



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년03월31일
(11) 등록번호 10-0890885
(24) 등록일자 2009년03월23일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2005-7018667

(22) 출원일자 2005년09월30일

심사청구일자 2005년09월30일

번역문제출일자 2005년09월30일

(65) 공개번호 10-2005-0123134

(43) 공개일자 2005년12월29일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2004/003356

국제출원일자 2004년03월30일

(87) 국제공개번호 WO 2004/092412

국제공개일자 2004년10월28일

(30) 우선권주장

60/459,491 2003년03월31일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

Am. J. Trop. Med. Hyg., 48(3), 440-446(1993)*

NCBI Accession Number AF404753(2002.07.23.)*

GB2279954 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

에프. 호프만-라 로슈 아게

스위스 체하-4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124

(72) 발명자

영 카렌 케이 와이

미국 94583 캘리포니아주 산라몬 브런즈윅 코트 9943

(74) 대리인

특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 21 항

심사관 : 허주형

(54) 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원을 포함하는, 특정플라비바이러스 검출용 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 시료 내의 특정한 플라비바이러스의 존재성을 밝혀내기 위한 신속하고 정확한 방법, 프라이머, 프로브 및 키트를 제공한다. 검출될 수 있는 플라비바이러스에는 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원, 뎅기 바이러스, 세인트 루이스 뇌염 바이러스, 몬타나 미요티 백질뇌염 바이러스, 모독 바이러스 및 황열 바이러스가 포함된다. 본 발명의 상기 프라이머 및 프로브는 검출할 바이러스 게놈의 3' 비번역 영역 내의 영역에서 혼성화될 수 있다.

(30) 우선권주장

60/552,454 2004년03월12일 미국(US)

60/555,530 2004년03월22일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

일본 뇌염 바이러스(JEV), 웨스트 나일 바이러스(WNV), 세인트 루이스 뇌염 바이러스, 머레이 벨리 뇌염 바이러스, 및 쿤진 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산의 검출을 위한, 하기를 포함하는 키트:

- a) 서열 번호 1 의 6 내지 25 개의 연속적인 뉴클레오타이드를 갖는 핵산에 상보적인 핵산으로 이루어진 제 1 올리고뉴클레오타이드;
- b) 서열 번호 9 의 6 내지 25 개의 연속적인 뉴클레오타이드를 갖는 핵산에 상보적인 핵산으로 이루어진 제 2 올리고뉴클레오타이드; 및
- c) 서열 번호 16 의 16 내지 28 개의 연속적인 뉴클레오타이드를 갖는 핵산에 상보적인 핵산으로 이루어진 제 3 올리고뉴클레오타이드와 검출가능한 표지를 포함하는 프로브.

청구항 40

일본 뇌염 바이러스(JEV), 웨스트 나일 바이러스(WNV), 세인트 루이스 뇌염 바이러스, 머레이 벨리 뇌염 바이러스, 및 쿤진 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산의 검출을 위한, 하기를 포함하는 키트:

- a) 서열 번호 2 의 16 내지 25 개의 연속적인 뉴클레오타이드를 갖는 핵산에 상보적인 핵산으로 이루어진 제 1 올리고뉴클레오타이드;
- b) 서열 번호 10 의 16 내지 25 개의 연속적인 뉴클레오타이드를 갖는 핵산에 상보적인 핵산으로 이루어진 제 2 올리고뉴클레오타이드; 및
- c) 서열 번호 17 의 16 내지 28 개의 연속적인 뉴클레오타이드를 갖는 핵산에 상보적인 핵산으로 이루어진 제 3 올리고뉴클레오타이드와 검출가능한 표지를 포함하는 프로브.

청구항 41

제 40 항에 있어서, 상기 제 1 올리고뉴클레오타이드가 서열 번호 8 로 이루어진 키트.

청구항 42

제 41 항에 있어서, 서열 번호 8 의 위치 24 에서의 잔기가 N⁶-알킬-데옥시아데노신인 키트.

청구항 43

제 39 항에 있어서, 제 3 올리고뉴클레오타드가 서열 번호 28 을 갖는 핵산에 상보적인 핵산으로 이루어진 키트.

청구항 44

제 40 항에 있어서, 제 3 올리고뉴클레오타드가 서열 번호 28 을 갖는 핵산으로 이루어진 키트.

청구항 45

제 39 항 또는 제 40 항에 있어서, 프로브가 검출가능한 표지로서 형광 부분을 포함하는 키트.

청구항 46

제 45 항에 있어서, 프로브가 소광제 부분을 추가로 포함하는 키트.

청구항 47

제 45 항에 있어서, 형광 부분이 플루오레신계 염료, 폴리할로플루오레신계 염료, 헥사클로로플루오레신계 염료, 쿠마린계 염료, 로다민계 염료, 시아닌계 염료, 옥사진계 염료, 티아진계 염료, 스쿠아레인계 염료, 킬레이트화 란탄계 염료, 및 BODIPY[®] 계 염료로 이루어진 군으로부터 선택되는 키트.

청구항 48

제 45 항에 있어서, 형광 부분이 6-카르복시플루오레신인 키트.

청구항 49

제 46 항에 있어서, 소광제 부분이 플루오레신계 염료, 폴리할로플루오레신계 염료, 헥사클로로플루오레신계 염료, 쿠마린계 염료, 로다민계 염료, 시아닌계 염료, 옥사진계 염료, 티아진계 염료, 스쿠아레인계 염료, 킬레이트화 란탄계 염료, BODIPY[®] 계 염료, 및 비형광성 소광제 부분으로 이루어진 군으로부터 선택되는 키트.

청구항 50

제 49 항에 있어서, 비형광성 소광제 부분이 BHQTM 계 염료, Iowa BlackTM, 또는 Dabcyl 인 키트.

청구항 51

제 46 항에 있어서, 소광제 부분이 Cy5TM 인 키트.

청구항 52

제 39 항 또는 제 40 항에 있어서, 열안정성 DNA 폴리머라아제를 추가로 포함하는 키트.

청구항 53

제 52 항에 있어서, 열안정성 DNA 폴리머라아제가 카르복시도테르무스 히드로젠포르만스(*Carboxydotherrmus hydrogenformans*) DNA 폴리머라아제, 테르모시포 아프리카누스(*Thermosipho africanus*) DNA 폴리머라아제, 바실루스 팔리두스(*Bacillus pallidus*) DNA 폴리머라아제, 테르무스(*Thermus*) 종 Z05 DNA 폴리머라아제, 테르무스 아쿠아티쿠스(*Thermus aquaticus*) DNA 폴리머라아제, 테르무르 테르모필러스(*Thermus thermophilus*) DNA 폴리머라아제, 테르마토가 마리티마(*Thermatoga maritima*) DNA 폴리머라아제, 테르마토가 네아폴리타나(*Thermatoga neapolitana*) DNA 폴리머라아제, 및 테르무스(*Thermus*) 종 sps17 DNA 폴리머라아제의 군으로부터 선택되는 키트.

청구항 54

삭제

청구항 55

제 40 항에 있어서, 제 2 올리고뉴클레오타이드가 서열 번호 15 로 이루어진 키트.

청구항 56

제 55 항에 있어서, 서열 번호 15 의 위치 23 에서의 잔기가 N⁶-알킬-데옥시아데노신인 키트.

청구항 57

일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산의 검출을 위한, 하기를 포함하는 방법:

- a) 서열 번호 1 의 6 내지 25 개의 연속적인 뉴클레오타이드를 갖는 핵산에 상보적인 핵산으로 이루어진 제 1 올리고뉴클레오타이드 및 서열 번호 9 의 6 내지 25 개의 연속적인 뉴클레오타이드를 갖는 핵산에 상보적인 핵산으로 이루어진 제 2 올리고뉴클레오타이드와 시료를 접촉시키는 단계로서, 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산이 상기 올리고뉴클레오타이드에 혼성화하도록 하는 조건 하에서 상기 제 1 또는 상기 제 2 올리고뉴클레오타이드가 고체 지지체에 공유결합된, 단계 ;
- b) 서열 번호 16 의 16 내지 28 개의 연속적인 뉴클레오타이드를 갖는 핵산에 상보적인 핵산으로 이루어진 제 3 올리고뉴클레오타이드와 검출가능한 표지를 포함하는 프로브를 고체 지지체에 접촉시키는 단계: 및
- c) 프로브의 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산에 대한 혼성화 검출에 의하여 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산을 검출하는 단계.

청구항 58

일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산의 검출을 위한, 하기를 포함하는 방법:

- a) 서열 번호 2 의 16 내지 25 개의 연속적인 뉴클레오타이드를 갖는 핵산에 상보적인 핵산으로 이루어진 제 1 올리고뉴클레오타이드 및 서열 번호 10 의 16 내지 25 개의 연속적인 뉴클레오타이드를 갖는 핵산에 상보적인 핵산으로 이루어진 제 2 올리고뉴클레오타이드와 시료를 접촉시키는 단계로서, 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산이 상기 올리고뉴클레오타이드에 혼성화하도록 하는 조건 하에서 상기 제 1 또는 상기 제 2 올리고뉴클레오타이드가 고체 지지체에 공유결합된, 단계 ;
- b) 서열 번호 17 의 16 내지 28 개의 연속적인 뉴클레오타이드를 갖는 핵산에 상보적인 핵산으로 이루어진 제 3 올리고뉴클레오타이드와 검출가능한 표지를 포함하는 프로브를 고체 지지체에 접촉시키는 단계: 및
- c) 프로브의 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산에 대한 혼성화 검출에 의하여 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산을 검출하는 단계.

청구항 59

일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산의 검출을 위한, 하기를 포함하는 방법:

- a) 서열 번호 16 의 16 내지 28 개의 연속적인 뉴클레오타이드를 갖는 핵산에 상보적인 핵산으로 이루어진 제 3 올리고뉴클레오타이드와 검출가능한 표지를 포함하는 프로브, 서열 번호 1 의 6 내지 25 개의 연속적인 뉴클레오타이드를 갖는 핵산에 상보적인 핵산으로 이루어진 제 1 올리고뉴클레오타이드, 서열 번호 9 의 6 내지 25 개의 연속적인 뉴클레오타이드를 갖는 핵산에 상보적인 핵산으로 이루어진 제 2 올리고뉴클레오타이드, 및 5'-3' 엑소뉴클레아제 활성이 있는 템플레이트 의존성 핵산 폴리머라아제를, 템플레이트 의존성 핵산 폴리머라아제가 프로브를 절단하도록 하는 조건 하에 시료와 접촉시키는 단계; 및
- b) 프로브의 절단을 검출하는 단계로서, 프로브의 절단이 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산의 존재성을 표시하는 단계.

청구항 60

일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산의 검출을 위한, 하기를 포함하는 방법:

- a) 서열 번호 17 의 16 내지 28 개의 연속적인 뉴클레오타이드를 갖는 핵산에 상보적인 핵산으로 이루어진 제 3

올리고뉴클레오타이드와 검출가능한 표지를 포함하는 프로브, 서열 번호 2 의 16 내지 25 개의 연속적인 뉴클레오타이드를 갖는 핵산에 상보적인 핵산으로 이루어진 제 1 올리고뉴클레오타이드, 서열 번호 10 의 16 내지 25 개의 연속적인 뉴클레오타이드를 갖는 핵산에 상보적인 핵산으로 이루어진 제 2 올리고뉴클레오타이드, 및 5'-3' 엑소뉴클레아제 활성이 있는 템플레이트 의존성 핵산 폴리머라아제를, 템플레이트 의존성 핵산 폴리머라아제가 프로브를 절단하도록 하는 조건 하에 시료와 접촉시키는 단계; 및

b) 프로브의 절단을 검출하는 단계로서, 프로브의 절단이 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산의 존재성을 표시하는 단계.

명세서

- <1> 플라비비리대 (Flaviviridae) 과 및 플라비바이러스 (Flavivirus) 속은 잠재적으로 치명적인 인간 병원인 다수의 바이러스를 포함한다. 상기 바이러스에는 뎅기 바이러스, 황열 바이러스, 모독 바이러스 (Modoc virus) 및 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 바이러스가 포함된다. 상기 일본 뇌염 바이러스 혈청군에는 매우 가까운 유연 관계가 있는 바이러스, 예컨대 일본 뇌염 바이러스 (JEV), 웨스트 나일 바이러스 (WNV), 세인트 루이스 뇌염 바이러스 (St. Louis encephalitis virus), 머레이 밸리 뇌염 바이러스 (Murray Valley encephalitis virus) 및 쿤진 바이러스 (Kunjin virus) 가 포함된다. 쿤진 바이러스는 종종 WNV 의 변이체로서 언급되는데, 이는 상기 두 바이러스 사이의 서열 보존성 정도 때문이다. 특징화된 WNV 균주는 서열 분석을 근거로 계통 I 및 계통 II 의 두 개의 군으로 분류된다.
- <2> 1999 년에, 미국에서 인간 WNV 감염의 최초 사례가 보고되었다. 그 이래로, 매년 전염병이 발생했다. 2002 년 8 월에는, 4 명의 장기 수혜자가 1 명의 장기 공여자에 의해 감염되어 모기가 무는 것 외의 경로를 통한 WNV 의 전달이 확인되었다. 그 이래로, 상기 바이러스는 혈액 제제 (21 개의 확인된 사례) 의 수혈 및 모유에 의해 전달될 수 있음이 발견되었다.
- <3> 활성 WNV 감염의 검출은 어려운데, 이는 병후가 비특이적이며 상기 바이러스에 특이적인 항체가 일반적으로 바이러스혈증 상 (viraemic phase) 이후에만 검출될 수 있기 때문이다. 더욱이, WNV-특이적 IgM 은 1 년 넘게 살아남을 수 있어서, 활성 감염과 과거의 노출 사이를 구분하는 것을 어렵게 한다. 바이러스 핵산의 직접적인 검출과 같은, 더욱 민감한 검출 방법이 필요하다. 바이러스 핵산의 검출은, 현재 이용 중인 혈청학적 방법보다 WNV 및 기타 플라비바이러스에 의한 감염의 조기 검출을 위한 보다 민감한 방법을 제시한다.
- <4> 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원을 포함하는 기타 플라비바이러스가 또한 인간 병소이다. 상기 병소에는, 일본 뇌염 혈청군, 예컨대 일본 뇌염 바이러스, 세인트 루이스 뇌염 바이러스 (SLEV) 및 머레이 밸리 뇌염 바이러스 및 기타 플라비바이러스, 예컨대 뎅기 바이러스, 황열 바이러스 및 모독 바이러스가 포함된다. 혈액 제제를 통한 WNV 이외의 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 전달은 문헌의 뒷받침이 없는 채로 남아있다. 그러나, 상기 전달은 가능하며, 상기 바이러스가 더욱 널리 퍼지면 발생할 확률이 커진다. 따라서, 인간 병소인 상기 플라비바이러스를 검출할 수 있는 신규하고 민감하며 특이적인 검정법이 크게 요망되고 있다. 더욱이, 일본 뇌염 혈청군의 여러 구성원을 검출할 수 있는 단일 검정법이 또한 크게 요망되고 있다.
- <5> **발명의 개요**
- <6> 본 발명은 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 여러 구성원을 포함하는, 특정 플라비바이러스의 핵산의 존재성 검출용 조성물, 방법 및 키트를 제공한다. 본 발명의 조성물 및 방법은, 부분적으로는 예를 들어 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 존재성을 검출하기 위한 프라이머 및 프로브로서 사용될 수 있는 올리고뉴클레오타이드의 발견에 근거한다. 예를 들어, 웨스트 나일 바이러스, 쿤진 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, 세인트 루이스 뇌염 바이러스 (SLEV) 및 머레이 밸리 뇌염 바이러스는 본 발명의 올리고뉴클레오타이드로 검출될 수 있다. 추가로, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 예를 들어, 뎅기 바이러스, 몬타나 미요티 백질뇌염 바이러스, 모독 바이러스 및 황열 바이러스를 포함하는, 일본 뇌염 바이러스 혈청군 이외의 플라비바이러스의 검출에 이용될 수 있다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 본원에 기재된 방법에 따라 상기 플라비바이러스 검출을 위해 프라이머 및 프로브로서 이용될 수 있다.
- <7> 특정 국면에서, 본 발명은 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 여러 구성원의 핵산 검출 방법을 제공한다. 상기 방법에서, 하기에 상세하게 기술될 본 발명의 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드는 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 여러 구성원의 핵산 검출을 위한 프로브로서 이용된다. 상기 프로브는 서열 번호 16 의 핵산 또는 그의 상보물로서, 본 발명에 따라 검출될 수 있는 플라비바이러스 핵산의 3' 비번역 영역 내의 보존성 영역의 서열에 혼성화한다. 본 발명의 특정 구현예에서, 5'-3' 엑소뉴클레아제 활성이 있는 템플레이트 의존성 핵

산 폴리머라아제는 상기 프로브를 절단하는데, 여기서, 상기의 검출가능하게 표지된 프로브의 절단은 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산 존재성을 표시한다.

<8> 특정 구현예에서, 상기 방법은 검출가능하게 표지된 핵산 프로브의 존재 하에 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산 증폭 단계를 포함하는데, 여기서 검출가능하게 표지된 핵산 프로브는 서열 번호 17 의 20 개 이상의 연속적인 뉴클레오타이드, 또는 그의 상보물을 포함한다. 또다른 구현예에서, 상기 방법은 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드의 존재 하에 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산 증폭 단계를 포함하며, 여기서 상기 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 18, 또는 그의 상보물을 포함한다. 서열 번호 18 은, 본 발명에 따라 검출될 수 있는 현재 공지된 플라비바이러스 핵산의 보존성 영역에 혼성화하는 올리고뉴클레오타이드 서열이다. 또다른 구현예에서, 상기 방법은 검출가능하게 표지된 핵산 프로브의 존재 하에 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산 증폭 단계를 포함하며, 상기 검출가능하게 표지된 프로브는 서열 번호 28 또는 그의 상보물을 포함한다. 서열 번호 28 은 본 발명에 따라 플라비바이러스 검출에 이용될 수 있는 특이적인 프로브 핵산 서열이다.

<9> 특정 구현예에서, 상기 프로브는 검출가능한 부분을 포함한다. 상기 검출가능한 부분은 제한없이 당업자에게 공지된 임의의 검출가능한 부분이다. 예를 들어, 검출가능한 부분은 형광 부분일 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 형광 부분은 플루오레신계 염료, 폴리할로플루오레신계 염료, 핵사클로로플루오레신계 염료, 쿠마린계 염료, 로다민계 염료, 시아닌계 염료, 옥사진계 염료, 티아진계 염료, 스쿠아레인계 염료, 킬레이트화 란탄계 염료 및 BODIPY[®] 계 염료로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 상기 형광 부분은 6-카르복시플루오레신이다.

<10> 특정 구현예에서, 프로브는 소광제 부분을 포함한다. 상기 소광제 부분은 제한없이 당업자에게 공지된 임의의 소광제 부분일 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 소광제 부분은 플루오레신계 염료, 폴리할로플루오레신계 염료, 핵사클로로플루오레신계 염료, 쿠마린계 염료, 로다민계 염료, 시아닌계 염료, 옥사진계 염료, 티아진계 염료, 스쿠아레인계 염료, 킬레이트화 란탄계 염료, BODIPY[®] 계 염료 및 비형광성 소광제 부분으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 특정 구현예에서, 비형광성 소광제 부분은 BHQ[™] 계 염료, Iowa Black[™] 또는 Dabcyl 일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 상기 소광제 부분은 Cy5[™] 이다.

<11> 특정 구현예에서, 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산은 본 발명의 올리고뉴클레오타이드로 검출될 수 있다. 특정 구현예에서, 서열 번호 1 의 핵산에 혼성화하는 제 1 올리고뉴클레오타이드는 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산을 증폭하기 위한 프라이머로서 이용될 수 있다. 서열 번호 1 은 본 발명에 따라 검출될 수 있는 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원들 사이에서 보존되는 서열의 발견을 근거로 한다. 특정 구현예에서, 제 1 프라이머는 서열 번호 2 의 16 개 이상의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함한다. 또다른 구현예에서, 제 1 프라이머는 서열 번호 3 을 포함한다. 서열 번호 3 은 본 발명에 따라 검출될 수 있는 일본 뇌염 바이러스 혈청군 유래의 모든 현재 공지된 서열의 보존성 영역의 발견을 근거로 하는 프라이머 서열이다. 또다른 구현예에서, 제 1 프라이머는 서열 번호 8 을 포함한다. 서열 번호 8 은 본 발명에 따라 일본 뇌염 혈청군 구성원 증폭에 이용될 수 있는 특이적인 프라이머 서열이다.

<12> 특정 구현예에서, 서열 번호 9 의 핵산에 혼성화하는 제 2 올리고뉴클레오타이드는 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산 증폭을 위한 프라이머로서 이용될 수 있다. 서열 번호 9 는 본 발명에 따라 검출될 수 있는 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원들 사이에서 보존되는 서열의 발견을 근거로 한 보존성 서열이다. 특정 구현예에서, 제 2 프라이머는 서열 번호 10 의 16 개 이상의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함한다. 서열 번호 10 은 서열 번호 9 에 상보적이다. 다른 구현예에서, 제 2 프라이머는 서열 번호 11 을 포함한다. 서열 번호 11 은 본 발명에 따라 검출될 수 있는 일본 뇌염 바이러스 혈청군 구성원 유래의 모든 현재 공지된 서열의 보존성 영역의 발견을 근거로 한 프라이머 서열이다. 또다른 구현예에서, 제 2 프라이머는 서열 번호 15 또는 서열 번호 74 를 포함한다. 서열 번호 15 및 서열 번호 74 는 본 발명에 따라 일본 뇌염 혈청군 구성원 핵산 증폭에 이용될 수 있는 특이적인 프라이머 서열이다. 특정 구현예에서, 제 1 및 제 2 프라이머는 함께 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산 검출 방법에서 이용될 수 있다.

<13> 특정 구현예에서, 상기 방법은 형광 부분 및 소광제 부분을 포함하며 검출가능하게 표지된 핵산 프로브의 존재 하에 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산 증폭 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 5'-3' 뉴클레아제 활성이 있는 템플레이트 의존성 핵산 폴리머라아제에 의한, 검출가능하게 표지된 프로브의 절단은 소광제 부분으로부터 형광 부분을 분리한다. 특정 구현예에서, 프로브의 절단 및 이에 따른 일본 뇌염 바이러스 혈

청군의 구성원의 핵산의 존재성은 형광의 발광 모니터링으로써 검출될 수 있다.

- <14> 특정 구현예에서, 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산은 고체 지지체에 공유결합된 본 발명의 프라이머 또는 프로브에 핵산을 혼성화시킴으로써 검출될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 핵산은 검출가능하게 표지된 프라이머 또는 프로브를 핵산에 혼성화시켜 검출될 수 있다. 또다른 구현예에서, 상기 핵산은 검출가능한 부분을 핵산에 혼입시켜 직접 검출될 수 있다.
- <15> 또다른 구현예에서, 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산은 그곳에 본 발명에 따른 2 개 이상의 프라이머 또는 프로브가 공유결합되어 있는 나노입자를 이용하여 검출될 수 있다. 또다른 구현예에서, 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산은 본 발명의 프라이머 및/또는 프로브를 이용하는 롤링 썬클 증폭 검정법 (rolling circle amplification assay) 을 이용하여 검출될 수 있다. 또다른 구현예에서, 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산은 본 발명의 2 개의 프라이머를 이용하는 가닥 전치 증폭 검정법 (Strand Displacement Amplification assay) 을 이용하여 검출될 수 있다. 또다른 구현예에서, 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산은 본 발명의 프라이머 및/또는 프로브를 이용하는 전사 매개 증폭 검정법 (transcription-mediated amplification assay) 을 이용하여 검출될 수 있다. 또다른 구현예에서, 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산은 본 발명의 프라이머 및/또는 프로브를 이용하는 핵산 서열 기준 증폭 (nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)) 검정법을 이용하여 검출될 수 있다. 또다른 구현예에서, 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산은 본 발명의 프라이머 및/또는 프로브를 이용하는 진단 PCR 을 이용하여 검출될 수 있다.
- <16> 특정 구현예에서, 본 발명의 제 1 및 제 2 프라이머 및 프로브는 함께 일본 뇌염 혈청군의 구성원 검출 방법에 이용될 수 있다. 특정 구현예에서, 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산은 분자 표지 (molecular beacon) 를 포함하는 본 발명의 프로브를 이용하여 검출될 수 있다. 또다른 구현예에서, 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산은 본 발명의 프라이머 및/또는 프로브를 이용하는 핵산 서열 기준 증폭 검정법을 이용하여 검출될 수 있다. 또다른 구현예에서, 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산은 본 발명의 2 개의 프라이머를 이용하여 증폭한 후, 본 발명의 검출가능하게 표지된 프로브로 핵산을 검출함으로써 검출될 수 있다. 특정 구현예에서, 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산은 본 발명의 프라이머 및/또는 프로브를 이용한 도트 블랏 검정법을 이용하여 검출될 수 있다. 또다른 구현예에서, 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산은 본 발명의 프라이머 및/또는 프로브를 이용하는 역 도트 블랏 검정법을 이용하여 검출될 수 있다. 또다른 구현예에서, 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산은 덴드리머와 같은 다가 프로브를 이용하여 검출될 수 있다.
- <17> 상기 방법에 더하여, 본 발명은 추가로 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산 검출용 핵산 프라이머 및 프로브를 제공한다. 특정 국면에서, 본 발명은 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원 검출용 핵산 프라이머를 제공한다. 특정 구현예에서, 상기 프라이머는 서열 번호 1 의 핵산에 혼성화하는 핵산을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 핵산 프라이머는 서열 번호 2 의 16 개 이상의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함한다. 또다른 구현예에서, 상기 핵산 프라이머는 서열 번호 3 을 포함한다. 또다른 구현예에서, 상기 핵산 프라이머는 서열 번호 8 을 포함한다.
- <18> 특정 구현예에서, 핵산 프라이머는 서열 번호 8 의 위치 23 에서 N^6 -알킬-데옥시아데노신을 포함한다. 특정 구현예에서, 핵산 프라이머는 서열 번호 8 의 위치 23 에서 N^6 -메틸-데옥시아데노신을 포함한다. 특정 구현예에서, 핵산 프라이머는 서열 번호 8 의 위치 24 에서 N^6 -알킬-데옥시아데노신을 포함한다. 특정 구현예에서, 핵산 프라이머는 서열 번호 8 의 위치 24 에서 N^6 -tert-부틸-벤질-데옥시아데노신을 포함한다. 특정 구현예에서, 핵산 프라이머는 서열 번호 8 의 위치 23 및 24 에서 N^6 -알킬-데옥시아데노신을 포함한다. 또다른 특정 구현예에서, 핵산 프라이머는 서열 번호 8 의 위치 23 에서 N^6 -메틸-데옥시아데노신을 포함하며, 서열 번호 8 의 위치 24 에서 N^6 -tert-부틸-벤질-데옥시아데노신을 포함한다.
- <19> 특정 구현예에서, 본 발명은 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원 검출용 핵산 프라이머를 제공한다. 특정 구현예에서, 상기 프라이머는 서열 번호 9 의 핵산에 혼성화하는 핵산을 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 핵산 프라이머는 서열 번호 10 의 16 개 이상의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함한다. 또다른 구현예에서, 핵산 프라이머는 서열 번호 11 를 포함한다. 또다른 구현예에서, 핵산 프라이머는 서열 번호 15 또는 서열 번호 74 를 포함한다. 특정 구현예에서, 핵산 프라이머는 서열 번호 15 또는 서열 번호 74 의 위치 24 에서 N^6 -알킬-데옥시아데노신을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 핵산 프라이머는 서열 번호 15 또는 서열 번호

74 의 위치 24 에서 N^6 -tert-부틸-벤질-데옥시아데노신을 포함한다.

- <20> 다른 국면에서, 본 발명은 플라비바이러스의 핵산 검출용 핵산 프로브를 제공한다. 상기 프로브로 검출될 수 있는 플라비바이러스 핵산에는, 예를 들어 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원, 뎅기 바이러스, 황열 바이러스, 몬타나 미요티스 백색질 뇌염 바이러스 및 모독 바이러스가 포함된다. 특정 구현예에서, 상기 프로브는 서열 번호 16 의 핵산 또는 그의 상보물에 혼성화하는 핵산을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 핵산 프로브는 서열 번호 17 의 20 개 이상의 연속적인 뉴클레오타이드 또는 그의 상보물을 포함한다. 다른 구현예에서, 핵산 프로브는 서열 번호 18 또는 그의 상보물을 포함한다. 또다른 구현예에서, 핵산 프로브는 서열 번호 28 또는 그의 상보물을 포함한다.
- <21> 특정 구현예에서, 본 발명은 형광 부분 및 소광제 부분을 포함하는 핵산 프로브를 제공한다. 특정 구현예에서, 상기 형광 부분은 프로브가 온전한 경우 상기 형광 부분에 의해 방출되는 광자가 소광제 부분에 의해 흡수 되도록 소광제 부분 근처에 위치한다. 5' 뉴클레아제 활성이 있는 효소에 의한 프로브의 절단은, 형광 부분에 의해 방출되는 광자가 검출될 수 있도록 소광제 부분으로부터 형광 부분을 분리한다.
- <22> 다른 국면에서, 본 발명은 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산 검출용 키트를 제공한다. 특정 구현예에서, 상기 키트는 본 발명의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 추가 구현예에서, 상기 키트는 본 발명의 프라이머 및 프로브의 조합 한 가지 이상을 포함한다. 예를 들어, 한 구현예에서, 상기 키트는 서열 번호 1 의 핵산에 혼성화하는 제 1 핵산 프라이머; 서열 번호 9 의 핵산에 혼성화하는 제 2 핵산 프라이머; 및 서열 번호 16 의 핵산에 혼성화하는 핵산 프로브 또는 이들의 상보물을 포함한다.
- <23> 특정 구현예에서, 본 발명의 키트의 제 1 핵산 프라이머는 서열 번호 2 의 16 개 이상의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 구현예에서, 제 1 핵산 프라이머는 서열 번호 3 을 포함한다. 또다른 구현예에서, 제 1 핵산 프라이머는 서열 번호 8 을 포함한다. 특정 구현예에서, 제 1 핵산 프라이머는 서열 번호 8 의 위치 23 에서 N^6 -알킬-데옥시아데노신을 포함한다. 특별한 구현예에서, 제 1 핵산 프라이머는 서열 번호 8 의 위치 23 에서 N^6 -메틸-데옥시아데노신을 포함한다. 특정 구현예에서, 제 1 핵산 프라이머는 서열 번호 8 의 위치 24 에서 N^6 -알킬-데옥시아데노신을 포함한다. 특별한 구현예에서, 제 1 핵산 프라이머는 서열 번호 8 의 위치 24 에서 N^6 -tert-부틸-벤질-데옥시아데노신을 포함한다. 특정 구현예에서, 제 1 핵산 프라이머는 서열 번호 8 의 위치 23 및 24 에서 N^6 -알킬-데옥시아데노신을 포함한다. 또다른 특별한 구현예에서, 제 1 핵산 프라이머는 서열 번호 8 의 위치 23 에서 N^6 -메틸-데옥시아데노신을 포함하며, 서열 번호 8 의 위치 24 에서 N^6 -tert-부틸-벤질-데옥시아데노신을 포함한다.
- <24> 특정 구현예에서, 본 발명의 키트의 제 2 핵산 프라이머는 서열 번호 10 의 16 개 이상의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 구현예에서, 제 2 핵산 프라이머는 서열 번호 11 을 포함한다. 또다른 구현예에서, 제 2 핵산 프라이머는 서열 번호 15 를 포함한다. 특정 구현예에서, 제 2 핵산 프라이머는 서열 번호 15 의 위치 24 에서 N^6 -알킬-데옥시아데노신을 포함한다. 특별한 구현예에서, 제 2 핵산 프라이머는 서열 번호 15 의 위치 24 에서 N^6 -tert-부틸-벤질-데옥시아데노신을 포함한다.
- <25> 특정 구현예에서, 본 발명의 키트의 핵산 프로브는 서열 번호 17 의 20 개 이상의 연속적인 뉴클레오타이드 또는 그의 상보물을 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 핵산 프로브는 서열 번호 18 또는 그의 상보물을 포함한다. 또다른 구현예에서, 상기 핵산 프로브는 서열 번호 28 또는 그의 상보물을 포함한다.
- <26> 특정 구현예에서, 본 발명의 키트는 핵산 프로브로서 유용한 올리고뉴클레오타이드를 포함하는데, 하나 이상의 검출가능한 부분이 핵산 프로브에 결합되어 있다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 검출가능한 부분은 형광 부분이다. 특정 구현예에서, 상기 형광 부분은 플루오레신계 염료, 폴리할로플루오레신계 염료, 헥사클로로플루오레신계 염료, 쿠마린계 염료, 로다민계 염료, 시아닌계 염료, 옥사진계 염료, 티아진계 염료, 스쿠아레인계 염료, 킬레이트화 란탄계 염료 및 BODIPY[®] 계 염료로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 상기 형광 부분은 6-카르복시플루오레신이다.
- <27> 특정 구현예에서, 본 발명의 키트는 핵산 프로브로서 유용한 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 여기서 하나 이상의 소광제 부분은 핵산 프로브에 결합되어 있다. 특정 구현예에서, 상기 소광제 부분은 플루오레신계 염료,

폴리할로플루오레신계 염료, 헥사칼로로플루오레신계 염료, 쿠마린계 염료, 로다민계 염료, 시아닌계 염료, 옥사진계 염료, 티아진계 염료, 스쿠아레인계 염료, 킬레이트화 란탄계 염료, BODIPY[®] 계 염료 및 비형광성 소광제 부분으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 비형광성 소광제 부분은 BHQ[™] 계 염료, Iowa Black[™] 또는 Dabcyl 이다. 바람직한 구현예에서, 상기 소광제 부분은 Cy5[™] 이다. 다른 구현예에서, 상기 프로브는 하나 이상의 검출가능한 부분, 예를 들어 형광 부분 및 하나 이상의 소광제 부분을 포함한다.

- <28> 특정 구현예에서, 본 발명의 키트는 열안정성 DNA 폴리머라아제를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 열안정성 DNA 폴리머라아제는 역전사 활성을 갖는다. 특정 구현예에서, 본 발명의 키트는 추가적으로 본 발명의 방법에 따라 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산 검출을 위한 지시사항을 포함한다.
- <29> 본 발명은 또한 서열 번호 29, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 32, 서열 번호 33, 서열 번호 34, 서열 번호 35, 서열 번호 36, 서열 번호 37, 서열 번호 38, 서열 번호 39 또는 서열 번호 40 을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- <30> 본 발명은 또한 서열 번호 29, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 32, 서열 번호 33, 서열 번호 34, 서열 번호 35, 서열 번호 36, 서열 번호 37, 서열 번호 38, 서열 번호 39 또는 서열 번호 40 를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- <31> 본 발명은 또한 서열 번호 29 또는 그의 상보물, 서열 번호 30 또는 그의 상보물, 서열 번호 31 또는 그의 상보물, 서열 번호 32 또는 그의 상보물, 서열 번호 33 또는 그의 상보물, 서열 번호 34 또는 그의 상보물, 서열 번호 35 또는 그의 상보물, 서열 번호 36 또는 그의 상보물, 서열 번호 37 또는 그의 상보물, 서열 번호 38 또는 그의 상보물, 서열 번호 39 또는 그의 상보물, 서열 번호 40 또는 그의 상보물에 혼성화하는 10 개 이상의 연속적인 뉴클레오티드의 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 68, 또는 서열 번호 69 의 상보물에 혼성화한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 64, 서열 번호 65, 서열 번호 66 및 서열 번호 67 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 64, 서열 번호 65, 서열 번호 66 및 서열 번호 67 로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 100 개 미만의 뉴클레오티드를 갖는다.
- <32> 본 발명은 또한 서열 번호 29 또는 그의 상보물, 서열 번호 30 또는 그의 상보물, 서열 번호 31 또는 그의 상보물, 서열 번호 32 또는 그의 상보물, 서열 번호 33 또는 그의 상보물, 서열 번호 34 또는 그의 상보물, 서열 번호 35 또는 그의 상보물, 서열 번호 36 또는 그의 상보물, 서열 번호 37 또는 그의 상보물, 서열 번호 38 또는 그의 상보물, 서열 번호 39 또는 그의 상보물, 서열 번호 40 또는 그의 상보물에 혼성화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 반응 혼합물을 제공한다.
- <33> 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 68, 또는 서열 번호 69 의 상보물에 혼성화한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 64, 서열 번호 65, 서열 번호 66 및 서열 번호 67 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 64, 서열 번호 65, 서열 번호 66 및 서열 번호 67 로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- <34> 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 서열 번호 64 및 서열 번호 65 로 이루어진 군으로부터 선택되는 올리고뉴클레오티드; 및 서열 번호 66 및 서열 번호 67 로 이루어진 군으로부터 선택되는 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 100 개 미만의 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 서열 번호 16 또는 그의 상보물에 혼성화하는 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오티드를 추가로 포함한다.
- <35> 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 DNA 폴리머라아제를 포함한다.
- <36> 일부 구현예에서, 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 17 의 20 개 이상의 연속적인 뉴클레오티드 또는 그의 상보물을 포함한다. 일부 구현예에서, 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 28 또는 그의 상보물을 포함한다. 일부 구현예에서, 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오티드는 형광 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오티드는 추가로 소광제 부분을 포함한다.
- <37> 본 발명은 또한 세인트 루이스 뇌염 바이러스의 검출 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 서열

번호 29 또는 그의 상보물, 서열 번호 30 또는 그의 상보물, 서열 번호 31 또는 그의 상보물, 서열 번호 32 또는 그의 상보물, 서열 번호 33 또는 그의 상보물, 서열 번호 34 또는 그의 상보물, 서열 번호 35 또는 그의 상보물, 서열 번호 36 또는 그의 상보물, 서열 번호 37 또는 그의 상보물, 서열 번호 38 또는 그의 상보물, 서열 번호 39 또는 그의 상보물 또는 서열 번호 40 또는 그의 상보물에 혼성화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 이용하여, 올리고뉴클레오티드 유래의 뉴클레오티드 서열 일부 이상의 증폭 개시를 허용하는 조건 하에 세인트 루이스 뇌염 바이러스의 핵산을 증폭시키는 단계; 및 증폭된 핵산을 검출함으로써, 세인트 루이스 뇌염 바이러스를 검출하는 단계를 포함한다.

<38> 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 64, 서열 번호 65, 서열 번호 66 및 서열 번호 67 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 64, 서열 번호 65, 서열 번호 66 및 서열 번호 67 로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 68, 또는 서열 번호 69 의 상보물에 혼성화한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 100 개 미만의 뉴클레오티드를 갖는다.

<39> 일부 구현예에서, 세인트 루이스 뇌염 바이러스의 핵산은 서열 번호 64 및 서열 번호 65 로 이루어진 군으로부터 선택되는 프라이머; 및 서열 번호 66 및 서열 번호 67 로 이루어진 군으로부터 선택되는 프라이머를 이용하여 증폭된다.

<40> 일부 구현예에서, 검출 단계는, 서열 번호 16 에 혼성화하는 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오티드를 세인트 루이스 뇌염 바이러스의 핵산의 증폭된 핵산에 혼성화시키는 단계; 및 프로브의 증폭된 핵산에 대한 혼성화의 검출 단계를 포함한다.

<41> 일부 구현예에서, 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 17 의 20 개 이상의 연속적인 뉴클레오티드 또는 그의 상보물을 포함한다. 일부 구현예에서, 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 28 또는 그의 상보물을 포함한다. 일부 구현예에서, 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오티드는 형광 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오티드는 추가로 소광제 부분을 포함한다.

<42> 일부 구현예에서, 증폭된 핵산의 양은 증폭 단계 동안 측정함으로써, 시료 내의 바이러스를 정량한다.

<43> 일부 구현예에서, 증폭 단계는 5'-3' 엑소뉴클레아제 활성을 가진 템플레이트 의존성 핵산 폴리머라아제를 포함하는 증폭 반응 혼합물 중에서, 템플레이트 의존성 핵산 폴리머라아제가 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오티드를 절단하도록 하는 조건 하에 수행되며; 상기 방법은 검출가능하게 표지된 핵산 올리고뉴클레오티드의 절단 검출 단계를 추가로 포함한다.

<44> 본 발명은 세인트 루이스 뇌염 바이러스 검출용 키트를 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 키트는 서열 번호 29 또는 그의 상보물, 서열 번호 30 또는 그의 상보물, 서열 번호 31 또는 그의 상보물, 서열 번호 32 또는 그의 상보물, 서열 번호 33 또는 그의 상보물, 서열 번호 34 또는 그의 상보물, 서열 번호 35 또는 그의 상보물, 서열 번호 36 또는 그의 상보물, 서열 번호 37 또는 그의 상보물, 서열 번호 38 또는 그의 상보물, 서열 번호 39 또는 그의 상보물 또는 서열 번호 40 또는 그의 상보물에 혼성화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

<45> 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 68, 또는 서열 번호 69 의 상보물에 혼성화한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 64, 서열 번호 65, 서열 번호 66 및 서열 번호 67 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 64, 서열 번호 65, 서열 번호 66 및 서열 번호 67 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

<46> 일부 구현예에서, 키트는 서열 번호 64 및 서열 번호 65 로 이루어진 군으로부터 선택되는 올리고뉴클레오티드; 및 서열 번호 66 및 서열 번호 67 로 이루어진 군으로부터 선택되는 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 100 개 미만의 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 구현예에서, 키트는 서열 번호 16 또는 그의 상보물에 혼성화하는 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

<47> 본 발명은 또한 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60, 서열 번호 61, 서열 번호 62 및 서열 번호 63 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60, 서열 번호 61, 서열 번호 62 및 서열 번호 63 으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- <48> 본 발명은 또한 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60, 서열 번호 61, 서열 번호 62 및 서열 번호 63 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 반응 혼합물을 제공한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60, 서열 번호 61, 서열 번호 62 및 서열 번호 63 으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- <49> 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 추가로 서열 번호 25 또는 그의 상보물에 혼성화하는 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 추가로 FGGTCTAGAIGGTTAGAGGAGACCTCCAG (여기서, F 는 CY5 이고; I 는 FAM 이고; P 는 PO₄ 이고; U 는 프로피닐 dU 이고; E 는 5-메틸-dC 이다) 를 포함하며 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 추가로 서열 번호 16 또는 그의 상보물에 혼성화하는 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- <50> 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 DNA 폴리머라아제를 포함한다. 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 하나 이상의 업스트림 프라이머 및 하나 이상의 다운스트림 프라이머를 포함한다.
- <51> 본 발명은 또한 황열 바이러스의 검출 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60, 서열 번호 61, 서열 번호 62 및 서열 번호 63 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 올리고뉴클레오타이드 유래의 뉴클레오타이드 서열의 일부 이상의 증폭 개시를 가능하게 하는 조건 하에서의 황열 바이러스의 핵산 증폭 단계; 및 증폭된 핵산을 검출함으로써, 황열 바이러스를 검출하는 단계를 포함한다.
- <52> 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60, 서열 번호 61, 서열 번호 62 및 서열 번호 63 으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 검출 단계는 서열 번호 25, 또는 그의 상보물에 혼성화하는 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드를 황열 바이러스의 핵산의 증폭된 핵산에 혼성화시키는 단계; 및 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드의 증폭된 핵산에 대한 혼성화의 검출 단계를 포함한다.
- <53> 일부 구현예에서, 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드는 FGGTCTAGAIGGTTAGAGGAGACCTCCAG (여기서, F 는 CY5 이며; I 는 FAM 이며; P 는 PO₄ 이며; U 는 프로피닐 dU 이며; E 는 5-메틸-dC 이다) 를 포함한다. 일부 구현예에서, 검출 단계는 서열 번호 16, 또는 그의 상보물에 혼성화하는 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드를 황열 바이러스의 핵산의 증폭된 핵산에 혼성화하는 단계; 및 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드의 증폭된 핵산으로의 혼성화를 검출하는 단계를 포함한다.
- <54> 일부 구현예에서, 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 17 의 20 개 이상의 연속적인 뉴클레오타이드 또는 그의 상보물을 포함한다. 일부 구현예에서, 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 28 또는 그의 상보물을 포함한다. 일부 구현예에서, 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드는 형광 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드는 추가로 소광제 부분을 포함한다.
- <55> 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 100 개 미만의 뉴클레오타이드를 갖는다. 일부 구현예에서, 증폭된 핵산의 양은 증폭 단계 동안 측정됨으로써, 시료 내의 바이러스를 정량한다.
- <56> 일부 구현예에서, 증폭 단계는 5'-3' 엑소뉴클레아제 활성이 있는 템플레이트 의존성 핵산 폴리머라아제를 포함하는 증폭 반응 혼합물 중에서, 템플레이트 의존성 핵산 폴리머라아제가 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드를 절단하도록 하는 조건 하에서 수행되며; 상기 방법은 추가로 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드의 절단 검출을 포함한다.
- <57> 본 발명은 또한 황열 바이러스 검출용 키트를 제공한다. 상기 키트는 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60, 서열 번호 61, 서열 번호 62 및 서열 번호 63 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60, 서열 번호 61, 서열 번호 62 및 서열 번호 63 으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- <58> 일부 구현예에서, 상기 키트는 서열 번호 16 또는 그의 상보물에 혼성화하는 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 키트는 서열 번호 25 또는 그의 상보물에 혼성화하는 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 키트는

FGGTCTAGAIGGTTAGAGGAGACCTCCAG (여기서, F 는 CY5 이며; I 는 FAM 이며; P 는 PO₄ 이며; U 는 프로피닐 dU 이며; E 는 5-메틸-dC 이다) 를 포함하며 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오티드를 추가로 포함한다.

- <59> 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 DNA 폴리머라아제를 포함한다. 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 하나 이상의 업스트림 프라이머 및 하나 이상의 다운스트림 프라이머를 포함한다.
- <60> 본 발명은 또한 서열 번호 41, 서열 번호 42, 서열 번호 43, 서열 번호 44, 서열 번호 45, 서열 번호 46, 서열 번호 47, 서열 번호 48, 서열 번호 49, 서열 번호 50, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 53, 서열 번호 54 및 서열 번호 55 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 41, 서열 번호 42, 서열 번호 43, 서열 번호 44, 서열 번호 45, 서열 번호 46, 서열 번호 47, 서열 번호 48, 서열 번호 49, 서열 번호 50, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 53, 서열 번호 54 및 서열 번호 55 로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- <61> 본 발명은 또한 서열 번호 41, 서열 번호 42, 서열 번호 43, 서열 번호 44, 서열 번호 45, 서열 번호 46, 서열 번호 47, 서열 번호 48, 서열 번호 49, 서열 번호 50, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 53, 서열 번호 54 및 서열 번호 55 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 반응 혼합물을 제공한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 41, 서열 번호 42, 서열 번호 43, 서열 번호 44, 서열 번호 45, 서열 번호 46, 서열 번호 47, 서열 번호 48, 서열 번호 49, 서열 번호 50, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 53, 서열 번호 54 및 서열 번호 55 로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- <62> 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 서열 번호 16 또는 그의 상보물에 혼성화하는 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오티드를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 DNA 폴리머라아제를 포함한다. 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 하나 이상의 업스트림 프라이머 및 하나 이상의 다운스트림 프라이머를 포함한다.
- <63> 본 발명은 또한 땡기열 바이러스 검출 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 땡기열 바이러스의 핵산을 서열 번호 41, 서열 번호 42, 서열 번호 43, 서열 번호 44, 서열 번호 45, 서열 번호 46, 서열 번호 47, 서열 번호 48, 서열 번호 49, 서열 번호 50, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 53, 서열 번호 54 및 서열 번호 55 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 이용하여, 올리고뉴클레오티드 유래의 뉴클레오티드 서열의 일부 이상의 증폭 개시를 가능하게 하는 조건 하에 증폭하는 단계; 및 증폭된 핵산을 검출하여, 땡기열 바이러스를 검출하는 단계를 포함한다.
- <64> 일부 구현예에서, 상기 방법은 서열 번호 16 에 혼성화하는 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오티드를 증폭된 땡기열 바이러스 핵산에 혼성화하는 단계; 및 올리고뉴클레오티드의 증폭된 핵산에 대한 혼성화 검출 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 41, 서열 번호 42, 서열 번호 43, 서열 번호 44, 서열 번호 45, 서열 번호 46, 서열 번호 47, 서열 번호 48, 서열 번호 49, 서열 번호 50, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 53, 서열 번호 54 및 서열 번호 55 로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- <65> 일부 구현예에서, 상기 핵산은 하나 이상의 업스트림 프라이머 및 하나 이상의 다운스트림 프라이머를 사용하여 증폭된다. 일부 구현예에서, 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 17 의 20 개 이상의 연속적인 뉴클레오티드 또는 그의 상보물을 포함한다. 일부 구현예에서, 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 28 또는 그의 상보물을 포함한다. 일부 구현예에서, 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오티드는 형광 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오티드는 추가로 소광제 부분을 포함한다.
- <66> 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 100 개 미만의 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 구현예에서, 증폭된 핵산의 양은 증폭 단계 동안 측정됨으로써, 시료 내의 바이러스를 정량한다. 일부 구현예에서, 증폭 단계는 5'-3' 엑소뉴클레아제 활성을 가진 템플레이트 의존성 핵산 폴리머라아제를 포함하는 증폭 반응 혼합물 내에서 템플레이트 의존성 핵산 폴리머라아제가 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오티드를 절단하도록 하는 조건 하에 수행되며; 상기 방법은 추가로 검출가능하게 표지된 핵산 올리고뉴클레오티드의 절단 검출 단계를 포함한다.
- <67> 본 발명은 또한 땡기 바이러스 검출용 키트를 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 키트는 서열 번호 41, 서열 번호 42, 서열 번호 43, 서열 번호 44, 서열 번호 45, 서열 번호 46, 서열 번호 47, 서열 번호 48, 서열 번호 49, 서열 번호 50, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 53, 서열 번호 54 및 서열 번호 55 로 이루어진 군

으로부터 선택되는 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열 번호 41, 서열 번호 42, 서열 번호 43, 서열 번호 44, 서열 번호 45, 서열 번호 46, 서열 번호 47, 서열 번호 48, 서열 번호 49, 서열 번호 50, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 53, 서열 번호 54 및 서열 번호 55 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

<68> 일부 구현예에서, 상기 키트는 추가로 서열 번호 16 또는 그의 상보물에 혼성화하는 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오티드를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 반응 혼합물은 DNA 폴리머라아제를 포함한다.

<69> 일부 구현예에서, 정량 단계는 내부 또는 외부 대조군 핵산을 이용하여 수행한다. US 특허 5,476,774 및 5,219,727 을 참고할 것이며, 이들은 본원에 전부 참고문헌으로 포함된다.

<70> 도면의 간단한 설명

<71> 도 1 은, 본 발명의 조성물 및 방법을 이용하여 검출될 수 있고 본 발명의 프라이머에 의해 결합될 수 있는 플라비바이러스의 게놈의 3' 비번역 영역 중의, 서열 번호 1 로 동정된 보존성 서열의 영역을 나타낸다. 서열 번호 2 는 서열 번호 1 의 상보물을 나타낸다.

<72> 도 2 는, 본 발명의 조성물 및 방법을 이용하여 검출될 수 있고 본 발명의 프라이머에 의해 결합될 수 있는 플라비바이러스의 게놈의 3' 비번역 영역 중의, 서열 번호 9 로 동정된 보존성 서열의 영역을 나타낸다. 서열 번호 10 은 서열 번호 9 의 상보물을 나타낸다.

<73> 도 3 은, 본 발명의 조성물 및 방법을 이용하여 검출될 수 있고 본 발명의 프로브에 의해 결합될 수 있는 플라비바이러스의 게놈의 3' 비번역 영역 중의, 서열 번호 16 로 동정된 보존성 서열의 영역을 나타낸다. 서열 번호 17 은 서열 번호 16 의 상보물을 나타낸다. 서열 번호 16 에서, N 는 결실부이거나, 또는 A 또는 C 이다. 서열 번호 17 에서, N 는 결실부이거나, 또는 T 또는 G 이다.

<74> 도 4 는 일본 뇌염 바이러스 혈청군 구성원의 핵산 서열과 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 핵산 서열의 정렬을 나타낸다.

<75> 도 5 는 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원이 아닌 검출가능한 플라비바이러스의 핵산 서열과 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 핵산 서열의 정렬을 나타낸다.

<76> 도 6 은 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 이용하여 일련의 회석된 추출 WNV RNA 의 검출을 나타내는 증폭 싸이클의 횟수에 대한 표준화된 형광의 곡선을 나타낸다.

<77> 도 7 은, 본 발명의 조성물 및 방법에 의해 검출될 수 있고 본 발명의 프라이머에 의해 결합될 수 있는 다수의 SLEV 단리물의 게놈의 3' 비번역 영역의 서열을 나타낸다. 하기 단리물에 대한 서열이 도시되었다: BFS1750 (서열 번호 29), 1750-Std (서열 번호 30), TD6-4G (서열 번호 31), CoaV750 (서열 번호 32), L695121.05 (서열 번호 33), TNM771K (서열 번호 34), MSI-7 (서열 번호 35), Kern217 (서열 번호 36), CoaV608 (서열 번호 37), TBH-28 (서열 번호 38), VR1265 (서열 번호 39) 및 CoaV353 (서열 번호 40).

<78> 1. 약자

<79> 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 특정 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 지칭하는 약자는 통상적인 단문자 약자이다. 따라서, 핵산 중에 포함될 때, 자연히 발생하는 뉴클레오티드의 암호화가 하기와 같이 약자로 표현된다: 아데닌 (A), 구아닌 (G), 시토신 (C), 티민 (T) 및 우라실 (U). 또한, 달리 명기되지 않다면, 일련의 단문자 약자들로서 표현되는 핵산 서열은 5' → 3' 방향으로 제시되었다.

<80> 2. 정의

<81> "증폭 반응" 은 템플레이트인 핵산 서열의 복사본을 증가시키거나 템플레이트의 존재를 의미하는 신호를 증가시키는 임의의 반응 (예컨대, 화학, 효소 또는 다른 형태의 반응)을 지칭한다. 증폭 반응은 예컨대 중합효소 연쇄 반응(PCR) 및 리가아제 연쇄 반응 (LCR) [U.S. 특허 제 4,683,195 호 및 제 4,683,202 호; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis 등, eds, 1990)], 가닥 전위 증폭 (SDA) [Walker 등, Nucleic Acids Res. 20(7):1691-6 (1992); Walker PCR Methods Appl 3(1):1-6 (1993)], 전사-매개 증폭 [Phyffer, 등, J. Clin. Microbiol. 34:834-841 (1996); Vuorinen, 등., J. Clin. Microbiol. 33:1856-1859 (1995)], 핵산 서열-기준 증폭 (NASBA) [Compton, Nature 350(6313):91-2 (1991)], 롤링 썬클 증폭 (RCA) [Lisby, Mol. Biotechnol. 12(1):75-99 (1999); Hatch 등., Genet. Anal. 15(2):35-40 (1999)] 분지형 DNA 시그널 증폭 (bdNA) [Iqbal 등, Mol. Cell Probes 13(4):315-320 (1999)] 및 Q-베타 레플리카아제 [Lizardi 등,

Bio/Technology 6:1197 (1988)]을 포함한다.

<82> 본원에서 사용되고 있는 "시료"는 핵산을 함유하거나 또는 함유할 것으로 추정되는 임의 물질을 가리킨다. 시료는 천연 또는 합성 기원일 수 있고 당업자에게 공지된 임의 수단으로써 획득될 수 있다. 시료는, 예컨대 하기를 포함하나, 하기로 한정되지 않는, 한 개체 또는 개체들로부터 단리시킨 조직 또는 유체의 시료일 수 있다: 피부, 혈장, 혈청, 전체 혈액, 척수액, 정액, 정액의 유체, 림프액, 활액의 유체, 소변, 눈물, 혈액 세포, 기관, 종양, 기관지폐포성 세척(bronchio-alveolar lavage), 및 또한 시험관 내 세포 배양 성분의 시료(하기를 포함하나 하기에 한정되지 않음: 세포 배양 배지의 세포 성장을 야기하는 조건부 배지, 재조합 세포 및 세포 성분). 핵산은 당 기술에 공지된 임의 절차에 의해 생물학적 시료로부터 획득될 수 있다.

<83> 본 원에서 사용된 용어 "핵산", " 폴리뉴클레오티드" 및 " 올리고뉴클레오티드" 는 프라이머, 프로브, 탐지될 올리고머 단편, 올리고머 대조군 및 비표지된 블로킹 올리고머를 지칭하고, 폴리디옥시리보뉴클레오티드 (2-데옥시-D-리보오스 함유), 폴리리보뉴클레오티드 (D-리보오스 함유)의 직쇄형 중합체, 및 퓨린 또는 피리미딘 염기의 임의 다른 N-글리코시드, 또는 변형된 퓨린 또는 피리미딘 염기를 통칭한다.

<84> 핵산, 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드는, 포스포디에스테르 결합 또는 하기를 포함하나, 하기로 한정되지 않는 변형된 결합을 포함할 수 있다: 포스포트리에스테르, 포스포라미데이트, 실록산, 카르보네이트, 카르복시메틸에스테르, 아세트아미데이트, 카르바메이트, 티오에테르, 가교 포스포라미데이트, 가교 메틸렌 포스포네이트, 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트, 포스포로디티오에이트, 가교 포스포로티오에이트 또는 술폰 결합, 및 상기 결합들의 조합.

<85> 핵산, 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드는 5 가지의 생물학적 발생 염기 (아데닌, 구아닌, 티민, 시토신 및 우라실) 및/또는 5 가지의 생물학적 발생 염기 외 염기를 포함할 수 있다. 상기 염기는 다수의 목적들, 예컨대 혼성화의 안정화 또는 불안정화; 프로브 분해 촉진 또는 억제; 또는 검출될 부분 또는 소광제 부분에 대한 결합 지점의 역할을 할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 하기를 포함하나 하기로 한정되지 않는, 하나 이상의 변형, 비-표준 또는 유도체화된 염기 부분을 함유할 수 있다: N⁶-메틸-아데닌, N⁶-tert-부틸-벤질-아데닌, 이미다졸, 치환된 이미다졸, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-요도우라실, 하이포크산틴, 크산틴, 4-아세틸시토신, 5-(카르복시히드록시메틸)우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우리딘, 5-카르복시메틸아미노메틸우라실, 디히드로우라실, 베타-D-갈락토실큐에오신, 이노신, N6-이소펜테닐아데닌, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, N6-메틸아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우라실, 베타-D 만노실큐에오신, 5'-메톡시카르복시메틸우라실, 5-메톡시우라실, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데닌, 우라실-5-옥시아세트산(v), 와이부톡소신, 슈도우라실, 큐에오신, 2-티오시토신, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, 우라실-5-옥시아세트산메틸에스테르, 3-(3-아미노-3-N-2-카르복시프로필) 우라실, (acp3)w, 2,6-디아미노퓨린, 및 5-프로피닐 피리미딘. 변형, 비-표준 또는 유도체화 염기 부분의 다른 예시는 U.S. 특허 제 6,001,611 호, 제 5,955,589 호, 제 5,844,106 호, 제 5,789,562 호, 제 5,750,343 호, 제 5,728,525 호, 및 제 5,679,785 호에서 볼 수 있고, 상기 각각의 특허는 그 전체가 본원에서 참고문헌으로 포함된다.

<86> 게다가, 핵산, 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드는 하기를 포함하나, 하기로 한정되지 않는, 하나 이상의 변형된 당 부분을 포함할 수 있다: 아라비노오스, 2-플루오로아라비노오스, 자일로스, 및 헥소오스.

<87> 본 발명은 공급원이 핵산, 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드로 국한된 것으로 의도되지 않았다. 핵산, 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드는 인간 또는 인간이 아닌 포유류, 또는 임의의 기타 유기체 유래일 수 있거나, 임의 재조합원으로부터 유도된 것, 시험관 내 합성 또는 화학 합성으로부터 합성된 것일 수 있다. 핵산, 뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드는 DNA, RNA, cDNA, DNA-RNA, 잠금(locked) 핵산 (LNA), 펩티드 핵산 (PNA), 동일한 것의 하이브리드 또는 임의 혼합물일 수 있고, 이중 가닥, 단일 가닥 또는 부분 이중 가닥 형태로 존재할 수 있다. 핵산은 또한 U.S. 특허 제 5,696,248 호 [본원에 전부 참고문헌으로 포함된다]에서 기재된 것처럼 유도체 핵산일 수 있다. 본 발명의 핵산은 유전자, 염색체, 플라스미드, 미생물, 예컨대 박테리아, 효모, 바이러스, 바이로이드, 곰팡이, 진균, 식물, 동물, 인간 등과 같은 생물학적 물질의 계능을 포함하며, 정제되거나 정제되지 않은 형태의 핵산 및 그의 단편 모두를 포함한다.

- <88> 용어 핵산, 폴리뉴클레오티드 및 올리고뉴클레오티드에서 길이 구별은 의도되지 않았으며, 상기 용어는 호환성 있게 사용될 수 있다. 상기 용어는 이중- 및 단일-가닥 DNA 뿐 아니라, 이중- 및 단일 가닥 RNA도 포함한다.
- <89> 본원에서 사용되는 용어 "잔기"는 뉴클레오티드 또는 상기에서 정의된 핵산 내 염기를 의미한다. 잔기는 제한 없이 당업자에게 공지된 임의의 뉴클레오티드일 수 있고, 상기에서 설명된 생물학적 발생 뉴클레오티드 및 비 생물학적 발생 뉴클레오티드 전부를 포함한다.
- <90> 용어 "프라이머"는 템플레이트 가닥과 상보적인 프라이머 신장 산물의 합성을 허용하는 조건하에서, 템플레이트 인 상기 핵산 가닥을 따라 폴리뉴클레오티드 합성의 시작점으로서 작용할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 프라이머는 정제된 제한 단편, 또는 합성으로 제조된 것으로서의 제조합 근원으로부터 수득될 수 있다. 프라이머 신장 조건은 전형적으로 적합한 온도 및 적합한 완충액 ("완충액"은 보조 인자이거나 또는 pH, 이온 세기 등에 영향을 끼치는 치환기를 포함할 수 있다)에서 DNA 폴리머라제 또는 역전사효소와 같은 중합 작용 시약 및 4 가지의 상이한 데옥시리보뉴클레오티드 트리포스페이트의 존재를 포함한다. 프라이머는 증폭시 최대 효율을 나타내기 위해서는 단일 가닥이 바람직하다. 본 발명의 프라이머는, 예컨대, 5 내지 500 개의 뉴클레오티드이고, 일부 구현예에서는 10, 20, 30, 25, 30, 40, 50, 75 또는 100 개 이상의 뉴클레오티드를 가지고/가지거나 500, 300, 200, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 또는 20 개 미만의 뉴클레오티드를 가진다.
- <91> 용어 "혼성화"는 단일 가닥 핵산 또는 이중 가닥 핵산 중 국소적 단일 가닥 영역이 상보적 서열을 가진 또 다른 단일 가닥 핵산 또는 이중 가닥 핵산 중 국소적 단일 가닥 영역과 결합하는 것을 의미한다. 당업자가 인식하는 것처럼, 두 개의 핵산 가닥이 서로 혼성함에 있어서 완전히 상보적이어야만 하는 것은 아니다. 혼성화 조건에 따라, 핵산은 한쪽 또는 양쪽의 가닥에서, 몇 개, 일부 또는 다수의 맞지 않는 것, 결실, 또는 부가가 있더라도 그것의 상보물에 혼성화될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 프라이머 및 프로브는 하기에 정의된대로, 적어도 부분적으로 상보성이 있는 핵산에 선택적으로 혼성화할 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 프라이머 및 프로브는 하기에서 정의된 바와 같이, 엄격한 조건하에서, 적어도 부분적으로 상보성이 있는 서열에 혼성화할 수 있다.
- <92> 본원에서 사용된 용어 "엄격한" 또는 "엄격한 조건"은 당 기술에 잘 공지된 낮은 이온 세기 및 고온의 혼성화 조건을 의미한다. 예컨대, [Maniatis 등, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d Edition; Current Protocols in Molecular Biology, 1988, ed.], [Ausubel 등, J. Wiley & Sons publ., New York, and Tijssen, 1993], [Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization Nucleic Acid Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays]를 참고하며, 이들 각각은 본원에서 참고문헌으로 포함된다. 일반적으로, 정의된 이온 세기 및 pH에서, 특정 서열의 용융점 (T_m)보다 약 5-30°C 더 낮은 온도에서 엄격한 조건이 선택된다. 대안적으로, 정의된 이온 세기 및 pH에서, 특정 서열의 용융점 (T_m)보다 약 5-15°C 낮은 온도에서 엄격한 조건이 선택된다. T_m 은 (정의된 이온 세기, pH 및 핵산 농도 하에서) 목표물과 상보적인 프로브의 50%가 (목표 서열은 T_m 에서 과량으로 존재하고, 평형상태에서는 프로브의 50%로 존재한다) 평형상태에서 목표 서열과 혼성화하는 온도를 말한다. 예를 들면, 엄격한 혼성화 조건은, 염 농도가 약 pH 7.0 내지 약 pH 8.3에서 약 1.0M 미만의 나트륨(또는 다른 염) 이온 농도, 전형적으로는 약 0.01 내지 약 1 M 나트륨 이온 농도를 말하고, 온도는 단(短)프로브(예컨대, 10 내지 50 개의 뉴클레오티드)용으로는 약 25°C 미만이고, 장(長)프로브 (예컨대, 50 개 초과 뉴클레오티드)용으로는 약 55°C의 조건을 말한다. 엄격한 조건은 또한 포름아미드와 같은 혼성화 불안정화 시약의 첨가로 변형될 수 있다.
- <93> 본원에서 사용된 용어 "선택적인" 또는 "선택적인 조건"이란, 검출가능한 플라비바이러스로부터 유도되지 않거나, 플라비바이러스 게놈과 관계 없는 영역으로부터 유도된 추가 핵산을 포함할 수 있는 시료 중의 검출가능한 플라비바이러스 핵산을 증폭, 검출 및/또는 정량하게 하는 본 발명의 프라이머 및/또는 프로브용에 대한 혼성화 조건을 의미한다. 검출가능한 플라비바이러스는 하기에 설명하였다.
- <94> 본원에서 사용된 핵산 서열의 "상보물(complement)"은, 한쪽 서열의 5'말단이 다른 쪽 서열의 3' 말단과 염기쌍을 이루는 것과 같이, 상기 핵산 서열과 정렬할 때, 역평행 (anti-parallel) 관계에 있는 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 핵산 서열의 상보물은 상기 서열의 모든 뉴클레오티드와 정확히 조화 (match) 될 필요는 없다; 안정된 이중구조(duplex)는 조화되지 않는 (mismatch) 염기쌍 또는 부조화 (unmatch) 된 염기들을 함유할

수 있다. 핵산 기술의 당업자는, 예컨대 올리고뉴클레오타이드의 길이, 염기 구성 및 올리고뉴클레오타이드의 서열, 이온 세기, 및 부조화된 염기쌍의 발생률을 포함하는 많은 변수를 선택적으로 고려함으로써 이중구조(duplex)의 안전성을 결정할 수 있다.

<95> 핵산 이중구조의 안전성은 용융점, 또는 " T_m " 으로 측정할 수 있다. 명기된 조건 하에서, 특정 핵산 이중구조의 T_m 은 잠재적 염기쌍이 반으로 분리될 때의 온도이다.

<96> 본원에서 사용된 용어 "프로브"란, 프로브의 하나 이상의 서열이 핵산 영역서열과의 상보성 때문에, 핵산의 영역과 이중 구조를 형성할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프로브는 바람직하게 프라이머의 서열과 상보적인 서열을 포함하지 않는다. 하기에 논의된 바와 같이, 프로브는 표지될 수 있거나, 표지되지 않을 수 있다. 프로브의 3' 말단은 "블로킹" 되어, 프라이머 신장 산물로 프로브가 삽입되는 것을 막을 수 있다. "블로킹" 은 비상보적인 염기를 이용함으로써, 또는 비오틴 또는 인산 염기와 같은 화학적 부분을 마지막 뉴클레오타이드의 3' 히드록실기에 첨가함으로써 달성될 수 있고, 선택된 부분에 따라, 상기 차단은 표지에 결합된 핵산을 후에 검출 또는 포착하는 표지의 역할도 또한 하게 됨으로써, 이중의 성과를 볼 수 있다. 차단은 또한 3' 히드록실기를 제거함으로써 또는 디데옥시뉴클레오타이드와 같은 3' 히드록실기가 결핍된 뉴클레오타이드를 이용함으로써 달성될 수 있다.

<97> 본원에서 사용된 용어 "검출가능한 부분"이란, 검출가능한 (임의적으로 적격이라 할 수 있는) 신호를 제공하기 위해 사용될 수 있고, 핵산 또는 단백질에 결합될 수 있는 임의의 원자 또는 분자를 지칭한다. 검출가능한 부분은 형광, 방사선, 색측정(colorimetry), 중량분석(gravimetry), X 선 분절 또는 흡수, 자기작용, 효소 활성 등으로 검출가능한 신호를 제공할 수 있다. 본 발명에 대한 편리한 검출가능한 부분은 올리고뉴클레오타이드 단편의 크기 검출을 용이하게 하는 것을 포함한다.

<98> 본원에서 사용된 용어 "형광성 부분"이란, 특정 부분에 적절한 조건 하에서, 빛을 발산할 수 있는 화학 부분을 지칭한다. 전형적으로, 특정 형광성 부분은 단파의 빛 흡수 후에, 특정 파장의 빛을 발산할 수 있다. 특정 형광 부분에 의해 발산된 빛의 파장은 상기 부분의 전형이다. 따라서, 단파의 빛과 함께 형광성 부분의 여기 후, 적절한 파장의 빛을 검출함으로써 특정 형광성 부분은 검출될 수 있다. 본 발명의 방법 및 조성물에 사용될 수 있는 형광성의 예는, 하기를 포함하나 하기에 한정되지 않는다: 플루오레세인계 염료, 폴리할로플루오레세인계 염료, 핵사클로로플루오레세인계 염료, 쿠마린계 염료, 로다민계 염료, 시아닌계 염료, 옥사진계 염료, 티아진계 염료, 스쿠아레인계 염료, 킬레이트화 란탄계 염료, 및 BODIPY®계 염료.

<99> 본원에서 사용된 용어 "소광제(quencher) 부분" 은 소광제 부분이 형광성 부분에 충분히 근접될 때, 예컨대 소광제 및 형광성 부분 모두가 공통 폴리뉴클레오타이드와 결합될 때, 형광성 부분에 의해 방출된 에너지를 흡수할 수 있는 화학 부분을 지칭한다. 이 현상은 일반적으로 형광 공명 에너지 전이 ("FRET") 로서 당분야에는 공지되어 있다. 소광제 부분은 상기 소광제 부분에 대해 특징적인 신호에서 형광부분으로부터 흡수된 에너지를 재차 방출할 수 있고, 이에 따라 소광제 역시 "형광성 부분"일 수 있다. 대안적으로, 소광제 부분은 열로서 형광성 부분으로부터 흡수된 에너지를 방산할 수 있다.

<100> 본원에서 정의된 바와 같이, "5' 에서 3' 로의 뉴클레아제 활성" 또는 "5' 뉴클레아제 활성"이란, 효소의 활성을 지칭하는데, 이것에 의해 뉴클레오타이드는 순차적으로 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에서부터 제거된다. 5' 뉴클레아제 활성은 5' 에서 3' 로의 엑소뉴클레아제 활성이거나 5'에서 3'로의 엔도뉴클레아제 활성일 수 있다. 예컨대, 많은 템플레이트-특이적 핵산 폴리머라제는 전통적으로 일부 DNA 폴리머라제 (즉, 대장균 DNA 폴리머라제 I 은 상기 활성을 가진 반면에 대장균 DNA 폴리머라제 I의 클레노우(Klenow) 단편은 활성을 가지지 못한다) 와 연관된 5' 에서 3' 로의 엑소뉴클레아제 활성을 보인다. 5' 에서 3' 로의 엑소뉴클레아제 활성은 또한 기질의 5' 말단에서 하나 이상의 포스포디에스테르 결합(뉴클레오타이드)를 가진 기질 핵산을 절단할 수 있다. 임의의 특정한 조작 이론에 구애되지 않더라도, DNA 폴리머라제와 연계된 5' 에서 3' 으로의 엑소뉴클레아제 활성의 상기 국면은, 프로브로부터 절단된 올리고뉴클레오타이드 단편의 방출을 야기시키는데, 상기 프로브의 특정 뉴클레오타이드 구성에 따라 좌우될 수 있다. 예를 들면, 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드, 특히 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단과 템플레이트 핵산 사이의 조화 (match) 또는 부조화 (mismatch) 의 수는 [Holland 등, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-80 (이것의 전체는 본원에서 참고문헌으로 포함된다)] 에 기재된 바와 같이 상기 활성에 영향을 끼칠 수 있다.

<101> 본원에서 사용된 용어 "대조군 5' 뉴클레아제 반응" 은 예컨대, 검출가능한 플라비바이러스의 핵산의 공지된 양, 복제 수에 대해 하기에 기재된 대로 수행된 5' 뉴클레아제 반응을 지칭한다. 그러한 반응에 의해 발

산된 형광의 양은 시료에 존재하는 상기 핵산의 양을 평가하기 위한 일본뇌염 바이러스 혈청군의 미지의 양과 시료 상에서 실시된 반응에서 비교될 수 있다.

<102> 본원에서 사용된 용어 "인접한" 은 템플레이트 핵산의 상보성 가닥 상의 프로브 또는 템플레이트핵산 가닥과 동일한 가닥 상의 프로브에 대해 프라이머의 위치선정을 지칭한다. 프라이머 및 프로브는 약 150 개 이상의 뉴클레오티드, 약 125 개 이상의 뉴클레오티드, 약 100 개 이상의 뉴클레오티드, 약 80 개 이상의 뉴클레오티드, 약 60 개 이상의 뉴클레오티드, 약 50 개 이상의 뉴클레오티드, 약 40 개 이상의 뉴클레오티드, 약 30 개 이상의 뉴클레오티드, 약 20 개 이상의 뉴클레오티드, 약 1 내지 약 20 개의 뉴클레오티드, 약 1 내지 약 10 개의 뉴클레오티드에 의해 분리될 수 있거나 또는 직접 서로 접할 수 있다. 플라비바이러스 핵산을 중합-독립 공정으로 검출하고자 하면, 프로브를 바람직하게 약 1 내지 약 10 개의 뉴클레오티드로 분리시킨다. 중합-의존성 과정에서, 예를 들면, 본원에서 교시된 PCR 증폭 및 검출 방법에서, 프로브는 프라이머의 다운스트림에 있는 증폭될 서열 내 어디든지 간에 검출가능한 핵산에 혼성화할 수 있어, 이에 따라 프라이머 신장으로 폴리머라제의 위치를 선정하게 되어 프로브는 단편화된다.

<103> 용어 "열안정성 핵산 폴리머라제" 는, 예컨대 대장균의 뉴클레오티드 폴리머라제와 비교시, 비교적 열에 안정성이 있고 뉴클레오시드 트리포스페이트의 중합을 촉매하는 효소를 지칭한다. 일반적으로, 상기 효소는 당업자가 호열성 유기체라고 여기는 유기체로부터 수득된다. 일반적으로, 효소는 프라이머 결합 서열에 어닐링된 프라이머의 3' 말단에서 합성을 일으키며, 계속해서 템플레이트의 5' 말단으로 새 가닥을 합성시킨다. 폴리머라제가 5' 에서 3' 으로의 뉴클레아제 활성을 보유하는 경우, 그것은 중합반응이 끝나거나 모든 프로브 단편이 검출될 핵산으로부터 분리될 때까지, 템플레이트에 어닐링된 개재 프로브를 가수분해하여 표지된 프로브 단편 및 표지되지 않은 프로브 단편 모두를 방출할 수 있다. 테르무스 아쿠아티쿠스 (*Thermus aquaticus*) (Taq)에서 단리된 대표적인 내열성 효소는 U.S. 특허 제 4,889,818 호에 기재되어 있고, 그것을 통상의 PCR에서 사용하는 방법은 [Saiki 등, 1988, Science 239:487-91]에 기재되어 있다. 또 다른 대표적인 내열성 효소는 테르무스 중 Z05 DNA 폴리머라제를 포함한다. 예로, U.S. 특허 제 5,674,738 호를 참고. Taq DNA 폴리머라제는 DNA 합성-의존성 가닥 전치 5'-3' 엑소뉴클레아제 활성을 가진다 [Gelfand, "Taq DNA Polymerase" in PCR Technology Principles and Applications for DNA Amplification, Erlich, Ed., Stockton Press, N.Y.(1989), Chapter 2 참고]. 따라서, Taq DNA 폴리머라제는 템플레이트 DNA에 결합되지 않으면 프로브를 분해하지 않는다.

<104> 용어 핵산 프라이머 또는 프로브의 "5' 뉴클레아제 반응" 이란, 프라이머가 상기에서 정의되고 하기에 상세히 설명된 바와 같이 5' 에서 3' 으로의 뉴클레아제 활성을 가진 핵산 폴리머라제에 의해 신장될 때, 그 핵산에 혼성화된 프로브를 분해하는 것을 지칭한다. 상기 반응은 U.S. 특허 제 6,214,979 호, 제 5,804,375 호, 제 5,487,972 호 및 제 5,210,015 호에 기재된 반응에 기초하며, 각각의 특허 전체는 본원에서 참고문헌으로 포함된다.

<105> 두 개의 핵산 서열의 "백분율 상보성" 또는 "백분율 상동성"을 결정하기 위해, 최적 비교의 목적으로 상기 서열을 정렬 (예컨대, 제 2 서열과의 최적 정렬을 위해 제 1 핵산 서열에 간격이 도입될 수 있다) 시켰다. 이어서, 상응하는 뉴클레오티드 위치에서의 뉴클레오티드를 비교하였다. 제 1 서열에서의 위치가 제 2 서열에서의 상응 위치와 상보적인 뉴클레오티드로 점유되면, 상기 분자들은 그 위치에서 상보적이다. 마찬가지로, 제 1 서열에서의 위치가 제 2 서열에서의 상응 위치와 동일한 뉴클레오티드로 점유되면, 상기 분자들은 그 위치에서 상동이다. 두 개의 서열 사이의 백분율 상보성(또는 백분율 상동성)은 서열의 상보적 위치 갯수를 비교되는 위치의 총계로 나눈 함수이다. (즉, % 상보성 = 상보적인 중복 위치의 갯수/더 짧은 뉴클레오티드 위치의 총계 x 100%; 및 % 상동성 = 상동인 중복 위치의 갯수/더 짧은 뉴클레오티드 위치의 총계 x 100%).

<106> 두 개의 서열 사이에서 백분율 상동성 측정은 수학적 알고리즘을 이용해 완성할 수 있다. 두 개의 서열 비교에 이용된 바람직한 수학적 알고리즘의 무제한 예시는 [Karlin 및 Altschul 의 함수, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268, Karlin 및 Altschul 의 변형된 함수, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877]이다. 상기 알고리즘은 [the NBLAST program of Altschul 등, 1990, J. Mol. Biol. 215:403] 에 포함되어 있다.

<107> 본 발명의 실시는 다른 것을 명기하지 않는한, 분자 생물학, 미생물학의 통상 기술 및 재조합 DNA 기술을 이용하였고, 당기술의 범위 내에 있다. 상기 기술은 문헌에서 완전히 설명되어 있다. [Sambrook 등, 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold

Spring Harbor, New York; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization(B.D.Hames & S. J. Higgins, eds., 1984); A Practical Guide to Molecular Cloning (B.Perbal, 1984); 및 Methods in Enzymology 시리즈 (Academic Press, Inc.) 참고]

<108> **3. 일본 뇌염 혈청군의 구성원 및 다른 특정 플라비바이러스의 핵산 검출용 핵산 프라이머 및 프로브**

<109> 본 발명은 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원 및 플라비바이러스 속의 특정 기타 구성원의 핵산의 존재 검출에 프라이머 및 프로브로서 유용한 올리고뉴클레오타이드 및 그것의 사용 방법을 제공한다. 상기 프라이머 및 프로브는 하기에 자세히 기재되어 있다. 본원에서 논의된 프라이머는 특정 바이러스 타입 (예컨대, 웨스트 나일 바이러스, SLEV, 뎅기 바이러스, 황열 바이러스 등) 증폭에 특히 유용한 것으로서 지목될 수 있고, 상기 프라이머는 또한 다른 바이러스도 증폭에 유용하다는 점이 주목된다.

<110> 본 발명의 방법에 유용한 올리고뉴클레오타이드는, 두 가지 이상의 일본 뇌염 바이러스 혈청군 구성원 또는 플라비바이러스 속의 다른 구성원 사이에서 보존되거나 플라비바이러스의 상이한 군주 사이에서 보존된 뉴클레오타이드 서열, 또는 그의 상보물을 포함하도록 고안될 수 있다. 상이한 군주 또는 혈청군 구성원 또는 속 사이에서 보존성 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 예컨대, 상이한 군주 또는 구성원 검출에 이용될 수 있는 프라이머 또는 프로브로서 유용할 수 있어, 상이한 군주 또는 원을 검출하는데 필수적인 프라이머 또는 프로브 수를 감소시킬 수 있다. 보존성 서열은 예컨대, 두 개 이상의 군주 또는 두 개 이상의 일본 뇌염 바이러스 혈청군 원 또는 플라비바이러스 속의 다른 원 사이에서 완전히 (즉, 100%) 또는 실질적으로 동일한 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50 개 이상의 근접한 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 실질적으로 동일한 서열은 상기에 열거된 근접한 뉴클레오타이드에 걸친 두 개 이상의 군주 사이에서 예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상동인 서열을 포함한다.

<111> **3.1. 핵산 프라이머**

<112> **서열 번호 1 번에 기초한 프라이머**

<113> 한 국면에서, 본 발명은 일본 뇌염 바이러스 혈청군 원의 검출 방법에 사용될 수 있는 핵산 프라이머를 제공한다. 특정 구현예에서, 일본 뇌염 바이러스 혈청군 구성원 검출에 이용될 수 있는 제 1 핵산 프라이머는 서열 번호 1 번의 핵산에 혼성화하는 핵산 또는 그의 상보물을 포함한다. 도 1 에 있는 서열 번호 1 번은 본 발명의 조성물 및 방법을 이용해 검출할 수 있는 플라비바이러스 게놈의 3' 비번역 영역에서 보존성 서열 영역을 나타낸다. 서열 번호 2 번은 서열 번호 1 번에 대한 상보물을 나타낸다.

<114> 본 발명의 상기 구현예에서, 제 1 핵산 프라이머는 정의된 조건하에서 서열 번호 1 번의 핵산에 혼성화를 허용하는 뉴클레오타이드 조성, 즉, 화학 구조를 가진다. 일부 경우에는, 핵산에 혼성화한 프라이머의 각 뉴클레오타이드가 핵산의 뉴클레오타이드와 염기쌍 상보물을 형성할 것이다. 예컨대, 서열 번호 1 번의 핵산 중 C 잔기에 혼성화한 표준 뉴클레오타이드를 함유한 프라이머는 상응하는 위치에 G 잔기를 가져야 한다. 따라서 서열 번호 1 번의 핵산에 혼성화하는 것은 뉴클레오타이드 서열 및 이에 따른 프라이머의 정확한 화학 구조를 명백히 보여준다. 게다가, 상기에서 자세히 열거된 올리고뉴클레오타이드 및 프라이머의 정의에 따라, 제 1 핵산 프라이머는 또한 비-표준 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 특정의 상기 비-표준 뉴클레오타이드는 또한 다른 표준 또는 비-표준 뉴클레오타이드에 결합할 수 있어 염기쌍을 형성할 수 있다. 예컨대, 비표준 뉴클레오타이드 이노신은 우라실, 시토신, 및 아데닌과 쌍을 이룰 수 있다. 혼성화 및 화학 구조 사이의 공지된 상관관계가 주어지면, 당업자는 본 발명의 프라이머의 표준 특징을 쉽게 알 수 있다. 대표적인 구현예를 하기에 상세히 기재하였다.

<115> 특정 구현예에서, 서열 번호 1 번의 핵산에 혼성화한 제 1 핵산 프라이머는 약 6 개의 뉴클레오타이드만큼 짧을 수 있다. 다른 구현예에서, 제 1 핵산 프라이머는 약 80 개의 뉴클레오타이드만큼 길 수 있다. 특정 구현예에서, 제 1 핵산 프라이머는 약 10, 약 12, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30, 약 35, 또는 약 40 개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구현예에서는, 제 1 핵산 프라이머는 100, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 21 또는 20 개 미만의 뉴클레오타이드를 포함할 것이다.

<116> 프라이머의 조성 및 길이는 선택되어, 적절한 반응 조건 하에서 플라비바이러스 핵산에 프라이머의 혼성화를 보장하는 충분한 열역학적 안정성을 제공하도록 선택되며, 이는 실시될 검출 방법에 좌우된다. 예컨대, 변형, 비-표준, 또는 유도체화 뉴클레오타이드를 가진 프라이머는 유사한 열역학적 혼성화 특징을 가지면서 통상의

뉴클레오티드를 가진 프라이머보다 더 길거나 더 짧을 수 있다. U.S. 특허 제 6,320,005 호, 제 6,174,998 호, 제 6,001,611 호 및 제 5,990,303 호에 상기 비-표준 염기의 예시가 적혀 있으며, 상기 특허 각각은 그 전체가 본원에서 참고문헌으로 포함된다. 또 다른 예시로서, G/C-풍부 서열을 가진 프라이머는 고온에서 A/T-풍부 서열을 가진 유사한 길이의 프라이머인 목적 서열에 어닐링할 수 있다. 따라서, 특정 구현예에서는 제 1 핵산 프라이머는 상기에서 정의된 바와 같이 변형, 비-표준, 또는 유도체화 염기를 포함한다.

특정 구현예에서, 제 1 핵산 프라이머는 서열 목록 2 번의 약 16 개 이상의 연속 뉴클레오티드를 포함한다. 도 1 에 나타난 서열 번호 2 번은 서열 번호 1 번의 상보물이다. 다른 구현예에서, 제 1 핵산 프라이머는 서열 번호 2 번의 약 18 개 이상의 연속 뉴클레오티드를 포함한다. 추가 다른 구현예에서, 제 1 핵산 프라이머는 서열 번호 2 번의 약 20 개 이상의 연속 뉴클레오티드를 포함한다. 추가 다른 구현예에서, 제 1 핵산 프라이머는 서열 번호 2 번의 약 22 개 이상의 연속 뉴클레오티드를 포함한다. 추가 다른 구현예에서, 제 1 핵산 프라이머는 서열 번호 2 번의 약 24 개 이상의 연속 뉴클레오티드를 포함한다.

특정 구현예에서, 본 발명은 일본 뇌염 바이러스 혈청군 구성원 검출에 이용할 수 있는 핵산 프라이머를 제공한다. 상기 프라이머는 표 1 에 제시된 것과 같이, 그의 핵산 서열을 참고하여 구조적으로 정의될 수 있다.

표 1

서열 번호 3 번 일본 뇌염 바이러스 혈 청군 프라이머 1	GN ² AA ⁵ CCN ^{8,9,10,12,13} AN ¹⁵ CN ^{17,18,19,20} TCGGN ^{25,26} [식 중, N ² 는 T 또는 A 이고; N ⁵ 는 G 또는 C 이고; N ⁸ 는 T 이거나 결실부이 고; 9 위치에 N 은 C 또는 G 이고; N ¹⁰ 는 T 또는 C 이고; N ¹² 는 A 또는 G 이고; N ¹³ 는 G 또는 A 이고; N ¹⁵ 는 A 또는 C 이고; N ¹⁷ 는 C 또는 T 이고; N ¹⁸ 는 G 또는 C 이고; N ¹⁹ 는 T 또는 C 이고; N ²⁰ 는 C 또는 T 이고; N ²⁵ 는 A 또는 G 이고; N ²⁶ 는 A 또는 T 이다.]
서열 번호 4 번 웨스트 나일 바이러스 프라이머 1	GTAAGCCN ⁸ CN ¹⁰ CAGAACCGN ^{19,20} TCGGAA [식 중, N ⁸ 는 결실부이거나 또는 T 이고; N ¹⁰ 는 T 또는 C 이고; N ¹⁹ 는 T 또 는 C 이고; N ²⁰ 는 C 또는 T 이다.]
서열 번호 5 번 일본 뇌염 바이러스 프 라이머 1	GAAAN ⁵ CCN ⁸ CTCN ^{12,13} AAC N ¹⁷ GTN ²⁰ TCGGAA [식 중, N ⁵ 는 G 또는 C 이고; N ⁸ 는 결실부이고; N ¹² 는 A 또는 G 이고; N ¹³ 는 G 또는 A 이고; N ¹⁷ 는 C 또는 T 이고; N ²⁰ 는 C 또는 T 이다.]
서열 번호 6 번 머레이 벨리 뇌염 바이 러스 프라이머 1	GAAAGCCTCCCAGAN ¹⁵ CCGTN ²⁰ TCGGAA [식 중, N ¹⁵ 는 A 또는 C 이고; N ²⁰ 는 C 또는 T 이다.]
서열 번호 7 번 코우탄고 바이러스 프라 이머 1	GTAAGCCCTCAGAACCGTCTCGGAA
서열 번호 8 번 예시 프라이머 1	GTAAGCCCTCAGAACCGTCTCGGAA
서열 번호 11 번 일본 뇌염 바이러스 혈청군 프라이머 2	N ¹ CCN ⁴ AN ⁶ TN ⁸ TN ^{10,11,12,13} CCAGGTN ²⁰ TCAA [식 중, N ¹ 는 T 또는 C 이고; N ⁴ 는 C 또는 T 이고; N ⁶ 는 G 또는 C 이고; N ⁸ 는 C 또는 A 이고; N ¹⁰ 는 A 또는 T 이고; N ¹¹ 는 결실부이거나 T 이고; N ¹² 는 T 또는 C 이고; N ¹³ 는 C 또는 T 이고; N ²⁰ 는 G 또는 A 이다.]
서열 번호 12 번 웨스트 나일 바이러스 프라이머 2	N ¹ CCTAGTCTATCCCAGGTN ¹⁹ TCAA [식 중, N ¹ 는 T 또는 C 이고, N ¹⁹ 는 G 또는 A 이다.]

서열 번호 13 번 일본 뇌염 바이러스 프 라이머 2	CCCN ⁴ AN ⁶ TN ⁸ TATN ^{12,13} N ²⁰ CCAGGTGTCAA [식 중, N ⁴ 는 C 또는 T 이고; N ⁶ 는 G 또는 C 이고; N ⁸ 는 C 또는 A 이고; N ¹² 는 T 또는 C 이고; N ¹³ 는 C 또는 T 이다.]
-------------------------------------	--

서열 번호 14 번 머레이 계곡 뇌염 바이 러스 프라이머 2	TCCTAGTCTTTTCCCAGGTGTCAA
서열 번호 15 번 예시 프라이머 2	TCCTAGTCTATCCCAGGTGTCAA
서열 번호 74 번 예시 프라이머 2	TCTCCTAGTCTATCCCAGGTGTCAA

- <121> 특정 구현예에서, 제 1 핵산 프라이머는 임의의 서열 번호 제 3-8 번을 포함한다. 본 발명의 특정 구현예에서, 프라이머 특이성을 향상시키기 위해, 프라이머는 하나 이상의 알킬화 뉴클레오티드를 그것의 3' 말단 부근에 포함할 수 있다. 예컨대, 특정 구현예에서, 제 1 핵산 프라이머는 서열 번호 8 번을 포함하고, 여기서 위치 23 의 잔기는 N⁶-알킬-데옥시아데노신이다. 구체적인 구현예에서, 제 1 핵산 프라이머는 서열 번호 8 번을 포함하고, 여기서 위치 23 의 잔기는 N⁶-메틸-데옥시아데노신이다. 특정 구현예에서, 제 1 핵산은 서열 번호 8 번을 포함하고, 여기서 위치 24 의 잔기는 N⁶-알킬-데옥시아데노신이다. 구체적인 구현예에서, 제 1 핵산은 서열 번호 8 번을 포함하고, 여기서 위치 24 의 잔기는 N⁶-tert-부틸-벤질-데옥시아데노신이다.
- 특정 구현예에서, 제 1 핵산 프라이머는 서열 번호 8 번을 포함하고, 여기서 위치 23 의 잔기는 N⁶-알킬-데옥시아데노신이고, 위치 24 의 잔기는 N⁶-알킬-데옥시아데노신이다. 또 다른 구체적인 구현예에서, 제 1 핵산 프라이머는 서열 번호 8 번을 포함하고, 여기서 위치 23 의 잔기는 N⁶-메틸-데옥시아데노신이고, 위치 24 의 잔기는 N⁶-tert-부틸-벤질-데옥시아데노신이다. 상기에 참고문헌으로 포함된 U.S. 특허 제 6,001,611 호는 상기 비-표준 뉴클레오티드와 동일한 알킬 부분 뿐 아니라, N⁶-알킬-데옥시아데노신을 기재한다. 예컨대, 특정 구현예에서, 알킬 부분은 C₁ 내지 약 C₁₀ 분지형 또는 비분지형 알킬을 포함한다. 다른 구현예에서, 알킬 부분은 C₁ 내지 약 C₂₀ 분지형 또는 비분지형 알킬을 포함한다.
- <122> 또 다른 국면에서, 본 발명은 서열 번호 9 번 및 그의 상보물의 핵산에 혼성화한 핵산을 포함하는 일본 뇌염 바이러스 혈청군 구성원 검출용의 제 2 핵산 프라이머를 제공한다. 도 2 에 있는 서열 번호 9 번은 조성물 및 본 발명의 방법을 이용해 검출할 수 있는 플라비바이러스 게놈의 3' 비번역 영역에서 보존성 서열의 영역을 나타낸다. 도 2 는 또한 서열 번호 10번이 서열 번호 9 번의 상보물을 나타내는 것을 보여준다.
- <123> 그런 본 발명의 구현예에서, 제 2 핵산 프라이머는 서열 번호 9 번의 핵산에 혼성화를 허용하는 뉴클레오티드 조성물, 즉 화학구조를 가진다. 예컨대, 서열 번호 9 번 핵산의 C 잔기에 혼성화하는 표준 뉴클레오티드를 함유한 프라이머는 상응 위치에 G 잔기를 가져야한다. 따라서, 서열 번호 9 번 핵산에 대한 혼성화는 뉴클레오티드 서열 및 이에 따른 정확한 프라이머의 화학구조를 정의한다. 더욱이, 제 2 핵산 프라이머는 또한 상기에서 열거된 프라이머 및 올리고뉴클레오티드의 정의에 따른 비-표준 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 특정의 상기 비-표준 뉴클레오티드는 또한 다른 표준 또는 비-표준 뉴클레오티드에 결합하여 염기쌍을 형성할 수 있다. 예컨대, 비표준 뉴클레오티드 이노신은 우라실, 시토신 및 아데닌과 쌍을 이룰 수 있다. 혼성화 및 화학 구조간의 공지된 상관 관계가 주어진다면, 당업자는 쉽게 본 발명의 프라이머의 표준 특징을 알 수 있다. 예시적인 구현예를 하기에 상세히 기술했다.
- <124> 특정 구현예에서, 서열 번호 9 번 핵산에 혼성화한 제 2 핵산 프라이머는 약 6개의 뉴클레오티드만큼 짧을 수 있다. 다른 구현예에서, 제 2 핵산 프라이머는 약 80 개의 뉴클레오티드만큼 길 수 있다. 특정 구현예에서, 제 2 핵산 프라이머는 약 10, 약 12, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30, 약 35 또는 약 40 개의 뉴클레오티드를 포함한다.
- <125> 적절한 반응 조건 하에서, 플라비바이러스의 핵산에 프라이머의 혼성화를 보장하도록 제 2 프라이머의 길이 및 조성이 선택되어 충분한 열역학 안정성을 제공하도록 하며, 이것은 실시될 검출 방법에 좌우된다. 예컨대, 변형, 비-표준, 유도체화 뉴클레오티드를 가진 프라이머는 유사한 혼성화 특징을 가지지만 통상의 뉴클레오티드의 그것보다 더 길거나 더 짧을 수 있다. 상기 비-표준 염기의 예는 U.S. 특허 제 6,320,005 호, 제 6,174,998 호, 제 6,001,611 호 및 제 5,990,303 호에서 찾아 볼 수 있으며, 위 각각의 특허는 여기서 전체가 참고로서 삽입되었다. 또 다른 예로서, G/C-풍부 서열의 프라이머는 고온에서 A/T-풍부 서열을 가진 유사

길이의 프라이머인 목적 서열에 어닐링할 수 있다. 따라서, 특정 구현예에서, 제 2 핵산 프라이머는 위에서 정의한 바와 같이 변형, 비-표준, 또는 유도체화 염기를 포함한다.

<126> 특정 구현예에서, 제 2 핵산 프라이머는 서열 번호 10 번의 16 개 이상의 연속 뉴클레오티드를 포함한다. 도 2 에 나타난 바와 같이, 서열 번호 10 번은 서열 번호 9 번의 상보물을 의미한다. 다른 구현예에서, 제 2 핵산 프라이머는 서열 번호 10 번의 약 18 개 이상의 연속 뉴클레오티드를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 제 2 핵산 프라이머는 서열 번호 10 번의 약 20 개 이상의 연속 뉴클레오티드를 포함한다. 추가의 다른 구현예에서, 제 2 핵산 프라이머는 서열 번호 10 번의 약 22 개 이상의 연속 뉴클레오티드를 포함한다. 추가 다른 구현예에서, 제 2 핵산 프라이머는 서열 번호 10 번의 약 24 개 이상의 연속 뉴클레오티드를 포함한다.

<127> 특정 구현예에서, 제 2 핵산 프라이머는 서열 번호 11 번을 포함한다. 다른 구현예에서, 제 2 핵산 프라이머는 서열 번호 12 번을 포함한다. 다른 구현예에서, 제 2 핵산 프라이머는 서열 번호 13 번을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 제 2 핵산 프라이머는 서열 번호 14 번을 포함한다. 추가 다른 구현예에서, 제 2 핵산 프라이머는 서열 번호 15 번 또는 서열 번호 74 번을 포함한다. 특정 구현예에서, 제 2 핵산 프라이머는 비-표준 또는 유도체화 뉴클레오티드를 포함한다. 다른 구현예에서, 제 2 핵산 프라이머는 하나 이상의 알킬화 뉴클레오티드를 3' 말단에 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 제 2 핵산 프라이머는 서열 번호 15 번 또는 서열 번호 74 번을 포함할 수 있으며, 여기서 위치 24 의 잔기는 N⁶-알킬-데옥시아데노신이다. 특정 구현예에서, 알킬 부분은 C₁ 내지 약 C₁₀ 분지형 또는 비분지형 알킬을 포함한다. 다른 구현예에서, 알킬 부분은 C₁ 내지 약 C₂₀ 분지형 또는 비분지형 알킬을 포함한다. 구체적인 구현예에서, 제 2 핵산 프라이머는 서열 번호 15 번 또는 서열 번호 74 번을 포함하고, 여기서 위치 24 의 잔기는 N⁶-tert-부틸-벤질-데옥시아데노신이다.

<128> 본 발명의 핵산 프라이머는 추가적으로 일본 뇌염 바이러스 혈청군 원에 혼성화하고/혼성화하지 않거나 상보적이지 않은 핵산 서열을 포함할 수 있다. 상기 추가적인 서열은 당업자에 의해 선택되어, 예컨대, 일본 뇌염 바이러스 혈청군 구성원의 검출에 도움을 줄 수 있다. 일본 뇌염 바이러스 혈청군 원의 핵산을 포함하는 핵산 검출 방법은 하기의 섹션 4.2 및 4.3에 광범위하게 기재되어 있다. 상기 방법은 본 발명의 핵산 프라이머에 존재할 수 있는 추가 핵산 서열 뿐 아니라 일본 뇌염 바이러스 혈청군 구성원 검출에 상기 추가 서열을 이용하는 방법도 설명한다.

<129> 핵산 프라이머는 제한없이 당업자에게 공지된 적합한 방법으로 제조될 수 있다. 기재된 서열의 올리고뉴클레오티드 제조 방법은 당 기술에 잘 공지되어 있고, 예컨대 클로닝 및 적절한 서열의 클로닝 및 제한(resstriction) 및 직접적인 화학 합성을 포함한다. 화학 합성 방법은, 예컨대 포스포트리에스테르 방법 [Narang 등, 1979, Methods in Enzymology 68:90] 포스포디에스테르 방법 [Brown 등, 1979, Methods in Enzymology 68:109], 디에틸포스포라미데이트 방법 [Beaucage 등, 1981, Tetrahedron Letters 22:1859], 및 고체 지지 방법 [U.S. 특허 제 4,458,066 호]를 포함한다. 또한, 상기에 기재된 합성 방법의 변형은 바람직하게 합성된 올리고뉴클레오티드에 대한 효소 거동에 영향을 주기위해 사용될 수 있다. 예컨대, 변형된 포스포디에스테르 결합 (예컨대, 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트, 포스포아미데이트, 또는 보라노포스페이트) 또는 아인산 유도체 외의 결합은 올리고뉴클레오티드로 삽입되어 선택된 부위에서 절단을 막을 수 있는데 사용될 수 있다. 또한, 2'-아미노 변형 당의 사용은 신규한 핵산 가닥 합성의 템플레이트가기도 한 핵산에 혼성화할 때, 올리고뉴클레오티드의 절단보다 전위를 선호하는 경향이 있다.

<130> **덴기 바이러스 프라이머**

<131> 본 발명의 추가적인 프라이머는 덴기 바이러스 3' UTR에 혼성화한다. 덴기 바이러스 핵산의 증폭 및/또는 검출에 유용한 전형적인 프라이머는 표 2 에 나타내었다 (5' → 3')

표 2

서열	해설	서열 번호
GAGCCCGTCCAAGGACGTAAAAAGAA	덴기 바이러스 공통 업스트림 프라이머.	41

GAGCCCCGTCCAAGGACGTAAAAAGAJ	덴기 바이러스 공통 업스트림 프라이머.	42
GAGCCCCGTCCAAGGACGTAAAAAGEJ	덴기 바이러스 공통 업스트림 프라이머.	43
GAGCCCCGTCCAAGGACGTAAATGAA	덴기 바이러스 type I 업스트림 프라이머.	44
GAGCCCCGTCCAAGGACGTAAATGAJ	덴기 바이러스 타입 I 업스트림 프라이머.	45
GAGCCCCGTCCAAGGACGTAAATGEJ	덴기 바이러스 타입 I 업스트림 프라이머.	46
GAGCCCCGTCCAAGGACGTAAAAAGAA	덴기 바이러스 타입 II & III 업스트림 프라이머.	47
GAGCCCCGTCCAAGGACGTAAAAAGAJ	덴기 바이러스 타입 II & III 업스트림 프라이머.	48
GAGCCCCGTCCAAGGACGTAAAAAGEJ	덴기 바이러스 타입 II & III 업스트림 프라이머.	49
ATTGAAGTCAGGCCACTTGTGCCA	덴기 바이러스 타입 IV 업스트림 프라이머.	50
ATTGAAGTCAGGCCACTTGTGCCJ	덴기 바이러스 타입 IV 업스트림 프라이머.	51
ATTGAAGTCAGGCCACTTGTGCUJ	덴기 바이러스 타입 IV 업스트림 프라이머.	52
GATCTCTGGTCTTTCCAGCGTCAA	덴기 바이러스 다운스트림 프라이머.	53
GATCTCTGGTCTTTCCAGCGTCAJ	덴기 바이러스 다운스트림 프라이머.	54
GATCTCTGGTCTTTCCAGCGTCEJ	덴기 바이러스 다운스트림 프라이머.	55
프라이머 추가 문자 정의: J = t-부틸-벤질-dA, E = 메틸-dA; U= 에틸-dC		

<133> 몇몇의 구현예에서, 하나의 "업스트림" 프라이머 및 "다운스트림" 프라이머는 덴기 바이러스 핵산을 증폭시키기 위해 조합의 형태로 사용된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 업스트림 프라이머는 하나 이상의 다운스트림 프라이머와 조합되어 하나 이상의 덴기 바이러스 핵산 검출에 사용된다. 단일 증폭 반응에서 다중의 업스트림 프라이머의 사용은 상이한 덴기 바이러스 변종의 증폭 및/또는 검출을 가능하게 한다. 예컨대, 일부 구현예에서, 제 1 업스트림 프라이머 (서열 번호 41 번, 서열 번호 42 번 및 서열 번호 43 번에서 선택함) 및 제 2 업스트림 프라이머 (서열 번호 50 번, 서열 번호 51 번, 및 서열 번호 52 번에서 선택함)는 덴기 바이러스 다운스트림 프라이머 (예컨대, 서열 번호 53 번, 서열 번호 54 번, 및 서열 번호 55 번을 포함하는 프라이머에서 선택됨)와 조합되어 사용된다. 상기 구현예는 예컨대, 임의의 덴기 바이러스 타입 1, 2, 3 또는 4의 검출에 유용하다.

<134> **황열 바이러스 프라이머**

<135> 본 발명의 추가 프라이머는 황열 바이러스 3' UTR에 혼성화한다. 덴기 바이러스 핵산의 검출 및/또는 증폭에 유용한 전형적인 프라이머는 표 3 (5'→3')에 제시된 것을 포함한다.

표 3

<136>

서열	해설	서열 번호
AACCGGGATAAAAACTACGGGTGGAGAA	황열 바이러스 업스트림 프라이머.	56
AACCGGGATAAAAACTACGGGTGGAGAJ	황열 바이러스 업스트림 프라이머.	57
AACCGGGATAAAAACTACGGGTGGAGEJ	황열 바이러스 업스트림 프라이머.	58
ATAAAAACTACGGGTGGAGAACCGGA	황열 바이러스 업스트림 프라이머.	59

ATAAAACTACGGGTGGAGAACCGGJ	황열 바이러스 업스트림 프라이머.	60
ACTCCGGTCTTTCCTGGCGTCAA	황열 바이러스 다운스트림 프라이머.	61
ACTCCGGTCTTTCCTGGCGTCAJ	황열 바이러스 다운스트림 프라이머.	62
ACTCCGGTCTTTCCTGGCGTCEJ	황열 바이러스 다운스트림 프라이머.	63
표 2의 추가 문자 참조.		

<137> 일부 구현예에서, 하나의 "업스트림" 프라이머 및 "다운스트림" 프라이머는 황열 바이러스 핵산을 증폭하기 위해 조합 형태로 사용된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 업스트림 프라이머는 하나 이상의 다운스트림 프라이머와 조합되어 하나 이상의 황열 바이러스 핵산을 검출하는데 사용된다. 다중의 업스트림 프라이머는 단일 증폭 반응에 사용될 수 있다. 예컨대, 일부 구현예에서, 제 1 업스트림 프라이머 (예컨대, 서열 번호 56 번, 서열 번호 57 번 및 서열 번호 58 번에서 선택됨) 및 제 2 업스트림 프라이머 (예컨대, 서열 번호 59 번, 서열 번호 60 번 및 서열 번호 61 번에서 선택됨)는 황열 바이러스 다운스트림 프라이머 (예컨대, 서열 번호 62 번 및 서열 번호 63 번을 포함하는 프라이머에서 선택됨)와 조합되어 사용된다.

<138> 도 7 의 서열에 기초한 프라이머

<139> 본 발명의 추가 프라이머는 증폭 반응의 프라이밍(priming)을 허용하는 조건에서, 도 7 (예컨대, 서열 번호 29 번, 서열 번호 30 번, 서열 번호 31 번, 서열 번호 32 번, 서열 번호 33 번, 서열 번호 34 번, 서열 번호 35 번, 서열 번호 36 번, 서열 번호 37 번, 서열 번호 38 번, 서열 번호 39 번, 서열 번호 40 번)에 나타난 임의의 서열 또는 그의 상보물에 혼성화한다. 일부 경우, 상기 프라이머는 SLEV 유래의 핵산 증폭 및/또는 검출에 유용하다.

<140> 상기에 기재된 서열 번호 1 번에 혼성화하는 프라이머와 같이, 도 7 에 제시된 임의의 서열에 혼성화하는 프라이머는 상기에서 열거한 프라이머 및 올리고뉴클레오타이드의 정의에 따른 비-표준 뉴클레오타이드를 또한 포함할 수 있다.

<141> 적절한 반응 조건 하에서, 플라비바이러스의 핵산에 프라이머의 혼성화를 보장하도록 도 7 에 제시된 임의의 서열에 혼성화하는 프라이머의 길이 및 조성을 선택하여 충분한 열역학 안정성을 제공할 수 있는데, 이것은 실시될 검출 방법에 의해 좌우된다. 예컨대, 변형, 비-표준, 또는 유도체화 뉴클레오타이드를 가진 프라이머는 유사한 열역학 혼성화 특성을 가지지만 통상의 뉴클레오타이드의 그것보다 더 길거나 짧을 수 있다. 따라서, 특정 구현예에서, 제 2 핵산 프라이머는 상기에서 정의된 변형, 비-표준, 또는 유도체화 염기를 포함한다. 도 7 에 제시된 임의의 서열에 혼성화하는 프라이머는 예컨대, 도 7 에 제시된 임의의 서열의 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50 개 이상의 인접 뉴클레오타이드 또는 그의 상보물을 포함할 수 있다.

<142> 당업자는 프라이머 쌍이 SLEV의 3' UTR 영역 유래의 목적 서열을 증폭하기 위해 서열 번호 29 번, 서열 번호 30 번, 서열 번호 31 번, 서열 번호 32 번, 서열 번호 33 번, 서열 번호 34 번, 서열 번호 35 번, 서열 번호 36 번, 서열 번호 37 번, 서열 번호 38 번, 서열 번호 39 번, 서열 번호 40 번을 이용해 고안될 수 있다는 것을 인식할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 제 1 프라이머는 증폭 반응의 프라이밍을 허용하는 조건하에서, TTGACACCTGGAAGACAGGAGA (서열 번호 68 번)에 혼성화 하고 제 2 프라이머는 CAAAGCCCCTCATTCGACTCGGG (서열 번호 69 번)의 상보물에 혼성화한다.

<143> SLEV의 검출 및/또는 증폭용의 전형적인 프라이머는 표 4에 나타난 것을 포함한다.

표 4

서열	해설	서열 번호
CAAAGCCCCTCATTCGACTCGGGA	세인트 루이스 뇌염 바이러스 업스트림 프라이머.	64
CAAAGCCCCTCATTCGACTCGGGJ	세인트 루이스 뇌염 바이러스 업스트림 프라이머.	65

TCTCCTGTCTTTCCAGGTGTCAA	세인트 루이스 뇌염 바이러스 다운스 트림 프라이머.	66
TCTCCTGTCTTTCCAGGTGTCAJ	세인트 루이스 뇌염 바이러스 다운스 트림 프라이머.	67
표 2의 추가 문자 참고.		

3.2. 핵산 프로브

또 다른 국면에서, 본 발명은 특정 플라비바이러스 핵산의 검출용 프로브를 제공한다. 본 발명의 프로브로 검출할 수 있는 플라비바이러스 핵산은 하기의 섹션 3.3 및 3.4에 설명하였다. 프로브는 제한없이 당업자에게 공지된 검출가능한 플라비바이러스의 핵산 존재를 식별하는데 사용될 수 있는 임의의 핵산 프로브일 수 있다. 전형적으로 프로브는 검출할 플라비바이러스 핵산 영역에 혼성화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

프로브 뉴클레오타이드 서열은 검출할 플라비바이러스의 핵산의 특이적 결합에 충분한 임의의 길이의 것일 수 있다. 특정 구현예에 있어서, 상기 프로브는 약 6개 이상의 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에 있어서, 상기 프로브는 약 140개 미만의 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에 있어서, 상기 프로브는 길이에 있어서 약 18 내지 약 25개, 약 25 내지 약 35개, 또는 약 35 내지 약 45개의 뉴클레오타이드일 수 있다. 프로브의 길이와 조성은, 실행될 검출 방법에 의존하는 적절한 반응 조건 하에서 플라비바이러스 핵산에 대한 프로브의 혼성화를 보증하는데 충분한 열역학적 안정성을 가지도록 선택될 수 있다. 예를 들어, 개질된, 비표준적이거나, 또는 유도화된 뉴클레오타이드를 갖는 프로브는, 유사한 열역학적 혼성화 성질을 가지는 통상의 뉴클레오타이드를 갖는 것보다 더 길거나 더 짧을 수 있다. 상기의 비표준 염기의 예는 미국 특허 제 6,320,005호, 제 6,174,998호, 제 6,001,611호 및 제 5,990,303호에서 찾을 수 있고, 상기 각각은 그 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된다. 다른 예로서, G/C 풍부 서열을 갖는 프로브가 A/T 풍부 서열을 갖는 유사한 길이의 프로브인 표적 서열에 더욱 고온에서 어닐링될 수 있다.

통상적으로, 검출가능한 핵산에 혼성화하는 프로브 뉴클레오타이드 서열의 부분은 상기 프로브가 혼성화하는 검출가능한 핵산의 영역과 상동이거나 또는 상보적이다. 그러나, 프로브의 상기 부분은 프로브가 혼성화하는 검출가능한 바이러스 핵산의 영역에 대한 100% 미만의 서열 상동성 또는 상보성을 가질 수 있다. 본 발명의 특정 구현예에서, 검출가능한 바이러스 핵산에 혼성화하는 프로브의 부분의 뉴클레오타이드 서열은 프로브가 혼성화하는 검출가능한 바이러스 핵산의 영역에 대한 약 99%, 약 98%, 약 97%, 약 96%, 약 95%, 약 90%, 약 85% 또는 약 80% 상보성 또는 상동성을 가질 수 있다.

특정 구현예에 있어서, 본 발명은 서열 번호 16의 핵산에 혼성화하는 핵산을 포함하는 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원을 검출하기 위한 프로브를 제공한다. 도 3에 나타난 바와 같은 서열 번호 16은 본 발명의 조성물 및 방법을 사용하여 검출할 수 있는 플라비바이러스의 게놈의 3' 비번역 영역에 있는 보존성 서열의 영역을 나타낸다. 도 3은 또한 서열 번호 17이 서열 번호 16에 대한 상보물을 나타내는 것임을 보여준다.

본 발명의 상기와 같은 구현예에 있어서, 프로브는, 그것이 소정 조건 하에서 서열 번호 16의 핵산에 혼성화하게 하는 뉴클레오타이드 조성, 즉 화학적 구조를 갖는다. 예를 들어, 서열 번호 16의 핵산에서 C 잔기에 혼성화하는 표준 뉴클레오타이드를 포함하는 프로브는 대응하는 위치에 G 잔기를 가져야 한다. 이에, 서열 번호 16의 핵산에 대한 혼성화는, 뉴클레오타이드 서열 및 이에 따라 프로브의 정확한 화학적 구조를 정의한다. 부가적으로, 프로브는 또한, 전술한 올리고뉴클레오타이드 및 프라이머의 정의에 따라 비표준 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기와 같은 특정 비표준 뉴클레오타이드는 또한, 다른 표준 또는 비표준 뉴클레오타이드에 결합하여 염기쌍을 형성할 수 있다. 예를 들어, 비표준 뉴클레오타이드 이노신은 우라실, 사이토신, 및 아데닌과 쌍을 이룰 수 있다. 혼성화와 화학적 구조 사이의 공지된 상관관계가 주어지면, 당업자는 본 발명의 프로브의 표준 특질을 용이하게 인식할 수 있다. 예시 구현예를 하기에 상세히 기술한다.

특정 구현예에 있어서, 서열 번호 16에 혼성화할 수 있는 프로브는 약 10, 약 12, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30, 약 32, 약 34, 약 36, 약 38, 약 40, 약 42, 약 44, 약 46, 약 48, 약 50, 약 55, 약 60, 약 65, 약 70, 약 75, 또는 약 80개 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 구현예에 있어서, 상기 정의한 바와 같이, 프로브는 개질된, 비표준, 또는 유도화된 염기를 포함한다.

특정 구현예에 있어서, 프로브는 서열 번호 17의 약 20개 이상의 연속 뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 구현

예에 있어서, 프로브는 서열 번호 17의 약 22개 이상의 연속 뉴클레오티드를 포함한다. 또다른 구현예에 있어서, 프로브는 서열 번호 17의 약 24개 이상의 연속적인 뉴클레오티드를 포함한다. 또다른 구현예에 있어서, 프로브는 서열 번호 17의 약 26개 이상의 연속적인 뉴클레오티드를 포함한다. 또다른 구현예에 있어서, 프로브는 서열 번호 17의 약 28개 이상의 연속적인 뉴클레오티드를 포함한다. 또다른 구현예에 있어서, 프로브는 서열 번호 17의 약 30개 이상의 연속적인 뉴클레오티드를 포함한다. 또다른 구현예에 있어서, 프로브는 서열 번호 17의 약 32개 이상의 연속적인 뉴클레오티드를 포함한다. 또다른 구현예에 있어서, 프로브는 서열 번호 17의 약 34개 이상의 연속적인 뉴클레오티드를 포함한다. 또다른 구현예에 있어서, 프로브는 서열 번호 17의 약 36개 이상의 연속적인 뉴클레오티드를 포함한다. 또다른 구현예에 있어서, 프로브는 서열 번호 17의 약 38개 이상의 연속적인 뉴클레오티드를 포함한다. 또다른 구현예에 있어서, 프로브는 서열 번호 17의 약 40개 이상의 연속적인 뉴클레오티드를 포함한다.

<153>

특정 구현예에 있어서, 본 발명은 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원 뿐만 아니라 특정의 기타 플라비바이러스 검출에 사용될 수 있는 특정 핵산 프로브를 제공한다. 상기 프로브는, 표 5에 나타낸 바와 같이 그의 핵산 서열을 참조하여 구조적으로 정의될 수 있다.

표 5a

서열번호 18 플라비바이러스 검출용 프로브	GGN ³ CTAGN ⁸ GGTTAGAGGAGACCCN ²⁴ N ²⁵ N ²⁶ N ²⁷ N ²⁸ (여기서, N ³ 는 A 또는 T이고; N ⁸ 는 A 또는 T 이고; N ²⁴ 는 C 또는 T이고; N ²⁵ 는 G, C, T, A, 또는 결실부이고; N ²⁶ 는 C, T, G, 또는 결실부이고; N ²⁷ 는 G, C, A, T, 또는 결실부이고; N ²⁸ 는 G, C, A, T, 또는 결실부이다.)
서열번호 19 일본 뇌염 바이러스 혈청군 구성원의 검출용 프로브	GGACTAGN ⁸ GGTTAGAGGAGACCCCN ²⁵ N ²⁶ N ²⁷ N ²⁸ (여기서, N ⁸ 는 A 또는 T이고; N ²⁵ 는 G 또는 A 이고; N ²⁶ 는 C 또는 T이고; N ²⁷ 는 G 또는 T이고; N ²⁸ 는 G 또는 T이다.)
서열번호 20 웨스트 나일 바이러스 검출용 프로브	GGACTAGN ⁸ GGTTAGAGGAGACCCCN ²⁵ CGN ²⁸ (여기서, N ⁸ 는 A 또는 T이고; N ²⁵ 는 G 또는 A 이고; N ²⁸ 는 G 또는 T이다.)
서열번호 21 일본 뇌염 바이러스 검출용 프로브	GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCGN ²⁶ GG (여기서, N ²⁶ 는 C 또는 T이다.)
서열번호 22 무레이 밸리 뇌염 바이러스 검출용 프로브	GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCACTC
서열번호 23 쿤진 바이러스 검출용 프로브	AATAN ⁵ GTGGATTACATGAN ¹⁹ TTCAN ²⁴ TGAA G (여기서, N ⁵ 는 T 또는 C이고; N ¹⁹ 는 G 또는 C이고; N ²⁴ 는 T 또는 C이다.)

<154>

표 5b

서열번호 24 헵기 바이러스 검출용 프로브	GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCN ²⁵ N ²⁶ N ²⁷ N ²⁸ (여기서, N ²⁵ 는 C 또는 T 이고; N ²⁶ 는 C 또는 G 이고; N ²⁷ 는 C 또는 G 이고; N ²⁸ 는 G, C 또는 A 이다.)
서열번호 25 황열 바이러스 검출용 프로브	GGTCTAGAGGTTAGAGGAGACCCTCCAG
서열번호 26 몬타나 미요티스 백질 뇌염 바이러스 검출용 프로브	GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCTTCC
서열번호 27 모독 바이러스 검출용 프로브	GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCGGC
서열번호 28 예시 프로브 1	GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCGCGG
서열번호 70 플라비바이러스 안티센스 프로브	GGGTCTCCTCTAACCTCTAGTCCTTCCCCC

<155>

<156>

본 발명의 특정 구현예에 있어서, 프로브는 서열 번호 18 ~ 28 또는 70 중 임의의 것 또는 이의 상보물을 포함한다.

<157>

본 발명의 핵산 프로브는, 본 개시된 프로브로 검출할 수 있는 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원 또는 다른 플라비바이러스의 핵산으로부터 유도되지 아니하고/아니하거나 혼성화하지 아니하는 다른 핵산 서열을 부가적으로 포함할 수 있다. 이들 부가적 핵산 서열은 목적하는 관능성을 프로브에 제공하기 위해 당업자에 의해 선택될 수 있다. 예를 들어, 핵산 프로브는 검출 방법을 개선시키는 부가적 서열을 포함할 수 있다. 부가적 핵산 서열을 포함할 수 있거나 또는 본 발명의 프로브, 방법, 및 키트에 사용하기 위해 채택될 수 있는 프로브의 예는 미국 특허 제 6,323,337 호, 제 6,248,526 호, 제 6,150,097 호, 제 6,117,635 호, 제 6,090,552 호, 제 5,866,336 호, 및 제 5,723,591 호에서 찾을 수 있고, 이들 각각은 그 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된다. 또한, 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원 또는 다른 검출가능한 플라비바이러스의 핵산을 포함하는 핵산 검출 방법은 하기의 섹션 4.2 및 4.3 에 집중적으로 개시되어있다. 상기 방법의 일부는 또한 본 발명의 핵산 프라이머에 존재할 수 있는 부가적인 핵산 서열을 사용하고; 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원을 검출하기 위한 상기 부가적 핵산 서열 및 상기 부가적 서열의 사용 방법을 하기에 기재한다.

<158>

본 발명의 핵산 프로브는, 제한없이 당업자에게 공지되어 있는 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 특히, 진술한 본 발명의 핵산 프라이머를 제조하기 위해 사용되는 방법이 본 발명의 핵산 프로브 제조에 또한 사용될 수 있다.

<159>

프로브 뉴클레오타이드 서열에 부가하여, 프로브는 본 발명의 방법을 저해하지 아니하는 부가적 뉴클레오타이드 서열 또는 다른 부분을 포함할 수 있다. 본 발명의 통상적인 구현예에 있어서, 프로브는 본 발명의 방법을 용이하게 하는 부가적 뉴클레오타이드 서열 또는 다른 부분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 프로브는 프로브에 의해 프라이밍(priming)되는 목적하지 아니하는 핵산 중합을 방지하기 위해 그의 3' 종결부에서 블로킹될 수 있다. 또한, 뉴클레오타이드 서열과 프로브 또는 프로브 단편의 혼성화를 안정화 또는 불안정화하는 부분이 프로브 내에 존재할 수 있다. 본 발명의 프로브는 또한 상기 정의한 바와 같은 개질된, 비표준, 또는 유도화

된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

- <160> 본 발명의 특정 구현예에 있어서, 프로브는 검출가능한 부분을 포함할 수 있다. 검출가능한 부분은 제한없이 당업자에게 공지되어 있는 임의의 검출가능한 부분일 수 있다. 또한, 검출가능한 부분은 제한없이 당업자에게 공지되어 있는 임의의 수단에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어, 검출가능한 부분은 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적, 또는 화학적 수단에 의해 검출될 수 있다.
- <161> 본 발명의 프로브 검출에 사용될 수 있는 다양한 검출가능한 부분 뿐만 아니라 프로브에 대한 이의 연결 방법이 당업계에 공지되어 있고, 하기가 포함되나, 이에 제한되지는 아니한다: 효소 (예컨대, 알칼리 포스파타아제 및 서양고추냉이 퍼옥시다아제) 및 효소 기질, 방사성 부분, 형광 부분, 발색단, 화학발광 표지, 전기화학발광 표지, 예컨대 OriginTM (Igen 제), 특이적인 결합짝을 갖는 리간드, 또는 서로 상호작용하여 신호를 증진, 변경, 또는 감소시킬 수 있는 임의의 기타 표지. 물론, 5' 뉴클레아제 반응은 승온에서 열안정성 DNA 폴리머라아제를 사용하여 수행하여야하고, 검출가능한 부분은 상기와 같은 승온에 의해 분해되지 아니하거나 또는 검출되지 아니하여야 한다.
- <162> 특정 구현예에 있어서, 검출가능한 부분은 형광 부분일 수 있다. 형광 부분은 제한없이 당업자에게 공지되어 있는 임의의 형광 부분일 수 있다. 통상적으로, 단일비색계(monochromometer) 보다는 필터를 갖는 형광 분광계의 사용을 허용하고 검출 효율을 증가시키는, 광폭 Stokes 쉬프트를 갖는 형광 부분이 바람직하다. 특정 구현예에 있어서, 형광 부분은 플루오레세인계 염료 (Integrated DNA Technologies, Inc.제, Coralville, IA 소재), 폴리할로플루오레세인계 염료, 헥사클로로플루오레세인계 염료, 쿠마린계 염료 (Molecular Probes, Inc.제, Eugene, Or 소재), 로다민계 염료 (Integrated DNA Technologies, Inc.제), 시아닌계 염료, 옥사진계 염료, 티아진계 염료, 스쿠아레인계 염료, 킬레이트된 란탄계 염료, 및 BODIPY[®]계 염료 (Molecular Probes, Inc.제)로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 바람직한 구현예에 있어서, 형광 부분은 6-카르복시플루오레세인 (FAMTM) (Integrated DNA Technologies, Inc.제) 이다. 본 발명의 프로브, 방법, 및 키트에 사용될 수 있는 형광 부분의 다른 예는 미국 특허 제 6,406,297 호, 제 6,221,604 호, 제 5,994,063 호, 제 5,808,044 호, 제 5,880,287 호, 제 5,556,959 호, 및 제 5,135,717 호에서 찾을 수 있고, 이들 각각은 그 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된다.
- <163> 다른 구현예에 있어서, 검출가능한 부분은 형광 부분 이외의 검출가능한 부분일 수 있다. 방사성 부분 중에서도, ³²P-표지된 화합물이 바람직하다. 제한없이 당업자에게 공지된 임의의 방법이 프로브에 ³²P 도입에 사용될 수 있다. 예를 들어, 프로브는 키나아제를 사용한 5' 표지에 의해 또는 닉(nick) 번역에 의한 랜덤 삽입에 의해 ³²P 로 표지될 수 있다. 효소인 검출가능한 부분은 통상적으로는 그의 활성화에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어, 알칼리 포스파타아제는 적절한 기질 화합물상에서의 효소 작용에 의해 생성되는 형광을 측정함으로써 검출될 수 있다. 특이적 결합짝 중의 구성원이 검출가능한 부분으로서 사용될 경우, 프로브의 존재는 특이적 결합짝 중의 구성원에 대한 분자의 특이적 결합을 검출함으로써 검출될 수 있다. 예를 들어, 항원이 프로브에 연결될 수 있고, 그 항원에 대해 특이적인 모노클로날 항체가 항원의 존재, 및 그에 따라서 프로브의 존재 검출에 사용될 수 있다.
- <164> 검출가능한 부분으로서 사용될 수 있는 다른 특이적 결합짝으로는, 비오틴 및 아비딘 또는 스트렙타비딘, IgG 및 단백질 A, 및 당업계에 널리 공지된 수많은 다른 수용체-리간드 커플이 포함된다. 형광 부분이 아닌 검출가능한 부분의 다른 예는 미국 특허 제 5,525,465 호, 제 5,464,746 호, 제 5,424,414 호, 및 제 4,948,882 호에서 찾을 수 있고, 이들 각각은 그 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된다.
- <165> 동일 표지가 몇가지 상이한 양태에서 작용할 수 있기 때문에, 검출가능한 부분의 상기 기재는 다양한 표지를 명확한 부류로 범주화하는 것을 의미하지는 아니한다. 예를 들어, ¹²⁵I 가 방사성 부분으로서 또는 전자밀집 시약으로서 작용할 수 있다. 서양고추냉이 퍼옥시다아제가 효소 또는 단일클론 항체용 항원으로서 작용할 수 있다. 또한, 목적하는 효과를 위해 다양한 검출가능한 부분을 조합할 수 있다. 예를 들어, 프로브를 비오틴으로 표지할 수 있고, 그의 존재를 ¹²⁵I 로 표지된 아비딘 또는 서양고추냉이 퍼옥시다아제로 표지된 항비오틴 단일클론 항체로 검출할 수 있다. 다른 변경 및 가능성은 당업자에게 명백할 것이고, 본 발명의 범주 내에 있는 등가사항으로 간주된다.
- <166> 물론, 검출가능한 부분을 프로브에 연결 또는 융합하는 방법은 사용되는 검출가능한 부분 또는 부분들의 유형

및 프로브상의 검출가능한 부분 위치에 의존한다.

- <167> 검출가능한 부분은 다양한 기술에 의해 직접 또는 간접적으로 프로브에 부착될 수 있다. 사용되는 검출가능한 부분의 정확한 유형에 따라, 검출가능한 부분이 프로브의 5' 또는 3' 말단에 위치할 수 있거나, 프로브의 뉴클레오타이드 서열에 내부적으로 위치할 수 있거나, 또는 다양한 크기 및 조성의 스페이서 암 (spacer arm) 에 부착하여 신호 상호작용을 용이하게 할 수 있다. 시판되는 포스포라미디트 시약을 사용하여, 적절히 보호된 포스포라미디트를 경유하여 임의의 종결부에 관능기 (예컨대, 티올 또는 1급 아민)를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 제조할 수 있고, 예를 들어 [PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis 등 편저, Academic Press, Inc., 1990]에 기재된 프로토콜을 사용하여 상기에 검출가능한 부분을 부착할 수 있다.
- <168> 하나 이상의 슬퍼드릴, 아미노 또는 히드록실 부분을 올리고뉴클레오타이드 프로브 서열 내, 통상적으로 5' 종결부에 도입하기 위한 올리고뉴클레오타이드 관능화 시약의 도입 방법은 미국 특허 제 4,914,210 호에 기재되어 있다. 폴리뉴클레오타이드 키나아제 및 [감마-³²P]ATP 를 사용하여 리포터(reporter) 기를 제공함으로써 5' 포스페이트기를 방사성 동위원소로서 도입할 수 있다. 합성 동안에 도입되는 아미노티미딘 잔기 또는 알킬아미노 연결부를 비오틴의 N-히드록시숙신아미드 에스테르와 반응시킴으로써 비오틴을 5' 말단에 첨가할 수 있다. 형광 부분을 포함하는 검출가능한 부분을 프로브에 부착하는 다른 방법은 미국 특허 제 5,118,802 호에서 찾을 수 있고, 이는 그 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된다.
- <169> 또한, 목적하는 부분, 예컨대 코르디세핀(cordycepin) ³⁵S-dATP, 및 비오틴닐화된 dUTP 를 첨가하기 위해 예를 들어 폴리뉴클레오타이드 종말 트랜스퍼라아제를 이용함으로써 프로브의 3' 종결부에 검출가능한 부분을 부착하는 것도 가능하다.
- <170> 또한, 올리고뉴클레오타이드 유도체도 본 발명의 프로브, 방법 및 키트에서 사용될 수 있는 검출가능한 부분이다. 예를 들어, 에테노-dA 및 에테노-A 가 올리고뉴클레오타이드 프로브에 혼입될 수 있는 공지된 형광 아데닌 뉴클레오타이드이다. 유사하게, 에테노-dC 가 프로브 합성에서 사용될 수 있는 다른 유사체이다. 상기와 같은 뉴클레오타이드 유도체를 포함하는 프로브가 분해되어, 예를 들어 폴리머라아제의 5' 내지 3' 뉴클레아제 활성에 의해 온전한 (intact) 프로브보다 훨씬 더욱 강한 형광이 있는 모노뉴클레오타이드를 방출할 수 있다.
- <171> 본 발명의 특정 구현예에 있어서, 프로브는 하나 초과와 검출가능한 부분으로 표시될 수 있다. 상기와 같은 특정 구현예에 있어서, 각 검출가능한 부분은 프로브의 상이한 염기에 개별적으로 부착될 수 있다. 다른 구현예에 있어서, 하나 초과와 검출가능한 부분이 프로브의 동일 염기에 부착될 수 있다.
- <172> 특정 구현예에 있어서, 검출가능한 부분은 프로브의 5' 말단에 부착될 수 있다. 다른 구현예에 있어서, 검출가능한 부분은 프로브의 5' 말단으로부터 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 약 35, 또는 약 40 잔기 이내에 있는 잔기에서 프로브에 부착될 수 있다. 특정 구현예에 있어서, 검출가능한 부분은 프로브의 3' 말단에 부착될 수 있다. 다른 구현예에 있어서, 검출가능한 부분은 프로브의 3' 말단으로부터 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 약 35, 또는 약 40 잔기 이내에 있는 잔기에서 프로브에 부착될 수 있다. 검출가능한 부분은 프로브 잔기의 임의의 부분에 부착될 수 있다. 예를 들어, 검출가능한 부분은 프로브내 뉴클레오타이드의 당, 포스페이트, 또는 염기 부분에 부착될 수 있다. 다른 구현예에 있어서, 검출가능한 부분은 프로브의 두 잔기 사이에 부착될 수 있다.
- <173> 본 발명의 특정 구현예에 있어서, 프로브는 형광 부분 및 소광제 (quencher) 부분을 포함할 수 있다. 상기 구현예에 있어서, 형광 부분은 전술한 바와 같은 당업자에게 공지된 임의의 형광 부분일 수 있다. 또한, 소광제 부분은 제한없이 당업자에게 공지되어 있는 임의의 소광제 부분일 수 있다. 특정 구현예에 있어서, 소광제 부분은 플루오레세인계 염료, 폴리할로플루오레세인계 염료, 헥사클로로플루오레세인계 염료, 쿠마린계 염료, 로다민계 염료, 시아닌계 염료, 옥사진계 염료, 티아진계 염료, 스쿠아레인계 염료, 킬레이트된 란탄계 염료, BODIPY®계 염료, 및 비형광 소광제 부분으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 특정 구현예에 있어서, 비형광 소광제 부분은 BHQ™ 계 염료(WO 01/86001 에 기재된 소광제를 포함함), Iowa Black™ 또는 Dabcyl (Integrated DNA Technologies, Inc. 제)일 수 있다. 구체적인 소광제 부분의 다른 예로는 예를 들어, TAMRA (N,N,N',N'-테트라메틸-6-카르복시로다민) (Molecular Probes, Inc. 제), DABCYL (4-(4'-디메틸아미노페닐아조)벤조산), Iowa Black™ (Integrated DNA Technologies, Inc. 제), Cy3™ (Integrated DNA Technologies, Inc. 제) 또는 Cy5™ (Integrated DNA Technologies, Inc. 제)가 포함되며, 이에 제한되지는 아니한다. 바람

직한 구현예에 있어서, 소광제 부분은 Cy5TM이다. 본 발명의 프로브, 방법, 및 키트에서 사용될 수 있는 소광제 부분의 다른 예는 미국 특허 제 6,399,392 호, 제 6,348,596 호, 제 6,080,068 호, 및 제 5,707,813 호에서 찾을 수 있고, 각각은 그 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된다.

<174> 특정 구현예에 있어서, 소광제 부분은 프로브의 3' 말단에 부착될 수 있다. 다른 구현예에 있어서, 소광제 부분은 프로브의 5' 말단으로부터 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 약 35 또는 약 40 잔기인 잔기에서 프로브에 부착될 수 있다. 특정 구현예에 있어서, 소광제 부분은 프로브의 3' 말단에 부착될 수 있다. 다른 구현예에 있어서, 소광제 부분은 프로브의 3' 말단으로부터 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 약 35 또는 약 40 잔기 이내에 있는 잔기에서 프로브에 부착될 수 있다. 바람직한 구현예에 있어서, 형광 부분은 프로브의 5' 말단에 부착되고 소광제 부분은 프로브의 5' 말단의 약 9 잔기 이내에 있는 잔기에 부착된다. 소광제 부분은 프로브의 잔기의 임의 부분에 부착될 수 있다. 예를 들어, 소광제 부분은 프로브내 뉴클레오티드의 당, 포스페이트, 또는 염기 부분에 부착될 수 있다. 다른 구현예에 있어서, 소광제 부분은 프로브의 두 잔기 사이에 부착될 수 있다.

<175> 임의의 특정 이론 또는 작용 메커니즘에 구속되고자 함이 없이, 프로브가 온전한 경우, 형광 부분에 의해 방출되는 광양자가 흡수되어, 소광제 부분에 의해 켄칭될 수 있다고 여겨진다. 그 후, 소광제 부분은 상이한 파장의 광양자로서 또는 열로서 광양자의 에너지를 방출한다. 이에, 소광제 부분도 또한 형광 부분일 수 있다. 전술한 바와 같이, 상기 현상은 형광 공명 에너지 전이 ("FRET")로 칭해진다. 형광 부분과 소광제 사이에 프로브를 가르는 것이 소광제 부분에 의한 형광 부분의 방출된 형광의 켄칭을 감소시킨다.

<176> 통상적으로, 형광 부분과 소광제 부분 사이의 에너지 전이는 형광 부분과 소광제 부분 사이의 거리 및 특정의 형광 부분-소광제 부분 쌍의 임계 전이 거리에 좌우된다. 임계 전이 거리는 소정의 소광제 부분과 쌍을 이룬 소정의 형광 부분에 대해 특징적이고 일정하다. 또한, 소광제 부분과 관련하여 형광 부분의 공간 관계는 형광부분-소광제 부분 쌍의 임계 전이 거리가 형광 부분과 소광제 부분 사이의 거리에 근접할 경우 더욱 민감하게 결정될 수 있다. 따라서, 당업자는 프로브상에서 소광제 부분으로부터 형광 부분을 분리하는 거리에 근접한 임계 전이 거리를 갖도록 형광 부분과 소광제 부분을 선택할 수 있다. 특정 형광 부분-소광제 부분 쌍의 임계 전이 거리는 당업계에 널리 공지되어 있고, 예를 들어, 논문 [Wu 및 Brand, 1994, Anal. Biochem. 218:1-13]에서 찾을 수 있고, 이는 그 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된다.

<177> 특정 형광 부분-소광제 부분 쌍 부문에 대한 다른 범주로는, 예를 들어 형광 부분에 의한 형광 방출의 양자 수율, 형광 부분에 의해 방출된 형광의 파장; 소광제 부분의 흡광 계수; 존재할 경우, 소광제 부분에 의해 방출되는 형광의 파장; 및 존재할 경우, 소광제 부분에 의한 형광 방출의 양자 수율이 포함된다. 부가적으로, 소광제 부분이 또한 형광 부분인 경우, 소광제 부분과 형광 부분은 바람직하게는 어느 하나에 의해 방출되는 형광이 다른 하나에 의해 방출되는 형광과 용이하게 식별될 수 있도록 선택될 수 있다. 또한, 특정 형광 부분-소광제 부분 쌍의 선택에 대한 지침은 리뷰 논문인 [Klostermeier 및 Millar, 2002, Biopolymers 61:159-179]에서 찾을 수 있고, 이는 그 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된다.

<178> 본 발명의 본 양상에서 사용될 수 있는 형광 부분과 소광제 부분의 예시적 조합으로는, 형광 부분 로다민 590 및 소광제 부분 크리스탈 바이올렛이 포함되나, 이에 한정되지는 아니한다. 형광 및 소광제 부분의 바람직한 조합은 형광 부분 6-카르복시플루오레세인 및 소광제 부분 Cy5TM이다. 본 발명의 프로브, 방법, 및 키트에서 사용될 수 있는 형광 부분-소광제 부분 쌍의 다른 예는 미국 특허 제 6,245,514 호에서 찾을 수 있고, 이는 그 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된다.

<179> FRET 에서 형광 또는 소광제 부분 모두로서 사용될 수 있는 분자의 예로는 플루오레세인, 6-카르복시플루오레세인, 2',7'-디메톡시-4',5'-디클로로-6-카르복시플루오레세인, 로다민, 6-카르복시로다민, 6-카르복시-X-로다민, 및 5-(2'-아미노에틸)아미노나프탈렌-1-술폰산 (EDANS)이 포함된다. 형광 부분이 공여자인지 또는 수여자인지 여부는 그의 흡수 및 방출 스펙트럼 및 그와 쌍을 이룬 형광 부분에 의해 정의된다. 예를 들어, FAMTM 이 488 nm 파장의 광을 가장 효율적으로 흡수하고, 500 내지 650 nm 의 스펙트럼을 갖고 525 nm에서 최대 방출하는 광을 방출한다. 따라서, FAMTM 은 예를 들어, 소광제 부분으로서 514 nm에서 최대 흡수하는 TAMRA 와 함께 사용하기에 적합한 형광 부분이다.

<180> 일부 구현예에 있어서, 하기의 프로브 변이체가 사용된다:

- <181> FGGACTAGAIGGTTAGAGGAGACCCCGCGGP (서열 번호 28의 변이체);
- <182> FGGAEUAGAIGGUUAGAGGAGAEEEEGEGGP (서열 번호 28의 변이체);
- <183> FGGGTCTCCITCTAACCTCTAGTCCTTCCCCCP (서열 번호 70의 변이체);
- <184> FGGGUEUEEIEUEAACCTCTAGTCCTTCCCCCP (서열 번호 70의 변이체); 및
- <185> FGGTCTAGAIGGTTAGAGGAGACCCTCCAGP (서열 번호 25의 변이체). 상기 프로브 모두에 있어서, F = CY5; I = FAM; P = PO₄; U = 프로피닐 dU; E = 5-메틸-dC 이다.

<186> **3.3. 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 검출가능한 구성원의 핵산**

<187> 본 발명의 프라이머, 프로브, 방법, 및 키트는 플라비바이러스 속의 특정 구성원의 검출에 유용하다. 특히, 상기 프라이머, 프로브, 방법, 및 키트는 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원 검출에 유용하다. 예를 들어, 본 발명에 따라 검출될 수 있는 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원으로는, 일본 뇌염 바이러스, 웨스트 나일 바이러스, 무레이 밸리 뇌염 바이러스, SLEV, 및 쿤진 바이러스가 포함되나, 이에 제한되지는 아니한다. 몇몇 예에 있어서, 이들 바이러스 중 일부의 균주 하나 이상의 완전한 서열이 결정되었다. 이들 서열은 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 갖는 일본 뇌염 바이러스 혈청군 구성원의 핵산 서열이 정렬되어 있는 도 4에 있는 GenBank 등록번호를 참조하여 찾을 수 있다. 도 4에 있는 등록 번호에 의해 확인되는 각 플라비바이러스 계통의 핵산 서열은 그 전체가 본원에 참고문헌으로 포함된다.

<188> 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 다른 구성원, 예컨대 카시파코어 바이러스(Cacipacore virus), 세인트 루이스 뇌염 바이러스(St. Louis encephalitis virus), 우수투 바이러스(Usutu virus), 및 유엔테 바이러스(Youende virus)의 계통의 완전한 핵산 서열은 아직 결정되지 않았다. 그럼에도 불구하고, 본 발명의 프라이머와 프로브는 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 모든 구성원과 고도의 보존성을 갖고 서열에 혼성화한다고 여겨진다. 또한, 당업자는, 이들 바이러스 계통의 핵산 서열의 결정이 후속될, 아직 서열분석되지 아니한 구성원 중의 하나로부터의 핵산에 프라이머와 프로브가 혼성화할 수 있다는 것을 용이하게 인식할 수 있다.

<189> 특정 구현예에 있어서, 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산이 검출될 수 있다. 다른 구현예에 있어서, 일본 뇌염 바이러스의 핵산이 검출될 수 있다. 다른 구현예에 있어서, 웨스트 나일 바이러스의 핵산이 검출될 수 있다. 또다른 구현예에 있어서, 쿤진 바이러스의 핵산이 검출될 수 있다. 또다른 구현예에 있어서, 무레이 밸리 뇌염 바이러스의 핵산이 검출될 수 있다. 또다른 구현예에 있어서, SLEV의 핵산이 검출될 수 있다. 또다른 구현예에 있어서, 일본 뇌염 바이러스, 웨스트 나일 바이러스, SLEV 또는 무레이 밸리 뇌염 바이러스의 핵산이 검출될 수 있다.

<190> 검출될 핵산은 본원에 개시된 바와 같은 검출가능한 플라비바이러스로부터의 임의의 핵산일 수 있다. 통상적으로, 검출될 플라비바이러스가 플러스가닥 단일가닥 RNA 계통을 갖기 때문에, 상기 핵산은 단일가닥 RNA 일 것이다. 그러나, 또한 검출될 핵산은 검출될 수 있는 플라비바이러스의 RNA 계통에 대한 서열에 대응하는 DNA 일 수 있다. 상기와 같은 DNA는 예를 들어, 하기 4.1절에서 개시된 바와 같은 바이러스 RNA를 역전사함으로써 제조될 수 있다.

<191> 검출가능한 플라비바이러스의 핵산의 존재는 제한없이 당업자에게 공지되어 있는 임의의 공급원으로부터의 시료에서 검출될 수 있다. 예를 들어, 바이러스의 핵산은 전술한 바와 같이, 생물학적 시료에서 검출될 수 있다. 바이러스의 핵산은 척추 동물, 예컨대 어류, 양서류, 파충류, 조류, 및 포유류, 및 무척추 동물, 예컨대 곤충류, 갑각류, 거미류 등을 포함하는 임의의 천연 공급원으로부터의 시료에서 검출될 수 있다. 부가적으로, 시험될 시료는 무생물 공급원, 예컨대 물 또는 토양 시료 또는 스윙프(swipe) 시료로부터의 것일 수 있고, 이와 같은 것은 표면을 시험하여 얻어진다.

<192> 본 발명의 특정 구현예에 있어서, 검출될 핵산은 당업자에게 공지된 방법에 따라서 증폭될 수 있다. 상기 증폭은 본원에 기재된 방법에 따른 검출 이전에 수행될 수 있거나, 또는 상기 증폭은 본원에 기재된 바와 같은 검출과 동시에 수행될 수 있다. 핵산의 증폭 방법은 하기 기재되며, 예를 들어, [Saiki 등, 1988, Science 239:487-91]에 기재되어 있고, 상기의 내용은 그 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된다.

<193> **3.4. 다른 검출가능한 플라비바이러스의 핵산**

<194> 본 발명의 프로브, 방법 및 키트는 또한, 탱기 바이러스, 몬타나 미요티스 백질뇌염 바이러스, 모독 바이러스, 및 황열 바이러스를 포함하나 이에 제한되지는 아니하는 다른 플라비바이러스로부터의 핵산을 검출에 사용될 수

있다. 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원과 마찬가지로, 상기 바이러스 중 소정 균주 하나 이상의 핵산 서열이 결정되었다. 이들 서열은 서열 번호 16 을 갖는 상기 검출가능한 플라비바이러스의 핵산 서열 정렬을 제시하는 도 5 에 있는 등록번호를 참조하여 찾을 수 있다. 도 5 에 있는 GenBank 등록번호에 의해 확인되는 각 플라비바이러스 게놈의 핵산 서열은 그 전체가 본원에 참고문헌으로 포함된다.

<195> 본원에서 논의된 바와 같이, 프라이머 서열 번호: 41, 서열 번호: 42, 서열 번호: 43, 서열 번호: 44, 서열 번호: 45, 서열 번호: 46, 서열 번호: 47, 서열 번호: 48, 서열 번호: 49, 서열 번호: 50, 서열 번호: 51, 서열 번호: 52, 서열 번호: 53, 서열 번호: 54, 및 서열 번호: 55 이 댕기 바이러스의 증폭 및/또는 검출에 유용하고, 프라이머 서열 번호: 56, 서열 번호: 57, 서열 번호: 58, 서열 번호: 59, 서열 번호: 60, 서열 번호: 61, 서열 번호: 62, 및 서열 번호: 63 이 황열 바이러스의 증폭 및/또는 검출에 유용하다.

<196> 3.5. 상이한 바이러스 변이체 또는 상이한 바이러스를 검출하기 위한 다중 증폭 반응

<197> 본 발명의 프라이머 및 프로브를 반응에서 조합하여, 하나 초과 바이러스 핵산을 검출할 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에 있어서, 상이한 바이러스 변이체 (예컨대, 단독 프라이머 또는 프라이머 쌍에 의해서는 검출되지 아니하거나 오직 열악하게 검출될 것)를 검출에 사용하기 위하여, 다중 업스트림 및/또는 다중 다운스트림 프라이머를 한 반응 혼합물에서 조합한다. 일부 구현예에 있어서, 다중 업스트림 및/또는 다중 다운스트림 프라이머는 하나의 반응 혼합물에서 조합되어 하나 초과 바이러스를 검출한다. 그와 같은 구현예에 있어서, 검출될 각 바이러스에 대해 특이적인 프라이머가 반응 혼합물에 포함되고, 이에 의해 시료에 존재하는 각 바이러스 핵산의 증폭이 허용된다. 예를 들어, 어떠한 바이러스의 검출을 목적하는가에 따라, 웨스트 나일 바이러스, SLEV, 댕기 바이러스 및 황열 바이러스의 증폭을 위한 프라이머의 임의 조합물이 포함될 수 있다. 단독 반응을 사용한 다중 바이러스 검출이, 예를 들어, 혈액 공급물을 스크리닝할 때 또는 검출할 필요가 있는 임의 바이러스로의 오염물이 있는 모든 다른 경우에 있어서 유용하다.

<198> 본 발명의 프로브가 전술한 반응에 있어서 사용될 수 있다. 목적하는 결과에 따라, 임의의 가능한 바이러스 핵산 생성물을 검출할 수 있는 단독 프로브가 사용될 수 있다. 대안적으로는, 각 가능한 바이러스 핵산 생성물에 특이적으로 혼성화하는 상이한 프로브가 사용될 수 있다. 상기와 같은 경우에 있어서, 각 프로브를 갖는 상이한 검출 표지를 이용하여, 바이러스 핵산 생성물을 구별하는 것이 유용할 수 있다.

<199> 일부 구현예에 있어서, 전술한 성분을 사용한 다중 바이러스 핵산을 검출하기 위해 다중 PCR (multiplex PCR) 이 사용될 수 있다. 다중 PCR 은 동일 반응에 있어서 다중 폴리뉴클레오티드 단편이 증폭 및/또는 검출되게 한다. 예컨대 다음을 참조한다: [PCR Primer, A Laboratory Manual (Dieffenbach 편저, 1995) Cold Spring Harbor Press, 157-171 페이지].

<200> 일부 구현예에 있어서, 웨스트 나일 바이러스 및 SLEV 모두를 검출하기 위한 프라이머가 사용된다. 일부 구현예에 있어서, 웨스트 나일 바이러스, SLEV, 및 댕기 바이러스의 검출을 위한 프라이머가 사용된다. 일부 구현예에 있어서, 웨스트 나일 바이러스, SLEV, 및 황열 바이러스의 검출을 위한 프라이머가 사용된다. 일부 구현예에 있어서, 웨스트 나일 바이러스, SLEV, 황열 및 댕기 바이러스의 검출을 위한 프라이머가 사용된다. 일부 경우에 있어서, 다중 반응은 본원에 기재된 바와 같은 프로브 하나 이상을 추가로 포함한다.

<201> 4. 일본 뇌염 혈청군의 구성원 및 특정의 다른 플라비바이러스의 핵산의 검출 및/또는 정량 방법.

<202> 특정 국면에 있어서, 본 발명은 특정 플라비바이러스의 핵산을 검출하기 위한 핵산 프라이머 및 프로브의 이용 방법을 제공한다. 다른 국면에 있어서, 본 발명은 시료 중 특정 플라비바이러스의 핵산을 정량하기 위한 핵산 프라이머 및 프로브의 사용 방법을 제공한다. 제한없이 당업자에게 공지되어 있는 핵산을 검출하기 위한 핵산 프라이머 및 프로브의 임의 사용 방법이, 전술한 바와 같이 검출가능한 플라비바이러스의 핵산 검출에 사용될 수 있다. 특정 구현예에 있어서, 상기 방법은, 프라이머 및 프로브를 사용하여 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산을 검출하는 것을 제공한다. 다른 구현예에 있어서, 상기 방법은, 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산을 검출하기 위해 두 프라이머 및 프로브를 사용하는 것을 제공한다. 또다른 구현예에 있어서, 상기 방법은, 후술하는 바와 같이, 특정 플라비바이러스를 검출하기 위해 프로브를 사용하는 것을 제공한다.

<203> 4.1. 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산을 검출 및/또는 정량화하기 위한, 5' 뉴클레아제 반응에 근거한 분석법

<204> 본 발명의 특정 국면에 있어서, 상기 방법은 프라이머 및 프로브를 사용하여 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산을 검출하는 것을 포함한다. 상기 방법은 통상적으로 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산에 혼성화된 프라이머를 5' 뉴클레아제 활성이 있는 효소와 접촉시키는 것을 포함한다. 그 후, 5' 뉴클레아

제 활성이 있는 효소는 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산에 혼성화된 프로브를 5' 뉴클레아제 반응에서 절단한다. 상기 프로브는 프로브의 절단을 검출가능케 하는 검출가능한 부분으로 표지될 수 있다.

상기와 같은 방법은 미국 특허 제 6,214,979 호, 제 5,804,375 호, 제 5,487,972 호 및 제 5,210,015 호에 기재된 것에 근거한 것이고, 상기 각각은 그 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된다.

<205> 5' 뉴클레아제 반응에 있어서, 핵산, 프라이머 및 프로브는 제한없이 당업자에게 공지되어 있는 5' 내지 3' 뉴클레아제 활성을 갖는 임의의 효소와 접촉될 수 있다. 바람직하게는, 폴리머라아제가 프로브를 절단하고 핵산으로부터 다수개의 프로브 단편을 방출하게 하도록 조건을 선택한다. 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 바람직한 효소로는, 템플레이트 의존성 핵산 폴리머라아제가 포함된다. 상기와 같은 폴리머라아제의 공지된 천연 및 재조합 형태로는, 예를 들어, 대장균 DNA 폴리머라아제 I (Fermentas, Inc. 제, Hanover, MD 소재), 바실러스 스테아로테르모필러스(*Bacillus stearothermophilus*) DNA 폴리머라아제, 및 테르모코쿠스 리토랄리스(*Thermococcus littoralis*) DNA 폴리머라아제가 포함된다.

<206> 바람직한 구현예에 있어서, 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소는 열안정성 및 열활성 핵산 폴리머라아제이다. 상기 열안정성 폴리머라아제로는, 진정박테리아 속의 다양한 종, 테르무스(*Thermus*), 테르마토가(*Thermatoga*), 및 테르모시포(*Thermosipho*) 유래의 폴리머라아제의 천연 및 재조합 형태가 포함되나, 이에 제한되지는 아니한다. 예를 들어, 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 테르무스 종 폴리머라아제로는, 각각 그 전문이 본원에 참고문헌으로 포함되는 미국 특허 제 5,405,774 호, 제 5,352,600 호, 제 5,079,352 호, 제 4,889,818 호, 제 5,466,591 호, 제 5,618,711 호, 제 5,674,738 호, 및 제 5,795,762 호에 기재된 바와 같은, 테르무스 아쿠아티쿠스(*Thermus aquaticus*) (Taq) DNA 폴리머라아제, 테르무스 테르모필러스(*Thermus thermophilus*) (Tth) DNA 폴리머라아제, 테르무스 종 Z05 (Z05) DNA 폴리머라아제, 및 테르무스 종 sps17 (sps17)가 포함된다. 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 테르마토가 폴리머라아제로는, 예를 들어, 테르마토가 마리티마(*Thermatoga maritima*) DNA 폴리머라아제 및 테르마토가 네아폴리타나(*Thermatoga neapolitana*) DNA 폴리머라아제가 포함되고, 사용될 수 있는 테르모시포 폴리머라아제의 예는 테르모시포 아프리카누스(*Thermosipho africanus*) DNA 폴리머라아제이다. 테르마토가 마리티마 및 테르모시포 아프리카누스 DNA 폴리머라아제의 서열은, 그 전문이 본원에 참고문헌으로 포함되는 공보 번호 WO 92/06200 인 국제 특허 출원 제 PCT/US91/07035 호에 간행되어 있다. 테르마토가 네아폴리타나의 서열은 국제 특허 공보 제 WO 97/09451 호에서 찾을 수 있고, 이는 그 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된다.

<207> 5' 뉴클레아제 반응은, 프라이머와 프로브가 핵산에 혼성화하는 조건 하에서, 검출될 핵산을 프라이머, 프로브, 및 5' 내지 3' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소와 접촉시키는 것을 포함한다. 5' 뉴클레아제 반응의 성분들은 검출될 핵산과 임의의 순서로 접촉할 수 있고, 예를 들어, 프라이머를 검출될 핵산과 먼저 접촉시킨 후 프로브 및 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소를 접촉시킬 수 있거나, 또는 대안적으로는 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소를 검출될 핵산과 먼저 접촉시킨 후 프로브 및 프라이머를 접촉시킬 수 있다. 특정 구현예에 있어서, 하나 초과인 프라이머 또는 프로브가 5' 뉴클레아제 반응에 첨가될 수 있다. 특정의 바람직한 구현예에 있어서, 프라이머의 쌍이 5' 뉴클레아제 반응에서 핵산과 접촉할 수 있다. 프라이머는 DNA 합성 반응을 프라이밍할 수 있는 임의의 프라이머일 수 있다. 오직 하나의 프라이머를 사용하는 경우, 프라이머는 프로브의 핵산 업스트림에 혼성화하여야 하는데, 즉, 프라이머의 3' 말단이 프로브의 5' 말단을 향해야 한다. 프라이머의 3' 말단을 프로브의 5' 말단에 인접하여 혼성화할 수 있고, 또는 프라이머의 3' 말단을 프로브의 5' 말단의 더 먼 업스트림에 혼성화할 수 있다. 하나 초과인 프라이머를 사용할 경우, 하나 이상의 프라이머가 전술한 바와 같이, 프로브의 업스트림에 있는 검출될 핵산에 혼성화하여야 한다.

<208> 본 발명의 5' 뉴클레아제 반응의 특정 구현예는 당업자에게 공지된 몇가지 5' 뉴클레아제 반응을 근거로 한다. 상기 반응의 예는 예를 들어, 미국 특허 제 5,210,015 호에 상세히 기재되어 있고, 상기의 내용은 그 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된다.

<209> 간략하게, 5' 뉴클레아제 반응에 있어서, 프라이머 및 프로브가 핵산의 가닥에 혼성화하는 조건 하에서, 표적 핵산이 프라이머 및 프로브와 접촉된다. 또한, 핵산, 프라이머 및 프로브는 5' 내지 3' 뉴클레아제 활성을 갖는 효소, 예를 들어 핵산 폴리머라아제와 접촉된다. 5' 내지 3' 뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 폴리머라아제는 프라이머의 다운스트림 핵산에 혼성화된 프로브를 절단할 수 있다. 프라이머의 3' 말단은 핵산 폴리머라아제에 의해 템플레이트 핵산에 기초한 새로운 핵산의 확장을 위한 기질을 제공한다. 폴리머라아제가 새로운 핵산을 신장시키면, 이는 프로브의 5' 말단과 만나고, 프로브로부터 단편을 절단하기 시작한다.

<210> 프라이머와 프로브는, 이들이 표적 핵산에 서로 근접하게 혼성화하여, 프라이머의 3' 말단에 대한 핵산 폴리머

라아제의 결합이 프로브의 5' 말단과 접촉하게 하도록 고안될 수 있다. 이 과정에 있어서, 핵산 확장은 핵산 폴리머라아제가 절단을 완결할 위치에 놓이도록 할 것을 요구하지는 아니한다. 용어 "중합 독립적 절단"은 상기 과정을 지칭한다.

- <211> 대안적으로, 프라이머 및 프로브를 핵산의 공간적으로 더욱 멀리 있는 영역에 어닐링하는 경우, 핵산 폴리머라아제가 프로브의 5' 말단을 만나기 전에 핵산 확장이 일어나야 한다. 중합을 계속함에 따라, 폴리머라아제는 프로브의 5' 말단으로부터 점진적으로 단편을 절단한다. 상기 절단은 프로브의 나머지가 템플레이트 분자로부터 해리할 정도로 불안정화되는 때까지 계속한다. 용어 "중합 의존적 절단"은 상기 과정을 지칭한다.
- <212> 중합 독립적 절단의 한가지 장점은 핵산 증폭화에 대한 필요를 제거함에 있다. 프라이머 확장의 부재에 있어서, 핵산의 가닥은 실질적으로 단일가닥화되어 있다. 프라이머와 프로브가 핵산에 인접하게 결합되면, 올리고뉴클레오타이드 어닐링 및 단편의 절단의 순차적 일주가 일어날 수 있다. 이에, 충분한 양의 프로브가 단편화되어 검출가능한 신호를 생성할 수 있고, 이에 의해, 중합의 부재 중에서의 검출을 허용한다.
- <213> 어느 과정에 있어서도, 핵산을 함유하는 시료가 제공된다. 핵산이 이중가닥화된 것인 경우, 먼저, 이를 변성, 예를 들어, 핵산의 가닥들을 서로 분리시켜야 한다. 제한없이 당업자에게 공지되어 있는, 물리적, 화학적, 또는 효소적 수단을 포함하는 임의의 적합한 변성 방법이 핵산 가닥 분리에 사용될 수 있다. 가닥 분리를 위한 바람직한 물리적 수단은 그것이 완전히 (>99%) 변성될 때까지 핵산을 가열하는 것이다. 통상적인 열 변성은 약 10 초 내지 약 10 분 동안, 약 80℃ 내지 약 105℃ 범위의 온도를 수반한다. 변성에 대한 대안으로서, 핵산은 시료 중에서 단일가닥화된 형태로, 예컨대 단일가닥화된 RNA 또는 DNA 바이러스로 존재할 수 있다.
- <214> 본 발명의 프라이머, 프로브, 방법, 및 키트로 검출될 수 있는 바이러스는 단일가닥화된 플러스가닥 RNA 바이러스라는 점을 주목해야 한다. 따라서, 천연 바이러스 게놈의 변성은 비중폭 바이러스 게놈 검출에 요구되지 않는다. 그러나, 하기 기재된, 본 발명의 특정 구현예에 따라 천연 바이러스 게놈이 DNA 로 역전사될 경우, 본 발명의 프라이머 및 프로브를 사용한 검출 이전에 증폭 바이러스 핵산의 변성이 필요하다.
- <215> 검출될 핵산이 RNA 인 경우, RNA 는 전술한 바와 같이 5' 뉴클레아제 반응을 위한 RNA 템플레이트로서 사용될 수 있거나, 또는 RNA 는 cDNA 로의 역전사를 위한 템플레이트로서 사용될 수 있거나, 또는 상기 두가지가 동시적일 수 있다. 특정 구현예에 있어서, RNA 는 본 발명의 방법을 사용하여 cDNA 로의 역전사없이 검출될 수 있다. 전술한 바와 같은 중합 독립적 절단은 상기와 같은 구현예에 특히 적합하다. 다른 구현예에 있어서, 먼저, RNA 는 프로브의 부재 중에 cDNA 로 역전사될 수 있고, 그 후, cDNA 생성물이 본 발명의 방법에 따라 검출될 수 있다. 또다른 구현예에 있어서, RNA 는 프로브의 존재 하에 역전사될 수 있고, 동시에, 후속하여 증폭 및/또는 검출될 수 있는 cDNA 를 생성하고, 본원에 기재된 바와 같이 프로브의 절단을 평가함으로써 RNA 의 존재성을 검출할 수 있다.
- <216> RNA 가 프로브의 부재 중에 역전사될 경우, RNA 는 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해 cDNA 로 역전사될 수 있다. 그 후, 상기의 역전사 생성물은 본원에 기재된 방법에 따라 임의의 검출가능한 핵산과 마찬가지로 검출될 수 있다.
- <217> RNA 가 프로브의 존재 하에 역전사될 경우, DNA 가닥 합성을 위한 템플레이트로서 RNA 를 사용할 수 있는 5'-3' 뉴클레아제 활성을 갖는 DNA 폴리머라아제에 의해 RNA 가 역전사될 수 있다. 모든 공지된 DNA 폴리머라아제 합성 활성과 마찬가지로, 상기 합성은 프라이머, 예컨대 본원에 기재된 것들의 존재를 필요로 한다. RNA 를 템플레이트로 사용할 수 있는 DNA 폴리머라아제는 바람직하게는 열안정성이므로, 변성 및 DNA 합성의 다중 사이클이 폴리머라아제의 파괴없이 일어날 수 있다. 또한, 역전사에 사용되는 DNA 폴리머라아제는 바람직하게는 또한 DNA 템플레이트를 사용하여 DNA 를 합성할 수 있다. 상기 폴리머라아제는 예를 들어, 미국 특허 제 6,468,775 호 (카르복시도테르무스 히드로젠포르만스 (*Carboxydotherrmus hydrogenformans*) DNA 폴리머라아제), 제 5,968,799 호 (테르모시포 아프리카누스 DNA 폴리머라아제), 제 5,736,373 호 (바실루스 팔리두스 (*Bacillus pallidus*) DNA 폴리머라아제), 제 5,674,738 호 (테르무스 종 Z05 DNA 폴리머라아제), 및 제 5,407,800 호 (테르무스 아쿠아티쿠스 및 테르무스 테르모필러스 DNA 폴리머라아제)에 기재되어 있고, 상기 각각은 그 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된다. 부가적으로, 역전사 활성을 갖는 열안정성 DNA 폴리머라아제를 사용하여 RNA 를 역전사하기 위한 방법 및 조성물이 미국 특허 제 5,693,517 호, 제 5,561,058 호, 제 5,405,774 호, 제 5,352,600 호, 제 5,310,652 호, 및 제 5,079,352 호에 기재되어 있고, 상기 각각은 그 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된다.

- <218> RNA 또는 DNA 어느 것이건, 변성된 핵산 가닥은 그 후, 프라이머와 프로브가 핵산 가닥에 결합하게 할 수 있는 혼성화 조건 하에서 프라이머 및 프로브와 접촉된다. 특정 구현예에 있어서, 두 프라이머가 핵산을 증폭화 하는데 사용될 수 있다. 상기 구현예에 있어서, 확장이 일어난 후에는 하나의 프라이머로부터 합성된 확장 생성물이 그의 템플레이트 (상보물)로부터 분리되어 다른 프라이머의 확장을 위한 템플레이트로서 작용하여 정해진 길이의 증폭 생성물을 산출할 수 있도록, 두 프라이머가 핵산을 따라 상대적으로 위치하게 두 프라이머를 선택할 수 있다. 생성물의 길이는 두 프라이머 사이의 서열 길이 및 두 프라이머 자체의 길이에 좌우된다.
- <219> 상보적 가닥은 프로브 또는 프라이머보다 통상적으로 더 길기 때문에, 상기 가닥은 더욱 많은 접촉지점을 가지며, 이에따라 임의의 소정 기간에 걸쳐 서로 발견 및 결합할 기회가 더 많다. 높은 초과 몰량의 프로브 및 프라이머는, 템플레이트의 재어닐링보다는 프라이머와 프로브의 어닐링 쪽으로 평형이 이동하는 것을 돕는다.
- <220> 프라이머는 중합 시약의 존재 하에 신장 생성물의 합성을 충분히 길게 프라이밍해야 한다. 프라이머의 정확한 길이와 조성은, 어닐링 반응의 온도, 프라이머의 공급원과 조성, 프라이머 어닐링 부위에 대한 프로브 어닐링 부위의 근접도, 및 프라이머:프로브 농도비를 포함하는 수많은 인자에 좌우될 수 있다. 예를 들어, 비록 그보다 더 적은 또는 더 많은 뉴클레오티드를 포함할 수도 있지만, 서열의 복잡성에 따라, 올리고뉴클레오티드 프라이머는 통상적으로 약 15 ~ 30개 뉴클레오티드를 포함한다. 프라이머는 그의 개별 가닥 및 형태 안정성 이중나선에 선택적으로 어닐링하기에 충분히 상보적이어야 한다.
- <221> 각 프라이머는 핵산 가닥에 "실질적으로" 상보적이라도 선택될 수 있다. 프라이머는 템플레이트의 정확한 서열을 반영할 필요는 없지만, 적절한 반응 조건 하에서 각 개별 가닥에 선택적으로 혼성화하기에 충분히 상보적이어야 한다. 프라이머가 그의 템플레이트 가닥과 함께 안정한 이중나선을 형성하기에 충분한 상보성을 유지한다면, 비상보적 염기 또는 더욱 긴 서열이 프라이머에 산재될 수 있거나 또는 프라이머의 말단에 위치할 수 있다. 프라이머의 비상보적 뉴클레오티드 서열은 제한 효소 부위를 포함할 수 있다. 임의의 비상보적 뉴클레오티드 서열은 바람직하게는 프라이머의 3' 말단에 없다.
- <222> 폴리머라아제가 핵산과 프라이머를 결합하고 검출가능한 핵산의 템플레이트에 기초하여 프라이머로부터 새로운 핵산 가닥의 확장을 시작하기 이전에, 프로브가 바람직하게는 검출될 핵산에 혼성화한다. 프로브가 검출가능한 핵산과 접촉하기 이전에 폴리머라아제가 프라이머와 검출될 핵산을 결합하는 것이 가능하나, 상기 배열은, 후술된 바와 같은 바람직한 PCR 기초 5' 뉴클레아제 반응에서처럼 프라이머 확장의 다중 사이클이 수행되지 아니한다면 프로브 단편화를 감소시킬 수 있다. 따라서, 폴리머라아제에 의한 프라이머 확장을 시작하기 이전에 프로브가 검출될 핵산에 혼성화하는 것이 바람직하다.
- <223> 프라이머 확장 중합이 상기 이중나선 영역에 도달하기 이전에 또는 폴리머라아제가 중합 독립적 과정에서 엽스트림 올리고뉴클레오티드에 부착하기 이전에 프로브가 검출가능한 핵산에 혼성화할 경향을 증진시키기 위해, 당업자에게 공지된 다양한 기술이 이용될 수 있다. 예를 들어, 핵산과 함께 충분히 안정한 혼성화 복합체를 형성하기 위해, 짧은 프라이머 분자는 통상적으로 더욱 냉온을 요구한다. 따라서, 프로브가 프라이머 어닐링에 비해 더욱 고온에서 핵산에 우선적으로 어닐링하도록 프로브를 프라이머보다 더욱 길게 설계할 수 있다.
- <224> 또한, 그들의 뉴클레오티드 조성에 근거하여 차별적인 열안정성을 갖는 프라이머 및 프로브를 사용할 수 있다. 예를 들어, 프로브는 더욱 높은 G/C 함량을 가지면, 결과적으로 프라이머보다 더욱 큰 열안정성을 갖도록 선택될 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 하나 이상의 개질된, 비표준 또는 유도화된 DNA 염기를 프라이머 또는 프로브에 혼입하여, 오직 통상적인 DNA 염기만을 갖는 프라이머 또는 프로브와 비교시 열안정성이 더욱 크도록 또는 더욱 작도록 할 수 있다. 상기와 같은 개질된, 비표준 또는 유도화된 염기의 예는 미국 특허 제 6,320,005 호, 제 6,174,998 호, 제 6,001,611 호, 및 제 5,990,303 호에서 찾을 수 있고, 상기 각각은 그 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된다.
- <225> 또한, 프로브 및 프라이머의 차별적인 열안정성의 장점을 이용하기 위해, 반응 온도를 또한 변화시킬 수 있다. 예를 들어, 전술한 바와 같은 고온에서의 변성에 이어, 프라이머가 아닌 프로브가 결합되도록 하는 중간 온도에서 반응을 인큐베이션할 수 있고, 이어서, 프라이머 어닐링 및 후속하는 확장을 허용하도록 하기 위해 추가적으로 온도를 감소시킬 수 있다.
- <226> 높은 초과 몰량의 프로브 대 프라이머 농도가 또한 프라이머 이전에 프로브의 결합이 우선적으로 선호되게 하기 위하여 사용될 수 있다. 상기와 같은 프로브 농도는 통상적으로 0.5 내지 5×10^{-7} M 인 개별 프라이머 농도보다 통상적으로 약 2 내지 20배 더 높은 범위 내에 있다.

- <227> 올리고뉴클레오타이드 프라이머(들)의 템플레이트 의존성 확장은 적절한 염, 금속 양이온, 및 pH 완충계로 이루어진 반응 매질 중에서, 상기 논의된 바와 같이, 적당량의 4가지 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트 (dATP, dGTP, dCTP, 및 dTTP) 또는 유사체, 예를 들어 dUTP의 존재 하에 DNA 폴리머라아제에 의해 촉매화된다. 적합한 중합제는 프라이머 및 템플레이트 의존성 DNA 합성을 촉매화하고 5' 내지 3' 뉴클레아제 활성을 갖는다고 공지된 효소이다. 상기 효소로는 예를 들어, 대장균 DNA 폴리머라아제 I, 테르무스 테르모필러스 DNA 폴리머라아제, 바실러스 스테아로테르모필러스 DNA 폴리머라아제, 테르모코쿠스 리토랄리스 DNA 폴리머라아제, 테르무스 아쿠아티쿠스 DNA 폴리머라아제, 및 Z05 DNA 폴리머라아제가 포함된다. 추가로, 상기 DNA 폴리머라아제를 이용한 DNA 합성 수행을 위한 반응 조건은 당업계에 널리 공지되어 있다. 본 발명의 방법에 유용하게 하기 위해서는, 중합 시약은 올리고뉴클레오타이드를 유효하게 절단할 수 있는 5' 뉴클레아제 활성을 보유해야 하며, 표지된 절편을 방출하여 검출가능한 시그널이 직접적으로 또는 간접적으로 발생되도록 해야 한다.
- <228> 상기 합성 산물은 템플레이트 가닥 및 프라이머 신장 가닥으로 이루어진 이중 분자이다. 상기 합성의 부산물은 모노-, 디- 및 올리고-뉴클레오타이드 절편의 혼합물로 이루어질 수 있는 프로브 절편이다. 바람직한 구현예에서, 변성, 프로브 및 프라이머 어닐링 및 프라이머 신장의 반복 사이클 및 프로브 제거가 수행될 수 있어, 프라이머에 의해 한정되는 증폭 영역의 기하급수적 축적 및 표지된 분절의 기하급수적 생성을 초래한다. 상기 반복되는 열 사이클링은 일반적으로 당업계에 폴리머라아제 연쇄 반응 (PCR)으로서 공지되어 있다. 충분한 사이클이 수행되어 양성 반응, 즉 검출할 핵산이 존재하는 것을 음성 반응, 즉 검출할 핵산이 존재하지 않는 것으로부터 구분할 만큼 충분한 양의 프로브 절편을 제공할 수 있다. 일반적으로, 양성 반응은 음성 반응에 비해 엄청나게 큰 시그널을 나타낸다.
- <229> 특정 바람직한 구현예에서, PCR 반응은 열안정성 효소를 이용하는 자동화된 공정으로서 수행된다. 상기 공정에서, 반응 혼합물은 변성 단계, 프로브 및 프라이머 어닐링 단계 및 합성 단계를 통해 사이클링됨으로써, 제거 및 전치가 프라이머 의존성 템플레이트 신장과 동시에 발생한다. 열 사이클러, 예컨대 ABI 3700 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)는, 열안정성 효소 사용에 특이적으로 고안되어 이용될 수 있다. 본 발명의 특별한 상기 구현예에서, 검출될 핵산은 검출가능하게 표지된 프로브의 부재 하에 증폭될 수 있으며, 이후 별도 반응에서 증폭 산물을 검출한다. 대안적으로는, 검출될 핵산은 프로브의 존재 하에 증폭된 후, 단일 반응에서 증폭 및 검출을 가능하게 한다.
- <230> 열안정성 폴리머라아제가 상기 자동화된 공정에서 바람직한데, 이는 이중 가닥의 상기 신장 산물의 바람직한 변성 방법이 이들을 PCR 사이클 동안 고온 (약 95°C)에 노출시키는 것이기 때문이다. 예를 들어, U.S. 특허 4,889,818에서는 테르무스 아쿠아티쿠스 (*Thermus aquaticus*)에서 분리된 대표적인 열안정성 효소를 개시한다. 추가적인 대표적 열안정성 폴리머라아제에는, 예를 들어 열안정성 박테리아 테르무스 플라부스 (*Thermus flavus*), 테르무스 루베르 (*Thermus ruber*), 테르무스 테르모필러스 (*Thermus thermophilus*), 바실러스 스테아로테르모필러스 (*Bacillus stearothermophilus*) (열거된 기타의 것보다 약간 더 낮은 온도 최적점을 가짐), 테르무스 락테우스 (*Thermus lacteus*), 테르무스 루벤스 (*Thermus rubens*), 테르모토가 마리티마 (*Thermotoga maritima*), 테르모코쿠스 리토랄리스 (*Thermococcus littoralis*), 메타노테르무스 페르비두스 (*Methanothermus fervidus*) 및 피로코쿠스 푸리오수스 (*Pyrococcus furiosus*) (Stratagene, La Jolla, CA)가 포함된다. 상기 기재된 바와 같이, 특정한 상기 열안정성 폴리머라아제는 RNA 템플레이트로부터 DNA를 합성할 수 있다. RNA 분자가 본 발명의 방법에 따라 검출하려는 경우, RNA 템플레이트로부터 DNA를 합성할 수 있는 DNA 폴리머라아제, 즉 역전사 활성을 가진 것이 이용되어야 한다.
- <231> 다른 국면에서, 본 발명의 방법은 또한 시료 내의 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산의 양 정량에 이용될 수 있다. 상기 방법에서, 상기 기재된 바와 같은 5' 뉴클레아제 반응이 수행되며, 형광 산물의 양이 정량된다. 형광의 양은 제한없이 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해 정량될 수 있다. 특정 구현예에서, 발광된 형광의 양은 플루오로미터 (fluorometer)를 이용하여 정량될 수 있다. 상기 형광의 양은 대조군 반응에 의해 발광된 형광의 양과 대조할 수 있다. 대조군 반응은 바람직하게는 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산의 공지된 양을 가진 시료와 동일한 시약 및 동일한 시간을 이용하여 수행된다. 대안적으로는, 형광 부분에 의해 발광된 형광의 양은 바이러스 핵산 농도에 대해 작성된 표준 곡선과 대조될 수 있다. 대표적인 표준 곡선은 도 6에 나타났다. 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산의 정량에서의 추가적인 안내사항은 공개된 US 특허 2002-0058262 및 유럽 특허 1 138 780 및 1 138 784에서 찾을 수 있다.
- <232> **4.2. 하나 이상의 프라이머 및 프로브를 이용하는 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산 검출을 위한 기타 방법**

- <233> 상기 기재된 5' 뉴클레아제 반응에 더하여, 본 발명은 추가로 하기 기재된, 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산 검출에 이용될 수 있는 다른 방법을 제공한다.
- <234> 특정 구현예에서, 핵산 검출을 위해 2 개의 핵산 프라이머 및 핵산 프로브를 이용하는, 당업자에게 공지된 임의의 방법이 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산 검출에 이용될 수 있다. 섹션 3.1 및 3.2 에 기재된 핵산 프라이머 및 프로브는 제한없이 임의의 상기 공지된 방법에 이용될 수 있다. 바이러스 핵산 검출에 이용될 수 있는 예시적인 증폭 반응에는, 예를 들어 폴리머라아제 연쇄 반응 (PCR) 및 리가아제 연쇄 반응 (LCR) (U.S. 특허 4,683,195 및 4,683,202; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis 등, eds, 1990) 를 참조), 가닥 전치 증폭 (SDA) (Walker, 등 *Nucleic Acids Res.* 20(7):1691-6 (1992); Walker *PCR Methods Appl* 3(1):1-6 (1993)), 전사 매개 증폭 (Phyffer, 등, *J. Clin. Microbiol.* 34:834-841 (1996); Vuorinen, 등, *J. Clin. Microbiol.* 33:1856-1859 (1995)), 핵산 서열 기준 증폭 (NASBA) (Compton, *Nature* 350(6313):91-2 (1991), 롤링 씨클 증폭 (RCA) (Lisby, *Mol. Biotechnol.* 12(1):75-99 (1999)); Hatch 등, *Genet. Anal.* 15(2):35-40 (1999)), 분지화 DNA 시그널 증폭 (bdNA) (예를 들어, Iqbal 등, *Mol. Cell Probes* 13(4):315-320 (1999) 을 참조) 및 Q-베타 레플리카아제 (Lizardi 등, *Bio/Technology* 6:1197 (1988)) 가 포함된다.
- <235> 상기 방법의 한 가지 예시는, 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산 증폭 및 분자 표지인 프로브를 이용한 핵산의 존재성 검출이다. 상기 프로브는 헤어핀을 형성할 수 있는 상보적인 서열에 근접한 것에 혼성화할 수 있는 표적 인식 서열을 포함한다. 상기 분자 표지는 프로브의 반대쪽 말단에 형광 부분 및 소광제 부분을 갖는다. 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산에 대한 분자 표지의 혼성화는 형광 부분의 검출이 가능하도록 소광제 부분으로부터 형광 부분을 분리시켜, 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산 존재성을 밝혀낸다. 본 발명의 임의의 프로브가, 헤어핀 구조를 형성할 수 있는 것으로서 당업자가 인지하는 프로브의 5' 및 3' 말단 상에 여러 잔기를 추가하여 상기 방법에 이용될 수 있다. 분자 표지의 선별 및 이용에 대한 추가적인 안내사항은 [Tyagi and Kramer, 1996, *Nat. Biotechnol.* 14:303-308] 에 의한 논문에서 찾을 수 있으며, 상기 문헌은 전부 본원에 참고문헌으로 포함된다.
- <236> 또다른 구현예에서, 본 발명의 2 개의 프라이머 및 프로브는 핵산 서열 기준 증폭을 이용하여 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산 검출에 이용될 수 있다. 핵산 서열 기준 증폭 (NASBA) 은 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산 검출에 이용될 수 있는 조야한 (robust) 증폭 기술이다. NASBA 방법에서, 3 가지의 효소가 이용되며, 여기에는 역전사효소, T7 RNA 폴리머라아제 및 RNase H 가 포함된다. 최종적인 증폭 산물은 검출할 핵산의 것과는 반대의 극성을 가진 단일 가닥의 RNA 이다. 증폭된 RNA 산물은, 루테늄 표지 검출자 프로브와 전기 화학적 발광 (ECL) 을 측정할 수 있는 기기 (NucliSens Reader; bioMerieux) 를 연결하는 자성 입자에 결합된 표적 특이적 포획 프로브를 이용하여 검출될 수 있다. 대안적으로, NASBA 에 의해 증폭된 RNA 는 상기 기재된 바와 같이 증폭 반응에서 분자 표지 프로브를 포함함으로써 실시간으로 특이적으로 검출될 수 있다. 본 발명의 프라이머 및 프로브 이용에 대한 추가적인 안내사항은 [Compton, 1991, *Nature* 350:91-92] 및 [Kievits 등, 1991, *J. Virol. Methods* 35:273-86] 에 의한 논문에서 찾을 수 있으며, 상기 문헌은 각각 전부 본원에 참고문헌으로 포함된다.
- <237> 상기 방법의 다른 예시에는 상기에 집중적으로 기재된 5' 뉴클레아제 반응이 포함된다. 상기 방법의 또다른 예시에는 본 발명의 2 개의 프라이머를 이용한 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산 증폭 후 본 발명의 프로브로 증폭된 핵산을 검출하는 방법이 포함된다. 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산 검출을 위해 당업자가 채택하거나 또는 이용될 수 있는 상기 방법의 또다른 예시는 US 특허 6,403,339, 6,329,152, 5,952,202 및 5,387,510 에서 찾을 수 있으며, 이들은 각각 전부 본원에 참고 문헌으로 포함된다.
- <238> 다른 구현예에서, 핵산 검출을 위해 핵산 프라이머 및 핵산 프로브를 이용하는, 당업자에게 공지된 임의의 방법이 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산 검출을 위해 이용될 수 있다. 섹션 3.1 및 3.2 에 기재된 핵산 프라이머 및 프로브는 제한없이 당업자에게 공지된 임의의 방법에 이용될 수 있다. 특정의 상기 방법에서, 당업자는 본 발명의 프라이머가 프로브로 이용될 수 있으며 본 발명의 프로브가 프라이머로서 이용될 수 있다는 것을 인지할 것이다.
- <239> 예를 들어, 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산은 고체 지지체에 결합된 본 발명의 프라이머에 혼성화할 수 있다. 이어서, 본 발명의 검출가능하게 표지된 프로브는 검출될 핵산에 혼성화하여, 핵산의 존재성을 나타낸다. 대안적으로는, 상기 프로브는 고체 지지체에 결합하여 핵산 포획에 이용될 수 있으며, 이어서 상기 프라이머는 검출가능하게 표지될 수 있고 핵산에 혼성화함으로써, 핵산의 존재성을 나타낸다. 고체상에

결합된 프로브 이용 방법은 US 5,232,829 및 EP 420 260 에 개시되어 있다.

- <240> 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산 검출을 위한 핵산 프라이머 및 프로브를 이용하는 방법의 또다른 예시는 나노입자의 이용을 수반한다. 상기 방법에서, 검출될 핵산의 상이한 영역에 혼성화할 수 있는 2 개의 올리고뉴클레오타이드, 예컨대 본발명의 프라이머 또는 프로브는 나노입자에 공유결합으로 결합될 수 있다. 상기 나노입자는 혼성화 조건 하에 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산과 접촉된다. 상기 핵산이 존재하는 경우, 상기 핵산은 나노입자에 결합된 올리고뉴클레오타이드에 결합하여, 검출될 수 있는 큰 분자량의 복합체를 제공할 것이다. 상기 복합체는 제한없이 당업자에게 공지된 임의의 방법으로 검출할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 복합체는 복합체 침전에 의해 검출된다. 본 발명의 프라이머 및 프로브와 연관된 나노입자 이용 방법에 관한 추가적인 안내사항은 [Taton 등, 2000, Science 289(5485):1757-60] 및 US 특허 6,506,564, 6,495,324, 6,417,340, 6,399,303 및 6,361,944 에서 찾을 수 있다.
- <241> 또다른 예시에서, 롤링 썬클 증폭 ("RCA") 가 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산 검출 방법의 일부로서 이용될 수 있다. RCA 방법의 특정 구현예에서, DNA 썬클은 상보적인 프라이머의 폴리머라아제 신장에 의해 증폭된다. 본 발명의 임의의 프라이머 또는 프로브는 상기 방법에서 이용될 수 있다. DNA 환형화 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 분자내 라이게이션을 선호하는 조건 하에서의 DNA 분자 말단 상호간의 라이게이션이 포함된다. 이어서, 단일 가닥 산물 콘카타머 (concatamer) 산물이 제한없이 당업자에게 공지된 임의의 핵산 검출 방법으로 검출될 수 있다. 예를 들어, 콘카타머 산물은 본 발명의 검출가능하게 표지된 프로브를 이용하여 검출될 수 있다. 공지된 서열의 핵산 검출 방법의 또다른 예시는 본원에 집중적으로 기재되어 있다. RCA 의 다른 구현예에서, 콘카타머 산물에 상보적인 제 2 프라이머가 이용될 수 있다. 상기 프라이머는 환형 DNA 템플레이트에 존재하는 서열의 지수적인 증폭을 가능하게 한다. 상기 증폭 산물은 역시, 예를 들어 본 발명의 검출가능하게 표지된 프로브를 이용하여 검출될 수 있다. 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산 검출을 위한 RCA 방법에서의 본 발명의 프라이머 및 프로브 이용에 관한 추가적인 안내사항은 US 특허 6,344,329, 6,350,580, 6,221,603, 6,210,884, 5,648,245 및 5,714,320, 및 국제 특허 공보 WO 95/35390 에서 찾을 수 있으며, 이들은 각각 전부 본원에 참고문헌으로 포함된다.
- <242> 상기 방법의 또다른 예시는 상기 기재된 중합 독립적 5' 뉴클레아제 반응이다. 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원을 검출하기 위해 당업자에 의해 채택되거나 또는 이용될 수 있는, 프라이머 및 프로브를 이용하는 방법의 또다른 예시는 US 특허 6,316,200, 6,268,128, 6,180,338, 5,716,784 및 5,573,906 에 기재되어 있으며, 이들은 각각 전부 본원에 참고문헌으로 포함된다.
- <243> 특정 구현예에서, 핵산을 검출하기 위해 핵산을 증폭할 수 있는 2 개의 핵산 프라이머를 이용하는 당업자에게 공지된 임의의 검정법이 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산 검출을 위해 이용될 수 있다. 섹션 3.1 에 기재되어 있는 핵산 프라이머는 제한없이 당업자에게 공지된 임의의 상기 방법에 이용될 수 있다. 추가로, 본 발명의 프로브는 당업자는 특정한 상기 방법에서 프라이머로서 이용될 수 있다는 것을 인식할 것이다.
- <244> 상기 방법의 한 예시에서, 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산은 분자의 5' 말단에 형광 부분 및 소광제 부분을 포함하는 헤어핀 구조를 포함하는 하나 이상의 프라이머를 이용하여 핵산을 증폭시킴으로써 검출될 수 있다. 증폭 산물에 대한 프라이머의 혼입은 이어서 소광제 부분으로부터 형광 부분을 분리할 수 있고, 형광 부분의 검출을 가능하게 한다. 형광 부분의 검출은 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산의 존재성을 밝혀낸다. 당업자라면, 필요한 헤어핀 구조를 형성하도록 프라이머 또는 프로브에 추가적인 잔기를 혼입시킴으로써 상기 방법에서의 본 발명의 프라이머 또는 프로브의 용도를 쉽게 인지할 것이다. 상기 프라이머 및 프로브의 고안 및 선별에서의 추가적인 안내사항은 [Nazerenko 등, 1997, Nucleic Acids Res. 25:2516-2521] 및 [Thelwell 등, 2000, Nucleic Acids Res. 28:3752-3761] 에서 찾을 수 있으며, 이들은 각각 전부 본원에 참고문헌으로 포함된다.
- <245> 상기 방법의 또다른 예시에서, 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산은 표준 전치 증폭 ("SDA") 을 이용하여 검출될 수 있다. 상기 방법에서, 증폭된 일본 뇌염 바이러스 혈청군 핵산은 형광 부분, 소광제 부분 및 상기 두 부분을 분리하는 조작된 제한효소 부위를 포함하는 단일 가닥의 프라이머 혼입에 의해 검출된다. 당업자는 SDA 에 이용하기 위한 임의의 프라이머 또는 프로브를 개질하는 방법을 쉽게 인지할 수 있을 것이다.
- <246> SDA 에서 이용되는 제 1 증폭 반응에서, 상기 프라이머는, 예를 들어 티오-dCTP 의 존재 하에 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산 증폭에 이용됨으로써, 증폭 산물이 프라이머를 혼입시킨다. 이어서, 제한효소 뉴클레아제

가 프라이머 내의 제한효소 부위를 자국내기 (nick) 위해 이용될 수 있다. 상기 제한효소 뉴클레아제는, 증폭 산물에서의 티오-dCTP 의 혼입으로 인해 증폭 산물의 양 가닥을 절단하지는 못한다. 최종적으로 자국 (nick) 내어 만들어진 프라이머의 3' 말단은 신규한 증폭 반응을 프라이밍에 이용됨으로써, 템플레이트 가닥으로부터 가닥 3' 부분을 자국 (nick) 으로 대체할 수 있다. 가닥의 전치는 소광제 부분으로부터 형광 부분을 분리시킴으로써, 형광 부분에 의해 발광되는 형광의 소광을 방지한다. 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산은 이로써 형광의 존재성 및/또는 정량으로써 검출될 수 있다. SDA 용 프라이머 및 프로브의 선별 및 개질에 대한 추가적인 안내사항은 [Little 등, 1999, Clin. Chem. 45:777-784] 및 US 특허 6,528,254 및 6,528,632 에서 찾을 수 있으며, 이들 각각은 전부 본원에 참고문헌으로 포함된다.

<247> 또다른 예시에서, 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산은 전사 매개 증폭 ("TMA") 을 이용하여 검출될 수 있다. TMA 는 검출할 핵산 증폭을 위해 RNA 폴리머라아제 및 역전사효소를 이용하는 RNA 전사 증폭 시스템이다.

상기 방법에서, RNA 폴리머라아제에 대한 프로모터를 갖는 본 발명의 프라이머는 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 RNA 의 역전사 프라이밍에 이용된다. 이어서, 역전사효소의 RNA 분해효소 활성은 RNA 템플레이트를 분해하여, cDNA 가닥을 방출한다. 제 2 가닥 합성은 본 발명의 제 2 프라이머를 이용하여 프라이밍되며, 역전사효소에 의해 촉매화된다. 이어서, RNA 폴리머라아제는 제 2 가닥에서 합성된 프로모터를 인식하며, 제 2 가닥 유래의 RNA 전사의 다중 싸이클을 촉매한다. 상기 RNA 산물은 이어서 검출되거나 또는 증폭의 또다른 국면을 위해 템플레이트로서 제공된다.

<248> 이어서, TMA 의 RNA 산물은 당업자에게 공지된 임의의 방법으로 검출될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 RNA 산물은 본 발명의 프로브로 검출될 수 있다. 다른 구현예에서, 상기 RNA 산물은 아크리딘-에스테르 표지 (Gen-Probe, Inc., San Diego, CA)로 표지된 본 발명의 프로브로 검출될 수 있다. 상기 표지는 혼성화되지 않은 프로브로부터 화학적으로 제거될 수 있으며, 동시에 혼성화된 프로브 상의 표지는 제거되지 않은 채 남게 된다. 이에 따라, 상기 구현예에서, 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산의 존재성은 아크리딘-에스테르 표지의 존재성 검출에 의해 검출될 수 있다. TMA-기초 방법에서의 본 발명의 프라이머 및 프로브 이용에서의 추가적인 안내사항은 [Arnold 등, 1989, Clin. Chem. 35:1588-1594, Miller 등, 1994, J. Clin. Microbiol. 32:393-397] 및 US 특허 6,335,166 및 6,294,338 에서 찾을 수 있고, 이들은 각각 전부 본원에 참고문헌으로 포함된다.

<249> 또다른 예시에서, 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산은 진단 PCR 에 의해 검출될 수 있다. 상기 방법에서, 검출할 핵산의 존재성은 PCR 산물의 성공적인 템플레이트 의존성 증폭에 의해 표시된다. 일반적으로, PCR 산물의 동정은 PCR 산물의 크기로부터 결정될 수 있으며; 검출할 핵산의 성공적인 증폭은 일반적으로 공지된 크기의 PCR 산물을 제공한다. PCR 산물과 같은 핵산의 크기 결정 방법은 당업계에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어 다른 것들 중에서도 특히 겔 및 모세관 전기영동이 포함된다.

<250> PCR 산물의 성공적인 증폭을 검출하여 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 존재성을 밝혀내는 기타 방법에는, 비특이적 DNA 결합 염색제를 이용하는 것이 포함된다. 예를 들어, SYBR Green (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) 는 증폭 반응에 포함될 수 있으며, 이는 PCR 동안 생성된 임의의 이중 가닥 DNA 의 검출 및 정량을 가능하게 한다. 상기 방법의 예시는 US 특허 6,323,337 및 5,863,753 에서 찾을 수 있으며, 이들은 각각 전부 본원에 참고문헌으로 포함된다.

<251> 최종적으로, 일본 바이러스 혈청군의 구성원 검출을 위해 본 발명의 프라이머 및 프로브를 이용하기 위한 당업자에게 의해 채택되거나 또는 이용될 수 있는 기타 방법은 US 특허 6,528,632, 6,475,729, 6,361,944, 6,329,152, 6,270,967, 6,258,546, 6,063,603, 6,057,099, 6,040,166, 5,914,230, 5,843,650, 5,747,255, 5,747,251, 5,731,146, 5,712,386, 5,635,347, 5,554,517, 5,409,818, 5,384,242, 4,965,188, 4,868,104, 4,800,159, 및 4,683,195 에 기재되어 있으며, 이들은 각각 전부 본원에 참고문헌으로 포함된다.

<252> 다른 구현예에서, 핵산 검출을 위해 핵산에 혼성화할 수 있는 단일 핵산 프라이머 또는 프로브를 이용하는, 당업자에게 공지된 임의의 검정법이 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산 검출을 위해 이용될 수 있다. 섹션 3.1 및 3.2 에 기재되어 있는 핵산 프라이머 및 프로브는 제한없이 당업자에게 공지된 임의의 방법에서 이용될 수 있다. 추가로, 당업자는 본 발명의 프라이머가 프로브로 이용될 수 있고, 본 발명의 프로브가 상기 기재된 특정 방법에서는 프라이머로서 이용될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

<253> 예를 들어, 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산은 프라이머 신장 반응을 개시하기 위해 프라이머를 이용해 검출될 수 있다. 핵산 폴리머라아제에 의한 프라이머의 성공적인 신장은 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산의 존재성을 표시한다. 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 존재성을 표시하는 프라이머

신장 산물은 당업자에게 공지된 임의의 방법으로 검출될 수 있다. 예를 들어, 상기 프라이머 신장 반응은 ³²P-표지 또는 형광으로 표지된 뉴클레오타이드를 혼입할 수 있다.

<254> 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원을 검출하기 위해 당업자에 의해 채택되거나 또는 기재된 바와 같이 이용될 수 있는 방법을 기재한 단일 프라이머 또는 프로브 검출 방법의 기타 예시는, US 특허 6,440,707, 6,379,888, 6,368,803, 6,365,724, 6,361,944, 6,352,827, 6,326,145, 6,312,906, 6,268,128, 6,261,784, 6,177,249, 6,140,055, 6,130,047, 6,124,090, 6,121,001, 6,110,677, 6,054,279, 6,022,686, 5,981,176, 5,958,700, 5,945,283, 5,935,791, 5,919,630, 5,888,739, 5,888,723, 5,882,867, 5,876,924, 5,866,336, 5,856,092, 5,853,990, 5,846,726, 5,814,447, 5,808,036, 5,800,989, 5,795,718, 5,792,614, 5,710,028, 5,683,875, 5,683,872, 5,679,510, 5,641,633, 5,597,696, 5,595,890, 5,571,673, 5,547,861, 5,525,462, 5,514,546, 5,491,063, 5,437,977, 5,294,534, 5,118,605, 5,102,784, 4,994,373, 4,851,331, 4,767,700 및 4,683,194 에 서 찾을 수 있으며, 이들 각각은 전부 본원에 참고문헌으로 포함된다.

<255> 상기 인용된 특정 US 특허는 1 또는 2 개의 프라이머 또는 1 또는 2 개의 프라이머 및 프로브를 이용할 수 있는 방법을 개시한다. 상기 기재사항은 상기 방법을 한정하려는 의미는 아니다. 예를 들어, 단일 프라이머를 이용하여 핵산을 검출하기 위한 방법을 제공하는 것으로, US 특허에 제공된, 2 개의 프라이머를 이용하는 핵산 검출 방법이 또한 참고문헌으로서 포함되며, 본 발명의 프라이머, 프로브 및 키트와 이용될 수 있다.

<256> **4.3. 프로브를 이용한, 일본 뇌염 혈청군의 구성원 및 특정한 기타 플라비바이러스의 핵산 검출 방법.**

<257> 상기 기재된 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산 검출을 위한 검정법에 추가하여, 본 발명은 추가로 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원 및 기타 플라비바이러스의 핵산 검출 방법을 제공한다. 상기 방법에 따라 검출될 수 있는 플라비바이러스는 상기 섹션 3.4 에 기재되어 있다.

<258> 특정 구현예에서, 핵산 검출을 위해 핵산 프로브를 이용하는 당업자에게 공지된 임의의 방법이 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원 및 특정한 기타 플라비바이러스의 핵산 검출을 위해 이용될 수 있다. 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원 및 특정한 기타 플라비바이러스의 핵산 검출에 이용될 수 있는 핵산 프로브는 상기 섹션 3.2 에 기재되어 있다.

<259> 특정 구현예에서, 본 발명의 프로브는, 상기 프로브가 시료 내에 존재하는 바이러스 서열에 결합하는지 여부를 측정함으로써 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원 및 특정한 기타 플라비바이러스의 핵산의 바이러스 서열이 시료 내에 존재하는지 여부 결정에 이용될 수 있다. 예를 들어, 상기 검출은 도트 블랏 포맷을 이용하여 달성될 수 있다. 도트 블랏 포맷에서, 표지되지 않은 증폭된 시료는 멤브레인과 같은 고체 지지체에 고정시키고, 상기 멤브레인을 적합한 혼성화 조건 하에 표지된 프로브와 인큐베이션시키고, 혼성화되지 않은 프로브는 세척하여 제거하고, 결합된 프로브의 존재성에 대해 필터를 모니터링한다. 다중의 시료를 단일 프로브로 분석하는 경우, 도트 블랏 포맷이 꽤 유용하다. 다수의 시료를 단일 멤브레인 상의 분리된 위치에 고정시켜 프로브의 용액에 상기 멤브레인을 침잠시킴으로써 동시에 혼성화할 수 있다.

<260> 다수의 상이한 프로브가 이용될 경우 꽤 유용한 대안적인 방법은 "역" 도트 블랏 포맷으로, 여기서 증폭된 서열은 표지를 포함하고, 상기 프로브는 고체 지지체에 결합된다. 상기 포맷은, 시료 상에서 동시에 수행될 일련의 방법들 중 하나로서 본 발명의 검정 방법이 이용되는 경우 유용하다. 상기 포맷에서, 표지되지 않은 프로브는 멤브레인에 결합되어, 적당하게 엄격한 혼성화 조건 하에 표지된 시료에 노출된다. 이어서, 혼성화되지 않은 표지된 시료는 적당히 엄격한 조건 하에 세척하여 제거되고, 이후 필터는 결합된 서열의 존재성에 대해 모니터링된다.

<261> 정방향 및 역방향 도트 블랏 검정법은 모두 마이크로타이터 플레이트에서 편리하게 수행될 수 있으며; 1989 년 9 월 29 일에 출원된 US 특허 출원 414,542 의 연속 출원인 (CIP), 1991 년 5 월 3 일에 출원된 US 특허 출원 695,072, 등록 US 특허 5,232,829 를 참조할 수 있으며, 이들은 각각 전부 본원에 참고문헌으로서 포함된다. 상기 프로브는, 예를 들어 마이크로리터 플레이트에 결합되어 프로브를 고정시킨 소 혈청 알부민 (BSA) 에 결합될 수 있다.

<262> 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원 및 플라비바이러스의 핵산 검출을 위한 프로브 이용 방법의 또다른 예시는 U.S. 특허 6,383,756 에 기재되어 있으며, 이는 멤브레인에 결합된 핵산 검출 방법을 제공하고, 본원에 전부 참고문헌으로 포함된다.

<263> 또다른 예시에서, 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산은 분지형의 DNA 근거 방법을 이용하여 검출될 수

있다. 상기 방법에서, 텐드리머 단량체는 각 가닥의 중심 부분에 위치한 서열 상보성 영역을 공유하는 2 개의 DNA 가닥으로 구축된다. 2 개의 가닥이 어닐링하여 단량체를 형성하는 경우, 수득되는 구조는 4 개의 단일 가닥 말단에 의해 경계지어지는 이중 가닥의 중심을 갖는다. 상기 단량체의 단일 가닥 말단의 서로간 혼성화에 의해 텐드리머가 단량체로부터 조립될 수 있으며, 동시에 다수의 단일 가닥 말단이 여전히 유리되어 있게 된다. 상기 유리된 단일 가닥 말단은 본 발명의 임의의 프라이머 또는 프로브의 서열을 가질 수 있다.

텐드리머는, 본 발명의 프로브와 관련하여 상기 기재된 바와 같이, 제한없이 당업자에게 공지된 임의의 검출 가능한 부분으로 검출가능하게 표지될 수 있다.

<264> 이어서, 텐드리머는 하기 기재되는 도트 블랏 검정에서 프로브로서 이용될 수 있다. 추가로, 텐드리머는 프로브가 직접 검출되는, 당업자에게 공지된 임의의 방법에서 프로브로서 이용될 수 있다. 프로브는, 도트 블랏 또는 서던 혼성화과 같이 임의의 후속적인 반응 또는 개질없이 프로브의 존재성이 측정될 수 있는 경우 직접 검출된다. 일본 뇌염 혈청군의 구성원 또는 기타 검출가능한 플라비바이러스의 핵산을 검출하기 위한 프로브로서의 텐드리머의 선별 및 용도에 대한 추가적인 안내사항은 U.S.특허 6,261,779 및 [Nilsen 등, 1997, J. Theoretical Biology 187: 273-284], [Capaldi 등, 2000, Nucleic. Acids Res., 28(7): 21e], [Wang 등, 1998, J. Am. Chem. Soc. 120: 8281-8282] 및 [Wang 등, 1998, Electroanalysis 10(8): 553-556] 에서 찾을 수 있을 것이며, 이들은 각각 전부 본원에 참고문헌으로서 포함된다.

<265> 당업자는, 본 발명의 프로브가, 본 발명의 프로브로 검출될 수 있는 바이러스에 선택적으로 혼성화하는 임의의 프라이머와 병용될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 따라서, 본 발명의 프로브 및 검출가능한 플라비바이러스에 선택적으로 혼성화하는 임의의 프라이머를 병용하여 검출가능한 플라비바이러스를 검출하는 방법은 본 발명의 범위에 있는 것으로 의도된다.

<266> 상기 섹션 4.2 에 기재된 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산 검출에 이용될 수 있는 단일한 프라이머 또는 프로브를 이용하는 임의의 방법은, 상기 섹션 3.4 에 기재된 기타 플라비바이러스 검출을 위해 본 발명의 프로브와 함께 이용될 수 있다.

<267> 5. 키트

<268> 또다른 국면에서, 본 발명은 일본 뇌염 바이러스 혈청군 구성원 및/또는 특정한 기타 플라비바이러스의 검출에 이용될 수 있는 키트를 제공한다. 본 발명의 키트로 검출될 수 있는 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원은 상기 섹션 3.3 에 기재되어 있으며, 동시에 본 발명의 키트로 검출될 수 있는 기타 플라비바이러스의 핵산은 상기 섹션 3.4 에 기재되어 있다.

<269> 특정 구현예에서, 상기 키트는 본 발명의 프로브를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 키트는 본 발명의 프라이머를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 키트는 본 발명의 하나 이상의 프라이머 및 프로브의 조합을 포함한다.

<270> 예를 들어, 한 구현예에서 상기 키트는 서열 번호 1 의 핵산에 혼성화하는 제 1 핵산 프라이머 및 서열 번호 9 의 핵산에 혼성화하는 제 2 핵산 프라이머를 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 키트는 서열 번호 29, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 32, 서열 번호 33, 서열 번호 34, 서열 번호 35, 서열 번호 36, 서열 번호 37, 서열 번호 38, 서열 번호 39, 서열 번호 40 또는 그의 상보물에 혼성화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 프라이머 (예를 들어, 하나 이상의 업스트림 및/또는 하나의 다운스트림 프라이머) 를 포함한다. 예시적인 프라이머는 예를 들어 서열 번호 64, 서열 번호 65, 서열 번호 66 및 서열 번호 67 로부터 선택될 수 있다.

<271> 일부 구현예에서, 상기 키트는 서열 번호 41, 서열 번호 42, 서열 번호 43, 서열 번호 44, 서열 번호 45, 서열 번호 46, 서열 번호 47, 서열 번호 48, 서열 번호 49, 서열 번호 50, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 53, 서열 번호 54 또는 서열 번호 55 로부터 선택되는 하나 이상의 업스트림 및/또는 다운스트림 프라이머를 포함한다.

<272> 다른 구현예에서, 상기 키트는 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60, 서열 번호 61, 서열 번호 62 또는 서열 번호 63 로부터 선택되는 하나 이상의 업스트림 및/또는 다운스트림 프라이머를 포함한다.

<273> 상기 기재된 구현예 중 일부에서, 상기 키트는 본원에 기재된 바와 같이 서열 번호 16 의 핵산, 또는 그의 상보물에 혼성화하는 핵산 프로브를 또한 포함한다.

<274> 특정 구현예에서, 상기 키트는 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산 검출을 위한 2 개의 핵산 프라이머

및 핵산 프로브를 포함한다. 본 발명의 키트의 요소가 될 수 있는 핵산 프라이머는 상기 섹션 3.1 에서 집중적으로 기재되어 있으며, 본 발명의 키트의 요소가 될 수 있는 핵산 프로브는 상기 섹션 3.2 에서 집중적으로 기재되어 있다. 상기 프로브는 임의로는 상기 기재된 바와 같이 표지될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 키트는 열안정성 DNA 폴리머라아제를 포함한다. 특정 구현예에서, 열안정성 DNA 폴리머라아제는 역전사 활성을 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 키트는 본 발명의 방법에 따라 검출가능한 플라비바이러스의 핵산 검출을 위한 지시사항을 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 키트는 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원을 검출하기 위한 지시사항을 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 키트는 상기 키트의 요소를 담지하기 위한 하나 이상의 용기를 포함한다.

<275> 특정 구현예에서, 상기 키트는 본 발명의 프라이머를 포함하는 조성물을 포함할 수 있다. 상기 키트는 또한 본 발명의 프로브를 포함하는 조성물을 포함할 수 있다. 상기 키트는 추가로 열안정성 DNA 폴리머라아제를 포함하는 조성물을 포함할 수 있다. 본 발명의 프라이머 또는 프로브 또는 열안정성 DNA 폴리머라아제를 포함하는 조성물은 추가로 부가적인 시약을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물은 조성물의 분해를 방지하는 적합한 보존제, 조성물의 pH 를 조절하는 적합한 완충액, 조성물의 점도 변경을 위한 적합한 희석제 등을 포함할 수 있다.

<276> 상기 키트는 추가적으로 상기에 기재된 바와 같이 5' 뉴클레아제 반응을 수행하기 위한 기타 시약을 포함할 수 있다. 추가로, 상기 키트는 일본 뇌염 바이러스 혈청군 구성원의 핵산의 존재성을 표시하는 절단된 프로브의 검출을 촉진하는 시약을 포함할 수 있다. 정의된 서열의 핵산 검출에 이용될 수 있는 키트는 US 특허 6,514,736, 6,197,563, 6,040,166 및 5,641,864 에 기재되어 있으며, 이들은 각각 전부 본원에 참고문헌으로서 포함된다. 당업자는 본 발명의 범위에 있는 추가적인 키트 고안을 위해 상기 US 특허의 개시된 것을 개질하기 위해 본 발명의 프라이머 및 프로브를 용이하게 이용할 수 있다.

<277> 요약하면, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원 검출 방법에 대한 것이다:

<278> a) 서열 번호 16 의 핵산 또는 그의 상보물에 혼성화하는 검출가능하게 표지된 핵산 프로브, 서열 번호 1 의 핵산 또는 그의 상보물에 혼성화하는 프라이머 및 5'-3' 엑소뉴클레아제 활성이 있는 템플레이트 의존성 핵산 폴리머라아제를, 템플레이트 의존성 핵산 폴리머라아제가 검출가능하게 표지된 핵산 프로브를 절단하도록 하는 조건 하에 시료와 접촉시키는 단계; 및

<279> b) 검출가능하게 표지된 핵산 프로브의 절단을 검출하는 단계로서, 상기 검출가능하게 표지된 프로브의 절단이 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산의 존재성을 표시하는 단계.

<280> 바람직한 구현예에서, 검출가능하게 표지된 프로브는 서열 번호 17, 서열 번호 18, 서열 번호 28 의 임의의 20 개 이상의 연속적인 뉴클레오타이드 또는 그의 상보물을 포함한다. 바람직하게는, 검출가능하게 표지된 프로브는 형광 부분을 포함한다. 상기 형광 부분은 바람직하게는 플루오레신계 염료, 폴리할로플루오레신계 염료, 핵사클로로플루오레신계 염료, 쿠마린계 염료, 로다민계 염료, 시아닌계 염료, 옥사진계 염료, 티아진계 염료, 스쿠아레인계 염료, 킬레이트화 란탄계 염료 및 BODIPY[®] 계 염료로 이루어진 군으로부터 선택된다. 더욱 바람직한 형광 부분은 6-카르복시플루오레신이다.

<281> TaqMan 검정법의 바람직한 구현예에 대하여, 검출가능하게 표지된 프로브는 추가로 소광제 부분을 포함한다. 상기 소광제 부분은 바람직하게는 플루오레신계 염료, 폴리할로플루오레신계 염료, 핵사클로로플루오레신계 염료, 쿠마린계 염료, 로다민계 염료, 시아닌계 염료, 옥사진계 염료, 티아진계 염료, 스쿠아레인계 염료, 킬레이트화 란탄계 염료, BODIPY[®] 계 염료, 염료 및 비형광성 소광제 부분으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

가장 바람직한 소광제 부분은 Cy5[™] 이다. 바람직한 비형광성 소광제 부분은 BHQ[™] 계 염료, Iowa Black[™] 또는 Dabcyl 로 이루어진 군으로부터 선택된다. 가장 바람직한 비형광성 소광제 부분은 BHQ[™]-1, BHQ[™]-2 및 BHQ[™]-3 의 군으로부터 선택된다. TaqMan 검정에서, 5'-3' 뉴클레아제 활성을 가진 템플레이트 의존성 핵산 폴리머라아제에 의한 검출가능하게 표지된 프로브의 절단은 형광 부분을 소광제 부분으로부터 분리한다. 바람직하게는, 프로브의 절단은 레이저 유도성 형광에 의해 검출된다. 더욱 바람직하게는, 형광 부분은 레이저 유도성 형광으로 검출된다. 더욱 바람직하게는, 상기 형광 부분은, 프로브가 온전한 경우 형광 부분에 의해 방출되는 광자가 소광제 부분에 의해 흡수되도록 소광제 부분 근처에 위치하나, 형광 부분에 의해 방출되는 광자가 검출될 수 있도록 5'-3' 뉴클레아제 활성이 있는 효소에 의한 프로브의 절단은 형광 부분을 소광제 부분과 분리시킨다.

- <282> 한 방법에서, 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산은 서열 번호 1 의 핵산에 혼성화하는 핵산을 포함하는 제 1 프라이머로 증폭된다. 더욱 바람직하게는, 상기 핵산은 서열 번호 2 의 16 개 이상의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함하는 제 1 프라이머로 증폭된다. 가장 바람직하게는, 제 1 프라이머는 서열 번호 3 또는 서열 번호 8 을 포함한다.
- <283> 개질된 잔기가 사용되는 경우, 바람직하게는 서열 번호 8 의 위치 23 에서의 잔기는 N⁶-알킬-데옥시아데노신이거나 또는 서열 번호 8 의 위치 23 에서의 잔기는 N⁶-메틸-데옥시아데노신이거나 또는 서열 번호 8 의 위치 24 에서의 잔기는 N⁶-알킬-데옥시아데노신이고, 가장 바람직하게는, N⁶-tert-부틸-벤질-데옥시아데노신이다. 더욱 바람직하게는, 서열 번호 8 의 위치 23 에서의 잔기는 N⁶-메틸-데옥시아데노신이며, 서열 번호 8 의 위치 24 에서의 잔기는 N⁶-tert-부틸-벤질-데옥시아데노신이다.
- <284> 바람직하게는, 제 2 프라이머는 서열 번호 9 의 핵산, 더욱 바람직하게는 서열 번호 10 의 16 개 이상의 연속적인 뉴클레오타이드에 혼성화하는 핵산을 포함하며, 가장 바람직하게는 서열 번호 11 또는 15 를 포함한다. 개질된 잔기가 이용되는 경우, 바람직하게는 제 2 프라이머는 서열 번호 15 의 위치 24 에서 N⁶-알킬데옥시아데노신을, 가장 바람직하게는 N⁶-tert-부틸벤질-데옥시아데노신을 포함한다.
- <285> 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드는 상기 기재된 바와 같은 방법에서 사용되는 프라이머 및 프로브이다. 이들의 위치 및 서열에 따라서, 프라이머는 프로브로서 이용되거나 또는 그 반대로도 가능하다. 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 2, 9 및 17 중 임의의 것 또는 이들의 상보물에 포함되는 16 개 이상의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함한다. 기타 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 및 28 의 임의의 것 또는 이들의 상보물에 포함된 16 개 이상의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함한다.
- <286> 바람직한 키트는 상기 언급된 바람직한 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 더욱 바람직하게는, 키트는 하기를 포함한다:
- <287> a) 서열 번호 1 의 핵산 또는 그의 상보물에 혼성화하는 제 1 핵산 프라이머;
- <288> b) 서열 번호 9 의 핵산 또는 그의 상보물에 혼성화하는 제 2 핵산 프라이머; 및
- <289> c) 서열 번호 16 의 핵산 또는 그의 상보물에 혼성화하는 핵산 프로브. 가장 바람직한 키트는 바람직한 프라이머 및 프로브를 포함하며, 임의로 또는 바람직하게는 상기 기재된 바와 같이 표지되고 개질된 것을 포함한다. 추가로, 상기 키트는 부가적으로 열안정성 DNA 폴리머라아제를 포함한다. 상기 열안정성 DNA 폴리머라아제는 역전사 활성을 가질 수 있다. 역전사 활성이 있는 상기 열안정성 DNA 폴리머라아제는 바람직하게는 카르복시도테르무스 히드로겐포르만스 (*Carboxydotherrnus hydrogenformans*) DNA 폴리머라아제, 테르모시포아프리카누스 (*Thermosipho africanus*) DNA 폴리머라아제, 바실러스 팔리더스 (*Bacillus pallidus*) DNA 폴리머라아제, 테르무스 종 (*Thermus species*) Z05 DNA 폴리머라아제, 테르무스 아쿠아티쿠스 (*Thermus aquaticus*) DNA 폴리머라아제, 테르무스 테르모필러스 (*Thermus thermophilus*) DNA 폴리머라아제, 및 테르무스 sps17 (*Thermus sps17*) DNA 폴리머라아제로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- <290> 키트는 추가적으로 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산 검출에 대한 지시사항을 포함한다.
- <291> 본 발명의 또다른 주제는 서열 번호 1 의 핵산 또는 그의 상보물에 혼성화하는 핵산 프라이머 및 완충액을 포함하는 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원 검출을 위한 조성물이다. 바람직한 프라이머 및 프로브는 상기 기재된 바와 같다.
- <292> 본 발명의 또다른 대상은 하기 단계를 포함하는, 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원 또는 뎅기 바이러스, 황열 바이러스, 모독 바이러스 또는 몬타나 미요티 백색질 뇌염 바이러스의 핵산을 시료에서 검출하기 위한 방법이다:
- <293> a) 서열 번호 16 에 혼성화하는 핵산 프로브와 시료를 접촉시키는 단계; 및
- <294> b) 상기 핵산 프로브의, 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원 또는 뎅기 바이러스, 황열 바이러스, 모독 바이러스, 또는 몬타나 미요티 백색질 뇌염 바이러스의 핵산에 대한 혼성화를 검출함으로써, 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원 또는 뎅기 바이러스, 황열 바이러스, 모독 바이러스 또는 몬타나 미요티 백색질 뇌염 바이러스의

핵산의 존재성을 검출하는 단계.

- <295> 본 발명의 또다른 대상은 하기 단계를 포함하는, 시료에서 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산을 검출하는 방법이다:
- <296> a) 서열 번호 16 에 혼성화하는 핵산 프로브 및 5'-3' 엑소뉴클레아제 활성이 있는 템플레이트 의존성 DNA 폴리머라아제의 존재 하에 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산을 증폭시키는 단계; 및
- <297> b) 프로브의 절단을 검출함으로써, 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산의 존재성을 검출하는 단계.
- <298> 본 발명의 또다른 대상은 하기 단계를 포함하는, 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산의 검출 방법이다.:
- <299> a) 서열 번호 1, 9, 16 또는 29 중 임의의 것에 혼성화하는 프로브 또는 핵산 프라이머와 시료를 접촉시키는 단계로서, 상기 핵산 프라이머 또는 프로브가 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산이 핵산 프라이머 또는 프로브에 혼성화하도록 하는 조건 하에 고체 지지체에 공유결합하는 단계 ;
- <300> b) 서열 번호 1, 9, 16 또는 29 중 임의의 것으로 고체 지지체에 공유결합된 프라이머 또는 프로브와는 상동인 아닌 것에 혼성화하며 검출가능하게 표지된 프라이머 또는 프로브를 고체 지지체에 접촉시키는 단계: 및
- <301> c) 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산에 대한 검출가능하게 표지된 프라이머 또는 프로브의 혼성화 검출에 의한 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산 검출 단계.
- <302> 본 발명의 또다른 대상은 하기 단계를 포함하는, 시료 내의 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산의 양을 정량하는 방법이다:
- <303> a) 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원 검출을 위한 시료를, 서열 번호 16 의 핵산 또는 그의 상보물에 혼성화하며 형광으로 표지된 핵산 프로브 및 5'-3' 엑소뉴클레아제 활성이 있는 템플레이트 의존성 핵산 폴리머라아제에 접촉시키는 단계;
- <304> b) 5'-3' 엑소뉴클레아제 활성이 있는 템플레이트 의존성 핵산 폴리머라아제에 의한 형광으로 표지된 핵산 프로브의 절단된 양을 검출하는 단계로서, 형광으로 표지된 프로브의 절단된 양이 시료 내에 존재하는 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산의 양과 비례하는 단계; 및
- <305> c) 형광으로 표지된 프로브에 의해 발광되는 형광의 양과 대조군 반응에서 형광으로 표지된 프로브에 의해 발광되는 형광의 양을 비교하여 형광으로 표지된 프로브의 절단된 양을 측정하는 단계.
- <306> 본 발명의 또다른 대상은 하기 단계를 포함하는, 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산 검출 방법이다:
- <307> a) 일본 뇌염 바이러스 혈청군의 구성원의 핵산을 증폭시키는 단계;
- <308> b) 서열 번호 16 에 혼성화하는 검출가능하게 표지된 프로브를 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 증폭된 핵산에 혼성화시키는 단계; 및
- <309> c) 검출가능하게 표지된 프로브를 검출함으로써, 일본 뇌염 혈청군의 구성원의 핵산을 검출하는 단계.
- <310> 본 발명의 또다른 대상은 서열 번호 29, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 32, 서열 번호 33, 서열 번호 34, 서열 번호 35, 서열 번호 36, 서열 번호 37, 서열 번호 38, 서열 번호 39 또는 서열 번호 40 를 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드이다.
- <311> 본 발명의 또다른 대상은 서열 번호 29, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 32, 서열 번호 33, 서열 번호 34, 서열 번호 35, 서열 번호 36, 서열 번호 37, 서열 번호 38, 서열 번호 39 또는 서열 번호 40 를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터이다.
- <312> 본 발명의 추가적인 대상은 서열 번호 29 또는 그의 상보물, 서열 번호 30 또는 그의 상보물, 서열 번호 31 또는 그의 상보물, 서열 번호 32 또는 그의 상보물, 서열 번호 33 또는 그의 상보물, 서열 번호 34 또는 그의 상보물, 서열 번호 35 또는 그의 상보물, 서열 번호 36 또는 그의 상보물, 서열 번호 37 또는 그의 상보물, 서열 번호 38 또는 그의 상보물, 서열 번호 39 또는 그의 상보물, 서열 번호 40 또는 그의 상보물에 혼성화하는 10 개 이상의 연속적인 뉴클레오티드의 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드이다. 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 100 개 미만의 뉴클레오티드를 갖는다. 더욱 바람직하게는, 서열 번호 68, 또는 서열 번호 69 의 상보물에 혼성화하거나/하고 서열 번호 64, 서열 번호 65, 서열 번호 66 및 서열 번호 67 로 이루어지는 군으로

부터 선택되는 서열을 포함한다. 더욱더 바람직하게는, 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 64, 서열 번호 65, 서열 번호 66 및 서열 번호 67 로 이루어진 군으로부터 선택된다. 가장 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 64 및 서열 번호 65 로 이루어지는 군 또는 서열 번호 66 및 서열 번호 67 로부터 선택되는 올리고뉴클레오타이드이다.

<313> 본 발명의 또다른 대상은 상기 올리고뉴클레오타이드 중 임의의 것을 함유하는 반응 혼합물이다. 상기 반응 혼합물은 바람직하게는 추가로 서열 번호 16 또는 그의 상보물에 혼성화하는, 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드, 더욱 바람직하게는 상기 기재된 바와 같이, 바람직하게는 TaqMan 검정용으로 표지된 프로브를 포함한다. 가장 바람직하게는, 반응 혼합물은 DNA 폴리머라아제를 포함한다.

<314> 본 발명의 또다른 대상은 하기 단계를 포함하는, 세인트 루이스 뇌염 바이러스의 검출 방법이다:

<315> - 세인트 루이스 뇌염 바이러스의 핵산을, 서열 번호 29 또는 그의 상보물, 서열 번호 30 또는 그의 상보물, 서열 번호 31 또는 그의 상보물, 서열 번호 32 또는 그의 상보물, 서열 번호 33 또는 그의 상보물, 서열 번호 34 또는 그의 상보물, 서열 번호 35 또는 그의 상보물, 서열 번호 36 또는 그의 상보물, 서열 번호 37 또는 그의 상보물, 서열 번호 38 또는 그의 상보물, 서열 번호 39 또는 그의 상보물, 또는 서열 번호 40 또는 그의 상보물에 혼성화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드를 사용하여, 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열의 일부 이상의 증폭 개시를 가능하게 하는 조건 하에 증폭시키는 단계; 및

<316> - 증폭된 핵산을 검출함으로써, 세인트 루이스 뇌염 바이러스를 검출하는 단계. 바람직하게는, 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 64, 서열 번호 65, 서열 번호 66 및 서열 번호 67 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하며, 더욱 바람직하게는 서열 번호 64, 서열 번호 65, 서열 번호 66 및 서열 번호 67 로 이루어진 군으로부터 선택된다. 가장 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 68, 또는 서열 번호 69 의 상보물에 혼성화한다. 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 100 개 미만의 뉴클레오타이드를 갖는다. 서열 번호 64 및 서열 번호 65 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 프라이머; 및 서열 번호 66 및 서열 번호 67 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 프라이머를 이용하는 방법이 바람직하다.

<317> 상기 방법은 바람직하게는, 세인트 루이스 뇌염 바이러스의 증폭된 핵산에 서열 번호 16 에 혼성화하는 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드를 혼성화하는 단계; 및 증폭된 핵산에 대한 상기 프로브의 혼성화 검출 단계를 포함한다. 바람직한 프로브는 상기 기재되어 있다. 바람직하게는, 증폭된 핵산의 양은 증폭 단계 동안 측정된다. 가장 바람직한 것은 TaqMan[®] 방법이다.

<318> 본 발명의 또다른 대상은 상기 방법과 관련하여 상기 언급되는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 키트이다.

<319> 본 발명의 또다른 대상은, 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60, 서열 번호 61, 서열 번호 62 및 서열 번호 63 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드이다. 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60, 서열 번호 61, 서열 번호 62 및 서열 번호 63 으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

<320> 또다른 대상은, 상기 올리고뉴클레오타이드, 바람직하게는 서열 번호 25 또는 그의 상보물에 혼성화하는 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 반응 혼합물이다. 더욱 바람직하게는, 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 16 또는 그의 상보물에 혼성화한다. 가장 바람직하게는, 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드는 서열 FGGTCTAGAIGGTTAGAGGAGACCCTCCAG (식 중, F 는 CY5 이며; I 는 FAM 이며; P 는 PO₄ 이며; U 는 프로피닐 dU 이며; E 는 5-메틸-dC 이다) 를 포함한다. 바람직하게는, 상기 반응 혼합물은 하나 이상의 업스트림 프라이머 및 하나 이상의 다운스트림 프라이머를 포함한다.

<321> 본 발명의 또다른 대상은 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60, 서열 번호 61, 서열 번호 62 및 서열 번호 63 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 상기 올리고뉴클레오타이드 유래의 일부 이상의 뉴클레오타이드 서열의 증폭 개시를 가능하게 하는 조건 하에 황열 바이러스의 핵산을 증폭시키는 단계; 및 증폭된 핵산을 검출함으로써, 황열 바이러스를 검출하는 단계를 포함하는, 황열 바이러스의 검출 방법이다. 더욱 바람직하게는, 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60, 서열 번호 61, 서열 번호 62 및 서열 번호 63 으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, 상기 검출 단계는, 황열 바이러스의 핵산의 증폭된 핵산에, 서열 번호 25 또는 그의 상보물에 혼성화하는 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드를 혼성화하는 단계; 및 증폭된 핵산에 대한 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드의 혼성화 검출 단계를 포함한다.

검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 5'-GGTCTAGAIGGTTAGAGGAGACCTCCAG-3'P (여기서, F 는 CY5 이며; I 는 FAM 이며; P 는 PO₄ 이다) 를 포함하거나; 또는 서열 번호 16, 또는 그의 상보물에 혼성화한다. 바람직하게는, 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 17 의 20 개 이상의 연속적인 뉴클레오타이드, 또는 그의 상보물을 포함하며, 서열 번호 18 또는 그의 상보물을 포함하며, 서열 번호 28 또는 그의 상보물을 포함한다. 바람직한 TaqMan 검정을 위해서는, 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 형광 부분 및 소광제 부분을 포함한다. 바람직하게는, 증폭된 핵산의 양은 증폭 단계 동안 측정함으로써, 시료 내의 바이러스를 정량한다.

<322> 황열 바이러스 검출용 키트는 해당 방법에 대해 상기 언급된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

<323> 본 발명의 또다른 대상은 서열 번호 41, 서열 번호 42, 서열 번호 43, 서열 번호 44, 서열 번호 45, 서열 번호 46, 서열 번호 47, 서열 번호 48, 서열 번호 49, 서열 번호 50, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 53, 서열 번호 54 및 서열 번호 55 로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드이다. 바람직하게는, 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 41, 서열 번호 42, 서열 번호 43, 서열 번호 44, 서열 번호 45, 서열 번호 46, 서열 번호 47, 서열 번호 48, 서열 번호 49, 서열 번호 50, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 53, 서열 번호 54 및 서열 번호 55 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

<324> 본 발명의 또다른 대상은 상기 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 반응 혼합물이다. 바람직하게는, 올리고뉴클레오타이드는 검출가능한 표지를 포함한다.

<325> 본 발명의 또다른 대상은, 서열 번호 41, 서열 번호 42, 서열 번호 43, 서열 번호 44, 서열 번호 45, 서열 번호 46, 서열 번호 47, 서열 번호 48, 서열 번호 49, 서열 번호 50, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 53, 서열 번호 54 및 서열 번호 55 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드를 사용하여, 올리고뉴클레오타이드 유래의 일부 이상의 뉴클레오타이드 서열의 증폭 개시를 가능하게 하는 조건 하에 Dengue 바이러스의 핵산을 증폭시키는 단계; 및 증폭된 핵산을 검출함으로써, Dengue 바이러스를 검출하는 단계를 포함하는, Dengue 바이러스의 검출 방법이다. 바람직하게는, 상기 방법은 서열 번호 16 에 혼성화하며 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드를 증폭된 Dengue 바이러스에 혼성화시키는 단계; 및 증폭된 핵산에 대한 올리고뉴클레오타이드의 혼성화 검출 단계를 추가로 포함한다. 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 서열 번호 24 또는 그의 상보물을 포함한다. 더욱 바람직하게는, 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 41, 서열 번호 42, 서열 번호 43, 서열 번호 44, 서열 번호 45, 서열 번호 46, 서열 번호 47, 서열 번호 48, 서열 번호 49, 서열 번호 50, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 53, 서열 번호 54 및 서열 번호 55 로 이루어진 군으로부터 선택된다. 상기 핵산은 하나 이상의 업스트림 프라이머 및 하나 이상의 다운스트림 프라이머로 증폭된다. 바람직하게는, 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드는 서열 번호 17 의 20 개 이상의 연속적인 뉴클레오타이드 또는 그의 상보물을 포함하거나, 서열 번호 18 또는 그의 상보물을 포함하거나 또는 서열 번호 28, 또는 그의 상보물을 포함한다. TaqMan 및 정량 검정을 위해, 상기 언급된 바람직한 특징들이 적용된다.

<326> 본 발명의 또다른 대상은 Dengue 바이러스 검출용 키트이며, 상기 키트는 해당 방법에 대해 상기 언급된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

<327> 실시예

<328> 실시예 1: 웨스트 나일 바이러스 RNA 의 증폭 및 검출

<329> 바이러스 감염 세포 배양물 상청액의 분해물을 질병 방제 및 예방 센터의 Dr. R. Lanciotti로부터 입수했다. QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA)로부터의 시약을 이용하여 제조사의 지시사항에 따라 상기 분해물로부터 핵산을 정제했다. 정제된 핵산의 일련의 10 배 희석물 (10⁻² - 10⁻⁷) 을 제조했다.

각 희석물 50 μl 를 TaqMan 시약 및 1 μM 프라이머 (각각 서열 번호 8 및 서열 번호 15), 55 mM 트리신 (pH 7.7, Sigma, cat T-5816), 450 μM dNTPs (각각 dATP, dCTP, dGTP 및 dUTP, Pharmacia), 2.7 mM 망간 아세트산염 (Fluka, cat. 63537), 135 mM 칼륨 아세트산염 (Fluka, cat. 60035), 7% (v/v) DMSO (Sigma, cat. D8418), 6% (V/V) 글리세롤 (USB, cat. 16347), 5 유닛의 우라실-N-글리코실라아제 (Roche Diagnostics), 40 유닛의 Z05 DNA 폴리머라아제 (Roche Diagnostics) 및 0.15 μM 프로브 (서열 번호 28, FAM 및 CY5 로 표지함) 을 포함하는 100 ml 반응액 중에서의 RT-PCR 법을 이용하여 5' 뉴클라아제 반응 검정에서 증폭했다. 역전사/PCR 은 하기의 열순환 파라미터를 이용하는 COBAS TaqMan Instrument (Roche Diagnostics, Pleasanton, CA) 에서 수행했다: 50℃ 에서 4 분 → 59℃ 에서 30 분 → 95℃ 에서 15 초, 58℃ 에서 50 초로 2 사이클 →

91℃ 에서 15 초, 58℃ 에서 50 초로 60 사이클 → 40℃ 에서 2 분. 증폭 결과의 예시는 도 6 에 나타냈다.

<330> 본 발명의 각종 구현예가 기재되어 있다. 상세한 설명 및 실시예는 본 발명을 제한하고자 하는 것이 아니라 설명하려는 의도이다. 한편, 본 발명의 진의를 벗어나지 않거나 또는 하기 첨부된 청구의 범위의 범위를 벗어나지 않고도 기재된 본 발명의 각종 구현예에 대한 변형이 가능하다는 것은 당업자에게 자명할 것이다.

도면

도면1a

서열 번호 8	GTAAAGCC CTGAGAACCGTCTCGGAA (->)
AF196835	CAACCCGAGGAGCACTGGGTGAACAAAGCCGCGAAGTGA TCCATGTAAAGCC CTGAGAACCGTCTCGGAGGAGGACCCACATGTTGTAAC TTCAAAG
AF260968	T.....
AF260969	C.....
AF481864	C.....
M12294	C.....
AF206518	G.....
AF317203	G.....
AF202541	G.....
AF404757	T.....
AF404753	T.....
AF404754	T.....
AF404755	T.....
AF404756	T.....
AF017254	T.....
I48977	C.....
AF196536	C.....
AF196537	T.....
AF196538	T.....
AF196540	T.....
AF196541	T.....
AF196542	T.....
AF196543	T.....
AF297840	T.....
AF458343	T.....
AF458344	T.....
AF458347	T.....
AF458348	T.....
AF458350	T.....
AF458352	T.....
AF458353	T.....
AF458355	T.....
AF458358	T.....
AF458360	T.....
AF458361	T.....

AF208017	C.	T..G.	C.		G.C.T.G.C.
AF196539	C	T	C		G.C.T.G.C.
AF196535	C.	G.	C.		G.C.T.G.C.
AF458359	C.	T..G.	C.		G.C.T.G.C.
AF458357	C.	G.	C.		G.C.T.G.C.
AF458354	C.	T..G.	C.		G.C.T.G.C.
AF458349	C.	C.T.G.	C.		G.C.T.G.C.
AF458345	C.	T..G.	C.		G.C.T.G.C.
AF458346	C.	T..G.	C.	T	G.C.T.G.CC.
AF533540	C.	T..G.	C.		
AY187012					
AX187013		G.			
AY187014					
AY187015					
AY262283					
AY277251	AT.T.	AT.G.C.	C.	AT..T.	C.G.G.
AY277252					
AY278441					
AY278442					
AY268132				A	
AY268133					
AY490240		T.			
Kunjin					
D00246	T.			A	G.G.
AY274504	T.			A	G.G.
AY274505	T.			A	G.G.
L4931I	T.	G.	C.	A	G.T.G.C.G.
L48978	T.			A	G.G.
L48979	T.			A	G.G.
AF297840	T.			A	G.G.
AF297841	T.		C.	A	G.G.
AF297842	T.			A	G.G.
AF297843	T.			A	G.G.
AF297844	T.			A	G.G.
AF297845	T.			A	G.G.
AF297846	T.			A	G.G.
AF297847	T.			C	T.G.G.
AF297848	T.			C	A.A.G.G.

AF297849	..	T.	..	..	..	A.	..	..	G
AF297850	..	T.	..	..	..	C.	..	..	G
AF297851	..	T.	..	..	..	C.	GFA	..	G
AF297852	..	T.	..	..	..	C.	..	G.G.	GC
AF297853	..	T.	..	..	..	C.	..	..	G
AF297854	..	T.	..	..	..	A.	..	..	G
AF297855	..	T.	..	..	..	A.	..	..	GA
AF297856	G	T.	..	..	..	A.	..	..	G
AF297857	..	T.	..	..	..	A.	..	..	G
AF297858	..	T.	..	..	G	A.	..	CCT	GA
AF297859	..	T.	..	..	..	A.	..	..	G
AF458351	..	T.	..	..	..	A.	..	..	G
AF458356	..	T.	..	..	..	GA	..	..	G
L24512	..	T.	..	..	..	C.	..	A.	G
JEV	..	T.	..	..	..	A.	..	..	G
AB051292	GTT	T.	T.	AC	CG	AGGTGG	A.	..	..
AF014160	GT	T.	T.	AC	TA	AAGTGA	A.	C.	T.
AF014161	GT	T.	T.	AC	TA	AAGTGA	A.	C.	T.
AF045551	GT	T.	T.	AC	CG	AGGTGG	A.	C.	T.
AF069076	GT	T.	T.	AC	CA	AAGTGA	A.	C.	T.
AF075723	GT	T.	T.	AC	CA	GAGTGA	A.	C.	T.
AF080251	GT	T.	T.	AC	CA	AAGTGA	A.	C.	T.
AF098735	GT	T.	T.	AC	CA	AAGTGA	A.	T.	T.
AF098736	GT	T.	T.	AC	CA	AAGTGA	A.	C.	T.
AF098737	GT	T.	T.	AC	CA	AAGTGA	A.	C.	T.
AF217620	GTT	T.	T.	AC	CA	AAGTGA	A.	C.	T.
AF221459	GT	T.	T.	AC	CA	AGGTGA	A.	C.	T.
AF221500	GT	T.	T.	AC	CA	AAGTGA	A.	T.	T.
AF254452	GT	T.	T.	AC	CA	AAGTGA	A.	T.	T.
AF254453	GT	T.	T.	AC	CA	AAGTGA	A.	C.	T.
AF315119	GT	T.	T.	AC	CA	AAGTGA	A.	C.	T.
AF416457	GT	T.	T.	AC	CAA	AAGTGA	A.	T.	T.
AF486638	GT	T.	T.	AC	CA	AAGTGA	A.	T.	T.
U14163	GT	T.	T.	AC	CA	AAGTGA	A.	C.	T.
U15763	GT	T.	T.	AC	CA	AAGTGA	A.	T.	T.
L48961	GT	T.	T.	AC	CG	AAGTGA	A.	T.	T.
U47032	GT	T.	T.	AC	CA	AAGTGA	A.	T.	T.
M18370	GT	T.	T.	AC	CA	AAGTGA	A.	T.	T.

- 52 -

도면1e

```

L695121.05 TGG.....T.....T.T.....AATCC.GCTGGGT GCA.....C.....TT...A.....G...GTCC.TGGCATGTAG.CTGGAGAGG.C
INM771K-C TGG.....T.....C.T.....AATCT.GCTGGGT GCA.....C.....TT...A.....G...GTCC.TGGCACGTAG.CTGGAGAGG.C
MSI-7-C TGG.....C.....T.T.....AATCC.GCTGGGT GCA.....C.....TT...A.....G...GTCC.TGGCACGTAG.CTGGAGAGG.C
Kern217 TGG.....C.....T.T.....AATCC.GCTGGGT GCA.....C.....TT...A.....G...GTCC.TGGCACGTAG.CTGGAGAGG.C
CoaV608 TGG.....T.....T.T.....AATCC.GCTGGGT GCA.....C.....TT...A.....G...GTCC.TGGCACGTAG.CTGGAGAGG.C
TBH-28 TGG.....T.....T.T.....AATCC.GCTGGGT GCA.....C.....TT...A.....G...GTCC.TGGCACGTAG.CTGGAGAGG.C
VR1265 TGG.....T.....T.T.....AATCT.GCTGGGT GCA.....C.....TT...A.....G...GTCC.TGGCACGTAG.CTGGAG.GG.C
CoaV353 TGG.....T.....T.T.....AATCTAGCTGAGT GCA.....C.....TT...A.....G...GTCC.TGGCACGTAG.CTGGAGAGG.C
MVEV
VR77 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
AF161266 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
M35172 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48972 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48973 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48974 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48975 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48976 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48977 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48978 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48979 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48980 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48981 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48982 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48983 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48984 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48985 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48986 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48987 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48988 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48989 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48990 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48991 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48992 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48993 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48994 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48995 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48996 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48997 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48998 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L48999 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A
L49000 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACATGGAGATG.A

```

[illegible]

AF217620	.TC..C.....AGG.A.T.....A.....CAT	TTG..T.....A.....G.....
AF221499	CTC..C.....AGG..T.....A.....CAT	TTG..T.....A.....G.....
AF221500	CTC..C.....AGG..T.....A.....CAT	TTG..T.....A.....G.....
AF254452	CCC..C.....AGG..T.....A.....CAT	TTG..T.....A.....G.....
AF254453	CCC..C.....AGG..T.....A.....CAT	TTG..T.....A.....G.....
AF315119	CCC..C.....AGG..T.....A.....CAT	TTG..T.....A.....G.....
AF416457	CCC..C.....AGG..T.....A.....CAT	TTG..T.....A.....G.....
AF486638	CCC..C.....AGG..T.....A.....CAT	TTG..T.....A.....G.....
U14163	CCC..C.....AGG..T.....A.....CAT	TTG..T.....A.....G.....
U15763	CCC..C.....AGG..T.....A.....CAT	TTG..T.....A.....G.....
L48961	CTC..C.....AGG..T.....A.....CAT	TTG..T.....A.....G.....
U47032	CCC..C.....AGG..T..G.....A.....CAT	TTG..T.....A.....G.....
M18370	CCC..C.....AGG..T.....A.....CAT	TTG..T.....A.....G.....
M55506	CCC..C.....AGG..T.....A.....CAT	TTG..T.....A.....G.....
L78128	CCC..C.....AGG..T.....A.....CAT	TTG..T.....A.....G.....
D90195	CCC..C.....AGG..T.....A.....CAT	TTG..T.....A.....G.....
D90194	CCC..C.....AGG..T.....A.....CAT	TTG..T.....A.....G.....
AF311748	CCC..C.....AGG..T.....A.....CAT	TTG..T.....A.....G.....
AY184212	CCCT..C.....AAG..T.....A.....CAT	TTTG..T.....A.....G.....
AY316157	CCC..C.....AGG..T.....A.....CAA	TTTG..T.....A.....G.....
AF306514	CCC..C.....AGG..T..T..A.....CAA	TTTG..T.....A.....G.....
AF306515	CCC..C.....AGG..T.....A.....CAT	TTG..T.....A.....G.....
AF306516	CCC..C.....AGGG..T.....A.....CAT	TTG..T.....A.....G.....
AF306517	CCC..C.....AGG..T.....A.....CAT	TTG..T.....A.....G.....
D00037	CCT..T..T...T.T.AGGT..TT...T..T...T.A...T.....CT	TTG..T.....A.....G.....
M14933	CCT..T..T...T.T.AGGT..TT...T..T...T.A...T.....CT	TTG..T.....A.....G.....
SLEV		
BFS1750-C	CCG..C.....AGAC..G.....A.....T...G TT...G..A....	
1750-Std	CCG..C.....AGAC..G.....A.....C.GA	
TD6-4G-C	CCG..C.....AGAT..G.....A.....T...G TT...G..A....	
TD6-4G-20	CCG..C.....AGAT..G.....A.....T...G TT...G..A....	
CoaV750	CCG..C.....AGAT..G.....A.....T...G TT...G..A....	
L695121.05	CCG..C.....AGAC..G.....A.....T...G TT...G..A....	
TNM771K-C	CCG..C.....AGAC..G.....A.....T...G TT...G..A....	
MSI-7-C	CCG..CA.....AGAC..G.....A.....T...G TT...G..A....	
Kern217	CCG..CA.....AGAC..G.....A.....T...G TT...G..A....	
CoaV608	CCG..CA.....AGAC..G.....A.....T...G TT...G..A....	
TBH-28	CCG..C.....AGAC..G.....A.....T...G TT...G..A....	

VR1265	CCG..C.....AGAC..G.....A.....T....G TC...G..A.....	A.....
CoaV353	CCG..C.....AGAC..G.....A.....T....G TT...G..A.....	A.....
MVEV		
VR77	.CG.CA.G.G..T...C.....ACT.TG .AT... C.....AA.....	AA.....
AF161266	.CG.CA.G.G..T...C.....ACT.TG .AT... C.....AA.....	AA.....
M35172	.CG.CA.G.G..T...C.....ACT.TG .AT... C.....AA.....	AA.....

[illegible]

AF221499	GA . T . T .	AAA	C . TA	A .	TG .	AG CTC .	C .	AGG . T .	A .	CAATTGC TCA .
AF221500	GA . T . T .	AAA	C . TA	A .	TG .	AG CTC .	C .	AGG . T .	A .	CAATTGC TCA .
AF254452	GA . T . T .	AAA	C . CA	A .	TG .	AG CTC .	C .	AGG . T .	A .	CAATTGC TCA .
AF254453	GA . T . T .	AAA	C . CA	A .	TG .	AG CCC .	C .	AGG . T .	A .	CAATTGC TCA .
AF315119	GA . T . T .	AAA	C . CA	A .	TG .	AG CCC .	C .	AGG . T .	A .	CAATTGC TCA .
AF416457	GA . T . T .	AAA	C . CA	A .	TG .	AG CCC .	C .	AGG . T .	A .	CAATTGC TCA .
AF486638	GA . T . T .	AAA	C . CA	A .	TG .	AG CCC .	C .	AGG . T .	A .	CAATTGC TCA .
U14163	GA . T . T .	AAA	C . CA	A .	TG .	AG CCC .	C .	AGG . T .	A .	CAATTGC TCA .
U15763	GA . T . T .	AAA	C . CA	A .	TG .	AG CCC .	C .	AGG . T .	A .	CAATTGC TCA .
L48961	GA . T . T .	AAA	C . CA	AT	TG .	AG CTC .	C .	AGG . T . G .	A .	CAATTGC TCA .
U47032	GA . T . T .	AAA	C . CA	A .	TG .	AG CCC .	C .	AGG . T .	A .	CAATTGC TCA .
M18370	GA . T . T .	AAA	C . CA	A .	TG .	AG CCC .	C .	AGG . T .	A .	CAATTGC TCA .
M55506	GA . T . T .	AAA	C . CA	A .	TG .	AG CCC .	C .	AGG . T .	A .	CAATTGC TCA .
L78128	GA . T . T .	AAA	C . CA	A .	TG .	AG CCC .	C .	AGG . T .	A .	CAATTGC TCA .
D90195	GA . T . T .	AAA	C . CA	AT	TG .	AG CCC .	C .	AGG . T .	A .	CAATTGC TCA .
D90194	GA . T . T .	AAA	C . CA	A .	TG .	AG CCC .	C .	AGG . T .	A .	CAATTGC TCA .
AF311748	GA . T . T .	AAA	C . CA	A .	TG .	AG CCC .	C .	AGG . T .	A .	CAATTGC TCA .
AX184212	GA . T . T .	AAA	C . CA	A .	TG .	AG CCC .	C .	AGG . T .	A .	CAATTGC TCA .
AX151617	TA . T . T .	AAA	C . CA	A .	TG .	AG CCC .	C .	AGG . T .	A .	CAATTGC TCA .
AF306514	TTA . T . T .	AAA	C . CA	TT	TG .	AG CCC .	C .	AGG . T .	A .	CAATTGC TCA .
AF306515	GA . T . T .	AAA	C . AA	AA	TG .	AG CCC .	C .	AGG . T .	A .	CAATTGC TCA .
AF306516	GA . T . T .	AAA	C . AA	AA	TG .	AG CCC .	C .	AGG . T .	A .	CAATTGC TCA .
AF306517	GA . T . T .	AAA	C . AA	AA	TG .	AG CCC .	C .	AGG . T .	A .	CAATTGC TCA .
세인트 루이스 노리치 베어리츠										
RF517750	T .	CA	CTTG	..	A .	AA CCG . C	..	AGAC . G .	A .	T . GTT . CGC
RF517751	T .	CA	CTTG	..	A .	AA CCG . C	..	AGAC . G .	A .	T . GTT . CGC
T06 - 467	T .	CA	CTTG	..	A .	AA CCG . C	..	AGAT . G .	A .	T . GTT . CGC
Coav750	T .	CA	CTTG	..	A .	AA CCG . C	..	AGAT . G .	A .	T . GTT . CGC
L695121 . 05	T .	CA	CTTG	..	A .	AA CCG . C	..	AGAT . G .	A .	T . GTT . CGC
TN0771K	T .	A .	CTTG	..	A .	AA CCG . C	..	AGAC . G .	A .	T . GTT . CGC
MSI - 7	T .	A .	CTTG	..	A .	AA CCG . C	..	AGAC . G .	A .	T . GTT . CGC
Kern217	T .	A .	CTTG	..	A .	AA CCG . C	..	AGAC . G .	A .	T . GTT . CGC
Coav608	T .	A .	CTTG	..	A .	AA CCG . C	..	AGAC . G .	A .	T . GTT . CGC
TBH - 28	T .	A .	CTTG	..	A .	AA CCG . C	..	AGAC . G .	A .	T . GTT . CGC
VR1265	T .	A .	CTTG	..	A .	AA CCG . C	..	AGAC . G .	A .	T . GTT . CGC
Coav353	T .	CA	CTTG	..	A .	AA CCG . C	..	AGAC . G .	A .	T . GTT . CGC
마네이 벨리 노리치 베어리츠										
VR77	T .	RAG	..	A	G T .	AG . CG . C	..	A . G . G . T . C	A .	ACT . T . GC
AF161266	CC .	RAG	..	A	G T .	AG . CG . C	..	A . G . G . T . C	A .	ACT . T . GC
M35172	T .	RAG	..	A	G T .	AG . CG . C	..	A . G . G . T . C	A .	ACT . T . GC
원기 베어리츠 팀 1										
U08537	AT . GTT . GCA . T .	T . COMAGCA	AC . CCGGCA	GGGG .	A . ACC . GG . G	..	..	CCCTG . TG . T .	A .	CC . ACA . C .
U08536	AT . GTT . GCA . T .	T . COMAGCA	AC . CCGGCA	GGGG .	A . ACC . GG . G	..	..	CCCTG . TG . T .	A .	CC . ACA . C .
U08535	AT . GTT . GCA . T .	T . COMAGCA	AC . CCGGCA	GGGG .	A . ACC . GG . G	..	..	CCCTG . TG . T .	A .	CC . ACA . C .
M07512	AT . GTT . GCA . T .	T . COMAGCA	AC . CCGGCA	GGGG .	A . ACC . GG . G	..	..	CCCTG . TG . T .	A .	CC . ACA . C .
N206457	AT . GTT . GCA . T .	T . COMAGCA	AC . CCGGCA	GGGG .	A . ACC . GG . G	..	..	CCCTG . TG . T .	A .	CC . ACA . C .
XY145123	AT . GTT . GCA . T .	T . COMAGCA	AC . CCGGCA	GGGG .	A . ACC . GG . G	..	..	CCCTG . TG . T .	A .	CC . ACA . C .

AY145122	AT	GT	GCA	T	T	T	T	CCAAAGC	AC	CGACGA	GGGG	AG	CAGGA	G	CTC	T	T	CC	ACA	C	
AY145121	AT	GT	GCA	T	T	T	T	CCAAAGC	AC	CGACGA	GGGG	AG	CAGGA	G	CTC	T	T	CC	ACA	C	
AF514889	AT	GT	GCA	T	T	T	T	CCAAAGC	AC	CGACGA	GGGG	A	ACC	GG	CC	TG	T	CC	ACA	C	
AF514883	AT	GT	GCA	T	T	T	T	CCTAAGC	AT	CGACGA	GGGG	A	ACC	TG	CC	TG	T	CC	ATA	C	
AF514878	AT	GT	GCA	T	T	T	T	CCTAAGC	AC	CGACGA	GGGG	A	ACC	GG	CC	TG	T	CC	ACA	C	
AF514876	AT	GT	GCA	T	T	T	T	CCTAAGC	AT	CGACGA	GGGG	A	ACC	TG	CC	TG	T	CC	ATA	C	
AF513310	AT	GT	GCA	T	T	T	T	CCTAAGC	AC	CGACGA	GGGG	A	ACC	GG	CC	TG	T	CC	ACA	C	
AF530499	AT	GT	GCA	T	T	T	T	CCAAAGC	AC	CGACGA	GGGG	A	ACC	GG	CC	CTG	T	CC	ATA	C	
AF311958	AT	GT	GCA	T	T	T	T	CCTAAGC	AT	CGACGA	GGGG	A	ACC	TG	CC	TG	T	CC	TCA	C	
AF311957	AT	GT	GCA	T	T	T	T	CCTAAGC	AT	CGACGA	GGGG	A	ACC	GG	CC	TG	T	CC	ACA	C	
AF311956	AT	GT	GCA	T	T	T	T	CCTAAGC	AT	CGACGA	GGGG	A	ACC	TG	CC	TG	T	CC	ACA	C	
AF310148	AT	GT	GCA	T	T	T	T	CCTAAGC	AT	CGACGA	GGGG	A	ACC	GG	CC	TG	T	CC	ACA	C	
AF310147	AT	GT	GCA	T	T	T	T	CCAAAGC	AC	CGACGA	GGGG	A	ACC	GG	CC	CTG	T	CC	ATA	C	
AF310146	AT	GT	GCA	T	T	T	T	CCTAAGC	AC	CGACGA	GGGG	A	ACC	TG	CC	TG	T	CC	ACA	C	
AF309641	AT	GT	GCA	T	T	T	T	CCAAAGC	AT	CGACGA	GGGG	A	ACC	GG	CC	CTG	T	CC	ATA	C	
AF298808	AT	GT	GCA	T	T	T	T	CCAAAGC	AC	CGACGA	GGGG	A	ACC	GG	CC	CTG	T	CC	ATA	C	
AF298807	AT	GT	GCA	T	T	T	T	CCAAAGC	AT	CGACGA	GGGG	A	ACC	GG	CC	CTG	T	CC	ATA	C	
AF226687	AT	GT	GCA	T	T	T	T	CCAAAGC	AT	CGACGA	GGGG	A	ACC	GG	CC	TG	T	CC	ACA	C	
AF226686	AT	GT	GCA	T	T	T	T	CCAAAGC	AT	CGACGA	GGGG	A	ACC	TG	CC	TG	T	CC	ACA	C	
AF226685	AT	GT	GCA	T	T	T	T	CCTAAGC	AC	CGACGA	GGGG	A	ACC	GG	CC	TG	T	CC	ACA	C	
AF180818	AT	GT	GCA	T	T	T	T	CCAAAGC	AT	CGACGA	GGGG	A	ACC	GG	CC	CTG	T	CC	GTA	C	
AF180817	AT	GT	GCA	T	T	T	T	CCAAAGC	AC	CGACGA	GGGG	A	ACC	GG	CC	CTG	T	CC	GTA	C	
AB074761	AT	GT	GCA	T	T	T	T	CCAAAGC	AC	CGACGA	GGGG	A	ACC	GG	CC	CTG	T	CC	ATA	C	
AB074760	AT	GT	GCA	T	T	T	T	CCAAAGC	AC	CGACGA	GGGG	A	ACC	GG	CC	CTG	T	CC	ATA	C	
VR3444-3	AT	GT	GCA	T	T	T	T	CCAAAGC	AC	CGACGA	GGGG	A	ACC	GG	CC	CTG	T	CC	ATA	C	
AT	GT	GCA	T	T	T	T	T	CCAAAGC	AC	CGACGA	GGGG	A	ACC	GG	CC	CTG	T	CC	ATA	C	
AF022434	AT	CGT	GT	C	C	C	C	CCCTG	A	TCGACGACACGATGGG	AGGC	GA	T	TCTC	CT			CCGGA	A	C	GA
AF022435	AT	CGT	GT	C	C	C	C	CCCTG	A	TCGACGACACGATGGG	AGGC	GA	T	TCTC	CT			CCGGA	A	C	GA
AF022436	AT	CGT	GT	C	C	C	C	CCCTG	A	TCGACGACACGATGGG	AGGC	GA	T	TCTC	CT			CCGGA	A	C	GA
AF022437	AT	CGT	GT	C	C	C	C	CCCTG	A	TCGACGACACGATGGG	AGGC	GA	T	TCTC	CT			CCGGA	A	C	GA
AF022438	AT	CGT	GT	C	C	C	C	CCCTG	A	TCGACGACACGATGGG	AGGC	GA	T	TCTC	CT			CCGGA	A	C	GA
AF022439	AT	CGT	GT	C	C	C	C	CCCTG	A	TCGACGACACGATGGG	AGGC	GA	T	TCTC	CT			CCGGA	A	C	GA
AF022440	AT	CGT	GT	C	C	C	C	CCCTG	A	TCGACGACACGATGGG	AGGC	GA	T	TCTC	CT			CCGGA	A	C	GA
AF022441	AT	CGT	GT	C	C	C	C	CCCTG	A	TCGACGACACGATGGG	AGGC	GA	T	TCTC	CT			CCGGA	A	C	GA
AF038402	AT	CGT	GT	C	C	C	C	CCCTG	A	TCGACGACACGATGGG	AGGC	GA	T	TCTC	CT			CCGGA	A	C	GA
AF038403	AT	CGT	GT	C	C	C	C	CCCTG	A	TCGACGACACGATGGG	AGGC	GA	T	TCTC	CT			CCGGA	A	C	GA
AF010145	AT	CGT	GT	C	C	C	C	CCCTG	A	TCGACGACACGATGGG	AGGC	GA	T	TCTC	CT			CCGGA	A	C	GA
AF010146	AT	CGT	GT	C	C	C	C	CCCTG	A	TCGACGACACGATGGG	AGGC	GA	T	TCTC	CT			CCGGA	A	C	GA
AF010147	AT	CGT	GT	C	C	C	C	CCCTG	A	TCGACGACACGATGGG	AGGC	GA	T	TCTC	CT			CCGGA	A	C	GA
AF010148	AT	TGT	GT	C	C	C	C	CCCTG	A	TCGACGACACGATGGG	AGGC	GA	T	TCTC	CT			CCGGA	A	C	GA
AF010149	AT	CGT	GT	C	C	C	C	CCCTG	A	TCGACGACACGATGGG	AGGC	GA	T	TCTC	CT			CCGGA	A	C	GA
AF010150	AT	CGT	GT	C	C	C	C	CCCTG	A	TCGACGACACGATGGG	AGGC	GA	T	TCTC	CT			CCGGA	A	C	GA
AF010151	AT	CGT	GT	C	C	C	C	CCCTG	A	TCGACGACACGATGGG	AGGC	GA	T	TCTC	CT			CCGGA	A	C	GA
AF0100458	AT	CGT	GT	C	C	C	C	CCCTG	A	TCGACGACACGATGGG	AGGC	GA	T	TCTC	CT			CCGGA	A	C	GA
AF0100459	AT	CGT	GT	C	C	C	C	CCCTG	A	TCGACGACACGATGGG	AGGC	GA	T	TCTC	CT			CCGGA	A	C	GA
AF0100460	AT	CGT	GT	C	C	C	C	CCCTG	A	TCGACGACACGATGGG	AGGC	GA	T	TCTC	CT			CCGGA	A	C	GA

[illegible]

도면3e

M29095	AT..CGT.GT.....C.....	T.CGTGCACTGGG.....AGG..GA T.....TCTGCT.....A.....	CCGA A.C.A.
M84727	AT..CGT.GT.....T.CCTT AC	AGG..GA T.....TCTGCT.....A.....	CCGA A.C.A.
M84728	AT..CGT.GT.....T.CCTT AC	AGG..GA T.....TCTGCT.....A.....	CCGA A.C.A.
U61245	AT..CGT.GT.....T.CCTT AC	AGG..GA T.....TCTGCT.....A.....	CCGA A.C.A.
U61246	AT..CGT.GT.....T.CCTT AC	AGG..GA T.....TCTGCT.....A.....	CCGA A.C.A.
U61247	AT..CGT.GT.....T.CCTT AC	AGG..GA T.....TCTGCT.....A.....	CCGA A.C.A.
U61248	AT..CGT.GT.....T.CCTT AC	AGG..GA T.....TCTGCT.....A.....	CCGA A.C.A.
U87411	AT..CGT.GT.....T.CCTT AC	AGG..GA T.....TCTGCT.....A.....	CCGA A.C.A.
U87412	AT..CGT.GT.....T.CCTT AC	AGG..GA T.....TCTGCT.....A.....	CCGA A.C.A.
VR345-2	AT..CGT.GT.....T.CCTT AC	AGG..GA T.....TCTGCT.....A.....	CCGA A.C.A.
델기 바이리스 하원 3			
AF310149	AC..TGT.GCA.....T.CCATGAC	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.T..
M93130	AC..TGT.GCA.....T.CCATGAC	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..
AF317645	AC..TGT.GCA.....T.CCATGAC	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..
AY099336	AC..TGT.GCA.....T.CCATGAC	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..
AY099337	AC..TGT.GCA.....T.CCATGAC	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.T..
AY099343	AC..TGT.GCA.....T.CCATGAC	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.T..
AY099344	AC..TGT.GCA.....T.CCATGAC	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.T..
AY099345	AC..TGT.GCA.....T.CCATGAC	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.T..
AY099346	AC..TGT.GCA.....T.CCATGAC	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.T..
AY099347	AC..TGT.GCA.....T.CCATGAC	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.T..
VR1256-3	AC..TGT.GCA.....T.CCATGAC	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.T..
VR1256-5	AC..TGT.GCA.....T.CCATGAC	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..
델기 바이리스 하원 4			
M14931	GT..CAT.TT.....C.....	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..
AF289029	GT..CAT.TT.....C.....	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..
AF310150	GT..CAT.TT.....C.....	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..
AF310152	GT..CAT.TT.....C.....	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..
AF310153	GT..CAT.TT.....C.....	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..
AF326573	GT..CAT.TT.....C.....	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..
AF326825	GT..CAT.TT.....C.....	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..
AF326826	GT..CAT.TT.....C.....	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..
AF326827	GT..CAT.TT.....C.....	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..
AF375822	GT..CAT.TT.....C.....	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..
AY152039	GT..CAT.TT.....C.....	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..
AY152043	GT..CAT.TT.....C.....	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..
AY152047	GT..CAT.TT.....C.....	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..
AY152051	GT..CAT.TT.....C.....	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..
AY152055	GT..CAT.TT.....C.....	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..
AY152059	GT..CAT.TT.....C.....	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..
AY152063	GT..CAT.TT.....C.....	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..
AY152067	GT..CAT.TT.....C.....	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..
AY152071	GT..CAT.TT.....C.....	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..
AY152075	GT..CAT.TT.....C.....	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..
AY152079	GT..CAT.TT.....C.....	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..
AY152083	GT..CAT.TT.....C.....	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..
AY152087	GT..CAT.TT.....C.....	GCAG..GAG.ACTGAGG.....CC..CTTGCA.....A.....	CC..A.A.C..

도면3g

AX152283	GT . CAT .TT C T . CCATCACTGACA GCAGCA	AA .GGG GAAGCC .GGAG CTC .T . .T	CCCAACA C
AX152287	GT . CAT .TT C T . CCATCACTGACA GCAGCA	AA .GGG GAAGCC .GGAG CTC .T . .T	CCCAACA C
AX152291	GT . CAT .TT C T . CCATCACTGACA GCAGCA	AA .GGG GAAGCC .GGAG CTC .T . .T	CCCAACA C
AX152295	GT . CAT .TT C T . CCATCACTGACA GCAGCA	AA .GGG GAAGCC .GGAG CTC .T . .T	CCCAACA C
AX152299	GT . CAT .TT C T . CCATCACTGACA GCAGCA	AA .GGG GAAGCC .GGAG CTC .T . .T	CCCAACA C
AX152303	GT . CAT .TT C T . CCATCACTGACA GCAGCA	AA .GGG GAAGCC .GGAG CTC .T . .T	CCCAACA C
AX152307	GT . CAT .TT C T . CCATCACTGACA GCAGCA	AA .GGG GAAGCC .GGAG CTC .T . .T	CCCAACA C
AX152311	GT . CAT .TT C T . CCATCACTGACA GCAGCA	AA .GGG GAAGCC .GGAG CTC .T . .T	CCCAACA C
AX152315	GT . CAT .TT C T . CCATCACTGACA GCAGCA	AA .GGG GAAGCC .GGAG CTC .T . .T	CCCAACA C
AX152319	GT . CAT .TT C T . CCATCACTGACA GCAGCA	AA .GGG GAAGCC .GGAG CTC .T . .T	CCCAACA C
AX152323	GT . CAT .TT C T . CCATCACTGACA GCAGCA	AA .GGG GAAGCC .GGAG CTC .T . .T	CCCAACA C
AX152327	GT . CAT .TT C T . CCATCACTGACA GCAGCA	AA .GGG GAAGCC .GGAG CTC .T . .T	CCCAACA C
AX152331	GT . CAT .TT C T . CCATCACTGACA GCAGCA	AA .GGG GAAGCC .GGAG CTC .T . .T	CCCAACA C
AX152335	GT . CAT .TT C T . CCATCACTGACA GCAGCA	AA .GGG GAAGCC .GGAG CTC .T . .T	CCCAACA C
AX152339	GT . CAT .TT C T . CCATCACTGACA GCAGCA	AA .GGG GAAGCC .GGAG CTC .T . .T	CCCAACA C
AX152343	GT . CAT .TT C T . CCATCACTGACA GCAGCA	AA .GGG GAAGCC .GGAG CTC .T . .T	CCCAACA C
AX152347	GT . CAT .TT C T . CCATCACTGACA GCAGCA	AA .GGG GAAGCC .GGAG CTC .T . .T	CCCAACA C
AX152351	GT . CAT .TT C T . CCATCACTGACA GCAGCA	AA .GGG GAAGCC .GGAG CTC .T . .T	CCCAACA C
AX152355	GT . CAT .TT C T . CCATCACTGACA GCAGCA	AA .GGG GAAGCC .GGAG CTC .T . .T	CCCAACA C
AX152359	GT . CAT .TT C T . CCATCACTGACA GCAGCA	AA .GGG GAAGCC .GGAG CTC .T . .T	CCCAACA C
AX152363	GT . CAT .TT C T . CCATCACTGACA GCAGCA	AA .GGG GAAGCC .GGAG CTC .T . .T	CCCAACA C
AX152171	GT . CAT .TT C T . CCATCACTGACA GCAGCA	AA .GGG GAAGCC .GGAG CTC .T . .T	CCCAACA C
VR217-1	GT . CAT .TT C T . CCATCACTGACA GCAGCA	AA .GGG GAAGCC .GGAG CTC .T . .T	CCCAACA C

서열 번호 28 및 70 에 대한 2 개의 잠재적인 결함 부위는 도 3 의 영역에서 찾을 수 있다.
이들은 서열 번호 28 에 대해서는 단선의 밑줄표, 서열 번호 70 에 대해서는 음영으로 나타냈다.

도면4a

KY1129 5' -GTAAGCC CTCAGAACCGTCTCGGAA-3'

WNV

AF317203		
AF196835		
AF260967		
AF260968		
AF260969		
AF481864		
M12294		
AF206518		
AF317203		
AF202541		
AF404757		
AF404753		
AF404754		
AF404755		
AF404756		
AF017254		
L48977		
AF196536		
AF196537		
AF196538		
AF196540		
AF196541		
AF196542		
AF196543		
AF458343		C.....
AF458344		
AF458347		
AF458348		
AF458350		
AF458352		C.....
AF458353		
AF458355		
AF458358		
AF458360		
AF458361		
AF208017		
AF196539		
AF196535		
AF458359		
AF458357		
AF458354		
AF458349		
AF458345		
AF458346	T.....	T.....
AF533540		

도면4b

JEV

AB051292	.A.....
AF014160	.A.....
AF014161	.A.....
AF045551	.A.....
AF069076	.A.....
AF075723	.A.....
AF080251	.A.....G.....
AF098735	.A.....
AF098736	.A.....
AF098737	.A.....
AF217620	.A.....
AF221499	.A.....
AF221500	.A.....
AF254452	.A.....
AF254453	.A.....
AF315119	.A.....T.....
AF416457	.A.....
AF486638	.A.....
U14163	.A.....
U15763	.A.....

KY1129 5'-GTAAGCC CTCAGAACCGTCTCGGAA-3'

JEV cont.

L48961	.A.....
U47032	.A.....
M18370	.A.....
M55506	.A.....
L78128	.A.....
D90195	.A.....
D90194	.A.....
AF311748	.A.....
AF092550	.A.....
AF092552	.A.....
AF092553	.A.....
AF139531	.A.....
AF148900	.A.....
AF148902	.A.....
AF218068	.A.....
AF289816	.A.....
AF318291	.A.....
L48967	.A.....
L48968	.A..C..
L54067	.A.....
L54068	.A.....
L54069	.A.....
L54070	.A.....
L54071	.A.....
L54072	.A.....
L54122	.A.....
L54123	.A.....
AF306514	.A.....
AF306515	.A.....T.....

도면4c

AF306516 .A.....T.....
AF306517 .A.....A.....T.....

MVEV

AF161266 .A.....T.C.....
M35172 .A.....T.C.....
L48972 .A.....T.C.....
L48973 .A.....T.C.....
L48974 .A.....T.C.....C.....
L48975 .A.....T.C.....
L48976 .A.....T.C.....T.....

KUNJIN

AF458351G.
AF458356
AF297840C.....
AF297841
AF297842
AF297843
AF297844
AF297845
AF297846C.....
AF297847C.....
AF297848
AF297849
AF297850C.....
AF297851C.....GT
AF297852C.....
AF297853C.....
AF297854
AF297855
AF297856
AF297857G.....
AF297858
AF297859
L48978
L49311
D00246
L48979
L24512
.....

KOUTANGO

L48980
KY1130 5'-TCCTAGTCTA TCCCAGGTGTCAA-3'

WNV

AF196835
AF260967
AF260968
AF260969
.....

도면4d

AF481864	
M12294	C.....
AF206518	
AF317203	
AF202541	
AF404757	
AF404753	
AF404754	
AF404755	
AF404756	
AF017254	A....
L24512	

JEV

AB051292	...C.....T.....
AF014160	...C.....T.....
AF014161	...C.....T.....
AF045551	...C.C....T.....
AF069076	...C.....T.....
AF075723	...C.....T.....
AF080251	...C.....T.....
AF098735	...C.....T.....
AF098736	...C.....T.....
AF098737	...G.....TCT.....
AF217620	...C.....T.....
AF221499	...C.....T.....
AF221500	...C.....T.....
AF254452	...C.....T.....
AF254453	...C.....T.....
AF315119	...C.....T.....
AF416457	...C.....T.....
AF486638	...C...A..T.....
U14163	...C.....T.....
U15763	...C.....T.....
L48961	...C.....T.....
U47032	T.....
M18370	...C.....T.....
M55506	...C.....T.....
L78128	...C.....T.....
D90195	...C.....T.....
D90194	...C.....T.....
AF311748	...C.....T.....
AF306514	...C.C....T.....
AF306515	...C.....T.....
AF306516	...C.....T.....
AF306517	...C.C....T.....
D00037	...C.....T.....
M14933	...C.....T.....

MVEV

AF161266	TT.....
M35172	TT.....

도면4e

KY1131 5'-GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCGCGG-3'

WNV

AF196835	
AF260967	
AF260968	
AF260969	
AF481864	
M12294	T
AF206518	
AF317203	
AF202541	
AF404757	
AF404753	
AF404754	
AF404755	
AF404756	
AF017254	
AF208017	T.....A..T
L24512	T

JEV

AB051292	T..
AF014160	T..
AF014161	T..
AF045551	T..
AF069076	T..
AF075723	T..
AF080251	T..
AF098735	T..
AF098736	T..
AF098737	T..
AF217620	T..
AF221499	T..
AF221500	T..
AF254452	T..
AF254453	T..
AF315119	T..
AF416457	T..
AF486638	T..
U14163	T..
U15763	T..
L48961	T..
L24512	
U47032	T..
M18370	T..
M55506	T..
L78128	T..
D90195	T..
D90194	T..
AF311748	T..
AF306514	T..
AF306515	T..

도면4f

AF306516	T..
AF306517	T..

MVEV

AF161266	A.TC
M35172	A.TC

도면5a

KY1131 5' -GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCGCGG-3'

일기	
AF226685	C..C
AF311956	C..C
AF311957	C..C
AF311958	C..C
AY145121	C..C
AY145122	C..C
AF514878	C..C
AF514885	C..C
AF514889	C..C
AF489932	C..CA
AF226687	C..C
AX224213	C..C.
AX224215	C..C.
AX224217	C..C.
AX224219	C..C.
AX224225	C..C.
AX224227	C..C
AX224233	C..C
AB074760	C..C
AB074761	C..C
A75711	CG.C
AX224221	C..C.
AX224223	C..C.
U87412	C..C.
U61246	C..C.
U61247	C..C.
AF100465	C..CA
AF100466	C..CA
AX224209	C..C
AF180818	C..C
AF326573	C..CA
AF350498	C..C
AF359579	C..C.
AY037116	C..C.
AF309950	C..C.
AF309953	C..CA
AF309954	C..CA
AF309959	C..CA
AF309962	C..C.
AF309963	C..C.
AF309964	C..C.
AF309965	C..CA
AF289029	C..CA
AF208496	C..CA
AF310146	C..C
AF310149	C..C
AF310153	C..CA
AF226686	C..C
AF276619	C..C.

도면5b

AF169678	C.C.
AF169679	C.C.
AF169680	C.C.
AF169681	C.C.
AF169682	C.C.
AF169683	C.C.
AF169684	C.C.
AF169685	C.C.
AF169686	C.C.
AF169687	C.C.
AF169688	C.C.
AF100145	C.CA
AF100467	T.CC
AF100468	T.CC
AF100149	T.CC
M20558	C.CA
M29095	C.CA
M19197	C.CA
M14931	C.CA
U87411	C.C.
U88536	C..C

KY1131 5'-GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCGCGG-3'

덴기, 계속

U88537	C..C
AF038403	C.CA
AF326826	C.CA
AF326827	C.CA

몬타나 미요티스 백질뇌염 바이러스

NC_004119	TTCC
-----------	-----------

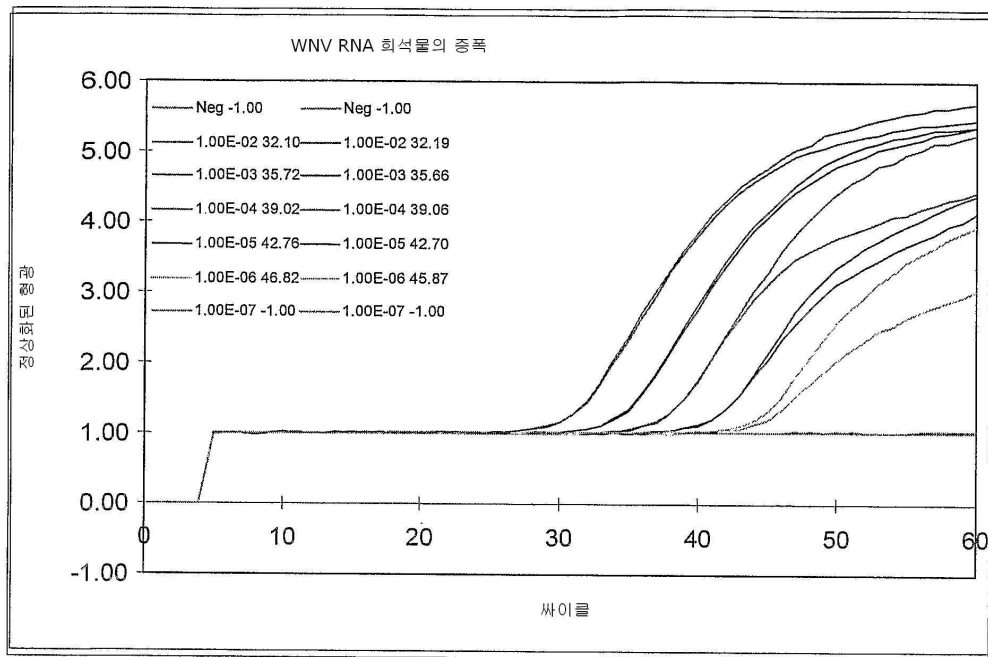
모독 바이러스

NC_003635	CG.C
-----------	-----------

황열 바이러스

X03700	..T.....TC.A.
U52393	..T.....TC.A.
U52407	..T.....TC.A.
AF052448	..T.....TC.A.

도면6



도면7a

BFS1750	TTGCCACCGGATGTCAGGTAAACGGTCTGCTCTGTAACTTGGCCCCAGGTGACTGGGTTATCAAAGCCAATCTGGCCGAGTGC	90
1750-Std		
TD6-4G	C.....	
CoaV750	C.....C.....T.....	
L695121.05		
TNM771K	C.....C.....T.G.....	
MSI-7	C.....C.....T.G.....	
Kern217	C.....C.....T.G.....	
CoaV608	C.....C.....T.G.....	
TBH-28	C.....C.....T.G.....	
VR1265	A.....T.G.....	
CoaV353	A..T.....	
BFS1750	CTCATTCGGACTCGGGAGGGTCCTTAGCACGTAGGCTGGAGAGGACGCAAAAGTCAGACCAGAAAATGCCACCTGAAAGCATGCTAAAGGT	180
1750-Std		
TD6-4G	G.....G.....	
CoaV750	T.....G.....	
L695121.05	G..T.....C.....	
TNM771K	G.....C.....	
MSI-7	G.....C.....	
Kern217	G.....C.....	
CoaV608	G.....C.....	
TBH-28	G.....C.....	
VR1265	G.....C.....	
CoaV353	G.....	
BFS1750	GCTGTCTGTATCATGCCCCAGGAGGACTGGGTAAACAAAGCTTAACAGCCCCAGCGGCCAAACCATGGAGTGGGTGACCATGGCGTAAGG	270
1750-Std		
TD6-4G		
CoaV750		
L695121.05		

[illegible]

서 열 목 록

- | | |
|-------|--|
| <110> | Roche Diagnostics GmbH
F. Hoffmann-La Roche AG |
| <120> | Compositions and Methods for Detecting Certain Flaviviruses,
Including Members of the Japanese Encephalitis Virus Serogroup |
| <130> | 21640 WO |
| <140> | US 10/815,480 |

<141> 2004-03-31

<150> US 60/459,491

<151> 2003-03-31

<150> US 60/552,454

<151> 2004-03-12

<150> US 60/555,530

<151> 2004-03-22

<160> 74

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> region of conserved sequence in 3' untranslated region of the
genomes of flaviviruses

<400> 1

gtaagccctc agaaccgtct cggaa

25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> complement to SEQ ID NO:1

<400> 2

ttccgagacg gttctgaggg cttac

25

<210> 3

<211> 26

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Japanese encephalitis virus serogroup Primer 1

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)
<223> n = t or absent

<400> 3
gwaascnsy crramcysy tcggrw

26

<210> 4
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> West Nile virus Primer 1

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)
<223> n = t or absent

<400> 4
gaaascnct crraacygy tcggaa

26

<210> 5
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Japanese encephalitis virus Primer 1

<220>
<221> misc_feature

<222> (8)
<223> n = absent

<400> 5
gaaascnct crraacygty tcggaa 26

<210> 6
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Murray Valley encephalitis virus Primer 1

<400> 6
gaaagcctcc cagamccgty tcggaa 26

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Koutango virus Primer 1

<400> 7
gtaagccctc agaaccgtct cggaa 25

<210> 8
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Example Primer 1

<400> 8
gtaagccctc agaaccgtct cggaa 25

<210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> region of conserved sequence in 3' untranslated region of the
 genomes of flaviviruses

<400> 9
 tctcctagtc tatcccaggt gtcaa 25

<210> 10
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> complement to SEQ ID NO:9

<400> 10
 agaggatcag ataggggtcca cagtt 25

<210> 11
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Japanese encephalitis virus serogroup Primer 2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)
 <223> n = t or absent

<400> 11
 yccyastmtw nyccaggtr tcaa 24

<210> 12
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> West Nile virus Primer 2

<400> 12
 ycctagtcta tcccagtrt caa 23

<210> 13
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Japanese encephalitis virus Primer 2

<400> 13
 cccyastmta tyccaggtg tcaa 24

<210> 14
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Murray Valley encephalitis virus Primer 2

<400> 14
 tcctagtctt ttcccaggtg tcaa 24

<210> 15
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Example Primer 2

<400> 15

tcctagtcta tcccaggtgt caa

23

<210> 16

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> region of conserved sequence in 3' untranslated region of the
genomes of flaviviruses

<400> 16

ggactagagg ttagaggaga ccccgagg

28

<210> 17

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> complement to SEQ ID NO:16

<400> 17

ccgcggggtc tcctctaacc tctagtcc

28

<210> 18

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe for detecting flaviviruses

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)

<223> n = g, c, t, a or absent

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)

<223> n = c, t, g or absent

<220>

<221> misc_feature

<222> (27)

<223> n = g, c, a, t or absent

<220>

<221> misc_feature

<222> (28)

<223> n = g, c, a, t or absent

<400> 18

ggwctagwgg ttagaggaga ccynnnn

28

<210> 19

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe for detecting Japanese encephalitis virus serogroup members

<400> 19

ggactagwgg ttagaggaga ccccrykk

28

<210> 20

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe for detecting West Nile virus

<400> 20
ggactagwgg ttagaggaga cccrcgk 28

<210> 21
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe for detecting Japanese encephalitis virus

<400> 21
ggactagagg ttagaggaga ccccgagg 28

<210> 22
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe for detecting Murray Valley encephalitis virus

<400> 22
ggactagagg ttagaggaga cccactc 28

<210> 23
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe for detecting Kunjin virus

<400> 23
aataygtgga ttacatgast tcaytgaag 29

<210> 24
<211> 28
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe for detecting Dengue virus

<400> 24

ggactagagg ttagaggaga ccccyssv

28

<210> 25

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe for detecting yellow fever virus

<400> 25

ggtctagagg ttagaggaga ccctccag

28

<210> 26

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe for detecting Montana myotis leukencephalitis virus

<400> 26

ggactagagg ttagaggaga ccccttcc

28

<210> 27

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe for detecting Modoc virus

<400> 27

ggactagagg ttgaggaga cccccggc	28
<210> 28	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Example Probe 1	
<400> 28	
ggactagagg ttagaggaga cccccggc	28
<210> 29	
<211> 418	
<212> DNA	
<213> St. Louis encephalitis virus	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (1)..(418)	
<223> 3' untranslated region of the genome of St. Louis encephalitis virus (SLEV) isolate BFS1750	
<400> 29	
ttgccaccgg atgtcaggta aacggtgctg tctgtaacct ggccccaggt gactgggtta	60
tcaaagccaa tctggccgag tgcaaagccc ctattccga ctcgggaggg tcctagcac	120
gtaggctgga gaggacgcaa aagtcagacc agaaatgcca cctgaaagca tgctaaaggt	180
gtgtgtctgta catgccccag gaggactggg ttaacaaagc ttaacagccc cagcggccca	240
aacctggag tgcgtgacca tggcgtaagg actagaggtt agaggagacc ccgctgcaac	300
ttggcaaggc ccaaaccgc tcgaagctgt agagacgggg gaaggactag aggttagagg	360
agacccttg ccgttaacgc aaacaacagc atattgacac ctggaaagac aggagatc	418

<210> 30
 <211> 342
 <212> DNA
 <213> St. Louis encephalitis virus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(342)
 <223> 3' untranslated region of the genome of St. Louis encephalitis virus (SLEV) isolate 1750-Std

<400> 30
 ttgccaccgg atgtcaggta aacggtgctg tctgtaacct ggccccaggt gactgggtta 60

 tcaaagccaa tctggccgag tgcaaagccc ctcatccga ctcgggaggg tccctagcac 120

 glaggctgga gaggacgcaa aagtcagacc agaaatgcca cctgaaagca tgctaaaggt 180

 gctgtctgta catgccccag gaggactggg ttaacaaagc ttaacagccc cagcgcccca 240

 aaccatggag tgcgtgacca tggcgtaagg actagaggtt agaggagacc ccgcgcaact 300

 tggcaaggcc caaaccgct cgaagctgta gagacggggg aa 342

<210> 31
 <211> 418
 <212> DNA
 <213> St. Louis encephalitis virus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(418)
 <223> 3' untranslated region of the genome of St. Louis encephalitis virus (SLEV) isolate TD6-4G

<400> 31
 ttgccaccgg atgtcaggta aacggtgctg cctgtaacct ggccccaggt gactgggtta 60

 tcaaagccaa tctggccgag tgcaaagccc ctcatccga ctcgggaggg tccctggcac 120

 glaggctgga gaggacgcaa aagtcagacc agaaatgcca cctgaaagca tgctaaaggt 180

gctgtctgta catgccccag gaggactggg ttaacaaagc ttaacagccc cagcggccca 240

aaccatggag tgcgtgacca tggcgtaagg actagaggtt agaggagacc ccgctgcaac 300

tcggcaaggc ccaaaccgc tcgaagctgt agagatgggg gaaggactag aggttagagg 360

agacccttg ccgttaacgc aaacaacagc atattgacac ctggaaagac aggagatc 418

<210> 32
 <211> 342
 <212> DNA
 <213> St. Louis encephalitis virus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(342)
 <223> 3' untranslated region of the genome of St. Louis encephalitis virus (SLEV) isolate CoaV750

<400> 32
 ttgccaccgg atgtcaggta aacggtgctg cctgtaacct ggccccaggt gactgggtta 60

ccaaagccaa tctggctgag tgcaaagccc ctcggtccga ttcgggaggg tccttggcac 120

gtaggctgga gaggacgcaa aagtcagacc agaaatgcca cctgaaagca tgctaaaggt 180

gctgtctgta catgccccag gaggactggg ttaacaaagc ttaacagccc cagcggccca 240

aaccatggag tgcgtgacca tggcgtaagg actagaggtt agaggagacc ccgcgcaact 300

tggcaaggcc aaaaccgct cgaagctgta gagatggggg aa 342

<210> 33
 <211> 418
 <212> DNA
 <213> St. Louis encephalitis virus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(418)

<223> 3' untranslated region of the genome of St. Louis encephalitis virus (SLEV) isolate L695121.05

<400> 33
 ttgccaccgg atgtcaggta aacggtgctg tctgtaacct ggccccaggt gactgggtta 60
 tcaaagccaa tccggctggg tgcaaagccc ctcatccga ctcgggaggg tccctggcat 120
 gtaggctgga gaggacgcac aagtcagacc agaaatgcca cctgaaagca tgctaaaggt 180
 gctgtctgta catgccccag gaggactggg ttaacaaagc ttaacagccc cagcggccca 240
 aaccatggag tgcgtgacca tggcgtaagg actagaggtt agaggagacc ccgctgtaac 300
 ttggcaaggc ccaaacccgc tcgaagctgt agagacgggg gaaggactag aggttagagg 360
 agacccttg ccgttaacgc aaacaacagc atattgacac ctggaaagac aggagatc 418

<210> 34
 <211> 418
 <212> DNA
 <213> St. Louis encephalitis virus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(418)
 <223> 3' untranslated region of the genome of St. Louis encephalitis virus (SLEV) isolate TNM771K

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (384)
 <223> n = g, a, c or t

<400> 34
 ttgccaccgg atgtcaggta aacggtgctg tctgtaacct ggccccaggt gactgggtca 60
 tcaaagccaa tctggctggg tgcaaagccc ctcatccga ctcgggaggg tccctggcac 120

gtaggtctgga gaggacgcac aagtcagacc agaaatgccca cctgaaagca tgctaaaggt 180

gtgtgtctgta catgccccag gaggactggg ttaacaaagc ttaacagccc cagcggccca 240

aacctggag agcgtgacca tggcgtaagg actagaggtt agaggagacc ccgctgtaac 300

ttggcaaggc ccaaaccgc tcgaagctgt agagacgggg gaaggactag aggttagagg 360

agacccttg ccgttaacgc aaanaacagc atattgacac ctggaaagac aggagatc 418

<210> 35
 <211> 418
 <212> DNA
 <213> St. Louis encephalitis virus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(418)
 <223> 3' untranslated region of the genome of St. Louis encephalitis virus (SLEV) isolate MSI-7

<400> 35
 ttgccaccgg atgtcaggta aacggtgctg tctgtaacct ggccccaggc gactgggtta 60

tcaaagccaa tccggctggg tgcaaagccc ctattccga ctcgggaggg tccctggcac 120

gtaggtctgga gaggacgcac aagtcagacc agaaatgccca cctgaaagca tgctaaaggt 180

gtgtgtctgta catgccccag gaggactggg ttaacaaagc ttaacagccc cagcggccca 240

aacctggag tgcgtgacca tggcgtaagg actagaggtt agaggagacc ccgctgtaac 300

ttggcaaggc ccaaaccgc tcaaagctgt agagacgggg gaaggactag aggttagagg 360

agacccttg ccgttaacgc aaacaacagc atattgacac ctggaaagac aggagatc 418

<210> 36
 <211> 405
 <212> DNA
 <213> St. Louis encephalitis virus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(405)
 <223> 3' untranslated region of the genome of St. Louis encephalitis virus (SLEV) isolate Kern217

<400> 36
 ccggtatgtca ggtaaacggt gctgtctgta acctggcccc aggtcactgg gttatcaaag 60

 ccaacccggc tgggtgcaaa gcccctcatt ccgactcggg agggtccttg gcacgtaggc 120

 tggagaggac gcacaagtca gaccagaaat gccacctgaa agcatgctaa aggtgctgtc 180

 tgtacatgcc ccaggaggac tgggtaaca aagcttaaca gccccagcgg cccaaacat 240

 ggagtgcgtg accatggcgt aaggactaga ggtagagga gaccccgctg taacttgga 300

 aggcccaaac ccgtcaaag ctgtagagac gggggaagga ctagaggta gaggagaccc 360

 cttgccgtta acgcaaaca cagcatattg acacctggaa agaca 405

<210> 37
 <211> 375
 <212> DNA
 <213> St. Louis encephalitis virus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(375)
 <223> 3' untranslated region of the genome of St. Louis encephalitis virus (SLEV) isolate CoaV608

<400> 37
 ccagcgac tgggttatca aagccaatcc ggctgggtgc aaagcccctc attccgactc 60

 gggagggtcc ctggcacgta ggctggagag gacgcacaag tcagaccaga aatgccacct 120

 gaaagcatgc taaaggtgct gtctgtacat gccccaggag gactgggtta acaaagctta 180

acagccccag cgccccaaac catggagtgc gtgacctg cgtaaggact agaggttaga 240

ggagaccccg ctgtaacttg gcaaggccca aaccgctca aagctgtaga gacgggggaa 300

ggactagagg ttagaggaga ccccttgccg ttaacgcaaa caacagcata ttgacacctg 360

gaaagacagg agatc 375

<210> 38
 <211> 411
 <212> DNA
 <213> St. Louis encephalitis virus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(411)
 <223> 3' untranslated region of the genome of St. Louis encephalitis virus (SLEV) isolate TBH-28

<400> 38
 ttgccaccgg atgtcaggta aacggtgctg tctgtaacct ggccccaggt gactgggtta 60

tcaaagccaa cccggctggg tgcaaagccc ctattccga ctggggaggg tccctggcac 120

gtaggccgga gaggacgcac aagtcagacc agaaatgcc a cctgaaagca tgctaaaggt 180

gctgtctgta catgccccag gaggactggg ttaacaaagc ttaacagccc cagcgccca 240

aacctggag tgcgtgacca tggcgtaagg actagaggtt agaggagacc ccgctgtaat 300

ttggcaaggc ccaaaccgc tcgaagctgt agagacgggg gaaggactag aggttagagg 360

agacccttg ccgttaacgc aaacaacagc atattgacac ctggaaagac a 411

<210> 39
 <211> 402
 <212> DNA
 <213> St. Louis encephalitis virus

<220>
 <221> misc_feature

<222> (1)..(402)
 <223> 3' untranslated region of the genome of St. Louis encephalitis virus (SLEV) isolate VR1265

<400> 39
 ccggaagtca ggtaaagggt gctgtctgta acctggcccc aggtgactgg gttatcaaag 60
 ccaatctggc tgggtgcaaa gcccctcatt ccgactcggg agggtccttg gcacgtaggc 120
 tggagcggac gcacaagtca gaccagaaat gccacctgaa agcatgctaa aggtgctgtc 180
 tgtacatgcc ccaggaggac tgggttaaca aagcttaaca gcccagcgg cccaaacct 240
 ggagtgcgtg accatggcgt aaggactaga ggtagagga gaccccgctg taacttgga 300
 aggcccaaac ccgtcgaag ctgtagagac gggggaagga ctagaggta gaggagacc 360
 ctgcccgtca acgcaaaca cagcatattg acacctggaa ag 402

<210> 40
 <211> 374
 <212> DNA
 <213> St. Louis encephalitis virus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(374)
 <223> 3' untranslated region of the genome of St. Louis encephalitis virus (SLEV) isolate CoaV353

<400> 40
 cccaggtgac tgggttatca aagccaatct agctgagtgc aaagccctc attccgactc 60
 gggagggtcc ctggcacgta ggctggagag gacgcaaaag tcagaccaga aatgccacct 120
 gaaagcatgc taaaggtgct gtctgtacat gcccaggag gactgggtta acaaagctta 180
 acagccccag cggcccaaac catggagtgc gtgacctgg cgtaaggact agaggttaga 240

ggagaccccg ctgcaacttg gcaaggccca aaccgctcg aagctgtaga gacgggggaa 300

ggactagagg ttagaggaga ccccttgccg ttaacgcaaa caacagcata ttgacacctg 360

gaaagacagg agat 374

<210> 41
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Dengue virus consensus upstream primer

<400> 41
gagccccgtc caaggacgta aaaagaa 27

<210> 42
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Dengue virus consensus upstream primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)
<223> n = t-butyl-benzyl-dA

<400> 42
gagccccgtc caaggacgta aaaagan 27

<210> 43
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Dengue virus consensus upstream primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)

<223> n = methyl-dA

<220>

<221> misc_feature

<222> (27)

<223> n = t-butyl-benzyl-dA

<400> 43

gagcccggtc caaggacgta aaaagnn

27

<210> 44

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Dengue virus type I upstream primer

<400> 44

gagcccggtc caaggacgta aaatgaa

27

<210> 45

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Dengue virus type I upstream primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (27)

<223> n = t-butyl-benzyl-dA

<400> 45
gagccccgtc caaggacgta aaatgan 27

<210> 46
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Dengue virus type I upstream primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)
<223> n = methyl-dA

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)
<223> n = t-butyl-benzyl-dA

<400> 46
gagccccgtc caaggacgta aaatgnn 27

<210> 47
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Dengue virus types II and III upstream primer

<400> 47
gagccccgtc caaggacgtt aaaagaa 27

<210> 48
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Dengue virus types II and III upstream primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)
<223> n = t-butyl-benzyl-dA

<400> 48
gagccccgtc caaggacgtt aaaagan

27

<210> 49
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Dengue virus types II and III upstream primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)
<223> n = methyl-dA

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)
<223> n = t-butyl-benzyl-dA

<400> 49
gagccccgtc caaggacgtt aaaagnn

27

<210> 50
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Dengue virus type IV upstream primer

<400> 50
attgaagtca ggccacttgt gccca 24

<210> 51
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Dengue virus type IV upstream primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)
<223> n = t-butyl-benzyl-dA

<400> 51
attgaagtca ggccacttgt gccn 24

<210> 52
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Dengue virus type IV upstream primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)
<223> n = ethyl-dC

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)
<223> n = t-butyl-benzyl-dA

<400> 52

attgaagtca ggccacttgt gcnn 24

<210> 53
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Dengue virus downstream primer

<400> 53
 gatctctggt ctttcccagc gtcaa 25

<210> 54
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Dengue virus downstream primer

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)
 <223> n = t-butyl-benzyl-dA

<400> 54
 gatctctggt ctttcccagc gtcan 25

<210> 55
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Dengue virus downstream primer

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)

<223> n = methyl-dA

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)

<223> n = t-butyl-benzyl-dA

<400> 55

gatctctggg ctttcccagc gtcnn

25

<210> 56

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> yellow fever virus upstream primer

<400> 56

aaccgggata aaaactacgg gtggagaa

28

<210> 57

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> yellow fever virus upstream primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (28)

<223> n = t-butyl-benzyl-dA

<400> 57

aaccgggata aaaactacgg gtggagan

28

<210> 58

<211> 28

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> yellow fever virus upstream primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)
<223> n = methyl-dA

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)
<223> n = t-butyl-benzyl-dA

<400> 58
aaccgggata aaaactacgg gtggagnn

28

<210> 59
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> yellow fever virus upstream primer

<400> 59
ataaaaacta cgggtggaga accgga

26

<210> 60
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> yellow fever virus upstream primer

<220>
<221> misc_feature

<222> (26)
 <223> n = t-butyl-benzyl-dA

<400> 60
 ataaaaacta cgggtggaga accggn 26

<210> 61
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> yellow fever virus downstream primer

<400> 61
 actccggtct ttcctggcg tcaa 24

<210> 62
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> yellow fever virus downstream primer

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)
 <223> n = t-butyl-benzyl-dA

<400> 62
 actccggtct ttcctggcg tcan 24

<210> 63
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> yellow fever virus downstream primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (23)

<223> n = methyl-dA

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)

<223> n = t-butyl-benzyl-dA

<400> 63

actccgtct ttcctggcg tcnn

24

<210> 64

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> St Louis encephalitis virus upstream primer

<400> 64

caaagcccct cattccgact cggga

25

<210> 65

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> St Louis encephalitis virus upstream primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)

<223> n = t-butyl-benzyl-dA

<400> 65
caaagccct cattccgact cgggn 25

<210> 66
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> St Louis encephalitis virus downstream primer

<400> 66
tctcctgtct ttccaggtgt caa 23

<210> 67
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> St Louis encephalitis virus downstream primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)
<223> n = t-butyl-benzyl-dA

<400> 67
tctcctgtct ttccaggtgt can 23

<210> 68
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> St. Louis encephalitis virus (SLEV) first primer complement

<400> 68

ttgacacctg gaaagacagg aga 23

<210> 69
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> St. Louis encephalitis virus (SLEV) second primer

<400> 69
caaagcccct cattccgact cggg 24

<210> 70
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> flavivirus anti-sense probe

<400> 70
gggtctcttc taacctctag tccttccccc 30

<210> 71
<211> 98
<212> DNA
<213> Flavivirus sp.

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(98)
<223> region of conserved sequence in 3' untranslated region of the genome of flavivirus AF196835

<400> 71
caaccccagg aggactgggt gaacaaagcc gcgaagtgat ccatgtaagc cctcagaacc 60

gtctcggaag gaggacccca catgttgtaa cttcaaag 98

<210> 72
 <211> 105
 <212> DNA
 <213> Flavivirus sp.

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(105)
 <223> region of conserved sequence in 3' untranslated region of the
 genome of flavivirus AF196835

<400> 72
 tgactgaagc ttaggtcag gggaaggact agaggtagt ggagaccccg tgccacaaaa 60

caccacaaca aaacagcata ttgacacctg ggatagacta ggaga 105

<210> 73
 <211> 121
 <212> DNA
 <213> Flavivirus sp.

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(121)
 <223> region of conserved sequence in 3' untranslated region of the
 genome of flavivirus AF196835

<400> 73
 cagggcgaaa ggactagagg ttagaggaga cccgcggtt taaagtgcac ggcccagcct 60

gactgaagct gtaggtcagg ggaaggacta gaggttagtg gagaccccg gccacaaaac 120

a 121

<210> 74
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Example Primer 2

<400> 74

tctcctagtc tatcccaggt gtcaa

25