

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2009-0028501 (43) 공개일자 2009년03월18일
(51) Int. Cl. <i>C12Q 1/68</i> (2006.01) <i>C07H 21/04</i> (2006.01) <i>C12P 19/34</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2008-7027025 (22) 출원일자 2008년11월04일 심사청구일자 없음 번역문제출일자 2008년11월04일 (86) 국제출원번호 PCT/US2007/008652 국제출원일자 2007년04월06일 (87) 국제공개번호 WO 2007/117642 국제공개일자 2007년10월18일 (30) 우선권주장 60/790,197 2006년04월07일 미국(US)		(71) 출원인 지멘스 헬쓰케어 다이아그노스틱스 인크. 미국, 일리노이스 60015, 디어필드, 디어필드 로드 1717 (72) 발명자 쿠, 라일링 미국 94588 캘리포니아 플레산톤 버질 씨클 3460 부쉬-도노반, 찰렌 미국 94551 캘리포니아 리버모어 암버우드 웨이 620 (뒷면에 계속) (74) 대리인 남상선

전체 청구항 수 : 총 31 항

(54) 나이세리아 고노레아 특이적 올리고뉴클레오타이드 서열

(57) 요약

본 발명은 증폭 프라이머 및 검출 프로브를 위한 올리고뉴클레오타이드 서열, 및 생물학적 샘플 내의 나이세리아 고노레아의 선택적이고 특정한 검출을 위한 핵산 증폭 방법에서의 이들의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 임균 감염의 검출 및 진단을 위한 키트 형태의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트 및 프라이머/프로브 세트를 제공한다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 및 프로브는 또한 나이세리아 고노레아 및 기타 표적 유기체, 예를 들어 클라미디아 트라코마티스의 동시 검출을 위해 기타 특정한 올리고뉴클레오타이드 프라이머 및 프로브와 함께 사용될 수 있다.

(72) 발명자

서먼, 데이비드

미국 95616 캘리포니아 데이비스 폰테버드 레인
2948

맹, 쿼

미국 94539 캘리포니아 프레몬트 카메로 웨이 1400

특허청구의 범위

청구항 1

SEQ ID NOs:1-52로 구성된 군으로부터 선택된 핵산 서열, 이들의 활성 단편, 및 이들의 조합물을 포함하는 분리된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 분리된 올리고뉴클레오타이드가 검출가능한 라벨을 추가로 포함하는 분리된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 검출가능한 라벨이 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에 부착된 형광 부분을 포함하는 분리된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드가 이의 3' 말단에 부착된 켄처(quencher) 부분을 추가로 포함하는 분리된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 형광 부분이 6-카르복시플루오레세인(6-carboxyfluorescein)을 포함하고, 상기 켄처 부분이 블랙 홀 켄처(Black Hole Quencher)를 포함하는 분리된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 6

프라이머 세트 1, 프라이머 세트 2, 프라이머 세트 3, 프라이머 세트 4, 프라이머 세트 5, 프라이머 세트 6, 프라이머 세트 7, 프라이머 세트 8, 프라이머 세트 9, 프라이머 세트 10, 프라이머 세트 11, 프라이머 세트 12, 프라이머 세트 13, 프라이머 세트 14, 프라이머 세트 15 및 프라이머 세트 16으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는, 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아(*Neisseria gonorrhoeae*)를 검출하기 위한 프라이머 집합물로서,

프라이머 세트 1이 SEQ ID NO:1의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:2의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 2가 SEQ ID NO:5의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:6의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 3이 SEQ ID NO:8의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:9의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 4가 SEQ ID NO:12의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:13의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 5가 SEQ ID NO:15의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:16의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 6이 SEQ ID NO:19의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:20의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 7이 SEQ ID NO:22의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:23의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 8이 SEQ ID NO:25의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:26의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 9가 SEQ ID NO:29의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID

NO:30의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 10이 SEQ ID NO:32의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:33의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 11이 SEQ ID NO:35의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:36의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 12가 SEQ ID NO:38의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:39의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 13이 SEQ ID NO:41의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:42의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 14가 SEQ ID NO:44의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:45의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 15가 SEQ ID NO:47의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:48의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 16이 SEQ ID NO:50의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:51의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하는, 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아를 검출하기 위한 프라이머 집합물.

청구항 7

프라이머/프로브 세트 1, 프라이머/프로브 세트 2, 프라이머/프로브 세트 3, 프라이머/프로브 세트 4, 프라이머/프로브 세트 5, 프라이머/프로브 세트 6, 프라이머/프로브 세트 7, 프라이머/프로브 세트 8, 프라이머/프로브 세트 9, 프라이머/프로브 세트 10, 프라이머/프로브 세트 11, 프라이머/프로브 세트 12, 프라이머/프로브 세트 13, 프라이머/프로브 세트 14, 프라이머/프로브 세트 15 및 프라이머/프로브 세트 16으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 프라이머/프로브 세트를 포함하는, 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아를 검출하기 위한 올리고뉴클레오타이드의 집합물로서,

프라이머/프로브 세트 1이 SEQ ID NO:1의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:2의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, SEQ ID NO:3의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브, 및 SEQ ID NO:4의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역 상보적(reverse complementary) 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 2가 SEQ ID NO:5의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:6의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:7의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 3이 SEQ ID NO:8의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:9의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, SEQ ID NO:10의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브, 및 SEQ ID NO:11의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역 상보적 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 4가 SEQ ID NO:12의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:13의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:14의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 5가 SEQ ID NO:15의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:16의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, SEQ ID NO:17의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브, 및 SEQ ID NO:18의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역 상보적 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 6이 SEQ ID NO:19의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:20의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:21의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 7이 SEQ ID NO:22의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:23의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:24의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 8이 SEQ ID NO:25의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:26의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, SEQ ID NO:27의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브, 및 SEQ ID NO:28의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역 상보적 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 9가 SEQ ID NO:29의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:30의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:31의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 10이 SEQ ID NO:32의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:33의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:34의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 11이 SEQ ID NO:35의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:36의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:37의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 12가 SEQ ID NO:38의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:39의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:40의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 13이 SEQ ID NO:41의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:42의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:43의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 14가 SEQ ID NO:44의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:45의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:46의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 15가 SEQ ID NO:47의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:48의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:49의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 16이 SEQ ID NO:50의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:51의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:52의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하는, 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아를 검출하기 위한 올리고뉴클레오티드의 집합물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 검출 프로브중 하나 이상이 검출가능한 라벨을 포함하는 올리고뉴클레오티드 집합물.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 검출가능한 라벨이 하나 이상의 검출 프로브에 직접적으로 부착된 올리고뉴클레오티드 집합물.

청구항 10

제 8항에 있어서, 상기 검출가능한 라벨이 하나 이상의 검출 프로브에 간접적으로 부착된 올리고뉴클레오티드 집합물.

청구항 11

제 8항에 있어서, 상기 검출가능한 라벨이 직접적으로 검출가능한 것인 올리고뉴클레오티드 집합물.

청구항 12

제 8항에 있어서, 상기 검출가능한 라벨이 간접적으로 검출가능한 것인 올리고뉴클레오타이드 집합물.

청구항 13

제 8항에 있어서, 상기 검출가능한 라벨이 하나 이상의 검출 프로브의 5' 말단에 부착된 형광 부분을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 집합물.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 하나 이상의 검출 프로브가 이의 3' 말단에 부착된 켄처 부분을 추가로 포함하는 올리고뉴클레오타이드 집합물.

청구항 15

제 14항에 있어서, 상기 형광 부분이 6-카르복시플루오레세인을 포함하고, 상기 켄처 부분이 블랙 홀 켄처를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 집합물.

청구항 16

증폭 반응 시약; 및 프라이머 세트 1, 프라이머 세트 2, 프라이머 세트 3, 프라이머 세트 4, 프라이머 세트 5, 프라이머 세트 6, 프라이머 세트 7, 프라이머 세트 8, 프라이머 세트 9, 프라이머 세트 10, 프라이머 세트 11, 프라이머 세트 12, 프라이머 세트 13, 프라이머 세트 14, 프라이머 세트 15 및 프라이머 세트 16으로 구성된 군 으로부터 선택된 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는, 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아를 검출하기 위한 키트로서,

프라이머 세트 1이 SEQ ID NO:1의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:2의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 2가 SEQ ID NO:5의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:6의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 3이 SEQ ID NO:8의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:9의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 4가 SEQ ID NO:12의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:13의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 5가 SEQ ID NO:15의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:16의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 6이 SEQ ID NO:19의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:20의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 7이 SEQ ID NO:22의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:23의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 8이 SEQ ID NO:25의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:26의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 9가 SEQ ID NO:29의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:30의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 10이 SEQ ID NO:32의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:33의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 11이 SEQ ID NO:35의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:36의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 12가 SEQ ID NO:38의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID

NO:39의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 13이 SEQ ID NO:41의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:42의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 14가 SEQ ID NO:44의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:45의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 15가 SEQ ID NO:47의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:48의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 16이 SEQ ID NO:50의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:51의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하는, 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아를 검출하기 위한 키트.

청구항 17

증폭 반응 시약; 및 프라이머/프로브 세트 1, 프라이머/프로브 세트 2, 프라이머/프로브 세트 3, 프라이머/프로브 세트 4, 프라이머/프로브 세트 5, 프라이머/프로브 세트 6, 프라이머/프로브 세트 7, 프라이머/프로브 세트 8, 프라이머/프로브 세트 9, 프라이머/프로브 세트 10, 프라이머/프로브 세트 11, 프라이머/프로브 세트 12, 프라이머/프로브 세트 13, 프라이머/프로브 세트 14, 프라이머/프로브 세트 15 및 프라이머/프로브 세트 16으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 프라이머/프로브 세트를 포함하는, 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아를 검출하기 위한 키트로서,

프라이머/프로브 세트 1이 SEQ ID NO:1의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:2의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, SEQ ID NO:3의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브, 및 SEQ ID NO:4의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역 상보적 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 2가 SEQ ID NO:5의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:6의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:7의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 3이 SEQ ID NO:8의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:9의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, SEQ ID NO:10의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브, 및 SEQ ID NO:11의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역 상보적 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 4가 SEQ ID NO:12의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:13의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:14의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 5가 SEQ ID NO:15의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:16의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, SEQ ID NO:17의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브, 및 SEQ ID NO:18의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역 상보적 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 6이 SEQ ID NO:19의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:20의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:21의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 7이 SEQ ID NO:22의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:23의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:24의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 8이 SEQ ID NO:25의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:26의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, SEQ ID NO:27의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브, 및 SEQ ID NO:28의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역 상보적 검출 프로브

를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 9가 SEQ ID NO:29의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:30의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:31의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 10이 SEQ ID NO:32의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:33의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:34의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 11이 SEQ ID NO:35의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:36의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:37의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 12가 SEQ ID NO:38의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:39의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:40의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 13이 SEQ ID NO:41의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:42의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:43의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 14가 SEQ ID NO:44의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:45의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:46의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 15가 SEQ ID NO:47의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:48의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:49의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 16이 SEQ ID NO:50의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:51의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:52의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하는, 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아를 검출하기 위한 키트.

청구항 18

제 17항에 있어서, 상기 검출 프로브중 하나 이상이 검출가능한 라벨을 포함하는 키트.

청구항 19

제 18항에 있어서, 상기 검출가능한 라벨이 하나 이상의 검출 프로브에 직접적으로 부착된 키트.

청구항 20

제 18항에 있어서, 상기 검출가능한 라벨이 하나 이상의 검출 프로브에 간접적으로 부착된 키트.

청구항 21

제 18항에 있어서, 상기 검출가능한 라벨이 직접적으로 검출가능한 것인 키트.

청구항 22

제 18항에 있어서, 상기 검출가능한 라벨이 간접적으로 검출가능한 것인 키트.

청구항 23

제 18항에 있어서, 상기 검출가능한 라벨이 하나 이상의 검출 프로브의 5' 말단에 부착된 형광 부분을 포함하는 키트.

청구항 24

제 23항에 있어서, 상기 하나 이상의 검출 프로브가 이의 3' 말단에 부착된 켄처 부분을 추가로 포함하는 키트.

청구항 25

제 24항에 있어서, 상기 형광 부분이 6-카르복시플루오레세인을 포함하고, 상기 켄처 부분이 블랙 홀 켄처를 포함하는 키트.

청구항 26

나이세리아 고노레아 핵산을 함유하는 것으로 여겨지는 시험 샘플을 제공하는 단계;

상기 시험 샘플과 하나 이상의 분리된 올리고뉴클레오티드를 접촉시켜, 나이세리아 고노레아 핵산이 시험 샘플 내에 존재시 이러한 나이세리아 고노레아 핵산에 상기 하나 이상의 올리고뉴클레오티드가 하이브리드될 수 있는 단계; 및

상기 나이세리아 고노레아 핵산에 하이브리드된 임의의 올리고뉴클레오티드를 검출하는 단계로서, 상기 나이세리아 고노레아 핵산에 하이브리드된 올리고뉴클레오티드의 검출이 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아의 존재를 나타내는 단계를 포함하는, 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아를 검출하는 방법으로서,

상기 분리된 올리고뉴클레오티드가 SEQ ID NOs: 1-52로 구성된 군으로부터 선택된 핵산 서열, 이들의 활성 단편, 및 이들의 조합물을 포함하는, 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아를 검출하는 방법.

청구항 27

나이세리아 고노레아 핵산을 함유하는 것으로 여겨지는 시험 샘플을 제공하는 단계;

나이세리아 고노레아 핵산이 시험 샘플 내에 존재시, 이의 전부 또는 일부가 증폭되도록 하는 조건하에서 상기 시험 샘플과 하나 이상의 프라이머 세트를 접촉시킴으로써, 나이세리아 고노레아 앰플리콘을 생성시키는 단계; 및

임의의 나이세리아 고노레아 앰플리콘을 검출하는 단계로서, 나이세리아 고노레아 앰플리콘의 검출이 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아의 존재를 나타내는 단계를 포함하는, 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아를 검출하는 방법으로서,

상기 하나 이상의 프라이머 세트가 프라이머 세트 1, 프라이머 세트 2, 프라이머 세트 3, 프라이머 세트 4, 프라이머 세트 5, 프라이머 세트 6, 프라이머 세트 7, 프라이머 세트 8, 프라이머 세트 9, 프라이머 세트 10, 프라이머 세트 11, 프라이머 세트 12, 프라이머 세트 13, 프라이머 세트 14, 프라이머 세트 15 및 프라이머 세트 16으로 구성된 군으로부터 선택되고,

프라이머 세트 1이 SEQ ID NO:1의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:2의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 2가 SEQ ID NO:5의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:6의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 3이 SEQ ID NO:8의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:9의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 4가 SEQ ID NO:12의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:13의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 5가 SEQ ID NO:15의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:16의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 6이 SEQ ID NO:19의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:20의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 7이 SEQ ID NO:22의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:23의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 8이 SEQ ID NO:25의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID

NO:26의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 9가 SEQ ID NO:29의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:30의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 10이 SEQ ID NO:32의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:33의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 11이 SEQ ID NO:35의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:36의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 12가 SEQ ID NO:38의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:39의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 13이 SEQ ID NO:41의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:42의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 14가 SEQ ID NO:44의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:45의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 15가 SEQ ID NO:47의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:48의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하고;

프라이머 세트 16이 SEQ ID NO:50의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:51의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하는, 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아를 검출하는 방법.

청구항 28

나이세리아 고노레아 핵산을 함유하는 것으로 여겨지는 시험 샘플을 제공하는 단계;

나이세리아 고노레아 핵산이 시험 샘플 내에 존재시, 이의 전부 또는 일부가 증폭되도록 하는 조건하에서 상기 시험 샘플과 하나 이상의 프라이머/프로브 세트를 접촉시킴으로써, 나이세리아 고노레아 앰플리콘을 생성시키는 단계; 및

임의의 나이세리아 고노레아 앰플리콘을 검출하는 단계로서, 나이세리아 고노레아 앰플리콘의 검출이 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아의 존재를 나타내는 단계를 포함하는, 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아를 검출하는 방법으로서,

상기 하나 이상의 프라이머/프로브 세트가 프라이머/프로브 세트 1, 프라이머/프로브 세트 2, 프라이머/프로브 세트 3, 프라이머/프로브 세트 4, 프라이머/프로브 세트 5, 프라이머/프로브 세트 6, 프라이머/프로브 세트 7, 프라이머/프로브 세트 8, 프라이머/프로브 세트 9, 프라이머/프로브 세트 10, 프라이머/프로브 세트 11, 프라이머/프로브 세트 12, 프라이머/프로브 세트 13, 프라이머/프로브 세트 14, 프라이머/프로브 세트 15 및 프라이머/프로브 세트 16으로 구성된 군으로부터 선택되고,

프라이머/프로브 세트 1이 SEQ ID NO:1의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:2의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, SEQ ID NO:3의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브, 및 SEQ ID NO:4의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역 상보적 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 2가 SEQ ID NO:5의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:6의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:7의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 3이 SEQ ID NO:8의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:9의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, SEQ ID NO:10의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브, 및 SEQ ID NO:11의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역 상보적 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 4가 SEQ ID NO:12의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID

NO:13의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:14의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 5가 SEQ ID NO:15의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:16의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, SEQ ID NO:17의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브, 및 SEQ ID NO:18의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역 상보적 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 6이 SEQ ID NO:19의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:20의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:21의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 7이 SEQ ID NO:22의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:23의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:24의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 8이 SEQ ID NO:25의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:26의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, SEQ ID NO:27의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브, 및 SEQ ID NO:28의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역 상보적 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 9가 SEQ ID NO:29의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:30의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:31의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 10이 SEQ ID NO:32의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:33의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:34의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 11이 SEQ ID NO:35의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:36의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:37의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 12가 SEQ ID NO:38의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:39의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:40의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 13이 SEQ ID NO:41의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:42의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:43의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 14가 SEQ ID NO:44의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:45의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:46의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 15가 SEQ ID NO:47의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:48의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:49의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하고;

프라이머/프로브 세트 16이 SEQ ID NO:50의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:51의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:52의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하는, 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아를 검출하는 방법.

청구항 29

제 27항 또는 제 28항에 있어서, 나이세리아 고노레아 핵산의 전부 또는 일부가 증폭되는 조건 하에서 상기 시험 샘플을 접촉시키는 것이 적절한 증폭 조건하 및 적절한 증폭 반응 시약의 존재하에서 수행되는 핵산 증폭 반응에 시험 샘플을 적용하는 것을 포함하는 방법.

청구항 30

제 29항에 있어서, 상기 증폭 반응이 중합효소 연쇄반응(PCR), 역전사효소 PCR(RT-PCR) 또는 택-맨(Taq-Man™) 분석을 이용하여 수행되는 방법.

청구항 31

제 26항 내지 제 28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 시험 샘플이 소변, 정액, 타액, 안구 유체, 림프액, 자궁 경내막, 요도, 직장, 질내, 외음-질내, 및 비인두 샘플로 구성된 군으로부터 선택된 체액을 포함하는 방법.

명세서

기술분야

<1> 본 출원은 2006년 4월 7일에 출원되고, "나이세리아 고노레아(*Neisseria Gonorrhoeae*) 특이적 올리고뉴클레오티드 서열"을 표제로 하는 미국 가출원 U.S.S.N. 60/790,197호를 우선권으로 청구한다. 이러한 가출원은 전체 내용이 참조로서 본원에 포함된다.

배경기술

- <2> 임질은 점막에서 성장하고 신속하게 증식될 수 있는 그람-네거티브의 세포내 호기성 쌍구균인 인간 병원체 나이세리아 고노레아(임균)에 의해 야기되는 성병(STD)이다. 임균 감염은 전세계적으로 매년 6천만명 이상의 환자가 보고되는 주요한 세계적인 건강 문제가 되고 있다 (A.C. Gerbase *et al.*, Lancet, 1998, 351(Suppl. 3): 2-4). 미국 질병 관리 예방 센터(CDC)에 따르면, 임질은 매년 거의 400,000명의 새로운 환자가 보고되는, 미국에서 두번째로 가장 빈번히 보고되는 STD이다 (CDC, "Summary of Notifiable Disease - United States. 2001", Morb. Mortal. Wkly Rep., 2001, 50: 1-108; CDC, "Sexually Transmitted Disease Surveillance, 2001", U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA, 2002; CDC, "Sexually Transmitted Disease Surveillance, 2002", U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA, 2003). 미국에서 가장 유행하는 세균 STD인 클라미디아와 같이, 임질은 실질적으로 과소보고되어 있고, 보고되는 것보다 약 2배 많은 신규한 감염자가 매년 발생하는 것으로 평가되고 있다(H. Weinstock *et al.*, Persp. Sex. Reprod. Health, 2004, 36: 6-10). 적어도 부분적으로 이러한 과소보고가 실재하는데, 이는 임질이 감염된 여성의 30-60% 및 감염된 남성의 10% 이하에서 자각증상이 없기 때문이다. 인지되지 않고 치료되지 않은 나이세리아 고노레아가 수 개월 동안 숙주에서 감염성인 채로 존재할 수 있으며, 이는 이의 만연을 촉진하고, 감염 보유를 촉진할 수 있다.
- <3> 임균이 존재하는 경우, 여성에서의 임균 감염의 최초 증상은 배뇨통, 질분비물, 간격을 둔 질내 출혈, 및 복통을 포함한다. 치료되지 않고 놔둔 경우, 임질에 걸린 여성은 증상의 존재 또는 중증도와 관계 없이 상기 감염으로부터 심각한 합병증이 발달할 위험을 지니게 된다. 특히, 임질은 골반염질환(PID)로 언급되는 난관과 난소의 염증을 지닌 중증의 고통스러운 골반 감염을 발생시킬 수 있다(E.W. Hook III and H.H. Handsfield, in "Sexually Transmitted Diseases", K.K. Holmes *et al.*, (Eds.), 3rd Ed., 1999, pp. 451-466, McGraw-Hill: New York, NY). PID는 난관, 자궁 및 주위 조직에 영구적인 손상을 야기시킬 수 있고, 이는 만성 골반 동통, 불임, 및 잠재적으로 치명적인 자궁외 임신을 초래할 수 있다(W. Cates Jr. *et al.*, Am. J. Obstet. Gynecol., 1991, 164: 1771-1781; J. Coste *et al.*, Fertil. Steril., 1994, 62: 289-295; L. Westroem and P. Wolner-Hansen, Genitourin. Med., 1993, 69: 9-17). 남성에서, 가장 흔한 최초 증상은 배뇨통 및 요도로부터의 화농성 분비물이다. 임질에 대한 평균 잠복기는 감염된 파트너와의 성 접촉후 약 2내지 5일이나; 증상은 30일 후만큼 늦게 나타날 수 있다. 나이세리아 고노레아는 요도로부터 남성 생식관의 기타 부분으로 만연되어, 부고환염, 전립선염, 및 다양한 기타 질환, 예를들어 요도주위 농양을 야기할 수 있다. 치료되지 않은 임질은 요도협착을 초래할 수 있고, 이는 요속 감소, 방광의 불완전한 비움, 요로 감염, 및 궁극적으로 신부전을 발생시킬 수 있다. 드물게 (감염된 여성의 1-3% 및 감염된 남성의 보다 낮은 백분율), 혈액을 통해 세균이 유포되어, 관절염, 세균혈증 또는 심내막염을 야기시킨다(E.W. Hook III and H.H. Handsfield, in "Sexually Transmitted Diseases", K.K. Holmes *et al.*, (Eds.), 3rd Ed., 1999, pp. 451-466, McGraw-Hill: New York, NY). 임질은 주로 성적으로 감염되는 감염으로 공지되어 있으나, 이는 또한 감염된 산도를 통한 분만 동안 신생아에 감염될 수 있다. 이는 아기에게 실명, 관절 감염 또는 생명을 위협하는 혈액 감염을 야기시킬 수 있다.

- <4> 임의의 성적으로 감염된 질병에 걸린 환자는 또 다른 STD에 공동-감염될 위험이 높으나, 클라미디아와 임질의 공동-감염이 가장 흔하다(임질에 걸린 여성의 40% 이하 및 남성의 20% 이하가 또한 클라미디아에 감염됨). 역학 및 생물학적 연구는 임균 감염이 남성 및 여성 모두에서 인간 면역결핍 바이러스(HIV)의 감염에 대한 감수성을 증가시키고, 이를 촉진시키는 강한 증거를 제시한다(M.S. Cohen *et al.*, Lancet, 1997, 349: 1868-1873; D.T. Fleming and J.N. Wasserheit, Sex. Transm. Infect., 1999, 75: 3-17; K.A. Workowski and W.C. Levine, Morb. Mortal. Wkly Rep., 2002, 51 (RR06): 1-80; T.A. Farley *et al.*, J. Acquir. Immun. Defic. Syndr., 2003, 33: 642-648).
- <5> 조기 검출이 임균 감염을 제어하기 위한 공공 보건 프로그램의 필수 구성요소이다. 조기 검출 및 조기 치료의 목적은 전염 고리의 중지, 장기 후유증의 예방, 및 공동-감염의 위험을 제한하기 위한 전염성 기간의 감소를 포함한다. 조기 검출은 또한 만연된 N. 고노레아 항생제 내성으로 인한 주요 우려인 과잉치료를 예방할 수 있다(CDC, "Fluoroquinolone-resistance in *Neisseria gonorrhoeae*, Hawaii, 1999, and decreased susceptibility to azithromycin in *N. gonorrhoeae*, Missouri, 1999", Morb. Mortal. Wkly Rep., 2000, 49: 833-837; CDC, "Increases in fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* - Hawaii and California, 2001", Morb. Mortal. Wkly Rep., 2002, 51: 1041-1044; CDC, "Increases in fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* among men who have sex with men - United States, 2003, and revised recommendations for gonorrhea treatment, 2004", Morb. Mortal. Wkly Rep., 2004, 53: 335-338).
- <6> 세포 배양물 내의 나이세리아 고노레아의 분리는 실험실 진단을 위한 전통적인 방법이며, 이의 특이성으로 인해 법의학 표본으로 선택되는 방법으로 남아있다. 그러나, 이러한 방법은 표본 생활력을 유지하기 위한 엄격한 운송 조건을 필요로 하고, 2 내지 3일의 총 처리시간을 지닌다. 다수의 환경에서, 세포 배양물은 보다 적은 운송 필요조건을 지니며 당일에 결과를 발생시키는, 직접적인 형광 항체 염색, 효소 면역검정, 및 효소면역측정법(ELISA)에 의한 항원 검출을 기초로 하는 보다 신속한 시험으로 대체되었다. 그러나, 이러한 방법은 여전히 고되고, 시간 소모적이며, 더욱 중요하게는 특히 자각증상이 없는 환자에 대해서는 스크리닝 검출과 같은 감수성이 결여된다.
- <7> 보다 최근에, 나이세리아 고노레아의 직접적인 검출을 위한 핵산-기재 하이브리드화 프로브 시험이 개발되었다. 이러한 시험은 보다 높은 특이성을 제공하나, 감수성에 대한 실질적인 개선은 없다. 또한, 이러한 시험의 대부분은 침습성 샘플 추출 과정을 이용하여 수득되는 자궁경내막 또는 요도 표본에 대해 수행된다. 중합효소 연쇄반응(PCR), 리가아제 연쇄반응(LCR), 가닥-변위 증폭(SDA), 또는 전사-매개 증폭(TMA) 기술에 기초한 핵산 증폭 분석이 현재 이용가능하다. 주위 표본 수송, 배칭(batching) 자동화, 및 신속한 처리 시간과 관련한 비-배양 시험의 모든 장점을 제공하는 것 외에, 이러한 분석은 보다 높은 특이성 및 100%에 도달하는 감수성을 제공한다. 또한, 이들은 덜 침습적인 임상 표본, 예를 들어 소변으로 수행될 수 있다. 모든 이러한 장점은 핵산 증폭 분석을 자각증상이 없는 임균 감염의 검출 및 스크리닝 도구에 특히 적합하게 한다.
- <8> 그러나, 현재의 임질 검출을 위한 핵산 증폭 분석은 특정한 불이익 및 제한을 여전히 나타낸다. 주요 우려는 엄격한 정도 관리가 적용되지 않는 경우의 특정 표본 내의 증폭 억제제의 존재에 의해 야기되는 위(false)-음성 결과, 및 교차-감염으로 인한 위-양성 결과를 포함한다. 명백하게, 임균 감염을 검출하기 위한 개선된 핵산 증폭 분석의 개발이 매우 요망된다.

발명의 상세한 설명

<9> 발명의 개요

- <10> 본 발명은 생물학적 샘플 내의 나이세리아 고노레아를 신속하고, 선택적이고, 특이적으로 검출하는 시스템 및 이의 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 임균 감염을 검출하고 진단하기 위한 핵산 증폭 시험을 개발하는데 사용될 수 있는 시약을 포함한다. 더욱 특히, 본 발명은 나이세리아 고노레아의 열린해독틀-1 (ORF1) 유전자, 시토신 메틸트랜스퍼라아제(dcmG) 유전자 및 파일린 반전 단백질 동족체(pilin inverting protein homolog, pivNG) 유전자 내의 표적 핵산 서열의 어느 한쪽 가닥의 검출을 위한 증폭 프라이머 및/또는 검출 프라이머로 사용될 수 있는 올리고뉴클레오타이드 서열을 제공한다.
- <11> 더욱 특히, 본 발명은 SEQ ID NOs:1-52 (표 1 참조)로 구성된 군으로부터 선택된 핵산 서열, 이들의 임의의 활성 단편, 및 이들의 임의의 조합물을 포함하는 분리된 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.
- <12> 특정 구체예에서, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 서열은 실시간 및/또는 복합 검출을 수반하는 분석을 포함하는

다양한 핵산 증폭 분석중 어느 것에도 사용될 수 있는 프라이머 세트 또는 프라이머/프로브 세트와 제공된다.

- <13> 본 발명은 또한 생물학적 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아를 검출하는 방법을 제공한다. 일반적으로, 이러한 방법은 나이세리아 고노레아 핵산을 함유하는 것으로 여겨지는 시험 샘플을 하나 이상의 본 발명의 올리고뉴클레오티드와 접촉시켜, 나이세리아 고노레아 핵산이 샘플 내에 존재시, 상기 올리고뉴클레오티드가 나이세리아 고노레아 핵산에 하이브리드되고; 상기 나이세리아 고노레아 핵산에 하이브리드된 임의의 올리고뉴클레오티드를 검출하는 것을 포함한다. 나이세리아 고노레아 핵산에 대한 올리고뉴클레오티드의 하이브리드화의 검출은 샘플 내에 나이세리아 고노레아가 존재하는 것을 나타낸다.
- <14> 본 발명의 기타 방법은 나이세리아 고노레아 핵산을 함유하는 것으로 여겨지는 시험 샘플을 본원에 기재된 하나 이상의 프라이머 세트 또는 프라이머/프로브 세트 및 증폭 반응 시약과 접촉시켜, 반응 혼합물을 형성시키는 것을 포함한다. 이후, 반응 혼합물은 나이세리아 고노레아 앰플리콘(amplicon)을 발생시키는 프라이머 세트 또는 프라이머/프로브 세트의 프라이머를 이용하는, 나이세리아 고노레아 핵산이 시험 샘플에 존재하는 경우 이의 전부 또는 일부를 증폭시키기 위한 증폭 조건하에 배치된다. 생성된 나이세리아 고노레아 앰플리콘은 임의의 다양한 검출 기술을 이용하여 검출될 수 있다. 특정 구체예에서, 나이세리아 고노레아 앰플리콘과 프라이머/프로브 세트의 검출 프로브 사이에 하이브리드가 형성되고, 검출되며, 이는 시험 샘플 내에 나이세리아 고노레아가 존재하는 것을 나타낸다.
- <15> 본 발명의 올리고뉴클레오티드 서열은 나이세리아 고노레아 및 기타 표적 유기체의 동시 검출을 위한 핵산 증폭 포맷에서 기타 특정 프라이머 및 프로브와 함께 사용될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 증폭 프라이머 및 검출 프로브는 생물학적 샘플 내의 나이세리아 고노레아 및 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*)의 동시 검출을 위해 클라미디아 트라코마티스 특이적 프라이머 및 프로브와 함께 사용된다.
- <16> 본 발명은 또한 본원에 기재된 바와 같은 증폭 프라이머, 검출 프로브, 프라이머 세트 또는 프라이머/프로브 세트, 및 임의로 증폭 반응 시약을 포함하는 키트를 제공한다.
- <17> 본 발명의 상기 및 기타 목적, 장점 및 특징은 하기의 상세한 설명을 참조하여 당업자에게 명백하게 될 것이다.
- <18> **도면의 간단한 설명**
- <19> **표 1**(파트 1 및 2)은 나이세리아 고노레아의 열린해독들-1 (ORF1) 유전자, 시토신 메틸트랜스퍼라아제(dcmG) 유전자 및 파일린 반전 단백질 동족체(pivNG) 유전자 서열로부터 유래된 본 발명의 특정 올리고뉴클레오티드 서열의 예를 나타낸다. 각각의 올리고뉴클레오티드의 맵 위치 및 SEQ ID NO가 표에 제시되어 있다.
- <20> **표 2**는 표 1에 기재된 증폭 프라이머 및 검출 프로브의 9개의 세트를 이용한 단일-플렉스(plex) 택맨(TaqMan) kPCR 분석의 결과를 나타낸다. 모든 프라이머/프로브 세트가 나이세리아 고노레아(GC)를 검출하는데 효과적인 것으로 밝혀졌고, 클라미디아 트라코마티스(CT) 표적 DNA와의 교차반응성은 나타내지 않았다.
- <21> **표 3**은 본 발명의 일부 프라이머/프로브 세트의 교차반응성을 시험하기 위해 사용된, 나이세리아 고노레아와 밀접하게 관련된 74개의 유기체의 목록이다.
- <22> **표 4**는 15개의 다양한 클라미디아 트라코마티스(CT) 혈청형 및 46개의 다양한 나이세리아 고노레아(GC) 분리물을 시험하기 위해 사용된 복합 택맨(TaqMan) kPCR 분석의 결과를 나타낸다.
- <23> **정의**
- <24> 본 명세서를 통해, 여러 용어는 하기의 단락에 정의된 바와 같이 사용된다.
- <25> 용어 "**개체**", "**피검체**" 및 "**환자**"는 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 이들은 나이세리아 고노레아의 숙주일 수 있으나, 이러한 세균에 감염되거나 감염되지 않은 인간을 의미한다. 이러한 용어는 특정 연령을 나타내지 않으며, 따라서 성인, 아동, 신생아 뿐만 아니라 태아를 포함한다.
- <26> 본원에서 사용되는 용어 "**시험 샘플**"은 나이세리아 고노레아 핵산을 함유하는 것으로 여겨지는 임의의 액체 또는 고체 물질을 의미한다. 시험 샘플은 나이세리아 고노레아 핵산을 함유할 수 있는 임의의 생물학적 조직 또는 유체이거나, 이로부터 유래될 수 있다. 종종, 샘플은 "임상 샘플", 즉 임균 감염에 대해 시험되는 환자로부터 수득되거나 분리된 샘플일 것이다. 이러한 샘플은 세포 물질을 함유하고, 세포를 함유하거나 함유하지 않는 체액, 예를 들어 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 정액, 타액, 안구 유체, 림프액, 양수 등; 자궁경내막, 요도, 직장, 질내, 외음-질내, 비인두 및 폐 샘플; 및 공지된 진단에 이용되는 기록 샘플을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 시험 샘플은 또한 동결된 절단물과 같은 조직의 절단물일 수 있다. 용어 "시험 샘플"은 또한 생물학적 샘플

플을 가공함으로써 유래된 임의의 물질을 포함한다. 유래된 물질은 샘플로부터 분리된 세포(또는 이의 자손), 세포 성분, 및 샘플로부터 추출된 핵산 분자를 포함하나, 이제 제한되지는 않는다. 시험 샘플을 획득하기 위한 생물학적 샘플의 가공은 여과, 증류, 원심분리, 추출, 농축, 희석, 정제, 간섭 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등중 하나 이상을 포함할 수 있다.

<27> 용어 "**핵산**", "**핵산 분자**" 및 "**폴리뉴클레오티드**"는 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 이들은 달리 언급되지 않는 한, 단일가닥 또는 이중가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 중합체를 의미하며, 천연 발생 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 작용할 수 있는 천연 뉴클레오티드의 공지된 유사체를 포함한다. 상기 용어는 합성 백본(backbone) 뿐만 아니라 중폭 생성물을 지니는 핵산-유사 구조를 포함한다.

<28> 본원에서 사용되는 용어 "**올리고뉴클레오티드**"는 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 중합체의 짧은 가닥을 의미한다. 올리고뉴클레오티드는 중폭 프라이머 및/또는 검출 프로브로 사용될 수 있다. 이러한 핵산 서열의 짧은 스트레치가 종종 화학적으로 합성된다. 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, 올리고뉴클레오티드의 길이(즉, 올리고뉴클레오티드가 함유하는 뉴클레오티드의 수)가 종종 이의 의도된 기능 또는 용도에 따라 매우 다양할 수 있다. 일반적으로, 올리고뉴클레오티드는 약 5 내지 약 150개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 약 15 내지 약 100개의 뉴클레오티드, 더욱 바람직하게는 약 15 내지 약 50개의 뉴클레오티드를 포함한다.

<29> 용어 "**분리된**"은 올리고뉴클레오티드를 언급하는 경우, 이의 본래에 의하거나 조작에 의해, 천연적으로 관련되거나 최초 획득되거나 제조되는 경우에 관련되는 성분의 적어도 일부로부터 분리되는 올리고뉴클레오티드를 의미한다. "분리된"은 대안적으로 또는 추가로 관심 올리고뉴클레오티드가 인간에 의해 생성되거나 합성되는 것을 의미한다.

<30> 올리고뉴클레오티드(예를들어, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드 서열)와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "**활성 단편**"은 전장 올리고뉴클레오티드 보다 적은 뉴클레오티드를 포함하고 전체 서열의 생물학적 특징중 하나 이상을 보유하는, 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열과 충분히 상동하거나 이로부터 유래되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 임의의 핵산 분자를 의미한다. 통상적으로, 활성 단편은 전장 올리고뉴클레오티드의 활성 중 하나 이상을 지니는 서열을 포함한다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드 서열의 활성 단편 또는 부분은, 예를 들어 10, 15, 20, 25, 30 또는 이 이상의 뉴클레오티드 길이이고, 생물학적 샘플 내의 나이세리아 고노레아의 검출을 위한 중폭 프라이머 및/또는 검출 프로브로서 사용될 수 있는 핵산 분자일 수 있다.

<31> 올리고뉴클레오티드의 활성 단편과 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "**충분한 상동성**"은 올리고뉴클레오티드에 대해 35% 이상의 서열 상동성을 지니는 핵산 분자를 의미한다. 특정 구체예에서, 서열 상동성은 40% 이상, 60% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 이 이상이다.

<32> 용어 "**상동성**" 및 "**동일성**"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 두개의 핵산 분자 사이의 서열 유사성을 의미한다. 두개의 핵산 서열의 상동성 또는 동일성 백분율의 계산은 최적 비교 목적을 위해 두개의 서열을 정렬시킴으로써 수행될 수 있다 (예를들어, 최적 정렬을 위해 제 1 및 제 2의 핵산 서열중 하나 또는 두개 모두에 갭(gap)이 도입될 수 있고, 비교 목적을 위해 비상동 서열이 무시될 수 있다). 특정 구체예에서, 비교 목적을 위해 정렬된 서열의 길이는 참조 서열의 길이의 30% 이상, 40% 이상, 60% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 100%이다. 이후, 상응하는 뉴클레오티드 위치의 뉴클레오티드가 비교된다. 제 1 서열 내의 위치가 제 2 서열 내의 상응하는 위치와 동일한 뉴클레오티드에 의해 점유되는 경우, 분자는 그 위치에서 동일(또는 상동)하다. 두개의 서열 사이의 동일성 백분율은 두개의 서열의 최적 정렬을 위해 도입되는 것이 필요한 갭의 수 및 각각의 갭의 길이를 고려하는, 서열에 의해 공유된 동일한 위치의 수의 함수이다.

<33> 두개의 서열 사이의 서열 비교 및 동일성 백분율의 결정은 수학적 알고리즘을 이용하여 달성될 수 있다. 예를 들어, 두개의 뉴클레오티드 서열 사이의 동일성 백분율은 마이어스 및 밀러(Meyers and Miller) (CABIOS, 1989, 4: 11-17)의 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있고, 이는 PAM120 중량 잔기 표, 12의 갭 길이 패널티 및 4의 갭 패널티를 이용하는 ALIGN 프로그램(version 2.0)에 통합되어 있다. 대안적으로 두개의 뉴클레오티드 서열 사이의 동일성 백분율은 NWSgapdna.CMP 매트릭스를 이용하는 GCG 소프트웨어 패키지(<http://www.gcg.com>에서 구입가능) 내의 GAP 프로그램을 이용하여 결정될 수 있다.

<34> 용어 "**하이브리드화**"는 충분히 상보적인 뉴클레오티드 서열 사이에 복합체가 형성되어, 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기쌍 또는 규정에 따르지 않는 염기쌍을 통해 복합체를 형성하는 것을 의미한다. 프라이머가 표적 서열(주형)과 "하이브리드"되는 경우, 이러한 복합체(또는 하이브리드)는 DNA 합성을 개시하기 위한, 예를들어 DNA 중합효소에 의해 요구되는 프라이밍 기능을 제공하기에 충분히 안정적이다. 하이브리드화 서열이 안정적인

하이브리드를 제공하기 위해 완전한 상보성을 지닐 필요는 없다는 것이 인지될 것이다. 다양한 상황에서, 염기의 약 10% 미만이 미스매치인 경우에도 안정적인 하이브리드가 형성될 것이다. 따라서, 본원에서 사용되는 용어 "**상보성**"은 일반적으로 약 90% 이상의 상동성이 존재하는 경우에 분석 조건하에서 상보체와 함께 안정적인 듀플렉스(duplex)를 형성하는 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 당업자는 적어도 요망되는 수준의 상보성을 지니는 서열이 안정적으로 하이브리드되고, 이보다 적은 상보성을 지니는 서열이 하이브리드되지 않는, 하이브리드화 조건의 엄격성을 측정하고, 조정하는 방법을 이해한다. 예를들어, 하이브리드화 조건 및 파라미터에 대해서는 하기 문헌[J. Sambrook *et al.*, "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", 1989, Second Edition, Cold Spring Harbor Press; Plainview, NY; F.M. Ausubel, "*Current Protocols in Molecular Biology*", 1994, John Wiley & Sons: Secaucus, NJ]을 참조하라.

<35> 본원에서 사용되는 용어 "**증폭**"은 샘플 내의 특정 핵산 서열 집단의 표시를 증가시키는 방법 또는 공정을 의미한다. 증폭 방법(예를들어, 중합효소 연쇄반응 또는 PCR)은 당 분야에 공지되어 있으며, 하기에 보다 상세하게 논의된다.

<36> 용어 "**표적 서열**" 및 "**표적 핵산**"은 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 이들은 존재 또는 부재가 검출되는 것이 요망되는 핵산 서열을 의미한다. 본 발명의 상황에서, 표적 서열은 바람직하게는 올리고뉴클레오티드 프라이머가 복합체를 형성하는 핵산 서열을 포함한다. 표적 서열은 또한 프로브가 요망되는 조건하에서 안정적인 하이브리드를 형성하는 프로브-하이브리드화 영역을 포함할 수 있다. 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, 표적 서열은 단일가닥 또는 이중가닥일 수 있다. 본 발명의 상황에서, 관심 표적 서열은 나이세리아 고노레아의 열린해독틀-1 (ORF1) 유전자, 시토신 메틸트랜스퍼라아제(dcmG) 유전자 및 파일린 반전 단백질 동족체(pivNG) 유전자 내에 위치된다.

<37> 용어 "**프라이머**" 및 "**증폭 프라이머**"는 본원에서 상호교환적으로 사용되고, 이들은 뉴클레오티드 및 핵산 중합 반응을 위한 작용제(예를들어, DNA-의존성 또는 RNA-의존성 중합효소)의 존재하에서 적절한 조건(예를들어, 완충용액, 염, 온도 및 pH)에 위치되는 경우, DNA의 상보적인 가닥인 프라이머 신장 생성물의 합성 개시점으로 작용할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 프라이머는 바람직하게는 증폭의 최대 효율을 위해 단일 가닥이나, 대안적으로 이중가닥일 수 있다. 이중가닥인 경우, 프라이머는 우선 신장 생성물을 제조하기 위해 사용되기 전에 프라이머의 가닥이 분리되도록 처리(예를들어, 변성)될 수 있다. 이러한 변성 단계는 통상적으로 열을 이용하여 수행되나, 대안적으로 알칼리를 이용하여 수행된 후 중화될 수 있다. 통상적인 프라이머는 표적 서열과 사실상 상보적인 약 10 내지 약 35개 뉴클레오티드 길이의 서열을 함유한다. 그러나, 프라이머는 또한 추가 서열을 함유할 수 있다. 예를들어, 가닥 치환 증폭(Strand Displacement Amplification, SDA)에 사용되는 증폭 프라이머는 바람직하게는 표적 결합 서열에 대해 5' 부위에 제한 엔도뉴클레아제 인지부를 포함한다(참조: 미국 특허 제5,270,184호 및 제5,455,166호). 핵산 서열 기재 증폭(Nucleic Acid Sequence Based Amplification, NASBA) 및 전사-매개 증폭(Transcription-Mediated Amplification, TMA) 프라이머는 바람직하게는 프라이머의 표적 결합 서열에 연결된 RNA 중합효소 프로모터를 포함한다. 선택된 증폭 반응에 사용하기 위한 결합 표적 서열에 상기 특화된 서열을 연결하는 방법은 당 분야에 널리 공지되어 있다.

<38> 용어 "**정방향 프라이머**" 및 "**정방향 증폭 프라이머**"는 본원에서 상호교환적으로 사용되고, 표적(주형 가닥)과 하이브리드(또는 어닐링)되는 프라이머를 의미한다. 용어 "**역방향 프라이머**" 및 "**역방향 증폭 프라이머**"는 본원에서 상호교환적으로 사용되고, 상보적인 표적 가닥에 하이브리드(또는 어닐링)되는 프라이머를 의미한다. 정방향 프라이머는 역방향 프라이머와 관련하여 표적 서열의 5'과 하이브리드된다.

<39> 본원에서 사용되는 용어 "**증폭 조건**"은 프라이머 서열의 어닐링 및/또는 신장을 촉진하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 당 분야에 널리 공지되어 있고, 선택된 증폭 방법에 좌우된다. 따라서, 예를들어 PCR 반응에서, 증폭 조건은 일반적으로 열 주기, 즉 두개 이상의 온도 사이의 반응 혼합물의 주기를 포함한다. 등은 증폭 반응에서, 증폭은 열 주기 없이 발생하나, 반응을 개시하기 위해 최초 온도 증가가 필요할 수 있다. 증폭 조건은 온도, 온도 주기, 완충용액, 염, 이온 강도, pH 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는 모든 반응 조건을 포함한다.

<40> 본원에서 사용되는 용어 "**증폭 반응 시약**"은 핵산 증폭 반응에서 사용되는 시약을 의미하고, 이는 완충용액, 시약, 역전사 활성 및/또는 중합 활성 또는 엑소뉴클레아제 활성을 지니는 효소; 마그네슘 또는 망간과 같은 효소 보조인자; 염; 및 데옥시뉴클레오티드 트리포스페이트(dNTP), 예를들어 데옥시아데노신 트리포스페이트(dATP), 데옥시구아노신 트리포스페이트(dGTP), 데옥시시티딘 트리포스페이트(dCTP), 데옥시티미딘 트리포스페이트(dTTP) 및 데옥시유리딘 트리포스페이트(dUTP)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 증폭 반응 시약

은 사용되는 증폭 방법에 따라 당업자에 의해 용이하게 선택될 수 있다.

- <41> 용어 "**프로브**" 및 "**검출 프로브**"는 본원에서 상호교환적으로 사용되고, 적절한 조건하에서 표적 서열의 적어도 일부(예를들어, 증폭된 표적 서열의 일부)에 선택적으로 하이브리드될 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 일반적으로, 프로브 서열은, "**상보적**" (즉, 코딩 또는 센스 가닥(+))에 대해 상보적)이거나, "**역 상보적**" (즉, 안티-센스 가닥(-))에 대해 상보적)인 것으로 확인된다. 특정 구체예에서, 검출 프로브는 검출가능한 부분으로 라벨링된다.
- <42> 용어 "**라벨링된**" 및 "**검출가능한 작용제(또는 부분)으로 라벨링된**"은, 예를들어 존재물(예를들어, 올리고뉴클레오타이드 검출 프로브)이 또 다른 존재물(예를들어, 증폭 반응 생성물 또는 애플리콘)으로의 결합 후에 시각화될 수 있음을 기술하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 바람직하게는, 검출가능한 작용제 또는 부분은 측정될 수 있는 신호를 발생시키고, 신호의 강도가 결합된 존재물의 양과 관련(예를들어, 이에 비례)되도록 선택된다. 핵산 분자를 라벨링하고/하거나 검출하기 위한 광범위한 시스템이 당 분야에 널리 공지되어 있다. 라벨링된 핵산은 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적, 전기적, 광학적, 화학적 또는 기타 수단에 의해 직접 또는 간접적으로 검출되는 라벨의 통합 또는 이로의 전이유기성에 의해 제조될 수 있다. 적절한 검출가능한 작용제는 방사선헌종, 형광단, 화학발광 작용제, 미립자, 효소, 비색 라벨, 자기 라벨, 합텐, 분자 비콘, 및 애플타머(aptamer) 비콘을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- <43> 용어 "**형광단**", "**형광 부분**" 및 "**형광 염료**"는 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 이들은 하나의 파장의 전자기 방사선의 양자를 흡수하고, 반응으로 다양한, 통상적으로 보다 긴 파장의 하나 이상의 광자를 방출하는 분자를 의미한다. 광범위한 구조 및 특성의 다수의 형광 염료가 본 발명의 실시예에 사용하기에 적합하다. 핵산 분자를 형광 라벨링시키는 방법 및 물질이 공지되어 있다(예를들어, 문헌[R.P. Haugland, "*Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 1992-1994*", 5th Ed., 1994, Molecular Probes, Inc.] 참조). 바람직하게는, 형광 부분은 고효율로 광을 흡수하고 방출하며(즉, 사용되는 여기 파장에서 높은 흡수 계수를 지니고, 높은 형광 양자 수율을 지닌다), 광안정적이다(즉, 분석을 수행하는데 필요한 시간 내에서 광 여기시 현저한 분해가 발생하지 않는다). 몇몇 형광 염료는 스스로가 직접적으로 검출되지 않고, 형광 공명 에너지 전달(FRET)으로 언급되는 공정에서 또 다른 형광 염료에 에너지를 전달하고, 제 2의 염료가 검출되는 신호를 발생시킨다. 이러한 FRET 형광 염료쌍이 또한 용어 "형광 부분"에 포함된다. 물리적으로 연결된 형광 리포터/켄처(quencher) 부분의 사용이 또한 본 발명의 범위에 해당된다. 이러한 구체예에서, 형광 리포터 및 켄처 부분이 핵산 프로브의 말단에서와 같이 매우 근접하여 위치되는 경우, 켄처 부분은 리포터 부분으로부터의 형광 신호의 검출을 방해한다. 상기 두개의 부분이 물리적으로 떨어져 있는 경우, 예를들어 DNA 중합효소에 의해 분열된 후, 리포터 부분으로부터의 형광 신호가 검출가능하게 된다.
- <44> 라벨 또는 검출가능한 부분과 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "**직접적으로 검출가능한**"은 라벨 또는 검출가능한 부분이 검출가능하게 되기 위한 추가의 반응 또는 조작을 필요로 하지 않는 것을 의미한다. 예를들어, 형광 부분은 형광 분광법에 의해 직접적으로 검출된다. 라벨 또는 검출가능한 부분과 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "**간접적으로 검출가능한**"은 라벨 또는 검출가능한 부분이 추가의 반응 또는 조작 후에 검출가능하게 되는 것을 의미한다. 예를들어, 합텐은 형광 염료와 같은 리포터에 부착된 적절한 항체와의 반응 후에 검출가능하게 된다.
- <45> **특정한 바람직한 구체예의 상세한 설명**
- <46> 상기 언급된 바와 같이, 본 발명은 생물학적 샘플 내의 나이세리아 고노레아를 검출하기 위한 방법 및 시약에 관한 것이다. 특정 구체예에서, 본 발명의 방법은 소량의 세균 세포만을 함유하는 샘플에서 나이세리아 고노레아의 검출을 가능케 하는 나이세리아 고노레아-특이적 올리고뉴클레오타이드 서열 및 감수성 핵산 증폭-기제 기술을 이용한다.
- <47> **I - 증폭 프라이머 및 검출 프로브를 위한 올리고뉴클레오타이드 서열**
- <48> **본 발명의 올리고뉴클레오타이드 서열**
- <49> 한 양태에서, 본 발명은 나이세리아 고노레아의 열린해독틀-1 (*ORF1*) 유전자, 시토신 메틸트랜스퍼라아제(*dcmG*) 유전자 및 파일린 반전 단백질 동족체(*pivNG*) 유전자 내의 표적 핵산 서열의 어느 한쪽 가닥의 특이적 검출을 위한 핵산 증폭 시험에 사용될 수 있는 올리고뉴클레오타이드 서열을 제공한다.
- <50> *ORF1* 유전자는 기타 나이세리아 종으로부터 나이세리아 고노레아를 구별하는데 사용될 수 있는 서열을 함유하는

유전체 영역으로 기재되어 있다(CG. Miyada and T.L. Born, Mol. Cell Probes, 1991, 5: 327-335). 나이세리아 고노레아의 *ORF1* 유전자는 또한 시토신 메틸트랜스퍼라아제(*dcmG*) 유전자와 같은 시토신 DNA 메틸트랜스퍼라아제(C.G. Miyada and T.L. Born, Mol. Cell Probes, 1991, 5: 327-335)에 대해 유의한 상동성을 지니는 것으로 보고되어 있다(J.F. Dempsey *et al.*, J. Bacteriol., 1991, 173: 5476-5486; J.A.F. Dempsey and J.G. Cannon, J. Bacteriol., 1994, 176: 2055-2060). *pivNG* 유전자는 나이세리아 고노레아 염색체 상에서 다수의 카피로 발견된다. 나이세리아 고노레아 균주 FA1090의 완전히 서열분석된 유전체의 실리카 분석 및 추가의 서던 블롯 분석은 나이세리아 고노레아 염색체의 별개의 3개 영역에 군집을 이루는 8개의 유전자 카피가 존재하는 것을 입증하였다(E.P. Skaar *et al.*, J. Bacteriol., 2005, 187: 1276-1286). 이러한 다수의 카피는 인버타아제(invertase)-관련 유전자로 언급된다(*irg1*, NCBI locuslink ID: 3282015; *irg2*, NCBI locuslink ID: 3282236; *irg3*, NCBI locuslink ID: 3281824; *irg4*, NCBI locuslink ID: 3281830; *irg5*, NCBI locuslink ID: 3281859; *irg6*, NCBI locuslink ID: 3281314; *irg7*, NCBI locuslink ID: 3281292; *irg8*, NCBI locuslink ID: 3282553). *pivNG* 유전자는 다른 나이세리아 종으로부터 나이세리아 고노레아를 구별하기 위해 사용될 수 있는 서열을 함유하는 것으로 보고되어 있다(C.S. Carrick *et al.*, Gene, 1998, 220: 21-29).

<51> 상기 언급된 바와 같이, 본 발명은 나이세리아 고노레아의 *ORF1* 유전자, *dcmG* 유전자 및 *pivNG* 유전자 내의 영역을 인지하는 올리고뉴클레오티드 서열을 제공한다. 본 발명의 예시적 올리고뉴클레오티드 서열은 이들의 상응하는 맵 위치와 함께 표 1에 제시된다(SEQ ID NOs: 1 내지 52). 이러한 서열은 벡터 NTI (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), ABI 프라이머 발현 소프트웨어 프로그램 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 및 올리고6(Oligo6) 프라이머 분석 소프트웨어 프로그램 (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, CA)을 이용하여, *ORF1* 유전자 서열, *dcmG* 유전자 서열 및 *pivNG* 유전자 서열과의 서열 정렬에 의해 본 출원인에 의해 확인되었다.

<52> 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, 나이세리아 고노레아의 증폭, 검출 또는 정량을 위한 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드 서열(또는 이의 활성 단편)중 임의의 것이 의도된 용도 및/또는 분석 포맷에 따라 검출 프로브 또는 증폭 프라이머로 사용될 수 있다. 예를들어, 한 분석에서 증폭 프라이머로 사용되는 본 발명의 올리고뉴클레오티드 서열은 상이한 분석에서 검출 프로브로 사용될 수 있다. 제공된 본 발명의 올리고뉴클레오티드 서열은 선택된 증폭 방법에 의해 요구되는 특화된 서열(예를들어, 프로모터 서열)인 서열로의 부착, 또는 검출을 촉진하는 라벨(예를들어, 형광 염료)의 부착에 의해 변형될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 올리고뉴클레오티드는 분해 공정에 대한 부가된 안정성 또는 감수성 또는 올리고뉴클레오티드에 대한 기타 요망되는 특성을 부여할 수 있는 스페이서, 링커, 또는 라벨링 또는 효소로의 결합을 위한 서열로 작용할 수 있는 하나 이상의 서열을 포함할 수 있다.

<53> 본 발명에 의해 제공된 올리고뉴클레오티드 서열에 기초하여, 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 유사체가 제조될 수 있다(하기 참조). 이러한 유사체는 펩티드 핵산 또는 "PNAs" (즉, 천연 발생 핵산의 포스페이트 당 백본 대신 펩티드-유사 백본을 지니는 분자)등과 같은 대안적 구조를 함유할 수 있다. 본 발명의 서열을 나타내는 이러한 대안적 구조 또한 본 발명의 일부이다. 유사하게, 본 발명의 서열로 구성되는 올리고뉴클레오티드는 핵산 분자의 특성에 부정적으로 영향을 미치지 않는 범위로, 핵산 염기의 결실, 첨가 및/또는 치환을 함유할 수 있다. 특히, 상기 변화는 올리고뉴클레오티드의 하이브리드화 특성을 현저하게 감소시키지 않아야 한다.

<54> **프라이머 세트 및 프라이머/프로브 세트**

<55> 또 다른 양태에서, 본 발명은 생물학적 샘플 내의 나이세리아 고노레아의 검출을 위한 본 발명에 기재된 올리고뉴클레오티드 서열의 조합물에 관한 것이다. 더욱 특히, 본 발명은 프라이머 세트 및 프라이머/프로브 세트를 제공한다.

<56> 본원에서 사용되는 용어 "**프라이머 세트**"는 관심 뉴클레오티드 서열(예를들어, 나이세리아 고노레아의 *ORF1* 유전자, *dcmG* 유전자 또는 *pivNG* 유전자 내의 표적 서열)의 증폭을 함께 프라이밍할 수 있는 두개 이상의 프라이머를 의미한다. 특정 구체예에서, 용어 "프라이머 세트"는 증폭되는 핵산 서열의 5'-말단과 하이브리드되는 5'(업스트림) 프라이머(또는 정방향 프라이머), 및 증폭되는 서열의 상보체와 하이브리드되는 3'(다운스트림) 프라이머(또는 역방향 프라이머)를 포함하는 프라이머 쌍을 의미한다. 이러한 프라이머 세트 또는 프라이머쌍은 PCR 증폭 반응에 특히 유용하다.

<57> 정방향 증폭 프라이머 및 역방향 증폭 프라이머를 포함하는 프라이머 세트의 예는 하기를 포함한다:

<58> SEQ ID NO:1 (5'-GCGGATTCCTTGTCAAGATT-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머,

및 SEQ ID NO:2 (5'-GCCGCGCTCACCTCTA-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하는, 프라이머 세트 1;

<59> SEQ ID NO:5 (5'-AGTACGTTTGATACAGGATTGATT-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:6 (5'-AGCCGTTTTCGCCAGTTTC-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하는, 프라이머 세트 2;

<60> SEQ ID NO:8 (5'-GGAACGAGCCATCAAAACAA-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:9 (5'-GCGGTTTCAGGAAGTGATAGC-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하는, 프라이머 세트 3;

<61> SEQ ID NO:12 (5'-AAGGTATGATTAGCCAGTTTATCG-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:13 (5'-CGCCACCTGTGCAATAATT-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하는, 프라이머 세트 4;

<62> SEQ ID NO:15 (5'-GCCTTTTTCCTTCGGGATT-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:16 (5'-GTACATAAGAAAGGCGGAGATTACG-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하는, 프라이머 세트 5;

<63> SEQ ID NO:19 (5'-GACGCTTCACGCTTCCTT-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:20 (5'-CCATGAATGAACAGCTGAAGTTT-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하는, 프라이머 세트 6;

<64> SEQ ID NO:22 (5'-GCATCCTGTTTGTCTGTTTGG-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:23 (5'-TTACGTAGTGAATCCGCTGAAAATA-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하는, 프라이머 세트 7;

<65> SEQ ID NO:25 (5'-CCGAATGCTCCGTTTGC-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:26 (5'-GTAACGCCGTAGGATTGGATATATC-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하는, 프라이머 세트 8;

<66> SEQ ID NO:29 (5'-TGATCTAAACCTTTTGAATCGTTGTC-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:30 (5'-AACGCATCCGCCATGGT-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하는, 프라이머 세트 9;

<67> SEQ ID NO:32 (5'-GACGCTTCACGCTTCCTT-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:33 (5'-CCATGAATGAACAGCTGAAGTTT-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하는, 프라이머 세트 10;

<68> SEQ ID NO:35 (5'-TCTGCCTATTGCCGGTATGGT-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:36 (5'-GAAGCGGCCAAAGCATATGC-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하는, 프라이머 세트 11;

<69> SEQ ID NO:38 (5'-ATTGCCGGTATGGTTTCAA-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:39 (5'-GAAGCGGCCAAAGCATATGC-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하는, 프라이머 세트 12;

<70> SEQ ID NO:41 (5'-GTCATTCTGCCTATTGCCGGT-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:42 (5'-GAAGCGGCCAAAGCATATGC-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하는, 프라이머 세트 13;

<71> SEQ ID NO:44 (5'-TCTGCCTATTGCCGGTATGGT-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:45 (5'-GAAGCGGCCAAAGCATATGC-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하는, 프라이머 세트 14;

<72> SEQ ID NO:47 (5'-TCTGCCTATTGCCGGTATGGT-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:48 (5'-GAAGCGGCCAAAGCATATGC-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하는, 프라이머 세트 15; 및

- <73> SEQ ID NO:50 (5'-TGATCTAAACCTTTTGAATCGTTGTC-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:51 (5'-GTAACGCCGTAGGATTGGATATATC-3')의 서열 또는 이의 임의의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머를 포함하는, 프라이머 세트 16.
- <74> 이러한 프라이머 세트는 표적 서열을 증폭시키기 위한 두개 이상의 올리고뉴클레오타이드(하기에 논의되는 바와 같음)를 이용하는 임의의 핵산 증폭 기술에 따라 사용될 수 있다. 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 생성된 증폭 생성물은 당 분야에 널리 공지된 임의의 다양한 검출 방법을 이용하여 검출될 수 있다. 예를들어, 증폭 생성물은 아가로오즈 겔 전기영동, 및 에티디움 브로마이드 염색 및 자외선(UV)광으로의 노출에 의한 시각화를 이용하거나, 나이세리아 고노레아 동일성의 확인을 위한 증폭 생성물의 서열분석에 의해 검출될 수 있다.
- <75> 대안적으로, 증폭 생성물을 검출하기 위한 다양한 동중성 또는 이중성 방법을 이용하여 프로브 서열이 사용될 수 있다. 일반적으로, 이러한 방법에서, 프로브는 증폭 생성물(또는 앰플리콘)의 가닥에 하이브리드되어 증폭 생성물/프로브 하이브리드를 형성한다. 이후, 하이브리드는 예를들어 프로브, 프라이머 또는 프로브와 프라이머 둘 모두에서 라벨을 이용하여 직접적 또는 간접적으로 검출될 수 있다.
- <76> 따라서, 본 발명은 생물학적 샘플 내의 나이세리아 고노레아의 검출을 위한 프라이머/프로브 세트를 제공한다. 본원에서 사용되는 용어 "**프라이머/프로브 세트**"는 관심 뉴클레오타이드 서열(예를들어, 나이세리아 고노레아의 *OFRI* 유전자, *dcmG* 유전자 또는 *pivNG* 유전자 내의 표적 서열)의 증폭을 함께 프라이밍할 수 있는 두개 이상의 프라이머, 및 표적 서열을 검출할 수 있는 하나 이상의 프로브를 포함하는 조합물을 의미한다. 프로브는 일반적으로 증폭 생성물(또는 앰플리콘)의 가닥에 하이브리드되어 증폭 생성물/프로브 하이브리드를 형성하고, 이는 검출될 수 있다.
- <77> 본 발명은 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아 표적 서열을 특이적으로 증폭시키고 검출하는 핵산 증폭 과정에 따라 사용될 수 있는 프라이머/프로브 세트를 제공한다. 본 발명의 프라이머/프로브 세트는 일반적으로 상기 기재된 바와 같은 프라이머 세트, 및 프라이머 세트에 의해 생성된 앰플리콘에 하이브리드되는 하나 이상의 검출 프로브를 포함한다. 검출 프로브는 검출가능한 부분을 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, 검출 프로브는 5' 말단에 부착된 형광 부분 및 3' 말단에 부착된 켄치 부분을 포함한다(하기 참조).
- <78> 프라이머/프로브 세트의 예는 하기를 포함한다:
- <79> SEQ ID NO:1 (5'-GCGGATTCCTTGTCAGATT-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:2 (5'-GCCGCGCTCACCTCTA-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, SEQ ID NO:3 (5'-TTCCATGATTGGAACAGCCGGG-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브, 및 SEQ ID NO:4 (5'-CCCGGCTGTTTCCAATCATGGAA-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역 상보적(reverse complementary) 검출 프로브를 포함하는, 프라이머/프로브 세트 1;
- <80> SEQ ID NO:5 (5'-AGTACGTTTGATACAGGATTGATT-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:6 (5'-AGCCGTTTTCGCCAGTTTC-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:7 (5'-CCATCCGAACCGACGCACAA-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브를 포함하는, 프라이머/프로브 세트 2;
- <81> SEQ ID NO:8 (5'-GGAACGAGCCATCAAAAACAA-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:9 (5'-GCGGTTTCAGGAAGTGATAGC-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, SEQ ID NO:10 (5'-TTGACGAGGTGGCGGTGGTACTT-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브, 및 SEQ ID NO:11 (5'-AAGTACCACGCCACCTGCTGCAA-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역 상보적 검출 프로브를 포함하는, 프라이머/프로브 세트 3;
- <82> SEQ ID NO:12 (5'-AAGGTATGATTAGCCACGTTTATCG-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:13 (5'-CGCCACCTGCTGCAATAATT-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:14 (5'-CGTATGCATCGGAACGAGCCATCAA-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브를 포함하는, 프라이머/프로브 세트 4;
- <83> SEQ ID NO:15 (5'-GCCTTTTTCCTTTCGGGATT-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:16 (5'-GTACATAAGAAAGGCGGAGATTACG-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, SEQ ID NO:17 (5'-ACGCCGATTGTAAACGCGATGGA-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브, 및 SEQ ID NO:18(5'-TCCATCGCGTTACAAATCGGCGT-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역 상보적 검출 프로브

를 포함하는, 프라이머/프로브 세트 5;

- <84> SEQ ID NO:19 (5'-GACGCTTCACGCCTTCCTT-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:20 (5'-CCATGAATGAACAGCTTGAAGTTT-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:21 (5'-AGGCTTCTCCGTCTGCTCTTTTATCTTCTCCTT-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브를 포함하는, 프라이머/프로브 세트 6;
- <85> SEQ ID NO:22 (5'-GCATCCTGTTTGTCTGTTTGG-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:23 (5'-TTACGTAGTGAATCCGCTGAAAATA-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:24 (5'-CGCTTGAACCTGCTTCTGCATACTTGC-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브를 포함하는, 프라이머/프로브 세트 7;
- <86> SEQ ID NO:25 (5'-CCGAATGCTCCGTTTTC-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:26 (5'-GTAACGCCGTAGGATTGGATATATC-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, SEQ ID NO:27 (5'-CCATGGCGGATGCGTTAAAGGTCAG-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브, 및 SEQ ID NO:28 (5'-CTGACCTTTAACGCATCCGCCATGG-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역 상보적 검출 프로브를 포함하는, 프라이머/프로브 세트 8;
- <87> SEQ ID NO:29 (5'-TGATCTAAACCTTTGAATCGTTGTC-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:30 (5'-AACGCATCCGCCATGGT-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:31 (5'-AATTTGCCGAATGCTCCGTTTTC-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 상보적 검출 프로브를 포함하는, 프라이머/프로브 세트 9;
- <88> SEQ ID NO:32 (5'-GACGCTTCACGCCTTCCTT-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:33 (5'-CCATGAATGAACAGCTTGAAGTTT-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:34 (5'-AGGCTTCTCCGTCTGCTCT-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하는, 프라이머/프로브 세트 10;
- <89> SEQ ID NO:35 (5'-TCTGCCTATTGCCGGTATGGT-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:36 (5'-GAAGCGGCCAAAGCATATGC-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:37 (5'-AGGCTTCTCCGTCTGCTCT-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하는, 프라이머/프로브 세트 11;
- <90> SEQ ID NO:38 (5'-ATTGCCGGTATGGTTTCAA-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:39 (5'-GAAGCGGCCAAAGCATATGC-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:40 (5'-AGGCTTCTCCGTCTGCTCT-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하는, 프라이머/프로브 세트 12;
- <91> SEQ ID NO:41 (5'-GTCATTCTGCCTATTGCCGGT-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:42 (5'-GAAGCGGCCAAAGCATATGC-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:43 (5'-TGCATCCAATCAGATTTCCTTTCG-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하는, 프라이머/프로브 세트 13;
- <92> SEQ ID NO:44 (5'-TCTGCCTATTGCCGGTATGGT-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:45 (5'-GAAGCGGCCAAAGCATATGC-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:46 (5'-GCTTCACGCCTTCCTTGAGTAA-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하는, 프라이머/프로브 세트 14;
- <93> SEQ ID NO:47 (5'-TCTGCCTATTGCCGGTATGGT-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:48 (5'-GAAGCGGCCAAAGCATATGC-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:49 (5'-TCACGCCTTCCTTGAGTAA-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하는, 프라이머/프로브 세트 15; 및
- <94> SEQ ID NO:50 (5'-TGATCTAAACCTTTTGAATCGTTGTC-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 정방향 프라이머, SEQ ID NO:51 (5'-GTAACGCCGTAGGATTGGATATATC-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 역방향 프라이머, 및 SEQ ID NO:52 (5'-CCATGGCGGATGCGTTAAAGGTCAG-3')의 서열 또는 이의 활성 단편을 포함하는 검출 프로브를 포함하는, 프라이머/프로브 세트 16.

올리고뉴클레오타이드 제조

- <95>
- <96> 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 당 분야에 널리 공지된 다양한 방법중 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다 (예를들어, 문헌[J. Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 1989, 2nd Ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press: New York, NY; "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", 1990, M.A. Innis (Ed.), Academic Press: New York, NY; P. Tijssen "Hybridization with Nucleic Acid Probes - Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (Parts I and II)", 1993, Elsevier Science; "PCR Strategies", 1995, M.A. Innis (Ed.), Academic Press: New York, NY; and "Short Protocols in Molecular Biology", 2002, F.M. Ausubel (Ed.), 5th Ed., John Wiley & Sons: Secaucus, NJ] 참조). 예를들어, 올리고뉴클레오타이드는 문헌[S. A. Narang *et al.*, Meth. Enzymol. 1979, 68: 90-98; E.L. Brown *et al.*, Meth. Enzymol. 1979, 68: 109-151; E.S. Belousov *et al.*, Nucleic Acids Res. 1997, 25: 3440-3444; D. Guschin *et al.*, Anal. Biochem. 1997, 250: 203-211; M.J. Blommers *et al.*, Biochemistry, 1994, 33: 7886-7896; and K. Frenkel *et al.*, Free Radic. Biol. Med. 1995, 19: 373-380; and U.S. Pat. No. 4,458,066]에 기술된 바와 같은 주형을 기재로 하여 화학적 합성 및 중합반응에 의해 제조될 수 있다.
- <97> 예를들어, 올리고뉴클레오타이드는 포스포라미다이트(phosphoramidite) 방법에 기초한 자동화된 고상 공정을 이용하여 제조될 수 있다. 이러한 방법에서, 각각의 뉴클레오타이드는 고형 지지대에 대해 3' 말단에 부착된 성장하는 올리고뉴클레오타이드 사슬의 5' 말단에 개별적으로 첨가된다. 첨가된 뉴클레오타이드는 5' 위치에서 디메톡시트리일(또는 DMT) 기에 의해 보호되는 3가 3'-포스포라미다이트의 형태이다. 염기 유도 포스포라미다이트 커플링 후, 5가 포스포트리에스테르 중간체 및 DMT 제거를 발생시키는 약한 산화는 올리고뉴클레오타이드 신장을 위한 새로운 부위를 제공한다. 이후, 올리고뉴클레오타이드는 고형 지지대에서 분리되고, 포스포다이에스테르 및 엑소시클릭 아미노기가 수산화암모늄으로 탈보호된다. 이러한 합성은 퍼킨 엘머/어플라이드 바이오시스템즈, 인크(Perkin Elmer/Applied Biosystems, Inc.)(Foster City, CA), 듀폰트(DuPont)(Wilmington, DE) 또는 밀리겐(Milligen)(Bedford, MA)사로부터 시판되는 것과 같은 올리고 합성기에서 수행될 수 있다. 대안적으로, 올리고뉴클레오타이드는 맞춤 주문될 수 있고, 미드랜드 서티파이드 리젠트 컴퍼니(Midland Certified Reagent Company)(Midland, TX), 익스프레스젠, 인크(ExpressGen, Inc.)(Chicago, IL), 오페론 테크놀로지스, 인크(Operon Technologies, Inc.)(Huntsville, AL), 바이오서치 테크놀로지스, 인크(BioSearch Technologies, Inc.)(Novato, CA) 및 이외 다수의 업체를 포함하는 당 분야에 널리 공지된 다양한 시판 업체로부터 주문될 수 있다.
- <98> 필요하거나 요망되는 경우, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 정제는 당 분야에 널리 공지된 다양한 방법중 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 통상적으로, 올리고뉴클레오타이드의 정제는 천연 아크릴아미드 젤 전기영동, 예를들어 문헌[J.D. Pearson and F.E. Regnier (J. Chrom., 1983, 255: 137-149)]에 기술된 바와 같은 음이온-교환 HPLC, 또는 역상 HPLC(G.D. McFarland and P.N. Borer, Nucleic Acids Res., 1979, 7: 1067-1080)에 의해 수행된다.
- <99> 올리고뉴클레오타이드의 서열은 화학적 분해(A.M. Maxam and W. Gilbert, Methods of Enzymology, 1980, 65: 499-560), 매트릭스 지원 레이저 탈착 이온화 비행시간형(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight, MALDI-TOF) 질량분광법(U. Pileles *et al.*, Nucleic Acids Res., 1993, 21: 3191-3196), 알칼리성 포스포타아제와 엑소뉴클레아제 분해물의 조합 후의 질량 분광법(H. Wu and H. Aboleneen, Anal. Biochem., 2001, 290: 347-352) 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 임의의 적절한 서열분석 방법을 이용하여 확인될 수 있다.
- <100> 상기에 이미 언급된 바와 같이, 당 분야에 공지된 여러 수단중 임의의 수단을 이용하여 변형된 올리고뉴클레오타이드가 제조될 수 있다. 이러한 변형의 비제한적인 예는 메틸화, "캡(cap)", 천연 발생 뉴클레오타이드중 하나 이상의 유사체로의 치환, 및 뉴클레오타이드간 변형, 예를들어 하전되지 않은 결합(예를들어, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카르바메이트 등), 또는 하전된 결합(예를들어, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)을 지니는 변형을 포함한다. 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 부가적인 공유 결합된 부분, 예를들어 단백질(예를들어, 뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 펩티드, 폴리-L-리신 등), 인터칼레이터(intercalator)(예를들어, 아크리딘, 프소랄렌 등), 킬레이트제(예를들어, 킬레이트 금속, 방사선 금속, 산화 금속 등), 및 알킬화제를 함유할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 또한 메틸 또는 에틸 포스포트리에스테르 또는 알킬 포스포라미데이트 결합의 형성에 의해 유도체화될 수 있다. 더욱이, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 서열은 또한 라벨을 이용하여 변형될 수 있다.

<101> **올리고뉴클레오타이드 서열의 라벨링**

<102> 특정 구체예에서, 검출 프로브 또는 증폭 프라이머 또는 프로브 및 프라이머 둘 모두는 증폭/검출 분석에 사용되기 전에 검출가능한 작용제 또는 부분으로 라벨링된다. 몇몇 구체예에서, 검출 프로브는 검출가능한 작용제로 라벨링된다. 검출가능한 작용제의 역할은 증폭된 표적 서열(앰플리콘)의 시각화 및 검출을 가능케 하는 것이다. 바람직하게는, 검출가능한 작용제는 측정될 수 있는 신호를 발생시키고, 신호의 강도가 분석되는 샘플 내의 증폭 생성물의 양과 관련(예를들어, 비례)되도록 선택된다.

<103> 올리고뉴클레오타이드(예를들어, 검출 프로브)와 검출가능한 작용제의 결합은 공유 또는 비공유 결합일 수 있다. 라벨링된 검출 프로브는 검출가능한 부분의 통합 또는 이에 대한 컨쥬게이션에 의해 제조될 수 있다. 라벨은 핵산 서열에 직접적으로 또는 간접적으로(예를들어, 링커를 통합) 부착될 수 있다. 다양한 길이의 링커 또는 스페이서 암(arm)이 당 분야에 공지되어 있고, 시판되며, 입체구조적 방해를 감소시키거나, 생성된 라벨링된 분자에 기타 유용하거나 요망되는 특성을 부여하도록 선택될 수 있다(예를들어, 문헌[E.S. Mansfield *et al.*, *Mol. Cell Probes*, 1995, 9: 145-156]).

<104> 핵산 분자를 라벨링하는 방법은 당 분야에 널리 공지되어 있다. 라벨링 프로토콜, 라벨 검출 기술 및 이러한 분야의 최근의 발달의 고찰에 대해서는, 문헌[L.J. Kricka, *Ann. Clin. Biochem.* 2002, 39: 114-129; R.P. van Gijlswijk *et al.*, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2001, 1: 81-91; and S. Joos *et al.*, *J. Biotechnol.* 1994, 35: 135-153]을 참조하라. 표준 핵산 라벨링 방법은 방사선 작용제의 통합, 형광 염료(L.M. Smith *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1985, 13: 2399-2412) 또는 효소(B.A. Connolly and O. Rider, *Nucl. Acids Res.*, 1985, 13: 4485-4502)의 직접적인 부착; 핵산 분자를 면역학적으로 검출가능하게 만드는 핵산 분자의 화학적 변형 또는 기타 친화성 반응에 의한 핵산 분자의 화학적 변형(T.R. Broker *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 1978, 5: 363-384; E.A. Bayer *et al.*, *Methods of Biochem. Analysis*, 1980, 26: 1-45; R. Langer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78: 6633-6637; R. W. Richardson *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 1983, 11: 6167-6184; D.J. Brigati *et al.*, *Virology* 1983, 126: 32-50; P. Tchen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81 : 3466-3470; J.E. Landegent *et al.*, *Exp. Cell Res.* 1984, 15: 61-72; and A.H. Hopman *et al.*, *Exp. Cell Res.* 1987, 169: 357-368); 및 효소-매개 라벨링 방법, 예를들어 무작위 프라이밍, 틸 번역(nick translation), PCR 및 말단 트랜스퍼라아제를 이용한 테일링(tailing) (효소적 라벨링 방법의 고찰을 위해서는, 문헌[J. Temsamani and S. Agrawal, *Mol. Biotechnol.* 1996, 5: 223-232] 참조)을 포함한다. 보다 최근에 개발된 핵산 라벨링 시스템은 단일반응성 시스플라틴 유도체와 DNA의 구아닌 부분의 N7 위치의 반응에 기초한 ULS (Universal Linkage System)(R.J. Heetebrij *et al.*, *Cytogenet. Cell. Genet.* 1999, 87: 47-52), 핵산으로 개제되어, UV 방사선 조사시 뉴클레오타이드 염기에 공유 결합되는 소랄렌-비오틴(C. Levenson *et al.*, *Methods Enzymol.* 1990, 184: 577-583; and C. Pfannschmidt *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 1996, 24: 1702-1709), 광반응 아지도 유도체(C. Neves *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 2000, 11: 51-55), 및 DNA 알킬화제(M.G. Sebestyen *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 1998, 16: 568-576)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

<105> 본 발명의 실시예 임의의 광범위한 검출가능한 작용제가 사용될 수 있다. 적절한 검출가능한 작용제는 다양한 리간드, 방사선헤종(예를들어, ^{32}P , ^{35}S , ^3H , ^{14}C , ^{125}I , ^{131}I 등); 형광 염료(특정한 예시적 형광 염료에 대해서는 하기 참조); 화학발광제(예를들어, 아크리리딘 에스테르, 안정화된 디옥세탄 등); 스펙트럼적으로 분해가능한 무기 형광 반도체 나노크리스탈(즉, 양자점(quantum dots)), 금속 나노입자(예를들어, 금, 은, 구리 및 백금) 또는 나노클러스터; 효소(예를들어, ELISA에 사용되는 효소, 즉 호스라디쉬 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase), 베타-갈락토시다아제, 루시퍼라아제, 알칼리성 포스파타아제); 비색 라벨(예를들어, 염료, 콜로이드성 금 등); 자성 라벨(예를들어, 다이내비드(DynabeadsTM)); 및 비오틴, 디옥시게닌 또는 기타 합텐을 포함하나, 이에 제한되지는 않고, 항혈청 또는 모노클로날 항체에 대한 단백질이 이용가능하다.

<106> 특정 구체예에서, 본 발명의 검출 프로브는 형광 라벨링된다. 광범위한 화학적 구조 및 물리적 특성의 다수의 공지된 형광 라벨링 부분이 본 발명의 실시예에 사용하기에 적합하다. 적합한 형광 염료는 플루오레세인 및 플루오레세인 염료(예를들어, 플루오레세인 이소티오시아닌 또는 FITC, 나프토플루오레세인, 4',5'-디클로로-2',7'-디메톡시-플루오레세인, 6-카르복시플루오레세인 또는 FAM), 카르보시아닌, 메로시아닌, 스티릴 염료, 옥소놀 염료, 피코에리트린, 에리트로신, 에오신, 로다민 염료(예를들어, 카르복시테트라메틸로다민 또는 TAMRA, 카르복시로다민 6G, 카르복시-X-로다민(ROX), 리스아민 로다민 B, 로다민 6G, 로다민 그린, 로다민 레드, 테트라메틸로다민 또는 TMR), 쿠마린 및 쿠마린 염료(예를들어, 메톡시쿠마린, 디알킬아미노쿠마린, 히드록시쿠마린 및 아미노메틸쿠마린 또는 AMCA), 오레곤 그린 염료(예를들어, 오레곤 그린 488, 오레곤 그린 500, 오레곤 그린

514), 텍사스 레드, 텍사스 레드-X, 스펙트럼 레드™, 스펙트럼 그린™, 시아닌 염료(예를들어, Cy-3™, Cy-5™, Cy-3.5™, Cy-5.5™), 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 염료(예를들어, 알렉사 플루오르 350, 알렉사 플루오르 488, 알렉사 플루오르 532, 알렉사 플루오르 546, 알렉사 플루오르 568, 알렉사 플루오르 594, 알렉사 플루오르 633, 알렉사 플루오르 660 및 알렉사 플루오르 680), BODIPY 염료(예를들어, BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY TMR, BODIPY TR, BODIPY 530/550, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665), IRD 염료(예를들어, IRD40, IRD 700, IRD 800) 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 형광 염료를 핵산 분자에 연결하거나 통합시키기 위한 적절한 형광 염료 및 방법의 보다 많은 예는 문헌["*The Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*", 9th Ed., Molecular Probes, Inc., Eugene, OR]를 참조하라. 형광 염료 뿐만 아니라 라벨링 키트는, 예를들어 아마삼 바이오사이언스, 인크.(Amersham Biosciences, Inc.)(Piscataway, NJ), 몰레큘라 프로브스, 인크.(Molecular Probes Inc.)(Eugene, OR), 및 뉴 잉글랜드 바이오랩스 인크.(New England Biolabs Inc.)(Beverly, MA)사에서 시판된다.

<107> 직접적으로 검출가능한 것들 외에, 몇몇 형광기(공여체)는 형광 공명 에너지 전달(FRET)의 과정에서 에너지를 또 다른 형광기(수용체)로 전달하고, 제 2의 기가 검출가능한 형광 신호를 발생시킨다. 이러한 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드 검출 프로브는, 예를들어 증폭된 표적 서열에 하이브리드되는 경우 검출가능하게 될 수 있다. 본 발명에 사용하기에 적합한 FRET 수용체/공여체 쌍의 예는 플루오레세인/테트라메틸로다민, IAEDANS/FITC, IAEDANS/5-(요오도아세토미도)플루오레세인, B-피코에리트린/Cy-5, 및 EDANS/Dabcyl을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

<108> 물리적으로 연결된 형광 리포터/켄처 분자쌍의 사용이 또한 본 발명의 범위에 해당된다. 택맨(TaqMan™) 분석에서의 상기 시스템의 사용(예를들어, 미국 특허 제5,210,015호; 제5,804,375호; 제5,487,792호 및 제6,214,979에 기재되어 있음) 또는 분자 비콘으로서의 상기 시스템의 사용(예를들어, 문헌[S. Tyagi and F.R. Kramer, Nature Biotechnol. 1996, 14: 303-308; S. Tyagi *et al.*, Nature Biotechnol. 1998, 16: 49-53; L.G. Kostrikis *et al.*, Science, 1998, 279: 1228-1229; D.L. Sokol *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95: 11538-11543; S.A. Marras *et al.*, Genet. Anal. 1999, 14: 151-156]; 및 미국 특허 제5,846,726호, 제5,925,517호, 제6,277,581호 및 제6,235,504호에 기재되어 있음)은 당 분야에 널리 공지되어 있다. 택맨(TaqMan™) 분석 포맷을 이용한, 증폭 반응의 생성물은 이들이 소위 "실시간" 방식으로 형성됨에 따라 검출될 수 있다. 그 결과로, 증폭 조건하에서 반응 혼합물이 존재하는 동안, 증폭 생성물/프로브 하이브리드가 형성되고, 검출된다.

<109> 본 발명의 몇몇 구체예에서, PCR 검출 프로브는 형광 부분을 지니는 5'-말단 및 켄처 부분을 지니는 3'-말단에 라벨링되는 택맨(TaqMan™)-유사 프로브이다. 택맨(TaqMan™)-유사 프로브에 사용하기 위한 적절한 형광단 및 켄처는 미국 특허 제5,210,015호; 제5,804,375호; 제5,487,792호; 및 제6,214,979호; 및 WO 01/86001호(각각의 전체 내용은 참조로서 본원에 포함됨)에 기재되어 있다. 켄처의 예는 DABCYL(즉, 4-(4'-디메틸아미노페닐아조)-벤조산) 숙신이미딜 에스테르, 디아릴로다민 카르복실산, 숙신이미딜 에스테르(또는 QSY-7), 및 4',5'-디니트로플루오레세인 카르복실산, 숙신이미딜 에스테르(또는 QSY-33)(예를들어, 모두 몰레큘라 프로브스(Molecular Probes)사로부터 입수가 가능), 켄처 1 (Q1; 에포치 바이오사이언시즈(Epoch Biosciences)(Bothell, WA)사로부터 입수가 가능), 또는 "블랙 홀 켄처(Black hole quenchers)" BHQ-1, BHQ-2, 및 BHQ-3 (바이오서치 테크놀로지스, 인크.(BioSearch Technologies, Inc.)(Novato, CA)사로부터 입수가 가능)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 구체예에서, PCR 검출 프로브는 FAM을 지니는 5' 말단 및 블랙 홀 켄처를 지니는 3' 말단에 라벨링되는 택맨(TaqMan™)-유사 프로브이다.

<110> 정상 또는 변형 뉴클레오타이드의 "테일(tail)"이 또한 검출감도 목적을 위해 올리고뉴클레오타이드 프로브에 첨가될 수 있다. 테일에 상보적이고, 하나 이상의 검출가능한 라벨(예를들어, 형광단, 효소 또는 방사선으로 라벨링된 염기)을 함유하는 핵산을 이용한 두번째 하이브리드화는 앰플리콘/프로브 하이브리드의 시각화를 가능케 한다(예를들어, 엔조 바이오켄, 인크.(Enzo Biochem. Inc.)(New York, NY)사에서 시판되는 시스템). 본 발명의 올리고뉴클레오타이드가 유용한 분석의 또 다른 예는 신호 증폭 방법이며, 예를들어 이는 미국 특허 제5,124,246호(이의 전체 내용은 참조로서 본원에 포함됨)에 기재되어 있다. 이러한 방법에서, 신호는 올리고뉴클레오타이드 프로브에 첨가된 "테일"에 특이적으로 하이브리드되는 첫번째 세그먼트, 및 라벨링된 프로브에 특이적으로 하이브리드되는 다수의 동일한 두번째 세그먼트를 함유하도록 작제된 폴리뉴클레오타이드인 증폭 중합체의 사용을 통해 증폭된다. 증폭의 정도는 이론적으로 두번째 세그먼트의 반복 수에 비례한다. 중합체는 선형이거

나 분지형일 수 있다. 분지된 중합체는 포크 또는 빗의 형태일 수 있다.

- <111> 특정 핵산 라벨링 기술의 선택은 상황에 따를 것이고, 라벨링 방법의 용이성 및 비용, 요망되는 샘플 라벨링의 품질, 하이브리드 반응(예를들어, 하이브리드화 공정의 속도 및/또는 효율성)에 대한 검출가능한 부분의 효과, 사용되는 증폭 방법의 특성, 검출 시스템의 특성, 검출 가능한 라벨에 의해 발생하는 신호의 특성 및 강도 등과 같은 여러 요인에 의해 좌우될 것이다.
- <112> **본 발명의 프라이머를 이용한 나이세리아 고노레아 표적 서열의 증폭**
- <113> 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아 표적 서열을 증폭시키기 위한 본 발명의 올리고뉴클레오티드 서열의 사용은 임의의 특정 핵산 증폭 기술 또는 임의의 특정 변형에 제한되지는 않는다. 사실, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 서열은 당 분야에 널리 공지된 다양한 핵산 증폭 방법중 임의의 방법에 사용될 수 있다(예를들어, 문헌[A.R. Kimmel and S.L. Berger, *Methods Enzymol.* 1987, 152: 307-316; J. Sambrook *et al.*, "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", 1989, 2nd Ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press: New York, NY; "*Short Protocols in Molecular Biology*", F.M. Ausubel (Ed.), 2002, 5th Ed., John Wiley & Sons: Secaucus, NJ] 참조).
- <114> 이러한 핵산 증폭 방법은 중합효소 연쇄반응(또는 PCR, 예를들어 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌["*PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*", M.A. Innis (Ed.), 1990, Academic Press: New York; "*PCR Strategies*", M.A. Innis (Ed.), 1995, Academic Press: New York; "*Polymerase chain reaction: basic principles and automation in PCR: A Practical Approach*", McPherson *et al.*, (Eds.), 1991, IRL Press: Oxford; Saiki *et al.*, *Nature*, 1986, 324: 163; 및 미국 특허 제4,683,195호, 제4,683,202호 및 제4,889,818호]에 기재되어 있음); 및 임의의 변형, 예를들어 택맨(TaqMan™)-기재 분석(Holland *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1991, 88: 7276-7280), 및 역전사 중합효소 연쇄반응(또는 RT-PCR, 예를들어 전체 내용이 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 제5,322,770호 및 제5,310,652호에 기재되어 있음)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- <115> PCR에서, 표적 핵산의 상보적 가닥에 하이브리드되기 위해 과량의 프라이머쌍이 사용된다. 프라이머는 각각 주형으로 표적 서열을 이용하는 DNA 중합효소에 의해 신장된다. 신장 생성물은 본래의 표적 가닥으로부터의 해리(변성) 후에 표적 자신이 된다. 이후, 새로운 프라이머가 하이브리드되고, 중합효소에 의해 신장되고, 이러한 주기가 반복되어, 애플리콘의 카피수가 지수적으로 증가된다. PCR 반응에서 프라이머 신장 생성물을 생성할 수 있는 DNA 중합효소의 예는 대장균(*E. coli*) DNA 중합효소 I, DNA 중합효소 I의 클레나우 단편(Klenow fragment), T4 DNA 중합효소, 다양한 업체(예를들어, 퍼킨 엘머)로부터 입수가능한 씨머스 아쿠아티쿠스(*Thermus aquaticus*)(Taq), 씨머스 씨모필루스(*Thermus thermophilus*)(United States Biochemicals), 바실러스 스테레오씨모필루스(*Bacillus stearothermophilus*)(Bio-Rad) 또는 씨모코쿠스 리토랄리스(*Thermococcus litoralis*)("Vent" 중합효소, New England Biolabs)로부터 분리된 열안정성 DNA 중합효소를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. RNA 표적 서열은 mRNA를 역전사함으로써 cDNA로 증폭될 수 있고, 이후 상기 기재된 바와 같이 PCR(RT-PCR)이 수행된다. 대안적으로, 미국 특허 제5,322,770호(이의 전체 내용은 참조로서 본원에 포함됨)에 기재된 바와 같이 두 단계에 단일한 효소가 사용될 수 있다.
- <116> 상기 기재된 바와 같은 효소적 열 증폭 방법 이외에, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이용하여 나이세리아 고노레아 표적 서열을 증폭시키기 위해 등온 효소적 증폭 반응이 이용될 수 있다(S.C. Andras *et al.*, *Mol. Biotechnol.*, 2001, 19: 29-44). 이러한 방법은 전사-매개 증폭(또는 TMA, 예를들어 문헌[D.Y. Kwok *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 1173-1177; C. Giachetti *et al.*, *J. Clin. Microbiol.*, 2002, 40: 2408-2419; 및 미국 특허 제5,399,491호]에 기재되어 있음); 자가-지속 서열 복제(Self-Sustained Sequence Replication)(또는 SSR, 예를들어 문헌[J.C. Guatelli *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87: 1874-1848; and E. Fahy *et al.*, *PCR Methods and Applications*, 1991, 1: 25-33]에 기재되어 있음); 핵산 서열 기재 증폭(또는 NASBA, 예를들어 문헌[T. Kievits *et al.*, *J. Virol.*, *Methods*, 1991, 35: 273-286; 및 미국 특허 제5,130,238호]에 기재되어 있음) 및 가닥 치환 증폭(Strand Displacement Amplification)(또는 SDA, 예를들어 문헌[G.T. Walker *et al.*, *PNAS*, 1992, 89: 392-396; EP 0 500 224 A2]에 기재되어 있음)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본 문단에 인용된 참고문헌 각각의 내용은 참조로서 본원에 포함된다.
- <117> 가닥-치환 증폭(SDA)는 표적 DNA의 변형되지 않은 가닥에 새김눈을 내는(nick) 제한 엔도뉴클레아제의 능력과 고정된 온도에서 새김눈에서 3' 말단으로 신장하여 다운스트림 DNA 가닥을 치환시키는 엑소뉴클레아제-결여 DNA

중합효소의 작용을 검비한다(G.T. Walker *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89: 392-396). SDA에서 사용되는 프라이머는 표적 결합 서열에 대해 5' 부위에서의 제한 엔도뉴클레아제 인식을 포함한다(미국 특허 제 5,270,184호 및 제5,344,166호, 각각의 전체 내용은 참조로서 본원에 포함됨).

<118> 핵산 서열 기재 증폭(NASBA)은 저온의 등온, 일반적으로 41°C에서 일체화 수행되는 3개의 효소(예를들어, RNase H, 조류 골수아세포종 바이러스(AMV) 역전사효소 및 T7 RNA 중합효소)를 이용한다(J. Compton, Nature, 1991, 350: 91-92; A.B. Chan and J.D. Fox, Rev. Med. Microbiol., 1999, 10: 185-196). NASBA 반응의 생성물은 주로 단일 가닥의 RNA이다. 자가-지속 서열 복제(3SR) 반응은 표적 DNA 또는 RNA 서열의 등온 증폭에 매우 효과적인 방법이다. 3SR 시스템은 AMV 역전사효소, 대장균 RNase H, 및 DNA-의존성 RNA 중합효소(예를들어, T7 RNA 중합효소)의 집합적 활성을 포함한다. 전사-매개 증폭(TMA)은 프라이머 영역 내에 공학처리된 프로모터로부터 RNA를 만들기 위해 RNA 중합효소, 이러한 RNA 주형으로부터 상보적 DNA를 생성하기 위해 역전사효소, 및 cDNA로부터 RNA를 제거하기 위해 RNase H를 이용한다(J.C. Guatelli *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87: 1874-1878).

<119> NASBA, 3SR, 및 TMA 프라이머는 프라이머의 표적 결합 서열에 연결된 RNA 중합효소 프로모터를 필요로 한다. 프라이머 내의 통합을 위한 프로모터 또는 프로모터 서열은 프로모터 서열을 인지하고 결합하는 RNA 중합효소에 의해 특이적으로 인지되고, 전사 과정이 개시되어 RNA 전사체가 생성되는 핵산 서열(천연 발생되거나, 합성 생성되거나, 제한 분해된 생성물)이다. 유용한 프로모터의 예는 박테리오파지 T3, T7 또는 SP6로부터의 중합효소와 같은 특정 박테리오파지 중합효소에 의해 인지되는 프로모터, 또는 대장균으로부터의 프로모터를 포함한다.

<120> **증폭된 나이세리아 고노레아 표적 서열의 검출**

<121> 본 발명의 특정 구체예에서, 증폭 반응에 의해 생성된 증폭 생성물(즉, 증폭된 나이세리아 고노레아 표적 서열)을 검출하기 위해 올리고뉴클레오타이드 프로브 서열이 사용된다. 본 발명의 프로브 서열은 다양한 널리 공지된 동종성 또는 이종성 방법을 이용하여 사용될 수 있다.

<122> 동종성 검출 방법은 프로브에 부착되고, 표적 서열의 존재하에서 신호를 방출하는 FRET 라벨인 분자 비콘의 사용(S. Tyagi and F.R. Kramer, Nature Biotechnol. 1996, 14: 303-308; S. Tyagi *et al.*, Nature Biotechnol. 1998, 16: 49-53; L.G. Kostrikis *et al.*, Science, 1998, 279: 1228-1229; D.L. Sokol *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95: 11538-11543; S.A. Marras *et al.*, Genet. Anal. 1999, 14: 151-156; 및 미국 특허 제5,846,726호, 제5,925,517호, 제6,277,581호 및 제6,235,504호), 및 소위 택맨(TaqMan™) 분석(미국 특허 제5,210,015호; 제5,804,375호; 제5,487,792호 및 제6,214,979호 및 WO 01/86001호)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 검출 기술을 이용하여, 증폭 반응의 생성물은 이들이 형성됨에 따라, 즉 소위 실시간 방식으로 검출될 수 있다. 이 결과로, 반응 혼합물이 증폭 조건하에서 존재하는 동안, 증폭 생성물/프로브 하이브리드가 형성되고, 검출된다.

<123> 특정 구체예에서, 본 발명의 검출 프로브가 택맨(TaqMan™) 분석에 사용된다. 플루오로제닉(fluorogenic) 5' 뉴클레아제 분석으로도 공지된 택맨(TaqMan™) 분석은 핵산 표적에 대해 강력하고, 용도가 넓은 PCR-기재 검출 시스템이다. 분석은 형광 신호의 발생을 모니터링하면서 열 주기와 함께 수행된다. 분석 시스템은 표적 카피수의 결정을 가능케 하는 정량적 데이터를 발생시키는 능력을 지닌다. 예를들어, 나이세리아 고노레아의 이전에 정량된 현탁액의 연속 희석을 이용하여 표준 곡선이 생성될 수 있고, 이에 대하여 공지되지 않은 샘플이 비교될 수 있다. 택맨(TaqMan™) 분석은 편리하게는 내인성 5' 뉴클레아제 활성을 지녀, 상기 논의된 바와 같이 형광 리포터 염료 및 켄처 부분 둘 모두로 라벨링된 올리고뉴클레오타이드 프로브를 분해시키는 앰플리택 골드(AmpliTaq Gold™) DNA 중합효소를 이용하여 수행된다. 프로브가 분해됨에 따라 증폭 주기 동안 발생하는 형광의 변화를 측정하고, 형광 부분과 켄처 부분을 커플링 해제시키고, 표적 서열의 증폭에 비례하는 형광 신호를 증가시킴으로써 분석 결과가 수득된다.

<124> 동종성 검출 방법의 기타 예는 하이브리드화 보호 분석(HPA)를 포함한다. 이러한 분석에서, 프로브는 비-뉴클레오타이드-기재 링커 암 화학(미국 특허 제5,585,481호 및 제5,185,439호)을 이용하여 매우 화학발광성 분자인 아크리디늄 에스테르(AE)로 라벨링된다(Weeks *et al.*, Clin. Chem., 1983, 29: 1474-1479; Berry *et al.*, Clin. Chem., 1988, 34: 2087-2090). 화학발광은 이후에 광자의 방출로 불활성화되는 여기된 N-메틸 아크리돈을 발생시키는 알칼리성 과산화수소를 이용한 AE 가수분해에 의해 트리거링(triggering)된다. 표적 서열의 부재하에서, AE 가수분해는 신속하다. 그러나, 프로브가 표적 서열에 결합되는 경우 AE 가수분해의 속도는 크게 감소된다. 따라서, 가수분해된 AE-라벨링된 프로브 및 가수분해되지 않은 AE-라벨링된 프로브는 물리적 분리

없이 용액 중에서 직접적으로 검출될 수 있다.

<125> 이종성 검출 시스템은 당 분야에 널리 공지되어 있고, 일반적으로 반응 혼합물 내의 다른 물질로부터 증폭된 서열을 분리시키는 포획제를 사용한다. 포획제는 통상적으로 하나 이상의 특정 결합 서열로 코팅된 고형 지지 물질(예를들어, 미세역가 웰, 비드, 칩 등)을 포함한다. 결합 서열은 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 프로브에 첨가된 테일 서열에 상보적일 수 있다. 대안적으로, 결합 서열은, 자체로 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 프로브의 테일 서열에 상보적인 서열을 포함하는, 포획 올리고뉴클레오타이드의 서열에 상보적일 수 있다. 잔여 반응 혼합물로부터의 포획 작용제에 결합된 증폭 생성물/프로브 하이브리드의 분리 후, 증폭 생성물/프로브 하이브리드는, 예를들어 본원에 기재된 것과 같은 임의의 검출 방법을 이용하여 검출될 수 있다.

<126> II - 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아의 검출 방법

<127> 또 다른 양태에서, 본 발명은 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아의 존재를 검출하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 임균 감염의 증상 또는 이의 후유증을 나타내거나 나타내지 않는 환자를 시험하고/하거나, 위험한 집단을 스크리닝하기 위해 사용될 수 있다.

<128> 통상적으로, 본 발명의 방법은 나이세리아 고노레아 핵산(예를들어, 나이세리아 고노레아의 열린해독틀-1(*ORF1*) 유전자, 시토신 메틸트랜스퍼라아제(*dcmG*) 유전자 또는 파일린 반전 단백질 동족체(*pivNG*) 유전자 내의 서열을 포함하는 핵산)을 함유하는 것으로 여겨지는 시험 샘플을 제공하는 단계; 상기 시험 샘플과 본원에 기재된 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드를 접촉시켜, 나이세리아 고노레아 핵산이 시험 샘플 내에 존재시 이러한 나이세리아 고노레아 핵산에 상기 올리고뉴클레오타이드가 하이브리드될 수 있는 단계; 및 나이세리아 고노레아 핵산에 하이브리드된 임의의 올리고뉴클레오타이드를 검출하는 단계를 포함하며, 여기서 나이세리아 고노레아 핵산에 대한 올리고뉴클레오타이드의 하이브리드화의 검출은 시험 샘플 내에 나이세리아 고노레아가 존재하는 것을 나타낸다.

<129> 본 발명의 기타 방법은 나이세리아 고노레아 핵산을 함유하는 것으로 여겨지는 시험 샘플을 본원에 기재된 하나 이상의 프라이머 세트 또는 프라이머/프로브 세트 및 증폭 반응 시약과 접촉시켜 반응 혼합물을 형성시키는 것을 포함한다. 이후, 반응 혼합물은 시험 샘플 내에 나이세리아 고노레아 핵산이 존재하는 경우 이를 증폭시키기 위한 증폭 조건 하에 배치되고, 증폭 생성물이 생성된다. 생성된 증폭 생성물은 다양한 검출 기술을 이용하여 검출될 수 있다. 특정 구체예에서, 증폭 생성물/프로브 하이브리드는 본 발명의 검출 프로브를 이용하여 형성되며, 이러한 하이브리드의 검출은 시험 샘플 내에 나이세리아 고노레아가 존재하는 것을 나타낸다.

<130> 샘플 제조

<131> 본 발명의 방법에 따르면, 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아의 존재는 나이세리아 고노레아의 열린해독틀-1(*ORF1*) 유전자, 시토신 메틸트랜스퍼라아제(*dcmG*) 유전자 또는 파일린 반전 단백질 동족체(*pivNG*) 유전자 내의 서열을 포함하는 임의의 나이세리아 고노레아 핵산을 검출함으로써 결정될 수 있다. 따라서, 이러한 나이세리아 고노레아 표적 서열을 포함하는 것으로 여겨지는 임의의 액체 또는 고체 생물학적 물질이 적절한 시험 샘플이 될 수 있다. 특정 구체예에서, 바람직한 시험 샘플은 소변(예를들어, 최초 배설 소변), 정액, 타액, 안구 유체, 림프액, 자궁경내막, 요도, 직장, 질내, 외음-질내, 및 비인두 샘플을 포함한다. 기타 바람직한 시험 샘플은 PAPS-스메어(PAPS-smear) 표본을 포함한다.

<132> 시험 샘플은 종종 나이세리아 고노레아에 감염된 것으로 여겨지는 환자로부터 획득되거나 이로부터 분리될 것이다. 상기에서 언급한 바와 같이, 시험 샘플은 분리 후 추가의 처리 없이 사용될 수 있거나, 대안적으로 분석 전에 가공될 수 있다. 예를들어, 시험 샘플은 나이세리아 고노레아 핵산을 함유하는 세포로부터 나이세리아 고노레아 핵산을 방출시키기 위해 처리될 수 있다. 핵산 추출 방법은 당 분야에 널리 공지되어 있고, 화학적 방법, 온도 방법 및 기계적 방법을 포함한다 (예를들어, 문헌[J. Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 1989, 2nd Ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press: New York, NY] 참조). 예를들어, 아머삼 바이오사이언시즈(Amersham Biosciences)(Piscataway, NJ), BD 바이오사이언시즈 클론텍(BD Biosciences Clontech)(Palo Alto, CA), 에피센터 테크놀로지스(Epicentre Technologies)(Madison, WI), 젠트라 시스템즈, 인크.(Gentra Systems, Inc.)(Minneapolis, MN), 마이크로프로브 코프.(MicroProbe Corp.)(Bothell, WA), 오르가논 테크니카(Organon Teknika)(Durham, NC), 및 키아젠 인크.(Qiagen Inc.)(Valencia, CA)사에서 시판되는, 생물학적 샘플로부터 핵산을 추출하는데 사용될 수 있는 다수의 다양하고 다양한 키트가 또한 존재한다. 후술되는 프로토콜을 매우 상세하게 기술하는 사용자 지침이 보통 상기 모든 키트에 포함된다. 민감도, 공정 시간 및 비용은 키트마다 상이할 수 있다. 당업자는 특정 상황에 대해 가장 적

절한 키트(들)를 용이하게 선택할 수 있다.

<133> 추출 전, 나이세리아 고노레아 핵산을 함유하는 세포가, 예를들어 여과 또는 원심분리에 의해 본래의 생물학적 샘플의 기타 구성성분으로부터 정제되거나, 농축되거나, 달리 분리될 수 있다.

<134> **샘플 분석**

<135> 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, 본 발명의 방법에 따른 나이세리아 고노레아 표적 서열의 증폭 및 증폭된 나이세리아 고노레아 핵산의 검출은 임의의 증폭/검출 방법, 예를들어 본원에 기재된 증폭/검출 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 특정 구체예에서, 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아의 검출은 택맨(TaqMan™) 분석을 이용하여 수행되고, 증폭 생성물의 형성은 형광에 의해 실시간 방식으로 모니터링된다. 이러한 구체예에서, 본원에 기재된 바와 같이 5' 말단에 형광 리포터 및 3' 말단에 켄처 부분으로 라벨링된 프로브가 사용될 것이다. 택맨(TaqMan™) 분석 포맷에 적합한 증폭 조건의 최적화 및 증폭 반응 시약의 선택은 당업자의 지식 범위에 해당된다.

<136> 특정 구체예에서, 추출 및/또는 표적 증폭을 위한 대조군으로 제공하기 위해 내부 대조군 또는 내부 표준이 생물학적 샘플(또는 생물학적 샘플로부터 추출된 정제된 핵산)에 첨가된다. 내부 대조군은 일반적으로 표적 서열(들)과 상이한 서열을 포함하고, 표적 나이세리아 고노레아 핵산(들)을 증폭시키는데 사용되는 프라이머에 의해 증폭될 수 있다. 내부 대조군의 사용은 추출 과정, 증폭 반응, 및 검출, 및 분석 성능 조절의 모니터링을 가능케 한다. 증폭된 대조군 및 증폭된 표적은 통상적으로 대조군 및 표적의 검출을 위한 다양한 프로브(예를들어, 다양한 검출가능한 작용제로 라벨링됨)를 이용함으로써 검출 단계에서 구별된다.

<137> 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아의 존재는 동일한 생물학적 시험 샘플의 다양한 분취량 또는 다양한 시험 샘플(예를들어, 분석되는 최초 샘플이 소변 샘플이거나, 다양한 시점에서 수거된 소변 샘플인 경우 자궁경내막 면봉)을 이용하는 본 발명에 따른 분석을 반복함으로써 확인될 수 있다. 본 발명의 프라이머의 다양한 세트를 이용하여 나이세리아 고노레아 염색체의 다양한 영역을 표적화함으로써 확인성 시험이 또한 수행될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아의 존재는 다양한 분석(즉, 다양한 방법에 기초한 분석)을 수행함으로써 확인될 수 있다. 예를들어, 택맨(TaqMan™) 분석을 이용하여 최초 분석이 수행되는 경우, 제 2의 분석이 전사-매개 증폭(TMA) 반응을 이용하여 수행될 수 있다.

<138> 대안적으로 또는 추가로, 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아의 존재는 다양한 분석(예를들어, 세포 배양물로부터의 분리물)에 의해 확인될 수 있다.

<139> **III - 나이세리아 고노레아 및 기타 유기체의 동기 검출을 위한 복합 분석**

<140> 상기에 언급한 바와 같이, 본 발명의 프라이머/프로브 세트는 나이세리아 고노레아에 대해 특이적이다. 따라서, 본 발명은 두개 이상의 프라이머 세트 또는 프라이머/프로브 세트의 조합물(즉, 본원에 기재된 나이세리아 고노레아 특이적 세트로부터 선택된 것 및 시험되는 기타 유기체에 특이적인 세트로부터 선택된 또 다른 것)을 이용하여 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아 및 또 다른 유기체의 존재를 동기 검출하기 위한 방법을 제공한다.

<141> 나이세리아 고노레아와 동시에 검출될 수 있는 기타 유기체는 표 4에 나열된 임의의 유기체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 구체예에서, 나이세리아 고노레아와 동시에 시험되는 기타 유기체는 클라미디아 트라코마티스이다.

<142> 특히, 본 발명은 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아 및/또는 클라미디아 트라코마티스를 검출하는 방법을 제공하고, 이는 나이세리아 고노레아 핵산 및/또는 클라미디아 트라코마티스 핵산을 함유하는 것으로 여겨지는 시험 샘플을 제공하는 단계; 나이세리아 고노레아 핵산이 샘플에 존재시, 이의 전부 또는 일부를 증폭시키는 조건하에서 상기 시험 샘플과 본원에 기재된 프라이머/프로브 세트를 접촉시켜, 나이세리아 고노레아 앰플리콘을 생성시키는 단계; 클라미디아 트라코마티스 핵산이 샘플에 존재시, 이의 전부 또는 일부를 증폭시키는 조건하에서 상기 시험 샘플과 클라미디아 트라코마티스에 대해 특이적인 하나 이상의 프라이머/프로브 세트를 접촉시켜, 클라미디아 트라코마티스 앰플리콘을 생성시키는 단계; 및 임의의 나이세리아 고노레아 앰플리콘 및 임의의 클라미디아 트라코마티스 앰플리콘을 검출하는 단계를 포함하며, 여기서 나이세리아 고노레아 앰플리콘의 검출은 시험 샘플 내의 나이세리아 고노레아의 존재를 나타내고, 클라미디아 트라코마티스 앰플리콘의 검출은 시험 샘플 내의 클라미디아 트라코마티스의 존재를 나타낸다.

<143> 특정한 바람직한 구체예에서, 클라미디아 트라코마티스에 특이적인 프라이머/프로브 세트는 국제 출원 번호

PCT/US2006/43394호(Siemens Medical Solutions Diagnostics)(전체 내용이 참조로서 본원에 포함됨)에 기술된 것이다.

IV - 키트

또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 방법에 따라 임균 감염의 검출에 유용한 물질을 포함하는 키트를 제공한다. 본 발명의 키트는 진단 연구소, 실험 연구소 또는 개업자에 의해 사용될 수 있다.

본 발명에 따른 나이세리아 고노레아의 검출에 필요한 기본적인 물질 및 시약이 키트 내에 어셈블리될 수 있다. 특정 구체예에서, 키트는 하나 이상의 본 발명의 프라이머 세트 또는 프라이머/프로브 세트, 및 임의로 증폭 반응 시약을 포함한다. 각각의 키트는 바람직하게는 절차 특이적이 되도록 하는 시약을 포함한다. 따라서, NASBA에 사용하기 위해 적합한 키트는 바람직하게는 표적 결합 서열에 연결된 RNA 중합효소 프로모터를 지니는 프라이머를 함유하는 반면, SDA에 사용하기 위해 적합한 키트는 바람직하게는 표적 결합 서열에 대해 5' 위치에 제한 엔도뉴클레아제 인식부를 포함하는 프라이머를 함유한다. 유사하게, 키트가 5' 뉴클레아제 분석, 예를 들어 택맨(TaqMan™) 분석에 사용하기 위해 적합한 경우, 검출 프로브는 바람직하게는 하나 이상의 형광 리포터 부분 및 하나 이상의 켄처 부분을 함유한다.

적합한 증폭 반응 시약은, 예를 들어 증폭 반응을 수행하기에 적합한 완충용액, 시약, 역전사효소 및/또는 중합효소 활성 또는 엑소뉴클레아제 활성을 지니는 효소, 효소 보조인자, 예를 들어 마그네슘 또는 망간; 염; 데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트(dNTPs), 예를 들어 데옥시아데노신 트리포스페이트(dATP), 데옥시구아노신 트리포스페이트(dGTP), 데옥시시티딘 트리포스페이트(dCTP), 데옥시티미딘 트리포스페이트(dTTP) 및 데옥시유리딘 트리포스페이트(dUTP)중 하나 이상을 포함한다. 예를 들어, NASBA에 사용하기 위해 적합한 키트는 적절한 양의 역전사효소, RNase H 및 T7 RNA 중합효소를 함유할 수 있다. 전사 증폭 반응, 예를 들어 NASBA에 적합한 키트에서, 완충용액은, 예를 들어 증폭 반응을 향상시키는 것으로 공지된 DMSO를 포함할 수 있다.

공정에 따라, 키트는 세척 완충용액 및/또는 시약, 하이브리드화 완충용액 및/또는 시약, 라벨링 완충용액 및/또는 시약, 및 검출 수단중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다. 완충용액 및/또는 시약은 바람직하게는 키트가 사용되는 특정 증폭/검출 기술에 대해 최적화된다. 상기 공정의 다양한 단계를 수행하기 위한 상기 완충용액 및 시약을 이용하기 위한 프로토콜이 키트 내에 포함될 수 있다.

또한, 키트는 증폭 과정에 대한 점검, 및 증폭 과정에서의 실패로 인한 위(false) 음성 시험 결과의 발생을 방지하기 위한 내부 대조군이 제공될 수 있다. 최적 대조군 서열은 증폭 반응에서 표적 핵산 서열과 경쟁하지 않는 방식으로 선택된다(상기 기재된 바와 같음).

키트는 또한 증폭 전의 생물학적 표본으로부터의 핵산의 분리 및/또는 핵산 추출 전의 나이세리아 고노레아 세포의 정제 또는 분리를 위한 시약을 함유할 수 있다.

시약은 고체(예를 들어, 동결건조된 것) 또는 액체 형태로 공급될 수 있다. 본 발명의 키트는 임의로 각각의 개별적 완충용액 및/또는 시약을 위한 다양한 용기(예를 들어, 바이얼, 앰플, 시험관, 플라스크 또는 병)을 포함할 수 있다. 각각의 성분은 일반적으로 이의 각각의 용기로 분취되거나, 농축된 형태로 제공되는 것이 적합할 것이다. 증폭/검출 분석의 특정 단계를 수행하기에 적합한 기타 용기가 또한 제공될 수 있다. 개별적 용기는 바람직하게는 상업적 판매를 위해 밀폐되어 유지된다.

키트는 또한 본원에 기재된 증폭 반응 시약 및 프라이머 세트 또는 프라이머/프로브를 이용하기 위한 설명서를 포함할 수 있다. 본 발명의 하나 이상의 방법에 따른 키트를 이용하기 위한 설명서는 생물학적 샘플의 가공, 핵산 분자 추출, 및/또는 시험 수행을 위한 설명서; 수득된 결과를 해석하기 위한 설명서 뿐만 아니라 약제 또는 생물학적 생성물의 제조, 사용 또는 판매를 통제하는 정부 기관(예를 들어, FDA)에 의해 규정된 형태의 공고를 포함할 수 있다.

실시예

하기의 실시예는 본 발명을 제조하고 실시하기 위한 바람직한 방식의 일부를 기술한다. 그러나, 이러한 실시예는 단지 예시를 목적으로 하며, 본 발명의 범위를 제한하는 것을 의미하지 않음이 이해되어야 한다. 더욱이, 실시예의 기재가 과거 시제로 나타내지 않는 경우, 명세서의 나머지와 같이 본문은 실험이 실제로 수행되었거나 데이터가 실제로 수득된 것을 암시하는 것이 아니다.

실시예 1: 클라미디아 트라코마티스/나이세리아 고노레아 복합 분석의 특이성

- <155> 15개의 다양한 클라미디아 트라코마티스(CT) 혈청형(즉, A, B, Ba, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L1, L2 및 L3) 및 46개의 다양한 나이세리아 고노레아(GC) 분리물을 시험하기 위해 복합 택맨(TaqMan) kPCR 분석을 이용하였다.
- <156> 단일한 밀봉된 반응 웰에서의 증폭 및 검출을 스트라타진(Stratagene)사의 Mx3000P™ 리얼-타임 PCR 시스템(Stratagene Inc., San Diego, CA)을 이용하여 수행하였다. 이러한 실험에서 사용된 분석 마스터 믹스에는 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems)(Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA) 또는 키아젠(QIAGEN)(Hilden, Germany)사의 Taq DNA 중합효소, 완충용액, 참조 염료(ROX), 및 MgCl₂, 앰프에레이즈(AmpErase™) UNG (1 유닛/μL)가 함유되었고, 본 발명의 택맨(TaqMan®) 올리고뉴클레오티드 프라이머 및 프로브는 사내에서 합성하거나, 바이오서치 인크.(BioSearch Inc.)사로부터 구입하였다. kPCR 반응 혼합물에는 25 μL의 마스터 믹스 및 25 μL의 정제된 DNA가 포함되었다.
- <157> 표 4에 보고된 수득된 결과는 CT/GC 복합 분석이 광범위한 범위의 CT 혈청형 및 GC 분리물을 검출할 수 있음을 나타낸다.
- <158> CT/GC 복합 PCR 마스터 믹스로 또한 74개의 밀접히 관련된 유기체(표 3에 나열됨)로부터의 유전체 DNA의 10⁷ 개의 카피를 시험하였고, 교차반응성을 나타내지 않았다.
- <159> 기타 구체예
- <160> 본 발명의 기타 구체예는 본원에 기재된 본 발명의 명세서 또는 실시를 고려하여 당업자에게 명백할 것이다. 명세서 및 실시에는 단지 예시로 간주되며, 본 발명의 진정한 범위는 하기의 청구의 범위에 제시된다.
- <161> 표 1

SEQ ID NO.	서열명*	맵 위치	서열(5' → 3')	가닥
1	NG1-ORF1-251-FP	251-271	GCGGATTCCTTGTCAAGATT	(+)
2	NG1-ORF1-315-RP	299-315	GCCGCGCTCACCTCTA	(-)
3	NG1-ORF1-273-"c" 프로브	273-296	R-TTCCATGATTGGAAACAGCCGGG-Q	(+)
4	NG1-ORF1-273-"r.c." 프로브	273-296	R-CCCGGCTGTTTCCAAATCATGGA-Q	(-)
5	NG2-ORF1-531-FP	531-557	AGTACGTTTGGATACAGGATTGTGATT	(+)
6	NG2-ORF1-601-RP	583-601	AGCCGTTTTCGCCAGTTTC	(-)
7	NG2-ORF1-561-"c" 프로브	561-581	R-CCATCCGGAACCGACGCACAA-Q	(+)
8	NG3-ORF1-800-FP	800-820	GGAACGAGCCATCAAAAACAA	(+)
9	NG3-ORF1-870-RP	850-870	GCGGTTTCAGGGAAGTGATAGC	(-)
10	NG3-ORF1-824-"c" 프로브	824-847	R-TTGCAGCAGGTGGCGGTGTACTT-Q	(+)
11	NG3-ORF1-824-"r.c." 프로브	824-847	R-AAGTACCACCGCCACCTGTGCAA-Q	(-)
12	NG4-ORF1-764-FP	764-788	AAGGTATGATTAGCCACGTTTATCG	(+)
13	NG4-ORF1-838-RP	819-838	CGCCACCTGCTGCAATAATT	(-)
14	NG4-ORF1-790-"c" 프로브	790-815	R-CGTATGCATCGGAACGAGCCATCAAA-Q	(+)
15	NG5-pivNG-113-FP	3583-3603	GCCTTTTTCCTTTTCGGGATT	(+)
16	NG5-pivNG-183-RP	3629-3653	GTACATAAGAAAGGCGGAGATTACG	(-)
17	NG5-pivNG-135-"c" 프로브	3605-3627	R-ACGCCGATTGTGAACGCGATGGA-Q	(+)
18	NG5-pivNG-135-"r.c." 프로브	3605-3627	R-TCCATCGCGTTACAAATCGGCGT-Q	(-)
19	NG6-pivNG-510-FP	3980-3998	GACGCTTCACGCTTCCTT	(+)
20	NG6-pivNG-593-RP	4040-4063	CCATGAATGAACAGCTTGAAGTTT	(-)
21	NG6-pivNG-535-"c" 프로브	4005-4037	R-AGGCTTCTCGTCTGCTCTTTATCTTCTCTT-Q	(+)
22	NG7-pivNG-794-FP	4264-4285	GCATCCTGTTTGTCTGTTTGG	(+)
23	NG7-pivNG-871-RP	4317-4341	TTACGTAGTGAATCCGCTGAAAAATA	(-)
24	NG7-pivNG-818-"c" 프로브	4288-4315	R-CGCTTGAACCTGCTTTCGCATACTTGC-Q	(+)
25	NG8-pivNG-1017-FP	4487-4504	CCGAATGCTCCGTTTTCG	(+)
26	NG8-pivNG-1091-RP	4537-4561	GTAACGCGTAGGATTGGATATATC	(-)
27	NG8-pivNG-1038-"c" 프로브	4508-4532	R-CCATGGCGGATGCGTTAAAGGTCAG-Q	(+)
28	NG8-pivNG-1038-"r.c." 프로브	4508-4532	R-CTGACCTTAAACGCATCCGCCATGG-Q	(-)

<162>

SEQ ID NO.	서열명 *	맵 위치	서열 (5' → 3')	가닥
29	NG9-pivNG-983-FP	4453-4478	TGATCTAAACCTTTTGAATCGTTGTC	(+)
30	NG9-pivNG-1053-RP	4507-4523	AACGCATCCGCCATGGT	(-)
31	NG9-pivNG-1010-"c" 프로브	4480-4504	R-AACTTTGCCGAATGCTCCGTTTTCG-Q	(+)
32	NG6-pivNG-510 FP	3980-3998	GACGCTTCACGCCTTCCTT	(+)
33	NG6-pivNG-593 RP	4040-4063	CCATGAATGAACAGCTTGAAGTTT	(-)
34	NG6-pivNG-535 프로브	4005-4023	R-AGGCTTCTCCGCTCTGCTCT-Q	(+)
35	NG6 FP02 pivNG -484FP	3954-3974	TCTGCCTATTGCCGGTATGGT	(+)
36	NG6 RP05 pivNG -717	4167-4187	GAAGCGGCCAAAGCATATGC	(-)
37	NG6-pivNG-535 프로브	4005-4023	R-AGGCTTCTCCGCTCTGCTCT-Q	(+)
38	NG6 FP01 pivNG -492FP	3962-3981	ATTGCCGGTATGGTTTCAA	(+)
39	NG6 RP05 pivNG -717	4167-4187	GAAGCGGCCAAAGCATATGC	(-)
40	NG6-pivNG-535 프로브	4005-4023	R-AGGCTTCTCCGCTCTGCTCT-Q	(+)
41	NG6 FP03 pivNG -479FP	3949-3970	GTCATTCTGCTATTGCCGGT	(+)
42	NG6 RP05 pivNG -717	4167-4187	GAAGCGGCCAAAGCATATGC	(-)
43	NG6-pivNG-535 프로브	4005-4023	R-TGCATCCAATCAGATTTCCTTCG-Q	(+)
44	NG6 FP02 pivNG -484FP	3954-3974	TCTGCCTATTGCCGGTATGGT	(+)
45	NG6 RP05 pivNG -717	4167-4187	GAAGCGGCCAAAGCATATGC	(-)
46	NG6 pivNG-513 프로브	3983-4003	R-GCTTCACGCCTTCCTTGCAGTTA-Q	(+)
47	NG6 FP02 pivNG -484FP	3954-3974	TCTGCCTATTGCCGGTATGGT	(+)
48	NG6 RP05 pivNG -632	4167-4187	GAAGCGGCCAAAGCATATGC	(-)
49	NG6 pivNG-516 프로브	3986-4003	R-TCACGCCTTCCTTGCAGTTA-Q	(+)
50	NG9-pivNG-983 FP	4453-4478	TGATCTAAACCTTTTGAATCGTTGTC	(+)
51	NG8-pivNG-1091 RP	4537-4561	GTAACGCCGTAGGATTGGATATATC	(-)
52	NG8-pivNG-1038 프로브	4508-4532	R-CCATGGCCGATGCGTTAAAGGTCAG-Q	(+)

<163>

<164> * "c"는 코딩 또는 센스 가닥에 상보적임을 나타내고(+), "r.c."는 코딩 또는 센스 가닥에 대해 역 상보적임을 나타낸다(-).

<165>

표 2

프라이머 - 프로브 세트 #	NG1	NG2	NG3	NG4	NG5	NG6	NG7	NG8	NG9
10 ⁴ DNA 카피의 NG	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁴ DNA 카피의 CT	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<166>

<167> 표 3

ID	유기체	ID	유기체
1	아시네토박터 칼코아세티쿠스 (<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>)	38	N. 락타미카(<i>N. lactamica</i>)
2	박테로이데스 테타이오타미크론 (<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>)	39	N. 락타미카(<i>N. lactamica</i>)
3	칸디다 알비칸스(<i>Candida albicans</i>)	40	N. 락타미카(<i>N. lactamica</i>)
4	칸디다 글라브라타(<i>Candida glabrata</i>)	41	N. 락타미카(<i>N. lactamica</i>)
5	클라미디아 뉴모니에(<i>Chlamydia pneumoniae</i>)	42	N. 락타미카(<i>N. lactamica</i>)
6	클라미디아 프시타시(<i>Chlamydia psittaci</i>)	43	N. 메닌지티디스 A(<i>N. meningitidis A</i>)
7	시트로박터 프로인디(<i>Citrobacter freundii</i>)	44	N. 메닌지티디스 A(<i>N. meningitidis A</i>)
8	코리네박테리움 레날레 (<i>Corynebacterium renale</i>)	45	N. 메닌지티디스 B(<i>N. meningitidis B</i>)
9	E. 콜라이(<i>E. coli</i>)	46	N. 메닌지티디스 C(<i>N. meningitidis C</i>)
10	엔테로박터 아에로게네스(<i>Enterobacter aerogenes</i>)	47	N. 메닌지티디스 C(<i>N. meningitidis C</i>)
11	가르네렐라 바기날리스(<i>Garnerella vaginalis</i>)	48	N. 메닌지티디스 C(<i>N. meningitidis C</i>)
12	스트렙토코쿠스 피오게네스(<i>Streptococcus pyogenes</i>) (그룹 A 베타)	49	N. 메닌지티디스 D(<i>N. meningitidis D</i>)
13	스트렙토코쿠스 아갈락티에 (<i>Streptococcus agalactiae</i>) (그룹 B 베타)	50	N. 메닌지티디스 X(<i>N. meningitidis X</i>)
14	해모필루스 인플루엔자(<i>Haemophilus influenzae</i>)	51	N. 메닌지티디스 Y(<i>N. meningitidis Y</i>)
15	헬리코박터 파이로리(<i>Helicobacter pylori</i>)	52	N. 메닌지티디스 Z(<i>N. meningitidis Z</i>)
16	단순 헤르페스 바이러스 I (<i>Herpes simplex virus I</i>)	53	N. 뮤코사(<i>N. mucosa</i>)
17	단순 헤르페스 바이러스 II (<i>Herpes simplex virus II</i>)	54	N. 뮤코사(<i>N. mucosa</i>)
18	킹셀라 킹가에 (<i>Kingella kingae</i>) (모락셀라 킹가에(<i>Moraxella kingae</i>)와 같음)	55	N. 뮤코사(<i>N. mucosa</i>) 변종 하이델베르겐네시스(<i>heidelbergensis</i>)
19	클레브시엘라 옥시토카(<i>Klebsiella oxytoca</i>)	56	N. 퍼플라바(<i>N. perflava</i>)
20	클레브시엘라 뉴모니아(<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	57	N. 퍼플라바(<i>N. perflava</i>)
21	락토바실러스 브레비스(<i>Lactobacillus brevis</i>)	58	N. 퍼플라바(<i>N. perflava</i>)
22	락토바실러스 델브루에키이 아종 락티스 (<i>Lactobacillus delbrueckii subsp lactis</i>)	59	N. 퍼플라바(<i>N. perflava</i>)
23	모락셀라 카타랄리스(<i>Moraxella catarrhalis</i>)	60	N. 폴리사카레아(<i>N. polysaccharae</i>)
24	모락셀라 브란하멜라 카타랄리스 (<i>Moraxella Branhamella catarrhalis</i>)	61	N. 시카(<i>N. sicca</i>)
25	모락셀라 라쿠나타(<i>Moraxella lacunata</i>)	62	N. 시카(<i>N. sicca</i>)
26	모락셀라 오슬로엔시스(<i>Moraxella osloensis</i>)	63	N. 시카(<i>N. sicca</i>)
27	미코플라스마 호미니스(<i>Mycoplasma hominis</i>)	64	N. 서브플라바(<i>N. subflava</i>)
28	N. 시네레아(<i>N. cinerea</i>)	65	N. 서브플라바(<i>N. subflava</i>)
29	N. 엘롱가타(<i>N. elongata</i>)	66	프로테우스 미라빌리스(<i>Proteus mirabilis</i>)
30	N. 엘롱가타 아종 글리콜리티카 (<i>N. elongata subsp. glycolytica</i>)	67	루미노코쿠스 프로덕투스(<i>Ruminococcus productus</i>) (페페토스트렙토코쿠스(<i>Pepetostreptococcus</i>)와 같음)
31	N. 엘롱가타 아종 니트로레두센스 (<i>N. elongata subsp. nitroreducens</i>)	68	살모넬라 미네소타(<i>Salmonella minnesota</i>)
32	N. 엘롱가타 아종 니트로레두센스 (<i>N. elongata subsp. nitroreducens</i>)	69	살모넬라 티피리움(<i>Salmonella typhimurium</i>)
33	N. 플라바(<i>N. flava</i>)	70	스테필로코쿠스 아갈락티에 (<i>Staphylococcus agalactiae</i>)
34	N. 플라베센스(<i>N. flavescens</i>)	71	스테필로코쿠스 아우레우스(<i>Staphylococcus aureus</i>)
35	N. 플라베센스(<i>N. flavescens</i>)	72	트리코모나스 바기날리스(<i>Trichomonas vaginalis</i>)
36	N. 플라베센스(<i>N. flavescens</i>)	73	우레아플라스마 우레알리티쿰 (<i>Ureaplasma urealyticum</i>)
37	N. 플라베센스(<i>N. flavescens</i>)	74	비브리오 콜레라(<i>Vibrio Cholerae</i>)

<168>

<169>

표 4

CT/GC 복합 분석	CT	GC
10 IFU/mL 의 클라미디아 트라코마티스 (A, B, Ba, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L1, L2 및 L3)	+	N/A
50 카피 /rxn 의 나이세리아 고노레아 (IA 1-22, IB 1-32)	N/A	+

<170>

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Ku, et al.

<120> Neisseria Gonorrhoeae Specific Oligonucleotide Sequences

<130> 2007674-0046

<140> 11/784,502
<141> 2007-04-06

<160> 52

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide sequence

<400> 1
gcggattccc ttgtcaagat t 21

<210> 2
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide sequenc

<400> 2
gccgcgctca ccctcta 17

<210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide sequence

<400> 3
ttccatgatt tggaaacagc cggg 24

<210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 4
 cccggtgtt tccaaatcat ggaa 24

<210> 5
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 5
 agtacgtttg gatacaggat ttgattt 27

<210> 6
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 6
 agccgttttc gccagtttc 19

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 7

ccatccggaa ccgacgcaca a 21

<210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 8
 ggaacgagcc atcaaaaaca a 21

<210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 9
 gcggttcagg gaagtgatag c 21

<210> 10
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 10
 ttgcagcagg tggcgggtgt actt 24

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

<220>

<223> Oligonucleotide sequence

<400> 11

aagtaccacc gccacctgct gcaa

24

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide sequence

<400> 12

aaggtatgat tagccacgtt tatcg

25

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide sequence

<400> 13

cgccacctgc tgcaataatt

20

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide sequence

<400> 14

cgtatgcatc ggaacgagcc atcaaa

26

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide sequence

<400> 15

gccttttttc ctttcgggat t

21

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide sequence

<400> 16

gtacataaga aaggcggaga ttacg

25

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide sequence

<400> 17

acgccgattt gtaacgcgat gga

23

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide sequence

<400> 18

tccatcgcgt tacaaatcgg cgt

23

<210> 19
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 19
 gagcttcac gccttcctt 19

<210> 20
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 20
 ccatgaatga acagcttgaa gttt 24

<210> 21
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 21
 aggcttctcc gtctgctctt ttatcttctc ctt 33

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

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 22

gcacccctgtt tgtctgtttt gg 22

<210> 23
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 23
 ttacgtagtg aatccgctga aaata 25

<210> 24
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 24

Cys	Gly	Cys	Thr	Thr	Gly	Ala	Ala	Cys	Cys	Thr	Gly	Cys	Thr	Thr	Thr
1				5				10						15	

Cys	Thr	Gly	Cys	Ala	Thr	Ala	Cys	Thr	Thr	Gly	Cys
		20					25				

<210> 25
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 25
 ccgaatgctc cgttttgc 18

<210> 26
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 26
 gtaacgccgt aggattggat atatc 25

<210> 27
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 27
 ccatggcgga tgcgttaaag gtcag 25

<210> 28
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 28
 ctgaccttta acgcatccgc catgg 25

<210> 29
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 29

tgatctaaac ctttgaatc gttgtc 26

<210> 30
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 30
 aacgcatccg ccatggt 17

<210> 31
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 31
 aactttgccg aatgctccgt ttgac 25

<210> 32
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 32
 gacgcttcac gccttcctt 19

<210> 33
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide sequence

<400> 33

ccatgaatga acagcttgaa gttt

24

<210> 34

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide sequence

<400> 34

aggcttctcc gtctgtct

19

<210> 35

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide sequence

<400> 35

tctgcctatt gccggtatgg t

21

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide sequence

<400> 36

gaagcggcca aagcatatgc

20

<210> 37

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide sequence

<400> 37

aggcttctcc gtctgtct

19

<210> 38

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide sequence

<400> 38

attgccggta tggtttcaa

19

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide sequence

<400> 39

gaagcggcca aagcatatgc

20

<210> 40

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide sequence

<400> 40

aggcttctcc gtctgtct

19

<210> 41
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 41
 gtcattctgc ctattgccg t 21

<210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 42
 gaagcggcca aagcatatgc 20

<210> 43
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 43
 tgcattcaat cagatttcct ttcg 24

<210> 44
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 44

tctgcctatt gccggtatgg t 21

<210> 45
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 45
 gaagcggcca aagcatatgc 20

<210> 46
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 46
 gcttcacgcc ttccttgag tta 23

<210> 47
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide sequence

<400> 47
 tctgcctatt gccggtatgg t 21

<210> 48
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide sequence

<400> 48

gaagcggcca aagcatatgc

20

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide sequence

<400> 49

tcacgccttc cttgcagtta

20

<210> 50

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide sequence

<400> 50

tgatctaaac ctttgaatc gttgtc

26

<210> 51

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide sequence

<400> 51

gtaacgccgt aggattggat atatc

25

<210> 52

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide sequence

<400> 52

ccatggcggg tgcgttaaag gtcag

25