



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0047384
(43) 공개일자 2020년05월07일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/70 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12Q 1/701 (2013.01)
C12Q 2563/107 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-0132294</p> <p>(22) 출원일자 2019년10월23일
심사청구일자 2019년10월23일</p> <p>(30) 우선권주장
JP-P-2018-200239 2018년10월24일 일본(JP)</p> | <p>(71) 출원인
국립감염증연구소장이 대표하는 일본국
일본국 도쿄도 신주쿠구 도야마 1-23-1
에이젠 가가꾸 가부시끼가이샤
일본국 도쿄도 다이토쿠 다이토 4쵸메 19반 9고</p> <p>(72) 발명자
사이조 마사유키
일본 도쿄도 신주쿠구 도야마 1-23-1 국립감염증
연구소내
시모지마 마사유키
일본 도쿄도 신주쿠구 도야마 1-23-1 국립감염증
연구소내
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
유미특허법인</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 중증열성혈소판감소증후군(SFTS) 바이러스 검출용 프라이머 세트

(57) 요약

본 발명은 중증열성혈소판감소증후군(SFTS) 바이러스를 고감도로 또한 신속하게 검출할 수 있는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 본 발명은, SFTS 바이러스에 특이적인 염기서열과 선택적으로 하이브리다이징하는 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여, LAMP법에 의해 SFTS 바이러스에 특이적인 염기서열을 증폭하는 것을 포함하는, SFTS 바이러스의 검출 방법.

(72) 발명자

후쿠시 슈에쓰

일본 도쿄도 신주쿠구 도야마 1-23-1 국립감염증연
구소내

구로스 다케시

일본 도쿄도 신주쿠구 도야마 1-23-1 국립감염증연
구소내

사노 시오리

일본 도치기켄 시모쓰가군 노기마치 노기 143 에이
켄 가가꾸 가부시끼가이샤 노기지교쇼내

명세서

청구범위

청구항 1

하기 (a)~(d)의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 전부를 포함하는, 중증열성혈소판감소증후군(SFTS) 바이러스에 특이적인 염기서열을 증폭하기 위한 프라이머 세트:

- (a) 5'-CCTCCTCAGGAAGCATCTG-3' (서열번호 1)
- (b) 5'-TCCTCTTTGTTCTTGTAGTACCC-3' (서열번호 2)
- (c) 5'-CATTCTACCTCCCTCTCTATGCATGGTGCGAATTG-3' (서열번호 3)
- (d) 5'-GGGAGGAACATTTTCATGCGCAGCTGTTGACCATATTCTC-3' (서열번호 4).

청구항 2

제1항에 있어서,

하기 (e) 및/또는 (f)의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 더 포함하는, 프라이머 세트:

- (e) 5'-GATTAGGCTGAATGGCTGAC-3' (서열번호 5)
- (f) 5'-CTCAGGCCGGTCCAC-3' (서열번호 6).

청구항 3

하기 (g)~(j)의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 전부를 포함하는, SFTS 바이러스에 특이적인 염기서열을 증폭하기 위한 프라이머 세트:

- (g) 5'-AGGGAAGTCTCATGGATGG-3' (서열번호 7)
- (h) 5'-ATCCACCACCCCATTG-3' (서열번호 8)
- (i) 5'-GGAGGCTGGATGTAAAGTGCGGGCGAACTTACATAAAGACAG-3' (서열번호 9)
- (j) 5'-CTCTTGTTGTTTCAAGCTTTTCAAGCTTTCCCCATGTATCC-3' (서열번호 10).

청구항 4

제3항에 있어서,

하기 (k) 및/또는 (l)의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 더 포함하는, 프라이머 세트:

- (k) 5'-CCCTGCATCATTCCTGTC-3' (서열번호 11)
- (l) 5'-CTTATTTTCGTCTCAAAGCTTAAGG-3' (서열번호 12).

청구항 5

하기 (m)~(p)의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 전부를 포함하는, SFTS 바이러스에 특이적인 염기서열을 증폭하기 위한 프라이머 세트:

- (m) 5'-GATGGAGATGGGACTAGCAAC-3' (서열번호 13)
- (n) 5'-CTTGATCTTGAAYCCACTCAG-3' (서열번호 14)
- (o) 5'-CTYCGGATSGATTCAATGACTGGCTTGAGGAGATCAGG-3' (서열번호 15)
- (p) 5'-GTGAYGACCTTGGGATCACCTAACCATGCAATGACCTC-3' (서열번호 16).

청구항 6

제5항에 있어서,

하기 (q) 및/또는 (r)의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 더 포함하는, 프라이머 세트:

(q) 5'-CATAAAGCCTGGCATCACTAC-3'(서열번호 17)

(r) 5'-YAACAGGGTRGCATCTGC-3'(서열번호 18).

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 기재된 프라이머 세트를 포함하는, SFTS 바이러스 검출 또는 SFTS 바이러스 감염증 진단용 키트.

청구항 8

제7항에 있어서,

형광 표지 프로브를 더 포함하는, 키트.

청구항 9

제8항에 있어서,

제1항 또는 제2항에 기재된 프라이머 세트를 포함하고, 형광 표지 프로브가 하기 (aa) 및/또는 (bb)의 올리고뉴클레오타이드를 가지는 형광 표지 프로브인, 키트:

(aa) 5'-GGATTAGGCTGAATGGCTGAGAAGC-3'(서열번호 19)

(bb) 5'-GGATTAGGCTGAATGGCTGAGAAIC-3'(서열번호 20).

청구항 10

제8항에 있어서,

제3항 또는 제4항에 기재된 프라이머 세트를 포함하고, 형광 표지 프로브가 하기 (cc)의 올리고뉴클레오타이드를 가지는 형광 표지 프로브인, 키트:

(cc) 5'-CAATATGCCCTGCATCATTCCTGTC-3'(서열번호 21).

청구항 11

제8항에 있어서,

제5항 또는 제6항에 기재된 프라이머 세트를 포함하고, 형광 표지 프로브가 하기 (dd)~(gg) 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드를 가지는 형광 표지 프로브인, 키트:

(dd) 5'-CATAAAGCCTGGCATCACTACTGAGCC-3'(서열번호 22)

(ee) 5'-TAACAGGGTGGCATCTGCATATAGAGGTC-3'(서열번호 23)

(ff) 5'-GGATCCAATAACAGGGTGGCATCTGC-3'(서열번호 24)

(gg) 5'-GGATCCAATAACAGGGTGGCATCTIC-3'(서열번호 25).

청구항 12

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 기재된 프라이머 세트 또는 제7항 내지 제11항 중 어느 한 항에 기재된 키트를 사용하여, SFTS 바이러스의 표적 핵산 영역의 증폭 반응을 행하는 공정을 포함하는, SFTS 바이러스의 검출 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

SFTS 바이러스의 표적 핵산 영역의 증폭 반응이 LAMP법에 의한 것인, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 기재된 프라이머 세트 또는 제7항 내지 제11항 중 어느 한 항에 기재된 키트를 사용하여, SFTS 바이러스의 표적 핵산 영역의 증폭을 검출함으로써, SFTS 바이러스 감염의 유무를 검사하는 공정을 포함하는, SFTS 바이러스 감염증의 검사 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 중증열성혈소판감소증후군(severe fever with thrombocytopenia syndrome: SFTS; 이하, 「SFTS」로 칭함) 바이러스의 검출 방법에 관한 것이며, 더욱 상세하게는 유전자의, 고감도이면서 신속한 검출법을 사용한 SFTS 바이러스 감염증의 진단 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 국립감염증연구소(일본)가 공표하는 정보에 의하면, SFTS는, 2011년에 중국의 연구자 등에 의해 발표된 부니아 바이러스과(Bunyaviridae) 플레보바이러스(Phlebovirus)속으로 분류되는 새로운 바이러스에 의한 진드기 매개성 감염증이다.

[0003] SFTS 바이러스에 감염되면, 6일~2주일의 잠복기를 거쳐, 발열, 소화기증상(식욕저하, 메스꺼움, 구토, 설사, 복통)이 생기고, 그 외에는 두통, 근육통, 의식장애나 실어증 등의 신경증상, 림프절종창, 피하출혈이나 하혈 등의 출혈 증상 등을 일으킨다.

[0004] 또한, SFTS 바이러스에 감염되면, 백혈구감소, 혈소판감소, AST·ALT·LDH의 혈청일탈효소의 상승이 많은 증례(症例)에서 인정되어, 혈청 페리틴의 상승이나 골수에서의 혈구탐식도 인정되는 경우가 있다. 또한, 치사율은 6.3~30 %로 보고되어 있다.

[0005] SFTS 바이러스 감염 경로는 주로 진드기(작은소참진드기(Haemaphysalis longicornis))를 통한 것이지만, 혈액 등의 환자체액과의 접촉에 의해 인간으로부터 인간으로의 감염도 보고되어 있다.

[0006] 종래에 있어서, SFTS의 치료는 대증적인 방법밖에 없고, 유효한 약제나 백신이 존재하지 않는다. 따라서, SFTS에 대한 백신이나 효율적인 SFTS 바이러스의 검출 방법의 개발이 요망되고 있다.

[0007] 한편, 특허문헌 1~4는, SFTS 바이러스를 검출하는 방법을 공개한다. 특허문헌 4는, LAMP법에 의해 SFTS 바이러스를 구성하는 S, M, 및 L의 각 세그먼트를 증폭하여 검출하고 있지만, 각 세그먼트를 단독으로 증폭한 경우에는 감도나 특이성이 충분하지 않으며, 3개의 세그먼트를 모두 증폭하는 방법이 바람직한 것으로 기재되어 있다. LAMP법은 다른 핵산증폭법과 비교하여 감도나 특이성이 양호한 방법이지만, 특허문헌 4는 LAMP법의 특징을 충분히 살리고 있다고는 할 수 없으며, 감도나 특이성이 보다 향상된 SFTS 바이러스의 검출 방법이 요망되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 중국특허 제102070704호 명세서
(특허문헌 0002) 중국특허출원공개 제105296674호 명세서
(특허문헌 0003) 중국특허출원공개 제106191307호 명세서
(특허문헌 0004) 중국특허 제102618669호 명세서

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은, 전술한 실정을 감안하여, SFTS 바이러스를 고감도로 또한 신속하게 검출할 수 있는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 전술한 과제를 해결하기 위해 예의(銳意) 연구를 행한 결과, SFTS 바이러스에 특이적인 염기서열과 선택적으로 하이브리다이징하는 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 제작하고, LAMP(Loop-mediated Isothermal Amplification)법에 의해 SFTS 바이러스에 특이적인 염기서열을 증폭함으로써, SFTS 바이러스를 고감도로 또한 신속하게 검출할 수 있는 것을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.
- [0011] 즉, 본 발명은, 이하를 포함한다.
- [0012] (1) 이하의 (a)~(d)의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 전부를 포함하는, SFTS 바이러스에 특이적인 염기서열을 증폭하기 위한 프라이머 세트.
- [0013] (a) 5'-CCTCCTCAGGAAGCATCTG-3'(서열번호 1)
- [0014] (b) 5'-TCCTCTTTGTTCTTGTAGTACCC-3'(서열번호 2)
- [0015] (c) 5'-CATTCTACCTCCCTCTCTATGCATGGTGCGAATTG-3'(서열번호 3)
- [0016] (d) 5'-GGGAGGAACATTTTCATGCGCAGCTGTTGACCATATTCTC-3'(서열번호 4)
- [0017] (2) 이하의 (e) 및/또는 (f)의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 더 포함하는, (1)에 기재된 프라이머 세트.
- [0018] (e) 5'-GATTAGGCTGAATGGCTGAC-3'(서열번호 5)
- [0019] (f) 5'-CTCAGGCCGGTCCAC-3'(서열번호 6)
- [0020] (3) 이하의 (g)~(j)의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 전부를 포함하는, SFTS 바이러스에 특이적인 염기서열을 증폭하기 위한 프라이머 세트.
- [0021] (g) 5'-AGGGAAGTCTCATGGATGG-3'(서열번호 7)
- [0022] (h) 5'-ATCCACCACCCATTG-3'(서열번호 8)
- [0023] (i) 5'-GGAGGCTGGATGTAAAGTGC GGCGAACTTACATAAAGACAG-3'(서열번호 9)
- [0024] (j) 5'-CTCTTGTTTCAGAGCTTTTACAAGCTTTCCCCATGTATCC-3'(서열번호 10)
- [0025] (4) 이하의 (k) 및/또는 (l)의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 더 포함하는, (3)에 기재된 프라이머 세트.
- [0026] (k) 5'-CCCTGCATCATTCCTGTC-3'(서열번호 11)
- [0027] (l) 5'-CTTATTTCTGCTCAAAGCTTAAGG-3'(서열번호 12)
- [0028] (5) 이하의 (m)~(p)의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 전부를 포함하는, SFTS 바이러스에 특이적인 염기서열을 증폭하기 위한 프라이머 세트.
- [0029] (m) 5'-GATGGAGATGGGACTAGCAAC-3'(서열번호 13)
- [0030] (n) 5'-CTTGATCTTGAAYCCACTCAG-3'(서열번호 14)
- [0031] (o) 5'-CTYCGGATSGATTCAATGACTGGCTTGAGGAGATCAGG-3'(서열번호 15)
- [0032] (p) 5'-GTGAYGACCTTGGGATCACCTAACCATGCAATGACCTC-3'(서열번호 16)
- [0033] (6) 이하의 (q) 및/또는 (r)의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 더 포함하는, (5)에 기재된 프라이머 세트.
- [0034] (q) 5'-CATAAAGCCTGGCATCACTAC-3'(서열번호 17)
- [0035] (r) 5'-YAACAGGGTRGCATCTGC-3'(서열번호 18)
- [0036] (7) (1)~(6) 중 어느 하나에 기재된 프라이머 세트를 포함하는, SFTS 바이러스 검출 또는 SFTS 바이러스 감염 증진단용 키트.
- [0037] (8) 형광 표지 프로브를 더 포함하는, (7)에 기재된 키트.
- [0038] (9) (1) 또는 (2)에 기재된 프라이머 세트를 포함하고, 형광 표지 프로브가 이하의 (aa) 및/또는 (bb)의 올리고뉴클레오타이드를 가지는 형광 표지 프로브인, (8)에 기재된 키트.
- [0039] (aa) 5'-GGATTAGGCTGAATGGCTGAGAAGC-3'(서열번호 19)

- [0040] (bb) 5'-GGATTAGGCTGAATGGCTGAGAAIC-3'(서열번호 20)
- [0041] (10) (3) 또는 (4)에 기재된 프라이머 세트를 포함하고, 형광 표지 프로브가 이하의 (cc)의 올리고뉴클레오타이드를 가지는 형광 표지 프로브인, (8)에 기재된 키트.
- [0042] (cc) 5'-CAATATGCCCTGCATCATTCTGTC-3'(서열번호 21)
- [0043] (11) (5) 또는 (6)에 기재된 프라이머 세트를 포함하고, 형광 표지 프로브가 이하의 (dd)~(gg) 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드를 가지는 형광 표지 프로브인, (8)에 기재된 키트.
- [0044] (dd) 5'-CATAAAGCCTGGCATCACTACTGAGCC-3'(서열번호 22)
- [0045] (ee) 5'-TAACAGGGTGGCATCTGCATATAGAGGTC-3'(서열번호 23)
- [0046] (ff) 5'-GGATCCAATAACAGGGTGGCATCTGC-3'(서열번호 24)
- [0047] (gg) 5'-GGATCCAATAACAGGGTGGCATCTIC-3'(서열번호 25)
- [0048] (12) (1)~(6) 중 어느 하나에 기재된 프라이머 세트 또는 (7)~(11) 중 어느 하나에 기재된 키트를 사용하여, SFTS 바이러스의 표적 핵산 영역의 증폭 반응을 행하는 공정을 포함하는, SFTS 바이러스의 검출방법.
- [0049] (13) SFTS 바이러스의 표적 핵산 영역의 증폭 반응이 LAMP법에 의한 것인, (12)에 기재된 방법.
- [0050] (14) (1)~(6) 중 어느 하나에 기재된 프라이머 세트 또는 (7)~(11) 중 어느 하나에 기재된 키트를 사용하여, SFTS 바이러스의 표적 핵산 영역의 증폭을 검출함으로써, SFTS 바이러스 감염의 유무를 검사하는 공정을 포함하는, SFTS 바이러스 감염증의 검사 방법.

발명의 효과

- [0051] 본 발명에 의하면, SFTS 바이러스에 특이적인 염기서열과 선택적으로 하이브리다이징하는 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 제작하고, LAMP법에 의해 SFTS 바이러스에 특이적인 염기서열을 증폭함으로써, SFTS 바이러스를 고감도로 또한 신속하게 검출할 수 있다. 특히 본 발명에서는, 다른 프라이머 세트를 조합하지 않고, L세그먼트의 서열을 증폭하는 프라이머 세트만으로, 고감도이며 특이성도 양호한 SFTS 바이러스 검출을 실현했다.

도면의 간단한 설명

- [0052] 도 1은 SFTS 바이러스의 게놈 L 세그먼트에서의 본 발명에 따른 프라이머의 설계 위치를 나타낸 도면이다.
- 도 2는 실시간 형광(인터칼레이터계) 측정에 의한 SFTS virus 검출용 Primer를 사용한 LAMP 반응의 증폭 곡선의 결과를 나타낸다.
- 도 3은 실시간 형광(probe계) 측정에 의한 SFTS virus 검출용 Primer를 사용한 LAMP 반응의 증폭 곡선의 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0053] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0054] 본 발명에 따른 프라이머 세트는, SFTS 바이러스에 특이적인 염기서열과 선택적으로 하이브리다이징하는 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하는, LAMP법에 의해 SFTS 바이러스에 특이적인 염기서열을 증폭하기 위한 프라이머 세트이다.
- [0055] 본 발명에 따른 프라이머 세트에 의하면, 피험체 유래의 샘플 중의 SFTS 바이러스를 고감도로 또한 신속하게 검출할 수 있다.
- [0056] 본 발명에 있어서 사용되는 샘플로서는, SFTS 바이러스 감염이 의심되는 인간 또는 다른 동물의 생체 유래의 샘플, 예를 들면, 객담(咯痰), 기관지폐포세정액, 콧물, 비강흡인액, 비강세정액, 비강 닦은 액, 인두 닦은 액, 양치질액, 타액, 혈액, 혈청, 혈장, 수액, 오줌, 정액 및 양수(羊水) 등의 체액, 대변, 조직 등이 있다. 또한, 감염 실험 등에 사용된 세포나 그의 배양액, 혹은 생체 유래의 검체나 배양 세포 등으로부터 분리한 바이러스를 포함하는 검체 등도 샘플이 될 수 있다. 이들 샘플은 분리, 추출, 농축, 정제 등의 전처리(前處理)를 행할 수도 있다.

- [0057] 본 발명에서의 핵산 증폭은, 노토미(納富) 등이 개발한, PCR법에서 불가결로 되는 온도 제어가 불필요한 핵산 증폭법: LAMP법으로 불리우는 루프 매개 등온(等溫) 증폭법(국제공개 제00/28082호 팜플렛)으로 달성할 수 있다. 상기 방법은, 주형이 되는 뉴클레오티드에 자체의 3'말단을 어닐링(annealing)시켜 상보쇄 합성의 기점으로 하고 또한, 이 때 형성되는 루프에 어닐링하는 프라이머를 조합함으로써, 등온에서의 상보쇄 합성 반응을 가능하게 한 핵산 증폭법이다. 또한, LAMP법에서는, 프라이머에 3'말단이 항상 샘플에 유래하는 영역에 대하여 어닐링하기 위하여, 염기서열의 상보적 결합에 의한 체크 기구(機構)가 반복적으로 기능하므로, 그 결과로서, 고 감도이며 또한 특이성이 높은 핵산 증폭 반응을 가능하게 하고 있다.
- [0058] LAMP 반응에서 사용되는 올리고뉴클레오티드 프라이머는, 주형 핵산의 염기서열의 합계 6영역, 즉 3'말단 측에서 F3c, F2c, F1c와 같은 영역과, 5'말단 측에서 B3, B2, B1과 같은 영역의 염기서열을 인식하는 적어도 4종류의 프라이머로서, 각각 이너(inner) 프라이머 F(FIP) 및 B(BIP)와 아우터(outer) 프라이머 F(F3) 및 B(B3)라고 한다. 또한, F1c, F2c, F3c의 상보 서열을 각각 F1, F2, F3, 또한 B1, B2, B3의 상보쇄를 B1c, B2c, B3c라고 한다. 이너 프라이머란, 표적 염기서열 상의 「어느 특정한 뉴클레오티드 서열 영역」을 인식하고, 또한 합성 기점을 제공하는 염기서열을 3'말단에 가지고, 또한 이 프라이머를 기점으로 하는 핵산 합성 반응 생성물이 임의의 영역에 대하여 상보적인 염기서열을 5'말단에 가지는 올리고뉴클레오티드이다. 여기서, 「F2로부터 선택된 염기서열」 및 「F1c로부터 선택된 염기서열」을 포함하는 프라이머를 이너 프라이머 F(FIP), 그리고 「B2로부터 선택된 염기서열」과 「B1c로부터 선택된 염기서열」을 포함하는 프라이머를 이너 프라이머 B(BIP)라고 한다. 한편, 아우터 프라이머란, 표적 염기서열 상의 「어느 특정한 뉴클레오티드 서열 영역」의 3'말단 측에 존재하는 어느 특정한 뉴클레오티드 서열 영역」을 인식하고, 또한 합성 기점을 제공하는 염기서열을 가지는 올리고뉴클레오티드이다. 여기서, 「F3로부터 선택된 염기서열」을 포함하는 프라이머를 아우터 프라이머 F(F3), 「B3로부터 선택된 염기서열」을 포함하는 프라이머를 아우터 프라이머 B(B3)라고 한다. 여기서, 각 프라이머에서의 F는, 표적 염기서열의 센스쇄와 상보적으로 결합하고, 합성 기점을 제공하는 프라이머 표시이며, 한편, B는, 표적 염기서열의 안티 센스 사슬과 상보적으로 결합하고, 합성 기점을 제공하는 프라이머 표시이다. 여기서, 프라이머로서 사용되는 올리고뉴클레오티드의 길이는, 10염기 이상, 바람직하게는 15염기 이상이며, 화학 합성 혹은 천연의 어느 쪽이라도 되고, 각 프라이머는 단일 올리고뉴클레오티드라도 되고, 복수의 올리고뉴클레오티드의 혼합물이라도 된다.
- [0059] LAMP법에 있어서는, 이너 프라이머와 아우터 프라이머 뿐만 아니라, 이와는 별도의 프라이머, 즉 루프 프라이머(Loop Primer)를 사용할 수 있다. 루프 프라이머 LF 및/또는 LB는, 증폭산물에서의 덤벨 구조의 5'말단 측의 루프 구조의 단일 가닥 부분의 염기서열에 상보적인 염기서열을 가지는 프라이머이다. 이 프라이머를 사용하면, 핵산 합성의 기점이 증가하고, 반응 시간의 단축과 검출 감도의 상승이 가능하게 된다(국제공개 제02/24902호 팜플렛). 루프 프라이머의 염기서열은 전술한 증폭산물의 덤벨 구조의 5'말단 측의 루프 구조의 단일 가닥 부분의 염기서열에 상보적이면, 표적 유전자의 염기서열 또는 그의 상보쇄로부터 선택되어도 되고, 다른 염기서열이라도 된다. 또한, 루프 프라이머는 1종류라도 되고 2종류라도 된다.
- [0060] SFTS 바이러스는 음성 가닥 단일 가닥 RNA 바이러스이다. LAMP법은 주형이 RNA인 경우에는, 주형이 DNA인 경우의 반응액에 역전사 효소를 첨가함으로써, 동일하게 핵산 증폭 반응을 진행시킬 수 있다(RT-LAMP법).
- [0061] SFTS 바이러스에 특이적인 염기서열을 신속하게 증폭할 수 있는 LAMP법의 프라이머의 염기서열과 그 조합을 예의 연구한 결과, SFTS 바이러스의 게놈 L 세그먼트를 표적 서열로서, 이하의 제1 및 제2 프라이머 세트를 선정했다.
- [0062] 제1 프라이머 세트(실시예에서의 「PM2119의 Primer set」에 상당):
- [0063] (a) F3: 5'-CCTCCTCAGGAAGCATCTG-3'(서열번호 1);
- [0064] (b) B3: 5'-TCCTCTTTGTCTTGTAGTACCC-3'(서열번호 2);
- [0065] (c) FIP: 5'-CATTCTACCCTCCCTCTCTATGCATGGTGCGAATTG-3'(서열번호 3);
- [0066] (d) BIP: 5'-GGGAGGAACATTTTCATGCGCAGCTGTTGACCATATTCTC-3'(서열번호 4);
- [0067] (e) LF: 5'-GATTAGGCTGAATGGCTGAC-3'(서열번호 5);
- [0068] (f) LB: 5'-CTCAGGCCGGTCCAC-3'(서열번호 6).
- [0069] 제2 프라이머 세트(실시예에서의 「PM3191의 Primer set」에 상당):

- [0070] (g) F3: 5'-AGGGAAGTCTCATGGATGG-3'(서열번호 7);
- [0071] (h) B3: 5'-ATCCACCACCCCATTG-3'(서열번호 8);
- [0072] (i) FIP: 5'-GGAGGCTGGATGTAAAGTGGGGCGAACTTACATAAAGACAG-3'(서열번호 9);
- [0073] (j) BIP: 5'-CTCTTGTTGTCAGAGCTTTTACAAGCTTTCCCCATGTATCC-3'(서열번호 10);
- [0074] (k) LF: 5'-CCCTGCATCATTCCTGTC-3'(서열번호 11);
- [0075] (l) LB: 5'-CTTATTCGTCTCAAAGCTTAAGG-3'(서열번호 12).
- [0076] 또한, 도 1에 나타난 바와 같이, SFTS 바이러스의 게놈 L 세그먼트를 표적 서열로 하고, 이하의 제3 프라이머 세트를 선정했다. 그리고, 도 1에 있어서, 「003A Ehime L」, 「SPL179」, 「SPL193」, 「SPL230」 및 「SPL238」은, 각 SFTS 바이러스주의 게놈 L 세그먼트이다.
- [0077] 또한, 도 1에 있어서, 「Primer 1」은 「PM5228의 Primer set 1」이며, 「Primer 2」는 「PM5228의 Primer set 2」이다.
- [0078] 제3 프라이머 세트:
- [0079] (m) F3: 5'-GATGGAGATGGGACTAGCAAC-3'(서열번호 13);
- [0080] (n) B3: 5'-CTTGATCTTGAAYCCACTCAG-3'(서열번호 14);
- [0081] (o) FIP: 5'-CTYCGGATSGATTCAATGACTGGCTTGAGGAGATCAGG-3'(서열번호 15);
- [0082] (p) BIP: 5'-GTGAYGACCTTGGGATCACCTAACCATGCAATGACCTC-3'(서열번호 16);
- [0083] (q) LF: 5'-CATAAAGCCTGGCATCACTAC-3'(서열번호 17);
- [0084] (r) LB: 5'-YAACAGGGTRGCATCTGC-3'(서열번호 18).
- [0085] (n)의 B3: 올리고뉴클레오티드 프라이머로서, 예를 들면, 이하의 (n') 및 (n'')의 올리고뉴클레오티드 프라이머 중 1개 또는 양쪽을 사용할 수도 있다:
- [0086] (n') B3: 5'-CTTGATCTTGAACCCACTCAG-3'(서열번호 26);
- [0087] (n'') B3: 5'-CTTGATCTTGAATCCACTCAG-3'(서열번호 27).
- [0088] 또한, (o)의 FIP: 올리고뉴클레오티드 프라이머로서, 예를 들면, 이하의 (o') 및 (o'')의 올리고뉴클레오티드 프라이머 중 1개 또는 양쪽을 사용할 수도 있다:
- [0089] (o') FIP: 5'-CTTCGGATGGATTCAATGACTGGCTTGAGGAGATCAGG-3'(서열번호 28);
- [0090] (o'') FIP: 5'-CTCCGATCGATTCAATGACTGGCTTGAGGAGATCAGG-3'(서열번호 29).
- [0091] 또한, (p)의 BIP: 올리고뉴클레오티드 프라이머로서, 예를 들면, 이하의 (p') 및 (p'')의 올리고뉴클레오티드 프라이머 중 1개 또는 양쪽을 사용할 수도 있다:
- [0092] (p') BIP: 5'-GTGACGACCTTGGGATCACCTAACCATGCAATGACCTC-3'(서열번호 30);
- [0093] (p'') BIP: 5'-GTGATGACCTTGGGATCACCTAACCATGCAATGACCTC-3'(서열번호 31).
- [0094] 또한, (r)의 LB: 올리고뉴클레오티드 프라이머로서, 예를 들면, 이하의 (r') 및 (r'')의 올리고뉴클레오티드 프라이머 중 1개 또는 양쪽을 사용할 수도 있다:
- [0095] (r') LB: 5'-TAACAGGGTGGCATCTGC-3'(서열번호 32);
- [0096] (r'') LB: 5'-CAACAGGGTAGCATCTGC-3'(서열번호 33).
- [0097] 바람직하게는, 제3 프라이머 세트로서는,
- [0098] 전술한 (m), (n'), (o') 및 (p')의 올리고뉴클레오티드 프라이머 전부를 포함하거나 또는 이들로 이루어지는 프라이머 세트;
- [0099] 전술한 (m), (n''), (o'') 및 (p'')의 올리고뉴클레오티드 프라이머 전부를 포함하거나 또는 이들로 이루어지는

프라이머 세트; 또는,

- [0100] 전술한 (m), (n'), (n''), (o'), (o''), (p') 및 (p'')의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 전부를 포함하거나 또는 이들로 이루어지는 프라이머 세트를 예로 들 수 있다.
- [0101] 더욱 바람직하게는, 제3 프라이머 세트로서는,
- [0102] 전술한 (m), (n'), (o'), (p'), (q) 및 (r')의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 전부를 포함하거나 또는 이들로 이루어지는 프라이머 세트(실시예에서의 「PM5228의 Primer set 1」에 상당); 전술한 (m), (n''), (o''), (p''), (q) 및 (r'')의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 전부를 포함하거나 또는 이들로 이루어지는 프라이머 세트(「PM5228의 Primer set 2」에 상당); 또는
- [0103] 전술한 (m), (n'), (n''), (o'), (o''), (p'), (p''), (q), (r') 및 (r'')의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 전부를 포함하거나 또는 이들로 이루어지는 프라이머 세트(「PM5228의 Primer set 1 및 2의 조합」에 상당)를 예로 들 수 있다.
- [0104] 핵산 합성에서 사용하는 효소는, 쉐치환 활성을 가지는 주형 의존성 핵산 합성 효소이면 특별히 한정되지 않는다. 이와 같은 효소로서는, 예를 들면, Bst DNA 폴리머라아제(라지 프래그먼트), Bca(exo-) DNA 폴리머라아제, 대장균 DNA 폴리머라아제 I의 클레노우 프래그먼트(Klenow fragment), Csa DNA 폴리머라아제 등이 있고, 바람직하게는 Bst DNA 폴리머라아제(라지 프래그먼트)를 예로 들 수 있다.
- [0105] RT-LAMP법에서 사용하는 역전사 효소로서는, RNA를 주형으로서 DNA를 합성하는 활성을 가지는 효소라면 특별히 한정되지 않는다. 이와 같은 효소로서는, 예를 들면, AMV, Cloned AMV, MMLV, Recombinant HIV의 역전사 효소, SuperscriptII/III/IV, ReverTraAce, Thermoscript, Ominiscript, Sensiscript 등이 있고, 바람직하게는, AMV 또는 Cloned AMV 역전사 효소를 예로 들 수 있다. 또한 Bca DNA 폴리머라아제와 같이, 역전사 효소 활성과 DNA 폴리머라아제 활성의 양쪽 활성을 가지는 효소를 사용하면, RT-LAMP 반응을 1개의 효소로 행할 수 있다.
- [0106] 핵산 합성에서 사용하는 효소나 역전사 효소는, 바이러스나 세균 등으로부터 정제된 것이라도 되고, 유전자 재조합 기술에 의해 제작된 것이라도 된다. 또한 이들 효소는 프래그먼트화나 아미노산의 치환 등의 개변된 것이라도 된다.
- [0107] LAMP 반응 후의 핵산 증폭산물의 검출에는 공지 기술을 적용할 수 있다. 예를 들면, 증폭된 염기서열을 특이적으로 인식하는 표지 올리고뉴클레오타이드나 형광성인터칼레이터법(일본공개특허 제2001-242169호 공보)을 사용하거나, 혹은 반응 종료 후의 반응액을 그대로 아가로스겔전기영동을 행해도 용이하게 검출할 수 있다. 아가로스겔전기영동에서는, LAMP 증폭산물은, 염기 길이가 상이한 다수의 밴드가 래더(사다리)형으로 검출된다. 또한, LAMP법에서는 핵산의 합성에 의해 기질이 대량으로 소비되어, 부산물인 피로인산이, 공존하는 마그네슘과 반응하여 피로인산 마그네슘이 되고, 반응액이 육안으로도 확인할 수 있는 정도로 백탁(白濁)한다. 따라서, 이 백탁을, 반응 종료 후 혹은 반응 중의 탁도 상승을 경시적(經時的)으로 광학적으로 관찰할 수 있는 측정 기기, 예를 들면, 400nm의 흡광도 변화를 통상의 분광 광도계를 사용하여 확인함으로써, 핵산 증폭 반응을 검출하는 것도 가능하다(국제공개 제01/83817호 팜플렛).
- [0108] LAMP 반응의 핵산 증폭산물의 검출의 일태양으로서, 형광 표지 프로브를 사용하는 방법을 예로 들 수 있다. 예를 들면, 형광 소광 프로브(Quenching Probe: QProbe(등록상표))로 칭해지는 3'말단 또는 5'말단에 형광 표지된 프로브는, 표적핵산에 하이브리다이제이션했을 때 형광 색소가 그 발광을 감소시킴으로써, 증폭산물을 검출 또는 정량(定量)할 수 있다(일본공개특허 제2001-286300호 공보). 또한 말단 부분에 있어서, 하이브리다이제이션의 염기쌍이 G(구아닌)과 C(시토신)의 페어를 형성하도록 설계되는 것을 특징으로 하고 있다. 여기서 사용되는 형광 표지로서는, 예를 들면, BODIPY-FL, 카르복시로다민6G(CR6G), 카르복시테트라메틸로다민(TAMRA), Pacific Blue, 플루오레세인-4-이소티오시아네이트(FITC) 등이 있다.
- [0109] 본 발명에 있어서는, 상기 3조(組)의 프라이머 세트에 맞추어서, 이하의 QProbe를 사용할 수 있다. 그리고, 각 QProbe는, 3'말단에 BODIPY-FL로 표지되어 있다.
- [0110] 제1 프라이머 세트에 대한 QProbe(실시예에서의 PM2119에 대한 QP에 상당):
- [0111] 이하의 (aa) 또는 (bb)의 올리고뉴클레오타이드를 가지는 QProbe:
- [0112] (aa) 5'-GGATTAGGCTGAATGGCTGAGAAGC-3'(서열번호 19);
- [0113] (bb) 5'-GGATTAGGCTGAATGGCTGAGAAIC-3'(서열번호 20).

- [0114] 제2 프라이머 세트에 대한 QProbe(실시예에서의 PM3191에 대한 QP에 상당):
- [0115] 이하의 (cc)의 올리고뉴클레오타이드를 가지는 QProbe:
- [0116] (cc) 5'-CAATATGCCCTGCATCATTCCTGTC-3'(서열번호 21).
- [0117] 제3 프라이머 세트에 대한 QProbe(실시예에서의 PM5228에 대한 QP에 상당):
- [0118] 이하의 (dd)~(gg) 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드를 가지는 QProbe:
- [0119] (dd) 5'-CATAAAGCCTGGCATCACTACTGAGCC-3'(서열번호 22);
- [0120] (ee) 5'-TAACAGGGTGGCATCTGCATATAGAGGTC-3'(서열번호 23);
- [0121] (ff) 5'-GGATCCAATAACAGGGTGGCATCTGC-3'(서열번호 24);
- [0122] (gg) 5'-GGATCCAATAACAGGGTGGCATCTIC-3'(서열번호 25).
- [0123] 본 발명에 따른 프라이머 세트를 사용하여 핵산 증폭의 검출을 행할 때 필요한 각종 시약류는, 미리 패키징하여 SFTS 바이러스 검출 또는 SFTS 바이러스 감염증 진단용으로 키트화할 수 있다. 구체적으로는, 본 발명에 따른 프라이머 세트, 형광 표지 프로브, 핵산 합성의 기질이 되는 4종류의 dNTP, 핵산 합성을 행하는 DNA 폴리머라아제, 역전사 활성을 가지는 효소, 효소 반응에 바람직한 조건을 제공하는 완충액이나 염류, 효소나 주형을 안정화하는 보호제, 또한 필요에 따라 반응 생성물의 검출에 필요한 시약류가 키트로서 제공된다.
- [0124] 이상에서 설명한 본 발명에 따른 프라이머 세트 또는 키트를 사용하여, SFTS 바이러스의 표적 핵산 영역의 증폭 반응(바람직하게는 LAMP법)을 행하여, SFTS 바이러스를 검출 또는 정량할 수 있다. 바꾸어 말하면, 상기 검출 또는 정량에 의해, SFTS 바이러스 감염의 유무를 검사하고, SFTS 바이러스 감염증을 검사 또는 평가할 수 있다. 본 발명에 따른 프라이머 세트를 사용한 LAMP의 반응액에는, 예를 들면, 반응액 25 μ l당, 본 발명에 따른 프라이머 세트에 포함되는 각 프라이머 2.5~80 pmol(바람직하게는 5~40 pmol), 검체용 핵산 0.02fg~4 μ g(바람직하게는 8fg~0.0004 μ g), 쉐치환형 DNA 합성 효소 4~64 U(바람직하게는 8~32 U), 역전사 효소 0.1~10 U(바람직하게는 0.5~4 U), 최종 농도 0.8~2.4 mM(바람직하게는 1.2~1.8 mM)의 dNTP가 포함된다. 또한, QProbe를 사용하는 경우에는, 예를 들면, LAMP의 반응액 25 μ l당 0.5~20 pmol(바람직하게는 1~5 pmol)의 QProbe를 포함한다. 또한, LAMP의 증폭 반응 조건으로서는, 예를 들면, 온도 60℃~65℃(바람직하게는 63℃)에서 10~60 분(바람직하게는 15~30 분)이다.
- [0125] [실시예]
- [0126] 이하, 실시예를 사용하여 본 발명을 보다 상세하게 설명하지만, 본 발명의 기술적 범위는 이들 실시예로 한정되는 것은 아니다.
- [0127] 이하의 실시예에 있어서 사용하는 프라이머 세트 및 QProbe(QP)를 하기 표 1에 나타낸다.

[표 1]

PM 2119

Primer name	Sequence	서열번호
PM 2119_F3	CCTCCTCAGGAAGCATCTG	1
PM 2119_B3	TCCTCTTTGTTCTTGTAGTACCC	2
PM 2119_FIP	CATTCTACCCTCCCCTCTCTA-TGCATGGTGCGAATTG	3
PM 2119_BIP	GGGAGGAACATTTCATGC-GCAGCTGTTGACCATATTCTC	4
PM 2119_LF	GATTAGGCTGAATGGCTGAC	5
PM 2119_LB	CTCAGGCCGGTCCAC	6
PM 2119_QP	GGATTAGGCTGAATGGCTGAGAAGC	19

PM3191

Primer name	Sequence	서열번호
PM 3191_F3	AGGGAAGTCTCATGGATGG	7
PM 3191_B3	ATCCACCACCCCATTG	8
PM 3191_FIP	GGAGGCTGGATGTAAAGTGC-GGGCGAACTTACATAAAGACAG	9
PM 3191_BIP	CTCTTGTGTTTACAGAGCTTTTACAA-GCTTTCCCCCATGTATCC	10
PM 3191_LF	CCCTGCATCATTCCTGTC	11
PM 3191_LB	CTTATTTCTGCTCAAAGCTTAAGG	12
PM 3191_QP	CAATATGCCCTGCATCATTCCTGTC	21

Primer set 1 (PM5228)

Primer name	Sequence	서열번호
SFTS virus_F3	GATGGAGATGGGACTAGCAAC	13
SFTS virus_B3	CTTGATCTTGAACCCACTCAG	26
SFTS virus_FIP	CTTCGGATGGATTCAATGAC-TGGCTTGAGGAGATCAGG	28
SFTS virus_BIP	GTGACGACCTTGGGATCA-CCTAACCATGCAATGACCTC	30
SFTS virus_LF	CATAAAGCCTGGCATCACTAC	17
SFTS virus_LB	TACAGGGTGGCATCTGC	32
SFTS virus_QP	CATAAAGCCTGGCATCACTACTGAGCC	22

[실시예 1] SFTS virus 검출용 Primer의 반응성 확인

SFTS virus 검출용 Primer를 사용하여 LAMP 반응을 행하였다.

1. 시료 및 시약의 조제

1) 시료

SFTS 바이러스 HB29주의 RNA를, 10mM Tris buffer(WAKO 제조) pH8.0에 용해하고, 1테스트당 100, 1000, 10000 카피로 되도록 시료 용액을 조제했다. 또한 상기 Tris buffer를 0카피의 시료 용액으로 했다.

2) LAMP법에서 사용하는 시약 조성 및 농도

LAMP법에서 사용하는 SFTS 바이러스 검출용 프라이머로서,

프라이머 세트(1): PM2119

프라이머 세트(2): PM3191

프라이머 세트(3): PM5228(Primer set 1)

을 사용했다.

최종 반응 용액 25 μ L 중의 각 시약 농도가 하기로 되도록 조제했다.

반응 용액 조성(탁도 검출계):

[0143] · 20mM Tricine pH8.6

[0144] · 30mM KCl

[0145] · 8mM MgSO₄

[0146] · 1.4mM dNTPs

[0147] · 0.5% Tween20

[0148] · 1.6mM DTT

[0149] · 1.6 μM FIP 및 BIP

[0150] · 0.2 μM F3 및 B3

[0151] · 0.8 μM LF 및 LB

[0152] · AMV Reverse Transcriptase 1.0U(20U/μl, Roche)

[0153] · Bst DNAPolymerase 16U(New England Biolabs)

[0154] · RNase Inhibitor(40U/μl) 1 μL

[0155] · RNA Template 5 μL

[0156] 반응 용액 조성(인터칼레이터계):

[0157] 상기 검출계의 반응 용액 조성에, 이하의 시약을 더욱 첨가하여 조제했다.

[0158] · PPase 20mU(New England Biolabs)

[0159] · YO-PRO-1160nM(Thermo Fisher Scientific)

[0160] 반응 용액 조성(probe계):

[0161] 상기 검출계의 반응 용액 조성에, 이하의 시약을 더욱 첨가하여 조제했다.

[0162] · PPase 20mU(New England Biolabs)

[0163] · QProbe 0.04 μM (닛테츠스미킨(日鐵住金)환경가부시키가이샤)

[0164] 표 1에 나타낸 각 QProbe(QP)를, 각 LAMP 프라이머 세트 (1)-(3)과 조합하여 사용하였다.

[0165] 2. LAMP법에 의한 반응

[0166] LAMP 반응은, LAMP용 시약에 RNA 용액 5 μL를 가하고, 최종 반응 용액 25 μL로 하고, 0.2mL의 전용 튜브 내에서 리얼타임 정량 PCR 시스템 Mx3005P(Agilent Technologies)를 사용하여, 63℃에서 30분 LAMP 반응을 행하였다.

[0167] 3. 리얼타임 형광(인터칼레이터계) 측정에 의한 검출 감도의 비교 결과

[0168] 프라이머 세트 (1)-(3)을 사용한 LAMP법의 리얼타임 형광 측정의 반응 시간의 결과를 표 2에 나타낸다. 각 카피 수에 대하여, 2중 측정을 실시했다. 표의 위로부터, 10000c/t(카피/테스트), 1000카피/테스트, 100카피/테스트, 주형없음(0카피/테스트)을 나타낸다. 또한, 증폭 곡선의 결과를 도 2에 나타낸다.

[0169] [표 2]

cps/test	PM2119		PM3191		PM5228	
10 ⁴	7.9	7.8	5.4	5.6	4.3	4.3
10 ³	9.5	9.2	6.3	6.5	4.6	4.6
10 ²	11.5	10.4	7.2	7.6	5.9	5.6
주형없음	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D. = not detected

Tt값(min.)

[0170]

[0171] <결과 · 고찰>

[0172] 프라이머 세트 (1)-(3)은, 100카피 이상이 측정 개시 후 20분까지 형광의 증가를 확인하고, 0카피는 측정 시간

중의 증가가 확인되지 않았다.

[0173] 4. 리얼타임 형광(probe계) 측정에 의한 검출 감도의 비교 결과

[0174] 프라이머 세트 (1)-(3)을 사용한 LAMP법의 리얼타임 형광 측정의 반응 시간의 결과를 표 3에 나타낸다. 각 카피 수에 대하여, 2중측정을 실시했다. 표의 위로부터, 10000c/t(카피/테스트), 1000카피/테스트, 100카피/테스트, 주형없음(0카피/테스트)을 나타낸다. 또한, 증폭 곡선의 결과를 도 3에 나타낸다.

[0175] [표 3]

cps/test	PM2119	PM3191	PM5228
10 ⁴	5.9	10.7	5.8
	5.9	10.5	5.9
10 ³	6.5	14.2	6.5
	6.5	17.1	6.5
10 ²	7.8	17.5	8.3
	8.3	20.7	8.4
주형없음	N.D.	N.D.	N.D.
	N.D.	N.D.	N.D.

N.D. = not detected

Tt값(min.)

[0176]

[0177] <결과 · 고찰>

[0178] 프라이머 세트 (1)-(3)은, 100카피 이상이 측정 개시 후 30분까지 형광의 증가를 확인하고, 0카피는 측정 시간 중의 증가가 확인되지 않았다.

산업상 이용가능성

[0179] 본 발명에 의하면, SFTS 바이러스를 고감도로 또한 신속하게 검출할 수 있고, SFTS 바이러스 감염증을 효율적으로 진단할 수 있다.

Primer 1 GTTC

Primer 2 GTTC

003A Ehime L 5401:CAAGCCAGCATCAAGGACTGACGGCTGTCCAGTCAGGATTATGGAAGGGGCTTCAGGAT 5460

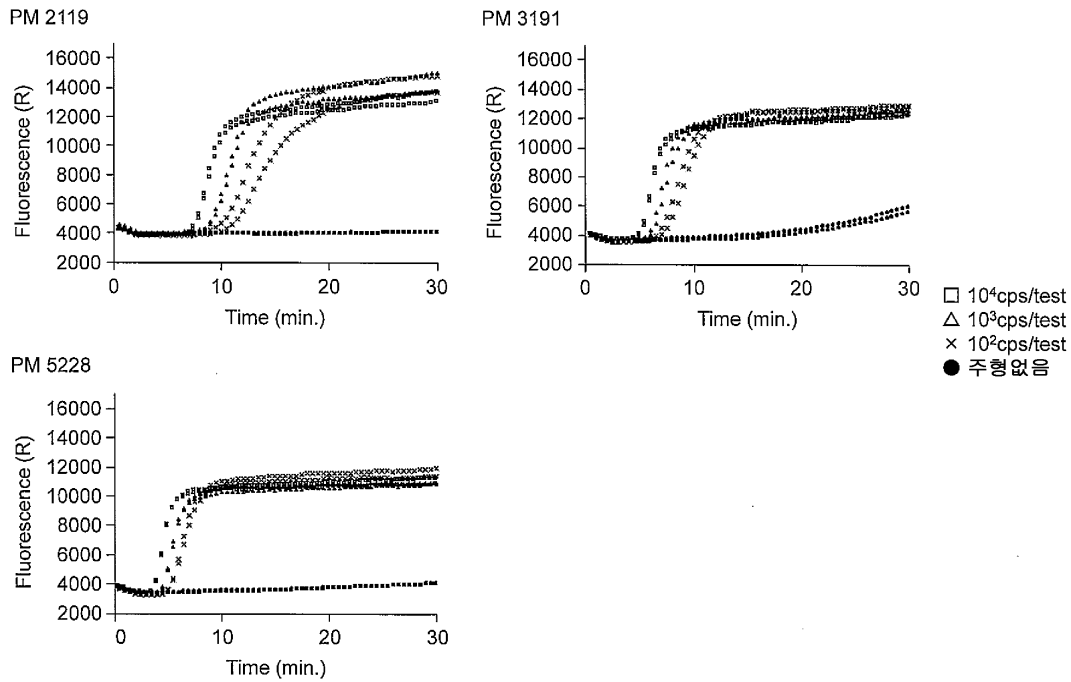
SPL179 5401:CAAGCCAGCATCAAGGACTGACGGCTGTCCAGTCAGGATTATGGAAGAGGCTTCAGGAT 5460

SPL193 5401:CAAGCCAGCATCAAGGACTGACGGCTGTCCAGTCAGGATCATGGAAGGGGCTTCAGGAT 5460

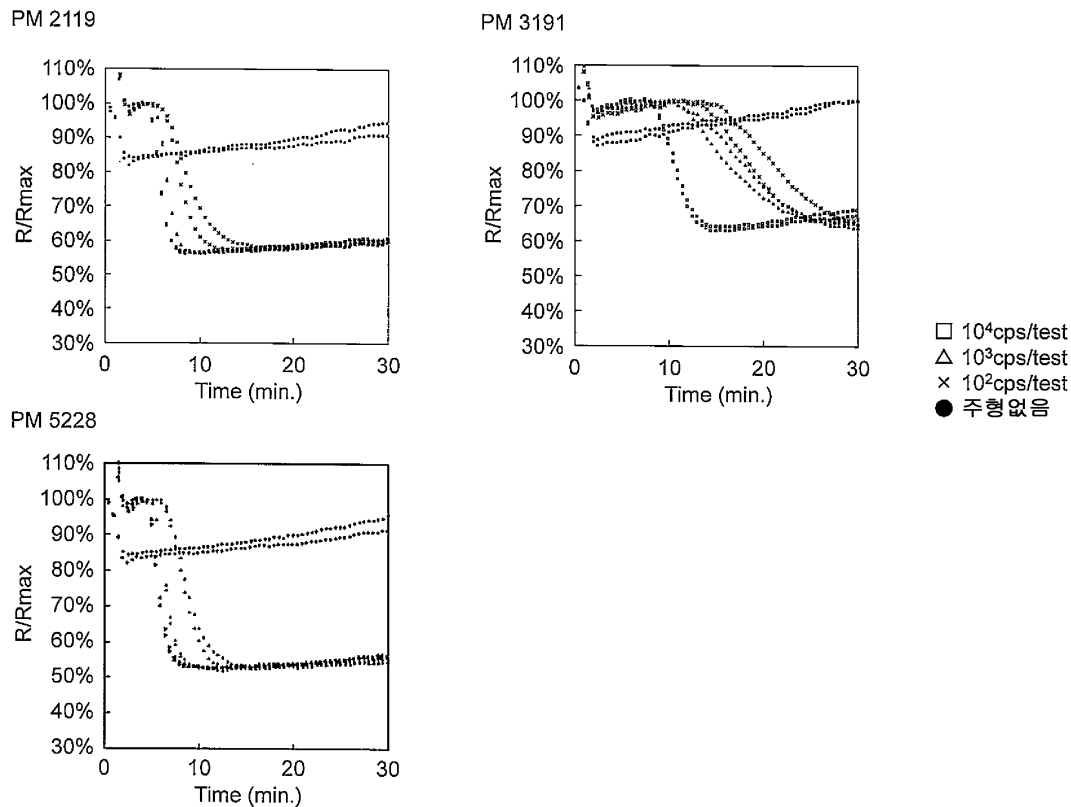
SPL230 5401:CAAGCCAGCATCAAGGACTGACGGCTGTCCAGTCAGGATTATGGAAGGGGCTTCAGGAT 5460

SPL238 5401:CAAGCCAGCATCAAGGACTGACGGCTGTCCAGTCAGGATTATGGAAGGGGCTTCAGGAT 5460

도면2



도면3



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> DIRECTOR-GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF INFECTIOUS DISEASES

EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> A primer set for detection of severe fever with thrombocytopenia
syndrome (SFTS) virus

<130> P18-0665

<160> 33

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 1

cctcctcagg aagcatctg 19

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 2

tcctctttgt tctttagta ccc 23

<210> 3

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 3

cattctaccc tcccctctct atgcatgggtg cgaattg 37

<210> 4

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 4

gggaggaaca ttcatgcgc agctgttgac catattctc 39

<210> 5

<211> 20
 <212> DNA
 <213>
 Artificial
 <220><223> primer
 <400> 5
 gattaggctg aatggctgac 20
 <210> 6
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> primer
 <400> 6
 ctcaggccgg tccac 15
 <210> 7
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> primer
 <400> 7
 agggaagtct catggatgg 19
 <210> 8
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 ><223> primer
 <400> 8
 atccaccacc ccattg 16
 <210> 9
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> primer
 <400> 9

ggaggctgga tgtaaagtgc gggcgaactt acataaagac ag 42

<210> 10

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 10

ctcttggtgtt cagagctttt acaagctttc ccccatgtat cc 42

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 11

ccctgcatca ttctgtgc 18

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 12

cttatttcgt ctcaaagctt aagg 24

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 13

gatggagatg ggactagcaa c 21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 14

cttgatcttg aayccactca g 21

<210> 15

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 15

ctycggatg attcaatgac tggcttgagg agatcagg 38

<210> 16

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 16

gtgaygacct tgggatcacc taaccatgca atgacctc 38

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 17

cataaagcct ggcataccta c 21

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 18

yaacagggtr gcatctgc 18

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial
 <220><223> probe
 <400> 19
 ggattaggct gaatggctga gaagc 25
 <210> 20
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> probe
 <220><221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> n is inosine
 <400> 20
 ggattaggct gaatggctga gaanc 25

 <210> 21
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> probe
 <400> 21
 caatatgcc tgcatttc ctgtc 25
 <210> 22
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> probe
 <400> 22
 cataaagcct ggcattcacta ctgagcc 27
 <210> 23
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> probe
 <400> 23

taacagggtg gcatctgcat atagaggtc	29
<210> 24	
<211	
> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> probe	
<400> 24	
ggatccaata acagggtggc atctgc	26
<210> 25	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> probe	
<220><221> misc_feature	
<222> (25)..(25)	
<223> n is inosine	
<400> 25	
ggatccaata acagggtggc atctnc	26
<210> 26	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> primer	
<400> 26	
cttgatcttg aaccactca g	21
<210> 27	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> primer	
<400> 27	
cttgatcttg aatccactca g	21
<210> 28	

<211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> primer
 <400> 28
 cttcggatgg attcaatgac tggcttgagg agatcagg 38
 <210> 29
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> primer
 <400> 29
 ctccggatcg attcaatgac tggcttgagg agatcagg 38
 <210> 30

 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> primer
 <400> 30
 gtgacgacct tgggatcacc taaccatgca atgacctc 38
 <210> 31
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> primer
 <400> 31
 gtgatgacct tgggatcacc taaccatgca atgacctc 38
 <210> 32
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> primer
 <400> 32
 taacagggtg gcatctgc 18

<210> 33

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer

<400> 33

caacagggtg gcatctgc

18