(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0132501
(43) 공개일자 2020년11월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/70 (2006.01) *C12Q 1/6818* (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/701 (2013.01)
C12Q 1/6818 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2019-0058136
(22) 출원일자 2019년05월17일
심사청구일자 2019년05월17일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
박만성
서울특별시 강남구 삼성로 417, 104동 704호 (대치동, 대치포스코더샵아파트)
배준용
서울특별시 노원구 공릉로34길 62, 1014동 906호 (공릉동, 태강아파트)
(74) 대리인
특허법인 무한

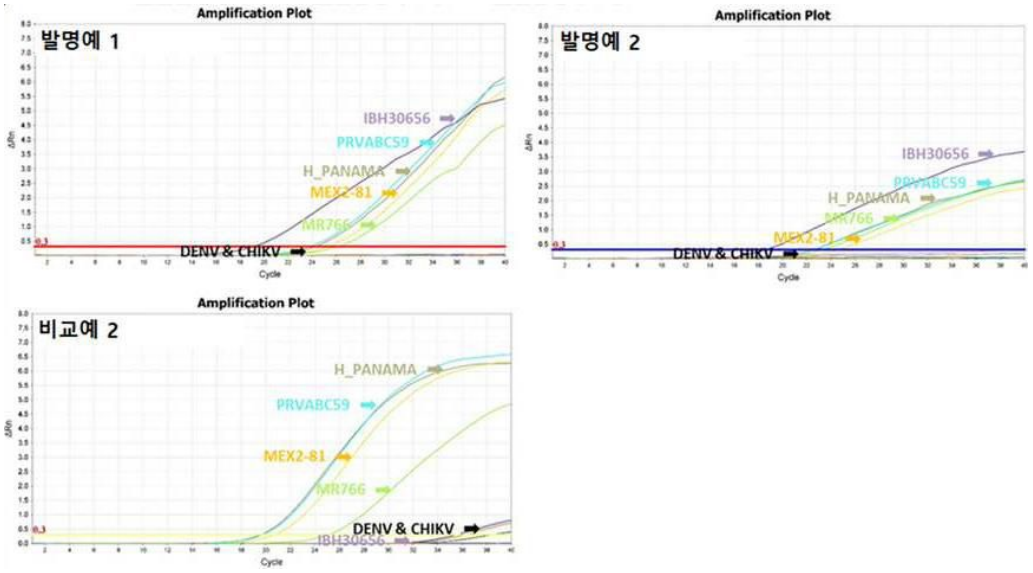
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **지카바이러스 진단용 프라이머 세트 및 이를 이용한 지카바이러스의 진단방법**

(57) 요 약

본 발명은 지카바이러스 진단용 프라이머 및 프로브 세트와 이를 이용한 지카바이러스의 진단방법에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12Q 2561/113 (2019.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711037735
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오.의료기술개발
연구과제명	지카 바이러스 유전자 진화 특성 분석 및 역유전학법 구축을 위한 전장유전체 확보
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.03.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드, 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어지는 프로브를 포함하는, 지카바이러스 진단용 조성물.

청구항 2

서열번호 4의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드, 서열번호 5의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어지는 프로브를 포함하는, 지카바이러스 진단용 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 프로브는 리포터 및 소광제가 부착된 것인, 지카바이러스 진단용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 리포터는 프로브의 5' 말단에 부착된 FAM인, 지카바이러스 진단용 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 소광제는 프로브의 3' 말단에 부착된 BHQ1인, 지카바이러스 진단용 조성물.

청구항 6

서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드, 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어지는 프로브를 포함하는, 지카바이러스 검출용 키트.

청구항 7

서열번호 4의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드, 서열번호 5의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어지는 프로브를 포함하는, 지카바이러스 진단용 키트.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서,

상기 진단은 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)에 의한 것인, 지카바이러스 진단용 키트.

청구항 9

서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드, 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어지는 프로브를 이용하여 실시간 qRT-PCR을 수행하는 단계를 포함하는, 지카바이러스의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

서열번호 4의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드, 서열번호 5의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어지는 프로브를 이용하여 실시간 qRT-PCR을 수행하는 단계를 포함하는, 지카바이러스의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서,

상기 실시간 qRT-PCR은 TaqMan 프로브 방식의 실시간 RT-PCR인, 지카바이러스의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 지카바이러스의 진화 양상을 고려하여 제작된 지카바이러스 진단용 프라이머 및 프로브 세트와 이를 이용한 지카바이러스의 진단방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 지카바이러스(zika virus, ZIKV)는 플라비비리대(*Flaviviridae*)에 속하는 단일가닥 RNA 바이러스로, 숲모기(Aedes mosquitoes)에 의해 전파되는 모기 매개 바이러스성 감염병의 원인체로 알려져 있다. 이집트 숲모기(*Aedes aegypti*)가 주요 매개체인 것으로 알려져 있으나, 흰줄 숲모기(*Aedes albopictus*)에 의해서도 전파가 가능한 것으로 여겨지고 있다. 사람과 사람 간 전파는 아직 정확히 밝혀지지는 않았으나, 수혈이나 성접촉에 의해 전파가 이루어질 가능성을 보여주는 사례들이 많이 보고되고 있다. 지카바이러스 감염 시 발열과 함께 관절통, 결막염, 근육통 등의 임상증상이 발생하나 약 80%는 불현성 감염으로 그 증상이 경미한 것으로 알려져 있다.

[0004] 지카바이러스는 1947년 우간다의 지카 숲에 살고 있는 히말라야 원숭이로부터 처음 분리되었다. 2007년 미크로네시아 연방의 섬인 야프섬에서 산발적으로 유행하였으며, 2013~2014년에는 프랑스의 폴리네시아 지역에서 유행한 사례들이 보고되었다. 또한, 최근 2015년 5월, 브라질에서 첫 인체감염 사례가 보고된 이후, 중남미 지역에서 유행이 확산되며 지속적으로 감염환자가 발생하였다. 이에 세계보건기구(WHO)에서는 2016년 2월 1일 지카바이러스의 비정상적인 확산에 기반하여 지카바이러스 비상사태를 선포하였다.

[0005] 특히, 경미한 임상증상에 불구하고, 지카바이러스 감염에 의한 소두증(mycrocephaly) 신생아 출산과 길랑-바레 증후군(Guillain-Bare syndrome) 발생의 연관성이 대두되면서, 공중보건학적으로 큰 문제가 되고 있는 바이러스로 알려졌다.

[0006] 현재 우리나라에는 토착화된 지카바이러스에 의한 인체감염 사례는 없다. 하지만 빈번한 국제교류의 증가로 해외유입에 의한 지카바이러스 감염 발생은 언제든지 일어날 수 있는 상황이다. 특히 2015년 동남아시아 국가에서 지카바이러스가 발생하였다는 사실과 지카바이러스를 매개할 수 있는 흰줄 숲모기가 국내에 서식하고 있다는 사실은 지카바이러스 발생에 대비 철저한 사전 대응책이 마련되어야 함을 의미한다.

[0007] 그러나 아직 지카바이러스 치료제나 백신은 전혀 개발되어 있지 않고 있으며 특히 지카바이러스 조기탐지에 필수적인 진단기술의 확보도 매우 필요한 상황이다. 이와 같이 항바이러스 치료제나 백신이 전무한 상황에서 신속

하고 정확한 진단은 지카바이러스 감염여부를 진단하고, 신속하게 대처할 수 있는 중요한 정보를 제공할 수 있다.

[0008] Waggoner jj 등은 2016년 지카바이러스 NS2B 유전자를 표적으로 하는 프라이머, 프로브 세트를 개발하여 지카바이러스 진단용으로의 사용 가능성을 발표하였고(비특헌 문헌 1), Victor 등은 2016년 기존에 보고되었던 다양한 지카바이러스 진단용 프라이머 및 프로브 세트를 바탕으로 기술적으로 민감도 한계점을 극복할 수 있는 방안을 발표하였다(비특허 문헌 2). 또한 국내 질병관리본부(KCDC)에서는 2016년 지카바이러스 및 일본뇌염 바이러스를 진단할 수 있는 프라이머 세트를 개발한 바 있다(특허 문헌 1).

[0009] 상기와 같이 여러 연구결과들이 발표되었으나, 보다 민감도와 특이도가 높고 오차가 발생하지 않으며, 진화적으로 유리하여 최근 유행하고 있는 다양한 지카바이러스를 진단할 수 있는 프라이머, 프로브 세트의 개발은 여전히 요구되고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1692436호

비특허문헌

[0012] (비특허문헌 0001) Waggoner JJ et, al., Zika Virus: Diagnostics for an Emerging Pandemic Threat. 2016 Journal clinical microbiology, 54(4):860-7

(비특허문헌 0002) Corman Victor M et al., Assay optimization for molecular detection of Zika virus. 2016 Bull World Health Organ. 1;94(2):880-892

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 과거 유행하고 사라진 것이 아닌, 현재 유행하고 있는 지카바이러스를 정확하고 신속하게 진단할 수 있는 프라이머 및 프로브 세트를 제공하는 것이다.

[0014] 보다 구체적으로는, 유전체 빅데이터 기반의 다양한(NCBI 등재 372개의 염기서열) 지카바이러스 염기서열 분석을 바탕으로 유행 년도가 서로 다른 지카바이러스(MR766_1947, IBH30656_1968, PRVABC59_2015, PANAMA_2016, MEX2-81_2016)에 대해 민감도와 특이도를 갖는 프라이머 및 프로브 세트를 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 프라이머 및 프로브 세트를 이용한 지카바이러스의 진단방법을 제공하는 것이다.

[0016] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드, 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어지는 프로브를 포함하는, 지카바이러스 진단용 조성물이 제공된다.

[0019] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 서열번호 4의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드, 서열번호 5의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어지는 프로브를 포함하는, 지카바

이러스 진단용 조성물이 제공된다.

[0020] 일 측에 따르면, 상기 프로브는 리포터 및 소광제가 부착된 것일 수 있다.

[0021] 일 측에 따르면, 상기 리포터는 프로브의 5' 말단에 부착된 FAM일 수 있다.

[0022] 일 측에 따르면, 상기 소광제는 프로브의 3' 말단에 부착된 BHQ1일 수 있다.

[0023] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드, 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어지는 프로브를 포함하는, 지카바이러스 진단용 키트가 제공된다.

[0024] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 서열번호 4의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드, 서열번호 5의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어지는 프로브를 포함하는, 지카바이러스 진단용 키트가 제공된다.

[0025] 일 측에 따르면, 상기 진단은 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)에 의한 것일 수 있다.

[0026] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드, 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어지는 프로브를 이용하여 실시간 qRT-PCR을 수행하는 단계를 포함하는, 지카바이러스의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법이 제공된다.

[0027] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 서열번호 4의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드, 서열번호 5의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어지는 프로브를 이용하여 실시간 qRT-PCR을 수행하는 단계를 포함하는, 지카바이러스의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법이 제공된다.

[0028] 일 측에 따르면, 상기 실시간 qRT-PCR은 TaqMan 프로브 방식의 실시간 qRT-PCR일 수 있다.

발명의 효과

[0030] 본 발명의 프라이머 및 프로브 세트는 지카바이러스 진화 양상을 고려하여 현재 인체를 감염시켜 유행하는 지카바이러스를 기반으로 제작한 것이므로, 실제 현장에 적용하였을 때 매우 높은 민감도와 특이도로 지카바이러스 유전자를 검출해낼 수 있다.

[0031] 또한, 1947년부터 2017년까지 보고된 모든 지카바이러스 유전자를 동치에 검출할 수 있으며, 지카바이러스 진화 양상을 고려하지 않고 개발된 기존 진단 키트에 비해 더 우수한 검출 민감도와 특이도를 나타낼 수 있다.

[0032] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1a는 Genbank로부터 372건의 지카바이러스 cDNA 염기서열을 추출한 뒤 정렬(aliment) 하여 프라이머 및 프로브를 선별한 것을 나타낸 것이다.

도 1b는 지카바이러스의 진화 양상을 분자계통수(phylogenetic tree)를 통해 도출한 결과이다.

도 2a는 본 발명의 프라이머 및 프로브 세트를 이용하여 서로 다른 5종의 지카바이러스에 대한 유전자 진단 검출한계 값을 one-step RT-PCR을 통해 나타낸 것이다.

도 2b는 양성대조군으로 선별된 프라이머 및 프로브 세트를 이용하여 서로 다른 5종의 지카바이러스에 대한 유전자 진단 검출한계 값을 one-step RT-PCR을 통해 나타낸 것이다.

도 3는 본 발명의 프라이머 및 프로브 세트와 양성 대조군 프라이머 및 프로브 세트를 이용하여 서로 다른 5종의 지카바이러스에 대한 유전자 진단 검출한계 값을 one-step RT-PCR을 통해 나타낸 것이다

도 4는 본 발명의 프라이머 및 프로브 세트와 양성 대조군 프라이머 및 프로브 세트를 이용한 실시간 one-step qRT-PCR의 결과를 통해 지카바이러스 검출 특이도를 비교한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 각 도면에 제시된 동일한 참조 부호는 동일한 부재를 나타낸다.

[0036] 아래 설명하는 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있다. 아래 설명하는 실시예들은 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 이들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0037] 실시예에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 실시예를 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0038] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0039] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조 부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0040] 본 발명자들은, public database인 Genebank에 등재된 372여 건의 지카바이러스 cDNA 염기서열을 모두 추출하여 Lasergene 7.0 (DNAstar) 프로그램을 통해 정렬(alignment)한 뒤 염기서열의 변이가 가장 적게 보인 envelop(Env) 유전자와 nonstructural 1(NS1) 유전자를 표적 유전자로 선정하고, 각 유전자에서 변이가 없이 잘 보존된 염기서열 위치를 분석함으로써, 지카바이러스 유전자만을 특이적으로 검출해 낼 수 있는 프라이머 및 프로브를 제작하였다(실시예 1).

[0041] 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드, 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어지는 프로브를 포함하는, 지카바이러스 진단용 조성물이 제공된다.

[0042] 또한, 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 서열번호 4의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드, 서열번호 5의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어지는 프로브를 포함하는, 지카바이러스 진단용 조성물이 제공된다.

[0043] 본 발명의 지카바이러스 진단용 조성물은 실시간 역전사 중합효소연쇄반응 또는 일반적인 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용하여 지카바이러스를 검출할 수 있다. 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응에서는 프라이머와 형광물질이 화학적으로 결합하여 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써 반응 결과를 실시간으로 모니터한다. 이러한 프로브는 중합효소 연쇄반응 과정에서 2개의 프라이머와 마찬가지로 검체의 핵산에 있는 상보서열에 결합하게 되는데, 위치는 프라이머에서 약간 떨어진 부분이다.

[0044] 상기 프로브는 양끝에 리포터(reporter)와 소광제(quencher)라는 형광물질이 붙어 있는 구조일 수 있으며, 이 경우 리포터와 소광제가 근접하여 존재하면 형광을 서로 상쇄하여 리포터의 형광이 감지되지 않으나, 증폭이 진행됨에 따라 리포터가 소광제로부터 떨어지면 리포터의 형광이 감지되는 것이다. 따라서 형광의 강도는 증폭 사이클이 증가함에 따라 점점 증가하게 된다. 상기 리포터는 프로브의 5' 말단에 부착된 FAM일 수 있으며, 소광제는 프로브의 3' 말단에 부착된 BHQ1일 수 있다.

[0045] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드, 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어지는 프로브를 포함하는, 지카바이러스 진단용 키트가 제공된다.

[0046] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 서열번호 4의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드, 서열번호 5의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어지는 프로브를 포함하는, 지카바이러스 진단용 키트가 제공된다.

[0047] 상기 키트는 본 발명의 프라이머 및 프로브 세트 외에 증폭용 완충용액, dNTP, 대조군, 검출 시약 등을 추가적으로 포함할 수 있으며, 액상 또는 건조 타입으로 제공될 수 있고, 반응에 영향이 없는 경우에 한하여 목적에 따라 추가적인 성분을 포함할 수 있다. 한편, 건조 상태로 제공되는 키트는 보관 안정성이 향상되어 오랜 기간 사용이 가능하며, 배양법과 유의성 있는 결과를 가짐으로써, 보다 빠른 시간 내에 정확한 결과를 얻을 수 있다.

[0048] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드, 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어지는 프로브를 이용하여 실시간 qRT-PCR을 수행하는 단계를 포함하는, 지카바이러스의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법이 제공된다.

[0049] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 서열번호 4의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드, 서열번호 5의 염기서열로 이루어지는 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어지는 프로브를 이용하여 실시간 qRT-PCR을 수행하는 단계를 포함하는, 지카바이러스의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법이 제공된다.

[0050] 상기 실시간 qRT-PCR은 TaqMan 프로브 방식의 실시간 qRT-PCR일 수 있다. 상기 서열번호 3의 염기서열로 이루어지는 프로브, 서열번호 6의 염기서열로 이루어지는 프로브를 TaqMan 프로브로 이용하는 경우, 전술한 바와 같이 5' 말단 및 3' 말단에 각각 리포터(reporter)와 소광제(quencher)라는 형광물질이 붙어 있는 것을 이용할 수 있다. 구체적으로, 상기 리포터는 프로브의 5' 말단에 부착된 FAM일 수 있으며, 소광제는 프로브의 3' 말단에 부착된 BHQ1일 수 있다.

[0052] 이하에서는, 본 발명의 실시예에서 사용된 실험 재료 및 방법에 대해 상세히 기술한다. 그러나 하기 실시예들은 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 발명의 범위가 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0054] **실시예 1: 지카바이러스 진단용 프라이머 및 프로브 제작**

[0055] Public database인 Genbank에 등재된 372여 건의 지카바이러스 cDNA 염기서열을 모두 추출하여 Largergene v7.0(DNAstar, USA) 프로그램을 통해 정렬(alignment) 한 다음, 염기서열의 변이가 가장 적게 보인 envelop(Env) 유전자와 nonstructural 1(NS1) 유전자를 표적 유전자로 선정하였다.

[0056] 최종적으로 분리 연도(1947년부터 2017년)에 따른 372여 건의 지카바이러스 Env 유전자와 NS1 유전자의 염기서열 중 변이가 없는 염기서열 위치를 분석하였다. 지카바이러스를 특이적으로 검출해낼 수 있는 RT-PCR용 프라이머로 지카바이러스 envelope 유전자 부위 중 nt2293~nt2405을 선정하였고, NS1 유전자는 nt2467~nt2609 부위를 선정하였다. 이들 프라이머를 이용한 RT-PCR의 최종 산물의 크기는 각각 112bp, 138bp이며, 구체적인 프라이머 및 프로브 세트의 서열을 하기 표 1에 나타냈다.

표 1

[0057]

서열번호	이름	염기서열(5'- 3)	위치	용도
1	ZIKV-Env_2293F	TTTGGAGCRGCYTTCAAATCA	2293-2313	정방향 프라이머
2	ZIKV-Env_2381R	AGGGARATRGATCCATTCTTTGTGT	2405-2381	역방향 프라이머
3	ZIKV-Env_2316 probe	TGTTTGGAGGAATGTCCTGGTTCTCACA	2316-2343	프로브
4	ZIKV-NS1_2467F	GGGTGYTCRGTGGACTTCTC	2467-2486	정방향 프라이머
5	ZIKV-NS1_2609R	CARGCYTGCTTGACTGCTGCTGC	2609-2587	역방향 프라이머
6	ZIKV-NS1_2552 probe	GGTACAAGTACCATCCTGACTCCCC	2552-2576	프로브

[0058] *염기서열에서 R은 A 또는 G를 의미함.

[0059] *염기서열에서 Y는 C 또는 T/U를 의미함.

[0061] **실시예 2: 지카바이러스 진화양상 분석**

[0062] 상기 실시예 1에서 제작한 프라이머 세트 및 프로브를 이용하여 지카바이러스에 대한 진단적 성능평가를 수행하기 위해 5종의 서로 다른 지카바이러스를 선정하였다. 바이러스 선정은 유전적 진화 양상을 확인할 수 있는 분자계통수를 BEAST(Bayesian Evolution Analysis Sampling Tree) 프로그램을 이용하여 분석한 다음(도 1b), 바이러스 분리 연도, 숙주, 분리 지역 등을 고려하여 최종 선정된 지카바이러스는 하기 표 2에 나타낸 바와 같다.

표 2

[0063]

	바이러스주	분리지역	분리년도	분리숙주	Genbank 등록번호
1	MR766	Uganda	1947	Rhesus monkey	KU963573
2	PRVABC59	Puerto Rico	2015	Human	KX087101
3	IBH30656	Nigeria	1968	Human	KU963574
4	MEX2-81	Mexico	2016	Mosquito	KX446950
5	PAN16	Panama	2016	Human	KX198135

[0065] **실시예 3: 성능평가에 사용될 양성대조 프라이머 및 프로브 제작**

[0066] 양성대조군으로 사용할 수 있는 프라이머 및 프로브를 제작하기 위해, 프라이머 및 프로브의 정보는 비특허 문헌 1(Waggoner JJ et, al.)과 특허문헌 1(대한민국 등록특허 제10-1692436)을 참고하여 제작하였으며, 구체적인 염기서열은 표 3에 나타냈다.

[0067] 한편, 양성대조군 프라이머는 RT-PCR을 위한 프라이머로, 지카바이러스의 NS5 유전자 부위 중 nt9527~nt9691, NS2B 유전자 부위 중 nt4533~nt4624를 타겟으로 한다. 이들의 각 RT-PCR에 의한 최종 산물의 유전자 크기는 164bp, 91bp이다.

표 3

[0068]

서열번호	이름	염기서열(5'- 3)	위치	용도
7	ZIKV-NS5_PC1_9527F	ATGGARGCTGAGGARGT	9527-9543	정방향 프라이머
8	ZIKV-NS5_PC1_9691R	RGCRTGTGCAAACCTATCA	9691-9673	역방향 프라이머
9	ZIKV-NS5_PC1_9680 probe	ACCTATCATCAATTGGCTTCACAACGC	9680-9654	프로브
10	ZIKV_NS2b_PC2_4533F	CTGTGGCATGAACCCAATAG	4533-4553	정방향 프라이머
11	ZIKV_NS2b_PC2_4624R	ATCCCATAGAGCACCACTCC	4624-4604	역방향 프라이머
12	ZIKV_NS2b_PC2_4578 probe	CCACGCTCCAGCTGCAAAGG	2552-2576	프로브

[0069] *프로브의 5' 말단에는 FAM, 3' 말단에는 BHQ1 부착함.

[0070] *염기서열에서 R은 A 또는 G를 의미함.

[0072] **실시예 4: One-step RT-PCR을 이용한 진단용 프라이머의 검출한계 측정**

[0073] 상기 실시예 1에서 제작한 프라이머를 이용하여 하기와 같은 방법으로 one-step RT-PCR을 수행하였다.

[0074] One-step RT-PCR을 위해, PCR 반응 튜브에 5x Hipi RT-PCR master premix 4 ul (엘피스바이오텍, EBT-1101), forward primer 1ul (10pmol/ul), reverse primer 1ul (10pmol/ul), nuclease free water 9ul 및 각 지카바이러스에서 추출한 RNA 5ul를 넣고 잘 섞어준 후, 유전자 증폭기(Proflex™ 3, Applied Biosystems, USA)에 PCR

반응 튜브를 넣고 반응을 수행하였다. 각 RNA 시료의 준비는 최저 검출 한계값을 측정하기 위하여 5종의 지카바이러스(MR766, PRVABC59, IBH30656, MEX2-81, PANAMA)의 세포배양액을 이용하여 $5x10^5$PFU/ml이 되도록 희석한 후 10배씩 단계 희석하여, 200ul를 취하고 ($1x10^5$~0.1PFU/ml) Qiagen viral RNA mini kit (QIAGEN, USA)를 사용하여 50ul의 RNA를 추출하였다. 유전자 증폭기에 상기의 조성으로 제작한 시료를 PCR 반응 튜브에 넣고 먼저 50℃에서 30분간 정치시켰다. 이 과정에서 RNA를 주형으로 cDNA가 합성되는 역전사 반응을 유도한 후 95℃에서 15분간 정치하고 중합효소(pfu polymerase)를 활성화시킨다.

[0075] 그 후 95℃ 15초, 58℃ 45초, 72℃ 45초간 정치하고 PCR을 45회 반복시키는 조건으로 반응을 실시한다. 이후 72℃에서 5분간 더 정치한다. 이와 같은 방법으로 RT-PCR이 완료된 시료는 2% 아가로즈젤에 20ul씩 전기영동을 수행하여 결과를 판정하였다. 그 결과, 도 2a 및 도 2b에 나타낸 바와 같이, 전체적으로 5종의 지카바이러스에 대한 one-step RT-PCR 검출 한계 값이 다양하게 확인되었다.

[0076] 먼저, 도 2a의 결과를 살펴보면 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 프라이머 세트(이하, '프라이머 세트 1')의 경우 MR766 바이러스는 10PFU/ml, PRVABC59 바이러스는 10^2PFU/ml, IBH30656 바이러스는 10PFU/ml, MEX2-81 바이러스는 10^2PFU/ml, PANAMA 바이러스는 10^2PFU/ml까지 검출할 수 있는 것으로 확인되었다.

[0077] 서열번호 4 및 서열번호 5의 염기서열로 이루어지는 프라이머 세트(이하, '프라이머 세트 2')의 경우에도 PANMA 바이러스는 10^3PFU/ml까지 검출할 수 있는 것을 제외하고는 나머지 4종의 지카바이러스에 대하여 10^2PFU/ml 가지 검출할 수 있는 것으로 확인되었다.

[0078] 한편, 양성 대조군인 서열번호 7 및 서열번호 8의 염기서열로 이루어지는 프라이머 세트(이하, '프라이머 세트 3')로 one-step RT-PCR을 수행한 결과, 5종의 지카바이러스 중 PRVABC59, IBH30656, MEX2-81 바이러스는 10 PFU/ml까지 검출할 수 있는 것으로 확인되었다. 이와 달리, 서열번호 10 및 서열번호 11의 염기서열로 이루어지는 프라이머 세트(이하, '프라이머 세트 4')는 MR766을 제외하고 4종의 지카바이러스 모두 10^3PFU/ml까지 검출할 수 있는 것으로 확인되었다(도 2b).

[0080] **실시예 5: 실시간 one-step qRT-PCR 법을 이용한 지카바이러스의 검출**

[0081] 상기 실시예 1에서 제작한 프라이머 및 프로브를 이용하여 실시간 one-step qRT-PCR을 다음과 같이 수행하였다. 유행 년도가 서로 다른 5종의 지카바이러스 유전자를 실시간으로 검출할 수 있도록 프라이머 세트 1과 서열번호 3의 프로브(발명예 1) 및 프라이머 세트 2와 서열번호 6의 프로브(발명예 2)를 이용하여 Taqman probe 방식의 실시간 one-step qRT-PCR 방법을 수행하였다.

[0082] 여기서, one-step qRT-PCR 키트는 TaqmanTM RNA-to-CTTM one-step kit (Applied biosystemsTM, USA)를 사용하였고, 음성대조군은 NFW를 사용하였으며, 양성대조군은 상기 실시예 3에서 제작한 프라이머 세트 3과 서열번호 9의 프로브(비교예 1) 및 프라이머 세트 4와 서열번호 12의 프로브(비교예 2)를 이용하여 지카바이러스 유전자 검출이 가능한지 비교 분석하였다.

[0083] 실시간 one-step qRT-PCR 수행을 위해, 반응튜브에 2X master mix 10ul, forward primer 1ul (10pmol/ul), reverse primer 1ul (10pmol/ul), 프로브 0.5ul (10pmol/ul), 40xRT enzyme 0.5ul, NFW 2ul에 실시예 3과 같이 서로 다른 5종의 바이러스 세포배양액을 이용하여 10^4PFU/ml로 희석한 후 추출한 RNA를 5ul 넣어 잘 섞어 준다. 준비 완료된 시료를 유전자 증폭기(ABI quantstudio 3, applied Biosystems)에 넣고 역전사 반응이 일어나도록 48℃에서 15분간 정치시켰다.

[0084] 이 과정에서 바이러스에서 추출한 RNA를 주형으로 cDNA가 합성된다. 역전사 반응을 유도한 다음 95℃에서 10분간 정치하여 중합효소를 활성화시킨다. 그 후 95℃에서 15초, 59℃에서 1분간 정치하는 것을 40회 반복 수행하고, 이 구간에서 유전자 증폭 여부가 형광 값으로 측정되었다.

[0085] 그 결과, 표 4에 나타낸 바와 같이, 실시간 one-step qRT-PCR의 조건에서 양성대조군으로 사용한 비교예 1에서 지카바이러스 유전자를 검출하지 못한 것을 확인할 수 있었다.

표 4

[0086]

	Ct value			
Viral RNA (10^4 PFU)	발명예 1	발명예 2	비교예 1	비교예 2
MR766	25.5	24.0	-	27.6
PRVABC59	24.6	24.2	-	21.8
IBH30656	20.6	21.3	-	-
MEX2-81	24.8	23.9	-	21.7
PANMA	23.8	24.2	-	21.2

[0087] 다음으로, 특허문헌 1(대한민국 등록특허 제10-1692436호)에 기재된 방법을 이용하여 2X Qrt-PCR master mix 12.5ul, forward primer 1.5ul (10pmol/ul), reverse primer 1.5ul (10pmol/ul), 프로브 0.4ul (10pmol/ul), 40xRT enzyme 0.4ul, NFW 3.1ul를 PCR 반응튜브에 넣고 상기에 명시된 유전자 증폭기에서 재실험을 수행하였다. 구체적으로, cDNA 합성은 45℃에서 10분간 정치시킨 뒤 95℃에서 10분간 정치하여 중합효소를(Taq polymerase)를 활성화시켰다. 그 후 95℃에서 15초, 53℃에서 45초로 45회 반복시키는 시험 조건으로 수정하여 실시간 one-step qRT-PCR을 수행하였다.

[0088] 그 결과, 상기 표 4에 나타낸 결과와 마찬가지로 양성대조군으로 사용한 비교예 1의 프라이머 및 프로브 세트는 지카바이러스 유전자를 전혀 검출하지 못하였다.

표 5

[0089]

	Ct value			
Viral RNA (10^4 PFU)	발명예 1	발명예 2	비교예 1	비교예 2
MR766	26.5	23.0	-	27.6
PRVABC59	25.6	23.2	-	22.2
IBH30656	20.8	22.3	-	-
MEX2-81	25.8	22.9	-	21.9
PANMA	24.1	24.3	-	22.2

[0090] 따라서, 이하에서는 실시간 one-step qRT-PCR의 검출한계 값 측정을 위한 양성대조군은 비교예 2의 프라이머 및 프로브 세트를 사용하여 비교분석을 수행하였다.

[0092] **실시예 6: 실시간 one-step qRT-PCR을 이용한 지카바이러스 검출한계 측정**

[0093] 상기 실시예 5에 기재된 방법으로 실시간 one-step qRT-PCR을 수행하여 지카바이러스 유전자의 검출한계에 대한 비교분석을 실시하였다.

[0094] 실시간 one-step qRT-PCR 수행을 위해, PCR 반응 튜브에 2X master mix 10ul, forward primer 1ul (10pmol/ul), reverse primer 1ul (10pmol/ul), 프로브 0.5ul (10pmol/ul), 40xRT enzyme 0.5ul, NFW 2ul 와 서로 다른 5종의 바이러스 세포배양액을 이용하여 10^5PFU/ml 부터 0.1PFU/ml까지 10배씩 단계 희석한 후 추출한 RNA를 5ul 넣어 잘 섞어 주었다.

[0095] 준비가 완료된 시료를 유전자 증폭기(ABI quantstudio 3, applied Biosystems)에 넣고 역전사 반응이 일어나도록 48℃에서 15분간 정치시켰다. 이 과정에서 바이러스에서 추출한 RNA를 주형으로 cDNA가 합성되었다. 역전사 반응을 유도한 다음 95℃에서 10분간 정치하여 중합효소를 활성화시킨 다음, 95℃에서 15초, 59℃에서 1분간 정치하는 것을 40회 반복 수행하였다. 이 구간에서 유전자 증폭 여부가 형광 값으로 측정되었다. 결과는 표 6에 나타냈으며, 결과값을 바탕으로 도 3의 표준 곡선(standard curve)을 도출하였다.

표 6

Name	Viral RNA	Ct value (±STD/CV value)							
		10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0	10^{-1}	NC
발명예 1	MR766	23.5 ±0.34/1.42	25.9 ±0.30/1.16	28.7 ±0.09/0.30	32.6 ±0.28/0.86	36.5 ±0.30/0.83	-	-	-
	PRVABC59	22.8 ±0.21/0.90	24.9 ±0.07/0.29	27.6 ±0.15/0.55	31.6 ±0.20/0.62	34.8 ±0.74/2.13	-	-	-
	IBH30656	18.6 ±0.01/0.03	22.4 ±0.34/1.52	25.7 ±0.75/2.91	29.2 ±0.59/2.03	32.08 ±0.02/0.05	36.9 ±0.64/1.74	-	-
	MEX2-81	23.5 ±0.30/1.28	26.0 ±0.45/1.72	28.6 ±0.46/1.61	32.5 ±0.54/1.65	36.9 ±1.22/0.60	-	-	-
	H/PANAMA	21.1 ±0.08/0.37	24.1 ±0.50/2.07	27.1 ±0.10/0.38	30.4 ±0.07/0.22	33.5 ±0.22/0.65	-	-	-
발명예 2	MR766	23.7 ±0.55/2.31	25.8 ±0.13/0.50	29.1 ±0.03/0.09	32.3 ±0.13/0.40	36.9 ±0.53/1.43	-	-	-
	PRVABC59	22.6 ±0.48/2.12	25.6 ±0.68/2.64	28.5 ±0.31/1.09	33.0 ±0.01/0.16	37.5 ±0.01/0.03	-	-	-
	IBH30656	19.5 ±0.10/0.52	22.1 ±0.11/0.51	25.7 ±0.19/0.73	29.0 ±0.06/0.22	32.8 ±0.04/0.11	37.9 ±0.93/2.45	-	-
	MEX2-81	23.7 ±0.28/1.17	25.8 ±0.09/0.34	28.9 ±0.05/0.17	32.8 ±0.47/1.45	36.0 ±0.13/0.36	-	-	-
	H/PANAMA	21.5 ±0.04/0.19	24.2 ±0.06/0.26	27.1 ±0.09/0.32	30.3 ±0.12/0.40	33.3 ±0.16/0.47	37.5 ±0.57/1.52	-	-
비교예 2	MR766	27.2 ±0.39/1.43	28.5 ±0.27/0.94	31.2 ±0.18/0.58	37.3 ±0.81/2.19	-	-	-	-
	PRVABC59	19.7 ±0.46/2.37	21.6 ±0.21/0.95	24.7 ±0.29/1.16	27.7 ±0.27/0.99	31.4 ±0.04/0.14	35.7 ±0.64/1.79	-	-
	IBH30656	-	-	-	-	-	-	-	-
	MEX2-81	19.4 ±0.15/0.76	21.9 ±0.03/0.13	25.4 ±0.27/1.04	28.8 ±0.08/0.28	32.3 ±0.15/0.47	37.2 ±0.26/0.7	-	-
	H/PANAMA	18.7 ±0.22/1.15	21.5 ±0.15/0.68	24.6 ±0.07/0.26	28.1 ±0.11/0.39	31.6 ±0.12/0.37	35.6 ±0.43/1.20	-	-

[0096]

[0097] 상기 표 6의 결과를 살펴보면 실시간 one-step qRT-PCR을 통해 발명예 1 및 발명예 2의 프라이머 및 프로브 세트는 지카바이러스 Env 유전자 부위와 NS1 유전자 부위를 각각 10PFU/ml까지 검출할 수 있는 것으로 확인되었다. 반면, 양성대조군인 비교예 2의 경우, 서로 다른 3종의 지카바이러스 유전자는 실험예 1 및 2와 유사한 검출한계 값을 보여주었으나, 1968년 분리된 IBH30656 지카바이러스 유전자는 검출하지 못했다. 한편, 전체적인 변동계수 (coefficient of variation, CV) 값을 평가할 때 5% 미만으로 확인되어 결과는 유의미함을 확인하였다.

[0099] **실시예 7: 실시간 one-step qRT-PCR 이용 지카바이러스 검출 특이도 분석**

[0100] 다음으로, 지카바이러스 검출 특이도 분석을 위해 지카바이러스와 동일한 플라비바이러스의 뎅기바이러스 혈청형 1,2,3,4, 알파바이러스속의 치쿤구니야바이러스(S27주)로부터 RNA를 추출하고 실시예 5에 명시된 바와 같이 동일한 시험 조건으로 실시간 one-step qRT-PCR을 수행하였다. 모든 바이러스의 RNA는 10^4 PFU/ml의 역가로 희석한 뒤 추출하였다.

[0101] 그 결과, 도 4 및 표 7에 나타낸 바와 같이, 발명예 1 및 2의 프라이머 및 프로브 세트를 이용한 경우 서로 다른 지카바이러스 5 종의 유전자만이 검출되었다. 이와 달리, 비교예 2의 프라이머 및 프로브 세트는 다른 플라비바이러스에 대해 36 이상의 검출(Ct) 값이 확인되어, 발명예 1 및 2의 프라이머 및 프로브 세트에 비해 특이도가 떨어지는 것을 확인할 수 있었다.

표 7

구분	Virus (Ct Mean ± SD)									
	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	CHIKV	MR766	PRVABC59	IBH30656	MEX2-81	H/PANAMA
발명예 1	N.D. *	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	25.7 ±0.44	24.1 ±0.51	21.1 ±0.05	25.3 ±0.09	23.8 ±0.52
발명예 2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	24.8 ±0.12	25.4 ±0.09	21.4 ±0.11	24.9 ±0.92	24.3 ±0.12
비교예 2	36.4 ±0.15	37.1 ±0.86	35.8 ±0.38	37.1 ±0.85	36.8 ±0.87	28.1 ±0.05	19.8 ±0.02	-	20.8 ±0.13	19.8 ±0.28

N.D. * : Not-determined

[0102]

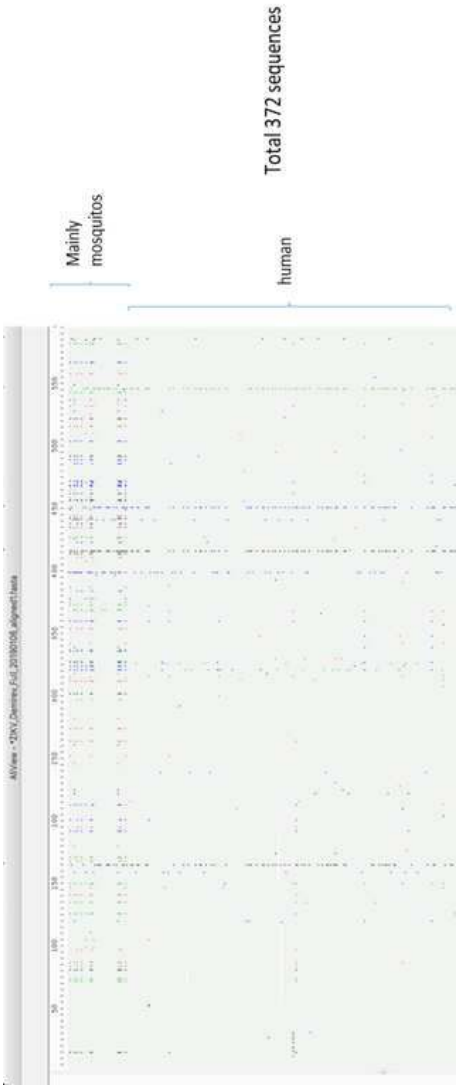
[0104] 즉, 본 발명의 프라이머 및 프로브 세트를 이용하면 현재 유행하고 있는 다양한 지카바이러스의 유전자를 실시간 one-step qRT-PCR을 통해 검출할 수 있으며, 기존에 보고된 유전자 진단기술에 비해 뛰어난 검출 민감도와 특이도를 가지므로 현재 유행하고 있는 다양한 종류의 지카바이러스를 효과적으로 진단할 수 있다.

[0106] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

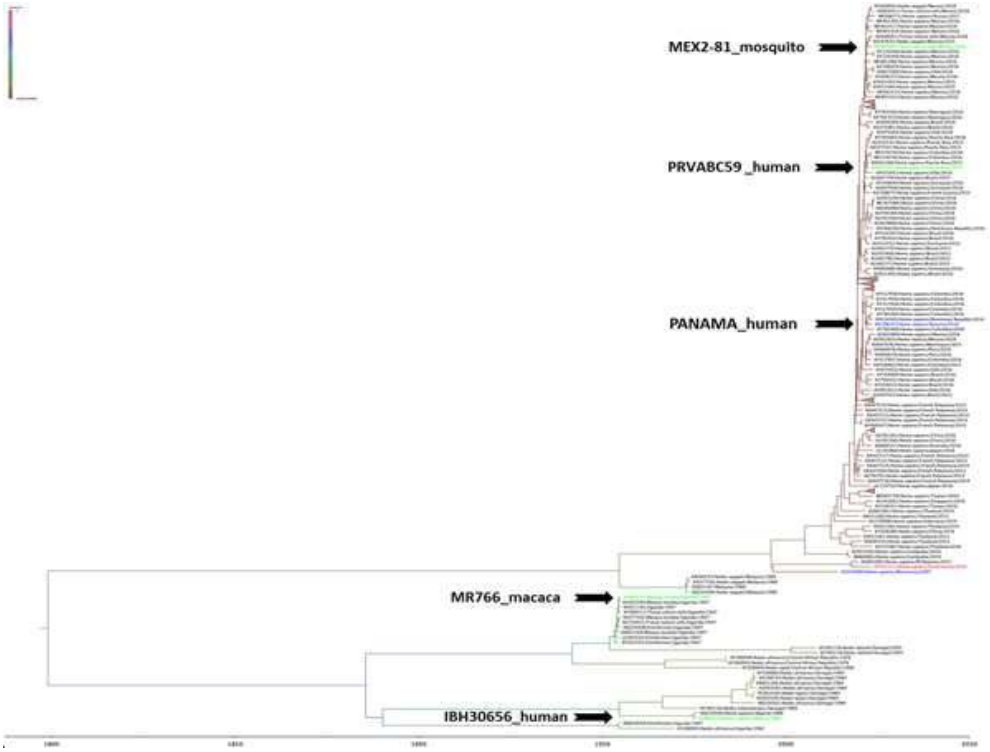
[0107] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 특허청구범위의 범위에 속한다.

도면

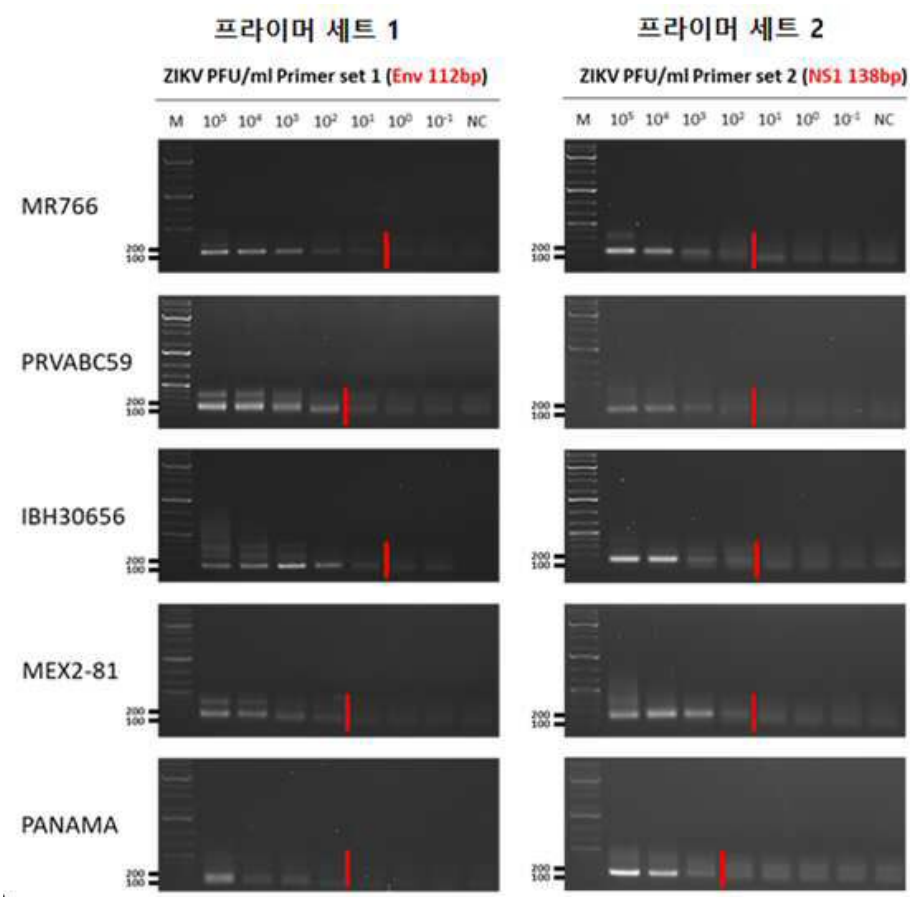
도면1a



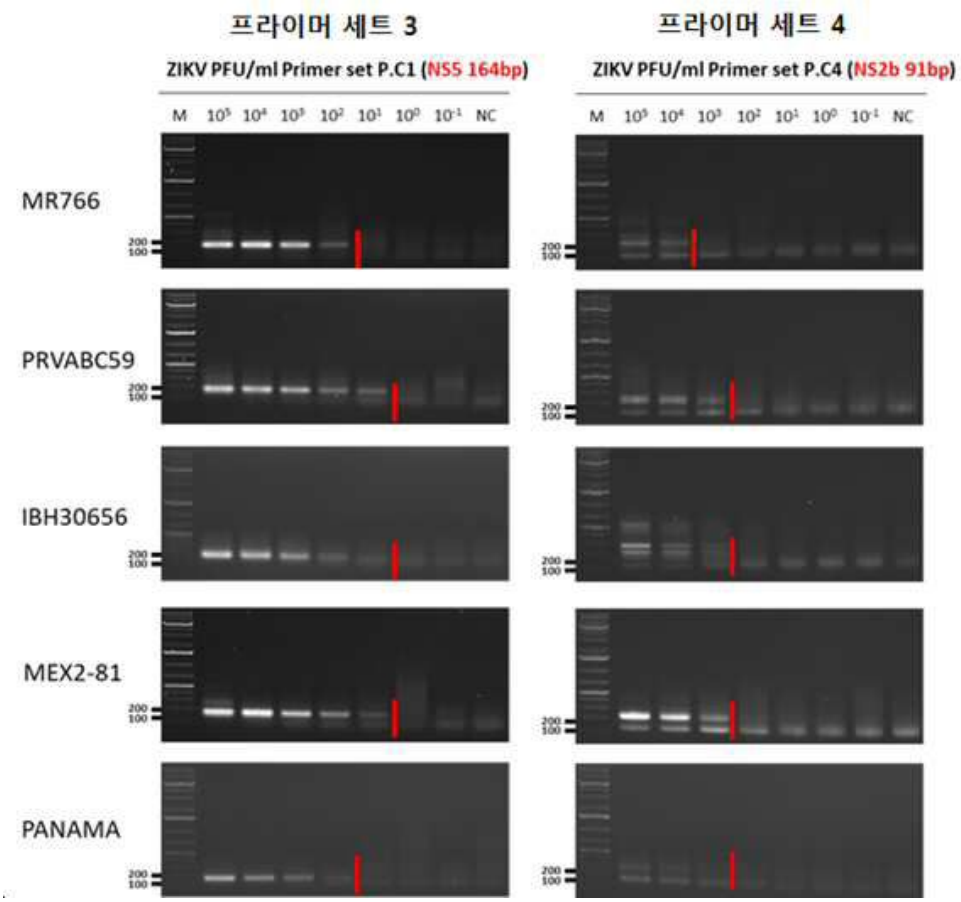
도면1b


MEX2-81_mosquito
PRVABC59_human
PANAMA_human
MR766_macaca
IBH30656_human

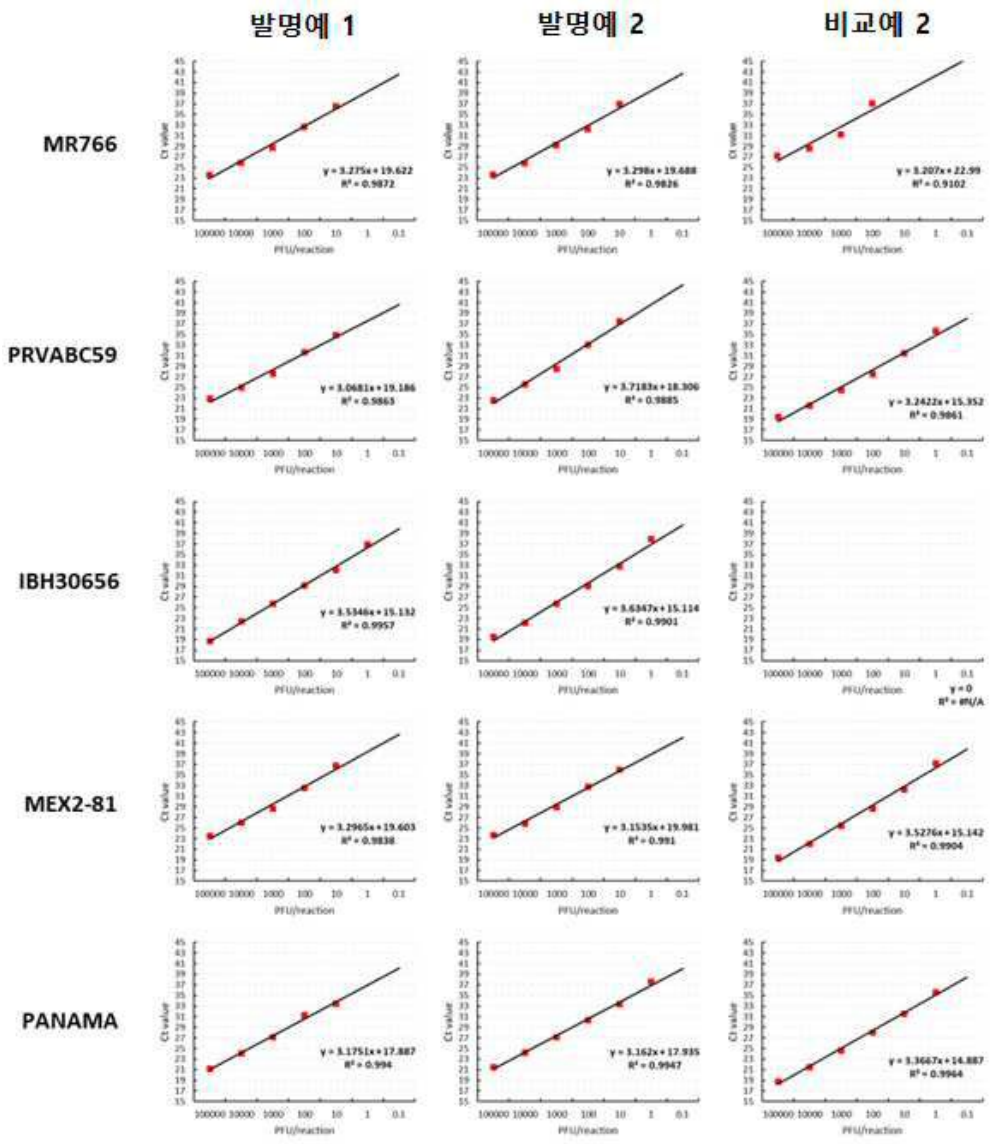
도면2a


프라이머 세트 1
ZIKV PFU/ml Primer set 1 (Env 112bp)
프라이머 세트 2
ZIKV PFU/ml Primer set 2 (NS1 138bp)
M 10⁵ 10⁴ 10³ 10² 10¹ 10⁰ 10⁻¹ NC
MR766
PRVABC59
IBH30656
MEX2-81
PANAMA
200
100

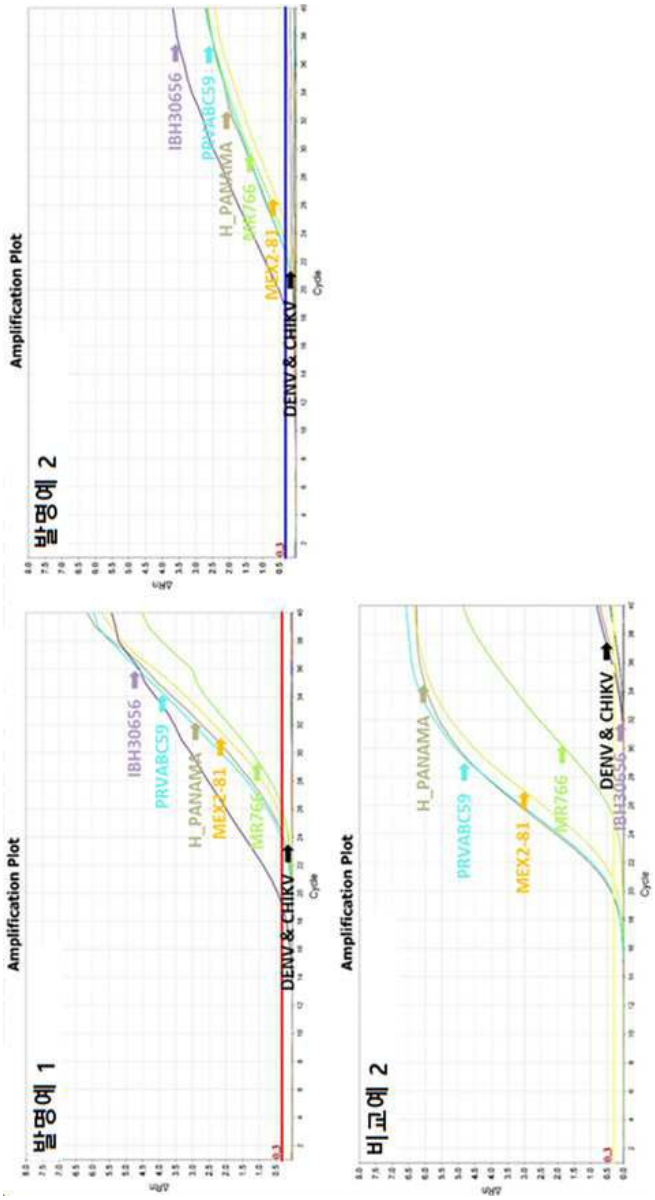
도면2b


프라이머 세트 3
ZIKV PFU/ml Primer set P.C1 (NS5 164bp)
프라이머 세트 4
ZIKV PFU/ml Primer set P.C4 (NS2b 91bp)
M 10⁵ 10⁴ 10³ 10² 10¹ 10⁰ 10⁻¹ NC
MR766
PRVABC59
IBH30656
MEX2-81
PANAMA
200
100

도면3


발명예 1
발명예 2
비교예 2
MR766
PRVABC59
IBH30656
MEX2-81
PANAMA
Ct value
PFU/reaction

도면4



서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> PRIMER SET FOR DIAGNOSING ZIKA VIRUS AND METHOD OF DIAGNOSING ZIKA VIRUS USING THE SAME

<130> APC-2019-0286

<160> 12

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZIKV-Env_2293F

<400> 1

tttggagcrg cyttcaaatc a 21

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> ZIKV-Env_2381R

<400> 2

agggaratrg atccattctt tgtgt 25

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZIKV-Env_2316 probe

<400> 3

tgtttggagg aatgtcctgg ttctcaca 28

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZIKV-NS1_2467F

<400> 4

gggtgytcrg tggacttctc 20

<210

> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZIKV-NS1_2609R

<400> 5

cargcytgct tgactgctgc tgc 23

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZIKV-NS1_2552 probe

<400> 6

ggtacaagta ccatcctgac tcccc 25

<210> 7

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZIKV-NS5_PC1_9527F

<400> 7

atggargctg aggargt 17

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZIKV-NS5_PC1_9691R

<400> 8

rgcrtgtgca aacctatca 19

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZIKV-NS5_PC1_9680 probe

<400> 9

acctatcatc aattggcttc acaacgc 27

<210> 10

<211> 20

<

212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZIKV_NS2b_PC2_4533F

<400> 10

ctgtggcatg aacccaatag 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZIKV_NS2b_PC2_4624R

<400> 11

atcccataga gcaccactcc 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZIKV_NS2b_PC2_4578 probe

<400> 12

ccacgctcca gctgcaaagg 20