



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년03월13일
 (11) 등록번호 10-0888377
 (24) 등록일자 2009년03월05일

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01) *C12Q 1/70* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2003-7017171
 (22) 출원일자 2003년12월29일
 심사청구일자 2007년04월06일
 번역문제출일자 2003년12월29일
 (65) 공개번호 10-2005-0119220
 (43) 공개일자 2005년12월21일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2002/020684
 국제출원일자 2002년06월28일
 (87) 국제공개번호 WO 2003/002753
 국제공개일자 2003년01월09일
 (30) 우선권주장
 60/302,077 2001년06월28일 미국(US)
 (뒷면에 계속)
 (56) 선행기술조사문헌
 J. Viol. Met., 44(2-3), Abstract(1993)*
 J. Virol., 58(3), 921-936(1986)*
 J. Clin., Virol., 13, 95-103(1999)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 노바티스 백신즈 앤드 다이아그노스틱스 인코포레이티드
 미합중국 캘리포니아 94608-2916 엠머리빌 호튼 스트리트 4560
 (72) 발명자
 피추안테스 서지오
 미국 캘리포니아 94530 엘 세리토 알링턴 불러바드 1505
 시야말라 벤카타리쉬나
 미국 캘리포니아 94605 오클랜드 선 밸리 드라이브 11430
 (74) 대리인
 김정욱, 박종혁, 송봉식, 정삼영

전체 청구항 수 : 총 19 항

심사관 : 허주형

(54) 파르보바이러스 B19의 진단 분석

(57) 요약

파르보바이러스 B19 게놈의 보존성 영역으로부터 유래된 사람 파르보바이러스 B19 프라이머 및 프로브가 개시된다. 또, 프라이머 및 프로브를 이용한 핵산-기초 분석이 개시된다.

(30) 우선권주장

60/365,956 2002년03월19일 미국(US)

60/369,224 2002년03월29일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

생물학적 샘플에서 사람 파르보바이러스 B19를 검출하는 방법에 있어서,

사람 파르보바이러스를 함유하는 것으로 의심되는 생물학적 샘플로부터 핵산을 분리하는 단계로서, 여기에서 (i) 표적 핵산 가닥이 생물학적 샘플에 존재하는 경우 포착 핵산과 혼성화하는 생물학적 샘플과, 고체 지지체와 결합된 포착 핵산을 포함하는 자성 비드를 포함하는 상기 고체 지지체를 접촉시키는 단계, 및 (ii) 생물학적 샘플로부터 고체 지지체를 분리하는 단계를 포함하는 방법에 의해, 생물학적 샘플로부터 핵산을 분리하는 단계, 여기에서 상기 포착 핵산은 SEQ ID NOS:49-54의 올리고뉴클레오티드 중 하나 이상과 SEQ ID NO:55의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것이다;

센스 및 안티센스 프라이머를 사용하여 분리된 핵산을 증폭하는 단계로서, (a) 상기 센스 프라이머는 SEQ ID NO:88로 구성되고, (b) 상기 안티센스 프라이머는 SEQ ID NO:89로 구성되는 단계; 및

샘플에서 사람 파르보바이러스 B19의 존재의 표시로서 증폭된 핵산의 존재를 검출하는 단계를 포함하고,

상기 증폭 단계는 상기 센스 및 안티센스 프라이머를 사용한 형광성 5' 뉴클레아제 분석을 사용하고, 상기 검출 단계는 검출가능한 표지를 포함하는 하나 이상의 프로브를 사용하여 수행하고, 상기 방법은 SEQ ID NO:92의 뉴클레오티드 서열로부터 유래한 내부 대조표준 서열을 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 포착 핵산은, 포착 핵산을 고체 지지체에 연결하기 위한 호모폴리머 사슬을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 호모폴리머 사슬은 폴리 A 사슬인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1 항에 있어서, 검출가능한 표지는 6-카복시플루오레세인(6-FAM), 테트라메틸로다민(TAMRA), 및 2',4',5',7'-테트라클로로-4-7-디클로로플루오레세인 (TET)으로 구성된 군으로부터 선택된 형광 표지인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 프로브는 5' 말단 및 3' 말단에 검출가능한 표지를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제 1 항에 있어서, 내부 대조표준 서열에 대한 검출가능하게 표지된 프로브 서열을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

제 1 항에 있어서, 포착 핵산은 SEQ ID NOS:49 및 55의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 1 항에 있어서, 포착 핵산은 SEQ ID NOS:50 및 55의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 1 항에 있어서, 포착 핵산은 SEQ ID NOS:51 및 55의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 1 항에 있어서, 포착 핵산은 SEQ ID NOS:52 및 55의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 1 항에 있어서, 포착 핵산은 SEQ ID NOS:53 및 55의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 1 항에 있어서, 포착 핵산은 SEQ ID NOS:54 및 55의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 1 항에 있어서, 포착 핵산은 SEQ ID NOS:49, 52, 53 및 55의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 1 항에 있어서, 포착 핵산은 SEQ ID NO:55의 올리고뉴클레오티드 및 SEQ ID NOS:49-54의 올리고뉴클레오티드 중 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제 19 항에 있어서, 포착 핵산은 SEQ ID NOS:49, 52, 53 및 55의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

생물학적 샘플에서 사람 파르보바이러스 B19를 검출하는 키트에 있어서,
 SEQ ID NOS:49-55로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 포착 핵산;
 프라이머 올리고뉴클레오티드 중 하나는 SEQ ID NO:88로 구성되고, 나머지 하나의 프라이머 올리고뉴클레오티드는 SEQ ID NO:89로 구성되는, 한 쌍의 프라이머 올리고뉴클레오티드;
 검출가능한 표지를 포함하는 하나 이상의 프로브 올리고뉴클레오티드; 및
 SEQ ID NO:92의 뉴클레오티드 서열로부터 유래한 내부 대조표준 서열을 포함하는 키트.

청구항 22

제 21 항에 있어서, 중합효소와 완충액을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 23

삭제

청구항 24

제 21 항에 있어서, 검출가능한 표지는 6-카르복시플루오레세인(6-FAM), 테트라메틸로다민(TAMRA), 및 2',4',5',7'-테트라클로로-4-7-디클로로플루오레세인 (TET)으로 구성된 군으로부터 선택된 형광 표지인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 25

제 24 항에 있어서, 프로브는 5' 말단 및 3' 말단에 검출가능한 표지를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 바이러스 진단에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 파르보바이러스 B19 감염을 정확히 진단하기 위한 핵산-기초 분석, 및 이 분석에서 사용하는 프라이머 및 프로브에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 사람 파르보바이러스 B19는 파르보비리데 과, 에리트로바이러스 속의 구성원이다. 약 5,600 뉴클레오티드의 선형 단일 가닥 DNA 분자를 가지고 있는 작은 22-nm 20면체의 외피 없는 바이러스이다. 바이러스 계놈은 VP1, VP2 및 NS1의 3가지 주요 단백질을 암호화한다. Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936 및 도 1 참조.
- <3> VP1(83kDa)과 VP2(58kDa)는 캡시드의 구조 단백질이다. 이 2개의 단백질은 약 뉴클레오티드 2444에서 4789까지 그리고 3125에서 4789까지의 중복 리딩 프레임에서 각각 암호화된다. VP2는 캡시드의 95%를 구성하고, 큰 VP1 단백질이 캡시드의 5%를 구성한다. VP1은 바이러스의 성숙한 형태에 필요하다. NS1(77kDa)는 비구조적 단백질이고, 감염된 세포의 핵 부분에만 존재하며, 세포질에는 없고, 혈청에는 완전한 비리온으로 있다.
- <4> 파르보바이러스 B19는 정상적 혈액 공여자의 혈청에서 처음으로 발견되었으며, 사람에서 병원성인 것으로 알려진 파르보비리데 과의 유일한 구성원이다. 이 바이러스는 넓은 범위의 질병 징후와 관련되어 있다. 통상, 사람 파르보바이러스 B19는 아이들에게 증상이 없거나 가벼운 자기-제한적 감염을 야기한다. 성인에서는 파르보바이러스 B19는 발진성, 일시적 대칭 복수관절통 및 관절염을 야기한다. 파르보바이러스 B19는 잠재적 용혈성 질병이 있는 환자에서 일시적 골수무형성 위기(TAC)와 관련되어 있다. 만성적 B19 감염과 지속적인 빈혈증이 급성 백혈병, 선천적 면역결핍증, AIDS 그리고 이후의 골수이식을 받은 면역손상된 환자에서 보고되었다. 파르보바이러스 B19는 또한 임신부에서의 태아사망과 관련된다.
- <5> 대부분의 나라에서는 일반적으로 어린 시절에 B19 바이러스 감염이 일어나는데, 약 50%의 아이들이 15세까지 항-B19 항체를 가진다. 일생 동안 B19 항체 유병율은 더욱 증가할 수 있고, 노인들에서는 90% 이상의 값에 도달한다.
- <6> 사람 파르보바이러스 B19 감염에서, 초기 바이러스 복제는 호흡기에서 발생하는 것으로 여겨진다. 그 다음에 바이러스는 골수에 있는 세포를 표적으로 한다. 이는 대규모 바이러스 복제를 가져오는데, $10^2 \sim 10^{14}$ 입자/ml의 바이러스혈증이 보고되었으며, 감염된 후 증상이 개시되기 전까지는 7-10일이 걸린다. 바이러스혈증의 정지는 2-3개월 동안 상승된 채로 있는 특이적 IgM 항체의 검출과 일치한다. IgM 항체가 나타난 후 수일 내에 항-B19 항체가 검출되고 일생 동안 지속된다.
- <7> 지질 외피의 부재와 제한된 DNA 내용이 파르보바이러스 B19를 물리화학적 비활성화에 내성으로 만든다. 특히, 고 농도에서 파르보바이러스 B19는 혈액 산물에 대한 종래의 열처리를 견딜 수 있으며, 용매-세제 처리된 인자 VIII 및 증기 또는 건조-가열된 인자 VIII와 IV 제제의 투여를 통한 전달이 보고되었다.
- <8> 사람 파르보바이러스 B19는 보편적인 세포 배양으로 기를 수 없기 때문에 실험실에서 바이러스를 검출하고 분리하는 것이 매우 어렵다. 따라서, 오랫동안 항원의 유일한 출처는 바이러스혈증 환자로부터의 혈청으로 구성되었다. 이들 문제를 회피하고자 하는 시도로 혈청학적 분석에서 사용하기 위한 재조합 항원이 생산되었다. Sisk and Berman, *Biotechnology* (1987) 5:1077-1080; U.S. Patent No. 6,204,044 참조.
- <9> 최근의 B19 감염을 진단할 뿐만 아니라 항-B19 IgM를 검출하기 위해서 면역효소적 IgM 포착 분석이 사용되었다. 그러나, 많은 상업적으로 입수가능한 시험의 진단적 성능은 동질적이지 않다. 추가로, IgM에 기초한 진단 시험은 감염의 바이러스혈증 단계 동안에는 바이러스를 검출할 수 없으며, 일단 IgM 항체가 합성되면, 이들은 바이러스혈증 단계가 끝난 후에 수 개월 동안 순환계 중에 남아 있을 수 있다.
- <10> 높은 바이러스혈증은 통상 일주일 동안만 지속된다는 사실과 함께 정상 모집단에서 B19 항체의 높은 유병율로 인하여 혈청학적 시험을 이용하는 것은 비실용적이다. 추가로, 면역손상된 환자에서의 혈청학적 진단은 신뢰할 수 없다.
- <11> 닷 블랏과 *in situ* 혼성화와 같은 핵산에 기초한 혼성화 분석이 B19 검출을 위해 사용되었다. 이러한 분석의 검출한계는 일반적으로 1~0.1pg 바이러스 DNA(약 $10^4 \sim 10^5$ 바이러스 입자)이다. PCR은 감수성이 더 높다(약 100 계놈 카피). 그러나, DNA 혼성화 기술은 시간-소모적이며 사용하는데 한계가 있고, PCR은 많은 수의 샘플을 스크린하는데 비실용적이다.
- <12> 따라서, 혈액 및 혈장 유도체를 통한 또는 개인사의 밀접한 접촉에 의한 바이러스 전달을 막기 위해서, 바이러스혈증 샘플에서 파르보바이러스 B19를 검출하기 위한 신뢰할 만한 진단 시험을 개발할 필요성이 남아 있다.
- <13> 발명의 개요

- <14> 본 발명은 핵산-기초 분석에서 사용하기 위한 독특한 프라이머 및 프로브의 발견과, 감염의 가능성이 있는 개체의 생물학적 샘플에서 파르보바이러스 B19 DNA를 검출하기 위한 민감하고 신뢰할 만한 핵산-기초 진단 시험의 개발에 기초한다. 여기에 설명된 기술은, 전사-매개 증폭(TMP)을 사용하고, 뿐만 아니라 TaqMan™ 기술과 같은 5' 뉴클레아제 분석에서, B19 서열의 보존된 게놈 영역을 증폭하기 위한 주형으로서 추출된 샘플 DNA를 이용한다. 이 방법으로 10³ 바이러스 입자/ml 정도의 낮은 바이러스 역가를 갖는 바이러스혈증 샘플에서 B19 DNA를 검출할 수 있다. 따라서, 감염된 샘플이 확인될 수 있고, 이들이 수혈뿐만 아니라 혈액 유도체의 제제로부터 제외될 수 있다. 여기에 설명된 프로브 및 프라이머는, 예를 들어 표준 혼성화 방법에서뿐만 아니라, PCR-기초 기술, 핵산 서열-기초 증폭(NASBA), 분기된 DNA 분자를 이용한 분석에서 유용하다.
- <15> 삭제
- <16> 따라서, 한 구체예에서, 본 발명은 생물학적 샘플에서 사람 파르보바이러스 B19 감염을 검출하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 다음 단계들을 포함한다:
- <17> (a) 사람 파르보바이러스 B19 DNA를 함유하는 것으로 의심되는 생물학적 샘플로부터, RNA 표적 서열을 포함하는 핵산을 분리하는 단계;
- <18> (b) 분리된 파르보바이러스 B19 핵산과, 복합체를 이를 만큼 RNA 표적 서열의 3'-말단 부분에 충분히 상보적인 복합 서열을 포함하는 제 1 프라이머를 포함하는 제 1 올리고뉴클레오티드를 반응시키는 단계, 여기서 제 1 프라이머는 DNA-의존성 RNA 중합효소 5'에 대한 프로모터를 더 포함하고, 복합 서열에 작동가능하게 연결되어 있으며, 반응은 올리고뉴클레오티드/표적 서열 복합체의 형성 및 DNA 합성의 개시를 제공하는 조건 하에서 행하고;
- <19> (c) 주형으로서 RNA 표적 서열을 사용한 확장 반응으로 제 1 프라이머를 확장시켜, RNA 표적 서열에 상보적인 제 1 DNA 프라이머 확장 산물을 제공하는 단계;
- <20> (d) RNA 표적 서열을 선택적으로 분해하는 효소를 사용하여 RNA 표적 서열로부터 제 1 DNA 프라이머 확장 산물을 분리하는 단계;
- <21> (e) 올리고뉴클레오티드/표적 서열 복합체의 형성 및 DNA 합성의 개시를 제공하는 조건 하에서, 복합체를 이를 만큼 DNA 프라이머 확장 산물의 3'-말단 부분에 충분히 상보적인 복합 서열을 포함하는 제 2 프라이머를 포함하는 제 2 올리고뉴클레오티드로 DNA 프라이머 확장 산물을 처리하는 단계;
- <22> (f) DNA 확장 반응으로 제 2 프라이머의 3'-말단을 확장시켜 제 2 DNA 프라이머 확장 산물을 제공함으로써, DNA-의존성 RNA 중합효소에 대한 주형을 생산하는 단계;
- <23> (g) 주형을 사용하여, 프로모터 서열을 인식하는 DNA-의존성 RNA 중합효소를 사용하여 표적 서열의 다수 RNA 카피를 생산하는 단계; 및
- <24> (h) (g) 단계의 RNA 카피를 사용하여 (b) 단계부터 (g) 단계까지 자가촉매적으로 반복하여 표적 서열을 증폭하는 단계
- <25> 어떤 구체예에서, 방법은 다음 단계들을 더 포함한다:
- <26> (i) 프로브와 표적 서열의 혼성화를 제공하는 조건 하에서 표적 서열의 일부에 상보적인 표지된 올리고뉴클레오티드 프로브를 (h) 단계의 산물에 첨가하여 프로브:표적 복합체를 형성하는 단계; 및
- <27> (j) 표적 서열의 존재 또는 부재를 표시하는 것인 표지의 존재 또는 부재를 검출하는 단계
- <28> 삭제
- <29> 추가의 구체예에서, 표지는 아크리디늄 에스테르이다.
- <30> 추가의 구체예에서, 상기 방법에서 사용된 제 1 및 제 2 프라이머, 및 프로브는 사람 파르보바이러스 B19 게놈의 VP1 영역으로부터, 예를 들어 도 2A-2U 또는 11A-11Z의 어느 하나에 나타낸 폴리뉴클레오티드 서열로부터 유래된다.

- <31> 또 다른 구체예에서, 본 발명은 생물학적 샘플에서 사람 파르보바이러스 B19 감염을 검출하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 다음 단계들을 포함한다:
- <32> (a) 사람 파르보바이러스 B19 DNA를 함유하는 것으로 의심되는 생물학적 샘플로부터, RNA 표적 서열을 포함하는 핵산을 분리하는 단계;
- <33> (b) 분리된 파르보바이러스 B19 핵산과, 복합체를 이를 만큼 RNA 표적 서열의 3'-말단 부분에 충분히 상보적인 복합 서열을 포함하는 제 1 프라이머를 포함하는 제 1 올리고뉴클레오티드를 반응시키는 단계, 여기서 제 1 프라이머는 DNA-의존성 RNA 중합효소 5'에 대한 프로모터를 더 포함하고, 복합 서열에 작동가능하게 연결되어 있으며, 제 1 프라이머는 도 2A-2U 또는 11A-11Z의 어느 하나에 나타낸 폴리뉴클레오티드 서열로부터 유래된 서열을 포함하고, 반응은 올리고뉴클레오티드/표적 서열 복합체의 형성 및 DNA 합성의 개시를 제공하는 조건 하에서 행하고;
- <34> (c) 주형으로서 RNA 표적 서열을 사용한 확장 반응으로 제 1 프라이머를 확장하여, RNA 표적 서열에 상보적인 제 1 DNA 프라이머 확장 산물을 제공하는 단계;
- <35> (d) RNA 표적 서열을 선택적으로 분해하는 효소를 사용하여 RNA 표적 서열로부터 제 1 DNA 프라이머 확장 산물을 분리하는 단계;
- <36> (e) 올리고뉴클레오티드/표적 서열 복합체의 형성 및 DNA 합성의 개시를 제공하는 조건 하에서, 복합체를 이를 만큼 DNA 프라이머 확장 산물의 3'-말단 부분에 충분히 상보적인 복합 서열을 포함하는 제 2 프라이머를 포함하는 제 2 올리고뉴클레오티드로 DNA 프라이머 확장 산물을 처리하는 단계, 여기서 제 2 프라이머는 도 2A-2U 또는 11A-11Z의 어느 하나에 나타낸 폴리뉴클레오티드 서열로부터 유래되고;
- <37> (f) DNA 확장 반응에서 제 2 프라이머의 3'-말단을 확장하여 제 2 DNA 프라이머 확장 산물을 제공함으로써, DNA-의존성 RNA 중합효소에 대한 주형을 생산하는 단계;
- <38> (g) 주형을 사용하여, 프로모터 서열을 인식하는 DNA-의존성 RNA 중합효소를 사용하여 표적 서열의 다수 RNA 카피를 생산하는 단계;
- <39> (h) (g) 단계의 RNA 카피를 사용하여 (b) 단계부터 (g) 단계까지 자가촉매적으로 반복하여 표적 서열을 증폭하는 단계;
- <40> (i) (h) 단계의 산물에 아크리디늄 에스테르-표지된 올리고뉴클레오티드 프로브를 첨가하는 단계, 여기서 올리고뉴클레오티드 프로브는 상기 표적 서열의 일부에 상보적이고, 프로브는 도 2A-2U의 어느 하나에 나타낸 폴리뉴클레오티드 서열로부터 유래되고, 프로브는 프로브와 표적 서열의 혼성화를 제공함으로써 프로브:표적 복합체를 형성하는 조건 하에서 첨가되고; 및
- <41> (j) 표적 서열의 존재 또는 부재를 표시하는 것인 표지의 존재 또는 부재를 검출하는 단계
- <42> 또 다른 구체예에서, 발명은 표적 파르보바이러스 B19 뉴클레오티드 서열을 증폭하기 위한 방법에 관한 것이다. 이 방법은 다음 단계들을 포함한다:
- <43> (a) 사람 파르보바이러스 B19 DNA를 함유하는 것으로 의심되는 생물학적 샘플로부터 RNA 표적 서열을 포함하는 핵산을 분리하는 단계;
- <44> (b) RNA 표적 서열에 혼성화할 수 있는 도 2A-2U 및 도 11A-11Z에 나타낸 폴리뉴클레오티드 서열로부터 유래된 하나 이상의 프라이머를 첨가하는 단계;
- <45> (c) 하나 이상의 프라이머와 관련하여 RNA 표적 서열 3'에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 첨가하는 단계; 및
- <46> (d) 중합효소를 사용하여 하나 이상의 프라이머를 확장하는 단계
- <47> 어떤 구체예에서, (a) 단계의 RNA 표적 서열은 역전사되어 cDNA를 제공하며, 방법은 중합효소 연쇄반응(RT-PCR) 또는 비대칭적 갭 리가아제 연쇄반응(RT-PCR)을 사용하여 cDNA를 증폭하는 단계를 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 중합효소는 Taq 중합효소 혹은 Vent 중합효소와 같은 열안정성 중합효소이지만, 이들에 한정되지는 않는다. 추가의 구체예에서, 중합효소는 *E.coli* DNA 중합효소 I, *E.coli* DNA 중합효소 I의 Klenow 단편, 또는 T4 DNA 중합효소이다.

- <48> 상기 설명된 다양한 방법의 어떤 구체예에서 내부 대조표준이 제공된다. 내부 대조표준은 도 12(SEQ ID NO:92)의 서열로부터 유래될 수 있다. 추가의 구체예에서, 내부 대조표준은 SEQ ID NO:90을 포함한다.
- <49> 추가의 구체예에서, 본 발명은 생물학적 샘플에서 사람 파르보바이러스 B19 감염을 검출하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 다음 단계들을 포함한다:
- <50> (a) 사람 파르보바이러스 B19 DNA를 함유하는 것으로 의심되는 생물학적 샘플로부터 표적 서열을 포함하는 핵산을 분리하는 단계;
- <51> (b) 프로브/표적 서열 복합체의 형성을 제공하는 조건 하에서, 분리된 파르보바이러스 B19 핵산과, 표적 서열에 충분히 상보적이며 그와 혼성화할 수 있는 검출가능하게 표지된 프로브를 반응시키는 단계, 여기서 프로브는 도 2A-2U 및 도 11 A-11Z의 어느 하나에 나타낸 폴리뉴클레오티드 서열로부터 유래되고; 및
- <52> (c) 표적 서열의 존재 또는 부재를 표시하는 것인 표지의 존재 또는 부재를 검출하는 단계
- <53> 추가의 구체예에서, 본 발명은 도 2A-2U 또는 도 11A-11Z에 나타낸 뉴클레오티드 서열 중 어느 하나를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.
- <54> 추가의 구체예에서, 본 발명은 상기와 같은, 폴리뉴클레오티드에 관한 것으로서, 여기서 뉴클레오티드 서열은 도 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G, 2H, 2I, 2J, 2K, 2L, 2M, 2N, 2O, 2P, 2Q, 2R, 2S, 2T, 2U, 11A, 11B, 11C, 11D, 11E, 11F, 11G, 11H, 11I, 11J, 11K, 11L, 11M, 11N, 11O, 11P, 11Q, 11R, 11S, 11T, 11U, 11V, 11W, 11X, 11Y, 또는 11Z에 나타낸 뉴클레오티드 서열로 구성된다.
- <55> 삭제
- <56> 삭제
- <57> 추가의 구체예에서, 본 발명은 도 3A-3C 또는 도 4A-4C에 나타낸 뉴클레오티드 서열 중 어느 하나를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.
 추가의 구체예에서, 본 발명은 상기와 같은 폴리뉴클레오티드에 관한 것으로서, 여기서 뉴클레오티드 서열은 도 3A-3C 또는 도 4A-4C에 나타낸 뉴클레오티드 서열로 구성된다.
- <58> 또 다른 구체예에서, 본 발명은 약 10 내지 약 75 뉴클레오티드의 사람 파르보바이러스 B19-특이적 복합 서열에 작동가능하게 연결된 DNA-의존성 RNA 중합효소에 의해 인식되는 프로모터 영역으로 구성된 올리고뉴클레오티드 프라이머에 관한 것이다. 어떤 구체예에서, 프로모터 영역은 T7 프로모터이고, 상기 중합효소는 T7 RNA 중합효소이다. 추가적으로, 사람 파르보바이러스 B19-특이적 서열은 사람 파르보바이러스 B19 게놈의 VP1 영역으로부터, 예를 들어 도 2A-2U 또는 도 11A-11Z의 어느 하나에 나타낸 폴리뉴클레오티드 서열로부터 유래할 수 있다.
- <59> 또 다른 구체예에서, 본 발명은 약 10 내지 약 75 뉴클레오티드의 사람 파르보바이러스 B19-특이적 복합 서열에 작동가능하게 연결된 T7 프로모터로 구성된 올리고뉴클레오티드 프라이머에 관한 것으로서, 여기서 사람 파르보바이러스 B19-특이적 복합 서열은 도 2A-2U 또는 도 11A-11Z의 어느 하나에 나타낸 폴리뉴클레오티드 서열로부터 유래된다.
- <60> 또 다른 구체예에서, 본 발명은 아크리디늄 에스테르 표지에 연결된 약 10 내지 약 50 뉴클레오티드의 파르보바이러스 B19-특이적 혼성화 서열을 함유하는 올리고뉴클레오티드 프로브에 관한 것이다. 어떤 구체예에서, 사람 파르보바이러스 B19-특이적 혼성화 서열은 사람 파르보바이러스 B19 게놈의 VP1 영역으로부터, 예를 들어 도 2A-2U 또는 도 11A-11Z의 어느 하나에 나타낸 폴리뉴클레오티드 서열로부터 유래된다.
- <61> 또 다른 구체예에서, 본 발명은 본원에 설명된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프라이머, 및 진단 시험을 수행하기 위한 설명서를 포함하는 진단 시험 키트에 관한 것이다. 어떤 구체예에서, 시험 키트는 아크리디늄 에스테르 표지에 연결된 약 10 내지 약 50 뉴클레오티드의 파르보바이러스 B19-특이적 혼성화 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브를 더 포함한다.
- <62> 삭제

- <63> 본 발명의 이러한 그리고 다른 양태는 다음 상세한 설명과 첨부된 도면을 참고하면 명백하다.
- <64> 도면의 간단한 설명
- <65> 도 1은 사람 파르보바이러스 B19 게놈을 간략하게 나타낸 것으로, 바이러스의 다양한 암호 영역을 묘사한다. 3개의 PCR 단편이 묘사되었는데, 하나는 Shade et al., J. Virol.(1986) 58:921-936에 기술된 파르보바이러스 B19 게놈의 뉴클레오티드 위치 2936-3635에 해당하는 약 700bp를 갖는 것이고, 하나는 Shade et al., J. Virol.(1986) 58:921-936에 기술된 파르보바이러스 B19 게놈의 뉴클레오티드 위치 3073-3442에 해당하는 약 370bp에서 약 700bp 이내의 단편을 갖는 것이고, 그리고 하나는 Shade et al., J. Virol. (1986) 58:921-936에 기술된 파르보바이러스 B19 게놈의 뉴클레오티드 위치 4728-4941에 해당하는 약 214bp를 갖는 것이다.
- <66> 도 2A 내지 2U(SEQ ID NOS:1-21)는, Shade et al., J. Virol.(1986) 58:921-936에 기술된 파르보바이러스 B19 게놈의 뉴클레오티드 위치 2936-3635에 해당하는 서열을 포함하는 다양한 파르보바이러스 B19 분리주로부터의 DNA 서열을 묘사한다(도 1로부터 700bp 단편). 도 2A(SEQ ID NO:1)는 분리주 CH47-26로부터 상응하는 서열; 도 2B(SEQ ID NO:2)는 CH48-29로부터 상응하는 서열; 도 2C(SEQ ID NO:3)는 분리주 CH33-2로부터 상응하는 서열; 도 2D(SEQ ID NO:4)는 분리주 CH33-3으로부터 상응하는 서열; 도 2E(SEQ ID NO:5)는 분리주 CH33-4로부터 상응하는 서열; 도 2F (SEQ ID NO:6)는 분리주 CH42-7로부터 상응하는 서열; 도 2G(SEQ ID NO:7)는 분리주 CH42-18로부터 상응하는 서열; 도 2H(SEQ ID NO:8)는 분리주 CH42-19로부터 상응하는 서열; 도 2I(SEQ ID NO:9)는 분리주 CH46-23으로부터 상응하는 서열; 도 2J (SEQ ID NO:10)는 분리주 CH1-1로부터 상응하는 서열; 도 2K(SEQ ID NO:11)는 분리주 CH1-6으로부터 상응하는 서열; 도 2L(SEQ ID NO:12)는 분리주 CH2-8로부터 상응하는 서열; 도 2M(SEQ ID NO:13)는 분리주 CH2-10로부터 상응하는 서열; 도 2N(SEQ ID NO:14)는 분리주 CH2-11C로부터 상응하는 서열; 도 2O(SEQ ID NO:15)는 분리주 CH5-13로부터 상응하는 서열; 도 2P(SEQ ID NO:16)는 분리주 CH7-22로부터 상응하는 서열; 도 2Q(SEQ ID NO:17)는 분리주 CH13-27로부터 상응하는 서열; 도 2R(SEQ ID NO:18)는 분리주 CH14-33로부터 상응하는 서열; 도 2S(SEQ ID NO:19)는 분리주 CH62-2로부터 상응하는 서열; 도 2T(SEQ ID NO:20)는 분리주 CH64-2로부터 상응하는 서열; 및 도 2U(SEQ ID NO:21)는 분리주 CH67-2로부터 상응하는 서열이다.
- <67> 도 3A-3C(SEQ ID NO:22)는 파르보바이러스 B19 클론 2-B1으로부터의 도 1에 나타낸 약 4.7 kbp PCR 단편의 서열을 나타낸다. 이 서열은 Shade et al., J. Virol.(1986) 58:921-936의 뉴클레오티드 위치 217-4893에 해당하는 4677 뉴클레오티드 단편이다. 묘사된 서열은 NS1,VP1, 및 VP2를 암호화하는 파르보바이러스 B19 전장 오픈 리딩 프레임과 추가로 5' 및 3' 미번역 서열을 함유한다.
- <68> 삭제
- <69> 도 4A-4C(SEQ ID NO:23)는 파르보바이러스 B19 클론 2-B6으로부터의 도 1에 나타낸 약 4.7 kbp PCR 단편의 서열을 나타낸다. 서열은 Shade et al., J. Virol. (1986)58:921-936의 뉴클레오티드 위치 217-4893에 해당하는 4677 뉴클레오티드 단편이다. 묘사된 서열은 NS1, VP1, 및 VP2를 암호화하는 파르보바이러스 B19 전장 오픈 리딩 프레임과 추가로 5' 및 3' 미번역 서열을 함유한다.
- <70> 삭제
- <71> 도 5A(SEQ ID NO:24) 및 도 5B(SEQ ID NO:25)는 파르보바이러스 B19 클론 2-B1로부터의 NS1 뉴클레오티드 및 단백질 서열을 각각 나타낸다.
- <72> 도 6A(SEQ ID NO:26) 및 도 6B(SEQ ID NO:27)는 파르보바이러스 B19 클론 2-B1로부터 VP1 뉴클레오티드 및 단백질 서열을 각각 나타낸다.
- <73> 도 7A(SEQ ID NO:28) 및 도 7B(SEQ ID NO:29)는 파르보바이러스 B19 클론 2-B1로부터의 VP2 뉴클레오티드 및 단백질 서열을 각각 나타낸다.
- <74> 도 8A(SEQ ID NO:30) 및 도 8B(SEQ ID NO:31)는 파르보바이러스 B19 클론 2-B6로부터의 NS1 뉴클레오티드 및 단백질 서열을 각각 나타낸다.
- <75> 도 9A(SEQ ID NO:32) 및 도 9B(SEQ ID NO:33)는 파르보바이러스 B19 클론 2-B6로부터의 VP1 뉴클레오티드 및

단백질 서열을 각각 나타낸다.

<76> 도 10A(SEQ ID NO:34) 및 도 10B(SEQ ID NO:35)는 파르보바이러스 B19 클론 2-B6로부터의 VP2 뉴클레오티드 및 단백질 서열을 각각 나타낸다.

<77> 도 11A 내지 11Z(SEQ ID NO:62-87)는 Shade et al., J. Virol.(1986) 58:921 -936에 기술된 파르보바이러스 B19 계통의 뉴클레오티드 위치 2936-3635에 해당하는 서열을 포함하는 다양한 파르보바이러스 B19 분리주로부터의 DNA 서열을 나타낸다. 도 11A(SEQ ID NO:62)는 분리주 CH80-1로부터의 상응하는 서열; 도 11B(SEQ ID NO:63)는 분리주 CH81-3로부터의 상응하는 서열; 도 11C(SEQ ID NO:64)는 분리주 B19SCL1-4로부터의 상응하는 서열; 도 11D(SEQ ID NO:65)는 분리주 B19SCL2-1로부터의 상응하는 서열; 도 11E(SEQ ID NO:66)는 분리주 B19SCL3-1로부터의 상응하는 서열; 도 11F(SEQ ID NO:67)는 분리주 B19SCL4-3로부터의 상응하는 서열; 도 11G(SEQ ID NO:68)는 분리주 B19SCL5-2로부터 상응하는 서열; 도 11H(SEQ ID NO:69)는 분리주 B19SCL6-2로부터의 상응하는 서열; 도 11I(SEQ ID NO:70)는 분리주 B19 SCL7-3로부터의 상응하는 서열; 도 11J(SEQ ID NO:71)는 분리주 B19SCL8-2로부터의 상응하는 서열; 도 11K(SEQ ID NO:72)는 분리주 B19SCL9-1로부터의 상응하는 서열; 도 11L(SEQ ID NO:73)는 분리주 B19SCL9-9로부터의 상응하는 서열; 도 11M(SEQ ID NO:74)는 분리주 B19SCL10-2로부터의 상응하는 서열; 도 11N(SEQ ID NO:75)는 분리주 B19SCL11-1로부터의 상응하는 서열; 도 11O(SEQ ID NO:76)는 분리주 B19SCL12-1로부터의 상응하는 서열; 도 11P(SEQ ID NO:77)는 분리주 B19SCL13-3로부터의 상응하는 서열; 도 11Q(SEQ ID NO:78)는 분리주 B19SCL14-1로부터의 상응하는 서열; 도 11R(SEQ ID NO:79)는 분리주 B19SCL15-3로부터의 상응하는 서열; 도 11S(SEQ ID NO:80)는 분리주 B19SCL16-2로부터의 상응하는 서열; 도 11T(SEQ ID NO:81)는 분리주 B19SCL17-1로부터의 상응하는 서열; 도 11U(SEQ ID NO:82)는 분리주 B19SCL18-1로부터의 상응하는 서열; 도 11V(SEQ ID NO:83)는 분리주 B19SCL19-1로부터의 상응하는 서열; 도 11W(SEQ ID NO:84)는 분리주 B19SCL20-3로부터의 상응하는 서열; 도 11X(SEQ ID NO:85)는 분리주 B19SCL21-3로부터의 상응하는 서열; 도 11Y(SEQ ID NO:86)는 분리주 B19SCL22-11로부터의 상응하는 서열; 도 11Z(SEQ ID NO:87)는 분리주 B19SCL2-14로부터의 상응하는 서열이다.

도 12(SEQ ID NO:92)는 표적 포착 및 증폭을 위한 내부 대조표준(IC)이 유래될 수 있는 전형적인 서열을 나타낸다.

<78> 삭제

<79> 삭제

<80> 삭제

<81> 삭제

<82> 발명의 상세한 설명

<83> 다르게 기재되지 않으면 본 발명의 수행은 당업계내의 화학, 생화학, 재조합 DNA 기술 그리고 바이러스학의 통상적인 방법을 사용한다. 그러한 기술은 본문에 상세하게 기술되어 있다. Fundamental Virology, 2nd Edition, vol. I & II(B.N. Fields and D.M. Knipe, eds); A. L. Lehninger, Biochemistry(Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., Molecular cloning: A laboratory Manual(2nd Edition,1989); Methods In Enzymology(S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Oligonucleotide Synthesis(N. Gait, ed., 1984); A Practical Guide to Molecular Cloning(1984) 참조.

<84> 삭제

<85> 본 명세서와 첨부된 청구항에서 사용되듯이 본문에서 다르게 명시되지 않으면, 단수 형태 "한", "하나", "그"는 복수 형태를 함유한다는 것이 주지되어야 한다. 따라서, 예를 들어, "항원"을 언급하는 것은 두 개 혹은 그 이상의 항원의 혼합물을 포함한다.

다음의 아미노산 약어가 본문에서 사용된다:

- <86> 알라닌: Ala (A) 아르기닌: Arg (R)
- <87> 아스파라긴: Asn (N) 아스파르트산: Asp (D)
- <88> 시스테인: Cys(C) 글루타민: Gln (Q)
- <89> 글루탐산: Glu(E) 글리신: Gly(G)
- <90> 히스티딘: His(H) 이소류신: Ile(I)
- <91> 류신: Leu (L) 리신: Lys(K)
- <92> 메티오닌: Met(M) 페닐알라닌: Phe(F)
- <93> 프롤린: Pro(P) 세린: Ser(S)
- <94> 트레오닌: Thr(T) 트립토판: Trp(W)
- <95> 티로신: Tyr(Y) 발린: Val(V)

<96> I. 정의

<97> 본 발명을 기술하는데 있어서, 다음 용어를 사용하고 하기 지시된 대로 정의하는 것으로 의도한다.

<98> "폴리펩티드"와 "단백질"은 아미노산 잔기의 폴리머를 말하며, 산물의 최소 길이에 제한되지 않는다. 따라서, 펩티드, 올리고펩티드, 다이머, 멀티머, 그리고 유사물은 정의 내부에 포함된다. 전장 단백질과 단편은 정의 내에 포함된다. 이 용어는 폴리펩티드의 발현 후 변경, 예를 들어, 당화, 아세틸화, 인산화 등등을 함유한다. 그리고, 단백질이 바람직한 활성을 유지하는 한, 본 발명의 목적상 "폴리펩티드"는 원 서열에 결실, 첨가, 치환(일반적으로 자연상태에서 보존적인)과 같은 변형을 포함하는 단백질을 말한다. 이러한 변형은 부위 특이적 돌연변이 유발을 통해 고의적으로, 또는 PCR 증폭 때문에 발생하는 단백질이나, 오차를 생성하는 숙주의 돌연변이 때문에 우연히 발생한다.

<99> 상기 정의된 대로 파르보바이러스 B19는 바이러스 캡시드, VP1(약 781 아미노산 길이)또는 VP2(약 554 아미노산 길이)를 형성하는 단백질, 그리고 비구조 단백질, NS1 및 NS2과 같은, B19 게놈에 의해 암호화된 단백질로부터 유래된 상기 정의된 바의 폴리펩티드이다. 대표적인 NS1, VP1, 및 VP2 서열이 도 5-10에 묘사되어 있다. 폴리펩티드는 실제로 파르보바이러스 B19로부터 유래될 필요는 없고, 합성적으로 또는 재조합적으로 생산될 수도 있다. 게다가, 폴리펩티드는 다양한 파르보바이러스 B19 균주 및 분리주 중 어느 것으로부터 유래될 수 있다. 많은 보존된 그리고 가변 영역이 이러한 균주와 분리주 사이에서 알려져 있으며, 일반적으로 이들 영역으로부터 유래된, 예를 들어 에피토프의 아미노산 서열은, 두 서열이 정렬되었을 때 높은 정도의 서열 상동성, 예를 들어 30% 이상, 바람직하게 40% 이상의 아미노산 서열 상동성을 가질 것이다. 따라서, 예를 들어, "VP1" 폴리펩티드는 다양한 파르보바이러스 B19 균주와 분리주 중 어느 것으로부터의 자생 VP1을 말한다. 많은 파르보바이러스 B19 균주 및 분리주 중 상기 단백질의 완전한 유전자형 및 서열이 알려져 있다. Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936; Gallinella et al., *J. Virol. Methods* (1993) 41:203-211 참조. 게다가, 이 영역으로부터 유래된 파르보바이러스 B19의 에피토프가 또 알려져 있다. 미국특허 No. 5,436,127 및 국제출원 No. W091/12269 참조.

<100> "유사체"와 "뮤테인"은 진단 분석에서 면역활성과 같은 바람직한 활성을 보유하고 있는 기준 분자의 생물학적 활성 유도체 또는 그러한 유도체의 단편을 말한다. 일반적으로, "유사체"는 변형이 면역원성 활성을 파괴하지 않는 한, 원 분자와 관련하여 하나 이상의 아미노산 첨가, 치환(일반적으로 자연상태에서 보존적인) 및/또는 결실을 갖는 원 폴리펩티드 서열 및 구조를 갖는 화합물을 말한다. "뮤테인"은 국제출원 No. W091/04282에 기술된 것과 같은, 하나 이상의 펩티드 모방("펩토이드")을 갖는 펩티드를 말한다. 바람직하게, 유사체 또는 뮤테인은 원 분자와 적어도 동일한 면역활성을 가진다. 폴리펩티드 유사체 및 뮤테인을 제조하는 방법은 당업계에 알려져 있으며 아래 설명된다.

<101> 삭제

<102> 특히 바람직한 유사체는 자연상태에서 보존적인 치환, 즉 그들의 측쇄에 관련되는 아미노산 패밀리 내에서 발생

하는 치환이다. 구체적으로, 아미노산은 일반적으로 4개 패밀리로 나뉜다:

<103> (1) 산성 - 아스파르테이트 및 글루타메이트

<104> (2) 염기성 - 리신, 아르기닌, 히스티딘

<105> (3) 비극성 - 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판

<106> (4) 비하전 극성 - 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌, 티로신.

<107> 페닐알라닌, 트립토판, 및 티로신은 때때로 방향족 아미노산으로 분류된다. 예를 들어, 류신을 이소류신 또는 발린으로, 아스파르테이트를 글루타메이트, 트레오닌을 세린으로 분리 치환하는 것, 구조적으로 관련된 아미노산으로 아미노산을 유사 보존성 치환하는 것은 생물학적 활성에 큰 영향을 미치지 않을 것이라고 합리적으로 예측된다. 예를 들어, 분자의 바람직한 기능이 완전히 유지되는 한, 해당 폴리펩티드는 약 5-10개까지의 보존성 또는 비-보존성 아미노산 치환, 또는 심지어 15-25개까지의 보존성 또는 비-보존성 아미노산 치환, 또는 5-25개 사이의 치환을 포함할 수 있다. 당업자는 당업계에 잘 알려진 Hopp/Woods 및 Kyte-Doolittle 플롯을 참조하여 변화를 견딜 수 있는 해당 분자의 영역을 쉽게 결정할 수 있다.

<108> 삭제

<109> 폴리펩티드를 말할 때 "분리된"은, 지시된 분자가, 자연상태에서 분자가 발견되는 전체 유기체로부터 분리되거나, 또는 동일한 종류의 다른 생물학적 거대분자의 실질적인 부재 하에 존재한다는 것을 의미한다. 폴리뉴클레오티드와 관련하여 용어 "분리된"은, 그것이 자연상태에서 정상적으로 관련되는 서열, 또는 그것이 자연상태에서 존재하는 대로의 서열은 전부 또는 부분적으로 없지만, 그와 관련된 이중성 서열, 또는 염색체로부터 분리된 분자를 갖는 핵산 분자이다.

<110> 지정된 서열"로부터 유래된" 또는 그"에 특이적인" 폴리뉴클레오티드는 지정된 뉴클레오티드 서열의 영역에 상응하는, 즉 동일하거나 상보적인 대략 적어도 약 6개 뉴클레오티드, 바람직하게 적어도 약 8개 뉴클레오티드, 더 바람직하게 적어도 약 10-12개 뉴클레오티드, 더욱더 바람직하게는 적어도 약 15-20개 뉴클레오티드의 연속 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열을 말한다. 유래된 폴리뉴클레오티드는 실제로 해당 뉴클레오티드 서열로부터 유래될 필요는 없지만, 폴리뉴클레오티드가 유래된 영역(들)에 있는 염기 서열에 의해 제공된 정보에 기초하여, 제한은 없으나 화학적 합성, 복제, 역전사 또는 전사를 포함하는 어떤 방식으로 생성될 수 있다. 이와 같이, 그것은 원 폴리뉴클레오티드의 센스 또는 안티센스 배향을 나타낼 수 있다.

<111> "상동성"은 두 폴리뉴클레오티드 또는 두 폴리펩티드 부분 사이의 상동성 퍼센트를 말한다. 2개의 DNA, 또는 2개의 폴리펩티드 서열은, 서열이 분자의 정해진 길이에 걸쳐서, 적어도 약 50%, 바람직하게 적어도 약 75%, 더 바람직하게 적어도 약 80%-85%, 바람직하게 적어도 약 90%, 가장 바람직하게 적어도 약 95%-98% 서열 상동성을 나타낼 때 서로 "실질적으로 상동성"이다. 본원에서 사용된, 실질적으로 상동성은 또한 특정 DNA 또는 폴리펩티드 서열과의 완전한 동일성을 나타내는 서열을 말한다.

<112> 일반적으로, "동일성"은 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열 각각의 정확한 뉴클레오티드 대 뉴클레오티드 또는 아미노산 대 아미노산 상응을 말한다. 동일성 퍼센트는, 서열을 정렬하고, 두 정렬된 서열 사이에서 일치하는 것의 정확한 수를 세고, 가장 짧은 서열의 길이로 나누고, 그 결과에 100을 곱하는 것에 의하여 두 분자 사이의 서열 정보를 직접 비교함으로써 측정될 수 있다.

<113> 상동성과 동일성 분석을 돕기 위해, 펩티드 분석을 위한 Smith and Waterman Advances in Appl. Math. 2:482-489의 국소적 상동성 알고리즘을 개조한 ALIGN(Dayhoff, M.O. in Atlas of Protein Sequence and Structure M.O. Dayhoff ed., 5 Suppl. 3:353-358, National biomedical Research Foundation, Washington, DC)와 같은 쉽게 입수가 가능한 컴퓨터 프로그램이 사용될 수 있다. 뉴클레오티드 서열 상동성을 측정하기 위한 프로그램은 Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8(Genetics Computer Group, Madison, WI로부터 입수가 가능함)로 입수가 가능하며, 예를 들어 Smith와 Waterman의 알고리즘에 의존하는 BESTFIT, FASTA 및 GAP 프로그램이 있다. 이들 프로그램은 제조자에 의해 추천되고 상기 인용된 Wisconsin Sequence Analysis Package에 설명된 디폴트 변수로 쉽게 이용된다. 예를 들어, 디폴트 점수표와 6개 뉴클레오티드 위치의 갭 페널티를 갖는 Smith와 Waterman의 상동성 알고리즘을 이용하여, 기준 서열에 대한 특정 뉴클레오티드 서열의 상동성 퍼센트가 측정될 수 있다.

- <114> 삭제
- <115> 본 발명의 문맥에서, 상동성 퍼센트를 확립하는 다른 방법은 University of Edinburgh가 권리를 소유하고, John F. Collins와 Shane S. Sturrok가 개발했으며, IntelliGenetics, Inc.(Mountain View, CA)가 배포한 프로그램인 MPSRCH 패키지를 사용하는 것이다. 이 한 벌의 패키지에서 점수표에 맞춰 디폴트 변수가 사용되는 경우 Smith-Waterman 알고리즘이 사용될 수 있다(예를 들어, 12의 갭 오픈 패널티, 1의 갭 확장 패널티, 및 6의 갭). 생성된 데이터에서 "일치" 값이 "서열 상동성"을 반영한다. 서열 사이의 동일성 또는 유사성을 계산하기 위한 다른 적합한 프로그램이 본 분야에 일반적으로 알려져 있는데, 예를 들어, 다른 정렬 프로그램은 디폴트 변수와 함께 사용되는 BLAST이다. 예를 들어, BLASTN 및 BLASTP는 다음 디폴트 변수를 사용하여 사용될 수 있다: 지네틱 코드 = 표준; 필터 = 없음; 스트랜드 = 양쪽; 컷오프 = 60; 익스펙트 = 10; 매트릭스 = BLOSUM62; 설명 = 50 서열; 정렬 = 하이 스코어; 데이터베이스 = 비-과잉; GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS 번역 + 스위스 단백질 + Spupdate + PIR. 이들 프로그램의 상세한 사항은 다음 인터넷 주소: <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>에서 찾을 수 있다.
- <116> 삭제
- <117> 삭제
- <118> 삭제
- <119> 삭제
- <120> 대안적으로, 상동성 영역 사이에 안정한 중복체를 형성하는 조건에서 폴리뉴클레오티드의 혼성화하고, 다음 단 일가닥 특이적 뉴클레아제로 효소절단하고, 절단된 단편의 크기를 결정하는 것에 의해 상동성이 측정될 수 있다. 실질적으로 상동성인 DNA 서열이 특정한 시스템에 대해 정의되는, 예를 들어 긴축 조건 하에서 서든 혼성화 실험으로 확인될 수 있다. 적합한 혼성화 조건의 정의는 당업자의 기술범위 이내이다. 예를 들어, Sambrook et al. supra; DNA Cloning, supra; Nucleic acid Hybridization, supra, 참조.
- <121> "작동가능하게 연결된"은 설명된 성분이 그들의 바람직한 기능을 수행하도록 배열된 구성요소의 배열을 말한다. 따라서, 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 주어진 프로모터는 전사를 행할 수 있고, 암호화 서열의 경우에는, 적절한 전사 인자 등이 존재할 때 암호화 서열의 발현을 행할 수 있다. 전사 및/또는 발현을 지지하는 기능을 하는 한, 프로모터가 핵산 서열에 인접할 필요는 없다. 따라서, 예를 들어, 전사된 인트론일 수 있는 것처럼, 개재하고 있는 미번역된 아직 전사되지 않은 서열이 프로모터 서열과 암호화 서열 사이에 존재할 수 있고, 프로모터 서열은 암호화 서열에 "작동가능하게 연결된"다고 여전히 말할 수 있다.
- <122> 핵산 분자를 설명하기 위해 본원에서 사용된 "재조합"은 실제로 그 기원이나 조각이 자연상태에서 관련되는 폴리뉴클레오티드의 일부 또는 전부와 관련되지 않는 게놈, cDNA, 바이러스, 반합성 또는 합성 기원의 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 단백질 또는 폴리펩티드와 관련하여 사용된 용어 "재조합"은 재조합 폴리뉴클레오티드의 발현에 의해서 생산된 폴리펩티드를 의미한다. 일반적으로, 형질전환된 유기체에서 해당 유전자가 클로닝된 후 발현되는데, 이것은 이후 더 설명된다. 발현 조건에서 숙주 유기체는 외래 유전자를 발현하여 단백질을 생산한다.
- <123> "조절 요소"는 연결되는 뉴클레오티드 서열의 전사 및/또는 번역을 돕는 폴리뉴클레오티드 서열을 말한다. 이 용어는 프로모터, 전사 종결 서열, 상류 조절 도메인, 폴리아데닐화 신호, 5'-UTR 및 3'-UTR을 포함하는 미번역 영역, 그리고 적절한 경우 리서 서열과 인핸서를 포함하고, 이들은 전체적으로 숙주 세포에서 암호화 서열의 전사 및 번역을 제공한다.
- <124> 본원에서 사용된 "프로모터"는 중합효소를 결합시키고 거기에 작동가능하게 연결된 하류(3'-방향) 뉴클레오티드 서열의 전사를 개시할 수 있는 조절 영역이다. 본 발명의 목적을 위해서, 프로모터 서열은 바탕값 이상의 검출

가능한 수준으로 해당 서열의 전사를 개시하는데 필요한 염기 또는 요소를 최소한의 수만큼 포함한다. 프로모터 서열 내에는 전사 개시 부위가 있을 뿐만 아니라, RNA 또는 DNA 중합효소의 결합을 일으키는 단백질 결합 도메인(공통 서열)이 있다. 예를 들어, 프로모터는 특정 부위에서 핵산에 결합하고 RNA의 전사를 개시하라는 신호로서 DNA-의존성 RNA 중합효소("전사효소")에 의해 인식되는 핵산 서열일 수 있다. 결합을 위해서, 그러한 전사효소는 일반적으로 프로모터 서열과 그의 보체를 포함하는 부분의 이중-가닥인 DNA를 필요로 하며, 주형 부분(전사될 서열)은 이중-가닥일 필요는 없다. 각 DNA-의존성 RNA 중합효소는 전사를 진행시키는 효능을 현저히 변화시킬 수 있는 여러 상이한 프로모터 서열을 인식한다. RNA 중합효소가 전사를 개시하는 프로모터 서열에 결합할 때, 이 프로모터 서열은 전사된 서열의 일부가 아니다. 따라서, 이와 같이 생성된 RNA 전사체는 이 서열을 포함하지 않을 것이다.

RNA 또는 DNA 중합효소가 프로모터 서열에 결합하여 인접한 서열을 전사하는 경우, 조절 서열은 뉴클레오티드 서열의 "전사를 지시한다".

<125> 삭제

<126> "DNA-의존성 DNA 중합효소"는 DNA 주형으로부터 상보성 DNA 카피를 합성하는 효소이다. 예는 *E.coli*로부터의 DNA 중합효소 I 및 박테리오파지 T7 DNA 중합효소이다. 모든 공지된 DNA-의존성 DNA 중합효소는 합성을 개시하기 위해서 상보성 프라이머를 필요로 한다. 적합한 조건에서, DNA-의존성 DNA 중합효소는 RNA 주형으로부터 상보성 DNA 카피를 합성할 수 있다.

<127> 삭제

<128> 삭제

<129> "DNA-의존성 RNA 중합효소" 또는 "전사효소"는 (통상 이중-가닥인) 프로모터 서열을 갖는 이중-가닥 또는 부분적 이중-가닥인 DNA 분자로부터 다수의 RNA 카피를 합성하는 효소이다. RNA 분자("전사체")는 프로모터의 바로 하류의 특정 위치에서 시작하여 5'에서 3' 방향으로 합성된다. 전사효소의 예는 *E.coli* 및 박테리오파지 T7, T3 및 SP6으로부터의 DNA-의존성 RNA 중합효소이다.

<130> 삭제

<131> "RNA-의존성 DNA 중합효소" 또는 "역 전사효소"는 RNA 주형으로부터 상보성 DNA 카피를 합성하는 효소이다. 모든 공지된 역 전사효소는 또한 DNA 주형으로부터 상보성 DNA 카피를 만들 수 있는 능력을 가지며, 따라서 이들은 RNA- 및 DNA-의존성 DNA 중합효소이다. RNA 및 DNA 주형을 가지고 합성을 개시하는 데는 프라이머가 필요하다.

<132> "RNAae H"는 RNA:DNA 듀플렉스의 RNA 부분을 분해하는 효소이다. 이러한 효소는 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제일 수 있다. 대부분의 역 전사효소는 일반적으로 중합효소 활성화에 더하여 RNAae H 활성을 함유한다. 그러나, RNAae H의 다른 출처는 관련된 중합효소 활성 없이 이용가능하다. 분해는 RNA:DNA 복합체로부터 RNA의 분리를 가져올 수 있다. 또는 달리, RNAae H는 다양한 장소에서 RNA를 단순히 절단할 수 있으며, 이로써 RNA의 부분이 용융되거나, 또는 효소가 RNA 부분을 퍼도록 허용한다.

<133> 삭제

<134> 본원에서 사용된 용어들 "폴리뉴클레오티드", "올리고뉴클레오티드", "핵산" 및 "핵산 분자"는 어떤 길이의 뉴클레오티드의 중합 형태, 즉 리보뉴클레오티드 또는 디옥시리보뉴클레오티드를 포함한다. 이 용어는 분자의 일차 구조만을 말한다. 따라서, 이들 용어는 3중, 2중 및 단일-가닥 DNA 뿐만 아니라, 3중, 2중 및 단일-가닥 RNA를 포함한다. 또한, 이들은 메틸화 및/또는 캡핑에 의한 것과 같은 변형, 및 폴리뉴클레오티드의 변형되지 않은 형태를 포함한다. 더 구체적으로, "폴리뉴클레오티드", "올리고뉴클레오티드", "핵산" 및 "핵산 분자"는 폴리데옥시리보뉴클레오티드(2-디옥시-D-리보오스), 폴리리보뉴클레오티드(D-리보오스 함유), 퓨린 또는 피리미

딘 염기의 N-또는 C-글리코시드인 다른 형태의 폴리뉴클레오티드, 및 비-뉴클레오티드 백본을 함유하는 다른 폴리머, 예를 들어 폴리아미드(예를 들어, 펩티드 핵산(PNAs)) 및 폴리모르폴리노(Anti-Virials, Inc., Corvallis, Oregon로부터 Neugene로서 입수가능) 폴리머, 그리고 DNA 및 RNA에서 발견되는 것처럼 염기쌍 만들기 및 염기 쌍기를 허용하는 입체배치의 뉴클레오티드를 함유하는 폴리머를 제공하는 다른 합성 서열-특이적 핵산 폴리머를 포함한다. "폴리뉴클레오티드", "올리고뉴클레오티드", "핵산" 및 "핵산 분자" 사이에 길이를 의도적으로 구분하지 않으며, 이들 용어는 상호교환하여 사용될 것이다. 이들 용어는 분자의 일차 구조만을 말한다. 따라서, 이들 용어는, 예를 들어 3'-디옥시-2',5'-DNA, 올리고디옥시리보뉴클레오티드 N3' P5' 포스포르아미데이트, 2'-O-알킬-치환 RNA, 이중- 및 단일-가닥 DNA, 뿐만 아니라 이중- 및 단일-가닥 RNA, DNA:RNA 혼성체, PNA와 DNA 또는 RNA 간 혼성체를 포함하며, 또한 공지된 종류의 변형, 예를 들어 당업계에 공지된 표지, 메틸화, "캡핑", 하나 이상의 자연적으로 발생하는 뉴클레오티드의 유사체로의 치환, 뉴클레오티드간 변형, 예를 들어 비하전 결합을 갖는 것(예를 들어, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포르아미데이트, 카르바메이트 등), 음으로 하전된 결합을 갖는 것(포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등), 양으로 하전된 결합을 갖는 것(아미노알킬포스포르아미데이트, 아미노알킬포스포트리에스테르), 펜던트 부분을 함유하는 것들, 예를 들어 단백질(뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 펩티드, 폴리-L-리신을 포함), 개재 인자를 갖는 것(예를 들어, 아크리딘, 솔라렌 등), 킬레이터를 갖는 것들(예를 들어, 금속, 방사성 금속, 붕소, 산화금속 등), 알킬화 인자를 함유하는 것, 변형된 결합을 갖는 것(예를 들어, 알파 아노머 핵산 등), 뿐만 아니라 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드의 미변형 형태를 포함한다. 특히, DNA는 디옥시리보핵산이다.

<135> 삭제

<136> 삭제

<137> 삭제

<138> 본원에서 사용된 용어인 "표적 핵산 영역" 또는 "표적 핵산"은 증폭될 "표적 서열"을 가진 핵산 분자를 나타낸다. 표적 핵산은 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있으며, 표적 서열 이외에 증폭되지 않을 수도 있는 다른 서열을 포함할 수 있다. 용어 "표적 서열"은 증폭될 표적 핵산의 특정한 뉴클레오티드 서열을 말한다. 표적 서열은 바람직한 조건에서 프로브와 안정한 혼성체를 형성하는 표적 분자 내에 함유된 프로브-혼성화 영역을 포함할 수 있다. 또한, "표적 서열"은 올리고뉴클레오티드 프라이머와 복합체를 이루고 표적 서열을 주형으로 사용하여 확장되는 복합 서열을 포함할 수 있다. 표적 핵산이 원래 단일-가닥인 경우, 용어 "표적 서열"은 또한 표적 핵산에 존재하는 "표적 서열"에 상보하는 서열을 말한다. "표적 핵산"이 원래 이중-가닥인 경우, 용어 "표적 서열"은 플러스(+) 및 마이너스(-) 가닥을 말한다.

<139> 본원에서 사용된 용어 "프라이머" 또는 "올리고뉴클레오티드 프라이머"는 프라이머 확장 산물의 합성이 유도되는 조건에 있을 때, 즉 DNA 또는 RNA 같은 뉴클레오티드 및 중합-유도 제제가 존재하고, 그리고 적합한 온도, pH, 금속 농도, 및 염 농도에서, 상보성 DNA 가닥의 합성을 개시하는 작용을 하는 올리고뉴클레오티드를 말한다. 최대 증폭 효능을 위해서 프라이머는 바람직하게는 단일-가닥이지만, 대안으로는 이중-가닥일 수도 있다. 이중-가닥인 경우, 프라이머는 먼저 그 가닥이 분리되도록 처리한 후에 확장 산물을 제조하는데 사용된다. 이 변성 단계는 전형적으로 열에 의해 행해지지만, 대안으로는 알칼리를 사용한 후 중화함으로써 행해질 수도 있다. 따라서, "프라이머"는 주형에 상보성이며, 주형과의 수소 결합이나 혼성화에 의해 복합체를 이루어 프라이머/주형 복합체를 제공함으로써 중합효소에 의해 합성을 개시하며, 이것은 DNA 합성 과정에서 공유결합 염기가 주형에 상보하는 3' 단부에 연결되어 추가됨으로써 확장된다.

<140> 본원에서 사용된 용어인 "프로브" 또는 "올리고뉴클레오티드 프로브"는 표적 핵산 분석물질에 존재하는 핵산 서열에 상보하는 핵산 서열을 함유하는, 상기 정의된 바와 같은, 폴리뉴클레오티드로 이루어진 구조를 말한다. 프로브의 폴리뉴클레오티드 영역은 DNA 및/또는 RNA 및/또는 합성 뉴클레오티드 유사체로 이루어질 수 있다. "올리고뉴클레오티드 프로브"가 TaqMan™ 기술과 같은 5' 뉴클레아제 분석에서 사용될 때, 프로브는 적어도 하나의 형광물질과 적어도 하나의 퀀처를 함유하며, 퀀처는 반응에 사용된 중합효소의 5' 엔드뉴클레아제 활성에 의해 효소분해됨으로써 어떤 증폭된 표적 올리고뉴클레오티드 서열이 검출된다. 이 환경에서, 올리고뉴클레오티드 프로브는 5' 단부에 인접한 충분한 수의 포스포디에스테르 결합을 가질 것이며, 이로써 사용된 5'에서 3'

을 향한 뉴클레아제 활성은 결합된 프로브를 효과적으로 분해하여 형광물질과 퀀처를 분리할 수 있다. 올리고뉴클레오티드 프로브가 TMA 기술에 사용될 때, 이것은 하기 설명된 것과 같이 적합하게 표지될 것이다.

- <141> 안정한 혼성체를 제공하기 위해서 혼성화 서열이 완벽한 상보성을 가질 필요는 없다는 것이 높이 인정될 것이다. 많은 상황에서, 약 10% 미만의 염기가 불일치되는 경우에 안정한 혼성체가 형성될 것이며, 4개 이상의 뉴클레오티드의 루프는 무시한다. 따라서, 본원에서 사용된 용어 "상보성"은, 일반적으로 약 90% 이상의 상동성이 있는 경우, 분석 조건에서 그것의 "보체"와 안정한 듀플렉스를 형성하는 올리고뉴클레오티드를 말한다.
- <142> 용어 "혼성화하다" 및 "혼성화"는 Watson-Crick 염기쌍에 의해 복합체를 형성할 만큼 충분히 상보성인 뉴클레오티드 서열들 사이에 복합체의 형성을 말한다. 프라이머가 표적(주형)과 "혼성화"하는 경우, 그러한 복합체(또는 혼성체)는, 예를 들어 DNA 합성을 개시하는 DNA 중합효소가 필요로 하는 시동 기능을 작용시킬 만큼 충분히 안정하다.
- <143> 본원에서 사용된 용어 "결합쌍"은, 핵산 듀플렉스를 형성할 수 있는 상보성 폴리뉴클레오티드 쌍과 같은, 서로 특이적으로 결합하는 제 1 분자와 제 2 분자를 말한다. 샘플 중 결합쌍의 제 1 구성원과 결합쌍의 제 2 구성원의 "특이적 결합"은 제 1 구성원과 제 2 구성원의 결합에 의해 증명되거나, 또는 반대로 샘플 중의 다른 성분들보다 더 큰 친화성 및 특이성으로 결합하는 것에 의해 증명된다. 결합쌍의 구성원 간의 결합은 전형적으로 비-공유결합이다. 문장에서 명백히 달리 나타내지 않는다면, 본원에서 사용된 용어 "친화성 분자" 및 "표적 분석 물질"이 결합쌍의 제 1 분자 및 제 2 분자를 각각 말한다.
- <144> 용어 "특이적-결합 분자" 및 "친화성 분자"는 본원에서 상호교환하여 사용되며, 화학적 또는 물리적 수단을 통해 샘플에 존재하는 검출가능한 물질에 선택적으로 결합하는 분자를 말한다. "선택적으로 결합한다" 라는 말은 이 분자가 해당 표적에 우선적으로 결합하거나, 또는 다른 분자들보다 표적에 더 큰 친화성으로 결합한다는 의미이다. 예를 들어, DNA 분자는 실질적으로 상보성인 서열에 결합하며, 관련되지 않은 서열에는 결합하지 않는다.
- <145> 삭제
- <146> 이중-가닥 DNA의 "용융 온도" 또는 "Tm"은, 염기쌍 사이의 수소 결합이 가열이나 그 밖의 다른 해리 작용, 예를 들어 산 또는 알칼리 처리 등으로 인해 DNA의 나선 구조의 반이 상실되는 온도로서 정의된다. DNA 분자의 Tm은 그것의 길이 및 염기 조성에 의존한다. GC 염기쌍이 많은 DNA 분자는 AT 염기쌍이 많은 것보다 Tm이 높다. 온도가 Tm 이하로 저하되었을 때, DNA의 분리된 상보 가닥은 자발적으로 다시 결합하거나 어닐링하여 듀플렉스 DNA를 형성한다. 최고 속도의 핵산 혼성화는 Tm보다 약 25°C 낮은 온도에서 일어난다. Tm은 다음 관계식을 사용하여 추정될 수 있다: $T_m = 69.3 + 0.41(GC)\%$ (Marmur et al.(1962) *J. Mol. Biol.* 5:109-118).
- <147> 본원에서 사용된 "생물학적 샘플"은 피험자로부터 분리된 조직 또는 유체의 샘플을 말하며, 이것은 통상 피험자에 의해 생성된 항체를 포함한다. 그러한 항체를 포함하는 전형적인 샘플이 당업계에 공지되어 있고, 그것은 혈액, 혈장, 혈청, 대변, 오줌, 골수, 쓸개즙, 척수액, 림프액, 피부 샘플, 피부, 호흡기, 장, 및 비뇨생식관 분비물, 눈물, 침, 젖, 혈액 세포, 기관, 생검조직, 그리고 또한 제한은 없지만 배양 배지 중 세포 및 조직의 성장에 의해 생긴 컨디셔닝 배지를 포함하는 시험관내 세포 배양 구성물의 샘플, 예를 들어 재조합 세포, 및 세포 성분들을 포함한다.
- <148> 본원에서 사용된 용어 "표지" 및 "검출가능한 표지"는, 제한은 없지만, 방사성 동위원소, 형광물질, 화학발광물질, 발색단, 효소, 효소 기질, 효소 보조인자, 효소 억제제, 발색단, 염료, 금속이온, 금속 줄, 리간드(즉, 바이오틴, 아비딘, 스트렙토아비딘 또는 헵텐) 등을 포함하는 검출할 수 있는 분자를 말한다. 용어 "형광물질"은 검출가능한 범위에서 형광을 나타낼 수 있는 물질 또는 물질 부분을 말한다.
- <149> 삭제
- <150> II. 발명을 수행하는 방식
- <151> 본 발명을 상세히 설명하기 전에, 본 발명이 특정한 제제 또는 공정 변수에 제한되지 않으며, 이들은 물론 변화할 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 본원에서 사용된 용어는 본 발명의 특정한 구체예를 설명하기 위한 것이며 본 발명을 제한하지 않는다.

- <152> 본원에 설명된 것과 유사하거나 동등한 많은 조성물 및 방법이 본 발명을 실시하는데 사용될 수 있으며, 바람직한 재료 및 방법이 본원에 설명된 것이다.
- <153> 상기 주지된 대로, 본 발명은 신규 프라이머 및 프로브 그리고 생물학적 샘플에서 파르보바이러스 B19 감염을 정확히 검출하기 위한 진단 방법의 발견에 기초를 둔다. 본 방법은 소량의 바이러스를 함유하는 샘플에서 파르보바이러스 B19 표적 핵산 서열의 확인을 허용하는 민감한 핵산-기초 검출 기술에 의존한다.
- <154> 특별히, 발명자는 진단 시험에 바람직한 표적인 파르보바이러스 B19 게놈 내의 영역의 특성을 나타낸다. 이 영역으로부터 유도된 프라이머와 프로브는 생물학적 샘플에서 파르보바이러스 B19 감염을 검출하는데 매우 유용하다.
- <155> 상기 기술된 파르보바이러스 B19 프라이머와 프로브는 생물학적 샘플에서 사람 파르보바이러스 B19 감염을 검출하기 위한 핵산-기초한 분석에서 사용된다.
- <156> 특히, 본 출원인은 본원에서 진단 시험을 위한 바람직한 표적인 파르보바이러스 B19 게놈 내의 특성화된 영역을 가진다. 이들 영역으로부터 유래된 프라이머 및 프로브는 생물학적 샘플에서 파르보바이러스 B19 감염의 검출에 대단히 유용하다.
 상기 설명된 파르보바이러스 B19 프라이머 및 프로브는 생물학적 샘플에서 사람 파르보바이러스 B19 감염을 검출하기 위한 핵산-기초 분석에서 사용된다. 특히, 이들 분석에서 사용되는 프라이머 및 프로브는 바람직하게는 Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936의 뉴클레오티드 위치 217-4678에 상응하는 파르보바이러스 B19 게놈의 약 4.7kb 단편으로부터 유래된다. 2개의 다른 파르보바이러스 B19 분리주로부터 유래한 이 영역의 뉴클레오티드 서열이 도 3A-3C 및 4A-4C에 묘사된다. 상기 설명된 대로, 이 단편은 NS1, VP1 및 VP2 암호화 영역을 함유한다.
- <157> 본 분석에서 사용되는 특히 바람직한 프라이머 및 프로브는 파르보바이러스 B19 게놈의 고도로 보존된 영역으로부터 디자인되며, 이로써 다양한 분리주에 의해 야기되는 파르보바이러스 B19 감염의 검출을 허용한다. 본원에 설명된, 파르보바이러스 B19 게놈의 고도로 보존된 영역은 Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936에 설명된 파르보바이러스 B19 게놈에 관하여 번호 매겨진, 뉴클레오티드 위치 2936-3635에 걸친 700bp 영역 내에서 발견된다. 이 영역은 게놈의 VP1 영역 내에서 발견된다. 21개의 다른 파르보바이러스 B19 분리주로부터 유래한 이 영역의 서열을 도 2A-2U에 나타낸다. 추가의 26개 분리주로부터 유래한 서열은 도 11A-11Z에 나타낸다. 서열의 비교는 이 영역이 분리주들이 약 98%에서 99.5%까지의 서열 상동성을 나타낸다는 것을 보이는데, 때문에 이것은 매우 바람직한 표적 서열이다. 또한, 프라이머 및 프로브를 디자인하는데 바람직한 것은 Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936에 관하여 번호 매겨진, 약 뉴클레오티드 위치 3073-3442에 걸친 VP1 내에서 발견된 370bp 영역과, 뿐만 아니라 4.7kb 단편의 3' 부분 내에서 발생하고, Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936에 관하여 번호 매겨진, 뉴클레오티드 위치 4728-4941에 걸친, 도 1에 묘사된 214bp 단편이다.
- <158> 삭제
- <159> 4.7kbp, 700bp, 및 370bp 영역은 본원에 설명되고, 미국특허 제4,683,195호, 제4,683,202호 및 제4,889,818호에 설명된 것과 같이, PCT 반응에서 프라이머로서 이들 특정한 영역 내에서 발견된 파르보바이러스 B19 서열의 부분을 사용하여, 그리고 본원에 제공된 서열에 기초하여, 추가의 분리주로부터 쉽게 얻어질 수 있다. 바람직한 서열을 갖는 뉴클레오티드 서열을 획득하기 위한 다른 방법은 종래의 자동 폴리뉴클레오티드 합성기에서 생산된 중첩하는 합성 올리고뉴클레오티드의 상보 세트를 어닐링하고, 그 다음 적합한 DNA 리가아제로 리게이션한 후, 리게이션된 뉴클레오티드 서열을 PCR에 의해 증폭하는 것이다. Jayaraman et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4084-4088 참조. 일단 서열을 제조되고 분리되면, 이들은 어떤 적합한 벡터 또는 복제단위로 클로닝될 수 있다. 많은 클로닝 벡터가 당업자에게 공지되어 있고, 적합한 클로닝 벡터의 선정은 선택의 문제이다. 적합한 벡터는, 제한은 없지만, 적절한 대조표준 요소와 결합되었을 때 복제할 수 있는 플라스미드, 파지, 트랜스포존, 코스미드, 염색체 또는 바이러스를 포함한다. 재조합 클론은 당업계에 잘 공지되고 하기 실시예에 설명된 기술을 사용하여, 제한효소 분석 및 폴리아크릴아미드 또는 아가로스 겔 전기영동으로 쉽게 확인된다.
- <160> 삭제

- <161> 본원에서 분석에 사용되는 프라이머 및 프로브는 이러한 서열로부터 유래되며, 예를 들어 미국특허 제4,458,066호 및 제4,415,732호; Beaucage et al. (1992) *Tetrahedron* 48:2223-2311; 및 *Applied Biosystems User Bulletin No. 13*(1987.4. 1)에 개시된, 포스포라미다이트 화학에 의한 고체상 합성과 같은 표준 기술에 의해 쉽게 합성된다. 그 밖의 다른 화학적 합성 방법들은, 예를 들어 Narang et al., *Meth. Enzymol.* (1979) 68:90에 의해서 설명된 포스포트리에스테르법 및 Brown et al., *Meth. Enzymol.* (1979) 68:109에 의해서 설명된 포스포디에스테르법을 포함한다. 폴리(A) 또는 폴리(C), 또는 다른 비-상보성 뉴클레오티드 확장체가 이들 동일한 방법을 이용하여 프로브에 통합될 수 있다. 핵사에틸렌 옥시드 확장체가 당업계에 공지된 방법에 의해서 프로브에 결합될 수 있다. Cload et al. (1991) *J. Am.Chem. Soc.* 113:6324-6326; 미국특허 No. 4,914,210, Levenson et al.; Durand et al. (1990) *Nucleic acid Res.* 18:6353-6359; 및 Horn et al. (1986) *Tet.Lett.* 27:4705-4708. 전형적으로, 프라이머 서열은 10 내지 75 뉴클레오티드 길이의 범위, 예를 들어 15 내지 60, 20 내지 40 등등이며, 더 전형적으로는 18 내지 40 뉴클레오티드 길이의 범위이고, 상술된 범위 사이의 어떤 길이여도 된다. 전형적인 프로브는 10 내지 50 뉴클레오티드 길이 범위, 예를 들어 15 내지 40, 18 내지 30 등등이며, 상술된 범위 사이의 어떤 길이여도 된다.
- <162> 더욱이, 프로브는 검출을 위해서 표지와 결합될 수 있다. 표지의 첨가를 허용하는 반응성 작용기를 갖는 올리고뉴클레오티드를 유도하기 위한 몇몇 수단이 공지되어 있다. 예를 들어, 프로브를 바이오틴화하기 위한 몇몇 접근법을 이용할 수 있는데, 여기서는 방사능, 형광, 화학발광, 효소 또는 전자 조밀 표지가 아비딘에 의해 부착될 수 있다. 예를 들어, 페리틴-아비딘-바이오틴 표지의 사용을 개시한 Broken et al., *Nucl. Acids Res.* (1978) 5:363-384; 그리고 아미노알킬포스포르아미드 링커 암에 의한 올리고뉴클레오티드 5'-말단의 바이오틴화를 개시한 Chollet et al. *Nucl. Acids Res.* (1985) 13:1529-1541을 참조한다. 또한, 이소티오시아네이트, N-히드록시숙신이미드 등의 아미노-반응성 기에 의해 유도된 형광성 또는 다른 종류의 화합물에 의해서 쉽게 표지되는 아미노-유도체화 올리고뉴클레오티드를 합성하기 위한 몇몇 방법을 이용할 수 있는데, 예를 들어 Connolly (1987) *Nucl. Acids Res.* 15:3131-3139, Gibson et al. (1987) *Nucl. Acids Res.* 15:6455-6467 및 미국특허 제4,605,735호(Miyoshi et al.)를 참조한다. 또한, 티올-특이적 표지와 반응될 수 있는 술폰히드릴-유도체화 올리고뉴클레오티드를 합성하기 위한 몇몇 방법을 또한 이용할 수 있는데, 예를 들어 미국특허 제4,757,141호(Fung et al.), Connolly et al. (1985) *Nucl. Acids Res.* 13:4485-4502 및 Spoot et al. (1987) *Nucl. Acids Res.* 15:4837-4848를 참조한다. DNA 단편을 표지하는 방법에 대한 포괄적인 리뷰는 Matthews et al., *Anal. Biochem.* (1988) 169:1-25에 제공된다.
- <163> 삭제
- <164> 삭제
- <165> 예를 들어, 프로브의 비-리케이팅 말단에 형광 분자를 연결함으로써 프로브가 형광 표지될 수 있다. 적합한 형광 표지를 선택하기 위한 지침은 Smith et al. *Meth. Enzymol.*(1987) 155:260-301; Karger et al. *Nucl. Acids Res.*(1991)19:4955 -4962; Haugland (1989) *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR)에서 찾을 수 있다. 바람직한 형광 표지는 미국특허 No. 4,318,846 및 Lee et al., *Cytometry* (1989) 10:151-164에 개시된 것과 같은, 플루오레세인 및 그 유도체, 및 6-FAM, JOE, TAMRA, ROX, HEX-1, HEX-2, ZOE, TET-1 또는 NAN-2 등을 포함한다.
- <166> 추가로, 프로브는 하기 설명된 기술을 사용하여 아크리디늄 에스테르(AE)로 표지될 수 있다. 현재 기술은 프로브 내의 어떤 장소에라도 AE 표지가 위치되도록 허용한다. 예를 들어, Nelson et al. (1995) "Detection of Acridinium Esters by Chemiluminescence" in *Nonisotopic Probing, Blotting and Sequencing*, Kricka L. J.(ed) Academic Press, San Diego, CA; Nelson et al.(1994) "Application of the Hybridization Protection Assay(HPA) to PCR" in *The Polymerase Chain Reaction*, Mullis et al. (eds.) Birkhauser, Boston, MA; Weeks et al., *Clin. Chem.* (1983) 29:1474-1479; Berry et al., *Clin.Chem.* (1988) 34:2087-2090를 참조한다. AE 분자는 프로브 내의 어떠한 장소에도 표지의 배치를 허용하는 비-뉴클레오티드-기초 링커 암 화학을 이용하여 프로브에 직접 부착될 수 있다. 예를 들어, 미국특허 제5,585,481호 및 제5,185,439호를 참조한다.

- <167> 삭제
- <168> 삭제
- <169> 어떤 구체예에서, 표적 포착 및 증폭을 위해 대조표준으로서 작용하는 내부 대조표준(IC) 또는 내부 기준을 첨가된다. 바람직하게, IC는 표적 서열과 상이하고, 샘플로부터 유래한 유기체에 특이적인 올리고뉴클레오티드를 분리하는데 사용되는 프로브 서열과 혼성화할 수 있고, 증폭할 수 있는 서열을 포함한다. IC의 사용은 분리 과정, 증폭 과정, 및 검출 시스템의 제어를 허용하고, 분석 성능의 모니터링과 샘플(들)의 정량을 허용한다. IC가 얻어질 수 있는 대표적인 서열이 도12에 도시된다. IC는 어떤 적합한 장소, 예를 들어 세포용해 완충액에 포함될 수 있다. 한 구체예에서, IC는 파르보바이러스 B19로부터 유래한 뉴클레오티드 서열과, 예를 들어 VP1 영역으로부터 유래한 서열을 포함하는 프로브와 혼성화하는 특정 서열을 함유하는 M13 ssDNA를 포함하며, 이 경우 표적 서열은 5 내지 20 염기 이상, 바람직하게는 5 내지 15 염기, 예를 들어 5, 10 또는 15 염기 또는 이들 범위 내의 어떤 수의 염기를 치환 또는 결실함으로써 변형된다. 치환된 또는 결실된 염기는 바람직하게 표적 서열의 전 길이에 걸쳐 발생하며, 이로써 단지 2 또는 3개의 연속 서열이 대체된다. 따라서, 예를 들어, 표적 서열이 CTACTTGCTGCGGGAGAAAACCT (SEQ ID NO:91)라면, IC에서 이 서열은, 예를 들어 AGCTAGACCTGCATGTCCTG(SEQ ID NO:90)로 치환될 수 있다.
- <170> 삭제
- <171> 고체 지지체는 내부 기준(IC 프로브)에 특이적인 프로브를 추가로 포함할 수 있으며, 이로써 IC 프로브를 사용할 때의 포착을 촉진한다. IC 프로브는 선택적으로 표적 서열의 검출가능한 표지와는 다른 검출가능한 표지와 결합될 수 있다. 검출가능한 표지가 형광단인 구체예에서, IC는 분광광도적으로 검출 연구의 한계까지 정량될 수 있다. 전형적으로, 표적 검출을 방해하지 않는 IC의 카피 수는, 바람직하게는 저 종점에서, 표적의 고정된 IU로 IC를 적정함으로써 결정되며, 국제적으로 승인된 IU의 샘플을 희석함으로써 표준 곡선이 생성된다. 파르보바이러스 B19 정량에 대하여, 8000 IU - 125 IU의 8개 부재 패널이 사용될 수 있다.
- <172> 다른 구체예에서, 본원에 설명된 IC는 당업자에게 공지되고 여기 설명된 표준 기술에 따라서 샘플로부터 분리된 RNA와 조합된다. 다음에, RNA가 역 전사효소를 사용하여 역전사되어 카피 DNA가 제공된다. cDNA 서열이 선택적으로 표지된 프라이머를 사용하여 (예를 들어, PCR에 의해) 증폭될 수 있다. 증폭 산물은 전형적으로는 전기 영동에 의해 분리되며, (증폭 산물의 양에 비례하는) 방사능의 양이 측정된다. 다음에, 공지된 표준에 의해 생긴 신호와 비교함으로써 샘플 중의 mRNA의 양이 계산된다.
- <173> 삭제
- <174> 생물학적 샘플에서 파르보바이러스 B19 감염을 검출하기 위해서 상기 설명된 프라이머 및 프로브가 중합효소 연쇄 반응(PCR)-기초 기술에 사용될 수 있다. PCR은 핵산 분자 또는 분자의 혼합물에 함유된 원하는 표적 핵산 서열을 증폭하기 위한 기술이다. PCR에서는 한 쌍의 프라이머를 과량으로 사용하여 표적 핵산의 상보성 가닥에 혼성화한다. 표적 핵산을 주형으로 사용하여 중합효소에 의해 프라이머가 각각 확장된다. 확장 산물은 최초의 표적 가닥으로부터의 해리 후에 표적 서열이 된다. 다음에, 새로운 프라이머가 혼성화되고 중합효소에 의해 확장되는데, 이 사이클을 반복하여 표적 서열 분자의 수를 기하급수적으로 증가시킨다. 표적 핵산 서열을 증폭시키는 PCR 방법은 당업계에 잘 공지되어 있으며, 예를 들어 Innis et al. (eds.) PCR Protocols (Academic Press, NY 1990); Taylor (1991) Polymerase chain reaction: basic principles and automation in PCR: A Practical Approach, McPherson et al. (eds.) IRL Press, Oxford; Saiki et al. (1986) Nature 324; 및 미국 특허 4,683,195, 4,683,202, 및 4,889,818에 설명된다.
- <175> 삭제
- <176> 특히, PCR은 3'-단부가 서로 마주보도록 배향되고, 각 프라이머가 나머지 하나를 향해 확장된, 증폭될 표적 뉴클레오티드 서열 측면의 비교적 짧은 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용한다. 폴리뉴클레오티드 샘플이 추출

되고, 바람직하게는 열에 의해 변성되며, 물 과량으로 존재하는 제 1 및 제 2 프라이머와 혼성화된다. 프라이머 확장 산물을 생산할 수 있는 어떤 효소, 예를 들어, *E. coli* DNA 중합효소 I, DNA 중합효소 I의 Klenow 단편, T4 DNA 중합효소, 여러 출처(예를 들어, Perkin Elmer)로부터 입수가 가능한 *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(United States Biochemicals), *Bacillus streptothermophilus*(Bio-Rad) 또는 *Thermococcus litoralis*("Vent" 중합효소, New England Biolabs)로부터 분리된 열안정성 DNA 중합효소와 같은, 프라이머- 및 주형-의존성 폴리뉴클레오티드 중합 체제를 사용하여 4개의 디옥시리보뉴클레오티드 트리포스페이트(dNTP -- dATP, dGTP, dCTP 및 dTTP)의 존재하에 중합이 촉매된다. 이 결과, 원 가닥의 새로 합성된 보체에 공유결합된 5'-단부에 각 프라이머를 함유하는 2개의 "긴 산물"이 생산된다. 다음에, 예를 들어, 온도를 저하하거나, 변성제를 불활성화하거나, 또는 중합효소를 더 첨가함으로써 반응 혼합물이 중합 조건으로 다시 되돌려지고, 제 2 사이클이 개시된다. 제 2 사이클은 최초의 두 가닥, 제 1 사이클로부터의 2개의 긴 산물, 원 가닥으로부터 복제된 2개의 새로운 긴 산물, 그리고 긴 산물로부터 복제된 2개의 "짧은 산물"을 제공한다. 짧은 산물은 각 단부에 프라이머를 갖는 표적 서열의 서열을 가진다. 각 추가 사이클에 의해, 추가의 2개의 긴 산물이 생산되고, 앞 사이클의 종료시 남은 긴 산물과 짧은 산물의 수와 동등한 많은 짧은 산물이 생산된다. 따라서, 표적 서열을 함유하는 짧은 산물의 수는 각 사이클에 있어 지수적으로 증가한다. 바람직하게, PCR은 상업적으로 입수가 가능한 열 사이클러, 예를 들어 Perkin Elmer를 가지고 수행된다.

<177> 삭제

<178> RNA는 mRNA를 cDNA로 역전사한 후, 상기 설명된 바의 PCR(RT-PCR)을 수행함으로써 증폭될 수 있다. 대안으로, 미국특허 제5,322,770호에 설명된 대로, 단일 효소가 두 단계 모두에서 사용될 수 있다. 또한, mRNA가 cDNA로 역전사되고, 이어서 Marshall et al.(1994) PCR Meth. App. 4:80-84에 설명된, 비대칭 잭 리가아제 연쇄 반응(RT-AGLCR)이 행해질 수 있다.

<179> TaqMan™ 분석(Perkin-Elmer)으로 알려진 형광성 5' 뉴클레아제 분석이 핵산 표적에 대한 강력한 다목적 PCR-기초 검출 시스템이다. 따라서, 본원에 설명된 파르보바이러스 B19 게놈의 영역으로부터 유래된 프라이머 및 프로브를 TaqMan™ 분석에 사용하여, 생물학적 샘플에서 감염의 존재를 검출할 수 있다. 분석은 열 사이클링과 함께 형광 신호의 발생을 모니터링함으로써 수행된다. 이 분석 시스템에서는 겔 전기영동 분석을 할 필요가 없으며, 정량 데이터를 생성하여 표적 카피 수를 측정할 수 있다.

<180> 형광성 5' 뉴클레아제 분석은, 예를 들어 내인성 5' 뉴클레아제 활성을 갖는 AmpliTaq Gold™ DNA 중합효소를 사용하여, 형광 리포터 염료와 퀴쳐로 표지된 내부 올리고뉴클레오티드 프로브를 효소절단함으로써 편리하게 수행된다(Holland et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) 88:7276-7280; Lee et al., *Nucl. Acids Res.* (1993) 21:3761-3766 참조). 분석 결과는, 증폭 사이클 동안 형광 프로브가 효소절단됨에 따라 발생하는 형광의 변화를 측정하고, 염료와 퀴쳐 표지의 결합을 풀고, 표적 DNA의 증폭에 비례하여 형광 신호의 증가를 일으킴으로써 검출된다.

<181> 증폭 산물은 용액 중에서 또는 고체 지지체를 사용하여 검출될 수 있다. 이런 방법에서는 TaqMan™ 프로브가 원하는 PCR 산물 내의 표적 서열과 혼성화하도록 디자인된다. TaqMan™ 프로브의 5' 단부는 형광 리포터 염료를 함유한다. 프로브의 3' 단부는 프로브 확장을 방지하기 위해 차단되며, 5' 형광단의 형광을 소멸시키는 염료를 함유한다. 연속 증폭 동안, 5' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 중합효소가 반응물에 존재한다면, 5' 형광 표지가 절단된다. 5' 형광단의 절단 결과 검출될 수 있는 형광이 증가된다.

<182> 특히, 올리고뉴클레오티드 프로브는 혼성화되지 않았을 때 프로브가 적어도 하나의 단일-가닥 형태로 존재하도록 구성되며, 이 경우 퀴쳐 분자는 리포터 분자의 형광을 소멸시킬 만큼 리포터 분자에 충분히 가까이 있게 된다. 또한, 올리고뉴클레오티드 프로브는 표적 폴리뉴클레오티드와 혼성화되었을 때, 퀴쳐 분자가 리포터 분자의 형광을 소멸시킬 만큼 충분히 가깝게 위치하지 않도록 하는 적어도 하나의 형태로 존재한다. 이들 혼성화된 형태와 혼성화되지 않은 형태를 채용함으로써, 프로브 상의 리포터 분자 및 퀴쳐 분자는 프로브가 혼성화될 때와 혼성화되지 않을 때 상이한 형광 신호 강도를 나타낸다. 결과적으로, 리포터 분자, 퀴쳐 분자 또는 이들의 조합의 형광 강도의 변화에 기초하여 프로브가 혼성화되었는지 혼성화되지 않았는지 측정하는 것이 가능하다. 게다가, 프로브가 혼성화되지 않았을 때는 퀴쳐 분자가 리포터 분자를 소멸시킬 수 있도록 프로브가 디자인될 수 있기 때문에, 프로브가 혼성화되었는지 효소절단되었는지 관계없이 리포터 분자가 제한된 형광을 나타내도록 프로브가 디자인될 수 있다.

- <183> 따라서, 본 발명은, 5'에서 3'을 향한 뉴클레아제 활성을 갖는 핵산 중합효소, 표적 B19 서열에 혼성화할 수 있는 하나 이상의 프라이머, 및 프라이머에 관하여 표적 B19 서열 3'에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여, 표적 파르보바이러스 B19 뉴클레오티드 서열을 증폭하는 방법에 관한 것이다. 증폭 동안, 중합효소는, 그것이 표적 서열에 혼성화되었을 때 올리고뉴클레오티드 프로브를 효소절단함으로써, 퀀처 분자로부터 리포터 분자를 분리한다. 증폭이 수행됨에 따라, 리포터 분자의 형광이 모니터되는데, 형광은 핵산 증폭의 발생에 상응한다. 리포터 분자는 바람직하게는 플루오레세인 염료이고, 퀀처 분자는 바람직하게는 로다민 염료이다.
- <184> 삭제
- <185> 프라이머 및 프로브의 길이는 변할 수 있으며, 프로브 서열은 프라이머 서열보다 낮은 용융 온도를 가지도록 선택된다. 그러므로, 프라이머 서열은 일반적으로 프로브 서열보다 길다. 전형적으로, 프라이머 서열은 10-75 뉴클레오티드 길이 범위, 더 전형적으로는 20-45의 범위이다. 전형적인 프로브는 10-50 뉴클레오티드 길이 범위, 더 전형적으로는 15-40 뉴클레오티드 길이이다.
- <186> 고체 지지체가 사용되는 경우, 올리고뉴클레오티드 프로브를 다양한 방식으로 고체 지지체에 부착될 수 있다. 예를 들어, 프로브의 3' 또는 5' 말단 뉴클레오티드를 고체 지지체에 부착시킴으로써 프로브가 고체 지지체에 부착될 수 있다. 더 바람직하게, 프로브는 프로브와 고체 지지체를 간격을 두고 떨어뜨리는 링커에 의해 고체 지지체에 부착된다. 링커는 일반적으로 적어도 15-30 원자 길이, 더 바람직하게는 15-50 원자 길이이다. 링커의 필요한 길이는 사용된 특정한 고체 지지체에 의존할 것이다. 예를 들어, 고도로 가교결합된 폴리스티렌이 고체 지지체로 사용될 때는 일반적으로 6개 원자의 링커면 충분하다.
- <187> 올리고뉴클레오티드 프로브를 고체 지지체에 부착하는데 사용될 수 있는 다양한 링커가 당업계에 공지되어 있다. 링커는 표적 서열과 고체 지지체에 부착된 프로브의 혼성화는 유의하게 방해하지 않는 어떤 화합물로 형성될 수 있다. 링커는 자동 합성에 의해 링커 위에 쉽게 부가될 수 있는 호모폴리머 올리고뉴클레오티드로 형성될 수 있다. 대안으로, 기능적 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리머가 링커로서 사용될 수 있다. 그러한 폴리머는 프로브와 표적 올리고뉴클레오티드와 혼성화를 유의하게 방해하지 않기 때문에 호모폴리머 올리고뉴클레오티드보다 바람직하다. 폴리에틸렌 글리콜이 특히 바람직하다.
- <188> 고온의 염기성 조건에서 고체 지지체, 링커, 및 프로브 사이의 결합은 염기 보호기를 제거하는 동안에 절단되지 않는 것이 바람직하다. 바람직한 결합의 예는 카르바메이트 및 아마이드 결합을 포함한다.
- <189> 올리고뉴클레오티드 프로브를 고정하기 위한 고체 지지체의 바람직한 종류의 예는 제어된 공극을 갖는 유리, 유리 플레이트, 폴리스티렌, 아비딘-코팅 폴리스티렌 비드, 셀룰로오스, 나일론, 아크릴아미드 겔 및 활성화 텍스트라를 포함한다.
- <190> TaqMan™ 분석, 거기에 사용되는 시약 및 조건에 대한 상세한 설명은, 예를 들어 Holland et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. (1991) 88:7276-7280; 미국특허 제5,538,848호, 제5,723,591호, 제5,876,930호를 참조한다.
- <191> 또한, 본원에 설명된 파르보바이러스 B19 서열은 전사-매개 증폭(TMA) 분석의 기초로서 사용될 수 있다. TMA는 생물학적 샘플에 매우 소량 존재하는 표적 핵산 서열을 확인하는 방법을 제공한다. 그러한 서열은 직접 분석 방법을 사용하여 검출하기는 어렵거나 불가능할 수 있다. 특히, TMA는 등온 자가촉매 핵산 표적 증폭 시스템으로서, 표적 서열의 10억개 이상의 RNA 카피를 제공할 수 있다. 이 분석은 정성적으로 행해질 수 있으며, 생물학적 샘플에서 표적 서열의 존재 또는 부재를 정확하게 검출한다. 또한, 이 분석은 여러 정도 크기의 농도 범위에 걸쳐 표적 서열의 양을 정량적으로 측정할 수 있다. TMA는 온도, 이온 강도 및 pH와 같은 반응 조건을 반복적 조작 없이도 표적 핵산 서열의 다수 카피를 자가촉매적으로 합성하는 방법을 제공한다.
- <192> 일반적으로, TMA는 다음의
- <193> (a) 파르보바이러스 B19로 감염된 것으로 의심되는 해당 생물학적 샘플로부터 RNA를 함유하여 핵산을 분리하는 단계; 및
- <194> (b) (i) 분리된 핵산,
- <195> (ii) 제 1 및 제 2 올리고뉴클레오티드 프라이머, 여기서 제 1 프라이머는 RNA 표적 서열의 3' 말단 부분에 충분히 상보적인 복합 서열을 가짐으로써, 표적 서열이 존재할 경우(예를 들어 (+) 가닥) 그것과 복합체를

이루고, 제 2 프라이머는 복합체를 이를 만큼 보체(예를 들어, (-) 가닥)의 표적 서열의 3' 말단 부분에 충분히 상보적인 복합 서열을 가지며, 여기서 제 1 올리고뉴클레오티드는 프로모터를 포함하는 복합 서열에 서열 5'를 더 포함하고,

- <196> (iii) 역 전사효소 또는 RNA 및 DNA 의존성 DNA 중합효소,
- <197> (iv) RNA-DNA 복합체의 RNA 가닥을 선택적으로 분해하는 효소 활성(예를 들어, RNase H), 및
- <198> (v) 프로모터를 인식하는 RNA 중합효소
- <199> 를 반응 혼합물로 조합하는 단계
- <200> 를 포함한다.
- <201> 삭제

- <202> 반응 혼합물의 성분들은 단계적으로 또는 한번에 조합될 수 있다. 표적 서열의 다수 카피를 제공하기에 충분한 시간 동안, (리보뉴클레오티드 트리포스페이트 및 디옥시리보뉴클레오티드 트리포스페이트를 포함하는) DNA 시동 및 핵산 합성 조건을 포함하는, 올리고뉴클레오티드/표적 서열이 형성되는 조건에서 반응 혼합물이 인큐베이션된다. 성분 효소와 같은 반응 성분들의 안정성이 유지되는데 적합하고, 증폭 반응의 진행과정 동안 반응 조건을 변경하거나 조작할 필요가 없는 조건에서 반응이 일어나는 것이 유리하다. 따라서, 실질적으로 등온이고, 실질적으로 일정한 이온 강도 및 pH를 포함하는 조건에서 반응이 일어날 수 있다. 이 반응은 편리하게도 제 1 DNA 확장 반응에 의해 생산된 RNA-DNA 복합체를 분리하기 위한 변성 단계를 필요로 하지 않는다.
- <203> 적합한 DNA 중합효소는 역전사효소, 예를 들어 조류 골수아종 바이러스(AMV) 역전사효소(예를 들어, Seikagaku American, Inc로부터 입수가가능함) 및 Moloney 쥐 백혈병 바이러스(MMLV) 역전사효소(Bethesda Research Laboratories로부터 입수가가능함)를 포함한다.
- <204> 프라이머로 통합시키는데 적합한 프로모터 또는 프로모터 서열은, 그 서열을 인식하여 그것에 결합하고, 전사 과정을 개시함으로써 RNA 전사체를 생산하는 RNA 중합효소에 의해 특이적으로 인식되는 핵산 서열(자연발생, 합성생산된 것 또는 제한효소 절단 산물 중 어느 것)이다. 이 서열은 선택적으로 RNA 중합효소의 정확한 제한 자리를 넘어서 확장된 뉴클레오티드 염기를 포함할 수 있는데, 이것은 분해 과정에 안정성 또는 감수성을 추가로 부여하거나, 또는 전사 효능을 추가로 증가시킬 수 있다. 유용한 프로모터의 예는 어떤 박테리오파지 중합효소, 예를 들어 박테리오파지 T3, T7 또는 SP6으로부터 유래한 것들에 의해 인식되는 것들, 또는 *E. coli*로부터의 프로모터를 포함한다. 이들 RNA 중합효소는 New England Biolabs 및 Epicentre와 같은 상업적 출처로부터 쉽게 입수가가능하다.
- <205> 본원의 방법에 사용되는 적합한 역 전사효소 중 일부는, AMV 역 전사효소와 같이 RNase H 활성을 가진다. 그러나, AMV 역 전사효소가 사용되었을 때도 *E.coli* RNase H 같은 외인성 RNase H를 첨가하는 것이 바람직할 수 있다. RNase H는, 예를 들어 Bethesda Research Laboratories로부터 쉽게 입수가가능하다.
- <206> 이들 방법에 의해 생산된 RNA 전사체는 주형으로서 작용하여 상기 설명된 메카니즘을 통해 표적 서열의 추가의 카피를 생산할 수 있다. 이 시스템은 자가촉매적이며, 온도, pH, 이온 강도 등과 같은 반응 조건을 반복적으로 변경하거나 변화시킬 필요 없이 증폭이 자가촉매적으로 일어난다.
- <207> 직접 서열화, 서열-특이적 올리고머와의 혼성화, 겔 전기영동 및 질량분석기를 포함하는, 광범한 방법을 사용하여 검출을 행할 수 있다. 이들 방법은 이중성 또는 동중성 포맷의 동위원소 또는 비-동위원소 표지를 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 표지를 전혀 사용하지 않을 수도 있다.
- <208> 한 바람직한 검출 방법은 상기 설명된 4.7kbp, 700bp, 370bp 및 214bp 단편으로부터 유래된 표적 서열-특이적 올리고뉴클레오티드 프로브의 사용이다. 이 프로브는 혼성화 보호 분석(HPA)에서 사용될 수 있다. 이 구체예에서, 프로브는 매우 화학발광성 분자인 아크리디늄 에스테르(AE)로 공유적으로 표지된다. 예를 들어, Nelson et al.(1995) "Detection of Acridinium Esters by Chemiluminescence" in *Nonisotopic Probing, Blotting and Sequencing*, Kricka L. J. (ed) Academic Press, San Diego, CA; Nelson et al. (1994) "Application of the Hybridization Protection Assay(HPA) to PCR" in *The Polymerase Chain Reaction*, Mullis et al. (eds.) Birkhauser, Boston, MA; Weeks et al., *Clin. Chem.* (1983) 29:1474-1479; Berry et al., *Clin. Chem.*(1983) 29:1474-1479; Berry et al., *Clin. Chem.*(1988) 34:2087-2090 참조. 하나의 AE 분자가 비-뉴클레오티드-기초

링커 암 화학을 사용하여 프로브에 직접 부착되며, 이것은 프로브 내의 어떤 장소에도 표지가 배치되도록 허용한다. 예를 들어, 미국 특허 제5,585,481호 및 제5,185,439호 참조. 화학발광은 알칼리성 과산화수소와의 반응에 의해 개시되는데, N-메틸 아크리돈이 여기되고, 그 다음 광자가 방출되면서 바닥 상태로 떨어진다. 추가로, AE는 에스테르 가수분해를 일으켜 비-화학발광성 메틸 아크리디늄 카르복실산을 제공한다.

<209> 삭제

<210> 삭제

<211> 삭제

<212> 삭제

<213> AE 분자가 핵산 프로브에 공유 부착될 때, 약한 알칼리성 조건에서는 가수분해가 빨라진다. AE-표지된 프로브가 표적 핵산 서열에 정확히 상보할 때는, AE 가수분해의 속도가 대단히 감소된다. 따라서, 혼성화된 AE-표지된 프로브와 혼성화되지 않은 프로브가 물리적으로 분리할 필요 없이 용액 중에서 직접 검출될 수 있다.

<214> HPA는 일반적으로 다음 단계로 구성된다: (a) AE-표지된 프로브가 약 15 내지 약 30분 동안 용액 중에서 표적 핵산과 혼성화된다. 다음에, 약한 알칼리성 용액이 첨가되고, 혼성화되지 않은 프로브와 결합된 AE가 가수분해된다. 이 반응은 약 5 내지 10분 걸린다. 남은 혼성체-결합 AE가 존재하는 표적의 양을 측정함으로써 검출된다. 이 단계는 약 2 내지 5초 걸린다. 바람직하게, 차등 가수분해 단계는 혼성화 단계와 동일한 온도, 전형적으로 50 내지 70°C에서 수행된다. 또는 달리, 두 번째 차등 가수분해 단계가 실온에서 수행된다. 이것은 사용된 pH를, 예를 들어 10-11의 범위로 상승시키며, 이것은 혼성화된 AE-표지된 프로브와 혼성화되지 않은 프로브 간 가수분해 속도의 차이를 더 크게 한다. HPA는, 예를 들어 미국특허 제6,004,745호; 제5,948,899호; 및 제5,283,174호에 상세히 설명된다.

<215> TMA는, 예를 들어 미국특허 제5,399,491호에 자세하게 설명되어 있다. 전형적인 분석에 대한 한 예에서, 파르보 바이러스 B19 표적 서열을 함유하는 것으로 의심되는 분리된 핵산 샘플이 완충제, 염, 마그네슘, 뉴클레오티드 트리포스페이트, 프라이머, 디티올트레이톨, 및 스퍼미딘을 함유하는 완충 농축물과 혼합된다. 반응은 선택적으로 약 2분 동안 약 100°C에서 인큐베이션되며, 이로써 어떤 2차 구조가 변성된다. 실온으로 냉각한 후, 역전사효소, RNA 중합효소, 및 RNase H를 첨가하고, 혼합물을 37°C에서 2 내지 4시간 동안 인큐베이션한다. 다음에, 생성물을 변성시키고, 프로브 용액을 첨가하고, 60°C에서 20분 동안 인큐베이션하고, 혼성화되지 않은 프로브를 선택적으로 가수분해하는 용액을 첨가하고, 반응물을 60°C에서 6분 동안 인큐베이션하고, 발광분석기에서 잔류한 화학발광을 측정함으로써 반응물이 분석될 수 있다.

<216> 삭제

<217> 또한, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 분자는 핵산 서열-기초 증폭(NASBA)에서 사용될 수 있다. 이 방법은 특정 핵산의 시험관내 연속, 균질 및 등온 증폭을 유도하여 핵산의 RNA 카피를 제공하는 프로모터-관련 효소 과정이다. NASBA를 수행하기 위한 시약은 프로모터를 포함하는 5' 미부를 갖는 제 1 DNA 프라이머, 제 2 DNA 프라이머, 역전사효소, RNase-H, T7 RNA 중합효소, NTP's 및 dNTP's를 포함한다. NASBA를 이용하여, 단일-가닥 RNA 또는 DNA, 또는 이중-가닥 DNA로부터 다량의 단일-가닥 RNA가 생성된다. RNA가 증폭될 때는 ssRNA가 주형으로 작용하여 RNA 중합효소 인식 부위를 함유하는 제 1 프라이머의 신장에 의해 제 1 DNA 가닥이 합성된다. 이 DNA 가닥은 이어서 제 2 프라이머의 신장에 의한 제 2 상보성 DNA 가닥의 합성을 위한 주형으로서 작용하며, 그 결과 이중-가닥 활성 RNA-중합효소 프로모터 부위가 생기고, 이 제 2 DNA 가닥이 주형으로 작용하여 RNA 중합효소의 도움을 받아 제 1 주형인 ssRNA가 다량 합성된다. NASBA 기술은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 유럽 특허 329,822, 국제특허출원 제W091/02814호, 미국특허 제6,063,603호, 제5,554,517호, 및 제5,409,818호에 설명된다.

<218> 또한, 본원에 설명된 파르보바이러스 B19 서열은 분기 DNA 분자를 이용하는 핵산 혼성화 및 증폭 기술에서 유용하다. 기초적인 핵산 혼성화 분석에서, 단일-가닥 분석물질 핵산이 표지된 단일-가닥 핵산 프로브에 혼성화되고, 생성된 표지된 듀플렉스가 검출된다. 외부 물질과 검출될 듀플렉스의 분리를 용이하게 하고, 및/또는 검출되는 신호를 증폭하기 위해서 기초적 계획안의 변형이 개발되었다. 신호를 증폭하는 한 방법은, 분석물질 핵산 또는 분석물질에 결합된 핵산의 가닥에 특이적으로 혼성화하는 제 1 세그먼트 및 표지된 프로브에 특이적으로 혼성화하는 제 2 세그먼트의 반복부를 갖는 폴리뉴클레오티드인 증폭 멀티머를 사용한다. 증폭은 이론적으로 제 2 세그먼트의 반복부의 수에 비례한다. 멀티머는 선형일 수도 분기형일 수도 있다. 분기형 멀티머의 두 일반적인 종류인 포크형 및 빗형이 이들 기술에서 유용하다. 분기형 핵산 분자를 제조하고 이용하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 미국특허 제5,849,481호에 설명된다.

<219> 삭제

<220> 본 발명의 다른 양태에서, 상기 설명된 시험 중 둘 이상이 유기체가 존재하는지를 확인하기 위해서 수행된다. 예를 들어, 제 1 시험에서 검출을 위해 핵산을 증폭하기 위해 전사-매개 증폭(TMA)이 사용되었다면, 다른 핵산 시험(NAT) 분석이, 예를 들어 본원에 설명된 PCR 증폭, RT PCR 등을 사용하여 수행된다. 따라서, 샘플이 예를 들어 HIV, 및 B형 간염 바이러스와 같은 다른 유기체를 함유할 때도 파르보바이러스 B19가 특이적으로 그리고 선택적으로 검출될 수 있다.

<221> 당연히 명백한 바와 같이, 본원에 설명된 분석의 디자인은 많이 변화될 수 있으며, 많은 포맷이 당업계에 공지되어 있다. 상기 설명된 단순히 지침으로서 제공된 것이고, 당업자는 설명된 프로토콜을 당업계에 잘 공지된 기술을 이용하여 쉽게 변형할 수 있다.

<222> 상기 설명된 분석을 수행하기 위해서, 프라이머, 프로브, 프로브가 결합되는 고체 지지체를 포함하는 상기 설명된 분석 시약뿐만 아니라 다른 검출 시약이 적합한 설명서 및 다른 필요한 시약과 함께 키트로 제공될 수 있다. 키트는 일반적으로 프라이머와 프로브의 조합(고체 매트릭스에 이미 결합되어 있거나, 분리되어 있다면 매트릭스에 이들을 결합시키기 위한 시약과 함께 있다), 대조표준 제제(양성 및/또는 음성), 분석 포맷이 같은 것을 필요로 할 때는 표지된 시약들, 그리고 표지가 신호를 직접 생성하지 않는다면 신호발생 시약(예를 들어, 효소 기질)을 분리된 용기들에 함유할 것이다. 분석을 수행하기 위한 설명서(예를 들어, 서면, 테이프, VCR, CD-ROM 등)가 일반적으로 키트에 포함될 것이다. 또한, 키트는 사용되는 특정 분석에 의존하여 다른 패키징된 시약 및 재료들(즉, 세척 완충액 등)을 함유할 수 있다. 상기 설명된 것과 같은 표준 분석이 이들 키트를 사용하여 수행될 수 있다.

<223> III. 실험

<224> 아래는 본 발명을 수행하기 위한 특정 구체예의 실시예들이다. 이 실시예는 예시의 목적으로만 제공되고, 본 발명의 범위를 어떤 식으로도 제한하지 않는다.

<225> 사용된 수(양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 확보하기 위해 노력했지만, 어떤 실험 오차와 편차는 물론 허용되어야 한다.

<226> 다음의 실시예에서 효소는 상업적 출처로부터 구입했으며, 제조자의 지침에 따라서 사용했다. 니트로셀룰로오스 필터 등도 상업적 출처로부터 구입했다.

<227> 주지된 것을 제외하고, DNA 단편의 분리시 모든 DNA 조작은 표준 과정에 따라서 행했다. Sambrook et al., *supra* 참조. 제한효소, T4 DNA 리가아제, *E.coli* DNA 중합효소 I, Klenow 단편, 및 다른 생물학적 시약들은 상업적 공급자로부터 구입할 수 있으며, 제조자의 지침에 따라 사용할 수 있다. 이중-가닥 DNA 단편은 아가로스 겔 상에서 분리했다.

실시예

<228> 실시예 1

<229> PCR을 위한 파르보바이러스 B19 핵산 추출

<230> IgM 또는 PCR 시험에 의해 미리 시험한 사람 파르보바이러스 B19에 대해 양성인 사람 혈청 샘플을 상업적 출처로부터 구입하여, 후속 PCR 실험을 위해 DNA를 분리하는데 사용했다. 사용될 때까지 샘플을 -80°C에 저장했다.

<231> 다음의 주의사항이 적혀진 제조자의 명세서에 따라 QIAamp DNA 혈액 미니 키트(QIAGEN, Valencia, CA)를 사용하여 혈청 0.2mL로부터 DNA를 추출했다. 캐리어 DNA를 세포용해 완충액에 첨가하여 핵산 결합 및 수율을 증진시켰다. 특히, 샘플 당 5.6μg의 양으로 폴리-아데닐산 5'(Sigma, St. Louis, MO) 또는 폴리-dA(Roche, Indianapolis, IN)을 첨가했다. 추가로, 파르보바이러스 B19 DNA를 물 대신 완충 AE 200μL으로 용출했다.

<232> 삭제

<233> 삭제

<234> 실시예 2

<235> PCR에 의한 파르보바이러스 B19 핵산-양성 샘플을 검출

<236> 두 상이한 PCR 과정을 사용하여 파르보바이러스 B19 단편을 증폭했다. 한 방법이 아래 상세히 설명되는데, 이것을 사용하여 약 700bp, 370bp 및 214bp의 단편을 증폭했다(도 1 참조). 고 충실도 확장 PCR(Roche)을 사용하여 약 4.7kb의 단편을 증폭했다. 약 700 bp의 단편이 Shade et al., *J. Virol.*(1986) 58:921-936에 설명된 파르보바이러스 B19 게놈의 뉴클레오티드 위치 2936-3635에 상응한다. 약 370bp는 뉴클레오티드 위치 3073-3442에서 700bp 단편 내에서 발생한다. 약 4.7kb 단편은 Shade et al., *J. Virol.*(1986) 58:921-936의 뉴클레오티드 위치 217-4893에 상응하는 4677 뉴클레오티드 단편이다.

<237> 삭제

<238> 약 700bp, 370bp 및 214bp의 B19 단편을 증폭하기 위해서, 표 1에 나타난 프라이머를 사용했다.

표 1

프라이머 역역	서열	PCR 산물	게놈
VP-5	AGGAAGTTTGCCGGAAGTTC (SEQ ID NO:36)	370 bp	VP1
VP-3	GTGCTGAAACTCTAAAGGTG (SEQ ID NO:37)	370bp	VP1
VP2-5	GACATGGATATGAAAAGCCTGAAG (SEQ ID NO:38)	214 bp	VP1/VP2
VP2-3	GTTGTTTCATATCTGGTTAAGTACT (SEQ ID NO:39)	214 bp	VP1/VP2
K-1sp	ATAAATCCATATACTCATT (SEQ ID NO:40)	700 bp	VP1/VP2
K-2sp	CTAAAGTATCCTGACCTTG (SEQ ID NO:41)	700 bp	VP1/VP2

<239>

<240> 이 실험을 위해, 정제된 파르보바이러스 DNA(상기 설명된 대로 정제된) 2μL, 각 디옥시뉴클레오티드 트리포스페이트 0.2mM 및 Pfu DNA 중합효소(Stratagene, La Jolla, CA) 1.25유닛을 사용하여 최종 부피 100μL로 PCR을 수행한다. 증폭 프로파일은 94°C에서 2분 변성, 37°C에서 3분 프라이머 어닐링, 그리고 72°C에서 3분 확장을 포함했고, 35 사이클을 행했다. 35 PCR 사이클의 전후에 각각, 94°C에서 3분 예비-인큐베이션하여 초기 변성을 확실히 하고, 72°C에서 마지막 7분 인큐베이션하여 단편의 충분한 확장을 확실히 한다. PCR 산물을 7% 폴리아크릴아미드 겔 상에서 전기영동하고 에티듐 브로마이드로 염색한 후, UV 광원 아래서 가시화했다. 증폭된 단편의 정제는 QiaQuick PCR 정제 키트(QIAGEN)를 사용하여 수행했다.

<241> 삭제

- <242> 700bp 밴드가 폴리아크릴아미드 겔 상에 보이지 않았을 때는 네스티드 PCR을 수행하여 370bp B19 단편을 증폭했다. 표 1에 나타난 프라이머를 사용한 네스티드 PCT에는 700bp DNA 물질을 사용했다.
- 다음과 같이, 고 충실도 확장 PCR(Roche)을 사용하여 4.7kb의 파르보바이러스 B19 단편을 증폭했다. 판매자의 추천에 따라, 고 충실도 확장 PCR 키트(Roche) 및 프라이머 Hicks-5(5'CCCGCCTTATGCAAAATGGGCAG3')(SEQ ID NO:42) 및 Hicks-3(5'TT GTGTTAGGCTGTCTTATAGG3')(SEQ ID NO:43)을 사용했다. 증폭 조건은 94℃ 1분, 50℃ 2분, 그리고 68℃ 4분이며, 35 또는 45 사이클을 행했다. 또한, 94℃에서 2분 예비-인큐베이션과 75℃에서 7분 사후 인큐베이션이 포함되었다. PCR 산물을 1% 아가로스 겔 상에서 분리했고, PCR 정제 키트(Promega, Madison, WI)를 사용하여 정제했다.
- <243> 삭제
- <244> 삭제
- <245> 삭제
- <246> 실시예 3
- <247> 파르보바이러스 B19 DNA 단편의 클로닝
- <248> PCR 단편을 TOPO-TA 벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA)로 클로닝했다. 이 벡터로의 클로닝은 증폭된 DNA가 그것의 3' 단부에 1개의 디옥시아데노신(A)을 함유할 때 매우 촉진된다. 따라서, 3'(A) 오버헤드를 첨가하기 위한 촉매 반응을 사용했다. 반응 혼합물은 dATP 1.25mM, Taq 중합효소(Perkin Elmer, Boston, MA) 0.5유닛을 함유했고, 72℃에서 15분 동안 진행하였다.
- <249> 삭제
- <250> 제조자의 명세서에 따라 Invitrogen의 TA 클로닝 키트(원 숫 톱 10 일렉트로컴페턴트 세포를 갖는 TOPO™ TA CloningR 키트)를 PCR 단편을 pCR2.1-TOPO 벡터로 클로닝했다. 37℃에서 압피실린 100µg/mL, 0.66mM IPTG 및 0.033% X-Gal을 함유하는 Luria Broth 플레이트 상에서 세균 세포를 인큐베이션했다. Luria Broth 압피실린(100µg/mL) 4mL에 많은 수의 흰색 콜로니를 접종하고, 셰이킹하면서 37℃에서 하룻밤 인큐베이션했다. QIAprep 미니프랩 키트(QIAGEN)를 사용하여 하룻밤 배양한 배양물 3mL로 플라스미드 DNA를 제조했다. 재조합 클론을 EcoRI(New England and Biolabs) 및 상기 설명된 7% 폴리아크릴아미드 또는 1% 아가로스 겔 전기영동을 사용하여 제한효소 분석에 의해 확인했다.
- <251> 클론의 DNA 서열을 결정하기 위해서, 재조합 클론으로부터 다량의 플라스미드를 상기와 같이 제조하고, 이 DNA를 TE(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA) 중에 2mg/mL로 현탁했다. Applied Biosystems 모델 373(또는 모델 377) DNA 서열화 시스템을 사용하여 파르보바이러스 B19 단편의 뉴클레오티드 서열 결정을 수행했다.
- <252> 삭제
- <253> 도 2A 내지 2U는 상기 설명된 대로 정제, 증폭 및 서열화된 21개 파르보바이러스 B19 분리주로부터의 DNA 서열을 나타내며, 이들은 Shade et al., *J. Virool.* (1986) 58:921-936에 설명된 파르보바이러스 B19 계통의 뉴클레오티드 위치 2936-3635에 상응한다(도 1로부터 상기 설명된 700bp 단편). 도 2A(SEQ ID NO:1)는 분리주 CH47-26로부터 서열; 도 2B(SEQ ID NO:2)는 분리주 CH48-29로부터의 서열; 도 2C(SEQ ID NO:3)는 분리주 CH33-2로부터의 서열; 도 2D(SEQ ID NO:4)는 분리주 CH 33-3로부터의 서열; 도 2E(SEQ ID NO:5)는 분리주 CH33-4로부터의 서열; 도 2F(SEQ ID NO:6)는 분리주 CH42-7로부터의 서열; 도 2G(SEQ ID NO:7)는 분리주 CH42-18로부터의 서열; 도 2H(SEQ ID NO:8)는 분리주 CH42-19로부터의 서열; 도 2I(SEQ ID NO:9)는 분리주 CH46-23로부터의 서열; 도 2J(SEQ ID NO:10)는 분리주 CH1-1로부터의 서열; 도 2K(SEQ ID NO:11)는 분리주 CH1-6로부터의 서열; 도 2L(SEQ ID NO:12)는 분리주 CH2-8로부터의 서열; 도 2M(SEQ ID NO:13)는 분리주 CH2-10로부터의 서열; 도

2N(SEQ ID NO:14)는 분리주 CH2-11C로부터의 서열; 도 20(SEQ ID NO:15)는 분리주 CH5-13로부터의 서열; 도 2P(SEQ ID NO:16)는 분리주 CH7-22로부터의 서열; 도 2Q(SEQ ID NO:17)는 분리주 CH13-27로부터의 서열; 도 2R(SEQ ID NO:18)는 분리주 CH14-33로부터의 서열; 도 2S(SEQ ID NO:19)는 분리주 CH62-2로부터의 서열; 도 2T(SEQ ID NO:20)는 분리주 CH64-2로부터의 서열; 도 2U(SEQ ID NO:21)는 분리주 CH67-2로부터의 서열이다.

<254> 도 11A 내지 11Z(SEQ ID NO:62-87)는 상기 설명된 대로 정제, 증폭 및 서열화된 추가 26개 파르보바이러스 B19 분리주로부터의 DNA 서열을 나타내며, 이들은 Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936에 설명된 파르보바이러스 B19 게놈의 뉴클레오티드 위치 2936-3635에 상응한다(도 1로부터의 상기 설명된 700bp 단편). 도 11A(SEQ ID NO:62)는 분리주 CH80-1로부터의 서열; 도 11B(SEQ ID NO:63)는 분리주 CH81-3로부터의 서열; 도 11C(SEQ ID NO:64)는 분리주 B19SCL1-4로부터의 서열; 도 11D(SEQ ID NO:65)는 분리주 B19SCL2-1로부터의 서열; 도 11E(SEQ ID NO:66)는 분리주 B19SCL3-1로부터의 서열; 도 11F(SEQ ID NO:67)는 분리주 B19SCL4-3로부터의 서열; 도 11G(SEQ ID NO:68)는 분리주 B19SCL5-2로부터의 서열; 도 11H(SEQ ID NO:69)는 분리주 B19SCL6-2로부터의 서열; 도 11I(SEQ ID NO:70)는 분리주 B19SCL7-3로부터의 서열; 도 11J(SEQ ID NO:71)는 분리주 B19SCL8-2로부터의 서열; 도 11K (SEQ ID NO:72)는 분리주 B19SCL9-1로부터의 서열; 도 11L(SEQ ID NO:73)는 분리주 B19SCL9-9로부터의 서열; 도 11M(SEQ ID NO:74)는 분리주 B19SCL10-2로부터의 서열; 도 11N(SEQ ID NO:75)는 분리주 B19SCL11-1로부터의 서열; 도 11O(SEQ ID NO:76)는 분리주 B19SCL12-1로부터의 서열; 도 11P(SEQ ID NO:77)는 분리주 B19SCL13-3로부터의 서열; 도 11Q(SEQ ID NO:78)는 분리주 B19SCL14-1로부터의 서열; 도 11R(SEQ ID NO:79)는 분리주 B19SCL15-3로부터의 서열; 도 11S(SEQ ID NO:80)는 분리주 B19SCL 16-2로부터의 서열; 도 11T(SEQ ID NO:81)는 분리주 B19SCL17-1로부터의 서열; 도 11U(SEQ ID NO:82)는 분리주 B19SCL18-1로부터의 서열; 도 11V(SEQ ID NO:83)는 분리주 B19SCL19-1로부터의 서열; 도 11W(SEQ ID NO:84)는 분리주 B19SCL20-3로부터의 서열; 도 11X(SEQ ID NO:85)는 분리주 B19SCL21-3로부터의 서열; 도 11Y(SEQ ID NO:86)는 분리주 B19SCL22-11로부터의 서열; 도 11Z(SEQ ID NO:87)는 분리주 B19SCL 2-14로부터의 서열이다.

<255> 삭제

<256> 삭제

<257> 삭제

<258> 삭제

<259> 서열 비교에 의해 여러 분리주들 사이에서 이 700bp 서열의 상동성은 약 98% 내지 99.5%인 것으로 밝혀졌다.

<260> 도 3A 내지 3C(SEQ ID NO:22)는 파르보바이러스 B19 클론 2-B1로부터 유래한 도 1에 나타내고 상기 설명한 약 4.7kbp PCR 단편의 서열을 나타낸다. 이 도면에 묘사된 서열은 Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936에 설명된 뉴클레오티드 위치 217-4893에 상응하는 4677 뉴클레오티드 단편이다. 나타낸 서열은 NS1, VP1 및 VP2를 암호화하는 파르보바이러스 B19 전장 오픈 리딩 프레임과, 추가로 5' 및 3' 미번역 서열을 함유한다. 서열화된 단편은 Shade et al., *J. Virol.*(1986) 58: 921-936에 의해 보고된 B19 서열의 뉴클레오티드 위치 367과 368 사이의 5' 비-암호화 영역에 추가의 뉴클레오티드를 함유했다.

<261> 삭제

<262> 도 4A 내지 도 4C(SEQ ID NO:23)는 파르보바이러스 B19 클론 2-B6로부터 유래한 도 1에 나타낸 약 4.7kbp PCR 단편의 서열을 나타낸다. 이 서열은 Shade et al., *J. Virol.*(1986) 58:921-936의 뉴클레오티드 위치 217-4893에 상응하는 4677 뉴클레오티드 단편이다. 묘사된 서열은 NS1, VP1 및 VP2를 암호화하는 파르보바이러스 B19 전장 오픈 리딩 프레임과, 추가로 5' 및 3' 미번역 서열을 함유한다. 서열화된 단편은 Shade et al., *J. Virol.*(1986) 58:921-936에 의해 보고된 B19 서열의 뉴클레오티드 위치 367과 368 사이의 5' 비-암호화 영역에 추가의 뉴클레오티드를 함유했다.

- <263> 삭제
- <264> 삭제
- <265> 실시예 4
- <266> 파르보바이러스 B19 NS1, VP1 및 VP2 재조합 단백질의 클로닝 및 발현
- <267> NS1, VP1 및 VP2를 암호화하는 단편(도 1 참조)을 pCR2.1-TOPO(상기 설명된)로 클로닝된 파르보바이러스 B19의 4.7kb 단편을 이용해 증폭했다. 특히, PCR 프라이머(아래 참조)는 파르보바이러스 B19의 NS1, VP1 및 VP2 영역 밖에서 PCR을 하도록 디자인되었다. 이들 영역의 효모 발현 벡터로의 클로닝을 촉진하기 위해서, 필요에 따라 프라이머에 *Xba*I, *Hind*III 및 *Sal*I 제한 부위를 도입했다.
- <268> 삭제
- <269> NS1, VP1 및 VP2 재조합 단백질의 효모 발현을 위해 파르보바이러스 B19 단편을 클로닝하고 증폭하기 위해서 사용된 프라이머는 상기 얻어진 서열에 기초했으며, 다음과 같다:
- NS1-5 (센스 프라이머)
 5'ATACTCTCTAGACAAAACAAAATGGAGCTATTTAGAGGGGTGCTTCAAGTTTCT3'
 (SEQ ID NO:44)
- NS1-3 (안티센스 프라이머)
 5'GAGTATGTCGACTTACTCATAATCTACAAAGCTTTGCAATCCAGACAG3' (SEQ ID NO:45)
- VP1-5SN (센스 프라이머)
 5'ATACTCAAGCTTACAAAACAAAATGAGTAAAGAAAAGTGGCAAATGGTGGGAAAAGT3'
 (SEQ ID NO:46)
- VPALL-3 (안티센스 프라이머)
 5'GAGTATGTCGACTTACAATGGGTGCACACGGCTTTGGCTGTCCACAATTC3' (SEQ ID NO:47)
- VP2-5SN (센스 프라이머)
 5'ATACTCAAGCTTACAAAACAAAATGACTTCAGTTAATTCTGCAGAAGCCAGCACT3'
 (SEQ ID NO:48)
- <270>
- <271> 삭제
- <272> PCR 프라이머를 합성하고 정제하고 300 μ l의 dH₂O에 현탁한 다음, 260nm에서 광학 밀도를 측정했다. 반응 혼합물은 최종 부피 50 μ l에 주형 0.25ng, 각 프라이머 100pmol, 1.25mM의 각 dNTP 10 μ l, 및 Taq 중합효소(Perkin Elmer, Boston, MA) 1유닛을 함유했다. 증폭 조건은 94 $^{\circ}$ C 1분, 50 $^{\circ}$ C 2분, 그리고 68 $^{\circ}$ C 4분이며, 35 사이클을 행했다. 75 $^{\circ}$ C에서 7분 사후-인큐베이션하는 것을 추가하여 단편의 충분한 확장을 확실히 했다. 5 μ l 알리쿼트를 사용하여 1% 아가로스 겔 상에서 전기영동에 의해 PCR 합성을 체크했다. 다음에, 전체 PCR 산물을 전기영동했고, 판매자의 추천에 따라서 PCR 정제 키트(Promega)를 사용하여, 예상된 크기를 나타낸 단편을 겔로부터 정제했다. 정제된 PCR DNA 약 0.8 μ g을 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 적절한 제한효소(Roche)로 효소절단하고, 그 산물을 Promega PCR 정제 키트를 사용하여 더 정제했다.
- <273> 파르보바이러스 B19 재조합 단백질의 이종성 발현을 위해 플라스미드 pBS24. 1을 사용했다. 이 효모 발현 벡터는, 효모에서의 자발적인 복제를 위한 2 μ 서열 및 역순 반복부(IR), 전사 종결을 확실히 하기 위한 α -인자 종결인자, 선택을 위한 효모 *leu2-d* 및 URA3를 함유한다. 또한, 복제의 ColE1 기원과 β -락타마제 유전자가 *E. coli*에서의 증식 및 선택을 위해서 존재한다(Pichuanes et al. (1996) "Expression of Heterologous Gene Products in Yeast." In: Protein Engineering: A Guide to Design and Production, Chapter 5. J.L. Cleland

and C. Craik, eds., Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y. pp.129-161). 판매자에 의해 추천된 조건에서, 플라스미드 pBS24.1을 *Bam*HI/*Sa*II로 효소절단하고, 10유닛의 소 내장 알칼리성 포스포타제(Boheringer Mannheim, Indianapolis, IN)로 탈인산화했다. 효소절단되고 정제된 PCR 단편을 *Bam*HI/*Sa*II 효소절단된 pBS24.1 및 클론될 PCR 단편에 존재하는 제한 부위에 따라서, *Bam*HI/*Sfu*I 또는 *Bam*HI/*Hind*III로 효소절단된 효모 혼성체 프로모터 ADH2/GAPDH(Cousens et al., Gene (1987) 61:265-275)를 함유하는 DNA 단편과 혼합했다. 다음에, 리게이션 혼합물을 사용하여 *E. coli* HB101 컴페턴트 세포를 형질전환하고, 37°C에서 하룻밤 배양한 후 100µg/mL로 암피실린을 함유하는 Luria Broth 플레이트에서 형질전환체를 선택했다. 각 형질전환의 몇몇 콜로니를 채집하여 100 µg/mL로 암피실린을 갖는 Luria Broth 3mL 중에 접종하고 37°C에서 셰이킹하면서 하룻밤 인큐베이션했다.

<274> 삭제

<275> 삭제

<276> 삭제

<277> 배양물 1.5mL 및 QIAprep 미니프랩 키트(QIAGEN)를 사용하여 플라스미드 DNA를 제조했다. *Bam*HI/*Sa*II를 사용한 분석적 제한효소 분석에 의하여 재조합 클론을 확인했다. 재조합 플라스미드의 대규모 체제를 만들어 서열화를 수행하여 클로닝된 파르보바이러스 B19 단편의 뉴클레오티드 서열을 확인했다.

<278> 다음과 같이, NS1, VP1 및 VP2에 대한 예상 서열을 나타내는 효모 발현 플라스미드를 효모 형질전환에 사용했다. 컴페턴트 *Saccharomyces cerevisiae* AD3 세포[*Mat a*, *trp1+*, *ura3-52*, *prb1-1122*, *pep4-3*, *prc1-407*, [*cir*⁰], ::*pDM15(pGAP/ADR 1::G418^R)*], *leu2(ΔAD)*]를 상기 설명된 대로 클로닝된 NS1, VP1 및 VP2을 암호화한 플라스미드 DNA로 형질전환했다. 48 내지 72시간 동안 30°C에서 인큐베이션한 후, 2 라운드의 우라실-결핍 플레이트, 이어서 1 라운드의 류신-결핍 플레이트에 의해 효모 재조합의 선택을 달성했다. 다음에, 배양물을 류신-결핍 배지에서 성장시킨 다음, 2% 글루코오스로 보충된 YEP(Pichuanes et al., Proteins: Struct. Funct. Genet. (1989) 6:324-337)에서 48시간 성장시킨 후, 재조합 단백질의 발현을 체크했다.

<279> 삭제

<280> 삭제

<281> 2개의 상이한 분리주로부터의 다양한 단백질에 대한 서열을 도 5 내지 10에 나타낸다. 특히, 도 5A(SEQ ID NO:24) 및 도 5B(SEQ ID NO:25)는 파르보바이러스 B19 클론 2-B1으로부터의 NS1 뉴클레오티드 및 단백질 서열을 각각 나타낸다. 도 6A(SEQ ID NO:26) 및 도 6B(SEQ ID NO:27)는 파르보바이러스 B19 클론 2-B1으로부터의 VP1 뉴클레오티드 및 단백질 서열을 각각 나타낸다. 도 7A(SEQ ID NO:28) 및 도 7B(SEQ ID NO:29)는 파르보바이러스 B19 클론 2-B1로부터의 VP2 뉴클레오티드 및 단백질 서열을 각각 도시한다. 도 8A(SEQ ID NO:30) 및 도 8B(SEQ ID NO:31)는 파르보바이러스 B19 클론 2-B6으로부터의 NS1 뉴클레오티드 및 단백질 서열을 각각 나타낸다. 도 9A(SEQ ID NO:32) 및 도 9B(SEQ ID NO:33)는 파르보바이러스 B19 클론 2-B6으로부터의 VP1 뉴클레오티드 및 단백질 서열을 각각 나타낸다. 도 10A (SEQ ID NO:34) 및 도 10B(SEQ ID NO:35)는 파르보바이러스 B19 클론 2-B6으로부터의 VP2 뉴클레오티드 및 단백질 서열을 각각 나타낸다.

<282> 삭제

<283> 실시예 5

<284> TaqMan™에 의한 파르보바이러스 B19 DNA의 검출 및 정량

- <285> 삭제
- <286> 파르보바이러스 B19 감염을 검출하기 위한 민감한 진단 방법을 다음과 같이 디자인하였다. 특히, TaqMan™ PCR 기술을 사용하여 파르보바이러스 B19 DNA를 검출하고 정량했다. 정량적 PCR은 핵산의 효과적인 추출을 필요로 한다. DNA 추출에 사용되는 혈장/혈청의 부피가 또한 검출의 민감도에 영향을 미친다. 두 접근법을 사용하여 혈장/혈청 0.5mL로부터 핵산을 분리했다. 특히, (a) 실리카와 결합; 및 (b) 표적-특이적 올리고뉴클레오티드에 대한 어닐링에 의해 DNA를 추출했다.
- <287> 삭제
- <288> 삭제
- <289> (a) 실리카와의 결합에 의한 핵산의 분리
- <290> 구아니디늄 이소티오시아네이트와 같은 고 농도의 카오트로픽 염의 존재하에서 핵산은 실리카에 결합한다. 작은 크기의 핵산은 산성 pH 조건에서 실리카에 더 효과적으로 결합한다. 결합된 핵산은 고온에서 저염, 알칼리성 pH 완충액 중에 효과적으로 용출된다. 규칙적인 실리카를 자화된 실리카로 치환하는 것이 핵산 분리의 세척 및 용출 단계를 촉진한다. 자성 염기를 사용하여 핵산-결합 실리카 입자를 포착함으로써, 규칙적인 실리카 입자를 침전시키기 위해 필요한 원심분리 과정이 제거된다. 사용된 세포용해 완충액은 Organon-Teknika(Durham, NC)로부터 입수했다. 이 세포용해 완충액은 단백질을 용해하고 RNase와 DNase를 불활성화시키는 구아니디늄 이소티오시아네이트를 함유한다. 세제 Triton X-100은 세포 구조와 핵 단백질의 가용화 및 분해 과정을 더 촉진하며, 이로써 핵산이 방출된다. 핵산 결합을 증진시키기 위해서 세포용해 시약을 산성화하며, 알칼리성 용출 완충액 50μl을 사용하여 결합된 핵산을 용출했다. 핵산 분리 후, 아래 설명된 대로 TaqMan™ PCR을 수행하여 파르보바이러스 DNA의 존재를 측정했다.
- <291> 삭제
- <292> 삭제
- <293> 삭제
- <294> (b) 표적-특이적 올리고뉴클레오티드에 대한 어닐링에 의한 핵산 분리
- <295> 자화된 실리카의 사용은 세척 및 용출 단계 동안 빠르고 손쉬운 취급을 촉진하지만, 핵산의 분리는 여전히 힘들고 시간 소모적이다. 따라서, 자성 비드를 사용하여 혈장 또는 혈청으로부터 특이적 핵산 표적을 1-단계 포착하는 것을 사용했다. 이것을 광범한 바이러스 핵산 포착 시험에 이용할 수 있게 하기 위해서, 올리고 dT와 결합된 일반적인 자성 비드를 사용했다. 14량체의 올리고 dT 길이를 갖는 Sera-Mag 자성 올리고 (dT) 비드 (Seradyn, Indianapolis, IN)를 사용된 파르보바이러스-특이적 서열에 인접한 3'-단부에 20개 폴리 A를 함유하는 포착 올리고뉴클레오티드와 함께 사용했다(하기 특정된 서열의 끝에 나타냄).
- <296> 삭제

<297> 사용된 안티센스 포착 올리고뉴클레오티드는 700bp 단편으로부터 유래되었으며, 다음과 같다:

VSPC1 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAAATCCTTAACAGCAATTTCTGATA (nt 3492-3514) (*)
(SEQ ID NO:49)

VSPC2 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCCCTGTAGTGCTGTCAG (nt 3549-3568)
(SEQ ID NO:50)

VSPC3 - AAAAAAAAAAAAAAAAAATATACCCAATAGGAAGTTCTG (nt 3639-3660)
(SEQ ID NO:51)

VSPC4 - AAAAAAAAAAAAAAAAAATAAATGCTGATTCITCACTTGC (nt 3737-3759)
(SEQ ID NO:52)

VSPC5 - AAAAAAAAAAAAAAAAAATGCTGTACTCTGTACCTA (nt 3789-3808)
(SEQ ID NO:53)

VSPC6 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCCCTCTAAATTTTCTGGG (nt 3838-3857)
(SEQ ID NO:54)

VSPC7 - AAAAAAAAAAAAAAAAAACTCCTAATGTGTCAGGAACC (nt 3910-3929)
(SEQ ID NO:55)

(*) 올리고뉴클레오티드 주: Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936에 기재됨.

<298>

<299> 삭제

<300> 자성 비드를 Novagen 세포용해 완충액(Madison, WI)에 현탁했고, 7개의 포착 올리고뉴클레오티드 시리즈(VSPC1-VSPC7, 상기 설명됨)를 개별적으로 또는 조합하여 시험하여, 미국 보건사회국, 생물평가연구 FDA 센터(FDA-CBER)로부터 입수한 패널로부터 파르보바이러스 B19 DNA를 포착했다.

<301> 삭제

<302> (c) 세척 완충액으로 비드 세척

포착 후에, 비드를 0.3M NaCl 중에서 pH 7.5로 완충된 10mM HEPES, 및 0.5% NP-40를 함유하는 완충액으로 세척했다. 혈청을 세포용해 완충액으로 처리, 혼성화, 비드의 자성 흡수, 및 세포용해 완충액의 제거 후에, 세척 완충액 1.5mL를 비드에 첨가했다. 일반적인 와동, 자성 흡수, 및 세척 완충액의 제거 후, 비드를 동일한 완충액 0.5mL로 2번 세척했고, 이로써 자성 비드는 압축될 수 있고, Taqman 분석을 위한 모든 시약을 함유하는 Universal PCR 완충액 100mL에 쉽게 현탁된다. DNA가 포착된 비드를 TaqMan™ 플레이트로 옮겨서 하기 설명된 대로 TaqMan™ PCR에 의한 검출을 행했다. TaqMan™ 분석에 의해 검출된 바, 몇몇 올리고뉴클레오티드 조합은 B19를 포착하는데 효과적이었다.

<303> 특히, TaqMan™ 기술은 포착된 표적 핵산을 DNA 앰플리콘으로서 증폭한다. 대안은 포착된 표적을 RNA로서 증폭하는 것이다. 이를 위해서, 증폭 올리고뉴클레오티드를 T7 프로모터 서열을 갖는 파르보바이러스 B19-특이적 프라이머로 구성했으며, 이로써 T7 RNA 중합효소를 사용하여 RNA 앰플리콘이 생성된다. Shade et al., *J. Virol.* (1986) 58:921-936에 설명된 파르보바이러스 B19 게놈의 뉴클레오티드 2936-3635에 상응하는 700bp 서열로부터 유래된, 3개의 증폭 프라이머(VSA1-A3, 아래 설명됨)를 그들의 증폭 능력에 대해서 시험했다. 프라이머는 다음과 같다:

<304> 삭제

센스 가닥 증폭 프라이머

VSA1-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCCATATACTCATTGGACTGT (nt 2942-2961) (SEQ ID NO:56)

VSA2 - AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCCAGAGCACCATTATAA (nt 3272-3288) (SEQ ID NO:57)

VSA3 -AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCACAATGCCAGTGAAAA (nt 3317-3333) (SEQ ID NO:58)

VSP2-GTGCTGAAACTCTAAAGGT (안티센스 프라이머 - nt 3424-3442) (SEQ ID NO:59)

<305>

<306>

RNAmplifire 키트(Qiagen) 시약을 사용하여, 표적으로서 파르보바이러스 DNA 50 카피를 최종 부피 20mL로 사용하여 증폭 효능을 시험했다. 증폭 프라이머를 제 2 프라이머로서 VSP2를 사용하여 개별적으로 또는 조합하여 시험했다. 제조사의 추천대로, 42°C에서 한 시간 인큐베이션한 후, 증폭된 물질의 알리퀴트를 100배 희석하여, TaqMan™ 분석을 행하여 증폭 프라이머의 효능을 평가했다. 2개 증폭 프라이머, VSA2 및 VSA3와 VSP2의 조합이 RNA 앰플리콘을 생성하는데 매우 효과적이었다.

<307>

삭제

<308>

TaqMan™ 분석의 민감도, PCR 프라이머 적합성 및 최적 반응 조건을 상기 설명된 4.7kb 단편을 함유하는 플라스미드 DNA를 사용하여 확립했다. 이 단편은 VP1 영역뿐만 아니라 NS1과 VP2 영역도 포함한다(도 1 참조). 하기 상세히 설명된 VP1 영역으로부터 유래된 PCR 증폭 프라이머를 사용했다. 번호 매기는 것은 Shade et al., J. Virol (1986) 58:921-936에 호응한다. X는 5'-플루오레세인 포스포르아미다이트를, Z는 DABCYL-dT를 나타내며, 두 물질은 모두 Glen Research Corporation, Sterling, VA로부터 입수했다. 서열 오른쪽에 표시된 수는 파르보바이러스 B19 서열로부터 유래한 프라이머의 뉴클레오티드를 말한다.

VSP1- GGAGGCAAAGGTTTGCA (센스 프라이머-nt 3334-3350) (SEQ ID NO:60)

VSP2-GTGCTGAAACTCTAAAGGT (안티센스 프라이머-nt 3424-3442) (SEQ ID NO:59)

VSPPR1-XCCCATGGAGATATTTAGATTZ (프로브-nt 3379-3398) (SEQ ID NO:61)

Vpara 8: TCCATATGACCCAGAGCACCA (nt3262-3282) (SEQ ID NO: 88)

Vpara 9: TTTCCACTGGCATTGTGGC (안티센스 프라이머-nt 3315- 3333)(SEQ ID NO: 89)

Vpara10: X TAAGGTGTTTTCTCCCGCAGCGAGT Z.(X 는 Fam 이고 Z 는 Tamra 이다.)

(nt3286- 3310) (SEQ ID NO: 93)

<309>

<310>

플라스미드 DNA 농도를 분광학적으로 추정했으며, 일련의 희석을 수행하여 5,000 내지 10 카피/20μl를 얻었다. 최종 부피 50μl 중에 반응 혼합물은 20μl 샘플, 3.2mM MgCl₂를 갖는 1× Gold Taq 증폭 완충액(Perkin Elmer), dNTP 각각 300 μM, 각 증폭 프라이머 1pmol, 프로브 0.4pmol, 및 AmpliTaq 효소 1유닛을 함유했다. 반응 조건은 효소 활성화를 위한 95°C 10분을 포함했고, ABI 7700 서열 검출기에서 95°C 30초와 60°C 30초를 번갈아서 45 사이클 행했다.

<311>

삭제

<312>

109bp PCR 산물을 생성했던 프라이머 쌍 VSP1와 VSP2 및 프로브 VSPPR1을 사용하여 분석 당 10 카피 정도의 적은 양을 검출할 수 있었다. 샘플의 부피는 최종 부피 50μl 중에 20μl였으므로, 이것은 파르보바이러스 B19 DNA를 50 카피/ml 정도로 적게 함유하는 혈장 샘플이 추출되고 TaqMan™ 기술에 의하여 검출될 수 있다는 것을 시사한다. 파르보바이러스는 높은 역가의 바이러스이므로, 50μl의 혈장/혈청 부피가 추출될 수 있고 분석에 사용될 수 있다.

- <313> FDA-CBER 파르보바이러스 B19 DNA 양성 샘플(10^6 카피/ml)을 사용하여 분석 당 50 카피 정도의 적은 양을 TaqMan™ 기술로 검출했다. 핵산과 면역역가를 상호관련시키기 위한 시도로서, 바이러스 DNA 로드를 몇몇 항체-양성 샘플에서 정량했다.
- <314> 따라서, 신규한 사람 파르보바이러스 B19 서열 및 이들 서열을 사용한 검출 분석이 개시되었다. 전술한 것으로부터, 본 발명의 특정 구체예가 예시의 목적으로 본원에 설명되었지만, 다양한 변형이 본 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않고 만들어질 수 있다는 것이 인정될 것이다.
- <315> 삭제
- <316> 삭제
- <317> 삭제
- <318> 삭제
- <319> 삭제
- <320> 삭제
- <321> 삭제
- <322> 삭제
- <323> 삭제
- <324> 삭제
- <325> 삭제
- <326> 삭제
- <327> 삭제
- <328> 삭제
- <329> 삭제

- <330> 삭제
- <331> 삭제
- <332> 삭제
- <333> 삭제
- <334> 삭제
- <335> 삭제
- <336> 삭제
- <337> 삭제
- <338> 삭제
- <339> 삭제
- <340> 삭제
- <341> 삭제
- <342> 삭제
- <343> 삭제
- <344> 삭제
- <345> 삭제
- <346> 삭제
- <347> 삭제

<348> 삭제

<349> 삭제

<350> 삭제

<351> 삭제

<352> 삭제

<353> 삭제

<354> 삭제

<355> 삭제

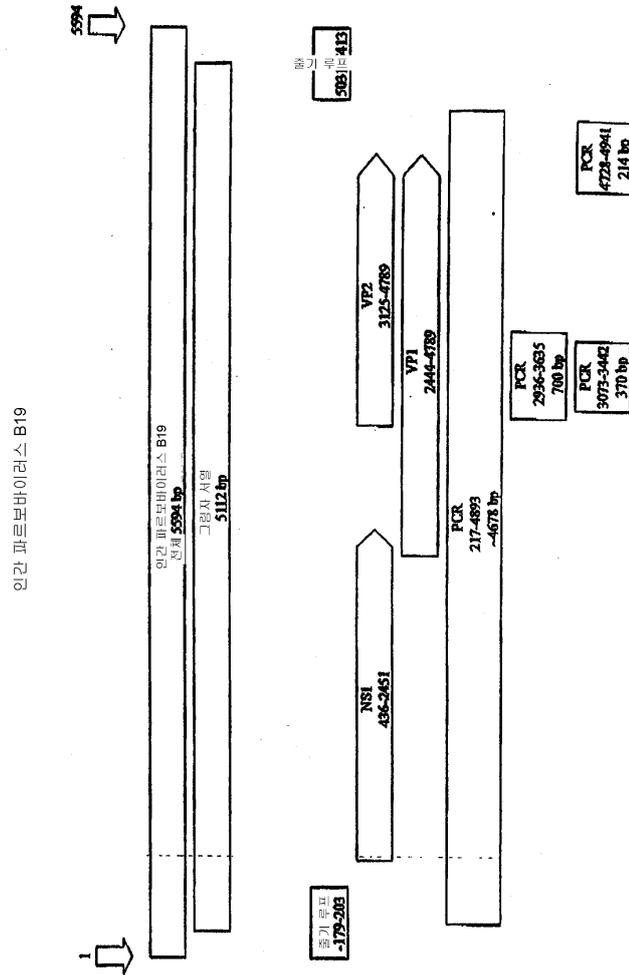
<356> 삭제

<357> 삭제

<358> 삭제

도면

도면1



도면2A

CH47-26

```

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaagggtgcagctgccctgtggccattttcaaggaagtttgc
ggaaagtcccgtfacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagcac
tgggagcaggagggggggcagtaactctgttaaagcatgtggagtggggggccacttttagtccaact
ctgtaactgtacatttccagacagttttaaattccatatgaccagagcaccattataaggtgtttctcccga
gcaagtagctccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgaccattagtcacataatgggataact
aaccctatggagatatttagatttaactgtttaaattgttttttcaccttagatttcagatttaattgaaaact
atggaagtatactcctgatctttaaactgtaaccatcagaattgctgtaaggatgttacagacaaaactg
gagggggagtacaagttactgacagcactaccgggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatattgttaggcaagggtcaggatacttttag
    
```

도면2B

CH48-29

ataaatccatatactcattggactgtgacagatgaagagctttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggagtttggc
ggaagtcccgttacaacgccctcagaacaataccaagcatgacttcagtaattctgcagaagccagcac
tgggtcaggaggggtggcagtaatcctgccaaaagcatgtggagtggggggccacttttactgccaact
ctgtaactgtacatttccagacagttttaattccatagaccagagcaccattataagggttttctcccga
gctagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgcaccattagtcocataatgggatactca
actccatggagatattagatttaagctttaaatttttttacccttagagtttcagcacctaattgaaaattat
ggaagtatagctcctgatgatttaactgtaaccatacagaaattgctgtaaggatgttacagacaaaactgg
aggggggttacaggttactgacagcactacagggcctatgcctgttagtagaccatgaatacaagtagcc
catatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

도면2C

CH33-2

ataaatccatatactcattggactgtgacagatgaagagctttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggagtttggc
ggaagtcccgttacaacgccctcagaacaataccaagcatgacttcagtaattctgcagaagccagcac
tgggtcaggaggggtggcagtaatcctgccaaaagcatgtggagtggggggccacttttactgccaact
ctgtaactgtacatttccagacagttttaattccatagaccagagcaccattataagggttttctcccga
gctagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgcaccattagtcocataatgggatactca
actccatggagatattagatttaagctttaaatttttttacccttagagtttcagcacctaattgaaaattat
ggaagtatagctcctgatgatttaactgtaaccatacagaaattgctgtaaggatgttacagacaaaactgg
aggggggttacaggttactgacagcactacagggcctatgcctgttagtagaccatgaatacaagtagcc
catatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

도면2D

CH33-3

ataaatccatatactcattggactgtgacagatgaagagctttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggagtttggc
ggaagtcccgttacaacgccctcagaacaataccaagcatgacttcagtaattctgcagaagccagcac
tgggtcaggaggggtggcagtaatcctgccaaaagcatgtggagtggggggccacttttactgccaact
ctgtaactgtacatttccagacagttttaattccatagaccagagcaccattataagggttttctcccga
gctagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgcaccattagtcocataatgggatactca
actccatggagatattagatttaagctttaaatttttttacccttagagtttcagcacctaattgaaaattat
ggaagtatagctcctgatgatttaactgtaaccatacagaaattgctgtaaggatgttacagacaaaactgg
aggggggttacaggttactgacagcactacagggcctatgcctgttagtagaccatgaatacaagtagcc
catatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

도면2E

CH33-4

ataaatccatatactcattggactgtgacagatgaagagctttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggagtttggc
ggaagtcccgttacaacgccctcagaaaaataccaagcatgacttcagtaattctgcagaagccagcac
tgggtcaggaggggtggcagtaatcctgccaaaagcatgtggagtggggggccacttttactgccaact
ctgtaactgtacatttccagacagttttaattccatagaccagagcaccattataagggttttctcccga
gctagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgcaccattagtcocataatgggatactca
actccatggagatattagatttaagctttaaatttttttacccttagagtttcagcacctaattgaaaattat
ggaagtatagctcctgatgatttaactgtaaccatacagaaattgctgtaaggatgttacagacaaaactgg
aggggggttacaggttactgacagcactacagggcctatgcctgttagtagaccatgaatacaagtagcc
catatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

도면2F

CH42-7

ataaatccataatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtagcagctgccctgtggccattttcaaggaaagtttgcc
ggaagtcccgcgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagtaattctgcagaagccagcac
tctgtaactgtacattttccagcagttttaattccatagaccagagcaccattataagggtttttctcccgc
agcaagtagctgcccaatgccagtggaaggaggcaagggttgcaccattagtcataatgggatact
caacccatggagatattagatttaagctttaaattttttcacctttagagttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagtcctgatgctttaaactgtaaccatatacagaattgctgtaaggatgttacagacaaaact
ggaggggggtacaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgtagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgtagggcaaggtcaggatacttag

도면2G

CH42-18

ataaatccataatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtagcagctgccctgtggccattttcaaggaaagtttgcc
ggaagtcccgcgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagtaattctgcagaagccagcac
tctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatagaccagagcaccattataagggtttttctcccgc
agcaagtagctgcccaatgccagtggaaggaggcaagggttgcaccattagtcataatgggatact
caacccatggagatattagatttaagctttaaattttttcacctttagagttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagtcctgatgctttaaactgtaaccatatacagaattgctgtaaggatgttacagacaaaact
ggaggggggtgcaaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgtagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgtagggcaaggtcaggatacttag

도면2H

CH42-19

ataaatccataatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtagcagctgccctgtggccattttcaaggaaagtttgcc
ggaagtcccgcgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagtaattctgcagaagccagcac
tctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatagaccagagcaccattataagggtttttctcccgc
agcaagtagctgcccaatgccagtggaaggaggcaagggttgcaccattagtcataatgggatact
caacccatggagatattagatttaagctttaaattttttcacctttagagttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagtcctgatgctttaaactgtaaccatatacagaattgctgtaaggatgttacagacaaaact
ggaggggggtacaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgtagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgtagggcaaggtcaggatacttag

도면2I

CH46-23

attaatccataatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
ncacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtagcagctgccctgtggccattttcaaggaaagtttgcc
ggaagtcccgcgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagtaattctgcagaagccagcac
tctgtaactgtacattttccagcagttttaattccatagaccagagcaccattataagggtttttctcccgc
agcaagtagctgcccaatgccagtggaaggaggcaagggttgcaccattagtcataatgggatact
caacccatggagatattagatttaagctttaaattttttcacctttagagttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagtcctgatgctttaaactgtaaccatatacagaattgctgtaaggatgttacagacaaaact
ggaggggggtacaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgtagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgtagggcaaggtcaggatacttag

도면2J

CH1-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggagtttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagcac
tctgtacactgtacattttccagacagttttaattccatgatgccagagcaccattataaggtgtttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtgaaaggaggcaaggttgcaccattagtcataatgggatact
caacccatggagatatttagatttaagctttaaattatTTTTTcaccttagatttcagcacttaattgaaaat
tatggagtagctcctgatgctttaaactgtaaccatatacagaattgctgtaaggtattacagacaaaact
ggaggggggtgacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

도면2K

CH1-6

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggagtttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagcac
tctgtacactgtacattttccagacagttttaattccatgatgccagagcaccattataaggtgtttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtgaaaggaggcaaggttgcaccattagtcataatgggatact
caacccatggagatatttagatttaagctttaaattatTTTTTcaccttagatttcagcacttaattgaaaat
tatggagtagctcctgatgctttaaactgtaaccatatacagaattgctgtaaggtattacagacaaaact
ggaggggggtgacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

도면2L

CH2-8

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggagtttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagcac
tctgtacactgtacattttccagacaaattttaattccatgatgccagagcaccattataaggtgtttctcccgc
gcaagtagctgccacaatgccagtgaaaggaggcaaggttgcaccattagtcataatgggatact
aacccatggagatatttagatttaagctttaaattatTTTTTcaccttagatttcagcacttaattgaaaat
atggagtagctcctgatgctttaaactgtaaccatatacagaattgctgtaaggtattacagacaaaact
ggaggggggtgacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

도면2M

CH2-10

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggagtttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagcac
tctgtacactgtacattttccagacaaattttaattccatgatgccagagcaccattataaggtgtttctcccgc
gcaagtagctgccacaatgccagtgaaaggaggcaaggttgcaccattagtcataatgggatact
aacccatggagatatttagatttaagctttaaattatTTTTTcaccttagatttcagcacttaattgaaaat
atggagtagctcctgatgctttaaactgtaaccatatacagaattgctgtaaggtattacagacaaaact
ggaggggggtgacaggttactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

도면2N

H2-11C

ataaacccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggagtttgc
ggaagtcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagtaattctgcagaagccagcac
tggtagcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaac
ctgtaactgtacatittccagacaattttaattccatagaccagagcaccattataagggttttctcccga
gcaagtagtgcacacaatgccagtggaaaggaggcaaaaggtttgcaccattagcccataatgggatactc
aaccocatggagatattagatttaactctttaaattttttttcaccttagagtttcagcacitaattgaaaatt
atggaaagtatagcctgatgctttaactgtaaccatatacagaattgctgtaaggatgttacagacaaaactg
gagggggggtgtaggtactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaataaagtac
ccatagtgttagggcaaggtcaggatactttag

도면2O

CH5-13

ctaaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggagtttgc
ggaagtcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagtaattctgcagaagccagcac
tggtagcaggagggggggcagtaatcctgttaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaact
ctgtaactgtacatittccagacagttttaattccatagaccagagcaccattataagggttttctcccga
gcaagtagtgcacacaatgccagtggaaagaggcaaaaggtttgcactattagcccataatgggatactc
aaccocatggagatatttagatttaactctttaaattttttttcaccttagagtttcagcacitaattgaaaatt
ggcagtagtgcctgatgctttaactgtaaccatatacagaattgctgtaaggatgttacagacaaaactg
agggggggtacaggtactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtacc
caatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

도면2P

CH7-22

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggagtttgc
ggaagtcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagtaattctgcagaagccagcac
tggtagcaggagggggggcagtaatcctgttaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaact
ctgtaactgtacatittccagacagttttaattccatagaccagagcaccattataagggttttctcccga
gcaagtagtgcacacaatgccagtggaaagaggcaaaaggtttgcaccattagcccataatgggatactc
aaccocatggagatatttagatttaactctttaaattttttttcaccttagagtttcagcacitaattgaaaact
atggaagtatagcctgatgctttaactgtaaccatatacagaattgctgtaaggatgttacagacaaaactg
gaggggggtagcaaggtactgacagcactacggggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatagtgttagggcaaggtcaggatactttag

도면2Q

CH13-27

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccattttcaaggagtttgc
ggaagtcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagtaattctgcagaagccagcac
tggtagcaggagggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtctaact
ctgtaactgtacatittccagacagttttaattccatagaccagagcaccattataagggttttctcccga
cggagtagtgcacacaatgccagtggaaagaggcaaaaggtttgcaccatcagtcaccataatgggatactc
aaccocatggagatatttagatttaactctttaaattttttttcaccttagagtttcagcacitaattgaaaatt
atggaagtatagcctgatgctttaactgtaaccatatacagaattgctgtaaggatgttacagacaaaactg
gaggggggtagcaggtactgacagcactacagggcgccctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtac
ccatagtgttagggcaaggtcaggatactttag

도면2R

CH14-33

ataaatccatatactcattggactgtgagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccctgtggccattttcaaggagtttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaatctgcagaagccagcac
tgggtcaggaggggggggagtaactctgttaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtccaactc
tctaactgtacatittccagacagttttaattccatagaccagagcaccattataagggtttttccccgag
caagtagctgccacaatgccagtgaaaagaggcaaaaggtttgcaccattagcccataatgggatactcaa
ccccatggagatafttagatfttaagctttaaattttttttcacctttagagttcagcacttaattgaaaattag
gtagtatagctctgatgctttaactgtaaccatacagaaattgctgttaaagatgttacagacaaaactggag
gggggggtacaggttactgacagcactacagggcgctatgcatgttagtgaccatgaatacaagtaacca
tatgtgttagggcaaggtcaggatacttag

도면2S

CH62-2

ataaatccatatactcattggactgtgagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccctgtggccattttcaaggagtttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcaatattctgcagaagccagcact
gggtcaggaggggggggagtaactctgtcaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtccaactc
tctaactgtacakttccagacagttttaattccatagaccagagcaccattataagggtttttccccga
gccagtagctgccacaatgccagtgaaaagaggcaaaaggtttgcaccattagcccataatgggatactc
aaccatggagatatttagatttaagctttaaattttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctctgatgctttaactgtaaccatacagaaattgctgttaaggatgttacagacaaaactg
gaggggggtacaggttactgacagcactacagggcgctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtaac
ccatagtgtagggcaaggtcaggatacttag

도면2T

CH64-2

ataaatccatatactcattggactgtgagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccctgtggccattttcaaggagtttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaatctgcagaagccagcac
tgggtcaggaggggggggagtaactctgttaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtccaactc
tctaactgtacatittccagacagttttaattccatagaccagagcaccattataagggtttttcccccga
gcaagtagctgccacaatgccagtgaaaagaggcaaaaggtttgcaccattagcccataatgggatactc
aaccatggagatacttagatttaagctttaaattttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctctgatgctttaactgtaaccatacagaaattgctgttaaggatgttacgacaaaactg
gaggggggtcaggttactgacagcactacagggcgctatgcatgttagtagaccatgaatacaagtaac
ccatagtgtagggcaaggtcaggatacttag

도면2U

CH67-2

ataaatccatatactcattggactgtgagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccctgtggccattttcaaggagtttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagttaatctgcagaagccagcac
tgggtcaggaggggggggagtaactctgttaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtccaactc
tctaactgtacatittccagacagttttaattccatagaccagagcaccattataagggtttttcccccga
gcaagtagctgccacaatgccagtgaaaagaggcaaaaggtttgcaccattagcccataatgggatactc
aaccatggagatatttagatttaagctttaaattttttttcacctttagagtttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctctgatgctttaactgtaaccatacagaaattgctgttaaggatgttacgacaaaactg
gaggggggtacaggttactgacagcactacagggcgctatgcatgttagtgaccatgaatacaagtaac
ccatagtgtagggcaaggtcaggatacttag

도면3A

파르보바이러스 B19 클론 #2-B1

1 cccgccctat gcaaatgggc agccatctta agtgttttac tataattta ttggtcagtt
 61 ttgtaacggt taaatgggc ggagcgtagg caaggactac agtatatata gcacagcact
 121 gccgcagctc tttcttctg ggctgcttt ttctggact tactgctgt tttttgtag
 181 ctaactaaca ggtatttata ctacttgta acatactaac atggagctat ttagagggtg
 241 gcttcaagt tcttctaatg ttctggactg tgetaacgat aactgggtgt gctcttact
 301 ggatttagac actctgact gggaacct aactcact aacagactaa tggcaatata
 361 ctaagcagt gtgctteta agcttgact tactgggggg cactagcag ggtgcttga
 421 ctttttcaa gtagaatga acaattga agaaggctat catattcatg tggttattgg
 481 ggggccaggg ttaaacecca gaaacctcac agtgtgtgta ggggggtat ttaataatg
 541 actttatcac ctgtactg aaaatctgaa gctaaaatt ttgccaggaa tgactacaaa
 601 aggcaaac ttagagatg gagagcagtt tatagaaaac tattaatga aaaaaatac
 661 ttaaatgtt gtatggtgtg ttactaatat tgatggacat atagatacct gtattctgc
 721 tacttttaga aaggagctt gccatgcca gaaacccgc atcaccacag ccaataatga
 781 tactagtact gatgctgggg agctagcgg cacaggggca gaggttgtgc catttaatgg
 841 gaagggaact aaggctagca taaagtcca aactatggtg aactggtgt gtgaaaacag
 901 agtgttaca gaggataagt ggaactagt tgacttaac cagtacact tactaagcag
 961 tagtcacagt ggaagtctc aaatcaaa gcaactaaa ctagcaatt ataaagcaac
 1021 taatttagt cctactagca cttttatt gcatacagac ttgagcaag ttatgtgtat
 1081 taaaaacaat aaaattgta aattgtact ttgtcaaac tatgacccc tattagtggg
 1141 gcagcatgtg ttaaagtgga ttgataaaa atgtggcaag aaaaacacac tgggtttta
 1201 tgggcccca agtacaggga aaacaaact ggcaatggcc attgctaaa gtgtccagt
 1261 atatggcatg gtaactgga ataataaaa ctctcattt aatgatgtag caggaaaaag
 1321 ctggtggtc tggatgaag gtattattaa gtctacaatt gtagaagctg caaaagccat
 1381 tttggcggg caaccacca gggtagatca aaaaatcgt ggaagtgtag ctgtcctgg
 1441 agtacctgtg gttatacca gcaatggtg cattacttt gttgaagcg ggaacactac
 1501 aacaactgta catgctaaag cctfaaaga ggcgatggtg aagitaact ttactgtaag
 1561 atgcagcct gatctgggt tactaacaga ggctgatgta caacagtggc ttacatggtg
 1621 taatgcaca agctgggacc actatgaaa etgggcaata aactacact ttgatttccc
 1681 tggaaattaat gcagatgccc tccaccaga cctccaaacc accecaattg tcacagacac
 1741 cagtatcagc agcagtggtg gtgaaagctc tgaagaacte agtgaagca gctttttaa
 1801 cctcatcacc ccaggcctt ggaacactga aacccgcgc tctagtacgc ceatcccgg
 1861 gaccagtcca ggagaatcat ctgtcggag eccagttcc tccgaagtgt tagctgcatc
 1921 gtgggaagaa gcctctaca caccttggc agaccagtt cgtgaactgt tagttgggt
 1981 tgattatgt tgggacggtg taaggggtt acctgtctgt tgtgtcaac atattaacaa

도면3B

2041 tagtggggga ggcttgggac tttgcccaca ttgcattaat gtaggggctt ggtataatgg
 2101 atggaaattt cgagaattta ccccagattt ggtgcgatgt agctgccatg tgggagcttc
 2161 taateccctt tctgtgctaa cctgcaaaaa atgtgcttac ctgtctggat tgcaagctt
 2221 ttagattat gagtaagaa agtggcaaat ggtgggaaag tgatgataaa tttgctaaag
 2281 ctgtgatca gcaatttgg gaattttatg aaaaggttac tggaacagac ttagagctta
 2341 ttcaaatatt aaaagatcat tataatattt ctttagataa tcccctagaa aaacctatct
 2401 cttgtttga cttagtgtc cgtattaaa ataacctaa aaactcteca gacttatata
 2461 gtcacatit tcaagtcac ggacagitat ctgaccacc ecattgcctta tcatccagta
 2521 gcagtcacg agaacctaga ggagaagatg cagtattatc tagtgaagac ttacacaagc
 2581 ctgggcaagt tagcgtaca ctaccggta ctaactatgt tgggctggc aatgagctac
 2641 aagctgggcc cccgcaaatg gctgttgaca gtgctgcaag gattcatgac ttaggtata
 2701 gccaactggc taagtggga ataatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc
 2761 ttttaaaaa tataaaaaat gaaactgggt tcaagcaca agtagtaaaa gactacttta
 2821 cttaaaagg tgcagetgac cctgtggccc atttcaagg aagtttccg gaagtcccg
 2881 cttacaacg ctcagaaaa tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca
 2941 ctggtgcagg aggggggggc agtaactctg tgaanaagcat gtaggtgag ggggccact
 3001 ttagtccaa cctgttaact tctacattt ccagacaatt ttaattcca tatgaccag
 3061 agcaccatta taagggttt tctcccag caagtagctg ccacaatcc agtggaaagg
 3121 aggcaaaggt ttgcaccatt agtcccataa tgggatactc aaacctatgg agatatttag
 3181 attttaatgc ttaaatfta tttttcac ctttagagt tcaagcacta attgaaaatt
 3241 atggaagtat agctcctgat gcttactg taaccatate agaaattgct gttaggatg
 3301 ttacggacaa aactggagg ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgctatgca
 3361 ttttagtaga ccatgaatat aagtacctat atgtgttagg gcaaggtcaa gatactttag
 3421 cccagaact tctatttgg gtactctc ccccaata cgcttacta acagtaggag
 3481 atgttaacac acaaggaatt tctggagaca gcaaaaaatt ggcaagtga gaaatcagat
 3541 ttatatgtt ggaacacagt tctttcagc ttttagtac aggaggtaca gcaactatgt
 3601 cttataagtt tctccagtg ccccagaaa atttagagg ctgcagica cactttatg
 3661 aatgtacaa ccccttatac ggatcccgt taggggttc tgacacatta ggaggtgacc
 3721 caaaatttag atcttaaca catgaagacc atgcaattca gcccnaaac ttatgccag
 3781 ggccactagt aaactcagtg tctacaaagg agggagacag ctctagtact ggagctggaa
 3841 aagcctaac aggccttag acaggtacct ctcaaaacac tagaatactc ttacgcccgt
 3901 ggccagtgtc tcaagcgtac caccctggg acacagataa atagtacaa ggaataaatg
 3961 ccatttctca tggcagacc acttatggta acgtgaaga caaagagtat cagcaaggag
 4021 tgggtagatt tcaaatgaa aaagaacage taaaacagtt acagggttta acaatgaca
 4081 cctacttcc caataaagga acccagcaat atacagatca aattgagcgc ccctaatgg
 4141 tgggttctgt atggaacaga agagccctc actatgaaag ccagctgtgg agtaaaatc
 4201 caaatttaga tgacagttt aaaactcagt ttgagcctt aggaggtagg ggtttgcatc

도면3C

4261 agccacetcc tcaaatattt taaaaaatat taccacaag tgggccaatt ggaggtatta
 4321 aatcaatggg aattactacc ttagttcagt atgcccggg aattatgaca gtaacctga
 4381 cattaaatt ggggccccgt aaagctacgg gacgggtgaa tctcaacct ggagtgtac
 4441 ccccgcacg agcaggctat ttaccatag factatatga ccccacagct acagatgcaa
 4501 aacaacacca cagacatgga tatgaaagc ctgaagaatt gtggacagcc aaagccgtg
 4561 tgcacctt gtaaacactc cccaccgtgc cctcagccag gatgtgtaac taaagccca
 4621 ceagtaccac ccagactgta cctgccctt cctataccta taagacagcc taacacaa

도면4A

파르보바이러스 B19 클론 #2-B6

1 cccgccttat gcaaatgggc agccatctta agtgttttac tataatttta ttggtcagtt
 61 ttgtaacgggt taaatgggc ggagcgtagg caaggactac agtatatata gcacagcact
 121 gccgcagctc tttcttctg ggctgctttt ttcctggact tacttgctgt ttttgtgag
 181 ctaactaaca ggtattata ctactgtta acatactaac atggagctat ttagaggggt
 241 gcttcaagtt tcttetaatg ttctggactg tgctaacgat aactgggtgt gctcttact
 301 ggatttagac acttctgact ggaaccaact aactcactac aacagactaa tggcaatata
 361 cftaagcagt gtggcttcta agcttgactt tactgggggg ccactagcag ggtgcttga
 421 ctttttcaa gtagaatga acaaatgtga agaaggetat catattcatg tggttattgg
 481 ggggccaggg taaacceca gaaacctcac agtgtgtgta gaggggttat ttaataatgt
 541 acttatcac ctgttaactg aaaatctgaa gctaaaattt ttgccaggaa tgactacaaa
 601 aggcaatac tftagagatg gagagcagtt tatagaaaac tatttaatga aaaaaatacc
 661 tttaatgtt gtatggtgtg ttactaatat tgatggacat atagatacct gtatttctg
 721 tacttttaga aaggagctt gccatgcaa gaaacccgc atcaccacag ccataaatga
 781 tactagfact gatgctgggg agtctagcgg cacaggggca gaggtgtgc cattaatgg
 841 gaagggaact aaggctagca taaagttca aactatggtta aactggtgt gtgaaaacag
 901 agtgttaca gaggataagt ggaactagt tgactttaa cagtacactt tactaagcag
 961 tagtcacagt ggaagtttc aaattcaag tgcactaaa ctagcaattt ataaagcaac
 1021 taatttagtg cctactagca catttttat gcatacagac tttagcaag ttatgtgtat
 1081 taaagacaat aaaattgta aatgtfact ttgtcaaac tatgaccccc tattagtggg
 1141 gcagcatgtg ttaaagtgga ttgataaaaa atgtggcaag aaaaacacac tgtggtttta
 1201 tggaccgcca agtacagga aaacaaactt ggcaatggcc atgtcaaaa gtttccagt
 1261 atatggeatg gttactgga ataagaaaa ctitccattt aatgatgtag caggaaaaag
 1321 cttggtgtc tgggatgaa gtattatata gtctacaatt gtagaagctg caaaagccat
 1381 tttaggcggg caaccacca gggtagatca aaaaatgctg ggaagtgtg ctgtgctgg
 1441 agtaccctg gttataacca gcaatgggta cattactttt gttgaagcg ggaacactac
 1501 aacaactgta catgtaaaag ccttaaaaga gcgcatggtta aagftaaact ttactgtaag
 1561 atgcagccct gacatgggtt tactaacaga ggctgatgta caacagtggc ttactggtg
 1621 taatgcaaaa agctgggacc actatgaaaa ctgggcaata aactacactt ttgatttccc
 1681 tggaaataat gcagatgccc tecaccaga cctccaaacc acccaattg tcacagacac
 1741 cagtatcagc agcagtggg gtgaaagctc tgaagaactc agtgaaagca gcttttttaa
 1801 cctcatcacc ccaggcgcct ggaacactga aaceccgcgc tctagtacgc ccatccccgg
 1861 gaccagttca ggagaatcat ctgtgggaag cccagtttcc tccgaagtgt tagctgcatc
 1921 gtgggaagaa gccctctaca caccittggc agaccagttt cgtgaaactgt tagttgggggt
 1981 tgattatgtg tgggacgggt taaggggttt acctgtctgt tgtgtgcaac atattaacaa
 2041 tagtggggga ggcttgggac ttgtcccca ttgcattaat gtaggggctt ggtataatgg

도면4B

2101 atggaaatt cgagaatta cccagattt ggtgcatgt agctgccatg tgggagcttc
 2161 taateccctt tctgtctaa cctgcaaaaa atgtgcttac ctgtctggt tgcaaaagctt
 2221 tgtagattat gagtaaagaa agtggcaaat ggtgggaaag tgatgataaa ttigttaaag
 2281 ctgtgtatca gcaatttctg gaattttatg aaaaggttac tggaaacagac ttagagctta
 2341 ttcaaatatt aaaagatcat tataatattt cttagataa tccctagaa aacctatct
 2401 cttgtttga ctagtgtct cgtattaaaa ataaccttaa aaacttcca gacttatata
 2461 gtcactattt tcaaagtcag ggacagttat ctgaccacc ccatgctta tcatcagta
 2521 gcagtcatgc agaacctaga ggagaagatg cagtattatc tagtgaagac ttacacaagc
 2581 ctgggcaagt tagcgtacaa ctaccggta ctaactatgt tgggctggc aatgagotac
 2641 aagctgggccc cccgcaagt gctgtgaca gtctgcaag gattcatgac ttaggtata
 2701 gccactggc taagtggga ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc
 2761 ttttaaaaa tataaaaaat gaaactgggt tcaagcaca agtagtaaaa gactactta
 2821 cttaaaaagg tgcagctgcc cctgtggccc atttcaagg aagttgccc gaagtcccc
 2881 cttaaacgc ctcagaaaaa taccacagca tgaactcagt taattctgca gaagccagca
 2941 ctggtgcagg aggggggggc agtaatcctg tgaaaagcat gggagtgag ggggccact
 3001 ttagtccaa ctctgtaact tgtacattt cagacaatt ttaattcca tatgaccag
 3061 agcaccatta taagggttt tctcccgag caagtagctg ccacaatgccc agtggaaagg
 3121 aggcaaaagt ttgaccatt agtccataa tgggatactc aacctcatgg agatatttag
 3181 attttaatge tttaaattt tttttcac cttagagtt tcaagcactta attgaaaatt
 3241 atggaagtat agctctgat gcttactg taacctatc agaaattgct gtaaggatg
 3301 ttacaacaa aactggagg ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca
 3361 tgftagtaga ccatgaatat aagtaccat atgtgttagg gcaaggtaa gatacttag
 3421 cccagaact tctatttgg gtatacttc cccctcaata cgttactta acagtaggag
 3481 atgttaaac acaaggaatt tctggagaca gcaaaaaatt ggcaagtga gaatcagcat
 3541 tttatgttt ggaacacagt tctttcagc ttttaggtac aggggtaca gcaactatgt
 3601 cttataagtt tctccagtg ccccagaaa atttagaggc ctgcagtaa cacttttat
 3661 aaatgtacaa ccccttatac ggatcccct taggggtcc tgacacatta ggaggtgacc
 3721 caaaatttag atctttaaca catgaagacc atgcaattca gcccacaaac tcatgccag
 3781 ggccactagt aaactcagt tctacaaagg agggagacag ctctagtact ggagctggaa
 3841 aagcctaac aggccttagc acaggtact ccaaaacac tagaatatcc ttacgcccgt
 3901 ggcagtgct tcaagctac caccactggg acacagataa atatgtcaca ggaataaatg
 3961 ccatttctca tggtagacc acttatggtc acgtgaaga caaagagtat cagaaggag
 4021 tgggtagatt tcaaatgaa aaagaacagc taaaacagtt acaggttta aacatgcaca
 4081 cctacttcc caataaagga acceagcaat ataagatea aattgagcgc cccetaatgg
 4141 tgggtctgt atggaacaga agagccctc actatgaaag ccagctgtgg agtaaaatc
 4201 caaatttaga tgacagttt aaaactcagt ttgagcctt aggggatgg ggtttgcatc
 4261 agccacctcc tcaaatattt taaaaatat taccacaaag tgggccaatt ggaggtata

도면4C

4321 aatcaatggg aattactacc ttagttcagt atgcccgtggg aattatgaca gtaacctga
 4381 catttaaat ggggccctg aaagctacgg gacggtggaa tctcaacct ggagtgtatc
 4441 cccgcacgc agcaggtcat ttaccatag tactatatga ccccacagct acagatgcaa
 4501 aacaacacca cagacatgga tatgaaaagc ctgaagaatt gttgacagcc aaaagccgtg
 4561 tgcaacctt gtaaacactc cccaccgtgc cctcagccag gatgtgtaac taaacgccca
 4621 ccagtaccac ccagactgta cctgccccct cctataccta taagacagcc taacacaa

도면5A

클론 B1-NS1 단일가닥 DNA서열

atactctcgaacaaaacaaaatggagctatttagagggtgcttcaagttcttcaatgttctgactgtgctaacgataactgggtgctctt
tactggatttagactctctgactgggaocactaactaactaactaacactaactggcaatatacttaagcagtgctgcttaagctgacttta
ctggggggccactagcagggtgcttctgactttttcaagtagaagtaacaaattgaaagactatcatatcatggttattggggggcca
gggtaaaccocagaacccacagtggtgttagagggtatttaataatgactttacacctgtaactgaaactgaaactaaaatttttgc
caggaaactactcaaaaggcaataacttttagagatggagagcagttatagaaaactatitaaataaaaataccctttaaigtgtatgggt
gttactaalatgatgacatataglacctgtattctgctacttttagaaaggagctggccatgccaaagaaacccccatcacaccagccat
aaatgatactagtactgatctggggagcttagcggcacaggggaggggtgcccatttaagggaagggaactaaggctagcataaag
tttcaaacatgtaaacctgggtgtgtaaacagaggtttacagaggafaaagtgaaactgttacttaaccagcttactaagcaggt
agtcacagtggaagtttcaaatcaaatgcaactaaactagcaattataaagcaactaatttagtgcctactagcaccatttttattgcatacag
actttgagcaagttatgtatttaaaaaacaataaaattgtaaatgttactttgcaaaaactagaccocctattagtgggcgacagctgttaaag
tggattgataaaaaatgtagcaagaaaaacacactgtgtttatgggcccaagtagcaggaaaaacaaactggcaatggccattgctaa
aagtgttccaglatatggcaatggttaactggaataatgaaaacttccatttaagtagtagcaggaaaaagctgggtctgggatgaag
gtattataagctctacaattgtagaagctgcaaaagccatttagcggcgaaccaccagggtgagatcaaaaaatgcgtggaagtgtagctg
tgcctggagctaccctgtgtataaccagcaatgggtgacattttgtgtaaggcgggaacactacaacactgtacatgctaaagccctaaaa
gagcgcattgtaaggttaacttactgtagaatgacccctgacatgggtgtaacagaggtgatgtacaacagctgcttaccatgggt
aatgcacaagctgggaccactatgaaaactggcaataaactaacacttttattccctggaattatgcagatgcctccaccagaccctcc
aaaccoccccaattgacacagacaccatgacagcagctgggtgaaagctctgaaactagtgaaagcagcttttttaacctca
ccccaggccctggaacactgaaaacccccgctctagtaagccatccccgggaccagttcaggaaatcatctgctggaagccagtttc
ctccgaagtgtgtagctgcatcctgggaaagccctctacacaccttggcagaccagttctgtaactgttagtggttgattatgtgtggg
acgtgttaagggtttaccctgctgtgtgcaacatattaacaatgtggggagcgtgggactgtccaccattgattaatgtagggct
tggataatgtaggaatttcgaaattaccocagattgggtgagtagctgcccattgggacttcaatccctttctgtactaacctgca
aaaaatgcttaccctgctgattgcaagctttagattagtaagtcgacatactc

도면5B

클론 B1 NS1 아미노산 서열:

MBLFRGVLVQSSNVLDACANDNWWCSLLDLTSDWEPLTHNRLMAIYLVSSVAS
KLDFTGFLACLIFYFVBCNKFEQVHHVIVIGPGLNPRNLTVCVBGLFNVLVHLVT
ENLKLKFLPGMTTKGKYFRDGBQFIENYLMKKIPLNVVWCVTNDGHIDTCISAFPRKGA
CHAKKPRITTAINDTSDAGBSSGTGAEEVVPFNGKGTKASIKFPQTMVNLNENRNVFTEDK
WKLVDNFQYTLSSSHSGSFQIQSALKLAIYKATNLVPTSTFLLHTDFBQVMCKNKNIKV
KLLLCQNYDPLLVGQHVLRKWDKCKGKKNLWFYGGPTGKTNLMAIAKSVVYGMVNW
NNENFPFNDVAGKSLVWVDEGHIKSTIVEAAKAILGQOPTRVDQKMRGSAVPGVFPVVI
SNGDITFVYSGNITTTVHAKALKERMVKLNFTVRCSPDMGLLTDADVQQWLTVCNLQSWD
HYENWAINYTFDFPGINADALHPDLQTFPIVDTISISSGGSSEELSESSFFNLTPTGA
WNTETPRSSFTIPGTSSGESSVSGPSVSEVVAASWEBAFYPLADQFRELLVGVDDVYWDG
VRGLPVCVQHINNSGGGLGLCPHCINVAWYNGWKFREFTPDLVRCSCHVGAENPFSVL
TCKKCAVLSGLQSFVDYE

도면6A

B1VP1 단일가닥 DNA 서열:

atactcaagcttaacaaaacaaaatgtaagaagtgcaaatgtggaaagtagataaattgctaaagctgtgtatcagcaatttgtaaattta
tgaanaagttacgggaacagacttagcattcaaatataaagatcattatatttcttagataatccocctag
aaaacccactcctcttggacttagtctctgtatfaaaaataaccttaaaactccagacttataatgctcat
ttcaagctcaatgacagctatgaccaccccatgcttactacagtagcagctcagagaacttagagagaaga
tgcagttatctatgtagaactacacaagccctggcgaagttagctcaactaccggctactactgtggcctg
gcaatgagctacaagctggcccccgcaaaagtctgtgacagctgctcaaggattcagactttatgtagccactg
gctaaattgggaataatccataactctgactgtgacagatgaagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgg
gtttcaagcacaagtagtaaaagactacttacttaaaagtgcaactgccccctggccccatttcaaggaattgc
cggaaagtcccgttcaaacccctcagaanaatacccaagcactgactcagttatctgcaagaaccagactggtgca
ggagggggggcagtaactctgtaaaagcactggagtgaggggcacttttagtccaactctgtaactgtacatt
ctcagacaaatttaactcaatgaccagacacattataaagggtttctcccgcaagcagtagctccacaatg
ccagtgaaggaagcagaagtttgcaccattgcccataatggatactcaacccatgagatatttagatttaat
gcttaaatatttttacccttaggtttcagcaactaattgaaattgaggaatgactcctgacttctaac
tgaaccaatcagaattgctgttaaggatgtacggacaacaaactggagggggtgcaggttactgacagcactacag
ggcccttagcttagtagaccatgaataatgaccatgtagtttagggcaaggtcagacttagccccagaa
cttctactttggtaactttcccccaatacgttactaactacagtaggaagtagaacacacaagaattctggaga
cagcaaaaattggcaagtagaagaatcagatttagttttggaacacagcttcttcaagctttagtagcaggaagta
cagcaactatgtcttataagtttccctgagccccagaaaatttagggctgcaactcaacttttagaatgtac
aacccccatagcggatccccttaggggttctgacacattaggaggtagcccaaattagacttttaacacatgaaga
ccatgcaactcagccccaaactcagccaggccactgtaaacctcagcttcaaaaaggaggacagactctgata
ctggagctgnaaaacccttaacagcccttagcacaagctcctcaaacactagaatactcactgcccctggccagtg
tctcagccgtaccacactggtgacagataaattgtcagcagaataaattgcaactttcactggtcagaccatfatg
taactgtgaagcaaaagtagtagcaagaggtggtagatttccaatgaaaaagaacagcaataaacagctaacagggt
taaacatgacacacttcccaataaaggaaacccaacacacagacatgataatgagcgcoccccaatggtgggtct
gtatggaacagaagcccctactatganaagcagctgtggatgaaattcaaattttagtagcagatttaaacca
gtttgagccttagaggaatgggtttgcaagccactcctcaaattttataaaatataccacaaggtggoccaa
ttggaggtataaactatggaattactacttagttagtccgtgggaatttagcagtaaacatgacattttaa
ttggggccocgtaaacctacggagctgggaactcacaactggagtagtccccccgacgcaaggtcattaccata
tgtactatagccccagctcagatgcaaaaacacaccacagactggaatgaaaagcctgaagaattgtggacag
ccaaaagccgtgtgcaaccttagttagtgaactactc

도면6B

B1 VP1 아미노산 서열:

MTSVNSAEASTGAGGGGSNPVKSMWSEGA TFSANSVTC TFSRQFLIP YDPEHH
YKVFSPAASSCHNASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFSPLEFQHLENIYGS
IAPDALTVTISEIAVKDVTDK TGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGQGGDTLAFE
LPIWVYFPPQYAYLTVGDVNTQGISGDSKKLASEBSAFYVLEHSSQLLGTGGTATMSYK
FPVPPENL BGCSQHFYEMYNPLYGSRLGVPD TLGGDPKFRSLTHEDHAIQPNFMPGPL
VNSVSTKBDSSSTGAGKAL TGLSTGTSQNTRISLRPFPVSQPYHHWDTDKYVTGINAIS
HGQTTYGNAEDKBYQQVGRFPNKEBQLKQLQGLNMHTYFPNKGTQQYTDQIERPLMVG
VWNRRLAHYBSQLWSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKILPQSGPIGGIKSM
GITTLVQYAVGIMTVMTFKLGRKATGRWNPQGVYPPHAA GHLPYVLYDPTATDAKQH
HRHGYEKPBEELWTA KSRVHPL

도면7A

B1 VP2 단일가닥 DNA 서열:

atactcaagcttcaaaaacaaaagacttcagtaattctcagaagccagcactggcagggggggggcagtaactcttgaaaacatgtggagtgagggggc
cacttttagtcccaactctgtaactgtacatttccagacaattttaattccatagaccagagcaccatt
ataagggttttccocgcagcaagtagctgccaacatgccaagggaaggcaaggtttgaccattagctccata
atgggatactcaacccatggagataattgatttaagcttaaattatttttacccttagattcagcaactt
atgggatactcaacccatggagataattgatttaagcttaaattatttttacccttagattcagcaactt
aattgaaaattatggagtagctcctgatgcttaactgtaaccatacagaattgctgtaaggatgttacggaca
aaactggaggggggtcagggttactgacagcaactacagggcgctatgcatgtagtagcattgaatataagtaacca
tatgtgttagggcaaggtcaagatacttagccccagaacttctattgggtatcttcccccaatacgtcttacti
aacagtaggagatgtaacacacaaggaattctggagacagcaaaaattggcaagtagaagaatcagcatttatgttt
tggacacaggtcttctcagcttaacttttagaattgatacacccttaccagatccoccttaggggtctcagacatt
aattgagggctgcaacttttagaattgatacacccttaccagatccoccttaggggtctcagacatt
aggggtgaccacaaatttagattttaacacatgaagcactgcaattcagccccaaacttaccagggccactag
taactcagctgctcaaaaggaggagacagctctgactgagctggaagccttaacagccttagcagcaggttacc
tctcaaacactagaatactcttagcgcctggcagctctcagcagctgacacacactgggacacagataaattgtcac
aggaataaattgcaattctcagctcagaccattatggtacagcagcaaacagatcagcaaggagtggtgat
ttcaaatgaaaaagacagcctaaacagttacaggggttaaacatgacacacttcccaataaggacccagca
tatacagatacaaatgagcgcctcaatggtggctctgtagaacagagagccctcactagaagaccagctgtg
ggtgaaattccaatttagacagattttaaactcagttgacagccttaggaggtgggtttgcatcagccacctc
ctcaaatittttaaataataccaaagtgccactggaggtatgaatacaatgggaattactactctgttcag
tatccgtgggaattatgacagtaaccatgacaatttaattggggccocctgaagctcagggaggtggaatoccaacc
tggagtgatccccgcagcagcaggtcattaccatagtactatagccccacagctacagatgcaaaacaacc
acagacatggaatgaaaaccctgaagaattgtggacagcaaaagccgtgacaccattgaagtcgacatactc

도면7B

B1 VP2 아미노산 서열:

MTSVNSAEASTGAGGGGSNPVKSMWSEGA TFSANSVTC TFSRQFLIP YDPEHH
YKVFSPAASSCHNASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFSPLEFQHLENIYGS
IAPDALTVTISEIAVKDVTDK TGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGQGGDTLAFE
LPIWVYFPPQYAYLTVGDVNTQGISGDSKKLASEBSAFYVLEHSSQLLGTGGTATMSYK
FPVPPENL BGCSQHFYEMYNPLYGSRLGVPD TLGGDPKFRSLTHEDHAIQPNFMPGPL
VNSVSTKBDSSSTGAGKAL TGLSTGTSQNTRISLRPFPVSQPYHHWDTDKYVTGINAIS
HGQTTYGNAEDKBYQQVGRFPNKEBQLKQLQGLNMHTYFPNKGTQQYTDQIERPLMVG
VWNRRLAHYBSQLWSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKILPQSGPIGGIKSM
GITTLVQYAVGIMTVMTFKLGRKATGRWNPQGVYPPHAA GHLPYVLYDPTATDAKQH
HRHGYEKPBEELWTA KSRVHPL

도면8A

B6 NS1 단일가닥 DNA서열:

atactctcgaacaaaataatggagctattagaggggtgctcfaagttcttaattgtctggactgtgtaacgataactgggtgctott
tactgatttagacacttctgactgggaaccatacatacagactaataatggcaataataaagcagtggtgcttaagctgacttia
ctggggggccactagcagggtgctgtacttttcaagtagaagtaacaattgaaagagctatcatattcatgtggtattgggggcca
gggttaaccccaagaacctacagtggtgtagaggggttattaataatgactttaccctgtaactgaaatctgaagctaaaattttgc
caggaatgactacaaaaggcaactcttagagatggagagcagttatagaaaacttttaagaaataactttaaatgtgtatggtgt
gttactaataatgtagacacatagataacctgtattctgctacttttagaaaggagcttgccatgccaagaaccccgcaccacagccat
aaatgatactagtagctgctggggagctagcggcacaggggcagaggttgccatttaagggaaggcaactaagctagcataaag
ttcaaacatgtagaacctggtgtgtaaacacagtggttacagaggataagtggaactagtgtacttaaccagtaactttactaagcagt
agtcacagtggaagtttcaaatcaaatgcaactaaactagcaattfaaagcaactaafftagtccactagcacattttttagcatacag
actttgagcaagttatgtgtataaagacaataaaatgttaaatgttactttgcaaaactatgacccctattagtggggcagcatgttaaag
tggatgataaaaaatgtggcaagaaaacacactgtgtttatggaccccaagctacagggaaaacaaactggcaatggocattgctaa
aagtgtccagtagatgcatggtaactggaataatgaaaacttccatttaagtagtagcaggaaaaagcttgggtgctgggtagaaggta
ttataagctacaaatgtagaagctgcaaaagccatttagcggggcaaccaccaggtagatcaaaaaatcggtggaagtgtagctgtgc
ctggagatccctggttataaccagcaatggtgacactttttgttaagcgggaactacaacaactgtacatgtaaaccttaaaaga
goccatggttaagtaactttactgtagatgagccctgacatgggttactaacaagagctgtagtaacaactggtccatcaggtgtaat
gcacaaagctgggaccactatgaaaactgggcaataaactacactttgatctccctggaataatgcagatgccctccaccagacccocaa
accaccccaattgtcacagacacacagtagcagcagcagtggtggtgaaagctcgaagaactcagtgaaagcagcttttaacctatcacc
ccagggcctggcaactgaaaccccgcctctagtagccatccccggaccagtcaggagaatcatctgctggaagccagtttcc
tccgaagtgtagctgcatcgtggggaagccctctacacaccttggcagaccagttctggaactgttagttggggtgattatgtggga
cgggtgaaaggggttaccctgctgtgtgtgcaacatatacaaatagtgggggagcgttggaacttgcaccatgcaattatgtagggcct
ggtataatggatgaaatttcagaaattaccagatttggcagtagctgccaatggtggagcttcaatccctttctgtcaactgca
aaaaatgcttaccctgctgattgcaaacctttagatttagtaagtgacatactc

도면8B

B6 NS1 아미노산 서열:

MELFRGVLQVSSNVLDCAANDNWWCSLLDLDTSDWEPLTHTNRLMAIYLSVVAS
KLDFTGGFLAGCLYFQVCECNKFBEGYHIIHVIGGPNLNRNLTVCEVGLFNNVLYHLVT
ENLKLKFLPGMTTKGKYFRDGBEQFIENYLMKIPNLVWVCVTDNHIDTCSIAFERKGA
CHAKKPRITTAINDSTDA GESSGTGAEVVFPNGKTKASIKFQTMVNLWLBENRVFTEDK
WKLVDVFNQYTLSSSHSGSFQIQSALKLAIYKATNLVPTSTFLLHTDFEQVMCIKDNKIV
KLLLCQNYDPLLVGQHVLRWIDKKCGKKNLWFYGPSTGKTNLAMAIAKSVPVYGMVNW
NNENPFNDVA GKSLLVWDEGIKSTIVEAAKAILGGQPTRVDQKMRGSVA VPGVPPVIT
SNGDITFVVSNGTITTVHAKALKERMVKLNFTVRCSPDMGLLTDADVQWLTCWNAQSWD
HYENWAINYTFDFPGINADALHPDLQTTPIVITPISISSGGESSEELSSFFNLITPGA
WNTETPRSSTPIPGTSSGESSV GSPVSSEVVAASWBEAFYTPLADQFRELVLGVYVWDG
VRGLPVCVQHINSSGGGLGCPHCINVGA WYNGWKFREFTPDLVRCSCHV GASNPFVSL
TCKKCA YLSGLQSFVDYE

도면9A

B6 VP1 단일가닥 DNA 서열:

atactcaagcttcaaaaaaataatgaaagaaatggcaaatgggggaaagtatgataaattgcaaacgtgtgtacgcaattgtg
gaaatttatgaaaaggttactggacacagactagagcttattcaaatataaagatcattataatattctttagataatcccttagaaaaccatc
ctctttgttgacttagtctgtatataaataaacttaaaaactctccagactatatagtcatatttcaaatgcatggacagttatctgaccac
ccccatgccittatccagtagcagtagcagaacctagaggagaagatgagtagtattctagtagaagacttacacaagcctgggcaagtt
agcgtacaactaccggactaactatgttggccggcaatgagctacaagctgggcccccaaatgctgttgacagctgtcgaagat
tcatgactttagtagtaaccaactgctaagtgggaataaatccatatactatggaactgtagcagatgaagagctttaaaaataaaaaaa
tgaactgggttcaagcacaagtataaagacttacttttaaaaggctgagctgccccctgtggccatttcaaggaagtttccggaa
gtfcccgttacaacgccctcagaaaaataccaagcagacttcaacttgcagaagccagcactggtcagggagggggggcagta
atcctgtgaaaagcagtgaggtagggggccacttttagtccaactctgtaactgtacaittccagacaatttttaattccatagcaccag
agccaccattaaaggttttctcccgacagtagctgccacaatgccagtggaaggagggcaaggtttgaccattagcccataatgg
gatacacaacccatggagatatttagaatttaattttttttccacttttagagtttcagcacttaattgaaaattatggaagtatagct
ctgatgctttaaactgtaaccatatacaaaatgctgtaaggatgttacaacaaaactggaggggggtgcaagttactgacagcactaca
ggggccctatgcatgttagtagacatgaataaagtagcaccatattgttttagggcaaggtcaagatactttagccccagaacttctatttgggt
atacttccccctcaatagcttacttaacagtagagatgtaacacacaaggaatttctggagaca gcaaaaaattggcaagtgaagaatca
gcaatttatgtttgaaacacagtttctttaggttacagggaggtacagaactatgtttataagtttctocagtgcccccaaaaaatt
agagggctcagctcaacactttatgaaatgacaaccccttaccgtagcccttaggggtctgacacataggaggtgaccoccaaaatt
agactttaaacacatgaagaccatgcaatcagccccaaaactcagcagccactgtaaacctcagttctacaagaaggaggagacag
ctctagtagctggagctgaaaagccttaacagcccttagcacaggtaccttcaaaactagaatattcttaccgocctggccaggtgtcca
ggccaccactgggacacagataaatalgtcacaggaaataatgccatttctaggtcagacaccattatgtaacgctgaagacaagaag
agtatcagcaagaggtggtagatttccaatgaaaagaacagctaaaacagttacagggttfaaacatgcacacctactttccaataaag
gaaccacgaatatacagatcaaatggagcccccctaatgggtggtctgtatggaacagaagagcccttactatgaagaccagctgtgg
agtaaaattcaaattagatgacagtttaaaactcagtttgcagccttagaggatgggtttgcatcagccactcctcaaatattCtataaa
atattaccacaaagtgggccaa ttggaggtattaaatcaatgggaattactaccttagttcagatgccgtgggaattatgacagtaacctga
catttaaa ttggggcccgtaaaagctacgggacggtggaactcaccctggaggtatccccccgacgcagcaggtcatttaccata tga
ctatagccccacagctacagatgcaaaaacaaccacagacatgatatgaaagcctgaaagaattgggacagccaaaagccgtgtg
caccattgtaagtcacatact

도면9B

B6 VP1 아미노산 서열:

MSKESGKWWESDDKFAKAVYQVFVEYKVTGTDLELIQLKDHYNISLDNPL
ENPSSLFDLVARIKNNLKNSPDLYSHHFQSHGQLSDHPHALSSSSSHAEPREDAVLSSE
DLHKPGQVSVQLPGTNYVGPBNLQAGFPQSAVDSAAIRHDFRYSQAKLGINPYTHWTV
ADEBLLKNIKNETGFQAQVVKDYFTLKGA AAPVAHFQGLPEVPAYNASEKYPMSVNS
AEASTGAGGGGNSPKSMWSEGATFSANSVCTFSRQFLIPYDPEHHYKVFSPAASSCHN
ASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFSPLEFQHLIENYGSIAFDALVTISEI
AVKDVINKTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPVVLGQQQDTLAPELPIWVYFPPQYA Y
LTVGDVNTQGISGDSKLLASESAFYVLEHSSFQLLGTGGTATMSYKFPVPPENLEGC
QH FYEMYNPLYGSRLGVPDITLGGDPKFRSLTHEDHAIQPNFMPGFLVNSVSTKEGDS
TGAGKALTGLSTGTSQNRISLRPGFVSQPYHHWDTDKYVTGINAISHGQTTYGNAEDKE
YQQGVGRFPNEKBLKQLQGLNMHTYFPNKGTQYTDQIERPLMVGSVWNRRLHYBSQL
WSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKLIPQSGPIGGIKSMGITTLVQYAVGIM
TVTMTFKLGRKATGRWNPQGVYPPHAAHGLPYVLYDPTATDAKQHRHRYGKPEELWT
AKSRVHPL

도면10A

B6 VP2 단일가닥 DNA 서열:

atactcaagcttacaacaaatgactcagttactcagaaagccagcctggtcaggagggggggcagtaactcgtgaaagcattgagtgaggggc
cacitttagtccaaactcgttaactgtacattccagacaattttaattccatagccagagcaccatt
ataagggtttttcccccagcaagtagtctcccaaatgcccagtggaaggagcaaaaggttgcaccattagtcocata
atgggatactcaacccatggagatafittaatgctttaaatttttttcaacttagattcagcaact
aattgaaattatgaaagtagctctctgatcttaactgtaaccatagatgctgtaaggatgtaacaaca
aaactgagggggggcaggttacgacagcaactacagggccctatgcatgtagtagaccatgaataagtaacca
tatgttagggcaaggtcaagatacttagccccaacttctattgggtatacttccctcaatacagcttact
aacagtagagatgtaacacaaagaaattctggagacagcaaaaaatggcaagtgaaagatcagcatttatgtt
tggacaacagttctttagctttagttagcaggaggtacagcaactatgcttaagtttccctcagtgcccccaga
aatttagagggctcagcaactttagaaatgtaacacccctatcggatcccgcttaggggttccagacatt
aggaggtgacccaaatttagactttaacacatgaagacatgcaattcagcccaaaactcagccaggccactag
taactcagctctacaagaggagacagctctgtagctgagctggaagccctaacagcccttagcagcaggtac
tcicaaaactagaatactctacgcccctggcaggtctcagccgtaaccactggacacagataaatagtcac
aggaaatgcccattctctgtagcaaccactatgtaacgctgaagacaagatcagaaggagtggtagat
ttcaaatgaaaaaacagctaaacagttacagggttaaacatgcaaccactcttcccaaaaggaaocccagca
tatcacagatcaaatgagcgcocccaaatggtggtctgtatgaaacagaagccctcactgaaagccagctgtg
gagtaaaatccaaatttagacagttttaaactcagtttgcagccttagaggatgggttgcacagccaccctc
ctcaaatitttaaaatattaccacaagtgcccaattggaggtatgaatgggaattactccttagttcag
tagcgtgggaattacagataaccatgacattaaattggcccccgttaagctagggagctggaatcctcaacc
tgaggttatccccccagcagcaggtcaattaccatgtaclatagaccccaagcagctacagatgcaaaacaccc
acagacatgatatgaaagcctgaaagattggacagccaaagcctgtgcaccattgtaagtcacatactc

도면10B

B6 VP2 아미노산 서열:

MTSVNSAEASTGAGGGGNSPKSMWSEGATFSANSVCTFSRQFLIPYDPEHH
YKVFSPAASSCHNASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFSPLEFQHLIENYGS
IAPDALVTISEIAVKDVINKTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPVVLGQQQDTLAPE
LPWVYFPPQYAYLTVGDVNTQGISGDSKLLASESAFYVLEHSSFQLLGTGGTATMSYK
FPVYPPENLEGCQH FYEMYNPLYGSRLGVPDITLGGDPKFRSLTHEDHAIQPNFMPGFL
VNSVSTKEGDSSTGAGKALTGLSTGTSQNRISLRPGFVSQPYHHWDTDKYVTGINAIS
HGQTTYGNAEDKEYQQGVGRFPNEKBLKQLQGLNMHTYFPNKGTQYTDQIERPLMVG
SVWNRRLHYBSQLWSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKLIPQSGPIGGIKSM
GITTLVQYAVGIMTVTMTFKLGRKATGRWNPQGVYPPHAAHGLPYVLYDPTATDAKQH
HRHRYGKPEELWTAKSRVHPL

도면11A

CH80-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactacttactttaaagggtgagctgcccctgtggccatttcaaggaaagttgcc
ggaagttcccgttacaacgcctcagaaaaatccaagcatgactcagttaatctcagaagccagcac
tgggtcagggggggggcagtaactcgttaaagcagtgaggagtgagggggccacttttagtccaact
ctgtaactgtacatttccagacagttttaaattccatagaccagagcaccattaaaggtgttttcccccga
cgaagtagctgcccaatgccagtgaaaggaggcaaggttgcaccattagtcaccataatgggatactc
aaccctatggagataatttagattttaaactttaaattgtttttcacccttagagtttcagcatttaattgaaaact
atggaaagtatagctcctgatgcttaactgtaacatatacagaattgctgtaaggatgttcagacaaaactg
gagggggagtacaagttactgacagcactaccggcgcctatgcatgtagtagaccatgaatacaagtac
ccatattgttaggcaaggtcaggatactttag

도면11B

CH81-3

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgccctgtggccatttcaaggaaagttgcc
ggaagtcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagtaattctgcagaagccagcac
tgggtcaggagggggggcagtaatcctgttaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaact
ctgtaactgtacattttccagacagttttaattccatagaccagagcaccattataaggtgtttcggccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaggaggcaaggttgcaccattagcccataatgggatactc
aaccctatggagatacttagatttaattcttaaaattttttcacctttagatttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgctttaaactgtaaccatacagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacaggggcctatgcatgtagtagaccatgaatacaagtac
ccatagtgttagggcaaggtcaggatactttag

도면11C

B19SCL1-4

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgccctgtggccatttcaaggaaagttgcc
ggaagtcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagtaattctgcagaagccagcac
tgggtcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaact
tctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatagaccagagcaccattataaggtgtttcggccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaggaggcaaggttgcaccattagcccataatgggatactc
aaccctatggagatacttagatttaattcttaaaattttttcacctttagatttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgctttaaactgtaaccatacagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacaggggcctatgcatgtagtagaccatgaatacaagtac
ccatagtgttagggcaaggtcaggatactttag

도면11D

B19SCL2-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgccctgtggccatttcaaggaaagttgcc
ggaagtcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagtaattctgcagaagccagcac
tgggtcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaact
tctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatagaccagagcaccattataaggtgtttcggccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaggaggcaaggttgcaccattagcccataatgggatactc
aaccctatggagatacttagatttaattcttaaaattttttcacctttagatttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgctttaaactgtaaccatacagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacaggggcctatgcatgtagtagaccatgaatacaagtac
ccatagtgttagggcaaggtcaggatactttag

도면11E

B19SCL3-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaataaaaaatgaaactgggttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgccctgtggccatttcaaggaaagttgcc
ggaagtcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagtaattctgcagaagccagcac
tgggtcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaact
tctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatagaccagagcaccattataaggtgtttcggccgca
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaggaggcaaggttgcaccattagcccataatgggatactc
aaccctatggagatacttagatttaattcttaaaattttttcacctttagatttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagtcctgatgctttaaactgtaaccatacagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaactg
gaggggggggtgcaggttactgacagcactacaggggcctatgcatgtagtagaccatgaatacaagtac
ccatagtgttagggcaaggtcaggatactttag

도면11F

B19SCL4-3

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccatttcaaggaagtttgc
ggaagttcccgtttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgactcagtttaattctgcagaagccagcac
tctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatagaccagagcaccattataaggtgttttctcccga
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaggaggcaagggttgcaccattagcccataatgggatactc
aaccocatggagatatttagattttaatgctttaaattatttttcacctttagatttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatacagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaactg
gagggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgtagtagaccatgaatataagtac
ccatagtgttagggcaaggtcaggatactttag

도면11G

B19SCL5-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttcaa
gcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccatttcaaggaagtttgc
ggaagttcccgtttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgactcagtttaattctgcagaagccagcac
tctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatagaccagagcaccattataaggtgttttctcccga
gcaagtagctgccacaatgccagtggaaggaggcaagggttgcaccattagcccataatgggatactc
aaccocatggagatatttagattttaatgctttaaattatttttcacctttagatttcagcacttaattgaaaatt
atggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatacagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaactg
gagggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgtagtagaccatgaatataagtac
ccatagtgttagggcaaggtcaggatactttag

도면11H

B19SCL6-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccatttcaaggaagtttgc
cgaagttcccgtttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgactcagtttaattctgcagaagccagcac
ctgtgtaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtcccaa
ctctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatagaccagagcaccattataaggtgttttctcccga
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaggaggcaagggttgcaccattagcccataatgggatactc
caaccocatggagatatttagattttaatgctttaaattatttttcacctttagatttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatacagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
ggagggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgtagtagaccatgaatataagta
ccatagtgttagggcaaggtcaggatactttag

도면11I

B19SCL7-3

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggcccatttcaaggaagtttgc
cgaagttcccgtttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgactcagtttaattctgcagaagccagcac
ctgtgtaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtcccaa
ctctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatagaccagagcaccattataaggtgttttctcccga
agcaagtagctgccacaatgccagtggaaggaggcaagggttgcaccattagcccataatgggatactc
caaccocatggagatatttagattttaatgctttaaattatttttcacctttagatttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatacagaaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
ggagggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgtagtagaccatgaatataagta
ccatagtgttagggcaaggtcaggatactttag

도면11J

B19SCL8-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaaataaaaaatgaaactgggttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccctgtggccatttcaaggaagtttgc
 cggaaagtcccgttacacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaa
 ctctgtaactgtacatfttccagacaattttaattccatagaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgaccattagtcataatgggatact
caacccatggagatafttaggtttaatgcttaaaftttttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatacagaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgctatgcatgtagtagaccatgaatataagta
 cccatagtgtagggcaaggtcaggatactttag

도면11K

B19SCL9-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaaataaaaaatgaaactgggttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccctgtggccatttcaaggaagtttgc
 cggaaagtcccgttacacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcaattaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggcagtaatcctgtcaaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaa
 ctctgtaactgtacatfttccagacagttttaattccatagaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 cagccagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgaccattagtcataatgggatact
 tcaacccatggagatafttagatttaactttaaaftttttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaa
 ttatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatacagaattgctgtaaggatgttacggacaaaac
 tggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgctatgcatgtagtagaccatgaatataagta
 accatagtgtagggcaaggtcaggatactttag

도면11L

B19SCL9-9

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaaataaaaaatgaaactgggttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccctgtggccatttcaaggaagtttgc
 cggaaagtcccgttacacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaa
 ctctgtaactgtacatfttccagacaattttaattccatagaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgaccattagtcataatgggatact
 caacccatggagatafttagatttaactttaaaftttttttcaccttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatacagaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgctatgcatgtagtagaccatgaatataagta
 cccatagtgtagggcaaggtcaggatactttag

도면11M

B19SCL10-2

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagctttaaaaaataaaaaatgaaactgggttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgccctgtggccatttcaaggaagtttgc
 cggaaagtcccgttacacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaa
 ctctgtaactgtacatfttccagacaattttaattccatagaccagagcaccattataaggtgtttctccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgaccattagtcataatgggatact
 caacccatggagatafttagatttaactttaaaftttttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatacagaattgctgtaaggatgttacggacaaaact
 ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgctatgcatgtagtagaccatgaatataagta
 cccatagtgtagggcaaggtcaggatactttag

도면11N

B19SCL11-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgc
cggaaagtcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagca
ctgtgtagcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtccaa
ctctgtaactgtacatttccagacaattttaattccatagaccagagcaccattataaggtgtttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtgaaaggaggcaaaaggttgcaccattagtcaccataatgggatact
caaccccatggagatatttagatttaatgctttaaattatttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgtacggacaaaact
ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaataaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttat

도면11O

B19SCL12-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgc
cggaaagtcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagca
ctgtgtagcaggagggggggcagtaatcctgtcaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtccaa
ctctgtgactgtacatttccagacagttttaattccatagaccagagcaccattataaggtgtttctcccgc
cagcaagtagctgccacaatgccagtgaaaggaggcaaaaggttgcaccattagtcaccataatgggatac
tcaaccccatggagatatttagatttaatgctttaaattatttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaa
ttatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgtacagacaaaact
ggaggggggggtgcaagttactgacagcagtagcagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatacaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

도면11P

B19SCL13-3

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgc
cggaaagtcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagca
ctgtgtagcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtccaa
ctctgtaactgtgcatttccagacaattttaattccatagaccagagcaccattataaggtgtttctcccgc
cagcaagtagctgccacaatgccagtgaaaggaggcaaaaggttgcaccattagtcaccataatgggatac
tcaaccccatggagatatttagatttaatgctttaaattatttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaa
ttatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgtacggacaaaact
tggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaataaagta
accatagtggttagggcaaggtcaggatactttag

도면11Q

B19SCL14-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttca
agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaagggtgcagctgcccctgtggccattttcaaggaagtttgc
cggaaagtcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagca
ctgtgtagcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtccaa
ctctgtaactgtacatttccagacaattttaattccatagaccagagcaccattataaggtgtttctcccgc
agcaagtagctgccacaatgccagtgaaaggaggcaaaaggttgcaccattagtcaccataatgggatact
caaccccatggagatatttagatttaatgctttaaattatttttcaccttttagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagtcctgatgctttaactgtaaccatatcagaaattgctgtaaggatgtacggacaaaact
ggaggggggggtgcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaataaagta
cccatatgtgttagggcaaggtcaggatactttag

도면11R

B19SCL15-3

ataaatccatatactcattggactgtgacagatgaagagctttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgccctgtggccattttcaaggaaagttgc
 cggaaagtcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatagaccagagcaccattataaggtttttcccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggagcaaaaggttgcaccattagtcacataatgggatact
 caacccatggagatattagatttaatgctttaaattttttcaccttagagttcagcacttaattgaaaaat
tatggaagtatagcctctgatgctttaactgtaaccatcagaaaatgctgtaaggatgtacggacaaaaat
 ggaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcctatgcatgttagaccatgaataaagta
 cccatagtgttagggcaaggtcaggatactttag

도면11S

B19SCL16-2

ataaatccatatactcattggactgtgacagatgaagagctttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgccctgtggccattttcaaggaaagttgc
 cggaaagtcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatagaccagagcaccattataaggtttttcccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggagcaaaaggttgcaccattagtcacataatgggatact
 caacccatggagatattagatttaatgctttaaattttttcaccttagagttcagcacttaattgaaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatcagaaaatgctgtaaggatgtacggacaaaaat
 ggaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcctatgcatgttagaccatgaataaagta
 cccatagtgttagggcaaggtcaggatactttat

도면11T

B19SCL17-1

ataaatccatatactattggactgtgacagatgaagagctttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgccctgtggccattttcaaggaaagttgc
 cggaaagtcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatagaccagagcaccattataaggtttttcccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggagcaaaaggttgcaccattagtcacataatgggatact
 caacccatggagatattagatttaatgctttaaattttttcaccttagagttcagcacttaattgaaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatcagaaaatgctgtaaggatgtacggacaaaaat
ggaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcctatgcatgttagtagaccatgaataaagta
 cccatagtgttagggcaaggtcaggatactttag

도면11U

B19SCL18-1

ataaatccatatactcattggactgtgacagatgaagagctttaaaaaataaaaaatgaaactgggtttca
 agcacaagtagtaaaagactactttactttaaaaggtgcagctgccctgtggccattttcaaggaaagttgc
 cggaaagtcccgttacaacgcctcagaaaaatacccaagcatgacttcagtttaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtgagggggccacttttagtccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatagaccagagcaccattataaggtttttcccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggagcaaaaggttgcaccattagtcacataatgggatact
 caacccatggagatattagatttaatgctttaaattttttcaccttagagttcagcacttaattgaaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatcagaaaatgctgtaaggatgtacggacaaaaat
ggaggggggtgcaggttactgacagcactacagggcctatgcatgttagtagaccatgaataaagta
 cccatagtgttagggcaaggtcaggatactttag

도면11V

B19SCL19-1

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggttca
 agcacaagtagtaaaagactacttactttaaaaggtagcagctgccctgtggcccattttcaaggagtttgc
 cggaaagtcccgcttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtagcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatagaccagagcaccattataagggttttctcccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgaccattagccataatgggatact
 caaccccatggagatatttagatttaatgctttaaattttttcaccittagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggagggggggtagcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatagtgttagggcaaggtcaggatacttag

도면11W

B19SCL20-3

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggttca
 agcacaagtagtaaaagactacttactttaaaaggtagcagctgccctgtggcccattttcaaggagtttgc
 cggaaagtcccgcttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtagcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatagaccagagcaccattataagggttttctcccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgaccattagccataatgggatact
 caaccccatggagatatttagatttaatgctttaaattttttcaccittagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggagggggggtagcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatagtgttagggcaaggtcaggatacttag

도면11X

B19SCL21-3

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggttca
 agcacaagtagtaaaagactacttactttaaaaggtagcagctgccctgtggcccattttcaaggagtttgc
 cggaaagtcccgcttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtagcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatagaccagagcaccattataagggttttctcccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgaccattagccataatgggatact
 caaccccatggagatatttagatttaatgctttaaattttttcaccittagagtttcagcacttaattgaaaat
tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggagggggggtagcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatagtgttagggcaaggtcaggatacttag

도면11Y

B19SCL22-11

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggttca
 agcacaagtagtaaaagactacttactttaaaaggtagcagctgccctgtggcccattttcaaggagtttgc
 cggaaagtcccgcttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgacttcagttaattctgcagaagccagca
 ctggtagcaggagggggggcagtaatcctgtgaaaagcatgtggagtggggggccacttttagtccaa
 ctctgtaactgtacattttccagacaattttaattccatagaccagagcaccattataagggttttctcccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtggaaaggaggcaagggttgaccattagccataatgggatact
 caaccccatggagatatttagatttaatgctttaaattttttcaccittagagtttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaactgtaaccatatcagaattgctgttaaggatgttacggacaaaact
 ggagggggggtagcaggttactgacagcactacagggcgcctatgcatgttagtagaccatgaatataagta
 cccatagtgttagggcaaggtcaggatacttag

도면11Z

B19SCL2-14

ataaatccatatactcattggactgtagcagatgaagagcttttaaaaaataaaaaatgaaactgggttca
 agcacaagtagtaaaagactacttactttaaagggtgcagctgccctgtggccatttcaaggagtttgc
 cggaggtcccgttacaacgcctcagaaaaataccaagcatgactcagtaattctgcagaagccagca
 ctggtgcaggagggggggcaglaatcctgtgaaaagcatgtggagtgaggggccacttttagtccaa
 ctctgtaactgtacatttccagacaattttaattccatagaccagagcaccattataagggttttctcccgc
 agcaagtagctgccacaatgccagtgaaaggaggcaagggttgcaccattagtcacataatgggatact
 caacccatgggatatctagatttaatgctttaaatttttttccacttagagttcagcacttaattgaaaat
 tatggaagtatagctcctgatgctttaaactgtaaccatatacagaaattgctgtaaggatgttaccggacaaaact
ggaggggggtgcaggttactgacagcactacaggggcctatgcatgtagtagaccatgaatataagta
 cccatagtgttagggcaaggtcaggatacttag

도면12

GAATTCACCTTGTACATTTTCCAGACAATTTTAATCCATATGACCCAGAGCACCATTAT
 ACAGTGACATGCAGGTCTAGCTCTGCCACAATGCCAGTGGAAAAGGAGGCAAAGGTTTGCA
 CCATTAGTCCCATAAATGGGATACTCAACCCATGGAGATATTTAGATTTTAAATGCTTTAA
 ATTTATTTTTTTCACCTTTAGAGTTTCAGCACTTAATTGAAAATTATGGAAAGTATAGCTC
 CTGATGCTTTAACTGTAACCATATCAGAAAATGCTGTTAAGGATGTTACGGACAAAACCTG
 GAGGGGGGTGCAGGTTACTGACAGCACTACAGGGCGCTATGCATGTTAGTAGACCATG
 AATATAAGTACCCATATGTGTTAGGGCAAGGTCAAGATACTTTAGCCCCAGAAGTCTCTA
 TTTGGGTATACTTTCCCCCTCAATACGCTTACTTAACAGTAGGAGATGTTAACACACAAG
 GAATTTCTGGAGACAGCAAAAAATGGCAAGTGAAGAATCAGCATTTTATGTTTTGGAAC
 ACAGTTCTTTTCAGCTTTTAGGTACAGGAGGTACAGCAACTATGTCTTATAAGTTTCCTC
 CAGTGCCCCCAGAAAATTTAGAGGGCTGCAGTCAACACTTTTATGAAAATGTACAACCCCT
 TATACGGATCCCGCTGTGAC (SEQ ID NO.:92)

서열목록

- <110> PICHUANES, Sergio
 SHYAMALA, Venkatakrishna
- <120> DIAGNOSTIC ASSAYS FOR PARVOVIRUS B19

- <130> 2301-17194 / PP17194.004

- <140> 10/187,253
- <141> 2002-06-28

- <150> 60/302,077
- <151> 2001-06-28

- <150> 60/365,956
- <151> 2002-03-19

- <150> 60/369,224

<151> 2002-03-29

<160> 93

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH47-26

<400> 1

```

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat      60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc      120
ctgtggccc atttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa      180
taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc      240
agtaatcctg ttaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctcctgtaact      300
tgtacatfff ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taaggtgttt      360
tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt      420
agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag atttaatgc tttaaatttg      480
ttttttcac ctttagagtt tcagatttia attgaaaact atggaagtat agctcctgat      540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggatg ttacagacaa aactggaggg      600
ggagtacaag ttactgacag cactaccggg cgctatgca tgttagtaga ccatgaatac      660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag      700
    
```

<210> 2
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate CH48-29

<400> 2
 ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaa tataaaaaat 60
 gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
 cctgtggccc atttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaacaa 180
 taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggtggc 240
 agtaatcctg caaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttaactgcaa ctctgtaact 300
 tgtacatfff ccagacagtt ttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtttt 360
 tctcccgcag ctagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420
 agtcccataa tgggatactc aactccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
 tttttttcac ctttagagtt tcagcaccta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
 gatttaactg taaccatadc agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
 ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgcc tgtagtaga ccatgaatac 660
 aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 3
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate CH33-2

<400> 3
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaacaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggtggc 240

agtaatcctg ccaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttactgceaa ctcgttaact 300

tgtacatfff ccagacagtt ttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtfff 360

tctcccgcag ctagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420

agtccataa tgggatactc aactccatgg agatatttag atttaaatgc tttaaattta 480

ttttttcac ctttagagtt tcagcaccta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540

gatttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600

ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgct tgttagtaga ccatgaatac 660

aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 4
<211> 700
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH33-3

<400> 4
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaca 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggtggc 240

agtaatcctg caaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttactgcaa ctcgtiaact 300

tgtacatfff ccagacagtt ttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtttt 360

tctcccag ctagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420

agtccataa tgggatactc aactccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480

ttttttcac ctttagagtt tcagcaccta atfgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540

gatttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacagaca aactggaggg 600

ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgcc tgttagtaga ccatgaatac 660

aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 5
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate CH33-4

<400> 5
 ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggtggc 240

agtaatcctg ccaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300

tgtacatfff ccagacagtt tttaatcca tatgaccag agcaccatta taagggtfff 360

tctcccgag ctatagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420

agtccataa tgggatactc aactccatgg agatatttag atttaatgc tttaaattta 480

ttttttcac ctttagagtt tcagcaccta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540

gatttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagaca aactggaggg 600

gggttacagg ttactgacag cactacaggg cgctatgcc tgtagtaga ccatgaatac 660

aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 6
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate CH42-7

<400> 6
 ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

agtaatcctg tcaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300

tgtacatfff ccaggcagtt tttaatcca tatgaccag agcaccatta taagggtfff 360

tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420

agtccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
 tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
 gctttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
 ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
 aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 7
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate CH42-18

<400> 7
 ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
 gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
 cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaaa 180
 tacciaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
 agtaatcctg tcaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgcaa ctcgttaact 300
 tgtacatttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taaggtgttt 360
 tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420
 agtccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
 tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
 gctttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600

ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660

aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

- <210> 8
- <211> 700
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> Description of Artificial Sequence: isolate CH42-19

<400> 8
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

agtaatcctg tcaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300

tgtacatfff ccagacagtt ttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtfff 360

tctcccag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420

agtccataa tgggatactc aacccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480

ttttttcac ctttagagtt tcagactta atfgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540

gctttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600

ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660

aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

- <210> 9
- <211> 700

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate CH46-23

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (76)
 <223> where 'n' is A, T, C or G

<400> 9
 attaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaa tataaaaaat 60

 gaaactgggt ttcaancaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

 cctgtggccc atttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaa 180

 taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

 agtaatcctg tcaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgcaa ctcgtgaact 300

 tgtacatfff ccaggcagtt ttaattcca tatgaccag agcaccatta taaggtgttt 360

 tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420

 agtccataa tgggatactc aacccatgg agatatttag atttaatgc tttaaatta 480

 tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540

 gctttaactg taaccatc agaaattgct gttaaggatg ttacagaaa aactggaggg 600

 ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660

 aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 10
 <211> 700
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH1-1

<400> 10

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

agtaatcctg tcaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctcgttaact 300

tgtacatfff ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taaggtgttt 360

tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420

agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480

ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540

gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600

gggttacagg ttactgacag cactacaggg cgctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660

aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 11

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH1-6

<400> 11

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

agtaatcctg tcaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctcgtgaact 300

tgtacatfff ccagacagtt tttaatcca tatgaccagc agcaccatta taagggtttt 360

tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420

agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag atttaaatgc tttaaattta 480

ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540

gctttaactg taaccatatac agaaattgct gtttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600

ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660

aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 12
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate CH2-8

<400> 12

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

agtaatcctg tgaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300

tgtacatfff ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtfff 360

tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420

agtccataa tgggatactc aacccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480

ttttttcac ctttagagtt tcagacttta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540

gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600

ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660

aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 13
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate CH2-10

<400> 13
 ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

agtaatcctg tgaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300

tgtacatfff ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtfff 360

tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420
 agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
 tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
 gctttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacagacag aactggaggg 600
 ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
 aagtacccat atgtgtagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 14
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate CH2-11C

<400> 14
 ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
 gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
 cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
 tacciaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
 agtaatcctg tgaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
 tgtacatfff ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taaggtgttt 360
 tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420
 agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
 tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540

gctttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600

ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660

aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 15
 <211> 699
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate CH5-13

<400> 15
 ctaaaccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc atttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

agtaatcctg ttaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgcaa ctcgttaact 300

tgtacatfff ccagacagtt ttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtfff 360

tctcccag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaaag aggcaaaggt ttgcactatt 420

agtccataa tgggatactc aacccatgg agatatttag atttaaatgc tttaaattta 480

ttttttcac ctttagagtt tcagactta attgaaaatt atggcagtat agctcctgat 540

gctttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600

ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660

aagtacccaa tgtgttaggg caaggtcagg atactttag 699

<210> 16
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate CH7-22

<400> 16
 ataaatccat gtactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaa tataaaaaat 60

 gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

 cctgtggccc attttaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaaa 180

 tacccaagca tgaattcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

 agtaatctg ttaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300

 tgtacatfff ccagacagtt ttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtfff 360

 tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt tgcaccatt 420

 agtcccataa tgggatactc aacccatgg agatatttag atttaatgc tttaaattg 480

 ttttttcac ctttagagtt tcagcattta attgaaaact atggaagtat agctcctgat 540

 gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacagaaa aactggaggg 600

 ggagtacaag ttactgacag cactaccggg cgcctatgca tgttagtaga ccatgaatac 660

 aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 17
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH13-27

<400> 17

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaa tataaaaaat	60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc	120
ccgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaaa	180
taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc	240
agtaattctg tcaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgctaa ctctgtaact	300
tgtacatfff ccagacagtt ttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtfff	360
tctcccgcag cgagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatc	420
agtccataa tgggatactc aacccatgg agatatttag atttaatgc tttaaattta	480
ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat	540
gctttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggatg ttacagacaa aactggaggg	600
ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgttagtaga ccatgaatac	660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag	700

<210> 18

<211> 699

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate CH14-33

<400> 18

ataaatccat atactcattg gactgtggca gatgaagagc ttttaaaaa tataaaaaat	60
--	----

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg agggggggga 240

gtaatcctgt taaaagcatg tggagtgagg gggccacttt tagtgccaac tctgtaactt 300

gtacattttc cagacagttt ttaattccat atgaccaga gcaccattat aaggtgtttt 360

ctcccgcagc aagtagctgc cacaatgcca gtggaaaaga ggcaaaggtt tgcaccatta 420

gtcccataat gggatactca accccatgga gatatttaga ttttaatgct ttaaatttat 480

tttttcacc tttagagttt cagcacttaa ttgaaaatta tggtagtata gtcctgatg 540

ctttaactgt aaccatatca gaaattgctg ttaaagatgt tacagacaaa actggagggg 600

gggtacaggt tactgacagc actacagggc gcctatgcat gttagtggac catgaataca 660

agtaccata tigttaggg caaggtcagg atactttag 699

<210> 19
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate CH62-2

<400> 19
 ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaaa 180

taccaagca tgacttcaat taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

agtaatcctg tcaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300

tgtacakttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtttt 360

tctcccgcag ccagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420

agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480

ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540

gctttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600

ggggtacagg ttactgacag cactacaggc cgctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660

aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 20
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate CH64-2

<400> 20
 ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

agtaatcctg ttaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300

tgtacatttt ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtttt 360

tcgcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420

agtccataa tgggatactc aaccccatgg agatacttag attttaatgc tttaaattta 480
 tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
 gctttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
 ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
 aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 21
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate CH67-2

<400> 21
 ataaatccat atactcattg gactgtggca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
 gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
 cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaaa 180
 tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggg 240
 agtaatcctg ttaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgcaa ctcgttaact 300
 tgtacatfff ccagacagtt ttaattcca tatgaccagc agcaccatta taaggtgttt 360
 tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaaag aggcaaaggt ttgcaccatt 420
 agtccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
 tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
 gctttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaagatg ttacagacaa aactggaggg 600

ggggtacagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgttagtgga ccatgaatac 660

aagtacccat atgtgtagg gcaaggtag gatactttag 700

<210> 22
 <211> 4678
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: 4.7 kbp PCR fragment from parvovirus B19 clone 2-B1

<400> 22
 cccgccttat gcaaatgggc agccatctta agtgttttac tataatttta ttggtcagtt 60

ttgtaacggt taaaatgggc ggagcgtagg caaggactac agtatatata gcacagcact 120

gccgcagctc tttctttctg ggctgctttt ttctggact tacttgctgt tttttgtgag 180

ctaactaaca ggtatttata ctacttgta acatactaac atggagctat ttagaggggt 240

gcttcaagtt tcttctaag tcttgactg tgctaacgat aactggtggt gctctttact 300

ggatttagac acttctgact gggaaccact aactcact aacagactaa tggcaatata 360

cttaagcagt gtggcttcta agcttgactt tactgggggg ccactagcag ggtgcttgta 420

ctttttcaa gtagaatga acaaattga agaaggctat catattcatg tggttattgg 480

ggggccaggg ttaaacccea gaaacctcac agtgtgtgta gaggggttat ttaataatgt 540

actttatcac ctigtactg aaaatctgaa gctaaaattt ttgccaggaa tgactacaaa 600

aggcaatac ttagagatg gagagcagtt tatagaaaac tatttaatga aaaaaatacc 660

tttaaatggt gtatggtgtg ttactaatat tgatggacat atagatacct gtatttctgc 720

tacttttaga aaggagctt gccatgcaa gaaacccgc atcaccacag ccataaatga 780

tactagtact gatgctgggg agtctagcgg cacaggggca gaggttgtgc catttaatgg	840
gaagggaaact aaggctagca taaagtttca aactatggta aactggttgt gtgaaaacag	900
agtgtttaca gaggataagt ggaaactagt tgactttaac cagtacactt tactaagcag	960
tagtcacagt ggaagttttc aaattcaaag tgactataaa ctagcaattt ataaagcaac	1020
taatttagtg cctactagca catttttatt gcatacagac tttagcaag ttatgtgat	1080
taaaaacaat aaaattgtta aattgttact ttgtcaaac tatgaccccc tattagtggg	1140
gcagcatgtg ttaaagtgga ttgataaaaa atgtggcaag aaaaacacac tgtggtttta	1200
tgggccgcca agtacagga aaacaaactt ggcaatggcc attgctaaaa gtgttccagt	1260
atatggcatg gttactgga ataataaaaa ctttccattt aatgatgtag caggaaaaag	1320
cttgggtgtc tgggatgaag gtattattaa gtctacaatt gtagaagctg caaaagccat	1380
tttagcggg caaccacca gggtagatca aaaaatgcgt ggaagtgtag ctgtgctgg	1440
agtacctgtg gttataacca gcaatgggta cattactttt gttgtaagcg ggaacactac	1500
aacaactgta catgctaaag ccttaaaaga gcgcatggta aagttaaact ttactgtaag	1560
atgcagccct gacatgggtt tactaacaga ggctgatgta caacagtggc ttacatggtg	1620
taatgcacaa agctgggacc actatgaaaa ctgggcaata aactacactt ttgatttccc	1680
tggaattaat gcagatgccc tccaccaga cctccaaacc accccaattg tcacagacac	1740
cagtatcagc agcagtgggt gtgaaagctc tgaagaactc agtgaaagca gcttttttaa	1800
cctcatcacc ccaggcgect ggaacactga aaccccgcgc tctagtacgc ccatccccgg	1860
gaccagtcca ggagaatcat ctgtcggaag cccagtttcc tccgaagttg tagctgcac	1920

gtgggaagaa gccttctaca cacctttggc agaccagttt cgtgaactgt tagttggggt 1980

tgattatgtg tgggacggtg taaggggttt acctgtctgt tgtgtgcaac atattaacaa 2040

tagtggggga ggcttgggac tttgtcccca ttgcattaat gtaggggctt ggtataatgg 2100

atggaattht cgagaattta ccccagattt ggtgcgatgt agctgccatg tgggagcttc 2160

taatcccttt tctgtgctaa cctgcaaaaa atgtgcttac ctgtctggat tgcaaagctt 2220

tgtagattat gagtaaagaa agtggcaaat ggtgggaaag tgatgataaa tttgctaaag 2280

ctgtgtatca gcaatttgtg gaattttatg aaaaggttac tggaacagac ttagagctta 2340

ttcaaatatt aaaagatcat tataatattt ctttagataa tcccctagaa aacctatcct 2400

ctttgtttga cttagttgct cgtattaaaa ataaccttaa aaactctcca gacttatata 2460

gtcatcattt tcaaagtcac ggacagttat ctgaccacce ccatgcctta tcatccagta 2520

gcagtcatgc agaacctaga ggagaagatg cagtattatc tagtgaagac ttacacaagc 2580

ctgggcaagt tagcgtacaa ctaccgggia ctaactatgt tgggcctggc aatgagctac 2640

aagctgggcc cccgcaaagt gctgttgaca gtgctgcaag gattcatgac tttaggtata 2700

gccaactggc taagttggga ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc 2760

ttttaaaaa tataaaaaat gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta 2820

ctttaaagg tgcagctgcc cctgtggccc attttcaagg aagttgccc gaagttcccg 2880

cttacaacgc ctcaaaaa tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca 2940

ctggtgcagg aggggggggc agtaatcctg tgaaaagcat gtggagttag ggggccactt 3000

ttagtgccaa ctctgtaact tgtacatttt ccagacaatt ttttaattcca tatgaccag 3060

agcaccatta taagtgtht tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg 3120

aggcaaaggt ttgcaccatt agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag 3180

atTTtaatgc tTtaaattta tTTTTttcac cTTtagagtt tcagcactta attgaaaatt 3240

atggaagtat agctcctgat gctTTaactg taacctatc agaaattgct gTTaaggatg 3300

tTaccgaca aactggaggg ggggtgcagg tTactgacag cactacaggg cgcctatgca 3360

tgttagtaga ccatgaatat aagtacccat atgtgttagg gcaaggTcaa gatactttag 3420

ccccagaact tcctatttgg gtatactttc ccctcaata cgcttactta acagtaggag 3480

atgtTaaac acaaggaatt tctggagaca gcaaaaaatt ggcaagtga gaatcagcat 3540

tTtatgtttt ggaacacagt tcttttcagc tTTtaggtac aggaggtaca gcaactatgt 3600

cttataagtt tctccagtg cccccagaaa atttagaggg ctgcagtcaa cacttttatg 3660

aaatgtaca cccttatac ggatccctct taggggttcc tgacacatta ggaggtgacc 3720

caaaatttag atctTtaaca catgaagacc atgcaattca gccccaaaac tTcatgccag 3780

ggccactagt aaactcagtg tctacaaagg agggagacag ctctagtact ggagctggaa 3840

aagcctaac aggccttagc acaggtacct ctcaaacac tagaatatcc tTaccctctg 3900

ggccagtgtc tcagccgtac caccactggg acacagataa atatgtcaca ggaataaatg 3960

ccattttca tggtcagacc acttatggta acgctgaaga caaagagtat cagcaaggag 4020

tgggtagatt tccaaatgaa aaagaacagc taaaacagtt acaggtTTa aacatgcaca 4080

cctactttcc caataaagga acccagcaat atacagatca aattgagcgc ccctaatgg 4140

tgggttctgt atggaacaga agagcccttc actatgaaag ccagctgtgg agTaaaattc 4200

caaatttaga tgacagtttt aaaactcagt ttgcagcctt aggaggatgg gttttgcac 4260

agccacctcc tcaaatatit ttaaaaatat taccacaaag tgggccaatt ggaggtatta 4320
aatcaatggg aattactacc ttagttcagt atgccgtggg aattatgaca gtaacctga 4380
catttaaatt ggggccccgt aaagctacgg gacggtggaa tcctcaacct ggagtgtatc 4440
ccccgcagc agcaggtcat ttaccataig tactatatga cccacagct acagatgcaa 4500
aacaacacca cagacatgga tatgaaaagc ctgaagaatt gtggacagcc aaaagccgtg 4560
tgcaccatt gtaaacactc cccaccgtgc cctcagccag gatgtgtaac taaacgcca 4620
ccagtaccac ccagactgta cctgccccct cctataccta taagacagcc taacacaa 4678

<210> 23
<211> 4678
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 4.7 kbp PCR fragment from parvovirus B19 clone 2-B6

<400> 23
ccgccttat gcaaatgggc agccatctta agtgttttac tataatttta ttggtcagtt 60
ttgtaacggt taaatgggc ggagcgtagg caaggactac agtatatata gcacagcact 120
gccgcagctc tttctttctg ggctgctttt ttcttgact tacttgctgt tttttgtgag 180
ctaactaaca ggiatttata ctacttgta acatactaac atggagctat ttagaggggt 240
gcttcaagtt tcttctaag tcttgactg tgctaacgat aactggtggt gctctttact 300
ggatttagac acttctgact gggaaccact aactcact aacagactaa tggcaatata 360
cttaagcagt gtggcttcta agcttgactt tactgggggg ccactagcag ggtgcttgta 420
ctttttcaa gtagaatgta acaaattga agaagctat catattcatg tggttattgg 480

ggggccaggg ttaaacccca gaaacctcac agtgtgtgta gaggggttat ttaataatgt 540

actttatcac ctigtactg aaaatctgaa gctaaaattt ttgccaggaa tgactacaaa 600

aggcaaatac ttiagagatg gagagcagtt tatagaaaac tatttaatga aaaaaatacc 660

tttaaatggt gtatggtgtg ttactaatat tgatggacat atagatacct gtatttctgc 720

tacttttaga aaggagactt gccatgcaa gaaacccgc atcaccacag ccataaatga 780

tactagtact gatgctgggg agtctagcgg cacaggggca gaggttgtgc catttaatgg 840

gaaggaact aaggctagca taaagtttca aactatggta aactggttgt gtgaaaacag 900

agtgtttaca gaggataagt ggaaactagt tgactttaac cagtacactt tactaagcag 960

tagtcacagt ggaagttttc aaattcaaag tgcactaaaa ctagcaattt ataaagcaac 1020

taatttagtg cctactagca catttttatt gcatacagac tttgagcaag ttatgtgtat 1080

taaagacaat aaaattgta aattgttact ttgtcaaac tatgaccccc tattagtggg 1140

gcagcatgtg ttaaagtgga ttgataaaaa atgtggcaag aaaaacacac tgtggtttta 1200

tggaccgcca agtacagga aaacaaactt ggcaatggcc attgctaaaa gtgttcagtt 1260

atatggcatg gttactgga ataataaaaa ctttcattt aatgatgtag caggaaaaag 1320

cttggtggtc tgggatgaag gtattattaa gtctacaatt gtagaagctg caaaagccat 1380

tttagcggg caaccacca gggtagatca aaaaatgcgt ggaagtgtag ctgtgcctgg 1440

agtaccctg gttataacca gcaatggtga cattactttt gttgtaagcg ggaacactac 1500

aacaactgta catgctaaag ccttaaaaga gcgcatggta aagttaaact ttactgtaag 1560

atgcagccct gacatggggt tactaacaga ggctgatgta caacagtggc ttacatggtg 1620

taatgcacaa agctgggacc actatgaaaa ctgggcaata aactacactt ttgatttccc 1680
 tggaattaat gcagatgcc tccaccaga cctccaaacc accccaattg tcacagacac 1740
 cagtatcagc agcagtggtg gtgaaagctc tgaagaactc agtgaagca gcttttttaa 1800
 cctcatcacc ccaggcgctt ggaacactga aacccccgcg tctagtacgc ccatccccgg 1860
 gaccagttca ggagaatcat ctgtcgggaag cccagtttcc tccgaagttg tagctgcatc 1920
 gtgggaagaa gccttctaca cacctttggc agaccagttt cgtgaactgt tagttggggt 1980
 tgattatgtg tgggacggtg taaggggttt acctgtctgt tgtgtgcaac atattaacaa 2040
 tagtggggga ggcttgggac tttgtcccca ttgcattaat gtaggggctt ggtataatgg 2100
 atggaaatth cgagaattta ccccagattt ggtgcatgt agctgccatg tgggagcttc 2160
 taatcccttt tctgtgctaa cctgcaaaaa atgtgcttac ctgtctggat tgcaaagctt 2220
 tntagattat gagnaagaa agtggcaaat ggtgggaag tgatgataaa tttgctaag 2280
 ctgtgtatca gcaatttggc gaattttatg aaaaggttac tggaacagac ttagagctta 2340
 ttcaaatatt aaaagatcat tataatattt ctttagataa tcccctagaa aacctatcct 2400
 ctttgtttga cttagttgct cgtattaaaa ataacctta aaactctca gacttatata 2460
 gtcattatth tcaaagtcac ggacagttat ctgaccacc ccatgcctta tcatccagta 2520
 gcagtcagc agaacctaga ggagaagatg cagtattatc tagtgaagac ttacacaagc 2580
 ctgggcaagt tagcgtacaa ctaccggta ctaactatgt tgggcctgac aatgagctac 2640
 aagctgggcc cccgcaaagt gctgttgaca gtgctgcaag gattcatgac tttaggtata 2700
 gccaaactggc taagttggga ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc 2760
 ttttaaaaa tataaaaaat gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta 2820

ctttaaagg tgcagctgcc cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg 2880

cttacaacgc ctcaaaaa tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca 2940

ctggtgcagg aggggggggc agtaatcctg tgaagaagcat gtggagtgag ggggccactt 3000

ttagtgccaa ctctgtaact tgtacatttt ccagacaatt ttaattcca tatgaccag 3060

agcaccatta taaggtgttt tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg 3120

aggcaaaggt ttgcaccatt agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag 3180

attttaatgc ttaaaattta tttttttcac ctttagagtt tcagcactta atgaaaatt 3240

atggaagtat agctcctgat gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg 3300

ttacaaacaa aactggaggg ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca 3360

tgtagtaga ccatgaatat aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcaa gatactttag 3420

ccccagaact tctatttgg gtatactttc ccctcaata cgcttactta acagtaggag 3480

atgtaaacac acaaggaatt tctggagaca gcaaaaaatt ggcaagtga gaaatcagcat 3540

tttatgtttt ggaacacagt tcttttcagc ttttaggtac aggaggtaca gcaactatgt 3600

cttataagtt tcctccagtg cccccagaaa atttagaggg ctgcagtcaa cacttttatg 3660

aatgtacaa ccccttatac ggatcccgt taggggttcc tgacacatta ggaggtgacc 3720

caaaatttag atctttaaca catgaagacc atgcaattca gccccaaaac ttcattgccag 3780

ggccactagt aaactcagt tctacaaagg agggagacag ctctagtact ggagctggaa 3840

aagcctaac aggccttagc acaggtacct ctcaaaacac tagaatatcc ttacgcctg 3900

ggccagtgtc tcagccgtac caccactggg acacagataa atatgtcaca ggaataaatg 3960

ccattttctca tggtcagacc accttatggta acgctgaaga caaagagtat cagcaaggag 4020

tgggtagatt tccaaatgaa aaagaacagc taaaacagtt acagggttta aacatgcaca 4080

cctactttcc caataaagga acccagcaat atacagatca aattgagcgc ccctaattgg 4140

tgggttctgt atggaacaga agagcccttc actatgaaag ccagctgtgg agtaaaattc 4200

caaatttaga tgacagtttt aaaactcagt ttgcagcctt aggaggatgg ggtttgcatc 4260

agccacctcc tcaaatatth ttaaaaatat taccacaaag tgggccaatt ggaggtatta 4320

aatcaatggg aattactacc ttagttcagt atgccgtggg aattatgaca gtaacatga 4380

catttaaatt ggggccccgt aaagctacgg gacggtggaa tcctcaacct ggagtgtatc 4440

ccccgcagc agcaggtcat ttaccatag tactatatga cccacagct acagatgcaa 4500

aacaacacca cagacatgga tatgaaaagc ctgaagaatt gtggacagcc aaaagccgtg 4560

tgacaccatt gtaaacactc cccaccgtgc cctcagccag gatgtgtaac taaagccca 4620

ccagtaccac ccagactgta cctgccccct cctataccta taagacagcc taacacaa 4678

<210> 24
 <211> 2049
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: NS1 from parvovirus B19 clone 2-B1

<400> 24
 atactcttcg aacaaaacaa aatggagcta tttagagggg tgcttcaagt ttcttctaat 60

gttctggact gtgctaacga taactggtgg tgctctttac tggatttaga cacttctgac 120

tgggaaccac taactcatac taacagacta atggcaatat acttaagcag tgtggcttct 180

aagcttgact ttactggggg gccactagca gggtgcttgt actttttca agtagaatgt 240

aacaaatttg aagaaggcta tcatattcat gtggttattg gggggccagg gttaaacccc 300

agaaacctca cagtgtgtgt agaggggtta ttaataatg tactttatca ccttgtaact 360

gaaaatctga agctaaaatt ttgcccagga atgactacaa aaggcaaata ctttagagat 420

ggagagcagt ttatagaaaa ctatttaatg aaaaaaac ctttaaatgt tgtatggtgt 480

gttactaata ttgatggaca tatagatacc tgtatttctg ctacttttag aaaggagct 540

tgccatgcca agaaaccccg catcaccaca gccataaatg aactagtagt tgatgctggg 600

gagtctagcg gcacaggggc agaggttgtg ccatttaatg ggaaggaac taaggctagc 660

ataaagtttc aaactatggt aaactggttg tgtgaaaaca gagtgtttac agaggataag 720

tggaaactag ttgactttaa ccagtacact ttactaagca gtagtcacag tggaaagttt 780

caaattcaaa gtgcactaaa actagcaatt tataaagcaa ctaatttagt gcctactagc 840

acatttttat tgcatacaga ctttgagcaa gttatgtgta ttaaaaacaa taaaattggt 900

aaattgttac ttigtcaaaa ctatgacccc ctattagtagg ggcagcatgt gttaaagtgg 960

attgataaaa aatgtggcaa gaaaaacaca ctgtggtttt atgggccgcc aagtacaggg 1020

aaaacaaact tggcaatggc cattgctaaa agtgttccag tataatggcat ggttaactgg 1080

aataatgaaa actttccatt taatgatgta gcaggaaaaa gcttgggtgt ctgggatgaa 1140

ggtattatta agtctacaat tgtagaagct gcaaaagcca ttttaggcgg gcaaccacc 1200

agggtagatc aaaaatgcg tggaaagtga gctgtgctg gagtacctgt ggttataacc 1260

agcaatggtg acattacttt tgttgtaagc gggaacacta caacaactgt acatgctaaa 1320

gccttaaaag agcgcgatggt aaagttaaac ttactgtaa gatgcagccc tgacatgggg 1380

ttactaacag aggctgatgt acaacagtgg cttacatggt gtaatgcaca aagctgggac 1440

cactatgaaa acitgggcaat aaactaacct ttgatttcc ctggaattaa tgcagatgcc 1500

ctccaccag acctccaac cacccaatt gtcacagaca ccagtatcag cagcagtgg 1560

ggtgaaagct ctgaagaact cagtgaaagc agcttttita acctcatcac cccaggcgcc 1620

tggaacactg aaaccccgcg ctctagtacg cccatccccg ggaccagttc aggagaatca 1680

tctgtcgaa gccagtttc ctccgaagt gtagctgcat cgtgggaaga agccttctac 1740

acaccttgg cagaccagtt tcgtgaactg ttagttgggg ttgattatgt gtgggacggt 1800

gtaaggggtt tacctgtctg ttgtgtgcaa catattaaca atagtggggg aggcttggga 1860

ctttgtcccc attgattaa tgtaggggct tggataatg gatggaaatt tcgagaattt 1920

acccagatt tggatgatg tagctgceat gtgggagcct ctaatccctt ttctgtgcta 1980

acctcaaaa aatgtgctta cctgtctgga ttgcaaagct ttgtagatta tgagtaagtc 2040

gacatactc 2049

<210> 25
 <211> 671
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: NS1 amino acid from parvovirus B19 clone 2-B1

<400> 25
 Met Glu Leu Phe Arg Gly Val Leu Gln Val Ser Ser Asn Val Leu Asp
 1 5 10 15

Cys Ala Asn Asp Asn Trp Trp Cys Ser Leu Leu Asp Leu Asp Thr Ser

Ser Ala Leu Lys Leu Ala Ile Tyr Lys Ala Thr Asn Leu Val Pro Thr
 260 265 270

Ser Thr Phe Leu Leu His Thr Asp Phe Glu Gln Val Met Cys Ile Lys
 275 280 285

Asn Asn Lys Ile Val Lys Leu Leu Leu Cys Gln Asn Tyr Asp Pro Leu
 290 295 300

Leu Val Gly Gln His Val Leu Lys Trp Ile Asp Lys Lys Cys Gly Lys
 305 310 315 320

Lys Asn Thr Leu Trp Phe Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Gly Lys Thr Asn
 325 330 335

Leu Ala Met Ala Ile Ala Lys Ser Val Pro Val Tyr Gly Met Val Asn
 340 345 350

Trp Asn Asn Glu Asn Phe Pro Phe Asn Asp Val Ala Gly Lys Ser Leu
 355 360 365

Val Val Trp Asp Glu Gly Ile Ile Lys Ser Thr Ile Val Glu Ala Ala
 370 375 380

Lys Ala Ile Leu Gly Gly Gln Pro Thr Arg Val Asp Gln Lys Met Arg
 385 390 395 400

Gly Ser Val Ala Val Pro Gly Val Pro Val Val Ile Thr Ser Asn Gly
 405 410 415

Asp Ile Thr Phe Val Val Ser Gly Asn Thr Thr Thr Thr Val His Ala
 420 425 430

Lys Ala Leu Lys Glu Arg Met Val Lys Leu Asn Phe Thr Val Arg Cys
 435 440 445

Ser Pro Asp Met Gly Leu Leu Thr Glu Ala Asp Val Gln Gln Trp Leu
 450 455 460

Thr Trp Cys Asn Ala Gln Ser Trp Asp His Tyr Glu Asn Trp Ala Ile
 465 470 475 480

Asn Tyr Thr Phe Asp Phe Pro Gly Ile Asn Ala Asp Ala Leu His Pro
 485 490 495

Asp Leu Gln Thr Thr Pro Ile Val Thr Asp Thr Ser Ile Ser Ser Ser
 500 505 510

Gly Gly Glu Ser Ser Glu Glu Leu Ser Glu Ser Ser Phe Phe Asn Leu
 515 520 525

Ile Thr Pro Gly Ala Trp Asn Thr Glu Thr Pro Arg Ser Ser Thr Pro
 530 535 540

Ile Pro Gly Thr Ser Ser Gly Glu Ser Ser Val Gly Ser Pro Val Ser
 545 550 555 560

Ser Glu Val Val Ala Ala Ser Trp Glu Glu Ala Phe Tyr Thr Pro Leu
 565 570 575

Ala Asp Gln Phe Arg Glu Leu Leu Val Gly Val Asp Tyr Val Trp Asp
 580 585 590

Gly Val Arg Gly Leu Pro Val Cys Cys Val Gln His Ile Asn Asn Ser
 595 600 605

Gly Gly Gly Leu Gly Leu Cys Pro His Cys Ile Asn Val Gly Ala Trp
 610 615 620

Tyr Asn Gly Trp Lys Phe Arg Glu Phe Thr Pro Asp Leu Val Arg Cys
 625 630 635 640

Ser Cys His Val Gly Ala Ser Asn Pro Phe Ser Val Leu Thr Cys Lys
 645 650 655

Lys Cys Ala Tyr Leu Ser Gly Leu Gln Ser Phe Val Asp Tyr Glu
 660 665 670

<210> 26
 <211> 2380
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: VP1 from parvovirus B19 clone 2-B1

<400> 26
 atactcaagc ttacaaaaca aaatgagtaa agaaagtggc aaatggtggg aaagtgatga 60

 taaatttgct aaagctgtgt atcagcaatt tgtggaatth tatgaaaagg ttactggaac 120

 agacttagag cttattcaaa tattaaaaga tcattataat atttctttag ataatccct 180

 agaaaacca tcctctttgt ttgacttagt tgctcgtatt aaaaataacc ttaaaaactc 240

 tccagactta tatagtcac attttcaaag tcatggacag ttatctgacc acccccatgc 300

 cttatcatcc agtagcagtc atgcagaacc tagaggagaa gatgcagtat tatctagtga 360

 agacttacac aagcctgggc aagttagcgt acaactaccc ggtactaact atgttgggcc 420

 tggcaatgag ctacaagctg ggccccgca aagtgtgtt gacagtgtg caaggattca 480

 tgactttagg tatagccaac tggctaagtt gggaataaat ccatatactc attggactgt 540

 agcagatgaa gagcttttaa aaaatataaa aaatgaaact gggtttcaag cacaagtagt 600

 aaaagactac ttiactttaa aagggtgcagc tgcccctgtg gccattttc aaggaagttt 660

 gccggaagtt cccgcttaca acgcctcaga aaaatacca agcatgactt cagttaattc 720

 tgcaagaacc agcactggtg caggaggggg gggcagtaat cctgtgaaaa gcatgtggag 780

 tgagggggcc acttttagtg ccaactctgt aacttgtaaa tttccagac aatttttaat 840

 tccatatgac ccagagcacc attataaggt gttttctccc gcagcaagta gctgccacaa 900

 tgccagtgga aaggaggcaa aggtttgcac cattagfcc ataatgggat actcaacccc 960

 atggagatat ttagatttta atgctttaaa tttatttttt tcacctttag agtttcagca 1020

 cttaatgaa aattatggaa gtatagctcc tgatgcttta actgtaacca tatcagaat 1080

tgctgttaag gatgttacgg acaaaaactgg aggggggggtg caggttactg acagcactac 1140
 agggcgcccta tgcatgttag tagaccatga atataagtac ccatatgtgt tagggcaagg 1200
 tcaagatact ttagccccag aacttcctat ttgggtatac tttcccctc aatacgtta 1260
 ctaaacagta ggagatgtta acacacaagg aatttctgga gacagcaaaa aattggcaag 1320
 tgaagaatca gcattttatg ttttgaaca cagttctttt cagcttttag gtacaggagg 1380
 tacagcaact atgtcttata agtttctcc agtgcccca gaaaatttag agggctgcag 1440
 tcaacacttt tatgaaatgt acaaccctt atacggatcc cgcttagggg ttcttgacac 1500
 attaggaggt gacccaaat ttagatcttt aacacatgaa gaccatgcaa ttcagcccca 1560
 aaacttcatg ccagggccac tagtaaacctc agtgtctaca aaggaggag acagctctag 1620
 tactggagct ggaaaagcct taacaggcct tagcacaggt acctctcaa aactagaat 1680
 atccttacgc ccgggccag tgtctcagcc gtaccaccac tgggacacag ataaatgt 1740
 cacaggaata aatgccattt ctcatggtca gaccattat ggtaacgctg aagacaaaga 1800
 gtatcagcaa ggagtgggta gatttccaaa tgaaaaagaa cagctaaaac agttacaggg 1860
 ttaaacatg cacacctact ttccaataa aggaaccag caatatacag atcaaattga 1920
 gcgcccccta atgtgggtt ctgtatggaa cagaagagcc cttcactatg aaagccagct 1980
 gtggagtaaa attccaaatt tagatgacag ttttaaact cagtttcag ccttaggagg 2040
 atggggtttg catcagccac ctctcaaat attttaaaa atattaccac aaagtgggcc 2100
 aattggaggt attaatcaa tgggaattac taccttagtt cagtatgccg tgggaattat 2160
 gacagtaacc atgacattta aattggggcc ccgtaaagct acgggacggt ggaatcctca 2220
 acctggagtg tatccccgc acgcagcagg tcatttacca tatgtactat atgacccac 2280

agctacagat gcaaaacaac accacagaca tggatatgaa aagcctgaag aattgtggac 2340

agccaaaagc cgtgtgcacc cattgtaagt cgacatactc 2380

- <210> 27
- <211> 781
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: VP1 amino acid from parvovirus B19 clone 2-B1

<400> 27
 Met Ser Lys Glu Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala
 1 5 10 15

Lys Ala Val Tyr Gln Gln Phe Val Glu Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly
 20 25 30

Thr Asp Leu Glu Leu Ile Gln Ile Leu Lys Asp His Tyr Asn Ile Ser
 35 40 45

Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala
 50 55 60

Arg Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asn Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His
 65 70 75 80

Phe Gln Ser His Gly Gln Leu Ser Asp His Pro His Ala Leu Ser Ser
 85 90 95

Ser Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly Glu Asp Ala Val Leu Ser Ser
 100 105 110

Glu Asp Leu His Lys Pro Gly Gln Val Ser Val Gln Leu Pro Gly Thr
 115 120 125

Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Gln Ala Gly Pro Pro Gln Ser
 130 135 140

Ala Val Asp Ser Ala Ala Arg Ile His Asp Phe Arg Tyr Ser Gln Leu
145 150 155 160

Ala Lys Leu Gly Ile Asn Pro Tyr Thr His Trp Thr Val Ala Asp Glu
165 170 175

Glu Leu Leu Lys Asn Ile Lys Asn Glu Thr Gly Phe Gln Ala Gln Val
180 185 190

Val Lys Asp Tyr Phe Thr Leu Lys Gly Ala Ala Ala Pro Val Ala His
195 200 205

Phe Gln Gly Ser Leu Pro Glu Val Pro Ala Tyr Asn Ala Ser Glu Lys
210 215 220

Tyr Pro Ser Met Thr Ser Val Asn Ser Ala Glu Ala Ser Thr Gly Ala
225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Ser Asn Pro Val Lys Ser Met Trp Ser Glu Gly Ala
245 250 255

Thr Phe Ser Ala Asn Ser Val Thr Cys Thr Phe Ser Arg Gln Phe Leu
260 265 270

Ile Pro Tyr Asp Pro Glu His His Tyr Lys Val Phe Ser Pro Ala Ala
275 280 285

Ser Ser Cys His Asn Ala Ser Gly Lys Glu Ala Lys Val Cys Thr Ile
290 295 300

Ser Pro Ile Met Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Arg Tyr Leu Asp Phe Asn
305 310 315 320

Ala Leu Asn Leu Phe Phe Ser Pro Leu Glu Phe Gln His Leu Ile Glu
325 330 335

Asn Tyr Gly Ser Ile Ala Pro Asp Ala Leu Thr Val Thr Ile Ser Glu
340 345 350

Ile Ala Val Lys Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Gly Gly Val Gln Val
355 360 365

Thr Asp Ser Thr Thr Gly Arg Leu Cys Met Leu Val Asp His Glu Tyr
370 375 380

Lys Tyr Pro Tyr Val Leu Gly Gln Gly Gln Asp Thr Leu Ala Pro Glu
385 390 395 400

Leu Pro Ile Trp Val Tyr Phe Pro Pro Gln Tyr Ala Tyr Leu Thr Val
405 410 415

Gly Asp Val Asn Thr Gln Gly Ile Ser Gly Asp Ser Lys Lys Leu Ala
420 425 430

Ser Glu Glu Ser Ala Phe Tyr Val Leu Glu His Ser Ser Phe Gln Leu
435 440 445

Leu Gly Thr Gly Gly Thr Ala Thr Met Ser Tyr Lys Phe Pro Pro Val
450 455 460

Pro Pro Glu Asn Leu Glu Gly Cys Ser Gln His Phe Tyr Glu Met Tyr
465 470 475 480

Asn Pro Leu Tyr Gly Ser Arg Leu Gly Val Pro Asp Thr Leu Gly Gly
485 490 495

Asp Pro Lys Phe Arg Ser Leu Thr His Glu Asp His Ala Ile Gln Pro
500 505 510

Gln Asn Phe Met Pro Gly Pro Leu Val Asn Ser Val Ser Thr Lys Glu
515 520 525

Gly Asp Ser Ser Ser Thr Gly Ala Gly Lys Ala Leu Thr Gly Leu Ser
530 535 540

Thr Gly Thr Ser Gln Asn Thr Arg Ile Ser Leu Arg Pro Gly Pro Val
545 550 555 560

Ser Gln Pro Tyr His His Trp Asp Thr Asp Lys Tyr Val Thr Gly Ile
565 570 575

Asn Ala Ile Ser His Gly Gln Thr Thr Tyr Gly Asn Ala Glu Asp Lys
580 585 590

Glu Tyr Gln Gln Gly Val Gly Arg Phe Pro Asn Glu Lys Glu Gln Leu
595 600 605

Lys Gln Leu Gln Gly Leu Asn Met His Thr Tyr Phe Pro Asn Lys Gly

<400> 28
 atactcaage ttacaaaaca aaatgacttc agttaattct gcagaagcca gcaactggtgc 60
 aggagggggg ggcagtaatc ctgtgaaaag catgtggagt gagggggcca cttttagtgc 120
 caactctgta acttgtacat tttccagaca atttttaatt ccatatgacc cagagcacca 180
 ttataagggtg ttttctcccg cagcaagtag ctgccacaat gccagtggaa aggaggcaaa 240
 ggtttgcacc attagtccca taatgggata ctcaacceca tggagatatt tagattttaa 300
 tgctttaaat ttatTTTTT caccittaga gtttcagcac ttaattgaaa attatggaag 360
 tatagctcct gatgctttaa ctgtaacat atcagaaatt gctgttaagg atgttacgga 420
 caaaactgga gggggggtgc aggttactga cagcactaca gggcctat gcatgttagt 480
 agaccatgaa tataagtacc catatgtgtt agggcaaggt caagatactt tagccccaga 540
 acttctatt tgggtatact ttccccctca atacgcttac ttaacagtag gagatgttaa 600
 cacacaagga atttctggag acagcaaaaa atfggcaagt gaagaatcag cattttatgt 660
 ttggaacac agttcttttc agcttttagg tacaggaggt acagcaacta tgtcttataa 720
 gtttctcca gtgccccag aaaatttaga gggctgcagt caacactttt atgaaatgta 780
 caaccctta tacggatccc gcttaggggt tctgacaca ttaggaggtg acccaaaatt 840
 tagatcttta acacatgaag accatgcaat tcagcccaa aacttcatgc cagggccact 900
 agtaaactca gtgtctacaa aggagggaga cagctctagt actggagctg gaaaagcctt 960
 aacagcctt agcacaggtta cctctcaaaa cactagaata tccttacgcc ctgggccagt 1020
 gtctcagccg taccaccact gggacacaga taaatatgtc acaggaataa atgccatttc 1080
 tcatggtcag accacttatg gtaacgtga agacaaagag tatcagcaag gagtgggtag 1140

atttccaaat gaaaaagaac agctaaaaca gttacagggt ttaaacaatgc acacctactt 1200

tccaataaa ggaaccacgc aatatacaga tcaaattgag cgccccctaa tggtaggttc 1260

tgtatggaac agaagagccc ttcactatga aagccagctg tggagtaaaa ttccaaattt 1320

agatgacagt ttiaaaactc agtttgacgc cttaggagga tggggtttgc atcagccacc 1380

tcctcaaata ttttaaaaa tattaccaca aagtgggcca attggaggtta ttaatcaat 1440

gggaattact accttagttc agtatgccgt gggaattatg acagtaacca tgacatttaa 1500

attggggccc cgtaaagcta cgggacggtg gaatcctcaa cctggagtgt atccccgca 1560

cgcagcaggt catttaccat atgtactata tgacccaca gctacagatg caaaacaaca 1620

ccacagacat ggatatgaaa agcctgaaga attgtggaca gccaaaagcc gtgtgcaccc 1680

attgtaagtc gacatactc 1699

<210> 29
 <211> 554
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: VP2 amino acid from parvovirus B19 clone 2-B1

<400> 29
 Met Thr Ser Val Asn Ser Ala Glu Ala Ser Thr Gly Ala Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Asn Pro Val Lys Ser Met Trp Ser Glu Gly Ala Thr Phe Ser
 20 25 30
 Ala Asn Ser Val Thr Cys Thr Phe Ser Arg Gln Phe Leu Ile Pro Tyr
 35 40 45
 Asp Pro Glu His His Tyr Lys Val Phe Ser Pro Ala Ala Ser Ser Cys

50	55	60																	
His	Asn	Ala	Ser	Gly	Lys	Glu	Ala	Lys	Val	Cys	Thr	Ile	Ser	Pro	Ile				
65					70					75					80				
Met	Gly	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Arg	Tyr	Leu	Asp	Phe	Asn	Ala	Leu	Asn				
				85					90						95				
Leu	Phe	Phe	Ser	Pro	Leu	Glu	Phe	Gln	His	Leu	Ile	Glu	Asn	Tyr	Gly				
			100					105						110					
Ser	Ile	Ala	Pro	Asp	Ala	Leu	Thr	Val	Thr	Ile	Ser	Glu	Ile	Ala	Val				
		115					120					125							
Lys	Asp	Val	Thr	Asp	Lys	Thr	Gly	Gly	Gly	Val	Gln	Val	Thr	Asp	Ser				
	130					135					140								
Thr	Thr	Gly	Arg	Leu	Cys	Met	Leu	Val	Asp	His	Glu	Tyr	Lys	Tyr	Pro				
145					150					155					160				
Tyr	Val	Leu	Gly	Gln	Gly	Gln	Asp	Thr	Leu	Ala	Pro	Glu	Leu	Pro	Ile				
			165						170						175				
Trp	Val	Tyr	Phe	Pro	Pro	Gln	Tyr	Ala	Tyr	Leu	Thr	Val	Gly	Asp	Val				
			180					185						190					
Asn	Thr	Gln	Gly	Ile	Ser	Gly	Asp	Ser	Lys	Lys	Leu	Ala	Ser	Glu	Glu				
		195					200						205						
Ser	Ala	Phe	Tyr	Val	Leu	Glu	His	Ser	Ser	Phe	Gln	Leu	Leu	Gly	Thr				
	210					215					220								
Gly	Gly	Thr	Ala	Thr	Met	Ser	Tyr	Lys	Phe	Pro	Pro	Val	Pro	Pro	Glu				
225					230					235					240				
Asn	Leu	Glu	Gly	Cys	Ser	Gln	His	Phe	Tyr	Glu	Met	Tyr	Asn	Pro	Leu				
			245						250					255					
Tyr	Gly	Ser	Arg	Leu	Gly	Val	Pro	Asp	Thr	Leu	Gly	Gly	Asp	Pro	Lys				
			260					265					270						
Phe	Arg	Ser	Leu	Thr	His	Glu	Asp	His	Ala	Ile	Gln	Pro	Gln	Asn	Phe				
	275						280						285						

Met Pro Gly Pro Leu Val Asn Ser Val Ser Thr Lys Glu Gly Asp Ser
 290 295 300

Ser Ser Thr Gly Ala Gly Lys Ala Leu Thr Gly Leu Ser Thr Gly Thr
 305 310 315 320

Ser Gln Asn Thr Arg Ile Ser Leu Arg Pro Gly Pro Val Ser Gln Pro
 325 330 335

Tyr His His Trp Asp Thr Asp Lys Tyr Val Thr Gly Ile Asn Ala Ile
 340 345 350

Ser His Gly Gln Thr Thr Tyr Gly Asn Ala Glu Asp Lys Glu Tyr Gln
 355 360 365

Gln Gly Val Gly Arg Phe Pro Asn Glu Lys Glu Gln Leu Lys Gln Leu
 370 375 380

Gln Gly Leu Asn Met His Thr Tyr Phe Pro Asn Lys Gly Thr Gln Gln
 385 390 395 400

Tyr Thr Asp Gln Ile Glu Arg Pro Leu Met Val Gly Ser Val Trp Asn
 405 410 415

Arg Arg Ala Leu His Tyr Glu Ser Gln Leu Trp Ser Lys Ile Pro Asn
 420 425 430

Leu Asp Asp Ser Phe Lys Thr Gln Phe Ala Ala Leu Gly Gly Trp Gly
 435 440 445

Leu His Gln Pro Pro Pro Gln Ile Phe Leu Lys Ile Leu Pro Gln Ser
 450 455 460

Gly Pro Ile Gly Gly Ile Lys Ser Met Gly Ile Thr Thr Leu Val Gln
 465 470 475 480

Tyr Ala Val Gly Ile Met Thr Val Thr Met Thr Phe Lys Leu Gly Pro
 485 490 495

Arg Lys Ala Thr Gly Arg Trp Asn Pro Gln Pro Gly Val Tyr Pro Pro
 500 505 510

His Ala Ala Gly His Leu Pro Tyr Val Leu Tyr Asp Pro Thr Ala Thr
 515 520 525

ataaagtffc aaactatggt aaactgggtg tgtgaaaaca gagtgtttac agaggataag 720

tggaaactag ttgactttaa ccagtacact ttactaagca gtagtcacag tggaaagttt 780

caaatcaaa gtgcactaaa actagcaatt tataaagcaa ctaatttagt gcctactagc 840

acatttttat tgcatacaga ctttgagcaa gttatgtgta ttaaagacaa taaaattggt 900

aaattgttac ttigtcaaaa ctatgacccc ctattagtgg ggcagcatgt gttaaagtgg 960

attgataaaa aatgtggcaa gaaaaacaca ctgtggtttt atggaccgcc aagtacaggg 1020

aaaacaaact tggcaatggc cattgctaaa agtgttccag tataatggcat ggttaactgg 1080

aataatgaaa actttccatt taatgatgta gcaggaaaaa gcttgggtgt ctgggatgaa 1140

ggtattatta agtctacaat tgtagaagct gcaaaagcca ttttaggcgg gcaaccacc 1200

agggtagatc aaaaaatgcg tggaaagtga gctgtgctg gagtaccctg ggttataacc 1260

agcaatggtg acattacttt tgttgaagc gggaacacta caacaactgt acatgctaaa 1320

gccttaaaag agcgcgatgt aaagttaaac ttactgtaa gatgcagccc tgacatgggg 1380

ttactaacag aggctgatgt acaacagtgg cttacatggt gtaatgcaca aagctgggac 1440

cactatgaaa actgggcaat aaactacact ttgatttcc ctggaattaa tgcagatgcc 1500

ctccaccag acctccaac cacccaatt gtcacagaca ccagtatcag cagcagtgg 1560

ggtgaaagct ctgaagaact cagtgaaagc agctttttta acctcatcac cccagcgccc 1620

tggaacactg aaaccccgcg ctctagtacg cccatccccg ggaccagttc aggagaatca 1680

tctgtcgaa gccagtttc ctccgaagt gtagctgcat cgtgggaaga agccttctac 1740

acaccttgg cagaccagtt tegtgaactg ttagttgggg ttgattatgt gtgggacggt 1800

gtaaggggtt tacctgtctg ttgtgtgcaa catattaaca atagtggggg aggcttggga 1860

ctttgtccce attgcattaa tgtaggggct tggataatg gatggaaatt tcgagaattt 1920
 accccagatt tggatcgatg tagctgccat gtgggagctt ctaatccctt ttctgtgcta 1980
 acctgcaaaa aatgtgctta cctgtctgga ttgcaaagct ttgtagatta tgagtaagtc 2040
 gacatactc 2049

<210> 31
 <211> 671
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: NS1 amino acid from parvovirus B19 clone 2-B6

<400> 31
 Met Glu Leu Phe Arg Gly Val Leu Gln Val Ser Ser Asn Val Leu Asp
 1 5 10 15

Cys Ala Asn Asp Asn Trp Trp Cys Ser Leu Leu Asp Leu Asp Thr Ser
 20 25 30

Asp Trp Glu Pro Leu Thr His Thr Asn Arg Leu Met Ala Ile Tyr Leu
 35 40 45

Ser Ser Val Ala Ser Lys Leu Asp Phe Thr Gly Gly Pro Leu Ala Gly
 50 55 60

Cys Leu Tyr Phe Phe Gln Val Glu Cys Asn Lys Phe Glu Glu Gly Tyr
 65 70 75 80

His Ile His Val Val Ile Gly Gly Pro Gly Leu Asn Pro Arg Asn Leu
 85 90 95

Thr Val Cys Val Glu Gly Leu Phe Asn Asn Val Leu Tyr His Leu Val
 100 105 110

Thr Glu Asn Leu Lys Leu Lys Phe Leu Pro Gly Met Thr Thr Lys Gly

Trp Asn Asn Glu Asn Phe Pro Phe Asn Asp Val Ala Gly Lys Ser Leu
 355 360 365

Val Val Trp Asp Glu Gly Ile Ile Lys Ser Thr Ile Val Glu Ala Ala
 370 375 380

Lys Ala Ile Leu Gly Gly Gln Pro Thr Arg Val Asp Gln Lys Met Arg
 385 390 395 400

Gly Ser Val Ala Val Pro Gly Val Pro Val Val Ile Thr Ser Asn Gly
 405 410 415

Asp Ile Thr Phe Val Val Ser Gly Asn Thr Thr Thr Thr Val His Ala
 420 425 430

Lys Ala Leu Lys Glu Arg Met Val Lys Leu Asn Phe Thr Val Arg Cys
 435 440 445

Ser Pro Asp Met Gly Leu Leu Thr Glu Ala Asp Val Gln Gln Trp Leu
 450 455 460

Thr Trp Cys Asn Ala Gln Ser Trp Asp His Tyr Glu Asn Trp Ala Ile
 465 470 475 480

Asn Tyr Thr Phe Asp Phe Pro Gly Ile Asn Ala Asp Ala Leu His Pro
 485 490 495

Asp Leu Gln Thr Thr Pro Ile Val Thr Asp Thr Ser Ile Ser Ser Ser
 500 505 510

Gly Gly Glu Ser Ser Glu Glu Leu Ser Glu Ser Ser Phe Phe Asn Leu
 515 520 525

Ile Thr Pro Gly Ala Trp Asn Thr Glu Thr Pro Arg Ser Ser Thr Pro
 530 535 540

Ile Pro Gly Thr Ser Ser Gly Glu Ser Ser Val Gly Ser Pro Val Ser
 545 550 555 560

Ser Glu Val Val Ala Ala Ser Trp Glu Glu Ala Phe Tyr Thr Pro Leu
 565 570 575

Ala Asp Gln Phe Arg Glu Leu Leu Val Gly Val Asp Tyr Val Trp Asp
 580 585 590

Gly Val Arg Gly Leu Pro Val Cys Cys Val Gln His Ile Asn Asn Ser
 595 600 605

Gly Gly Gly Leu Gly Leu Cys Pro His Cys Ile Asn Val Gly Ala Trp
 610 615 620

Tyr Asn Gly Trp Lys Phe Arg Glu Phe Thr Pro Asp Leu Val Arg Cys
 625 630 635 640

Ser Cys His Val Gly Ala Ser Asn Pro Phe Ser Val Leu Thr Cys Lys
 645 650 655

Lys Cys Ala Tyr Leu Ser Gly Leu Gln Ser Phe Val Asp Tyr Glu
 660 665 670

<210> 32
 <211> 2380
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: VP1 from parvovirus B19 clone
 2-B6

<400> 32
 atactcaagc ttacaaaaca aatgagtaa agaaagtggc aaatggtggg aaagtgatga 60
 taaatttgct aaagctgtgt atcagcaatt tgtggaattt tatgaaaagg ttactggaac 120
 agacttagag cttattcaaa tattaaaaga tcattataat atttctttag ataatccct 180
 agaaaacca tcctctttgt ttgacttagt tgctcgtatt aaaaataacc ttaaaaactc 240
 tccagactta tatagtcatc attttcaaag tcatggacag ttatctgacc accccatgc 300
 cttatcatcc agtagcagtc atgcagaacc tagaggagaa gatgcagtat tatctagtga 360
 agacttacac aagcctgggc aagttagcgt acaactaccc ggtactaact atgttgggcc 420

tggcaatgag ctacaagctg ggccccgca aagtgctgtt gacagtgtg caaggattca 480
 tgactttagg tatagccaac tggctaagtt gggaataaat ccatatactc attggactgt 540
 agcagatgaa gagcttttaa aaaatataaa aatgaaact gggtttcaag cacaagtagt 600
 aaaagactac ttiactttaa aagggtgcgc tgcctctgtg gccattttc aaggaagttt 660
 gccggaagtt cccgcttaca acgcctcaga aaaatacca agcatgactt cagttaattc 720
 tgcagaagcc agcactggtg caggaggggg gggcagtaat cctgtgaaaa gcatgtggag 780
 tgagggggcc acttttagtg ccaactctgt aacttgtaca tttccagac aatttttaat 840
 tccatgatgac ccagagcacc attataaggt gttttctccc gcagcaagta gctgccacaa 900
 tgccagtgga aaggaggcaa aggtttgcac cattagtccc ataatgggat actcaacccc 960
 atggagatat ttagatttta atgctttaaa tttatttttt tcacctttag agtttcagca 1020
 cttaatgaa aattatggaa gtatagctcc tgatgcttta actgtaacca tatcagaaat 1080
 tgctgttaag gatgttaca acaaaactgg agggggggtg caggttactg acagcactac 1140
 agggcgccta tgcatgttag tagaccatga atataagtac ccatatgtgt tagggcaagg 1200
 tcaagatact ttagccccag aacttctat ttgggtatac tttccccctc aatacgctta 1260
 cttaacagta ggagatgta acacacaagg aatttctgga gacagcaaaa aattggcaag 1320
 tgaagaatca gcattttatg ttttgaaca cagttctttt cagcttttag gtacaggagg 1380
 tacagcaact atgtcttata agtttcttcc agtgccccca gaaaatttag agggctgcag 1440
 tcaacacttt tatgaaatgt acaaccctt atacggatcc cgcttagggg ttctgacac 1500
 attagagggt gacccaaaat ttagatcttt aacacatgaa gaccatgcaa ttcagcccca 1560

aaacttcatg ccagggccac tagtaaactc agtgtctaca aaggaggag acagctctag 1620

tactggagct ggaaaagcct taacagcct tagcacaggt acctctcaa aactagaat 1680

atccttacgc ccigggccag tgtctcagcc gtaccaccac tgggacacag ataaatatgt 1740

cacaggaata aatgccattt ctcatgggtca gaccattat ggtaacgctg aagacaaaga 1800

gtatcagcaa ggagtgggta gatttccaaa tgaaaaagaa cagctaaaac agttacaggg 1860

tttaaacatg cacacctact ttccaataa aggaaccag caatatacag atcaaattga 1920

gcgcccccta atggtgggtt ctgtatggaa cagaagagcc cttcactatg aaagccagct 1980

gtggagtaaa attccaaatt tagatgacag ttttaaaact cagtttgacg ctttaggagg 2040

atggggtttg catcagccac ctctcaa atctttaaaa atattaccac aaagtgggcc 2100

aattggaggt attaaatcaa tgggaattac taccttagtt cagtatgccg tgggaattat 2160

gacagtaacc atgacattta aattggggcc ccgtaaagct acgggacggt ggaatcctca 2220

acctggagtg tatccccgc acgcagcagg tcatttacca tatgtactat atgacccac 2280

agctacagat gcaaaacaac accacagaca tggatatgaa aagcctgaag aattgtggac 2340

agccaaaagc cgtgtgcacc cattgtaagt cgacatactc 2380

<210> 33
 <211> 781
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: VP1 amino acid from parvovirus B19 clone 2-B6

<400> 33
 Met Ser Lys Glu Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala

1 5 10 15

 Lys Ala Val Tyr Gln Gln Phe Val Glu Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly
 20 25 30

 Thr Asp Leu Glu Leu Ile Gln Ile Leu Lys Asp His Tyr Asn Ile Ser
 35 40 45

 Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala
 50 55 60

 Arg Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asn Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His
 65 70 75 80

 Phe Gln Ser His Gly Gln Leu Ser Asp His Pro His Ala Leu Ser Ser
 85 90 95

 Ser Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly Glu Asp Ala Val Leu Ser Ser
 100 105 110

 Glu Asp Leu His Lys Pro Gly Gln Val Ser Val Gln Leu Pro Gly Thr
 115 120 125

 Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Gln Ala Gly Pro Pro Gln Ser
 130 135 140

 Ala Val Asp Ser Ala Ala Arg Ile His Asp Phe Arg Tyr Ser Gln Leu
 145 150 155 160

 Ala Lys Leu Gly Ile Asn Pro Tyr Thr His Trp Thr Val Ala Asp Glu
 165 170 175

 Glu Leu Leu Lys Asn Ile Lys Asn Glu Thr Gly Phe Gln Ala Gln Val
 180 185 190

 Val Lys Asp Tyr Phe Thr Leu Lys Gly Ala Ala Ala Pro Val Ala His
 195 200 205

 Phe Gln Gly Ser Leu Pro Glu Val Pro Ala Tyr Asn Ala Ser Glu Lys
 210 215 220

 Tyr Pro Ser Met Thr Ser Val Asn Ser Ala Glu Ala Ser Thr Gly Ala
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Ser Asn Pro Val Lys Ser Met Trp Ser Glu Gly Ala
 245 250 255

Thr Phe Ser Ala Asn Ser Val Thr Cys Thr Phe Ser Arg Gln Phe Leu
 260 265 270

Ile Pro Tyr Asp Pro Glu His His Tyr Lys Val Phe Ser Pro Ala Ala
 275 280 285

Ser Ser Cys His Asn Ala Ser Gly Lys Glu Ala Lys Val Cys Thr Ile
 290 295 300

Ser Pro Ile Met Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Arg Tyr Leu Asp Phe Asn
 305 310 315 320

Ala Leu Asn Leu Phe Glu Ser Pro Leu Glu Phe Gln His Leu Ile Glu
 325 330 335

Asn Tyr Gly Ser Ile Ala Pro Asp Ala Leu Thr Val Thr Ile Ser Glu
 340 345 350

Ile Ala Val Lys Asp Val Thr Asn Lys Thr Gly Gly Gly Val Gln Val
 355 360 365

Thr Asp Ser Thr Thr Gly Arg Leu Cys Met Leu Val Asp His Glu Tyr
 370 375 380

Lys Tyr Pro Tyr Val Leu Gly Gln Gly Gln Asp Thr Leu Ala Pro Glu
 385 390 395 400

Leu Pro Ile Trp Val Tyr Phe Pro Pro Gln Tyr Ala Tyr Leu Thr Val
 405 410 415

Gly Asp Val Asn Thr Gln Gly Ile Ser Gly Asp Ser Lys Lys Leu Ala
 420 425 430

Ser Glu Glu Ser Ala Phe Tyr Val Leu Glu His Ser Ser Phe Gln Leu
 435 440 445

Leu Gly Thr Gly Gly Thr Ala Thr Met Ser Tyr Lys Phe Pro Pro Val
 450 455 460

Pro Pro Glu Asn Leu Glu Gly Cys Ser Gln His Phe Tyr Glu Met Tyr
 465 470 475 480

Asn Pro Leu Tyr Gly Ser Arg Leu Gly Val Pro Asp Thr Leu Gly Gly
 485 490 495

Asp Pro Lys Phe Arg Ser Leu Thr His Glu Asp His Ala Ile Gln Pro
 500 505 510

Gln Asn Phe Met Pro Gly Pro Leu Val Asn Ser Val Ser Thr Lys Glu
 515 520 525

Gly Asp Ser Ser Ser Thr Gly Ala Gly Lys Ala Leu Thr Gly Leu Ser
 530 535 540

Thr Gly Thr Ser Gln Asn Thr Arg Ile Ser Leu Arg Pro Gly Pro Val
 545 550 555 560

Ser Gln Pro Tyr His His Trp Asp Thr Asp Lys Tyr Val Thr Gly Ile
 565 570 575

Asn Ala Ile Ser His Gly Gln Thr Thr Tyr Gly Asn Ala Glu Asp Lys
 580 585 590

Glu Tyr Gln Gln Gly Val Gly Arg Phe Pro Asn Glu Lys Glu Gln Leu
 595 600 605

Lys Gln Leu Gln Gly Leu Asn Met His Thr Tyr Phe Pro Asn Lys Gly
 610 615 620

Thr Gln Gln Tyr Thr Asp Gln Ile Glu Arg Pro Leu Met Val Gly Ser
 625 630 635 640

Val Trp Asn Arg Arg Ala Leu His Tyr Glu Ser Gln Leu Trp Ser Lys
 645 650 655

Ile Pro Asn Leu Asp Asp Ser Phe Lys Thr Gln Phe Ala Ala Leu Gly
 660 665 670

Gly Trp Gly Leu His Gln Pro Pro Pro Gln Ile Phe Leu Lys Ile Leu
 675 680 685

Pro Gln Ser Gly Pro Ile Gly Gly Ile Lys Ser Met Gly Ile Thr Thr
 690 695 700

Leu Val Gln Tyr Ala Val Gly Ile Met Thr Val Thr Met Thr Phe Lys

agacatgaa tataagtacc catatgtgtt agggcaaggt caagatactt tagccccaga 540

acttcttatt tgggtatact ttccccctca atacgcttac ttaacagtag gagatgttaa 600

cacacaagga atttctggag acagcaaaaa attggcaagt gaagaatcag cattttatgt 660

tttggaacac agttcttttc agcttttagg tacaggaggt acagcaacta tgtcttataa 720

gtttcctcca gtgccccag aaaatttaga gggctgcagt caacactttt atgaaatgta 780

caaccctta tacggatccc gcttaggggt tcctgacaca ttaggaggtg acccaaaatt 840

tagatcttta acacatgaag accatgcaat tcagcccaa aacttcatgc cagggccact 900

agtaaactca gtgtctacaa aggagggaga cagctctagt actggagctg gaaaagcctt 960

aacagcctt agcacaggtta cctctcaaaa cactagaata tccttacgcc ctgggccagt 1020

gtctcagccg taccaccact gggacacaga taaatatgtc acaggaataa atgccatttc 1080

tcatggtcag accacttatg gtaacgctga agacaaagag tatcagcaag gagtgggtag 1140

atttccaaat gaaaaagaac agctaaaaca gttacagggt ttaaacatgc acacctactt 1200

tccaataaa ggaaccagc aatatacaga tcaaatgag cgccccctaa tggtaggttc 1260

tgtatggaac agaagagccc ttcactatga aagccagctg tggagtataa ttccaaattt 1320

agatgacagt tttaaaactc agtttgcagc cttaggagga tggggtttgc atcagccacc 1380

tcctcaata ttttaaaaa tattaccaca aagtgggcca attggaggtta ttaaatcaat 1440

gggaattact accttagttc agtatgccgt gggaattatg acagtaacca tgacatttaa 1500

attggggccc cgtaaagcta cgggacgggtg gaatcctcaa cctggagtgt atccccgca 1560

cgcagcaggt catttaccat atgtactata tgacccaca gctacagatg caaaacaaca 1620

ccacagacat ggatatgaaa agcctgaaga attgtggaca gccaaaagcc gtgtgcaccc 1680

attgtaagtc gacatactc 1699

- <210> 35
- <211> 554
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: VP2 amino acid from parvovirus B19 clone 2-B6

<400> 35
 Met Thr Ser Val Asn Ser Ala Glu Ala Ser Thr Gly Ala Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Asn Pro Val Lys Ser Met Trp Ser Glu Gly Ala Thr Phe Ser
 20 25 30

Ala Asn Ser Val Thr Cys Thr Phe Ser Arg Gln Phe Leu Ile Pro Tyr
 35 40 45

Asp Pro Glu His His Tyr Lys Val Phe Ser Pro Ala Ala Ser Ser Cys
 50 55 60

His Asn Ala Ser Gly Lys Glu Ala Lys Val Cys Thr Ile Ser Pro Ile
 65 70 75 80

Met Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Arg Tyr Leu Asp Phe Asn Ala Leu Asn
 85 90 95

Leu Phe Phe Ser Pro Leu Glu Phe Gln His Leu Ile Glu Asn Tyr Gly
 100 105 110

Ser Ile Ala Pro Asp Ala Leu Thr Val Thr Ile Ser Glu Ile Ala Val
 115 120 125

Lys Asp Val Thr Asn Lys Thr Gly Gly Gly Val Gln Val Thr Asp Ser
 130 135 140

Thr Thr Gly Arg Leu Cys Met Leu Val Asp His Glu Tyr Lys Tyr Pro

Gln Gly Leu Asn Met His Thr Tyr Phe Pro Asn Lys Gly Thr Gln Gln
 385 390 395 400

Tyr Thr Asp Gln Ile Glu Arg Pro Leu Met Val Gly Ser Val Trp Asn
 405 410 415

Arg Arg Ala Leu His Tyr Glu Ser Gln Leu Trp Ser Lys Ile Pro Asn
 420 425 430

Leu Asp Asp Ser Phe Lys Thr Gln Phe Ala Ala Leu Gly Gly Trp Gly
 435 440 445

Leu His Gln Pro Pro Pro Gln Ile Phe Leu Lys Ile Leu Pro Gln Ser
 450 455 460

Gly Pro Ile Gly Gly Ile Lys Ser Met Gly Ile Thr Thr Leu Val Gln
 465 470 475 480

Tyr Ala Val Gly Ile Met Thr Val Thr Met Thr Phe Lys Leu Gly Pro
 485 490 495

Arg Lys Ala Thr Gly Arg Trp Asn Pro Gln Pro Gly Val Tyr Pro Pro
 500 505 510

His Ala Ala Gly His Leu Pro Tyr Val Leu Tyr Asp Pro Thr Ala Thr
 515 520 525

Asp Ala Lys Gln His His Arg His Gly Tyr Glu Lys Pro Glu Glu Leu
 530 535 540

Trp Thr Ala Lys Ser Arg Val His Pro Leu
 545 550

<210> 36
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer VP-5

<400> 36

aggaagtttg ccggaagttc 20

<210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer VP-3

<400> 37
 gtgctgaaac tctaaagtg 20

<210> 38
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer VP2-5

<400> 38
 gacatggata tgaaaagcct gaag 24

<210> 39
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer VP2-3

<400> 39
 gttgttcata tctggttaag tact 24

<210> 40
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer K-1sp

<400> 40

ataaatccat atactcatt

19

<210> 41

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer K-2sp

<400> 41

ctaaagtatc ctgaccttg

19

<210> 42

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer Hicks-5

<400> 42

cccgcttat gcaaattgggc ag

22

<210> 43

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer Hicks-3

<400> 43

ttgtgttagg ctgtcttata gg 22

<210> 44
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer NS1-5

<400> 44
 atactctcta gacaaaacaa aatggagcta tttagagggg tgcttcaagt ttct 54

<210> 45
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer NS1-3

<400> 45
 gagtatgtcg acttactcat aatctacaaa gctttgcaat ccagacag 48

<210> 46
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer VP1-5SN

<400> 46
 atactcaagc ttacaaaaca aatgagtaa agaaagtggc aaatggtggg aaagt 55

<210> 47
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer VPALL-3

<400> 47
 gagtatgtcg acttacaatg ggtgcacacg gcttttggt gtccacaatt c 51

<210> 48
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer VP2-5SN

<400> 48
 atactcaagc ttacaaaaca aatgacttc agttaattct gcagaagcca gcact 55

<210> 49
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: VSPC1

<400> 49
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa atccttaaca gcaatttctg ata 43

<210> 50
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: VSPC2

<400> 50

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa cgccctgtag tgctgtcag 39

<210> 51
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: VSPC3

<400> 51
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa tatacccaaa taggaagttc tg 42

<210> 52
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: VSPC4

<400> 52
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa taaatgctg attcttact tgc 43

<210> 53
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: VSPC5

<400> 53
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa tgctgtacct cctgtaccta 40

<210> 54
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: VSPC6

<400> 54
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agccctctaa attttctggg 40

<210> 55
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: VSPC7

<400> 55
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa ctcctaattgt gtcaggaacc 40

<210> 56
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer VSA1

<400> 56
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gccatatact cattggactg t 51

<210> 57
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer VSA2

<400> 57

aattctaata cgactcacta tagggagaag gccagagcac cattataa 48

<210> 58
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer VSA3

<400> 58
 aattctaata cgactcacta tagggagaag gcacaatgcc agtggaaa 48

<210> 59
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer VSP2

<400> 59
 gtgctgaaac tctaaaggt 19

<210> 60
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer VSP1

<400> 60
 ggaggcaaag gtttgca 17

<210> 61
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer VSPPR1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)
 <223> where 'c' is modified 5' with fluorescein phosphoramidite

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)
 <223> where 't' is modified 3' with DABCYL

<400> 61
 cccatggaga tatttagatt 20

<210> 62
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate CH80-1

<400> 62
 ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagac ttttaaaaa tataaaaaat 60
 gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
 cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
 tacciaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
 agtaatcctg ttaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctcctgtaact 300
 tgtacatfff ccagacagtt ttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtttt 360

tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420
 agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaatttg 480
 tttttttcac ctttagagtt tcagcattta attgaaaact atggaagtat agctcctgat 540
 gctttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
 ggagtacaag ttactgacag cactaccggg cgctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
 aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 63
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate CH81-3

<400> 63
 ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
 gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
 cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
 tacciaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
 agtaatcctg ttaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa cttctgtaact 300
 tgtacatfff ccagacagtt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taaggtgttt 360
 tcgcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420
 agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatacttag attttaatgc tttaaattta 480
 tttttttcac ctttagagtt tcagcattta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540

gctttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600

ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660

aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 64
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL1-4

<400> 64
 ataatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc atttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

agtaatcctg tgaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgcaa ctctgtaact 300

tgtacatfff ccagacaatt ttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtfff 360

tctcccag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420

agtccataa tgggatactc aacccatgg agatatttag atttaatgc tttaaattta 480

ttttttcac ctttagagtt tcagactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540

gctttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600

ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660

aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 65
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL2-1

<400> 65
 ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaa tataaaaaat 60

 gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

 cctgtggccc attttaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaaa 180

 tacccaagca tgaattcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

 agtaatcctg tgaagagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300

 tgtacatfff ccagacaatt ttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtfff 360

 tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt tgcaccatt 420

 agtcccataa tgggatactc aacccatgg agatatttag atttaaatgc tttaaattta 480

 tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540

 gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600

 ggggtgcagg ttactgacag cactacaggc cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660

 aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 66
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL3-1

<400> 66
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

ccgtggccc attttcaagg aagtttggcg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

agtaatcctg tgaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300

tgtacatfff ccagacaatt ttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtttt 360

tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420

agtccataa tgggatactc aacccatgg agatatttag atttaatgc tttaaattta 480

ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540

gctttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600

ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgttagtaga ccatgaatat 660

aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 67
<211> 700
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL4-3

<400> 67
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

agtaatcctg tgaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300

tgtacatfff ccagacaatt ttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtttt 360

tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420

agtccataa tgggatactc aacccatgg agatatttag atttaatgc tttaaattta 480

ttttttcac ctttagagtt tcagactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540

gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600

ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660

aagtacccat atgtgttagg gcaaggteag gatactttag 700

<210> 68
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL5-2

<400> 68
 ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

agtaatcctg tgaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
 tgtacatfff ccagacaatt ttttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtfff 360
 tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420
 agtcccataa tgggatactc aacccatgg agatatttag atttaatgc tttaaattta 480
 tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
 gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
 ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
 aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 69
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL6-2

<400> 69
 ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
 gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
 cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaaa 180
 taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
 agtaatcctg tgaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
 tgtacatfff ccagacaatt ttttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtfff 360
 tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420

agtccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
 tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
 gctttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
 ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
 aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 70
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL7-3

<400> 70
 ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
 gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
 cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaaa 180
 tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
 agtaatcctg tgaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
 tgtacatfff ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taaggtgttt 360
 tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420
 agtccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
 tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
 gctttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600

ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660

aagtacccat atgtgtagg gcaaggtcag gatactttag 700

- <210> 71
- <211> 700
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL8-2

<400> 71
 ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

agtaatcctg tgaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300

tgtacatfff ccagacaatt ttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtfff 360

tctccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420

agtccataa tgggatactc aacccatgg agatatttag gtttaaatgc tttaaattta 480

ttttttcac ctttagagtt tcagactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540

gctttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600

ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660

aagtacccat atgtgtagg gcaaggtcag gatactttag 700

- <210> 72
- <211> 700

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL9-1

<400> 72
 ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaa tataaaaaat 60
 gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
 cctgtggccc atttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaaa 180
 taccaagca tgacttcaat taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
 agtaatcctg tcaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgcaa ctctgtaact 300
 tgtacatfff ccagacagtt tttaatteca tatgaccagc agcaccatta taagtgfff 360
 tctccgcag ccagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420
 agtcccataa tgggatactc aacccatgg agatatttag atttaaatgc tttaaattta 480
 tttttttcac ctttagagtt tcagactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
 gctttaactg taaccatadc agaaattgct gttaaggatg ttacggaca aactggaggg 600
 ggggtgcagg ttactgacag cactacaggc gcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
 aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 73
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL9-9

<400> 73
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

agtaatcctg tgaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300

tgtacatfff ccagacaatt ttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtfff 360

tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420

agtccataa tgggatactc aacccatgg agatatttag atttaatgc tttaaattta 480

ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540

gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600

ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgttagtaga ccatgaatat 660

aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 74
<211> 700
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL10-2

<400> 74
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

agtaatcctg tgaagagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300

tgtacatttt ccagacaatt ttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtttt 360

tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420

agtccataa tgggatactc aacccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480

ttttttcac ctttagagtt tcagactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540

gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600

ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660

aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 75
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL11-1

<400> 75
 ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc attttaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

agtaatcctg tgaagagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300

tgtacatfff ccagacaatt tftaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtfff 360

tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420

agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tftaaattta 480

ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540

gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600

ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660

aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttat 700

<210> 76
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL12-1

<400> 76
 ataatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc tfttaaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc atfttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

agtaatcctg tcaaaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtccaa cttctgtgact 300

tgtacatfff ccagacagtt tftaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtfff 360

tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420

agtccgataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tftaaattta 480

ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacagacaa aactggaggg 600
ggggtgcaag ttactgacag cagtacaggg cgctatgca tgtagtaga ccatgaatac 660
aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 77
<211> 700
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL13-3

<400> 77
ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaa tataaaaaat 60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
cctgtggccc atttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaaa 180
tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
agtaatcctg tgaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgcaa ctctgtaact 300
tgtgcatttt ccagacaatt ttaattcca tatgaccag agcaccatta taaggtgttt 360
tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420
agtcccataa tgggatactc aacccatgg agatatttag atttaatgc tttaaattta 480
ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
gctttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660

aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 78
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL14-1

<400> 78
 ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

agtaatcctg tgaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300

tgtacatfff ccagacaatt ttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtfff 360

tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaagg aggcaaagg ttgcaccatt 420

agtcccataa tgggatactc aacccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480

ttttttcac ctttagagtt tcagactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540

gctttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600

ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgttagtaga ccatgaatat 660

aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 79
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL15-3

<400> 79

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

agtaatcctg tgaagcat gtggagttag ggggccactt ttagtgcaa ctctgtaact 300

tgtacatfff ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtfff 360

tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420

agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480

ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540

gctttaactg taaccatc agaaattgct gtttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600

ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660

aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 80

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL16-2

<400> 80

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

agtaatcctg tgaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctcgttaact 300

tgtacatfff ccagacaatt tttaatcca tatgaccagc agcaccatta taagggtttt 360

tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420

agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag atttaaatgc tttaaattta 480

ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540

gctttaactg taaccatata agaaattgct gtttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600

ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgttagtaga ccatgaatat 660

aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttat 700

<210> 81
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL17-1

<400> 81

ataaatccat atacttattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

agtaatcctg tgaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgcaa ctctgtaact 300

tgtacatfff ccagacaatt ttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggttt 360

tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420

agtccataa tgggatactc aacccatgg agatatttag atttaatgc tttaaatta 480

ttttttcac ctttagagtt tcagactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540

gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggaca aactggaggg 600

ggggtgcagg ttactgacag cactacaggc gcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660

aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 82
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL18-1

<400> 82
 ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc atttcaagg aagtttgccg gaagttccc cttacaacgc ctcagaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

agtaatcctg tgaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgcaa ctctgtaact 300

tgtacatfff ccagacaatt ttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggttt 360

tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420
 agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
 tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
 gctttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
 ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660
 aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 83
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL19-1

<400> 83
 ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaaa tataaaaaat 60
 gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
 cctgtggccc attttcaagg aagtttggcg gaagttcccg cttacaacgc ctcagaaaaa 180
 tacciaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
 agtaatcctg tgaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
 tgtacatfff ccagacaatt ttttaattcca tatgaccagc agcaccatta taaggtgttt 360
 tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420
 agtcccataa tgggatactc aaccccatgg agatatttag attttaatgc tttaaattta 480
 tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540

gctttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600

ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgttagtaga ccatgaatat 660

aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 84
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL20-3

<400> 84
 ataatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaa tataaaaaat 60

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc attttcaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

agtaatcctg tgaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300

tgtacatfff ccagacaatt ttaattcca tatgaccag agcaccatta taaggtgttt 360

tctcccag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420

agtccataa tgggatactc aacccatgg agatatttag atttaatgc tttaaattta 480

ttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540

gctttaactg taaccatatac agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600

ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgttagtaga ccatgaatat 660

aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 85
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL21-3

<400> 85
 ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaa tataaaaaat 60
 gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120
 cctgtggccc attttaagg aagtttgccg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaaa 180
 tacccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240
 agtaatcctg tgaagagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300
 tgtacatfff ccagacaatt ttaattcca tatgaccagc agcaccatta taagggtfff 360
 tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt tgcaccatt 420
 agtcccataa tgggatactc aacccatgg agatatttag atttaaatgc tttaaattta 480
 tttttttcac ctttagagtt tcagcactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540
 gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600
 ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgttagtaga ccatgaatat 660
 aagtacccat atgtgttagg gcaaggtcag gatactttag 700

<210> 86
 <211> 700
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL22-11

<400> 86

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaa tataaaaaat	60
gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc	120
ctctggccc attttcaagg aagtttccg gaagttccc cttacaacgc ctcaaaaa	180
taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcggg aggggggggc	240
agtaatcctg tgaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgcaa cctctgaact	300
tgtacatfff ccagacaatt ttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggttt	360
tctcccgcag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt	420
agtccataa tgggatactc aacccatgg agatatttag atttaatgc tttaaattta	480
ttttttcac ctttagagt tcaactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat	540
gctttaactg taaccatc agaaattgct gtttaagatg ttacggaca aactggaggg	600
ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgttagtaga ccatgaatat	660
aagtacccat atgtgtagg gcaaggtcag gatactttag	700

<210> 87

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: isolate B19SCL2-14

<400> 87

ataaatccat atactcattg gactgtagca gatgaagagc ttttaaaaa tataaaaaat	60
--	----

gaaactgggt ttcaagcaca agtagtaaaa gactacttta ctttaaaagg tgcagctgcc 120

cctgtggccc attttcaagg aagtttgcg gaagttcccg cttacaacgc ctcaaaaa 180

taccaagca tgacttcagt taattctgca gaagccagca ctggtgcagg aggggggggc 240

agtaatcctg tgaaaagcat gtggagtgag ggggccactt ttagtgccaa ctctgtaact 300

tgtacatfff ccagacaatt ttaattcca tatgaccag agcaccatta taagggtttt 360

tctcccgag caagtagctg ccacaatgcc agtggaaagg aggcaaaggt ttgcaccatt 420

agtccataa tgggatactc aacccatgg agatatctag atttaatgc tttaaattta 480

ttttttcac ctttagagtt tcagactta attgaaaatt atggaagtat agctcctgat 540

gctttaactg taaccatata agaaattgct gttaaggatg ttacggacaa aactggaggg 600

ggggtgcagg ttactgacag cactacaggg cgcctatgca tgtagtaga ccatgaatat 660

aagtacccat atgtgttagg gcaaggteag gatactttag 700

<210> 88
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer Vpara 8

<400> 88
 tccatatgac ccagagcacc a 21

<210> 89
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer Vpara 9

<400> 89
 tttccactgg cattgtggc 19

<210> 90
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: substitute sequence in the
 internal control

<400> 90
 agctagacct gcatgtcact g 21

<210> 91
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: target sequence

<400> 91
 ctacttgctg cgggagaaaa acacct 26

<210> 92
 <211> 681
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: internal control

<400> 92
 gaattcactt gtacattttc cagacaattt ttaattccat atgaccaga gcaccattat 60

acagtgacat gcaggtctag ctctgccaca atgccagtgg aaaggaggca aaggtttgca 120

ccattagtcc cataatggga tactcaacce catggagata tttagatttt aatgctttaa 180

atttatTTTT ttcaccttta gagtttcagc acttaattga aaattatgga agtatagctc 240

ctgatgcttt aactgtaacc atatcagaaa ttgctgttaa ggatgttacg gacaaaactg 300

gagggggggt gcaggttact gacagcacta cagggcgctt atgcatgtta gtagaccatg 360

aatataagta cccatatgtg ttagggcaag gtcaagatac tttagcccca gaacttccta 420

tttgggtata ctttccccct caatacgtt acttaacagt aggagatgtt aacacacaag 480

gaatttctgg agacagcaaa aaattggcaa gtgaagaatc agcattttat gttttggaac 540

acagttcttt tcagctttta ggtacaggag gtacagcaac tatgtcttat aagtttcctc 600

cagtgcctcc agaaaattta gagggctgca gtcaacactt ttatgaaatg tacaaccctt 660

tatacggatc ccgctgtcga c 681

<210> 93
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: probe Vpara10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)
 <223> where 'n' is Fam and 'z' is Tamra

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)
 <223> where 'n' is Tamra

<400> 93
ntaaggtgtt ttctcccgca gcgagtn

27