



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0045167
 (43) 공개일자 2008년05월22일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) Int. Cl.
 <i>C12Q 1/68</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2008-7005439</p> <p>(22) 출원일자 2008년03월05일
 심사청구일자 없음
 번역문제출일자 2008년03월05일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/GB2006/050231
 국제출원일자 2006년08월04일</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2007/017699
 국제공개일자 2007년02월15일</p> <p>(30) 우선권주장
 0516145.0 2005년08월05일 영국(GB)</p> | <p>(71) 출원인
 제노미카 에스.에이.유.
 스페인, 이-28820 마드리드, 코스라다 알카리아7</p> <p>(72) 발명자
 개스콘 에스코바르, 아이린
 스페인, 이-28016 마드리드, 5° 이즈다, 라몬 이
 카할, 아베니다
 빌라에르모사 진, 마리아 루이사
 스페인, 이-30720 무르시아, 시우다드 델 아이레
 산하이버, 아베니다 에스파냐 2</p> <p>(74) 대리인
 이원희</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 87 항

(54) 임상시료에서 인간 유두종 바이러스 동정용 생체외 진단키트

(57) 요약

시료에서 HPV 검출 및 유전자형 분석을 위한 방법 및 키트, 상기 방법에서 사용될 반응 용기가 기술되었다. 유니버설 HPV 프라이머를 PCR에 의한 시료 증폭에 사용되고; 상기 증폭된 시료는 이후 HPV 종류를 결정하기 위해 HPV 종류-특이적 프로브의 어레이에 혼성화된다.

특허청구의 범위

청구항 1

비 종류 특이적 방식으로 HPV 표적 서열을 증폭하도록 시료에서 핵산 증폭 반응을 수행하는 단계;

모든 증폭 산물로부터 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 수득하는 단계;

상기 단일 가닥 올리고뉴클레오티드가 상기 시료를 담기에 적합한 반응 용기 내에 위치한 고정 지지체 위에 준비된 다수의 HPV 종류-특이적 프로브를 혼성화 하도록 반응시키는 단계; 및,

혼성화된 올리고뉴클레오티드를 검출하는 단계를 포함하는 시료에서 인간 유두종 바이러스(human papillomavirus; HPV) 검출 및 유전자형 분석방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 HPV 종류-특이적 프로브는 DNA를 포함하는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 핵산 증폭 단계는 고정 지지체 위에 HPV 종류-특이적 프로브가 접촉하도록 반응 용기 내의 시료 상에서 수행되는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 4

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 핵산 증폭 단계는 반응 용기에 상기 증폭된 시료의 도입에 앞서 고정 지지체 위에 HPV 종류-특이적 프로브와 접촉하기 위해 시료 상에서 수행되는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로브는 모든 프로브에 대해 동일한 혼성화 조건에서 HPV 표적 서열에 특이적으로 결합하기 위해 선택되는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 20가지 HPV 종류에 특이적인 프로브가 사용되는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 HPV 종류 6, 11, 16, 18, 26, 30, 31, 32, 33, 34/64, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 81, 82, 83, 84, 85 및 89 중 20가지 형태에 특이적인 프로브가 사용되는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 8

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로브는 20 내지 40 뉴클레오티드 길이인 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 9

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로브는 25 내지 35 뉴클레오티드 길이인 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 10

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로브는 28 내지 32 뉴클레오티드 길이인 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 11

제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로브는 30 뉴클레오티드 길이인 것을 특징으로 하는 분석

방법.

청구항 12

제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로브는 HPV의 L1 영역에 특이적인 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 13

제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로브는 다른 HPV 종류에 특이적인 프로브와 적어도 2 뉴클레오티드가 다른 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 14

제 1항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로브는 다른 HPV 종류에 특이적인 프로브와 적어도 3 뉴클레오티드가 다른 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 15

제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 프로브가 서열번호 1 내지 서열번호 133을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 16

제 1항 내지 제 15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 모든 프로브가 서열번호 1 내지 서열번호 133을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 17

제 1항 내지 제 16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다수의 프로브가 하기 서열번호 그룹의 하나 이상으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 분석방법: 1 또는 2; 3 또는 4; 5 내지 9; 10 내지 13; 14 내지 18; 19, 20, 또는 21; 22 내지 25; 26 또는 27; 28 내지 31; 32 또는 33; 34 내지 37; 38 내지 43; 44 또는 45; 46 내지 50; 51 또는 52; 53 또는 54; 55 내지 59; 60 내지 64; 65 또는 66; 67 또는 68; 69, 70 또는 71; 72 또는 73; 74 또는 75; 76, 77, 또는 78; 79 내지 83; 84, 85, 또는 86; 87, 88, 또는 89; 90 내지 94; 95, 96 또는 97; 98 내지 102; 103 또는 104; 105 또는 106; 107 또는 108; 109 또는 110; 111 내지 115; 116 내지 119; 120 또는 121; 122, 123, 또는 124; 125 또는 126; 127 또는 128; 129 또는 130; 131, 132 또는 133.

청구항 18

제 17항에 있어서, 프로브는 상기 그룹의 각각에서 선택되는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 19

제 17항에 있어서, 각 프로브는 상기 그룹에서 선택되고, 적어도 하나의 프로브가 상기 그룹의 각각에서 선택되는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 20

제 17항에 있어서, 두 개 이상의 프로브가 상기 그룹의 각각에서 선택되는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 21

제 1항 내지 제 20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로브가 하기 서열번호들로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 분석방법: 2, 4, 7, 8, 9, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 40, 41, 42, 43, 45, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 57, 58, 59, 61, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 70, 71, 73, 74, 75, 76, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 112, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 124, 126, 128, 129, 130, 131, 132, 133.

청구항 22

제 1항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, 다수의 프로브가 동일한 HPV 종류에 특이적인 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 23

제 1항 내지 제 22항 중 어느 한 항에 있어서, 다수의 프로브가 검출될 각각의 HPV 종류에 특이적인 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 24

제 22항 또는 제 23항에 있어서, 상기 다수의 프로브의 각각은 상기 고형 지지체의 상기 동일한 영역에 고정화되는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 25

제 22항 또는 제 23항에 있어서, 상기 다수의 프로브의 각각은 상기 고형 지지체의 분리된 영역에 고정화되는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 26

제 23항 내지 제 25항 중 어느 한 항에 있어서, 동일한 HPV 종류에 특이적인 각각의 프로브는 HPV 표적 서열의 상이한 위치를 검출하는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 27

제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 프로브가 적어도 두 개의 분리된 위치에서 고형 지지체 위에 존재하는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 28

제 1항 내지 제 27항 중 어느 한 항에 있어서, 모든 프로브가 두 개의 분리된 위치에서 고형 지지체 위에 존재하는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 29

제 1항 내지 제 28항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 대조군 서열을 검출하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 30

제 29항에 있어서, 상기 대조군 서열은 모든 HPV 종류의 표적 서열에 혼성화되지 않으며, 상기 고형 지지체에 고정화된 프로브를 포함하는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 31

제 29항에 있어서, 상기 대조군 서열은 인간 게놈 표적 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 32

제 31항에 있어서, 상기 인간 표적 서열은 적어도 CFTR 유전자 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 33

제 1항 내지 제 32항 중 어느 한 항에 있어서, 이미 알려진 대조군 서열을 증폭하는 단계, 및 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 34

제 1항 내지 제 33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위하여 상기 시료에 증폭 반응 믹스를 혼합하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 35

제 1항 내지 제 34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 증폭 반응은 PCR인 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 36

제 1항 내지 제 35항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 가닥 올리고뉴클레오티드는 모든 존재하는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드의 변성에 의해 수득되는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 37

제 36항에 있어서, 상기 변성 단계는 반응 용기에 포함된 시료에서 수행되는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 38

제 1항 내지 제 37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 가닥 올리고뉴클레오티드는 강제적인 조건에서 혼성화 되는 것을 특징으로 하는 분석방법.

청구항 39

비 종류 특이적 방식으로 HPV 표적 서열을 증폭하도록 다수의 HPV 종류-특이적 프로브가 고정화된 고�형 지지체를 포함하는 반응 용기의 시료에서 핵산 증폭 반응을 수행하는 단계;

모든 증폭 산물로부터 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 수득하는 단계;

상기 단일 가닥 올리고뉴클레오티드와 상기 HPV 종류-특이적 프로브를 혼성화 하도록 하는 단계; 및,

혼성화된 올리고뉴클레오티드를 검출하는 단계를 포함하고, 상기 증폭 반응은 고�형 지지체에 접촉한 시료에서 발생하는 것을 특징으로 하는, 시료에서 인간 유두종 바이러스(HPV) 검출 및 유전자형 분석방법.

청구항 40

다수의 HPV 종류-특이적 프로브가 고정화된 고�형 지지체를 포함하고 상기 고�형 지지체에 접촉한 시료를 담기에 적합한 것을 특징으로 하는, 시료에서 HPV 검출 및 유전자형 분석을 위한 분석 수행용 반응 용기.

청구항 41

제 40항에 있어서, 상기 용기는 고�형 지지체에 접촉한 시료에서 핵산 증폭 반응을 수행하기에 적합한 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 42

제 40항 또는 제 41항에 있어서, 상기 프로브는 모든 프로브에 대해 동일한 혼성화 조건 하에서 HPV 표적 서열에 특이적으로 결합하기 위해 선택되는 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 43

제 40항 내지 제 42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로브는 핵산 증폭 반응을 수행하기에 적합한 반응 믹스를 포함하는 시료에서 HPV 표적 서열에 특이적으로 결합하기 위해 선택되는 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 44

제 40항 내지 제 43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HPV 종류-특이적 프로브는 DNA를 포함하는 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 45

제 40항 내지 제 44항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 20 개의 HPV 종류에 특이적인 프로브를 포함하는 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 46

제 40항 내지 제 44항 중 어느 한 항에 있어서, HPV 6, 11, 16, 18, 26, 30, 31, 32, 33, 34/64, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 81, 82, 83, 84, 85 및 89 중 적어도 20 가지에 특이적인 프로브를 포함하는 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 47

제 40항 내지 제 46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로브는 20 내지 40개의 뉴클레오티드 길이인 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 48

제 40항 내지 제 47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로브는 25 내지 35개의 뉴클레오티드 길이인 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 49

제 40항 내지 제 48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로브는 28 내지 32개의 뉴클레오티드 길이인 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 50

제 40항 내지 제 49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로브는 30개의 뉴클레오티드 길이인 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 51

제 40항 내지 제 50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로브는 HPV의 L1 지역에 특이적인 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 52

제 40항 내지 제 51항 중 어느 한 항에 있어서, HPV 종류 특이적인 각각의 프로브는 다른 HPV 종류 특이적인 프로브와 적어도 2 개의 뉴클레오티드가 상이한 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 53

제 40항 내지 제 52항 중 어느 한 항에 있어서, HPV 종류 특이적인 각각의 프로브는 다른 HPV 종류 특이적인 프로브와 적어도 3 개의 뉴클레오티드가 상이한 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 54

제 40항 내지 제 53항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 프로브가 서열번호 1 내지 서열번호 133으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 55

제 40항 내지 제 54항 중 어느 한 항에 있어서, 모든 프로브가 서열번호 1 내지 서열번호 133으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 56

제 40항 내지 제 55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다수의 프로브가 하기 서열번호 군의 하나 이상으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 용기:

1 또는 2; 3 또는 4; 5 내지 9; 10 내지 13; 14 내지 18; 19, 20, 또는 21; 22 내지 25; 26 또는 27; 28 내지 31; 32 또는 33; 34 내지 37; 38 내지 43; 44 또는 45; 46 내지 50; 51 또는 52; 53 또는 54; 55 내지 59; 60 내지 64; 65 또는 66; 67 또는 68; 69, 70 또는 71; 72 또는 73; 74 또는 75; 76, 77, 또는 78; 79 내지 83; 84, 85, 또는 86; 87, 88, 또는 89; 90 내지 94; 95, 96 또는 97; 98 내지 102; 103 또는 104; 105 또는 106; 107 또는 108; 109 또는 110; 111 내지 115; 116 내지 119; 120 또는 121; 122, 123, 또는 124; 125 또는 126; 127 또는 128; 129 또는 130; 131, 132 또는 133.

청구항 57

제 56항에 있어서, 프로브가 상기 그룹들의 각각에서 선택되는 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 58

제 56항에 있어서, 각각의 프로브가 상기 그룹들에서 선택되고, 적어도 하나의 프로브가 상기 그룹들의 각각에서 선택되는 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 59

제 56항에 있어서, 두 개 이상의 프로브가 상기 그룹들의 각각에서 선택되는 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 60

제 40항 내지 제 59항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로브가 하기 서열번호들로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 용기:

2, 4, 7, 8, 9, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 40, 41, 42, 43, 45, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 57, 58, 59, 61, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 70, 71, 73, 74, 75, 76, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 112, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 124, 126, 128, 129, 130, 131, 132, 133.

청구항 61

제 40항 내지 제 60항 중 어느 한 항에 있어서, 다수의 프로브가 동일한 HPV 종류에 특이적인 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 62

제 40항 내지 제 61항 중 어느 한 항에 있어서, 다수의 프로브가 검출된 각각의 HPV 종류에 특이적인 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 63

제 61항 또는 제 62항에 있어서, 상기 다수의 프로브의 각각은 상기 고형 지지체의 상기 동일한 영역에 고정화되는 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 64

제 61항 또는 제 62항에 있어서, 상기 다수의 프로브의 각각은 상기 고형 지지체의 분리된 영역에 고정화되는 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 65

제 62항 내지 제 64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 동일한 HPV 종류에 특이적인 각각의 프로브는 상기 HPV 표적 서열의 상이한 부분을 검출하는 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 66

제 40항 내지 제 65항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 프로브 종(species)은 적어도 두 개의 분리된 위치에서 고형 지지체 위에 존재하는 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 67

제 40항 내지 제 66항 중 어느 한 항에 있어서, 모든 프로브 종은 적어도 두 개의 분리된 위치에서 고형 지지체 위에 존재하는 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 68

제 40항 내지 제 67항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고형 지지체에 하나 이상의 대조군 서열을 추가로 포함하

는 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 69

제 68항에 있어서, 상기 대조군 서열은 모든 HPV 종류의 표적 서열에 혼성화되지 않으며, 상기 고형 지지체 위에 고정화된 프로브를 포함하는 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 70

제 68항에 있어서, 상기 대조군 서열은 인간 게놈 표적 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 71

제 70항에 있어서, 상기 인간 표적 서열은 적어도 상기 CFTR 유전자의 일부분을 포함하는 것을 특징으로 하는 용기.

청구항 72

제 40항 내지 제 71항 중 어느 한 항의 반응 용기를 포함하고 하기의 하나 이상을 추가로 포함하는 HPV 검출 및 유전자형 분석용 키트:

- i) DNA 추출 및/또는 정제용 시약;
- ii) 핵산 증폭 믹스;
- iii) 반응 용기의 프로브에 핵산의 혼성화를 시각화하기에 사용하기 위한 시약.

청구항 73

제 72항에 있어서, 상기 증폭 믹스는 HPV 종류-특이적 프로브가 장착된 고형 지지체를 포함하는 반응 용기와 분리된 반응 용기에 제공되는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 74

제 72항에 있어서, 상기 증폭 믹스는 HPV 종류-특이적 프로브가 장착된 고형 지지체를 포함하는 반응 용기에 제공되는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 75

제 72항 내지 제 74항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 증폭 믹스는 표지된 dNTP들을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 76

제 72항 내지 제 75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 증폭 믹스는 HPV 표적 서열의 부분에 결합하는 HPV 보존 (consensus) 프라이머를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 77

제 76항에 있어서, 상기 HPV 보존 프라이머는 MY09 및 MY11; 및 추가로 HMB01을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 78

제 72항 내지 제 77항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 증폭 믹스는 인간 표적 서열 증폭용 프라이머를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 79

제 78항에 있어서, 상기 인간 표적 서열은 HPV 표적 서열과 길이가 다른 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 80

제 78항 또는 제 79항에 있어서, 상기 인간 표적 서열은 적어도 상기 CFTR 유전자의 일부분인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 81

제 80항에 있어서, 상기 프라이머는 CFTR-F4(서열번호 134) 및 CFTR-R5(서열번호 135) 중 적어도 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 82

제 76항 내지 제 81항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프라이머는 표지된 프라이머인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 83

제 72항 내지 제 82항 중 어느 한 항에 있어서, 대조군 증폭 표적 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 84

제 83항에 있어서, 상기 대조군 증폭 표적 서열은 상기 인간 표적 서열의 측면(flanking) 부분에 대응하는 서열을 포함함으로써, 양쪽 표적 서열의 증폭은 동일한 프라이머를 이용하여 발생하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 85

서열번호 1 내지 서열번호 133으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 HPV 검출 및 유전자형 분석용 프로브.

청구항 86

제 85항에 있어서, 하기 서열번호들로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 프로브:

2, 4, 7, 8, 9, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 40, 41, 42, 43, 45, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 57, 58, 59, 61, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 70, 71, 73, 74, 75, 76, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 112, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 124, 126, 128, 129, 130, 131, 132, 133.

청구항 87

CFTR-F4(서열번호 134) 및 CFTR-R5(서열번호 135)로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 CFTR 증폭에 이용하기 위한 프라이머.

명세서

기술분야

- <1> 본 발명은 임상시료에서 인간 유두종 바이러스(Human Papillomavirus; HPV) 동정용 생체의 진단 키트 및 방법에 관한 것이다. 또한 상기 발명은 상기 키트 및 방법에서 이용하기 위한 기구에 관한 것이다.
- <2> 더욱 상세하게는, 바람직한 구체화에서 본 발명은 임상시료에서 HPV 유전자형 분석용 프로브를 사용한 인간 유두종 바이러스 유전자형의 특이적 검출용 생체의 진단 키트, 상기 프로브를 포함하는 핵산 어레이 및 표준 실험실용 반응 바이알이 결합된 플랫폼, 상기 결과의 자동 데이터 처리 장치 및 생체의 진단 키트를 이용한 HPV 감염 진단 방법에 관한 것이다.

배경기술

- <3> 현재까지 100 여종의 인간 유두종 바이러스(HPV)가 발견돼 왔다. HPV는 모든 HPV의 E6, E7 및 L1 영역의 유전자 서열이 이미 알려진 종류와 적어도 10%가 다를 경우 새로운 종류로 분리된다. 아형, 또는 변형체는 초기 형태와 2-5% 정도 상이하다. 상기 바이러스들은 인간 상피에 대해 친화성을 가지고, 심각한 인간 질환, 특히 생식기 및 구강 점막의 종양과 관련 있다.
- <4> 대략 50 여종의 HPV가 항문생식기 주위 점막에서 분리되었다. 이것들은 자궁경부암과의 관련성에 따라 저위험 종류(예, HPV 종류 6, 11, 42, 43 및 44) 및 고위험 종류(예, 종류 6, 18, 31, 33 및 45)로 분리된다. 고위험

종류의 HPV의 잠복감염은 자궁경부암의 주요 원인론적 인자이기 때문에, HPV 종류의 검출 및 동정은 매우 중요하다.

- <5> HPV 유전자형의 검출 및 동정은 HPV DNA 검사에 의해 수행된다. 상기 방법은 HPV DNA의 직접적인 검출 또는 증폭된 HPV DNA의 검출에 의해 수행될 수 있다. HPV DNA의 직접적인 검출을 위한 방법들 중에는 Digene Corp., Gaithersburg, Md., USA의 Hybrid Capturer(HC) 방법과 *in situ* 혼성화 기술이 있다. 상기 HC는 신호-증폭 혼성화 방법에 기초한 FDA 공인 기술이다. 사용되는 상기 혼성화 프로브는 HPV 특이적 RNA 서열이다. 임상시료에서 수득한 HPV 변성 DNA와 상기 프로브를 인큐베이션하면, 특이적 항체를 이용하여 검출될 수 있는 형태인 RNA/DNA 혼성체를 형성한다. 상기 HC 방법에 의해 고위험 및 저위험 HPV 종류를 구분할 수 있으나, HPV 종류를 동정할 수는 없다. 상기 검사 방법의 추가적인 단점은 프로브 각테일의 사용에 의해 종종 두 가지 종류(classes)의 HPV 종류 사이에서 교차 반응이 발생하는 것이다.
- <6> 바이러스 계통의 증폭에 의한 HPV 종류의 확인 방법은 주로 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)에 의해 수행된다. HPV의 유전자형 분석은 오직 하나의 특이적 종류만을 인식하는 프라이머를 사용한 종류-특이적 PCR에 의해 수행될 수 있다. 대안적인 시도에는 모든 HPV 종류의 증폭을 위한 유니버설-프라이머 PCR의 이용이 있다. 그 다음 상기 유도종 바이러스는 상기 증폭된 유전자 단편의 서열의 분석에 의해 분류된다. 상기 서열의 분석은 DNA 서열분석, 제한효소 절편길이 다양성(Restriction fragment length polymorphism; RFLP) 또는 핵산 혼성화와 같은 여러 방법에 의해 수행될 수 있다. 역교잡반응(reverse blot hybridisation)과 같은 혼성화 기술은 진단 목적에 가장 적합한 것으로 판단되어 왔다(Kleter et al. J Clin Microbiol. 1999, 37: 2508-2517; Van den Brule et al. J Clin Microbiol. 2002, 40: 779-787).
- <7> 최근에 마이크로어레이 기술이 발달되었다(미국특허 등록번호 5,445,934를 참조). 상기 용어 마이크로어레이는 수천 개의 DNA 서열을 동시에 분석할 수 있도록 하는 대규모 핵산 서열 분석을 용이하게 하는 많은 소 점적(spots)의 분석을 지시한다. 당업계에 이미 알려진 바와 같이, 역반응(reverse blotting)은 보통 막에서 수행되는 반면에, 마이크로어레이는 보통 고형 지지체에서 수행되며 또한 소규모로 수행될 수 있다. 상기 마이크로어레이 기술은 HPV 진단 분야에서 성공적으로 적용되어 왔다(국제 공개 특허 W00168915 및 캐나다 특허 CA2484681 참조).
- <8> 그러나, 마이크로어레이 기술의 사용에는 고가의 장치가 필요하고 운용이 어려운 것과 같은 장애들이 여전히 존재한다. 상기 불편함은 '어레이-튜브(array-tube)'가 제공된 미국특허 출원번호 US2005064469에서 제기되었다. 상기 용어 '어레이-튜브'는 마이크로어레이 기반 검사가 수행될 수 있는, 마이크로어레이가 바닥에 배열된, 외형 및 크기가 전형적인 실험실 반응 용기(예를 들면, 1.5 ml 에펜도르프 튜브)와 같은 반응 용기를 기술한다.

발명의 상세한 설명

- <9> 본 발명의 목적
- <10> 상기 관점에서, 본 발명의 목적은 혹시 임상시료에 존재할지 모르는 HPV 종류의 특이적 동정을 위한 신뢰성 있는 방법을 제공하는 것이다.
- <11> 더욱 자세하게는 본 발명의 목적은 '어레이-튜브' 플랫폼을 사용하여 HPV 종류의 특이적 동정을 위한 방법을 제공하는 것이다.
- <12> 또한, 본 발명의 목적은 상이한 HPV 종류의 특이적 검출 및/또는 동정용 프로브를 제공하는 것이다.
- <13> 아울러, 본 발명의 목적은 혹시 임상시료에 존재할지 모르는 HPV 종류의 신뢰성 있는 특이적 검출 및/또는 동정을 가능하게 하는 검색시약, 프로토콜 및 '어레이-튜브'에 배열된 HPV 특이적 프로브를 포함하는 HPV 종류 검출 및/또는 동정용 키트를 제공하는 것이다.
- <14> 본 발명의 요약
- <15> 본 발명의 첫 번째 측면에 의해, 시료에서 인간 유두종 바이러스(HPV)의 검출 및 유전자형 분석방법을 제공하고, 상기 분석방법은 하기를 포함한다: 비 종류 특이적 방식으로 HPV 표적 서열을 증폭하도록 시료에서 핵산 증폭 반응을 수행하는 단계; 모든 증폭 산물로부터 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 수득하는 단계; 상기 단일 가닥 올리고뉴클레오티드가 상기 시료를 담기에 적합한 반응 용기 내에 위치한 고형 지지체 위에 준비된 다수의 HPV 종류-특이적 프로브를 혼성화하도록 반응시키는 단계; 및 혼성화된 올리고뉴클레오티드를 검출하는 단계.

- <16> 또한 본 발명의 측면에서, 시료에서 인간 유두종 바이러스(HPV)의 검출 및 유전자형 분석방법을 제공하고, 상기 분석방법은 하기를 포함한다:
- <17> 비 종류 특이적 방식으로 HPV 표적 서열을 증폭하도록 다수의 HPV 종류-특이적 프로브가 고정화된 고형 지지체에 접촉한 시료에서 핵산 증폭 반응을 수행하는 단계; 모든 증폭 산물로부터 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 수득하는 단계; 상기 단일 가닥 올리고뉴클레오티드와 HPV 종류-특이적 프로브를 혼성화하도록 반응시키는 단계; 및 혼성화된 올리고뉴클레오티드를 검출하는 단계.
- <18> 상기 증폭 반응은 바람직하게는 PCR 이다. 단일 가닥 올리고뉴클레오티드는 예를 들면 열처리에 의해서 모든 존재하는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드를 변성함으로써 수득 될 수 있다. 단일 가닥 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 강제적인 조건에서 혼성화가 가능하게 한다; 상기 조건은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 바람직하게는 55℃에서 1 x SSC를 포함하는 완충용액에서 표적과 함께 변성된 올리고뉴클레오티드를 인큐베이션하는 것을 포함한다.
- <19> 바람직한 구체화에서, 상기 시료 및 상기 고형 지지체는 반응 용기에 담겨져 있다; 미국특허 출원번호 US2005064469에 그 예시가 기술되어 있다.
- <20> 적어도 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 또는 42 HPV 종류에 특이적인 바람직한 프로브가 사용되고, 바람직하게는 HPV 종류 6, 11, 16, 18, 26, 30, 31, 32, 33, 34/64, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 81, 82, 83, 84, 85 및 89로부터 선택된다. 상기 프로브는 알맞게 20 내지 40개의 뉴클레오티드 길이이고, 바람직하게는 25 내지 35개의 뉴클레오티드 길이이며, 더욱 바람직하게는 28 내지 32 뉴클레오티드 길이이고, 가장 바람직하게는 30개의 뉴클레오티드 길이이다. 모든 프로브의 길이가 동일할 필요는 없다. 상기 프로브는 알맞게는 HPV의 L1 영역에 특이적이다. 각각의 종류-특이적인 프로브는 다른 HPV 종류에 특이적인 프로브와 적어도 1, 2, 3 개의 뉴클레오티드, 또는 바람직하게는 3 개 이상의 뉴클레오티드가 상이할 수 있다. 바람직한 프로브는 서열번호 1 내지 서열번호 133을 포함하는 그룹으로부터 선택되고; 상기 프로브 중의 여럿은 하기에서 기술될 동일한 HPV 종류를 검출한다. 바람직하게는 다수의 프로브가 동일한 HPV 종류에 특이적이고, 더욱 바람직하게는 검출은 각각의 HPV 종류에 특이적인 적어도 두 개의 프로브가 이용된다. 상기 프로브의 혼합물은 고형 지지체의 동일한 위치에 고정화될 수 있고, 또는 각각의 종류-특이적 프로브는 상이한 위치에 고정화될 수 있다. 동일한 HPV 종류에 특이적인 각각의 프로브는 바람직하게는 상기 HPV 표적 서열의 상이한 부분을 검출한다.
- <21> 상기 프로브는 중복성을 위한 다중 검출 위치를 제공하기 위해 고형 지지체에 중복될 수 있다.
- <22> 또한 하나 이상의 대조군 서열이 검출될 수 있다; 예를 들면, 모든 HPV 종류의 표적 서열에 혼성화되지 않는 프로브를 고형 지지체에 고정화하였다. 상기 프로브는 인간 게놈 표적 서열에 특이적일 수 있다; 이후 상기 검사는 시료로부터 인간 표적 서열을 증폭하는 단계 및 증폭 반응이 수행되었는지 여부를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 추가의 대조군은 고형 지지체에 고정화된 비-특이적 표지 서열을 이용하여 도입될 수 있다; 상기 표지 검출은 상기 표지가 제대로 작동했는지 판단 가능하게 할 수 있다. 더욱 추가의 대조군은 인간 표적과 동일한 프라이머에 의해 증폭될 수 있는 대조군 증폭 서열을 포함함으로써 제공될 수 있을 것이지만, 그러나 고형 지지체 상에서 상이한 올리고뉴클레오티드에 의해 검출될 수 있다. 상기 대조군은 증폭이 정확하게 수행되었는지 확인하기 위한 것이다.
- <23> 본 발명은 또한 다수의 HPV 종류-특이적 프로브가 고정화된 고형 지지체를 포함하는 반응 용기를 제공한다. 또한 추가로 핵산 증폭 믹스와 상기 반응 용기를 포함하는 HPV 검출 및 유전자형 분석용 키트를 제공한다. 상기 믹스는 MY09 및 MY11; 및 선택적으로 HMB01과 같은 HPV 보존(consensus) 프라이머; 인간 표적 서열 증폭용 프라이머; 및 인간 표적 서열의 측면(flanking) 부분에 대응하는 서열을 포함하고, 상기 양쪽 표적 서열의 증폭은 동일한 프라이머를 이용하여 발생하도록 하는 대조군 증폭 표적 서열을 포함될 수 있다. 또한 상기 키트는 사용설명서를 포함될 수 있다.
- <24> 본 발명의 상세한 설명
- <25> HPV 종류 특이적 검출 및/또는 동적 방법은 하기 단계를 포함한다:
- <26> (i) 시료 DNA의 증폭: 추가의 유전자형 분석이 가능하도록 변이가 있는 게놈 영역의 측면에 위치한 모든 알려진 HPV 종류에 대한 유니버설 프라이머를 사용하여 바람직하게는 PCR 방법에 의해 임상시료로부터 수득한 DNA를 증폭한다. 비록 상기 PCR이 바람직한 증폭 방법일지라도, 시료에서 표적 서열의 증폭은 당업자에게 이미 알려진 어

떠한 다른 방법에 의해서도 수행될 수 있을 것이다(리가아제 사슬 반응(ligase chain reaction), 전사-기반 증폭 시스템(transcription-based amplification system), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 등). 본 발명의 구체화에서, 가변 L1 영역을 증폭하는 MY11 및 MY09 프라이머들을 사용하였다(Manos et al., Molecular Diagnostics of Human Cancer; Furth M, Greaves MF, eds.; Cold Spring Harbor Press. 1989, vol. 7: 209-214).

- <27> 표지는 추가의 검출이 가능하도록 증폭 과정 동안 증폭된 DNA에 도입되었고, 바람직하게는 상기 표지는 비색법에 의해 검출될 수 있는 신호를 제공한다. 바람직한 구체화에서, 상기 프라이머 중 적어도 하나는 5' 말단에 바이오틴으로 표지된다. 그러나 당업자에게 이미 알려진 다른 종류의 표지 방법이 사용될 수 있다(예를 들면, 디옥시제닌(digoxigenin)). 추가로 증폭된 DNA의 표지화는 상기 PCR 혼합물에서 표지(예를 들면, 바이오틴화 또는 디옥시제닌 dUTP 유도체)를 함유한 변형된 뉴클레오티드의 첨가에 의해 대안적으로 달성될 것이다. 어떤 구체화에서는 방사선 표지 또는 형광물질(fluorophores)이 사용될 수 있다.
- <28> (ii) 혼성화: 단계 (i)에서 수득한 증폭된 DNA를 변성화한 후(예를 들면, 열처리에 의해), 표 1에 기재된 하나 이상의 프로브(서열번호 1 - 133)와 함께 '어레이-튜브'에 적용한다. 게다가 증폭 후 단일 가닥 DNA를 제조하기 위한 다른 방법들이 사용될 수 있다. 표 1에서 나타난 각각의 프로브(서열번호 1 - 133)들은 오직 하나의 HPV 종류의 단계 (i)의 상기 증폭된 L1 영역과 특이적으로 혼성화가 가능하고, 그러므로 상기 종류가 생물학적 시료에 존재할 때, 상기 HPV 종류의 특이적 동정이 가능하게 된다. 시료 내 여러 HPV 종류들은 적어도 하나, 바람직하게는 하나 이상의 프로브의 상기 HPV 종류로부터 증폭된 DNA의 혼성화에 의해 동정 될 수 있다.
- <29> (iii) 검출: DNA 혼성체는 리간드에 대한 특이적인 결합 또는 면역 검출에 의한 표지의 인지에 의해 검출될 수 있다. 바람직한 구체화에서, 바이오틴 표지는 양고추냉이 퍼옥시다아제(horse-radish-peroxidase; HRP)와 결합한 스트렙타비딘(streptavidin)과의 특이적 결합 및 이에 수반되는 특정 프로브에 상응하여 결합된 고정된 위치에 침전되는 테트라메틸벤지딘(tetramethylbenzidine; TMB)의 푸른 색소로의 변환에 의해 검출된다. 또한 당업계에 이미 잘 알려진 다른 종류의 접합체(예를 들면, 스트렙타비딘-금(Au) 접합체)도 본 발명의 목적에 적합할 수 있다. 그 대신에 형광 표지 검출 시스템을 간접적 또는 직접적 표지에 사용할 수 있다. 대안적으로 그 외의 효소-기반 시스템이 사용될 수 있다.
- <30> (iv) 결과 분석 및 처리: 그렇게 제조된 '어레이-튜브'는 광학 현미경 또는 CLONDIAG 칩 테크놀로지 GmbH(Jena, Germany)사의 ATR01 및 ATS 리더기와 같은 간단한 광학 장치를 사용하여 판독할 수 있다.
- <31> 대안의 구체화에서, 상기 증폭 및 혼성화 단계는 동일한 어레이-튜브에서 수행될 수 있다; 즉, 시료를 상기 어레이-튜브에 첨가하고, 시료를 증폭하여 상기 튜브에서 프로브와 혼성화 된다.
- <32> 미국특허 출원번호 2005-064469에는 '어레이-튜브'의 제조 공정이 기술되어 있다. 본 발명의 바람직한 구체화에서, 5' 아민-연결된 올리고뉴클레오티드 프로브는 이미 알고 있는 분리된 위치에서 고형 지지체의 표면에 연결된다. 상기 프로브는 고형 지지체의 지정된 위치에 각각 또는 혼합물로 고정될 수 있다. 바람직한 구체화에서, 두 가지 종류 특이적 프로브는 각각의 HPV 종류에 대해 사용되고, 이것은 모든 HPV가 하나의 종류 특이적 프로브의 영역에서 뉴클레오티드 변화가 발생한 변이체를 포함하면서 정확하게 종류 분석이 될 수 있을 것이라는 추가적인 확실성을 제공한다. 바람직하게는 두 개의 종류-특이적 프로브는 상기 증폭 산물의 분리된 영역에서 혼성화가 가능하게 할 것이다.
- <33> 상기 프로브 또는 프로브의 혼합물은 고형 지지체의 단일 위치에, 바람직하게는 상기 고형 지지체의 두 개의 분리된 위치에, 더욱 바람직하게는 상기 고형 지지체의 세 개의 분리된 위치에 고정될 것이다. 도 1 내지 도 5는 마이크로어레이의 표면에서 프로브의 상이한 배열에 대한 대표도를 예시한다.
- <34> 본 발명에서 사용된 상기 '어레이-튜브'는 서열목록(서열번호 1 - 133)의 뉴클레오티드 서열로부터 선택된 하나 이상의 HPV 프로브를 포함할 것이다. 게다가 PCR 반응 대조군과 같은 대조군의 특이적인 검출 및 시료 대조군으로부터 DNA의 적절성을 위해 하나 이상의 프로브를 포함할 수 있다. 또한, 추가로 검출 반응의 양성 대조군 및 모든 존재하는 프로브의 위치를 알아내도록 하는 하나 이상의 위치 참조용 표지된 올리고뉴클레오티드(예를 들면, 바이오틴 변이된 올리고뉴클레오티드)를 포함할 수 있다.
- <35> HPV 종류 동정용 특이적 프로브는 하기에 따라 설계되었다. GenBank에 등록된 이미 알려진 변형체를 포함하는 모든 참조 HPV의 증폭된 L1 영역에 대한 서열을 BioEdit(4.8.6. version; Hall, Nucl Acids Symp Ser. 1999, 41:95-98)과 같은 일반적인 핵산 정렬 프로그램을 이용하여 정렬하였고, 상이한 HPV 종류 중에서 대부분의 변형된 서열 부분의 위치를 정하였다. 특이적 프로브로 사용 가능한 올리고뉴클레오티드 서열들을 상기 변형된 서

열 영역에서 선택되었고, 바람직하게는 하기 특징을 갖는다: 길이 20 내지 40 염기, 바람직하게는 대략 길이 30 염기; 바람직하게는 2차 구조 또는 연속적인 4 이상의 동일한 뉴클레오티드의 배열이 없음; 바람직하게는 50% G+C 비율 및 가능한 모든 선택된 프로브 간에 매우 비슷한 Tm; 및 바람직하게는 가능한 상기 올리고뉴클레오티드 서열의 중간에서 상이한 HPV 종류 간에 일치하지 않는 뉴클레오티드.

<36> 진술한 것처럼 선택된 각각의 가능한 프로브 서열은 NCBI 웹사이트의 BLAST 프로그램을 사용하여 상기 증폭된 L1 영역에서 모든 이미 알려진 HPV 서열과 비교되었다(Altschul et al. Nucleic Acid Res. 1997, 25: 3389-3402). 최종적으로 이미 알려진 모든 HPV 종류와 비교하여 적어도 세 개의 뉴클레오티드가 일치하지 않는 프로브(상기 HPV 종류와 비교하여 상기 올리고 뉴클레오티드 프로브가 특이적인 경우를 제외하고는)를 선택하였고, 일치하지 않는 서열이 세 개 이상인 프로브를 우선적으로 선택하였다.

<37> 본 발명은 42 개의 임상학적으로 가장 중요한 HPV 종류의 특이적인 검출용 프로브를 제공한다: 6, 11, 16, 18, 26, 30, 31, 32, 33, 34/64, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 81, 82, 83, 84, 85 및 89(표1; 서열번호 1 - 133). 프로브 서열은 5' 말단부터 3' 말단까지의 단일 가닥 DNA 올리고뉴클레오티드로 나타내어 진다. 본 발명의 바람직한 구체화에서, 프로브 서열은 안티센스 가닥에 대응하나, 상기 프로브의 어느 것이든 그대로 또는 이의 상보적인 형태, 또는 이의 RNA 형태(T가 U로 대체)로 사용될 수 있는 것이 당업자에게 자명하다. 또한 본 발명의 상기 프로브는 기능에 심각한 영향을 주지않는 한, 서열 중 하나 이상의 뉴클레오티드를 첨가 또는 변화되어 제공될 수 있다.

표 1

<38>

서열번호	프로브 명	HPV 종류	염기서열(5' -> 3')
1	6A1-AS	6	TGTATGTGGAAGATGTAGTTACGGATGCAC
2	6B4	6	CATGACGCATGTACTCTTTATAATCAGAATT
3	11A1-AS	11	TGTATGTAGCAGATTTAGACACAGATGCAC
4	11B1	11	CATGGCGCATGTATTCCTTATAATCTGAAT
5	16A	16	GTAGATATGGCAGCACATAATGACATATTT
6	16E-AS	16	TTCTGAAGTAGATATGGCAGCACATAATGA
7	16C3	16	CGTCTGCAGTTAAGGTTATTTGACAGTT
8	16C4	16	CAAAATAGTGAATTCATAGAATGTATGTAT
9	16C5	16	CTATAAGTATCTTCTAGTGTGCCCTCCTGGG
10	18A1-AS	18	ATCATATTGCCAGGTACAGGAGACTGTGT
11	18B3	18	CTTATTTTCAGCCGTGCAGCATCCTTTT
12	18C2	18	AAGTTCCAATCCTCTAAAATACTGCTATTC
13	18C3	18	TCCTTTAAATCCACATCCAAAACCTTAACT
14	26A1-AS	26	TGGTTTTAAATGGAGTGGATGCAGATGCTGC
15	26B2	26	ATCTTCCTTTGGCACAGGAGGGGCGTTACG
16	26C1	26	CATATTCTTCGCCATGTCTTATAAATGTT
17	26C3	26	TCCTCCAATATGGAGGCATTCATTAATGT
18	26C4	26	GATCTTCCTTTGGCACAGGAGGGGCGTTAC
19	30A1	30	CTGTGGCAGCTGGGGTGACAATCCAATA
20	30B1	30	GATAACGTTTGTGTGGTTGCAGATATAGTC
21	30C1	30	TTCCAGCCCTCAAGTAAAGTGGAGTTCATA
22	31A-AS	31	TGTAGTATCACTGTTTGAATTGCAGCACA
23	31B5	31	AGAACCTGAGGAGGTGTGGTCAATCCAAA
24	31C2	31	TCAAATCCTCACCATGTCTTAAATACTCTTTA
25	31C5	31	AAAATAGCAGGATTCATACTGTGAATATATG
26	32A1	32	AGTTAGTAGACTTGTATGTGTCTTCAGTTGTT
27	32B1	32	TTCCAAAATGAATAGTCAGAAAAGGATC
28	33A2	33	TACTGTCACTAGTTACTTGTGTGCATAAAG
29	33B1-AS	33	GTATATTTACCTAAGGGGTCTTCCTTTTCC
30	33C1	33	AATGTATATTTACCTAAGGGGTCTTCCTTT
31	33C3	33	TTCTGCAGTTAAGGTAACCTTGCATAGTTG

32	34/64A1	34/64	ATATGGTGGAGTTGTACTIONTGTGGATTGTGT
33	34/64B1	34/64	TCCTTAGGAGGTTGCGGACGCTGACATGTA
34	35A1-AS	35	GTCCTAGAAGACACAGCAGAACACACAGA
35	35B1	35	AATGGATCATCTTTAGGTTTTGGTGCCTG
36	35C4	35	TTACATAGCGATATGTGCTCTAAGGTAC
37	35C7	35	TTTGACAAGTTACAGCCTGTGATGTTACAT
38	39A1-AS	39	GGTATGGAAGACTCTATAGAGGTAGATAATG
39	39B1	39	GTATCTGTAAGTGTCTACCAAACTGGCAGA
40	39C2	39	TAGAGGTAGATAATGTAAAGTTGGTACTAC
41	39C3d	39	GTAAATCATACTCCTCCACGTGCCTGRTAT
42	39C4	39	CATCAGTTGTTAATGTGACAGTACACAGTT
43	39C4d	39	CATCAGTTGTTAATGTKACAGTACACAGTT
44	40A1-AS	40	CTTGAAATTACTGTTATTATATGGGGTTGG
45	40B1	40	CCTCCAACAACGTAGGATCCATTGCATGAA
46	42A1	42	GTATATGTATACCAGATGTGACAGTGGCA
47	42B1-AS	42	TAGCCTGACAGCGAATAGCTTCTGATTGTA
48	42C1	42	TGACAGCGAATAGCTTCTGATTGTACATAC
49	42C5	42	TCCTCTAATATGTTAGGATTCATATTGTGTA
50	42C6	42	TTCTAAAGTTCTGAAGGTGGTGGTCAAC
51	43A1	43	ATATGTACTGGGCACAGTAGGGTCAGTAGA
52	43B1-AS	43	AAGCAGAGGCAGGTGGGACACACAAAAT
53	44A1	44	TATATGTAGACGGAGGGACTGTGTAGTGG
54	44B1-AS	44	CGCATGTATTGCTTATATTGTTCACTAGTAT
55	45B1	45	CTGCTTTTCTGGAGGTGTAGTATCCTTTT
56	45B4-AS	45	GGCACAGGATTTTGTGTAGAGGCACATAAT
57	45C1d	45	TACTATASTGCTTAAACTTAGTAGGRTCAT
58	45C3d	45	CCACYAAACTGTAGTAGGTGGTGGAGGKA
59	45C4	45	CAGGTAACAGCAACTGATTGCACAAAACGA
60	51A1-AS	51	TAAATGTTGGGGAAACCGCAGCAGTGGCAG
61	51B1	51	TGGAGGGGTGTCCTTTTGCAGCTAGTAGC
62	51C3	51	ATGGTAGGATCCATTGTGTGTAATAAGCC
63	51C4	51	CCACTGTTCAAGAATGGTAGGATCCATTGT
64	51C5	51	CCTAACTAGCAGACGGAGGTAATGTTAATC
65	52A1-AS	52	TTATATGTGCTTTCCTTTTAACTCAGCA
66	52B2	52	GTGTCTCCAAGATGCAGACGGTGGTGG
67	53A1	53	AACCTCAGCAGACAGGGATATTTACATAG
68	53B1	53	AAGCTAGTGGCAACAGGAGGCGACAAACCT
69	54A1	54	GCTATCCTGCGTGGATGCTGTAGCACACAA
70	54B1	54	AACTACTGTAGCTGGGGGGTTATACCAA
71	54C1	54	ATCTGCTGTAAGGGTTATGGTACATAACTG
72	56A1	56	TGTCTAAGGTACTGATTAATTTTTCGTGCA
73	56B1	56	TTTATCTTCTAGGCTGGTGGCCACTGGCGG
74	57A1d	57	TATAATTAGTTTCTGTGKTACAGTGGCAC
75	57B1	57	AGTCCTTAGCAACCGCATCCATGTTAT
76	58A1	58	ATATTCTTCAACATGACGTACATATTCCTT
77	58B1a	58	TCTTCTTAGTACTTCAGTGCATAATGTC
78	58B1b	58	CCTTCTTAGTACTTCAGTGCATAATGTC
79	59A2	59	CTGGCATATTTTAAAACTGGTAGGTGTG
80	59B1-AS	59	TCCTGTTAACTGGCGGTGCGGTGTCCTTT
81	59C3_3d	59	GAAGVAGTAGTAGAAGCACACAGAAAAGA
82	59C4	59	TTCTCCACATGCTGGCATATTTCTTAAA
83	59C6	59	GTGGTATTCATATTATGAATGTATGACATT

84	61A1	61	TATATTCAGATACAGGGGGGATGTAGCAG
85	61B1	61	ATAACTTGGCATAGCGATCCTCCTGGGCG
86	61B2	61	ATATTCCTAAAGCTTGTGGCTTTATATTC
87	62A1	62	GTGGAAGGGGAGGTAACCCCAAAGTTC
88	62B1	62	ATACGGGTCCACCTTGGGACGGGTAGGCAG
89	62B2	62	AAATGTCATTTGCGCATACGGGTCCACCTT
90	66A1	66	GTTAATGTGCTTTTAGCTGCATTAATAGTC
91	66B1	66	TGGCGAAGGTATTGATTGATTTACGKGCA
92	66B2	66	CACATGGCGAAGGTATTGATTGATTTACG
93	66C3d	66	CCAATRTTCCAATCGTCTAATAAAGTATTA
94	66C4	66	CTGTGCTTTTAAATATACCTATATTATCCT
95	67A1	67	TCTTCCTTTGCTGTTGGAGGGATGTTTTT
96	67B1	67	TGGTGTGTATGTATTGCATAACATTTGCAG
97	67B2	67	GTTTTCATTTTTGTATGTAGCCTCTGATTT
98	68A1-AS	68	AGGTGCAGGGGCGTCTTTTTCACATGTAAT
99	68B1	68	AGCGGTATGTATCTACAAGACTAGCAGATG
100	68C4b	68	TACATCAGTTGACAATGTTATAGTACACAAC
101	68C4c	68	TACATCAGTGGATAATGTTATAGTACACAAC
102	68C7	68	CAAGACTAGCAGATGGTGGAGGGCAACAC
103	69A1	69	ATGGTTTAAAAGTGGCAGATGCAGATTGTG
104	69B1	69	TGTGCAGGGGCATCGGTTGACATGTAGTA
105	70A1-AS	70	AACTTTGTAGGGCTATATACAGCAGGTAT
106	70B1	70	TGGTGGAGGGTAACCTCCTATATTCCAATT
107	71A1	71	AATATTCATGAAACTAGAGGCTTTATATG
108	71B1	71	TTTTTCTGCAGGAGGAGGACTGTTTTTCTG
109	72A1	72	TCTGATACAGAGGACGCTGTGGCAGTACAA
110	72B1	72	GTGGCGAAGATACTCACGAAAATTAGAAGC
111	73A1	73	TAGAGTTGGCATAACGTTGTAGTAGAGCTAC
112	73A2	73	GAGTTGGCATAACGTTGTAGTAGAGCTACTA
113	73B1	73	AGGAGGTTGAGGACGTTGGCAACTAATAGC
114	73C3	73	TCCACTCTCCAATATAGTAGAATTCATAG
115	73C4	73	TTCTCTAAAGTACCTGACGGTGGTGGGGT
116	74A1a	74	TTAAATTTGCATAGGGATTGGGCTTTGCTT
117	74A1b	74	TTAAATTTGGCATAGGGATTAGGCTTTGCTT
118	74B1a	74	AGCAGAAGGCGATTGTGAGGTAGGAGCACA
119	74B1b	74	AGCAGGAGGGGATTGTGTAGTAGGCGCACA
120	81A1	81	TTCTGCAGCAGCAGATGTAGCTGTGCAAAAT
121	81B1	81	CTGTCCAAAATGACATGTCCGCATAAGGGT
122	82A2a-AS	82	TGCAACAGATGGAGTAACAGCAGTGCTAAT
123	82A2b-AS	82	TGCAACTGATGGAGTAGCAGCAGTGCTAAT
124	82B1	82	TGTAGAATCCATGGTGTGCAGGTAAGCCAT
125	83A1	83	TTCATTAGCCTGTGTAGCAGCAGCTGAAAT
126	83B1d	83	CACTCATCYAATAAATGTTTCATTCACTAT
127	84A1	84	ATATTCTGATTCCGGTGTGGTAGCAGCACT
128	84B1	84	AAATAGGACATGACCTCTGGAGTCAGACGG
129	85A1	85	ATATAGATGGAAGTGGATTAGTAGTTGCAG
130	85B1	85	CCTTTTTTTGTGGAACAACCACATCCTTCT
131	89A1	89	TCCTTAAAGCGTGTAGAAGTGTATTCTGTG
132	89B1	89	ATCTCAGGCGTTAGGTGTATCTTACATAGT
133	89C1	89	AATGGCCCGAGAGGTAAGAAAGCGATAGGT

<39> 상기 서열의 뉴클레오티드는 하기와 같이 설계되었다: 구아닌에 G, 아데닌에 A, 티민에 T, 시토신에 C, G 또는

A에 R, T 또는 C에 Y, A 또는 C에 M, G 또는 T에 K, G 또는 C에 S, A 또는 T에 W, A 또는 C 또는 T에 H, G 또는 T 또는 C에 B, G 또는 C 또는 A에 V, G 또는 A 또는 T에 D, 및 마지막으로 G 또는 A 또는 T 또는 C에 N. 본 발명에서 사용된 상기 뉴클레오타이드는 리보뉴클레오타이드, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 이노신(inosine) 또는 본질적으로 자체의 혼성화 성질을 변형하지 않는 변형된 반응군을 포함하는 뉴클레오타이드와 같은 변형된 뉴클레오타이드일 것이다.

- <40> 본 발명의 상기 프로브는 화학적 합성(예를 들면, 일반적인 포스포트라이에스터(phosphotriester) 방법) 또는 예를 들면, 상응하는 뉴클레오타이드 서열이 삽입된 재조합 플라스미드에서 뉴클레아제 처리에 의해 이후에 수득할 수 있는 분자 클로닝에 의한 유전자 공학적인 기술과 같은 상이한 방법에 의해 수득될 수 있다.
- <41> 다소의 HPV 종류에 대해서, 프로브는 이미 언급된 HPV 종류의 상이한 변형체에 대해 고정된 위치에서 분리된 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 영역으로부터 설계되었다. 이 경우에는서 축퇴성(degenerated) 프로브, 즉 언급된 위치에서 대체된 뉴클레오타이드를 각각 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 혼합물이 사용되었다. 프로브 39C3d [서열번호 41], 39C4d[서열번호 43], 45C1d[서열번호 57], 45C3d[서열번호 58], 57A1d[서열번호 74], 59C3_3d [서열번호 81], 66B1[서열번호 91], 66C3d[서열번호 93], 및 83B1d[서열번호 126]가 이 경우에 속한다. 대안적으로, 서열 영역이 정확하게 동일하지만 특정 위치에 대해 뉴클레오타이드 조성물이 다른 두 개의 올리고뉴클레오타이드의 등분자 혼합물이 단일 프로브로서 사용되었다(올리고뉴클레오타이드 58B1a[서열번호 77] 및 58B1b[서열번호 78]의 혼합물; 68C4b[서열번호 100] 및 68C4c[서열번호 101]; 74A1a[서열번호 116] 및 74A1b[서열번호 117]; 74B1a[서열번호 118] 및 74B1b[서열번호 119]; 및 올리고뉴클레오타이드 82A2a-AS [서열번호 122] 및 82A2b-AS [서열번호 123]의 혼합물).
- <42> 본 발명에서 기술된 모든 프로브는 상기 '어레이 튜브' 플랫폼에서 동일한 혼성화 조건하에서 이의 표적 서열에 특이적으로 혼성화되는 것이 입증되었다. 상기 사실은 상기 마이크로어레이 플랫폼을 이용한 42 개의 상이한 HPV 종류를 동시에 동정하는 데에 상기 프로브의 이용을 가능하게 된다. 또한 존재하는 HPV 종류가 임상학적으로 부정확하기 때문에, 본 발명에서 개발한 상기 '어레이 튜브'의 이용에 의해 동정된 상기 많은 수의 HPV 종류들은 상기 방법론이 직접적인 검출 방법으로 고려되도록 한다.
- <43> 진단 방법의 약점 중의 하나는 음성오류(false negative)가 발생하는 경우이다. 본 방법의 경우에서, 음성 오류는 DNA 시료의 품질이 낮거나 분석될 시료에 DNA 증합효소 억제제가 존재하는 경우에 발생할 수 있다. 상기 본 발명은 두 종류의 대조군의 이용에 의해 상기 음성 오류를 제거할 수 있는 방법을 예시한다.
- <44> 환자로부터 수득한 DNA의 증폭으로 이루어진 하나의 대조군은 바람직하게는 DNA 시료의 좋은 품질을 확인하는 데에 사용된다. 인간 DNA의 모든 서열 단편은 상기 목적을 위한 표적으로써 사용될 수 있다. CFTR 유전자와 같은 단일 카피 유전자로부터의 단편은 본 발명에서 DNA 품질의 양성 대조군을 위한 특히 적합한 표적으로써 고려된다. 프라이머 CFTR-F4(서열번호 134) 및 CFTR-R5(서열번호 135)는 CFTR 유전자로부터 892 bp 단편의 증폭을 위해 설계되었다. 단일 카피 대 다중 카피 표적의 이용 및 상기 품질 DNA 대조군의 더 큰 크기는 HPV 증폭 단편과 비교하여 각각 892 bp 및 450 bp의 산물을 증폭하고, 경쟁 효과를 최소화하면서 HPV 게놈의 L1 영역의 증폭에 사용되는 동일한 반응 혼합물에서 CFTR 증폭용 프라이머를 포함하도록 한다. 그러므로, 상기 시료가 HPV 검출에 대한 감수성에 영향을 주지 않고 분석되는 동일한 반응 튜브에서, 품질 DNA 대조군도 동시에 수행될 수 있을 것이다.
- <45> 2차 대조군은 예를 들면, DNA 증합효소 억제제에 기인한 PCR 반응 실패를 검출하는 증폭 양성 대조군으로써 사용될 것이다. 바람직한 구체화에서, 증폭 양성 대조군은 CFTR 유전자 단편의 증폭에 사용되는 것과 비교하여 동일한 프라이머 및 동일한 PCR 조건을 이용하여 증폭될 수 있는 재조합 플라스미드로 이루어진다. CFTR 유전자의 증폭 및 재조합 플라스미드의 증폭에 기인한 PCR 산물 사이에서 프라이머의 크기 및 내부의 서열이 상이하다. 이러한 방식으로, 증폭 산물의 두 가지 형태는 겔 전기영동 또는 특이적 프로브를 이용한 혼성화에 의해 쉽게 구별될 수 있다. 도 6은 상기 특성을 나타내는 재조합 플라스미드 pPG44의 대표도이다.
- <46> 플라스미드 pPG44는 분자수준 클로닝 기술에 의해 제조되었다. 간략하게, pBluescript[®] II SK + (Stratagene, La Jolla, CA, USA) 벡터의 CFTR-F4 및 CFTR-R5, CFTR 프라이머의 측면에 위치한 124번째 위치부터 1285번째 위치까지의 1162 bp 단편으로 이루어진 DNA 삽입체가 pGEM[®] T Easy 벡터에 Promega Corporation, Madison, WI, USA로부터 상업적으로 이용가능한 키트를 이용하여 클로닝되었다. 수득한 재조합 플라스미드 pPG44의 정제물을 제한효소의 사용 및 서열 분석에 의해 추가로 특징을 규명하였다. 플라스미드 pPG44는 선형화 형태에서 증폭 공정의 양성 대조군으로 사용되었다.

<47> 상기 시료가 분석될 동일한 PCR 증폭 혼합물에서 상기 언급된 재조합 플라스미드로써 양성 대조군의 존재는 음성 오류 결과의 발생을 예방하고, 상기 증폭 산물이 전혀 생성되지 않으면, 분명 상기 PCR 증폭이 적절하게 작동하지 않았다고 추론될 것이고, 상기 시료에 상기 HPV 게놈의 존재 여부의 결론을 내릴 수 없기 때문에, 즉 상기 시료에서 상기 표적 HPV 게놈이 존재하더라도 발생하는 음성 결과를 제한한다.

<48> 기술된 양성 대조군의 두 가지 종류의 특이적 검출용 프로브, 즉 DNA 품질 대조군 및 증폭 반응 대조군을 표 2에 나타내었다(서열번호 136-139 및 서열번호 145-147). 또한, 본 발명의 상기 증폭 산물의 어느 것에도 유한 수준의 상동성을 나타내지 않는 올리고뉴클레오티드 서열도 표 2에서 나타내었다(서열번호 140-141). 마이크로어레이의 표면에 고정될 때, 서열번호 140 및 서열번호 141의 바이오틴 표지된 올리고뉴클레오티드는 상기 PCR 산물 검출 반응의 양성 대조군 및 위치 참조의 역할을 함으로써 모든 존재하는 프로브의 위치를 알아낼 수 있다.

표 2

서열번호	프로브 명	대조군 형태	염기서열(5'-3')
136	CFTR-A1-AS	시료 DNA 품질	TTCTCCACCCACTACGCACCCCGCCAGCA
137	CFTR-B3	시료 DNA 품질	GGGCTCAAGCTCCTAATGCCAAAGACCTACTACTCTG
145	CFTR-B1-AS	시료 DNA 품질	CAAGCTCCTAATGCCAAAGACCTACTACTC
146	CFTR-B2	시료 DNA 품질	GGGCTCAAGCTCCTAATGCCAAAGACCTACTACTC
138	CIA1-AS	PCR 반응	CTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTAT
139	CIA2-AS	PCR 반응	TCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATG
147	CIA3-AS	PCR 반응	GAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGAC
140	Marker-1	검출 & 위치	GCAGTATAAGATTATTGATGCCGGAAC
141	Marker-2	검출 & 위치	GTCAAAACCTGGGATAGTAGTTTACC

<50> 또한 본 발명은 임상시료에서 HPV 종류의 특이적 검출용 생체의 진단 키트에 관한 것이다. 바람직하게, 상기 언급된 키트는 하기 성분 중의 일부 또는 모두를 포함할 것이다: 증폭 완충용액, dNTPs, 프라이머, 및 대조군 플라스미드를 포함하는 증폭 믹스; 세척 완충용액; 검출 시약; HPV 종류-특이적 프로브를 포함하는 고정 지지체를 포함하는 어레이; 시료 수득 및 제조용 시약. 비록 당업자가 적합한 키트 구성 성분 및 완충액 조성을 결정할 수 있으나, 상기 특이 성분은 상기 키트의 사용 목적에 따른 정밀한 조건에 따른다.

실시예

<58> 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<59> 실시예 1: '어레이-튜브'의 제조

<60> 본 발명의 '어레이 튜브'는 하기에 따라 CLONDIAG chip Technologies GmbH (Jena, Germany) 사에서 제조되었다. Eppendorf사의 폴리프로필렌으로 만들어졌고, 1.5 ml의 정상 수용량을 갖는 표준 반응 검사 튜브는 재-용해에 의해 변형되어서 점착성 가장자리로 지지된 마이크로어레이용 개방된 오목한 부분을 튜브 안에 만들어졌다.

<61> 상기 튜브에 삽입될 마이크로어레이는 MicroGrid II Arrayer(BioRobotics, Cambridge, Great Britain)를 이용하여 제조되었다. 서열목록의 서열을 갖는 5' 말단 아미노-변형된 올리고뉴클레오티드로 이루어진 프로브는 슬라이드(슬라이드 크기: 75 mm x 25 mm)의 에폭시드화 된 유리 표면 위에 정해진 위치에 점적되었고, 공유결합으로 고정화되었다. 단일 마이크로어레이는 올리고뉴클레오티드가 점적될 수 있는 12 x 10 = 120, 또는 12 x 11 = 132의 고정된 위치를 포함하였다. 상기 위치는 0.2 mm의 간격을 갖음으로써, 각각의 마이크로어레이에 포함된 상기 DNA 라이브러리가 2.4 mm x 2.4 mm의 영역을 가득 채웠고, 전체로 100 개 이상의 동일한 DNA 라이브러리가 슬라이드당 상기 방식으로 제조될 수 있었다. 실험의 종류에 따라, 하나의 단일 프로브 또는 이들의 혼합물이 상기 위치들의 각각의 하나에 점적될 수 있다. 보통, 단일 프로브는 프로브 선택을 위한 특이성 및 감수성 실험이 수행되었을 때 각각의 위치에 점적되었다. 한번 상기 프로브가 증명되면, 특이적 HPV 종류의 상기 증폭 산물의 분리된 영역에서 혼성화가 가능한 프로브의 혼합물은 HPV 유전자형 동정 분석이 수행되었을 때, 동일한 위치에서 점적될 수 있다. 도 1 내지 도 5는 상기 발명에 사용된 마이크로어레이에서 프로브의 상이한 배열을 나타낸다. 각각의 프로브 또는 이의 혼합물의 두 개 또는 세 개의 반복물이 각각의 마이크로어레이에 포

함되었다.

- <62> 마이크로어레이는 HPV 유전자형 분석용 및 증폭 대조군 및 DNA 대조군의 적절성의 검출용 특이적 프로브와 나란히, 본 발명의 상기 모든 증폭 서열에 대해 유의한 상동성을 가지지 않는 5' 말단 바이오틴 변형된 올리고뉴클레오티드(Marker-1[서열번호 140] 및 Marker-2[서열번호 141])로 이루어진 참조 표지를 여러 위치에서 포함하였다. 상기 참조 표지는 검출 반응의 적절한 수행의 확인 및 리더기에 의한 상기 이미지의 광학적 방위로서 작용하여 모든 잔여 프로브가 위치를 잘 찾고 상기 데이터가 분석될 수 있도록 하였다.
- <63> 모든 올리고뉴클레오티드들은 1x QMT Spotting Solution I(Quantifoil Micro Tools GmbH, Jena, Germany)을 이용하여 상기 슬라이드 위에 점적되었다. 각각의 점적 용액에서 올리고뉴클레오티드의 총 농도는 참조 표지의 2.5 μM부터 특이적 프로브의 20 μM까지이다. 올리고뉴클레오티드들은 이후 30분 동안 60°C에서 가열하고, 단계 세척 단계를 거쳐서 상기 유리 표면 위에 에폭시드기와 공유연결되었다. 건조된 슬라이드는 3.15 mm x 3.15 mm 유리 조각으로 잘려졌고, 엄밀히 말하면 마이크로어레이로 붙었다. '어레이 튜브' 제조의 마지막 단계에서, 상기 마이크로어레이는 이전에 언급한 변형된 에펜도르프 튜브 안에 삽입되었고 접착성 가장자리에 붙었다. 도 7은 본 실시예에서 지정한 대로 생산된 '어레이 튜브'의 사진을 나타낸 도이다.
- <64> 실시예 2: DNA 시료의 제조
- <65> 2.1 HPV DNA 표준
- <66> 종류-특이적 프로브의 특이성 및 감수성 평가를 위해 사용된 HPV DNA는 상기 증폭된 L1 영역(HPV 종류 6, 11, 13, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 61, 62, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85 및 89) 또는 증폭된 L1 영역이 추가로 DNA 서열분석된 임상시료에서 추출된 DNA를 포함하는 재조합 플라스미드였다. 재조합 플라스미드는 분자 클로닝 기술에 의해 제조되었다. 간략하게는, 각각의 HPV 종류로부터 증폭된 L1 영역은 Promega Corporation, Madison, WI, USA에서 상업적으로 이용가능한 키트를 이용하여 pGEM[®] T Easy 벡터에 클로닝되었다. 각각의 재조합 플라스미드로부터 수득한 정제 산물은 추가로 서열분석되었다. 1 내지 10 pg의 플라스미드 DNA는 특이성 검사의 평가에 사용되었다.
- <67> K562 세포주(Catalogue No. DD2011, Promega Corporation, Madison, WI, USA)로부터 수득한 DNA는 CFTR 특이적 프로브의 특이성 및 감수성 평가에 사용되었다.
- <68> 2.2 임상시료
- <69> HPV 검출 목적으로, 존재하는 생물학적 물질로부터 가장 먼저 DNA를 분리하였다. DNA 제조 방법은 시료의 종류에 따라 다르다. 다양한 종류의 시료로부터 DNA 준비를 위한 구체적인 실시예를 제공한다:
- <70> A. 스왑(Swabs): 깨끗하고, 건조된 면봉을 이용하여 시료를 채취하였다. 시료가 담겨진 용기에 1.5 ml의 식염수를 직접적으로 가하고 격렬히 볼텍싱(vortexing)함으로써 임상학적 스왑에 묻은 세포들을 회수하였다. 시료 물질들을 1.5 ml 에펜도르프 튜브에 옮기고 원심분리하여 침전시켰다. 상기 상등액을 제거하고, 상기 침전된 세포들을 10 mM Tris-HCl(25°C에서 pH 9.0), 50 mM KCl, 0.15 mM MgCl₂, 0.1% Triton[®] X-100, 0.5% Tween 20 및 0.25 mg/ml 단백질 가수분해 효소 K(Proteinase K)를 포함하는 100 μl의 분해 완충 용액에 현탁하였다. 상기 혼합물을 2 시간 동안 56°C에서 인큐베이션 한 후, 10분 동안 100°C에서 상기 혼합물을 인큐베이션함으로써 상기 단백질 가수분해 효소 K에 열을 가함으로써 불활성화 시켰다. 원심분리하여 분해물을 침전시키고, 상등액을 깨끗한 멸균 튜브에 옮겼다. 5 μl를 분리하여 이어서 PCR 반응에 이용하였다.
- <71> B. 세포 현탁액: 상기 종류의 시료들은 자궁경부 액상 세포검사에 이용되는 것을 참조하였다. 자궁경부 표본들은 브러시 또는 압설기를 이용하여 채취하였고, PreservCyt 용액(Cytec Corp., Marlborough, MA, USA)에 재현탁되었다. 1 ml을 분리하여 원심분리하고 침전물을 1 ml의 식염수에 재현탁하였다. 다시 원심분리한 후, 침전물은 문단 A에서 스왑 시료에서 사용된 것과 같은 100 μl의 분해 완충용액에 재현탁하였고 상기 섹션과 동일한 방법으로 남은 절차를 수행하였다.
- <72> C. 포르말린 고정 및 파라핀-봉매(paraffin-embedded) 생체검사법: 5 μm의 여러 종류의 조직 절편들이 생체검사의 표면 영역에 따라 2-5 절편들이 본 발명의 방법에서 사용되었다. 1.5 ml 멸균 튜브에 절편을 넣고, 문단 A에서 스왑 시료에서 사용된 것과 같은 100 μl의 분해 완충용액을 가하였다. 3 시간 동안 단백질 가수분해 효소 K 처리를 수행한 것을 제외하고, 상기 섹션과 동일한 방법으로 남은 절차를 수행하였다.
- <73> 대안으로는, 스왑, 세포 현탁액 또는 포르말린 고정 및 파라핀-봉매 생체검사 시료 처리를 위해 다양한 종류의

시료로부터 DNA 분리를 위해 설계된 상업적 키트(NucleoSpin® Tissue kit Catalogue No. 635966 from BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA)를 사용되었다. 이 경우, 상기 DNA 분리 과정의 시작은 섹션 A, B 및 C에서 기술된 방법에 따른다. 100 μ l의 용해 완충용액의 이용 대신에, 180 μ l의 완충용액 T1을 상기 시료에 첨가하였다. 절차는 세포 및 조직에서 게놈 DNA의 분리를 위한 제조사의 설명서에 따라 진행되었다.

<74> 임상시료 또는 상기 DNA 준비 방법이 무엇이든지 간에, 음성 대조군을 각각의 시료와 일괄적으로 병행하여 수행되어야 한다. 1 ml의 식염수로 이루어진 상기 음성 대조군은 섹션 A에서와 같은 방법으로 진행되었다.

<75> 실험예 3: PCR 증폭

<76> 보존 프라이머 MY11 및 MY09 (Manos et al., Molecular Diagnostics of Human Cancer; Furth M, Greaves MF, eds.; Cold Spring Harbor Press. 1989, vol. 7: 209-214)를 이용한 PCR 증폭을 수행하였다. 또한, MY09 및 MY11만으로는 효율적으로 증폭되지 않는 HPV 종류 51의 증폭에 사용되며, 종종 MY09 및 MY11과 조합하여 사용되는 세 번째 프라이머인 HMB01(Hildesheim et al., J Infect Dis. 1994, 169: 235-240)도 PCR 반응에 포함되었다. 간략하게는 PCR 증폭은 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.3 μ M MY09 및 MY11 각각의 프라이머(서열번호 142 및 143), 0.03 μ M HMB01 프라이머(서열번호 144), 200 μ M 각각의 dNTP, 4 유닛 AmpliTaq Gold DNA 중합효소(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 및 5 μ l의 실시예 2.1의 각각의 HPV DNA 표준 또는 실시예 2.2의 임상시료 DNA를 포함하는 최종 반응 부피 50 μ l에서 수행되었다. 또한, 시료 DNA가 적절한지 검사하기 위해, 0.08 μ M CFTR-F4 및 CFTR-R5 각각의 프라이머(서열번호 134 및 135)도 반응 혼합물에 첨가되었다. 추가적으로, 증폭 절차 확인 및 반응 실패에 기인한 음성 오류를 제거하기 위해, 20 fg 내부 대조군 pPG44를 상기 시료가 분석될 동일한 반응 튜브에 포함시켰다. 상기 PCR 반응에 사용된 모든 정방향 프라이머들(MY11[서열번호 143] 및 CFTR-F4[서열번호 134])은 5' 말단에 바이오틴 표지됨으로서 모든 증폭된 DNA가 그 결과로서 검출될 수 있게 되었다.

<77> 실시예 2.2의 5 μ l 공시료로 구성된 음성 대조군 또는 5 μ l 탈이온수가 상기 시료 DNA와 병행하여 진행되었다. 상기 종류의 음성 대조군의 용도는 시료 처리 또는 PCR 반응 수행시 어떠한 시점에서도 오염이 발생하지 않는 것을 확인하는 역할을 수행하고, 모든 양성 결과는 상기 시료에 DNA가 정말로 존재하는 것을 나타낸다.

<78> PCR 반응은 하기 조건에 따라 프로그래밍된 Mastercycler thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany)에서 수행되었다: 초기 변성 95°C에서 9분 1회, 94°C에서 30초, 55°C에서 60초 및 72°C에서 90초 45회 반복, 및 72°C에서 8분 동안 최종 신장 1회. 증폭 후, 5 μ l의 각각의 반응 산물은 특이적 프로브를 이용한 이후의 검출에 사용되었다.

<79> 실시예 4: '어레이 튜브'를 이용한 HPV 유전자형의 동시 동정

<80> '어레이 튜브'를 사용 전에 각각의 튜브에 300 μ l의 0.5X PBS-Tween 20 완충용액을 첨가하고 여러 번 뒤집어가면서 전-세척하였다. 진공 시스템과 연결된 파스츄어 피펫(Pasteur pipette)을 사용하여 각각의 튜브의 내부로부터 모든 용액을 제거하였다.

<81> 실시예 3의 증폭 반응 산물을 95°C에서 10분 동안 가열처리하고 즉시 얼음에서 5분 동안 식혀줌으로써 변성하였다. 5 μ l의 변성된 증폭 반응 산물은 상기 실시예 1에서 제조한 '어레이 튜브'에 100 μ l의 혼성화 용액(250 mM 인산나트륨 완충용액, pH 7.2; SSC 1X; 0.2% Triton[®] X-100; 1 mM EDTA, pH 8.0)과 함께 가해졌다. 혼성화 반응은 상기 '어레이 튜브'를 55°C에서 1시간 동안 550 rpm으로 교반하면서 인큐베이션 함으로써 Thermomixer comfort(Eppendorf, Hamburg, Germany)에서 수행되었다. 인큐베이션 후, 진공 시스템과 연결된 파스테르 피펫을 사용하여 혼성화 반응을 제거하였고, 300 μ l의 0.5X PBS-Tween 20 완충용액을 이용한 세척 단계를 수행하였다.

<82> 혼성화된 DNA는 0.075 μ g/ml Poly-HRP 스트렙타비딘(Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA) 용액 100 μ l에 넣어 30°C에서 15분 동안 550 rpm으로 교반하면서 인큐베이션 함으로써 검출되었다. 이후, '어레이 튜브'의 모든 용액을 빠르게 제거하였고 앞서 언급된 두 단계 세척을 수행하였다. 발색 반응은 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(tetramethylbenzidine; TMB) 및 H₂O₂를 포함하는 완충 용액으로 이루어진 True Blue[™] 퍼옥시디아제 기질(KPL, Gaithersburg, MD, USA) 100 ml에서 25°C에서 10분 동안 인큐베이션 함으로써 수행되었다. 그렇게 생산된 상기 발색된 침전물은 마이크로어레이의 고정된 위치에서 광학적 전도에 변화를 야기하고, 이것은 CLONDIAG 칩 테크놀로지 GmbH(Jena, Germany) 사의 ATR01 또는 ATS 리더기를 사용하여 읽혀질 수 있다. 선택적으로, ATS 리더기는 본 발명에서 개발된 상기 '어레이 튜브'에서 수득한 시료 분석 결과의 자동 데이터 처리

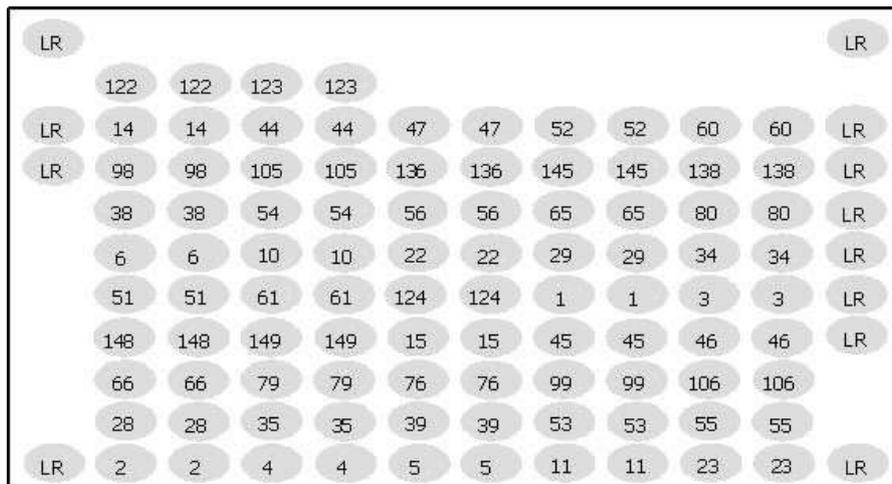
를 위해 설치된 특정 소프트웨어를 포함할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- <51> 도 1은 12 x 11 = 132 정위 마이크로어레이 표면에서 프로브의 배열을 나타낸 도이다. 번호들은 서열번호에 대응한다. 21 개의 상이한 HPV 종류 검출, DNA 시료 품질 대조군 및 증폭 대조군용 단일 프로브를 두 개의 상이한 위치에 고정하였다. LR = 위치 대조용 프로브(서열번호 140 + 서열번호 141).
- <52> 도 2는 12 x 11 = 132 정위 마이크로어레이 표면에서 프로브의 배열을 나타낸 도이다. 번호들은 서열번호에 대응한다. 23 개의 상이한 HPV 종류 검출, DNA 시료 품질 대조군 및 증폭 대조군용 단일 프로브 또는 이의 혼합물을 두 개의 상이한 위치에 고정하였다. LR = 위치 대조용 프로브(서열번호 140 + 서열번호 141).
- <53> 도 3은 12 x 11 = 132 정위 마이크로어레이 표면에서 프로브의 배열을 나타낸 도이다. 번호들은 서열번호에 대응한다. 42 개의 상이한 HPV 종류 검출 및 DNA 시료 품질 대조군용 프로브 혼합물을 두 개의 상이한 위치에 고정하였다. LR = 위치 대조용 프로브(서열번호 140 + 서열번호 141); M1 = 서열번호 76 + 서열번호 77 + 서열번호 78; M2 = 서열번호 122 + 서열번호 123 + 서열번호 124; M3 = 서열번호 116 + 서열번호 117 + 서열번호 118 + 서열번호 119.
- <54> 도 4는 12 x 10 = 120 정위 마이크로어레이 표면에서 프로브의 배열을 나타낸 도이다. 번호들은 서열번호에 대응한다. 35 개의 상이한 HPV 종류 검출, DNA 시료 품질 대조군 및 증폭 대조군용 단일 프로브 또는 이의 혼합물을 세 개의 상이한 위치에 고정하였다. LR = 위치 대조용 프로브(서열번호 140 + 서열번호 141); M1 = 서열번호 76 + 서열번호 77 + 서열번호 78; M2 = 서열번호 122 + 서열번호 123 + 서열번호 124.
- <55> 도 5는 12 x 10 = 120 정위 마이크로어레이 표면에서 프로브의 배열을 나타낸 도이다. 번호들은 서열번호에 대응한다. 14 개의 상이한 HPV 종류 검출, DNA 시료 품질 대조군 및 증폭 대조군용 단일 프로브 또는 이의 혼합물을 두 개의 상이한 위치에 고정하였다. LR = 위치 대조용 프로브(서열번호 140 + 서열번호 141); M4 = 서열번호 100 + 서열번호 101 + 서열번호 102.
- <56> 도 6은 증폭 양성 대조군으로서 PCR 반응에서 사용된 재조합 플라스미드 pPG44의 개열지도이다.
- <57> 도 7은 본 발명에서 사용된 '어레이 튜브'의 사진이다.

도면

도면1



도면2

LR	116	116	118	118	129	129	130	130	77	77	LR
	21	21	26	26	27	27	103	103	104	104	
LR	147	147	146	146	137	137	19	19	20	20	LR
LR	97	97	107	107	108	108	61	61	139	139	LR
	87	87	88	88	89	89	95	95	96	96	LR
	113	113	32	32	33	33	74	74	75	75	LR
	125	126	126	127	127	128	128	111	111	112	LR
	120	120	121	121	131	131	132	132	133	133	LR
112	90	90	91	91	92	92	109	109	110	110	
125	72	72	73	73	84	84	85	85	86	86	
LR	67	67	68	68	69	69	70	70	71	71	LR

도면3

LR	M3	M3	129	129	136	136	136	136	136	136	LR
	19	19	19	19	20	20	26	26	103	103	
LR	87	87	87	87	95	95	95	95	107	107	LR
LR	127	127	111	111	112	112	32	32	74	74	LR
	120	120	131	131	131	131	132	132	125	125	LR
	84	84	84	84	90	90	90	90	109	109	LR
	M2	67	67	69	69	69	69	70	70	72	LR
72	44	44	46	46	51	51	60	60	122	122	LR
M2	65	78	78	M1	M1	98	98	105	105	14	14
65	28	28	34	34	38	38	53	53	55	55	
LR	1	1	3	3	5	5	10	10	22	22	LR

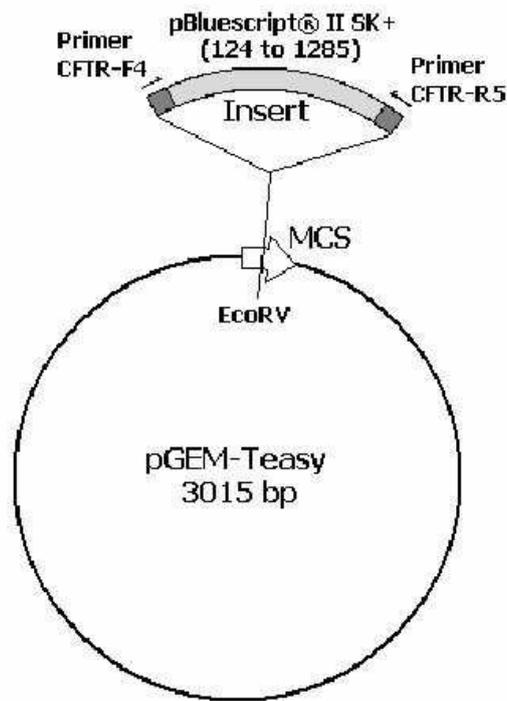
도면4

LR	105	107	109	111	120	M2	125	127	129	131	LR
60	65	67	69	72	M1	79	84	87	90	98	
LR	10	14	22	28	34	38	44	46	51	53	55
	120	M2	125	127	129	131	138	136	1	3	5
69	72	M1	79	84	87	90	98	105	107	109	111
22	28	34	38	44	46	51	53	55	60	65	67
M2	125	127	129	131	138	136	1	3	5	10	14
72	M1	78	84	87	90	98	105	107	109	111	120
	38	44	46	51	53	55	60	65	67	69	
LR	138	136	1	3	5	10	14	22	28	34	LR

도면5

LR	63	63	93	93	114	114	100	100	M4	M4	LR
	17	17	24	24	30	30	36	36	62	62	
LR	7	7	7	8	8	12	12	16	16	16	16
	100	100	101	101	102	102	114	114	115	115	7
64	64	81	81	82	82	83	83	93	93	94	94
50	50	57	57	58	58	59	59	62	62	63	63
40	40	41	41	42	42	43	43	48	48	49	49
24	24	25	25	30	30	31	31	36	36	37	37
	12	12	13	13	16	16	17	17	18	18	
LR	138	138	136	136	7	7	8	8	9	9	LR

도면6



도면7



서열목록

<110> GENOMICA S.A.U.

<120> In vitro diagnostic kit for identification of Human Papillomavirus in clinical samples

<130> 8fpi-02-03

<160> 149

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 1

tgtatgtgga agatgtagtt acggatgcac

30

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 2

catgacgcat gtactcttta taatcagaat t

31

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 3

tgtatgtagc agatttagac acagatgcac

30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 4

catggcgcat gtattcctta taatctgaat

30

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 5

gtagatatgg cagcacataa tgacatattt 30

<210> 6
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 6
 ttctgaagta gatatggcag cacataatga 30

<210> 7
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 7
 aactgtgcaa aataacctta actgcagacg 30

<210> 8
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 8
 atacatacat tctatgaatt ccactatttt g 31

<210> 9
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 9
cccaggaggc aactagaag atacttatag 30

<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe

<400> 10
atcatattgc ccaggtacag gagactgtgt 30

<210> 11
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe

<400> 11
cttattttca gccggtgcag catcctttt 29

<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 12

gaatagcagt attttagagg attggaactt 30

<210> 13
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probes

<400> 13
 agttaaagtt ttggaatgtg gatttaaagg a 31

<210> 14
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 14
 tggtttaaat ggagtggatg cagatgctgc 30

<210> 15
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 15
 atcttccttt ggcacaggag gggcgttacg 30

<210> 16
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 16

aacaatttat aagacatggc gaagaatatg

30

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 17

acatttaatg aatgcctcca tattggagga

30

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 18

gtaacgcccc tcctgtgcca aaggaagatc

30

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 19

cttgtggcag ctgggggtga caatccaata 30

<210> 20
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 20
 gataacgttt gtgtggttgc agatatagtc 30

<210> 21
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 21
 ttccagccct caagtaaagt ggagttcata 30

<210> 22
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 22
 tgtagtatca ctgtttgcaa ttgcagcaca 30

<210> 23
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 23
 agaacctgag ggaggtgtgg tcaatccaaa 30

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

<220>
 <223> probe

<400> 24
 taaagagtat ttaagacatg gtgaggaatt tga 33

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

<220>
 <223> probe

<400> 25
 catatattca cagtatgaat cctgctattt t 31

<210> 26
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 26

agtttagtaga cttgtatgtg tcttcagttg tt

32

<210> 27
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 27
 ttcccaaat gaatagtcag aaaaaggatc

30

<210> 28
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 28
 tactgtcact agttacttgt gtgcataaag

30

<210> 29
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 29
 gtatatttac ctaaggggtc ttccttttcc

30

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

<220>
 <223> probe

<400> 30
 aaaggaagac cccttaggta aatatacatt 30

<210> 31
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 31
 caactatgca aagttacctt aactgcagaa 30

<210> 32
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 32
 atatggtgga gttgtacttg tggattgtgt 30

<210> 33
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 33

tccttaggag gttgaggacg ctgacatgta 30

<210> 34
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 34
 gtcactagaa gacacagcag aacacacaga 30

<210> 35
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 35
 aatggatcat cttaggttt tggcactg 30

<210> 36
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 36
 gtacctaga ggacacatat cgctatgtaa 30

<210> 37
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 37
atgtaacatc acaggctgta acttgtaaaa 30

<210> 38
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe

<400> 38
ggtatggaag actctataga ggtagataat g 31

<210> 39
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe

<400> 39
gtatctgtaa gtgtctacca aactggcaga 30

<210> 40
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 40

gtagtaccaa ctttacatta tctacctcta 30

<210> 41
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 41
 ataycaggca cgtggaggag tatgatttac 30

<210> 42
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 42
 aactgtgtac tgtcacatta acaactgatg 30

<210> 43
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 43
 aactgtgtac tgmactatta acaactgatg 30

<210> 44
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe

<400> 44
cttgaatta ctgttattat atggggttgg 30

<210> 45
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 45
cctccaacaa cgtaggatcc attgcatgaa 30

<210> 46
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe

<400> 46
gtatatgtat caccagatgt tgcagtggca 30

<210> 47
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe

<400> 47

tagcctgaca gcgaatagct tctgattgta 30

<210> 48
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 48
 gtatgtacaa tcagaagcta ttcgctgtca 30

<210> 49
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 49
 tacacaatat gaatcctaac atattagagg a 31

<210> 50
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 50
 gttgcaccac caccttcagg aactttagaa 30

<210> 51
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 51
atatgtactg ggcacagtag ggtcagtaga 30

<210> 52
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 52
aagcagaggc aggtggggac acaccaaata 30

<210> 53
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 53
tatatgtaga cggaggggac tgtgtagtgg 30

<210> 54
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 54

cgcatgtatt gcttatattg ttcactagta t

31

<210> 55
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 55
 ctgcttttct ggaggtgtag tatcctttt

29

<210> 56
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 56
 ggcacaggat tttgtgtaga ggcacataat

30

<210> 57
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 57
 atgaycctac taagttaag castatagta

30

<210> 58
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 58
tmcctccacc acctactaca agtttrgtgg 30

<210> 59
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 59
tcgtttgtg caatcagttg ctgttacctg 30

<210> 60
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe

<400> 60
taaagtgttg gaaaccgca gcagtggcag 30

<210> 61
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 61

tggaggggtg tccttttgac agctagtagc 30

<210> 62
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 62
 ggcttattta cacacaatgg atcctacat 30

<210> 63
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 63
 acaatggatc ctaccattct tgaacagtgg 30

<210> 64
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 64
 gattaacatt acctccgtct gctagtttgg 30

<210> 65
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe

<400> 65
ttatatgtgc tttccttttt aacctcagca 30

<210> 66
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 66
gtgtcctcca aagatgcaga cgggtgtgg 29

<210> 67
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 67
aacctcagca gacaggata tttacatag 30

<210> 68
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 68

aagctagtgg caacaggagg cgacaaacct 30

<210> 69
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 69
 gctatcctgc gtggatgctg tagcacacaa 30

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

<220>
 <223> Probe

<400> 70
 aactacttgt agctgggggg gttataccea 30

<210> 71
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 71
 atctgctgta aggttatgg tacataactg 30

<210> 72
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 72
 tgtctaaggt actgattaat ttttcgtgca 30

<210> 73
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 73
 tttatcttct aggctggtgg ccaactggcgg 30

<210> 74
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 74
 tataattagt ttctgtgktt acagtggcac 30

<210> 75
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 75

agtcctctag caaccgca tccatgttat 30

<210> 76
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 76
 atattcttca acatgacgta catattcctt 30

<210> 77
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 77
 tcttctttag ttacttcagt gcataatgtc 30

<210> 78
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 78
 ccttccttag ttacttcagt gcataatgtc 30

<210> 79
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 79

ctggcatatt ctttaaaact ggtaggtgtg

30

<210> 80

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 80

tctgtttaa ctggcgtgc ggtgtcctt

30

<210> 81

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 81

tctttctgtg tgtgcttcta ctactbcttc

30

<210> 82

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 82

tttaaagaat atgccagaca tgtggaggaa 30

<210> 83
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 83
 aatgtcatac attcataata tgaataccac 30

<210> 84
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 84
 tatattcaga tacagggggg gatgtagcag 30

<210> 85
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 85
 ataacttggc atagcgatcc tccttgggcg 30

<210> 86
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe

<400> 86
atattcccta aagcttgtgg ctttatattc 30

<210> 87
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 87
gtggaagggg gaggtaaaac cccaagttc 30

<210> 88
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 88
atacgggtcc accttgggac ggtaggcag 30

<210> 89
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe

<400> 89

aaatgtcatt tgcgcatagc ggtccacctt 30

<210> 90
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 90
 gttaatgtgc ttttagctgc attaatagtc 30

<210> 91
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 91
 tggcgaaggt attgattgat ttcacgkca 30

<210> 92
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 92
 cacatggcga aggtattgat tgatttcacg 30

<210> 93
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 93
taatacttta ttagacgatt ggaayattgg 30

<210> 94
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 94
aggataaata taggtatatt aaaagcacag 30

<210> 95
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe

<400> 95
tcttcctttg ctgttgagg ggatgttttt 30

<210> 96
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe

<400> 96

tggtgtgtat gtattgcata acatttgcag 30

<210> 97
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 97
 gttttcattt ttgtatgtag cctctgattt 30

<210> 98
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 98
 aggtgcaggg gcgtctttt gacatgtaat 30

<210> 99
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 99
 agcggtatgt atctacaaga ctagcagatg 30

<210> 100
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 100
gttgtgtact ataacattgt caactgatgt a

31

<210> 101
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 101
gttgtgtact ataacattat ccaactgatgt a

31

<210> 102
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 102
gtgttgcccc tccaccatct gctagtcttg

30

<210> 103
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe

<400> 103

atggtttaaa agtggcagat gcagattgtg 30

<210> 104
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 104
 tgtgcagggg catcgcgttg acatgtagta 30

<210> 105
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 105
 aaactttgta gggctatata cagcaggtat 30

<210> 106
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 106
 tggtagggg gtaactccta tattccaatt 30

<210> 107
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 107

aatattccat gaaactagag gctttatg

30

<210> 108

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 108

tttttctgca ggaggaggac tgttttctg

30

<210> 109

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 109

tctgatacag aggacgctgt ggcagtacaa

30

<210> 110

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 110

gtggcgaaga tactcacgaa aattagaagc 30

<210> 111
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 111
 tagagttggc atacgttgta gtagagctac 30

<210> 112
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 112
 gagttggcat acgtttagt agagctacta 30

<210> 113
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 113
 aggagttga ggacgttggc aactaatagc 30

<210> 114
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 114
ctatgaattc tactatattg gaagagtgga 30

<210> 115
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 115
accccaccac cgtcaggtac ttagaggaa 30

<210> 116
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe

<400> 116
ttaaatttgc atagggattg ggctttgctt 30

<210> 117
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe

<400> 117

ttaaattggc atagggatta ggctttgctt 30

<210> 118
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 118
 agcagaaggc gattgtgagg taggagcaca 30

<210> 119
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 119
 agcaggaggg gattgtgtag taggcgcaca 30

<210> 120
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 120
 ttctgcagca gcagatgtag ctgtgcaaat 30

<210> 121
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 121
ctgtccaaaa tgacatgtcg gcataagggt 30

<210> 122
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe

<400> 122
tgcaacagat ggagtaacag cagtgctaat 30

<210> 123
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe

<400> 123
tgcaactgat ggagtagcag cagtgctaat 30

<210> 124
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 124

tgtagaatcc atggtgtgca ggtaagccat 30

<210> 125
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 125
 ttcattagcc tgttagcag cagctgaaat 30

<210> 126
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 126
 cactcatcya ataatgttc attcatacta t 31

<210> 127
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 127
 atattctgat tcggtgttgg tagcagcaat 30

<210> 128
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 128
aaataggaca tgacctctgg agtcagacgg 30

<210> 129
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 129
atatagatgg aactggatta gtagttgcag 30

<210> 130
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 130
cctttttttg tgaacaacc acatccttct 30

<210> 131
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 131

tccttaaagc gtgtagaact gtattctgtg 30

<210> 132
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe

<400> 132
 atctcaggcg ttaggtgat cttacatagt 30

<210> 133
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 133
 aatggcccga gaggtaagaa agcgataggt 30

<210> 134
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 134
 actaggatca tcgggaaaag 20

<210> 135
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 135
 tggctctcta ttcaatcagc 20

<210> 136
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 136
 ttctccacc actacgacc cccgccagca 30

<210> 137
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 137
 gggctcaagc tcctaagcc aaagacctac tactctg 37

<210> 138
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 138

ctcattagge accccaggct ttacacttta t 31

<210> 139
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 139
 tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatg 35

<210> 140
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 140
 gcagtataag attattgatg ccggaac 27

<210> 141
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 141
 gtcaaacct gggatagtag ttttacc 27

<210> 142
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 142
cgtccmarrg gawactgatc 20

<210> 143
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 143
gcmcaggwc ataayaatgg 20

<210> 144
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 144
gcgaccaat gcaaattggt 20

<210> 145
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe

<400> 145

caagctccta atgccaaga cctactactc 30

<210> 146
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 146
 gggctcaagc tcctaatgcc aaagacctac tactc 35

<210> 147
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 147
 gagtgagctg ataccgctcg ccgagccga acgac 35

<210> 148
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 148
 gtagatatgg cagcacatat tgacatattt 30

<210> 149
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 149

gtagatatgg cagtcataa tgtcatattt

30