



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0011600
(43) 공개일자 2011년02월08일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01) C12R 1/92 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7020518

(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년02월19일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2010년09월14일

(86) 국제출원번호 PCT/US2009/001032

(87) 국제공개번호 WO 2009/105212

국제공개일자 2009년08월27일

(30) 우선권주장

61/064,166 2008년02월20일 미국(US)

(71) 출원인

이와키, 코스케, 켄

미국 캘리포니아 90274, 팔로스 베르데스 이스테이츠, 바이어 호르켈라 613

(72) 발명자

이와키, 코스케, 켄

미국 캘리포니아주 90274, 팔로스 베르데스 이스테이츠, 바이어 호르켈라 613

(74) 대리인

임훈빈

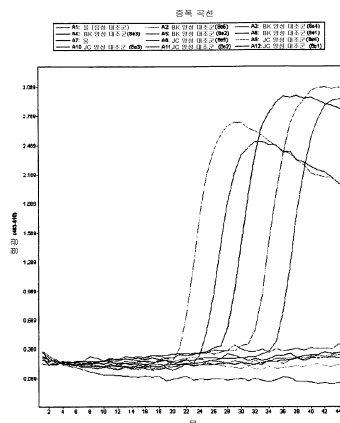
전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 폴리오마바이러스 검출

(57) 요약

샘플에서 폴리오마바이러스, 예컨대 BKV의 존재 또는 부재를 검사하기 위한 방법 및 키트가 제공된다. 이 방법 및 키트는 BKV를 정량화하고, JCV로부터 BKV를 식별하는데 유용하다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

샘플에서 서열번호 1의 서열, 그의 역상보체 또는 서열번호 1과 서열 상동성이 90% 이상인 서열을 갖는 핵산의 존재 또는 부재를 검사하는 것을 포함하여, 샘플에서 폴리오마바이러스의 존재 또는 부재를 검사하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 서열번호 1 또는 그의 역상보체 또는 이중 일부의 핵산을 증폭시킨 다음, 생성된 앰플리콘의 존재 또는 부재를 검사하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 검사 단계가 샘플을 엄격한 조건하에서 서열번호 1 또는 그의 역상보체의 핵산에 하이브리드 화할 수 있는 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 프로브와 접촉시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 검사 단계가 용해 곡선 분석의 수행을 추가로 포함하는 방법.

청구항 5

제 3 항에 있어서, 증폭 단계가 적어도 증폭 프라이머 서열번호 2(BK_F_1.1) 및 서열번호 3(BK_R_1.2)의 사용을 포함하고, 검사 단계가 적어도 올리고뉴클레오타이드 프로브 서열번호 4(BK_P_1.3) 및 서열번호 5(BK_P_1.4)의 사용을 포함하는 방법.

청구항 6

제 3 항에 있어서, 증폭 단계가 적어도 증폭 프라이머 서열번호 2(BK_F_1.1) 및 서열번호 6(BK_R_1.5)의 사용을 포함하고, 검사 단계가 적어도 올리고뉴클레오타이드 프로브 서열번호 4(BK_P_1.3) 및 서열번호 5(BK_P_1.4)의 사용을 포함하는 방법.

청구항 7

제 3 항에 있어서, 증폭 단계가 적어도 증폭 프라이머 서열번호 2(BK_F_1.1) 및 서열번호 3(BK_R_1.2)의 사용을 포함하고, 검사 단계가 적어도 올리고뉴클레오타이드 프로브 서열번호 4(BK_P_1.3) 및 서열번호 23(JC_P_1.5)의 사용을 포함하는 방법.

청구항 8

제 3 항에 있어서, 증폭 단계가 적어도 증폭 프라이머 서열번호 2(BK_F_1.1) 및 서열번호 3(BK_R_1.2)의 사용을 포함하고, 검사 단계가 적어도 올리고뉴클레오타이드 프로브 서열번호 5(BK_P_1.4) 및 서열번호 23(JC_P_1.5)의 사용을 포함하는 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 증폭 단계가 적어도 증폭 프라이머 서열번호 8(BK_F_2.1) 및 서열번호 9(BK_R_2.2)의 사용을 포함하는 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 검사 단계가 이중가닥 DNA에 결합하는 시아닌 염료의 사용을 포함하는 방법.

청구항 11

제 3 항에 있어서, 증폭 단계가 적어도 증폭 프라이머 서열번호 4(폴리오마바이러스_F_3.1) 및 서열번호 6(폴리오마바이러스_R_3.2)의 사용을 포함하고, 검사 단계가 적어도 올리고뉴클레오타이드 프로브 서열번호 9(BK_P_3.3)

및 서열번호 13(JCV_P_3.4)의 사용을 포함하는 방법.

청구항 12

제 3 항에 있어서, 증폭 단계가 적어도 증폭 프라이머 서열번호 4(폴리오마바이러스_F_3.1) 및 서열번호 6(폴리오마바이러스_R_3.2)의 사용을 포함하고, 검사 단계가 적어도 올리고뉴클레오타이드 프로브 서열번호 9(BK_P_3.3)의 사용을 포함하는 방법.

청구항 13

제 3 항에 있어서, 증폭 단계가 적어도 증폭 프라이머 서열번호 4(폴리오마바이러스_F_4.1) 및 서열번호 6(폴리오마바이러스_R_4.2)의 사용을 포함하고, 검사 단계가 적어도 올리고뉴클레오타이드 프로브 서열번호 14(BK_P_4.3) 및 서열번호 15(JCV_P_4.4)의 사용을 포함하는 방법.

청구항 14

엄격한 조건하에서 서열번호 1의 핵산에 하이브리드화할 수 있는 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하는 키트.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 서열번호 1, 그의 상보체, 전사체 또는 일부의 핵산을 증폭시키기 위한 증폭 프라이머를 추가로 포함하는 키트.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 증폭 프라이머 서열번호 2(BK_F_1.1) 및 서열번호 3(BK_R_1.2), 및 올리고뉴클레오타이드 프로브 서열번호 4(BK_P_1.3) 및 서열번호 5(BK_P_1.4)를 포함하는 키트.

청구항 17

제 15 항에 있어서, 증폭 프라이머 서열번호 2(BK_F_1.1) 및 서열번호 6(BK_R_1.5), 및 올리고뉴클레오타이드 프로브 서열번호 4(BK_P_1.3) 및 서열번호 5(BK_P_1.4)를 포함하는 키트.

청구항 18

제 15 항에 있어서, 증폭 프라이머 서열번호 2(BK_F_1.1) 및 서열번호 3(BK_R_1.2), 및 올리고뉴클레오타이드 프로브 서열번호 4(BK_P_1.3) 및 서열번호 23(JC_P_1.5)을 포함하는 키트.

청구항 19

제 15 항에 있어서, 증폭 프라이머 서열번호 2(BK_F_1.1) 및 서열번호 3(BK_R_1.2), 및 올리고뉴클레오타이드 프로브 서열번호 5(BK_P_1.4) 및 서열번호 23(JC_P_1.5)을 포함하는 키트.

청구항 20

제 15 항에 있어서, 증폭 프라이머 서열번호 4(폴리오마바이러스_F_3.1) 및 서열번호 6(폴리오마바이러스_R_3.2), 및 올리고뉴클레오타이드 프로브 서열번호 9(BK_P_3.3) 및 서열번호 13(JCV_P_3.4)를 포함하는 키트.

청구항 21

제 15 항에 있어서, 증폭 프라이머 서열번호 4(폴리오마바이러스_F_3.1) 및 서열번호 6(폴리오마바이러스_R_3.2), 및 올리고뉴클레오타이드 프로브 서열번호 9(BK_P_3.3)를 포함하는 키트.

청구항 22

제 15 항에 있어서, 증폭 프라이머 서열번호 4(폴리오마바이러스_F_4.1) 및 서열번호 6(폴리오마바이러스_R_4.2), 및 올리고뉴클레오타이드 프로브 서열번호 14(BK_P_4.3) 및 서열번호 15(JCV_P_4.4)를 포함하는 키트.

청구항 23

증폭 프라이머 서열번호 8(BK_F_2.1) 및 서열번호 9(BK_R_2.2)를 포함하는 키트.

청구항 24

제 1 항 내지 13 항중 어느 한항의 방법을 포함하여, 장기 제공자의 혈액 샘플에서 폴리오마바이러스 존재를 검사하는 방법.

청구항 25

제 24 항에 있어서, 기증이 고려되는 장기가 신장, 간 및 심장으로 구성된 군중에서 선택되는 방법.

청구항 26

제 24 항에 있어서, 폴리오마바이러스에 양성으로 밝혀진 장기 기증자의 장기를 거부하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 27

제 1 항 내지 13 항중 어느 한항의 방법을 이용하여 폴리오마바이러스를 보유한 환자에서 폴리오마바이러스의 바이러스량을 측정하는 것을 포함하여, 상기 환자의 치료를 감시하는 방법.

청구항 28

제 27 항에 있어서, 바이러스량이 치료 전 및 치료중에 측정되는 방법.

청구항 29

제 27 항에 있어서, 치료가 항바이러스제 투여를 포함하는 방법.

청구항 30

제 29 항에 있어서, 항바이러스제가 시도포비르, 레플루노마이드, 퀴놀론 항생제 및 정맥내 면역글로불린으로 구성된 군중에서 선택되는 방법.

청구항 31

제 1 항에 있어서, 증폭 단계가 적어도 증폭 프라이머 서열번호 2 및 서열번호 6, 및 프로브 서열번호 14의 사용을 포함하는 방법.

청구항 32

제 1 항에 있어서, 증폭 단계가 적어도 증폭 프라이머 서열번호 4 및 서열번호 6, 및 프로브 서열번호 14의 사용을 포함하는 방법.

청구항 33

제 1 항에 있어서, 증폭 단계가 적어도 증폭 프라이머 서열번호 2 및 프라이머 BKV_5.2 및 프로브 서열번호 14의 사용을 포함하는 방법.

청구항 34

제 1 항에 있어서, 증폭 단계가 적어도 증폭 프라이머 서열번호 4 및 프라이머 BKV_5.2 및 프로브 서열번호 14의 사용을 포함하는 방법.

명세서

기술 분야

관련 특허 출원의 상호참조

본 출원은 그의 전체내용이 본 원에 참고로 인용되는, 2008년 2월 20일 출원된 미국 가특허출원 제61/064,166호를 우선권으로 주장한다.

배경 기술

- [0003] 인간 폴리오마바이러스 JC 및 BK는 인간에게서 흔히 볼 수 있다. 이들 바이러스에 의한 일차 감염은 보통 증상이 없으며, 일시적인 바이러스노증을 초래할 수 있다. 일차 감염 후, JC 바이러스(JCV) 및 BK 바이러스(BKV)는 모두 신장 조직 및 B 림프구에 잠복하게 된다(G. Lecatsas, B. D. Schoub, A. R. Rabson, and M. Joffe, Letter, Lancet 2:907-08, 1976). 폴리오마바이러스-관련 질환은 주로 면역 손상에 관련되며, 면역저하 환자에서 병인체의 신속한 검출 및 분화는 임상적 관리 지원에 중요하다. JCV는 주로 AIDS 환자에서 발생하는 신경계 질환인 진행성 다발성 백질뇌병증의 원인 물질인 반면, BKV-관련 질환은 면역억제 요법을 받은 이식 환자에서 가장 흔히 발견되는 출혈성 방광염, 요관 협착 및 기타 요로 질환을 포함한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 폴리오마바이러스를 검출 및 확인하는 통상의 방법은 세포 배양에 의한 바이러스 분리 및 전자현미경 검사에 의한 혈청 방법을 포함한다. 최근 연구에 따르면, 광범위 임상 샘플에서 폴리오마바이러스를 검출하는데 PCR이 효과적인 수단임이 밝혀졌다.

과제의 해결 수단

- [0005] 그러나, 폴리오마바이러스의 효과적인 검출 분석을 개발하는데 주된 검출물은 BKV 및 JCV의 뉴클레오티드 서열 내 아주 많은 수의 종내 다형태이다. 지금까지 SNP, 삽입 및 결실과 같은 뉴클레오티드 다형태 때문에 감염을 검출하는데 신뢰적인 수단을 개발하는 것이 불가능하였었다. 따라서, 보다 엄격한 분석법이 필요하다.
- [0006] 개요
- [0007] 본 발명의 일 측면에 따라, 샘플에서 서열번호 1의 서열, 그의 역상보체 또는 서열번호 1과 서열 상동성이 90% 이상인 서열을 갖는 핵산의 존재 또는 부재를 검사하는 것을 포함하여, 샘플에서 폴리오마바이러스의 존재 또는 부재를 검사하는 방법이 제공된다.
- [0008] 일부 구체예에 있어서, 상기 방법은 서열번호 1 또는 그의 역상보체 또는 이중 일부의 핵산을 증폭시킨 다음, 생성된 앰플리콘의 존재 또는 부재를 검사하는 것을 추가로 포함한다. 일부 측면에 있어서, 검사 단계는 샘플을 엄격한 조건하에서 서열번호 1 또는 그의 역상보체의 핵산에 하이브리드화할 수 있는 적어도 하나의 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키거나, 용해 곡선 분석을 행하는 것을 포함한다.
- [0009] 일 구체예에 있어서, 상기 방법은 적어도 증폭 프라이머 서열번호 2 및 서열번호 3의 사용을 포함하고, 검사 단계는 적어도 올리고뉴클레오티드 프로브 서열번호 4 및 서열번호 5의 사용을 포함한다.
- [0010] 다른 구체예에 있어서, 상기 방법은 적어도 증폭 프라이머 서열번호 2 및 서열번호 6의 사용을 포함하고, 검사 단계는 적어도 올리고뉴클레오티드 프로브 서열번호 4 및 서열번호 5의 사용을 포함한다.
- [0011] 다른 구체예에 있어서, 상기 방법은 적어도 증폭 프라이머 서열번호 2 및 서열번호 3의 사용을 포함하고, 검사 단계는 적어도 올리고뉴클레오티드 프로브 서열번호 4 및 서열번호 23의 사용을 포함한다.
- [0012] 또 다른 구체예에 있어서, 상기 방법은 적어도 증폭 프라이머 서열번호 2 및 서열번호 6의 사용을 포함하고, 검사 단계는 적어도 올리고뉴클레오티드 프로브 서열번호 4 및 서열번호 23의 사용을 포함한다.
- [0013] 그밖의 다른 구체예에 있어서, 상기 방법은 적어도 증폭 프라이머 서열번호 8 및 서열번호 9의 사용을 포함한다. 일 측면에 있어서, 검사 단계는 이중가닥 DNA에 결합하는 시아닌 염료의 사용을 포함한다.
- [0014] 다른 구체예에 있어서, 상기 방법은 적어도 증폭 프라이머 서열번호 4 및 서열번호 6의 사용을 포함하고, 검사 단계는 적어도 올리고뉴클레오티드 프로브 서열번호 9 및 서열번호 13의 사용을 포함한다. 프로브 서열번호 9 및 서열번호 13은 검사 단계에서 개별적으로 또는 동시에 사용될 수 있다.
- [0015] 다른 구체예에 있어서, 상기 방법은 적어도 증폭 프라이머 서열번호 4 및 서열번호 6의 사용을 포함하고, 검사 단계는 적어도 올리고뉴클레오티드 프로브 서열번호 14 및 서열번호 15의 사용을 포함한다.
- [0016] 다른 구체예에 있어서, 상기 방법은 적어도 증폭 프라이머 BKV_5.2 및 BKV_5.1의 사용을 포함한다. 이들 프라이머는 VP2/3 유전자의 말단부에 인접하여 위치한다. VP2/3 및 VP1은 상이한 개방 관독 프레임(ORF)을 가지지

만, BKV 5.2 및 BKV 5.1 프라이머는 VP1 유전자 개시부와 중첩되는 VP2/3 유전자 영역을 증폭시킨다.

- [0017] 다른 측면에 있어서, 엄격한 조건하에서 서열번호 1의 핵산에 하이브리드화할 수 있는 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하는 키트가 제공된다. 일 측면에 있어서, 키트는 서열번호 1, 그의 상보체, 전사체 또는 일부의 핵산을 증폭시키기 위한 증폭 프라이머를 추가로 포함한다.
- [0018] 일 구체예에 있어서, 키트는 증폭 프라이머 서열번호 2 및 서열번호 3 및 올리고뉴클레오타이드 프로브 서열번호 4 및 서열번호 5를 포함한다.
- [0019] 다른 구체예에 있어서, 키트는 증폭 프라이머 서열번호 2 및 서열번호 6 및 올리고뉴클레오타이드 프로브 서열번호 4 및 서열번호 5를 포함한다.
- [0020] 다른 구체예에 있어서, 키트는 증폭 프라이머 서열번호 2 및 서열번호 3 및 올리고뉴클레오타이드 프로브 서열번호 4 및 서열번호 23을 포함한다.
- [0021] 또 다른 구체예에 있어서, 키트는 증폭 프라이머 서열번호 2 및 서열번호 6 및 올리고뉴클레오타이드 프로브 서열번호 4 및 서열번호 23을 포함한다.
- [0022] 다른 구체예에 있어서, 키트는 증폭 프라이머 서열번호 4 및 서열번호 6 및 올리고뉴클레오타이드 프로브 서열번호 9 및 서열번호 13을 포함한다. 프로브 서열번호 9 및 서열번호 13은 개별적으로 또는 동시에 사용될 수 있다.
- [0023] 일 구체예에 있어서, 키트는 증폭 프라이머 서열번호 4 및 서열번호 6 및 올리고뉴클레오타이드 프로브 서열번호 14 및 서열번호 15를 포함한다.
- [0024] 일 구체예에 있어서, 키트는 증폭 프라이머 서열번호 8 및 서열번호 9를 포함한다.
- [0025] 다른 구체예에 있어서, 키트는 증폭 프라이머 BKV_5.2 및 BKV_5.1을 포함한다. 이들 프라이머는 VP2/3 유전자 말단부에 인접하여 위치한다. VP2/3 및 VP1은 상이한 개방 판독 프레임(ORF)을 가지지만, BKV 5.2 및 BKV 5.1 프라이머는 VP1 유전자 개시부와 중첩되는 VP2/3 유전자 영역을 증폭시킨다.
- [0026] 일부 구체예에 있어서, 적어도 하나의 증폭 프라이머는 엄격한 조건하에서 BKV 게놈 DNA에 특이적으로 결합한다. 일 구체예에 있어서, 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 프로브는 BKV 게놈 DNA에 특이적으로 결합한다. 다른 구체예에 있어서, 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 프로브는 JCV 게놈 DNA에 특이적으로 결합한다.
- [0027] 일부 구체예에 있어서, 키트는 또한 앰플리콘 또는 결합 프로브의 검출에 용이한 시약을 함유한다.
- [0028] 다른 측면에 있어서, 상술된 방법을 이용하여 장기 기증자의 혈액 샘플에서 폴리오마바이러스 존재를 검사하기 위한 방법이 제공된다. 또한, 상술된 방법을 이용하여 환자에서 폴리오마바이러스의 바이러스량을 측정하는 것을 포함하여, 폴리오마바이러스를 보유한 환자의 치료를 감시하는 방법이 제공된다. 일 예로, 바이러스량은 치료 전 및 치료중에 측정된다. 이때 치료는 항바이러스제, 예컨대 시도포비르, 레플루노마이드, 퀴놀론 항생제 및/또는 정맥내 면역글로불린의 투여를 포함할 수 있다.
- [0029] 기타 다른 목적, 특징 및 이점은 이하 상세한 설명으로부터 분명해질 것이다. 당업자들이라면 본 발명의 취지 및 영역내에서 상세한 설명으로부터 다양한 변화 및 변경이 행해질 수 있음을 당연히 알 수 있기 때문에, 상세한 설명 및 특정 실시예는 설명만을 목적으로 제공된다. 또한, 실시예는 본 발명의 원리를 입증하는 것이며, 선행업자들에게 명백히 유용할 모든 실시예에 본 발명이 적용된다고 명확히 예증되었을 것으로 기대할 수는 없다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은 BKV 및 JCV DNA의 PCR 증폭을 나타낸다. 샘플 A1 및 A7은 바이러스 DNA를 함유하지 않는 대조군이다. A2는 BKV DNA를 8×10^5 카피의 최종 농도로 함유한다. A3 내지 A6은 BKV DNA의 일련의 희석물을 각각 8×10^4 카피, 8×10^3 카피, 8×10^2 카피, 8×10^1 카피의 농도로 함유한다. A8은 JCV DNA를 8×10^5 카피의 최종 농도로 함유한다. A9 내지 A12는 JCV DNA의 일련의 희석물을 각각 8×10^4 카피, 8×10^3 카피, 8×10^2 카피, 8×10^1 카피의 농도로 함유한다.
- 도 2는 도 1의 증폭 곡선에 대한 표준 회귀곡선을 나타낸다. 표준 곡선의 오차율(P 값)은 0.0949이고, 효율은

1.935이다.

도 3은 용해 곡선 분석을 제공한다. 도면은 각각 바이러스 DNA를 함유하지 않는 샘플, JCV DNA 만을 함유하는 샘플 및 BKV DNA 만을 함유하는 샘플의 용융 피크를 나타낸다.

도 4는 BKV 및 JCV DNA의 PCR 증폭을 나타낸다. 샘플 D1은 바이러스 DNA를 함유하지 않는 음성 대조군이다. D2는 BKV DNA를 8×10^5 카피의 최종 농도로 함유한다. D3 내지 D6은 BKV DNA의 일련의 희석물을 각각 8×10^4 카피, 8×10^3 카피, 8×10^2 카피, 8×10^1 카피의 농도로 함유한다. 웰 D7 내지 D12는 각각 웰 D1 내지 D6의 중복이다. 샘플 E1은 블랭크 대조군이다. 샘플 E2는 BKV DNA 대 JCV DNA를 1:1 비 및 8×10^5 BKV DNA 카피 및 8×10^5 JCV DNA 카피의 농도로 함유한다. 샘플 E3 내지 E6은 웰 E2내 샘플의 10배의 일련의 희석물을 E3: 8×10^4 BKV DNA 카피 및 8×10^4 JCV DNA 카피; E4: 8×10^3 BKV DNA 카피 및 8×10^3 JCV DNA 카피; E5: 8×10^2 BKV DNA 카피 및 8×10^2 JCV DNA 카피; E6: 8×10^1 BKV DNA 카피 및 8×10^1 JCV DNA 카피 농도로 함유한다. 웰 E7 내지 E12는 각각 웰 E1 내지 E6의 중복이다.

도 5는 도 4의 증폭 곡선에 대한 표준 회귀곡선을 나타낸다. 표준 곡선의 오차율(P 값)은 0.0391이고, 효율은 1.934이다.

도 6은 용해 곡선 분석을 제공한다. 도면은 1:1 비의 BKV DNA 및 JCV DNA를 상이한 농도로 함유하는 샘플에 대한 용융 피크를 나타낸다. E1: 바이러스 DNA를 함유하지 않는 음성 대조군 샘플; E2: 8×10^5 BKV DNA 카피 및 8×10^5 JCV DNA 카피; E3: 8×10^4 BKV DNA 카피 및 8×10^4 JCV DNA 카피; E4: 8×10^3 BKV DNA 카피 및 8×10^3 JCV DNA 카피; E5: 8×10^2 BKV DNA 카피 및 8×10^2 JCV DNA 카피; E6: 8×10^1 BKV DNA 카피 및 8×10^1 JCV DNA 카피. 웰 E7 내지 E12는 웰 E1 내지 E6의 중복이다.

도 7은 분석 능력을 입증한다. 미국병리학회(CAP) 관리하의 비교 분석에 따라, 다양한 분석이 비교되었다. 본 출원의 방법을 이용한 정량적 결과는 각 양성 CAP 샘플에 대한 중앙값 또는 그 근처에 존재한 반면, 다른 기술 을 이용하여 다른 실험실에서 얻은 정량값은 상당히 가변적이었다.

도 8은 분석 정밀도(assay precision)를 나타낸다. 증폭 곡선은 본 발명의 방법이 광범위 다이내믹 레인지 (broad dynamic range)에 걸쳐 정확성 및 재현성이 있다고 입증하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

상세한 설명

샘플이 폴리오마바이러스, 특히 BKV를 함유하는지를 평가하는데 BKV 게놈의 안정한 보존 영역이 효과적인 표적인 것으로 판명되고 결정되었다. 10 종 이상의 폴리오마바이러스 유래 아미노산 및 뉴클레오타이드 서열에 대해, 뉴클레오타이드 서열이 형태 및 기능면에서 엄격한 생물학적 제한에 놓여진 영역을 비교 평가하였더니, 숙주 면역 계로부터 제한적인 선택압을 겪은 서열 산물 및 뉴클레오타이드 서열 또는 그 서열의 산물이 바이러스 복제 및 감염에 필수적이었다. VP2 유전자의 C-말단(NCBI 수염번호 YP_717937), 및 특히 아미노산 272 내지 323을 포함하는 영역이 이상적인 표적인 것으로 확인되었다. 따라서, BKV 및 JCV를 검출 및 정량화하는 방법뿐 아니라 이 방법에 사용하기 위한 프라이머, 프로브 및 키트가 제공된다.

생물학적 서열

본 원에 사용된 생물학적 서열에 대해서 이하에 설명한다.

1437 내지 1592 위치에서 선택되는 NCBI 수염번호 NC_001538의 서열 일부가 표적 BKV 서열(서열번호 1)로 사용될 수 있다:

TCAGGAGAGTTTATAGAAAAAACTATTGCCCCAGGAGGTGCTAATCAAA
GAACTGCTCCTCAATGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGGACT
GTAACACCTGCTCTTGAAGCATATGAAGATGGCCCCAACCAAAAGAAAA
GGAGAGTG.

- [0037] 또한, 1437 내지 1605 위치에서 선택되는 NCBI 수염번호 NC_001538의 다른 부분이 표적 서열로 사용될 수 있다.
- [0038] 또한, 1437 내지 1679 위치에서 선택되는 NCBI 수염번호 NC_001538의 다른 부분이 표적 서열로 사용될 수 있다.
- [0039] 또한, 1 내지 5153 위치에서 선택되는 NCBI 수염번호 NC_001538의 다른 부분이 표적 서열로 사용될 수 있다.
- [0040] 또한, 1 내지 5130 위치에서 선택되는 NCBI 수염번호 NC_001699의 다른 부분이 표적 서열로 사용될 수 있다.
- [0041] 하기 표 1에 예시적인 프라이머 및 프로브가 나타나 있으며, NCBI 수염번호 NC_001538 또는 NC_001699에 대한 그들의 위치가 제공되었다.

표 1

프라이머/프로브	서열 (5'→3')	5' 변경	3' 변경	타입	프로브 포맷	NC_001538 또는 NC_001699에 대한 위치
BK_F_1.1 (서열번호 2)	CCC AGG AGG TGC TAA TCA AAG A	없음	없음	프라이머 (F)	N/A	NC_001538의 1466 내지 1487
BK_R_1.2 (서열번호 3)	TCA TAT GCT TCA AGA GCA GGT GT	없음	없음	프라이머 (R)	N/A	NC_001538의 1539 내지 1561
BK_P_1.3, 폴리오마바이라리스_F_3.1, 폴리오마바이라리스_F_4.2 (서열번호 4)	GCT CCT CAA TGG ATG TTG CCT	없음	공여체 형광단 (예: FAM)	프로브	하이브리드화 (Hyb 프로브)	NC_001538의 1491 내지 1511
		없음	없음	프라이머 (F)	N/A	
BK_P_1.4 (서열번호 5)	CTT CTA GGC CTG TAC GGG ACT GTA	수용체 형광단	C3-차단제 또는 포스페이트	프로브	하이브리드화	NC_001538의 1515 내지 1538
BK_R_1.5, 폴리오마바이라리스_R_3.2, 폴리오마_R_4.1 (서열번호 6)	TCA (I)AT GCT TCA AGA GCA GGT GT (I) = 테옥시이오노신	없음	없음	프라이머 (R)	N/A	NC_001538의 1539 내지 1561

BK_F_1.6 (서열번호 7)	AAA AAC TAT TGC CCC AGG AGG TG	없음	없음	없음	프라이머 (F)	N/A	NC_001538 의 1454 내지 1476
BK_F_2.1 (서열번호 8)	C CCC AGG AGG TGC TAA TCA AAG A	없음	없음	없음	프라이머 (F)	SYBR Green	NC_001538 의 1465 내지 1487
BK_R_2.2, BK_R_2.2.2 (서열번호 9)	TAC AGT CCC GTA CAG GCC TAG AA	없음	없음	없음	프라이머 (R)	SYBR Green	NC_001538 의 1516 내지 1538
		수용체 형광단	없음	없음	프라이머 (R)	FRET 함침 프라이머	
		포스페이트	형광단	형광단	프로브	표준 형광-표지	
BK_P_2.3 (서열번호 10)	AAG GCA ACA TCC ATT GAG GAG CAG T	형광단	소광 분자(예: TAMRA)	소광 분자(예: TAMRA)	프로브	가수분해 (Taqman)	NC_001538 의 1488 내지 1512
BK_P_2.4 (서열번호 11)	AGG CAA CAT CCA TTG AG	형광단	소광제 및 부품 결합제	소광제 및 부품 결합제	프로브	가수분해 (Taqman MGB)	NC_001538 의 1495 내지 1511
BK_F_2.5 (서열번호 12)	TCA GGA GAG TTT ATA GAA AAA ACT	없음	없음	없음	프라이머 (F)	SYBR Green	NC_001538 의 1437 내지 1460
JCV-P-3.4 (서열번호 13)	TAC AGT CCC GTA CAA CCC TAA AA	포스페이트	형광단	형광단	프로브	표준 형광-표지	NC_001699 의 1421 내지 1433

BKV_P_4.3 (시열번호 14)	CCG TAC AGG CCT AGA A	형광단	소광제 및 부품 결합제	프로브	가수분해(Taqman MGB)	NC_001538 의 1516 내지 1531
JCV_P_4.4 (시열번호 15)	CGT ACA ACC CTA AAA GT	형광단	소광제 및 부품 결합제	프로브	가수분해(Taqman MGB)	NC_001699 의 1419 내지 1435
BKV_P_4.5 (시열번호 16)	ACA GTC CCG TAC AGG CCT AGA AG	형광단	소광제	프로브	가수분해(Taqman)	NC_001538 의 1515 내지 1537
BK_R_1.7 (시열번호 17)	TTT GGC TTT TTG GGA GCT G	없음	없음	프라이머 (R)	N/A	NC_001538 의 1601 내지 1619
BK_R_1.8 (시열번호 18)	CCC TGG ACA CTC TCC TTT TCT TT	없음	없음	프라이머 (R)	N/A	NC_001538 의 1577 내지 1599
BK_F_1.1.1 (시열번호 19)	C CCC AGG AGG TGC TAA TCA AA	없음	없음	프라이머 (F)	N/A	NC_001538 의 1465 내지 1485
BK_R_1.2.1 (시열번호 20)	ATG CTT CAA GAG CAG GTG TTA CAG	없음	없음	프라이머 (R)	N/A	1534 내지 1557 (NC_001538)
BK_P_1.3.1 (시열번호 21)	CT GCT CCT CAA TGG ATG TTG CCT	없음	공여체 형광단 (예: FAM)	프로브	하이브리드화	NC_001538 의 1489 내지 1511
폴리오마_F_1.1.2	CCC AGG AGG TGC (DAA TCA AAG A	없음	없음	프라이머 (R)	N/A	NC_001538 의

(서열번호 22)	(I) = 테옥시아오노신 CTT TTA GGG TTG TAC GGG ACT GTA	수용체 형광단	C3- 차단제 또는 포스페이트	프로브	하ybrid화	1466 내지 1487 NC_001699 의 1420 내지 1443
JC_P_1.5 (서열번호 23)		없음	없음	프로브	하ybrid화	
BKV_5.2	5'-CTG CCC CTG GAC ACT CTC-3'	없음	없음	프로브	하ybrid화	NC_001538 의 586-1603
BKV_5.1	5'-AGC TGC CCC TGG ACA CTC TC-3'	없음	없음	프로브	하ybrid화	NC_001538 의 1586-1605

방법

본 발명은 일반적으로 샘플내 폴리오마바이러스, 특히 BKV의 검출에 관한 것이다. 일 측면으로, BKV는 정량화 되고/되거나 JCV로부터 식별된다.

일 측면에 있어서, 폴리오마바이러스의 존재 또는 부재를 검사하는 방법은 샘플에서 서열번호 1 또는 그의 역상보체의 서열을 가지는 핵산의 존재 또는 부재를 검사하는 것을 포함한다. 일부 구체예에 있어서, 핵산은 DNA를 포함하고, 다른 구체예에 있어서, 핵산은 RNA를 포함한다.

서열번호 1 및 그의 역상보체의 핵산은 당업계에서 공지된 임의의 방법을 이용하여 검출될 수 있다. 일 구체예에 있어서, 서열번호 1 또는 그의 역상보체의 핵산은 핵산에 특이적으로 하ybrid화하는 프로브를 사용하여 검출된다. 전형적으로, 검출은 존재하는 영역에 프로브가 특이적으로 하ybrid화하는 조건하에서 샘플과 프로브를 접촉시키고, 하ybrid화 산물의 존재 또는 부재를 결정하는 것을 포함한다. 하ybrid화 산물의 존재는 서열번호 1의 핵산이 존재함을 제시한다. 반대로, 하ybrid화 산물의 부재는 서열번호 1의 핵산이 존재하지 않음을 제시한다.

프로브는 전형적으로 핵산, 예컨대 DNA, RNA, PNA 또는 합성 핵산이다. 프로브는 서열번호 1 또는 각각 그의

역상보체의 핵산에 우선적으로 또는 선택적으로 하이브리드화하지만, 임의의 다른 DNA 또는 RN 서열에 하이브리드화하지 않는다면, 서열번호 1 또는 그의 역상보체의 핵산에 특이적으로 하이브리드화한다.

- [0051] 프로브는 바람직하게는 엄격한 하이브리드화 조건하에서 서열번호 1의 핵산에 특이적으로 하이브리드화한다. 하이브리드화를 허용하는 조건은 당업계에 익히 알려져 있다(예: Sambrook *et al.*, 2001, Molecular Cloning: a laboratory manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press; 및 Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 2, Ausubel *et al.*, Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995)).
- [0052] 일반적으로, "엄격한 하이브리드화 조건"은 완전한 염기쌍 이중가닥 DNA 하이브리드의 용점보다 약 10 °C 아래인 것을 가리킨다($T_m - 10$ 로 나타내어짐). 완전한 염기쌍 이중가닥 DNA의 용융 온도(T_m)는 다음과 같은 이미 확립된 식으로 정확히 예측할 수 있다:
- [0053] $T_m = 16.6 \times \log[Na^{30}] + 0.41 \times \%G:C + 81.5 - 0.72 \times (\%)(w/v)$ 포름아미딘
- [0054] 상기 식은 각각의 하이브리드화 조건에서 각각의 개별 DNA에 대해 T_m 을 실험적으로 측정할 필요없이 다양한 염 및 포름아미딘 농도를 갖는 용액에서 다양한 DNA에 대해 엄격하지 않은 하이브리드화 조건 및 엄격한 하이브리드화 조건을 결정하기 위한 기준점을 설정하는데 편리한 수단을 제공한다.
- [0055] 프로브의 길이는 서열번호 1의 핵산과 동일하거나, 이보다 짧거나 길 수 있다. 프로브는 뉴클레오타이드 길이가 전형적으로 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 45, 적어도 50, 적어도 75 또는 적어도 100이다. 예를 들어, 프로브는 뉴클레오타이드 길이가 5 내지 200, 7 내지 100, 10 내지 50일 수 있다. 프로브는 바람직하게는 뉴클레오타이드 길이가 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 또는 40이다. 프로브는 바람직하게는 서열번호 1 또는 그의 역상보체의 핵산과 서열 동일성에 기초해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 상동성을 공유하는 서열을 포함한다.
- [0056] 당업계의 표준 방법을 이용하여 서열 상동성을 결정할 수 있다. 예를 들어, UWGCG 패키지는 가령 디폴트 세팅(default setting)으로 사용되는, 상동성을 계산하기 위해 사용될 수 있는 BESTFIT 프로그램을 제공한다(Devereux *et al.*, Nucleic Acids Research, 1984; 12: 387-395). 예를 들면, 문헌(Altschul J Mol Evol, 1993; 36: 290-300; Altschul, *et al* (J Mol Biol, 1990; 215: 403-10)에 기술된 바와 같이, 상동성 또는 정렬 서열(예컨대 등가 잔기 또는 상응하는 서열의 확인(전형적으로 그의 디폴트 세팅 상에서))을 계산하는데 PILEUP 및 BLAST 알고리즘이 사용될 수 있다. BLAST 분석을 행하기 위한 소프트웨어는 국립생물기술정보센터(National Center for Biotechnology) 정보를 통해 공개적으로 입수할 수 있다(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
- [0057] 프로브는 검출가능하게 표지된다. 검출가능한 표지로 프로브와 보편 영역 사이에서 특이적 하이브리드화로 형성된 하이브리드화 산물의 존재 또는 부재(및 그에 따른 보편 영역의 존재 또는 부재)를 결정할 수 있다. 임의의 표지가 사용될 수 있다. 적합한 표지는 형광 분자, 방사성 동위원소, 예를 들면 ^{125}I , ^{35}S , 효소, 항체 및 비오틴과 같은 링커를 들 수 있으나, 이들에 한정되지는 않는다.
- [0058] 일 측면에 있어서, 프로브는 분자 표지 프로브일 수 있다. 분자 표지 프로브는 한쪽 끝에 형광 표지 및 다른 쪽 끝에 소광 분자를 포함한다. 검출 영역이 존재하지 않으면, 프로브는 헤어핀 루프를 형성하며, 소광 분자가 형광 표지에 근접 위치해 신호가 검출될 수 없다. 검출 영역에 프로브가 하이브리드화되면, 루프가 풀리고, 형광 분자가 소광자와 분리되어 신호가 검출될 수 있다. 분자 표지에 사용하기에 적합한 형광 분자 및 소광자 조합은 당업계에 알려져 있다. 이러한 조합으로는 카복시플루오레세인(FAM) 및 덤실이 포함되나, 이들에 한정되지는 않는다.
- [0059] 다른 구체예에 있어서, 프로브는 당업계에 공지된 임의의 기술을 이용하여 지지체상에 고정될 수 있다. 적합한 고체 지지체는 당업계에 주지되었으며, 플레이트, 예컨대 다중 웰 플레이트, 필터, 멤브레인, 비드, 칩, 핀, 딥 스틱(dipstick) 및 다공성 담체를 예로 들 수 있다.
- [0060] 일 구체예에 있어서, 핵산 자체가 검출된다. 다른 구체예에 있어서, 핵산으로부터 전사된 RNA가 검출된다. 핵산으로부터 전사된 RNA 샘플의 존재는 자체로 샘플내 핵산의 존재를 나타낸다.
- [0061] 일부 구체예에 있어서, 방법은 서열번호 1 또는 그의 역상보체 또는 이중 일부의 핵산을 증폭시킨 다음, 생성된

애플리콘의 존재 또는 부재를 검사하는 것을 추가로 포함한다. 예를 들어, 증폭은 서열번호 2 및 서열번호 3, 서열번호 2 및 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 17, 또는 서열번호 7 및 서열번호 18과 같은 한쌍의 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하여 이루어질 수 있다. 다소 짧거나 길게 변형된 정방향 및 역방향 프라이머가 마찬가지로 사용될 수 있는 것으로 이해하여야 한다. 예를 들어, 증폭 단계는 프라이머 서열번호 19 및 서열번호 20의 사용을 포함할 수 있다. 애플리콘을 생성하는데 상이한 조합의 정방향 및 역방향 프라이머가 사용될 수 있는 것 또한 당연한 것으로 이해될 것이다.

[0062] 일 구체예에 있어서, 표적은 그의 존재를 결정하기 전에 증폭된다. 다른 구체예에 있어서, 표적은 그의 존재를 결정하는 동안 실시간으로 증폭된다. 실시간 방법은 실시예에 기술되었으며, 당업계에 공지되었다. 이러한 방법은 예를 들어 미국 특허 제5,487,972호 및 문헌[Afonia *et al.* (Biotechniques, 2002; 32: 946-9)]에 기술되어 있다.

[0063] DNA 또는 RNA는 당업계에 공지된 일상적인 방법을 이용하여 증폭될 수 있다. 일부 구체예에 있어서, 표적 핵산의 증폭은 중합효소 연쇄반응(PCR)(참조예: 미국 특허 제4,683,195 및 4,683,202호); 리가제 연쇄반응("LCR")(참조예: Landegren *et al.*, *Science* 241:1077-1080 (1988); D.Y. Wu and R.B. Wallace, *Genomics* 4:560-69 (1989); 및 F. Barany, *PCR Methods Appl.* 1:5-6 (1991)); 루프-매개 등온 증폭("LAMP")(Nagamin *et al.*, *Clin. Chem.* 47(9):1742-1743 (2001); Notomi *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 28(12):E63 (2000)); 핵산 서열 기초 분석 (NASBA)(J. Compton, *Nature* 350:91-92 (1991)); 자립(self-sustained) 서열 복제("3SR")(Guatelli *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87(5):1874-1878 (1990)); 가닥 치환 증폭("SDA")(Walker *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 20:1691-1696 (1992); 및 Walker *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:392-396 (1992)); 또는 전사 매개 증폭("TMA")(Pasternack *et al.*, *J. Clin. Microbiol.* 35(3):676-678 (1997))을 이용하여 수행된다.

[0064] 당업자들이라면 서열번호 1의 핵산을 증폭시키기 위한 특이적 프라이머를 설계할 수 있다. 프라이머는 보통 증폭되는 서열의 양 말단 서열에 상보성이나, 임의의 다른 서열에 상보성이 아니도록 설계된다. 프라이머 설계에 대해서는 예를 들어 문헌[Sambrook *et al.*, 2001, 상동]에 기술되어 있다.

[0065] 애플리콘은 상기 언급된 것을 포함하여, 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용하여 검출될 수 있다. 일부 구체예에 있어서, 부호 결합체(Minor Groove Binder, MGB) 부분을 포함하는 가수분해 프로브 포맷(예: Taqman)을 이용하여 애플리콘을 검출할 수 있다. 다른 구체예에 있어서, 이중가닥 DNA에 결합하는 시아닌 염료가 사용된다. 예시적인 시아닌 염료에는 SYBR 그린 II, SYBR 골드, YO(옥사졸 옐로우), TO(티아졸 오렌지) 및 PG(피코그린)를 들 수 있다.

[0066] 다른 구체예에 있어서, 검사 단계는 용해 곡선 분석의 수행을 포함한다. 특정 염료 또는 프로브 포맷이 사용되는 경우, PCR 종료시 형광-대 온도 플롯을 관찰하여 추가의 정보를 제공할 수 있다. 예를 들어, SYBR 그린 염료를 사용하는 경우, 용융 온도를 통해 PCR 산물의 순도 및 동일성을 확인할 수 있다. 유사하게, 하이브리드화 프로브가 사용되는 경우, 다형태를 포함한 서열 변경이 프로브 용융 온도로 식별될 수 있다.

[0067] 일례로, 최종 PCR 사이클 직후, 샘플을 90 내지 95 °C에서 변성시키고, 대상 T_m 범위 보다 약 5 내지 10 °C 아래의 온도로 냉각시킨 다음, 전형적으로 0.1 내지 0.4 °C/초의 램프 속도(ramp rate)로 서서히 가열한다(이 동안에 형광은 지속적으로 관찰된다). 특정 형광 화학에 따라, (a) 프로브가 애플리콘으로부터 분리되거나(하이브리드화 프로브의 경우), 또는 (b) 이중가닥 PCR 산물이 단일 가닥의 DNA로 분리되는 온도에 이르면, 형광에 뚜렷한 감소가 관찰된다.

[0068] 용융 전이는 동시에 발생하지 않으나, 소범위 온도에 걸쳐 일어난다. 형광-대-온도 플롯에서 용해 곡선 기울기 중간이 T_m 으로 언급된다. 용융 온도 또는 T_m 은 DNA 듀플렉스의 열 안정성 척도이며, 각 타입의 뉴클레오티드(A,T,G,C 등)의 길이, G/C 함량 및 상대 위치를 포함한 다수의 인자에 따라 달라진다(Wetmur, J.G. 1997. DNA Probes: applications of principles of nucleic acid hybridization. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 26:227-259). 용융 온도는 또한 DNA:DNA 또는 프로브:DNA 듀플렉스 사이에서 일어날 수 있는 뉴클레오티드 미스매치(A:A, A:G, G:T, G:A 등)의 수, 상대 위치 및 타입에 좌우된다(S.H. Ke and Wartell, R. 1993. Influence of nearest neighbor sequence on stability of base pair mismatches in long DNA: determination by temperature-gradient gel electrophoresis. *Nucleic acids Res* 21:5137-5143.) 따라서, 표적 산물의 크기 및 서열을 알 수 있다면, 용융 온도에 의해 특정 애플리콘의 존재를 확인할 수 있다. 마찬가지로, 서열 변형으로 인한 상이한 용융 온도에 기초해 두개의 상이한 종을 구분하는 것이 가능하다. PCR-기반 검출 시스템에서 용해

곡선 분석의 실현성 및 유용성은 주지되었다.

- [0069] 일부 구체예에 있어서, 증폭 단계는 적어도 하나의 프라이머가 BKV에 특이적이지 않은 한쌍의 프라이머의 사용을 포함한다. 예를 들어, 방법은 샘플을 서열번호 2 및 서열번호 3, 서열번호 2 및 서열번호 6, 서열번호 19 및 서열번호 20, 서열번호 7 및 서열번호 17, 서열번호 7 및 서열번호 18, 또는 서열번호 4 및 서열번호 6을 예로 들 수 있으나 이들에 한정되지 않는 한쌍의 프라이머와 접촉시켜 서열번호 1의 핵산을 증폭시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에 있어서, 방법은 엄격한 조건하에서 BKV에 특이적으로 혼성화할 수 있는 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하는 것을 포함하는 검사 단계를 추가로 포함한다. 예시적인 프로브로는 서열번호 5, 서열번호 9, 서열번호 14, 서열번호 16 및 서열번호 21을 들 수 있으나 이들에 한정되지 않는다.
- [0070] 다른 구체예에 있어서, 증폭 단계는 적어도 하나의 프라이머가 BKV에 특이적인 한쌍의 프라이머의 사용을 포함한다. 예를 들어, 방법은 서열번호 1의 핵산을 적어도 서열번호 8 및 서열번호 9의 핵산 서열을 가지는 프라이머로 증폭시키는 것을 포함한다. 일 구체예에 있어서, 검사 단계는 이중가닥 DNA에 결합하는 시아닌 염료의 사용을 포함한다.
- [0071] 또 다른 측면으로, 샘플에서 JCV의 존재 또는 부재를 검사하는 방법이 제공된다. 이 방법은 샘플에서 서열번호 1, 그의 역상보체, 또는 서열번호 1과 서열 상동성이 90% 이상인 서열을 갖는 핵산의 존재 또는 부재를 검사하는 것을 포함한다.
- [0072] 일부 구체예에 있어서, 증폭 단계는 적어도 하나의 프라이머가 BKV에 특이적이지 않은 한쌍의 프라이머의 사용을 포함한다. 이러한 일부 구체예에 있어서, 방법은 샘플을 서열번호 2 및 서열번호 3, 서열번호 2 및 서열번호 6, 서열번호 19 및 서열번호 20, 서열번호 7 및 서열번호 17, 서열번호 7 및 서열번호 18, 또는 서열번호 4 및 서열번호 6을 예로 들 수 있으나 이들에 한정되지 않는 한쌍의 프라이머와 접촉시켜 서열번호 1의 핵산을 증폭시키는 것을 포함한다. 이러한 일부 구체예에 있어서, 방법은 엄격한 조건하에서 JCV에 특이적으로 혼성화할 수 있는 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하는 것을 포함하는 검사 단계를 추가로 포함한다. 예시적인 프로브로는 서열번호 13, 서열번호 15, 및 서열번호 23을 들 수 있으나 이들에 한정되지 않는다.
- [0073] 그밖의 다른 측면으로, 방법은 하나 이상의 폴리오마바이러스 종의 존재 또는 부재를 동시에 검사하기 위한 다중 반응에 이용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법은 샘플에서 각 BKV 및 JCV의 존재 또는 양을 동시에 검출하는데 이용될 수 있다.
- [0074] 일부 구체예에 있어서, 프라이머는 BKV 및 JCV DNA 모두를 증폭시킬 수 있으며, 이어서 하나는 BKV에 특이적이며, 다른 하나는 JCV에 특이적인 적어도 두개의 프로브를 사용하여 각 BKV 및 JCV의 존재 또는 양을 검출할 수 있다. 예를 들어, 상이한 표지, 예컨대 플루오레세인 및 로다민이 각각 BKV-특이적 및 JCV-특이적 프로브에 사용될 수 있다. 다른 한편으로, 플루오레세인이 양 프로브에 사용되는 경우, 각 프로브에 대한 형광단은 두 프로브를 식별하기에 충분히 상이한 방출 파장을 가져야 한다.
- [0075] **키트**
- [0076] 샘플에서 하나 이상의 폴리오마바이러스 종의 존재를 검사하기 위한 키트가 제공된다. 일 구체예에 있어서, 키트는 하이브리드화 프로브: 서열번호 5 및 서열번호 23, 및 서열번호 2 및 서열번호 3을 포함하는 한쌍의 프라이머를 포함한다. 일례로, 서열번호 5 및 서열번호 23은 5' 말단에 수용체 형광단 및 3' 말단에 C3 차단체 또는 포스페이트를 포함한다. 다른 구체예에 있어서, 키트는 하이브리드화 프로브: 서열번호 9 및 서열번호 13, 및 서열번호 4 및 서열번호 6을 포함하는 한쌍의 프라이머를 포함한다. 일례로, 서열번호 9 및 서열번호 13은 특징적이고 구별가능한 방출 파장에서 형광을 나타내는 두개의 상이한 형광단으로 표지된다. 다른 구체예에 있어서, 키트는 하이브리드화 프로브: 서열번호 14 및 서열번호 15, 및 서열번호 4 및 서열번호 6을 포함하는 한쌍의 프라이머를 포함한다.
- [0077] 키트는 상술한 본 발명의 방법을 실행시킬 수 있는 하나 이상의 다른 시약 또는 장비를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 시약 또는 장비는 적절한 완충제(들)(수용액) 또는 반응이 일어날 수 있는 웰을 포함하는 지지체중 하나 이상을 포함한다. 시약은 유체 샘플이 시약을 재현탁시키도록 키트내에서 건조 상태로 존재할 수 있다. 키트는 임의로 키트가 본 발명의 방법에 사용될 수 있다는 설명서를 포함할 수 있다.
- [0078] 실시예 1 - 폴리오마바이러스 검출
- [0079] 프라이머 서열번호 2 및 서열번호 3, 및 프로브 서열번호 4 및 서열번호 5를 사용하여 실시간 증폭 분석을 수행

하였다. 분석은 엄격한 조건하에서 BKV DNA에 특이적으로 하이브리드화하도록 설계되고, 플루오레세인-표지 공여체 프로브 서열번호 4 및 LC610-표지 수용체 프로브 서열번호 5를 사용하여 실시간 검출되는 중합효소 연쇄반응(PCR)에 의한 DNA 증폭을 포함한다. DN 샘플을 함유하지 않는 음성 대조군과 함께, BKV DNA 및 JCV DNA를 다양한 농도로 시험하였다.

[0080] 실시간 PCR 증폭을 LightCycler®

480 PCR 기기(로슈, 스위스 바젤 소재) 상에서 수행하고, 제조업자가 제공한 소프트웨어 버전 LCS480 1.2.9.11을 이용하여 데이터 분석을 행하였다. 모든 반응에 로슈(Roche)사(스위스 바젤 소재)의 시약을 사용하였다. 20 μ l의 각 PCR 반응물은 dNTPs 및 DNA 중합효소, 0.5 μ M의 각 프라이머(서열번호 2 및 서열번호 3) 및 0.2 μ M의 각 프로브(서열번호 4 및 서열번호 5)를 포함하는 1X Fast-Start Hyb 프로브 마스터 믹스(로슈, 스위스 바젤 소재)를 함유한다. 추가의 $MgCl_2$ 를 4.125 mM $MgCl_2$ 의 최종 농도가 되도록 첨가하였다. 웰 A2 내지 A6은 BKV DNA를 각각 8×10^5 카피, 8×10^4 카피, 8×10^3 카피, 8×10^2 카피 및 8×10^1 카피로 함유하고, 웰 A8 내지 A12는 JCV DNA를 각각 8×10^5 카피, 8×10^4 카피, 8×10^3 카피, 8×10^2 카피 및 8×10^1 카피로 함유하도록, 각 반응 웰에 BKV DNA 및 JCV DNA를 상이한 농도로 첨가하였다. 웰 A1 및 A7은 바이러스 DNA를 함유하지 않으며, 음성 대조군으로 제공되었다. 열 사이클 파라미터는 95 $^{\circ}$ C에서 10 분의 1 사이클, 95 $^{\circ}$ C에서 10 초, 55 $^{\circ}$ C에서 5 초 및 72 $^{\circ}$ C에서 10 초의 45 사이클로 구성된다. PCR 증폭동안 형광 신호를 610 nm 파장에서 LCS480 소프트웨어를 이용하여 실시간으로 관찰하였다.

[0081] 용해 곡선 분석을 또한 제조업자의 지시에 따라 수행하였다. 특히, 용해 곡선 사이클은 샘플을 95 $^{\circ}$ C로 10 분간 가열한 다음, 42 $^{\circ}$ C로 1 분간 냉각시키고, 온도를 90 $^{\circ}$ C로 상승시키는 것으로 구성된다. 각 반응에 대한 형광 출력을 $^{\circ}$ C당 5 수집으로 연속 측정하였다. LCS480 소프트웨어로 프로브에 대한 용융 온도를 결정하였다.

[0082] 결과를 도 1 내지 3에 나타내었다.

[0083] 도 1에 도시된 바와 같이, 시험된 샘플은 뚜렷하면서 중첩되지 않은 형광 신호를 나타내었다. 최초 교점(Cp, 형광값이 백그라운드 보다 높은 사이클 수)을 가지는 샘플은 최고 농도의 BKV DNA를 함유하는 샘플에 대한 것이다. 형광의 지수적 상승은 BKV DNA를 함유하는 샘플에서만 관찰되었다. JCV DNA 만을 함유하는 샘플에서는 백그라운드값 보다 높은 형광이 관찰되지 않았으며, 이는 프로브가 55 $^{\circ}$ C의 어닐링 온도에서 BKV DNA에만 하이브리드하고 JCV DNA에는 하이브리드화하지 않음을 제시한다. 시험을 이중으로 행하여 키트의 정밀도 및 신뢰성을 입증하였다. 종합적으로, 분석에 따라 프로브의 특이성 뿐만 아니라 키트가 BKV와 JCV를 식별할 수 있음이 입증되었다.

[0084] 도 2의 표준 곡선은 0.0949의 낮은 오차율(P 값)을 가지며, 이는 10^5 내지 10^1 BKV DNA 카피의 광범위 농도에 걸쳐 BKV DNA 양을 측정하는데 있어 분석 정확성을 입증한다. 실험적으로 유도된 1.935의 PCR 증폭 효율로 프라이머의 고 능력이 증명되었다.

[0085] 도 3에 도시된 바와 같이, 양성 샘플은 용융 온도에 의해 BKV로서 확인될 수 있다. 양 서열번호 4 및 서열번호 5가 표적 앰플리콘에 하이브리드화하여 FRET가 일어나는 경우에만 수용체 형광단에 의한 형광 방출이 검출된다. 프로브 서열번호 4의 뉴클레오타이드 서열은 BKV 및 JCV에 100% 상동성이다. 따라서, 서열번호 4는 BKV 및 JCV 둘 모두에 결합할 것이다. 서열번호 5는 BKV DNA에 100% 상동성이나, JCV DNA와 3개의 뉴클레오타이드 미스매치를 갖는다. 이는 BKV에 대해 관찰된 T_m 60 내지 64 $^{\circ}$ C 및 JCV에 대해 관찰된 T_m 47 내지 50 $^{\circ}$ C에 상응한다. 따라서, BKV DNA 및 JCV DNA 사이에 서열번호 4의 프로브에서 거의 10 $^{\circ}$ C T_m 차가 관찰되었다. 따라서, 프라이머/프로브 어닐링 단계가 55 $^{\circ}$ C 이상에서 행해지는 경우, JCV DNA 만을 가지는 샘플에서는 형광 증가가 관찰되지 않았다. 그러므로, 서열번호 4는 프라이머 또는 프로브로 사용되는 경우, JCV로부터 BKV를 식별할 수 있다.

[0086] 실시예 2 - BKV 및 JCV를 포함하는 샘플의 평가

[0087] BKV 및 JCV를 둘 다 함유하는 샘플을 실시예 1에 기술된 일반적인 조건을 이용하여 평가하였다. 웰 D1은 바이러스 DNA를 함유하지 않는 음성 대조군이다. 웰 D2 내지 D6은 BKV DNA를 각각 8×10^5 카피, 8×10^4 카피, 8×10^3 카피, 8×10^2 카피 및 8×10^1 카피로 함유한다. 웰 D7 내지 D12은 각각 웰 D1 내지 D6의 중복이다. 웰 E1은 바이러스 DNA를 함유하지 않는 음성 대조군이다. 웰 E2 내지 E6은 1:1 비의 두 BKV DNA:JCV DNA를 각각

E2: 10^5 BKV DNA 카피 및 10^5 JCV DNA 카피; E3: 10^4 BKV DNA 카피 및 10^4 JCV DNA 카피; E4: 10^3 BKV DNA 카피 및 10^3 JCV DNA 카피; E5: 10^2 BKV DNA 카피 및 10^2 JCV DNA 카피; E6: 10^1 BKV DNA 카피 및 10^1 JCV DNA 카피의 농도로 함유한다. 웰 E7 내지 E12는 각각 웰 E1 내지 E6의 중복이다.

[0088] 증폭 곡선, 표준 회귀곡선 및 용융 피크를 각각 도 4, 도 5 및 도 6에 나타내었다.

[0089] 도 4는 프로브가 55 °C 이상의 어닐링 온도에서 BKV에 하이브리드화하나, JCV DNA에는 하이브리드화하지 않음을 보여준다. 도 1의 증폭 곡선과 비교시, 샘플에서 JCV DNA와 BKV DNA가 1:1 비로 존재하는 것은 키트의 재현성 또는 정밀도에 영향을 미치지 않는다. 따라서, BKV 및 JCV DNA를 최대 1:1 비로 함유하는 샘플에서는 고 수준의 정확성 및 정밀도가 유지된다.

[0090] 도 5는 도 2에서 관찰된 정확성이 재현가능함을 나타낸다.

[0091] 도 6의 그래프는 두 BKV 및 JCV DNA의 믹스를 포함하는 샘플에서 특징적인 이중 용융 피크를 보여준다. 하나는 BKV DNA에 대한 T_m 이고 다른 하나는 JCV DNA에 대한 T_m 일 것으로 예상되는 이중 용융 피크는 BKV 및 JCV DNA를 포함하는 혼합 샘플을 제시한다.

[0092] 실시예 3 - 임상 시험

[0093] 하기 프라이머/프로브 조합을 이용하여 임상 샘플에 일상적인 검사를 실시하였다: 프라이머 서열번호 6 및 서열번호 4와 프로브 서열 서열번호 14로 구성된 조합 1; 프라이머 서열번호 6 및 서열번호 2와 프로브 서열 서열번호 14로 구성된 조합 2; 프라이머 BKV_5.2 및 서열번호 4와 프로브 서열 서열번호 14로 구성된 조합 3; 및 프라이머 BKV_5.2 및 서열번호 2와 프로브 서열 서열번호 14로 구성된 조합 4.

[0094] PCR 반응은 샘플 10 μ l 및 마스터 믹스 30 μ l를 포함하여, 40 μ l의 최종 반응 부피를 포함한다. 마스터 믹스 조성(30 μ l)은 샘플 웰당 총 부피 40 μ l에 대해 3.125 μ M 농도의 정방향 프라이머, 3.125 μ M 농도의 역방향 프라이머, 2.0 내지 2.5 μ M 농도의 MGB Taqman 프로브, LightCycler®

480 프로브 마스터 믹스 20 μ l 및 샘플 DNA 10 μ l를 포함한다. 프라이머 프로브 조합에 대한 PCR 사이클링 파라미터는 i) 95 °C에서 10 분간의 초기 단일 변성 사이클 후, ii) 95 °C에서 10 초, 60 °C에서 15 초 및 72 °C에서 1 초간의 45 사이클 - 각 사이클 종료시 단일 형광 측정, 및 임의로 iii) 40 °C에서 30 초간 96-웰 플레이트의 최종 냉각이다.

[0095] 42 노 및 40 혈장 검체로 이루어진 82 임상 검체군에 대해 상기 언급된 프로토콜을 이용하여 폴리오마바이러스 검출을 검사하였다. 검사한 노 샘플 중, 35 샘플이 양성이고, 7 샘플이 음성인 것으로 확인되었다. 혈장 샘플 중에서는, 22 샘플이 양성이고, 18 샘플이 음성인 것으로 확인되었다. 검사한 82 임상 샘플중 총 57 샘플이 폴리오마바이러스 양성으로 확인되었다. 양성으로 확인된 모든 샘플은 임상적으로 확인된 바이러스노 및/또는 바이러스혈증 사례로부터 결정되었다.

[0096] 실시예 4 - BKV 바이러스량에 대한 미국병리학회(CAP) 조사

[0097] BKV 바이러스량을 검사하기 위한 두개의 상이한 CAP 검사실에서 두 샘플을 분석하였다. 실시예 3에 설명된 상기 언급된 프로토콜을 이용하여, 모든 BKV 양성 샘플이, 예를 들어 시판 BKV 검출용 키트를 비롯한 다양한 기술 수단을 이용하여 43곳의 모든 조사 참가자에 따라 확인되었다. 도 7에 예시된 바와 같이, CAP 능력 시험 결과, 본 출원의 방법은 각 양성 CAP 샘플에 대한 중앙값 또는 그 근처에 존재하는 것으로 판명되었다. 중요하게도, 본 출원의 방법은 각 샘플에 대해 중앙값 또는 그 근처에 존재한 반면, 상이한 방법을 이용하여 다른 참가자에 의해 얻어진 정량값은 상당히 가변적이었다.

[0098] 실시예 5 - 외부 실험실과 비교 조사

[0099] 본 출원의 방법을 독립적인 외부 실험실과 비교 조사하여 추가로 확인하였다. 총 74개의 임상 샘플이 시험되었다. 각 샘플의 임상 상태, 예컨대 폴리오마바이러스 양성 또는 폴리오마바이러스 음성은 검사시 미지 상태였다. 총 74개의 미지 샘플은 30 노 샘플 및 44 혈장 샘플의 샘플 세트로 구성되었다. 30 노 샘플중, 10

개의 샘플이 BKV에 양성이었으며, 20개는 음성이었다. 44 혈장 샘플중, 24개가 BKV에 양성이었으며, 20개는 음성이었다.

[0100] 본 출원의 방법을 이용하여, 100% 민감도가 달성되었다. 민감도 및 특이성은 다음 식을 이용하여 계산되었다:

[0101] 노 샘플 민감도 (%) = (진 양성/(진 양성 + 가 음성)) × 100 = (34/(34+0))x100 = 100%.

[0102] 혈장 샘플 특이성 (%) = (진 음성/(진 음성 + 가 양성)) × 100 = (40/(40+0))x100 = 100%.

[0103] 분석 정밀도를 결정하기 위해서, 기지 농도의 상용화 표준을 이용하여 본 발명의 방법의 정밀도를 측정하였다. 서열번호 4, BKV_5.2 및 서열번호 14 프라이머 프로브 세트를 이용하여 상기 언급된 방법에 따라 일련의 기지 BK 바이러스 DNA 회색물을 증폭시켰다. 증폭을 삼중으로 수행하였으며, 본 발명의 방법의 정밀도는 표 2에 요약하여 나타내었다. 본 출원의 방법은 다회 수행된 실험에서 아주 약간 달라지며, 이들 결과는 직접 비교될 수 있는 것으로 판명되었다.

[0104] 도 8은 본 발명의 방법의 정밀도 및 재현성을 나타내는 제2 실시예이다. 증폭 곡선은 본 발명의 방법이 광범위 다이내믹 레인지에 걸쳐 정밀도 및 재현성이 있음을 나타낸다.

[0105] 즉, 본 발명은 샘플에서 폴리오마바이러스 DNA의 존재 또는 부재를 검사하는 방법에 관한 것이며, 이때 검사 결과는 예정 교점(Cp)에서 95% 초과 정밀도, 바람직하게는 97% 초과 정밀도로 재현될 수 있다. 더욱 바람직하게, 검사 방법은 측정된 DNA의 출발량이 적은지, 중간 정도인지 또는 많은지를 결정한다.

표 2: 분석 정밀도

중복시험 번호	상대 농도	메우 높음	고	중	중	지	메우 낮음
	예상 농도 (가괴/μl/ 웰)	7.5E+05	7.5E+04	7.5E+03	7.5E+02	7.5E+01	7.5
	실험 1						
중복 1	관찰 농도	7.60E+05	8.10E+04	7.27E+03	7.65E+02	5.95E+01	6.59E+00
	<i>Cp (PCR 증폭 사이클)</i>	22.71	25.96	29.46	32.73	35.44	37.06
중복 2	관찰 농도	7.07E+05	7.75E+04	6.69E+03	7.51E+02	5.17E+01	8.96E+00
	<i>Cp (PCR 증폭 사이클)</i>	22.82	26.03	29.53	32.76	35.56	36.86
중복 3	관찰 농도	---	8.25E+04	7.59E+03	7.11E+02	8.75E+01	5.44E+00
	<i>Cp (PCR 증폭 사이클)</i>	---	25.93	29.4	32.84	35.11	37.19
중복 4	관찰 농도	---	7.53E+04	7.11E+03	8.67E+02	8.20E+01	1.54E+01
	<i>Cp (PCR 증폭 사이클)</i>	---	26.07	29.49	32.55	35.17	36.48

[0106]

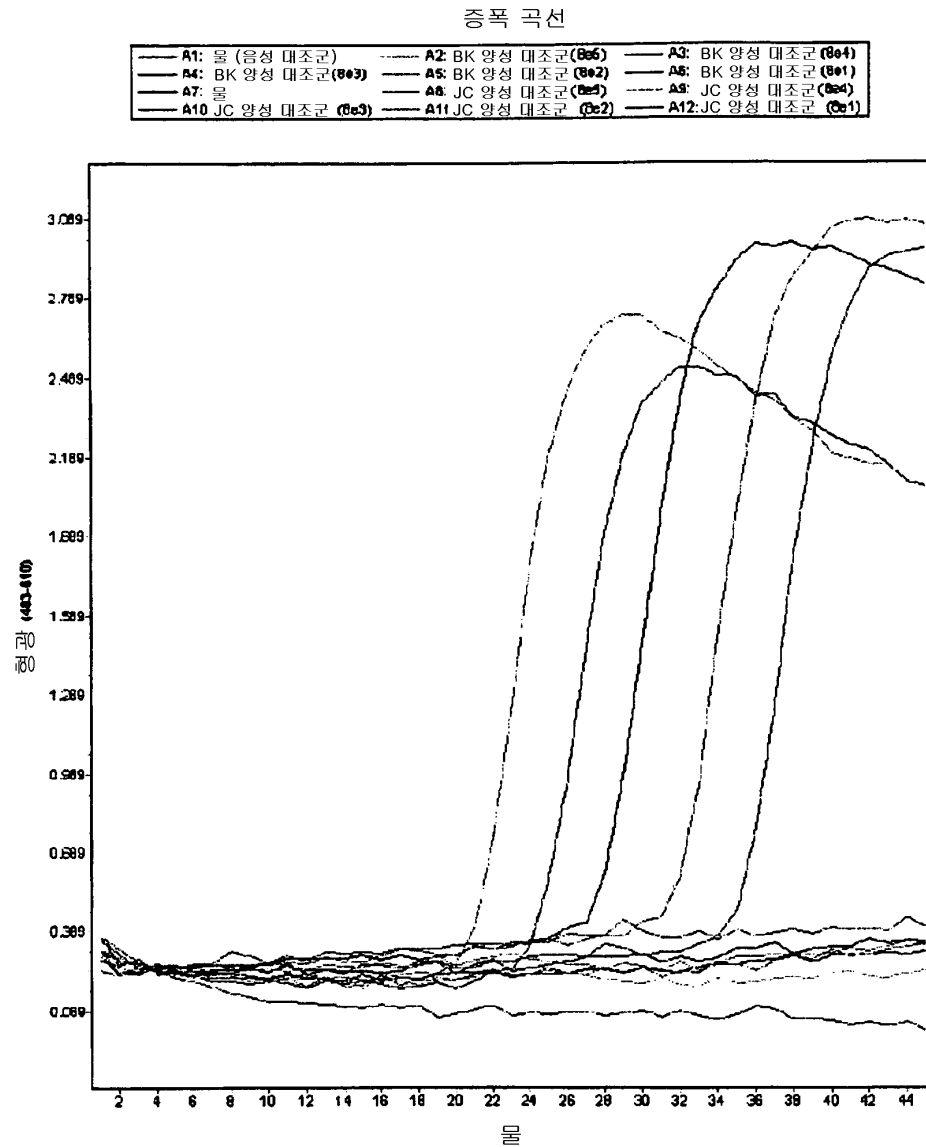
중복 1	실험 2 관찰 농도 Cp (PCR 증폭 사이클)	7.16E+05	7.71E+04	6.67E+03	7.57E+02	7.31E+01	9.35E+00
		21.61	24.89	28.49	31.69	35.13	38.16
중복 2	관찰 농도 Cp (PCR 증폭 사이클)	---	8.26E+04	8.17E+03	7.86E+02	8.33E+01	1.33E+01
		---	24.78	28.19	31.64	34.94	37.64
중복 3	관찰 농도 Cp (PCR 증폭 사이클)	---	---	---	7.88E+02	7.28E+01	4.71E+00
		---	---	---	31.63	35.14	39.17
중복 4	관찰 농도 Cp (PCR 증폭 사이클)	---	---	---	7.48E+02	6.36E+01	8.52E+00
		---	---	---	31.71	35.34	38.29
중복 1	실험 3 관찰 농도 Cp (PCR 증폭 사이클)	7.89E+05	7.15E+04	7.21E+03	7.46E+02	5.22E+01	1.18E+01
		22.34	25.88	29.25	32.59	35.69	37.04
중복 2	관찰 농도 Cp (PCR 증폭 사이클)	7.62E+05	7.47E+04	7.08E+03	8.20E+02	8.46E+01	5.12E+00
		22.39	25.81	29.28	32.46	35.21	37.73

정밀도 요약:

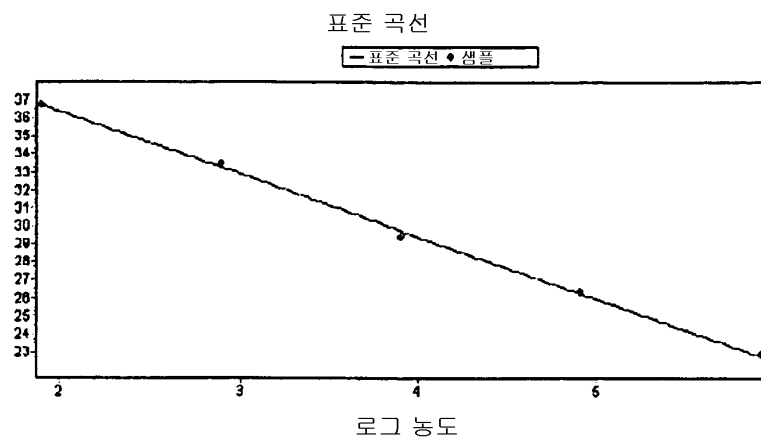
평균 (Cp)	22.37	25.67	29.14	32.26	35.27	37.56
표준편차 (Cp)	0.47	0.52	0.59	0.52	0.23	0.89
CV (평균/SD)	2.1%	2.0%	2.0%	1.6%	0.7%	2.4%

도면

도면1

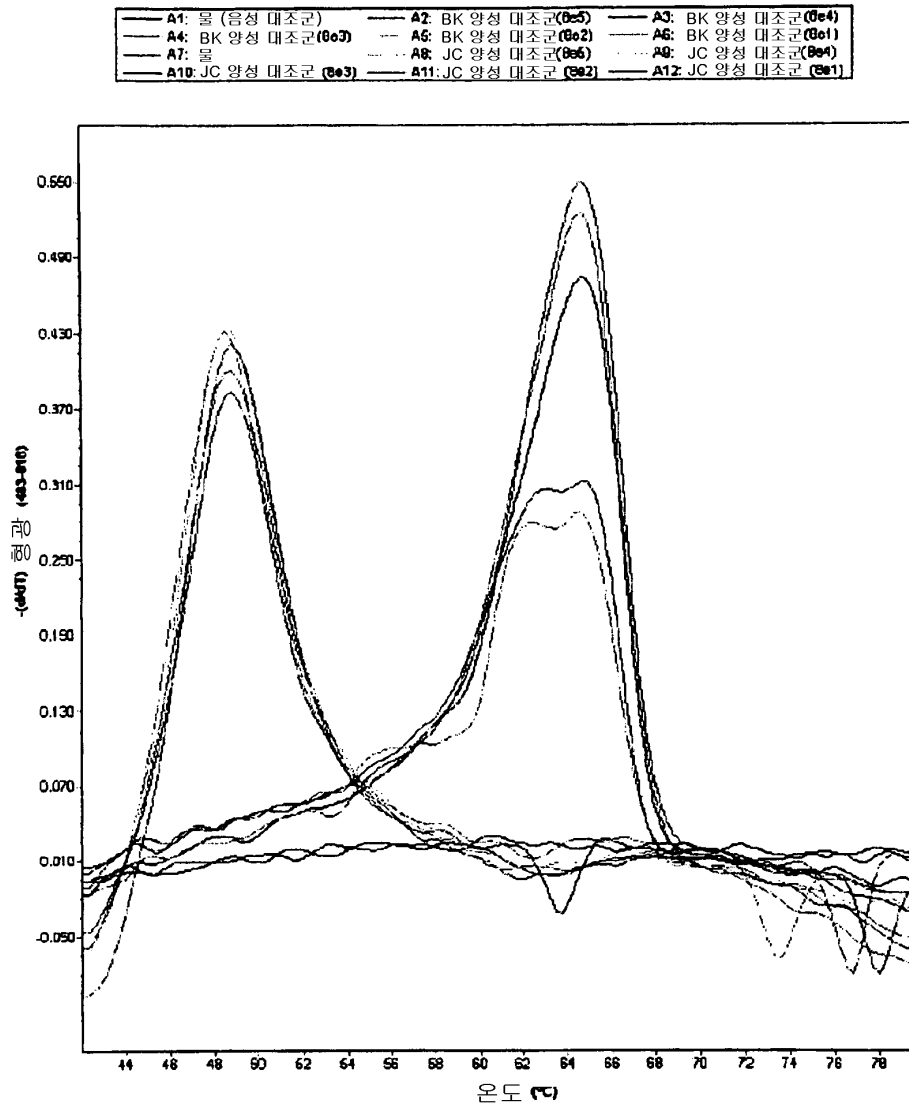


도면2

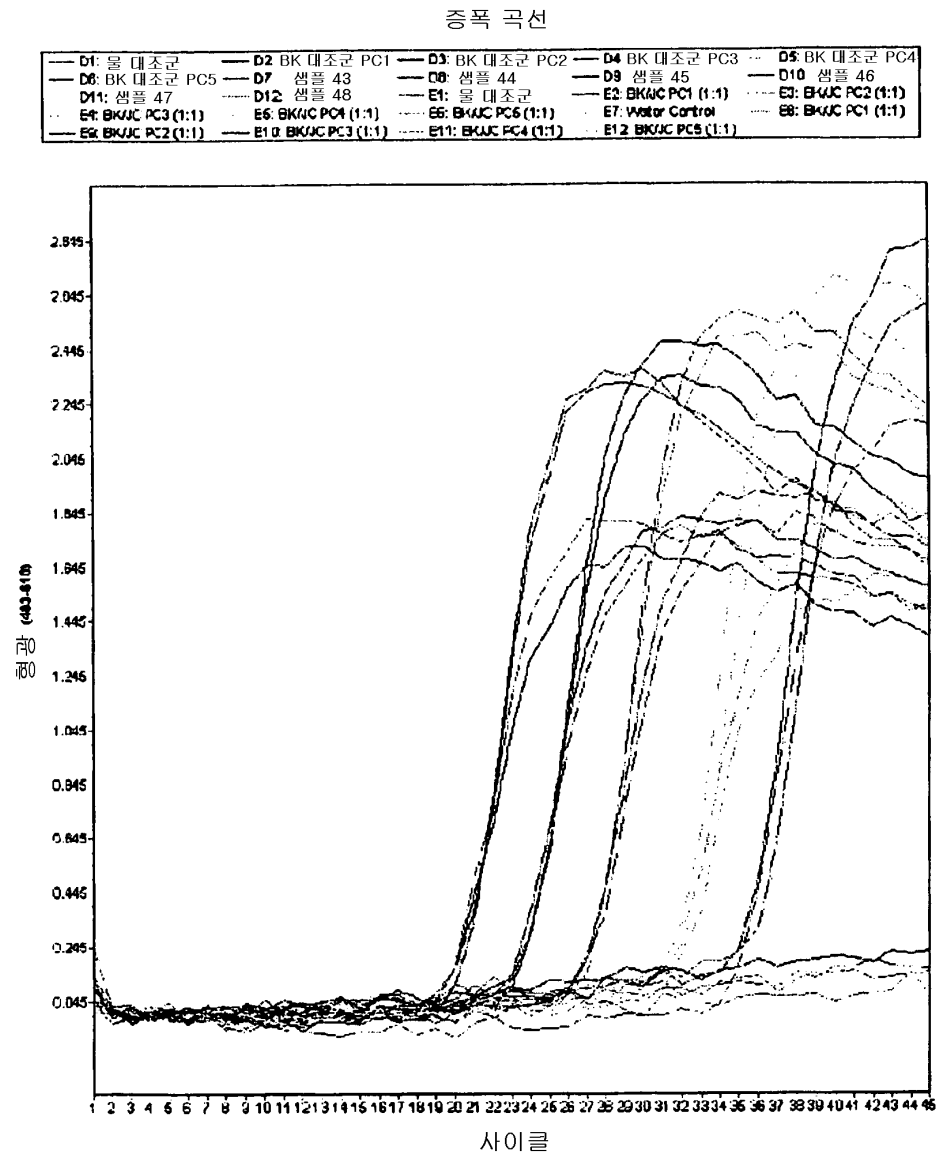


도면3

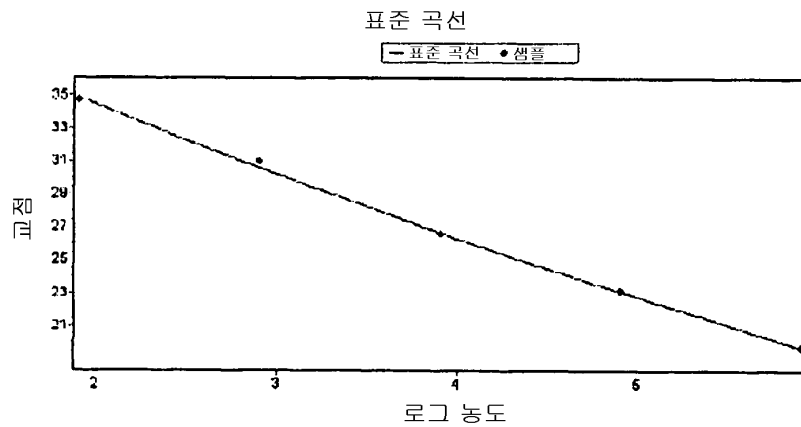
용융 피크



도면4

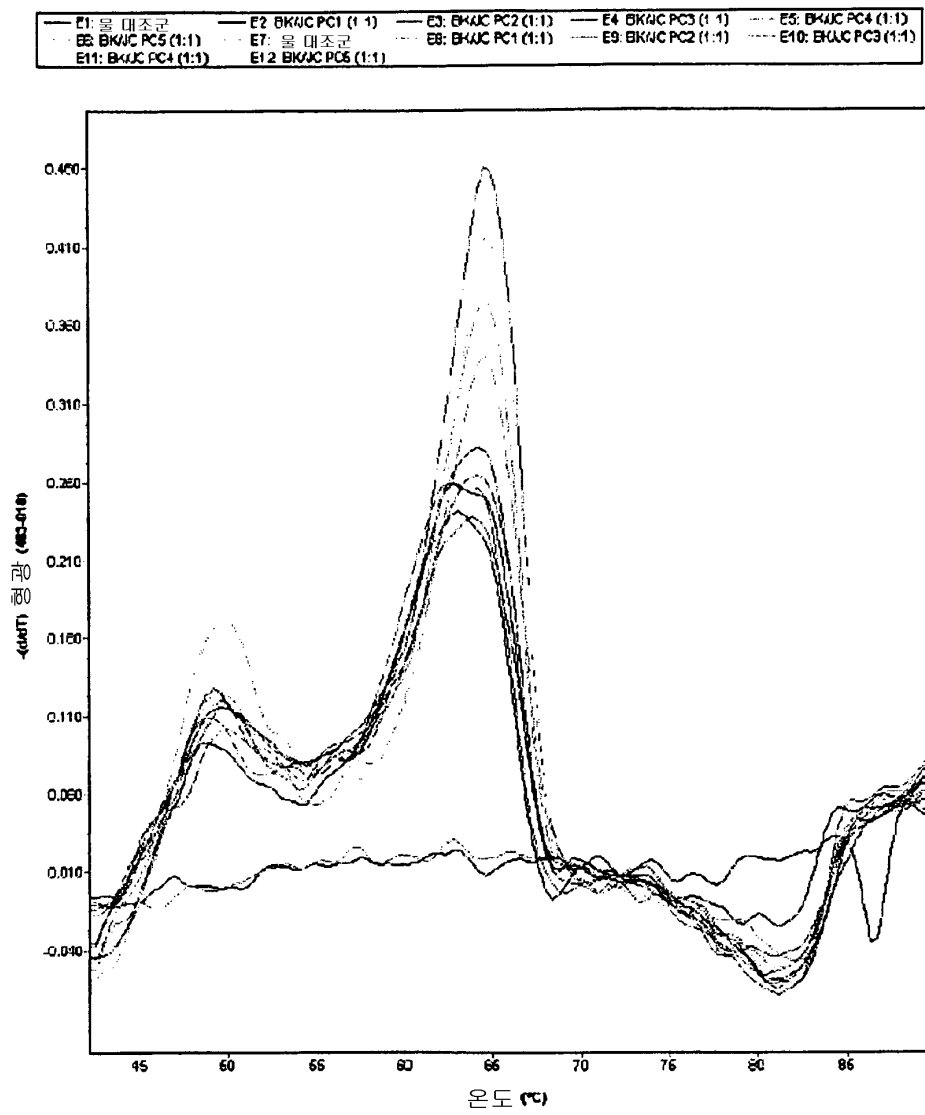


도면5



도면6

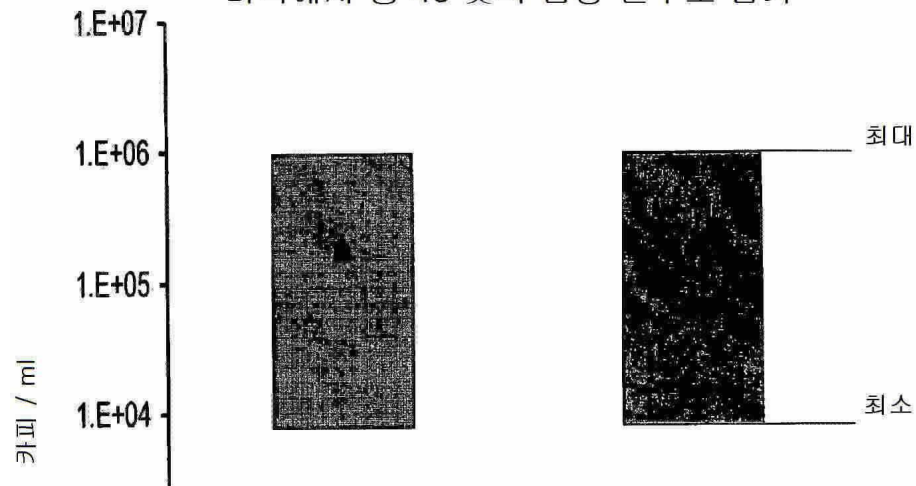
용융 피크



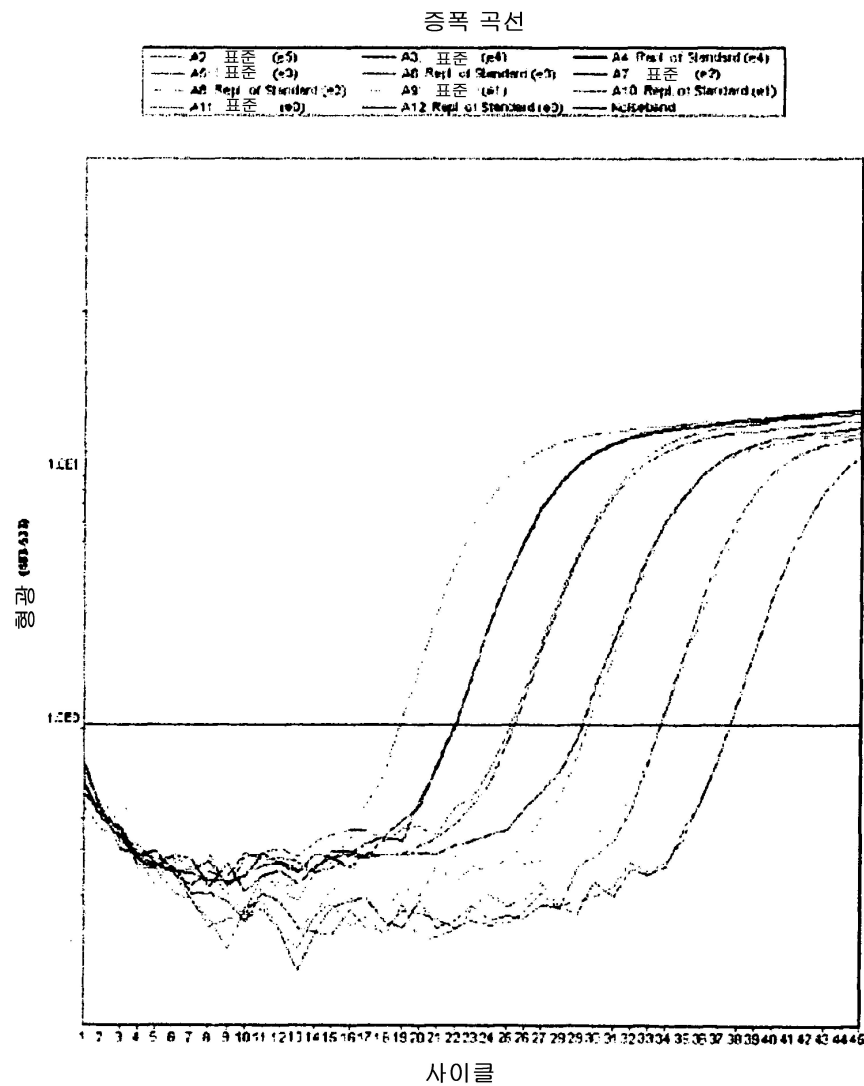
도면7

8월에 수행된 BK-CAP 일차 조사 CAP(미국병리학회)

미국에서 총 43 곳의 임상 연구소 참가



도면8



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> METIC IMMUNOGENETIC CONSULTANT, INC.

<120> DETECTION OF POLYOMAVIRUS

<130> 092813-0101

<140> PCT/US2009/001032

<141> 2009-02-19

<150> 61/064,166

<151> 2008-02-20

<160> 25

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 156
 <212> DNA
 <213> BK polyomavirus
 <400> 1
 tcaggagagt ttatagaaaa aactattgcc ccaggaggtg ctaatcaaag aactgctcct 60
 caatggatgt tgcctttact tctaggcctg tacgggactg taacacctgc tcttgaagca 120
 tatgaagatg gcccacaacca aaagaaaagg agagtg 156

<210> 2
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 2
 cccaggaggt gctaatcaaa ga 22

<210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 3
 tcatatgctt caagagcagg tgt 23

<210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<400> 4
gctcctcaat ggatgttgcc t 21
<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"
<400> 5
cttctaggcc tgtacgggac tgta 24
<210> 6
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
<220>
<221> Variation
<222> (4)..(4)
<223> /replace="Deoxyionosine"
<400> 6
tcanatgctt caagagcagg tgt 23
<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
<400> 7
aaaaactatt gccccaggag gtg 23
<210> 8

<211>
23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
<400> 8
ccccaggagg tgctaatacaa aga 23
<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 9
tacagtcccg tacaggccta gaa 23
<210> 10
<211> 25
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"
<400> 10
aaggcaacat ccattgagga gcagt 25
<210> 11
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"

<400> 11

aggcaacatc cattgag 17

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<

220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 12

tcaggagagt ttatagaaaa aact 24

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"

<400> 13

tacagtcccg tacaacccta aaa 23

<210> 14

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223>

/note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"

<400> 14

ccgtacaggc ctagaa 16

<210> 15

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"

<400> 15

cgtacaaccc taaaagt 17

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"

<400> 16

acagtcccggt acaggcctag aag 23

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 17

tttggctttt tgggagctg 19

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 18

ccctggacac tctccttttc ttt 23

<210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 19
 ccccaggagg tgctaatcaa a 21
 <210> 20
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"
 <400> 20
 atgcttcaag agcaggtgtt acag 24
 <210> 21
 <211> 23
 <212>
 DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"
 <400> 21
 ctgctcctca atggatgttg cct 23
 <210> 22
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<220><221> Variation

<222> (13)..(13)

<223> /replace="Deoxyionosine"

<400> 22

cccaggaggt gcnaatcaaa ga 22

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"

<400> 23

cttttagggt tgtacgggac tgta 24

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 24

ctgccctgg acactctc 18

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 25

agctgccct ggacactctc 20