

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0009407
(43) 공개일자 2020년01월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/70 (2006.01) C12Q 1/686 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/706 (2013.01)
C12Q 1/686 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2018-0083720
(22) 출원일자 2018년07월18일
심사청구일자 2018년07월18일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
송진원
서울특별시 서초구 방배로 278, 101동 401호
김원근
서울특별시 중랑구 봉화산로31길 12-8, 2층
리, 진영
서울특별시 동대문구 약령서길 136-1
(74) 대리인
공병욱

전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 다중 복합 프라이머 세트를 포함하는 A형 간염 바이러스 검출용 조성물, A형 간염 진단용 키트 및 A형 간염 바이러스의 전장 유전체 서열 획득 방법

(57) 요약

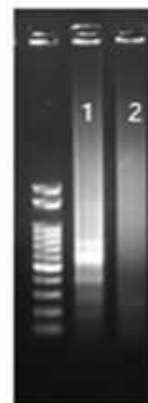
본 발명은 다중 복합 프라이머 세트를 포함하는 A형 간염 바이러스 검출용 조성물, A형 간염 진단용 키트 및 A형 간염 바이러스의 전장 유전체 서열 획득 방법에 관한 것으로서, 상기 다중 복합 프라이머 세트를 이용하면 극미 세소량의 바이러스 유전체를 증폭하여 바이러스 감염 여부를 확인하고 유전체 서열의 농도 또한 증가시킬 수 있으므로, 이를 효과적으로 바이러스의 검출, 감염여부 진단 및 바이러스 전장 유전체의 획득에 이용할 수 있다.

대표도 - 도2a

1st PCR product

Patient serum
82w-82 strain

1st PCR product 2nd PCR product

Patient samples:
1. 82w-70 (serum)
2. 04-1 (serum)

(52) CPC특허분류

C12Q 2527/143 (2019.08)

C12Q 2531/113 (2013.01)

C12Q 2537/143 (2013.01)

C12Q 2600/16 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 52의 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 염기서열로 이루어진 다중 복합 프라이머 52종을 포함하는 A형 간염 바이러스(Hepatitis A virus) 검출용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 서열번호 53 내지 81의 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 염기서열로 이루어진 다중 복합 프라이머 29종을 추가적으로 포함하는 것인, A형 간염 바이러스 검출용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 다중 복합 프라이머의 농도는 각각 0.1 내지 1.0 pM 인 것인, A형 간염 바이러스 검출용 조성물.

청구항 4

서열번호 1 내지 52의 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 염기서열로 이루어진 다중 복합 프라이머 52종을 포함하는 A형 간염 진단용 키트.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 키트는 서열번호 53 내지 81의 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 염기서열로 이루어진 다중 복합 프라이머 29종을 추가적으로 포함하는 것인, A형 간염 진단용 키트.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 다중 복합 프라이머의 농도는 각각 0.1 내지 1.0 pM 인 것인, A형 간염 진단용 키트.

청구항 7

다음의 단계를 포함하는 A형 간염 바이러스(Hepatitis A virus)의 전장 유전체 서열(Whole genome sequences) 획득 방법:

시료에 대하여 서열번호 1 내지 52의 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 염기서열로 이루어진 다중 복합 프라이머 52종을 포함하는 다중 복합 프라이머(Multiplex primer) 세트를 이용하여 멀티플렉스 중합효소 연쇄반응(multiplex polymerase chain reaction, mPCR)을 수행하는 서열 증폭 단계; 및

mPCR에 의한 생성물을 포함하는 A형 간염 바이러스 서열 라이브러리를 차세대 시퀀싱(next generation sequencing, NGS)으로 분석하는 NGS 분석 단계.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 다중 복합 프라이머 세트는 서열번호 53 내지 81의 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 염기서열로 이루어진 다중 복합 프라이머 29종을 추가적으로 포함하는 것인, 전장 유전체 서열 획득 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 다중 복합 프라이머 세트의 다중 복합 프라이머의 농도는 각각 0.1 내지 1.0 pM 인 것인, 전장 유전체 서열 획득 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 증폭 단계의 mPCR은 30 내지 50 사이클 조건으로 수행되는 것인, 전장 유전체 서열 획득 방법.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 서열 증폭 단계의 mPCR에 의한 생성물은 300 내지 1000 bp 길이인 것인, 전장 유전체 서열 획득 방법.

청구항 12

제7항에 있어서, 상기 방법은 서열 증폭 단계 이후, mPCR에 의한 생성물을 시료로 하여 서열번호 1 내지 52의 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 염기서열로 이루어진 다중 복합 프라이머 52종을 포함하는 다중 복합 프라이머 세트를 이용하여 mPCR을 수행하는 서열 재증폭 단계를 추가적으로 포함하는 것인, 전장 유전체 서열 획득 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 다중 복합 프라이머 세트는 서열번호 53 내지 81의 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 염기서열로 이루어진 다중 복합 프라이머 29종을 추가적으로 포함하는 것인, 전장 유전체 서열 획득 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 재증폭 단계의 mPCR은 15 내지 35 사이클 조건으로 수행되는 것인, 전장 유전체 서열 획득 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 다중 복합 프라이머 세트를 포함하는 A형 간염 바이러스 검출용 조성물, A형 간염 진단용 키트 및 A형 간염 바이러스의 전장 유전체 서열 획득 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 A형 간염 환자의 시료로부터 A형 간염 바이러스를 검출하여 A형 간염 여부를 진단하며, 다중 복합 프라이머 세트를 이용하여 극미세소량의 유전체 서열까지도 검출함으로써 차세대 염기서열 분석기법을 통해 전장 유전체 서열을 획득하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생명체를 구성하는 유전자의 염기서열 순서를 확정하는 기술은 1세대 생어(Sanger) 방식과 차세대 염기서열 분석법인 NGS(Next Generation Sequencing)로 나뉜다.

[0003] 1977년경에 개발된 생어 서열분석(Sanger sequencing)이라 불리는 1세대 방법은 유전자 증폭 반응(Polymerase Chain Reaction; PCR) 과정 중 ddNTPs(di-deoxynucleotidetriphosphates)가 DNA 가닥(strand)의 합성을 중단시키는 연쇄-정지(chain-termination) 원리를 응용하여 증폭된 DNA 절편(fragment)을 모아 염기서열을 확인하는 방법이다. 이 방법은 정확도는 높지만, 염기서열 확정에 시간이 오래 걸리며, 높은 비용이 발생한다는 문제점을 가지고 있다.

[0004] 이와 같은 문제점을 극복하기 위하여 차세대 염기 서열 분석법이 개발되었다. 수많은 유전체의 유전정보를 분절화한 후, 증폭하여 빅데이터를 얻은 다음 생물정보학을 이용하여 원하는 생물체의 전장 유전체 염기서열(Whole genome sequences; WGS)을 확보하는 것이다.

[0005] 1990년대 시작된 인간 유전체 분석 프로젝트로부터 저비용, 고속, 대용량 분석 기술이 요구됨에 따라서 2006년과 2007년에 각각 로슈(Roche)와 일루미나(Illumina)사에서 차세대 시퀀싱 장비를 개발함으로써 NGS의 역사가 시작되었다. 마이크로 혹은 나노 테크놀로지를 이용하여 시료 길이를 줄이고, 병렬 시퀀싱을 가능하게 하여, 수백만 개의 다중 시료들을 저비용으로 동시에 분석할 수 있는 길을 열었다.

[0006] 기종에 따라 약간의 차이는 있지만 상기 장비들은 기본적으로 DNA 서열에 대한 증폭을 수행하고 그 후 형광 표시 등을 카메라로 찍어 이미지 처리를 하는 과정을 거침으로써 염기를 읽어낸다. PCR 증폭 방식에 따라서 로슈(Roche, 454)와 라이프 테크놀로지스(Life Technologies)의 기종들은 유탁액 PCR(mulsion PCR; emPCR) 방식인데 반해, 일루미나(Illumina)의 기종들은 고체상 증폭(solid-phase amplification)을 사용하는 것으로 나눌 수 있다.

- [0007] NGS는 인간의 WGS, 엑솜(Exome-seq), RNA 연구(RNA-seq), 후성 유전체(Epi-genomics)연구 등에 널리 활용되고 있다. NGS에 기반한 유전체 분석은 46%가 인간을 대상으로 하는 연구이며, 동물(25%), 식물(12%), 미생물(2%) 순으로 순위를 정할 수 있다. 특히, 바이러스 분야는 NGS를 활용하는 데 있어 초기 단계에 불과한 실정이다. 미생물의 경우 유전자가 상대적 잘 보존되어 있는 서열들이 많이 존재하지만, 바이러스의 경우 개별 바이러스마다 염기서열(sequences)들이 다르며 유전자 변이가 매우 잘 일어나기 때문에 NGS를 이용한 바이러스 분야 연구에 있어서는 진척이 더디게 이루어지고 있다.
- [0008] 현재, A형 간염바이러스 감염여부를 확인하는 검사방법으로는 항A형 간염 바이러스 면역글로불린M 항체검사(IgM anti-HAV), RT-PCR, 실시간(Real-time) PCR 방법 등이 있다. 항A형 간염 바이러스 IgM 항체는 증상이 나타나기 시작할 무렵에서 감염이 회복된 후 6개월까지 검사 결과상 양성으로 나타날 수 있으며 급성 A형 간염의 확진에만 이용되는 항체검사이다. RT-PCR이나 실시간 PCR 방법은 신속하고 민감도는 높으나 바이러스 특이적인 프라이머에만 반응이 되는 제한이 있어 시료들 사이에 오염이 발생하는 단점을 가지고 있다. 이와 같이 기존의 감염 검사 방법으로는 A형 간염바이러스의 전장 유전체 서열을 효과적으로 얻을 수 없다는 단점이 있다.
- [0009] NGS는 각 방법들의 단점을 보완하고 NGS 실험의 장점을 더하여 A형 간염바이러스 감염 진단의 효용성을 증대시킬 수 있고, RT-PCR 검사법으로 전체 서열을 얻는 것보다는 시간을 단축할 수 있다는 장점이 있다.
- [0010] 또한, 감염 환자 시료로부터 직접적으로 바이러스 유전체 염기서열을 확인하는 것은 바이러스 유전체가 극미세 용량이기 때문에 매우 어렵다고 알려져 있다. 이러한 단점을 극복하기 위해 극미세용량의 A형 간염 바이러스 유전체의 염기서열 정보를 분자생물학적 증폭(Molecular enrichment)을 이용해 감염 환자로부터 직접적으로 신속하게 확보하는 방법이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 이에 본 발명자들은 다중 복합프라이머 세트를 이용하여 멀티플렉스 PCR을 수행한 결과 극미세소량의 유전체를 검출하고 이에 차세대 염기서열 분석기법을 이용하면 A형 간염 바이러스의 전장 유전체 서열을 수득하는 데 유용함을 확인하였다.
- [0012] 이에, 본 발명의 목적은 서열번호 1 내지 52의 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 염기서열로 이루어진 프라이머 52종을 포함하는 A형 간염 바이러스(Hepatitis A virus) 검출용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 서열번호 1 내지 52의 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 염기서열로 이루어진 프라이머 52종을 포함하는 A형 간염 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 A형 간염 바이러스의 전장 유전체 서열(Whole genome sequences) 획득 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명은 다중 복합 프라이머 세트를 포함하는 A형 간염 바이러스 검출용 조성물, A형 간염 진단용 키트 및 A형 간염 바이러스의 전장 유전체 서열 획득 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 다중 복합 프라이머 세트를 이용하면 극미세소량의 유전체 서열까지도 검출하여 차세대 염기서열 분석기법(Next Generation Sequencing; NGS)을 통해 전장 유전체 서열을 획득할 수 있다.
- [0016] 본 발명자들은 다중 복합 프라이머 세트를 이용하여 A형 간염 환자의 시료로부터 A형 간염 바이러스의 유전체 서열을 검출하였고, 이를 통해 라이브러리를 제작함으로써 NGS 시스템에 적용할 수 있음을 확인하였다.
- [0017] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [0018] 본 발명의 일 양태는 서열번호 1 내지 52의 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 염기서열로 이루어진 프라이머 52종을 포함하는 A형 간염 바이러스(Hepatitis A virus) 검출용 조성물이다.
- [0019] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 검출용 조성물은, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 7의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 8의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 9의 염기서열

[illegible]

[0020] 상기 조성물은 서열번호 53 내지 81의 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 염기서열로 이루어진 프라이머 29종을 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.

[illegible]

루어진 프라이머, 서열번호 69의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 70의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 71의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 72의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 73의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 74의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 75의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 76의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 77의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 78의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 79의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 80의 염기서열로 이루어진 프라이머 및 서열번호 81의 염기서열로 이루어진 프라이머를 포함할 수 있다.

- [0022] 상기 프라이머의 농도는 각각 0.1 내지 1.0 pM, 0.1 내지 0.8 pM, 0.1 내지 0.6 pM, 0.2 내지 1.0 pM, 0.2 내지 0.8 pM, 0.2 내지 0.6 pM, 0.3 내지 1.0 pM, 0.3 내지 0.8 pM, 0.3 내지 0.6 pM, 0.4 내지 1.0 pM 또는 0.4 내지 0.8 pM, 예를 들어, 0.4 내지 0.6 pM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명의 다른 양태는 서열번호 1 내지 52의 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 염기서열로 이루어진 프라이머 52종을 포함하는 A형 간염 진단용 키트이다.
- [0024] 상기 키트는 서열번호 53 내지 81의 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 염기서열로 이루어진 프라이머 29종을 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.
- [0025] 상기 프라이머의 농도는 각각 0.1 내지 1.0 pM, 0.1 내지 0.8 pM, 0.1 내지 0.6 pM, 0.2 내지 1.0 pM, 0.2 내지 0.8 pM, 0.2 내지 0.6 pM, 0.3 내지 1.0 pM, 0.3 내지 0.8 pM, 0.3 내지 0.6 pM, 0.4 내지 1.0 pM 또는 0.4 내지 0.8 pM, 예를 들어, 0.4 내지 0.6 pM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 양태는 다음의 단계를 포함하는 A형 간염 바이러스(Hepatitis A virus)의 전장 유전체 서열(Whole genome sequences) 획득 방법이다:
- [0027] 시료에 대하여 서열번호 1 내지 52의 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 염기서열로 이루어진 프라이머 52종을 포함하는 다중 복합 프라이머(Multiplex primer) 세트를 이용하여 멀티플렉스 중합효소 연쇄반응(multiplex polymerase chain reaction, mPCR)을 수행하는 서열 증폭 단계; 및
- [0028] mPCR에 의한 생성물을 포함하는 A형 간염 바이러스 서열 라이브러리를 차세대 시퀀싱(next generation sequencing, NGS)으로 분석하는 NGS 분석 단계.
- [0029] 상기 시료는 RNA 또는 cDNA인 것일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일 구현예에서, 시료 내 목적 바이러스에서 얻어진 총 RNA로부터 합성된 cDNA에 결합하는 프라이머 쌍을 이용하여 유전자 증폭 반응을 실시할 수 있다. mRNA를 얻기 위하여, 시료에서 총 RNA를 분리할 수 있다. 총 RNA를 분리하는 것은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다. 예컨대, Trizol을 이용하면 용이하게 총 RNA를 분리할 수 있다. 이어, 분리된 mRNA로부터 cDNA를 합성하고, 이 cDNA를 증폭할 수 있다.
- [0031] 상기 시료는 혈액, 혈청, 객담, 소변, 대변 및 생체조직으로 이루어진 군으로부터 얻는 것일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 다중 복합 프라이머 세트는, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 7의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 8의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 9의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 10의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 11의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 12의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 13의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 14의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 15의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 16의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 17의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 18의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 19의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 20의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 21의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 22의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 23의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 24의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 25의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 26의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 27의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 28의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 29의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 30의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 31의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 32의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 33의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 34의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 35의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 36의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 37의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 38의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 39의 염기서열로 이루어진 프라이머

퍼, 서열번호 40의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 41의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 42의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 43의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 44의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 45의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 46의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 47의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 48의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 49의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 50의 염기서열로 이루어진 프라이머, 서열번호 51의 염기서열로 이루어진 프라이머 및 서열번호 52의 염기서열로 이루어진 프라이머를 포함할 수 있다.

[0033] 상기 다중 복합 프라이머 세트는 서열번호 53 내지 81의 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 염기서열로 이루어진 프라이머 29종을 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.

[illegible]

[0035] 상기 다중 복합 프라이머 세트의 프라이머의 농도는 각각 0.1 내지 1.0 pM, 0.1 내지 0.8 pM, 0.1 내지 0.6 pM, 0.2 내지 1.0 pM, 0.2 내지 0.8 pM, 0.2 내지 0.6 pM, 0.3 내지 1.0 pM, 0.3 내지 0.8 pM, 0.3 내지 0.6 pM, 0.4 내지 1.0 pM 또는 0.4 내지 0.8 pM, 예를 들어, 0.4 내지 0.6 pM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 상기 증폭 단계의 mPCR은 30 내지 50 사이클, 30 내지 46 사이클, 30 내지 44 사이클, 33 내지 50 사이클, 33

내지 46 사이클, 33 내지 44 사이클, 36 내지 50 사이클, 36 내지 46 사이클, 36 내지 44 사이클, 38 내지 50 사이클 또는 38 내지 46 사이클, 예를 들어, 38 내지 44 사이클 조건으로 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 상기 서열 증폭 단계의 mPCR에 의한 생성물은 300 내지 1000 bp 길이인 것일 수 있다.

[0038] 상기 방법은 서열 증폭 단계 이후, mPCR에 의한 생성물을 시료로 하여 서열번호 1 내지 52의 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 염기서열로 이루어진 프라이머 52종을 포함하는 다중 복합 프라이머 세트를 이용하여 mPCR을 수행하는 서열 재증폭 단계를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.

[0039] 상기 다중 복합 프라이머 세트는 서열번호 53 내지 81의 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 염기서열로 이루어진 프라이머 29종을 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.

[0040] 상기 재증폭 단계의 mPCR은 15 내지 35 사이클, 15 내지 32 사이클, 15 내지 30 사이클, 15 내지 28 사이클, 18 내지 35 사이클, 18 내지 32 사이클, 18 내지 30 사이클, 18 내지 28 사이클, 22 내지 35 사이클, 22 내지 32 사이클 또는 22 내지 30 사이클, 예를 들어, 22 내지 28 사이클 조건으로 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 상기 NGS 분석 단계는 NGS 장비를 이용하여 수행될 수 있다.

[0042] 본 발명의 일 구현예에서, NGS 장비는 일루미나 사에서 개발된 MiSeq일 수 있다. MiSeq은 소형 NGS 장비로서 기존 기법과 같이 DNA 서열을 용액 안에서 증폭시키는 것이 아니라, 서열을 판 위에 고정시킨 후 서열이 판 위에서 구부러지면서 증폭되도록 유도하여 서열집단을 형성하는 방법으로 공정을 수행하는 것을 특징으로 한다. 상기기와 같이 형성된 서열집단은 각 집단별로 시퀀싱이 이루어져 각 리드(read)의 염기서열 정보로 전환되고 이 정보를 분석과정에 적용할 수 있다. MiSeq은 2 x 150 bp에서 최대 24시간 이내 3.7 ~ 4.6 Gb의 생체 정보 데이터를 생산할 수 있다.

발명의 효과

[0043] 본 발명은 다중 복합 프라이머 세트를 포함하는 A형 간염 바이러스 검출용 조성물, A형 간염 진단용 키트 및 A형 간염 바이러스의 전장 유전체 서열 획득 방법에 관한 것으로서, 상기 다중 복합 프라이머 세트를 이용하면 극미세소량의 바이러스 유전체를 증폭하여 바이러스 감염 여부를 확인하고 유전체 서열의 농도 또한 증가시킬 수 있으므로, 이를 효과적으로 바이러스의 검출, 감염 여부 진단 및 바이러스 전장 유전체의 획득에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 전장 유전체 서열을 증폭하기 위한 다중 복합 프라이머(Multiplex primer)로 PCR을 수행하였을 때 예상되는 증폭된 생성물을 나타낸 모식도이다.

도 2a는 A형 간염 환자 혈청(patient serum) 시료에 대하여 52개 프라이머로 이루어진 다중 복합 프라이머 세트를 이용한 PCR 결과 확인 사진이다.

도 2b는 A형 간염 환자 혈청 시료에 대하여 81개 프라이머로 이루어진 다중 복합 프라이머 세트를 이용한 PCR 결과 확인 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0047] 실시예 1: A형 간염바이러스 전장 유전체 검출을 위한 다중 복합 프라이머의 설계 및 제작

[0048] A형 간염바이러스에 복합적으로 작용하여 유전체 검출을 가능하게 할 수 있는 다중 복합 프라이머의 설계 및 제작을 위해 헤파토바이러스(Hepatovirus) 속(Genus)에 속하는 A형 간염바이러스(Hepatitis A virus) 프로토타입(Prototype)인 GBM(Germany_1976)주의 전장 유전체 서열을 참조 서열(Reference Genome Sequence)로 사용하였다.

[0049] 본 발명에서 A형 간염바이러스 전장 유전체를 검출하기 위한 다중 복합 프라이머의 설계는 도 1과 같다.

[0050] 다중 복합 프라이머 세트는 A형 간염바이러스의 단일-가닥(single-stranded) RNA에서 300 내지 1000 bp 길이 단위로 산물이 증폭될 수 있도록 일반적인 단일 프라이머를 설계하였다. 이런 단일 프라이머를 모두 복합시켜서 만든 것이 다중 복합 프라이머이다.

[0051] A형 간염바이러스 다중 복합 프라이머 세트의 각 프라이머 서열은 표 1과 같다.

표 1

[0052]

서열번호	명칭	서열	위치
1	1F	TTCAAGAGGGGTCTCCGGA	1_19
2	84F	AGGCTATAGGCTAAATTTCCCT	84-105
3	208F	ACGCTTTCTGTCTCYTTTCTT	208-228
4	493F	CATTCAACGCCGAGGACT	493-511
5	732F	TAATGAATATGTCCAGACAAGGT	732-754
6	923F	GAACCTTTGAAAACCTCTGTGTG	923-944
7	1426F	TTTACAGATTTGGAGTTGC	1426-1444
8	1528F	TATGAAGATGCAAGGGCAAA	1528-1547
9	1818F	TTGATTTTCAGGTTTTTCC	1818-1836
10	2210F	GGAGATGATTCAGGAGGTTTT	2210-2230
11	2412F	CTGAATTGAARCTGGAGAGT	2412-2432
12	2746F	TTACAAAACGCCCCTTGGGA	2746-2764
13	3263F	ACTGAGGAGCATGAAATAATGAA	3263-3285
14	3591F	TGTTGCATTGGCTAAATCC	3591-3609
15	4103F	AATTATGGCAADAAGAAGGAT	4103-4123
16	4260F	TGAGAACTGTTCAYTCAATGG	4260-4280
17	4394F	TGTGAGCCAGTTGTTTGCT	4394-4412
18	4636F	ATGCCCAATGAGATTGAATA	4636-4655
19	4846F	GGCTAAACAAATGATGCAATT	4846-4867
20	5007F	CAGATGATGAYAAATGATAGTGC	5007-5028
21	5674F	GGAGATGTACCTAGAGCCTTG	5674-5694
22	5788F	AGGTCTTCCWGAATGTGTG	5788-5807
23	6082F	AGTCCCATTATCATCACATTG	6082-6103
24	6678F	ATTTTCTGCTTTTGATGCTAGT	6678-6700
25	6936F	TGTGGTTCAATGCCTTCTG	6836-6854
26	7027F	GTGCCTCAATTGAAGCCAGT	7027-7046
27	595R	TGCCCTAAGCACAGAGAGGT	576-595
28	1093R	AACCTTGAACAGCAAACCTGC	1074-1093
29	1485R	AATTCATTTCTCATCTGTGT	1463-1485
30	1680R	GAATCTGAAGCATTAAATGGA	1660-1680
31	1998R	ATCCAAGGAACACGAAATCT	1979-1998
32	2230R	AAAACCTCCTGAATCATCTCC	2210-2230
33	2379R	GGATCYTCAATTGTTGTAATAGC	2357-2379
34	2578R	TGGCAAACCATGAGGAGGATTAG	2556-2578
35	2921R	AATGATTGTAATTGCAATCT	2901-2921
36	3285R	TTCATTATTTTCATGCTCCTC	3266-3285
37	3354R	CCAGCAGCCAAAGARAATCCA	3334-3354
38	3911R	AGATAACTGAGCAGCCAAT	3893-3911
39	4179R	GCTTCTCTCAATYGCTTTCTCTAT	4157-4179
40	4413R	TAGCAAACAACCTGGCTCAC	4395-4413
41	4763R	CAATKGCTTCCTTAACATAAACT	4741-4763
42	4917R	AATGAAACATTATGTCCATCCAT	4895-4917
43	5240R	TCACGCCATGGTAAACCCC	5222-5240
44	5390R	CTCCTAAGGCATTCTAACCC	5370-5390
45	5583R	TCTCTAAACTTDGGAATTGTAGGA	5560-5583
46	5818R	CAAGGCCCCACCACACATT	5800-5818
47	6364R	GGACATAAGGAAACCCAGG	6346-6364
48	6560R	AACTAATAGCTGGACCCAATAC	6538-6560

49	6674R	ATGCCAATAGCAACACCTGT	6655-6674
50	6792R	ATAGTRTTGATAAGAGCYGTTCC	6770-6792
51	7278R	TGCATAAAAGCAAACCACT	7260-7278
52	7477R	ATTTACTGAWAARARAAAATAACA	7454-7477
53	130R	AAGGAAATAGGGRAAGGAC	112-130
54	145R	TTACAAAAACAAAAGGA	126-145
55	167R	CTGAACCTGCAGGAATTAATA	147-167
56	212R	AGCGTGAAAATTGAGTGTTTC	193-212
57	311R	GACTCCTACAGCTCCATGC	293-311
58	374R	GGTTCATGAAAGCCAAGTTA	353-372
59	467R	TATCCGCCGCTGTTACCTATCC	445-467R
60	535R	CATTTAAGGCCAAATAGTGTTC	513-535
61	564R	CTAGAGACAGCCCTGACAATC	554-564
62	671R	CTTGTTGGACATATTCATTA	651-671
63	796R	GACAGGATGTGGTCAAGGC	778-796
64	855R	CCAGTCACTGCAGTMCATCAAC	833-855
65	1588F	CTCTCAAGGTGGTGAATTAA	1588-1608
66	2120R	AAGCAACATTAGAAGGAGAAGTC	2098-2120
67	2782F	AAGAAGAACAGGRAACATTCAGAT	2782-2805
68	2894F	TCTATTCAGATTGCAAATTACAA	2894-2916
69	3197R	CATTTGACAACCTCTTCCTGAGC	3176-3197
70	3368F	ACTCTTGAGATGGATGCTG	3368-3386
71	3428F	TGGACAGAAATGAARGATGA	3428-3447
72	3510F	CACATGGAATGTTGGATCTT	3510-3529
73	3581F	TTGTGTTTCYTGTTCATTG	3581-3600
74	3602R	GCCAATGCAACARGAAACA	3584-3602
75	3977R	TCATTCTGGARTCCATTG	3959-3977
76	4499R	CCGGTTCACACCATAGTG	4481-4499
77	4567F	CATCATGATGATATTGGCC	4567-4586
78	4770R	CTACGATCAATTGCTTCCT	4752-4770
79	4858F	TGATGCAATTAAGGACATGTC	4858-4878
80	5619F	CTAGAGCTTTGAATCGKYTGCC	5619-5638
81	6770F	CAATGCCTTCTGGGTCTCCT	6770-6789

[0054] 실시예 2: 시료로부터의 RNA 추출 및 cDNA 합성

[0055] A형 간염 환자의 혈청(각각 82w-82, 82w-70 및 04-1)을 확보하고, 확보된 시료에 LS TRIzol(Invitrogen)을 처리하여 총 RNA를 분리하였다. 분리된 총 RNA 1 ug을 키트(High-Capacity RNA-to-cDNA Kit, Applied Biosystems)를 사용하여 최종 볼륨 20 ul로 준비하였다. 이렇게 준비된 시료를 37℃에서 60분, 94℃에서 5분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

[0057] 실시예 3: 멀티플렉스 1차 PCR 수행

[0058] 실시예 2에 따라 준비된 cDNA를 1.0 ul를 주형(template)으로 하고, 다중 복합 프라이머 세트 믹스(각 프라이머의 농도는 0.5 pM) 10.0 ul, 믹스(Solgtm 2X Uh-Taq PCR Smart mix) 12.5 ul 및 정제수(Molecular grade water) 25.0 ul를 이용하여 1차 PCR을 수행(Proflex Thermal Cycler, Biosystems)하였다.

[0059] 구체적으로, 다중 복합 프라이머 세트 믹스는, 표 1에서 서열번호 1 내지 52에 해당하는 프라이머들을 포함하는 52개 프라이머 세트 및 서열번호 1 내지 81에 해당하는 프라이머들을 포함하는 81개 프라이머 세트, 즉 두 가지의 경우로 구분하여 실험 수행에 각각 이용되었다.

[0060] 1차 PCR의 수행 조건은 하기 표 2와 같다.

표 2

온도	시간	비고
95℃	15 min	X 1
95℃	20 sec	X 40
50℃	40 sec	
72℃	1 min	
72℃	3 min	X 1
10℃	∞	

[0061]

[0062]

95℃에서 15분 동안 1 사이클, 95℃에서 20초, 50℃에서 40초, 및 72℃에서 1분 동안 40 사이클, 최종 연장(extension) 반응은 72℃에서 3분 동안 1 사이클 반응시켰다. 상기 반응 조건에 따라 PCR을 수행함으로써 핵산을 증폭한 후, 증폭 산물을 3%(w/w)의 아가로스 겔 상에서 전기영동하여 표준 마커를 기준으로 목표로 하는 검출 유전자의 증폭 유무를 확인하였다.

[0063]

실시예 4: 멀티플렉스 2차 PCR 수행

[0064]

실시예 3에 따라 1차 멀티플렉스 PCR을 통해 제조된 생성물의 1.0 ul를 주형으로 하고, 다중 복합 프라이머 세트 믹스(52개 프라이머 세트 및 81개 프라이머 세트, 각 프라이머 농도는 0.5 pM) 10.0 ul, 믹스(SolgtTM 2X Uh-Taq PCR Smart mix) 12.5 ul 및 정제수 25.0 ul를 이용하여 2차 PCR을 수행(Proflex Thermal Cycler, Biosystems)하였다.

[0065]

2차 PCR의 수행 조건은 하기 표 3과 같다.

표 3

온도	시간	비고
95℃	15 min	X 1
95℃	20 sec	X 25
50℃	40 sec	
72℃	1 min	
72℃	3 min	X 1
10℃	∞	

[0066]

[0067]

95℃에서 15분 동안 1 사이클, 95℃에서 20초, 50℃에서 40초, 및 72℃에서 1분 동안 25 사이클, 최종 연장 반응은 72℃에서 3분 동안 1 사이클 반응시켰다. 상기 반응 조건에 따라 PCR을 수행함으로써 핵산을 증폭한 후, 증폭 산물을 3%(w/w)의 아가로스 겔 상에서 전기영동하여 표준 마커를 기준으로 목표로 하는 검출 유전자의 증폭 유무를 확인하였다. 도 2a 및 2b에서 확인할 수 있듯이, A형 간염 바이러스 환자 혈청 시료 중 바이러스 핵산 서열의 양이 많은 일부 시료에서는 1차 PCR 반응 결과로부터 계단식 형태의 생성물이 확인되었고, 상기 생성물을 주형으로 하여 2차 PCR을 수행한 결과 사진에서는 얇게 펼쳐진 흐린 형태의 반응 생성물을 확인할 수 있었다.

[0069]

실시예 5: A형 간염바이러스 전장 유전체 서열 검출을 위한 시료 전처리 및 NGS 수행

[0070]

멀티플렉스 PCR 생성물을 시료 전처리 장치(Covaris Focused-Ultrasonicator)를 이용하여 분편화하였다. 분편화된 PCR 생성물은 마그네틱 비드(magnetic bead)를 이용하여 정제(clean up)한 후, 말단 복구 반응(End repair reaction)을 말단 복구 믹스(End repair mix) 40 ul를 이용하여 30℃에서 30분 동안 수행하였다.

[0071]

이후 마그네틱 비드(Illumina)를 2배 부피에 해당하는 DEPC-treated water (Invitrogen)로 희석하여(1:2, v/v) 대형(Large, 1,000 bp 이상) 사이즈의 DNA 절편(fragment)을 제거하고, 마그네틱 비드를 이용하여 소형(Small, 300 bp 이하) 사이즈 DNA 절편을 제거하였다. 사이즈 기준으로 선별된 PCR 생성물은 아데노신-테일링 믹스(A-tailing mix, Illumina TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit (Catalog number: FC-121-4-1, FC-121-4002)) 12.5 ul를 이용하여 37℃에서 30분, 70℃에서 5분, 4℃에서 5분 동안 1 사이클로 반응시켰다.

[0072]

상기 반응을 수행한 PCR 생성물을 시료로 하여 일루미나 버퍼(Illumina buffer, Illumina) 2.5 ul, 라이게이션

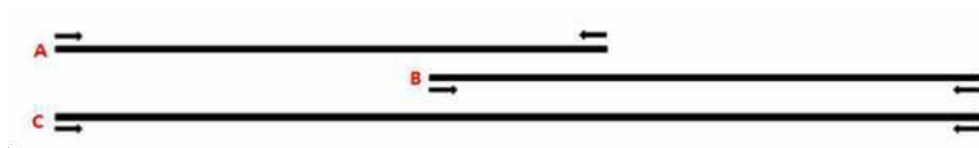
믹스(Ligation mix, Illumina) 2.5 ul, 정해진 특정한 DNA 어댑터(adapter, Illumina) 2.5 ul를 이용하여 30℃에서 10분 동안 라이게이션(Ligation) 반응을 수행하였다. 10분 후에는 반응정지액(Stop solution, Illumina) 5 ul을 넣고 라이게이션 반응을 정지시켰다.

[0073] 두 번의 정제 과정을 거친 시료는 PCR 프라이머 콕테일(PCR primer cocktail, Illumina) 5 ul와 인핸스드 PCR 믹스(Enhanced PCR mix, Illumina) 20 ul를 넣고 PCR을 통해 시료의 양을 증폭시켰다. 95℃에서 3분 동안 1 사이클, 98℃에서 20초, 60℃에서 15초, 72℃에서 30초 동안 8 사이클, 최종 연장 반응은 72℃에서 5분 동안 1 사이클로 반응시켰다.

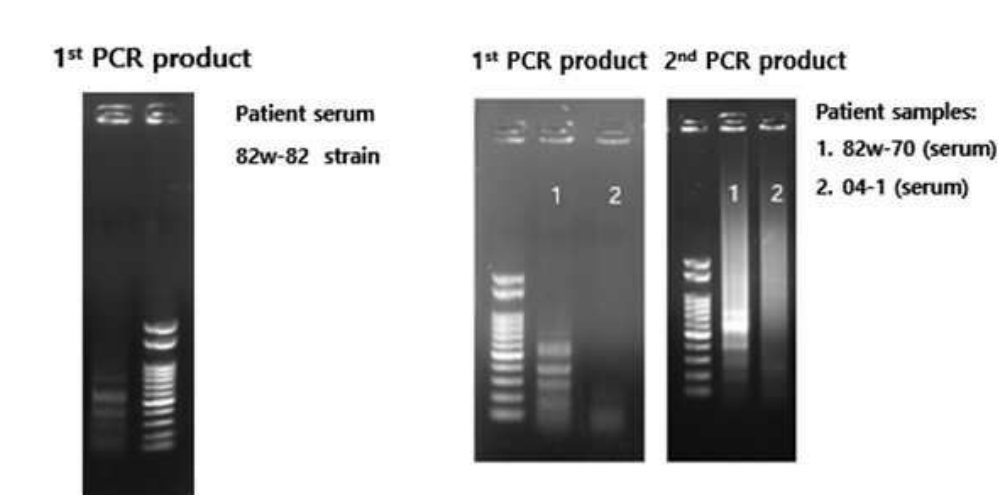
[0074] 위의 반응이 완료된 후, 한번의 정제 과정을 거친 후 품질 관리(Quality control)를 통해 NGS 장비(MiSeq, Illumina)에서 수행할 준비를 하였다. 바이오분석기(Bio-analyzer) 및 RT-qPCR을 통해 시료의 농도와 품질(quality)을 확인한 후, 장비를 이용하여 NGS 반응을 수행하였다. 이후 A형 간염 바이러스 전장 유전체 서열을 획득할 수 있었다.

도면

도면1

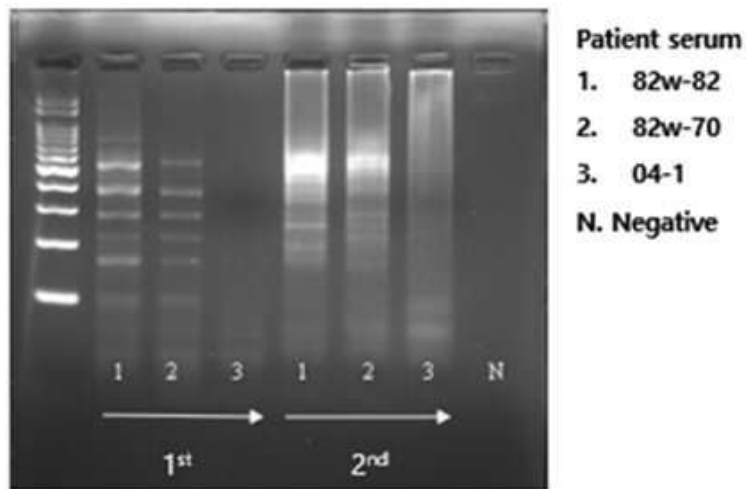


도면2a



도면2b

1st & 2nd PCR product



서열목록

<110> Industry-University Cooperation Foundation Korea University

<120> Composition for detecting Hepatitis A virus comprising multiplex primer set, kit for diagnosing Hepatitis A and method for obtaining Hepatitis A virus whole genome sequence

<130> PN180044

<160> 81

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 1

ttcaagaggg gtctccgga

19

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 2

aggctatagg ctaaatttcc ct	22
<210> 3	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400> 3	
acgctttctg tctcytttct t	21
<210> 4	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400>	
> 4	
cattcaacgc cggaggact	19
<210> 5	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400> 5	
taatgaatat gtccagacaa ggt	23
<210> 6	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400> 6	
gaacctttga aaacctctgt tg	22
<210> 7	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	7	
tttacagatt	tgagattgc	19
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	8	
tatgaagatg	caaggc aaa	20
<210>	9	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	9	
ttgatttyca	ggtttttcc	19
<210>	10	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	10	
ggagatgatt	caggagttt t	21
<210>	11	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	11	
ctgaattgaa	rcctggagag t	21
<210>	12	
<211>	19	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 12

ttacaaaact gcccttgga 19

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 13

actgaggagc atgaaataat gaa 23

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 14

tggtgcattg gctaaatcc 19

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 15

aattatggca adaagaagga t 21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 16

tgagaactgt ycaytcaatg g 21

<210> 17

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 17

tgtgagccag ttgtttgct 19

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 18

atgcccaatg agattgaata 20

<210> 19
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 19

ggctaaaaca aatgatgcaa tt 22

<210> 20
 <211> 22

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 20

cagatgatga yaatgatagt gc 22

<210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 21

ggagatgtac ctaggcctt g	21
<210> 22	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400> 22	
aggtcttccw ggaatgtgtg	20
<210> 23	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400> 23	
agtcccatc atcatcacat tg	22
<210> 24	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400> 24	
atttttctgc yttgatget agt	23
<210> 25	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400> 25	
tgtggtcaa tgccttctg	19
<210> 26	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Artificial Sequence

<400> 26

gtgcctcaat tgaagccagt 20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 27

tgccctaagc acagagaggt 20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 28

aaccttgaac agcaaactgc 20

<210> 29

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 29

aattcatttc tcatcatctg tgt 23

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 30

gaatctgaag cattaaatgg a 21

<210> 31

<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 31
 atccaaggaa cacgaaatct 20
 <210> 32
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 32
 aaaacctcct gaatcatctc c 21
 <210> 33
 <211> 23

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 33
 ggatcytcaa ttgttgtaat agc 23
 <210> 34
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 34
 tggcaaacca tgaggaggat tag 23
 <210> 35
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 35
 aatgattgta atttgcaatc t 21

<210>	36	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	36	
	ttcattatatt catgctcctc	20
<210>	37	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	37	
	ccagcagcca aagaraatcc a	21
<210>	38	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	38	
	agataactga gcagccaat	19
<210>	39	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	39	
	gcttcctcaa tygctttctc tat	23
<210>	40	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	40	

tagcaaacaa ctggctcac	19
<210> 41	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400> 41	
caatkgettc cttaacataa act	23
<210> 42	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400> 42	
aatgaaacat tatgtccatc cat	23
<210> 43	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400> 43	
tcacgccatg gtaaacc	19
<210> 44	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400> 44	
ctcctaaggc attcataacc c	21
<210> 45	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Artificial Sequence

<400> 45

tctctaaact tdggaattgt agga

24

<210> 46

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 46

caaggcccca ccacacatt

19

<210> 47

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 47

ggacataagg aaacccagg

19

<210> 48

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 48

aactaatagc tggaccccaa tac

23

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 49

atgccaatag caacacctgt

20

<210> 50

<211> 23

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	50	
	atagtrttga taagagcygt tcc	23
<210>	51	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	51	
	tgcataaaag caaaccact	19
<210>	52	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	52	
	atttactgaw aararaaata aaca	24
<210>	53	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	53	
	aaggaaatag ggraaggac	19
<210>	54	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	54	
	ttacaaacaa aacaaaagga	20

<210>	55	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	55	
ctgaacctgc aggaattaat a		21
<210>	56	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	56	
agcgtgaaaa ttgagtgttc		20
<210>	57	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	57	
gactcctaca gtcctatgc		19
<210>	58	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	58	
ggttcatgaa agccaagtta		20
<210>	59	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	

<400>	59	
tatccgccgc	tgttacccta tcc	23
<210>	60	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	60	
cattttaaggc	caaatagtgt ttg	23
<210>	61	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	61	
ctagagacag	ccctgacaat c	21
<210>	62	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	62	
cttggttgga	catattcatt a	21
<210>	63	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	63	
gacaggatgt	ggtcaaggc	19
<210>	64	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> Artificial Sequence

<400> 64

ccagtcactg cagtmctatc aac 23

<210> 65

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 65

ctctcaaggt ggtggaatta a 21

<210> 66

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 66

aagcaacatt agaaggagaa gtc 23

<210> 67

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 67

aagaagaaca ggraacattc agat 24

<210> 68

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 68

tctattcaga ttgcaaatta caa 23

<210> 69

<211> 22

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 69

catttgacaa ctcttcctga gc 22

<210> 70
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 70

actcttgaga tggatgctg 19

<210> 71
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 71

tggacagaaa tgaargatga 20

<210> 72
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 72

cacatggaat gttgatctt 20

<210> 73
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 73

ttgtgtttcy tgttcattg 20

<210> 74
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 74
 gccaatgcaa cargaaaca 19

<210> 75
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 75
 tcattctgga rtccatttg 19

<210> 76
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 76
 ccggttcaac accatagtg 19

<210> 77
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 77

catcattgat gatattggcc 20
 <210> 78
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence

<400>	78	
ctacgatcaa ttgcttcct		19
<210>	79	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	79	
tgatgcaatt aaggacatgt c		21
<210>	80	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	80	
ctagagcttt gaatcgkytg gc		22
<210>	81	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Artificial Sequence	
<400>	81	
caatgccttc tgggtctcct		20