



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0005698
(43) 공개일자 2009년01월14일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0068952

(22) 출원일자 2007년07월10일

심사청구일자 2007년07월10일

(71) 출원인

의료법인제일의료재단

서울 중구 목정동 1-19

(72) 발명자

강영순

경기도 파주시 교하읍 와동리 월드메르디앙아파트 104동 306호

정미선

서울시 동작구 상도3동 327-6 덕운카운티빌 401호

(74) 대리인

이동기

전체 청구항 수 : 총 32 항

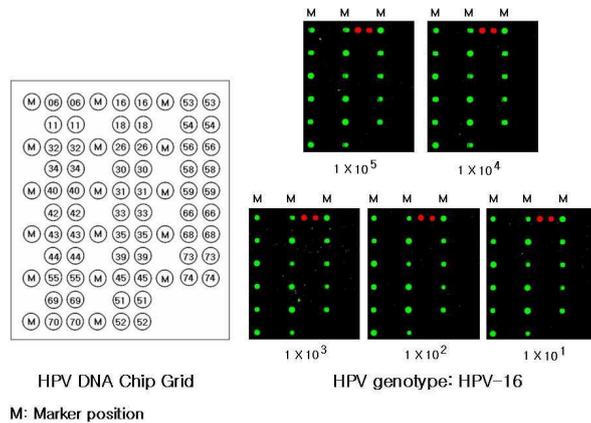
(54) 실시간 중합효소 연쇄반응과 HPV DNA 칩을 이용한정량 및 정성적 인유두종바이러스 검사 방법 및 이를 위한검사키트

(57) 요약

본 발명의 인유두종바이러스 검사방법은, 제1표지물질이 결합된 HPV 유전자 증폭용 프라이머 및 증폭되는 HPV 유전자와 관련하여 HPV 유전자 증폭량을 나타내는 제2표지물질을 이용하여 피검자의 HPV 유전자를 PCR 증폭하는 단계와, 상기 HPV 유전자의 증폭 후, 상기 제2표지물질을 이용하여 산출된 HPV 유전자 증폭량에 기초하여 HPV 바이러스 부하량을 산출하는 단계와, 상기 HPV 유전자에 대해 특이적인 HPV 프로브 염기서열을 준비하는 단계와, 상기 증폭된 HPV 유전자 산물과 상기 HPV 프로브 염기서열을 혼성화하는 단계와, 상기 제1표지물질을 검출하여 상기 증폭된 HPV 유전자 산물과 상기 HPV 프로브 염기서열의 혼성화여부를 검출하는 단계를 포함한다.

본 발명은 31종의 HPV 바이러스 부하를 정량할 수 있고, 31종의 HPV의 유전자형을 민감도와 특이도가 100%에 가깝도록 손쉽게 정확하게 검사할 수 있으며, 또한 재현성도 매우 높아 HPV에 의한 자궁경부암 전암 병변 및 자궁경부암의 양상과 위험 정도, 그리고 예후를 분석하는데 매우 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도15



특허청구의 범위

청구항 1

제1표지물질이 결합된 HPV 유전자 증폭용 프라이머 및 증폭되는 HPV 유전자와 관련하여 HPV 유전자 증폭량을 나타내는 제2표지물질을 이용하여 피검자의 HPV 유전자를 PCR 증폭하는 단계와,

상기 HPV 유전자의 증폭 후, 상기 제2표지물질을 이용하여 산출된 HPV 유전자 증폭량에 기초하여 HPV 바이러스 부하량을 산출하는 단계와,

상기 HPV 유전자에 대해 특이적인 HPV 프로브 염기서열을 준비하는 단계와,

상기 증폭된 HPV 유전자 산물과 상기 HPV 프로브 염기서열을 혼성화하는 단계와,

상기 제1표지물질을 검출하여 상기 증폭된 HPV 유전자 산물과 상기 HPV 프로브 염기서열의 혼성화여부를 검출하는 단계를 포함하는 인유두종바이러스 검사방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제2표지물질은 형광물질이고, 상기 제2표지물질로부터의 형광의 세기를 측정하여 상기 HPV 유전자의 증폭량을 산출하는 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스 검사방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

증폭 전 HPV 유전자의 카피수를 알고 있는 HPV 양성 표준자를 PCR 증폭하는 단계와,

상기 HPV 양성 표준자의 전체 PCR 증폭 기간에 대한 상기 제2표지물질의 형광세기의 변화를 측정하고, 일정한 형광세기에 도달하는 PCR 반응회수(Ct 값)를 분석하는 단계와,

상기 형광세기의 변화를 측정하여 얻어진 표준곡선으로부터 상기 HPV 양성 표준자의 카피수와 Ct 값을 대응시키는 단계와,

상기 피검자의 HPV 유전자의 전체 PCR 증폭 기간에 대한 상기 제2표지물질의 형광세기의 변화를 측정하고, 일정한 형광세기에 도달하는 PCR 반응회수(Ct 값)를 분석하는 단계와,

상기 피검자의 HPV 유전자를 PCR 증폭하여 얻은 Ct 값을 상기 HPV 양성 표준자의 카피수에 대응시켜 피검자의 HPV 바이러스 부하량을 측정하는 단계를 더 포함하는 인유두종바이러스 검사방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 HPV 양성 표준자는 클로닝된 HPV 유전자 절편과, HPV 유전자를 갖고 있지 않은 세포로부터 얻은 유전자 추출물의 HPV 유전자 음성 표준물질을 포함하는 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스 검사방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 HPV 양성 표준자의 HPV 유전자 절편은 서열번호 34 및 서열번호 35의 프라이머 쌍을 이용하여 클로닝되는 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스 검사방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 HPV 유전자 증폭용 프라이머는 상류 프라이머 및 하류 프라이머의 프라이머 쌍으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스 검사방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 제1표지물질은 상기 HPV 유전자 증폭용 프라이머 중 하류 프라이머의 5'말단에 결합된 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스 검사방법.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서,

상기 상류 프라이머는 서열번호 1의 염기서열을 갖고, 상기 하류 프라이머는 서열번호 2의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스 검사방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

적어도 1종의 HPV 유전자형 각각에 대해 특이적인 적어도 1종의 HPV 프로브 염기서열을 준비하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스 검사방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 증폭된 HPV 유전자 산물과 상기 특이적인 HPV 프로브 염기서열과의 혼성화를 상기 제1표지물질에 의해 검출하여 피검자의 HPV 유전자형을 결정하는 단계를 더 포함하는 인유두종바이러스 검사방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 HPV 유전자형은 HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18, HPV-26, HPV-30, HPV-31, HPV-32, HPV-33, HPV-34, HPV-35, HPV-39, HPV-40, HPV-42, HPV-43, HPV-44, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-53, HPV-54, HPV-55, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-66, HPV-68, HPV-69, HPV-70, HPV-73 및 HPV-74로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종인 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스 검사방법.

청구항 12

제1항, 제9항, 제10항, 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 HPV 프로브 염기서열은 서열번호 3 내지 서열번호 33으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종의 염기서열인 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스 검사방법.

청구항 13

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1표지물질은 형광물질인 Cy5이고, 상기 제2표지물질은 형광물질인 SYBR 그린 I(SYBR green I)인 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스 검사방법.

청구항 14

제1표지물질이 결합된 HPV 유전자 증폭용 프라이머, 증폭되는 HPV 유전자와 관련하여 HPV 유전자 증폭량을 나타내는 제2표지물질, DNA 중합효소, dNTPs 및 PCR 완충용액을 포함하는 피검자의 HPV 유전자를 PCR 증폭하는 수단과,

상기 HPV 유전자의 증폭 후, 상기 제2표지물질을 이용하여 산출된 HPV 유전자 증폭량에 기초하여 HPV 바이러스 부하량을 산출하는 수단과,

상기 HPV 유전자에 대해 특이적인 HPV 프로브 염기서열을 포함하고 상기 증폭된 HPV 유전자 산물과 상기 HPV 프로브 염기서열을 혼성화하는 챔버를 포함하는 HPV 유전자 검출 수단과,

상기 제1표지물질은 검출하여 상기 증폭된 HPV 유전자 산물과 상기 HPV 프로브 염기서열의 혼성화여부를 검출하는 수단을 포함하는 인유두종바이러스 검사키트.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 제2표지물질은 형광물질이고, 상기 HPV 바이러스 부하량을 산출하는 수단은 상기 제2표지물질로부터의 형광의 세기를 측정하여 상기 HPV 유전자의 증폭량을 산출하는 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스 검사방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 HPV 바이러스 부하량을 산출하는 수단은 증폭 전 HPV 유전자의 카피수를 알고 있는 HPV 양성 표준자를 포함하고, 또한,

증폭 전 HPV 유전자의 카피수를 알고 있는 HPV 양성 표준자를 PCR 증폭하는 수단과,

상기 HPV 양성 표준자의 전체 PCR 증폭 기간에 대한 상기 제2표지물질의 형광세기의 변화를 측정하고, 일정한 형광세기에 도달하는 PCR 반응회수(Ct 값)를 분석하는 수단과,

상기 형광세기의 변화를 측정하여 얻어진 표준곡선으로부터 상기 HPV 양성 표준자의 카피수와 Ct 값을 대응시키는 수단과,

상기 피검자의 HPV 유전자의 전체 PCR 증폭 기간에 대한 상기 제2표지물질의 형광세기의 변화를 측정하고, 일정한 형광세기에 도달하는 PCR 반응회수(Ct 값)를 분석하는 수단과,

상기 피검자의 HPV 유전자를 PCR 증폭하여 얻은 Ct 값을 상기 HPV 양성 표준자의 카피수에 대응시켜 피검자의 HPV 바이러스 부하량을 측정하는 수단을 더 포함하는 인유두종바이러스 검사키트.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 HPV 양성 표준자는 클로닝된 HPV 유전자 절편과, HPV 유전자를 갖고 있지 않은 세포로부터 얻은 유전자 추출물의 HPV 유전자 음성 표준물질을 포함하는 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스 검사키트.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 HPV 양성 표준자의 HPV 유전자 절편을 클로닝하기 위한 서열번호 34 및 서열번호 35의 프라이머 쌍을 더 포함하는 인유두종바이러스 검사키트.

청구항 19

제14항에 있어서,

상기 HPV 유전자 증폭용 프라이머는 상류 프라이머 및 하류 프라이머의 프라이머 쌍으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스 검사키트.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 제1표지물질은 상기 HPV 유전자 증폭용 프라이머 중 하류 프라이머의 5' 말단에 결합된 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스 검사키트.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서,

상기 상류 프라이머는 서열번호 1의 염기서열을 갖고, 상기 하류 프라이머는 서열번호 2의 염기서열을 갖는 것

을 특징으로 하는 인유두종바이러스 검사키트.

청구항 22

제14항에 있어서,

적어도 1종의 HPV 유전자형 각각에 대해 특이적인 적어도 1종의 HPV 프로브 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스 검사키트.

청구항 23

제22항에 있어서,

상기 증폭된 HPV 유전자 산물과 상기 특이적인 HPV 프로브 염기서열과의 혼성화를 상기 제1표지물질에 의해 검출하여 피검자의 HPV 유전자형을 결정하는 수단을 더 포함하는 인유두종바이러스 검사키트.

청구항 24

제23항에 있어서,

상기 피검자의 HPV 유전자형을 결정하는 수단은 HPV 프로브 염기서열이 부착되어 있는 마이크로어레이 칩 전용 스캐너이고, 상기 특이적인 HPV 프로브 염기서열에 결합된 HPV 유전자 산물의 5'말단에 부착되어 있는 제1표지물질의 발광을 분석함으로써 HPV 유전자형을 판독하는 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스 검사키트.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서,

상기 HPV 유전자형은 HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18, HPV-26, HPV-30, HPV-31, HPV-32, HPV-33, HPV-34, HPV-35, HPV-39, HPV-40, HPV-42, HPV-43, HPV-44, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-53, HPV-54, HPV-55, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-66, HPV-68, HPV-69, HPV-70, HPV-73 및 HPV-74로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종인 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스 검사키트.

청구항 26

제14항, 제22항, 제23항, 제24항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 HPV 프로브 염기서열은 서열번호 3 내지 서열번호 33으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종의 염기서열인 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스 검사키트.

청구항 27

제14항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1표지물질은 형광물질인 Cy5이고, 상기 제2표지물질은 형광물질인 SYBR 그린 I(SYBR green I)인 것을 특징으로 하는 인유두종바이러스 검사키트.

청구항 28

염기서열 1의 HPV 유전자 증폭용 상류 프라이머, 5'말단에 제1표지물질이 결합된 염기서열 2의 HPV 유전자 증폭용 하류 프라이머, 증폭되는 HPV 유전자와 관련하여 HPV 유전자 증폭량을 나타내는 제2표지물질, DNA 중합효소, dNTPs 및 PCR 완충용액을 포함하는 HPV 유전자 PCR 증폭키트.

청구항 29

제28항에 있어서,

상기 제1표지물질은 형광물질인 Cy5이고, 상기 제2표지물질은 형광물질인 SYBR 그린 I(SYBR green I)인 것을 특징으로 하는 HPV 유전자 PCR 증폭키트.

청구항 30

HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18, HPV-26, HPV-30, HPV-31, HPV-32, HPV-33, HPV-34, HPV-35, HPV-39, HPV-40,

HPV-42, HPV-43, HPV-44, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-53, HPV-54, HPV-55, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-66, HPV-68, HPV-69, HPV-70, HPV-73 및 HPV-74로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종의 HPV 유전자형에 대해 특이적인 HPV 프로브 염기서열로서, 서열번호 3 내지 서열번호 33으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종의 염기서열을 포함하는 HPV 유전자형 검사 칩.

청구항 31

제30항에 있어서,

상기 HPV 프로브 염기서열이 부착되는 기관과, 상기 기관에 결합되고 HPV 유전자와 HPV 프로브 염기서열이 혼성화되는 챔버를 더 포함하는 HPV 유전자형 검사 칩.

청구항 32

제31항에 있어서,

상기 HPV 프로브 염기서열은 일정한 간격과 배열로 상기 기관 상에 마이크로어레이되는 것을 특징으로 하는 HPV 유전자형 검사 칩.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

<1> 본 발명은 실시간(Real-time, 이하 "리얼 타임"으로 기재함) 증합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR) 방법과 올리고염기 마이크로어레이 칩(oligonucleotide microarray chip)을 이용하여 자궁경부암(Cervical cancer)을 유발하는 원인으로 알려진 인유두종바이러스(Human Papillomavirus: HPV, 이하 HPV로 기술함)의 바이러스 부하(viral load)를 정량화하고, HPV의 유전자형(genotype)을 정성적으로 판독하는 HPV DNA 검사 방법 및 이를 위한 검사키트에 관한 것이다.

<2> 보다 구체적으로는 본 발명은 리얼타임(Real-time) PCR을 수행하는 과정에서 두 가지의 서로 다른 형광물질이 PCR 산물에 부착되도록 고안하여 하나의 형광물질로는 HPV DNA의 바이러스 부하를 정량하고, 다른 하나의 형광물질로는 HPV DNA의 유전자형을 정성적으로 판독가능하게 하는 HPV DNA 검사 방법 및 이를 위한 검사키트에 관한 것이다.

배경기술

<3> 자궁경부암은 자궁경부(Cervix)에서 발생하는 악성 종양(malignant tumor)으로 전체 자궁암 발생 빈도의 95% 이상을 차지하고 있으며, 전 세계적으로 유방암(breast cancer)에 이어 여성에게 발생하는 악성종양 중 2번째로 흔한 암이다(Parkin MD, et al., rlay J., Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. Int. J. Cancer 2001; 94: 153-6). 우리나라의 경우 1995년 이후로 꾸준히 감소하고 있는 추세이긴 하나 2003년 한국 부인암 등록 사업 보고서 통계에 따르면 2000년도에 2,899명의 새로운 자궁경부암 환자가 발생하여 여전히 부인 암 중 1위를 차지하고 있다(대한산부인과학회 부인종양위원회. 한국 부인암 등록사업 조사 보고서. 대한산부인과학회지 2003; 46(2): 221-58).

<4> 자궁경부암과 그 전암병변의 일차 선별을 위해 전통적으로 사용되어온 검사는 George Papanicolau가 1943년에 도입한 자궁경부의 세포진 검사(Papanicolau cervical cytology test; PAP smear)이다. 이는 끝에 술이 붙은 면봉형 기구로 자궁경부를 스왑(swab)한 다음 현미경용 유리 슬라이드에 자궁경부 세포를 도말하여 그 세포학적 형태를 파악하는 검사로서 자궁경부암의 조기진단을 위하여 매우 효과적인 방법으로 인정받아 왔으며, 발병률과 사망률을 급격히 감소시키는 데에도 크게 기여하였다. 그러나 자궁경부 세포진 검사는 여러 문헌에서 15-50%의 높은 위음성율이 관찰되었으며(Fetherson WC. False negative cytology in invasive cancer of the cervix. Clin Obstet Gynecol 1983; 26: 929-35), 민감도와 예측도 또한 낮은 것으로 보고되었다(Dewar MA, et al., Cervical cancer screening. Past success and future challenge. Prim Care 1992; 19(3): 589-606).

<5> 1980년대에 이르러 분자생물학적 기술의 발전으로 HPV가 자궁경부암의 발생에 주요한 역할을 하는 것으로 확인됨에 따라(Lorincz AT, et al., Oncogenic association of specific human papillomavirus types with

cervical neoplasia. J. Natl. Cancer Inst 1987; 79(4): 671-7), 기존의 자궁경부 세포진 검사의 부정확성을 개선하기 위한 방안으로 HPV의 병태 생리학적 특성을 반영하고, 병의 진행, 치료 및 예후를 예측할 수 있는 새로운 세포진 검사의 분류체계의 필요성이 대두되었다. 이에 따라 1989년 The Bethesda System이 도입되었다 (National Cancer Institute Workshop. The 1989 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnosis. JAMA1989; 262:931-4). The Bethesda System은 상기한 기존 자궁경부 세포진 검사의 한계점을 보완하기 위해 HPV의 감염을 분류체계에 포함시켜 전암 단계에 대한 새로운 세포 진단학적 분류체계를 도입하였는데, 자궁경부암의 전암 병변을 정상과 구분하기 모호한 경우인 비정형 상피세포 이상증(atypical squamous cell of unknown significance, ASCUS), 저위험형 내지 저등급 편평상피내병변(low grade squamous intraepithelial lesion, LSIL), 고위험형 내지 고등급 편평상피내병변(high grade squamous intraepithelial lesion, HSIL) 등의 단계로 분류하였다.

- <6> 자궁경부 세포진 검사의 부정확성을 개선하기 위한 방안으로 자궁경부 확대경검사 및 조직생검 등 여러 가지 검사법들이 상호 보완적으로 사용되어 왔으며, 1992년에 HPV 검사를 시행하여 자궁경부암 및 전암병변 선별검사의 효용성을 높일 수 있다는 연구가 보고되었다(Cox JT, et al., An evaluation of human papillomavirus testing as part of referral to colposcopy clinics. Obstet Gynecol 1992; 80: 389).
- <7> HPV는 파포마 바이러스(papova virus) 계열에 속하는 DNA 바이러스로서 72개의 외각 단위단백질체(capsomer)로 이루어진 20면체이며 7,900 개의 염기서열이 이중 원형 DNA로 이루어져 있다. HPV는 게놈(genome)을 구성하고 있는 염기서열의 유사성에 따라 120 여종의 다른 아형으로 나누어진다. 이들 120 여종의 아형 중 30여 종이 하부 생식기에 감염되는 것으로 알려져 있으며, 자궁경부 상피내 종양과 자궁경부암을 유발하는 위험 정도에 따라 HPV-16, HPV-18, HPV-26, HPV-30, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-53, HPV-56, HPV-57, HPV-58, HPV-59, HPV-67, HPV-68, HPV-73, HPV-74 등의 고 위험군(high risk type)과 HPV-2a, HPV-3, HPV-6, HPV-10, HPV-11, HPV-32, HPV-34, HPV-40, HPV-42, HPV-43, HPV-44, HPV-54, HPV-55, HPV-61, HPV-69, HPV-70등의 저위험군(low risk type)으로 나누어진다(Munoz N et al., N Engl J Med, 2003, 348(6): 518-27).
- <8> HPV의 게놈 구조는 크게 초기전사부위 E (early gene region)와 후기전사부위 L (late gene region), 그리고 발현되지 않는 부위인 LCR (long control region)으로 나누어지며, HPV의 게놈 구조는 발병의 양상과 위험 정도, 예후에 커다란 영향을 끼친다. 특히 초기전사부위 중 E6와 E7 유전자는 HPV가 감염 세포의 게놈 내로 들어가 머물러 있는 동안 발현(expression)되어 발암에 가장 중요한 역할을 한다. 즉, HPV-16, -18 등의 고 위험군에 속하는 HPV의 E6와 E7 유전자는 종양억제유전자(tumor suppressor gene)인 p53과 rb(retinoblastoma) 유전자에서 발현되는 단백질들과 각각 결합하여 이들 단백질들을 불활성화시키며, 그 결과 세포주기(cell cycle)의 조절과 세포사멸(apoptosis) 기전이 저해됨으로써 자궁경부의 정상세포가 암세포로 변형된다. 이에 반해 HPV-6, HPV-11 등의 저위험군에 속하는 HPV의 경우 종양억제 유전자들에서 발현되는 단백질들을 불활성화시키는 능력이 떨어지므로 자궁경부암을 유발하기 어렵다(Barbosa M. S. et al., In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among HPVs of different oncogenic potential. J. Virol., 65: 292-298, 1991).
- <9> HPV-16, -18 등의 고 위험군에 속하는 HPV의 지속적인 감염은 자궁경부 상피내 종양 (Cervical intraepithelial neoplasia; CIN)과 자궁경부암 발생과 진행에 주요 원인이 되며, HPV 감염의 지속성은 바이러스 복제의 결과인 바이러스 부하 (viral load)의 양과 비례하는 것으로 알려져 있다(Cox JT, et al., Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of a typical squamous cells of undetermined significance. Am J Obstet Gynecol 1995; 172: 946-54.). HPV의 바이러스 부하의 정도와 자궁경부 병변의 조직학적 심각도 사이의 관계는 아직 확실하게 규명되지는 않았지만, 위험인자인 HPV의 바이러스 부하의 정도와 자궁경부 병변의 심각도가 비례 관계에 있고, HPV의 바이러스 부하가 높을수록 자궁경부암의 발생 가능성이 높은 것으로 보고되었다(Moberg M, et al., High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. Br J Cancer 2005; 92: 891-4). 따라서 HPV의 DNA를 정량적 방법으로 분석하여 자궁경부 상피내 종양의 발생 및 진행과의 연관성을 밝히기 위한 연구가 많이 시행되어져 왔고, 진행된 병변일수록 높은 바이러스 부하를 가지며, 이것이 병변의 크기와 진행 정도를 예측하는 데 도움을 줄 수 있다고 보고된 바 있다(Abba MC, et al., Association of human papillomavirus viral load with HPV16 and high grade intraepithelial lesion. Int J Gynecol Cancer 2003; 13: 154-8).
- <10> HPV가 자궁경부암의 발생에 주요한 역할을 하는 것으로 확인되고, 또한 HPV검사가 자궁경부 세포진 검사 보다 자궁경부암의 선별 정확도가 더 높은 것으로 보고된 이후 최근 약 10년 사이에 자궁경부 세포 검체에서 HPV의

감염 유무뿐만 아니라 더 나아가 그 유전자형 또는 감염된 HPV의 부하를 정량하여 고 위험군 HPV의 감염 여부를 확인하여 자궁경부암의 발병위험을 예측하려는 시도가 이루어져 왔다.

- <11> 현재 널리 시행되고 있는 HPV의 검사방법은 크게 HPV 감염의 유무 및 그 유전자형을 분석하는 정성적 방법(qualitative method)과 HPV 감염의 유무 및 바이러스 부하의 정도를 측정하는 정량적 방법(quantitative method) 두 가지로 나눌 수 있다.
- <12> HPV의 검사방법 중에서 전자에 속하는 HPV 감염의 유무 및 그 유전자형을 분석하는데 사용하고 있는 정성적(qualitative) 검사 방법은 크게 세 가지로 나눌 수 있다.
- <13> 그 중 첫 번째 검사 방법은 생식기에서 발생하는 것으로 알려진 각각의 HPV 유전자형의 게놈들 중 염기서열이 가장 유사하게 잘 보존되어 있는 부위인 주요 바이러스 캡시드(viral capsid) L1 유전자나 E6 및 E7 유전자를 소위 공통된 프라이머(general primer)를 이용하여 PCR 방법으로 증폭한 다음 전기영동(electrophoresis) 등으로 확인하는 방법이다. 그러나, 이는 HPV 감염의 유무만을 파악할 수 있을 뿐 감염된 HPV의 유전자형은 알 수 없으며, 검출된 HPV가 고 위험군에 속하는지 혹은 저 위험군에 속하는지도 알 수 없다. 이외에도 PCR 방법을 기본으로 하여, 각각의 HPV 유전자형 별로 다양한 크기의 PCR 산물이 생성되도록 한 다음 이를 전기영동 하는 방법, 서던블로팅(Southern blotting) 방법, 제한효소 단편 길이 다양성 분석(Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP) 방법, 역혼성화 분석법(reverse hybridization line blot detection method) 등의 방법을 이용할 수도 있으나 상기 방법들은 노동집약적이고 자동화시키기 힘들며, 분석할 수 있는 유전자형이 한정적이라는 단점이 있다.
- <14> 정성적(qualitative) 검사 방법의 두 번째는 PCR을 시행한 후 이를 직접 염기서열 분석(direct sequencing analysis)하는 방법이다. 염기서열 분석 방법은 HPV 유전자형의 분석에 있어 가장 정확한 표준적 검사(golden standard test) 방법이다. 그러나 염기서열 분석 방법은 한 번 내지 두 번의 검사로 한가지의 검체만을 검사할 수 있으며, 시간과 비용이 많이 들고 노동집약적이어서 일상적으로 사용하기에는 어렵다는 단점이 있다. 또한, 하나 이상의 HPV 유전자형이 복합적으로 감염되어 있을 경우 이를 각각 클로닝(cloning)하여 그 염기서열을 분석해야 하는 단점도 있다.
- <15> 정성적(qualitative) 검사 방법의 세 번째는 올리고염기 마이크로어레이 칩을 이용하는 방법으로서 마이크로어레이 칩(Microarray Chip)은 최근 분자생물학적 기술과 전자공학적 기술의 접목을 통해 한 장의 슬라이드에 수십에서 수만 종류의 유전자를 동시에 검사할 수 있는 방법이다. 이에 최근 HPV를 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 HPV DNA 마이크로어레이 칩의 개발이 널리 시도되고 있다. 그러나 기존의 마이크로어레이 칩을 이용한 HPV DNA 검사 방법들은 주로 PCR 반응 후의 산물을 HPV DNA 칩에 혼성화하여 단순히 유전자형만을 식별하는 종말점 분석(end-point analysis)방법이다. 하지만 PCR 과정은 DNA 증폭율이 일정하고 재현성이 높은 기하급수적 단계(exponential phases)를 지나 PCR에 필요한 성분이 점점 고갈되기 시작하면서 증폭율이 감소하기 시작하여 DNA 양이 산술적으로 증가하는 선형 단계(linear phases)를 거쳐 PCR이 멈추는 시기로 재현성이 가장 낮은 안정 단계(plateau phases)로 진행된다. 따라서, 기존의 통상적인 PCR 방법은 실험재료 내의 목적하는 DNA를 극미량까지 검출할 수 있다는 장점이 있는 반면에 위양성 결과를 나타낼 수 있다는 단점을 가지고 있다. 또한 PCR 증폭 산물이 반드시 원래의 주형량(Amount of template)을 반영하는 것이 아니기 때문에 증폭된 산물로부터 주형의 양을 측정하기에는 적합하지 않아 HPV의 바이러스 부하를 정확하게 정량할 수 없다는 한계점을 가지고 있다.
- <16> 상기한 HPV의 검사방법 중 후자에 속하는 HPV 감염의 유무 및 바이러스 부하의 정도를 측정하는데 사용되고 있는 기존의 정량적 검사 방법은 하이브리드 캡처 II 시스템(Hybrid Capture II system)(Digene Diagnostics, Inc. USA)과 실시간 중합효소 연쇄반응(Real-time Polymerase Chain Reaction; Real-time PCR)을 이용하는 방법으로 나누어진다.
- <17> 정량적 검사 방법 중 첫 번째 방법인 하이브리드 캡처 II 시스템(Hybrid Capture II system)은 화학발광 검출(chemiluminescent detection) 방법을 이용하는 것으로서, 자궁경부 세포에서 추출한 DNA에 고 위험군 HPV의 RNA 프로브 혼합물(high risk HPV RNA probe cocktail or mixture) 및 저 위험군 HPV의 RNA 프로브 혼합물(Low risk HPV RNA probe cocktail or mixture)을 혼성화하여 RNA-DNA 중합체를 만든 다음, 이를 시험관에 부착되어 있는 1차 면역 항체에 결합시키고 여기에 다시 2차 면역항체와 화학발광물질을 첨가한 다음 그 발광량의 정도를 측정 후 양성 및 음성 대조군에 대한 발광량과 샘플의 발광량의 상대적인 수치를 분석함으로써 HPV DNA를 정량하는 방법이다(Impramin C. Abstract presented at 92nd General meeting of the American Society of Microbiology. 1992). 그러나 하이브리드 캡처 II 시스템(Hybrid Capture II system)은 각각의 유전자형에 대응하는 프로브(probe)가 혼합되어 있어 각각의 HPV 유전자형은 알 수 없다는 단점이 있다. 또한, 중합효소 연쇄

반응 방법으로 증폭시키지 않기 때문에 검사의 민감도가 떨어지는 단점도 있다.

- <18> 정량적 검사 방법 중 두 번째 방법인 리얼타임(Real-time) PCR 방법은 PCR 장치(thermal cycler)와 분광형광광도계(spectrophotometer)가 일체화된 장치로 PCR 과정 후 PCR 산물의 확인을 위한 전기영동과정 없이 실시간으로 PCR 증폭산물의 생성과정을 모니터링하여 초기에 투입된 DNA의 양을 분석하는 방법이다. 보다 구체적으로 리얼타임(Real-time) PCR 방법은 형광물질(fluorescent material)을 PCR 기법에 응용한 것으로 반응 중 검체 내에 존재하는 목적 유전자의 증폭과 함께 형광물질의 발광(emission) 정도를 실시간으로 검출하고 정량 분석하여 목적 유전자의 증폭 유무 및 그 양상을 신속하고 정확하게 분석할 수 있는 방법이다. 리얼타임(Real-time) PCR 방법은 크게 TaqMan 프로브를 이용하는 방법과 SYBR 그린 I(SYBR Green I)을 사용하는 방법으로 나누어진다.
- <19> TaqMan 프로브를 이용한 리얼타임(Real-time) PCR은 일반 PCR과 같이 2개의 프라이머를 이용하는 원리는 같으나 형광물질이 화학적으로 결합되어 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하여야 한다. TaqMan 프로브는 5' 말단에는 리포터(reporter) 형광물질로서 FAM 등을 부착하고, 3' 말단에는 리포터(reporter) 형광물질의 형광을 상쇄시키는 소광물질(quencher)로서 형광물질인 TAMRA등을 부착한 것이다. TaqMan 프로브를 PCR 반응액에 첨가하면 TaqMan 프로브는 PCR 과정 중 주형과의 결합반응(annealing)으로 주형 DNA에 결합되지만 리포터 및 소광물질의 상쇄작용에 의해 형광이 감지되지 않으며, PCR 과정 중 Taq DNA 폴리머라제(Taq DNA polymerase)에 의한 신장반응(extension)시 Taq DNA 폴리머라제의 5' → 3' 엑소뉴클레아제(exonuclease) 활성으로 주형에 혼성화된 TaqMan 프로브가 분해되면 형광물질 FAM이 유리됨으로써 소광물질(quencher)에 의한 상쇄가 해제되어 형광을 발하게 되며, 검출되는 형광의 양을 분석하여 증폭산물의 생성량을 측정할 수 있다.
- <20> SYBR 그린 I(SYBR Green I)을 이용한 리얼타임(Real-time) PCR은 전체 형광을 모니터링하는 방법이다. 이는 이중가닥(double strand) DNA 사슬에 결합(interchelating)되는 원리를 이용하는 것으로서 PCR 반응에 형광물질로서 SYBR 그린 I(SYBR Green I)을 첨가하여 PCR 산물의 증폭과 함께 발색하는 형광의 양을 검출함으로써 증폭산물의 생성량을 측정할 수 있으며, 또한 증폭 DNA의 용해온도를 측정할 수 있다.
- <21> 최근 TaqMan 프로브를 이용한 리얼타임(Real-time) PCR 방법으로 HPV DNA의 바이러스 부하를 정량하는 방법이 개발된 바 있다(Tucker RA, et al., Real-time PCR-based fluorescent assay for quantitation of human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18. Mol Diagn. 2001 Mar;6(1):39-47, Fujii T, et al., Comparison between in situ hybridization and real-time PCR technique as a means of detecting the integrated form of human papillomavirus 16 in cervical neoplasia. Diagn Mol Pathol. 2005 Jun;14(2):103-8, Guo M, et al., Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. Mod Pathol. 2007 Feb;20(2):256-66.). 그러나, 상기한 TaqMan 프로브를 이용한 리얼타임(Real-time) PCR 방법들은 HPV-6, -16, -18 등 소수 특정 HPV 유전자형에 특이적인 TaqMan 프로브를 제작한 것으로서, 특정 HPV 유전자형의 바이러스 부하의 정량만이 가능하다. 따라서 여러 HPV 유전자형의 바이러스 부하를 정량하기 위해서는 각각의 특정 HPV 유전자형에 특이적인 TaqMan 프로브를 제작하여야 하므로 프로브의 제작 과정이 복잡할 뿐만 아니라 제작비용도 상당히 고가여서 일상적으로 사용하기에는 용이하지 않다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <22> 본 발명은 상기한 기존의 HPV 검사 방법이 가지고 있는 여러 문제점을 극복하고, 자궁경부암(Cervical cancer)을 유발하는 원인으로 알려진 HPV의 바이러스 부하 정량과 HPV의 유전자형 분석이 모두 가능하며, 누구나 간편하게 이용할 수 있는 HPV DNA 검사 방법 및 이를 위한 검사키트를 개발하고자 안출되었다.
- <23> 본 발명의 목적은 31종의 HPV DNA를 정확하고, 효율(efficiency)이 높게 동시에 증폭시킬 수 있는 프라이머를 제공하는데 있다.
- <24> 본 발명의 또 다른 목적은 여러 종의 HPV DNA의 유전자형을 높은 특이도와 민감도로 분석할 수 있는 프로브를 제공하는데 있다.
- <25> 본 발명의 또 다른 목적은 리얼타임(Real-time) PCR 방법으로 정확하고 효율(efficiency)이 높게 HPV의 바이러스 부하를 정량하는데 필요한 HPV DNA 양성 표준자(positive standard)와 HPV DNA 음성 대조군(negative control)을 제공하는데 있다.

- <26> 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 프로브를 포함하는 HPV DNA 유전자형 분석용 올리고뉴클레오티드 마이크로어레이(oligonucleotide microarray) DNA 칩(chip)을 제공하는 것이다.
- <27> 본 발명의 또 다른 목적은 자궁경부 샘플 채취 기구, 자궁경부 세포내 DNA 추출 시약, 추출된 DNA의 유효성을 평가하기 위한 시약, 상기한 프라이머, 프로브, HPV DNA 양성 표준물질, HPV DNA 음성 표준물질, 및 상기한 리얼타임(Real-time) PCR과 HPV DNA 칩과 관련된 모든 시약을 포함하는 정량 및 정성적 HPV DNA 검사 키트를 제공하는데 있다.
- <28> 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 자궁경부 샘플 채취 기구, 자궁경부 세포내 DNA 추출 시약, 상기한 프라이머, 프로브, HPV DNA 양성 표준물질, HPV DNA 음성 표준물질, 및 상기한 리얼타임(Real-time) PCR과 HPV DNA 칩과 관련된 키트 및 리얼타임(Real-time) PCR 장치와 HPV DNA 칩을 이용하여 HPV DNA를 정량 및 정성적으로 검사할 수 있는 방법을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

- <29> 상기한 발명의 기술적 과제를 해결하고 상기한 발명의 목적에 부합되도록 예의 연구를 거듭한 결과, 본 발명은 리얼타임(Real-time) PCR과 올리고뉴클레오티드 마이크로어레이(oligonucleotide microarray) DNA 칩(chip) 기술을 접목함으로써 보다 저렴하고 신속하게, 그리고 정확하고 재현성이 높게 HPV의 바이러스 부하를 정량하고 또한 동시에 HPV의 유전자형을 판독할 수 있는 HPV DNA 검사방법을 완성하게 되었다.
- <30> 본 발명의 인유두종바이러스 검사방법은, 제1표지물질이 결합된 HPV 유전자 증폭용 프라이머 및 증폭되는 HPV 유전자와 관련하여 HPV 유전자 증폭량을 나타내는 제2표지물질을 이용하여 피검자의 HPV 유전자를 PCR 증폭하는 단계와, 상기 HPV 유전자의 증폭 후, 상기 제2표지물질을 이용하여 산출된 HPV 유전자 증폭량에 기초하여 HPV 바이러스 부하량을 산출하는 단계와, 상기 HPV 유전자에 대해 특이적인 HPV 프로브 염기서열을 준비하는 단계와, 상기 증폭된 HPV 유전자 산물과 상기 HPV 프로브 염기서열을 혼성화하는 단계와, 상기 제1표지물질을 검출하여 상기 증폭된 HPV 유전자 산물과 상기 HPV 프로브 염기서열의 혼성화여부를 검출하는 단계를 포함한다.
- <31> 본 발명의 일실시예의 인유두종바이러스 검사방법은, 증폭 전 HPV 유전자의 카피수를 알고 있는 HPV 양성 표준자를 PCR 증폭하는 단계와, 상기 HPV 양성 표준자의 전체 PCR 증폭 기간에 대한 상기 제2표지물질의 형광세기의 변화를 측정하고, 일정한 형광세기에 도달하는 PCR 반응회수(Ct 값)를 분석하는 단계와, 상기 형광세기의 변화를 측정하여 얻어진 표준곡선으로부터 상기 HPV 양성 표준자의 카피수와 Ct 값을 대응시키는 단계와, 상기 피검자의 HPV 유전자의 전체 PCR 증폭 기간에 대한 상기 제2표지물질의 형광세기의 변화를 측정하고, 일정한 형광세기에 도달하는 PCR 반응회수(Ct 값)를 분석하는 단계와, 상기 피검자의 HPV 유전자를 PCR 증폭하여 얻은 Ct 값을 상기 HPV 양성 표준자의 카피수에 대응시켜 피검자의 HPV 바이러스 부하량을 측정하는 단계를 더 포함한다.
- <32> 본 발명의 일실시예에서는 적어도 1종의 HPV 유전자형 각각에 대해 특이적인 적어도 1종의 HPV 프로브 염기서열을 준비하는 단계를 포함하고, 증폭된 HPV 유전자 산물과 특이적인 HPV 프로브 염기서열과의 혼성화를 제1표지물질에 의해 검출하여 피검자의 HPV 유전자형을 결정할 수 있다.
- <33> 본 발명의 인유두종바이러스 검사키트는, 제1표지물질이 결합된 HPV 유전자 증폭용 프라이머, 증폭되는 HPV 유전자와 관련하여 HPV 유전자 증폭량을 나타내는 제2표지물질, DNA 중합효소, dNTPs 및 PCR 완충용액을 포함하는 피검자의 HPV 유전자를 PCR 증폭하는 수단과, 상기 HPV 유전자의 증폭 후, 상기 제2표지물질을 이용하여 산출된 HPV 유전자 증폭량에 기초하여 HPV 바이러스 부하량을 산출하는 수단과, 상기 HPV 유전자에 대해 특이적인 HPV 프로브 염기서열을 포함하고 상기 증폭된 HPV 유전자 산물과 상기 HPV 프로브 염기서열을 혼성화하는 챔버를 포함하는 HPV 유전자 검출 수단과, 상기 제1표지물질을 검출하여 상기 증폭된 HPV 유전자 산물과 상기 HPV 프로브 염기서열의 혼성화여부를 검출하는 수단을 포함한다.
- <34> 본 발명의 HPV 유전자 PCR 증폭키트는 염기서열 1의 HPV 유전자 증폭용 상류 프라이머, 5' 말단에 제1표지물질이 결합된 염기서열 2의 HPV 유전자 증폭용 하류 프라이머, 증폭되는 HPV 유전자와 관련하여 HPV 유전자 증폭량을 나타내는 제2표지물질, DNA 중합효소, dNTPs 및 PCR 완충용액을 포함한다.
- <35> 본 발명의 HPV 유전자 검사 칩은 HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18, HPV-26, HPV-30, HPV-31, HPV-32, HPV-33, HPV-34, HPV-35, HPV-39, HPV-40, HPV-42, HPV-43, HPV-44, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-53, HPV-54, HPV-55, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-66, HPV-68, HPV-69, HPV-70, HPV-73 및 HPV-74로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종의 HPV 유전자형에 대해 특이적인 HPV 프로브 염기서열로서, 서열번호 3 내지 서열번호 33으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종의 염기서열을 포함한다.

- <36> 본 발명의 일실시예의 HPV 유전자 검사 칩은 상기 HPV 프로브 염기서열이 부착되는 기관과, 상기 기관에 결합되고 HPV 유전자와 HPV 프로브 염기서열이 혼성화되는 챔버를 더 포함할 수 있다.
- <37> 본 발명의 일실시예에서, 제1표지물질은 형광물질인 Cy5이고, 제2표지물질은 형광물질인 SYBR 그린 I(SYBR green I)일 수 있지만, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아니고 당업계에 알려진 방사성 물질 또는 발광성 물질 등 다양한 표지물질이 사용될 수 있다.
- <38> 본 발명의 일실시예에서, HPV 양성 표준자는 클로닝된 HPV 유전자 절편과, HPV 유전자를 갖고 있지 않은 세포로부터 얻은 유전자 추출물의 HPV 유전자 음성 표준물질을 포함할 수 있다. HPV 양성 표준자의 HPV 유전자 절편은 서열번호 34 및 서열번호 35의 프라이머 쌍을 이용하여 클로닝될 수 있다.
- <39> 본 발명의 일실시예에서, HPV 유전자 증폭용 프라이머는 상류 프라이머 및 하류 프라이머의 프라이머 쌍으로 이루어질 수 있고, 제1표지물질은 HPV 유전자 증폭용 프라이머 중 하류 프라이머의 5'말단에 결합될 수 있다. 상기 상류 프라이머는 서열번호 1의 염기서열을 갖고, 상기 하류 프라이머는 서열번호 2의 염기서열을 갖는 것이 바람직하다.
- <40> 본 발명의 일실시예에서, 검사대상이 되는 HPV 유전자형은 HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18, HPV-26, HPV-30, HPV-31, HPV-32, HPV-33, HPV-34, HPV-35, HPV-39, HPV-40, HPV-42, HPV-43, HPV-44, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-53, HPV-54, HPV-55, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-66, HPV-68, HPV-69, HPV-70, HPV-73 및 HPV-74로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종인 것을 특징으로 한다.
- <41> 본 발명의 일실시예에서, HPV 프로브 염기서열은 서열번호 3 내지 서열번호 33으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종의 염기서열인 것을 특징으로 한다.
- <42> 본 발명의 일실시예에서는, 마이크로어레이 칩 전용 스캐너를 이용하여, 특이적인 HPV 프로브 염기서열에 결합된 HPV 유전자 산물의 5'말단에 부착되어 있는 제1표지물질의 발광을 분석함으로써 HPV 유전자형을 관독할 수 있다.
- <43> 구체적으로 본 발명은 다음과 같은 단계로 이루어져 있다.
- <44> **제 1단계: HPV 유전자형 공통 프라이머(general primer)의 선별 및 합성**
- <45> 본 발명의 목적에 따라 31종의 HPV 유전자형 각각의 DNA와 결합 효율(binding efficiency)이 높고, 정확하며, 또한 재현성이 높게 증폭할 수 있는 HPV DNA 공통 프라이머(general primer)를 하기와 같이 고안하였다.
- <46> 미국 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 데이터베이스로부터 HPV-6, -11, -16, -18, -26, -30, -31, -32, -33, -34, -35, -39, -40, -42, -43, -44, -45, -51, -52, -53, -54, -55, -56, -58, -59, -66, -68, -69, -70, -73, -74의 총 31가지 HPV 유전자형의 전체 DNA 염기서열을 확보하였다. 확보된 31종의 HPV DNA 염기서열을 컴퓨터 프로그램 DNASTAR Lagergene 7.1(DNASTAR Inc.)를 이용하여 ClustalW 방법으로 쌍정렬(pairwise alignment) 및 다중서열정렬(multiple sequence alignment)을 실행하여 상기 31종의 HPV 유전자형의 증폭이 모두 가능한 HPV 유전자형 공통 상류(forward) 및 하류(reverse) 프라이머(general primer)를 최종적으로 선별하였으며, 이를 올리고염기 합성기를 이용하여 합성하였다. 특히 GPM7 하류 프라이머는 5'말단에 형광물질인 Cy5를 부착하여 합성하였다(후술하는 실시예 1 참조).
- <47> **제 2단계: HPV 유전자형 특이(specific) 프로브(probe)의 선별 및 합성**
- <48> 본 발명의 목적에 따라 31종의 HPV 유전자형에 특이적(specific)인 프로브(probe)를 하기와 같이 고안하였다.
- <49> 미국 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 데이터베이스로부터 HPV-6, -11, -16, -18, -26, -30, -31, -32, -33, -34, -35, -39, -40, -42, -43, -44, -45, -51, -52, -53, -54, -55, -56, -58, -59, -66, -68, -69, -70, -73, -74의 총 31가지 HPV 유전자형의 전체 DNA 염기서열을 확보하였다. 확보된 31종의 HPV DNA 염기서열을 컴퓨터 프로그램 DNASTAR Lagergene 7.1(DNASTAR Inc.)를 이용하여 ClustalW 방법으로 쌍정렬(pairwise alignment) 및 다중서열정렬(multiple sequence alignment)을 실행하였다. 그 결과, 상기 31종의 HPV DNA 유전자형에 특이적인 프로브를 최종적으로 선별하였으며, 선별된 31종의 HPV DNA 특이 프로브를 알데하이드가 코팅된 슬라이드에 부착시키기 위하여 상기 프로브의 5'말단에 아민(amine)기를 부착하였고, HPV DNA 칩에 부착되어 있는 HPV DNA 특이 프로브와 PCR 증폭산물의 결합력을 보강하기 위하여 5'의 아민기 다음에 10개의 티민(thymine) 염기를 부착하였다. 상기 프로브들은 올리고염기 합성기를 이용하여 합성하였다(후술하는 실시예 2 참조).

<50> **제 3단계: HPV DNA 음성 대조군의 준비**

<51> 본 발명의 목적에 따라 리얼타임(Real-time) PCR 방법으로 정확하고 효율(efficiency)이 높게 HPV DNA의 바이러스 부하를 정량하는데 필요한 HPV DNA 음성 대조군(negative control; NTC)을 하기와 같이 고안하였다.

<52> HPV가 검출되지 않는 것으로 알려진 HPV 음성대조군 세포주(cell line) MG-63(ATCC, CRL-1427)을 제조사의 지시에 따라 배양하고, 0.25% 트립신 용액을 가하여 배양 접시로부터 탈락시킨 다음 인산완충용액(Dulbecco's phosphate-buffered saline, Gibco Inc.)으로 1회 세척한 후 DNA 추출용 완충용액과 프로테이나제 K(proteinase K)을 가하여 12 시간 동안 반응시켜 DNA를 추출한 다음 농도를 측정하여 HPV DNA 음성 표준물질로 활용하였다(후술하는 실시예 3 참조).

<53> **제 4단계: HPV DNA 양성 표준자의 준비**

<54> 본 발명의 목적에 따라 리얼타임(Real-time) PCR 방법으로 정확하고 효율(efficiency)이 높게 HPV DNA의 바이러스 부하를 정량하는데 필요한 HPV DNA 양성 표준자(positive standard; STD)를 하기와 같이 고안하였다.

<55> **1) HPV DNA 양성 표준자 제작용 HPV-16 DNA 절편의 획득**

<56> HPV-16 양성으로 확인된 CaSki 세포주(ATCC, CRL-1550)를 제조사의 지시에 따라 배양하고, DNA를 추출한 다음 추출한 DNA를 주형으로 하여 6,945 bp에 달하는 HPV-16 DNA 절편 획득용 상류 및 하류 프라이머를 사용하여 PCR을 시행하였으며, PCR 산물을 플라스미드 벡터에 접합(Ligation)하고 이를 박테리아에 형질전환(transformation)시켰다. 형질전환된 박테리아를 배양한 뒤 박테리아로부터 플라스미드 DNA를 분리정제한 다음 제한효소를 처리하여 다시 HPV-16 DNA 절편을 획득한 다음 농도를 측정하여 카피(copy) 수를 산출하였다(후술하는 실시예 4 참조).

<57> **2) HPV DNA 양성 표준자의 제작**

<58> 본 발명의 검사 대상인 환자의 자궁경부 검체는 DNA 추출 시 어떠한 정제 과정도 거치지 않으므로 증류수에 손수하게 녹아 있는 상태인 6,945 bp의 HPV-16 DNA 절편을 HPV DNA 양성 표준자로 사용하여 환자 샘플 내에 존재하는 HPV의 바이러스 부하를 정량하기에는 부적절하다. 이에 본 발명자는 상기 문제점을 극복하고 HPV DNA 양성 표준자의 상태를 환자 샘플의 상태와 유사하게 구현하기 위하여 HPV-16 DNA 절편에 상기에서 획득한 HPV DNA 음성 표준물질을 추가하여 환자 샘플과 유사한 환경을 가지는 HPV DNA 양성 표준자를 제작하였다(후술하는 실시예 4 참조).

<59> **제 5 단계: HPV 유전자형 분석용 HPV DNA 칩의 제작**

<60> 본 발명의 목적에 따라 HPV DNA의 유전자형을 높은 특이도와 민감도로 분석할 수 있는 프로브를 포함하는 HPV 유전자형 분석용 HPV DNA 칩을 하기와 같이 고안하였다.

<61> 5' 말단에 아민기(amine, -NH₂)와 10개의 티민(thymine) 염기를 부착시킨 31종의 HPV DNA 특이 프로브에 스폿팅 용액(spottting solution)을 첨가한 다음 슬라이드의 표면이 알데하이드기(aldehyde, -CHO)로 코팅된 유리 슬라이드를 8-웰(8-well) 혼성화용 챔버에 적합하도록 8개 구역으로 분할한 다음 1 구역 당 상기의 31종 HPV DNA 특이 프로브를 일정한 간격과 배열로 상기 유리 슬라이드에 부착하였으며, 상기 프로브에 결합된 증폭 산물의 위치를 확인할 수 있도록 양성 대조군용 형광물질(Cy3)을 부착시켰다(후술하는 실시예 5 참조).

<62> **제 6단계: HPV DNA 검사키트의 제작**

<63> 본 발명의 리얼타임(Real-time) PCR과 HPV DNA 칩을 이용한 정량 및 정성적 HPV DNA 검사키트는 하기와 같은 시약 및 기구로 구성되어 있으며, 이를 키트화하면 다량의 검체에 대한 HPV의 바이러스 부하 정량 및 HPV 유전자형 판독을 시간과 노력을 줄이며 손쉽게 할 수 있는 바, 본 발명의 보호 범위에는 HPV DNA 검사 키트 역시 포함된다(후술하는 실시예 6 참조):

- <64> 1) 자궁경부 세포 채취 기구;
- <65> 2) 채취된 자궁경부 세포로부터 DNA를 추출하기 위한 시약;
- <66> 3) 추출된 DNA의 유효성 판정용 시약;
- <67> 4) 프라이머, 형광물질, HPV DNA 음성 표준물질, HPV DNA 양성 표준자 및 PCR 완충용액 등을 포함하는 리얼타임(Real-time) PCR용 시약; 및

<68> 5) 프로브를 포함하는 HPV DNA 칩 및 관련 시약.

<69> **제 7단계: HPV의 바이러스 부하 정량과 HPV의 유전자형 판독**

<70> 본 발명의 자궁경부 세포 채취 기구, 채취된 자궁경부 세포로부터 DNA를 추출하기 위한 시약, 추출된 DNA의 유효성 판정용 시약, 리얼타임(Real-time) PCR용 시약, HPV DNA 칩 및 관련 시약들을 포함하는 HPV DNA 검사 키트와 리얼타임(Real-time) PCR 장치, DNA 칩용 스캐너(scanner)를 이용하여 HPV의 바이러스 부하를 정량하고 HPV의 유전자형을 판독하는 방법을 하기와 같이 고안하였다.

<71> 본 발명의 방법은 구체적으로 4가지 과정으로 나눌 수 있는데, 첫 번째는 자궁경부로부터 자궁경부세포를 채취하여 DNA를 추출하는 과정, 두 번째는 추출된 자궁경부세포 DNA의 유효성을 평가하는 과정, 세 번째는 추출된 DNA를 대상으로 리얼타임(Real-time) PCR을 시행하여 HPV의 바이러스 부하를 정량하는 과정, 그리고 네 번째는 제작한 HPV DNA 칩 키트를 이용하여 HPV의 유전자형을 판독하는 과정으로 이루어져 있다.

<72> 구체적으로, 본 발명의 리얼타임(Real-time) PCR과 HPV DNA 칩을 이용한 정량 및 정성적 HPV DNA 검사 방법은 하기와 같은 단계들로 구성된다:

- <73> 1. 자궁경부로부터 자궁경부세포를 채취하여 DNA를 추출하는 단계;
- <74> 2. 추출된 자궁경부세포 DNA의 유효성을 평가하는 단계;
- <75> 3. 리얼타임(Real-time) PCR 장치를 이용하여 HPV의 바이러스 부하를 정량하는 단계; 및
- <76> 4. HPV DNA 칩과 스캐너를 이용하여 HPV의 유전자형을 분석하는 단계.

효 과

<77> 본 발명은 실시간 증합효소 연쇄반응(Real-time Polymerase Chain Reaction; Real-time PCR) 방법과 올리고염기 마이크로어레이 칩(oligonucleotide microarray chip)을 이용하여 인유두종바이러스(Human papillomavirus: HPV)의 바이러스 부하(viral load)를 정량할 수 있을 뿐만아니라 HPV의 유전자형을 높은 특이성과 민감도로 판독할 수 있다.

<78> 구체적으로, 본 발명의 HPV DNA 검사 방법은 31종의 HPV 바이러스 부하를 정량할 수 있고, 31종의 HPV의 유전자형을 민감도와 특이도가 100%에 가깝도록 손쉽게 정확하게 검사할 수 있으며, 또한 재현성도 매우 높아 HPV에 의한 자궁경부암 전암 병변 및 자궁경부암의 양상과 위험 정도, 그리고 예후를 분석하는데 매우 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<79> 이하, 본 발명을 구현한 일실시예를 나타낸 표, 도면 및 실험예를 참조하여 본 발명에 따른 HPV DNA의 바이러스 부하 정량 및 HPV의 유전자형 판독을 포함하는 HPV DNA 검사 방법에 대해 보다 상세하게 설명한다. 하기의 도면 및 설명은 본 발명을 제한하는 것이 아니며, 본 발명은 청구 범위에 기재된 사항을 바탕으로 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 여러 가지 치환, 변형 및 변경이 가능함은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 명백할 것이다.

<80> **실시예 1 HPV DNA 유전자형 공통 프라이머의 선별 및 합성**

<81> 본 발명의 목적에 따라 31종의 HPV DNA 유전자형 전부를 정확하고, 주형과의 결합 효율(binding efficiency)이 높게 증폭할 수 있는 HPV DNA 공통 프라이머를 하기와 같이 제작하였다.

<82> 1) 공통 프라이머의 선별

<83> 미국 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 데이터베이스로부터 HPV-6, -11, -16, -18, -26, -30, -31, -32, -33, -34, -35, -39, -40, -42, -43, -44, -45, -51, -52, -53, -54, -55, -56, -58, -59, -66, -68, -69, -70, -73, -74의 총 31가지 HPV DNA 유전자형의 전체 DNA 염기서열을 확보하였다. 확보된 31종의 HPV DNA 염기서열을 컴퓨터 프로그램 DNASTAR Lagergene 7.1(DNASTAR Inc.)를 이용하여 ClustalW 방법으로 쌍정렬(pairwise alignment) 및 다중서열정렬(multiple sequence alignment)을 실행하였으며, 상기 31종의 HPV DNA 유전자형의 증폭이 모두 가능한 HPV DNA 유전자형 공통 프라이머(general primer)를 최종적으로 선별하여 이를 GPM7 상류 프라이머(서열번호 1), GPM7 하류 프라이머(서열번호 2)로 각각 명명하였다(표 1).

<84> 표 1: HPV 공통 PCR 프라이머 염기서열 구조

프라이머 명	염기서열 구조 (5' → 3')
GPM7F	AGTGGTCATCCWTTTWAATAAAATTKGATGA
GPM7R	CCAWAGCCWGTATCWACCATRTCACCATC

<86> 2) 선별된 GPM7 상류 및 하류 프라이머의 합성

<87> 상기 과정에서 선별된 GPM7 상류 및 하류 프라이머를 올리고 뉴클레오티드 포스포르아미다이트 합성화학에 근거한 고체상 합성기법을 탑재하고 있는 Expedite™ 8909 핵산 합성기(ABI 사)를 이용하여 합성하였으며, 특히 GPM7 하류 프라이머는 5' 말단에 형광물질인 Cy5를 부착하였다. 합성반응은 올리고뉴클레오티드 3' 말단에 위치한 뉴클레오사이드를 고정시킨 CPG 컬럼에서 수행하였으며, 기본적으로 디트리틸레이션(detritylation), 커플링(coupling), 캡핑(capping), 산화(oxidation) 반응을 반복주기로 하여 선별된 PCR 프라이머의 올리고뉴클레오티드 중합반응을 수행하였다. 합성 종료 후 30% 암모니아수를 CPG 컬럼에 가하여 상기 올리고머를 격리시킨 다음 55℃에서 12시간 이상 탈보호(deprotection)시켜 고속진공(Speed Vac.)으로 농축 건조하였으며 다시 역상액체크로마토그래피 및 음이온교환 크로마토그래피를 수행하여 순수 정제하였다. 최종 정제된 올리고머는 260nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

<88> 실시예 2 HPV DNA 유전자형 특이 프로브의 선별 및 합성

<89> 본 발명의 목적에 따라 31종의 HPV DNA 유전자형에 특이적인 프로브를 하기와 같이 제작하였다.

<90> 1) HPV DNA 유전자형 특이 프로브의 선별

<91> 미국 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 데이터베이스로부터 HPV-6, -11, -16, -18, -26, -30, -31, -32, -33, -34, -35, -39, -40, -42, -43, -44, -45, -51, -52, -53, -54, -55, -56, -58, -59, -66, -68, -69, -70, -73, -74의 총 31가지 HPV DNA 유전자형의 전체 DNA 염기서열을 확보하였다. 확보된 31종의 HPV DNA 염기서열을 컴퓨터 프로그램 DNASTAR Lagergene 7.1(DNASTAR Inc.)를 이용하여 ClustalW 방법으로 쌍정렬(pairwise alignment) 및 다중서열정렬(multiple sequence alignment)을 실행하였으며, 상기 31종의 HPV DNA 유전자형에 특이적인 프로브(서열번호 3 내지 서열번호 33)를 최종적으로 선별하였다(표 2).

<92> 표 2: HPV DNA 유전자형 특이 프로브의 염기서열 구조

프로브 명	염기서열 구조 (5' → 3')
HPV-6	TGGTGGTAACCCCTGGACAGGATA
HPV-11	GTATGGTGGTAATCCTGGTCAGG
HPV-16	TTATGCAGCAAATGCAGGTGTGG
HPV-18	CGCCACGTCTAATGTTTCTGAGG
HPV-26	GGCTACTGTAAATGCAGACTG
HPV-30	AGCTAATCAGGATACAGCAGAGG
HPV-31	ATATGCCGGTGGTCTGGCACTG
HPV-32	ATATGCTGCAGGGCTGGAAGT
HPV-33	GTATCCTGGACAACCGGTGCTG
HPV-34	ATATATTGGTGGAAACATAGCAG
HPV-35	ATATGTTGGTAACTCTGGTAACT
HPV-39	TTCATCAACCACCAATAAGGACAG
HPV-40	CTATGGCACAGGTCCGGGGCAGG
HPV-42	ATATGGTGGAGGCCCTGGTACAG
HPV-43	GTATGGCACATCGCCGGGACAAG
HPV-44	TTATGCAGCCGGTCCGGGTCAGG
HPV-45	AGCTACAGCTGTTATTACGCAGG
HPV-51	AGCAAATGGCAATGCACAACAAG
HPV-52	ATATGCTGGTAAACCTGGTATAG
HPV-53	AGCTATTGAGGATACTGCCCCGG
HPV-54	ATATGTTGGTGCAGGAGCTGACA

HPV-55	TTATGCAGCCAGTCCAGGTCAGG
HPV-56	AGCAAATAATAATGTTATAGAAG
HPV-58	ATATCCCGCACAGCCAGGGTCTG
HPV-59	AGCATCTGCTGTTGATACCAAAG
HPV-66	AGCAGGTAATAATGTTATAGAAG
HPV-68	TTCTCTAATAAAAAATCCTAAAG
HPV-69	TGCCACTGCTAATGCAGACACTG
HPV-70	TCTCATTTTTCTCTGCTGTTAG
HPV-73	ATACATTGCTGGACAAAATACAG
HPV-74	TTATGCAGCTAATCCTGGTCAGG

<94> 2) 선별된 HPV DNA 특이 프로브의 합성

<95> 상기 과정에서 선별된 31종의 HPV DNA 특이 프로브를 알데하이드가 코팅된 슬라이드에 부착시키기 위하여 5' 말단에 아민기를 부착하였으며, HPV DNA 칩에 부착되어 있는 HPV DNA 특이 프로브와 PCR 증폭산물의 결합력을 보강하기 위하여 5'의 아민기 다음에 10개의 티민(thymine) 염기를 부착하여 프로브를 합성하였다. 합성반응은 올리고뉴클레오티드 3' 말단에 위치한 뉴클레오사이드를 고정시킨 CPG 컬럼에서 수행하였으며, 기본적으로 디트리틸레이션(detritylation), 커플링(coupling), 캡핑(capping), 산화(oxidation) 반응을 반복주기로 하여 선별된 프로브의 올리고뉴클레오티드 중합반응을 수행하였다. 합성 종료 후 30% 암모니아수를 CPG 컬럼에 가하여 상기 프로브를 격리시킨 다음 55℃에서 12시간 이상 탈보호(deprotection)시켜 고속진공(Speed Vac.)으로 농축 건조하였으며 다시 역상액체크로마토그래피 및 음이온교환 크로마토그래피를 수행하여 순수 정제하였다. 최종 정제된 프로브는 260nm에서 흡광도를 측정하여 농도가 100 pmol/μl이 되도록 하였다.

<96> 실시예 3 HPV DNA 음성 대조군 제작

<97> 본 발명의 목적에 따라 리얼타임(Real-time) PCR 방법으로 정확하고 효율(efficiency)이 높게 HPV DNA의 바이러스 부하를 정량하는데 필요한 HPV DNA 음성 대조군(negative control)을 하기와 같이 제작하였다.

<98> HPV DNA 음성 대조군(negative control)의 제작

<99> HPV DNA가 검출되지 않는 것으로 알려진 HPV DNA 음성대조군 세포주(negative control cell line) MG-63 세포주(ATCC, CRL-1427)를 제조사의 지시에 따라 배양하였다. 0.25% 트립신 용액을 가하여 배양 접시로부터 세포들을 탈락시킨 다음 인산완충용액(Dulbecco's phosphate-buffered saline; PBS)으로 1회 세척하였다. 그런 다음, 현미경하에서 세포수를 계측한 후 세포들을 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 침전시킨 다음 상층액을 제거하였다. 펠렛(pellet)을 다시 0.5 ml 인산완충용액에 부유시킨 다음 1.5 ml 튜브로 옮기고, 세포들을 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 침전시킨 후 상층액을 제거하였다. 그런 다음, 펠렛에 200μl 세포 용해완충용액(10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 2.5mM MgCl₂, 0.5% Tween20, pH8.3)과 프로테이나제 K(proteinase K, 50 μg/ml)를 첨가하여 55℃ 항온조에서 12 시간 동안 반응시킨 후 95℃에서 10분간 가온하여 프로테이나제 K를 불활성화시켰다. MG-63 세포주에서 추출한 DNA는 분광광도계(spectrophotometer)로 그 농도를 측정한 다음 500 ng/μl의 농도가 되도록 조정하였으며, 이를 1/10으로 희석하여 HPV DNA 음성 표준물질(negative control)로 활용하였다.

<100> 실시예 4 HPV DNA 양성 표준자(positive standard; STD) 제작

<101> 본 발명의 목적에 따라 리얼타임(Real-time) PCR 방법으로 정확하고 효율(efficiency)이 높게 HPV DNA의 바이러스 부하를 정량하는데 필요한 HPV DNA 양성 표준자(positive standard)를 하기와 같이 제작하였다.

<102> 1) HPV-16 양성 대조군 CaSki 세포주 DNA 추출

<103> HPV-16 양성 대조군 CaSki 세포주(ATCC, CRL-1550)를 제조사의 지시에 따라 배양하였다. 0.25% 트립신 용액을 가하여 배양 접시로부터 세포들을 탈락시킨 다음 PBS로 1회 세척하였다. 그런 다음, 현미경하에서 세포수를 계측한 후 세포들을 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 침전시킨 다음 상층액을 제거하였다. 펠렛을 다시 0.5 ml 인산완충용액에 부유시킨 다음 1.5 ml 튜브로 옮기고, 세포들을 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 침전시켜 상층액을 제거하였다. 그런 다음, 펠렛에 200μl 세포 용해완충용액(10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 2.5mM MgCl₂, 0.5% Tween20, pH8.3)과 프로테이나제 K를 첨가하여 55℃ 항온조에서 12 시간 동안 반응시킨 후 95℃에서 10분간 가온하여 프로테이나제 K를 불활성화시켰다. CaSki 세포주에서 추출한 DNA는 분광광도계로 그 농도를 측정

다음 50 ng/ μ l의 농도가 되도록 조정하였다.

<104> 2) HPV DNA 양성 표준자 제작용 프라이머의 선별 및 합성

<105> 미국 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 데이터베이스로부터 확보한 HPV-16의 전체 염기 서열을 대상으로 하여 프라이머 제조에 널리 사용되는 프로그램인 primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)를 이용하여 HPV DNA 양성 표준자 제작용 상류 프라이머(서열번호 34)와 하류 프라이머(서열번호 35)를 선별하였다. PCR 산물을 플라스미드 벡터(pBacPAK9)(Clontech lab. Inc.)에 삽입(Ligation)하기 위하여 상류 프라이머의 5' 말단에 제한효소 XbaI 절단 인식 서열 (GCTCTAGAGC), 하류 프라이머의 5' 말단에 제한효소 Pac I 절단 인식 서열(CCTTAATTAAGG)을 추가하여 HPV DNA 양성 표준자 제작용 상류 및 하류 프라이머로 제작하였다(표 3). 실시예 1의 2)에서 기술한 바와 같은 뉴클레오티드 합성 방법에 따라 HPV DNA 양성 표준자 제작용 상류 및 하류 프라이머를 합성하였다.

<106> 3) HPV-16 DNA 절편 획득 및 클로닝(cloning)

<107> 상기 실시예 4의 1)에서 추출한 HPV-16 양성 대조군 CaSki 세포주의 DNA를 대상으로, 상기 2)에서 합성된 HPV DNA 양성 표준자 제작용 상류 및 하류 프라이머를 이용하여 PCR을 시행한 다음 PCR 산물을 0.8% 아가로스젤에 전기영동하여 6,945 bp의 HPV-16 DNA 절편이 생성되었음을 확인하였다(도 1). 6,945 bp의 HPV-16 DNA 절편과 5.5 kb의 플라스미드 벡터 pBacPAK9을 각각 제한효소 XbaI(New England Biolabs, Inc.), PacI(New England Biolabs, Inc.)으로 이중 절단한 다음 플라스미드 벡터 pBacPAK9에 PCR 산물을 접합(ligation)시키고, 이를 플라스미드 수용 박테리아 세포(competent cell)(INV aF', Invitrogen Co.)에 형질전환(transformation)시켰다. 형질 전환된 박테리아를 배양한 뒤 박테리아로부터 플라스미드 DNA를 분리정제하여 6,945 bp의 HPV-16 DNA 절편과 5.5 kb의 플라스미드 벡터 pBacPAK9가 접합되었음을 확인하였다(도 1). 상기 HPV-16 DNA 절편과 플라스미드 벡터 pBacPAK9의 접합체를 제한효소 Xba I과 Pac I으로 이중 절단하여 다시 6,945 bp의 HPV-16 DNA 절편을 회수한 다음 분광광도계로 농도를 측정하여 카피(copy) 수를 산출하였다.

<108> 4) HPV DNA 양성 표준자의 제작

<109> 본 발명의 검사 대상인 환자의 자궁경부 검체는 DNA 추출 시 어떠한 정제 과정도 거치지 않으므로 증류수에 순수하게 녹아 있는 상태인 6,945 bp의 HPV-16 DNA 절편을 HPV DNA 양성 표준자로 사용하여 환자 샘플 내에 존재하는 HPV의 바이러스 부하를 정량하기에는 부적절하다. 이에 본 발명자는 상기 문제점을 극복하고 HPV DNA 양성 표준자의 상태를 환자 샘플의 상태와 유사하게 구현하기 위하여 HPV-16 DNA 절편에 실시예 3에서 획득한 HPV DNA 음성 표준물질을 추가하여 환자 샘플과 유사한 환경을 가지는 HPV DNA 양성 표준자를 하기와 같이 제작하였다.

<110> 실시예 4의 3)에서 제작된 6,945 bp의 HPV-16 DNA 절편을 일정한 간격으로 희석하고 여기에 실시예 3의 HPV DNA 음성 표준물질을 일정량 혼합하면 환자 검체와 유사한 조건을 가지면서 일정 간격의 HPV 카피 수(copy number)를 갖는 HPV DNA 양성 표준자가 제작된다. 즉 5×10^8 카피/ μ l의 HPV-16 DNA 단편을 10배 간격으로 희석하여 5×10^7 카피/ μ l, 5×10^6 카피/ μ l, 5×10^5 카피/ μ l, 5×10^4 카피/ μ l, 5×10^3 카피/ μ l, 5×10^2 카피/ μ l, 5×10^1 카피/ μ l의 농도로 희석한 다음, 희석하지 않은 원래의 5×10^8 카피/ μ l의 HPV 양성 DNA 단편과 각각의 상기 희석액 50 μ l에 500 ng/ μ l의 농도를 가진 HPV DNA 음성 표준물질 50 μ l를 가한 다음 증류수 400 μ l를 가한다. 이로써 각각의 HPV-16 DNA 단편 및 HPV 음성 표준물질을 10배씩 희석하게 되므로, 각각 5×10^8 카피/10 μ l, 5×10^7 카피/10 μ l, 5×10^6 카피/10 μ l, 5×10^5 카피/10 μ l, 5×10^4 카피/10 μ l, 5×10^3 카피/10 μ l, 5×10^2 카피/10 μ l, 5×10^1 카피/10 μ l의 HPV DNA 카피수를 갖는 HPV-16 DNA 표준 양성 물질을 수득할 수 있게 된다.

<111> 표 3: HPV DNA 양성 표준자 제작용 상류 및 하류 프라이머의 염기서열 구조

프라이머 명	염기서열 구조 (5' → 3')
STDF	GCTCTAGAGCCAGCTCAGAGGAGGAGGATG ^{*1}
STDR	CCTTAATTAAGGTCAGGAAAACAGGGATTGG ^{*2}

<112> *1. 밑줄친 염기서열은 제한효소 Xba I(GCTCTAGAGC)의 절단 인식 부위를 나타낸다.

- <114> *2. 밑줄친 염기서열은 제한효소 Pac I(CCTTAATTAAGG)의 절단 인식 부위를 나타낸다.
- <115> 실시예 5 HPV 유전자형 분석용 HPV DNA 칩 제작
- <116> 본 발명의 목적에 따라 HPV DNA의 유전자형을 높은 특이도와 민감도로 분석할 수 있는 프로브를 포함하는 HPV DNA 유전자형 분석용 올리고뉴클레오티드 마이크로어레이(oligonucleotide microarray) DNA 칩(chip)을 하기와 같이 제작하였다.
- <117> 상기 실시예 2의 2)에서 제작한 31종의 HPV DNA 특이 프로브(100pmol/μl) 20μl에 스폿팅 용액(spotting solution)을 20μl씩 첨가하여 농도가 50pmol/μl이 되도록 균일하게 혼합하였다. 슬라이드의 표면이 알데하이드기로 코팅된 유리 슬라이드(Luminano, Inc.)를 준비하고, 8-well 혼성화 챔버(Coverwell perfusion chamber, Gracebio Inc.)를 이용하여 상기 유리 슬라이드를 8개 구역으로 분할하였다. 상기 8개의 구역에 1 구역 당 50 pmol/μl의 농도로 맞춰진 31종의 HPV DNA 특이 프로브를 마이크로어레이어(microarrayer)를 이용하여 일정한 간격과 배열로 상기 유리 슬라이드에 부착하였다. 상기 31종의 HPV DNA 특이 프로브들은 1종 마다 2개씩 부착시키고, 상기 프로브에 결합된 증폭 산물의 위치를 확인할 수 있도록 형광물질 Cy3가 부착되어 있는 형광 양성 대조 균을 부착시켰으며, 사용시까지 건조한 암실에서 보관하였다(도 2).
- <118> 실시예 6 리얼타임(Real-time) PCR과 올리고염기 마이크로어레이 칩을 이용한 인유두종바이러스의 정성 및 정량적 검사 방법에 필요한 검사키트의 제작
- <119> 본 발명의 목적에 따라 각 과정에서 필요한 시약과 기구들을 편리하게 사용 할 수 있게 하기 위하여, 자궁경부로부터 세포를 채취하기 위한 자궁경부검체 채취 기구와, 상기 세포로부터 DNA를 추출하기 위한 세포용해완충용액(lysis buffer)과, 상기 추출 DNA의 유효성을 검증하기 위한 인체 베타-글로빈(Human β-globin: HBB)과, 유전자 증폭을 위한 시약과, 실시간으로 유전자의 증폭량을 분석하기 위한 리얼타임(Real-time) PCR 키트와, 상기의 증폭 산물을 HPV DNA 칩에 혼성화시키는데 필요한 시약을 포함하는 검사용 키트를 제작하였다(도 4).
- <120> 상기한 자궁경부검체 채취 기구, 세포용해완충용액, 인체 베타-글로빈(Human β-globin: HBB), 유전자 증폭을 위한 시약, 실시간으로 유전자의 증폭량을 분석하기 위한 리얼타임(Real-time) PCR 키트, 증폭 산물을 HPV DNA 칩에 혼성화시키는데 필요한 시약을 포함하는 검사용 키트는 하기와 같은 시약, 기구 및 장치로 구성되어 있다.
- <121> **1) 자궁경부에서의 세포 채취 기구**
- <122> ① 자궁경부 세포 채취용 스푼 100 (도 3) EA
- <123> ② 인산완충식염수를 포함하는 운반 용기 (도 3) 100 EA
- <124> **2) DNA 추출 및 DNA 유효성 확인 시약 (도 5, 도 6)**
- <125> ① 세포용해액(lysis buffer) 20 ml 및 프로테이나제 K(proteinase K 50 mg/ml) 0.1 ml
- <126> ② 인체 베타글로빈 유전자 증폭 확인용 5X HBB 믹스(mix) 0.1 ml
- <127> **3) HPV DNA 바이러스 부하 정량을 위한 HPV 리얼타임(Real-time) PCR 키트 (도 6)**
- <128> ① HPV DNA 증폭용 상류 프라이머 GPM7F(10 pmol/μl) 0.1 ml
- <129> ② 형광물질인 Cy5가 부착된 HPV DNA 증폭용 하류 프라이머 GPM7R(10 pmol/μl) 0.1 ml
- <130> ③ PCR 완충용액 (50 mM Tris-HCl pH8.3, 250 mM KCl, 7.5 mM MgCl₂), 0.2 I.U.의 Taq 폴리머라제, dNTPs 및 형광물질인 SYBR 그린 I(SYBR Green I)이 포함되어 있는 2X 프리믹스(pre mix) 2.5 ml
- <131> ④ HPV DNA 양성 표준자(Standard: STD, 5 X 10⁸ 카피/μl) 0.05 ml
- <132> ⑤ HPV DNA 음성 대조군(HPV negative control: NTC, 500 ng/μl) 0.5 ml
- <133> ⑥ 3X 증류수 4 ml
- <134> **4) HPV DNA 유전자형을 분석하기 위한 HPV DNA 칩 키트 (도 7)**
- <135> ① 31종의 HPV DNA 프로브가 부착된 유리 슬라이드 15장
- <136> ② 8구역으로 분할되어 있는 실리콘 재질의 혼성화 챔버(Coverwell perfusion chamber, Gracebio Inc.) 15장

- <137> ③ 수소화붕소나트륨(Sodium borohydride) 용액 300 ml
- <138> ④ 20X SSC 100 ml
- <139> ⑤ 20% SDS 100 ml
- <140> 상기의 키트를 사용하여 자궁경부로부터 채취된 세포에서 DNA를 오염 없이 간편하게 추출한 다음 리얼타임(Real-time) PCR을 이용하여 HPV의 바이러스 부하를 정량하고, HPV의 유전자형을 HPV DNA 칩으로 판독하는데 약 8시간이 소요된다. 또한, 한 장의 HPV DNA 칩 슬라이드로 환자 8명의 검체를 동시에 검사할 수 있다. 따라서, 본 발명의 리얼타임(Real-time) PCR과 HPV DNA 칩을 이용한 HPV의 정량 및 정성적 검사 방법에 필요한 검사키트는 HPV DNA의 바이러스 부하의 정량 및 HPV의 유전자형을 판독하는 검사 방법에 유용하게 사용될 수 있다.
- <141> 본 발명의 HPV 부하의 정량 및 유전자형을 판독하는 검사 방법은, HPV DNA 공통 프라이머(GPM7F, GPM7R), HPV DNA 양성 표준자, HPV DNA 음성 표준물질을 포함하는 리얼타임(Real-time) PCR 키트와, 자궁경부 세포 채취 기구 및 DNA 추출용 세포용해액 등을 포함하는 HPV DNA 키트와, 31종의 HPV DNA 유전자형 특이 프로브가 부착되어 있는 유리 슬라이드 및 혼성화 챔버를 포함하는 HPV DNA 칩과, 실시간 유전자 증폭(Real-time PCR) 장치와, HPV DNA 칩 분석용 스캐너(scanner)를 이용하여 수행한다.
- <142> 본 발명의 HPV DNA 검사방법은 구체적으로 자궁경부로부터 자궁경부 세포를 채취하여 DNA를 추출하는 과정과, 추출된 자궁경부세포 DNA의 유효성을 평가하는 과정과, 추출된 DNA를 대상으로 리얼타임(Real-time) PCR을 시행하여 HPV의 바이러스 부하를 정량하는 과정과, HPV DNA 칩 키트를 이용하여 HPV의 유전자형을 분석하는 과정을 포함한다. 아래의 실시예들에서는 리얼타임(Real-time) PCR과 HPV DNA 칩을 이용한 인유두종바이러스의 정량 및 정성적 검사 방법을 살펴본다.
- <143> 실시예 7 HPV DNA 양성 및 음성 대조군 및 환자 자궁경부 세포의 채취와 보관
- <144> HPV DNA 양성 및 음성 대조군 세포주와 환자 자궁경부 세포의 채취와 보존은 하기와 같은 방법으로 실시하였다.
- <145> HPV DNA 양성 세포주인 것으로 확인된 CaSki 세포주(HPV 16, ATCC, CRL-1550) 및 HeLa 세포주(HPV 18, ATCC, CCL-2)와, HPV DNA가 검출되지 않는 MG-63(ATCC, CRL-1427) 세포주를 미국 ATCC 사(Manassas, VA20108, USA)로부터 구입하여 제조사의 지시에 따라 배양하였다. 배양 종료 후 0.25% 트립신 용액을 가하여 배양 접시로부터 세포들을 탈락시킨 다음 얻어진 세포들을 인산완충용액(Dulbecco's phosphate-buffered saline, Gibco Inc.)으로 1회 세척하고 트립판 블루(Trypan blue)로 염색하여 정확한 세포 수를 측정하였다. 그런 다음, 3,000 rpm으로 10분간 세포들을 원심분리하여 침전시킨 다음 상층액을 제거하고 이를 다시 0.5 ml 인산완충용액에 부유시킨 다음 1.5 ml 튜브로 옮겼다. 그리고, 3,000 rpm으로 10분간 세포들을 원심분리하여 침전시킨 다음 상층액을 제거하여 얻어진 펠렛(pellet)을 DNA 추출시까지 -70 °C에서 보관하였다.
- <146> 환자 자궁경부 세포는 자궁경부세포 채취 술(도 3)을 이용하여 임상환자 5명의 자궁경부로부터 채취하여 5ml 인산완충용액이 담겨져 있는 15 ml 보관용기(도 3)에 넣고 술의 끝 부분을 절단한 후 마개를 닫아 실험실로 운반하였다. 자궁경부세포 채취 술이 들어 있는 용기를 2분 동안 강력하게 교반하여 술에 붙어 있는 세포가 인산완충용액에 떨어져 나오도록 하였다. 그리고, 3,000 rpm으로 10분간 세포들을 원심분리하여 침전시킨 다음 상층액을 제거하고 이를 다시 0.5 ml 인산완충용액에 부유시킨 다음 1.5 ml 튜브로 옮겼다. 그리고 나서, 3,000 rpm으로 10분간 세포들을 원심분리하여 침전시킨 다음 상층액을 제거하여 얻어진 펠렛을 DNA 추출시까지 -70 °C에서 보관하였다.
- <147> 실시예 8 HPV DNA 양성 및 음성 대조군 및 환자 자궁경부 세포로부터 DNA 추출
- <148> 상기 실시예 7의 HPV DNA 양성 대조군인 CaSki 세포주 및 HeLa 세포주, HPV DNA 음성 대조군인 MG-63 세포주, 임상환자 자궁경부에서 채취한 세포 등의 펠렛에 실시예 6의 2)의 ①에서 제작한 세포용해액 및 프로테이나제 K(proteinase K 50 µg/ml)를 첨가하여 55°C 항온조에서 12 시간 동안 반응시킨 후 95°C에서 10분간 가온하여 프로테이나제 K(proteinase K)의 활성도를 제거하였으며, 실험에 사용하기 전까지 -20 °C에서 보관하였다.
- <149> 실시예 9 추출된 HPV DNA의 유효성 평가
- <150> 실시예 8에서 추출된 HPV DNA 양성 표준자의 유효성 평가를 하기와 같은 방법으로 실시하였다.
- <151> 1) 인체 베타글로빈 유전자의 증폭
- <152> 500µl PCR 튜브에서, 실시예 8에서 추출한 DNA 5µl에 인체 베타글로빈 유전자의 상류 프라이머(서열번호 36) 및

하류 프라이머(서열번호 37) 각각 10pmol, PCR 완충용액(50 mM Tris-HCl pH8.3, 250 mM KCl, 7.5 mM MgCl₂), 0.2 I.U.의 Taq 폴리머라제를 포함하고 있는 5X HBB 믹스(mix) 10 μl를 첨가한 후 증류수로 총 부피가 50μl가 되도록 하였다. 혼합과 원심분리과정을 거친 후 95℃에서 4분 동안 가온한 다음 95℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 30초의 반복되는 과정을 35회 실시하고, 마지막회는 72℃에서 7분 동안 더 가온하였다. PCR 반응 종료 후 5μl를 취하여 DNA 사이즈 스탠더드 마커(size standard marker)와 함께 2% 아가로스 겔(agarose gel)에 전기영동하였다. 전기영동이 종료된 다음 아가로스 겔을 0.00005% 에티디움 브로마이드(ethidium bromide) 용액으로 염색한 다음 이미지 분석장치(image analyzer)에 의해 인체 베타글로빈 유전자의 증폭여부를 확인하였다(도 8).

<153> 도 8은 HPV DNA 양성 대조군인 CaSki 세포주 및 HeLa 세포주, 임상환자 자궁경부에서 채취한 세포, HPV DNA 음성 대조군인 MG-63 세포주에서 추출한 DNA를 주형으로 하여 인체 베타 글로빈 유전자의 일부를 PCR한 후 PCR 산물을 전기영동한 사진이다. 도면에서 M은 사이즈 마커 (Size marker; 2-Log DNA ladder, NEB Inc.)이고, 레인 1은 HPV DNA 양성 대조군인 CaSki 세포주(HPV 16), 레인 2는 HPV DNA 양성 대조군인 HeLa 세포주(HPV 18), 레인 3은 임상 환자 1에서 채취한 검체, 레인 4는 임상 환자 2에서 채취한 검체, 레인 5는 임상 환자 3에서 채취한 검체, 레인 6는 임상 환자 4에서 채취한 검체, 레인 7은 임상 환자 5에서 채취한 검체, 레인 8은 HPV DNA 음성 대조군인 MG-63 세포주, 레인 9은 PCR 음성 대조군으로서 PCR의 주형을 DNA가 아닌 3X 증류수로 대체한 PCR 음성 대조군의 PCR 결과이다.

<154> 도 8에서 확인할 수 있는 바와 같이, HPV DNA 양성 대조군인 CaSki 세포주(레인 1) 및 HeLa 세포주 (레인 2), 임상환자 자궁경부에서 채취한 세포(레인 3, 4, 5, 6, 7), HPV DNA 음성 대조군인 MG-63(레인 8)에서 추출한 DNA에서는 인체 베타 글로빈의 증폭산물이 존재함을 관찰할 수 있으나, 3X 증류수를 사용한 PCR 음성 대조군(레인 9)에서는 HPV DNA의 증폭산물이 관찰되지 않았다.

<155>

<156> 표 4: 인체 베타 글로빈 유전자 PCR 프라이머 염기서열 구조

<157>

프라이머 명	염기서열 구조 (5' → 3')	PCR 생성물 길이
HBBF	GGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTA	200 bp
HBBR	ACATCAAGCGTCCCATAGACTCAC	200 bp

<158> 2) HPV DNA의 증폭

<159> 500μl PCR 튜브에서, 실시예 8에서 추출된 DNA 5μl에 형광물질 Cy5가 부착된 HPV DNA 증폭용 하류 프라이머 GPM7R(서열번호 2) 10pmol, HPV DNA 증폭용 상류 프라이머 GPM7F(서열번호 1) 10pmol, PCR 완충용액(50 mM Tris-HCl pH8.3, 250 mM KCl, 7.5 mM MgCl₂), 0.2 I.U.의 Taq 폴리머라제를 첨가한 후 증류수로 총 부피가 50 μl가 되게 하였다. 혼합과 원심분리과정을 거친 후 95℃에서 4분 동안 가온한 다음 95℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 30초의 반복되는 과정을 35회 실시하고, 마지막회는 72℃에서 7분 동안 더 가온하였다. PCR 반응 종료 후 5μl를 취하여 DNA 사이즈 스탠더드 마커(size standard marker)와 함께 2% 아가로스 겔(agarose gel)에 전기영동하였다. 전기영동이 종료된 다음 아가로스 겔을 0.00005% 에티디움 브로마이드(ethidium bromide) 용액으로 염색한 다음 이미지 분석장치(image analyzer)로 HPV 유전자의 증폭여부를 확인하였다(도 9).

<160> 도 9는 HPV DNA 양성 대조군인 CaSki 세포주 및 HeLa 세포주, 임상환자 자궁경부에서 채취한 세포, HPV DNA 음성 대조군인 MG-63에서 추출한 DNA를 주형으로 하여 HPV 공통 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 수행한 후 PCR 산물을 전기영동한 사진이다. 도면에서 M은 사이즈 마커 (Size marker; 2-Log DNA ladder, NEB Inc.)이고, 레인 1은 HPV DNA 양성 대조군인 CaSki 세포주(HPV 16), 레인 2는 HPV DNA 양성 대조군인 HeLa 세포주(HPV 18), 레인 3은 임상 환자 1에서 채취한 검체, 레인 4는 임상 환자 2에서 채취한 검체, 레인 5는 임상 환자 3에서 채취한 검체, 레인 6는 임상 환자 4에서 채취한 검체, 레인 7은 임상 환자 5에서 채취한 검체, 레인 8은 HPV DNA 음성 대조군인 MG-63 세포주, 레인 9은 PCR 음성 대조군으로서 PCR의 주형을 DNA가 아닌 3X 증류수로 대체한 PCR 음성 대조군의 PCR 결과이다.

<161> 도 9에서 확인할 수 있는 바와 같이, HPV DNA 양성 대조군인 CaSki 세포주(레인 1) 및 HeLa 세포주 (레인 2), 임상환자 자궁경부에서 채취한 세포(레인 3, 4, 5, 6, 7)에서는 HPV DNA의 증폭산물이 관찰되었으나, HPV DNA 음성 대조군인 MG-63(레인 8)에서 추출한 DNA와 3X 증류수를 사용한 PCR 음성 대조군(레인 9)에서는 어떠한 HPV

DNA의 증폭산물도 관찰되지 않았다.

<162> 실시예 10 리얼타임(Real-time) PCR을 이용하여 HPV의 바이러스 부하를 정량하는 방법

<163> 본 발명의 목적에 따라 실시예 4에서 제작한 HPV 양성 표준자의 유효성을 하기와 같이 평가하였다.

<164> 1) 순수한 HPV DNA 양성 표준자를 이용한 HPV 바이러스 부하 정량방법의 유효성 평가

<165> 실시예 4의 3)에서 획득하여 증류수에 순수하게 녹아 있는 6,945 bp의 HPV-16 DNA 절편만으로 HPV DNA 양성 표준자를 제작하여 HPV 바이러스 부하 정량방법의 유효성을 하기와 같이 평가하였다.

<166> 5×10^8 카피/ $10\mu\text{l}$ 의 농도를 가진 HPV-16 DNA 절편 $10\mu\text{l}$ 에 증류수 $90\mu\text{l}$ 를 혼합하여 5×10^7 카피/ $10\mu\text{l}$ 의 농도로 희석하였으며, 상기 희석액을 이하 순차적으로 10배 간격으로 희석하여 5×10^6 카피/ $10\mu\text{l}$, 5×10^5 카피/ $10\mu\text{l}$, 5×10^4 카피/ $10\mu\text{l}$, 5×10^3 카피/ $10\mu\text{l}$, 5×10^2 카피/ $10\mu\text{l}$, 5×10^1 카피/ $10\mu\text{l}$ 의 농도를 가진 HPV DNA 양성 표준자를 제작하였다. 그런 다음, 각각의 농도의 HPV DNA 양성 표준자 $10\mu\text{l}$ 를 $500\mu\text{l}$ PCR 튜브에 넣고, 형광물질인 Cy5가 부착된 HPV DNA 증폭용 하류 프라이머 GPM7R 10pmol, HPV DNA 증폭용 상류 프라이머 GPM7F 10pmol, PCR 완충용액(50 mM Tris-HCl pH8.3, 250 mM KCl, 7.5 mM MgCl₂), 0.2 I.U.의 Taq 폴리머라제, dNTPs 및 형광물질인 SYBR 그린 I(SYBR Green I)을 포함하고 있는 2X 프리믹스(pre mix) $25\mu\text{l}$ 를 첨가한 후 증류수로 총 부피가 $50\mu\text{l}$ 가 되게 하였다. 혼합과 원심분리과정을 거친 후 실시간 유전자 증폭 장치(Thermal Cycler Dice Real Time System)를 이용하여 95°C 에서 10초 동안 가온한 다음 95°C 에서 5초, 55°C 에서 20초, 72°C 에서 25초의 반복되는 과정을 40회 실시하였으며, 반응 종료 후 용해곡선(melting curve)을 분석하여 각각의 농도별 HPV DNA 양성 표준자의 Ct값을 획득하였다(표 5). 순수한 HPV DNA 양성 표준자를 대상으로 하여 HPV 바이러스 부하 정량 방법의 유효성을 평가한 결과, R 제곱값이 0.999이고, 본 발명의 HPV DNA 증폭용 상류 프라이머 및 하류 프라이머와 HPV DNA 양성 표준자와의 결합 효율(binding efficiency)이 92.7%로 매우 높은 것으로 나타났다(도 10).

<167> 표 5

<168>

Standard No.	Ct	Standard No.	Ct
5×10^8	9.82	5×10^4	24.29
5×10^7	13.57	5×10^3	28.07
5×10^6	17.27	5×10^2	31.89
5×10^5	20.75	음성대조군	-

<169> 2) 임상환자 자궁경부 검체의 조건을 반영한 HPV DNA 양성 표준자의 유효성 평가

<170> 검사 대상인 환자의 자궁경부 검체는 DNA 추출 시 어떠한 정제 과정도 거치지 않으므로 증류수에 순수하게 녹아 있는 상태인 6,945 bp의 HPV-16 DNA 절편을 HPV DNA 양성 표준자로 사용하여 환자 샘플 내에 존재하는 HPV의 바이러스 부하를 정량하기에는 부적절하다. 이에 본 발명자는 상기 문제점을 극복하고 HPV DNA 양성 표준자의 상태를 환자 샘플의 상태와 유사하게 구현하기 위하여 HPV-16 DNA 절편에 실시예 3에서 획득한 HPV DNA 음성 표준물질을 추가하여 환자 샘플과 유사한 환경을 가지는 HPV DNA 양성 표준자를 제작하여 HPV DNA 양성 표준물질의 유효성을 평가하였다.

<171> 실시예 4의 4)에서 제작된 5×10^8 카피/ $10\mu\text{l}$, 5×10^7 카피/ $10\mu\text{l}$, 5×10^6 카피/ $10\mu\text{l}$, 5×10^5 카피/ $10\mu\text{l}$, 5×10^4 카피/ $10\mu\text{l}$, 5×10^3 카피/ $10\mu\text{l}$, 5×10^2 카피/ $10\mu\text{l}$, 5×10^1 카피/ $10\mu\text{l}$ 의 HPV DNA 카피수를 갖는 HPV DNA 양성 표준자 $10\mu\text{l}$ 를 $500\mu\text{l}$ PCR 튜브에 넣고, 형광물질인 Cy5가 부착된 HPV DNA 증폭용 하류 프라이머 GPM7R 10pmol, HPV DNA 증폭용 상류 프라이머 GPM7F 10pmol, PCR 완충용액(50 mM Tris-HCl pH8.3, 250 mM KCl, 7.5 mM MgCl₂), 0.2 I.U.의 Taq 폴리머라제, dNTPs 및 형광물질인 SYBR 그린 I(SYBR Green I)을 포함하고 있는 2X 프리믹스(pre mix) $25\mu\text{l}$ 를 첨가한 후 증류수로 총 부피가 $50\mu\text{l}$ 가 되게 하였다. 혼합과 원심분리과정을 거친 후 실시간 유전자 증폭 장치(Thermal Cycler Dice Real Time System)를 이용하여 95°C 에서 10초 동안 가온한 다음 95°C 에서 5초, 55°C 에서 20초, 72°C 에서 25초의 반복되는 과정을 40회 실시하였으며, 반응 종료 후 용해곡선(melting curve)을 분석하여 각각의 농도별 HPV DNA 양성 표준자의 Ct값을 획득하였다(표 6). 임상환자 자궁경부 검체의 조건을 반영한 HPV DNA 양성 표준자를 대상으로 하여 HPV 바이러스 부하 정량 방법의 유효성을 평가한 결과, R

제공값이 0.999이고, 본 발명의 HPV DNA 증폭용 상류 프라이머 및 하류 프라이머와 HPV DNA 양성 표준자와의 결합 효율(binding efficiency)이 92.0%로 매우 높은 것으로 나타났다(도 11).

<172> 표 6

Standard No.	Ct	Standard No.	Ct
5×10^8	9.45	5×10^4	24.02
5×10^7	12.50	5×10^3	28.03
5×10^6	16.52	5×10^2	31.44
5×10^5	20.11	음성대조군	-

<174> 상기 임상환자 자궁경부 검체의 조건을 반영한 HPV DNA 양성 표준자의 유효성을 평가한 결과는 순수하게 HPV-16 DNA 절편만으로 제작한 HPV DNA 양성 표준자의 유효성 평가 결과와 매우 유사한 것으로 나타났다. 따라서, HPV DNA 음성 표준물질이 본 발명이 목적하는 실시간 유전자 증폭실험에 영향을 주지 않으면서 환자 샘플을 유사하게 구현하는 것이 확인되었다. 상기한 바와 같이 각 농도별로 회석된 HPV DNA는 실시간 유전자 증폭반응에 있어서 일정한 간격을 갖는 HPV DNA 양성 표준자로 이용할 수 있으며, 상기 HPV DNA 양성 표준자에는 50 ng/ μ l 농도의 HPV DNA 음성 표준물질이 포함되어 있어 환자 검체와 유사한 조건을 가지게 되어 HPV DNA 양성 표준자를 단독으로 사용하는 것 보다 환자의 검체에서의 증폭 양상을 100%에 가깝게 반영할 수 있다.

<175> 실시예 4의 4)에서 제작된 HPV DNA 양성 표준자를 포함하는 리얼타임(Real-time) PCR 키트(실시예 6의 3) 참조)와 리얼타임(Real-time) PCR 장치를 이용하여 실시예 8에서 추출된 HPV DNA 양성 세포주와 환자 자궁경부 세포들의 DNA를 대상으로 HPV DNA의 바이러스 부하를 하기와 같이 정량하였다.

<176> 3) HPV DNA 양성 표준 대조군인 CaSki 세포주 내의 HPV 부하 정량

<177> 실시예 4의 4)에서 제작한 각각의 HPV DNA 양성 표준자 10 μ l와, 5×10^5 개의 세포, 5×10^4 개의 세포, 5×10^3 개의 세포, 5×10^2 개의 세포, 5×10^1 개의 세포수를 갖는 CaSki 세포주로부터 획득한 검체 5 μ l를 각각 500 μ l PCR 튜브에 넣고, 형광물질인 Cy5가 부착된 HPV DNA 증폭용 하류 프라이머 GPM7R 10pmol, HPV DNA 증폭용 상류 프라이머 GPM7F 10pmol, PCR 완충용액(50 mM Tris-HCl pH8.3, 250 mM KCl, 7.5 mM MgCl₂), 0.2 I.U.의 Taq 폴리머라제, dNTPs 및 형광물질인 SYBR 그린 I(SYBR Green I)을 포함하고 있는 2X 프리믹스(pre mix) 25 μ l를 첨가한 후 증류수로 총 부피가 50 μ l가 되게 하였다. 혼합과 원심분리과정을 거친 후 실시간 유전자 증폭 장치(Thermal Cycler Dice Real Time System)를 이용하여 95 $^{\circ}$ C에서 10초 동안 가온한 다음 95 $^{\circ}$ C에서 5초, 55 $^{\circ}$ C에서 20초, 72 $^{\circ}$ C에서 25초의 반복되는 과정을 40회 실시하였으며, 반응 종료 후 용해곡선(melting curve)을 분석하여 각각의 농도별 HPV DNA 양성 표준자의 Ct값을 획득하였다. 획득한 Ct값을 이용하여 각각의 농도별 HPV DNA 양성 표준자의 표준 곡선을 구한 다음, 5×10^5 개의 세포, 5×10^4 개의 세포, 5×10^3 개의 세포, 5×10^2 개의 세포, 5×10^1 개의 세포수를 갖는 CaSki 세포주에서 획득한 검체로부터 얻어진 Ct값을 상기의 HPV DNA 양성 표준자의 표준 곡선에 대입하여 검체 내의 HPV DNA 바이러스의 부하를 정량하였다(표 7). 본 실시예 결과에 따르면, 5×10^1 개의 CaSki 세포주에서 추출한 DNA 내에 2.50×10^4 개의 HPV 카피가 존재하는 것으로 관찰되었으며, 이를 CaSki 세포주 세포 하나 당으로 계산하면 500 카피/세포가 된다. 본 실시예의 결과는 하나의 CaSki 세포 당 500-600개 내외의 HPV-16 DNA 카피가 존재한다는 ATCC(CaSki 세포주 입수처)의 세포주 정보와 매우 정확하게 일치하는 것으로 나타났다. 본 실시예에서의 실험결과의 재현성을 나타내는 R 제공값은 0.999이고, HPV DNA 증폭용 상류 프라이머 및 하류 프라이머와 HPV DNA와의 결합 효율은 91.0%인 것으로 나타나 본 발명에 따른 HPV DNA 바이러스 부하의 정량 방법이 재현성 및 증폭 효율이 매우 높음을 알 수 있다(도 12).

<178> 표 7

세포수 *	Ct	HPV 카피수	카피수/세포
5×10^1	23.8	2.50×10^4	500
5×10^2	19.76	3.37×10^5	674

5×10^3	16.33	3.07×10^6	614
5×10^4	12.97	2.69×10^7	538
5×10^5	9.89	2.58×10^8	516

<180> *: HPV-16 양성으로 확인된 CaSki 세포주는 세포 하나당 HPV-16형이 약 500-600 카피가 존재하는 것으로 알려져 있다.

<181> 4) HPV DNA 양성 표준 대조군인 HeLa 세포주 내의 HPV 부하 정량

<182> 실시예 4의 4)에서 제작한 각각의 HPV DNA 양성 표준자 $10\mu\text{l}$ 와, 1×10^4 개의 세포, 1×10^3 개의 세포, 1×10^2 개의 세포, 1×10^1 개의 세포, 1×10^0 개의 세포수를 갖는 HeLa 세포주로부터 획득한 각각의 검체 $5\mu\text{l}$ 를 $500\mu\text{l}$ PCR 튜브에 넣고, 형광물질인 Cy5가 부착된 HPV DNA 증폭용 하류 프라이머 GPM7R 10pmol, HPV DNA 증폭용 상류 프라이머 GPM7F 10pmol, PCR 완충용액(50 mM Tris-HCl pH8.3, 250 mM KCl, 7.5 mM MgCl_2), 0.2 I.U.의 Taq 폴리머라제, dNTPs 및 형광물질인 SYBR 그린 I(SYBR Green I)을 포함하고 있는 2X 프리믹스(pre mix) $25\mu\text{l}$ 를 첨가한 후 증류수로 총 부피가 $50\mu\text{l}$ 가 되게 하였다. 혼합과 원심분리과정을 거친 후 실시간 유전자 증폭 장치(Thermal Cycler Dice Real Time System)를 이용하여 95°C 에서 10초 동안 가온한 다음 95°C 에서 5초, 55°C 에서 20초, 72°C 에서 25초의 반복되는 과정을 40회 실시하였으며, 반응 종료 후 용해곡선(melting curve)을 분석하여 각각의 농도별 HPV DNA 양성 표준자의 Ct값을 획득하였다. 획득한 Ct값을 이용하여 각각의 농도별 HPV DNA 양성 표준자의 표준 곡선을 구한 다음, 1×10^4 개의 세포, 1×10^3 개의 세포, 1×10^2 개의 세포, 1×10^1 개의 세포, 1×10^0 개의 세포수를 갖는 HeLa 세포주에서 획득한 검체로부터 얻어진 Ct값을 상기의 HPV DNA 양성 표준자의 표준 곡선에 대입하여 검체 내의 HPV DNA 바이러스의 부하를 정량하였다(표 8). 본 실시예 결과에 따르면, 1×10^0 개, 즉 1개의 HeLa 세포주에서 추출한 DNA 내에 14.4개의 HPV 카피가 존재하는 것으로 관찰되었다. 본 실시예의 결과는 하나의 HeLa 세포 당 10-50개 내외의 HPV-18 DNA 카피가 존재한다는 ATCC(HeLa 세포주 입수처)의 세포주 정보와 매우 정확하게 일치하는 것으로 나타났다. 본 실시예에서의 실험결과의 재현성을 나타내는 R 제곱값은 0.999이고, HPV DNA 증폭용 상류 프라이머 및 하류 프라이머와 HPV DNA와의 결합효율은 91.2%인 것으로 나타나 본 발명에 따른 HPV DNA 바이러스 부하의 정량 방법이 재현성 및 증폭 효율이 매우 높음을 알 수 있다(도 13).

<183> 표 8

<184>

세포수 *	Ct	HPV 카피수	카피수/세포
1×10^0	35.51	1.44×10^1	14.4
1×10^1	32.16	1.26×10^2	12.6
1×10^2	28.22	1.62×10^3	16.2
1×10^3	24.18	2.22×10^4	22.2
1×10^4	21.35	1.39×10^5	13.9

<185> *: HPV-18 양성으로 확인된 HeLa 세포주는 세포 하나당 HPV-18형이 약 10-50 카피가 존재하는 것으로 알려져 있다.

<186> 5) 임상 환자 자궁경부 세포 검체 내 HPV DNA 바이러스의 부하 정량

<187> 실시예 4의 4)에서 제작한 각각의 HPV DNA 양성 표준자 $10\mu\text{l}$ 와, 임상 환자 자궁경부 세포로부터 추출한 각각의 검체 $5\mu\text{l}$ 를 $500\mu\text{l}$ PCR 튜브에 넣고, 형광물질인 Cy5가 부착된 HPV DNA 증폭용 하류 프라이머 GPM7R 10pmol, HPV DNA 증폭용 상류 프라이머 GPM7F 10pmol, PCR 완충용액(50 mM Tris-HCl pH8.3, 250 mM KCl, 7.5 mM MgCl_2), 0.2 I.U.의 Taq 폴리머라제, dNTPs 및 형광물질인 SYBR 그린 I(SYBR Green I)을 포함하고 있는 2X 프리믹스(pre mix) $25\mu\text{l}$ 를 첨가한 후 증류수로 총 부피가 $50\mu\text{l}$ 가 되게 하였다. 혼합과 원심분리과정을 거친 후 실시간 유전자 증폭 장치(Thermal Cycler Dice Real Time System)를 이용하여 95°C 에서 10초 동안 가온한 다음 95°C 에서 5초, 55°C 에서 20초, 72°C 에서 25초의 반복되는 과정을 40회 실시하였으며, 반응 종료 후 용해곡선

(melting curve)을 분석하여 각각의 농도별 HPV DNA 양성 표준자의 Ct값을 획득하였다. 획득한 Ct값을 이용하여 각각의 농도별 HPV DNA 양성 표준자의 표준 곡선을 구한 다음, 임상 환자 자궁경부 세포로부터 추출한 검체로부터 얻어진 Ct값을 상기의 HPV DNA 양성 표준자의 표준 곡선에 대입하여 검체 내의 HPV DNA 바이러스의 부하를 정량하였다(표 9). 본 실시예에서의 실험결과 재현성을 나타내는 R 제곱값은 0.999이고, HPV DNA 증폭용 상류 프라이머 및 하류 프라이머와 HPV DNA와의 결합효율은 91.6%인 것으로 나타나 본 발명에 따른 HPV DNA 바이러스 부하의 정량 방법이 재현성 및 증폭 효율이 매우 높음을 알 수 있다(도 14).

표 9

환자 번호	Ct	Qty	환자 번호	Ct	Qty
1	20.57	5.61×10^5	4	17.93	3.00×10^6
2	26.01	1.85×10^4	5	29.93	1.58×10^3
3	23.53	8.75×10^4	음성대조군	-	-

실시에 11 HPV DNA 칩을 이용하여 HPV DNA의 유전자형을 분석하는 방법

실시에 5에서 제작하여 실시예 6의 4)에서 키트화한 HPV DNA 칩에 실시예 10의 리얼타임(Real-time) PCR 산물을 혼성화하고 이를 실시예 6의 4)에서 키트화한 시약으로 세척한 다음, 마이크로어레이 칩 스캐너를 이용하여 31종의 HPV DNA 유전자형 특이 프로브와 리얼타임(Real-time) PCR 산물의 혼성화 여부를 분석하였다.

1) HPV DNA 칩의 제작

실시에 5에서 제작한 31종의 HPV DNA 유전자형 특이 프로브가 부착되어 있는 유리 슬라이드를 0.2% SDS 용액 300 ml로 2분간 3회 세척하고, 멸균된 3차 증류수로 3회 세척한 다음 수소화붕소나트륨 용액에 4시간 정치시켰다. 그런 다음, 멸균된 3차 증류수로 1분간 3회 세척한 다음 650 rpm에서 5분간 원심분리하여 물기를 제거하였으며, 유리 슬라이드에 8구역으로 분할되어 있는 실리콘 재질의 혼성화 챔버(coverwell perfusion chamber)를 밀착시켜 HPV DNA 칩을 완성하였다(도 2).

2) HPV DNA 칩과 리얼타임(Real-time) PCR 산물의 혼성화

500µl PCR 튜브에 리얼타임(Real-time) PCR 산물 10µl와 3X 증류수 45µl를 넣어 혼합하고 95°C에서 5분간 가온한 다음 얼음에 2분간 정치하여 리얼타임(Real-time) PCR 산물을 단일 염기가닥(single strand DNA)으로 변성(denaturation)시켰다. 그런 다음, 상기 PCR 산물을 상온에서 5분간 정치한 후 20X SSC 15µl와 5% SDS 2.4µl를 추가하여 거품이 생기지 않도록 잘 혼합한 다음, 상기 1)의 HPV DNA 칩의 혼성화 챔버 1웰(well) 당 1검체씩 주입하고 42°C 항온기에서 4시간 동안 혼성화 반응시켰다.

3) HPV DNA 칩에 비특이적으로 결합된 산물의 세척

2X SSC, 0.1% SDS가 포함되어 있는 1차 세척완충용액이 담겨 있는 수조에 상기의 혼성화 반응이 종료된 유리 슬라이드를 넣고 조심스럽게 혼성화 챔버를 제거한 다음 유리 슬라이드를 꺼내어 2X SSC, 0.1% SDS가 포함되어 있는 1차 세척완충용액으로 3분간 2회 세척하고, 1X SSC, 0.1% SDS가 포함되어 있는 2차 세척완충용액으로 3분간 2회 세척하며, 다시 0.1X SSC가 포함되어 있는 3차 세척완충용액으로 1회 세척한 다음 650 rpm에서 5분간 원심분리하여 물기를 제거하였다. 그런 다음, 마이크로어레이 칩 전용 스캐너를 이용하여 HPV DNA의 유전자형을 분석하기 전까지 빛이 차단된 곳에 보관하였다.

4) HPV DNA칩을 이용한 리얼타임(Real-time) PCR 산물 내 HPV 유전자형 분석

마이크로어레이 칩 전용 스캐너를 550nm의 여기 파장과 570nm의 방출 파장을 검출할 수 있도록 설정한 후, 상기 3)에서 세척된 HPV DNA 칩을 넣고 HPV DNA 유전자형 특이 프로브에 리얼타임(Real-time) PCR 산물이 결합하여 형광을 발하는 위치를 분석함으로써 HPV DNA의 유전자형을 판독하였다(도 15 내지 도 19).

5) HPV DNA칩을 이용한 리얼타임(Real-time) PCR 산물 내 HPV 유전자형 분석

마이크로어레이 칩 전용 스캐너를 Cy5의 최대 방출 파장은 532nm로 설정하고, Cy3의 최대 방출 파장은 635nm로 설정한 후, 상기 3)에서 세척된 HPV DNA 칩을 넣고 HPV DNA 유전자형 특이 프로브에 리얼타임(Real-time) PCR 산물이 결합하여 형광을 발하는 위치를 분석함으로써 HPV DNA의 유전자형을 판독하였다(도 15 내지 도 19).

- <202> 도 15는 5×10^5 개 세포, 5×10^4 개 세포, 5×10^3 개 세포, 5×10^2 개 세포, 5×10^1 개 세포수를 갖는 각각의 HPV-16 양성 대조군 CaSki 세포주에서 추출한 DNA를 주형으로 실시예 10의 3)의 방법에 따라 리얼타임(Real-time) PCR을 시행하여 바이러스 부하의 정량을 종료한 후, 리얼타임(Real-time) PCR 산물을 실시예 11의 방법에 따라 HPV DNA 칩에 혼성화한 다음 세척하여 마이크로어레이 칩 스캐너로 HPV의 유전자형을 판독한 형광 스캐너 사진이다. 도 15에서 확인되는 바와 같이, 리얼타임(Real-time) PCR 산물이 모두 비특이적 결합 없이 HPV-16 특이 프로브에 결합되어 HPV의 유전자형이 HPV-16형인 것으로 판독되었다. 한편, 샘플 내의 세포수와 관계없이 리얼타임(Real-time) PCR 산물 모두 유사한 형광량을 보여 HPV DNA 칩만을 이용한 HPV 검사 방법으로는 단지 유전자형의 판독만 가능할 뿐 HPV의 바이러스의 부하를 정량하기에는 부적합 것으로 판단된다.
- <203> 도 16은 1×10^4 개 세포, 1×10^3 개 세포, 1×10^2 개 세포, 1×10^1 개 세포, 1×10^0 개 세포수를 갖는 각각의 HPV-18 양성 대조군 HeLa 세포주에서 추출한 DNA를 주형으로 실시예 10의 4)의 방법에 따라 리얼타임(Real-time) PCR을 시행하여 바이러스 부하의 정량을 종료한 후, 1×10^1 개 세포수를 갖는 HeLa 세포주에서 얻어진 리얼타임(Real-time) PCR 산물을 실시예 11의 방법에 따라 HPV DNA 칩에 혼성화한 다음 세척하여 마이크로어레이 칩 스캐너로 HPV의 유전자형을 판독한 형광 스캐너 사진이다. 도 16에서 확인되는 바와 같이, 리얼타임(Real-time) PCR 산물이 비특이적 결합 없이 HPV-18 특이 프로브에 결합되어 HPV의 유전자형이 HPV-18형인 것으로 판독되었다.
- <204> 도 17은 임상 환자 자궁경부 검체 중 1예에서 추출한 DNA를 주형으로 실시예 10의 5)의 방법에 따라 리얼타임(Real-time) PCR을 시행하여 바이러스 부하의 정량을 종료한 후 리얼타임(Real-time) PCR 산물을 실시예 11의 방법에 따라 HPV DNA 칩에 혼성화한 다음 세척하여 마이크로어레이 칩 스캐너로 HPV의 유전자형을 판독한 형광 스캐너 사진이다. 도 17에서 확인되는 바와 같이, 리얼타임(Real-time) PCR 산물이 비특이적 결합 없이 HPV-16 특이 프로브에 결합되어 HPV의 유전자형이 HPV-16형인 것으로 판독되었다.
- <205> 도 18은 임상 환자 자궁경부 검체 중 1예에서 추출한 DNA를 주형으로 실시예 10의 5)의 방법에 따라 리얼타임(Real-time) PCR을 시행하여 바이러스 부하의 정량을 종료한 후, 리얼타임(Real-time) PCR 산물을 실시예 11의 방법에 따라 HPV DNA 칩에 혼성화한 다음 세척하여 마이크로어레이 칩 스캐너로 HPV의 유전자형을 판독한 형광 스캐너 사진이다. 도 18에서 확인되는 바와 같이, 리얼타임(Real-time) PCR 산물이 비특이적 결합 없이 HPV-31 특이 프로브에 결합되어 HPV의 유전자형이 HPV-31형인 것으로 판독되었다.
- <206> 도 19는 임상 환자 자궁경부 검체 중 1예에서 추출한 DNA를 주형으로 실시예 10의 5)의 방법에 따라 리얼타임(Real-time) PCR을 시행하여 바이러스 부하의 정량을 종료한 후, 리얼타임(Real-time) PCR 산물을 실시예 11의 방법에 따라 HPV DNA 칩에 혼성화한 다음 세척하여 마이크로어레이 칩 스캐너로 HPV의 유전자형을 판독한 형광 스캐너 사진이다. 도 19에서 확인되는 바와 같이, 리얼타임(Real-time) PCR 산물이 비특이적 결합 없이 HPV-58 특이 프로브에 결합되어 HPV의 유전자형이 HPV-58형인 것으로 판독되었다.
- <207> 한편, 임상 환자 자궁경부 검체 중 나머지 2예의 HPV DNA 칩 결과를 분석한 결과, 리얼타임(Real-time) PCR 산물이 모두 HPV-58형인 것으로 판독되었다(도시하지 않음).
- <208> 5) HPV DNA 칩 판독 결과의 유효성 검증
- <209> 상기한 HPV DNA칩을 이용한 HPV 유전자형 판독결과의 유효성을 검증하기 위하여 자동염기서열 분석 장치 (automatic sequence analyzer, ABI 3100)로 리얼타임(Real-time) PCR 산물의 염기 서열을 분석하였다(도 20 내지 도 23).
- <210> 도 20은 도 15, 도17에서 HPV 유전자형이 16인 것으로 판독된 결과의 유효성을 검증하기 위하여 ABI prism 3100 자동염기서열 분석기로 HPV-16 양성 대조군 CaSki 세포주의 HPV DNA와 임상환자의 HPV DNA의 염기서열을 분석한 것으로 HPV의 유전자형이 HPV-16 형인 것으로 관찰되어 본 발명의 HPV DNA 칩에서 관찰된 결과와 자동염기서열 분석 결과가 일치하는 것으로 나타났다. 도 20에서는 CaSki 세포주의 HPV DNA의 염기서열 분석결과와, 임상환자의 HPV DNA의 염기서열 분석결과가 동일하게 나타난 점을 감안하여 동일한 그래프는 편의상 생략하였다.
- <211> 도 21은 HPV 유전자형이 18인 것으로 판독된 결과(도 16)의 유효성을 검증하기 위하여 ABI prism 3100 자동염기서열 분석기로 HPV-18 양성 대조군 HeLa 세포주의 HPV DNA의 염기서열을 분석한 것이다. 도 21에서 확인되는 바와 같이, HPV의 유전자형이 HPV-18형인 것으로 관찰되어 본 발명의 HPV DNA 칩에서 관찰된 결과와 자동염기서열 분석 결과가 일치하는 것으로 나타났다.

<212> 도 22는 HPV 유전자형이 31인 것으로 판독된 결과(도 18)의 유효성을 검증하기 위하여 ABI prism 3100 자동염기서열 분석기로 HPV 유전자형이 31로 판독된 임상환자의 HPV DNA의 염기서열을 분석한 것이다. 도 22에서 확인되는 바와 같이, HPV의 유전자형이 HPV-31형인 것으로 관찰되어 본 발명의 HPV DNA 칩에서 관찰된 결과와 자동염기서열 분석 결과가 일치하는 것으로 나타났다.

<213> 도 23은 도 19에서 HPV 유전자형이 58로 판독된 결과의 유효성을 검증하기 위하여 ABI prism 3100 자동염기서열 분석기로 HPV 유전자형이 HPV-58 형인 것으로 판독된 임상환자의 3예의 HPV DNA 염기서열을 분석한 것으로 임상환자 3예의 HPV DNA 유전자형이 모두 HPV-58 형인 것으로 관찰되어 본 발명의 HPV DNA 칩에서 관찰된 결과와 자동염기서열 분석 결과가 일치하는 것으로 나타났다. 나머지 2예의 염기서열 분석 결과는 도 23과 동일하여 생략하였다.

도면의 간단한 설명

<214> 도 1은 본 발명에 따른 HPV DNA 양성 표준자 제작용 HPV-16 DNA 절편 획득 및 클로닝 결과를 보여주는 사진이다.

<215> 도 2는 본 발명에 따른 HPV 유전자형을 판독하는데 필요한 HPV DNA 칩과 HPV DNA 칩 내 HPV 유전자형 특이 프로브의 부착 위치(Grid)를 보여주는 사진이다.

<216> 도 3은 본 발명에 따른 자궁경부로부터 세포를 채취하는 기구의 구성을 보여주는 사진이다.

<217> 도 4는 본 발명에 따른 HPV의 바이러스 부하 정량 및 HPV의 유전자형 판독에 사용되는 HPV DNA 검출 키트, 리얼타임(Real-time) PCR 키트, 및 HPV DNA 칩 키트 일체를 보여주는 사진이다.

<218> 도 5는 본 발명에 따른 HPV DNA 검출 키트의 구성을 보여주는 사진이다.

<219> 도 6은 본 발명에 따른 HPV의 바이러스 부하를 정량하는데 필요한 리얼타임(Real-time) PCR 키트의 구성을 보여주는 사진이다.

<220> 도 7는 본 발명에 따른 HPV 유전자형을 판독하는데 필요한 HPV DNA 칩 키트의 구성을 보여주는 사진이다.

<221> 도 8은 실시예 8에서 추출한 HPV DNA의 유효성을 평가하기 위하여 인체 베타글로빈 유전자를 증폭하여 2% 아가로스겔에 전기영동한 결과의 사진이다.

<222> 도 9는 실시예 8에서 추출한 HPV DNA를 증폭하여 2% 아가로스겔에 전기영동한 결과의 사진이다.

<223> 도 10은 HPV-16 DNA 절편을 이용하여 순수한 HPV DNA 양성 표준자를 제작한 다음, 리얼타임(Real-time) PCR을 시행하여 HPV DNA의 바이러스 부하를 정량하는 방법에 대한 유효성을 평가한 결과의 그래프이다. 도 10에서는 증폭 도해(amplification plots), 표준곡선(standard curve), 및 리얼타임(Real-time) PCR 반응 종료 후 획득된 용해곡선(melting curve)을 도시하고 있다.

<224> 도 11은 본 발명의 HPV DNA 양성 표준자를 대상으로 리얼타임(Real-time) PCR을 시행한 결과의 그래프이다.

<225> 도 12는 리얼타임(Real-time) PCR을 시행하여 HPV DNA 양성 표준 대조군 CaSki 세포주 내 HPV DNA의 바이러스 부하를 정량한 결과의 그래프이다.

<226> 도 13은 리얼타임(Real-time) PCR을 시행하여 HPV DNA 양성 표준 대조군 HeLa 세포주 내 HPV DNA의 바이러스 부하를 정량한 결과의 그래프이다.

<227> 도 14는 리얼타임(Real-time) PCR을 시행하여 임상 환자 자궁경부세포 검체 내 HPV DNA 바이러스의 부하를 정량한 결과의 그래프이다.

<228> 도 15는 HPV-16 양성 대조군 CaSki 세포주에서 추출한 DNA를 대상으로 리얼타임 PCR을 시행하여 바이러스 부하의 정량을 종료한 후, PCR 산물을 HPV DNA 칩에 혼성화하여 HPV의 유전자형을 판독한 형광 스캐너 사진이다.

<229> 도 16은 HPV-18 양성 대조군 HeLa 세포주에서 추출한 DNA를 대상으로 리얼타임 PCR을 시행하여 바이러스 부하의 정량을 종료한 후, PCR 산물을 HPV DNA 칩에 혼성화하여 HPV의 유전자형을 판독한 형광 스캐너 사진이다.

<230> 도 17은 임상 환자 자궁경부 검체 중 1예에서 추출한 DNA를 대상으로 리얼타임 PCR을 시행하여 바이러스 부하의 정량을 종료한 후, PCR 산물을 HPV DNA 칩에 혼성화하여 HPV의 유전자형을 판독한 형광 스캐너 사진이다.

<231> 도 18은 임상 환자 자궁경부 검체 중 다른 1예에서 추출한 DNA를 대상으로 리얼타임 PCR을 시행하여 바이러스

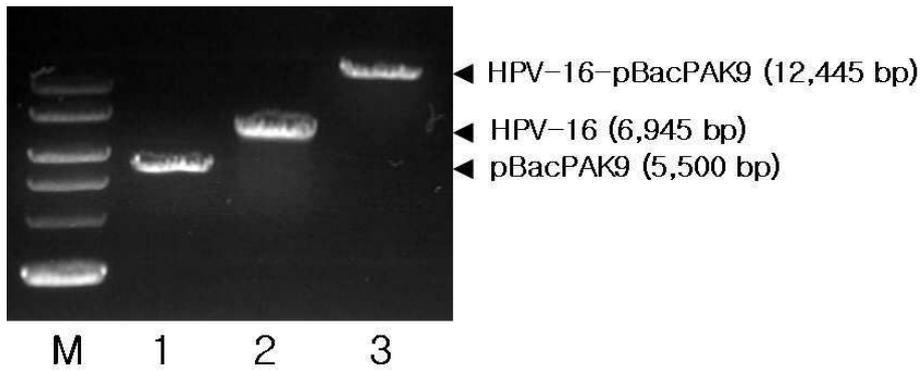
부하의 정량을 종료한 후, PCR 산물을 HPV DNA 칩에 혼성화하여 HPV의 유전자형을 판독한 형광 스캐너 사진이다.

<232> 도 19는 임상 환자 자궁경부 검체 중 또 다른 1예에서 추출한 DNA를 대상으로 리얼타임 PCR을 시행하여 바이러스 부하의 정량을 종료한 후, PCR 산물을 HPV DNA 칩에 혼성화하여 HPV의 유전자형을 판독한 형광 스캐너 사진이다.

<233> 도 20 내지 도 23은 HPV DNA 칩을 이용한 HPV의 유전자형 판독결과의 유효성을 검증하기 위하여 자동염기서열 분석 장치로 리얼타임 PCR 산물의 염기서열을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

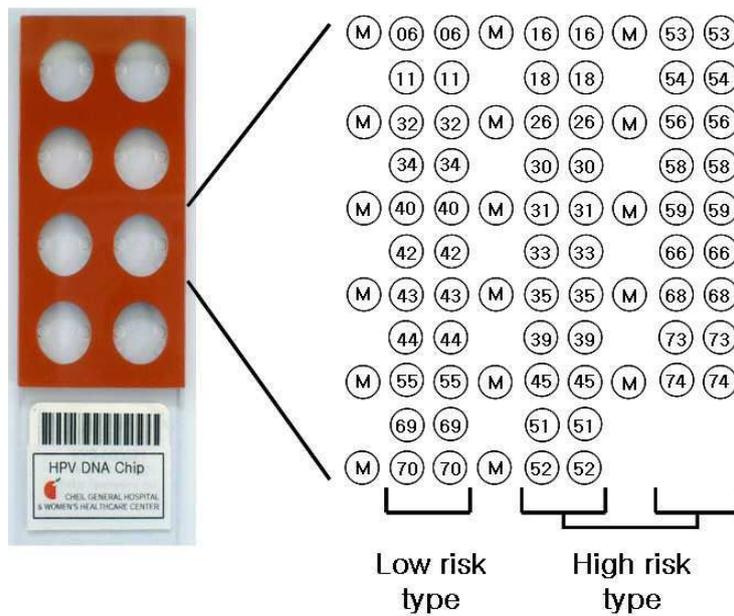
도면

도면1

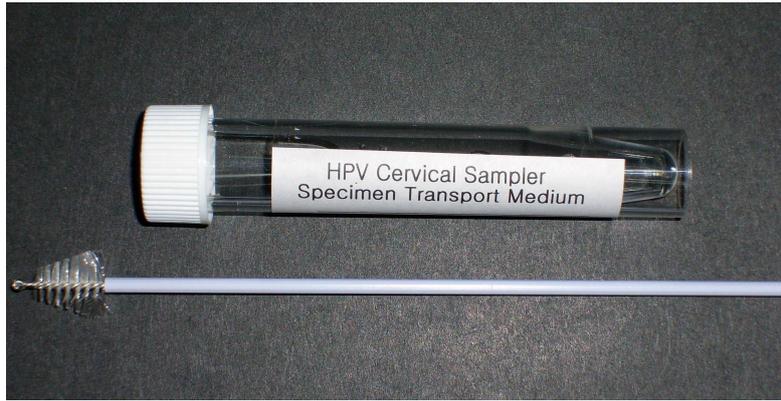


도면2

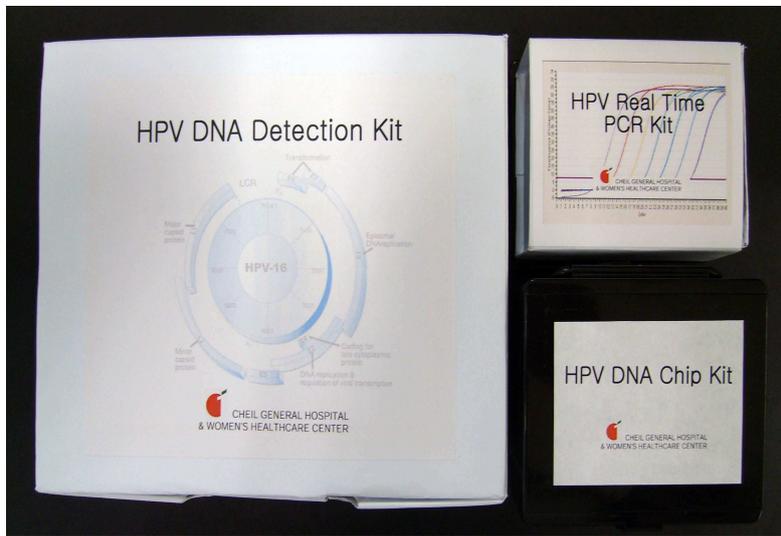
HPV DNA Chip Grid



도면3



도면4



도면5



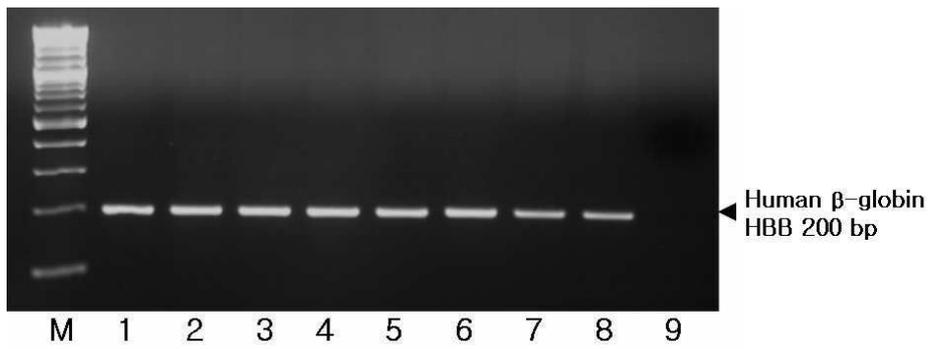
도면6



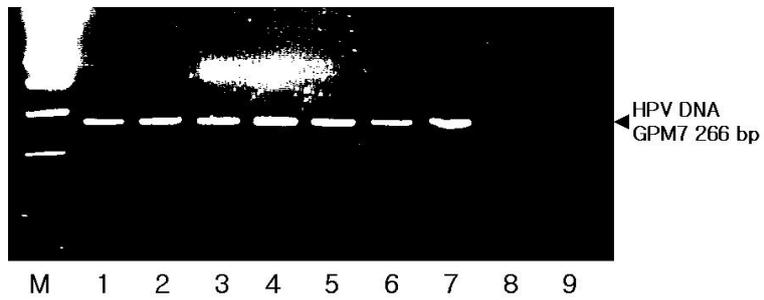
도면7



도면8

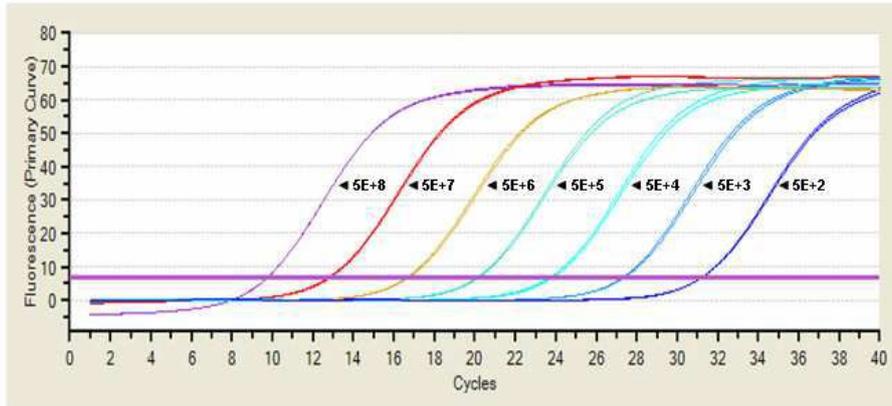


도면9

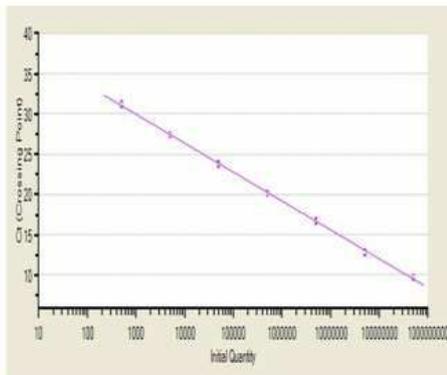


도면10

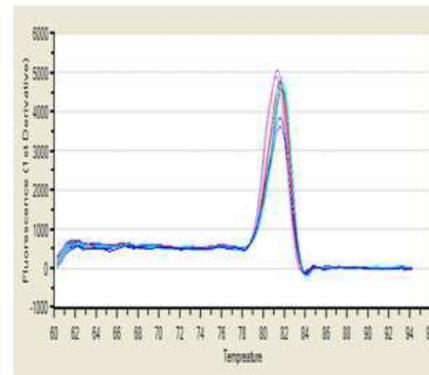
Amplification Plots



Standard Curve



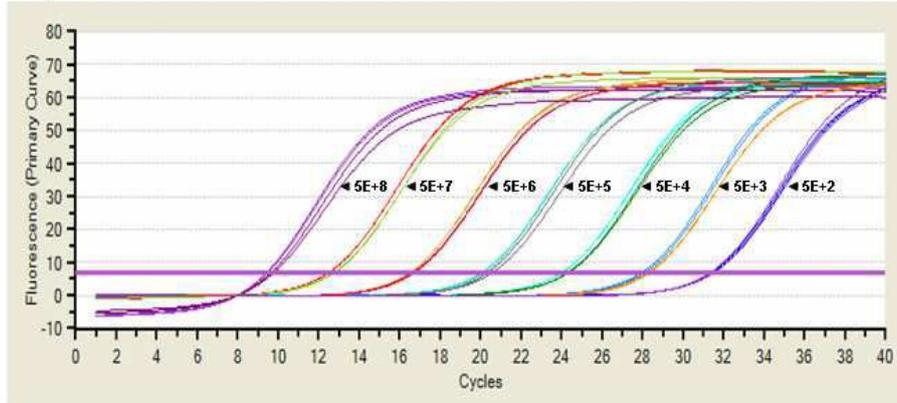
Dissociation Curve



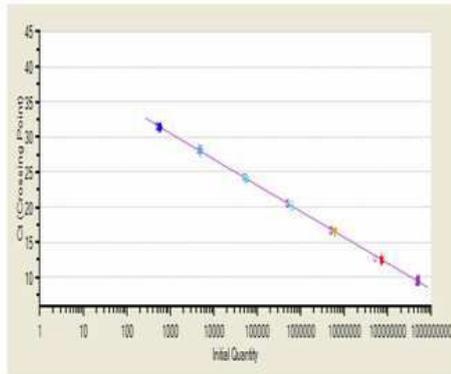
$Y = -3.511 * \text{LOG}(X) + 40.73$ RSq : 0.999 Eff = 92.7 %

도면11

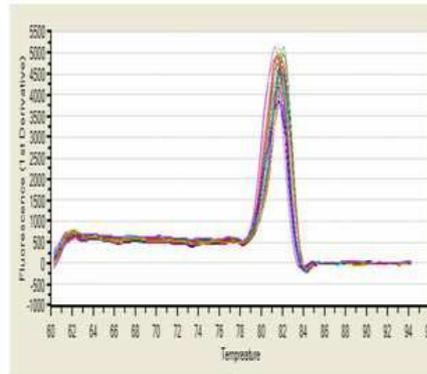
Amplification Plots



Standard Curve



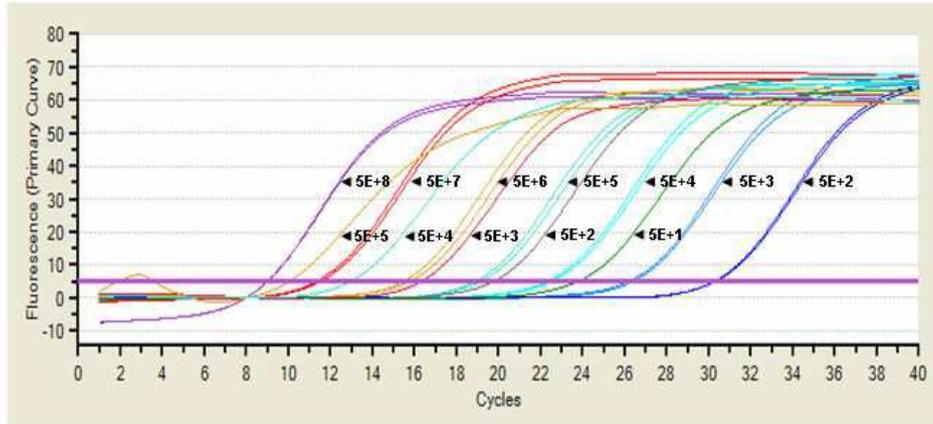
Dissociation Curve



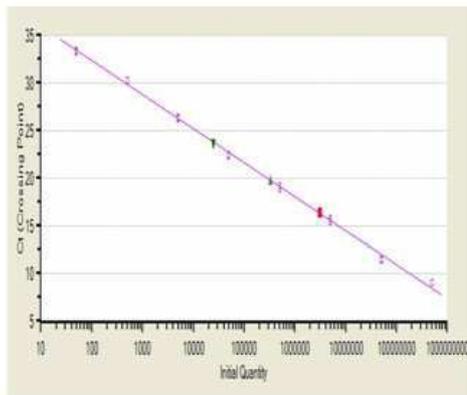
$Y = -3.528 * \text{LOG}(X) + 41.66$ RSq : 0.999 Eff = 92.0 %

도면12

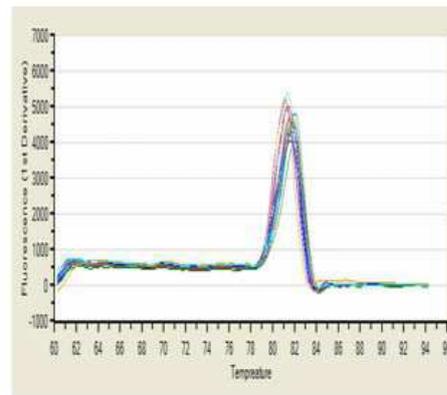
Amplification Plots



Standard Curve



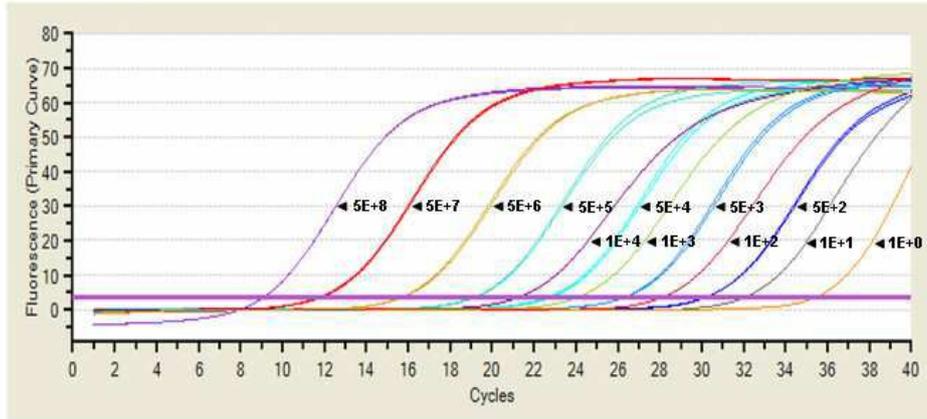
Dissociation Curve



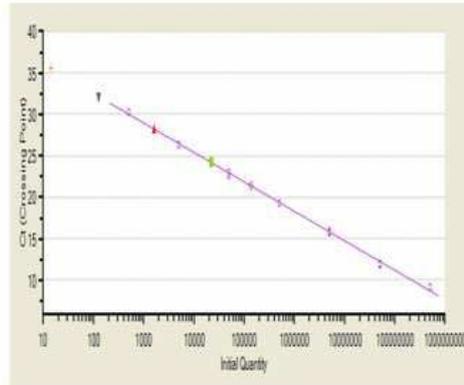
$Y = -3.558 * \text{LOG}(X) + 39.51$ $RSq : 0.999$ $Eff = 91.0 \%$

도면13

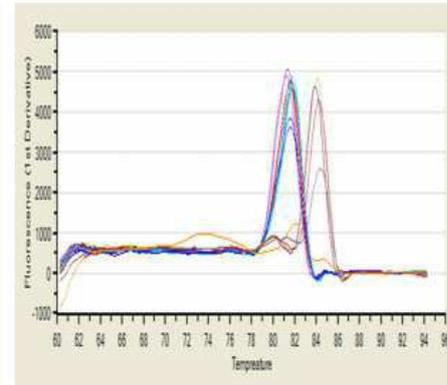
Amplification Plots



Standard Curve



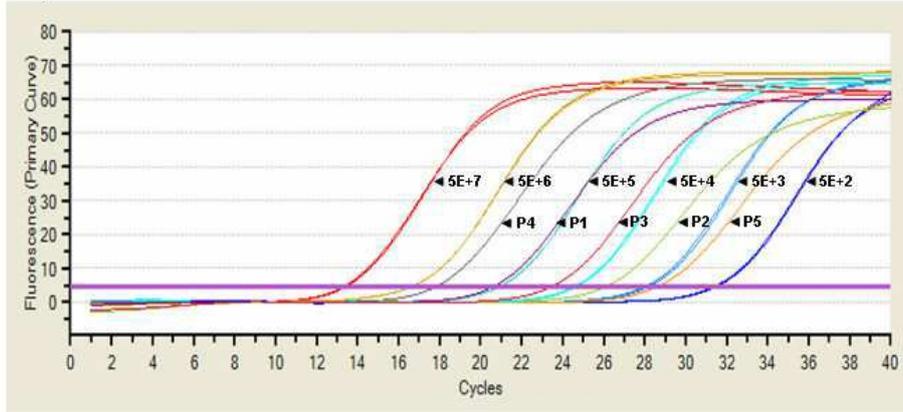
Dissociation Curve



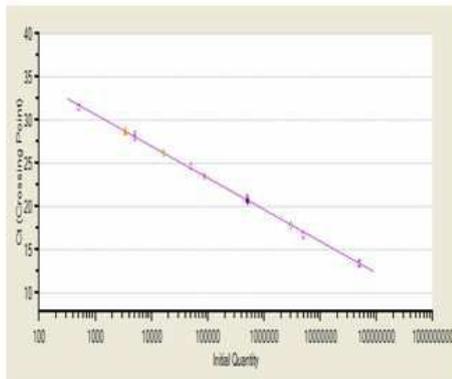
$Y = -3.553 * \text{LOG}(X) + 39.62$ RSq : 0.999 Eff = 91.2 %

도면14

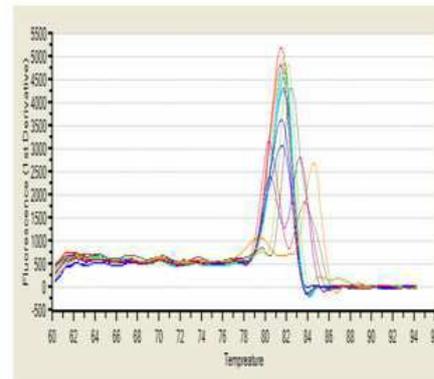
Amplification Plots



Standard Curve

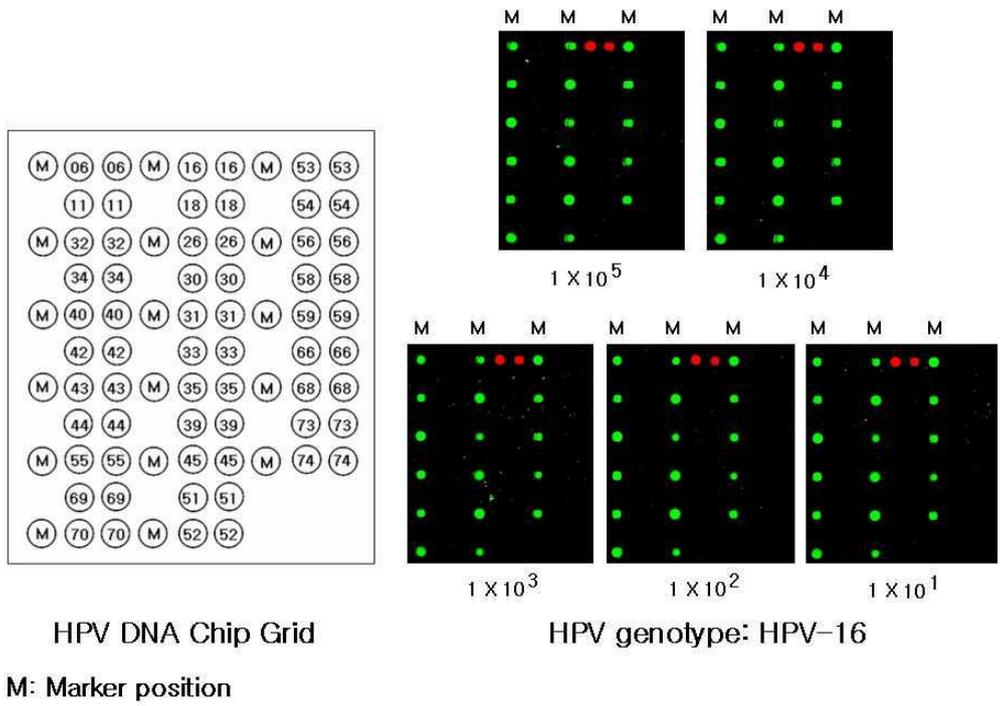


Dissociation Curve

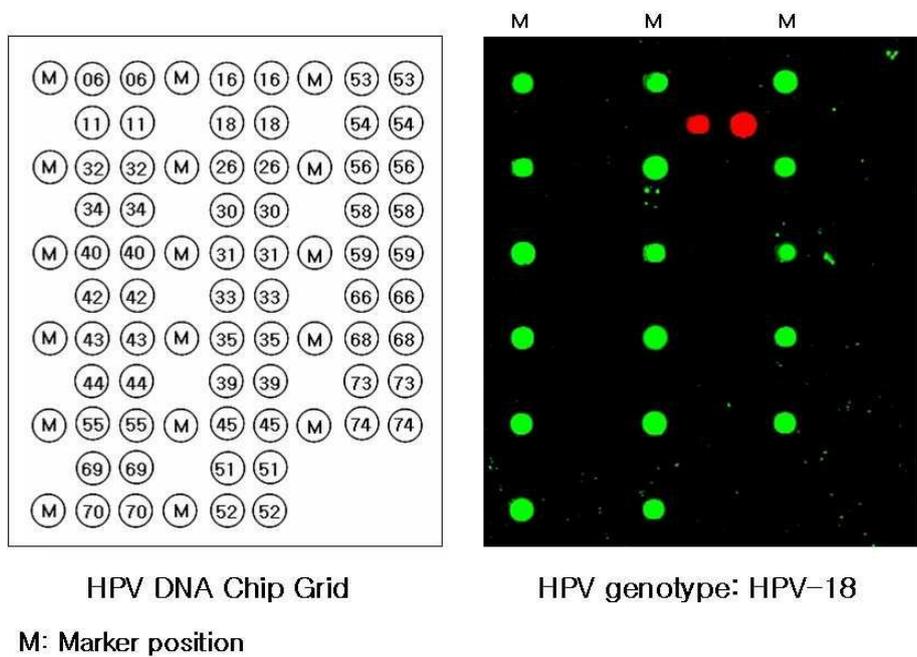


$Y = -3.542 * \text{LOG}(X) + 41.67$ RSq : 0.999 Eff = 91.6 %

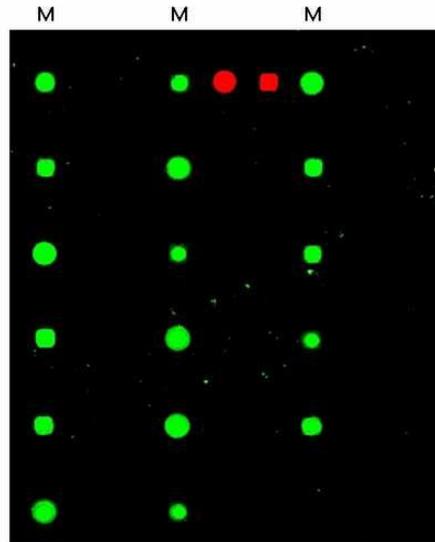
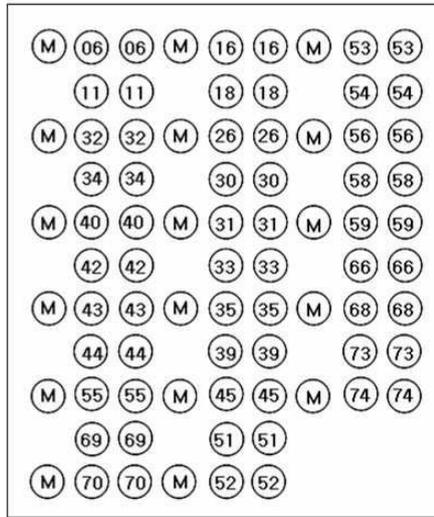
도면15



도면16



도면17

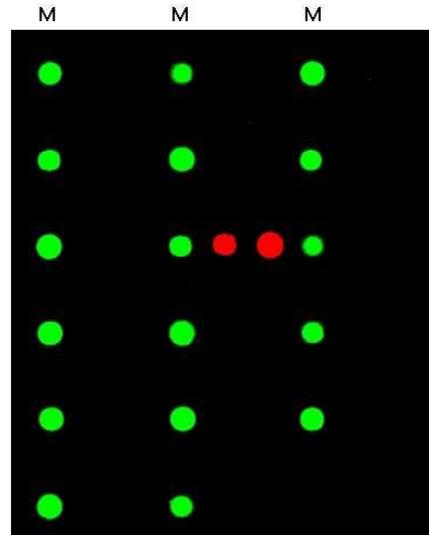
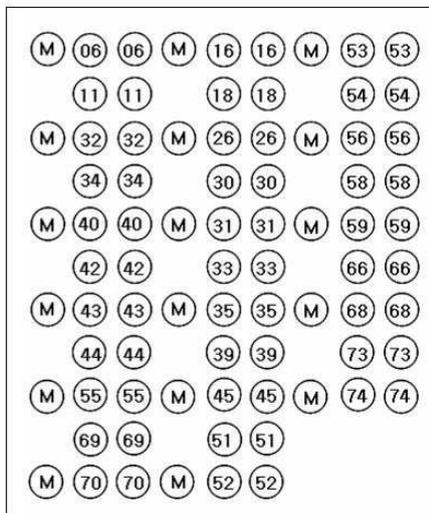


HPV DNA Chip Grid

HPV genotype: HPV-16

M: Marker position

도면18

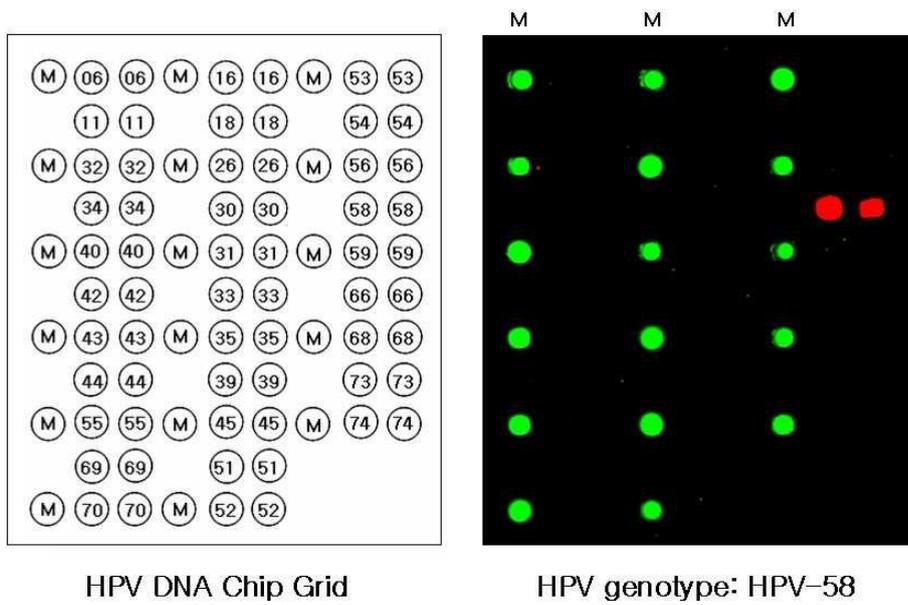


HPV DNA Chip Grid

HPV genotype: HPV-31

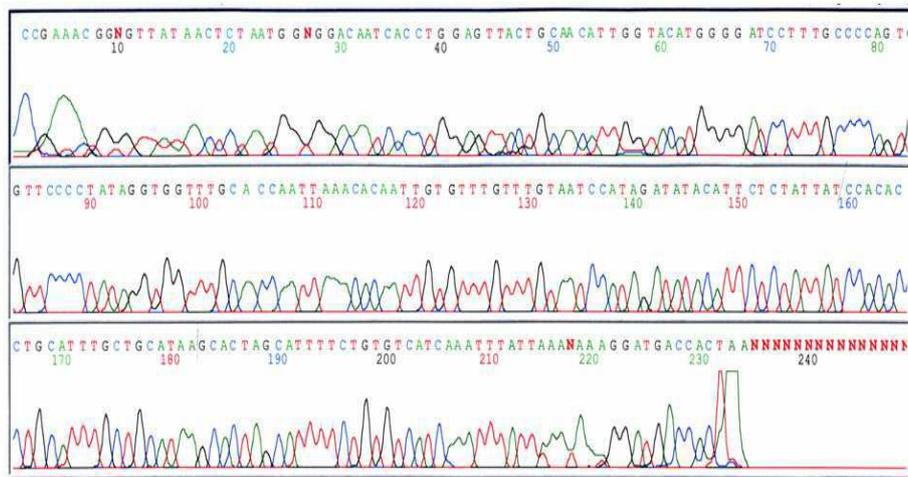
M: Marker position

도면19



M: Marker position

도면20



서열목록

<110> CHEIL GENERAL HOSPITAL AND WOMEN'S HEALTHCARE CENTER
 <120> METHOD AND KIT FOR DETECTING HUMAN PAPILLOMAVIRUS QUANTITATIVELY
 AND QUALITATIVELY USING REAL-TIME PCR AND HPV DNA CHIP

<130> P07-0065KR

<160> 37

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HPV GENERAL PCR UPSTREAM PRIMER GPM7F

<400> 1

agtgggtcatc cwtttwaa taaattkgat ga

32

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HPV GENERAL PCR DOWNSTREAM PRIMER GPM7R

<400> 2

ccawagccwg tatcwacat rtcaccatc

29

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe for HPV-6

<400> 3
 tgggtgtaac cctggacagg ata 23

<210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe for HPV-11

<400> 4
 gtatggtggt aatcctggtc agg 23

<210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe for HPV-16

<400> 5
 ttatgcagca aatgcaggtg tgg 23

<210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe for HPV-18

<400> 6
 cgccacgtct aatgtttctg agg 23

<210> 7

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

<220>
 <223> probe for HPV-26

<400> 7
 ggctactgta aatgcagaca ctg 23

<210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe for HPV-30

<400> 8
 agctaatacag gatacagcag agg 23

<210> 9
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe for HPV-31

<400> 9
 atatgccggt ggtcctggca ctg 23

<210> 10
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe for HPV-32

<400> 10
 atatgctgca ggcctggaa ctg 23

<210> 11
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe for HPV-33

<400> 11
 gtatcctgga caaccgggtg ctg 23

<210> 12
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe for HPV-34

<400> 12
 atatattggt gaaacatag cag 23

<210> 13
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe for HPV-35

<400> 13
 atatgttggg aactctggta act 23

<210> 14
 <211> 24

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe for HPV-39

<400> 14
 ttcatcaacc accaataagg acag 24

<210> 15
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe for HPV-40

<400> 15
 ctatggcaca ggtccggggc agg 23

<210> 16
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe for HPV-42

<400> 16
 atatggtgga ggccttgta cag 23

<210> 17
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe for HPV-43

<400> 17
 gtatggcaca tcgccgggac aag 23

<210> 18
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe for HPV-44

<400> 18
 ttatgcagcc ggtccgggtc agg 23

<210> 19
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe for HPV-45

<400> 19
 agctacagct gttattacgc agg 23

<210> 20
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe for HPV-51

<400> 20
 agcaaatggc aatgcacaac aag 23

<210> 21
 <211> 23
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe for HPV-52

<400> 21

atatgctggt aaacctggta tag

23

<210> 22

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe for HPV-53

<400> 22

agctattcag gatactgccc cgg

23

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe for HPV-54

<400> 23

atatgttggg gcaggagctg aca

23

<210> 24

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe for HPV-55

<400> 24

ttatgcagcc agtccaggtc agg 23

- <210> 25
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> probe for HPV-56

<400> 25
agcaaataat aatggtatag aag 23

- <210> 26
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> probe for HPV-58

<400> 26
atatccgca cagccagggt ctg 23

- <210> 27
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> probe for HPV-59

<400> 27
agcatctgct gttgatacca aag 23

- <210> 28
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe for HPV-66

<400> 28
 agcaggtaat aatggtatag aag 23

<210> 29
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe for HPV-68

<400> 29
 ttcctctaataaaaaatccta aag 23

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

<220>
 <223> probe for HPV-69

<400> 30
 tgccactgct aatgcagaca ctg 23

<210> 31
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe for HPV-70

<400> 31

tctcattttt cctctgctgt tag 23

<210> 32
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe for HPV-73

<400> 32
 atacattgct ggacaaaata cag 23

<210> 33
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> probe for HPV-74

<400> 33
 ttatgcagct aatcctggtc agg 23

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

<220>
 <223> UPSTREAM PRIMER FOR HPV DNA POSITIVE STANDARD

<400> 34
 gctctagagc cagctcagag gaggaggatg 30

<210> 35
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> DOWNSTREAM PRIMER FOR HPV DNA POSITIVE STANDARD

<400> 35
ccttaattaa ggtcaggaaa acagggattt gg 32

<210> 36
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR UPSTREAM PRIMER FOR HUMAN BETA-GLOBULIN GENE

<400> 36
ggatctgtcc actcctgatg ctgtta 26

<210> 37
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR DOWNSTREAM PRIMER FOR HUMAN BETA-GLOBULIN GENE

<400> 37
acatcaagcg tcccatagac tcac 24