



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년06월25일
(11) 등록번호 10-1992390
(24) 등록일자 2019년06월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/70 (2006.01) C12Q 1/6818 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/705 (2013.01)
C12Q 1/6818 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2018-0138275
(22) 출원일자 2018년11월12일
심사청구일자 2018년11월12일
(56) 선행기술조사문헌
KR101642784 B1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
대한민국
(72) 발명자
원경미
부산광역시 기장군 기장읍 기장해안로 216 (시랑리, 수산과학원)
정승희
부산광역시 기장군 기장읍 기장해안로 216 (시랑리, 수산과학원)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이치영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 12 항

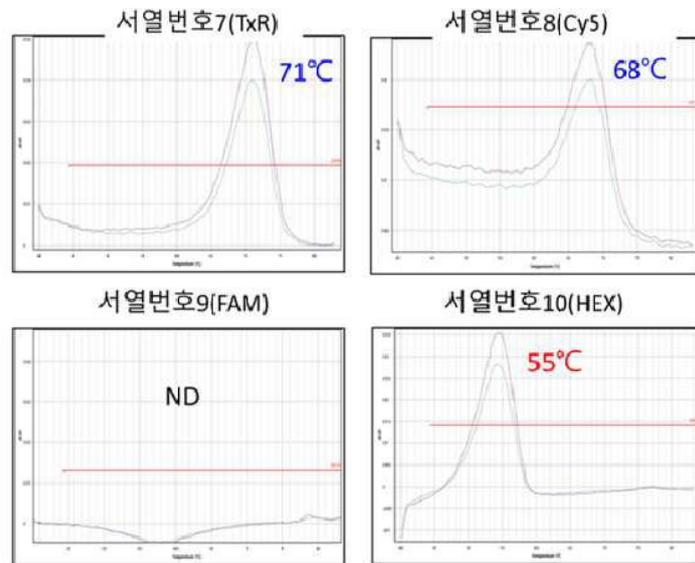
심사관 : 김현태

(54) 발명의 명칭 **글 허피스 바이러스 검출 및 유형 판별을 위한 유전자 마커, 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 글 허피스 바이러스 검출 및 유형 판별을 위한 유전자 마커, 및 이의 용도에 관한 것으로, 더 상세하게는 시료 내 글 허피스 바이러스 감염 여부를 검출하기 위한 유전자 마커, 및 검출된 글 허피스 바이러스의 유형을 판별하기 위한 유전자 마커, 및 상기 유전자 마커에 특이적으로 결합하는 PNA 프로브를 이용하여 시료의 글
(뒷면에 계속)

대표도 - 도4



	구분	서열번호 7	서열번호 8	서열번호 9	서열번호 10	비고
예상 판정표	Group 1	1	1	0	0	일치
실제 판정표	Group 1	1	1	0	0	

히피스 바이러스 감염 여부를 검출하고, 추가적인 PNA 프로브를 이용하여 검출된 굴 히피스 바이러스의 유형을 판별하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 굴 히피스 바이러스에 특이적으로 결합하는 PNA 프로브를 이용하여 굴 히피스 바이러스 감염 여부를 종래 PCR법과 시퀀싱을 통해 검출하던 방식에 비해 훨씬 간단·신속·정확하게 검출할 수 있도록 하였고, 특히 추가적인 PNA 프로브의 조합 사용으로 굴 히피스 바이러스 유형까지 동시에 판별할 수 있도록 함으로써, 최근 굴 양식에 가장 큰 위협으로 떠오르고 있는 굴 히피스 바이러스의 감염 및 확산을 조기에 차단할 수 있는 효과가 있다.

(52) CPC특허분류

C12Q 2525/107 (2013.01)

C12Q 2565/101 (2013.01)

(72) 발명자

조미영

부산광역시 기장군 기장을 기장해안로 216 (시랑리, 수산과학원)

도정완

부산광역시 기장군 기장을 기장해안로 216 (시랑리, 수산과학원)

김명석

부산광역시 기장군 기장을 기장해안로 216 (시랑리, 수산과학원)

이덕찬

부산광역시 기장군 기장을 기장해안로 216 (시랑리, 수산과학원)

김나영

부산광역시 기장군 기장을 기장해안로 216 (시랑리, 수산과학원)

한현자

부산광역시 기장군 기장을 기장해안로 216 (시랑리, 수산과학원)

권문경

부산광역시 기장군 기장을 기장해안로 216 (시랑리, 수산과학원)

황지연

부산광역시 기장군 기장을 기장해안로 216 (시랑리, 수산과학원)

유지현

부산광역시 기장군 기장을 기장해안로 216 (시랑리, 수산과학원)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1525006362

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 농림식품기술기획평가원

연구사업명 수산생물방역체계구축

연구과제명 수산생물 방역프로그램 개발·운영

기 여 율 1/1

주관기관 국립수산과학원

연구기간 2017.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 표시되는 굴 허피스 바이러스 검출용 유전자 마커.

청구항 2

제1항의 유전자 마커에 상보적으로 결합하는 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 굴 허피스 바이러스 검출용 PNA 프로브.

청구항 3

제2항에 있어서, 리포터 및 소광자 중에서 어느 하나 이상이 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 PNA 프로브.

청구항 4

서열번호 5, 6의 염기서열로 표시되는 프라이머 및 제2항의 PNA 프로브를 포함하는 굴 허피스 바이러스 검출용 조성물.

청구항 5

서열번호 5, 6의 염기서열로 표시되는 프라이머 및 제2항의 PNA 프로브를 포함하는 굴 허피스 바이러스 검출용 키트.

청구항 6

다음 단계를 포함하는 굴 허피스 바이러스를 검출하는 방법:

- (a) 검체로부터 핵산을 추출하는 단계
- (b) 상기 핵산으로부터 서열번호 5와 서열번호 6의 염기서열로 표시되는 프라이머를 이용하여 핵산 단편을 생성시키는 단계;
- (c) 상기 핵산 단편에 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브를 혼성화시키는 단계;
- (d) 상기 혼성화된 산물의 온도를 높이면서 온도별 용해곡선을 얻는 단계; 및
- (e) 상기 용해곡선의 분석을 통해 용해온도로부터 굴 허피스 바이러스를 검출하는 단계.

청구항 7

서열번호 5, 6의 염기서열로 표시되는 프라이머, 제2항의 PNA 프로브, 및 서열번호 8 내지 서열번호 10의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브를 포함하는 굴 허피스 바이러스 유형 판별용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 4종의 PNA 프로브는 각각 서로 상이한 리포터 및 소광자 중에서 어느 하나 이상이 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

서열번호 5, 6의 염기서열로 표시되는 프라이머, 제2항의 PNA 프로브, 및 서열번호 8 내지 서열번호 10의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브를 포함하는 굴 허피스 바이러스 유형 판별용 키트.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 4종의 PNA 프로브는 각각 서로 상이한 리포터 및/또는 소광자가 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 11

다음 단계를 포함하는 굴 허피스 바이러스의 유형을 판별하는 방법:

- (a) 검체로부터 핵산을 추출하는 단계
- (b) 상기 핵산으로부터 서열번호 5와 서열번호 6의 염기서열로 표시되는 프라이머를 이용하여 핵산 단편을 생성시키는 단계;
- (c) 상기 핵산 단편에 서열번호 7 내지 서열번호 10의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브를 혼성화시키는 단계;
- (d) 상기 혼성화된 산물의 온도를 높이면서 온도별 용해곡선을 얻는 단계; 및
- (e) 상기 용해곡선의 분석을 통해 용해온도로부터 굴 허피스 바이러스를 유형을 판별하는 단계.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 (e) 단계는,

- (i) 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브 및 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브와의 용해온도가 확인되는 경우, reference type 굴 허피스 바이러스로 판별하고,
- (ii) 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브, 서열번호 9의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브 및 서열번호 9의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브와의 용해온도가 확인되는 경우, u-var type 굴 허피스 바이러스로 판별하고,
- (iii) 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브 와 서열번호 8으로 표시되는 PNA 프로브 및 서열번호 10으로 표시되는 PNA 프로브와의 용해온도가 확인되는 경우, china type 굴 허피스 바이러스로 판별하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 굴 허피스 바이러스 검출 및 유형 판별을 위한 유전자 마커, 및 이의 용도에 관한 것으로, 더 상세하게는 시료 내 굴 허피스 바이러스 감염 여부를 검출하기 위한 유전자 마커, 및 검출된 굴 허피스 바이러스의 유형을 판별하기 위한 유전자 마커, 및 상기 유전자 마커에 특이적으로 결합하는 PNA 프로브를 이용하여 시료의 굴 허피스 바이러스 감염 여부를 검출하고, 추가적인 PNA 프로브를 이용하여 검출된 굴 허피스 바이러스의 유형을 판별하는 방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

[0003] 굴은 글리코젠, 비타민 A, B12 및 아연 함량이 풍부하면서, 타우린 등과 같은 여러 가지 건강 기능성분을 함유하고 있을 뿐만 아니라 열량이 낮으면서 굴 특유의 향미가 있어, 예로부터 세계적으로 어느 나라 소비자들이나 즐겨먹고 있는 대표적인 패류 자원이다(Shiozaki et al., 2010; Chen et al., 2016). 우리나라에서도 굴은 예로부터 선호되어 왔고, 생산량도 최근 10년간 253천-351천 M/T 범위에 이를 정도로 점차 증가되어 전체 패류 생산량의 63.1-72.9% 범위에 이르고 있다(KOSIS, 2017). 우리나라에서 굴의 소비 패턴은 예전과는 달리 최근에는 해당연도 10월부터 다음 해 4월까지의 경우 주로 고가의 생굴로 소비되었고, 이후부터 8월까지의 경우 냉동굴, 건조굴 및 통조림등과 같은 가공품의 형태로 다량 소비되는 패턴을 나타내었다.

[0004] 굴은 생굴과 여러 가지 가공품과 같은 최종 산물에 관계없이 모두 생물학적 및 화학적 위생 안전성을 확보하여야 상품성을 가질 수 있다. 하지만, 최근 굴이 양식되는 해양생태계는 원자력 발전소의 이상 현상 발생, 이상기후변화, 경제발전에 따른 하수량의 증가, 레저(낚시선 등)에 의한 오물 등으로부터 야기되는 일반세균, 대장균군 및 식중독균 등과 같은 미생물학적 오염원뿐만 아니라, 중금속, 방사능, 벤조피렌, 플랑크톤에 의하여 야기되는 여러 가지 패류독소 등과 같은 이화학적 오염원도 점차 증가하고 있는 추세이다. 또한, 굴은 서식 생태 특성상 정착성이어서 주변 환경으로부터의 오염을 피할 수 없을 뿐 아니라, 대부분의 서식 환경이 폐쇄 내만에 집중되어 있다. 특히, 굴은 먹이를 여과하여 섭취하는 이때패이어서 일부 오염된 지역에 서식하는 경우 이화학적 위해 요인뿐만 아니라 미생물에도 오염되어 있을 수도 있어 이를 섭취한 소비자들에게 아주 심각한 위해를 일으킬 수도 있다. 이러한 측면에서 최근 굴에 대한 국내외 기준 규격의 강화가 두드러지게 나타나고 있다 (박선영 et al., 2017). 특히, 최근 치명적인 굴 허피스 바이러스(Ostreid herpesvirus)에 의한 굴의 집단 폐사가 태평양 연안을 중심으로 확인되면서, 이에 대한 시급한 대책 마련이 요구되는 실정이다.

[0005] 현재 굴 허피스 바이러스를 진단하기 위한 방법 중 분자진단을 사용한 진단 방법이 개발되어 있으며, 이는 일반적인 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)법을 수행한 다음 상기 반응의 증폭산물을 전기영동법으로 확인하는 방법이다. 그러나 상기 방법은 PCR 증폭산물의 전기영동 확인 시 객관적인 분석이 불가능하거나(gray zone), 희미한 PCR 증폭산물을 클로닝 벡터를 이용하여 클로닝한 후 시퀀싱을 통하여 상기 증폭산물의 염기서열을 재확인하는 등의 검증 단계를 거치게 되는데, 이러한 검증 단계는 비특이적 산물(non-specific PCR band)의 서열을 확인하여 검증하는 방식으로 분석 절차가 복잡하고, 많은 시간을 소모하는 등의 문제점을 가지고 있다. 특히, 종래 PCR법에 의해 증폭산물이 양성으로 확인되면(시퀀싱 판정 이전), 수산생물전염병의 감염이 우려되는 경우에 해당되어 대응조치를 취하게 됨에 따라, 이후 시퀀싱에 따라 위양성으로 판정되는 경우 검사기관의 신뢰성 하락 및 어업인의 피해 발생 사례도 있으므로, 신속, 정확하게 굴 허피스 바이러스의 감염 여부를 진단하는 방법의 개선이 절실하다.

[0006] 또한, 굴 허피스바이러스의 특성상 병원성에 따른 구분이 필요하나, 기존 PCR 법에서는 이를 확인 하는 방법이 시퀀싱 방법 밖에 없어 즉각적인 대응에 어렵다는 문제점이 있었다.

[0007] 이러한 기술적 배경하에서, 본 발명자들은 굴 허피스 바이러스의 검출용 유전자 마커를 발굴하고, 상기 유전자 마커에 특이적으로 결합하는 PNA 프로브를 이용하는 경우 굴 허피스 바이러스를 간단·신속·정확하게 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 추가적인 PNA 프로브를 조합하여 사용함으로써 굴 허피스 바이러스의 유형도 함께 판별할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Shiozaki K et al., 2010. Identification of oyster-derived hypotensive peptide acting as angiotensin-I-converting enzyme inhibitor. Fisheries Sci 76, 865-872. <http://dx.doi.org/10.1007/s12562-010-0264-0>.

(비특허문헌 0002) Chen H et al., 2016. Microbiological analysis and microbiota in oyster: a review. ISJ 13, 374-388.

(비특허문헌 0003) 박선영 et al., 2017. 양식산 굴(Crassostrea gigas)의 생굴 및 가공소재용으로서 화학적 및 생물학적 위생 특성. 한국 수산과학회지 50(4), 335-342.

(비특허문헌 0004) Disease of Aquatic organisms 2013, 105 109-126

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 굴 허피스 바이러스 검출용 유전자 마커, 굴 허피스 바이러스 검출용 PNA 프로브, 굴 허피스 바이러스 검출용 조성물, 굴 허피스 바이러스 검출용 키트, 및 굴 허피스 바이러스의 검출방법을 제공하는데 있다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 굴 허피스 바이러스 유형 판별용 조성물, 굴 허피스 바이러스 유형 판별용 키트, 및 굴 허피스 바이러스의 유형 판별방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 굴 허피스 바이러스 검출용 유전자 마커를 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한, 상기 유전자 마커에 상보적으로 결합하는 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 굴 허피스 바이러스 검출용 PNA 프로브를 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한, 서열번호 5, 6의 염기서열로 표시되는 프라이머 및 상기 PNA 프로브를 포함하는 굴 허피스 바이러스 검출용 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한, 서열번호 5, 6의 염기서열로 표시되는 프라이머 및 상기 PNA 프로브를 포함하는 굴 허피스 바이러스 검출용 키트를 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한,
 - (a) 검체로부터 핵산을 추출하는 단계
 - [0018] (b) 상기 핵산으로부터 서열번호 5와 서열번호 6의 염기서열로 표시되는 프라이머를 이용하여 핵산 단편을 생성시키는 단계;
 - [0019] (c) 상기 핵산 단편에 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브를 혼성화시키는 단계;
 - [0020] (d) 상기 혼성화된 산물의 온도를 높이면서 온도별 용해곡선을 얻는 단계; 및
 - [0021] (e) 상기 용해곡선의 분석을 통해 용해온도로부터 굴 허피스 바이러스를 검출하는 단계;를 포함하는 굴 허피스 바이러스를 검출하는 방법을 제공한다.
- [0023] 본 발명은 또한, 서열번호 5, 6의 염기서열로 표시되는 프라이머, 상기 PNA 프로브, 및 서열번호 8 내지 서열번호 10의 염기서열로 표시되는 굴 허피스 바이러스 검출용 프로브를 포함하는 굴 허피스 바이러스 유형 판별용 조성물을 제공한다.
- [0024] 본 발명은 또한, 서열번호 5, 6의 염기서열로 표시되는 프라이머, 상기 PNA 프로브, 및 서열번호 8 내지 서열번호 10의 염기서열로 표시되는 굴 허피스 바이러스 검출용 프로브를 포함하는 굴 허피스 바이러스 유형 판별용 키트를 제공한다.
- [0025] 본 발명은 또한,
 - [0026] (a) 검체로부터 핵산을 추출하는 단계
 - [0027] (b) 상기 핵산으로부터 서열번호 5와 서열번호 6의 염기서열로 표시되는 프라이머를 이용하여 핵산 단편을 생성시키는 단계;
 - [0028] (c) 상기 핵산 단편에 서열번호 7 내지 서열번호 10의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브를 혼성화시키는 단계;
 - [0029] (d) 상기 혼성화된 산물의 온도를 높이면서 온도별 용해곡선을 얻는 단계; 및
 - [0030] (e) 상기 용해곡선의 분석을 통해 용해온도로부터 굴 허피스 바이러스를 유형을 판별하는 단계;를 포함하는 굴

허피스 바이러스의 유형을 판별하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0031] 본 발명은 굴 허피스 바이러스에 특이적으로 결합하는 PNA 프로브를 이용하여 굴 허피스 바이러스 감염 여부를 종래 PCR법과 시퀀싱을 통해 검출하던 방식에 비해 훨씬 간단·신속·정확하게 검출할 수 있도록 하였고, 특히 추가적인 PNA 프로브의 조합 사용으로 굴 허피스 바이러스 유형까지 동시에 판별할 수 있도록 함으로써, 최근 굴 양식에 가장 큰 위협으로 떠오르고 있는 굴 허피스 바이러스의 감염 및 확산을 조기에 차단할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 프라이머 쌍을 이용한 비대칭 PCR 단계, PNA 프로브와의 혼성화 단계 및 혼성화 산물이 용해되는 단계를 나타내는 개념도이다.

도 2는 본 발명에 따른 실험을 진행하는 경우 야생형과 돌연변이형의 용해온도 차이가 나타나는 이유를 설명하기 위한 개념도이다.

도 3은 서열번호 7 내지 10의 염기서열로 표시되는 4종의 PNA 프로브가 각각 이에 상보적으로 결합하는 서열과 혼성화 된 후 용해되는 과정에서 용해곡선의 피크 및 용해온도를 확인한 결과이다.

도 4는 서열번호 7 내지 10의 염기서열로 표시되는 4종의 PNA 프로브와 Group 1(reference type)에 해당하는 굴 허피스 바이러스 유형의 유전자를 인공 합성하여 본 발명의 방법에 따라 반응시킴으로써, 본 발명에 따른 판별 방법의 신뢰도를 검증한 결과이다.

도 5는 서열번호 7 내지 10의 염기서열로 표시되는 4종의 PNA 프로브와 Group 2(u-var type)에 해당하는 굴 허피스 바이러스 유형의 유전자를 인공 합성하여 본 발명의 방법에 따라 반응시킴으로써, 본 발명에 따른 판별 방법의 신뢰도를 검증한 결과이다.

도 6은 서열번호 7 내지 10의 염기서열로 표시되는 4종의 PNA 프로브와 Group 3(china type)에 해당하는 굴 허피스 바이러스 유형의 유전자를 인공 합성하여 본 발명의 방법에 따라 반응시킴으로써, 본 발명에 따른 판별 방법의 신뢰도를 검증한 결과이다.

도 7은 종래 PCR 법에 따라 다양한 시료로부터 굴 허피스 바이러스를 검출한 결과이다.

도 8은 서열번호 7 내지 10의 염기서열로 표시되는 4종의 PNA 프로브와 굴 허피스 바이러스에 감염된 시료(가리비 1)를 본 발명의 방법에 따라 반응시킴으로써, 굴 허피스 바이러스의 유형을 확인하고 이의 신뢰도를 검증한 결과이다.

도 9은 서열번호 7 내지 10의 염기서열로 표시되는 4종의 PNA 프로브와 굴 허피스 바이러스에 감염된 시료(가리비 2)를 본 발명의 방법에 따라 반응시킴으로써, 굴 허피스 바이러스의 유형을 확인하고 이의 신뢰도를 검증한 결과이다.

도 10은 서열번호 7 내지 10의 염기서열로 표시되는 4종의 PNA 프로브와 굴 허피스 바이러스에 감염된 시료(굴 1)를 본 발명의 방법에 따라 반응시킴으로써, 굴 허피스 바이러스의 유형을 확인하고 이의 신뢰도를 검증한 결과이다.

도 11은 서열번호 7 내지 10의 염기서열로 표시되는 4종의 PNA 프로브와 굴 허피스 바이러스에 감염된 시료(꼬막 1)를 본 발명의 방법에 따라 반응시킴으로써, 굴 허피스 바이러스의 유형을 확인하고 이의 신뢰도를 검증한 결과이다.

도 12은 서열번호 7 내지 10의 염기서열로 표시되는 4종의 PNA 프로브와 굴 허피스 바이러스에 감염된 시료(꼬막 2)를 본 발명의 방법에 따라 반응시킴으로써, 굴 허피스 바이러스의 유형을 확인하고 이의 신뢰도를 검증한 결과이다.

도 13은 서열번호 7 내지 10의 염기서열로 표시되는 4종의 PNA 프로브와 음성체를 본 발명의 방법에 따라 반응시킴으로써, 굴 허피스 바이러스의 유형을 확인하고 이의 신뢰도를 검증한 결과이다.

도 14은 서열번호 7 내지 10의 염기서열로 표시되는 4종의 PNA 프로브와 굴 허피스 바이러스에 감염된 시료(꼬막 3)를 본 발명의 방법에 따라 반응시킴으로써, 굴 허피스 바이러스의 유형을 확인하고 이의 신뢰도를 검증한 결과이다.

결과이다.

도 15은 서열번호 7 내지 10의 염기서열로 표시되는 4종의 PNA 프로브와 굴 허피스 바이러스에 감염된 시료(꼬막 4)를 본 발명의 방법에 따라 반응시킴으로써, 굴 허피스 바이러스의 유형을 확인하고 이의 신뢰도를 검증한 결과이다.

도 16은 시료 내 주형 DNA의 농도(copy 수)에 따른 본 발명의 민감도를 확인한 결과이다.

도 17은 굴 허피스 바이러스의 주요 숙주인 굴 자체 DNA에 의해 본 발명의 방법이 위양성 판별되는지 여부를 확인한 결과이다.

도 18은 굴 허피스 바이러스의 주요 숙주인 꼬막 자체 DNA에 의해 본 발명의 방법이 위양성 판별되는지 여부를 확인한 결과이다.

도 19은 굴 허피스 바이러스의 주요 숙주인 가리비 자체 DNA에 의해 본 발명의 방법이 위양성 판별되는지 여부를 확인한 결과이다.

도 20은 굴 허피스 바이러스의 주요 숙주인 홍합 자체 DNA에 의해 본 발명의 방법이 위양성 판별되는지 여부를 확인한 결과이다.

도 21은 굴 허피스 바이러스의 주요 숙주인 바지락 자체 DNA에 의해 본 발명의 방법이 위양성 판별되는지 여부를 확인한 결과이다.

도 22는 굴 허피스 바이러스의 유형에 따른 계통학적 분류를 나타낸다.(Disease of Aquatic organisms 2013, 105 109-126)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0036] 본 발명에서는 굴 허피스 바이러스를 검출하기 위하여, 종래 유전자 마커에 따른 PCR 산물의 특이/비특이적 증폭여부를 시퀀싱 단계 없이 또는 시퀀싱 단계 전에 검출하기 위한 대안으로, 새로운 유전자 마커 및 이에 특이적으로 결합하는 PNA 프로브를 개발하게 되었다. 더욱 상세하게 설명하면, (1) 굴 허피스 바이러스를 검출할 수 있는 굴 허피스 바이러스 특이적인 검출용 PNA 프로브(서열번호 7) 및 프라이머 쌍(서열번호 5 및 서열번호 6)을 포함하는 올리고머 혼합물(oligomer mixture); 및 (2) 상기 프라이머를 이용하여 생성된 증폭산물을 주형으로 단일가닥 DNA를 생성하고 상기 단일가닥에 상기 PNA 프로브를 혼성화시키기 위한 버퍼;를 포함하는 굴 허피스 바이러스 검출할 수 있는 조성물 또는 키트를 개발하였다.
- [0037] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 굴 허피스 바이러스 검출용 유전자 마커에 관한 것이다.
- [0038] 본 발명은 다른 관점에서, 서열번호 7로 표시되는 굴 허피스 바이러스 검출용 PNA 프로브에 관한 것이다.
- [0039] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 프라이머, 및 상기 PNA 프로브를 포함하는 굴 허피스 바이러스 검출용 조성물 및 키트에 관한 것이다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 상기 PNA 프로브는 리포터 및 소광자 중에서 어느 하나 이상이 결합되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0042] 본 발명에서는 또한, 굴 허피스 바이러스에 대하여, 서열번호 5 및 서열번호 6의 염기서열로 표시되는 검출용 프라이머 쌍을 이용한 비대칭 PCR법에 의해 합성된 단일가닥의 PCR 증폭산물에 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브를 혼성화시킨 후 상기 혼성화물을 용해시켜 얻은 용해곡선으로부터 용해온도(Tm)를 확인하여 굴 허피스 바이러스를 검출하고 상기 바이러스의 감염 여부를 확인할 수 있었다.
- [0043] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서
- [0044] (a) 검체로부터 핵산을 추출하는 단계
- [0045] (b) 상기 핵산으로부터 서열번호 5와 서열번호 6의 염기서열로 표시되는 프라이머를 이용하여 핵산 단편을 생성

시키는 단계;

- [0046] (c) 상기 핵산 단편에 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브를 혼성화시키는 단계;
- [0047] (d) 상기 혼성화된 산물의 온도를 높이면서 온도별 용해곡선을 얻는 단계; 및
- [0048] (e) 상기 용해곡선의 분석을 통해 용해온도로부터 굴 허피스 바이러스를 검출하는 단계;를 포함하는 굴 허피스 바이러스의 검출방법에 관한 것이다.
- [0049] 본 발명에 있어서, 상기 단일가닥 형성용 버퍼는 DNA 중합효소, dNTPs(deoxynucleotides) 및 안정제 (Stabilizer)를 함유할 수 있고, 여기서, DNA 중합효소는 Taq 중합효소일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계에서는 서열번호 5와 서열번호 6의 염기서열로 표시되는 프라이머를 대체하여, 종래 알려진 프라이머 쌍을 이용하여 상기 핵산을 증폭하고, TaqMan 프로브를 추가로 포함시켜 증폭곡선을 얻을 수 있다.
- [0051] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계는 실시간 PCR(Real-Time Polymerase Chain Reaction)방법으로 수행할 수 있다.
- [0053] 본 발명에서는 또한, 굴 허피스 바이러스의 유형에 따라 공통되는 서열의 패턴을 분석하고 이들 공통서열을 후보군으로 하여 굴 허피스 바이러스의 유형 판별 여부를 검증함으로써, 굴 허피스 바이러스의 유형을 판별할 수 있는 유전자 마커 및 이에 특이적으로 결합하는 PNA 프로브를 개발하였다.
- [0054] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, 서열번호 5, 6의 염기서열로 표시되는 프라이머, 서열번호 7 내지 서열번호 10의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브를 포함하는 굴 허피스 바이러스 유형 판별용 조성물에 관한 것이다.
- [0055] 본 발명은 또 다른 관점에서, 서열번호 5, 6의 염기서열로 표시되는 프라이머, 제2항의 PNA 프로브, 및 서열번호 8 내지 서열번호 10의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브를 포함하는 굴 허피스 바이러스 유형 판별용 키트에 관한 것이다.
- [0056] 본 발명에 있어서, 상기 4종의 PNA 프로브는 각각 서로 상이한 리포터 및/또는 소광자가 결합되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0058] 상기 4종의 PNA 프로브를 이용하는 경우, 굴 허피스 바이러스 유전자('All type'이라 칭함)가 함유된 시료는 서열번호7의 PNA 프로브와 혼성화 산물(TxR 형광)이 69~73℃에서 용해온도를 나타내었다. 또한, reference type 굴 허피스 바이러스('Group 1'이라 칭함) 유전자가 함유된 시료에서는 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브의 혼성화 산물(TxR 형광)이 69~73℃에서 용해온도를 나타내었고 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브의 혼성화 산물(Cy5 형광)이 66~70℃에서 용해온도를 나타내었다.
- [0059] 한편, u-var type 굴 허피스 바이러스 유전자('Group 2'라 칭함)가 함유된 시료에서는 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브의 혼성화 산물(TxR 형광)이 69~73℃에서 용해온도를 나타내었고, 서열번호 9의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브의 혼성화 산물(FAM)이 61~65℃에서 용해온도를 나타내었다.
- [0060] 마지막으로, china type 굴 허피스 바이러스 유('Group 3'이라 칭함) 유전자를 함유한 시료에서는 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브의 혼성화 산물(TxR 형광)이 69~73℃에서 용해온도를 나타내었고, 서열번호 8으로 표시되는 PNA 프로브의 혼성화 산물(Cy5)이 66~70℃에서 용해온도를 나타내었고, 서열번호 10의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브의 혼성화 산물(HEX)이 66~70℃에서 용해온도를 나타내었다.
- [0061] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서,
- [0062] (a) 검체로부터 핵산을 추출하는 단계
- [0063] (b) 상기 핵산으로부터 서열번호 5와 서열번호 6의 염기서열로 표시되는 프라이머를 이용하여 핵산 단편을 생성시키는 단계;
- [0064] (c) 상기 핵산 단편에 서열번호 7 내지 서열번호 10의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브를 혼성화시키는 단계;
- [0065] (d) 상기 혼성화된 산물의 온도를 높이면서 온도별 용해곡선을 얻는 단계; 및
- [0066] (e) 상기 용해곡선의 분석을 통해 용해온도로부터 굴 허피스 바이러스를 유형을 판별하는 단계;를 포함하는 굴 허피스 바이러스의 유형을 판별하는 방법에 관한 것이다.

- [0067] 본 발명에 있어서, 상기 단일가닥 형성용 버퍼는 DNA 중합효소, dNTPs(deoxynucleotides) 및 안정제(Stabilizer)를 함유할 수 있고, 여기서, DNA 중합효소는 Taq 중합효소일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0068] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계에서는 서열번호 5와 서열번호 6의 염기서열로 표시되는 프라이머를 대체하여, 종래 알려진 프라이머 쌍을 이용하여 상기 핵산을 증폭하고, TaqMan 프로브를 추가로 포함시켜 증폭곡선을 얻을 수 있다.
- [0069] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계는 실시간 PCR(Real-Time Polymerase Chain Reaction)방법으로 수행할 수 있다.
- [0070] 상기 (e) 단계의 용해곡선의 분석에서,
- [0071] (i) 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브 및 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브와의 용해온도가 확인되는 경우, reference type 굴 허피스 바이러스로 판별하고,
- [0072] (ii) 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브 및 서열번호 9로 표시되는 PNA 프로브와의 용해온도가 확인되는 경우, u-var type 굴 허피스 바이러스로 판별하고,
- [0073] (iii) 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브, 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브 및 서열번호 10의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브와의 용해온도가 확인되는 경우, china type 굴 허피스 바이러스로 판별하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0075] 본 발명에서, 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브와의 용해온도가 확인되는 경우란, 혼성화된 산물에서 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브가 용해되면서 69~73℃에서 용해 피크를 나타내는 것을 의미하고, 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브와의 용해온도가 확인되는 경우란, 혼성화된 산물에서 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브가 용해되면서 66~70℃에서 용해 피크를 나타내는 것을 의미하며, 서열번호 9의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브와의 용해온도가 확인되는 경우란, 혼성화된 산물에서 서열번호 9의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브가 용해되면서 61~65℃에서 용해 피크를 나타내는 것을 의미하고, 서열번호 10의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브와의 용해온도가 확인되는 경우란, 혼성화된 산물에서 서열번호 10의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브가 용해되면서 66~70℃에서 용해 피크를 나타내는 것을 의미한다.
- [0076] 본 발명에 있어서, 상기 reference type 굴 허피스 바이러스(Group 1)는 서열번호 7과 서열번호 8으로 구성된 군에서 선택되고,
- [0077] 상기 u-var type 타입 굴 허피스 바이러스(Group 2)는 서열번호 7과 서열번호 9로 구성된 군에서 선택되며,
- [0078] china type 굴 허피스 바이러스(Group 3)는 서열번호 7, 서열번호 8 와 서열번호10로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0080] 본 발명에서 상기 PNA 프로브는 양 말단에 리포터(reporter)와 리포터 형광을 소광(quenching)할 수 있는 소광자(quencher)의 형광 물질이 결합할 수 있다. 상기 리포터(reporter)는 FAM(6-carboxyfluorescein), Texas red, HEX(2',4',5',7',-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), JOE, Cy3 및 Cy5로 구성되는 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 상기 소광자는 TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), BHQ1, BHQ2 및 Dabcyl로 구성되는 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 바람직하게는 Dabcyl(FAM-labeled)을 사용할 수 있다.
- [0081] 펩티드핵산(Peptide nucleic acid, PNA)이란 핵산염기가 인산 결합이 아닌 펩티드 결합으로 연결된 유사 DNA로, 1991년에 Nielsen 등에 의해 처음으로 합성되었으며, 자연계에서는 발견되지 않아 화학적인 방법으로 인공 합성될 수 있다.
- [0082] PNA는 LNA(Locked nucleic acid) 또는 MNA(Mopholino nucleic acid)와 같이 유전자 인식물질의 하나로, 기본 골격이 폴리아미드(polyamide)로 구성되어 있다. PNA는 친화도(affinity)와 선택성(selectivity)이 매우 우수하며, 핵산분해효소에 대한 안정성이 높아 현존하는 제한효소(restriction enzyme)로 분해되지 않는 장점이 있다. 또한, 열/화학적으로 물성 및 안정성이 높아 보관이 용이하고 쉽게 분해되지 않는 장점이 있다.
- [0083] PNA는 상보적인 염기 서열의 천연 핵산과 혼성화(hybridization) 반응을 통해 이중가닥을 형성한다. 길이가 같은 경우 PNA/DNA 이중가닥은 DNA/DNA 이중가닥보다, PNA/RNA 이중가닥은 DNA/RNA 이중가닥보다 안정하다. 또한, PNA는 단일 염기 부정합(single base mismatch) 때문에 이중 가닥이 불안정해지는 정도가 크기 때문에

SNP(single nucleotide polymorphism)를 검출하는 능력이 천연핵산보다 더 뛰어나다

- [0084] 또한, DNA-DNA 결합력보다 PNA-DNA 결합력이 매우 우수하여 1개의 뉴클레오티드 미스 매치(nucleotide miss match)에도 10~15℃가량 차이가 난다. 이러한 결합력의 차이를 이용하여 SNP(Single-nucleotide polymorphism) 및 In/DeI의 뉴클레오티드(nucleotide)의 변화를 검출(detection)할 수 있게 된다.
- [0085] 본 발명에 따른 PNA 염기서열의 길이는 특별히 제한되지는 않지만, 바이러스 종류에 따른 특정 염기서열(예컨대, 염기변이 또는 단일염기 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP))이 포함되도록 12~18mer 길이로 제작할 수 있다. 이 때, PNA 프로브의 길이를 조절하여 원하는 Tm값을 가지도록 PNA 프로브를 디자인할 수도 있고, 같은 길이의 PNA 프로브라도 염기서열에 변화를 주어 Tm값을 조절하는 것도 가능하다. 또한, PNA 프로브는 DNA보다 결합력이 우수하여 기본적인 Tm값이 높기 때문에 DNA보다 짧은 길이로 디자인이 가능하여 가깝게 이웃한 염기변이 또는 SNP라도 검출이 가능하다. 기존의 HRM(High Resolution Melt) 방법에 의하면 Tm값의 차이가 약 0.5℃로 매우 적어서 추가적인 분석프로그램이나 세밀한 온도 변화 또는 보정을 필요로 하고, 이 때문에 2개 이상의 염기변이 또는 SNP가 나타날 경우에는 분석이 어려웠지만, 본 발명에 따른 PNA 프로브는 PNA 프로브의 서열과 SNP에 대해서는 영향을 받지 않아 간편하게 분석이 가능하다.
- [0086] 본 발명에서와 같이, PNA 프로브가 16개의 염기서열을 포함하는 경우에는, 가운데 염기서열 중 하나 이상의 위치에 바이러스의 염기변이 또는 SNP 부위에 상응하는 서열을 가지는 것이 바람직하다. 또한, PNA 프로브는 염기서열의 가운데 부분에 바이러스의 염기변이 또는 SNP 부위에 상응하는 서열을 포함하여 구조적인 변형을 가질 수 있고, 이를 통해 완전한 혼성화를 이루는 표적 핵산(perfect match)과의 용해온도(Tm) 차이를 더욱 크게 할 수 있다.
- [0088] 본 발명에서 "검체" 또는 "시료"는 다양한 시료를 포함하며, 바람직하게는, 본 발명의 방법을 이용하여 생물시료(biosample)를 분석한다. 보다 바람직하게는, 본 발명에 기재된 바이러스 종(species)과 혼합된 시료이거나 상기 바이러스에 감염된 개체(예컨대, 잉어 등)의 시료일 수 있으며, 식물, 동물, 인간, 균류, 박테리아 및 바이러스 기원의 생물시료가 분석될 수 있다. 포유류 또는 인간 기원의 시료를 분석하는 경우, 상기 시료는 특정 조직 또는 기관으로부터 유래될 수 있다. 조직의 대표적인 예로는, 결합, 피부, 근육 또는 신경 조직이 포함된다. 기관의 대표적인 예로는, 눈, 뇌, 폐, 간, 비장, 골수, 흉선, 심장, 림프, 혈액, 뼈, 연골, 췌장, 신장, 담낭, 위, 소장, 고환, 난소, 자궁, 직장, 신경계, 선 및 내부 혈관이 포함된다. 분석되는 생물시료는 생물학적 근원으로부터 나온 어떠한 세포, 조직, 유체액(fluid), 또는 본 발명에 의하여 잘 분석될 수 있는 어떠한 다른 매질(medium)도 포함하며, 이는 인간, 동물, 인간 또는 동물의 소비를 위하여 제조된 음식으로부터 얻은 시료도 포함된다. 또한, 분석되는 생물시료는 체액 시료를 포함하며, 이는 혈액, 혈청, 혈장, 림프, 모유, 소변, 분변, 안구 유액, 타액, 정액, 뇌 추출물(예컨대, 뇌 분쇄물), 척수액, 충수, 비장 및 편도선 조직 추출물이 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0089] 본 발명의 '표적 핵산', '합성 DNA' 또는 '인공합성 올리고'는 검출 여부를 판별하고자 하는 핵산 서열(염기변이 또는 SNP 포함)을 의미하며, 생리생화학적 기능을 가지는 단백질을 코딩하는 '표적 유전자'의 핵산 서열의 특정 부위를 포함하고, 혼성화, 어닐링 또는 증폭 조건 하에서 프라이머 또는 프로브와 어닐링 또는 혼성화된다.
- [0090] 본 발명의 '혼성화'는 상보적인 단일가닥 핵산들이 이중-가닥 핵산을 형성하는 것을 의미한다. 혼성화는 2개의 핵산 가닥 간의 상보성이 완전할 경우(perfect match) 일어나거나 또는 일부 부정합(mismatch) 염기가 존재하여도 일어날 수 있다. 혼성화에 필요한 상보성의 정도는 혼성화 조건에 따라 달라질 수 있으며, 특히 온도에 의하여 조절될 수 있다.
- [0091] 본 발명에 있어서, 상기 용해곡선 분석은 FMCA(Fluorescence Melting Curve Analysis; 형광용해곡선분석) 방법으로 수행하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0092] 본 발명의 리포터 및 소광자가 포함된 PNA 프로브는 표적 핵산과 혼성화된 후 형광 신호가 발생하며, 온도가 올라감에 따라 프로브의 적정 용해 온도에서 표적 핵산과 빠르게 용해되어 형광 신호가 소광되며, 이러한 온도 변화에 따른 상기 형광 신호로부터 얻어진 고해상도의 용해곡선 분석을 통하여 표적 핵산의 염기 변성(염기변이 또는 SNP 포함) 유무를 검출할 수 있다. 상기 PNA 프로브는 표적 핵산 염기서열과 완전한 혼성화(perfect match)를 이루는 경우 예상된 용해온도(Tm) 값을 보이지만, 염기변이가 존재하는 표적 핵산과는 불완전한 혼성화(mismatch)를 이루어서 예상보다 낮은 용해온도(Tm) 값을 보이는 것이 특징이다.
- [0093] 본 발명의 '염기변이'는 표적 핵산의 염기서열에 변이가 일어난 것으로, 단일염기 다형성(single nucleotide

polymorphism, SNP)뿐만 아니라, 염기의 치환, 결실 또는 삽입되어 변이가 일어난 것을 포함하는 것을 특징으로 하며, 본 발명의 PNA 프로브는 표적 핵산의 SNP 또는 표적 핵산의 염기가 치환, 결실 또는 삽입되어 변이가 일어난 것을 용해곡선 분석을 통해 분석할 수 있다.

[0094] 본 발명의 상기 PNA 프로브는 양 말단에 리포터(reporter)와 리포터 형광을 소광(quenching)할 수 있는 소광자(quencher)의 형광 물질이 결합할 수 있다. 상기 리포터(reporter)는 FAM(6-carboxyfluorescein), Texas red, HEX(2',4',5',7',-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), JOE, Cy3 및 Cy5로 구성되는 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 상기 소광자는 TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), BHQ1, BHQ2 및 Dabcyl로 구성되는 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 바람직하게는 Dabcyl(FAM-labeled)을 사용할 수 있다.

[0095] PNA 프로브의 뉴클레오티드와 이에 상보적으로 결합하는 DNA의 뉴클레오티드의 차이에 따라서도 Tm값의 변화를 나타내어 이를 이용한 애플리케이션(application)의 개발이 용이하다. PNA 프로브는 TaqMan 프로브의 가수분해 방법(hydrolysis method)과는 다른 혼성화방법(hybridization method)를 이용하여 분석하며 비슷한 역할을 하는 프로브로는 분자 비컨 프로브(molecular beacon probe), 스코피온 프로브(scorpion probe)가 있다.

[0096] PNA 프로브를 이용한 특정 염기서열(예컨대, 염기변이 또는 SNP) 분석을 위해서는 우선 특정 염기서열을 인식하는 염기(들)가 포함된 프로브와 PCR을 위한 정방향/역방향(Forward/Reverse) 프라이머 세트(종래 프라이머 쌍: OIE(Office of International Epizootics, 세계동물보건기구) 기준에 따름) 및 상기 프라이머 세트에 의해 증폭된 유전자 마커 염기서열을 주형(template)으로 단일가닥의 유전자 마커 서열단편을 생성시키는 프라이머만 있으면 충분하다. 상기 PCR 조건은 기존의 방법을 사용가능하며 PCR이 끝난 후 용해(melting) 과정이 필요하고 0.5℃씩 증가할 때마다 형광의 세기를 측정하여 Tm값을 얻는다. 특히 일반적인 실시간 PCR(real-time PCR) 장치는 널리 보급되어 있으며 HRM(High resolution melting)과 같이 부가적인 프로그램 구입이나 세밀한 온도변화를 요구하지 않는 장점이 있다.

[0097] 본 발명의 용해곡선 분석은 표적 핵산인 DNA 또는 RNA와 프로브로 형성되는 이중체 핵산의 용해온도를 해석하는 방법이다. 이러한 방법은 예컨대, Tm 해석, 또는 상기 이중체의 용해곡선의 해석에 의해 행해지기 때문에, 용해곡선 분석이라고 불리고 있다. 검출 대상(표적)의 특정 염기서열(염기변이 또는 SNP 포함)에 상보적인 프로브를 이용하여, 검출 시료의 표적 단일체 DNA와 상기 프로브와의 하이브리드(이중체 DNA)를 형성시킨다. 계속해서, 이 하이브리드 형성체에 가열 처리를 실시하고, 온도 상승에 따른 하이브리드의 해리(용해)를, 흡광도 등의 시그널의 변동에 의해 검출한다. 그리고, 이 검출 결과에 기초하여 Tm값을 결정함으로써, 특정 염기서열의 유무를 판단하는 방법이다. Tm값은 하이브리드 형성체의 상동성이 높을수록 높고, 상동성이 낮을수록 낮아진다. 이 때문에, 검출 대상의 특정 염기서열과 그것에 상보적인 프로브와의 하이브리드 형성체에 대해서 미리 Tm값(평가 기준값)을 구해 두고, 검출 시료의 표적 단일체 DNA와 상기 프로브와의 Tm값(측정값)을 측정하여, 측정값이 평가 기준값과 동일한 정도이면, 매치, 즉 표적 DNA에 특정 염기서열이 존재한다고 판단할 수 있고, 측정값이 평가 기준값 보다 낮으면, 미스매치, 즉 표적 DNA에 변이가 존재하지 않는다고 판단할 수 있다.

[0098] 본 발명의 형광용해곡선 분석은 형광물질을 사용하여 용해곡선을 분석하는 방법으로, 보다 구체적으로, 형광물질을 포함하는 프로브를 이용하여 용해곡선을 분석할 수 있다. 형광물질은 리포터 및 소광자일 수 있으며, 인터칼레이팅 형광물질일 수 있다.

[0099] 본 발명의 리얼타임 PCR(Real-Time Polymerase Chain Reaction) 방법은, 형광물질이 PCR 과정에서 이중가닥(double strand) DNA 사슬에 결합(interchelating)되도록 하고 PCR 산물의 증폭과 함께, 온도를 높여 주어 DNA 이중 가닥을 풀어줌으로써 DNA 이중 가닥 사이에 존재하는 형광물질의 양이 줄어들게 되는 용해곡선의 패턴, 특히 DNA가 용해(변성)되는 온도(Tm)를 분석하여 특정 염기서열(염기변이, SNP 포함)의 유무로 바이러스 유형의 검출 및/또는 판별이 가능하다.

[0100] 본 발명의 키트는 버퍼, DNA 중합효소 조인자 및 데옥시리보뉴클레오타이드-5-트리포스페이트와 같은 표적 핵산 증폭 반응(예컨대, PCR 반응)을 실시하는데 필요한 시약을 선택적으로 포함할 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 키트는 또한 다양한 폴리뉴클레오타이드 분자, 역전사효소, 다양한 버퍼 및 시약, 및 DNA 중합효소 활성을 억제하는 항체를 포함할 수 있다. 또한, 상기 키트는 특정 반응에서 사용되는 시약의 최적량은, 본 명세서에 개시사항을 습득한 당업자에 의해서 용이하게 결정될 수 있다. 전형적으로, 본 발명의 장비는 앞서 언급된 구성 성분들을 포함하는 별도의 포장 또는 컴파트먼트(compartment)로 제작될 수 있다.

[0101] 상기 키트를 이용하면, PNA 프로브에 의한 용해곡선 분석을 통하여 표적 핵산의 단일염기변이 및 염기의 결손

또는 삽입에 의한 변이를 효과적으로 검출할 수 있고, 이를 통하여 굴 허피스 바이러스의 검출이 가능하다.

[0103] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0105] 실시예 1: 굴 허피스 바이러스 검출용 유전자 마커, 및 상기 바이러스에 특이적인 프라이머 및 PNA 프로브 제작

[0107] 굴 허피스 바이러스를 검출하기 위한 특이적 유전자 마커를 도출하기 위하여, 미국 국립생물공학정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)의 뉴클레오티드 DB(nucleotide database)에 등록된 113개의 염기서열과 국립수산물과학원에서 보유중인 11개의 염기서열을 가지고 분석을 진행 하였으며, 공통서열(consensus)은 총4개 group으로 제작하였으며, gorup1은 35개, group2은 37개, group3은 23개, 기타 group은 33개의 염기서열을 바탕으로 하였다.

표 1

[0110]

No.	Group	Type	NCBI No.
1	Group1	reference type	AB734066.1, AB734073.1, AY459363.1, AY509253.2, AY509253.2-2, GQ153938.1, GQ153938.1-2, JF894308.1, JN800067.1, JN800075.1, JN800076.1, JN800079.1, JN800082.1, JN800083.1, JN800085.1, JN800088.1, JN800089.1, JN800111.1, JN800128.1, KF185069.1, KJ922507.1, KM886578.1, KM886579.1, KM886580.1, KM886581.1, KM886582.1, KM886583.1, KM886584.1, KM886585.1, KM886586.1, KM886587.1, KM886588.1, KM886589.1, KM886590.1
2	Group2	u-var	HQ842610.1, HQ842610, JN800100.1, JN800120.1, JN800122.1, JN800129.1, JQ959597.1, JQ959597, JQ959598.1, KF185070.1, KF185073.1, KF185075.1, KM115665.1, Kor15_Oys, Kor15_Sca, KT429162.1, KT429163.1, KT429164.1, KT429165.1, KT429166.1, KT429167.1, KT429168.1, KT429169.1, KT429170.1, KT429171.1, KT429173.1, KT429174.1,KT429175.1, KT429176.1, KT429177.1, KU861510.1, KU861511.1, KY242785.1, KY242785.1-2, KY271630.1, KY271630.1-2
3	Group3	china	KM886572.1, KM886573.1, KM886574.1, KM886575.1, KM886576.1, KM886577.1, Kor16, Kor16_AS-1, Kor16_AS-2, Kor16_AS-3, Kor16_AS-4, Kor16_BC, Kor16_Oys-1, Kor16_Oys-2, Kor16_Sca-1, KP412538.1, KR075679.1, KR075680.1, KR075681.1, KR075682.1, KR075683.1, KU518246.1
4	Group4	-	AB734057.1, AB734058.1, AB734059.1, AB734060.1, AB734061.1, AB734062.1, AB734063.1, AB734064.1, AB734065.1, AB734067.1, AB734068.1, AB734069.1, AB734070.1, AB734071.1, AB734072.1, AB734074.1, AB734075.1, AB734076.1, AB734077.1, AB734078.1, AB734079.1, JN800130.1, JN800131.1, JN800132.1, JN800133.1, KC685525.1, KM886591.1, , KM886592.1, KM886593.1, KM886594.1, KM886595.1, KT429178.1

[0112] 굴 허피스 바이러스를 검출하기 위한 공통서열(Consensus Sequence) 분석 결과, 서열번호 1 내지 4로 표시되는 4개의 공통서열을 굴 허피스 바이러스를 검출하기 위한 유전자 마커로 선정하였다.

[0113] 또한, 상기 유전자 마커의 증폭용 프라이머 쌍으로 서열번호 5와 서열번호 6으로 표시되는 프라이머 및 상기 유전자 마커의 혼성화용 프로브로 각각 서열번호 7 내지 10으로 표시되는 PNA 프로브를 제작하였다.

[0114] 이 중 서열번호 1은 굴 허피스 바이러스 여부 판별용 유전자 마커이고, 서열번호 7은 굴 허피스 바이러스 여부 판별용 PNA 프로브이다.

[0115] 서열번호 2는 reference type 굴 허피스 바이러스 여부 판별용 유전자 마커이고, 서열번호 8은 reference type 굴 허피스 바이러스 여부 판별용 PNA 프로브이다.

[0116] 서열번호 3은 u-var type 굴 허피스 바이러스 여부 판별용 유전자 마커이고, 서열번호 9는 u-var type 굴 허피스 바이러스 여부 판별용 PNA 프로브이다.

[0117] 서열번호 3과 서열 번호 4는 china type 굴 허피스 바이러스 판별용 유전자 마커이고, 서열번호 8 과 서열 번호 10은 china type 굴 허피스 바이러스 판별용 PNA 프로브이다.

표 2

구분	서열번호	서열(5'→3')	변형
유전자 마커	서열번호 1	ATGAGATTGTGTGTTG	-
유전자 마커	서열번호 2	AGATTGAGTGTGTGGG	-
유전자 마커	서열번호 3	CTTTGCAATTGAAAGAGA	-
유전자 마커	서열번호 4	TCGAATACGACGTTAGG	-
프라이머	서열번호 5	CTCTTTACCATGAAGATACCCACC	-
프라이머	서열번호 6	AAAAATGGTAAGCCGTGCAC	-
PNA 프로브	서열번호 7	CAACACACAATCTCAT	TexasRed, Dabcyl
PNA 프로브	서열번호 8	CCCACACACTCAATCT	Cy5, Dabcyl
PNA 프로브	서열번호 9	TCTCTTTCAATTGCAAAG	FAM, Dabcyl
PNA 프로브	서열번호 10	CCTAACGTCGTATCGA	HEX, Dabcyl

[0121] 상기 표 2에 나타난 바와 같은 염기서열과 리포터 및 소광자로 PNA 프로브를 제작하였다. PNA 프로브는 파나진 (Panagene, 한국)에서 HPLC 정제 방법으로 합성하였고, 합성된 모든 프로브의 순도는 질량분석법을 이용하여 확인하였다. 표적 핵산과의 더 효과적인 결합을 위해 프로브의 불필요한 이차구조는 피하였다.

[0123] 실시예 2: 굴 허피스 바이러스 검출 및 유형 판별을 위한 반응조건 확인

[0125] 실시예 1에서 제작된 PNA 프로브 및 프라이머를 이용하여, 굴 허피스바이러스 핵산 샘플에 대하여 증폭곡선 및 용해곡선을 도출하였고, 이를 분석하여 실시간 유전자 증폭 확인 조건을 최적화하고자 하였다. 이때, 프라이머 세트는 서열번호 5 및 서열번호 6을 사용하였다.

[0126] 실시간(Real-time) PCR 반응은 CFX96™Real-Time 시스템(BIO-RAD 사, 미국)을 이용하여 수행하였으며 서열 번호 1, 2, 3, 4에 상보적인 가닥 형성을 위해 비대칭 PCR로 진행하였다. 비대칭 PCR을 위해 2pmol 순방향 프라이머 1ul, 20pmol 역방향 프라이머 2ul가 사용되었고, PNA 프로브는 5pmol 농도로 0.5ul씩 사용되었으며, 이들 프라이머와 PNA 프로브를 섞어 올리고머 믹스라 칭하였다. 버퍼의 조성은 2X의 사용 농도로 nTaq-HOT(0.2 unit/ μ l), nTaq-HOT buffer(4mM MgCl₂ 함유), dNTP 혼합물(A, T, G, C 각각 0.4mM) 및 안정제(Stabilizer)를 포함하도록 하였다.

[0127] 실시간(Real-time) PCR 반응물의 조성은 표 3에 나타내었다. 키트의 마스터 믹스를 만든 후 DNA를 1~3 μ L 첨가하여 분석을 수행하였다.

표 3

조성	용량
2X 버퍼	10 μ L
올리고머 믹스 (PNA 프로브, 프라이머)	7 μ L
주형(Template, DNA)	1~3 μ L
증류수	up to 20 μ L

[0131] 표 4는 실시간(real-time) PCR 반응 조건을 나타낸 것으로, DNA를 증폭하면서 형광 촬영을 통해 실시간 유전자 증폭을 확인하고, 변성 단계를 통해 단일가닥 DNA를 형성하며, PNA 프로브와 단일가닥 DNA가 혼성화 된 후, 상기 혼성화된 산물의 온도를 높이며 용해 곡선을 얻는 과정이 진행된다. 이 때, 유전자 증폭 및 실시간 유전자 확인 단계에서 형광 촬영을 통해 유전자 증폭을 확인할 수 있었고, 용해 단계에서 형광 촬영을 통해 용해 곡선을 얻을 수 있었다.

표 4

단계	온도(℃)	반응시간 및 사이클	
Pre-denaturation	95	10 min	
유전자 증폭 및 실시간 유전자 확인	95	30 sec	45 cycle
	55	30 sec	
	72	50 sec	
변성(Denaturation)	95	1 min	
프로브 결합(Probe binding)	75	30 sec	
	55	30 sec	
융해(Melting)	45 to 85	Increment 1.0℃ 5 sec (TexasRed)	

[0133]

[0135]

상기와 같이 제작된 PNA 프로브 각각에 대한 융해 곡선을 확인해 본 결과, 도 3에서와 같이, 해당 시료에 대해 PNA 프로브 7 내지 10은 각각 72℃, 68℃, 64℃, 68℃에서 깨끗한 융해 곡선을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 서열번호 7의 PNA 프로브는 70~74℃, 서열번호 8의 PNA 프로브는 66~70℃, 서열번호 9의 PNA 프로브는 62~66℃, 서열번호 10의 PNA 프로브는 66~70℃ 범위에서 융해 피크가 관찰되는 경우, 해당 PNA 프로브에 의해 검출되는 표적 핵산이 존재하는 것으로 판단할 수 있을 것이다.

[0137]

실시예 3: 굴 허피스 바이러스의 유형 판별 시험

[0139]

실시예 2에서 제작한 PNA 프로브 4종을 동시에 시료에 첨가하고, 한 번의 반응을 통하여 굴 허피스 바이러스이 유형을 판별할 수 있는지 확인해 보고자 하였다.

[0140]

굴 허피스 바이러스 유전자('All'이라 칭함)가 함유된 시료는 PNA 프로브 7에서 해당 융해온도를 나타낼 것이고, reference type 굴 허피스 바이러스('Group 1'이라 칭함) 유전자가 함유된 시료에서는 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브 및 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브에서 해당 융해온도를 나타낼 것이며, u-var type 굴 허피스 바이러스 유전자('Group 2'라 칭함)가 함유된 시료에서는 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브 와 서열번호 9의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브에서 해당 융해온도를 나타낼 것이고, china type 굴 허피스 바이러스('Group 3'이라 칭함) 유전자를 함유한 시료에서는 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브 및 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 PNA 프로브 및 서열 번호10으로 표시되는 PNA 프로브에서 해당 융해온도를 나타낼 것이다.

[0141]

이를 실험적으로 확인하기 위하여, 각 굴 허피스 바이러스 유형에 따른 그룹(Group 1, Group 2, Group 3)을 대표하는 서열을 합성하고 이를 기초로 실시예 2의 반응 조건에 따라 실험을 진행한 결과, 도 4 내지 도 6에 나타난 바와 같이, 예상했던 프로브의 조합에서 융해온도가 도출되어, 합성된 서열의 유전자형을 정확히 판별할 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 각 프로브에 대한 융해온도 유무에 따라 이를 이진법의 코드로 표현하여, 해당 코드분류표를 통하여, 해당 굴 허피스 바이러스 유형을 간단하게 판별할 수 있도록 하였다.

[0143]

상기 결과를 기초로, 실제 어패류에 감염된 굴 허피스 바이러스의 유형을 판별하고자 하였다. 우선 표 5에 표시된 시료에 굴 허피스 바이러스의 감염 여부를 서열번호 5 및 6의 프라이머를 이용한 종래 PCR법으로 확인한 결과, 6번 음성체(NTC)를 제외한 시료에서 굴 허피스바이러스가 존재하는 것으로 확인되었다(도 7 참조).

표 5

No.	1	2	3	4	5	6	7	8
시료	가비리 1	가리비 2	굴 1	꼬막 1	꼬막 2	음성체(NTC)	꼬막 3	꼬막 4

[0145]

[0147]

이후, 상기 시료를 본 발명의 PNA 프로브 4종을 함께 포함하여 실시예 2의 반응 조건에 따라 실험을 진행한 결과, 도 8 내지 도 15에 나타난 바와 같이 굴 허피스바이러스의 감염 여부 및 유형을 확인할 수 있었고, 해당 시료로부터 분리된 굴 허피스바이러스의 유전자를 서열분석(Sequencing)해 본 결과, PNA 프로브를 통한 유형 판별과 동일한 결과를 나타내는 것으로 확인되었고, 이로부터 본 발명의 신뢰도를 확인할 수 있었다.

[0149]

실시예 4: 굴 허피스 바이러스 검출 및 판별 반응조건에 민감도 확인

[0151]

실시예 2에서 확인한 반응조건에서 유전자 농도를 각각 변화시키며 본 발명의 민감도를 확인하고자 하였다. 이를 위하여 시료에 포함된 PCR 주형(template)으로 사용되는 표적 유전자를 각각 10000copy, 1000copy, 100copy

로 정량하여 주입한 후, 해당 용해온도가 관찰되는지 확인하였다.

[0152] 그 결과, 도 16에 나타낸 바와 같이, 10000copy, 1000copy, 100copy 모두에서 PNA 프로브를 이용한 용해곡선이 용해피크를 나타내어, 본 발명을 이용하면 매우 적은 양의 시료로부터도 굴 허피스 바이러스를 검출하고 그 유형을 판별할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0154] **실시예 5: 굴 허피스바이러스 키트의 특이도 확인**

[0156] 굴 허피스 바이러스의 숙주로 알려진 굴, 꼬막, 가리비, 홍합, 바지락 자체 DNA에 의한 간섭 현상이 있는지 여부를 확인하기 위하여, 굴 허피스 바이러스에 감염되지 않은 굴, 꼬막, 가리비, 홍합, 바지락의 DNA를 추출하여 실시예 2와 동일한 실험방법을 적용해 보았다.

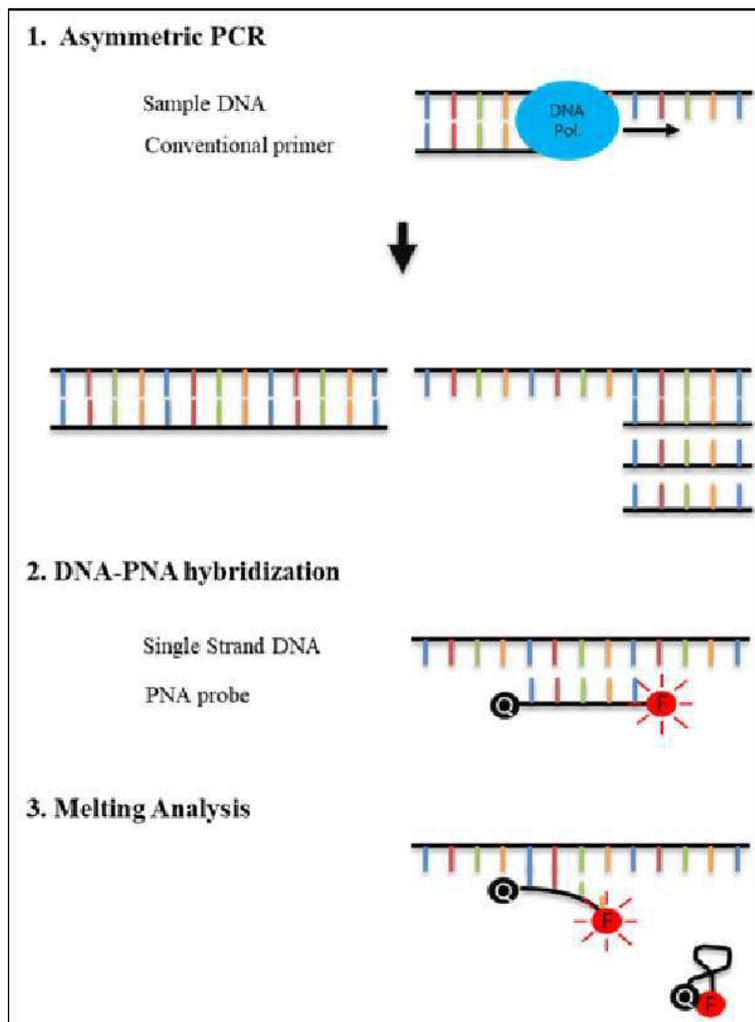
[0157] 그 결과, 도 17~도 21에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 PNA 프로브에 따른 용해곡선이 전혀 확인되지 않았으며, 이로부터 본 발명에 따른 PNA 프로브는 숙주 DNA와의 간섭 없이 굴 허피스 바이러스 특이적으로 반응하는 것을 검증할 수 있었다.

[0159] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

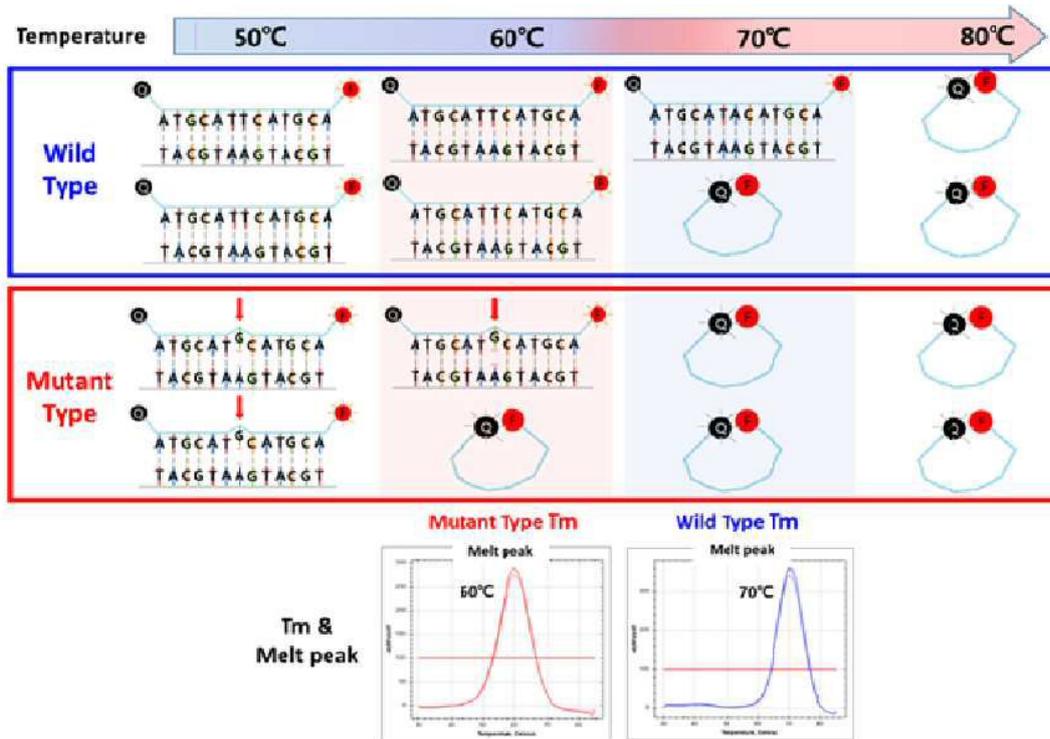
[0160]

도면

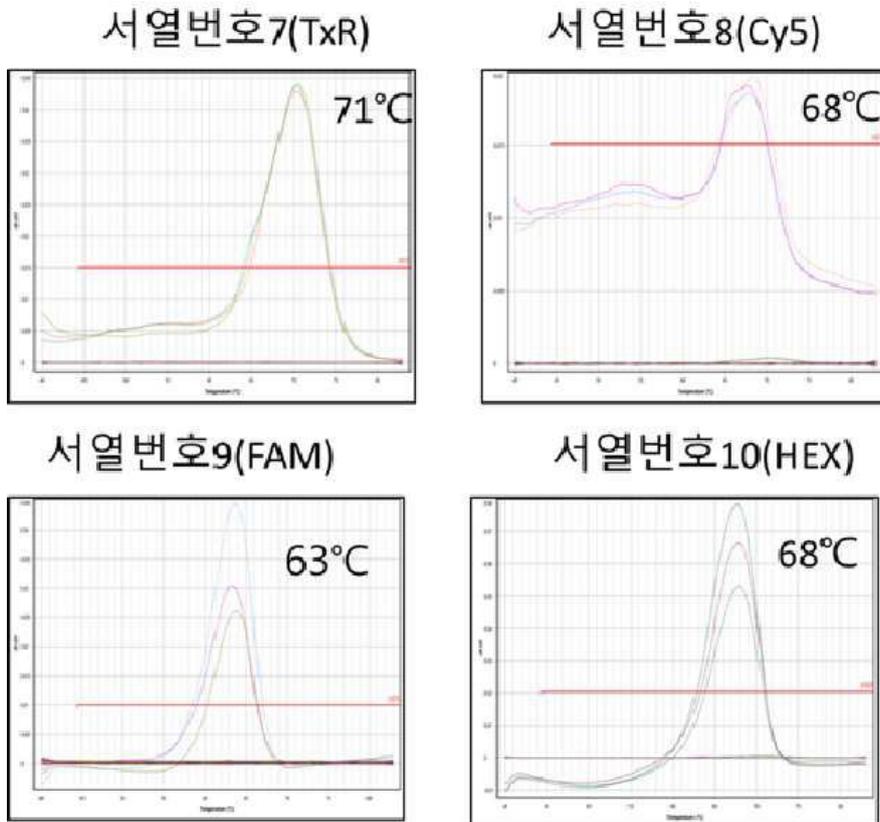
도면1



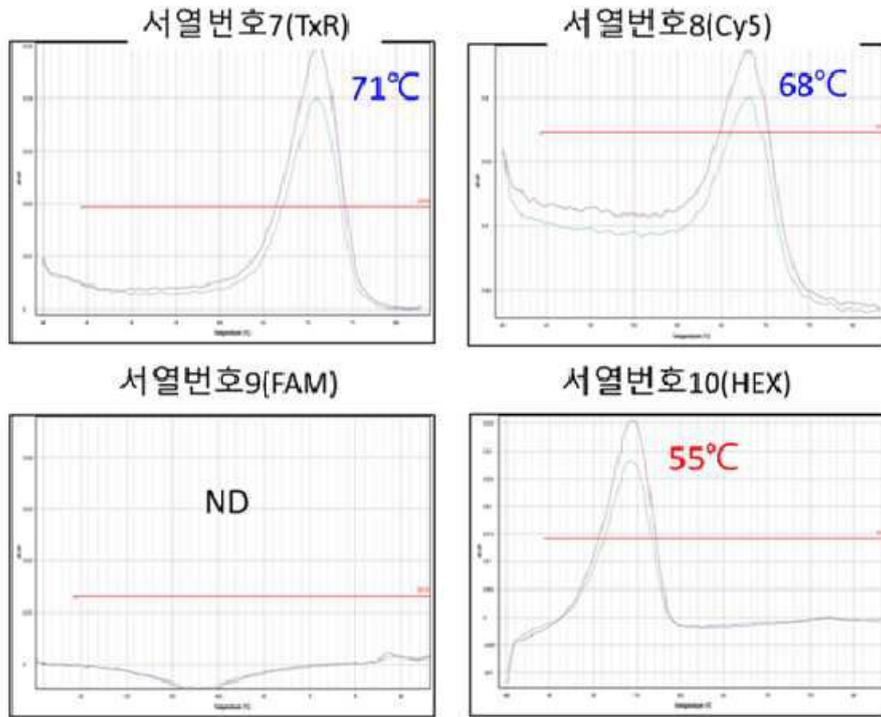
도면2



도면3



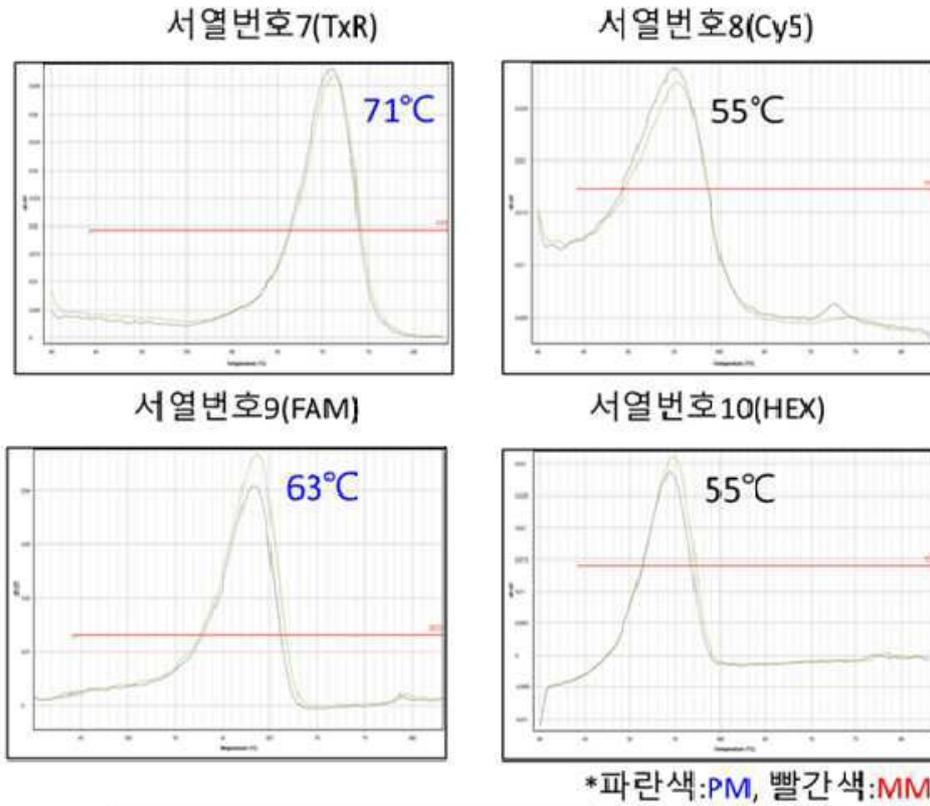
도면4



*파란색:PM, 빨간색:MM

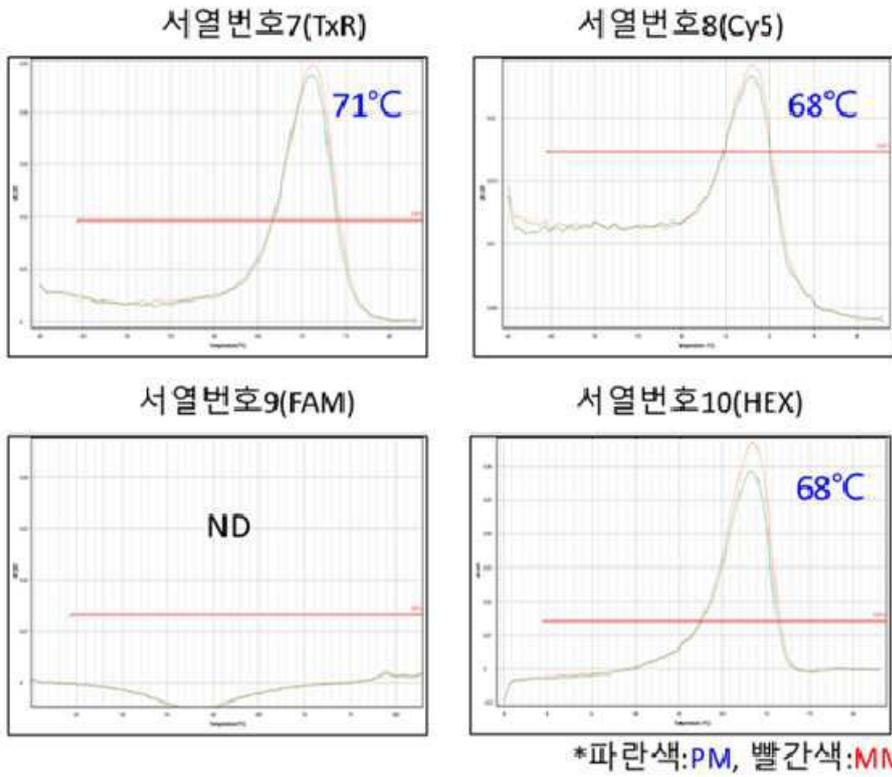
	구분	서열번호 7	서열번호 8	서열번호 9	서열번호 10	비고
예상 판정표	Group 1	1	1	0	0	일치
실제 판정표	Group 1	1	1	0	0	

도면5



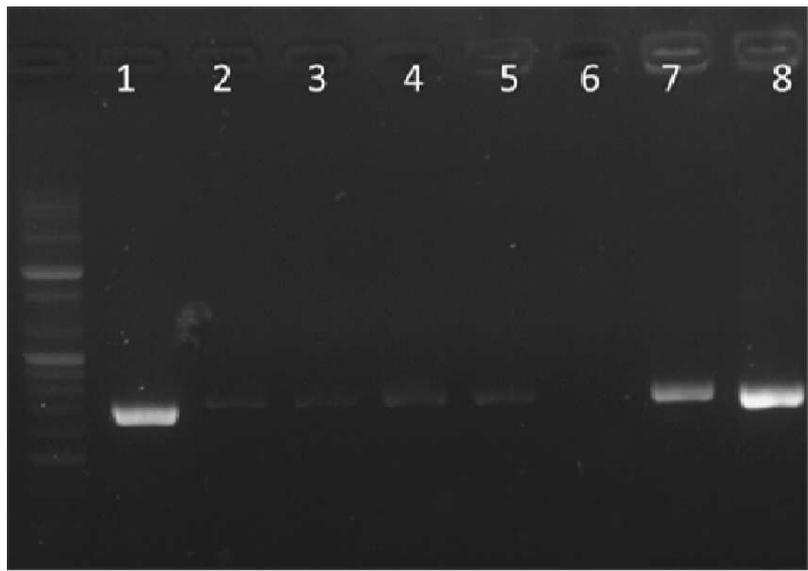
	구분	서열번호 7	서열번호 8	서열번호 9	서열번호 10	비고
예상 판정표	Group 2	1	0	1	0	일치
실제 판정표	Group 2	1	0	1	0	

도면6

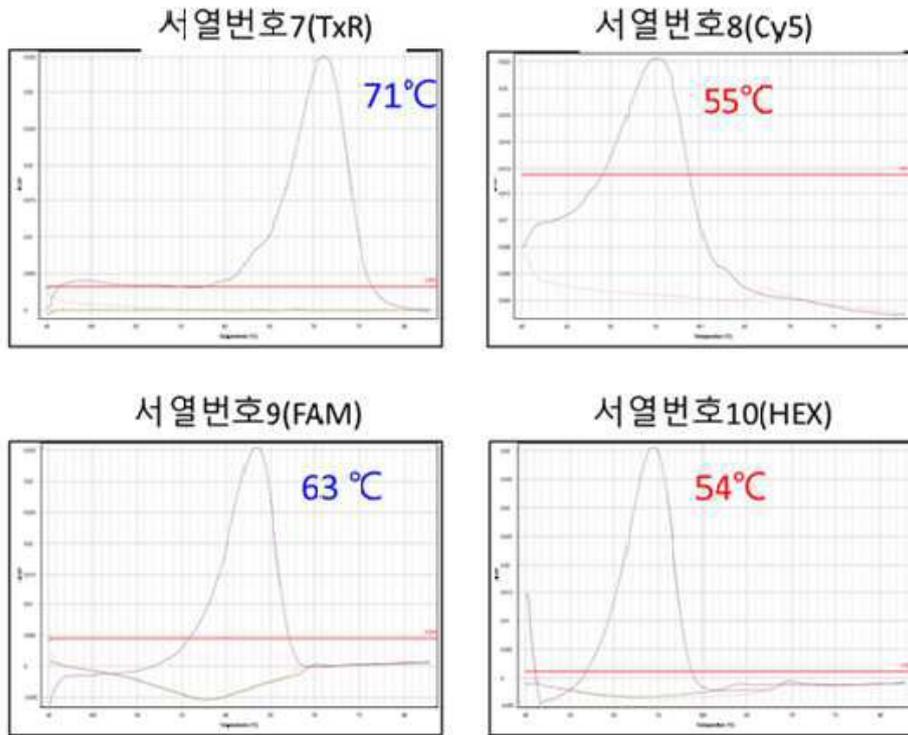


	구분	서열번호 7	서열번호 8	서열번호 9	서열번호 10	비고
예상 판정표	Group 3	1	1	0	1	일치
실제 판정표	Group 3	1	1	0	1	

도면7



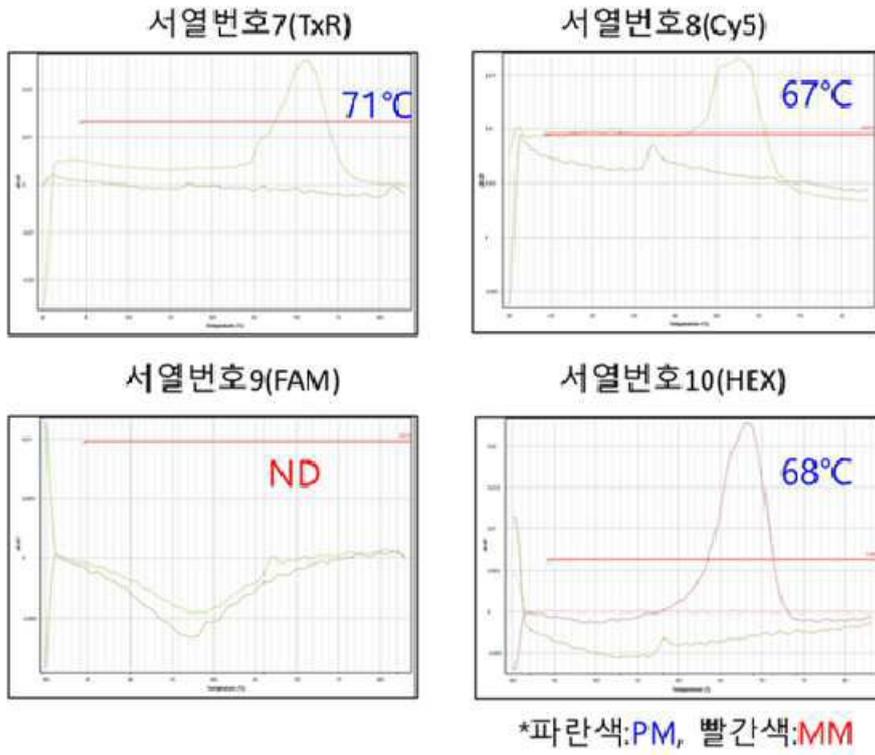
도면8



*파란색:PM, 빨간색:MM

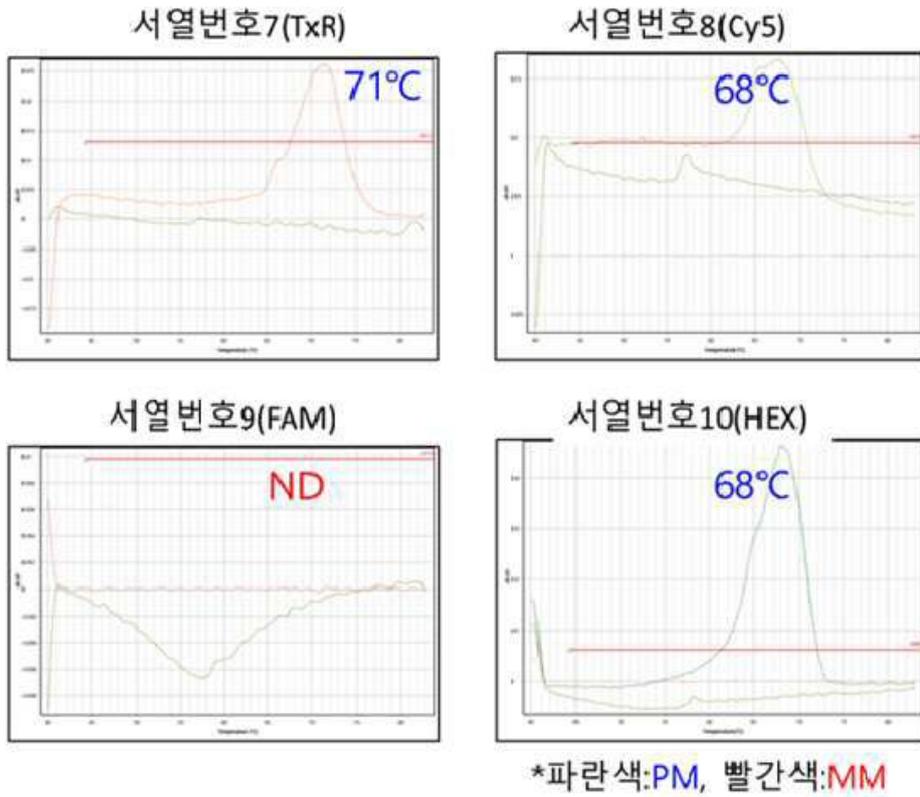
	구분	서열번호 7	서열번호 8	서열번호 9	서열번호 10	비고
Oligo Tm	기준 표	71°C	68°C	63°C	68°C	Group2 판정
실제 결과	판정 결과	1	0	1	0	

도면9



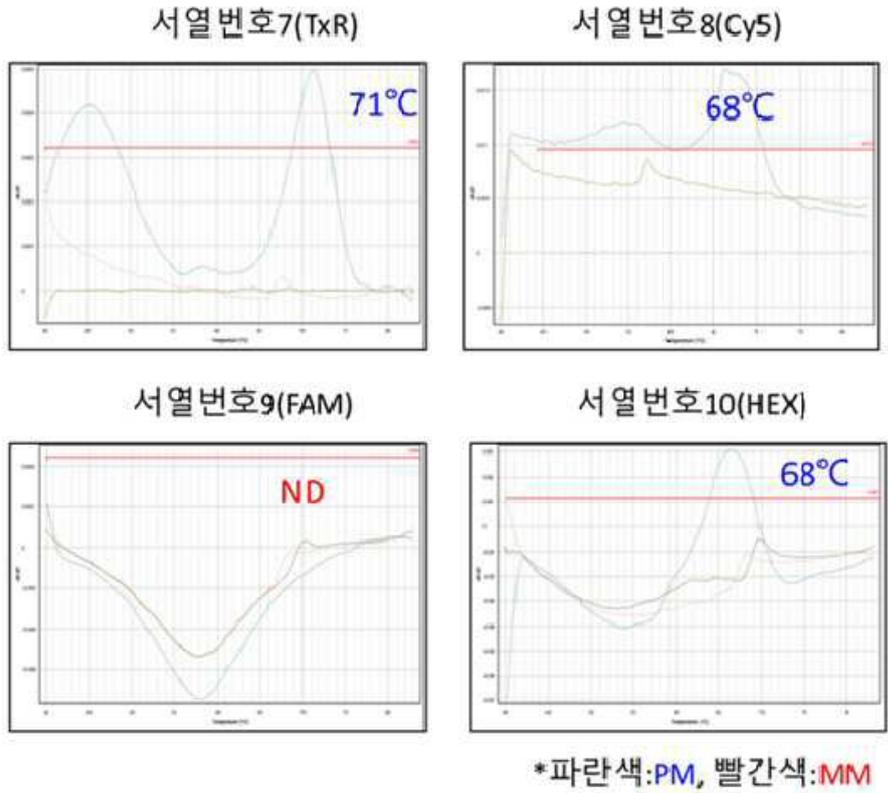
	구분	서열번호 7	서열번호 8	서열번호 9	서열번호 10	비고
Oligo Tm	기준 표	71°C	68°C	63°C	68°C	Group3 판정
실제 결과	판정 결과	1	1	0	1	

도면10



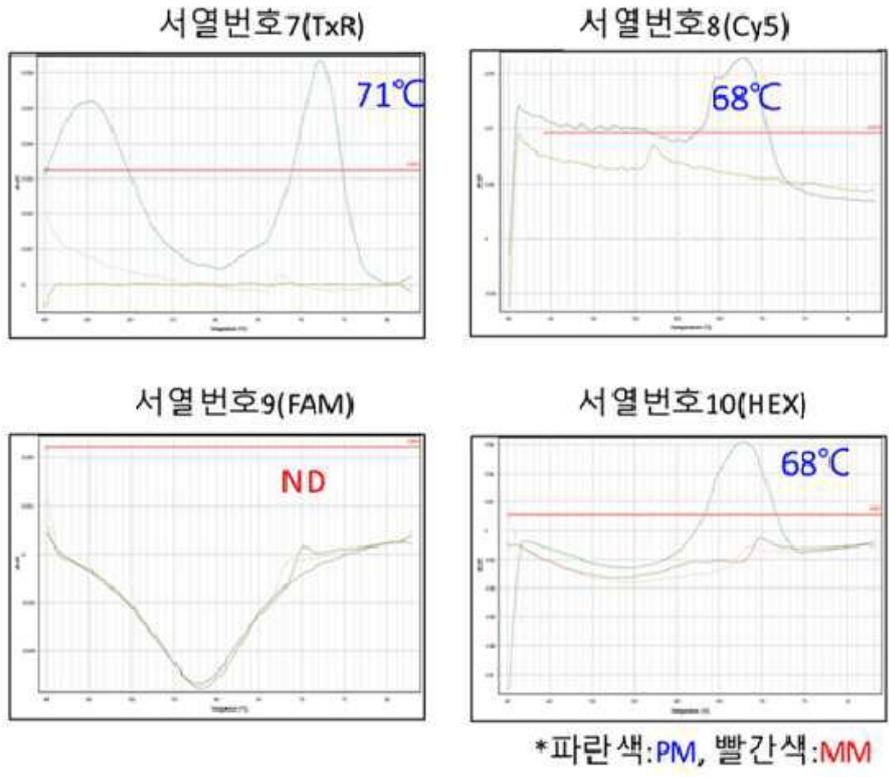
	구분	서열번호 7	서열번호 8	서열번호 9	서열번호 10	비고
Oligo Tm	기준 표	71°C	68°C	63°C	68°C	Group3 판정
실제 결과	판정 결과	1	1	0	1	

도면11



	구분	서열번호 7	서열번호 8	서열번호 9	서열번호 10	비고
Oligo Tm	기준 표	71°C	68°C	63°C	68°C	Group3 판정
실제 결과	판정 결과	1	1	0	1	

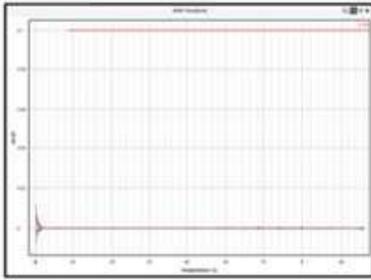
도면12



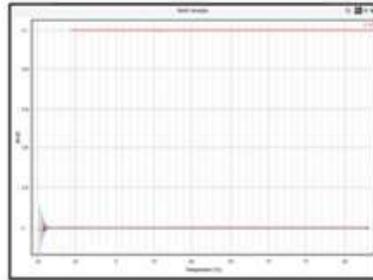
	구분	서열번호 7	서열번호 8	서열번호 9	서열번호 10	비고
Oligo Tm	기준 표	71°C	68°C	63°C	68°C	Group3 판정
실제 결과	판정 결과	1	1	0	1	

도면13

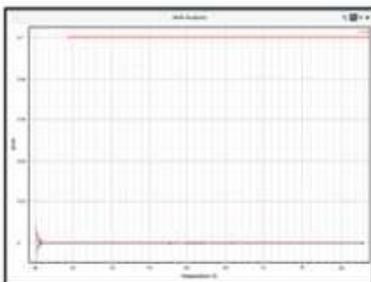
서열번호7(TxR)



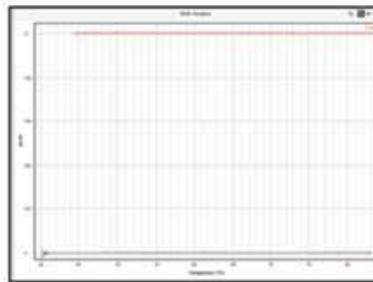
서열번호8(Cy5)



서열번호9(FAM)



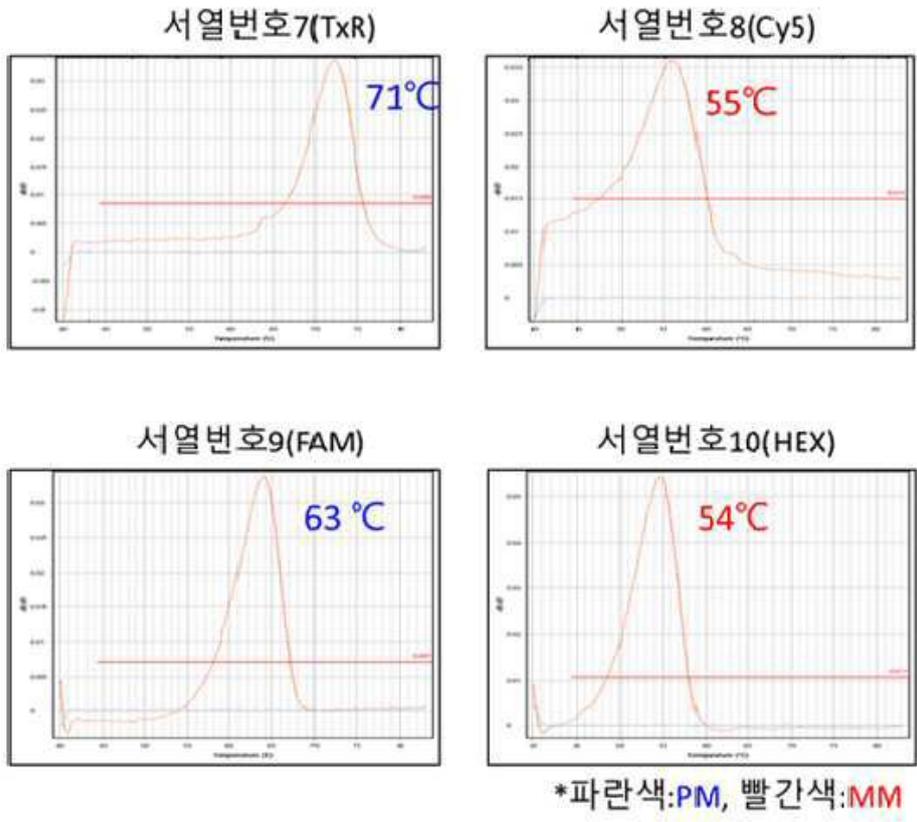
서열번호10(HEX)



*파란색:PM, 빨간색:MM

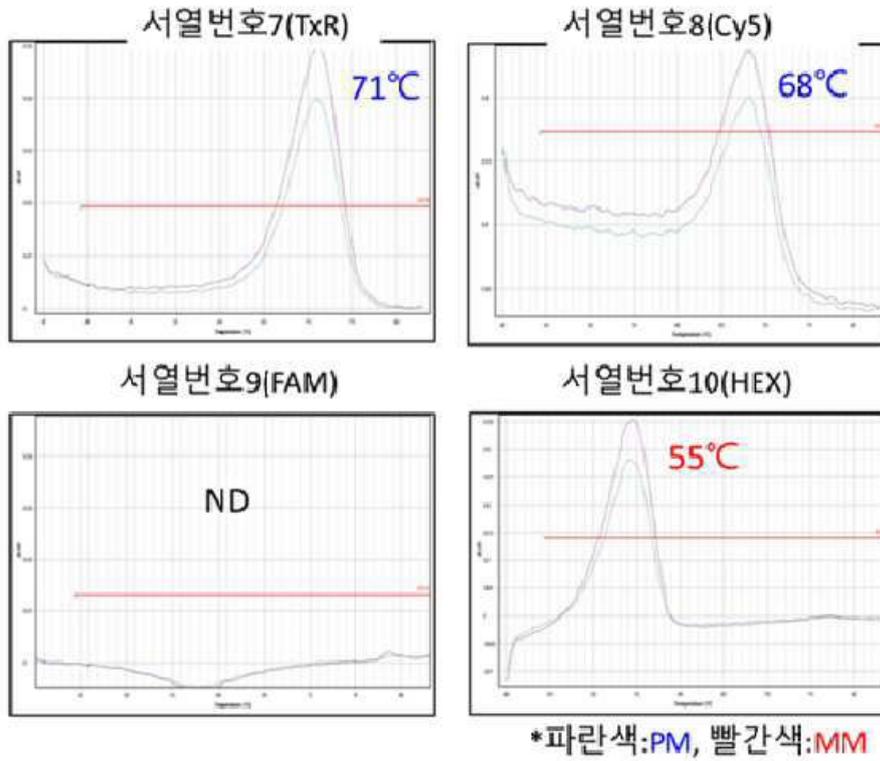
	구분	서열번호 7	서열번호 8	서열번호 9	서열번호 10	비고
Oligo Tm	기준 표	71°C	68°C	63°C	68°C	-
실제 결과	판정 결과	0	0	0	0	NTC

도면14



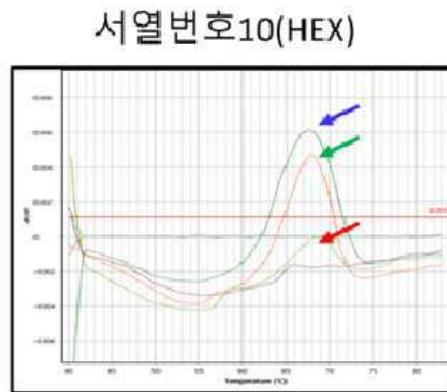
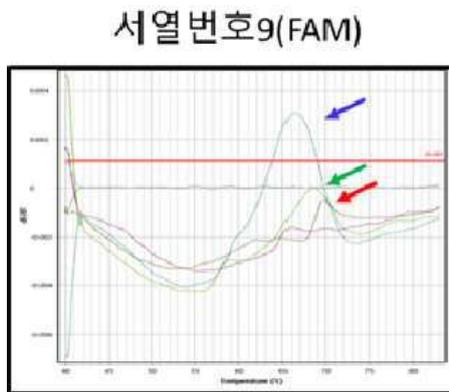
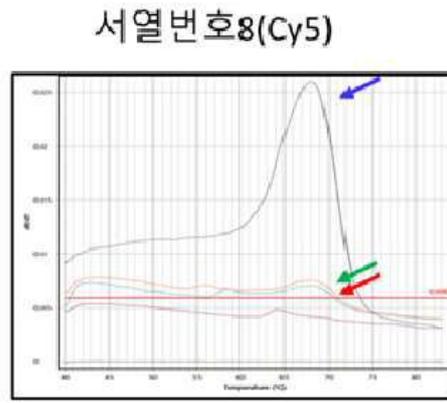
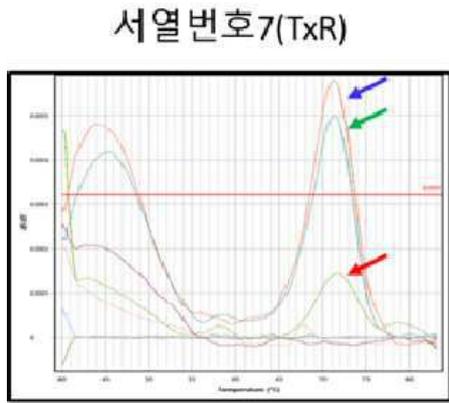
	구분	서열번호 7	서열번호 8	서열번호 9	서열번호 10	비고
Oligo Tm	기준 표	71°C	68°C	63°C	68°C	Group2 판정
실제 결과	판정 결과	1	0	1	0	

도면15

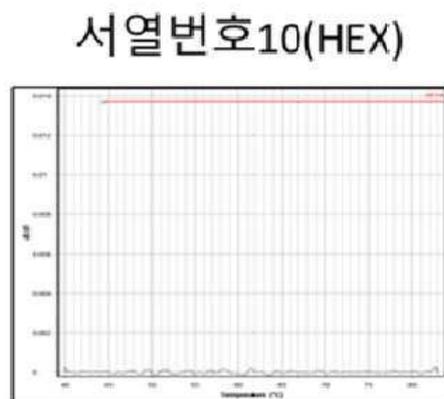
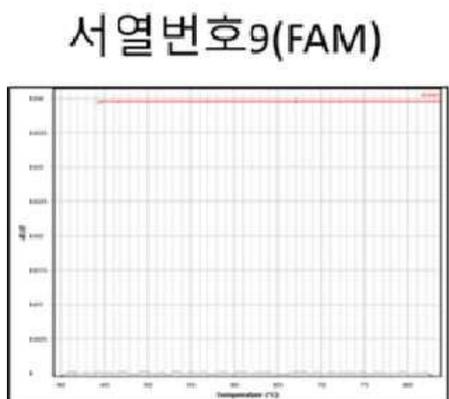
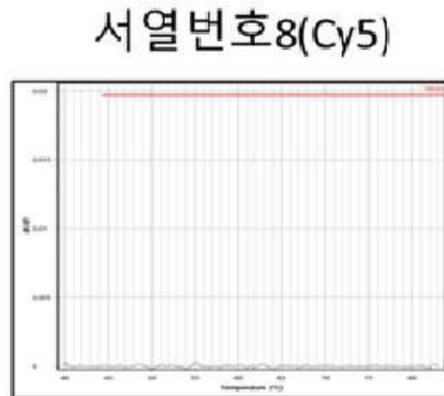
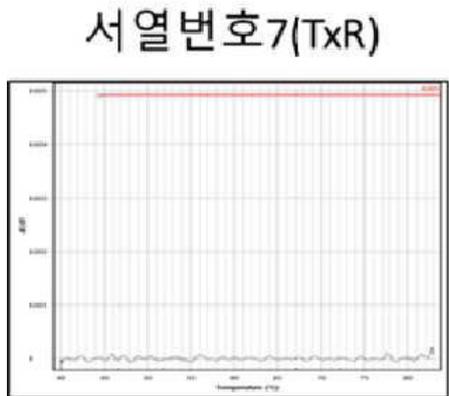


	구분	서열번호 7	서열번호 8	서열번호 9	서열번호 10	비고
Oligo Tm	기준 표	71°C	68°C	63°C	68°C	Group1 판정
실제 결과	판정 결과	1	1	0	0	

도면16

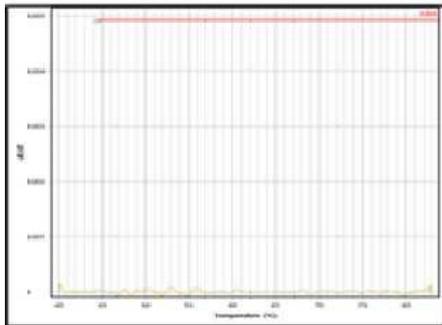


도면17

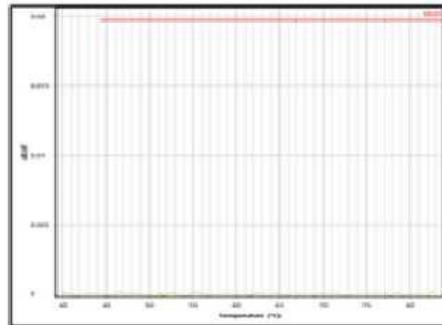


도면18

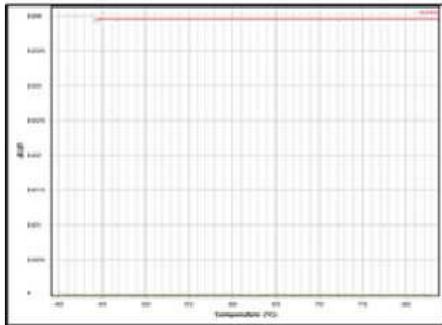
서열번호7(TxR)



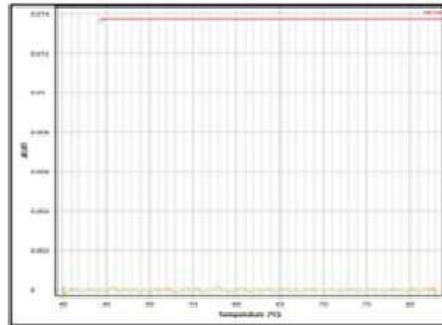
서열번호8(Cy5)



서열번호9(FAM)

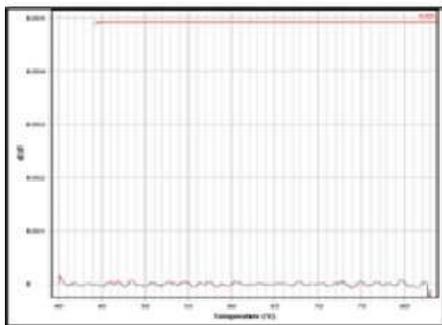


서열번호10(HEX)

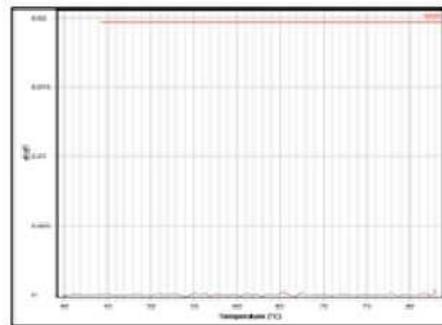


도면19

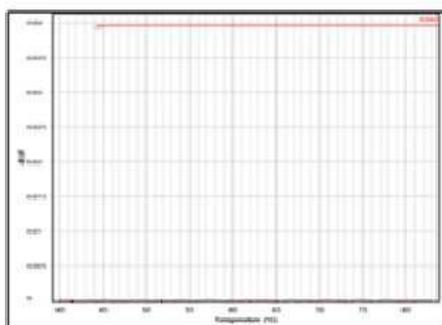
서열번호7(TxR)



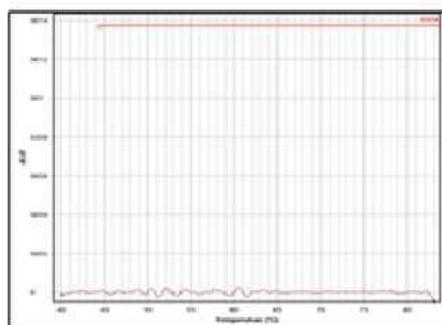
서열번호8(Cy5)



서열번호9(FAM)

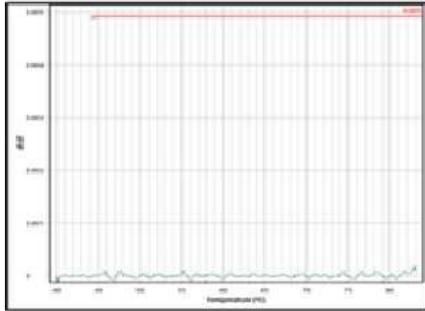


서열번호10(HEX)

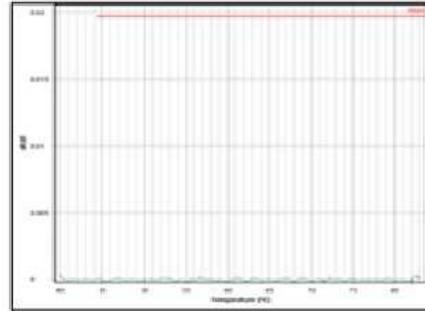


도면20

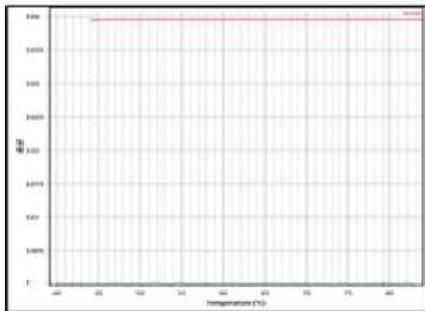
서열번호7(TxR)



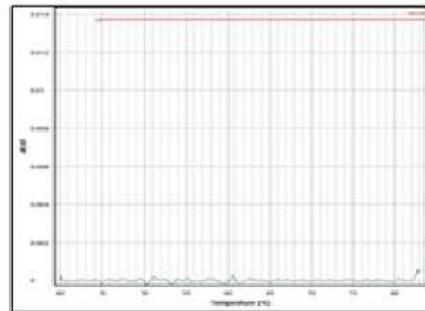
서열번호8(Cy5)



서열번호9(FAM)

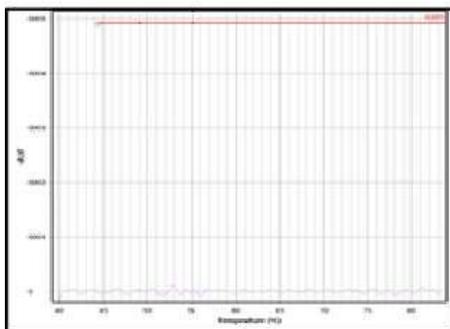


서열번호10(HEX)

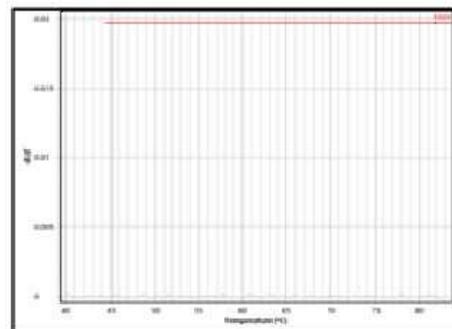


도면21

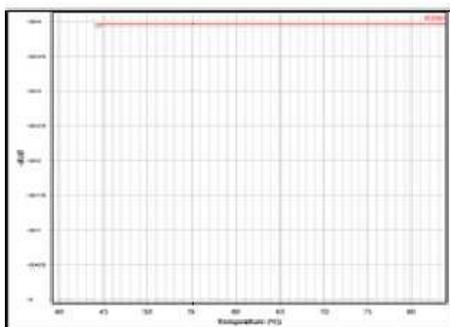
서열번호7(TxR)



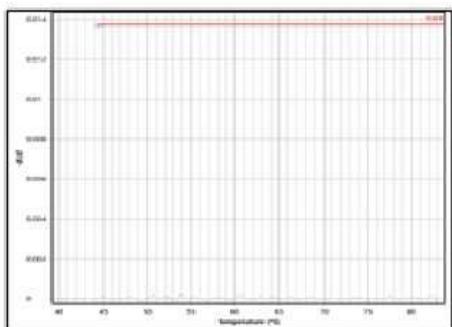
서열번호8(Cy5)



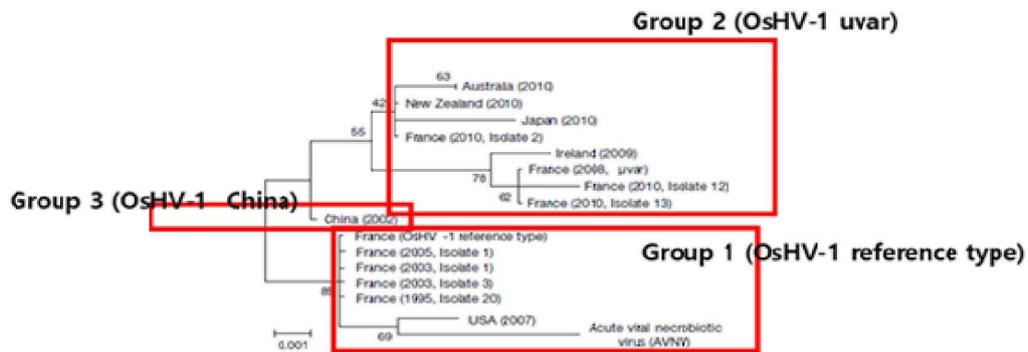
서열번호9(FAM)



서열번호10(HEX)



도면22



서열 목록

<110> Republic of Korea(National Fisheries Research and Development Institute)

<120> Genetic Markers for Detecting Oyster Herpes Virus and
Discriminating Oyster Herpes Virus Type and Use the Same

<130> P17-B294

<160> 10

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oyster Herpes Virus

<400> 1

atgagattgt gtgttg

16

<210> 2

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oyster Herpes Virus

<400> 2

tggctgatgt gatgg

15

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oyster Herpes Virus

<400>	3	
	ctttgcaatt gaaagaga	18
<210>	4	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Oyester Herpes Virus	
<400>	4	
	tcgaatacga cgtagg	17
<210>	5	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	5	
	ctctttacca tgaagatacc cacc	24
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	6	
	aaaaatggta agccgtgcac	20
<210>	7	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PNA probe	
<400>	7	
	caacacacaa tctcat	16
<210>	8	
<211>	15	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence
 <220><223> PNA probe
 <400> 8
 ccatcacatc agcca 15
 <210> 9
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PNA probe
 <400> 9
 tctctttcaa ttgcaaag 18
 <210> 10
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PNA probe
 <400> 10
 cctaacgtcg tattcga 17