

## Lateral Flow Membrane을 이용한 인유두종 바이러스 DNA Array의 개발

김기황<sup>1</sup> · 이형구<sup>2</sup> · 조홍범<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>다이아프루브(주), <sup>2</sup>디지털제노믹스(주), <sup>3</sup>서경대학교 생물공학과

본 연구에서는 임신진단 등의 간편 현장 진단(point of care test, POCT)에 주로 사용되고 있는 멤브레인 측면흐름 분석기법을 사용하여 인유두종 바이러스(Human papillomavirus, HPV)의 특정 서열을 검출할 수 있는 DNA array를 개발하였다. HPV type 6, 11, 16, 18, 31, 45에 특이적인 DNA 탐침들을 측면흐름 분석용 멤브레인 표면에 고정하고, biotin이 label된 MY09/11 primer를 사용하여 얻어진 HPV PCR 반응 결과물과 탐침 사이에 hybridization 반응을 유도하였다. 이후 streptavidin이 label된 colloidal gold가 교잡물의 biotin과 반응함으로써 DNA hybridization 결과를 육안으로 확인할 수 있었다. 본 연구를 통해 개발된 HPV DNA lateral flow membrane array는 기존의 HPV DNA chip 기법과 비교하여 경제적이고 편리하게 주요 HPV type을 확인할 수 있음을 보여 주었다.

**Key words** □ DNA array, human papillomavirus (HPV), lateral flow membrane

인유두종 바이러스(Human papillomavirus, HPV)는 자궁경부암과 피부암, 음경암, 구강암 그리고 인후두암 등의 다양한 인체 질환을 유발하는 주요한 원인 바이러스로 알려지고 있다. 현재 약 100여 개의 HPV 아형(type)이 보고되고 있으며, 자궁경부암의 경우 발병 정도에 따라 저위험군과 고위험군으로 분류된다. 고위험군 HPV에 의한 감염은 자궁경부 상피내 이형성 그리고 자궁경부암 발병과 매우 밀접한 관련성을 지니는 것으로 보고되고 있다(1, 5, 13, 19).

HPV 위험군의 분류 방법은 특정 유전자의 염기서열을 분석하는 방법으로 이루어진다. HPV의 유전자는 감염 초기 바이러스 복제를 통제하는 전기 유전자(early gene, E gene)와 바이러스의 구조를 형성하는 후기 유전자(late gene, L gene) 그리고 비암호화 유전자(long control region, LCR 또는 upper regulatory region, URR)로 구성되어 있다(11). HPV는 3종류의 유전자 중에서, 계통발생학적으로 비교적 잘 보존이 되어있는 L1 유전자 부위의 염기서열에 따라 분류되어지는데, L 유전자는 HPV의 외부 피막 구조를 형성하는 캡시드 단백질을 암호화하고 있으며, 발현 되어진 단백질은 숙주세포의 수용체와 반응하여 감염을 유도하고, helper T-cell의 표적인자가 되기도 한다(8).

L1 유전자의 유사도에 따라 60% 미만일 경우에는 HPV 속으로, 60~70%일 경우 종으로, 71~89%일 경우 같은 유전자형으로 분류된다(18). L1 유전자를 분석하기 위한 방법으로는 염기서열을 분석하거나(15) HPV 유전자형에 특이적인 프라이머를 사용한 PCR 기법(2, 16), southern blot을 이용한 Line probe assay (6) 등이 다양하게 적용되고 있다.

본 연구에서도 HPV의 L1 유전자를 손쉽게 검출할 수 있는 DNA array 개발을 목표로 하고 있으며, 특히 자궁경부암 유발 주요 아형(고위험군)인 Type 16, Type 18, Type 31, Type 45 그리고 생식기 사마귀 등을 유발시키지만 암으로의 진행 가능성은 낮은 저위험군 아형으로 Type 6과 Type 11을 분석 목표로 삼고 있는 바, 이 HPV 아형들은 최근에 개발되어 시판되고 있는 Gardasil (MSD, Germany)과 Cervarix (GSK, UK) 등의 HPV 백신(vaccine) 제제에서 목표로 하는 아형들과 동일하다.

임상에서 HPV 백신을 적용하기 위해서는 HPV의 감염 여부를 확인하는 사전 검사가 매우 중요한 의미를 갖는데, 현재 국내 상업용 HPV DNA 진단 방법으로는 HPV HybridCapture (Digene, Germany)와 국내 3개 바이오벤처 기업에서 개발 판매하고 있는 HPV DNA chip이 사용되고 있다. 하지만 Digene 사의 HybridCapture의 경우 HPV의 type 구분이 불가능하기에 HPV 백신 시술의 사전 검사용으로는 부적합하다고 볼 수 있다. 반면 HPV DNA chip은 보통 18~24종의 HPV type을 구분할 수 있지만 이들 중에는 백신의 target이 아닌 다수의 저위험군 type도 포함되어 있을 뿐 아니라 결과의 해독을 위해서 고가의 chip scanner 장비가 필요하고, 상대적으로 검사 비용이 고가이기 때문에 검출의 효율성과 경제성 측면에서 불리하다.

따라서 본 연구에서는 상기 vaccine의 대상이 되는 6종의 HPV 아형의 감염 여부를 신속하고 정확하게 검출하기 위해 각 HPV 아형의 L1 유전자 부위에 특이적인 DNA 탐침(probe)들을 측면흐름 분석용 멤브레인(lateral flow membrane) 표면에 고정하고, biotin이 label된 MY09/11 primer를 사용하여 얻어진 HPV PCR 반응 결과물(target DNA)과 탐침 사이에 hybridization 반응을 유도한 후 streptavidin이 label된 colloidal gold가 교잡물(hybrid)의 biotin과 반응함으로써 DNA hybridization 결과를 육

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 82-2-940-7187, Fax: 82-2-919-0345  
E-mail: hbcho@skuniv.ac.kr

안으로 쉽게 확인할 수 있는 HPV DNA lateral flow membrane array를 개발하고자 하였다.

**개발 내역**

본 연구에 사용된 HPV 아형은 6종으로 Type 6, 11, 16, 18, 31, 45이며, 이는 (재)한국부인암재단과 (주)씨에스엘로부터 제공된 시료로부터 MY11/09 primer (9)를 이용한 HPV screening PCR과 6종의 HPV type에 대한 type specific primer PCR을 통해 각 아형별 genomic DNA를 확보하였다. PCR의 조건은 HPV screening PCR의 경우 37°C에서 5분간 urasil nucleotide glycosidase (UNG) (Promega, USA) 반응을 유도하고 pre-denaturation (95°C, 3분) 후 denaturation (95°C, 30초), annealing (55°C, 30초), extension (72°C, 30초)의 조건으로 40회 반복하였다. Type specific primer를 이용한 nested PCR의 경우 pre-denaturation (95°C, 3분) 후 denaturation (95°C, 10초), annealing (50°C, 30초), extension (72°C, 30초)의 조건으로 30회 반복하였다.

본 연구의 HPV DNA array 분석용 primer는 HPV L1 유전자를 타깃으로 하는 MY11/09 그리고 GP5+/GP6+ (12)를 사용하였으며, MY09의 5' 말단부위에 biotin을 부착하였다.

HPV type specific primer와 HPV DNA array 제작에 사용된 probe들은 National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)과 Los Alamos National Laboratory HPV Database (<http://hvp-web.lanl.gov/>)의 HPV sequence data base를 기반으로 하였으며, HPV type별 sequence들을 Genetyx software (version 7.03: Genetyx corporation, Japan)로 배열하여 type별 상이 정도를 확인한 후 Primer3 software (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>)를 사용하여 디자인하였다. 모든 primer와 probe는 Bioneer Ltd. (Korea)에서 제작하였다. HPV array 제작용 probe는 nitrocellulose membrane 상에 고정하기 위해 5' 말단에 5개의 poly T를 첨가하고 amine 기를 부착하여 carrier protein과 결합할 수 있도록 하였다(Table 1).

Target sequence와 특이하게 결합하는 capture probe를 nitrocellulose membrane에 고착시키기 위한 방법으로 Grabarek와 Gergely의 방법(4)을 일부 변형하여 사용하였다. Carrier protein은 일반적으로 사용되는 BSA (Sigma, USA)를, coupling agent로는 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC) (Sigma, USA)를 사용하였다.

본 실험에서 사용한 membrane은 측면 이동을 유도하기 위해 polyester 재질로 backing 된 nitrocellulose membrane SA3F171101 (Millipore, USA)을 사용하였고, absorbent pad는 Specimen collection paper No. 470 (S&S Bioscience, Germany)을 적당한 크기로 잘라 사용하였다. 일반적으로 nitrocellulose membrane의 흡착력은 IgG의 경우 0.5~20 µg/cm<sup>2</sup>로 알려져 있다(14). 하지만 본 연구에서는 DNA를 기반으로 하므로 각기 다른 농도에서의 반응의 강도를 측정, 최적의 coating 조건을 확립하였다. BSA-coupled capture probe를 nitrocellulose membrane 상에 고정시키기 위해 BSA-coupled capture probe를 coating buffer (0.05 M

**Table 1.** HPV PCR primer and HPV type specific capture probe sequence.

Type	Primer & probe	Sequence (5' → 3')	Product size	References
	MY 09	Biotin-cgtccMaRRggaWactgatc	450 bp	(9)
	MY 11	gcMcagggWcataaYaattgg		
	GP 5+	ttgttactgtgtagatactac	150 bp	(12)
	GP 6+	gaaaataaactgtaaatcatattc		
16	PV16F	tatgtcattatgtgctgccatattctac	226 bp	This study
16	PV16R	atcttctagtgtgctcctctggg		
18	PV18F	cacagtctcctgtacctgggc	268 bp	This study
18	PV18R	tcagccggtgcagcatc		
6	PV6F	gtgcatccgtaactacattctcc	299 bp	This study
6	PV6R	actaaggTTTTATAGGATCTGGC		
11	PV11F	tgtgcatctgtgtctaaatctgct	302 bp	This study
11	PV11R	aaactcatatccttataggatcctgt		
31	PV31F	gctgcaattgcaaacagtgata	203 bp	This study
31	PV31R	gaacctgaggagggtgtggtc		
45	PV45F	acaaaatctgtgccaagtacatat	198 bp	This study
45	PV45R	ctgttagtaggtggaggaggac		
16	PV16P*	gtagataggcagcacataatgacata		This study
18	PV18P*	gcccaggtacaggagactgtg		This study
6	PV6P*	tgtatgtggaagatgtattacggat		This study
11	PV11P*	ttagtgtatgtagcagatttagacacagat		This study
31	PV31P*	tatcactgtttgcaattgcagc		This study
45	PV45P*	atatgtactggcacaggattttgt		This study

\* M=A or C, R=A or G, W=A or T, Y=C or T, K=T or G

\* All probe labelled with amine and 5 base of thymine at 5' end of sequence

sodium carbonate, pH 9.6)에 용해시키고 이를 DCI-300 (ZETA corporation, Korea)을 이용하여 0.8 µl/cm의 농도로 분주하였다. Target band는 membrane 하단부로부터 5 mm 위치에, control band는 membrane 하단부로부터 10.5 mm 위치에 분주하고 배양기(Sanyo, Japan)에서 37°C, 30분 동안 건조하였다. 제조된 HPV membrane DNA array는 Fig. 1의 모식도와 같다.

Colloidal gold conjugate 제조는 Lucocq와 Baschong의 방법(7)을 일부 변형하여 수행하였다. Colloidal gold particle 용액 100 ml에 streptavidin (Sigma, USA) 4 mg을 넣어 conjugation 반응을 유도하였고, streptavidin과 conjugation 된 colloidal gold는 10% BSA (Sigma, USA) 용액으로 blocking 처리하였다.

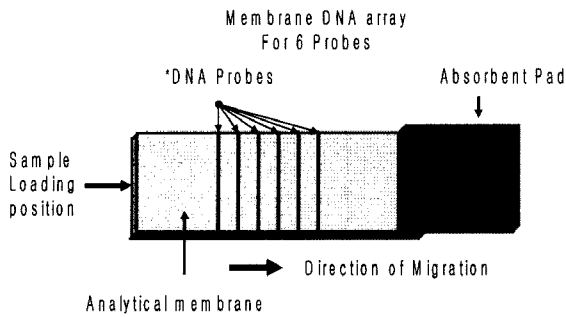


Fig. 1. System of HPV membrane DNA array

Conjugation 된 colloidal gold 용액을 30분, 12,000 rpm에서 고속원심분리로 침전시킨 후 gold conjugate dilution buffer (0.05 M sodium phosphate, 1% BSA, 0.1% sodium azide)에 용해하여 사용하였다.

HPV DNA lateral flow membrane array 분석은 다음의 방법으로 수행되었다. PCR 산물 10  $\mu$ l에 1 N NaOH 1  $\mu$ l를 섞어준 뒤 10분간 방치하여 변성시키고, 변성된 PCR 산물에 hybridization buffer 50  $\mu$ l를 혼합한 후 준비된 HPV membrane array에 주입하였다. 용액이 membrane 표면을 따라 흡수 이동하는데 소요된 시간은 상온에서 10분 정도였으며, 이후 30  $\mu$ l의 streptavidin coupled colloidal gold를 membrane에 재주입하였으며, membrane array 표면에서 gold concentration에 의하여 발색된 violet line의 유무와 위치를 통해 HPV type을 확인하였다.

총 272개의 시료들 중에서 HPV *L1* gnen의 약 450 bp 서열을 증폭하는 MY09/11 PCR을 통해 171개의 양성 시료를 확인하였으며, MY09/11 PCR의 결과물을 template로 하여 150 bp 크기의 내부 서열을 증폭하는 GP5+/GP6+ nested PCR을 통해서 190개의 양성 시료를 확인함으로써 본 연구에서 사용될 HPV genomic DNA pool을 확보하였다(자료 미제시).

190개의 HPV 양성 시료를 대상으로 type specific primer (Table 1) PCR을 통해 HPV typing을 시행한 결과, 102개의 시료에서 본 연구에서 목표로 하는 6종의 HPV type을 확인할 수

있었다(Table 2). 전체 272개의 시료에서 차지하는 6종의 HPV 아형의 비율은 37.6%, HPV 양성 190개(6종의 HPV type과 HPV other types)의 시료 중에서는 53.6%의 높은 비율을 나타내었고, 특히 HPV type 16과 18 그리고 31과 같이 발암 가능성이 높은 아형의 경우 HPV 양성 시료 중에서는 26.8%로 매우 높은 분포를 나타내었다. 이는 본 연구의 HPV DNA array와 머크 (MSD, Germany), 그락소(GSK, UK)와 같은 제약회사의 HPV 백신에서 왜 상기 6종의 아형을 타깃 type으로 하고 있는 지를 잘 설명하고 있다.

190개의 HPV 양성 시료를 대상으로 본 연구에서 개발된 HPV DNA membrane array를 이용하여 HPV typing을 확인하였다(Table 2). HPV type specific primer PCR의 경우 6종의 타깃 HPV type을 102개의 시료에서 확인한 반면, HPV DNA membrane array의 방법으로는 98개의 시료에서 확인되었다. Type 별로는 HPV type 16, 6, 31, 45에서 각각 1개씩의 시료에서 type 확인이 되지 않았는 바, HPV DNA membrane array와 HPV type specific primer PCR의 결과 일치도는 96.07%를 보임으로써, 본 연구에서 개발한 HPV DNA membrane array가 약 3% 낮은 민감도를 나타내었다.

이는 *L1* 유전자의 증폭에 사용하는 primer의 annealing 효율의 차이로서 HPV DNA membrane array에서는 MY09/11과 같은 universal primer를 사용하기 때문에 상대적으로 특정 아형의 HPV typing 만을 위해 고안된 type specific primer를 사용하는 PCR에 비해서는 증폭 효율성이 떨어질 수 밖에는 없으나, 약 3% 정도의 민감도 차이는 한번에 6종의 HPV 아형을 동시에 typing 할 수 있다는 장점에 비해 미미한 수준의 약점으로 해석될 수 있다.

본 연구에서 HPV DNA array에 상대적으로 민감도가 높은 nested PCR 혹은 HPV type specific primer를 사용하지 못한 것은 각 기법상의 특성에 기인한다. MY PCR의 경우 single round PCR 과정으로 PCR 반응 이전에 urasil nucleotide glycosidase (UNG)를 사용하여 오염발생을 억제 할 수 있지만 nested PCR의 경우에는 두 단계의 PCR로 이루어진 assay 과정에서 PCR 오염

Table 2. Comparison results of type specific primer PCR with HPV membrane DNA array

HPV type No.	Number of positive results by HPV type specific primer PCR (Distribution of each type among total samples, %)	Number of positive results by HPV DNA array	% of agreement
16	21 (7.7)	20	95.2%
18	14 (5.1)	14	100.0%
6	19 (6.9)	18	94.7%
11	18 (6.6)	18	100.0%
31	16 (5.8)	15	93.7%
45	14 (5.1)	13	92.8%
Subtotal	102 (37.6)	98	96.07%
Other types		88 (32.3)	
Negative		82 (30.1)	
Total		272 (100)	

을 방지하는 것이 불가능하기 때문이었다. 아울러 HPV type specific primer의 경우 MY 혹은 GP와 같은 universal primer를 사용하는 경우 보다 높은 민감도와 특이도를 나타낼 수 있지만 한 개의 PCR tube에서 동시에 여러 종의 HPV type을 산출시키는 것이 어렵기 때문에 제품과 기술의 확장성과 편리성을 저해할 것으로 판단되어 배제할 수밖에 없었다.

한편, 본 연구의 대상인 HPV 6종 아형 이외의 HPV PCR 결과물들과의 교차반응 정도를 확인하기 위하여 다양한 type의 HPV DNA를 증폭하여 적용하였다. 이를 위하여 6종 이외의 HPV 양성 시료는 88개 그리고 HPV PCR 음성 시료는 82개 (Table 2)가 사용되었다. 본 연구에서 사용된 HPV other type 양성 시료들과 음성 시료들의 경우 HPV DNA array와 HPV specific primer PCR에서 모두 음성 결과를 산출하였다(자료 미제시). 이는 본 연구에서 사용되었던 HPV DNA membrane array의 probe 및 HPV type specific primer들과 교차반응 정도가 매우 낮았기 때문으로 보인다. 아울러 음성 시료들의 경우에도 비특이 반응이나 위양성 반응을 나타내지 않았으므로써 본 연구에서 개발된 HPV DNA array의 반응 특이도가 매우 높음을 확인할 수 있었다.

### HPV DNA array의 적용 사례

Figure 2는 본 연구의 HPV DNA membrane array를 적용했을 때의 사례이다. Figure 2의 (A)는 HPV 단일 type 시료를 분석하여 얻어진 결과로 각 type의 membrane array 상의 위치를 보여주기 위한 그림이며, Fig. 1에서와 같이 membrane 표면에 고정된 각 HPV specific probe들의 위치와 일치하는 gold concentrated line을 확인할 수 있었다. Figure 2의 (B)는 HPV 중복 감염 시료들을 적용한 결과를 나타낸 그림으로 각 membrane array 상에 2종 혹은 3종의 HPV type 발색 line을 확

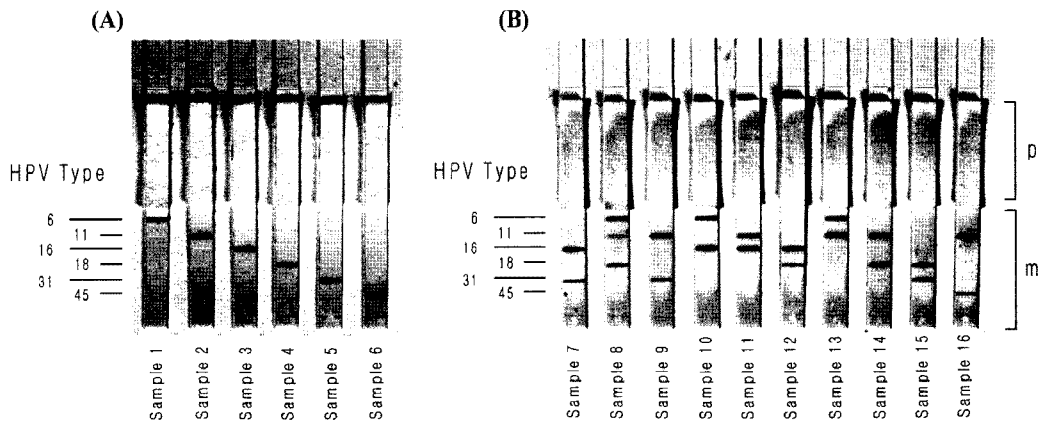
인 할 수 있었다. 아울러 각 membrane array 표면에서 다른 type의 probe 고정 위치에서 비 특이반응에 의한 발색은 나타나지 않아 probe와 PCR 결과물 간의 반응 특이도가 매우 높음을 확인할 수 있었다.

현재 HPV typing에 사용되고 있는 제품들은 HPV PCR과 southern blot 기술을 응용한 line probe assay 기법(17) 그리고 DNA chip 기법(10)을 바탕으로 하는 제품들이 대부분을 차지하고 있다. 그러나 이와 같은 기법들은 분석 과정이 매우 복잡하고 고가의 분석 장비를 필요로 하는 등의 단점을 갖고 있다. 이에 비해 본 연구의 HPV DNA membrane array는 기존의 기법들에 비하여 경제적이며, 분석 과정이 편리하고 별도의 분석 장비를 필요로 하지 않는 장점이 있다.

Membrane array 기법은 현재 널리 유용되고 있는 DNA membrane dip-strip 기법(3)과 형태상으로 유사하지만 분명한 차이를 나타낸다. DNA membrane dip-strip 경우 DNA hybridization 반응이 아닌 antigen-antibody 결합 반응을 기반으로 하기에 2종 이하의 PCR 결과물만을 분석 할 수 있다는 단점과 함께 비특이 반응에 의한 문제를 갖고 있다. 이에 비하여 membrane array 기법의 경우 많은 DNA 시료를 높은 특이도로 동시에 확인할 수 있기에 한 단계 진보된 기술이다.

### 향후 계획

Membrane array의 분석 과정에서 기존의 임신진단 등 간편 현장 진단용(point of care test, POCT) lateral flow test 제품처럼 액체 시료만을 주입하거나 PCR product를 colloidal gold와 함께 membrane에 적용하지 않은 것은 PCR product와 gold 용액을 함께 assay membrane에 적용할 경우 발색 반응을 이루지 못하였기 때문이다. 이는 PCR product와 colloidal gold를 함께 membrane에 주입할 경우 colloidal gold 표면의 극성이 PCR



**Fig. 2.** Probe layout of the HPV membrane DNA array and assay result. Hybridization results of the probe layout on strip for the HPV genotypes. Concentrated gold signals of type specific probe hybridize with standard positive DNA PCR amplicons (A) (sample1, HPV 6; sample2, HPV11; sample3, HPV16; sample4, HPV18; sample5, HPV31; sample6, HPV45) and unknown test sample PCR amplicons from cervical swab sample DNA (B) (sample7, HPV type 16 and 31; sample8, HPV type 6, 11 weak and 18; sample9, HPV type 11 and 31; sample10, HPV type 6 and 16; sample11, HPV type 11 and 16; sample12, HPV type 16 and 18; sample13, HPV type 6 and 11; sample14, HPV type 11 and 18; sample15, HPV type 18 and 31; sample16, HPV type 11 and 45). Left side of figure indicate HPV type specific probe location. p and m in the right side of figure indicate absorbent pad and lateral flow membrane, accordingly.

product와 probe 사이의 hybridization을 방해하여 일어나는 현상으로 추정되고 있다. 현재 이러한 현상을 개선할 추가적인 연구를 수행하고 있으며, 향후 이러한 문제점만 보완한다면 기존의 protein을 타깃으로 하는 lateral flow test 제품처럼 분석 과정이 간편하고 별도의 분석 장비를 필요로 하지 않는다는 특성을 가진 DNA 진단용 현장 검사 키트의 생산도 가능할 것으로 기대된다.

### 참고문헌

1. Baay, M.F., W.A. Tjalma, J. Weyler, G. Goovaerts, P. Buytaert, E.A. van Marck, F. Lardon, and J.B. Vermorken. 2001. Human papillomavirus infection in the female population of Antwerp, Belgium: prevalence in healthy women, women with premalignant lesions and cervical cancer. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 22, 204-208.
2. Van Den Brule, A.J.C., J.M.M. Walboomers, M. Du Maine, P. Kenemans, and C.J.L.M. Meijer. 1991. Difference in prevalence of human papillomavirus genotypes in cytologically normal cervical smears is associated with a history of cervical intraepithelial neoplasia. *Int. J. Cancer* 48, 404-408.
3. Corstjens, P., M. Zuiderwijk, A. Brink, S. Li, H. Feindt, R.S. Niedbala, and H. Tanke. 2001. Use of up-converting phosphor reporters in lateral-flow assays to detect specific nucleic acid sequences: A rapid, sensitive DNA test to identify human papillomavirus type 16 infection. *Clin. Chem.* 47, 1885-1893.
4. Grabarek, Z. and J. Gergely. 1990. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Anal. Biochem.* 185, 131-135.
5. Iwasawa, A., P. Nieminen, M. Lehtinen, and J. Paavonen. 1996. Human papillomavirus DNA in uterine cervix squamous cell carcinoma and adenocarcinoma detected by polymerase chain reaction. *Cancer* 77, 2275-2279.
6. Jacobs, M.V., J.M. Walboomers, P.J. Snijders, F.J. Voorhorst, R.H. Verheijen, N. Franssen-Daalmeijer, and C.J. Meijer. 2000. Distribution of 37 mucosotropic HPV types in women with cytologically normal cervical smears: the age-related patterns for high-risk and low-risk types. *Int. J. Cancer* 87, 221-227.
7. Lucocq, J.M. and W. Baschong. 1986. Preparation of protein colloidal gold complexes in the presence of commonly used buffers. *Eur. J. Cell Biol.* 42, 332-337.
8. Luxton, J. and P. Shepherd. 2001. Human papillomavirus antigens and T-cell recognition. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 14, 139-143.
9. Manos, M.M., Y. Ting, D.K. Wright, A.J. Lewis, T.R. Broker, and S.M. Wolinsky. 1989. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cell.* 7, 209-214.
10. Pease, A.C., D. Solas, E.J. Sullivan, M.T. Cronin, C.P. Holmes, and S.P. Fodor. 1994. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5022-5026.
11. Prendiville, W. and P. Davies. 2004. The human papillomavirus. In W. Prendiville and P. Davis (eds.), *The Health Professionals HPV Handbook: Human papillomavirus and cervical cancer*, 1 of 3rd ed., p. 11-26. Taylor and Francis, Oxford.
12. De Roda Husman, A.M., J.M.M. Walboomers, A.J.C. Van De Brule, C.J.L.M. Meijer, and P.J.F. Snijders. 1995. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J. Gen. Virol.* 76, 1057-1062.
13. Shyu, J.S., C.J. Chen, C.C. Chiu, S.C. Huang, and H.J. Harn. 2001. Correlation of human papillomavirus 16 and 18 with cervical neoplasia in histological typing and clinical stage in Taiwan: an in-situ polymerase chain reaction approach. *J. Surg. Oncol.* 78, 101-109.
14. Snowden, K. and M. Hommel. 1991. Antigen detection immunoassay using dipsticks and colloidal dyes. *J. Immunol. Methods* 140, 57-65.
15. Smits, H.L., L.M. Tieben, S.P. Tjong-A-Hung, M.F. Jebbink, R.P. Minnaar, C.L. Jansen, and J. Ter Schegget. 1992. Detection and typing of human papillomaviruses in fixed and stained archival cervical smears by a consensus polymerase chain reaction and direct sequence analysis allowing the identification of a broad spectrum of human papillomavirus types. *J. Gen. Virol.* 73, 3263-3268.
16. Sotlar, K., D. Diemer, A. Dethleffs, Y. Hack, A. Stubner, N. Vollmer, S. Menton, M. Menton, K. Dietz, D. Wallwiener, R. Kandolf, and B. Bltman. 2003. Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 3176-3184.
17. Stuyver, L., R. Rossau, A. Wyseur, M. Duhamel, B. Vanderborght, H. Van Henverswyn, and G. Maertens. 1993. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J. Gen. Virol.* 74, 1093-1102.
18. De Villiers, E.M., C. Fauquet, T.R. Broker, H.U. Bernard, and H. zur Hausen. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 17-27.
19. Zehbe, I. and E. Wilander. 1997. Human papillomavirus infection and invasive cervical neoplasia: a study of prevalence and morphology. *J. Pathol.* 181, 270-275.

(Received October 24, 2008/Accepted November 7, 2008)

---

**ABSTRACT : Development of Human Papillomavirus DNA Array by Using Lateral Flow Membrane Assay**

**Ki-Whang Kim<sup>1</sup>, Hyung-Ku Lee<sup>2</sup>, and Hong-Bum Cho<sup>3\*</sup>** (<sup>1</sup>Diaprobe Ltd., Seokyeong University, Seoul 136-704, Republic of Korea, <sup>2</sup>Digital genomics Ltd., #805, Namsung Plaza, Seoul 135-010, Republic of Korea, <sup>3</sup>Department of Biological Engineering, Seokyeong University, Seoul 136-704, Republic of Korea)

This study develops DNA array which can detect specific sequence of human papillomavirus (HPV) by using lateral flow membrane assay which is usually used for point of care test including pregnant diagnosis. Principle of HPV DNA array is as follow; fixing DNA probe which is peculiar to HPV type 6, 11, 16, 18, 31, 45 on a surface of lateral flow membrane and inducing hybridization response between probe and HPV PCR products which is obtained by using biotin-labeled MY09/11 primers. And then, we can see the result of DNA hybridization that streptavidin labelled colloidal gold is responded with hybrid biotin. Lateral flow membrane array developed in this study confirms major HPV type economically and conveniently compared with existing HPV DNA chip method.