



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년08월26일
(11) 등록번호 10-2293785
(24) 등록일자 2021년08월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
C12Q 2537/143 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7015852
(22) 출원일자(국제) 2014년11월17일
심사청구일자 2019년11월15일
(85) 번역문제출일자 2016년06월14일
(65) 공개번호 10-2016-0079117
(43) 공개일자 2016년07월05일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/065975
(87) 국제공개번호 WO 2015/073978
국제공개일자 2015년05월21일
(30) 우선권주장
61/905,051 2013년11월15일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020070076532 A*
KR1020100115030 A*
NCBI Reference Sequence: NG_012646.1
(2009.08.07.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
아벨리노 랩 유에스에이, 인크.
미국, 캘리포니아 94025, 멘로 파크, 스위트
비-2, 아담스 드라이브 1505
(72) 발명자
차오션 코니
미국 94025 캘리포니아주 멘로 파크 아담스 드라
이브 1505 스위트 비2
조 선영
미국 94025 캘리포니아주 멘로 파크 아담스 드라
이브 1505 스위트 비2
이 진
미국 94025 캘리포니아주 멘로 파크 아담스 드라
이브 1505 스위트 비2
(74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 김승범

(54) 발명의 명칭 **안과 질환과 관련된 대립유전자의 멀티플렉스 검출 방법**

(57) 요약

인간 대상으로부터의 샘플에서 각막 이영양증과 관련된 적어도 2개의 게놈 대립유전자를 검출하기 위한 시스템 및 방법이 개시되어 있으며, 여기서 대상의 세포(예컨대, 상피 세포)는 기재의 팁에 부착되어 있다. 상기 기재의 팁은 상기 기재에 부착된 세포를 용해시키는 용해액 중에서 교반한다. 상기 기재는 이 교반이 완료되면 용해액으로부터 분리한다. 얻어진 용해액을 인큐베이션한 다음, 상기 용해액으로부터 게놈 DNA를 분리하여 gDNA 용액을 형성한다. 이로부터, 적어도 2개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머쌍 및 gDNA 용액을 이용하여, 인간 TGFβ I 유전자 내에 존재하는 적어도 2개의 뉴클레오타이드의 정체(identity)가 확인된다. 이들 적어도 2개의 뉴클레오타이드는, 각막 이영양증과 관련된 각각의 독립적인 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)에 상응하는 TGFβ I 유전자의 각각의 독립적인 위치에 위치한다.

(52) CPC특허분류

C12Q 2600/156 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

하기 (A) 내지 (D)를 포함하는, 인간 대상에서 각막 이영양증을 검출하기 위한 반응 혼합물:

(A) 상기 대상으로부터의 생물학적 샘플로부터 제1 TGFβ1 유전자 서열을 증폭시키고 결정하기 위한 적어도 제1 증폭 프라이머쌍;

(B) 서열번호: 25의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 제1 표지된 검출 프로브, 서열번호: 26의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 제2 표지된 검출 프로브, 서열번호: 49의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 제3 표지된 검출 프로브, 및 서열번호: 48의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 제4 표지된 검출 프로브를 포함하는 적어도 4개의 검출 프로브의 제1 세트로서, 상기 적어도 4개의 검출 프로브의 제1 세트 중 하나의 표지된 검출 프로브는 상기 제1 TGFβ1 유전자 서열에 노출될 때 제1 TGFβ1 유전자 서열에 혼성화하는 것인 적어도 4개의 검출 프로브의 제1 세트;

(C) 상기 대상으로부터의 생물학적 샘플로부터 제2 TGFβ1 유전자 서열을 증폭시키고 결정하기 위한 적어도 제2 증폭 프라이머쌍; 및

(D) 서열번호: 45의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 제5 검출 프로브, 서열번호: 46의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 제6 검출 프로브, 및 서열번호: 50의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 제7 검출 프로브를 포함하는 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트로서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트 중 하나의 검출 프로브는 상기 제2 TGFβ1 유전자 서열에 노출될 때 제2 TGFβ1 유전자 서열에 혼성화하는 것인 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제1 증폭 프라이머쌍은 제1 증폭 프라이머 및 제2 증폭 프라이머를 포함하고, 상기 제1 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 1을 포함하며, 상기 제2 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 2를 포함하는 것인 반응 혼합물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 제1 TGFβ1 유전자 서열은, 대상으로부터의 생물학적 샘플 유래의 아미노산 잔기 124를 인코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 제2 TGFβ1 유전자 서열은 대상으로부터의 생물학적 샘플 유래의 아미노산 잔기 555를 인코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 것인 반응 혼합물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 증폭 프라이머쌍은 제3 증폭 프라이머 및 제4 증폭 프라이머를 포함하고, 상기 제3 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 43을 포함하며, 상기 제4 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 44를 포함하는 것인 반응 혼합물.

청구항 5

하기 (A-1), (B-1), (C-1), (A-2), (B-2) 및 (C-2)를 포함하는, 각막 이영양증을 검출하는 방법:

(A-1) 적어도 제1 증폭 프라이머쌍 및 적어도 4개의 검출 프로브의 제1 세트를 포함하는 반응 혼합물을 이용하여, 인간 대상으로부터의 생물학적 샘플로부터 제1 TGFβ1 유전자 서열을 증폭시키는 단계로서, 상기 적어도 4개의 검출 프로브의 제1 세트는 서열번호: 25의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 제1 표지된 검출 프로브, 서열번호: 26의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 제2 표지된 검출 프로브, 서열번호: 49의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 제3 표지된 검출 프로브, 및 서열번호: 48의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 제4 표지된 검출 프로브를 포함하는 것인 단계;

(B-1) 상기 적어도 4개의 검출 프로브의 제1 세트 중 하나의 검출 프로브를 상기 제1 TGFβ1 유전자 서열에 혼성화시키는 단계;

(C-1) (i) 상기 제1 TGFβI 유전자 서열에 대한 상기 적어도 4개의 검출 프로브의 제1 세트 중 하나의 검출 프로브의 혼성화, 및 (ii) 상기 제1 TGFβI 유전자 서열에 대한 상기 적어도 4개의 검출 프로브의 제1 세트 중 다른 3개의 검출 프로브의 혼성화 실패에 기초하여, 상기 제1 TGFβI 유전자 서열 내의 돌연변이를 검출하는 단계;

(A-2) 동일한 반응 혼합물을 이용하여 생물학적 샘플로부터 제2 TGFβI 유전자 서열을 증폭시키는 단계로서, 상기 반응 혼합물은 적어도 제2 증폭 프라이머쌍 및 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트를 포함하고, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트는 서열번호: 45의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 제5 검출 프로브, 서열번호: 46의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 제6 검출 프로브, 및 서열번호: 50의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 제7 검출 프로브를 포함하는 것인 단계;

(B-2) 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트 중 하나의 검출 프로브를 상기 제2 TGFβI 유전자 서열에 혼성화시키는 단계; 및

(C-2) (i) 상기 제2 TGFβI 유전자 서열에 대한 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트 중 하나의 검출 프로브의 혼성화, 및 (ii) 상기 제2 TGFβI 유전자 서열에 대한 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트 중 다른 2개의 검출 프로브의 혼성화 실패에 기초하여, 상기 제2 TGFβI 유전자 서열 내의 돌연변이를 검출하는 단계.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 반응 혼합물은 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 기재된 반응 혼합물을 포함하는 것인 검출 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 반응 혼합물 중의 상기 제2 증폭 프라이머쌍은 제3 증폭 프라이머 및 제4 증폭 프라이머를 포함하고, 상기 제3 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 43을 포함하며, 상기 제4 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 44를 포함하는 것인 검출 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 하기 i) 내지 iii)의 단계들 중 하나 이상을 동시에 수행하는 것인 검출 방법:

- i) 상기 제1 TGFβI 유전자 서열의 증폭 단계(A-1)과 상기 제2 TGFβI 유전자 서열의 증폭 단계(A-2);
- ii) 상기 혼성화 단계(B-1)과 상기 혼성화 단계(B-2); 및
- iii) 상기 검출 단계(C-1)과 상기 검출 단계(C-2).

청구항 9

제6항에 있어서, 하기 i) 내지 iii)의 단계들 중 하나 이상을 동시에 수행하는 것인 검출 방법:

- i) 상기 제1 TGFβI 유전자 서열의 증폭 단계(A-1)과 상기 제2 TGFβI 유전자 서열의 증폭 단계(A-2);
- ii) 상기 혼성화 단계(B-1)과 상기 혼성화 단계(B-2); 및
- iii) 상기 검출 단계(C-1)과 상기 검출 단계(C-2).

청구항 10

제7항에 있어서, 하기 i) 내지 iii)의 단계들 중 하나 이상을 동시에 수행하는 것인 검출 방법:

- i) 상기 제1 TGFβI 유전자 서열의 증폭 단계(A-1)과 상기 제2 TGFβI 유전자 서열의 증폭 단계(A-2);
- ii) 상기 혼성화 단계(B-1)과 상기 혼성화 단계(B-2); 및
- iii) 상기 검출 단계(C-1)과 상기 검출 단계(C-2).

청구항 11

하기 (A) 내지 (G)를 포함하는, 인간 대상으로부터의 샘플에서 각막 이영양증과 관련된 계놈 돌연변이를 검출하

는 방법:

(A) 기재의 팁에 부착된 인간 대상의 상피 세포를 제공하는 단계;

(B) 상기 기재의 팁을, 상기 기재에 부착된 세포를 용해시키는 용해액 중에서 교반하는 단계;

(C) 상기 교반(B)이 완료되면, 상기 용해액으로부터 기재를 분리하는 단계;

(D) 상기 분리(C) 후, 상기 용해액을 인큐베이션하는 단계;

(E) 상기 용해액으로부터 게놈 DNA를 단리하여 gDNA 용액을 형성하는 단계;

(F) 적어도 제1 프라이머쌍, 적어도 4개의 검출 프로브의 제1 세트, 및 상기 gDNA 용액을 이용하여, 상기 gDNA 용액을 상기 적어도 4개의 검출 프로브에 동시에 노출시킴으로써, TGFβ I 유전자 내에 존재하는 적어도 제1 뉴클레오타이드의 정체를 확인하는 단계로서,

상기 적어도 4개의 검출 프로브의 제1 세트는 서열번호: 25의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 제1 표지된 검출 프로브, 서열번호: 26의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 제2 표지된 검출 프로브, 서열번호: 49의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 제3 표지된 검출 프로브, 및 서열번호: 48의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 제4 표지된 검출 프로브를 포함하고,

상기 적어도 제1 뉴클레오타이드는, 각막 이영양증과 관련된 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)에 상응하는, TGFβ I 유전자의 특정 위치에 위치하며,

상기 적어도 4개의 검출 프로브의 제1 세트 중 적어도 3개의 검출 프로브 각각은 TGFβ I 유전자의 특정 위치에 있는 상이한 돌연변이를 검출하도록 구성되는 것인 단계; 및

(G) 적어도 제2 프라이머쌍, 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트, 및 상기 gDNA 용액을 이용하여, 상기 gDNA 용액을 상기 적어도 4개의 검출 프로브의 제1 세트 및 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트에 동시에 노출시킴으로써, TGFβ I 유전자 내에 존재하는 적어도 제2 뉴클레오타이드의 정체를 확인하는 단계로서,

상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트는 서열번호: 45의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 제5 검출 프로브, 서열번호: 46의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 제6 검출 프로브, 및 서열번호: 50의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 제7 검출 프로브를 포함하고,

상기 적어도 제2 뉴클레오타이드는, 상기 적어도 제1 뉴클레오타이드의 위치에 독립적으로, 각막 이영양증과 관련된 제2 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)에 상응하는, TGFβ I 유전자의 제2의 특정 위치에 위치하며,

상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트 중 적어도 2개의 검출 프로브는 TGFβ I 유전자의 제2의 특정 위치에 있는 각각의 돌연변이를 검출하도록 구성되는 것인 단계.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은 일반적으로 질환과 관련된 유전적 대립유전자의 단리 및 검출 방법에 관한 것이다. 특히, 본원은 아벨리노 각막 이영양증(Avellino corneal dystrophy) 관련 대립유전자의 검출을 위한 개선된 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 실시간 PCR은 실질적으로 동일한 서열을 갖는 핵산 서열 간의 차이를 검출하는 데 사용될 수 있다. 서로 다르게 표지된 형광성 핵산 프로브, 예를 들면 야생형 서열에 결합하는 프로브 및 돌연변이 서열에 결합하는 프로브의 사용을 통해, 인간 게놈 내의 단일 뉴클레오타이드 변화는 빠르고 신뢰성 있게 검출될 수 있다. 이러한 분해능은 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP), 즉, 단백질의 코딩 및/또는 비코딩 서열 내에서 발견되는 단일 염기 변화가 인간 질환과 관련된, 의료 진단에 적용되어 왔다.

[0003] 그러나, 실시간 PCR 분석은 고품질 샘플의 수집 및 단리에 크게 의존한다. 불량한 샘플 수집 및/또는 단리는 더 긴 분석 조건 및 더 많은 양의 실시간 PCR 시약의 사용을 요구하며, 이 둘은 비용 증가 및 생산성 저하를 야기

한다. 더욱이, 실시간 PCR 단일 뉴클레오타이드 다형성 검출 분석이 실패하는 경우 추가적인 샘플을 수집할 필요가 있으며, 이는 시간 및 자원에서 훨씬 더 큰 손실을 유발할 수 있다.

[0004] 따라서, 분석의 전체적인 성공률을 개선하고, 분석에 필요한 시약을 줄이고, 나중에 추가적인 샘플을 수집할 필요성을 줄이는, 개선된 샘플 수집 및 단리를 야기하는 방법이 매우 바람직하다. 더욱이, 소량의 샘플 물질로 실시간 PCR SNP 검출 분석을 수행하는 방법은 또한 고품질 샘플의 수집 및 단리와 연관된 난제를 감소시킬 것이다.

[0005] 각막 이영양증은 상염색체 우성 유전 질환일 수 있으며, 이는 초기에는 환자의 각막의 중심에서 시야 흐림(blurred vision)을 야기한다. 상기 시야 흐림은 점차 각막의 주변부로 확산되어, 환자가 나이가 들어감에 따라 시력을 악화시킨다. 아벨리노 각막 이영양증(Avellino corneal dystrophy), 과립형 각막 이영양증(Granular corneal dystrophy), 래티스 타입 I 각막 이영양증(lattice type I corneal dystrophy), 티엘벵케(Thiel-Behnke), 및 레이스버클러스 각막 이영양증(Reis-bucklers corneal dystrophy)을 포함하는, 몇 가지 유형의 각막 이영양증이 규명되었다. 각막 이영양증은, 적어도 일부 경우, β IG-H3 단백질(TGF β I 단백질, TGF β I 단백질, 및 케라토포에텔린(keratopithelin)으로도 알려짐)을 인코딩하는 형질전환 성장인자 베타 유도된(TGF β I) 유전자에서의 돌연변이에 의해 유발되는 것으로 알려져 있다.

[0006] 아벨리노 각막 이영양증을 겪는 이형접합형 환자는 나이가 들어감에 따라 점차 시력이 상실하여 인생 말년에는 심각해진다. 이와 달리, 동종접합성 환자는 6세에 심각하거나 완전한 시력 상실을 나타낸다. 아벨리노 각막 이영양증은 1988년경에 하나의 구별되는 유형의 각막 이영양증으로서 최초로 인식되었다. 그 이전에는, 아벨리노 각막 이영양증은 아마도 과립형 각막 이영양증으로서 잘못 분류되었다. 오늘날, 아벨리노 각막 이영양증은 전세계적으로 가장 흔한 형태의 간질 각막 이영양증인 것으로 알려져 있다. 한국에서, 아벨리노 각막 이영양증은 870명당 약 1명꼴로 발생하는 것으로 여겨진다(Lee, J. H. et al., *Ophthalmic Epidemiol.*, 17:160, 2010; see also Holland, E. J. et al., *Ophthalmology*, 99:1564, 1992; Kennedy, S. M. et al., *Br. J. Ophthalmol.*, 80:489, 1996; Dolmetsch, A. M. et al., *Can. J. Ophthalmol.*, 31:29, 1996; Afshari, N. A. et al., *Arch. Ophthalmol.*, 119:16, 2001; Stewart, H. S. *Hum. Mutat.*, 14:126, 1999 참고).

[0007] 이전에, 이형접합형 개인(예컨대, 하나의 야생형 β IG-H3 대립유전자 및 하나의 돌연변이 β IG-H3 대립유전자를 갖는 이형접합형 개인)은 라식 수술 후 가속화되는 시력 손실에 매우 민감한 것으로 발견되었다. 주목할만하게도, 수술 2년 후에, 이들 환자에서 공격성 증가와 함께 각막 혼탁 증가가 관찰되었고, 이는 결국 완전한 시력 상실을 야기하였다(Jun, R. M. et al., *Ophthalmology*, 111:463, 2004). 이전에, 라식 또는 엑시머 레이저 수술이 각막 이영양증을 겪는 환자의 시야 흐림을 제거할 것이라는 기대감으로 눈 수술이 수행되어 왔다. 30만건의 가상적인 수의 라식 수술에 대해, 아벨리노 각막 이영양증을 겪는 이형접합형 환자의 1/1000의 최소 추정에 기초하여, 300명이 시력을 잃을 것이다. 라식 수술을 한 환자들은 주로 생산적인 활동을 하는 20대와 30대이므로, 이들의 시력 상실은 사회 및 경제 모두에 심각한 문제를 야기한다.

[0008] 또한, 미국에서 2000년에 라식 수술이 승인된 후, 라식 수술을 한 아벨리노 각막 이영양증을 겪는 아프리카계 미국인 환자들이 시력을 잃은 것으로 나타났고, 이는 많은 비슷한 사례가 전 세계적으로 일어나고 있을지도 모른다는 것을 암시한다.

[0009] 그러므로, 라식 수술에 의한 아벨리노 각막 이영양증의 진행을 예방하기 위하여 아벨리노 각막 이영양증의 정확한 진단이 요구됨에도 불구하고, 아벨리노 각막 이영양증의 진단은 단지 각막 혼탁의 현미경 관찰(예컨대, 세극 등 검사(slit-lamp examination))에 의해서 수행되므로 종종 의사들은 라식 수술을 수행하는 환자의 잠재적인 증상을 놓쳐 시력 상실을 야기한다. 그러므로, 각막 이영양증의 신속하고 정확한 유전적 진단이 바람직하다.

[0010] 아벨리노 각막 이영양증의 원인이 되는 β IG-H3 유전자에서의 돌연변이를 검출하기 위한 DNA 칩이 개발되었다(대한민국 출원공보 제10-2007-0076532호). 그러나, DNA 칩을 이용한 아벨리노 각막 이영양증의 진단은 불리하게도 샘플 내의 DNA를 증폭시키는 단계, 증폭된 DNA를 DNA 칩과 혼성화시키는 단계, 혼성화된 DNA 칩을 세척하는 단계, 및 양성 반응을 검출하는 단계를 포함하는, 몇 가지 단계를 필요로 한다.

[0011] 상기 배경기술을 고려해 볼 때, 각막 이영양증과 관련된 다수의 돌연변이된 대립유전자를 검출하는 개선된 방법이 본 기술분야에서 요구된다.

발명의 내용

[0012] 본 개시내용은 인간 질환과 관련된 하나 이상의 대립유전자를 검출하기 위한 개선된 방법을 제공한다. 하기 기

재된 방법은 대상에 관한 의료 정보를 내놓는 분석들을 수행하는 것과 연관된 시간 및 비용을 줄인다. 예를 들면, 일부 구현예에서, 상기 개선된 방법은 환자에게 감소된 비용으로, 아벨리노 각막 이영양증과 관련된 계놈 마커의 단일 검출을 가능하게 한다.

- [0013] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는, 대상으로부터의 샘플에서 각막 이영양증과 관련된 적어도 2개의 계놈 대립유전자를 검출하는 방법을 제공한다: (A) 기재(substrate)의 팁에 부착된, 대상의 상피 세포를 제공하는 단계; (B) 상기 기재의 팁을, 상기 기재에 부착된 세포를 용해시키는 용해액 중에서 교반(agitater)하는 단계; (C) 상기 교반(B)이 완료되면, 용해액으로부터 기재를 분리하는 단계; (D) 상기 분리(C) 후, 상기 용해액을 인큐베이션하는 단계; (E) 상기 용해액으로부터 계놈 DNA를 단리하여 gDNA 용액을 형성하는 단계; 및 (F) 적어도 2개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머쌍 및 상기 gDNA 용액을 이용하여 TGFβI 유전자 내에 존재하는 적어도 2개의 뉴클레오타이드의 정체(identity)를 확인하는 단계로서, 여기서 상기 적어도 2개의 뉴클레오타이드는, 각막 이영양증과 관련된 각각의 독립적인 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)에 상응하는, TGFβI 유전자의 각각의 독립적인 위치에 위치한다.
- [0014] 일부 구현예에서, 상기 TGFβI 유전자 내에 존재하는 적어도 2개의 뉴클레오타이드는 인간 계놈에서 적어도 1개의 뉴클레오타이드에 의해 분리되어 있다.
- [0015] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머쌍 중 적어도 한 쌍은 서열번호: 1을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 정방향 프라이머 및 서열번호: 2를 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 역방향 PCR 프라이머를 포함한다.
- [0016] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머쌍 중 적어도 한 쌍은 서열번호: 43을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 정방향 프라이머 및 서열번호: 44를 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 역방향 PCR 프라이머를 포함한다.
- [0017] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머쌍은 제1 증폭 프라이머쌍 및 제2 증폭 프라이머쌍을 포함한다. 상기 제1 증폭 프라이머쌍은 서열번호: 1을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 정방향 프라이머 및 서열번호: 2를 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 역방향 PCR 프라이머를 포함한다. 상기 제2 증폭 프라이머쌍은 서열번호: 43을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 정방향 프라이머 및 서열번호: 44를 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 역방향 PCR 프라이머를 포함한다.
- [0018] 일부 구현예에서, 상기 확인 단계(F)는 하기를 이용하는 것을 추가로 포함한다: (i) 서열번호: 25를 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 제1 야생형 검출 프로브 및 서열번호: 26, 서열번호: 48, 또는 서열번호: 49를 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 제1 돌연변이 검출 프로브; 및 (ii) 서열번호: 45 또는 서열번호: 47을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 제2 야생형 검출 프로브 및 서열번호: 46 또는 서열번호: 50을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 제2 돌연변이 검출 프로브.
- [0019] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는, 각막 이영양증을 검출하는 방법을 제공한다: (A) 적어도 제1 증폭 프라이머쌍 및 적어도 제2 증폭 프라이머쌍을 포함하는 반응 혼합물을 이용하여 인간 대상으로부터의 생물학적 샘플로부터, 아미노산 잔기 124를 인코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 제1 TGFβI 유전자 서열 및 아미노산 잔기 555를 인코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 제2 TGFβI 유전자 서열을 포함하는, 적어도 2개의 TGFβI 유전자 서열을 증폭시키는 단계; (B) 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브쌍의 제1 검출 프로브를 상기 제1 TGFβI 유전자 서열에 혼성화시키는 단계; (C) 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브쌍의 제2 검출 프로브를 상기 제2 TGFβI 유전자 서열에 혼성화시키는 단계; 및 (D) 상기 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브쌍 및 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브쌍을 포함하는, 적어도 2개의 검출 프로브쌍의 사용에 기초하여 상기 제1 TGFβI 유전자 서열 및/또는 상기 제2 TGFβI 유전자 서열 내의 하나 이상의 돌연변이를 검출하는 단계.
- [0020] 일부 구현예에서, 상기 제1 TGFβI 유전자 서열 및/또는 상기 제2 TGFβI 유전자 서열 내의 하나 이상의 돌연변이를 검출하는 것은 상기 제1 TGFβI 유전자 서열 및/또는 상기 제2 TGFβI 유전자 서열 내의 2개 이상의 돌연변이를 검출하는 것을 포함하고, 상기 2개 이상의 돌연변이는 인간 계놈에서 적어도 하나의 뉴클레오타이드에 의해 분리되어 있다.
- [0021] 일부 구현예에서, 상기 적어도 제1 증폭 프라이머쌍은 제1 증폭 프라이머 및 제2 증폭 프라이머를 포함하고, 상기 제1 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 1을 포함하고, 상기 제2 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 2를 포함한다.

- [0022] 일부 구현예에서, 상기 적어도 제2 증폭 프라이머쌍은 제3 증폭 프라이머 및 제4 증폭 프라이머를 포함하고, 상기 제3 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 43으로 표시되고, 상기 제4 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 44로 표시된다.
- [0023] 일부 구현예에서, 상기 제1 증폭 프라이머쌍은 제1 증폭 프라이머 및 제2 증폭 프라이머를 포함하고, 상기 제1 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 1을 포함하며, 상기 제2 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 2를 포함하며, 상기 제2 증폭 프라이머쌍은 제3 증폭 프라이머 및 제4 증폭 프라이머를 포함하고, 상기 제3 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 43을 포함하며, 상기 제4 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 44를 포함한다.
- [0024] 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 돌연변이 중 하나는, 인코딩된 TGFβI 단백질 내에서, 아미노산 124에서, 시스테인으로 돌연변이된 아르기닌(R124C), 히스티딘으로 돌연변이된 아르기닌(R124H), 및/또는 류신으로 돌연변이된 아르기닌(R124L)에 상응한다.
- [0025] 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 돌연변이 중 하나는, 인코딩된 TGFβI 단백질 내에서, 아미노산 555에서, 트립토판으로 돌연변이된 아르기닌(R555W) 및/또는 글루타민으로 돌연변이된 아르기닌(R555Q)에 상응한다.
- [0026] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브쌍 각각은 개별적으로 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 서열번호: 25-26, 서열번호: 25 및 48, 서열번호: 25 및 49, 서열번호: 27-28, 서열번호: 29-30, 서열번호: 31-32, 서열번호: 33-34, 서열번호: 35-36, 서열번호: 37-38, 서열번호: 39-40, 서열번호: 41-42, 서열번호: 45-46 및 서열번호: 46-47, 서열번호: 45 및 50, 및 서열번호: 47 및 50으로 이루어진 군으로부터 개별적으로 선택되는 뉴클레오타이드 서열쌍을 포함한다.
- [0027] 일부 구현예에서, 상기 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브쌍은 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 25 및 서열번호: 26을 포함한다.
- [0028] 일부 구현예에서, 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브쌍은 제3 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제4 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제3 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제4 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 45 및 서열번호: 46을 포함한다.
- [0029] 일부 구현예에서, 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브쌍은 제3 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제4 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 제3 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제4 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 47 및 서열번호: 46을 포함한다.
- [0030] 일부 구현예에서, 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브쌍은 제3 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제4 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제3 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제4 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 25 및 서열번호: 48을 포함한다.
- [0031] 일부 구현예에서, 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브쌍은 제3 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제4 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제3 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제4 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 25 및 서열번호: 49를 포함한다.
- [0032] 일부 구현예에서, 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브쌍은 제3 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제4 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제3 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제4 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 45 및 서열번호: 50을 포함한다.
- [0033] 일부 구현예에서, 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브쌍은 제3 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제4 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제3 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제4 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 47 및 서열번호: 50을 포함한다.

한다.

- [0034] 일부 구현예에서, 상기 제1 검출 프로브는 제1 표지와 커플링되고 상기 제2 검출 프로브는 제2 표지에 커플링된다.
- [0035] 일부 구현예에서, 상기 제1 표지는 VIC이고 상기 제2 표지는 FAM이다.
- [0036] 일부 구현예에서, 상기 혼성화 단계(B)와 상기 혼성화 단계(C)는 동일한 중 용액에서 동시에 수행된다.
- [0037] 일부 구현예에서, 상기 혼성화 단계(B)와 상기 혼성화 단계(C)는 동일한 용액 또는 상이한 용액 중에서 동시에 또는 상이한 시점에 수행된다.
- [0038] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는, 인간 대상에서 각막 이영양증을 검출하기 위한 반응 혼합물을 제공한다: (A) (1) 상기 대상으로부터의 생물학적 샘플로부터 아미노산 잔기 124를 인코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 적어도 2개의 TGFβ I 유전자 서열 중 제1 TGFβ I 유전자 서열을, 그리고 (2) 상기 대상으로부터의 생물학적 샘플로부터 아미노산 잔기 555를 인코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 적어도 2개의 TGFβ I 유전자 서열 중 제2 TGFβ I 유전자 서열을 증폭시키고 결정하기 위한 적어도 제1 증폭 프라이머쌍 및 제2 증폭 프라이머쌍; 및 (B) 적어도 2개의 검출 프로브쌍, 여기서 상기 적어도 2개의 검출 프로브쌍 각각에서의 검출 프로브는 적어도 2개의 TGFβ I 유전자 서열 중 적어도 하나에 혼성화한다.
- [0039] 일부 구현예에서, 상기 제1 증폭 프라이머쌍은 제1 증폭 프라이머 및 제2 증폭 프라이머를 포함하고, 상기 제1 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 1을 포함하며, 상기 제2 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 2를 포함한다.
- [0040] 일부 구현예에서, 상기 제2 증폭 프라이머쌍은 제3 증폭 프라이머 및 제4 증폭 프라이머를 포함하고, 상기 제3 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 43을 포함하며, 상기 제4 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 44를 포함한다.
- [0041] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 프로브쌍 중 적어도 하나는, 인코딩된 TGFβ I 단백질 내에서, 아미노산 124에서, 시스테인으로 돌연변이된 아르기닌(R124C), 히스티딘으로 돌연변이된 아르기닌(R124H), 및/또는 류신으로 돌연변이된 아르기닌(R124L)에 상응하는 돌연변이를 검출하는 데 사용된다.
- [0042] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 프로브쌍 중 적어도 하나는, 인코딩된 TGFβ I 단백질 내에서, 아미노산 555에서, 트립토판으로 돌연변이된 아르기닌(R555W) 및/또는 글루타민으로 돌연변이된 아르기닌(R555Q)에 상응하는 돌연변이를 검출하는 데 사용된다.
- [0043] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 프로브쌍 중 각각의 검출 프로브는 개별적으로 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 서열번호: 25-26, 서열번호: 25 및 48, 서열번호: 25 및 49, 서열번호: 27-28, 서열번호: 29-30, 서열번호: 31-32, 서열번호: 33-34, 서열번호: 35-36, 서열번호: 37-38, 서열번호: 39-40, 서열번호: 41-42, 서열번호: 45-46 및 서열번호: 46-47, 서열번호: 45 및 50, 및 서열번호: 47 및 50으로 이루어진 군으로부터 개별적으로 선택되는 뉴클레오타이드 서열쌍을 포함한다.
- [0044] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 프로브쌍 중 하나는 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 25 및 서열번호: 26을 포함한다.
- [0045] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 프로브쌍 중 하나는 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 45 및 서열번호: 46을 포함한다.
- [0046] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 프로브쌍 중 하나는 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 47 및 서열번호: 46을 포함한다.
- [0047] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 프로브쌍 중 하나는 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 25 및 서열번호: 48을 포함한다.

- [0048] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 프로브쌍 중 하나는 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 25 및 서열번호: 49를 포함한다.
- [0049] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 프로브쌍 중 하나는 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 45 및 서열번호: 50을 포함한다.
- [0050] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 프로브쌍 중 하나는 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 47 및 서열번호: 50을 포함한다.
- [0051] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 프로브 중 제1 검출 프로브는 제1 표지와 커플링되고 상기 적어도 2개의 검출 프로브 중 제2 검출 프로브는 제2 표지에 커플링된다.
- [0052] 일부 구현예에서, 상기 제1 표지는 VIC이고, 상기 제2 표지는 FAM이다.
- [0053] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는, 인간 대상에서 각막 이영양증을 검출하기 위한 반응 혼합물을 제공한다: (A) 대상으로부터의 생물학적 샘플로부터 TGFβ I 유전자 서열을 증폭시키고 결정하기 위한 적어도 제1 증폭 프라이머쌍; 및 (B) 적어도 3개의 검출 프로브의 세트, 여기서 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트 중 하나의 검출 프로브는 TGFβ I 유전자 서열에 노출될 때 TGFβ I 유전자 서열에 혼성화한다.
- [0054] 일부 구현예에서, 상기 TGFβ I 유전자 서열은 대상으로부터의 생물학적 샘플로부터 아미노산 잔기 124를 인코딩하는 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0055] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트는 서열번호: 25-42 및 48-49로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 검출 프로브를 포함한다.
- [0056] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트는 서열번호: 25-42 및 48-49로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 2개 이상의 검출 프로브를 포함한다.
- [0057] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트는 서열번호: 25-42 및 48-49로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 3개 이상의 검출 프로브를 포함한다.
- [0058] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트는 제1 검출 프로브 서열번호: 25 및 제2 검출 프로브 서열번호: 26을 포함한다.
- [0059] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트는 서열번호: 48 및 서열번호: 49로 이루어진 군으로부터 선택되는 제3 검출 프로브를 포함한다.
- [0060] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트는, 제3 검출 프로브와 다르며 서열번호: 48 및 서열번호: 49로 이루어진 군으로부터 선택되는 제4 검출 프로브를 포함한다.
- [0061] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트는 서열번호: 26 및 48-49로 이루어진 군으로부터 선택되는 2개 이상의 검출 프로브를 포함한다.
- [0062] 일부 구현예에서, 상기 제1 증폭 프라이머쌍은 제1 증폭 프라이머 및 제2 증폭 프라이머를 포함하고, 상기 제1 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 1을 포함하며, 상기 제2 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 2를 포함한다.
- [0063] 일부 구현예에서, 상기 반응 혼합물은 하기를 추가로 포함한다: (C) 생물학적 샘플로부터 제2 TGFβ I 유전자 서열을 증폭시키고 결정하기 위한 적어도 제2 증폭 프라이머쌍; 및 (D) 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트, 여기서 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트 중 하나의 검출 프로브는 제2 TGFβ I 유전자 서열에 노출될 때 제2 TGFβ I 유전자 서열에 혼성화한다.
- [0064] 일부 구현예에서, 상기 제2 TGFβ I 유전자 서열은 대상으로부터의 생물학적 샘플로부터 아미노산 잔기 555를 인코딩하는 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0065] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트는 서열번호: 45-47 및 50으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 검출 프로브를 포함한다.

- [0066] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트는 서열번호: 45-47 및 50으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 2개 이상의 검출 프로브를 포함한다.
- [0067] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트는 서열번호: 45-47 및 50으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 3개 이상의 검출 프로브를 포함한다.
- [0068] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트는 서열번호: 45 또는 서열번호: 47인 제1 검출 프로브, 서열번호: 46인 제2 검출 프로브, 및 서열번호: 50인 제3 검출 프로브를 포함한다.
- [0069] 일부 구현예에서, 상기 제2 증폭 프라이머쌍은 제3 증폭 프라이머 및 제4 증폭 프라이머를 포함하고, 상기 제3 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 43을 포함하며, 상기 제4 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 44를 포함한다.
- [0070] 일부 구현예에서, 상기 TGFβ1 유전자 서열은 대상으로부터의 생물학적 샘플로부터 아미노산 잔기 555를 인코딩하는 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0071] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트는 서열번호: 45-47 및 50으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 검출 프로브를 포함한다.
- [0072] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트는 서열번호: 45-47 및 50으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 2개 이상의 검출 프로브를 포함한다.
- [0073] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트는 서열번호: 45-47 및 50으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 3개 이상의 검출 프로브를 포함한다.
- [0074] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트는 서열번호: 45 또는 서열번호: 47인 제1 검출 프로브, 서열번호: 46인 제2 검출 프로브, 및 서열번호: 50인 제3 검출 프로브를 포함한다.
- [0075] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는, 각막 이영양증을 검출하는 방법을 제공한다: (A-1) 적어도 제1 증폭 프라이머쌍 및 적어도 3개의 검출 프로브의 세트를 포함하는 반응 혼합물을 이용하여 인간 대상으로부터의 생물학적 샘플로부터 제1 TGFβ1 유전자 서열을 증폭시키는 단계; (B-1) 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트 중 제1 검출 프로브를 상기 제1 TGFβ1 유전자 서열에 혼성화시키는 단계; 및 (C-1) (i) 상기 제1 TGFβ1 유전자 서열에 대한 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트 중 제1 검출 프로브의 혼성화, 및 (ii) 상기 제1 TGFβ1 유전자 서열에 대한 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트 중 제2 및 제3 검출 프로브의 혼성화 실패에 기초하여, 상기 제1 TGFβ1 유전자 서열 내의 돌연변이를 검출하는 단계.
- [0076] 일부 구현예에서, 상기 방법은 하기를 추가로 포함한다: (A-2) 동일한 반응 혼합물을 이용하여 생물학적 샘플로부터 제2 TGFβ1 유전자 서열을 증폭시키는 단계로서, 여기서 상기 반응 혼합물은 적어도 제2 증폭 프라이머쌍 및 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트를 포함하며; (B-2) 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트 중 제1 검출 프로브를 상기 제2 TGFβ1 유전자 서열에 혼성화시키는 단계; 및 (C-2) (i) 상기 제1 TGFβ1 유전자 서열에 대한 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트 중 제1 검출 프로브의 혼성화, 및 (ii) 상기 제2 TGFβ1 유전자 서열에 대한 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트 중 제2 검출 프로브 및 제3 검출 프로브의 혼성화 실패에 기초하여 상기 제2 TGFβ1 유전자 서열 내의 돌연변이를 검출하는 단계.
- [0077] 일부 구현예에서, 증폭 단계(A-1), 증폭 단계(A-2), 혼성화 단계(B-1), 혼성화 단계(B-2), 검출 단계(C-1), 및 검출 단계(C-2)는 생물학적 샘플의 동일한 분취량을 이용하여 수행된다.
- [0078] 일부 구현예에서, 제1 TGFβ1 유전자 서열을 증폭시키는 것(A-1) 및 제2 TGFβ1 유전자 서열을 증폭시키는 것(A-2)는 동시에 수행된다.
- [0079] 일부 구현예에서, 혼성화 단계(B-1) 및 혼성화 단계(B-2)는 동시에 수행된다.
- [0080] 일부 구현예에서, 검출 단계(C-1) 및 검출 단계(C-2)는 동시에 수행된다.
- [0081] 일부 구현예에서, 상기 반응 혼합물은 상기 기재된 특징 중 일부를 갖는다. 간결성을 위해, 상기 세부사항은 본원에서 반복되지 않는다.
- [0082] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 인간 대상에서 이형접합형 각막 이영양증의 검출을 통해 대상에서 레이저 눈 수술에 따른 합병증의 위험을 예측하기 위한, 상기 어느 곳에 언급된 반응 혼합물의 용도를 제공한다.

- [0083] 일부 구현예에서, 상기 레이저 눈 수술은 라식 및 엑시머 레이저 수술 중 하나를 포함한다.
- [0084] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는, 인간 대상으로부터의 샘플에서 각막 이영양증과 관련된 게놈 돌연변이를 검출하는 방법을 제공한다: (A) 기재의 팁에 부착된 인간 대상의 상피 세포를 제공하는 단계; (B) 상기 기재의 팁을, 상기 기재에 부착된 세포를 용해시키는 용해액 중에서 교반하는 단계; (C) 상기 교반(B)이 완료되면, 상기 용해액으로부터 기재를 분리하는 단계; (D) 상기 분리(C) 후, 상기 용해액을 인큐베이션하는 단계; (E) 상기 용해액으로부터 게놈 DNA를 단리하여 gDNA 용액을 형성하는 단계; 및 (F) 상기 gDNA 용액을 적어도 3개의 검출 프로브에 동시에 노출시킴으로써 적어도 제1 프라이머쌍, 적어도 3개의 검출 프로브의 세트, 및 상기 gDNA 용액을 이용하여 TGFβ1 유전자 내에 존재하는 적어도 하나의 뉴클레오타이드의 정체를 확인하는 단계로서, 여기서, 상기 적어도 하나의 뉴클레오타이드는, 각막 이영양증과 관련된 단일 뉴클레오타이드 다형성 (SNP)에 상응하는, TGFβ1 유전자의 특정 위치에 위치하며, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트 중 적어도 2개의 검출 프로브 각각은 TGFβ1 유전자의 특정 위치에 상이한 돌연변이를 검출하도록 구성된다.
- [0085] 일부 구현예에서, 상기 방법은 하기를 추가로 포함한다: (G) 상기 gDNA 용액을 적어도 3개의 검출 프로브의 세트 및 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트에 동시에 노출시킴으로써 적어도 제2 프라이머쌍, 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트, 및 gDNA 용액을 이용하여 TGFβ1 유전자 내에 존재하는 적어도 제2 뉴클레오타이드의 정체를 확인하는 단계로서, 여기서, 상기 적어도 제2 뉴클레오타이드는, 각막 이영양증과 관련된 제2 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)에 상응하는, TGFβ1 유전자의 제2의 특정 위치에 위치하며, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트 중 적어도 2개의 검출 프로브는 TGFβ1 유전자의 제2의 특정 위치에 있는 각각의 돌연변이를 검출하도록 구성된다.
- [0086] 일부 구현예에서, 상기 확인 단계(F)와 상기 확인 단계(G)는 동시에 수행된다.
- [0087] 일부 구현예에서, 상기 확인 단계(F)와 상기 확인 단계(G)는 동일한 gDNA 용액을 이용하여 수행된다.

도면의 간단한 설명

- [0088] **도 1a-1b**는 일부 구현예에 따라, 질환과 관련된 게놈 대립유전자를 검출하는 개선된 방법(100)을 예시한다.
- 도 2**는 일부 구현예에 따라, 아벨리노 각막 이영양증과 관련된 단일 뉴클레오타이드 다형성의 실시간 PCR 검출에 유용한 정방향 및 역방향 PCR 프라이머쌍의 서열목록(서열번호: 1-24)을 제공한다.
- 도 3**은 일부 구현예에 따라, 아벨리노 각막 이영양증과 관련된 단일 뉴클레오타이드 다형성의 실시간 PCR 검출에 유용한 야생형 및 돌연변이 검출 프로브쌍의 서열목록(서열번호: 25-42)을 제공한다.
- 도 4**는 도 5 내지 8에 나타난 대립유전자 검출 실험에서 사용된 프로브 서열 및 프라이머의 목록을 제공한다.
- 도 5**는 도 4에 기술된 프로브를 이용하여 R124C, R124H, R124L, R555W 및 R555Q 돌연변이를 검출하는 것과 관련된 실험 데이터를 제공한다. 도 5a는 표시된 시약 혼합물 및 표시된 사이클링 조건(우측 패널)을 이용한 대립유전자 식별 플롯 실행(좌측 패널)을 제공한다. 도 5b는 정상 대조군과 비교하여 다양한 돌연변이에 대한 실시간 PCR 플롯을 제공한다. 도 5c는 동종접합성 대조군과 비교하여 다양한 돌연변이에 대한 실시간 PCR 플롯을 제공한다.
- 도 6**은 도 4에 기재된 프로브를 이용하여 R124C, R124H, R124L, R555W 및 R555Q 돌연변이를 검출하는 것과 관련된 실험 데이터를 제공한다. 도 6a는 표시된 시약 혼합물 및 표시된 사이클링 조건(우측 패널)을 이용한 대립유전자 식별 플롯 실행(좌측 패널)을 제공한다. 도 6b는 정상 대조군과 비교하여 다양한 돌연변이에 대한 실시간 PCR 플롯을 제공한다. 도 6c는 동종접합성 대조군과 비교하여 다양한 돌연변이에 대한 실시간 PCR 플롯을 제공한다.
- 도 7**은 도 4에 기재된 프로브를 이용하여 R124C, R124H, R124L, R555W 및 R555Q 돌연변이를 검출하는 것과 관련된 실험 데이터를 제공한다. 도 7은 표시된 시약 혼합물 및 표시된 사이클링 조건(우측 패널)을 이용한 대립유전자 식별 플롯 실행(좌측 패널)을 제공한다.
- 도 8**은 도 4에 기재된 프로브를 이용하여 R124C, R124H, R124L, R555W 및 R555Q 돌연변이를 검출하는 것과 관련된 실험 데이터를 제공한다. 특히, 도 8은 표시된 시약 혼합물 및 표시된 사이클링 조건(우측 패널)을 이용한 대립유전자 식별 플롯 실행(좌측 패널)을 제공한다. 상기 대립유전자 식별 플롯(좌측 패널) 내의 표시 "B"는 샘플이 실시간 PCR 분석을 수행하기 전에 용해 버퍼로 전처리되었음을 가리킨다. 상기 대립유전자 식별 플롯(좌측 패널) 내의 표시 "DW-A"는 샘플이 실시간 PCR 분석을 수행하기 전에 증류수로 전처리되었음을 가리킨다. 상이한

샘플 점 주위의 원은, 검출된 대립유전자 각각에 대한, 2개의 매치된 샘플, "B" 및 "DW-A"를 각각 나타내며(좌측 패널 참조); 각 원 안에는 2개의 점이 있으며, 하나는 "B"에 대한 점이고, 하나는 샘플 "DW-A"에 대한 점이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

I. 도입

질환 관련 SNP의 검출은 다양한 의료 상태의 진단 및 예후를 위한 점점 더 중요한 도구가 되고 있다. 예를 들면, TGFβI 유전자의 엑손 4에서의 단일 뉴클레오타이드 변화의 존재는 아벨리노 각막 이영양증과 강한 연관이 있다. 이러한 SNP에 대해 이형접합형인 개인은 라식 수술 후 시력 상실에 대한 위험이 높은 것으로 확인되었다. 라식은 많은 사람들의 삶의 질을 크게 개선하는 의료 수술이지만, G/A TGFβI SNP를 갖는 개인의 경우, 라식은 흔히 4개월 내지 18개월 동안 점진적인 시력 장애를 유발하여, 시력 상실을 야기할 수 있다. 상기 시력 장애는 더 길거나 더 짧은 기간 내에 일어날 수 있다. 다행히도, 라식 수술을 피해야 하는 상기 돌연변이를 갖는 개인을 확인하기 위해 스크리닝이 수행될 수 있다.

본 개시내용은 샘플 단리, 제조, 및 분석을 개선하는 방법의 개발에 적어도 일부 기초한다. 일부 구현예에서, 예를 들면, 분석이 실패하거나 또는 부가적인 추적 시험을 수행할 필요가 있을 때, 환자 샘플의 재사용을 허용하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 이들 개선된 방법은 환자의 구강막으로부터 벗겨낸 세포를 갖는 기재(예컨대, 레이온 팁 또는 면봉)를 실온에서 30-45초 동안(상승된 온도에서 20분 동안 연장된 인큐베이션보다) 용해액에서 조심스레 휘젓는 것을 포함한다. 그리고 나서, 상기 용해액을 45°C에서 30분 동안 인큐베이션하여 용해를 개선하고 게놈 샘플의 수율을 증가시킨다. 이후, 유리하게도, 상기 레이온 팁 또는 면봉은 재시험을 위해 사용되는 게놈 DNA의 재-단리를 위해 보관될 수 있다(예컨대, 동결되거나 냉동됨).

일부 구현예에서, 본원에 제공된 개선점은 실시간 PCR 검출 분석을 위해 소량의 게놈 DNA 주형의 사용을 통해 제공된다. 일부 구현예에서, 이것은 수행되는 실시간 PCR 사이클의 수를 증가시키고/거나(예컨대, 약 40 사이클로) 95°C에서 3초 변성 사이클 시간을 이용함으로써 달성된다. 유리하게도, 이들 방법에 의해 필요한 샘플량이 줄어들기 때문에, 실시간 PCR 시약에 대한 요구량 역시 줄어든다. 진단 분석에 사용되는 많은 시약들은 특허권이 있기 때문에 비쌀 수 있다. 사용되는 시약의 양을 감소시키는 것은 또한 시약과 관련된 비용을 현저히 감소시킬 수 있다.

이들 개별적인 단계 각각을 수행하기 위한 특정한 조건(예컨대, 샘플 핸들링, 인큐베이션 온도, 반응 부피, 반응 사이클 수, 반응 사이클 시간, 반응 사이클 온도)의 모든 조합이 TGFβI 유전자의 엑손 4에서 발견되는 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP와 같은, 질환 관련 SNP를 검출하기 위한 본원에 기재된 방법을 수행하는 데 사용될 수 있음이 고려된다.

II. 선택된 정의

본원에 사용된 바와 같이 용어 "발명" 또는 "본 발명"은 본 발명의 어느 하나의 특정한 구현예에 제한하는 것을 의미하는 것이 아니라, 일반적으로 청구항 및 명세서에 기재된 본 발명의 어느 또는 모든 구현예에 적용된다.

본원에 사용된 바와 같이, 단수형은 문맥이 달리 명확히 언급하지 않는 한 복수형 언급을 포함한다. 따라서, 예를 들면, "방법"의 언급은 본원에 기재된 유형의 하나 이상의 방법들, 및/또는 단계들을 포함하며, 이는 본 개시내용을 읽을 때 본 기술분야의 숙련자에게 자명해질 것이다.

본원에 사용된 바와 같이, 용어 "다형성(polymorphism)" 및 이의 변형은 상이한 게놈 또는 개인 간에 또는 중에서 2개 이상의 대체 게놈 서열 또는 대립유전자의 존재를 가리킨다. 용어 "유전적 돌연변이" 또는 "유전적 변이" 및 이의 변형은 다형성을 포함한다.

본원에 사용된 바와 같이 용어 "단일 뉴클레오타이드 다형성("SNP)" 및 이의 변형은 대립유전자 간에 다른 하나의 뉴클레오타이드의 부위를 가리킨다. 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)은 단일 염기 변화 또는 점 돌연변이지만, 개인 간에 유전적 변이를 야기하는 이른바 "인텔" 돌연변이(뉴클레오타이드의 삽입 또는 결실)도 포함한다. 모든 인간 유전적 변이의 약 90%를 차지하는 SNP는 30억-염기 인간 게놈 사이에 100 내지 300 염기마다 일어난다. 그러나, SNP는 바이러스와 같은 다른 유기체에서 훨씬 더 빈번하게 일어날 수 있다. SNP는 게놈의 코딩 또는 비코딩 영역에서 일어날 수 있다. 코딩 영역에서의 SNP는 단백질 산물의 아미노산 서열을 변화시키거나 변화시키지 않을 수 있다. 비코딩 영역에서의 SNP는 프로모터 또는 처리 부위를 변화시킬 수 있고, 유전자 전사 및/또는 처리에 영향을 미칠 수 있다. 개인이 관심있는 게놈 영역 내에 특정한 SNP를 갖는지에 관한 지식은 다

양한 질환에 대한 진단적, 예방적 및 치료적 적용을 개발하기 위한 충분한 정보를 제공할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시내용은 아벨리노 각막 이영양증과 관련된 TGFβ1 유전자의 엑손 4에 위치한 구아닌에서 아데닌으로의 SNP(guanine-to-adenine SNP)의 검출에 관한 것이다.

- [0099] 용어 "프라이머" 및 이의 변형은 PCR 반응에서 DNA 합성의 개시점으로서 작용하는 올리고뉴클레오타이드를 가리킨다. 프라이머는 일반적으로 약 15 내지 약 35 뉴클레오타이드 길이이며, 표적 서열에 상보적인 영역에 혼성화한다.
- [0100] 용어 "프로브" 및 이의 변형(예컨대, 검출 프로브)은 PCR 반응에서 표적 핵산 서열에 혼성화하는 올리고뉴클레오타이드를 가리킨다. 표적 서열은 분석될 핵산의 영역을 가리키며 관심있는 다형성 부위를 포함한다.
- [0101] 달리 정의하지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 대등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실행 또는 시험에서 사용될 수 있음에도 불구하고, 방법 및 물질의 다양한 구현예가 본원에 구체적으로 기재되어 있다.
- [0102] **III. 샘플 제조**
- [0103] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 실시간 PCR 단일 뉴클레오타이드 다형성 검출 분석에서 사용되는 계놈 샘플을 분리하는 개선된 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 개선된 방법(100)은 도 1에 개괄된 단계들의 조합을 이용한다.
- [0104] 일부 구현예에서, 상기 방법은 대상으로부터 세포의 샘플을 제공하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 환자의 세포 표면을 상기 세포를 기재 상에 가역적으로 고정화할 수 있는 기재와 접촉함으로써 수집된다.
- [0105] 상기 개선된 방법은 다양한 샘플로부터 획득된 다양한 세포 유형에 적용될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 개선된 방법에 사용하기 위한 세포 유형은 비제한적으로 상피 세포, 내피 세포, 결합 조직 세포, 골격 근육 세포, 내분비 세포, 심장 세포, 요 세포, 멜라노사이트, 케라티노사이트, 혈액 세포, 백혈구 세포, 비피 코트, 유모 세포(hair cell)(예컨대, 모근 세포 포함) 및/또는 타액 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 상피 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 피막하-혈관주위(상피 유형 1); 담염(pale)(상피 유형 2); 중간(상피 유형 3); 어둡(상피 유형 4); 미분화(상피 유형 5); 및 거대-수질(상피 유형 6)이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 구강 상피 세포(예컨대, 구강 스왑을 이용하여 수집된 상피 세포)이다. 일부 구현예에서, 상기 개선된 방법에서 사용되는 세포의 샘플은 상기 확인된 세포 유형의 임의의 조합을 포함한다.
- [0106] 일부 구현예에서, 상기 방법은 대상으로부터의 세포의 샘플을 제공하는 것(102)을 포함한다. 일부 구현예에서, 제공된 상기 세포는 구강 상피 세포이다.
- [0107] 상기 세포 샘플은 대상 세포를 기재에 가역적으로 결합시키는 임의의 다양한 방법에 의해 수집된다. 일부 구현예에서, 상기 기재는 상기 세포를 기재에 가역적으로 결합시키기 위해, 대상의 세포를 함유하는 샘플과의 물리적 상호작용에서 이용된다. 일부 구현예에서, 상기 기재는 상기 세포를 기재에 가역적으로 결합시키기 위해 대상의 몸과의 물리적 상호작용에서 이용된다. 일부 구현예에서, 상기 샘플은 구강 세포 샘플이고, 상기 구강 세포의 샘플은 상기 대상의 구강 막(예컨대, 그들의 볼의 내부)을 상기 막으로부터 제거된 세포를 가역적으로 고정화시킬 수 있는 기재와 접촉함으로써 수집된다. 그러한 구현예에서, 사람의 치아를 닦는 것과 동등한 힘(예컨대, 가벼운 양의 힘 또는 압력)으로 스왑을 대상의 내부에 문지른다. 대상의 세포를 기재에 가역적으로 결합시키는 어떠한 방법이 상기 개선된 방법에서 사용하기 위해 고려된다.
- [0108] 일부 구현예에서, 상기 샘플은 유리하게는 비-침습적 방식으로 수집되며, 그와 같이 샘플 수집은 어느 곳에서나 그리고 거의 모든 사람에게 의해 달성된다. 예를 들면, 일부 구현예에서 상기 샘플은 의사의 사무실에서, 대상의 집에서, 또는 라식 수술이 수행되거나 수행될 시설에서 수집된다. 일부 구현예에서, 환자, 환자의 의사, 간호사 또는 의사의 보조원 또는 다른 임상 인원이 샘플을 수집한다.
- [0109] 일부 구현예에서, 기재는 세포가 가역적으로 결합되는 다양한 물질 중 어느 것으로 구성된다. 예시적인 기재는 레이온, 면, 실리카, 엘라스토머, 셀락, 호박, 천연 또는 합성 고무, 셀룰로오스, BAKELITE, NYLON, 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리아크릴로니트릴, 또는 다른 물질 또는 이의 조합으로 구성된 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 기재는 레이온 톱 또는 면봉을 갖는 스왑이다.
- [0110] 이후, 기재의 톱(예컨대, 레이온 스왑 또는 면 스왑의 톱)은 약 10초 내지 60초(1분), 또는 약 20초 내지 60초, 약 20초 내지 약 45초, 또는 약 20초 내지 약 30초, 약 15초 내지 약 60초, 약 15초 내지 약 45초, 또는 약 15

초 내지 약 30초, 약 10초 내지 약 60초, 약 10초 내지 약 45초, 또는 약 10초 내지 약 30초, 약 10초 내지 약 15초 또는 약 10초 내지 약 20초 동안 용해액 중에서 교반된다. 일부 구현예에서, 상기 교반은 약 60초 또는 약 1분 동안 일어난다. 일부 구현예에서, 상기 교반은 1분 미만(예컨대, 60초 미만) 동안 일어난다. 일부 구현예에서, 상기 교반은 15초, 20초, 30초, 45초, 60초, 90초, 120초 이하 동안 일어난다. 일부 구현예에서, 상기 교반은 45초 이하 동안 일어난다. 일부 구현예에서, 상기 교반은 30초 이하 동안 일어난다. 일부 구현예에서, 상기 교반은 20초 이하 동안 일어난다. 일부 구현예에서, 상기 교반은 15초 이하 동안 일어난다.

[0111] 일부 구현예에서, 교반은 용해액에서 기재의 임의의 움직임(움직임)을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 기재의 팁(예컨대, 레이온 스왑 또는 면 스왑의 팁)은, 복수의 구강 세포가 이후 및/또는 차후에 단리를 위해 기재에 부착된 상태를 유지하도록, 용해액에서 부드럽게 움직인다. 용해액에서의 그러한 움직임은 휘젓기 동작, 좌우 동작, 상하 동작 및/또는 디핑(dipping) 동작, 또는 용해액에서 기재의 어떠한 다른 움직임을 포함하며, 이는 일부 구강 세포를 용해액에 분산시키면서 복수의 구강 세포를 상기 팁에 부착된 상태로 유지시킨다.

[0112] 일부 구현예에서, 상기 교반 단계는 실온, 예를 들면, 약 15°C 내지 약 30°C, 약 18°C 내지 약 28°C, 약 18°C 내지 약 25°C 또는 약 20°C 내지 약 25°C의 온도에서 수행된다.

[0113] 교반 후, 기재(예컨대, 레이온 팁 또는 면봉을 갖는 스왑)가 제거되며, 일부 구현예에서, 재시험 또는 추가(예컨대, 상이한 또는 부가적인) 시험이 요구되는 경우에 이후에 사용하기 위해 보관된다. 일부 구현예에서, 기재(예컨대, 레이온 팁 또는 면봉을 갖는 구강 스왑)는 용기에 넣어 냉동보관된다. 일부 구현예에서, 기재(예컨대, 레이온 팁 또는 면봉을 갖는 구강 스왑)는 냉장된다. 일부 구현예에서, 기재는, 하나 이상의 추가 추출에 여전히 유용한 상태를 유지하면서 임의의 다양한 온도에서 그리고 임의의 다양한 시간 동안 보관된다.

[0114] 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 0주, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 11주 또는 12주 이상 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 0주 내지 12주, 1주 내지 12주, 2주 내지 12주, 3주 내지 12주, 4주 내지 12주, 5주 내지 12주, 6주 내지 12주, 7주 내지 12주, 8주 내지 12주, 9주, 10주 내지 12주, 또는 11주 내지 12주 동안 보관되고/거나 보관될 수 있다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 30, 또는 36개월 이상 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 1개월 내지 36개월, 2개월 내지 36개월, 3개월 내지 36개월, 4개월 내지 36개월, 5개월 내지 36개월, 6개월 내지 36개월, 7개월 내지 36개월, 8개월 내지 36개월, 9개월 내지 36개월, 10개월 내지 36개월, 12개월 내지 36개월, 14개월 내지 36개월, 16개월 내지 36개월, 18개월 내지 36개월 동안 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 1개월 내지 30개월, 2개월 내지 30개월, 3개월 내지 30개월, 4개월 내지 30개월, 5개월 내지 30개월, 6개월 내지 30개월, 7개월 내지 30개월, 8개월 내지 30개월, 9개월 내지 30개월, 10개월 내지 30개월, 12개월 내지 30개월, 14개월 내지 30개월, 16개월 내지 30개월 또는 18개월 내지 30개월 동안 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 1개월 내지 24개월, 2개월 내지 24개월, 3개월 내지 24개월, 4개월 내지 24개월, 5개월 내지 24개월, 6개월 내지 24개월, 7개월 내지 24개월, 8개월 내지 24개월, 9개월 내지 24개월, 10개월 내지 24개월, 12개월 내지 24개월, 14개월 내지 24개월, 16개월 내지 24개월, 18개월 내지 24개월 동안 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 1개월 내지 22개월, 2개월 내지 22개월, 3개월 내지 22개월, 4개월 내지 22개월, 5개월 내지 22개월, 6개월 내지 22개월, 7개월 내지 22개월, 8개월 내지 22개월, 9개월 내지 22개월, 10개월 내지 22개월, 12개월 내지 22개월, 14개월 내지 22개월, 16개월 내지 22개월, 18개월 내지 22개월 동안 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 1개월 내지 20개월, 2개월 내지 20개월, 3개월 내지 20개월, 4개월 내지 20개월, 5개월 내지 20개월, 6개월 내지 20개월, 7개월 내지 20개월, 8개월 내지 20개월, 9개월 내지 20개월, 10개월 내지 20개월, 12개월 내지 20개월, 14개월 내지 20개월, 16개월 내지 20개월, 18개월 내지 20개월 동안 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 1개월 내지 18개월, 2개월 내지 18개월, 3개월 내지 18개월, 4개월 내지 18개월, 5개월 내지 18개월, 6개월 내지 18개월, 7개월 내지 18개월, 8개월 내지 18개월, 9개월 내지 18개월, 10개월 내지 18개월, 12개월 내지 18개월, 14개월 내지 18개월, 16개월 내지 18개월 또는 17개월 내지 18개월 동안 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 1개월 내지 12개월, 2개월 내지 12개월, 3개월 내지 12개월, 4개월 내지 12개월, 5개월 내지 12개월, 6개월 내지 12개월, 7개월 내지 12개월, 8개월 내지 12개월, 9개월 내지 12개월, 10개월 내지 12개월 또는 11개월 내지 12개월 동안 보관된다.

[0115] 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 약 2°C, 약 3°C, 약 4°C, 약 5°C, 약 6°C, 약 7°C, 또는 약 8°C에서 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 약 2°C 내지 약 8°C, 약 3°C 내지 약 8°C, 약 4°C 내지 약 8°C, 약 5°C 내지 약 8°C, 약 6°C 내지 약 8°C 또는 약 7°C 내지 약 8°C에서 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 약 -25°C, 약 -24°C, 약 -23°C, 약 -22°C, 약 -21°C, 약 -20°C, 약 -19°C, 약 -18°C, 약

-17℃, 약 -16℃ 또는 약 -15℃에서 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 약 -25℃ 내지 약 -15℃, 약 -22℃ 내지 약 -17℃, 약 -20℃ 내지 약 -15℃ 또는 약 -25℃ 내지 약 -20℃에서 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 t 약 -90℃, 약 -89℃, 약 -88℃, 약 -87℃, 약 -86℃, 약 -85℃, 약 -84℃, 약 -83℃, 약 -82℃, 약 -81℃, 약 -80℃, 약 -79℃, 약 -78℃, 약 -77℃, 약 -76℃, 약 -75℃, 약 -74℃, 약 -73℃, 약 -72℃, 약 -71℃, 약 -70℃, 약 -69℃, 약 -68℃, 약 -67℃, 약 -66℃ 또는 약 -65℃에서 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 약 -90℃ 내지 약 -65℃, 약 -85℃ 내지 약 -65℃, 약 -80℃ 내지 약 -65℃, 약 -75℃ 내지 약 -65℃ 또는 약 -70℃ 내지 약 -65℃에서 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 -90℃ 내지 -65℃에서 보관된다.

[0116] 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 1회 이상 동결-해동되고/거나(예컨대, 동결된 후, 샘플을 함유하는 기재는 해동되고, 본 방법에 따라 사용되며, 재동결된다), 본 방법에서 사용된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20회 이상 동결-해동된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20회 이상 본 방법에서 사용된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 1 내지 20회, 2 내지 20회, 3 내지 20회, 4 내지 30회, 5 내지 20회, 6 내지 20회, 7 내지 20회, 8 내지 20회, 9 내지 20회, 10 내지 20회, 11 내지 20회, 12 내지 20회, 13 내지 20회, 14 내지 20회, 15 내지 20회, 16 내지 20회, 17 내지 20회, 18 내지 20회, 19 내지 20회, 5 내지 15회, 5 내지 10회, 1 내지 10회 또는 1 내지 5회 동결-해동된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 1 내지 20회, 2 내지 20회, 3 내지 20회, 4 내지 30회, 5 내지 20회, 6 내지 20회, 7 내지 20회, 8 내지 20회, 9 내지 20회, 10 내지 20회, 11 내지 20회, 12 내지 20회, 13 내지 20회, 14 내지 20회, 15 내지 20회, 16 내지 20회, 17 내지 20회, 18 내지 20회, 19 내지 20회, 5 내지 15회, 5 내지 10회, 1 내지 10회, 1 내지 5회, 1 내지 4회, 1 내지 3회 또는 1 내지 2회 본 방법에서 사용된다.

[0117] 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 실온 또는 약 15℃ 내지 약 30℃에서 1주 동안 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플은 약 2℃ 내지 약 8℃ 또는 약 4℃에서 약 1, 2 또는 3주 동안 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 -25℃ 내지 약 -15℃ 또는 약 -20℃에서 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개월 동안 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 약 -90℃ 내지 약 -65℃ 또는 약 -80℃에서 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개월 동안 보관된다.

[0118] 유리하게도 그리고 놀랍게도, 기재로부터 추출된 세포 수의 감소가 개별적인 세포로부터 핵산의 추출 증가에 의해 방지되는 것으로 확인되었다. 일부 구현예에서, 추출 증가는 세포를 표준 관행과 비교하여 더 긴 시간 동안 인큐베이션하거나, 세포를 표준 관행과 비교하여 상승된 온도에서 인큐베이션하거나, 또는 이 둘의 조합에 의해 달성된다.

[0119] 일부 구현예에서, 세포의 핵산의 증가된 추출은 표준 관행과 비교하여 증가되거나 더 긴 시간 동안 추출 인큐베이션을 수행함으로써 달성된다. 일부 구현예에서, 상기 추출 인큐베이션은 약 45분, 예컨대, 45±5, 45±10, 45±15, 또는 45±20분 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 추출 인큐베이션은 약 25분 내지 약 65분, 약 30분 내지 약 60분, 약 35분 내지 약 55분, 약 45분 내지 약 65분, 약 45분 내지 약 55분, 또는 약 40분 내지 약 50분 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 추출 인큐베이션 시간은 약 25분, 약 30분, 약 35분, 약 40분, 약 45분, 약 50분, 약 55분, 약 60분 또는 약 65분이다.

[0120] 일부 구현예에서, 세포의 핵산의 추출 증가는 표준 관행과 비교하여 증가되거나 더 높은 온도에서 추출 인큐베이션을 수행함으로써 달성된다. 일부 구현예에서, 상기 추출 인큐베이션은 약 45℃, 예컨대, 45±2℃, 45±5℃, 또는 45±10℃에서 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 추출 인큐베이션 온도는 약 35℃ 내지 약 55℃, 약 40℃ 내지 약 50℃ 또는 약 43℃ 내지 약 47℃이다. 일부 구현예에서, 상기 추출 온도는 약 43℃, 약 44℃, 약 45℃, 약 46℃, 약 47℃, 약 48℃, 약 49℃, 약 50℃, 약 51℃, 약 52℃, 약 53℃, 약 54℃ 또는 약 55℃이다. 일부 구현예에서, 하나를 초과하는 추출 온도가 사용된다. 예를 들면 일부 구현예에서, 추출의 일부에 대해 표준 온도가 사용되고, 추출의 또 다른 부분에 대해 증가된 온도가 사용된다.

[0121] 일부 구현예에서, 본 시스템 및 방법에 따른 차후의 용해를 위해 실질적으로 적은 수의 세포가 기재로부터 방출된다. 일부 구현예에서, 적어도 1개의 세포, 적어도 2개의 세포, 적어도 5개의 세포, 적어도 10개의 세포, 적어도 15개의 세포, 적어도 20개의 세포, 적어도 50개의 세포, 적어도 75개의 세포, 적어도 100개의 세포, 적어도 125개의 세포, 적어도 150개의 세포, 적어도 175개의 세포, 적어도 200개의 세포, 적어도 250개의 세포, 적어도 300개의 세포, 적어도 350개의 세포, 적어도 400개의 세포, 적어도 450개의 세포, 적어도 500개의 세포 또는 그 이상이 교반 동안 기재로부터 방출된다.

- [0122] 일부 구현예에서, 약 0.55 내지 2.00, 약 0.6 내지 약 2.00, 약 0.7 내지 약 2.00 약 0.8 내지 약 2.00, 약 0.9 내지 약 2.00, 약 1.0 내지 약 2.00 약 1.1 내지 약 2.00, 약 1.2 내지 약 2.00, 약 1.3 내지 약 2.00, 약 1.4 내지 약 2.00, 약 1.5 내지 약 2.00, 약 1.6 내지 약 2.00, 약 1.7 내지 약 2.00, 약 1.8 내지 약 2.00, 또는 약 1.9 내지 약 2.00의 순도를 갖는 약 1 ng/μL 내지 약 50 ng/μL, 약 1 ng/μL 내지 약 40 ng/μL, 약 1 ng/μL 내지 약 30 ng/μL, 약 1 ng/μL 내지 약 20 ng/μL, 약 1 ng/μL 내지 약 10 ng/μL, 약 1 ng/μL 내지 약 5 ng/μL, 약 1 ng/μL 내지 약 4 ng/μL, 약 1 ng/μL 내지 약 3 ng/μL 또는 약 1 ng/μL 내지 약 2 ng/μL의 핵산이 상기 기재된 방법을 이용하여 단일 대상으로부터 이용된다(수득된다). 일부 구현예에서, 약 0.55 내지 2.00의 순도를 갖는 1 ng/μL 내지 50 ng/μL가 상기 기재된 방법을 이용하여 단일 대상으로부터 이용된다(수득된다).
- [0123] **IV. 용해액**
- [0124] 다양한 용해액이 기술되어 왔고 본 기술분야의 숙련가에게 알려져 있다. 이러한 잘 알려진 용해액 중 어느 것이 샘플로부터 핵산을 단리하기 위해 본 방법에 이용될 수 있다. 예시적인 용해액은 INVITROGEN®, QIAGEN®, LIFE TECHNOLOGIES® 및 다른 제조사에 의해 판매되는 것과 같은 상업적으로 이용가능한 것뿐만 아니라 실험실 환경에서 숙련가에 의해 생성될 수 있는 것을 포함한다. 용해 버퍼 역시 잘 기술되어 왔으며, 문헌[Molecular Cloning (three volume set, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012) 및 Current Protocols (Genetics and Genomics; Molecular Biology; 2003-2013)]에 기재된 것을 포함한 다양한 용해 버퍼가 상기 개시된 방법에 유용할 수 있고, 이들 모두는 모든 목적을 위해 참고로 본원에 통합되어 있다.
- [0125] 세포 용해는 세포 내로부터 핵산을 회수하기 위해 흔히 수행되는 방법이다. 많은 경우에, 세포는 용해액, 통상적으로 세제를 포함하는 알칼리 용액, 또는 용해 효소의 용액과 접촉된다. 그러한 용해액은 전형적으로 염, 세제 및 완충제뿐만 아니라 숙련가가 사용하는 것으로 이해할 다른 제제를 함유한다. 완전 및/또는 부분 용해 후, 핵산은 용해액으로부터 회수된다.
- [0126] 일부 구현예에서, 세포는 약 pH 4 내지 약 10, 약 5 내지 약 9, 약 6 내지 약 8 또는 약 7 내지 약 9 범위의 pH를 갖는, 수성 버퍼에 재현탁된다.
- [0127] 일부 구현예에서, 상기 버퍼 염 농도는 약 10 mM 내지 약 200 mM, 약 10 mM 내지 약 100 mM 또는 약 20 mM 내지 약 80 mM이다.
- [0128] 일부 구현예에서, 버퍼는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA) 또는 에틸렌 글리콜 테트라아세트산(EGTA)과 같은 킬레이트제를 추가로 포함한다.
- [0129] 일부 구현예에서, 용해액은 예를 들면 비제한적으로 수크로스를 포함하는 폴리올 뿐만 아니라 말티톨, 솔비톨, 자일리톨, 에리트리톨, 및/또는 이소말트와 같은 당알콜과 같은 세포로부터 핵산 방출을 돕는 다른 화합물을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리올은 약 2% 내지 약 15% w/w, 또는 약 5% 내지 약 15% w/w 또는 약 5% 내지 약 10% w/w의 범위이다.
- [0130] 일부 구현예에서, 용해액은 예를 들면 비제한적으로 트리톤 X-100, SDS, CTAB, X-114, CHAPS, DOC, 및/또는 NP-40과 같은, 계면활성제를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서 그러한 계면활성제는 약 1% 내지 약 5% w/w, 약 1% 내지 약 4% w/w, 또는 약 1% 내지 약 3% w/w의 범위이다.
- [0131] 구현예에서, 용해액은 예를 들면 비제한적으로 우레아, 소듐 도데실 설페이트 및/또는 티오우레아와 같은 카오트로프(chatrope)를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 카오트로프는 약 0.5 M 내지 8 M, 약 1 M 내지 약 6 M, 약 2 M 내지 약 6 M 또는 약 1 M 내지 3 M 범위의 농도로 사용된다.
- [0132] 일부 구현예에서, 용해액은 하나 이상의 부가적인 용해 시약을 추가로 포함하며, 그러한 용해 시약은 본 기술분야에서 잘 알려져 있다. 일부 구현예에서, 그러한 용해 시약은 예를 들면 비제한적으로 리소자임과 같은, 세포벽 용해 효소를 포함한다. 일부 구현예에서, 용해 시약은 0.5% 소듐 도데실 설페이트를 함유하는 0.1 수성 수산화나트륨과 같은 알칼리 세제 용액을 포함한다.
- [0133] 일부 구현예에서, 용해액은 수크로스 용액과 같은 당 수용액 및 EDTA와 같은 킬레이트제, 예를 들면 STET 버퍼를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 용해 시약은 세포 현탁액을 원하는 농도의 2배(예를 들면 0.2 소듐 하이드록사이드, 1.0% 소듐 도데실 설페이트)를 갖는 동일한 부피의 용해액과 혼합함으로써 제조된다.
- [0134] 일부 구현예에서, 원하는 정도의 용해가 달성된 후, 용해액 및 용해된 세포를 포함하는 혼합물은 상기 용해 시약이 원하는 산물에 부정적인 영향을 미치지 않도록 조건을 조절하는 중화 또는 켄칭 시약과 접촉된다. 일부 구

현예에서, pH는 예를 들면 비제한적으로 핵산을 포함하는 세포 내용물의 분해를 최소화하고/거나 방지하기 위해 약 5 내지 약 9, 약 6 내지 약 8, 약 5 내지 약 7, 약 6 내지 약 7 또는 약 6.5 내지 7.5의 pH로 조절된다. 일부 구현예에서, 용해 시약이 알칼리 용액을 포함하는 경우, 중화 시약은 산성 버퍼, 예를 들면 알칼리 금속 아세테이트/아세트산 버퍼를 포함한다. 일부 구현예에서, 예를 들면 비제한적으로 핵산을 포함하는 원하는 산물의 분해를 최소화하면서 용해가 실질적으로 완료되도록 용해 시약의 온도 및 조성과 같은 용해 조건이 선택된다.

[0135] 일부 구현예에서, 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9, 제10, 제11, 제12, 제13, 제14, 제15 또는 제20 용해액이 본 방법에 이용된다. 일부 구현예에서, 사용되는 용해 버퍼의 부피는 약 10 μ L, 약 20 μ L, 약 30 μ L, 약 40 μ L, 약 50 μ L, 약 60 μ L, 약 70 μ L, 약 80 μ L, 약 90 μ L, 약 100 μ L, 약 120 μ L, 약 130 μ L, 약 140 μ L, 약 150 μ L, 160 μ L, 약 170 μ L, 약 180 μ L, 약 190 μ L, 약 200 μ L, 약 220 μ L, 약 230 μ L, 약 240 μ L, 약 250 μ L, 약 260 μ L, 약 270 μ L, 약 280 μ L, 약 290 μ L, 약 300 μ L, 약 320 μ L, 약 330 μ L, 약 340 μ L, 약 350 μ L, 약 360 μ L, 약 370 μ L, 약 380 μ L, 약 390 μ L, 약 400 μ L, 약 450 μ L, 약 500 μ L, 약 550 μ L, 약 600 μ L, 약 650 μ L, 약 700 μ L, 약 750 μ L, 약 800 μ L, 약 850 μ L, 900 μ L, 950 μ L, 1000 μ L, 1500 μ L 또는 2000 μ L이다. 일부 구현예에서, 상기 용해 버퍼는 약 10 μ L 내지 약 1000 μ L, 약 10 μ L 내지 약 800 μ L, 약 10 μ L 내지 약 600 μ L, 약 10 μ L 내지 약 400 μ L, 약 20 μ L 내지 약 400 μ L, 약 50 μ L 내지 약 300 μ L, 약 50 μ L 내지 약 200 μ L, 약 50 μ L 내지 및 약 400 μ L, 약 100 μ L 내지 약 400 μ L, 약 10 μ L 내지 약 300 μ L 또는 약 100 μ L 내지 약 200 μ L이다.

[0136] 상기 중 어느 조합이 숙련가에 의해 이용될 수 있을 뿐만 아니라 다른 알려진 그리고 일상적인 방법과 조합될 수 있고, 그러한 조합은 본 발명에 의해 고려된다.

[0137] **V. 용해 버퍼로부터 핵산의 정제**

[0138] 일부 구현예에서, 예를 들면 비제한적으로 게놈 DNA를 포함하는 핵산은 차후 분석을 수행하기 전에 용해 버퍼로부터 단리된다. 일부 구현예에서, 핵산은 예를 들면 비제한적으로 실시간 PCR 분석과 같은 부가적인 분석을 수행하기 전에 용해 버퍼로부터 단리된다. 소량의 핵산의 단리에 유용한 임의의 다양한 방법이 상기 개시된 방법의 다양한 구현예에 의해 사용된다. 이들은 비제한적으로 침전, 겔 여과, 밀도 구배 및 고상 결합을 포함한다. 그러한 방법은 또한 예를 들면, 문헌[Molecular Cloning (three volume set, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012) 및 Current Protocols (Genetics and Genomics; Molecular Biology; 2003-2013)]에 기재되어 있으며, 이들은 모든 목적을 위해 본원에 참고로 통합되어 있다.

[0139] 핵산 침전은 본 기술분야의 숙련가에 의해 알려진 단리를 위한 잘 알려진 방법이다. 비제한적으로 비드(예컨대, 실리카, 자기), 컬럼, 막의 형태 또는 본 기술분야에 알려진 임의의 다양한 다른 물리적 형태로 고상(solid phase)을 이용하는 고상 결합 방법을 포함하는, 다양한 고상 결합 방법 역시 본 기술분야에 알려져 있다. 일부 구현예에서, 상기 개시된 방법에서 사용되는 고상은 핵산에 가역적으로 결합한다. 그러한 고상의 예는 적어도 2 개의 상이한 고상의 혼합물인 이른바 "혼합층(mixed-bed)" 고상을 포함하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 통합된 미국특허출원 제2002/0001812호에 기재된 바와 같이 상이한 용액 조건하에 핵산에 대한 수용력을 가지며, 상이한 조건하에 핵산을 방출하는 능력 및/또는 수용력을 갖는다. 상기 개시된 방법에 따른 핵산에 대한 고상 친화도는 기재에 용질을 결합시키기 위해 전형적으로 사용되는 많은 수단 중 어느 것을 통해서일 수 있다. 그러한 수단의 예는 비제한적으로, 이온성 상호작용(예컨대, 음이온-교환 크로마토그래피) 및 소수성 상호작용(예컨대, 역상 크로마토그래피), pH 차등 및 변화, 염 차등 및 변화(예컨대, 농도 변화, 카오트로픽 염/제제의 사용)를 포함한다. 예시적인 pH 기반 고상은 비제한적으로 낮은 pH(<6.5)에서 핵산에 결합하여 높은 pH(>8.5)에서 핵산을 방출하는 INVITROGEN ChargeSwitch 정규화된 구강 키트 자기 비드 및 7.5 미만의 pH에서 핵산에 결합하고 8보다 큰 pH에서 핵산을 방출하는 모노-아미노-N-아미노에틸(MANAE)에서 사용된 것을 포함한다. 예시적인 이온 교환 기반 기재는 비제한적으로 PHARMACIA (Piscataway, N.J.)사로부터의 DEAE-SEPHAROSE™, Q-SEPHAROSE™, 및 DEAE-SEPHADEX™, Dow Chemical Company (Midland, Mich.)사로부터의 DOWEX® I, Rohm & Haas (Philadelphia, Pa.)사로부터의 AMBERLITE®, Duolite International (Cleveland, Ohio)사로부터의 DUOLITE®, DIALON TI 및 DIALON TII를 포함한다.

[0140] 단독으로 또는 다른 방법과 조합하여 사용하기 위해 임의의 개별적인 방법이 고려되며, 그러한 유용한 조합은 본 기술분야의 숙련가에 의해 잘 이해되고 인식된다.

[0141] **VI. 핵산 분석**

[0142] 상기 개시된 방법은 게놈 분석을 포함하는 다양한 핵산 분석을 위해 게놈 DNA(gDNA)와 같은 핵산을 단리하는 데

사용된다. 일부 구현예에서, 상기 분석은 비제한적으로 하나 이상의 결실, 삽입, 전이 및 전환(transversion)을 포함하는 다양한 유전적 돌연변이의 검출을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 돌연변이는 단일-뉴클레오타이드 다형성(SNP)이다.

[0143] 상기 단리된 핵산, 예를 들면 비제한적으로 게놈 DNA(gDNA)를 분석하기 위한 다양한 방법이 본 기술분야에 알려져 있으며, 이는 실시간 PCR 분석과 같은 PCR 방법, 마이크로어레이 분석, 혼성화 분석 및 핵산 서열 분석뿐만 아니라 핵산 조성물을 분석하는 그리고 본 기술분야의 숙련자에게 알려진 다양한 다른 방법을 포함한다. 예를 들면, 문헌[Molecular Cloning (three volume set, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012) 및 Current Protocols (Genetics and Genomics; Molecular Biology; 2003-2013)]을 참고한다.

[0144] **a. 실시간 PCR**

[0145] 실시간 PCR 분석의 설계를 위해, 종종 앰플리콘으로도 불리는, 2개의 프라이머 옆에 배치된 후 증폭되는 DNA 단편, 사용되는 2개의 프라이머 및 검출 프로브 또는 프로브들을 포함하는 몇 가지 부분이 조정된다.

[0146] 실시간 PCR은 서열-특이적 방식으로 게놈 대립유전자와 결합하는 짧은 폴리뉴클레오타이드("검출 프로브"로 불림)에 접합된 형광성 염료의 시각적 방출에 의존한다. 단일 뉴클레오타이드가 상이한 실시간 PCR 프로브들은 상이한 파장에서 형광을 발하는 프로브의 접합 및 검출에 의해 실시간 PCR 분석에서 구분될 수 있다. 실시간 PCR은 검출 적용(진단 적용), 정량 적용 및 유전자형 분석 적용에서 유용하다.

[0147] 실시간 PCR을 수행하기 위한 몇 가지 관련된 방법이 본 기술분야에 개시되어 있으며, 이는 TAQMAN® 프로브(미국특허 제5,210,015호 및 제5,487,972호, 및 Lee et al., *Nucleic Acids Res.* 21:3761-6, 1993), 분자 비콘 프로브(미국특허 제5,925,517호 및 제6,103,476호, 및 Tyagi 및 Kramer, *Nat. Biotechnol.* 14:303-8, 1996), 셀프-프로빙 앰플리콘(스콜피온)(미국특허 제6,326,145호, 및 Whitcombe et al., *Nat. Biotechnol.* 17:804-7, 1999), 앰플리센서(Chen et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4210-6, 1998), 앰플리플루오르(미국특허 제6,117,635호, 및 Nazarenko et al., *Nucleic Acids Res.* 25:2516-21, 1997, 치환 혼성화 프로브(Li et al., *Nucleic Acids Res.* 30:E5, 2002), DzyNA-PCR(Todd et al., *Clin. Chem.* 46:625-30, 2000), 형광 제한효소 검출(Cairns et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318:684-90, 2004) 및 인접 혼성화 프로브(미국특허 제6,174,670 및 Wittwer et al., *Biotechniques* 22:130-1, 134-8, 1997)에 의존하는 분석을 포함한다.

[0148] 일부 경우에, 실시간 PCR은, 예를 들면 비제한적으로 SNP를 포함하는 다양한 유전자 돌연변이를 검출할 수 있다. 일부 구현예에서, 특정한 유전자 후보에서 SNP의 검출은 연결된 켄칭 모이어티의 사용에 의한 형광 분자의 분자내 켄칭의 사용에 기초하여, 실시간 PCR을 이용함으로써 수행된다. 따라서, 예시적인 구현예에 따르면, 실시간 PCR 방법은 또한 분자 비콘 기술의 사용을 포함한다. 상기 분자 비콘 기술은 내부적으로 켄칭된 형광단을 갖는 헤어핀-모양의 분자를 이용하며, 상기 내부적으로 켄칭된 형광단의 형광은 관심있는 DNA 표적에 결합함으로써 회복된다(예컨대, Kramer, R. et al. *Nat. Biotechnol.* 14:303-308, 1996 참고). 일부 구현예에서, 축적되는 PCR 산물에 대한 분자 비콘 프로브의 결합 증가가 게놈 DNA에 존재하는 SNP를 특이적으로 검출하는 데 사용된다.

[0149] 많은 적합한 유전자형 분석 과정 중 하나는 TAQMAN® 대립유전자 식별 분석이다. 이 분석의 일부 경우에, 프로브의 5' 말단에 형광성 리포터 염료 및 프로브 3' 말단에 켄처 염료로 표지된 올리고뉴클레오타이드 프로브가 이용된다. 온전한(intact) 프로브에 대한 켄처의 근접은 리포터에 대해 낮은 형광을 유지한다. PCR 반응 동안, DNA 폴리머라아제의 5' 뉴클레아제 활성이 프로브를 절단하여, 염료 및 켄처를 분리시킨다. 그 결과, 리포터의 형광이 증가한다. PCR 산물의 축적은 리포터 염료의 형광 증가를 모니터링함으로써 직접 검출된다. DNA 폴리머라아제의 5' 뉴클레아제 활성은, 상기 프로브가 표적에 혼성화되어 PCR 동안 증폭되는 경우에만 프로브를 리포터와 켄처 사이에서 절단한다. 상기 프로브는, 특정한 SNP 대립유전자가 존재하는 경우에만, 표적 SNP 위치의 양쪽에 걸쳐 핵산 분자에 혼성화되도록 설계된다.

[0150] 예로써, TGFβ I 유전자의 엑손 4에 위치한 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP를 증폭하기 위해, 미국 특허공개 제2012/0077200호에 기술된 바와 같이 정방향 및 역방향 PCR 프라이머쌍(도 2에서 서열번호: 1 내지 24)이 구축되었다. 일부 구현예에서, 상기 문헌에 개시된 정방향 및 역방향 프라이머쌍 중 어느 것이 본원에 개시된 개선된 방법에서 사용된다. 바람직한 구현예에서, 서열번호: 1(정방향) 및 서열번호: 2(역방향)의 정방향 및 역방향 프라이머쌍이 본원에 제공된 개선된 방법에서 사용된다.

[0151] TGFβ I 유전자의 엑손 4에서 구아닌에서 아데닌으로의 돌연변이를 검출하기 위해, 도 3에서 나타나 바와 같은 서열번호: 25 내지 42에 따른 뉴클레오타이드 서열을 갖는 야생형("G") 및 아벨리노 각막 이영양증 관련 돌연변

이("A") 대립유전자의 검출을 위한 형광 표지된 실시간 PCR 프로브쌍이 미국 특허공개 제2012/0077200호에 기술된 바와 같이 구축되었다. 일부 구현예에서, 상기 야생형 및 돌연변이 프로브 중 어느 것이 본원에 개시된 개선된 방법에서 사용된다. 바람직한 구현예에서, 서열번호: 25(야생형) 및 서열번호: 26(돌연변이)의 야생형 및 돌연변이 프로브쌍이 본원에 제공된 개선된 방법에서 사용된다. 질환 관련 대립유전자와 야생형 대립유전자를 구분하기 위해, 상기 야생형 프로브를 VIC로 표지하고, 상기 돌연변이 프로브를 FAM으로 표지하였다. 상보적인 유전자 단편에 대한 결합을 용이하게 하기 위하여 좁은 홈 결합물질(MGB)을 상기 프로브에 부착시켰다.

[0152] **b. 실시간 PCR 사이클**

[0153] 실시간 PCR 방법은 증폭을 위한 방법의 부분으로서 다양한 단계 또는 사이클을 포함한다. 이들 사이클은 이중 가닥 핵산을 변성시키는 것, 정방향 프라이머, 역방향 프라이머 및 검출 프로브를 표적 게놈 DNA 서열에 어닐링하는 것 및 상기 어닐링된 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머로부터 제2 가닥 DNA를 합성하는 것(즉, 복제하는 것)을 포함한다. 이러한 3단계 공정은 본원에서 하나의 사이클로서 불린다.

[0154] 일부 구현예에서, 약 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 또는 60 사이클이 이용된다. 일부 구현예에서, 약 10 내지 약 60 사이클, 약 20 내지 약 50 또는 약 30 내지 약 40 사이클이 이용된다. 일부 구현예에서, 40 사이클이 이용된다.

[0155] 일부 구현예에서, 이중 가닥 핵산을 변성시키는 단계는 약 80°C 내지 100°C, 약 85°C 내지 약 99°C, 약 90°C 내지 약 95°C의 온도에서 약 1초 내지 약 5초, 약 2초 내지 약 5초, 또는 약 3초 내지 약 4초 동안 일어난다. 일부 구현예에서, 이중 가닥 핵산을 변성시키는 단계는 95°C의 온도에서 약 3초 동안 일어난다.

[0156] 일부 구현예에서, 정방향 프라이머, 역방향 프라이머 및 검출 프로브를 표적 게놈 DNA 서열에 어닐링하는 단계는 약 40°C 내지 약 80°C, 약 50°C 내지 약 70°C, 약 55°C 내지 약 65°C에서 for 약 15초 내지 약 45초, 약 20초 내지 약 40초, 약 25초 내지 약 35초 동안 일어난다. 일부 구현예에서, 정방향 프라이머, 역방향 프라이머 및 검출 프로브를 표적 게놈 DNA 서열에 어닐링하는 단계는 약 60°C에서 약 30초 동안 일어난다.

[0157] 일부 구현예에서, 상기 어닐링된 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머로부터 제2-가닥 DNA를 합성하는 것(즉, 복제하는 것)은 약 40°C 내지 약 80°C, 약 50°C 내지 약 70°C, 약 55°C 내지 약 65°C에서 약 15초 내지 약 45초, 약 20초 내지 약 40초, 약 25초 내지 약 35초 동안 일어난다. 일부 구현예에서, 정방향 프라이머, 역방향 프라이머 및 검출 프로브를 표적 게놈 DNA 서열에 어닐링하는 단계는 약 60°C에서 약 30초 동안 일어난다.

[0158] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 본 방법에 따라 제조된 약 1 μL, 약 2 μL, 약 3 μL, 약 4 μL 또는 약 5 μL의 게놈 DNA 샘플이 단지 약 0.05 μL, 약 0.10 μL, 약 0.15 μL, 약 0.20 μL, 약 0.25 μL 또는 약 0.25 μL의 30X, 35X, 40X, 45X, 50X 또는 100X 실시간 PCR 분석 믹스 및 증류수와 조합되어 PCR 마스터 믹스를 형성하는 것으로 확인되었다. 일부 구현예에서, 상기 PCR 마스터 믹스는 약 5 μL, 약 6 μL, 약 7 μL, 약 8 μL, 약 9 μL, 약 10 μL, 약 11 μL, 약 12 μL, 약 13 μL, 약 14 μL, 약 15 μL, 약 16 μL, 약 17 μL, 약 18 μL, 약 19 μL 또는 약 20 μL 이상의 최종 부피를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 기재된 바와 같이 제조된 2 μL의 게놈 DNA 샘플이 PCR 마스터 믹스를 형성하기 위해 단지 약 0.15 μL의 40X 실시간 PCR 분석 믹스 및 2.85 μL의 증류수와 조합되는 것으로 확인되었다.

[0159] 예시적인 반응이 본원에 기재되어 있음에도 불구하고, 숙련가는 프로브 설계에 기초하여 온도 및 시간을 변형하는 방법을 이해할 것이다. 더욱이, 본 방법은 상기 시간 및 온도의 임의의 조합을 고려한다.

[0160] **c. PCR 프라이머 및 프라이머 설계**

[0161] 일부 구현예에서, 프라이머는 실험실 환경에서 시험되고 설계된다. 일부 구현예에서, 프라이머는 인 실리코 방법에 기초하여 컴퓨터에 의해 설계된다. 프라이머 서열은 증폭될 앰플리콘 또는 표적 핵산 서열에 기초한다. 더 짧은 앰플리콘은 더 긴 앰플리콘과 비교하여 전형적으로 더 효율적으로 복제되며 더 효율적인 증폭을 야기한다.

[0162] 프라이머 설계시, 숙련가는 설계되는 프라이머의 GC 및 AT 함량뿐만 아니라 2차 구조 고려사항(GC 함량 증가는 2차 구조 증가를 야기할 수 있음)에 기초하여 용융 온도(T_m ; 프라이머-표적 이합체의 절반이 해리되어 단일 가닥이 될 때의 온도로서 이합체 안정성을 나타냄; T_m 증가는 안정성 증가를 나타냄)를 고려할 필요를 이해할 것이다. T_m 은 본 기술분야에 알려진 다양한 방법을 이용하여 계산될 수 있고, 숙련가는 T_m 을 계산하기 위한 그러한 다양한 방법을 쉽게 이해할 것이며, 그러한 방법은 예를 들면 웹(world wide web) 상의 promega.com/techserv/tools/biomath/calcl1.htm에서 이용가능한 T_m 계산기와 같은 온라인 도구에서 이용가능한

것을 포함한다. 프라이머 특이성은 Taq 폴리머라아제에 의해 연장되는 부위인 3' 말단 서열과 조합하여 그의 완전한 서열에 의해 정의된다. 일부 구현예에서, 잘못된 프라이밍(false-priming) 및 부정확한 증폭 산물의 생성을 감소시키는 것을 돕기 위해, 3' 말단은 표적 서열 내의 다른 어느 곳에서도 발견되지 않는 적어도 5개 내지 7개의 독특한 뉴클레오타이드를 가져야 한다. 정방향 및 역방향 프라이머는 전형적으로 표적에 유사한 효율로 결합한다. 일부 경우에, NCBI BLAST(웹상의 ncbi.nlm.nih.gov에 위치함)와 같은 도구가 정렬을 수행하고 프라이머 설계를 돕기 위해 사용된다.

[0163] 본 기술분야의 숙련가는 표적 핵산 서열을 위한 프라이머 설계에 관한 기본을 잘 알 것이고, 다양한 참고 매뉴얼 및 교과서가 그러한 방법을 광범위하게 교시하고 있으며, 이는 예를 들면, 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 통합된 문헌[Molecular Cloning (three volume set, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012) and Current Protocols (Genetics and Genomics; Molecular Biology; 2003-2013) and Real-Time PCR in Microbiology: From Diagnostics to Characterization (Ian M. MacKay, Calster Academic Press; 2007); PrimerAnalyser Java tool available on the World Wide Web at primerdigital.com/tools/PrimerAnalyser.html and Kalendar R, et al. (*Genomics*, 98(2): 137-144 (2011))]을 포함한다.

[0164] 프라이머 설계의 부가적인 측면은 프라이머 복잡성 또는 언어학적 서열 복잡성이다(Kalendar R, et al. (*Genomics*, 98(2): 137-144 (2011) 참고). 더 큰 언어학적 서열 복잡성(예컨대, 뉴클레오타이드 배열 및 조성)을 갖는 프라이머가 전형적으로 더 효율적이다. 일부 구현예에서, 상기 언어학적 서열 복잡성 계산 방법은 단순한 서열 반복, 불완전한 직접적인 또는 역전된 반복, 폴리퓨린 및 폴리피리미딘 3가닥의 cDNA 구조, 및 4가닥의 구조(예컨대, G-4중체)를 포함하는 낮은-복잡성 영역의 검출을 위해 비교된 서열 간의 보존 영역을 서치하기 위해 사용된다. 일부 구현예에서, 언어학적 복잡성(LC) 측정은 전체 서열 길이를 따라 알파벳-수용력 L-그램(alphabet-capacity L-gram) 방법(A. Gabrielian, A. Bolshoy, *Computer & Chemistry* 23:263-274 (1999) 및 Y.L. Orlov, V.N. Potapov, Complexity: an internet resource for analysis of DNA sequence complexity, *Nucleic Acids Res.* 32: W628-W633(2004) 참조)을 이용하여 수행되며 서열 내의 1부터 L 크기 위드의 관찰된 범위 (ξ)의 합을 이 서열 길이에 대한 예측된(E) 값의 합으로 나눔으로써 계산된다. 일부 G-풍부(및 C-풍부) 핵산 서열은 G-4중체의 스택(stack)을 함유하는 4가닥의 DNA 구조로 접힌다(웹의 quadruplex.org 참고). 일부 경우에, 이들 4중체는 2 또는 4개의 DNA 분자의 분자내 결합, 2개의 G-염기를 함유하는 서열들의 이합체화, 또는 구아닌의 4개의 블록을 함유하는 단일 가닥의 분자내 폴딩에 의해 형성되며(P.S. Ho, *PNAS*, 91:9549-9553 (1994); I.A. Il'icheva, V.L. Florent'ev, *Russian Journal of Molecular Biology* 26:512-531(1992); D. Sen, W. Gilbert, *Methods Enzymol.* 211:191-199 (1992); P.A. Rachwal, K.R. Fox, *Methods* 43:291-301 (2007); S. Burge, G.N. Parkinson, P. Hazel, A.K. Todd, K. Neidle, *Nucleic Acids Res.* 34:5402-5415 (2006); A. Guedin, J. Gros, P. Alberti, J. Mergny, *Nucleic Acids Res.* 38:7858-7868 (2010); O. Stegle, L. Payet, J.L. Mergny, D.J. MacKay, J.H. Leon, *Bioinformatics* 25:i374-i382 (2009); 일부 경우에, 이들은 이들의 낮은 언어학적 복잡성 ((TTAGGG)₄에 대해 LC=32%임) 때문에, 프라이머 설계로부터 제거된다.

[0165] 이들 방법은 CG 함량 및 용융 온도에 관한 GC 왜곡(skew), (G-C)/(G+C), AT 왜곡, (A-T)/(A+T), CG-AT 왜곡, (S-W)/(S+W), 또는 퓨린-피리미딘 (R-Y)/(R+Y) 왜곡을 갖는 서열에서의 패턴 분석을 위한 다양한 생물정보를 포함하고, 언어학적 서열 복잡성 프로파일을 결정하기 위한 도구를 제공한다. 예를 들면 n (n은 양의 정수임) 염기의 슬라이딩 윈도우에서의 GC 왜곡은 식 (G-C)/(G+C)에 따라 하나의 염기의 단계를 이용하여 계산되며, 여기서 상기 윈도우 내의 모든 서열에 대하여 G는 구아닌의 총수이고, C는 시토신의 총수이다(Y. Benita, et al., *Nucleic Acids Res.* 31:e99 (2003)). 양성 GC-왜곡 값은 G 염기의 과잉을 가리킨 반면, 음성 GC-왜곡 값은 C 염기의 과잉을 나타내었다. 유사하게, 다른 왜곡이 상기 서열에서 계산된다. 상기 방법뿐만 아니라 다른 방법이 일부 구현예에서 프라이머 복잡성을 결정하는 데 이용된다.

[0166] 비제한적인 예 구현예에 따르면, 실시간 PCR은 엑소뉴클레아제 프라이머(TAQMAN® 프로브)를 이용하여 수행된다. 그러한 구현예에서, 상기 프라이머는 증폭 반응 내에 존재하는 이중-표지된 프로브를 절단하기 위해 Taq와 같은 내열성 폴리머라아제의 5' 엑소뉴클레아제 활성을 이용한다(예컨대, Wittwer, C. et al. *Biotechniques* 22:130-138, 1997 참고). PCR 산물에 상보적임에도 불구하고, 이 분석에서 사용되는 프라이머 프로브는 PCR 프라이머와 다르며, 형광을 낼 수 있는 분자 및 형광을 퀀칭할 수 있는 분자 모두로 이중 표지되어 있다. 상기 프로브가 온전한 경우, DNA 프로브 내의 형광 신호의 분자내 퀀칭이 신호를 거의 야기하지 않는다. 상기 형광 분자가 증폭 동안 Taq의 엑소뉴클레아제 활성에 의해 방출되는 경우, 퀀칭이 크게 감소되어 형광성 신호를 증가시킨다. 형광성 프로브의 비제한적인 예는 6-카복시-플루오레세인 모이어티 등을 포함한다. 예시

적인 켄처는 블랙 홀 켄처 1 모이어티 등을 포함한다.

[0167] 다양한 PCR 프라이머가 상기 개시된 방법에서 유용할 수 있다. 예시적인 프라이머는 비제한적으로 본원에 기재된 것을 포함한다. 상기 개시된 방법에서 사용하기 위한 프라이머는 또한 모든 목적을 위해 참고로 본원에 통합된 미국 특허공개 제20120077200호에서 확인된다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 방법에서 사용하기 위한 PCR 프라이머는 비제한적으로 표 1에 열거된 하기의 것을 포함하며, 이는 TGFβ I 유전자의 검출에 유용하다. 표 2 및 3은 웹의 primerdigital.com/tools/PrimerAnalyser.html을 이용하여 계산된 바와 같이, 각각의 프라이머에 대한 생물물리학적 파라미터를 제공한다.

표 1

[0168]

TGFβ I 유전자를 위한 예시적인 프라이머		
프라이머명	서열번호:	프라이머 서열
ACD Fw 프라이머	서열번호: 1	5'-TCC ACC ACC ACT CAG CTG TA
ACD Re 프라이머	서열번호: 2	5'-CCA TCT CAG GCC TCA GCT T (60 bp)
AV Fw 프라이머	서열번호: 3	5'-TGC AGC CCT ACC ACT CTC AA
AV Re 프라이머	서열번호: 4	5'-AGG CCT CGT TGC TAG G (150 bp)
Real Fw 프라이머	서열번호: 5	5'-TAG TCT CTT ATT CTA ATA GA
Real Re 프라이머	서열번호: 6	5'-GCT GCA GAC TCT GTG TTT AA (860 bp)
ACD Fw2 프라이머	서열번호: 7	5'-CCA TCC CTC CTT CTG TCT TCT G
ACD Re2 프라이머	서열번호: 8	5'-CGG GCC CCT CCA TCT C (140 bp)
ACD Fw3 프라이머	서열번호: 9	5'-CAG AGA AGG GAG GGT GTG GTT
ACD Re3 프라이머	서열번호: 10	5'-GGG CGA AGA TGG TGA AGC T (190 bp)
ACD Fw4 프라이머	서열번호: 11	5'-TCC TCG TCC TCT CCA CCT GTA
ACD Re4 프라이머	서열번호: 12	5'-AGC TGG CAA GGA GGC CC
ACD Fw5 프라이머	서열번호: 13	5'-TTT GGG CTT TCC CAC ATG C
ACD Re5 프라이머	서열번호: 14	5'-GGC AGA CGG AGG TCA TCT CA
ACD Fw6 프라이머	서열번호: 15	5'-GTA GTA CCG TGC TCT CTG
ACD Re6 프라이머	서열번호: 16	5'-AGT TCC CCA TAA GAA TCC CCC
ACD Fw7 프라이머	서열번호: 17	5'-GGC TGG ACC CCC AGA GG
ACD Re7 프라이머	서열번호: 18	5'-ACC CCT CGG GGA AGT AAG G
ACD Fw8 프라이머	서열번호: 19	5'-AAC CTT TAC GAG ACC CTG GGA
ACD Re8 프라이머	서열번호: 20	5'-GAC TCC CAT CCA TCA TGC CC
ACD Fw9 프라이머	서열번호: 21	5'-AGT CGT TGG ATC CAC CAC CA
ACD Re9 프라이머	서열번호: 22	5'-GAC GTC ATT TCC TAC TGT TTC AGG
ACD Fw10 프라이머	서열번호: 23	5'-CCC CCC AGA AAC AGC CTG
ACD Re10 프라이머	서열번호: 24	5'-TTC TAA GGG GTT AAG GAG AAA GCT T
GCD1 Fw 프라이머	서열번호: 43	5'-ACA CAG TCT TTG CTC CCA CAA A
GCD1 Re 프라이머	서열번호: 44	5'-ACT TAA GTT GGT CTT TAC CCA AGA GTC T

표 2

[0169]

정방향 프라이머에 대한 생물물리학적 파라미터						
정방향 프라이머	길이	Tm1	Tm2	GC 함량	% 복잡성	PCR 효율
서열번호: 1	19	55.4	57.8	57.9	70	70
서열번호: 3	20	57.1	58	55	81	66
서열번호: 5	20	40.2	45.7	25	73	38
서열번호: 7	22	55.9	60.2	54.5	62	43
서열번호: 9	21	57.5	60.2	57.1	64	40
서열번호: 11	21	57.6	60.2	57.1	66	57
서열번호: 13	19	55.4	55.7	52.6	81	80
서열번호: 15	18	50.6	55.3	55.6	75	66

서열번호: 17	17	57.8	62.2	76.5	74	60
서열번호: 19	21	56.6	58.2	52.4	82	73
서열번호: 21	20	57.4	58	55	78	46
서열번호: 23	18	56.5	59.9	66.7	69	69
평균	19.67	54.96	57.80	56.05	72.69	59.85
중간	20	56.55	58.1	55.3	73.5	63
표준 편차	1.50	5.00	4.24	11.78	6.84	14.10

표 3

[0170]

역방향 프라이머	길이	Tm1	Tm2	GC 함량	% 복잡성	PCR 효율
서열번호: 2	19	55.5	57.8	57.9	72	52
서열번호: 4	16	52.1	54.5	62.5	78	78
서열번호: 6	20	52.4	53.9	45	84	41
서열번호: 8	16	55.2	59.6	75	63	53
서열번호: 10	19	56.5	57.8	57.9	78	69
서열번호: 12	17	58.5	59.8	70.6	74	66
서열번호: 14	20	57.6	60.1	60	84	74
서열번호: 16	21	54.9	58.2	52.4	71	51
서열번호: 18	19	56.6	60	63.2	78	60
서열번호: 20	20	56.5	60.1	60	65	65
서열번호: 22	24	55.5	58.7	45.8	88	67
서열번호: 24	25	55.3	57.2	40	74	40
평균	19.69	55.61	58.13	57.33	76.54	60.69
중간	19.5	55.5	58.45	58.95	76	62.5
표준 편차	2.77	1.86	2.10	10.33	7.52	12.30

[0171]

일부 구현예에서, 상기 개시된 방법에 사용하기 위한 실시간 PCR 프라이머는 적어도 70%, 적어도 72%, 적어도 75%, 적어도 77%, 적어도 80%, 적어도 82%, 적어도 85%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97% 또는 적어도 99%의 언어학적 서열 복잡성을 갖는다.

[0172]

d. 검출 프로브 설계 및 검출 프로브

[0173]

다양한 검출 프로브가 상기 개시된 방법에 유용할 수 있고 유전자형 분석 및 또는 정량을 위해 이용된다. 본 기술분야의 숙련가에 의해 통상적으로 이용되는 검출 프로브는 비제한적으로 가수분해 프로브(TAQMAN® 프로브, 5' 뉴클레아제 프로브 또는 이중-표지된 프로브로도 알려짐), 혼성화 프로브, 및 스크립온 프라이머(프라이머 및 검출 프로브를 하나의 분자로 조합함)를 포함한다. 일부 구현예에서, 검출 프로브 설계는 프로브가 사용된 PCR 프라이머와 양립가능하도록(예컨대, 프라이머 및 프로브가 실시간 PCR 분석에서 서로의 기능을 방해하지 않아 함), 원하는 프로브 표적에 기초하여 본 기술분야의 숙련가에 의해 결정된다. 일부 구현예에서, 프로브는 효율적인 신호 생성을 촉진하기 위해 프라이머보다 더 높은 Tm을 갖도록 설계된다. Tm은 본 기술분야에 알려진 임의의 다양한 방법을 이용하여 계산되며, 숙련가는 Tm을 계산하기 위한 그러한 다양한 방법을 쉽게 이해할 것이며, 그러한 방법은 예를 들면 웹상의 promega.com/techserv/tools/biomath/calc11.htm에서 이용가능한 계산기와 같은 온라인 도구에서 이용가능한 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 검출 프로브의 Tm 증가는 프라이머가 폴리머라아제에 의해 연장되기 전에 검출 프로브가 결합되는 것을 제공한다.

[0174]

일부 구현예에서, 검출 프로브는 다양한 변형을 함유한다. 일부 구현예에서, 검출 프로브는 비제한적으로 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드 변형, 포스포로티오에이트 백본 변형, 포스포디티오에이트 백본 변형, 포스포르아미데이트 백본 변형, 메틸포스포네이트 백본 변형, 3' 말단 포스페이트 변형 및/또는 3' 알킬 치환과 같은, 변형된 핵산 잔기를 포함한다.

[0175]

일부 구현예에서, 검출 프로브는 변형으로 인해 표적 서열에 대해 증가된 친화성을 갖는다. 그러한 검출 프로브는 길이가 증가된 검출 프로브 뿐만 아니라 화학적 변형을 함유하는 검출 프로브를 포함한다. 그러한 변형은 비제한적으로 2'-플루오로(2'-테옥시-2'-플루오로-뉴클레오사이드) 변형, LNA(잠금 핵산), PNA(펩타이드 핵산), ZNA(집 핵산), 모폴리노, 메틸포스포네이트, 포스포르아미데이트, 폴리양이온성 접합체 및 2'-피렌 변형을 포함

한다. 일부 구현예에서, 검출 프로브는 2' 플루오로 변형(aka, 2'-데옥시-2'-플루오로-뉴클레오사이드), LNA(잠금 핵산), PNA(펩타이드 핵산), ZNA(Zip 핵산), 모폴리노, 메틸포스포네이트, 포스포르아미데이트, 및/또는 폴리양이온성 접합체를 포함하는 하나 이상의 변형을 함유한다.

[0176] 일부 구현예에서, 검출 프로브는 본원에 기재된 것과 같은 검출가능한 모이어티뿐만 아니라 본 기술분야의 숙련가에게 알려진 임의의 검출가능한 모이어티를 함유한다. 그러한 검출가능한 모이어티는 예를 들면 비제한적으로 형광성 표지 및 화학발광성 표지를 포함한다. 그러한 검출가능한 모이어티의 예는 또한 FRET 쌍의 멤버를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 검출 프로브는 검출가능한 독립체(entity)를 함유한다.

[0177] 형광성 표지의 예는 비제한적으로 AMCA, DEAC(7-디에틸아미노쿠마린-3-카복실산); 7-하이드록시-4-메틸쿠마린-3; 7-하이드록시쿠마린-3; MCA(7-메톡시쿠마린-4-아세트산); 7-메톡시쿠마린-3; AMF(4'-(아미노메틸)플루오레세인); 5-DTAF(5-(4,6-디클로로트리아지닐)아미노플루오레세인); 6-DTAF(6-(4,6-디클로로트리아지닐)아미노플루오레세인); 6-FAM(6-카복시플루오레세인; aka FAM; TAQMAN® FAM™ 포함); TAQMAN VIC®; 5(6)-FAM 카다베린; 5-FAM 카다베린; 5(6)-FAM 에틸렌디아민; 5-FAM 에틸렌디아민; 5-FITC(FITC 이성질체 I; 플루오레세인-5-이소티오시아네이트); 5-FITC 카다베린; 플루오레세인-5-말레이미드; 5-IAF(5-아이오도아세타미도플루오레세인); 6-JOE(6-카복시-4',5'-디클로로-2',7'-디메톡시플루오레세인); 5-CR1 10(5-카복시로다민 110); 6-CR1 10(6-카복시로다민 110); 5-CR6G(5-카복시로다민 6G); 6-CR6G(6-카복시로다민 6G); 5(6)-카복시로다민 6G 카다베린; 5(6)-카복시로다민 6G 에틸렌디아민; 5-ROX(5-카복시-X-로다민); 6-ROX(6-카복시-X-로다민); 5-TAMRA(5-카복시 테트라메틸로다민); 6-TAMRA(6-카복시 테트라메틸로다민); 5-TAMRA 카다베린; 6-TAMRA 카다베린; 5-TAMRA 에틸렌디아민; 6-TAMRA 에틸렌디아민; 5-TMR C6 말레이미드; 6-TMR C6 말레이미드; TR C2 말레이미드; TR 카다베린; 5-TRITC; G 이성질체(테트라메틸로다민-5-이소티오시아네이트); 6-TRITC; R 이성질체(테트라메틸로다민-6-이소티오시아네이트); 단실 카다베린(5-디메틸아미노나프탈렌-1-(N-(5-아미노펜틸))설폰아미드); EDANS C2 말레이미드; 플루오레스카민; NBD; 및 피로메텐 및 이의 유도체를 포함한다.

[0178] 화학발광성 표지의 예는 비제한적으로 서던 블롯 및 웨스턴 블롯과 함께 사용되는 표지(예를 들어, Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (3rd ed.) (2001) 참고; 그 전체가 참고로 본원에 통합됨)를 포함한다. 예는 비제한적으로 -(2'-스피로아다만탄)-4-메톡시-4-(3"-포스포릴옥시)페닐-1,2-디옥세탄(AMPPD); 아크리디늄 에스테르 및 아다만틸-안정화된 1,2-디옥세탄, 및 이의 유도체를 포함한다.

[0179] 프로브의 표지화는 본 기술분야에 알려져 있다. 표지된 프로브는 증폭 동안 증폭된 영역 내에서 혼성화하는 데 사용된다. 프로브는 이들이 증폭을 위한 프라이머로서 작용하는 것을 피하기 위해 변형된다. 검출 프로브는 2개의 형광성 염료인 다른 염료의 형광을 퀀칭할 수 있는 하나의 염료로 표지된다. 하나의 염료는 프로브의 5' 말단에 부착되며 다른 염료는 내부 부위에 부착되어, 프로브가 비-혼성화된 상태일 때 퀀칭이 일어난다.

[0180] 전형적으로, 실시간 PCR 프로브는 형광 공명 에너지 전달(FRET)에 관여하는 염료의 쌍(리포터 염료 및 수용체 염료)로 이루어지며, 이에 의해 수용체 염료가 리포터 염료의 방출을 퀀칭한다. 일반적으로, 형광-표지된 프로브는 앰플리콘 정량의 특이성을 증가시킨다.

[0181] 상기 개시된 방법의 일부 구현예에 사용되는 실시간 PCR은 또한 이러한 개시내용에 비추어, 본 기술분야의 숙련가에게 의해 결정된 바와 같이, 하나 이상의 혼성화 프로브(즉, 검출 프로브)의 사용을 포함한다. 비제한적인 예로써, 그러한 혼성화 프로브는 비제한적으로 상기 기재된 방법에서 제공된 것 중 하나 이상을 포함한다. HEX 채널 및/또는 FAM 채널 프로브와 같은 예시적인 프로브가 본 기술분야의 숙련가에게 의해 이해된다.

[0182] 예시적인 구현예에 따르면, 검출 프로브 및 프라이머는 예컨대, 프라이머 설계 소프트웨어를 이용한 인 실리코 분석 및 미국 국립 생물공학정보 센터(NCBI)에 보관된 유전자 및 게놈의 이용가능한 뉴클레오타이드 데이터베이스에 대해 교차-참조를 이용하여 간편하게 선택된다. 일부 구현예에서 프라이머 및/또는 프로브의 선택을 위해 일부 추가 지침이 사용될 수 있다. 예를 들면, 일부 구현예에서, 프라이머 및 프로브는 서로 근접하지만 겹치지 않도록 선택된다. 일부 구현예에서, 프라이머들은 동일한(또는 근접한) T_m(예컨대, 약 58°C 내지 약 60°C)을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 프로브의 T_m은 프라이머의 T_m을 위해 선택된 것보다 약 10°C 더 높다. 일부 구현예에서, 프로브 및 프라이머의 길이는 약 17 내지 39 염기 쌍 등이 되도록 선택된다. 적절한 프라이머 및/또는 프로브를 선택하는 데 있어 이러한 지침 및 다른 지침이 본 기술분야의 숙련가에게 의해 일부 경우에 사용된다.

[0183] 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 프로브는 비제한적으로 표 4에 열거된 하기 예시적인 프로브를 포함한다.

표 4

[0184]

TGFβ I 유전자를 위한 예시적인 프로브		
프로브명	서열번호:	프로브 서열
정상 프로브 1	서열번호: 25	VIC-CAC GGA CCG CAC GGA-NFQ (15 bp)
돌연변이 프로브 1	서열번호: 26	FAM-CAC GGA CCA CAC GGA-NFQ
정상 프로브 2	서열번호: 27	VIC-ACA CGG ACC GCA CG-NFQ
돌연변이 프로브 2	서열번호: 28	FAM-ACA CGG ACC ACA CG-NFQ (14 bp)
정상 프로브 3	서열번호: 29	VIC-TAC ACG GAC CGC A-NFQ
돌연변이 프로브 3	서열번호: 30	FAM-TAC ACG GAC CAC A-NFQ (13 bp)
정상 프로브 4	서열번호: 31	VIC-CTG TAC ACG GAC CGC ACG-NFQ
돌연변이 프로브 4	서열번호: 32	FAM-CTG TAC ACG GAC CAC ACG-NFQ (18 bp)
정상 프로브 5	서열번호: 33	VIC-CTG TAC ACG GAC CGC ACG GAG-NFQ
돌연변이 프로브 5	서열번호: 34	FAM-CTG TAC ACG GAC CAC ACG GAG-NFQ (21 bp)
정상 프로브 6	서열번호: 35	VIC-GCT GTA CAC GGA CCG CAC GGA GAA-NFQ
돌연변이 프로브 6	서열번호: 36	FAM-GCT GTA CAC GGA CCA CAC GGA GM-NFQ
정상 프로브 7	서열번호: 37	VIC-ACC GCA CGG AGA AGC-NFQ
돌연변이 프로브 7	서열번호: 38	FAM-ACC ACA CGG AGA AGC-NFQ
정상 프로브 8	서열번호: 39	VIC-ACC GCA CGG AGA AGC TGA GGC-NFQ
돌연변이 프로브 8	서열번호: 40	FAM-ACC ACA CGG AGA AGC TGA GGC-NFQ
정상 프로브 9	서열번호: 41	VIC-ACC GCA CGG AGA AGC TGA GGC CTG-NFQ
돌연변이 프로브 9	서열번호: 42	FAM-ACC ACA CGG AGA AGC TGA GGC CTG-NFQ
정상 프로브 10	서열번호: 45	VIC-CAC CAA GAG AAC GGA-NFQ
돌연변이 프로브 10	서열번호: 46	FAM-CAC CAA GAG AAT GG-NFQ
정상 프로브 10a	서열번호: 47	VIC-CAC CAA GAG AAC GGA G-MGB NFQ
#TGFβ I R124C	서열번호: 48	FAM-CAC GGA CTG CAC GGA-MGB NFQ
#TGFβ I R124L	서열번호: 49	FAM-CAC GGA CCT CAC GGA-MGB NFQ
#TGFβ I R555Q-1	서열번호: 50	FAM-AC CAA GAG AACA GA G-MGB NFQ

[0185]

VII. 진단 시험

[0186]

일부 구현예에서, 다양한 돌연변이 중 어느 것을 검출함으로써 하나 이상의 유전적 상태를 확인하기 위해 진단 시험이 이용된다. 일부 구현예에서, 진단 시험은 예를 들면 신체적 표시, 징후 및/또는 증상뿐만 아니라 가족력 정보에 기초하여 특정한 질환이 의심될 때 진단을 확인하기 위해 사용된다. 일부 구현예에서, 진단 시험의 결과는 의료 분야의 숙련가가 주어진 환자에 대한 적절한 치료 요법을 결정하는 것을 돕고 보다 개인맞춤형이고 보다 효과적인 치료 요법을 가능하게 한다. 일부 구현예에서, 치료 요법은 본 기술분야의 숙련가에 의해 결정된 바와 같이 다양한 약제학적 치료, 수술 치료, 생활방식 변화 또는 이의 조합 중 어느 것을 포함한다.

[0187]

상기 개시된 방법에 의해 수득된 핵산은 결실, 삽입, 전환(transversion) 및 전이와 같은 돌연변이를 검출하기 위한 시험을 포함하는, 다양한 진단 시험에서 유용하다. 일부 구현예에서, 그러한 진단은 질환이 발현되기 위해 2 카피를 요구하는 질환에 대한 유전자 중 1 카피를 갖는 병에 걸리지 않은 개인을 확인하는 것, 치료 요법을 개발하는데 상기 정보가 유용할 수 있는 질환에 대한 유전자 중 1 카피를 갖는 병에 걸리지 않은 개인을 확인하는 것, 착상전 유전적 진단, 산전 진단 시험, 신생아 선별, 계통 DNA 시험(유전적 계통 목적을 위해), 헌팅턴병과 같은 성인형(adult-onset) 장애를 예측하기 위한 전증상 시험, 성인형 암 및 알츠하이머병이 생길 위험성을 추정하기 위한 전증상 시험, 증상을 보이는 개인의 확정 진단, 및/또는 법의학/신원확인 테스트에 유용하다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 각막 이영양증의 검출에서 유용하다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 TGFβ I 유전자에서 R124 돌연변이(예를 들면 비제한적으로 C(G/A)C SNP로도 불리는 TGFβ I 유전자의 뉴클레오타이드 418에서의 C의 A로의 전이에 의해 유발되는 R124H 돌연변이를 포함)를 야기하는 것과 같은, 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 TGFβ I 유전자에서 R555 돌연변이(예를 들면 비제한적으로 (C/T)GG SNP로도 불리는 TGFβ I 유전자의 뉴클레오타이드

1663에서의 C의 T로의 전이에 의해 유발되는 R555W 돌연변이를 포함)를 야기하는 것과 같은, 과립형 각막 이영양증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 TGFβI 유전자에서 R124 및/또는 626 돌연변이(예를 들면 비제한적으로 (C/T)GC SNP로도 불리는 TGFβI 유전자의 뉴클레오타이드 417에서의 C의 T로의 전이에 의해 유발되는 R124C 돌연변이 또는 TGFβI 유전자의 뉴클레오타이드 1924에서의 A의 C로의 전이에 의해 유발되는 H626P 돌연변이를 포함)를 야기하는 것과 같은, 래티스 이상증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 TGFβI 유전자에서 R124 돌연변이(예를 들면 비제한적으로 (C/G/T)C SNP로도 불리는 TGFβI 유전자의 뉴클레오타이드 418에서의 G의 T로의 전이에 의해 유발되는 R124L 돌연변이를 포함)를 야기하는 것과 같은, 레이스버클러 각막 이영양증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 TGFβI 유전자에서 R555 돌연변이(예를 들면 비제한적으로 (C/G/A)G SNP로도 불리는 TGFβI 유전자의 뉴클레오타이드 1664에서의 G의 A로의 전이에 의해 유발되는 R555Q 돌연변이를 포함)를 야기하는 것과 같은, 티엘벵케 각막 이영양증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다.

[0188] 일부 구현예에서, 신생아 선별은 유전적 장애를 확인하기 위해 출생 후 곧바로 이용되는 어떤 유전적 스크리닝을 포함한다. 일부 구현예에서, 치료 요법이 생애 초기에 결정되므로, 신생아 선별은 유전적 장애의 확인에 유용하다. 그러한 시험은 비제한적으로 페닐케톤뇨증 및 선천성 갑상선 기능 저하증에 대해 유아를 시험하는 것을 포함한다.

[0189] 일부 구현예에서, 단일 카피의 유전자 돌연변이를 갖는 사람을 확인하기 위해 보인자 시험(carrier testing)이 이용된다. 일부 경우에, 2 카피로 존재할 때, 돌연변이는 유전적 장애를 일으킬 수 있다. 일부 경우에, 1 카피는 유전적 장애를 일으키는데 불충분하다. 일부 경우에, 주어진 환자를 위해 적절한 치료 요법을 수행하는 것을 보장하기 위해 아벨리노 돌연변이의 존재 및 수술 절차를 수행하기 전 사전-스크리닝과 같이, 2 카피의 존재는 특정한 치료 요법에 대해 금지된다. 일부 구현예에서, 그러한 정보는 또한 출산을 고려하고 있는 개인에게 유용하며, 개인이 현명한 결정을 하는 것을 도울 뿐만 아니라, 개별 환자 뿐만 아니라 환자의 친척들에게 중요한 조언을 제공하는데 있어 의료 분야의 숙련가에게 도움을 준다.

[0190] 일부 구현예에서, 예측하는 유형 및/또는 전증상 유형의 시험이 다양한 장애와 관련된 유전자 돌연변이를 검출하는 데 사용된다. 일부 경우에, 이들 시험은 유전적 장애가 있는 가족 구성원이 있지만 시험 시점에는 상기 장애의 어떠한 특징도 나타내지 않을 수 있는 사람에게 도움이 된다. 일부 구현예에서, 예측 시험은 예를 들면 비제한적으로 어떤 유형의 암을 포함하는 유전적 기초를 갖는 장애가 생길 사람의 가능성을 증가시키는 돌연변이를 확인한다. 일부 구현예에서, 전증상 시험은 어떤 신체적 징후 또는 증상이 나타나기 전에, 사람이 유전적 장애가 생길지 여부를 판단하는 데 유용하다. 예측 및 전증상 시험의 결과는 특정 장애가 생길 사람의 위험성에 관한 정보를 제공하고 환자뿐만 아니라 환자의 친척을 위해 적절한 의료 치료 요법에 관해 결정을 내리는 데 도움을 준다. 예측 시험은 또한 비제한적으로 치료레이저각막절제술(phototherapeutic keratectomy(PTK)) 및/또는 굴절교정 레이저각막절제술(Photorefractive keratectomy(PRK))과 같은, 라식 수술 및/또는 다른 굴절 수술을 수행하는 것을 금지하는 아벨리노 돌연변이의 존재와 같은, 어떤 치료 요법을 금지하는 돌연변이를 검출하기 위해, 일부 구현예에서 이용된다. 예를 들면, 아벨리노 돌연변이를 나타내는 환자는 라식 수술 또는 다른 굴절 수술을 해서는 안 된다.

[0191] 일부 구현예에서, 진단 시험은 또한 유전적 변이가 약물 반응에 미치는 영향을 판단하는 유전적 시험을 포함하는 과마코게노믹스(pharmacogenomics)를 포함한다. 상기 과마코게노믹스 분석으로부터 얻은 정보는 적절한 치료 요법을 결정하고 개발하는 데 유용하다. 의료 분야의 숙련가는 적절한 치료 요법을 설계하는 데 있어서 유전적 변이의 존재 및/또는 부재에 관한 정보를 이용한다.

[0192] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 방법을 이용하여 유전적 프로파일의 결정되는 질환은 비제한적으로 안과 장애, 암, 당뇨병, 고혈압, 정신분열증, 및 가장 흔한 선천성 기형, 예컨대 구순구개열(cleft lip), 구개 파열(cleft palate), 신경관 결손, 연골형성부전(Achondroplasia), 알파-1 항트립신 결핍, 향인지질 증후군, 자폐증, 상염색체 우성 다낭성 신장 질환, 샤르코마리투스(Charcot-Marie-Tooth), 대장암, 묘성 증후군(Cri du chat), 크론병, 낭포성 섬유증, 더컴병(Dercum disease), 다운 증후군, 듀안 증후군, 뒤센형 근육위축증(Duchenne Muscular Dystrophy), 인자 V 라이덴 혈전증, 가족성 고콜레스테롤혈증, 가족성 지중해 열병, 취약 X 증후군, 고세병, 혈색소 침착증, 혈우병, 완전전뇌증(Holoprosencephaly), 헌팅턴병, 클라인펠터 증후군, 마르판 증후군(Marfan syndrome), 근긴장성 이상증(myotonic dystrophy), 신경섬유종증, 누난 증후군(Noonan Syndrome), 골형성부전증(osteogenesis imperfecta), 파킨슨병, 페닐케톤뇨증, 폴란드 기형(Poland Anomaly), 포르피린증(Porphyrria), 조로증(Progeria), 색소성 망막염, 중증 복합 면역결핍증(SCID), 겸상 세포 질환, 척수성 근위축증, 테이삭스병(Tay-Sachs), 지중해 빈혈, 트리메틸아민뇨증, 터너 증후군, 구개심장안면증후군

(Velocardiofacial Syndrome), WAGR 증후군, 윌슨병, 뿐만 아니라 유전적 성분과 관련된 임의의 다른 질환을 포함한다. 안과 장애 및/또는 안과 성분을 포함하는 장애는 비제한적으로 선립중안검맥립종(chalazion), 다래끼(stye), 첩모난생증(trichiasis), 안검내반(entropion), 안검외반(ectropion), 토안(lagophthalmos), 안검염(blepharitis), 누낭염(dacryocystitis), 안와봉와염(orbital cellulitis), 익상편(pterygium), 익상편 각막 이영양증(ptyerygiumcorneal dystrophy), 결막염(conjunctivitis), 신생아 안염(ophthalmia neonatorum), 박테리아 각막 궤양, 진균 각막 궤양, 녹내장, 푸크스 이상증(Fuchs dystropy), 원뿔 각막(keratoconus), 진행성 황반 변성, 색소성 망막염(Retinitis pigmentosa, 백내장, 망막 장애, 황반 변성, 당뇨병성 눈 문제(예를 들면, 당뇨병성 망막증), 실눈-눈꺼풀처짐-역내안각주름 증후군(blepharophimosis-ptosis-epicanthus-inversus syndrome(BPES)), 안피부백피(oculocutaneous albinism), 마르판 증후군(Marfan syndrome), 스틱클러 증후군(Stickler syndrome), 및 CHARGE(coloboma, heart anomalies, atresia of the choanae, retardation of growth and development, genital/urinary anomalies, ear abnormalities or deafness) 증후군을 포함한다. 각막 이영양증은 비제한적으로 아벨리노 각막 이영양증, 과립형 각막 이영양증, 래티스 타입 I 각막 이영양증, 푸크스 이상증, 티엘벵케 및 레이스버클러스 각막 이영양증을 포함한다. 암은 비제한적으로 암종, 육종, 아세포종, 림프종, 백혈병 생식 세포 종양, 및 미지 기원의 암을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 암은 비제한적으로 두경부, 피부, 대장, 구강, 교아종, 유방, 후두, 식도, 내피, 자궁내막, 난소, 폐, 비노생식기, 직장, 전립선, 신장, 흑색종, 신장, 췌장, 위장, 혈액, 간, 자궁 및 뇌뿐만 아니라 유두종 바이러스-유도된 암과 같은 바이러스 유도된 암을 포함한다.

[0193] 일부 구현예에서, 본 방법은 개인을 위한 유전적 프로파일을 결정하는 데 사용되는 게놈 DNA를 제공함으로써 개인 맞춤형 약물 치료 요법의 개발에 유용하다. 일부 구현예에서, 그러한 유전적 프로파일 정보는 치료 요법을 결정하고/거나 개발하기 위해 본 기술분야의 숙련가에 의해 이용된다. 일부 구현예에서, 상기 기재된 방법에 의해 단리된 핵산에서 확인된 다양한 유전적 변이 및 돌연변이의 존재 및/또는 부재는 개인 맞춤형 약물 치료 요법 또는 계획의 일부로서 본 기술분야의 숙련가에 의해 사용된다. 예를 들면, 일부 구현예에서, 상기 개시된 방법을 이용하여 획득된 정보는 특정 질환에 대한 진단을 결정하고/거나 치료 요법을 결정하기 위해 데이터베이스 또는 다른 확립된 정보와 비교된다. 일부 경우에, 특정한 환자에서 유전적 돌연변이의 존재 또는 부재와 관련된 정보는 제안된 치료 요법과 관련된 결정을 내리기 위해 데이터베이스 또는 다른 표준 출처의 정보와 비교된다. 일부 경우에, 유전적 돌연변이의 존재는 특정한 치료 요법을 수행하는 것을 가리킨다. 일부 경우에 유전적 돌연변이의 부재는 특정한 치료 요법을 수행하지 않는 것을 가리킨다.

[0194] 일부 구현예에서, 특정한 유전적 돌연변이의 존재 및/또는 부재에 관한 정보는 치료약(therapeutic entity)을 이용한 치료의 치료 효능을 확인하기 위한 것뿐만 아니라, 치료약을 이용한 치료를 위한 치료 요법을 조정하기 위해 사용된다. 일부 구현예에서, 유전적 돌연변이의 존재 및/또는 부재에 관한 정보는 치료 요법을 수행할지 여부를 결정하는 데 이용된다. 일부 구현예에서, 유전적 돌연변이의 존재 및/또는 부재에 관한 정보는 치료 요법을 계속할지 여부를 결정하는 데 이용된다. 일부 구현예에서, 유전적 돌연변이의 존재 및/또는 부재는 치료 요법을 중단할지 여부를 결정하는 데 이용된다. 다른 구현예에서, 유전적 돌연변이의 존재 및/또는 부재는 치료 요법을 변형할지 여부를 결정하는 데 이용된다. 일부 구현예에서, 유전적 변이의 존재 및/또는 부재는 치료 요법의 일부로서 투여되고 있는 치료의 투여량을 증가시키거나 감소시킬지 여부를 결정하는 데 사용된다. 다른 구현예에서, 유전적 돌연변이의 존재 및/또는 부재는 치료 요법의 일부로서 투여된 치료의 투여 빈도를 바꿀지 여부를 결정하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 유전적 돌연변이의 존재 및/또는 부재는 치료의 1일당, 1주일당 투여 수, 1일당 시간을 바꿀지 여부를 결정하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 유전적 돌연변이의 존재 및/또는 부재는 치료의 투여량을 바꿀지 여부를 결정하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 유전적 돌연변이의 존재 및/또는 부재는, 치료 요법을 개시하기 전 및/또는 치료 요법을 시작한 후에 확인한다. 일부 구현예에서, 유전적 돌연변이의 존재 및/또는 부재를 확인하고, 유전적 돌연변이의 존재 또는 부재에 관한 지정된 표준 정보와 비교한다.

[0195] 일부 구현예에서, 상기 개시된 방법을 이용하여 하나를 초과하는 유전적 돌연변이의 존재 및/또는 부재의 복합(composite)이 생성되며, 그러한 복합은 하나를 초과하는 유전적 돌연변이의 존재 및/또는 부재에 관한 정보의 임의의 수집을 포함한다. 일부 구현예에서, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상 또는 40 이상의 유전적 돌연변이의 존재 또는 부재가 조사되며 이는 복합의 생성을 위해 사용된다. 예시적인 정보는, 일부 구현예에서, 핵산 또는 단백질 정보, 또는 핵산 및/또는 단백질 유전적 돌연변이 모두와 관련된 정보의 조합을 포함한다. 일반적으로, 상기 복합은 유전적 돌연변이의 존재 및/또는 부재에 관한 정보를 포함한다. 일부 구현예에서, 이들 복합은 치료 요법을 수행하거나, 유지하거나 또는 중단하기

위해 지정된 표준 정보와의 비교를 위해 사용된다.

[0196]

일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 비제한적으로 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP, 과립형 각막 이영양증 관련 SNP, 래티스 이상증 관련 SNP, 레이스버클러 각막 이영양증 관련 SNP, 및/또는 티엘벵케 각막 이영양증 관련 SNP로부터 선택되는 2, 3, 4 또는 5개의 SNP의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 과립형 각막 이영양증 관련 SNP, 래티스 이상증 관련 SNP, 레이스버클러 각막 이영양증 관련 SNP, 및/또는 티엘벵케 각막 이영양증 관련 SNP와 조합되어, 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP, 래티스 이상증 관련 SNP, 레이스버클러 각막 이영양증 관련 SNP, 및/또는 티엘벵케 각막 이영양증 관련 SNP와 조합되어, 과립형 각막 이영양증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP, 과립형 각막 이영양증 관련 SNP, 래티스 이상증 관련 SNP, 및/또는 티엘벵케 각막 이영양증 관련 SNP와 조합되어, 레이스버클러 각막 이영양증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP, 과립형 각막 이영양증 관련 SNP, 래티스 이상증 관련 SNP, 및/또는 티엘벵케 각막 이영양증 관련 SNP와 조합되어, 티엘벵케 각막 이영양증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다.

[0197]

일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP로부터 선택된 2, 3, 4, 5 및/또는 6개의 SNP의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 상기 SNP는 인간 TGFβ1 유전자에 의해 인코딩된 폴리펩타이드의 위치 124, 555 및/또는 626에서 돌연변이를 야기하는 SNP를 포함한다. 이들 돌연변이는 TGFβ1 유전자에서 R124 돌연변이(예를 들면 비제한적으로 C(G/A)C SNP로도 지칭되는, TGFβ1 유전자의 뉴클레오타이드 418에서 G의 A로의 전이에 의해 야기되는 R124H 돌연변이를 포함)를 야기하는 것, TGFβ1 유전자에서 R555 돌연변이 ((C/T)GG SNP로도 지칭되는, TGFβ1 유전자의 뉴클레오타이드 1663에서 C의 T로의 전이에 의해 야기되는 R555W 돌연변이를 포함)를 야기하는 것과 같은 과립형 각막 이영양증 관련 SNP, TGFβ1 유전자에서 R124 돌연변이(예를 들면 비제한적으로 (C/T)GC SNP로도 지칭되는, TGFβ1 유전자의 뉴클레오타이드 417에서 C의 T로의 전이에 의해 야기되는 R124C 돌연변이를 포함)를 야기하는 것과 같은 래티스 이상증 관련 SNP, TGFβ1 유전자에서 R124 돌연변이(예를 들면 비제한적으로 C(G/T)C SNP로도 지칭되는, TGFβ1 유전자의 뉴클레오타이드 418에서 G의 T로의 전이에 의해 야기되는 R124L 돌연변이를 포함)를 야기하는 것과 같은 레이스버클러 각막 이영양증 관련 SNP 및/또는 TGFβ1 유전자에서 R555 돌연변이(예를 들면 비제한적으로 C(G/A)G SNP로도 지칭되는, TGFβ1 유전자의 뉴클레오타이드 1664에서 G의 A로의 전이에 의해 야기되는 R555Q 돌연변이를 포함)를 야기하는 것과 같은 티엘벵케 각막 이영양증 관련 SNP를 포함한다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은 예를 들면 TGFβ1 유전자에서 R555 돌연변이(예를 들면 비제한적으로 (C/T)GG SNP로도 지칭되는 TGFβ1 유전자의 뉴클레오타이드 1663에서 C의 T로의 전이에 의해 야기되는 R555W 돌연변이를 포함)를 야기하는 것과 같은 과립형 각막 이영양증 관련 SNP와 조합되어, TGFβ1 유전자에서 R124 돌연변이(예를 들면 비제한적으로 C(G/A)C SNP로도 지칭되는, TGFβ1 유전자의 뉴클레오타이드 418에서 G의 A로의 전이에 의해 야기되는 R124H 돌연변이를 포함)를 야기하는 것과 같은 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은 예를 들면 TGFβ1 유전자에서 H626P 돌연변이(예를 들면 비제한적으로 TGFβ1 유전자의 뉴클레오타이드 1924에서 A의 C로의 전이에 의해 야기되는 H626P 돌연변이를 포함)를 야기하는 것과 같은, 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다.

[0198]

일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 R124C, R124H, R124L, R555W, R555Q 및/또는 H626P 중 2, 3, 4, 5 및/또는 6개의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 R124C, R124H, R124L, R555W, 및/또는 R555Q 중 2, 3, 4 및/또는 5개의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 R124H, R124L, R555W 및/또는 R555Q 중 하나 이상과 조합되어 R124C의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 R124C, R124L, R555W 및/또는 R555Q 중 하나 이상과 조합되어 R124H의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 R124C, R124H, R124L 및/또는 R555Q 중 하나 이상과 조합되어 R555W의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 R124C, R124H, R124L 및/또는 R555Q 중 하나 이상과 조합되어 R555Q의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, R124H는 R555W와 조합되어 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 R124C, R124H, R124L, R555W 및/또는 R555Q 중 하나 이상과 조합되어 H626P의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, R124C, R124H, R124L, R555W 및/또는 R555Q가 모두 검출된다. 일부 구현예에서, R124C, R124H, R124L, R555W, R555Q 및/또는 H626P가

모두 검출된다.

[0199] **VIII. 진단 키트**

[0200] 일부 구현예에서, 상기 기재된 시약 중 어느 것 또는 모두는 진단 키트 내로 포장된다. 그러한 키트는 본원에 기재된 프라이머, 프로브, 버퍼 및/또는 다른 시약 중 어느 것 및/또는 모두를 임의의 조합으로 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 R124C, R124H, R124L, R555W, R555Q 및/또는 H626P 중 2, 3, 4, 5 및/또는 6개의 검출을 위한 시약을 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 R124C, R124H, R124L, R555W 및 R555Q 중 2, 3, 4, 및/또는 5개의 검출을 위한 시약을 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 R124C, R124H, 및 R124L의 검출을 위한 시약을 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 R555W 및 R555Q의 검출을 위한 시약을 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 R124C의 검출을 위한 시약을 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 R124H의 검출을 위한 시약을 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 R124L의 검출을 위한 시약을 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 R555W의 검출을 위한 시약을 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 R555Q의 검출을 위한 시약을 포함한다.

[0201] 일부 구현예에서, 키트는 R124C, R124H, R124L, R555W, R555Q 및/또는 H626P 중 2, 3, 4, 5 및/또는 6개의 검출을 위한 프라이머 및 프로브를 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 R124C, R124H, R124L, R555W 및 R555Q 중 2, 3, 4, 및/또는 5개의 검출을 위한 프라이머 및 프로브를 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 R124C, R124H, 및 R124L의 검출을 위한 프라이머 및 프로브를 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 R555W 및 R555Q의 검출을 위한 프라이머 및 프로브를 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 R124C의 검출을 위한 프라이머 및 프로브를 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 R124H의 검출을 위한 프라이머 및 프로브를 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 R124L의 검출을 위한 프라이머 및 프로브를 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 R555W의 검출을 위한 프라이머 및 프로브를 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 R555Q의 검출을 위한 프라이머 및 프로브를 포함한다. 일부 구현예에서, H626P의 검출을 위한 프라이머 및 프로브를 포함한다.

[0202] 일부 구현예에서, 키트 내의 시약은 동결건조된 분말로서 포함된다. 일부 구현예에서, 키트 내의 시약은 재구성을 위한 설명서와 함께 동결건조된 분말로서 포함된다. 일부 구현예에서, 키트 내의 시약은 액체로서 포함된다. 일부 구현예에서, 시약은 플라스틱 및/또는 유리 바이알 또는 다른 적절한 용기 내에 포함된다. 일부 구현예에서 프라이머 및 프로브는 키트 내의 개별적인 용기 내에 모두 함유된다. 일부 구현예에서, 프라이머는 하나의 용기에 함께 포장되고, 프로브는 또 다른 용기에 함께 포장된다. 일부 구현예에서, 프라이머 및 프로브는 하나의 용기에 함께 포장된다.

[0203] 일부 구현예에서, 키트는 대조군 gDNA 및/또는 DNA 샘플을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서 포함된 대조군 DNA 샘플은 TGFβ1 R124 정상이다. 일부 구현예에서 포함된 대조군 DNA 샘플은 R124C, R124H, R124L, R555W, R555Q 및/또는 H626P를 포함하는, 검출되는 돌연변이에 상응한다. 일부 구현예에서, TGFβ1 R124 정상에 상응하는 대조군 DNA 샘플 및 R124C, R124H, R124L, R555W, R555Q 및/또는 H626P에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 구현예에서, TGFβ1 R124 정상에 상응하는 대조군 DNA 샘플 및 R124C, R124H, R124L, R555W 및/또는 R555Q에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 구현예에서, TGFβ1 R124 정상에 상응하는 대조군 DNA 샘플 및 R124C에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 구현예에서, TGFβ1 R124 정상에 상응하는 대조군 DNA 샘플 및 R124H에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 구현예에서, TGFβ1 R124 정상에 상응하는 대조군 DNA 샘플 및 R124L에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 구현예에서, TGFβ1 R124 정상에 상응하는 대조군 DNA 샘플 및 R555W 및/또는 R555Q에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 구현예에서, TGFβ1 R124 정상에 상응하는 대조군 DNA 샘플 및 R124C에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 구현예에서, TGFβ1 R124 정상에 상응하는 대조군 DNA 샘플 및 R124H에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 구현예에서, TGFβ1 R124 정상에 상응하는 대조군 DNA 샘플 및 R124L에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 구현예에서, TGFβ1 R124 정상에 상응하는 대조군 DNA 샘플 및 R555W에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 구현예에서, TGFβ1 R124 정상에 상응하는 대조군 DNA 샘플 및 H626P에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 구현예에서, 대조군 DNA 샘플의 농도는 5 ng/μL, 10 ng/μL, 20 ng/μL, 30 ng/μL, 40 ng/μL, 50 ng/μL, 60 ng/μL, 70 ng/μL, 80 ng/μL, 90 ng/μL, 100 ng/μL, 110 ng/μL, 120 ng/μL, 130 ng/μL, 140 ng/μL, 150 ng/μL, 160 ng/μL, 170 ng/μL, 180 ng/μL, 190 ng/μL 또는 200 ng/μL이다. 일부 구현예에서, 대조군 DNA 샘플의 농도는 50 ng/μL, 100 ng/μL, 150 ng/μL 또는 200 ng/μL이다. 일부 구현예에서, 대조군 DNA 샘플의 농도는 100 ng/μL이다. 일부 구현예에서, 대조군 DNA 샘플들은 동일한 농도를 갖는다. 일부 구현예에서, 대조군 DNA 샘플들은 상이한 농도를 갖는다.

[0204] 일부 구현예에서, 키트는 버퍼, 예를 들면, GTXpress TAQMAN® 시약 혼합물, 또는 임의의 동등한 버퍼를 추가로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 버퍼는 본원에 기재된 임의의 버퍼를 포함한다.

[0205] 일부 구현예에서, 키트는 벡터(예컨대, M13 벡터 포함)와 같은, 클로닝에 사용하기 위한 시약을 추가로 포함할 수 있다.

[0206] 일부 구현예에서, 키트는 DNA의 정제에 사용하기 위한 시약을 추가로 포함할 수 있다.

[0207] 일부 구현예에서, 키트는 대상에서 각막 이영양증의 검출을 위한 키트를 사용하기 위한 설명서를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 이들 설명서는 본원에 기재된 프로토콜의 다양한 양태를 포함한다.

[0208] **실시예**

[0209] **실시예 1: DNA 추출(DNA Extract All Reagents, ThermoFisher)**

[0210] 하기 기재된 바와 같이 그리고 본원에 제공된 개시내용에 따라 구강 상피 또는 모근 또는 전혈로부터 DNA를 추출하였다.

[0211] 구강 상피 또는 모근으로부터 DNA를 추출하기 위해, 샘플을 먼저 1X PBS 300 μL에서 전처리하였다. 그 다음, 30 μL 용해액을 튜브에 부가하고, 상기 혼합물을 볼텍싱하였다. 그리고 나서, 상기 혼합물을 95°C에서 3분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 30 μL의 DNA 안정화 용액(Life Technologies/Thermo Scientific, USA)을 부가하고 상기 혼합물을 볼텍싱하였다. 그리고 나서, 상기 혼합물을 13,000 RPM에서 1분 동안 원심분리하였다.

[0212] 전혈로부터 DNA를 추출하기 위해, 3 μL의 전혈로 출발하여, 샘플을 먼저 1X PBS 300 μL에서 전처리하였다. 그 다음, 30 μL의 용해액을 튜브에 부가하고, 상기 혼합물을 볼텍싱하였다. 그리고 나서, 상기 혼합물을 95°C에서 3분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 30 μL의 DNA 안정화 용액(Life Technologies/Thermo Scientific, USA)을 부가하고 상기 혼합물을 볼텍싱하였다. 그리고 나서, 상기 혼합물을 13,000 RPM에서 1분 동안 원심분리하였다.

[0213] 상기 과정을 완료한 후, 상업적으로 이용가능한 Tecan® Infinite® 200 PRO NanoQuant를 이용하여 DNA 농도를 판독하였다. 정량을 위해, 100 μL의 용리액을 투명한 96 웰 플레이트 내로 피펫팅하였다. 그 다음, 100 μL의 준비된 블랭크 용액을 웰 H12에 부가하였다. 그리고 나서, NanoQuant와 함께 제공된 제조사의 설명서를 이용하여 농도를 판독하였다.

[0214] 하기 표 5 및 6에 기재된 프로브 및 프라이머를 이용하여 반응 혼합물을 준비하였다.

표 5

[0215]

프로브 서열	
프로브	서열
TGF β I R124정상 (서열번호: 25)	VIC-CAC GGA CCG CAC GGA- MGB NFQ
TGF β I R124H (서열번호: 26)	FAM-CAC GGA CCA CAC GGA- MGB NFQ
TGF β I R124C (서열번호: 48)	FAM-CAC GGA CTG CAC GGA- MGB NFQ
TGF β I R124L (서열번호: 49)	FAM-CAC GGA CCT CAC GGA- MGB NFQ
TGF β I R555정상 (서열번호: 45)	VIC-CAC CAA GAG AAC GGA-MGB NFQ
TGF β I R555W (서열번호: 46)	FAM-CAC CAA GAG AAT GG-MGB NFQ
TGF β I R555Q (서열번호: 50)	FAM-AC CAA GAG AAC AGA G-MGB NFQ

표 6

[0216]

프라이머 서열	
프라이머	서열
TGF β I 124 F (서열번호: 1)	TCC ACC ACC ACT CAG CTG TA
TGF β I 124 R (서열번호: 2)	CCA TCT CAG GCC TCA GCT T
TGF β I 555 F (서열번호: 43)	ACA CAG TCT TTG CTC CCA CAA A
TGF β I 555 R (서열번호: 44)	ACT TAA GTT GGT CTT TAC CCA AGA GTC T

[0217] 예시적인 반응 혼합물에 사용된 성분 및 비율이 하기 표 7에 나타나 있다.

표 7

반응 혼합물		
All reagent extract (전혈)		3.00 μ l
GTXpress TaqMan®		10.00 μ l
프라이머 (124R) (역방향)	10 pMol	0.50 μ l
프라이머 (124F) (정방향)	10 pMol	0.50 μ l
프라이머 (555R) (역방향)	10 pMol	0.50 μ l
프라이머 (555F) (정방향)	10 pMol	0.50 μ l
프로브 (NL/VIC)	10 pMol	0.20 μ l
프로브 (R124H/FAM)	10 pMol	0.30 μ l
프로브 (R124C/FAM)	10 pMol	0.20 μ l
프로브 (R124L/FAM)	10 pMol	0.50 μ l
프로브 (R555N/VIC)	10 pMol	0.20 μ l
프로브 (R555Q-1/FAM)	10 pMol	0.20 μ l
프로브 (R555W/FAM)	10 pMol	0.20 μ l
증류수		3.20 μ l

[0218]

[0219]

예시적인 PCR 사이클링 조건이 하기 표 8에 나타나 있다.

표 8

PCR 사이클링				
판독 전	유지 단계	사이클링 단계 40 사이클		판독 후
60°C	95°C	95°C	64°C	60°C
1분	20초	3초	30초	1분

[0220]

[0221]

상기 프로토콜을 사용하여 도 4-8에 제공된 실시간 PCR 데이터를 생성하였다.

[0222]

참고문헌

[0223]

모든 제목 및 부분 명칭은 단지 명확성 및 참고 목적을 위해 사용되며 어떤 식으로든 제한하는 것으로 간주되지 않아야 한다. 예를 들면, 본 기술분야의 숙련가는 본원에 기재된 발명의 의미 및 범위에 따라 상이한 제목의 다양한 양태를 적절하게 조합하는 유용성을 인식할 것이다.

[0224]

본원에 언급된 모든 참고문헌은 마치 각각의 개별적인 문헌 또는 특허 또는 특허출원이 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로써 본원에 통합된 것으로 명시적으로 그리고 개별적으로 표시된 것과 같은 정도로 그 전체가 참고로써 그리고 모든 목적을 위해 본원에 참고로 통합된다.

[0225]

본 기술분야의 숙련가에게 자명할 바와 같이, 그 의미 및 범위를 벗어나지 않으면서 본원의 많은 변형 및 변이가 이뤄질 수 있다. 본원에 기재된 특정한 구현예 및 실시예는 단지 예로써 제공되며, 본원은 청구항이 가지는 등가물의 전체 범위에 따라, 첨부된 청구항의 용어에 의해서만 한정될 것이다.

TGFBI 유전자 서열 (NCBI 참조 번호 NG_012646.1):

```

1 gcttgcccgt cggtcgctag ctcgctcggg gcgctcgtc ccgctccatg gcgctcttcg
61 tgcgggtgct ggtctcgcg ctggtctggt ccctgggcc cgccgcgacc ctggcgggtc
121 ccgccaagt cgcctaccag ctggtgctgc agcacagcag gctccggggc cgccagcagc
181 ggtaagccga gccgcctggc caggggctgc ggaaggtcag gtagtcgggg ctccggagcgc
241 aagcgcgtgg gggcattgaa ctgggctggg ggccagggg acaaagccc aactaaaaac
301 cttgcagcat ggagcgtcgc gacaccagcc ctgcacgcgg tggaaaggaga gagggaggga
361 ggtggaggac catggaggga aagcgggagg ccgccgcttt gtagaaggga gtggggaagt
421 ggaccagaga ctttcgacgc aggccaagag cctgagacgg acagcgcttt cagcttctcc
481 tcccagccac tcgagaaagg gggaaatggc aactctttgg ccataatcac cgtgggaggg
541 tgccaagggc aaagcccacc cagcagtaaca cctattccaa cccagccagg cccccggcca
601 gcgactccag acaagaacct gggccacaca cgggtgcgac atctaagggtg ccccaggctc
661 ctgtgtctct gggcaggccc tgcactcaga cactgctggc acccgacact gctctctggg
721 tacagaagg gcaatgtggc acttcttgtc ctgcccgatg aagagcagga gaatgcactg
781 ggccctcaca cacactgttc aaatggggaa actgagtcct gagtgggtcc actttcccac
841 agtctgaag tgtgactggt agccaggatt ggagtcgtgc ttaaagtaat agctgggttt
901 gtaaatgtag gacactatca ttgcaggaat tcctttgaga ccctgaagat gtgttggttt
961 taggagacaa actcaagcag aaggtctggt ctgatagtgg ccctaatact gaccagggca
1021 gaggcaggca acatctctac ctcaaaaacc aggccatacc tgcgtcacia ataccaggc
1081 tttgtgcag ctccagcct accctgttgc accaacttct tttctataac tagttaaacc
1141 tataatctag tagaatcttg tagtgactcc tcagaggaag cctaaatacc atcggggctc
1201 ggcgttcaca ccacaaagca atgcccacac ctccaagaga ctgggcagat ctgtgctcaa
1261 atcaaaactc atgtgtgggg gtgatagagt tgacttcaca ggccctgaaa gtcttggtc
1321 cttgcactag gagtgtctgc ggtacgggta caggctgccc ctgtgagggc atagtgtctc
1381 ttgtttctct tacttgtggc tttatggtct aggcctttca ggagtttggg gctctggcgg
1441 agagggcctg ctgggagcac atctggccac cctgcagagt gaaatcaaac caggcctggc
1501 tgcaacctca acaccctcct ggaagaggga gaatactggg gatatcctgg ggtctttctg
1561 gaagtgggag aatcagcttt gacttgggca gtgtgcagaa tagagtgagg ggggatgtca
1621 gaaagatgag agggatgata ggcctcaaca tcaaaatgca agcacctggc atttttatta
1681 tctctgcccc cctctcgttt ggtctctctg cctttctctg caatgaattg tgttatgttt
1741 gggtgcctca atttgcctag gaggttctta tttctctctg atcttcgcca ctaagtccag
1801 agaagatcct tatagcatgc cctgcaacag tgtcacctgt aagggcattc ctctgcacag
1861 ccacagtga ggtatcctca aggtattgag ggctttccat caagagccat ctttacagca
1921 aacctctttc ccttcagagc ccagaagagt gctgaccagc tggaaaacag ggtttttttc
1981 ttaaattgca atgctcttga ttatgagttc cagatattag atcaacttcc ccaccatacc
2041 cctgcaggca aagcctctta attagcttcc tgcagcacag ctggaaggcc ctattgtaat
2101 ctgtgatggg cagagtgact taagaagtca caggagcacc cctgtcccag tagaatctgg
2161 atgctgcagg acatgaacca tggcaaaaat gttgcaggca cagtgtgatt tactctgatc
2221 taactgtccc tgttaatgcc acagggctgc ctggcctggc acacagggct gtgggcctct
2281 gtgcaaatgg ataacgttgt tctagctcca gcctttcatt caaagtgaaa actgttagaa
2341 agggaaaggaa aacttttgct ttttaaggaa ttgtagcgtg ctgcctgata tgaaggaaga
2401 aataacagct gtgccttgct tgtgcgcagc actcgtattg cgcttttgct ttcgacctca
2461 ccacaacaca gtgagatcta ctgttcatgt tcccatttta caggagggtg aactgcagct
2521 tagtgaggta gagagtgact tagttcagac acagaatgct gttgggagag taataactat
2581 gatatggtct ctgactccc agctatatct gtgttgctat agggaaaggg aaaaataata
2641 ctgaaagaga agtaaaaaata caatcacact tccaaacatc aaccacaaa aactgaactg
2701 aatttcttga agcacttggg tttcaaatct aagctgaaca tcaatgctgt tattcttgag
2761 gcccaagagc aacttgetca tttcaattaa gcttcagcat gaacttcta tgtacacagc
2821 caccacacac tccccgatgt gagaaggaga gggtcacagc cgccccagc ctctgctgct
2881 gccacaagga cagcagcagt ggaaacattc agcaaaggaa tgttggagcc acatcccaa
2941 gagactcact gaagattcgc caaacgccta cggaaagtgg cagggaattc attgacagta
3001 attgtttcct gcttgatcag attgaagagc ttctgggatt ctgtaacaat aaataggacc
3061 .ggggctgga gtaaggccag caaggactct tcaggggtta ttcagggact gtctaacctg
3121 tgaatcctag gcagcaaaaca gaaaccaggt attcagaaat ctggagattg tggctaggcc
3181 cagctaggac tagggaggca tgggcctctg ctggctgtgg tcccttctcc agccttcact
3241 tctcttctcc ctgatcctt acatggattc attaatgctc attgtccctc ctggggccac
3301 tcactttcac ctgttgaaca aaaaactggc caagaggtga cagtcatac accgcagaag
3361 agacagggca gagaatgaa ggggcagaat ggactccac ccaaaagcct gactctgaat
3421 atttgagaat tgttcaagtt cctgcagagg aatcatgatg gggacagtag gtgtagtttt
3481 tactgcaata ttggtgtctt cttacaacaa acgctgcaca tcaagtgatg tctgtggatg

```

[0226]

3541 gcattcttaa agtaacagg aaattgatgt taaagaaata cttcatcctt tgggtgatac
 3601 ctgaagtctt ctgagcttgg aggtcttgtg aaagccctca gtattgtttg ttttatttgc
 3661 tttcctctga cttgtgattc agtcagatgc atgcctgcct ctggctcagg aagatcaacc
 3721 ctctcctgac tgaccacgcc tctcctgact gaccacgtag cacagcagct tcctttccct
 3781 aggggctcct aatgaagctt tcacaatcac ctggcctgag cacagtttgg gtcaggactt
 3841 ggtatacttg aaaaaacat gcaaaaccaa aatcctgtgg ttctggaaaa ggcttcttag
 3901 cagaaccccc agacatttac actctgcttt ttcacagggt ccctgaggat tctttggatc
 3961 tgggtagttt ggggagcagt attttcaaca agttcatttc gtgctccttc tacaccctgc
 4021 ctggatgcta ggccccatct agaatgtgaa caacagaaca aggcagaaca ctgtcctca
 4081 aggttctgtt gagtgttaga tgcaagaaag agacaccccc cacctccccg catcacttac
 4141 aggaattctg tttggaacc aacatcaaat aaggaccgta tccactgtca gaggatggga
 4201 agcagcatgt catctgggac attgagaaaa ggctcctggg ggaagtggga cttgagctgt
 4261 gatctaagta atgaacaact gagagttaaa tgggagagca tccccatca gggtcctgag
 4321 agcaaccagc catggtttaa accagctata aagcctcggg tttataggat agacagtaac
 4381 aatggcttgt ctttgggagc caagcagctg gtccaggcat gcagagcatg tctgtatgga
 4441 gagctgcctg agagatgctt ttgtttacac ttatcaattg cccatgtcaa agaaggatat
 4501 gtacatgaag ttacatcagt atgtaagaga gattttaaca atttttgagc ggaagcttt
 4561 catgggggct gatgggaatc taggtaaaca gaaccaaaat ctaaacccaa gatatcccca
 4621 gtaccaagac tgaaatgact ctctcctcta tctctagaaa gttccagtga cccaaggagg
 4681 caaacacgat gggagctcatt aaagtggggt ggacgtgctg atcatcttcc taattctgct
 4741 gcttttgtt tcagcccaa cgtgtgtgct gtgcagaagg ttattggcac taataggag
 4801 tacttcaaca actgcaagca gtggtaccaaa aggaaaatc gtggcaaatc aacgtgagta
 4861 tctgtaacca gccaggagac caagctgtat gcacgctggc tgcagttccc cagggctgg
 4921 gccagccttc tagaaggta ggttgcttaa aaagccatga agatgcatgt gcgaacatgt
 4981 ctgggacctg cgtgctagg agtggcattt tttagaagct ttgcaaatct gttttgcat
 5041 ttaaggctg ctgacaagac ttggagacat ttttcagggc tggtttgggt ttgcaagaaa
 5101 catgaaacac tgcgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtttctc aatcctcata aaataatata
 5161 gatatgcagt ggagaagcca ccagcatgtg actctgaaa agaaaagccca ttggtgaatc
 5221 tgtactaaa aatgscatcc ctatcttaca gtcctaaggt aaacacccca aaaagactta
 5281 gagcactaaa catatgcaga ttatgagaca gcatagcata taatatgtgc acagacttcc
 5341 tcattcaaac cctagctcta cctggggcag tcgattcatc tttagaacce tccattgctt
 5401 tacctgaaaa gttcgtataa caaaaggacc caccttatgg gtttgttaca aggatggaat
 5461 gaaataatgt acataagaga ctgaatatgg tgcccagcat atatcagtcg tcaataaatg
 5521 ctagctacta ttattattat caccctagat ttgcaaatct agaccacaca agcagaagta
 5581 agagtgccaa cgggtgtgtg accagtgctg ttacaatagg gcttgttgat gctgtttca
 5641 gcaaggaggg aggcagcttt taccctactg cccagctccc tgggtggaatc aggtgcatgt
 5701 tctaacaatt ctggggaaac ctaatctggt ttggcactgt caacagatct caaagctggc
 5761 tgtctcctat agctaggaag atgtgtatga caaatctcct gagccaactg tgaaggcctg
 5821 acctctccc tgtctccata cataatggga tgattaagaa actctaagcc actctcttaa
 5881 gcacttttca atgttaggga tttttaagtt tattgttgtg acattgcttt tgagcagaca
 5941 tctcctccaa ttaatatagc aactgaaaga agagaaaatg ctctttcctt aaactgtatg
 6001 tggaaataaa tattccaatg tgtgaccctg attatgttag gcaattagca atcctaatat
 6061 gaattgaggg aagttgggat tcatggcaca gctggggaga taccagcagt ccctgggagc
 6121 ctgtcccagg caggtccatg gcagcttctt ccatgcctga ttgacagccc agcctgcaag
 6181 ctaaaagtgt agtgagctag gaggacacac tgccaagatt cagctaacag acaccagcag
 6241 atattcttgc tgctatgaac aaaaggagac tatgcaaatt atacaccacc cattcttcca
 6301 ggatgcctga cttaaaaaat aagaaaaaag atgggcccgg cacagtggct cacgcctgta
 6361 atccaacac tttgggaggc cgaggtgggc ggatcacaag gtcaggagac agagaccatc
 6421 ctggctaaca tgggtaaac ccgtctctac taaaaaata caaaaatatt agcgggctgtg
 6481 gtggcgggca cctgtagtcc cagctactcg ggaggctgag gcaggagaat ggcgtgaacc
 6541 tgggaggcgg agcttgcagt gagccaagat cgtgccactg cagtccagcc tgggtgacag
 6601 agtgagacac cgtctcaaaa aaaaaaaaaa aaaaagaaaa gaaaaccttt agtactgatt
 6661 gatttttcc catgtgtgta tattatctac tcaaattaac aattaattac ttaattaaac
 6721 acaaagccag gcctcaccta attgcttctt ggaaggtgac cagagtgtca gtgccaagca
 6781 aacaactctt ctatatctca agagccctgg gcttcagagg gccatctttt ttgttaattc
 6841 aagtttctct gaaaatggag acccgtttat gatgacaagc tggctacagg gttagcatctg
 6901 ccacactgtt tcgggggtgc cgctgggctg aagcatttgc ccagctagtt aacaatagct
 6961 cgataacatt ccctatcagt gtccaggctg agaatactgt cagtgatgag tgccttggc
 7021 tcttgtaact gtatctttgt gtgccaggac aaggcacaag caacagagct gtgtgttgc
 7081 aaaatgttcc tgatgagcag gtcaaccctc cgggggcagg tttggatag ataatgtggt
 7141 gatgtgggtg cgcagctccc ttaccagtg agcacaaggg gagtctctca ggaaaaggaa

[0227]

7201 gaaatgtctg gatgaggtgg ggagatgggg ttcagagtgg actcaggcaa agccccgatgc
 7261 ccagtcocag ctgttggcct agtctcacia agccagaagg atatgacatt tacattcaac
 7321 tcttgaatth ttggccactg ctttgggcaa cttcaagag agaaaatgaa gatagaaaa
 7381 tattatttga tataaaactt ctaggacaag agaggccctt cctggaacat tacatgtagt
 7441 attaggaagg tggagctgcc ctggaaaaga tccagagaac tcagagagag gaagaggtgg
 7501 aaccocatct tgttcttga gagagctcag taagagtggc ttggcagggc tctgtgtac
 7561 ctgagaccaa gaccagtggg gaggctactg tctgaccacc ataccggtcag aattcagtg
 7621 catgggtggg cagggtggaa ggggagagga ctgtgctggc tggagttgat gttatcctgg
 7681 ggaaagttag tccctagatg cctttagtgg agtgaggagc agactgggaa atgggagcac
 7741 agtagtgggt ggggcaaaaa ggactgtctc tgcagtgggt ccataggcag ttggaattht
 7801 ctgagcaaga ctccagagaa gagggtgga gcagaggtgt atgttgggat gaaaaggagt
 7861 aaagtatcat gggggaggag gcagctcagg ttgtcaaggg tcaagaacc agaaggagaa
 7921 tttcaccttg gaagcagaca acgggtacca agcatacagg ggaatacttt gtggtgagag
 7981 gtcacacaga gatacaggag ccgacctggg gagacaggag cctggagcca cctgcctgct
 8041 tttgtgagcc cccagactcc actgctatca tcaggtgaag ctctgttggc tgcacacaaa
 8101 agcttttctg catttaciaa gagagaaggg cctgagtttc tgggtgcaatg cgtcaagctg
 8161 acatatggac tttattacag gaagtgggta ccagtgggtc cctatttagt ggctgttatt
 8221 gtgaatthta ttgttcggaa attcacttta gcatthtatt cagatcctaa atagcaccgg
 8281 agtgatacaa tggctaatac acaaaagagg gctgtgggga gcagacagtc agcatcccc
 8341 tctgtgattt caggccctgg tttgattagt agccataaaa tttttactgt gtggcacttt
 8401 gagcaaaagg gcagaaaatt gtggctcagga agcctggctg cctctcgaca ggcttccttt
 8461 gtgctagccc cagggagagg aggcctattt aacagccaag tccaagtga catcatggga
 8521 ctggaatagt catagcagga gctcagacat cataaacgtg gcatagggag ggctgtgga
 8581 ggagctagcg ggtatgggtg gcagctattc attccaaaag tcttgaatth gtttcacgag
 8641 caacacattt cacaagtgcg aagcccttct ctggagccaa gatgagctgg cagagcactc
 8701 ctgttttctc agtagcaagt gttcctttgc ccaggggcaa aatatthaat actcctcag
 8761 cactgcatta atgctthaaag attthacttt taaagagatc agctgtgca tggctgagct
 8821 tttccatcag ctggcagggc tttttcagta ggtgtccttc tgggcagggc actggggaca
 8881 gctgacgtga aggtgaagaa gagctgtcgt tttcctccct tatatcccac aacctgtgct
 8941 ccaagaggaa aaaaaagaag atggtgagaa gtcattcaag cagaccccag acccactacta
 9001 gtgcctcctt tctgttttca tatccctgtg cagccagctg ggatctcttg aataactgtg
 9061 tctgggggca ctgagattgg acatacacca aacagcggag atcgacaaa cgcctctgtt
 9121 gggcagtggt tctgagggg tctgtcccat tctgtthaaact agggagctga ctgactgaca
 9181 aggaatthta ttctgttggg tatthacatg aacctatgtg ccacctgggg taagacctg
 9241 tggtaggttag aaacatgact tccccaaaat gtccacatcc taactcttaa ttctgthaat
 9301 atattcccct actggaaaaa gagactttgc aggtgtgatt aatthaaagga tcataagagg
 9361 gagagattat ccaggattat ttgatgagtc taatataatc atcagggtac thaaaagagg
 9421 gaggcaggct gtgcctgggtg gttcacgcct tthaatcccag cactttggga gactgaggcg
 9481 agcgggtcac gaggacagga gttggagacc agcctgacca acatggtgaa actccccctc
 9541 tagtaaaaaa aaaaatacaa aaattagcca ggcatggtgg tacacacctg thaatcccagc
 9601 tactcaggag gctgagggcg gagaattgct tgaaccccag aggcagaggt tgggtgagc
 9661 tgagatcgca ccactgccct ccagcctggg caacagagca agactccatc tcaaaaaaaa
 9721 aaaaagaggg aggcagtggtg atcagagtca gagaaggcaa cgtgatgatg aaagctgaca
 9781 tttgagtgat gcaaccacaa gccaaaggaat gcaggcagct tctcaaagct ggaaggagc
 9841 agcaatggat tcttccctac agcctctgtg aggaatgcag cctttgattt thaacccata
 9901 aggccgattt ctgactctag cctctggaat tgtaagataa tttgcatgat ctcaagccac
 9961 thaatthgtg gtaattthgtc acagaaagca atgggaagcc aacacaggcc thaatthgtg
 10021 acttatagat gcattthtct thattthcaat gtactthtat caatggtctc atgtagggta
 10081 ttgctthtcaa tgaagatatt aacatagtht caactthtaag gthttatctt ggagthtctt
 10141 tagaagcttc acaactgacc acttagthaa cagthaagcat ctgtthaaagt cttctcatat
 10201 gthaagttcat tcaatttctca caatcacact ataagataaaa tatgattatt agccccatta
 10261 cagatgagga gacaggtcga aaagacttht atgcaacctg gthcaagtca thcactggta
 10321 agctgagggg gtctgtccac thcctthtgc tgccccaggg gggthtcaag cctggcagtt
 10381 agtgtcagcg acttagggag tgaacaagtg agcaggcctg taggacctg cthaaactgcc
 10441 ccaggtctct gtctacagcc thaaacctgt ggctgtgggt cccagagaca aggcctcctc
 10501 agcatcagag aaggatgcct ttgtctcagg gthcatcaacc thctccaggt thctacccc
 10561 ctgctgthaa ggggatcccc aagaccgctc atcagacaag gagcttggga actgaggaga
 10621 cacagtacgc ctccaggagt gcccaaatg ccctcacatg ctgcatacag atthgcccacaa
 10681 ataaagtaca tccacattct gaagactctg thctcatcac caaccaggct gggccctggg
 10741 gagggtctga gtggttagg cctthtgggg tagacagtag gthaaagcaa gccatgattt
 10801 tctattggga ggcttcagaa tcagctcagc tgtgtthtca agaccaggag ggcagaaag

[0228]

10861 aaacatccc aggcaagcag tccatgggcc atgtcagatg tctagacgtt atgggtctgt
 10921 gtttgctctg ccattcctct cggaaactat gatgcctctg atggtttacc ttcagtcaca
 10981 ggtgactggc ctacagggcc attccttggt ccaacgactt ctcgagtata attaatcccc
 11041 aggcatttac ggccagagca gccggccaaa tccgtgaagt gcagtgggtg ttttaaat
 11101 tattaacttc ttggaaactt attttaggga gagaaaactc agtacttctc tctatccaat
 11161 cttgagtaaa aatgtagtaa gggactgggt gagagcctcc cagacatccc tacacataga
 11221 ctttgggttg acattatctc tttgcacctt ccttgaactt ttcttctaaa ttaggtgcct
 11281 tccctaattt aggcaccttc ccagtactag tctgtgacct gtttaggaacc aggccacaca
 11341 gcaggagtgg agtggcaggg agtgagcatt attgcctgag ctccgcctcc tgcagatca
 11401 cgagtggcat tagattctca tagcagtcgg aatactattg tgaactgtgc gtgtaagggg
 11461 tctagcttgt gcattcctta tgagaatcta atgcccgatg gtctgagatg gaagagtctc
 11521 ataccaaaac cacccttcc ccctgccacc atctggggaa atattgtcta ccacgaaact
 11581 gatccctggg gccaaaaagg ttggggaccg ctgtccctaa ggatctgctt tttctgacct
 11641 gaggtttttc tttattagac tgtatctggc tgaggagaag cctgaagcct ttaatcggaa
 11701 cagctttggc tgatgagatt agattcagaa accaacagat tggctctttc tatgcaggga
 11761 agcctaggaa ctggggggct atggctggga agccccctat tggttccatc ctttctatg
 11821 ttcactctgg aggaatggca tcagaccctt gcctctgtga ttgtcccag cccatccaac
 11881 cacagatctc atgttctgca ttggaccagg gccaggggag atggcacact gagctgagta
 11941 taaggagagt ggagcaggcc actgccagcc cagaaaaatt tggtaaaagt tgcctgaaat
 12001 cttctcagcc ttcgattcac agctgctctc tctgctctg gggccatgca gaccagtcca
 12061 gaaaagagtt aatttgttgg ggcagttgga ggcaggtgga ctgccagctt tgacacctc
 12121 ccagcccaca ggctgctgca ctggggctga aggcgtggct aaccctgca cacctagaga
 12181 gtgacagaga tgcagactg ggcagcagga aggcaagagg attaagagag agcttctctg
 12241 ctgaaagcca cactcggtta accaggaaaa agcccctggc acgagaagac tcagtggcct
 12301 gaggcactga gccttggtg ttggcctatg gctgcataag ccatccatgt gtgacagtag
 12361 agtgtagtcc agccactgtg ggacatgggt gctgaaagac cacatggaga ggaacagtga
 12421 gtgctgacaa gggctagcct tgatcacttt ggagacaccc cctgtgtctt ctatagtca
 12481 gactttccaa atctgtctgc tatcctccaa acgtgcattt tcaagagcaa tggaaaaagg
 12541 attggacttg atggaatgca gcaagagtcc taggtctggt actacctacc tatgacctta
 12601 agaaaactcct tcaccctcca gaacccttac agctttcttt ctgattctat cctgagttac
 12661 tctactccaa gctgagactt ttctgcttag atctatccct tcctcctaaa cccccacct
 12721 ccatttctcc ttgtgtcttt ctttacacac ccctcagcat acacacacac ctgaccacag
 12781 gaaccaatga gttaatatth gaggagtggg ttttcttttg tcctcaatga gatcctgggtg
 12841 aggccacttg agctgttcag ctcccctggc gtattttggg gatggaactc agaagccaac
 12901 aatatagaaa aagagtcttt ggccagcttt cccaggggct ccatgccata gagagtactg
 12961 caccctgtgt cacagggggc cctgacatga ggactttgag gataaacta ttctccaac
 13021 tctgcttcag catctccatg gattttcaca cagacacttt aggaagaaa ctaagttagg
 13081 ggggacttga cctaatacca catcacagcc ccagtaatac agccctggaa ttatcacag
 13141 aaagcctaga atcccatgca tatcccatgc atatgcaccc ctagtccatg gggttcaagg
 13201 cttggagctc tccctggatt tagctgggaa aagttggcag acagtctctc tctgtctct
 13261 agaaaatagc actagaatcg tgagtgtgag attgcaagta acttttaaaa tcatctagtt
 13321 taacttcacc ccatttccata gaccaagaaa ctgagaccag agagagaaat ggactttcaa
 13381 gttcaccctg ctagtactg atggatcaca agtcaaactc cctgattcta gactgtttc
 13441 tcttacacca caccaccttt gaaagtgtgt caatcaaatc ttactttagt tgcagaggt
 13501 gactttagtt tctgaagata aaattgtgag tcaatcaaga tgagtcccaa gacaatagcc
 13561 tgtttagccc ttataagttc agggatgaaa ggttagaagg aaacaggatg gaaggaggac
 13621 tggagaaaaa aacaaaagag gaaggaaagg gaggaaagca aacaggaaaa aaaaagatg
 13681 tgcatagtct gtcactctc agtcatttcc tgggagccca tttctagcaa agtgacagct
 13741 gcaactccct ggccactga gcatcttagc tgatctgtct ctgaaacacc cctgggagaa
 13801 cagatgaatc aggttctatc ttctgctaac taagtctctc ctgagacgac tccatttaaa
 13861 tgaacaagag caggatttcc tgggcacact gagagcacct tccagaggcc cctccagagc
 13921 cctaagcctt gtatttctc cagtccgctt gtttcttctc tgggtgatgtc attaaacgcc
 13981 ctttgagagt cccacagtga gcagtctgca ggtaaaacc gctgcaatta aagtctgagt
 14041 cctttctctg ctcaaaggcc atattcatat agaagaaagg aaaaggaagg actggctggt
 14101 tgcatttggg tccagccctg ttgagtagag gtcgtgctca ctcccaggaa ggtacagggg
 14161 agccttcagc agaacctggg gatttggttt taagcaagtc tttcttaggt gtgggctttc
 14221 agaacacttc cttccttgca atattatthg aaattctcag tgttttagcc gtccccagaa
 14281 tattggttgc ttaaagctgt gtatttcaga tctccagaca gtggtcactg tttgtatatt
 14341 ttcaatttca aaccagaaaa caaaagtctt tattgattac ttttttatt taaaaataa
 14401 aaagtaagta tcttcgtaag aggagctttg ttttaatttt aaagttaaa atttgattgt
 14461 gaagacagag aaaaacttga tgattgtaga tataattccc tctttggcta ttcaatcaga

[0229]

14521 gaactagaaa atcatgagag atttaatgac cactgcctga tacacatatg tgttttacag
 14581 atgaggaaac tgagaccag agagatgatg aaattggctg aggatggccc agctggtcag
 14641 tgaagactc agagccagag ctgggtcagg gctctttcta ttccttctctg ttcctttca
 14701 ggaacactca ccatcggtt tcctgtgaat aatgttgaga taaaatcctt ggtgcattat
 14761 gttttctagt cacaaactg actaggctgc cagagtcctc tgttctccca gttgggtggc
 14821 tgtagggtt ggcagccgcc aggagcattc tacagaacag aggaggagtg agactctcct
 14881 tgctcaggaa aggcagacct atgacttagc aaataactcc taagaggaga gtgtttcacc
 14941 caccattcct cttccttggc tgtggaggca acttagtgga gaggggccag atgacctgtg
 15001 aggaacagtg aagccctgcc taacacaatg tatggttgtc ttgttacaga gtcacagct
 15061 acgagtctg tcctggatat gaaaaggcc ctggggagaa gggctgtcca gcagggtaat
 15121 gaatcctccg ggccttgcct gttggtgtg gtggaaggga atggtgggag agaggagtac
 15181 ccacataaaa ggcagcagag tigtgatggg ggcagtgcca caaggacatg gcattctccc
 15241 cacgtgccca ctggccccag gctctatgag agggctgag gaatggaagc tggaaacagc
 15301 gcatttctg agtctctcct cctggcctcc ttaccacact ggtggagtga actccaactg
 15361 tggcctgtcc atgcccttcc cagcaggcac aggcctcagg tcaggctctt ggcctctgcc
 15421 tctggctggg agtgattcta aacacatcca gcagggtcag cctgatagcc catcagtttc
 15481 cgatcagctc tgctagagag ccgatgggat gtgggaggag ggggtcactg gtgggctggc
 15541 aacccaagc catccccttc tccctctgtg tctaaactg gcccttgga gttcggtagg
 15601 gagaagagcc ataggccagg tgggctcacc cagagtcagc agagagtccc acaaatggtt
 15661 gcaactggcg aaagcagca tggcacctgt gaattttatt agagcttttc ttttagtgct
 15721 acacacaagt gactgtacag gggagttagt atttgtttt aattttgaaa tagagtcac
 15781 ttttggatc tgcgggggat tgattctagg acccattcta ggatgccata tcctcagatg
 15841 ttcaagtccc tgatataaag tggatagta tttgcatgta atctatgcat attcttccat
 15901 gtactttaaa tcatctcaag attacttata atacaaaata taatgtaaat cctatgtaag
 15961 tagttgttat accctctttt aaattttgtt attatctttt attgtatttc aaaaaatatt
 16021 tttggtccat gtttagttga atctgtgggt gaagaacca cagatacga gggccaactg
 16081 tattggctat ttttttagtt aagaatgta gactgaggcc aggcagctg gctcatgctc
 16141 ttgattccag cactttggga gccaagagg ggcagatcac ctgagccaag aattcgagac
 16201 cagcagcccg tgcaacatag tgagacctg tctcttaaag attgtgagac tgggctgggc
 16261 acggtggctc acgcctgtaa tcttagcact ttgggaggcc aaggcagggt gatcaactga
 16321 ggtcaggagt ttgagatcag cctggctaac atagtgaac tctgtctcta ctaaaaatc
 16381 aaaaaatta gctgggtgtg gtggtggcg cctataatcc cagctactca ggaggctgag
 16441 gcaggagaaat cgctgtatc caggaggcgg aggttgcat gagctgagat agggccgttg
 16501 cactccagcc tgggcaagaa gagcaaaact ccatctcaaa aataaataaa taaataaata
 16561 aataaatcat gagactgaga cataacagga aggagggcaa ttgggttggg tccaaggttc
 16621 cttagatgat tgatgggaga ggttgggtcg ggtggggcca tggaggtact gactcaagtg
 16681 gagggacag tggggaatg gggatgggaaa agaagattga ccttagaagg ggagctcaac
 16741 ctctgaacc taatttcaga ccctcaaaa tgaatattaa gctcattttg gctcaagaaa
 16801 caaaaaacaa atgaacatga aactcatttt ggtcttataa ggtctgagaa accccttcta
 16861 aacttcaagc tgctttaaga aataacattt tattacctgc aaatacacac agtactttgg
 16921 agatttataa tagtctctta ttctaataga agccattagg gaaccagttt caataaacag
 16981 gtaaatctgt aagactagtt tgtaattagg atatctgttt ccaggtcca ttcctgcctc
 17041 tgttatctaa atgtctggga acaagagctg tgctctgctg tgtttaaagt gattaaaaat
 17101 caccaattag ttgagttcac gtagacaggg atttgactta ttgagttgtt ttaagaagac
 17161 tataacaagc cttaaagccc ccagaaaacag cctgtctttg ggctttccca catgcctcct
 17221 cgtcctctcc acctgtagat gtaccgtgct ctctgtcaga gaaggagggt tgtggttggg
 17281 ctggaccccc agagcccatc cctcctctg tcttctgctc ctgcagccct accactctca
 17341 aacctttacg agaccctggg agtcggttga tccaccacca ctcagctgta cacggaccgc
 17401 acggagaagc tgaggcctga gatggagggg cccggcagct tcaccatctt cgcccctagc
 17461 aacgaggcct gggcctcctt gccagctgtg agatgacctc cgtctgccc ggggactctt
 17521 atggggaact gccttacttc cccgagggggt gggcatgatg aatgggagtc tgcagtcatt
 17581 tcctactggt tcaggaagct ttctccttaa ccccttagaa aaggctgtgg aacttgagct
 17641 aaaatgatgc ttaccaggtt gcgtctaata cccccgttc cctactgggc agaaaagactt
 17701 ggggtccttc tgaggagggg tccttggcag aagagaggcc tgggctcacg agggctgaga
 17761 acatgtttcc cagagttgca aggacccatc tcttaaacac agagtctgca gccctaaact
 17821 gacaccctgt ccttctcctc aggaagtgtc ggactccctg gtcagcaatg tcaacattga
 17881 gctgtcfaat gccctccgct accatattgt gggcagggca gtcctgactg atgagctgaa
 17941 acacggcatg accctcaact ctatgtacca gaattccaac atccagatcc accactatcc
 18001 taatggggta ggggatcccc agccatactg catggccctt ggtgcataat gaaccattt
 18061 ctgttccatg tgtgggtggt tttctgggtt ttaagctgta gacaaccac cctctttgtg
 18121 cctgcttctc cttgggcccct ctattccaca gcttgtggaa cccacatttt gctactgtgt

[0230]

18181 ttgaaaacac tgttttctcc tcccggggct ttgggactat gcctctgttg tgttgactgc
 18241 tcatccttgc tgcttctctg ggcagattgt aactgtgaac tegtccccgc tgcetgaaagc
 18301 cgaccaccat gcaaccaacg ggggtgtgca cctcatcgat aaggtcatct ccaccatcac
 18361 caacaacatc cagcagatca ttgagatcga ggacaccttt gagacccttc gggtaaggga
 18421 ctgccctggg tggaggccca ggcttgggac acattgcctc ccaagagggg cctagcagga
 18481 actcttctgc aggagaggta gaggatggct cctgtagggg aacatagagc aggttcccct
 18541 gaatgccttt gaacatggag aattcattga ccagacattc agcttgacct aaactgtgaa
 18601 attctccatc ttcttataa agtgttcctt tccttgccct ccctggaaaag gtcagtgggtg
 18661 tgtggctgca gcagcacagt gtctctgag ccctggacct gcactgtggc tccagaggt
 18721 ggcagttccc acatggggta ctagaataaa tggcctatca ggctgtgtgt gctttgggat
 18781 cacatgtccc caccctagga ccctggttcc aaccatacgc atgttctctt ggagcccaga
 18841 acagcagaga agccaccagt gtggacacag aagtcaaggg tctgatttcc agcctggcctt
 18901 ctgactgctc tggggccgca ggaatacggg tccttcccc atgcccagca ggcatttgtc
 18961 ttacaactgg aggggaaggc atgttctctt tggcaaggac tgctcaggag gaagtggagg
 19021 caggtgccc tgtcagggtt tttgccttga tcaaggaga acttccctaac caaaaaggat
 19081 acaagtggga gtgagggcga ccctccctag agatctccaa cacagagaga caaacacgct
 19141 ggggctggct ggcactgaca ggctcgcag gtgtggatgg ctgttagctg ggagcttcgc
 19201 tgtctaagct cctctccctt gcttttcttc tgggttgctc gaaggacggg ggtctgcaag
 19261 aaaaatgatg tcccacatag ttggcagcac gtgaacagca attgatccct ttgcatcacc
 19321 tcctcttact gtttagattt ggtaaatatt tcttcttcc ctcttctgac cctccatttt
 19381 gccgatcttt ccttcttata acacatactt actaggtagc tgctacttcc cgggtgggccc
 19441 tatgtgccag gagtatagag gtgaacaagg aaggcaaggt tctattctca gtagagctaa
 19501 tactctatct ggagagagac acaaaacaaa tcaacaaggt agccaggggc tgtgataatt
 19561 tatgtcaagt gggcaggtaa atcgggagtg acagtagtgc agggaggatt ggaagtcag
 19621 ggagtctctc ctggaggagg tggcttttga tctgcagcct aaaggatgag aatgggtcca
 19681 ttatacaaaa tgcctgggca agagcacacc cagtagaggg gagagtaata gcaaggctc
 19741 agggcaggaa gggcaaggga gaggccagtg ggtgaggtca catgtgaagg gcatacaatg
 19801 ggcaaaagca agccagagat ggcagggccc aatcctccag gacttgcaga cctgggaaag
 19861 atgcatctcc catcctggga gcagcaggaa accactcagg cctttagaag atccttctgg
 19921 cagctgtgta gagaatgggt ggtgtgatcc tccatgcat gggctcatgt acgtgattac
 19981 cagtaactgt cgagtgcagc tgtgaggagg gctgcaagcc atgagtgtag gcacagcaga
 20041 cagactcacc tttgtctggc ggtgagatgg ggtgggaagt gtgccaaagt gacctccaa
 20101 agaaatgata ttttagtgga agaatagaata gaatcagaga agcaaaagta gagggaagag
 20161 cagagaggac agcagggaca aggacttggg ggcaggaaga ggaaggcag gtaaggaca
 20221 tgaagatgg ccaggctggc tggagctcag gccagcaag gccccctggg gccatggtc
 20281 atgggtgagc ttgggtttgg cttctgtttt cgtctgggc tctgtgaaa gcctcgacc
 20341 cttgctggga accagtgaa cctgtgtgac atcttctgtg gggagtcca gactctcag
 20401 ggagcactcc atcttctctc ctccccacag gctgctgtgg ctgcatcagg gctcaacacg
 20461 atgcttgaag gtaaccggca gtacacgctt ttggccccga ccaatgaggc ctcgagaag
 20521 atcccctagtg agacttga cctatcctg ggcgacccag aagccctgag aggtgagcat
 20581 cctttggctc ctgctgctgc ctcatgttg cagctagatt gagcccaaga cctgctctgg
 20641 tccaagatga acataaccac tgcctgagg tgaccctcag gatattccact gcagccatgg
 20701 gctggggtca tctgtctctg ttgcttcagc taaccgtgtc tctagcagcc aactactct
 20761 gagggtgctg tacagaatcc agcagctttt gtctgggaga gctggactga agagaggcat
 20821 agctggagac ccatagctgg ccctggccag aaacagggag agtgaaaggc tggaaatagc
 20881 aaggccagag caaggcta at aggtagagca acagcttaca ggtgtggggg tggcagatac
 20941 tggcaccctt gaaatggatt cctcatgccc acgcttca atcttctct gtggctaggg
 21001 gatttatgga taaaccaaaa ttacagttaa aaaccagcca taggccaggc acagtgactc
 21061 acgctttaa tatcagcact ttgggaggac aaggtggcg gatcacctga gatctggaat
 21121 ttgagaccag cctggccaac atggcgaac cccatctcta ctaaaaatc aaaaattagc
 21181 tggcatgggt ggtggccacc tghtaatccca gttactcagg gctgaggca ggagaaccac
 21241 ttgaaccag gagggtggag ttgcagtgag ccaagcttgc accactgcac tccagcctgg
 21301 gtgacacagc gacactccgt ctcaagaaaa aaaaaaaaaa aaacagttat agtagtcaac
 21361 ttttgactct ccatttcaga tttcgtcatg ccctcctcaa tgagctgcta agttaggcag
 21421 tgcattgatt attgctgcag gagagggaa gaaggagcta acgtgttttc acatgttttc
 21481 cttttggaga tgagaaagga ggactctgcc ttccccctac cctgcccct tctactccag
 21541 gacctctgaa aggccaatgag cacaaagctg ctgctgagt cccctgaaat gcagggtacg
 21601 cccaggtct ctgatgtacc ccaccacact tttctctca aacatattcc aggatcactt
 21661 gatttctttt gaactatatt aaaccaccg tgtcaatgtg ctatataaaa tgtctaagc
 21721 atttcagaca ccctatacat ctatacattt aaagtgttct ccttctatct gtgcaggat
 21781 gggaaagggc atatttctga aagcacagat gggaaagcgg gatttgttcc gtgtccagg

[0231]

21841 gattatggtta cctctatgcg cctggccggc actggggaca gaggccatga aaatgaatac
 21901 agcacagcct ttgcctccaa gaaacttaag acctagtaga aatggcaggc tttaaaacag
 21961 gttgttggga tctgattttg tgagtgaat gacagagata ctcacagcac aaaatgggga
 22021 atgagggcgg gcattgggac acacatagcc ttaaggggccc caaaggcttt tagaactgta
 22081 ttccctatta aaacatgatt tgacacagagc acattccttg ctttggagac ctcagaactc
 22141 cttactatag gccgggcatg gttataatcc cagcactttg ggaagccaag gcgggagat
 22201 cacttgaggg tgagagtcca agaccagcct ggccaacatg gtaaaacccc gtctctacta
 22261 aaaatacaaaa aattagctgg gtgtggtggt ggccacctgt aatcccagct actcaggagg
 22321 ctgaggttag agaatcactt gaacctggga ggcagaagt gcaataagcc cagatcatgc
 22381 cactgcactc cagcctgggg aacaaaagcta gactctctca aaagaaaaaa acaaaaacaaa
 22441 acaaaaacaaa acaaaaacaaa ctccctatta taaactgtaa gaaaaaaaag gccctactt
 22501 cgtccctttt gcaaatctgc cttttctac tcaactaacca gctggttcag agcaaggaca
 22561 ctctgtttgg tgccatcgct gcagactgga aggaagaggt ccttgcccca caccacaacag
 22621 tctctgtctg ttaccggcag gttggcaggg aggcaggcga gaagcagcca gggctggtgg
 22681 tgtgtccagt ttgaaacta gtttccagcc ctggccctgc tcaccctcca agtggccctg
 22741 gcaggttccct ctaccacatc gtggacttca ccttccctct ctagaagct caatccccaa
 22801 ggcctcatc ccataggcct tctcaccctt tttctttccc tctggctgaa tgtggccagc
 22861 acgggcttcc aaggccatca actcgtctgc agcagcccca tgcttgcag gccctcagag
 22921 cttctctctg cctatgacag tgtggtttg gttccacac ttgggatcag attgaaactc
 22981 gcctccgtgg tgagaatatg ggacatagag cctcggtgac ctgggtgagc agcagtcag
 23041 gccacctggc cagcctgggg ttgggggggg ctccctctcc ttgactggtc cttgactttg
 23101 cctccatcca gcctgtctgg gctctccgag gcaatggaga ccagcaggag tcacgatggg
 23161 tcaggagccc cctttggggc tcagccctgc cctgccccct aaagtagcac ttggataagc
 23221 aaataaatta ttatacttac tatttatggg tgtggtgat gggatggcaa aggccaaagtc
 23281 ttactgatca ccaaacctta agatataatc tggcagctag tagacccttg ggctaaatga
 23341 acagaaaact ggacaaaata agtgtacaca aataactcaa agctgtcatt tgtacacttt
 23401 tcgtcttttc ctactacagt ttacattttt ataaaggtga gtatattctt aaaatcccgt
 23461 ggtaggctct cttgagtttt tcttgatcc ctgaaagtca gctacaataa agtcaatcac
 23521 taacatttgt tgagcattta ctctgttgc aggcctctg ccgagtgtt taggttcaga
 23581 atttcatgtc atccccacag cagccctagg agatgaatgc aattcttatg tccactgac
 23641 tgataaggaa gtgaggttc aaagaggcta aatgactctc ccagggtccc acagctggaa
 23701 ggtggccaca gggccccagc tggttttcta gggcagcagg cagaaggcga ggagatctg
 23761 ggcctctgtg tgcccagacc tcactctgag gtcctcatct gagagaacag gatcctcaca
 23821 gcatgggagc gctgcaagtg gtcctgagg ttatcgtgga gtggaccctg acttgaccctg
 23881 agtctgtttg gacccagacc ctgctgaaca accacatctt gaagtcagct atgtgtgctg
 23941 aagccatcgt tgcggggctg tctgtagaga cctcggaggg cagcagactg gaggtgggct
 24001 gcagcgggga catgtctcact atcaacggga aggcgatcat ctccaataaa gacatcctag
 24061 ccaccaacgg ggtgatccac tacattgatg agctactcat cccagactca ggtaggccag
 24121 gcctccgggg gccttgggcc tgccctggcc accatctctt ctgccatcct ttgtggcggg
 24181 ggaggggaaa ttcagagatc tttggggcag tccctgcctt ggaccagct cacagcttct
 24241 cggccactgc aaatgtgtgg gttgtgacca gactgatgtg tcttgagctt caggcttgca
 24301 agtgagctgg agaggcagtg gggagctatt gaaggggtct ggggacagac tcaatcacag
 24361 aggcctttca gaagatctgc ctgctgtgca tgggcaaaag gggccacttg ctgacctcag
 24421 agcatgtgct ttctcagtag tgcccaagct gtcccattgt cactgaccca gttagaatga
 24481 ctgaatggac tttgcttgg gtctcattag gaatcctagc cccattctag tcttccagtg
 24541 agatctgtcc atgagtgaag gaatctcaca ggaaaaaaca aaatgcttct atgggtgtgg
 24601 ttgctggcct tatctacacc acagaagcca tcacacagac tgtctttctt cccatgttta
 24661 gaatgtgccc tgaccaagca gccacaggg cctgggacag aggtgatct ctgcctaaact
 24721 gagctcactc ctccctccctc tcctcctgac tgggttagatt ttctaggtga ctgttcccct
 24781 gatgacacaa gcccgctggg ccccagcagt gtttagaggg gttgttgact cacgagatga
 24841 cattcctgct gatgtgtgtc atgcccctgg gtggatgaat gataaatgaa aacagcgctt
 24901 ttaacttttg aaccactttt ctccctcctt gttagcaga cactatttga attggctgca
 24961 gagtctgatg tgtccacagc cattgacctt ttcagacaag ccggcctcgg caatcatctc
 25021 tctggaagtg agcgggtgac cctcctggct cccctgaatt ctgtattcaa aggtaacatg
 25081 gggaaggcat cctgtttaga ttgtccctgg aggcagcttc cccaccctg tcacctccac
 25141 aacactctcc gatttacagc accccatggg acattagaac ttccactcag ctcaacaaa
 25201 agcagatgtg acttcagcag aaacttcaga ggctctgttg tttcattagg cagtcagag
 25261 aatgcctttg gggagccggt cctcagaact caagacttga catctgggag gcagccgctc
 25321 ctcagaactc aagacttgac atctgggaga gcagagcatt cccttgctt tctatttgca
 25381 gggctcactg ccaatgtata gtcaagaggt cagagtgagg gtacagctga gctgcagccc
 25441 caggaaggca gagaaggggg ccaagttgtg tgcgtgctg cccttccctc ttagggcaaa

[0232]

25501 actccaaaca cccttgatta tctggatctt cttaattct ccatagaaga taccagatgt
 25561 taaggaatat tggcagcttc acttggtttc tcaatccctg ttcccaaact caaggagga
 25621 tgggcttttt cactgtatth atctctctac actctcttca ttgcaggagc acatctctct
 25681 ggaccctaacc atcacccttt cttgtagatg gaaccctcc aattgatgac catacaagga
 25741 atttgcttcg gaaccacata ataaagacc agctggcctc taagtatctg taccatggac
 25801 agaccctgga aactctgggc ggcaaaaaac tgagagtttt tgtttatcgt aatgtaagtt
 25861 ctgggctcta aatcatgctc ctgggaagct ccttactgtg ggacttgtat tagtataaaa
 25921 aaaaatgtcc tcaataagca ggagtttgca tgagaactgg ttgctgacaa ggaaggaaat
 25981 aatttctgga aaatatagat aacaaaaatga gatcctgcag aaggattgga atctcttttt
 26041 ctggaggcct ttgagaataa accacacaat tatccaacct gtattgtgaa ggaataagtc
 26101 cttcttgaat tcaggaatta acacctggga ggaggatgg agttcagact ctttctgagc
 26161 ttatgagaag agaagcccc taaactaaaa tacagcctc cttgggtccaa aaggtgcctt
 26221 ctctcttctg ctgtatcttc tttgttttca aaccacacag ttaccctgga aatcaaaaag
 26281 gaagtacaac tcaacatagc tcttgccctg gaccaaccag caccatttgg ctaaagatgg
 26341 ttatcatctg ttaaacaaaag aaataaataa atgggttcaa cgtatttatt tcaacattgt
 26401 caatggacct catgtgtaac tgatattctc attatgggac ctctgtgtga ctttattggg
 26461 gcctctctaa ccgttctttc cttaaaggaag accatttatt gttttatttc ctggagaaaa
 26521 tacatcattt tatcccagcc ttaataaacc atocagtgat atactccttc atcttcatgg
 26581 ataatgaccc tgtacatgct tctgaacaaa tcaggaggcc cctcgtggaa gtataaccag
 26641 tcctttcttt ctctgtccct cttctgtgca gagcctctgc attgagaaca gctgcatccc
 26701 ggcccacgac aagaggggga ggtacgggac cctgttcacg atggaccggg tegtgacccc
 26761 cccaatgggg actgtcatgg atgtcctgaa gggagacaat gcctttaggt aatagtctc
 26821 atccccgggt ggagctctctg cccagtggtc atgctggagt gggatgtggg gccccagcta
 26881 tttgtcaagc tttcttctac cttggggatt caattaacac tagcagtgca ctgctgcgac
 26941 cttccagact tgggatggg aaaaggcaag ggtgccttg aaagcttaca ttgggaagaa
 27001 gggttacttc taagagtga atcttccat gcattgggag cagggggggg ggactacatt
 27061 tttatgactg aagtgcagg aaaacatcac cctctcattg taaagctcca agtgagccaa
 27121 gagcacatag tttacagtgc acgatgagcc tctcactctc tgcgcagtat ctgtttattg
 27181 caactgaagc acccttgtga gtttgttttc ttgcccggct atctccattt ctgacttgct
 27241 cattcacctt ggggtgtctg catattgaaat gttccctgt cactgacttc agcccactgc
 27301 acaagggctt ggagaccaca cccctctgcc ctcccagaat catatccctg gaggctcagc
 27361 tagtctctgg gtcagccata cctctgccct tcctttccc tcctttctcc tgtggcctc
 27421 gacgtctggc catttaacag agcttagcat tttgtctggg tggagagagc tggagcctgg
 27481 aatcactccc tctttgtgca tacggagggc atgaaaacca aggtgtgtgc attccagtg
 27541 cctggactct actatcctca gtgtgaggt atttaaggaa aatacctctc agcgtggtga
 27601 ggtatttaag gaaaatacct gttgacaggt gacattttct gtgtgtgtat ctacagcatg
 27661 ctggtagctg ccatccagtc tgcaggactg acggagacc tcaaccggga aggagtctac
 27721 acagcttttg ctcccacaaa tgaagccttc cgagcctgc caccaagaga acggagcaga
 27781 ctcttgggta aaagcaact taagtacacg tctccatttt tctaaagtag tgatccctca
 27841 gggcccagc agcaaacagt tggcacatca aggattgact tgaaggatt ttatgacaag
 27901 actattagtg aaagagtgg cgggactaaa ggaactagca aaggatgagg ccaaccaggg
 27961 actagcaacc ctgggaagcc tttactacc ctaggcctgg gggaatggga ggatgagagc
 28021 aggaaccagg gaggtcatga gccttgaca agggcacaga acagcagcca gagccatgtg
 28081 cagccagcca ctgtcagaac catgcaagg ggaccactca gcgccccagc ctcccctca
 28141 gacagttgct atctggctct cttgttggt gatgagagag caggagggag cccactgatg
 28201 cagttcatag agctcagcct cctgggcagg aaaccgggca gagaggagta gaaaagaatt
 28261 aagggtggct ggcaccagcc cagtcactga ggcacgtttc ccaactggaga cctatgagca
 28321 cagtgataat aaagccagt acctgcactg actatccctc cagacaaaag ctttcccaag
 28381 aagtttagtca tggctctgag agatctagtt gaggatgttt ggcaggggat ctagtgggta
 28441 cgggtggcta agaaaaatga ggaagtaag agtatcttgc agcctgtgtt gggagatta
 28501 aataggatgc cacacacag gccaggcaga cagcctggct agtaatagcc atgacgatgg
 28561 gggcgggggg agcaggaatg ggagttgcag tgtttagctc agatgcatgc ctgtgagaga
 28621 tgcttccact ctacagaaa gatgagacca aggaaaagga ggaggaagag gaaggacctt
 28681 gacaaacctt gggggccaca ttgtctacac ctccctctct gctctagagc agaatagaaa
 28741 gttcaggttg caggcagctc taagttgaat tcgtgtcctg ttaattttc ttattgcta
 28801 aatgaatgcc tgtgtctgtg atgctgacgt atgttcttaa ggagagggga gaagttcatt
 28861 ctgaacataa actttctatc ctctctctgt ccagcaagaa ttggaatatt cccaagtggc
 28921 ctgagccagc ttggctttct tttgttttc aattatgtgg gaggttgagga ggggatggg
 28981 aaaagcttcc caaacacacc ctccccagg cctgaggcac ccctggggga cagagatgtg
 29041 tagaggttgg tacaggtgtt agagatattg aaaggacatc ccatgcaccc caggggctgg
 29101 tgtggtctct tacttccagg caatattttg tgaaggggga accttctcag ctccaggtt

[0233]

29161 tggatggttg aaaatcagtt ggtaccacgt ggctccatcc tctggcaggc atgtggattt
 29221 gtcaataacc aagtgaactc tccaaaataa gttaaaactt cctcccttct cagtttcaag
 29281 atgctggaat tagctgttca taagccctgg ggaaattag ccttttggtt ggtaatggga
 29341 gtatccgaga tgagagggca gctggaactc ttcggaatga cctcccacac ttaatttggg
 29401 aaatgcctct gcacctttat gggcaaccag atgcctgccc cagttgctgg agacactgat
 29461 gtgggctgaa agaatgctg agacgtgacg aggagagatg ctgaggaggg aatatcccc
 29521 tcagccctga cctcatcgcc tccatggctc ctcccacagta cagctgtcta ctcttttaag
 29581 ttctcccttc aggaatagc catctcaaac agaatgtgca tttgagggca gaatgtgtaa
 29641 atattgcaact actgtgttat aaccgtcagg agccatgctg atgatgaaac gtcccagatg
 29701 cccgtgctgg aaagtgccct ggctttccaa gcaaatattt atctcatgga aacatgagtc
 29761 atactcacag aggagtatgg attaactcct tctcagcagc cagggagccc agcatcccag
 29821 acagcatatt taaccagag gccaactgac tgctggggca gatttgggtt catgaacatg
 29881 tgctttgtgt cctctgacca ttagacagat tgggggtcac aacgttgagt atacagtggg
 29941 agcttaataa gtgcttattc cctgggaggc gagttcttca tttcaggggt gaccacttac
 30001 atcttctcct ctgggcccct cttgaccagg ctaattacca ttcttgggat taactctatc
 30061 tccttttccc gcaacctgca ggagatgcca aggaacttgc caacatcctg aaataccaca
 30121 ttggtgatga aatcctggtt agcggaggca tccggggcct ggtgaggcta aagtctctcc
 30181 aaggtgacaa gctggaagt agcttggtta gtgtcctgca aatcaaaggc tggctaattt
 30241 tccccaggc agggctccag gacatctctc acccccagga ttgaattata cacacacaac
 30301 cttaagttg cagccogaat ctctgagtgt aattcgtcca aagaaaaaga gaaaagagaa
 30361 gagggtcttc agggaaatca agtgagatca tagttagaca tgagtaagaa cttccagatt
 30421 tacaagggaa tagagcatg gatttggcat ctgagagagc ctattagatc ttccttctct
 30481 taaggaggtt gtaggcaact agttatgtga ctgaagagat cagtctgtac tcacaccatc
 30541 ccacccccca accccagggc ttcactgagt tgtaccatga accagaccat cccagaggc
 30601 tttttgagtt atgcacactg ctctgtgagc ctcccttgc cttgacattt gatgatataa
 30661 ctttgaact gcaactaagag tgttctctaa gcagatagcc agccgagctc cagaatctc
 30721 cctggctgca cctgcaagg cccactgacc ctctgtggag ggaccgctct tcagtgtgtg
 30781 gctggcttct actctctgct cctctctctt ggtctctcag catccattgc tcaccagttt
 30841 ctacagagga gcataggaat atatgcatgt agggaggtag gcacgggggt gactgttttg
 30901 actttagcag gtcattcaag aatctcctcg cacctgggtt cagatgctgg ggtcctgtct
 30961 gtcacaggct tctgtgcctc ctaccccctt gagtttgc caatggccctt caggaaggcc
 31021 tgagatagat ttgcccctgg ttggcctcct atgagaaaaat cttaagttag gcaccaggc
 31081 aaaatggaaa gaggcctttt cccagagcag gaagcctgtc ttccatttcc agctgttcca
 31141 cctacttagc ttaaaagagg cacttcgctt gtcttcagtc tcagtctcag tctcctcttc
 31201 ttgggaatgg gacaataata tctactctcc ttatcataca ctgctgtgag cagtgtgtgg
 31261 atcacacaaa aaagcattat gtaaatgca aagtgtctaa tccacacagg agatttgaat
 31321 taatccacca cactgaaggt ctgtcaaggg cagggactgt ttcattcacc agagtatccc
 31381 cagtctaaca caggacttgg catatgaaaa gtgttcagta ggcggggtgc agtggctcat
 31441 gcctgtaatc ccagacttct gggaggccaa agtgggaggc tcatctgagg tcaggagttc
 31501 aagtcacaggc tggccaacgt ggtgaaacca catctctact aaaaatacaa aattagctgg
 31561 gcgtgggtgg acatgcctgt aatcacagct actctggagg ctgaggcagg agaatcactt
 31621 gaaccaggga ggcggagggtt gcagtgtgct gagatcatgc cactgcaact cagcctgggc
 31681 gacaagattg aaactccatc tcaaaaacaa agaacaagga aaaaaacgaa aactgttcag
 31741 taaacacttg ctgaatgaat aaaaataata tataaatgta taaataaatg ctctactttc
 31801 aaccactact ctgtttttct tttagaaaaa caatgtgggt agtgtcaaca aggagcctgt
 31861 tgccgagcct gacatcatgg ccacaaatgg cgtggtccat gtcacacca atgttctgca
 31921 gcctccagggt aagtgtcgca tcccactgca ctctgcagcc agtccctttc ttcattgtggc
 31981 agttgggtgga gagaagaaaa actgttctaa acaatgatga gaataacatg taattgtgat
 32041 agttaaactg tgcctatgtg actgattgca gagtgaattg ggagctgttg gttttgaatg
 32101 caccacacta agaatgtgga ggacacattg ctctttgagg agttgcccag ctatattagc
 32161 tcccctggga cacagcccag ttttctgtat tcgctgggat gctgtccgcy cgattcccag
 32221 cactcctctt acagcatctc acctcagtgat atgttcttgg cctccagtg cagttgaacct
 32281 cagtcctgct tctcctcatg tgtgcattca ctttcttgg tgctctctcc ccatgggcca
 32341 agttctacca tgagttatga aacattatgg agaaaaatg tctttggaaa tgtgagccag
 32401 aaagcccacc agtgcccctc agtcacggtt gttatgaatg acatgctaat ggtttcactc
 32461 tggtaaaacc tgccctttct ttcctcttca gccaacagac ctcaggaaaag aggggatgaa
 32521 cttgcagact ctgctcttga gatcttcaaa caagcatcag cgttttccag ggtaagatgc
 32581 ctgctagggt tgccctctagc ctgagcagcc tcaggtcctc tgtttgggccc atagaggagc
 32641 ctctccagcc cctgtcttcc ttggctgctc cccagggctc tcttaaaact tctcccact
 32701 cccactgagg catcctcagc cccagcctgt gtcaaattca gaggtaagaa ccaaggcaac
 32761 tccctggctt tcatgggcca aagcgcaggc tttcacaccg aggcctctga gcctcagatc

[0234]

32821 atgggggaagt cactgctgga gagaacagac atagctctgg aagccatctg cccaagaggg
 32881 cagcccatcc caagttcatc ttacagtggc caggcctgcc ctgagccggg gcctctgggt
 32941 cactcttctg ctgtccatgg cattgcccac cctgggtgag gctggggctc tcctggggac
 33001 tgtatgtatt ctggatacag ggatactggg ctgctatgt gtgtggagcc atcccctcct
 33061 tgccccagcc ccacctccct ctcaaacctc ctctggctct tctgagctt cctttcctgc
 33121 tccccagctt gcccagtgct cagtggccca cttggctctt ttgctacttc gggtcaggtg
 33181 gagcctcttg ggaatgtgaa gtgccttaca gaaagattgc acttcaagag gagaggctgc
 33241 agggagccat cctaaccaca gaggcctgga gcttactgtg tcactttact tttgtacaca
 33301 ggggtctcct tagtgccctc gagaaggatt cttggccctg agcttctact cctgaggcca
 33361 cctctgtgca gcccagctc cctcaactct aggctgtagt ctgagtgga aagcctggct
 33421 tgggggtctc ctaggaatgt ccacctgaag gcacacttga taggggcttg cacaaactat
 33481 gtctgccaag gccacctgag gaactcctg gtgcctataa gttccacctt cccttctctc
 33541 ttctcgccc cagcattttt tctgagtagg ggtggcaatg ggcaagcca ttgtcataag
 33601 cagttgcagg tataactttc actagaaaac ctgacacctt gtgttttctt tcaggcttcc
 33661 cacaggtctg tgcgactagg tgagtctggt ctgggttga agtcattgca gacctgtta
 33721 ggccttacc ccaagcaaga ccaagcctgc catctgctgt atatagataa gaacatcatg
 33781 gtgcagtaaa agaagcctgg cctttggagt cagaacagca gggtgacttg gggtcagacc
 33841 cagagcacc catttcctc tctgtaagat gaggataata agagtaacaa ccttttaggg
 33901 ttaaggtgag ttttcagctt aggaagtctg ggaatatgca aaagggcttg gcaggaacc
 33961 atggtgagga tctagtcca agttgatagg tacagaaaac cagaacatcg ggccttgagt
 34021 aaagagttaa gtttcacaaa ccacaaagca cctgctatgt gcaggagagc atggcagaag
 34081 gaggtgctt ggcctggtc cttgagattc tgacagtgtc ctgacagac atggggagat
 34141 ctgcacctat ttgacgttac caactctct ttttcagccc ctgtctatca aaagtatta
 34201 gagaggatga agcattagct tgaagcacta caggaggaaat gcaccacgac agctctccgc
 34261 caatttctct cagatttcca cagagactgt ttgaatggtt tcaaaaccaa gtatcacact
 34321 ttaatgtaca tgggccgac cataatgaga tgtgagcctt gtgcatgtgg gggaggagg
 34381 agagagatgt actttttaa tcatgttccc cctaaacatg gctgttaacc cactgcatgc
 34441 agaaacttg atgtcactgc ctgacattca cttccagaga ggacctatcc caaatgtgga
 34501 attgactgcc tatgccaagt cctggaaaaa ggagcttcag tatttgggg ctcataaaac
 34561 atgaatcaag caatccagcc tcatgggaag tctctggaca gttttgtaa agccttgca
 34621 cagctggaga aatggcatca ttataagcta tgagtgaaa tgttctgtca aatgtgtctc
 34681 acatctacac gtggcttga ggctttatg ggccttctc caggtagaaa agaaatggta
 34741 ttagagctt agatttcctc attgtgacag agccatggtg tgtttgtaat aataaaacca
 34801 aagaaacata

TGFβ1 유전자 단백질 생성물 (βIG-H3 단백질 서열 ; NCBI 참조 번호

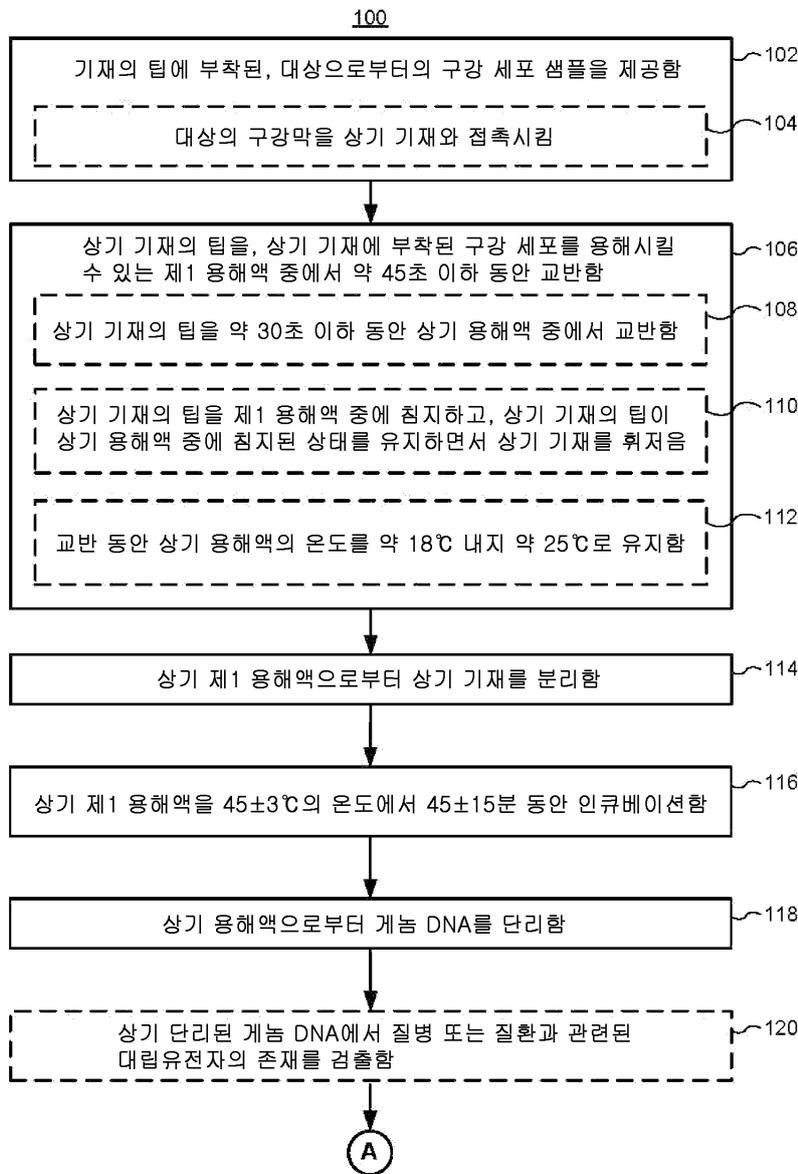
NG 012646.1):

MALFVRLALALALALGPAATLAGPAKSPYQLVQLQHSRLRGRQH
 GPNVCAVQKVIGTNRKYFTNCKQWYQRKICGKSTVISYECCPGYEKVPGEKGCPPALP
 LSNLYETLGVVSTTTQLYTDREKLRPEMEGPGSFTIFAPSNEAWASLPAEVLDSL
 SNVNIPELLNALRYHMVGRVLTDELKHGMTLTSMYQNSNIQIHYPNGIVTVNCARLL
 KADHATNGVVHLIDKVIISTITNNIQIIEIEDTFETLRAAVAASGLNTMLEGNGQYT
 LLAPTNEAFEKIPSETLNRILGDPEALRDLNNHILKSAMCAEAIVAGLSVETLEGTT
 LEVGCSDMLTINGKAIISNKDILATNGVIHYIDELIIPDSAKTLFELAAESDVSTAI
 DLFRQAGLGNHLSGSERLTLLAPLNSVFKDGTPPIDAHTRNLLRNHIKQQLASKYLY
 HGQTLETLGKKLRVYVRNSLCIENSCIAAHDKRGRYGTLFMTMDRVLTPEMGTVM
 LKGDNRFSMLVAAIQSAGLTETLNREGVYTVFAPTNEAFRALPPRERSRLLDGAKELA
 NILKYHIGDEILVSGGIGALVRLKSLQGDKLEVSLKNNVVSVNKEPVAEPDIMATNGV
 VHVITNVLQPPANRPQERGDELADSALEIFKQASAFSRASQRSVRLAPVYQKLLERMK
 H

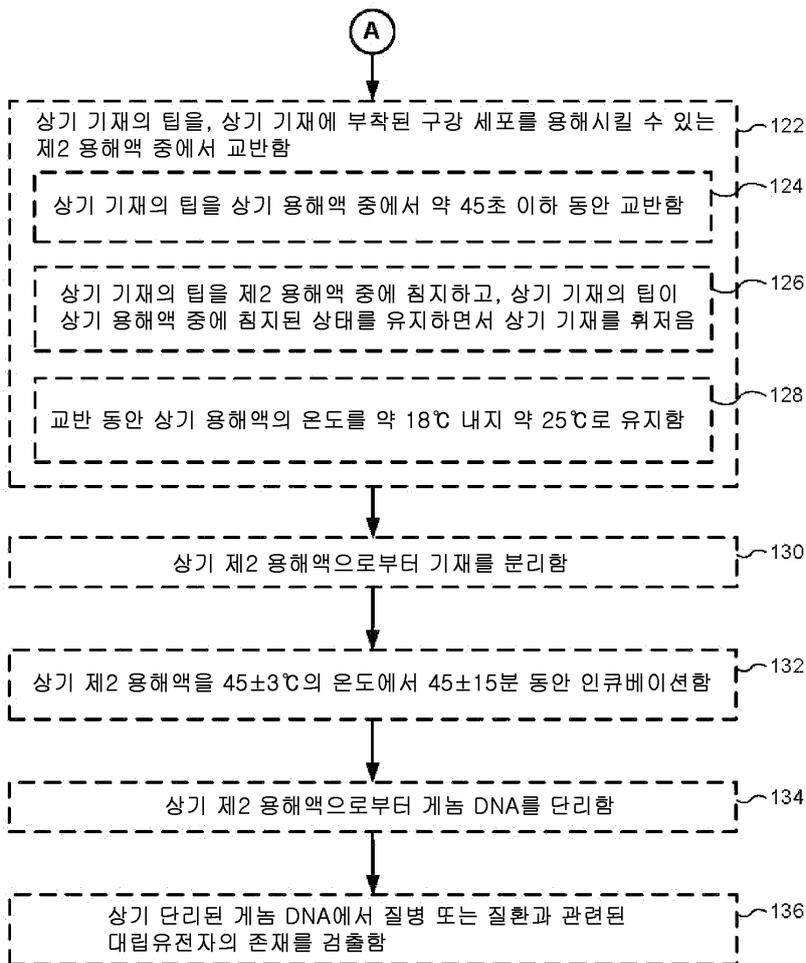
[0235]

도면

도면1a



도면1b



도면2

ACD Fw 프라이머: (서열번호 1) 5'-TCC ACC ACC ACT CAG CTG TA	ACD Fw5 프라이머: (서열번호 13) 5'-TTT GGG CTT TCC CAC ATG C
ACD Re 프라이머: (서열번호 2) 5'-CCA TCT CAG GCC TCA GCT T (60 bp)	ACD Re5 프라이머: (서열번호 14) 5'-GGC AGA CGG AGG TCA TCT CA
AV Fw 프라이머: (서열번호 3) 5'-TGC AGC CCT ACC ACT CTC AA	ACD Fw6 프라이머: (서열번호 15) 5'-GTA GTA CCG TGC TCT CTG
AV Re 프라이머: (서열번호 4) 5'-AGG CCT CGT TGC TAG G (150 bp)	ACD Re6 프라이머: (서열번호 16) 5'-AGT TCC CCA TAA GAA TCC CCC
Real Fw 프라이머: (서열번호 5) 5'-TAG TCT CTT ATT CTA ATA GA	ACD Fw7 프라이머: (서열번호 17) 5'-GGC TGG ACC CCC AGA GG
Real Re 프라이머: (서열번호 6) 5'-GCT GCA GAC TCT GTG TTT AA (860 bp)	ACD Re7 프라이머: (서열번호 18) 5'-ACC CCT CGG GGA AGT AAG G
ACD Fw2 프라이머: (서열번호 7) 5'-CCA TCC CTC CTT CTG TCT TCT G	ACD Fw8 프라이머: (서열번호 19) 5'-AAC CTT TAC GAG ACC CTG GGA
ACD Re2 프라이머: (서열번호 8) 5'-CGG GCC CCT CCA TCT C (140 bp)	ACD Re8 프라이머: (서열번호 20) 5'-GAC TCC CAT CCA TCA TGC CC
ACD Fw3 프라이머: (서열번호 9) 5'-CAG AGA AGG GAG GGT GTG GTT	ACD Fw9 프라이머: (서열번호 21) 5'-AGT CGT TGG ATC CAC CAC CA
ACD Re3 프라이머: (서열번호 10) 5'-GGG CGA AGA TGG TGA AGC T (190 bp)	ACD Re9 프라이머: (서열번호 22) 5'-GAC GTC ATT TCC TAC TGT TTC AGG
ACD Fw4 프라이머: (서열번호 11) 5'-TCC TCG TCC TCT CCA CCT GTA	ACD Fw10 프라이머: (서열번호 23) 5'-CCC CCC AGA AAC AGC CTG
ACD Re4 프라이머: (서열번호 12) 5'-AGC TGG CAA GGA GGC CC	ACD Re10 프라이머: (서열번호 24) 5'-TTC TAA GGG GTT AAG GAG AAA GCT T

도면3

<p>정상 프로브 1: (서열번호 25) VIC-CAC GGA CCG CAC GGA-NFQ (15 bp)</p>	<p>정상 프로브 5: (서열번호 33) VIC-CTG TAC ACG GAC CGC ACG GAG-NFQ</p>
<p>돌연변이 프로브 1: (서열번호 26) FAM-CAC GGA CCA CAC GGA-NFQ</p>	<p>돌연변이 프로브 5: (서열번호 34) FAM-CTG TAC ACG GAC CAC ACG GAG-NFQ (21 bp)</p>
<p>정상 프로브 2: (서열번호 27) VIC-ACA CGG ACC GCA CG-NFQ</p>	<p>정상 프로브 6: (서열번호 35) VIC-GCT GTA CAC GGA CCG CAC GGA GAA-NFQ</p>
<p>돌연변이 프로브 2: (서열번호 28) FAM-ACA CGG ACC ACA CG-NFQ (14 bp)</p>	<p>돌연변이 프로브 6: (서열번호 36) FAM-GCT GTA CAC GGA CCA CAC GGA GAA-NFQ</p>
<p>정상 프로브 3: (서열번호 29) VIC-TAC ACG GAC CGC A-NFQ</p>	<p>정상 프로브 7: (서열번호 37) VIC-ACC GCA CGG AGA AGC-NFQ</p>
<p>돌연변이 프로브 3: (서열번호 30) FAM-TAC ACG GAC CAC A-NFQ (13 bp)</p>	<p>돌연변이 프로브 7: (서열번호 38) FAM-ACC ACA CGG AGA AGC-NFQ</p>
<p>정상 프로브 4: (서열번호 31) VIC-CTG TAC ACG GAC CGC ACG-NFQ</p>	<p>정상 프로브 8: (서열번호 39) VIC-ACC GCA CGG AGA AGC TGA GGC-NFQ</p>
<p>돌연변이 프로브 4: (서열번호 32) FAM-CTG TAC ACG GAC CAC ACG-NFQ (18 bp)</p>	<p>돌연변이 프로브 8: (서열번호 40) FAM-ACC ACA CGG AGA AGC TGA GGC-NFQ</p>
	<p>정상 프로브 8: (서열번호 41) VIC-ACC GCA CGG AGA AGC TGA GGC CTG-NFQ</p>
	<p>돌연변이 프로브 8: (서열번호 42) FAM-ACC ACA CGG AGA AGC TGA GGC CTG-NFQ</p>

도면4

TaqMan MGB 프로브

#TGFBI R124N VIC-CAC GGA CCG CAC GGA- MGB NFQ
 #TGFBI R124H FAM-CAC GGA CCA CAC GGA- MGB NFQ
 #TGFBI R124C FAM-CAC GGA CTG CAC GGA- MGB NFQ
 #TGFBI R124L FAM-CAC GGA CCT CAC GGA- MGB NFQ

#TGFBI R555N VIC-CAC CAA GAG AAC GGA-MGB NFQ
 #TGFBI R555W FAM-CAC CAA GAG AAT GG-MGB NFQ
 #TGFBI R555Q-1 FAM-AC CAA GAG AAC AGA G-MGB NFQ

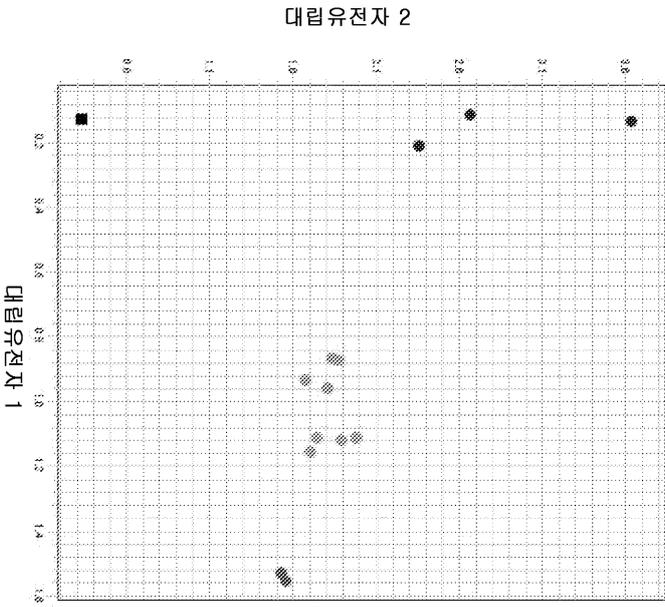
서열 검출 프라이머

#TGFBI 124 F TCC ACC ACC ACT CAG CTG TA
 #TGFBI 124 R CCA TCT CAG GCC TCA GCT T

#TGFBI 555 F ACA CAG TCT TTG CTC CCA CAA A
 #TGFBI 555 R ACT TAA GTT GGT CTT TAC CCA AGA GTC T

DATA A >> LifeTech/7500FAST; 고속 모드

대립유전자 식별 플롯

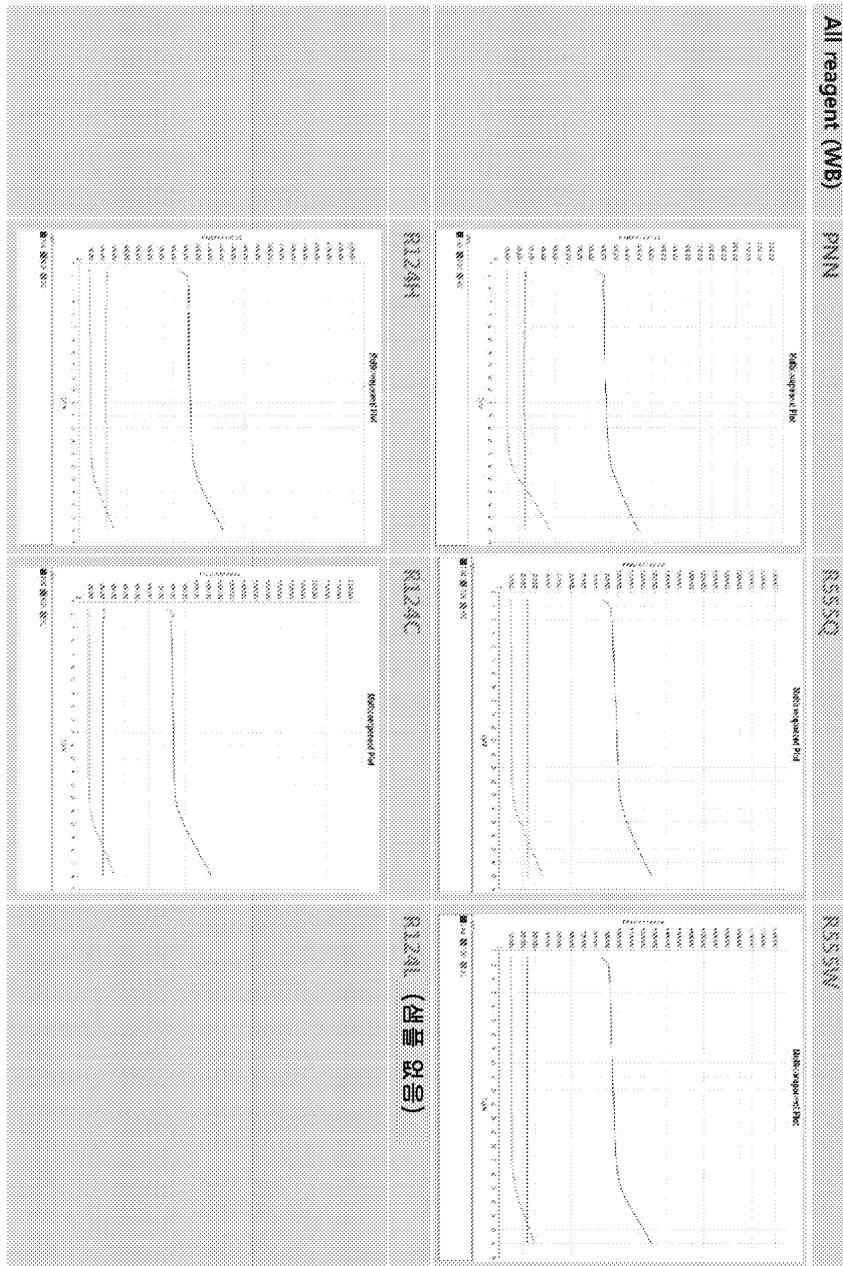


All reagent extract (전혈)					
GTX 프레스 타그		3.00	nl		
프라이머(124R)	10pmol	10.00	nl		
프라이머(124F)	10pmol	0.50	nl		
프라이머(555R)	10pmol	0.50	nl		
프라이머(555F)	10pmol	0.50	nl		
프로브 (NL/VIC)	10pmol	0.20	nl		
프로브 (R124H/FAM)	10pmol	0.40	nl		
프로브 (R124C/FAM)	10pmol	0.20	nl		
프로브 (R124L/FAM)	10pmol	0.60	nl		
프로브 (R555N/VIC)	10pmol	0.20	nl		
프로브 (R555Q-1/FAM)	10pmol	0.20	nl		
프로브 (R555W/FAM)	10pmol	0.20	nl		
DW		3.00	nl		

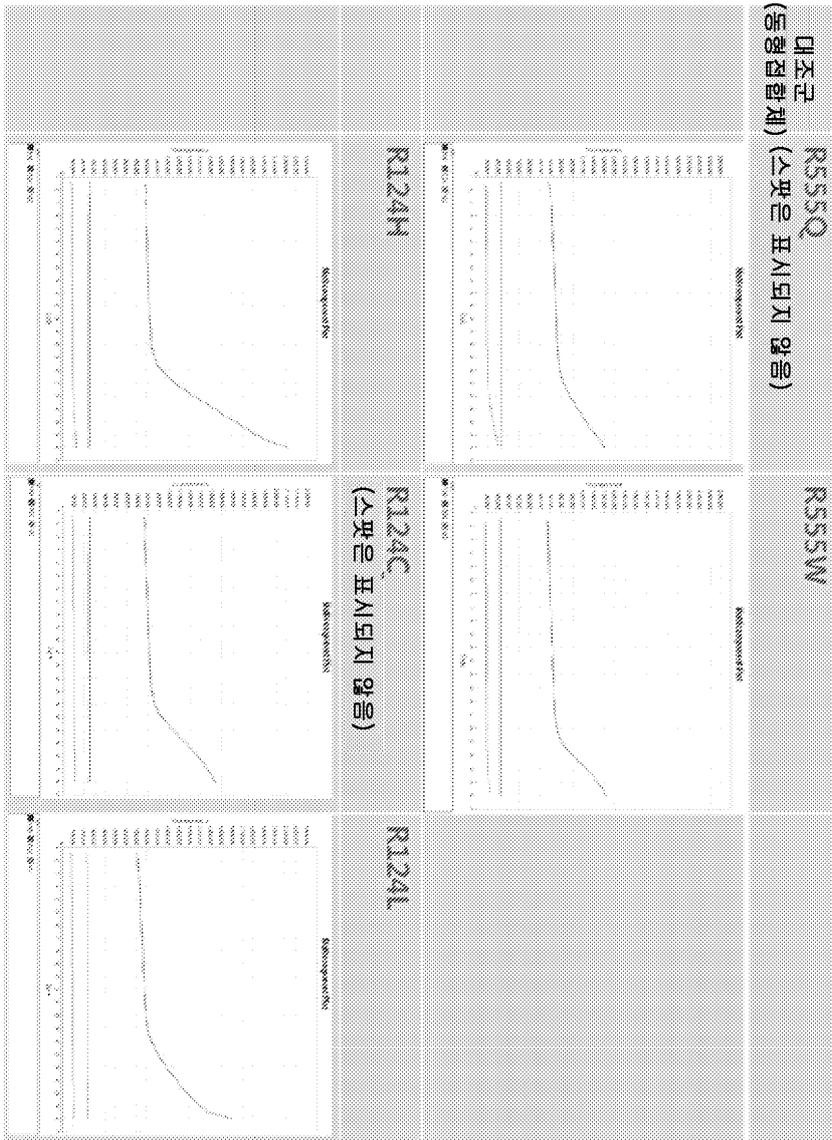
판독 전	유지 단계	사이클링 단계	판독 후
60°C	95°C	40 사이클	60°C
Imin	20sec	3sec	Imin
		30sec	

도면5a

도면5b

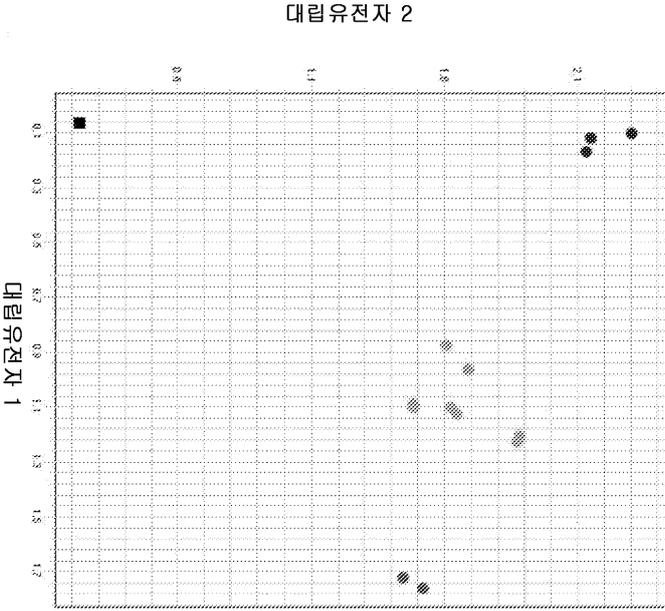


도면5c



DATA B >> LifeTech/7500FAST; 고속 모드

대립유전자 식별 플롯

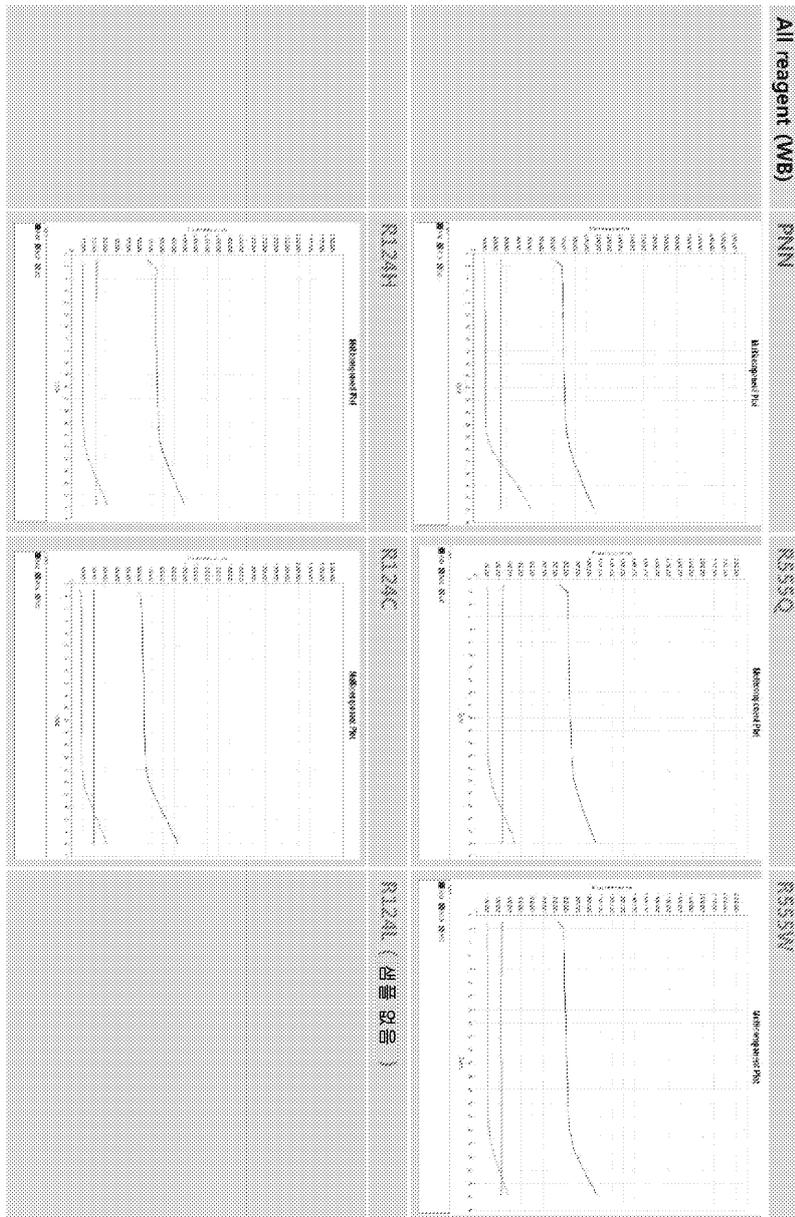


All reagent extract (전혈)		3.00	nl
GTX 프레스 탭 2		10.00	nl
프라이머(I24R)	10pmol	0.50	nl
프라이머(I24F)	10pmol	0.50	nl
프라이머(S55R)	10pmol	0.50	nl
프라이머(S55F)	10pmol	0.50	nl
프로브 (NL/VIC)	10pmol	0.20	nl
프로브 (R124H/FAM)	10pmol	0.30	nl
프로브 (R124C/FAM)	10pmol	0.20	nl
프로브 (R124L/FAM)	10pmol	0.50	nl
프로브 (R555N/VIC)	10pmol	0.20	nl
프로브 (R555Q-1/FAM)	10pmol	0.20	nl
프로브 (R555W/FAM)	10pmol	0.20	nl
DW		3.20	nl

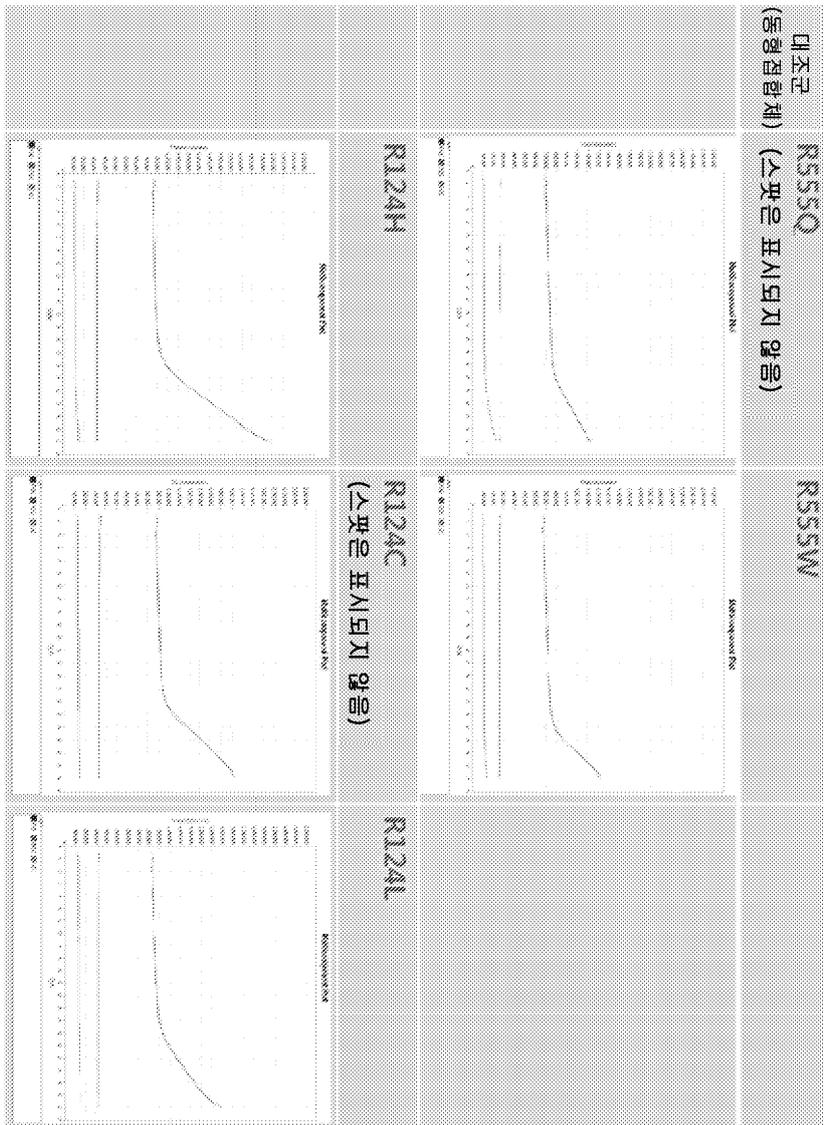
판독 전	유지 단계	사이클링 단계	판독 후
60°C	95°C	40 사이클	60°C
1min	20sec	3sec	1min
		30sec	

도면 6a

도면6b

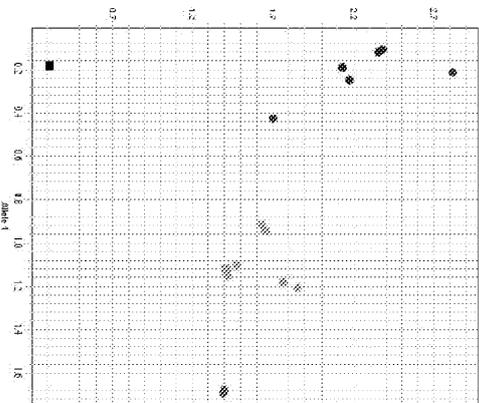


도면6c

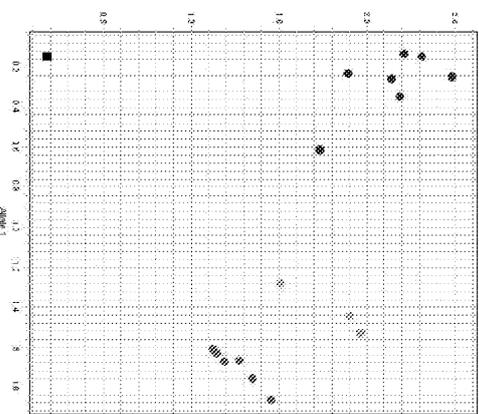


DATA C >> LifeTech/7500FAST; 고속 모드

관독 전	유지 단계	사이클링 단계	관독 후
60°C	95°C	95°C	60°C
1min	20sec	3sec	1min
40 사이클			
GTX 포레스 태그			
포라이머(124R)	10pmol	0.50	nl
포라이머(124F)	10pmol	0.50	nl
포라이머(555R)	10pmol	0.50	nl
포라이머(555F)	10pmol	0.50	nl
포로브 (NT/ YTC)	10pmol	0.20	nl
포로브 (R124H/FAM)	10pmol	0.20	nl
포로브 (R124C/FAM)	10pmol	0.20	nl
포로브 (R124L/FAM)	10pmol	0.50	nl
포로브 (R555N/YTC)	10pmol	0.20	nl
포로브 (R555Q-1/FAM)	10pmol	0.20	nl
포로브 (R555W/FAM)	10pmol	0.20	nl
DW		3.30	nl



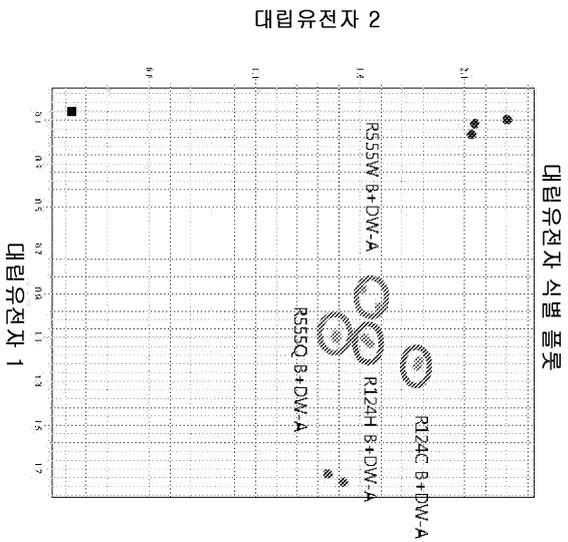
All reagent extract



OMEGA kit extract

DATA B >> LifeTech/7500FAST; 고속 모드

도면8



All reagent extract (전철)				
GTX 프레스 태그				
포라이머(124R)	10pmol	3.00	nl	
포라이머(124F)	10pmol	10.00	nl	
포라이머(124H)	10pmol	0.50	nl	
포라이머(555R)	10pmol	0.50	nl	
포라이머(555F)	10pmol	0.50	nl	
포로브 (NL/VIC)	10pmol	0.20	nl	
포로브 (R124H/FAM)	10pmol	0.30	nl	
포로브 (R124C/FAM)	10pmol	0.20	nl	
포로브 (R124L/FAM)	10pmol	0.50	nl	
포로브 (R555SN/VIC)	10pmol	0.20	nl	
포로브 (R555Q-1/FAM)	10pmol	0.20	nl	
포로브 (R555W/FAM)	10pmol	0.20	nl	
DW		3.20	nl	

판독 전	유지 단계	사이클링 단계 40 사이클	판독 후
60°C	95°C	95°C	60°C
1min	20sec	3sec	1min

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Avellino Lab USA, Inc.

<120> METHODS FOR MULTIPLEX DETECTION OF ALLELES ASSOCIATED WITH OPHTHALMIC CONDITIONS

<130> 070335-5007-WO

<140> PCT/US14/65975

<141> 2014-11-17

<150> 61/905,051

<151> 2013-11-15

<160> 52

<170> Patent in version 3.2

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

tccaccacca ctcagctgta 20

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

ccatctcagg cctcagctt 19

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

tgcagcccta ccaacttcaa 20

<210> 4

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

aggcctcggt gctagg 16

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

tagtctctta ttctaata 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

gctgcagact ctgtgtttaa 20

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

ccatccctcc ttctgtcttc tg 22

<210> 8

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

cgggccctc catctc 16

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

cagagaagg agggtgtgt t 21

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

gggcgaagat ggtgaagct 19

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

tctctgtcct ctccacctgt a 21

<210> 12

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

agctggcaag gaggccc 17

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

tttgggcttt cccacatgc 19

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

ggcagacgga ggtcatctca 20

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

gtagtaccgt gctctctg 18

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213>

Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

agttcccat aagaatcccc c 21

<210> 17

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 17

ggctggacce ccagagg 17

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 18

accctcggg gaagtaagg 19

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 19

aaccttacg agacctggg a 21

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

primer

<400> 20

gactcccatc catcatgcc 20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 21

agtcgttggg tccaccacca 20

<210> 22

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 22

gacgtcattt cctactgttt cagg 24

<210> 23

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 23

ccccccagaa acagcctg 18

<210> 24

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 24

ttctaagggg ttaaggagaa agctt 25

<210> 25

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 25

cacggaccgc acgga 15

<210> 26

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 26

cacggaccac acgga 15

<210> 27

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 27

acacggaccg cacg 14

<210> 28

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 28

acacggacca cacg 14

<210> 29

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 29

tacacggacc gca 13

<210> 30

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 30

tacacggacc aca 13

<210> 31

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 31

ctgtacacgg accgcacg 18

<210> 32

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 32

ctgtacacgg accacacg 18

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 33

ctgtacacgg accgcacgga g 21

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 34

ctgtacacgg accacacgga g 21

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 35

gctgtacacg gaccgcacgg agaa 24

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 36

gctgtacacg gaccacacgg agaa 24

<210> 37

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 37

accgcacgga gaagc 15

<210> 38

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 38

accacacgga gaagc 15

<210> 39

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 39

accgcacgga gaagctgagg c 21

<210> 40

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 40

accacacgga gaagctgagg c 21

<210> 41

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 41

accgcacgga gaagctgagg cctg 24

<210> 42

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 42

accacacgga gaagctgagg cctg 24

<210> 43

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 43

acacagtctt tgctccaca aa 22

<210> 44

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer
<400> 44
acttaagttg gtctttaccc aagagtct 28
<210> 45
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Normal Probe 10
<400> 45
caccaagaga acgga 15
<210> 46
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutant Probe 10

<400> 46
caccaagaga atgg 14
<210> 47
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Normal Probe 10a
<400> 47
caccaagaga acggag 16
<210> 48
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> #TGFBI R124C
<400> 48
cacggactgc acgga 15
<210> 49
<211> 15
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> #TGFBI R124L

<400> 49

cacggacctc acgga 15

<210> 50

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> #TGFBI R555Q-1

<400> 50

accaagagaa cagag 15

<210> 51

<211> 34810

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gene sequence

<400> 51

gcttgcccgt cggctcgtag ctgcctcggg gcgcgtcgtc ccgctccatg gcgctcttcg	60
tgccggtgct ggctctgcc ctggctctgg cctgggccc cgccgcgacc ctggcgggtc	120
ccgccaagtc gcctaccag ctgggtctgc agcacagcag gctccggggc cgccagcacg	180
ggtaagccga gccccctggc caggggctgc ggaaggtcag gtagtcgggg ctcgagcgc	240
aagccgctgg gggcattgaa ctgggctggg ggcgagggg acaaagccc aactaaaaac	300
cttgacgcat ggagcgtcgc gacaccagcc ctgcacgagg tggaaggaga gagggaggga	360
ggtggaggac catggaggga aagcgggagg ccgccgcttt gtagaaggga gtggggaagt	420
ggaccagaga ctttcgacgc aggccaagag cctgagacgg acagcgttt cagcttctcc	480
tcccagccac tcagaaaagg gggaaatggc aactctttgg ccataatcac cgtgggaggg	540
tgccaagggc aaagcccacc cagcagtaca cctattcaa cccagccagg cccccggcca	600
gcgactccag acaagaacct gggccacaca cgtggcagc atctaagggtg ccccaggctc	660
ctgtgctcct ggccaggccc tgcaactcaga cactgctggc acccgacact gctctctggg	720
tacagcaagg gcaatgtggc acttcttgtc ctgcccgatg aagagcagga gaatgcactg	780
ggccctcaca cacactgttc aaatggggaa actgagtcct gagtggttcc actttcccac	840
agtcctgaag tgtgactgg agccaggatt ggagtctgtc ttaaagtaat agctgggttt	900

gtaaagttag gacactatca ttgcaggaat tcctttgaga ccctgaagat gtgttgctt 960
 taggagacaa actcaagcag aaggtctggt ctgatagtgg ccctaatact gaccaggca 1020
 gaggcaggca acatttctac ctcaaaaacc aggccatacc tgcgtcacia ataccaggc 1080
 tttgctgcag ctccagcct acctggttgc accaacttct tttcataac taggtaaac 1140
 tataatagag tagaatcttg tagtgactcc tcagaggaag cctaataacc atcggggtct 1200

 ggcgttcaca ccacaagca atgcccacac ctccaagaga ctgggcagat ctgtgctcaa 1260
 atcaaaactc attgttgggg gtgatagagt tgacttcaca ggccctgaaa gtcttgctc 1320
 ctgactag gagtgcctg ggtacgggta caggctgccc cttgtagggc atagtgtctc 1380
 ttgtttctc tacttgtggc tttatggtct aggccittca ggagtttggg gctctggcgg 1440
 agaggcctg ctgggagcac atctggccac cctgcagagt gaaatcaaac caggcctggc 1500
 tgcaacctca acacctct ggaaagagga gaatactggg gatatcctgg ggtctttctg 1560
 gaagtgggag aatcagcttt gacttgggca gtgtgcagaa tagagtgagg ggggatgtca 1620

 gaaagatgag agggatatga ggcctcaaca tcaaatgca agcacctggc atttttatta 1680
 tctctgccc cctctccgtt ggtctctctg ctttctctgc caatgaattg tgttatgttt 1740
 ggggtgctca atttgcctag gaggtttca tttcttctgt atcttcgcca ctaagtcagg 1800
 agaagatcct tatagcatgc cctgcaacag tgcacctgt aaggcatct cctgcacag 1860
 ccacagtga ggatctcaa aggtattgag gctttccat caagagccat ctttacagca 1920
 aacctcttc cttcagagc ccagaagagt gctgaccagc tggaaaacag ggttttttc 1980
 ttaaatgcag atgctcttga ttatgagttc cagatattag atcaacttcc ccaccatacc 2040

 cctgcaggca aagcctctta attagcttcc tgcagcacag ctggaaagc ctattgtaat 2100
 ctgtgatggg cagagtaatc taagaagtca caggagcacc cctgtcccag tagaatctgg 2160
 atgcgaggc acatgaacca tggcaaaatg gttgcaggca cagtgtatt tactctgatc 2220
 taactgtccc tgtaaatgcc acagggtctc ctggcctggc acacagggt gtggcgcctt 2280
 gtgcaaatgg ataacttgt tctagctcca gcctttcatt caaagtgaaa actgttagaa 2340
 aggaaggaa aactttgcta ttttaaggaa ttgtagectg ctgcctgata tgaaggaaga 2400
 aataacagct gtgccttctg tgtgcgagc actcgattgc cgcttttct ttcgacctca 2460

 ccacaacaca gtgagatcta ctgttcatgt tcccattta caggaggtga aactgcagct 2520
 tagtgaggta gagagtgact tagttcagac acagaatgct gttgggagag taataactat 2580
 gataggtct cttgactccc agctatatct gtgttgctat aggaaggagg aaaaataata 2640
 ctgaaagaga agtaaaaata caatcacact tcaaacatc aaccacaaa aactgaactg 2700
 aatttctga agcacttggg tttcaaatct aagctgaaca tcaatgctgt tattcttgag 2760

gcccagaagc aacttgctca tttcaattaa gcttcagcat gaacttccta tgtacacagc 2820
ccaccacac tccccgatgt gagaaggaga gggtcacagc cgccccagc ctctgctgct 2880

gccacaagga cagcagcagt ggaaacattc agcaaaggaa tgttggagcc acatccacaa 2940
gagactcact gaagattcgc caaacgccta cggaaagtgg caggaattc attgacagta 3000
attgtttcct gcttgatcag attgaagagc ttctgggatt ctgtaacaat aataggacc 3060
gggggctgga gtatggccag caaggactct tcaggggtta ttcagggact gtctaacctg 3120
tgaatcctag gcagcaaca gaaaccaggt attcagaaat ctggaggatt tggtcaggcc 3180
cagctaggac tagggaggca tgggcctctg ctggctgtgg tcccttctcc agccttact 3240
tctctgtcc ctagatcctt acatggattc attaatgctc attgtccctc ctgggcccac 3300

tcactttcac ctgttgaaca aaaaactggc caagaggtga cagtcatac accgcagaag 3360
agacaggga gagaaatgaa ggggcagaat ggactccac ccaaaagcct gactctgaat 3420
atitgagaat tgttcaagtt cctgcagagg aatcatgatg gggacagtag gtgtagtttt 3480
tactgcaata ttgggtctt cttacaaat acgctgcaca tcaagtgatg tctgtggatg 3540
gcattcttaa agtaacaggg aaattgatgt taaagaaata cttcatcctt tgggtgatac 3600
ctgaagtctt ctgagcttgg aggtcttctg aaagccctca gtattgtttg ttttatttgc 3660
tttctctga cttgtgattc agtcagatgc atgctgcct ctggctcagg aagatcaacc 3720

ctctcctgac tgaccacgcc tctcctgact gaccacgtag cacagcagct tcctttcctt 3780
aggggctcct aatgaagctt tcacaatcac ctggcctgag cacagtttgg gtcaggactt 3840
ggtatacttg aaaaaacat gcaaaaccaa aatcctgtgg ttctggaaaa ggcttcttag 3900
cagaaccccc agacatttac actctgcttt ttcacagggt ccctgaggat tctttggatc 3960
tgggtagttt ggggagcagt atttcaaca agttcattc gtgctcttc tacaccctgc 4020
ctggatgcta ggccccatct agaatgtgaa caacagaaca aggcagaaca cttgtcctca 4080
aggttctgtt gagtgttaga tgcagagaag agacacccc cacctcccc catcacttac 4140

aggaattctg tttggaacc aacatcaaat aaggaccgta tccactgtca gaggatggga 4200
agcagcatgt catctgggac attggagaaa ggctcctggg ggaagtggga cttgagctgt 4260
gatctaagta atgaacaact gagagttaa tgggagagca tcccctatca gggtcctgag 4320
agcaaccagc catggtttaa accagctata aagcctcggg tttataggat agacagtaac 4380
aatggcttgt ctttgggagc caagcagctg gtccaggcat gcagagcatg tctgtatgga 4440
gagctgcctg agagatgctt ttgtttacac ttatcaattg cccatgtcaa agaaggatat 4500

gtacatgaag ttacatcagt atgtaagaga gatTTtaaca atTTTtgcag gggaagcttt 4560

catgggggct gatgggaatc taggtaaaca gaaccaaagt ctaaacccea gatatcccca 4620

gtaccaagac tgaatgact ctctctcta tctctagaaa gttccagtga cccaaggagg 4680

caaacacgat gggagtcatt aaagtggggt ggacgtgctg atcatcttcc taattctgct 4740

gctTTtgttt tcagcccaa cgtgtgtgct gtgcagaagg ttattggcac taataggaag 4800

tacttacca actgcaagca gtggtacca aggaaaatct gtggcaaac aacgtgagta 4860

tctgtaacca gccaggagac caagctgtat gcacgtggc tgcagttccc cagggcctgg 4920

gccagccttc tagaaggta ggttgcctaa aaagccatga agatgcatgt gcgaacatgt 4980

ctgggacctg cgtgctaggg agtggcattt ttaggaagct ggccaatttt gttttgcatt 5040

TTtaaggctg ctgacaagac ttggagacat tttcagggc tggTTtgggt ttgcaagaaa 5100

catgaaacac tgcgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtttctc aatctcata aaataataca 5160

gatatgcagt ggagaagcca ccagcatgtg actctggaaa agaaagccca ttggtgaatc 5220

tgtactaaag aatgccatcc ctatcttaca gtcttaaggt aaacaccca aaaagactta 5280

gagcactaaa catatgcaga ttatgagaca gcatagcata taatatttgc acagacttcc 5340

tcattcaaac cctagctcta cctgggccag tcgattcatc tttagaacc tccattgctt 5400

tacctgaaaa gttcgtataa caaaaggacc caccttatgg ggttgttaca aggattgaat 5460

gaaataatgt acataagaga ctgaatatgg tgcccagcat atatcagtgc tcaataaatg 5520

ctagctacta ttattattat caccctagat ttgcaaatct agaccacaca agcagaagta 5580

agagtccaa cggggtgtgg accagtgtgg ttacaatagg gcttgttgat gtctgtttca 5640

gcaaggaggg aggcagcttt taccctactg cccagctccc tggTggaatc aggtgcatgt 5700

tctaacaatt ctggggaac ctaatctgtt ttggcactgt caacagatct caaagctggc 5760

tgtctctat agctaggaag atgtgtatga caaatctct gagccacttg tgaaggcctg 5820

accttctcc tgtctcata cataatggga tgattaagaa actctaagcc actctcttaa 5880

gcacttttca atgttagga ttttaagtT tattgtgtg acattgcttt tgagcagaca 5940

tctctccaa tTaatagcc aactgaaaga agagaaaatg ctctttcctt aaactgtatg 6000

tggaaataaa tattccaatg tgtgacctg attatgttag gcaattagca atcctaatat 6060

gaattgaggg aagtTggat tcatggcaca gctggggaga taccagcagt cctTgggagc 6120

ctgtccaggg caggtccatg gcagcttct ccatgcctga ttgacagccc agcctgcaag 6180

ctaaaagtT agtgagctag gaggacacac tgccaagatt cagctaacag acaccagcg 6240

atattcttgc tgctatgaac aaaaggagac tatgcaaatt atacaccacc cattcttcca 6300
 ggatgcctga cttaaaaaat aagaaaaaag atgggccggg cacagtggct cacgcctgta 6360
 atccaacac tttgggaggc cgaggtgggc ggatcacaag gtcaggagac agagaccatc 6420
 ctggctaaca tggtgaaacc ccgtctctac taaaaaata caaaaatatt agcgggcgtg 6480
 gtggcgggca cctgtagtc cagctactcg ggaggctgag gcaggagaat ggcgtgaacc 6540
 tgggaggcgg agcttgcagt gagccaagat cgtgccactg cagtccagcc tgggtgacag 6600
 agtgagacac cgtctcaaaa aaaaaaaaaa aaaaagaaaa gaaaaccttt agtactgatt 6660

 gattttttcc catgtgtgta tattatctac tcaaattaac aattaattac ttaattaac 6720
 acaaagccag gcctcaccta attgcttctt ggaaggtagc cagagtgcta gtccaagca 6780
 aacaactctt ctatatctca agagccctgg gcttcagagg gccatctttt ttgttaattc 6840
 aagtttctct gaaaatggag acccgtttat gatgacaagc tggctacagg gtagcatctg 6900
 ccacactgtt tcgggggtgc cgctgggctg aagcatttgc ccagctagtt aacaatagct 6960
 cgataacatt ccctatcagt gtccaggctg agaatactgt cagtgatgag tcgccttggc 7020
 tcttgtacct gtatctttgt gtgccaggac aaggcacaag caacagagct gtgtgttgcc 7080

 aaaatgttcc tgatgagcag gtcaaccctt cgggggcagg tttggatatg ataatgtggt 7140
 gatgtggtgg cgcagctccc ttaccagtg agcacaaggg gagtctctta ggaaaaggaa 7200
 gaaatgtctg gatgaggtgg ggagatgggg ttcagagtgg actcaggcaa agcccgatgc 7260
 ccagtcccag ctgttggcct agtctcacia agccagaagg atatgacatt tacattcaac 7320
 tcttgaattt gtggccactg ctttgggcaa cttcaaagag agaaaatgaa gatagaaaaa 7380
 tattatttga tataaaactt ctaggacaag agaggccctt cctggaacat tacatgtagt 7440
 attaggaagg tggagctgcc ctggaaaaga tcagagaaac tcagagagag gaagaggtgg 7500

 aaccatctc tgttcttcta gagagctcag taagagtggc ttggcagggc tectgtgtac 7560
 ctgagaccaa gaccagttag gaggctactg tctgaccacc atacggtcag aattcagtgc 7620
 catgggtggt caggtgggaa ggggagagga ctgtgctggc tggagttagt gttatcctgg 7680
 ggaaagtagg tccttagatg cctttagttag agtgaggagc agactgggaa atgggagcac 7740
 agtagtgggt ggggcaaaaa ggactgtctc tgcatgaggt ccataggcag ttggaatttt 7800
 ctgagcaaga ctccagagaa ggaggctgga gcagaggtgt atgttgggat gaaaaggagt 7860
 aaagtatcat gggggaggag gcagctcagg ttgtcaaggg tcaagaaacc agaaggagaa 7920

 tttcaccttg gaagcagaca acgggtacca agcatacagg ggaatacttt gtggtgagag 7980
 gtcacacaga gatacaggag ccgacctggt gagacaggag cctggagcca cctgcctgct 8040
 tttgtgaggc cccagactcc actgctatca tcaggtgaag ctctgttggc tgcacacaaa 8100

agcttttctg catttaca aa gagagaaggg cctgagtttc tggtgcaatg cgtcaagctg 8160
 acatatggac ttattacag gaagtgggta ccagtgggtc cctatttagt ggctgttatt 8220
 gtgaatttta ttgttcggaa attcacttta gcattttatt cagatcctaa atagcaccgg 8280
 agtgatacaa tggctaata ca aacaaagagg gctgtgggga gcagacagtc agcatcccc 8340

 tctgtgattt caggccctgg ttgattagt agccataaaa ttttttacgt gtggcacttt 8400
 gagcaaaggt gcaggaaatt gtggcagga agcctggctg cctctcgaca ggcttccttt 8460
 gtgctagccc caggagagg aggcctattt aacagccaag tccaagtga catcatggga 8520
 ctggaatagt catagcagga gctcagacat cataaacgtg gcatagggag ggctggtgga 8580
 ggagctagcg ggiatgggtg gcagctattc attccaaaag tcttgaatt gtttcacgag 8640
 caacacattt cacaagtgcg aagcccttct ctggagccaa gatgagctgg cagagcactc 8700
 ctgtttctct agtagcaagt gttcctttgc ccaggggcaa aatattaat actccttcag 8760

 cactgcatta atgcttaaag atttaacttt taaagagatc agctggtgca tggtcgagct 8820
 tttccatcag ctggcagggc ttttcagta ggtgtccttc tgggcagggc actggggaca 8880
 gctgacgtga aggtgaagaa gagctgtcgt tttctcctt tataccccac aaccttggtc 8940
 ccaagaggaa aaaaaagaag atggtgagaa gtcacccaag cagaccccag acccatacta 9000
 gtgcctcctt tctgtttca taccctgtg cagccagctg ggatctcttg aataatctgc 9060
 tctgggggca ctgagattgg acatacacca aacagcggag atcgacaaa cgcctctgtt 9120
 gggcagtggt tctgaggggt tctgtccat tctgtaact aggaggctga ctagctgaca 9180

 aggaatttta ttctgttggg tatttacaatg aacctatgtg ccacctgggg taagaccctg 9240
 tggtaggtag aaacatgact tcccaaaaat gtccacatcc taatctctaa ttctgtaaat 9300
 atattcctt actggaaaa gagactttgc aggtgtgatt aaattaagga tcataagagg 9360
 gagagattat ccaggattat ttgatgagtc taatataatc atcagggtac ttaaaagagg 9420
 gaggcaggct gtgcctggtg gttcacgcct ttaatcccag cactttggga gactgaggcg 9480
 agcgggtcac gaggacagga gttggagacc agcctgacca acatggtgaa actccccctc 9540
 tagtaaaaaa aaaaatacaa aaattagecca ggcatggtgg tacacacctg taateccagc 9600

 tactcaggag gctgaggcgg gagaattgct tgaaccagg aggcagaggt tgtggtgagc 9660
 tgagatcgca ccaactgcct ccagcctggg caacagagca agactccatc tcaaaaaaaaa 9720
 aaaaagaggg aggcagtggg atcagagtca gagaaggcaa cgtgatgatg aaagctgaca 9780
 tttgagtgat gcaaccacaa gccaaaggaat gcaggcagct tctcaaagct ggaaaggacg 9840
 agcaatggat tcttccctac agcctctgtg aggaatgcag cctttgattt taaceccata 9900
 aggccgattt ctgactctag cctctggaat tgtaagataa tttgcatgat ctcaagccac 9960

taaatttggtg gtaatttgtc acagaaagca atgggaagcc aacacaggcc ttatttggtg 10020

 acttatagat gcatttttct ttatttcaat gtacttttat caatggcttc atgtaggta 10080
 ttgctttcaa tgaagatatt aacatagttt caactttaag gtttatatct ggagtttctt 10140
 tagaagcttc acaactgacc acttagtaaa cagtaagcat ctgttaagtg cttctcatat 10200
 gtaagttcat tcaattctca caatcacact ataagataaa tatgattatt agccattta 10260
 cagatgagga gacaggctca aaagactttt atgcaacctg gtcaaagtca ttcactggta 10320
 agctgaggag gtctgtccac ttcttttgc tgccccagg gggtatcaag cctggcagtt 10380
 agtgtcagcg acttaggagg tgaacaagtg agcaggcctg taggacctgg ctaaactgcc 10440

 ccaggctctt gtctacagcc tcaaacctgt ggctgtgggt cccagagaca aggcctctc 10500
 agcatcagag aaggatgctt ttgtctcagg gtcacacacc ttctccaggt tgctcacccc 10560
 ctgctgtaaa ggggatcccc aagaccgctc atcagacaag gagcttggga actgaggaga 10620
 cacagtcagc ctccaggagt gcccaaatg ccctcacatg ctgcatacag attgccacaa 10680
 ataaagtaca tccacattct gaagactctg tctcatcac caaccaggct ggcccctggt 10740
 gagggtgta gtggttgagg cctttgttgg tagacagtag gttaaagcaa gccatgattt 10800
 tctattggga ggcttcagaa tcagctcagc tgtgtttcca agaccaggag ggcagaaagc 10860

 aaaccatccc aggcaagcag tccatgggccc atgtcagatg tctagacgtt atgggtctgt 10920
 gtttgcctct ccattcctct cggaactat gatgccctgt atggtttacc ttcagtcaca 10980
 ggtgactggc ctacagggcc attccttgtt ccaacgactt ctcgagtata attaatccc 11040
 aggcatttac ggccagagca gccggccaaa tccgtgaagt gcagtggttg ttttaaatta 11100
 tattaacttc ttggaaactt attttaggga gagaaaactc agtacttctc tctatccaat 11160
 cttgagtaaa aatgttagaa gggactgggt gagagcctcc cagacatccc tacacataga 11220
 ctttgggttg acattatctc tttgcacctt ccttgaactt ttcttctaaa ttaggtgcct 11280

 tcctaattt aggcaccttc ccagtactag tctgtgacct gtttaggaacc agccacaca 11340
 gcaggagtgt agtggcaggg agtgagcatt attgcctgag ctccgctcc tgcagatca 11400
 gcagtggcat tagattctca tagcagtccg aatactattg tgaactgtgc gtgtaaggga 11460
 tctagcttgt gcattcctta tgagaatcta atgcccgatg gtctgagatg gaagagtttc 11520
 atacaaaac cacccttcc cctgccacc atctggggaa atattgtcta ccacgaaact 11580
 gatccctggt gccaaaaagg ttggggaccg ctgtcctaag ggatctgctt tttctgacct 11640
 gaggttttcc tttattagac tgtatctggc tgaggagaag cctgaagcct ttaatcgaa 11700

cagctttggc tgatgagatt agattcagaa accaacagat tggctctttc tatgcaggga 11760
 agcctaggaa ctggggggct atggctggga agccccctat tgtttccatc ctttcctatg 11820
 ttcatcctgg aggaatggca tcagacccat gcctctgtga ttgctcccag cccatccaac 11880
 cacagcatct atgttctgcc tgggaccagg gccagggagc atggcacact gagctgagta 11940
 taaggagagt ggagcaggcc actgccagcc cagaaaattt tggtaaagt tgctgaaat 12000
 cttctcagcc ttcgattcac agctgctctc tctgctctg gggccatgca gaccagtca 12060
 gaaaagagt aatttgttgg ggcagttgga ggcaggtgga ctgccagctt tgacacctc 12120

 ccagcccaca ggctgctgca ctggggctga aggcgtggct aaccctgca cacctagaga 12180
 gtgacagaga tgccagactg ggcagcagga aggcaagagg attaagagag agcttcctgg 12240
 ctgaaagcca cactcgggta accaggaaaa agcccttggc acgagaagac tcagtggcct 12300
 gagggactga gccttgggtt ttgggcatgt gctgcataag ccatccatgt gtgacagtag 12360
 agtgtagtcc agccactgtg ggacatgggt gctgaaagac cacatggaga ggaacagtga 12420
 gtgctgacaa gggctagcct tgatcacttt ggagacacc cctgtgtctt ctagatgtca 12480
 gactttccaa atctgtctgc tatectccaa acgtgcattt tcaagagcaa tggaaaaagg 12540

 attggacttg atggaatgca gcaagagtcc taggtctgtt actacctacc tatgacctta 12600
 agaaactcct tcacctca gaaccttac agctttcttt ctgattctat cctgagttac 12660
 tctactccaa gtgagactt ttctgcttag atctatccct tctcctaaa ccccaacct 12720
 ccatttctcc tgggtgtcttt ctttacacac ccctcagcat acacacacac ctagccacag 12780
 gaaccaatga gttaatattt gaggagtgg ttttctttt tctcaatga gatcctggtg 12840
 aggccacttg agctgttcag ctcccttgcg gtattttggg gatggaactc agaagccaac 12900
 aatatagaaa aagagtcttt ggccagcttt ccaggggct ccatgccata gagagtactg 12960

 caccctgtg cacagggggc cctgacatga ggactttgag gataaacta ttcctccaac 13020
 tctgcttcag catctccatg gatcttcaca cagacacttt aggaaagaaa ctaagtttgg 13080
 ggggacttga cctaatecca catecacagc ccagtaatac agccctggaa ttatcacag 13140
 aaagcctaga atcccatgca tateccatgc atatgcatcc ctagtctat gggttcaagg 13200
 cttggagctc tcctggatt tagctgggaa aagtggcag acagtcttc tctgtcttct 13260
 agaaatagtg actagaatcg tgagtgtgag attgcaagta acttttaaaa tcatctagtt 13320
 taacttacc ccatttcata gaccaagaaa ctgagaccag agagagaaat ggactttcaa 13380

 gttcacctg ctagtactg atggatcaca agtcaaatct cctgattcta gcaactgttc 13440
 tcttacacca caccaccttt gaaagtgtgt caatcaaatc ttaactttagt tgcagaggat 13500
 gactttagtt tctgaagata aaattgtgag tcaatcaaga tgagtcccaa gacaatagcc 13560

tgtttagccc ttataagttc agggatgaaa ggtagaaag aaacaggatg gaaggaggac 13620
 tggagaaaa aacaaaagag gaaggaagga ggaggaagca aacaggaaaa aaaaagaatg 13680
 tgcatagctt gtcactcctc agtcatttcc tgggagccca tttctagcaa agtgacagct 13740
 gcaactccct ggccacctga gcatcttagc tgatctgtct ctgaaacacc ccctggagaa 13800

 cagatgaate aggcttcate ttcgcttaac taagtcttcc ctgagacgac tccattttaa 13860
 tgaacaagag caggatttcc tgggcacact gagagcacct tccagaggcc cctccagagc 13920
 cctaaagcct gtatttcttc cagtcggcct gtttcttcc tggatgatgc attaaacgcc 13980
 ctttgagagt cccacagtga gcagttctgc ggtaaaaccc gctgcaatta aagtctgagt 14040
 ctttctctgt ctcaaagggc atattcatat agaagaaagg aaaaggaagg actggctgtt 14100
 tgcatttggc tccaggcctg ttgagtagag gtcgtgtctc ctccaccgaa ggtacagggt 14160
 agccttcagc agaacctggg gatttggttt taagcaagtc tttcttaggt gtgggctttc 14220

 agaacacttc ctcccttca atattatttg aaattctcag tgttttagcc gtccccagaa 14280
 tattggttcg ttaaagctgt gtatttcaga tctccagaca gtggcactg tttgtatatt 14340
 ttcaatttca aaccagaaaa caaaagtctt tattgattac tttttttatt taaaaataa 14400
 aaagtaagta tcttcgtaag aggagctttg ttttaatttt aaagtttaa atttgattgt 14460
 gaagacagag aaaaacttga tgattgtaga tatattcccc tctttggcta ttcaatcaga 14520
 gaactagaaa atcatgagag atttaatgac cactgcctga tacacatag tgttttacag 14580
 atgaggaaac tgagaccag agagatgatg aaattggctg aggatggccc agctggtcag 14640

 tgaaagactc agagccagag ctggcagcagg gctctttcta ttccttctg ttcctttca 14700
 ggaacactca ccatcggtt tctgtgaat aatggtgaga taaaatcctt ggtgcattat 14760
 gttttctagt cacacattg actaggctgc cagagtctc tgttctcca gttggttggc 14820
 tgtagtggtt ggcagccgc aggagcattc tacagaacag aggaggagt agactctct 14880
 tgctcaggaa aggcagacct atgacttagc aaataactcc taagaggaga gtgtttcacc 14940
 caccattcct ctcccttggc tgtggaggca acttagtga gaggggccag atgacctgtg 15000
 aggaacagtg aagccctgcc taacacaatg tatggttgc ttgttacaga gtcacagct 15060

 acgagtgtg tcttgatgaa gaaaaggtcc ctggggagaa gggctgtcca gcaggtgaat 15120
 gaatcctccg ggccttgcct gttggtgtgg gtggaaggga atggtgggag agaggagtac 15180
 ccacataaaa ggcagcagag tgtgaatggg ggcagtggca caaggacatg gcattctccc 15240
 cacgtgcca ctggccccag gctctatgcg aggggctgag gaatggaagc tggaaacagc 15300
 gcatttctg agctgctcct cctggcctcc ttaccacact ggtggagtag actccaactg 15360
 tggcctgtcc atgccctcc cagcaggcac aggctcaggc tcaggctctt gcctctgcc 15420

tctggctggg agtgattcta aacacatcca gcagggtcag cctgatagcc catcagtttc 15480

cgatcagctc tgctagagag ccgatgggat gtgggaggag ggggtcactg gtgggctggc 15540

aacccaage catcccacatc tccctctgtg tctaaacttg gccctttgga gttcggtagg 15600

gagaagagcc ataggccagg tgggctcacc cagagtcagc agagagtccc acaaatggtt 15660

gcactgggcg aaagacagca tggcacctgt gaatatttatt agagcttttc ttttagtgct 15720

acacacaagt gactgtacag gggagttagt attttgtttt aattttgaaa tagagtcac 15780

ttttggtatc tgcgggggat tgattctagg acccattcta ggatgccata tcctcagatg 15840

ttcaagtccc tgatataaag tggatatagta tttgcatgta atctatgcat attcttccat 15900

gtactttaa tcatctcaag attacttata ataccaata taatgtaaat cctatgtaag 15960

tagttgttat accctctttt aaattttgtt attatctttt attgtatttc aaaaaatatt 16020

tttggccat gtttagttga atctgtgggt gaagaacca cagatcga gggccaactg 16080

tattggctat ttttttagtt aagaatgtga gactgaggcc aggcgcagtg gctcatgcct 16140

ttgattccag cactttggga ggccaagagg ggacgatcac ctgagccaag aattcgagac 16200

cagcagcccc tgcaacatag tgagaccttg tctcttaaag attgtgagac tgggctgggc 16260

acggtggctc acgcctgtaa tcctagcact ttgggaggcc aaggcaggtg gatcaactga 16320

ggtcaggagt ttgagatcag cctggctaac atagtgaac tctgtctcta ctaaaaatac 16380

aaaaaaatta gctgggtgtg gtgggggag cctataatcc cagctactca ggaggctgag 16440

gcaggagaat cgcttgatc caggaggcgg aggttgcagt gagctgagat agggccgttg 16500

cactccagcc tgggcaagaa gagcaaaact ccatctcaaa aataaataaa taaataaata 16560

aataaatcat gagactgaga cataacagga aggagggcaa tttggttggt tccaagttc 16620

ctagagtatg tgatgggaga ggttggtgcg ggtggggcca tggaggtact gactcaagtg 16680

gagggacagg tggggaaatg ggatgggaaa agaagattga ccttagaagg ggagctcaac 16740

ctctgaacce taatttcaga cccttcaaaa tgaatattaa gctcattttg gtctaagaaa 16800

caaaaaaca atgaacatga aactcatttt ggtcttataa ggtctgagaa accccttcta 16860

aacttcaagc tgctttaaga aataacattt tattacctgc aaatacacac agtactttgg 16920

agatttataa tagtctctta ttctaataga agccattagg gaaccagttt caataaacag 16980

gtaaactctg aagactagtt tgtaattagg atatctgttt ccagtgtcca ttctgcctc 17040

tgttatctaa atgtctggga acaagagctg tgctctgctg tgtttaaaat gattaaaaat 17100

caccaattag ttgagttcac gtagacaggc atttgactta ttgagttggt ttaagaagac 17160

tataacaagc cttaaagcccc ccagaaacag cctgtctttg ggctttccca catgcctcct 17220
 cgtcctctcc acctgtagat gtacctgtct cctgtcaga gaaggagagg tgtggtggg 17280
 ctggaccccc agaggccatc cctccttctg tcttctgctc ctgcagccct accactctca 17340
 aacctttacg agaccctggg agtcgttggg tccaccacca ctgagctgta cacggaccgc 17400
 acggagaagc tgaggctga gatggagggg cccggcagct tcaccatctt cggccctagc 17460
 aacgaggcct gggcctcctt gccagctgtg agatgacctc cgtctgcccg ggggactctt 17520
 atggggaact gccttacttc cccgaggggt gggcatgatg aatgggagtc tgcagtcatt 17580

tctactgtt tcaggaagct ttctccttaa ccccttagaa aaggctgtgg aacttgagct 17640
 aaaatatgtc ttaccaggtt gcgtctaatg cccccgttc cctactgggc agaaagactt 17700
 gggctgttcc tgaggagggg tcttggcag aagagaggcc tgggctcacg agggctgaga 17760
 acatgtttcc cagagttgca aggaccatc tcttaaacac agagtctgca gcccttaact 17820
 gacaccctgt ccttctcctt aggaagtgtt ggactccctg gtcagcaatg tcaacattga 17880
 gctgctcaat gccctccgt accatatggt gggcaggcga gtcctgactg atgagctgaa 17940
 acacggcatg accctacct ctatgtacca gaattccaac atccagatcc accactatcc 18000

taatgggta ggggatcccc agccatactg catggcctt ggtgcataat gaaccattt 18060
 ctgttccatg tgtgggctgg tttctggggt ttaagctgta gacaaccac cctctttgtg 18120
 cctgttctc ctgggcccct ctattccaca gcttgtggaa cccacattt gctactgtgt 18180
 ttgaaaacac tgttttctcc tcccgggct ttgggactat gcctctgtt tgttgactgc 18240
 tcatccttgc tcttctctg ggcagattgt aactgtgaac tgtgcccggc tgetgaaagc 18300
 cgaccacat gcaaccaacg ggggtgtgca cctcatgat aaggtcatct ccaccatcac 18360
 caacaacatc cagcagatca ttgagatga ggacacctt gagacccttc ggtaagggg 18420

ctgcctggg tggaggccca ggcttgggac acattgectc ccaagagggg cctagcagga 18480
 actcttctgc aggagaggtg gaggatggct cctgtagggg aacatagagc aggttcccct 18540
 gaatgcctt gaacatggag aattcattga ccagacattc agcttgacct aacctgtgaa 18600
 attctccate ttctttataa agtgttccct tcttgectc cctggaaag gtcagtgggtg 18660
 tgtggctgca gcagcacagt gtcctctgag ccctggacct gcaactgtggc ttccagaggt 18720
 ggcagttccc acatgggta ctagaataaa tggcctatca ggctgtgtgt gctttgggat 18780
 cacatgtccc caccctagga ccctggttcc aaccatacgc atgttctctt ggagccaga 18840

acagcagaga agccaccagt gtggacacag aagtcaaggg tctgatttcc agcctggctt 18900
 ctgactgctc tggggcccga ggaatcgggt tcttccccc atgcccagca ggcatttgtc 18960
 ttacaactgg aggggaaggc atgttctct tggcaaggac tgctcaggag gaagtggagg 19020

caggctgccc tgcagggtt ttgacctga ttcaaggaga acttcctaac cacaaaggat 19080
 acaagtggga gtgaggcgga ccctccctag agatctcaa cacagagaga caaacacgct 19140
 ggggctggct ggcactgaca ggccctgcag gtgtggatgg ctgttagctg ggagcttcgc 19200
 tgtctaagct ccctcccat gcttttcttc tgggttgctc gaaggacggg ggtctgcaag 19260

 aaaatgatgt tcccacatag ttggcagcac gtgaacagca attgatccct ttgcatcacc 19320
 tcctcttact gtttagattt ggtaaatatt tcttcttcc ctcttctgac cctccatitt 19380
 gccgatcttt ccttcttata acacatactt actaggtacc tgctacttcc cgggtgggccc 19440
 tatgtccag gagtatagag gtgaacaagg aaggcaaagt tctattctca gtagagctaa 19500
 tactctatct ggagagagac aacaacaaa tcaacaagggt agccaggggc tgtgataatt 19560
 tatgtcaagt gggcaggtaa atcgggagt acagtagtgc agggaggatt ggaaagt cag 19620
 ggagtctct ctggaggagg tggcttttga tctgcagcct aaaggatgag aatgggtcca 19680

 ttatacaaaa tgctggggca agagcacacc cagtagaggg gagagtaata gcaaaggctc 19740
 agggcaggaa gggcaaggga gaggccagtg ggtgaggtca catgtgaagg gcatacaatg 19800
 ggcaaagaca agccagagt ggccaggccc aatcctccag gacttgcaaga cctgggaaag 19860
 agtgcattct catcctggga gcagcaggaa accactcagg cctttagaag atccttctgg 19920
 cagctgtgta gagaatgggt ggtgtgatcc ttccatgcat gggctcatgt acgtgattac 19980
 cagtaactgt cgagtgcagc tgtgaggagg gctgcaagcc atgagtgtag gcacagcaga 20040
 cagactcacc tttgtctggc ggtgagatgg ggtgggaagt gtgccaagtt gacctccaa 20100

 agaaatgata ttttagtga agaataaata gaatcagaga agcaaagtaa gagggaagag 20160
 cagagaggac agcagggaca aggacttggg ggcaggaaga ggaaaggcag gtttaaggaca 20220
 tgaaagatgg ccaggctggc tggagctcag gccagcaag gcccctggg ggccatggtc 20280
 atgggtgagc ttgggtttgg cttctgtttt cgtcttgggc ttctgtgaaa gectcgagcc 20340
 cttgctggga accagtgaag ctgtgtgtgc atcttctgtg gggagtcca gactctcag 20400
 ggagcactcc atcttctctc ctccccacag gctgctgtgg ctgcatcagg gctcaacacg 20460
 atgcttgaag gtaacggcca gtacacgctt ttggccccga ccaatgaggc cttcgagaag 20520

 atccctagt agactttgaa ccgtatcctg ggcgaccag aagccctgag aggtgagcat 20580
 cctttggctc ctgctgctc ctcatttctg cagctagatt gagcccaaga cctgctctgg 20640
 tccaagatga acataccacc tgccatgagg tgaccctcag gatatccact gcagccatgg 20700
 gctgggtca tctgtctctg ttgcttcagc taaccgtgtc tctagcagcc aactactct 20760
 gagggtgac tacagaatcc agcagctttt gctctgggaga gctggactga agagaggcat 20820
 agctggagac ccatagctgg ccctggccag aaacaggag agtgaaagc tggaaagcc 20880

aaggccagag caaggctaata aggttagagca acagcttaca ggtgtggggg tggcagatac 20940

tggcacccctt gaaatggatt cctcatgccc acgcttcact attcttctct gtggctaggg 21000
gatttatgga taaacccaaa ttacagttaa aaaccagcca taggccaggc acagtgactc 21060
acgcctttaa taccagcact ttgggaggac aaggtgggcg gatcacctga gatctggaat 21120
ttgagaccag cctggccaac atggcgaaac cccatctcta ctaaaaatac aaaaattagc 21180
tgggcatggt ggtgggcacc tghtaatccca gttactcagg ggctgaggca ggagaaccac 21240
ttgaaccag gaggtggagg ttgcagtgag ccaagcttgc accactgcac tccagcctgg 21300
gtgacacagc gacactccgt ctcaagaaaa aaaaaaaaaa aaacagttat agtagtcaac 21360

ttttgactct ccatttcaga tttcgtcatg ccctcctcaa tgagctgcta agttaggcag 21420
tgcattgatt attgctgcag gagaggggaag gaaggagcta acgtgttttc acatgttttc 21480
cttttggaga tgagaaagga ggactctgcc tccccctac cctgccccctt tctactccag 21540
gacctctgaa aggccatgag cacaagctg ctgcctgagt cccctgaaat gcagggtacg 21600
ccccaggtct ctgatgtacc ccaccacact tttcctctca aacatattcc aggatcactt 21660
gatttctttt gaatctattt aaaccaccg tgtcaatgtg ctatataaaa tgtctaatagc 21720
atrtcagaca ccctatacat ctatacattt aaagtgttct ccttctatct gtgcagggat 21780

gggaaagggc atatttctga aagcacagat gggaagacgg gatttgttcc gtgtccaggt 21840
gattatggta ccctatgcg cctggccggc actggggaca gaggccatga aatgaatac 21900
agcacagcct ttgcctcaa gaaacttaag acctagtaga aatggcaggc tttaaaacag 21960
gttgttggga tctgatttgg tgagtgcaat gacagagata ctacacagcac aaaatgggga 22020
atgagggcgg gcattgggac acacatagcc ttaaggggcc caaaggcttt tagaactgta 22080
ttccctatta aaacatgatt tgcacagagc acattctttg ctttggagac ctcagaactc 22140
cttactatag gccgggcatg gttataatcc cagcactttg ggaagccaag gcgggcagat 22200

cacttgaggc tgagagtcca agaccagcct ggccaacatg gtaaaacccc gtcttacta 22260
aaaaatacaa aattagctgg gtgtgggtgt ggccacctgt aatcccagct actcaggagg 22320
ctgaggtagg agaactcactt gaacctggga ggcagaagtt gcaataagcc cagatcatgc 22380
cactgcactc cagcctgggc aacaaagcta gactctctca aaagaaaaaa acaaaacaaa 22440
acaaaacaaa acaaaaaaaa ctcttatta taaactgtaa gaaaaaaaag gccctactt 22500
cgtcctttt gcaaatctgc ctttctctac tctaaccac gctggttcag agcaaggaca 22560
ctctgtttgg tgccatcgt gcagactgga aggaagaggt ccttgccca cacccaacag 22620

tctcctgctg ttaccggcag gttggcaggc aggcaggcga gaagcagcca gggctggtgg 22680
 tgtgtccagt ttgaagacta gtttccagcc ctggccctgc tcaccctcca agtggccctg 22740
 gcaggttctt ctaccacatc gtggacttca ctttcttct ctaagaagct caatcccca 22800
 ggccctattc ccataggcct tctcacccct tttctttccc tctggctgaa tgtggccagc 22860
 acgggcttcc aaggccatca actcgtctgc agcagcccca tgccttgagc ggccctagag 22920
 cttcctctg cctatgacag tgtggttttg gttcccacac ttgggatcag attgaaactc 22980
 gcctccgtgg tgagaatatg ggacatagag cctcggtgac cttggtgagc agcagtcag 23040

 gccacctgct cagcctgggg ttgggggggg ctctctctcc ttgactggtc cttgcatttg 23100
 cctccatcca gcctgtctgg gctctccgag gcaatggaga ccagcaggag tcacgatggg 23160
 tcaggagccc ctttgggcc tcagccctgc cctgcccct aaagtagcac ttggataagc 23220
 aaataaatta ttatacttac tatttatggg tgtggtgaat gggatggcaa aggccaagtc 23280
 ttactgatca ccaaacctta agatatatcc tggcagctag tagacccttg ggctaaatga 23340
 acagaaaact ggacaaaata agtgtacaca aataactcaa agctgtcatt tgtacacttt 23400
 tcgtcttttc ctactacagt ttacattttt ataaagtgga gtagatttct aaaatcccgt 23460

 ggtaggctct cttagtttt tcttgtatcc ctgaagtca gctacaaata agctaatacac 23520
 taacatttgt tgagcattta ctctgttgc aggccccgtg ccgagtgtt taggttcaga 23580
 atttcatgct atccccacag cagccctagg agatgaatgc aattcttatg tccacttgac 23640
 tgataaggaa gttgaggttc aaagaggcta aatgactctc ccagggtccc acagctggaa 23700
 agtggccaca gggccccagc tggttttcta gggcagcagg cagaaggcga ggaggatctg 23760
 ggccctgtgg tgccccagcc tcatctgagg gtccctcatct gagagaacag gatcctcaca 23820
 gcatgggcag gctgcaagtg gtcctgagg ttatcgtgga gtggaccctg acttgacctg 23880

 agtctgtttg gaccccagac ctgctgaaca accacatctt gaagtcagct atgtgtgctg 23940
 aagccatcgt tgcggggctg tctgtagaga ccttgagggg cacgacactg gaggtgggct 24000
 gcagcgggga catgctcact atcaacggga agcgcgatcat ctccaataaa gacatcctag 24060
 ccaccaacgg ggtgatccac tacattgatg agctactcat cccagactca ggtaggccag 24120
 gcctccgggg gccttggccc tgctggccc accatctctt ctgccatcct ttgtggcggg 24180
 ggaggggaaa ttcagagatc tttgggcgac ttccctgctt ggaccagct cacagcttct 24240
 cggccactgc aaatgttgg gttgtgacca gactgatgtg tcttgagctt caggcttga 24300

 agtgcagtgg agaggcagtg gggagctatt gaaggggtct ggggacagac tcaatcacag 24360
 aggcctttca gaagatctgc ctgctgtgca tgggcaaaga gggccacttg ctgacctcag 24420
 agcatgtgct ttctcagtag tgcccaagct gtcccatggt cactgacca gttagaatga 24480

ctgaatggac ttggccttgt gtctcattag gaatcctagc cccattctag tcttccagtg 24540
 agatctgtcc atgagtgaag gaatctcaca ggaaaaaaca aaatgcttct atgggtgtgg 24600
 ttgctggcct tatctacacc acagaagcca tcacacagac tgtctttctt cccattgtta 24660
 gaatgtgcc tgaccaagca gcccacaggg cctgggacag aggctgatct ctgcctaact 24720

 gagctcacct ctctccctc tctctctgac tggttagatt ttctaggtga ctgttccct 24780
 gatgacacaa gcccgctggg ccccagcagt gtttagaggg gttgttgact cacgagatga 24840
 cattcctgct gatgtgtgc atgccctggg gtggatgaat gataaatgaa aacagcgtt 24900
 ttaactttt aaccacttt ctcttctt gtagccaaga cactatttga attggtgca 24960
 gagtctgatg tgiccacagc cattgacctt tcagacaag ccggcctcgg caatcatctc 25020
 tctggaagtg agcggttgac cctcctggct ccctgaatt ctgtattcaa aggtaacatg 25080
 gggaaggcat cctgttaga ttgtccctgg aggcagcttc cccaccctg tcacctccac 25140

 aacactctcc gatttacagc accccatggg acattagaac ttccactcag ctcaaccaa 25200
 agcagatgtg acttcagcag aaacttcaga ggctctgttg ttctattagg cagtgcagag 25260
 aatgcctttg gggagccgtt cctcagaact caagactga catctgggag gcagccgttc 25320
 ctcagaactc aagacttgac atctgggaga gcagagcatt ccctgcctt tctatttga 25380
 ggtcacttg ccaatgtata gtcaagaggt cagagtgagg gtacagctga gctgcagccc 25440
 caggaagca gagaagggg ccaagtgtg tgcgtgctg ccctccctc ttagggcaaa 25500
 actcaaaca cccttgatta tctggatctt cttaattct ccatagaaga taccagatgt 25560

 taaggaatat tggcagcttc acttggtttc tcaatecctg ttccaaact caaggagga 25620
 tgggctttt cactgtattt atctctcacc actctcttca ttgcaggagc acatctctt 25680
 ggacctaacc atacccttt ctgtgatag gaaccctcc aattgatgcc catacaagga 25740
 atttgcttg gaaccacata attaaagacc agctggctc taagtatctg taccatggac 25800
 agaccctgga aactctggg gcgcaaaaac tgagagttt tgtttatcgt aatgtaagtt 25860
 ctgggtccta aatcatgctc ctgggaagct ccttactgtg ggacttgtat tagtgtaaaa 25920
 aaaaatgtcc tcaataagca ggagtgtgca tgagaactgg ttgctgacaa ggaaggaat 25980

 aatttctgga aaatatagat aacaaaatga gatcctgcag aaggattgga atctctttt 26040
 ctggaggcct ttgagaataa accacacaaat tatccaacct gtattgtgaa ggaataagtc 26100
 cttcttgaat tcaggaatta acacctggga ggagggatgg agttcagact ctttctgagc 26160
 ttatgagaag agaagcccc taaactaaaa tacagccctc cttggtccaa aaggtgcctt 26220
 ctctcttctg ctgtatctt tttgttttca aaccaacag ttaccctgga aatcaaaaag 26280
 gaagtacaac tcaacatagc tcttgcttgg gaccaaccag caccatttgg ctaaagatgg 26340

ttatcatctg ttaaacaag aaataaataa atgggttcaa cgtatttatt tcaacattgt 26400

 caatggacct catgtgtaac tgatattctc attatgggac ctctgtgtga ctttattggg 26460
 gcctctctaa ccgttcttcc ctttaaggaag accatttatt gttttatttc ctggagaaaa 26520
 tacatcattt tatcccagcc ttaataacc atcccagtgt atactccttc atcttcatgg 26580
 ataatgacce tgctacatgc tctgaacaaa tcaggaggcc cctctgtgaa gtataaccag 26640
 tcctttcttt ctctgtccct cttctgtgca gagcctctgc attgagaaca getgcatcgc 26700
 ggcccacgac aagaggggga ggtacgggac cctgttcacg atggaccggg tgctgacccc 26760
 cccaatgggg actgtcatgg atgtcctgaa gggagacaat cgctttaggt aattagtcc 26820

 atccccgggt ggagcttctg cccagtggtc atgctggagt gggatgtggg gccccagcta 26880
 tttgtcaage tttcttctac cttggggatt caattaacac tagcagtgca ctgctcgcac 26940
 ctccagact tgggatgggg aaaaggcaag ggtcgccttg aaagcttaca ttgggaagaa 27000
 gggttacttc taagagtga atcttcacat gcatgggaag caggagggg ggactacatt 27060
 tttatgactg aagtgaagg aaaacatcac cctctcattg taaagctcca agtgagccaa 27120
 gagcacatag ttacatgac acgatgagcc tctcactctc tgcgcagtat ctgtttattg 27180
 caactgaagc acccttgtga gtttgttttc ttgcccggct atctccattt ctgacttgct 27240

 cattcacctt ggggtgctgt catattgaat gtttccctgt cactgacttc agccacctgc 27300
 acaaggcctt ggagaccaca cccctctgcc ctcccagaat catatccctg gaggcctcagc 27360
 tagtctctgg gtcagccata cctctgccct tcttttccc tctttctcc tgtggcctct 27420
 gagctctggc catttaacag agcttagcat ttttgcctgg tggagagagc tggagcctgg 27480
 aatcactccc tctttgtgca tacggagggc atgaaaacca aggtgtgtgc attccagtgg 27540
 cctggactct actatctca gtggtgaggt atttaaggaa aatacctctc agcgtggtga 27600
 ggtatttaag gaaaatacct gttgacaggt gacattttct gtgtgtgtat ctacagcatg 27660

 ctggtagctg ccatccagtc tgcaggactg acggagacc tcaaccggga aggagtctac 27720
 acagtctttg ctcccacaaa tgaagccttc cgagccctgc caccaagaga acggagcaga 27780
 ctcttgggta aagaccaact taagtacacg tctccatttt tctaaagtag tgatccctca 27840
 gggccccagc agcaaacagt tggcacatca aggattgact tgaagggatt ttatgacaag 27900
 actattagtg aaagagtggg cgggactaaa ggaactagca aaggatgagg ccaaccaggg 27960
 actagcaacc ctgggaagcc ttactacc ctaggcctgg gggaatggga ggatgagagc 28020
 aggaaccagg gaggtcatga gccttggaca agggcacaga acagcagcca gagccatgtg 28080

cagccagcca ctgtcagaac catgcaaggg ggaccactca gcgccccagc ctccctctca 28140
 gacagtggcc atctgggtct cttgttggct gatgagagag caggaggagag cccactgatg 28200
 cagttcatag agctcagcct cctgggcagg aaaccgggca gagaggagta gaaaagaatt 28260
 aagggtggct gcgaccagcc cagtactga ggcacgtttc cactggaga cctatgagca 28320
 cagtataat aaagccagt acctgactg actatccctc cagacaaaag ctttccaag 28380
 aagttagtca tggctctgag agatctagt gaggatgttt ggaggggat ctagtggtta 28440
 cgggtggcta agaaaaatga ggaaggtaag agtatcttgc agcctgtgtt gggaggatta 28500

 aataggatgc cacacacagg gccaggcaga cagcctggtc agtaatagcc atgacgatgg 28560
 gggcgggggg agcaggaatg ggagtgcag tgtttagctc agatgcatgc ctgtgagaga 28620
 tgcttccact ctacagaaa gatgagacca aggaaaagga ggaggaagag gaaggacctt 28680
 gacaaaacct ggggccaca ttgtctacac ctcccttctt gctctagagc agaatagaaa 28740
 gttcaggttg caggcagctc taagtgaat tcgtgtcctg tttaatcttc tttattgcta 28800
 aatgaatgcc tgtgtctgtg atgctgacgt atgttcctaa ggagaggga gaagttcatt 28860
 ctgaacataa acttttcatc ctctctctgt ccagcaagaa tggaatatc cccaagtggc 28920

 ctgagccagc ttggctttct ttttgtttc aattatgtgg gagttagga ggggatggg 28980
 aaaagcttc caaacacacc ctccccagg cctgaggcac ccctggggga cagagagtgt 29040
 tagagtttg tacaggtgtt agagatattg aaaggacatc ccatgcacc caggggctgg 29100
 tgtggctctg tacttccagg caatattttg tggaggga acctgtcag ctccaggttg 29160
 tggatgtttg aaaatcagtt ggtaccagt ggctccatcc tctggcagc atgtggattt 29220
 gtcaataacc aagtgaactc tccaaaataa gttaaaactt cctcccttct cagtttcaag 29280
 atgctggaaa tagctgttca taagccctgg ggaatttag cctttggct ggtaatggga 29340

 gtatccgaga tgagaggca gctgaaaact ttcggaatga cctccacac ttaatttggg 29400
 aatgctct gcaccttat gggcaaccag atgcctgcc cagtgtctgg agacactgat 29460
 gtgggctgaa agaatgctg agacgtgacg aggagatg ctgcggagg aatatcccc 29520
 tcagccctga cctcatcggc tccatgctc ctccacagta cagctgtcta ctctttaag 29580
 ttctccctc aggaaatagc catctcaaac agaatgtgca tttgaggca gaatgtgtaa 29640
 atattgact actgtgttat aaccgtcagg agccatgctg atgatgaaac gtcccagatg 29700
 ccggtgctgg aaagtcctt ggctttccaa gcaaatattt atctcatgga aacatgagtc 29760

 atactcacag aggagtatgg attaactct tctcagcagc caggagccc agcatcccag 29820
 acagcatatt taaccagag gccaaactgac tctggggca gatttgggt catgaacatg 29880
 tgctttgtgt cctctgacca ttagacagat tgggtcac aacgtgagt atacagtggg 29940

agcttaataa gtgcttattc cctgggcagg gagttcttca tttcaggggt gaccacttac 30000
 atcttctcct ctgggccctc cttgaccagg ctaattacca ttcttgggat taactctatc 30060
 tccttttccc gcaacctgca ggagatgcca aggaacttgc caacatcctg aaataccaca 30120
 ttggtgatga aatcctgggt agcggaggca tcggggccct ggtgcggcta aagtctctcc 30180

 aaggtgacaa gctggaagtc agcttggtaa gtgtcctgca aatcaaagc tggctaatt 30240
 tccccagggc agggctccag gacatatctc acccccagga tggattata cacacacaac 30300
 cttcaagttg cagcccgaat ctctgagtgt aattcgtcca aagaaaaaga gaaaagagaa 30360
 gagggcttcc agggaaatca agtgagatca tagttagaca tgagtaagaa cttccagatt 30420
 tacaagggaa tagagcatct gatttggcat ctgagagagg ctattagatc ttccttctct 30480
 taaggagggt gtaggcaact agttatgtga ctgaagagat cagtctgtac tcacaccatc 30540
 ccacccccca aaccagggc ttcactgagt tgtacatga accagacat cccaagaggc 30600

 tttttgagtt ctgacacttg ctctgtgagc cttcccttgc tctgcacatt gatgatataa 30660
 ctttghtaact gactaagag tgttctaaa gcagatagcc agccgagctc cagaaatctc 30720
 cctggtctca cctgcagagg ccactgacc cctctgtggag ggaccgctct tcagtgtgtg 30780
 gctggcttct actctctgct cctctctctt ggtcttcagc catccattgc tcaccagttt 30840
 ctcacgagga gcataggaag atatgcatgt agggaggtag gcacggggat gacttgtttg 30900
 actttagcag gtcattcaag aatctcctcg cacctggttt cagatgctgg ggtcctgtct 30960
 gtcacaggct tctgtgcctc ctacccctt gaggttgtca catggccctt caggaaggcc 31020

 tgagatagat ttgccctggg tgggectcct atgagaaaat ctttaagtgag gcaccaggc 31080
 aaaatggaaa gagccttttg cccagagcag gaagcctgtc ttccatttcc agctgttcca 31140
 cctactttagc ttaaaagagg cacttgcct gtcttcagtc tcagtctcag tctcctctc 31200
 tgtggaatgg gacaataata tctactctcc ttatcataca ctgctgtgag gactgagtgg 31260
 atcacacaaa aaagcattat gtaaatgca aagtgtctaaa tccacacagg agatttgaat 31320
 taatccacca cactgaaggt ctgtcaaggg caggactgt ttcatcacc agagtatccc 31380
 cagtctaaca caggacttgg catatgaaaa gtgttcagta ggccgggtgc agtggetcat 31440

 gcctgtaate ccagcacttt gggaggccaa agtgggcgga tcatctgagg tcaggagtcc 31500
 aagtccagcc tggccaactg ggtgaaacca catctctact aaaaatacaa aattagctgg 31560
 gcgtggtggc acatgcctgt aatcacagct actctggagg ctgaggcagg agaactcatt 31620
 gaaccaggga ggcggagggt gcagtgagtc gagatcatgc cactgcactc cagcctgggc 31680
 gacaagattg aaactccatc tcaaaaacaa agaacaagga aaaaaacgaa aactgttcag 31740
 taaacacttg ctgaatgaat aaaataata tataaatgta taaataatg ctctactttc 31800

aaccactact ctgtttttct tttagaaaaa caatgtgggtg agtgtcaaca aggagcctgt 31860

tgccgagcct gacatcatgg ccacaaatgg cgtgggtccat gtcacacca atgttctgca 31920
gcctccaggt aagtgtcgca tcccactga ctctgcagcc agtccttttc ttcattgtggc 31980
agttgggtgga gagaagaaaa actgttctaa acaatgatga gaataacatg taatttgat 32040
agttaaactg tgcctatgtg actgattgca gagtgaattg ggagctgttg gttttgaatg 32100
caccacacta aggaatgtga ggacacattg ctctttgagg agttgccag ctatattagc 32160
tcccctcgga cacagcccag ttttctgtat tcgcgtggat gctgtccgcg cgattcccag 32220
cactcctctt acagcatctc acctcagtgt atgttccttg cctccagtgc agttgaacct 32280

cagtctgcc tctcctcatg tgtgcattca cctttcttgg tgctctctcc ccatgggcca 32340
agttctacca tgagttafga aacattatgg agaaaacatg tctttggaaa tgtgagccag 32400
aaagcccacc agtgcccctc agtcacgggtt gttatgaatg acatgctaata ggtttcactc 32460
tggtcaaacc tgccttttct ttctcttca gccaacagac ctgaggaaag aggggatgaa 32520
cttgagact ctgccttga gatcttcaaa caagcatcag cgttttcag ggtaaatgac 32580
ctgctaggtt tgcgcctagc ctgagcagcc tcaggctctc tgtttgggcc atagaggagc 32640
ctctccagcc cctgtcttcc ttggctgctc cccagggtc tcttaaaact tctcccact 32700

cccactgagg catcctcagc cccagcctgt gtcaaattca gagtaagaa ccaagcaac 32760
tccttgctt tcatgggcca aagcgcaggc ttccacaccg aggcctctga gcctcagatc 32820
atggggaagt cactgctgga gagaacagac atagctctgg aagccatctg cccaagaggg 32880
cagcccatec caagttcacc ttacagtggc caggcctgcc ctgagccggg gcctctgggt 32940
cactctctg ctgtccatgg cattgcccac cctgggtgag gctggggctc tctggggcac 33000
tgtatgtatt ctggatacag ggatactggg ctgcctatgt gtgtggagcc atcccttct 33060
tgcccagcc ccacctcct ctcaaacct ctctggetct ttctgagett cctttctg 33120

tcccagctt gccagtgct cagtgccccca cttggctctt ttgctacttc gggtcaggtg 33180
gagcctcttg ggaatgtgaa gtgccttaca gaaagattgc acttcaagag gagaggctgc 33240
aggagccat cctaaacca gaggcctgga gcttactgtg tcactttact tttgtacaca 33300
gggtctctct tagtgcctc gagaaggatt cttggccctg agcttctact cctgaggcca 33360
cctctgtgca gccccagctc cctcaactct aggctgtagt ctgagggga aagcctggct 33420
tgggggtctc ctaggatgt ccacctgaag gcacactga taggggcttg cacaacttat 33480
gtctgccaag gccacctgag gaactcctg gtgcctataa gttccactt ccccttctc 33540

ttcctcgccc cagcattttt tctgagtagg ggtggcaatg ggcaaagcca ttgtcataag 33600
 cagttgcagg tataactttc actagaaaac ctgacacctt gtgttttctt tcaggcttcc 33660
 cagaggtctg tgcgactagg tgagtctggt ctgggtttga agtcattgca gacctgttta 33720
 ggccfttacc ccaagcaagc ccaagcctgc catctgctgt atatagataa gaacatcatg 33780
 gtgcagtaaa agaagcctgg cctttggagt cagaacagca gggtgacttg gggtcagacc 33840
 cagagcacc ctttccctc tctgtaagat gaggataata agagtaacaa ctttttaggg 33900
 ttaaggtgag ttttcagctt aggaagtctg ggaatattgc aaagggttg gcaggaaccc 33960

atggtgagga tctagttcca agttgatagg tacagaaaac cagaacatcg ggccttgagt 34020
 aaagagtgaa gtttcacaaa ccacaaagca cctgctatgt gcaggagagc atggcagaag 34080
 gaggctgctt ggcctggtc cttgagattc tgacagtgtc ctagacagac atggggagat 34140
 ctgcacctat ttgacgttac caacttctct ttttcagccc ctgtctatca aaagtatta 34200
 gagaggatga agcattagct tgaagcacta caggaggaat gcaccacggc agctctccgc 34260
 caatttctct cagatttcca cagagactgt ttgaatgttt tcaaaaccaa gtatcacact 34320
 ttaatgtaca tgggccgcac cataatgaga tgtgagcctt gtgcatgtgg gggaggaggg 34380

agagagatgt actttttaa tcatgttccc cctaaacatg gctgttaacc cactgcatgc 34440
 agaaacttgg atgtcactgc ctgacattca cttccagaga ggacctatcc caaatgtgga 34500
 attgactgcc taigccaagt ccctggaaaa ggagcttcag tattgtgggg ctcataaaac 34560
 atgaatcaag caatccagcc tcatgggaag tcttggcaca gtttttgtaa agcccttgca 34620
 cagctggaga aatggcatca ttataagcta tgagttgaaa tgttctgtca aatgtgtctc 34680
 acatctacac gtggcttggg ggcttttatg gggccctgtc caggtagaaa agaaatggta 34740
 tgtagagcctt agatttccct attgtgacag agccatggtg tgtttgtaat aataaaacca 34800

aagaaacata 34810

<210> 52

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> gene protein product

<400> 52

Met Ala Leu Phe Val Arg Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Leu

1 5 10 15

Gly Pro Ala Ala Thr Leu Ala Gly Pro Ala Lys Ser Pro Tyr Gln Leu

20 25 30

Val Leu Gln His Ser Arg Leu Arg Gly Arg Gln His Gly Pro Asn Val
 35 40 45
 Cys Ala Val Gln Lys Val Ile Gly Thr Asn Arg Lys Tyr Phe Thr Asn
 50 55 60
 Cys Lys Gln Trp Tyr Gln Arg Lys Ile Cys Gly Lys Ser Thr Val Ile
 65 70 75 80
 Ser Tyr Glu Cys Cys Pro Gly Tyr Glu Lys Val Pro Gly Glu Lys Gly
 85 90 95
 Cys Pro Ala Ala Leu Pro Leu Ser Asn Leu Tyr Glu Thr Leu Gly Val
 100 105 110
 Val Gly Ser Thr Thr Thr Gln Leu Tyr Thr Asp Arg Thr Glu Lys Leu
 115 120 125
 Arg Pro Glu Met Glu Gly Pro Gly Ser Phe Thr Ile Phe Ala Pro Ser
 130 135 140
 Asn Glu Ala Trp Ala Ser Leu Pro Ala Glu Val Leu Asp Ser Leu Val
 145 150 155 160
 Ser Asn Val Asn Ile Glu Leu Leu Asn Ala Leu Arg Tyr His Met Val
 165 170 175
 Gly Arg Arg Val Leu Thr Asp Glu Leu Lys His Gly Met Thr Leu Thr
 180 185 190
 Ser Met Tyr Gln Asn Ser Asn Ile Gln Ile His His Tyr Pro Asn Gly
 195 200 205
 Ile Val Thr Val Asn Cys Ala Arg Leu Leu Lys Ala Asp His His Ala
 210 215 220
 Thr Asn Gly Val Val His Leu Ile Asp Lys Val Ile Ser Thr Ile Thr
 225 230 235 240
 Asn Asn Ile Gln Gln Ile Ile Glu Ile Glu Asp Thr Phe Glu Thr Leu
 245 250 255
 Arg Ala Ala Val Ala Ala Ser Gly Leu Asn Thr Met Leu Glu Gly Asn
 260 265 270
 Gly Gln Tyr Thr Leu Leu Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Glu Lys Ile

Glu Thr Leu Asn Arg Glu Gly Val Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn
 530 535 540
 Glu Ala Phe Arg Ala Leu Pro Pro Arg Glu Arg Ser Arg Leu Leu Gly

 545 550 555 560
 Asp Ala Lys Glu Leu Ala Asn Ile Leu Lys Tyr His Ile Gly Asp Glu
 565 570 575
 Ile Leu Val Ser Gly Gly Ile Gly Ala Leu Val Arg Leu Lys Ser Leu
 580 585 590
 Gln Gly Asp Lys Leu Glu Val Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser Val
 595 600 605
 Asn Lys Glu Pro Val Ala Glu Pro Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly Val

 610 615 620
 Val His Val Ile Thr Asn Val Leu Gln Pro Pro Ala Asn Arg Pro Gln
 625 630 635 640
 Glu Arg Gly Asp Glu Leu Ala Asp Ser Ala Leu Glu Ile Phe Lys Gln
 645 650 655
 Ala Ser Ala Phe Ser Arg Ala Ser Gln Arg Ser Val Arg Leu Ala Pro
 660 665 670
 Val Tyr Gln Lys Leu Leu Glu Arg Met Lys His
 675 680