(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년02월12일
(11) 등록번호 10-1947101
(24) 등록일자 2019년02월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/10 (2017.01) *C12N 9/12* (2006.01)
C12P 19/34 (2006.01) *C12Q 1/6806* (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/1075 (2013.01)
C12N 9/1276 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7003649(분할)
(22) 출원일자(국제) 2009년04월09일
심사청구일자 2018년02월23일
(85) 번역문제출일자 2018년02월06일
(65) 공개번호 10-2018-0016635
(43) 공개일자 2018년02월14일
(62) 원출원 특허 10-2016-7013385
원출원일자(국제) 2009년04월09일
심사청구일자 2016년06월15일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2009/054329
(87) 국제공개번호 WO 2009/125006
국제공개일자 2009년10월15일
(30) 우선권주장
0806562.5 2008년04월10일 영국(GB)
(56) 선행기술조사문헌
KR101653775 B1*
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 13 항

(73) 특허권자
써모 피셔 사이언티픽 발틱스 유에이비
리투아니아 엘티-02241 빌니우스 브이. 에이. 그라이치우노 8
(72) 발명자
자누라이티스 아르바이다스
리투아니아 엘티-08122 빌니우스 마로니오지 8
스키르가일라 레미지 주스
리투아니아 엘티-03103 빌니우스 노시오스 4-22
식스니에네 단기라
리투아니아 엘티-03127 빌니우스 코나르스키오 32-26
(74) 대리인
유미특허법인

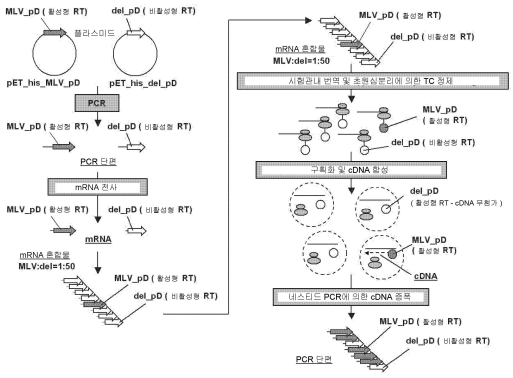
심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 **핵산 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은, (a) 타겟 단백질을 코딩하는 하나 이상의 RNA 또는 DNA 분자를 포함하는 RNA 또는 DNA 분자 어레이를 제공하는 단계; (b) 상기 어레이로부터 타겟 단백질을 생성시켜, RNA 또는 DNA 분자가 복합체에 비공유 또는 공유 결합된, RNA-단백질 복합체 또는 DNA-단백질 복합체를 형성하는 단계; (c) 상기 복합체를, 거의 모든 또는 모든 구획에 1개 이하의 복합체가 포함되도록 구획으로 나누는 단계; (d) 상기 복합체를 타겟 단백질의 활성을 허용하는 반응 조건에 두는 단계; 및 (e) 타겟 단백질과 관련된 활성을 토대로 타겟 단백질을 코딩하는 핵산을 선별하는 단계를 포함하며, 상기 복합체가 DNA가 비공유 결합된 DNA-단백질 복합체인 경우, 단계 b)는 각 복합체에 대한 분리된 구획 없이 수행되는, 타겟 단백질을 코딩하는 핵산의 제조 방법을 제공한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12P 19/34 (2013.01)
C12Q 1/6806 (2018.05)
C12Y 207/07049 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
KR101828902 B1*
J Virol. 2007 Nov;81(22):12337-47.
J Virol. 2006 Sep;80(17):8379-89.
WO2007022045 A2
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명 세 서

청구범위

청구항 1

몰로니 뮤라인 백혈병 바이러스 (Moloney Murine Leukemia Virus) 역전사 효소로서,

서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하며,

42℃ 내지 60℃의 온도에서 최적의 활성을 가지며,

상기 아미노산 서열이

(a) D200N, A 또는 G를 포함하거나, 또는

(b) (i) D200N, A 또는 G 및 (ii) 하기 돌연변이들 중 하나 이상의 조합을 포함하는, 역전사 효소:

T330P; E607K, G 또는 A; T287A;

Q221R; I49V 또는 T; N479D; H594K, R 또는 Q; H634Y; D524A, N 또는 G;

A502V; D653G, A, H 또는 V; K658R 또는 Q; P130S; Q237R;

A307V; Y344H; Q430R; D449G 또는 A; A644V 또는 T; N649S;

L671P; E673G 또는 K; M39V 또는 L; Q91R 또는 L; M66L; W388R;

I179T 또는 V; L333Q; R390W; Q374R; 및 E5K.

청구항 2

제1항에 있어서,

대응되는 야생형 효소에 비해 50℃ 이상의 온도에서 더 높은 활성을 가지는, 역전사 효소.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

대응되는 야생형 효소에 비해 50℃에서 더 높은 활성을 가지는, 역전사 효소.

청구항 4

제1항에 있어서,

50℃에서 대응되는 야생형 효소에 비해 110% 이상의 비활성(specific activity)을 가지는, 역전사 효소.

청구항 5

제1항에 있어서,

47.8℃의 온도에서 cDNA를 합성하는 능력을 가진, 역전사 효소.

청구항 6

제1항에 있어서,

2 이상의 돌연변이를 포함하는, 역전사 효소.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 2 이상의 돌연변이가 D200N, A 또는 G 및 T330P인, 역전사 효소.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 2 이상의 돌연변이가 D200N 및 T330P인, 역전사 효소.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 2 이상의 돌연변이가 D200N, A 또는 G 및 N479D인, 역전사 효소.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 2 이상의 돌연변이가 D200N 및 N479D인, 역전사 효소.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 돌연변이가 D653G, A, H 또는 V인, 역전사 효소.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 돌연변이가 H594K, R 또는 Q인, 역전사 효소.

청구항 13

제1항에 따른 역전사 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 타겟 단백질을 코딩하는 핵산의 제조 방법 및 그에 따라 수득가능한, 핵산 처리 효소, 특히 역전사 효소 등의 효소를 포함하는 타겟 단백질에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 단백질 진화(protein evolution)는 대규모 라이브러리로부터 단백질의 선별 및 방향적 진화(directed evolution)를 위한 공지된 기법이다. 기본적인 선별 원칙은 특정 표현형(단백질)과 이것을 코딩하는 유전자형 간에 연관성(linkage)이 있음을 확보하는 것이다. 이러한 표현형-유전자형 연관성은 3가지 상이한 방식으로 구현할 수 있다:

[0003] - mRNA 디스플레이, 및 어느 정도의 파지 디스플레이, 박테리아 디스플레이, 효모 디스플레이 등의 공유 결합

[0004] - 친화성 상호작용을 이용하는 비-공유 결합. 그 예는 리보솜 디스플레이, CIS 디스플레이, 플라스미드 디스플레이 등이 있다.

[0005] - 시험관내 구획화(IVC: *in vitro* compartmentalisation), 구획화된 자가-복제(CSR: compartmentalized self-replication), 간단한 박테리아 스크리닝, 고성능 스크리닝 등.

[0006] 상기 단락에서 언급된 바와 같이, 공유성 표현형-유전자형 연관성의 일 예는 mRNA 디스플레이를 이용하여 달성된다. Roberts & Szostak (1997)가 지적한 바와 같이, mRNA와 이로부터 코딩되는 펩타이드 또는 단백질 간의 공유적 융합은, 3' 말단에 펩타이드 억셉터 항생제인 퓨로마이신을 가지고 있는 합성 mRNA의 시험관내 번역에 의해 형성시킬 수 있다.

[0007] 표현형과 유전자형 간의 비-공유성 연관성은 리보솜 디스플레이를 이용하여 달성할 수 있다. 리보솜 디스플레이에서, 타겟 단백질을 코딩하는 RNA 한 개 이상을 포함하는 RNA 어레이를 시험관내 번역 시스템에 투입시켜, tRNA가 커플링된, 리보솜, mRNA 및 단백질의 비-공유적인 3중 복합체가 형성되게 한다. 이러한 3중 복합체 어레이는 안정화되어야 한다. 즉, 시험관내 번역 중에 형성되는 각각의 3중 복합체는 말단에 정지 코돈이 없는 mRNA를 이용한다. 3중 복합체는 또한 저온(4℃)과 고농도 마그네슘(50 mM) 조건에서 안정화된다. 안정적인 복합체에서는, 표현형과 유전자형 간의 연관성이 보존된다. 여전히 3중 복합체에 부착된 상태로, 타겟 단백질을 단백질의 속성을 기초로 선별하는 선별 단계를 수행한다. 그 후, 선별한 3중 복합체를 해리시켜, 타겟 단백질과 조합된 mRNA를 RT-PCR로 증폭시킨다.

[0008] 일반적으로, 리보좀 디스플레이는, 여러가지 타겟에 결합하는, 펩타이드(Mattheakis et al., 1994; Matsuura and Pluckthun, 2003) 및 단백질(Hanes and Pluckthun, 1997; He and Taussig, 1997; Irving et al., 2001)의 선별에 성공적으로 적용되고 있다. 일부 경우들에서는, 자살 저해제(Amstutz et al., 2002)나 활성 부위 리간드(Takahashi et al., 2002)를 이용한 단백질의 친화성 선별을 수행하여, 효소 활성을 선별하는데, 리보솜 디스플레이를 이용할 수도 있다.

[0009] 시험관내 구획화(IVC)에서는, 표현형과 유전자형의 연관성은 유중수 에멀젼내 유전자의 시험관내 구획화를 통해 실현된다. 대부분의 수 구획에 단일 유전자가 2개 이상 함유되지 않도록, 에멀젼 제조시 사용하는 유전자의 수를 계산한다. 구획화된 유전자는 전사 및 번역된다. 그 후, 합성 단백질의 활성을 평가한다. 단백질 활성을 기초로 한 이후의 선별을 통해, 원하는 특성을 가진 활성 단백질을 코딩하는 DNA를 증폭시킨다. 대부분의 IVC 활용에 사용되는 물 액적의 크기는 2-3 ㎛이고, 반응 부피는 ~5 펨토리터이고, 에멀젼 1 ml 당 유중수 구획(50 ㎕ 수상)의 수는 $\sim 10^{10}$개이다. IVC 선별 시스템에 대한 최초의 성공 사례는 타겟-특이적인 DNA 메틸화 활성에 대한 것이다(Tawfik and Griffiths, 1998). HaeIII 메틸트랜스퍼라제 유전자를 구획화하여, 전사 및 번역시킨다. 조인자의 존재 하에 시험관내에서 합성되어진 메틸트랜스퍼라제는 자신의 DNA를 메틸화할 수 있었다. 메틸화된 DNA(반응 산물)가 HaeIII 제한 엔도뉴클레아제에 의해 절단되지 않는 내성을 토대로, 메틸트랜스퍼라제를 코딩하는 유전자를 10^7 배수의 다른 DNA 분자들 중에서 선별하였다.

[0010] 지금까지, IVC에 대한 많은 변형들이 계획되었고 수행되어왔다. IVC 선별을 수행하기 위한 가장 쉬운 방법은, DNA-변형 효소, 특히 DNA-메틸트랜스퍼라제를 이용하는 방법이다(Lee et al., 2002; Cohen et al., 2004). FokI 제한 엔도뉴클레아제의 활성형 변이체를 선별하는데 유사한 실험 전략이 적용되었다(Doi et al., 2004). 활성형의 제한 엔도뉴클레아제를 코딩하는 구획화된 DNA를 절단한 다음, 바이오틴-dUTP를 병합시키고 스트렙타미딘 비드에 대한 결합을 통해 선별하였다.

[0011] DNA 중합효소의 진화에 다양한 IVC 선별 전략들이 적용되었다(Ghadessy et al., 2001; Ghadessy et al., 2004; Ong et al., 2006). 이러한 새로운 선별 방법은 활성 DNA 중합효소를 코딩하는 유전자의 '구획화된 자가-복제'(CSR)를 기초로 한다. 대상 단백질이 인 시츄(in situ)로 발현되는 통상적인 IVC와는 대조적으로, CSR은 호열성 DNA 중합효소를 발현하는 박테리아 세포의 구획화를 통해 실시된다. 프라이머와 dNTP를 보충한 PCR 완충액에 재현탁된 세포는, 에멀젼화되며 ~15 ㎛ 크기의 구획이 형성된다. 각 액적이 개별 PCR 구획으로서 제공된다. 처음 PCR 변성 단계에서, 박테리아 세포가 파괴되고, 발현된 호열성 DNA 중합효소와 이의 코딩 유전자는 반응 혼합물로 방출됨으로써, 자가-복제가 진행되게 되는 반면, 다른 박테리아 단백질은 고온에 의해 변성된다.

[0012] IVC의 변형 방법은 수중유중수의 이중 에멀젼을 이용한다. 오일 층으로 둘러싸인 물 액적을 초 당 변이체 $>10^4$ 개의 속도로 FACS에서 분석 및 분류할 수 있다(Bernath et al., 2004; Mastrobattista et al., 2005).

[0013] 또한, 결합을 위한 단백질 선별도 IVC로 수행할 수 있다. 유중수 구획내에서 발현되는 대상 단백질은, 이것을 코딩하는 유전자와 공유(Bertschinger and Neri, 2004) 또는 비-공유적(Doi and Yanagawa, 1999; Yonezawa et al., 2003; Sepp and Choo, 2005)으로 커플링된다.

[0014] 구획내에 포획된 마이크로비드를 단백질 및 유전자 커플링을 위한 매개체로서 사용하는 다른 IVC 방법들도 공지되어 있다. 마이크로비드에 부착된 단일 유전자는 물 액적안에서 전사 및 번역된다. 새롭게 합성된 단백질은 반응 구획내 동일한 비드 상에 포획되게 된다. 에멀젼을 파괴한 후, 분리되는 비드를 친화성 선별에 추가로 이용할 수 있다(Sepp et al., 2002). 에멀젼은 통상적으로 유기 용매(헥산, 에테르, 클로로포름)를 이용하여 파괴하는데, 유기 용매는 또한 비드 상에 나열된 특정 효소의 활성을 감소시킬 수 있어, 이러한 방법의 적용에는 한계가 따른다. 촉매 활성 선별시에는, 비드를 쉽게 세정하여 여러가지 반응 완충액에 재현탁한 다음, 제2 에멀젼화 단계로 다시 구획화시킬 수 있다(Griffiths and Tawfik, 2003). 그러나, 때때로 견고한 효소-비드-유전자 복합체(입체 장애 및 효소 이동성 제한에 의함)가 필수 반응 요건을 충족시키지 못해, 부착된 효소의 활성이 유리형 효소의 활성 보다 낮을 수 있다. 또한, 이러한 방법에는 많은 추가적인 성분(예, 친화성 테그, 항체 및 비드)들이 사용되어야 하기 때문에 기술적으로 복잡하다.

[0015] IVC에 사용되는 에멀젼 조성은, 물 구획의 안정성과 mRNA의 시험관내 전사 및 이후의 타겟 단백질의 번역 효과를 보장하도록 설계된다. 시험관내 진화는 개선시킬 광의의 타겟 범위를 포함한다. 일부 대상 단백질과 효소는 견고한 하드-워커이며, 여러가지 완충액, 특히 IVC에 사용되는 반응 혼합물에서 충분히 활성을 보일 수 있다. 그러나, 최적화된 또는 특정 조건에서만 작동할 수 있는 복잡한 효소들도 다수 있다. 또한, 시험관내 진화의 제1 법칙은 - "당신이 선별하고자 하는 것을 진화시킬 것이다"라는 것이다. 즉, 전사/번역 반응 혼합물내에서 진화되고 최적화된 효소는 그러한 특정 혼합물에서 양호하게 작동할 것이며, 그 자신의 완충액에서는 훨씬 더 좋지 않게 작동될 수 있음을 의미한다. 일부 경우에, 효소가 작동하는 조건은, 구획 안에서 단백질을 발현시키기 위해 사용하는 시험관내 전사 및 번역 혼합물과 화합되지 않는다. 부분 해법은 여러가지 용질을 에멀젼 구획 안으로 운반하는데 사용되는 나노-액적 전달 시스템이다(Bernath et al., 2005). 유중수 구획을 이용한 보다 복잡한 조작들도, 마이크로 유체 장치를 이용하여 수행할 수 있다. 고도의 단분산 단일 또는 이중 에멀젼을 초 당 수계 액적 최대 10000개를 처리하는 속도로 제조할 수 있다(Thorsen et al., 2001; Okushima et al., 2004). 제조되는 물 구획체들을 마이크로유체 채널로 운반하여, 융합, 세분화 및 분류할 수 있다(Song et al., 2003; Link et al., 2006). 그래도 구획 내부의 전체 완충액의 교체는 여전히 문제가 된다.

[0016] 역전사 효소는 mRNA 타겟으로부터 cDNA를 합성하기 위해 사용하는 매우 중요한 시판 효소이다. 역전사 효소의 특성을 개선시키기 위한 많은 연구들이 행해져 왔다. 그러나, 역전사 효소를 시험관내에서 진화시키는데 적합한, 적절하게 작동하는 선별 시스템은 지금까지 알려진 바 없다. 거의 모든 개선들이 이루어졌지만, 역전사 효소의 돌연변이는 고성능 스크리닝과 합리적인 설계를 통해 선별되고 있다.

[0017] 리보솜 디스플레이(RD)나 시험관내 구획화(IVC)도 완전 활성형의 역전사 효소의 선별에는 사용될 수 없다. 리보솜 디스플레이에 사용되는 3중 복합체는 역전사 효소를 선별하는데 필수적인 고온에서는 일반적으로 안정적이지 않아, 결과적으로 표현형과 유전자형 간의 연관성이 소실될 것이다. 한편, 리보솜 디스플레이에 사용되는 비교적 안정적인 3중 복합체는 시험관내 번역 추출물인 WakoPURE (Matsuura et al., 2007) 합성물을 이용하여 제조할 수 있지만, 리보좀 및 mRNA에 고정화되는 시험관내 번역된 역전사 효소는 전장 cDNA가 합성되는 동안에 심각한 입체 장애에 직면하게 될 것이다. 또한, 고정화된 효소는 트랜스 뿐만 아니라 시스로도 작용할 가능성도 있는데, 이는 표현형-유전자형 연관성이 보존되지 않게 되기 때문에, 단백질 진화 전략에 맞지 않는다.

[0018] IVC는 일반적으로 유전 물질로서 DNA를 사용한다. mRNA 시험관내 전사와 타겟 단백질의 번역은 DNA 존재 하에 공간적으로 분리된 에멀젼화된 수 구획에서 수행된다. 역전사 효소의 시험관내 진화의 경우, 코딩 DNA의 존재는 역전사 효소의 활성을 선별하는 주요한 필수 조건 - cDNA는 새롭게 합성되어야 한다 -이 필요없게 한다. 즉, 보다 나은 역전사 효소 변이체를 선별하는 것은 mRNA로부터 이의 코딩 cDNA를 합성하는 효소의 능력을 기반으로 한다. 새롭게 합성된 cDNA는 PCR로 증폭시켜야 하며, 따라서 cDNA가 반응에서 유일한 DNA 소스여야 한다. IVC 선별에 사용되는 DNA는 cDNA와 함께 증폭될 것이며, 이는 기본적인 선별 계획을 필요없게 한다.

[0019] 수 구획안에 포획된 마이크로비드(Sepp et al., 2002; Griffiths and Tawfik, 2003)를 사용하는 것처럼, 시험관내 구획화에 대한 보다 복잡한 변형들을 통해, 반응 완충액 전체를 교체할 수 있다. 이러한 방법에서, 표면형-유전자형 연관성은 견고한 선별 유닛인 mRNA-마이크로비드-단백질을 형성하는 마이크로비드를 통해 구현되는데, 역전사 효소를 선별하는 경우, 이러한 방법은 다시 입체 장애를 유발할 수 있으며 그 결과 cDNA 합성에 비효율적이다.

[0020] ~300개의 뉴클레오티드 길이의 cDNA를 합성할 수 있는 Taq DNA 중합효소가 파지 디스플레이 변형 기법을 이용하여 선별되었다(Vichier-Guerre et.al, 2006). 이러한 방법은 수행은 가능하나, 몇가지 문제가 있었다: 1) 파지상에 모든 단백질들이 디스플레이되지 않을 수 있다; 2) 선별을 위해 바이오틴으로 표지된 뉴클레오티드를 사용하여야하는 절대 요건; 3) 디스플레이된 효소는 트랜스 및 시스로도 작용할 수 있다; 4) 입체 장애 및 효소 이동성의 제한으로 인해, 파지-효소-DNA/RNA 복합체는 cDNA의 효과적인 합성을 방해할 수 있다.

[0021] 또한, 역전사 효소의 선별 가능성은 WO 0222869에서도 언급되었는데, 이 특허는 구획화된 자가 복제(CSR) 방법에 관한 것이다. CSR 기법을 이용하여, 호열성 DNA 중합효소, 특히 Taq DNA 중합효소(Ghadessy et al., 2001; Ghadessy et al., 2004; Ong et al., 2006)를 선별한다. 호열성 DNA 중합효소의 돌연변이 라이브러리를 발현하는 박테리아 세포를 PCR 혼합물에 현탁하고, 에멀젼화를 수행하여, 활성이 보다 우수한 중합효소를 시험관내에서 선별하기 위해 분리된 PCR 구획들을 만든다.

[0022] 실제 역전사 효소 활성의 선별은 중간 온도에서 활성인 상태로 남아있는 박테리아 RNase의 존재로 인해 방해받으며, 타겟 mRNA는 분해될 것이다. 또한, 선별되지 않은 플라스미드 DNA(박테리아 세포로부터 방출됨)로 인한 DNA 오염도 있을 것이며, 모든 E.coli 효소, 구조 단백질, 리보좀, NTP, RNase, DNase 및 저분자량 분자도 존재할 것이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0023] (비특허문헌 0001) Mattheakis LC, Bhatt RR, Dower WJ. An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Sep 13;91(19):9022-6.

(비특허문헌 0002) Matsuura T, Pluckthun A. Selection based on the folding properties of proteins with ribosome display. FEBS Lett. 2003 Mar 27;539(1-3):24-8.

(비특허문헌 0003) Hanes J, Pluckthun A. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 May 13;94(10):4937-42.

(비특허문헌 0004) He M, Taussig MJ. Antibody-ribosom-mRNA (ARM) complexes as efficient selection particles for in vitro display and evolution of antibody combining sites. Nucleic Acids Res. 1997 Dec 15;25(24):5132-4.

(비특허문헌 0005) Irving RA, Coia G, Roberts A, Nuttall SD, Hudson PJ. Ribosome display and affinity maturation: from antibodies to single V-domains and steps towards cancer therapeutics. J Immunol Methods. 2001 Feb 1;248(1-2):31-45. Review.

(비특허문헌 0006) Amstutz P, Pelletier JN, Guggisberg A, Jermutus L, Cesaro-Tadic S, Zahnd C, Pluckthun A. In vitro selection for catalytic activity with ribosome display. J Am Chem Soc. 2002 Aug 14;124(32):9396-403.

(비특허문헌 0007) Takahashi F, Ebihara T, Mie M, Yanagida Y, Endo Y, Kobatake E, Aizawa M. Ribosome display for selection of active dihydrofolate reductase mutants using immobilized methotrexate on agarose beads. FEBS Lett. 2002 Mar 6;514(1):106-10.

(비특허문헌 0008) Tawfik DS, Griffiths AD. Man-made cell-like compartments for molecular evolution.

(비특허문헌 0009) Nat Biotechnol. 1998 Jul;16(7):652-6.

(비특허문헌 0010) Lee YF, Tawfik DS, Griffiths AD. Investigating the target recognition of DNA cytosine-5 methyltransferase HhaI by library selection using in vitro compartmentalisation. Nucleic Acids Res. 2002 Nov 15;30(22):4937-44.

(비특허문헌 0011) Cohen HM, Tawfik DS, Griffiths AD. Altering the sequence specificity of HaeIII methyltransferase by directed evolution using in vitro compartmentalization.

(비특허문헌 0012) Protein Eng Des Sel. 2004 Jan;17(1):3-11.

(비특허문헌 0013) Ghadessy FJ, Ong JL, Holliger P. Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self-replication. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Apr 10;98(8):4552-7. Epub 2001 Mar 27.

(비특허문헌 0014) Ghadessy FJ, Ramsay N, Boudsocq F, Loakes D, Brown A, Iwai S, Vaisman A, Woodgate R, Holliger P. Generic expansion of the substrate spectrum of a DNA polymerase by directed evolution. Nat Biotechnol. 2004 Jun;22(6):755-9. Epub 2004 May 23.

(비특허문헌 0015) Ong JL, Loakes D, Jaroslawski S, Too K, Holliger P. Directed evolution of DNA polymerase, RNA polymerase and reverse transcriptase activity in a single polypeptide. J Mol Biol. 2006 Aug 18;361(3):537-50. Epub 2006 Jul 5.

(비특허문헌 0016) Bernath K, Hai M, Mastrobattista E, Griffiths AD, Magdassi S, Tawfik DS. In vitro compartmentalization by double emulsions: sorting and gene enrichment by fluorescence activated cell sorting. Anal Biochem. 2004 Feb 1;325(1):151-7.

(비특허문헌 0017) Mastrobattista E, Taly V, Chanudet E, Treacy P, Kelly BT, Griffiths AD. High-throughput screening of enzyme libraries: in vitro evolution of a beta-galactosidase by fluorescence-activated sorting of double emulsions. Chem Biol. 2005 Dec;12(12):1291-300.

(비특허문헌 0018) Bertschinger J, Neri D. Covalent DNA display as a novel tool for directed evolution of proteins in vitro. Protein Eng Des Sel. 2004 Sep;17(9):699-707. Epub 2004 Nov 2.

(비특허문헌 0019) Doi N, Yanagawa H. STABLE: protein-DNA fusion system for screening of combinatorial protein libraries in vitro. FEBS Lett. 1999 Aug 27;457(2):227-30.

(비특허문헌 0020) Yonezawa M, Doi N, Kawahashi Y, Higashinakagawa T, Yanagawa H. DNA display for in vitro selection of diverse peptide libraries. Nucleic Acids Res. 2003 Oct 1;31(19):e118.

(비특허문헌 0021) Sepp A, Choo Y. Cell-free selection of zinc finger DNA-binding proteins using in vitro compartmentalization. J Mol Biol. 2005 Nov 25;354(2):212-9. Epub 2005 Oct 3.

(비특허문헌 0022) Sepp A, Tawfik DS, Griffiths AD. Microbead display by in vitro compartmentalisation: selection for binding using flow cytometry. FEBS Lett. 2002 Dec 18;532(3):455-8.

(비특허문헌 0023) Griffiths AD, Tawfik DS. Directed evolution of an extremely fast phosphotriesterase by in vitro compartmentalization. EMBO J. 2003 Jan 2;22(1):24-35.

(비특허문헌 0024) Bernath K, Magdassi S, Tawfik DS. Directed evolution of protein inhibitors of DNA-nucleases by in vitro compartmentalization (IVC) and nano-droplet delivery. J Mol Biol. 2005 Feb 4;345(5):1015-26. Epub 2004 Dec 7.

(비특허문헌 0025) Thorsen T, Roberts RW, Arnold FH, Quake SR. Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device. Phys Rev Lett. 2001 Apr 30;86(18):4163-6.

(비특허문헌 0026) Okushima S, Nisisako T, Torii T, Higuchi T. Controlled production of monodisperse double emulsions by two-step droplet breakup in microfluidic devices. Langmuir. 2004 Nov 9;20(23):9905-8.

(비특허문헌 0027) Song H, Tice JD, Ismagilov RF. A microfluidic system for controlling reaction networks in time. Angew Chem Int Ed Engl. 2003 Feb 17;42(7):768-72.

(비특허문헌 0028) Link DR, Grasland-Mongrain E, Duri A, Sarrazin F, Cheng Z, Cristobal G, Marquez M, Weitz DA. Electric control of droplets in microfluidic devices. Angew Chem Int Ed Engl. 2006 Apr 10;45(16):2556-60.

(비특허문헌 0029) Matsuura T, Yanagida H, Ushioda J, Urabe I, Yomo T. Nascent chain, mRNA, and ribosome complexes generated by a pure translation system. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Jan 12;352(2):372-7. Epub 2006 Nov 17.

(비특허문헌 0030) Gerard GF, D'Alessio JM, Kotewicz ML, Noon MC. Influence on stability in Escherichia coli of the carboxy-terminal structure of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. DNA. 1986 Aug;5(4):271-9.

(비특허문헌 0031) Forrer P, Jaussi R. High-level expression of soluble heterologous proteins in the cytoplasm of Escherichia coli by fusion to the bacteriophage lambda head 단백질 D. Gene. 1998 Dec 11;224(1-2):45-52.

(비특허문헌 0032) Gerard GF, Potter RJ, Smith MD, Rosenthal K, Dhariwal G, Lee J, Chatterjee DK. The role of template-primer in protection of reverse transcriptase from thermal inactivation. Nucleic Acids Res. 2002 Jul 15;30(14):3118-29.

(비특허문헌 0033) Vichier-Guerre S, Ferris S, Auberger N, Mahiddine K, Jestin JL. A population of thermostable reverse transcriptases evolved from Thermus aquaticus DNA polymerase I by phage display. Angew Chem Int Ed Engl. 2006 Sep 18;45(37):6133-7.

(비특허문헌 0034) Ghadessy FJ, Holliger P. A novel emulsion mixture for in vitro compartmentalization of transcription and translation in the rabbit reticulocyte system. Protein Eng Des Sel. 2004 Mar;17(3):201-4. Epub 2004 Feb 27.

(비특허문헌 0035) Roberts RW, Szostak JW. RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Nov 11;94(23):12297-302.

(비특허문헌 0036) Odegrip R, Coomber D, Eldridge B, Hederer R, Kuhlman PA, Ullman C, FitzGerald K, McGregor D. CIS display: In vitro selection of peptides from libraries of protein-DNA complexes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Mar 2;101(9):2806-10. Epub 2004 Feb 23.

(비특허문헌 0037) Reiersen H, Lobersli I, Loset GA, Hvattum E, Simonsen B, Stacy JE, McGregor D, Fitzgerald K, Welschof M, Brekke OH, Marvik OJ. Covalent antibody display--an in vitro antibody-DNA library selection system. Nucleic Acids Res. 2005 Jan 14;33(1):e10.

(비특허문헌 0038) Bertschinger J, Neri D. Covalent DNA display as a novel tool for directed evolution of proteins in vitro. Protein Eng Des Sel. 2004 Sep;17(9):699-707. Epub 2004 Nov 2.

(비특허문헌 0039) Stein V, Sielaff I, Johnsson K, Hollfelder F. A covalent chemical genotype-phenotype linkage for in vitro protein evolution. Chembiochem. 2007 Dec 17;8(18):2191-4.

(비특허문헌 0040) Tabuchi I, Soramoto S, Nemoto N, Husimi Y. An in vitro DNA virus for in vitro protein evolution. FEBS Lett. 2001 Nov 23;508(3):309-12.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0024] **발명의 개요**

[0025] 본 발명은 종래 방법의 문제점을 해결한 개선된 단백질 진화 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0026] 이에, 본 발명은 제1 측면으로,

[0027] (a) 타겟 단백질을 코딩하는 하나 이상의 RNA 또는 DNA 분자를 포함하는 RNA 또는 DNA 분자 어레이를 제공하는 단계;

[0028] (b) 상기 어레이로부터 타겟 단백질을 생성시켜, RNA 또는 DNA 분자가 복합체에 비공유 또는 공유 결합된, RNA-단백질 복합체 또는 DNA-단백질 복합체를 형성하는 단계;

[0029] (c) 상기 복합체를, 거의 모든 또는 모든 구획에 1개 이하의 복합체가 포함되도록 구획으로 나누는 단계;

[0030] (d) 상기 복합체를 타겟 단백질의 활성을 허용하는 반응 조건에 두는 단계; 및

[0031] (e) 타겟 단백질과 관련된 활성을 토대로 타겟 단백질을 코딩하는 핵산을 선별하는 단계를 포함하며,

[0032] 상기 복합체가 DNA가 비공유 결합된 DNA-단백질 복합체인 경우, 단계 b)는 각 복합체에 대한 별개의 구획화 없이 수행되는, 타겟 단백질을 코딩하는 핵산의 제조 방법을 제공한다.

[0033] 본 발명자들은 2가지 구별되는 표현형-유전자형의 연관성 타입을 이용하는 방법을 고안하였으며, 실험실에서 단백질 진화 방법에 이용하기 위한 새로운 선별 시스템을 달성하게 되었다. 하기에서 더욱 설명되는 이러한 방법의 새로운 측면들로 인해 종래 방법에 비해 확장된 범위의 타겟 단백질에 적용할 수 있으며, 사용 용이성 및 융통성이 향상되었다. 특히, 본 발명은, 분자 생물학자의 툴박스에서 가장 중요한 효소 그룹들 중 하나인 역전사 효소의 진화 특성의 개선 가능성을 최초로 제공한다.

[0034] 이러한 측면의 일 구현예에서, 본 발명은

[0035] (a) 타겟 단백질을 코딩하는 하나 이상의 RNA 또는 DNA 분자를 포함하는 RNA 또는 DNA 분자 어레이를 제공하는 단계;

[0036] (b) 상기 어레이로부터 타겟 단백질을 생성시켜, RNA-단백질 복합체 또는 DNA-단백질 복합체를 형성하는 단계;

[0037] (c) 상기 복합체를, 거의 모든 또는 모든 구획에 1개 이하의 복합체가 포함되도록 구획으로 나누는 단계;

[0038] (d) 상기 복합체를 타겟 단백질의 활성을 허용하는 반응 조건에 두는 단계; 및

[0039] (e) 타겟 단백질과 관련된 활성을 토대로 타겟 단백질을 코딩하는 핵산을 선별하는 단계를 포함하며,

[0040] 상기 RNA-단백질 복합체에서 RNA는 복합체에 공유 또는 비공유 결합되고, 상기 DNA-단백질 복합체에서 DNA는 복합체에 공유 결합된, 타겟 단백질을 코딩하는 핵산의 제조 방법을 제공한다.

[0041] 이러한 측면에 대한 제2 구현예로서, 본 발명은

[0042] (a) 타겟 단백질을 코딩하는 하나 이상의 RNA 또는 DNA 분자를 포함하는 RNA 또는 DNA 분자 어레이를 제공하는 단계;

[0043] (b) 상기 어레이로부터 타겟 단백질을 생성시켜, RNA 또는 DNA 분자가 복합체에 비공유 또는 공유 결합된, RNA-단백질 복합체 또는 DNA-단백질 복합체를 형성하는 단계;

[0044] (c) 상기 복합체를, 거의 모든 또는 모든 구획에 1개 이하의 복합체가 포함되게 구획으로 나누는 단계;

[0045] (d) 상기 복합체를 타겟 단백질의 활성을 허용하는 반응 조건에 두는 단계; 및

[0046] (e) 타겟 단백질과 관련된 활성을 토대로 타겟 단백질을 코딩하는 핵산을 선별하는 단계를 포함하며,

[0047] 상기 단계 b)는 각 복합체에 대한 분리된 구획화 없이 수행되는, 타겟 단백질을 코딩하는 핵산의 제조 방법을 제공한다.

[0048] DNA 및 RNA와 단백질 간의 공유 결합은 당해 기술 분야에 공지된 임의의 기법, 예컨대, mRNA 디스플레이, 파지 디스플레이, 박테리아 디스플레이 또는 효모 디스플레이에 의해 만들 수 있다. 특히, RNA-단백질 공유 결합은 mRNA 디스플레이 기법을 이용하여 만들 수 있으며, DNA-단백질 공유 결합은 공유 항체 디스플레이(CAD) 기법(Reiersen et al., 2005)을 이용하거나, 공유 DNA 디스플레이에 의한 구획내에서의 번역을 수행하거나(Bertschinger and Neri, 2004), 또는 Stein et al., (2005)에 의해 언급된 방법 등의 유사한 공유 디스플레이 기법을 이용하여 만들 수 있다.

[0049] DNA 또는 RNA와 타겟 단백질 간의 비공유 결합 역시 당해 기술 분야에 공지된 임의의 기법, 예컨대 리보솜 디스플레이, CIS 디스플레이 또는 플라스미드 디스플레이에 의해 만들 수 있다. 특히, DNA-단백질 비공유 결합은 CIS 디스플레이를 이용한 구획화 없이 만들 수 있으며(Odergrip et al., 2004), RNA-단백질 공유 결합은 리보솜 디스플레이 기법을 이용하여 만들 수 있다.

[0050] 상기에서 언급된 바와 같이, 상기 복합체가 DNA가 비공유 결합된 DNA-단백질 복합체인 경우, 본 발명의 방법에서 단계 (b)는 각 복합체에 대한 분리된 구획 없이 수행된다. 다시 말해, 단계 (b)는 비-구획화로 수행된다. 구체적으로, 제조된 복합체가 DNA가 비공유 결합된 DNA-단백질 복합체인 경우, 생성 단계는 어레이의 각 성분을 서로 분리하지 않고 수행한다. 특히, 생성 단계는 시험관내 구획화(IVC)에 의해 어레이의 각 성분을 분리하지

않고 수행된다. 특히 바람직한 구현예에서, 상기 생성 단계는 유중수 에멀젼내에서 어레이의 각 성분을 분리하지 않고 수행된다.

[0051] 또한, 구획화는 구획들 모두 또는 실질적으로 모든 구획에 1개 이하의 복합체가 포함되도록 복합체를 제조 또는 분리시킬 수 있는 당해 기술 분야에 공지된 임의 방법에 의해 수행될 수 있다. 특히, 구획의 70% 이상, 80% 이상 또는 90% 이상은 2개 이상의 복합체를 포함하지 않는 것이 바람직하다. 예컨대, 구획화는, 마이크로타이터 또는 나노타이터 플레이트의 각각의 웰에 어레이의 구성 요소 또는 각 복합체를 분리하여 넣거나, 또는 시험관내 구획화(IVC)에 의해 수행할 수 있다. 특히, IVC에 의한 분리는 유중수 에멀젼 또는 수중유중수 에멀젼 중의 수계 액적으로 분리시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0052] 본 발명의 방법은 공유 결합, 비공유 결합 및 구획화 중에서 선택되는 2가지 이상의 유전자형-표현형 연관성 타입을 조합한다. 본 발명의 바람직한 측면으로, 상기 방법은 상기 3가지 이상의 결합을 사용하지 않는다. 따라서, 특히 바람직한 구현예에서, 상기 방법은 단계 (b)에서 유일한 유전자형-표현형 결합으로서 공유 또는 비공유 결합을 이용한다. 즉, 이러한 구현예에서, 단계 b)에서 구획화는 수행되지 않는다.

[0053] 구획화가 없는 조건에서의, DNA 또는 RNA와 단백질 간의 공유/비공유 결합은, 매우 다양한 방식으로, 예컨대 리보솜 디스플레이, mRNA 디스플레이(Roberts and Szostak, 1997), CIS 디스플레이(Odergrip et al., 2004) 또는 공유 항체 디스플레이(CAD) (Reiersen et al., 2005)로 확립할 수 있다. 특히, DNA-단백질 공유 결합은 CAD 기법을 이용함으로써 구획화 없이도 실현시킬 수 있으며, RNA-단백질 공유 결합 및 RNA-단백질 비공유 결합은 각각 mRNA 디스플레이 및 리보솜 디스플레이에 의해 확립할 수 있다.

[0054] 본 발명은 여러가지 다양한 결합의 조합을 통해 실현될 수 있다. 예컨대, 본 발명은 리보솜 디스플레이와 시험관내 구획화의 조합을 통해, 또는 mRNA 디스플레이, CIS 디스플레이 또는 CAD 디스플레이 및 IVS의 조합을 통해 실현될 수 있다.

[0055] 바람직한 측면에서, 타겟 단백질을 코딩하는 핵산의 제조 방법은, 리보솜 디스플레이와 시험관내 구획화의 조합을 통해 이루어진다. 특히, 이러한 방법은,

[0056] (a) 타겟 단백질을 코딩하는 하나 이상의 mRNA를 포함하는 mRNA 어레이를 제공하는 단계;

[0057] (b) 상기 mRNA 어레이를 리보솜 번역 조건하에 인큐베이션하여, 각각이 mRNA, 리보솜 및 상기 mRNA로부터 번역된 단백질을 포함하는 3중 복합체의 어레이를 제조하는 단계;

[0058] (c) 상기 3중 복합체 어레이를 유중수 또는 수중유중수 에멀젼의 수상 액적에 넣어, 상기 수상 액적 대부분이 또는 모든 수상 액적이 1개 이하의 3중 복합체를 포함하도록 하는 단계;

[0059] (d) 상기 수상 액적을 단백질 활성을 허용하는 반응 조건에 두는 단계; 및

[0060] (e) 상기 타겟 단백질의 효소 활성을 기초로 상기 타겟 단백질을 코딩하는 핵산을 선별하는 단계를 포함한다.

[0061] 본 발명에 따른 이러한 방법은 "구획화된 리보솜 디스플레이"(CRD)라고 칭해질 수 있다. CRD는, 매우 넓은 범주의, 효소 등의, 타겟 단백질에 적용할 수 있다. CRD는 효소와 mRNA 사이의 결합은 비공유 결합이어도 된다는 장점을 가진다. 따라서, 단계 (d)에 사용되는 반응 조건에 승온 조건이 포함된다면, 단계 (b)에서 제조되는 3중 복합체는 각각 분리되어 효소가 분리될 것이다. 이러한 방식은, 효소가 비드에 고정된 상기 종래 방법에서 언급된 효소 이동성과 관련된 문제점을 방지한다.

[0062] 내부에 리보솜 디스플레이 복합체를 가진 에멀젼 액적은, 단계 (e)에서 다수의 방법으로 분류 또는 선별될 수 있다. 바람직하게는, 이것은 형광 활성화된 세포 분류(FACS) 또는 마이크로 유체 기법에 의해 분류된다. 2가지 기법들은 주로 형광을 기초로 한 액적 분류 방법을 이용한다. 그러나, 액적은, 단계 (d)에서 사용되는 반응 조건과 선별 중인 단백질 활성에 따라, 크기, 광 회절 또는 광 흡수에 의해 분리할 수도 있다.

[0063] 형광을 기초로 하는 분류 방법은, 타겟 단백질이 효소일 때 사용하는 것이 바람직하다. 이러한 구현예에서, 단계 (d)에서 사용되는 반응 조건은 형광성 산물로 변환될 수 있는 비-형광 기질을 포함한다. 효소에 의한 활성은 형광성 산물을 만들어내므로, FAC를 이용하여 활성 효소가 포함된 형광 액적과, 활성 효소가 없거나 활성이 약한 효소가 포함된 비-형광 또는 약한 형광 액적을 구별할 수 있다.

[0064] 특히, CRD는 역전사 효소 등의 핵산 가공(processing) 효소에 적용할 수 있으며, 신속하고 효과적인 시험관내 진화를 가능하게 한다.

[0065] 다른 측면에서, 본 발명은,

[0066] (a) 타겟 단백질을 코딩하며, 타겟 단백질을 포함하는 효소나 상기 타겟 단백질의 코엔자임에 대한 기질을 포함하는, 하나 이상의 mRNA를 포함하는, mRNA 어레이를 제공하는 단계;

[0067] (b) 상기 mRNA 어레이를 리보솜 번역 조건 하에 인큐베이션하여, 복합체 각각이 mRNA, 리보솜 및 상기 mRNA로부터 번역된 단백질을 포함하는 3중 복합체의 어레이를 제조하는 단계

[0068] (c) 상기 3중 복합체 어레이 및 선택적으로 상기 코엔자임을, 유중수 또는 수중유중수 에멀젼의 수상 액적에 넣어, 상기 수상 액적의 대부분 또는 모든 수상 액적들이 상기 3중 복합체를 1개 이하로 포함하게 하는 단계;

[0069] (d) 상기 수상 액적을 효소 활성을 허용하는 반응 조건에 두는 단계;

[0070] (e) 상기 타겟 단백질과 관련된 효소 활성을 기초로 상기 타겟 단백질을 코딩하는 핵산을 선별하는 단계를 포함하는, 타겟 단백질을 코딩하는 핵산의 제조 방법을 제공한다.

[0071] 본 발명의 이러한 측면의 일 구현예에서, 상기 핵산 가공 효소가 DNA 의존성 DNA 중합효소인 경우, 단계 (a)의 mRNA를 이중 가닥의 DNA 어댑터 분자와 연결시켜 기질로 제공할 수 있다.

[0072] CRD 다양성(diversity)은 변이체 ~10^{9}-10^{10}개이며, IVC 공정에 의해 제한된다. 새로운 방법은, 역전사 효소의 돌연변이 변이체 ~10^{5}-10^{6}개를 스크리닝할 수 있는, 고성능 스크리닝(HTS)에 비해 훨씬 더 효율적이고, 시간 절약적이며 저렴하다. CRD 다양성은 HTS 대비 약 4차수 이상이므로, HTS에서 누락되는 보다 더 많은 유익한 돌연변이를 구획화된 리보솜 디스플레이 선별 방법으로 쉽게 찾아낼 수 있다.

[0073] 단계 (a)에서, 타겟 단백질을 코딩하는 어레이의 한개 이상의 구성 요소를 포함하는, 전형적으로 합성된 mRNA인, mRNA 어레이가 제공된다. 타겟 단백질이 역전사 효소이면, mRNA는 타겟 단백질을 포함하는 효소 또는 상기 타겟 단백질의 코엔자임에 대한 기질을 포함한다. 그 후의 선별 단계 (e)에서, 타겟 단백질을 코딩하는 핵산은 타겟 단백질과 관련된 효소 활성을 기초로 선별된다. 이러한 방식으로, 본 발명의 2가지 구현예들이 고려되는데, 한가지는 효소 활성이 타겟 단백질에 의해 제공되는 것이고, 다른 한가지는 효소 활성이 타겟 단백질의 존재 하에 타겟 단백질의 코엔자임에 의해 제공되는 것이다. 코엔자임이 요구되는 구현예에서, 코엔자임은 3중 복합체의 어레이와 같이, 단계 (c)의 유중수 에멀젼의 수상 액적내에 혼입된다. 효소가 타겟 단백질을 포함하는 경우에는, 수상 액적에 혼입시킬 추가적인 코엔자임은 필요하지 않다.

[0074] 상기 방법의 단계 (b)에서, mRNA 어레이를 리보솜 처리하여 3중 복합체 어레이를 제조하며, 상기 3중 복합체들은 각각 mRNA, 리보솜 및 상기 mRNA로부터 번역된 단백질을 포함한다. 이 단계는, 예컨대 리보솜 디스플레이 기법에서 사용되는 바와 같이, mRNA의 시험관내 번역에 전형적으로 적합한 임의의 조건하에 수행될 수 있다. 이 시점에서, 3중 복합체는, 필수적이지 않지만, 정제될 수 있다. 이때, 3중 복합체에, 이후의 효소 활성에 필수적인 임의의 공-기질을 보충할 수 있으며, 그런 다음 반응 혼합물은 전형적으로 에멀젼화되어, 각각의 평균 직경이 전형적으로 약 2 - 3 ㎛인 유중수 구획 약 10^{10}개가 형성된다. 시험관내 번역 반응물은 적은 부피(25 ㎕)로도, 축적된 리보솜 복합체 분자 약 10^{11} - 10^{12}개를 만들어낸다. 전형적인 리보솜 디스플레이 방법은, 정지 코돈이 존재할 수도 있지만, 정지 코돈이 없는 mRNA를 이용한다. 대부분 또는 모든 액적이, 3중 복합체를 1개 이하 포함하는 수상 액적을 만들기 위해, 3중 복합체의 농도는 전형적인 리보솜 디스플레이 기법에 사용되는 농도와 비교하여 약 2차수 크기만큼 감소되어야 한다. 매우 적은 농도의 3중 복합체가 본 방법의 이 단계에 사용된다.

[0075] 효소는 RNA 가공 효소일 수 있는, 핵산 가공 효소를 포함할 수 있다. 핵산 가공 효소는 타겟 단백질을 포함할 수 있으며, 핵산 중합효소, 핵산 라이게이즈 및 말단 데옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라제 중에서 선택될 수 있다. 본원에서 더욱 상세하게 언급된 바와 같이, 핵산 중합 효소는 역전사 효소를 포함할 수 있다. 이에 대한 구현예에서, 역전사 효소를 코딩하는 mRNA는 역전사 효소의 기질 자체이다. 타겟 단백질을 코딩하는 핵산을 선별하는 단계 (e)는, 역전사 효소의 작용에 의해 만들어지는 역전사 효소를 코딩하는 cDNA를 선별하는 단계를 포함한다.

[0076] 타겟 단백질이 핵산 라이게이즈인 경우, RNA를 RNA에 연결하거나 또는 DNA를 DNA에 연결할 수 있는 RNA(DNA) 라이게이즈를 선별할 수 있다. 바람직하게는, 효소 활성을 허용하는 반응 조건은, RT-PCR에서 처리되는 mRNA의 특이적인 증폭을 위해, 리간드 결합 파트너 또는 서열 테그에 부착하기 위한 친화성 리간드를 더 포함하는, 핵산 링커 또는 어댑터를 포함하는, 공-기질을 포함한다. 첫번째 경우, 타겟 단백질을 코딩하는 mRNA는, 핵산 라

이게이즈를 코딩하는 mRNA를 포함하는 그러한 수상 액적내에서, 공-기질과 연결된다. 바람직하게는, 상기 친화성 리간드는 바이오틴을 포함하며, 상기 리간드 결합 파트너는 스트렙타비딘을 포함한다. 타겟 단백질을 코딩하는 핵산의 선별 단계는, 리간드 결합 파트너를 포함하는 고상에 부착함으로써, 상기 공-기질이 병합된 mRNA를 선별하는 단계를 포함한다. 전형적인 공정으로, 라이게이즈의 돌연변이 라이브러리는 시험관내에서 번역되고, 정제된 3중 복합체는 바이오틴 표지된 DNA/RNA 링커 및/또는 어댑터와 함께 반응 완충액 중에서 희석 및 에멀젼화된다. 에멀젼의 온도가 37℃가 되면, 리보솜 3중 복합체는 해리된다. 라이게이즈가 분리되고, mRNA의 3' 말단이 바이오틴 표지된 어댑터와 이후 라이게이션 반응에 노출되게 될 것이다. 오직 라이게이즈 활성을 보이는 (또는 보다 활성이 우수한) 변이체들을 코딩하는, 바이오틴 표지된 mRNA는, 스트렙타비딘 비드 상에서 정제하여, RT-PCR로 증폭할 수 있다.

[0077] 2번째의 경우, 타겟 단백질을 코딩하는 핵산의 선별 단계는, 역전사와 이후 PCR용 프라이머의 선택적인 어닐링 부위로 사용할 수 있는, 부착된 서열 특이적인 테그를 이용하여 mRNA를 선별하는 단계를 포함한다.

[0078] 전형적인 과정에서, 라이게이즈의 돌연변이 라이브러리를 시험관내에서 번역시키고, 정제된 3중 복합체를 DNA/RNA 링커 및/또는 어댑터와 함께 반응 완충액 내에서 희석 및 에멀젼화한다. 에멀젼의 온도가 37℃가 되면, 리보솜 3중 복합체가 해리된다. 라이게이즈가 분리되고, mRNA의 3' 말단이 어댑터와 이후 라이게이션 반응에 노출되게 될 것이다. 오직 라이게이즈 활성만 보이는(또는 활성이 우수한) 변이체들을 코딩하는, mRNA는, 역전사에 사용되는 프라이머의 특이적인 어닐링에 필요한 특이적인 링커 서열을 가지고 있으며, RT-PCR로 효율적으로 증폭시킬 수 있다.

[0079] 또한, 말단 데옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라제(TdT)를 선별할 수 있다. 이 효소는 RNA에 작용하여, 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 뉴클레오티드 유사체 등을 병합한다. 이러한 구현예에서, 효소 활성을 허용하는 반응 조건은 리간드 결합 파트너와의 부착용 친화성 리간드를 추가로 포함하는 dNTP를 포함하는 공-기질을 포함한다. 핵산 라이게이즈에서와 같이, 상기 친화성 리간드는 바이오틴일 수 있고, 리간드 결합 파트너는 스트렙타비딘일 수 있다. 타겟 단백질을 코딩하는 핵산 선별은, 상기 리간드 결합 파트너를 포함하는 고상에 부착시킴으로써, 상기 공-기질이 병합된 mRNA를 선별하는 단계를 포함할 수 있다. TdT의 돌연변이 라이브러리는 시험관내에서 번역할 수 있으며, 정제된 3중 복합체는 희석되고 바이오틴 표지된 뉴클레오티드, 예컨대 바이오틴-dUTP와 함께 반응 완충액 중에서 에멀젼화되어야 할 수 있다. 야생형 효소의 최적 작용 온도는 37℃이다. 이 온도에서, 리보좀 3중 복합체는 해리되고, mRNA의 3' 말단이 주형 독립적인 중합 반응에 노출되게 될 것이다. 바이오틴 표지된 뉴클레오티드가 병합된 TdT-코딩 mRNA는, 스트렙타비딘 비드 상에서 선별하고, 이후 RT-PCR에 의해 역전사 및 증폭시킬 수 있다.

[0080] 다른 구현예에서, 타겟 단백질은 헬리카제, 피로포스파타제, 진행 인자(processivity factor), RNA 결합 단백질 또는 역전사 효소의 존재 하에 역전사 반응을 개선시킬 수 있는 그외 단백질 등의 역전사 헬퍼 효소를 포함한다. 이러한 구현예로, 핵산 가공 효소는, 유중수 에멀젼의 수상 액적내에 혼입되는 코엔자임인, 역전사 효소를 포함한다. 핵산 타겟 단백질을 선별하는 단계 (e)에서, cDNA를 선별하며, cDNA는 역전사 효소의 작용에 의해 생성되는데, 이것은 역전사 효소 헬퍼 효소를 코딩한다. 수상내 역전사 효소 헬퍼 효소가 존재하면, 헬퍼를 코딩하는 mRNA의 역전사는 촉진된다. 따라서, 역전사된 mRNA는 헬퍼를 코딩하는 cDNA를 생성시키며, 이는 PCR로 증폭될 수 있다.

[0081] 다른 구현예에서, 타겟 단백질은 RNase 저해제를 포함한다. 이러한 구현예에서, 핵산 가공 효소는 RNase를 포함한다. 타겟 단백질을 코딩하는 핵산을 선별하는 단계 (e)는, RNase로 분해되지 않는 mRNA를 선별하는 단계를 포함한다. 이러한 구현예에서, RNase는 유중수 에멀젼의 수상 액적내로 코엔자임으로서 혼입된다. 반응 조건이 효소 활성을 허용하면, 유효한 RNase 저해제를 함유하지 않는 모든 액적은, mRNA를 분해하는 RNase 활성은 나타내지 않을 것이다. 따라서, 사용되는 반응 조건에 유효한 RNase 활성을 코딩하는 mRNA는 살아남을 것이다. 전형적으로, RNase 저해제의 돌연변이 라이브러리는 시험관내에서 번역되며, 적절한 RNase와 함께 반응 완충액으로 희석 및 에멀젼화된다. 다른 구현예에서, RNase는 에멀젼 마이크로 액적에 의해 나중에 전달될 수 있다. 오직 활성인(또는 보다 안정적인) RNase 저해제를 코딩하는 mRNA를 정제하여, RT-PCR로 증폭시킨다.

[0082] 구획화된 리보솜 디스플레이에서도, 선별 완충액은 시험관내 번역 혼합물과 상용성이 없는 시험관내 구획화용 반응 완충액을 교체하는데 사용할 수 있으며, 이후의 산물로의 변환은 엄격하게 통제된 반응 조건 하에서 수행되어야 한다.

[0083] 타겟 단백질과 관련된 효소 활성을 기초로 선택된, 타겟 단백질을 코딩하는 핵산은, 전술한 바와 같이 DNA 또는 RNA일 수 있다. 어레이를 변환 또는 증폭시켜, DNA 또는 RNA를 만들 수 있다. 바람직한 구현예에서, 어레이를

변환 또는 증폭시켜, 상기 방법의 단계 (a)의 mRNA 어레이 만든 다음, 단계 (b) 내지 (e)를 1회 이상 추가로 반복 실시하여, 어레이에서 타겟 단백질을 코딩하는 mRNA의 양이 증가되도록 더욱 농화시킨다.

[0084] 수상 액적을 효소 활성을 허용하는 반응 조건에 두는 단계 (d)는, 타겟 단백질을 코딩하는 핵산을 선별하는 선별 단계 (e)의 토대가 된다. 선택압(selection pressure)을 제공하기 위해, 매우 다양한 반응 조건들이 단계 (d)에서 사용될 수 있다. 일 예로, 반응 조건은 야생형 효소의 최적 온도 보다 높은 온도를 포함한다. 이러한 반응 조건들을 이용하여, 야생형 효소 보다 보다 열 안정성이 높거나 또는 그 온도에서 더 큰 반응 속도 또는 변형된 온도-활성 프로파일을 가진, 돌연변이 효소를 선별할 수 있다. 돌연변이 효소는, 수상 액적내 mRNA의 농도가 약 400 pM이기 때문에, 야생형 효소 보다 높은 민감도로 작동해야 할 수 있다. 또한, 돌연변이 효소는 보다 정확하게 수행할 수 있어야 할 수 있다. 이러한 선택압들 모두 역전사 효소에서 특히 중요하다. 반응 조건은, 물리적 조건 뿐만 아니라, 완충액, 금속 이온 등의 다른 인자의 농도 및 pH에 대한 변형을 포함할 수 있다.

[0085] 우수한 역전사 효소를 선별하는 CRD에서 보다 더 많은 다양한 선택압들을 적용할 수 있다: 1) 응집되는 경향이 낮은, 용해성이 우수한 효소의 선별 - 3중 복합체(에멀젼화 이전)를, 표면에 노출된 소수성 잔기를 가진 단백질을 제거하기 위해, 소수성 물질과 예비 인큐베이션하여야 함; 2) 보다 신속한 효소의 선별 - 역전사 반응 시간은 선별 사이클에서 점차적으로 단축되어야 함; 3) 긴 cDNA를 합성하는 효소 선별 - CRD에 사용되는 mRNA 라이브러리의 점차적인 연장과 그 결과 보다 긴 cDNA의 합성; 4) 2차 구조를 전사할 수 있는 효소 선별 - 2차 구조를 형성하는 서열이 CRD에 사용되는 mRNA 라이브러리에 도입되어야 함; 5) RT 완충액과 상이한 완충액(예, PCR의 경우, 한 단계 RT-PCR 완충액 또는 변성제 첨가)에서 작동하는 효소 선별 - CRD 선별은 선택한 완충액에서 수행되어야 함; 6) 뉴클레오티드 유사체를 병합할 수 있는 효소 선별 - 선별은, 바이오틴 표지된 뉴클레오티드 유사체를 이용하여 RT 완충액과, 이후의 스트렙타비딘 비드 상에서의 cDNA 정제에서, 수행되어야 함.

[0086] 구획화된 리보솜 디스플레이(CRD)) 역시 다수의 형광 활성화된 세포 분류(FACS) 적용에 적합하다. 대상 단백질은 리보솜 디스플레이 형식으로 나열되어야 한다. 선택적으로 정제된 (또는 단지 여러번 희석된), mRNA-리보솜-단백질(tRNA)를 포함하는 3중 복합체는, 반응 완충액 중에서 비-형광 기질(S)과 혼합된 상태에서, 에멀젼화되어, 2중의 수중유중수 에멀젼으로 제조되어야 한다(Bernath et al., 2004; Mastrobattista et al., 2005). 구획화된 효소의 활성 변이체들은 기질(S)을, FACS를 통해 형광(활성 효소 내부) 및 "어둠"(비활성 효소 내부) 액적을 구별할 수 있는, 형광성 산물(P)로 변환시키게 된다. 이전에 공지한, 전사/번역 혼합물 중에서 효소 반응이 이루어져야 하는 경우와는 대조적으로, CRD는 완충액의 완전한 교체와 보다 천연적인(필수) 조건에서 활성 효소의 선별을 가능하게 한다(도 10).

[0087] CRD를 이용하여 열 안정적인 DNA 중합효소의 선별과 진화도 가능하다(도 11). 대상 중합효소는 리보솜 디스플레이 형식으로 나열되어야 한다. 선택적으로, 정제된 (또는 단지 여러번 희석된), mRNA-리보솜-중합효소를 포함하는, 3중 복합체를 이용하여, PCR 완충액 중에 역전사 효소(헬퍼 효소), dNTP 및 프라이머 세트가 첨가된 반응 혼합물을 만들 수 있다. 반응 용액은 에멀젼화되어, 유중수 에멀젼을 형성할 수 있어야 한다. 1차 RT 단계에서 - 역전사 효소는 cDNA를 합성할 수 있어야 하며, 이것은 나중에 2차 PCR 단계 - 리보솜 나열된 DNA 중합효소에 의한 cDNA 증폭의 타겟으로 제공된다. PCR에 사용되는 프라이머들 중 어떤 것은 스트렙타비딘 비드 및 비-상보적인 5'말단을 이용한 이후의 선택적인 정제를 위하여, 바이오틴을 포함할 수 있다. RT-PCR 에멀젼이 파괴된 후, 새롭게 합성된 DNA 단편은 바이오틴을 이용하여 정제하고, cDNA에 상보적이지 않지만 1차 증폭 반응(cDNA 백그라운드에 대한 DNA 선별 증폭)에서 사용된 프라이머의 5' 부분과는 동일한 서열을 가진 프라이머 한 가지가 포함된, 새로운 프라이머 세트를 이용하여 다시 증폭시킬 수 있다. DNA 중합효소에 대한 우수한 활성형의 변이체들은 활성이 보다 낮은 변이체들 보다 농화될 것이며, 추가 분석이나 그 다음의 선별 과정에 사용할 수 있다(도 11).

[0088] 구획화된 리보솜 디스플레이 기법의 주요 측면은 다음과 같다:

[0089] 1) 유전자형은 RNA 가공 효소 선별에 특히 유용한 mRNA 라이브러리에 의해 보유됨;

[0090] 2) 선별 단위는 mRNA-리보솜-단백질(tRNA)의 3중 복합체이며, 이것은 초원심분리, 젤 여과, 친화성 테그 정제 및 다른 간단한 수단에 의해 쉽게 정제할 수 있음;

[0091] 3) 반응 완충액을 교체할 수 있어, 상기 선별 단위를 새로운 반응 혼합물에 옮기고 동시에 100 내지 200배 희석할 수 있음(에멀젼화 후 리보솜 복합체의 수가 반응 구획 당 1개 이하가 되도록 조절하기 위함);

[0092] 4) CRD의 mRNA 라이브러리 다양성은 오직 시험관내 구획화의 다양성에 의해서만 제한되며, 상이한 변이체 10^{10}개

미만이다.

[0093] 5) 에멀젼화되면, 선별 반응은 에멀젼이 4 내지 94℃의 온도에서 안정적이기 때문에, 상기한 넓은 온도 범위에서 수행할 수 있다;

[0094] 6) 선별이 승온 조건(30℃ 이상)에서 수행된 경우, 3중 복합체는 해체되지만 구획화된 상태에 잔류하고 있어, 유전자형-표현형의 연결은 없어지지 않으며, mRNA와 시험관내에서 번역된 단백질이 분리됨.

[0095] 본 발명의 구획화된 리보솜 디스플레이 방법을 통해, 새로운 역전사 효소들의 진화를 촉진시키는데 특히 잘 작동한다는 것을 확인하였다. 예로, M-MuLV 역전사 효소(Gerard et al., 1986, pRT601)를 선별 대상으로 사용할 수 있다(이 효소는 정제용으로 N 말단에 His 테그를 포함함). 이 역전사 효소의 최적 활성 온도는 42℃이고, 최대 50℃까지 활성을 보인다. M-MuLV 역전사 효소를 코딩하는 mRNA 어레이를, 본 발명의 방법의 단계(d)에서, 50℃ 내지 60℃ 범위의 인큐베이션 온도에서 cDNA 합성에 필요한 프라이머와 dNTP를 포함하는 반응 조건에 투입시킬 수 있다. 이렇듯 승온 조건에서, 4℃에서 안정적인 저장된 리보솜 복합체는, 신속하게 용액으로 역전사 효소 기질(mRNA) 및 효소를 방출한다.

[0096] 일 구현예에서, 리보솜 복합체로부터 방출되는, 시험관내에서 번역된 역전사 효소 M-MuLV는, 리보솜 디스플레이 구조체에 스페이서로서 사용된 람다 파지의 외표면 단백질 D가 C 말단에 융합되어 있어, 리보솜 터널에 잔류하며(Matsuura and Pluckthun, 2003), 번역이 완전히 종결되지 않았기 때문에 tRNA가 공유적으로 결합된다. 단백질 D는 매우 잘 발현되며, 가용성의 안정적인 단백질이며, 미폴딩 전이 온도(unfolding transition temperature)는 ~57℃이므로, 열 안정적인 역전사 효소를 선별하는데 있어 좋은 융합 파트너이다.

[0097] 구획화된 리보솜 디스플레이 선별 방법에서, 충분할 활성을 보이는 역전사 효소 변이체들만, 동일한 활성 효소를 코딩하는, cDNA의 합성을 수행할 수 있다. 역전사 반응 종결 후 1시간 후에, 에멀젼을 파괴하고, cDNA를 네스티드 PCR을 통해 정제 및 증폭한다. CRD의 선별 특성으로 인해, 역전사 효소의 활성형 변이체를 코딩하는 cDNA만, 전장 cDNA 합성을 수행할 수 있으므로, 이를 증폭시키고, 필요에 따라 다음 차례의 선별 단계로 이송시킨다. T7 중합효소 프로모터 영역내에서 이루어진 부적절한 돌연변이를 소거하기 위해, 리보솜 결합 부위(RBS) 및 단백질 D 서열, M-MuLV 서열만 코딩하는 증폭된 DNA를, 오리지날 리보솜 디스플레이 구조체가 복원되어 다음 차례의 선별 과정을 수행할 수 있도록, 천연 5' 및 3' 말단 단편들에 연결시킬 수 있다.

[0098] 5번의 선별 과정을 통해, 50℃에서 특이적인 활성을 가진 효소 변이체들이 동정되었으며, 이것은 라이브러리 제조시 사용된 제1 효소의 활성과 비교하여 2-4배 높은 활성을 보인다. 일부 단백질은 빠르며, 일부 단백질들은 열 안정성이 우수하다. 선별된 다수의 M-MuLV 변이체들은, 역전사 효소의 RNase H 활성이 상실된 돌연변이 D524G 또는 D583N을 가지고 있으며, cDNA 합성 및 열 안정성이 개선되었다(Gerard et al., 2002). 선별된 M-MuLV 역전사 효소들 중에서 많은 수의 변이체들이, 이전에 언급되고 개시된(US7056716; US20060094050A1; US7078208; US20050232934A1; WO07022045A2), 여러가지 다른 유익한 돌연변이(H204R; H638R; T197A; M289V; E302K; T306A; N454K; Y64C; E69G; Q190R; V223M; F309S; L435P; E562K)가 포함되어 있다. 또한, 본 발명자들은 역전사 효소의 아미노산 서열에서 새로운 다수의 주요 부위(hot spot)들을 찾았다. 일부 돌연변이들은 빈번하게 반복되고, 매우 중요하며, 이는 정제된 돌연변이 분석에서 확인되었다(실시예 2). 따라서, 본 발명자들은, 본 CRD 기법은 매우 신속하고 견고한 선별 방법이며, 그 효율성은 M-MuLV 역전사 효소의 방향적 진화 및 개선에 의해 검증되었음을 명시할 수 있다. 원리에 대한 증거로서, 본 발명자들은 더 높은 온도에서 더 잘 작동하는 M-MuLV 역전사 효소 변이체들을 선별하였다.

[0099] 다른 측면으로, 본 발명은 본원에 기술된 방법에 의해 수득할 수 있는 역전사 효소를 제공한다.

[0100] 다른 측면으로, 본 발명은 42℃ 보다 높은 온도, 바람직하게는 50℃ 이상, 더 바람직하게는 50℃ 내지 60℃의 범위에서 최적의 활성을 가진 역전사 효소를 제공한다. 역전사 효소는, 본원에 기술된 방법에 따라, 승온, 바람직하게는 50℃ 이상의 반응 조건을 적용함으로써, 선별할 수 있다. 본 발명의 이러한 측면에서, 역전사 효소는 최적 활성이 관찰되는 온도를 증가시키기 위해, 야생형 효소와 비교하여 활성-온도 프로파일이 변동된 것을 선택할 수 있다.

[0101] 다른 측면에서, 본 발명은, 하기 아미노산 위치들 중 한가지 이상의 위치에 돌연변이를 가진, MMLV 역전사 효소를 포함하는, 역전사 효소를 제공한다:

[0102] D200, D653, L603, T330, L139, Q221,

[0103] T287, I49, N479, H594, F625, H126,

[0104] A502, E607, K658, P130, Q237, N249,

[0105] A307, Y344, Q430, D449, A644, N649,

[0106] L671, E673, M39, Q91, M66, W388,

[0107] I179, E302, L333, R390 Q374 및 E5

[0108] D653 돌연변이 경우, 돌연변이는 D653N이 아닌 것이 바람직하다. L603 돌연변이 경우, 돌연변이는 L603A가 아닌 것이 바람직하다. 또한, H594 돌연변이 경우, 돌연변이는 H594A가 아닌 것이 바람직하다.

[0109] 상기 위치에서의 돌연변이는 점 돌연변이가 바람직하다.

[0110] 바람직하게는, 역전사 효소는 하기 돌연변이들 중 하나 이상을 가진다:

[0111] D200N,A 또는 G; D653N,G,A,H 또는 V; L603W 또는 M; T330P; L139P; Q221R; T287A; I49V 또는 T; N479D; H594R 또는 Q; F625S 또는 L; H126S 또는 R; A502V; E607K, G 또는 A; K658R 또는 Q; P130S; Q237R; N249D; A307V; Y344H; Q430R; D449G 또는 A; A644V 또는 T; N649S; L671P; E673G 또는 K; M39V 또는 L; Q91R 또는 L; M66L; W388R; I179T 또는 V; E302K; L333Q; R390W; Q374R; 및 E5K.

[0112] 이들 돌연변이들은 각각, 예컨대, 야생형 효소와 비교하여 50℃에서 더 높은 활성을 가지는 돌연변이 효소로 확인되었다. 이들 돌연변이에 대한 상세한 내용은 특정 실시예들에 기술되어 있다.

[0113] 본 발명의 특히 바람직한 측면에서, 돌연변이 효소는 2개 이상의 돌연변이를 포함한다. 일 구현예에서, 2개의 돌연변이는 D200 및 L603 위치에 있다. 예컨대, 돌연변이는 D200N 및 L603W이다. 다른 구현예에서, 돌연변이는 N479 및 H 594 위치에 있다. 예컨대, 돌연변이는 N479D 및 H594R이다.

[0114] 다른 측면에서, 본 발명은 37℃ 보다 높은 온도에서 최적의 활성을 보이며, 50℃에서의 활성이 37℃에서의 활성의 120% 이상인, 역전사 효소를 제공한다. 바람직하게는, 상기 50℃에서의 활성은 37℃에서의 활성에 130% 이상, 더 바람직하게는 160% 이상이다.

[0115] 다른 측면에서, 본 발명은 야생형 효소 보다 50℃에서의 활성이 2배 이상 높은 돌연변이 역전사 효소를 제공한다.

[0116] 다른 측면에서, 본 발명은 37℃에서의 특정 활성이 야생형 효소 보다 130% 이상 높은 돌연변이 역전사 효소를 제공한다. 바람직하게는, 상기 돌연변이 역전사 효소의 특정 활성은, 야생형 효소의 특정 활성 보다, 140% 이상, 더 바람직하게는 150% 이상, 특히 바람직하게는 160% 이상이다. 본원에서, 일부 정제된 야생형 효소의 37℃에서의 활성은 약 200000 U/mg인 것으로 확인되었다. 본 발명의 방법에 따라 수득가능한 특정 돌연변이 역전사 효소는 특정 실시예에서 더욱 상세하게 설명된다.

[0117] 다른 측면에서, 본 발명은 열 안정성이 야생형 효소에 비해 1.5배 이상인 돌연변이 역전사 효소를 제공한다. 열 안정성은 본 발명에서 50℃에서 5분 처리한 후 37℃에서 잔류 활성으로서 측정된다. 바람직하게는, 상기 돌연변이 역전사 효소의 열 안정성은, 야생형 효소에 비해 1.5배 이상, 바람직하게는 2배 이상, 더 바람직하게는 2.5배 이상이다. 전형적으로, 야생형 역전사 효소의 37℃ 잔류 활성은 무처리 효소 대비 약 11%이다.

[0118] 바람직하게는, 본 발명에 따른 역전사 효소는 MMLV 역전사 효소를 포함한다.

[0119] 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기술된 역전사 효소를 코딩하는, 폴리뉴클레오티드, 예컨대 mRNA 또는 DNA를 제공한다.

[0120] 본 발명에 따른 역전사 효소는 RT-PCR(qRT-PCR 등)의 다양한 분자생물학 기법에 이용될 수 있다. 키트의 역전사 효소가 본 발명에 따른 역전사 효소인, RT-PCR용 키트도 제공될 수 있다.

[0121] 본 발명은 이하 첨부된 도면과 첨부물들을 참조하여 단순히 예를 들어 더욱 상세하게 설명될 것이다.

발명의 효과

[0122] 본 발명은 타겟 단백질을 코딩하는 핵산의 제조 방법 및 그에 따라 수득가능한, 핵산 처리 효소, 특히 역전사 효소 등의 효소를 포함하는 타겟 단백질에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0123] **도 1**. 실시예 1의 실험 계획. 2종의 플라스미드 pET_his_MLV_pD((단백질 D 스페이서가 융합된 M-MLV(Moloney Murine Leukemia Virus) 역전사 효소 코딩) 및 pET_his_del_pD(비활성화된(pol 도메인에 57개의 아미노산 결손됨), M-MLV(Moloney Murine Leukemia Virus) 역전사 효소와 여기에 융합된 단백질 D 스페이서를 코딩함)를 이용하여, PCR 단편들을 합성하였다. PCR 단편은 전사 반응과 3' 말단에 정지 코돈이 없는 mRNA 합성에 이용하였다. mRNA를 정제하여, 1 : 50 = MLV (활성형 RT) : del (비활성형 RT) 비율로 혼합하여, 시험관내 번역 반응에 사용하였다. 번역 반응 동안에, 리보솜 복합체는 단백질을 합성하며, 정지 코돈이 없는 mRNA 말단에서 정지한다. 3중 복합체(TC)의 혼합물을 슈크로스 완충물 상에서의 초원심분리에 의해 정제한다. 정제된 3중 복합체(수득한 분자 수 < 3 x 10^9)에는 시험관내에서 번역된 MLV 역전사 효소에 결합된 mRNA가 이미 포함되어 있으며, 이를 이용하여 외래 dNTP 세트와 프라이머가 보충된 RT 반응용 역전사 반응 혼합물을 제조한다. 차가운 RT 반응물을 ~2 ㎛ 크기의 유중수 구획체 ~1 x 10^{10}개로 에멀젼화한다. 에멀젼화된 RT 반응물(< TC (mRNA + MLV RT) / 구획)은, RT 반응을 수행하기 위해 42℃에서 1시간 인큐베이션한다. 구획화된 RT 반응 혼합물의 온도가 승온되면, 대부분의 TC는 해리되어, mRNA와 역전사 효소가 분리된다. 성공적인 RT 반응은 활성 MLV 역전사 효소(MLV_pD)가 포함된 구획에서만 이루어지며, 비활성 역전사 효소(del_pD)가 포함된 구획에서는 cDNA가 합성되지 않는다. 이후, PCR을 수행하여 cDNA를 증폭시키고, 비활성 역전사 효소(del_pD)에 비해 활성 역전사 효소(MLV_pD)의 농화가 관찰된다.

도 2. pET_his_MLV_pD 플라스미드의 구조

도 3. 실시예 1 - CRD 선별 동안에 합성한 cDNA를 대상으로 실시한 1차 PCR의 아가로스 젤 전기영동. 사용 프라이머: RD_Nde(서열번호 9) 및 pD_55(서열번호 10). PCR 단편의 예상 길이는 MLV_pD가 2185 bp이고, del_pD가 2014 bp이었다. 증폭은, 웰 당 PCR 믹스 10 ㎕를 로딩한 1% 아가로스 젤에서 분석하였다.

도 4. 실시예 1 - 1차 PCR 산물을 대상으로 수행한 유전자 일부 증폭에 대한 네스티드 PCR의 아가로스 젤 전기영동. 사용 프라이머: M_F (서열번호 11) 및 M_2R (서열번호 12). PCR 단편의 예상 길이는 MLV_pD가 907 bp이고, del_pD가 736 bp이었다. 증폭은, 웰 당 PCR 믹스 10 ㎕를 로딩한 1% 아가로스 젤에서 분석하였다.

도 5. 실시예 1 - 1차 PCR 산물을 대상으로 수행한 전체 유전자 증폭에 대한 네스티드 PCR의 아가로스 젤 전기영동. 사용 프라이머: M_Esp (서열번호 13) 및 M_Eri (서열번호 14). PCR 단편의 예상 길이는 MLV_pD가 2077 bp이고, del_pD가 1906 bp이었다. 증폭은, 웰 당 PCR 믹스 10 ㎕를 로딩한 1% 아가로스 젤에서 분석하였다.

도 6. 실시예 2의 CRD 선별을 위한 실험 계획. 역전사 효소(단백질 D와 융합형) MLV_pD의 돌연변이 라이브러리를 코딩하는 PCR 단편을 이용하여 mRNA를 합성하였다. 정제한 mRNA를 시험관내 번역 반응에 사용하였다. mRNA-리보솜-MLV_pD(tRNA)의 3중 복합체(TC)를 번역 혼합물 중에서 형성시켰으며, 저온과 고농도의 Mg^{2+} 이온으로 안정화시켰다. TC의 혼합물은 슈크로스 완충 상에서 초원심분리로 정제하였다. 침전된 TC를 차가운 완충액(50mM Mg^{2+})에 용해하고, 이를 이용하여 외부 dNTP 세트와 프라이머가 첨가된 RT 반응용 역전사 반응 믹스를 제조하였다. 차가운 RT 반응 혼합물은 에멀젼화되어, ~2 ㎛ 크기의 유중수 구획체 ~1 x 10^{10}가 형성되었다. MLV RT의 최적 반응 온도는 ~42℃이다. 보다 높은 온도에서 더 잘 작동하는 역전사 효소 변이체를 선별하기 위해, 에멀젼화된 RT 반응 혼합물(구획체 당 TC(mRNA + MLV RT) 1개 이하)을 50℃에서 1시간 인큐베이션하였다. 이 온도에서, 전장 cDNA의 성공적인 합성은 활성이 보다 우수하거나 열 안정성이 우수한 MLV 역전사 효소 변이체가 포함된 구획내에서 잘 수행되었다. 후속적인 PCR을 실시하여 전장 cDNA를 증폭시키고, 활성이 보다 우수하고 열 안정적인 역전사 효소 유전자의 농화를 수행하였다. PCR 증폭시킨 유전자들을 CRD 포맷으로 다시 이동시켜, 라이게이션 PCR에 의해 온전한 5' (START 단편 - T7 중합효소 프로모터, SD 및 His-테그 코딩 서열) 및 3' (END 단편 - gs 링커, 단백질 D 및 제2 gs 링커) 서열을 복원하였다. 역전사 효소 유전자의 농화된 라이브러리가 포함된, 재구축한 PCR 단편을, 이후 mRNA 전사와 다음의 CRD 선별 과정에 사용하였다. 각 선별 과정은 보다 높은 온도의 RT 반응에서 수행하였다: 50℃ (1st 라운드); 52.5℃ (2nd 라운드); 55℃ (3rd 라운드); 57.5℃ (4th 라운드) 및 60℃ (5th 라운드).

도 7. 새로운 CRD 선별 라운드를 수행하기 전 PCR 단편의 재구축 계획. 돌연변이된 MLV RT 라이브러리를 Esp3I(NcoI 상용가능한 말단)와 EcoRI으로 자르고, CRD 선별에 적합한 PCR 단편을 수득하기 위해, START(244 bp)와 END(398 bp) 단편을 연결하였다. START 단편(T7 중합효소 프로모터, SD 및 His-테그 코딩 서열 포함)은 처음 983 bp START 단편(타겟 - 플라스미드 pET_his_del_pD(서열번호 2), 프라이머 - pro-pIVEX(서열번호 3) 및 M_1R(서열번호 15))을 PCR 증폭한 다음, NcoI(인지 서열 C↓CATGG)으로 잘라, 244 bp DNA 단편으로 구축하

였다. END 단편 (gs 링커, 단백질 D 및 제2 gs 링커 서열 포함)은, 처음 1039 bp END 단편(타겟 - 플라스미드 pET_his_del_pD(서열번호 2), 프라이머 - M_3F(서열번호 16) 및 pD-ter(서열번호 4))을 PCR 증폭한 다음, EcoRI(인지 서열 G↓AATTC)으로 잘라, 398 bp DNA 단편으로 구축하였다.

도 8. 37℃, 50℃에서 측정한 돌연변이 RT 변이체들의 역전사 효소 활성 및 50℃에서 5분 인큐베이션한 후 37℃에서의 잔류 활성. 37℃에서의 역전사 효소 활성은 항상 100%로 표준화하였고, 생략하였다. 따라서, 2가지 타입의 막대(50℃에서의 RT 활성% 및 50℃에서 5분 인큐베이션한 후 37℃에서의 잔류 RT 활성%)만 나타낸다. 대조군은 돌연변이 라이브러리 구축에 사용한 wt M-MuLV 역전사 효소이다. 이러한 일차 효소(primary enzyme)는 돌연변이 RT 변이체와 동일한 벡터에서 발현시키고 동일한 방식으로 정제하였다. 테스트한 모든 돌연변이의 50℃에서의 돌연변이 RT 활성의 평균값은 약 ~92%이었고, wt 효소(45%) 보다 2배 이상 높았다. 50℃에서 5분 인큐베이션한 후 37℃에서의 돌연변이 RT 변이체의 평균 잔류 활성은 12%(wt 효소 - 11%)였다.

도 9. 37℃에서 10분 측정한, 부분 정제된 wt 및 돌연변이 RT 변이체의 비활성도(U/mg(단백질)).

도 10. FACS를 이용한 CRD 선별의 제안된 실험 계획. 대상 단백질을 리보솜 디스플레이 포맷으로 나열한다. mRNA-리보솜-단백질(tRNA)을 포함하는, 정제된(또는 단순히 여러번 희석한) 3중 복합체를, 반응 완충액 중에서 비-형광 기질(S)과 혼합한 다음, 수중유중수의 이중 에멀젼으로 에멀젼화하였다. 구획화된 효소의 활성 변이체들은, 기질(S)을, FACS를 통해 형광(활성형 효소 내부) 및 "어둠"(비활성형 효소 내부) 액적을 구별할 수 있는, 형광성 산물(P)로 변환시킬 것이다.

도 11. CRD를 이용한 열 안정적인 DNA 중합효소의 선별 및 진화에 대한 제안된 실험 계획. 대상 중합효소는 리보솜 디스플레이 포맷으로 나열되어야 한다. mRNA-리보솜-중합효소를 포함하는, 선택적으로 정제된 (또는 단순히 여러번 희석된) 3중 복합체를 이용하여, PCR 완충액 중에 역전사 효소(헬퍼 효소), dNTP 및 프라이머 세트와 함께 반응 혼합물을 제조할 수 있다. 반응 용액은 에멀젼화되어 유중수 에멀젼이 형성된다. 1차 RT 단계에서 - 역전사 효소는 cDNA를 합성하여야 하며, 그 후 제2 PCR 단계의 타겟으로서 제공될 것이다 - 리보솜에 나열된 DNA 중합효소에 의한 cDNA 증폭. PCR에 사용되는 프라이머 중 한가지는, 스트렙타비딘 비드와 비-상보적인 5' 말단을 이용한 이후의 선택적인 정제를 위한 바이오틴을 함유할 수 있다. RT-PCR 수행 후, 에멀젼을 파괴시키고, 새롭게 합성된 DNA 단편은 바이오틴을 통해 정제할 수 있으며, cDNA에 비상보적이지만 1차 증폭 반응에 사용된 프라이머의 5' 부분과는 동일한 서열을 가진 프라이머가 포함된 새로운 프라이머 세트를 이용하여 다시 증폭시킬 수 있다(cDNA 백그라운드 상에서 DNA의 선별적인 증폭). 활성이 보다 강한 DNA 중합효소 변이체들은 활성이 보다 낮은 변이체들 보다 농화될 것이며, 이것은 추가적인 분석이나 다음 번의 선별 라운드에 사용할 수 있다.

도 12. 실시예 4의 실험 계획. 본 실험 설계에서는, M-MuLV 역전사 효소를 DNA 의존성 DNA 중합효소로 사용한다. 2가지 플라스미드 pET_his_MLV_D583N_pD (RNase H 생략된 M-MLV(Moloney Murine Leukemia Virus) 역전사 효소 및 단백질 D 스페이서 융합형) 및 pET_his_del_pD (비활성 역전사 효소 및 단백질 D 스페이서 융합형 - pol 도메인에 아미노산 57개 결손 및 RNase H 도메인에 점 돌연변이 D583N)를 이용하여 PCR 단편들을 합성하였다. 나아가, PCR 단편들을 전사 반응에 이용한다. 정제된 mRNA를, 비율 1 : 20 = MLV_D583N_pD (활성형 RT) : del_pD (비활성형 RT)로 혼합하고, 이를 이용하여 T4 DNA 라이게이즈를 이용한 mRNA 믹스에 대한 dsDNA 라이게이션에 의해 mRNA/dsDNA 복합체를 제조한다. mRNA/dsDNA 복합체는 시험관내 번역 반응에 사용한다. 번역 반응이 진행되는 동안에, 리보솜 복합체는 단백질을 합성하며, mRNA의 말단(mRNA/DNA 하이브리드 시작부)에서 정지한다. 3중 복합체(TC)의 혼합물은, 슈크로스 완충물 상에서의 초원심분리에 의해 정제한다. 정제된 3중 복합체(<3 x 10^9개의 분자가 수득됨)는 이미 시험관내 번역된 중합효소(M-MuLV 역전사 효소)가 연결된 mRNA/dsDNA를 포함하고 있으며, 이것을 이용하여, 외래 바이오틴-dUTP이 첨가된 연장 반응 믹스를 준비한다. 차가운 반응 혼합물은 에멀젼화되어, ~2 ㎛ 크기의 유중수 구획체 ~1 x 10^{10}를 형성한다. 에멀젼화된 연장 반응 혼합물(구획당 TC(mRNA/dsDNA + 중합효소) 1개 이하)은 바이오틴화된 뉴클레오티드를 병합하기 위해 37℃에서 30분간 인큐베이션한다. 구획화된 반응 혼합물의 온도를 승온시킨 후, 대부분의 TC는 해리되어, mRNA/dsDNA 복합체와 중합효소는 방출된다. dsDNA 기질에 대한 성공적인 병합 반응은, 활성형 중합효소(역전사 효소 - MLV_D583N_pD)가 포함된 구획에서만 이루어지며, 비활성형 중합효소(del_pD)가 포함된 구획에서는 cDNA는 합성되지 않는다. 에멀젼이 파괴된 후, 젤 여과 미니-컬럼을 이용하여 과잉의 바이오틴-dUTP를 제거한다. 바이오틴화된 mRNA/dsDNA 복합체는 스트렙타비딘 비드 상에서 정제하며, 이를 이용하여 cDNA를 합성한다. 이후의 PCR을 통해 cDNA를 합성하며, 비활성형 중합효소(del_pD) 대비 활성형 중합효소(역전사 효소 - MLV_D583N_pD)의 농화가 관찰된다.

도 13. mRNA/dsDNA 복합체 및 자가 개시된(primed) mRNA로의 바이오틴-dUTP 병합율 측정. dTTP 또는 바이오틴

-dUTP를 병합한 후, mRNA/dsDNA(MLV_D583N_pD) 및 mRNA(del_pD)의 샘플에 대해 수행한 RT-PCR 사진. 앰플리콘의 예상 크기는 MLV_D583N_pD가 907 bp, del_pD cDNA가 736 bp이다. PCR 산물은, 웰 당 PCR 믹스 10 ㎕를 로딩한 1% 아가로스 젤에서 분석하였다.

도 14. dTTP(바이오틴-dUTP) 및 [α-P^{33}]dATP의 병합에 의한 mRNA/dsDNA 복합체의 일반적인 컨트롤. 방사성 dATP는 초기 dTTP 또는 바이오틴-dUTP에 병합된 다음 dsDNA 기질에 도입되어야 한다. A - 에티듐 브로마이드로 가시화된 아가로스 젤(mRNA 또는 mRNA/dsDNA 밴드 ~2.5 kb). B - A와 동일한 샘플로서, 필터지 상에서 건조시키고 사이클론 포스포르 이미저로 가시화함(Perkin-Elmer, Wellesley, MA). 표지된 mRNA/dsDNA 복합체 및/또는 dsDNA 밴드가 관찰된다. C - mRNA/dsDNA 복합체에서 DsDNA 구조 및 서열.

도 15. 실시예 4의 최종 제조된 RT-PCR 단편의 분석. 앰플리콘의 예상 크기는 MLV_D583N_pD가 907 bp이고 del_pD cDNA가 736 bp이다. PCR 산물은, 웰 당 PCR 믹스 10 ㎕를 로딩한 1% 아가로스 젤에서 분석하였다. 스트렙타비딘 비드로 정제하기 전의 RT-PCR 샘플은 활성형과 비활성형 중합효소 유전자의 비율이 1:20 (거의 del_pD 단편 ~736 bp만 육안으로 확인됨)이다. 스트렙타비딘 비드 상에서의 정제한 후, RT-PCR 샘플에서의, 1회 선별 라운드 후 활성형 및 비활성형 중합효소 유전자의 비율은 1:1이다. 이러한 선별에서의 농화 차수는 ~20으로 관찰된다.

도 16. 1 kb 및 4.5 kb cDNA 합성 반응의 최고 온도를 결정하기 위해 사용한 알칼리 아가로스 젤의 일부 예. PCR 장비 - Eppendor Mastercycle Gradient. A-D - 1 kb cDNA 합성 (M-MuLV (wt), D200N, L603W 및 Q221R); 온도 구배 41.9℃, 43.6℃, 45.5℃, 47.8℃, 50.4℃, 53.1℃, 55.8℃, 58.1℃, 60.1℃, 62.1℃; 크기 표준 - DNA Fast Ruler Middle Range(Fermentas). E-G - 4.5 kb cDNA 합성(M2, M3 및 M4); 온도 구배 49.8℃, 51.5℃, 53.4℃, 55.7℃, 58.3℃, 61.0℃, 63.7℃, 66.1℃, 68.0℃, 70.0℃; 크기 표준 - Zip Ruler Express DNA ladder 2(Fermentas).

부록 1. 처음 MLV RT 라이브러리에서 발견된 전체 돌연변이 도표(NcoI와 EcoRI 제한효소 부위 사이의 서열 - 서열번호 24). 23개의 뉴클레오티드 돌연변이들이, 서열분석한 10개의 유전자들에서 확인되었고(변위 1개, 전이 20개 - 돌연변이된 위치들은 밑줄 침, 서열 위에 돌연변이 서열 나타냄, 결손 2개 - 밑줄 표시하고 서열 위에 점선 표시), 아미노산 교체 15개, 침묵 돌연변이 6개, 정지 코돈 1개 및 코딩 프래임의 프래임 이동 2건이 확인되었으며, 평균적으로 유전자 1개 당 아미노산 치환율은 1-2개이다.

부록 2. 문헌들에서 일반적으로 사용된 바와 동일하게 아미노산 번호를 매기기 위해 N 말단에 His 테그가 없는, 전체 104개 단백질 서열의 CLUSTALW 정렬. 야생형 서열인 MLV(서열번호 25)는 늘 첫번째 서열로 둔다(돌연변이 서열들은, 나타낸 순서대로 서열번호 26 - 128로 기재함). 돌연변이는 역상의 백색 글씨로 표시된다. 어떠한 방식으로도 M-MuLV 역전사 효소 특성을 개선시키고 다른 특허 출원에서도 언급된 돌연변이의 아미노산 위치는, 회색으로 강조한 아미노산(백색 글자) 행 열로 표시되어 있다. 본 발명에서 선별되었으며 회색 줄로 표시되는 돌연변이는, 본 선별 방법이 유익한 주요 부위(hot spot)나 도처에 언급된 실제 아미노산 돌연변이를 정확하게 조준하고 있음을 시사한다. 50℃에서의 활성인 최초 wt M-MuLV(wt 활성 70%, 특히 45%) 보다 실질적으로 우수한 것으로 분석된 단백질의 서열은 회색으로 강조되어 있다.

부록 3. 선별된 모든 RT 변이체들에서 확인된 돌연변이 리스트. 단백질은 돌연변이 갯수의 내림차순으로 정렬되어 있다.

부록 4. 선별된 RT 변이체의 돌연변이 빈도(내림차수). 50℃에서의 활성이 최초 wt M-MuLV(wt 활성 70%, 특히 45%) 보다 실질적으로 우수한 것으로 분석된 단백질의 서열은 회색으로 강조되어 있다.

부록 5. M-MuLV (wt) 역전사 효소 및 단일 돌연변이에 대한 총괄 표로서, 단백질 명칭, 선별 빈도(실제 돌연변이가 있는 서열분석한 돌연변이의 수, 괄호 안 숫자는 본 설별에서 확인딘 특정 아미노산 돌연변이의 총 수를 나타냄), 단백질 농도(mg/ml), 37℃에서의 역전사 효소 특이적인 활성(U/mg), 50℃에서의 상대적인 활성(%), 효소를 50℃에서 5분간 인큐베이션한 후 37℃에서의 상대적인 잔류 활성(%), 단백질의 특이적인 RNase H 활성(U/mol), 상대적인 RNase H 활성(%) 및 1 kb DNA 합성 반응의 최고 온도가 열거되어 있다.

부록 6. M-MuLV (wt) 역전사 효소 및 단일 돌연변이에 대한 총괄 표로서, 단백질 명칭, 단백질 농도(mg/ml), 37℃에서의 역전사 효소 특이적인 활성(U/mg), 50℃에서의 상대적인 활성(%), 1 kb 및 4.5 kb cDNA 합성 반응의 최고 온도가 열거되어 있다.

부록 7. 서열번호 1 내지 23에 대한 서열과 정보

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0124] **실시예 1 - *CRD - 원리 입증***

[0125] 구획화된 리보솜 디스플레이 선별 시스템의 기본 원리의 증거를 제공하기 위해, 테스트 선별을 수행하였다. 원리 실험의 전형적인 증거는, 활성 효소에서는 신호가 나타나지만(본 발명의 경우, 오리지날 MLV 역전사 효소에 대한 RT-PCR 단편이 형성됨), 비활성 효소에서는 신호가 나타나지 않아야 한다(비활성화된 MLV 역전사 효소에 대한 RT-PCR 단편이 없음). 보다 복잡한 실험은, 활성형과 비활성형의 효소를 코딩하는 정해진 비율의 유전자들의 혼합물을 이용하는 방법이다. 활성 효소를 코딩하는 유전자가, 성공적인 실험의 결과로, 비활성형 효소를 코딩하는 유전자 보다 농화되어야 한다.

[0126] 실험의 전반적인 계획을 도 1에 나타낸다. 2종의 플라스미드 pET_his_MLV_pD((단백질 D 스페이서가 융합된 M-MLV(Moloney Murine Leukemia Virus) 역전사 효소를 코딩함) 및 pET_his_del_pD(비활성화된(pol 도메인에 57개의 아미노산 결손됨) M-MLV(Moloney Murine Leukemia Virus) 역전사 효소와 여기에 융합된 단백질 D 스페이서를 코딩함)를 이용하여, PCR 단편들을 합성하였다. 또한, PCR 단편은 전사 반응에 사용하여, 3' 말단에 정지 코돈이 없는 mRNA를 합성하였다. 상기 2가지 PCR 단편으로부터 제조되는 정제된 mRNA를, 1 : 50 = MLV (활성형 RT) : del (비활성형 RT) 비율로 혼합하여, 시험관내 번역 반응에 사용하였다. 번역 반응 동안에, 리보솜 복합체는 단백질을 합성하며, 정지 코돈이 없는 mRNA 말단에서 정지한다. 번역 반응은 50 mM Mg^{2+}이 포함된 차가운 완충액으로 희석하여 정지시켰다. 저온, 고농도의 Mg^{2+} 이온 및 mRNA 말단에 정지 코돈의 부재는, mRNA-리보솜-단백질(tRNA) 3중 복합체(TC)를 안정화한다. 3중 복합체(TC)의 혼합물을 슈크로스 완충 상에 초원심분리에 의해 정제하였다. 초원심분리는, TC(~3.5 MDa)는 초원심분리 시험관의 바닥에 침전되지만, 저분자량의 분자, 단백질과 대부분의 유리형 mRNA(~0.9 MDa)에는 상층액에 존재하도록, 최적화되었다. 침전된 TC를 차가운 완충액(50mM Mg^{2+})에 용해하였다. 정제된 3중 복합체(수득한 분자 수 <3 x 10^{9})에는 시험관내에서 번역된 MLV 역전사 효소와 여기에 결합된 mRNA가 이미 포함되어 있어, 이를 이용하여 외래 dNTP 세트와 프라이머가 보충된 RT 반응을 위한 역전사 반응 혼합물을 제조하였다. 차가운 RT 반응물을 ~2 ㎛ 크기의 유중수 구획체 ~1 x 10^{10}개로 에멀젼화하였다. 에멀젼화된 RT 반응물(< TC (mRNA + MLV RT) / 구획)을 RT 반응을 수행하기 위해 42℃에서 1시간 인큐베이션하였다. 구획화된 RT 반응 혼합물의 온도가 승온되면, 대부분의 TC는 해리되어, mRNA와 역전사 효소가 분리된다. 성공적인 RT 반응은 활성 MLV 역전사 효소(MLV_pD)가 포함된 구획에서만 이루어지며, 비활성 역전사 효소(del_pD)가 포함된 구획에서는 cDNA가 합성되지 않는다. 이후의 PCR로 합성된 cDNA를 증폭시키고, 비활성 역전사 효소(del_pD) 대비 활성 역전사 효소(MLV_pD)의 농화가 관찰된다.

[0127] **재료 및 방법**

[0128] 개시 플라스미드 pET_his_MLV_pD(서열번호 1 및 도 2)는, pET 타입의 플라미스미의 T7 중합효소 프로모터 및 Shine-Dalgarno 서열 영역에서의 변형과, MLV H+ 역전사 효소 코딩 서열(306-2363, 서열번호 1) 삽입 및 N-말단 His-테그(258-305, 서열번호 1)와 C-말단에 글리신-세린(gs) 링커(2364-2393, 서열번호 1), 람다 파지 유래의 단백질 D (pD)의 일부분(2394-2669, 서열번호 1) 및 제2 글리신-세린(gs) 링커(2670-2759, 서열번호 1)의 융합에 의해, 제작하였다. N-말단 His-테그를 단백질 발현 정제에 사용한다. C-말단의 융합이, 단백질의 시험관내 번역 과정 중에 리보솜 터널내에 잔류되게 하여 mRNA-리보솜-MLV(tRNA) 3중 구조가 형성되게 한다.

[0129] M-MuLV 역전사 효소는 2가지의 주된 효소 활성을 가지고 있다: RNA 의존성 DNA 중합효소 및 RNase H. 역전사 효소의 RNase H 활성은, 점 돌연변이 D583N(단일 뉴클레오티드 G에서 A로 치환, 플라스미드 pET_his_MLV_pD에서 2055번 위치, 서열번호 1) 도입시 소실되었다. 아스파르테이트 583은 RNase H 활성 부위에 위치하며, Mg 이온 결합에 참여하는, RNase H 활성에 중요한 부분이다. 새로운 플라스미드는 pET_his_MLV_D583N_pD라고 하며, 이를 이용하여, 다음번의 비활성형 역전사 효소를 코딩하는 플라스미드 pET_his_del_pD(서열번호 2)를 제작하였다. 플라스미드 pET_his_MLV_D583N_pD를, 제한효소 엔도뉴클레아제 XmaJI(인지 서열 C↓CTAGG - 서열 1에서 1047 및 1218번 위치)로 절단하였다. 171 pb 길이의 유전자 단편은 제거하고, 잘라진 플라스미드를 자가 연결시켜, 뉴클레오티드 171개 또는 아미노산 51개에 의해 짧은 역전사 효소 유전자를 포함하며 단백질 번역 프래임 변동이 없는, 플라스미드 pET_his_del_pD (서열번호 2)를 제작하였다.

[0130] 동일한 역전사 효소 유전자를 취하는 것이 중요하였다: 1) 짧은 길이(PCR 검출 용이성을 위해); 2) 비활성형(중합효소 도메인에서 57개의 아미노산 제거가 중합효소의 활성을 완전히 불활성화시키며, 돌연변이 D583N이 RNase H 활성을 불활성화시킨다는 것이 실험을 통해 확인되었음); 및 3) 프래임 변동은 없음(어떠한 프래임 변동으로

정지 코돈이 형성될 수 있으며, 정지 코돈은 리보솜 디스플레이 포맷에서 사용할 수 없음).

[0131] 시험관내 전사를 위한 PCR 단편의 제조. PCR 혼합물: 20 ㎕ - 10X Taq 완충액 + KCl (Fermentas); 20 ㎕ - 2 mM의, 각각의 dNTP (Fermentas); 12 ㎕ - 25 mM $MgCl_2$ (Fermentas); 16 ㎕ - DMSO (D8418 - Sigma); 4 ㎕ - 1 u/㎕ LC (재조합) Taq DNA 중합효소(Fermentas); 1 ㎕ - 100 μM pro-pIVEX 프라이머 (서열번호 3); 1 ㎕ - 100 μM pD-ter 프라이머 (서열번호 4); 122 ㎕ 물 - 을 얼음 위에서 준비한 다음, 혼합물을 2개의 시험관에 2 x 98 ㎕로 나누었다. 2 x 98 ㎕의 PCR 마스터 믹스에, 2 ㎕의 pET_his_MLV_pD (~1 ng/㎕로 희석) 또는 2 ㎕의 pET_his_del_pD (~1 ng/㎕로 희석) 중 한가지를 첨가하였다. 순환성 프로토콜은 다음과 같다: 1차 변성 단계 3분간 94℃, 30회 사이클(45초간 94℃, 45초간 53℃, 및 2분간 72℃) 및 최종 연장 5분간 72℃. 증폭은 플라스미드(7873 bp) 2 ng으로부터 증폭된 산물(pET_his_MLV_pD의 경우 PCR 단편 2702 bp; pET_his_del _pD의 경우 PCR 단편 2531 bp) ~5 ㎍ (50 ng/㎕)가 되는 ~7000배였다.

[0132] 전사 혼합물: 40 ㎕ - 5 x T7 전사 완충액(1 M HEPES-KOH pH 7.6; 150 mM Mg 아세테이트; 10 mM 스퍼미딘; 0.2 M DTT); 56 ㎕ - 25 mM의, 각각의 NTP (Fermentas); 8 ㎕ - 20 u/㎕ T7 RNA 중합효소(Fermentas); 4 ㎕ - 40 u/㎕ RiboLock RNase 저해제(Fermentas); 52 ㎕ 뉴클레아제 비함유수 - 을 제조한 다음, 2개의 시험관에 2 x 80 ㎕로 나누고, 20 ㎕ - 50 ng/㎕의 MLV_pD(pro-pIVEX//pD-ter) 또는 20 ㎕ - 50 ng/㎕의 del_pD(pro-pIVEX//pD-ter) PCR 혼합물을 첨가하였다. 전사는 37℃에서 3시간 수행하였다.

[0133] 2가지 전사 혼합물을 뉴클레아제 비함유성 차가운 물 200 ㎕로 희석하고, 6 M LiCl 용액 200 ㎕를 첨가하였다. 혼합물을 +4℃에서 30분간 인큐베이션한 다음, +4℃에서 30분의 조건으로 냉각중인 원심분리기에서 최대 속도(25,000 g)로 원심분리하였다. 상층액은 버리고, RNA 펠렛을 75%의 차가운 에탄올 500 ㎕로 헹구었다. 다시 시험관을 +4℃에서 5분의 조건으로 냉각중인 원심분리기에서 최대 속도로 원심분리한 다음 상층액을 버렸다. RNA 펠렛을 실온에서 12분간 건조시킨 다음 뉴클레아제 비함유성 차가운 물 200 ㎕에서 +4℃에서 15분간 1400 rpm으로 교반함으로써 재현탁하였다. 용해되지 않은 RNA를 분리하기 위해, 시험관을 다시 +4℃에서 5분의 조건으로 냉각중인 원심분리기에서 최대 속도로 원심분리하였다. 상층액 약 180 ㎕를, 10x DNase I 완충액 (Mg^{2+})(Fermentas) 20 ㎕; 1 ㎕ - 1 u/㎕ DNaseI (RNase-결핍) (Fermentas)이 들어 있는 새로운 시험관에 옮기고, DNA를 분해시키기 위해 20분간 +37℃에서 인큐베이션하였다. 각 시험관에 20 ㎕의 3 M 소듐 아세테이트 pH 5.0 용액과 500 ㎕의 96% 차가운 에탄올을 첨가하였다. 마지막으로, -20℃에서 30분간 인큐베이션한 다음 +4℃에서 30분의 조건으로 냉각중인 원심분리기에서 최대 속도(25,000 g)로 원심분리함으로써, RNA를 침전시켰다. 상층액은 버리고, RNA 펠렛은 500 ㎕의 75% 차가운 에탄올로 헹구었다. 시험관을 다시 +4℃에서 5분의 조건으로 냉각중인 원심분리기에서 최대 속도로 원심분리하고, 상층액을 버렸다. RNA 펠렛을 실온에서 12분간 건조한 다음, 뉴클레아제 비함유성 차가운 물 43 ㎕에 +4℃에서 15분간 1400 rpm으로 교반함으로써 재현탁하였다. RNA 용액은 4 x 10 ㎕로 분할하여, 액체 질소에서 동결하였다. mRNA의 농도를 분광광도측정으로 측정하고, RiboRuler™ RNA Ladder, High Range (Fermentas)를 이용하여 아가로스 젤 상에서 이중 체크하였다 - MLV_pD mRNA ~1.2 ㎍/㎕; del_pD mRNA ~1.2 ㎍/㎕.

[0134] 정제된 mRNA를 1:50 = MLV (활성형 RT) : del (비활성형 RT)로 혼합하였다. MLV_pD mRNA는 ~48 ng/㎕로 25배 희석하고, 1 ㎕ (~48 ng)를 2 ㎕와 혼합하였다. ~1.2 ㎍/㎕ del_pD mRNA(2.4 ㎍)로 1:50의 비율의 mRNA 혼합물 ~0.8 ㎍/㎕을 제조하였다. 시험관내 번역은 2가지 번역 시스템 RTS 100 E.coli HY Kit (03 186 148 001 - Roche) 및 synthetic WakoPURE (295-59503 - Wako)을 이용하여 수행하였다. 단백질 번역 서열은, MLV_pD는 서열번호 6에, del_pD는 서열번호 7에 나타낸다.

[0135] RTS HY 시스템용 번역 혼합물(25 ㎕): 6 ㎕ - E.coli 용혈물(Roche); 5 ㎕ - 반응 믹스(Roche); 6 ㎕ - 아미노산(Roche); 0.5 ㎕ - 100 mM Met (Roche); 0.5 ㎕ - 40 u/㎕ RiboLock RNase 저해제(Fermentas); 0.4 ㎕ - 200 μM assrA 올리고뉴클레오티드(서열번호 5); 0.25 ㎕ - 1 M DTT; 2.5 ㎕ 재구성 완충액(Roche); 2.5 ㎕ 뉴클레아제 비함유수 및 1.5 ㎕ - 0.8 ㎍/㎕ mRNA 혼합물 1:50 = MLV_pD:del_pD (~1200 ng). 시험관내 번역은 20분간 30℃에서 수행하였다.

[0136] WakoPURE system용 번역 혼합물(25 ㎕): 12.5 ㎕ - A 용액(Wako); 5 ㎕ - B 용액(Wako); 0.5 ㎕ - 40 u/㎕ RiboLock RNase 저해제(Fermentas); 0.4 ㎕ - 200 μM αssrA 올리고뉴클레오타이드 (서열번호 6); 0.25 ㎕ - 1 M DTT; 5 ㎕ 뉴클레아제 비함유수 및 1.5 ㎕ - 0.8 ㎍/㎕ mRNA 혼합물 1:50 = MLV_pD:del_pD (~1200 ng). 시험관내 번역은 20분간 30℃에서 수행하였다.

[0137] 2가지 번역 반응물(~25 ㎕)들은, 155 ㎕의 차가운 정지 완충액 WBK_{500} + DTT + 트리톤(50 mM 트리스-아세테이

트 pH 7.5, 25℃; 50 mM NaCl; 50 mM Mg-아세테이트; 500 mM KCl; 10 mM DTT; 0.1% (v/v) - 트리톤 x-100 (T8787 - Sigma))을 첨가하여 반응을 정지시키고, 5분간 +4℃에서 25,000 g로 원심분리하였다. 매우 조심스럽게, 160 ㎕의 원심분리된 번역 혼합물을, WBK_{500}+DTT+트리톤 중의 840 ㎕의 35% (w/v) 슈크로스 용액(50 mM 트리스-아세테이트 pH 7.5, 25℃; 50 mM NaCl; 50 mM Mg-아세테이트; 500 mM KCl; 10 mM DTT; 0.1% (v/v) - 트리톤 x-100 (T8787 - Sigma); 35% (w/v) - 슈크로스(84097 - Fluka)) 위에 파이펫으로 적층하였다. 3중 복합체(TC) mRNA-리보솜-단백질(tRNA)을 정제하기 위해, TL-100 Beckman 초원심분리기; TLA100.2 고정각 로터(Beckman); 투명한 1 ml 초원심분리관(343778 - Beckman)을 이용하여 9분간 +4℃에서 100,000 rpm으로 초원심분리를 수행하였다. 초원심분리관 바닥에 작고 투명한 TC 펠렛이 유지되도록, 시험관 전체를 조심스럽게 다루었다. 먼저, 용액 750 ㎕을 원심분리관의 최상단으로부터 취하였다. 그런 후, (매우 조심스럽게) 시험관의 벽을 750 ㎕의 WBK_{500}(50 mM 트리스-아세테이트 pH 7.5, 25℃; 50 mM NaCl; 50 mM Mg-아세테이트; 500 mM KCl)로 헹구었다. 마지막으로, 원심분리관의 최상단에서부터 시작하여 용액 전체를 제거하고, 펠렛을 30 ㎕의 차가운 정지 완충액 WBK_{500}+DTT+트리톤(50 mM 트리스-아세테이트 pH 7.5, 25℃; 50 mM NaCl; 50 mM Mg-아세테이트; 500 mM KCl; 10 mM DTT; 0.1% (v/v) - 트리톤 x-100 (T8787 - Sigma))에 용해하였다.

[0138] 초원심분리 후 방사능 표지된 mRNA를 이용하여 측정된 바에 따라, 투입한 mRNA의 5% - 30%가 3중 복합체 펠렛에 위치하는 것으로 확인되었다. 따라서, 30 ㎕의 완충액 중의 mRNA는 360 ng 미만(번역 반응에 사용된 mRNA 1200 ng에서 30%)인 것으로 예상되었다(~12 ng/㎕ 또는 9 x 10^9개의 분자/㎕(3중 복합체)).

[0139] 선별용 역전사 반응 혼합물: 60 ㎕ - 5 x 역전사 효소 반응 완충액(Fermentas); 7.5 ㎕ - 40 u/㎕ RiboLock RNase 저해제(Fermentas); 15 ㎕ - 20 μM pD_42 올리고뉴클레오타이드 (서열번호 8); 188 ㎕ 뉴클레아제 비함유수 - 는 얼음 위에서 준비하고, 혼합물을 2개의 시험관에 2 x 135 ㎕로 나누고, 0.9 ㎕의 정제된 (< 8 x 10^9개의 분자) TC (Roche - RTS HY 키트로 번역) 또는 0.9 ㎕의 정제된(< 8 x 10^9개의 분자) TC(Wako - WakoPURE로 번역)를 첨가하였다. 각 반응 혼합물(~135 ㎕)을 다시 2개의 시험관에 45 ㎕ 및 90 ㎕로 나누었다. 제1 파트 - 45 ㎕의 RT 혼합물에, 5 ㎕의 뉴클레아제 비함유수를 첨가하였다. 이 샘플은 선별 음성 대조군(dNTP 무첨가)으로 간주되며, 반응 혼합물에 DNA 오염이 없고 cDNA 합성이 3중 복합체에서 MLV RT로부터 나오는 역전사 효소의 기능성 활성과 엄격하게 결부되어 있다는 것을 입증해줄 것이다. 제2 파트 - 90 ㎕의 RT 혼합물에는, 각각 10 mM인 dNTP Mix (Fermentas) 10 ㎕을 첨가하고, 다시 반응 혼합물을 2개의 시험관에 선별 대조군용 50 ㎕과, 선별 양성 대조군용으로 200 u/㎕ RevertAid H- M-MuLV 역전사 효소(Fermentas) 1 ㎕이 첨가된 50 ㎕으로 나누었다. 프로토콜에 따라, 각각의 역전사 반응 믹스에는 3중 복합체 < 2.7 x 10^9개가 부피 50 ㎕로 함유되어 있다.

[0140] 에멀젼화를 위한 오일-계면활성제 혼합물을, ABIL EM 90(Goldschmidt)을 미네랄 오일(M5904 - Sigma)에 최종 농도 4%(v/v)로 혼합함으로써 준비하였다(Ghadessy and Holliger, 2004; US2005064460). 오일-계면활성제 혼합물 950 ㎕를 RT 혼합물 50 ㎕와 혼합하여, 에멀젼을 5 ml 극저온용 바이얼에서 +4℃에서 준비하였다. 혼합은 속도 조절되는 MS-3000 자기 교반기(Biosan); Rotilabo®- (3x8 mm) 마그네틱 막대 및 센터 고리(1489.2 - Roth)를 ~2100 rpm으로 이용하여 수행하였고, 30초마다 10 ㎕ 분액씩 수상을 첨가하고, 2분 이상(총 혼합 시간 - 4분) 계속 혼합하였다. 광학현미경 데이타에 따르면, 에멀젼내 구획의 크기는 0.5 ㎛ 내지 10 ㎛로 다양하며, 평균 직경은 ~2 ㎛이었다. 따라서, 역전사 반응 혼합물 50 ㎕을 에멀젼화한 후, 유중수 구획이 ~1 x 10^{10}개 형성되며, 3중 복합체의 분자 수는 2.7 x 10^9 이하(구획 3-4개 당 mRNA 및 역전사 효소 분자 약 1개)인 것으로 예상되었다.

[0141] Roche - RTS HY 키트(음성 선별 대조군, 선별 대조군 및 양성 선별 대조군)에서 번역한 TC, 및 Wako - WakoPURE (음성 선별 대조군, 선별 대조군 및 양성 선별 대조군)에서 번역한 TC를 이용한 RT 반응물이 존재하는 6가지의 에멀젼을, 모두 +42℃에서 1시간 인큐베이션하였다.

[0142] 반응 혼합물을 회수하기 위해, 에멀젼을 1.5 ml 시험관에 옮겨 실온에서 1분간 25,000 g로 원심분리하였다. 수상을 제거하고 시험관 바닥에 농축된(그러나 여전히 온전한) 에멀젼을 남기고, 여기에 250 ㎕의 PB 완충액(Qiagen PCR 정제 키트)을 첨가하였다. 마지막으로, 에멀젼을, 0.9 ml 포화 에테르 수용액; 0.9 ml 포화 에틸아세테이트 수용액(ABIL EM 90 용제를 제거하기 위함) 및 다시 0.9 ml 포화 에테르 수용액으로 추출하여, 파괴하였다. 수상은 실온에서 진공 하에 5분 건조시켰다. 이를 Qiagen PCR 정제 키트를 이용하여 합성된 cDNA를 정제하고, 이를 30 ㎕의 EB 완충액(Qiagen PCR 정제 키트)으로 용리시켰다.

[0143] cDNA의 증폭은 네스티드 PCR로 수행하였다. 처음 PCR 혼합물: 16 ㎕ - 10X Taq 완충액 + KCl (Fermentas); 16 ㎕ - 2 mM의 각 dNTP (Fermentas); 9.6 ㎕ - 25 mM $MgCl_2$ (Fermentas); 3.2 ㎕ - 1 u/㎕ LC (재조합) Taq DNA 중합효소(Fermentas); 0.8 ㎕ - 100 μM RD_Nde 프라이머(서열번호 9); 0.8 ㎕ - 100 μM pD_55 프라이머 (서열번호 10); 74 ㎕ 물 - 을 얼음 위에서 준비한 다음, 혼합물을 15 ㎕ 6개(6 x 15 ㎕)와 30 ㎕로 나누었다. 6 x 15 ㎕의 PCR 마스터 믹스에 5 ㎕의 cDNA (1-6 RT 샘플)를 첨가하고, 30 ㎕의 PCR 마스터 믹스에는 물 9 ㎕을 첨가한 다음 혼합물을 다시 2개의 시험관에 음성 PCR 대조군(+ 0.5 ㎕ 물) 및 양성 PCR 대조군(+ 0.5 ㎕ - pET_his_MLV_pD와 pET_his_del_pD 플라스미드의 1:1 혼합물(~1ng))으로 2 x 19.5 ㎕로 나누었다. 순환성 프로토콜은 다음과 같다: 1차 변성 단계 3분간 94℃, 25회 사이클(45초간 94℃, 45초간 58℃, 및 2분간 72℃) 및 최종 연장 5분간 72℃. PCR 단편의 예상 길이는 MLV_pD의 경우 2185 bp이고 del _pD의 경우 2014 bp이었다. 증폭은, 웰 당 PCR 믹스 10 ㎕를 로딩한 1% 아가로스 젤에서 분석하였다(도 3).

[0144] 네스티드 PCR은, 2종의 상이한 프라이머 세트를 이용하여, 부분 유전자 증폭(RT 샘플에서 MLV:del cDNA 비율에 대한 보다 우수한 분석을 위해) 또는 전체 유전자 증폭(전체 유전자 회수 가능성을 입증하기 위해)을 실시하였다.

[0145] 부분 유전자 증폭을 위한 네스티드 PCR 혼합물: 28 ㎕ - 10X Taq 완충액 + KCl (Fermentas); 28 ㎕ - 2 mM의, 각 dNTP (Fermentas); 16.8 ㎕ - 25 mM $MgCl_2$ (Fermentas); 5.6 ㎕ - 1 u/㎕ LC (재조합) Taq DNA 중합효소 (Fermentas); 1.4 ㎕ - 100 μM M_F 프라이머 (서열번호 11); 1.4 ㎕ - 100 μM M_2R 프라이머 (서열번호 12); 185 ㎕ 물 - 을 얼음 위에서 준비한 다음, 2 x 19 ㎕ 및 6 x 38 ㎕로 나누었다. PCR 마스터 믹스 2 x 19 ㎕에, 1차 PCR의 양성 또는 음성 대조군 (프라이머 세트 RD_Nde//pD_55) - 30회 PCR 사이클 증폭물- 1 ㎕을 첨가하고, 6 x 38 ㎕의 PCR 마스터 믹스에는 2 ㎕의 1차 PCR (프라이머 세트 RD_Nde//pD_55) (1-6의 샘플)을 첨가한 다음 다시 23 또는 30회 PCR 사이클 증폭을 위해 2 x 20 ㎕로 2개로 나누었다. 순환성 프로토콜은 다음과 같다: 1차 변성 단계 3분간 94℃, 23 또는 30회 사이클(45초간 94℃, 45초간 57℃, 및 1분간 72℃) 및 최종 연장 5분간 72℃. PCR 단편의 예상 길이는 MLV_pD의 경우 907 bp이고 del_pD의 경우 736 bp이었다. 증폭은, 웰 당 PCR 믹스 10 ㎕를 로딩한 1% 아가로스 젤에서 분석하였다(도 4).

[0146] 전체 유전자 증폭용 네스티드 PCR 혼합물: 28 ㎕ - 10X Taq 완충액 + KCl (Fermentas); 28 ㎕ - 2 mM의, 각 dNTP (Fermentas); 16.8 ㎕ - 25 mM $MgCl_2$ (Fermentas); 5.6 ㎕ - 1 u/㎕ LC (재조합) Taq DNA 중합효소 (Fermentas); 1.4 ㎕ - 100 μM M_Esp 프라이머 (서열번호 13); 1.4 ㎕ - 100 μM M_Eri 프라이머 (서열번호 14); 185 ㎕ 물 - 을 얼음 위에서 준비한 다음, 혼합물을 2 x 19 ㎕ 및 6 x 38 ㎕로 나누었다. PCR 마스터 믹스 2 x 19 ㎕에, 1차 PCR의 양성 또는 음성 대조군 (프라이머 세트 RD_Nde//pD_55) - 30회 PCR 사이클 증폭물 - 1 ㎕을 첨가하고, 6 x 38 ㎕의 PCR 마스터 믹스에는 2 ㎕의 1차 PCR (프라이머 세트 RD_Nde//pD_55) (1-6의 샘플)을 첨가한 다음 다시 각 샘플을 23 또는 30회 PCR 사이클 증폭을 위해 2 x 20 ㎕로 2개로 나누었다. 순환성 프로토콜은 다음과 같다: 1차 변성 단계 3분간 94℃, 23 또는 30회 사이클(45초간 94℃, 45초간 55℃, 및 2분간 72℃) 및 최종 연장 5분간 72℃. PCR 단편의 예상 길이는 MLV_pD의 경우 2077 bp이고 del_pD의 경우 1906 bp이었다. 증폭은, 웰 당 PCR 믹스 10 ㎕를 로딩한 1% 아가로스 젤에서 분석하였다(도 5).

[0147] **결과**

[0148] 구획화된 리보솜 디스플레이(CRD) 방법의 원칙을 입증하기 위해, 1:50 = MLV:del 비율의 단백질 D 스페이서가 융합된 활성형(MLV) 및 비활성형(del) 역전사 효소를 코딩하는 2종의 mRNA의 혼합물을 출발 물질로 하여 선별을 수행하였다(도 11). 시험관내 번역은, 본 실험 설정에서 번역 시스템이 더 우수한지를 확인하기 위해, 2가지 상이한 번역 시스템 Roche - RTS 100 E.coli HY 또는 Wako - WakoPURE를 이용하였다. 각 번역 시스템에서, 3가지의 구획화된 RT 반응을 수행하였다; 반응 혼합물에 DNA에 혼입되어 있지 않다는 것을 입증하는, dNTP를 첨가하지 않은 음성 선별 대조군; 활성형 효소와 cDNA를 합성할 수 있기 때문에, 비활성형 효소를 코딩하는 유전자(del)에 비해 활성형 역전사 효소를 코딩하는 유전자(MLV)의 농화를 입증하는, 선별 대조군; 및 모든 구획들에서 MLV_pD 및 del_pD mRNA 두가지로부터 cDNA를 합성하는 RT 양성 대조군으로 제공되는, 외래 RevertAid H-시판되는 역전사 효소가 첨가된 양성 선별 대조군으로, 선별압 적용 없이 반응 혼합물내 유전자의 실제 비율을 보여줌.

[0149] 합성된 cDNA를 네스티드 PCR로 증폭하였다. 최초 PCR(25회)의 아가로스 젤 전기영동 사진(도 3)에서 양성 선별 대조군(번역 시스템 - Roche 및 Wako)에서만 약한 PCR 단편 밴드가 보인다. 이들 샘플에는 외래 RT 효소가 포함되어 있어, 구획 당 시험관내 합성된 역전사 효소 분자가 1개에 불과한 반응물과 비교하면 cDNA가 보다 효율

적으로 합성되기 때문에, 이러한 결과는 정상적이었다.

[0150] 네스티드 PCR(부분 유전자 증폭)의 아가로스 젤 전기영동 사진은 도 4에 나타낸다. 23회 및 30회 PCR 사이클 수행 후의 증폭 결과들에서 하기의 사항들은 일관되게 나타났다:

[0151] 1) 음성 선별 대조군(w/o dNTP)에서는 증폭이 이루어지지 않는다(DNA 비함유);

[0152] 2) 양성 선별 대조군(외래 RT 효소)에서는 매우 효율적인 del_pD cDNA (736 bp DNA 단편) 증폭이 관찰되지만, 초기의 MLV_pD : del_pD mRNA 비율이 1:50이기 때문에 MLV_pD cDNA 증폭은 가시적으로 보이지 않는다;

[0153] 3) 선별 대조군에서는 cDNA MLV_pD (907 bp DNA 단편) 및 del_pD (736 bp DNA 단편) 둘다 증폭된다.

[0154] 4) Roche 번역 시스템에서 합성되는 역전사 효소에서의 MLV_pD:del_pD 비율은 ~ 1:1이며, 이는 초기 1:50 비율로부터 출발하여 MLV_pD 유전자가 del_pD 유전자 대비 ~50배 농화되었음을 의미한다;

[0155] 5) Wako 번역 시스템에서 합성되는 역전사 효소에서의 MLV_pD:del_pD 비율은 ~ 1:3이며, 이는 초기 1:50 비율로부터 출발하여 MLV_pD 유전자가 del_pD 유전자 대비 ~16배 농화되었음을 의미한다.

[0156] 네스티드 PCR(전체 유전자 증폭)의 아가로스 젤 전기영동 사진은 도 5에 나타낸다. 23회 및 30회 PCR 사이클 수행 후의 증폭 결과는 서로 일치되며, 부분 유전자 증폭에 사용된 네스티드 PCR의 결과와 비교된다(도 5):

[0157] 1) 음성 선별 대조군(w/o dNTP)에서는 증폭이 이루어지지 않는다(DNA 비함유);

[0158] 2) 양성 선별 대조군(외래 RT 효소)에서는 매우 효율적인 del_pD cDNA (1906 bp DNA 단편) 증폭이 관찰되지만, 초기의 MLV_pD : del_pD mRNA 비율이 1:50이기 때문에 MLV_pD cDNA 증폭은 가시적으로 보이지 않는다;

[0159] 3) 선별 대조군에서는 cDNA MLV_pD (2077 bp DNA 단편) 및 del_pD (1906 bp DNA 단편) 둘다 증폭된다.

[0160] 4) 전체 유전자 증폭에서, 2077 bp (MLV_pD) 및 1906 bp (del_pD) DNA 단편 간의 상대적인 차이는 충분히 크기 않기 때문에, MLV_pD:del_pD의 비율을 측정하기 어렵지만, 일반적으로 비율은 부분 유전자 증폭에 사용한 네스티드 PCR의 결과와 비슷하다.

[0161] 본 실시예의 결과로, 본 발명자들은, CRD 포맷으로 수행되는 역전사 반응 동안에, 비활성형 효소를 코딩하는 유전자에 비해 활성형 MLV 역전사 효소를 코딩하는 유전자가, 시험관내에서 효소를 합성하기 위해 사용한 Roche 번역 시스템에서는 50배, Wako 번역 시스템에서는 16배 수준으로 농화되는 것으로 결론내릴 수 있었다.

[0163] **실시예 2 - *CRD - 고온에서 성능이 개선된 역전사 효소 선별***

[0164] 구획화된 리보솜 디스플레이(CRD) 선별 방법이 얼마나 효과적으로 작용하는지를 보기 위해, M-MuLV(Moloney Murine Leukemia Virus) 역전사 효소의 진화 실험을 수행하였다. 실험의 일반적인 계획은 도 6에 나타낸다. 처음 역전사 효소 돌연변이 라이브러리는, 뉴클레오티드 유사체 dPTP와 8-옥소-dGTP를 이용한 에러 유발형(error-prone) PCR에 의해 구축하였다. 전체 유전자(~2 kb) 돌연변이 유발은, 유전자 당 2-3개의 뉴클레오티드 또는 1-2개의 아미노산 돌연변이가 도입되도록 수행하였다. 역전사 효소 돌연변이 라이브러리 MLV_pD(단백질 D 융합형)를 코딩하는 PCR 단편을 이용하여 mRNA를 합성하였다. 정제한 mRNA를 이용하여 시험관내 번역 반응을 수행하였다. mRNA-리보솜-MLV_pD(tRNA)의 3중 복합체(TC)를 번역 혼합물 중에서 형성시켜, 이를 저온과 고농도의 Mg^{2+} 이온으로 안정화시켰다. TC 혼합물은 슈크로스 완충 상에서의 초원심분리에 의해 정제하였다. 침전된 TC를 차가운 완충액(50mM Mg^{2+})에 용해하고, 이를 이용하여, 외래 dNTP 세트 및 프라이머가 첨가된 RT 반응용 역전사 반응 믹스를 제조하였다. 차가운 RT 반응 혼합물을 에멀젼화하여, ~2 ㎛ 크기의 유중수 구획 ~1 x 10^{10}가 형성되게 하였다. MLV RT의 최적 반응 온도는 ~42℃이다. 보다 높은 온도에서 더 잘 작동하는 역전사 효소 변이체를 선별하기 위해, 에멀젼화된 RT 반응 혼합물(구획 당 TC(mRNA + MLV RT) 1개 이하)을 50℃에서 1시간 인큐베이션하였다. 이 온도에서, 전장 cDNA의 성공적인 합성은, 활성이 보다 우수하거나 열 안정성이 우수한 MLV 역전사 효소 변이체가 포함된 구획내에서 잘 수행되었다. 후속적인 PCR을 실시하여 전장 cDNA를 증폭시키고, 활성이 보다 우수하고 열 안정적인 역전사 효소 유전자의 농화를 수행하였다. PCR 증폭시킨 유전자들을 CRD 포맷으로 다시 이동시켜, 라이게이션 PCR에 의해 온전한 5' (START 단편 - T7 중합효소 프로모터, SD 및 His-테그 코딩 서열) 및 3' (END 단편 - gs 링커, 단백질 D 및 제2 gs 링커) 서열을 복원하였다.

[0165] 농화시킨 역전사 효소 유전자 라이브러리를 포함하는, 재구축된 PCR 단편을 이후의 mRNA 전사와 다음 차례의 CRD 선별 라운드에 사용하였다. 각 선별 라운드는 보다 높은 온도의 RT 반응에서 수행하였다: 50℃ (1st

라운드); 52.5℃ (2nd 라운드); 55℃ (3rd 라운드); 57.5℃ (4th 라운드) 및 60℃ (5th 라운드).

[0166] 5차 라운드 후 증폭된 역전사 효소 유전자 라이브러리(C 말단에 pD 링커 없음)를 플라스미드 벡터에 클로닝하였다. 각각의 클론을 서열분석하고 분석하였다. 생성된 단백질 풀과 개별 돌연변이 풀을 친화성 크로마토그래피를 이용하여 His-테그로 정제하였다. 37℃, 50℃ 및 50℃에서 5분간 인큐베이션한 후 37℃에서의 MLV 역전사 효소 특이적인 활성들을 측정하였다.

[0167] **재료 및 방법**

[0168] 처음 플라스미드 pET_his_MLV_pD (서열번호 1 및 도 2)를 에러 유발형 PCR을 위한 출발 물질로 사용하였다. dPTP 및 8-옥소-dGTP 뉴클레오티드 유사체를 이용하여 돌연변이를 도입하였다. 에러 유발형 PCR을 위한 PCR 혼합물: 10 ㎕ - 10X Taq 완충액 + KCl (Fermentas); 10 ㎕ - 2 mM의, 각 dNTP (Fermentas); 6 ㎕ - 25 mM $MgCl_2$ (Fermentas); 2 ㎕ - 1 u/㎕ LC (재조합) Taq DNA 중합효소(Fermentas); 0.5 ㎕ - 100 μM M_Esp 프라이머 (서열번호 13); 0.5 ㎕ - 100 μM M_Eri 프라이머 (서열번호 14); 1 ㎕ - 10 μM dPTP (TriLink BioTechnolgies); 5 ㎕ - 100 μM 8-옥소-dGTP (TriLink BioTechnolgies); 3.75 ㎕ - 40 ng/㎕ (총 150 ng)의 pET_his_MLV_pD 플라스미드; 61.25 ㎕ 물 - 을 얼음 위에서 준비하였다. 순환성 프로토콜은 다음과 같다: 1차 변성 단계 3분간 94℃, 30회 사이클(3초간 94℃, 3초간 55℃, 및 2분간 72℃) 및 최종 연장 5분간 72℃. 플라스미드(7873 bp) 150 ng으로부터 증폭되는 산물(pET_his_MLV_pD의 경우 PCR 단편 2702 bp)은 ~6-12 ㎍으로 150-300배 증폭되었다. PCR 단편은 Qiagen PCR 정제 키트를 이용하여 정제한 다음, Esp3I (인지 서열 CGTCTC (1/5)) 및 EcoRI (인지 서열 G↓AATTC)로 자르고, 아가로스 젤로부터 Qiagen 젤 추출 키트를 이용하여 최종적으로 정제하여 DNA 농도 ~50 ng/㎕을 수득하였다.

[0169] 돌연변이 유발율과 라이브러리의 품질을, NcoI와 EcoRI로 자른 오리지날 플라스미드 pET_his_MLV_pD에 다시 서브클로닝한 각 클론의 서열 분석에 의해 체크하였다. 예상한 바와 같이, 돌연변이는 MLV RT 유전자의 증폭된 서열 상에 전체적으로 임의적으로 분포되어 있었다(부록 1). 서열분석한 유전자 10개에서, 23개의 뉴클레오티드 돌연변이(변위 1개, 전이 20개, 결손 2개 - 부록 1에 붉은 색으로 표시)가 확인되었으며, 이는 15개의 아미노산 치환, 6개의 침묵 돌연변이, 정지 코돈 1개 및 코딩 프레임 이동 2건으로 나타나며, 평균적으로 유전자 1개당 아미노산 치환율은 1-2개이었다.

[0170] CRD 선별에 적합한 PCR 단편을 수득하기 위해, 돌연변이 라이브러리를 START (244 bp) 및 END (398 bp) 단편에 연결하였다(도 7). START 단편(T7 중합효소 프로모터, SD 및 His-테그 코딩 서열 포함)은, 처음 983 bp START 단편 (타겟 - 플라스미드 pET_his_del_pD (서열번호 2), 프라이머 - pro-pIVEX (서열번호 3) 및 M_1R (서열번호 15))을 PCR 증폭한 다음, NcoI (인지 서열 C↓CATGG)으로 잘라, 244 bp DNA 단편으로 구축하였다. END 단편 (gs 링커, 단백질 D 및 제2 gs 링커 서열 포함)은, 처음 1039 bp END 단편 (타겟 - 플라스미드 pET_his_del_pD (서열번호 2), 프라이머 - M_3F (서열번호 16) 및 pD-ter (서열번호 4))을 PCR 증폭한 다음 EcoRI (인지 서열 G↓AATTC)으로 잘라, 398 bp DNA 단편으로 구축하였다.

[0171] 라이게이션 반응물(150 ㎕)은 실온에서 준비하였다: 15 ㎕ - 10X T4 DNA 라이게이즈 라이게이션 완충액 (Fermentas); 15 ㎕ - 1 u/㎕ T4 DNA 라이게이즈 (Fermentas); 26 ㎕ - 50 ng/㎕의 돌연변이된 MLV RT 라이브러리로서, Esp3I (NcoI 상용가능한 말단)/ EcoRI (~1300ng 또는 ~5.9 x 10^{11} 개의 분자)로 절단됨; 9.4 ㎕ - 35 ng/㎕ START 단편으로서 NcoI으로 절단됨(~329 ng 또는 ~1.2 x 10^{12} 개의 분자); 15.7 ㎕ - 35 ng/㎕ END 단편으로서 EcoRI으로 절단됨 (~548 ng 또는 ~1.2 x 10^{12} 개의 분자); 68.9 ㎕ 물. 라이게이션은 +4℃에서 수행하였다. 반응 혼합물을 페놀 1회, 클로로포름 2회 처리한 다음 침전시킨 후 물 53 ㎕에 용해하였다. 대략적인 라이게이션 수율은, 라이게이션 혼합물과 기지량의 플라스미드 pET_his_MLV_pD의 증폭 효율과 비교하여 ~20%로 확인되었다. 20%의 라이게이션 수율을 고려하여, MLV RT 돌연변이 라이브러리의 다양성은 ~1.2 x 10^{11} 분자(50 ㎕)로 정해졌다.

[0172] 라이게이션한 MLV RT 라이브러리를 PCR (1 ml - 얼음 위에서 준비됨)로 증폭하였다: 100 ㎕ - 10X Taq 완충액 + KCl (Fermentas); 100 ㎕ - 2 mM의, 각 dNTP (Fermentas); 60 ㎕ - 25 mM $MgCl_2$ (Fermentas); 80 ㎕ - DMSO (D8418 - Sigma); 20 ㎕ - 1 u/㎕ LC (재조합) Taq DNA 중합효소(Fermentas); 5 ㎕ - 100 μM pro-pIVEX 프라이머 (서열번호 3); 5 ㎕ - 100 μM pD-ter- 프라이머 (서열번호 17); 20 ㎕ - 라이게이션된 MLV RT 라이브러리 (~5 x 10^{10} 개의 분자); 610 ㎕ 물. 순환성 프로토콜은 다음과 같다: 초기 변성 단계 3분간 94℃, 15회 사

이클(3초간 94℃, 3초간 53℃, 및 3분간 72℃) 및 최종 연장 5분간 72℃. 최종 라이게이션 단편 타겟 사이즈 2702 bp의 ~5 x 10^{10}(~150 ng)개의 분자로부터, 증폭된 산물(2702 bp PCR 단편)은 ~30 ㎍으로, ~200배 증폭되었다.

[0173] **1차 선별 라운드**

[0174] 전사 혼합물(100 ㎕)을 준비하였다: 20 ㎕ - 5 x T7 전사 완충액(1 M HEPES-KOH pH 7.6; 150 mM Mg 아세테이트; 10 mM 스퍼미딘; 0.2 M DTT); 28 ㎕ - 25 mM의, 각각의 NTP (Fermentas); 4 ㎕ - 20 u/㎕ T7 RNA 중합효소 (Fermentas); 2 ㎕ - 40 u/㎕ RiboLock RNase 저해제(Fermentas); 30 ㎕ - 30 ng/㎕의 돌연변이 라이브러리 (pro-pIVEX//pD-ter-) PCR 혼합물(~900 ng 또는 ~3 x 10^{11} 개의 분자); 16 ㎕ 뉴클레아제 비함유수. 전사는 37℃에서 3시간 수행하였다(라이브러리 다양성 ~5 x 10^{10} 개의 분자).

[0175] 전사 혼합물을 차가운 뉴클레아제 비함유수로 200 ㎕로 희석하고, 여기에 200 ㎕의 6 M LiCl 용액을 첨가하였다. 이 호합물을 +4℃에서 30분간 인큐베이션한 다음, 냉각 원심분리기에서 +4℃로 30분간 최대 속도(25,000 g)로 원심분리하였다. 상층액은 버리고, RNA 펠렛을 500 ㎕의 75% 차가운 에탄올로 헹구었다. 시험관을 다시 냉각 원심분리기에서 +4℃로 5분간 최대 속도로 원심분리하고, 상층액을 버렸다. RNA 펠렛을 실온에서 12분간 건조시키고, +4℃에서 1400 rpm으로 15분간 교반함으로써 뉴클레아제 비함유성 차가운 물 200 ㎕에 재현탁하였다. 시험관을 다시 냉각 원심분리기에서 +4℃로 5분간 최대 속도로 원심분리하여, 용해되지 않은 RNA를 분리하였다. 상층액 약 180 ㎕을, 20 ㎕의 10x DNase I 완충액(Mg^{2+})(Fermentas); 1 ㎕ - 1 u/㎕ DNaseI (RNase-free)(Fermentas)이 든 새로운 시험관에 옮기고, 30분간 +37℃에서 인큐베이션하여 DNA를 분해시켰다. 반응 혼합물에 20 ㎕의 3 M 소듐 아세테이트 pH 5.0 용액과 500 ㎕의 차가운 96% 에탄올을 첨가하였다. 마지막으로, R30분간 -20℃에서 인큐베이션한 다음 냉각 원심분리기에서 +4℃로 30분간 최대 속도(25,000 g)로 원심분리하여, RNA를 침전시켰다. 상층액은 버리고, RNA 펠렛을 500 ㎕의 75% 차가운 에탄올로 헹구었다. 시험관을 다시 냉각 원심분리기에서 +4℃로 5분간 최대 속도로 원심분리하고, 상층액을 버렸다. RNA 펠렛을 실온에서 12분간 건조시키고, +4℃에서 1400 rpm으로 10분간 교반함으로써 뉴클레아제 비함유성 차가운 물 33 ㎕에 재현탁하였다. RNA 용액을 3x 10 ㎕으로 분액하고, 액체 질소에서 냉동시켰다. mRNA의 농도는 분광광도측정으로 측정하고, RiboRuler™ RNA Ladder, High Range (Fermentas)를 이용하여 아가로스 젤 상에서 이중 체크하였다 - MLV RT 라이브러리 mRNA ~2.1 ㎍/㎕.

[0176] 시험관내 번역을, RTS 100 E.coli HY (03 186 148 001 - Roche) 번역 시스템(25 ㎕)을 이용하여 수행하였다: 6 ㎕ - E.coli 용혈물 (Roche); 5 ㎕ - 반응 믹스 (Roche); 6 ㎕ - 아미노산 (Roche); 0.5 ㎕ - 100 mM Met (Roche); 0.5 ㎕ - 40 u/㎕ RiboLock RNase 저해제(Fermentas); 0.4 ㎕ - 200 μM assrA 올리고뉴클레오타이드 (서열번호 5); 0.25 ㎕ - 1 M DTT; 3 ㎕ 재구성 완충액(Roche); 2.5 ㎕ 뉴클레아제 비함유수 및 0.6 ㎕ - 2.1 ㎍/㎕ mRNA (~1200 ng). 반응 혼합물을 20분간 30℃에서 인큐베이션하였다. 번역은, 155 ㎕의 차가운 정지 완충액 WBK_{500}+DTT+트리톤 (50 mM 트리스-아세테이트 pH 7.5, 25℃; 50 mM NaCl; 50 mM Mg-아세테이트; 500 mM KCl; 10 mM DTT; 0.1% (v/v) - 트리톤 x-100 (T8787 - Sigma))을 첨가하여 정지시킨 다음, 5분간 +4℃에서 25,000 g으로 원심분리하였다. 매우 조심스럽게, 160 ㎕의 원심분리된 번역 혼합물을, WBK_{500}+DTT+트리톤 중의 840 ㎕의 35% (w/v) 슈크로스 용액(50 mM 트리스-아세테이트 pH 7.5, 25℃; 50 mM NaCl; 50 mM Mg-아세테이트; 500 mM KCl; 10 mM DTT; 0.1% (v/v) - 트리톤 x-100 (T8787 - Sigma); 35% (w/v) - 슈크로스(84097 - Fluka)) 위에 파이펫으로 적층하였다. 3중 복합체(TC) mRNA-리보솜-MLV(tRNA)을 정제하기 위해, TL-100 Beckman 초원심분리기; TLA100.2 고정각 로터(Beckman); 투명한 1 ml 초원심분리관(343778 - Beckman)을 이용하여 9분간 +4℃에서 100,000 rpm으로 초원심분리를 수행하였다. 초원심분리관 바닥에 작고 투명한 TC 펠렛이 유지되도록, 시험관 전체를 조심스럽게 다루었다. 먼저, 용액 750 ㎕을 원심분리관의 최상단으로부터 취하였다. 그런 후, (매우 조심스럽게) 시험관의 벽을 750 ㎕의 WBK_{500} (50 mM 트리스-아세테이트 pH 7.5, 25℃; 50 mM NaCl; 50 mM Mg-아세테이트; 500 mM KCl)로 헹구었다. 마지막으로, 원심분리관의 최상단에서부터 시작하여 용액 전체를 제거하고, 펠렛을 30 ㎕의 차가운 정지 완충액 WBK_{500}+DTT+트리톤 (50 mM 트리스-아세테이트 pH 7.5, 25℃; 50 mM NaCl; 50 mM Mg-아세테이트; 500 mM KCl; 10 mM DTT; 0.1% (v/v) - 트리톤 x-100 (T8787 - Sigma))에 용해하였다.

[0177] 방사능 표지된 mRNA를 이용하여 실험적으로 측정된 바에 따르면, 투입한 mRNA의 5% - 30%가 3중 복합체 펠렛에 위치하는 것으로 확인되었다. 따라서, 30 ㎕의 완충액 중의 mRNA는 360 ng 미만(번역 반응에 사용된 mRNA

1200 ng에서 30%)인 것으로 예상되었다(~12 ng/㎕ 또는 9 x 10^9개의 분자/㎕(3중 복합체)).

[0178] 선별을 위한 역전사 반응 혼합물: 60 ㎕ - 5 x 역전사 효소 반응 완충액(Fermentas); 7.5 ㎕ - 40 u/㎕ RiboLock RNase 저해제(Fermentas); 15 ㎕ - 20 μM pD_42 올리고뉴클레오타이드 (서열번호 8); 188 ㎕ 뉴클레아제 비함유수 및 1.8 ㎕의 정제된(<1.8 x 10^{10} 개의 분자) TC (translation in Roche - RTS HY kit)을 얼음 위에서 준비하였다. 반응 혼합물을 2개의 시험관에 45 ㎕ 및 225 ㎕로 나누었다. 제1 파트 - 45 ㎕의 RT 혼합물에, 5 ㎕의 뉴클레아제 비함유수를 첨가하였다. 이 샘플은 선별 음성 대조군(dNTP 무첨가)으로 간주되며, 반응 혼합물에 DNA 오염이 없으며, cDNA 합성이 3중 복합체에서 MLV RT로부터 생기는 역전사 효소의 기능성 활성과 엄격하게 결부되어 있다는 것을 입증해준다. 제2 파트 - 225 ㎕의 RT 혼합물에는, 각각 10 mM의 dNTP Mix (Fermentas) 25 ㎕을 첨가하고, 다시 반응 혼합물을 2개의 시험관에 선별 대조군용 200 ㎕(4x 50 ㎕)와, 선별 양성 대조군용으로 200 u/㎕ RevertAid H- M-MuLV 역전사 효소 (Fermentas) 1 ㎕이 첨가된 50 ㎕으로 나누었다. 프로토콜에 따라, 각각의 역전사 반응 믹스에는 3중 복합체 <3 x 10^9개가 부피 50 ㎕로 함유되어 있다.

[0179] 에멀젼화를 위한 오일-계면활성제 혼합물을, ABIL EM 90(Goldschmidt)을 미네랄 오일(M5904 - Sigma)에 최종 농도 4% (v/v)로 혼합함으로써 준비하였다(Ghadessy and Holliger, 2004; US2005064460). 오일-계면활성제 혼합물 950 ㎕를 RT 혼합물 50 ㎕와 혼합하여, 에멀젼을 5 ml 극저온용 바이얼(430492 - Corning)에서 +4℃에서 준비하였다. 혼합은 속도 조절되는 MS-3000 자기 교반기(Biosan); Rotilabo®- (3x8 mm) 마그네틱 막대 및 센터 고리(1489.2 - Roth)를 ~2100 rpm으로 이용하여 수행하였고, 30초마다 10 ㎕ 분액씩 수상을 첨가하고, 2분 이상(총 혼합 시간 - 4분) 계속 혼합하였다. 광학현미경 데이타에 따르면, 에멀젼내 구획의 크기는 0.5 ㎛ 내지 10 ㎛로 다양하며, 평균 직경은 ~2 ㎛이었다. 따라서, 역전사 반응 혼합물 50 ㎕을 에멀젼화한 후, 유중수 구획이 ~1 x 10^{10}개 형성되며, 3중 복합체의 분자 수는 3 x 10^9 이하(구획 3-4개 당 mRNA 및 역전사 효소 분자 약 1개)인 것으로 예상되었다.

[0180] 보다 높은 온도에서 더 잘 작동하는 역전사 효소 변이체를 선별하기 위해, 에멀젼을 모두 +50℃에서 1시간 인큐베이션하였다. 반응 혼합물을 회수하기 위해, 에멀젼을 1.5 ml 시험관에 옮겨 실온에서 10분간 25,000 g로 원심분리하였다. 오일상을 제거하여 시험관 바닥에 농축된(그러나 여전히 온전한) 에멀젼을 남겨두었다. 에멀젼은, 0.9 ml 포화 에테르 수용액; 0.9 ml 포화 에틸아세테이트 수용액(ABIL EM 90 용제를 제거하기 위함) 및 다시 0.9 ml 포화 에테르 수용액으로 추출하여, 파괴하였다. 수상은 실온에서 진공 하에 5분 건조하고, 여기에 250 ㎕의 PB 완충액(Qiagen PCR 정제 키트)을 첨가하였다. 4종의 선별 샘플을 2개의 시험관으로 합하였다. 합성된 cDNA는 이후 Qiagen PCR 정제 키트를 이용하여 정제하고, 이를, 선별 대조군의 경우에는 2 x 30 ㎕, 음성 및 양성 선별 대조군의 경우에는 30 ㎕의 EB 완충액(Qiagen PCR 정제 키트)으로 용리시켰다.

[0181] cDNA의 증폭은 네스티드 PCR로 수행하였다. 먼저, 음성 및 양성 선별 대조군을 체크하기 위해 소규모의 PCR 증폭을 실시하였고, 선별 샘플에서 cDNA의 효율적인 증폭에 필요한 PCR 사이클의 최소 횟수를 정하였다. PCR 혼합물 20 ㎕ - 10X Taq 완충액 + KCl (Fermentas); 20 ㎕ - 2 mM의, 각 dNTP (Fermentas); 12 ㎕ - 25 mM $MgCl_2$ (Fermentas); 2.5 ㎕ - 1 u/㎕ LC (재조합) Taq DNA 중합효소(Fermentas); 1 ㎕ - 2.5 u/㎕ Pfu DNA 중합효소(Fermentas); 1 ㎕ - 100 μM RD_Nde 프라이머 (서열번호 9); 1 ㎕ - 100 μM pD_55 프라이머 (서열번호 10); 50 ㎕ - 선별 대조군의 정제된 cDNA; 92 ㎕ 물 - 을 얼음 위에서 준비하였다. 2185 bp PCR 단편에 대한 순환성 프로토콜은 다음과 같다: 1차 변성 단계 3분간 94℃, 25회 사이클(45초간 94℃, 45초간 58℃, 및 2분간 72℃) 및 최종 연장 5분간 72℃.

[0182] 전체 유전자 증폭용 네스티드 PCR 혼합물(500 ㎕): 50 ㎕ - 2 mM의, 각 dNTP (Fermentas); 30 ㎕ - 25 mM $MgCl_2$ (Fermentas); 6.25 ㎕ - 1 u/㎕ LC (재조합) Taq DNA 중합효소(Fermentas); 2.5 ㎕ - 2.5 u/㎕ Pfu DNA 중합효소(Fermentas); 2.5 ㎕ - 100 μM M_Esp 프라이머 (서열번호 13); 2.5 ㎕ - 100 μM M_Eri 프라이머 (서열번호 14); 50 ㎕의 1차 PCR (프라이머 세트 RD_Nde//pD_55); 306 ㎕ 물 - 을 얼음 위에서 준비하였다. 2077 bp PCR 단편에 대한 순환성 프로토콜은 다음과 같다: 1차 변성 단계 3분간 94℃, 22회 사이클(45초간 94℃, 45초간 55℃, 및 2분간 72℃) 및 최종 연장 5분간 72℃.

[0183] 최종 선별 샘플의 PCR 단편을 Qiagen 젤 추출 키트(60 ㎕ ~50 ng/㎕로 용리함)를 이용하여 아가로스 젤에서 정제하였다. 정제된 PCR 단편은 37℃에서 1시간 동안 EcoRI 및 Esp3I로 절단하고, 다시 아가로스 젤에서 정제하였다(30 ㎕ ~50 ng/㎕로 용리함).

[0184] 1차 선별 라운드 수행 후 회수된 MLV 역전사 효소 라이브러리를, 2차 CRD 선별(도 6)에 적합한 PCR 단편(도 7)을 수득하기 위해, START 및 END 단편(본 실시예에서 앞부분에 설명된 바에 따라 구축)과 라이게이션하였다. 라이게이션 반응물(40 ㎕)을 실온에서 준비하였다: 4 ㎕ - 10X T4 DNA 라이게이즈용 라이게이션 완충액(Fermentas); 2 ㎕ - 1 u/㎕ T4 DNA 라이게이즈 (Fermentas); 4 ㎕ - 50 ng/㎕ 선별된 라이브러리로서 Esp3I 및 EcoRI로 절단된 형태(~200 ng 또는 ~0.9 x 10^{11} 개의 분자); 1.1 ㎕ - 35 ng/㎕ START 단편으로서 NcoI으로 절단됨(~35 ng 또는 ~1.5 x 10^{11} 개의 분자); 1.76 ㎕ - 35 ng/㎕ END 단편으로서 EcoRI으로 절단됨 (~61 ng 또는 ~1.5 x 10^{11} 개의 분자); 27.2 ㎕ 물. 라이게이션은 실온에서 1시간 수행하였다.

[0185] 라이게이션한 MLV RT 라이브러리를 PCR (300 ㎕ - 얼음 위에서 준비됨)로 증폭하였다: 30 ㎕ - 10X Taq 완충액 + KCl (Fermentas); 30 ㎕ - 2 mM의, 각 dNTP (Fermentas); 18 ㎕ - 25 mM $MgCl_2$ (Fermentas); 24 ㎕ - DMSO (D8418 - Sigma); 3.7 ㎕ - 1 u/㎕ LC (재조합) Taq DNA 중합효소(Fermentas); 1.5 ㎕ - 2.5 u/㎕ Pfu DNA 중합효소(Fermentas); 1.5 ㎕ - 100 μM pro-pIVEX 프라이머 (서열번호 3); 1.5 ㎕ - 100 μM pD-ter- 프라이머 (서열번호 17); 25.5 ㎕ - 라이게이션된 MLV RT 라이브러리 (<0.6 x 10^{10} 개의 분자); 164.3 ㎕ 물. 2702 bp PCR 단편에 대한 순환성 프로토콜은 다음과 같다: 초기 변성 단계 3분간 94℃, 15회 사이클(45초간 94℃, 45초간 53℃, 및 3분간 72℃) 및 최종 연장 5분간 72℃. PCR 단편은 Qiagen 젤 추출 키트 (30 ㎕ ~100 ng/㎕로 용리함)로 아가로스 젤에서 정제하였다.

[0186] **2차 선별 라운드**

[0187] 2차 선별 라운드는, PCR 사이클, 에멀젼화된 RT 반응 온도 및 하기 몇가지 사항을 일부 수정하여 1차 선별 라운드의 실험 계획의 일반적인 조건에 따라 수행하였다.

[0188] 수정 사항들은 모두 아래에 나타낸다:

[0189] - 전사 - 10 ㎕ - 아가로스 젤에서 정제한 PCR 단편 100 ng/㎕ (~1000ng)을 사용함; 2차 선별 라운드에서 사용한 최종 mRNA 농도는 1.5 ㎍/㎕임;

[0190] - 번역 - 0.8 ㎕ - 1.5 ㎍/㎕ (~1.2 ㎍) mRNA를 사용함;

[0191] - 에멀젼화된 RT 반응은 1시간 동안 52.5℃에서 수행함;

[0192] - 1st PCR (RD_Nde//pD_55) - 24회 사이클을 수행함;

[0193] - 2nd (nested) PCR (M_Esp//M_Eri) - 23회 사이클을 수행함;

[0194] - 절단된 PCR 단편의 최종 농도 - 80 ng/㎕;

[0195] - 라이게이션 - 200 ng (~0.9 x 10^{11} 개의 분자)의 MLV RT 라이브러리를 사용함;

[0196] - PCR (라이게이션 믹스 상에) - <0.6 x 10^{10} 개 분자의 선별된 라이브러리를 사용하고, 15회 PCR 사이클을 수행함; 아가로스 젤에서 정제한 최종 PCR 단편의 농도는 200 ng/㎕임.

[0197] **3차 선별 라운드**

[0198] 3차 선별 라운드는, PCR 사이클, 에멀젼화된 RT 반응 온도 및 하기 몇가지 사항을 일부 수정하여 1차 선별 라운드의 실험 계획의 일반적인 조건에 따라 수행하였다.

[0199] 수정 사항들은 모두 아래에 나타낸다:

[0200] - 전사 - 5 ㎕ - 아가로스 젤에서 정제한 PCR 단편 200 ng/㎕ (~1000ng)을 사용함; 3차 선별 라운드에서 사용한 최종 mRNA 농도는 1.5 ㎍/㎕임;

[0201] - 번역 - 0.8 ㎕ - 1.5 ㎍/㎕ (~1.2 ㎍) mRNA를 사용함;

[0202] - 에멀젼화된 RT 반응은 1시간 동안 55℃에서 수행함;

[0203] - 1st PCR (RD_Nde//pD_55) - 25회 사이클을 수행함;

[0204] - 2nd (nested) PCR (M_Esp//M_Eri) - 22회 사이클을 수행함;

[0205] - 절단된 PCR 단편의 최종 농도 - 70 ng/㎕;

[0206] - 라이게이션 - 200 ng (~0.9 x 10^{11} 개의 분자)의 MLV RT 라이브러리를 사용함;

[0207] - PCR (라이게이션 믹스 상에) - <0.6 x 10^{10} 개 분자의 선별된 라이브러리를 사용하고, 15회 PCR 사이클을 수행함; 아가로스 젤에서 정제한 최종 PCR 단편의 농도는 100 ng/㎕임.

[0208] **4차 선별 라운드**

[0209] 4차 선별 라운드는, PCR 사이클, 에멀젼화된 RT 반응 온도 및 하기 몇가지 사항을 일부 수정하여 1차 선별 라운드의 실험 계획의 일반적인 조건에 따라 수행하였다.

[0210] 수정 사항들은 모두 아래에 나타낸다:

[0211] - 전사 - 10 ㎕ - 아가로스 젤에서 정제한 PCR 단편 100 ng/㎕ (~1000ng)을 사용함; 4차 선별 라운드에서 사용한 최종 mRNA 농도는 1.8 ㎍/㎕임;

[0212] - 번역 - 0.67 ㎕ - 1.8 ㎍/㎕ (~1.2 ㎍) mRNA를 사용함;

[0213] - 에멀젼화된 RT 반응은 1시간 동안 57.5℃에서 수행함;

[0214] - 1st PCR (RD_Nde//pD_55) - 25회 사이클을 수행함;

[0215] - 2nd (nested) PCR (M_Esp//M_Eri) - 24회 사이클을 수행함;

[0216] - 절단된 PCR 단편의 최종 농도 - 50 ng/㎕;

[0217] - 라이게이션 - 200 ng (~0.9 x 10^{11} 개의 분자)의 MLV RT 라이브러리를 사용함;

[0218] - PCR (라이게이션 믹스 상에) - <0.6 x 10^{10} 개 분자의 선별된 라이브러리를 사용하고, 15회 PCR 사이클을 수행함; 아가로스 젤에서 정제한 최종 PCR 단편의 농도는 100 ng/㎕임.

[0219] **5차 선별 라운드**

[0220] 5차 선별 라운드는, PCR 사이클, 에멀젼화된 RT 반응 온도 및 최종 분석 단계에 몇가지 사항을 일부 수정하여 1차 선별 라운드의 실험 계획의 일반적인 조건에 따라 수행하였다.

[0221] 수정 사항들은 모두 아래에 나타낸다:

[0222] - 전사 - 10 ㎕ - 아가로스 젤에서 정제한 PCR 단편 100 ng/㎕ (~1000ng)을 사용함; 5차 선별 라운드에서 사용한 최종 mRNA 농도는 1.1 ㎍/㎕임;

[0223] - 번역 - 1.1 ㎕ - 1.1 ㎍/㎕ (~1.2 ㎍) mRNA를 사용함;

[0224] - 에멀젼화된 RT 반응은 1시간 동안 60℃에서 수행함;

[0225] - 1st PCR (RD_Nde//pD_55) - 25회 사이클을 수행함;

[0226] - 2nd (nested) PCR (M_Esp//M_Eri) - 33회 사이클을 수행함.

[0227] 전체 유전자 증폭용 네스티드 PCR 혼합물(500 ㎕): 50 ㎕ - 10X Taq 완충액 + KCl (Fermentas); 50 ㎕ - 2 mM의, 각 dNTP (Fermentas); 30 ㎕ - 25 mM $MgCl_2$ (Fermentas); 6.25 ㎕ - 1 u/㎕ LC (재조합) Taq DNA 중합효소 (Fermentas); 2.5 ㎕ - 2.5 u/㎕ Pfu DNA 중합효소(Fermentas); 2.5 ㎕ - 100 μM M_Esp 프라이머 (서열번호 13); 2.5 ㎕ - 100 μM M_Hind3+ 프라이머 (서열번호 18); 50 ㎕의 1차 PCR (프라이머 세트 RD_Nde//pD_55); 306 ㎕ 물 - 을 얼음 위에서 준비하였다. 2077 bp PCR 단편에 대한 순환성 프로토콜은 다음과 같다: 1차 변성 단계 3분간 94℃, 22회 사이클(45초간 94℃, 45초간 55℃, 및 3분간 72℃) 및 최종 연장 5분간 72℃.

[0228] 최종 선별 샘플의 PCR 단편을 Qiagen 젤 추출 키트(60 ㎕ ~60 ng/㎕로 용리함)를 이용하여 아가로스 젤에서 정제하였다. 정제된 PCR 단편은 37℃에서 1시간 동안 HindIII 및 Esp3I로 절단하고, 다시 아가로스 젤에서 정

제하였다(40 ㎕ ~50 ng/㎕로 용리함).

[0229] 5차 선별 라운드 수행 후 회수된 MLV 역전사 효소 라이브러리를, NcoI 및 HindIII으로 절단한 pET_his_MLV_pD (서열번호 1 및 도 2)로부터 제조한 플라스미드 벡터에 연결하여, 친화성 크로마토그래피를 이용하여 신속하게 단백질을 정제하기 위해, N 말단에 His-테그가 있고 C 말단에는 pD 융합이 없는, MLV RT를 코딩하는 새로운 7474 bp의 플라스미드 pET_his_MLV (서열번호 19)를 수득하였다.

[0230] 5차 선별 라운드 후 라이게이션한 MLV RT 라이브러리를 T7 발현주인 ER2566에 전기충격으로 도입하였다. 각각의 클론을 서열분석 및 분석하였다. 생성된 단백질 풀 뿐만 아니라 동일 구조의 개별 돌연변이 및 일차 wt M-MuLV 역전사 효소를, LB 200 ml에서 A590 ~0.7으로 배양한 다음, Qiagen - Ni-NTA 슈퍼플로우 수지 2 ml을 이용한 친화성 크로마토그래피에 의해 His-테그로 정제하였다(모든 정제는 제공자 권고안에 따른 네이티브 조건하에 수행함). 용리는 1 ml의 EB (50 mM - NaH_2PO_4, 300 mM - NaCl, 250 mM - 이미다졸, pH 8.0, 10 mM - 베타-머캅토에탄올 및 0.1% 트리톤 X-100)에서 수행하였다. 모든 단백질은 50배의 저장 완충액(50 mM 트리스-HCl (pH 8.3 at 25℃), 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.1% (v/v) 트리톤 X-100 및 50% (v/v) 글리세롤)에서 투석하였다. 단백질 순도는 SDS-PAGE(통상 타겟 단백질의 ~40-80%)에서 체크하였다. 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 분석(500-0006)을 토대로 브레드포드 방법을 이용하여 결정하였다.

[0231] MLV 역전사 효소 특이적인 활성은, 37℃, 50℃ (특수 희석 완충액에 희석한 효소: 30 mM 트리스-HCl pH 8.3, 25℃, 10 mM DTT, 0.5 mg/ml BSA)에서 측정하고, 50℃에서 5분간 인큐베이션한 후의 37℃에서의 잔류 활성(효소는 1x RT 반응 완충액(50 mM 트리스-HCl pH 8.3, 25℃, 4 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 50 mM KCl)으로 희석하고 안정성을 측정함)을 측정하였다. 모든 경우에서, 효소 활성은 하기 최종 혼합물 중에서 분석하였다: 50 mM 트리스-HCl (pH 8.3, 25℃), 6 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 40 mM KCl, 0.5 mM dTTP, 0.4 MBq/ml [3H]-dTTP, 0.4 mM polyA-oligo$(dT)_{12-18}$. 활성 단위는 특정 반응 온도에서 10분간 폴리뉴클레오티드 분획으로의 dTMP 병합을 측정하여 결정하였고(DE-81에 흡착), 시판 효소의 기지량과 비교하였다.

[0232] **결과**

[0233] 선별 데이타를 분석하면서, 전장 M-MuLV 역전사 효소를 발현하는 서열 104개를 모았다. 단백질 모두에 대한 전체 CLUSTALW 정렬(부록 2)을 수행하였으며, 문헌들에서 일반적으로 사용되는 바와 동일하게 아미노산 번호를 지정하기 위해 N 말단에 His 테그없이 실시하였다. MLV로 지칭되는 야생형 서열을 늘 첫번째 서열로 나타낸다. 돌연변이는 역상의 백색 글씨로 표시된다(부록 2). 어떠한 방식으로도 M-MuLV 역전사 효소 특성을 개선시키고 다른 특허 출원에서 언급된 돌연변이의 아미노산 위치는, 회색으로 강조한 아미노산(백색 글자) 행 열로 표시되어 있다. 본 발명에서 선별되었으며 회색 줄로 표시되는 돌연변이는, 본 선별 방법이 유익한 주요 부위(hot spot)나 도처에 언급된 실제 아미노산 돌연변이를 정확하게 조준있다는 증거로서 제공된다. 50℃에서의 활성인 최초 wt M-MuLV(wt 활성 70%, 특히 45%) 보다 실질적으로 우수한 것으로 분석된 단백질의 서열은 회색으로 강조되어 있다. 104개의 서열분석된 클론들 중에서, 98개가 유닉크한 서열들이고 1개가 wt (L5_87) 서열이다. 서열 5개는 2번 반복된다(L5_21 & L5_111; L5_43 & L5_112; L5_49 & L5_63; L5_64 & L5_93; L5_85 & L5_96). 전체적으로, 본 발명자들은 55개의 단백질들을 무작위 발현시켰다. 발현된 55개의 단백질 중에서, 효소적으로 활성형의 M-MuLV 역전사 효소 돌연변이 변이체(대조군 wt 포함) 40개는 SDS-PAGE에서 동질성 40-80%로 성공적으로 정제되었다. 정제된 RT 샘플들의 총 단백질 농도 범위는 0.6-5.5 mg/ml이었다. RT 돌연변이 변이체들을, 37℃, 50℃에서의 역전사 효소 활성, 및 50℃에서 5분간 인큐베이션한 후 37℃에서의 잔류 활성에 대해 조사하였다(도 8). 37℃에서의 역전사 효소 활성은 100%로 표준화하였고, 도 8에서는 생략하였다. 따라서, 2가지 타입의 막대(50℃에서의 RT 활성% 및 50℃에서 5분 인큐베이션한 후 37℃에서의 잔류 RT 활성%)만 나타내었다. 대조군으로서 돌연변이 라이브러리 구축에 사용된 wt M-MuLV 역전사 효소를 나타내었다. 이러한 기원 효소(primary enzyme)를 돌연변이 RT 변이체와 동일한 벡터에서 발현시키고 동일한 방식으로 정제하였다. wt 효소의 50℃에서의 RT 평균 활성은 37℃의 활성 대히 약 45%였다. 테스트한 모든 단백질들에서, 일부만 제외하고는, 50℃에서의 45% 보다 더 높았다. 테스트한 모든 돌연변이들의 경우, 50℃에서의 평균적인 RT 활성율은 약 ~92%이었고, wt 효소(45%) 보다 2배 이상 높았다. 일부 돌연변이들은 50℃에서도 100% 이거나 또는 37℃에서의 활성 보다 활성이 더 높았다: 20, 23, L5_16, L5_24, L5_30, L5_35, L5_37, L5_43, L5_46, L5_47, L5_49, L5_52, L5_55, L5_64, L5_65, L5_68, L5_72. 최상의 돌연변이는 50℃에서 약 140% 이상(wt의 45% 보다 3배 이상 높음)의 RT 활성을 보였다: 20 (165%), L5_37 (162%), L5_43 (156%), L5_46 (135%), L5_47 (179%), L5_52 (137%), L5_64 (142%) 및 L5_68 (153%).

[0234] 대다수의 돌연변이들이 50℃에서 매우 높은 RT 활성을 가지더라도 열 안정적인 것은 아니다. wt 대조군은 50℃에서 5분간 인큐베이션 한 후 37℃에서의 RT 잔류 활성이 ~11%이었다. 선별한 효소의 동일한 잔류 활성도 ~12%로 유사하였다. 그러나 일부 테스트한 RT 변이체들은 실질적으로 열 안정성이 더 우수하였고, wt 효소에 비해 잔류 활성이 2-3배 높았다(11%): L5_8 (25%), L5_43 (32%), L5_46 (27%), L5_64 (28%), L5_65 (25%), L5_68 (31%).

[0235] 부분 정제된 wt 효소의 비활성도(U/mg(단백질))는 ~200,000 U/mg이다(도 9). 선별한 RT 변이체들도 발현시킨 다음 매우 다양한 방식으로 정제하였으며, 이의 평균 비활성도(~155,000 U/mg)는 wt 대조군 보다 조금 낮았다(도 9). 일부 경우들에서는, 비활성도가 낮았고, 어떤 경우에는 높았다(20 - ~274,000 U/mg; L5_11 - ~273,000 U/mg; L5_28 - ~230,000 U/mg; L5_30 - ~224,000 U/mg; L5_35 - ~316,000 U/mg; L5_43 - ~328,000 U/mg; L5_46 - ~304,000 U/mg; L5_52 - ~310,000 U/mg; L5_64 - ~256,000 U/mg; L5_65 - ~247,000 U/mg).

[0236] 본 발명의 선별 시스템이 잘 작동된다는 것이 명확해졌다. 선별압 요소로서 RT 반응의 온도를 증가시켜 사용함으로써, 본 발명에서는 보다 신속하고(50℃에서의 특이적인 RT 반응이 더 높고), 열 안정성이 보다 우수한(50℃에서 5분 예비 인큐베이션한 후 37℃에서의 잔류 RT 활성) 역전사 효소가 생성되도록 조절하였다.

[0237] 유용한 정보 소스는 선별한 단백질 서열의 정렬(부록 2)이다. 50℃에서의 활성이 기원 효소인 wt M-MuLV 보다 실질적으로 우수(wt 활성의 45%에 비해 70% 이상임)한 것으로 분석된 단백질들의 서열은 회색으로 강조하였다. (부록 2). 돌연변이가 발생된 아미노산의 수는 0 (wt 또는 L5_87) 내지 12 (L5_9)로 다양하였다. 모든 선별한 RT 변이체들에서 확인한 돌연변이 리스트는 부록 3에 나타내었다. 단백질들은 돌연변이 갯수의 내림 차순으로 정렬되어 있다. 대부분의 돌연변이들(104개 중 53개)은 서열 1개 당 4-6개의 돌연변이가 있었다. 역전사 효소 서열에, 일반적으로 RT 반응과 효소의 열 안정성에 매우 중요하고 유익한, 몇개의 주요 부위가 있다는 것은 자명한 사실이다. 이러한 주요 부위는 다중 서열 정렬(부록 2)에서 특정 위치에 돌연변이가 집중되는 것으로 쉽게 확인할 수 있다. 특히, M-MuLV 역전사 효소 성능이 우수한 변이체들에서 발견된 돌연변이들이 중요하다(서열은 회색으로 강조됨 - 부록 2). 가장 빈도가 높은 돌연변이에 대한 종합적인 정보(내림차순)는 부록 4에 제공되어 있다. 이전 부록물에서와 같이 50℃에서 활성이 실질적으로 높은 돌연변이 단백질들은 회색으로 강조되어 있다. 동일한 돌연변이가 수차례 반복되고 있고 이러한 돌연변이가 있는 테스트한 역전사 효소가 50℃에서의 성능이 우수하다면, 이 돌연변이가 역전사 반응에 어떻게든 유익하다는 것을 의미한다.

[0238] 돌연변이가 발견되는 빈도에 따라, 5개의 클래스로 나눌 수 있다: 21-31회 반복; 14-18회 반복; 4-7회 반복; 2-3회 반복 및 1회 반복. 가장 빈도가 높은 돌연변이 제1 그룹에는 4가지 아미노산, D524 (31회 반복); D200 (30회 반복); D653 (23회 반복) 및 D583 (21회 반복)이 포함된다. 아미노산 2종(D524 및 D583)은 리보뉴클레아제 H 도메인의 활성 센터에서 마그네슘 이온을 착화하는 것으로 알려져 있다. D524G, D583N 및 E562Q 돌연변이들은 M-MuLV 역전사 효소의 RNase H 활성을 중단시키는데 사용되며(Gerard et al., 2002), cDNA의 합성을 개선시킨다. 본 발명의 선별 결과도 매우 유사하다. 아스파르테이트 524번의 돌연변이가 98개 중 31개의 서열에서 발견되었다. 또한, D524N 치환은 1번 확인되었고, D524A는 10번, D524G는 20번으로 확인되었다. 따라서, 본 발명의 선별 방법은 중요한 아미노산을 정확하게 표적화할 수 있을 뿐만 아니라 최대 부위로 알려진 동일한 아미노산 치환을 표적화한다. 실제, 동일한 치환은 아스파르테이트 583번 돌연변이에도 있는데, 이러한 돌연변이는 104개 중 21개의 선별 단백질들에서 반복되고 있다. D583E 치환은 1번, D583A는 3번, D583G는 7번, 마지막으로 D583N은 10번이다. 또한, 최대 부위로 알려진 동일한 아미노산 및 동일한 치환(D583N)이 가장 높은 빈도로 선별되었다. 인비트로젠사의 시판 효소 SUPERSCRIPT II에는 3가지 돌연변이가 포함되어 있다: D524G, D583N 및 E562Q(WO2004024749). 가장 흥미로운 사항은, 세번째 아미노산 치환 E562에서의 돌연변이는 본 발명의 선별에서는 1회(L5_71에서의 E562K) 확인되었다는 것이다. 이러한 결과는, 글루타메이트 562번이 아스파르테이트 524번과 583번 만큼 중요하지 않을 가능성이 크거나, 또는 이 아미노산의 치환이 어떠한 이유로 일부 부작용을 유발할 수 있으며, 승온된 온도(>50℃)에서 수행되는 RT 반응에 유익하지 않다는 것을 시사한다.

[0239] 선별된 단백질의 서열에 대한 추가적인 분석으로, 다수의 더욱 중요한 아미노산 위치들을 동정할 수 있었으며, 이의 돌연변이는 다른 특허 출원들에서 개선된 M-MuLV 역전사 효소에 대한 것으로 기술되어 있다: H204R - 7회 반복(US7078208); H638R - 4회 반복(US20050232934A1); T197A - 2회 반복(US7056716); M289V(L), T306A(M) - 2회 반복(US7078208); E302K, N454K - 2회 반복(WO07022045A2); E69G, L435P - 1 회(WO07022045A2); Y64C, Q190R, V223M, F309S - 1회(US7056716); E562K - 1회 (US7078208). 또한, 문헌에 언급된 3가지 아미노산 치환들의 조합을 가지고 있는 역전사 효소 서열도 선별된 서열들에서 2개 있었다(30 - D200N, T306M, D524N, D583G;

L5_28 - T306A, F309S, D524A, H594R, F625S).

[0240] 공지된 돌연변이들 외에도, 본 발명에서는 꽤 빈번하게 돌연변이되는 다수의 아미노산 위치들도 동정하였다: D200N(A, G) - 30회 반복; D653N(G, A, H, V) - 23회 반복; L603W(M) - 18회 반복; T330P - 15회 반복; L139P - 14회 반복; Q221R - 6회 반복; T287A - 6회 반복; I49V(T) - 5회 반복; N479D - 5회 반복; H594R(Q) - 5회 반복; F625S(L) - 5회 반복; P65S - 4회 반복; H126S(R) - 4회 반복; L333Q(P) - 4회 반복; A502V - 4회 반복; E607K(G, A) - 4회 반복; K658R(Q) - 4회 반복; H8P(R) - 3회 반복; P130S - 3회 반복; E233K - 3회 반복; Q237R - 3회 반복; N249D - 3회 반복; A283D(T) - 3회 반복; A307V - 3회 반복; Y344H - 3회 반복; P407S(L) - 3회 반복; M428L - 3회 반복; Q430R - 3회 반복; D449G(A) - 3회 반복; A644V(T) - 3회 반복; N649S - 3회 반복; L671P - 3회 반복; E673G(K) - 3회 반복; N678I - 3회 반복(부록 4).

[0241] RT 성능이 가장 우수한 변이체들은 일반적으로 가장 높은 빈도로 변형되는 아미노산 돌연변이를 가지고 있다:

[0242] 20 (50℃ - 123%) - D200N (30회 반복), L603W (18회 반복) & C 말단에 일부 변형 - N678I, S679P, R680A;

[0243] L5_35 (50℃ - 125%) - D200N (30회 반복), T330P (15회 반복), N479D (5회 반복);

[0244] L5_37 (50℃ - 162%) - H123S (4회 반복), L149F (1회), D200N (30회 반복), N454K (2회 반복), D583N (21회 반복);

[0245] L5_43 (50℃ - 160%) - D200N (30회 반복), Q237R (3회 반복), T330P (15회 반복), D524G (31회 반복), F625S (5회 반복), D653N (23회 반복);

[0246] L5_46 (50℃ - 135%) - D200N (30회 반복), T330P (15회 반복), D583N (21회 반복), T644T (3회 반복);

[0247] L5_47 (50℃ - 179%) - N107S (1회), H126R (4회 반복), T128A (1회), I179V (2회 반복), D200N (30회 반복), H642Y (2회 반복), D653N (23회 반복);

[0248] L5_52 (50℃ - 137%) - D200N (30회 반복), T330P (15회 반복), Q374R (2회 반복), (D583N (21회 반복);

[0249] L5_64 (50℃ - 142%) - D200N (30회 반복), D216G (2회 반복), D524G (31회 반복), E545G (2회 반복);

[0250] L5_65 (50℃ - 127%) - D200N (30회 반복), Q238H (1회), L570I (1회), L603W (18회 반복);

[0251] L5_68 (50℃ - 153%) - M39V (2회 반복), I49V (2회 반복), Q91R (2회 반복), H204R (7회 반복), T287A (6회 반복), N454K (2회 반복), F625L (5회 반복), D653H (23회 반복).

[0252] 돌연변이 단백질의 측정한 RT 활성과 서열 정렬 분석 데이타를 조합한 결과는, M-MuLV 역전사 효소 소열의 서열에서 다수의 유익한 돌연변이(및 이의 조합)를 찾을 수 있게 해준다.

[0254] **실시예 3 - *M-MuLv 역전사 효소 돌연변이 분석***

[0255] 실시예 2에 기술된 시험관내 진화 실험은 매우 유효하였다. 역전사 반응의 점차적인 승온 조건을 선택압으로 사용하여, 많은 수의 다양한 M-MuLV RT 돌연변이체들을 만들었다. 돌연변이 대부분은 기원 효소 보다 승온 조건에서 더 잘 작동할 수 있었다. 생성된 역전사 효소의 서열분석에서는, 효소 특성의 복잡한 개선의 요인인, 주요 부위와 대부분의 중요한 아미노산 위치들(치환)이 드러났다. 상이한 돌연변이들 각각의 효과를 밝히기 위해, M-MuLV RT의 단일 돌연변이 및 다중 돌연변이를 구축하고, 부분 정제하여 분석하였다. 돌연변이 구조체의 출발점은, M-MuLV RT와, 친화성 크로마토그래피로 신속하게 단백질을 정제하기 위한 N-말단 His-테그를 코딩하는, 7474 bp의 pET_his_MLV (서열번호 19) 플라스미드이다. 37℃에서의 M-MuLV 역전사 효소 비활성도, 50℃에서의 상대적인 활성, 및 50℃에서 5분 인큐베이션한 후 37℃에서의 상대적인 잔류 활성을 측정하였다. 일부 경우들에서는, RNase H 활성을 체크하였고, 1kb 또는 4.5kb RNA를 대상으로 다양한 온도에서의 cDNA 합성 반응도 수행하였다.

[0256] **방법 및 재료**

[0257] 개시 플라스미드 pET_his_MLV (서열번호 19)를 돌연변이 유발성 PCR의 출발 물질로 사용하였다. 돌연변이 유발 프라임를 사용하여 돌연변이를 도입하였다. 각각의 클론의 서열을 분석하였다. M-MuLV RT 돌연변이들은 T7 발현 균주인 ER2566에서 발현시켰다. 동일한 구성으로 각각의 단백질과 기원 wt M-MuLV 역전사 효소를 LB 200 ml에 A590 ~0.7로 배양한 다음, Qiagen - Ni-NTA 슈퍼플로우 수지 2 ml을 이용한 친화성 크로마토그래피에 의해 His-테그로 정제하였다(모든 정제는 제공자 권고안에 따른 네이티브 조건 하에 수행함). 용리는 1 ml의 EB

(50 mM - NaH_2PO_4, 300 mM - NaCl, 250 mM - 이미다졸, pH 8.0, 10 mM - 베타-머캅토에탄올 및 0.1% 트리톤 X-100)에서 수행하였다. 모든 단백질은 50배의 저장 완충액(50 mM 트리스-HCl (pH 8.3 at 25℃), 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.1% (v/v) 트리톤 X-100 및 50% (v/v) 글리세롤)에서 투석하였다. 단백질 순도는 SDS-PAGE(통상 타겟 단백질의 ~40-80%)에서 체크하였다. 단백질 농도는 브레드포드 시약(Fermentas #R1271)을 이용하여 측정하였다.

[0258] MLV 역전사 효소 특이적인 활성은, 37℃, 50℃ (특수 희석 완충액에 희석한 효소: 30 mM 트리스-HCl pH 8.3, 25℃, 10 mM DTT, 0.5 mg/ml BSA)에서 측정하고, 50℃에서 5분간 인큐베이션한 후의 37℃에서의 잔류 활성(효소는 1x RT 반응 완충액(50 mM 트리스-HCl pH 8.3, 25℃, 4 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 50 mM KCl)으로 희석하고 안정성을 측정함)을 측정하였다. 모든 경우에서, 효소 활성은 하기 최종 혼합물 중에서 분석하였다: 50 mM 트리스-HCl (pH 8.3, 25℃), 6 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 40 mM KCl, 0.5 mM dTTP, 0.4 MBq/ml [3H]-dTTP, 0.4 mM polyA-oligo$(dT)_{12-18}$. 활성 단위는 특정 반응 온도에서 10분간 폴리뉴클레오티드 분획으로의 dTMP 병합을 측정하여 결정하였고(DE-81에 흡착), 시판 효소의 기지량과 비교하였다.

[0259] M-MuLV 역전사 효소 변이체들의 RNase H 활성을 미국 특허 5405776에 따라 측정하였다. 정제한 효소의 RNase H 활성은, 50mM 트리스-HCl pH 8.3, 2 mM $MnCl_2$, 1 mM DTT 및 [3H](A)n*(dT)n (5 μM [3H](A)n, 35 cpm/pmol; 20 μM (dT)n)을 포함하는 반응 혼합물(50 ㎕) 중에서 분석하였다. 반응물을 10분간 37℃에서 인큐베이션하고, 10 ㎕의 tRNA (1 mg/ml)와 20 ㎕의 차가운 50% TCA를 첨가하여 정지시켰다. 얼음 위에서 10분 후, 혼합물을 에펜도르프 원심분리기에서 10분간(25000g) 원심분리하였다. 상층액 40 ㎕를 LSC-유니버셜 칵테일(Roth - Rotiszint eco plus) 중에서 계수하였다. RNase H 1 유닛은, 37℃에서 10분간 [3H](A)n*(dT)n 중에서 [3H](A)n 1몰을 가용화하는데 소요되는 효소의 양이다.

[0260] "RevertAid™ 제1 가닥 cDNA 합성 키트" (#K1622 - Fermentas)와 이의 대조군 1.1 kb RNA + 3'-poly(A) 테일을 oligo$(dT)_{18}$ 프라이머와 조합하여 사용하여, 여러가지 온도에서의 cDNA 합성 능력을 정제된 역전사 효소를 대상으로 체크하였다. 또는, 4.5 kb RNA (synthesized from Eco31I로 선형화한 pTZ19R 플라스미드로부터 합성한 것으로, 람다 파지의 DNA 일부 5505-8469bp가 추가적으로 포함되어 있음)를 이용하여, 역전사 반응을 테스트하였다. 키트 구성품인 합성 RNA 1 ㎍을 이용하고 일부 수정(37℃에서의 5분간의 예비 인큐베이션 수행 안함)만 가한 제공된 프로토콜에 따라, 반응 부피 20 ㎕로 1시간 동안 cDNA를 합성하였다. 역전사 반응은 해당되는 온도 구배를 적용하면서 엔펜도르프 마스터사이클러 그레디언트 PCR 장치에서 96웰 플레이트를 이용하여 수행하였다. 합성된 cDNA는, 알칼리 아가로스 젤 전기영동에 의해 (에티듐 브로마이드로 염색함) 분석하였다. 알칼리 아가로스 젤 상에서 cDNA 합성 분석한 샘플을 도 16에 나타내었다.

[0261] **결과**

[0262] M-MuLV 역전사 효소 진화시 발견되는 돌연변이 빈도에 따라, 5개의 클래스로 나눌 수 있다: 21-31회 반복; 14-18회 반복; 4-7회 반복; 2-3회 반복 및 1회. 일반적으로 각각의 역전사 효소 돌연변이의 구축은 이러한 정보에 따라 수행하였다. 가장 빈도가 많은 돌연변이를 먼저 테스트하였다. 37℃에서의 역전사 효소 비활성도, 50℃에서의 상대적인 활성, 및 50℃에서 5분 인큐베이션한 후 37℃에서의 상대적인 잔류 활성을 측정하였다. 일부 경우들에서는, RNase H 활성을 체크하였고, 1kb 또는 4.5kb RNA를 대상으로 다양한 온도에서의 cDNA 합성 반응도 수행하였다. 각 돌연변이에 대한 모든 실험 데이타는 부록 5에 나타내었다. 제2열("선별 빈도")은 동일한 돌연변이가 있는 서열분석된 돌연변이의 수를 나타내고, 괄호안 숫자는 선별시 특정 아미노산 돌연변이가 확인된 돌연변이의 수를 나타낸다. 예컨대, D200N - 25 (30)는, 아스파르테이트 200번이 아스파라긴으로 치환된 경우가 전체 D200 돌연변이들 30개 중에서 25개라는 것을 의미한다. 37℃에서 측정한 역전사 효소 비활성도는 단백질 mg 당 유닛으로 나타내었다. 50℃에서의 상대적인 효소 활성과 50℃에서 5분간 인큐베이션한 후 37℃에서의 상대적인 잔류 RT 활성은, 37℃에서 측정한 동일 효소의 비활성도(100%)에 대한 백분율로 보정하여 나타내었다. 대조군(제1행)으로서 돌연변이 라이브러리 구축에 사용한 wt M-MuLV 역전사 효소를 나타내었다. 이 기원 효소는, RT 돌연변이 변이체들과 동일한 벡터에서 동일한 방식으로 정제한 것이다. wt 효소의 비활성도는 37℃에서 약 200,000 U/mg이고, 50℃에서의 상대적인 활성(37℃에서의 활성 대비)은 45-50% (90,000-100,000 U/mg)이고, 50℃에서 5분간 인큐베이션한 후 37℃에서의 상대적인 잔류 RT 활성(37℃에서의 활성 대비)은 약 11% (~22,000 U/mg)이다. 야생형 효소의 RNase H 활성은 160-200 U/mol이며, 48℃에서 1kb cDNA 전장을 합성할 수 있다. M-MuLV 역전사 효소는 주형-프라이머 기질에 결합함으로써 열에 의한 불활성화로부터 예방되며, 반대로 효소는 용액에서 단독시 열 안정성이 거의 없는 것으로, 알려져 있다(Gerard et al., 2002). 50℃에서

5분 인큐베이션한 후 37℃에서의 상대적인 잔류 RT 활성은, 기질이 없는 용액내에서의 효소 열 안정성을 직접적으로 나타낸다. 한편, 50℃에서의 상대적인 활성은 RNA/DNA 기질과의 복합체 상태에서의 효소 열 안정성과 cDNA 합성 속도를 보여준다. 신속한 역전사 효소 변이체들은, 이의 열 안정성이 야생형 효소와 동일하더라도, 50℃에서의 중합효소 유닛 크기는 높을 것이다. cDNA 합성의 최고 온도(1kb 또는 4.5kb의 경우)는, 승온 조건에서 cDNA를 합성하는 효소의 전반적인 능력을 보여주는, 가장 포괄적인 파라미터이다. 10% 이상 증가된 - 37℃에서의 비활성도(≥220,000 U/mg, 200,000 U/mg - wt), 37℃에서의 돌연변이 활성 대비 50℃에서의 상대적인 활성(≥54%, 45-50% - wt) 또는 37℃에서의 돌연변이 활성 대비, 50℃에서 5분 인큐베이션한 후 37℃에서의 상대적인 잔류 활성(≥13%, 11% - wt)을 보이는 - 역전사 효소 돌연변이는 회색으로 명암을 주었으며, 현저하게 개선된 효소로 간주하였다. 또한, 48℃ 보다 높은 온도에서 1kb의 전장 cDNA를 합성할 수 있는 돌연변이들도 회색 음영 처리하였다.

[0263] 37℃에서의 비활성도가 증가된 역전사 효소 돌연변이(≥220,000 U/mg)는 다음과 같다(부록 5):

[0264] D200 (D200N - 254,000 U/mg; D200G - 276,000 U/mg; D200H - 234,000 U/mg),

[0265] T330 (T330N - 223,000 U/mg; T330D - 240,000 U/mg),

[0266] Q221 (Q221R - 268,000 U/mg),

[0267] H594 (H594K - 270,000 U/mg; H594Q -231,000 U/mg),

[0268] D449 (D449E - 224,000 U/mg; D449N - 221,000 U/mg),

[0269] M39 (M39N - 349,000 U/mg),

[0270] M66 (M66L - 237,000 U/mg; M66V - 227,000 U/mg; M66I - 240,000 U/mg),

[0271] H126 (H126R - 227,000 U/mg),

[0272] W388 (W388R - 266,000 U/mg),

[0273] I179 (I179V - 251,000 U/mg).

[0274] 50℃에서의 상대적인 활성이 증가된 역전사 효소 돌연변이(≥54%)는 다음과 같다(부록 5):

[0275] D200 (D200N - 84%; D200A - 87%; D200Q - 103%; D200E - 79%; D200V - 131%; D200W - 103%; D200G - 88%; D200K - 102%; D200R - 68%; D200H - 54%),

[0276] L603 (L603W - 105%; L603F - 104%; L603Y - 95%; L603M - 77%),

[0277] D653 (D653N - 93%; D653K - 106%; D653A - 99%; D653V - 98%; D653Q - 93%; D653L - 83%; D653H - 116%; D653G - 90%; D653W - 93%; D653E - 80%),

[0278] T330 (T330P - 80%; T330N - 69%; T330D - 55%; T330V - 65%; T330S - 67%),

[0279] Q221 (Q221R - 94%; Q221K - 77%; Q221E - 64%; Q221M - 58%; Q221Y - 77%),

[0280] E607 (E607K - 84%; E607A - 98%; E607G - 72%; E607D - 69%),

[0281] L139 (L139P - 59%),

[0282] T287 (T287S - 68%),

[0283] N479 (N479D - 81%),

[0284] H594 (H594R - 69%; H594K - 80%; H594Q - 75%; H594N - 61%),

[0285] D449 (D449G - 79%; D449E - 77%; D449N - 75%; D449A - 99%; D449V - 83%),

[0286] M39 (M39V - 54%; M39N - 71%),

[0287] M66 (M66L - 79%; M66V - 73%; M66I - 80%),

[0288] L333 (L333Q - 54%),

[0289] H126 (H126R - 58%),

[0290] P130 (P130S - 70%),

[0291] Q91 (Q91R - 56%),

[0292] W388 (W388R - 72%),

[0293] R390 (R390W - 64%),

[0294] Q374 (Q374R - 56%),

[0295] E5 (E5K - 67%).

[0296] 50℃에서 5분 인큐베이션한 후 37℃에서의 상대적인 잔류 활성이 (37℃에서의 활성에 비해) 증가된 역전사 효소 돌연변이(≥13%)는 다음과 같다(부록 5):

[0297] D200 (D200N - 15%; D200A - 18%; D200Q - 23%; D200R - 27%; D200H - 27%),

[0298] L603 (L603W - 23%; L603Y - 13%; L603P - 15%),

[0299] D653 (D653N - 21%; D653K - 15%; D653A - 18%; D653V - 16%; D653Q - 18%; D653H - 13%; D653G - 13%; D653W - 13%; D653E - 19%),

[0300] T330 (T330P - 21%; T330N - 13%; T330D - 16%; T330S - 15%),

[0301] T287 (T287A - 13%; T287F - 13%),

[0302] H594 (H594R - 14%; H594Q - 13%),

[0303] D449 (D449G - 13%),

[0304] M39 (M39V- 13%),

[0305] M66 (M66L - 13%),

[0306] Y344 (Y344H - 13%),

[0307] Q91 (Q91R - 13%),

[0308] N649 (N649S - 16%),

[0309] W388 (W388R - 14%).

[0310] 48℃ 보다 높은 온도에서 1kb의 전장 cDNA를 합성할 수 있는 돌연변이는 다음과 같다(부록 5):

[0311] D200 (D200N - 50.4℃; D200H - 50.4℃),

[0312] L603 (L603W - 53.1℃; L603F - 50.4℃; L603Y - 47.8-50.4℃),

[0313] D653 (D653N - 50.4-53.1℃; D653K - 50.4-53.1℃; D653A - 50.4℃; D653V - 50.4℃; D653Q - 50.4℃; D653L - 50.4℃; D653H - 50.4-53.1℃; D653G - 50.4℃; D653W - 50.4℃),

[0314] Q221 (Q221R - 50.4℃),

[0315] E607 (E607K - 47.8-50.4℃),

[0316] H594 (H594K- 47.8-50.4℃; H594Q - 47.8-50.4℃).

[0317] 알칼리 아가로스 젤 상에서의 1kb cDNA 합성 분석 샘플은 도 16 A-D에 나타낸다.

[0318] 수집한 생화학적 데이타에 따라, 승온된 조건에서 cDNA 합성에 영향을 미칠 수 있는 M-MuLV 역전사 효소 서열에서 가장 중요한 위치는 다음과 같다: **D200, L603, D653, T330, Q221, E607, L139, T287, N479, H594, D449, M39, M66, L333, H126, Y344, P130, Q91, N649, W388, R390, I179, Q374, E5.**

[0319] 일반적으로 대상 돌연변이들은 서로 조합될 수 있으며, 기질, 속도(velocity), 진행력(processivity) 및 승온된 조건에서 cDNA를 합성하는 전반적인 능력을 가지거나 가지지 않은 M-MuLV 역전사 효소의 열 안정성은 더욱 개선될 수 있다. 조합 방법(combinatorial approach)에 의한 효소 개선을 예시하고 있는 일부 데이타들을 부록 6에 나타내었다. 단일 돌연변이인 D200N과 L603W는 50℃에서의 상대적인 활성은 84% 및 105%이다. 1kb cDNA 합성

의 최고 온도는 50.4℃ 및 53.1℃이다. 2중 돌연변이 D200N; L603W의 상대적인 활성은 50℃에서 131%이며, 56℃에서 1kb cDNA를 합성할 수 있다. 3중 돌연변이 D200N; L603W; T330P (50℃에서 80%; 47.8℃에서 1kb cDNA 합성)는 더욱 개선되어, 50℃에서의 상대적인 활성은 175%이고, 56-58℃에서 1kb cDNA를 합성할 수 있다. 4중 돌연변이 D200N; L603W; T330P; E607K (50℃에서 84%; 47.8-50.1℃에서 1kb cDNA 합성)의 50℃에서의 상대적인 활성은 174%이고, 60-62℃에서 1kb cDNA를 합성할 수 있다. 5중 돌연변이 D200N; L603W; T330P; E607K; L139P (50℃에서 59%; 47.8℃에서 1kb cDNA 합성)의 50℃에서의 상대적인 활성은 176%이고, 62℃에서 1kb cDNA를 합성할 수 있는데, 이는 야생형 M-MuLV 역전사 효소(47.8℃에서 1kb cDNA 합성)와 비교하여 약 14℃ 높은 것이다. 또한, 다음의 돌연변이들에서 추가적인 열 안정성 특징들이 관찰된다:

[0320] N479D, H594R 돌연변이 (D200N; L603W - 50℃에서 131%, 56℃에서 1kb cDNA 합성 vs D200N; L603W; N479D; H594R - 50℃에서 182%, 56-58℃에서 1kb cDNA 합성, 56-58℃에서 4.5kb cDNA 합성),

[0321] T330P 돌연변이 (D200N; L603W; D653N; D524G - 50℃에서 155%, 58-60℃에서 1kb cDNA 합성 vs D200N; L603W; D653N; D524G; T330P - 50℃에서 180%, 60-62℃에서 1kb cDNA 합성).

[0322] 알칼리 아가로스 젤 상에서의 4.5 kb cDNA 합성 분석 샘플은 도 16 E-G에 제시한다.

[0324] **실시예 4 - *CRD 변형: 바이오틴-dUTP를 이용한 DNA 의존성 DNA 중합효소 활성*** 선별(원칙 입증)

[0325] 본 실시예에서는, 변형된 뉴클레오티드를 DNA-DNA 기질에 병합시킬 수 있는, DNA 의존성 DNA 중합효소로서의 역전사 효소의 활성을 기반으로 한 선별 전략을 예시한다. 이러한 선별 방법의 기본 계획은 도 12에 개략적으로 나타내었다. 2종의 플라스미드 pET_his_MLV_D583N_pD(RNase H가 생략된 M-MLV(Moloney Murine Leukemia Virus) 역전사 효소 및 단백질 D 스페이서 융합형 코딩함) 및 이의 유도체 pET_his_del_pD (비활성형 역전사 효소 코딩; pol 도메인에 57개의 아미노산이 결손되어 있으며, RNase H 도메인에 D583N 돌연변이 있음, 실시예 1, 서열번호 2)를 본 실시예의 출발 물질로 이용하였다. 활성형 및 비활성형 역전사 효소를 코딩하는 일차 DNA 단편들을, 타겟으로서 플라스미드 pET_his_MLV_D583N_pD 및 pET_his_del_pD를 이용한 2가지 독립적인 PCR 방법으로 합성하였다. 합성된 PCR 단편들을, 3' 말단에 정지 코돈이 결핍된 mRNA 합성을 위한 전사 반응에 사용하였다. 정제된 mRNA를 1:20=MLV (활성형 RT):del (비활성형 RT)으로 혼합하였다. 이중 가닥 DNA 어댑터(DNA 의존성 DNA 중합효소 활성 선별을 위해 필요함)를 T4 DNA 라이게이즈에 의해 3' mRNA에 연결하였다. 이 mRNA-dsDNA 복합체를 시험관내 번역 반응에 사용한다. mRNA 가닥에 따라 이동하는리보솜은 RNa-DNA 혼성화 부위에서 번역을 중단한다(Tabuchi et al., 2001). 리보솜-mRNA/dsDNA-단백질 복합체는, 50 mM Mg^{2+}를 포함하는 차가운 완충액으로의 번역 혼합물 희석에 의해 안정되었다(통계적인 리보솜 디스플레이에서와 같이). 3중 복합체(TC)의 혼합물을, 슈크로스 완충 상에서의 초원심분리에 의해 정제하였다. 시험관내 번역된 M-MuLV(RNase H) 역전사 효소에 결합된 mRNA-dsDNA를 포함하고 있는 정제된 3중 복합체(<3 x 10^9 개의 분자가 수득됨)를 이용하여, 바이오틴-dUTP 및 반응 완충액에 부가적으로 보충된 반응 혼합물을 제조하였다. 차가운 반응 혼합물을 에멀젼화하여, ~2 ㎛ 크기의 유중수 구획 ~1 x 10^{10}개를 만들었다. 에멀젼화된 반응 혼합물(구획 당 TC, 리보솜-mRNA/dsDNA-단백질 1개 이하)을 37℃에서 30분간 인큐베이션하였다. 구획화된 반응 혼합물의 온도를 높인 후, 대부분의 TC는 해리되어, mRNA/dsDNA와 역전사 효소가 분리된다. 성공적인 병합 반응은 활성형 M-MuLV (RNase H-) 역전사 효소를 포함하고 있는 구획에서만 이루어질 수 있으며, 그 결과 mRNA/dsDNA 복합체의 바이오틴화가 이루어진다. 바이오틴화된 복합체는 스트렙타비딘이 코팅된 자기 비드 상에 선택적으로 고정시켜, RT-PCR에 의해 특이적으로 증폭시킬 수 있다. 성공적인 실험 결과로, 활성형 효소를 코딩하는 유전자(본 경우에는, MLV_D583N_pD 역전사 효소의 RT-PCR 단편)는 비활성형 효소를 코딩하는 유전자(del_pD) 보다 농화되어야 한다.

[0326] **방법 및 재료**

[0327] **mRNA/dsDNA 복합체의 제조.**

[0328] **(1) 라이게이션 효율 결정.** 라이게이션 반응의 효율은, 스플린트(splint)로서 ddC-Long2 프라이머 (서열번호 22)를 이용한, MLV_pD mRNA (pET_his_MLV_pD 플라스미드로부터 합성, 실시예 1)과 프라이머 Long+Tb (서열번호 23)의 라이게이션에 의해 결정하였다. Long+Tb의 5' 말단은 T4 폴리뉴클레오티드 키나제(Fermentas)로 이미 인산화되어 있었다.

[0329] 8.5 pmol(~10 ㎍)의 정제된 MLV_pD mRNA를 4배 몰수의 Long+Tb (서열번호 23) 및 4.2배 몰 수의 ddC-Long2 (서열번호 22)와 뉴클레아제 결핍된 물에서 혼합하여, 어닐링 믹스 36㎕을 제조하였다. 이 혼합물을 5분간 70℃에서 인큐베이션한 다음 실온에서 20분간 냉각시켰다. 라이게이션 반응 성분들을 첨가하기 전에, 이 혼합물

을 이동시켜 2분간 냉각 정치시켰다.

[0330] 4.5 ㎕의 10x 라이게이션 완충액과 4.5㎕의 T4 DNA 라이게이즈(5v/㎕) (Fermentas)를, 36㎕의 어닐링 혼합물에 첨가하였다. 라이게이션 반응은 37℃에서 30분간 수행한 다음, 동일 부피의 Roti® 페놀/클로로포름(ROTH)으로 1회, 그리고 동일 부피의 클로로포름으로 2회 추출하였다. mRNA의 양을 라이게이션 반응을 위해 취한 초기량과 비슷하게 추정하고, 라이게이션 산물 믹스 ~5 ㎍를 뉴클레아제 결핍된 물로 43 ㎕로 희석하였다. 제조되는 혼합물은 Dynabeads M-280 스트렙타비딘 비드 (Dynabeads® kilobase BINDER™ Kit (DYNAL Biotech)) 상에 고정하기 전에, 이의 분액 2 ㎕를 아가로스 젤 분석을 위해 빼두었다.

[0331] 재현탁한 Dynabead 10 ㎕를 1.5 ml의 마이크로원심분리관에 옮기고, 키트에 구비된 결합 용액 50 ㎕로 헹구었다. 이 시험관을 1-2분 동안 비드가 시험관 바닥에 고정될 때까지 자석 위에 둔 다음, 용액을 제거하였다. 비특이 mRNA 결합을 최소화하기 위해, tRNA (효모 유래 tRNA(Roche)) 수용액(1 ㎍/㎕) 2 ㎕이 첨가된 결합 용액 38 ㎕에 Dynabead를 파이펫으로 조심스럽게 이동시켜, 재현탁하였다. 결합 용액 중의 Dynabead 40 ㎕를, 라이게이션 산물 믹스가 포함된 용액(~40 ㎕)에 첨가하였다. 이 시험관을 터모믹서(Eppendorf)에서 60분간 +22℃에서 교반하면서 인큐베이션하였다. 라이게이션된 mRNA/dsDNA의 결합 후, 상층액을 제거하고, 비드는 50 ㎕의 세정 용액(키트에 구비)으로 3번 세정하였다. 라이게이션된 mRNA/dsDNA 복합체가 고정된, 수집한 Dynabead를 뉴클레아제 비함유수 26 ㎕에 재현탁한 다음, 40 ㎕의 Roti® 페놀/클로로포름(ROTH)으로 1회, 40 ㎕의 클로로포름으로 2회 추출하여, 자기 비드로부터 mRNA/dsDNA 복합체를 해리시켰다. 최종 믹스 1, 2 및 5 ㎕를, 고정하기 전에 남겨둔 샘플(2 ㎕) 및 Mass Ruler™ High Range DNA ladder와 함께 아가로스 젤 상에서 분석하였다. 스트렙타비딘 비드 상에서 정제된 mRNA/DNA 복합체에서 mRNA의 양을, 고정하기 전과 후의 mRNA 양과 비교하여 결정하였다. 회수되는 mRNA의 수율은 ~60%이었다. mRNA의 60% 이상이 DNA 이중 가닥과 성공적으로 라이게이션되어, mRNA/dsDNA 복합체가 형성되었음을 의미한다.

[0332] **(2) mRNA/dsDNA 복합체 및 자가 개시된(primed) mRNA로의 바이오틴-dUTP의** 병합율 측정. 제1 mRNA의 dsRNA로의 라이게이션 실험에서 확인된 바와 같이, 라이게이션 반응 효율은 ~60% 이상이다. 라이게이션 혼합물에 둔 유리형 mRNA는 자가 개시될 수 있으며, M-MuLV 역전사 효소 및 바이오틴-dUTP를 이용한 연장 반응에서 석출될 수 있다. 본 실험은 mRNA/dsDNA 복합체(라이게이션 산물)가 유리형의 자가 개시된 mRNA 보다 나은 기질임을 확인하기 위해 수행하였다.

[0333] 전술한 공정(시작 플라스미드인 pET_his_MLV_D583N_pD 및 pET_his_del_pD의 구축에 대한 상세한 내용은 실시예 1에 기술되어 있음)에 따라, MLV_D583N_pD mRNA를 long+ 올리고뉴클레오타이드 (서열번호 21)와 연결하였다. 준비한 기질 (MLV_D583N_pD mRNA/long+) ~12,5 ng을, 미리 70℃에서 5분간 인큐베이션한 ~12,5 ng의 del_pD mRNA와 조합한 다음 뉴클레아제 결핍된 물 중에서 총 부피 12.5 ㎕으로 20분간 실온으로 냉각시켰다. 역전사 효소에 의한 dTTP 또는 바이오틴-dUTP 병입을 위한 제2 믹스를 제조하였다: 8 ㎕의 5 x 역전사 효소 반응 완충액; 1 ㎕ - 40 u/㎕ RiboLock™ RNase 저해제(Fermentas); 18.6 ㎕ 뉴클레아제 비함유수; 0.4 ㎕ - 200 u/㎕ RevertAid™ Minus M-MuLV 역전사 효소 (Fermentas). 제조한 믹스를 2개의 시험관에 2 x 15 ㎕로 나누고, 1 ㎕의 1 mM dTTP (Fermentas) 또는 1 ㎕의 1 mM 바이오틴-dUTP (Fermentas)를 첨가하였다. 이후, 5 ㎕의 기질(제1 믹스)를 dTTP 및 바이오틴-dUTP를 포함하는 혼합물에 첨가하였다. 반응은 60분간 37℃에서 수행하였다. 그 후, 1 ㎕의 0.5M EDTA (pH 8.0)를 2가지 샘플 모두에 첨가하고, 반응 혼합물을 동일 부피의 Roti® 페놀/클로로포름(ROTH)로 1회, 동일 부피의 클로로포름으로 1회 추출한 다음 G-50 MicroColumns (GE Healthcare)에서 추출하였다. 제조되는 반응 산물 중 2 ㎕는 직접 RT 반응(스트렙타비딘 비드 정제 실시 안함)용으로 남겨두고, 나머지 용액을 Dynabeads M-280 스트렙타비딘 비드 (Dynabeads® kilobase BINDER™ Kit (DYNAL Biotech)) 상에 바이오틴화된 mRNA-dsDNA 복합체에 고정하는데 사용하였다. 재현탁한 Dynabea 10 ㎕를 1.5 ml 마이크로원심분리관에 옮기고, 제공받은 결합 용액 25 ㎕로 세정하였다. 이 시험관을 1-2분 동안 비드가 시험관 바닥에 고정될 때까지 자석 위에 둔 다음, 용액을 제거하였다. 비특이 mRNA 결합을 최소화하기 위해, tRNA (효모 유래 tRNA(Roche)) 수용액(1 ㎍/㎕) 2 ㎕ 및 결합 용액 90 ㎕에 Dynabead를 파이펫으로 조심스럽게 이동시켜, 재현탁하였다. 결합 용액 중의 Dynabead 40 ㎕를, dTTP 및 바이오틴-dUTP에 의한 연장 단편이 포함된 용액(~40 ㎕)에 첨가하였다. 이 시험관을 터모믹서(Eppendorf)에서 40분간 +22℃에서 교반(1400 rpm)하면서 인큐베이션하였다. 결합 단계 후, 상층액을 제거하고, 비드는 +22℃에서 5분간 교반(1400 rpm)하면서 50 ㎕의 세정 용액(키트에 구비)으로 3번 세정하였다. 연장된 mRNA/dsDNA 복합체가 고정된, 수집한 Dynabead를 역전사 반응 혼합물에 재현탁하였다. 역전사 반응 혼합물은 얼음 위에서 준비하였다: 20 ㎕ - 5 x 역전사 효소 반응 혼합물 (Fermentas); 10 ㎕ - 10 mM dNTP (Fermentas); 2.5 ㎕ - 40 u/㎕ RiboLock RNase

저해제(Fermentas); 5 ㎕ - 20 μM pD_42 올리고뉴클레오타이드 (서열번호 8); 2,5 ㎕ RevertAid™ Minus M-MuLV 역전사 효소(200 u/㎕)(Fermentas); 55 ㎕ 뉴클레아제 비함유수. 제조한 믹스는 5개 19 ㎕ (5 x 19 ㎕) 분액으로 나누고, 2개는 Dynabead를 고정된 연장 mRNA/dsDNA 복합체 또는 mRNA로 재현탁하고, 나머지 2개는 스트렙타비딘 비드를 이용한 정제를 수행하지 않고 남겨 둔 샘플이 든 시험관으로 옮기고, 나머지 19 ㎕ 분액에는 뉴클레아제 비함유수 1 ㎕를 첨가하였으며, 이것은 반응 혼합물에 DNA가 포함되어 있지 않음을 입증하기 위한 음성 반응 대조군이다. 모든 반응 혼합물들은, cDNA 합성 반응이 종료될 때까지 1시간 동안 터모믹서(Eppendorf)에서 +42℃로 교반(1000 rpm)하면서 인큐베이션하였다.

[0334] cDNA의 증폭은 네스티드 PCR로 수행하였다. 처음 PCR 혼합물은 얼음 위에서 준비하였다: 14 ㎕ - 10X *Taq* 완충액 + KCl (Fermentas); 14 ㎕ - 2 mM의, 각 dNTP (Fermentas); 8,4 ㎕ - 25 mM $MgCl_2$ (Fermentas); 2.8 ㎕ - 1 u/㎕ LC (재조합) *Taq* DNA 중합효소(Fermentas); 0.7 ㎕ - 100 μM M_F 프라이머 (서열번호 11); 0.7 ㎕ - 100 μM M_2R 프라이머 (서열번호 12); 92.4 ㎕ 물. 이 혼합물을 19 ㎕ 씩 7개의 샘플(7x19 ㎕)로 나누었다. PCR 마스터 믹스 5 x 19 ㎕에 1 ㎕의 cDNA (1-5번 RT 샘플)를 첨가하고, PCR 마스터 믹스 6번에는 물 1 ㎕를 첨가하여 PCR 음성 대조군으로 하였고, 7번(PCR 양성 대조군)에는 pET_his_MLV_D583N_pD 플라스미드 (~1 ng) 1 ㎕를 첨가하였다. 순환성 프로토콜은 다음과 같다: 1차 변성 단계 3분간 94℃, 25회 사이클(45초간 94℃, 45초간 57℃, 및 1분간 72℃) 및 최종 연장 3분간 72℃.

[0335] 앰플리콘의 예상 크기는 MLV_D583N_pD는 907 bp, del_pD cDNA는 736 bp이다. PCR 산물은 웰 당 PCR 믹스 10 ㎕를 로딩한 1% 아가로스 젤에서 분석하였다(도 13).

[0336] 예상된 바와 같이, 효과적인 cDNA 증폭은 바이오틴-dUTP를 이용한 연장 반응에서만 관찰된다. 매우 희미한 증폭된 cDNA 밴드를 dTTP를 이용한 연장 반응에서 검출할 수 있으며, mRNA의 스트렙타비딘 비드에 대한 약한 비특이적인 결합으로 설명될 수 있다. 스트렙타비딘 비드 상에서 정제한 후, MLV_D583N_pD 유전자(907 bp)를 코딩하는 DNA는 del_pD (736 bp)에 비해 농화된다. 이는, mRNA/dsDNA 복합체가 자가 개시된 del_pD mRNA 보다 훨씬 더 효과적으로 바이오틴-dUTP에 의해 연장된다.

[0337] **(3) mRNA 혼합물(MLV_D583N_pD:del_pD=1:20)과 RNA/dsDNA 복합체의 제조.**

[0338] 시험관내 전사를 위한 PCR 단편의 제조. PCR 혼합물을 얼음 위에서 준비하였다: 20 ㎕ - 10X Taq 완충액 + KCl (Fermentas); 20 ㎕ - 2 mM의, 각 dNTP (Fermentas); 12 ㎕ - 25 mM $MgCl_2$ (Fermentas); 16 ㎕ - DMSO (D8418 - Sigma); 4 ㎕ - 1 u/㎕ LC (재조합) Taq DNA 중합효소(Fermentas); 1 ㎕ - 100 μM pro-pIVEX 프라이머 (서열번호 3); 1 ㎕ - 100 μM pD-ter- 프라이머 (서열번호 20); 122 ㎕ 물. 이 혼합물을 2개의 시험관에 2 x 98 ㎕로 나누었다. PCR 마스터 믹스 2 x 98 ㎕에, 2 ㎕의 pET_his_MLV_D583N_pD (~1 ng/㎕로 희석됨) 또는 2 ㎕의 pET_his_del_pD (~1 ng/㎕로 희석된)(시작 플라스미드 pET_his_MLV_D583N_pD와 pET_his_del_pD 구축에 대한 상세한 내용은 실시예 1에 기술되어 있음)을 첨가하였다. 순환성 프로토콜은 다음과 같다: 1차 변성 단계 3분간 94℃, 30회 사이클(45초간 94℃, 45초간 53℃, 및 2분간 72℃) 및 최종 연장 5분간 72℃. 증폭 효율은 플라스미드(7873 bp) 2 ng으로부터 증폭된 산물(pET_his_MLV_D583N_pD로부터 MLV_D583N_pD PCR 단편 2702 bp; del_pD PCR 단편 2531 bp) ~5 ㎍ (50 ng/㎕)가 되는 ~7000배였다 .

[0339] 전사 혼합물: 80 ㎕ - 5 x T7 전사 완충액(1 M HEPES-KOH pH 7.6; 150 mM Mg 아세테이트; 10 mM 스퍼미딘; 0.2 M DTT); 56 ㎕ - 112 mM의, 각각의 NTP (Fermentas); 16 ㎕ - 20 u/㎕ T7 RNA 중합효소(Fermentas); 8 ㎕ - 40 u/㎕ RiboLock RNase 저해제(Fermentas); 114 ㎕ 뉴클레아제 비함유수 - 을 제조한 다음, 2개의 시험관에 2 x 165 ㎕로 나누고, 35 ㎕ - 20 ng/㎕의 MLV_D583N_pD PCR 단편(비정제된 PCR 혼합물) 또는 35 ㎕ - 20 ng/㎕의 del_pD PCR 단편(비정제된 PCR 혼합물)을 첨가하였다. 전사는 37℃에서 2시간 수행하였다.

[0340] 2가지 전사 혼합물을 뉴클레아제 비함유성 차가운 물 200 ㎕로 희석하고, 6 M LiCl 용액 200 ㎕를 첨가하였다. 혼합물을 +4℃에서 25분간 인큐베이션한 다음, +4℃에서 25분의 조건으로 냉각중인 원심분리기에서 최대 속도(25,000 g)로 원심분리하였다. 상층액은 버리고, RNA 펠렛을 75%의 차가운 에탄올 500 ㎕로 헹구었다. 다시 시험관을 +4℃에서 5분의 조건으로 냉각중인 원심분리기에서 최대 속도로 원심분리한 다음 상층액을 버렸다. RNA 펠렛을 실온에서 5분간 건조시킨 다음 뉴클레아제 비함유성 차가운 물 400 ㎕에서 +4℃에서 15분간 1400 rpm으로 교반함으로써 재현탁하였다. 용해되지 않은 RNA를 분리하기 위해, 시험관을 다시 +4℃에서 5분의 조건으로 최대 속도로 원심분리하였다. 상층액 약 380 ㎕를, 10x DNase I 완충액(Mg^{2+}) (Fermentas) 42 ㎕; 3 ㎕ - 1 u/㎕ DNaseI (RNase-결핍) (Fermentas)이 들어 있는 새로운 시험관에 옮기고, DNA를 분해시키기 위해 20분간 +37℃에서 인큐베이션하였다. 반응 혼합물을 동일 부피의 Roti® 페놀/클로로포름(ROTH)로 1회, 동일

부피의 클로로포름으로 2회 추출하여, DNase I을 제거하였다. 43 ㎕의 3 M 소듐 아세테이트 pH 5.0 용액과 1075 ㎕의 차가운 96% 에탄올을 각 시험관에 첨가하였다. 마지막으로, -20℃에서 30분간 인큐베이션한 다음 +4℃에서 25분간 최대 속도(25,000g)로 원심분리하여, RNA를 침전시켰다. 상층액은 버리고, RNA 펠렛을 500 ㎕의 75% 차가운 에탄올으로 세정하였다. 시험관을 다시 최대 속도로 +4℃에서 4분 원심분리하고, 상층액을 버렸다. RNA 펠렛을 실온에서 5분 건조한 다음, 150 ㎕의 뉴클레아제 비함유성 차가운 물에 +4℃에서 15분간 교반(1400 rpm)함으로써 재현탁하였다. RNA 용액을 10 ㎕로 나누어 액체 질소에 냉동시켰다. mRNA의 농도는 분광광도측정으로 측정하고, RiboRuler™ RNA Ladder, High Range (Fermentas)를 이용하여 아가로스 젤 상에서 이중 체크하였다.

[0341] 스플린트로서 ddC-Long2 올리고데옥시뉴클레오티드를 이용한 long+ 올리고데옥시뉴클레오티드의 mRNA와의 라이게이션함으로써, mRNA/dsDNA 복합체를 제조하였다. long+의 5' 말단은 T4 폴리뉴클레오티드 키나제(Fermentas)로 이미 인산화되어 있었다. 올리고데옥시뉴클레오티드 ddC-Long2에는, 그것의 본래의 RNA-DNA 기질에 대한 역전사 효소에 의한 3' 말단 연장 가능성을 방지하기 위해, 3' 말단에 변형(ddC)이 가해져 있다.

[0342] 어닐링 믹스 50 ㎕는, 1:20=MLV_D583N_pD (활성형 RT) : del_pD (비활성형 RT) 비율의 정제된 mRNA 혼합물 17 pmol을 4.3배 몰수의 long+과 4.1배 몰수의 ddC-Long2를 뉴클레아제 비함유수 중에서 혼합함으로써, 제조하였다. 이 혼합물을 5분간 70℃에서 인큐베이션한 다음 실온으로 20분간 냉각시켰다. 라이게이션 반응 구성성분들을 첨가하기 전에, 혼합물을 옮겨 2분간 냉강 정치시켰다.

[0343] 5 ㎕의 10x 라이게이션 완충액과 5㎕의 T4 DNA 라이게이즈(5u/㎕)(Fermentas)를 어닐링 혼합물 40 ㎕에 첨가하였다. 음성 라이게이션 반응은 T4 라이게이즈 없이 1 X 라이게이션 완충액내에서 동일한 어닐링 혼합물을 이용하여 수행하였다. 제조된 라이게이션 반응 혼합물을 37℃에서 30분간 인큐베이션하였다. 라이게이션 반응을 정지시키기 위해, 1 ㎕의 0.5M EDTA (pH 8.0)를 양쪽 시험관에 첨가하고, 반응 혼합물을 동일 부피의 Roti® 페놀/클로로포름(ROTH)으로 1회, 그리고 동일 부피의 클로로포름으로 2회 추출한 다음, 진공 농축기 5301(Eppendorf)에서 30℃에서 10분간 반응 산물들을 농축하였다. 탈염은 illiustra ProbeQuant G-50 MicroColumns (GE Healthcare)을 이용하여 수행하였다. 라이게이션 산물의 농도는 아가로스 젤 상에서 RiboRuler™ RNA Ladder, High Range (Fermentas)를 이용하여 측정하였다 - long+/ddC-Long2 올리고데옥시뉴클레오티드 ~0.24 ㎍/㎕에 연결된 mRNA 혼합물(MLV_D583N_pD:del_pD=1:20)(T4 DNA 라이게이즈 첨가된 샘플) 및 long+/ddC-Long2 올리고데옥시뉴클레오티드 ~0.06 ㎍/㎕와의 단순 mRNA 혼합물(T4 DNA 라이게이즈 무첨가 샘플).

[0344] **(4) [α-P^{33}]dATP 병합에 의한 mRNA/dsDNA 복합체의 전반적인 컨트롤.** 제조한 mRNA/dsDNA 복합체(기질)을 역전사 효소에 의한 dTTP (또는 바이오틴-dUTP) 및 이후의 [α-P^{33}]dATP 병합에 대해 테스트하였다. 반응 혼합물 : 16㎕의 5 x 역전사 효소 반응 완충액; 4 ㎕ - 40 u/㎕ RiboLock ™ RNase 저해제(Fermentas); 2 ㎕ [α-P^{33}]dATP (10mCi)/ml, SRF-203 (Hartmann Analytic)); 35 ㎕ 뉴클레아제 결핍된 물; 1 ㎕ - 200 u/㎕ RevertAid™ Minus M-MuLV 역전사 효소 (Fermentas). 제조된 믹스를 2개의 시험관에 2 x 28 ㎕로 나누고, 2 ㎕의 1mM dTTP (Fermentas) 또는 2 ㎕의 1mM 바이오틴-dUTP (Fermentas)를 첨가하였다. 제조되는 혼합물을 시험관 2개에 2 x 15㎕로 나누었다. 첫번째 시험관에, 1.25 ㎕ (~0.3㎍)의 라이게이션 산물 + 3.75 ㎕의 뉴클레아제 결핍된 물을 첨가하였다. 두번째 시험관에는 5 ㎕ (~0.3㎍)의 음성 라이게이션 반응 산물을 첨가하였다. 반응 혼합물을 37℃에서 30분 인큐베이션하였다. 그 후, 1 ㎕의 0.5M EDTA (pH 8.0)를 시험관 모두에 첨가하고, 반응 혼합물을 동일 부피의 Roti® 페놀/클로로포름(ROTH)으로 1회, 동일 부피의 클로로포름으로 2회 추출한 다음, illiustra ProbeQuant G-50 MicroColumns (GE Healthcare) 상에서 정제하였다. 반응 산물을 RiboRuler™ RNA Ladder, High Range (Fermentas)와 함께 아가로스 젤 상에서 분석하였다(도 14A). 샘플 모두(라이게이즈 첨가 및 무첨가된 샘플)에서, 약한 del_pD mRNA 밴드(~2500b)를 볼 수 있다(mRNA 혼합물에 존재하는, 20배 적은 양의 MLV_D583N_pD mRNA ~2700b는 식별할 수 없음). 그 후, 아가로스 젤을 필터지에서 건조시키고, 양성 라이게이션 샘플(라이게이즈 첨가)에서만 방사능 표지된 mRNA/dsDNA 복합체(mRNA와 동일 위치에서)가 검출되었고, 음성 라이게이션 샘플(라이게이즈 무첨가)에서는 그렇지 않았다(도 14B).

[0345] **(5) 바이오틴-dUTP를 이용한, DNA 의존성 DNA 중합효소 활성 선별.**

[0346] 미리 제조한 mRNA/dsDNA 복합체 (mRNA 믹스 MLV_D583N_pD (활성형 RT):del_pD (비활성형 RT)=1:20)를, 합성 WakoPURE system (295-59503 - Wako)을 이용한 시험관내 번역에 사용하였다. WakoPURE system (25 ㎕)용 번

역 혼합물: 12,5 ㎕ - A 용액 (Wako); 5 ㎕ - B 용액 (Wako); 0,5 ㎕ - 40 u/㎕ RiboLock RNase 저해제 (Fermentas); 0.25 ㎕ - 1 M DTT; 1,75 ㎕ 뉴클레아제 비함유수 및 5 ㎕ - 0.24 ㎍/㎕ mRNA/dsDNA 기질 (~1200 ng). 시험관내 번역을 37℃에서 120분간 수행하였다.

[0347] 번역(~25 ㎕)은 155 ㎕의 차가운 정지 완충액 WBK_{500}+DTT+트리톤 (50 mM 트리스-아세테이트 pH 7.5, 25℃; 50 mM NaCl; 50 mM Mg-아세테이트; 500 mM KCl; 10 mM DTT; 0.1% (v/v) - 트리톤 X-100 (T8787 - Sigma)) 을 첨가하여 정지시키고, 5분간 +4℃에서 25,000 g로 원심분리하였다. 원심분리한 번역 혼합물 160 ㎕를, 매우 조심스럽게 WBK_{500}+DTT+트리톤 X-100(50 mM 트리스-아세테이트 pH 7.5, 25℃; 50 mM NaCl; 50 mM Mg-아세테이트; 500 mM KCl; 10 mM DTT; 0.1% (v/v) - 트리톤 X-100 (T8787 - Sigma); 35% (w/v) - 슈크로스 (84097 - Fluka)) 중의 840 ㎕의 35% (w/v) 슈크로스 용액 상부에서 투명한 1 ml 초원심분리관(343778 - Beckman)으로 이동시켰다. mRNA/dsDNA-리보솜-단백질(tRNA)로 이루어진 3중 복합체(TC)를, TL-100 Beckman 초원심분리기 TLA100.2 고정각 로터(Beckman)에서 100,000 rpm으로 9분간 +4℃로 초원심분리하여 정제하였다. 먼저, 용액 750 ㎕를 원심분리관 최상부에서 취하였다. 그런 후, 시험관 벽을 750 ㎕의 WBK_{500} (50 mM 트리스-아세테이트 pH 7.5, 25℃; 50 mM NaCl; 50 mM Mg-아세테이트; 500 mM KCl)으로 헹구었다(매우 조심스럽게 초원심분리관 바닥에 작고 투명한 TC 펠렛을 온전하게 유지시킴). 마지막으로, 원심분리관의 최상부에서부터 시작하여 용액을 모두 제거하고, 펠렛을 차가운 정지 완충액 WBK_{500}+DTT+트리톤 (50 mM 트리스-아세테이트 pH 7.5, 25℃; 50 mM NaCl; 50 mM Mg-아세테이트; 500 mM KCl; 10 mM DTT; 0.1% (v/v) - 트리톤 X-100 (T8787 - Sigma)) 30 ㎕에 용해하였다.

[0348] 초원심분리 후 방사성 표지된 mRNA를 이용하여 측정된 바와 같이, 투입 mRNA의 5% - 30%는 3중 복합체 펠렛에 위치되어 있다. 따라서, 30 ㎕의 완충액(3중 복합체 ~12 ng/㎕ 또는 9 x 10^9 molecules/㎕)내의 mRNA가 360 ng 이하(번역 반응에 사용된 mRNA 1200 ng에 대해 30%)로 예측되었다.

[0349] 변형 뉴클레오티드의 병합 반응 믹스를, 5 x 역전사 효소 반응 완충액(Fermentas) 5 ㎕; 1.25 ㎕ - 40 u/㎕ RiboLock RNase 저해제(Fermentas); 2.5 ㎕ - 1mM 바이오틴-dUTP (Fermentas); 40.95 ㎕ 뉴클레아제 비함유수 및 0.3 ㎕의 정제된(<2.7 x 10^9 개의 분자) TC를 혼합하여, 얼음 위에서 준비하였다. 프로토콜에 따라, 뉴클레오티드 병합 반응 믹스 50 ㎕에는 <2.7 x 10^9개 분자의 3중 복합체가 포함된다.

[0350] 오일-계면활성제 혼합물은, ABIL EM 90(Goldschmidt)을 미네랄 오일(M5904 - Sigma)에 최종 농도 4% (v/v)로 혼합함으로써 준비하였다(Ghadessy and Holliger, 2004; US2005064460). 오일-계면활성제 혼합물 950 ㎕를 RT 혼합물 50 ㎕와 혼합하여, 에멀젼을 5 ml 극저온용 바이얼에서 +4℃에서 준비하였다. 혼합은 ~2100 rpm로 속도 조절하여 MS-3000 자기 교반기(Biosan); Rotilabo®- (3x8 mm) 마그네틱 막대 및 센터 고리(1489.2 - Roth)를 이용하여 수행하였고, 30초마다 10 ㎕ 분액씩 수상을 첨가하고, 2분 이상(총 혼합 시간 - 4분) 계속 혼합하였다. 광학현미경 데이타에 따르면, 제조되는 에멀젼내 구획물의 크기는 0.5 ㎛ - 10 ㎛로 다양하고, 평균 직경은 ~2 ㎛이었다. 따라서, 역전사 반응 혼합물 50 ㎕을 에멀젼화한 후, 유중수 구획이 ~1 x 10^{10}개 형성되며, 3중 복합체의 분자 수는 2.7 x 10^9 이하(구획 3-4개 당 mRNA-dsDNA 복합체 및 역전사 효소 분자는 약 1개)인 것으로 예상되었다.

[0351] 제조된 에멀젼은 37℃에서 30분간 인큐베이션하였다.

[0352] 에멀젼으로부터 반응 혼합물을 회수하기 위해, 20 ㎕의 0.1M EDTA를 에멀젼에 첨가하여 10초간 교반한 다음 50 ㎕ 페놀/클로로포름 믹스를 첨가하고 다시 10초 교반하였다. 그 후, 에멀젼을 1.5 ml 원심분리관으로 옮기고, 포화 에테르 수용액 0.5 ml을 첨가하여 볼텍싱에 의해 혼합하고, 실온에서 10분간 16,000g로 원심분리하였다. 오일-에테르 상을 제거하고, 시험관 바닥에 농축된(그러나 여전히 온전한) 에멀젼을 남겨두었다. 마지막으로, 에멀젼을, 9 ml 포화 에테르 수용액; 0.9 ml 포화 에틸아세테이트 수용액(ABIL EM 90 용제를 제거하기 위함) 및 다시 0.9 ml 포화 에테르 수용액으로 2번 추출하여, 파괴하였다. 수상을 실온에서 진공 하에 12분 건조한 후, illiustra ProbeQuant G-50 MicroColumns (GE Healthcare) 사어에서 병합된 뉴클레오티드를 제거하였다. 반응 혼합물의 2 ㎕ 분액은 직접 RT 반응용으로 남겨두고(스트렙타비딘 비드 정제 안함), 용액의 나머지는 Dynabeads M-280 스트렙타비딘 비드 (DYNAL Biotech) 상의 바이오틴화된 mRNA/dsDNA 복합체 고정용으로 사용하였다.

[0353] Dynabeads® kilobase BINDER™ 키트(DYNAL Biotech)를, 제품 설명서에 따라 바이오틴화된 mRNA-dsDNA 복합체의 분리에 사용하였다. 재현탁한 Dynabead 5 ㎕를 1.5 ml 원심분리관에 옮겨, 키트에 제공되는 결합 용액 20 ㎕로 헹구었다. 이 시험관을 1-2분 동안 비드가 시험관 바닥에 고정될 때까지 자석 위에 둔 다음, 용액을 제거하였다. 비특이 mRNA 결합을 최소화하기 위해, tRNA (효모 유래 tRNA(Roche)) 수용액(1 ㎍/㎕) 1 ㎕와 결합 용액 50 ㎕에 Dynabead를 파이펫으로 조심스럽게 이동시켜, 재현탁하였다. 결합 용액 중의 Dynabead 50 ㎕를, 바이오틴화된 RNA-DNA 단편이 포함된 용액(~50 ㎕)에 첨가하였다. 이 시험관을 터모믹서(Eppendorf)에서 1시간 +22℃에서 교반하면서 인큐베이션하였다. mRNA/dsDNA의 결합 후, 비드로부터 상층액을 제거하고, 비드를, +22℃에서 5분간 교반(1400 rpm)하면서 50 ㎕의 세정 용액(키트에 구비)으로 2번, 그리고 +22℃에서 12분간 교반(1400 rpm)하면서 세정 용액 50 ㎕으로 1번 세정하였다. 바이오틴화된 mRNA/dsDNA 복합체가 고정된 수집한 Dynabead를 역전사 반응 혼합물에 재현탁하였다.

[0354] 선별된 mRNA/dsDNA 복합체에 대한 역전사 반응 혼합물을 얼음 위에서 준비하였다: 12 ㎕ - 5 x 역전사 효소 반응 완충액(Fermentas); 6 ㎕ - 10 mM dNTP (Fermentas); 1.5 ㎕ - 40 u/㎕ RiboLock RNase 저해제 (Fermentas); 0,3 ㎕ - 20 μM pD_42 올리고뉴클레오타이드 (서열번호 8); 1,5㎕ RevertAid™ Minus M-MuLV 역전사 효소(200 u/㎕)(Fermentas); 35.7 ㎕ 뉴클레아제 비함유수. 제조한 믹스를 3개 19 ㎕ 분액으로 나누고, 한개를 이용하여 바이오틴화된 mRNA/dsDNA 복합체가 고정된 Dynabead를 재현탁하고, 다른 19 ㎕ 분액을 스트렙타비딘 비드 정제하지 않고 둔 연장시킨 mRNA/dsDNA 복합체 샘플이 든 시험관에 옮기고, 나머지 19 ㎕ 분액에는 뉴클레아제 비함유수 1 ㎕를 첨가하였다(음성 반응 대조군 - 반응 혼합물이 오염되어 있지 않음을 입증하기 위함). 반응 혼합물은 모두 터모믹서(Eppendorf)에서 1시간 동안 +42℃에서 교반(1000 rpm)하면서 인큐베이션하였다.

[0355] cDNA의 증폭은 네스티드 PCR로 수행하였다. 처음 PCR 혼합물: 10 ㎕ - 10X Taq 완충액 + KCl (Fermentas); 10 ㎕ - 2 mM의 각 dNTP (Fermentas); 6 ㎕ - 25 mM $MgCl_2$ (Fermentas); 2 ㎕ - 1 u/㎕ LC (재조합) Taq DNA 중합효소(Fermentas); 1 ㎕ - 2,5 u/㎕ *Pfu* DNA 중합효소(Fermentas); 0.5 ㎕ - 100 μM RD_Nde 프라이머 (서열번호 9); 0.5 ㎕ - 100 μM pD_55 프라이머 (서열번호 10); 65 ㎕ 물 - 을 얼음 위에서 준비한 다음, 혼합물을 19 ㎕씩 5개(5 x 19 ㎕)로 나누었다. 3x 19 ㎕의 PCR 마스터 믹스에 1 ㎕의 cDNA (1-3번 RT 샘플)를 첨가하고, 19 ㎕의 PCR 마스터 믹스이 든 시험관 1개에는 1 ㎕의 물을 첨가하였다(음성 PCR 대조군). 양성 PCR 대조군으로는, 1 ㎕의 pET_his_MLV_pD 플라스미드(~1ng)를 첨가하였다. 순환성 프로토콜은 다음과 같다: 1차 변성 단계 3분간 94℃, 30회 사이클(45초간 94℃, 45초간 58℃, 및 3분간 72℃) 및 최종 연장 5분간 72℃.

[0356] (RT 샘플내 MLV_D583N_pD:del_pD cDNA 비율을 더 명확하게 확인하기 위해) 부분 유전자 증폭을 위한 네스티드 PCR 혼합물: 28 ㎕ - 10X Taq 완충액 + KCl (Fermentas); 20 ㎕ - 10X Taq 완충액 + KCl (Fermentas); 20 ㎕ - 2 mM의, 각 dNTP (Fermentas); 12 ㎕ - 25 mM $MgCl_2$ (Fermentas); 0.9 ㎕ - 5 u/㎕ *Taq* DNA 중합효소 (Fermentas); 1.0 ㎕ - 100 μM M_F 프라이머 (서열번호 11); 1.0 ㎕ - 100 μM M_2R 프라이머 (서열번호 12); 135.1 ㎕ 물 - 을 얼음 위에서 준비한 다음, 혼합물을 5 x 38 ㎕로 나누었다. 1차 PCR (프라이머 세트 RD_Nde//pD_55) 산물 2 ㎕을 제조한 네스티드 PCR 혼합물에 첨가하였다. 마스터 믹스를 다시 혼합하고, 30회 또는 35회 PCR 사이클 증폭을 위해 시험관 2개(2 x 20 ㎕)에 나누었다. 순환성 프로토콜은 다음과 같다: 1차 변성 단계 3분간 94℃, 30회 또는 35회 사이클(45초간 94℃, 45초간 57℃, and 1 min at 72℃) 및 최종 연장 3분간 72℃. PCR 단편의 예상 길이는 MLV_D583N_pD의 경우 907 bp이고 del_pD의 경우 736 bp이었다. 증폭은, 웰 당 PCR 믹스 10 ㎕를 로딩한 1% 아가로스 젤에서 분석하였다(도 15).

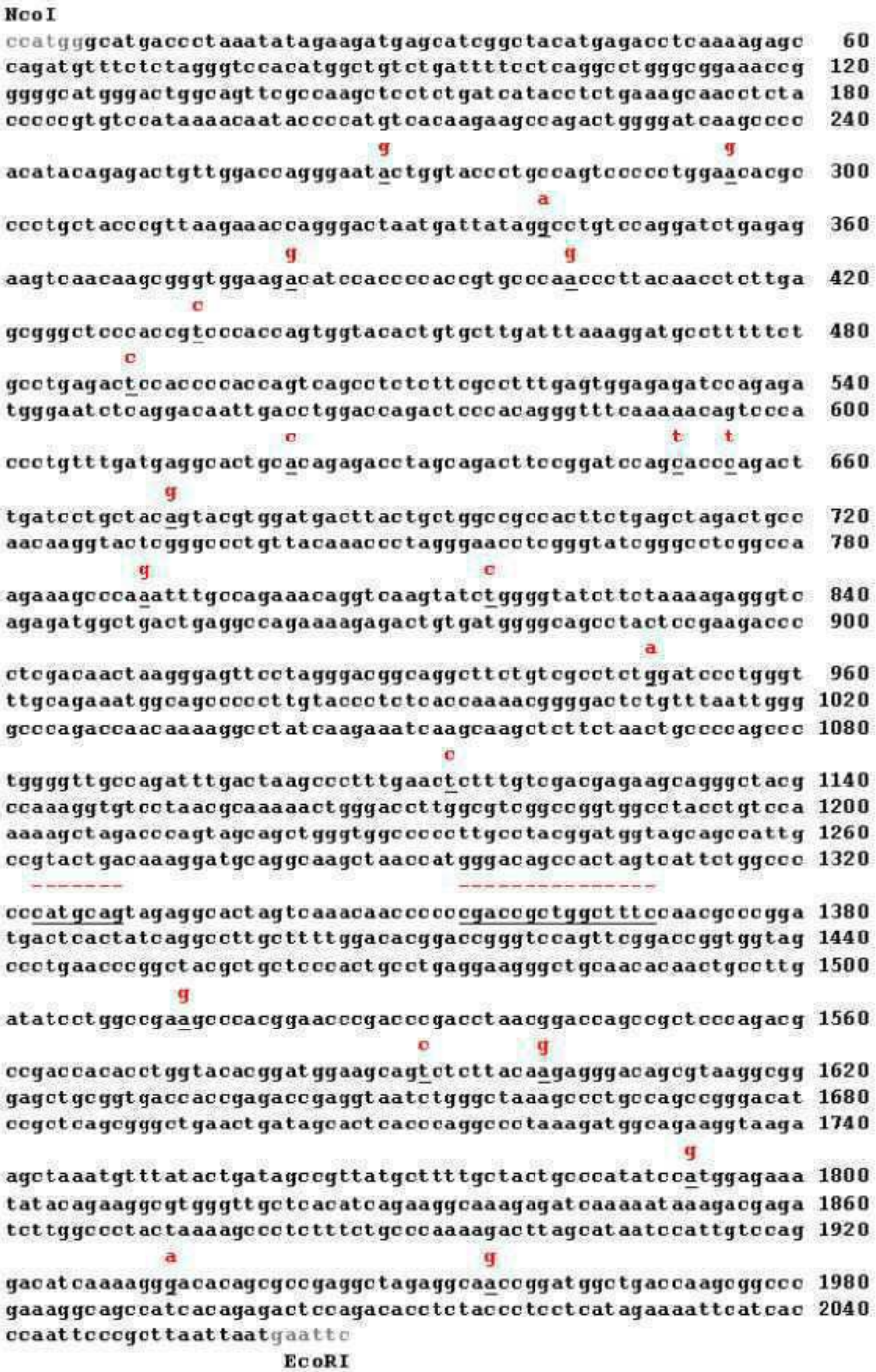
[0357] **결과**

[0358] 1. 이중 가닥(dsDNA) 어댑터를 T4 DNA 라이게이즈를 이용하여 mRNA에 성공적으로 연결하였다. 라이게이션 효율은 dsDNA-바이오틴 어댑터의 라이게이션에 의해 측정한 바에 따라 약 60%였다. mRNA/dsDNA 복합체를 스트렙타비딘 비드 상에서 특이적으로 정제하여, 바이오틴 표지된 기질과 바이오틴 표지되지 않은 기질을 구별하는 기회를 제공할 수 있다. 유리형 mRNA는 mRNA/dsDNA에 비해 DNA 의존성 DNA 중합효소에 대해 훨씬 더 좋지 않은 기질이다. 결과적으로 mRNA에 대한 dsDNA의 라이게이션 효율 60%는 충분히 우수하며, 이 기질은 생성 공정에 성공적으로 사용될 수 있다.

[0359] 2. mRNA/dsDNA 복합체(mRNA 혼합물 MLV_D583N_pD:del_pD=1:20)를 이용한 광범위한 선별 실험을 수행하였다. 시험관내 번역은 WakoPURE 단백질 번역 시스템을 이용하여 수행하였고, 구획화된, dsDNA에 대한 바이오틴-dUTP 병합 반응을 수행하여, 비활성형 효소를 코딩하는 유전자(del_pD)에 비해 활성형 역전사 효소를 코딩하는 유전

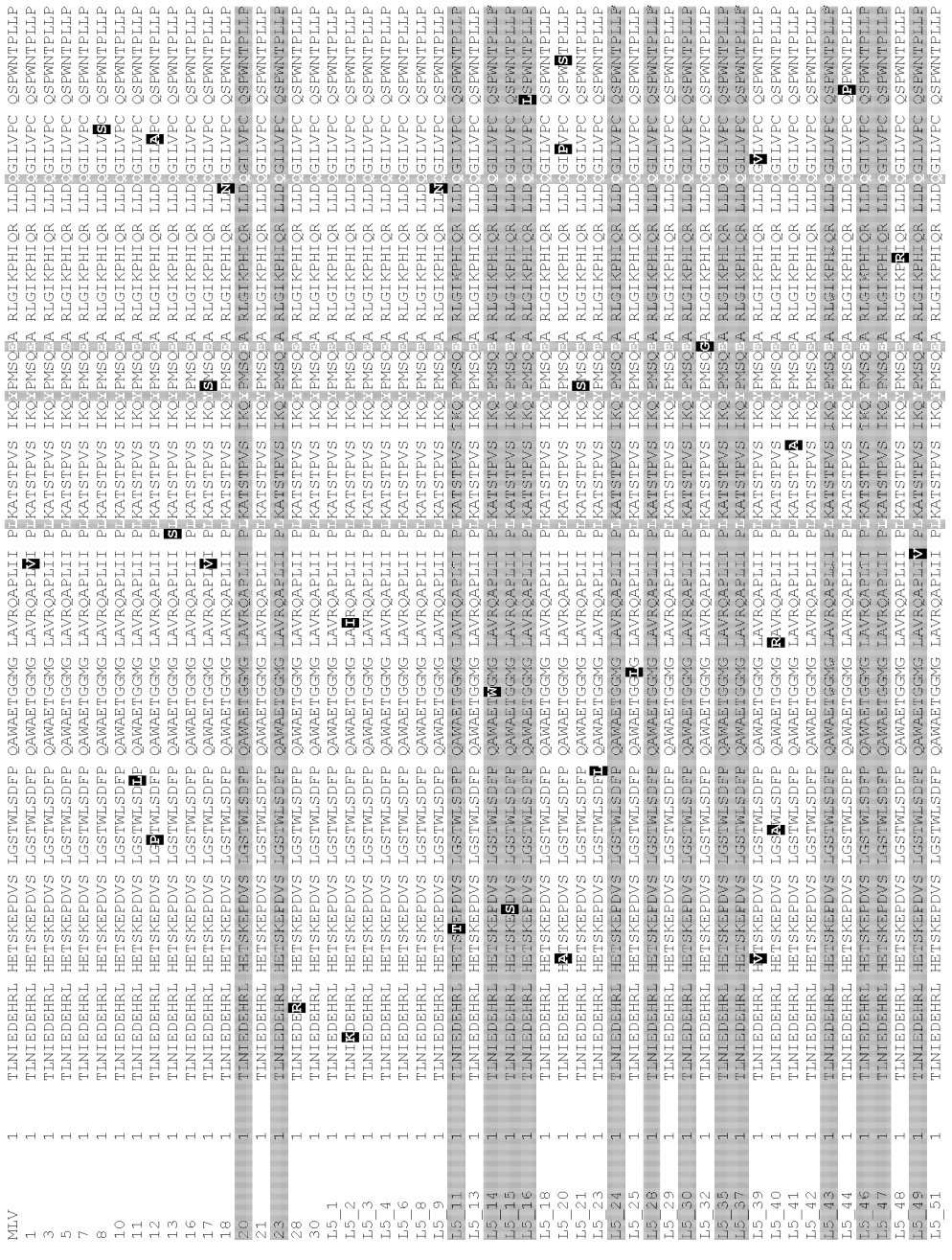
자(MLV_D583N_pD)의 농화를 입증하였다. 선별 공정(도 12)에 따르면, 바이오틴-dUTP의 병합 반응은 활성형(MLV_D583N_pD) 역전사 효소를 포함하는 수계 구획에서만 이루어져, mRNA/dsDNA 복합체의 바이오틴화가 이루어져야 한다. DNA 의존성 DNA 중합효소는, 자석 비드 상에 고정된 스트렙타비딘에 바이오틴화된 복합체의 결합에 의해 선택한 다음, RT-PCR로 선별된 유전자를 증폭시킨다. (MLV_D583N_pD 역전사 효소에 대한 RT-PCR 단편 경우) 활성형 효소를 코딩하는 유전자는 비활성형 효소를 코딩하는 유전자 보다 농화되었다(도 15). 유전자 MLV_D583N_pD:del_pD의 초기 비율은 1:20이었으며, (농화 후) 최종 비율은 ~1:1이었다. 각각 이러한 특별한 실험에서 농화 인자는 ~20배였다. 여러가지 실험들에서 계산된 농화 인자는 5 내지 200으로 범위가 다양하였다. DNA 의존성 DNA 중합효소는 구획화된 리보솜 디스플레이(CDR)를 적용하여 변형 뉴클레오티드 병합용으로 선별될 수 있다는 것이 확인되었다. 일반적인 DNA 의존성 DNA 중합효소의 선별을 바로 수행할 수 있다. 바이오틴-dUTP는 3'에 변형이 있는 뉴클레오티드 유사체 등의 여러가지 대상 뉴클레오티드 유사체로 교체할 수 있다. 이들 뉴클레오티드 유사체가 DNA 가닥에 병합된 후, 3' 말단은 블록킹되며, 연장되지 않으며, 연장 반응은 종결될 것이다. 이러한 방법은 합성에 의한 서열분석(SBS) 방법에 사용되며, SBS에 적합한 DNA 중합효소를 구획화된 리보솜 디스플레이(CRD) 기법을 이용하여 쉽게 생성시킬 수 있다.

[0360] 부록 1



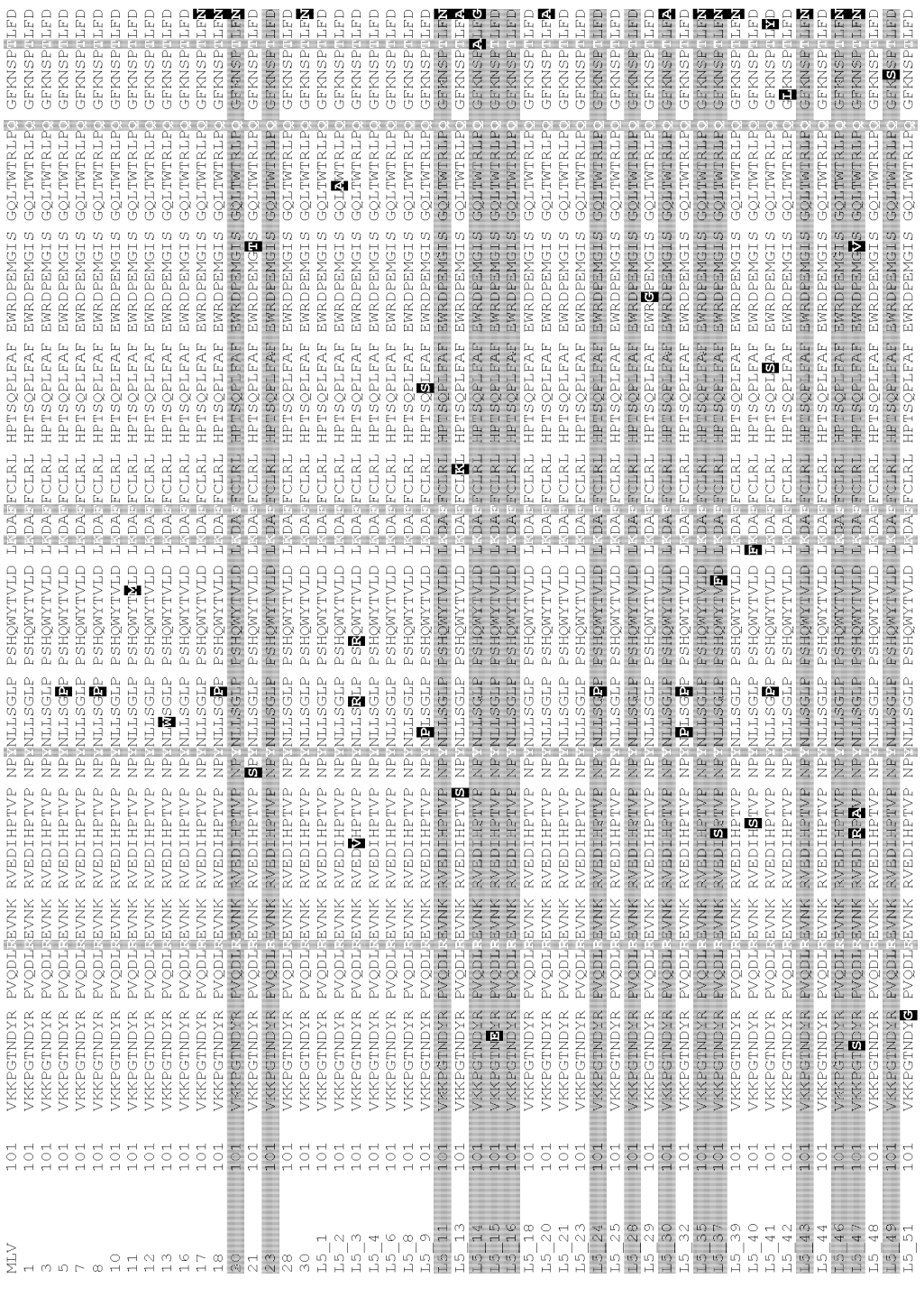
[0361]

[0362] 부록 2

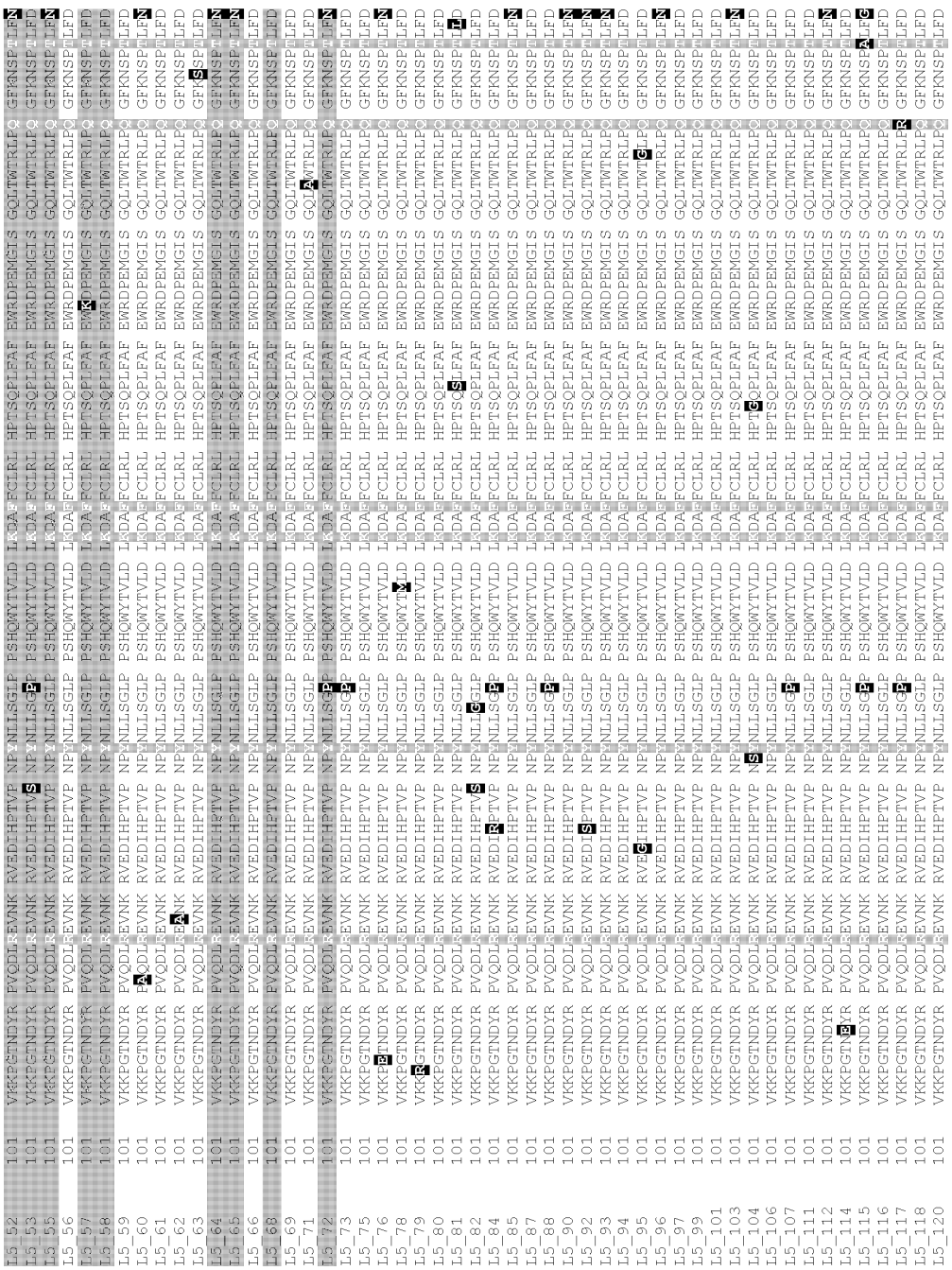


[0363]

[0364]

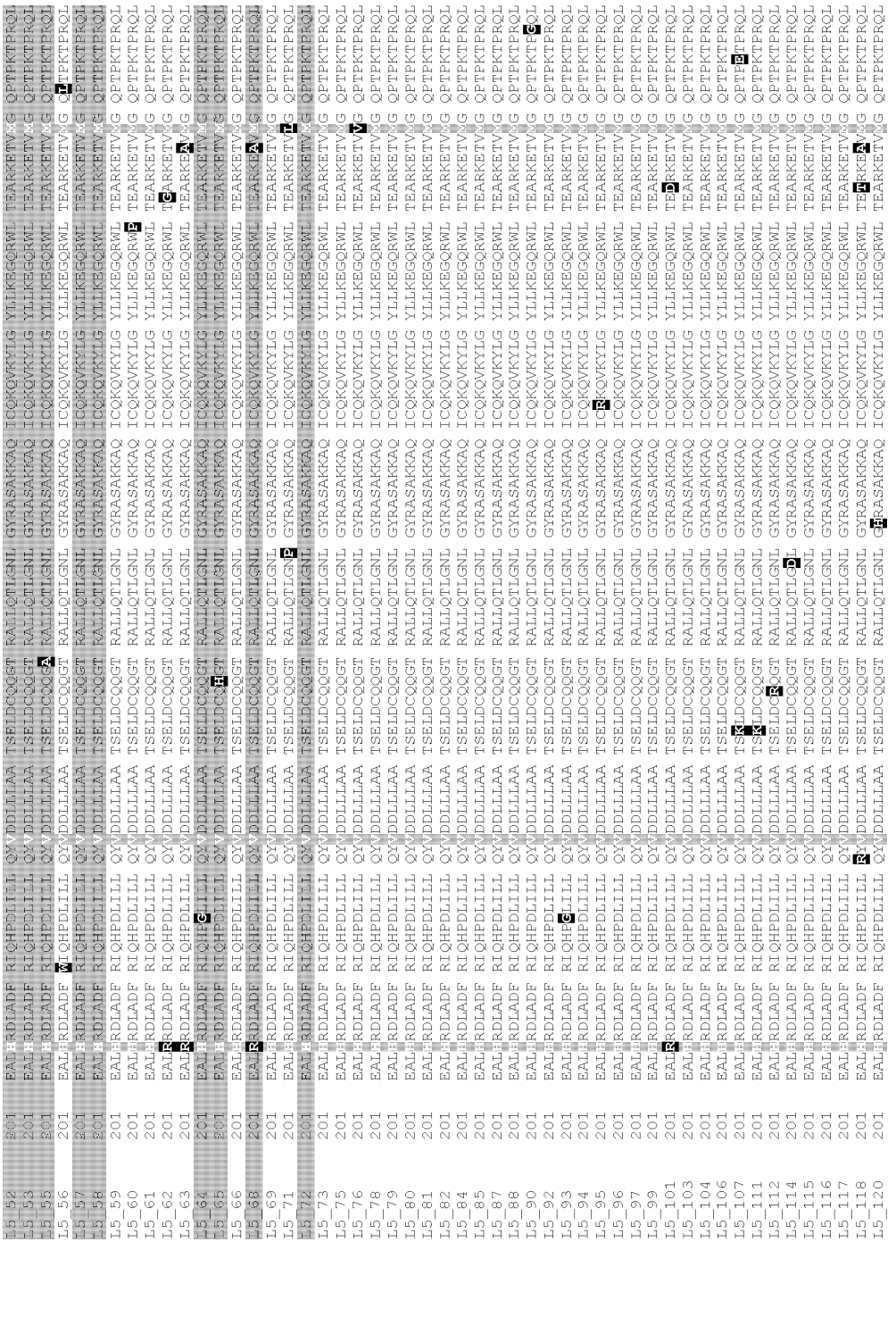


[0365]



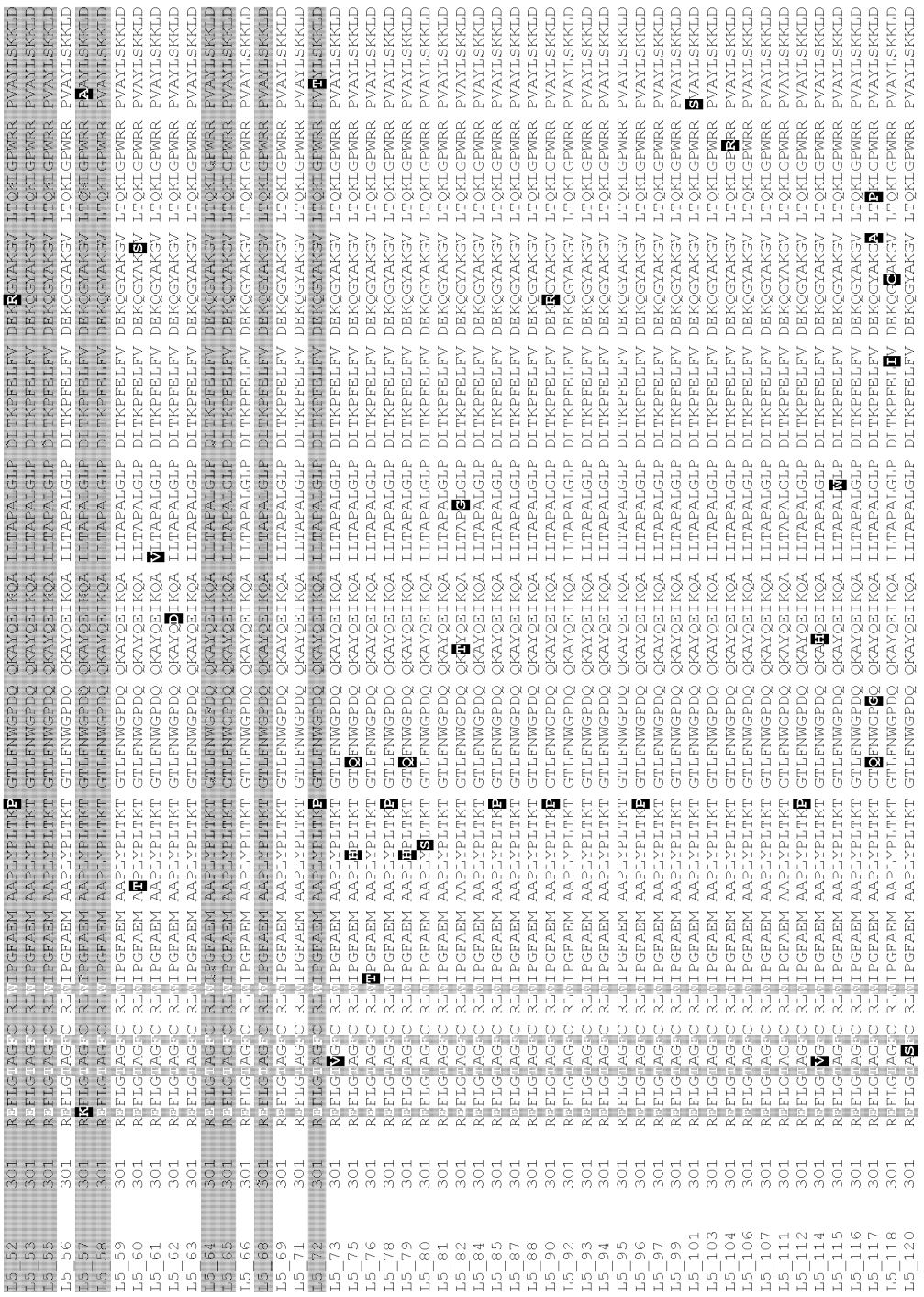
[0366]

[0367]

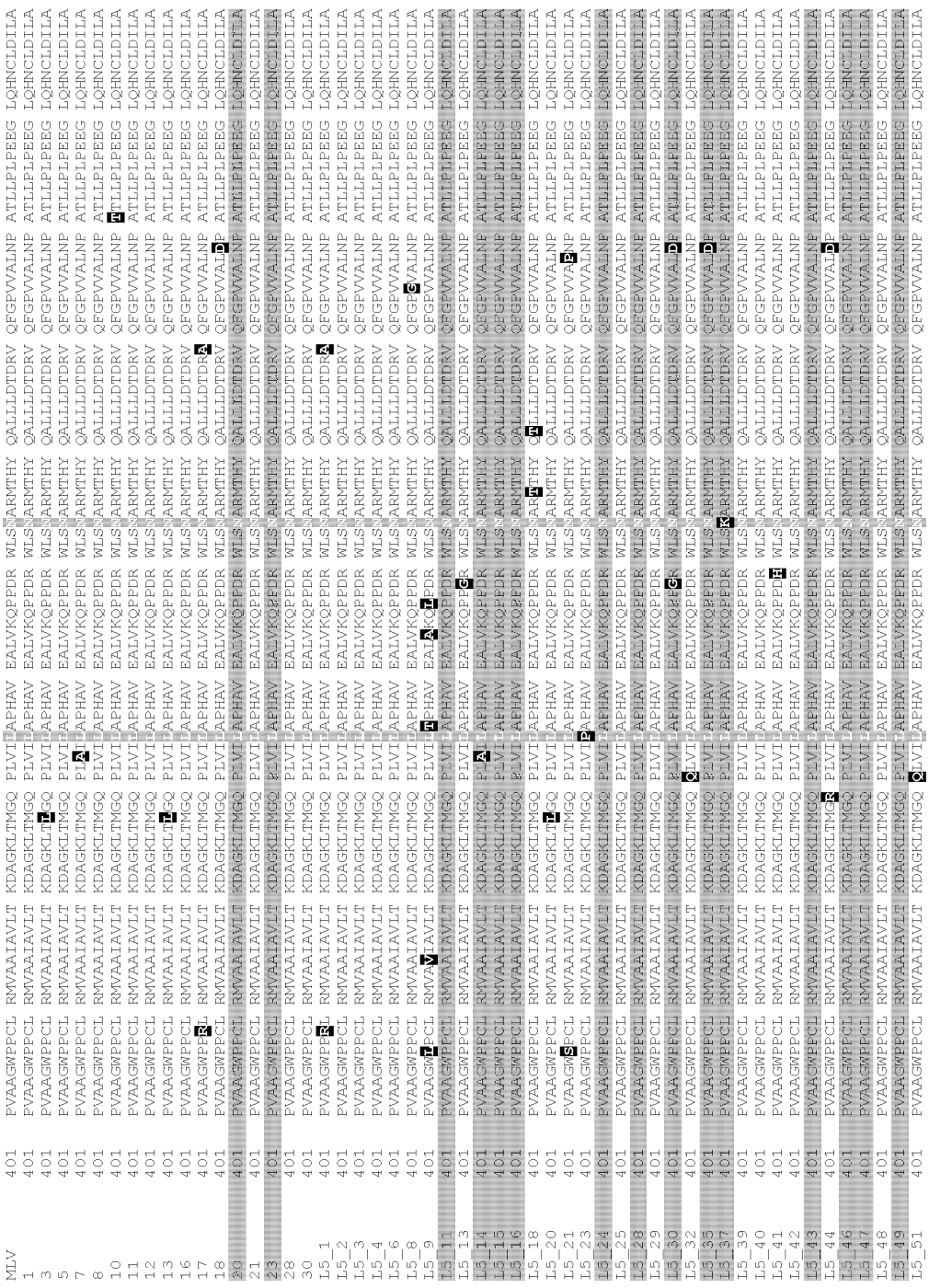


[0368]

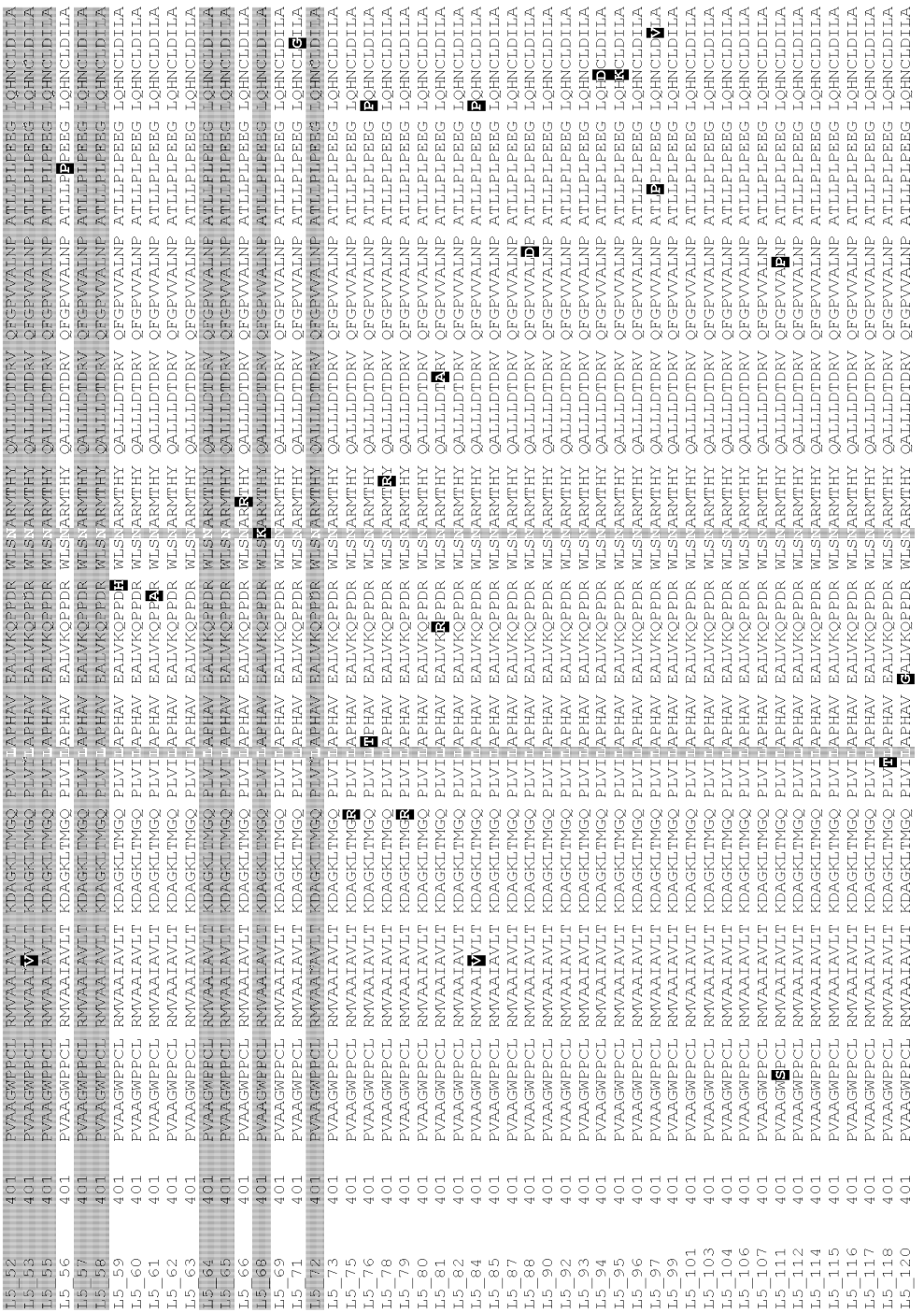
[0369]



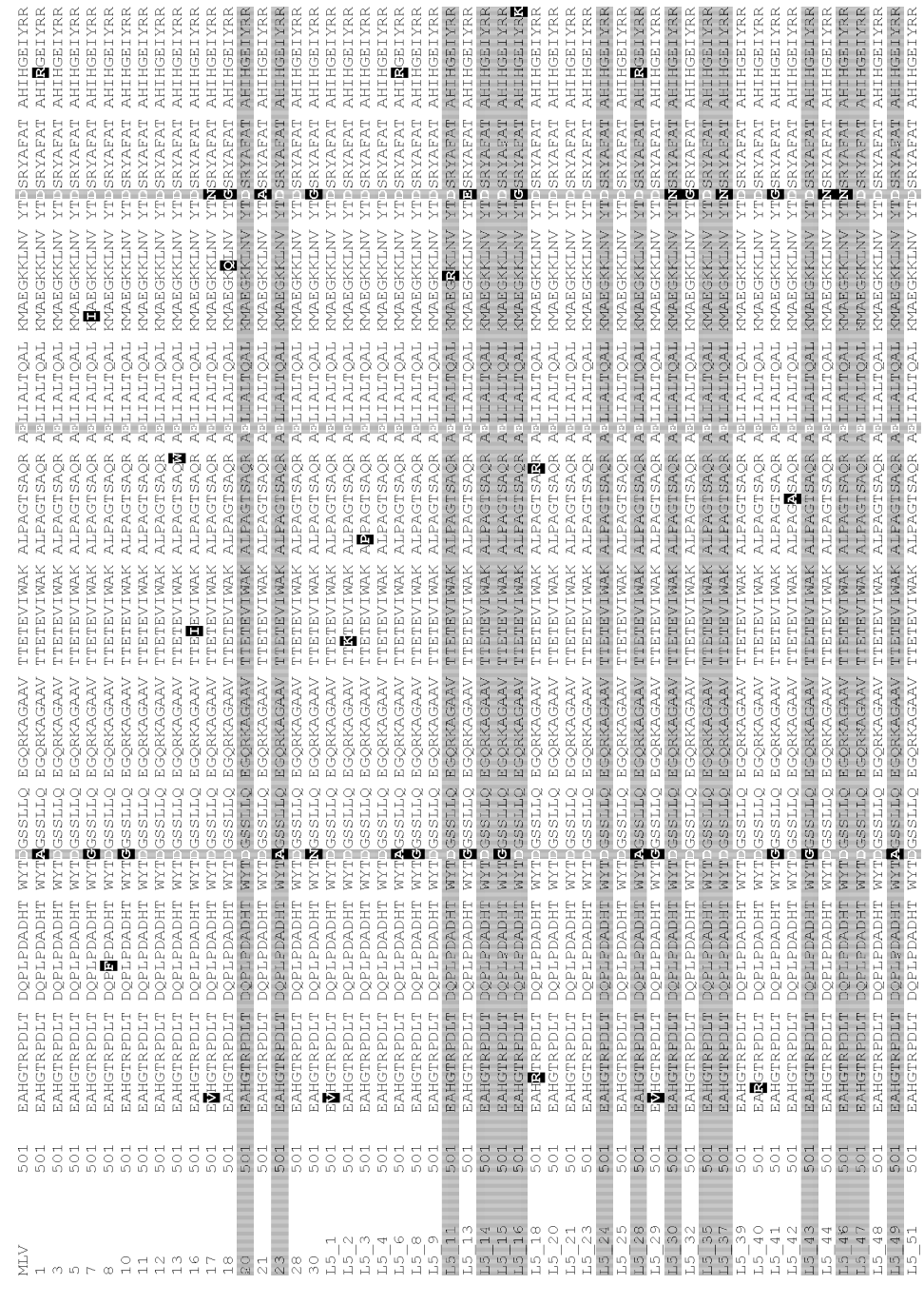
[0370]



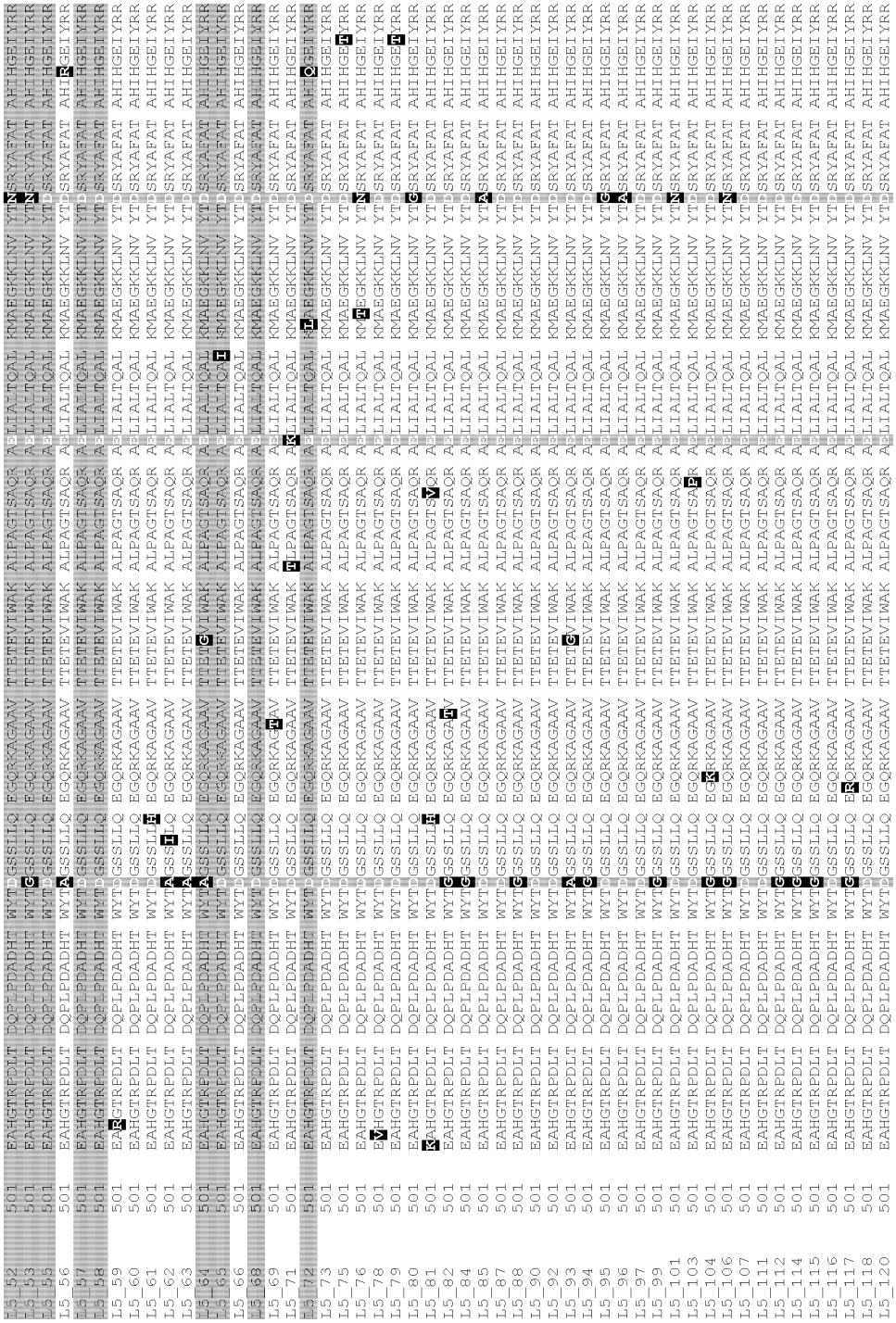
[0371]



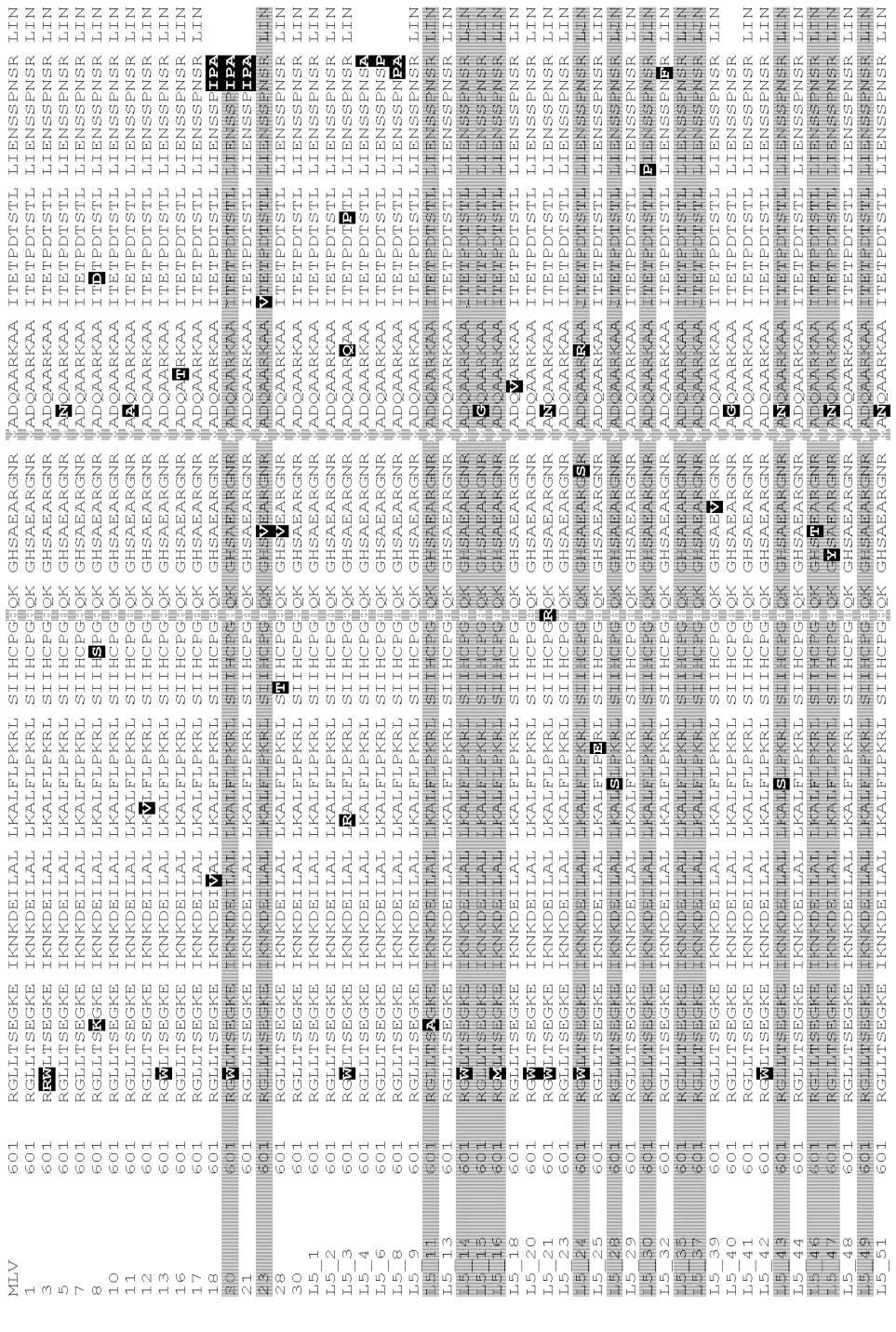
[0372]



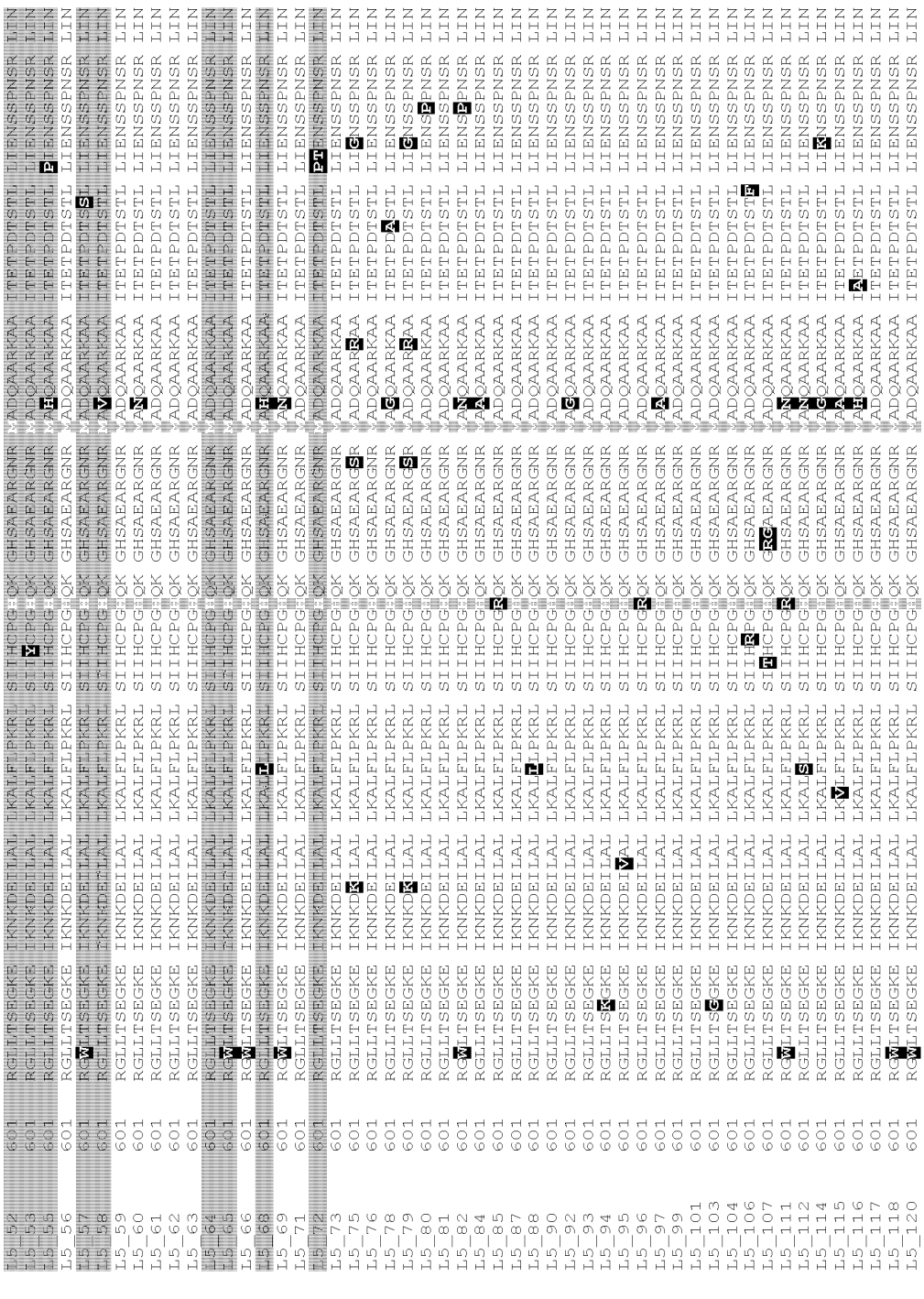
[0373]



[0374]



[0375]



[0376]

[0377] 부록 3

[0378]

L5_9	12 mutations,	83D->N, 135L->P, 166P->S, 214H->R, 222Y->C, 293T->A, 344Y->H, 407P->L, 415A->V, 436A->T, 444V->A, 447P->L
18	11 mutations,	83D->N, 139L->P, 200D->N, 330T->P, 479N->D, 577K->Q, 583D->G, 618L->V, 678N->I, 679S->P, 680R->A
L5_79	10 mutations,	74I->T, 104P->R, 325Y->H, 333L->Q, 430Q->R, 597I->T, 616E->K, 649N->S, 658K->R, 673E->G
L5_82	10 mutations,	26L->P, 130P->S, 137S->G, 343A->T, 356A->G, 524D->G, 539A->T, 603L->W, 653D->N, 676S->P
L5_117	10 mutations,	14S->P, 95N->S, 139L->P, 190Q->R, 333L->Q, 339D->G, 380V->A, 383Q->P, 524D->G, 532G->R
21	9 mutations,	131N->S, 179I->T, 204H->R, 323P->L, 353T->A, 583D->A, 678N->I, 679S->P, 680R->A
L5_3	9 mutations,	125L->V, 138G->R, 143H->R, 380V->A, 552L->P, 603L->W, 622K->R, 658K->Q, 668S->P
L5_20	9 mutations,	12E->A, 87L->P, 95N->S, 200D->A, 221Q->R, 242A->T, 331G->E, 428M->L, 603L->W
L5_75	9 mutations,	11H->Y, 325Y->H, 333L->Q, 430Q->R, 597I->T, 616E->K, 649N->S, 658K->R, 673E->G
L5_76	9 mutations,	66M->L, 105G->E, 200D->N, 289M->V, 314I->T, 436A->T, 491L->P, 573A->T, 583D->N
8	8 mutations,	89P->S, 139L->P, 287T->A, 330T->P, 514L->F, 607E->K, 635C->S, 663E->D
L5_13	8 mutations,	130P->S, 159R->K, 200D->A, 221Q->R, 330T->P, 449D->G, 524D->G, 583D->E
L5_41	8 mutations,	60S->A, 139L->P, 168F->S, 199F->Y, 346E->D, 450R->H, 524D->G, 583D->G
L5_68	8 mutations,	39M->V, 49I->V, 91Q->R, 204H->R, 287T->A, 454N->K, 625F->L, 653D->H
L5_72	8 mutations,	139L->P, 200D->N, 330T->P, 393A->T, 572M->L, 594H->Q, 671L->P, 672I->T
L5_114	8 mutations,	17P->S, 108D->E, 249N->D, 307A->V, 344Y->H, 524D->G, 653D->G, 673E->K
L5_115	8 mutations,	8H->P, 139L->P, 197T->A, 200D->G, 358G->W, 524D->G, 623A->V, 653D->A
17	7 mutations,	49I->V, 65P->S, 200D->N, 409C->R, 470V->A, 502A->V, 583D->N
L5_15	7 mutations,	17P->S, 108D->E, 249N->D, 307A->V, 344Y->H, 524D->G, 653D->G
L5_21, L5_111	7 mutations,	65P->S, 233E->K, 407P->S, 478L->P, 603L->W, 638H->R, 653D->N
L5_40	7 mutations,	24T->A, 41L->R, 127P->S, 151L->F, 330T->P, 503H->R, 653D->G
L5_47	7 mutations,	107N->S, 126H->R, 128T->A, 179I->V, 200D->N, 642H->Y, 653D->N
L5_71	7 mutations,	97P->S, 184T->A, 250L->P, 289M->L, 497D->G, 551A->T, 562E->K
L5_78	7 mutations,	11H->R, 148V->M, 330T->P, 459H->R, 502A->V, 653D->G, 667T->A
L5_81	7 mutations,	166P->S, 199F->L, 446Q->R, 468D->A, 501E->K, 530Q->H, 558A->V
L5_118	7 mutations,	221Q->R, 283A->T, 287T->A, 369F->I, 376Y->C, 434I->T, 603L->W
13	6 mutations,	51P->S, 136L->W, 207L->P, 428M->L, 560R->W, 603L->W
L5_30	6 mutations,	200D->A, 330T->P, 449D->G, 479N->D, 583D->N, 671L->P
L5_32	6 mutations,	69E->G, 135L->P, 139L->P, 431P->Q, 583D->G, 679S->F
L5_43, L5_112	6 mutations,	200D->N, 237Q->R, 330T->P, 524D->G, 625F->S, 653D->N
L5_53	6 mutations,	130P->S, 139L->P, 417A->V, 524D->G, 583D->N, 634H->Y
L5_56	6 mutations,	8H->P, 211R->W, 292P->L, 486L->P, 524D->A, 594H->R
L5_57	6 mutations,	49I->V, 173R->K, 302E->K, 392V->A, 603L->W, 669T->S
L5_60	6 mutations,	112V->A, 200D->N, 280L->P, 322A->T, 379G->S, 653D->N
L5_62	6 mutations,	118V->A, 204H->R, 282E->G, 346E->D, 524D->A, 528L->I
L5_84	6 mutations,	126H->R, 139L->P, 417A->V, 491L->P, 524D->G, 653D->A
L5_95	6 mutations,	124D->G, 187R->G, 263Q->R, 494N->K, 583D->G, 618L->V
L5_107	6 mutations,	139L->P, 233E->K, 295K->E, 633I->T, 642H->R, 643S->G

16	5 mutations,	241R->Q, 259A->T, 311R->H, 544T->I, 656A->T
20	5 mutations,	200D->N, 603L->W, 678N->I, 679S->P, 680R->A
23	5 mutations,	221Q->R, 332T->I, 524D->A, 644A->V, 661I->V
L5_2	5 mutations,	5E->K, 43V->I, 184T->A, 391P->L, 543E->K
L5_14	5 mutations,	37G->W, 197T->A, 200D->G, 433V->A, 603L->W
L5_18	5 mutations,	457M->T, 462A->T, 504G->R, 559Q->R, 655A->V
L5_23	5 mutations,	30P->L, 223V->M, 388W->R, 390R->W, 435L->P
L5_24	5 mutations,	139L->P, 221Q->R, 603L->W, 649N->S, 658K->R
L5_28	5 mutations,	306T->A, 309F->S, 524D->A, 594H->R, 625F->S
L5_37	5 mutations,	126H->S, 149L->F, 200D->N, 454N->K, 583D->N
L5_49, L5_63	5 mutations,	50I->V, 194N->S, 204H->R, 287T->A, 524D->A
L5_55	5 mutations,	5E->K, 200D->N, 240T->A, 653D->H, 671L->P
L5_69	5 mutations,	14S->T, 49I->T, 538A->T, 603L->W, 653D->N
L5_88	5 mutations,	70A->V, 139L->P, 479N->D, 524D->G, 625F->L
L5_101	5 mutations,	65P->S, 204H->R, 283A->D, 391P->S, 583D->N
L5_104	5 mutations,	132P->S, 164S->G, 388W->R, 524D->G, 533Q->K
3	4 mutations,	221Q->R, 428M->L, 602G->R, 603L->W
5	4 mutations,	139L->P, 283A->D, 358G->V, 653D->N
7	4 mutations,	204H->R, 433V->A, 524D->G, 572M->I
11	4 mutations,	29F->L, 148V->M, 390R->W, 653D->A
12	4 mutations,	23S->P, 88V->A, 237Q->R, 623A->V
30	4 mutations,	200D->N, 306T->M, 524D->N, 583D->G
L5_1	4 mutations,	249N->D, 409C->R, 470V->A, 502A->V
L5_6	4 mutations,	287T->A, 524D->A, 594H->R, 680R->P
L5_8	4 mutations,	475V->G, 524D->G, 679S->P, 680R->A
L5_11	4 mutations,	15K->T, 200D->N, 576K->R, 607E->A
L5_16	4 mutations,	91Q->L, 583D->G, 600R->K, 603L->M
L5_29	4 mutations,	174D->G, 312L->P, 502A->V, 524D->G
L5_39	4 mutations,	12E->V, 86I->V, 200D->N, 646A->V
L5_42	4 mutations,	192F->L, 333L->P, 556T->A, 603L->W
L5_44	4 mutations,	92S->P, 430Q->R, 479N->D, 583D->N
L5_46	4 mutations,	200D->N, 330T->P, 583D->N, 644A->T
L5_52	4 mutations,	200D->N, 330T->P, 374Q->R, 583D->N
L5_61	4 mutations,	64Y->C, 351L->V, 449D->A, 530Q->H
L5_64, L5_93	4 mutations,	200D->N, 216D->G, 524D->A, 545E->G
L5_65	4 mutations,	200D->N, 238Q->H, 570L->I, 603L->W
L5_85, L5_96	4 mutations,	200D->N, 330T->P, 583D->A, 638H->R
L5_90	4 mutations,	200D->N, 298R->G, 330T->P, 374Q->R
L5_103	4 mutations,	96T->M, 200D->N, 559Q->P, 607E->G
L5_106	4 mutations,	524D->G, 583D->N, 635C->R, 670L->F
L5_120	4 mutations,	252Y->H, 308G->S, 441E->G, 603L->W
1	3 mutations,	49I->V, 524D->A, 594H->R
28	3 mutations,	8H->R, 632I->T, 644A->V
L5_4	3 mutations,	208A->V, 225D->G, 680R->A
L5_25	3 mutations,	39M->L, 302E->K, 628K->E
L5_35	3 mutations,	200D->N, 330T->P, 479N->D
L5_51	3 mutations,	110R->G, 431P->Q, 653D->N
L5_58	3 mutations,	66M->L, 90C->Y, 653D->V
L5_66	3 mutations,	93P->L, 457M->R, 603L->W
L5_73	3 mutations,	67S->P, 139L->P, 307A->V
L5_80	3 mutations,	326P->S, 583D->G, 676S->P
L5_92	3 mutations,	126H->S, 200D->N, 653D->G
L5_94	3 mutations,	494N->D, 524D->G, 607E->K
L5_97	3 mutations,	484L->P, 498I->V, 653D->A
10	2 mutations,	481A->T, 524D->G
L5_59	2 mutations,	450R->H, 503H->R
L5_99	2 mutations,	36T->I, 524D->G
L5_116	2 mutations,	653D->H, 662T->A
L5_48	1 mutations,	77H->R
WT_MLV, L5_87	0 mutations	

[0379]

[0380] 부록 4

Position 524, total mutations 31, 3 different amino acids
D->G, 20 sequences (7, 10, L5_8, L5_13, L5_15, L5_29, L5_41, L5_43, L5_53, L5_82, L5_84, L5_88, L5_94, L5_99, L5_104, L5_106, L5_112, L5_114, L5_115, L5_117)
D->A, 10 sequences (1, 23, L5_6, L5_28, L5_49, L5_56, L5_62, L5_63, L5_64, L5_93)
D->N, 1 sequences (30)

Position 200, total mutations 30, 3 different amino acids
D->G, 2 sequences (L5_14, L5_115)
D->A, 3 sequences (L5_13, L5_20, L5_30)
D->N, 25 sequences (17, 18, 20, 30, L5_11, L5_35, L5_37, L5_39, L5_43, L5_46, L5_47, L5_52, L5_55, L5_60, L5_64, L5_65, L5_72, L5_76, L5_85, L5_90, L5_92, L5_93, L5_96, L5_103, L5_112)

Position 653, total mutations 23, 5 different amino acids
D->V, 1 sequences (L5_58)
D->G, 5 sequences (L5_15, L5_40, L5_78, L5_92, L5_114)
D->A, 4 sequences (11, L5_84, L5_97, L5_115)
D->N, 10 sequences (5, L5_21, L5_43, L5_47, L5_51, L5_60, L5_69, L5_82, L5_111, L5_112)
D->H, 3 sequences (L5_55, L5_68, L5_116)

Position 583, total mutations 21, 4 different amino acids
D->E, 1 sequences (L5_13)
D->G, 7 sequences (18, 30, L5_16, L5_32, L5_41, L5_80, L5_95)
D->A, 3 sequences (21, L5_85, L5_96)
D->N, 10 sequences (17, L5_30, L5_37, L5_44, L5_46, L5_52, L5_53, L5_76, L5_101, L5_106)

Position 603, total mutations 18, 2 different amino acids
L->W, 17 sequences (3, 13, 20, L5_3, L5_14, L5_20, L5_21, L5_24, L5_42, L5_57, L5_65, L5_66, L5_69, L5_82, L5_111, L5_118, L5_120)
L->M, 1 sequences (L5_16)

Position 330, total mutations 15, 1 different amino acids
T->P, 15 sequences (8, 18, L5_13, L5_30, L5_35, L5_40, L5_43, L5_46, L5_52, L5_72, L5_78, L5_85, L5_90, L5_96, L5_112)

Position 139, total mutations 14, 1 different amino acids
L->P, 14 sequences (5, 8, 18, L5_24, L5_32, L5_41, L5_53, L5_72, L5_73, L5_84, L5_88, L5_107, L5_115, L5_117)

Position 204, total mutations 7, 1 different amino acids
H->R, 7 sequences (7, 21, L5_49, L5_62, L5_63, L5_68, L5_101)

Position 221, total mutations 6, 1 different amino acids
Q->R, 6 sequences (3, 23, L5_13, L5_20, L5_24, L5_118)

Position 287, total mutations 6, 1 different amino acids
T->A, 6 sequences (8, L5_6, L5_49, L5_63, L5_68, L5_118)

Position 680, total mutations 6, 2 different amino acids
R->P, 1 sequences (L5_6)
R->A, 5 sequences (18, 20, 21, L5_4, L5_8)

Position 49, total mutations 5, 2 different amino acids
I->T, 1 sequences (L5_69)
I->V, 4 sequences (1, 17, L5_57, L5_68)

Position 479, total mutations 5, 1 different amino acids
N->D, 5 sequences (18, L5_30, L5_35, L5_44, L5_88)

[0381]

Position 594, total mutations 5, 2 different amino acids
H->Q, 1 sequences (L5_72)
H->R, 4 sequences (1, L5_6, L5_28, L5_56)

Position 625, total mutations 5, 2 different amino acids
F->S, 3 sequences (L5_28, L5_43, L5_112)
F->L, 2 sequences (L5_68, L5_88)

Position 679, total mutations 5, 2 different amino acids
S->F, 1 sequences (L5_32)
S->P, 4 sequences (18, 20, 21, L5_8)

Position 65, total mutations 4, 1 different amino acids
P->S, 4 sequences (17, L5_21, L5_101, L5_111)

Position 126, total mutations 4, 2 different amino acids
H->S, 2 sequences (L5_37, L5_92)
H->R, 2 sequences (L5_47, L5_84)

Position 333, total mutations 4, 2 different amino acids
L->Q, 3 sequences (L5_75, L5_79, L5_117)
L->P, 1 sequences (L5_42)

Position 502, total mutations 4, 1 different amino acids
A->V, 4 sequences (17, L5_1, L5_29, L5_78)

Position 607, total mutations 4, 3 different amino acids
E->G, 1 sequences (L5_103)
E->A, 1 sequences (L5_11)
E->K, 2 sequences (8, L5_94)

Position 638, total mutations 4, 1 different amino acids
H->R, 4 sequences (L5_21, L5_85, L5_96, L5_111)

Position 658, total mutations 4, 2 different amino acids
K->Q, 1 sequences (L5_3)
K->R, 3 sequences (L5_24, L5_75, L5_79)

Position 8, total mutations 3, 2 different amino acids
H->P, 2 sequences (L5_56, L5_115)
H->R, 1 sequences (28)

Position 130, total mutations 3, 1 different amino acids
P->S, 3 sequences (L5_13, L5_53, L5_82)

Position 233, total mutations 3, 1 different amino acids
E->K, 3 sequences (L5_21, L5_107, L5_111)

Position 237, total mutations 3, 1 different amino acids
Q->R, 3 sequences (12, L5_43, L5_112)

Position 249, total mutations 3, 1 different amino acids
N->D, 3 sequences (L5_1, L5_15, L5_114)

Position 283, total mutations 3, 2 different amino acids
A->D, 2 sequences (5, L5_101)
A->T, 1 sequences (L5_118)

[0382]

Position 307, total mutations 3, 1 different amino acids
A->V, 3 sequences (L5_15, L5_73, L5_114)

Position 344, total mutations 3, 1 different amino acids
Y->H, 3 sequences (L5_9, L5_15, L5_114)

Position 407, total mutations 3, 2 different amino acids
P->S, 2 sequences (L5_21, L5_111)
P->L, 1 sequences (L5_9)

Position 428, total mutations 3, 1 different amino acids
M->L, 3 sequences (3, 13, L5_20)

Position 430, total mutations 3, 1 different amino acids
Q->R, 3 sequences (L5_44, L5_75, L5_79)

Position 449, total mutations 3, 2 different amino acids
D->G, 2 sequences (L5_13, L5_30)
D->A, 1 sequences (L5_61)

Position 644, total mutations 3, 2 different amino acids
A->T, 1 sequences (L5_46)
A->V, 2 sequences (23, 28)

Position 649, total mutations 3, 1 different amino acids
N->S, 3 sequences (L5_24, L5_75, L5_79)

Position 671, total mutations 3, 1 different amino acids
L->P, 3 sequences (L5_30, L5_55, L5_72)

Position 673, total mutations 3, 2 different amino acids
E->G, 2 sequences (L5_75, L5_79)
E->K, 1 sequences (L5_114)

Position 678, total mutations 3, 1 different amino acids
N->I, 3 sequences (18, 20, 21)

Position 5, total mutations 2, 1 different amino acids
E->K, 2 sequences (L5_2, L5_55)

Position 11, total mutations 2, 2 different amino acids
H->R, 1 sequences (L5_78)
H->Y, 1 sequences (L5_75)

Position 12, total mutations 2, 2 different amino acids
E->V, 1 sequences (L5_39)
E->A, 1 sequences (L5_20)

Position 14, total mutations 2, 2 different amino acids
S->T, 1 sequences (L5_69)
S->P, 1 sequences (L5_117)

Position 17, total mutations 2, 1 different amino acids
P->S, 2 sequences (L5_15, L5_114)

[0383]

Position 39, total mutations 2, 2 different amino acids
M->V, 1 sequences (L5_68)
M->L, 1 sequences (L5_25)

Position 50, total mutations 2, 1 different amino acids
I->V, 2 sequences (L5_49, L5_63)

Position 66, total mutations 2, 1 different amino acids
M->L, 2 sequences (L5_58, L5_76)

Position 83, total mutations 2, 1 different amino acids
D->N, 2 sequences (18, L5_9)

Position 91, total mutations 2, 2 different amino acids
Q->R, 1 sequences (L5_68)
Q->L, 1 sequences (L5_16)

Position 95, total mutations 2, 1 different amino acids
N->S, 2 sequences (L5_20, L5_117)

Position 108, total mutations 2, 1 different amino acids
D->E, 2 sequences (L5_15, L5_114)

Position 135, total mutations 2, 1 different amino acids
L->P, 2 sequences (L5_9, L5_32)

Position 148, total mutations 2, 1 different amino acids
V->M, 2 sequences (11, L5_78)

Position 166, total mutations 2, 1 different amino acids
P->S, 2 sequences (L5_9, L5_81)

Position 179, total mutations 2, 2 different amino acids
I->T, 1 sequences (21)
I->V, 1 sequences (L5_47)

Position 184, total mutations 2, 1 different amino acids
T->A, 2 sequences (L5_2, L5_71)

Position 194, total mutations 2, 1 different amino acids
N->S, 2 sequences (L5_49, L5_63)

Position 197, total mutations 2, 1 different amino acids
T->A, 2 sequences (L5_14, L5_115)

Position 199, total mutations 2, 2 different amino acids
F->L, 1 sequences (L5_81)
F->Y, 1 sequences (L5_41)

Position 216, total mutations 2, 1 different amino acids
D->G, 2 sequences (L5_64, L5_93)

Position 289, total mutations 2, 2 different amino acids
M->V, 1 sequences (L5_76)
M->L, 1 sequences (L5_71)

[0384]

Position 302, total mutations 2, 1 different amino acids
E->K, 2 sequences (L5_25, L5_57)

Position 306, total mutations 2, 2 different amino acids
T->A, 1 sequences (L5_28)
T->M, 1 sequences (30)

Position 325, total mutations 2, 1 different amino acids
Y->H, 2 sequences (L5_75, L5_79)

Position 346, total mutations 2, 1 different amino acids
E->D, 2 sequences (L5_41, L5_62)

Position 358, total mutations 2, 2 different amino acids
G->W, 1 sequences (L5_115)
G->V, 1 sequences (5)

Position 374, total mutations 2, 1 different amino acids
Q->R, 2 sequences (L5_52, L5_90)

Position 380, total mutations 2, 1 different amino acids
V->A, 2 sequences (L5_3, L5_117)

Position 388, total mutations 2, 1 different amino acids
W->R, 2 sequences (L5_23, L5_104)

Position 390, total mutations 2, 1 different amino acids
R->W, 2 sequences (11, L5_23)

Position 391, total mutations 2, 2 different amino acids
P->S, 1 sequences (L5_101)
P->L, 1 sequences (L5_2)

Position 409, total mutations 2, 1 different amino acids
C->R, 2 sequences (17, L5_1)

Position 417, total mutations 2, 1 different amino acids
A->V, 2 sequences (L5_53, L5_84)

Position 431, total mutations 2, 1 different amino acids
P->Q, 2 sequences (L5_32, L5_51)

Position 433, total mutations 2, 1 different amino acids
V->A, 2 sequences (7, L5_14)

Position 436, total mutations 2, 1 different amino acids
A->T, 2 sequences (L5_9, L5_76)

Position 450, total mutations 2, 1 different amino acids
R->H, 2 sequences (L5_41, L5_59)

Position 454, total mutations 2, 1 different amino acids
N->K, 2 sequences (L5_37, L5_68)

Position 457, total mutations 2, 2 different amino acids
M->T, 1 sequences (L5_18)
M->R, 1 sequences (L5_66)

[0385]

Position 470, total mutations 2, 1 different amino acids
V->A, 2 sequences (17, L5_1)

Position 478, total mutations 2, 1 different amino acids
L->P, 2 sequences (L5_21, L5_111)

Position 491, total mutations 2, 1 different amino acids
L->P, 2 sequences (L5_76, L5_84)

Position 494, total mutations 2, 2 different amino acids
N->D, 1 sequences (L5_94)
N->K, 1 sequences (L5_95)

Position 503, total mutations 2, 1 different amino acids
H->R, 2 sequences (L5_40, L5_59)

Position 530, total mutations 2, 1 different amino acids
Q->H, 2 sequences (L5_61, L5_81)

Position 545, total mutations 2, 1 different amino acids
E->G, 2 sequences (L5_64, L5_93)

Position 559, total mutations 2, 2 different amino acids
Q->P, 1 sequences (L5_103)
Q->R, 1 sequences (L5_18)

Position 572, total mutations 2, 2 different amino acids
M->L, 1 sequences (L5_72)
M->I, 1 sequences (7)

Position 597, total mutations 2, 1 different amino acids
I->T, 2 sequences (L5_75, L5_79)

Position 616, total mutations 2, 1 different amino acids
E->K, 2 sequences (L5_75, L5_79)

Position 618, total mutations 2, 1 different amino acids
L->V, 2 sequences (18, L5_95)

Position 623, total mutations 2, 1 different amino acids
A->V, 2 sequences (12, L5_115)

Position 635, total mutations 2, 2 different amino acids
C->S, 1 sequences (8)
C->R, 1 sequences (L5_106)

Position 642, total mutations 2, 2 different amino acids
H->R, 1 sequences (L5_107)
H->Y, 1 sequences (L5_47)

Position 676, total mutations 2, 1 different amino acids
S->P, 2 sequences (L5_80, L5_82)

Position 15, total mutations 1, 1 different amino acids
K->T, 1 sequences (L5_11)

[0386]

Position 23, total mutations 1, 1 different amino acids
S->P, 1 sequences (12)

Position 24, total mutations 1, 1 different amino acids
T->A, 1 sequences (L5_40)

Position 26, total mutations 1, 1 different amino acids
L->P, 1 sequences (L5_82)

Position 29, total mutations 1, 1 different amino acids
F->L, 1 sequences (11)

Position 30, total mutations 1, 1 different amino acids
P->L, 1 sequences (L5_23)

Position 36, total mutations 1, 1 different amino acids
T->I, 1 sequences (L5_99)

Position 37, total mutations 1, 1 different amino acids
G->W, 1 sequences (L5_14)

Position 41, total mutations 1, 1 different amino acids
L->R, 1 sequences (L5_40)

Position 43, total mutations 1, 1 different amino acids
V->I, 1 sequences (L5_2)

Position 51, total mutations 1, 1 different amino acids
P->S, 1 sequences (13)

Position 60, total mutations 1, 1 different amino acids
S->A, 1 sequences (L5_41)

Position 64, total mutations 1, 1 different amino acids
Y->C, 1 sequences (L5_61)

Position 67, total mutations 1, 1 different amino acids
S->P, 1 sequences (L5_73)

Position 69, total mutations 1, 1 different amino acids
E->G, 1 sequences (L5_32)

Position 70, total mutations 1, 1 different amino acids
A->V, 1 sequences (L5_88)

Position 74, total mutations 1, 1 different amino acids
I->T, 1 sequences (L5_79)

Position 77, total mutations 1, 1 different amino acids
H->R, 1 sequences (L5_48)

Position 86, total mutations 1, 1 different amino acids
I->V, 1 sequences (L5_39)

Position 87, total mutations 1, 1 different amino acids
L->P, 1 sequences (L5_20)

[0387]

Position 88, total mutations 1, 1 different amino acids
V->A, 1 sequences (12)

Position 89, total mutations 1, 1 different amino acids
P->S, 1 sequences (8)

Position 90, total mutations 1, 1 different amino acids
C->Y, 1 sequences (L5_58)

Position 92, total mutations 1, 1 different amino acids
S->P, 1 sequences (L5_44)

Position 93, total mutations 1, 1 different amino acids
P->L, 1 sequences (L5_66)

Position 96, total mutations 1, 1 different amino acids
T->M, 1 sequences (L5_103)

Position 97, total mutations 1, 1 different amino acids
P->S, 1 sequences (L5_71)

Position 104, total mutations 1, 1 different amino acids
P->R, 1 sequences (L5_79)

Position 105, total mutations 1, 1 different amino acids
G->E, 1 sequences (L5_76)

Position 107, total mutations 1, 1 different amino acids
N->S, 1 sequences (L5_47)

Position 110, total mutations 1, 1 different amino acids
R->G, 1 sequences (L5_51)

Position 112, total mutations 1, 1 different amino acids
V->A, 1 sequences (L5_60)

Position 118, total mutations 1, 1 different amino acids
V->A, 1 sequences (L5_62)

Position 124, total mutations 1, 1 different amino acids
D->G, 1 sequences (L5_95)

Position 125, total mutations 1, 1 different amino acids
I->V, 1 sequences (L5_3)

Position 127, total mutations 1, 1 different amino acids
P->S, 1 sequences (L5_40)

Position 128, total mutations 1, 1 different amino acids
T->A, 1 sequences (L5_47)

Position 131, total mutations 1, 1 different amino acids
N->S, 1 sequences (21)

Position 132, total mutations 1, 1 different amino acids
P->S, 1 sequences (L5_104)

[0388]

Position 136, total mutations 1, 1 different amino acids
L->W, 1 sequences (13)

Position 137, total mutations 1, 1 different amino acids
S->G, 1 sequences (L5_82)

Position 138, total mutations 1, 1 different amino acids
G->R, 1 sequences (L5_3)

Position 143, total mutations 1, 1 different amino acids
H->R, 1 sequences (L5_3)

Position 149, total mutations 1, 1 different amino acids
L->F, 1 sequences (L5_37)

Position 151, total mutations 1, 1 different amino acids
L->F, 1 sequences (L5_40)

Position 159, total mutations 1, 1 different amino acids
R->K, 1 sequences (L5_13)

Position 164, total mutations 1, 1 different amino acids
S->G, 1 sequences (L5_104)

Position 168, total mutations 1, 1 different amino acids
F->S, 1 sequences (L5_41)

Position 173, total mutations 1, 1 different amino acids
R->K, 1 sequences (L5_57)

Position 174, total mutations 1, 1 different amino acids
D->G, 1 sequences (L5_29)

Position 187, total mutations 1, 1 different amino acids
R->G, 1 sequences (L5_95)

Position 190, total mutations 1, 1 different amino acids
Q->R, 1 sequences (L5_117)

Position 192, total mutations 1, 1 different amino acids
F->L, 1 sequences (L5_42)

Position 207, total mutations 1, 1 different amino acids
L->P, 1 sequences (13)

Position 208, total mutations 1, 1 different amino acids
A->V, 1 sequences (L5_4)

Position 211, total mutations 1, 1 different amino acids
R->W, 1 sequences (L5_56)

Position 214, total mutations 1, 1 different amino acids
H->R, 1 sequences (L5_9)

Position 222, total mutations 1, 1 different amino acids
Y->C, 1 sequences (L5_9)

[0389]

Position 223, total mutations 1, 1 different amino acids
V->M, 1 sequences (L5_23)

Position 225, total mutations 1, 1 different amino acids
D->G, 1 sequences (L5_4)

Position 238, total mutations 1, 1 different amino acids
Q->H, 1 sequences (L5_65)

Position 240, total mutations 1, 1 different amino acids
T->A, 1 sequences (L5_55)

Position 241, total mutations 1, 1 different amino acids
R->Q, 1 sequences (16)

Position 242, total mutations 1, 1 different amino acids
A->T, 1 sequences (L5_20)

Position 250, total mutations 1, 1 different amino acids
L->P, 1 sequences (L5_71)

Position 252, total mutations 1, 1 different amino acids
Y->H, 1 sequences (L5_120)

Position 259, total mutations 1, 1 different amino acids
A->T, 1 sequences (16)

Position 263, total mutations 1, 1 different amino acids
Q->R, 1 sequences (L5_95)

Position 280, total mutations 1, 1 different amino acids
L->P, 1 sequences (L5_60)

Position 282, total mutations 1, 1 different amino acids
E->G, 1 sequences (L5_62)

Position 292, total mutations 1, 1 different amino acids
P->L, 1 sequences (L5_56)

Position 293, total mutations 1, 1 different amino acids
T->A, 1 sequences (L5_9)

Position 295, total mutations 1, 1 different amino acids
K->E, 1 sequences (L5_107)

Position 298, total mutations 1, 1 different amino acids
R->G, 1 sequences (L5_90)

Position 308, total mutations 1, 1 different amino acids
G->S, 1 sequences (L5_120)

Position 309, total mutations 1, 1 different amino acids
F->S, 1 sequences (L5_28)

Position 311, total mutations 1, 1 different amino acids
R->H, 1 sequences (16)

[0390]

Position 312, total mutations 1, 1 different amino acids
L->P, 1 sequences (L5_29)

Position 314, total mutations 1, 1 different amino acids
I->T, 1 sequences (L5_76)

Position 322, total mutations 1, 1 different amino acids
A->T, 1 sequences (L5_60)

Position 323, total mutations 1, 1 different amino acids
P->L, 1 sequences (21)

Position 326, total mutations 1, 1 different amino acids
P->S, 1 sequences (L5_80)

Position 331, total mutations 1, 1 different amino acids
G->E, 1 sequences (L5_20)

Position 332, total mutations 1, 1 different amino acids
T->I, 1 sequences (23)

Position 339, total mutations 1, 1 different amino acids
D->G, 1 sequences (L5_117)

Position 343, total mutations 1, 1 different amino acids
A->T, 1 sequences (L5_82)

Position 351, total mutations 1, 1 different amino acids
L->V, 1 sequences (L5_61)

Position 353, total mutations 1, 1 different amino acids
T->A, 1 sequences (21)

Position 356, total mutations 1, 1 different amino acids
A->G, 1 sequences (L5_82)

Position 369, total mutations 1, 1 different amino acids
F->I, 1 sequences (L5_118)

Position 376, total mutations 1, 1 different amino acids
Y->C, 1 sequences (L5_118)

Position 379, total mutations 1, 1 different amino acids
G->S, 1 sequences (L5_60)

Position 383, total mutations 1, 1 different amino acids
Q->P, 1 sequences (L5_117)

Position 392, total mutations 1, 1 different amino acids
V->A, 1 sequences (L5_57)

Position 393, total mutations 1, 1 different amino acids
A->T, 1 sequences (L5_72)

Position 415, total mutations 1, 1 different amino acids
A->V, 1 sequences (L5_9)

[0391]

Position 434, total mutations 1, 1 different amino acids
I->T, 1 sequences (L5_118)

Position 435, total mutations 1, 1 different amino acids
L->P, 1 sequences (L5_23)

Position 441, total mutations 1, 1 different amino acids
E->G, 1 sequences (L5_120)

Position 444, total mutations 1, 1 different amino acids
V->A, 1 sequences (L5_9)

Position 446, total mutations 1, 1 different amino acids
Q->R, 1 sequences (L5_81)

Position 447, total mutations 1, 1 different amino acids
P->L, 1 sequences (L5_9)

Position 459, total mutations 1, 1 different amino acids
H->R, 1 sequences (L5_78)

Position 462, total mutations 1, 1 different amino acids
A->T, 1 sequences (L5_18)

Position 468, total mutations 1, 1 different amino acids
D->A, 1 sequences (L5_81)

Position 475, total mutations 1, 1 different amino acids
V->G, 1 sequences (L5_8)

Position 481, total mutations 1, 1 different amino acids
A->T, 1 sequences (10)

Position 484, total mutations 1, 1 different amino acids
L->P, 1 sequences (L5_97)

Position 486, total mutations 1, 1 different amino acids
L->P, 1 sequences (L5_56)

Position 497, total mutations 1, 1 different amino acids
D->G, 1 sequences (L5_71)

Position 498, total mutations 1, 1 different amino acids
I->V, 1 sequences (L5_97)

Position 501, total mutations 1, 1 different amino acids
E->K, 1 sequences (L5_81)

Position 504, total mutations 1, 1 different amino acids
G->R, 1 sequences (L5_18)

Position 514, total mutations 1, 1 different amino acids
L->F, 1 sequences (8)

Position 528, total mutations 1, 1 different amino acids
L->I, 1 sequences (L5_62)

[0392]

Position 532, total mutations 1, 1 different amino acids
G->R, 1 sequences (L5_117)

Position 533, total mutations 1, 1 different amino acids
Q->K, 1 sequences (L5_104)

Position 538, total mutations 1, 1 different amino acids
A->T, 1 sequences (L5_69)

Position 539, total mutations 1, 1 different amino acids
A->T, 1 sequences (L5_82)

Position 543, total mutations 1, 1 different amino acids
E->K, 1 sequences (L5_2)

Position 544, total mutations 1, 1 different amino acids
T->I, 1 sequences (16)

Position 551, total mutations 1, 1 different amino acids
A->T, 1 sequences (L5_71)

Position 552, total mutations 1, 1 different amino acids
L->P, 1 sequences (L5_3)

Position 556, total mutations 1, 1 different amino acids
T->A, 1 sequences (L5_42)

Position 558, total mutations 1, 1 different amino acids
A->V, 1 sequences (L5_81)

Position 560, total mutations 1, 1 different amino acids
R->W, 1 sequences (13)

Position 562, total mutations 1, 1 different amino acids
E->K, 1 sequences (L5_71)

Position 570, total mutations 1, 1 different amino acids
L->I, 1 sequences (L5_65)

Position 573, total mutations 1, 1 different amino acids
A->T, 1 sequences (L5_76)

Position 576, total mutations 1, 1 different amino acids
K->R, 1 sequences (L5_11)

Position 577, total mutations 1, 1 different amino acids
K->Q, 1 sequences (18)

Position 600, total mutations 1, 1 different amino acids
R->K, 1 sequences (L5_16)

Position 602, total mutations 1, 1 different amino acids
G->R, 1 sequences (3)

Position 622, total mutations 1, 1 different amino acids
K->R, 1 sequences (L5_3)

[0393]

Position 628, total mutations 1, 1 different amino acids
K->E, 1 sequences (L5_25)

Position 632, total mutations 1, 1 different amino acids
I->T, 1 sequences (28)

Position 633, total mutations 1, 1 different amino acids
I->T, 1 sequences (L5_107)

Position 634, total mutations 1, 1 different amino acids
H->Y, 1 sequences (L5_53)

Position 643, total mutations 1, 1 different amino acids
S->G, 1 sequences (L5_107)

Position 646, total mutations 1, 1 different amino acids
A->V, 1 sequences (L5_39)

Position 655, total mutations 1, 1 different amino acids
A->V, 1 sequences (L5_18)

Position 656, total mutations 1, 1 different amino acids
A->T, 1 sequences (16)

Position 661, total mutations 1, 1 different amino acids
I->V, 1 sequences (23)

Position 662, total mutations 1, 1 different amino acids
T->A, 1 sequences (L5_116)

Position 663, total mutations 1, 1 different amino acids
E->D, 1 sequences (8)

Position 667, total mutations 1, 1 different amino acids
T->A, 1 sequences (L5_78)

Position 668, total mutations 1, 1 different amino acids
S->P, 1 sequences (L5_3)

Position 669, total mutations 1, 1 different amino acids
T->S, 1 sequences (L5_57)

Position 670, total mutations 1, 1 different amino acids
L->F, 1 sequences (L5_106)

Position 672, total mutations 1, 1 different amino acids
I->T, 1 sequences (L5_72)

[0394]

[0395] 부록 5

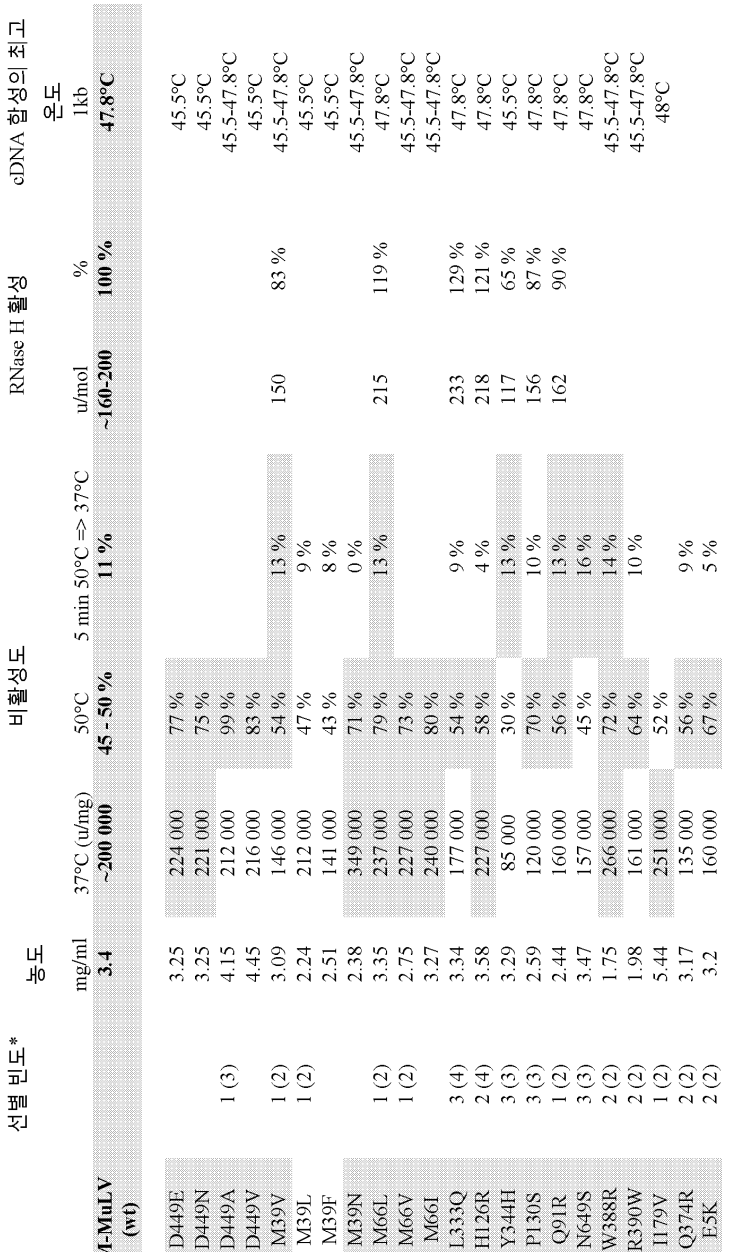
	선별 빈도*		농도	비활성도			RNase H 활성		cDNA 합성의 최고 온도
			mg/ml	37°C (u/mg)	50°C	5 min 50°C => 37°C	u/mol	%	1kb
M-MuLV (wt)			**3.4**	**~200 000**	**45 - 50 %**	**11 %**	**~160-200**	**100 %**	**47.8°C**
D200N	25 (30)		2.91	254 000	84 %	15 %	174	97 %	50.4°C
D200A	3 (30)		2.73	187 000	87 %	18 %	179	99 %	47.8°C
D200Q			3.82	135 000	103 %	23 %	161	89 %	47.8°C
D200E			2.33	71 000	79 %	7 %			47.8°C
D200V			2.04	87 000	131 %	2 %	102	57 %	47.8°C
D200W			2.84	114 000	103 %	4.3 %			47.8°C
D200G	2 (30)		2.68	276 000	88 %	10 %			47.8°C
D200P			1.15	0	0 %	0 %			
D200K			3.14	175 000	102 %	2.5 %			47.8°C
D200R			3.69	52 000	68 %	27 %	171	95 %	45.5°C
D200H			6.23	234 000	54 %	27 %			50.4°C
L603W	17 (18)		2.41	110 000	105 %	23 %	202	112 %	53.1°C
L603F			3.18	109 000	104 %	9 %	112	62 %	50.4°C
L603Y			3.12	139 000	95 %	13 %			47.8 - 50.4°C
L603P			3.24	138 000	20 %	15 %			45.5°C
L603I			2.85	178 000	33 %	7 %	142	79 %	
L603M	1 (18)		3.7	149 000	77 %	9 %	161	89 %	47.8°C
L603V			2.69	190 000	39 %	7 %			45.5°C
L603G			3.42	149 000	36 %	10 %			
D653N	10 (23)		2.39	179 000	93 %	21 %			50.4-53.1°C
D653K			2.38	211 000	106 %	15 %			50.4-53.1°C
D653A	4 (23)		2.98	198 000	99 %	18 %			50.4°C
D653V	1 (23)		2.82	172 000	98 %	16 %			50.4°C
D653Q			2.79	182 000	93 %	18 %			50.4°C
D653L			2.60	212 000	83 %	11 %			50.4°C
D653H	3 (23)		2.41	180 000	116 %	13 %			50.4-53.1°C
D653G	5 (23)		3.05	135 000	90 %	13 %			50.4°C
D653W			2.68	178 000	93 %	13 %			50.4°C
D653E			2.46	200 000	80 %	19 %			47.8°C
T330P	15 (15)		1.76	154 000	80 %	21 %	185	103 %	47.8°C
T330N			2.62	223 000	69 %	13 %			47.8°C

[0396]

[0397]

	선별 빈도*	농도	비활성도			RNase H 활성		cDNA 합성의 최고 온도
		mg/ml	37°C (u/mg)	50°C	5 min 50°C => 37°C	u/mol	%	1kb
M-MuLV (wt)		**3.4**	**~200 000**	**45 - 50 %**	**11 %**	**~160-200**	**100 %**	**47.8°C**
T330L		3.26	128 000	49 %	9 %			45.5°C
T330D		3.32	240 000	55 %	16 %			47.8°C
T330V		2.56	197 000	65 %	12 %			47.8°C
T330S		2.33	201 000	67 %	15 %			47.8°C
Q221R	6 (6)	2.38	268 000	94 %	0 %	117	65 %	50.4°C
Q221N		3.09	114 000	53 %	10 %			45.5°C
Q221H		2.47	55 000	44 %	8 %			43.6-45.5°C
Q221K		1.85	179 000	77 %	0 %			45.5
Q221E		1.85	83 000	64 %	0 %			43.6-45.5°C
Q221M		1.3	107 000	58 %	2 %			45.5
Q221Y		1.76	60 000	77 %	0 %			43.6-45.5°C
E607K	2 (4)	3.94	182 000	84 %	9 %	260	144 %	47.8-50.4°C
E607A	1 (4)	4.28	204 000	98 %				47.8°C
E607G	1 (4)	4.02	184 000	72 %				47.8°C
E607D		2.24	181 000	69 %				45.5°C
E607Q		1.02	0	0 %				
L139P	14 (14)	1.34	148 000	59 %	7 %	176	98 %	47.8°C
T287A	6 (6)	2.34	204 000	52 %	13 %	174	96 %	45.5-47.8°C
T287S		2.75	213 000	68 %	11 %			45.5-47.8°C
T287L		2.28	179 000	38 %	11 %			45.5°C
T287N		2.46	197 000	50 %	12 %			45.5°C
T287F		2.18	190 000	48 %	13 %			45.5°C
T287P		1.64	134 000	7 %	11 %			41.9°C
N479D	5 (5)	3.15	190 000	81 %	9 %	234	130 %	47.8°C
N479Q		2.82	176 000	33 %				43.6°C
N479E		2.58	179 000	48 %				45.5°C
H594R	4 (5)	2.67	184 000	69 %	14 %	232	129 %	47.8°C
H594K		3.66	270 000	80 %	9 %	170	94 %	47.8-50.4°C
H594Q	1 (5)	3.85	231 000	75 %	13 %			47.8-50.4°C
H594N		4.15	216 000	61 %	11 %			47.8°C
D449G	2 (3)	3.53	123 000	79 %	13 %	162	90 %	45.5-47.8°C

등록특허 10-1947101



	선별 빈도*	농도	비활성도			RNase H 활성		cDNA 합성의 최고 온도
		mg/ml	37°C (u/mg)	50°C	5 min 50°C => 37°C	u/mol	%	1kb
M-MuLV (wt)		**3.4**	**~200 000**	**45 - 50 %**	**11 %**	**~160-200**	**100 %**	**47.8°C**
D449E		3.25	224 000	77 %				45.5°C
D449N		3.25	221 000	75 %				45.5°C
D449A	1 (3)	4.15	212 000	99 %				45.5-47.8°C
D449V		4.45	216 000	83 %				45.5°C
M39V	1 (2)	3.09	146 000	54 %	13 %	150	83 %	45.5-47.8°C
M39L	1 (2)	2.24	212 000	47 %	9 %			45.5°C
M39F		2.51	141 000	43 %	8 %			45.5°C
M39N		2.38	349 000	71 %	0 %			45.5-47.8°C
M66L	1 (2)	3.35	237 000	79 %	13 %	215	119 %	47.8°C
M66V	1 (2)	2.75	227 000	73 %				45.5-47.8°C
M66I		3.27	240 000	80 %				45.5-47.8°C
L333Q	3 (4)	3.34	177 000	54 %	9 %	233	129 %	47.8°C
H126R	2 (4)	3.58	227 000	58 %	4 %	218	121 %	47.8°C
Y344H	3 (3)	3.29	85 000	30 %	13 %	117	65 %	45.5°C
P130S	3 (3)	2.59	120 000	70 %	10 %	156	87 %	47.8°C
Q91R	1 (2)	2.44	160 000	56 %	13 %	162	90 %	47.8°C
N649S	3 (3)	3.47	157 000	45 %	16 %			47.8°C
W388R	2 (2)	1.75	266 000	72 %	14 %			45.5-47.8°C
R390W	2 (2)	1.98	161 000	64 %	10 %			45.5-47.8°C
I179V	1 (2)	5.44	251 000	52 %				48°C
Q374R	2 (2)	3.17	135 000	56 %	9 %			
E5K	2 (2)	3.2	160 000	67 %	5 %			

[0398]

[0399] 부록 6

	농도	비활성도		cDNA 합성의 최고 온도	
	mg/ml	37°C (u/mg)	50°C	1kb	4.5kb
M-MuLV (wt)	**3.4**	**~200 000**	**45 - 50 %**	**47.8°C**	
D200N, L603W (20 mut.)	0.46	260 000	131 %	56°C	
D200N, L603W, T330P (M0_1)	4,17	321 194	175 %	56-58°C	53°C
D200N, L603W, T330P, E607K (M1)	4,27	311 576	174 %	60-62°C	56°C
D200N, L603W, T330P, E607K, L139P (M2)	2,91	348 694	176 %	62°C	61°C
D200N, L603W, N479D, H594R (M3)	5,37	371 510	182 %	56-58°C	56°C
D200N, L603W, D653N, D524G (M4)	4,84	358 112	155 %	58-60°C	58°C
D200N, L603W, D653N, D524G, T330P (M6)	5,23	272 031	180 %	60-62°C	58°C

[0400]

[0401] 부록 7

서열번호 1

```
LOCUS       pET-his-MLV-pD          7873 bp    DNA     circular      5-JUN-
2007
SOURCE
  ORGANISM
COMMENT     This file is created by Vector NTI
            http://www.invitrogen.com/
COMMENT     ORIGDB|GenBank
COMMENT     VNTDATE|448383004|
COMMENT     VNTDBDATE|448383004|
COMMENT     LSOWNER|
COMMENT     VNTNAME|pET-his-MLV-pD|
COMMENT     VNTAUTHORNAME|Remigijus Skirgaila|
COMMENT     VNTAUTHORTEL|+370-5-2394224|
COMMENT     VNTAUTHOREML|skirgaila@fermentas.lt|
COMMENT     VNTAUTHORWWW|www.fermentas.com|
FEATURES             Location/Qualifiers
     CDS             3534..4391
                     /vntifkey="4"
                     /label=Ap
                     /note="ORF: Frame #2   Start: atg   Stop:  taa"
     CDS             complement(6586..7674)
                     /vntifkey="4"
                     /label=lacI
                     /note="ORF: Frame #3   Start: gtg   Stop:  tga"
     terminator      2864..2910
                     /vntifkey="43"
                     /label=T7\terminator
     rep_origin      2947..3402
                     /vntifkey="33"
                     /label=f1\origin
     rep_origin      complement(2936..2936)
                     /vntifkey="33"
                     /label=ori
     promoter        174..190
                     /vntifkey="30"
                     /label=PT7
     misc_feature    2394..2669
                     /vntifkey="21"
                     /label=pD
     misc_feature    2364..2393
                     /vntifkey="21"
                     /label=gs\linker
     misc_feature    2670..2759
                     /vntifkey="21"
                     /label=gs\linker
     misc_feature    306..2363
                     /vntifkey="21"
                     /label=MLV\H+
     misc_feature    258..305
                     /vntifkey="21"
                     /label=his
BASE COUNT     1873 a      2155 c      2084 g      1761 t
ORIGIN
```

[0402]

[0403]

```
   1 cacggggcct gccaccatac ccacgccgaa acaagcgctc atgagcccga agtggcgagc
  61 ccgatcttcc ccatcggtga tgtcggcgat ataggcgcca gcaaccgcac ctgtggcgcc
 121 ggtgatgccg gccacgatgc gtccggcgta gaggatcgag atctatacga aattaatacg
 181 actcactata gggagaccac aacggtttcc ctctagaaat aattttgttt aactttaaga
 241 aagaggagaa attacatatg agaggatcgc atcaccatca ccatcacgga tctggttcca
 301 tgggcatgac cctaaatata gaagatgagc atcggctaca tgagacctca aaagagccag
 361 atgtttctct agggtccaca tggctgtctg attttcctca ggcctgggcg gaaaccgggg
 421 gcatgggact ggcagttcgc caagctcctc tgatcatacc tctgaaagca acctctaccc
 481 ccgtgtccat aaaacaatac cccatgtcac aagaagccag actggggatc aagccccaca
 541 tacagagact gttggaccag ggaatactgg taccctgcca gtccccctgg aacacgcccc
 601 tgctacccgt taagaaacca gggactaatg attataggcc tgtccaggat ctgagagaag
 661 tcaacaagcg ggtggaagac atccacccca ccgtgcccaa cccttacaac ctcttgagcg
 721 ggctcccacc gtcccaccag tggtacactg tgcttgattt aaaggatgcc tttttctgcc
 781 tgagactcca ccccaccagt cagcctctct tcgcctttga gtggagagat ccagagatgg
 841 gaatctcagg acaattgacc tggaccagac tcccacaggg tttcaaaaac agtcccaccc
 901 tgtttgatga ggcactgcac agagacctag cagacttccg gatccagcac ccagacttga
 961 tcctgctaca gtacgtggat gacttactgc tggccgccac ttctgagcta gactgccaac
1021 aaggtactcg ggccctgtta caaaccctag ggaacctcgg gtatcgggcc tcggccaaga
1081 aagcccaaat ttgccagaaa caggtcaagt atctggggta tcttctaaaa gagggtcaga
1141 gatggctgac tgaggccaga aaagagactg tgatggggca gcctactccg aagacccctc
1201 gacaactaag ggagttccta gggacggcag gcttctgtcg cctctggatc cctgggtttg
1261 cagaaatggc agcccccttg taccctctca ccaaaacggg gactctgttt aattggggcc
1321 cagaccaaca aaaggcctat caagaaatca agcaagctct tctaactgcc ccagccctgg
1381 ggttgccaga tttgactaag ccctttgaac tctttgtcga cgagaagcag ggctacgcca
1441 aaggtgtcct aacgcaaaaa ctgggacctt ggcgtcggcc ggtggcctac ctgtccaaaa
1501 agctagaccc agtagcagct gggtggcccc cttgcctacg gatggtagca gccattgccg
1561 tactgacaaa ggatgcaggc aagctaacca tgggacagcc actagtcatt ctggcccccc
1621 atgcagtaga ggcactagtc aaacaacccc ccgaccgctg gctttccaac gcccggatga
1681 ctcactatca ggccttgctt ttggacacgg accgggtcca gttcggaccg gtggtagccc
1741 tgaacccggc tacgctgctc ccactgcctg aggaagggct gcaacacaac tgccttgata
1801 tcctggccga agcccacgga acccgacccg acctaacgga ccagccgctc ccagacgccg
1861 accacacctg gtacacggat ggaagcagtc tcttacaaga gggacagcgt aaggcgggag
1921 ctgcggtgac caccgagacc gaggtaatct gggctaaagc cctgccagcc gggacatccg
1981 ctcagcgggc tgaactgata gcactcaccc aggccctaaa gatggcagaa ggtaagaagc
2041 taaatgttta tactgatagc cgttatgctt ttgctactgc ccatatccat ggagaaatat
2101 acagaaggcg tgggttgctc acatcagaag gcaaagagat caaaaataaa gacgagatct
2161 tggccctact aaaagccctc tttctgccca aaagacttag cataatccat tgtccaggac
2221 atcaaaaggg acacagcgcc gaggctagag gcaaccggat ggctgaccaa gcggcccgaa
2281 aggcagccat cacagagact ccagacacct ctaccctcct catagaaaat tcatcaccca
2341 attcccgctt aattaatgaa ttcggatccg gtggcggttc cggcggtgga tctatgggta
2401 ccgcaaccgc gcccggcgga ttgagtgcga aagcgcctgc aatgaccccg ctgatgctgg
2461 acacctccag ccgtaagctg gttgcgtggg atggcaccac cgacggtgct gccgttggca
2521 ttcttgcggt tgctgctgac cagaccagca ccacgctgac gttctacaag tccggcacgt
2581 tccgttatga ggatgtgctc tggccggagg ctgccagcga cgagacgaaa aaacggaccg
2641 cgtttgccgg aacggcaatc agcatcgttg gatctggtgg cggttccggc ggtggatctg
2701 gtggcggttc cggcggtgga tctggtggcg gttccggcgg tggatcgtgt cttctttaag
2761 cttgcggccg cactcgagca ccaccaccac caccactgag atccggctgc taacaaagcc
2821 cgaaaggaag ctgagttggc tgctgccacc gctgagcaat aactagcata acccccttggg
2881 gcctctaaac gggtcttgag gggttttttg ctgaaaggag gaactatatc cggattggcg
2941 aatgggacgc gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg
3001 tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc ccttcctttc
3061 tcgccacgtt cgccggcttt ccccgtcaag ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc
3121 gatttagtgc tttacggcac ctcgacccca aaaaacttga ttagggtgat ggttcacgta
3181 gtgggccatc gccctgatag acggtttttc gccctttgac gttggagtcc acgttctttta
3241 atagtggact cttgttccaa actggaacaa cactcaaccc tatctcggtc tattcttttg
3301 atttataagg gattttgccg atttcggcct attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa
3361 aatttaacgc gaattttaac aaaatattaa cgtttacaat ttcaggtggc acttttcggg
3421 gaaatgtgcg cggaacccct atttgtttat ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc
3481 tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgagta
```

3541 ttcaacattt ccgtgtcgcc cttattccct tttttgcggc attttgcctt cctgtttttg
3601 ctcacccaga aacgctggtg aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtgg
3661 gttacatcga actggatctc aacagcggta agatccttga gagttttcgc cccgaagaac
3721 gttttccaat gatgagcact tttaaagttc tgctatgtgg cgcggtatta tcccgtattg
3781 acgccgggca agagcaactc ggtcgccgca tacactattc tcagaatgac ttggttgagt
3841 actcaccagt cacagaaaag catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg
3901 ctgccataac catgagtgat aacactgcgg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac
3961 cgaaggagct aaccgctttt ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt
4021 gggaaccgga gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgcag
4081 caatggcaac aacgttgcgc aaactattaa ctggcgaact acttactcta gcttcccggc
4141 aacaattaat agactggatg gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgctcggccc
4201 ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggta
4261 tcattgcagc actggggcca gatggtaagc cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg
4321 ggagtcaggc aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga
4381 ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt actcatatat actttagatt gatttaaaac
4441 ttcattttta atttaaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgaccaaaa
4501 tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat
4561 cttcttgaga tccttttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc
4621 taccagcggt ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg
4681 gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc
4741 acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgctct gctaatcctg ttaccagtgg
4801 ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg
4861 ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa
4921 cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg
4981 aagggagaaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga
5041 gggagcttcc agggggaaac gcctggtatc tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct
5101 gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca
5161 gcaacgcggc ctttttacgg ttcctggcct tttgctggcc ttttgctcac atgttctttc
5221 ctgcgttatc ccctgattct gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg
5281 ctcgccgcag ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagtgag cgaggaagcg gaagagcgcc
5341 tgatgcggta ttttctcctt acgcatctgt gcggtatttc acaccgcata tatggtgcac
5401 tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gttaagccag tatacactcc gctatcgcta
5461 cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg
5521 gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg
5581 tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa cgcgcgaggc agctgcggta aagctcatca
5641 gcgtggtcgt gaagcgattc acagatgtct gcctgttcat ccgcgtccag ctcgttgagt
5701 ttctccagaa gcgttaatgt ctggcttctg ataaagcggg ccatgttaag ggcggttttt
5761 tcctgtttgg tcactgatgc ctccgtgtaa gggggatttc tgttcatggg ggtaatgata
5821 ccgatgaaac gagagaggat gctcacgata cgggttactg atgatgaaca tgcccggtta
5881 ctggaacgtt gtgagggtaa acaactggcg gtatggatgc ggcgggacca gagaaaaatc
5941 actcagggtc aatgccagcg cttcgttaat acagatgtag gtgttccaca gggtagccag
6001 cagcatcctg cgatgcagat ccggaacata atggtgcagg gcgctgactt ccgcgtttcc
6061 agactttacg aaacacggaa accgaagacc attcatgttg ttgctcaggt cgcagacgtt
6121 ttgcagcagc agtcgcttca cgttcgctcg cgtatcggtg attcattctg ctaaccagta
6181 aggcaacccc gccagcctag ccgggtcctc aacgacagga gcacgatcat gcgcacccgt
6241 ggggccgcca tgccggcgat aatggcctgc ttctcgccga aacgtttggt ggcgggacca
6301 gtgacgaagg cttgagcgag ggcgtgcaag attccgaata ccgcaagcga caggccgatc
6361 atcgtcgcgc tccagcgaaa gcggtcctcg ccgaaaatga cccagagcgc tgccggcacc
6421 tgtcctacga gttgcatgat aaagaagaca gtcataagtg cggcgacgat agtcatgccc
6481 cgcgcccacc ggaaggagct gactgggttg aaggctctca agggcatcgg tcgagatccc
6541 ggtgcctaat gagtgagcta acttacatta attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag
6601 tcgggaaacc tgtcgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggt
6661 ttgcgtattg ggcgccaggg tggtttttct tttcaccagt gagacgggca acagctgatt
6721 gcccttcacc gcctggccct gagagagttg cagcaagcgg tccacgctgg tttgccccag
6781 caggcgaaaa tcctgtttga tggtggttaa cggcgggata taacatgagc tgtcttcggt
6841 atcgtcgtat cccactaccg agatatccgc accaacgcgc agcccggact cggtaatggc
6901 gcgcattgcg cccagcgcca tctgatcgtt ggcaaccagc atcgcagtgg gaacgatgcc
6961 ctcattcagc atttgcatgg tttgttgaaa accggacatg gcactccagt cgccttcccg
7021 ttccgctatc ggctgaattt gattgcgagt gagatattta tgccagccag ccagacgcag

[0404]

```
     7081 acgcgccgag acagaactta atgggcccgc taacagcgcg atttgctggt gacccaatgc
     7141 gaccagatgc tccacgccca gtcgcgtacc gtcttcatgg gagaaaataa tactgttgat
     7201 gggtgtctgg tcagagacat caagaaataa cgccggaaca ttagtgcagg cagcttccac
     7261 agcaatggca tcctggtcat ccagcggata gttaatgatc agcccactga cgcgttgcgc
     7321 gagaagattg tgcaccgccg ctttacaggc ttcgacgccg cttcgttcta ccatcgacac
     7381 caccacgctg gcacccagtt gatcggcgcg agatttaatc gccgcgacaa tttgcgacgg
     7441 cgcgtgcagg gccagactgg aggtggcaac gccaatcagc aacgactgtt tgcccgccag
     7501 ttgttgtgcc acgcggttgg gaatgtaatt cagctccgcc atcgccgctt ccacttttc
     7561 ccgcgttttc gcagaaacgt ggctggcctg gttcaccacg cgggaaacgg tctgataaga
     7621 gacaccggca tactctgcga catcgtataa cgttactggt ttcacattca ccaccctgaa
     7681 ttgactctct tccgggcgct atcatgccat accgcgaaag gttttgcgcc attcgatggt
     7741 gtccgggatc tcgacgctct cccttatgcg actcctgcat taggaagcag cccagtagta
     7801 ggttgaggcc gttgagcacc gccgccgcaa ggaatggtgc atgcaaggag atggcgccca
     7861 acagtccccc ggc
```

서열번호 2

```
LOCUS       pET_his_del_pD          7702 bp    DNA     circular      6-JUN-
2007
SOURCE
  ORGANISM
COMMENT     This file is created by Vector NTI
            http://www.invitrogen.com/
COMMENT     VNTDATE|448455242|
COMMENT     VNTDBDATE|448455855|
COMMENT     LSOWNER|
COMMENT     VNTNAME|pET_his_del_pD|
COMMENT     VNTAUTHORNAME|Remigijus Skirgaila|
COMMENT     VNTAUTHORTEL|+370-5-2394224|
COMMENT     VNTAUTHOREML|skirgaila@fermentas.lt|
COMMENT     VNTAUTHORWWW|www.fermentas.com|
FEATURES             Location/Qualifiers
     misc_feature    2499..2588
                     /vntifkey="21"
                     /label=gs\linker
     misc_feature    2193..2222
                     /vntifkey="21"
                     /label=gs\linker
     misc_feature    2223..2498
                     /vntifkey="21"
                     /label=pD
     promoter        174..190
                     /vntifkey="30"
                     /label=PT7
     rep_origin      complement(2765..2765)
                     /vntifkey="33"
                     /label=ori
     rep_origin      2776..3231
                     /vntifkey="33"
                     /label=f1\origin
     terminator      2693..2739
                     /vntifkey="43"
                     /label=T7\terminator
     CDS             complement(6415..7503)
                     /vntifkey="4"
                     /label=lacI
                     /note="ORF: Frame #3   Start: gtg   Stop:  tga"
```

[0405]

```
     CDS             3363..4220
                     /vntifkey="4"
                     /label=Ap
                     /note="ORF: Frame #2   Start: atg   Stop:  taa"
     misc_feature    258..305
                     /vntifkey="21"
                     /label=his
     misc_feature    306..2192
                     /vntifkey="21"
                     /label=del
BASE COUNT     1823 a      2115 c      2033 g      1731 t
ORIGIN
        1 cacggggcct gccaccatac ccacgccgaa acaagcgctc atgagcccga agtggcgagc
       61 ccgatcttcc ccatcggtga tgtcggcgat ataggcgcca gcaaccgcac ctgtggcgcc
      121 ggtgatgccg gccacgatgc gtccggcgta gaggatcgag atctatacga aattaatacg
      181 actcactata gggagaccac aacggtttcc ctctagaaat aattttgttt aactttaaga
      241 aagaggagaa attacatatg agaggatcgc atcaccatca ccatcacgga tctggttcca
      301 tgggcatgac cctaaatata gaagatgagc atcggctaca tgagacctca aaagagccag
      361 atgtttctct agggtccaca tggctgtctg attttcctca ggcctgggcg gaaaccgggg
      421 gcatgggact ggcagttcgc caagctcctc tgatcatacc tctgaaagca acctctaccc
      481 ccgtgtccat aaaacaatac cccatgtcac aagaagccag actggggatc aagccccaca
      541 tacagagact gttggaccag ggaatactgg taccctgcca gtccccctgg aacacgcccc
      601 tgctacccgt taagaaacca gggactaatg attataggcc tgtccaggat ctgagagaag
      661 tcaacaagcg ggtggaagac atccacccca ccgtgcccaa cccttacaac ctcttgagcg
      721 ggctcccacc gtcccaccag tggtacactg tgcttgattt aaaggatgcc tttttctgcc
      781 tgagactcca ccccaccagt cagcctctct tcgcctttga gtggagagat ccagagatgg
      841 gaatctcagg acaattgacc tggaccagac tcccacaggg tttcaaaaac agtcccaccc
      901 tgtttgatga ggcactgcac agagacctag cagacttccg gatccagcac ccagacttga
      961 tcctgctaca gtacgtggat gacttactgc tggccgccac ttctgagcta gactgccaac
     1021 aaggtactcg ggccctgtta caaaccctag ggacggcagg cttctgtcgc ctctggatcc
     1081 ctgggtttgc agaaatggca gccccccttgt accctctcac caaaacgggg actctgttta
     1141 attggggccc agaccaacaa aaggcctatc aagaaatcaa gcaagctctt ctaactgccc
     1201 cagccctggg gttgccagat ttgactaagc cctttgaact ctttgtcgac gagaagcagg
     1261 gctacgccaa aggtgtccta acgcaaaaac tgggaccttg gcgtcggccg gtggcctacc
     1321 tgtccaaaaa gctagaccca gtagcagctg ggtggccccc ttgcctacgg atggtagcag
     1381 ccattgccgt actgacaaag gatgcaggca agctaaccat gggacagcca ctagtcattc
     1441 tggcccccca tgcagtagag gcactagtca aacaaccccc cgaccgctgg ctttccaacg
     1501 cccggatgac tcactatcag gccttgcttt tggacacgga ccgggtccag ttcggaccgg
     1561 tggtagccct gaacccggct acgctgctcc cactgcctga ggaagggctg caacacaact
     1621 gccttgatat cctggccgaa gcccacggaa cccgacccga cctaacggac cagccgctcc
     1681 cagacgccga ccacacctgg tacacggatg gaagcagtct cttacaagag ggacagcgta
     1741 aggcgggagc tgcggtgacc accgagaccg aggtaatctg ggctaaagcc ctgccagccg
     1801 ggacatccgc tcagcgggct gaactgatag cactcaccca ggccctaaag atggcagaag
     1861 gtaagaagct aaatgtttat actaatagcc gttatgcttt tgctactgcc catatccatg
     1921 gagaaatata cagaaggcgt gggttgctca catcagaagg caaagagatc aaaaataaag
     1981 acgagatctt ggccctacta aaagccctct ttctgcccaa aagacttagc ataatccatt
     2041 gtccaggaca tcaaaaggga cacagcgccg aggctagagg caaccggatg gctgaccaag
     2101 cggcccgaaa ggcagccatc acagagactc cagacacctc taccctcctc atagaaaatt
     2161 catcacccaa ttcccgctta attaatgaat tcggatccgg tggcggttcc ggcggtggat
     2221 ctatgggtac cgcaaccgcg cccggcggat tgagtgcgaa agcgcctgca atgaccccgc
     2281 tgatgctgga cacctccagc cgtaagctgg ttgcgtggga tggcaccacc gacggtgctg
     2341 ccgttggcat tcttgcggtt gctgctgacc agaccagcac cacgctgacg ttctacaagt
     2401 ccggcacgtt ccgttatgag gatgtgctct ggccggaggc tgccagcgac gagacgaaaa
     2461 aacggaccgc gtttgccgga acggcaatca gcatcgttgg atctggtggc ggttccggcg
     2521 gtggatctgg tggcggttcc ggcggtggat ctggtggcgg ttccggcggt ggatcgtgtc
     2581 ttctttaagc ttgcggccgc actcgagcac caccaccacc accactgaga tccggctgct
     2641 aacaaagccc gaaaggaagc tgagttggct gctgccaccg ctgagcaata actagcataa
     2701 ccccttgggg cctctaaacg ggtcttgagg ggtttttttgc tgaaaggagg aactatatcc
     2761 ggattggcga atgggacgcg ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt gtggtggtta
```

[0406]

```
2821 cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctcctttc gctttcttcc
2881 cttccttttct cgccacgttc gccggctttc cccgtcaagc tctaaatcgg gggctccctt
2941 tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat tagggtgatg
3001 gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg ttggagtcca
3061 cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct atctcggtct
3121 attcttttga tttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga
3181 tttaacaaaa atttaacgcg aattttaaca aaatattaac gtttacaatt tcaggtggca
3241 cttttcgggg aaatgtgcgc ggaacccctа tttgtttatt tttctaaata cattcaaata
3301 tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aaatgcttca ataatattga aaaaggaaga
3361 gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc
3421 ctgtttttgc tcacccagaa acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg
3481 cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc
3541 ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat
3601 cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgcat acactattct cagaatgact
3661 tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat
3721 tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata acactgcggc caacttactt ctgacaacga
3781 tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc
3841 ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga
3901 tgcctgcagc aatggcaaca acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag
3961 cttcccggca acaattaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc
4021 gctcggccct tccggctggc tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt
4081 ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct
4141 acacgacggg gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg
4201 cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagttta ctcatatata ctttagattg
4261 atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca
4321 tgaccaaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga
4381 tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa
4441 aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga
4501 aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagtg tagccgtagt
4561 taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt
4621 taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat
4681 agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct
4741 tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca
4801 cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag
4861 agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc
4921 gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc agggggggcgg agcctatgga
4981 aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca
5041 tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagtgag
5101 ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg
5161 aagagcgcct gatgcggtat tttctcctta cgcatctgtg cggtatttca caccgcatat
5221 atggtgcact ctcagtacaa tctgctctga tgccgcatag ttaagccagt atacactccg
5281 ctatcgctac gtgactgggt catggctgcg ccccgacacc cgccaacacc cgctgacgcg
5341 ccctgacggg cttgtctgct cccggcatcc gcttacagac aagctgtgac cgtctccggg
5401 agctgcatgt gtcagaggtt ttcaccgtca tcaccgaaac gcgcgaggca gctgcggtaa
5461 agctcatcag cgtggtcgtg aagcgattca cagatgtctg cctgttcatc cgcgtccagc
5521 tcgttgagtt tctccagaag cgttaatgtc tggcttctga taaagcgggc catgttaagg
5581 gcggtttttt cctgtttggt cactgatgcc tccgtgtaag ggggatttct gttcatgggg
5641 gtaatgatac cgatgaaacg agagaggatg ctcacgatac gggttactga tgatgaacat
5701 gcccggttac tggaacgttg tgagggtaaa caactggcgg tatggatgcg gcgggaccag
5761 agaaaaatca ctcagggtca atgccagcgc ttcgttaata cagatgtagg tgttccacag
5821 ggtagccagc agcatcctgc gatgcagatc cggaacataa tggtgcaggg cgctgacttc
5881 cgcgtttcca gactttacga aacacggaaa ccgaagacca ttcatgttgt tgctcaggtc
5941 gcagacgttt tgcagcagca gtcgcttcac gttcgctcgc gtatcggtga ttcattctgc
6001 taaccagtaa ggcaacccccg ccagcctagc cgggtcctca acgacaggag cacgatcatg
6061 cgcacccgtg gggccgccat gccggcgata atggcctgct tctcgccgaa acgtttggtg
6121 gcgggaccag tgacgaaggc ttgagcgagg gcgtgcaaga ttccgaatac cgcaagcgac
6181 aggccgatca tcgtcgcgct ccagcgaaag cggtcctcgc cgaaaatgac ccagagcgct
6241 gccggcacct gtcctacgag ttgcatgata aagaagacag tcataagtgc ggcgacgata
6301 gtcatgcccc gcgcccaccg gaaggagctg actgggttga aggctctcaa gggcatcggt
```

[0407]

```
6361 cgagatcccg gtgcctaatg agtgagctaa cttacattaa ttgcgttgcg ctcactgccc
6421 gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg
6481 agaggcggtt tgcgtattgg gcgccagggt ggtttttctt ttcaccagtg agacgggcaa
6541 cagctgattg cccttcaccg cctggccctg agagagttgc agcaagcggt ccacgctggt
6601 ttgccccagc aggcgaaaat cctgtttgat ggtggttaac ggcgggatat aacatgagct
6661 gtcttcggta tcgtcgtatc ccactaccga gatatccgca ccaacgcgca gcccggactc
6721 ggtaatggcg cgcattgcgc ccagcgccat ctgatcgttg gcaaccagca tcgcagtggg
6781 aacgatgccc tcattcagca tttgcatggt ttgttgaaaa ccggacatgg cactccagtc
6841 gccttcccgt tccgctatcg gctgaatttg attgcgagtg agatatttat gccagccagc
6901 cagacgcaga cgcgccgaga cagaacttaa tgggcccgct aacagcgcga tttgctggtg
6961 acccaatgcg accagatgct ccacgcccag tcgcgtaccg tcttcatggg agaaaataat
7021 actgttgatg ggtgtctggt cagagacatc aagaaataac gccggaacat tagtgcaggc
7081 agcttccaca gcaatggcat cctggtcatc cagcggatag ttaatgatca gcccactgac
7141 gcgttgcgcg agaagattgt gcaccgccgc tttacaggct tcgacgccgc ttcgttctac
7201 catcgacacc accacgctgg cacccagttg atcggcgcga gatttaatcg ccgcgacaat
7261 ttgcgacggc gcgtgcaggg ccagactgga ggtggcaacg ccaatcagca acgactgttt
7321 gcccgccagt tgttgtgcca cgcggttggg aatgtaattc agctccgcca tcgccgcttc
7381 cacttttcc cgcgttttcg cagaaacgtg gctggcctgg ttcaccacgc gggaaacggt
7441 ctgataagag acaccggcat actctgcgac atcgtataac gttactggtt tcacattcac
7501 caccctgaat tgactctctt ccgggcgcta tcatgccata ccgcgaaagg ttttgcgcca
7561 ttcgatggtg tccgggatct cgacgctctc ccttatgcga ctcctgcatt aggaagcagc
7621 ccagtagtag gttgaggccg ttgagcaccg ccgccgcaag gaatggtgca tgcaaggaga
7681 tggcgcccaa cagtcccccg gc
```

서열번호 3

```
oligonucleotide (22 b)
pro-pIVEX
5′-GCGAGCCCGATCTTCCCCATCG-3′
```

서열번호 4

```
oligonucleotide (21 b)
pD-ter
5′-AAGAAGACACGATCCACCGCC-3′
```

서열번호 5

```
oligonucleotide (38 b)
assrA
5′-TTAAGCTGCTAAAGCGTAGTTTTCGTCGTTTGCGACTA-3′
```

서열번호 6

```
protein (833 aa)
MLV_pD
mrgshhhhhhgsgsmgmtlniedehrlhetskepdvslgstwlsdfpqawaetggmglavrqapliiplkatstpvs
ikqypmsqearlgikphiqrlldqgilvpcqspwntpllpvkkpgtndyrpvqdlrevnkrvedihptvpnpynlls
glppshqwytvldlkdaffclrlhptsqplfafewrdpemgisgqltwtrlpqgfknsptlfdealhrdladfriqh
pdlillqyvddlllaatseldcqqgtrallqtlgnlgyrasakkaqicqkqvkylgyllkegqrwltearketvmgq
ptpktprqlreflgtagfcrlwipgfaemaaplypltktgtlfnwgpdqqkayqeikqalltapalglpdltkpfel
```

[0408]

fvdekqgyakgvltqklgpwrrpvaylskkldpvaagwppclrmvaaiavltkdagkltmgqplvilaphavealvk
qppdrwlsnarmthyqallldtdrvqfgpvvalnpatllplpeeglqhncldilaeahgtrpdltdqplpdadhtwy
tdgssllqegqrkagaavtteteviwakalpagtsaqraelialtqalkmaegkklnvytdsryafatahihgeiyr
rrglltsegkeiknkdeilallkalflpkrlsiihcpghqkghsaeargnrmadqaarkaaitetpdtstllienss
pnsrlinefgsgggsgggsmgtatapgglsakapamtplmldtssrklvawdgttdgaavgilavaadqtsttltfy
ksgtfryedvlwpeaasdetkkrtafagtaisivgsgggsgggsgggsgggsgggscll

서열번호 7

protein (766 aa)
del_pD
mrgshhhhhhgsgsmgmtlniedehrlhetskepdvslgstwlsdfpqawaetggmglavrqapliiplkatstpvs
ikqypmsqearlgikphiqrlldqgilvpcqspwntpllpvkkpgtndyrpvqdlrevnkrvedihptvpnpynlls
glppshqwytvldlkdaffclrlhptsqplfafewrdpemgisgqltwtrlpqgfknsptlfdealhrdladfriqh
pdlillqyvddlllaatseldcqqgtrallqtlgtagfcrlwipgfaemaaplypltktgtlfnwgpdqqkayqeik
qalltapalglpdltkpfelfvdekqgyakgvltqklgpwrrpvaylskkldpvaagwppclrmvaaiavltkdagk
ltmgqplvilaphavealvkqppdrwlsnarmthyqallldtdrvqfgpvvalnpatllplpeeglqhncldilaea
hgtrpdltdqplpdadhtwytdgssllqegqrkagaavtteteviwakalpagtsaqraelialtqalkmaegkkln
vytdsryafatahihgeiyrrrglltsegkeiknkdeilallkalflpkrlsiihcpghqkghsaeargnrmadqaa
rkaaitetpdtstlliensspnsrlinefgsgggsgggsmgtatapgglsakapamtplmldtssrklvawdgttdg
aavgilavaadqtsttltfyksgtfryedvlwpeaasdetkkrtafagtaisivgsgggsgggsgggsgggsgggsg
ggscll

서열번호 8

oligonucleotide (15 b)
pD_42
5′-TTACGGCTGGAGGTG-3′

서열번호 9

oligonucleotide (28 b)
RD_Nde
5′- CTTTAAGAAAGAGGAGAAATTACATATG-3′

서열번호 10

oligonucleotide (14 b)
pD_55
5′-GCCGGGCGCGGTTG-3′

서열번호 11

oligonucleotide (23 b)
M_F
5′-GATCAAGCCCCACATACAGAGAC-3′

[0409] 서열번호 12

oligonucleotide (19 b)
M_2R
5′-GCCCTGCTTCTCGTCGACA-3′

서열번호 13

oligonucleotide (40 b)
M_Esp
5′-ATCGTCTCCCATGGGCATGACCCTAAATATAGAAGATGAG-3′

서열번호 14

oligonucleotide (32 b)
M_Eri
5′-AATGAATTCATTAATTAAGCGGGAATTGGGTG-3′

서열번호 15

oligonucleotide (18 b)
M_1R
5′-CAGGGCCCGAGTACCTTG-3′

서열번호 16

oligonucleotide (17 b)
M_3F
5′-CCAGTTCGGACCGGTGG-3′

서열번호 17

oligonucleotide (19 b)
pD_ter-
5′-AAGAAGACACGATCCACCG-3′

서열번호 18

oligonucleotide (36 b)
M_Hind3+
5′-CGGATCAAGCTTAATTAATTAAGCGGGAATTGGGTG-3′

서열번호 19

[0410]

LOCUS pET_his_MLV 7474 bp DNA circular 4-JUN-2007

```
SOURCE
  ORGANISM
COMMENT     This file is created by Vector NTI
            http://www.invitrogen.com/
COMMENT     ORIGDB|GenBank
COMMENT     VNTDATE|446486240|
COMMENT     VNTDBDATE|448293778|
COMMENT     LSOWNER|
COMMENT     VNTNAME|pET_his_MLV|
COMMENT     VNTAUTHORNAME|Remigijus Skirgaila|
COMMENT     VNTAUTHORTEL|+370-5-2394224|
COMMENT     VNTAUTHOREML|skirgaila@fermentas.lt|
COMMENT     VNTAUTHORWWW|www.fermentas.com|
FEATURES             Location/Qualifiers
     CDS             3135..3992
                     /vntifkey="4"
                     /label=Ap
                     /note="ORF: Frame #2   Start: atg   Stop:  taa"
     CDS             complement(6187..7275)
                     /vntifkey="4"
                     /label=lacI
                     /note="ORF: Frame #3   Start: gtg   Stop:  tga"
     terminator      2465..2511
                     /vntifkey="43"
                     /label=T7\terminator
     rep_origin      2548..3003
                     /vntifkey="33"
                     /label=f1\origin
     rep_origin      complement(2537..2537)
                     /vntifkey="33"
                     /label=ori
     promoter        174..190
                     /vntifkey="30"
                     /label=PT7
     CDS             306..2360
                     /vntifkey="4"
                     /label=MLV
     CDS             258..305
                     /vntifkey="4"
                     /label=his
BASE COUNT     1810 a      2046 c      1942 g      1676 t
ORIGIN
        1 cacggggcct gccaccatac ccacgccgaa acaagcgctc atgagcccga agtggcgagc
       61 ccgatcttcc ccatcggtga tgtcggcgat ataggcgcca gcaaccgcac ctgtggcgcc
      121 ggtgatgccg gccacgatgc gtccggcgta gaggatcgag atctatacga aattaatacg
      181 actcactata gggagaccac aacggtttcc ctctagaaat aattttgttt aactttaaga
      241 aagaggagaa attacatatg agaggatcgc atcaccatca ccatcacgga tctggttcca
      301 tgggcatgac cctaaatata gaagatgagc atcggctaca tgagacctca aaagagccag
      361 atgtttctct agggtccaca tggctgtctg attttcctca ggcctgggcg gaaaccgggg
      421 gcatgggact ggcagttcgc caagctcctc tgatcatacc tctgaaagca acctctaccc
      481 ccgtgtccat aaaacaatac cccatgtcac aagaagccag actggggatc aagccccaca
      541 tacagagact gttggaccag ggaatactgg taccctgcca gtccccctgg aacacgcccc
      601 tgctacccgt taagaaacca gggactaatg attataggcc tgtccaggat ctgagagaag
      661 tcaacaagcg ggtggaagac atccacccca ccgtgcccaa cccttacaac ctcttgagcg
      721 ggctcccacc gtcccaccag tggtacactg tgcttgattt aaaggatgcc ttttttctgcc
      781 tgagactcca ccccaccagt cagcctctct tcgcctttga gtggagagat ccagagatgg
      841 gaatctcagg acaattgacc tggaccagac tcccacaggg tttcaaaaac agtcccaccc
      901 tgtttgatga ggcactgcac agagacctag cagacttccg gatccagcac ccagacttga
      961 tcctgctaca gtacgtggat gacttactgc tggccgccac ttctgagcta gactgccaac
```

[0411]

```
1021 aaggtactcg ggccctgtta caaaccctag ggaacctcgg gtatcgggcc tcggccaaga
1081 aagcccaaat ttgccagaaa caggtcaagt atctggggta tcttctaaaa gagggtcaga
1141 gatggctgac tgaggccaga aaagagactg tgatggggca gcctactccg aagacccctc
1201 gacaactaag ggagttccta gggacggcag gcttctgtcg cctctggatc cctgggtttg
1261 cagaaatggc agcccccttg taccctctca ccaaaacggg gactctgttt aattgggggcc
1321 cagaccaaca aaaggcctat caagaaatca agcaagctct tctaactgcc ccagccctgg
1381 ggtttgccaga tttgactaag ccctttgaac tctttgtcga cgagaagcag ggctacgcca
1441 aaggtgtcct aacgcaaaaa ctgggacctt ggcgtcggcc ggtggcctac ctgtccaaaa
1501 agctagaccc agtagcagct gggtggcccc cttgcctacg gatggtagca gccattgccg
1561 tactgacaaa ggatgcaggc aagctaacca tgggacagcc actagtcatt ctggcccccc
1621 atgcagtaga ggcactagtc aaacaacccc ccgaccgctg gctttccaac gcccggatga
1681 ctcactatca ggccttgctt ttggacacgg accgggtcca gttcggaccg gtggtagccc
1741 tgaacccggc tacgctgctc ccactgcctg aggaagggct gcaacacaac tgccttgata
1801 tcctggccga agcccacgga acccgacccg acctaacgga ccagccgctc ccagacgccg
1861 accacacctg gtacacggat ggaagcagtc tcttacaaga gggacagcgt aaggcgggag
1921 ctgcggtgac caccgagacc gaggtaatct gggctaaagc cctgccagcc gggacatccg
1981 ctcagcgggc tgaactgata gcactcaccc aggccctaaa gatggcagaa ggtaagaagc
2041 taaatgttta tactgatagc cgttatgctt ttgctactgc ccatatccat ggagaaatat
2101 acagaaggcg tgggttgctc acatcagaag gcaaagagat caaaaataaa gacgagatct
2161 tggccctact aaaagccctc tttctgccca aaagacttag cataatccat tgtccaggac
2221 atcaaaaggg acacagcgcc gaggctagag gcaaccggat ggctgaccaa gcggcccgaa
2281 aggcagccat cacagagact ccagacacct ctaccctcct catagaaaat tcatcaccca
2341 attcccgctt aattaattaa gcttgcggcc gcactcgagc accaccacca ccaccactga
2401 gatccggctg ctaacaaagc ccgaaaggaa gctgagttgg ctgctgccac cgctgagcaa
2461 taactagcat aaccccttgg ggcctctaaa cgggtcttga ggggtttttt gctgaaagga
2521 ggaactatat ccggattggc gaatgggacg cgccctgtag cggcgcatta agcgcggcgg
2581 gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt
2641 tcgctttctt cccttccttt ctcgccacgt tcgccggctt tccccgtcaa gctctaaatc
2701 gggggctccc tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg
2761 attagggtga tggttcacgt agtgggccat cgccctgata gacggttttt cgccctttga
2821 cgttggagtc cacgttcttt aatagtggac tcttgttcca aactggaaca acactcaacc
2881 ctatctcggt ctattctttt gatttataag ggattttgcc gatttcggcc tattggttaa
2941 aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattttaa caaaatatta acgtttacaa
3001 tttcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa
3061 tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt
3121 gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgcgg
3181 cattttgcct tcctgttttt gctcacccag aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag
3241 atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcggt aagatccttg
3301 agagttttcg ccccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg
3361 gcgcggtatt atcccgtatt gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt
3421 ctcagaatga cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga
3481 cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaacttac
3541 ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac atgggggatc
3601 atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc
3661 gtgacaccac gatgcctgca gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac
3721 tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag
3781 gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg
3841 gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgta
3901 tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg
3961 ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata
4021 tactttagat tgatttaaaa cttcatttttt aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt
4081 ttgataatct catgaccaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc
4141 ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atccttttttt tctgcgcgta atctgctgct
4201 tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa
4261 ctcttttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag
4321 tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc
4381 tgctaatcct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg
4441 actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca
4501 cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat
```

[0412]

```
4561 gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg
4621 tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc caggggggaaa cgcctggtat ctttatagtc
4681 ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc
4741 ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc
4801 cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg
4861 cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga
4921 gcgaggaagc ggaagagcgc ctgatgcggt attttctcct tacgcatctg tgcggtattt
4981 cacaccgcat atatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat agttaagcca
5041 gtatacactc cgctatcgct acgtgactgg gtcatggctg cgccccgaca cccgccaaca
5101 cccgctgacg cgccctgacg ggcttgtctg ctcccggcat ccgcttacag acaagctgtg
5161 accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg ttttcaccgt catcaccgaa acgcgcgagg
5221 cagctgcggt aaagctcatc agcgtggtcg tgaagcgatt cacagatgtc tgcctgttca
5281 tccgcgtcca gctcgttgag tttctccaga agcgttaatg tctggcttct gataaagcgg
5341 gccatgttaa gggcggtttt ttcctgtttg gtcactgatg cctccgtgta agggggattt
5401 ctgttcatgg gggtaatgat accgatgaaa cgagagagga tgctcacgat acgggttact
5461 gatgatgaac atgcccggtt actggaacgt tgtgagggta aacaactggc ggtatggatg
5521 cggcgggacc agagaaaaat cactcagggt caatgccagc gcttcgttaa tacagatgta
5581 ggtgttccac agggtagcca gcagcatcct gcgatgcaga tccggaacat aatggtgcag
5641 ggcgctgact tccgcgtttc cagactttac gaaacacgga aaccgaagac cattcatgtt
5701 gttgctcagg tcgcagacgt tttgcagcag cagtcgcttc acgttcgctc gcgtatcggt
5761 gattcattct gctaaccagt aaggcaaccc cgccagccta gccgggtcct caacgacagg
5821 agcacgatca tgcgcacccg tggggccgcc atgccggcga taatggcctg cttctcgccg
5881 aaacgtttgg tggcgggacc agtgacgaag gcttgagcga gggcgtgcaa gattccgaat
5941 accgcaagcg acaggccgat catcgtcgcg ctccagcgaa agcggtcctc gccgaaaatg
6001 acccagagcg ctgccggcac ctgtcctacg agttgcatga taaagaagac agtcataagt
6061 gcggcgacga tagtcatgcc ccgcgcccac cggaaggagc tgactgggtt gaaggctctc
6121 aagggcatcg gtcgagatcc cggtgcctaa tgagtgagct aacttacatt aattgcgttg
6181 cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc
6241 caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgccagg gtggtttttc ttttcaccag
6301 tgagacgggc aacagctgat tgcccttcac cgcctggccc tgagagagtt gcagcaagcg
6361 gtccacgctg gtttgcccca gcaggcgaaa atcctgtttg atggtggtta acggcgggat
6421 ataacatgag ctgtcttcgg tatcgtcgta tcccactacc gagatatccg caccaacgcg
6481 cagcccggac tcggtaatgg cgcgcattgc gcccagcgcc atctgatcgt tggcaaccag
6541 catcgcagtg ggaacgatgc cctcattcag catttgcatg gtttgttgaa aaccggacat
6601 ggcactccag tcgccttccc gttccgctat cggctgaatt tgattgcgag tgagatattt
6661 atgccagcca gccagacgca gacgcgccga gacagaactt aatgggcccg ctaacagcgc
6721 gatttgctgg tgacccaatg cgaccagatg ctccacgccc agtcgcgtac cgtcttcatg
6781 ggagaaaata atactgttga tgggtgtctg gtcagagaca tcaagaaata acgccggaac
6841 attagtgcag gcagcttcca cagcaatggc atcctggtca tccagcggat agttaatgat
6901 cagcccactg acgcgttgcg cgagaagatt gtgcaccgcc gctttacagg cttcgacgcc
6961 gcttcgttct accatcgaca ccaccacgct ggcacccagt tgatcggcgc gagatttaat
7021 cgccgcgaca atttgcgacg gcgcgtgcag ggccagactg gaggtggcaa cgccaatcag
7081 caacgactgt ttgcccgcca gttgttgtgc cacgcggttg ggaatgtaat tcagctccgc
7141 catcgccgct tccacttttt cccgcgtttt cgcagaaacg tggctggcct ggttcaccac
7201 gcgggaaacg gtctgataag agacaccggc atactctgcg acatcgtata acgttactgg
7261 tttcacattc accaccctga attgactctc ttccgggcgc tatcatgcca taccgcgaaa
7321 ggttttgcgc cattcgatgg tgtccgggat ctcgacgctc tcccttatgc gactcctgca
7381 ttaggaagca gcccagtagt aggttgaggc cgttgagcac cgccgccgca aggaatggtg
7441 catgcaagga gatggcgccc aacagtcccc cggc
```

서열번호 20

```
oligonucleotide (19 b)
pD-ter-
```

[0413]

5′-AAGAAGACACGATCCACCG-3′

서열번호 21

oligonucleotide (35 b)
long+
5′- CGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGAAGTC-3′

서열번호 22

oligonucleotide (71 b + 3′ modification ddC)
ddC-Long2
5′-TTTTTTTAGACTTCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGAAGAAGACACGAT
CCACCGCCGGTTCCG-ddC-3′

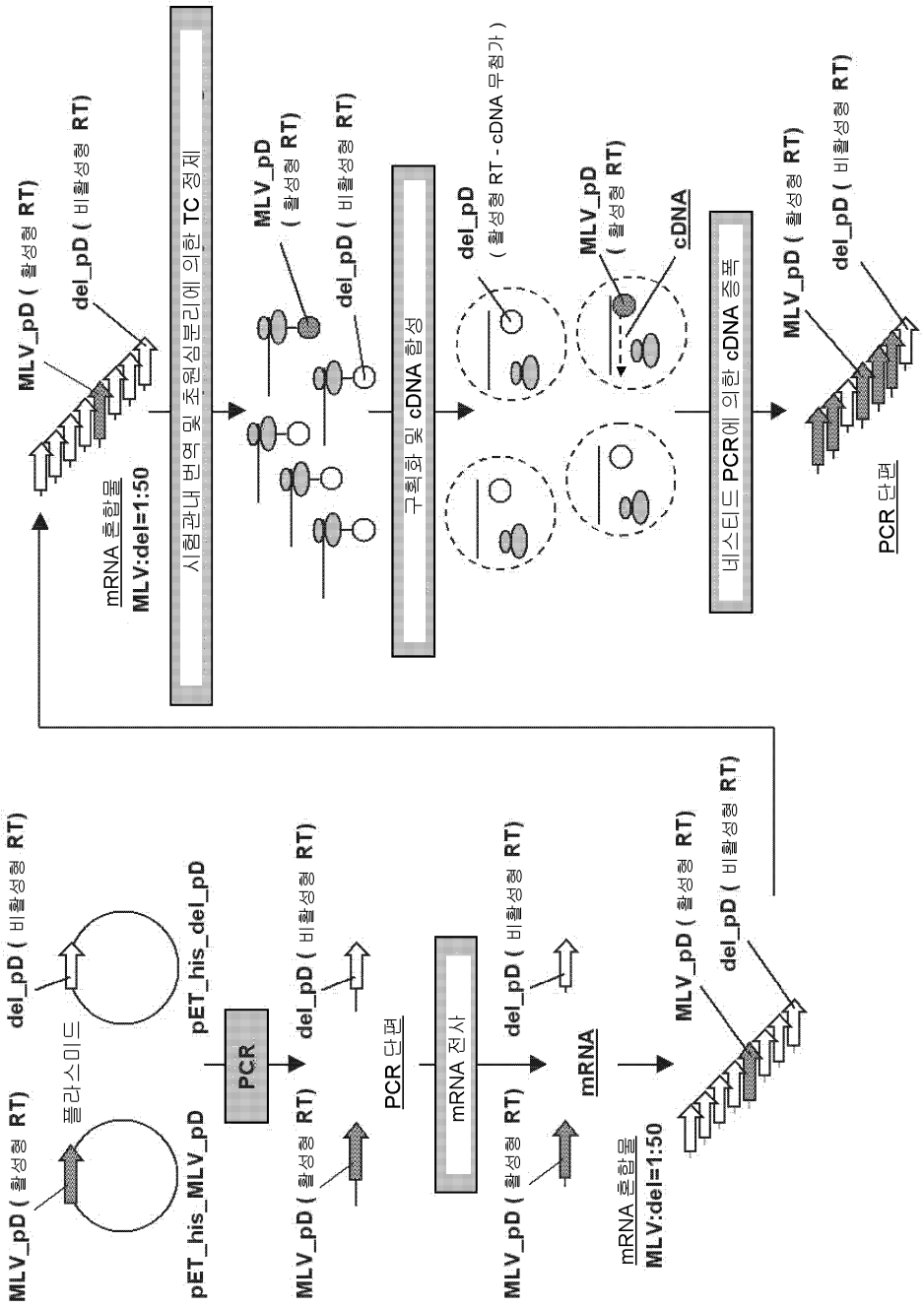
서열번호 23

oligonucleotide (35 b + 3′ Biotin (TEG)
Long+Tb
5′- CGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGAAGTC-Bio-3′

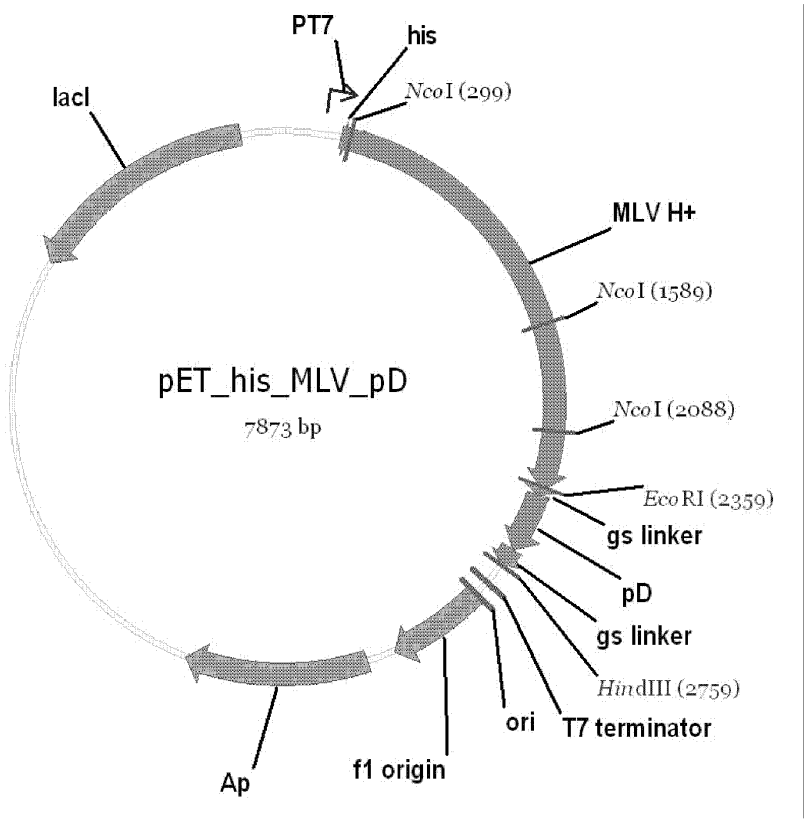
[0414]

도면

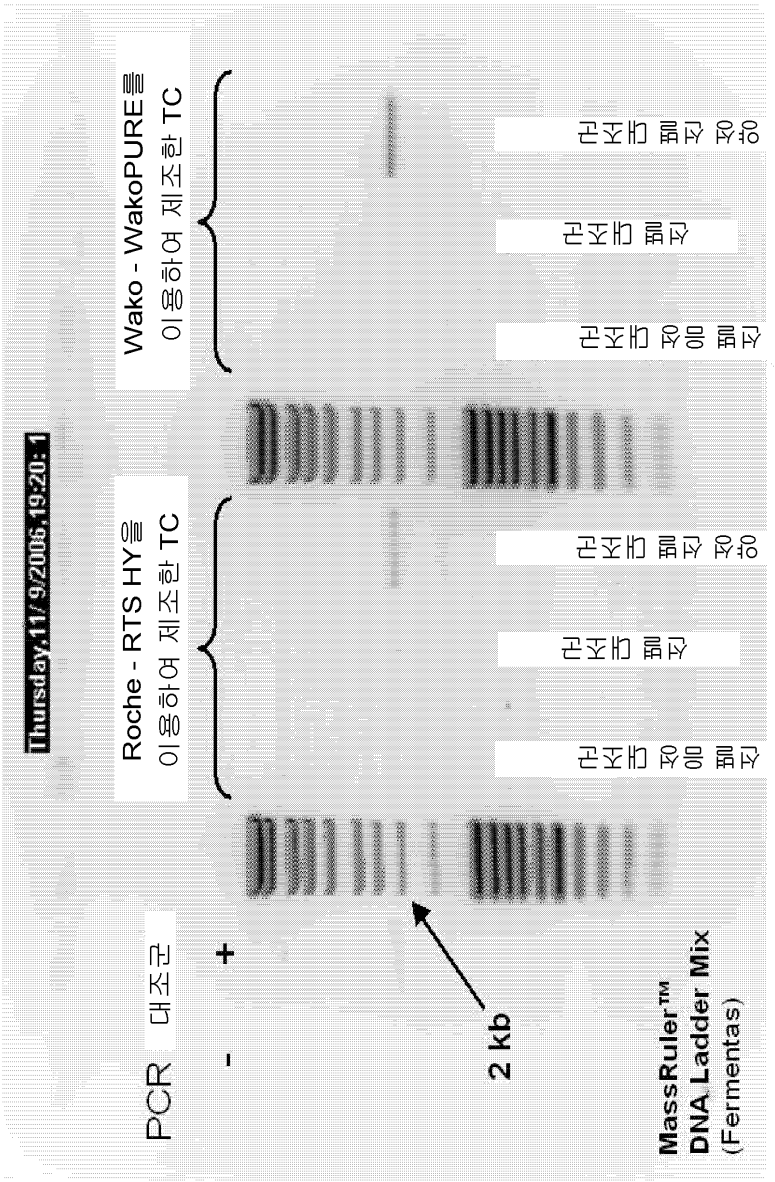
도면1


MLV_pD (활성형 RT)
del_pD (비활성형 RT)
mRNA 혼합물
MLV:del=1:50
시험관내 번역 및 초원심분리에 의한 TC 정제
MLV_pD
(활성형 RT)
del_pD (비활성형 RT)
구획화 및 cDNA 합성
del_pD
(활성형 RT - cDNA 무첨가)
MLV_pD
(활성형 RT)
cDNA
네스티드 PCR에 의한 cDNA 증폭
MLV_pD (활성형 RT)
del_pD (비활성형 RT)
PCR 단편
MLV_pD (활성형 RT)
del_pD (비활성형 RT)
플라스미드
pET_his_MLV_pD
pET_his_del_pD
PCR
MLV_pD (활성형 RT)
del_pD (비활성형 RT)
PCR 단편
mRNA 전사
MLV_pD (활성형 RT)
del_pD (비활성형 RT)
mRNA
mRNA 혼합물
MLV:del=1:50
MLV_pD (활성형 RT)
del_pD (비활성형 RT)

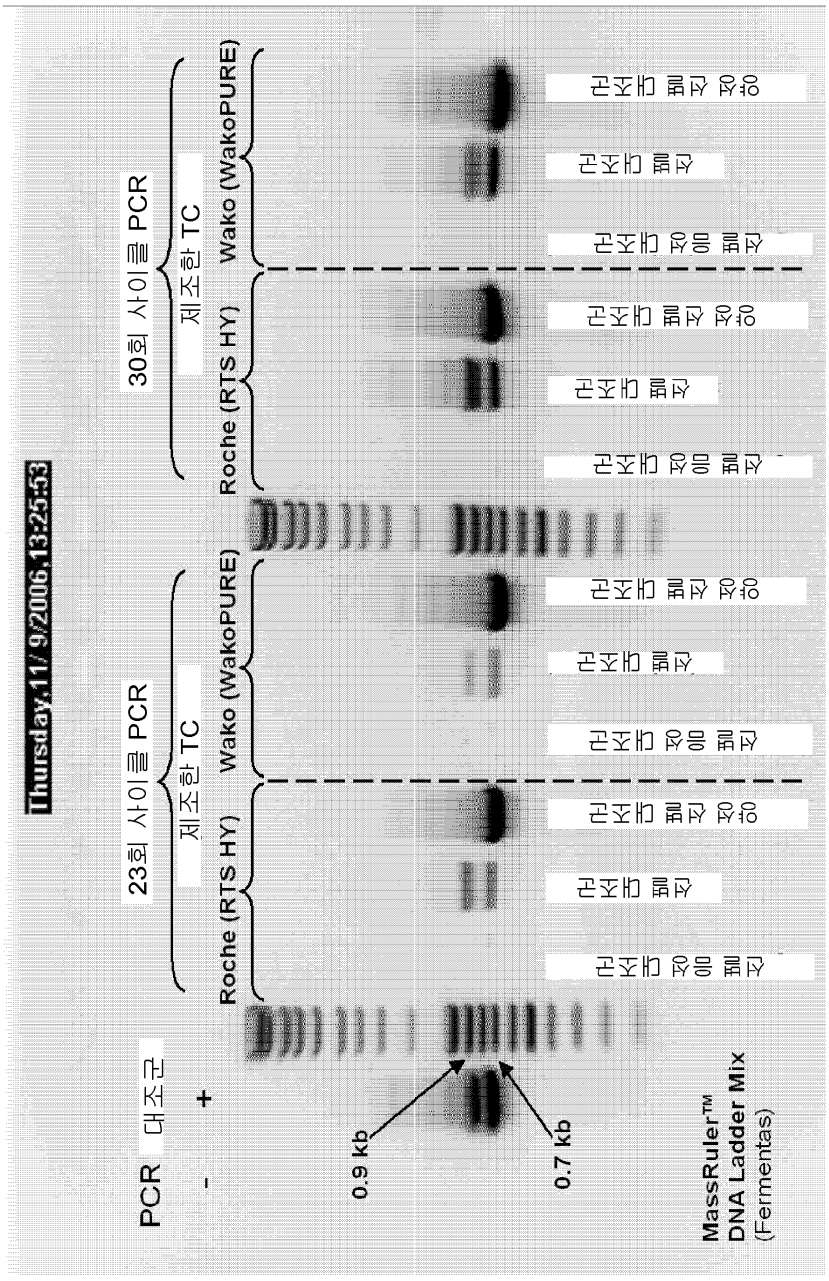
도면2


PT7
his
NcoI (299)
lacI
MLV H+
NcoI (1589)
pET_his_MLV_pD
7873 bp
NcoI (2088)
EcoRI (2359)
gs linker
pD
gs linker
HindIII (2759)
ori
T7 terminator
Ap
f1 origin

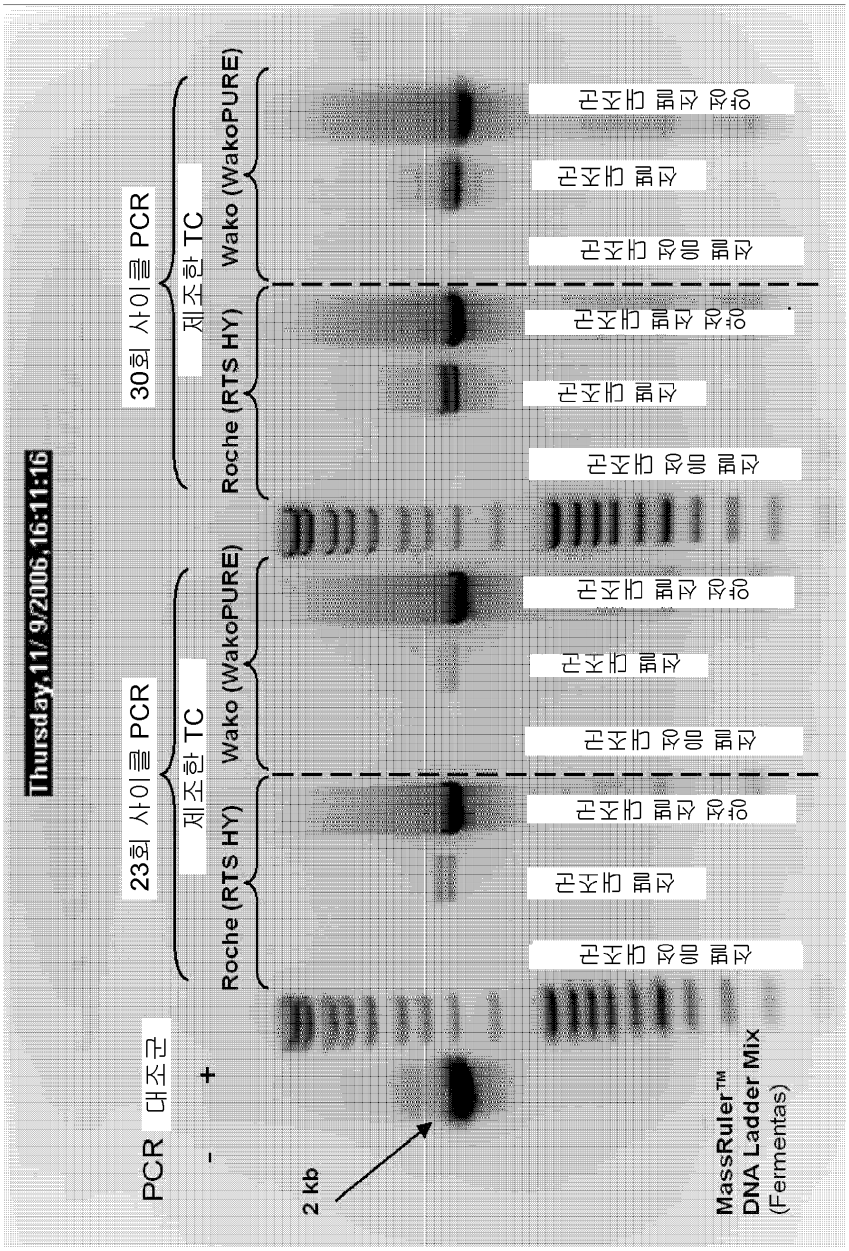
도면3


Thursday,11/ 9/2006,19:20: 1
PCR 대조군
-
+
2 kb
MassRuler™
DNA Ladder Mix
(Fermentas)
Roche - RTS HY을
이용하여 제조한 TC
Wako - WakoPURE를
이용하여 제조한 TC

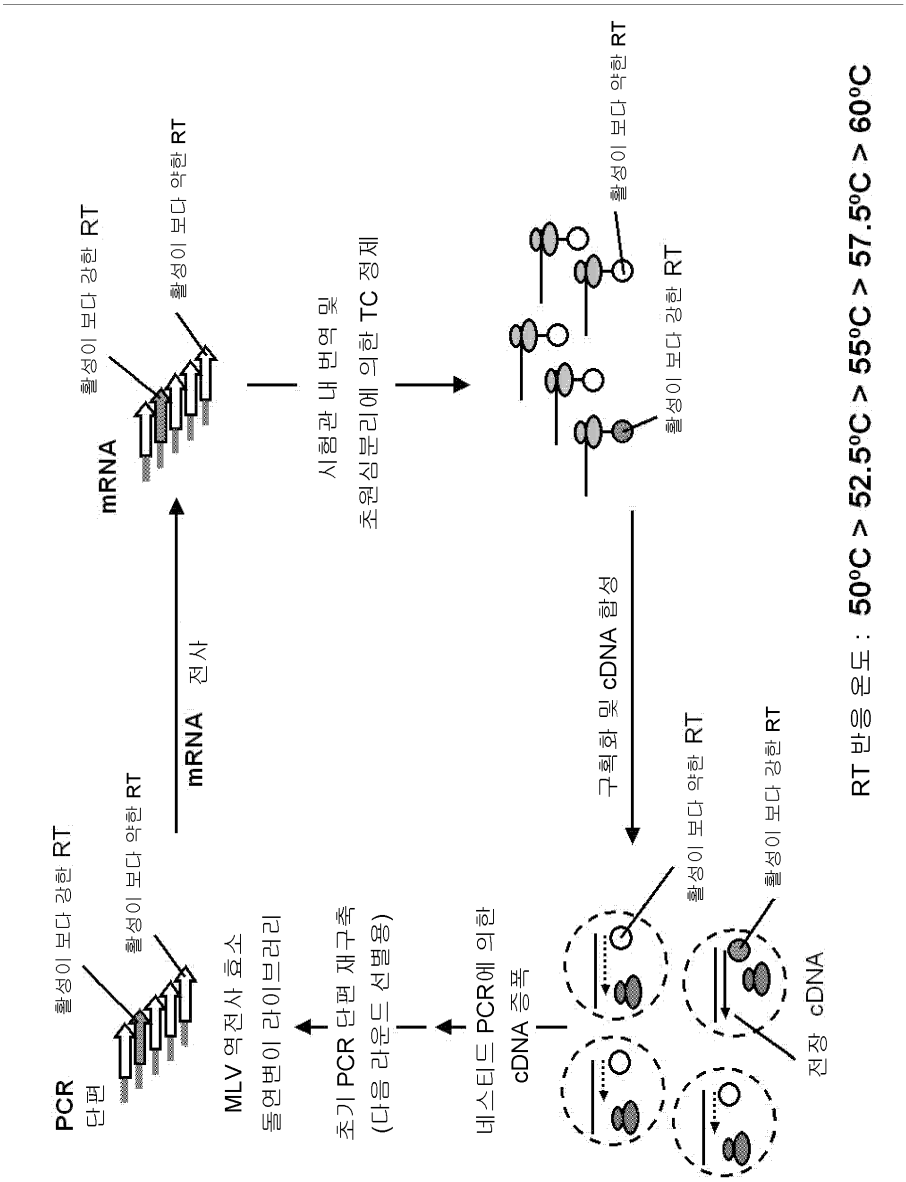
도면4


Thursday, 11/ 9/2006, 13:25:53
PCR 대조군
+
-
23회 사이클 PCR
30회 사이클 PCR
제조한 TC
Roche (RTS HY)
Wako (WakoPURE)
0.9 kb
0.7 kb
MassRuler™
DNA Ladder Mix
(Fermentas)

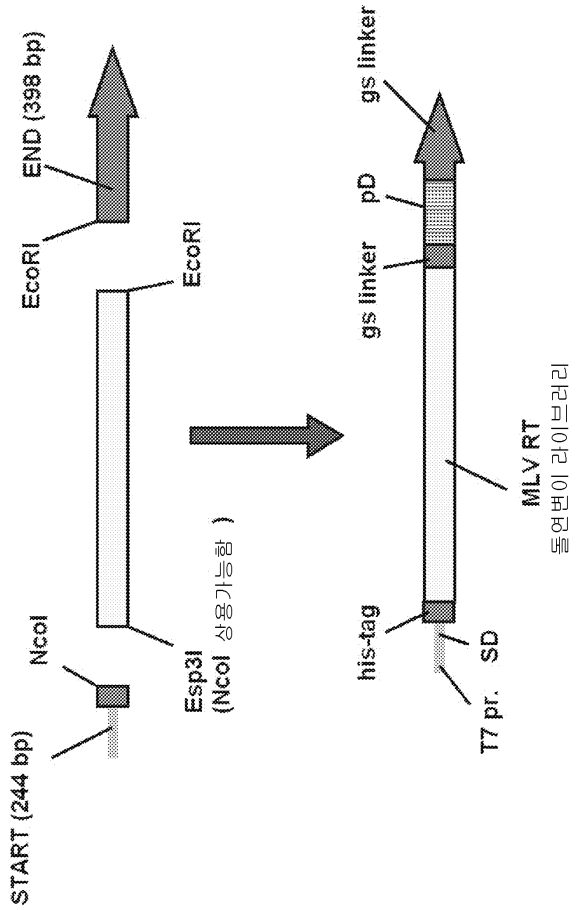
도면5


Thursday, 11/ 9/2006, 16:11:16
PCR 대조군
-
+
23회 사이클 PCR
제조한 TC
Roche (RTS HY)
Wako (WakoPURE)
30회 사이클 PCR
제조한 TC
Roche (RTS HY)
Wako (WakoPURE)
2 kb
MassRuler™
DNA Ladder Mix
(Fermentas)

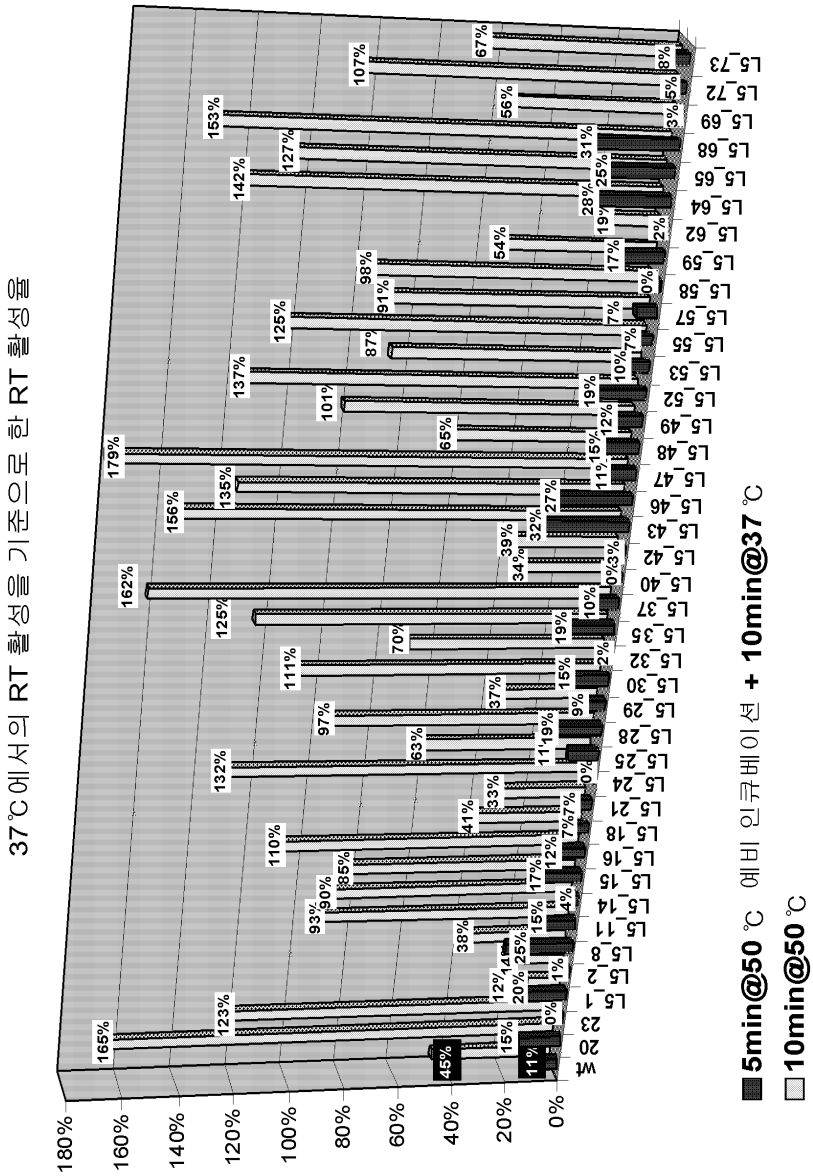
도면6


PCR
단편
활성이 보다 강한 RT
활성이 보다 약한 RT
MLV 역전사 효소
돌연변이 라이브러리
초기 PCR 단편 재구축
(다음 라운드 선별용)
네스티드 PCR에 의한
cDNA 증폭
mRNA 전사
mRNA
활성이 보다 강한 RT
활성이 보다 약한 RT
시험관 내 번역 및
초원심분리에 의한 TC 정제
구획화 및 cDNA 합성
활성이 보다 약한 RT
활성이 보다 강한 RT
전장 cDNA
RT 반응 온도 : 50°C > 52.5°C > 55°C > 57.5°C > 60°C

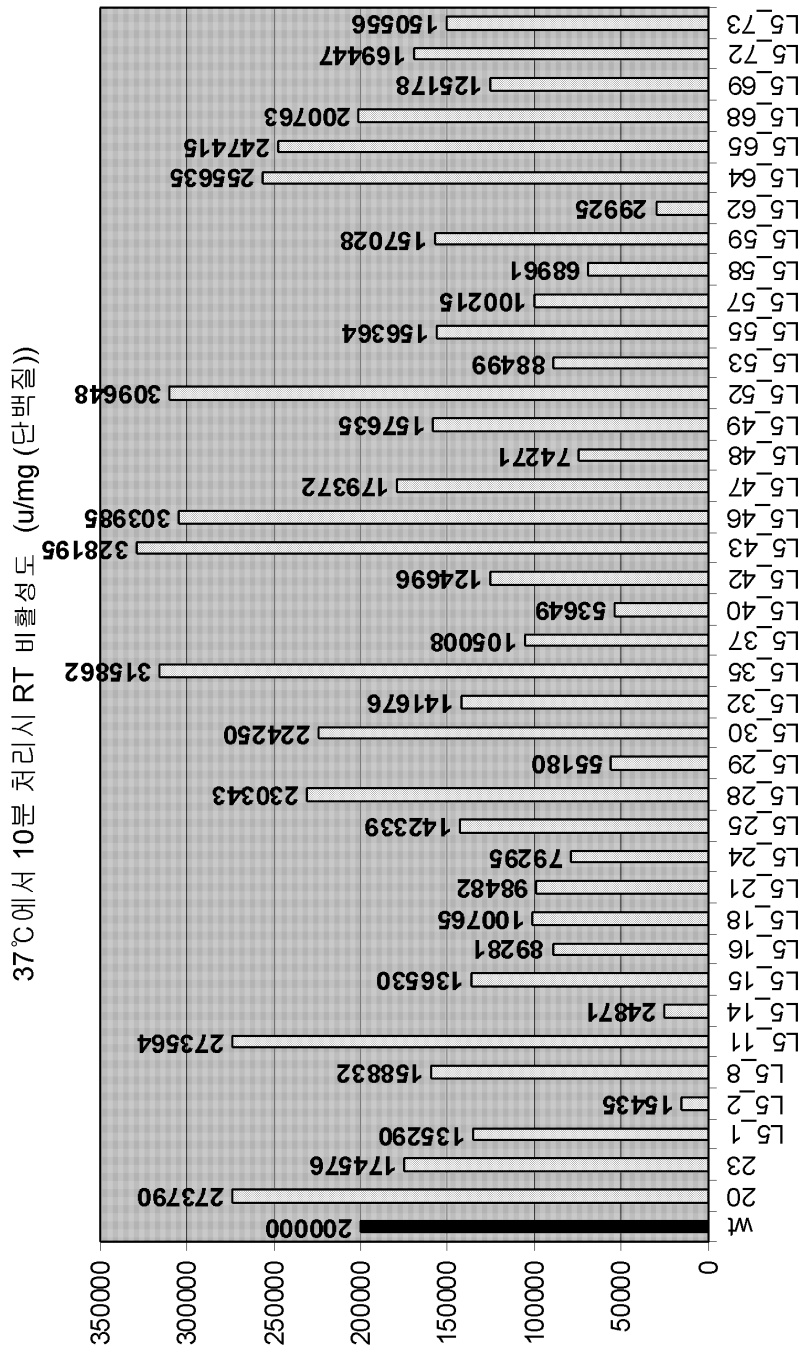
도면7


START (244 bp)
NcoI
EcoRI
END (398 bp)
EcoRI
Esp3I
(NcoI 상용기능함)
T7 pr.
SD
his-tag
gs linker
pD
gs linker
MLV RT
gs linker

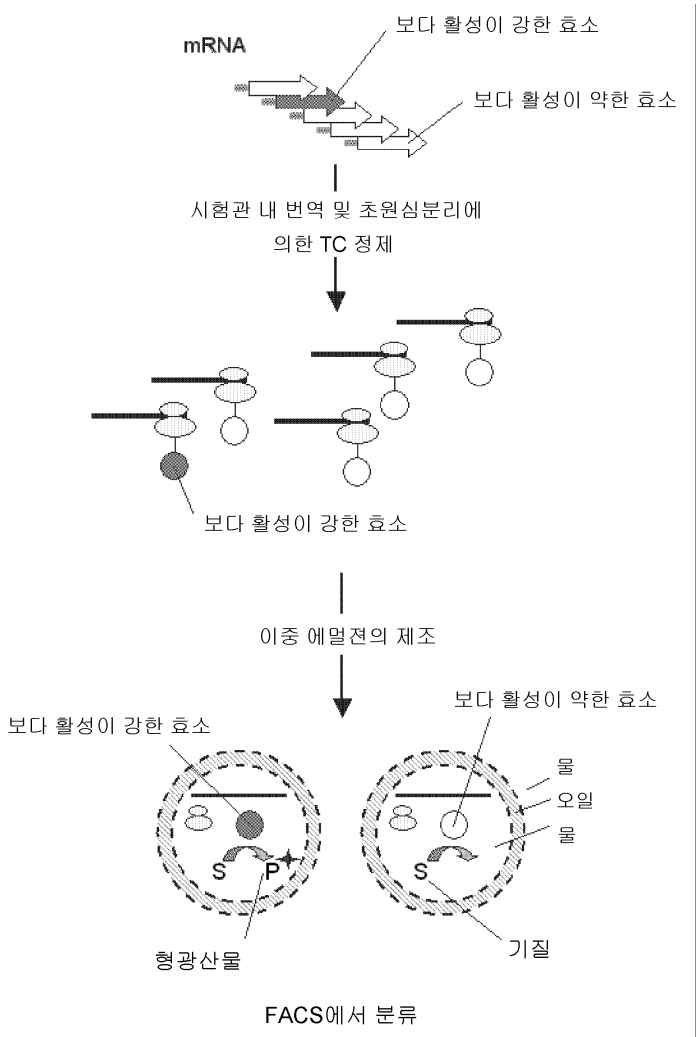
도면8


37℃에서의 RT 활성을 기준으로 한 RT 활성율
180%
160%
140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
wt
20
23
L5_1
L5_2
L5_8
L5_11
L5_14
L5_15
L5_16
L5_18
L5_21
L5_24
L5_25
L5_28
L5_29
L5_30
L5_32
L5_35
L5_37
L5_40
L5_42
L5_43
L5_46
L5_47
L5_48
L5_49
L5_52
L5_53
L5_55
L5_57
L5_58
L5_59
L5_62
L5_64
L5_65
L5_68
L5_69
L5_72
L5_73
5min@50 ℃ 예비 인큐베이션 + 10min@37 ℃
10min@50 ℃

도면9

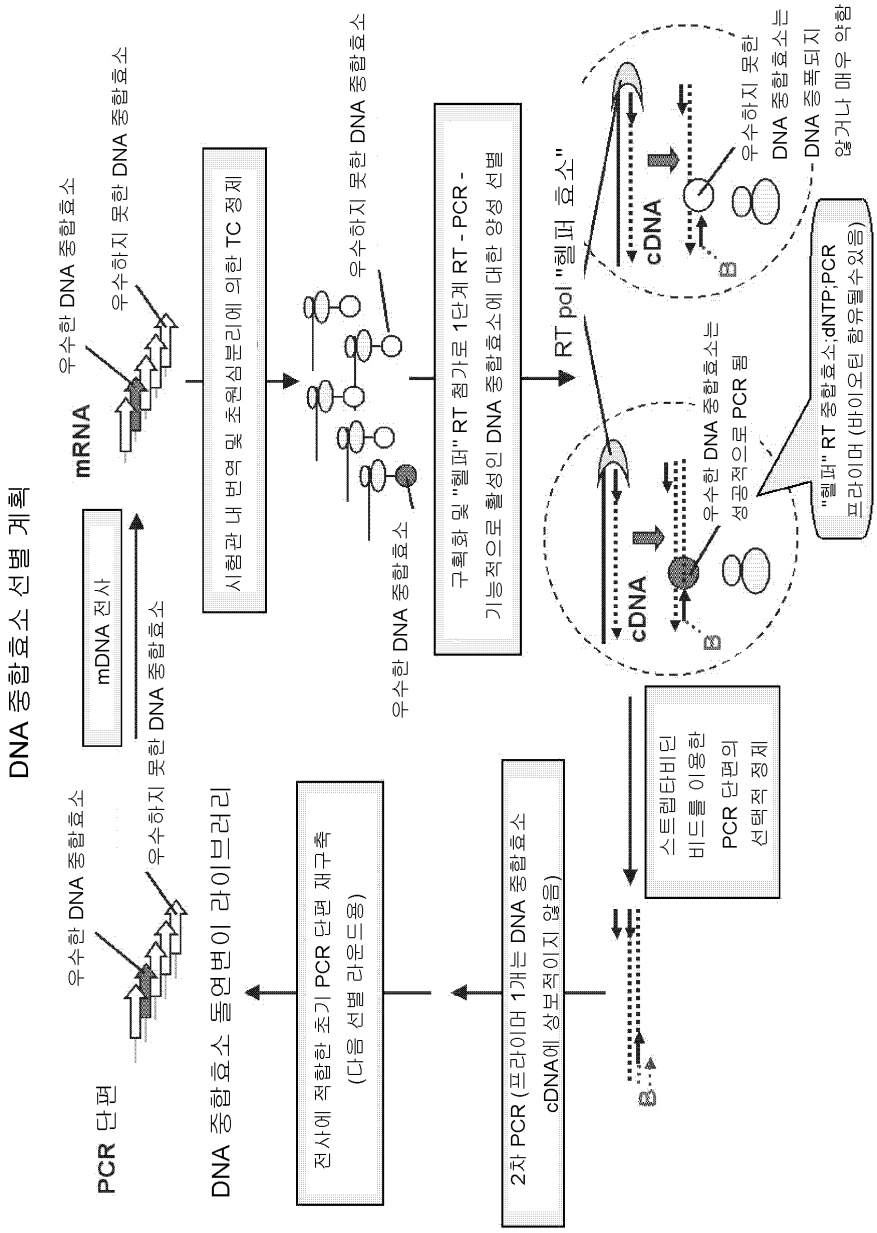

37℃에서 10분 처리시 RT 비활성도 (u/mg (단백질))
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
wt
20
23
L5_1
L5_2
L5_8
L5_11
L5_14
L5_15
L5_16
L5_18
L5_21
L5_24
L5_25
L5_28
L5_29
L5_30
L5_32
L5_35
L5_37
L5_40
L5_42
L5_43
L5_46
L5_47
L5_48
L5_49
L5_52
L5_53
L5_55
L5_57
L5_58
L5_59
L5_62
L5_64
L5_65
L5_68
L5_69
L5_72
L5_73
200000
273790
174576
135290
15435
158832
273564
24871
136530
89281
100765
98482
79295
142339
230343
55180
224250
141676
315862
105008
53649
124696
328195
303985
179372
74271
157635
309648
88499
156364
100215
68961
157028
29925
255635
247415
200763
125178
169447
150556

도면10

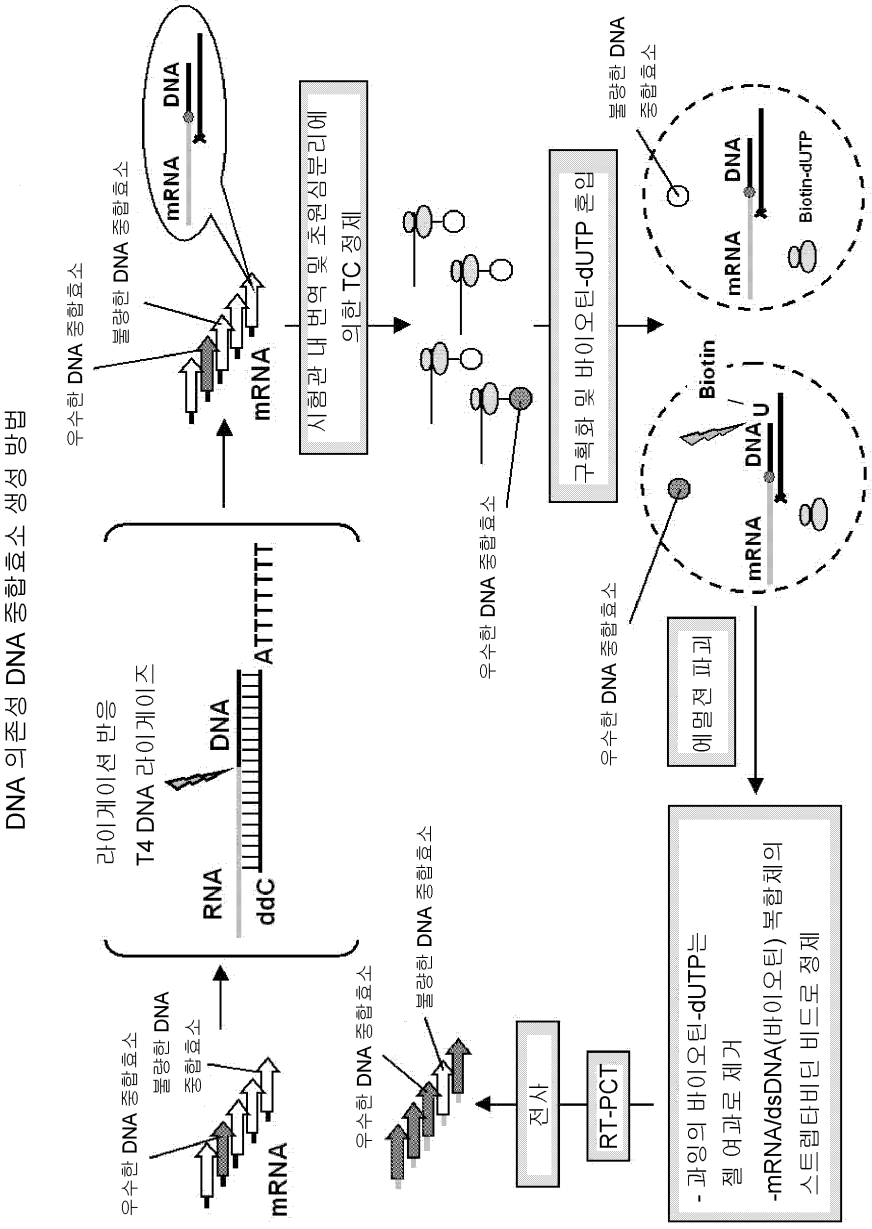


FACS에서 분류

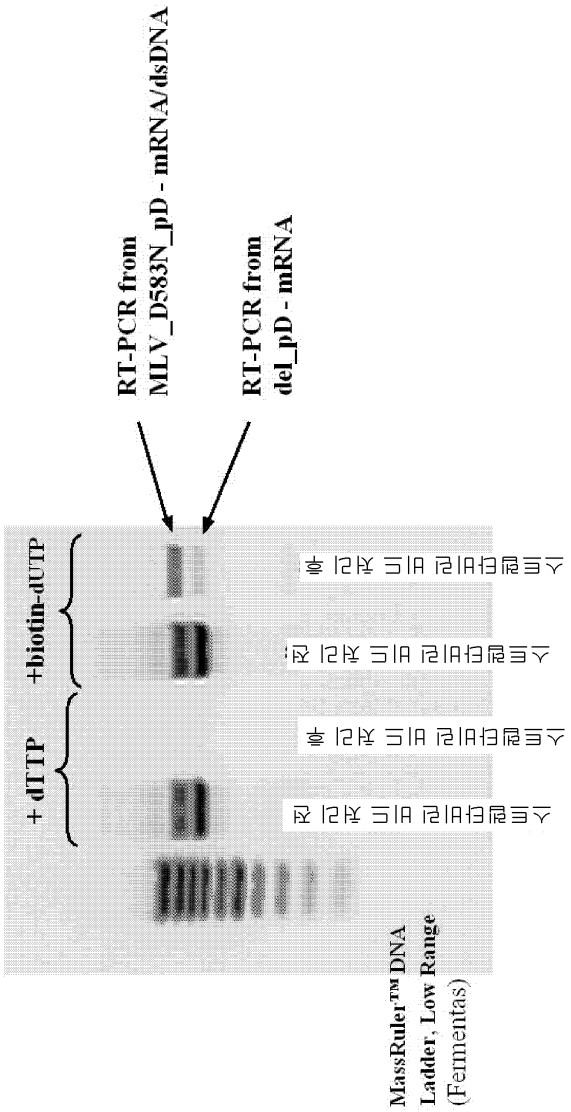
도면11


DNA 중합효소 선별 계획
PCR 단편
우수한 DNA 중합효소
우수하지 못한 DNA 중합효소
DNA 중합효소 돌연변이 라이브러리
mDNA 전사
mRNA
우수한 DNA 중합효소
우수하지 못한 DNA 중합효소
시험관 내 번역 및 초원심분리에 의한 TC 정제
우수한 DNA 중합효소
우수하지 못한 DNA 중합효소
구획화 및 "헬퍼" RT 첨가로 1단계 RT - PCR -
기능적으로 활성인 DNA 중합효소에 대한 양성 선별
RT pol "헬퍼 효소"
cDNA
cDNA
우수한 DNA 중합효소는
성공적으로 PCR 됨
우수하지 못한
DNA 중합효소는
DNA 증폭되지
않거나 매우 약함
"헬퍼" RT 중합효소;dNTP;PCR
프라이머 (바이오틴 함유물수있음)
스트렙타비딘
비드를 이용한
PCR 단편의
선택적 정제
2차 PCR (프라이머 1개는 DNA 중합효소
cDNA에 상보적이지 않음)
전사에 적합한 초기 PCR 단편 재구축
(다음 선별 라운드용)

도면12


DNA 의존성 DNA 중합효소 생성 방법
우수한 DNA 중합효소
불량한 DNA 중합효소
mRNA
라이게이션 반응
T4 DNA 라이게이즈
RNA
DNA
ddC
ATTTTTTT
전사
RT-PCT
- 과잉의 바이오틴-dUTP는
젤 여과로 제거
-mRNA/dsDNA(바이오틴) 복합체의
스트렙타비딘 비드로 정제
에멀젼 파괴
구획화 및 바이오틴-dUTP 혼입
시험관 내 번역 및 초원심분리에
의한 TC 정제
Biotin
DNA
U
Biotin-dUTP

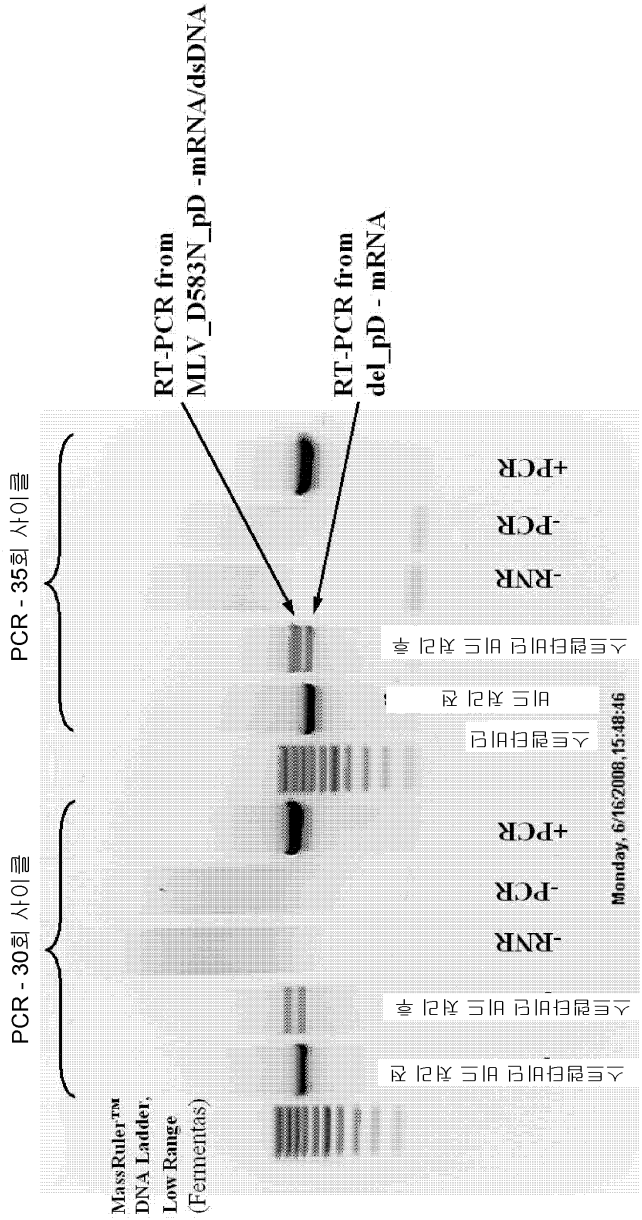
도면13


RT-PCR from
MLV_D583N_pD - mRNA/dsDNA
RT-PCR from
del_pD - mRNA
+biotin-dUTP
+ dTTP
스트렙타비딘 비드 처리 후
스트렙타비딘 비드 처리 전
스트렙타비딘 비드 처리 후
스트렙타비딘 비드 처리 전
MassRuler™ DNA
Ladder, Low Range
(Fermentas)

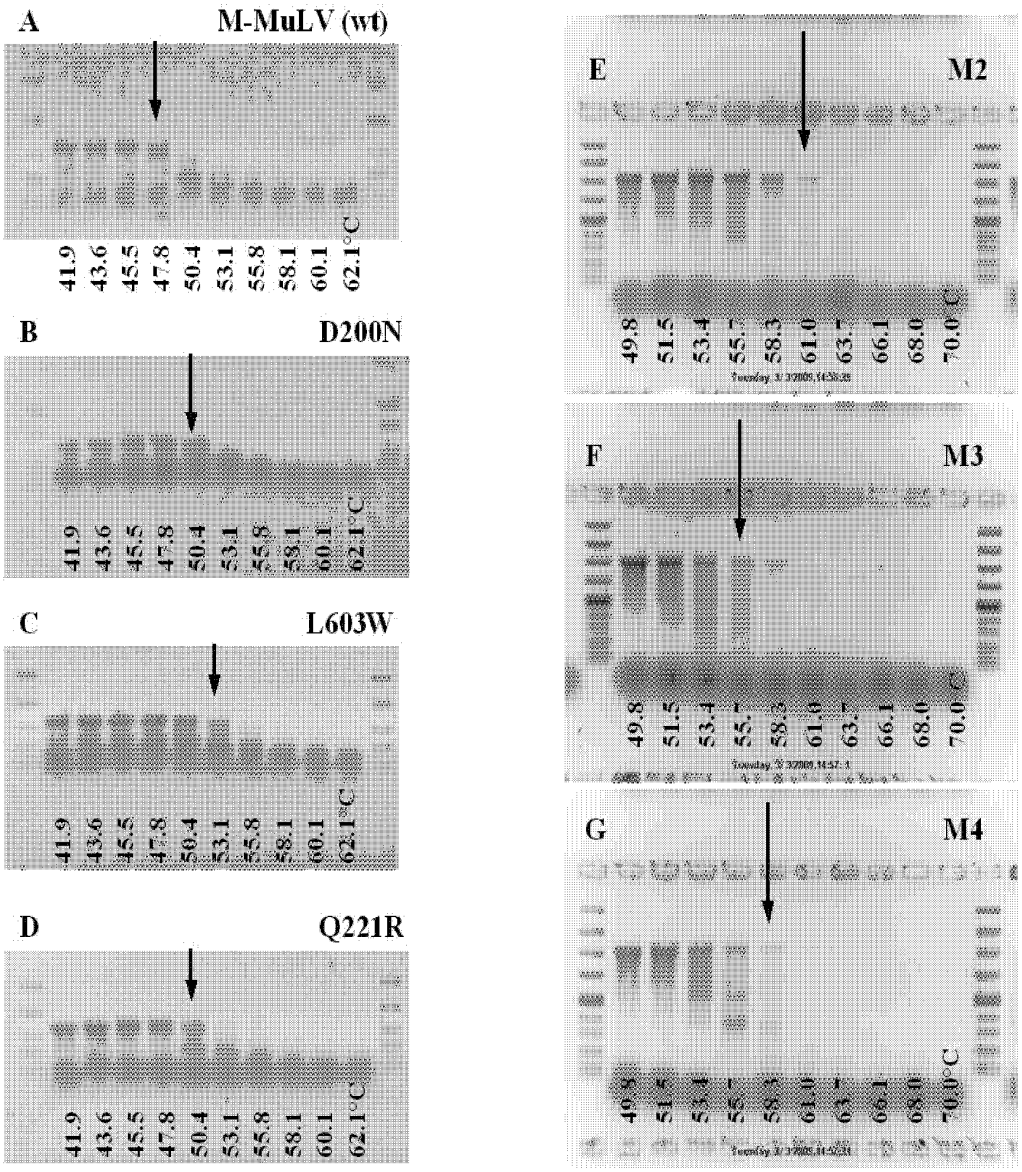
도면14

A
+ dTTP
+biotin-dUTP
- + - +
라이게이즈
RiboRuler™
RNA Ladder,
High Range
(Fermentas)
B
+ dTTP
+biotin-dUTP
- + - +
라이게이즈
C
long+
5′-.....mRNA.....CGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGAAGTC +dTTP(biotin-dUTP)+[α-P33]dATP
ddC-GCCTTGGCCGCCACCTAGCACACAGAAGAAGCTTGCACCGCTCTTTCCTTCCCTTCTTTCTTCAGATTTTTTT-5′
ddC-Long2

도면15


RT-PCR from
MLV_D583N_pD -mRNA/dsDNA
RT-PCR from
del_pD - mRNA
PCR - 35회 사이클
PCR - 30회 사이클
MassRuler™
DNA Ladder,
Low Range
(Fermentas)
스트렙타비딘 비드 처리 전
스트렙타비딘 비드 처리 후
-RNR
-PCR
+PCR
Monday, 6/16/2008, 15:48:46
스트렙타비딘
비드 처리 전
스트렙타비딘 비드 처리 후
-RNR
-PCR
+PCR

도면16



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Fermentas UAB

<120> Production of nucleic acid

<130> 316023.WO/JND/CJS

<140> PCT/EP2009/054329

<141> 2009-04-09

<160> 128

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 7873

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> plasmid pET-his-MLV-pD

<400> 1

cacggggcct gccaccatac ccacgccgaa acaagcgctc atgagcccga agtggcgagc 60

ccgatcttcc ccatcggtga tgtcggcgat ataggcgcca gcaaccgcac ctgtggcgcc 120

ggtgatgccg gccacgatgc gtccggcgta gaggatcgag atctatacga aattaatacg 180

actcactata gggagaccac aacggtttcc ctctagaaat aattttgttt aactttaaga 240

aagaggagaa attacatatg agaggatcgc atcaccatca ccatcacgga tctggttcca 300

tgggcatgac cctaaatata gaagatgagc atcggctaca tgagacctca aaagagccag 360

atgtttctct agggtccaca tggctgtctg attttcctca ggcctgggcg gaaaccgggg 420

gcatgggact ggcagttcgc caagctcctc tgatcatacc tctgaaagca acctctaccc 480

ccgtgtccat aaaacaatac cccatgtcac aagaagccag actggggatc aagccccaca 540

tacagagact gttggaccag ggaatactgg taccctgcca gtccccctgg aacacgcccc 600

tgctacccgt taagaaacca gggactaatg attataggcc tgtccaggat ctgagagaag 660

tcaacaagcg ggtggaagac atccacccca ccgtgcccaa cccttacaac ctcttgagcg 720

ggctcccacc gtcccaccag tggtacactg tgcttgattt aaaggatgcc tttttctgcc 780

tgagactcca ccccaccagt cagcctctct tcgcctttga gtggagagat ccagagatgg 840

gaatctcagg acaattgacc tggaccagac tcccacaggg tttcaaaaac agtcccaccc 900

tgtttgatga ggcactgcac agagacctag cagacttccg gatccagcac ccagacttga 960

tcctgctaca gtacgtggat gacttactgc tggccgccac ttctgagcta gactgccaac 1020

aaggtactcg ggccctgtta caaaccctag ggaacctcgg gtatcgggcc tcggccaaga 1080

aagcccaaat ttgccagaaa caggtcaagt atctggggta tcttctaaaa gagggtcaga 1140

gatggctgac tgaggccaga aaagagactg tgatggggca gcctactccg aagacccctc 1200

gacaactaag ggagttccta gggacggcag gcttctgtcg cctctggatc cctgggtttg 1260

cagaaatggc agccccctg taccctctca ccaaaacggg gactctgttt aattggggcc 1320

cagaccaaca aaaggcctat caagaaatca agcaagctct tctaactgcc ccagccctgg 1380

ggttgccaga tttgactaag ccctttgaac tctttgtcga cgagaagcag ggctacgcca 1440

aaggtgtcct aacgcaaaaa ctgggacctt ggcgtcggcc ggtggcctac ctgtccaaaa 1500

agctagaccc agtagcagct gggtggcccc cttgcctacg gatggtagca gccattgccg 1560

tactgacaaa ggatgcaggc aagctaacca tgggacagcc actagtcatt ctggcccccc 1620

atgcagtaga ggcactagtc aaacaacccc ccgaccgctg gctttccaac gcccggatga 1680

ctcactatca ggccttgctt ttggacacgg accgggtcca gttcggaccg gtggtagccc 1740

tgaacccggc tacgctgctc ccactgcctg aggaagggct gcaacacaac tgccttgata 1800

tcctggccga agcccacgga acccgacccg acctaacgga ccagccgctc ccagacgccg 1860

accacacctg gtacacggat ggaagcagtc tcttacaaga gggacagcgt aaggcgggag 1920

ctgcggtgac caccgagacc gaggtaatct gggctaaagc cctgccagcc gggacatccg 1980

ctcagcgggc tgaactgata gcactcaccc aggccctaaa gatggcagaa ggtaagaagc 2040

taaatgttta tactgatagc cgttatgctt ttgctactgc ccatatccat ggagaaatat 2100

acagaaggcg tgggttgctc acatcagaag gcaaagagat caaaaataaa gacgagatct 2160

tggccctact aaaagccctc tttctgccca aaagacttag cataatccat tgtccaggac 2220

atcaaaaggg acacagcgcc gaggctagag gcaaccggat ggctgaccaa gcggcccgaa 2280

aggcagccat cacagagact ccagacacct ctaccctcct catagaaaat tcatcaccca 2340

attcccgctt aattaatgaa ttcggatccg gtggcggttc cggcggtgga tctatgggta 2400

ccgcaaccgc gcccggcgga ttgagtgcga aagcgcctgc aatgaccccg ctgatgctgg 2460

acacctccag ccgtaagctg gttgcgtggg atggcaccac cgacggtgct gccgttggca 2520

ttcttgcggt tgctgctgac cagaccagca ccacgctgac gttctacaag tccggcacgt 2580

tccgttatga ggatgtgctc tggccggagg ctgccagcga cgagacgaaa aaacggaccg 2640

cgtttgccgg aacggcaatc agcatcgttg gatctggtgg cggttccggc ggtggatctg 2700

gtggcggttc cggcggtgga tctggtggcg gttccggcgg tggatcgtgt cttctttaag 2760

cttgcggccg cactcgagca ccaccaccac caccactgag atccggctgc taacaaagcc 2820

cgaaaggaag ctgagttggc tgctgccacc gctgagcaat aactagcata acccccttggg 2880

gcctctaaac gggtcttgag gggtttttttg ctgaaaggag gaactatatc cggattggcg 2940

aatgggacgc gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg 3000

tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc ccttcctttc 3060

tcgccacgtt cgccggcttt ccccgtcaag ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc 3120

gatttagtgc tttacggcac ctcgacccca aaaaacttga ttagggtgat ggttcacgta 3180

gtgggccatc gccctgatag acggtttttc gccctttgac gttggagtcc acgttcttta 3240

atagtggact cttgttccaa actggaacaa cactcaaccc tatctcggtc tattcttttg 3300

atttataagg gattttgccg atttcggcct attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa 3360

aatttaacgc gaattttaac aaaatattaa cgtttacaat ttcaggtggc acttttcggg 3420

gaaatgtgcg cggaacccct atttgtttat ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc 3480

tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgagta 3540

ttcaacattt ccgtgtcgcc cttattccct tttttgcggc attttgcctt cctgtttttg 3600

ctcacccaga aacgctggtg aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtgg 3660

gttacatcga actggatctc aacagcggta agatccttga gagttttcgc cccgaagaac 3720

gttttccaat gatgagcact tttaaagttc tgctatgtgg cgcggtatta tcccgtattg 3780

acgccgggca agagcaactc ggtcgccgca tacactattc tcagaatgac ttggttgagt 3840

actcaccagt cacagaaaag catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg 3900

ctgccataac catgagtgat aacactgcgg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac 3960

cgaaggagct aaccgctttt ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt 4020

gggaaccgga gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgcag 4080

caatggcaac aacgttgcgc aaactattaa ctggcgaact acttactcta gcttcccggc 4140

aacaattaat agactggatg gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgctcggccc 4200

ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggta 4260

tcattgcagc actggggcca gatggtaagc cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg 4320

ggagtcaggc aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga 4380

ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt actcatatat actttagatt gatttaaaac 4440

ttcattttta atttaaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgaccaaaa 4500

tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat 4560

cttcttgaga tccttttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc 4620

taccagcggt ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg 4680

gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc 4740

acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgctct gctaatcctg ttaccagtgg 4800

ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg 4860

ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa 4920

cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg 4980

aagggagaaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga 5040

gggagcttcc agggggaaac gcctggtatc tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct 5100

gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca 5160

gcaacgcggc ctttttacgg ttcctggcct tttgctggcc ttttgctcac atgttctttc 5220

ctgcgttatc ccctgattct gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg 5280
ctcgccgcag ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagtgag cgaggaagcg gaagagcgcc 5340
tgatgcggta ttttctcctt acgcatctgt gcggtatttc acaccgcata tatggtgcac 5400
tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gttaagccag tatacactcc gctatcgcta 5460
cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg 5520
gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg 5580
tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa cgcgcgaggc agctgcggta aagctcatca 5640

gcgtggtcgt gaagcgattc acagatgtct gcctgttcat ccgcgtccag ctcgttgagt 5700
ttctccagaa gcgttaatgt ctggcttctg ataaagcggg ccatgttaag ggcggttttt 5760
tcctgtttgg tcactgatgc ctccgtgtaa gggggatttc tgttcatggg ggtaatgata 5820
ccgatgaaac gagagaggat gctcacgata cgggttactg atgatgaaca tgcccggtta 5880
ctggaacgtt gtgagggtaa acaactggcg gtatggatgc ggcgggacca gagaaaaatc 5940
actcagggtc aatgccagcg cttcgttaat acagatgtag gtgttccaca gggtagccag 6000
cagcatcctg cgatgcagat ccggaacata atggtgcagg gcgctgactt ccgcgtttcc 6060

agactttacg aaacacggaa accgaagacc attcatgttg ttgctcaggt cgcagacgtt 6120
ttgcagcagc agtcgcttca cgttcgctcg cgtatcggtg attcattctg ctaaccagta 6180
aggcaacccc gccagcctag ccgggtcctc aacgacagga gcacgatcat gcgcacccgt 6240
ggggccgcca tgccggcgat aatggcctgc ttctcgccga aacgtttggt ggcgggacca 6300
gtgacgaagg cttgagcgag ggcgtgcaag attccgaata ccgcaagcga caggccgatc 6360
atcgtcgcgc tccagcgaaa gcggtcctcg ccgaaaatga cccagagcgc tgccggcacc 6420
tgtcctacga gttgcatgat aaagaagaca gtcataagtg cggcgacgat agtcatgccc 6480

cgcgcccacc ggaaggagct gactgggttg aaggctctca agggcatcgg tcgagatccc 6540
ggtgcctaat gagtgagcta acttacatta attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag 6600
tcgggaaacc tgtcgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggt 6660
ttgcgtattg ggcgccaggg tggtttttct tttcaccagt gagacgggca acagctgatt 6720
gcccttcacc gcctggccct gagagagttg cagcaagcgg tccacgctgg tttgccccag 6780
caggcgaaaa tcctgtttga tggtggttaa cggcgggata taacatgagc tgtcttcggt 6840
atcgtcgtat cccactaccg agatatccgc accaacgcgc agcccggact cggtaatggc 6900

gcgcattgcg cccagcgcca tctgatcgtt ggcaaccagc atcgcagtgg gaacgatgcc 6960

ctcattcagc atttgcatgg tttgttgaaa accggacatg gcactccagt cgccttcccg 7020

ttccgctatc ggctgaattt gattgcgagt gagatattta tgccagccag ccagacgcag 7080

acgcgccgag acagaactta atgggcccgc taacagcgcg atttgctggt gacccaatgc 7140

gaccagatgc tccacgccca gtcgcgtacc gtcttcatgg gagaaaataa tactgttgat 7200

gggtgtctgg tcagagacat caagaaataa cgccggaaca ttagtgcagg cagcttccac 7260

agcaatggca tcctggtcat ccagcggata gttaatgatc agcccactga cgcgttgcgc 7320

gagaagattg tgcaccgccg ctttacaggc ttcgacgccg cttcgttcta ccatcgacac 7380

caccacgctg gcacccagtt gatcggcgcg agatttaatc gccgcgacaa tttgcgacgg 7440

cgcgtgcagg gccagactgg aggtggcaac gccaatcagc aacgactgtt tgcccgccag 7500

ttgttgtgcc acgcggttgg gaatgtaatt cagctccgcc atcgccgctt ccacttttтc 7560

ccgcgttttc gcagaaacgt ggctggcctg gttcaccacg cgggaaacgg tctgataaga 7620

gacaccggca tactctgcga catcgtataa cgttactggt ttcacattca ccaccctgaa 7680

ttgactctct tccgggcgct atcatgccat accgcgaaag gttttgcgcc attcgatggt 7740

gtccgggatc tcgacgctct cccttatgcg actcctgcat taggaagcag cccagtagta 7800

ggttgaggcc gttgagcacc gccgccgcaa ggaatggtgc atgcaaggag atggcgccca 7860

acagtccccc ggc 7873

<210> 2

<211> 7702

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> plasmid pET_his_del_pD

<400> 2

cacggggcct gccaccatac ccacgccgaa acaagcgctc atgagcccga agtggcgagc 60

ccgatcttcc ccatcggtga tgtcggcgat ataggcgcca gcaaccgcac ctgtggcgcc 120

ggtgatgccg gccacgatgc gtccggcgta gaggatcgag atctatacga aattaatacg 180

actcactata gggagaccac aacggtttcc ctctagaaat aattttgttt aactttaaga 240

aagaggagaa attacatatg agaggatcgc atcaccatca ccatcacgga tctggttcca 300

tgggcatgac cctaaatata gaagatgagc atcggctaca tgagacctca aaagagccag 360

atgtttctct agggtccaca tggctgtctg attttcctca ggcctgggcg gaaaccgggg 420

gcatgggact ggcagttcgc caagctcctc tgatcatacc tctgaaagca acctctaccc 480

ccgtgtccat aaaacaatac cccatgtcac aagaagccag actggggatc aagccccaca 540

tacagagact gttggaccag ggaatactgg taccctgcca gtccccctgg aacacgcccc 600

tgctacccgt taagaaacca gggactaatg attataggcc tgtccaggat ctgagagaag 660

tcaacaagcg ggtggaagac atccacccca ccgtgcccaa cccttacaac ctcttgagcg 720

ggctcccacc gtcccaccag tggtacactg tgcttgattt aaaggatgcc tttttctgcc 780

tgagactcca ccccaccagt cagcctctct tcgcctttga gtggagagat ccagagatgg 840

gaatctcagg acaattgacc tggaccagac tcccacaggg tttcaaaaac agtcccaccc 900

tgtttgatga ggcactgcac agagacctag cagacttccg gatccagcac ccagacttga 960

tcctgctaca gtacgtggat gacttactgc tggccgccac ttctgagcta gactgccaac 1020

aaggtactcg ggccctgtta caaaccctag ggacggcagg cttctgtcgc ctctggatcc 1080

ctgggtttgc agaaatggca gccccccttgt accctctcac caaaacgggg actctgttta 1140

attggggccc agaccaacaa aaggcctatc aagaaatcaa gcaagctctt ctaactgccc 1200

cagccctggg gttgccagat ttgactaagc cctttgaact ctttgtcgac gagaagcagg 1260

gctacgccaa aggtgtccta acgcaaaaac tgggaccttg gcgtcggccg gtggcctacc 1320

tgtccaaaaa gctagaccca gtagcagctg ggtggccccc ttgcctacgg atggtagcag 1380

ccattgccgt actgacaaag gatgcaggca agctaaccat gggacagcca ctagtcattc 1440

tggcccccca tgcagtagag gcactagtca aacaaccccc cgaccgctgg ctttccaacg 1500

cccggatgac tcactatcag gccttgcttt tggacacgga ccgggtccag ttcggaccgg 1560

tggtagccct gaacccggct acgctgctcc cactgcctga ggaagggctg caacacaact 1620

gccttgatat cctggccgaa gcccacggaa cccgacccga cctaacggac cagccgctcc 1680

cagacgccga ccacacctgg tacacggatg gaagcagtct cttacaagag ggacagcgta 1740

aggcgggagc tgcggtgacc accgagaccg aggtaatctg ggctaaagcc ctgccagccg 1800

ggacatccgc tcagcgggct gaactgatag cactcaccca ggccctaaag atggcagaag 1860

gtaagaagct aaatgtttat actaatagcc gttatgcttt tgctactgcc catatccatg 1920

gagaaatata cagaaggcgt gggttgctca catcagaagg caaagagatc aaaaataaag 1980

acgagatctt ggccctacta aaagccctct ttctgcccaa aagacttagc ataatccatt 2040

gtccaggaca tcaaaaggga cacagcgccg aggctagagg caaccggatg gctgaccaag 2100

cggcccgaaa ggcagccatc acagagactc cagacacctc taccctcctc atagaaaatt 2160

catcacccaa ttcccgctta attaatgaat tcggatccgg tggcggttcc ggcggtggat 2220

ctatgggtac cgcaaccgcg cccggcggat tgagtgcgaa agcgcctgca atgaccccgc 2280

tgatgctgga cacctccagc cgtaagctgg ttgcgtggga tggcaccacc gacggtgctg 2340

ccgttggcat tcttgcggtt gctgctgacc agaccagcac cacgctgacg ttctacaagt 2400

ccggcacgtt ccgttatgag gatgtgctct ggccggaggc tgccagcgac gagacgaaaa 2460

aacggaccgc gtttgccgga acggcaatca gcatcgttgg atctggtggc ggttccggcg 2520

gtggatctgg tggcggttcc ggcggtggat ctggtggcgg ttccggcggt ggatcgtgtc 2580

ttctttaagc ttgcggccgc actcgagcac caccaccacc accactgaga tccggctgct 2640

aacaaagccc gaaaggaagc tgagttggct gctgccaccg ctgagcaata actagcataa 2700

ccccttgggg cctctaaacg ggtcttgagg ggtttttttgc tgaaaggagg aactatatcc 2760

ggattggcga atgggacgcg ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt gtggtggtta 2820

cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctcctttc gctttcttcc 2880

cttcctttct cgccacgttc gccggctttc cccgtcaagc tctaaatcgg gggctccctt 2940

tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat tagggtgatg 3000

gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg ttggagtcca 3060

cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct atctcggtct 3120

attcttttga tttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga 3180

tttaacaaaa atttaacgcg aattttaaca aaatattaac gtttacaatt tcaggtggca 3240

cttttcgggg aaatgtgcgc ggaacccctа tttgtttatt tttctaaata cattcaaata 3300

tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aaatgcttca ataatattga aaaaggaaga 3360

gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc 3420

ctgtttttgc tcacccagaa acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg 3480

cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc 3540

ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat 3600

cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgcat acactattct cagaatgact 3660

tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat 3720

tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata acactgcggc caacttactt ctgacaacga 3780

tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc 3840

ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga 3900

tgcctgcagc aatggcaaca acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag 3960

cttcccggca acaattaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc 4020

gctcggccct tccggctggc tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt 4080

ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct 4140

acacgacggg gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg 4200

cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagttta ctcatatata ctttagattg 4260

atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca 4320

tgaccaaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga 4380

tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa 4440

aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga 4500

aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagtg tagccgtagt 4560

taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt 4620

taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat 4680

agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct 4740

tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca 4800

cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag 4860

agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc 4920

gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc agggggggcgg agcctatgga 4980

aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca 5040

tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagtgag 5100

ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg 5160

aagagcgcct gatgcggtat tttctcctta cgcatctgtg cggtatttca caccgcatat 5220

atggtgcact ctcagtacaa tctgctctga tgccgcatag ttaagccagt atacactccg 5280

ctatcgctac gtgactgggt catggctgcg ccccgacacc cgccaacacc cgctgacgcg 5340

ccctgacggg cttgtctgct cccggcatcc gcttacagac aagctgtgac cgtctccggg 5400

agctgcatgt gtcagaggtt ttcaccgtca tcaccgaaac gcgcgaggca gctgcggtaa 5460

agctcatcag cgtggtcgtg aagcgattca cagatgtctg cctgttcatc cgcgtccagc 5520

tcgttgagtt tctccagaag cgttaatgtc tggcttctga taaagcgggc catgttaagg 5580

gcggtttttt cctgtttggt cactgatgcc tccgtgtaag ggggatttct gttcatgggg 5640

gtaatgatac cgatgaaacg agagaggatg ctcacgatac gggttactga tgatgaacat 5700

gcccggttac tggaacgttg tgagggtaaa caactggcgg tatggatgcg gcgggaccag 5760

agaaaaatca ctcagggtca atgccagcgc ttcgttaata cagatgtagg tgttccacag 5820

ggtagccagc agcatcctgc gatgcagatc cggaacataa tggtgcaggg cgctgacttc 5880

cgcgtttcca gactttacga aacacggaaa ccgaagacca ttcatgttgt tgctcaggtc 5940

gcagacgttt tgcagcagca gtcgcttcac gttcgctcgc gtatcggtga ttcattctgc 6000

taaccagtaa ggcaaccccg ccagcctagc cgggtcctca acgacaggag cacgatcatg 6060

cgcacccgtg gggccgccat gccggcgata atggcctgct tctcgccgaa acgtttggtg 6120
gcgggaccag tgacgaaggc ttgagcgagg gcgtgcaaga ttccgaatac cgcaagcgac 6180
aggccgatca tcgtcgcgct ccagcgaaag cggtcctcgc cgaaaatgac ccagagcgct 6240
gccggcacct gtcctacgag ttgcatgata aagaagacag tcataagtgc ggcgacgata 6300
gtcatgcccc gcgcccaccg gaaggagctg actgggttga aggctctcaa gggcatcggt 6360
cgagatcccg gtgcctaatg agtgagctaa cttacattaa ttgcgttgcg ctcactgccc 6420
gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg 6480

agaggcggtt tgcgtattgg gcgccagggt ggtttttctt ttcaccagtg agacgggcaa 6540
cagctgattg cccttcaccg cctggccctg agagagttgc agcaagcggt ccacgctggt 6600
ttgccccagc aggcgaaaat cctgtttgat ggtggttaac ggcgggatat aacatgagct 6660
gtcttcggta tcgtcgtatc ccactaccga gatatccgca ccaacgcgca gcccggactc 6720
ggtaatggcg cgcattgcgc ccagcgccat ctgatcgttg gcaaccagca tcgcagtggg 6780
aacgatgccc tcattcagca tttgcatggt ttgttgaaaa ccggacatgg cactccagtc 6840
gccttcccgt tccgctatcg gctgaatttg attgcgagtg agatatttat gccagccagc 6900

cagacgcaga cgcgccgaga cagaacttaa tgggcccgct aacagcgcga tttgctggtg 6960
acccaatgcg accagatgct ccacgcccag tcgcgtaccg tcttcatggg agaaaataat 7020
actgttgatg ggtgtctggt cagagacatc aagaaataac gccggaacat tagtgcaggc 7080
agcttccaca gcaatggcat cctggtcatc cagcggatag ttaatgatca gcccactgac 7140
gcgttgcgcg agaagattgt gcaccgccgc tttacaggct tcgacgccgc ttcgttctac 7200
catcgacacc accacgctgg cacccagttg atcggcgcga gatttaatcg ccgcgacaat 7260
ttgcgacggc gcgtgcaggg ccagactgga ggtggcaacg ccaatcagca acgactgttt 7320

gcccgccagt tgttgtgcca cgcggttggg aatgtaattc agctccgcca tcgccgcttc 7380
cacttttttcc cgcgttttcg cagaaacgtg gctggcctgg ttcaccacgc gggaaacggt 7440
ctgataagag acaccggcat actctgcgac atcgtataac gttactggtt tcacattcac 7500
caccctgaat tgactctctt ccgggcgcta tcatgccata ccgcgaaagg ttttgcgcca 7560
ttcgatggtg tccgggatct cgacgctctc ccttatgcga ctcctgcatt aggaagcagc 7620
ccagtagtag gttgaggccg ttgagcaccg ccgccgcaag gaatggtgca tgcaaggaga 7680
tggcgcccaa cagtcccccg gc 7702

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide pro-pIVEX

<400> 3

gcgagcccga tcttccccat cg 22

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide pD-ter

<400> 4

aagaagacac gatccaccgc c 21

<210> 5

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide assrA

<400> 5

ttaagctgct aaagcgtagt tttcgtcgtt tgcgacta 38

<210> 6

<211> 833

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MLV_pD

<400> 6

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Gly Ser Met Gly
1 5 10 15

Met Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys
20 25 30

Glu Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln
35 40 45

Ala Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro

50 55 60

Leu Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln
65 70 75 80
Tyr Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln
85 90 95
Arg Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn
100 105 110
Thr Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro

115 120 125

Val Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro
130 135 140
Thr Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His
145 150 155 160
Gln Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg
165 170 175
Leu His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro

180 185 190

Glu Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly
195 200 205
Phe Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu
210 215 220
Ala Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val
225 230 235 240
Asp Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly

245 250 255

Thr Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser
260 265 270
Ala Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr
275 280 285
Leu Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr

290 295 300

Val Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe

305 310 315 320

Leu Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu

325 330 335

Met Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn

340 345 350

Trp Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu

355 360 365

Leu Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu

370 375 380

Leu Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln

385 390 395 400

Lys Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu

405 410 415

Asp Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala

420 425 430

Ile Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro

435 440 445

Leu Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro

450 455 460

Pro Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu

465 470 475 480

Leu Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn

485 490 495

Pro Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys

500 505 510

Leu Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp

515 520 525

Gln Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser

530 535 540

Leu Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu
545 550 555 560
Thr Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln

565 570 575
Arg Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly
580 585 590
Lys Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala
595 600 605
His Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu
610 615 620
Gly Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala

625 630 635 640
Leu Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln
645 650 655
Lys Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala
660 665 670
Ala Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu
675 680 685
Ile Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn Glu Phe Gly Ser

690 695 700
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Met Gly Thr Ala Thr Ala Pro Gly
705 710 715 720
Gly Leu Ser Ala Lys Ala Pro Ala Met Thr Pro Leu Met Leu Asp Thr
725 730 735
Ser Ser Arg Lys Leu Val Ala Trp Asp Gly Thr Thr Asp Gly Ala Ala
740 745 750
Val Gly Ile Leu Ala Val Ala Ala Asp Gln Thr Ser Thr Thr Leu Thr

755 760 765
Phe Tyr Lys Ser Gly Thr Phe Arg Tyr Glu Asp Val Leu Trp Pro Glu
770 775 780
Ala Ala Ser Asp Glu Thr Lys Lys Arg Thr Ala Phe Ala Gly Thr Ala

785 790 795 800

Ile Ser Ile Val Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly

805 810 815

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Cys Leu

820 825 830

Leu

<210> 7

<211> 776

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> del_pD

<400> 7

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Gly Ser Met Gly

1 5 10 15

Met Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys

20 25 30

Glu Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln

35 40 45

Ala Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro

50 55 60

Leu Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln

65 70 75 80

Tyr Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln

85 90 95

Arg Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn

100 105 110

Thr Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro

115 120 125

Val Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro

130 135 140

Thr Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His

145 150 155 160

Gln Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg

165 170 175

Leu His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro

180 185 190

Glu Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly

195 200 205

Phe Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu

210 215 220

Ala Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val

225 230 235 240

Asp Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly

245 250 255

Thr Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu

260 265 270

Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr

275 280 285

Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr

290 295 300

Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro

305 310 315 320

Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr

325 330 335

Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val

340 345 350

Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro

355 360 365

Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly

370 375 380

Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val

385 390 395 400

Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg
405 410 415
Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe
420 425 430

Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu
435 440 445
Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly
450 455 460
Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr
465 470 475 480
Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala
485 490 495

Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu
500 505 510
Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln
515 520 525
Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser
530 535 540
Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg
545 550 555 560

Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu
565 570 575
Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile
580 585 590
Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly
595 600 605
Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr
610 615 620

Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg
625 630 635 640
Leu Ile Asn Glu Phe Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Met

645 650 655

Gly Thr Ala Thr Ala Pro Gly Gly Leu Ser Ala Lys Ala Pro Ala Met

660 665 670

Thr Pro Leu Met Leu Asp Thr Ser Ser Arg Lys Leu Val Ala Trp Asp

675 680 685

Gly Thr Thr Asp Gly Ala Ala Val Gly Ile Leu Ala Val Ala Ala Asp

690 695 700

Gln Thr Ser Thr Thr Leu Thr Phe Tyr Lys Ser Gly Thr Phe Arg Tyr

705 710 715 720

Glu Asp Val Leu Trp Pro Glu Ala Ala Ser Asp Glu Thr Lys Lys Arg

725 730 735

Thr Ala Phe Ala Gly Thr Ala Ile Ser Ile Val Gly Ser Gly Gly Gly

740 745 750

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

755 760 765

Ser Gly Gly Gly Ser Cys Leu Leu

770 775

<210> 8

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide pD_42

<400> 8

ttacggctgg aggtg 15

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide RD_Nde

<400> 9

ctttaagaaa gaggagaaat tacatatg 28

<210> 10

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide pD_55

<400> 10

gccgggcgcg gttg 14

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide M_F

<400> 11

gatcaagccc cacatacaga gac 23

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide M_2R

<400> 12

gccctgcttc tcgtcgaca 19

<210> 13

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide M_Esp

<400> 13

atcgtctccc atgggcatga ccctaaatat agaagatgag 40

<210> 14

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide M_Eri

<400> 14

aatgaattca ttaattaagc gggaattggg tg 32

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide M_1R

<400> 15

cagggcccga gtaccttg 18

<210> 16

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide M_3F

<400> 16

ccagttcgga ccggtgg 17

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide pD_ter-

<400> 17

aagaagacac gatccaccg 19

<210> 18

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide M_Hind3+

<400> 18

cggatcaagc ttaattaatt aagcgggaat tgggtg 36

<210> 19

<211> 7474

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> plasmid pET_his_MLV

<400> 19

cacggggcct gccaccatac ccacgccgaa acaagcgctc atgagcccga agtggcgagc 60

ccgatcttcc ccatcggtga tgtcggcgat ataggcgcca gcaaccgcac ctgtggcgcc 120

ggtgatgccg gccacgatgc gtccggcgta gaggatcgag atctatacga aattaatacg 180

actcactata gggagaccac aacggtttcc ctctagaaat aattttgttt aactttaaga 240

aagaggagaa attacatatg agaggatcgc atcaccatca ccatcacgga tctggttcca 300

tgggcatgac cctaaatata gaagatgagc atcggctaca tgagacctca aaagagccag 360

atgtttctct agggtccaca tggctgtctg attttcctca ggcctgggcg gaaaccgggg 420

gcatgggact ggcagttcgc caagctcctc tgatcatacc tctgaaagca acctctaccc 480

ccgtgtccat aaaacaatac cccatgtcac aagaagccag actggggatc aagccccaca 540

tacagagact gttggaccag ggaatactgg taccctgcca gtccccctgg aacacgcccc 600

tgctacccgt taagaaacca gggactaatg attataggcc tgtccaggat ctgagagaag 660

tcaacaagcg ggtggaagac atccacccca ccgtgcccaa cccttacaac ctcttgagcg 720

ggctcccacc gtcccaccag tggtacactg tgcttgattt aaaggatgcc tttttctgcc 780

tgagactcca ccccaccagt cagcctctct tcgcctttga gtggagagat ccagagatgg 840

gaatctcagg acaattgacc tggaccagac tcccacaggg tttcaaaaac agtcccaccc 900

tgtttgatga ggcactgcac agagacctag cagacttccg gatccagcac ccagacttga 960

tcctgctaca gtacgtggat gacttactgc tggccgccac ttctgagcta gactgccaac 1020

aaggtactcg ggccctgtta caaaccctag ggaacctcgg gtatcgggcc tcggccaaga 1080

aagcccaaat ttgccagaaa caggtcaagt atctggggta tcttctaaaa gagggtcaga 1140

gatggctgac tgaggccaga aaagagactg tgatggggca gcctactccg aagacccctc 1200

gacaactaag ggagttccta gggacggcag gcttctgtcg cctctggatc cctgggtttg 1260

cagaaatggc agccccccttg taccctctca ccaaaacggg gactctgttt aattggggcc 1320

cagaccaaca aaaggcctat caagaaatca agcaagctct tctaactgcc ccagccctgg 1380

ggttgccaga tttgactaag ccctttgaac tctttgtcga cgagaagcag ggctacgcca 1440

aaggtgtcct aacgcaaaaa ctgggacctt ggcgtcggcc ggtggcctac ctgtccaaaa 1500

agctagaccc agtagcagct gggtggcccc cttgcctacg gatggtagca gccattgccg 1560

tactgacaaa ggatgcaggc aagctaacca tgggacagcc actagtcatt ctggcccccc 1620

atgcagtaga ggcactagtc aaacaacccc ccgaccgctg gctttccaac gcccggatga 1680

ctcactatca ggccttgctt ttggacacgg accgggtcca gttcggaccg gtggtagccc 1740

tgaacccggc tacgctgctc ccactgcctg aggaagggct gcaacacaac tgccttgata 1800

tcctggccga agcccacgga acccgacccg acctaacgga ccagccgctc ccagacgccg 1860

accacacctg gtacacggat ggaagcagtc tcttacaaga gggacagcgt aaggcgggag 1920

ctgcggtgac caccgagacc gaggtaatct gggctaaagc cctgccagcc gggacatccg 1980

ctcagcgggc tgaactgata gcactcaccc aggccctaaa gatggcagaa ggtaagaagc 2040

taaatgttta tactgatagc cgttatgctt ttgctactgc ccatatccat ggagaaatat 2100

acagaaggcg tgggttgctc acatcagaag gcaaagagat caaaaataaa gacgagatct 2160

tggccctact aaaagccctc tttctgccca aaagacttag cataatccat tgtccaggac 2220

atcaaaaggg acacagcgcc gaggctagag gcaaccggat ggctgaccaa gcggcccgaa 2280

aggcagccat cacagagact ccagacacct ctaccctcct catagaaaat tcatcaccca 2340

attcccgctt aattaattaa gcttgcggcc gcactcgagc accaccacca ccaccactga 2400

gatccggctg ctaacaaagc ccgaaaggaa gctgagttgg ctgctgccac cgctgagcaa 2460

taactagcat aaccccttgg ggcctctaaa cgggtcttga ggggtttttt gctgaaagga 2520

ggaactatat ccggattggc gaatgggacg cgccctgtag cggcgcatta agcgcggcgg 2580

gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt 2640

tcgctttctt cccttccttt ctcgccacgt tcgccggctt tccccgtcaa gctctaaatc 2700

gggggctccc tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg 2760

attagggtga tggttcacgt agtgggccat cgccctgata gacggttttt cgcccttga 2820

cgttggagtc cacgttcttt aatagtggac tcttgttcca aactggaaca acactcaacc 2880

ctatctcggt ctattctttt gatttataag ggattttgcc gatttcggcc tattggttaa 2940

aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattttaa caaaatatta acgtttacaa 3000

tttcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa 3060

tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt 3120

gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgcgg 3180

cattttgcct tcctgttttt gctcacccag aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag 3240

atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcggt aagatccttg 3300

agagttttcg ccccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg 3360

gcgcggtatt atcccgtatt gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt 3420

ctcagaatga cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga 3480

cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaacttac 3540

ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac atgggggatc 3600

atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc 3660

gtgacaccac gatgcctgca gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac 3720

tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag 3780
gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg 3840
gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgta 3900
tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg 3960
ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata 4020
tactttagat tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt 4080
ttgataatct catgaccaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc 4140

ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atccttttt tctgcgcgta atctgctgct 4200
tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa 4260
ctcttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag 4320
tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc 4380
tgctaatcct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg 4440
actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca 4500
cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat 4560

gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg 4620
tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc 4680
ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc 4740
ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc 4800
cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg 4860
cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga 4920
gcgaggaagc ggaagagcgc ctgatgcggt attttctcct tacgcatctg tgcggtattt 4980

cacaccgcat atatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat agttaagcca 5040
gtatacactc cgctatcgct acgtgactgg gtcatggctg cgccccgaca cccgccaaca 5100
cccgctgacg cgccctgacg ggcttgtctg ctcccggcat ccgcttacag acaagctgtg 5160
accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg ttttcaccgt catcaccgaa acgcgcgagg 5220
cagctgcggt aaagctcatc agcgtggtcg tgaagcgatt cacagatgtc tgcctgttca 5280
tccgcgtcca gctcgttgag tttctccaga agcgttaatg tctggcttct gataaagcgg 5340
gccatgttaa gggcggtttt ttcctgtttg gtcactgatg cctccgtgta agggggattt 5400

ctgttcatgg gggtaatgat accgatgaaa cgagagagga tgctcacgat acgggttact 5460

gatgatgaac atgcccggtt actggaacgt tgtgagggta aacaactggc ggtatggatg 5520

cggcgggacc agagaaaaat cactcagggt caatgccagc gcttcgttaa tacagatgta 5580

ggtgttccac agggtagcca gcagcatcct gcgatgcaga tccggaacat aatggtgcag 5640

ggcgctgact tccgcgtttc cagactttac gaaacacgga aaccgaagac cattcatgtt 5700

gttgctcagg tcgcagacgt tttgcagcag cagtcgcttc acgttcgctc gcgtatcggt 5760

gattcattct gctaaccagt aaggcaaccc cgccagccta gccgggtcct caacgacagg 5820

agcacgatca tgcgcacccg tggggccgcc atgccggcga taatggcctg cttctcgccg 5880

aaacgtttgg tggcgggacc agtgacgaag gcttgagcga gggcgtgcaa gattccgaat 5940

accgcaagcg acaggccgat catcgtcgcg ctccagcgaa agcggtcctc gccgaaaatg 6000

acccagagcg ctgccggcac ctgtcctacg agttgcatga taaagaagac agtcataagt 6060

gcggcgacga tagtcatgcc ccgcgcccac cggaaggagc tgactgggtt gaaggctctc 6120

aagggcatcg gtcgagatcc cggtgcctaa tgagtgagct aacttacatt aattgcgttg 6180

cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc 6240

caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgccagg gtggtttttc ttttcaccag 6300

tgagacgggc aacagctgat tgcccttcac cgcctggccc tgagagagtt gcagcaagcg 6360

gtccacgctg gtttgcccca gcaggcgaaa atcctgtttg atggtggtta acggcgggat 6420

ataacatgag ctgtcttcgg tatcgtcgta tcccactacc gagatatccg caccaacgcg 6480

cagcccggac tcggtaatgg cgcgcattgc gcccagcgcc atctgatcgt tggcaaccag 6540

catcgcagtg ggaacgatgc cctcattcag catttgcatg gtttgttgaa aaccggacat 6600

ggcactccag tcgccttccc gttccgctat cggctgaatt tgattgcgag tgagatattt 6660

atgccagcca gccagacgca gacgcgccga gacagaactt aatgggcccg ctaacagcgc 6720

gatttgctgg tgacccaatg cgaccagatg ctccacgccc agtcgcgtac cgtcttcatg 6780

ggagaaaata atactgttga tgggtgtctg gtcagagaca tcaagaaata acgccggaac 6840

attagtgcag gcagcttcca cagcaatggc atcctggtca tccagcggat agttaatgat 6900

cagcccactg acgcgttgcg cgagaagatt gtgcaccgcc gctttacagg cttcgacgcc 6960

gcttcgttct accatcgaca ccaccacgct ggcacccagt tgatcggcgc gagatttaat 7020

cgccgcgaca atttgcgacg gcgcgtgcag ggccagactg gaggtggcaa cgccaatcag 7080

caacgactgt ttgcccgcca gttgttgtgc cacgcggttg ggaatgtaat tcagctccgc 7140

catcgccgct tccacttttt cccgcgtttt cgcagaaacg tggctggcct ggttcaccac 7200

gcgggaaacg gtctgataag agacaccggc atactctgcg acatcgtata acgttactgg 7260

tttcacattc accaccctga attgactctc ttccgggcgc tatcatgcca taccgcgaaa 7320

ggttttgcgc cattcgatgg tgtccgggat ctcgacgctc tcccttatgc gactcctgca 7380

ttaggaagca gcccagtagt aggttgaggc cgttgagcac cgccgccgca aggaatggtg 7440

catgcaagga gatggcgccc aacagtcccc cggc 7474

<210> 20

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide pD-ter-

<400> 20

aagaagacac gatccaccg 19

<210> 21

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide long +

<400> 21

cgaacgtggc gagaaaggaa gggaagaaag aagtc 35

<210> 22

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide ddC-Long2 (71b + 3' modification ddC)

<220><221> modified_base

<222> (72)..(72)

<223> modification ddC

<400> 22

ttttttaga cttctttctt cccttccttt ctcgccacgt tcgaagaaga cacgatccac 60

cgccggttcc gc 72

<210> 23

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligonucleotide Long+Tb (35b + 3' Biotin (TEG))

<400> 23

cgaacgtggc gagaaaggaa gggaagaaag aagtc 35

<210> 24

<211> 2066

<212> DNA

<213> Murine Leukemia Virus

<400> 24

ccatgggcat gaccctaaat atagaagatg agcatcggct acatgagacc tcaaaagagc 60

cagatgtttc tctagggtcc acatggctgt ctgattttcc tcaggcctgg gcggaaaccg 120

ggggcatggg actggcagtt cgccaagctc ctctgatcat acctctgaaa gcaacctcta 180

cccccgtgtc cataaaacaa taccccatgt cacaagaagc cagactgggg atcaagcccc 240

acatacagag actgttggac cagggaatac tggtaccctg ccagtccccc tggaacacgc 300

ccctgctacc cgttaagaaa ccagggacta atgattatag gcctgtccag gatctgagag 360

aagtcaacaa gcgggtggaa gacatccacc ccaccgtgcc caacccttac aacctcttga 420

gcgggctccc accgtcccac cagtggtaca ctgtgcttga tttaaaggat gccttttttct 480

gcctgagact ccaccccacc agtcagcctc tcttcgcctt tgagtggaga gatccagaga 540

tgggaatctc aggacaattg acctggacca gactcccaca gggtttcaaa aacagtccca 600

ccctgtttga tgaggcactg cacagagacc tagcagactt ccggatccag cacccagact 660

tgatcctgct acagtacgtg gatgacttac tgctggccgc cacttctgag ctagactgcc 720

aacaaggtac tcgggccctg ttacaaaccc tagggaacct cgggtatcgg gcctcggcca 780

agaaagccca aatttgccag aaacaggtca agtatctggg gtatcttcta aaagagggtc 840

agagatggct gactgaggcc agaaaagaga ctgtgatggg gcagcctact ccgaagaccc 900

ctcgacaact aagggagttc ctagggacgg caggcttctg tcgcctctgg atccctgggt 960

ttgcagaaat ggcagccccc ttgtaccctc tcaccaaaac ggggactctg tttaattggg 1020

gcccagacca acaaaaggcc tatcaagaaa tcaagcaagc tcttctaact gccccagccc 1080

tggggttgcc agatttgact aagccctttg aactctttgt cgacgagaag cagggctacg 1140

ccaaaggtgt cctaacgcaa aaactgggac cttggcgtcg gccggtggcc tacctgtcca 1200

aaaagctaga cccagtagca gctgggtggc ccccttgcct acggatggta gcagccattg 1260

ccgtactgac aaaggatgca ggcaagctaa ccatgggaca gccactagtc attctggccc 1320

cccatgcagt agaggcacta gtcaaacaac cccccgaccg ctggctttcc aacgcccgga 1380

tgactcacta tcaggccttg cttttggaca cggaccgggt ccagttcgga ccggtggtag 1440

ccctgaaccc ggctacgctg ctcccactgc ctgaggaagg gctgcaacac aactgccttg 1500

atatcctggc cgaagcccac ggaacccgac ccgacctaac ggaccagccg ctcccagacg 1560

ccgaccacac ctggtacacg gatggaagca gtctcttaca agagggacag cgtaaggcgg 1620

gagctgcggt gaccaccgag accgaggtaa tctgggctaa agccctgcca gccgggacat 1680

ccgctcagcg ggctgaactg atagcactca cccaggccct aaagatggca gaaggtaaga 1740

agctaaatgt ttatactgat agccgttatg cttttgctac tgcccatatc catggagaaa 1800

tatacagaag gcgtgggttg ctcacatcag aaggcaaaga gatcaaaaat aaagacgaga 1860

tcttggccct actaaaagcc ctctttctgc ccaaaagact tagcataatc cattgtccag 1920

gacatcaaaa gggacacagc gccgaggcta gaggcaaccg gatggctgac caagcggccc 1980

gaaaggcagc catcacagag actccagaca cctctaccct cctcatagaa aattcatcac 2040

ccaattcccg cttaattaat gaattc 2066

<210> 25

<211> 683

<212> PRT

<213> Murine Leukemia Virus

<400> 25

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620
Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

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

<210> 26

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 26

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15
Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30
Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45
Val Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80
Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95
Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110
Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140
Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Ala Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560
Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590
Ile Arg Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 27

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 27

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Arg Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Leu Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Arg Trp Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile
660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 28

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 28

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Pro Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Asp Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Val Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asn Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 29

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 29

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu Arg Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Ala Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Gly Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Ile Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala
645 650 655
Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670
Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 30
<211> 683
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase
<400> 30
Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15
Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45
Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60
Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80
Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Ser Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110
Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125
Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Pro Pro Pro Ser His Gln
130 135 140
Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Ala Val
275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Pro Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510

Pro Phe Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Lys Gly
595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Ser Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Asp Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 31

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 31

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Thr Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Gly Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile
660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 32

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 32

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Leu Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Met Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Trp Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Ala Gln Ala Ala
645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 33

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 33

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Pro Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Ala Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Arg Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Val Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 34

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 34

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Ser Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Trp Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Pro Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Leu Gly Gln Pro Leu
420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Trp
545 550 555 560
Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590
Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Trp Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620
Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala
645 650 655
Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile
660 665 670
Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 35

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 35

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Gln Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Thr Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys His Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Ile

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Thr

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 36

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 36

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Val Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Ser Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asn Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Arg Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Ala Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Val His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560
Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575
Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asn Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620
Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640
Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala
645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile
660 665 670
Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 37

<211> 680

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 37

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asn Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Pro Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asn Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Pro Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asp Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Gln Leu Asn Val Tyr Thr Gly Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Val Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Ile Pro Ala

675 680

<210> 38

<211> 680

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 38

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asn Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540

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

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

Glu Asn Ser Ser Pro Ile Pro Ala
675 680

<210> 39
<211> 680
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 39

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Ser Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Thr Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu Arg Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Leu Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Ala Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Ala Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Ile Pro Ala

675 680

<210> 40

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 40

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Arg Tyr Val Asp
210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Ile Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Ala Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575
Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590
Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620

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

<210> 41

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 41

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu Arg Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Thr Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Val Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 42

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 42

```
Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1               5                  10                  15
Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
            20                  25                  30
Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
        35                  40                  45
Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
    50                  55                  60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65                  70                  75                  80
Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
                85                  90                  95
Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
            100                 105                 110
Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
        115                 120                 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
    130                 135                 140
Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145                 150                 155                 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
                165                 170                 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
            180                 185                 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asn Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
        195                 200                 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
    210                 215                 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225                 230                 235                 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
```

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Met Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asn Gly Ser Ser Leu
515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Gly Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala
645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile
660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 43

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 43

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asp Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Arg Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Ala Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Val His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 44

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 44

Thr Leu Asn Ile Lys Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30
Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Ile Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45
Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60
Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95
Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110
Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125
Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Ala Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Leu Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Lys Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560
Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575
Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620
Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640
Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala
645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile
660 665 670
Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 45
<211> 683
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase
<400> 45
Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15
Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Val His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Arg Leu Pro Pro Ser Arg Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Ala Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Pro Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Trp Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Arg Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Gln Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Pro Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 46

<211> 680

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 46

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Val
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220

Gly Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540

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

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

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Ala
675 680

<210> 47
<211> 680
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase
<400> 47
Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15
Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30
Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Ala Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Ala Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile Arg Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Pro

675 680

<210> 48

<211> 680

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 48

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60
Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80
Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95
Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125
Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140
Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Gly Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Gly Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575
Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590
Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620

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

<210> 49
<211> 683
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase
<400> 49
Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15
Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30
Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45
Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asn Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Pro Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Ser Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln Arg Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Cys Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Ala Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala His Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Leu Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Val Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Thr Pro His Ala Val Glu Ala Leu Ala Lys Gln Leu Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 50

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 50

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Thr Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80
Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95
Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110
Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140
Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asn Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Arg
565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Ala Gly
595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala
645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile
660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 51

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transriptase

<400> 51

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Ser Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Lys Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Ala Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Arg Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Pro Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Gly Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Gly Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Glu Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 52

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 52

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Trp Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95
Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110
Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125
Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Ala Leu Phe Gly Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Ala Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560
Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Trp Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala
645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile
660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 53

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 53

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Ser Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Glu Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asp Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Val Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala His Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Gly Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Gly Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 54

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 54

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Leu Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540

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

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Lys Arg Gly Met Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605

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

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 55
<211> 683
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase
<400> 55
Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15
Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30
Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45
Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60
Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80
Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95
Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Thr Thr His Tyr Gln Thr Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Arg Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Arg Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Val Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 56

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 56

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Ala Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Pro Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Ser Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125
Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140
Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Ala Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Arg Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240

Arg Thr Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Glu Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Leu Gly Gln Pro Leu
420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575
Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590
Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Trp Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620

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

<210> 57
<211> 683

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase
<400> 57
Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15
Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30
Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45
Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60
Ser Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80
Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95
Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110
Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Lys Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Ser Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Pro Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560
Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Trp Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly Arg Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asn Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 58

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 58

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Leu Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140
Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Met Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Arg Arg Trp Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Pro Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560
Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590
Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala
645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile
660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 59

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 59

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Pro Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Arg Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Trp Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Ser Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Arg Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 60

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 60

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Leu Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Lys Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560
Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575
Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620
Phe Leu Pro Glu Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala
645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile
660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 61

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 61

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Ala Ala Gly Ser Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Ala Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile Arg Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Ser Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 62

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 62

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

```
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Gly Pro Glu
                165                 170                 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
            180                 185                 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
        195                 200                 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
    210                 215                 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225                 230                 235                 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
                245                 250                 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
            260                 265                 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
        275                 280                 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
    290                 295                 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Pro Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305                 310                 315                 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
                325                 330                 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
            340                 345                 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
        355                 360                 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
    370                 375                 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385                 390                 395                 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
```

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Val His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Gly Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540

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

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620
Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640
Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala
645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile
660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 63

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 63

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Ala Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Pro Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Gly Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asp Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asn Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Pro Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 64

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 64

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Gly Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Pro Leu Ser Gly Pro Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Gln Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Gly Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala
645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile
660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Phe Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 65

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 65

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asn Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Pro Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asp Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 66

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 66

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile Ser Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Phe Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asn Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Lys Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560
Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asn Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590
Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620
Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala
645 650 655
Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile
660 665 670
Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 67

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 67

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Val Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Val Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asn Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560
Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575
Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620
Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640
Gly His Ser Ala Glu Val Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile
660 665 670
Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 68

<211> 680

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 68

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Ala Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Arg Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Ser Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Phe Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Pro Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala Arg Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560
Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575
Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620
Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640
Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Gly Gln Ala Ala
645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile
660 665 670
Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg
675 680

<210> 69

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 69

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ala Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Pro Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Ser Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Tyr Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Asp Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp His Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Gly Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Gly Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 70

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transriptase

<400> 70

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Leu
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Pro Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540

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

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

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 71
<211> 683
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 71

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asn Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Arg Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Pro Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Gly Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Ser Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asn Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 72

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 72

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Pro Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Arg Pro Leu
420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asp Pro
465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575
Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asn Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590
Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620

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

<210> 73
<211> 683

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase
<400> 73

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15
Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30
Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45
Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60
Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80
Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95
Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110
Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125
Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140
Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asn Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Pro Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asn Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Thr Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 74

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 74

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Ser Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile Arg Pro Ala

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Val Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asn Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640

Gly Tyr Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asn Gln Ala Ala
645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile
660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 75

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 75

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30
Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45
Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60
Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro Arg Ile Gln Arg

65 70 75 80
Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95
Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110
Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125
Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140
Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 76

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 76

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

```
            20                  25                  30
Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
        35                  40                  45
Ile Val Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
    50                  55                  60
Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65                  70                  75                  80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
                85                  90                  95
Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
            100                 105                 110
Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
        115                 120                 125
Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
    130                 135                 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145                 150                 155                 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
                165                 170                 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
            180                 185                 190
Lys Ser Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu Arg Arg Asp Leu Ala
        195                 200                 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
    210                 215                 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225                 230                 235                 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
                245                 250                 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
            260                 265                 270
```

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Ala Val
275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Ala Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560
Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575
Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620
Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640
Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala
645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile
660 665 670
Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 77
<211> 683
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase
<400> 77
Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15
Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45
Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60
Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80
Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95
Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Gly Pro Val
100 105 110
Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125
Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140
Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Gln Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asn Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 78

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 78

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asn Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Pro Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Arg Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

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

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

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 79
<211> 683
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase
<400> 79
Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15
Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30
Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60
Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80
Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95
Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110
Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125
Val Ser Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Pro Pro Pro Ser His Gln
130 135 140
Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Val Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Gly Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asn Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile Tyr Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 80

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 80

Thr Leu Asn Ile Lys Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asn Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Ala
225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575
Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590
Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620

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

<210> 81

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 81

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu Pro Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15
Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30
Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45
Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80
Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95
Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110
Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125
Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140
Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205
Asp Phe Trp Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Leu Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Pro Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Ala Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile Arg Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 82

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 82

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Val Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Lys Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Lys Phe Leu
290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Ala Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560
Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Trp Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala
645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Ser Leu Leu Ile
660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 83

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 83

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Leu Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Tyr Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95
Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110
Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125
Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140
Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Val Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 84

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 84

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445

Asp His Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala Arg Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620
Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640
Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala
645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile
660 665 670
Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 85
<211> 683
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase
<400> 85

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15
Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30
Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45
Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60
Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80
Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Ala
100 105 110
Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125
Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140
Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asn Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Pro Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Thr Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Ser Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asn Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 86

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 86

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Cys

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Val Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445

Ala Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525

Leu His Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

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

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 87
<211> 683
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase
<400> 87
Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15
Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30
Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45
Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60
Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80
Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95
Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Ala Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125
Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140
Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu Arg Arg Asp Leu Ala
195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Gly Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Asp Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Ala Gly Ser Ser Ile

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala
645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile
660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 88

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 88

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Val Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Ser Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu Arg Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Ala Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Ala Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560

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

610 615 620

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

<210> 89
<211> 683

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase
<400> 89
Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15
Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30
Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45
Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60
Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80
Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95
Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110
Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140
Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asn Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Gly Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Ala Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Gly Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 90

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 90

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asn Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln His Gly Thr
225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560
Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Ile Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590
Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Trp Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620
Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala
645 650 655
Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile
660 665 670
Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 91
<211> 683
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase
<400> 91
Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15
Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30
Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45
Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60
Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80
Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Leu Trp Asn Thr
85 90 95
Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110
Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125
Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Arg Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Trp Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 92

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 92

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Val Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Val Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Arg Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu Arg Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Ala Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Lys Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560
Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575
Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620
Leu Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640
Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala His Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile
660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 93

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 93

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Thr Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Thr Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Thr Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Trp Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asn Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 94

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 94

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Ser Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Ala Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Pro Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Leu Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Gly Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540

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

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620
Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640
Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala
645 650 655
Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 95

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 95

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Pro Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asn Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Pro Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Thr Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Leu Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile Gln Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Pro Thr

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 96

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 96

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Pro Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Pro Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300

Gly Thr Val Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 97

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 97

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu Tyr Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu His Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Gln Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Arg Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Thr Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Lys Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Ser Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Arg Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Gly Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 98

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 98

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Leu Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Glu Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asn Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Val Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Thr Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Thr Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Pro Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Thr Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asn Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 99

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 99

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu Arg Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Met Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Pro Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr Arg Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Val His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Gly Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Ala Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 100

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 100

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30
Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45
Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60
Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Thr Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95
Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Arg Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110
Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125
Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu His Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Gln Phe Asn Trp
325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Arg Pro Leu
420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Thr Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Lys Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Ser Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Arg Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Gly Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 101

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 101

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Ser Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560
Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575
Lys Leu Asn Val Tyr Thr Gly Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590
Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620
Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640
Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala
645 650 655
Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670
Glu Asn Ser Pro Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 102
<211> 683
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase
<400> 102
Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15
Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45
Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60
Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80
Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110
Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125
Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140
Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Ser Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Leu Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Arg Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Ala Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Lys Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu His Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Val Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 103

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 103

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Pro Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Ser Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Gly Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Thr Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Gly Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Gly Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Thr Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

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

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

<210> 104
<211> 683
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase
<400> 104
Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15
Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30
Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60
Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80
Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95
Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile Arg Pro Thr
115 120 125
Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Pro Pro Pro Ser His Gln
130 135 140
Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Val Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Pro Gln His Asn Cys Leu
485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Gly Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Ala Gln Ala Ala
645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile
660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 105

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 105

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asn Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Pro Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560
Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575
Lys Leu Asn Val Tyr Thr Ala Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590
Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620
Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly Arg Gln Lys

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

<210> 106
<211> 683
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 106
Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15
Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30
Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45
Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80
Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95
Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110
Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140
Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 107

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 107

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Val Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Pro Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asp Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Gly Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575
Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590
Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620
Leu Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640
Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655
Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile
660 665 670
Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 108
<211> 683
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase
<400> 108
Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30
Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45
Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60
Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95
Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110
Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125
Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asn Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Gly Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Pro Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Arg Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 109

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 109

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile Ser Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asn Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Gly Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 110

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 110

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110
Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125
Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140
Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asn Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Gly Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Ala Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540

Gly Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560
Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575
Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 111

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 111

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asp Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Gly Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Lys Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

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

<210> 112
<211> 683
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase
<400> 112
Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15
Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30
Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60
Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80
Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95
Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Gly Ile His Pro Thr
115 120 125
Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140
Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Gly Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Arg Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Lys Cys Leu
485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575
Lys Leu Asn Val Tyr Thr Gly Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590
Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Val Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 113

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 113

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asn Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Pro Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Ala Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620
Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly Arg Gln Lys

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

<210> 114
<211> 683
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 114
Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15
Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30
Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45
Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80
Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95
Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110
Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140
Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Pro Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Val Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560
Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590
Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Ala Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 115

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 115

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Ile Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Gly Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile
660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 116

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 116

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Ser Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160
His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu Arg Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Asp Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Ser Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560
Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575
Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asn Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620
Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 117

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 117

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Met

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asn Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Pro Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Gly Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala
645 650 655
Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670
Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 118
<211> 683
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase
<400> 118
Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15
Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45
Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60
Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80
Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110
Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125
Val Pro Asn Ser Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140
Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Gly Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175
Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Arg Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Gly Gly Ser Ser Leu
515 520 525

Leu Gln Glu Gly Lys Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 119

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 119

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Gly Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asn Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Arg Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Phe Leu Ile
660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 120

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 120

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Pro Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190
Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Lys Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Glu Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575
Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590
Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Thr His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640
Gly Arg Gly Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala
645 650 655
Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 121

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 121

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Ser Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Lys Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Ser Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Pro Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Trp Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly Arg Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asn Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 122

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 122

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asn Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205
Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Arg Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Pro Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Gly Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560
Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590
Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620
Ser Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asn Gln Ala Ala
645 650 655
Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile
660 665 670
Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 123

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 123

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu

1 5 10 15

Ser Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala

20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu

35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr

50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg

65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr

85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Glu Tyr Arg Pro Val

100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr

115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln

130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu

145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu

165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe

180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asp Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Val Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala His Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Gly Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Gly Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Lys Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 124

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 124

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu Pro Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Pro Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Ala Leu Phe Gly Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala

195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220
Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Trp Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480
Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Gly Gly Ser Ser Leu
515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560
Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575
Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Val Leu
610 615 620
Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys
625 630 635 640
Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Ala Gln Ala Ala
645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile
660 665 670
Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680
<210> 125

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 125

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala His Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Ala Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 126

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 126

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Pro Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Ser Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Pro Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Arg Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp

210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr
225 230 235 240
Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300
Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Gln Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Gly Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365
Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Ala Leu Thr Pro Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430
Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495
Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Gly Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Arg Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540

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

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

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn
675 680

<210> 127
<211> 683
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 127

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Arg Tyr Val Asp
210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala

245 250 255

Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu

260 265 270

Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Thr Arg Lys Glu Ala Val

275 280 285

Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu

290 295 300

Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met

305 310 315 320

Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp

325 330 335

Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu

340 345 350

Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu

355 360 365

Ile Val Asp Glu Lys Gln Gly Cys Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys

370 375 380

Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp

385 390 395 400

Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile

405 410 415

Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu

420 425 430

Val Thr Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro

435 440 445

Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu

450 455 460

Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro

465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu

485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln

500 505 510

Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu

515 520 525

Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr

530 535 540

Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg

545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys

565 570 575

Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His

580 585 590

Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Trp Leu Thr Ser Glu Gly

595 600 605

Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu

610 615 620

Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys

625 630 635 640

Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala

645 650 655

Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile

660 665 670

Glu Asn Ser Ser Pro Asn Ser Arg Leu Ile Asn

675 680

<210> 128

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutant MLV reverse transcriptase

<400> 128

Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu
1 5 10 15

Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala
20 25 30

Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu
35 40 45

Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr
50 55 60

Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr
85 90 95

Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val
100 105 110

Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr
115 120 125

Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln
130 135 140

Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu
145 150 155 160

His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu
165 170 175

Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe
180 185 190

Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala
195 200 205

Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp
210 215 220

Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr

225 230 235 240

Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly His Arg Ala Ser Ala
245 250 255
Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu
260 265 270
Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val
275 280 285
Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu
290 295 300

Gly Thr Ala Ser Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met
305 310 315 320
Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp
325 330 335
Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu
340 345 350
Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys Pro Phe Glu Leu
355 360 365

Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly Val Leu Thr Gln Lys
370 375 380
Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr Leu Ser Lys Lys Leu Asp
385 390 395 400
Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys Leu Arg Met Val Ala Ala Ile
405 410 415
Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu
420 425 430

Val Ile Leu Ala Pro His Ala Val Gly Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro
435 440 445
Asp Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu
450 455 460
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn Pro
465 470 475 480

Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn Cys Leu
485 490 495

Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu Thr Asp Gln
500 505 510
Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser Leu
515 520 525
Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu Thr
530 535 540
Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln Arg
545 550 555 560

Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys
565 570 575
Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His
580 585 590
Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Arg Gly Trp Leu Thr Ser Glu Gly
595 600 605
Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu
610 615 620

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