



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년 12월 30일
(11) 등록번호 10-2483783
(24) 등록일자 2022년 12월 28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
C12Q 2537/143 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-7024701(분할)

(22) 출원일자(국제) 2014년11월17일
심사청구일자 2021년09월02일

(85) 번역문제출일자 2021년08월04일

(65) 공개번호 10-2021-0099204

(43) 공개일자 2021년08월11일

(62) 원출원 특허 10-2016-7015852
원출원일자(국제) 2014년11월17일
심사청구일자 2019년11월15일

(86) 국제출원번호 PCT/US2014/065975

(87) 국제공개번호 WO 2015/073978
국제공개일자 2015년05월21일

(30) 우선권주장
61/905,051 2013년11월15일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌
KR1020070076532 A*
KR1020100115030 A*
NCBI Reference Sequence: NG_012646.1
(2009.08.07.)*

(73) 특허권자
아벨리노 랩 유에스에이, 임크.
미국, 캘리포니아 94025, 멘로 파크, 스위트
비-2, 아담스 드라이브 1505

(72) 발명자
차오 션 코니
미국 94025 캘리포니아주 멘로 파크 스위트 비2
아담스 드라이브 1505

조 선영
미국 94025 캘리포니아주 멘로 파크 스위트 비2
아담스 드라이브 1505

리 진
미국 94025 캘리포니아주 멘로 파크 스위트 비2
아담스 드라이브 1505

(74) 대리인
김진희, 김태홍

(74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 10 항

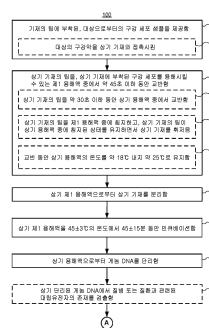
심사관 : 이준혁

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

(57) 요약

인간 대상으로부터의 샘플에서 각막 이영양증과 관련된 적어도 2개의 게놈 대립유전자를 검출하기 위한 시스템 및 방법이 개시되어 있으며, 여기서 대상의 세포(예컨대, 상피 세포)는 기재의 텁에 부착되어 있다. 상기 기재의 텁은 상기 기재에 부착된 세포를 용해시키는 용해액 중에서 교반한다. 상기 기재는 이 교반이 완료되면 용해액으로 (뒷면에 계속)

대 표 도 - 도 1a



로부터 분리한다. 얻어진 용해액을 인큐베이션한 다음, 상기 용해액으로부터 계놈 DNA를 단리하여 gDNA 용액을 형성한다. 이로부터, 적어도 2개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머쌍 및 gDNA 용액을 이용하여, 인간 TGF β I 유전자 내에 존재하는 적어도 2개의 뉴클레오타이드의 정체(identity)가 확인된다. 이들 적어도 2개의 뉴클레오타이드는, 각각 이영양증과 관련된 각각의 독립적인 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)에 상응하는 TGF β I 유전자의 각각의 독립적인 위치에 위치한다.

(52) CPC특허분류

C12Q 2600/156 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

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

(A) 상기 대상으로부터의 생물학적 샘플로부터 제1 TGF β I 유전자 서열을 증폭시키고 결정하기 위한 적어도 제1 증폭 프라이머쌍; 및

(B) 서열번호: 45 및 서열번호: 47로부터 선택된 서열을 포함하는 제1 검출 프로브, 서열번호: 46의 서열을 포함하는 제2 검출 프로브, 및 서열번호: 50의 서열을 포함하는 제3 검출 프로브를 포함하는 적어도 3개의 검출 프로브의 제1 세트.

청구항 2

제1항에 있어서, 검출 프로브의 제2 세트, 및 상기 대상으로부터의 생물학적 샘플로부터 제2 TGF β I 유전자 서열을 증폭시키고 결정하기 위한 적어도 제2 증폭 프라이머쌍을 추가로 포함하는 반응 혼합물로서, 상기 검출 프로브의 제2 세트는

서열번호: 25의 서열을 포함하는 제4 검출 프로브; 및

서열번호: 26의 서열을 포함하는 제5 검출 프로브, 서열번호: 48의 서열을 포함하는 제6 검출 프로브, 및 서열 번호: 49의 서열을 포함하는 제7 검출 프로브로 이루어진 군에서 선택되는 하나 또는 두 개의 검출 프로브를 포함하는 것인 반응 혼합물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 제1 증폭 프라이머쌍은 제1 증폭 프라이머 및 제2 증폭 프라이머를 포함하고, 상기 제1 증폭 프라이머는 서열번호: 43의 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 제2 증폭 프라이머는 서열번호: 44의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 반응 혼합물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 제1 TGF β I 유전자 서열은 대상으로부터의 생물학적 샘플 유래의 아미노산 잔기 555를 인코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 것인 반응 혼합물.

청구항 5

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

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 제1 증폭 프라이머쌍은 제1 증폭 프라이머 및 제2 증폭 프라이머를 포함하고, 상기 제1 증폭 프라이머는 서열번호: 43의 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 제2 증폭 프라이머는 서열번호: 44의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 상기 제2 증폭 프라이머쌍은 제3 증폭 프라이머 및 제4 증폭 프라이머를 포함하고, 상기 제3 증폭 프라이머는 서열번호: 1의 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 제4 증폭 프라이머는 서열번호: 2의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 반응 혼합물.

청구항 7

하기 (A), (B) 및 (C) 단계를 포함하는, 각막 이영양증을 검출하는 방법:

(A) TGF β I 유전자 서열을 증폭시키기 위한 적어도 제1 증폭 프라이머쌍 및 적어도 3개의 검출 프로브의 세트를 포함하는 반응 혼합물을 이용하여, 인간 대상으로부터의 생물학적 샘플로부터 제1 TGF β I 유전자 서열을 증폭시

키는 단계로서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트는 서열번호: 45 및 서열번호: 47로부터 선택된 서열을 포함하는 제1 검출 프로브, 서열번호: 46의 서열을 포함하는 제2 검출 프로브, 및 서열번호: 50의 서열을 포함하는 제3 검출 프로브를 포함하는 것인 단계;

(B) 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트 중 하나의 검출 프로브를 상기 제1 TGF β I 유전자 서열에 혼성화시키는 단계; 및

(C) (i) 상기 제1 TGF β I 유전자 서열에 대해 단계 (B)에서 혼성화된 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트 중 하나의 검출 프로브의 혼성화, 및 (ii) 상기 제1 TGF β I 유전자 서열에 대한 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트 중 다른 2개의 검출 프로브의 혼성화 실패에 기초하여, 상기 제1 TGF β I 유전자 서열 내의 돌연변이를 검출하는 단계.

청구항 8

제7항에 있어서, 반응 혼합물이 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 정의된 반응 혼합물을 포함하는 것인 방법.

청구항 9

하기 (A) 내지 (F) 단계를 포함하는, 인간 대상으로부터의 샘플에서 각각 이영양증과 관련된 게놈 돌연변이를 검출하는 방법:

(A) 기재의 텁에 부착된 인간 대상의 상피 세포를 사용하는 단계;

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

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

(D) 상기 제거(C) 후, 상기 용해액을 인큐베이션하는 단계;

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

(F) TGF β I 유전자 서열을 증폭시키기 위한 적어도 제1 프라이머쌍, 적어도 3개의 검출 프로브의 제1 세트 및 상기 gDNA 용액을 이용하여, 상기 gDNA 용액을 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제1 세트에 동시에 노출시킴으로써, TGF β I 유전자 내에 존재하는 적어도 제1 뉴클레오타이드의 정체를 확인하는 단계로서,

상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제1 세트는 서열번호: 45 및 서열번호: 47로부터 선택된 서열을 포함하는 제1 검출 프로브, 서열번호: 46의 서열을 포함하는 제2 검출 프로브, 및 서열번호: 50의 서열을 포함하는 제3 검출 프로브를 포함하고,

상기 적어도 제1 뉴클레오타이드는, 각각 이영양증과 관련된 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)에 상응하는, TGF β I 유전자의 특정 위치에 위치하는 것인 단계.

청구항 10

제9항에 있어서, 하기 (G) 단계를 추가로 포함하는 것인 방법:

(G) 적어도 제2 프라이머쌍, 검출 프로브의 제2 세트, 및 상기 gDNA 용액을 이용하여, 상기 gDNA 용액을 상기 검출 프로브의 제2 세트에 동시에 노출시킴으로써, TGF β I 유전자 내에 존재하는 적어도 제2 뉴클레오타이드의 정체를 확인하는 단계로서,

상기 검출 프로브의 제2 세트는

서열번호: 25의 서열을 포함하는 제4 검출 프로브; 및

서열번호: 26의 서열을 포함하는 제5 검출 프로브, 서열번호: 48의 서열을 포함하는 제6 검출 프로브, 및 서열 번호: 49의 서열을 포함하는 제7 검출 프로브로 이루어진 군에서 선택되는 하나 또는 두 개의 검출 프로브를 포함하며,

상기 적어도 제2 뉴클레오타이드는, 상기 적어도 제1 뉴클레오타이드의 위치에 독립적으로, 각각 이영양증과 관련된 제2 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)에 상응하는, TGF β I 유전자의 제2의 특정 위치에 위치하는 것인 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

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

배경 기술

[0002]

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

[0003]

그러나, 실시간 PCR 분석은 고품질 샘플의 수집 및 단리에 크게 의존한다. 불량한 샘플 수집 및/또는 단리는 더 긴 분석 조건 및 더 많은 양의 실시간 PCR 시약의 사용을 요구하며, 이 둘은 비용 증가 및 생산성 저하를 야기한다. 더욱이, 실시간 PCR 단일 뉴클레오타이드 다형성 검출 분석이 실패하는 경우 추가적인 샘플을 수집할 필요가 있으며, 이는 시간 및 자원에서 훨씬 더 큰 손실을 유발할 수 있다.

[0004]

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

[0005]

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

[0006]

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

[0007]

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

[0008]

또한, 미국에서 2000년에 라식 수술이 승인된 후, 라식 수술을 한 아벨리노 각막 이영양증을 겪는 아프리카계 미국인 환자들이 시력을 잃은 것으로 나타났고, 이는 많은 비슷한 사례가 전 세계적으로 일어나고 있을지도 모

른다는 것을 암시한다.

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

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

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

발명의 내용

[0012] 본 개시내용은 인간 질환과 관련된 하나 이상의 대립유전자를 검출하기 위한 개선된 방법을 제공한다. 하기 기재된 방법은 대상에 관한 의료 정보를 내놓는 분석들을 수행하는 것과 연관된 시간 및 비용을 줄인다. 예를 들면, 일부 구현예에서, 상기 개선된 방법은 환자에게 감소된 비용으로, 아벨리노 각막 이영양증과 관련된 게놈 마커의 당일 검출을 가능하게 한다.

[0013] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는, 대상으로부터의 샘플에서 각막 이영양증과 관련된 적어도 2개의 게놈 대립유전자를 검출하는 방법을 제공한다: (A) 기재(substrate)의 팁에 부착된, 대상의 상피 세포를 제공하는 단계; (B) 상기 기재의 팁을, 상기 기재에 부착된 세포를 용해시키는 용해액 중에서 교반(aggregate)하는 단계; (C) 상기 교반(B)이 완료되면, 용해액으로부터 기재를 분리하는 단계; (D) 상기 분리(C) 후, 상기 용해액을 인큐베이션하는 단계; (E) 상기 용해액으로부터 게놈 DNA를 단리하여 gDNA 용액을 형성하는 단계; 및 (F) 적어도 2개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머쌍 및 상기 gDNA 용액을 이용하여 TGF β I 유전자 내에 존재하는 적어도 2개의 뉴클레오타이드의 정체(identity)를 확인하는 단계로서, 여기서 상기 적어도 2개의 뉴클레오타이드는, 각막 이영양증과 관련된 각각의 독립적인 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)에 상응하는, TGF β I 유전자의 각각의 독립적인 위치에 위치한다.

[0014] 일부 구현예에서, 상기 TGF β I 유전자 내에 존재하는 적어도 2개의 뉴클레오타이드는 인간 게놈에서 적어도 1개의 뉴클레오타이드에 의해 분리되어 있다.

[0015] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머쌍 중 적어도 한 쌍은 서열번호: 1을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 정방향 프라이머 및 서열번호: 2를 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 역방향 PCR 프라이머를 포함한다.

[0016] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머쌍 중 적어도 한 쌍은 서열번호: 43을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 정방향 프라이머 및 서열번호: 44를 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 역방향 PCR 프라이머를 포함한다.

[0017] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머쌍은 제1 증폭 프라이머쌍 및 제2 증폭 프라이머쌍을 포함한다. 상기 제1 증폭 프라이머쌍은 서열번호: 1을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 정방향 프라이머 및 서열번호: 2를 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 역방향 PCR 프라이머를 포함한다. 상기 제2 증폭 프라이머쌍은 서열번호: 43을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 정방향 프라이머 및 서열번호: 44를 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 역방향 PCR 프라이머를 포함한다.

[0018] 일부 구현예에서, 상기 확인 단계(F)는 하기를 이용하는 것을 추가로 포함한다: (i) 서열번호: 25를 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 제1 야생형 검출 프로브 및 서열번호: 26, 서열번호: 48, 또는 서열번호: 49를 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 제1 돌연변이 검출 프로브; 및 (ii) 서열번호: 45 또는 서열번호: 47을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 제2 야생형 검출 프로브 및 서열번호: 46 또는 서열번호: 50을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 제2 돌연변이 검출 프로브.

[0019] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는, 각막 이영양증을 검출하는 방법을 제공한다: (A) 적어도 제1 증폭 프라이머쌍 및 적어도 제2 증폭 프라이머쌍을 포함하는 반응 혼합물을 이용하여 인간 대상으로부터의 생물

학적 샘플로부터, 아미노산 잔기 124를 인코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 제1 TGF β I 유전자 서열 및 아미노산 잔기 555를 인코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 제2 TGF β I 유전자 서열을 포함하는, 적어도 2개의 TGF β I 유전자 서열을 증폭시키는 단계; (B) 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브쌍의 제1 검출 프로브를 상기 제1 TGF β I 유전자 서열에 혼성화시키는 단계; (C) 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브쌍의 제2 검출 프로브를 상기 제2 TGF β I 유전자 서열에 혼성화시키는 단계; 및 (D) 상기 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브쌍 및 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브쌍을 포함하는, 적어도 2개의 검출 프로브쌍의 사용에 기초하여 상기 제1 TGF β I 유전자 서열 및/또는 상기 제2 TGF β I 유전자 서열 내의 하나 이상의 돌연변이를 검출하는 단계.

[0020] 일부 구현예에서, 상기 제1 TGF β I 유전자 서열 및/또는 상기 제2 TGF β I 유전자 서열 내의 하나 이상의 돌연변이를 검출하는 것은 상기 제1 TGF β I 유전자 서열 및/또는 상기 제2 TGF β I 유전자 서열 내의 2개 이상의 돌연변이를 검출하는 것을 포함하고, 상기 2개 이상의 돌연변이는 인간 게놈에서 적어도 하나의 뉴클레오타이드에 의해 분리되어 있다.

[0021] 일부 구현예에서, 상기 적어도 제1 증폭 프라이머쌍은 제1 증폭 프라이머 및 제2 증폭 프라이머를 포함하고, 상기 제1 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 1을 포함하고, 상기 제2 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 2를 포함한다.

[0022] 일부 구현예에서, 상기 적어도 제2 증폭 프라이머쌍은 제3 증폭 프라이머 및 제4 증폭 프라이머를 포함하고, 상기 제3 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 43으로 표시되고, 상기 제4 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 44로 표시된다.

[0023] 일부 구현예에서, 상기 제1 증폭 프라이머쌍은 제1 증폭 프라이머 및 제2 증폭 프라이머를 포함하고, 상기 제1 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 1을 포함하며, 상기 제2 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 2를 포함하며, 상기 제2 증폭 프라이머쌍은 제3 증폭 프라이머 및 제4 증폭 프라이머를 포함하고, 상기 제3 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 43을 포함하며, 상기 제4 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 44를 포함한다.

[0024] 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 돌연변이 중 하나는, 인코딩된 TGF β I 단백질 내에서, 아미노산 124에서, 시스테인으로 돌연변이된 아르기닌(R124C), 히스티딘으로 돌연변이된 아르기닌(R124H), 및/또는 류신으로 돌연변이된 아르기닌(R124L)에 상응한다.

[0025] 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 돌연변이 중 하나는, 인코딩된 TGF β I 단백질 내에서, 아미노산 555에서, 트립토판으로 돌연변이된 아르기닌(R555W) 및/또는 글루타민으로 돌연변이된 아르기닌(R555Q)에 상응한다.

[0026] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브쌍 각각은 개별적으로 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 서로 다른 서열번호: 25-26, 서열번호: 25 및 48, 서열번호: 25 및 49, 서열번호: 27-28, 서열번호: 29-30, 서열번호: 31-32, 서열번호: 33-34, 서열번호: 35-36, 서열번호: 37-38, 서열번호: 39-40, 서열번호: 41-42, 서열번호: 45-46 및 서열번호: 46-47, 서열번호: 45 및 50, 및 서열번호: 47 및 50으로 이루어진 군으로부터 개별적으로 선택되는 뉴클레오타이드 서열쌍을 포함한다.

[0027] 일부 구현예에서, 상기 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브쌍은 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 25 및 서열번호: 26을 포함한다.

[0028] 일부 구현예에서, 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브쌍은 제3 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제4 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제3 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제4 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 45 및 서열번호: 46을 포함한다.

[0029] 일부 구현예에서, 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브쌍은 제3 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제4 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 제3 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제4 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 47 및 서열번호: 46을 포함한다.

[0030] 일부 구현예에서, 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브쌍은 제3 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제4 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제3 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제4 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 25 및 서열번호: 48을 포함한다.

[0031] 일부 구현예에서, 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브쌍은 제3 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제4 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제3 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제4 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 25 및 서열번호: 49를 포함한다.

[0032] 일부 구현예에서, 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브쌍은 제3 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제4 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제3 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제4 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 45 및 서열번호: 50을 포함한다.

[0033] 일부 구현예에서, 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브쌍은 제3 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제4 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제3 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제4 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 47 및 서열번호: 50을 포함한다.

[0034] 일부 구현예에서, 상기 제1 검출 프로브는 제1 표지와 커플링되고 상기 제2 검출 프로브는 제2 표지에 커플링된다.

[0035] 일부 구현예에서, 상기 제1 표지는 VIC이고 상기 제2 표지는 FAM이다.

[0036] 일부 구현예에서, 상기 혼성화 단계(B)와 상기 혼성화 단계(C)는 동일한 중 용액에서 동시에 수행된다.

[0037] 일부 구현예에서, 상기 혼성화 단계(B)와 상기 혼성화 단계(C)는 동일한 용액 또는 상이한 용액 중에서 동시에 또는 상이한 시점에 수행된다.

[0038] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는, 인간 대상에서 각막 이영양증을 검출하기 위한 반응 혼합물을 제공한다: (A) (1) 상기 대상으로부터의 생물학적 샘플로부터 아미노산 잔기 124를 인코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 적어도 2개의 TGF β I 유전자 서열 중 제1 TGF β I 유전자 서열을, 그리고 (2) 상기 대상으로부터의 생물학적 샘플로부터 아미노산 잔기 555를 인코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 적어도 2개의 TGF β I 유전자 서열 중 제2 TGF β I 유전자 서열을 증폭시키고 결정하기 위한 적어도 제1 증폭 프라이머쌍 및 제2 증폭 프라이머쌍; 및 (B) 적어도 2개의 검출 프로브쌍, 여기서 상기 적어도 2개의 검출 프로브쌍 각각에서의 검출 프로브는 적어도 2개의 TGF β I 유전자 서열 중 적어도 하나에 혼성화한다.

[0039] 일부 구현예에서, 상기 제1 증폭 프라이머쌍은 제1 증폭 프라이머 및 제2 증폭 프라이머를 포함하고, 상기 제1 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 1을 포함하며, 상기 제2 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 2를 포함한다.

[0040] 일부 구현예에서, 상기 제2 증폭 프라이머쌍은 제3 증폭 프라이머 및 제4 증폭 프라이머를 포함하고, 상기 제3 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 43을 포함하며, 상기 제4 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 44를 포함한다.

[0041] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 프로브쌍 중 적어도 하나는, 인코딩된 TGF β I 단백질 내에서, 아미노산 124에서, 시스테인으로 돌연변이된 아르기닌(R124C), 히스티딘으로 돌연변이된 아르기닌(R124H), 및/또는 류신으로 돌연변이된 아르기닌(R124L)에 상응하는 돌연변이를 검출하는 데 사용된다.

[0042] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 프로브쌍 중 적어도 하나는, 인코딩된 TGF β I 단백질 내에서, 아미노산 555에서, 트립토판으로 돌연변이된 아르기닌(R555W) 및/또는 글루타민으로 돌연변이된 아르기닌(R555Q)에 상응하는 돌연변이를 검출하는 데 사용된다.

[0043] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 프로브쌍 중 각각의 검출 프로브는 개별적으로 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 서열번호: 25-26, 서열번호: 25 및 48, 서열번호: 25 및 49, 서열번호: 27-28, 서열번호: 29-30, 서열번호: 31-32, 서열번호: 33-34, 서열번호: 35-36, 서

열번호: 37-38, 서열번호: 39-40, 서열번호: 41-42, 서열번호: 45-46 및 서열번호: 46-47, 서열번호: 45 및 50, 및 서열번호: 47 및 50으로 이루어진 군으로부터 개별적으로 선택되는 뉴클레오타이드 서열쌍을 포함한다.

[0044] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 프로브쌍 중 하나는 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 25 및 서열번호: 26을 포함한다.

[0045] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 프로브쌍 중 하나는 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 45 및 서열번호: 46을 포함한다.

[0046] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 프로브쌍 중 하나는 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 47 및 서열번호: 46을 포함한다.

[0047] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 프로브쌍 중 하나는 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 25 및 서열번호: 48을 포함한다.

[0048] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 프로브쌍 중 하나는 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 25 및 서열번호: 49을 포함한다.

[0049] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 프로브쌍 중 하나는 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 45 및 서열번호: 50을 포함한다.

[0050] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 프로브쌍 중 하나는 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 47 및 서열번호: 50을 포함한다.

[0051] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 프로브 중 제1 검출 프로브는 제1 표지와 커플링되고 상기 적어도 2개의 검출 프로브 중 제2 검출 프로브는 제2 표지에 커플링된다.

[0052] 일부 구현예에서, 상기 제1 표지는 VIC이고, 상기 제2 표지는 FAM이다.

[0053] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는, 인간 대상에서 각막 이영양증을 검출하기 위한 반응 혼합물을 제공한다: (A) 대상으로부터의 생물학적 샘플로부터 TGF β I 유전자 서열을 증폭시키고 결정하기 위한 적어도 제1 증폭 프라이머쌍; 및 (B) 적어도 3개의 검출 프로브의 세트, 여기서 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트 중 하나의 검출 프로브는 TGF β I 유전자 서열에 노출될 때 TGF β I 유전자 서열에 혼성화한다.

[0054] 일부 구현예에서, 상기 TGF β I 유전자 서열은 대상으로부터의 생물학적 샘플로부터 아미노산 잔기 124를 인코딩하는 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0055] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트는 서열번호: 25-42 및 48-49로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 검출 프로브를 포함한다.

[0056] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트는 서열번호: 25-42 및 48-49로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 2개 이상의 검출 프로브를 포함한다.

[0057] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트는 서열번호: 25-42 및 48-49로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 3개 이상의 검출 프로브를 포함한다.

[0058] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트는 제1 검출 프로브 서열번호: 25 및 제2 검출 프로브 서열번호: 26을 포함한다.

[0059] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트는 서열번호: 48 및 서열번호: 49로 이루어진 군으로부터 선택되는 제3 검출 프로브를 포함한다.

[0060] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트는, 제3 검출 프로브와 다르며 서열번호: 48 및 서열번

호: 49로 이루어진 군으로부터 선택되는 제4 검출 프로브를 포함한다.

[0061] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트는 서열번호: 26 및 48-49로 이루어진 군으로부터 선택되는 2개 이상의 검출 프로브를 포함한다.

[0062] 일부 구현예에서, 상기 제1 증폭 프라이머쌍은 제1 증폭 프라이머 및 제2 증폭 프라이머를 포함하고, 상기 제1 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 1을 포함하며, 상기 제2 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 2를 포함한다.

[0063] 일부 구현예에서, 상기 반응 혼합물을 하기를 추가로 포함한다: (C) 생물학적 샘플로부터 제2 TGF β I 유전자 서열을 증폭시키고 결정하기 위한 적어도 제2 증폭 프라이머쌍; 및 (D) 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트, 여기서 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트 중 하나의 검출 프로브는 제2 TGF β I 유전자 서열에 노출될 때 제2 TGF β I 유전자 서열에 혼성화한다.

[0064] 일부 구현예에서, 상기 제2 TGF β I 유전자 서열은 대상으로부터의 생물학적 샘플로부터 아미노산 잔기 555를 인코딩하는 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0065] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트는 서열번호: 45-47 및 50으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 검출 프로브를 포함한다.

[0066] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트는 서열번호: 45-47 및 50으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 2개 이상의 검출 프로브를 포함한다.

[0067] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트는 서열번호: 45-47 및 50으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 3개 이상의 검출 프로브를 포함한다.

[0068] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트는 서열번호: 45 또는 서열번호: 47인 제1 검출 프로브, 서열번호: 46인 제2 검출 프로브, 및 서열번호: 50인 제3 검출 프로브를 포함한다.

[0069] 일부 구현예에서, 상기 제2 증폭 프라이머쌍은 제3 증폭 프라이머 및 제4 증폭 프라이머를 포함하고, 상기 제3 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 43을 포함하며, 상기 제4 증폭 프라이머는 뉴클레오타이드 서열 서열번호: 44를 포함한다.

[0070] 일부 구현예에서, 상기 TGF β I 유전자 서열은 대상으로부터의 생물학적 샘플로부터 아미노산 잔기 555를 인코딩하는 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0071] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트는 서열번호: 45-47 및 50으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 검출 프로브를 포함한다.

[0072] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트는 서열번호: 45-47 및 50으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 2개 이상의 검출 프로브를 포함한다.

[0073] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트는 서열번호: 45-47 및 50으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 3개 이상의 검출 프로브를 포함한다.

[0074] 일부 구현예에서, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트는 서열번호: 45 또는 서열번호: 47인 제1 검출 프로브, 서열번호: 46인 제2 검출 프로브, 및 서열번호: 50인 제3 검출 프로브를 포함한다.

[0075] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는, 각막 이영양증을 검출하는 방법을 제공한다: (A-1) 적어도 제1 증폭 프라이머쌍 및 적어도 3개의 검출 프로브의 세트를 포함하는 반응 혼합물을 이용하여 인간 대상으로부터의 생물학적 샘플로부터 제1 TGF β I 유전자 서열을 증폭시키는 단계; (B-1) 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트 중 제1 검출 프로브를 상기 제1 TGF β I 유전자 서열에 혼성화시키는 단계; 및 (C-1) (i) 상기 제1 TGF β I 유전자 서열에 대한 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트 중 제1 검출 프로브의 혼성화, 및 (ii) 상기 제1 TGF β I 유전자 서열에 대한 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트 중 제2 및 제3 검출 프로브의 혼성화 실패에 기초하여, 상기 제1 TGF β I 유전자 서열 내의 돌연변이를 검출하는 단계.

[0076] 일부 구현예에서, 상기 방법은 하기를 추가로 포함한다: (A-2) 동일한 반응 혼합물을 이용하여 생물학적 샘플로부터 제2 TGF β I 유전자 서열을 증폭시키는 단계로서, 여기서 상기 반응 혼합물은 적어도 제2 증폭 프라이머쌍 및 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트를 포함하며; (B-2) 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트 중 제1 검출 프로브를 상기 제2 TGF β I 유전자 서열에 혼성화시키는 단계; 및 (C-2) (i) 상기 제1 TGF β I 유전자 서열

에 대한 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트 중 제1 검출 프로브의 혼성화, 및 (ii) 상기 제2 TGF β I 유전자 서열에 대한 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트 중 제2 검출 프로브 및 제3 검출 프로브의 혼성화 실패에 기초하여 상기 제2 TGF β I 유전자 서열 내의 돌연변이를 검출하는 단계.

[0077] 일부 구현예에서, 증폭 단계(A-1), 증폭 단계(A-2), 혼성화 단계(B-1), 혼성화 단계(B-2), 검출 단계(C-1), 및 검출 단계(C-2)는 생물학적 샘플의 동일한 분취량을 이용하여 수행된다.

[0078] 일부 구현예에서, 제1 TGF β I 유전자 서열을 증폭시키는 것(A-1) 및 제2 TGF β I 유전자 서열을 증폭시키는 것(A-2)는 동시에 수행된다.

[0079] 일부 구현예에서, 혼성화 단계(B-1) 및 혼성화 단계(B-2)는 동시에 수행된다.

[0080] 일부 구현예에서, 검출 단계(C-1) 및 검출 단계(C-2)는 동시에 수행된다.

[0081] 일부 구현예에서, 상기 반응 혼합물은 상기 기재된 특정 중 일부를 갖는다. 간결성을 위해, 상기 세부사항은 본원에서 반복되지 않는다.

[0082] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 인간 대상에서 이형접합형 각막 이영양증의 검출을 통해 대상에서 레이저 눈 수술에 따른 합병증의 위험을 예측하기 위한, 상기 어느 곳에 언급된 반응 혼합물의 용도를 제공한다.

[0083] 일부 구현예에서, 상기 레이저 눈 수술은 라식 및 엑시머 레이저 수술 중 하나를 포함한다.

[0084] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는, 인간 대상으로부터의 샘플에서 각막 이영양증과 관련된 계놈 돌연변이를 검출하는 방법을 제공한다: (A) 기재의 텁에 부착된 인간 대상의 상피 세포를 제공하는 단계; (B) 상기 기재의 텁을, 상기 기재에 부착된 세포를 용해시키는 용해액 중에서 교반하는 단계; (C) 상기 교반(B)이 완료되면, 상기 용해액으로부터 기재를 분리하는 단계; (D) 상기 분리(C) 후, 상기 용해액을 인큐베이션하는 단계; (E) 상기 용해액으로부터 계놈 DNA를 단리하여 gDNA 용액을 형성하는 단계; 및 (F) 상기 gDNA 용액을 적어도 3개의 검출 프로브에 동시에 노출시킴으로써 적어도 제1 프라이머쌍, 적어도 3개의 검출 프로브의 세트, 및 상기 gDNA 용액을 이용하여 TGF β I 유전자 내에 존재하는 적어도 하나의 뉴클레오타이드의 정체를 확인하는 단계로서, 여기서, 상기 적어도 하나의 뉴클레오타이드는, 각막 이영양증과 관련된 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)에 상응하는, TGF β I 유전자의 특정 위치에 위치하며, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 세트 중 적어도 2개의 검출 프로브 각각은 TGF β I 유전자의 특정 위치에 상이한 돌연변이를 검출하도록 구성된다.

[0085] 일부 구현예에서, 상기 방법은 하기를 추가로 포함한다: (G) 상기 gDNA 용액을 적어도 3개의 검출 프로브의 세트 및 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트에 동시에 노출시킴으로써 적어도 제2 프라이머쌍, 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트, 및 gDNA 용액을 이용하여 TGF β I 유전자 내에 존재하는 적어도 제2 뉴클레오타이드의 정체를 확인하는 단계로서, 여기서, 상기 적어도 제2 뉴클레오타이드는, 각막 이영양증과 관련된 제2 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)에 상응하는, TGF β I 유전자의 제2의 특정 위치에 위치하며, 상기 적어도 3개의 검출 프로브의 제2 세트 중 적어도 2개의 검출 프로브는 TGF β I 유전자의 제2의 특정 위치에 있는 각각의 돌연변이를 검출하도록 구성된다.

[0086] 일부 구현예에서, 상기 확인 단계(F)와 상기 확인 단계(G)는 동시에 수행된다.

[0087] 일부 구현예에서, 상기 확인 단계(F)와 상기 확인 단계(G)는 동일한 gDNA 용액을 이용하여 수행된다.

도면의 간단한 설명

[0088] 도 1a-1b는 일부 구현예에 따라, 질환과 관련된 계놈 대립유전자를 검출하는 개선된 방법(100)을 예시한다.

도 2는 일부 구현예에 따라, 아벨리노 각막 이영양증과 관련된 단일 뉴클레오타이드 다형성의 실시간 PCR 검출에 유용한 정방향 및 역방향 PCR 프라이머쌍의 서열목록(서열번호: 1-24)을 제공한다.

도 3은 일부 구현예에 따라, 아벨리노 각막 이영양증과 관련된 단일 뉴클레오타이드 다형성의 실시간 PCR 검출에 유용한 야생형 및 돌연변이 검출 프로브쌍의 서열목록(서열번호: 25-42)을 제공한다.

도 4는 도 5 내지 8에 나타난 대립유전자 검출 실험에서 사용된 프로브 서열 및 프라이머의 목록을 제공한다.

도 5는 도 4에 기술된 프로브를 이용하여 R124C, R124H, R124L, R555W 및 R555Q 돌연변이를 검출하는 것과 관련된 실험 데이터를 제공한다. 도 5a는 표시된 시약 혼합물 및 표시된 사이클링 조건(우측 패널)을 이용한 대립 유전자 식별 플롯 실행(좌측 패널)을 제공한다. 도 5b는 정상 대조군과 비교하여 다양한 돌연변이에 대한 실시

간 PCR 플롯을 제공한다. 도 5c는 동종접합성 대조군과 비교하여 다양한 돌연변이에 대한 실시간 PCR 플롯을 제공한다.

도 6은 도 4에 기재된 프로브를 이용하여 R124C, R124H, R124L, R555W 및 R555Q 돌연변이를 검출하는 것과 관련된 실험 데이터를 제공한다. 도 6a는 표시된 시약 혼합물 및 표시된 사이클링 조건(우측 패널)을 이용한 대립 유전자 식별 플롯 실행(좌측 패널)을 제공한다. 도 6b는 정상 대조군과 비교하여 다양한 돌연변이에 대한 실시간 PCR 플롯을 제공한다. 도 6c는 동종접합성 대조군과 비교하여 다양한 돌연변이에 대한 실시간 PCR 플롯을 제공한다.

도 7은 도 4에 기재된 프로브를 이용하여 R124C, R124H, R124L, R555W 및 R555Q 돌연변이를 검출하는 것과 관련된 실험 데이터를 제공한다. 도 7은 표시된 시약 혼합물 및 표시된 사이클링 조건(우측 패널)을 이용한 대립 유전자 식별 플롯 실행(좌측 패널)을 제공한다.

도 8은 도 4에 기재된 프로브를 이용하여 R124C, R124H, R124L, R555W 및 R555Q 돌연변이를 검출하는 것과 관련된 실험 데이터를 제공한다. 특히, 도 8은 표시된 시약 혼합물 및 표시된 사이클링 조건(우측 패널)을 이용한 대립유전자 식별 플롯 실행(좌측 패널)을 제공한다. 상기 대립유전자 식별 플롯(좌측 패널) 내의 표시 "B"는 샘플이 실시간 PCR 분석을 수행하기 전에 용해 베퍼로 전처리되었음을 가리킨다. 상기 대립유전자 식별 플롯(좌측 패널) 내의 표시 "DW-A"는 샘플이 실시간 PCR 분석을 수행하기 전에 중류수로 전처리되었음을 가리킨다. 상이한 샘플 점 주위의 원은, 검출된 대립유전자 각각에 대한, 2개의 매치된 샘플, "B" 및 "DW-A"를 각각 나타내며(좌측 패널 참조); 각 원 안에는 2개의 점이 있으며, 하나는 "B"에 대한 점이고, 하나는 샘플 "DW-A"에 대한 점이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

I. 도입

[0089] 질환 관련 SNP의 검출은 다양한 의료 상태의 진단 및 예후를 위한 점점 더 중요한 도구가 되고 있다. 예를 들면, TGF β I 유전자의 엑손 4에서의 단일 뉴클레오타이드 변화의 존재는 아벨리노 각막 이영양증과 강한 연관이 있다. 이러한 SNP에 대해 이형접합형인 개인은 라식 수술 후 시력 상실에 대한 위험이 높은 것으로 확인되었다. 라식은 많은 사람들의 삶의 질을 크게 개선하는 의료 수술이지만, G/A TGF β I SNP를 갖는 개인의 경우, 라식은 흔히 4개월 내지 18개월 동안 점진적인 시력 장애를 유발하여, 시력 상실을 야기할 수 있다. 상기 시력 장애는 더 길거나 더 짧은 기간 내에 일어날 수 있다. 다행히도, 라식 수술을 피해야 하는 상기 돌연변이를 갖는 개인을 확인하기 위해 스크리닝이 수행될 수 있다.

[0091] 본 개시내용은 샘플 단리, 제조, 및 분석을 개선하는 방법의 개발에 적어도 일부 기초한다. 일부 구현예에서, 예를 들면, 분석이 실패하거나 또는 부가적인 추적 시험을 수행할 필요가 있을 때, 환자 샘플의 재사용을 허용하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 이들 개선된 방법은 환자의 구강막으로부터 벗겨낸 세포를 갖는 기재(예컨대, 레이온 텁 또는 면봉)를 실온에서 30-45초 동안(상승된 온도에서 20분 동안 연장된 인큐베이션보다) 용해액에서 조심스레 휘젓는 것을 포함한다. 그리고 나서, 상기 용해액을 45°C에서 30분 동안 인큐베이션하여 용해를 개선하고 계凫 샘플의 수율을 증가시킨다. 이후, 유리하게도, 상기 레이온 텁 또는 면봉은 재시험을 위해 사용되는 계凫 DNA의 재-단리를 위해 보관될 수 있다(예컨대, 동결되거나 냉동됨).

[0092] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 개선점은 실시간 PCR 검출 분석을 위해 소량의 계凫 DNA 주형의 사용을 통해 제공된다. 일부 구현예에서, 이것은 수행되는 실시간 PCR 사이클의 수를 증가시키고/거나(예컨대, 약 40 사이클로) 95°C에서 3초 변성 사이클 시간을 이용함으로써 달성된다. 유리하게도, 이들 방법에 의해 필요한 샘플량이 줄어들기 때문에, 실시간 PCR 시약에 대한 요구량 역시 줄어든다. 진단 분석에 사용되는 많은 시약들은 특허권이 있기 때문에 비쌀 수 있다. 사용되는 시약의 양을 감소시키는 것은 또한 시약과 관련된 비용을 현저히 감소시킬 수 있다.

[0093] 이들 개별적인 단계 각각을 수행하기 위한 특정한 조건(예컨대, 샘플 핸들링, 인큐베이션 온도, 반응 부피, 반응 사이클 수, 반응 사이클 시간, 반응 사이클 온도)의 모든 조합이 TGF β I 유전자의 엑손 4에서 발견되는 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP과 같은, 질환 관련 SNP를 검출하기 위한 본원에 기재된 방법을 수행하는 데 사용될 수 있음이 고려된다.

II. 선택된 정의

[0095] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "발명" 또는 "본 발명"은 본 발명의 어느 하나의 특정한 구현예에 제한하는 것을

의미하는 것이 아니라, 일반적으로 청구항 및 명세서에 기재된 본 발명의 어느 또는 모든 구현예에 적용된다.

[0096] 본원에 사용된 바와 같이, 단수형은 문맥이 달리 명확히 언급하지 않는 한 복수형 언급을 포함한다. 따라서, 예를 들면, "방법"의 언급은 본원에 기재된 유형의 하나 이상의 방법들, 및/또는 단계들을 포함하며, 이는 본 개시내용을 읽을 때 본 기술분야의 숙련가에게 자명해질 것이다.

[0097] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "다형성(polymorphism)" 및 이의 변형은 상이한 게놈 또는 개인 간에 또는 중에서 2개 이상의 대체 게놈 서열 또는 대립유전자의 존재를 가리킨다. 용어 "유전적 돌연변이" 또는 "유전적 변이" 및 이의 변형은 다형성을 포함한다.

[0098] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "단일 뉴클레오타이드 다형성"("SNP") 및 이의 변형은 대립유전자 간에 다른 하나의 뉴클레오타이드의 부위를 가리킨다. 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)은 단일 염기 변화 또는 점 돌연변이 이지만, 개인 간에 유전적 변이를 야기하는 이른바 "인델" 돌연변이(뉴클레오타이드의 삽입 또는 결실)도 포함한다. 모든 인간 유전적 변이의 약 90%를 차지하는 SNP는 30억-염기 인간 게놈 사이에 100 내지 300 염기마다 일어난다. 그러나, SNP는 바이러스와 같은 다른 유기체에서 훨씬 더 빈번하게 일어날 수 있다. SNP는 게놈의 코딩 또는 비코딩 영역에서 일어날 수 있다. 코딩 영역에서의 SNP는 프로모터 또는 처리 부위를 변화시킬 수 있고, 유전자 전사 및/또는 처리에 영향을 미칠 수 있다. 개인이 관심있는 게놈 영역 내에 특정한 SNP를 갖는지에 관한 지식은 다양한 질환에 대한 진단적, 예방적 및 치료적 적용을 개발하기 위한 충분한 정보를 제공할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시내용은 아벨리노 각막 이영양증과 관련된 TGF β I 유전자의 엑손 4에 위치한 구아닌에서 아데닌으로의 SNP(guanine-to-adenine SNP)의 검출에 관한 것이다.

[0099] 용어 "프라이머" 및 이의 변형은 PCR 반응에서 DNA 합성의 개시점으로서 작용하는 올리고뉴클레오타이드를 가리킨다. 프라이머는 일반적으로 약 15 내지 약 35 뉴클레오타이드 길이이며, 표적 서열에 상보적인 영역에 혼성화 한다.

[0100] 용어 "프로브" 및 이의 변형(예컨대, 검출 프로브)은 PCR 반응에서 표적 핵산 서열에 혼성화하는 올리고뉴클레오타이드를 가리킨다. 표적 서열은 분석될 핵산의 영역을 가리키며 관심있는 다형성 부위를 포함한다.

[0101] 달리 정의하지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 대등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실행 또는 시험에서 사용될 수 있음에도 불구하고, 방법 및 물질의 다양한 구현예가 본원에 구체적으로 기재되어 있다.

III. 샘플 제조

[0103] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 실시간 PCR 단일 뉴클레오타이드 다형성 검출 분석에서 사용되는 게놈 샘플을 단리하는 개선된 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 개선된 방법(100)은 도 1에 개괄된 단계들의 조합을 이용한다.

[0104] 일부 구현예에서, 상기 방법은 대상으로부터 세포의 샘플을 제공하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 환자의 세포 표면을 상기 세포를 기재 상에 가역적으로 고정화할 수 있는 기재와 접촉함으로써 수집된다.

[0105] 상기 개시된 방법은 다양한 샘플로부터 수득된 다양한 세포 유형에 적용될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 개시된 방법에 사용하기 위한 세포 유형은 비체한적으로 상피 세포, 내피 세포, 결합 조직 세포, 골격 근육 세포, 내분비 세포, 심장 세포, 요 세포, 멜라노사이트, 케라티노사이트, 혈액 세포, 백혈구 세포, 베피 코트, 유모세포(hair cell)(예컨대, 모근 세포 포함) 및/또는 타액 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 상피 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 피막하-혈관주위(상피 유형 1); 담염(pale)(상피 유형 2); 중간(상피 유형 3); 어둠(상피 유형 4); 미분화(상피 유형 5); 및 거대-수질(상피 유형 6)이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 구강 상피 세포(예컨대, 구강 스왑을 이용하여 수집된 상피 세포)이다. 일부 구현예에서, 상기 개시된 방법에서 사용되는 세포의 샘플은 상기 확인된 세포 유형의 임의의 조합을 포함한다.

[0106] 일부 구현예에서, 상기 방법은 대상으로부터의 세포의 샘플을 제공하는 것(102)을 포함한다. 일부 구현예에서, 제공된 상기 세포는 구강 상피 세포이다.

[0107] 상기 세포 샘플은 대상 세포를 기재에 가역적으로 결합시키는 임의의 다양한 방법에 의해 수집된다. 일부 구현예에서, 상기 기재는 상기 세포를 기재에 가역적으로 결합시키기 위해, 대상의 세포를 함유하는 샘플과의 물리적 상호작용에서 이용된다. 일부 구현예에서, 상기 기재는 상기 세포를 기재에 가역적으로 결합시키기 위해 대

상의 몸과의 물리적 상호작용에서 이용된다. 일부 구현예에서, 상기 샘플은 구강 세포 샘플이고, 상기 구강 세포의 샘플은 상기 대상의 구강 막(예컨대, 그들의 볼의 내부)을 상기 막으로부터 제거된 세포를 가역적으로 고정화시킬 수 있는 기재와 접촉함으로써 수집된다. 그러한 구현예에서, 사람의 치아를 닦는 것과 동등한 힘(예컨대, 가벼운 양의 힘 또는 압력)으로 스왑을 대상의 내부에 문지른다. 대상의 세포를 기재에 가역적으로 결합시키는 어떠한 방법이 상기 개시된 방법에서 사용하기 위해 고려된다.

[0108] 일부 구현예에서, 상기 샘플은 유리하게는 비-침습적 방식으로 수집되며, 그와 같이 샘플 수집은 어느 곳에서나 그리고 거의 모든 사람에 의해 달성된다. 예를 들면, 일부 구현예에서 상기 샘플은 의사의 사무실에서, 대상의 집에서, 또는 라식 수술이 수행되거나 수행될 시설에서 수집된다. 일부 구현예에서, 환자, 환자의 의사, 간호사 또는 의사의 보조원 또는 다른 임상 인원이 샘플을 수집한다.

[0109] 일부 구현예에서, 기재는 세포가 가역적으로 결합되는 다양한 물질 중 어느 것으로 구성된다. 예시적인 기재는 레이온, 면, 실리카, 엘라스토머, 셀락, 호박, 천연 또는 합성 고무, 셀룰로오스, BAKELITE, NYLON, 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리아크릴로니트릴, 또는 다른 물질 또는 이의 조합으로 구성된 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 기재는 레이온 텁 또는 면봉을 갖는 스왑이다.

[0110] 이후, 기재의 텁(예컨대, 레이온 스왑 또는 면 스왑의 텁)은 약 10초 내지 60초(1분), 또는 약 20초 내지 60초, 약 20초 내지 약 45초, 또는 약 20초 내지 약 30초, 약 15초 내지 약 60초, 약 15초 내지 약 45초, 또는 약 15초 내지 약 30초, 약 10초 내지 약 60초, 약 10초 내지 약 45초, 또는 약 10초 내지 약 30초, 약 10초 내지 약 15초 또는 약 10초 내지 약 20초 동안 용해액 중에서 교반된다. 일부 구현예에서, 상기 교반은 약 60초 또는 약 1분 동안 일어난다. 일부 구현예에서, 상기 교반은 1분 미만(예컨대, 60초 미만) 동안 일어난다. 일부 구현예에서, 상기 교반은 15초, 20초, 30초, 45초, 60초, 90초, 120초 이하 동안 일어난다. 일부 구현예에서, 상기 교반은 45초 이하 동안 일어난다. 일부 구현예에서, 상기 교반은 30초 이하 동안 일어난다. 일부 구현예에서, 상기 교반은 20초 이하 동안 일어난다. 일부 구현예에서, 상기 교반은 15초 이하 동안 일어난다.

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

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

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

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

내지 22개월, 3개월 내지 22개월, 4개월 내지 22개월, 5개월 내지 22개월, 6개월 내지 22개월, 7개월 내지 22개월, 8개월 내지 22개월, 9개월 내지 22개월, 10개월 내지 22개월, 12개월 내지 22개월, 14개월 내지 22개월, 16개월 내지 22개월, 18개월 내지 22개월 동안 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 1개월 내지 20개월, 2개월 내지 20개월, 3개월 내지 20개월, 4개월 내지 20개월, 5개월 내지 20개월, 6개월 내지 20개월, 7개월 내지 20개월, 8개월 내지 20개월, 9개월 내지 20개월, 10개월 내지 20개월, 12개월 내지 20개월, 14개월 내지 20개월, 16개월 내지 20개월, 18개월 내지 20개월 동안 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 1개월 내지 18개월, 2개월 내지 18개월, 3개월 내지 18개월, 4개월 내지 18개월, 5개월 내지 18개월, 6개월 내지 18개월, 7개월 내지 18개월, 8개월 내지 18개월, 9개월 내지 18개월, 10개월 내지 18개월, 12개월 내지 18개월, 14개월 내지 18개월, 16개월 내지 18개월 또는 17개월 내지 18개월 동안 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 1개월 내지 12개월, 2개월 내지 12개월, 3개월 내지 12개월, 4개월 내지 12개월, 5개월 내지 12개월, 6개월 내지 12개월, 7개월 내지 12개월, 8개월 내지 12개월, 9개월 내지 12개월, 10개월 내지 12개월 또는 11개월 내지 12개월 동안 보관된다.

[0115]

일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 약 2°C, 약 3°C, 약 4°C, 약 5°C, 약 6°C, 약 7°C, 또는 약 8°C에서 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 약 2°C 내지 약 8°C, 약 3°C 내지 약 8°C, 약 4°C 내지 약 8°C, 약 5°C 내지 약 8°C, 약 6°C 내지 약 8°C 또는 약 7°C 내지 약 8°C에서 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 약 -25°C, 약 -24°C, 약 -23°C, 약 -22°C, 약 -21°C, 약 -20°C, 약 -19°C, 약 -18°C, 약 -17°C, 약 -16°C 또는 약 -15°C에서 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 약 -25°C 내지 약 -15°C, 약 -22°C 내지 약 -17°C, 약 -20°C 내지 약 -15°C 또는 약 -25°C 내지 약 -20°C에서 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 t 약 -90°C, 약 -89°C, 약 -88°C, 약 -87°C, 약 -86°C, 약 -85°C, 약 -84°C, 약 -83°C, 약 -82°C, 약 -81°C, 약 -80°C, 약 -79°C, 약 -78°C, 약 -77°C, 약 -76°C, 약 -75°C, 약 -74°C, 약 -73°C, 약 -72°C, 약 -71°C, 약 -70°C, 약 -69°C, 약 -68°C, 약 -67°C, 약 -66°C 또는 약 -65°C에서 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 약 -90°C 내지 약 -65°C, 약 -85°C 내지 약 -65°C, 약 -80°C 내지 약 -65°C, 약 -75°C 내지 약 -65°C 또는 약 -70°C 내지 약 -65°C에서 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 -90°C 내지 -65°C에서 보관된다.

[0116]

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

[0117]

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

[0118]

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

[0119]

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

분 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 추출 인큐베이션 시간은 약 25분, 약 30분, 약 35분, 약 40분, 약 45분, 약 50분, 약 55분, 약 60분 또는 약 65분이다.

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

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

[0122] 일부 구현예에서, 약 0.55 내지 2.00, 약 0.6 내지 약 2.00, 약 0.7 내지 약 2.00 약 0.8 내지 약 2.00, 약 0.9 내지 약 2.00, 약 1.0 내지 약 2.00 약 1.1 내지 약 2.00, 약 1.2 내지 약 2.00, 약 1.3 내지 약 2.00, 약 1.4 내지 약 2.00, 약 1.5 내지 약 2.00, 약 1.6 내지 약 2.00, 약 1.7 내지 약 2.00, 약 1.8 내지 약 2.00, 또는 약 1.9 내지 약 2.00의 순도를 갖는 약 1 ng/µL 내지 약 50 ng/µL, 약 1 ng/µL 내지 약 40 ng/µL, 약 1 ng/µL 내지 약 30 ng/µL, 약 1 ng/µL 내지 약 20 ng/µL, 약 1 ng/µL 내지 약 10 ng/µL, 약 1 ng/µL 내지 약 5 ng/µL, 약 1 ng/µL 내지 약 4 ng/µL, 약 1 ng/µL 내지 약 3 ng/µL 또는 약 1 ng/µL 내지 약 2 ng/µL의 핵산이 상기 기재된 방법을 이용하여 단일 대상으로부터 이용된다(수득된다). 일부 구현예에서, 약 0.55 내지 2.00의 순도를 갖는 1 ng/µL 내지 50 ng/µL가 상기 기재된 방법을 이용하여 단일 대상으로부터 이용된다(수득된다).

IV. 용해액

[0124] 다양한 용해액이 기술되어 왔고 본 기술분야의 숙련가에게 알려져 있다. 이러한 잘 알려진 용해액 중 어느 것이 샘플로부터 핵산을 단리하기 위해 본 방법에 이용될 수 있다. 예시적인 용해액은 INVITROGEN®, QIAGEN®, LIFE TECHNOLOGIES® 및 다른 제조사에 의해 판매되는 것과 같은 상업적으로 이용가능한 것뿐만 아니라 실험실 환경에서 숙련가에 의해 생성될 수 있는 것을 포함한다. 용해 버퍼 역시 잘 기술되어 왔으며, 문헌[Molecular Cloning (three volume set, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012) 및 Current Protocols (Genetics and Genomics; Molecular Biology; 2003-2013)]에 기재된 것을 포함한 다양한 용해 버퍼가 상기 개시된 방법에 유용할 수 있고, 이를 모두는 모든 목적을 위해 참고로 본원에 통합되어 있다.

[0125] 세포 용해는 세포 내로부터 핵산을 회수하기 위해 흔히 수행되는 방법이다. 많은 경우에, 세포는 용해액, 통상적으로 세제를 포함하는 알칼리 용액, 또는 용해 효소의 용액과 접촉된다. 그러한 용해액은 전형적으로 염, 세제 및 완충제뿐만 아니라 숙련가가 사용하는 것으로 이해할 다른 제제를 함유한다. 완전 및/또는 부분 용해 후, 핵산은 용해액으로부터 회수된다.

[0126] 일부 구현예에서, 세포는 약 pH 4 내지 약 10, 약 5 내지 약 9, 약 6 내지 약 8 또는 약 7 내지 약 9 범위의 pH를 갖는, 수성 버퍼에 재현된다.

[0127] 일부 구현예에서, 상기 버퍼 염 농도는 약 10 mM 내지 약 200 mM, 약 10 mM 내지 약 100 mM 또는 약 20 mM 내지 약 80 mM이다.

[0128] 일부 구현예에서, 버퍼는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA) 또는 에틸렌 글리콜 테트라아세트산(EGTA)과 같은 칼레이트제를 추가로 포함한다.

[0129] 일부 구현예에서, 용해액은 예를 들면 비제한적으로 수크로스를 포함하는 폴리올 뿐만 아니라 말티톨, 슬비톨, 자일리톨, 에리트리톨, 및/또는 이소말트와 같은 당알콜과 같은 세포로부터 핵산 방출을 돋는 다른 화합물을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리올은 약 2% 내지 약 15% w/w, 또는 약 5% 내지 약 15% w/w 또는 약 5% 내지 약 10% w/w의 범위이다.

[0130] 일부 구현예에서, 용해액은 예를 들면 비제한적으로 트리톤 X-100, SDS, CTAB, X-114, CHAPS, DOC, 및/또는 NP-40과 같은, 계면활성제를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서 그러한 계면활성제는 약 1% 내지 약 5% w/w, 약 1% 내지 약 4% w/w, 또는 약 1% 내지 약 3% w/w의 범위이다.

[0131] 구현예에서, 용해액은 예를 들면 비제한적으로 우레아, 소디움 도데실 설페이트 및/또는 티오우레아와 같은 카오트로프(chaotrope)를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 카오트로프는 약 0.5 M 내지 8 M, 약 1 M 내지 약 6 M, 약 2 M 내지 약 6 M 또는 약 1 M 내지 3 M 범위의 농도로 사용된다.

[0132] 일부 구현예에서, 용해액은 하나 이상의 부가적인 용해 시약을 추가로 포함하며, 그러한 용해 시약은 본 기술분야에서 잘 알려져 있다. 일부 구현예에서, 그러한 용해 시약은 예를 들면 비제한적으로 리소자임과 같은, 세포벽 용해 효소를 포함한다. 일부 구현예에서, 용해 시약은 0.5% 소디움 도데실 설페이트를 함유하는 0.1 수성 수산화나트륨과 같은 알칼리 세제 용액을 포함한다.

[0133] 일부 구현예에서, 용해액은 수크로스 용액과 같은 당 수용액 및 EDTA와 같은 칼레이트제, 예를 들면 STET 버퍼를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 용해 시약은 세포 혼탁액을 원하는 농도의 2배(예를 들면 0.2 소디움 하이드록사이드, 1.0% 소디움 도데실 설페이트)를 갖는 동일한 부피의 용해액과 혼합함으로써 제조된다.

[0134] 일부 구현예에서, 원하는 정도의 용해가 달성된 후, 용해액 및 용해된 세포를 포함하는 혼합물은 상기 용해 시약이 원하는 산물에 부정적인 영향을 미치지 않도록 조건을 조절하는 중화 또는 웬칭 시약과 접촉된다. 일부 구현예에서, pH는 예를 들면 비제한적으로 핵산을 포함하는 세포 내용물의 분해를 최소화하고/거나 방지하기 위해 약 5 내지 약 9, 약 6 내지 약 8, 약 5 내지 약 7, 약 6 내지 약 7 또는 약 6.5 내지 7.5의 pH로 조절된다. 일부 구현예에서, 용해 시약이 알칼리 용액을 포함하는 경우, 중화 시약은 산성 버퍼, 예를 들면 알칼리 금속 아세테이트/아세트산 버퍼를 포함한다. 일부 구현예에서, 예를 들면 비제한적으로 핵산을 포함하는 원하는 산물의 분해를 최소화하면서 용해가 실질적으로 완료되도록 용해 시약의 온도 및 조성과 같은 용해 조건이 선택된다.

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

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

[0137] **V. 용해 버퍼로부터 핵산의 정제**

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

[0139] 핵산 침전은 본 기술분야의 숙련가에 의해 알려진 단리를 위한 잘 알려진 방법이다. 비제한적으로 비드(예컨대, 실리카, 자기), 컬럼, 막의 형태 또는 본 기술분야에 알려진 임의의 다양한 다른 물리적 형태로 고상(solid phase)을 이용하는 고상 결합 방법을 포함하는, 다양한 고상 결합 방법 역시 본 기술분야에 알려져 있다. 일부 구현예에서, 상기 개시된 방법에서 사용되는 고상은 핵산에 가역적으로 결합한다. 그러한 고상의 예는 적어도 2 개의 상이한 고상의 혼합물인 이른바 "혼합층(mixed-bed)" 고상을 포함하며, 이를 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 통합된 미국특허출원 제2002/0001812호에 기재된 바와 같이 상이한 용액 조건하에 핵산에

대한 수용력을 가지며, 상이한 조건하에 핵산을 방출하는 능력 및/또는 수용력을 갖는다. 상기 개시된 방법에 따른 핵산에 대한 고상 친화도는 기재에 용질을 결합시키기 위해 전형적으로 사용되는 많은 수단 중 어느 것을 통해서일 수 있다. 그러한 수단의 예는 비제한적으로, 이온성 상호작용(예컨대, 음이온-교환 크로마토그래피) 및 소수성 상호작용(예컨대, 역상 크로마토그래피), pH 차등 및 변화, 염 차등 및 변화(예컨대, 농도 변화, 카오트로픽 염/제제의 사용)를 포함한다. 예시적인 pH 기반 고상은 비제한적으로 낮은 pH(<6.5)에서 핵산에 결합하여 높은 pH(>8.5)에서 핵산을 방출하는 INVITROGEN ChargeSwitch 정규화된 구강 키트 자기 비드 및 7.5 미만의 pH에서 핵산에 결합하고 8보다 큰 pH에서 핵산을 방출하는 모노-아미노-N-아미노에틸(MANAE)에서 사용된 것을 포함한다. 예시적인 이온 교환 기반 기재는 비제한적으로 PHARMACIA (Piscataway, N.J.)사로부터의 DEAE-SEPHAROSE™, Q-SEPHAROSE™, 및 DEAE-SEPHADEX™, Dow Chemical Company (Midland, Mich.)사로부터의 DOWEX® I, Rohm & Haas (Philadelphia, Pa.)사로부터의 AMBERLITE®, Duolite International (Cleveland, Ohio)사로부터의 DUOLITE®, DIALON TI 및 DIALON TII를 포함한다.

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

VI. 핵산 분석

[0142] 상기 개시된 방법은 게놈 분석을 포함하는 다양한 핵산 분석을 위해 게놈 DNA(gDNA)와 같은 핵산을 단리하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 상기 분석은 비제한적으로 하나 이상의 결실, 삽입, 전이 및 전환(transversion)을 포함하는 다양한 유전적 돌연변이의 검출을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 돌연변이는 단일-뉴클레오타이드 다형성(SNP)이다.

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

a. 실시간 PCR

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

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

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

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

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

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

[0151] TGF β I 유전자의 엑손 4에서 구아닌에서 아데닌으로의 돌연변이를 검출하기 위해, 도 3에서 나타나 바와 같은 서열번호: 25 내지 42에 따른 뉴클레오타이드 서열을 갖는 야생형("G") 및 아벨리노 각막 이영양증 관련 돌연변이("A") 대립유전자의 검출을 위한 형광 표지된 실시간 PCR 프로브쌍이 미국 특허공개 제2012/0077200호에 기술된 바와 같이 구축되었다. 일부 구현예에서, 상기 야생형 및 돌연변이 프로브 중 어느 것이 본원에 개시된 개선된 방법에서 사용된다. 바람직한 구현예에서, 서열번호: 25(야생형) 및 서열번호: 26(돌연변이)의 야생형 및 돌연변이 프로브쌍이 본원에 제공된 개선된 방법에서 사용된다. 질환 관련 대립유전자와 야생형 대립유전자를 구분하기 위해, 상기 야생형 프로브를 VIC로 표지하고, 상기 돌연변이 프로브를 FAM으로 표지하였다. 상보적인 유전자 단편에 대한 결합을 용이하게 하기 위하여 좁은 흡 결합물질(MGB)을 상기 프로브에 부착시켰다.

[0152] **b. 실시간 PCR 사이클**

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

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

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

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

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

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

2.85 μ L의 증류수와 조합되는 것으로 확인되었다.

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

c. PCR 프라이머 및 프라이머 설계

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

[0162] 프라이머 설계시, 숙련가는 설계되는 프라이머의 GC 및 AT 함량뿐만 아니라 2차 구조 고려사항(GC 함량 증가는 2차 구조 증가를 야기할 수 있음)에 기초하여 용융 온도(T_m ; 프라이머-표적 이합체의 절반이 해리되어 단일 가닥이 될 때의 온도로서 이합체 안정성을 나타냄; T_m 증가는 안정성 증가를 나타냄)를 고려할 필요를 이해할 것이다. T_m 은 본 기술분야에 알려진 다양한 방법을 이용하여 계산될 수 있고, 숙련가는 T_m 을 계산하기 위한 그러한 다양한 방법을 쉽게 이해할 것이며, 그러한 방법은 예를 들면 웹(world wide web) 상의 [promega.com/techserv/tools/biomath/calcl1.htm](http://www.promega.com/techserv/tools/biomath/calcl1.htm)에서 이용가능한 T_m 계산기와 같은 온라인 도구에서 이용가능한 것을 포함한다. 프라이머 특이성은 Taq 폴리머라아제에 의해 연장되는 부위인 3' 말단 서열과 조합하여 그의 완전한 서열에 의해 정의된다. 일부 구현예에서, 잘못된 프라이밍(false-priming) 및 부정확한 증폭 산물의 생성을 감소시키는 것을 돋기 위해, 3' 말단은 표적 서열 내의 다른 어느 곳에서도 발견되지 않는 적어도 5개 내지 7개의 독특한 뉴클레오타이드를 가져야 한다. 정방향 및 역방향 프라이머는 전형적으로 표적에 유사한 효율로 결합한다. 일부 경우에, NCBI BLAST(웹상의 [ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)에 위치함)와 같은 도구가 정렬을 수행하고 프라이머 설계를 돋기 위해 사용된다.

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

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

[0165] 이들 방법은 CG 함량 및 용융 온도에 관한 GC 왜곡(skew), (G-C)/(G+C), AT 왜곡, (A-T)/(A+T), CG-AT 왜곡,

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

[0166]

비제한적인 예 구현예에 따르면, 실시간 PCR은 엑소뉴클레아제 프라이머(TAQMAM® 프로브)를 이용하여 수행된다. 그러한 구현예에서, 상기 프라이머는 증폭 반응 내에 존재하는 이중-표지된 프로브를 절단하기 위해 Taq과 같은 내열성 폴리머라아제의 5' 엑소뉴클레아제 활성을 이용한다(예컨대, Wittwer, C. et al. *Biotechniques* 22:130-138, 1997 참고). PCR 산물에 상보적임에도 불구하고, 이 분석에서 사용되는 프라이머 프로브는 PCR 프라이머와 다르며, 형광을 낼 수 있는 문자 및 형광을 펜칭할 수 있는 문자 모두로 이중 표지되어 있다. 상기 프로브가 온전한 경우, DNA 프로브 내의 형광 신호의 문자내 펜칭이 신호를 거의 야기하지 않는다. 상기 형광 문자가 증폭 동안 Taq의 엑소뉴클레아제 활성에 의해 방출되는 경우, 펜칭이 크게 감소되어 형광 성 신호를 증가시킨다. 형광성 프로브의 비제한적인 예는 6-카복시-플루오레세인 모이어티 등을 포함한다. 예시적인 펜처는 블랙 훌 펜처 1 모이어티 등을 포함한다.

[0167]

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

표 1

[0168]

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

ACD Fw10 프라이머	서열번호: 23	5'-CCC CCC AGA AAC AGC CTG
ACD Re10 프라이머	서열번호: 24	5'-TTC TAA GGG GTT AAG GAG AAA GCT T
GCD1 Fw 프라이머	서열번호: 43	5'-ACA CAG TCT TTG CTC CCA CAA A
GCD1 Re 프라이머	서열번호: 44	5'-ACT TAA GTT GGT CTT TAC CCA AGA GTC T

표 2

[0169]

정방향 프라이머에 대한 생물물리학적 파라미터						
정방향 프라이머	길이	Tm1	Tm2	GC 함량	% 복잡성	PCR 효율
서열번호: 1	19	55.4	57.8	57.9	70	70
서열번호: 3	20	57.1	58	55	81	66
서열번호: 5	20	40.2	45.7	25	73	38
서열번호: 7	22	55.9	60.2	54.5	62	43
서열번호: 9	21	57.5	60.2	57.1	64	40
서열번호: 11	21	57.6	60.2	57.1	66	57
서열번호: 13	19	55.4	55.7	52.6	81	80
서열번호: 15	18	50.6	55.3	55.6	75	66
서열번호: 17	17	57.8	62.2	76.5	74	60
서열번호: 19	21	56.6	58.2	52.4	82	73
서열번호: 21	20	57.4	58	55	78	46
서열번호: 23	18	56.5	59.9	66.7	69	69
평균	19.67	54.96	57.80	56.05	72.69	59.85
중간	20	56.55	58.1	55.3	73.5	63
표준 편차	1.50	5.00	4.24	11.78	6.84	14.10

표 3

[0170]

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

[0171]

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

[0172]

d. 검출 프로브 설계 및 검출 프로브

[0173]

다양한 검출 프로브가 상기 개시된 방법에 유용할 수 있고 유전자형 분석 및 또는 정량을 위해 이용된다. 본 기술분야의 숙련가에 의해 통상적으로 이용되는 검출 프로브는 비제한적으로 가수분해 프로브(TAQMAM® 프로브, 5' 뉴클레아제 프로브 또는 이중-표지된 프로브로도 알려짐), 혼성화 프로브, 및 스콜피온 프라이머(프라이머 및 검출 프로브를 하나의 분자로 조합함)를 포함한다. 일부 구현예에서, 검출 프로브 설계는 프로브가 사용된

PCR 프라이머와 양립가능하도록(예컨대, 프라이머 및 프로브가 실시간 PCR 분석에서 서로의 기능을 방해하지 않아야 함), 원하는 프로브 표적에 기초하여 본 기술분야의 숙련가에 의해 결정된다. 일부 구현예에서, 프로브는 효율적인 신호 생성을 촉진하기 위해 프라이머보다 더 높은 T_m 을 갖도록 설계된다. T_m 은 본 기술분야에 알려진 임의의 다양한 방법을 이용하여 계산되며, 숙련가는 T_m 을 계산하기 위한 그러한 다양한 방법을 쉽게 이해할 것이며, 그러한 방법은 예를 들면 웹상의 promega.com/techserv/tools/biomath/calc11.htm에서 이용가능한 계산기와 같은 온라인 도구에서 이용가능한 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 검출 프로브의 T_m 증가는 프라이머가 폴리머라아제에 의해 연장되기 전에 검출 프로브가 결합되는 것을 제공한다.

[0174] 일부 구현예에서, 검출 프로브는 다양한 변형을 함유한다. 일부 구현예에서, 검출 프로브는 비제한적으로 2'-0-메틸 리보뉴클레오타이드 변형, 포스포로티오에이트 백본 변형, 포스포로디티오에이트 백본 변형, 포스포르아미데이트 백본 변형, 메틸포스포네이트 백본 변형, 3' 말단 포스페이트 변형 및/또는 3' 알킬 치환과 같은, 변형된 핵산 잔기를 포함한다.

[0175] 일부 구현예에서, 검출 프로브는 변형으로 인해 표적 서열에 대해 증가된 친화성을 갖는다. 그러한 검출 프로브는 길이가 증가된 검출 프로브 뿐만 아니라 화학적 변형을 함유하는 검출 프로브를 포함한다. 그러한 변형은 비제한적으로 2'-플루오로(2'-데옥시-2'-플루오로-뉴클레오사이드) 변형, LNA(잠금 핵산), PNA(펩타이드 핵산), ZNA(집 핵산), 모폴리노, 메틸포스포네이트, 포스포르아미데이트, 폴리양이온성 접합체 및 2'-피렌 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 검출 프로브는 2' 플루오로 변형(aka, 2'-데옥시-2'-플루오로-뉴클레오사이드), LNA(잠금 핵산), PNA(펩타이드 핵산), ZNA(집 핵산), 모폴리노, 메틸포스포네이트, 포스포르아미데이트, 및/또는 폴리양이온성 접합체를 포함하는 하나 이상의 변형을 함유한다.

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

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

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

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

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

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

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

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

표 4

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

VII. 진단 시험

[0185] 일부 구현예에서, 다양한 돌연변이 중 어느 것을 검출함으로써 하나 이상의 유전적 상태를 확인하기 위해 진단 시험이 이용된다. 일부 구현예에서, 진단 시험은 예를 들면 신체적 표시, 징후 및/또는 증상뿐만 아니라 가족력 정보에 기초하여 특정한 질환이 의심될 때 진단을 확인하기 위해 사용된다. 일부 구현예에서, 진단 시험의 결과

는 의료 분야의 숙련가가 주어진 환자에 대한 적절한 치료 요법을 결정하는 것을 돋고 보다 개인맞춤형이고 보다 효과적인 치료 요법을 가능하게 한다. 일부 구현예에서, 치료 요법은 본 기술분야의 숙련가에 의해 결정된 바와 같이 다양한 약제학적 치료, 수술 치료, 생활방식 변화 또는 이의 조합 중 어느 것을 포함한다.

[0187]

상기 개시된 방법에 의해 수득된 핵산은 결실, 삽입, 전환(transversion) 및 전이와 같은 돌연변이를 검출하기 위한 시험을 포함하는, 다양한 진단 시험에서 유용하다. 일부 구현예에서, 그러한 진단은 질환이 발현되기 위해 2 카페를 요구하는 질환에 대한 유전자 중 1 카페를 갖는 병에 걸리지 않은 개인을 확인하는 것, 치료 요법을 개발하는데 상기 정보가 유용할 수 있는 질환에 대한 유전자 중 1 카페를 갖는 병에 걸리지 않은 개인을 확인하는 것, 착상전 유전적 진단, 산전 진단 시험, 신생아 선별, 계통 DNA 시험(유전적 계통 목적을 위해), 헌팅턴병과 같은 성인형(adult-onset) 장애를 예측하기 위한 전증상 시험, 성인형 암 및 알츠하이머병이 생길 위험성을 추정하기 위한 전증상 시험, 증상을 보이는 개인의 확정 진단, 및/또는 법의학/신원확인 테스트에 유용하다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 각막 이영양증의 검출에서 유용하다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 TGF β I 유전자에서 R124 돌연변이(예를 들면 비제한적으로 C(G/A)C SNP로도 불리는 TGF β I 유전자의 뉴클레오타이드 418에서의 C의 A로의 전이에 의해 유발되는 R124H 돌연변이를 포함)를 야기하는 것과 같은, 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 TGF β I 유전자에서 R555 돌연변이(예를 들면 비제한적으로 (C/T)GG SNP로도 불리는 TGF β I 유전자의 뉴클레오타이드 1663에서의 C의 T로의 전이에 의해 유발되는 R555W 돌연변이를 포함)를 야기하는 것과 같은, 과립형 각막 이영양증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 TGF β I 유전자에서 R124 및/또는 626 돌연변이(예를 들면 비제한적으로 (C/T)GC SNP로도 불리는 TGF β I 유전자의 뉴클레오타이드 417에서의 C의 T로의 전이에 의해 유발되는 R124C 돌연변이 또는 TGF β I 유전자의 뉴클레오타이드 1924에서의 A의 C로의 전이에 의해 유발되는 H626P 돌연변이를 포함)를 야기하는 것과 같은, 래티스 이상증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 TGF β I 유전자에서 R124 돌연변이(예를 들면 비제한적으로 C(G/T)C SNP로도 불리는 TGF β I 유전자의 뉴클레오타이드 418에서의 G의 T로의 전이에 의해 유발되는 R124L 돌연변이를 포함)를 야기하는 것과 같은, 레이스버클러 각막 이영양증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 TGF β I 유전자에서 R555 돌연변이(예를 들면 비제한적으로 C(G/A)G SNP로도 불리는 TGF β I 유전자의 뉴클레오타이드 1664에서의 G의 A로의 전이에 의해 유발되는 R555Q 돌연변이를 포함)를 야기하는 것과 같은, 티엘뱅크 각막 이영양증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다.

[0188]

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

[0189]

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

[0190]

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

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

[0192] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 방법을 이용하여 유전적 프로파일이 결정되는 질환은 비제한적으로 안과 장애, 암, 당뇨병, 고혈압, 정신분열증, 및 가장 흔한 선천성 기형, 예컨대 구순구개열(cleft lip), 구개 파열(cleft palate), 신경관 결손, 연골형성부전(Achondroplasia), 알파-1 항트립신 결핍, 항인지질 증후군, 자폐증, 상염색체 우성 다낭성 신장 질환, 샤르코마리투스(Charcot-Marie-Tooth), 대장암, 묘성 증후군(Cri du chat), 크론병, 낭포성 섬유증, 더컴병(Dercum disease), 다운 증후군, 듀안 증후군, 뒤텐형 근육위축증(Duchenne Muscular Dystrophy), 인자 V 라이덴 혈전증, 가족성 고콜레스테롤혈증, 가족성 지중해 열병, 취약 X 증후군, 고세병, 혈색소 침착증, 혈우병, 완전전뇌증(Holoprosencephaly), 헌팅턴병, 클라인펠터 증후군, 마르판 증후군(Marfan syndrome), 근긴장성 이상증(myotonic dystrophy), 신경섬유종증, 누난 증후군(Noonan Syndrome), 골형성부전증(osteogenesis imperfecta), 파킨슨병, 페닐케톤뇨증, 폴란드 기형(Poland Anomaly), 포르피린증(Porphyrria), 조로증(Progeria), 색소성 망막염, 중증 복합 면역결핍증(SCID), 겸상 세포 질환, 척수성 근위축증, 테이삭스병(Tay-Sachs), 지중해 빈혈, 트리메틸아민뇨증, 터너 증후군, 구개심장안면증후군(Velocardiofacial Syndrome), WAGR 증후군, 월슨병, 뿐만 아니라 유전적 성분과 관련된 임의의 다른 질환을 포함한다. 안과 장애 및/또는 안과 성분을 포함하는 장애는 비제한적으로 선립종안검맥립증(chalazion), 다래끼(stye), 첨모난생증(trichiasis), 안검내반(entropion), 안검외반(ectropion), 토안(lagophthalmos), 안검염(bleharitis), 누낭염(dacryocystitis), 안와봉와염(orbital cellulitis), 익상편(ptergium), 익상편 각막 이영양증(pterygiumcorneal dystrophy), 결막염(conjunctivitis), 신생아 안염(ophthalmia neonatorum), 박테리아 각막 궤양, 진균 각막 궤양, 녹내장, 푸크스 이상증(Fuchs dystrophy), 원뿔 각막(keratoconus), 진행성 황반 변성, 색소성 망막염(Retinitis pigmentosa, 백내장, 망막 장애, 황반 변성, 당뇨병성 눈 문제(예를 들면, 당뇨병성 망막증), 실눈-눈꺼풀처짐-역내안각주름 증후군(blepharophimosis-ptosis-epicanthus-inversus syndrome(BPES)), 안피부백파(oculocutaneous albinism), 마르판 증후군(Marfan syndrome), 스티클러 증후군(Stickler syndrome), 및 CHARGE(coloboma, heart anomalies, atresia of the choanae, retardation of growth and development, genital/urinary anomalies, ear abnormalities or deafness) 증후군을 포함한다. 각막 이영양증은 비제한적으로 아벨리노 각막 이영양증, 과립형 각막 이영양증, 래티스 타입 I 각막 이영양증, 푸크스 이상증, 티엘벵케 및 레이스버클러스 각막 이영양증을 포함한다. 암은 비제한적으로 암종, 육종, 아세포종, 림프종, 백혈병 생식 세포 종양, 및 미지 기원의 암을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 암은 비제한적으로 두경부, 피부, 대장, 구강, 교아종, 유방, 후두, 식도, 내피, 자궁내막, 난소, 폐, 비뇨생식기, 직장, 전립선, 신장, 흑색종, 신장, 췌장, 위장, 혈액, 간, 자궁 및 뇌뿐만 아니라 유두종 바이러스-유도된 암과 같은 바이러스 유도된 암을 포함한다.

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

[0194] 일부 구현예에서, 특정한 유전적 돌연변이의 존재 및/또는 부재에 관한 정보는 치료약(therapeutic entity)을 이용한 치료의 치료 효능을 확인하기 위한 것뿐만 아니라, 치료약을 이용한 치료를 위한 치료 요법을 조정하기 위해 사용된다. 일부 구현예에서, 유전적 돌연변이의 존재 및/또는 부재에 관한 정보는 치료 요법을 수행할지 여부를 결정하는 데 이용된다. 일부 구현예에서, 유전적 돌연변이의 존재 및/또는 부재에 관한 정보는 치료 요법을 계속할지 여부를 결정하는 데 이용된다. 일부 구현예에서, 유전적 돌연변이의 존재 및/또는 부재는 치료 요법을 중단할지 여부를 결정하는 데 이용된다. 다른 구현예에서, 유전적 돌연변이의 존재 및/또는 부재는 치료 요법을 변형할지 여부를 결정하는 데 이용된다. 일부 구현예에서, 유전적 변이의 존재 및/또는 부재는 치료 요

법의 일부로서 투여되고 있는 치료의 투여량을 증가시키거나 감소시킬지 여부를 결정하는 데 사용된다. 다른 구현예에서, 유전적 돌연변이의 존재 및/또는 부재는 치료 요법의 일부로서 투여된 치료의 투여 빈도를 바꿀지 여부를 결정하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 유전적 돌연변이의 존재 및/또는 부재는 치료의 1일당, 1주일당 투여 수, 1일당 시간을 바꿀지 여부를 결정하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 유전적 돌연변이의 존재 및/또는 부재는 치료의 투여량을 바꿀지 여부를 결정하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 유전적 돌연변이의 존재 및/또는 부재는, 치료 요법을 개시하기 전 및/또는 치료 요법을 시작한 후에 확인한다. 일부 구현예에서, 유전적 돌연변이의 존재 및/또는 부재를 확인하고, 유전적 돌연변이의 존재 또는 부재에 관한 지정된 표준 정보와 비교한다.

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

[0196] 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 비제한적으로 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP, 과립형 각막 이영양증 관련 SNP, 래티스 이상증 관련 SNP, 레이스버클러 각막 이영양증 관련 SNP, 및/또는 티엘뱅케 각막 이영양증 관련 SNP로부터 선택되는 2, 3, 4 또는 5개의 SNP의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 과립형 각막 이영양증 관련 SNP, 래티스 이상증 관련 SNP, 레이스버클러 각막 이영양증 관련 SNP, 및/또는 티엘뱅케 각막 이영양증 관련 SNP와 조합되어, 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP, 래티스 이상증 관련 SNP, 레이스버클러 각막 이영양증 관련 SNP, 및/또는 티엘뱅케 각막 이영양증 관련 SNP와 조합되어, 과립형 각막 이영양증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP, 및/또는 티엘뱅케 각막 이영양증 관련 SNP와 조합되어, 래티스 이상증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP, 과립형 각막 이영양증 관련 SNP, 래티스 이상증 관련 SNP, 및/또는 티엘뱅케 각막 이영양증 관련 SNP와 조합되어, 레이스버클러 각막 이영양증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP, 과립형 각막 이영양증 관련 SNP, 래티스 이상증 관련 SNP 및/또는 레이스버클러 각막 이영양증 관련 SNP와 조합되어, 티엘뱅케 각막 이영양증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다.

[0197] 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP로부터 선택된 2, 3, 4, 5 및/또는 6개의 SNP의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 상기 SNP는 인간 TGF β I 유전자에 의해 인코딩된 폴리펩타이드의 위치 124, 555 및/또는 626에서 돌연변이를 야기하는 SNP를 포함한다. 이를 돌연변이는 TGF β I 유전자에서 R124 돌연변이(예를 들면 비제한적으로 C(G/A)C SNP로도 지칭되는, TGF β I 유전자의 뉴클레오타이드 418에서 G의 A로의 전이에 의해 야기되는 R124H 돌연변이를 포함)를 야기하는 것, TGF β I 유전자에서 R555 돌연변이 ((C/T)GG SNP로도 지칭되는, TGF β I 유전자의 뉴클레오타이드 1663에서 C의 T로의 전이에 의해 야기되는 R555W 돌연변이를 포함)를 야기하는 것과 같은 과립형 각막 이영양증 관련 SNP, TGF β I 유전자에서 R124 돌연변이(예를 들면 비제한적으로 (C/T)GC SNP로도 지칭되는, TGF β I 유전자의 뉴클레오타이드 417에서 C의 T로의 전이에 의해 야기되는 R124C 돌연변이를 포함)를 야기하는 것과 같은 래티스 이상증 관련 SNP, TGF β I 유전자에서 R124 돌연변이(예를 들면 비제한적으로 C(G/T)C SNP로도 지칭되는, TGF β I 유전자의 뉴클레오타이드 418에서 G의 T로의 전이에 의해 야기되는 R124L 돌연변이를 포함)를 야기하는 것과 같은 레이스버클러 각막 이영양증 관련 SNP 및/또는 TGF β I 유전자에서 R555 돌연변이(예를 들면 비제한적으로 C(G/A)G SNP로도 지칭되는, TGF β I 유전자의 뉴클레오타이드 1664에서 G의 A로의 전이에 의해 야기되는 R555Q 돌연변이를 포함)를 야기하는 것과 같은 티엘뱅케 각막 이영양증 관련 SNP를 포함한다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은 예를 들면 TGF β I 유전자에서 R555 돌연변이(예를 들면 비제한적으로 (C/T)GG SNP로도 지칭되는 TGF β I 유전자의 뉴클레오타이드 1663에서 C의 T로의 전이에 의해 야기되는 R555W 돌연변이를 포함)를 야기하는 것과 같은 과립형 각막 이영양증 관련 SNP와 조합되어, TGF β I 유전자에서 R124 돌연변이(예를 들면 비제한적으로 C(G/A)C SNP로도 지칭되는, TGF β I 유전자의 뉴클레오타이드 418에서 G의 A로의 전이에 의해 야기되는 R124H 돌연변이를 포함)를 야기하는 것과 같은 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은 예를 들

면 TGF β I 유전자에서 H626P 돌연변이(예를 들면 비제한적으로 TGF β I 유전자의 뉴클레오타이드 1924에서 A의 C로의 전이에 의해 야기되는 H626P 돌연변이를 포함)를 야기하는 것과 같은, 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다.

[0198] 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 R124C, R124H, R124L, R555W, R555Q 및/또는 H626P 중 2, 3, 4, 5 및/또는 6개의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 R124C, R124H, R124L, R555W, 및/또는 R555Q 중 2, 3, 4 및/또는 5개의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 R124H, R124L, R555W 및/또는 R555Q 중 하나 이상과 조합되어 R124C의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 R124C, R124L, R555W 및/또는 R555Q 중 하나 이상과 조합되어 R124H의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 R124C, R124H, R124L 및/또는 R555Q 중 하나 이상과 조합되어 R555W의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 R124C, R124H, R124L 및/또는 R555W 중 하나 이상과 조합되어 R555Q의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, R124H는 R555W과 조합되어 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 R124C, R124H, R124L, R555W 및/또는 R555Q 중 하나 이상과 조합되어 H262P의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, R124C, R124H, R124L, R555W 및/또는 R555Q가 모두 검출된다. 일부 구현예에서, R124C, R124H, R124L, R555W, R555Q 및/또는 H626P가 모두 검출된다.

VIII. 진단 키트

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

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

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

[0203] 일부 구현예에서, 키트는 대조군 gDNA 및/또는 DNA 샘플을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서 포함된 대조군 DNA 샘플은 TGF β I R124 정상이다. 일부 구현예에서 포함된 대조군 DNA 샘플은 R124C, R124H, R124L, R555W, R555Q 및/또는 H626P를 포함하는, 검출되는 돌연변이에 상응한다. 일부 구현예에서, TGF β I R124 정상에 상응하는 대조군 DNA 샘플 및 R124C, R124H, R124L, R555W, R555Q 및/또는 H626P에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 구현예에서, TGF β I R124 정상에 상응하는 대조군 DNA 샘플 및 R124C, R124H, R124L, R555W 및/또는 R555Q에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 구현예에서, TGF β I R124 정상에 상응하는 대조군 DNA 샘플 및 R124C, R124H 및/또는 R124L에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 구현예에서, TGF β I R124 정상에 상응하는 대조군 DNA 샘플 및 R555W 및/또는 R555Q에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 구현예에서, TGF β I R124 정상에 상응하는 대조군 DNA 샘플 및 R555W 및/또는 R555Q에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다.

부 구현예에서, TGF β I R124 정상에 상응하는 대조군 DNA 샘플 및 R124C에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 구현예에서, TGF β I R124 정상 DNA에 상응하는 대조군 DNA 샘플 및 R124H에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 구현예에서, TGF β I R124 정상에 상응하는 대조군 DNA 샘플 및 R124L에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 구현예에서, TGF β I R124 정상 DNA에 상응하는 대조군 DNA 샘플 및 R555W에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 구현예에서, TGF β I R124 정상에 상응하는 대조군 DNA 샘플 및 R555Q에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 구현예에서, TGF β I R124 정상에 상응하는 대조군 DNA 샘플 및 H626P에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 구현예에서, 대조군 DNA 샘플의 농도는 5 ng/μL, 10 ng/μL, 20 ng/μL, 30 ng/μL, 40 ng/μL, 50 ng/μL, 60 ng/μL, 70 ng/μL, 80 ng/μL, 90 ng/μL, 100 ng/μL, 110 ng/μL, 120 ng/μL, 130 ng/μL, 140 ng/μL, 150 ng/μL, 160 ng/μL, 170 ng/μL, 180 ng/μL, 190 ng/μL 또는 200 ng/μL이다. 일부 구현예에서, 대조군 DNA 샘플의 농도는 50 ng/μL, 100 ng/μL, 150 ng/μL 또는 200 ng/μL이다. 일부 구현예에서, 대조군 DNA 샘플의 농도는 100 ng/μL이다. 일부 구현예에서, 대조군 DNA 샘플들은 동일한 농도를 갖는다. 일부 구현예에서, 대조군 DNA 샘플들은 상이한 농도를 갖는다.

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

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

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

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

[0208] **실시예**

[0209] **실시예 1: DNA 추출(DNA Extract A11 Reagents, ThermoFisher)**

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

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

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

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

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

표 5

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

TGF β I R555Q (서열번호: 50)	FAM-AC CAA GAG AAC AGA G-MGB NFQ
--------------------------------	----------------------------------

표 6

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

[0216]

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

표 7

반응 혼합물		
A11 reagent extract (전혈)		3.00 μ l
GTxpress TaqMan®		10.00 μ l
프라이머 (124R) (역 방향)	10 pMol	0.50 μ l
프라이머 (124F) (정 방향)	10 pMol	0.50 μ l
프라이머 (555R) (역 방향)	10 pMol	0.50 μ l
프라이머 (555F) (정 방향)	10 pMol	0.50 μ l
프로브 (NL/VIC)	10 pMol	0.20 μ l
프로브 (R124H/FAM)	10 pMol	0.30 μ l
프로브 (R124C/FAM)	10 pMol	0.20 μ l
프로브 (R124L/FAM)	10 pMol	0.50 μ l
프로브 (R555N/VIC)	10 pMol	0.20 μ l
프로브 (R555Q-1/FAM)	10 pMol	0.20 μ l
프로브 (R555W/FAM)	10 pMol	0.20 μ l
증류수		3.20 μ l

[0217]

예시적인 PCR 사이클링 조건이 하기 표 8에 나타나 있다.

표 8

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

[0220]

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

[0221]

참고문헌

[0222]

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

[0223]

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

[0224]

본 기술분야의 숙련가에게 자명할 바와 같이, 그 의미 및 범위를 벗어나지 않으면서 본원의 많은 변형 및 변이가 이뤄질 수 있다. 본원에 기재된 특정한 구현예 및 실시예는 단지 예로써 제공되며, 본원은 청구항이 가지는

등가물의 전체 범위에 따라, 첨부된 청구항의 용어에 의해서만 한정될 것이다.

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

```

1 gcttgcgcgt cggtcgctag ctgcgtcggt ggcgtcgct cgcgtccatg ggcgtcttcg
61 tggcgctgct ggctctcgcc ctggctctgg cccctggccc cggccgcacc ctggcggtgc
121 ccccaagtc gcccattacca ctggcgctgc agcacagcag gctccggggc cgccagcagc
181 ggtaaaggcga gcccgcgtgc caggggctgc ggaaggctcg gtagtcgggg ctcggagcgc
241 aaggccgtgg gggcattgaa ctggctctgg ggcgcagggg acaaagcccg aactaaaaac
301 cttgcacat ggacgcgtcg gacaccagcc ctgcacgcgg tggaggaga gaggaggaga
361 ggtggaggac catggaggga aaggcggagg cccgcgtttt gtagaaggga gtggggaggt
421 ggaccagaga ctttcgacgc aggecaagag cctgagacgg acagcgctt cagttctcc
481 tcccaaggccac tgcagaaaagg gggaaatggc aactctttgg ccataatcac cgtggaggg
541 tgccaagggc aaagccacc cagcgtaca ctattccaa cccagccagg ccccgggcca
601 gcgactccat ggccacaca cggtggcagc atctaagggtt ccccagggtc
661 ctgtgcctt gggcaggccc tgacttcaga cactgctggc acccgacact gctctctgg
721 tacagcaagg gcaatgtgc acttcttgc ctgcccgtt aagagcagga gaatgcactg
781 ggcctcaca cacactgttc aaatggggaa actgagtctt gtaggttcc actttccac
841 agtctgttgg tggactcg ggcaggatt ggactgttcc ttaaaatgtt agtgggttt
901 gtaaatgtt gacactatca ttgcaggat tcccttggaa cccttggaaat gtgtgggtt
961 taggagacaa actcaagcag aaggcttggt ctgtatgtt ccctaataact gaccaggca
1021 gaggcaggca acatttttac cttttttttt accggccatacc tgctgtccaa atatccaggc
1081 tttgtgcag cttccagctt acctgggttc accaacttctt ttttccatacc tagttaaaac
1141 tatatatgtt tagaatttttgc tagtactcc tcagaggaa ccttaataacc atcgggttct
1201 tgccgttcaca cccacaagca atggccaaac ctccaaagaga ctggccatccat ctgtgcctaa
1261 atcaaaactt atgttgggg gtatagatgt tgcatttttttccat gggccgtttt gcttgggtc
1321 ctgtcactt ggtgttgc ggttgcggta caggctggc cttgttagggc atatgttgc
1381 ttgtttccat ttttttttttgc ttttttttttca agggccatccat ggttttttttgg gctctggcgg
1441 agagggcctg ctgggagcac atctggccac cttgcagat gaaatcaaacc cggccctggc
1501 tgcaacccatc acaccatccat gggaaaggaa gaaatctgg gatatttttgc ggttttttttgc
1561 gaagtgggg aatcagctt gacttggggc gttgtcggaa tagatgttgg gggatgtca
1621 gaaagatgttggggatatgaa ggccatcaaca tccaaatgttccat gacccatggc attttttata
1681 tctctccca cttccatccat ggttgccttgc ctttttttttgc caatgttggg ttttttttttgc
1741 ggggtccatc attttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc attttttttttgc ttttttttttgc
1801 agaagatctt ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc
1861 ccacatccat ggttgccttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc
1921 aacccatccat cttccatccat cttccatccat cttccatccat cttccatccat cttccatccat
1981 ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc
2041 cttccatccat cttccatccat cttccatccat cttccatccat cttccatccat cttccatccat
2101 ctgtgttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc
2161 atgcgcggc acatgttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc
2221 taactgttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc
2281 gtgttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc
2341 agggaaaggaa aacttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc
2401 aataacatccat gtttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc
2461 ccacatccat ggttgccttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc
2521 tagtggggatgttggggatatgaa gtttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc
2581 gatatgttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc
2641 ctgttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc
2701 aatccatccat gtttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc
2761 gcccacatccat gtttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc
2821 ccacatccat cttccatccat cttccatccat cttccatccat cttccatccat cttccatccat
2881 gcccacatccat cttccatccat cttccatccat cttccatccat cttccatccat cttccatccat
2941 gagactcaatccat gtttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc
3001 attttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc
3061 gggggcttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc
3121 ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc
3181 cttccatccat cttccatccat cttccatccat cttccatccat cttccatccat cttccatccat
3241 ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc
3301 ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc
3361 agacatccat gtttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc
3421 attttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc
3481 tactgttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc

```

3541 gcattcttaa agtaacagg 3601 ctgaagttt ctgagcttg 3661 ttcccttga ctgtgattc 3721 ctccctgac tgaccacgc 3781 agggctctt aatgaagtc 3841 ggtatacttg aaaaaaacat 3901 cagaaccccc agacattac 3961 tggtagttt ggggagcagt 4021 ctggatgcta gggcccatct 4081 agttctgtt gaggtagttag 4141 aggaattctg ttggAACCC 4201 agcagcatgt catctggac 4261 gactaagaat atgaacaact 4321 agcaaccagc catggtttaa 4381 aatggcttgc ctggggagc 4441 gagctgcctg agagatgctt 4501 gtacatgaag ttacatcagt 4561 catggggct gatggaaatc 4621 gtaccaagac tggaaatgact 4681 caaaacagcat gggagtatt 4741 gctttgttt tcagcccaa 4801 tacttcacca actgcaagca 4861 tctgtaccca gccaggagac 4921 gccagccctc tagaaggctca 4981 ctgggactctc ctgtctgggg 5041 ttaaggctg ctgacaagac 5101 catgaaacac tgctgtgtg 5161 gatatgcagt ggagaagcca 5221 tgtactaaat agtccatcc 5281 gagactaaat catatcgaga 5341 tcattcaaac cttagctca 5401 tacctgaaaa gttcgtataa 5461 gaaaataatgt acataagaga 5521 ctgactacta ttattttat 5581 agagtccaa cgggggtgtg 5641 gcaaggaggg aggccagctt 5701 tctaacaatt ctggggaaac 5761 tgctctatct agcttaggaag 5821 accttccttc tgctccata 5881 gcactttca atgttaggg 5941 tctccctcaa ttaatagcc 6001 tggaaaataaa tattccaatg 6061 gaattgaggg aagtggat 6121 ctgtccaggg caggctccat 6181 ctaaaatgtt agtgagctag 6241 atattcttc tgctatgaac 6301 ggatgcctga cttaaaaat 6361 atcccaacac ttggggaggc 6421 ctgctaaaca tggtaaaaaac 6481 gtggccggc ctgttagcc 6541 tggggccggc agcttgcagt 6601 agtgagacac cgtctcaaaa 6661 gatttttcc catgtgtgt 6721 aacaaggccag gctccactca 6781 aacaacttctt ctatatc 6841 aatgttctt gaaaatggag 6901 ccacactgtt tcgggggtgc 6961 cgataacatt ccctatcagt 7021 tctgtaccc ttatctttgt 7081 aaaaatgttcc tgatgagcag 7141 qatgtatgttggc ccaagctcc

aaattgtatgt taaagaataata 3601 ctgcattctt tgggtgatac 3661 aggtcttgc aaagccctca 3721 agtcagatgc atgcctgcct 3781 tctcttgcact gaccacgtg 3841 tcacaatcac tcggcttag 3901 gcaaaaccaa aatcctgtgg 3961 actctgtt ttcacagggt 4021 attttcaaca agttcatttc 4081 agaatgtgaa caacagaaca 4141 tcgagaaag aacatcccc 4201 aatggagaaa aaggaccgt 4261 gaggtttaaaa tgggagagca 4321 accagctata aacccctggg 4381 caagcagctg gtccaggat 4441 ttgttacac ttatcaattt 4501 atgtaaagaga gattttaaaca 4561 taggttacaca gaaccaaagt 4621 ctctccctca tctcttagaa 4681 aaagtgggtt ggacgtgtc 4741 cgtgtgtct gtgcagaagg 4801 gtgttaccaaa agaaaatct 4861 caagctgtat gcacgcgtgc 4921 ggttgcctaa aagccatgt 4981 agtggcattt ttagaaatgt 5041 ttgttgcacat tttcaggccc 5101 ttttgcattt ttttgcaggc 5161 ttttgcattt aatcctcata 5221 aaataataca ttttgcattt 5281 ttatgcacat ttatgcata 5341 cctggcccaat ttttgcattt 5401 cttttttttt ttttgcattt 5461 cttttttttt aatcctcata 5521 aaataataca ttttgcattt 5581 ttttgcattt ttttgcattt 5641 ttttgcattt ttttgcattt 5701 ttttgcattt ttttgcattt 5761 ttttgcattt ttttgcattt 5821 ttttgcattt ttttgcattt 5881 ttttgcattt ttttgcattt 5941 ttttgcattt ttttgcattt 6001 ttttgcattt ttttgcattt 6061 ttttgcattt ttttgcattt 6121 ttttgcattt ttttgcattt 6181 ttttgcattt ttttgcattt 6241 ttttgcattt ttttgcattt 6301 ttttgcattt ttttgcattt 6361 ttttgcattt ttttgcattt 6421 ttttgcattt ttttgcattt 6481 ttttgcattt ttttgcattt 6541 ttttgcattt ttttgcattt 6601 ttttgcattt ttttgcattt 6661 ttttgcattt ttttgcattt 6721 ttttgcattt ttttgcattt 6781 ttttgcattt ttttgcattt 6841 ttttgcattt ttttgcattt 6901 ttttgcattt ttttgcattt 6961 ttttgcattt ttttgcattt 7021 ttttgcattt ttttgcattt 7081 ttttgcattt ttttgcattt 7141 ttttgcattt ttttgcattt

[0227]

7201 gaaatgtctg gatgaggctgg ggagatgggg ttccagagtgg actcaggca a gcccgc atgc
 7261 ccagtccca gctgtggcct agtctcacaa agccagaagg atatgacatt tacattcaac
 7321 tcttgaattt gtggccactg ctttggcaaa ctccaaagag agaaaatgaa gatagaaaaaa
 7381 tattatttga tataaaactt ctaggacaag agaggccctt cctggaaacat tacatgttagt
 7441 attaggaagg tggagctgcc ctggaaaaga tccagagaac tcagagagag gaagaggctgg
 7501 aaccatctc tggcattgtgagactc tagaggtgc ttggcaggcc tcctgtgtac
 7561 ctgagaccaa caggactgagactc tctgaccatc acggctc aattcagtgc
 7621 catgggtgtt cagggtggaa ggggagaggctgtggc tggagttgtat gttatcctgg
 7681 gaaaaatgg tagg tccctagatg cctttagttt agtggaggc agactggaa atggggcac
 7741 agtagtggg ggggcaaaa ggactgtc tgcattgaggtt ccataggcag ttggaaattt
 7801 ctcagcaaga ctccagagaa ggagctggaa gcagagggtt atggtgggat gaaaaggagt
 7861 aaatatac gggggaggag cagactcagg ttgtcaaggg tcaagaaacc agaaggagaa
 7921 tttcacctt gaaagcagaca acgggttacca agcatacagg ggaataactt gtggtagag
 7981 gtcacacaga gatacaggag ccgcacttggt gagacaggag cctggagcca cctgcctgct
 8041 tttgtgaggc cccagactcc actgtatca tcaggtaag ctctgttgc tgccacacaaa
 8101 agctttctg catttacaaa gagagaaggccctgttgc tggtagatg cgtcaagctg
 8161 acatgttac ttttatttacag gaagttgttgc cctatggc cttatggat ggctgttatt
 8221 gtgaattttt ttgtccgaa attcaacttgcatttattt cagatcctaa atagcacccg
 8281 agtgatacaa ttggctaatca aacaaagagg gctgtgggg gcaagcagtc a gcatcccc
 8341 tctgtgattt caggccctgg tttgatttttgc accataaaat tttttacgt gtggcaattt
 8401 gagcaaaatgttgcaggatggcaggatggcaggatggcaggatggcaggatggcaggatggc
 8461 gtgcctggc caggagaggccctt aacagccaa tccaaatgttgc catcatggga
 8521 ctggaaatgttgcatgcaggatgcataaactgttgcataggggag ggctgttgc
 8581 ggagcttagcg ggtatgggttgcagctatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 8641 caacacattt cacaatgtcgaaagcccttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 8701 ctgtttcttcttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 8761 cactgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 8821 tttccatcag ctggcaggccttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 8881 gtcgacgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 8941 ccaagaggaa aaaaaggaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 9001 gtgccttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 9061 tctggggcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 9121 gggcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 9181 aggaattttt ttctgttggg tatttacatg aacctatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 9241 ttgttaggttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 9301 atatcccttactggaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 9361 gagatggatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 9421 gaggcaggcttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 9481 agcgggttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 9541 tagtaaaaaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 9601 tactcaggatggcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 9661 tgatgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 9721 aaaaaggaggatggcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 9781 tttgtgtatgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 9841 agcaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 9901 agggcgatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 9961 taaaattttgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 10021 acttataatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 10081 ttgtttcaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 10141 tagaagtcttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 10201 gtaagtcttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 10261 cagatggatggcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 10321 agctgaggatggcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 10381 agtgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 10441 ccaggcttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 10501 agcatcgatggcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 10561 ctgtgtaaa ggggatccccaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 10621 cacagtcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 10681 ataaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 10741 gagggctgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc
 10801 tctatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc

[0229]

14521 gaactagaaa atcatgagag attaatgac cactgcctga tacacatatg tgttttacag
 14581 atgagggaaac tgagacccag agagatgatg aaattggctg agatggccc agctggctag
 14641 taaaagactc agaggccag ctggtgcagg gctcttcta ttcccttcgt ttcccttc
 14701 ggaacactca ccatcggtt tcctgtaat aatgttgaga taaaatccctt ggtgcattat
 14761 gttttctagt cacaacattg actaggctgc cagagtccctc tgggttccca gttgggtggc
 14821 tggtaggtgtt ggcagccccc agggacattc tacagaacag agggaggatg agactctcc
 14881 tgctcaaggaa aggacagact atgacttagc aaataactcc taagaggaga gtgtttcacc
 14941 caccatctt cttccctggc tggtaggtgtt gggggccag atgaccctgt
 15001 aggaacagt aaggccctggc taacacaatg tgggttgc ttgttacaga gtcatcagct
 15061 acgagtgtc tccctggat gaaaagggtcc ctggggagaa gggctgtcca gcaggtaat
 15121 gaatccctccg ggccttgcct tgggtgtgg gtggaaaggaa atgggtggag agaggagatc
 15181 ccacataaaa ggcagcagag tggtaatggg ggcagttggca caaggacatg gcattctcc
 15241 cacgtccccca ctggggccag gctctatgcg agggggctgag gaatggaaagc tggaaacacgc
 15301 gcattttctg agctgtctt cctggcctcc ttaccacact ggtggagtag actccaaactg
 15361 tggcctgtcc atgccttcc cagcaggcac aggtctcaggc tcaggcttcc ggcctctgccc
 15421 tctggctggg agtgtatcca aacacatcca gcagggtcg cctgatagcc catcaggatc
 15481 cgatcagctc tgcttagagag ccgtgggat gtggggaggag ggggtcactg gtgggtggc
 15541 aaccccaagc catccccatc tccctctgtg tctaaacttg gccccttggg gttcggtagg
 15601 gagaagagcc ataggccagg tgggtccacc cagagtccgc agagagtccc acaaatgggtt
 15661 gcaactggcg aaagacagca tggcacctgt gatattttt agagctttc ttttagtgc
 15721 acacacaatg gactgtacag gggagttgtt attttgcattt aattttgaaa tagactatc
 15781 ttttgggtatc tgcggggat tggtaggtt acccattctt ggtatccata tcctcagatg
 15841 ttcaagttccc tggatataag tggtaggtt tttgtatgtt atctatgcatttccat
 15901 gtacttttaa tcatctcaag attacttata ataccaaaa taatgttaat cctatgttag
 15961 tagttttat accctttttaaatttttattt attatgtttt attgtatttc aaaaaatatt
 16021 ttttgggtccat tggtaggtt atctgtgggtt gaaagacccca cagatcggaa gggccaaactg
 16081 ttttgggtatc ttttttagt aagaatgtga gactggggcc aggcgcagg gctcatgcct
 16141 ttgtatccag cacttgggaa ggcagatcac ctgagccaaag aattcggagac
 16201 cagcaggcccg tgcacatag tgacatcttgc tttctttaaag attgtgagac tgggtggggc
 16261 acgggtgtc acgcctgttcc tcttagact ttggggaggcc aaggcagggt gatcaactga
 16321 ggtcaggatg tggatcatc cctggctaaatg atagtaaaac tctgttctt ctttttttt
 16381 aaaaaatattt gctgggtgtt gttggggccg cctataatcc cagctactca ggaggcttag
 16441 gcaggagaat cgcttgcattc caggaggccg aggttgcattt ggtctggat agggccgtt
 16501 cactccacatc tggggcaaaa gggccaaactt ccattttttttaaaaataaa taaaataata
 16561 aataaaatcatc gagatgttca cataacacggg agggggccca tttgggttgc tccaaggatc
 16621 cttagatgtt tggatgttca ggttgggtgc ggttggggca tggaggatct gactcaatg
 16681 gagggacagg tggggaaatg ggttggggaa agaagatgtt ctttgcatttggggcc
 16741 ctctgaaccc taatttcaga cccttcaaaa tggatattaa gcttgcatttgc tcttgcattt
 16801 caaaaaacaaat atgacatgtt aacttgcattt ggtcttataa ggtctggagaa accccttctt
 16861 aacttcaacgc tgctttaaag aataacatctt tattacctgc aaataacacac agtactttgg
 16921 agattttataa tagtcttca ttcttaataga acccattttt ggttggggcc ttttttttt
 16981 gtaaatctgtt aagactgtt tggatattttt atatctgttt ccagtgttca ttccctggccc
 17041 tggtaggttcaat atgctgggaa acaagatgtt tgctctgtg tggtaggtt gtttttttt
 17101 cacaatcttccatc tggtaggttcaat gtagacatgtt tggtaggtt gtttttttt
 17161 tataaacaatc ctttttttttccatc tggtaggttcaat gtagacatgtt tggtaggtt
 17221 ctt
 17281 ctggacccccc agggccatc ctt
 17341 aaccccttacg agaccctggg agtctgttca tccaccatca ctcagtttttccatc
 17401 acggagaagc tgaggccatc gatgggggggg cccggcaggct tcaccatctt cggccctttagc
 17461 aacggggccatc gggccatc tggccatc tggccatc tggccatc tggccatc tggccatc
 17521 atggggaaactt gccttacttcc cccgggggggg gggccatc tggccatc tggccatc
 17581 tccttacttcc tggatgttca ttt
 17641 aaaaatgttcaat ttt
 17701 ggggtttccatc tggtaggttca ttt
 17761 acatgttccatc tggtaggttca ttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt
 17821 gacaccctgtt ctt
 17881 gtt
 17941 acacggcatg acccttcacccatc ttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt
 18001 taatggggta ggggatcccc accatctgtt ttttttttttttttttttttttttttttttt
 18061 ctgtttccatc tggtaggttca ttt
 18121 ctt

[0231]

21841 gattatggta cctctatgcg cctggccggc actggggaca gaggccatga aaatgaatac
 21901 agcacagcct ttgcctcaa gaaacttaag acctagtaga aatggcagac tttaaaacag
 21961 gtgttggga tctgattgg tagtgcata gacagagata ctcacagcac aaaatggga
 22021 atgagggcgg gcattggac acacatgc ttaagggcc caaaggctt tagaactgt
 22081 ttccctatta aaacatgatt tgccacagac acattcttg ctttggagac ctcagaactc
 22141 cttactatag gcccggatg gtataatcc cagcacttt ggaagccaag gccccgagat
 22201 cacttgaggc tgagagtca agaccagct gccaacatg gtaaaacccc gtctctacta
 22261 aaatacaca aattagctgg gtgtgggtt ggcacactgt aatcccagct actcaggagg
 22321 ctgaggttag agaactactt gaacctggga ggcagaagtt gcaataagcc cagatcatgc
 22381 cactgcactc cagctggc aacaagcta gactctctca aaaaaaaaaa aaaaaacaaa
 22441 acaaaacaaa acaaaaaaaaaa ctccattata taaaactgtaa gaaaaaaaaa gccccctactt
 22501 cgtcccttt gcaaatctgc ctttccctac tcactaacca gctggttcag agcaaggaca
 22561 ctctgttgg tgccatcgct gcacactgga aggaagaggt ccttgccca caccac
 22621 ttcctcgtc ttacccggcag gttggcaggc aggccaggca gaagcagc gggctgttg
 22681 tgggtccagt ttgaagacta ggcacatgg cttccggc tccctccca agtggccctg
 22741 gcaggttccctt caccatcgttgcacttca cttccctctc ctaagaactt caatccccaa
 22801 ggcctcattc ccataggcct tctcaccctt tttttttttc tctggctgaa tggccagc
 22861 acgggcttcc aaggccatca actcgctgc agcagcccc tgccttcag ggcctcagag
 22921 cttccctctg cctatcagac tgggttttgg tttccacac ttggatcag attgaaactc
 22981 gcctccgtgg tggaaatata ggcacatgg cttccggc tccctccca agtggccctg
 23041 gccacctgtc cagctggggg ttgggggggg cttccctccca ttgactggc cttgcattt
 23101 cttccatcca gcctgtctgg gctctccgg gcaatggaga ccacggagag tcacatggg
 23161 tcaggagccccc ctttggcc tcacccctgc cttcccccctt aaagtagcac ttggataagc
 23221 aaataaattt ttactacttac ttttttttttgg tgggtgaat gggatggcaaa aggccaaatc
 23281 ttactgtatca ccaaaatcta agatataatcc tggcagctag tagacccttgg gcttaatga
 23341 acagaaaaact ggacaaataa agtgcacaca aataactcaa agtgcattt tttttttttt
 23401 tcgtcttttcccttactacatgtt ttacatttttaaaaggtga gtagattttt aaaaatccct
 23461 ggtaggctctt ttt
 23521 taacatgtt tgccatggccttgc ttt
 23581 atttcatttc atcccccacag cggcccttgg agatgcatttttttttttttttttttttttttt
 23641 tgataaggaa gttgagggttc aaaggaggctt aatgcatttttttttttttttttttttttttt
 23701 agtggccaca gggcccccagc ttt
 23761 ggcctctgtgg tgcccccagcc ttt
 23821 gcatggccagc gtcgcaatgg ttt
 23881 agtctgttttgg gaccccttgg ctt
 23941 aaggccatcgt ttt
 24001 gcagcgggggacatgttgcacttacatcaacgggaggcgttcatcttttttttttttttttttt
 24061 ccaccaacgg ggtgatccac tacattgtatgc agtactactcat cccagactca ggtaggccag
 24121 gcctccggggg gccttggcc ttt
 24181 ggagggggaaa ttccatgttgc ttt
 24241 cggccactgtc aatgtgttgg ttt
 24301 agtgcagtgg agaggcgtt gggagctt gggggggctt gggggacagac tcaatcac
 24361 aggcccttca gaagatgttgc ttt
 24421 agcatgtgttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttccctt
 24481 ctgttgcatt
 24541 agatctgtcc atgactgttgc aatgttgcatttttttttttttttttttttttttttttttt
 24601 ttgttgccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttccctt
 24661 gaatgttgc ttt
 24721 gagcttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttccctt
 24781 gatgacacaa gcccctggg cccctggg gtttttttttttttttttttttttttttttttttt
 24841 cttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttccctt
 24901 ttaacttttgc aacccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttccctt
 24961 gatgttgcatt
 25021 ttt
 25081 ggg
 25141 aacactctcc gtt
 25201 agcagatgttgc acttccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttccctt
 25261 aatgccttttgc ggg
 25321 cttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttccctt
 25381 ggg
 25441 cttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttccctt

25501 actccaaaca cccttgatta tctggatctt cttaattct ccatagaaga taccagatgt
 25561 taaggaatat tggcagcttc acttggttgc tcaatccctg tttccaaact caaggaggg
 25621 tggctttt cactgtattt atctctcatc actctcttca ttgcaggagc acatctct
 25681 ggacctaacc atcacccctt cttagatgc gaaacccctt aattgtatgc catacaagga
 25741 attgtctcg gaaccacata attaaagacc agctggctc taagtatctg taccatggac
 25801 agaccctgga aactctggc ggaaaaaaac tgagagttt tgatctcg aatgtaaatt
 25861 ctgggtctca aatcatgtc ctggaaagct cctactgtg ggacttgc tagtgtaaaa
 25921 aaaaatgtcc tcaataagca ggagtttgc tgagaactgg ttgctgacaa ggaaggaat
 25981 aatttctgga aaatataatg aaaaaatga gatcctgc aaggatggg atctctttt
 26041 ctggggcct ttgagaataa accacacata tccaaact gtattgtgaa ggaataagtc
 26101 ctctgttcaat tcaggaatta acacctggc ggagggatgg agttcagact ctctctgagc
 26161 ttatgagaag agaagcccc taaactaaaa tacagccctt cttgtccaa aaggtgcctt
 26221 ctctcttctg ctgtatctt ttttttca aacccaacag ttaccctgga aataaaaag
 26281 gaagtacac tcaacatagc tctgcctgg gaccaaccag caccattgg ctaaagatgg
 26341 ttatcatctg taaaacaaag aaataaataa atgggttca cgtatttatt tcaacatgt
 26401 caatggacact catgttaac tgatcttc attatggac ctctgtgtga ctattttgg
 26461 gcctctctaa ccgttcttc cttaaaggaag accattttt gttttatttct ctggagaaaa
 26521 tacatcattt tatcccagcc ttaataaccc atcccagtgt atactcttc atcttcatgg
 26581 ataatgaccc tgctacatgc tctgaacaaa tcaggaggcc cctcgtgaa gtataaccag
 26641 tccttctt ctctgtccct cttctgtgc gacccctgc attgagaaca gctgcacatgc
 26701 ggccacac aaggggggg ggtacggac cctgttccacg atggaccggg tgctgacccc
 26761 cccaatgggg actgtcatgg atgtctgaa gggagacaaat cgctttaggt aattagtcc
 26821 atccccgggt ggagcttctg cccagtggc atgctggagt gggatgtggg gccccagcta
 26881 ttgtcaagc ttcttctac ctgggggatt caattaacac tagcagtgc ctgtcgac
 26941 ctccacact tggtatgggg aaaaggcaag ggtgccttgg aaagcttaca ttggaaagaa
 27001 ggttacttc taagagtta atcttcatc gcatgggaa cgggggggg ggactacatt
 27061 ttatgactg aagtgcacaa aacatcac cctctcattt taaagctcca agtgagccaa
 27121 gacacatag ttacagtgc acgtgagcc tctactctc tgccgagttt ctgtttattt
 27181 caactgaagc acccttgc tttttttc ttggccgggt atctccattt ctgacttgc
 27241 cattcacctt ggggtgcgtt catattgaat gtttttttgc cactgacttc agccaccc
 27301 acaaggccatc ggagaccaca cccctctgc ctccccagaat catatccctg gaggctcagc
 27361 tagtctcttgc tccagccata cctctgcctt ttcttttccc tccttttctc tggtggctct
 27421 gacgtctggc catttaacag agcttagcat ttttgcgtggg tggagagacg tggagctgg
 27481 aatcaactccc tcttttgc tccggggc ataaaaacca aggtgtgtgc attccagtt
 27541 cctggactt actatccctca gtgtgtggat attaaggaa aataacctctc agcgtggta
 27601 ggttatttaag gaaaatactt gttgacaggt gacattttct gtgtgttat ctacagcatg
 27661 ctggtagctg ccattccatc tgccggactg acggagaccc tcaaccggg aggagtctac
 27721 acagtcttgc tccccacaaa tgaagccctc cgagccctgc caccaagaga acggagcaga
 27781 ctcttggta aagaccaact taagtagacg tctccattt tctaaagtag tgatccctca
 27841 gggcccccacg acgaaacact tgccacatca aggattgact tgaaggatt ttatgacaag
 27901 actatttagt gaaagatggg cgggactaaa ggaacttagca aaggatgagg ccaaccagg
 27961 actagcaacc ctggaaagcc ttactaccc ctggccctt gggatggg gatgagac
 28021 aggaaccagg gaggtcatga gccttggaca agggcacaga acagcagcca gagccatgt
 28081 cagccagcca ctgtcagaac catgcaaggg ggaccaactca gcgcggccacg ctcctctca
 28141 gagctgtcc atctgggtct ctgtgtggc gatgcgagat cgggggggg cccactgatg
 28201 cagttcatag agctcagcc cctggggcagg aaacccggca gagaggatg gaaaagatt
 28261 aagggtggct gcgaccacgg cagtcactga ggcacgtttc ccactggaga cctatgagca
 28321 cagtgataat aaagccagg acctgcactg actatccctc cagacaaaag ctttccaaag
 28381 aagtttagtca tggctctgag agatctagtt gaggatgtt ggcaggggat ctgtgttta
 28441 cgggtggctt agaaaaatg ggaaggtaag agtacttgc agcctgtgtt gggaggat
 28501 aataggatgc cacacacagg gcccggcaga cagccctggc agtaatagcc atgacgatgg
 28561 gggcgggggg agcagaatg ggatgtcgatg tggatgttgc agatgcatgc ctgtgagaga
 28621 tgcttccact ctcacagaaa gatgagacca agggaaaagg ggggggggg gggggat
 28681 gacaaacctt gggggccaca ttgtctacac ctcccttctt gctctagac agaataaaaa
 28741 gttcagggtt cagggcagctc taagttgaat tggatgttgc tttatattt tttattgtca
 28801 aatgaatgcc tggatgttgc atgttgcgtt atgttccattt ggggggggg gggggat
 28861 ctgaacataa acttttcatc ctctctctgt ccaccaagaa tggatattt cccaaatgg
 28921 ctgagccagc ttggcttttctt ttttttttcaattatgtgg gggggatgggg gggggat
 28981 aaaagcttcc caaacacacc ctccccccagg cctggggcac ccctgggggg gggggat
 29041 tagaggttgg tacaggttgg agagatattt aaaggacatc ccatgcaccc cggggctgg
 29101 tggctctgt tacttccagg caatattttt ggggggggg gggggatgggg gggggat

[0233]

29161 tggatgtttg aaaatcagtt ggtacccagt ggctccatcc tctggcaggc atgtggatt
 29221 gtcaataacc aagtgaactc tcacaaataa gttaaaactt cctcccttct cagtttcaag
 29281 atgctgaaa tagctgttca taagccctgg gaaaaatttag cccttggct ggtatgggaa
 29341 gtatccgaga tgagaggca gctgaaaact ttccgaatga cctcccacac ttaatttggg
 29401 aatgcctct gcacccctat ggcaaccagg atgcctgccc cagttgtgg agacactgat
 29461 gtgggctaa aggaatgtcg agacgtgacg aggagatgt ctgcggagg aatatcccc
 29521 tcagccctga cctcatcgcc tccatggctc ctccacagta cagctgtcta ctcttttaa
 29581 ttctcccttc agggaaatagc catctcaaac agaatgtca tttgaggcga gaatgtgtaa
 29641 atattgcact actgtttat aacccgtcagg agccatgtg atgatgaaac gtcccaagatg
 29701 ccgggtctgg aaaggccctt ggcttccaa gcaaataattt atctcatggaa aacatgatc
 29761 atactcacag aggatgttgg attaactct ttcagcgc cagggagccc aacatcccc
 29821 acagcatatt taaccagag gccaactgac tgctggggca gatttgtgtt catgaacatg
 29881 tgctttgtgt cctctgacca tttagacatg tttgggtcact aacgttgagt atacagtgg
 29941 agcttaataa gtgttcttcc cctggccagg gagggttcttca tttcagggtt gaccacttac
 30001 atcttccttcc ctggccctt cttggccagg ctaatttacca ttcttggat taactcttac
 30061 tccttttcc gcaacactgca ggagatgcca aggaacttgc caacatctt aataccaca
 30121 ttggtgatgaaatctggg aggccgggca tcggggccctt ggtgcggctt aagtctctt
 30181 aagggtgacaa gctggaaatc agcttggtaa gtgtcctgca aatcaaaggc tggctaaatt
 30241 tcccccaggc aggggtccatc gacatatctc accccccaggc tggaaattata cacacacaac
 30301 cttaactgttgc cagggccatc ctctgttgc aattctgttca aagaaaaaaa gaaaagagaa
 30361 gagggttcc agggaaatca agtgagatca tagttagaca tgtagtaaaaaa ctccagatt
 30421 taacaggaa tagacatctt gattttggcat ctgagagagg ctattagatc ttcttctt
 30481 taaggagggtt gtggcaact agttatgtga ctgaagagat cagttgttac tcacaccatc
 30541 ccacccccc aaccaggc ttctactgtt ttttgggttccatgatc accagaccat cccaaaggc
 30601 cttttggatgtt ctggacactt ctctgttgc cttcccttgc tctgcacattt gatgatataa
 30661 ctggtaactt gcaacttggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg
 30721 cttggctgca cttggcaggc ccactgaccc ctctgttgc gggccctt tcaactgttgc
 30781 gctggcttctt actctctgtt cttctctt ggtcttgc ctttttttgc tcaactgttgc
 30841 ctacggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg
 30901 acttttagcgtt gtcacttgc aatctcttgc ctttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 30961 gtcacggctt ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 31021 ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 31081 aaaaatggaaa gggcccttgc cccagaggc gggcccttgc ttttttttgc ttttttttgc
 31141 ctttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 31201 ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 31261 atcacacaaa aaaaatggaaa gggcccttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 31321 taatccacca ctttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 31381 ctttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 31441 gtttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 31501 aaaaatggaaa gggcccttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 31561 gtttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 31621 gtttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 31681 gtttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 31741 ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 31801 aaaaatggaaa gggcccttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 31861 gtttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 31921 gtttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 31981 gtttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 32041 gtttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 32101 aaaaatggaaa gggcccttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 32161 gtttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 32221 ctttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 32281 gtttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 32341 gtttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 32401 aaaaatggaaa gggcccttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 32461 gtttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 32521 gtttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 32581 gtttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 32641 gtttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 32701 aaaaatggaaa gggcccttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc
 32761 gtttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc

32821 atggggaaagt cactgtggaa gagaacagac atagctctgg aagccatctgg cccaaagagggg
32881 cagcccatcc caagttcatc ttacagtggc caggcctgtcc ctgagggcggg gcctctgggt
32941 cacttctgt ctgtccatgg cattggccat cctgggttag gctggggctc tcctgggcac
33001 tgtatgtt ccgtatcacag ggatactggg ctcgtctatgt gtgtgagcc atcccttc
33061 tgcggccagcc ccacccctcc tcttgcaccc tcttgcgtt ttctgagctt cttttctgc
33121 tccccagctt gcccagtgtc cagtgccccca cttggcttctt ttgctacttc gggtcagggt
33181 gagcctcttg ggaatgtgaa gtgccttaca gaaagattgc acttcaagag gagaggctgc
33241 aggaggccat cttttttttttt gaggcctgtgg gcttactgt tcactttaact ttgtacaca
33301 ggggtctctt tagtgccttc gagaaggattt cttggccctg agcttctact cctggggca
33361 cttctgtgtca gccccagctc cttcaactctt aggtgttagt ctcagtgggaa aaggcttgc
33421 tgggggtctc ctaggaatgtt ccacccgttgc gcacacttgc tagggcttg cacaacttat
33481 gtctgccaag gccacccgtgg gaaactccctgtt gtgccttataa gttccacccctt cccttc
33541 ttccctgtccccc cagccatttt ttcgtggatgg ggtggcaatgg ggcaaaagccca ttgtcataag
33601 cagttgtccca tataacttttcc actagaaaaat cttttttttttt cttttttttt cttttttttt
33661 cagagggtctg tgcgtactagg tggatgttttgc ctttttttttgc ctttttttttgc
33721 ggcttaccc ccaaggcaagc ccaaggcttc ctttttttttgc ctttttttttgc
33781 gtgcagtaaa aagaaggctgg ctttttttttgc ctttttttttgc
33841 cagaggccccc cattttttcc ttttttttttgc ctttttttttgc
33901 ttaaggtagt gtttgcgttgc ctttttttttgc ctttttttttgc
33961 atggtgagga tctagtccat ctttttttttgc ctttttttttgc
34021 aaagagtgtt gtttccacaaa ctttttttttgc ctttttttttgc
34081 gaggtctgtt ggccctgtgtc ctttttttttgc ctttttttttgc
34141 ctgcacccat ttgcgtttac ctttttttttgc ctttttttttgc
34201 gagaggatgtt aacccatgtt ctttttttttgc ctttttttttgc
34261 caatttctctt cagattttccat ctttttttttgc ctttttttttgc
34321 ttaatgttaca tggggccgcac ctttttttttgc ctttttttttgc
34381 agagagatgtt attttttttttgc ctttttttttgc
34441 aaaaacttttttgc ctttttttttgc
34501 attgtactgtt ttttttttttgc ctttttttttgc
34561 atgaatcaag caatccagcc ctttttttttgc ctttttttttgc
34621 cagctggaga aatggcatca ttttttttttgc ctttttttttgc
34681 acatctcacat gtggcttggg ctttttttttgc ctttttttttgc
34741 ttttttttttgc ctttttttttgc
34801 aagaaacata ttttttttttgc ctttttttttgc

TGF β 1 유전자 단백질 생성물 (**BIG-H3** 단백질 서열 ; **NCBI** 참조 번호

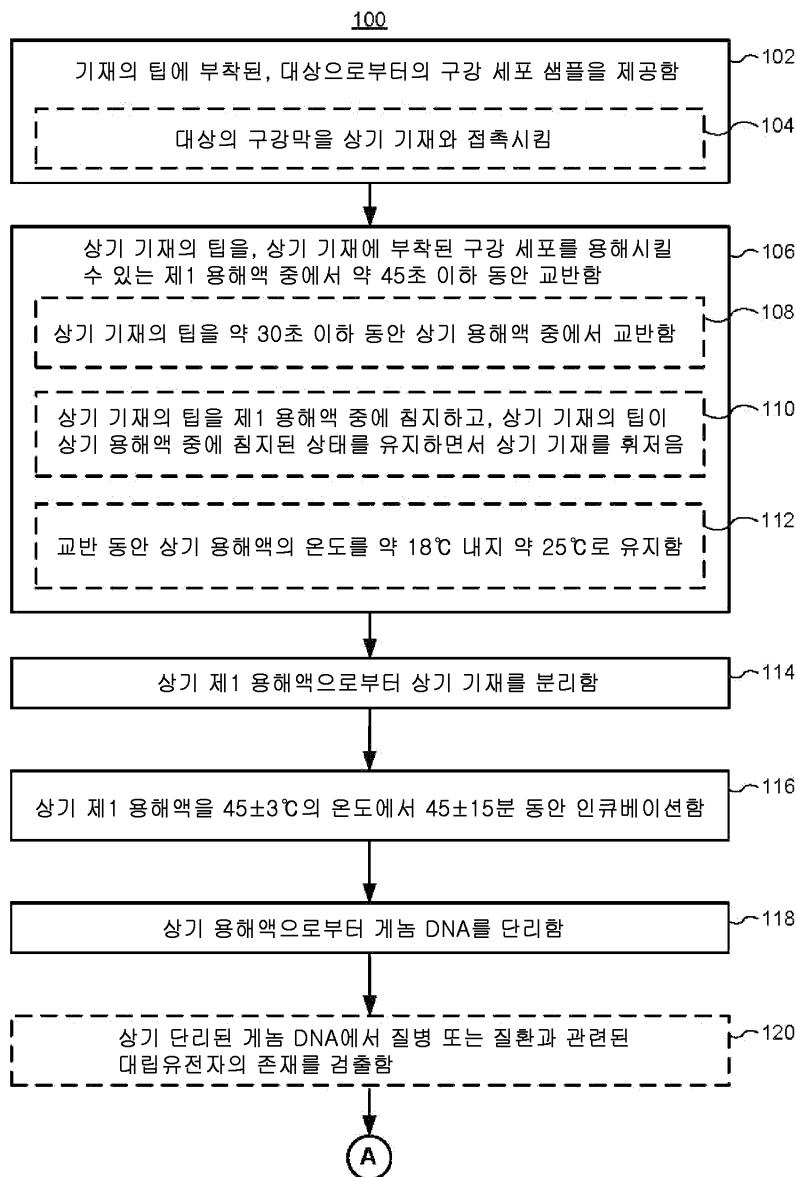
NG 012646.1):

MALFVRLALALALALGPAATLAGPAKSPYQLVQHSLRGRQH
GPNVCQVQKIVGTONRKYFTNCQKQWYQRKICGKSTVISYECCPGYEVPGKEKGCPAALP
LSNLYETLGVVGSTTQLYTDREKLRPEMEGPGSFTIFAPSNEAWASLPAEVLDSLV
SNVNIELLNALRYHMVGRRLTDELKHGMTLSMYQNSNIQIHYPNGIVTVNCARLL
KADHHATNGVVLHIDKVISTITNNIQQIEIETFTETLRAAVAASGLNTMLEGNGQYT
LLAPTNFAFEKIPSETLNRILGDPEALRDLNNHILKSAMCAEAIVAGLSVETLEGTT
LEVGCSGDMLTINGKAIISNKDILATNGVIHYIDELLIPLDSAKTLLFELAAESDVSTAI
DLFRQAGLGNHLGSGSERLTLAPLNSVFKDGTPTIDAHTRNLLRNHIDKDLASKYLY
HGQTLETLLGGKKLRLFVYRNSLCEINSCTIAHDKGRGRTLFMDRVLTPPMGTVMDV
LKGDNRSFMLVAAIQSAGLTETLNREGVTVFAPTNEAFRALPPRERSRLDGAKELA
NILKYHIGDEILVSGGIGALVRLKSLQGDKEVSLKNNVVSVNKEPVAEPDIMATNGV
VHVITNVLQOPPANRPQERGDELADSALEIFKQASAFSRASQRSVRLAPVYQKLLERMK
H

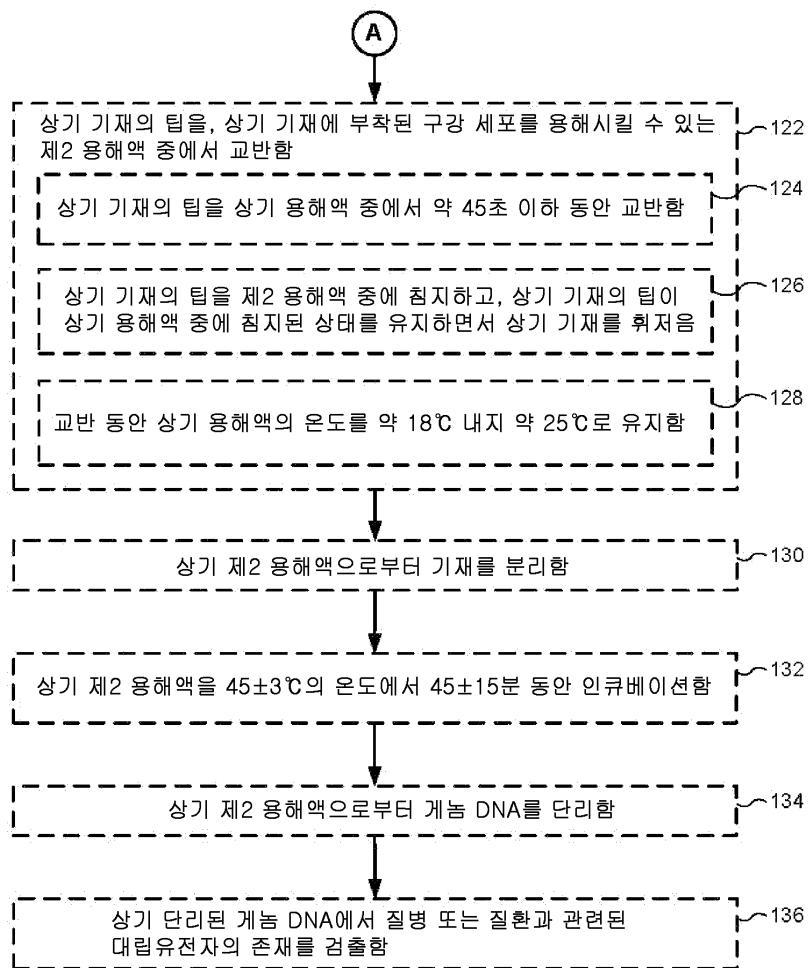
[0235]

도면

도면 1a



도면 1b



도면2

ACD Fw1 프라이머:
(서열번호 1)
5'-TCC ACC ACC ACT CAG CTG TA

ACD Re1 프라이머:
(서열번호 2)
5'-CCA TCT CAG GCC TCA GCT T
(60 bp)

AV Fw1 프라이머:
(서열번호 3)
5'-TGC AGC CCT ACC ACT CTC AA

AV Re1 프라이머:
(서열번호 4)
5'-AGG CCT CGT TGC TAG G
(150 bp)

Real Fw1 프라이머:
(서열번호 5)
5'-TAG TCT CTT ATT CTA ATA GA

Real Re1 프라이머:
(서열번호 6)
5'-GCT GCA GAC TCT GTG TTT AA
(860 bp)

ACD Fw2 프라이머:
(서열번호 7)
5'-CCA TCC CTC CTT CTG TCT TCT G

ACD Re2 프라이머:
(서열번호 8)
5'-CGG GCC CCT CCA TCT C
(140 bp)

ACD Fw3 프라이머:
(서열번호 9)
5'-CAG AGA AGG GAG GGT GTG GTT

ACD Re3 프라이머:
(서열번호 10)
5'-GGG CGA AGA TGG TGA AGC T
(190 bp)

ACD Fw4 프라이머:
(서열번호 11)
5'-TCC TCG TCC TCT CCA CCT GTA

ACD Re4 프라이머:
(서열번호 12)
5'-AGC TGG CAA GGA GGC CC

ACD Fw5 프라이머:
(서열번호 13)
5'-TTT GGG CTT TCC CAC ATG C

ACD Re5 프라이머:
(서열번호 14)
5'-GGC AGA CGG AGG TCA TCT CA

ACD Fw6 프라이머:
(서열번호 15)
5'-GTA GTA CCG TGC TCT CTG

ACD Re6 프라이머:
(서열번호 16)
5'-AGT TCC CCA TAA GAA TCC CCC

ACD Fw7 프라이머:
(서열번호 17)
5'-GGC TGG ACC CCC AGA GG

ACD Re7 프라이머:
(서열번호 18)
5'-ACC CCT CGG GGA AGT AAG G

ACD Fw8 프라이머:
(서열번호 19)
5'-AAC CTT TAC GAG ACC CTG GGA

ACD Re8 프라이머:
(서열번호 20)
5'-GAC TCC CAT CCA TCA TGC CC

ACD Fw9 프라이머:
(서열번호 21)
5'-AGT CGT TGG ATC CAC CAC CA

ACD Re9 프라이머:
(서열번호 22)
5'-GAC GTC ATT TCC TAC TGT TTC AGG

ACD Fw10 프라이머:
(서열번호 23)
5'-CCC CCC AGA AAC AGC CTG

ACD Re10 프라이머:
(서열번호 24)
5'-TTC TAA GGG GTT AAG GAG AAA GCT T

도면3

정상 프로브 1:
(서열번호 25)
VIC-CAC GGA CCG CAC GGA-NFQ
(15 bp)

돌연변이 프로브 1:
(서열번호 26)
FAM-CAC GGA CCA CAC GGA-NFQ

정상 프로브 2:
(서열번호 27)
VIC-ACA CGG ACC GCA CG-NFQ

돌연변이 프로브 2:
(서열번호 28)
FAM-ACA CGG ACC ACA CG-NFQ
(14 bp)

정상 프로브 3:
(서열번호 29)
VIC-TAC ACG GAC CGC A-NFQ

돌연변이 프로브 3:
(서열번호 30)
FAM-TAC ACG GAC CAC A-NFQ
(13 bp)

정상 프로브 4:
(서열번호 31)
VIC-CTG TAC ACG GAC CGC ACG-NFQ

돌연변이 프로브 4:
(서열번호 32)
FAM-CTG TAC ACG GAC CAC ACG-NFQ
(18 bp)

정상 프로브 5:
(서열번호 33)
VIC-CTG TAC ACG GAC CGC ACG GAG-NFQ

돌연변이 프로브 5:
(서열번호 34)
FAM-CTG TAC ACG GAC CAC ACG GAG-NFQ
(21 bp)

정상 프로브 6:
(서열번호 35)
VIC-GCT GTA CAC GGA CCG CAC GGA GAA-NFQ

돌연변이 프로브 6:
(서열번호 36)
FAM-GCT GTA CAC GGA CCA CAC GGA GAA-NFQ

정상 프로브 7:
(서열번호 37)
VIC-ACC GCA CGG AGA AGC-NFQ

돌연변이 프로브 7:
(서열번호 38)
FAM-ACC ACA CGG AGA AGC-NFQ

정상 프로브 8:
(서열번호 39)
VIC-ACC GCA CGG AGA AGC TGA GGC-NFQ

돌연변이 프로브 8:
(서열번호 40)
FAM-ACC ACA CGG AGA AGC TGA GGC-NFQ

정상 프로브 8:
(서열번호 41)
VIC-ACC GCA CGG AGA AGC TGA GGC CTG-NFQ

돌연변이 프로브 8:
(서열번호 42)
FAM-ACC ACA CGG AGA AGC TGA GGC CTG-NFQ

도면4

TaqMan MG8 프로브

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

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

서열 검출 프라이머

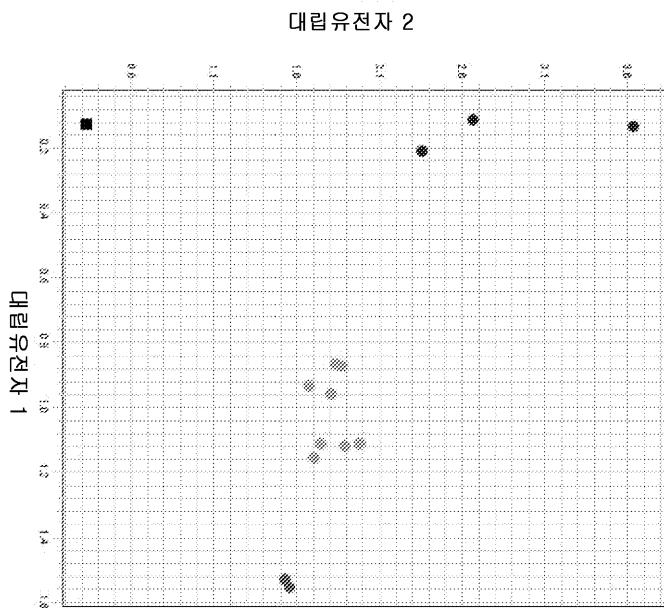
```
#TGFBI 124 F| TCC ACC ACC ACT CAG CTG TA
#TGFBI 124 R| CCA TCT CAG GCC TCA GCT T

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

도면5a

DATA A >> LifeTech/7500FAST, 고속 모드

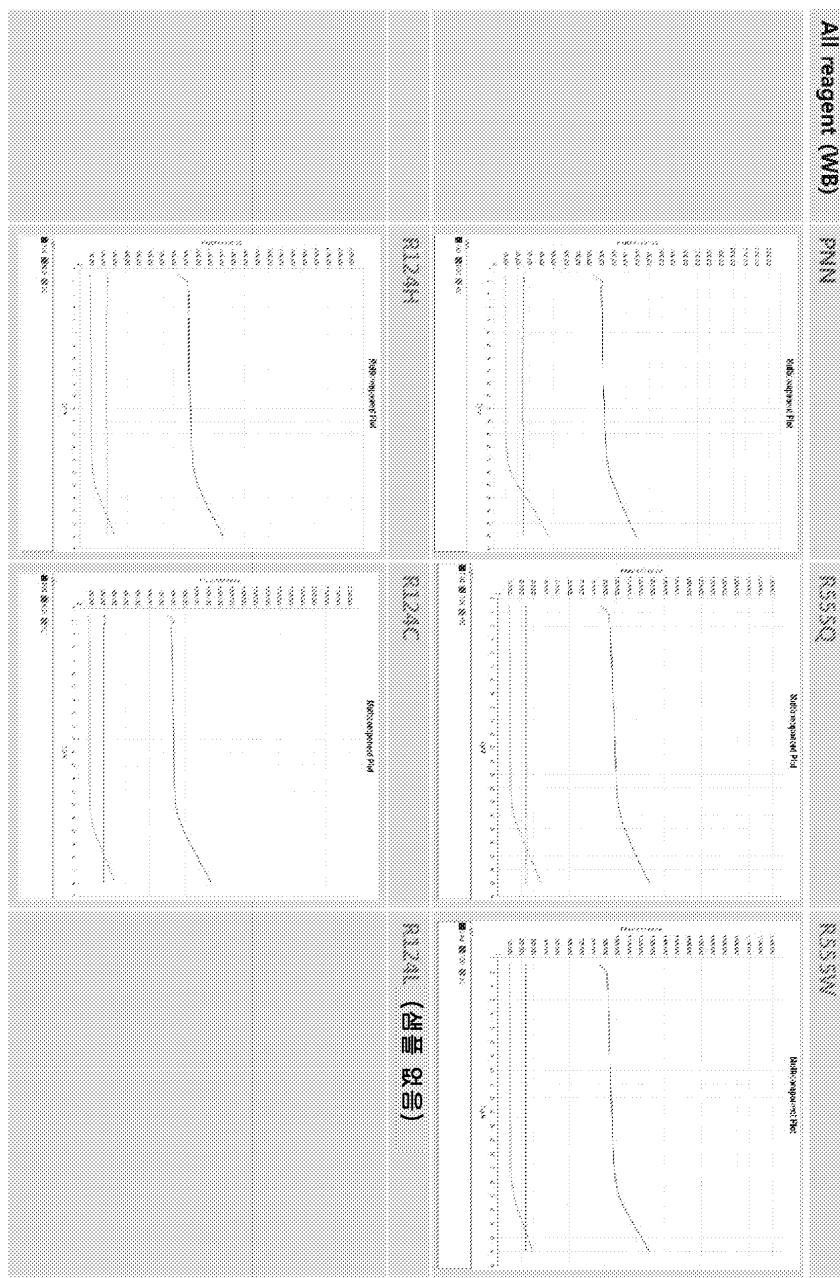
대립유전자 식별 플롯



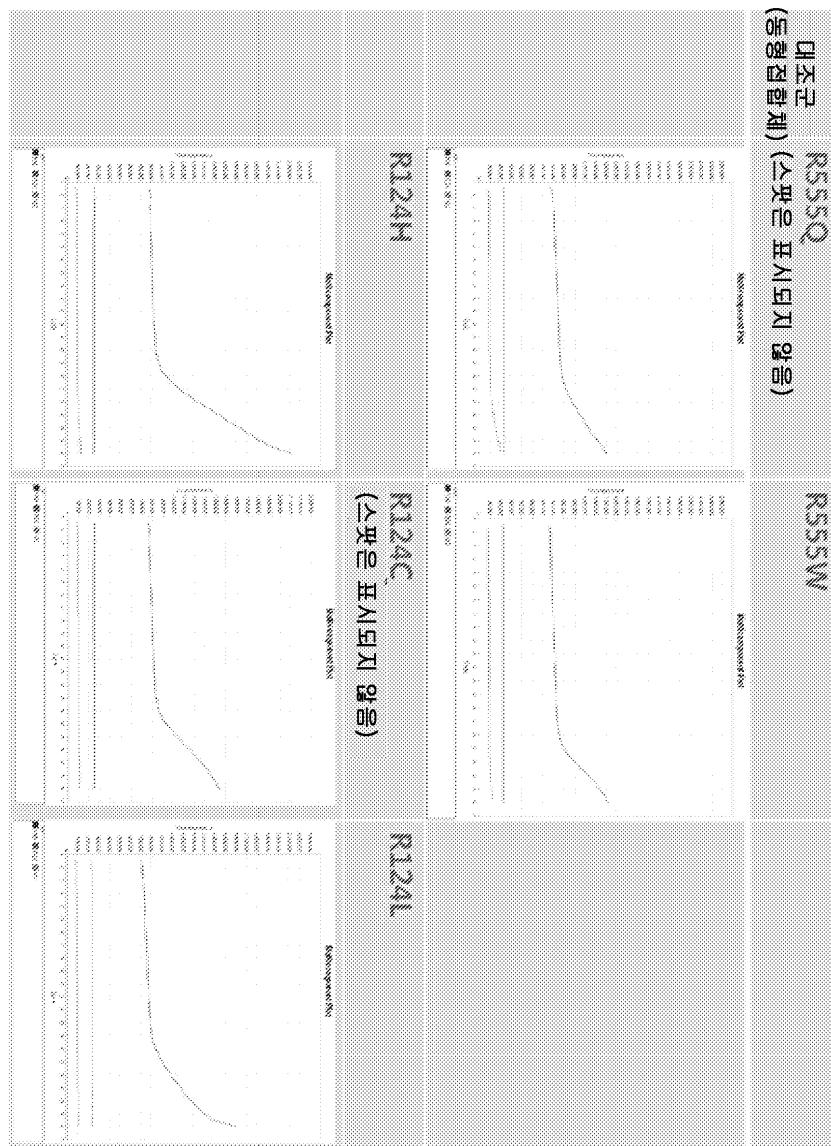
Reagent extract (㎕)	3.00 ㎕
GTx-프레스 태그	10.00 ㎕
프로토B(124R)	10pmol 0.50 ㎕
프로토B(124F)	10pmol 0.50 ㎕
프로토B(55SR)	10pmol 0.50 ㎕
프로토B(55SF)	10pmol 0.50 ㎕
프로브 (NLVIC)	10pmol 0.20 ㎕
프로브 (R124HF/FAM)	10pmol 0.40 ㎕
프로브 (R124CF/FAM)	10pmol 0.20 ㎕
프로브 (R124LF/FAM)	10pmol 0.60 ㎕
프로브 (R55N/VIC)	10pmol 0.20 ㎕
프로브 (R355Q-1FAM)	10pmol 0.20 ㎕
프로브 (R355W/FAM)	10pmol 0.20 ㎕
DW	3.00 ㎕

편집 전	유지 단계	사이클링 단계	판독 후
60°C 1min	95°C 20sec	98°C 3sec	64°C 30sec

도면5b

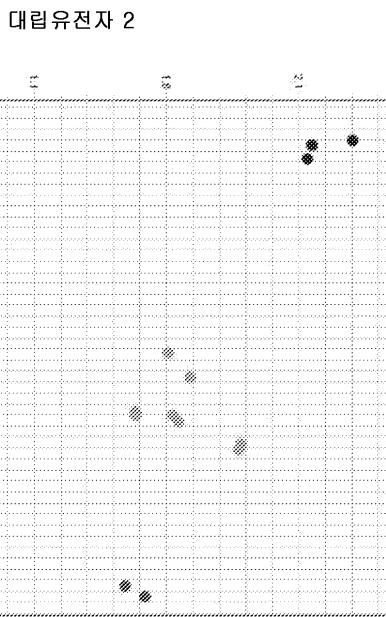


도면5c



DATA B >> LiteTech/7500FAST, 고속 모드

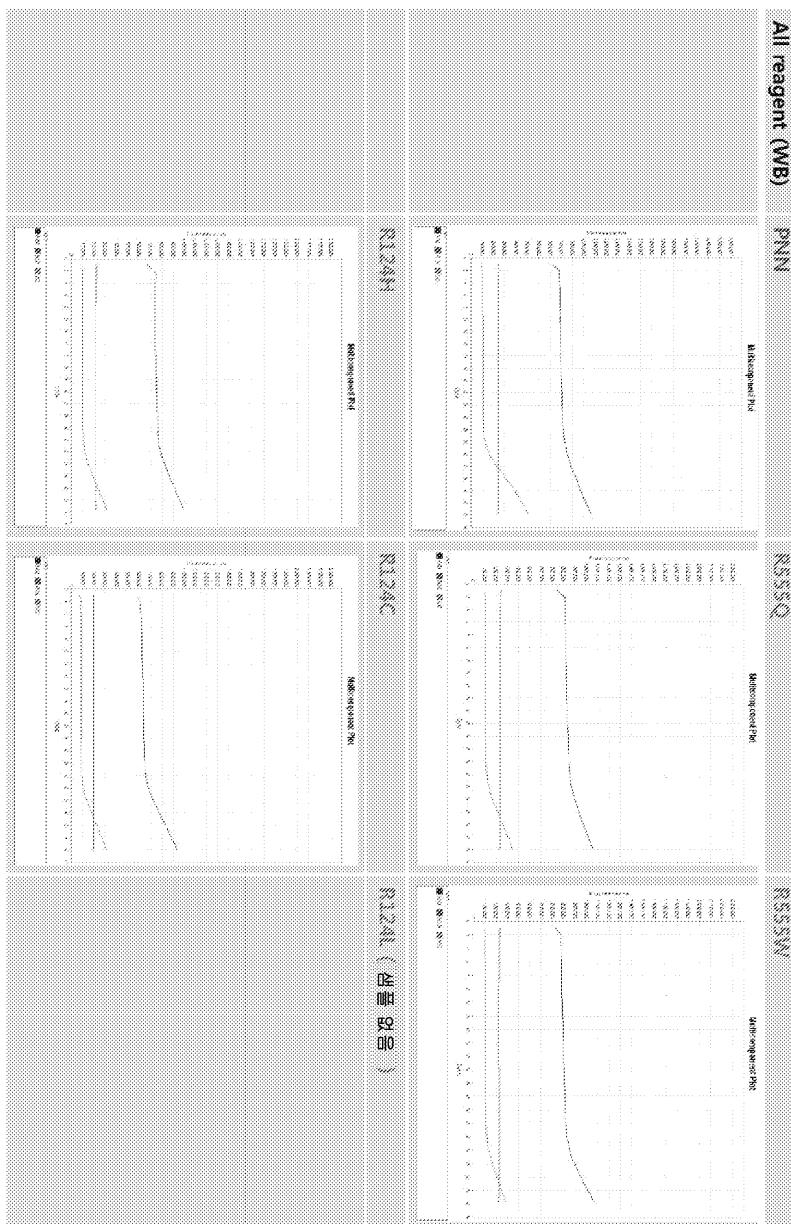
대립유전자 식별 플롯



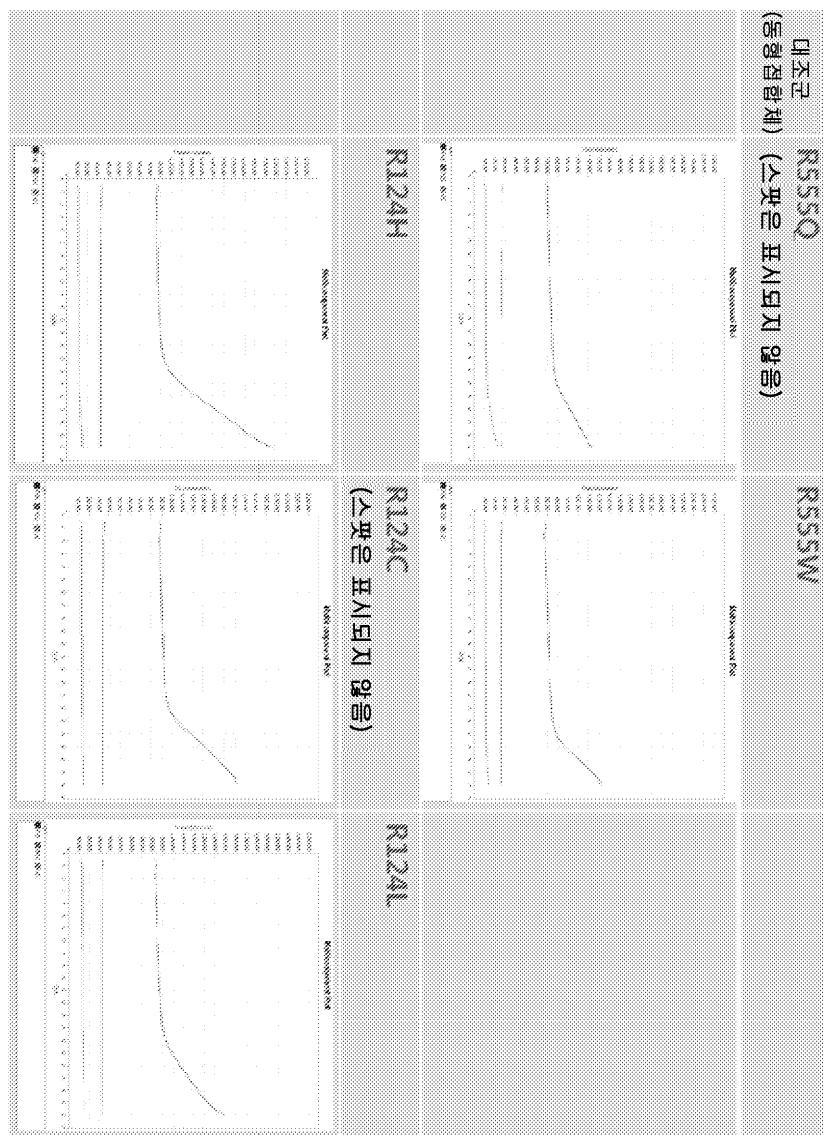
판독 전	유지 단계	시이클링 단계	판독 후
60°C	95°C	95°C	60°C
1min	20sec	3sec	30sec
			1min
DW			3.20 ul

도면6a

도면6b

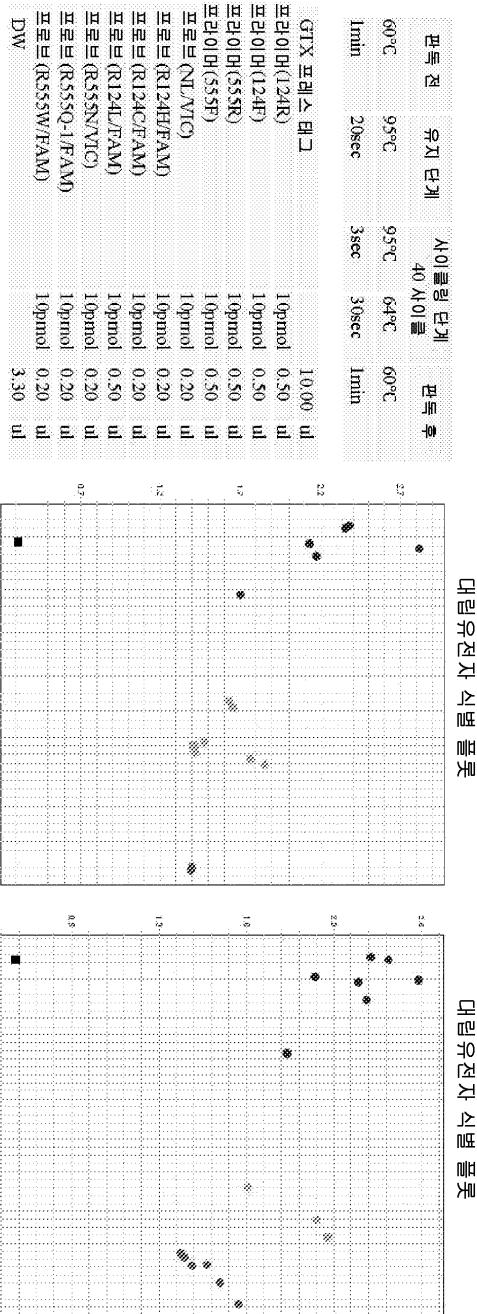


도면6c



도면7

DATA C >> LifeTech/7500FAST, 고속 모드



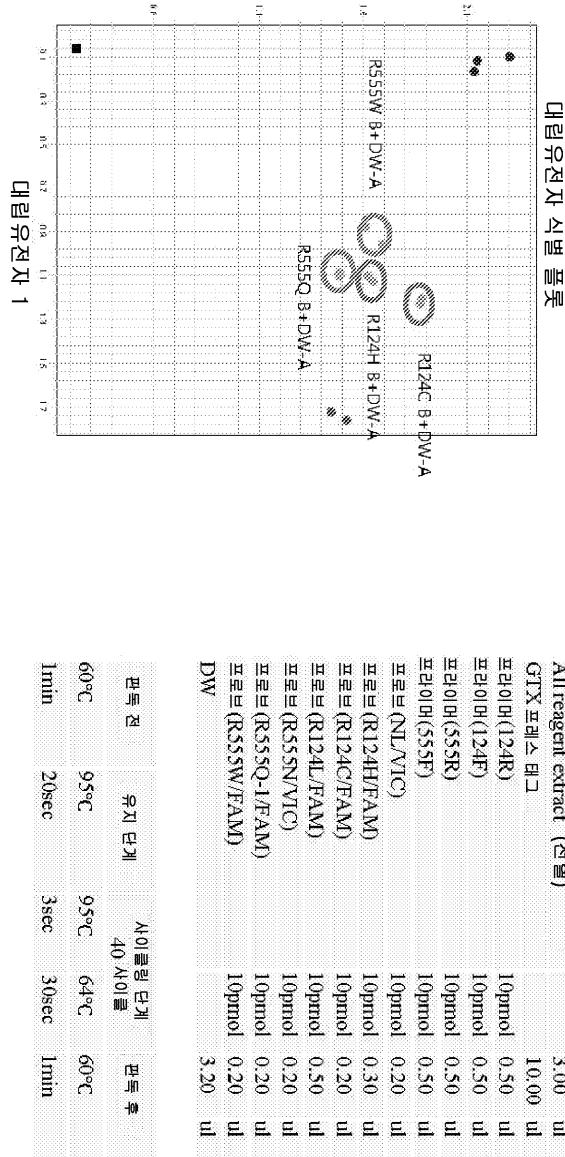
All reagent extract

OMEGA kit extract

도면8

DATA B >> LifeTech/7500FAST, 고속 모드

대립유전자 2



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Avellino Lab USA, Inc.

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

<130> 070335-5007-W0

<140> PCT/US14/65975

<141> 2014-11-17

<150> 61/905,051

<151> 2013-11-15

<160> 52

<170> Patentin version 3.2

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

tccaccacca ctcagctgta 20

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

ccatctcagg cctcagctt 19

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

tgcagcccta ccactctcaa 20

<210> 4

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

aggcctcggtt gctagg 16

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

tagtctctta ttctaataga 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

gctgcagact ctgtgtttaa 20

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

ccatccctcc ttctgtcttc tg 22

<210> 8

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

cggggccctc catctc 16

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

cagagaaggg agggtgtgggt t 21

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10
ggcgaaat ggtaaatc 19
<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 11
tcctcgatcttccacatgt a 21

<210> 12
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 12
agctggcaag gaggccc 17
<210> 13
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 13
tttgggtttt cccacatgc 19
<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 14
ggcagacgga ggtcatctca 20
<210> 15
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

gtagtaccgt gctctctg 18

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213>

Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

agttcccat aagaatcccc c 21

<210> 17

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 17

ggctggaccc ccagagg 17

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 18

accctcgaaa gaagtaagg 19

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 19

aaccttacg agaccctggg a 21

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

primer

<400> 20

gactccatc catcatgcc 20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 21

agtcggtggatccaccacca 20

<210> 22

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 22

gacgtcattt cctactgttt cagg 24

<210> 23

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 23

ccccccagaa acagcctg 18

<210> 24

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 24

ttcttaagggg ttaaggagaa agctt 25

<210> 25

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 25

cacggaccgc acgga 15

<210> 26

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 26

cacggaccac acgga 15

<210> 27

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 27

acacggaccg cacg 14

<210> 28

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 28

acacggacca cacg 14

<210> 29

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 29

tacacggacc gca 13

<210> 30
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 30

tacacggacc aca 13

<210> 31

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 31

ctgtacacgg accgcacg 18

<210> 32

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 32

ctgtacacgg accacacg 18

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 33

ctgtacacgg accgcacgga g 21

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 34

ctgtacacgg accacacgga g 21

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 35

gctgtacacg gaccgcacgg agaa 24

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 36

gctgtacacg gaccacacgg agaa 24

<210> 37

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 37

accgcacgga gaagc 15

<210> 38

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 38

accacacgga gaagc 15

<210> 39

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 39

accgcacgga gaagctgagg c 21

<210> 40

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 40

accacacgga gaagctgagg c 21

<210> 41

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 41

accgcacgga gaagctgagg cctg 24

<210> 42

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 42

accacacgga gaagctgagg cctg 24

<210> 43

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 43

acacagtctt tgctccacaa 22

<210> 44

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

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

<213> Artificial Sequence

<220><223> #TGFBI R124L

<400> 49

cacggacctc acgga 15

<210> 50

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> #TGFBI R555Q-1

<400> 50

accaagagaa cagag 15

<210> 51

<211> 34810

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gene sequence

<400> 51

gcttgcctgt cggcgcttag ctgcgtcggt ggcgcgtgtc ccgcgtccatg ggcgtcttcg	60
tgcggctgct ggctctcgcc ctggctctgg ccctggggcc cggcgccgacc ctggcggtc	120
ccgccaagtc gcccattaccag ctgggtgtgc agcacagcag gtcgggggc cggcagcagc	180
ggtaagccga gcccctggc caggggtgtc ggaagggtcag gtagtcgggg ctggagcgc	240
aagccgctgg gggcattgaa ctgggctggg ggcgcagggg acaaagcccg aactaaaaac	300
cttgcatggat ggagcgctcg gacaccagcc ctgcacgcgg tggaaaggaga gagggaggga	360

ggtgaggac catggaggga aagcggagg ccggcgttt gtagaaggga gtggggaaat	420
ggaccagaga ctgcgacgc aggccaagag cctgagacgg acagcgctt cagcttc	480
tcccgccac tgcagaaagg gggaaatggc aactcttgg ccataatcac cgtggggagg	540
tgcggccacc aaagcccacc cagcgtaca cctattccaa cccagccagg ccccccggcca	600
gcaactccag acaagaacct gggccacaca cgggtggcagc atctaagggtg ccccaaggctc	660
ctgtgctctt ggcggccccc tgcactcaga cactgctggc acccgacact gctctctggg	720
tacagcaagg gcaatgtggc acttcttgc ctgcccgtg aagagcagga gaatgcactg	780

ggccctcaca cacactgttc aaatggggaa actgagtctt gatgtggttcc acttcccac	840
agtccctgaag tgtgcactgg agccaggatt ggagtctgtc ttaaagtaat agctggttt	900

gtaaatgtag gacactatca ttgcaggaat tccttgaga ccctgaagat gtgtggctt	960
taggagacaa actcaagcag aaggctgtt ctgatagttt ccctaatact gaccaggca	1020
gaggcaggca acatttctac ctcaaaaacc aggcatacc tgcgtcacaa ataccaggc	1080
tttgcgtcag ctccagctt acctgttgc accaacttct tttcataac tagttaaaac	1140
tatatatgag tagaatctt tagtgactcc tcagaggaag cctaaatacc atcgggtct	1200
ggcgttcaca cccacaagca atgcccacac ctccaagaga ctggcagat ctgtgctcaa	1260
atcaaaaactc attgttgggg gtgatagatg tgacttcaca ggcctgaaa gtctggctc	1320
cttgcactag gagtgctctg ggtacggta caggctgccc cttgttaggc atagttgctc	1380
ttgttccctc tacttgtgc ttatggctt aggccttca ggagtttggg gctctgggg	1440
agagggcctg ctgggagcac atctggccac cctgcagagt gaaatcaaac caggctggc	1500
tgcaacctca acaccctctt ggaaagagga gaatactggg gatatcctgg ggtcttctg	1560
gaagtgggag aatcagctt gacttggca gtgtgcagaa tagagtgagg gggatgtca	1620
gaaagatgag agggatatga ggcctcaaca tcaaaatgca agcacctggc attttatta	1680
tctctgcca cctctccgtt ggtctctgt ctttcctgc caatgaattt tgttatgttt	1740
gggtgcctca atttgcttag gagggttcta ttcttctgt atttcgcca ctaagtcagg	1800
agaagatcct tatagcatgc cctgcaacag tgcacctgt aaggcatct ctctgcacag	1860
ccacagtgaa ggatcctcaa aggtatttag ggcttccat caagagccat cttacagca	1920
aaccttttc cttcagagc ccagaagagt gctgaccagc tggaaaacag gtttttttc	1980
ttaaatgcag atgccttga ttatgagttc cagatattttag atcaacttcc ccaccatacc	2040
cctgcaggca aagccttta attagcttcc tgcagcacag ctggaaaggc ctattgtat	2100
ctgtgatggg cagagtaatc taagaagtca caggagcaccc cctgtcccg tagaatctgg	2160
atgcgcaggc acatgaacca tggcaaaatg gttgcaggca cagttgtatt tactctgtatc	2220
taactgtccc tggtaatgcc acagggctgc ctggcctggc acacaggct gtggccctt	2280
gtgcaaattgg ataacgttgt tctagctca gccttcatt caaagtggaa actgttagaa	2340
aggaaaggaa aactttgcta tttaaggaa ttgttagcgtt ctgcctgata tgaaggaaga	2400
aataacagct gtgccttgc tgcgcagc actcgattgc cgctttgtt ttcgacccatca	2460
ccacaacaca gtgagatcta ctgttcatgt tcccatatc caggaggta aactgcagct	2520
tagtgaggtt gagagtgtact tagttcagac acagaatgtt gttggagag taataactat	2580
gatatggctt ctgtactccc agcttatatct gtgttgcatt agggaaaggaa aaaaataata	2640
ctgaaagaga agtaaaaata caatcacact tccaaacatc aaccaccaaa aactgaactg	2700
aatttcctga agcacttggt ttcaaatct aagctgaaca tcaatgtgt tatttttgag	2760

gcccagaagc aacttgctca tttcaattaa gcttcagcat gaacttccta tgtacacagc	2820
ccacccacac tccccatgt gagaaggaga gggcacagc cgcccccagc ctctgctgct	2880
gccacaagga cagcagcagt gaaacattc agcaaaggaa tggagcc acatccacaa	2940
gagactcact gaagattcgc caaacgccta cgaaagtgg cagggattc attgacagta	3000
atttttcct gcttgcattc attgaagac ttctggatt ctgtacaat aaataggacc	3060
ggggcgtgga gtatggccag caaggactt tcaggggtt ttcaggact gtctaacctg	3120
tgaatccat gcagcaaaca gaaaccagg attcagaaat ctggaggatt tggcaggcc	3180
cagctaggac tagggaggca tggcctctg ctggctgtt tcccttctcc agccttact	3240
tctcttgtcc ctatgcctt acatggattc attaigtctc attgtccctc ctggccac	3300
tcactttcac ctgttgaaca aaaaactggc caagaggta cagtcatac accgcagaag	3360
agacagggca gagaatgaa gggcagaat ggactcccac cccaaagcct gactctgaat	3420
atttgagaat tttcaagtt cctgcagagg aatcatgtt gggacagtag gtgttagttt	3480
tactgcaata ttgggtctt ctttacaaat acgctgcaca tcaagtgtt tctgtggat	3540
gcattcttaa agtaacaggg aaattgtt taaagaata cttcatcct tgggtgatac	3600
ctgaagttct ctgagcttgg aggtcttgc aaagccctca gtatttttgc ttttatttgc	3660
tttccctctga ctgtgattc agtcagatgc atgcctgc ctggctcagg aagatcaacc	3720
ctctccgtac tgaccacgcc tctccgtact gaccacgtt cacagcagct tccttcct	3780
agggcctt aatgaagctt tcacaatcac ctggcctgag cacagttgg gtcaggactt	3840
ggtatacttgg aaaaaacat gcaaaaccaa aatccgtgg ttctggaaaa ggcttcttag	3900
cagaaccccc agacatttac actctgtttt ttcacagggt ccctgaggat tcttggatc	3960
tggtagttt gggagcagt atttcaaca agtttatttc gtgtccttc tacaccctgc	4020
ctggatgcta gccccatct agaatgtgaa caacagaaca aggcagaaca cttgtccatca	4080
agttctgtt gagttttaga tgcagagaag agacaccccc cacccccc catcaattac	4140
aggaattctg ttggaaaccc aacatcaaattt aaggacgtt tccactgtca gaggatggga	4200
agcagcatgt catctggac attggagaaa ggctcctgg ggaagtggga cttgagctgt	4260
gatctaagta atgaacaact gagagtttttggagagca tccctatca gggcctgag	4320
agcaaccaggc catggttaa accagctata aagcctcggg ttataggat agacagtaac	4380
aatggcttgtt ctttggagc caagcagctg gtccaggat gcagagcatg tctgtatgga	4440
gagctgcctg agagatgctt ttgtttacac ttatcaatttgc cccatgtcaa agaaggat	4500

gtacatgaag ttacatcagt atgtaagaga gatTTTAACA atTTTgcag ggaaagctt	4560
catggggct gatggaaatc tagtaaaca gaaccaaagt ctaaacccaa gatatccca	4620
gtaccaagac taaaatgact ctctcctcta tctctagaaa gttccagtga cccaggagg	4680
caaacacgt gggagtcatt aaagtgggt ggacgtgctg atcatcttc taattctgt	4740
gctttgtt tcagcccaa cgtgtgtct gtgcagaagg ttattggcac taatggaaag	4800
tacttacca actgcaagca gtggtaacca aggaaaatct gtggcaaatc aacgtgagta	4860
tctgttaacca gccaggagac caagctgtat gcacgctggc tgcagttccc cagggctgg	4920
gccagccttc tagaaggtca ggttgcctaa aaagccatga agatgcatgt gcgaacatgt	4980
ctgggacctg cgtgttaggg agtggcattt ttaggaagct ggccatTTT gtttgcatt	5040
tttaaggctg ctgacaagac ttggagacat tttcagggc tgggggtt ttgcaagaaa	5100
catgaaacac tgcgtgtgt tgcgtgtgt tgcgttctc aatcctcata aaataataca	5160
gatatgcagt ggagaagcca ccagcatgtg actctggaaa agaaagccca ttggtaatc	5220
tgtactaaag aatgccatcc ctatttaca gtcctaaggt aaacacccca aaaagactta	5280
gagcactaaa catatgcaga ttatgagaca gcatagcata taatattgc acagacttcc	5340
tcatcaaac cctagctcta cctggccag tcgattcatc tttagaacc tccattgttt	5400
tacctgaaaa gttcgatataa caaaaggacc caccttatgg gtttgtaca aggattgaat	5460
gaaataatgt acataagaga ctgaatatgg tgcccgat atatcagtgc tcaataatgt	5520
ctagctacta ttattttat caccctagat ttgcaaatct agaccacaca agcagaagta	5580
agagtgccaa cgggggtgtgg accagtgtgg ttacaatagg gttgtgtat gtctgttca	5640
gcaaggaggg aggcagctt taccctactg cccagctccc tggtggaaatc aggtgcgt	5700
tctaacaatt ctggggaaac ctaatctgtt ttggcactgt caacagatct caaagctggc	5760
tgtctcctat agcttaggaag atgtgtatga caaatctcct gagccacttg tgaaggcctg	5820
actttcctcc tgtctccata cataatggga tgattaagaa actctaagcc actctttaa	5880
gcactttca atgttaggaa ttttaagtt tattgtgtg acattgttt tgagcagaca	5940
tctcctccaa tttaatagcc aactgaaaga agagaaaatg ctcttcctt aaactgtatg	6000
tggaaataaa tattccaatg tgtgaccctg attatgttag gcaatttagca atcctaataat	6060
gaattgaggg aagttggat tcatggcaca gctggggaga taccagcagt ccctgggagc	6120
ctgtccaggg caggtccatg gcagctgtc ccatgcctga ttgacagccc agcctgcaag	6180
ctaaaagttg agtgagctag gaggacacac tgccaagatt cagctaacag acacccagcg	6240

atattcttc tgctatgaac aaaaggagac tatgcaaatt atacaccacc cattttcca	6300
ggatgcctga cttaaaaaat aagaaaaaaat atggccggg cacagtggct cacgcctgt	6360
atcccaacac ttgggaggc cgaggtggc ggatcacaag gtcaggagac agagaccatc	6420
ctggctaca tggtaaaacc cctctctac taaaaaaaata caaaaatatt agcggcgt	6480
gtggcggca cctgttagtcc cagctactcg ggaggctgag gcaggagaat ggcgtgaacc	6540
tggaggcgg agcttgcagt gagccaagat cgtccactg cagtccagcc tgggtgacag	6600
agtgagacac cgtctcaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaagaaaaaaa gaaaacctt agtactgatt	6660
gatttttcc catgtgtgta tattatctac tcaaattaac aattaattac ttaattaaac	6720
acaaggccag gcctcaccta attgcttctt ggaagggtgac cagagtgtca gtgcacaa	6780
aacaactctt ctatatctca agagccctgg gcttcagagg gccatcttt ttgttaattc	6840
aagtttctt gaaaatggag acccgtttat gatgacaagc tggctacagg gtagcatcg	6900
ccacactgtt tcgggggtgc cgctggctg aagcattgc ccagctagtt aacaatagct	6960
cgataacatt ccctatcagt gtccaggctg agaatactgt cagtgtatgat tcgccttggc	7020
tcttgtaacct gtagttttgt gtgcaggac aaggcacaag caacagagct gtgtgttgc	7080
aaaatgttcc ttagtggcgg gtcacccct cggggcagg tttggatatg ataatgtgg	7140
gatgtggtgg cgccgcctcc ttacccagtg agcacaaggg gagtcctcta ggaaaaggaa	7200
gaaatgtctg gatgaggtgg ggagatgggg ttcagagtgg actcaggcaa agcccgatgc	7260
ccagttccag ctgttgcct agtctcacaa agccagaagg atatgacatt tacattcaac	7320
tcttgaattt gtggccactg ctttggcaa cttcaaagag agaaaatgaa gatagaaaaaa	7380
tattatttga tataaaactt cttaggacaag agaggccctt cctggaaacat tacatgtgt	7440
attaggaagg tggagctgcc ctggaaaaga tccagagaac tcagagagag gaagagggtgg	7500
aaccatctc tttttgtt gaggactcag taagagtggc ttggcaggc tcctgtgtac	7560
ctgagaccaa gaccaggatg gaggctactg tctgaccacc atacggctc aattcagtgc	7620
catgggttgt caggtggaa ggggagagga ctgtgtggc tggagtgtat gttatctgg	7680
ggaaagttagg tccctagatg ctttagttt agtggggc agactggaa atggggcac	7740
agttagtggtt gggcaaaaaa ggactgtctc tgcatgaggt ccataggcag ttggaaattt	7800
ctcagcaaga ctccagagaa ggaggctggc gcagagggtgt atgttggat gaaaaggagt	7860
aaagtagatcat gggggaggag gcagactcagg ttgtcaaggg tcaagaaacc agaaggagaa	7920
tttacacccatgg gaaggcagaca acgggtacca agcatacagg ggaataactt gtgggtgagag	7980
gtcacacaga gatacaggag ccgacactgtt gagacaggag cctggagcc cctgcctgt	8040
tttgtgaggc cccagactcc actgctatca tcaggtgaag ctctgttgc tgcacacaaa	8100

agctttctg cattacaaa gagagaaggg cctgagttc tggcaatg cgtcaagctg	8160
acatatggac ttatattacag gaagtggta ccagtggtc cctatttagt ggctgttatt	8220
gtgaattta ttgtcgaa attcactta gcatttattt cagatcctaa atagcaccgg	8280
agtatacaa tggtaatca aacaaagagg gctgtggga gcagacagtc agcatcccc	8340
tctgtgattt caggccctgg tttgattgt agccataaaa tttttacgt gtggcactt	8400
gagcaaagggt gcaggaaatt gtggtcagga agcctggctg cctctcgaca ggcttcctt	8460
gtgctagccc cagggagagg aggcctattt aacagccaag tccaagttga catcatggga	8520
ctggaatagt catagcagga gctcagacat cataaacgtg gcatagggag ggctgggtgaa	8580
ggagctagcg ggtatgggtg gcagctattt attccaaag tcttggaaatt gtttacgag	8640
caacacattt cacaagtgcg aagcccttct ctggagccaa gatgagctgg cagagcactc	8700
ctgtttctct agtagcaagt gttccttgc ccagggccaa aaatattaat actccttcag	8760
cactgcatta atgcttaaag atttaactt taaagagatc agctggtgca tggcagact	8820
tttccatcag ctggcaggc tttttagta ggtgccttc tggcaggc actgggaca	8880
gctgacgtga aggtgaagaa gagctgtcgt tttcccttct tatatccac aaccttggtc	8940
ccaagaggaa aaaaaagaag atggtgagaa gtcatccaag cagacccag acccatacta	9000
gtgcctcctt tcctgttca tatccctgtc cagccagctg ggatctttg aataatctgc	9060
tctggggca ctgagattgg acatacacca aacagcggag atcgacccaa cgcctctgtt	9120
ggcagtgtt tcctgagggt tctgtccat tctgtaaact aggaggctga ctgcgtaca	9180
aggaatttttta ttctgttggg tatttacatg aacctatgtc ccacctgggg taagaccctg	9240
tggtaggtaaacatgact tcccaaaaat gtccacatcc taatctctaa ttctgttaat	9300
atattccctt actggaaaaa gagactttgc aggtgtgatt aaattaagga tcataagagg	9360
gagagattt ccaggattat ttgatgagtc taatataatc atcagggtac taaaagagg	9420
gaggcaggct gtgcctgggt gttcacgcct ttaatccag cactttggga gactgaggcg	9480
agcgggtcac gaggcagga gttggagacc agcctgacca acatggtaa actccccctc	9540
tagtaaaaaaa aaaaatacaa aaat tagcca ggcattggg tacacacctg taatccagc	9600
tactcaggag gctgaggcgg gagaatttgc tgaacccagg aggcagagg tttgtgtgagc	9660
tgagatgcac ccactgcctt ccagcctggg caacagagca agactccatc tcaaaaaaaa	9720
aaaaagaggg aggcagtggg atcagagtca gagaaggca cgtgatgtaaagctgaca	9780
ttttagtgcata gcaaccacaa gccaaggaat gcaggcagct tctcaagatggaaaggacg	9840
agcaatggat tctccctac agcctctgtc aggaatgcag ctttgattt taacccata	9900
aggccgattt ctgactctag cctctgaaat tgtaagataa tttgcattgt ctcaagccac	9960

taaatttgt gtaattgtc acagaaagca atggaaagcc aacacaggcc ttatttgtt	10020
acttatagat gcattttct ttatttcaat gtactttat caatggctc atgtaggta	10080
ttgcattcaa tgaagatatt aacatagttt caacttaag gttatatct ggagttctt	10140
tagaagcttc acaactgacc acttagtaaa cagtaagcat ctgttaagt cttctcatat	10200
gtaagttcat tcaattctca caatcacact ataagataaa tatgattatt agccattta	10260
cagatgagga gacaggctca aaagactttt atgcaacctg gtcaaagtca ttcactggta	10320
agctgaggag gtctgtccac tccctttgc tgccccagg gggtatcaag cctggcagtt	10380
agtgtcagcg acttaggagg tgaacaagtg agcaggcctg taggacctgg ctaaactgcc	10440
ccaggtctct gtctacagcc tcaaacctgt ggctgtgggt cccagagaca aggccctctc	10500
agcatcagag aaggatgcct ttgtctcagg gtcatcaacc ttctccaggt tgctcacccc	10560
ctgctgtaaa gggatcccc aagaccgctc atcagacaag gagcttggaa actgaggaga	10620
cacagtcagc ctccaggagt gcccaaatacg ccctcacatg ctgcatacag attgccacaa	10680
ataaagtaca tccacattct gaagactctg tcctcatcac caaccaggct gccccctgg	10740
gagggctgta gtgggtgagg ctttgggg tagacagtag gttaagcaa gccatgattt	10800
tctattggga ggcttcagaa tcaagtcagc tgtgtttcca agaccaggag ggcagaaagc	10860
aaaccatccc aggcaagcag tccatggcc atgtcagatg tctagacgtt atgggtctgt	10920
gtttgctctg ccattcctct cggaaactat gatgccctgt atggtttacc ttcatcaca	10980
ggtgactggc ctacagggcc attccttgc ccaacgactt ctgcgtata attaatcccc	11040
aggcatttac gccagagca gccggccaaa tccgtgaagt gcagtgggtt tttaaattt	11100
tattaaactt ttggaaactt attttaggaa gagaaaactc agtacttctc tctatccat	11160
cttgagtaaa aatgttagaa gggactgggt gagagcctcc cagacatccc tacacataga	11220
cttgggttg acattatctc tttgcacctt ccttggaaact ttcttctaaa ttaggtgcct	11280
tccctaattt aggcaccttc ccagactactag tctgtgaccc gtttaggaacc aggccacaca	11340
gcaggagttt agtggcagggt agtggcattt attgcctgag ctccgcctcc tgtcagatca	11400
gcagtgccat tagattctca tagcagtccg aatactattt tgaactgtgc gtgtaaaggaa	11460
tctagcttgt gcattcctta tgagaatcta atgcccgtat gtctgagatg gaagagttt	11520
ataccaaaac cacccttcc ccctggccacc atctggggaa atattgtcta ccacgaaact	11580
gatccctggc gccaaaagg ttggggaccc ctgtcttaag ggtatctgc ttctgaccc	11640
gagggttttc ttatttagac tgtatctggc tgaggagaag cctgaagcct ttaatcgaa	11700

cagctttggc tcatgagatt agattcagaa accaacagat tggctttc tatgcaggga	11760
agccttagaa ctggggggct atggctggga agccccat tggccatc cttcctatg	11820
ttcatcctgg aggaatggca tcagacccat gcctctgtga ttgctccag cccatccaac	11880
cacagcatct atgtctgcc tggaccagg gccaggagc atggcacact gagctgagta	11940
taaggagagt ggagcaggcc actgccagcc cagaaaattt tggtcaaagt tgccctgaaat	12000
cttcctagcc ttcgattcac agctgctctc tgctgcttg gggccatgca gaccagtca	12060
gaaaagagtt aatttggg ggcagttgga ggcaggtgga ctgccagctt tgacaccc	12120
ccagccccaca ggctgctgca ctggggctga aggctggct aaccctgca cacctagaga	12180
gtgacagaga tgccagactg ggcagcagga aggcaagagg attaagagag agcttc	12240
ctgaaagcca cactcggtta accaggaaaa agcccttggc acgagaagac tcagtggct	12300
gagggactga gccttgggtt ttgggcatgt gctgcataag ccatccatgt gtgacagtag	12360
agtgtatgcc accactgtg ggacatgggt gctgaaagac cacatggaga ggaacagtga	12420
tgctgacaa gggctagcct tgcactttt ggagacaccc cctgtgtctt ctatgtca	12480
gactttccaa atctgtctgc tattctccaa acgtgcattt tcaagagcaa tgaaaaagg	12540
attggacttg atggaatgca gcaagagtcc taggtctgtt actacctacc tatgaccta	12600
agaaactcct tcacccctca gaacccttac agcttctt ctgattctat cctgagttac	12660
tctactccaa gctgagactt ttctgcttag atctatccct tccctctaaa cccccaac	12720
ccattctcc tgggtgtctt ctttacacac ccctcagcat acacacacac ctggccacag	12780
gaaccaatga gttaatattt gaggagttgg ttttcttttgc tcccaatga gatccgttg	12840
aggccacttg agctgttcag ctcccttgcg gtatttggg gatggaactc agaagccaac	12900
aatatagaaa aagagtcttt ggccagctt cccagggct ccatgccata gagagtactg	12960
caccctgtg cacagggggc cctgacatga ggactttgag gataacacta ttcctccaa	13020
tctgcttcag catctccatg gatttcaca cagacactt agaaagaaaa ctaagttgg	13080
ggggacttga cctaatccca catcacagcc ccagtaatac agccctggaa ttatcacag	13140
aaagcctaga atcccatgca tatcccatgc atatgcattc ctgtcctat gggttcaagg	13200
cttggagctc tccctggatt tagctggaa aagttggcag acagttttc tctgtttct	13260
agaaatatgg actagaatcg ttagtgttagt attgcaagta actttaaaa tcatctagtt	13320
taacttccacc ccatttcata gaccaagaaa ctgagaccag agagagaaat ggacttcaa	13380
gttcaccctg ctatgtactg atggatcaca agtcaaatct cctgattcta gcactgttc	13440
tcttacacca caccacccctt gaaagtgtgt caatcaaatc ttacttttagt tgccagaggat	13500
gacttttagtt tctgaagata aaattgttagt tcaatcaaga tgagtccaa gacaatagcc	13560

tgttagccc ttataagttc agggatgaaa ggtagaaag aaacaggatg gaaggaggac	13620
tggagaaaaa aacaaaagag gaaggaagga ggaggaagca aacagaaaaaaa aaaaagaatg	13680
tgcatacgctt gtcactcctc agtcattcc tggagccca ttctagcaa agtgcacagct	13740
gcaactccct gcccacctga gcatcttagc tgatctgtct ctgaaacacc ccctggagaa	13800
cagatgaatc aggttcatc ttgcgttaac taagtcttcc ctgagacgac tccattnaa	13860
tgaacaagag caggattcc tggcacact gagagcacct tccagaggcc cctccagagc	13920
cctaaagcct gtatttcttc cagtcggcct gtttcttcc tggtgatgtc attaaacgcc	13980
cttgagagt cccacagtga gcagttctgc ggtaaaaccc gctgcaatta aagtcgtgat	14040
ccttcgtt ctcaaggcct atattcatat agaagaagg aaaaggaagg actggctgtt	14100
tgcatttgtt tccaggcctg ttgagtagag gtcgtgctca ctccaccgaa ggtacagggt	14160
agccttcagc agaacctggg gatttggtt taagcaagtc ttcttaggt gtggcttc	14220
agaacacttc ctcccttgca atattatttgc aaattctcag tgttttagcc gtccccagaa	14280
tattggttcg ttaaagctgt gtatttcaga tctccagaca gtggtaactg tttgtatatt	14340
ttcaatttca aaccagaaaa caaaagtct tattgattac ttttttatt taaaaataaa	14400
aaagtaagta tcttcgtaag aggagcttg tttaatttt aaagttaaa atttgattgt	14460
gaagacagag aaaaacttga tgattgtaga tatattcccc tcttggtca ttcaatcaga	14520
gaactagaaa atcatgagag attaatgac cactgcctga tacacatatg tgtttacag	14580
atgagggaaac tgagacccag agagatgtaa aattggctg aggatggccc agctggcag	14640
tgaaagactc agagccagag ctggtgccagg gctctttcta ttcccttcgt ttcccttca	14700
ggaacactca ccatcggtt tcctgtgaat aatgttgaga taaaatcctt ggtgcattat	14760
gtttcttagt cacaacatttgc actaggctgc cagagtcctc ttttccca gttgggtggc	14820
tgttaggtttt ggcagccgcc aggagcattc tacagaacag aggaggagtg agactctcct	14880
tgctcaggaa aggagacact atgacttagc aaataactcc taagaggaga gtgttccacc	14940
caccattctt ctcccttggc tggaggca acttagtgaa gagggccag atgacctgt	15000
aggAACAGTG aagccctgccc taacacaatg tatgggtgtc ttgttacaga gtcacatcgt	15060
acgagtgcgtc tcctggatataaaaagggtcc ctggggagaa gggctgtccca gcagggtaaat	15120
gaatccctcg ggccttcgtt gttgggtgg gtggaaaggaa atgggtggag agaggagttac	15180
ccacataaaaaa ggcagcagag tgtgaatggg ggcagtggca caaggacatg gcattctccc	15240
cacgtgcctca ctggcccccag gctctatgcg aggggtgag gaatggaaagc tggaaacagc	15300
gcatttcgtt agctgcctt cctggcctcc ttaccacact ggtggagtag actccaaatgc	15360
tggcctgtcc atgccttcc cagcaggcac aggctcaggc tcaggctt ggcctctgccc	15420

tctggctggg agtGattcta aacacatcca gcagggtcag cctgatagcc catcagttc	15480
cgatcagctc tgctagagag ccgatggat gtgggaggag ggggtcactg gtgggctggc	15540
aaccccaagc catccccatc tccctctgtc tctaaacttg gcccttgga gttcggtagg	15600
gagaagagcc ataggccagg tgggctcacc cagagtca gagaagtc acaaatggtt	15660
gcactggcg aaagacagca tggcacctgt gaattttt agagctttc tttagtgc	15720
acacacaagt gactgtacag gggagttgtt atttgtttt aattttgaaa tagagtcatc	15780
ttttggtatac tgcggggat tgattctagg acccattcta ggatgccata tcctcagatg	15840
ttcaagtccc tgatataaag tggatagta ttgcatgta atctatgcat attcttccat	15900
gtacttaaa tcatctcaag attacttata ataccaaata taatgtaaat cctatgtaa	15960
tagttttat accctttttt aaattttgtt attatctttt attgtatttc aaaaaatatt	16020
tttggtccat gtttagttga atctgtgggt gaagaaccca cagatacgaa gggccaactg	16080
tattggctat ttttttagttt aagaatgtga gactgaggcc aggccgactg gctcatgc	16140
ttgattccag cacttggga gcccaagagg ggacgatcac ctgagccaag aattcgagac	16200
cagcagcccg tgcaacatag tgagaccttg tctcttaaag attgtgagac tgggctggc	16260
acggtggtc acgcctgtaa tcctagcact ttgggaggcc aaggcaggtg gatcaactga	16320
ggtcaggagt tttagatcag cctggctaac atagtgaaac tctgtctcta ctaaaaatac	16380
aaaaaaatata gctgggtgtg gtggtggcg cctataatcc cagctactca ggaggctgag	16440
gcaggagaat cgcttgtatc caggaggcg agggtgcagt gagctgagat agggccgttg	16500
cactccagcc tggcaagaa gagcaaaact ccatactaaa aataaataaaa taaataata	16560
aataaatcat gagactgaga cataacagga aggaggcaaa ttgggttggt tccaaggttc	16620
ctagagtatg ttagggaga ggttggtgcg ggtggggcca tggaggtact gactcaagt	16680
gagggacagg tggggaaatg ggatggaaa agaagattga ctttagaagg ggagctcaac	16740
ctctgaaccc taattcaga cccttcaaaa tgaatattaa gtcatttg gtctaagaaa	16800
caaaaaacaa atgaacatga aactcattt ggtcttataa ggtctgagaa acccattcta	16860
aacttcaagc tgcttaaga aataacattt tattacctgc aaatacacac agtactttgg	16920
agatttataa tagtcttta ttctaataga agccattagg gaaccagttt caataaacag	16980
gtaaatctgt aagacttagtt tgtaattagg atatctgtt ccagtgtcca ttccctgc	17040
tgttatctaa atgtctggga acaagagctg tgctctgcg tggtaaaat gattaaaaat	17100
caccaattag ttgagttcac gtagacagggc atttgactt ttgagttgtt ttaagaagac	17160

tataacaagc cttaaagcccc ccagaaacag cctgttttg ggctttcca catgcctcct	17220
cgtcctctcc acctgttagat gtaccgtgct ctctgtcaga gaagggaggg tgtggttggg	17280
ctggacccccc agaggccatc ctccttctg tcttctgctc ctgcagccct accactctca	17340
aaccttacg agacccctggg agtcgttgg tccaccacca ctacgttgc cacggaccgc	17400
acggagaagc tgaggcctga gatggagggg cccggcagct tcaccatctt cgcccttagc	17460
aacgaggcct gggcctcctt gccagctgtg agatgacctc cgtctgcccggggactctt	17520
atgggaact gccttacttc cccgaggggt gggcatgtg aatgggagtc tgcaagtatt	17580
tcctactgtt tcaggaagct ttctccttaa ccccttagaa aaggctgtgg aacttgagct	17640
aaaatatgtc ttaccagggtt gcgtctaattt ccccccgttc cctactggc agaaagactt	17700
gggtgcttcc tgaggaggga tccttggcag aagagaggcc tgggctcacg agggctgaga	17760
acatgtttcc cagagttgca aggacccatc tcttaaacac agagtcgtca gcccctaact	17820
gacaccctgt cttccctctt aggaagtgtt ggactccctg gtcagcaatg tcaacattga	17880
gctgctcaat gccctccgct accatatggt gggcaggcga gtcctgactg atgagctgaa	17940
acacggcatg accctcacct ctatgttacca gaattccaaatccatccatcc accactatcc	18000
taatgggta ggggatcccc agccatactg catggccctt ggtgcataat gaaccattt	18060
ctgttccatg tggggctgg tttctgggtt ttaagctgtt gacaacccac cctctttgtt	18120
cctgcttctc ctggggccctt ctattccaca gcttggaa cccacatttt gctactgtgt	18180
ttgaaaacac tttttctcc tccggggctt ttggactat gcctctgttg ttttgactgc	18240
tcatccttgc tggctctgtt ggcagattgtt aactgttacac tggccggc tgctgaaagc	18300
cgaccacat gcaaccaacg ggggggttgc cctcatcgat aaggtcatct ccaccatcac	18360
caacaacatc cagcagatca ttgagatcga ggacacctt gagacccttc gggtaaggga	18420
ctgcccctggg tggaggccca ggcttgggac acattgcctc ccaagagggg cctagcagga	18480
actcttctgc aggagaggtt gaggatggctt cctgttagggg aacatagagc agttccctt	18540
gaatggccctt gaacatgggaaattcatttgc ccagacattt agttgacccatc aacctgtt	18600
attctccatc ttctttataa agtggccctt tccttgcctc ccctggaaag gtcagtggtt	18660
tgtggcttgc gcagcacagt gtcctctgtt ccctggacccatc gcactgttgc ttccagaggt	18720
ggcagttccc acatgggta cttagaataaa tggcctatca ggctgtgtt gctttggat	18780
cacatgtccc cacccttagga ccctgggttcc aaccatacgc atgttctt ggagccca	18840
acagcagaga agccaccagt gtggacacag aagtcaaggg tctgatttcc agcctggctt	18900
ctgactgctc tggggccgca ggaatacggt tccttccccccatccagca ggcatttgc	18960
ttacaactgg aggggaaggc atgttctctt tggcaaggac tgctcaggag gaagtggagg	19020

caggctgccctgtcagggttttgccctgattcaggagaacttcctaaccacaaggat	19080
acaagtggatgtaggcgacccctccctagagatctccaacacagagagacaacacgct	19140
ggggctggctggcactgacaggcctcgaggtgtggatggctgttagctggagcttcgc	19200
tgtctaatgtcctccatgtttcttcgtgttgctcgaaggacgggggtctgcaag	19260

aaaatgatgt tcccacatag ttggcagcac gtgaacagca attgatccct ttgcacacc	19320
tcccttact gtttagattt ggtaaatatt ttttccttcc ctttctgac cttccatttt	19380
gccgatctt ctttctata acacatactt actaggtacc tgctacttcc cgggtggcc	19440
tatgtgccag gagtatagag gtgaacaagg aaggcaaagt tctattctca gtagagctaa	19500
tactctatct ggagagagac aacaaacaaa tcaacaaggt agccagggc tgtgataatt	19560
tatgtcaagt gggcaggtaa atcgggagtg acagtagtgc agggaggatt ggaaagttag	19620
ggagttctt ctggaggagg tggctttga tctgcagcc aaaggatgat aatgggttcca	19680

ttatacaaaa tgctgggca agagcacacc cagtagaggg gagagtata gcaaaggctc	19740
agggcaggaa gggcaaggga gaggccagtg ggtgaggtca catgtgaagg gcataacaatg	19800
ggcaaagaca aggccagagt ggccaggccc aatcctccag gacttgcaga cctggaaag	19860
agtgcatctc catcctggaa gcagcaggaa accactcagg cctttagaag atcctctgg	19920
cagctgtgta gagaatgggt ggtgtatcc ttccatgcat gggctcatgt acgtgattac	19980
cagtaactgt cgagtgacag tgtgaggagg gctgcaagcc atgagtgtag gcacagcaga	20040
cagactcaacc tttgtctggc ggtgagatgg ggtggaaagt gtgccaagtt gaccccaa	20100

agaatgata tttagtgga agaatgaata gaatcagaga agcaaagtaa gagggaaagag	20160
cagagaggac agcagggaca aggacttggg ggcaggaaga ggaaaggcag gttaaggaca	20220
tgaaagatgg ccaggctggc tggagcttag gcccagcaag gccccctggg ggccatggtc	20280
atgggtgagc ttgggtttgg ctctgttt cgtcttggc ttctgtaaaa gcctcgagcc	20340
cttgccggga accagtgaag ctgtgtgtc atcttctgt gggagtgcga gagtcttcag	20400
ggagcactcc atcttctctc ctccccacag gctgctgtgg ctgcatcagg gctcaacacg	20460
atgttgaag gtaacggcca gtacacgctt ttggcccgaa ccaatgaggc cttcgagaag	20520

atccctatgt agactttgaa ccgtatcctg ggcgacccag aagccctgag aggtgagcat	20580
cctttggctc ctgctgctgc ctcatttgta cagctagatt gagcccaaga cctgctctgg	20640
tccaaatgtt acataccacc tgccatgagg tgacccttagt gatatccact gcagccatgg	20700
gctggggtca tcctgtccctg ttgcttcagc taaccgtgtc tctagcagcc acactactct	20760
gaggggctgac tacagaatcc agcagctttt gtctgggaga gctggactga agagaggcat	20820
agctggagac ccatactgg ccctggccag aaacagggag agtgaaaggc tggaatagcc	20880

aaggccagag caaggctaat aggtagagca acagcttaca ggtgtgggg tggcagatac	20940
tggcaccctt gaaatggatt cctcatgcc acgcttcaact attcttctct gtggctaggg	21000
gatttatgga taaaccaaaa ttacagttaa aaaccagcca taggccaggc acagtgactc	21060
acgccttaa tatcagcaact ttgggaggac aaggtggcg gatcacctga gatctggaat	21120
tttaggaccag cctggcaac atggcggaaac cccatctcta ctaaaatac aaaaattagc	21180
tggcatggt ggtggcacc tgaatccca gttactcagg ggctgaggca ggagaaccac	21240
ttgaacccag gaggtggagg ttgcagttag ccaagcttc accactgcac tccagctgg	21300
gtgacacagc gacactccgt ctcaagaaaa aaaaaaaaaa aaacagttat agtagtcaac	21360
tttgactct ccattcaga ttcgtcatg ccctctcaa tgagctgcta agttaggcag	21420
tgcattgatt attgctgcag gagaggaaag gaaggagcta acgttttc acatgtttc	21480
ctttggaga tgagaaagga ggactctgcc ttccccctac cctgcccctt tctactccag	21540
gacctctgaa agccatgag cacaagctg ctgcctgagt cccctgaaat gcagggtagc	21600
ccccaggctct ctgatgtacc ccaccacact ttccctctca aacatattcc aggatcaatt	21660
gattctttt gaatctattt aaacccacccg tgtcaatgtg ctatataaaa tgtctaattgc	21720
atttcagaca ccctatacat ctatacattt aaagtgttct cttctatct gtgcagggat	21780
gggaaaggc atattctga aagcacagat gggaaagacgg gatttggcc gtgtccaggt	21840
gattatggta cctctatgcg cctggccggc actggggaca gaggccatga aatgaatac	21900
agcacagcct ttgcctccaa gaaacttaag acctagtaga aatggcaggc tttaaaacag	21960
gttgtggta tctgatttg tgagtcaat gacagagata ctacagcac aaaatggga	22020
atgagggcgg gcattggac acacatagcc ttaagggcc caaaggctt tagaactgta	22080
ttccctattt aaacatgatt tgcacagaggc acatttttgc cttggagac ctcagaactc	22140
cttactatag gccggccatg gttataatcc cagacttgc ggaagccaag gcggcagat	22200
cacttgaggc tgagagttca agaccagcct ggccaaacatg gtaaaacccc gtctacta	22260
aaaataaaaa aattagctgg gtgtgggtt ggccacctgt aatcccagct actcaggagg	22320
ctgaggtagg agaatcaactt gaacctggga ggcagaagtt gcaataagcc cagatcatgc	22380
cactgcactc cagctggc aacaaagcta gactctctca aaagaaaaaa aaaaaacaaa	22440
acaaaaacaaa aaaaaaaaaa ctccttattt taaactgtaa gaaaaaaaaaag gcccctactt	22500
cgtccctttt gcaaatctgc ctttcttac tcactaaccg gctgggtcag agcaaggaca	22560
ctctgtttgg tgccatcgct gcagactggc aggaagaggt cttggccca caccacacag	22620

ttcctgctg ttacggcag gttggcaggc aggcaggcga gaagcagcca gggctgggg	22680
tgtgtccagt ttgaagacta gtttccagcc ctggccctgc tcaccctcca agtggccctg	22740
gcaggttccct ctaccacatc gtggacttca ctttccttct ctaagaagct caatccccaa	22800
ggcctcattt ccataggcct tctcaccctt ttttttccc tctggctgaa tgtggccagg	22860
acgggcttcc aaggccatca actcgctgc agcagccca tgccttgag ggcctcagag	22920
tttcctctg cctatgacag tgtggtttg gttccacac ttggatcag attgaaactc	22980
gcctccgtgg tgagaatatg ggacatagag ctcggtgac cttggtagc agcagtccag	23040
gccacctgct cagcctgggg ttgggggggg ctcctctcc ttgactggc cttgcattt	23100
cctccatcca gcctgtctgg gctctccag gcaatggaga ccagcaggag tcacgtgg	23160
tcaggagccc ccttgggcc tcagccctgc cctgccccct aaagttagcac ttggataagc	23220
aaataaatta ttatacttac tattatggg tgtgtgaat gggatggcaa aggccaagtc	23280
ttactgatca ccaaacctta agatataatcc tggcagctag tagaccctt ggctaaatga	23340
acagaaaact ggacaaataa agtgtacaca aataactcaa agctgtcatt tgtacactt	23400
tcgtctttc ctactacagt ttacatttt ataaaggta gtagattct aaaatccgt	23460
ggtaggctct tttaggtttt tcttgatcc ctgaagttca gctacaataa agctaatcac	23520
taacatttg tgagcattt ctctgttgc aggccccgtg ccgagtgctt tagttcaga	23580
atttcatgtc atccccacag cagccctagg agatgaatgc aattctttag tccacttgac	23640
tgataaggaa gtttaggttc aaagaggcta aatgactctc ccagggccc acagctggaa	23700
agtggccaca gggcccccagc tggtttctt gggcagcagg cagaaggcga ggaggatctg	23760
ggccctgtgg tgcccccagcc tcatactgagg gtcctcatct gagagaacag gatcctaca	23820
gcatggcag gctgcaagtg gtccctgagg ttatcgtgga gtggaccctg acttgacctg	23880
agtctgtttg gaccccagac ctgctgaaca accacatctt gaagtcagct atgtgtgctg	23940
aagccatcg tgcggggctg tctgtagaga ccctggaggg cacgacactg gaggtggct	24000
gcagcgggaa catgtcaact atcaacggga aggcgtatcat ctccaataaa gacatcttag	24060
ccaccaacgg ggtgatccac tacattgtat agctactcat cccagactca ggtaggccag	24120
gcctccgggg gccttggccc tgcctggccc accatcttt ctgcctatct ttgtggcggg	24180
ggaggggaaa ttcaagatc ttggcgcac ttccctgcct ggaccagct cacagttct	24240
cggccactgc aaatgtgtgg gttgtgacca gactgtatgt tcttgagctt caggcttgc	24300
agtgcagtgg agaggcagtg gggagctatt gaaggggtct ggggacagac tcaatcacag	24360
aggcctttca gaagatctgc ctgctgtgca tggcggaaaga gggccacttg ctgacctcag	24420
agcatgtgct ttctcagtag tgcccaagct gtcccatggt cactgaccca gttagaatga	24480

ctgaatggac ttggcttgt gtctcattag gaatccatgc cccattctag tcttcagtg	24540
agatctgtcc atgagtgaag gaatctcaca ggaaaaaaca aaatgcttct atgggtgtgg	24600
ttgctggcct tatctacacc acagaagcca tcacacagac tgtcttctt cccattgtta	24660
gaatgtgcc tgaccaagca gcccacaggg cctggacag aggctgatct ctgcctaact	24720
gagtcacact ctcctccctc tcctcctgac tggtagatt ttctaggtga ctgttcccct	24780
gatgacacaa gcccgtggg ccccagcagt gtttagaggg gttgttgact cacgagatga	24840
cattcctgct gatgtgtgtc atgcccgtggg gtggatgaat gataaatgaa aacagcgctt	24900
ttaactttg aaccacttt ctccttcctt gtagccaaga cactattga attggctgca	24960
gagtcgtatg tgcacacgc cattgacattt ttcagacaag cggcctcgaa caatcatctc	25020
tctgaaagtg agcggttgac ctcctggct cccctgaatt ctgtattcaa aggttaacatg	25080
gggaaggcat ccctgtttaga ttgtccctgg aggcatctc cccaccctg tcacccac	25140
aacactctcc gattacagc accccatggg acattagaac ttccactcag ctcaaccaa	25200
agcagatgtg acttcagcag aaacttcaga ggctctgtg tttcatttgg cagtgcagag	25260
aatgccttg gggagccgtt cctcagaact caagacttga catctggag gcagccgttc	25320
ctcagaactc aagacttgac atctgggaga gcagagcatt ccctgcctt tctatttgc	25380
gggtcacttg ccaatgtata gtcaagaggt cagagtgagg gtacagctga gctgcagccc	25440
caggaaggca gagaaggggg ccaagttgtg tgcgtgcctg ccctccctc ttagggcaaa	25500
actccaaaca cccttgattt tctggatctt cttaatttctt ccatagaaga taccagatgt	25560
taaggaatat tggcagcttc acttggtttc tcaatccctg tttccaaact caaggaggaa	25620
tggcctttt cactgtattt atctctcatc actctttca ttgcaggagc acatctct	25680
ggacctaacc atcacccttt ctgttagatg gaaccctcc aattgtatgcc catacaagga	25740
atttgcttcg gaaccacata attaaagacc agctggctc taagtatctg taccatggac	25800
agacccttggaa aactctgggc ggcaaaaaac tgagagttt tgatgtatgt aatgtaaat	25860
ctgggtctta aatcatgctc ctggaaatgt cttactgtg ggacttgtat tagttaaaa	25920
aaaaatgtcc tcaataagca ggagtttgca tgagaactgg ttgctgacaa ggaaggaaat	25980
aatttctgga aaatataatgaa aacaaaatgaa gatccctgcag aaggatggaa atctctttt	26040
ctggaggcct ttgagaataa accacacaat tatccaaacct gtattgtgaa ggaataagtc	26100
cttctttaat tcaggaatta acacctggaa ggagggatgg agttcagact ctttctgagc	26160
ttatgagaag agaagccccca taaactaaaa tacagccctc ctgggtccaa aaggtgcctt	26220
ctctcttctg ctgtatcttc ttgtttca aacccaaacag ttaccctgga aatcaaaaag	26280
gaagtacaac tcaacatagc tttgcctgg gaccaaccag caccattgg ctaaagatgg	26340

ttatcatctg ttaaacaag aaataaataa atgggttcaa cgtatttatt tcaacattgt	26400
caatggacct catgtgtaac tgatattctc attatggac ctctgtgtga ctttattggg	26460
gcctctctaa ccgttcttc ctttaggaag accatttatt gttttatttc ctggagaaaa	26520
tacatcattt tateccagcc ttaataaccc atcccagtgt atactccttc atcttcatgg	26580
ataatgaccc tgcgtacatgc tctgaacaaa tcaggaggcc cctcgtggaa gtataaccag	26640
tccttcttt ctctgtccct cttctgtgca gaggcctgc attgagaaca gctgcacgc	26700
ggcccacgac aagaggggga ggtacgggac cctgttcacg atggaccggg tgctgacccc	26760
cccaatgggg actgtcatgg atgtcctgaa gggagacaat cgcttaggt aattagttcc	26820
atccccgggt ggagcttctg cccagtggc atgctggagt gggatgtggg gccccagcta	26880
tttgtcaagc ttcttctac ctggggatt caattaacac tagcagtgc ctgcgtgcac	26940
cttccagact tggatgggg aaaaggcaag ggtgccttg aaagcttaca ttggaaagaa	27000
gggttacttc taagagtgtat atcttcacat gcatgggaag cagggagggg ggactacatt	27060
tttatgactg aagtgcagg aaaacatcac cctctcattt taaagctcca agtgagccaa	27120
gagcacatag ttacagtgc acgatgagcc tctcaacttc tgccgactat ctgttattt	27180
caactgaagc acccttgtga gtttgtttc ttgcccggct atctccattt ctgacttgct	27240
cattcacctt ggggtgctgt catattgaat gttccctgt cactgacttc agccacctgc	27300
acaaggcctt ggagaccaca cccctctgcc ctcccagaat catatccctg gaggctcagc	27360
tagtctctgg gtccggccata cctctgcctt ttctttccc tcctttctcc tgtggctct	27420
gacgtctggc catttaacag agcttagcat ttttgcgtgg tggagagagc tggagcctgg	27480
aatcactccc tctttgtgca tacggaggc atgaaaacca aggtgtgtgc attccagtgg	27540
cctggactct actatcctca gtggtgaggt atttaagggaa aatacccttc agcgtggta	27600
ggtatttaag gaaaataacct gttgacaggt gacattttct gtgtgtgtat ctacagcatg	27660
ctggtagctg ccatccagtc tgcaggactg acggagaccc tcaacccggg aggagtctac	27720
acagtctttg ctcccacaaa tgaaggcttc cgagccctgc caccaagaga acggagcaga	27780
ctcttggta aagaccaact taagtacacg tctccatttt tctaaagtag tgatccctca	27840
ggcccccagc agcaaacagt tggcacatca aggattgact tgaaggatt ttatgacaag	27900
actatttagtg aaagagtggg cgggactaaa ggaactagca aaggatgagg ccaaccagg	27960
actagcaacc ctggaaagcc tttactaccc ctaggcctgg gggatggga ggtgagagc	28020
aggaaccagg gaggtcatga gccttggaca agggcacaga acagcagcca gagccatgt	28080

cagccagcca ctgtcagaac catgcaaggg ggaccactca ggcggccagc ctccctctca	28140
gacagttgcc atctgggtct ctgttggct gatgcgagag caggagggag cccactgatg	28200
cagtccatag agctcagcct cctggcagg aaaccggca gagaggagta gaaaagaatt	28260
aagggtggct gcgaccagcc cagtcaactga ggcacgttc ccactggaga cctatgagca	28320
cagtgataat aaagccagtt acctgcactg actatccctc cagacaaaag ctttccaag	28380
aagtttagtca tggctctgag agatcttagtt gaggatgtt ggcaggggat ctatgttta	28440
cgggtggcta agaaaaatga ggaaggtaag agtatcttgc agcctgttta gggaggatta	28500
aataggatgc cacacacagg gccaggcaga cagcctggc agtaatagcc atgacgtgg	28560
gggcgggggg agcaggaatg ggagttgcag tggtagctc agatgcatgc ctgtgagaga	28620
tgcttccact ctcacagaaa gatgagacca agggaaagga ggaggaagag gaaggaccc	28680
gacaaacctt gggcccaaca ttgtctacac ctcccttctc gctctagagc agaatagaaa	28740
gttcagggtt caggcagctc taagttgaat tcgtgtccctg tttatatttca tttattgtca	28800
aatgaatgcc tggctctgt atgctgacgt atgttctaa ggagagggga gaagttcatt	28860
ctgaacataa actttcatac ctctctctgt ccagcaagaa tggaaatattc cccaaatggc	28920
ctgagccagc ttggctttct tttgttttca aattatgtgg gagttgagga gggggatggg	28980
aaaagcttcc caaacacacc ctcccccagg cctgaggcac ccctggggga cagagagtgt	29040
tagaggttgg tacaggtttt agagatatttga aaggacatc ccatgcaccc cagggctgg	29100
tgtggctctg tacttccagg caatatttttg tggaagggga accttgcac ctccagggtt	29160
tggatgtttt aaaaatcgtt ggtacccagt ggctccatcc tctggcaggc atgtggattt	29220
gtcaataacc aagtgaactc tccaaaataa gttaaaactt cctcccttct cagttcaag	29280
atgctggaaa tagtgttca taagccctgg ggaaatttag cccttggct ggtaatggga	29340
gtatccgaga ttagagggca gctggaaact ttggaaatga cctcccacac ttaatttggg	29400
aaatgcctct gcacctttat gggcaaccag atgcctgccc cagttgtgg agacactgat	29460
gtggctgaa aggaatgctg agacgtgacg aggagagatg ctggcagggg aatatcccc	29520
ttagccctga cctcatcgcc tccatggctc ctccacagta cagctgtcta ctcttttaag	29580
ttctcccttc agggaaatagc catctaaac agaatgtgca tttgaggggca gaatgtgtaa	29640
atattgcact actgtgttat aaccgtcagg agccatgctg atgatgaaac gtcccgatgt	29700
ccgggtgtgg aaaggccct ggcttccaa gcaaataattt atctcatgga aacatgagtc	29760
atactcacag aggagtatgg attaactcct tctcagcagc cagggagccc agcatccag	29820
acagcatatt taacccagag gccaactgac tgctggggca gattttgtgtt catgaacatg	29880
tgctttgtt cctctgacca ttagacagat tgggggtcac aacgttgagt atacagtggg	29940

agcttaataa gtgcttattc cctggcagg gagttcttca tttcaggggt gaccacttac	30000
atcttctctt ctggccctc cttgaccagg ctaattacca ttcttggat taactctatc	30060
tcctttccc gcaacctgca ggagatgcc a ggaacttgc caacatctg aaataccaca	30120
ttggtgatga aatcctgtt agcggaggca tcggggccct ggtgcggcta aagtctcttcc	30180

aagggtgacaa gctggaagtc agcttggtaa gtgtcctgca aatcaaaggc tggctaaatt	30240
tccccagggc agggctccag gacatatctc acccccagga tggaattata cacacacaac	30300
cttcaagttg cagccccaat ctctgagtgt aattcgtcca aagaaaaaga gaaaaagagaa	30360
gagggtcttc agggaaatca agtgagatca tagttagaca tggtaagaa cttccagatt	30420
tacaaggaa tagagcatct gatttggcat ctgagagagg ctattagatc ttccctctct	30480
taaggaggtt gtaggcaact agttatgtga ctgaagagat cagtcgtac tcacaccatc	30540
ccaccccccaca aacccagggc ttcaactgagt tgtaccatga accagaccat cccaaaggagc	30600

tttttgagg t ctgacacttg ctctgtgagc cttcccttgc tctgcacatt gatgatataa	30660
ctttgttaact gcactaagag tggccctaaa gcagatagcc agccgagctc cagaaatctc	30720
cctggctgca cctgcagagg ccactgaccc ctctgtggag ggaccgctct tcagggtgt	30780
gctggcttct actctctgtc cctctctttt ggtttcagc catccattgc tcaccaggtt	30840
ctcacgagga gcataggaag atatgcgtt agggaggttgc acggggat gacttgttgc	30900
acttttagcag gtcattcaag aatctctcg cacctggttt cagatgctgg ggtcctgtct	30960
gtcacaggtt tctgtgcctc ctaccctt gagttgtca catggccctt caggaaggcc	31020

tgagatagat ttgccctggg tgggcctcct atgagaaaat cttaaagttag gcacccaggc	31080
aaaatggaaa gaggcctttg cccagagcag gaagcctgtc ttccatttcc agctgttcca	31140
cctacttagc ttaaaagagg cacttgcct gtcttcagtc tcagtcgtc tctcccttc	31200
tgtggaatgg gacaataata tctactctcc ttatcataca ctgctgtgag gactgagtgg	31260
atcacacaaa aaagcattat gtaaaattgca aagtgcataa tccacacagg agatttgaat	31320
taatccacca cactgaaggt ctgtcaaggg cagggactgt ttcattcacc agagtatccc	31380
cagtctaaaca caggacttgg catatgaaaa gtgttcagta ggccgggtgc agtggctcat	31440

gcctgttaatc ccagcacttt gggaggccaa agtggcgga tcatctgagg tcaggagttc	31500
aagtccagcc tggccaaacgt ggtgaaacca catctctact aaaaatacaa aattagctgg	31560
gcgtgggtggc acatgcctgt aatcacagct actctggagg ctgaggcagg agaatcactt	31620
gaacccagga ggcggaggtt gcagtgagtc gagatcatgc cactgcactc cagcctggc	31680
gacaagatg aaactccatc tcaaaaacaa agaacaagga aaaaaacgaa aactgttcag	31740
taaactcttg ctgaatgaat aaaataaata tataaatgtta taaataatgttctactttc	31800

aaccactact ctgttttct tttagaaaaa caatgtggtg agtgtcaaca aggagcctgt	31860
tgccgagcct gacatcatgg ccacaaatgg cgtggccat gtcatcacca atgttctgca	31920
gcctccaggt aagtgtcgca tccccactga ctctgcagcc agtcctttc ttcatgtggc	31980
agttggtgga gagaagaaaa actgttctaa acaatgatga gaataacatg taattgtat	32040
agttaaactg tgcctatgtg actgattgca gagtgaattg ggagctgtt gtttgaatg	32100
caccacacta aggaatgtga ggacacattg ctcttgccg agttgcccag ctatattgc	32160
tcccctcgga cacagccag ttttctgtat tcgcgtggat gctgtccgca cgattccag	32220
cactcctt acagcatctc acctcagtgt atgttccttg cctccagtgc agttgaacct	32280
cagtcctgcc tctcctcatg tgtgcattca cttttttgg tgctctctcc ccatggcca	32340
agttctacca ttagttatga aacattatgg agaaaacatg tctttggaaa tgtgagccag	32400
aaagccacc agtgccttc agtcacggtt gttatgaatg acatgcta at gtttca	32460
tggtcaaacc tgcctttct tcccttca gccaacagac cttagggaaag agggatgaa	32520
cttgcagact ctgcgttga gatcttcaaa caagcatcag cgtttccag ggttaagatgc	32580
ctgctagggtt tgcgccttagc ctgagcagcc tcaggtcctc ttttggcc atagaggagc	32640
ctctccagcc cctgtcttcc ttggctgctc cccagggctc tcttaaaact tctccccact	32700
cccactgagg catcctcagc cccagcctgt gtcaaattca gagtaaagaa ccaaggcaac	32760
tccctggctt tcatggcca aagcgcaggg tttcacccg aggcccttga gcctcagatc	32820
atgggaaagt cactgctgga gagaacagac atagctctgg aagccatctg cccaagaggg	32880
cagcccatcc caagttcata ttacagtggc caggcctgcc ctgagccgg gcctctgggt	32940
cactcttctg ctgtccatgg cattgccccat cttgggtgag gctggggctc tcttggcac	33000
tgtatgtatt ctggatacag ggatactggg ctgcgtatgt gtgtggagcc atcccttct	33060
tgccccagcc ccacccctt ctcaaaccct ctctggctct ttctgagctt ccttccctgc	33120
tccccagctt gcccagtgtc cagtgccca cttggcttt ttgtacttc gggtcaggtg	33180
gagccttttggaa ggaatgtgaa gtgccttaca gaaagattgc acttcaagag gagaggtgc	33240
agggagccat cctaaaccca gaggcctgga gcttactgtc tcactttact tttgtacaca	33300
ggggcttcct tagtgcctc gagaaggatt cttggccctg agcttctact cctgaggcca	33360
cctctgtgca gccccagctc cctcaactct aggctgtatgt ctcaatggaa aagccctggct	33420
tgggggtctc cttagaatgt ccacctgaag gcacacttga tagggctt cacaacttat	33480
gtctgccaag gcccacccgtgaa gaaatccctg gtgcctataa gttccacccctt ccccttcctc	33540

ttcctcgccc cagcatttt tctgagtagg ggtggcaatg ggcaaagcca ttgtcataag	33600
cagttgcagg tataacttgc actagaaaac ctgacaccc ttgtttctt tcaggctcc	33660
cagaggctcg tgcgactagg tgagtctgg ctgggttga agtcattgca gacctgtta	33720
ggccttaccc ccaagcaagc ccaagccgc catctgctgt atatagataa gaacatcatg	33780
gtgcagtaaa agaagcctgg ccttggagt cagaacagca gggtgacttg gggtcagacc	33840
cagagcaccc catttccttc tctgttaagat gaggataata agagtaacaa ccttttaggg	33900
ttaaggtgag tttcagctt aggaagtctg ggaatattgc aaaggccttg gcaggaaccc	33960

atggtgagga tctagttcca agttgatagg tacagaaaac cagaacatcg ggccttgagt	34020
aaagagtgaa gttcacaaa ccacaaagca cctgctatgt gcaggagagc atggcagaag	34080
gaggctgctt ggcctggc cttgagattc tgacagtgtc cttagacagac atggggagat	34140
ctgcacccat ttgacgttac caacttctt tttcagccc ctgtctatca aaagttatta	34200
gagaggatga agcattagct tgaagcacta caggaggaat gcaccacggc agctctccgc	34260
caatttctt cagatttcca cagagactgt ttgaatgtt tcaaaaccaa gtatcacact	34320
ttaatgtaca tggccgcac cataatgaga tgtgaccc ttgtcatgtgg gggaggaggg	34380

agagagatgt acttttaaa tcatgttccc cctaaacatg gctgttaacc cactgcatgc	34440
agaaacttgg atgtcactgc ctgacattca cttccagaga ggacctatcc caaatgtgga	34500
attgactgcc tatgccaagt ccctggaaaa ggagcttcag tattgtgggg ctcataaaac	34560
atgaatcaag caatccagcc tcatggaaag tcctggcaca gttttgtaa agcccttgca	34620
cagctggaga aatggcatca ttataagcta tgagttgaaa tttctgtca aatgtgtctc	34680
acatctacac gtggcttgga ggctttatg gggccctgtc caggtagaaaa agaaatggta	34740
tgttagagctt agattccct attgtgacag agccatggtg tttgttaat aataaaacca	34800

aagaaacata	34810
------------	-------

<210> 52

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> gene protein product

<400> 52

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

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

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

35 40 45

Cys Ala Val Gln Lys Val Ile Gly Thr Asn Arg Lys Tyr Phe Thr Asn

50 55 60

Cys Lys Gln Trp Tyr Gln Arg Lys Ile Cys Gly Lys Ser Thr Val Ile

65 70 75 80

Ser Tyr Glu Cys Cys Pro Gly Tyr Glu Lys Val Pro Gly Glu Lys Gly

85 90 95

Cys Pro Ala Ala Leu Pro Leu Ser Asn Leu Tyr Glu Thr Leu Gly Val

100 105 110

Val Gly Ser Thr Thr Thr Gln Leu Tyr Thr Asp Arg Thr Glu Lys Leu

115 120 125

Arg Pro Glu Met Glu Gly Pro Gly Ser Phe Thr Ile Phe Ala Pro Ser

130 135 140

Asn Glu Ala Trp Ala Ser Leu Pro Ala Glu Val Leu Asp Ser Leu Val

145 150 155 160

Ser Asn Val Asn Ile Glu Leu Leu Asn Ala Leu Arg Tyr His Met Val

165 170 175

Gly Arg Arg Val Leu Thr Asp Glu Leu Lys His Gly Met Thr Leu Thr

180 185 190

Ser Met Tyr Gln Asn Ser Asn Ile Gln Ile His His Tyr Pro Asn Gly

195 200 205

Ile Val Thr Val Asn Cys Ala Arg Leu Leu Lys Ala Asp His His Ala

210 215 220

Thr Asn Gly Val Val His Leu Ile Asp Lys Val Ile Ser Thr Ile Thr

225 230 235 240

Asn Asn Ile Gln Gln Ile Ile Glu Ile Glu Asp Thr Phe Glu Thr Leu

245 250 255

Arg Ala Ala Val Ala Ala Ser Gly Leu Asn Thr Met Leu Glu Gly Asn

260 265 270

Gly Gln Tyr Thr Leu Leu Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Glu Lys Ile

275

280

285

Pro Ser Glu Thr Leu Asn Arg Ile Leu Gly Asp Pro Glu Ala Leu Arg

290

295

300

Asp Leu Leu Asn Asn His Ile Leu Lys Ser Ala Met Cys Ala Glu Ala

305 310 315 320

Ile Val Ala Gly Leu Ser Val Glu Thr Leu Glu Gly Thr Thr Leu Glu

325

330

335

Val Gly Cys Ser Gly Asp Met Leu Thr Ile Asn Gly Lys Ala Ile Ile

340

345

350

Ser Asn Lys Asp Ile Leu Ala Thr Asn Gly Val Ile His Tyr Ile Asp

355

360

365

Glu Leu Leu Ile Pro Asp Ser Ala Lys Thr Leu Phe Glu Leu Ala Ala

370

375

380

Glu Ser Asp Val Ser Thr Ala Ile Asp Leu Phe Arg Gln Ala Gly Leu

385 390 395 400

Gly Asn His Leu Ser Gly Ser Glu Arg Leu Thr Leu Leu Ala Pro Leu

405

410

415

Asn Ser Val Phe Lys Asp Gly Thr Pro Pro Ile Asp Ala His Thr Arg

420

425

430

Asn Leu Leu Arg Asn His Ile Ile Lys Asp Gln Leu Ala Ser Lys Tyr

435

440

445

Leu Tyr His Gly Gln Thr Leu Glu Thr Leu Gly Gly Lys Leu Arg

450

455

460

Val Phe Val Tyr Arg Asn Ser Leu Cys Ile Glu Asn Ser Cys Ile Ala

465 470 475 480

Ala His Asp Lys Arg Gly Arg Tyr Gly Thr Leu Phe Thr Met Asp Arg

485

490

495

Val Leu Thr Pro Pro Met Gly Thr Val Met Asp Val Leu Lys Gly Asp

500

505

510

Asn Arg Phe Ser Met Leu Val Ala Ala Ile Gln Ser Ala Gly Leu Thr

515

520

525

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

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

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