



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년12월30일

(11) 등록번호 10-2483783

(24) 등록일자 2022년12월28일

(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.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
아벨리노 랩 유에스에이, 인크.
미국, 캘리포니아 94025, 멘로 파크, 스위트
비-2, 아담스 드라이브 1505
(72) 발명자
차오 셴 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

전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 이준혁

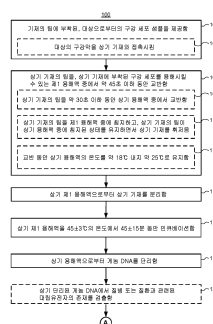
(54) 발명의 명칭 안과 질환과 관련된 대립유전자의 멀티플렉스 검출 방법

(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 틸에 부착되어 있다. 상기 기재의 틸은 상기 기재에 부착된 세포를 용해시키는 용해액 중에서 교반한다. 상기 기재는 이 교반이 완료되면 용해액으

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1a



로부터 분리한다. 얻어진 용해액을 인큐베이션한 다음, 상기 용해액으로부터 게놈 DNA를 분리하여 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, 각막 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 서열번호: 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 각막 이영양증과 관련된 계놈 돌연변이를 검출하는 방법:

(A) 기재의 팁에 부착된 인간 대상의 상피 세포를 사용하는 단계;

(B) 상기 기재의 팁을, 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 계놈 DNA를 분리하여 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, 각막 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 서열번호: 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, 각막 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), 티엘베크(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 케라토에피텔린(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 가상의 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(agitate)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 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: 49를 포함한다.
- [0049] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 프로브쌍 중 하나는 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 45 및 서열번호: 50을 포함한다.
- [0050] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 프로브쌍 중 하나는 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하고, 여기서 상기 제1 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 상기 제2 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 각각 뉴클레오타이드 서열쌍 서열번호: 47 및 서열번호: 50을 포함한다.
- [0051] 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 검출 프로브 중 제1 검출 프로브는 제1 표지와 커플링되고 상기 적어도 2개의 검출 프로브 중 제2 검출 프로브는 제2 표지에 커플링된다.
- [0052] 일부 구현예에서, 상기 제1 표지는 VIC이고, 상기 제2 표지는 FAM이다.
- [0053] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는, 인간 대상에서 각막 이영양증을 검출하기 위한 반응 혼합물을 제공한다: (A) 대상으로부터의 생물학적 샘플로부터 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 서열번호

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 혼합물은 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, 각각 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 특징 중 일부를 갖는다. 간결성을 위해, 상기 세부사항은 본원에서 반복되지 않는다.
- [0082] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 인간 대상에서 이형접합형 각막 이영양증의 검출을 통해 대상에서 레이저 눈 수술에 따른 합병증의 위험을 예측하기 위한, 상기 어느 곳에 언급된 반응 혼합물의 용도를 제공한다.
- [0083] 일부 구현예에서, 상기 레이저 눈 수술은 라식 및 엑시머 레이저 수술 중 하나를 포함한다.
- [0084] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는, 인간 대상으로부터의 샘플에서 각막 이영양증과 관련된 게놈 돌연변이를 검출하는 방법을 제공한다: (A) 기재의 팁에 부착된 인간 대상의 상피 세포를 제공하는 단계; (B) 상기 기재의 팁을, 상기 기재에 부착된 세포를 용해시키는 용해액 중에서 교반하는 단계; (C) 상기 교반(B)이 완료되면, 상기 용해액으로부터 기재를 분리하는 단계; (D) 상기 분리(C) 후, 상기 용해액을 인큐베이션하는 단계; (E) 상기 용해액으로부터 게놈 DNA를 분리하여 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 게놈 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 대립유전자 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 대립유전자 식별 플롯 실행(좌측 패널)을 제공한다. 도 6b는 정상 대조군과 비교하여 다양한 돌연변이에 대한 실시간 PCR 플롯을 제공한다. 도 6c는 동종접합성 대조군과 비교하여 다양한 돌연변이에 대한 실시간 PCR 플롯을 제공한다.

도 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 대립유전자 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 버퍼로 전처리되었음을 가리킨다. 상기 대립유전자 식별 플롯(좌측 패널) 내의 표시 "DW-A"는 샘플이 실시간 PCR 분석을 수행하기 전에 증류수로 전처리되었음을 가리킨다. 상이한 샘플 점 주위의 원은, 검출된 대립유전자 각각에 대한, 2개의 매치된 샘플, "B" 및 "DW-A"를 각각 나타내며(좌측 패널 참조); 각 원 안에는 2개의 점이 있으며, 하나는 "B"에 대한 점이고, 하나는 샘플 "DW-A"에 대한 점이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

I. 도입

질환 관련 SNP의 검출은 다양한 의료 상태의 진단 및 예후를 위한 점점 더 중요한 도구가 되고 있다. 예를 들면, 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.

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

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

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

II. 선택된 정의

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

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

- [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 숙련자에게 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 돌연변이이지만, 개인 간에 유전적 변이를 야기하는 이른바 "인텔" 돌연변이(뉴클레오타이드의 삽입 또는 결실)도 포함한다. 모든 인간 유전적 변이의 약 90%를 차지하는 SNP는 30억-염기 인간 게놈 사이에 100 내지 300 염기마다 일어난다. 그러나, SNP는 바이러스와 같은 다른 유기체에서 훨씬 더 빈번하게 일어날 수 있다. SNP는 게놈의 코딩 또는 비코딩 영역에서 일어날 수 있다. 코딩 영역에서의 SNP는 단백질 산물의 아미노산 서열을 변화시키거나 변화시키지 않을 수 있다. 비코딩 영역에서의 SNP는 프로모터 또는 처리 부위를 변화시킬 수 있고, 유전자 전사 및/또는 처리에 영향을 미칠 수 있다. 개인이 관심있는 게놈 영역 내에 특정한 SNP를 갖는지에 관한 지식은 다양한 질환에 대한 진단적, 예방적 및 치료적 적용을 개발하기 위한 충분한 정보를 제공할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시내용은 아벨리노 각막 이영양증과 관련된 TGFβ1 유전자의 엑손 4에 위치한 구아닌에서 아데닌으로의 SNP(guanine-to-adenine SNP)의 검출에 관한 것이다.
- [0099] 용어 "프라이머" 및 이의 변형은 PCR 반응에서 DNA 합성의 개시점으로서 작용하는 올리고뉴클레오타이드를 가리킨다. 프라이머는 일반적으로 약 15 내지 약 35 뉴클레오타이드 길이며, 표적 서열에 상보적인 영역에 혼성화한다.
- [0100] 용어 "프로브" 및 이의 변형(예컨대, 검출 프로브)은 PCR 반응에서 표적 핵산 서열에 혼성화하는 올리고뉴클레오타이드를 가리킨다. 표적 서열은 분석될 핵산의 영역을 가리키며 관심있는 다형성 부위를 포함한다.
- [0101] 달리 정의하지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 대등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실행 또는 시험에서 사용될 수 있음에도 불구하고, 방법 및 물질의 다양한 구현예가 본원에 구체적으로 기재되어 있다.
- [0102] **III. 샘플 제조**
- [0103] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 실시간 PCR 단일 뉴클레오타이드 다형성 검출 분석에서 사용되는 게놈 샘플을 분리하는 개선된 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 개선된 방법(100)은 도 1에 개괄된 단계들의 조합을 이용한다.
- [0104] 일부 구현예에서, 상기 방법은 대상으로부터 세포의 샘플을 제공하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 환자의 세포 표면을 상기 세포를 기재 상에 가역적으로 고정화할 수 있는 기재와 접촉함으로써 수집된다.
- [0105] 상기 개시된 방법은 다양한 샘플로부터 수득된 다양한 세포 유형에 적용될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 개시된 방법에 사용하기 위한 세포 유형은 비제한적으로 상피 세포, 내피 세포, 결합 조직 세포, 골격 근육 세포, 내분비 세포, 심장 세포, 요 세포, 멜라노사이트, 케라티노사이트, 혈액 세포, 백혈구 세포, 버피 코트, 유모 세포(hair cell)(예컨대, 모근 세포 포함) 및/또는 타액 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 상피 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 피막하-혈관주위(상피 유형 1); 담염(pale)(상피 유형 2); 중간(상피 유형 3); 어둡(상피 유형 4); 미분화(상피 유형 5); 및 거대-수질(상피 유형 6)이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 구강 상피 세포(예컨대, 구강 스왑을 이용하여 수집된 상피 세포)이다. 일부 구현예에서, 상기 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 사람에게 의해 달성된다. 예를 들면, 일부 구현예에서 상기 샘플은 의사의 사무실에서, 대상의 집에서, 또는 라식 수술이 수행되거나 수행될 시설에서 수집된다. 일부 구현예에서, 환자, 환자의 의사, 간호사 또는 의사의 보조원 또는 다른 임상 인원이 샘플을 수집한다.

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

[0110] 이후, 기재의 팁(예컨대, 레이온 스왑 또는 면 스왑의 팁)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 움직임(움직임)을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 기재의 팁(예컨대, 레이온 스왑 또는 면 스왑의 팁)은, 복수의 구강 세포가 이후 및/또는 차후에 단리를 위해 기재에 부착된 상태를 유지하도록, 용해액에서 부드럽게 움직인다. 용해액에서의 그러한 움직임은 휘젓기 동작, 좌우 동작, 상하 동작 및/또는 디핑(dipping) 동작, 또는 용해액에서 기재의 어떠한 다른 움직임을 포함하며, 이는 일부 구강 세포를 용해액에 분산시키면서 복수의 구강 세포를 상기 팁에 부착된 상태로 유지시킨다.

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

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

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

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

[0115] 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 약 2℃, 약 3℃, 약 4℃, 약 5℃, 약 6℃, 약 7℃, 또는 약 8℃에서 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 약 2℃ 내지 약 8℃, 약 3℃ 내지 약 8℃, 약 4℃ 내지 약 8℃, 약 5℃ 내지 약 8℃, 약 6℃ 내지 약 8℃ 또는 약 7℃ 내지 약 8℃에서 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 약 -25℃, 약 -24℃, 약 -23℃, 약 -22℃, 약 -21℃, 약 -20℃, 약 -19℃, 약 -18℃, 약 -17℃, 약 -16℃ 또는 약 -15℃에서 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 약 -25℃ 내지 약 -15℃, 약 -22℃ 내지 약 -17℃, 약 -20℃ 내지 약 -15℃ 또는 약 -25℃ 내지 약 -20℃에서 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 t 약 -90℃, 약 -89℃, 약 -88℃, 약 -87℃, 약 -86℃, 약 -85℃, 약 -84℃, 약 -83℃, 약 -82℃, 약 -81℃, 약 -80℃, 약 -79℃, 약 -78℃, 약 -77℃, 약 -76℃, 약 -75℃, 약 -74℃, 약 -73℃, 약 -72℃, 약 -71℃, 약 -70℃, 약 -69℃, 약 -68℃, 약 -67℃, 약 -66℃ 또는 약 -65℃에서 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 약 -90℃ 내지 약 -65℃, 약 -85℃ 내지 약 -65℃, 약 -80℃ 내지 약 -65℃, 약 -75℃ 내지 약 -65℃ 또는 약 -70℃ 내지 약 -65℃에서 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플을 함유하는 기재는 -90℃ 내지 -65℃에서 보관된다.

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

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

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

[0119] 일부 구현예에서, 세포의 핵산의 증가된 추출은 표준 관행과 비교하여 증가되거나 더 긴 시간 동안 추출 인큐베이션을 수행함으로써 달성된다. 일부 구현예에서, 상기 추출 인큐베이션은 약 45분, 예컨대, 45±5, 45±10, 45±15, 또는 45±20분 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 추출 인큐베이션은 약 25분 내지 약 65분, 약 30분 내지 약 60분, 약 35분 내지 약 55분, 약 45분 내지 약 65분, 약 45분 내지 약 55분, 또는 약 40분 내지 약 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℃, 예컨대, 45±2℃, 45±5℃, 또는 45±10℃에서 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 추출 인큐베이션 온도는 약 35℃ 내지 약 55℃, 약 40℃ 내지 약 50℃ 또는 약 43℃ 내지 약 47℃이다. 일부 구현예에서, 상기 추출 온도는 약 43℃, 약 44℃, 약 45℃, 약 46℃, 약 47℃, 약 48℃, 약 49℃, 약 50℃, 약 51℃, 약 52℃, 약 53℃, 약 54℃ 또는 약 55℃이다. 일부 구현예에서, 하나를 초과하는 추출 온도가 사용된다. 예를 들면 일부 구현예에서, 추출의 일부에 대해 표준 온도가 사용되고, 추출의 또 다른 부분에 대해 증가된 온도가 사용된다.

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

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

[0123] IV. 용해액

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

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

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

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

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

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

- [0130] 일부 구현예에서, 용해액은 예를 들면 비제한적으로 트리톤 X-100, SDS, CTAB, X-114, CHAPS, DOC, 및/또는 NP-40과 같은, 계면활성제를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서 그러한 계면활성제는 약 1% 내지 약 5% w/w, 약 1% 내지 약 4% w/w, 또는 약 1% 내지 약 3% w/w의 범위이다.
- [0131] 구현예에서, 용해액은 예를 들면 비제한적으로 우레아, 소듐 도데실 설페이트 및/또는 티오우레아와 같은 카오트로프(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% 소듐 도데실 설페이트를 함유하는 0.1 수성 수산화나트륨과 같은 알칼리 세제 용액을 포함한다.
- [0133] 일부 구현예에서, 용해액은 수크로스 용액과 같은 당 수용액 및 EDTA와 같은 킬레이트제, 예를 들면 STET 버퍼를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 용해 시약은 세포 현탁액을 원하는 농도의 2배(예를 들면 0.2 소듐 하이드록사이드, 1.0% 소듐 도데실 설페이트)를 갖는 동일한 부피의 용해액과 혼합함으로써 제조된다.
- [0134] 일부 구현예에서, 원하는 정도의 용해가 달성된 후, 용해액 및 용해된 세포를 포함하는 혼합물은 상기 용해 시약이 원하는 산물에 부정적인 영향을 미치지 않도록 조건을 조절하는 중화 또는 퀀칭 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 분리된다. 일부 구현예에서, 핵산은 예를 들면 비제한적으로 실시간 PCR 분석과 같은 부가적인 분석을 수행하기 전에 용해 버퍼로부터 분리된다. 소량의 핵산의 단리에 유용한 임의의 다양한 방법이 상기 개시된 방법의 다양한 구현예에 의해 사용된다. 이들은 비제한적으로 침전, 겔 여과, 밀도 구배 및 고상 결합을 포함한다. 그러한 방법은 또한 예를 들면, 문헌[Molecular Cloning (three volume set, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012) 및 Current Protocols (Genetics and Genomics; Molecular Biology; 2003-2013)]에 기재되어 있으며, 이들은 모든 목적을 위해 본원에 참고로 통합되어 있다.
- [0139] 핵산 침전은 본 기술분야의 숙련가에 의해 알려진 단리를 위한 잘 알려진 방법이다. 비제한적으로 비드(예컨대, 실리카, 자기), 컬럼, 막의 형태 또는 본 기술분야에 알려진 임의의 다양한 다른 물리적 형태로 고상(solid phase)을 이용하는 고상 결합 방법을 포함하는, 다양한 고상 결합 방법 역시 본 기술분야에 알려져 있다. 일부 구현예에서, 상기 개시된 방법에서 사용되는 고상은 핵산에 가역적으로 결합한다. 그러한 고상의 예는 적어도 2 개의 상이한 고상의 혼합물인 이른바 "혼합층(mixed-bed)" 고상을 포함하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 본원에 통합된 미국특허출원 제2002/0001812호에 기재된 바와 같이 상이한 용액 조건하에 핵산에

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

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

[0141] VI. 핵산 분석

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

[0143] 상기 단리된 핵산, 예를 들면 비제한적으로 게놈 DNA(gDNA)를 분석하기 위한 다양한 방법이 본 기술분야에 알려져 있으며, 이는 실시간 PCR 분석과 같은 PCR 방법, 마이크로어레이 분석, 혼성화 분석 및 핵산 서열 분석뿐만 아니라 핵산 조성물을 분석하는 그리고 본 기술분야의 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.

[0144] a. 실시간 PCR

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

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

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

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

- [0149] 많은 적합한 유전자형 분석 과정 중 하나는 TAQMAN® 대립유전자 식별 분석이다. 이 분석의 일부 경우에, 프로브의 5' 말단에 형광성 리포터 염료 및 프로브 3' 말단에 퀀처 염료로 표지된 올리고뉴클레오타이드 프로브가 이용된다. 온전한(intact) 프로브에 대한 퀀처의 근접은 리포터에 대해 낮은 형광을 유지한다. PCR 반응 동안, DNA 폴리머라아제의 5' 뉴클레아제 활성이 프로브를 절단하여, 염료 및 퀀처를 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 퀀처 사이에서 절단한다. 상기 프로브는, 특정한 SNP 대립유전자가 존재하는 경우에만, 표적 SNP 위치의 양쪽에 걸쳐 핵산 분자에 혼성화되도록 설계된다.
- [0150] 예로써, TGFβ I 유전자의 엑손 4에 위치한 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP를 증폭하기 위해, 미국 특허공개 제2012/0077200호에 기술된 바와 같이 정방향 및 역방향 PCR 프라이머쌍(도 2에서 서열번호: 1 내지 24)이 구축되었다. 일부 구현예에서, 상기 문헌에 개시된 정방향 및 역방향 프라이머쌍 중 어느 것이 본원에 개시된 개선된 방법에서 사용된다. 바람직한 구현예에서, 서열번호: 1(정방향) 및 서열번호: 2(역방향)의 정방향 및 역방향 프라이머쌍이 본원에 제공된 개선된 방법에서 사용된다.
- [0151] TGFβ I 유전자의 엑손 4에서 구아닌에서 아데닌으로의 돌연변이를 검출하기 위해, 도 3에서 나타나 바와 같은 서열번호: 25 내지 42에 따른 뉴클레오타이드 서열을 갖는 야생형("G") 및 아벨리노 각막 이영양증 관련 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 홈 결합물질(MGB)을 상기 프로브에 부착시켰다.
- [0152] **b. 실시간 PCR 사이클**
- [0153] 실시간 PCR 방법은 증폭을 위한 방법의 부분으로서 다양한 단계 또는 사이클을 포함한다. 이들 사이클은 이중 가닥 핵산을 변성시키는 것, 정방향 프라이머, 역방향 프라이머 및 검출 프로브를 표적 게놈 DNA 서열에 어닐링하는 것 및 상기 어닐링된 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머로부터 제2 가닥 DNA를 합성하는 것(즉, 복제하는 것)을 포함한다. 이러한 3단계 공정은 본원에서 하나의 사이클로서 불린다.
- [0154] 일부 구현예에서, 약 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 또는 60 사이클이 이용된다. 일부 구현예에서, 약 10 내지 약 60 사이클, 약 20 내지 약 50 또는 약 30 내지 약 40 사이클이 이용된다. 일부 구현예에서, 40 사이클이 이용된다.
- [0155] 일부 구현예에서, 이중 가닥 핵산을 변성시키는 단계는 약 80℃ 내지 100℃, 약 85℃ 내지 약 99℃, 약 90℃ 내지 약 95℃의 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℃의 온도에서 약 3초 동안 일어난다.
- [0156] 일부 구현예에서, 정방향 프라이머, 역방향 프라이머 및 검출 프로브를 표적 게놈 DNA 서열에 어닐링하는 단계는 약 40℃ 내지 약 80℃, 약 50℃ 내지 약 70℃, 약 55℃ 내지 약 65℃에서 for 약 15초 내지 약 45초, 약 20초 내지 약 40초, 약 25초 내지 약 35초 동안 일어난다. 일부 구현예에서, 정방향 프라이머, 역방향 프라이머 및 검출 프로브를 표적 게놈 DNA 서열에 어닐링하는 단계는 약 60℃에서 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℃ 내지 약 80℃, 약 50℃ 내지 약 70℃, 약 55℃ 내지 약 65℃에서 약 15초 내지 약 45초, 약 20초 내지 약 40초, 약 25초 내지 약 35초 동안 일어난다. 일부 구현예에서, 정방향 프라이머, 역방향 프라이머 및 검출 프로브를 표적 게놈 DNA 서열에 어닐링하는 단계는 약 60℃에서 약 30초 동안 일어난다.
- [0158] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 본 방법에 따라 제조된 약 1 μL, 약 2 μL, 약 3 μL, 약 4 μL 또는 약 5 μL의 게놈 DNA 샘플이 단지 약 0.05 μL, 약 0.10 μL 약 0.15 μL, 약 0.20 μL, 약 0.25 μL 또는 약 0.25 μL의 30X, 35X, 40X, 45X, 50X 또는 100X 실시간 PCR 분석 믹스 및 증류수와 조합되어 PCR 마스터 믹스를 형성하는 것으로 확인되었다. 일부 구현예에서, 상기 PCR 마스터 믹스는 약 5 μL, 약 6 μL, 약 7 μL, 약 8 μL, 약 9 μL, 약 10 μL, 약 11 μL, 약 12 μL, 약 13 μL, 약 14 μL, 약 15 μL, 약 16 μL, 약 17 μL, 약 18 μL, 약 19 μL 또는 약 20 μL 이상의 최종 부피를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 기재된 바와 같이 제조된 2 μL의 게놈 DNA 샘플이 PCR 마스터 믹스를 형성하기 위해 단지 약 0.15 μL의 40X 실시간 PCR 분석 믹스 및

2.85 μL 의 증류수와 조합되는 것으로 확인되었다.

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

[0160] **c. PCR 프라이머 및 프라이머 설계**

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

[0162] 프라이머 설계시, 숙련가는 설계되는 프라이머의 GC 및 AT 함량뿐만 아니라 2차 구조 고려사항(GC 함량 증가는 2차 구조 증가를 야기할 수 있음)에 기초하여 용융 온도(T_m ; 프라이머-표적 이합체의 절반이 해리되어 단일 가닥이 될 때의 온도로서 이합체 안정성을 나타냄; T_m 증가는 안정성 증가를 나타냄)를 고려할 필요를 이해할 것이다. T_m 은 본 기술분야에 알려진 다양한 방법을 이용하여 계산될 수 있고, 숙련가는 T_m 을 계산하기 위한 그러한 다양한 방법을 쉽게 이해할 것이며, 그러한 방법은 예를 들면 웹(world wide web) 상의 promega.com/techserv/tools/biomath/calc11.htm에서 이용가능한 T_m 계산기와 같은 온라인 도구에서 이용가능한 것을 포함한다. 프라이머 특이성은 Taq 폴리머라아제에 의해 연장되는 부위인 3' 말단 서열과 조합하여 그의 완전한 서열에 의해 정의된다. 일부 구현예에서, 잘못된 프라이밍(false-priming) 및 부정확한 증폭 산물의 생성을 감소시키는 것을 돕기 위해, 3' 말단은 표적 서열 내의 다른 어느 곳에서도 발견되지 않는 적어도 5개 내지 7개의 독특한 뉴클레오타이드를 가져야 한다. 정방향 및 역방향 프라이머는 전형적으로 표적에 유사한 효율로 결합한다. 일부 경우에, NCBI BLAST(웹상의 ncbi.nlm.nih.gov에 위치함)와 같은 도구가 정렬을 수행하고 프라이머 설계를 돕기 위해 사용된다.

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

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

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

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

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

TGFβI 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

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

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

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.

d. 검출 프로브 설계 및 검출 프로브

다양한 검출 프로브가 상기 개시된 방법에 유용할 수 있고 유전자형 분석 및 또는 정량을 위해 이용된다. 본 기술분야의 숙련가에 의해 통상적으로 이용되는 검출 프로브는 비제한적으로 가수분해 프로브(TAQMAN® 프로브, 5' 뉴클레아제 프로브 또는 이중-표지된 프로브로도 알려짐), 혼성화 프로브, 및 스크리온 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'-O-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); 단일 카다베린(5-디에틸아미노나프탈렌-1-(N-(5-아미노펜틸))설폰아미드); EDANS C2 말레이미드; 플루오레스카민; NBD; 및 피로메텐 및 이의 유도체를 포함한다.

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

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

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

[0181] 상기 개시된 방법의 일부 구현예에 사용되는 실시간 PCR은 또한 이러한 개시내용에 비추어, 본 기술분야의 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

[0184]

TGFβ1 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
#TGFβ1 R124C	서열번호: 48	FAM-CAC GGA CTG CAC GGA-MGB NFQ
#TGFβ1 R124L	서열번호: 49	FAM-CAC GGA CCT CAC GGA-MGB NFQ
#TGFβ1 R555Q-1	서열번호: 50	FAM-AC CAA GAG AACA GA G--MGB NFQ

[0185] VII. 진단 시험

[0186] 일부 구현예에서, 다양한 돌연변이 중 어느 것을 검출함으로써 하나 이상의 유전적 상태를 확인하기 위해 진단 시험이 이용된다. 일부 구현예에서, 진단 시험은 예를 들면 신체적 표시, 징후 및/또는 증상뿐만 아니라 가족력 정보에 기초하여 특정한 질환이 의심될 때 진단을 확인하기 위해 사용된다. 일부 구현예에서, 진단 시험의 결과

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

[0187] 상기 개시된 방법에 의해 수득된 핵산은 결실, 삽입, 전환(transversion) 및 전이와 같은 돌연변이를 검출하기 위한 시험을 포함하는, 다양한 진단 시험에서 유용하다. 일부 구현예에서, 그러한 진단은 질환이 발현되기 위해 2 카피를 요구하는 질환에 대한 유전자 중 1 카피를 갖는 병에 걸리지 않은 개인을 확인하는 것, 치료 요법을 개발하는데 상기 정보가 유용할 수 있는 질환에 대한 유전자 중 1 카피를 갖는 병에 걸리지 않은 개인을 확인하는 것, 착상전 유전적 진단, 산전 진단 시험, 신생아 선별, 계통 DNA 시험(유전적 계통 목적을 위해), 헌팅턴병과 같은 성인형(adult-onset) 장애를 예측하기 위한 전증상 시험, 성인형 암 및 알츠하이머병이 생길 위험성을 추정하기 위한 전증상 시험, 증상을 보이는 개인의 확정 진단, 및/또는 법의학/신원확인 테스트에 유용하다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 각막 이영양증의 검출에서 유용하다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 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, 티엘벵케 각막 이영양증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다.

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

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

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

- [0191] 일부 구현예에서, 진단 시험은 또한 유전적 변이가 약물 반응에 미치는 영향을 판단하는 유전적 시험을 포함하는 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, 뒤센형 근육위축증(Duchenne Muscular Dystrophy), 인자 V 라이덴 혈전증, 가족성 고콜레스테롤혈증, 가족성 지중해 열병, 취약 X 증후군, 고세병, 혈색소 침착증, 혈우병, 완전전뇌증(Holoprosencephaly), 헌팅턴병, 클라인펠터 증후군, 마르판 증후군(Marfan syndrome), 근긴장성 이상증(myotonic dystrophy), 신경섬유종증, 누난 증후군(N Noonan Syndrome), 골형성부전증(osteogenesis imperfecta), 파킨슨병, 페닐케톤뇨증, 폴란드 기형(Poland Anomaly), 포르피린증(Porphyrria), 조로증(Progeria), 색소성 망막염, 중증 복합 면역결핍증(SCID), 겸상 세포 질환, 척수성 근위축증, 테이삭스병(Tay-Sachs), 지중해 빈혈, 트리메틸아민뇨증, 터너 증후군, 구개심장안면증후군(Velocardiofacial Syndrome), WAGR 증후군, 윌슨병, 뿐만 아니라 유전적 성분과 관련된 임의의 다른 질환을 포함한다. 안과 장애 및/또는 안과 성분을 포함하는 장애는 비제한적으로 선립종안검맥립종(chalazion), 다래끼(stye), 첩모난생증(trichiasis), 안검내반(entropion), 안검외반(ectropion), 토안(lagophthalmos), 안검염(blepharitis), 누낭염(dacryocystitis), 안와봉와염(orbital cellulitis), 익상편(pterygium), 익상편 각막 이영양증(ptyerygiumcorneal dystrophy), 결막염(conjunctivitis), 신생아 안염(ophthalmia neonatorum), 박테리아 각막 궤양, 진균 각막 궤양, 녹내장, 푸크스 이상증(Fuchs dystrophy), 원뿔 각막(keratoconus), 진행성 황반 변성, 색소성 망막염(Retinitis pigmentosa, 백내장, 망막 장애, 황반 변성, 당뇨병성 눈 문제(예를 들면, 당뇨병성 망막증), 실눈-눈꺼풀치짐-역내안각주름 증후군(blepharophimosis-ptosis-epicanthus-inversus syndrome(BPES)), 안피부백피(oculocutaneous albinism), 마르판 증후군(Marfan syndrome), 스틱클러 증후군(Stickler syndrome), 및 CHARGE(coloboma, heart anomalies, atresia of the choanae, retardation of growth and development, genital/urinary anomalies, ear abnormalities or deafness) 증후군을 포함한다. 각막 이영양증은 비제한적으로 아벨리노 각막 이영양증, 과립형 각막 이영양증, 래티스 타입 I 각막 이영양증, 푸크스 이상증, 티엘벵케 및 레이스버클러스 각막 이영양증을 포함한다. 암은 비제한적으로 암종, 육종, 아세포종, 림프종, 백혈병 생식 세포 종양, 및 미지 기원의 암을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 암은 비제한적으로 두경부, 피부, 대장, 구강, 교아종, 유방, 후두, 식도, 내피, 자궁내막, 난소, 폐, 비노생식기, 직장, 전립선, 신장, 흑색종, 신장, 췌장, 위장, 혈액, 간, 자궁 및 뇌뿐만 아니라 유두종 바이러스-유도된 암과 같은 바이러스 유도된 암을 포함한다.
- [0193] 일부 구현예에서, 본 방법은 개인을 위한 유전적 프로파일을 결정하는 데 사용되는 게놈 DNA를 제공함으로써 개인 맞춤형 약물 치료 요법의 개발에 유용하다. 일부 구현예에서, 그러한 유전적 프로파일 정보는 치료 요법을 결정하고/거나 개발하기 위해 본 기술분야의 숙련가에 의해 이용된다. 일부 구현예에서, 상기 기재된 방법에 의해 단리된 핵산에서 확인된 다양한 유전적 변이 및 돌연변이의 존재 및/또는 부재는 개인 맞춤형 약물 치료 요법 또는 계획의 일부로서 본 기술분야의 숙련가에 의해 사용된다. 예를 들면, 일부 구현예에서, 상기 개시된 방법을 이용하여 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 티엘벵케 각막 이영양증 관련 SNP로부터 선택되는 2, 3, 4 또는 5개의 SNP의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 과립형 각막 이영양증 관련 SNP, 래티스 이상증 관련 SNP, 레이스버클러 각막 이영양증 관련 SNP, 및/또는 티엘벵케 각막 이영양증 관련 SNP와 조합되어, 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP, 래티스 이상증 관련 SNP, 레이스버클러 각막 이영양증 관련 SNP, 및/또는 티엘벵케 각막 이영양증 관련 SNP와 조합되어, 과립형 각막 이영양증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP, 과립형 각막 이영양증 관련 SNP, 레이스버클러 각막 이영양증 관련 SNP, 및/또는 티엘벵케 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 티엘벵케 각막 이영양증 관련 SNP와 조합되어, 레이스버클러 각막 이영양증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP, 과립형 각막 이영양증 관련 SNP, 래티스 이상증 관련 SNP 및/또는 레이스버클러 각막 이영양증 관련 SNP와 조합되어, 티엘벵케 각막 이영양증 관련 SNP의 검출을 통해 검출된다.

[0197] 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 아벨리노 각막 이영양증 관련 SNP로부터 선택된 2, 3, 4, 5 및/또는 6개의 SNP의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, 상기 SNP는 인간 TGF β I 유전자에 의해 인코딩된 폴리펩타이드의 위치 124, 555 및/또는 626에서 돌연변이를 야기하는 SNP를 포함한다. 이들 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 티엘벵케 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 R555W와 조합되어 검출된다. 일부 구현예에서, 각막 이영양증은, 예를 들면 R124C, R124H, R124L, R555W 및/또는 R555Q 중 하나 이상과 조합되어 H626P의 검출을 통해 검출된다. 일부 구현예에서, R124C, R124H, R124L, R555W 및/또는 R555Q가 모두 검출된다. 일부 구현예에서, R124C, R124H, R124L, R555W, R555Q 및/또는 H626P가 모두 검출된다.

[0199] **VIII. 진단 키트**

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

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

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

[0203] 일부 구현예에서, 키트는 대조군 gDNA 및/또는 DNA 샘플을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서 포함된 대조군 DNA 샘플은 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. 일

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/ μ L, 10 ng/ μ L, 20 ng/ μ L, 30 ng/ μ L, 40 ng/ μ L, 50 ng/ μ L, 60 ng/ μ L, 70 ng/ μ L, 80 ng/ μ L, 90 ng/ μ L, 100 ng/ μ L, 110 ng/ μ L, 120 ng/ μ L, 130 ng/ μ L, 140 ng/ μ L, 150 ng/ μ L, 160 ng/ μ L, 170 ng/ μ L, 180 ng/ μ L, 190 ng/ μ L 또는 200 ng/ μ L이다. 일부 구현예에서, 대조군 DNA 샘플의 농도는 50 ng/ μ L, 100 ng/ μ L, 150 ng/ μ L 또는 200 ng/ μ L이다. 일부 구현예에서, 대조군 DNA 샘플의 농도는 100 ng/ μ L이다. 일부 구현예에서, 대조군 DNA 샘플들은 동일한 농도를 갖는다. 일부 구현예에서, 대조군 DNA 샘플들은 상이한 농도를 갖는다.

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

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

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

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

[0208] 실시예

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

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

[0211] 구강 상피 또는 모근으로부터 DNA를 추출하기 위해, 샘플을 먼저 1X PBS 300 μ L에서 전처리하였다. 그 다음, 30 μ L 용해액을 튜브에 부가하고, 상기 혼합물을 볼텍싱하였다. 그리고 나서, 상기 혼합물을 95°C에서 3분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 30 μ L의 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 μ L의 전혈로 출발하여, 샘플을 먼저 1X PBS 300 μ L에서 전처리하였다. 그 다음, 30 μ L의 용해액을 튜브에 부가하고, 상기 혼합물을 볼텍싱하였다. 그리고 나서, 상기 혼합물을 95°C에서 3분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 30 μ L의 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 μ L의 용리액을 투명한 96 웰 플레이트 내로 피펫팅하였다. 그 다음, 100 μ L의 준비된 블랭크 용액을 웰 H12에 부가하였다. 그리고 나서, NanoQuant와 함께 제공된 제조사의 설명서를 이용하여 농도를 판독하였다.

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

표 5

[0215]

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

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

표 6

[0216]

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

[0217]

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

표 7

[0218]

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

[0219]

예시적인 PCR 사이클링 조건이 하기 표 8에 나타나 있다.

표 8

[0220]

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

[0221]

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

[0222]

참고문헌

[0223]

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

[0224]

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

[0225]

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

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

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

```

1  gcttgcccgt  cggtcgctag  ctcgctcggt  gcgcgtcgtc  ccgctccatg  gcgctcttcg
61  tgcggctgct  ggctctcgcc  ctggctctgg  ccctgggccc  cgccgcgacc  ctggcgggtc
121  ccgccaagtc  gccctaccag  ctggtgtgtg  agcacagcag  gctccggggc  cgccagcacg
181  ggtaagccga  gccgcctggc  caggggctgc  ggaaggtcag  gtagtcgggg  ctcgagcgcc
241  aagcgctggt  gggcattgaa  ctgggctggg  gggcgagggg  acaaagcccg  aactaaaaac
301  cttgcagcat  ggagcgctcg  gacaccagcc  ctgcacgcgg  tggaggaga  gagggaggga
361  ggtggaggac  catggaggga  aagcgggagg  ccgccgcttt  gtagaaggga  gtggggaagt
421  ggaccagaga  ctttcgacgc  aggccaaag  cctgagacgg  acagcgcttt  cagcttctcc
481  tcccagccac  tgcaaaaagg  gggaaatggc  aactctttgg  ccataatcac  cgtgggaggg
541  tgccaagggc  aaagcccacc  cagcagtaca  cctattccaa  cccagccagg  cccccggcca
601  gcgactccag  acaagaacct  gggccacaca  cgggtggcagc  atctaagggt  ccccagggtc
661  ctgtgctcct  ggcaggcccc  tgcactcaga  cactgctggc  acccgacact  gctctctggg
721  tacagcaagg  gcaatgtggc  acttctgtgc  ctgcccgatg  aagagcagga  gaatgactg
781  ggccctcaca  cacactgttc  aaatggggaa  actgagtcct  gagtgggtcc  actttccac
841  agtctgaag  tgtgactgg  agccaggatt  ggagtctgtc  ttaaagtaat  agctgggttt
901  gtaaatgtag  gacactatca  ttgcaggaa  tcctttgaga  ccctgaagat  gtgttggtct
961  taggagacaa  actcaagcag  aaggtctggt  ctgatagtgg  ccctaatact  gaccaggcca
1021  gaggcaggca  acatttctac  ctcaaaaacc  aggccatacc  tgcgtcacia  ataccaggc
1081  tttgctgcag  ctccagcct  acctggttgc  accaacttct  tttcataac  taggtaaaac
1141  tatatatgag  tagaatcttg  tagtgactcc  tcagaggaag  cctaaatacc  atcggggtct
1201  ggcgcttcaca  ccacacaagc  atgcccacac  ctccaagaga  ctgggcagat  ctgtgctcaa
1261  atcaaaactc  attgttgggg  gtgatagagt  tgacttcaca  ggccctgaaa  gtcttggtct
1321  cttgactag  gactgtctgt  ggtacgggta  caggctgccc  ctgttagggc  atagttgctc
1381  ttgtttcctc  tacttgtggc  tttatggtct  aggcctttca  ggagtttggg  gctctggcgg
1441  agagggcctg  ctggggcac  atctggccac  cctgcagagt  gaaatcaaac  caggcctggc
1501  tgcaacctca  acaccctcct  ggaagaggga  gaatactggg  gatatcctgg  ggtctttctg
1561  gaagtgggag  aatcagcttt  gacttgggca  gtgtgcagaa  tagagtgagg  ggggatgtca
1621  gaaagatgag  agggatagga  ggcctcaaca  tcaaaatgca  agcacctggc  atttttatta
1681  tctctgccca  cctctccgtt  ggtctctctg  cctttcctgc  caatgaattg  tgttatgttt
1741  ggggtgctca  atttgcttag  gaggttctta  tttctctgt  atcttcgcca  ctaagttagg
1801  agaagatcct  tatagcatgc  cctgcaacag  tgtcacctgt  aagggcattc  ctctgcacag
1861  ccacagtga  ggatcctcaa  aggtattgag  ggctttccat  caagagccat  ctttacagca
1921  aacctctttc  ccttcagagc  ccagaagagt  gctgaccagc  tggaaaacag  ggtttttttc
1981  ttaaatgag  atgctcttga  ttatgagttc  cagatattag  atcaacttcc  ccacataacc
2041  cctgcaggca  aagcctctta  attagcttcc  tgcagcacag  ctggaaaggc  ctattgtaat
2101  ctgtgatggg  cagagtaatc  taagaagtca  caggagcacc  cctgtcccag  tagaatctgg
2161  atgcgaggc  acatgaacca  tggcaaaatg  gttgcaggca  cagtgtgatt  tactctgac
2221  taactgtccc  tgttaatgcc  acagggtgct  ctggcctggc  acacagggtc  gtggcgccct
2281  gtgcaaatgg  ataacgttgt  tctagctcca  gcctttcatt  caaagtga  actgttagaa
2341  agggaaagg  aactttgtct  ttttaaggaa  ttgtagcgtg  ctgcctgata  tgaaggaaga
2401  aataacagct  gtgccttgta  tgtgcgcagc  actcgattgc  cgcttttgct  ttcgacctca
2461  ccacacacac  gtgagatcta  ctgttcatgt  tcccatttta  caggaggtga  aactgcagct
2521  tagtgaggta  gagagtgact  tagttcagac  acagaatgct  gttgggagag  taataactat
2581  gatatggtct  ctgactccc  agctatatct  gtgttgctat  agggaaaggg  aaaaataata
2641  ctgaaagaga  agtaaaaata  caatcacact  tccaaacatc  aaccaccaa  aactgaactg
2701  aatttctctg  agcacttggt  tttcaaatct  aagctgaaca  tcaatgctgt  tattcttgag
2761  gccagaagc  aacttgctca  tttcaattaa  gcttcagcat  gaacttctta  tgtacacagc
2821  ccaccacac  tccccgatgt  gagaaggaga  ggggtcacagc  cgccccagc  ctctgctgct
2881  gccacaagga  cagcagcagt  ggaacattc  agcaaaggaa  tgttgaggcc  acatccacaa
2941  gagactcact  gaagattcgc  caaacgccta  cggaaagtgg  cagggaattc  attgacagta
3001  attgtttcct  gctgatcag  attgaagagc  ttctgggatt  ctgtaacaat  aaataggacc
3061  gggggctgga  gtatggccag  caaggactct  tcagggggta  ttcagggact  gtctaactg
3121  tgaatcctag  gcagcaaaac  gaaaccagg  attcagaaat  ctggaggatt  tggtcaggcc
3181  cagctaggac  tagggaggca  tgggcctctg  ctggctgtgg  tcccttctcc  agccttcaact
3241  tctcttgctc  ctatgctctt  acatggattc  attaatgctc  attgtccctc  ctggggccac
3301  tcactttcac  ctgttgaaac  aaaaactggc  caagagggtg  cagtcatatc  accgcagaag
3361  agacagggca  gagaatgaa  ggggcagaat  ggactccac  ccaaaagcct  gactctgaat
3421  atttgagaat  tgttcaagtt  cctgcagagg  aatcatgatg  gggacagtag  gtgtagtttt
3481  tactgcaata  ttggtgtctt  cttaacaaat  acgtgcaca  tcaagtgatg  tctgtggatg

```

3541 gcattcttaa agtaacaggg aaattgatgt taaagaaata cttcatcctt tgggtgatac
 3601 ctgaagttct ctgagcttgg aggtcttgtg aaagccctca gtattgtttg ttttatttgc
 3661 tttcctctga cttgtgattc agtcagatgc atgcctgcct ctggctcagg aagatcaacc
 3721 ctctcctgac tgaccacgcc tctcctgact gaccacgtag cacagcagct tcctttccct
 3781 aggggctcct aatgaagctt tcacaatcac ctggcctgag cacagtttgg gtcaggactt
 3841 ggtatacttg aaaaaaacat gcaaaaccaa aatcctgtgg ttctggaaaa ggcttcttag
 3901 cagaaccccc agacatttac actctgcttt ttcacagggt ccctgaggat tctttggatc
 3961 tgggtagttt ggggagcagt attttcaaca agttcatttc gtgctccttc tacaccctgc
 4021 ctggatgcta ggccccatct agaattgtga caacagaaca aggcagaaca ctgtcctca
 4081 aggttctgtt gagtgttaga tgacagagaag agacaccccc cacctccccg catcacttac
 4141 aggaattctg tttggaaccc aacatcaaat aaggaccgta tccactgtca gaggatggga
 4201 agcagcatgt catctgggac attggagaaa ggctcctggg ggaagtggga cttgagctgt
 4261 gatctaagta atgaacaact gagagttaaa tgggagagca tccccatca gggtcctgag
 4321 agcaaccagc catggtttta accagctata aagcctcggg tttataggat agacagtaac
 4381 aatggcttgt ctttgggagc caagcagctg gtccaggcat gcagagcatg tctgtatgga
 4441 gagctgcctg agagatgctt ttgtttacac ttatcaattg cccatgtcaa agaaggatat
 4501 gtacatgaag ttacatcagt atgtaagaga gattttaaca atttttgcag gggaagcttt
 4561 catggggggt taggtgaatc taggttaaca gaaccaaagt ctaaacccaa gatatcccca
 4621 gtaccaagac tgaaatgact ctctcctcta tctctagaaa gttccagtga cccaaggagg
 4681 caaacacgat gggagtcatt aaagtggggt ggacgtgctg atcatcttcc taattctgct
 4741 gcttttgtt tcagcccaa cgtgtgtgct gtgcagaagg ttattggcac taataggag
 4801 tacttcacca actgcaagca gtggtaccaa aggaaaatc gtggcaaatc aacgtgagta
 4861 tctgtaacca gccaggagac caagctgtat gcacgctggc tgcagtcccc cagggcctgg
 4921 gccagccttc tagaaggta ggttgcttaa aaagccatga agatgcatgt gcgaacatgt
 4981 ctgggacctg cgtgctagg agtggcattt ttaggaaagt ggccaatttt gttttgcatt
 5041 ttttaaggctg ctgacaagac ttggagacat ttttcagggc tggtttgggt ttgcaagaaa
 5101 catgaaacac tgcgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtttctc aatcctcata aaataatata
 5161 gatatgcagt ggagaagcca ccagcatgtg actctgaaa agaaagccca ttggtgaatc
 5221 tgtactaaag aatgcatcc ctatcttaca gtcctaaggt aaacacccca aaagactta
 5281 gagcactaaa catatgcaga ttatgagaca gcatagcata taatatgtgc acagacttcc
 5341 tcattcaaac cctagctcta cctgggccag tcgattcatc tttagaaccc tccattgctt
 5401 tacttgaaaa gtctgtataa caaaaggacc caccttatgg ggttgttaca aggatggaat
 5461 gaaataatgt acataagaga ctgaatatgg tgcccagcat atatcagtgc tcaataaatg
 5521 ctagctacta ttattattat caccctagat ttgcaaatct agaccacaca agcagaagta
 5581 agagtgcctc cggtgtgtgg accagtgtgg ttacaatagg gcttgttgat gctgtttca
 5641 gcaaggaggg aggcagcttt taccctactg cccagctccc tgggtggaatc aggtgcatgt
 5701 tctaacaatt ctggggaaac ctaatctggt ttggcactgt caacagatct caaagctggc
 5761 tgtctcctat agctaggaag atgtgtatga caaatctcct gagccaactt tgaaggcctg
 5821 accttctccc tgtctccata cataatggga tgattaagaa actctaagcc actctcttaa
 5881 gcacttttca atgttaggga tttttaagtt tattgttgtg acattgcttt tgagcagaca
 5941 tctcctccaa tttaatagcc aactgaaaga agagaaaatg ctctttcctt aaactgtatg
 6001 tggaataaaa tattccaatg tgtgaccctg attatgttag gcaattagca atcctaatat
 6061 gaattgaggg aagtgtggat tcatggcaca gctggggaga taccagcagt ccctgggagc
 6121 ctgtccaggg caggtccatg gcagcttgct ccatgcctga ttgacagccc agcctgcaag
 6181 ctaaaagttg agtgaagtag gaggacacac tgccaagatt cagctaacag acaccagcg
 6241 atattcttgc tgcatagaac aaaaggagac tatgcaaatt atacaccacc cattcttcca
 6301 ggatgcctga cttaaaaaat aagaaaaaag atgggccggg cacagtggct cagcctgta
 6361 atcccaacac tttgggaggc cgaggtgggc ggaacacaag gtcaggagac agagaccatc
 6421 ctggctaaca tgggtgaaacc ccgtctctac taaaaaata caaaaatatt agcgggctg
 6481 gtggcgggca cctgtagtcc cagctactcg ggaggctgag gcaggagaat ggctggaacc
 6541 tgggaggcg agcttgcagt gagccaagat cgtgccactg cagtccagcc tgggtgacag
 6601 agtgagacac cgtctcaaaa aaaaaaaaaa aaaaagaaaa gaaaaccttt agtactgatt
 6661 gattttttcc catgtgtgta tattatctac tcaaattaac aattaattac ttaattaaac
 6721 acaaagccag gcctcaccta attgcttctt ggaaggtgac cagagtgtca gtgccaagca
 6781 acaactctt ctatatctca agagccctgg gcttcagagg gccatctttt ttgttaattc
 6841 aagtttctct gaaaatggag acccgtttat gatgacaagc tggctacagg gtagcatctg
 6901 ccacactgtt tcgggggtgc cgctgggctg aagcatttgc ccagctagtt aacaatagct
 6961 cgataacatt ccctatcagt gtccaggctg agaatactgt cagtgtatg tgccttggc
 7021 tcttgtaacct gtatcttctt gtgccaggac aaggcacaag caacagagct gtgtgttgcc
 7081 aaaaatgtcc tgatgagcag gtcaaccctc cgggggcagg tttggatatg ataattgtgt
 7141 gatgtgggtg cgcagctccc ttaccagtg agcacaaggg gagtctctca ggaaaaggaa

[0227]

7201 gaaatgtctg gatgaggtgg ggagatgggg ttcagagtgg actcaggcaa agcccgatgc
 7261 ccagtcaccag ctgttggcct agtctcacaa agccagaagg atatgacatt tacattcaac
 7321 tcttgaattt gtggccactg ctttgggcaa cttcaaagag agaaaatgaa gatagaaaaa
 7381 tattatttga tataaaactt ctaggacaag agaggccctt cctggaacat tacatgtagt
 7441 attaggaagg tggagctgcc ctggaaaaga tccagagaac tcagagagag gaagaggtgg
 7501 aacccatctc tgttcttcta gagagctcag taagagtggc ttggcagggc tctgtgtac
 7561 ctgagaccaa gaccagtggg gaggctactg tctgaccacc atacggctcag aattcagtgc
 7621 catgggtggg cagggtggga ggggagagga ctgtgctggc tggagtgtat gttatcctgg
 7681 ggaaagttagg tccctagatg cctttagtgg agtgaggagc agactgggaa atgggagcac
 7741 agtagtgggt ggggcaaaaa ggactgtctc tgcagtgggt ccataggcag ttggaatttt
 7801 ctgagcaaga ctccagagaa ggaggctgga gcagaggtgt atgttgggat gaaaaggagt
 7861 aaagtatcat gggggaggag gcagctcagg ttgtcaaggg tcaagaaacc agaaggagaa
 7921 ttccaccttg gaagcagaca acgggtacca agcatacagg ggaatacttt gtggtgagag
 7981 gtcacacaga gatacaggag ccgacctggg gagacaggag cctggagcca cctgcctgct
 8041 tttgtgaggc cccagactcc actgctatca tcaggtgaag ctctgttgcc tgcacacaaa
 8101 agcttttctg catttacaac gagagaaggg cctgagtttc tgggtgcaatg cgtcaagctg
 8161 acatatggac tttattacag gaagtgggta ccagtgggtc cctatttagt ggctgttatt
 8221 gtgaatttta ttgttcggaa attcacttta gcatattttt cagatcctaa atagcacagg
 8281 agtgatacaa tggctaataa aacaaaggag gctgtgggga gcagacagtc agcatccccc
 8341 tctgtgattt caggccctgg tttgattagt agccataaaa ttttttactg gtggcacttt
 8401 gagcaaaagg gcagaaatt gtggtcagga agcctggctg cctctcgaca ggcttccctt
 8461 gtgctagccc cagggagagg aggcctattt aacagccaag tccaagttag catcatggga
 8521 ctggaatagt catagcagga gctcagacat cataaacgtg gcatagggag ggctggtgga
 8581 ggagctagcg ggtatgggtg gcagctattc attccaaaag tcttgaattt gtttcacgag
 8641 caacacattt cacaagtgcg aagcccttct ctggagccaa gatgagctgg cagagcactc
 8701 ctgttttctc agtagcaagt gttcctttgc ccaggggcaa aaatattaat actccttcag
 8761 cactgcatta atgcttaaa atttaacttt taaagagatc agctggtgca tggctcagct
 8821 tttccatcag ctggcagggc tttttcagta ggtgtccttc tgggcagggc actggggaca
 8881 gctgacgtga aggtgaagaa gagctgtcgt tttcctccct tatatccac aaccttggtc
 8941 ccaagaggaa aaaaaagaag atgggtgagaa gtcattcaag cagaccccag acccatacta
 9001 gtgcctcctt tctgttttca tatccctgtg cagccagctg ggatctcttg aataatctgc
 9061 tctgggggca ctgagattgg acatacacca aacagcggag atcgaccaa cgcctctgtt
 9121 gggcagtggt tctgagggt tctgtcccat tctgtaaaact agggagctga ctagctgaca
 9181 aggaatttta ttctgttggg tatttacatg aacctatgtg ccacctgggg taagaccttg
 9241 tggtaggtag aaacatgact tcccaaaaat gtccacatcc taatctctaa ttctgtaaat
 9301 atattccctt actggaaaaa gagactttgc aggtgtgatt aaattaaagg tcataaagg
 9361 gagagattat ccaggattat ttgatgagtc taatataatc atcagggtac ttaaaggagg
 9421 gaggcaggct gtgcctgggt gttcacgcct ttaatccag cactttggga gactgaggcg
 9481 agcgggtcac gaggacagga gttggagacc agcctgacca acatggtgaa actccccctc
 9541 tagtaaaaaa aaaaatacaa aaattagcca ggcatggtg tacacacctg taatcccagc
 9601 tactcaggag gctgaggcgg gagaattgct tgaacccagg aggcagaggt tgtggtgagc
 9661 tgagatcgca cactgcctc ccagcctggg caacagagca agactccatc tcaaaaaaaa
 9721 aaaaagaggg aggcagtggt atcagagtca gagaaggcaa cgtgatgatg aaagctgaca
 9781 tttgagtgat gcaaccacaa gccaaggaaat gcaggcagct tctcaaagct ggaaggagc
 9841 agcaatggat tcttccctac agcctctgtg aggaatgcag cctttgattt taaccccata
 9901 aggccgattt ctgactctag cctctggaat tgtaagataa tttgcatgat ctcaagccac
 9961 taaatttgtg gtaatttgtc acagaaagca atgggaagcc aacacaggcc ttatttgttg
 10021 acttatagat gcatttttct ttatttcaat gtacttttat caatgggtctc atgtagggtg
 10081 ttgtcttcaa tgaagatatt aacatagttt caactttaag gtttatatct ggagtttctt
 10141 tagaagcttc acaactgacc acttagtaaa cagtaagcat ctgttaagtg cttctcatat
 10201 gtaagtcat tcaattctca caatcacact ataagataaa tatgattatt agccatttta
 10261 cagatgagga gacaggctca aaagactttt atgcaacctg gtcaaagtca ttcactggta
 10321 agctgaggag gtctgtccac ttcttttgc tgcccccagg ggggtatcaag cctggcagtt
 10381 agtgtcagcg acttaggag tgaacaagtg agcaggcctg taggacctg ctaaaactgcc
 10441 ccaggtctct gtctacagcc tcaaactctg ggctgtgggt cccagagaca aggcctcctc
 10501 agcatcagag aaggatgcct ttgtctcagg gtcataacc ttctccaggt tgctcacc
 10561 ctgctgtaaa ggggatcccc aagaccgctc atcagacaag gagcttggga actgaggaga
 10621 cacagtacgc ctccaggagt gcccaaatg ccctcacatg ctgcatacag attgccacaa
 10681 ataaagtaca tccacattct gaagactctg tcctcatcac caaccaggct ggccccgtgt
 10741 gagggctgta gtggttgagg cctttgttgg tagacagtag gttaaagcaa gccatgattt
 10801 tctattggga ggcttcagaa tcagctcagc tgtgtttcca agaccaggag ggcagaaagg

[0228]

```

10861 aaaccatccc aggcaagcag tccatgggcc atgtcagatg tctagacgtt atgggtctgt
10921 gtttgcctctg ccattcctct cggaaactat gatgccctgt atgggtttacc ttcagtcaca
10981 ggtgactggc ctacagggcc attccttgtt ccaacgactt ctcgagtata attaatcccc
11041 aggcattttac ggccagagca gccggccaaa tccgtgaagt gcagtgggtg ttttaaatta
11101 tattaacttc ttggaaactt attttaggga gagaaaactc agtacttctc tctatccaat
11161 cttgagtaaa aatgttagaa gggactgggt gagagcctcc cagacatccc tacacataga
11221 ctttgggttg acattatctc tttgcacctt ccttgaactt ttcttctaaa ttaggtgcct
11281 tccctaattt aggcaccttc ccagtactag tctgtgacct gttaggaacc aggccacaca
11341 gcaggagtgt agtggcagg agtgagcatt attgcctgag ctccgcctcc tgtcagatca
11401 gcagtggcat tagattctca tagcagtcgg aatactattg tgaactgtgc gtgtaaggga
11461 tctagcttgt gcattcctta tgagaatcta atgcccgatg gtctgagatg gaagagtttc
11521 ataccaaaac cacccttcc ccctgccacc atctggggaa atattgtcta ccacgaaact
11581 gatccctggt gccaaaaagg ttggggaccg ctgtcctaag ggatctgctt tttctgacct
11641 gaggtttttc tttattagac tgtatctggc tgaggagaag cctgaagcct ttaatcggaa
11701 cagctttggc tgatgagatt agattcagaa accaacagat tggctctttc tatgcaggga
11761 agcctaggaa ctggggggct atggctggga agccccctat tgtttccatc ctttctctatg
11821 ttcactctgg aggaattgca tcagaccct gcctctgtga ttgctccag ccatccaac
11881 cacagatcat atgttctgcc tgggaccagg gccaggggagc atggcacact gagctgagta
11941 taaggagagt ggagcaggcc actgccagcc cagaaaaatt tggctcaaagt tgcctgaaat
12001 cttctcagcc ttcgattcac agctgctctc tgcgtctctg gggccatgca gaccagttca
12061 gaaaagagtt aatttgttgg ggcagttgga ggcaggtgga ctgccagctt tgacaccttc
12121 ccagcccaca ggctgtgca ctggggctga aggcgtggct aaccctgca cactagaga
12181 gtgacagaga tgcagactg ggcagcagga aggcaagagg attaagagag agcttctctg
12241 ctgaaagcca cactcgttta accaggaaaa agcccttggc acgagaagac tcagtggcct
12301 gagggactga gccttggttg ttggcatgt gctgcataag ccatccatgt gtgacagtgt
12361 agtgtagtcc agccactgtg ggacatgggt gctgaaagac cacatggaga ggaacagtga
12421 gtgctgacaa ggcctagcct tgatcacttt ggagacacct cctgtgtctt ctagatgtca
12481 gactttccaa atctgtctgc tatcctccaa acgtgcattt tcaagagcaa tggaaaaagg
12541 attggaactg atggaatgca gcaagagtcc taggtctgtt actacctacc tatgacctta
12601 agaaactcct tcacccctca gaacccttac agctttcttt ctgattctat cctgagttac
12661 tctactccaa gctgagactt ttctgcttag atctatccct tcctcctaaa ccccaacct
12721 ccatttctcc tgggtgtctt ctttacacac ccctcagcat acacacacac ctagccacag
12781 gaaccaatga gttaatattt gaggagttgg ttttcttttg tcctcaatga gatcctgggt
12841 aggccacttg agctgttcag ctcccttgcg gtattttggg gatggaactc agaagccaac
12901 aatatagaaa aagagtcttt ggccagcttt ccaggggct ccatgccata gagagtactg
12961 caccctgtgt cacagggggc cctgacatga ggactttgag gataaacta ttcctccaac
13021 tctgcttcag catctccatg gattttcaca cagacacttt aggaagaaaa ctaagtttgg
13081 ggggacttga cctaatacca catcacagcc ccagtaatac agccctggaa tttatcacag
13141 aaagcctaga atcccatgca tatcccatgc atatgcatac ctagtccat gggttcaagg
13201 cttggagctc tccctggatt tagctgggaa aagttggcag acagtctctc tctgtcttct
13261 agaaatatgg actagaatcg tgagtgtgag attgcaagta acttttaaaa tcatctagtt
13321 taacttcacc ccatttcata gaccaagaaa ctgagaccag agagagaaat ggactttcaa
13381 gttcaccctg ctagttagt atggatcaca agtcaaatct cctgattcta gcaactgttc
13441 tcttacacca caccaccttt gaaagtgtgt caatcaaatc ttactttagt tgcagaggat
13501 gacttttagt tctgaagata aaattgtgag tcaatcaaga tgagtcccaa gacaatagcc
13561 tgttttagccc ttataagttc agggatgaaa ggttagaaa aaacaggatg gaaggaggac
13621 tggagaaaaa aacaaaagag gaaggaaagg gagggaagca aacaggaaaa aaaaagaatg
13681 tgcatagtct gtcactctc agtcatttcc tgggagccca tttctagcaa agtgacagct
13741 gcaactccct ggccacctga gcatcttagc tgatctgtct ctgaaacacc ccctggagaa
13801 cagatgaatc aggttctatc ttcgcttaac taagtcttcc ctgagacgac tccattttaa
13861 tgaacaagag caggatttcc tgggcacact gagagcacct tccagaggcc cctccagagc
13921 cctaaaagcct gtatttcttc cagtcggcct gtttcttcc tgggtgatgtc attaaacgcc
13981 ctttgagagt cccacagtga gcagtctctg ggtaaaaccc gctgcaatta aagtctgagt
14041 cctttctctg ctcaaaggcc atattcatat agaagaaagg aaaaggaagg actggctgtt
14101 tgcatttggg tccaggcctt ttgagtagag gtcgtgctca ctccaccgaa ggtacagggt
14161 agccttcagc agaacctggg gatthggttt taagcaagtc tttcttaggt gtgggctttc
14221 agaacacttc cttccttgca atattatttg aaattctcag tgttttagcc gtccccagaa
14281 tattggttcg ttaaagctgt gtatttcaga tctccagaca gtggtcactg tttgtatatt
14341 ttcaatttca aaccagaaaa caaaagttct tattgattac tttttttatt taaaaataa
14401 aaagtaagta tcttcgtaag aggagctttg ttttaatttt aaagttttaa atttgattgt
14461 gaagacagag aaaaacttga tgattgtaga tataattccc tctttggcta ttcattcaga

```

[0229]

14521 gaactagaaa atcatgagag atttaaatgac cactgcctga tacacatatg tgttttacag
 14581 atgaggaaac tgagaccag agagatgatg aaattggctg aggatggccc agctggtcag
 14641 tgaagagctc agagccagag ctggtgcagg gctctttcta ttccttctctg ttccttttca
 14701 ggaacactca ccatcggtctt tcctgtgaat aatgttgaga taaaatcctt ggtgcattat
 14761 gttttctagt cacaacattg actaggctgc cagagtcctc tgttctccca gttgggtggc
 14821 tgtagggtgtt ggcagccgcc aggagcattc tacagaacag aggaggagtg agactctcct
 14881 tgctcaggaa aggcagacct atgacttagc aaataactcc taagaggaga gtgtttcacc
 14941 caccattcct cttccttggc tgtggaggca acttagtgga gaggggccag atgacctgtg
 15001 aggaacagtg aagccctgcc taacacaatg tatggtgtgc ttgttacaga gtcacagct
 15061 acgagtgtctg tcctggatat gaaaaggctc ctggggagaa gggctgtcca gcagggtgaat
 15121 gaatcctccg ggccttgctt gttggtgtgg gtggaaggga atggtgggag agaggagtac
 15181 ccacataaaa ggcagcagag tgtgaatggg ggcagtggca caaggacatg gcattctccc
 15241 cactgtgcca ctggcccccag gctctatgag aggggctgag gaatggaagc tggaaacagc
 15301 gcatttctctg agctgctcct cctggcctcc ttaccacact ggtggagtat actccaactg
 15361 tggcctgtcc atgccccttc cagcaggcac aggcctcagg tcaggctctt ggcctctgcc
 15421 tctggctggg agtgattcta aacacatcca gcagggtcag cctgatagcc catcagtttc
 15481 cgatcagctc tgctagagag ccgatgggat gtgggaggag ggggtcactg gtgggctggc
 15541 aaccccaagc catccccatc tccctctgtg tctaaacttg gccctttgga gttcggtagg
 15601 gagaagagcc ataggccagg tgggctcacc cagagtcagc agagagtcctt acaaatgggt
 15661 gcaactggcg aaagacagca tggcacctgt gaattttatt agagcttttc ttttagtgct
 15721 acacacaagt gactgtacag gggagttagt attttgtttt aattttgaaa tagagtcatc
 15781 ttttgggtatc tgcgggggat acccattcta ggatgccata tcctcagatg
 15841 ttcaagtccc tgatataaag tggatagata tttgcatgta atctatgcat attcttccat
 15901 gtacttttaa tcatctcaag attacttata ataccaaata taatgtaaat cctatgtaag
 15961 tagttgttat accctctttt aaatttttgt attatctttt attgtatttc aaaaaatatt
 16021 tttggtccat gtttagttga atctgtgggt gaagaacca cagatacga gggccaactg
 16081 tattggctat ttttttagtt aagaattgga gactgaggcc aggcgcagtg gctcatgcct
 16141 ttgattccag cactttggga ggccaagagg ggcagatcac ctgagccaa gaaatcgagac
 16201 cagcagcccg tgcaacatag tgagaccttg tctcttaaag attgtgagac tgggctgggc
 16261 acggtggctc acgcctgtaa tcctagcact ttgggaggcc aaggcagggt gatcaactga
 16321 ggtcaggagt ttgagatcag cctggctaac atagtgaac tctgtctcta ctgagctgag
 16381 aaaaaaatta gctgggtgtg gtggtggcg cctataatcc cagctactca gggagctgag
 16441 gcaggagaaat cgctgttatc caggaggcgg aggttgcatg gagctgagat agggccgttg
 16501 cactccagcc tgggcaagaa gagcaaaact ccatctcaaa aataaataaa taaataaata
 16561 aataaatcat gagactgaga cataacagga aggagggcaa tttggttggg tccaaggttc
 16621 cttagagtatg tgatgggaga ggttgggtcg ggtggggcca tggaggtact gactcaagtg
 16681 gagggacagg tggggaaatg ggaatgggaa agaagattga ccttagaagg ggagctcaac
 16741 ctctgaacc taaatttcaga ccttcaaaa tgaatattaa gctcattttg gctcaagaaa
 16801 caaaaaacaa atgaacatga aactcatttt ggtcttataa ggtctgagaa accccttcta
 16861 aacttcaagc tgctttaaga aataacattt tattacctgc aaatacacac agtactttgg
 16921 agatttataa tagtctctta ttctaataga agccattagg gaaccagttt caataaacag
 16981 gtaaatctgt aagactagtt tgtaattagg atatctgttt ccagtgtcca ttctgcctc
 17041 tgttatctaa atgtctggga acaagagctg tgctctgctg tgtttaaat gattaaaaat
 17101 caccaattag ttgagttcac gttagacagg atttgactta ttgagttgtt ttaagaagac
 17161 tataacaagc cttaaagccc ccagaaacag cctgtctttg ggctttccca catgcctcct
 17221 cgtcctctcc acctgtagat gtaccgtgct ctctgtcaga gaaggagggt tgtggttggg
 17281 ctggaccccc agaggccatc cctccttctg tcttctgctc ctgcagccct accactctca
 17341 aacctttacg agacctggg agtcgttggg tccaccacca ctgagctgta cacggaccgc
 17401 acggagaagc tgaggcctga gatggagggt cccggcagct tcaccatctt cgcccttagc
 17461 aacgaggcct gggcctcctt gccagctgtg agatgacctc cgtctgccc ggggactctt
 17521 atggggaact gccttacttc cccgagggggt gggcatgatg aatgggagtc tgcagtcatt
 17581 tcctactgtt tcaggaaagt ttctccttaa ccccttagaa aaggctgtgg aacttgagct
 17641 aaaatatgtc ttaccaggtt gcgtctaata cccccgttc cctactgggc agaaagactt
 17701 ggggtccttc tgaggaggga tccttgagc aagagaggcc tgggctcacg agggctgaga
 17761 acatgtttcc cagagttgca aggacccatc tcttaaacac agagtctgca gcccttaact
 17821 gacacctgt ccttctcctt aggaagtgtt ggactccctg gtcagcaatg tcaacattga
 17881 gctgtcctat gccctccgct accatatggt gggcaggcga gtcctgactg atgagctgaa
 17941 acacggcatg accctcacct ctatgtacca gaattccaac atccagatcc accactatcc
 18001 taatggggta ggggatcccc agccatactg catggccctt ggtgcataat gaaccattt
 18061 ctgttccatg tgtgggctgg tttctgggtt ttaagctgta gacaaccac cctctttgtg
 18121 cctgcttctc cttgggcccct ctattccaca gcttgtggaa cccacatttt gctactgtgt

[0230]

18181 ttgaaacac tgttttctcc tcccggggct ttgggactat gcctctgttg tgttgactgc
 18241 tcatccttgc tgcctctctg ggcagattgt aactgtgaac tgtgcccggc tgcgaaagc
 18301 cgaccaccat gcaaccaacg ggggtgtgca cctcatcgat aaggtcatct ccaccatcac
 18361 caacaacatc cagcagatca ttgagatcga ggacaccttt gagaccttc gggtaaggga
 18421 ctgcccctggg tggaggccca ggcttgggac acattgcctc ccaagagggg cctagcagga
 18481 actcttctgc aggagaggta gaggatggct cctgtagggg aacatagagc aggttcccct
 18541 gaatgccttt gaacatggag aattcattga ccagacattc agcttgacct aacctgtgaa
 18601 attctccatc ttctttataa agtgttcctt tccttgccct ccttggaagc gtcagtgggtg
 18661 tgtggctgca gcagcacagt gtcctctgag ccctggacct gcactgtggc tccagaggt
 18721 ggcagttccc acatggggta ctagaataaa tggcctatca ggctgtgtgt gctttgggat
 18781 cacatgtccc caccctagga ccctggttcc aaccatacgc atgttctctt ggagccaga
 18841 acagcagaga agccaccagt gtggacacag aagtcaaggg tctgatttcc agcctggctt
 18901 ctgactgtc tggggccgca ggaatacggg tccttcccc atgcccagca ggcatttgtc
 18961 ttacaactgg aggggaaggc atgttctctt tggcaaggac tgctcaggag gaagtggagg
 19021 caggctgccc tgtcagggtt tttgccttga ttcaaggaga acttctaac cacaaggat
 19081 acaagtggga gtgaggcgga ccctccctag agatctccaa cacagagaga caaacacgct
 19141 ggggctggct ggcactgaca ggctcgcag gtgtggatgg ctgttagctg ggagcttcgc
 19201 tgtctaagct cctctcccat gcttttcttc tgggttgctc gaaggacggg ggtctgcaag
 19261 aaaaatgatg tcccacatag ttggcagcac gtgaacagca attgatccct ttgcatcacc
 19321 tctcttact gtttagattt ggtaaatatt tcttcttcc ctcttctgac cctccatttt
 19381 gccgatcttt ccttcttata acacatactt actaggatcc tgctacttcc cgggtgggccc
 19441 tatgtgccag gagtatagag gtgaacaagg aaggcaaatg tctattctca gtagagctaa
 19501 tactctatct ggagagagac aacaaacaaa tcaacaaggg agccaggggc tgtgataatt
 19561 tatgtcaagt gggcaggtaa atcgggagtg acagtagtgc agggaggatt ggaagtgcag
 19621 ggagtctctc ctggaggagg tggcttttga tctgcagcct aaaggatgag aatgggtcca
 19681 ttatacaaaa tgcctgggca agagcacacc cagtagaggg gagagtaata gcaaggctc
 19741 agggcaggaa gggcaaggga gaggccagtg ggtgaggtca catgtgaagg gcatacaatg
 19801 ggcaaaagca aggccagagt gggcaggccc aatcctccag gacttgcaag cctgggaaag
 19861 agtgcacttc catcctggga gcagcaggaa accactcagg cctttagaag atccttctgg
 19921 cagctgtgta gagaatgggt ggtgtgatcc ttccatgcat gggctcatgt acgtgattac
 19981 cagtaactgt cgagtgcag tgtgaggagg gctgcaagcc atgagtgtag gcacagcaga
 20041 cagactcacc tttgtctggc ggtgagatgg ggtgggaagt gtgccaagt gacctccaa
 20101 agaaatgata ttttagtgga agaatagaata gaatcagaga agcaaagtaa gagggaagag
 20161 cagagaggac agcagggaca aggacttggg ggcaggaaag ggaaggcag gtttaaggaca
 20221 tgaagatgg ccaggctggc tggagctcag gccagcaag gccctctggg ggccatggct
 20281 atgggtgagc ttgggtttgg cttctgtttt cgtcttgggc ttctgtgaaa gcctcgagcc
 20341 cttgagggga accagtgaag ctgtgtgtgc atcttctgtg gggagtgcc gaagtctcag
 20401 ggagcactcc atcttctctc ctccccacag gctgctgttg ctgcatcagg gctcaacacg
 20461 atgcttgaag gtaacggcca gtacacgctt ttggccccga ccaatgaggc cttcgagaag
 20521 atccctagtg agactttgaa ccgtatcctg ggcagcccag aagccctgag aggtgagcat
 20581 cctttggctc ctgctgctgc ctcatattgt cagctagatt gagcccaaga cctgctctgg
 20641 tccaagatga acataaccac tggcatgagg tgaccctcag gatattccact gcagccatgg
 20701 gctggggtca tctgtcctg ttgcttcagc taaccgtgtc tctagcagcc aactactct
 20761 gagggctgac tacagaatcc agcagctttt gtctgggaga gctggactga agagaggcat
 20821 agctggagac ccatagtctg ccctggccag aaacaggag agtgaaaggc tggaaatagcc
 20881 aaggccagag caaggctaatt aggtagagca acagcttaca ggtgtggggg tggcagatac
 20941 tggcaccctt gaaatggatt cctcatgccc acgcttcaat attcttctct gtggctaggg
 21001 gatttatgga taaacaaaa ttacagttaa aaaccagcca taggccaggc acagtgactc
 21061 acgctttaa tatcagcact ttgggaggac aagtggggag gatcacctga gatctggaat
 21121 ttgagaccag cctggccaac atggcgaaac cccatctcta ctaaaaatac aaaaattagc
 21181 tgggcatggg ggtgggcacc tgtaatccca gttactcagg ggtgaggga ggagaaccac
 21241 ttgaaccagc gaggtggagg ttgcagttag ccaagcttgc accactgcac tccagcctgg
 21301 gtgacacagc gacactccgt ctcaagaaaa aaaaaaaaaa aaacagttat agtagtcaac
 21361 ttttgactct ccatttcaga tttcgtcatg ccctcctcaa tgagctgcta agttaggcag
 21421 tgcattgatt attgtctcag gagagggaa gaaggagcta acgtgttttc acatgttttc
 21481 cttttggaga tgagaaagga ggactctgcc ttccccctac cctggccctt tctactccag
 21541 gacctctgaa aggcctagag cacaagctg ctgcttgagt cccctgaaat gcagggtacg
 21601 cccaggtct ctgatgtacc ccaccacact tttcctctca aacatattcc aggatcactt
 21661 gatttctttt gaatctattt aaaccaccg tgtcaatgtg ctatataaaa tgtctaatac
 21721 atttcagaca ccctatacat ctatacattt aaagtgttct ccttctatct gtgcagggat
 21781 gggaaagggc atatttctga aagcacagat gggaagacgg gatttgttcc gtgtccagg

[0231]

21841 gattatggtta cctctatgcg cctggccggc actggggaca gaggccatga aatgaatac
 21901 agcacagcct ttgcctccaa gaaacttaag acctagtaga aatggcaggc tttaaaacag
 21961 gttgttggga tctgattttg tgagtgcagt gacagagata ctcacagcac aaaatgggga
 22021 atgagggcgg gcattgggac acacatagcc ttaaggggccc caaaggcttt tagaactgta
 22081 ttccctatta aaacatgatt tgcacagagc acattctttg ctttggagac ctcagaactc
 22141 cttactatag gccgggcatg gttataatcc cagcactttg ggaagccaag gcgggcagat
 22201 cacttgaggc tgagagtcca agaccagcct ggccaacatg gtaaaacccc gtctctacta
 22261 aaaatacaaa aattagctgg gtgtggtggt ggccacctgt aatcccagct actcaggagg
 22321 ctgaggttagg agaatacactt gaacctggga ggcagaagtt gcaataagcc cagatcatgc
 22381 cactgcactc cagcctgggc aacaaagcta gactctctca aaagaaaaaa acaaaacaaa
 22441 acaaaacaaa acaaaaaaaa ctccttatta taaactgtaa gaaaaaaaag gccctactt
 22501 cgtccctttt gcaaatctgc cttttctac tactaacca gctggttcag agcaaggaca
 22561 ctctgtttgg tgccatcgct gcagactgga aggaagaggt ccttgcccca caccacacag
 22621 tctcctgctg ttaccggcag gttggcaggc aggcaggcga gaagcagcca gggctggtgg
 22681 tctgtccagt ttgaagacta gtttccagcc ctggccctgc tcacctcca agtggccctg
 22741 gcaggttccct ctaccacatc gtggacttca ccttccttct ctaagaagct caatcccaa
 22801 ggcctcatte ccataggcct tctcaccctt tttctttccc tctggctgaa tgtggccagc
 22861 acgggcttcc aaggccatca actcgtctgc agcagcccca tgcttgacag ggcctcagag
 22921 cttcctctcg cctatgacag tgtggtttt gttccacacac ttgggatcag attgaaactc
 22981 gcctccgtgg tgagaatatg ggacatagag cctcgttgac cttggtgagc agcagtcag
 23041 gccacctgct cagcctgggg ttgggggggg ctcctcctcc ttgactggtc cttgcatttg
 23101 cctccatcca gcctgtctgg gctctccgag gcaatggaga ccagcaggag tcacgatggg
 23161 tcaggagccc cctttggggc tcagccctgc cctgccccct aaagtagcac ttggataagc
 23221 aaataaatta ttatacttac tatttatggg tgtggtgaat gggatggcaa aggccaaagtc
 23281 ttactgatca ccaaacctta agatataatc tggcagctag tagacccttg ggctaaatga
 23341 acagaaaact ggacaaataa agtgtacaca aataactcaa agctgtcatt tgtacacttt
 23401 tctctttttc ctactacagt ttacattttt ataaagggtga gtagatttct aaaatcccg
 23461 ggtagctctc cttgagtttt tctgttatcc ctgaagttca gctacaataa agctaatac
 23521 taacatttgt tgagcattta ctctgttgc aggcctcgtg ccgagtgtct taggttcaga
 23581 atttcatgtc atcccacag cagccctagg agatgaatgc aattcttatg tccacttgac
 23641 tgataaggaa gttgaggttc aaagaggcta aatgactctc ccagggtccc acagctggaa
 23701 agtgcccaaa gggccccagc ttgttttcta gggcagcagg cagaaggcga ggaggatctg
 23761 ggcctctgtg tgcccagacc tcatctgagg gtccctcatc gagagaacag gatcctcaca
 23821 gcatgggcag gctgcaagtg gtccctgagg ttatcgtgga gtggaccctg acttgacctg
 23881 agtctgtttg gaccacagac ctgctgaaca accacatctt gaagtcagct atgtgtgctg
 23941 aagccatcgt tgcggggcgt tctgtagaga ccctggaggg cagcagactg gaggtgggct
 24001 gcagcgggga catgtctcact atcaacggga aggcgatcat ctccaataaa gacatcctag
 24061 ccaccaacgg ggtgatccac tacattgatg agctactcat ccagactca ggtaggccag
 24121 gcctccgggg gccttgggcc tgccctggcc accatctctt ctgccatcct ttgtggcggg
 24181 ggaggggaaa ttcagagatc ttggggcgac ttccctgcct ggaccagct cacagcttct
 24241 cggccactgc aaatgtgtgg gttgtgacca gactgatgtg tcttgagctt caggcttgca
 24301 agtgagctgg agaggcagtg gggagctatt gaagggtctt ggggacagac tcaatcacag
 24361 aggcctttca gaagatctgc ctgctgtgca tgggcaaaag gggccacttg ctgacctcag
 24421 agcatgtgct ttctcagtag tgcccaagct gtcccatggt cactgaccca gttagaatga
 24481 ctgaatggac ttgtgcttgt gtctcattag gaatcctagc ccattcttag tcttccagtg
 24541 agatctgtcc atgagtgaag gaatctcaca ggaaaaaaca aaatgcttct atgggtgtgg
 24601 ttgctggcct tatctacacc acagaagcca tcacacagac tgtctttctt cccattgtta
 24661 gaatgtgccc tgaccaagca gccacaggg cctgggacag aggctgatct ctgcctaact
 24721 gagctcacct ctcctccctc tcctcctgac tgggttagatt ttctaggtga ctgttcccct
 24781 gatgacacaa gcccgtctgg cccacagcag gtttagaggg gttgttgact cacgagatga
 24841 cattcctgct gatgtgtgtc atgcccctgg gtggatgaat gataaatgaa aacagcgctt
 24901 ttaacttttg aaccactttt ctccctcctt gtagccaaga cactatttga attggctgca
 24961 gagtctgatg tgtccacagc cattgacctt ttcagacaag ccggcctcgg caatcatctc
 25021 tctggaagtg agcgggttgac cctcctggct cccctgaatt ctgtattcaa aggtaacatg
 25081 gggaaggcat ccctgttaga ttgtccctgg aggcagcttc cccacccctg tcacctccac
 25141 aacactctcc gatttacagc accccatggg acattagaac ttccactcag ctcaacaaaa
 25201 agcagatgtg acttcagcag aaacttcaga ggctctgttg tttcattagg cagtgcagag
 25261 aatgcctttg gggagccgtt cctcagaact caagacttga catctgggag gcagccgttc
 25321 ctcagaactc aagacttgac atctgggaga gcagagcatt cccttgctt tctatttgca
 25381 gggctcactg ccaatgtata gtcaagaggt cagagtggag gtacagctga gctgcagccc
 25441 cagggaaggca gagaaggggg ccaagttgtg tgcgtgcctg ccttccctc ttagggcaaa

[0232]

25501 actccaaaca cccttgatta tctggatctt cttaattctt ccatagaaga taccagatgt
 25561 taaggaaatat tggcagcttc acttgggttc tcaatccctg ttccaaact caaggaggga
 25621 tgggcttttt cactgtatct atctctcatc actctcttca ttgcaggagc acatctctct
 25681 ggacctaacc atcacccttt cttgtagatg gaaccctcc aattgatgcc catacaagga
 25741 atttgcttcg gaaccacata attaaagacc agctggcctc taagtatctg taccatggac
 25801 agaccctgga aactctgggc ggcaaaaaac tgagagtttt tgtttatcgt aatgtaagtt
 25861 ctgggtccta aatcatgctc ctgggaagct ccttactgtg ggactgtat tagtgtaaaa
 25921 aaaaatgtcc tcaataagca ggagtttgca tgagaactgg ttgctgacaa ggaaggaaat
 25981 aatttctgga aaatatagat aacaaaaatga gatcctgcag aaggattgga atctctttt
 26041 ctggaggcct ttgagaataa accacacaat tatccaacct gtattgtgaa ggaataagtc
 26101 cttcttgaat tcaggaatta acacctggga ggaggatgg agttcagact ctttctgagc
 26161 ttatgagaag agaagcccc taaactaaaa tacagccctc cttgggtcaa aagggtgcct
 26221 ctctcttctg ctgtatcttc tttgttttca aacccaacag ttacctgga aatcaaaaag
 26281 gaagtacaac tcaacatagc tcttgccctg gaccaaccag caccatttgg ctaaagatgg
 26341 ttatcatctg ttaaacaaag aaataaataa atgggttcaa cgtatttatt tcaacattgt
 26401 caatggacct catgtgtaac tgatattctc attatgggac ctctgtgtga ctttattggg
 26461 gcctctctaa ccgttctttc ctttaaggaag accatttatt gttttatttc ctggagaaaa
 26521 tacatcattt tatcccagcc ttaataaccc atcccagtg atactccttc atcttcatgg
 26581 ataatgaccc tgtacatgac tctgaacaaa tcaggaggcc cctcgtggaa gtataaccag
 26641 tccttctctt ctctgtccct cttctgtgca gaggcctctg attgagaaca gctgcatcgc
 26701 ggcccacgac aagaggggga ggtacgggac cctgttcacg atggaccggg tgctgacccc
 26761 cccaatgggg actgtcatgg atgtcctgaa gggagacaat cgcttttagt aattagtctc
 26821 atccccgggt ggagctctcg cccagtggtc atgctggagt gggatgtggg gccccagcta
 26881 tttgtcaagc tttcttctac cttggggatt caattaacac tagcagtga cctgctcgac
 26941 cttccagact tgggatgggg aaaaaggcaag ggtcgccttg aaagcttaca ttgggaagaa
 27001 gggttacttc taagagtgtg atcttcacat gcatgggaag caggggaggg ggactacatt
 27061 tttatgactg aagtgcaggg aaaacatcac cctctcattg taaagctcca agtgagccaa
 27121 gagcacatag ttacagtgc acgatgagcc tctactctc tgcgcagtat ctgtttattg
 27181 caactgaagc acccttgtga gtttgttttc ttgccggct atctccattt ctgacttgct
 27241 cattcacctt ggggtgtgtg catattgaat gtttccctgt cactgacttc agcccactgc
 27301 acaagggtct ggagaccaca cccctctgcc ctcccagaat catatccctg gaggctcagc
 27361 tagtctctgg gtcagccata cctctgccct ttcttttccc tcctttctcc tgtggcctct
 27421 gacgtctggc catttaacag agcttagcat tttgtctggg tggagagagc tggagcctgg
 27481 aatcactccc tctttgtgca tacggagggc atgaaaacca aggtgtgtgc attccagtgg
 27541 cctgactctg actatcctca gtgtgaggt atttaaggaa aatacctctc agcgtggtga
 27601 ggtatttaag gaaaataacct gttgacaggt gacattttct gtgtgtgtat ctacagcatg
 27661 ctggtagctg ccatccagtc tgcaggactg acggagaccc tcaaccggga aggagtctac
 27721 acagtctttc ctcccacaaa tgaagccttc cgagccctgc caccaagaga acgagcaga
 27781 ctcttgggta aagaccaact taagtacacg tctccatttt tctaaagtag tgatccctca
 27841 gggcccccagc agcaaacagt tggcacatca aggattgact tgaagggttt ttatgacaag
 27901 actatttagt aaagagtggg cgggactaaa ggaactagca aaggatgagg ccaaccaggg
 27961 actagcaacc ctgggaagcc ttactaccc ctaggcctgg gggaatggga ggatgagagc
 28021 aggaaccagg gaggtcatga gccttggaca agggcacaga acagcagcca gagccatgtg
 28081 cagccagcca ctgtcagaac catgcaaggg ggaccactca gcgccccagc ctcccctctca
 28141 gacagttgcc atctgggtct cttgttggt gatgagagag caggagggag cccactgatg
 28201 cagttcatag agctcagcct cctgggcagg aaaccgggca gagaggagta gaaaagaatt
 28261 aagggtggct ggcaccagcc cagtactga ggcacgtttc ccactggaga cctatgagca
 28321 cagtataat aaagccagtt acctgcactg actatccctc cagacaaaag ctttcccaag
 28381 aagtttagtca tggctctgag agatctagtt gaggtgtttt ggcaggggat ctagtgttta
 28441 cggttggtcta agaaaaatga ggaaggtaag agtatcttgc agcctgtgtt gggaggatta
 28501 aataggatgc cacacacagg gccaggcaga cagcctgggt agtaatagcc atgacgatgg
 28561 gggcgggggg agcaggaatg ggagttgcag tgtttagctc agatgcagtc ctgtgagaga
 28621 tgcttccact ctacacagaa gatgagacca aggaaaagga ggagggaagag gaaggacctt
 28681 gacaaacctt gggggccaca ttgtctacac ctcccttctt gctctagagc agaatagaaa
 28741 gttcaggttg caggcagctc taagttgaat tcgtgtcctg tttaattttc ttatttgcta
 28801 aatgaatgcc tgtgtctgtg atgctgacgt atgttcttaa ggagagggga gaagttcatt
 28861 ctgaacataa acttttctac ctctctctgt ccagcaagaa tggaatatcc ccaagtggc
 28921 ctgagccagc ttggctttct ttttgttttc aattatgtgg gaggtagga gggggatggg
 28981 aaaagcttcc caaacacacc ctccccagg cctgaggcac ccctggggga cagagagtgt
 29041 tagaggttgg tacaggtgtt agagatatgg aaaggacatc ccatgcaccc caggggctgg
 29101 tgtggtctct tacttccagg caatattttg tgaagggga accttgtcag ctccaggttg

[0233]

29161 tggatgtttg aaaatcagtt ggtaccagtt ggctccatcc tctggcaggc atgtggattt
 29221 gtcaataaacc aagtgaactc tccaaaaataa gttaaaactt cctcccttct cagtttcaag
 29281 atgctggaaa tagctgttca taagccctgg ggaaatttag ccttttggtt ggtaatggga
 29341 gtatccgaga tgagagggca gctggaaact ttccgaatga cctccacacac ttaatttggg
 29401 aaatgcctct gcacctttat gggcaaccag atgcctgccc cagttgtctg agacactgat
 29461 gtgggctgaa aggaatgctg agacgtgacg aggagagatg ctgaggaggg aatatccccc
 29521 tcagccctga cctcatcgcc tccatggctc ctccacagta cagctgtcta ctcttttaag
 29581 ttctcccttc aggaatatgc catctcaaac agaattgtga tttgagggca gaattgttaa
 29641 atattgcaact actgtgttat aaccgtcagg agccatgctg atgatgaaac gtcccagatg
 29701 ccggtgctgg aaaggtccct ggctttccaa gcaaatattt atctcatgga aacatgagtc
 29761 atactcacag aggagtatgg attaactcct tctcagcagc caggagagccc agcatcccag
 29821 acagcatatt taaccagag gccaactgac tgctggggca gatttgtgtt catgaacatg
 29881 tgcttttgtt cctctgacca ttagacagat tgggtgtcac aacgttgagt atacagtggg
 29941 agcttaataa gtgcttattc cctgggaggc gagttcttca tttcaggggg gaccacttac
 30001 atcttctcct ctgggcccct cttgaccagg ctaattacca ttcttgggat taactctatc
 30061 tccttttccc gcaacctgca ggagatgcca aggaacttgc caacatcctg aaataccaca
 30121 ttggtgatga aatcctggtt agcggaggca tcggggccct ggtgaggcta aagtctctcc
 30181 aaggtgacaa gctggaagtc agcttggtta gtgtcctgca aatcaaaaggc tggctaaatt
 30241 tccccagggc aggggtccag gacatatctc acccccagga tgggaattata cacacacaa
 30301 ctcaagttg cagccgaat ctctgagtgt aattcgtcca aagaaaaaga gaaaagagaa
 30361 gaggtcttc agggaaatca agtgagatca tagttagaca tgagtaagaa cttccagatt
 30421 tacaagggaa tagagcatct gatttggcat ctgagagagg ctattagatc ttccttctct
 30481 taaggaggtt gtaggcaact agttatgtga ctgaagagat cagtctgtac tcacaccatc
 30541 ccacccccca aacccagggc ttcaactgagt tgtaccatga accagaccat cccaagaggc
 30601 tttttgagtt ctgacacttg ctctgtgagc ctcccttgc tctgcacatt gatgatataa
 30661 ctttgaact gcactaagag tgttctctaa gcagatagcc agccgagctc cagaaatctc
 30721 cctggctgca cctgcagagg ccactgaccc ctctgtggag ggaccgctct tcagtgtgtg
 30781 gctggcttct actctctgct cctctctctt ggtcttcagc catccattgc tcaccagttt
 30841 ctacagagga gcataggaag atatgcatgt agggaggtag gcaccggggt gactgtgttg
 30901 actttagcag gtcattcaag aatctcctcg cacctgggtt cagatgctgg ggtcctgtct
 30961 gtcacaggct tctgtgcctc ctacccctt gagtttgtca catggccctt cagggaaggcc
 31021 tgagatagat ttgccctggg ttggcctcct atgagaaaaat cttaagttag gcaccaggc
 31081 aaaatggaaa gagccttttg cccagagcag gaagcctgtc ttccatttcc agctgttcca
 31141 cctacttagc ttaaaagagg cacttcgctc gtcttcagtc tcagtctcag tctcctcttc
 31201 tgtggaatgg gacaataata tctactctcc ttatcataca ctgctgtgag gactgagtgg
 31261 atcacacaaa aaagcattat gtaaatgtca aagtgtctaa tccacacagg agatttgaat
 31321 taatccacca cactgaaggt ctgtcaaggg cagggaactgt ttcatccacc agagtatccc
 31381 cagtctaaca caggacttgg catatgaaaa gtgttcagta ggccgggtgc agtggctcat
 31441 gccgtgtaac cagacacttt gggaggccaa agtgggaggc tcactgtagg tcaggagttc
 31501 aagtcacaggc tggccaacgt ggtgaaacca catctctact aaaaatacaa aattagctgg
 31561 gcgtgggtggc acatgcctgt aatcacagct actctggagg ctgaggcagg agaatcactt
 31621 gaacccagga ggccgagggtt gcagtgaatc gagatcatgc cactgcactc cagcctgggc
 31681 gacaagattg aaactccatc tcaaaaacaa agaacaagga aaaaaacgaa aactgttcag
 31741 taaacacttg ctgaatgaat aaaataaata tataaatgta taaataaatg ctctactttc
 31801 aaccactact ctgtttttct tttagaaaaa caatgtgggt agtgtcaaca aggagcctgt
 31861 tgccgagcct gacatcatgg ccacaaatgg cgtggtccat gtcataacca atgttctgca
 31921 gcctccagggt aagtgtcgca tccccactga ctctgcagcc agtccttttc ttcagtgtggc
 31981 agttgggtgga gagaagaaaa actgttctaa acaatgatga gaataacatg taattgtgat
 32041 agttaaactg tgcctatgtg actgattgca gagtgaattg ggagctgttg gttttgaatg
 32101 caccacacta aggaatgtga ggacacattg ctctttgcgg agttgccag ctatattagc
 32161 tccccctgga cacagcccag tttctctgat tcgctgggat gctgtccgag cgattcccag
 32221 cactcctctt acagcatctc acctcagtg atgttcttgc cctccagtg agttgaacct
 32281 cagtccctgc tctctcatg tgtgcattca cctttcttgg tgctctctcc ccatgggcca
 32341 agttctacca tgagttatga aacattatgg agaaaaatg tctttgaaa tgtgagccag
 32401 aaagcccacc agtgcctctc agtcacggtt gttatgaatg acatgcta at ggtttcactc
 32461 tgggtcaaac tgccctttct tctctcttca gccaacagac ctgaggaaag aggggatgaa
 32521 cttgcagact ctgagcttga gatcttcaaa caagcatcag cgttttccag ggtaagatgc
 32581 ctgctagggt tgccgctagc ctgagcagcc tcaggctcctc tgtttgggccc atagaggagc
 32641 ctctccagcc cctgtcttcc ttggctgtc cccagggtc tcttaaaact tctccccact
 32701 cccactgagg catcctcagc cccagcctgt gtcaaatcca gagtaagaa ccaaggcaac
 32761 tccctggcct tcatgggcca aagcgcaggc tttcacaccg aggcctctga gcctcagatc

[0234]

32821 atgggggaagt cactgctgga gagaacagac atagctctgg aagccatctg cccaagaggg
 32881 cagcccatcc caagttcatc ttacagtggc caggcctgcc ctgagccggg gcctctgggt
 32941 cactcttctg ctgtccatgg cattgcccac cctgggtgag gctggggctc tcctggggcac
 33001 tgtatgtatt ctggatacag ggatactggg ctgctatgt gtgtggagcc atcccttcct
 33061 tgccccagcc ccacctccct ctcaaacctt ctctggctct ttctgagctt cctttcctgc
 33121 tccccagctt gccagtgct cagtgcacca cttggctctt ttgctacttc gggtcagggtg
 33181 gagcctcttg ggaatgtgaa gtgccttaca gaaagattgc acttcaagag gagaggctgc
 33241 agggagccat cctaaccaca gaggcctgga gcttactgtg tcactttact tttgtacaca
 33301 ggggtctcct tagtgccctc gagaaggatt cttggccctg agcttctact cctgaggcca
 33361 cctctgtgca gcccagctc cctcaactct aggcctgtagt ctgagtgga aagcctggct
 33421 tgggggtctc ctaggaaatgt ccacctgaag gcacacttga taggggcttg cacaacttat
 33481 gtctgccaag gccacctgag gaactccctg gtgcctataa gttccacctt cccttcctc
 33541 ttctctgccc cagcattttt tctgagtagg ggtggcaatg ggcaaagcca ttgtcataag
 33601 cagttgcag tataactttc actagaaaac ctgacacctt gtgttttctt tcaggcttcc
 33661 cagaggtctg tgcgactagg tgagtctggt ctgggtttga agtcattgca gacctgttta
 33721 ggccttacct ccaagcaagc ccaagcctgc catctgctgt atatagataa gaacatcatg
 33781 gtgcagtaaa agaagcctgg cctttggagt cagaacagca gggtgacttg gggtcagacc
 33841 cagagcacc catttccttc tctgtaagat gaggataata agagtaacaa ccttttaggg
 33901 ttaaggtgag ttttcagctt aggaagtctg ggaatattgc aaagggcttg gcaggaaccc
 33961 atggtgagga tctagtcca agttgatagg tacagaaaac cagaacatcg ggccttgagt
 34021 aaagagtga gtttcacaaa ccacaaagca cctgctatgt gcaggagagc atggcagaag
 34081 gaggtgctt ggccttggtc cttgagattc tgacagtgtc ctgacagac atggggagat
 34141 ctgcacctat ttgacgttac caacttctct ttttcagccc ctgtctatca aaagttatta
 34201 gagaggatga agcattagct tgaagcacta caggaggaaat gcaccacgac agctctccgc
 34261 caatttctct cagatttcca cagagactgt ttgaatgttt tcaaaaccaa gtatcacact
 34321 ttaagtgtaca tgggcccgc cacaatgaga tgtgagcctt gtgcatgtgg gggaggaggg
 34381 agagagatgt actttttaa tcatgttccc cctaaacatg gctgttaacc cactgcatgc
 34441 agaaaacttg atgtcactgc ctgacattca cttccagaga ggacctatcc caaatgtgga
 34501 attgactgcc tatgccaagt ccctggaaaa ggaagctcag tattgtgggg ctcaaaaaac
 34561 atgaatcaag caatccagcc tcatgggaag tcttggcaca gtttttgtaa agccttgca
 34621 cagctggaga aatggcatca ttataagcta tgagtgtaaa tgttctgtca aatgtgtctc
 34681 acatctacac gtggcttgga ggcctttatg ggcctctgtc caggtagaaa agaaatggta
 34741 tgtagagctt agatttcctt attgtgacag agccatggtg tgtttgtaat aataaaacca
 34801 aagaaacata

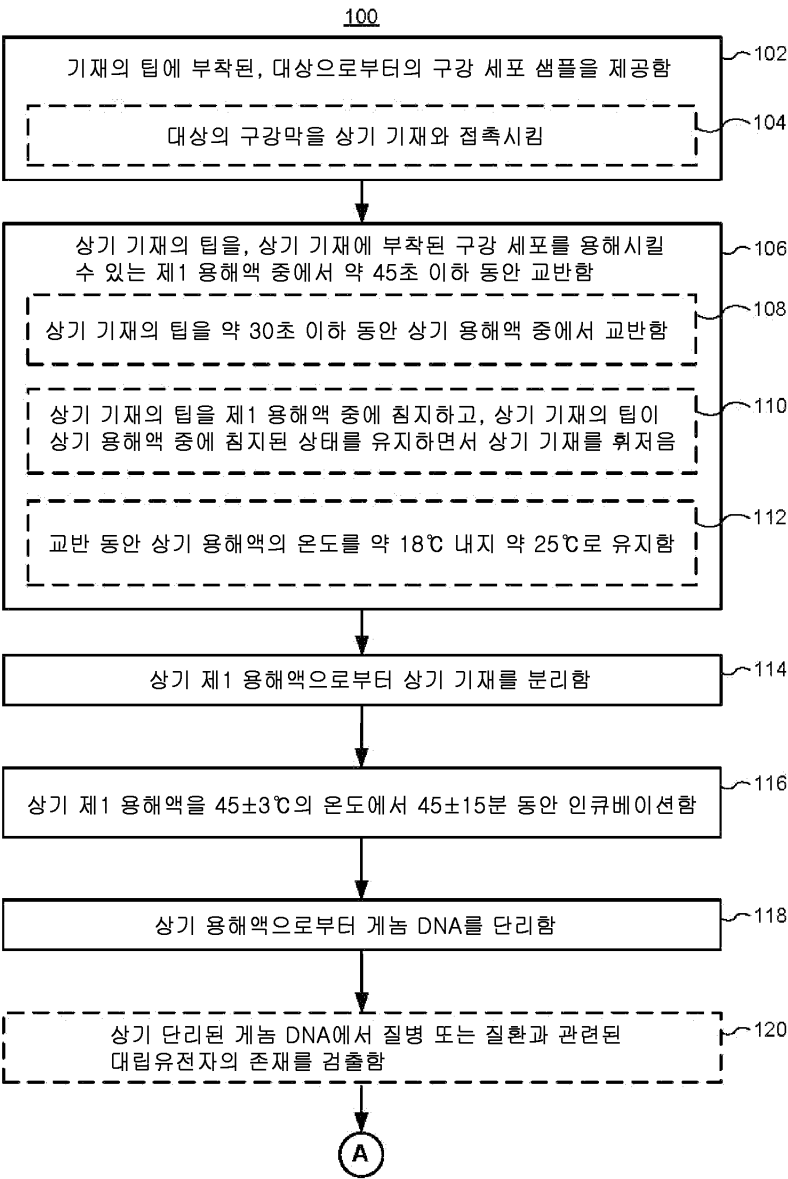
TGFβ1 유전자 단백질 생성물 (βIG-H3 단백질 서열 ; NCBI 참조 번호

NG_012646.1):

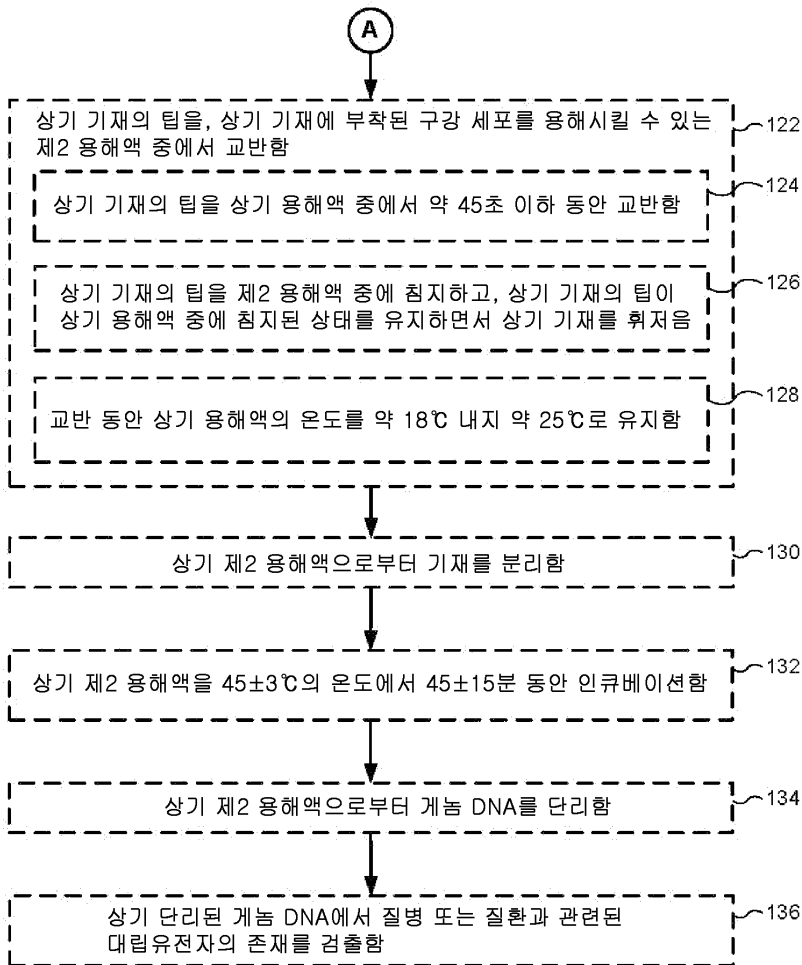
MALFVRLALALALALGPAATLAGPAKSPYQLVLQHSRLRGRQH
 GPNVCAVQKVIGTNRKYFTNCKQWYQRKICGKSTVISYECCPGYEKVPGEKGC PAALP
 LSNLYETLG VVGSTTTQLYTDRTKLRPEMEGPGSFTIFAPSNEAWASLPAEVLDSL
 SNVNIELLNALRYHVMGRRVLTDELKHGMLTSMYQNSNIQIHHPNGIIVTVNCARLL
 KADHHAATNGVVHLIDKVISITITNNIQIIEIEDTFETLRAAVAASGLNTMLEGNQYT
 LLAPTNEAFEKIPSETLNRILGDPEALRDLNNHILKSAMCAEAI VAGLSVETLEGTT
 LEVGCSGDMLTINGKAIISNKDILATNGVIHYIDELLIPDSAKTLFELAAESDVSTAI
 DLFRQAGLGNHLSGSERLTLLAPLNSVFKDGT PPI DAHTRNLLRNHI IKDQLASKYLY
 HGQTLET LGGKKLRFVYRNSLCIENSCIAAHDKRGRYGT LFTMDRVLT PPMGTVM DV
 LKGDNRFSMLVAAIQSAGLTETLNREGVYTVFAPTNEAFRALPPRERSRL LGDAKELA
 NILKYHIGDEILVSGGIGALVRLKSLQGDKLEVSLKNNVSVNKEPVAEPDIMATNGV
 VHVITNVLQPPANRPQERGDELADSALEIFKQASAFSRASQRSVRLAPVYQKLLERMK
 H

도면

도면1a



도면1b



도면2

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

도면3

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

도면4

TaqMan MGB 프로브

```
#TGFB1 R124NI VIC-CAC GGA CCG CAC GGA- MGB NFQ
#TGFB1 R124H FAM-CAC GGA CCA CAC GGA- MGB NFQ
#TGFB1 R124C FAM-CAC GGA CTG CAC GGA- MGB NFQ
#TGFB1 R124L FAM-CAC GGA CCT CAC GGA- MGB NFQ

#TGFB1 R555NI VIC-CAC CAA GAG AAC GGA-MGB NFQ
#TGFB1 R555W FAM-CAC CAA GAG AAT GG-MGB NFQ
#TGFB1 R555Q-1 FAM-AC CAA GAG AAC AGA G-MGB NFQ
```

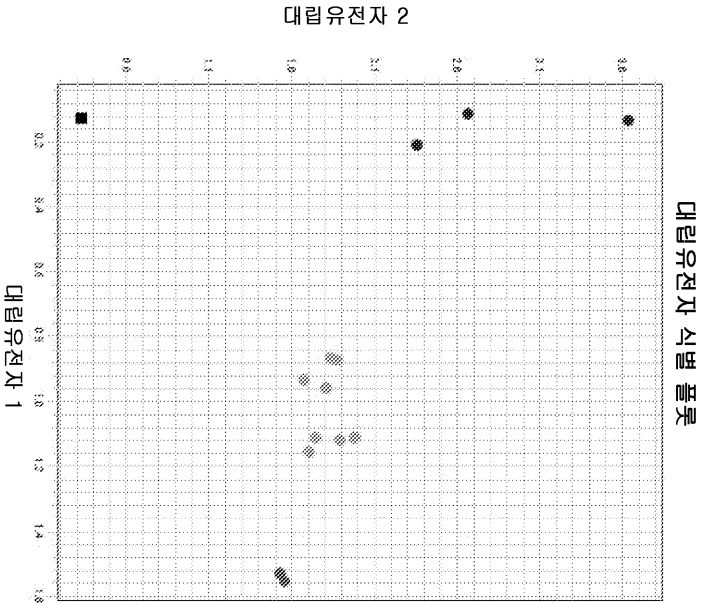
서열 검출 프라이머

```
#TGFB1 124 F TCC ACC ACC ACT CAG CTG TA
#TGFB1 124 R CCA TCT CAG GCC TCA GCT T

#TGFB1 555 F ACA CAG TCT TTG CTC CCA CAA A
#TGFB1 555 R ACT TAA GTT GGT CTT TAC CCA AGA GTC T
```

DATA A >> LifeTech/7500FAST, 고속 모드

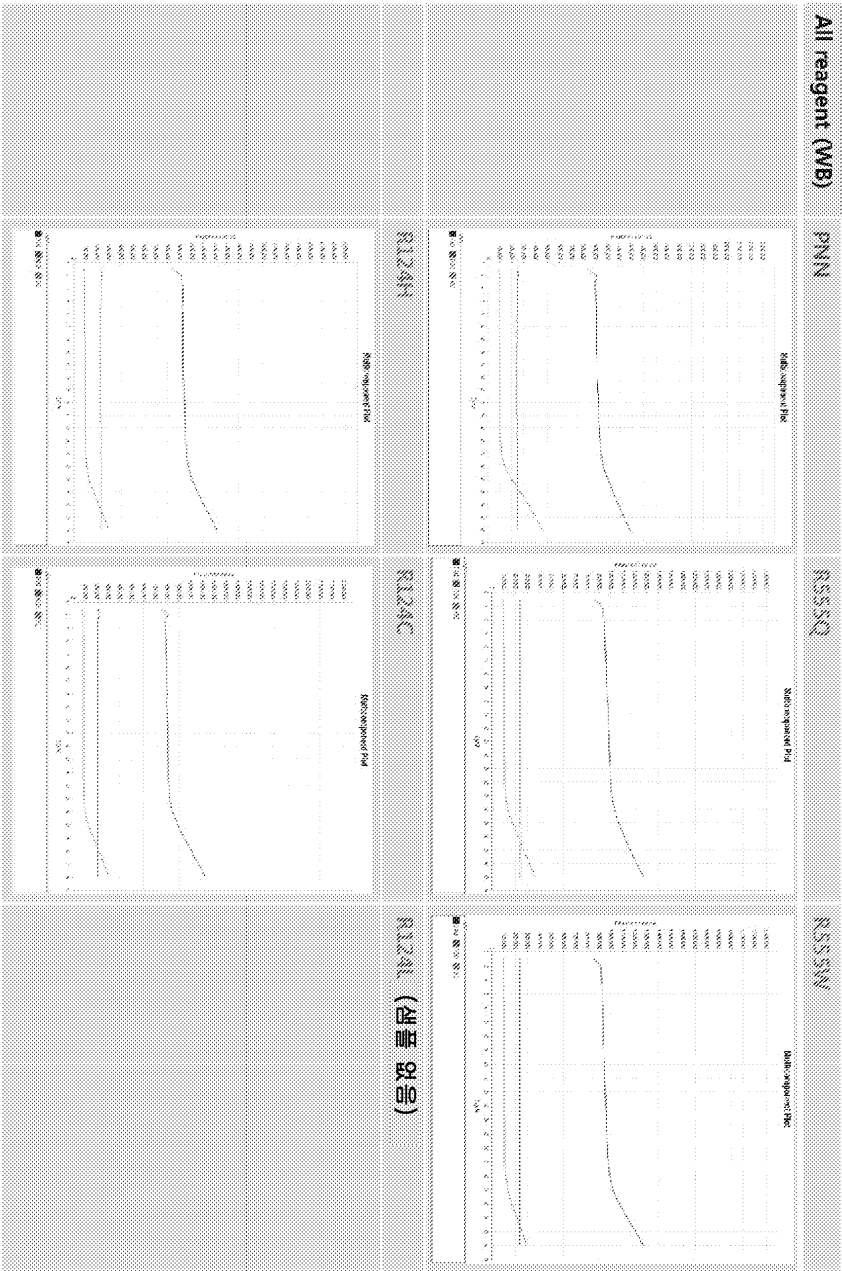
도면5a



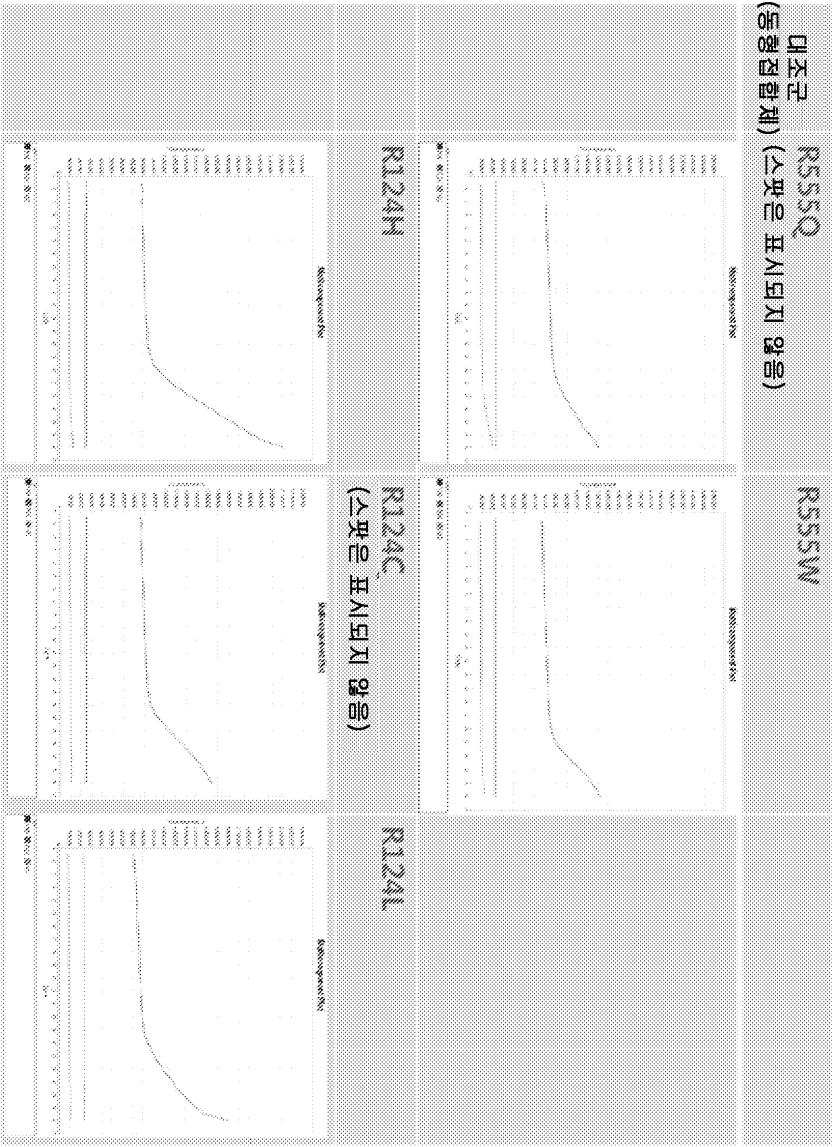
All reagent extract (전혈)				
GTx 프레스 타그			3.00	nl
프라이머(124R)		10pmol	10.00	nl
프라이머(124F)		10pmol	0.50	nl
프라이머(555R)		10pmol	0.50	nl
프라이머(555F)		10pmol	0.50	nl
프로브 (NL/VIC)		10pmol	0.20	nl
프로브 (R124H/FAM)		10pmol	0.40	nl
프로브 (R124C/FAM)		10pmol	0.20	nl
프로브 (R124L/FAM)		10pmol	0.60	nl
프로브 (R555N/VIC)	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

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

도면5b

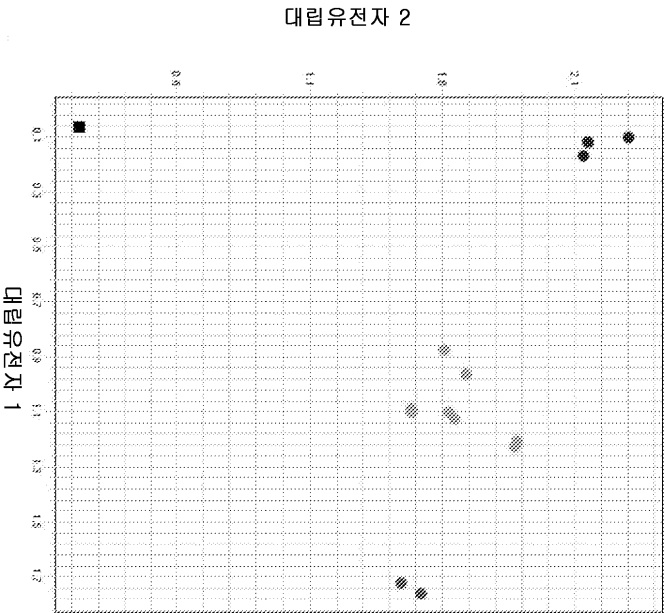


도면5c



DATA B >> LifeTech/7500FAST; 고속 모드

대립유전자 식별 플롯

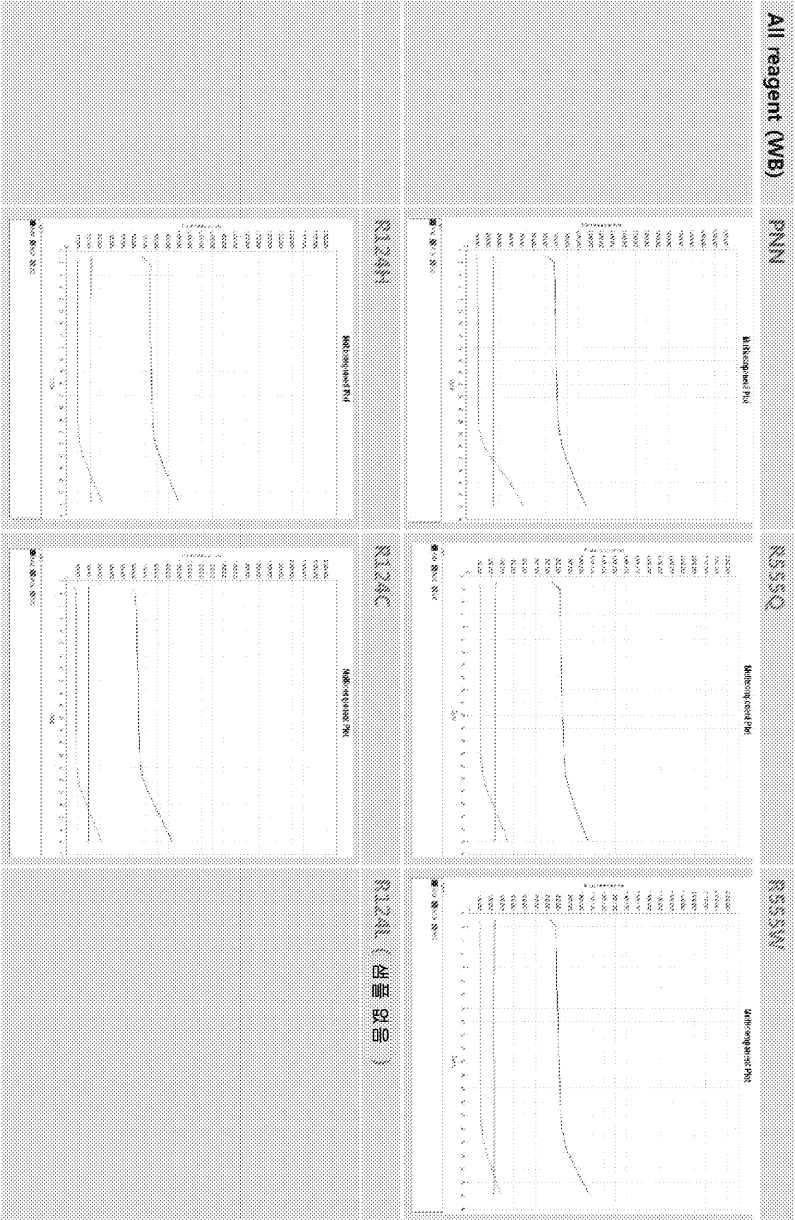


도면6a

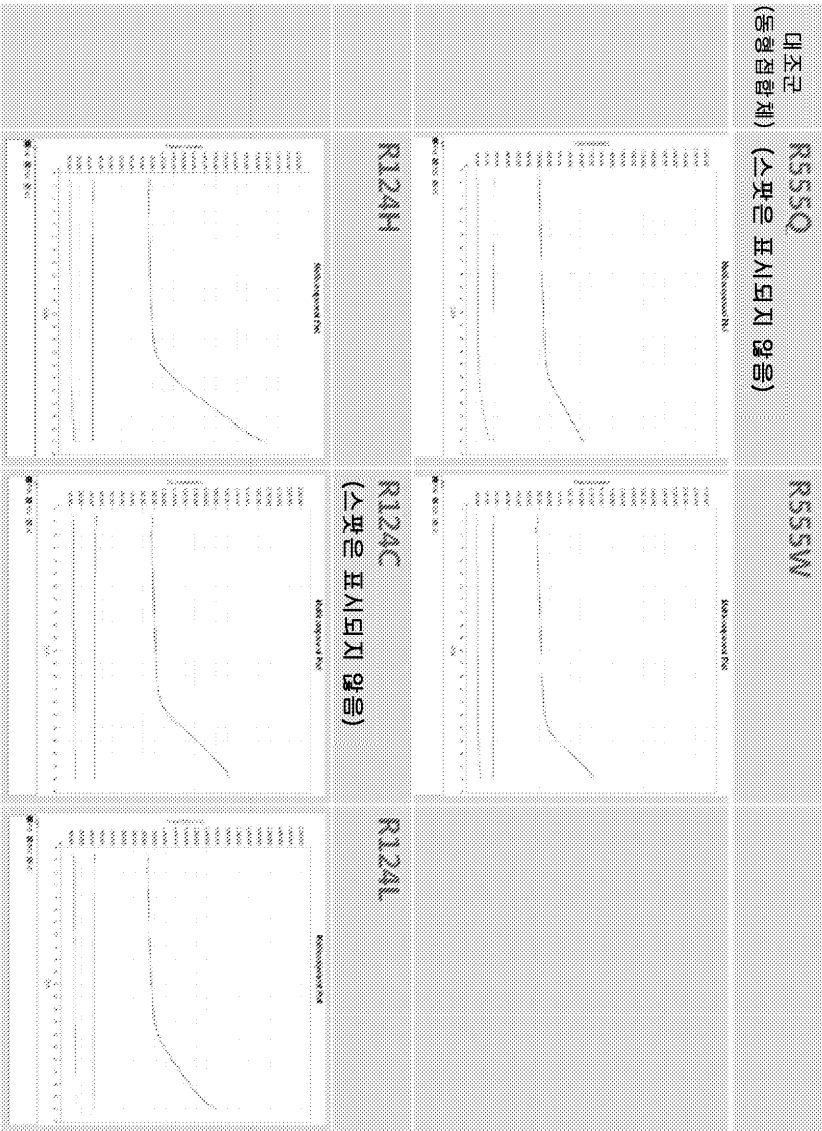
All reagent extract (전혈)			
GTX 프레스 탭 그			
프라이머(124R)	10pmol	3.00	nl
프라이머(124F)	10pmol	0.50	nl
프라이머(555R)	10pmol	0.50	nl
프라이머(555F)	10pmol	0.50	nl
프로브 (NL/VIC)	10pmol	0.20	nl
프로브 (R124H/FAM)	10pmol	0.30	nl
프로브 (R124C/FAM)	10pmol	0.20	nl
프로브 (R124L/FAM)	10pmol	0.50	nl
프로브 (R555N/VIC)	10pmol	0.20	nl
프로브 (R555Q-1/FAM)	10pmol	0.20	nl
프로브 (R555W/FAM)	10pmol	0.20	nl
DW		3.20	nl

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

도면6b

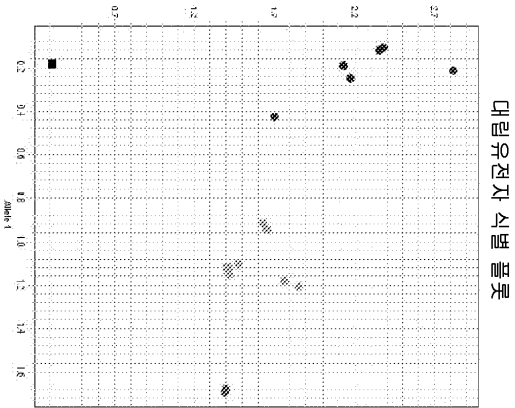


도면6c

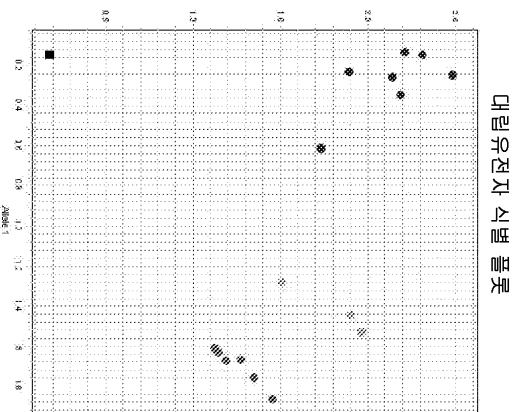


DATA C >> LifeTech/7500FAST; 고속 모드

반독 전	유지 단계	사이클링 단계	반독 후
60°C	95°C	40 사이클 95°C 64°C 60°C	
1min	20sec	3sec 30sec 1min	
GTx 포레스 타그			
포라이머(124R)		10pmol	0.50 ul
포라이머(124F)		10pmol	0.50 ul
포라이머(555R)		10pmol	0.50 ul
포라이머(555F)		10pmol	0.50 ul
프로브 (NT/VTC)		10pmol	0.20 ul
프로브 (R124R/FAM)		10pmol	0.20 ul
프로브 (R124C/FAM)		10pmol	0.20 ul
프로브 (R124L/FAM)		10pmol	0.50 ul
프로브 (R555N/VIC)		10pmol	0.20 ul
프로브 (R555Q-1/FAM)		10pmol	0.20 ul
프로브 (R555W/FAM)		10pmol	0.20 ul
DW			3.30 ul



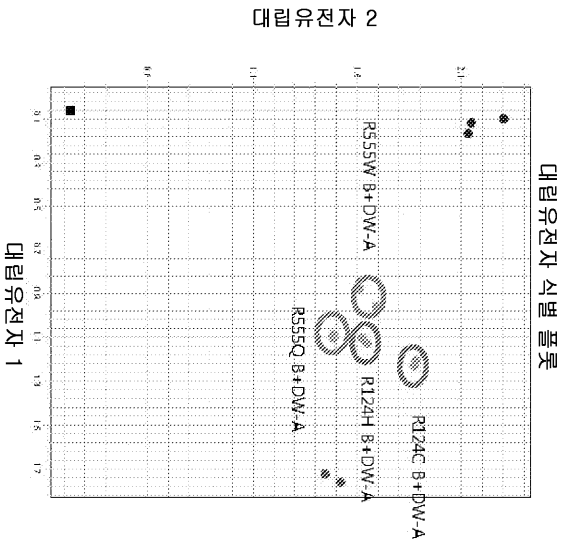
All reagent extract



OMEGA kit extract

DATA B >> LifeTech/7500FAST; 고속 모드

도면8



All reagent extract (전혈)					
GTX 프로세스 태그					
포라이머(124R)	10pmol	3.00	nl		
포라이머(124F)	10pmol	0.50	nl		
포라이머(555R)	10pmol	0.50	nl		
포라이머(555F)	10pmol	0.50	nl		
프로브 (NL/VIC)	10pmol	0.20	nl		
프로브 (R124H/FAM)	10pmol	0.30	nl		
프로브 (R124C/FAM)	10pmol	0.20	nl		
프로브 (R124L/FAM)	10pmol	0.50	nl		
프로브 (R55SN/VIC)	10pmol	0.20	nl		
프로브 (R55SQ-1/FAM)	10pmol	0.20	nl		
프로브 (R55SW/FAM)	10pmol	0.20	nl		
DW		3.20	nl		

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

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 ccacttcaa 20

<210> 4

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

aggcctcggt gctagg 16

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

tagtctctta ttctaata 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

gctgcagact ctgtgtttaa 20

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

ccatccctcc ttctgtcttc tg 22

<210> 8

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

cgggccctc catctc 16

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

cagagaaggg aggtgttgt t 21

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10
 gggcgaagat ggtgaagct 19
 <210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 11
 tcctcgtcct ctccacctgt a 21

<210> 12
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 12
 agctggcaag gaggccc 17
 <210> 13
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 13
 tttgggcttt ccacatgc 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

accctcgagg gaagtaagg 19

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 19

aacctttacg agaccctggg a 21

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

primer

<400> 20

gactcccatc catcatgccc 20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 21

agtcgttgga tccaccacca 20

<210> 22

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 22

gacgtcattt cctactgttt cagg 24

<210> 23

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 23

ccccccagaa acagcctg 18

<210> 24

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 24

ttctaagggg ttaaggagaa agctt 25

<210> 25

<211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 25
 cacggaccgc acgga 15
 <210> 26
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 26
 cacggaccac acgga 15
 <210> 27
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 27
 acacggaccg cacg 14
 <210> 28
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 28
 acacggacca cacg 14
 <210> 29
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 29
 tacacggacc gca 13

<210> 30
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 30
 tacacggacc aca 13
 <210> 31
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 31
 ctgtacacgg accgcacg 18
 <210> 32
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 32
 ctgtacacgg accacacg 18
 <210> 33
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 33
 ctgtacacgg accgcacgga g 21

 <210> 34
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 34

ctgtacacgg accacacgga g 21
 <210> 35
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 35
 gctgtacacg gaccgcacgg agaa 24
 <210> 36
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 36
 gctgtacacg gaccacacgg agaa 24
 <210> 37
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 37
 accgcacgga gaagc 15
 <210> 38
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 38
 accacacgga gaagc 15
 <210> 39
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe

<400> 39
 accgcacgga gaagctgagg c 21
 <210> 40
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 40
 accacacgga gaagctgagg c 21
 <210> 41
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 41
 accgcacgga gaagctgagg cctg 24
 <210> 42
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 42
 accacacgga gaagctgagg cctg 24
 <210> 43
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 43
 acacagtctt tgctccaca aa 22
 <210> 44
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> primer
 <400> 44
 acttaagttg gtctttaccc aagagtct 28
 <210> 45
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Normal Probe 10
 <400> 45
 caccaagaga acgga 15
 <210> 46
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mutant Probe 10
 <400> 46
 caccaagaga atgg 14
 <210> 47
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Normal Probe 10a
 <400> 47
 caccaagaga acggag 16
 <210> 48
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> #TGFB1 R124C
 <400> 48
 cacggactgc acgga 15
 <210> 49
 <211> 15
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> #TGFB1 R124L

<400> 49

cacggacctc acgga 15

<210> 50

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> #TGFB1 R555Q-1

<400> 50

accaagagaa cagag 15

<210> 51

<211> 34810

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gene sequence

<400> 51

gcttgcccgt cggctcgctag ctgctcgggt gcgcgtcgtc ccgctccatg gcgctcttcg 60

tgcgggtgct ggctctcgcc ctggctctgg ccctgggccc cgccgcgacc ctggcgggtc 120

ccgccaagtc gccctaccag ctgggtgctgc agcacagcag gctccggggc cgccagcacg 180

ggtaagccga gccgcctggc caggggctgc ggaaggtcag gtagtcgggg ctcgagcgcg 240

aagccgctgg gggcattgaa ctgggctggg ggcgagggg acaaagccc aactaaaaac 300

cttgagcat ggagcgctcg gacaccagcc ctgcacgcgg tggaaggaga gagggaggga 360

ggtggaggac catggaggga aagcgggagg ccgccgcttt gtagaaggga gtggggaagt 420

ggaccagaga ctttcgacgc aggccaagag cctgagacgg acagcgcttt cagcttctcc 480

tcccagccac tgcagaaagg gggaaatggc aactctttgg ccataatcac cgtgggaggg 540

tgccaagggc aaagcccacc cagcagtaca cctattccaa ccagccagg cccccggcca 600

gcgactccag acaagaacct gggccacaca cgtgggcagc atctaagggt ccccaggctc 660

ctgtgctcct ggccaggccc tgcactcaga cactgctggc acccgacact gctctctggg 720

tacagcaagg gcaatgtggc acttcttctc ctgccgatg aagagcagga gaatgcactg 780

ggccctcaca cacactgttc aaatggggaa actgagtcct gagtgggttc actttccac 840

agtcctgaag tgtgcactgg agccaggatt ggagtcctgc ttaaagtaat agctgggttt 900

gtaaatgtag gacactatca ttgcaggaat tcctttgaga ccctgaagat gtgttggctt	960
taggagacaa actcaagcag aaggtctggt ctgatatgg ccctaatact gaccaggca	1020
gaggcaggca acatttctac ctcaaaaacc aggccatacc tgcgtcaca ataccaggc	1080
tttgcctcag ctccagcct acctggttgc accaacttct ttttcataac taggtaaaac	1140
tatatatgag tagaatcttg tagtgactcc tcagaggaag cctaataacc atcggggtct	1200
ggcgttcaca ccacaagca atgcccacac ctccaagaga ctgggcagat ctgtgctcaa	1260
atcaaaactc attgttgggg gtgatagagt tgacttcaca ggccctgaaa gtcttggctc	1320
cttgactag gagtgtctg ggtacgggta caggctgccc cttgtagggc atagtgtctc	1380
ttgtttcctc tacttgtggc tttatggtct aggcctttca ggagtttggg gctctggcgg	1440
agagggcctg ctgggagcac atctggccac cctgcagagt gaaatcaaac caggcctggc	1500
tgcaacctca acacctcct ggaaagagga gaatactggg gatatcctgg ggtctttctg	1560
gaagtgggag aatcagcttt gacttgggca gtgtgcagaa tagagtgagg ggggatgtca	1620
gaaagatgag agggatatga ggcctcaaca tcaaatgca agcacctggc atttttatta	1680
tctctgcccc cctctccgtt ggtctctctg cctttctgc caatgaattg tgttatgttt	1740
gggtgctca atttgcctag gagggttcta tttcttctgt atcttcgcca ctaagtcagg	1800
agaagatcct tatagcatgc cctgcaacag tgtcacctgt aaggcatct cctgcacag	1860
ccacagtga ggatcctcaa aggtattgag ggccttccat caagagccat ctttacagca	1920
aacctcttc cctcagagc ccagaagagt gctgaccagc tggaaaacag ggttttttc	1980
ttaaatgcag atgctcttga ttatgagttc cagatatag atcaacttcc ccaccatacc	2040
cctgcaggca aagcctctta attagcttcc tgcagcacag ctggaaaggc ctattgtaat	2100
ctgtgatggg cagagtaatc taagaagtca caggagcacc cctgtcccag tagaatctgg	2160
atgcgcaggc acatgaacca tggcaaaatg gttgcaggca cagtgtatt tactctgac	2220
taactgtccc tgtaaatgcc acagggtgc ctggcctggc acacagggt gtggcgcctt	2280
gtgcaaatgg ataacgttg tctagctcca gcctttcatt caaagtgaac actgttagaa	2340
agggaaggaa aactttgcta ttttaaggaa ttgtagcgtg ctgcctgata tgaaggaaga	2400
aataacagct gtgccttgt tgtgcgcagc actcgattgc cgcttttgc ttcgacctca	2460
ccacaacaca gtgagatcta ctgttcatgt tcccatttta caggaggtga aactgcagct	2520
tagtgaggta gagagtgact tagttcagac acagaatgct gttgggagag taataactat	2580
gatatggtct cttgactccc agctatatct gtgttgctat aggggaagggg aaaaataata	2640
ctgaaagaga agtaaaaata caatcacact tccaaacatc aaccacaaa aactgaactg	2700
aatttcctga agcacttgg tttcaaatct aagctgaaca tcaatgctgt tattcttgag	2760

gccagaagc aacttgctca ttccaattaa gcttcagcat gaacttccta tgtacacagc 2820
 ccacccacac tccccgatgt gagaaggaga gggtcacagc cgcacccagc ctctgctgct 2880

 gccacaagga cagcagcagt ggaaacattc agcaaaggaa tgttgagacc acatccacaa 2940
 gagactcact gaagattcgc caaacgccia cggaaagtgg cagggaattc attgacagta 3000
 attgtttcct gcttgatcag attgaagagc ttctgggatt ctgtaacaat aaataggacc 3060
 gggggctgga gtatggccag caaggactct tcaggggtta ttcagggact gtctaacctg 3120
 tgaatcctag gcagcaaaca gaaaccaggt attcagaaat ctggaggatt tggtcaggcc 3180
 cagctaggac tagggaggca tgggcctctg ctggctgtgg tcccttctcc agccttact 3240
 tctcttgctc ctagatcctt acatggattc attaatgctc attgtccctc ctgggcccac 3300

 tcactttcac ctgttgaaca aaaaactggc caagaggtga cagtcatac accgcagaag 3360
 agacaggga gagaatgaa ggggcagaat ggactccac ccaaaagcct gactctgaat 3420
 atttgagaat tgttcaagtt cctgcagagg aatcatgatg gggacagtag gtgtagtttt 3480
 tactgcaata ttggtgtctt cttaacaaat acgtgcaca tcaagtgatg tctgtggatg 3540
 gcattcttaa agtaacaggg aaattgatgt taaagaaata cttcatcctt tgggtgatac 3600
 ctgaagtctt ctgagcttgg aggtcttctg aaagccctca gtattgtttg ttttatttgc 3660
 tttcctctga cttgtgattc agtcagatgc atgctgcct ctggctcagg aagatcaacc 3720

 ctctcctgac tgaccacgcc tctcctgact gaccacgtag cacagcagct tcctttccct 3780
 aggggctcct aatgaagctt tcacaatcac ctggcctgag cacagtgttg gtcaggactt 3840
 ggtatacttg aaaaaacat gcaaaaccaa aatcctgttg ttctggaaaa ggcttcttag 3900
 cagaaccccc agacatttac actctgcttt ttcacagggt cctgaggat tctttggatc 3960
 tgggtagttt ggggagcagt atttcaaca agttcattc gtgctcctc tacaccctgc 4020
 ctggatgcta ggccccatct agaattgtaa caacagaaca aggcagaaca ctgtcctca 4080
 aggttctgtt gagtgttaga tgcagagaag agacaccccc cacctccccg catcattac 4140

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

gtacatgaag ttacatcagt atgtaagaga gatTTtaaca atTTttgcag gggaagcttt	4560
catgggggct gatgggaatc taggtaaaca gaaccaaagt ctaaacccea gatatcccca	4620
gtaccaagac tgaatgact ctctcctcta tctctagaaa gttccagtga cccaaggagg	4680
caaacacgat gggagtcatt aaagtggggt ggacgtgctg atcatcttcc taattctgct	4740
gcttttgttt tcagcccca cgtgtgtgct gtgcagaagg ttattggcac taataggaag	4800
tacttcacca actgcaagca gtggtacca aggaaaatct gtggcaaatc aacgtgagta	4860
tctgtaacca gccaggagac caagctgtat gcacgtggc tgcagttccc cagggcctgg	4920
gccagccttc tagaaggta ggttgcccta aaagccatga agatgcatgt gcgaacatgt	4980
ctgggacctg cgigctaggg agtggcattt ttaggaagct ggccaatttt gttttgcatt	5040
tttaaggctg ctgacaagac ttggagacat ttttcagggc tggtttgggt ttgcaagaaa	5100
catgaaacac tgcgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtttctc aatctcata aaataataca	5160
gatatgcagt ggagaagcca ccagcatgt actctggaaa agaaagcca ttggtgaatc	5220
tgtactaaag aatgccatcc ctatcttaca gtcctaaggt aaacaccca aaaagactta	5280
gagcactaaa catatgcaga ttatgagaca gcatagcata taatatgtgc acagacttcc	5340
tcattcaaac cctagctcta cctgggccag tcgattcatc tttagaacct tccattgctt	5400
tacctgaaaa gttcgtataa caaaaggacc caccttatgg ggttggtaca aggattgaat	5460
gaaataatgt acataagaga ctgaatatgg tgcccagcat atatcagtgc tcaataaatg	5520
ctagctacta ttattattat caccctagat ttgcaaactc agaccacaca agcagaagta	5580
agagtccaa cggggtgtgg accagtgtgg ttacaatagg gcttgttgat gtctgtttca	5640
gcaaggaggg aggagcttt taccctactg ccagctccc tggaggaaatc aggtgcatgt	5700
tctaacaatt ctggggaac ctaatctgtt ttggcactgt caacagatct caaagctggc	5760
tgtctcctat agctaggaag atgtgtatga caaatctcct gagccacttg tgaaggcctg	5820
accttctcc tgtctcata cataatggga tgattaagaa actctaagcc actctcttaa	5880
gcacttttca atgttagga ttttaagt tttgtgtg acattgctt tgagcagaca	5940
tctctccaa tttaatagcc aactgaaaga agagaaaatg ctctttcctt aaactgtatg	6000
tggaaataaa tattccaatg tgtgacctg attatgttag gcaattagca atcctaatat	6060
gaattgaggg aagtgggat tcatggcaca gctggggaga taccagcagt ccctgggagc	6120
ctgtccaggg caggctcatg gcagcttgct ccatgcctga ttgacagccc agcctgcaag	6180
ctaaaagtgt agtgagctag gaggacacac tgccaagatt cagctaacag acaccagcg	6240

atattcttgc tgctatgaac aaaaggagac tatgcaaatt atacaccacc cattcttcca	6300
ggatgcctga cttaaaaaat aagaaaaaag atgggccggg cacagtggct cagcctgta	6360
atcccaacac tttgggaggc cgaggtgggc ggatcacaag gtcaggagac agagaccatc	6420
ctggctaaca tggtgaaacc ccgtctctac taaaaaaata caaaaatatt agcgggcgtg	6480
gtggcgggca cctgtagtcc cagctactcg ggaggctgag gcaggagaat ggcgtgaacc	6540
tgggaggcgg agcttgcagt gagccaagat cgtgccactg cagtccagcc tgggtgacag	6600
agtgagacac cgictcaaaa aaaaaaaaaa aaaaagaaaa gaaaccttt agtactgatt	6660
gattttttcc catgtgtgta tattatctac tcaaattaac aattaattac ttaattaaac	6720
acaaagccag gcctcaccta attgcttctt ggaaggtagc cagagtgcta gtgccaagca	6780
aacaactctt ctatatctca agagccctgg gcttcagagg gccatctttt ttgttaattc	6840
aagtttctct gaaaatggag acccgtttat gatgacaagc tggctacagg gtagcatctg	6900
ccacactgtt tcgggggtgc cgctgggctg aagcatttgc ccagctagtt aacaatagct	6960
cgataacatt ccctatcagt gtccaggctg agaatactgt cagtgatgag tcgccttggc	7020
tcttgtacct gtatctttgt gtgccaggac aaggcacaag caacagagct gtgtgttgcc	7080
aaaatgttcc tgatgagcag gtcaaccctt cgggggcagg tttggatatg ataatgtggt	7140
gatgtggtgg cgcagctccc ttaccagtg agcacaaggg gagtctctta ggaaaaggaa	7200
gaaatgtctg gatgaggtgg ggagatgggg ttccagagtgg actcaggcaa agcccgatgc	7260
ccagtcccag ctgttggcct agtctcacia agccagaagg atatgacatt tacattcaac	7320
tcttgaattt gtggccactg ctttgggcaa cttcaaagag agaaaatgaa gatagaaaaa	7380
tattatttga tataaaactt ctaggacaag agaggccctt cctggaacat tacatgtagt	7440
attaggaagg tggagctgcc ctggaaaaga tccagagaac tcagagagag gaagaggtgg	7500
aaccatctc tgttcttcta gagagctcag taagagtggc ttggcagggc tectgtgtac	7560
ctgagaccaa gaccagttag gaggctactg tctgaccacc atacggtcag aattcagtgc	7620
catgggtggt caggtgggaa ggggagagga ctgtgctggc tggagttagt gttatcctgg	7680
ggaaagtagg tccttagatg cctttagttag agtgaggagc agactgggaa atgggagcac	7740
agtagtgggt ggggcaaaaa ggactgtctc tgcattgaggt ccataggcag ttggaatttt	7800
ctcagcaaga ctccagagaa ggaggctgga gcagaggtgt atgttgggat gaaaaggagt	7860
aaagtatcat gggggaggag gcagctcagg ttgtcaaggg tcaagaaacc agaaggagaa	7920
tttcaccttg gaagcagaca acgggtacca agcatacagg ggaatacttt gtggtgagag	7980
gtcacacaga gatacaggag ccgacctggt gagacaggag cctggagcca cctgcctgct	8040
tttgtgaggc cccagactcc actgctatca tcaggtgaag ctctgttgcc tgcacacaaa	8100

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

 tctgtgattt caggccctgg ttgtattagt agccataaaa ttttttacgt gtggcacttt 8400
 gagcaaaggc gcaggaaatt gtggtcagga agcctggctg cctctcgaca ggcttccttt 8460
 gtgctagccc caggagagg aggccatttt aacagccaag tccaagtga catcatggga 8520
 ctggaatagt catagcagga gctcagacat cataaacgtg gcatagggag ggctgttgga 8580
 ggagctagcg ggtatgggtg gcagctattc attccaaaag tcttgaaatt gtttcacgag 8640
 caacacattt cacaagtgcg aagcccttct ctggagccaa gatgagctgg cagagcactc 8700
 ctgtttctct agtagcaagt gtccctttgc ccaggggcaa aaatattaat actccttcag 8760

 cactgcatta atgcttaaag atttaacttt taaagagatc agctgggtga tggtcgagct 8820
 tttccatcag ctggcagggc ttttccagta ggtgtccttc tgggcagggc actggggaca 8880
 gctgacgtga aggtgaagaa gagctgtcgt tttcctccct tataatccac aaccttggtc 8940
 ccaagaggaa aaaaaagaag atggtagagaa gtcacccaag cagaccccag acccatacta 9000
 gtgcctcctt tctgtttca tatccctgtg cagccagctg ggatctcttg aataatctgc 9060
 tctgggggca ctgagattgg acatacacca aacagcggag atcgacaaa cgcctctgtt 9120
 gggcagtggt tctgagggt tctgtccat tctgtaact aggaggctga ctagctgaca 9180

 aggaatttta ttctgttggg tatttcatg aacctatgtg ccacctgggg taagaccctg 9240
 tggtaggtag aaacatgact tcccaaaaat gtccacatcc taatctctaa ttctgtaaat 9300
 atattccctt actggaaaa gagactttgc aggtgtgatt aaattaagga tcataagagg 9360
 gagagattat ccaggattat ttgatgagtc taatataatc atcagggtac ttaaaagagg 9420
 gaggcaggct gtgcctgggt gtccacgcct ttaatcccag cactttggga gactgaggcg 9480
 agcgggtcac gaggacagga gttggagacc agcctgacca acatgggtgaa actccccctc 9540
 tagtaaaaaa aaaaatacaa aaattagcca ggcatggtgg tacacacctg taatccagc 9600

 tactcaggag gctgaggcgg gagaattgct tgaaccagg aggagaggt tgtggtgagc 9660
 tgagatcgca cactgcctt ccagcctggg caacagagca agactccatc tcaaaaaaaa 9720
 aaaaagaggg aggcagtggg atcagagtca gagaaggcaa cgtgatgatg aaagctgaca 9780
 tttgagtgat gcaaccacaa gccaaggaat gcaggcagct tctcaaagct ggaaaggacg 9840
 agcaatggat tttccctac agcctctgtg aggaatgcag cctttgattt taaccccata 9900
 aggccgattt ctgactctag cctctggaat tgtaagataa tttgcatgat ctcaagccac 9960

taaatttgtg gtaatttgtc acagaaagca atgggaagcc aacacaggcc ttatttgttg	10020
acttatagat gcatttttct ttatttcaat gtacttttat caatggctctc atgtagggtta	10080
ttgcttttcaa tgaagatatt aacatagttt caactttaag gtttatatct ggagtttctt	10140
tagaagcttc acaactgacc acttagtaaa cagtaagcat ctgttaagtg cttctcatat	10200
gtaagtctat tcaattctca caatcacact ataagataaa tatgattatt agcccattta	10260
cagatgagga gacaggctca aaagactttt atgcaacctg gtcaaagtca ttcactggtta	10320
agctgaggag gtctgtccac ttccttttgc tgccccagg gggtatcaag cctggcagtt	10380
agtgtcagcg acttaggagg tgaacaagtg agcaggcctg taggacctgg ctaaactgcc	10440
ccaggctctc gtctacagcc tcaaacctgt ggctgtgggt cccagagaca aggcctcctc	10500
agcatcagag aaggatgcct ttgtctcagg gtcatcaacc ttctccaggt tgctcacccc	10560
ctgctgtaaa ggggatcccc aagaccgtc atcagacaag gagcttggga actgaggaga	10620
cacagtcagc ctccaggagt gccc aaaatg cctcacatg ctgcatacag attgccacaa	10680
ataaagtaca tccacattct gaagactctg tctcatcac caaccaggct ggcccctggt	10740
gagggtctga gtggttgagg ctttgttgg tagacagtag gttaaagcaa gccatgattt	10800
tctattggga ggcttcagaa tcagctcagc tgtgtttcca agaccaggag ggcagaaagc	10860
aaaccatccc aggcaagcag tccatgggcc atgtcagatg tctagacgtt atgggtctgt	10920
gtttgtctg ccatttctct cggaactat gatgccctgt atggtttacc ttcagtcaca	10980
ggtgactggc ctacagggcc attccttgtt ccaacgactt ctcgagtata attaatcccc	11040
aggcatttac ggccagagca gccggccaaa tccgtgaagt gcagtggttg ttttaaatta	11100
tattaacttc ttggaaactt attttaggga gagaaaactc agtacttctc tctatccaat	11160
cttgagtaaa aatgttagaa gggactggtg gagagcctcc cagacatccc tacacataga	11220
ctttgggttg acattatctc ttgacactt ccttgaaact ttcttctaaa ttaggtgcct	11280
tccctaattt aggcaccttc ccagtactag tctgtgacct gttaggaacc aggccacaca	11340
gcaggagttg agtggcaggg agtgagcatt attgcctgag ctccgctcc tgtcagatca	11400
gcagtggcat tagattctca tagcagtccg aatactattg tgaactgtgc gtgtaaggga	11460
tctagcttgt gcattcctta tgagaatcta atgcccgatg gtctgagatg gaagagtttc	11520
ataccaaaac cacccttcc cctgccacc atctggggaa atattgtcta ccacgaaact	11580
gatccctggt gccaaaaagg ttggggaccg ctgtcctaag ggatctgctt tttctgacct	11640
gaggtttttc tttattagac tgtatctggc tgaggagaag cctgaagcct ttaatcgga	11700

cagctttggc tgatgagatt agattcagaa accaacagat tggctttttc tatgcaggga	11760
agcctaggaa ctggggggct atggctggga agccccctat tgtttccatc ctttcctatg	11820
ttcatcctgg aggaatggca tcagacccat gcctctgtga ttgctcccag cccatccaac	11880
cacagcatct atgtttctgc tgggaccagg gccaggaggc atggcacact gagctgagta	11940
taaggagagt ggagcaggcc actgccagcc cagaaaattt tggtaaagt tgcctgaaat	12000
ctttcagcc ttcgattcac agctgctctc tctgctctg gggccatgca gaccagtta	12060
gaaaagagtt aatttgttgg ggcagttgga ggcagggtga ctgccagctt tgacaccttc	12120
ccagcccaca ggctgctgca ctggggctga aggcgtggct aaccctgca cacctagaga	12180
gtgacagaga tgccagactg ggcagcagga aggcaagagg attaagagag agcttcctgg	12240
ctgaaagcca cactcggta accaggaaaa agcccttggc acgagaagac tcagtggcct	12300
gagggactga gccttgggtt ttgggcatgt gctgcataag ccatccatgt gtgacagtag	12360
agtgtagtcc agccactgtg ggacatgggt gctgaaagac cacatggaga ggaacagtga	12420
gtgctgacaa gggctagcct tgatcacttt ggagacaccc cctgtgtctt ctgatgtca	12480
gactttccaa atctgtctgc tatectccaa acgtgcattt tcaagagcaa tggaaaaagg	12540
attggacttg atggaatgca gcaagagtcc taggtctgtt actacctacc tatgacctta	12600
agaaactcct tcacccctca gaacccttac agctttcttt ctgattctat cctgagttac	12660
tctactccaa gctgagactt ttctgcttag atctatccct tctctctaaa cccccaacct	12720
ccattttctc tgggtgtctt ttttacacac cctcagcat acacacacac ctageccag	12780
gaaccaatga gttaatatat gaggagttag ttttctttg tctcaatga gatcctggtg	12840
aggccacttg agctgttcag ctcccttgcg gtattttggg gatggaactc agaagccaac	12900
aatatagaaa aagagtcttt ggccagcttt ccaggggct ccatgccata gagagtactg	12960
cacccgtgtg cacagggggc cctgacatga ggactttgag gataacacta ttcctccaac	13020
tctgcttcag catctccatg gattttcaca cagacacttt aggaaagaaa ctaagtttgg	13080
ggggacttga cctaatecca catcacagcc ccagtaatac agccctggaa ttatcacag	13140
aaagcctaga atcccatgca tateccatgc atatgcatcc ctatgctat gggttcaagg	13200
cttgagctc tccttgatt tagctgggaa aagtggcag acagtcttc tctgtcttct	13260
agaaatatgg actagaatcg tgagtgtgag attgcaagta acttttaaaa tcatctagtt	13320
taacttcacc ccatctcata gaccaagaaa ctgagaccag agagagaaat ggactttcaa	13380
gttcaccctg ctagtactg atggatcaca agtcaaatct cctgattcta gcaactgttc	13440
tcttacacca caccacttt gaaagtgtgt caatcaaatc ttactttagt tgcagaggat	13500
gactttagtt tctgaagata aaattgtgag tcaatcaaga tgagtcctaa gacaatagcc	13560

tgtttagccc ttataagttc agggatgaaa ggtagaaaag aaacaggatg gaaggaggac	13620
tggagaaaaa aacaaaagag gaaggaagga ggaggaagca aacaggaaaa aaaaagaatg	13680
tgcatagctt gtcactcctc agtcatttcc tgggagccca tttctagcaa agtgacagct	13740
gcaactccct ggccacctga gcatcttagc tgatctgtct ctgaaacacc ccctggagaa	13800
cagatgaatc aggtttcatc ttcgtttaac taagtcttcc ctgagacgac tccatttaaa	13860
tgaacaagag caggatttcc tgggcacact gagagcacct tccagaggcc cctccagagc	13920
cctaaagcct gtatttcttc cagtcggcct gtttctttcc tggatgatgc attaaacgcc	13980
ctttgagagt cccacagtga gcagttctgc ggtaaaaccc gctgcaatta aagtctgagt	14040
cctttcctgt ctcaaagggc atattcatat agaagaaagg aaaaggaagg actggctgtt	14100
tgcatttggt tccaggcctg ttgagtagag gtcgtgtctc ctccaccgaa ggtacagggt	14160
agccttcagc agaacctggg gatttggttt taagcaagtc tttcttaggt gtgggctttc	14220
agaacacttc cticcttgca atattatttg aaattctcag tgttttagcc gtccccagaa	14280
tattggttcg ttaaagctgt gtatttcaga tctccagaca gtggtcactg tttgtatatt	14340
ttcaatttca aaccagaaaa caaaagtctt tattgattac tttttttatt taaaaataa	14400
aaagtaagta tcttcgtaag aggagctttg ttttaatttt aaagtttaaa atttgattgt	14460
gaagacagag aaaaacttga tgattgtaga tatattcccc tctttggcta ttcaatcaga	14520
gaactagaaa atcatgagag atttaatgac cactgcctga tacacatatg tgttttacag	14580
atgaggaaac tgagaccag agagatgatg aaattggctg aggatggccc agctggtcag	14640
tgaaagactc agagccagag ctgggtcagg gctctttcta ttccttctg ttcctttca	14700
ggaacactca ccatcggtt tctgtgaat aatgttgaga taaaatcctt ggtgcattat	14760
gttttctagt cacaacattg actaggctgc cagagtctc tgttctcca gttggttgcc	14820
tgtaggtgtt ggcagccgcc aggagcattc tacagaacag aggaggagtg agactctcct	14880
tgctcaggaa aggcagacct atgacttagc aaataactcc taagaggaga gtgtttcacc	14940
caccattcct cticcttggc tgtggaggca acttagtgga gaggggcccag atgacctgtg	15000
aggaacagtg aagccctgcc taacacaatg tatggttgtc ttgttacaga gtcacagct	15060
acgagtgtg tcttgatgat gaaaaggctc ctggggagaa gggctgtcca gcaggtgaat	15120
gaatcctccg ggccttgctt gttggtgtgg gtggaaggga atggtgggag agaggagtac	15180
ccacataaaa ggcagcagag tgtgaatggg ggcagtggca caaggacatg gcattctccc	15240
cacgtgcccc ctggccccag gctctatgcg aggggctgag gaatggaagc tggaaacagc	15300
gcatttctgt agctgtcct cctggcctcc ttaccacact ggtggagtag actccaactg	15360
tggcctgtcc atgcccctcc cagcaggcac aggcctaggc tcaggctctt ggcctctgcc	15420

tctggctggg agtgattcta aacacatcca gcagggtcag cctgatagcc catcagtttc	15480
cgatcagctc tgctagagag ccgatgggat gtgggaggag ggggtcactg gtgggctggc	15540
aaccccaagc catcccatc tccctctgtg tctaaacttg gccctttgga gttcggtagg	15600
gagaagagcc ataggccagg tgggctcacc cagagtcagc agagagtccc acaaatggtt	15660
gcactgggcg aaagacagca tggcacctgt gaattttatt agagcttttc ttttagtgct	15720
acacacaagt gactgtacag gggagttagt attttgtttt aattttgaaa tagagtcac	15780
ttttggtatc tgcgggggat tgattctagg acccattcta ggatgccata tcctcagatg	15840
ttcaagtccc tgatataaag tggatatagta ttgcatgta atctatgcat attcttccat	15900
gtactttaaa tcactcaag attacttata ataccaaata taatgtaaat cctatgtaag	15960
tagttgttat accctctttt aaatttttgi attatctttt attgtatttc aaaaaatatt	16020
tttggccat gtttagttga atctgtgggt gaagaacca cagatacga gggccaactg	16080
tattggctat ttttttagtt aagaatgtga gactgaggcc aggcgcagt gctcatgcct	16140
ttgattccag cactttggga ggccaagagg ggacgatcac ctgagccaag aattcgagac	16200
cagcagcccc tgcaacatag tgagaccttg tctcttaaag attgtgagac tgggctgggc	16260
acggtggctc acgcctglaa tcctagcact ttgggaggcc aaggcaggtg gatcaactga	16320
ggtcaggagt ttgagatcag cctggctaac atagtgaac tctgtctcta ctaaaaatac	16380
aaaaaaatta gctgggtgtg gtgggggag cctataatcc cagctactca ggaggctgag	16440
gcaggagaat cgcttgtatc caggaggcgg aggttgcagt gagctgagat agggccgttg	16500
cactccagcc tgggcaagaa gagcaaaact ccatctcaaa aataaataaa taaataaata	16560
aataaatcat gagactgaga cataacagga aggagggcaa tttggttggt tccaaggttc	16620
ctagagtatg tgatgggaga ggttggtgcg ggtggggcca tggaggtact gactcaagt	16680
gagggacagg tggggaaatg ggatgggaaa agaagattga ccttagaagg ggagctcaac	16740
ctctgaacc taatttcaga ccttcaaaa tgaatattaa gctcattttg gtctaagaaa	16800
caaaaaacaa atgaacatga aactcatttt ggtcttataa ggtctgagaa accccttcta	16860
aacttcaagc tgctttaaga aataacattt tattacctgc aaatacacac agtactttgg	16920
agatttataa tagtctctta ttctaataga agccattagg gaaccagttt caataaacag	16980
gtaaatctgt aagactagt ttgtaattagg atatctgttt ccagtgtcca ttcctgcctc	17040
tgttatctaa atgtctggga acaagagctg tgctctgctg tgtttaaaat gattaaaaat	17100
caccaattag ttgagttcac gtagacaggc atttgactta ttgagttgtt ttaagaagac	17160

tataacaagc cttaaagcccc ccagaaacag cctgtctttg ggctttccca catgcctcct	17220
cgctcctctcc acctgtagat gtacctgtct ctctgtcaga gaaggaggagg tgtgggtggg	17280
ctggaccccc agaggccatc cctccttctg tcttctgtct ctgcagccct accactctca	17340
aacctttacg agaccttggg agtcgttggg tccaccacca ctacagctgta cacggaccgc	17400
acggagaagc tgaggcctga gatggaggagg cccggcagct tcaccatctt cggccctagc	17460
aacgaggcct gggcctcctt gccagctgtg agatgacctc cgtctgcccg ggggactctt	17520
atggggaact gccttacttc cccgaggggt gggcatgatg aatgggagtc tgcagtcatt	17580
tcctactgtt tcaggaagct ttctccttaa ccccttagaa aaggctgtgg aacttgagct	17640
aaaatatgtc ttaccaggtt gcgtctaatt cccccgttc cctactgggc agaaagactt	17700
gggtgcttcc tgaggaggga tccttggcag aagagaggcc tgggctcacg agggctgaga	17760
acatgtttcc cagagttgca aggaccatc tcttaaacac agagtctgca gcccctaact	17820
gacacctgt ccttcctcct aggaagtgtt ggactccctg gtcagcaatg tcaacattga	17880
gctgctcaat gccctccgt accatatggt gggcaggcga gtcctgactg atgagctgaa	17940
acacggcatg acctcacct ctatgtacca gaattccaac atccagatcc accactatcc	18000
taatgggta ggggatcccc agccatactg catggccctt ggtgcataat gaaccattt	18060
ctgttccatg tgtgggctgg tttctggggt ttaagctgta gacaaccac cctctttgtg	18120
cctgcttctc ctggggccct ctattccaca gcttgtggaa cccacatttt gctactgtgt	18180
ttgaaaacac tgttttctcc tcccggggct ttgggactat gcctctgttg tgttgactgc	18240
tcaccttgc tgccttctg ggcagattgt aactgtgaac tgtgcccggc tgctgaaagc	18300
cgaccacat gcaaccaacg ggggtgtgca cctcatgat aaggtcatct ccaccatcac	18360
caacaacatc cagcagatca ttgagatga ggacacctt gagacccttc gggtgaggga	18420
ctgcctggg tggaggccca ggcttgggac acattgcctc ccaagagggg cctagcagga	18480
actcttctgc aggagaggta gaggatggct cctgtagggg aacatagagc aggttccct	18540
gaatgccctt gaacatggag aattcattga ccagacattc agcttgacct aacctgtgaa	18600
attctccatc ttctttataa agtgttccct tccttgcctc ccctggaaag gtcagtgggtg	18660
tgtggctgca gcagcacagt gtcctctgag ccctggacct gcaactgtggc ttccagaggt	18720
ggcagttccc acatgggga ctagaataaa tggcctatca ggctgtgtgt gctttgggat	18780
catatgtccc caccctagga ccctggttcc aaccatacgc atgttctctt ggagccaga	18840
acagcagaga agccaccagt gtggacacag aagtcaaggg tctgatttcc agcctggctt	18900
ctgactgctc tggggccgca ggaatacgtt tccttccccc atgcccagca ggcatttgtc	18960
ttacaactgg aggggaaggc atgttctctt tggcaaggac tgctcaggag gaagtggagg	19020

caggctgccc tgcagggtt ttgacctga ttcaaggaga acttcctaac cacaagat	19080
acaagtggga gtgaggcgga ccctccctag agatctccaa cacagagaga caaacacgt	19140
ggggctggct ggcactgaca ggccctgcag gtgtggatgg ctgttagctg ggagcttcgc	19200
tgtctaagct ccctcccat gcttttcttc tgggttgctc gaaggacggg ggtctgcaag	19260
aaaatgatgt tcccacatag ttggcagcac gtgaacagca attgacccct ttgcatcacc	19320
tcctcttact gtttagattt ggtaaatatt tcttcttcc ctcttctgac cctccatttt	19380
gccgatcttt ccttcttata acacatactt actaggtacc tgctacttcc cgggtgggccc	19440
tatgtccag gagtatagag gtgaacaagg aaggcaaat tctattctca gtagagctaa	19500
tactctatct ggagagagac aacaacaaaa tcaacaagg agccaggggc tgtgataatt	19560
tatgtcaagt gggcaggtaa atcgggagtg acagtagtgc agggaggatt ggaaagtcag	19620
ggagtctct ctggaggagg tggcttttga tctgcagcct aaaggatgag aatgggtcca	19680
ttatacaaaa tgctggggca agagcacacc cagtagaggg gagagtaata gcaaaggctc	19740
agggcaggaa gggcaaggga gaggccagt ggtgaggtca catgtgaagg gcatacaatg	19800
ggcaagaca aggccagagt ggccaggccc aatcctccag gacttgaga cctgggaaag	19860
agtgcattct catcctggga gcagcaggaa accactcagg cctttagaag atccttctgg	19920
cagctgtgta gagaatgggt ggtgtgatcc ttccatgcat gggctcatgt acgtgattac	19980
cagtaactgt cgagtgcagc tgtgaggagg gctgcaagcc atgagtgtag gcacagcaga	20040
cagactcacc ttgtctggc ggtgagatgg ggtgggaagt gtgccaagtt gacctccaa	20100
agaaatgata ttttagtga agaataata gaatcagaga agcaaagtaa gagggaagag	20160
cagagaggac agcagggaca aggacttggg gcaggaaga ggaaaggcag gtaaggaca	20220
tgaagatgg ccaggctggc tggagctcag gccagcaag gcccctggg ggccatggc	20280
atgggtgagc ttgggtttgg cttctgtttt cgtcttggg tttctgtaa gcctcgagcc	20340
cttgcgggga accagtgaag ctgtgtgtgc atcttctgtg gggagtcca gactctcag	20400
ggagcactcc atcttctct cccccacag gctgctgtgg ctgcatcagg gctcaacacg	20460
atgcttgaag gtaacggcca gtacacgtt ttggccccga ccaatgaggc cttcgagaag	20520
atccctagt agactttgaa ccgtatcctg ggcgaccag aagccctgag aggtgagcat	20580
cctttggctc ctgctgtgc ctcatttgt cagctagatt gagcccaaga cctgctctgg	20640
tccaagatga acataccacc tgccatgagg tgaccctcag gatattcact gcagccatgg	20700
gctgggtgca tctgtcctg ttgcttcagc taaccgtgc tctagcagcc acactactct	20760
gagggtgac tacagaatcc agcagctttt gtctgggaga gctggactga agagaggcat	20820
agctggagac ccatagctgg ccctggccag aaacaggag agtgaaaggc tggaatagcc	20880

aaggccagag caaggctaata aggttagagca acagcttaca ggtgtggggg tggcagatac	20940
tggcacccctt gaaatggatt cctcatgccc acgcttcact attcttctct gtggctaggg	21000
gatttatgga taaacaaaaa ttacagttaa aaaccagcca taggccaggc acagtgactc	21060
acgcctttaa tatcagcact ttgggaggac aaggtgggcg gatcacctga gatctggaat	21120
ttgagaccag cctggccaac atggcgaaac cccatctcta ctaaaaatac aaaaattagc	21180
tgggcatggt ggtgggcacc tgtaatccca gttactcagg ggctgaggca ggagaaccac	21240
ttgaaccag gaggtggagg ttgcagttag ccaagcttgc accactgcac tccagcctgg	21300
gtgacacagc gacactccgt ctcaagaaaa aaaaaaaaaa aaacagttat agtagtcaac	21360
ttttgactct ccatttcaga tttcgtcatg cctcctcaa tgagctgcta agttaggcag	21420
tgcattgatt attgctgcag gagagggaag gaaggagcta acgtgttttc acatgttttc	21480
cttttgaga tgagaaagga ggactctgcc tccccctac cctgccccct tctactccag	21540
gacctctgaa aggccatgag cacaagctg ctgcctgagt cccctgaaat gcagggtacg	21600
ccccaggtct ctgatgtacc ccaccacact tttcctctca aacatattcc aggatcactt	21660
gatttctttt gaatctatit aaaccacccg tgtcaatgtg ctatataaaa tgtctaattgc	21720
atttcagaca ccctatacat ctatacatit aaagtgttct cttctatct gtgcagggat	21780
gggaaagggc atatttctga aagcacagat gggaagacgg gatttgttcc gtgtccaggt	21840
gattatggta cctctatgcg cctggccggc actggggaca gaggccatga aaatgaatac	21900
agcacagcct ttgcctcaa gaaacttaag acctagtaga aatggcaggc tttaaaacag	21960
gttgttggga tctgatttgg tgagtgaat gacagagata ctcacagcac aaaatgggga	22020
atgagggcgg gcattgggac acacatagcc ttaaggggcc caaaggcttt tagaactgta	22080
ttccctatta aaacatgatt tgcacagagc acattctttg ctttgagac ctcagaactc	22140
cttactatag gccgggcatg gttataatcc cagcactttg ggaagccaag gcgggcagat	22200
cacttgaggc tgagagtcca agaccagcct ggccaacatg gtaaaacccc gtctctacta	22260
aaaatacaaa aattagctgg gtgtggtggt ggccacctgt aatcccagct actcaggagg	22320
ctgaggtagg agaatacatt gaacctggga ggcagaagtt gcaataagcc cagatcatgc	22380
cactgcactc cagcctgggc aacaaagcta gactctctca aaagaaaaaa acaaaacaaa	22440
acaaaacaaa acaaaaaaaa ctcttatta taaactgtaa gaaaaaaaag gccctactt	22500
cgtcctttt gcaaactgct ctttctctac tctaacca gctggttcag agcaaggaca	22560
ctctgttttg tgccatcgct gcagactgga aggaagaggt ccttgcccca cacccaacag	22620

tctcctgctg ttaccggcag gttggcaggc aggcaggcga gaagcagcca gggctggtgg	22680
tgtgtccagt ttgaagacta gtttccagcc ctggccctgc tcaccctcca agtggccctg	22740
gcaggttcct ctaccacatc gtggacttca ctttcttct ctaagaagct caatcccca	22800
ggcctcattc ccataggcct tctcacccct tttctttccc tctggctgaa tgtggccagc	22860
acgggcttcc aaggccaatc actcgtctgc agcagcccca tgccttgagc ggcctcagag	22920
cttctcctg cctatgacag tgtggttttg gttccacac ttgggatcag attgaaactc	22980
gcctccgtgg tgagaatatg ggacatagag cctcgggtgac cttggtgagc agcagtcag	23040
gccacctgct cagcctgggg ttgggggggg ctcctcctcc ttgactggtc ctgcatittg	23100
cctccatcca gcctgtctgg gctctccgag gcaatggaga ccagcaggag tcacgatggg	23160
tcaggagccc ctttggggc tcagccctgc cctgccccct aaagtagcac ttggataagc	23220
aaataaatta ttatacttac tattttatggg tgtggtgaat gggatggcaa aggccaaagtc	23280
ttactgatca ccaaacctta agatatatcc tggcagctag tagacccttg ggctaaatga	23340
acagaaaact ggacaaataa agtgtacaca aataactcaa agctgtcatt tgtacacttt	23400
tcgtcttttc ctactacagt ttacattttt ataaaggtga gtagatttct aaaatcccgt	23460
ggtaggctct cttagatttt tcttgtatcc ctgaagtca gctacaaata agctaatac	23520
taacatttgt tgagcattta ctctgttgc agggcccggtg ccgagtgtt taggttcaga	23580
atttcatgct atccccacag cagccctagg agatgaatgc aattcttatg tccacttgac	23640
tgataaggaa gttgaggttc aaagaggcta aatgactctc ccagggtccc acagctggaa	23700
agtggccaca gggccccagc tggttttcta gggcagcagg cagaaggcga ggaggatctg	23760
ggccctgtgg tgccccagcc tcacttgagg gtccctcatc gagagaacag gatcctcaca	23820
gcatgggcag gctgcaagtg gtcctgagg ttatcgtgga gtggaccctg acttgacctg	23880
agtctgtttg gaccccagac ctgctgaaca accacatctt gaagtcagct atgtgtgctg	23940
aagccatcgt tgcggggctg tctgtagaga ccttgagggg cagcactg gaggtgggct	24000
gcagcgggga catgctcact atcaacggga aggcgatcat ctccaataaa gacatcctag	24060
ccaccaacgg ggtgatccac tacattgatg agctactcat ccagactca ggtaggccag	24120
gcctccgggg gccttggccc tgccctggccc accatctctt ctgccatcct ttgtggcggg	24180
ggaggggaaa ttcagagatc tttgggcgac ttccctgcct ggaccagct cacagcttct	24240
cggccactgc aaatgtgtgg gttgtgacca gactgatgtg tcttgagctt caggcttgca	24300
agtgcagtgg agaggcagtg gggagctatt gaagggtct ggggacagac tcaatcacag	24360
aggcctttca gaagatctgc ctgctgtgca tgggcaaaga gggccacttg ctgacctcag	24420
agcatgtgct ttctcagtag tgcccaagct gtcccatggg cactgacca gttagaatga	24480

ctgaatggac ttiggcttgt gtctcattag gaatcctagc cccattctag tcttcagtg	24540
agatctgtcc atgagtgaag gaatctcaca ggaaaaaaca aaatgcttct atgggtgtgg	24600
ttgctggcct tatctacacc acagaagcca tcacacagac tgtctttctt cccattgtta	24660
gaatgtgccc tgaccaagca gcccacaggg cctgggacag aggctgatct ctgcctaact	24720
gagctcacct ctctccctc tctcctgac tggttagatt ttctaggtga ctgttccct	24780
gatgacacaa gcccgtggg ccccgagcgt gtttagaggg gttgttgact cacgagatga	24840
cattcctgct gatgtgtgc atgccctggg gtggatgaat gataaatgaa aacagcgctt	24900
ttaactttt aaaccacttt ctcttctt gttagccaaga cactatttga attggctgca	24960
gagtctgatg tgccacagc cattgacctt ttcagacaag ccggcctcgg caatcatctc	25020
tctggaagtg agcgggtgac cctcctggct ccctgaatt ctgtattcaa aggtaacatg	25080
gggaaggcat cctgttaga ttgtccctgg aggcagcttc cccaccctg tcacctccac	25140
aacactctcc gatttacagc accccatggg acattagaac ttccactcag ctcaacaaa	25200
agcagatgtg acttcagcag aaacttcaga ggctctgttg ttctattagg cagtgcagag	25260
aatgcctttg gggagccgtt cctcagaact caagacttga catctgggag gcagccgttc	25320
ctcagaactc aagacttgac atctgggaga gcagagcatt ccctgcctt tctatttgca	25380
gggtcacttg ccaatgtata gtcaagaggt cagagtgagg gtacagctga gctgcagccc	25440
caggaaggca gagaaggggg ccaagtgtg tgcgtgcctg ccctccctc ttagggcaaa	25500
actccaaaca cccttgatta tctggatctt ctttaattct ccatagaaga taccagatgt	25560
taaggaatat tggcagcttc acttggtttc tcaatccctg ttccaaact caaggaggga	25620
tgggctttt cactgtattt atctctcctc actctcttca ttgcaggagc acatctctct	25680
ggacctaac atcaccttt cttgtatag gtacccctcc aattgatgcc catacaagga	25740
atttgcctcg gaaccacata attaaagacc agctggcctc taagtatctg taccatggac	25800
agacctgga aactctgggc ggcaaaaaac tgagagtttt tgtttatcgt aatgtaagtt	25860
ctgggtccta aatcatgctc ctgggaagct cttactgtg ggacttgtat tagtgtaaaa	25920
aaaaatgtcc tcaataagca ggagtgtgca tgagaactgg ttgctgacaa ggaaggaaat	25980
aatttctgga aaatatagat aacaaaatga gatcctgcag aaggattgga atctctttt	26040
ctggaggcct ttgagaataa accacacaat tatccaacct gtattgtgaa ggaataagtc	26100
cttcttgaat tcaggaatta acacctggga ggagggatgg agttcagact ctttctgagc	26160
ttatgagaag agaagcccc taaactaaaa tacagccctc cttggtccaa aaggtgcctt	26220
ctctcttctg ctgtatcttc ttgttttca aaccaacag ttaccctgga aatcaaaaag	26280
gaagtacaac tcaacatagc tcttcctgg gaccaaccag caccatttgg ctaaagatgg	26340

ttatcatctg ttaacaaaag aaataaataa atgggttcaa cgtatttatt tcaacattgt	26400
caatggacct catgtgtaac tgatattctc attatgggac ctctgtgtga ctttattggg	26460
gcctctctaa ccgttcttcc ctttaaggaag accatttatt gttttatttc ctggagaaaa	26520
tacatcattt tatcccagcc ttaataaccc atcccagtgt atactccttc atcttcatgg	26580
ataatgacct tgctacatgc tctgaacaaa tcaggaggcc cctcgtggaa gtataaccag	26640
tcctttcttt ctctgtccct cttctgtgca gagcctctgc attgagaaca gctgcatcgc	26700
ggccccagac aagaggggga ggtacgggac cctgttcacg atggaccggg tgctgacccc	26760
cccaatgggg actgtcatgg atgtcctgaa gggagacaat cgctttaggt aattagtcc	26820
atccccgggt ggagcttctg cccagtgggc atgctggagt gggatgtggg gccccagcta	26880
tttgtcaagc tttcttctac cttggggatt caattaacac tagcagtgc ctgctgcgac	26940
cttcagact tgggatgggg aaaaggcaag ggtcgccttg aaagcttaca ttgggaagaa	27000
gggttacttc taagagtga atcttcacat gcatgggaag caggaggggg ggactacatt	27060
tttatgactg aagtgaagg aaaacatcac cctctcattg taaagctcca agtgagccaa	27120
gagcacatag ttacagtgc acgatgagcc tctcactctc tgcgcagtat ctgtttattg	27180
caactgaagc acccttgta gtttgtttcc ttgcccggct atctccattt ctgacttgct	27240
cattcacctt ggggtgctgt catattgaat gtttcctgt cactgacttc agccacctgc	27300
acaagggtct ggagaccaca cccctctgcc ctcccagaat catatccctg gaggtcagc	27360
tagtctctgg gtcagccata cctctgccct ttcttttccc tctttctcc tgtggcctct	27420
gacgtctggc catttaacag agcttagcat ttttgctggg tggagagagc tggagcctgg	27480
aatcactccc tctttgtga tacggagggc atgaaaacca aggtgtgtgc attccagtgg	27540
cctggactct actatctca gtggtaggt atttaaggaa aatacctctc agcgtggtga	27600
ggtatttaag gaaaatacct gttgacaggt gacattttct gtgtgtgtat ctacagcatg	27660
ctggtagctg ccatccagtc tgcaggactg acggagacct tcaaccggga aggagtctac	27720
acagtctttg ctcccacaaa tgaagccttc cgagccctgc caccaagaga acggagcaga	27780
ctcttgggta aagaccaact taagtacacg tctccatttt tctaaagtag tgatccctca	27840
gggccccagc agcaaacagt tggcacatca aggattgact tgaagggatt ttatgacaag	27900
actattagtg aaagagtggg cgggactaaa ggaactagca aaggatgagg ccaaccaggg	27960
actagcaacc ctgggaagcc ttactaccc ctaggcctgg gggaatggga ggatgagagc	28020
aggaaccagg gaggtcatga gccttggaac agggcacaga acagcagcca gagccatgtg	28080

cagccagcca ctgtcagaac catgcaaggg ggaccactca gcgccccagc ctccctctca	28140
gacagttgcc atctgggtct cttgttggct gatgcgagag caggaggag cccactgatg	28200
cagttcatag agctcagcct cctgggcagg aaaccgggca gagaggagta gaaaagaatt	28260
aagggtggct gcgaccagcc cagtcactga ggcacgtttc ccactggaga cctatgagca	28320
cagtataat aaagccagtt acctgcactg actatccctc cagacaaaag ctttccaag	28380
aagttagtca tggctctgag agatctagtt gaggatgttt ggcaggggat ctagtggtta	28440
cgggtggcta agaaaaatga ggaaggtaag agtatcttgc agcctgtgtt gggaggatta	28500
aataggatgc cacacacagg gccaggcaga cagcctggtc agtaatagcc atgacgatgg	28560
gggcgggggg agcaggaatg ggagttgcag tgtttagctc agatgcatgc ctgtgagaga	28620
tgtttccact ctacagaaa gatgagacca aggaaaagga ggaggaagag gaaggacctt	28680
gacaaacctt gggggccaca ttgtctacac ctcccttctt gctctagagc agaatagaaa	28740
gttcaggttg caggcagctc taagttgaat tcgtgtcctg tttaattttc tttattgcta	28800
aatgaatgcc tgtgtctgtg atgtgcactg atgttcctaa ggagagggga gaagttcatt	28860
ctgaacataa acttttcac cttctctgtt ccagcaagaa tggaaatatc cccaagtggc	28920
ctgagccagc ttggctttct ttttgttttc aattatgtgg gagttgagga gggggatggg	28980
aaaagcttcc caaacacacc ctccccagg cctgaggcac ccctggggga cagagagtgt	29040
tagaggttgg tacaggtgtt agagatattg aaaggacatc ccatgcaccc caggggctgg	29100
tgtggctctg tacttccagg caatatTTTg tggaaaggga acctgtcag ctccaggttg	29160
tggatgtttg aaaatcagtt ggtaccagtt ggctccatcc tctggcaggc atgtggattt	29220
gtcaataacc aagtgaactc tccaaaataa gttaaaactt cctcccttct cagtttcaag	29280
atgtggaaa tagctgttca taagccctgg ggaaatttag ccttttggtt ggtaatggga	29340
gtatccgaga tgagagggca gctggaaact ttcggaatga cctccacac ttaatttggg	29400
aaatgcctct gcacctttat gggcaaccag atgcctgccc cagttgctgg agacactgat	29460
gtgggctgaa aggaatgtg agacgtgacg aggagagatg ctgcggaggg aatatcccc	29520
tcagccctga cctcatcggc tccatggctc ctccacagta cagctgtcta ctcttttaag	29580
ttctcccttc aggaaatagc catctcaaac agaattgtca tttgagggca gaatgtgtaa	29640
atattgcaact actgtgttat aaccgtcagg agccatgtg atgatgaaac gtcccagatg	29700
ccggtgctgg aaaggtccct ggctttccaa gcaaatattt atctcatgga aacatgagtc	29760
atactcacag aggagtatgg attaaactct tctcagcagc caggagagccc agcatcccag	29820
acagcatatt taaccagag gccaaactgac tgcTggggca gatttTggt catgaacatg	29880
tgtttTgtgt cctctgacca ttagacagat tTgggtcac aacgtTgagt atacagtggg	29940

agcttaataa gtgccttattc cctgggcagg gagttcttca tttcaggggt gaccacttac	30000
atcttctcct ctgggccctc cttgaccagg ctaattacca ttcttgggat taactctatc	30060
tccttttccc gcaacctgca ggagatgcca aggaacttgc caacatcctg aaataccaca	30120
ttggtgatga aatcctgggt agcggaggca tcggggccct ggtgcggcta aagtctctcc	30180
aaggtgacaa gctggaagtc agcttggtta gtgtcctgca aatcaaagc tggctaaatt	30240
tccccagggc agggctccag gacatatctc acccccagga tggaattata cacacacaac	30300
cttcaagttg cagcccgaat ctctgagtgt aattcgtcca aagaaaaaga gaaaagagaa	30360
gagggtcttc agggaaatca agtgagatca tagttagaca tgagtaagaa cttccagatt	30420
tacaagggaa tagagcatct gatttggcat ctgagagagg ctattagatc ttccttctct	30480
taaggagggt gtaggcaact agttatgtga ctgaagagat cagtctgtac tcacaccatc	30540
ccacccccca aaccagggc ttcactgagt tgtaccatga accagaccat cccaagaggc	30600
tttttgagtt ctgacacttg ctctgtgagc ctcccttgc tctgcacatt gatgatataa	30660
ctttgtaact gactaagag tgttccataa gcagatagcc agccgagctc cagaaatctc	30720
cctggctgca cctgcagagg ccactgacct ctctgtggag ggaccgctct tcagtgtgtg	30780
gctggcttct actctctgct cctctctctt ggtcttcagc catccattgc tcaccagttt	30840
ctcacgagga gcataggaag atatgcatgt agggaggtag gcacggggat gacttgtttg	30900
acttttagcag gtcattcaag aatctcctcg cacctggttt cagatgctgg ggtcctgtct	30960
gtcacaggct tctgtgcctc ctacccctt gagtttgtca catggccctt caggaaggcc	31020
tgagatagat ttgccctggg tgggcctcct atgagaaaat ctttaagtgag gcaccaggc	31080
aaaatggaaa gagccttttg ccagagcag gaagcctgtc ttccatttcc agctgttcca	31140
cctacttagc ttaaaagagg cacttcgctt gtcttcagtc tcagtctcag tctcctcttc	31200
tgtggaatgg gacaataata tctactctcc ttatcataca ctgctgtgag gactgagtgg	31260
atcacacaaa aaagcattat gtaaatgca aagtgtctaaa tccacacagg agatttgaat	31320
taatccacca cactgaaggt ctgtcaaggg cagggactgt ttcattcacc agagtatccc	31380
cagtctaaca caggacttgg catatgaaaa gtgttcagta ggccgggtgc agtggtcat	31440
gcctgtaate ccagcacttt gggaggccaa agtgggcgga tcacttgagg tcaggagttc	31500
aagtccagcc tggccaacgt ggtgaaacca catctctact aaaaatacaa aattagctgg	31560
gcgtggtggc acatgcctgt aatcacagct actctggagg ctgaggcagg agaatcactt	31620
gaaccagga ggcggagggt gcagtgagtc gagatcatgc cactgcactc cagcctgggc	31680
gacaagattg aaactccatc tcaaaaacaa agaacaagga aaaaaacgaa aactgttcag	31740
taaacacttg ctgaatgaat aaaataata tataaatgta taaataaatg ctctactttc	31800

aaccactact ctgtttttct tttagaaaaa caatgtgggtg agtgtcaaca aggagcctgt	31860
tgccgagcct gacatcatgg ccacaaatgg cgtgggtccat gtcacacca atgtttctgca	31920
gcctccaggt aagtgtcgca tccccactga ctctgcagcc agtccttttc ttcattgtggc	31980
agttgggtgga gagaagaaaa actgtttctaa acaatgatga gaataacatg taatttgtat	32040
agttaaactg tgcctatgtg actgattgca gagtgaattg ggagctgttg gttttgaatg	32100
caccacacta aggaatgtga ggacacattg ctctttgcgg agttgcccag ctatattagc	32160
tcccctcgga cacagcccag ttttctgtat tcgcgtggat gctgtccgcg cgattcccag	32220
cactcctctt acagcatctc acctcagtgt atgttccttg cctccagtgc agttgaacct	32280
cagtctctgcc tctcctcatg tgtgcattca cctttcttgg tgctctctcc ccatgggcca	32340
agttctacca tgagttaaga aacattatgg agaaaacatg tctttggaaa tgtgagccag	32400
aaagcccacc agtgcacctc agtcacgggtt gttatgaatg acatgctaata ggtttcactc	32460
tgggtcaaacc tgccttttct ttcctcttca gccaacagac ctccaggaaag aggggatgaa	32520
cttgacagact ctgccttga gatcttcaaa caagcatcag cgttttccag ggtaaatgac	32580
ctgctaggtt tgcgcctage ctgagcagcc tcaggctctc tgtttgggcc atagaggagc	32640
ctctccagcc cctgtcttcc ttggctgctc cccagggtctc tcttaaaact tctccccact	32700
cccactgagg catcctcagc cccagcctgt gtcaaattca gagtaaagaa ccaaggcaac	32760
tccctggctt tcatgggcca aagcgcaggc ttccacaccg aggcctctga gcctcagatc	32820
atggggaagt cactgctgga gagaacagac atagctctgg aagccatctg cccaagaggg	32880
cagcccatcc caagtccatc ttacagtggc caggcctgcc ctgagccggg gcctctgggt	32940
cactcttctg ctgtccatgg cattgcccac cctgggtgag gctggggctc tcctgggcac	33000
tgtatgtatt ctggatacag ggatactggg ctgcctatgt gtgtggagcc atcccttct	33060
tgcccagcc ccacctccct ctcaaacct ctctggetct ttctgagctt cctttcctgc	33120
tccccagctt gccagtgct cagtgcccc cttggctctt ttgctacttc gggtcaggtg	33180
gagcctcttg ggaatgtgaa gtgccttaca gaaagattgc acttcaagag gagaggtgc	33240
aggagccat cctaaaccca gaggcctgga gcttactgtg tcactttact ttgtacaca	33300
gggtctctct tagtgcctc gagaaggatt cttggccctg agcttctact cctgaggcca	33360
cctctgtgca gccccagctc cctcaactct aggtgtagt ctgagtgga aagcctggct	33420
tgggggtctc ctaggaatgt ccacctgaag gcacactga taggggcttg cacaacttat	33480
gtctgccaag gccacctgag gaactccctg gtgcctataa gttccacctt ccccttctc	33540

ttcctcgccc cagcattttt tctgagtagg ggtggcaatg ggcaaagcca ttgtcataag 33600
cagttgcagg tataactttc actagaaaac ctgacacctt gtgttttctt tcaggcttcc 33660
cagaggtctg tgcgactagg tgagctctgt ctgggtttga agtcattgca gacctgttta 33720
ggccttacc ccaagcaagc ccaagcctgc catctgctgt atatagataa gaacatcatg 33780
gtgcagtaaa agaagcctgg cctttggagt cagaacagca gggtgacttg gggtcagacc 33840
cagagcacc catttccttc tctgtaagat gaggataata agagtaacaa ctttttaggg 33900
ttaaggtgag ttttcagctt aggaagctcg ggaatatgtc aaagggcttg gcaggaaccc 33960

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

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

aagaaacata 34810

<210> 52

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> gene protein product

<400> 52

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

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 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