(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0124946
(43) 공개일자 2023년08월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/22 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
C12Q 1/6853 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/22 (2013.01)
C12N 15/62 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7022952
(22) 출원일자(국제) 2021년12월22일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년07월06일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/064879
(87) 국제공개번호 WO 2022/140553
국제공개일자 2022년06월30일
(30) 우선권주장
63/277,273 2021년11월09일 미국(US)
63/130,548 2020년12월24일 미국(US)

(71) 출원인
인티그레이티드 디엔에이 테크놀로지스 아이엔씨.
미국 아이오와 52241 코럴빌 커머셜 파크 1710
(72) 발명자
도보시 조셉
미국 아이오와 52241 코럴빌 리버티 레인 1901
프롤리그 존
미국 아이오와 52317 노쓰 리버티 유닛 11 워싱턴 애비뉴490
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리앤목특허법인

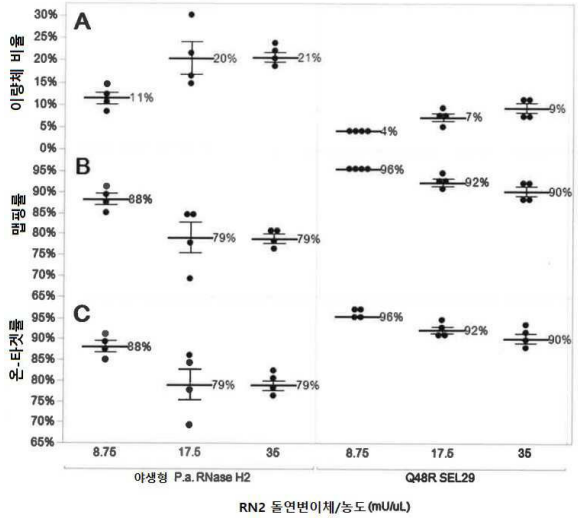
전체 청구항 수 : 총 76 항

(54) 발명의 명칭 **고-충실도 DNA 폴리머라아제를 이용한 rhPCR 기반 앰플리콘시퀀싱에서 프라이머 이량체 및 오프-타겟 증폭을 감소시키는 RNAse H2 돌연변이체**

(57) 요 약

본 발명은 피로코커스 아비시(*Pyrococcus abyssi*)(*P.a.*), 써모코커스 코다카렌시스(*Thermococcus kodakarensis*)(*T.kod*), 및 피로코커스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*) 개체로부터의 아미노산 서열의 단편을 포함하는 하이브리드 RNase H2 단백질, 및 고-충실도 DNA 폴리머라아제 완충액에서 불일치(mismatch) 식별 및 활성을 개선하기 위해 이를 사용하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 1/6853 (2018.05)
C12Y 301/26004 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)
C12N 2310/315 (2013.01)
C12N 2310/321 (2013.01)
C12N 2310/322 (2013.01)

(72) 발명자
페르슈바허 캐서린
미국 아이오와 52241 코럴빌 10쓰 스트리트 1600
벨츠 크리스틴
미국 아이오와 52404 시더 래피즈 샤먼 애비뉴 사우스웨스트2706
로즈 스캇
미국 아이오와 52241 코럴빌 메스키트 드라이브 1180
벨케 마크 아론
미국 아이오와 52241 코럴빌 하이랜드 파크 애비뉴 960

명 세 서

청구범위

청구항 1

하이브리드 RNase H2 단백질로서, 상기 하이브리드 RNase H2 단백질은 피로코커스 아비시(*Pyrococcus abyssi*)(*P.a.*), 써모코커스 코다카렌시스(*Thermococcus kodakarensis*)(*T.kod*) 및 피로코커스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*) 개체로부터의 아미노산 서열의 단편을 포함하는 것인 하이브리드 RNase H2 단백질.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 하이브리드 RNase H2 단백질은 *T.kod* RNase H2의 아미노산 잔기 26-40번 및 잔기 100-120번을 포함하는 것인 하이브리드 RNase H2 단백질.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 하이브리드 RNase H2 단백질은 서열번호 2 및 3으로부터 선택되는 것인 하이브리드 RNase H2 단백질.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 하이브리드 RNase H2 단백질은 서열번호 14 내지 20으로부터 선택되는 것인 하이브리드 RNase H2 단백질.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항의 하이브리드 RNase H2 단백질을 코딩하는 재조합 핵산.

청구항 6

프라이머 신장 방법에 적합한 조건 하에서, 청구항 1 내지 4 중 어느 한 항의 하이브리드 RNase H2 단백질을 프라이머, 폴리뉴클레오티드 주형, 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 DNA 폴리머라아제와 접촉시켜, 신장된 프라이머를 생산하는 단계를 포함하는, 프라이머 신장을 수행하는 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 DNA 폴리머라아제는 고-충실도 고세균 DNA 폴리머라아제(high-fidelity archaeal DNA polymerase)를 포함하는 것인 방법

청구항 8

청구항 6에 있어서, 상기 프라이머는 차단-절단가능한(blocked-cleavable) 프라이머를 포함하는 것인 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 프라이머 신장 방법은 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 수행하는 방법을 포함하는 것인 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 PCR을 수행하는 방법은 상기 프라이머와 상기 폴리뉴클레오티드 주형 사이에 형성되는 프라이머:폴리뉴클레오티드 하이브리드 중 불일치 식별(mismatch discrimination)을 개선시키는 것인 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 불일치 식별의 개선은 3'-불일치 식별의 개선을 포함하는 것인 방법.

청구항 12

청구항 1 내지 4에 따른 하이브리드 RNase H2 단백질, 적어도 하나의 프라이머, 폴리뉴클레오티드 주형, 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 DNA 폴리머라아제를 포함하는 반응 혼합물.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 DNA 폴리머라아제는 고-충실도 고세균 DNA 폴리머라아제를 포함하는 것인 반응 혼합물.

청구항 14

청구항 12 또는 13에 있어서, 상기 적어도 하나의 프라이머는 차단-절단가능한 프라이머를 포함하는 것인 반응 혼합물.

청구항 15

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항의 하이브리드 RNase H2 및 프라이머로 프라이머 신장을 수행하는 단계를 포함하는, rhPCR을 수행하는 방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 고-충실도 고세균 DNA 폴리머라아제로 프라이머 신장을 수행하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 17

청구항 15 또는 16에 있어서, 상기 하이브리드 RNase H2 효소가 화학적 변형, 압타머 또는 차단 항체(blocking antibody)에 의해 가역적으로 불활성화되는 것인 방법.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 차단기(blocking group)가 상기 프라이머의 3' 말단 뉴클레오티드에 부착되는 것인 방법.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 상기 차단기는 3' 말단 잔기의 5'에 부착되어 상기 프라이머가 DNA 합성을 위한 주형으로 작용하는 것을 억제하는 것인 방법.

청구항 20

청구항 19항에 있어서, 상기 차단기는 하나 이상의 무염기성(abasic) 잔기를 포함하는 것인 방법.

청구항 21

청구항 24에 있어서, 상기 하나 이상의 무염기성 잔기가 C3 스페이서인 것인 방법.

청구항 22

청구항 18 내지 21 중 어느 한 항에 있어서, 상기 차단기는 RDDDDx, RDDDDMx, RDxxD, RDxxDM, RDDDDxxD, RDDDDxxDM 및 DxxD로 구성된 군으로부터 선택되고, R은 RNA 잔기이고, D는 DNA 잔기이며, M은 불일치 잔기이고, x는 C3 스페이서 또는 DNA 폴리머라아제에 의한 신장을 방지하는 기타 방법인 것인 일원(member)을 포함하는 것인 방법.

청구항 23

청구항 18 내지 22 중 어느 한 항에 있어서, 상기 차단기는 신장 증폭(extension amplification) 반응의 검출을 허용하는 표지를 포함하는 것인 방법.

청구항 24

청구항 23에 있어서, 상기 증폭 반응의 검출을 허용하는 표지는 절단 부위로부터 3'인 올리고뉴클레오티드 프라이머에 부착되는 것인 방법.

청구항 25

청구항 24에 있어서, 상기 표지는 형광단인 것인 방법.

청구항 26

청구항 23에 있어서, 상기 표지는 질량 분석법에 의한 증폭 반응의 검출을 위한 질량 태그(mass tag)인 것인 방법.

청구항 27

청구항 14 내지 26 중 어느 한 항에 있어서, 상기 차단-절단가능한 프라이머의 절단 도메인은 DNA 잔기, 무염기성 잔기, 변형된 뉴클레오시드 또는 변형된 포스페이트 뉴클레오티드간 결합 중 하나 이상을 포함하는 것인 방법.

청구항 28

청구항 14 내지 26 중 어느 한 항에 있어서, 상기 절단 도메인은 단일 RNA 잔기를 포함하는 것인 방법.

청구항 29

청구항 14 내지 26 중 어느 한 항에 있어서, 상기 절단 도메인은 2개의 인접한 RNA 잔기를 포함하는 것인 방법.

청구항 30

청구항 14 내지 26 중 어느 한 항에 있어서, 상기 절단 도메인은 3개 이상의 RNA 잔기의 연속 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 31

청구항 14 내지 26 중 어느 한 항에 있어서, 상기 절단 도메인은 RNA 잔기가 없는 것인 방법.

청구항 32

청구항 14 내지 26 중 어느 한 항에 있어서, 상기 절단 도메인은 하나 이상의 2'-변형 뉴클레오시드를 포함하는 것인 방법.

청구항 33

청구항 32에 있어서, 상기 하나 이상의 2'-변형 뉴클레오시드는 2'-O-알킬 RNA 뉴클레오시드, 2'-플루오로뉴클레오시드, LNA(locked nucleic acid), 2'-에틸렌 핵산 잔기, 2'-에틸렌 핵산 잔기, 2'-알킬 뉴클레오시드, 2'-아미노뉴클레오시드 및 2'-티오뉴클레오시드로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 34

청구항 32에 있어서, 상기 하나 이상의 2'-변형 뉴클레오시드는 2'-O-메틸 RNA 뉴클레오시드인 것인 방법.

청구항 35

청구항 32에 있어서, 상기 하나 이상의 2'-변형 뉴클레오시드는 2'-플루오로뉴클레오시드인 것인 방법.

청구항 36

표적 DNA 서열을 증폭시키는 방법으로서:

(a) 반응 혼합물을 제공하는 단계로서, 상기 반응 혼합물은:

(i) 차단기의 5'에 위치하며, RNase H2 효소에 의해 절단가능한, 절단 도메인을 갖는 올리고뉴클레오티드 프라이머로서, 상기 차단기는 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머의 3'-말단 또는 그 근처에 연결되며, 상기 차단기는 프라이머 신장을 방지하고 및/또는 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머가 DNA 합성을 위한 주형으로 작용하는 것을 억제하는 것인 올리고뉴클레오티드 프라이머,

(ii) 표적 서열일 수 있거나, 표적 서열이 아닐 수 있는 샘플 핵산,

(iii) DNA 폴리머라아제, 및

(iv) 청구항 1 내지 4에 따른 하이브리드 RNase H2 단백질;을 포함하는 것인 단계;

(b) 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머를 표적 DNA 서열에 혼성화시켜 이중 가닥 기질을 형성하는 단계;

(c) 상기 절단 도메인 내 또는 그에 인접한 절단 부위에서 상기 하이브리드 RNase H2 효소로 혼성화된 올리고뉴클레오티드 프라이머를 절단하여 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머로부터 상기 차단기를 제거하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 37

청구항 36에 있어서, 상기 DNA 폴리머라아제는 고-충실도 고세균 DNA 폴리머라아제인 것인 방법.

청구항 38

청구항 36 또는 37에 있어서, 상기 RNase H2 단백질은 화학적 변형, 압타머에 의해 또는 차단 항체에 의해 가역적으로 불활성화되는 것인 방법.

청구항 39

청구항 36 내지 38 중 어느 한 항에 있어서, 상기 차단기는 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머의 3'-말단 뉴클레오티드에 부착되는 것인 방법.

청구항 40

청구항 36 내지 38 중 어느 한 항에 있어서, 상기 차단기는 3'-말단 잔기의 5'에 부착되고, 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머가 DNA 합성을 위한 주형으로 작용하는 것을 억제하는 것인 방법.

청구항 41

청구항 36 내지 40 중 어느 한 항에 있어서, 상기 차단기는 하나 이상의 무염기성 잔기를 포함하는 것인 방법.

청구항 42

청구항 41에 있어서, 상기 하나 이상의 무염기성 잔기는 C3 스페이서인 것인 방법.

청구항 43

청구항 40 또는 41에 있어서, 상기 차단기는 RDDDDx, RDDDDMx, RDxxD, RDxxDM, RDDDDxxD, RDDDDxxDM 및 DxxD로 구성된 군으로부터 선택되고, R은 RNA 잔기이고, D는 DNA 잔기이며, M은 불일치 잔기이고, x는 C3 스페이서 또는 DNA 폴리머라아제에 의한 신장을 차단하는 기타 방법인 것인 일원을 포함하는 것인 방법.

청구항 44

청구항 36 내지 43 중 어느 한 항에 있어서, 상기 차단기는 신장 증폭 반응의 검출을 허용하는 표지를 포함하는 것인 방법.

청구항 45

청구항 36 내지 44 중 어느 한 항에 있어서, 상기 증폭 반응의 검출을 허용하는 표지를 더 포함하고, 상기 표지는 상기 절단 부위로부터 3'인 올리고뉴클레오티드 프라이머에 부착되는 것인 방법.

청구항 46

청구항 45에 있어서, 상기 표지는 형광단인 것인 방법.

청구항 47

청구항 45에 있어서, 상기 표지는 질량 분석법에 의한 증폭 반응의 검출을 위한 질량 태그인 것인 방법.

청구항 48

청구항 36 내지 47 중 어느 한 항에 있어서, 상기 절단 도메인은 DNA 잔기, 무염기성 잔기, 변형된 뉴클레오시드 또는 변형된 포스페이트 뉴클레오티드간 결합 중 하나 이상을 포함하는 것인 방법.

청구항 49

청구항 36 내지 48 중 어느 한 항에 있어서, 상기 절단 도메인은 단일 RNA 잔기를 포함하는 것인 방법.

청구항 50

청구항 36 내지 48 중 어느 한 항에 있어서, 상기 절단 도메인은 2개의 인접한 RNA 잔기를 포함하는 것인 방법.

청구항 51

청구항 36 내지 48 중 어느 한 항에 있어서, 상기 절단 도메인은 3개 이상의 RNA 잔기의 연속 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 52

청구항 36 내지 48 중 어느 한 항에 있어서, 상기 절단 도메인은 하나 이상의 2'-변형 뉴클레오시드를 포함하는 것인 방법.

청구항 53

청구항 52에 있어서, 상기 하나 이상의 2'-변형 뉴클레오시드는 2'-O-알킬 RNA 뉴클레오시드, 2'-플루오로뉴클레오시드, LNA(locked nucleic acid), 2'-에틸렌 핵산 잔기, 2'-에틸렌 핵산 잔기, 2'-알킬 뉴클레오시드, 2'-아미노뉴클레오시드 및 2'-티오뉴클레오시드로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 54

청구항 52에 있어서, 상기 하나 이상의 2'-변형 뉴클레오시드는 2'-O-메틸 RNA 뉴클레오시드인 것인 방법.

청구항 55

청구항 52에 있어서, 상기 하나 이상의 2'-변형 뉴클레오시드는 2'-플루오로뉴클레오시드인 것인 방법.

청구항 56

청구항 36 내지 55 중 어느 한 항에 있어서, 상기 절단 부위를 플랭킹하는 서열은 뉴클레아제 절단에 내성인 하나 이상의 뉴클레오티드간 결합을 포함하는 것인 방법.

청구항 57

청구항 56에 있어서, 뉴클레아제 내성 결합이 포스포로티오에이트인 것인 방법.

청구항 58

청구항 1 내지 4에 따른 하이브리드 RNase H2 단백질을 제공하는 하나 이상의 용기를 포함하는, 신장된 프라이머의 생산용 키트.

청구항 59

청구항 58에 있어서, (a) 프라이머 신장 조건 하에서 소정의(predetermined) 폴리뉴클레오티드 주형에 혼성화 가능한 프라이머를 제공하는 용기; (b) 뉴클레오시드 트리포스페이트를 제공하는 용기; (c) 프라이머 신장에 적합한 완충액을 제공하는 용기; 및 (d) DNA 폴리머라아제로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 추가 용기를 더 포함하는 것인 키트.

청구항 60

청구항 59에 있어서, 상기 DNA 폴리머라아제는 고-충실도 고세균 DNA 폴리머라아제를 포함하는 것인 키트.

청구항 61

청구항 58 내지 60 중 어느 한 항에 있어서, 차단-절단가능한 프라이머를 포함하는 용기로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 추가 용기를 더 포함하는 것인 키트.

청구항 62

청구항 1 내지 4의 RNase H2 및 고-충실도 고세균 DNA 폴리머라아제를 포함하는 반응 완충액을 포함하는, 표적 DNA 서열의 증폭을 수행하기 위한 키트.

청구항 63

청구항 62에 있어서, 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 더 포함하고, 적어도 하나의 올리고뉴클레오티드 프라이머는 차단기의 5'에 위치하는, RNase H2 효소에 의해 절단가능한 절단 도메인을 갖고, 상기 차단기는 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머의 3'-말단 또는 그 근처에 연결되고, 상기 차단기는 프라이머 신장을 방지하고 및/또는 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머가 DNA 합성을 위한 주형으로 작용하는 것을 억제하는 것인 키트.

청구항 64

청구항 63에 있어서, 상기 차단기는 RDDDDx, RDDDDMx, RDxxD, RDxxDM, RDDDDxxD, RDDDDxxDM 및 DxxD로 구성된 군으로부터 선택된 일원을 포함하고, R은 RNA 잔기이고, D는 DNA 잔기이며, M은 불일치 잔기이고, x는 C3 스페이서 또는 DNA 폴리머라아제에 의한 신장을 차단하는 기타 모이어티인 것인 방법.

청구항 65

주형 핵산의 앰플리콘 라이브러리를 제조하는 방법으로서,

혼합물을 형성하는 단계로서, 상기 혼합물은:

핵산의 집단;

적어도 하나의 차단-절단가능한 프라이머;

하이브리드 RNase H2 단백질;

dNTP;

DNA 폴리머라아제; 및

완충액을 포함하고,

상기 혼합물에서 상기 적어도 하나의 차단-절단가능한 프라이머와 상기 핵산의 집단 사이에 하이브리드 이중체가 형성되는 것인 단계;

상기 적어도 하나의 차단-절단가능한 프라이머를 상기 하이브리드 돌연변이 RNase H2 단백질로 절단하여, 상기 DNA 폴리머라아제에 의해 프라이머 신장이 가능한 하나 이상의 활성 프라이머를 생성하는 단계; 및

상기 핵산의 집단으로부터 하나 이상의 주형 핵산의 증폭을 허용하는 조건 하에서 상기 완충액에서 상기 DNA 폴리머라아제로 상기 적어도 하나의 활성 프라이머를 신장시켜 주형 핵산의 앰플리콘을 생성시키는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 66

청구항 65에 있어서, 상기 하이브리드 RNase H2 단백질은 Q48R SEL29(서열번호) 또는 기타로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 67

청구항 65에 있어서, 상기 DNA 폴리머라아제는 KOD DNA 폴리머라아제 또는 기타 고-충실도 고세균 DNA 폴리머라아제인 것인 방법.

청구항 68

청구항 65에 있어서, 상기 완충액은 KOD DNA 폴리머라아제 완충액 또는 기타 고-충실도 고세균 DNA 폴리머라아제 완충액인 것인 방법.

청구항 69

대규모 병렬 시퀀싱(massively parallel sequencing)을 수행하는 방법으로서:

주형 핵산의 라이브러리 집단을 제조하는 단계로서:

혼합물로 PCR을 수행하고, 상기 혼합물은:

핵산 집단:

하이브리드 RNase H2 단백질;

적어도 하나의 차단-절단가능한 프라이머;

DNA 폴리머라아제;

dNTP; 및

완충액;을 포함하는 것인 단계를 포함하는 것인 단계, 및

상기 주형 핵산의 라이브러리 집단으로부터 복수의 원하는 주형 핵산을 시퀀싱하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 70

청구항 69에 있어서, 상기 하이브리드 RNase H2 단백질은 Q48R SEL29(서열번호 18) 또는 기타로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 71

핵산 주형의 앰플리콘 라이브러리로부터 SNP-함유 핵산 주형을 검출하는 방법으로서,

혼합물을 형성하는 단계로서, 상기 혼합물은:

핵산 주형의 앰플리콘 라이브러리;

적어도 하나의 차단-절단가능한 프라이머;

하이브리드 RNase H2 단백질;

dNTP;

DNA 폴리머라아제; 및

완충액을 포함하고,

상기 혼합물에서 상기 적어도 하나의 차단-절단가능한 프라이머와 상기 핵산 주형의 앰플리콘 라이브러리 중 SNP-함유 핵산 주형 사이에 하이브리드 이중체가 형성되는 것인 단계;

상기 하이브리드 이중체의 적어도 하나의 차단-절단가능한 프라이머를 상기 하이브리드 RNase H2 단백질로 절단하여, 상기 DNA 폴리머라아제에 의한 상기 하이브리드 이중체의 프라이머 신장이 가능한 적어도 하나의 활성 프라이머를 생성하는 단계; 및

상기 핵산 주형의 앰플리콘 라이브러리로부터 하나 이상의 주형 핵산의 증폭을 허용하는 조건 하에서 상기 완충액에서 상기 DNA 폴리머라아제에 의해 상기 하이브리드 이중체에서 상기 적어도 하나의 활성 프라이머를 신장시켜, 상기 SNP-함유 핵산 주형을 검출하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 72

청구항 71에 있어서, 상기 하이브리드 RNase H2 단백질이 Q48R SEL29(서열번호 18) 또는 기타로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 73

루프-매개 증폭(loop-mediated amplification) 반응을 수행하는 방법으로서:

혼합물을 형성하는 단계로서, 상기 혼합물은

핵산 주형;

4개의 차단-절단가능한 프라이머로서, 상기 차단-절단가능한 프라이머는 RNase H2 단백질의 기질인 핵산 주형과 이중체를 형성하는 것인 차단-절단가능한 프라이머;

RNase H2 단백질로서, 상기 RNase H2 단백질은 Q48R SEL29(서열번호 18) 또는 기타로부터 선택되는 것인 RNase H2 단백질;

DNA 폴리머라아제 단백질;

dNTP; 및

완충액;을 포함하는 것인 단계, 및

상기 혼합물로 등온 증폭 사이클을 수행하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 74

Q48R SEL29 RNase H2(서열번호 18)로 청구항 6, 15, 36, 69, 71, 및 73 중 어느 한 항에 따른 방법을 이용하여 생성된 산물 혼합물(product mixture)로서, 그로부터 생성된 산물 혼합물은 야생형 *P.a.* RNase H2(서열번호 1)로 생산된 산물 혼합물 대비 프라이머 이량체의 감소된 집단을 포함하는 것인 산물 혼합물.

청구항 75

Q48R SEL29 RNase H2(서열번호 18)로 프라이머 신장을 수행하는 단계를 포함하는, 감소된 프라이머 이량체 형성을 갖는 rhPCR 분석을 수행하는 방법으로서, 감소된 프라이머 이량체 형성은 야생형 *P.a.* RNase H2(서열번호 1)로 수행된 rhPCR 분석과 비교시 Q48R SEL29 RNase H2(서열번호 18)에 의한 rhPCR 분석 동안 형성된 프라이머 이량체의 감소된 양에 해당하는 것인 방법.

청구항 76

원하는 산물에 대한 개선된 맵핑률(mapping rate) 및 온-타겟률(on-target rate)을 갖는 rhPCR 분석을 수행하는 방법으로서, 상기 방법은 Q48R SEL29 RNase H2(서열번호 18)로 프라이머 신장을 수행하는 단계를 포함하고, 개선된 맵핑률 및 온-타겟률은 야생형 *P.a.* RNase H2(서열번호 1)로 수행된 rhPCR 분석과 비교시 Q48R SEL29 RNase H2(서열번호 18)에 의한 rhPCR 분석 동안 형성된 원하는 산물의 증가된 맵핑 및 온-타겟 증폭에 해당하는 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

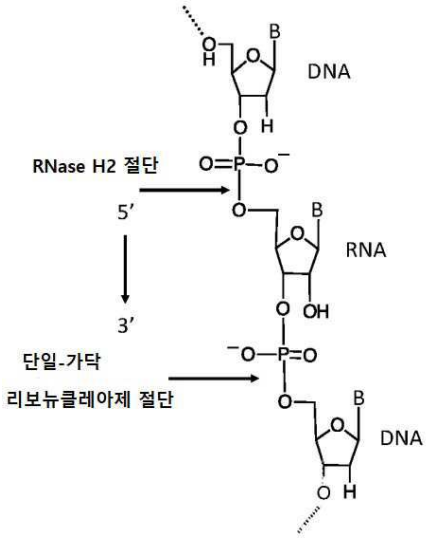
[0001] 관련 출원에 대한 교차-참조

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. 119에 따라 2020년 12월 24일에 제출되고 명칭이 "고-충실도 폴리머라아제 완충액에서 불일치 식별 및 활성을 증진하는 RNase H2 돌연변이체(RNASE H2 MUTANTS THAT ENHANCE MISMATCH DISCRIMINATION AND ACTIVITY IN HIGH-FIDELITY POLYMERASE BUFFER)"인 미국 임시 특허 출원 63/130,548, 및 2021년 11월 9일에 제출되고, 명칭이 "고-충실도 DNA 폴리머라아제에 의한 rhPCR-기반 앰플리콘 시퀀싱에서 프라이머 이량체 및 오프-타겟 증폭을 감소시키는 RNase H2 돌연변이체(RNASE H2 MUTANTS THAT REDUCE PRIMER DIMERS AND OFF-TARGET AMPLIFICATION IN rhPCR-BASED AMPLICON SEQUENCING WITH HIGH-FIDELITY DNA POLYMERASES)"인 미국 임시 특허 출원 63/277,273에 대한 우선권의 이익을 주장하며, 이들의 내용은 전체로 참조에 의해 본원에 포함된다.

[0003] 본 발명은 타입 II RNase H(이하 RNase H2) 하이브리드 효소 변이체(hybrid enzyme variant) 및 생물학적 분석을 개시, 보조, 모니터링 또는 수행하기 위해 핵산 가닥을 절단하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0004] RNase H2 효소의 패밀리는 광범위하게 특성이 규명되었다. 이들 효소는 (이중체(duplex) 형태) DNA 서열 내에 내장된(embedded) 단일 리보뉴클레오티드를 절단하기 위한 기질 특이성을 갖는다(Eder, et al., (1993) *Biochimie*, **75**, 123-126). 흥미롭게도 절단은 RNA 잔기의 5' 측에서 일어난다(반응식(scheme) I 참조). 이러한 효소, 그들의 특성, 및 생물학적 분석에서의 응용의 개요가 Walder 등에 의한 미국특허 8,911,948 B2에 요약된다.



[0005] **(반응식 I)**

[0006] 초고온균(hyperthermophile) 피로코커스 아비시(*Pyrococcus abyssi*)(*P.a.*)로부터 단리된 RNase H2 효소는 완전히 DNA로 이루어진 핵산 가닥에 내장된 리보뉴클레오티드의 5' 측을 절단한다. RNase H2-의존적 PCR(rhPCR)은 3' 말단 근처의 단일 리보뉴클레오티드를 포함하는 프라이머를 절단하여 3' 말단의 차단 그룹(blocking group)을 제거하는 열안정성 RNase H2 효소를 사용하여 PCR의 특이성을 향상시킨다(Dobosy et al., 2011; 미국 특허 8,911,948 B2). 이 프라이머는 처음에는 DNA 폴리머라아제에 의해 신장될 수 없지만, RNase H2에 의해 3' 말단에서 차단 그룹이 제거되면, 프라미어가 신장될 수 있다. *P.a.* RNase H2는 리보뉴클레오티드 근처의 DNA-RNA 헤테로듀플렉스에서 단일-염기 불일치에 민감하고, 불일치-함유 주형을 훨씬 감소된 비율로 절단하여, 완벽하게 일치하는 이중체가 우선적으로 절단되고 신장될 수 있게 한다. 이는 rhPCR 반응의 특이성 증가를 가져오고, 프라이머-이량체(primer-dimer) 형성 및 기타 오프-타겟(off-target) 증폭을 감소시킨다.

[0007] rhPCR이 PCR의 특이성에 가져오는 개선에도 불구하고, 현재 여전히 한계가 있다. rhPCR의 명백한 불일치 식별은 이론적으로 달성할 수 있는 것보다 낮다. WT *P.a.* RNase H2는 불일치의 특성에 따라 효율성이 다르나, RNA 염기의 바로 반대쪽에 있는 단일 염기 불일치를 고도로 인식한다. 또한, 네이티브(native) 효소는 RNA 염기의 직접한 5' 또는 3' 위치에서 상대적으로 제한된 불일치 식별을 갖는다. 이러한 제한에도 불구하고, 이 위치들에 돌연변이를 배치하는 것이 유리할 수 있다. 예를 들어, RNA의 직접한 5' 불일치는 프라이머 절단 후 PCR 증폭에서 차별적 DNA 폴리머라아제(예를 들면, H784Q 써무스 아쿠아티쿠스(*Thermus aquaticus*) DNA 폴리머라아제)를 사용한 2차 선택 단계로 이용될 수 있다(미국 특허 출원 15/361280 참조). RNA의 3'에 불일치를 배치하면 불일치 인식이 주형 변환(template conversion) 동안 한번이 아니라, 매 사이클마다 일어날 것이기 때문에, 주형 변환의 가능성을 낮춘다.

[0008] rhPCR의 유용성에도 불구하고, 야생형 P.a. RNase H2의 불일치 식별은 "누출형(leaky)"일 수 있어서, 프라이머 이량체의 일부 증폭을 초래할 수 있다. 시퀀싱 라이브러리의 증폭 동안 생성된 프라이머 이량체는 Illumina 플로우 셀에 결합하여 시퀀싱을 진행할 수 있으나, 의미 있는 데이터를 제공하지 않기 때문에 문제가 된다. 높은 수준의 프라이머 이량체는 목적 표적에 맵핑되는 리드(read)의 비율을 감소시켜, 궁극적으로 분석 민감도를 감소시키거나, 또는 저 빈도 변이체의 검출에 필요한 온-타겟 리드(on-target read)의 수를 생성하기 위해 시퀀싱 비용의 현저한 상승을 필요로 한다. 저 빈도 변이체 검출은 또한 PCR 동안 증폭 오류의 도입에 의해 영향을 받을 수 있다. 고 충실도(high fidelity) DNA 폴리머라아제 및 최적화된 완충액 조건을 사용하여 오류율을 낮출 수 있다. 그러나, 이러한 완충액 조건은 rhPCR에서 야생형 P.a. RNase H2의 효소 활성 및 불일치 민감도를 감소시킨다.

[0009] 이전에 야생형 P.a. RNase H2의 아미노산 서열과 기타 관련된 종으로부터의 서열의 부분적 재조합에 의해 생성된 RNase H2 돌연변이체의 사용이 고 충실도 DNA 폴리머라아제 완충액에서 RNase H2 효소 활성의 개선을 가져온다는 것이 확인되었다. 이러한 돌연변이체 중 2개, Q48R SEL29 RNase H2 및 A107V SEL29 RNase H2는 써모코커스 코다카렌시스(Thermococcus kodakarensis)(KOD) DNA 폴리머라아제 반응 완충액을 사용하여 개선된 효소 활성을 갖는 것으로 나타났다. 또한, 두 돌연변이체 모두 야생형 P.a. RNase H2와 비교하여, RNA 염기의 3' 및 5' 불일치뿐만 아니라 RNA 염기 반대쪽의 불일치의 증진된 식별을 보였다. 그 내용이 전체로 참조에 의해 본원에 포함된, 2020년 12월 24일에, 명칭 "고-충실도 폴리머라아제 완충액에서 불일치 식별 및 활성을 증진시키는 RNase H2 돌연변이체(RNASE H2 MUTANTS THAT ENHANCE MISMATCH DISCRIMINATION AND ACTIVITY IN HIGH-FIDELITY POLYMERASE BUFFER)"으로 출원된 미국 임시 특허 출원 63/130,548(Attorney Docket No. IDT01-018-PRO)를 참조한다.

[0010] 본 개시는 고-충실도 DNA 폴리머라아제 및 완충액을 함유하는 다중 rhAmpSeq 워크플로우 중 이러한 신규한 하이브리드 RNase H2 효소 변이체, Q48R SEL29 RNase H2 중 하나에 관한 것이다. 야생형 P.a. RNase H2에 비해, Q48R SEL29 RNase H2는 PCR 증폭 동안 생성되는 프라이머 이량체를 감소시켜 맵핑률(mapping rate) 및 온-타겟률(on-target rate)을 향상시킨다. 이러한 척도(metrics)를 개선하면서, Q48R SEL29 RNase H2는 앰플리콘 균일성, 앰플리콘 탈락률(dropout rate) 및 앰플리콘 균일성 분포를 포함한 기타 중요한 시퀀싱 척도에 영향을 미치지 않았다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] **발명의 간단한 요약**

[0012] 제1 양태에서, 하이브리드 RNase H2 단백질이 제공된다. 상기 하이브리드 RNase H2 단백질은 피로코커스 아비시(*Pyrococcus abyssi*)(*P.a.*), 써모코커스 코다카렌시스(*Thermococcus kodakarensis*) (*T.kod*) 및 피로코커스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*) 개체로부터의 아미노산 서열의 단편을 포함한다.

[0013] 제2 양태에서, 본원에 개시된 임의의 하이브리드 RNase H2 단백질을 코딩하는 재조합 핵산이 제공된다.

[0014] 제3 양태에서, 프라이머 신장(primer extension)을 수행하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 프라이머 신장 방법에 적합한 조건 하에서, 본원에 개시된 하이브리드 RNase H2 단백질을 프라이머, 폴리뉴클레오티드 주형, 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 DNA 폴리머라아제와 접촉시켜, 신장된 프라이머를 생산하는 단계를 포함한다.

[0015] 제4 양태에서, 반응 혼합물이 제공된다. 상기 반응 혼합물은 본원에 기술된 바와 같은 하이브리드 RNase H2 단백질, 적어도 하나의 프라이머, 폴리뉴클레오티드 주형, 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 DNA 폴리머라아제를 포함한다.

[0016] 제5 양태에서, rhPCR을 수행하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 본원에 기술된 바와 같은 하이브리드 RNase H2, DNA 폴리머라아제 및 프라이머로 프라이머 신장을 수행하는 단계를 포함한다.

[0017] 제6 양태에서, 표적 DNA 서열을 증폭하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 여러 단계를 포함한다. 제1 단계는 (i) 차단기의 5'에 위치하는, RNase H2 효소에 의해 절단 가능한, 절단 도메인을 갖는 올리고뉴클레오티드 프라이머로서, 상기 차단기는 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머의 3'-말단 또는 그 근처에 연결되고, 상기 차단기는 프라이머 신장을 방지하고 및/또는 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머가 DNA 합성을 위한 주형으로 작용하는 것을 억제하는 것인 올리고뉴클레오티드 프라이머, (ii) 표적 서열일 수도 있거나 또는 표적 서열이 아닐 수 있는 샘플 핵산; (iii) DNA 폴리머라아제, 및 (iv) 본원에 개시된 하이브리드 RNase H2 단백질을 포함하는 반응 혼합물을 제공하는 것이다. 제2 단계는 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머를 표적 DNA 서열에 혼성화하여 이중-가닥 기질을 형성하는 것이다. 제3 단계는 상기 혼성화된 올리고뉴클레오티드 프라이머를 상기 절단 도메인 내 또는 그에 인접한 절단 부위에서 상기 하이브리드 RNase H2 효소로 절단하여 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머로부터 차단기를 제거하는 것이다.

[0018] 제7 양태에서, 신장된 프라이머를 생산하기 위한 키트가 제공된다. 상기 키트는 본원에 개시된 바와 같은 하이브리드 RNase H2 단백질을 제공하는 적어도 하나의 용기를 포함한다.

[0019] 제8 양태에서, 표적 DNA 서열의 증폭을 수행하기 위한 키트가 제공된다. 상기 키트는 본원에 기술된 RNase H2 및 고-충실도 고세균 DNA 폴리머라아제(high-fidelity archaeal DNA polymerase)를 포함하는 반응 완충액을 포

함한다.

[0020] 제9 양태에서, 주형 핵산의 앰플리콘 라이브러리를 제조하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 여러 단계를 포함한다. 제1 단계는 핵산의 집단, 적어도 하나의 차단-절단가능한 프라이머(block-cleavable primer), 하이브리드 RNase H2 단백질, dNTP, DNA 폴리머라아제 및 완충액을 포함하는 혼합물을 형성하여, 상기 혼합물에서 상기 적어도 하나의 차단-절단가능한 프라이머와 상기 핵산의 집단 간에 하이브리드 이중체(hybrid duplex)가 형성될 수 있는 것이다. 제2 단계는 상기 하이브리드 RNase H2 단백질로 상기 적어도 하나의 차단-절단가능한 프라이머를 절단하여 DNA 폴리머라아제에 의한 프라이머 신장이 가능한 적어도 하나의 활성 프라이머(active primer)를 생성하는 것이다. 제3 단계는 상기 핵산의 집단으로부터 하나 이상의 주형 핵산의 증폭을 허용하는 조건 하에서 상기 완충액 중 DNA 폴리머라아제로 상기 적어도 하나의 활성 프라이머를 신장시켜, 주형 핵산의 앰플리콘을 생성하는 것이다. 제1 측면에서, 상기 하이브리드 RNase H2 단백질은 Q48R SEL29(서열번호 18) 또는 기타로부터 선택된다. 제2 측면에서, 상기 DNA 폴리머라아제는 KOD DNA 폴리머라아제 또는 기타 고-충실도 고세균 DNA 폴리머라아제이다. 제3 측면에서, 상기 완충액은 고-충실도 고세균 DNA 폴리머라아제 완충액이다.

[0021] 제10 양태에서, 대규모 병렬 시퀀싱(MPS)을 수행하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 여러 단계를 포함한다. 제1 단계는 PCR 방법에서 핵산의 집단, 하이브리드 RNase H2 돌연변이 단백질, 적어도 하나의 차단-절단가능한 프라이머, DNA 폴리머라아제, dNTP 및 완충액을 사용하여 주형 핵산의 라이브러리 집단을 제조하는 것이다. 제2 단계는 상기 주형 핵산의 라이브러리 집단으로부터 복수의 원하는 주형 핵산을 시퀀싱하는 것이다. 제1 측면에서, 상기 하이브리드 RNase H2 단백질은 Q48R SEL29(서열번호 18) 또는 기타로부터 선택된다.

[0022] 제11 양태에서, 핵산 주형의 앰플리콘 라이브러리로부터 SNP-함유 핵산 주형을 검출하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 여러 단계를 포함한다. 제1 단계는 핵산 주형의 앰플리콘 라이브러리; 하나 이상의 차단-절단가능한 프라이머; 하이브리드 돌연변이 RNase H2 단백질; dNTP; DNA 폴리머라아제; 및 완충액을 포함하는 혼합물을 형성하는 것을 포함한다. 상기 혼합물에서 상기 핵산 주형의 앰플리콘 라이브러리 중 SNP-함유 핵산 주형과 상기 하나 이상의 차단-절단가능한 프라이머 사이에 하이브리드 이중체가 형성된다. 제2 단계는 상기 하이브리드 이중체의 하나 이상의 차단-절단가능한 프라이머를 하이브리드 RNase H2 단백질로 절단하여, 상기 DNA 폴리머라아제에 의해 상기 하이브리드 이중체의 프라이머 신장이 가능한 하나 이상의 활성 프라이머를 생성하는 것을 포함한다. 제3 단계는 상기 핵산 주형의 앰플리콘 라이브러리로부터 하나 이상의 주형 핵산의 증폭을 허용하는 조건 하에서 완충액에서 DNA 폴리머라아제로 상기 이중체에서 하나 이상의 활성 프라이머를 신장시키고, 그에 의해 상기 SNP-함유 핵산을 검출하는 것을 포함한다. 제1 측면에서, 상기 방법은 Q48R SEL29(서열번호 18), 또는 기타로부터 선택되는 하이브리드 돌연변이 RNase H2 단백질을 포함한다. 제2 측면에서, 상기 방법은 고-충실도 고세균 DNA 폴리머라아제 완충액인 완충액을 포함한다.

[0023] 제12 양태에서, 루프-매개 증폭(loop-mediated amplification) 반응을 수행하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 2 단계를 포함한다. 제1 단계는 핵산 주형; 4개의 차단-절단가능한 프라이머로서, 상기 차단-절단가능한 프라이머는 RNase H2 단백질의 기질인 핵산 주형과 이중체를 형성하는 것인 4개의 차단-절단가능한 프라이머; RNase H2 단백질로서, 상기 RNase H2 단백질은 Q48R SEL29(서열번호 18) 또는 기타로부터 선택되는 것인 RNase H2 단백질; DNA 폴리머라아제 단백질; dNTP; 및 완충액을 포함하는 혼합물을 형성하는 것을 포함한다. 제2 단계는 상기 혼합물로 등온 증폭 사이클을 수행하는 것을 포함한다.

[0024] 제13 양태에서, 프라이머 이량체 형성이 감소된 rhPCR 분석을 수행하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 Q48R SEL29 RNase H2(서열번호 18)로 프라이머 연장을 수행하는 것을 포함한다. 감소된 프라이머 이량체 형성은 야생형 *P.a.* RNase H2(서열번호 1)로 수행된 rhPCR 분석과 비교할 때 Q48R SEL29 RNase H2(서열번호 18)에 의한 rhPCR 분석 동안 형성된 프라이머 이량체의 감소된 양에 해당한다.

[0025] 제14 양태에서, 원하는 산물에 대한 개선된 맵핑률(mapping rate) 및 온-타겟률을 갖는 rhPCR 분석을 수행하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 Q48R SEL29 RNase H2(서열번호 18)로 프라이머 신장을 수행하는 것을 포함한다. 개선된 맵핑률 및 온-타겟률은 야생형 *P.a.* RNase H2(서열번호 1)로 수행된 rhPCR 분석과 비교할 때 Q48R SEL29 RNase H2(서열번호 18)에 의한 rhPCR 분석 동안 형성된 원하는 산물의 증가된 맵핑 및 온-타겟 증폭에 해당한다.

과제의 해결 수단

[0026] 발명의 상세한 설명

[0027] 본 발명은 이중체 주형에서 불일치 식별력을 유지하거나 증진하는 능력을 유지하면서, 특정 DNA 폴리머라아제

완충액을 사용한 rhPCR 동안 효소 활성을 증진시키는 신규한 하이브리드 RNase H2 효소 변이체를 제공한다. RNase H2 효소 하이브리드는 피로코커스 아비시(*Pyrococcus abyssi*)(*P.a.*), 써모코커스 코다카렌시스(*Thermococcus kodakarensis*) (*T.kod*) 및 피로코커스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*) 개체로부터의 아미노산 서열의 단편을 조합한다. 결과적으로 수득된 하이브리드 RNase H2 효소, 및 이러한 효소에 기반한 선별된 돌연변이체는 불일치 식별을 크게 증진시킨다. 특히, 프라이머 신장을 수행하는 방법, rhPCR을 수행하는 방법, 표적 DNA 서열을 증폭하는 방법, 대규모 병렬 시퀀싱을 수행하는 방법, 핵산 주형의 앰플리콘 라이브러리에서 SNP-함유 핵산 주형을 검출하는 방법, 및 루프-매개 증폭 반응을 수행하는 방법에서, 구체적으로, Q48R SEL29 RNase H2(서열번호 18)는 야생형 *P.a.* RNase H2 (서열번호 1)에 의해 생성된 산물 혼합물에 비해 프라이머 이량체 종의 감소된 집단을 갖는 산물 혼합물을 생성하는 것으로 확인된다.

[0028] ***정의***

[0029] 본 발명의 이해를 돕기 위해 여러 용어를 하기에 정의한다.

[0030] 본 발명을 설명하는 맥락에서(특히, 하기 청구범위의 맥락에서) 용어 "a" 및 "an" 및 "the" 및 유사한 지시 대상의 사용은, 본원에서 달리 명시되거나 문맥에 의해 명백히 모순되는 경우가 아니면, 단수 및 복수 모두를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 용어 "포함하는", "갖는", "들어있는" 및 "함유하는"이라는 용어는 달리 명시되지 않는 한, 개방형 용어(즉, "포함하나, 그에 한정되지 않는"을 의미함)로 해석되어야 한다. 본원에서 값의 범위를 기술하는 것은 본원에서 달리 나타내지 않는 한, 단지 그 범위 내에 속하는 각각의 별개의 값을 개별적으로 언급하는 약칭(shorthand) 방법으로 작용하도록 의도되고, 각각의 별개의 값은 본원에서 개별적으로 기술된 것처럼 명세서에 포함된다. 본원에 기술된 모든 방법은, 본원에서 달리 나타내거나 또는 문맥상 명백히 모순되지 않는 한, 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본원에 제공된 모든 예, 또는 예시적인 언어(예를 들면, "~와 같은")의 사용은 단지 본 발명을 더 잘 설명하기 위한 것으로 의도되고, 달리 청구되지 않는 한, 본 발명의 범위를 제한하지 않는다. 명세서의 어떤 언어도 청구되지 않은 요소를 본 발명의 실시에 필수적인 것으로 나타내는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0031] 본원에서 사용되는 용어 "핵산" 및 "올리고뉴뉴클레오티드"는 폴리데옥시리보뉴클레오티드(2-데옥시-D-리보오스 함유), 폴리리보뉴클레오티드(D-리보오스 함유), 및 퓨린 또는 피리미딘 염기의 N-글리코시드인 임의의 기타 타입의 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 용어 "핵산", "올리고뉴클레오티드" 및 "폴리뉴클레오티드" 간에 길이의 의도된 구별은 없고, 이들 용어는 상호 교환적으로 사용될 것이다. 이러한 용어는 분자의 일차 구조만을 의미한다. 따라서, 이러한 용어는 이중- 및 단일-가닥 DNA 및 이중- 및 단일-가닥 RNA를 포함한다. 본 발명에서 사용하기 위해, 올리고뉴클레오티드는 또한 염기, 당 또는 포스페이트 백본이 변형된 것인 뉴클레오티드 유사체 뿐만 아니라 비-퓨린 또는 비-피리미딘 뉴클레오티드 유사체를 포함할 수 있다.

[0032] 올리고뉴클레오티드는 각각 참조에 의해 본원에 포함된, Narang et al., 1979, Meth. Enzymol. 68:90-99의 포스포트리에스테르 방법; Brown et al., 1979, Meth. Enzymol. 68:109-151의 포스포디에스테르 방법; Beaucage et al., 1981, Tetrahedron Lett. 22:1859-1862의 디에틸포스포르아미다이트 방법; 미국 특허 4,458,066의 고체 지지체 방법과 같은 방법에 의한 직접적인 화학 합성을 포함한, 임의의 적합한 방법에 의해 제조될 수 있다. 올리고뉴클레오티드 및 변형된 뉴클레오티드의 컨쥬게이트의 합성 방법의 리뷰가 참조에 의해 본원에 포함된, Goodchild, 1990, Bioconjugate Chemistry 1(3): 165-187에서 제공된다.

[0033] 본원에서 사용되는 용어 "프라이머"는 적합한 조건 하에서 DNA 합성의 개시지점으로 작용할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 그러한 조건은 핵산 가닥에 상보적인 프라이머 신장 산물의 합성이 적합한 온도에서 적절한 완충액에서 4개의 상이한 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 신장을 위한 작용제(예를 들면, DNA 폴리머라아제 또는 역전사효소)의 존재 하에 유도되는 것인 조건을 포함한다. 프라이머 신장은 또한 1종 이상의 뉴클레오티드 트리포스페이트가 없는 상태에서 수행될 수 있으며, 이 경우 제한된 길이의 신장 산물이 생성된다. 본원에서 사용되는 용어 "프라이머"는 하나의 올리고뉴클레오티드가 인접한 위치에서 혼성화하는 제2 올리고뉴클레오티드로의 라이게이션에 의해 "신장"되는 것인 라이게이션-매개 반응에 사용되는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것으로 의도된다. 따라서, 본원에서 사용되는 용어 "프라이머 신장(primer extension)"은 DNA 합성의 개시 지점으로서 프라이머를 사용하는, 개별 뉴클레오시드 트리포스페이트의 중합 및 신장된 산물을 형성하기 위한 2개의 올리고뉴클레오티드의 라이게이션 모두를 지칭한다.

[0034] 프라이머는 바람직하게는 단일 가닥 DNA이다. 프라이머의 적절한 길이는 프라이머의 의도된 용도에 따라 다르나, 일반적으로 6개 내지 50개 뉴클레오티드, 바람직하게는 15개 내지 35개 뉴클레오티드의 범위이다. 짧은 프라이머 분자는 일반적으로 주형과 충분히 안정적인 하이브리드 복합체를 형성하기 위해 더 낮은 온도를 필

요로 한다. 프라이머는 주형 핵산의 정확한 서열을 반영할 필요는 없지만 주형과 혼성화할 수 있도록 충분히 상보적이어야 한다. 주어진 표적 서열의 증폭을 위한 적합한 프라이머의 설계는 당업계에 잘 알려져 있고 본원에 인용된 문헌에 기술되어 있다.

[0035] 프라이머는 프라이머의 검출 또는 고정화를 허용하나, DNA 합성의 개시 지점으로 작용하는 프라이머의 기본적인 특성을 변경하지 않는 추가적인 특징을 통합할 수 있다. 예를 들어, 프라이머는 표적 핵산에 혼성화하지 않지만 증폭된 산물의 클로닝 또는 검출을 용이하게 하는 추가 핵산 서열을 5' 말단에 포함할 수 있다. 혼성화하기 위해 주형에 충분히 상보적인 프라이머 영역을 혼성화 영역(hybridizing region)이라고 한다.

[0036] 본원에서 사용되는 용어 "표적", "표적 서열", "표적 영역" 및 "표적 핵산"은 동의어이며 증폭, 시퀀싱 또는 검출될 핵산의 영역 또는 서열을 의미한다.

[0037] 본원에서 사용되는 용어, "혼성화(hybridization)"는 상보적인 염기쌍 형성으로 인해 두 개의 단일 가닥 핵산에 의해 이중체(duplex) 구조가 형성되는 것을 의미한다. 혼성화는 완전히 상보적인 핵산 가닥 간에, 또는 약간의 불일치 영역을 포함하는 "실질적으로 상보적인" 핵산 가닥 간에 일어날 수 있다. 완전히 상보적인 핵산 가닥의 혼성화가 강하게 바람직한 조건은 "엄격한 혼성화 조건(stringent hybridization condition)" 또는 "서열-특이적 혼성화 조건"으로 지칭된다. 실질적으로 상보적인 서열의 안정한 이중체는 덜 엄격한 혼성화 조건에서 달성될 수 있다; 허용되는 불일치의 정도는 혼성화 조건의 적절한 조정에 의해 제어될 수 있다. 핵산 기술 분야의 당업자는 당해 분야에 의해 제공되는 지침(guidance)(예를 들어, 참조에 의해 본원에 포함된, Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; Wetmur, 1991, Critical Review in Biochem. 및 Mol. Biol. 26(3/4):227-259; 및 Owczarzy et al., 2008, Biochemistry, 47: 5336-5353 참조)에 따라, 예를 들어, 올리고뉴클레오티드의 길이 및 염기쌍 조성, 이온 강도 및 불일치 염기쌍의 발생률을 포함한, 다수의 변수를 고려하여 이중체 안정성을 경험적으로 결정할 수 있다.

[0038] 용어 "증폭 반응"은 주형 핵산 서열의 카피를 증가시키거나 주형 핵산의 전사를 가져오는 효소 반응을 비롯한 모든 화학 반응을 의미한다. 증폭 반응은 역전사, 실시간 PCR(미국 특허 4,683,195 및 4,683,202; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al., eds, 1990) 참조), 및 리가아제 연쇄 반응(LCR)(Barany et al., 미국 특허 5,494,810 참조)을 포함한 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 포함한다. 예시적인 "증폭 반응 조건" 또는 "증폭 조건"은 전형적으로 2 단계 또는 3 단계 사이클을 포함한다. 2 단계 사이클(two step cycle)은 고온 변성 단계 및 뒤이은 혼성화/신장(또는 라이게이션) 단계를 갖는다. 3 단계 사이클은 변성 단계, 뒤이은 혼성화 단계 및 뒤이은 별개의 신장 또는 라이게이션 단계를 포함한다.

[0039] 본원에서 사용되는 "폴리머라아제"는 뉴클레오티드의 중합을 촉매하는 효소를 의미한다. 일반적으로, 이 효소는 핵산 주형 서열에 어닐링된 프라이머의 3'-말단에서 합성을 개시할 것이다. "DNA 폴리머라아제"는 디옥시리보뉴클레오티드의 중합을 촉매한다. 공지된 DNA 폴리머라아제는 예를 들어 피로코커스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*)(Pfu) DNA 폴리머라아제(Lundberg et al., 1991, Gene, 108:1), 대장균 DNA 폴리머라아제 I(Lecomte and Doubleday, 1983, Nucleic Acids Res. 11:7505), T7 DNA 폴리머라아제(Nordstrom et al., 1981, J. Biol. Chem. 256:3112), 써무스 써모필루스(*Thermus thermophilus*)(Tth) DNA 폴리머라아제(Myers and Gelfand 1991, Biochemistry 30:7661), 바실러스 스테아로써모필루스(*Bacillus stearothermophilus*) DNA 폴리머라아제(Stenesh and McGowan, 1977, Biochim Biophys Acta 475:32), 써모코커스 리토랄리스(*Thermococcus litoralis*)(Tli) DNA 폴리머라아제 (Vent DNA 폴리머라아제라고도 함, Cariello et al., 1991, Nucleic Acids Res, 19: 4193), 써모토가 마리티마(*Thermotoga maritima*)(Tma) DNA 폴리머라아제(Diaz and Sabino, 1998 Braz J. Med. Res, 31:1239), 써무스 아쿠아티쿠스(*Thermus aquaticus*)(Taq) DNA 폴리머라아제(Chien et al., 1976, J. Bacteoriol, 127: 1550), 써모코커스/피로코커스 코다카렌시스(*Thermoccus/Pyrococcus kodakaraensis*) KOD DNA 폴리머라아제(Takagi et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63:4504), JDF-3 DNA 폴리머라아제(특허 출원 WO 0132887), 및 Pyrococcus GB-D(PGB-D) DNA 폴리머라아제(Juncosa-Ginesta et al., 1994, Biotechniques, 16:820)를 포함한다. 임의의 전술된 효소의 폴리머라아제 활성은 당업계에서 잘 알려진 수단에 의해 결정될 수 있다.

[0040] 본원에서 사용되는 바와 같이, 충분히 엄격한 조건 하에서 증폭 반응에 사용될 때 프라이머가 주로 표적 핵산에 혼성화된다면, 프라이머는 표적 서열에 대해 "특이적(specific)"이다. 일반적으로, 프라이머-표적 이중체 안정성이 프라이머와 샘플에서 발견되는 임의의 다른 서열 사이에 형성된 이중체의 안정성보다 크면, 프라이머는 표적 서열에 대해 특이적이다. 당업자는 프라이머의 염기 조성 및 불일치의 위치, 및 염 조건과 같은 다양한 인자

가 프라이머의 특이성에 영향을 미칠 것이며, 프라이머 특이성의 일상적인 실험적 확인이 많은 경우에 요구될 것이라는 것을 인식할 것이다. 프라이머가 표적 서열과만 안정한 이중체를 형성할 수 있는 혼성화 조건을 선택할 수 있다. 따라서, 적절하게 엄격한 증폭 조건 하에서 표적 특이적 프라이머를 사용하면 표적 프라이머 결합 부위를 포함하는 표적 서열을 선택적으로 증폭할 수 있다.

[0041] 본원에서 사용되는 용어 "비특이적 증폭(non-specific amplification)"은 프라이머가 표적 서열 이외의 서열과 혼성화하고 프라이머 신장을 위한 기질로 작용하여 초래되는, 표적 서열이 아닌 핵산 서열의 증폭을 의미한다. 비-표적 서열에 대한 프라이머의 혼성화를 "비특이적 혼성화"라고 하며, 낮은 온도, 감소된 엄격도, 사전-증폭(pre-amplification) 조건에서, 또는 샘플 중에 SNP(Single Nucleotide Polymorphism)의 경우와 같이 진정한 표적과 매우 밀접하게 관련된 서열을 갖는 변이 대립유전자가 있는 상황에서 특히 일어나기 쉽다.

[0042] 용어 "3'-불일치 식별(3'-mismatch discrimination)"은 신장될 핵산(예를 들어, 프라이머 또는 기타 올리고뉴클레오티드)이 혼성화하는 주형과 비교하여 상기 핵산의 3' 말단에 불일치를 갖는 것인 불일치-함유(거의 상보적인) 서열로부터 완전히 상보적인 서열을 구별하는 DNA 폴리머라아제의 특성을 의미한다. 일부 구체예에서, 신장될 핵산은 완전히 상보적인 서열 대비, 3' 말단에서 불일치를 포함한다.

[0043] 용어 "3'-불일치 식별 분석(3'-mismatch discrimination assay)"은 표적 DNA 서열이 개별적인 3'-말단 또는 그 근처에서 하나 이상의 상이한 염기 조성을 갖는 뉴클레오티드 잔기의 출현을 제외하고는 실질적으로 동일한 서열을 갖는 2개의 프라이머로 조사될 때, 표적 DNA 서열의 증폭에서 향상된 특이성이 존재하는지를 식별하는 분석을 의미한다. 예를 들어, 표적 DNA 서열에 대해 완벽한 상보성을 갖는 3'-말단 서열을 갖는 제1 프라이머는 3'-일치 프라이머(3'-matched primer)로 간주되고, 표적 DNA 서열에 대해 하나 이상의 뉴클레오티드 염기 비-상보성을 갖는 3'-말단 서열을 갖는 제2 프라이머는 3'-불일치 프라이머로 간주된다. 3'-불일치 식별 검정의 예는 다수의 예, 특히, 실시예 4, **표 10** 및 **11**에서 제공된다.

[0044] 본원에서 사용되는 용어 "프라이머 이량체(primer dimer)"는 용어는 주형-독립적인 비-특이적 증폭 산물을 의미하고, 이는 또다른 프라이머가 주형으로 작용하는 것인 프라이머 신장의 결과로 사료된다. 프라이머 이량체는 종종 두 개의 프라이머의 연쇄체(concatamer), 즉 이량체로 보이나, 2개 초과의 프라이머의 연쇄체도 발생한다. 용어 "프라이머 이량체"는 용어는 본원에서 일반적으로 주형-독립적인 비-특이적 증폭 산물을 포함하도록 사용된다.

[0045] 본원에서 사용되는 용어 "반응 혼합물"은 주어진 반응을 수행하는 데 필요한 시약을 함유하는 용액을 의미한다. 증폭 반응을 수행하는 데 필요한 시약을 포함하는 용액을 의미하는 "증폭 반응 혼합물"은 일반적으로 적합한 완충액에 올리고뉴클레오티드 프라이머 및 DNA 폴리머라아제 또는 리가제를 포함한다. "PCR 반응 혼합물"은 전형적으로 적합한 완충액에 올리고뉴클레오티드 프라이머, DNA 폴리머라아제(가장 일반적으로 열안정성 DNA 폴리머라아제), dNTP 및 2가 금속 양이온을 포함한다. 반응 혼합물은 반응을 가능하게 하는 데 필요한 모든 시약을 포함하는 경우 완전한 것으로 지칭되고 필요한 시약의 서브세트만 포함하는 경우 불완전한 것으로 간주된다. 당업자는 편리, 저장 안정성을 이유로, 또는 성분 농도의 응용-의존적(application-dependent) 조정을 허용하기 위해 반응 성분들이 일상적으로 별개의 용액으로 저장되고, 반응 성분들은 완전한 반응 혼합물을 생성하기 위해 반응 전에 조합된다는 것을 이해할 것이다. 또한, 당업자는 반응 성분이 상업화를 위해 별도로 포장되고 유용한 상업적 키트가 본 발명의 차단된 프라이머를 포함하는 반응 성분의 임의의 서브세트를 함유할 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0046] 본 발명의 목적을 위해, 본원에서 사용되는 용어 "비활성화된(non-activated)" 또는 "불활성화된(inactivated)"은, DNA 폴리머라아제 또는 DNA 리가아제가 그의 의도된 목적을 위해 올리고뉴클레오티드와 상호작용할 수 없기 때문에 프라이머 신장 반응 또는 라이게이션 반응에 참여할 수 없는 프라이머 또는 기타 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오티드가 프라이머인 경우, 비활성화 상태는 프라이머가 프라이머 신장을 방지하기 위해 3'-말단에서 또는 그 근처에서 차단되기 때문에 발생한다. 특정 그룹이 프라이머의 3'-말단 또는 그 근처에 결합된 경우, DNA 폴리머라아제는 프라이머에 결합할 수 없고, 신장이 일어날 수 없다. 그러나, 비활성화된 프라이머는 실질적으로 상보적인 뉴클레오티드 서열에 혼성화할 수 있다.

[0047] 본 발명의 목적을 위해, 본원에서 사용되는 용어 "활성화된"은 DNA 폴리머라아제 또는 DNA 리가아제와의 반응에 참가할 수 있는 프라이머 또는 기타 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 프라이머 또는 기타 올리고뉴클레오티드는 실질적으로 상보적인 핵산 서열에 혼성화되고 절단되어 기능성 3'- 또는 5'-말단을 생성한 후 활성화되어 DNA 폴리머라아제 또는 DNA 리가아제와 상호작용할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드가 프라이머이고, 상기 프라이머가 주형에 혼성화된 경우, DNA 폴리머라아제가 프라이머의 3' 말단에 결합하고, 프라이머 신장을 촉진

할 수 있도록 3'-차단기(3'-blocking group)가 예를 들어, 절단 효소에 의해 상기 프라이머로부터 제거될 수 있다.

[0048] 본원에서 사용되는 용어 "절단 도메인(cleavage domain)" 또는 "절단형 도메인(cleaving domain)"은 동의어이며, 프라이머 또는 기타 올리고뉴클레오티드를 절단할 절단 화합물, 예를 들어 절단 효소에 의해 인식되는, 프라이머 또는 기타 올리고뉴클레오티드의 5'-말단과 3'-말단 사이에 위치한 영역을 의미한다. 본 발명의 목적을 위해, 절단 도메인은 프라이머 또는 기타 올리고뉴클레오티드가 상보적인 핵산 서열에 혼성화된 경우, 절단되나, 단일 가닥일 때는 절단되지 않도록 설계된다. 절단 도메인, 또는 그를 플랭킹하는 서열은 a) 폴리머라아제 또는 리가아제에 의한 프라이머 또는 기타 올리고뉴클레오티드의 신장 또는 라이게이션을 방지하거나 억제하거나, b) 변이 대립유전자를 검출하는 식별력을 강화하거나, 또는 c) 원하지 않는 절단 반응을 억제하는 모이어티를 포함할 수 있다. 하나 이상의 그러한 모이어티가 절단 도메인 또는 그를 플랭킹하는 서열에 포함될 수 있다.

[0049] 본원에서 사용되는 용어 "RNase H 절단 도메인"은 하나 이상의 리보핵산 잔기 또는 RNase H에 대한 기질을 제공하는 대체 유사체를 포함하는 절단 도메인의 일 유형이다. RNase H 절단 도메인은 프라이머 또는 올리고뉴클레오티드 내의 어디에나 위치할 수 있으며, 바람직하게는 분자의 3'-말단 또는 5'-말단에 또는 그 근처에 위치한다.

[0050] "RNase H2 절단 도메인"은 하나의 RNA 잔기, 연속적으로 연결된 RNA 잔기의 서열 또는 DNA 잔기 또는 다른 화학 그룹에 의해 분리된 RNA 잔기를 포함할 수 있다. 일 구체예에서, RNase H2 절단 도메인은 2'-플루오로뉴클레오시드 잔기이다. 보다 바람직한 구체예에서, RNase H2 절단가능 도메인은 2개의 인접한 2'-플루오로 잔기를 포함한다.

[0051] 본 명세서에서 사용되는 용어 "차단된 프라이머(blocked primer)"는 최소한, 표적 서열에 충분히 혼성화하기에 적합한 절단 도메인, 절단가능한 도메인 및 절단이 일어날때까지 플라이머의 3' 말단으로부터의 신장을 방지하는 차단기(blocking group)를 갖는 프라이머이다. 바람직한 구체예에서, 절단가능한 도메인은 RNase H 절단 도메인이고, 차단기는 프로판디올(C3) 스페이서이다.

[0052] 본원에서 사용되는 용어 "절단 화합물(cleavage compound)" 또는 "절단제(cleaving agent)"는 프라이머 또는 기타 올리고뉴클레오티드 내의 절단 도메인을 인식할 수 있고, 절단 도메인의 존재에 기초하여 올리고뉴클레오티드를 선택적으로 절단할 수 있는 임의의 화합물을 의미한다. 본 발명에서 이용되는 절단 화합물은 실질적으로 상보적인 핵산 서열에 혼성화된 경우에 절단 도메인을 포함하는 프라이머 또는 기타 올리고뉴클레오티드를 선택적으로 절단하나, 단일 가닥인 경우, 상기 프라이머 또는 기타 올리고뉴클레오티드를 절단하지 않을 것이다. 절단 화합물은 절단 도메인 내에 있거나 또는 그에 인접한 프라이머 또는 기타 올리고뉴클레오티드를 절단한다. 본원에서 사용되는 용어 "인접한(adjacent)"은 절단 화합물이 절단 도메인의 5'-말단 또는 3' 말단에 있는 프라이머 또는 기타 올리고뉴클레오티드를 절단한다는 것을 의미한다. 본 발명에서 바람직한 절단 반응은 5'-포스페이트기 및 3'-OH기를 산출한다.

[0053] 바람직한 구체예에서, 상기 절단 화합물은 "절단 효소"이다. 절단 효소는 프라이머 또는 기타 뉴클레오티드가 실질적으로 상보적인 핵산 서열에 혼성화될 때 절단 도메인을 인식할 수 있으나, 상보적인 핵산 서열을 절단하지 않는 단백질 또는 리보자임이다(즉, 이중체에서 단일 가닥 절단(single strand break)을 제공함). 절단 효소는 또한 그것이 단일 가닥일 때 절단 도메인을 포함하는 프라이머 또는 다른 올리고뉴클레오티드를 절단하지 않을 것이다. 절단 효소의 예는 RNase H 효소 및 기타 닉킹(nicking) 효소이다.

[0054] 본원에서 사용되는 용어 "닉킹(nicking)"은 완전한 또는 부분적 이중 가닥 핵산의 이중-가닥 부분의 하나의 가닥만의 절단을 의미한다. 핵산이 닉킹되는 위치는 "닉킹 부위(nicking site)"(NS)로 지칭된다. "닉킹제(nicking agent)"(NA)는 부분적으로 또는 완전히 이중 가닥인 핵산을 닉킹하는 작용제이다. 닉킹제는 효소 또는 기타 화학적 화합물 또는 조성물일 수 있다. 특정 구체예에서, 닉킹제는 완전히 또는 부분적으로 이중-가닥인 핵산의 특정 뉴클레오티드 서열을 인식할 수 있고 인식 서열의 위치로부터 특정한 위치(즉, NS)에서 상기 완전한 또는 부분적 이중 가닥 핵산의 한 가닥만을 절단할 수 있다. 이러한 닉킹제("서열 특이적 닉킹제"라고 함)는 닉킹 엔도뉴클레아제(예를 들어, N.BstNB)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0055] 따라서, 본원에서 사용되는 "닉킹 엔도뉴클레아제"(NE)는 완전한 또는 부분적 이중 가닥 핵산 분자의 뉴클레오티드 서열을 인식하고, 인식 서열로부터 특정한 위치에서 상기 핵산 분자의 한 가닥만을 절단하는 엔도뉴클레아제를 의미한다. 이러한 경우, 인식 부위로부터 절단 지점까지의 전체 서열이 "절단 도메인"을 구성한다.

[0056] 본원에서 사용되는 용어 "차단기(blocking group)"는 증폭 반응이 일어나지 않도록 프라이머 또는 기타 올리고뉴클레오티드에 결합된 화학적 모이어티를 의미한다. 예를 들어, 프라이머 신장 및/또는 DNA 라이게이션이 일어나지 않는다. 차단기가 프라이머 또는 기타 올리고뉴클레오티드에서 제거되면, 올리고뉴클레오티드는 설계시 의도된 분석(PCR, 라이게이션, 시퀀싱 등)에 참가할 수 있다. 따라서, "차단기"는 폴리머라아제 또는 DNA 리가아제에 의한 인식을 억제하는 임의의 화학적 모이어티일 수 있다. 차단기는 절단 도메인에 통합될 수 있지만 일반적으로 절단 도메인의 5'- 또는 3'-측에 위치한다. 차단기는 1개 초과의 화학적 모이어티로 구성될 수 있다. 본 발명에서, "차단기"는 일반적으로 올리고뉴클레오티드가 그의 표적 서열에 혼성화된 후에 제거된다.

[0057] 용어 "형광 생성 프로브(fluorescent generation probe)"는 a) 부착된 형광단 및 퀀처(quencher), 및 선택적으로, 작은 홈 결합제(minor groove binder)를 갖는 올리고뉴클레오티드 또는 b) SYBR® Green 염료와 같은 DNA 결합 시약을 의미한다.

[0058] 용어 "형광 표지" 또는 "형광단"은 약 350 내지 900nm에서 최대 형광 방출을 갖는 화합물을 의미한다. 5-FAM(5-카르복시플루오레세인이라고도 함; 스피로(이소벤조퓨란-1(3H),9'-(9H)크산텐)-5-카르복실산,3',6'-디히드록시-3-옥소-6-카르복시플루오레세인이라고도 함); 5-헥사클로로-플루오레세인; ([4,7,2',4',5',7'-헥사클로로-(3',6'-디피발로일-플루오레세닐)-6-카르복실산]); 6-헥사클로로-플루오레세인; ([4,7,2',4',5',7'-헥사클로로-(3',6'-디피발로일-플루오레세이닐)-5-카르복실산]); 5-테트라클로로-플루오레세인; ([4,7,2',7'-테트라-클로로-(3',6'-디피발로일플루오레세이닐)-5-카르복실산]); 6-테트라클로로-플루오레세인; ([4,7,2',7'-테트라클로로-(3',6'-디피발로일플루오레세이닐)-6-카르복실산]); 5-TAMRA(5-카르복시테트라메틸로다민); 크산틸륨, 9-(2,4-디카르복시페닐)-3,6-비스(디메틸-아미노); 6-TAMRA(6-카르복시테트라메틸로다민); 9-(2,5-디카르복시페닐)-3,6-비스(디메틸아미노); EDANS(5-((2-아미노에틸)아미노)나프탈렌-1-술폰산); 1,5-IAEDANS(5-((((2-요오도아세틸)아미노)에틸)아미노)나프탈렌-1-술폰산); Cy5(인도디카르보시아닌-5); Cy3(인도-디카르보시아닌-3); 및 BODIPY FL(2,6-디브로모-4,4-디플루오로-5,7-디메틸-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-프로피온산); Quasar®-670 염료(Biosearch Technologies); Cal Fluor® Orange 염료(Biosearch Technologies); Rox 염료; Max 염료(Integrated DNA Technologies) 및 이들의 적합한 유도체를 포함하나, 그에 한정되지 않는 광범위하게 다양한 형광단이 사용될 수 있다.

[0059] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "퀀처(quencher)"는 형광 공여체에 부착되거나 그에 근접할 때 형광 공여체로부터의 방출을 감소시킬 수 있는 분자 또는 화합물의 일부를 의미한다. 퀀칭(quenching)은 형광 공명 에너지 전달, 광-유도 전자 전달, 시스템간 교차(instersystem crossing)의 상자성 강화, Dexter 교환 커플링(Dexter exchange coupling), 및 엑시톤 커플링(exciton coupling), 예를 들면, 다크 복합체(dark complex)의 형성을 포함한 여러 메커니즘에 의해 발생할 수 있다. 형광단에 의해 방출된 형광이 퀀처의 부재시 형광과 비교하여 적어도 10%, 예를 들어 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99.9% 이상 감소될 때, 형광은 "퀀칭(quenched)"된다. 다수의 상업적으로 입수가능한 퀀처가 당업계에 공지되어 있고, DABCYL, Black Hole™ Quencher(BHQ-1, BHQ-2 및 BHQ-3), Iowa Black® FQ 및 Iowa Black® RQ를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이들은 소위 다크 퀀처(dark quencher)이다. 이들은 고유 형광이 없어서, 본질적으로 형광을 내는 TAMRA와 같은 다른 퀀처에서 볼 수 있는 백그라운드 문제를 사실상 제거한다.

[0060] 본원에서 사용되는 용어 "라이게이션(ligation)"은 2개의 폴리뉴클레오티드 말단의 공유 결합을 의미한다. 다양한 구체예에서, 라이게이션은 제1 폴리뉴클레오티드의 3' 말단(수용체)을 제2 폴리뉴클레오티드(공여체)의 5' 말단에 공유 결합시키는 것을 포함한다. 라이게이션은 폴리뉴클레오티드 말단 사이에 포스포디에스테르 결합의 형성을 가져온다. 다양한 구체예에서, 라이게이션은 폴리뉴클레오티드 말단의 공유결합에 의한 연결을 초래하는 임의의 효소, 화학물질, 또는 프로세스에 의해 매개될 수 있다. 특정 구체예에서, 라이게이션은 리가아제 효소에 의해 매개된다.

[0061] 본원에서 사용되는 바와 같이, "리가아제(ligase)"는 하나의 폴리뉴클레오티드의 3' 히드록실기를 제2 폴리뉴클레오티드의 5' 포스페이트기에 공유결합에 의해 연결할 수 있는 효소를 의미한다. 리가아제의 예는 대장균 DNA 리가아제, T4 DNA 리가아제 등을 포함한다.

[0062] 라이게이션 반응은 "리가아제 증폭 반응"(LAR)으로도 지칭되는 "리가아제 연쇄 반응"(LCR)과 같은 DNA 증폭 방법에서 이용될 수 있다. 참조에 의해 본원에 포함된, Barany, Proc. Natl. Acad. Sci., 88:189 (1991); 및 Wu 및 Wallace, Genomics 4:560(1989)을 참조한다. LCR에서, 4개의 올리고뉴클레오티드, 즉, 표적 DNA의 한 가닥에 고유하게 혼성화하는 2개의 인접한 올리고뉴클레오티드 및 반대 가닥에 혼성화하는 인접한 올리고뉴클레오티드의 상보적인 세트를 혼합하고, DNA 리가아제를 혼합물에 첨가한다. 표적 서열의 존재시, DNA 리가아제는 혼성

화된 분자의 각 세트를 공유결합에 의해 연결할 것이다. 중요한 것은, LCR에서 2개의 올리고뉴클레오티드가 갭 없이 서열과 염기쌍을 형성하는 경우에만 함께 라이게이션된다는 것이다. 변성, 혼성화 및 라이게이션의 반복된 사이클이 DNA의 짧은 세그먼트를 증폭시킨다. 인접한 올리고뉴클레오티드 사이의 접합부(junction)에서의 불일치는 라이게이션을 억제한다. 다른 올리고뉴클레오티드 라이게이션 분석에서와 같이, 이 특성은 LCR이 SNP와 같은 변이 대립 유전자를 구별하는 데 사용될 수 있게 한다. LCR은 또한 단일 염기 변화의 증진된 검출을 달성하기 위해 PCR과 함께 사용되었다. Segev, PCT 공개 WO9001069(1990)를 참조한다.

[0063] 폴리펩티드를 코딩하는 특정 핵산을 수식하는 용어인 "코돈-최적화(codon-optimized)"는 주어진 미생물(예를 들어, 특히, 대장균, 사카로마이세스 세레비시애(S. cerevisae) 등) 또는 포유동물 세포(예를 들어, 특히 HeLa, COS 세포와 같은 인간 세포)에서 효율적인 발현을 위한 선호되는 코돈의 포함을 의미한다. 그러한 선호되는 코돈은 다양한 유기체에 대해 개발된 코돈 편향표(codon bias table)에 기초하여 당업계에 잘 알려져 있다. 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 코돈 편향 표가 개발되었거나 그러한 표가 경험적 결정으로부터 쉽게 식별될 수 있는 임의의 공지된 개체에 대해 코돈-최적화 개방 해독 프레임을 갖는 것들을 포함한다.

[0064] 어구 "BaseX PCR 증폭 방법(BaseX PCR amplification)"은 각 증폭 사이클에 대해 증폭 산물을 2배 이상 증가 및 따라서, 기존 PCR 대비 증가된 민감도 및 속도를 가능하게 하는 고도로 효율적인 핵산 증폭을 의미한다. 이 방법은 2019년 4월 30일에 발행된, R. Higuchi(출원인: Cepheid)에 의한 "Exponential base-greater-than-2 nucleic acid amplification" 명칭의 미국특허 공개 US10273534 (B2)에 개시되고, 상기 문헌의 내용은 참조에 의해 그 전체로 본원에 포함된다.

[0065] 어구 "융합 단백질" 또는 "융합 폴리펩티드"는 단백질에 고유하지 않은 추가 아미노산 정보의 포함으로, 상기 추가 아미노산 정보가 공유결합에 의해 상기 단백질에 부착된 것을 의미한다. 이러한 추가 아미노산 정보는 융합 단백질의 정제 또는 식별을 가능하게 하는 태그를 포함할 수 있다. 이러한 추가 아미노산 정보는 융합 단백질이 세포 내로 수송되고 및/또는 세포 내의 특정 위치로 수송될 수 있게 하는 펩티드를 포함할 수 있다. 이러한 목적을 위한 태그의 예는 하기를 포함한다: 효소 BirA에 의한 비오티닐화를 허용하여 단백질이 스트렙타비딘에 의해 단리될 수 있도록 하는 펩티드인 AviTag; 단백질 칼모듈린(calmodulin)에 의해 결합된 펩티드인 칼모듈린-태그; Mono-Q와 같은 음이온 교환 수지에 효율적으로 결합하는 펩티드인 폴리글루타메이트 태그; 항체에 의해 인식되는 펩티드인 E-태그; 항체에 의해 인식되는 펩티드인 FLAG-태그; 항체에 의해 인식되는 헤마글루티닌 유래 펩티드인 HA-태그; 일반적으로 니켈 또는 코발트 킬레이트가 결합된 5-10개의 히스티딘인 His-태그; 항체에 의해 인식되는 c-myc에서 유래된 펩티드인 Myc-태그; 단일 클론 IgG1 항체에 의해 인식되는 신규한 18개-아미노산 합성 펩티드로, 웨스턴 블롯팅, ELISA, 유세포분석, 면역세포화학, 면역침전 및 재조합 단백질의 친화도 정제를 포함한 광범위한 응용에서 유용한, NE-태그; 리보뉴클레아제 A에서 유래된 펩티드인 S-태그; 스트렙타비딘에 결합하는 펩티드인 SBP-태그; 포유동물 발현을 위한 Softag 1; 원핵생물 발현을 위한 Softag 3; 스트렙타비딘 또는 스트렙탁틴(streptactin)으로 불리는 변형된 스트렙타비딘에 결합하는 펩티드인 Strep-태그(Strep-태그 II); FlAsH 및 ReAsH 이-비소(biarsenical) 화합물에 의해 인식되는 테트라시스테인 태그인 TC 태그; 항체에 의해 인식되는 펩티드인 V5 태그; 항체에 의해 인식되는 펩티드인 VSV-태그; Xpress 태그; 필린-C(*pilin-C*) 단백질에 공유 결합에 의해 결합하는 펩티드인 이소펩태그(Isopeptag); *SpyCatcher* 단백질에 공유 결합에 의해 결합하는 펩티드인 SpyTag; *SnoopCatcher* 단백질에 공유 결합에 의해 결합하는 펩티드인 SnoopTag; 스트렙타비딘에 의한 인식을 가능하게 하기 위해 BirA에 의해 비오티닐화된 단백질 도메인인 BCCP(Biotin Carboxyl Carrier Protein); 고정된 글루타티온에 결합하는 단백질인 글루타티온-S-트랜스퍼라아제-태그; 자발적으로 형광을 내며 항체에 의해 결합될 수 있는 단백질인 녹색 형광 단백질-태그; 반응성 할로알칸 기질에 공유결합에 의해 부착되어 다양한 기질로의 부착을 가능하게 하는, 돌연변이된 박테리아 할로알칸 데할로게나아제인, HaloTag; 아밀로오스 아가로오스에 결합하는 단백질인 말토오스 결합 단백질-태그; Nus 태그; 티오레독신-태그; 및 이량체화 및 가용화를 가능하게 하고, Protein-A Sepharose에서의 정제를 위해 사용될 수 있는, 면역글로불린 Fc 도메인에서 유래된 Fc-tag. SV40로부터 얻은 것과 같은, 핵 국재화 신호(nuclear localization signal: NLS)는 단백질이 세포에 들어가는 즉시 핵으로 수송될 수 있게 한다. 네이티브(native) Cas9 단백질이 박테리아 기원이고, 따라서, 자연적으로 NLS 모티프를 포함하지 않는다는 것을 고려할 때, 재조합 Cas9 단백질에 하나 이상의 NLS 모티프를 추가하면 표적 게놈 DNA 기질이 핵에 존재하는 것인 진핵 세포에서 사용될 때 향상된 게놈 편집 활성을 보일 것으로 예상된다. 당업자는 이러한 다양한 융합 태그 기술, 관련된 특정 아미노산 서열, 및 이들을 포함하는 융합 단백질을 제조하고 사용하는 방법을 인식할 것이다. 일 구체예에서, 매우 바람직한 융합 단백질 또는 융합 폴리펩티드는 His-태그 모티프를 포함하나, 당업자는 전술된 바와 같이, 기타 태그가 포함될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 본 발명은 융합 단백질 또는 융합 폴리펩티드뿐만 아니라 추가 아미노산 서열 정보가 결여된 상응

하는 단백질 또는 폴리펩티드의 원래의 돌연변이된 버전의 버전을 포함한다.

[0066] **공지된 RNase H2 효소로부터의 아미노산 서열의 재조합 리셔플링(reshuffling)에 의해 생성된 신규한 하이브리드 RNase H2 효소 변이체.**

[0067] 피로코커스 아비시(*Pyrococcus abyssi*), 써모코커스 코다카렌시스(*Thermococcus kodakarensis*) 및 피로코커스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*) 를 포함한, 3종의 RNase H2 효소로부터의 아미노산 서열의 부분적 재조합("셔플링")을 통해 새롭고 유용한 특성을 가진 2종의 하이브리드 RNase H2 효소를 생성하였다. 하이브리드 RNase H2 효소를 생성할 수 있다. 특히, 피로코커스 아비시(*Pyrococcus abyssi*), 써모코커스 코다카렌시스(*Thermococcus kodakarensis*) 및 피로코커스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*) 개체로부터의 아미노산 서열의 단편을 조합하는 2개의 돌연변이 RNase H2 효소, SEL28 RNase H2(서열번호 89) 및 SEL29 RNase H2(서열번호 90)는 불일치 차별을 크게 향상시키는 것으로 밝혀졌다. 이들 돌연변이체는 RNase H2 서열의 랜덤 셔플링(random shuffling)에 의해 생성된 라이브러리에서 선택되었다. 다른 변화들도 존재하나, 두 돌연변이 효소 모두 *T. kod* RNase H2의 아미노산 잔기 26-40 및 잔기 100-120의 단편을 함유한다. 알려진 결정 구조에 대한 구조적 상동성을 기반으로 (Muroya et al., 2001; Rychlik et al., 2010), 이 잔기들은 결합된 DNA 이중체와 접촉할 가능성이 있다. 임의의 특정 이론에 얽매이지 않으면서, *T. kod* RNase H2의 잔기 26-40 및 잔기 100-120이 기질 이중체에 대한 효소 결합 포켓을 변화시켜, 결합 친화도 및 핵산 절단의 촉매작용의 변화를 초래할 것이라는 가설을 수립할 수 있다. 야생형 *P. ab.* RNase H2 단백질(서열번호 88), 하이브리드 SEL28 RNase H2 단백질(서열번호 89) 및 하이브리드 SEL29 RNase H2 단백질(서열번호 90)의 아미노산 서열이 **표 1**에 기재된다. 야생형 *P. ab.* RNase H2 단백질(서열번호 1), 하이브리드 SEL28 RNase H2 단백질(서열번호 2) 및 하이브리드 SEL29 RNase H2 단백질(서열번호 3)의 상응하는 $(His)_6$-태깅 아미노산 서열도 제조하고, 추가적인 돌연변이 RNase H2 단백질을 생성하기 위한 기반으로 활용되었다(**표 3** 참조).

[0068] **표 1. 하이브리드 RNase H2 단백질의 아미노산 서열.**

표 1

서열번호	단백질 설명	서열 [1]
88	WT *P. ab.* RNase H2	MKVAGADEAGRGPVIGPLVIVAAVVEEDKIRSLTKLGVKD SKQLTPAQREKLFDEIVKVLDDYSVVIVSPQDIDGRKGSMN ELEVENFVKALNSLKVKPEVIYIDSADVKAERFAENIRSRL AYEAKVVAEHKADAKYEIVSAASILAKVIRDREIEKLKAEY GDFGSGYPSDPRTKKWLEEWYSKHGNFPPIVRRTWDTAKK IEEKFKRAQLTLDNFLKRFRN
89	SEL28 RNase H2	MKVAGADEAGRGPVIGPLVIVAAVV**D**EN**S**LP**K**L**E**E**L**K**V**R DSK**K**LTP**KR**REKLFDEIVKVLDDYSVVIVSPQDIDGRKGSM NELEVENFVKALNSLKVKP**D**VIY**A**DA**A**DV**DE**ERFA**RELGE** RL**N**FEA**E**VVA**K**HKAD**DIFPV**VSAASILAKVIRDREIEKLKA EYGDFGSGYPSDPRTKKWLEEWYSKHGNFPPIVRRTWDTA KKIEEKFKRAQLTLDKFFKKP
90	SEL29 RNase H2	MKVAGIDEAGRGPAIGPLVIVAAVV**D**EN**S**LP**K**L**E**E**L**K**V**R**D** SK**K**LTPAQREKLFDEIVKVLDDYSVVIVSPQDIDGRKGSMN ELEVENFVKALNSLKVKP**D**VIY**A**DA**A**DV**DE**ERFA**RELGE**R LN**F**EAKVVAEHKADAKYEIVSAASILAKVIRDREIEKLKAE YGDFGSGYPSDPRT**RAF**LE**NYY**R**E**HG**E**FPPIVR**KG**W**K**T**L**K KI**AEKVE**S**E**KK**AEER**QA**TLD**RYFRKV**

[1] 야생형 피로코커스 아비시(*Pyrococcus abyssi*) RNase H2와 동일한 아미노산은 밑줄 없고, 비-볼드체 서열로 표시됨. 써모코커스 코다카렌시스(*Thermococcus kodakarensis*) 및 피로코커스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*) Rnase H2 서열로부터 유래된 아미노산은 각각 볼드체 및 밑줄로 표시됨.

[0069]

[0070] 서열번호 89 및 90에 의해 코딩된, 결과적으로 수득된 하이브리드 SEL28 및 SEL29 RNase H2 효소는 불일치가 RNA 뉴클레오티드에 위치할 때 불일치 식별을 개선하지만, 다양한 정도 및 상이한 특이성으로 개선한다(데이터는 표시되지 않음). 마찬가지로, 서열번호 89 및 90에 의해 코딩된, SEL28 및 SEL29 돌연변이 RNase H2 효소는 RNA 뉴클레오티드의 5' 불일치 식별을 개선한다(데이터는 표시되지 않음).

[0071] 또한, rhPCR은 써무스 아쿠아티쿠스(*Thermus aquaticus*)(Taq)의 DNA 폴리머라아제 대신 피로코커스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*) 및 써모코커스 코다카렌시스(*Thermococcus kodakarensis*)(KOD)의 DNA 폴리머라아제와 같은 고-충실도 DNA 폴리머라아제를 사용하여 수행할 수 있다. 그러나, WT *P.a.* RNase H2, SEL28 RNase H2 및 SEL29 RNase H2는 고-충실도 폴리머라아제 및 관련 반응 완충액을 사용한 rhPCR에서 제한된 활성을 갖는다. Taq DNA 폴리머라아제에 대한 최적의 반응 완충액은 KOD DNA 폴리머라아제에 대한 최적의 완충액과 상당히 다르다. KOD DNA 폴리머라아제에 대한 반응 완충액의 성분에 대해 더 큰 내성을 갖는 RNase H2의 돌연변이가 발견될 수 있다. 본 발명자들은 Q48R, A107V 및 P13S/A107V가 하이브리드 돌연변이체 SEL28 또는 SEL29 RNase H2에 추가되었을 때 KOD DNA 폴리머라아제 반응 완충액을 사용한 효소 활성을 증진시킨다는 것을 밝힌다.

[0072] 본 발명은 KOD DNA 폴리머라아제 및 이의 최적 반응 완충액을 사용하여 rhPCR 동안 효소 활성을 증진시키는 돌연변이 RNase H2 효소에 관한 것이다. SEL29 RNase H2의 48번째 및 107번째 아미노산의 돌연변이가 이러한 향상된 활성을 갖는 것으로 나타났다. SEL28 RNase H2 또는 SEL29 RNase H2의 백그라운드를 갖는 7개의 점 돌연변이의 스크린을 수행하였고, Q48R SEL29 RNase H2 및 A107V SEL29 RNase H2가 KOD DNA 폴리머라아제 반응 완충액을 사용하여 효소 활성을 증진시키는 것으로 나타났다. 이들은 또한 SEL29 RNase H2의 불일치 식별 능력을 유지하거나 증진시키는 것으로 나타났다.

[0073] *RNase H2-매개 PCR*

[0074] 본원에 개시된 하이브리드 RNase H2 돌연변이 단백질은 다양한 PCR 응용에서 사용될 수 있다. RNase H2-의존적 PCR은 피로코커스 아비시(*Pyrococcus abyssi*) 또는 관련 개체의 RNase H2와 단일 리보뉴클레오티드 잔기 및 3' 차단 모이어티를 포함하는 DNA 프라이머("차단-절단가능한 프라이머(blocked-cleavable primers)")를 사용하여 PCR 특이성을 높이고 프라이머-이량체를 제거하는 방법이다. 차단-절단가능한 프라이머는 RNase H2 효소에 의해 절단될 때 활성화된다. 절단은 표적 DNA에 대한 프라이머 혼성화 후 RNA 염기의 5' 측에서 일어난다. 프라이머는 완벽하게 일치하는 표적 서열에 혼성화한 후에만 절단될 수 있기 때문에, 프라이머-이량체가 감소된다. 높은 표적 상보성에 대한 요건이 밀접하게 관련된 서열의 증폭을 감소시킨다.

[0075] 이와 관련하여, 하이브리드 RNase H2 돌연변이 단백질은 차세대 시퀀싱 응용(NGS)과 같은 고처리량 멀티플렉스 시퀀싱(high throughput multiplex sequencing) 응용을 위한 고품질 게놈 앰플리콘 라이브러리를 생성하는 성능을 증진시키기 위해 특히 적합할 수 있다. 구체적으로, Q48R SEL29는 출원인의 rhAmpSeq™ 시스템과 같은 RNase H2-매개 PCR 응용 및 시스템에 유용한 RNase H2 효소이다.

[0076] *RNase H2-매개 SNP 검출 및 희귀 대립유전자 검출*

[0077] 증진된 3'-불일치 식별 속성으로 인해, 본원에 개시된 하이브리드 RNase H2 돌연변이 단백질은 단일 뉴클레오티드 다형성(SNP) 검출 및 희귀 대립유전자(rare allele) 검출을 검출하는 데 사용될 수 있다. 원하는 SNP-함유 핵산 주형과만 완벽한 이중체를 형성하는 차단-절단가능한 프라이머의 사용은 하이브리드 RNase H2 돌연변이 단백질에 의해 인식되고 절단되어, 프라이머:원하는 핵산 주형 이중체를 적절한 조건 하에 DNA 폴리머라아제에 의한 프라이머 신장을 위해 활성화시킨다.

[0078] *루프-매개 등온 증폭(LAMP)의 RNase H2*

[0079] LAMP(Loop-meditated isothermal amplification)에서 RNase H2의 사용도 본원에서 고려된다. LAMP 증폭 방법은 등온 조건 하에, 즉, 순환 동안 반응 온도의 변화 없이 수행된다. LAMP는 원하는 앰플리콘의 6개의 상이한 영역을 인식하도록 설계된 최소 4개의 상이한 프라이머를 필요로 한다(Notomi, et al. Nucleic Acids Research, 28(12) (2000)). 증폭 반응은 DNA 폴리머라아제, 일반적으로 바실러스 스테아로써모필루스(*Bacillus stearothermophilus*) (Bst)의 DNA 폴리머라아제의 가닥 치환(strand displacement) 활성에 의존한다. 생성물은 표적 서열의 역반복(inverted repeat)의 긴 사슬로 구성된 구조를 갖는다.

[0080] LAMP 반응은 다수의 프라이머와 중온성 DNA 폴리머라아제를 사용하기 때문에 프라이머-이량체를 형성하는 경향이 있다. LAMP는 또한 증폭 BST 폴리머라아제에서 5'→3' 엑소뉴클레아제 활성이 없는데, 이는 이 활성이 필수적인 가닥-치환 활성과 경쟁하여 증폭을 손상시킨다는 사실 때문이다. 차단-절단가능한 프라이머 및 RNase H2의 사용은 LAMP 반응에서 프라이머-이량체 신호의 검출을 감소시키거나 제거하기 위해 사용될 수 있다. 이와 관련하여, 하이브리드 RNase H2 돌연변이 단백질은 특히 프라이머-이량체의 부수적인 생성 없이 LAMP 반응에서 형성된 원하는 산물의 성능을 증진시키기에 특히 적합할 수 있다.

[0081] *응용*

[0082] 제1 양태에서, 하이브리드 RNase H2 단백질이 제공된다. 상기 하이브리드 RNase H2 단백질은 피로코커스 아비시(*Pyrococcus abyssi*)(*P.a.*), 써모코커스 코다카렌시스(*Thermococcus kodakarensis*) (*T.kod*) 및 피로코커스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*) 개체로부터의 아미노산 서열의 단편을 포함한다. 제1 측면에서, 상기 하이브리드 RNase H2 단백질은 *T. kod* RNase H2의 아미노산 잔기 26-40 및 잔기 100-120을 포함한다. 제2 측면에서, 상기 하이브리드 RNase H2 단백질은 서열번호 2 및 3에서 선택된다. 제3 측면에서, 하이브리드 RNase H2 단백질은 서열번호 14-20에서 선택된다.

[0083] 제2 양태에서, 본원에 개시된 임의의 하이브리드 RNase H2 단백질을 코딩하는 재조합 핵산이 제공된다. 제1 측면에서, 상기 하이브리드 RNase H2 단백질을 코딩하는 예시적인 재조합 핵산은 **표 14**의 서열번호 79-87을 포함한다.

[0084] 제3 양태에서, 프라이머 신장을 수행하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 프라이머 신장 방법에 적합한 조건 하에서, 본원에 개시된 하이브리드 RNase H2 단백질을 프라이머, 폴리뉴클레오티드 주형, 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 DNA 폴리머라아제와 접촉시켜, 신장된 프라이머를 생산하는 단계를 포함한다. 제1 측면에서, 상기 DNA 폴리머라아제는 고-충실도 고세균 DNA 폴리머라아제를 포함한다. 제2 측면에서, 상기 프라이머는 차단-절단가능한 프라이머를 포함한다. 제3 측면에서, 프라이머 신장 방법은 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 수행하는

방법을 포함한다. 제4 측면에서, 상기 PCR을 수행하는 방법은 프라이머와 폴리뉴클레오티드 주형 사이에 형성된 프라이머:폴리뉴클레오티드 하이브리드 중 불일치 식별을 개선한다. 제5 측면에서, 불일치 식별의 개선은 3'-불일치 식별의 개선을 포함한다.

[0085] 제4 양태에서, 반응 혼합물이 제공된다. 상기 반응 혼합물은 본원에 기술된 바와 같은 하이브리드 RNase H2 단백질, 적어도 하나의 프라이머, 폴리뉴클레오티드 주형, 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 DNA 폴리머라아제를 포함한다. 제1 측면에서, 상기 반응 혼합물은 고-충실도 고세균 DNA 폴리머라아제인 DNA 폴리머라아제를 포함한다. 제2 측면에서, 상기 반응 혼합물은 차단-절단가능한 프라이머인 적어도 하나의 프라이머를 포함한다.

[0086] 제5 양태에서, rhPCR을 수행하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 본원에 기술된 바와 같은 하이브리드 RNase H2, DNA 폴리머라아제 및 프라이머로 프라이머 신장을 수행하는 단계를 포함한다. 제1 측면에서, 상기 rhPCR을 수행하는 방법은 고-충실도 고세균 DNA 폴리머라아제로 프라이머 신장을 수행하는 것을 포함한다. 제2 측면에서, 상기 하이브리드 RNase H2 효소는 화학적 변형, 압타머 또는 차단 항체에 의해 가역적으로 불활성화된다. 제3 측면에서 차단기(blocking group)는 프라이머의 3'-말단 뉴클레오티드에 부착된다. 제4 측면에서 차단기는 3'-말단 잔기의 5'에 부착되어 상기 프라이머가 DNA 합성을 위한 주형으로 작용하는 것을 억제한다. 제5 측면에서, 차단기는 하나 이상의 무염기성 잔기를 포함한다. 제6 측면에서, 상기 하나 이상의 무염기성 잔기는 C3 스페이서이다. 제7 측면에서, 차단기는 RDDDDx, RDDDDMx, RDxxD, RDxxDM, RDDDDxxD, RDDDDxxDM 및 DxxD로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 일원을 포함하고, 여기서 R은 RNA 잔기이고, D는 DNA 잔기이며, M은 불일치 잔기이고, x는 C3 스페이서, 또는 분해에 내성인 기타 전용 기(proprietary group)이다. 이와 관련하여, 차단기는 신장 증폭 반응을 검출할 수 있는 표지를 포함한다. 이와 관련하여, 증폭 반응을 검출할 수 있는 표지는 절단 부위로부터 올리고뉴클레오티드 프라이머 3'에 부착된다. 이와 관련하여, 표지는 형광단, 또는 질량 분석법에 의한 증폭 반응의 검출을 위한 질량 태그(mass tag)이다. 추가적인 양태에서, 차단-절단가능한 프라이머의 절단 도메인은 하기 모이어티 중 하나 이상을 포함한다: DNA 잔기, 무염기성 잔기, 변형된 뉴클레오시드 또는 변형된 포스페이트 뉴클레오티드간 결합. 추가적인 양태에서, 절단 도메인은 단일 RNA 잔기, 2개의 인접한 RNA 잔기, 3개 이상의 RNA 잔기의 연속 서열을 포함하고, 단일 RNA 잔기, 또는 하나 이상의 2'-변형 뉴클레오시드가 결여되어 있다. 절단 도메인이 하나 이상의 2'-변형 뉴클레오시드를 포함하는 것인 측면에서, 상기 하나 이상의 2'-변형 뉴클레오시드는 2'-O-알킬 RNA 뉴클레오시드, 2'-플루오로뉴클레오시드, LNA(locke nucleic acid), 2'-에틸렌 핵산 잔기, 2'-알킬 뉴클레오시드, 2'-아미노뉴클레오시드 및 2'-티오뉴클레오시드로 구성된 군으로부터 선택된다. 예시적인 2'-변형 뉴클레오시드는 2'-O-메틸 RNA 뉴클레오시드 및 2'-플루오로뉴클레오시드를 포함한다.

[0087] 제6 양태에서, 표적 DNA 서열을 증폭하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 여러 단계를 포함한다. 제1 단계는 (i) 차단기의 5'에 위치하는, RNase H2 효소에 의해 절단 가능한, 절단 도메인을 갖는 올리고뉴클레오티드 프라이머로서, 상기 차단기는 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머의 3'-말단 또는 그 근처에 연결되고, 상기 차단기는 프라이머 신장을 방지하고 및/또는 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머가 DNA 합성을 위한 주형으로 작용하는 것을 억제하는 것인 올리고뉴클레오티드 프라이머, (ii) 표적 서열일 수도 있거나 또는 표적 서열이 아닐 수 있는 샘플 핵산; (iii) DNA 폴리머라아제, 및 (iv) 본원에 개시된 하이브리드 RNase H2 단백질을 포함하는 반응 혼합물을 제공하는 것이다. 제2 단계는 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머를 표적 DNA 서열에 혼성화하여 이중-가닥 기질을 형성하는 것이다. 제3 단계는 상기 혼성화된 올리고뉴클레오티드 프라이머를 상기 절단 도메인 내 또는 그에 인접한 절단 부위에서 상기 하이브리드 RNase H2 효소로 절단하여 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머로부터 차단기를 제거하는 것이다. 상기 방법의 제1 측면에서, 상기 DNA 폴리머라아제는 고세균 고-충실도 DNA 폴리머라아제이다. 제2 측면에서, RNase H2 단백질은 화학적 변형이나 차단 항체에 의해 가역적으로 불활성화된다. 상기 방법의 추가적인 측면에서, 차단기는 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머의 3'-말단 뉴클레오티드에 부착된다. 상기 방법의 추가적인 측면에서, 차단기는 3'-말단 잔기의 5'에 부착되고, 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머가 DNA 합성을 위한 주형으로 작용하는 것을 억제한다. 상기 방법의 추가적인 측면에서, 차단기는 하나 이상의 무염기성 잔기를 포함한다. 상기 방법의 추가적인 양태에서, 상기 하나 이상의 무염기성 잔기는 C3 스페이서, 또는 분해에 내성인 기타 전용(proprietary) 기이다. 상기 방법의 추가적인 측면에서, 차단기는 RDDDDx, RDDDDMx, RDxxD, RDxxDM, RDDDDxxD, RDDDDxxDM 및 DxxD로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 일원을 포함하며, 여기서 R은 RNA 잔기이고, D는 DNA 잔기이고, M은 불일치 잔기이며, x는 C3 스페이서, 또는 분해에 내성인 기타 전용 기이다. 상기 방법의 추가적인 측면에서, 차단기는 신장 증폭 반응의 검출을 허용하는 표지를 포함한다. 상기 방법의 추가적인 측면에서, 상기 방법은 증폭 반응의 검출을 허용하는 표지를 추가로 포함하고, 상기 표지는 절단 부위로부터 3'인 올리고뉴클레오티드 프라이머에 부착된다. 이러한 측면들에서, 표지는 질량 분석법에 의한 증폭 반응의 검출을 위한 질량 태그 또는 형광단이다. 상기 방법의 추가적인 양태에서, 절단 도메인은 하기 모이어티 중 하나 이상을 포함한다: DNA 잔기, 염기성 잔기, 변형된 뉴클레오시드 또는 변형된 포스페이트

뉴클레오티드간 결합. 방법의 추가 양태에서, 절단 도메인은 하기 모이어티 중 하나 이상을 포함한다: DNA 잔기, 무염기성 잔기, 변형된 뉴클레오시드 또는 변형된 포스페이트 뉴클레오티드간 결합. 상기 방법의 추가적인 측면에서, 절단 도메인은 단일 RNA 잔기, 2개의 인접한 RNA 잔기, 3개 이상의 RNA 잔기의 연속 서열, 또는 하나 이상의 2'-변형 뉴클레오시드를 포함한다. 절단 도메인이 하나 이상의 2'-변형 뉴클레오시드를 포함하는 것인 측면에서, 상기 하나 이상의 2'-변형 뉴클레오시드는 2'-O-알킬 RNA 뉴클레오시드, 2'-플루오로뉴클레오시드, LNA(locke nucleic acid), 2'-에틸렌 핵산 잔기, 2'-알킬 뉴클레오시드, 2'-아미노뉴클레오시드 및 2'-티오뉴클레오시드로 구성된 군으로부터 선택된다. 예시적인 2'-변형 뉴클레오시드는 2'-O-메틸 RNA 뉴클레오시드 및 2'-플루오로뉴클레오시드를 포함한다.

[0088] 제7 양태에서, 신장된 프라이머를 생산하기 위한 키트가 제공된다. 상기 키트는 본원에 개시된 바와 같은 하이브리드 RNase H2 단백질을 제공하는 적어도 하나의 용기를 포함한다. 제1 측면에서, 상기 키트는 (a) 프라이머 신장 조건 하에서 소정의(predetermined) 폴리뉴클레오티드 주형에 혼성화 가능한 프라이머를 제공하는 용기; (b) 뉴클레오시드 트리포스페이트를 제공하는 용기; (c) 프라이머 신장에 적합한 완충액을 제공하는 용기; 및 (d) DNA 폴리머라아제로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 추가 용기를 더 포함한다. 제2 측면에서, 상기 DNA 폴리머라아제는 고-충실도 고세균 DNA 폴리머라아제를 포함한다. 제3 측면에서, 전술한 키트는 차단-절단가능한 프라이머를 포함하는 하나 이상의 추가 용기를 포함한다.

[0089] 제8 양태에서, 표적 DNA 서열의 증폭을 수행하기 위한 키트가 제공된다. 상기 키트는 본원에 기술된 RNase H2 및 고-충실도 고세균 DNA 폴리머라아제(를 포함하는 반응 완충액을 포함한다. 제1 측면에서, 상기 키트는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 더 포함하고, 상기 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프라이머는 차단기의 5'에 위치하는, RNase H2 효소에 의해 절단가능한 절단 도메인을 가지며, 상기 차단기는 올리고뉴클레오티드 프라이머의 3'-말단에 또는 그 근처에 연결되고, 상기 차단기는 프라이머 신장을 방지하고 및/또는 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머가 DNA 합성을 위한 주형으로 작용하는 것을 억제한다. 제2 측면에서, 상기 키트는 RDDDDx, RDDDDMx, RDxxD, RDxxDM, RDDDDxxD, RDDDDxxDM 및 DxxD로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 일원인 차단기를 포함하고, 여기서 R은 RNA 잔기이고, D는 DNA 잔기이며, M은 미스매치된 잔기이고, x는 C3 스페이서, 또는 분해에 내성인 기타 전용 기이다.

[0090] 제9 양태에서, 주형 핵산의 앰플리콘 라이브러리를 제조하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 여러 단계를 포함한다. 제1 단계는 핵산의 집단, 적어도 하나의 차단-절단가능한 프라이머, 하이브리드 RNase H2 단백질, dNTP, DNA 폴리머라아제 및 완충액을 포함하는 혼합물을 형성하여, 상기 혼합물에서 상기 적어도 하나의 차단-절단가능한 프라이머와 상기 핵산의 집단 간에 하이브리드 이중체(hybrid duplex)가 형성될 수 있는 것인 단계이다. 제2 단계는 상기 하이브리드 RNase H2 단백질로 상기 적어도 하나의 차단-절단가능한 프라이머를 절단하여 DNA 폴리머라아제에 의한 프라이머 신장이 가능한 적어도 하나의 활성 프라이머(active primer)를 생성하는 것이다. 제3 단계는 상기 핵산의 집단으로부터 하나 이상의 주형 핵산의 증폭을 허용하는 조건 하에서 상기 완충액 중 DNA 폴리머라아제로 상기 적어도 하나의 활성 프라이머를 신장시켜, 주형 핵산의 앰플리콘을 생성하는 것이다. 제1 측면에서, 상기 하이브리드 RNase H2 단백질은 Q48R SEL29(서열번호 18) 또는 기타로부터 선택된다. 제2 측면에서, 상기 DNA 폴리머라아제는 고-충실도 고세균 DNA 폴리머라아제 또는 기타로부터 선택된다. 제3 측면에서, 상기 완충액은 고-충실도 고세균 DNA 폴리머라아제 완충액이다.

[0091] 제10 양태에서, 대규모 병렬 시퀀싱(MPS)을 수행하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 여러 단계를 포함한다. 제1 단계는 PCR 방법에서 핵산의 집단, 하이브리드 RNase H2 돌연변이 단백질, 적어도 하나의 차단-절단가능한 프라이머, DNA 폴리머라아제, dNTP 및 완충액을 사용하여 주형 핵산의 라이브러리 집단을 제조하는 것이다. 제2 단계는 상기 주형 핵산의 라이브러리 집단으로부터 복수의 원하는 주형 핵산을 시퀀싱하는 것이다. 제1 측면에서, 상기 하이브리드 RNase H2 단백질은 Q48R SEL29(서열번호 18) 또는 기타로부터 선택된다.

[0092] 제11 양태에서, 핵산 주형의 앰플리콘 라이브러리로부터 SNP-함유 핵산 주형을 검출하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 여러 단계를 포함한다. 제1 단계는 핵산 주형의 앰플리콘 라이브러리; 하나 이상의 차단-절단가능한 프라이머; 하이브리드 돌연변이 RNase H2 단백질; dNTP; DNA 폴리머라아제; 및 완충액을 포함하는 혼합물을 형성하는 것을 포함한다. 상기 혼합물에서 상기 핵산 주형의 앰플리콘 라이브러리 중 SNP-함유 핵산 주형과 상기 하나 이상의 차단-절단가능한 프라이머 사이에 하이브리드 이중체가 형성된다. 제2 단계는 상기 하이브리드 이중체의 하나 이상의 차단-절단가능한 프라이머를 하이브리드 RNase H2 단백질로 절단하여, 상기 DNA 폴리머라아제에 의해 상기 하이브리드 이중체의 프라이머 신장이 가능한 하나 이상의 활성 프라이머를 생성하는 것을 포함한다. 제3 단계는 상기 핵산 주형의 앰플리콘 라이브러리로부터 하나 이상의 주형 핵산의 증폭을 허용하는 조건 하에서 완충액에서 DNA 폴리머라아제로 상기 이중체에서 하나 이상의 활성 프라이머를 신장시키고, 그에 의해

상기 SNP-함유 핵산을 검출하는 것을 포함한다. 제1 측면에서, 상기 방법은 Q48R SEL29(서열번호 18), 또는 기타로부터 선택되는 하이브리드 돌연변이 RNase H2 단백질을 포함한다. 제2 측면에서, 상기 방법은 고-충실도 고세균 DNA 폴리머라아제 완충액인 완충액을 포함한다.

[0093] 제12 양태에서, 루프-매개 증폭(loop-mediated amplification) 반응을 수행하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 2 단계를 포함한다. 제1 단계는 핵산 주형; 4개의 차단-절단가능한 프라이머로서, 상기 차단-절단가능한 프라이머는 RNase H2 단백질의 기질인 핵산 주형과 이중체를 형성하는 것인 4개의 차단-절단가능한 프라이머; RNase H2 단백질로서, 상기 RNase H2 단백질은 Q48R SEL29(서열번호 18) 또는 기타로부터 선택되는 것인 RNase H2 단백질; DNA 폴리머라아제 단백질; dNTP; 및 완충액을 포함하는 혼합물을 형성하는 것을 포함한다. 제2 단계는 상기 혼합물로 등온 증폭 사이클을 수행하는 것을 포함한다.

[0094] 제13 양태에서, 프라이머 이량체 형성이 감소된 rhPCR 분석을 수행하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 Q48R SEL29 RNase H2(서열번호 18)로 프라이머 신장을 수행하는 것을 포함한다. 감소된 프라이머 이량체 형성은 야생형 *P.a.* RNase H2(서열번호 1)로 수행된 rhPCR 분석과 비교할 때 Q48R SEL29 RNase H2(서열번호 18)에 의한 rhPCR 분석 동안 형성된 프라이머 이량체의 감소된 양에 해당한다.

[0095] 제14 양태에서, 원하는 산물에 대한 개선된 맵핑률(mapping rate) 및 온-타겟률(on-target rate)을 갖는 rhPCR 분석을 수행하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 Q48R SEL29 RNase H2(서열번호 18)로 프라이머 신장을 수행하는 것을 포함한다. 개선된 맵핑률 및 온-타겟률은 야생형 *P.a.* RNase H2(서열번호 1)로 수행된 rhPCR 분석과 비교할 때 Q48R SEL29 RNase H2(서열번호 18)에 의한 rhPCR 분석 동안 형성된 원하는 산물의 증가된 맵핑 및 온-타겟 증폭에 해당한다.

[0096] 마지막으로, 본 발명의 RNase H2 폴리펩티드는 미국 특허 공보 US10273534(B2)에 개시된 매우 효율적인 증폭 방법인 BaseX PCR 증폭 방법에서 사용하기에 적합하며, 상기 특허의 내용은 전체가 본원에 참조로 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0097] **도 1**은 야생형 *P.a.* RNase H2 효소와 비교하여 돌연변이 Q48R SEL29 RNase H2 효소를 사용하여 모든 효소 농도에서 이량체 비율이 낮아진다는 것을 보여주는 예시적인 플롯(패널 A); 야생형 *P.a.* RNase H2 효소에 비해 돌연변이 Q48R SEL29 RNase H2 효소를 사용하여 모든 RNase H2 효소 농도에서 맵핑률이 더 높다는 예시적인 데이터(패널 B); 야생형 *P.a.* RNase H2에 비해 돌연변이 Q48R SEL29 RNase H2 효소를 사용하여 모든 효소 농도에서 온-타겟률이 더 높다는 것을 보여주는 예시적인 데이터 (패널 C)를 보여주는 플롯이다.

도 2는 확인된 각각의 프라이머 쌍당 평균 정규화 이량체 총수(count)의 예를 도시하며, 돌연변이 Q48R SEL29 RNase H2 효소는 야생형 *P.a.* RNase H2 효소에 비해 확인된 대부분의 프라이머 이량체를 절반으로 감소시킨다.

도 3은 앰플리콘 균일성(amplicon uniformity) ≥ 0.2X 및 앰플리콘 균일성 ≤ 0.05X(탈락율)의 예시적인 데이터를 도시하며, 여기서 라이브러리의 수율은 돌연변이 Q48R SEL29 RNase H2 효소와 야생형 *P.a.* RNase H2 효소 간에 모든 농도에서 비슷하고 (패널 A); 테스트된 다양한 농도에서, 돌연변이 Q48R SEL29 RNase H2 효소의 전체 앰플리콘 균일성 ≥ 0.2X는 야생형 P.a. RNase H2 효소에 필적하며(패널 B); 테스트된 모든 적정(titration) 농도에서 앰플리콘 탈락률(dropout rate)이 돌연변이 Q48R SEL29 RNase H2 효소와 야생형 *P.a.* RNase H2 효소 사이에서 유사했다(패널 C).

도 4는 균일성 분포(앰플리콘 평균 커버리지(coverage) 대비 0-0.1X, 0.1-0.2X, 0.2X-0.5X, 0.5X-1.5X, 1.5X-2.5X, 및 2.5-5X 범위의 커버리지를 갖는 앰플리콘의 퍼센트)가 돌연변이 Q48R SEL29 RNase H2 효소와 야생형 *P.a.* RNase H2 효소 간에 유사하다는 것을 보여주는 예시적인 데이터를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0098] **실시예**

[0099] 본 발명은 하기 실시예를 참조하여 더 설명된다. 그러나, 전술된 구체예와 같이, 이러한 실시예는 예시적인 것이며, 어떤 식으로도 본 발명의 실시가능한 범위를 한정하는 것으로 해석되어서는 안된다는 점에 유의해야 한다.

[0100] **실시예 1. 재조합 재셔플링(recombination reshuffling)을 통한 SEL28 및 SEL29 하이브리드 RNase H2 단백질의 생성.**

[0101] 돌연변이 RNase H2 단백질은 인 비트로 DNA 재조합 및 유도 분자 진화(directed molecular evolution) 기술을 사용하여 합성하였다. Altravax™ Inc.(캘리포니아주 서니베일)는 Integrated DNA Technologies와의 계약에 따라 5,500개 돌연변이체의 라이브러리를 생성했다. SEL28 및 SEL29 돌연변이체는 IDT에서 수행된 초기 스크리닝에서 선택되었고, 상기 돌연변이체는 RNase H2 절단 반응에서 증가된 불일치 식별을 나타냈다. 돌연변이체는 대장균(*E. coli*) BL21(DE3) 내부의 pET-27b(+) 플라스미드 벡터에서 생성되었다. T7 시스템에 기반한 발현된 단백질은 N-말단에 pelB 신호 서열, 돌연변이된 RNase H2 유전자, 인간 단순 포진 바이러스(human herpes simplex virus) 2 에피토프 태그 및 C-말단에 6-히스티딘 태그를 포함한다. 대장균 세포는 50mL TPP TubeSpin® Bioreactors(Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland)를 사용하여 50 μg/mL 카나마이신(Teknova™, Hollister, CA)이 포함된 LB Broth 12 mL에서 증식시켰다. RNase H2의 발현은 Overnight Express™ Autoinduction System 1(MilliporeSigma™, Burlington, MA)을 사용하여 37℃에서 20시간 동안 유도시켰다. 박테리아 발현 균주는 MaxQ™ 4000 오비탈 진탕기(ThermoFisher Scientific™, Grand Island, NY)를 사용하여 250 rpm에서 진탕시키면서 증식시켰다. 세포를 ThermoScientific Sorvall™ Legend XTR 원심분리기에서 10분 동안 7,500 xg로 원심분리하고 상층액을 버렸다. 세포 페이스트를 -80℃에서 보관하고 50 mM NaCl, 40 mM Tris-HCl pH 8.0, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM $CaCl_2$, 1x BugBuster® Extraction Reagent(MilliporeSigma™, Burlington, MA), 1x cOmplete™, EDTA-불포함 프로테아제 억제제 칵테일(MilliporeSigma™, Burlington, MA), 0.1 mg/mL 라이소자임(~600 유닛, ThermoFisher™ Scientific, Grand Island, NY) 및 4 U/mL Ambion™ DNase I(ThermoFisher™ Scientific, Grand Island, NY)을 함유하는 세포 재현탁 완충액으로 구성된 용해 용액 0.6 mL에 재현탁시켰다. 용해는 25℃에서 15분이 소요되었고 세포는 120 rpm에서 진탕시켰다. 불용성 물질은 16,000 x g에서 20분간 원심분리하여 제거하였다. DNase I 및 네이티브(native) 대장균 단백질을 75℃에서 15분 동안 변성시켰다. 불용성 변성된 단백질을 16,000 x g에서 15분 동안 원심분리하여 다시 제거했다. Capturem™ His-Tagged Miniprep Kit(Takara Bio™, Mountain View, CA)를 단백질 정제에 사용했다. 키트의 결합 컬럼을 세포 재현탁 완충액으로 세척하고 RNase H2를 포함하는 상층액을 컬럼에 로딩했다. 용액을 11,000 x g에서 1분 동안 원심분리에 의해 컬럼을 통해 통과시켰다. 컬럼을 20 mM 이미다졸이 첨가된 200 μℓ의 세척 완충액(20 mM Na_3PO_4, 150 mM NaCl, pH 7.6)으로 2회 세척하였다. RNase H2 효소를 200 μℓ의 용리 완충액(20 mM Na_3PO_4, 500 mM NaCl, 500 mM 이미다졸, pH 7.6)으로 용리시키고, D-Tube™ Dialyzer Midi, MWCO 6-8kDa(MilliporeSigma™, Burlington, MA)를 사용하여 1 L의 2x 저장 완충액 F(pH 8.4, 40 mM Tris-HCl, 0.2 mM EDTA, 200 mM KCl)에 대해 밤새 투석시켰다. 탱크의 투석 완충액을 1회 이상 교체했다. 샘플을 투석으로부터 회수하고 99.8%(v/v) 글리세롤과 0.2%(v/v) Triton X-100의 혼합물과 1:1 부피비로 혼합했다. 이러한 정제 및 농축된 RNase H2 용액을 -20℃에서 보관하였다. 이들의 순도는 Any kD™ Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gels(Bio-Rad®, Hercules, CA)를 사용하여 SDS 겔 전기영동으로 평가했다. RNase H2 효소는 모든 정제된 샘플에서 우세한 단백질 밴드(>75%)를 보였고, 그 위치는 Precision Plus Protein™ Unstained Standards(Bio-Rad®, Hercules, CA) 대비 28.9 kg/mol의 예상 분자량에 해당했다.

[0102] 돌연변이 단백질의 아미노산 서열은 **표 1**에서 서열번호 89 및 90으로 표시된다. 시퀀싱은 Applied Biosystems BigDye Terminators v3.1 키트를 사용하여 수행하였다. 플라스미드 DNA는 제조사의 프로토콜에 따라 Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System(Promega, Madison, WI)을 사용하여 박테리아 균주로부터 분리하였다. 시퀀싱 데이터는 Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer로 수집했다.

[0103] **실시예 2. SEL29 RNase H2의 Q48R 및 A107V SDM 돌연변이는 SEL29 RNase H2와 비교하여 써모코커스 코다카렌시스(*Thermococcus kodakarensis*) DNA 폴리머라아제 반응 완충액에서 효소 활성을 증가시킨다.**

[0104] $(His)_6$-태깅된 돌연변이 SEL28 및 SEL29 RNase H2 단백질은 부위-지정 돌연변이유발(SDM) 기술에 의해 생성하였다(예를 들어, Weiner M. et al., Gene, 151:119-123(1994) 참조). SEL28 및 SEL29 RNase H2의 SDM에 사용된 프라이머는 **표 2**, 서열번호 4-13으로 제시된다. 돌연변이체는 서열로 확인하였고, 단백질은을 표준 방법을 이용하여 대장균에서 발현시켰다. 정제는 앞서 기술된 바와 같이(Dobosy et al., 2011 및 미국 특허 8,911,948 B2) 하전된 Ni^{2+} 컬럼 상에서 친화도 정제에 의해 수행하였다. 돌연변이 단백질의 아미노산 서열은 **표 3**, 서열번호 2-3, 14-20에 제시된다.

[0105] **표 2. RNase H2 효소의 돌연변이 유발을 위한 SDM 프라이머.**

표 2

프라이머 명칭	서열 번호	특이적 AA 변화	서열 [1]
P13S SEL28 Forward Oligo	4	P13S	GGTGCAGATGAAGCTGGTCGTGGT**T** **CT**GTTATTGGTCCGCTGGTTATTGTT GCT
P13S SEL28 Reverse Oligo	5	P13S	AGCAACAATAACCAGCGGACCAATA AC**AGA**ACCACGACCAGCTTCATCTG CACC
A107V SEL28 Forward Oligo	6	A107V	AAGCCGGATGTTATTTACGCTGATGC C**GTA**GATGTTGATGAAGAACGTTTC GCTAGA
A107V SEL28 Reverse Oligo	7	A107V	TCTAGCGAAACGTTCTTCATCAACAT C**TAC**GGCATCAGCGTAAATAACATC CGGCTT
P13S SEL29 Forward Oligo	8	P13S	GGTATAGATGAAGCTGGTCGTGGT**T** **CT**GCTATTGGTCCGCTGGTTATTGTT GCT
P13S SEL29 Reverse Oligo	9	P13S	AGCAACAATAACCAGCGGACCAATA GC**AGA**ACCACGACCAGCTTCATCTA TACC
Q48R SEL29 Forward Oligo	10	Q48R	AGACTCCAAAAAGCTGACCCCGGCG **CGC**CGTGAAAAACTGTTCGATGAAA TCG
Q48R SEL29 Reverse Oligo	11	Q48R	CGATTTCATCGAACAGTTTTTCACG**G** **CG**CGCCGGGGTCAGCTTTTTGGAGT CT
A107V SEL29 Forward Oligo	12	A107V	AAGCCGGATGTTATTTACGCTGATGC C**GTA**GATGTTGATGAAGAACGTTTC GCTAGA
A107V SEL29 Reverse Oligo	13	A107V	TCTAGCGAAACGTTCTTCATCAACAT C**TAC**GGCATCAGCGTAAATAACATC CGGCTT

[1] 모든 염기는 DNA 임. 볼드체 및 밑줄로 표시된 문자는 돌연변이유발(mutagenic) 뉴클레오티드임.

[0106]

[0107] 표 3. RNase H2 단백질의 아미노산 서열.

표 3

Mut ID #	서열 번호	특이적 AA 변화	서열 [1]
N/A	1	WT *P.a.* RNase H2	MKVAGADEAGRGPVIGPLVIVAAVVEEDKI RSLTKLGVKDSKQLTPAQREKLFDEIVKVL DDYSVVIVSPQDIDGRKGSMNELEVENFVK ALNSLKVKPEVIYIDSADVKAERFAENIRSR LAYEAKVVAEHKADAKYEIVSAASILAKVI RDREIEKLKAEYGDFGSGYPSDPRTKKWLE EWYSKHGNFPPIVRRTWDTAKKIEEKFKRA QLTLDNFLKRFRN*KLAAALEIKRASQPELAPE DPEDVEHHHHHH*
1	2	SEL28 RNase H2	MKVAGADEAGRGPVIGPLVIVAAVVDENS LPKLEELKVRDSKKLTPKRREKLFDEIVKVL DDYSVVIVSPQDIDGRKGSMNELEVENFVK ALNSLKVKPDVIYADAADVDEERFARELGE RLNFEAEVVAKHKADDIFPVVSAASILAKVI RDREIEKLKAEYGDFGSGYPSDPRTKKWLE EWYSKHGNFPPIVRRTWDTAKKIEEKFKRA QLTLDKFFKKP*KLAAALEIKRASQPELAPEDP EDVEHHHHHH*
2	3	SEL29 RNase H2	MKVAGIDEAGRGPAIGPLVIVAAVVDENSL PKLEELKVRDSKKLTPAQREKLFDEIVKVL DDYSVVIVSPQDIDGRKGSMNELEVENFVK ALNSLKVKPDVIYADAADVDEERFARELGE RLNFEAKVVAEHKADAKYEIVSAASILAKV IRDREIEKLKAEYGDFGSGYPSDPRTRAFLE NYYREHGEFPPIVRKGWKTLKKIAEKVESE KKAEERQATLDRYFRKV*KLAAALEIKRASQP ELAPEDPEDVEHHHHHH*
3	14	P13S SEL28 RNase H2	MKVAGADEAGRG<u>S</u>VIGPLVIVAAVVDENS LPKLEELKVRDSKKLTPKRREKLFDEIVKVL DDYSVVIVSPQDIDGRKGSMNELEVENFVK ALNSLKVKPDVIYADAADVDEERFARELGE RLNFEAEVVAKHKADDIFPVVSAASILAKVI RDREIEKLKAEYGDFGSGYPSDPRTKKWLE EWYSKHGNFPPIVRRTWDTAKKIEEKFKRA QLTLDKFFKKP*KLAAALEIKRASQPELAPEDP EDVEHHHHHH*
4	15	A107V SEL28 RNase H2	MKVAGADEAGRGPVIGPLVIVAAVVDENS LPKLEELKVRDSKKLTPKRREKLFDEIVKVL DDYSVVIVSPQDIDGRKGSMNELEVENFVK ALNSLKVKPDVIYADA<u>V</u>DVDEERFARELGE RLNFEAEVVAKHKADDIFPVVSAASILAKVI RDREIEKLKAEYGDFGSGYPSDPRTKKWLE EWYSKHGNFPPIVRRTWDTAKKIEEKFKRA QLTLDKFFKKP*KLAAALEIKRASQPELAPEDP EDVEHHHHHH*

[0108]

Mut ID #	서열 번호	특이적 AA 변화	서열 [1]
5	16	P13S/A107V SEL28 RNase H2	MKVAGADEAGRGSVIGPLVIVAAVVDENS LPKLEELKVRDSKKLTPKRREKLFDEIVKVL DDYSVVIVSPQDIDGRKGSMNELEVENFVK ALNSLKVKPDVIYADAVDVDEERFARELGE RLNFEAEVVAKHKADDIFPVVSAASILAKVI RDREIEKLKAEYGDFGSGYPSDPRTKKWLE EWYSKHGNFPPIVRRTWDTAKKIEEKFKRA QLTLDKFFKKP*KLAAALEIKRASQPELAPEDP EDVEHHHHHH*
6	17	P13S SEL29 RNase H2	MKVAGIDEAGRGSAIGPLVIVAAVVDENSL PKLEELKVRDSKKLTPAQREKLFDEIVKVL DDYSVVIVSPQDIDGRKGSMNELEVENFVK ALNSLKVKPDVIYADAADVDEERFARELGE RLNFEAKVVAEHKADAKYEIVSAASILAKV IRDREIEKLKAEYGDFGSGYPSDPRTRAFLE NYYREHGEFPPIVRKGWKTLKKIAEKVESE KKAEERQATLDRYFRKV*KLAAALEIKRASQP ELAPEDPEDVEHHHHHH*
7	18	Q48R SEL29 RNase H2	MKVAGIDEAGRGPAIGPLVIVAAVVDENSL PKLEELKVRDSKKLTPARREKLFDEIVKVL DDYSVVIVSPQDIDGRKGSMNELEVENFVK ALNSLKVKPDVIYADAADVDEERFARELGE RLNFEAKVVAEHKADAKYEIVSAASILAKV IRDREIEKLKAEYGDFGSGYPSDPRTRAFLE NYYREHGEFPPIVRKGWKTLKKIAEKVESE KKAEERQATLDRYFRKV*KLAAALEIKRASQP ELAPEDPEDVEHHHHHH*
8	19	A107V SEL29 RNase H2	MKVAGIDEAGRGPAIGPLVIVAAVVDENSL PKLEELKVRDSKKLTPAQREKLFDEIVKVL DDYSVVIVSPQDIDGRKGSMNELEVENFVK ALNSLKVKPDVIYADAVDVDEERFARELGE RLNFEAKVVAEHKADAKYEIVSAASILAKV IRDREIEKLKAEYGDFGSGYPSDPRTRAFLE NYYREHGEFPPIVRKGWKTLKKIAEKVESE KKAEERQATLDRYFRKV*KLAAALEIKRASQP ELAPEDPEDVEHHHHHH*
9	20	P13S/A107V SEL29 RNase H2	MKVAGIDEAGRGSAIGPLVIVAAVVDENSL PKLEELKVRDSKKLTPAQREKLFDEIVKVL DDYSVVIVSPQDIDGRKGSMNELEVENFVK ALNSLKVKPDVIYADAVDVDEERFARELGE RLNFEAKVVAEHKADAKYEIVSAASILAKV IRDREIEKLKAEYGDFGSGYPSDPRTRAFLE NYYREHGEFPPIVRKGWKTLKKIAEKVESE KKAEERQATLDRYFRKV*KLAAALEIKRASQP ELAPEDPEDVEHHHHHH*

[1] 돌연변이의 위치는 볼드체 및 밑줄로 표시됨. 말단 신장(ending extension) 및 $(His)_6$-태그는 이탤릭체로 표시됨.

[0109]

[0110] P13S, A107V 및 P13S/A107V SEL28 RNase H2 또는 P13S, Q48R, A107V 또는 P13S/A107V SEL29 RNase H2가 WT *P.a.* RNase H2와 비교하여 rhPCR로 KOD DNA 폴리머라아제 반응 완충액에서 증가된 활성을 갖는지 여부를 결정하기 위해, SMAD7에서 rs4939827 SNP를 표적으로 하는 정량적 rhPCR 분석을 설계했다. 이 SNP는 과거에 rhPCR 효율성 및 특이성을 특성화하기 위해 활용되었으며(Dobosy et al., 2011 및 미국 특허 8,911,948 B2), 다양한 조건에서의 반응이 잘 알려져 있다. 이 분석에 사용된 프라이머는 **표 4**, 서열번호 21-23에 제시된다. 분석은 10 ㎕ 반응 부피로 수행되었다. 온도 순환(thermal cycling) 및 데이터 수집은 CFX384® Real Time System(Bio-Rad ®, Hercules, CA)에서 수행하였다. 요약하면, 200 nM(2 pmol)의 차단된 정방향 프라이머(서열번호 22) 및 200 nM(2 pmol)의 미차단(unblocked) 역방향 프라이머(서열번호 23), 또는 200 nM(2 pmol)의 미차단 정방향 프라이머(서열번호 21) 및 200 nM(2 pmol)의 미차단 역방향 프라이머(서열번호 23)를 2.5 mM(총) $MgSO_4$, 0.2 mM(각각) dNTP(MilliporeSigma™, Burlington, MA) 및 0.5x EvaGreen® Dye(Biotium Inc., Fremont, CA)를 포함하는 1x 내부 KOD 완충액(ROKStar 완충액 v2.0 또는 v1.66)(IDT, Coralville, IA)에 혼합했다. RNase H2 희석 완충액(IDT, Coralville, IA) 또는 21 fmol의 WT *P.a.* (서열번호 1), SEL28(서열번호 2), SEL29(서열번호 3), P13S

SEL28(서열번호 14), A107V SEL28(서열번호 15), P13S/A107V SEL28(서열번호 16), P13S SEL29(서열번호 17), Q48R SEL29(서열번호 18), A107V SEL29(서열번호 19), 또는 P13S/A107V SEL29(서열번호 20) RNase H2 효소를 각 반응에 첨가하였다. rs4939827 SNP에서 동형 접합 유전형을 나타내는 게놈 세포주(genomic cell line) DNA(세포주 NA12878, Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ) 10 ng을 각 반응에 첨가했다. 반응은 3회(triplicate) 수행하고, 결과를 평균했다. 반응은 다음 조건에서 순환되었다: 95℃$^{3:00}$ → (95℃$^{0:10}$ → 60℃$^{0:30}$) x 75. 각 신장 시점 후에 삽입된(intercalated) EvaGreen®에 대한 형광 데이터를 수집하였다. 분석이 완료된 후 데이터를 분석하고, Bio-Rad CFX Manager® 소프트웨어의 자동 호출(automatic calling) 기능을 사용하여 Cq 값을 계산했다. 결과가 **표 5**에 제시된다.

[0111] **표 4. 실시예 2에 기술된 실험에 사용된 프라이머의 서열 및 서열번호**

표 4

서열번호	명칭	서열 [1]
21	rs4939827 For unblocked	CAGCCTCATCCAAAAGAGGAAA
22	rs4939827 For blocked	CAGCCTCATCCAAAAGAGGAAAcAGGAG-X
23	rs4939827 Rev unblocked	CTCACTCTAAACCCCAGCATT

[1]DNA 는 대문자, RNA 는 소문자임. X = 엑소뉴클레아제에 내성인 전용 차단기(Proprietary blocker group resistant to exonuclease).

[0112]

[0113] **표 5. 실시예 2의 실험에 대한 Cq, △Cq 및 △△Cq 값.**

표 5

ROKstar 완충액 v2.0 중 RNase H2	미차단 (서열번호 21)	차단 (서열번호 22)	[1]ΔCq	[2]ΔΔCq (WT – 돌연변이)
불포함 (None)	24.2	> 75.0	> 50.8	n/a
WT (*P.a.*)	24.3	36.7	12.4	n/a
SEL28 (Mut ID 1)	24.2	41.3	17.1	0
P13S SEL28 (Mut ID 3)	24.3	> 75.0	> 50.8	< −33.7
A107V SEL28 (Mut ID 4)	24.1	44.1	20.0	−2.9
P13S/A107V SEL28 (Mut ID 5)	24.1	45.7	21.5	−4.5
SEL29 (Mut ID 2)	24.2	48.9	24.6	0
P13S SEL29 (Mut ID 6)	23.6	> 75.0	> 51.4	< −26.8
Q48R SEL29 (Mut ID 7)	24.2	41.4	17.2	7.4
A107V SEL29 (Mut ID 8)	24.1	38.0	13.9	10.7
P13S/A107V SEL29 (Mut ID 9)	24.4	51.4	26.9	−2.3

ROKstar 완충액 v1.66 중 RNase H2R	미차단 (서열번호 21)	차단 (서열번호 22)	[1]ΔCq	[2]ΔΔCq (WT – 돌연변이)
불포함	24.7	> 75.0	> 50.3	n/a
WT (*P.a.*)	24.6	45.7	21.1	n/a
SEL28 (Mut ID 1)	25.0	55.6	30.6	0
P13S SEL28 (Mut ID 3)	24.6	> 75.0	> 50.4	< −19.8
A107V SEL28 (Mut ID 4)	24.8	60.6	35.8	−5.2
P13S/A107V SEL28 (Mut ID 5)	24.7	56.4	31.8	−1.2
SEL29 (Mut ID 2)	24.1	54.5	30.3	0
P13S SEL29 (Mut ID 6)	24.9	> 75.0	> 50.1	< −19.8
Q48R SEL29 (Mut ID 7)	25.0	50.4	25.4	4.9
A107V SEL29 (Mut ID 8)	24.9	46.9	21.9	8.4
P13S/A107V SEL29 (Mut ID 9)	24.7	57.4	32.8	−2.4

[0114]

[0115] [1]ΔCq 값은 차단된 프라이머(서열번호 22)에 대한 Cq 값과 미차단 프라이머(서열번호 21)에 대한 Cq 값 간의 차이로 계산되었음. [2]ΔΔCq 값은 백그라운드 SEL28 또는 SEL29 RNase H2에 대한 ΔCq 값과 돌연변이 SEL28 또는 SEL29 RNase H2에 대한 ΔCq 값 간의 차이로 계산되었음.

[0116] 이 데이터는 Q48R SEL29 및 A107V SEL29 RNase H2가 백그라운드 SEL29 RNase H2와 비교하여 써모코커스 코다카렌시스 DNA 폴리머라아제 반응 완충액에서 증가된 효소 활성을 가지나, P13S SEL29 RNase H2 및 P13S/A107V RNase H2는 그렇지 않다는 것을 보여준다. 또한, P13S SEL28, A107V SEL28 및 P13S/A107V RNase H2는 백그라운드 SEL28 RNase H2와 비교하여 써모코커스 코다카렌시스 DNA 폴리머라아제 반응 완충액에서 효소 활성을 증가시키지 않는다. RNase H2의 추가 없이, 차단된 프라이머는 절단되지 않아 PCR을 지원할 수 없다. 고-충실도 DNA 폴리머라아제에 의한 프라이머의 차단제거(deblocking)를 방지하기 위해 전용(proprietary) 엑소뉴클레아제-내

성 차단 프라이머의 사용이 필요하다. WT(*P.a.*) RNase H2는 차단된 프라이머를 절단할 수 있지만 증폭 지연이 있어서, 미차단 프라이머와 비교하여 ROKstar 완충액 v2.0에서 12.4 사이클, ROKstar 완충액 v1.66에서 21.1 사이클의 △Cq를 초래한다. 증폭 지연의 △Cq 정량화는 ROKstar 완충액 v2.0에서 SEL28 RNase H2의 경우 17.1회 사이클 및 SEL29 RNase H2의 경우 24.6회 사이클로 증가하고 ROKstar 완충액 v1.66에서 SEL28 RNase H2의 경우 30.6회, 및 SEL29 RNase H2의 경우 30.3회로 증가한다. 증폭 지연의 △Cq 정량화는 Q48R SEL29 RNase H2(ROKstar 완충액 v2.0에서 17.2회, 및 ROKstar 완충액 v1.66에서 25.4회) 및 A107V RNase H2(ROKstar 완충액 v2.0에서 13.9회, 및 ROKstar 완충액 v1.66에서 21.9회)의 경우 감소한다. P13S/A107V SEL29 RNase H2는 증폭 지연의 △Cq 정량화를 ROKstar 완충액 v2.0에서 26.9회로, ROKstar 완충액 v1.66에서 32.8회로 증가시킨다. P13S SEL28 및 P13S SEL29 RNase H2는 ROKstar 완충액 v2.0 또는 v1.66에서 뚜렷한 활성을 갖지 않는다. 또한, P13S/A107V SEL28 RNase H2는 증폭 지연의 △Cq 정량화를 ROKstar 완충액 v2.0에서 21.5회, ROKstar 완충액 v1.66에서 31.8회로 증가시킨다. A107V SEL28 RNase H2는 증폭 지연의 △Cq 정량화를 ROKstar 완충액 v2.0에서 20.0회, ROKstar 완충액 v1.66에서 35.8회로 증가시킨다. Q48R, A107V 및 P13S/A107V *P.a.* RNase H2는 모두 써모코커스 코다카렌시스 DNA 폴리머라아제 반응 완충액에서 증가된 효소 활성을 갖고, P13S *P.a.* RNase H2는 써모코커스 코다카렌시스 DNA 폴리머라아제 반응 완충액에서 더 낮지만 측정 가능한 효소 활성을 가졌기 때문에, 이러한 결과는 *P.a.* RNase H2의 돌연변이와 대조된다. Q48R SEL29 및 A107V SEL29 RNase H2는 써모코커스 코다카렌시스 DNA 폴리머라아제 반응 완충액과 함께 사용할 때, 정도는 다르지만 효소 활성을 향상시킨다.

[0117] **실시예 3. Q48R SEL29 및 A107V SEL29 RNase H2는 불일치가 RNA의 반대쪽에 위치할 때 WT RNase H2에 비해 불일치 식별을 증가시킨다.**

[0118] 효소의 비활성(specific activity)은 형광-기반 동역학 분석을 이용하여 결정하였다. DNA 기질의 서열은 **표 6**, 서열번호 24-25에 제시된다. 기질은 이중-가닥 영역 내에 일치하는(matched) RNA 염기를 갖는 DNA 헤어핀이다. 프로브의 3' 말단에 부착된 것은 6-FAM(6-카르복시플루오레세인)이고, 프로브의 5' 말단에 부착된 것은 Iowa Black® FQ(서열번호 24)이다. 6-FAM의 형광은 온전한 헤어핀 프로브에서 Iowa Black® FQ 모이어티에 의해 퀀칭된다. RNase H2는 RNA 염기의 5'을 절단하고 6-FAM을 가진 프로브의 3' 말단을 방출한다. 따라서, 6-FAM의 형광은 더 이상 퀀칭되지 않고 형광을 낼 수 있다. RNA 염기는 있지만 형광단 또는 퀀처(quencher)는 없는 DNA 헤어핀을 경쟁자(서열번호 25)로 사용하였다. 분석은 10 ㎕ 반응 부피로 수행하였다. 데이터 수집은 LightCycler® 480 II(Roche Life Science, Indianapolis, IN)로 수행하였다. 요약하면, 1x의 rhAmp™ Backbone v3을 200 nM(2 pmol)의 표지된 헤어핀(서열번호 24) 및 10 μM(100 pmol)의 경쟁자 헤어핀(서열번호 25)과 조합하여 사용하였다. WT *P.a.* RNase H2(서열번호 1) 또는 돌연변이 RNase H2(서열번호 18-19) 0.5, 1.0, 2.0 또는 5.0 fmol을 각 반응에 첨가하였다. 분석을 시작하기 전에 기질의 절단을 방지하기 위해 반응을 초기에 4℃에서 유지시켰다. 샘플은 65℃에서 수행하였다. 형광 여기 파장은 483nm이고; 형광 방출 파장은 533nm였다. 형광 강도는 135분 동안 13.75초마다 수집되었다. 각 반응에 대한 초기 속도와 펨토몰 당 속도를 계산했다. 각 돌연변이에 대한 펨토몰 당 속도를 이전에 효소 ㎍당 17 유닛의 비활성을 갖는 것으로 결정된 WT *P.a.* RNase H2의 값으로 정규화시켰다. Q48R SEL29 RNase H2는 효소 ㎍당 46.03 유닛의 비활성을 갖고, A107V SEL29 RNase H2는 효소 ㎍당 7.77 유닛의 비활성을 갖는다.

[0119] **표 6. RNase H2 단위 활성(unit activity)을 결정하기 위한 DNA 헤어핀의 서열 및 서열번호.**

표 6

서열번호	명칭	서열 [1]
24	염료-퀀처 표지 헤어핀 (Dye-quencher labeled hairpin)	Q–TATAAGCTACCAGCATGGTTTTT CCATGCTGGTAGcTTATA–F
25	네이티브 경쟁자 헤어핀 (Native competitor hairpin)	TATAAGCTACCAGCATGGTTTTT CCATGCTGGTAGcTTATA

[1]DNA 는 대문자, RNA 는 소문자임. Q = Iowa Black® FQ. F = 6-FAM (Fluorescein).

[0120]

[0121] 이러한 돌연변이 RNase H2 효소가 RNA 염기의 바로 반대의 불일치에 대한 불일치 식별을 개선할 수 있는지 여부를 완전히 결정하기 위해, 합성, 정량적 rhPCR 분석을 이전에 기술된 바와 같이 이용하였다(Dobosy et al, 2011 및 미국 특허 8,911,948 B2). 이 분석은 완벽한 일치 대비 각각의 특정한 단일-염기 불일치의 효과를 직접 비교

할 수 있다. 이 분석에 사용된 프라이머는 **표 7**, 서열번호 26-31에 제시된다. 분석은 10 ㎕ 반응 부피로 수행되었다. 온도 순환 및 데이터 수집은 CFX384® Real Time System(Bio-Rad®, Hercules, CA)에서 수행하였다. 요약하면, 200 nM(2 pmol)의 차단된 역방향 프라이머(서열번호 28-31) 및 200 nM(2 pmol)의 미차단 정방향 프라이머(서열번호 26) 또는 200 nM(2 pmol)의 미차단 역방향 프라이머(서열번호 27) 및 200 nM(2 pmol)의 미차단 정방향 프라이머(서열번호 26)를 1x iQ™ SYBR® Green Supermix®(Bio-Rad ®, Hercules, CA)에 혼합했다. 5 mU의 WT *P.a.*(서열번호 1), 40 mU의 Q48R SEL29(서열번호 18), 또는 5 mU의 A107V SEL29(서열번호 19) RNase H2 효소를 각 반응에 첨가하였다. 각각 RNA 염기의 바로 반대에 상이한 뉴클레오티드를 갖는, 각각의 합성 표적 서열(서열번호 32-35) 20,000 카피를 각 반응에 첨가했다. 반응은 3회 수행하고, 결과를 평균했다. 반응은 하기 조건에서 순환되었다: $95℃^{3:00}$ → ($95℃^{0:10}$ → $60℃^{0:30}$) x 75. 각 신장 시점 후에, 삽입된 SYBR® Green에 대한 형광 데이터를 수집하였다. 분석이 완료된 후, 데이터를 분석하고, 각 쌍별(pair-wise) 조합에 대한 평균 Cq 및 ΔCq 값을 계산했다. 결과는 **표 8** 및 **9**에 제시된다.

[0122] **표 7. 실시예 2에 기재된 실험에 사용된 프라이머 및 주형의 서열 및 서열번호.**

표 7

서열번호	명칭	서열[1]
26	Syn For 미차단	AGCTCTGCCCAAAGATTACCCTG
27	Syn Rev 미차단	CTGAGCTTCATGCCTTTACTGT
28	Syn Rev rA 차단	CTGAGCTTCATGCCTTTACTGTaCCCCC-X
29	Syn Rev rC 차단	CTGAGCTTCATGCCTTTACTGTcCCCCC-X
30	Syn Rev rG 차단	CTGAGCTTCATGCCTTTACTGTgCCCCC-X
31	Syn Rev rU 차단	CTGAGCTTCATGCCTTTACTGTuCCCCC-X
32	Syn A 주형	AGCTCTGCCCAAAGATTACCCTGACAGCTAAGT GGCAGTGGAAGTTGGCCTCAGAAGTAGTGGCCA GCTGTGTGTCGGGG**A**ACAGTAAAGGCATGAAGC TCAG
33	Syn C 주형	AGCTCTGCCCAAAGATTACCCTGACAGCTAAGT GGCAGTGGAAGTTGGCCTCAGAAGTAGTGGCCA GCTGTGTGTCGGGG**C**ACAGTAAAGGCATGAAGC TCAG
34	Syn G 주형	AGCTCTGCCCAAAGATTACCCTGACAGCTAAGT GGCAGTGGAAGTTGGCCTCAGAAGTAGTGGCCA GCTGTGTGTCGGGG**G**ACAGTAAAGGCATGAAGC TCAG
35	Syn U 주형	AGCTCTGCCCAAAGATTACCCTGACAGCTAAGT GGCAGTGGAAGTTGGCCTCAGAAGTAGTGGCCA GCTGTGTGTCGGGG**T**ACAGTAAAGGCATGAAGC TCAG

[1]DNA는 대문자이고, RNA는 소문자임. X = C3 스페이서(프로판디올) 차단기(blocker group). 불일치(mismatch)의 위치가 합성 주형에서 볼드체 및 밑줄로 표시됨.

[0123]

[0124] **표 8. 실시예 2에 기재된 실험에 대한 Cq 값.**

표 8

RNase H2 효소	역방향 프라이머 명칭	역방향 프라이머 서열번호	Syn A 주형에 대한 C_q	Syn C 주형에 대한 C_q	Syn G 주형에 대한 C_q	Syn T 주형에 대한 C_q
WT (*P.a.*) RNase H2	Syn Rev 미차단	27	26.2	27.5	26.8	27.7
	Syn Rev rA 차단	28	28.8	28.6	32.7	28.2
	Syn Rev rC 차단	29	26.8	29.4	27.2	28.6
	Syn Rev rG 차단	30	37.9	27.6	35.6	33.5
	Syn Rev rU 차단	31	26.4	32.3	36.6	28.8
Q48R SEL29 RNase H2 (Mut ID 7)	Syn Rev 미차단	27	26.7	27.5	27.0	28.1
	Syn Rev rA 차단	28	37.1	39.9	41.5	29.2
	Syn Rev rC 차단	29	35.5	51.6	27.6	40.8
	Syn Rev rG 차단	30	37.1	32.7	39.1	43.7
	Syn Rev rU 차단	31	26.3	46.6	40.3	44.2

[0125]

RNase H2 효소	역방향 프라이머 명칭	역방향 프라이머 서열번호	Syn A 주형에 대한 C_q	Syn C 주형에 대한 C_q	Syn G 주형에 대한 C_q	Syn T 주형에 대한 C_q
WT (*P.a.*) RNase H2	Syn Rev 미차단	27	26.1	26.1	26.8	28.5
	Syn Rev rA 차단	28	28.5	34.7	36.9	26.9
	Syn Rev rC 차단	29	26.8	37.4	26.9	30.9
	Syn Rev rG 차단	30	37.4	28.7	37.6	39.6
	Syn Rev rU 차단	31	26.3	41.9	37.5	31.3

A107V SEL29 RNase H2 (Mut ID 8)	Syn Rev 미차단	27	26.3	26.9	26.7	26.8
	Syn Rev rA 차단	28	39.4	41.6	38.4	27.4
	Syn Rev rC 차단	29	38.9	53.0	27.2	44.6
	Syn Rev rG 차단	30	40.2	31.6	37.7	40.7
	Syn Rev rU 차단	31	26.5	46.9	36.9	40.5

RNase H2 효소	**역방향 프라이머 명칭**	**역방향 프라이머 서열번호**	**Syn A 주형에 대한 C_q**	**Syn C 주형에 대한 C_q**	**Syn G 주형에 대한 C_q**	**Syn T 주형에 대한 C_q**
WT (*P.a.*) RNase H2	Syn Rev 미차단	27	25.2	26.3	25.2	25.6
	Syn Rev rA 차단	28	30.2	26.1	35.0	24.8
	Syn Rev rC 차단	29	25.2	26.3	25.2	25.6
	Syn Rev rG 차단	30	36.0	25.3	35.6	31.6
	Syn Rev rU 차단	31	24.5	28.7	34.5	25.9
SEL29 RNase H2 (Mut ID 2)[1]	Syn Rev 미차단	27	24.4	24.6	24.9	24.7
	Syn Rev rA 차단	28	37.2	38.7	37.2	25.1
	Syn Rev rC 차단	29	37.0	39.6	25.3	36.6
	Syn Rev rG 차단	30	37.9	26.0	36.7	38.6
	Syn Rev rU 차단	31	26.3	39.6	36.4	37.9

[0126]

[0127] 표 9. 실시예 2에 기술된 실험에 대한 ΔCq 값.

표 9

[0128]

RNase H2 효소	역방향 프라이머 명칭	역방향 프라이머 서열번호	Syn A 주형에 대한 ΔC_q	Syn C 주형에 대한 ΔC_q	Syn G 주형에 대한 ΔC_q	Syn T 주형에 대한 ΔC_q
WT (*P.a.*) RNase H2	Syn Rev rA 차단	28	0.6	0.3	4.5	0
	Syn Rev rC 차단	29	−0.4	2.2	0	1.5
	Syn Rev rG 차단	30	10.3	0	8.0	5.9
	Syn Rev rU 차단	31	0	6.0	10.2	2.4
Q48R SEL29 RNase H2 (Mut ID 7)	Syn Rev rA 차단	28	7.9	10.7	12.3	0
	Syn Rev rC 차단	29	8.0	24.1	0	13.2
	Syn Rev rG 차단	30	4.5	0	6.5	11.0
	Syn Rev rU 차단	31	0	20.3	14.0	17.9

[0129]

RNase H2 효소	역방향 프라이머 명칭	역방향 프라이머 서열번호	Syn A 주형에 대한 ΔC_q	Syn C 주형에 대한 ΔC_q	Syn G 주형에 대한 ΔC_q	Syn T 주형에 대한 ΔC_q
WT (*P.a.*) RNase H2	Syn Rev rA 차단	28	1.5	7.7	9.9	0
	Syn Rev rC 차단	29	−0.1	10.5	0	4.0
	Syn Rev rG 차단	30	8.7	0	8.9	10.9
	Syn Rev rU 차단	31	0	15.6	11.2	5.1
A107V SEL29 RNase H2 (Mut ID 8)	Syn Rev rA 차단	28	12.0	14.2	11.0	0
	Syn Rev rC 차단	29	11.7	25.7	0	17.4
	Syn Rev rG 차단	30	8.7	0	6.2	9.1
	Syn Rev rU 차단	31	0	20.4	10.4	14.0

RNase H2 효소	역방향 프라이머 명칭	역방향 프라이머 서열번호	Syn A 주형에 대한 ΔC_q	Syn C 주형에 대한 ΔC_q	Syn G 주형에 대한 ΔC_q	Syn T 주형에 대한 ΔC_q
WT (*P.a.*) RNase H2	Syn Rev rA 차단	28	5.4	1.4	10.3	0
	Syn Rev rC 차단	29	0.0	1.0	0	0.3
	Syn Rev rG 차단	30	10.7	0	10.3	6.3
	Syn Rev rU 차단	31	0	4.2	10.0	1.4
SEL29 RNase H2 (Mut ID 2)	Syn Rev rA 차단	28	12.0	13.5	12.1	0
	Syn Rev rC 차단	29	11.8	14.3	0	11.3
	Syn Rev rG 차단	30	11.9	0	10.7	12.6
	Syn Rev rU 차단	31	0	13.3	10.1	11.6

[0130]

[0131] **표 9**의 ΔCq 값은 각 주형에 대한 뉴클레오티드-특이적 프라이머에 대한 Cq 값과 완벽한 일치 주형에 대한 Cq 값 간의 차이로 계산됨.

[0132] 이 데이터는 Q48R SEL29 및 A107V SEL29 RNase H2에 대해 불일치가 rC의 반대편인 경우, 불일치 식별의 엄청난 증가를 보여준다(각각 ~14.0회 및 ~13.5회 사이클). 특히, Q48R SEL29 및 A107V SEL29 RNase H2에 대해 rC:C 쌍에 대한 불일치 식별의 큰 증가가 있다(각각 21.9회 및 15.2회). 불일치가 rU의 반대편인 경우, Q48R SEL29 RNase H2에 대해 불일치 식별에서 유의한 증가가 있으나(~11.2회), A107V SEL29 RNase H2에 대해서는 덜 유의한 증가가 있다(~4.3회). 불일치가 rA의 반대편인 경우, Q48R SEL29 및 A107V SEL29 RNase H2에 대해 불일치 식별에서 유의한 변화가 있다(각각 ~8.5회 및 ~6.0회). 불일치가 rG의 반대편인 경우, 불일치 식별에 거의 변화가 없고; WT RNase H2를 사용하는 경우 rG 불일치에 대해 이미 다소 우수한 불일치 식별이 있었기 때문에, 이러한 불일치 식별의 변화 결여는 덜 중요하다. Q48R SEL29 및 A107V SEL29 RNase H2에 대한 불일치 식별의 이러한 증가는 백그라운드 SEL29 RNase H2에 대해 보여진 것들과 유사하다. 불일치가 RNA 염기의 정반대편에 위치할 때 두 돌연변이 모두 불일치 식별을 개선하나, 상이한 정도와 상이한 특이성으로 개선한다.

[0133] **실시예 4. Q48R SEL29 및 A107V SEL29 RNase H2는 불일치가 RNA의 5'에 위치할 때 WT RNase H2에 비해 불일치 식별을 증가시킨다.**

[0134] Q48R SEL29 및 A107V SEL29 RNase H2 효소를 사용하여 불일치가 RNA 뉴클레오티드의 5'에 위치할 때 불일치 식별의 정도를 결정하기 위해, RNA의 5'에 바로 위치한 SNP를 이용하여 인간 BRAF 유전자의 V600E SNP인 rs113488022를 표적으로 하는 분석을 설계하였다. 이 분석에 사용된 프라이머가 **표 10**, 서열번호 36-39에 제시된다. 분석은 10 ㎕ 반응 부피로 수행하였다. 온도 순환 및 데이터 수집은 CFX384® Real Time System(Bio-Rad®, Hercules, CA)에서 수행하였다. 요약하면, 200 nM(2 pmol)의 차단된 정방향 프라이머(서열번호 38 또는 39) 및 200 nM(2 pmol)의 미차단 역방향 프라이머(서열번호 37), 또는 200 nM(2 pmol)의 미차단 정방향 프라이머(서열번호 36) 및 200 nM(2 pmol)의 미차단 프라이머(서열번호 37)를 1x iQ™ SYBR® Green Supermix®에 혼합했다. 5 mU 또는 10 mU의 WT(서열번호 1) *P.a.* RNase H2 효소, 5 mU 또는 10 mU의 SEL29(서열번호 3) RNase H2 효소, 20 mU 또는 40 mU의 Q48R SEL29(서열번호 18) RNase H2 효소, 또는 5 mU 또는 10 mU의 A107V SEL29(서열번호 19) RNase H2 효소를 각 반응에 첨가하였다. 각각 rs113488022 SNP에서 동형접합 유전형에 해당하는, 합성 이중 가닥 gBlock®(IDT, Coralville, IA) 주형 (서열번호 40 또는 41) 2,000 카피를 각 반응에 첨가했다. 반응은 3회 수행하였다. 반응은 하기 조건 하에 순환되었다: 95℃$^{3:00}$ → (95℃$^{0:10}$ → 60℃$^{0:30}$) x 65. 각 신장 시점 후에, 삽입된 SYBR® Green에 대한 형광 데이터를 수집하였다. 분석이 완료된 후, 데이터를 분석하고 각 쌍별 조합에 대한 평균 Cq 및 ΔCq 값을 계산했다. 결과가 **표 11**에 제시된다.

[0135] **표 10. 실시예 4에 기재된 실험에 사용된 프라이머 및 주형의 서열 및 서열번호.**

표 10

서열번호	명칭	서열 [1]
36	rs113488022 For 미차단	GTGATTTTGGTCTAGCTACAGT
37	rs113488022 Rev 미차단	CCTCAATTCTTACCATCCACAAA
38	rs113488022 TrG 4dmx	GTGATTTTGGTCTAGCTACAGTgAAATG-x
39	rs113488022 ArG 4dmx	GTGATTTTGGTCTAGCTACAGAgAAATG-x
40	gBlock® T 주형	TAAGAGGAAAGATGAAGTACTATGTTTTAA AGAATATTATATTACAGAATTATAGAAATT AGATCTCTTACCTAAACTCTTCATAATGCTT GCTCTGATAGGAAAATGAGATCTACTGTTT TCCTTTACTTACTACACCTCAGATATATTTC TTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTG ATTTTGGTCTAGCTACAGTGAAATCTCGAT GGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGT CTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTG AGGCTATTTTTCCACTGATTAAATTTTTGGC CCTGAGATGCTGCTGAGTTACTAGAAAGTC ATTGAAGGTCTCAACTATAGTATTTTCATA GTTCCCAGTATTCACAAAAATCAGTGTTCT TATTTTTT
41	gBlock® A 주형	TAAGAGGAAAGATGAAGTACTATGTTTTAA AGAATATTATATTACAGAATTATAGAAATT AGATCTCTTACCTAAACTCTTCATAATGCTT GCTCTGATAGGAAAATGAGATCTACTGTTT TCCTTTACTTACTACACCTCAGATATATTTC TTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTG ATTTTGGTCTAGCTACAGAGAAATCTCGAT GGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGT CTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTG AGGCTATTTTTCCACTGATTAAATTTTTGGC CCTGAGATGCTGCTGAGTTACTAGAAAGTC ATTGAAGGTCTCAACTATAGTATTTTCATA GTTCCCAGTATTCACAAAAATCAGTGTTCT TATTTTTT

[0136]

[0137] [1]DNA는 대문자, RNA는 소문자임. X = C3 스페이서(프로판디올) 차단기 그룹. 불일치의 위치는 gBlocks®에서 볼드체 및 밑줄로 표시됨.

[0138] **표 11. 실시예 4의 실험에 대한 Cq 및 △Cq 값.**

표 11

RNase H2	정방향 프라이머	T 주형	A 주형	ΔC_q	T 주형	A 주형	ΔC_q
		5 mU RNase H2			10 mU RNase H2		
WT	미차단	25.9	26.6	0.7	25.5	26.3	0.9
	TrG	27.6	31.4	3.8	26.5	30.0	3.5
	ArG	38.1	28.0	10.1	37.4	27.4	10.0
A107V SEL29	미차단	25.6	26.2	0.6	25.4	26.1	0.8
	TrG	28.0	35.9	7.8	26.9	34.2	7.3
	ArG	38.7	27.5	11.2	38.9	27.4	11.5

RNase H2	정방향 프라이머	T 주형	A 주형	ΔC_q	T 주형	A 주형	ΔC_q
		5 mU RNase H2			10 mU RNase H2		
WT	미차단	26.0	26.6	0.6	25.4	26.2	0.7
	TrG	27.4	31.9	4.5	26.7	30.3	3.6
	ArG	38.5	27.5	10.9	37.5	27.1	10.4
SEL29	미차단	26.0	26.6	0.5	25.4	26.3	0.9
	TrG	29.1	36.3	7.2	26.9	34.3	7.4
	ArG	39.6	27.8	11.8	38.4	27.5	10.9
		20 mU RNase H2			40 mU RNase H2		
Q48R SEL29	미차단	25.7	26.5	0.9	25.4	26.2	0.8
	TrG	30.1	36.2	6.1	27.8	34.7	6.9
	ArG	38.6	28.0	10.6	37.7	27.5	10.2

[0139]

[0140] 이러한 데이터는 Q48R SEL29 및 A107V SEL29 RNase H2가 RNA 뉴클레오티드의 5' 불일치 식별을 상당히 향상시킨다는 것을 보여준다. TrG 프라이머에 대한 ΔCq 정량화는 WT *P.a.* RNase H2에 의한 3.8회 사이클로부터 A107V SEL29 RNase H2에 의한 5.9회로 증가하고(5 mU의 WT RNase H2 및 A107V SEL29 RNase H2의 경우), WT *P.a.* RNase H2에 의한 4.5회 사이클로부터 Q48R SEL29 RNase H2에 의한 6.9회로 증가한다(5 mU의 WT RNase H2 및 40 mU의 Q48R SEL29 RNase H2의 경우). ArG 프라이머에 대한 ΔCq 정량화는 WT *P.a.* RNase H2에 의한 10.1회 사이클로부터 A107V SEL29 RNase H2에 의한 11.2회로 증가하나(5 mU의 WT RNase H2 및 A107V SEL29 RNase H2의 경우), WT *P.a.* RNase H2에 의한 10.9회 사이클로부터 Q48R SEL29 RNase H2에 의한 10.2회로 감소했다(5 mU의 WT RNase H2 및 40 mU의 Q48R SEL29 RNase H2의 경우). WT 효소를 사용하여 ArG 프라이머에 대해 ΔCq가 이미 다소 효과적이었기 때문에, ArG 프라이머에 의한 불일치 식별의 변화는 덜 중요하다. Q48R SEL29 및 A107V SEL29 RNase H2에 대한 불일치 식별의 이러한 증가는 백그라운드 SEL29 RNase H2에 대한 것과 유사하다. 따라서, 불일치가 RNA 염기의 5'에 위치할 때, Q48R SEL29 및 A107V SEL29 RNase H2는 불일치 식별을 향상시킨다.

[0141] **실시예 5. Q48R SEL29 및 A107V SEL29 RNase H2는 불일치가 RNA의 3'에 위치할 때 WT RNase H2에 비해 불일치 식별을 증가시킨다.**

[0142] Q48R SEL29 및 A107V SEL29 RNase H2 효소가 불일치가 RNA 뉴클레오티드의 3'에 위치할 때 불일치 식별을 개선할 수 있는지 여부를 결정하기 위해, RNA의 바로 3'에 위치한 불일치를 이용하여 rs7583169 및 rs3117947 SNP를 표적으로 하는 분석을 설계하였다. 이 분석에 사용된 프라이머는 **표 12**, 서열번호 42-47에 제시된다. 분석은 10 ㎕ 반응 부피에서 실행되었다. 분석은 10 ㎕ 반응 부피로 수행되었다. 온도 순환 및 데이터 수집은 CFX384® Real Time System(Bio-Rad®, Hercules, CA)에서 수행하였다. 요약하면, 200 nM(2 pmol)의 차단된 정방향 프라이머(서열번호 43 또는 46) 및 200 nM(2 pmol)의 미차단 역방향 프라이머(서열번호 44 또는 47), 또는 200 nM(2 pmol)의 미차단 정방향 프라이머(서열번호 42 또는 45) 및 200 nM(2 pmol)의 미차단 역방향 프라이머(서열번호 44 또는 47)를 3.0 mM(총) $MgCl_2$ 및 0.5x EvaGreen® 염료(Biotium Inc., Fremont, CA)를 포함하는 1x

PrimeTime® Gene Expression Master Mix(IDT, Coralville, IA)에 혼합했다. 5 mU 또는 10 mU의 WT(서열번호 1) *P.a.* RNase H2 효소, 50 mU 또는 100 mU의 Q48R SEL29(서열번호 18) RNase H2 효소, 또는 20 mU 또는 40 mU의 A107V SEL29(서열번호 19) RNase H2 효소를 각 반응에 첨가했다. rs7583169 및 rs3117947 SNP에서 2개의 동형접합 유전형을 나타내는, 게놈 세포주 DNA(세포주 NA12878 및 NA24385, Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ) 20 ng을 각 반응에 첨가하였다. 반응은 3회 수행하고, 결과는 평균하였다. 반응은 하기 조건에서 순환되었다: $95℃^{3:00}$ → ($95℃^{0:10}$ → $60℃^{0:30}$) x 65. 각 신장 시점 후에, 삽입된 SYBR® Green에 대한 형광 데이터를 수집하였다. 분석이 완료된 후, 데이터를 분석하고, 각 쌍별 조합에 대한 평균 Cq 및 ΔCq 값을 계산했다. 결과는 **표 13**에 제시된다.

[0143] **표 12. 실시예 5에 기재된 실험에 사용된 프라이머의 서열 및 서열번호.**

표 12

서열번호	명칭	서열 [1]
42	rs7583169 For unblocked	GGCAGATTTTCTTCTGCACCGCG
43	rs7583169 For blocked	GGCAGATTTTCTTCTGCACCGCgGT-X-TC-X
44	rs7583169 Rev unblocked	TCCCGTCGAGCACCAGCAATTTTACTC
45	rs3117947 For unblocked	CTTTGGATAAGGAAGAAGCCAACT
46	rs3117947 For blocked	CTTTGGATAAGGAAGAAGCCAACuGC-X-AG-X
47	rs3117947 Rev unblocked	GGGAGCTTGAAATGAACAAGGTGAGAAG

[1]DNA 대문자, RNA 는 소문자임. X = C3 스페이서(프로판디올) 차단기 그룹.

[0144] 불일치의 위치는 qBlocks®에서 볼드체 및 밑줄로 표시됨.

[0145] **표 13. 실시예 5의 실험에 대한 Cq 및 △Cq 값.**

표 13

RNase H2	SNP	정방향 프라이머 서열번호	NA 12878	NA 24385	ΔC_q	NA 12878	NA 24385	ΔC_q
			5 mU RNase H2			10 mU RNase H2		
WT	rs7583169	42	25.3	25.1	-0.2	24.8	24.6	-0.2
		43	26.1	26.1	0.0	25.2	25.2	-0.1
	rs3117947	45	25.9	25.3	-0.6	24.9	24.7	-0.2
		46	28.0	38.7	10.7	26.2	32.6	6.3
SEL29 (Mut ID 2)	rs7583169	42	25.0	25.6	0.6	24.7	25.2	0.4
		43	26.0	30.5	4.5	25.5	28.2	2.8
	rs3117947	45	25.1	24.7	-0.5	25.0	25.1	0.1
		46	26.7	40.9	14.2	26.3	37.9	11.6
			20 mU RNase H2			40 mU RNase H2		
A107V SEL29 (Mut ID 8)	rs7583169	42	25.0	24.9	-0.2	24.6	24.8	0.2
		43	25.5	28.1	2.6	25.1	26.5	1.4
	rs3117947	45	25.3	25.2	-0.1	24.7	24.9	0.1
		46	32.2	52.2	20.0	28.6	50.9	22.3
			50 mU RNase H2			100 mU RNase H2		
Q48R SEL29 (Mut ID 7)	rs7583169	42	25.2	24.9	-0.3	25.1	24.9	-0.2
		43	25.9	44.5	18.6	25.3	36.8	11.5
	rs3117947	45	25.4	25.5	0.1	25.1	24.9	-0.2
		46	32.8	55.0	22.2	28.6	49.0	20.4

[0146]

[0147] **표 13**의 ΔCq 값은 불일치 주형(NA24385)에 대한 Cq 값과 일치하는 주형(NA12878)에 대한 Cq 값 간의 차이로 계산됨. SEL29 RNase H2에 대한 데이터는 이전에 수집되었음.

[0148] 이 데이터는 Q48R SEL29 및 A107V SEL29 RNase H2가 RNA 뉴클레오티드의 3' 불일치 식별을 상당히 증가시킨다는 것을 보여준다. rs7583169 SNP에 대한 불일치 식별의 △Cq 정량화는 WT *P.a.* RNase H2에 의한 0.0회 사이클로부터 A107V SEL29 RNase H2에 의한 1.4회로 증가하고(5 mU의 WT RNase H2 및 40 mU의 A107V SEL29 RNase H2의 경우), WT *P.a.* RNase H2에 의한 0.0회 사이클로부터 Q48R SEL29 RNase H2에 의한 11.5회로 증가한다(5 mU의 WT RNase H2 및 100 mU의 Q48R SEL29 RNase H2의 경우). rs3117947 SNP에 대한 불일치 식별의 △Cq 정량화는 WT *P.a.* RNase H2에 의한 10.7회 사이클로부터 A107V SEL29 RNase H2에 의한 22.3회로 증가하고(5 mU의 WT RNase H2 및 40 mU의 A107V SEL29 RNase H2의 경우), WT *P.a.* RNase H2에 의한 10.7회 사이클로부터 Q48R SEL29 RNase H2에 의한 20.4회로 증가한다(5 mU의 WT RNase H2 및 100 mU의 Q48R SEL29 RNase H2의 경우). Q48R SEL29 및 A107V SEL29 RNase H2에 대한 불일치 식별의 이러한 증가는 백그라운드 SEL29 RNase H2에 대한 것보다 훨씬 크다. 따라서, 불일치가 RNA 염기의 3'에 위치할 때, Q48R SEL29 및 A107V SEL29 RNase H2는 불일치 식별을 향상시킨다.

[0149] **실시예 6. LAMP 반응에서 Q48R SEL29 및 A107V SEL29 하이브리드 RNase H2 단백질의 사용.**

[0150] 본 실시예는 프라이머-이량체 형성을 감소시키기 위한 LAMP 반응에서 하이브리드 RNase H2 단백질의 용도를 입증하는 방법의 개요를 설명한다.

[0151] 상이한 RNase H2 단백질(WT 또는 하이브리드 RNase H2 단백질)을 포함하는 LAMP 프로토콜에 대한 rhPrimer의 기능을 평가하기 위해, (1) 비변형 대조군 프라이머(unmodified control primer); "r"은 RNA 염기이고, "D"는 DNA 염기이며, "m"은 불일치이고, "x"는 C3 스페이서인 것인 "Gen1" rDDDDMx 프라이머; 및 "Gen2" rDxxDM 프라이머를 이용하여 3개의 분석을 설계할 수 있었다. 평가에 사용되는 분석의 세부 사항은 **표 14**, **15** 및 **16**에 상술된다. 각 유형의 프라이머를 사용한 LAMP 반응은 테스트 전 0 또는 2시간 동안 25℃(실온)에서 유지될 것이다. 이는 프라이머-이량체 산물의 형성을 허용할 것이다. 실온 유지 후, 모든 반응은 BioRad CFX384 또는 Roche LightCycler 480에서 65℃에서 2시간 동안 수행될 것이다. 이러한 모든 반응에서 신호 생성은 반응에 첨가된 1x EvaGreen으로 수행될 것이다(*Biotechnology Letters*, December 2007, Volume 29, Issue 12, pp 1939-1946 참조).

[0152] **표 14: 비변형 대조군 프라이머(controlled unmodified primer) 디자인.**

표 14

서열 번호	명칭	서열
48	FIP-lambda	CAGCCAGCCGCAGCACGTTCGCTCATAGGAGATATGGTAGA GCCGC
49	BIP-lambda	GAGAGAATTTGTACCACCTCCCACCGGGCACATAGCAGTCCT AGGGACAGT
50	E3-lambda	GGCTTGGCTCTGCTAACACGTT
51	B3-lambda	GGACGTTTGTAATGTCCGCTCC
52	rhLAMP Probe-lambda	F-ACGTGCTGCGgCTGGCTGGT-Q
53	FIP-hCFTR	CCAAAGAGTAAAGTCCTTCTCTCTCGAGAGACTGTTGG CCCTTGAAGG
54	BIP-hCFTR	GTGTTGATGTTATCCACCTTTTGTGGACTAGGAAAACA GATCAATAG
55	E3-hCFTR	TAATCCTGGAACTCCGGTGC
56	B3-hCFTR	TTTATGCCAATTAACATTTTGAC
57	rhLAMP Probe-hCFTR	F-CCTCCCTGTGGATgAGAGAGAAGG-Q

DNA 염기는 대문자이고; RNA 염기는 소문자임. F = 6-카르복시플루오레세인;

Q = Iowa Black™ FQ 형광 퀀처(fluorescence quencher).

[0153]

[0154] 표 15: Gen1 프라이머 디자인.

표 15

서열 번호	명칭	서열
58	FIP-lambda	CAGCCAGCCGCAGCACGTTCGCTCATAGGAGATATGGTAGA GCCGCaGACAG-X
59	BIP-lambda	GAGAGAATTTGTACCACCTCCCACCGGGCACATAGCAGTCCT AGGGACAGTgGCGTT-X
60	E3-lambda	GGCTTGGCTCTGCTAACACGTTgCTCAA-X
61	B3-lambda	GGACGTTTGTAATGTCCGCTCCgGCACT-X
62	rhLAMP Probe-lambda	F-ACGTGCTGCGgCTGGCTGGT-Q
63	FIP-hCFTR	CCAAAGAGTAAAGTCCTTCTCTCTCGAGAGACTGTTGGCCCT TGAAGGaGAGCA-X
64	BIP-hCFTR	GTGTTGATGTTATCCACCTTTTGTGGACTAGGAAAACAGATC AATAGaTAAGC-X
65	E3-hCFTR	TAATCCTGGAACTCCGGTGCuAAGGT-X
66	B3-hCFTR	TTTATGCCAATTAACATTTTGACuTTATT-X
67	rhLAMP Probe-hCFTR	F-CCTCCCTGTGGATgAGAGAGAAGG-Q

DNA 염기는 대문자이고; RNA 염기는 소문자임. F = 6-카르복시플루오레세인;

[0155] Q = Iowa Black™ FQ 형광 퀀처(fluorescence quencher). X = C3 스페이서.

[0156] 표 16: GEN2 프라이머 디자인.

표 16

서열 번호	명칭	서열
68	FIP-lambda	CAGCCAGCCGCAGCACGTTCGCTCATAGGAGATATGGTAGA GCCGCaG-X-X-AG
69	BIP-lambda	GAGAGAATTTGTACCACCTCCCACCGGGCACATAGCAGTCCT AGGGACAGTgG-X-X-TT
70	E3-lambda	GGCTTGGCTCTGCTAACACGTTgC-X-X-AA
71	B3-lambda	GGACGTTTGTAATGTCCGCTCCgG-X-X-CT
72	rhLAMP Probe-lambda	F-ACGTGCTGCGgCTGGCTGGT-Q
73	FIP-hCFTR	CCAAAGAGTAAAGTCCTTCTCTCTCGAGAGACTGTTGGCCCT TGAAGGaG-X-X-CA
74	BIP-hCFTR	GTGTTGATGTTATCCACCTTTTGTGGACTAGGAAAACAGATC AATAGaT-X-X-GC
75	E3-hCFTR	TAATCCTGGAACTCCGGTGCuA-X-X-GT
76	B3-hCFTR	TTTATGCCAATTAACATTTTGACuT-X-X-TT
77	rhLAMP Probe-hCFTR	F-CCTCCCTGTGGATgAGAGAGAAGG-Q

DNA 염기는 대문자이고; RNA 염기는 소문자임. F = 6-카르복시플루오레세인; Q = Iowa Black™ FQ 형광 퀀처(fluorescence quencher). X = C3 스페이서.

[0157]

[0158] 각 분석은 하기와 같이 수행할 수 있다: 샘플은 Coriell gDNA 또는 Lambda 파아지 게놈 DNA일 것이다. 각 분석 조건은 5 ng Lambda 파아지 게놈 DNA 또는 20ng 인간 게놈 DNA의 샘플 인풋으로 3중으로 실행될 수 있다. 각 분석에 대해, 인터칼레이팅 염료(intercalating dye)(예를 들면, EvaGreen)를 갖는 비변형 프라이머, 및 인터칼레이팅 염료를 갖는, 절단가능하고, 차단된 프라이머를 사용하여 반응을 실행할 수 있다. 각 분석에 대해, 반응은 0 또는 적정된(titrated) 수준의 RNase H2(WT 또는 하이브리드 RNase H2 단백질)를 사용하여 수행될 것이다.

[0159] 각 분석은 3회 수행될 것이다. 비변형 LAMP 분석과 변형된 LAMP 분석 간의 비교는 신호-생성 산물의 형성에 필요한 시간의 길이를 비교하는 것에 의해 수행될 것이다. LAMP 반응에서 하이브리드 RNase H2 단백질은 기존의 야생형 RNase H2 단백질을 포함하는 반응보다 상당히 늦게 이러한 산물을 생성할 것으로 예상된다.

[0160] 25 ㎕ EvaGreen 반응 혼합물은 하기를 포함할 것이다:

[0161] 12.5 ㎕의 2X 마스터 믹스(1x는 20 mM Tris pH 8.8 @25℃, 10mM KCl, 10mM $(NH_4)_2SO_4$, 8mM $MgSO_4$, 0.01% Tween-20, 1.4mM dNTPs임)

[0162] 1.6 μM FIP 프라이머

[0163] 1.6 μM BIP 프라이머

[0164] 1x EvaGreen 염료

[0165] 0.2 μM F3 프라이머

[0166] 0.2 μM B3 프라이머

[0167] 8 U BST DNA 폴리머라아제 (New England Biolabs: https://www.neb.com/products/m0275-bst-dna-polymerase-

large-fragment)

[0168] 1 ㎕의 하이브리드 RNase H2 단백질(RNase H2 대조군이 없는 경우, 완충액 D가 사용됨)

[0169] 뉴클레아제 불포함 물(Nuclease Free Water) 25 ㎕가 되게 하는 양

[0170] 2 ㎕ 샘플(10 ng/㎕ 인간 gDNA 또는 2.5 ng/㎕ 람다 게놈 DNA)

[0171] **실시예 7. Q48R SEL29 RNase H2는 177-플렉스 분석 패널을 사용한 다중 rhPCR 앰플리콘 시퀀싱 워크플로에서 야생형 *P.a.* RNase H2에 비해 NGS 라이브러리의 품질을 향상시킨다.**

[0172] 저빈도 변이체 검출을 위해 변형된 rhAmpSeq 프로토콜을 개조시켰다. 이 프로토콜은 증폭 오류를 감소시키는 고-충실도 DNA 폴리머라아제 및 오류 교정(error correction)을 위한 UMI(unique molecular identifier)를 사용한다. 이 시스템에서 이량체 형성이 감소되는지 여부를 결정하기 위해 Q48R SEL29 RNase H2를 야생형 *P.a.* RNase H2와 비교했다.

[0173] 각 단계 후, SPRI(Solid Phase Reversible Immobilization, Beckman Coulter Life sciences, Indianapolis, IN) 클린업을 포함하는 2개의 PCR 순환 단계가 있다. 제1 PCR 단계(PCR 1)의 목적은 표적 앰플리콘의 각 측면에 6-뉴클레오티드 축퇴 UMI를 통합하는 것이다. 이 단계는 또한 3'-차단 프라이머의 사용을 포함하고, 차단제를 절단하고, 고-충실도 DNA 폴리머라아제가 각 표적을 신장하고 증폭할 수 있게 하기 위해 RNase H2를 필요로 한다. 표적-특이적 분석 패널은 177개의 전용(proprietary) 프라이머 쌍을 포함하고, 야생형 *P.a.* RNase H2가 PCR1에 존재하는 경우, 총 리드(read)의 약 20%가 프라이머 이량체가 된다. 이 패널은 다량의 프라이머 이량체를 생성하여, Q48R SEL29 RNase H2 테스트에 최적이다.

[0174] RNase H2 저장 완충액(Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) 중에 Q48R SEL29 RNase H2 및 야생형 *P.a.* RNase H2의 다양한 10X 적정 농도 (titration)(87.5 mU/㎕, 175 mU/㎕ 및 350 mU/㎕)를 제조했다. 각 PCR 1 반응은 최종 부피가 20 ㎕였으며 각각의 정방향 및 역방향 프라이머 10 nM(200 fmol), 0.03U/㎕ Phusion Hot Start II DNA Polymerase(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), 20ng의 게놈 세포주 DNA(세포주 NA24385, Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ), 및 전용 고-충실도 폴리머라아제 완충액 중 RNase H2의 1X 최종 농도를 포함했다. 온도 순환은 **표 17**에 열거된 순환 조건으로 T100 Thermal Cycler(Bio-Rad®, Hercules, CA)에서 수행하였다. PCR1 온도 순환 후 즉시 SPRI 클린업이 이어졌다. 1.25X(25 ㎕)의 AMPure 자성 비드(Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, IN)를 각 웰에 첨가하고 완전히 혼합했다. 플레이트를 벤치탑에서 5분 동안 실온에서 인큐베이션하고, 이어서 자석에서 5분 동안 인큐베이션했다. 상층액을 버리고 라이브러리를 80% 에탄올로 2회 세척했다. 샘플을 22 ㎕의 IDTE pH 7.5(IDT, Coralville, IA)로 용리시켰다. 20 ㎕의 용리된 산물을 PCR2에 대한 인풋으로 이용했다.

[0175] **표 17. PCR 1 순환 조건.**

표 17

[0176]

	사이클	온도(℃)	시간
효소활성화	1	95℃	10분
증폭	2	95℃	15초
		60℃	12분
유지(hold)	1	4℃	∞ 유지

[0177] 제2 PCR 단계(PCR 2)의 목적은 PCR 1 산물을 증폭하고 풀링(pooling) 및 시퀀싱 목적을 위해 고유한 샘플 인덱스 서열을 첨가하는 것이었다. PCR 2는 RNase H2의 사용을 필요로 하지 않는다. PCR 2 반응은 50 ㎕ 최종 부피에서 수행되었다. PCR 1에서 사용된 고-충실도 폴리머라아제 완충액의 2X 버전을 최종 1X 농도를 위해 PCR 1에서 용리된 각 샘플에 첨가했다. 각 반응은 또한 각각 500 nM의 i5 및 i7 rhAmpSeq 인덱스 프라이머(IDT)의 고유한 조합을 가졌다. 온도 순환은 **표 18**에 나열된 순환 조건으로 T100 Thermal Cycler(Bio-Rad®, Hercules, CA)에서 수행하였다. SPRI 클린업이 PCR 2 직후에 수행되며, PCR 2 후 0.9X에서 사용된 AMPure 비드 농도를 제외하고는, 앞서 나열된 방법과 동일하다. 샘플을 22 ㎕의 IDTE pH 7.5(IDT, Coralville, IA)로 용리시켰다. 20 ㎕의 용리된 생성물을 취하여 시퀀싱할 때까지 -20℃에서 보관했다.

[0178] **표 18. PCR 2 순환 조건.**

표 18

[0179]

	사이클	온도(℃)	시간
효소 활성화	1	95℃	30초
증폭	22	95℃	15초
		60℃	30초
		72℃	30초
최종 신장	1	72℃	1분
유지	1	4℃	∞ 유지

[0180] 결과적으로 수득된 라이브러리를 시퀀싱을 위해 동일한 부피(5 ㎕)로 풀링했다. Qubit dsDNA HS 분석 키트(Thermo Fisher)를 사용하여 이 풀을 정량하고, 4 nM 최종 농도로 희석했다. 동량의 라이브러리 풀을 0.2N NaOH와 조합하여 라이브러리를 변성시켰다. 이 반응을 뒤이어 2.5% PhiX(Illumina, San Diego, CA) 스파이크-인(spike-in)을 포함하는 8 pM의 최종 농도까지 희석했다. 이 반응액을 MiSeq 300 사이클 키트(Illumina, San Diego, CA)에 로딩하고 실행시켰다(클러스터 밀도(cluster density): 1002 ± 34; Q30: 93.13%). 결과를 내부 전용 IDT rhAmpSeq VII 생물정보학 분석 파이프라인을 통해 실행시켰다.

[0181] 본 개시의 목적을 위해, 하기 결과와 관련된 계산 및 용어가 여기에 열거된다. 시퀀싱 라이브러리의 증폭 동안 생성된 프라이머 이량체의 양은 이량체 비율(dimer rate)로 정의된다. rhAmpSeq VII 파이프라인은 확인된 이량체의 전체 총수(count)를 취하고, QC 통과 리드의 갯수(순도 필터(chastity)를 통과한 리드의 총 갯수)로 나누어 이를 계산한다. 맵핑률(mapping rate)은 맵핑된 리드의 총 갯수를 취하고 QC 통과 리드로 나누는 것에 의해 계산한다. 온-타겟률(on target rate)은 온-타겟 리드의 총 갯수를 취하고 QC 통과 리드로 나누는 것에 의해 계산한다. 전체 앰플리콘 균일성(overall amplicon uniformity) 또는 앰플리콘 균일성 ≥ 0.2X는 앰플리콘 평균 커버리지(amplicon mean coverage)의 0.2배 이상인 정상 앰플리콘의 백분율로 계산된다. 탈락률(dropout rate) 또는 균일성 ≤ 0.05X는 앰플리콘 평균 커버리지의 0.05배 미만인 정상 앰플리콘의 백분율로 계산된다. 앰플리콘 균일성 분포는 주어진 샘플에 대한 평균 앰플리콘 커버리지 대비 각 앰플리콘의 커버리지를 비교하고, 0.1-0.2X, 0.2-0.5X, 0.5-1.5X, 1.5-2.5X 및 2.5-5X 범위로 도시한다(plot).

[0182] 또한, rhAmpSeq VII 파이프라인은 각 프라이머 이량체의 형성에 기여하는 프라이머를 식별한다. 정규화된 이량체 총수는 각 프라이머 이량체가 총 이량체 비율(total dimer rate)에 기여하는 백분율을 반영하고, 하기 공식을 이용하여 계산된다:

[0183]
$$\text{정규화된 이량체 총수 (Normalized Dimer Count)} = \frac{\text{이량체 중량} * \text{샘플당 총 이량체 리드}}{\text{샘플당 총 리드 (Total Reads per Sample)}}$$

[0184] 테스트한 모든 농도에서, Q48R SEL29 RNase H2는 야생형 *P.a.* RNase H2에 비해 이량체 비율을 감소시키고, 맵핑률 및 온-타겟률을 증가시켰다. 가장 낮은 농도(8.75 mU/㎕)에서, Q48R SEL29 RNase H2는 11% 이량체를 생성한 대조군 야생형 *P.a.* RNase H2와 비교하여, 4% 이량체를 포함하는 라이브러리를 생성했다(**도 1, 패널 A**).

[0185] 가장 낮은 농도의 Q48R SEL29 RNase H2(8.75 mU/㎕)로 생성된 라이브러리의 맵핑률 및 온-타겟률은 야생형 *P.a.* RNase H2의 88%에 비해 96%로 증가했다(**도 1, 패널 B 및 C**).

[0186] 이량체 비율은 생성된 개별 프라이머 이량체로 분해될 수 있고, 그 후, 전술된 바와 같이 전체 이량체 비율에 대한 각 프라이머 이량체의 기여도를 결정하기 위해 정규화될 수 있다(정규화된 이량체 총수). Q48R SEL29 RNase H2는 대부분의 프라이머 이량체의 양을 절반으로 감소시킨다. 예를 들어, Q48R Mut 29 RNase H2의 가장 낮은 농도(8.75 mU/㎕)로 생성된 라이브러리에서, 모든 샘플 라이브러리(*NOTCH1_19.GAP95.9623.relax.t0_FOR:NOTCH1_9.GAP104.1246.relax.t0_REV*)에서 확인된 상위 이량체(top dimer)는 2.83%의 야생형 *P.a.* RNase H2에 비해 단지 전체 이합체 비율의 1.23%를 차지한다. *undetermined:TERT_15.GAP27.511.relax.t0_REV*의 경우, 일부 이합체는 절반보다 더 많이 이상 감소한다. Q48R SEL29 RNase H2 라이브러리는 야생형 *P.a.* RNase H2에 비해 0.11%에서 75% 더 적은 이량체를 생성하고, 이 이량체는 전체 이량체 비율에 0.47% 기여한다(**표 19 및 도 2**).

[0187] **표 19. 실시예 1에 기술된 확인된 프라이머 쌍 당 정규화된 이량체 총수.**

표 19

	야생형 P.a. RNase H2	**Q48R SEL29 *RNase H2***
프라이머 쌍	**8.75 mU/μL RN2**	**8.75 mU/μL RN2**
NOTCH1_19.GAP95.9623.relax.t0_FOR: NOTCH1_9.GAP104.1246.relax.t0_REV	2.83%	1.23%
NOTCH1_5.413.t0_FOR: NOTCH1_3.GAP109.4611.relax.t0_REV	1.65%	0.63%
미결정(undermined): TERT_1,TERT_promoter_1.GAP34.2454.relax.t0_REV	0.63%	0.32%
undetermined: TERT_15.GAP27.511.relax.t0_REV	0.47%	0.11%
undetermined: NOTCH1_9.GAP104.1246.relax.t0_REV	0.61%	0.29%
MET_1.4348.t0_FOR: TERT_2.GAP30.2127.relax.t0_REV	0.38%	0.16%
APC_1.342.t0_FOR: undetermined	0.21%	미검출
undetermined: TERT_2.GAP32.29.relax.t0_REV	0.20%	0.07%
NOTCH1_30,NOTCH1_29.GAP81.2618.relax.t0_FOR TERT_15.GAP27.511.relax.t0_REV	0.18%	0.03%
undetermined: MET_1.8919.t0_REV	0.12%	0.06%
TERT_2.GAP30.2127.relax.t0_FOR: undetermined	0.13%	0.06%
MYCN_1.GAP7.2462.relax.t0_FOR: undetermined	0.13%	0.05%
EGFR_19.492.t0_FOR: TERT_15.GAP27.511.relax.t0_REV	0.10%	미검출
EGFR_25.1333.t0_FOR: TERT_15.GAP27.511.relax.t0_REV	0.10%	미검출
NOTCH1_17.GAP97.178.relax.t0_FOR: undetermined	0.13%	0.15%
TERT_7.69.t0_FOR: MYC_2.884.t0_REV	0.07%	0.07%
NOTCH1_34.GAP74.1722.relax.t0_FOR:	0.07%	0.03%

[0188]

	야생형 P.a. RNase H2	**Q48R SEL29 *RNase H2***
프라이머 쌍	**8.75 mU/μL RN2**	**8.75 mU/μL RN2**
undetermined		
MET_1.9844.t0_FOR: MET_1.8919.t0_REV	0.12%	0.08%
MET_1.4348.t0_FOR: NOTCH1_6.1377.t0_FOR	0.09%	0.04%
TERT_7.69.t0_FOR: MYCL_2.GAP2.2394.relax.t0_REV	미검출	0.06%
undetermined: NOTCH1_12,NOTCH1_11.207.t0_REV	미검출	0.03%
NOTCH1_19.GAP95.9623.relax.t0_FOR: NOTCH1_2.45.t0_REV	0.06%	0.05%
DNMT3B_15.337.t0_REV: DNMT3B_15.337.t0_REV	미검출	0.06%
MAP3K1_1.GAP39.5178.relax.t0_FOR: TERT_2.GAP33.6839.relax.t0_REV	미검출	0.06%
TERT_1,TERT_promoter_1.GAP34.14490.relax.t0_FOR: undetermined	미검출	0.05%
TERT_5.GAP29.1338.relax.t0_FOR: undetermined	미검출	0.07%
undetermined: NOTCH1_6.1377.t0_REV	0.09%	0.10%
undetermined: NOTCH1_8.381.t0_REV	미검출	0.06%
undetermined: NOTCH1_22.GAP94.2342.relax.t0_REV	미검출	0.09%
undetermined: TERT_2.GAP31.8317.relax.t0_REV	0.10%	0.13%
undetermined: undetermined	0.10%	0.04%

[0189]

[0190] Q48R SEL29 RNase H2가 이합체 비율을 감소시키는 능력은 라이브러리 수율, 전체 균일성 및 탈락률, 또는 균일성 분포 지표(uniformity distribution index)에 영향을 미치지 않는다. 앰플리콘 평균 커버리지에 의해 입증된 바와 같이, Q48R SEL29 RNase H2는 야생형 *P.a.* RNase H2 효소와 비교하여 테스트한 모든 적정 농도에서 유사한 라이브러리 수율을 생성한다(**도 3, 패널 A**). 또한, 테스트한 모든 적정 농도에서, 전체 앰플리콘 균일성 ≥ 0.2X 및 앰플리콘 탈락률(앰플리콘 균일성 ≤ 0.05X)은 Q48R SEL29 RNase H2와 야생형 *P.a.* 효소 간에 유사하다(**도 3, 패널 B 및 C**). 또한, Q48R SEL29와 야생형 *P.a.* RNase H2 간에 균일성 분포는 유사해 보인다(**도 4**). 다른 중요한 시퀀싱 지표를 변경시키지 않으면서, rhAmpseq 워크플로우에서 라이브러리 생성 동안, Q48R SEL29 RNase H2는 표준 야생형 *P.a.* RNase H2에 비해 프라이머 이량체 형성을 감소시킨다.

[0191] 함께, 이 데이터는 Q48R SEL29 RNase H2가 고-충실도 완충액에서 고-충실도 DNA 폴리머라아제를 사용하여 멀티플렉스 차세대 시퀀싱 라이브러리의 생성을 개선한다는 것을 보여준다.

[0192] **실시예 8. RNase H2 단백질을 코딩하는 예시적인 아미노산 및 핵산 서열.**

[0193] RNase H2 단백질을 코딩하는 예시적인 아미노산 및 핵산 서열이 하기에 제시된다.

[0194] **표 20. 전술된 RNase H2 단백질을 코딩하는 핵산 서열.**

표 20

Mut ID #	서열 번호	특이적 AA 변화	서열 [1]
N/A	78	WT *P.a.* RNase H2	ATGAAAGTTGCAGGTGCAGATGAAGCTGGTC GTGGTCCAGTTATTGGTCCGCTGGTTATTGTT GCTGCTGTTGTGGAGGAAGACAAAATCCGCT CTCTGACTAAGCTGGGTGTTAAAGACTCCAAA CAGCTGACCCCGGCGCAACGTGAAAAACTGT TCGATGAAATCGTAAAAGTACTGGATGATTAC TCTGTGGTCATTGTGTCCCCGCAGGACATTGA CGGTCGTAAGGGCAGCATGAACGAACTGGAG GTAGAAAACTTCGTTAAAGCCCTGAATAGCCT GAAAGTTAAGCCGGAAGTTATTTACATTGATT CCGCTGATGTTAAAGCTGAACGTTTCGCTGAA AACATTCGCAGCCGTCTGGCGTACGAAGCGA AAGTTGTAGCCGAACATAAAGCGGATGCGAA GTATGAGATCGTATCCGCAGCCTCTATCCTGG CAAAAGTTATCCGTGACCGCGAGATCGAAAA GCTGAAAGCCGAATACGGTGATTTTGGTTCCG GTTACCCGTCTGATCCGCGTACTAAGAAATGG CTGGAAGAATGGTATAGCAAACACGGCAATT TCCCGCCGATCGTGCGTCGTACTTGGGATACT GCAAAGAAAATCGAAGAAAAATTCAAACGTG CGCAGCTGACCCTGGACAACTTCCTGAAGCGT TTTCGCAAC*AAGCTTGCGGCCGCACTCGAGATC* *AAACGGGCTAGCCAGCCAGAACTCGCCCCGGAA* *GACCCCGAGGATGTCGAGCACCACCACCACCAC* *CACTGA*
1	79	SEL28 RNase H2	ATGAAAGTTGCAGGTGCAGATGAAGCTGGTC GTGGTCCAGTTATTGGTCCGCTGGTTATTGTT GCTGCTGTTGTGGATGAAAACAGTCTCCCCAA GCTGGAAGAGCTGAAAGTTAGAGACTCCAAA AAGCTGACCCCGAAGCGACGTGAAAAACTGT TCGATGAAATCGTAAAAGTACTGGATGATTAC TCTGTGGTCATTGTGTCCCCGCAGGACATTGA CGGTCGTAAGGGCAGCATGAACGAACTGGAG GTAGAAAACTTCGTTAAAGCCCTGAATAGCCT GAAAGTTAAGCCGGATGTTATTTACGCTGATG CCGCTGATGTTGATGAAGAACGTTTCGCTAGA GAGCTTGGCGAGCGTCTGAACTTCGAAGCGG AAGTTGTAGCCAAACATAAAGCGGATGACAT CTTTCCGGTCGTATCCGCAGCCTCTATCCTGG CAAAAGTTATCCGTGACCGCGAGATCGAAAA GCTGAAAGCCGAATACGGTGATTTTGGTTCCG GTTACCCGTCTGATCCGCGTACTAAGAAATGG CTGGAAGAATGGTATAGCAAACACGGCAATT TCCCGCCGATCGTGCGTCGTACTTGGGATACT GCAAAGAAAATCGAAGAAAAATTCAAACGTG

[0195]

Mut ID #	서열 번호	특이적 AA 변화	서열 [1]
			CGCAGCTGACCCTGGACAAGTTCTTCAAGAA ACCT*AAGCTTGCGGCCGCACTCGAGATCAAACG* *GGCTAGCCAGCCAGAACTCGCCCCGGAAGACCC* *CGAGGATGTCGAGCACCACCACCACCACCACTG* *A*
2	80	SEL29 RNase H2	ATGAAAGTTGCAGGTATAGATGAAGCTGGTC GTGGTCCAGCTATTGGTCCGCTGGTTATTGTT GCTGCTGTTGTGGATGAAAACAGTCTCCCCAA GCTGGAAGAGCTGAAAGTTAGAGACTCCAAA AAGCTGACCCCGGCGCAACGTGAAAAACTGT TCGATGAAATCGTAAAAGTACTGGATGATTAC TCTGTGGTCATTGTGTCCCCGCAGGACATTGA CGGTCGTAAGGGCAGCATGAACGAACTGGAG GTAGAAAACTTCGTTAAAGCCCTGAATAGCCT GAAAGTTAAGCCGGATGTTATTTACGCTGATG CCGCTGATGTTGATGAAGAACGTTTCGCTAGA GAGCTTGGCGAGCGTCTGAACTTCGAAGCGA AAGTTGTAGCCGAACATAAAGCGGATGCGAA GTATGAGATCGTATCCGCAGCCTCTATCCTGG CAAAAGTTATCCGTGACCGCGAGATCGAAAA GCTGAAAGCCGAATACGGTGATTTTGGTTCCG GTTACCCGTCTGATCCGCGTACTAGGGCATTC CTGGAAAATTACTATAGAGAACACGGCGAAT TCCCGCCGATCGTGCGTAAAGGTTGGAAGACT CTAAAGAAAATCGCAGAAAAAGTCGAAAGTG AGAAGAAGGCTGAGGAACGGCAGGCGACCCT GGACAGGTACTTCAGGAAGGTT*AAGCTTGCGG* *CCGCACTCGAGATCAAACGGGCTAGCCAGCCAG* *AACTCGCCCCGGAAGACCCCGAGGATGTCGAGC* *ACCACCACCACCACCACTGA*
3	81	P13S SEL28 RNase H2	ATGAAAGTTGCAGGTGCAGATGAAGCTGGTC GTGGT**TCT**GTTATTGGTCCGCTGGTTATTGTT GCTGCTGTTGTGGATGAAAACAGTCTCCCCAA GCTGGAAGAGCTGAAAGTTAGAGACTCCAAA AAGCTGACCCCGAAGCGACGTGAAAAACTGT TCGATGAAATCGTAAAAGTACTGGATGATTAC TCTGTGGTCATTGTGTCCCCGCAGGACATTGA CGGTCGTAAGGGCAGCATGAACGAACTGGAG GTAGAAAACTTCGTTAAAGCCCTGAATAGCCT GAAAGTTAAGCCGGATGTTATTTACGCTGATG CCGCTGATGTTGATGAAGAACGTTTCGCTAGA GAGCTTGGCGAGCGTCTGAACTTCGAAGCGG AAGTTGTAGCCAAACATAAAGCGGATGACAT CTTTCCGGTCGTATCCGCAGCCTCTATCCTGG CAAAAGTTATCCGTGACCGCGAGATCGAAAA GCTGAAAGCCGAATACGGTGATTTTGGTTCCG GTTACCCGTCTGATCCGCGTACTAAGAAATGG

[0196]

[0197]

Mut ID #	서열 번호	특이적 AA 변화	서열 [1]
			CTGGAAGAATGGTATAGCAAACACGGCAATT TCCCGCCGATCGTGCGTCGTACTTGGGATACT GCAAAGAAAATCGAAGAAAAATTCAAACGTG CGCAGCTGACCCTGGACAAGTTCTTCAAGAA ACCT*AAGCTTGCGGCCGCACTCGAGATCAAACG* *GGCTAGCCAGCCAGAACTCGCCCCGGAAGACCC* *CGAGGATGTCGAGCACCACCACCACCACCACTG* *A*
4	82	A107V SEL28 RNase H2	ATGAAAGTTGCAGGTGCAGATGAAGCTGGTC GTGGTCCAGTTATTGGTCCGCTGGTTATTGTT GCTGCTGTTGTGGATGAAAACAGTCTCCCCAA GCTGGAAGAGCTGAAAGTTAGAGACTCCAAA AAGCTGACCCCGAAGCGACGTGAAAAACTGT TCGATGAAATCGTAAAAGTACTGGATGATTAC TCTGTGGTCATTGTGTCCCCGCAGGACATTGA CGGTCGTAAGGGCAGCATGAACGAACTGGAG GTAGAAAACTTCGTTAAAGCCCTGAATAGCCT GAAAGTTAAGCCGGATGTTATTTAC**GTA**GAT GCCGCTGATGTTGATGAAGAACGTTTCGCTAG AGAGCTTGGCGAGCGTCTGAACTTCGAAGCG GAAGTTGTAGCCAAACATAAAGCGGATGACA TCTTTCCGGTCGTATCCGCAGCCTCTATCCTG GCAAAAGTTATCCGTGACCGCGAGATCGAAA AGCTGAAAGCCGAATACGGTGATTTTGGTTCC GGTTACCCGTCTGATCCGCGTACTAAGAAATG GCTGGAAGAATGGTATAGCAAACACGGCAAT TTCCCGCCGATCGTGCGTCGTACTTGGGATAC TGCAAAGAAAATCGAAGAAAAATTCAAACGT GCGCAGCTGACCCTGGACAAGTTCTTCAAGA AACCT*AAGCTTGCGGCCGCACTCGAGATCAAAC* *GGGCTAGCCAGCCAGAACTCGCCCCGGAAGACC* *CCGAGGATGTCGAGCACCACCACCACCACCACT* *GA*
5	83	P13S/A107V SEL28 RNase H2	ATGAAAGTTGCAGGTGCAGATGAAGCTGGTC GTGGT**TCT**GTTATTGGTCCGCTGGTTATTGTT GCTGCTGTTGTGGATGAAAACAGTCTCCCCAA GCTGGAAGAGCTGAAAGTTAGAGACTCCAAA AAGCTGACCCCGAAGCGACGTGAAAAACTGT TCGATGAAATCGTAAAAGTACTGGATGATTAC TCTGTGGTCATTGTGTCCCCGCAGGACATTGA CGGTCGTAAGGGCAGCATGAACGAACTGGAG GTAGAAAACTTCGTTAAAGCCCTGAATAGCCT GAAAGTTAAGCCGGATGTTATTTAC**GTA**GAT GCCGCTGATGTTGATGAAGAACGTTTCGCTAG AGAGCTTGGCGAGCGTCTGAACTTCGAAGCG GAAGTTGTAGCCAAACATAAAGCGGATGACA TCTTTCCGGTCGTATCCGCAGCCTCTATCCTG

[0198]

Mut ID #	서열 번호	특이적 AA 변화	서열 [1]
			GCAAAAGTTATCCGTGACCGCGAGATCGAAA AGCTGAAAGCCGAATACGGTGATTTTGGTTCC GGTTACCCGTCTGATCCGCGTACTAAGAAATG GCTGGAAGAATGGTATAGCAAACACGGCAAT TTCCCGCCGATCGTGCGTCGTACTTGGGATAC TGCAAAGAAAATCGAAGAAAAATTCAAACGT GCGCAGCTGACCCTGGACAAGTTCTTCAAGA AACCT*AAGCTTGCGGCCGCACTCGAGATCAAAC* *GGGCTAGCCAGCCAGAACTCGCCCCGGAAGACC* *CCGAGGATGTCGAGCACCACCACCACCACCACT* *GA*
6	84	P13S SEL29 RNase H2	ATGAAAGTTGCAGGTATAGATGAAGCTGGTC GTGGT**TCT**GCTATTGGTCCGCTGGTTATTGTT GCTGCTGTTGTGGATGAAAACAGTCTCCCCAA GCTGGAAGAGCTGAAAGTTAGAGACTCCAAA AAGCTGACCCCGGCGCAACGTGAAAAACTGT TCGATGAAATCGTAAAAGTACTGGATGATTAC TCTGTGGTCATTGTGTCCCCGCAGGACATTGA CGGTCGTAAGGGCAGCATGAACGAACTGGAG GTAGAAAACTTCGTTAAAGCCCTGAATAGCCT GAAAGTTAAGCCGGATGTTATTTACGCTGATG CCGCTGATGTTGATGAAGAACGTTTCGCTAGA GAGCTTGGCGAGCGTCTGAACTTCGAAGCGA AAGTTGTAGCCGAACATAAAGCGGATGCGAA GTATGAGATCGTATCCGCAGCCTCTATCCTGG CAAAAGTTATCCGTGACCGCGAGATCGAAAA GCTGAAAGCCGAATACGGTGATTTTGGTTCCG GTTACCCGTCTGATCCGCGTACTAGGGCATTC CTGGAAAATTACTATAGAGAACACGGCGAAT TCCCGCCGATCGTGCGTAAAGGTTGGAAGACT CTAAAGAAAATCGCAGAAAAAGTCGAAAGTG AGAAGAAGGCTGAGGAACGGCAGGCGACCCT GGACAGGTACTTCAGGAAGGTT*AAGCTTGCGG* *CCGCACTCGAGATCAAACGGGCTAGCCAGCCAG* *AACTCGCCCCGGAAGACCCCGAGGATGTCGAGC* *ACCACCACCACCACCACTGA*
7	85	Q48R SEL29 RNase H2	ATGAAAGTTGCAGGTATAGATGAAGCTGGTC GTGGTCCAGCTATTGGTCCGCTGGTTATTGTT GCTGCTGTTGTGGATGAAAACAGTCTCCCCAA GCTGGAAGAGCTGAAAGTTAGAGACTCCAAA AAGCTGACCCCGGCG**CGC**CGTGAAAAACTGT TCGATGAAATCGTAAAAGTACTGGATGATTAC TCTGTGGTCATTGTGTCCCCGCAGGACATTGA CGGTCGTAAGGGCAGCATGAACGAACTGGAG GTAGAAAACTTCGTTAAAGCCCTGAATAGCCT GAAAGTTAAGCCGGATGTTATTTACGCTGATG CCGCTGATGTTGATGAAGAACGTTTCGCTAGA

Mut ID #	서열 번호	특이적 AA 변화	서열 [1]
			GAGCTTGGCGAGCGTCTGAACTTCGAAGCGA AAGTTGTAGCCGAACATAAAGCGGATGCGAA GTATGAGATCGTATCCGCAGCCTCTATCCTGG CAAAAGTTATCCGTGACCGCGAGATCGAAAA GCTGAAAGCCGAATACGGTGATTTTGGTTCCG GTTACCCGTCTGATCCGCGTACTAGGGCATTC CTGGAAAATTACTATAGAGAACACGGCGAAT TCCCGCCGATCGTGCGTAAAGGTTGGAAGACT CTAAAGAAAATCGCAGAAAAAGTCGAAAGTG AGAAGAAGGCTGAGGAACGGCAGGCGACCCT GGACAGGTACTTCAGGAAGGTT*AAGCTTGCGG* *CCGCACTCGAGATCAAACGGGCTAGCCAGCCAG* *AACTCGCCCCGGAAGACCCCGAGGATGTCGAGC* *ACCACCACCACCACCACTGA*
8	86	A107V SEL29 RNase H2	ATGAAAGTTGCAGGTATAGATGAAGCTGGTC GTGGTCCAGCTATTGGTCCGCTGGTTATTGTT GCTGCTGTTGTGGATGAAAACAGTCTCCCCAA GCTGGAAGAGCTGAAAGTTAGAGACTCCAAA AAGCTGACCCCGGCGCAACGTGAAAAACTGT TCGATGAAATCGTAAAAGTACTGGATGATTAC TCTGTGGTCATTGTGTCCCCGCAGGACATTGA CGGTCGTAAGGGCAGCATGAACGAACTGGAG GTAGAAAACTTCGTTAAAGCCCTGAATAGCCT GAAAGTTAAGCCGGATGTTATTTACGCTGATG CC**GTA**GATGTTGATGAAGAACGTTTCGCTAG AGAGCTTGGCGAGCGTCTGAACTTCGAAGCG AAAGTTGTAGCCGAACATAAAGCGGATGCGA AGTATGAGATCGTATCCGCAGCCTCTATCCTG GCAAAAGTTATCCGTGACCGCGAGATCGAAA AGCTGAAAGCCGAATACGGTGATTTTGGTTCC GGTTACCCGTCTGATCCGCGTACTAGGGCATT CCTGGAAAATTACTATAGAGAACACGGCGAA TTCCCGCCGATCGTGCGTAAAGGTTGGAAGAC TCTAAAGAAAATCGCAGAAAAAGTCGAAAGT GAGAAGAAGGCTGAGGAACGGCAGGCGACCC TGGACAGGTACTTCAGGAAGGTT*AAGCTTGCG* *GCCGCACTCGAGATCAAACGGGCTAGCCAGCCA* *GAACTCGCCCCGGAAGACCCCGAGGATGTCGAG* *CACCACCACCACCACCACTGA*
9	87	P13S/A107V SEL29 RNase H2	ATGAAAGTTGCAGGTATAGATGAAGCTGGTC GTGGT**TCT**GCTATTGGTCCGCTGGTTATTGTT GCTGCTGTTGTGGATGAAAACAGTCTCCCCAA GCTGGAAGAGCTGAAAGTTAGAGACTCCAAA AAGCTGACCCCGGCGCAACGTGAAAAACTGT TCGATGAAATCGTAAAAGTACTGGATGATTAC TCTGTGGTCATTGTGTCCCCGCAGGACATTGA CGGTCGTAAGGGCAGCATGAACGAACTGGAG

[0199]

Mut ID #	서열 번호	특이적 AA 변화	서열 [1]
			GTAGAAAACTTCGTTAAAGCCCTGAATAGCCT GAAAGTTAAGCCGGATGTTATTTACGCTGATG CC**GTA**GATGTTGATGAAGAACGTTTCGCTAG AGAGCTTGGCGAGCGTCTGAACTTCGAAGCG AAAGTTGTAGCCGAACATAAAGCGGATGCGA AGTATGAGATCGTATCCGCAGCCTCTATCCTG GCAAAAGTTATCCGTGACCGCGAGATCGAAA AGCTGAAAGCCGAATACGGTGATTTTGGTTCC GGTTACCCGTCTGATCCGCGTACTAGGGCATT CCTGGAAAATTACTATAGAGAACACGGCGAA TTCCCGCCGATCGTGCGTAAAGGTTGGAAGAC TCTAAAGAAAATCGCAGAAAAAGTCGAAAGT GAGAAGAAGGCTGAGGAACGGCAGGCGACCC TGGACAGGTACTTCAGGAAGGTT*AAGCTTGCG* *GCCGCACTCGAGATCAAACGGGCTAGCCAGCCA* *GAACTCGCCCCGGAAGACCCCGAGGATGTCGAG* *CACCACCACCACCACCACTGA*

[1] 돌연변이의 위치는 볼드체 및 밑줄로 표시됨. 종결 코돈을 포함한 플라스미드 신장 및 $(His)_6$-태그는 이탤릭체로 표시됨.

[0200]

[0201] 표 21. C-말단 신장 서열이 결여된 RNase H2 단백질에 대한 아미노산 서열.

표 21

서열번호	특이적 AA 변화	서열 [1]
88	P13S SEL28 RNase H2	MKVAGADEAGRGSVIGPLVIVAAVVDE NSLPKLEELKVRDSKKLTPKRREKLFDEI VKVLDDYSVVIVSPQDIDGRKGSMNELE VENFVKALNSLKVKPDVIYADAADVDE ERFARELGERLNFEAEVVAKHKADDIFP VVSAASILAKVIRDREIEKLKAEYGDFGS GYPSDPRTKKWLEEWYSKHGNFPPIVR RTWDTAKKIEEKFKRAQLTLDKFFKKP
89	A107V SEL28 RNase H2	MKVAGADEAGRGPVIGPLVIVAAVVDE NSLPKLEELKVRDSKKLTPKRREKLFDEI VKVLDDYSVVIVSPQDIDGRKGSMNELE VENFVKALNSLKVKPDVIYADAVDVDE ERFARELGERLNFEAEVVAKHKADDIFP VVSAASILAKVIRDREIEKLKAEYGDFGS GYPSDPRTKKWLEEWYSKHGNFPPIVR RTWDTAKKIEEKFKRAQLTLDKFFKKP
90	P13S/A107V SEL28 RNase H2	MKVAGADEAGRGSVIGPLVIVAAVVDE NSLPKLEELKVRDSKKLTPKRREKLFDEI VKVLDDYSVVIVSPQDIDGRKGSMNELE VENFVKALNSLKVKPDVIYADAVDVDE ERFARELGERLNFEAEVVAKHKADDIFP VVSAASILAKVIRDREIEKLKAEYGDFGS GYPSDPRTKKWLEEWYSKHGNFPPIVR RTWDTAKKIEEKFKRAQLTLDKFFKKP
91	P13S SEL29 RNase H2	MKVAGIDEAGRGSAIGPLVIVAAVVDE NSLPKLEELKVRDSKKLTPAQREKLFDE IVKVLDDYSVVIVSPQDIDGRKGSMNEL EVENFVKALNSLKVKPDVIYADAADVD EERFARELGERLNFEAKVVAEHKADAK YEIVSAASILAKVIRDREIEKLKAEYGDF GSGYPSDPRTRAFLENYYREHGEFPPIVR KGWKTLKKIAEKVESEKKAEERQATLD RYFRKV
92	Q48R SEL29 RNase H2	MKVAGIDEAGRGPAIGPLVIVAAVVDE NSLPKLEELKVRDSKKLTPARREKLFDE IVKVLDDYSVVIVSPQDIDGRKGSMNEL EVENFVKALNSLKVKPDVIYADAADVD EERFARELGERLNFEAKVVAEHKADAK YEIVSAASILAKVIRDREIEKLKAEYGDF GSGYPSDPRTRAFLENYYREHGEFPPIVR KGWKTLKKIAEKVESEKKAEERQATLD RYFRKV
93	A107V SEL29 RNase H2	MKVAGIDEAGRGPAIGPLVIVAAVVDE NSLPKLEELKVRDSKKLTPAQREKLFDE IVKVLDDYSVVIVSPQDIDGRKGSMNEL EVENFVKALNSLKVKPDVIYADAVDVD

[0202]

서열번호	특이적 AA 변화	서열 [1]
		EERFARELGERLNFEAKVVAEHKADAK YEIVSAASILAKVIRDREIEKLKAEYGDF GSGYPSDPRTRAFLENYYREHGEFPPIVR KGWKTLKKIAEKVESEKKAEERQATLD RYFRKV
94	P13S/A107 V SEL29 RNase H2	MKVAGIDEAGRG**S**AIGPLVIVAAVVDE NSLPKLEELKVRDSKKLTPAQREKLFDE IVKVLDDYSVVIVSPQDIDGRKGSMNEL EVENFVKALNSLKVKPDVIYADA**V**DVD EERFARELGERLNFEAKVVAEHKADAK YEIVSAASILAKVIRDREIEKLKAEYGDF GSGYPSDPRTRAFLENYYREHGEFPPIVR KGWKTLKKIAEKVESEKKAEERQATLD RYFRKV

[1] 돌연변이의 위치는 볼드체 및 밑줄로 표시됨.

[0203]

[0204] 표 22. 추가적인 C-말단 신장 서열이 결여된 RNase H2 단백질을 암호화하는 핵산 서열.

표 22

서열 번호	특이적 AA 변화	서열 [1]
95	P13S SEL28 RNase H2	ATGAAAGTTGCAGGTGCAGATGAAGCTGGTC GTGGT**TCT**GTTATTGGTCCGCTGGTTATTGTT GCTGCTGTTGTGGATGAAAACAGTCTCCCCAA GCTGGAAGAGCTGAAAGTTAGAGACTCCAAA AAGCTGACCCCGAAGCGACGTGAAAAACTGT TCGATGAAATCGTAAAAGTACTGGATGATTAC TCTGTGGTCATTGTGTCCCCGCAGGACATTGA CGGTCGTAAGGGCAGCATGAACGAACTGGAG GTAGAAAACTTCGTTAAAGCCCTGAATAGCCT GAAAGTTAAGCCGGATGTTATTTACGCTGATG CCGCTGATGTTGATGAAGAACGTTTCGCTAGA GAGCTTGGCGAGCGTCTGAACTTCGAAGCGG AAGTTGTAGCCAAACATAAAGCGGATGACAT CTTTCCGGTCGTATCCGCAGCCTCTATCCTGG CAAAAGTTATCCGTGACCGCGAGATCGAAAA GCTGAAAGCCGAATACGGTGATTTTGGTTCCG GTTACCCGTCTGATCCGCGTACTAAGAAATGG CTGGAAGAATGGTATAGCAAACACGGCAATT TCCCGCCGATCGTGCGTCGTACTTGGGATACT GCAAAGAAAATCGAAGAAAAATTCAAACGTG CGCAGCTGACCCTGGACAAGTTCTTCAAGAA ACCT*TGA*
96	A107V SEL28 RNase H2	ATGAAAGTTGCAGGTGCAGATGAAGCTGGTC GTGGTCCAGTTATTGGTCCGCTGGTTATTGTT GCTGCTGTTGTGGATGAAAACAGTCTCCCCAA GCTGGAAGAGCTGAAAGTTAGAGACTCCAAA AAGCTGACCCCGAAGCGACGTGAAAAACTGT TCGATGAAATCGTAAAAGTACTGGATGATTAC TCTGTGGTCATTGTGTCCCCGCAGGACATTGA CGGTCGTAAGGGCAGCATGAACGAACTGGAG GTAGAAAACTTCGTTAAAGCCCTGAATAGCCT GAAAGTTAAGCCGGATGTTATTTAC**GTA**GAT GCCGCTGATGTTGATGAAGAACGTTTCGCTAG AGAGCTTGGCGAGCGTCTGAACTTCGAAGCG GAAGTTGTAGCCAAACATAAAGCGGATGACA TCTTTCCGGTCGTATCCGCAGCCTCTATCCTG GCAAAAGTTATCCGTGACCGCGAGATCGAAA AGCTGAAAGCCGAATACGGTGATTTTGGTTCC GGTTACCCGTCTGATCCGCGTACTAAGAAATG GCTGGAAGAATGGTATAGCAAACACGGCAAT TTCCCGCCGATCGTGCGTCGTACTTGGGATAC TGCAAAGAAAATCGAAGAAAAATTCAAACGT GCGCAGCTGACCCTGGACAAGTTCTTCAAGA AACCT*TGA*
97	P13S/A107V SEL28	ATGAAAGTTGCAGGTGCAGATGAAGCTGGTC GTGGT**TCT**GTTATTGGTCCGCTGGTTATTGTT

[0205]

서열 번호	특이적 AA 변화	서열 [1]
	RNase H2	GCTGCTGTTGTGGATGAAAACAGTCTCCCCAA GCTGGAAGAGCTGAAAGTTAGAGACTCCAAA AAGCTGACCCCGAAGCGACGTGAAAAACTGT TCGATGAAATCGTAAAAGTACTGGATGATTAC TCTGTGGTCATTGTGTCCCCGCAGGACATTGA CGGTCGTAAGGGCAGCATGAACGAACTGGAG GTAGAAAACTTCGTTAAAGCCCTGAATAGCCT GAAAGTTAAGCCGGATGTTATTTAC**GTA**GAT GCCGCTGATGTTGATGAAGAACGTTTCGCTAG AGAGCTTGGCGAGCGTCTGAACTTCGAAGCG GAAGTTGTAGCCAAACATAAAGCGGATGACA TCTTTCCGGTCGTATCCGCAGCCTCTATCCTG GCAAAAGTTATCCGTGACCGCGAGATCGAAA AGCTGAAAGCCGAATACGGTGATTTTGGTTCC GGTTACCCGTCTGATCCGCGTACTAAGAAATG GCTGGAAGAATGGTATAGCAAACACGGCAAT TTCCCGCCGATCGTGCGTCGTACTTGGGATAC TGCAAAGAAAATCGAAGAAAAATTCAAACGT GCGCAGCTGACCCTGGACAAGTTCTTCAAGA AACCT*TGA*
98	P13S SEL29 RNase H2	ATGAAAGTTGCAGGTATAGATGAAGCTGGTC GTGGT**TCT**GCTATTGGTCCGCTGGTTATTGTT GCTGCTGTTGTGGATGAAAACAGTCTCCCCAA GCTGGAAGAGCTGAAAGTTAGAGACTCCAAA AAGCTGACCCCGGCGCAACGTGAAAAACTGT TCGATGAAATCGTAAAAGTACTGGATGATTAC TCTGTGGTCATTGTGTCCCCGCAGGACATTGA CGGTCGTAAGGGCAGCATGAACGAACTGGAG GTAGAAAACTTCGTTAAAGCCCTGAATAGCCT GAAAGTTAAGCCGGATGTTATTTACGCTGATG CCGCTGATGTTGATGAAGAACGTTTCGCTAGA GAGCTTGGCGAGCGTCTGAACTTCGAAGCGA AAGTTGTAGCCGAACATAAAGCGGATGCGAA GTATGAGATCGTATCCGCAGCCTCTATCCTGG CAAAAGTTATCCGTGACCGCGAGATCGAAAA GCTGAAAGCCGAATACGGTGATTTTGGTTCCG GTTACCCGTCTGATCCGCGTACTAGGGCATTC CTGGAAAATTACTATAGAGAACACGGCGAAT TCCCGCCGATCGTGCGTAAAGGTTGGAAGACT CTAAAGAAAATCGCAGAAAAAGTCGAAAGTG AGAAGAAGGCTGAGGAACGGCAGGCGACCCT GGACAGGTACTTCAGGAAGGTT*TGA*
99	Q48R SEL29 RNase H2	ATGAAAGTTGCAGGTATAGATGAAGCTGGTC GTGGTCCAGCTATTGGTCCGCTGGTTATTGTT GCTGCTGTTGTGGATGAAAACAGTCTCCCCAA GCTGGAAGAGCTGAAAGTTAGAGACTCCAAA AAGCTGACCCCGGCG**CGC**CGTGAAAAACTGT

[0206]

[0207]

서열 번호	특이적 AA 변화	서열 [1]
		TCGATGAAATCGTAAAAGTACTGGATGATTAC TCTGTGGTCATTGTGTCCCCGCAGGACATTGA CGGTCGTAAGGGCAGCATGAACGAACTGGAG GTAGAAAACTTCGTTAAAGCCCTGAATAGCCT GAAAGTTAAGCCGGATGTTATTTACGCTGATG CCGCTGATGTTGATGAAGAACGTTTCGCTAGA GAGCTTGGCGAGCGTCTGAACTTCGAAGCGA AAGTTGTAGCCGAACATAAAGCGGATGCGAA GTATGAGATCGTATCCGCAGCCTCTATCCTGG CAAAAGTTATCCGTGACCGCGAGATCGAAAA GCTGAAAGCCGAATACGGTGATTTTGGTTCCG GTTACCCGTCTGATCCGCGTACTAGGGCATTC CTGGAAAATTACTATAGAGAACACGGCGAAT TCCCGCCGATCGTGCGTAAAGGTTGGAAGACT CTAAAGAAAATCGCAGAAAAAGTCGAAAGTG AGAAGAAGGCTGAGGAACGGCAGGCGACCCT GGACAGGTACTTCAGGAAGGTT*TGA*
100	A107V SEL29 RNase H2	ATGAAAGTTGCAGGTATAGATGAAGCTGGTC GTGGTCCAGCTATTGGTCCGCTGGTTATTGTT GCTGCTGTTGTGGATGAAAACAGTCTCCCCAA GCTGGAAGAGCTGAAAGTTAGAGACTCCAAA AAGCTGACCCCGGCGCAACGTGAAAAACTGT TCGATGAAATCGTAAAAGTACTGGATGATTAC TCTGTGGTCATTGTGTCCCCGCAGGACATTGA CGGTCGTAAGGGCAGCATGAACGAACTGGAG GTAGAAAACTTCGTTAAAGCCCTGAATAGCCT GAAAGTTAAGCCGGATGTTATTTACGCTGATG CC**GTA**GATGTTGATGAAGAACGTTTCGCTAG AGAGCTTGGCGAGCGTCTGAACTTCGAAGCG AAAGTTGTAGCCGAACATAAAGCGGATGCGA AGTATGAGATCGTATCCGCAGCCTCTATCCTG GCAAAAGTTATCCGTGACCGCGAGATCGAAA AGCTGAAAGCCGAATACGGTGATTTTGGTTCC GGTTACCCGTCTGATCCGCGTACTAGGGCATT CCTGGAAAATTACTATAGAGAACACGGCGAA TTCCCGCCGATCGTGCGTAAAGGTTGGAAGAC TCTAAAGAAAATCGCAGAAAAAGTCGAAAGT GAGAAGAAGGCTGAGGAACGGCAGGCGACCC TGGACAGGTACTTCAGGAAGGTT*TGA*
101	P13S/A107V SEL29 RNase H2	ATGAAAGTTGCAGGTATAGATGAAGCTGGTC GTGGT**TCT**GCTATTGGTCCGCTGGTTATTGTT GCTGCTGTTGTGGATGAAAACAGTCTCCCCAA GCTGGAAGAGCTGAAAGTTAGAGACTCCAAA AAGCTGACCCCGGCGCAACGTGAAAAACTGT TCGATGAAATCGTAAAAGTACTGGATGATTAC TCTGTGGTCATTGTGTCCCCGCAGGACATTGA CGGTCGTAAGGGCAGCATGAACGAACTGGAG

서열 번호	특이적 AA 변화	서열[1]
		GTAGAAAACTTCGTTAAAGCCCTGAATAGCCT GAAAGTTAAGCCGGATGTTATTTACGCTGATG CC**GTA**GATGTTGATGAAGAACGTTTCGCTAG AGAGCTTGGCGAGCGTCTGAACTTCGAAGCG AAAGTTGTAGCCGAACATAAAGCGGATGCGA AGTATGAGATCGTATCCGCAGCCTCTATCCTG GCAAAAGTTATCCGTGACCGCGAGATCGAAA AGCTGAAAGCCGAATACGGTGATTTTGGTTCC GGTTACCCGTCTGATCCGCGTACTAGGGCATT CCTGGAAAATTACTATAGAGAACACGGCGAA TTCCCGCCGATCGTGCGTAAAGGTTGGAAGAC TCTAAAGAAAATCGCAGAAAAAGTCGAAAGT GAGAAGAAGGCTGAGGAACGGCAGGCGACCC TGGACAGGTACTTCAGGAAGGTT*TGA*

[1]돌연변이의 위치는 볼드체 및 밑줄로 표시됨. 종결 코돈은 이탤릭체로 표시됨.

[0208]

[0209] 인용된 참조문헌

[0210] Joseph R Dobosy, Scott D Rose, Kristin R Beltz, Susan M Rupp, Kristy M Powers, Mark A Behlke and Joseph A Walder. RNase H-dependent PCR (rhPCR): improved specificity and single nucleotide polymorphism detection using blocked cleavable primers. BMC Biotechnology (2011), 11:80.

[0211] Ayumu Muroya, Daisuke Tsuchiya, Momoyo Ishikawa, Mitsuru Haruki, Masaaki Morikawa,Shigenori Kanaya, and Kosuke Morikawa. Catalytic center of an archaeal type 2 ribonuclease H as revealed by Xray crystallographic and mutational analyses. Protein Science (2001), 10:707-714.

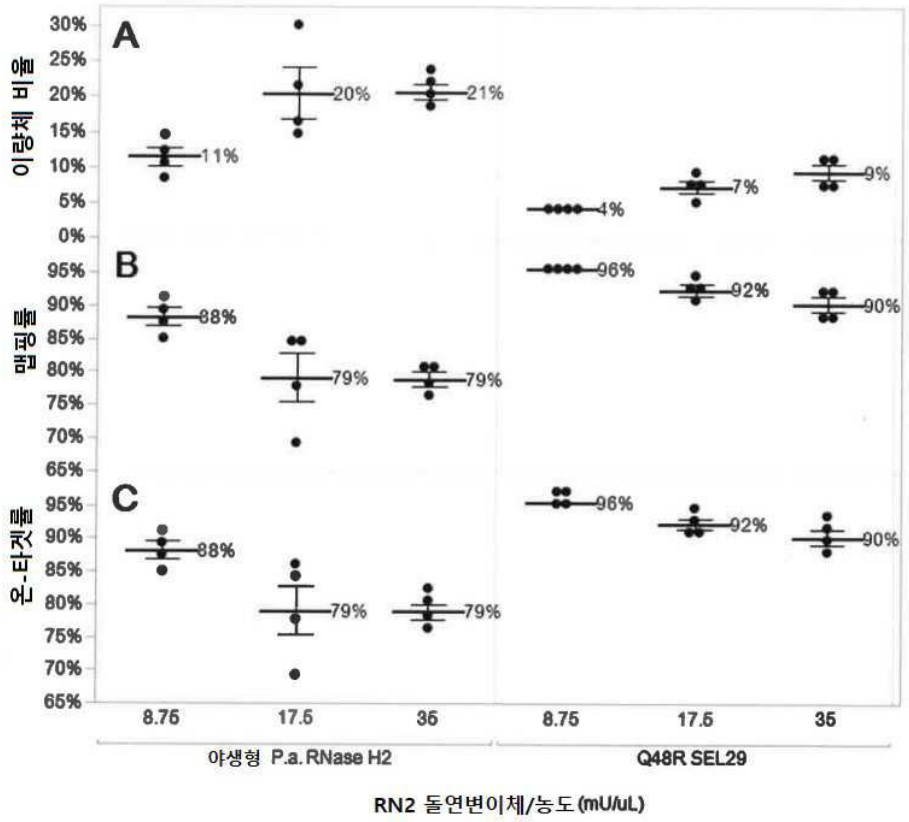
[0212] Monika P. Rychlik, Hyongi Chon, Susana M. Cerritelli, Paulina Klimek, Robert J. Crouch, and Marcin Nowotny. Crystal Structures of RNase H2 in Complex with Nucleic Acid Reveal the Mechanism of RNA-DNA Junction Recognition and Cleavage. Molecular Cell (2010), 40:658-670.

[0213] 본원에서 인용된 간행물, 특허 출원 및 특허를 포함한 모든 참조문헌은 각각의 참조문헌이 개별적으로 및 구체적으로 참조에 의해 포함되는 것으로 표시되고, 그 전체가 본원에 기재된 것과 동일한 정도로 이에 의해 참조로 포함된다.

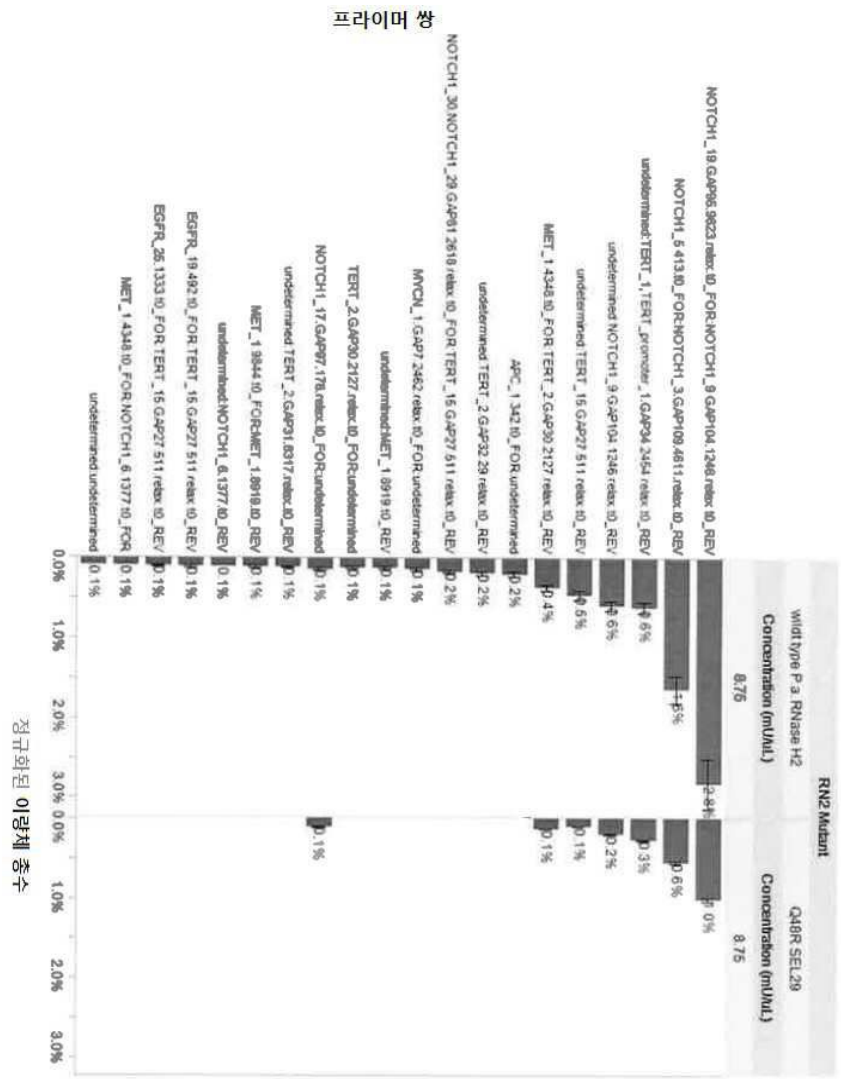
[0214] 본 발명을 수행하기 위해 본 발명자들에게 알려진 최선의 모드를 포함한, 본 발명의 바람직한 구체예가 본원에 기술된다. 그러한 바람직한 구체예의 변형은 전술한 설명을 읽으면 당업자에게 명백해질 수 있다. 본 발명자들은 숙련된 기술자가 이러한 변형을 적절하게 채택할 것을 기대하고, 본 발명자들은 본 발명이 본원에 구체적으로 기술된 것과 달리 실시될 것을 의도한다. 따라서, 본 발명은 적용가능한 법률이 허용하는 바에 따라 여기에 첨부된 청구범위에 기재된 대상의 모든 변경 및 등가물을 포함한다. 또한, 본원에서 달리 표시되거나, 문맥상 명백히 모순되지 않는 한, 전술한 요소들의 모든 가능한 변형의 임의의 조합은 본 발명에 포함된다.

도면

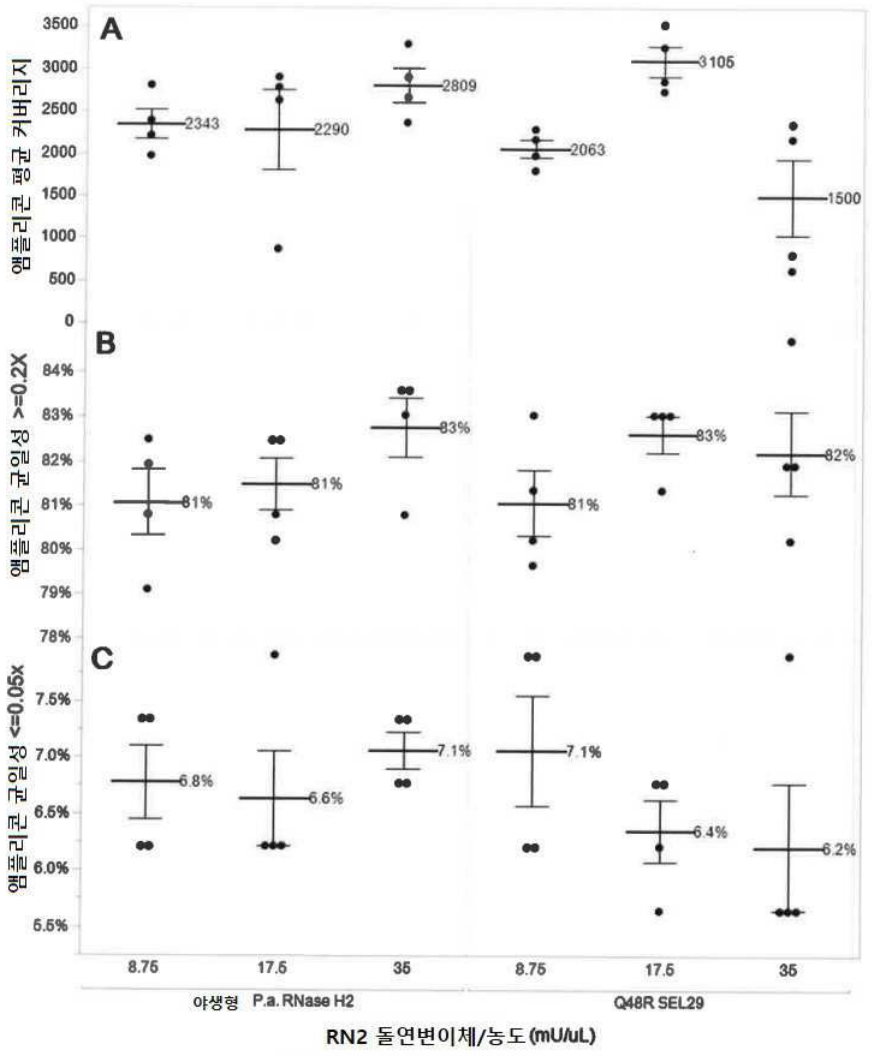
도면1


A
B
C
이량체 비율
맵핑률
온-타겟률
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
95%
90%
85%
80%
75%
70%
65%
11%
20%
21%
4%
7%
9%
88%
79%
79%
96%
92%
90%
88%
79%
79%
96%
92%
90%
8.75
17.5
35
8.75
17.5
35
야생형 P.a. RNase H2
Q48R SEL29
RN2 돌연변이체/농도(mU/uL)

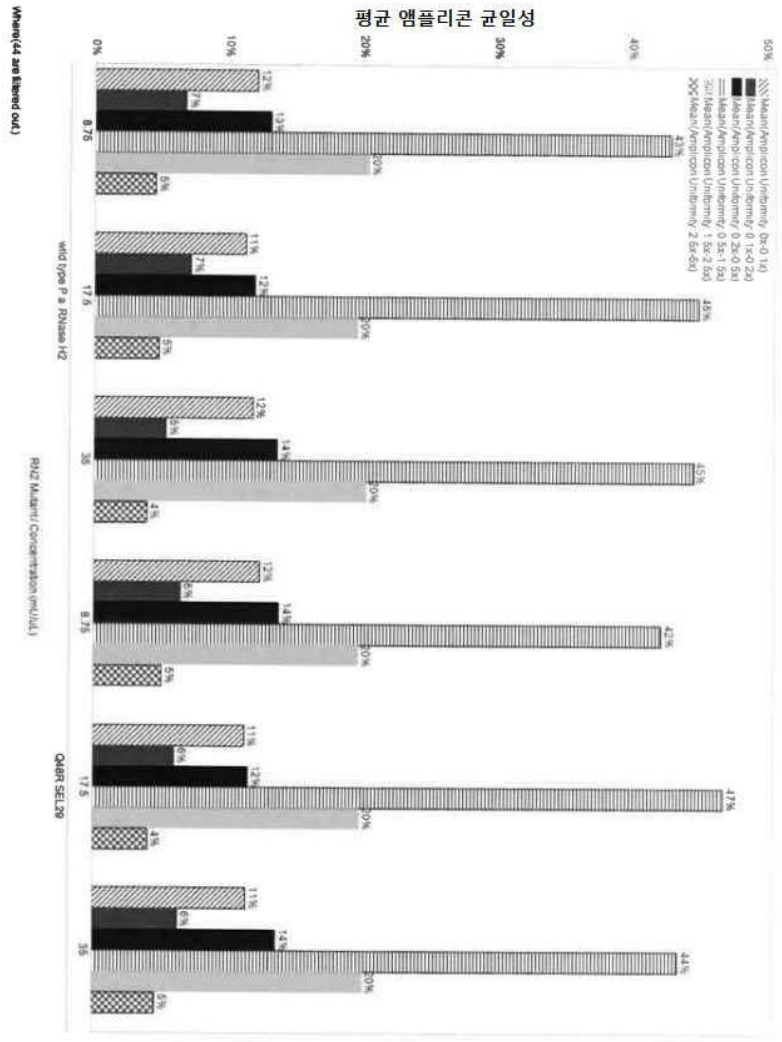
도면2


RN2 Mutant
wildt type P.a RNase H2
Concentration (mUnit)
8.75
Q48R SEL29
Concentration (mUnit)
8.75
프라이머 쌍
정규화된 이량체 총수
0.0%
1.0%
2.0%
3.0%

도면3


A
B
C
앰플리콘 평균 커버리지
앰플리콘 균일성 >=0.2X
앰플리콘 균일성 <=0.05x
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
84%
83%
82%
81%
80%
79%
78%
7.5%
7.0%
6.5%
6.0%
5.5%
2343
2290
2809
2063
3105
1500
81%
81%
83%
81%
83%
82%
6.8%
6.6%
7.1%
7.1%
6.4%
6.2%
8.75
17.5
35
8.75
17.5
35
야생형 P.a. RNase H2
Q48R SEL29
RN2 돌연변이체/농도 (mU/uL)

도면4



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES, INC.

Dobosy, Joseph

Perschbacher, Katherine

Beltz, Kristin

Rose, Scott

Behlke, Mark A.

<120> RNASE H2 MUTANTS THAT REDUCE PRIMER DIMERS AND OFF-TARGET AMPLIFICATION IN RHPCR-BASED AMPLICON SEQUENCING WITH HIGH-FIDELITY DNA POLYMERASES

<130> IDT01-018-PCT

<140> PCT/US21/64879

<141> 2021-12-22

<150> US63/277273

<151> 2021-11-09

<150> US63/130548

<151> 2020-12-24

<160

> 101

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 255

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 1

Met Lys Val Ala Gly Ala Asp Glu Ala Gly Arg Gly Pro Val Ile Gly
1 5 10 15

Pro Leu Val Ile Val Ala Ala Val Val Glu Glu Asp Lys Ile Arg Ser
20 25 30

Leu Thr Lys Leu Gly Val Lys Asp Ser Lys Gln Leu Thr Pro Ala Gln
35 40 45

Arg Glu Lys Leu Phe Asp Glu Ile Val Lys Val Leu Asp Asp Tyr Ser
50 55 60

Val Val Ile Val Ser Pro Gln Asp Ile Asp Gly Arg Lys Gly Ser Met
65 70 75 80

Asn Glu Leu Glu Val Glu Asn Phe Val Lys Ala Leu Asn Ser Leu Lys
85 90 95

Val Lys Pro Glu Val Ile Tyr Ile Asp Ser Ala Asp Val Lys Ala Glu
100 105 110

Arg Phe Ala Glu Asn Ile Arg Ser Arg Leu Ala Tyr Glu Ala Lys Val
115 120 125

Val Ala Glu His Lys Ala Asp Ala Lys Tyr Glu Ile Val Ser Ala Ala
130 135 140

Ser Ile Leu Ala Lys Val Ile Arg Asp Arg Glu Ile Glu Lys Leu Lys
145 150 155 160
Ala Glu Tyr Gly Asp Phe Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Arg Thr
165 170 175

Lys Lys Trp Leu Glu Glu Trp Tyr Ser Lys His Gly Asn Phe Pro Pro
180 185 190
Ile Val Arg Arg Thr Trp Asp Thr Ala Lys Lys Ile Glu Glu Lys Phe
195 200 205
Lys Arg Ala Gln Leu Thr Leu Asp Asn Phe Leu Lys Arg Phe Arg Asn
210 215 220
Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ser Gln Pro Glu Leu
225 230 235 240

Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp Val Glu His His His His His His
245 250 255

<210> 2
<211> 253
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE
<400> 2
Met Lys Val Ala Gly Ala Asp Glu Ala Gly Arg Gly Pro Val Ile Gly
1 5 10 15
Pro Leu Val Ile Val Ala Ala Val Val Asp Glu Asn Ser Leu Pro Lys
20 25 30
Leu Glu Glu Leu Lys Val Arg Asp Ser Lys Lys Leu Thr Pro Lys Arg

35 40 45
Arg Glu Lys Leu Phe Asp Glu Ile Val Lys Val Leu Asp Asp Tyr Ser
50 55 60
Val Val Ile Val Ser Pro Gln Asp Ile Asp Gly Arg Lys Gly Ser Met
65 70 75 80
Asn Glu Leu Glu Val Glu Asn Phe Val Lys Ala Leu Asn Ser Leu Lys
85 90 95

Val Lys Pro Asp Val Ile Tyr Ala Asp Ala Ala Asp Val Asp Glu Glu

100 105 110

Arg Phe Ala Arg Glu Leu Gly Glu Arg Leu Asn Phe Glu Ala Glu Val

115 120 125

Val Ala Lys His Lys Ala Asp Asp Ile Phe Pro Val Val Ser Ala Ala

130 135 140

Ser Ile Leu Ala Lys Val Ile Arg Asp Arg Glu Ile Glu Lys Leu Lys

145 150 155 160

Ala Glu Tyr Gly Asp Phe Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Arg Thr

165 170 175

Lys Lys Trp Leu Glu Glu Trp Tyr Ser Lys His Gly Asn Phe Pro Pro

180 185 190

Ile Val Arg Arg Thr Trp Asp Thr Ala Lys Lys Ile Glu Glu Lys Phe

195 200 205

Lys Arg Ala Gln Leu Thr Leu Asp Lys Phe Phe Lys Lys Pro Lys Leu

210 215 220

Ala Ala Ala Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ser Gln Pro Glu Leu Ala Pro

225 230 235 240

Glu Asp Pro Glu Asp Val Glu His His His His His His

245 250

<210> 3

<211> 259

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 3

Met Lys Val Ala Gly Ile Asp Glu Ala Gly Arg Gly Pro Ala Ile Gly

1 5 10 15

Pro Leu Val Ile Val Ala Ala Val Val Asp Glu Asn Ser Leu Pro Lys

20 25 30

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

35 40 45

Arg Glu Lys Leu Phe Asp Glu Ile Val Lys Val Leu Asp Asp Tyr Ser

50 55 60

Val Val Ile Val Ser Pro Gln Asp Ile Asp Gly Arg Lys Gly Ser Met

65 70 75 80

Asn Glu Leu Glu Val Glu Asn Phe Val Lys Ala Leu Asn Ser Leu Lys

85 90 95

Val Lys Pro Asp Val Ile Tyr Ala Asp Ala Ala Asp Val Asp Glu Glu

100 105 110

Arg Phe Ala Arg Glu Leu Gly Glu Arg Leu Asn Phe Glu Ala Lys Val

115 120 125

Val Ala Glu His Lys Ala Asp Ala Lys Tyr Glu Ile Val Ser Ala Ala

130 135 140

Ser Ile Leu Ala Lys Val Ile Arg Asp Arg Glu Ile Glu Lys Leu Lys

145 150 155 160

Ala Glu Tyr Gly Asp Phe Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Arg Thr

165 170 175

Arg Ala Phe Leu Glu Asn Tyr Tyr Arg Glu His Gly Glu Phe Pro Pro

180 185 190

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

195 200 205

Glu Ser Glu Lys Lys Ala Glu Glu Arg Gln Ala Thr Leu Asp Arg Tyr

210 215 220

Phe Arg Lys Val Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ser

225 230 235 240

Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp Val Glu His His His

245 250 255

His His His

<210> 4

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 4

ggtgcagatg aagctggtcg tggttctgtt attggtccgc tggttattgt tgct 54

<210> 5

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 5

agcaacaata accagcggac caataacaga accacgacca gcttcatctg cacc 54

<210> 6

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 6

aagccggatg ttatttacgc tgatgccgta gatgttgatg aagaacgttt cgctaga 57

<210> 7

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 7

tctagcgaaa cgttcttcat caacatctac ggcatcagcg taaataacat ccggctt 57

<210> 8

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 8

ggtatagatg aagctggtcg tggttctgct attggtccgc tggttattgt tgct 54

<210> 9

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 9

agcaacaata accagcggac caatagcaga accacgacca gcttcatcta tacc 54

<210> 10

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 10

agactccaaa aagctgaccc cggcgcgccg tgaaaaactg ttcgatgaaa tcg 53

<210> 11

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 11

cgatttcatc gaacagtttt tcacggcgcg ccggggtcag ctttttggag tct 53

<210> 12

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 12

aagccggatg ttatttacgc tgatgccgta gatgttgatg aagaacgttt cgctaga 57

<210> 13

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 13

tctagcgaaa cgttcttcat caacatctac ggcatcagcg taaataacat ccggctt 57

<210> 14

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 14

Met Lys Val Ala Gly Ala Asp Glu Ala Gly Arg Gly Ser Val Ile Gly
1 5 10 15

Pro Leu Val Ile Val Ala Ala Val Val Asp Glu Asn Ser Leu Pro Lys
20 25 30

Leu Glu Glu Leu Lys Val Arg Asp Ser Lys Lys Leu Thr Pro Lys Arg
35 40 45

Arg Glu Lys Leu Phe Asp Glu Ile Val Lys Val Leu Asp Asp Tyr Ser
50 55 60

Val Val Ile Val Ser Pro Gln Asp Ile Asp Gly Arg Lys Gly Ser Met
65 70 75 80

Asn Glu Leu Glu Val Glu Asn Phe Val Lys Ala Leu Asn Ser Leu Lys
85 90 95

Val Lys Pro Asp Val Ile Tyr Ala Asp Ala Ala Asp Val Asp Glu Glu
100 105 110

Arg Phe Ala Arg Glu Leu Gly Glu Arg Leu Asn Phe Glu Ala Glu Val
115 120 125

Val Ala Lys His Lys Ala Asp Asp Ile Phe Pro Val Val Ser Ala Ala
130 135 140

Ser Ile Leu Ala Lys Val Ile Arg Asp Arg Glu Ile Glu Lys Leu Lys
145 150 155 160

Ala Glu Tyr Gly Asp Phe Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Arg Thr
165 170 175

Lys Lys Trp Leu Glu Glu Trp Tyr Ser Lys His Gly Asn Phe Pro Pro
180 185 190

Ile Val Arg Arg Thr Trp Asp Thr Ala Lys Lys Ile Glu Glu Lys Phe
195 200 205

Lys Arg Ala Gln Leu Thr Leu Asp Lys Phe Phe Lys Lys Pro Lys Leu
210 215 220

Ala Ala Ala Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ser Gln Pro Glu Leu Ala Pro
225 230 235 240

Glu Asp Pro Glu Asp Val Glu His His His His His His
245 250

<210> 15

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 15

Met Lys Val Ala Gly Ala Asp Glu Ala Gly Arg Gly Pro Val Ile Gly
1 5 10 15

Pro Leu Val Ile Val Ala Ala Val Val Asp Glu Asn Ser Leu Pro Lys
20 25 30

Leu Glu Glu Leu Lys Val Arg Asp Ser Lys Lys Leu Thr Pro Lys Arg
35 40 45

Arg Glu Lys Leu Phe Asp Glu Ile Val Lys Val Leu Asp Asp Tyr Ser
50 55 60

Val Val Ile Val Ser Pro Gln Asp Ile Asp Gly Arg Lys Gly Ser Met
65 70 75 80

Asn Glu Leu Glu Val Glu Asn Phe Val Lys Ala Leu Asn Ser Leu Lys
85 90 95

Val Lys Pro Asp Val Ile Tyr Ala Asp Ala Val Asp Val Asp Glu Glu
100 105 110

Arg Phe Ala Arg Glu Leu Gly Glu Arg Leu Asn Phe Glu Ala Glu Val
115 120 125

Val Ala Lys His Lys Ala Asp Asp Ile Phe Pro Val Val Ser Ala Ala
130 135 140

Ser Ile Leu Ala Lys Val Ile Arg Asp Arg Glu Ile Glu Lys Leu Lys
145 150 155 160
Ala Glu Tyr Gly Asp Phe Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Arg Thr
165 170 175

Lys Lys Trp Leu Glu Glu Trp Tyr Ser Lys His Gly Asn Phe Pro Pro
180 185 190
Ile Val Arg Arg Thr Trp Asp Thr Ala Lys Lys Ile Glu Glu Lys Phe
195 200 205
Lys Arg Ala Gln Leu Thr Leu Asp Lys Phe Phe Lys Lys Pro Lys Leu
210 215 220
Ala Ala Ala Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ser Gln Pro Glu Leu Ala Pro
225 230 235 240

Glu Asp Pro Glu Asp Val Glu His His His His His His
245 250

<210> 16
<211> 253
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE
<400> 16
Met Lys Val Ala Gly Ala Asp Glu Ala Gly Arg Gly Ser Val Ile Gly
1 5 10 15
Pro Leu Val Ile Val Ala Ala Val Val Asp Glu Asn Ser Leu Pro Lys
20 25 30
Leu Glu Glu Leu Lys Val Arg Asp Ser Lys Lys Leu Thr Pro Lys Arg

35 40 45
Arg Glu Lys Leu Phe Asp Glu Ile Val Lys Val Leu Asp Asp Tyr Ser
50 55 60
Val Val Ile Val Ser Pro Gln Asp Ile Asp Gly Arg Lys Gly Ser Met
65 70 75 80
Asn Glu Leu Glu Val Glu Asn Phe Val Lys Ala Leu Asn Ser Leu Lys
85 90 95

Val Lys Pro Asp Val Ile Tyr Ala Asp Ala Val Asp Val Asp Glu Glu

100 105 110

Arg Phe Ala Arg Glu Leu Gly Glu Arg Leu Asn Phe Glu Ala Glu Val

115 120 125

Val Ala Lys His Lys Ala Asp Asp Ile Phe Pro Val Val Ser Ala Ala

130 135 140

Ser Ile Leu Ala Lys Val Ile Arg Asp Arg Glu Ile Glu Lys Leu Lys

145 150 155 160

Ala Glu Tyr Gly Asp Phe Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Arg Thr

165 170 175

Lys Lys Trp Leu Glu Glu Trp Tyr Ser Lys His Gly Asn Phe Pro Pro

180 185 190

Ile Val Arg Arg Thr Trp Asp Thr Ala Lys Lys Ile Glu Glu Lys Phe

195 200 205

Lys Arg Ala Gln Leu Thr Leu Asp Lys Phe Phe Lys Lys Pro Lys Leu

210 215 220

Ala Ala Ala Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ser Gln Pro Glu Leu Ala Pro

225 230 235 240

Glu Asp Pro Glu Asp Val Glu His His His His His His

245 250

<210> 17

<211> 259

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 17

Met Lys Val Ala Gly Ile Asp Glu Ala Gly Arg Gly Ser Ala Ile Gly

1 5 10 15

Pro Leu Val Ile Val Ala Ala Val Val Asp Glu Asn Ser Leu Pro Lys

20 25 30

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

35 40 45

Arg Glu Lys Leu Phe Asp Glu Ile Val Lys Val Leu Asp Asp Tyr Ser

50 55 60

Val Val Ile Val Ser Pro Gln Asp Ile Asp Gly Arg Lys Gly Ser Met

65 70 75 80

Asn Glu Leu Glu Val Glu Asn Phe Val Lys Ala Leu Asn Ser Leu Lys

85 90 95

Val Lys Pro Asp Val Ile Tyr Ala Asp Ala Ala Asp Val Asp Glu Glu

100 105 110

Arg Phe Ala Arg Glu Leu Gly Glu Arg Leu Asn Phe Glu Ala Lys Val

115 120 125

Val Ala Glu His Lys Ala Asp Ala Lys Tyr Glu Ile Val Ser Ala Ala

130 135 140

Ser Ile Leu Ala Lys Val Ile Arg Asp Arg Glu Ile Glu Lys Leu Lys

145 150 155 160

Ala Glu Tyr Gly Asp Phe Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Arg Thr

165 170 175

Arg Ala Phe Leu Glu Asn Tyr Tyr Arg Glu His Gly Glu Phe Pro Pro

180 185 190

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

195 200 205

Glu Ser Glu Lys Lys Ala Glu Glu Arg Gln Ala Thr Leu Asp Arg Tyr

210 215 220

Phe Arg Lys Val Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ser

225 230 235 240

Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp Val Glu His His His

245 250 255

His His His

<210> 18

<211> 259

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 18

Met Lys Val Ala Gly Ile Asp Glu Ala Gly Arg Gly Pro Ala Ile Gly
1 5 10 15

Pro Leu Val Ile Val Ala Ala Val Val Asp Glu Asn Ser Leu Pro Lys
20 25 30

Leu Glu Glu Leu Lys Val Arg Asp Ser Lys Lys Leu Thr Pro Ala Arg
35 40 45

Arg Glu Lys Leu Phe Asp Glu Ile Val Lys Val Leu Asp Asp Tyr Ser
50 55 60

Val Val Ile Val Ser Pro Gln Asp Ile Asp Gly Arg Lys Gly Ser Met
65 70 75 80

Asn Glu Leu Glu Val Glu Asn Phe Val Lys Ala Leu Asn Ser Leu Lys
85 90 95

Val Lys Pro Asp Val Ile Tyr Ala Asp Ala Ala Asp Val Asp Glu Glu
100 105 110

Arg Phe Ala Arg Glu Leu Gly Glu Arg Leu Asn Phe Glu Ala Lys Val
115 120 125

Val Ala Glu His Lys Ala Asp Ala Lys Tyr Glu Ile Val Ser Ala Ala
130 135 140

Ser Ile Leu Ala Lys Val Ile Arg Asp Arg Glu Ile Glu Lys Leu Lys
145 150 155 160

Ala Glu Tyr Gly Asp Phe Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Arg Thr
165 170 175

Arg Ala Phe Leu Glu Asn Tyr Tyr Arg Glu His Gly Glu Phe Pro Pro
180 185 190

Ile Val Arg Lys Gly Trp Lys Thr Leu Lys Lys Ile Ala Glu Lys Val
195 200 205

Glu Ser Glu Lys Lys Ala Glu Glu Arg Gln Ala Thr Leu Asp Arg Tyr
210 215 220

Phe Arg Lys Val Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ser
225 230 235 240
Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp Val Glu His His His
245 250 255
His His His

<210> 19
<211> 259
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 19
Met Lys Val Ala Gly Ile Asp Glu Ala Gly Arg Gly Pro Ala Ile Gly
1 5 10 15
Pro Leu Val Ile Val Ala Ala Val Val Asp Glu Asn Ser Leu Pro Lys
20 25 30
Leu Glu Glu Leu Lys Val Arg Asp Ser Lys Lys Leu Thr Pro Ala Gln
35 40 45
Arg Glu Lys Leu Phe Asp Glu Ile Val Lys Val Leu Asp Asp Tyr Ser
50 55 60

Val Val Ile Val Ser Pro Gln Asp Ile Asp Gly Arg Lys Gly Ser Met
65 70 75 80
Asn Glu Leu Glu Val Glu Asn Phe Val Lys Ala Leu Asn Ser Leu Lys
85 90 95
Val Lys Pro Asp Val Ile Tyr Ala Asp Ala Val Asp Val Asp Glu Glu
100 105 110
Arg Phe Ala Arg Glu Leu Gly Glu Arg Leu Asn Phe Glu Ala Lys Val
115 120 125

Val Ala Glu His Lys Ala Asp Ala Lys Tyr Glu Ile Val Ser Ala Ala
130 135 140
Ser Ile Leu Ala Lys Val Ile Arg Asp Arg Glu Ile Glu Lys Leu Lys
145 150 155 160

Ala Glu Tyr Gly Asp Phe Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Arg Thr
165 170 175
Arg Ala Phe Leu Glu Asn Tyr Tyr Arg Glu His Gly Glu Phe Pro Pro
180 185 190

Ile Val Arg Lys Gly Trp Lys Thr Leu Lys Lys Ile Ala Glu Lys Val
195 200 205
Glu Ser Glu Lys Lys Ala Glu Glu Arg Gln Ala Thr Leu Asp Arg Tyr
210 215 220
Phe Arg Lys Val Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ser
225 230 235 240
Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp Val Glu His His His
245 250 255

His His His

<210> 20
<211> 259
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE
<400> 20
Met Lys Val Ala Gly Ile Asp Glu Ala Gly Arg Gly Ser Ala Ile Gly
1 5 10 15
Pro Leu Val Ile Val Ala Ala Val Val Asp Glu Asn Ser Leu Pro Lys
20 25 30
Leu Glu Glu Leu Lys Val Arg Asp Ser Lys Lys Leu Thr Pro Ala Gln
35 40 45

Arg Glu Lys Leu Phe Asp Glu Ile Val Lys Val Leu Asp Asp Tyr Ser
50 55 60
Val Val Ile Val Ser Pro Gln Asp Ile Asp Gly Arg Lys Gly Ser Met
65 70 75 80
Asn Glu Leu Glu Val Glu Asn Phe Val Lys Ala Leu Asn Ser Leu Lys
85 90 95

Val Lys Pro Asp Val Ile Tyr Ala Asp Ala Val Asp Val Asp Glu Glu
100 105 110

Arg Phe Ala Arg Glu Leu Gly Glu Arg Leu Asn Phe Glu Ala Lys Val
115 120 125
Val Ala Glu His Lys Ala Asp Ala Lys Tyr Glu Ile Val Ser Ala Ala
130 135 140
Ser Ile Leu Ala Lys Val Ile Arg Asp Arg Glu Ile Glu Lys Leu Lys
145 150 155 160
Ala Glu Tyr Gly Asp Phe Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Arg Thr
165 170 175

Arg Ala Phe Leu Glu Asn Tyr Tyr Arg Glu His Gly Glu Phe Pro Pro
180 185 190
Ile Val Arg Lys Gly Trp Lys Thr Leu Lys Lys Ile Ala Glu Lys Val
195 200 205
Glu Ser Glu Lys Lys Ala Glu Glu Arg Gln Ala Thr Leu Asp Arg Tyr
210 215 220
Phe Arg Lys Val Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ser
225 230 235 240

Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp Val Glu His His His
245 250 255
His His His

<210> 21
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE
<400> 21
cagcctcatc caaaagagga aa 22
<210> 22
<211> 28
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> 3'-PROPRIETARY BLOCKER GROUP

<400> 22

cagcctcatc caaaagagga aacaggag 28

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 23

ctcactctaa accccagcat t 21

<210> 24

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5'- Iowa Black?FLUORESCENT QUENCHER

<220><221> misc_feature

<222> (36)..(36)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (41)..(41)

<223> 3'-(6-FAM) FLUORESCENT LABEL

<400> 24

tataagctac cagcatggtt tttccatgct ggtagcttat a 41

<210> 25

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (36)..(36)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<400> 25

tataagctac cagcatggtt tttccatgct ggtagcttat a 41

<210> 26

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 26

agctctgccc aaagattacc ctg 23

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 27

ctgagcttca tgcctttact gt 22

<210> 28

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223

> RIBONCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> 3'-C3 spacer (propanediol) blocker group

<400> 28

ctgagcttca tgcctttact gtaccccc 28

<210> 29

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> 3'-C3 spacer (propanediol) blocker group

<400> 29

ctgagcttca tgcctttact gtcccccc 28

<210> 30

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> 3'-C3 spacer (propanediol) blocker group

<400> 30

ctgagcttca tgcctttact gtgccccc 28

<210> 31

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> 3'-C3 spacer (propanediol) blocker group

<400> 31

ctgagcttca tgcctttact gtuccccc 28

<210> 32

<211> 103

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 32

agctctgccc aaagattacc ctgacagcta agtggcagtg gaagttggcc tcagaagtag 60

tggccagctg tgtgtcgggg aacagtaaag gcatgaagct cag 103

<210> 33

<211> 103

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 33

agctctgccc aaagattacc ctgacagcta agtggcagtg gaagttggcc tcagaagtag 60

tggccagctg tgtgtcgggg cacagtaaag gcatgaagct cag 103

<210> 34

<211> 103

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 34

agctctgccc aaagattacc ctgacagcta agtggcagtg gaagttggcc tcagaagtag 60

tggccagctg tgtgtcgggg gacagtaaag gcatgaagct cag 103

<210> 35

<211> 103

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 35

agctctgccc aaagattacc ctgacagcta agtggcagtg gaagttggcc tcagaagtag 60

tggccagctg tgtgtcgggg tacagtaaag gcatgaagct cag 103

<210> 36

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 36

gtgattttgg tctagctaca gt 22

<210> 37

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 37

cctcaattct taccatccac aaa 23

<210> 38

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> 3'-C3 spacer (propanediol) blocker group

<400> 38

gtgattttgg tctagctaca gtgaaatg 28

<210> 39

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> 3'-C3 spacer (propanediol) blocker group

<400> 39

gtgattttgg tctagctaca gagaaatg 28

<210> 40

<211> 401

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 40

taagaggaaa gatgaagtac tatgttttaa agaatattat attacagaat tatagaaatt 60

agatctctta cctaaactct tcataatgct tgctctgata ggaaaatgag atctactgtt 120

ttcctttact tactacacct cagatatatt tcttcatgaa gacctcacag taaaaatagg 180

tgattttggt ctagctacag tgaaatctcg atggagtggg tcccatcagt ttgaacagtt 240

gtctggatcc attttgtgga tggtaagaat tgaggctatt tttccactga ttaaatttt 300

ggccctgaga tgctgctgag ttactagaaa gtcattgaag gtctcaacta tagtattttc 360

atagttccca gtattcacaa aaatcagtgt tcttattttt t 401

<210> 41

<211> 401

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 41

taagaggaaa gatgaagtac tatgttttaa agaatattat attacagaat tatagaaatt 60

agatctctta cctaaactct tcataatgct tgctctgata ggaaaatgag atctactgtt 120

ttcctttact tactacacct cagatatatt tcttcatgaa gacctcacag taaaaatagg 180

tgattttggt ctagctacag agaaatctcg atggagtggg tcccatcagt ttgaacagtt 240

gtctggatcc attttgtgga tggtaagaat tgaggctatt tttccactga ttaaatttt 300

ggccctgaga tgctgctgag ttactagaaa gtcattgaag gtctcaacta tagtattttc 360

atagttccca gtattcacaa aaatcagtgt tcttattttt t 401

<210> 42

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 42

ggcagatttt cttctgcacc gcg 23

<210> 43

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> INTERNUCLEOTIDE C3 PROPANE DIOL SPACER

<220><221> misc_feature

<222> (27)..(27)

<223> 3'-C3 PROPANE DIOL SPACER

<400> 43

ggcagatttt cttctgcacc gcggttc 27

<210> 44

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 44

tcccgtcgag caccagcaat tttactc 27

<210> 45

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 45

ctttggataa ggaagaagcc aact 24

<210> 46

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> INTERNUCLEOTIDE C2 PROPANE DIOL

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> 3'-C2 PROPANE DIOL

<400> 46

ctttggataa ggaagaagcc aacugcag 28

<210> 47

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 47

gggagcttga aatgaacaag gtgagaag 28

<210> 48

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 48

cagccagccg cagcacgttc gctcatagga gatatggtag agccgc 46

<210> 49

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 49

gagagaattt gtaccacctc ccaccgggca catagcagtc ctagggacag t 51

<210> 50

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 50

ggcttggctc tgctaacacg tt 22

<210> 51

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 51

ggacgtttgt aatgtccgct cc 22

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5'-(6-carboxyfluorescein) MOIETY

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> 3'-(Iowa Black FQ fluorescence quencher) MOIETY

<400> 52

acgtgctgcg gctggctggt 20

<210> 53

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 53

ccaaagagta aagtccttct ctctcgagag actgttggcc cttgaagg 48

<210> 54

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 54

gtgttgatgt tatccacctt ttgtggacta ggaaaacaga tcaatag 47

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 55

taatcctgga actccggtgc 20

<210> 56

<211

> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 56

tttatgccaa ttaacatttt gac 23

<210> 57

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5'-(6-carboxyfluorescein) MOIETY

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> RIBONCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> 3'-(Iowa Black FQ fluorescence quencher) MOIETY

<400> 57

cctccctgtg gatgagagag aagg 24

<210> 58

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (47)..(47)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (52)..(52)

<223> 3'-C3 PROPANE DIOL

<400> 58

cagccagccg cagcacgttc gctcatagga gatatggtag agccgcagac ag 52

<210> 59

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (52)..(52)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (57)..(57)

<223> 3'-C3 PROPANE DIOL

<400> 59

gagagaattt gtaccacctc ccaccgggca catagcagtc ctagggacag tggcgtt 57

<210> 60

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> 3'-C3 PROPANE DIOL

<400> 60

ggcttggctc tgctaacacg ttgctcaa 28

<210> 61

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> 3'-C3 PROPANE DIOL

<400> 61

ggacgtttgt aatgtccgct ccggcact 28

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5'-(6-carboxyfluorescein) MOIETY

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> 3'-(Iowa Black FQ fluorescence quencher) MOIETY

<400> 62

acgtgctgcg gctggctggt 20

<210> 63

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (49)..(49)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (54)..(54)

<223> 3'-C3 PROPANE DIOL

<400

> 63

ccaaagagta aagtccttct ctctcgagag actgttggcc cttgaaggag agca 54

<210> 64

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (48)..(48)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (53)..(53)

<223> 3'-C3 PROPANE DIOL

<400> 64

gtgttgatgt tatccacctt ttgtggacta ggaaaacaga tcaatagata agc 53

<210> 65

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> 3'-C3 PROPANE DIOL

<400> 65

taatcctgga actccggtgc uaaggt 26

<210> 66

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (29)..(29)

<223> 3'-C3 PROPANE DIOL

<400> 66

tttatgccaa ttaacatttt gacuttatt 29

<210> 67

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5'-(6-carboxyfluorescein) MOIETY

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> 3'-(Iowa Black FQ fluorescence quencher) MOIETY

<400> 67

cctccctgtg gatgagagag aagg 24

<210> 68

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (47)..(47)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (48)..(48)

<223> 2 C3 PROPANE DIOL INTERNUCLEOTIDE LINKAGES

<400> 68

cagccagccg cagcacgttc gctcatagga gatatggtag agccgcagag 50

<210> 69

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (52)..(52)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (53)..(53)

<223

> 2 C3 PROPANE DIOL INTERNUCLEOTIDE LINKAGES

<400> 69

gagagaattt gtaccacctc ccaccgggca catagcagtc ctagggacag tggtt 55

<210> 70

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> 2 C3 PROPANE DIOL INTERNUCLEOTIDE LINKAGES

<400> 70

ggcttggctc tgctaacacg ttgcaa 26

<210> 71

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> 2 C3 PROPANE DIOL INTERNUCLEOTIDE LINKAGES

<400> 71

ggacgtttgt aatgtccgct ccggct 26

<210> 72

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5'-(6-carboxyfluorescein) MOIETY

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> 3'-(Iowa Black FQ fluorescence quencher) MOIETY

<400> 72

acgtgctgcg gctggctggt 20

<210> 73

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (49)..(49)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (50)..(50)

<223> 2 C3 PROPANE DIOL INTERNUCLEOTIDE LINKAGES

<400> 73

ccaaagagta aagtccttct ctctcgagag actgttggcc cttgaaggag ca 52

<210> 74

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (48)..(48)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (49)..(49)

<223> 2 C3 PROPANE DIOL INTERNUCLEOTIDE LINKAGES

<400> 74

gtgttgatgt tatccacctt ttgtggacta ggaaaacaga tcaatagatg c 51

<210> 75

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> 2 C3 PROPANE DIOL INTERNUCLEOTIDE LINKAGES

<400> 75

taatcctgga actccggtgc uagt 24

<210> 76

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223

> 2 C3 PROPANE DIOL INTERNUCLEOTIDE LINKAGES

<400> 76

tttatgccaa ttaacatttt gacuttt 27

<210> 77

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5'-(6-carboxyfluorescein) MOIETY

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> RIBONUCLEOTIDE

<220><221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> 3'-(Iowa Black FQ fluorescence quencher) MOIETY

<400> 77

cctccctgtg gatgagagag aagg 24

<210> 78

<211> 768

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 78

atgaaagttg caggtgcaga tgaagctggt cgtggtccag ttattggtcc gctggttatt 60

gttgctgctg ttgtggagga agacaaaatc cgctctctga ctaagctggg tgttaaagac 120

tccaaacagc tgaccccggc gcaacgtgaa aaactgttcg atgaaatcgt aaaagtactg 180

gatgattact ctgtggtcat tgtgtccccg caggacattg acggtcgtaa gggcagcatg 240

aacgaactgg aggtagaaaa cttcgttaaa gccctgaata gcctgaaagt taagccggaa 300

gttatttaca ttgattccgc tgatgttaaa gctgaacgtt tcgctgaaaa cattcgcagc 360

cgtctggcgt acgaagcgaa agttgtagcc gaacataaag cggatgcgaa gtatgagatc 420

gtatccgcag cctctatcct ggcaaaagtt atccgtgacc gcgagatcga aaagctgaaa 480

gccgaatacg gtgattttgg ttccggttac ccgtctgatc cgcgtactaa gaaatggctg 540

gaagaatggt atagcaaaca cggcaatttc ccgccgatcg tgcgtcgtac ttgggatact 600

gcaaagaaaa tcgaagaaaa attcaaacgt gcgcagctga ccctggacaa cttcctgaag 660

cgttttcgca acaagcttgc ggccgcactc gagatcaaac gggctagcca gccagaactc 720

gccccggaag accccgagga tgtcgagcac caccaccacc accactga 768

<210> 79

<211> 762

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 79

atgaaagttg caggtgcaga tgaagctggt cgtggtccag ttattggtcc gctggttatt 60

gttgctgctg ttgtggatga aaacagtctc cccaagctgg aagagctgaa agttagagac 120

tccaaaaagc tgaccccgaa gcgacgtgaa aaactgttcg atgaaatcgt aaaagtactg 180

gatgattact ctgtggtcat tgtgtccccg caggacattg acggtcgtaa gggcagcatg 240

aacgaactgg aggtagaaaa cttcgttaaa gccctgaata gcctgaaagt taagccggat 300

gttatttacg ctgatgccgc tgatgttgat gaagaacgtt tcgctagaga gcttggcgag 360

cgtctgaact tcgaagcgga agttgtagcc aaacataaag cggatgacat ctttccggtc 420

gtatccgcag cctctatcct ggcaaaagtt atccgtgacc gcgagatcga aaagctgaaa 480

gccgaatacg gtgattttgg ttccggttac ccgtctgatc cgcgtactaa gaaatggctg 540

gaagaatggt atagcaaaca cggcaatttc ccgccgatcg tgcgtcgtac ttgggatact 600

gcaaagaaaa tcgaagaaaa attcaaacgt gcgcagctga ccctggacaa gttcttcaag 660

aaacctaagc ttgcggccgc actcgagatc aaacgggcta gccagccaga actcgccccg 720

gaagaccccg aggatgtcga gcaccaccac caccaccact ga 762

<210> 80

<211> 780

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 80

atgaaagttg caggtataga tgaagctggt cgtggtccag ctattggtcc gctggttatt 60

gttgctgctg ttgtggatga aaacagtctc cccaagctgg aagagctgaa agttagagac 120

tccaaaaagc tgaccccggc gcaacgtgaa aaactgttcg atgaaatcgt aaaagtactg 180

gatgattact ctgtggtcat tgtgtccccg caggacattg acggtcgtaa gggcagcatg 240

aacgaactgg aggtagaaaa cttcgttaaa gccctgaata gcctgaaagt taagccggat 300

gttatttacg ctgatgccgc tgatgttgat gaagaacgtt tcgctagaga gcttggcgag 360

cgtctgaact tcgaagcgaa agttgtagcc gaacataaag cggatgcgaa gtatgagatc 420

gtatccgcag cctctatcct ggcaaaagtt atccgtgacc gcgagatcga aaagctgaaa 480

gccgaatacg gtgattttgg ttccggttac ccgtctgatc cgcgtactag ggcattcctg 540

gaaaattact atagagaaca cggcgaattc ccgccgatcg tgcgtaaagg ttggaagact 600

ctaaagaaaa tcgcagaaaa agtcgaaagt gagaagaagg ctgaggaacg gcaggcgacc 660

ctggacaggt acttcaggaa ggttaagctt gcggccgcac tcgagatcaa acgggctagc 720

cagccagaac tcgccccgga agaccccgag gatgtcgagc accaccacca ccaccactga 780

<210> 81

<211> 762

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 81

atgaaagttg caggtgcaga tgaagctggt cgtggttctg ttattggtcc gctggttatt 60

gttgctgctg ttgtggatga aaacagtctc cccaagctgg aagagctgaa agttagagac 120

tccaaaaagc tgaccccgaa gcgacgtgaa aaactgttcg atgaaatcgt aaaagtactg 180

gatgattact ctgtggtcat tgtgtccccg caggacattg acggtcgtaa gggcagcatg 240

aacgaactgg aggtagaaaa cttcgttaaa gccctgaata gcctgaaagt taagccggat 300

gttatttacg ctgatgccgc tgatgttgat gaagaacgtt tcgctagaga gcttggcgag 360

cgtctgaact tcgaagcgga agttgtagcc aaacataaag cggatgacat ctttccggtc 420

gtatccgcag cctctatcct ggcaaaagtt atccgtgacc gcgagatcga aaagctgaaa 480

gccgaatacg gtgattttgg ttccggttac ccgtctgatc cgcgtactaa gaaatggctg 540

gaagaatggt atagcaaaca cggcaatttc ccgccgatcg tgcgtcgtac ttgggatact 600

gcaaagaaaa tcgaagaaaa attcaaacgt gcgcagctga ccctggacaa gttcttcaag 660

aaacctaagc ttgcggccgc actcgagatc aaacgggcta gccagccaga actcgccccg 720

gaagaccccg aggatgtcga gcaccaccac caccaccact ga 762

<210> 82

<211> 762

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 82

atgaaagttg caggtgcaga tgaagctggt cgtggtccag ttattggtcc gctggttatt 60

gttgctgctg ttgtggatga aaacagtctc cccaagctgg aagagctgaa agttagagac 120

tccaaaaagc tgaccccgaa gcgacgtgaa aaactgttcg atgaaatcgt aaaagtactg 180

gatgattact ctgtggtcat tgtgtccccg caggacattg acggtcgtaa gggcagcatg 240

aacgaactgg aggtagaaaa cttcgttaaa gccctgaata gcctgaaagt taagccggat 300

gttatttacg tagatgccgc tgatgttgat gaagaacgtt tcgctagaga gcttggcgag 360

cgtctgaact tcgaagcgga agttgtagcc aaacataaag cggatgacat ctttccggtc 420

gtatccgcag cctctatcct ggcaaaagtt atccgtgacc gcgagatcga aaagctgaaa 480

gccgaatacg gtgattttgg ttccggttac ccgtctgatc cgcgtactaa gaaatggctg 540

gaagaatggt atagcaaaca cggcaatttc ccgccgatcg tgcgtcgtac ttgggatact 600

gcaaagaaaa tcgaagaaaa attcaaacgt gcgcagctga ccctggacaa gttcttcaag 660

aaacctaagc ttgcggccgc actcgagatc aaacgggcta gccagccaga actcgccccg 720

gaagaccccg aggatgtcga gcaccaccac caccaccact ga 762

<210> 83

<211> 762

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 83

atgaaagttg caggtgcaga tgaagctggt cgtggttctg ttattggtcc gctggttatt 60

gttgctgctg ttgtggatga aaacagtctc cccaagctgg aagagctgaa agttagagac 120

tccaaaaagc tgaccccgaa gcgacgtgaa aaactgttcg atgaaatcgt aaaagtactg 180

gatgattact ctgtggtcat tgtgtccccg caggacattg acggtcgtaa gggcagcatg 240

aacgaactgg aggtagaaaa cttcgttaaa gccctgaata gcctgaaagt taagccggat 300

gttatttacg tagatgccgc tgatgttgat gaagaacgtt tcgctagaga gcttggcgag 360

cgtctgaact tcgaagcgga agttgtagcc aaacataaag cggatgacat ctttccggtc 420

gtatccgcag cctctatcct ggcaaaagtt atccgtgacc gcgagatcga aaagctgaaa 480

gccgaatacg gtgattttgg ttccggttac ccgtctgatc cgcgtactaa gaaatggctg 540

gaagaatggt atagcaaaca cggcaatttc ccgccgatcg tgcgtcgtac ttgggatact 600

gcaaagaaaa tcgaagaaaa attcaaacgt gcgcagctga ccctggacaa gttcttcaag 660

aaacctaagc ttgcggccgc actcgagatc aaacgggcta gccagccaga actcgccccg 720

gaagaccccg aggatgtcga gcaccaccac caccaccact ga 762

<210> 84

<211> 780

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 84

atgaaagttg caggtataga tgaagctggt cgtggttctg ctattggtcc gctggttatt 60

gttgctgctg ttgtggatga aaacagtctc cccaagctgg aagagctgaa agttagagac 120

tccaaaaagc tgaccccggc gcaacgtgaa aaactgttcg atgaaatcgt aaaagtactg 180

gatgattact ctgtggtcat tgtgtccccg caggacattg acggtcgtaa gggcagcatg 240

aacgaactgg aggtagaaaa cttcgttaaa gccctgaata gcctgaaagt taagccggat 300

gttatttacg ctgatgccgc tgatgttgat gaagaacgtt tcgctagaga gcttggcgag 360

cgtctgaact tcgaagcgaa agttgtagcc gaacataaag cggatgcgaa gtatgagatc 420

gtatccgcag cctctatcct ggcaaaagtt atccgtgacc gcgagatcga aaagctgaaa 480

gccgaatacg gtgattttgg ttccggttac ccgtctgatc cgcgtactag ggcattcctg 540

gaaaattact atagagaaca cggcgaattc ccgccgatcg tgcgtaaagg ttggaagact 600

ctaaagaaaa tcgcagaaaa agtcgaaagt gagaagaagg ctgaggaacg gcaggcgacc 660

ctggacaggt acttcaggaa ggttaagctt gcggccgcac tcgagatcaa acgggctagc 720

cagccagaac tcgccccgga agaccccgag gatgtcgagc accaccacca ccaccactga 780

<210> 85

<211> 780

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 85

atgaaagttg caggtataga tgaagctggt cgtggtccag ctattggtcc gctggttatt 60

gttgctgctg ttgtggatga aaacagtctc cccaagctgg aagagctgaa agttagagac 120

tccaaaaagc tgaccccggc gcgccgtgaa aaactgttcg atgaaatcgt aaaagtactg 180

gatgattact ctgtggtcat tgtgtccccg caggacattg acggtcgtaa gggcagcatg 240

aacgaactgg aggtagaaaa cttcgttaaa gccctgaata gcctgaaagt taagccggat 300

gttatttacg ctgatgccgc tgatgttgat gaagaacgtt tcgctagaga gcttggcgag 360

cgtctgaact tcgaagcgaa agttgtagcc gaacataaag cggatgcgaa gtatgagatc 420

gtatccgcag cctctatcct ggcaaaagtt atccgtgacc gcgagatcga aaagctgaaa 480

gccgaatacg gtgattttgg ttccggttac ccgtctgatc cgcgtactag ggcattcctg 540

gaaaattact atagagaaca cggcgaattc ccgccgatcg tgcgtaaagg ttggaagact 600

ctaaagaaaa tcgcagaaaa agtcgaaagt gagaagaagg ctgaggaacg gcaggcgacc 660

ctggacaggt acttcaggaa ggttaagctt gcggccgcac tcgagatcaa acgggctagc 720

cagccagaac tcgccccgga agaccccgag gatgtcgagc accaccacca ccaccactga 780

<210> 86

<211> 780

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 86

atgaaagttg caggtataga tgaagctggt cgtggtccag ctattggtcc gctggttatt 60

gttgctgctg ttgtggatga aaacagtctc cccaagctgg aagagctgaa agttagagac 120

tccaaaaagc tgaccccggc gcaacgtgaa aaactgttcg atgaaatcgt aaaagtactg 180

gatgattact ctgtggtcat tgtgtccccg caggacattg acggtcgtaa gggcagcatg 240

aacgaactgg aggtagaaaa cttcgttaaa gccctgaata gcctgaaagt taagccggat 300

gttatttacg ctgatgccgt agatgttgat gaagaacgtt tcgctagaga gcttggcgag 360

cgtctgaact tcgaagcgaa agttgtagcc gaacataaag cggatgcgaa gtatgagatc 420

gtatccgcag cctctatcct ggcaaaagtt atccgtgacc gcgagatcga aaagctgaaa 480

gccgaatacg gtgattttgg ttccggttac ccgtctgatc cgcgtactag ggcattcctg 540

gaaaattact atagagaaca cggcgaattc ccgccgatcg tgcgtaaagg ttggaagact 600

ctaaagaaaa tcgcagaaaa agtcgaaagt gagaagaagg ctgaggaacg gcaggcgacc 660

ctggacaggt acttcaggaa ggttaagctt gcggccgcac tcgagatcaa acgggctagc 720

cagccagaac tcgccccgga agaccccgag gatgtcgagc accaccacca ccaccactga 780

<210> 87

<211> 780

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 87

atgaaagttg caggtataga tgaagctggt cgtggttctg ctattggtcc gctggttatt 60

gttgctgctg ttgtggatga aaacagtctc cccaagctgg aagagctgaa agttagagac 120

tccaaaaagc tgaccccggc gcaacgtgaa aaactgttcg atgaaatcgt aaaagtactg 180

gatgattact ctgtggtcat tgtgtccccg caggacattg acggtcgtaa gggcagcatg 240

aacgaactgg aggtagaaaa cttcgttaaa gccctgaata gcctgaaagt taagccggat 300

gttatttacg ctgatgccgt agatgttgat gaagaacgtt tcgctagaga gcttggcgag 360

cgtctgaact tcgaagcgaa agttgtagcc gaacataaag cggatgcgaa gtatgagatc 420

gtatccgcag cctctatcct ggcaaaagtt atccgtgacc gcgagatcga aaagctgaaa 480

gccgaatacg gtgattttgg ttccggttac ccgtctgatc cgcgtactag ggcattcctg 540

gaaaattact atagagaaca cggcgaattc ccgccgatcg tgcgtaaagg ttggaagact 600

ctaaagaaaa tcgcagaaaa agtcgaaagt gagaagaagg ctgaggaacg gcaggcgacc 660

ctggacaggt acttcaggaa ggttaagctt gcggccgcac tcgagatcaa acgggctagc 720

cagccagaac tcgccccgga agaccccgag gatgtcgagc accaccacca ccaccactga 780

<210> 88

<211> 222

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 88

Met Lys Val Ala Gly Ala Asp Glu Ala Gly Arg Gly Ser Val Ile Gly
1 5 10 15

Pro Leu Val Ile Val Ala Ala Val Val Asp Glu Asn Ser Leu Pro Lys
20 25 30

Leu Glu Glu Leu Lys Val Arg Asp Ser Lys Lys Leu Thr Pro Lys Arg
35 40 45

Arg Glu Lys Leu Phe Asp Glu Ile Val Lys Val Leu Asp Asp Tyr Ser

50 55 60

Val Val Ile Val Ser Pro Gln Asp Ile Asp Gly Arg Lys Gly Ser Met
65 70 75 80

Asn Glu Leu Glu Val Glu Asn Phe Val Lys Ala Leu Asn Ser Leu Lys
85 90 95

Val Lys Pro Asp Val Ile Tyr Ala Asp Ala Ala Asp Val Asp Glu Glu
100 105 110

Arg Phe Ala Arg Glu Leu Gly Glu Arg Leu Asn Phe Glu Ala Glu Val

115 120 125

Val Ala Lys His Lys Ala Asp Asp Ile Phe Pro Val Val Ser Ala Ala
130 135 140

Ser Ile Leu Ala Lys Val Ile Arg Asp Arg Glu Ile Glu Lys Leu Lys
145 150 155 160

Ala Glu Tyr Gly Asp Phe Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Arg Thr
165 170 175

Lys Lys Trp Leu Glu Glu Trp Tyr Ser Lys His Gly Asn Phe Pro Pro

180 185 190

Ile Val Arg Arg Thr Trp Asp Thr Ala Lys Lys Ile Glu Glu Lys Phe
195 200 205

Lys Arg Ala Gln Leu Thr Leu Asp Lys Phe Phe Lys Lys Pro
210 215 220

<210> 89

<211> 222

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 89

Met Lys Val Ala Gly Ala Asp Glu Ala Gly Arg Gly Pro Val Ile Gly
1 5 10 15

Pro Leu Val Ile Val Ala Ala Val Val Asp Glu Asn Ser Leu Pro Lys
20 25 30

Leu Glu Glu Leu Lys Val Arg Asp Ser Lys Lys Leu Thr Pro Lys Arg
35 40 45

Arg Glu Lys Leu Phe Asp Glu Ile Val Lys Val Leu Asp Asp Tyr Ser
50 55 60

Val Val Ile Val Ser Pro Gln Asp Ile Asp Gly Arg Lys Gly Ser Met
65 70 75 80

Asn Glu Leu Glu Val Glu Asn Phe Val Lys Ala Leu Asn Ser Leu Lys
85 90 95

Val Lys Pro Asp Val Ile Tyr Ala Asp Ala Val Asp Val Asp Glu Glu
100 105 110

Arg Phe Ala Arg Glu Leu Gly Glu Arg Leu Asn Phe Glu Ala Glu Val
115 120 125

Val Ala Lys His Lys Ala Asp Asp Ile Phe Pro Val Val Ser Ala Ala
130 135 140

Ser Ile Leu Ala Lys Val Ile Arg Asp Arg Glu Ile Glu Lys Leu Lys
145 150 155 160

Ala Glu Tyr Gly Asp Phe Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Arg Thr
165 170 175

Lys Lys Trp Leu Glu Glu Trp Tyr Ser Lys His Gly Asn Phe Pro Pro
180 185 190

Ile Val Arg Arg Thr Trp Asp Thr Ala Lys Lys Ile Glu Glu Lys Phe
195 200 205

Lys Arg Ala Gln Leu Thr Leu Asp Lys Phe Phe Lys Lys Pro

210 215 220

<210> 90

<211> 222

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 90

Met Lys Val Ala Gly Ala Asp Glu Ala Gly Arg Gly Ser Val Ile Gly

1 5 10 15

Pro Leu Val Ile Val Ala Ala Val Val Asp Glu Asn Ser Leu Pro Lys

20 25 30

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

35 40 45

Arg Glu Lys Leu Phe Asp Glu Ile Val Lys Val Leu Asp Asp Tyr Ser

50 55 60

Val Val Ile Val Ser Pro Gln Asp Ile Asp Gly Arg Lys Gly Ser Met

65 70 75 80

Asn Glu Leu Glu Val Glu Asn Phe Val Lys Ala Leu Asn Ser Leu Lys

85 90 95

Val Lys Pro Asp Val Ile Tyr Ala Asp Ala Val Asp Val Asp Glu Glu

100 105 110

Arg Phe Ala Arg Glu Leu Gly Glu Arg Leu Asn Phe Glu Ala Glu Val

115 120 125

Val Ala Lys His Lys Ala Asp Asp Ile Phe Pro Val Val Ser Ala Ala

130 135 140

Ser Ile Leu Ala Lys Val Ile Arg Asp Arg Glu Ile Glu Lys Leu Lys

145 150 155 160

Ala Glu Tyr Gly Asp Phe Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Arg Thr

165 170 175

Lys Lys Trp Leu Glu Glu Trp Tyr Ser Lys His Gly Asn Phe Pro Pro

180 185 190

Ile Val Arg Arg Thr Trp Asp Thr Ala Lys Lys Ile Glu Glu Lys Phe
195 200 205

Lys Arg Ala Gln Leu Thr Leu Asp Lys Phe Phe Lys Lys Pro
210 215 220

<210> 91

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 91

Met Lys Val Ala Gly Ile Asp Glu Ala Gly Arg Gly Ser Ala Ile Gly
1 5 10 15

Pro Leu Val Ile Val Ala Ala Val Val Asp Glu Asn Ser Leu Pro Lys
20 25 30

Leu Glu Glu Leu Lys Val Arg Asp Ser Lys Lys Leu Thr Pro Ala Gln
35 40 45

Arg Glu Lys Leu Phe Asp Glu Ile Val Lys Val Leu Asp Asp Tyr Ser
50 55 60

Val Val Ile Val Ser Pro Gln Asp Ile Asp Gly Arg Lys Gly Ser Met
65 70 75 80

Asn Glu Leu Glu Val Glu Asn Phe Val Lys Ala Leu Asn Ser Leu Lys
85 90 95

Val Lys Pro Asp Val Ile Tyr Ala Asp Ala Ala Asp Val Asp Glu Glu
100 105 110

Arg Phe Ala Arg Glu Leu Gly Glu Arg Leu Asn Phe Glu Ala Lys Val
115 120 125

Val Ala Glu His Lys Ala Asp Ala Lys Tyr Glu Ile Val Ser Ala Ala
130 135 140

Ser Ile Leu Ala Lys Val Ile Arg Asp Arg Glu Ile Glu Lys Leu Lys
145 150 155 160

Ala Glu Tyr Gly Asp Phe Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Arg Thr
165 170 175

Arg Ala Phe Leu Glu Asn Tyr Tyr Arg Glu His Gly Glu Phe Pro Pro
180 185 190

Ile Val Arg Lys Gly Trp Lys Thr Leu Lys Lys Ile Ala Glu Lys Val
195 200 205

Glu Ser Glu Lys Lys Ala Glu Glu Arg Gln Ala Thr Leu Asp Arg Tyr
210 215 220

Phe Arg Lys Val
225

<210> 92

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 92

Met Lys Val Ala Gly Ile Asp Glu Ala Gly Arg Gly Pro Ala Ile Gly
1 5 10 15

Pro Leu Val Ile Val Ala Ala Val Val Asp Glu Asn Ser Leu Pro Lys
20 25 30

Leu Glu Glu Leu Lys Val Arg Asp Ser Lys Lys Leu Thr Pro Ala Arg
35 40 45

Arg Glu Lys Leu Phe Asp Glu Ile Val Lys Val Leu Asp Asp Tyr Ser
50 55 60

Val Val Ile Val Ser Pro Gln Asp Ile Asp Gly Arg Lys Gly Ser Met
65 70 75 80

Asn Glu Leu Glu Val Glu Asn Phe Val Lys Ala Leu Asn Ser Leu Lys
85 90 95

Val Lys Pro Asp Val Ile Tyr Ala Asp Ala Ala Asp Val Asp Glu Glu
100 105 110

Arg Phe Ala Arg Glu Leu Gly Glu Arg Leu Asn Phe Glu Ala Lys Val
115 120 125

Val Ala Glu His Lys Ala Asp Ala Lys Tyr Glu Ile Val Ser Ala Ala

130 135 140

Ser Ile Leu Ala Lys Val Ile Arg Asp Arg Glu Ile Glu Lys Leu Lys
145 150 155 160
Ala Glu Tyr Gly Asp Phe Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Arg Thr
165 170 175
Arg Ala Phe Leu Glu Asn Tyr Tyr Arg Glu His Gly Glu Phe Pro Pro
180 185 190
Ile Val Arg Lys Gly Trp Lys Thr Leu Lys Lys Ile Ala Glu Lys Val
195 200 205

Glu Ser Glu Lys Lys Ala Glu Glu Arg Gln Ala Thr Leu Asp Arg Tyr
210 215 220
Phe Arg Lys Val
225

<210> 93
<211> 228
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE
<400> 93
Met Lys Val Ala Gly Ile Asp Glu Ala Gly Arg Gly Pro Ala Ile Gly
1 5 10 15
Pro Leu Val Ile Val Ala Ala Val Val Asp Glu Asn Ser Leu Pro Lys
20 25 30

Leu Glu Glu Leu Lys Val Arg Asp Ser Lys Lys Leu Thr Pro Ala Gln
35 40 45
Arg Glu Lys Leu Phe Asp Glu Ile Val Lys Val Leu Asp Asp Tyr Ser
50 55 60
Val Val Ile Val Ser Pro Gln Asp Ile Asp Gly Arg Lys Gly Ser Met
65 70 75 80
Asn Glu Leu Glu Val Glu Asn Phe Val Lys Ala Leu Asn Ser Leu Lys
85 90 95

Val Lys Pro Asp Val Ile Tyr Ala Asp Ala Val Asp Val Asp Glu Glu
100 105 110
Arg Phe Ala Arg Glu Leu Gly Glu Arg Leu Asn Phe Glu Ala Lys Val
115 120 125
Val Ala Glu His Lys Ala Asp Ala Lys Tyr Glu Ile Val Ser Ala Ala
130 135 140
Ser Ile Leu Ala Lys Val Ile Arg Asp Arg Glu Ile Glu Lys Leu Lys
145 150 155 160

Ala Glu Tyr Gly Asp Phe Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Arg Thr
165 170 175
Arg Ala Phe Leu Glu Asn Tyr Tyr Arg Glu His Gly Glu Phe Pro Pro
180 185 190
Ile Val Arg Lys Gly Trp Lys Thr Leu Lys Lys Ile Ala Glu Lys Val
195 200 205
Glu Ser Glu Lys Lys Ala Glu Glu Arg Gln Ala Thr Leu Asp Arg Tyr
210 215 220

Phe Arg Lys Val
225

<210> 94
<211> 228
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE
<400> 94

Met Lys Val Ala Gly Ile Asp Glu Ala Gly Arg Gly Ser Ala Ile Gly
1 5 10 15
Pro Leu Val Ile Val Ala Ala Val Val Asp Glu Asn Ser Leu Pro Lys
20 25 30
Leu Glu Glu Leu Lys Val Arg Asp Ser Lys Lys Leu Thr Pro Ala Gln
35 40 45

Arg Glu Lys Leu Phe Asp Glu Ile Val Lys Val Leu Asp Asp Tyr Ser
50 55 60

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

Arg Phe Ala Arg Glu Leu Gly Glu Arg Leu Asn Phe Glu Ala Lys Val
115 120 125
Val Ala Glu His Lys Ala Asp Ala Lys Tyr Glu Ile Val Ser Ala Ala
130 135 140
Ser Ile Leu Ala Lys Val Ile Arg Asp Arg Glu Ile Glu Lys Leu Lys
145 150 155 160
Ala Glu Tyr Gly Asp Phe Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Arg Thr
165 170 175

Arg Ala Phe Leu Glu Asn Tyr Tyr Arg Glu His Gly Glu Phe Pro Pro
180 185 190
Ile Val Arg Lys Gly Trp Lys Thr Leu Lys Lys Ile Ala Glu Lys Val
195 200 205
Glu Ser Glu Lys Lys Ala Glu Glu Arg Gln Ala Thr Leu Asp Arg Tyr
210 215 220
Phe Arg Lys Val
225

<210> 95
<211> 669
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223>
SYNTHETIC SEQUENCE
<400> 95
atgaaagttg caggtgcaga tgaagctggt cgtggttctg ttattggtcc gctggttatt 60
gttgctgctg ttgtggatga aaacagtctc cccaagctgg aagagctgaa agttagagac 120
tccaaaaagc tgaccccgaa gcgacgtgaa aaactgttcg atgaaatcgt aaaagtactg 180
gatgattact ctgtggtcat tgtgtccccg caggacattg acggtcgtaa gggcagcatg 240

aacgaactgg aggtagaaaa cttcgttaaa gccctgaata gcctgaaagt taagccggat 300

gttatttacg ctgatgccgc tgatgttgat gaagaacgtt tcgctagaga gcttggcgag 360

cgtctgaact tcgaagcgga agttgtagcc aaacataaag cggatgacat ctttccggtc 420

gtatccgcag cctctatcct ggcaaaagtt atccgtgacc gcgagatcga aaagctgaaa 480

gccgaatacg gtgattttgg ttccggttac ccgtctgatc cgcgtactaa gaaatggctg 540

gaagaatggt atagcaaaca cggcaatttc ccgccgatcg tgcgtcgtac ttgggatact 600

gcaaagaaaa tcgaagaaaa attcaaacgt gcgcagctga ccctggacaa gttcttcaag 660

aaaccttga 669

<210> 96

<211> 669

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 96

atgaaagttg caggtgcaga tgaagctggt cgtggtccag ttattggtcc gctggttatt 60

gttgctgctg ttgtggatga aaacagtctc cccaagctgg aagagctgaa agttagagac 120

tccaaaaagc tgaccccgaa gcgacgtgaa aaactgttcg atgaaatcgt aaaagtactg 180

gatgattact ctgtggtcat tgtgtccccg caggacattg acggtcgtaa gggcagcatg 240

aacgaactgg aggtagaaaa cttcgttaaa gccctgaata gcctgaaagt taagccggat 300

gttatttacg tagatgccgc tgatgttgat gaagaacgtt tcgctagaga gcttggcgag 360

cgtctgaact tcgaagcgga agttgtagcc aaacataaag cggatgacat ctttccggtc 420

gtatccgcag cctctatcct ggcaaaagtt atccgtgacc gcgagatcga aaagctgaaa 480

gccgaatacg gtgattttgg ttccggttac ccgtctgatc cgcgtactaa gaaatggctg 540

gaagaatggt atagcaaaca cggcaatttc ccgccgatcg tgcgtcgtac ttgggatact 600

gcaaagaaaa tcgaagaaaa attcaaacgt gcgcagctga ccctggacaa gttcttcaag 660

aaaccttga 669

<210> 97

<211> 669

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 97

atgaaagttg caggtgcaga tgaagctggt cgtggttctg ttattggtcc gctggttatt 60

gttgctgctg ttgtggatga aaacagtctc cccaagctgg aagagctgaa agttagagac 120

tccaaaaagc tgaccccgaa gcgacgtgaa aaactgttcg atgaaatcgt aaaagtactg 180

gatgattact ctgtggtcat tgtgtccccg caggacattg acggtcgtaa gggcagcatg 240

aacgaactgg aggtagaaaa cttcgttaaa gccctgaata gcctgaaagt taagccggat 300

gttatttacg tagatgccgc tgatgttgat gaagaacgtt tcgctagaga gcttggcgag 360

cgtctgaact tcgaagcgga agttgtagcc aaacataaag cggatgacat ctttccggtc 420

gtatccgcag cctctatcct ggcaaaagtt atccgtgacc gcgagatcga aaagctgaaa 480

gccgaatacg gtgattttgg ttccggttac ccgtctgatc cgcgtactaa gaaatggctg 540

gaagaatggt atagcaaaca cggcaatttc ccgccgatcg tgcgtcgtac ttgggatact 600

gcaaagaaaa tcgaagaaaa attcaaacgt gcgcagctga ccctggacaa gttcttcaag 660

aaaccttga 669

<210> 98

<211> 687

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 98

atgaaagttg caggtataga tgaagctggt cgtggttctg ctattggtcc gctggttatt 60

gttgctgctg ttgtggatga aaacagtctc cccaagctgg aagagctgaa agttagagac 120

tccaaaaagc tgaccccggc gcaacgtgaa aaactgttcg atgaaatcgt aaaagtactg 180

gatgattact ctgtggtcat tgtgtccccg caggacattg acggtcgtaa gggcagcatg 240

aacgaactgg aggtagaaaa cttcgttaaa gccctgaata gcctgaaagt taagccggat 300

gttatttacg ctgatgccgc tgatgttgat gaagaacgtt tcgctagaga gcttggcgag 360

cgtctgaact tcgaagcgaa agttgtagcc gaacataaag cggatgcgaa gtatgagatc 420

gtatccgcag cctctatcct ggcaaaagtt atccgtgacc gcgagatcga aaagctgaaa 480

gccgaatacg gtgattttgg ttccggttac ccgtctgatc cgcgtactag ggcattcctg 540

gaaaattact atagagaaca cggcgaattc ccgccgatcg tgcgtaaagg ttggaagact 600

ctaaagaaaa tcgcagaaaa agtcgaaagt gagaagaagg ctgaggaacg gcaggcgacc 660

ctggacaggt acttcaggaa ggtttga 687

<210> 99

<211> 687

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 99

atgaaagttg caggtataga tgaagctggt cgtggtccag ctattggtcc gctggttatt 60

gttgctgctg ttgtggatga aaacagtctc cccaagctgg aagagctgaa agttagagac 120

tccaaaaagc tgaccccggc gcgccgtgaa aaactgttcg atgaaatcgt aaaagtactg 180

gatgattact ctgtggtcat tgtgtccccg caggacattg acggtcgtaa gggcagcatg 240

aacgaactgg aggtagaaaa cttcgttaaa gccctgaata gcctgaaagt taagccggat 300

gttatttacg ctgatgccgc tgatgttgat gaagaacgtt tcgctagaga gcttggcgag 360

cgtctgaact tcgaagcgaa agttgtagcc gaacataaag cggatgcgaa gtatgagatc 420

gtatccgcag cctctatcct ggcaaaagtt atccgtgacc gcgagatcga aaagctgaaa 480

gccgaatacg gtgattttgg ttccggttac ccgtctgatc cgcgtactag ggcattcctg 540

gaaaattact atagagaaca cggcgaattc ccgccgatcg tgcgtaaagg ttggaagact 600

ctaaagaaaa tcgcagaaaa agtcgaaagt gagaagaagg ctgaggaacg gcaggcgacc 660

ctggacaggt acttcaggaa ggtttga 687

<210> 100

<211> 687

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 100

atgaaagttg caggtataga tgaagctggt cgtggtccag ctattggtcc gctggttatt 60

gttgctgctg ttgtggatga aaacagtctc cccaagctgg aagagctgaa agttagagac 120

tccaaaaagc tgaccccggc gcaacgtgaa aaactgttcg atgaaatcgt aaaagtactg 180

gatgattact ctgtggtcat tgtgtccccg caggacattg acggtcgtaa gggcagcatg 240

aacgaactgg aggtagaaaa cttcgttaaa gccctgaata gcctgaaagt taagccggat 300

gttatttacg ctgatgccgt agatgttgat gaagaacgtt tcgctagaga gcttggcgag 360

cgtctgaact tcgaagcgaa agttgtagcc gaacataaag cggatgcgaa gtatgagatc 420

gtatccgcag cctctatcct ggcaaaagtt atccgtgacc gcgagatcga aaagctgaaa 480

gccgaatacg gtgattttgg ttccggttac ccgtctgatc cgcgtactag ggcattcctg 540

gaaaattact atagagaaca cggcgaattc ccgccgatcg tgcgtaaagg ttggaagact 600

ctaaagaaaa tcgcagaaaa agtcgaaagt gagaagaagg ctgaggaacg gcaggcgacc 660

ctggacaggt acttcaggaa ggtttga 687

<210> 101

<211> 687

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYNTHETIC SEQUENCE

<400> 101

atgaaagttg caggtataga tgaagctggt cgtggttctg ctattggtcc gctggttatt 60

gttgctgctg ttgtggatga aaacagtctc cccaagctgg aagagctgaa agttagagac 120

tccaaaaagc tgaccccggc gcaacgtgaa aaactgttcg atgaaatcgt aaaagtactg 180

gatgattact ctgtggtcat tgtgtccccg caggacattg acggtcgtaa gggcagcatg 240

aacgaactgg aggtagaaaa cttcgttaaa gccctgaata gcctgaaagt taagccggat 300

gttatttacg ctgatgccgt agatgttgat gaagaacgtt tcgctagaga gcttggcgag 360

cgtctgaact tcgaagcgaa agttgtagcc gaacataaag cggatgcgaa gtatgagatc 420

gtatccgcag cctctatcct ggcaaaagtt atccgtgacc gcgagatcga aaagctgaaa 480

gccgaatacg gtgattttgg ttccggttac ccgtctgatc cgcgtactag ggcattcctg 540

gaaaattact atagagaaca cggcgaattc ccgccgatcg tgcgtaaagg ttggaagact 600

ctaaagaaaa tcgcagaaaa agtcgaaagt gagaagaagg ctgaggaacg gcaggcgacc 660

ctggacaggt acttcaggaa ggtttga 687