



등록특허 10-2701188



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년08월30일
(11) 등록번호 10-2701188
(24) 등록일자 2024년08월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
C12Q 2600/156 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7032795
(22) 출원일자(국제) 2018년04월10일
심사청구일자 2021년03월23일
(85) 번역문제출일자 2019년11월05일
(65) 공개번호 10-2020-0017386
(43) 공개일자 2020년02월18일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/026962
(87) 국제공개번호 WO 2018/191304
국제공개일자 2018년10월18일
(30) 우선권주장
62/483,588 2017년04월10일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020070076532 A

KR1020110018702 A*

KR1020160088028 A

Invest Ophthalmol Vis Sci, 57(13):5407-5414.
(2016. 10. 01.)

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 1 항

심사관 : 최지다

(54) 발명의 명칭 각막 이상증과 관련된 대립유전자의 다중 검출을 위한 방법

(57) 요 약

본 개시내용은 돌연변이 TGFBI 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 표지된 프로브를 포함하는 반응 혼합물(반응 혼합물은 대상체로부터의 생물학적 샘플로부터 TGFBI 유전자 서열을 증폭시키기 위한 적어도 하나의 증폭 프라이머 쌍을 추가로 포함한다)을 포함하여 대상체에서 각막 이상증을 검출하고; TGFBI 유전자에서 G623D,

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1a

M502V, R124S, A546D, H572R, 및 H626R 돌연변이로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 돌연변이를 검출하는 방법을 제공하며; 여기서 검출 단계는 표지된 검출 프로브를 사용하여 하나 이상의 돌연변이를 검출함을 포함한다. 반응 혼합물을 포함하는 반응 키트가 추가로 제공된다.

(52) CPC특허분류

C12Q 2600/16 (2013.01)

(30) 우선권주장

62/573,537 2017년10월17일 미국(US)

62/624,660 2018년01월31일 미국(US)

62/624,661 2018년01월31일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

각막 이상증(CD) 검출에 대한 정보를 제공하는 방법으로서,

(A-1) 적어도 제1 증폭 프라이머를 포함하는 반응 혼합물을 사용하여 대상체로부터의 생물학적 샘플로부터 하나 또는 둘의 관심 DNA 영역을 증폭시켜 하나 또는 둘의 증폭된 관심 DNA 영역을 생산하는 단계;

(B-1) 서열 번호 36의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 표지된 TGFBI G623D 검출 프로브 및 서열 번호 30의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 표지된 TGFBI M502V 검출 프로브를, 상기 하나 또는 둘의 증폭된 관심 DNA 영역에서 아미노산 위치 623을 암호화하는 영역을 포함하는 제1 TGFBI 유전자 서열 및 상기 하나 또는 둘의 증폭된 관심 DNA 영역에서 아미노산 위치 502을 암호화하는 영역을 포함하는 제2 TGFBI 유전자 서열에 각각 하이브리드화(hybridizing)하는 단계;

(C) 상기 하나 또는 둘의 증폭된 관심 DNA 영역에서 적어도 G623D 및 M502V 돌연변이가 검출되는 경우, CD를 검출하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 출원은 일반적으로 각막 이상증을 검출 또는 진단하기 위한 프로브, 및 각막 이상증을 검출 또는 진단하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

실시간 PCR을 사용하여 실질적으로 동일한 서열을 갖는 핵산 서열들 간의 차이를 검출할 수 있다. 차동 표지된 형광 핵산 프로브, 예를 들어 야생형 서열에 결합하는 것 및 돌연변이 서열에 결합하는 것의 사용을 통해, 인간 게놈에서 단일 뉴클레오티드 변화가 신속하고 신뢰할 수 있게 검출될 수 있다. 이러한 분해능은 의학적 진단에 적용되었으며, 여기서 단일 뉴클레오타이드 다형성 (SNP), 즉 단백질의 코딩 및/또는 비-코딩 서열 내에서 발견되는 단일 염기 변화가 인간 질병과 상관성이 있다.

[0003]

그러나, 실시간 PCR 분석은 고품질 샘플의 수집 및 분리에 매우 의존한다. 불량한 샘플 수집 및/또는 분리는 더 긴 분석 조건과 더 많은 양의 실시간 PCR 시약의 사용을 필요로 하며, 이들 둘 다가 비용 증가와 생산성 저하를 초래한다. 게다가, 실시간 PCR 단일 뉴클레오티드 다형성 검출 분석의 실패는 추가 샘플을 수집해야 해서 시간과 자원의 손실이 훨씬 커질 수 있다.

[0004]

따라서, 분석의 전반적인 성공률을 개선하고, 분석에 필요한 시약을 줄이고, 나중에 추가 시료를 수집해야 할 필요성을 줄이는 개선된 샘플 수집 및 분리를 야기하는 방법이 매우 바람직하다. 게다가, 보다 적은 양의 샘플

물질로 실시간 PCR SNP 검출 분석을 수행하는 방법은 또한 고품질 샘플의 수집 및 분리와 관련된 문제를 줄일 수 있다.

[0005] 각막은 망막에 빛을 집중시키는 과정을 시작하는 안구 앞에 있는 무혈관 투명 조직이며 눈의 광출력의 대략 3분의 2를 차지한다. 다수의 유전 조건이 각막 선명도에 영향을 미치며, 이들은 영향을 받은 각막 층에 따라 후부, 간질 또는 표면으로 분류된다. 상염색체 우성 (AD), X-연관 열성 (XR), 및 상염색체 열성 (AR) 유전 패턴이 모두 관찰되었으며, 많은 경우에, 질병 유전자좌가 매핑되었고 원인 유전자가 확인되었다. 가장 많이 연구된 각막 이상증은 염색체 5q31.1에 위치한 형질전환 성장 인자 베타-유도된 유전자 (*TGFBI*)에서 상염색체 우성 미스센스 돌연변이에 의해 야기된 것이며, 이것은 세포 접착, 이동, 증식 및 분화를 매개함으로써 생리학적 및 병리학적 반응에서 중추적 역할을 하는 것으로 생각되는 세포외 기질 단백질을 암호화한다. 현재까지, 과립 각막 이상증 타입 1 (GCD1) 및 타입 2 (GCD2, 이전에 아벨리노 각막 이상증으로 명명됨), 상피 기저막 이상증 (EBMD), 격자 각막 이상증 (LCD), 레이스-버클러스 각막 이상증 (RBCD) 및 티엘-벵케 각막 이상증 (TBCD)을 포함하여 각막 아밀로이드 및 비-아밀로이드 침착물을 갖는 광범위하게 상이한 상피-간질 각막 이상증을 야기하는 62개의 *TGFBI* 돌연변이가 인간 유전자 돌연변이 데이터베이스 (HGMD)에 보고되어 있다. 다른 *TGFBI* 돌연변이가 특정 각막 이상증을 유발할 수 있으며, 유전자형-표현형 상관관계가 두 개의 돌연변이 호발부위, R124와 R555에서 입증되었다.

[0006] 라식 (LASIK)은 근시 (근시안), 원시 (초안) 및 난시에 대한 시력 교정을 제공하는 수술 절차이다. 각막 상피의 얇은 플랩을 자르고 접으며, 노출된 간질 층을 각막 초점력을 변경하기 위해 레이저로 재형성한다. 최소 절개 각막 추출법 (SMILE)은 근시의 교정을 위한 덜 침습적인 수술이다. 상피 층에 레이저에 의해 작은 절개를 만들고, 작은 간질 조각 (각막실질조각)을 제거하여 간질을 재형성한다. 굴절교정 레이저 각막절제 (PRK) 및 치료 레이저 각막절제 (PTK) 수술은 각막으로부터 표면 불투명도와 표면 불규칙성을 제거함으로써 시력 교정에 영향을 미치거나 다양한 안과 질환을 치료한다. 이러한 침습성 각막 수술은 간질 층에 상처를 유발하며, 이것이 *TGFBI*의 발현을 상향조절하여, 각막 이상증과 관련된 병리를 일으키는 *TGFBI* 돌연변이를 가진 개인의 각막 내에 각막 아밀로이드 침착을 야기한다. LASIK은 과립 각막 이상증 (GCD)을 가진 개인에서는 금지된다. 상업적으로 이용 가능한 유전자 검사는 *TGFBI* 유전자 내에서 다섯 가지 더 일반적인 유형의 각막 이상증과 관련된 다섯 가지 가장 일반적인 돌연변이를 검출할 수 있다: 과립 각막 이상증 타입 2의 경우 R124H, 격자 각막 이상증 타입 1의 경우 R124C, 레이스-버클러 각막 이상증의 경우 R124L, 과립 각막 이상증 타입 1의 경우 R555W, 및 티엘-벵케 각막 이상증의 경우 R555Q. 이러한 다섯 가지 돌연변이 유전자 검사는 원래 *TGFBI* 각막 이상증 사례의 대다수가 R124H 돌연변이에 의해 유발된 GCD2로 진단되는 한국인과 일본인을 대상으로 설계되었다. 한국과 일본 내에서, 검사는 주로 굴절교정 수술 전에 스크리닝 도구로서 사용된다. 그러나, 미국 및 유럽에서, 검사는 굴절교정 수술 후보를 선별하고 각막 이상증 질환의 임상 진단을 위한 확인 검사로서 사용된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 상기 배경을 감안할 때, 당업계에서 요구되는 것은 다양한 인구 및 지리적 위치에서 상이한 *TGFBI* 돌연변이의 유병률을 검토하여 전세계의 상이한 인구에서 사용하기 위해 유전자 검사를 개선하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 하나의 측면에서, 본 개시내용은 서열 번호 25-30, 36 및 54로 이루어진 그룹으로부터 선택된 돌연변이 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표지된 프로브(labeled probe)를 포함하는, 대상체에서 각막 이상증을 검출하기 위한 반응 혼합물을 제공한다. 반응 혼합물은 서열 번호 19-24, 33 및 50으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 정상 뉴클레오티드 서열을 포함하는 상응하는 표지된 프로브를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표지된 프로브는 서열 번호 25-30, 36 및 54로 이루어진 그룹으로부터 선택된 돌연변이 뉴클레오티드 서열로 이루어지고/지거나; 상응하는 표지된 프로브는 서열 번호 19-24, 33 및 50으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 정상 뉴클레오티드 서열로 이루어진다. 추가의 실시양태에서, 반응 혼합물은 서열 번호 33 또는 36의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표지된 *TGFBI* G623D 프로브; 및 서열 번호 24 또는 30의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표지된 *TGFBI* M502V 프로브를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 서열 번호 36의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표지된 *TGFBI* G623D 프로브; 및 서열 번호 30의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표지된 *TGFBI* M502V 프로브.

[0009] 일부 실시양태에서, 표지된 프로브는 형광 표지된다. 추가의 실시양태에서, 각각의 표지된 프로브는 상이한 프

로브를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 각각의 표지된 프로브는 독립적으로 VIC, FAM, ABY, 또는 JUN으로 표지된다.

[0010] 일부 실시양태에서, 반응 혼합물은 대상체로부터의 생물학적 샘플로부터 TGFBI 유전자 서열을 증폭시키기 위한 적어도 하나의 증폭 프라이머 쌍을 추가로 포함한다. 추가의 실시양태에서, 반응 혼합물은 (a) 서열 번호 7-12 및 41로 이루어진 그룹으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 상응하는 정방향 프라이머(forward primer); 및 (b) 서열 번호 13-18 및 47로 이루어진 그룹으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 상응하는 역방향 프라이머(reverse primer)를 포함한다. 반응 혼합물이 서열 번호 33 또는 36의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표지된 TGFBI G623D 프로브; 및 서열 번호 24 또는 30의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표지된 TGFBI M502V 프로브를 포함하는 경우, 반응 혼합물은 (a) 서열 번호 10 및 12를 포함하는 상응하는 정방향 프라이머; 및 (b) 서열 번호 16 및 18을 포함하는 상응하는 역방향 프라이머를 추가로 포함할 수 있다.

[0011] 하나의 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기술된 반응 혼합물을 포함하는 반응 키트(reaction kit)를 제공한다. 하나의 측면에서, 반응 키트는 TGBI 유전자에서 G623D 및 M502V 돌연변이에 대한 검출 프로브를 포함하는 반응 혼합물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 반응 키트는 TGBI 유전자에서 R124S, A546D, H572R, 및 H626R 돌연변이에 대한 하나 이상의 검출 프로브를 추가로 포함한다. 하나의 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기술된 반응 혼합물, 및 R124S, A546D, H572R, 및 H626R로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 TGFBI 돌연변이에 대한 하나 이상의 표지된 프로브를 포함하는 반응 키트를 제공한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 표지된 프로브는 반응 혼합물로부터 분리되어 있다. 추가의 실시양태에서, 하나 이상의 표지된 프로브는 서열 번호 19, 25, 20, 26, 21, 27, 23, 29, 50 및 54의 뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이들로 이루어진 표지된 프로브로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 추가의 실시양태에서, 반응 키트는 서열 번호 19 또는 25의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표지된 TGFBI R124S 프로브를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 반응 키트는 서열 번호 20 또는 26의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표지된 TGFBI A546D 프로브를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 반응 키트는 서열 번호 21 또는 27의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표지된 TGFBI H572R 프로브를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 반응 키트는 서열 번호 23, 29, 50 또는 54의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표지된 TGFBI H626R 프로브를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 반응 키트는 추가의 증폭 프라이머 세트를 추가로 포함할 수 있다. 추가의 실시양태에서, 반응 키트는 R124S 돌연변이를 포함하는 TGFBI 유전자를 증폭시키기 위한 제3 증폭 프라이머 세트, A546D 돌연변이를 포함하는 TGFBI 유전자를 증폭시키기 위한 제4 증폭 프라이머 세트, H572R 돌연변이를 포함하는 TGFBI 유전자를 증폭시키기 위한 제5 증폭 프라이머 세트, 및/또는 H626R 돌연변이를 포함하는 TGFBI 유전자를 증폭시키기 위한 제6 증폭 프라이머 세트를 추가로 포함한다.

[0012] 하나의 측면에서, 본 개시내용은 TGFBI 유전자에서 G623D, M502V, R124S, A546D, H572R, 및 H626R 돌연변이로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 돌연변이를 검출하는 단계를 포함하여, 각막 이상증을 검출하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 검출 단계는 TGFBI 유전자를 서열분석함을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 검출 단계는 표지된 검출 프로브를 사용하여 돌연변이를 검출함을 포함한다.

[0013] 하나의 측면에서, 본 개시내용은: (A-1) 적어도 제1 증폭 프라이머 쌍 및 적어도 두 개의 검출 프로브의 세트를 포함하는 반응 혼합물을 사용하여 대상체로부터의 생물학적 샘플로부터 제1 TGFBI 유전자 서열을 증폭시키는 단계; (B-1) 적어도 두 개의 검출 프로브의 세트의 제1 및 제2 검출 프로브를 각각 G623D 돌연변이를 갖는 제1 TGFBI 유전자 서열 및 M502V 돌연변이를 갖는 제2 TGFBI 유전자 서열에 하이브리드화(hybridizing)하는 단계; 및 (C-1) 각각 제1 및 제2 TGFBI 유전자 서열에 대한 제1 및 제2 검출 프로브의 하이브리드화에 기초하여 TGFBI 유전자 서열에서 하나, 둘 또는 그 이상의 돌연변이를 검출하는 단계를 포함하여, 각막 이상증을 검출하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 (A-2) 생물학적 샘플로부터 제3 TGFBI 유전자 서열을 증폭시키는 단계로서, 여기서, 반응 혼합물은 R124S, A546D, H572R, 및 H626R로 이루어진 그룹으로부터 선택된 제3 TGFBI 돌연변이에 대한 제3 표지된 프로브를 추가로 포함하는 단계; (B-2) 제3 표지된 프로브를 제3 TGFBI 유전자 서열에 하이브리드화하는 단계; 및 (C-2) 제3 TGFBI 유전자 서열에 대한 제3 검출 프로브의 하이브리드화에 기초하여 제3 TGFBI 유전자 서열에서 돌연변이를 검출하는 단계를 추가로 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1a는 다양한 TGFBI 돌연변이를 갖는 보고된 사례의 세계 지도를 예시한다. 지역이나 국가 위에 배치된 각 풍선은 인종, 돌연변이 및 사례 수와 같은 보고된 사례 정보를 담고 있다. 지도는 TGFBI 돌연변이 사례가 제한된 연구 능력 또는 출판이 어려운 언어를 가진 지역을 제외하고는 전세계에 걸쳐 보고되어 있음을 예시한다. 남미에서 보고된 사례는 거의 없으며, 아프리카나 러시아에서는 보고된 사례가 없다. 도 1b는 잉글랜드를 가리

키는 적색 화살표를 풍선에 담겨있는 정보의 예로서 예시한다. 왼쪽의 범례는 보고된 돌연변이, 인종 및 각각의 보고된 돌연변이에 대한 총 사례 수를 보여준다.

도 2는 자리 구역별 비교를 제공한다. 5가지 돌연변이, 6가지 추가 돌연변이 및 제안된 확장된 11가지 돌연변이 패널을 사용한 원래의 유전자 검사는 1,600건 이상의 보고된 사례에서 모델링되었다. 5가지 돌연변이를 사용한 이용 가능한 유전자 검사의 검출율은 유럽과 아시아 간에 매우 가깝다.

도 3은 보고된 사례 내에서 가장 높은 것부터 가장 낮은 것까지 5가지 가장 일반적인 돌연변이를 순위화한 표를 제공한다. 또한, 이것은 6가지 추가 돌연변이에 대해 사례 수를 높은 것부터 낮은 것까지 열거한다.

도 4는 R124C, R555W, R124H, R555Q, 및 R124L에 대해 이용 가능한 유전자 검사에 대한 이론적 결과를 나타내는 표를 제공한다. 이 검사는 Moorfield의 각막 이상증 연구에 의해 확인된 68명 TGFBI CD 코호트의 90%를 검출한다. 이 표는 또한 문헌 연구를 통해 확인된 6가지 추가 돌연변이를 사용한 결과를 보여준다. 이들은 검출율을 7%까지 증가시키며, 이것이 영국에서 전체 검출율을 97%로 되게 한다.

도 5a-5c는 실시예에서 사용된 표적, 프라이머 및 프로브에 대한 예시적인 서열을 제공한다.

도 6a 및 6b는 M502V 및 G623D TGFBI 프로브를 사용한 실시예 4로부터의 식별 플롯 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

I. 서론

[0015] 본 개시내용은 각막 이상증의 검출을 개선하기 위한 반응 혼합물, 반응 키트의 발견에 적어도 부분적으로 기초한다.

[0016] 아시아에서 TGFBI 각막 이상증의 보고된 유병률은 한국에서 870명 중 1명, 중국에서 416명 중 1명이다. 아시아는 근시 비율이 높으며, Holden 등에 의해 수행된 연구에서는 2050년까지 아시아-태평양 인구가 전세계 유병률 49.8%에 비해 66.4%로 모든 인구 중 가장 높은 근시 유병률을 가질 것으로 예측하였다. 이러한 아시아 인구에서의 높은 근시 유병률로 인해, LASIK 시력 교정 수술의 사용이 지속적으로 증가하고 있으며 계속 증가할 것으로 예측된다. 아시아 인구에서 TGFBI 돌연변이의 알려진 유병률 및 높은 근시 비율로 인해, 이 지역에서는 돌연변이 검사가 중요하다; 후속적으로, 5-돌연변이 유전자 검사가 초기에 아시아-태평양 인구에 도입되었다.

[0017] TGFBI 돌연변이를 과립 각막 이상증의 원인으로 하는 1988년 Folberg 등의 최초 설명 아래로, 이 질환에 대한 우리의 인식과 이해가 꾸준히 증가하고 있다. 가장 일반적인 R124 및 R555 돌연변이는 잘 기록되어 있으며 다음 단계의 공통 변이체를 이해하기 위해 추가 돌연변이가 보다 면밀히 조사되고 있다. 본 개시내용은 이러한 질환의 유병률을 이해하기 위해 다양한 TGFBI 각막 이상증에 관한 문헌의 보고서의 검토를 제공한다. 이 질환의 전세계적 유병률은 알려져 있지 않다; 그러나, 질환 결과는 쇠약하다. 궁극적인 치료는 각막 이식이며, 질환의 재발 특성은 종종 후속적인 각막 이식을 필요로 하며, 이것은 환자와 안과의 모두에게 대단히 충격적이며 비용이 많이 듈다. 따라서, 돌연변이 진단을 위한 분자 진단 검사를 사용한 예방 및 사전스크리닝이 중요하다.

[0018] 일부 실시양태에서, 하나의 목적은 굴절교정 수술 전에 사전스크리닝 검사에서 향상된 시험 능력을 제공하는 것이다. 또 다른 목적은 유전자 검사와 임상 진단으로부터 야기되는 검출율 간의 격차를 메우는 것이다.

II. 선택 정의

[0019] 본원에서 사용되는 용어 "발명" 또는 "본 발명"은 본 발명의 임의의 하나의 특정 실시양태로 제한되는 것이 아니라 청구범위 및 명세서에 기술된 바와 같은 본 발명의 임의의 및 모든 실시양태에 적용된다.

[0020] 본원에서 사용되는 바와 같이, 단수형 "a", "an", 및 "the"는 문맥상 명백하게 달리 뜻하지 않는 한, 복수형 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들면, "방법"에 대한 언급은 본 명세서를 읽을 때 당업계의 숙련가들에게 자명해질 본원에 기술된 유형의 하나 이상의 방법, 및/또는 단계를 포함한다.

[0021] 본원에서 사용되는 용어 "다형성" 및 이의 변이형은 상이한 계놈 또는 개체 간에 또는 상이한 계놈 또는 개체 사이에 둘 이상의 대안적인 계놈 서열 또는 대립유전자의 발생을 가리킨다. 용어 "유전자 돌연변이" 또는 "유전자 변이" 및 이의 변이형은 다형성을 포함한다.

[0022] 본원에서 사용되는 용어 "단일 뉴클레오티드 다형성" ("SNP") 및 이의 변이형은 대립유전자 사이에서 변하는 하나의 뉴클레오티드의 부위를 가리킨다. 단일 뉴클레오티드 다형성 (SNP)은 단일 염기 변화 또는 점 돌연변이이지만 또한 소위 "인델" 돌연변이 (뉴클레오티드의 삽입 또는 결실)를 포함하여, 개체 간의 유전자 변이를 초래

한다. 모든 인간 유전자 변이의 약 90%를 구성하는 SNP는 30억개-염기 인간 게놈을 따라 100 내지 300개 염기마다 발생한다. SNP는 게놈의 코딩 또는 비-코딩 영역에서 발생할 수 있다. 코딩 영역의 SNP는 단백질 산물의 아미노산 서열을 변화시킬 수 있거나 변화시키지 않을 수 있다. 비-코딩 영역의 SNP는 프로모터 또는 처리 부위를 변경시킬 수 있으며 유전자 전사 및/또는 처리에 영향을 줄 수 있다. 개체가 관심있는 게놈 영역에 특정 SNP를 가지고 있는지에 대한 지식은 다양한 질환에 대한 진단, 예방 및 치료 응용을 개발하기에 충분한 정보를 제공할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 TGBI 유전자로부터의 산물의 아미노산 서열에서 돌연변이를 야기하는 아미노산 서열을 변경시키는 코딩 영역에서의 SNP의 검출에 관한 것이다. 예를 들면, 본 개시내용은 TGFBI 유전자에서 G623D, M502V, R124S, A546D, H572R, H626R, G623D, R124S, H403Q, R124C 및/또는 R124H 돌연변이를 일으키는 SNP의 검출에 관한 것이다.

[0025] 용어 "프라이머" 및 이의 변이형은 PCR 반응에서 DNA 합성의 개시점으로서 작용하는 올리고뉴클레오티드를 가리킨다. 프라이머는 통상적으로 약 15 내지 약 35개의 뉴클레오티드 길이이며 표적 서열에 상보적인 영역에 하이브리드화된다.

[0026] 용어 "프로브" 및 이의 변이형 (예를 들어, 검출 프로브)은 PCR 반응에서 표적 핵산에 하이브리드화하는 올리고뉴클레오티드를 가리킨다. 표적 서열은 분석하고자 하는 핵산의 영역을 가리키며 관심있는 다형성 부위를 포함한다.

[0027] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 숙련가들에 의해 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 바와 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 방법 및 재료의 다양한 실시양태가 본원에 구체적으로 기술되어 있다.

III. 반응 혼합물

[0029] 하나의 측면에서, 본 개시내용은 TGBI에서 돌연변이를 검출하기 위한 검출 프로브를 포함하는, 대상체에서 각막 이상증을 검출하기 위한 반응 혼합물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 검출 프로브는 본원에 기술된 아미노산 돌연변이를 유발하는 SNP를 검출한다. 하나의 측면에서, 본 개시내용은 서열 번호 25-30, 36 및 54로 이루어진 그룹으로부터 선택된 돌연변이 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 대상체에서 각막 이상증을 검출하기 위한 반응 혼합물을 제공한다. 반응 혼합물은 서열 번호 19-24, 33 및 50으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 정상 뉴클레오티드 서열을 포함하는 상응하는 표지된 프로브를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표지된 프로브는 서열 번호 25-30, 36 및 54로 이루어진 그룹으로부터 선택된 돌연변이 뉴클레오티드 서열로 구성되고/되거나; 상응하는 표지된 프로브는 서열 번호 19-24, 33 및 50으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 정상 뉴클레오티드 서열로 구성된다. 추가의 실시양태에서, 반응 혼합물은 서열 번호 33 또는 36의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표지된 TGFBI G623D 프로브; 및 서열 번호 24 또는 30의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표지된 TGFBI M502V 프로브를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 서열 번호 36의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표지된 TGFBI G623D 프로브; 및 서열 번호 30의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표지된 TGFBI M502V 프로브.

[0030] 일부 실시양태에서, 반응 혼합물은 대상체로부터의 생물학적 샘플로부터 TGFBI 유전자 서열을 증폭시키기 위한 적어도 하나의 증폭 프라이머 쌍을 추가로 포함한다. 추가의 실시양태에서, 반응 혼합물은 (a) 서열 번호 7-12 및 41로 이루어진 그룹으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 상응하는 정방향 프라이머; 및 (b) 서열 번호 13-18 및 47로 이루어진 그룹으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 상응하는 역방향 프라이머를 포함한다. 반응 혼합물이 서열 번호 33 또는 36의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표지된 TGFBI G623D 프로브; 및 서열 번호 24 또는 30의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표지된 TGFBI M502V 프로브를 포함하는 경우, 반응 혼합물은 (a) 서열 번호 10 및 12를 포함하는 상응하는 정방향 프라이머; 및 (b) 서열 번호 16 및 18을 포함하는 상응하는 역방향 프라이머를 추가로 포함할 수 있다.

[0031] 일부 실시양태에서, 표지된 프로브는 형광 표지된다. 추가의 실시양태에서, 각각의 표지된 프로브는 상이한 프로브를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 각각의 표지된 프로브는 독립적으로 VIC, FAM, ABY, 또는 JUN으로 표지된다.

IV. 진단 키트

[0033] 하나의 측면에서, 본원에 기술된 임의의 또는 모든 시약은 진단 키트에 포장된다. 이러한 키트는 임의의 및/또는 모든 본원에 기술된 프라이머, 프로브, 완충액 및/또는 기타 시약을 임의의 조합으로 포함한다.

[0034] 하나의 측면에서, 본 개시내용은 TGBI 유전자에서 R124S, A546D, H572R, H626R, G623D 및 M502V 돌연변이를 검

출하기 위한 프라이머 세트, 검출 프로브 및/또는 시약을 포함하는 반응 키트를 제공한다. 하나의 측면에서, 본 개시내용은 TGBI 유전자에서 G623D 및 M502V 돌연변이를 검출하기 위한 프라이머 세트, 검출 프로브 및/또는 시약과 G623D 및 M502V를 검출하기 위한 프라이머 세트, 프로브 및/또는 시약의 조합을 포함하는 단일 반응 혼합물을 포함하는 반응 키트를 제공한다. 일부 실시양태에서, 반응 키트는 R124S, A546D, H572R, 및 H626R로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1, 2, 3 또는 4개의 TGFBI 돌연변이를 검출하기 위한 1, 2, 3 또는 4개의 프라이머 세트, 검출 프로브 및/또는 시약을 추가로 포함한다. 추가의 실시양태에서, 반응 키트는 G623D, R124S, H403Q, R124C 및 R124H로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1, 2, 3, 4 또는 5개의 프라이머 세트, 검출 프로브 및/또는 시약을 추가로 포함한다.

[0035] 하나의 측면에서, 본 개시내용은 상기한 반응 혼합물 및 하나 이상의 추가의 시약을 포함하는 반응 키트를 제공한다. 일부 실시양태에서, 반응 키트는 R124S, A546D, H572R, 및 H626R로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1, 2, 3 또는 4개의 TGFBI 돌연변이를 검출하기 위한 1, 2, 3 또는 4개의 프라이머 세트, 표지된 프로브 및/또는 시약을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, R124S, A546D, H572R, 및 H626R로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1, 2, 3 또는 4개의 TGFBI 돌연변이를 검출하기 위한 1, 2, 3 또는 4개의 프라이머 세트, 표지된 프로브 및/또는 시약은 키트에서 반응 혼합물로부터 분리되어 있다. 추가의 실시양태에서, 반응 키트는 서열 번호 19-24, 33, 50, 25-30, 36 및 54의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표지된 프로브로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 17개의 표지된 프로브를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 반응 키트는 서열 번호 19의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표지된 TGFBI R124S 정상 프로브 및/또는 서열 번호 25의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표지된 TGFBI R124S 돌연변이 프로브를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 반응 키트는 서열 번호 20의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표지된 TGFBI A546D 정상 프로브 및/또는 서열 번호 26의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표지된 TGFBI A546D 돌연변이 프로브를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 반응 키트는 서열 번호 21의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표지된 TGFBI H572R 정상 프로브 및/또는 서열 번호 27의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표지된 TGFBI H572R 돌연변이 프로브를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 반응 키트는 서열 번호 23 또는 50의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표지된 TGFBI H626R 정상 프로브 및/또는 서열 번호 29 또는 54의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표지된 TGFBI H626R 돌연변이 프로브를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 반응 키트는 TGFBI G623D 프로브가 별도로 보관되거나 TGBI M502V 프로브와 혼합되지 않은 키트는 배제한다. 추가의 실시양태에서, 반응 키트는 추가 증폭 프라이머 세트를 추가로 포함한다. 추가의 실시양태에서, 반응 키트는 R124S 돌연변이를 포함하는 TGFBI 유전자를 증폭시키기 위한 제3 증폭 프라이머 세트, A546D 돌연변이를 포함하는 TGFBI 유전자를 증폭시키기 위한 제4 증폭 프라이머 세트, H572R 돌연변이를 포함하는 TGFBI 유전자를 증폭시키기 위한 제5 증폭 프라이머 세트, 및/또는 H626R 돌연변이를 포함하는 TGFBI 유전자를 증폭시키기 위한 제6 증폭 프라이머 세트를 추가로 포함한다. 본원에서, R124S 돌연변이를 포함하는 TGFBI 유전자는 TGBI 단백질 산물에서 R124S 돌연변이를 유발하는 SNP를 포함하는 TGFBI 유전자를 가리킬 수 있다.

[0036] 추가의 실시양태에서, 반응 키트는 G623D, R124S, H403Q, R124C 및 R124H로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1, 2, 3, 4 또는 5개의 TGFBI 돌연변이를 검출하기 위한 1, 2, 3, 4 또는 5개의 프라이머 세트, 검출 프로브 및/또는 시약을 추가로 포함한다.

[0037] 일부 실시양태에서, 키트 중의 시약은 동결건조된 분말로서 포함된다. 일부 실시양태에서, 키트 중의 시약은 재구성을 위한 지침과 함께 동결건조된 분말로서 포함된다. 일부 실시양태에서, 키트 중의 시약은 액체로서 포함된다. 일부 실시양태에서, 시약은 플라스틱 및/또는 유리 바이알 또는 기타 적절한 용기에 포함된다. 일부 실시양태에서 프라이머와 프로브는 모두 키트에서 개별 용기에 담겨 있다. 일부 실시양태에서, 프라이머는 하나의 용기에 함께 포장되고, 프로브는 다른 용기에 함께 포장된다. 일부 실시양태에서, 프라이머와 프로브는 단일 용기에 함께 포장된다.

[0038] 일부 실시양태에서, 키트는 대조 gDNA 및/또는 DNA 샘플을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서 포함되는 대조 DNA 샘플은 G623 정상 서열을 갖는 TGFBI 샘플 및/또는 M502 정상 서열을 갖는 TGFBI 샘플이다. 일부 실시양태에서 포함되는 대조 DNA 샘플은 R124S, A546D, H572R, 및 H626R을 포함하여 검출되는 돌연변이에 상응한다. 일부 실시양태에서, TGFBI R124 정상에 상응하는 대조 DNA 샘플 및 R124C, R124H, R124L, R555W, R555Q 및/또는 H626P에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 실시양태에서, TGFBI R124 정상에 상응하는 대조 DNA 샘플 및 R124C, R124H, R124L, R555W 및/또는 R555Q에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 실시양태에서, TGFBI R124 정상에 상응하는 대조 DNA 샘플 및 R124C, R124H 및/또는 R124L에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 실시양태에서, TGFBI R124 정상에 상응하는 대조 DNA 샘플 및 R555W 및/또는 R555Q에

상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 실시양태에서, TGFB1 R124 정상에 상응하는 대조 DNA 샘플 및 R124C에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 실시양태에서, TGFB1 R124 정상 DNA에 상응하는 대조 DNA 샘플 및 R124H에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 실시양태에서, TGFB1 R124 정상에 상응하는 대조 DNA 샘플 및 R124L에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 실시양태에서, TGFB1 R124 정상 DNA에 상응하는 대조 DNA 샘플 및 R555W에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 사용된다. 일부 실시양태에서, TGFB1 R124 정상에 상응하는 대조 DNA 샘플 및 R555Q에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다. 일부 실시양태에서, TGFB1 R124 정상에 상응하는 대조 DNA 샘플 및 H626P에 상응하는 돌연변이 DNA 샘플이 포함된다.

[0039] 일부 실시양태에서, 대조 DNA 샘플의 농도는 5 ng/μL, 10 ng/μL, 20 ng/μL, 30 ng/μL, 40 ng/μL, 50 ng/μL, 60 ng/μL, 70 ng/μL, 80 ng/μL, 90 ng/μL, 100 ng/μL, 110 ng/μL, 120 ng/μL, 130 ng/μL, 140 ng/μL, 150 ng/μL, 160 ng/μL, 170 ng/μL, 180 ng/μL, 190 ng/μL 또는 200 ng/μL이다. 일부 실시양태에서, 대조 DNA 샘플의 농도는 50 ng/μL, 100 ng/μL, 150 ng/μL 또는 200 ng/μL이다. 일부 실시양태에서, 대조 DNA 샘플의 농도는 100 ng/μL이다. 일부 실시양태에서, 대조 DNA 샘플들은 동일한 농도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대조 DNA 샘플들은 상이한 농도를 갖는다.

[0040] 일부 실시양태에서, 키트는 완충제, 예를 들면, GTxpress TAQMAN® 시약 혼합물, 또는 임의의 등가 완충제를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 완충제는 본원에 기술된 임의의 완충제를 포함한다.

[0041] 일부 실시양태에서, 키트는 (예를 들어, M13 벡터를 포함한) 벡터와 같이 클로닝에 사용하기 위한 시약을 추가로 포함할 수 있다.

[0042] 일부 실시양태에서, 키트는 DNA의 정제에 사용하기 위한 시약을 추가로 포함한다.

[0043] 일부 실시양태에서, 키트는 대상체에서 각막 이상증의 검출에 키트를 사용하기 위한 지침서를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 지침서는 본원에 기술된 프로토콜의 다양한 측면을 포함한다.

V. 해설 분석

[0045] 하나의 측면에서, 본 개시내용은 TGFB1 유전자에서 G623D, M502V, R124S, A546D, H572R, 및 H626R 돌연변이로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 TGFB1 돌연변이를 검출함을 포함하여, 각막 이상증을 검출하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 G623D, R124S, H403Q, R124C 및 R124H로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1, 2, 3, 4 또는 5개의 TGFB1 돌연변이를 검출함을 추가로 포함할 수 있다.

[0046] 일부 실시양태에서, 검출 단계는 TGFB1 유전자를 서열분석함을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 검출 단계는 표지된 검출 프로브를 사용하여 돌연변이를 검출함을 포함한다.

[0047] 하나의 측면에서, 본 개시내용은: (A-1) 적어도 제1 증폭 프라이머 쌍 및 적어도 두 개의 검출 프로브의 세트를 포함하는 반응 혼합물을 사용하여 대상체로부터의 생물학적 샘플로부터 제1 TGFB1 유전자 서열을 증폭시키는 단계; (B-1) 적어도 두 개의 검출 프로브의 세트의 제1 및 제2 검출 프로브를 각각 G623D 돌연변이를 갖는 제1 TGFB1 유전자 서열 및 M502V 돌연변이를 갖는 제2 TGFB1 유전자 서열에 하이브리드화하는 단계; 및 (C-1) 각각 제1 및 제2 TGFB1 유전자 서열에 대한 제1 및 제2 검출 프로브의 하이브리드화에 기초하여 TGFB1 유전자 서열에서 하나, 둘 또는 그 이상의 돌연변이를 검출하는 단계를 포함하여, 각막 이상증을 검출하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 (A-2) 생물학적 샘플로부터 제3 TGFB1 유전자 서열을 증폭시키는 단계로서, 여기서, 반응 혼합물은 R124S, A546D, H572R, 및 H626R로 이루어진 그룹으로부터 선택된 제3 TGFB1 돌연변이에 대한 제3 표지된 프로브를 추가로 포함하는 단계; (B-2) 제3 표지된 프로브를 제3 TGFB1 유전자 서열에 하이브리드화하는 단계; 및 (C-2) 제3 TGFB1 유전자 서열에 대한 제3 검출 프로브의 하이브리드화에 기초하여 제3 TGFB1 유전자 서열에서 돌연변이를 검출하는 단계를 추가로 포함한다.

[0048] 일부 실시양태에서, 본원의 방법은 계놈 샘플을 단리하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 세포의 샘플을 제공하는 단계를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 대상체는 인간일 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포는 환자의 세포 표면을 세포를 기질에 가역적으로 고정시킬 수 있는 기질과 접촉 시킴으로써 수집된다.

[0049] 개시된 방법은 다양한 샘플로부터 수득된 다양한 세포 유형에 적용 가능하다. 일부 실시양태에서, 개시된 방법에 사용하기 위한 세포 유형은 상피 세포, 내피 세포, 결합 조직 세포, 골격근 세포, 내분비 세포, 심장 세포, 비뇨기 세포, 멜라닌 세포, 각질 세포, 혈액 세포, 백혈구, 베피 코트, 모발 세포 (예를 들어, 모근 세포 포함) 및/또는 타액 세포를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 세포는 상피 세포이다. 일부 실

시양태에서, 세포는 피막하-혈관주위 세포 (상피 유형 1)이고; 담염 세포 (상피 유형 2); 중층 세포 (상피 유형 3); 어둠 세포 (상피 유형 4); 미분화 세포 (상피 유형 5); 및 대-수질 세포 (상피 유형 6)이다. 일부 실시양태에서, 세포는 협측 상피 세포 (예를 들어, 협측 교환(buccal swap)을 사용하여 수집된 상피 세포)이다. 일부 실시양태에서, 개시된 방법에서 사용되는 세포의 샘플은 상기 확인된 세포 유형의 임의의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제공되는 세포는 협측 상피 세포이다.

[0050] 일부 실시양태에서, 샘플은 비-침습적인 방식으로 유리하게 수집되며 이와 같은 샘플 수집은 어디서든 거의 모든 사람들에 의해 달성된다. 예를 들면, 일부 실시양태에서 샘플은 의사의 사무실, 대상체의 집 또는 LASIK 수술이 수행되거나 수행될 시설에서 수집된다. 일부 실시양태에서 환자, 환자의 의사, 간호사 또는 의사의 조수 또는 기타 임상 요원이 샘플을 수집한다.

[0051] 예를 들면 게놈 DNA (gDNA) 샘플을 포함하지만 이에 제한되지 않는 샘플에서 SNP를 분석하기 위한 다양한 방법들이 당업계에 공지되어 있으며, PCR 방법, 예를 들어 실시간 PCR 분석, 마이크로어레이 분석, 하이브리드화 분석 및 핵산 서열 분석, 뿐만 아니라 핵산 조성물을 분석하고 당업계의 숙련가들에게 공지된 다양한 다른 방법들을 포함할 수 있다. 예를 들면, 문헌[Molecular Cloning (three volume set, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012)] 및 최신 프로토콜 (Genetics and Genomics; Molecular Biology; 2003-2013)을 참조한다.

a. 실시간 PCR

[0053] 실시간 PCR 분석의 설계를 위해, 두 개의 프라이머에 의해 플랭킹된 다음 증폭되는, 종종 앰플리콘이라고 하는 DNA 단편, 두 개의 프라이머 및 사용하고자 하는 검출 프로브 또는 프로브들을 포함하는 여러 부분이 조정된다.

[0054] 실시간 PCR은 서열-특이적 방식으로 게놈 대립유전자와 관련된 짧은 폴리뉴클레오티드 ("검출 프로브"로 지칭됨)에 접합된 형광 염료의 시각적 방출에 의존한다. 단일 뉴클레오티드를 달리하는 실시간 PCR 프로브는 상이한 과정에서 형광하는 프로브의 접합 및 검출에 의해 실시간 PCR 분석에서 구별될 수 있다. 실시간 PCR은 검출 용도 (진단 용도), 정량 용도 및 유전형 분석 용도에서 사용된다.

[0055] TAQMAN® 프로브 (미국 특허 제5,210,015호 및 제5,487,972호, 및 문헌 참조; Lee et al., *Nucleic Acids Res.* 21:3761-6, 1993), 분자 비콘 프로브 (미국 특허 제5,925,517호 및 제6,103,476호, 및 문헌 참조; Tyagi and Kramer, *Nat. Biotechnol.* 14:303-8, 1996), 자가-프로빙 앰플리콘 (scorpions) (미국 특허 제6,326,145호, 및 문헌 참조; Whitcombe et al., *Nat. Biotechnol.* 17:804-7, 1999), Amplisensor (Chen et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4210-6, 1998), Amplifluor (미국 특허 제6,117,635호, 및 문헌 참조; Nazarenko et al., *Nucleic Acids Res.* 25:2516-21, 1997, 변위 하이브리드화 프로브 (Li et al., *Nucleic Acids Res.* 30:E5, 2002), DzyNA-PCR (Todd et al., *Clin. Chem.* 46:625-30, 2000), 형광 제한 효소 검출 (Cairns et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318:684-90, 2004) 및 인접 하이브리드화 프로브 (미국 특허 제6,174,670호 및 문헌 참조; Wittwer et al., *Biotechniques* 22:130-1, 134-8, 1997)에 의존하는 분석들을 포함하여, 실시간 PCR를 수행하기 위한 몇 가지 관련 방법들이 당업계에 개시되어 있다.

[0056] 하나의 측면에서, 본 개시내용은 TGFBI 유전자에서 G623D, M502V, R124S, A546D, H572R, H626R, G623D, R124S, H403Q, R124C 및/또는 R124H 돌연변이를 유발하는 SNP의 검출에 관한 것이다. 몇몇 경우에, 실시간 PCR은 예를 들면 SNP를 포함하지만 이에 제한되지 않는 각종 유전자 돌연변이의 검출을 야기할 수 있다. 일부 실시양태에서, 특정 유전자 후보에서 SNP의 검출은 테더링된 퀸치 모이어티의 사용에 의한 형광 분자의 분자내 퀸치의 사용에 기초하여, 실시간 PCR을 사용하여 수행된다. 따라서, 예시적 실시양태에 따르면, 실시간 PCR 방법은 또한 분자 비콘 기술의 사용을 포함한다. 분자 비콘 기술은 관심있는 DNA 표적에 결합함으로써 형광이 회복되는 내부-퀸치된 형광단을 갖는 헤어핀 모양의 분자를 사용한다 (예를 들면, 참조; Kramer, R. et al. *Nat. Biotechnol.* 14:303-308, 1996). 일부 실시양태에서, 축적하는 PCR 산물에 대한 분자 비콘 프로브의 증가된 결합은 게놈 DNA에 존재하는 SNP를 특이적으로 검출하는데 사용된다.

[0057] 다수의 적합한 유전형 분석 절차 중 하나는 TAQMAN® 대립유전자 식별 분석이다. 이 분석의 일부 경우에서, 프로브의 5' 말단에 형광 리포터 염료 및 프로브의 3' 말단에 퀸처 염료 (quencher dye)로 표지된 올리고뉴클레오티드 프로브가 이용된다. 온전한 프로브에 대한 퀸처의 근접성은 리포터에 대해 낮은 형광을 유지한다. PCR 반응 동안, DNA 중합효소의 5' 뉴클레아제 활성이 프로브를 절단하고, 염료와 퀸처를 분리한다. 이것이 리포터의 형광 증가를 야기한다. PCR 산물의 축적은 리포터 염료의 형광 증가를 모니터링함으로써 직접적으로 검출된다. DNA 중합효소의 5' 뉴클레아제 활성은, 프로브가 표적에 하이브리드화되고 PCR 동안 증폭되는 경우에만 리포터와 퀸처 사이에 프로브를 절단한다. 프로브는 특정 SNP 대립유전자가 존재하는 경우에만 표적 SNP 위치를

가로지르고 핵산 분자에 하이브리드화되도록 설계된다.

[0058] 예를 들자면, TGFBI 유전자의 엑손 4에 위치한 아벨리노 각막 이상증 관련 SNP를 증폭시키기 위해, 정방향 및 역방향 PCR 프라이머 쌍이 미국 특허 공개 제2012/0077200호에 기술된 바와 같이 작제되었으며, 이의 개시내용은 본원에 참고로 포함된다.

b. 실시간 PCR 사이클

[0060] 실시간 PCR 방법은 증폭을 위한 방법의 일부로서 다양한 단계 또는 사이클을 포함한다. 이러한 사이클은 이중-가닥 핵산을 변성시키는 단계, 정방향 프라이머, 역방향 프라이머 및 검출 프로브를 표적 게놈 DNA 서열에 어닐링하는 단계 및 어닐링된 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머로부터 2차-가닥 DNA를 합성 (즉, 복제)하는 단계를 포함한다. 이러한 3 단계 프로세스를 본원에서 사이클이라고 한다.

[0061] 일부 실시양태에서, 약 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 또는 60 사이클이 사용된다. 일부 실시양태에서, 약 10 내지 약 60 사이클, 약 20 내지 약 50 또는 약 30 내지 약 40 사이클이 사용된다. 일부 실시양태에서, 40 사이클이 사용된다.

[0062] 일부 실시양태에서, 이중-가닥 핵산을 변성시키는 단계는 약 80°C 내지 100°C, 약 85°C 내지 약 99°C, 약 90°C 내지 약 95°C의 온도에서 약 1초 내지 약 5초, 약 2초 내지 약 5초, 또는 약 3초 내지 약 4초 동안 일어난다. 일부 실시양태에서, 이중-가닥 핵산을 변성시키는 단계는 95°C의 온도에서 약 3초 동안 일어난다.

[0063] 일부 실시양태에서, 정방향 프라이머, 역방향 프라이머 및 검출 프로브를 표적 게놈 DNA 서열에 어닐링하는 단계는 약 40°C 내지 약 80°C, 약 50°C 내지 약 70°C, 약 55°C 내지 약 65°C에서 약 15초 내지 약 45초, 약 20초 내지 약 40초, 약 25초 내지 약 35초 동안 일어난다. 일부 실시양태에서, 정방향 프라이머, 역방향 프라이머 및 검출 프로브를 표적 게놈 DNA 서열에 어닐링하는 단계는 약 60°C에서 약 30초 동안 일어난다.

[0064] 일부 실시양태에서, 어닐링된 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머로부터 2차-가닥 DNA를 합성 (즉, 복제)하는 단계는 약 40°C 내지 약 80°C, 약 50°C 내지 약 70°C, 약 55°C 내지 약 65°C에서 약 15초 내지 약 45초, 약 20초 내지 약 40초, 약 25초 내지 약 35초 동안 일어난다. 일부 실시양태에서, 정방향 프라이머, 역방향 프라이머 및 검출 프로브를 표적 게놈 DNA 서열에 어닐링하는 단계는 약 60°C에서 약 30초 동안 일어난다.

[0065] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 본 발명의 방법에 따라 제조된 약 1 μL, 약 2 μL, 약 3 μL, 약 4 μL 또는 약 5 μL의 게놈 DNA 샘플이 단지 약 0.05 μL, 약 0.10 μL, 약 0.15 μL, 약 0.20 μL, 약 0.25 μL 또는 약 0.25 μL의 30X, 35X, 40X, 45X, 50X 또는 100X 실시간 PCR 분석 믹스 및 증류수와 조합되어 PCR 마스터 믹스를 형성하는 것으로 밝혀졌다. 일부 실시양태에서, PCR 마스터 믹스는 약 1.5 μL, 약 2.5 μL, 약 5 μL, 약 6 μL, 약 7 μL, 약 8 μL, 약 9 μL, 약 10 μL, 약 11 μL, 약 12 μL, 약 13 μL, 약 14 μL, 약 15 μL, 약 16 μL, 약 17 μL, 약 18 μL, 약 19 μL 또는 그 이상의 최종 용적을 갖는다. 일부 실시양태에서, 상기 기술된 바와 같이 제조된 2 μL의 게놈 DNA 샘플은 PCR 마스터 믹스를 형성하기 위해 단지 약 0.15 μL의 40X 실시간 PCR 분석 믹스 및 2.85 μL의 증류수와 조합되는 것으로 밝혀졌다.

[0066] 예시적인 반응이 본원에 기술되어 있지만, 당업계의 숙련가는 프로브 설계에 기초하여 온도 및 시간을 변경하는 방법을 이해할 것이다. 또한, 본 발명의 방법은 상기 시간 및 온도의 임의의 조합을 고려한다.

c. PCR 프라이머 및 프라이머 설계

[0068] 일부 실시양태에서, 프라이머는 실험실 환경에서 시험 및 설계된다. 일부 실시양태에서, 프라이머는 *in silico* 방법에 기반한 컴퓨터에 의해 설계된다. 프라이머 서열은 증폭시키고자 하는 앰플리콘의 서열 또는 표적 핵산 서열에 기초한다. 더 짧은 앰플리콘이 전형적으로 더 긴 앰플리콘에 비해 더욱 효율적으로 복제되고 보다 효율적인 증폭을 초래한다.

[0069] 프라이머를 설계하는데 있어서, 당업자는 설계되는 프라이머의 GC 및 AT 함량 뿐만 아니라 이차 구조 고려사항 (증가된 GC 함량은 이차 구조를 증가시킬 수 있다)에 기초하여 용융 온도 (T_m ; 프라이머-표적 듀플렉스의 절반이 해리되고 단일 가닥이 되는 온도이고 듀플렉스 안정성의 지표이며; 증가된 T_m 은 증가된 안정성을 나타낸다)를 고려해야 할 필요성을 이해할 것이다. T_m 은 당업계에 공지된 다양한 방법을 사용하여 계산될 수 있고, 당업계의 숙련가들은 T_m 을 계산하기 위한 이러한 다양한 방법을 쉽게 이해할 것이며; 이러한 방법은 예를 들면 월드 와이드 웹 promega.com/techserv/tools/biomath/calc11.htm에서 이용 가능한 T_m 계산기와 같은 온라인 도구에서 이

용 가능한 것들을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 프라이머 특이성은 Taq 중합효소에 의해 연장된 부분인 3' 말단 서열과 조합된 이의 완전 서열에 의해 정의된다. 일부 실시양태에서, 부정확한 증폭 산물의 잘못된 프라이밍 및 생성을 감소시키는데 도움을 주기 위해, 3' 말단은 표적 서열에 다른 곳에서는 발견되지 않는 적어도 5 내지 7개의 독특한 뉴클레오티드를 가져야 한다. 정방향 및 역방향 프라이머는 전형적으로 유사한 효율로 표적에 결합한다. 몇몇 경우에, NCBI BLAST (월드 와이드 웹 ncbi.nlm.nih.gov에 위치)와 같은 도구가 정렬을 수행하고 프라이머 설계를 지원하는데 사용된다.

[0070]

프라이머 설계의 추가의 측면은 프라이머 복잡성 또는 언어적 서열 복잡성이다 (참조; Kalendar R, et al., *Genomics*, 98(2): 137-144 (2011)). 언어적 서열 복잡성을 갖는 프라이머 (예를 들어, 뉴클레오티드 정열 및 조성)가 전형적으로 더 효율적이다. 일부 실시양태에서, 언어적 서열 복잡성 계산 방법은 단순 서열 반복, 불완전한 동향 또는 역위 반복, 폴리퓨린 및 폴리피리미딘 삼중-가닥 cDNA 구조, 및 4-가닥 구조 (예를 들어 G-사중나선구조)를 포함한 저-복잡성 영역의 검출을 위한 비교된 서열들 사이의 보존된 영역을 검색하는데 사용된다. 일부 실시양태에서, 언어적 복잡성 (LC) 측정은 전체 서열 길이에 따라 알파벳-용량 L-그램 방법 (alphabet-capacity L-gram method) (참조; A. Gabrielian, A. Bolshoy, *Computer & Chemistry* 23:263-274 (1999) 및 Y.L. Orlov, V.N. Potapov, Complexity: an internet resource for analysis of DNA sequence complexity, *Nucleic Acids Res.* 32: W628-W633(2004))을 사용하여 수행되며 서열에서 1 내지 L 크기 단어로부터의 관찰된 범위 (x_i)의 합을 이 서열 길이에 대한 예상되는 (E) 값의 합으로 나눈 값으로서 계산된다. 일부 G-풍부 (및 C-풍부) 핵산 서열은 G-사중체의 스택을 함유하는 4-가닥 DNA 구조로 접힌다 (월드 와이드 웹 quadruplex.org 참조). 몇몇 경우에, 이러한 사중나선구조는 2개 또는 4개의 DNA 분자의 문자간 회합, 2개의 G-염기를 함유하는 서열의 이랑체화, 또는 4개의 구아닌 블록을 함유하는 단일 가닥의 문자간 접힘에 의해 형성된다 (참조; P.S. Ho, *PNAS*, 91:9549-9553 (1994); I.A. Il'icheva, V.L. Florent'ev, *Russian Journal of Molecular Biology* 26:512-531(1992); D. Sen, W. Gilbert, *Methods Enzymol.* 211:191-199 (1992); P.A. Rachwal, K.R. Fox, *Methods* 43:291-301 (2007); S. Burge, G.N. Parkinson, P. Hazel, A.K. Todd, K. Neidle, *Nucleic Acids Res.* 34:5402-5415 (2006); A. Guédin, J. Gros, P. Alberti, J. Mergny, *Nucleic Acids Res.* 38:7858-7868 (2010); O. Stegle, L. Payet, J.L. Mergny, D.J. MacKay, J.H. Leon, *Bioinformatics* 25:i374-i382 (2009); 몇몇 경우에는, 이들의 낮은 언어적 복잡성, $(TTAGGG)_4$ 의 경우 LC=32% 때문에 이들은 프라이머 설계로부터 제외된다.

[0071]

이러한 방법은 CG 함량 및 용융 온도에 관한 GC skew, $(G-C)/(G+C)$, AT skew, $(A-T)/(A+T)$, CG-AT skew, $(S-W)/(S+W)$, 또는 퓨린-피리미딘 $(R-Y)/(R+Y)$ skew를 갖는 서열에서의 패턴 분석을 위한 다양한 생물정보학 도구를 포함하고 언어적 서열 복잡성 프로파일을 결정하기 위한 도구를 제공한다. 예를 들면 n의 슬라이딩 윈도우에서 GC skew (여기서, n은 양의 정수이다) 염기는 $(G-C)/(G+C)$ 공식에 따라 하나의 염기의 스텝으로 계산되며, 여기서 G는 구아닌의 총 수이고 C는 윈도우에서 모든 서열에 대한 사이토신의 총 수이다 (Y. Benita, et al., *Nucleic Acids Res.* 31:e99 (2003)). 양의 GC-skew 값은 G 염기의 과잉을 나타내었고, 음의 GC-skew 값은 C 염기의 과잉을 나타내었다. 유사하게, 다른 skew가 서열에서 계산된다. 이러한 방법들 뿐만 아니라 다른 방법들이 일부 실시양태에서 프라이머 복잡성을 결정하는데 사용된다.

[0072]

비제한적인 예시적인 실시양태에 따르면, 실시간 PCR은 엑소뉴클레아제 프라이머 (TAQMAN® 프로브)를 사용하여 수행된다. 이러한 실시양태에서, 프라이머는 증폭 반응에 존재하는 이중-표지된 프로브를 절단하기 위해 Taq와 같은 열안정성 폴리머라제의 5' 엑소뉴클레아제 활성을 이용한다 (예를 들면, 참조; Wittwer, C. et al., *Biotechniques* 22:130-138, 1997). PCR 산물에 상보적이기는 하지만, 이 분석에 사용되는 프라이머 프로브는 PCR 프라이머와는 다르며 형광이 가능한 문자와 형광을 퀸칭할 수 있는 문자 둘 다로 이중-표지된다. 프로브가 손상되지 않은 경우, DNA 프로브 내의 형광 신호의 문자내 퀸칭은 신호를 거의 발생하지 않는다. 형광 문자가 증폭 동안 Taq의 엑소뉴클레아제 활성에 의해 유리될 때, 퀸칭이 크게 감소되어 형광 신호를 증가시킨다. 형광 프로브의 비제한적인 예는 6-카복시-플루오레세인 잔기 등을 포함한다. 예시적인 퀸처는 Black Hole Quencher 1 모이어터 등을 포함한다.

[0073]

예시적인 프라이머는 본원에 기술된 것들을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 개시된 방법에서 사용하기 위한 프라이머는 또한 미국 특허 공개 제20120077200호에서 찾아볼 수 있으며, 이것은 모든 목적을 위해 본원에 참고로 포함된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 방법에서 사용하기 위한 PCR 프라이머는 도 5b 및 5c의 표에 열거된 것들을 포함하지만 이에 제한되지 않으며, TGFBI 유전자의 검출에 사용된다. 각 프라이머에 대한 생물 물리학적 파라미터는 월드 와이드 웹 primerdigital.com/tools/PrimerAnalyser.html을 사용하여 계산할 수 있

다.

[0074] 일부 실시양태에서, 개시된 방법에 사용하기 위한 실시간 PCR 프라이머는 적어도 70%, 적어도 72%, 적어도 75%, 적어도 77%, 적어도 80%, 적어도 82%, 적어도 85%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97% 또는 적어도 99%의 언어적 서열 복잡성을 갖는다.

d. 검출 프로브 설계 및 검출 프로브

[0076] 당업계의 숙련가들에 의해 통상적으로 사용되는 검출 프로브는 가수분해 프로브 (TAQMAN® 프로브, 5' 뉴클레아제 프로브 또는 이중-표지된 프로브로도 알려짐), 하이브리드화 프로브, 및 Scorpion 프라이머 (하나의 분자에 프라이머와 검출 프로브를 구비함)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 프로브는 효율적인 신호 생성을 촉진하기 위해 프라이머보다 높은 T_m 을 갖도록 설계된다. T_m 은 당업계에 공지된 다양한 방법들 중의 어느 하나를 사용하여 계산되고 숙련가들은 T_m 을 계산하기 위한 이러한 다양한 방법들을 쉽게 이해할 것이며; 이러한 방법은 예를 들면 월드 와이드 웹 promega.com/techserv/tools/biomath/calcl1.htm에서 이용 가능한 계산기와 같은 온라인 도구에서 이용 가능한 것들을 포함한다.

[0077] 일부 실시양태에서, 검출 프로브는 다양한 변형을 함유한다. 일부 실시양태에서, 검출 프로브는 2'-0-메틸 리보뉴클레오티드 변형, 포스포로티오에이트 골격 변형, 포스포로디티오에이트 골격 변형, 포스포르아미데이트 골격 변형, 메틸포스포네이트 골격 변형, 3' 말단 포스페이트 변형 및/또는 3' 알킬 치환과 같지만 이에 제한되지 않는 변형된 핵산 잔기를 포함한다.

[0078] 일부 실시양태에서, 검출 프로브는 변형으로 인해 표적 서열에 대해 증가된 친화도를 갖는다. 이러한 검출 프로브는 길이가 증가된 검출 프로브 뿐만 아니라 화학적 변형을 함유하는 검출 프로브를 포함한다. 이러한 변형은 2'-플루오로 (2'-데옥시-2'-플루오로-뉴클레오시드) 변형, LNA (잠금 핵산), PNA (펩티드 핵산), ZNA (zip 핵산), 모르폴리노, 메틸포스포네이트, 포스포르아미데이트, 폴리양이온성 접합체 및 2'-파렌 변형을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 검출 프로브는 2' 플루오로 변형 (일명, 2'-데옥시-2'-플루오로-뉴클레오시드), LNA (잠금 핵산), PNA (펩티드 핵산), ZNA (zip 핵산), 모르풀리노, 메틸포스포네이트, 포스포르아미데이트, 및/또는 폴리양이온성 접합체를 포함하는 하나 이상의 변형을 함유한다.

[0079] 일부 실시양태에서, 검출 프로브는 본원에 기술된 것과 같은 검출 가능한 모이어티 뿐만 아니라 당업계의 숙련가들에게 공지된 임의의 검출 가능한 모이어티를 함유한다. 이러한 검출 가능한 모이어티는 예를 들면 형광 표지 및 화학발광 표지를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 이러한 검출 가능한 모이어티의 예는 또한 FRET 쌍의 구성원을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 검출 프로브는 검출 가능한 엔티티를 함유한다.

[0080] 형광 표지의 예는 ABY, JUN, AMCA, DEAC (7-디에틸아미노쿠마린-3-카복실산); 7-하이드록시-4-메틸쿠마린-3; 7-하이드록시쿠마린-3; MCA (7-메톡시쿠마린-4-아세트산); 7-메톡시쿠마린-3; AMF (4'-(아미노메틸)플루오레세인); 5-DTAF (5-(4,6-디클로로트리아지닐)아미노플루오레세인); 6-DTAF (6-(4,6-디클로로트리아지닐)아미노플루오레세인); 6-FAM (6-카복시플루오레세인; 일명 FAM; TAQMAN® FAM™ 포함); TAQMAN VIC®; 5(6)-FAM 카다베린; 5-FAM 카다베린; 5(6)-FAM 에틸렌디아민; 5-FAM 에틸렌디아민; 5-FITC (FITC 이성체 I; 플루오레세인-5-이소티오시아네이트); 5-FITC 카다베린; 플루오레세인-5-말레이미드; 5-IAF (5-요오도아세트아미도플루오레세인); 6-JOE (6-카복시-4',5'-디클로로-2',7'-디메톡시플루오레세인); 5-CR1 10 (5-카복시로다민 110); 6-CR1 10 (6-카복시로다민 110); 5-CR6G (5-카복시로다민 6G); 6-CR6G (6-카복시로다민 6G); 5(6)-카복시로다민 6G 카다베린; 5(6)-카복시로다민 6G 에틸렌디아민; 5-ROX (5-카복시-X-로다민); 6-ROX (6-카복시-X-로다민); 5-TAMRA (5-카복시테트라메틸로다민); 6-TAMRA (6-카복시테트라메틸로다민); 5-TAMRA 카다베린; 6-TAMRA 카다베린; 5-TAMRA 에틸렌디아민; 6-TAMRA 에틸렌디아민; 5-TMR C6 말레이미드; 6-TMR C6 말레이미드; TR C2 말레이미드; TR 카다베린; 5-TRITC; G 이성체 (테트라메틸로다민-5-이소티오시아네이트); 6-TRITC; R 이성체 (테트라메틸로다민-6-이소티오시아네이트); 단실 카다베린 (5-디메틸아미노나프탈렌-1-(N-(5-아미노펜틸))설폰아미드); EDANS C2 말레이미드; 플루오레사민; NBD; 및 피로메텐 및 이의 유도체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0081] 화학발광 표지의 예는 서던 블롯 및 웨스턴 블롯 프로토콜에 사용되는 표지를 포함하지만 이에 제한되지 않는다 (예를 들면, 참조; Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (3rd ed.) (2001); 전문이 본원에 참고로 포함됨). 예는 -(2'-스페로아다만탄)-4-메톡시-4-(3"-포스포릴옥시)페닐-1,2-디옥세탄 (AMPPD); 아크리디늄 에스테르 및 아다만틸-안정화된 1,2-디옥세탄, 및 이의 유도체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

- [0082] 일부 실시양태에서, 표지된 프로브는 증폭 동안 증폭된 영역 내에서 하이브리드화하는데 사용된다. 프로브는 증폭을 위한 프라이머로서 작용하지 않도록 변형될 수 있다. 검출 프로브는 두 개의 형광 염료로 표지될 수 있는데, 하나의 염료가 다른 염료의 형광을 퀸칭할 수 있다. 하나의 염료는 프로브의 5' 말단에 부착되고 다른 염료는 내부 부위에 부착되어, 프로브가 비-하이브리드화 상태에 있을 때 퀸칭이 일어난다.
- [0083] 전형적으로, 실시간 PCR 프로브는 형광 공명 에너지 전달 (FRET)에 관여하는 한 쌍의 염료 (리포터 염료 및 수용체 염료)로 구성되며, 이에 의해 수용체 염료가 리포터 염료의 방출을 퀸칭시킨다. 일반적으로, 형광-표지된 프로브는 앰플리콘 정량의 특이성을 증가시킨다.
- [0084] 개시된 방법의 일부 실시양태에서 사용되는 실시간 PCR은 또한 본 개시내용의 측면에서 당업계의 숙련가들에 의해 결정되는 바와 같이 하나 이상의 하이브리드화 프로브 (즉, 검출 프로브)의 사용을 포함한다. 비제한적인 예를 들자면, 이러한 하이브리드화 프로브는 기술된 방법에 제공된 것들 중의 하나 이상을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. HEX 채널 및/또는 FAM 채널 프로브와 같은 예시적인 프로브는 당업계의 숙련가들에 의해 이해된다.
- [0085] 예시적인 실시양태에 따르면, 검출 프로브 및 프라이머는 예를 들어 프라이머 설계 소프트웨어를 사용한 *in silico* 분석을 사용하고 국립 생물공학 정보 센터 (NCBI)에 기탁된 유전자 및 게놈의 이용 가능한 뉴클레오티드 데이터베이스에 대해 상호참조하여 편리하게 선택된다. 몇몇 추가 지침이 일부 실시양태에서 프라이머 및/또는 프로브의 선택에 사용될 수 있다. 예를 들면, 일부 실시양태에서, 프라이머 및 프로브는 서로 가까이 있지만 중첩되지 않도록 선택된다. 일부 실시양태에서, 프라이머는 동일한 (또는 가까운 T_m) (예를 들어, 약 58°C 내지 약 60°C)를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 프로브의 T_m 은 프라이머의 T_m 에 대해 선택된 것보다 대략 10°C 더 높다. 일부 실시양태에서, 프로브와 프라이머의 길이는 약 17 내지 39개 염기 쌍 등이도록 선택된다. 이를 및 다른 가이드라인이 몇몇 경우에 적절한 프라이머 및/또는 프로브를 선택하는데 있어서 당업계의 숙련가들에 의해 사용된다.
- [0086] 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 프로브는 도 5b 및 5c에 열거된 하기 예시적인 프로브를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0087] 실시예
- [0088] 실시예 1: 전세계 문헌 검색
- [0089] HGMD 데이터베이스를 조사하였으며 62개의 다른 *TGFB1* 돌연변이가 발견되었다. HGMD 데이터베이스는 전세계 분포의 그림 (도 1a 및 1b)을 구축하기 위해 이러한 돌연변이가 설명된 논문을 확인하는데 사용되었다. 세계 지도의 각 깃발은 특정 지역 또는 국가에서 보고된 돌연변이의 요약을 담고 있다. 요약은 인종, 돌연변이 및 각 돌연변이에 대해 보고된 총 사례 수를 포함한다 (도 1a). 돌연변이는 특정 인구나 지리 구역에서 분포에 유의적인 차이 없이 퍼져 있다. 남미에서 보고된 사례는 거의 없고, 아프리카 또는 러시아에서는 보고된 사례가 없다. 지도는 국가별 정보를 추출하는데 사용될 수 있으며, 예를 들어 런던은 도 1b에서 적색 화살표로 표시된다.
- [0090] 전세계적으로, 1,600건 이상의 사례에서 보고된 *TGFB1* 돌연변이의 75%는 이용 가능한 유전자 검사에 의해 현재 검출된 5가지 돌연변이 중 하나로 구성되었다. 신규 *TGFB1* 돌연변이에 대한 보고가 공개될 가능성이 있지만, 코돈 R124 및 R555에서 발견된 가장 일반적인 *TGFB1* 돌연변이는 반대로 적게 보고된다. 따라서, 문헌 내에서 *TGFB1* 이상증의 실제 전세계 검출율의 정확한 추정을 얻기는 어렵다.
- [0091] 우리의 연구에서 최고로 보고된 사례 수의 순위에 기초하여, 이용 가능한 유전자 검사 패널에 6개의 돌연변이를 추가함으로써 *TGFB1* 돌연변이 검출율에 대한 효과를 평가하였다. 가장 일반적인 5가지 돌연변이와 확장된 시험을 위해 제안된 6가지 추가 돌연변이 각각에 대해 보고된 사례 수는 도 3의 표에 나타내어져 있다. H626R은 R124L 다음으로 4번째로 가장 흔한 돌연변이라는 것이 주목할 만하다. 이러한 발견은 *TGFB1* 각각 이상증의 진단을 위해 확장된 패널에 이 돌연변이를 포함시킴을 지지한다. M502V와 관련된 *TGFB1* 각각 이상증의 4가지 사례 만이 문헌 (보충 자료) 내에 보고되었지만, M502V에 대한 이형접합 돌연변이가 하나의 샘플에서 검출되었다. 따라서, 이것은 확장 패널에 포함되었다.
- [0092] 문헌에 보고된 사례로부터, 6개의 새로운 돌연변이를 기존 패널에 추가하면 전세계 검출율을 75%에서 90%로 증가시킬 수 있다 (도 2). 이용 가능한 유전자 검사에 추가 돌연변이를 추가하면 이론적으로는 검출율이 남미에서는 32%, 북미에서는 30%까지 증가한다. 검출율이 둘 다 13% 증가한 유럽과 아시아가 또한 제안된 11개의 돌

연변이 패널로부터 혈액을 볼 수 있다 (도 2).

[0093] 실시예 2: 세계적인 이용 가능한 유전자 검사 데이터 분석

2008년 이후, 전세계적으로 600,000개 이상의 샘플이 이용 가능한 유전자 검사에 의해 시험되었으며; 대부분의 샘플은 한국과 일본에서 왔으며, 여기서 검사는 사전-굴절교정 수술 스크리닝에 사용된다. 전세계적 시험 데이터의 분석은 한국에서의 검출율이 10,000명 중 대략 15명으로, 870명 중 1명으로 보고된 유병률과 거의 일치한다는 것을 입증하였다.¹⁰ 일본에서의 TGFB1 돌연변이의 검출율 (10,000명 중 3명)은 한국보다 낮았다. 한국에서는, 검사가 모든 굴절교정 수술 후보자에 대한 일반적인 스크리닝으로서 시행되는 반면, 일본에서는 환자가 먼저 엄격한 임상 검사를 받고 각막 이상이 검출되지 않은 환자만 유전자 검사를 위해 샘플을 제출하였다.

[0095] 한국과 일본의 진료소/병원은 유전자 검사가 굴절교정 수술의 실습 지침의 일부를 형성하기 때문에 스크리닝 목적으로 유전자 검사를 사용한다. 미국에서, 일부 진료소/병원은 시력 교정 수술을 위한 수술전 검사 동안 스크리닝을 위해 검사를 사용하는 반면, 다른 진료소/병원은 임상 진단을 위한 확인으로 이를 사용하거나 의사가 환자의 각막에서 주목되는 결함에 대해 의심을 가질 경우 TGFB1 돌연변이를 제외하기 위해 이를 사용한다. 유럽의 진료소는 이러한 유형의 임상 확인에 주로 이 검사를 사용한다.

[0096] 실시예 3: 6개의 추가 돌연변이를 갖는 확장 패널의 평가

2016 UCL, Moorfield의 각막 이상증 연구와 같은 소수의 인구 연구에서는 전체 TGFB1 유전자에 대해 Sanger 서열분석을 수행하였다. 이 연구는 주어진 인구에서 핵염률을 높이기 위해 6개의 새로운 돌연변이 부위의 추가를 평가할 수 있는 일련의 데이터를 제공하였다. 간단히 말해서, 이 연구는 91명의 관련없는 TGFB1 각막 이상증 사례로 구성되었으며, 이 중 68명은 상피-간질 TGFB1 관련 이상증 (RBCD, TBCD, LCD 및 GCD)을 진단받았고 23명은 양측 상피 기저막 이상증 (EBMD)을 진단받았다⁴. UK 인구의 경우, 이들 돌연변이가 5개의 돌연변이 유전자 검사와 함께 적절한지 여부를 결정하기 위해 6개의 TGFB1 돌연변이 세트를 평가하였다. 데이터는 UK 코호트에서의 검출율이 90%에서 97%로 증가함을 보여주었다 (도 4의 표). 검출율을 거의 100%로 증가시키기 위해, 도 4의 표로부터 V625D 및 A620D와 같은 다른 후보 돌연변이가 고려될 수 있다. 이러한 결과는 이용 가능한 유전자 검사에 6가지 추가 돌연변이를 포함시키면서 핵염률을 개선시키는 것이 여전히 UK 인구에서 발견되는 일부 중요한 돌연변이를 놓칠 수 있음을 입증한다.

[0098] 원래의 유전자 검사로 음성으로 시험된 임상적 정후가 있는 19개 샘플 중 16개는 여전히 음성 (전체의 84.2%)인 반면, 3개는 확장 패널로 양성으로 시험되었다 (전체의 15.7%). LCD의 후기-발병의 임상 진단을 받은 어머니와 아들 쌍의 WES 결과는 이형접합성 TGFB1 H626R 돌연변이에 대해 양성이었다. 병행 실시간 PCR 검사는 동일한 이형접합성 H626R 돌연변이를 보여 주었다. 세 번째 샘플은 M502V에 대해 이형접합성인 것으로 밝혀졌다. 결과는 Sanger 서열분석으로 확인되었다. 후속 환자 병력은 환자가 왼쪽 각막에 매우 작은 각막 흉터가 있음을 나타내었다. 각막 이상증 또는 혼탁의 가족력은 없었다.

[0099] 문헌의 증거에 근거하여, 이용 가능한 유전자 검사에 6개의 돌연변이를 추가하면 검출율이 15%까지 증가한다. 이것은 우리의 샘플 코호트에 대한 검출에서의 15.7% 증가와 일치한다 (19개 샘플 중 3개). 지리적 또는 인구 차이는 검출되지 않았다; 따라서 새로 제안된 6개 추가 돌연변이는 현재 유전자 검사의 개선으로서 전세계적으로 사용하기에 적합하다. 새로운 돌연변이는 돌연변이 검출율을 상당히 개선시킬 것이다.

[0100] 확장된 패널에서 6개의 추가 돌연변이의 존재에 대한 19개 샘플의 시험은 확장된 유전자 검사가 TGFB1 돌연변이의 검출능을 증가시킬 것이라는 것을 입증하였다.

[0101] 실시예 4: 돌연변이의 다중화 검출

[0102] 첫째, 도 5b에 나타낸 바와 같은 각각의 돌연변이에 대해, 버전 1 (V1) 프라이머, 정상 서열을 갖는 VIC 표지된 프로브, 및 돌연변이 서열을 갖는 FAM 표지된 프로브를 조합하여 돌연변이를 검출하였다. R124S, A546D, H572R, G623D, H626R 및 M502V 각각에 대한 검출은 성공적이었다. 둘째, 도 5b에 나타낸 바와 같은 A546D, H572R 및 G623D 돌연변이 각각에 대해, V1 프라이머, 정상 서열을 갖는 ABY 표지된 프로브, 및 돌연변이 서열을 갖는 JUN 표지된 프로브를 조합하여 돌연변이를 검출하였다. G623D 돌연변이의 검출 만이 성공적이었다. 셋째, 도 5c에 나타낸 바와 같은 R124S, H626R, 및 M502V 돌연변이 각각에 대해, 버전 2 (V2) 프라이머, 정상 서열을 갖는 VIC 표지된 프로브, 및 돌연변이 서열을 갖는 FAM 표지된 프로브를 조합하여 돌연변이를 검출하였다. 단지 H626R에 대한 검출이 성공적이었다. 넷째, 도 5c에 나타낸 바와 같은 A546D, H572R, 및 G623D 돌연변이 각각에 대해, V2 프라이머, 정상 서열을 갖는 ABY 표지된 프로브, 및 돌연변이 서열을 갖는 JUN 표지된 프

로브를 조합하여 돌연변이를 검출하였다. 돌연변이 중 어느 것도 제대로 검출되지 않았다. 다섯째, 단일 반응 혼합물에서, 상이한 조합의 돌연변이를 검출하기 위해 프라이머 및 프로브를 혼합하였다.

- [0103] 하기 PCR 마스터 믹스 용적 계산 및 PCT 조건이 사용되었다:

[0104] TaqPath ProAmp 마스터 믹스 용적; 검사당 2.5 uL

[0105] M502V V1 프라이머 정방향 및 역방향 프라이머, 및 VIC 및 FAM 프로브 믹스 용적; 검사당 0.05 uL

[0106] G623D 20 pM V1 프라이머 정방향 및 역방향 프라이머 용적: 검사당 0.05 uL

[0107] G623D 50 pM V1 ABY 프로브 용적: 검사당 0.025 uL

[0108] G623D 50 pM V1 JUN 프로브 용적: 검사당 0.025 uL

[0109] 물 용적: 검사당 2.35 uL

[0110] PCR 형광 검출 증폭 사이클링 횟수 및 조건:

[0111] 사이클 횟수: 40 사이클

[0112] 사이클링 조건;

[0113] PCR-전 판독 (대기 상태): 60.0°C - 01:00분

[0114] 대기 단계: 95.0°C - 00:20분

[0115] 사이클링 상태: 40 cycles, 95.0°C - 00:30분

[0116] PCR-후 판독 (대기 단계): 60.0°C - 01:00분

[0117] 단일 반응 혼합물에서 돌연변이의 상이한 조합에 대한 프라이머 및 프로브 중에서, V1 M502V 프라이머와 VIC 및 FAM 프로브와 V1 G623D 프라이머와 ABY 및 JUN 프로브 만이 도 6a 및 6b에 나타낸 바와 같이 단일 반응 혼합물에서 돌연변이 둘 다를 성공적으로 검출하였다. R124S 및 A546D, H626R 및 H572R에 대한 시약의 조합은 돌연변이를 제대로 검출하지 못했다.

[0118] 다음은 GRCh38.p7 호모 사피엔스 형질전환 성장 인자 베타 유도된 (TGFB1), 염색체 5 상의 RefSeqGene, NCBI 참조 서열: NG_012646.1 (서열 번호 62)을 보여준다.

1 agagggaaca gaagccatcta ggagagattt gggaaaaca cctgcggat ctgggtact
61 gattgcacgt gggggaccag agacccggaa caggccaaac tgaatgcagg gtttcaacc
121 ttgagccga ccacccggaa gaatgaagaa atagaagaagg ggacccggac
181 aggatttot gatcttttga atgaatgttgc gtcgggtgtt ctcattttcc
241 ttatcttaacg tgcaagaaaa ctcgtggaa gcaagggaaa ggoatgtgta agccaaata
301 catctgtggg catccccca ctaaagtatt tgaggctcagg caactaaacg aacctccaaa
361 gtgcctctgg attcttttta gatatttttg ctggccaaa tcaatggaaac totcatgaaa
421 aatogggttc cctggaaaat gaaattgggt tctaaccacac aagtagcatt tggcggcc
481 tgatggaaag agcggatgtt tggagaaatgtt gtggaaacacg ccacgttatt taagaaacta
541 aacactgggg cctaatacgcc ttcttagggc gcggacggctg ttctgttccc atcaattgtca
601 gagccggaaat cctaatacggtt gttttttttt ctcgcattt caaaacctgtc gattttccca
661 gcctcccttg cgggttttga aaagagagaa gaatggaaagg tgactgtggc caattttcccc
721 tccctgtcca gtgtgtggaa gacactgtat atgcaccaatc tgacccttgtt cttgggcatt
781 tttaagggttcc tacccaaatgtt gagctggggcc tcagccggaa atggaggttc ctctgtgtt
841 acttcactgg tacacatttt caggtgtatt tgcttttttcc catgcctaca taaattgtaat
901 cctctgtttaa ccactcttgc gctcatgtat attaacatcg acctctgtat ctgtgtgcata
961 caaatcacct tggatgttgc tgaaatgtca gatttcgtgg qtcttggggat gttggggagg
1021 tataagatcc cacgtttttt catggaggttctt agaaaaataaa aataaaataaa taaaaatttt
1081 ttaaattttcc cacattttca atgaactctg gggttgtgtt gatgtatgtt ttttgcagat
1141 cacattttga gtggcaagac tggggaaaat cccttgagaaa tcaatccataaa atccccataaa
1201 tgatgttaca atccacccctt aatgttgc aacttcgtatgtt ttttttactt ttatgttcaa

- [0119]

1261 catggaaaaa acaattactg tataatgaagt accattctaa gttctgtgtg ttacacaagg
 1321 gatggcaatt ttccccaaa tttgattcac atctttcat ttggatatct ctggccaaaa
 1381 ctcacccccc ttctcccta gcaagtttg gggagctgaa ttttaagagc tcttttattta
 1441 gctatatggg ggccctctgaa aatgattttg actgtatctt ctgtctccat gtatgccaa
 1501 gcatcaccaag gaacttttagg gagtaaggaa aaggcaggcc tgggtgtcagc tgggtgtcag
 1561 atgcacagctt tcccaccaac aggcccggaa ccagtttctt tcctagggtc cttttgtaaag
 1621 aactttttgg aactactaat ttatcatgt gcataaagct tggttgtata ccciacagta
 1681 ttatccccaa aacctgaatg tttttgtga cttttcatgt gcaacaaaaat gtaaaaggcag
 1741 tcattttttt aaaaaggctt gaaaaaggat agttaaaggatt ctcccaagca agccctca
 1801 tctctgtttt agatgttta atcttggaaagg aaaaaattttt ttetcaatag acagggtttc
 1861 tgggtctgt tgggtctgt ggtcacttgg ggttggggg tccctgtct
 1921 taccccccacg agcatcaac ttgttctccaa agaagcagca acctcagggtg ggagaatgg
 1981 tatacttccaca gcatctgtt tttcatgtt gaaagggggg atgggtgtg gggcatggat
 2041 gtgggatttt aaaaaatata aataaaccata aataaaggat tactgcaate tctttactga
 2101 gctcatggaa aaaaactaag catcaatgt tagtttgcg aactggagaa gtgagggtcca
 2161 gtgaacttgc ttgacttgc ctaaatcttg cttagagagag agctggaaacc agatggcagg
 2221 gtccttggcc ttccatcata aaggagattt ttcccttggaa actycaatgc agccaaattt
 2281 tactggtcte agggggaaat tgggtctggg gtcagctgt gtttggatcc ctttgggttc
 2341 ttccccattat cctatgcca gcaatgttgc tgaaccccgag aatatttttgc ctttcaataa
 2401 atgaatgtgat cattttcaga taatttttgc tggatgttgc caaaacttate atatttttgc
 2461 attgaacccctt atcatataga acaatgtg gggagggatg ataataataaa tagcaatgca
 2521 tattttatgg ccattttttat tgaatttttgc catgtatctt agtttagatg cctgtgggt
 2581 aggttttattt atccctctca tgagggttggaa taacttgcggg aagaccacac agcttagaaag
 2641 tagaaagactt ggttatttttgc cccatcttgc ctcttttttgc tcccttccccc tcccttccccc
 2701 ttcccaacacc tgcctccaaag gaaatgttgc cagtgatgttgc cttagatgttgc caccgtgtcg
 2761 tagtgggtgc tcaatctgc atctccatc ctctatcata tcttagatgttgc aagaccccttgc
 2821 aataatagctt ccccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 2881 tgaacacaaaat tggggccatc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 2941 gcaacggcat ccccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 3001 acccttgcatg cccaaagggtt ttcccaatgttgc aataatgttgc accataaaaa ttccttccatc
 3061 accttgcattt tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 3121 gctcttgc tggcccttcc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 3181 ctaccatgttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 3241 taacttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 3301 accatatttcg ggctttggcc atctgttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 3361 tctgacacatg tggatgttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 3421 cggcccttccatc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 3481 ttttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 3541 ccccccattt tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 3601 cacccatgttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 3661 tgccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 3721 aataatcttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 3781 acttattatc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 3841 atatgttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 3901 tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 3961 gtctggcc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 4021 tcagccaaacc agataacttgc agtttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 4081 ttttcatctt tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 4141 gctcccaaag ccccccattt tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 4201 aaattttttttt tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 4261 tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 4321 cacccatgttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 4381 tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 4441 gaattttttt tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 4501 cccacccatc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 4561 tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 4621 agggggcc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 4681 agccatgttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 4741 tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 4801 gtccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc
 4861 actgttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc tcccttgc

[0120]

4921 agcacgggca cagtgcggga ggggggtgggt gcccaggcga gccaggggcg caccgggttgg
4981 gagggcccaag gggcccccac ctcttcgcac ggccggcccc agctttcccgcc cccttgttggcgt
5041 ccgccttccctt ccgttcgcag ctacttaac ctggccgggg cggccggggc getctcaactt ctgtccgttcc
5101 ccctggggcc gggcccttgc ctgtccgggg ctatgttcgtt cggccggcglt
5161 catggogcte ttgtgggggg tttgtgggttcc ctgccttgggt ctggccctgg
5221 gacccttgggg ggtcccccaca agtgcgccta coagcttgggt ctgcagccaca gcggcccg
5281 gggccggccag cacgggttca ccggccggcc tgccgggggg ctggccggggc tcagggttgc
5341 ggggttccggaa gogcaagccg ctggggggat tggaaacttggc ttggggggcca ggccggccaa
5401 cccgaactaa aaaccttgcg goatggggcg ctggacacc accgccttgcac ggggttggaa
5461 gaggggggggg ggggggttggg gggccatggg gggaaaggccg gggggggccgg
5521 ggggggtttttt aagtgttggcc gagactttgg acggagggccg acggccgttgg
5581 ttccatgtt ctctcccccag ccacttcaga aaaaaaaaaaaa tggcaacttct
5641 tcacccgtggg aggggttggca gggccaaagcc caccggccgg tacaccttatt
5701 caggccccccg gccacgcgtt ccacacaaac accttggggcc caacacgttgg
5761 ggtggcccccag gtcttcgttgc tcttggccgg gccttgcactt cagacacttgc
5821 cactgttctc tgggtacacg aaggggcaatg tggcaacttct tggcttgc
5881 aggagaatgc actggggccctt cacaacacact gtcaatattgg gaaaaacttgg
5941 ttccatcttcc coacagctt gaatgttgcg ctggagcccg gattttggatg tgbttttaa
6001 taatagtttgc gttttttataat ttggagactt atcatggcc gaattttttt
6061 agatgttttg gtttttaggg acaaacttcaa ggagaagggtc ttgttgcata
6121 tactgttccca ggcaggaggca ggcacacattt ctacttccaaa aaccggccca
6181 acaaatacccg agettgggttgc gggcccttca gggccacttgg tggcc
6241 taactgttggaa aaaaatataat ttgttagaaat ctgttgc
6301 taccoatggg gtctgggggtt cacacccaca agcaatggcc
6361 agatgttgc tcaatcttca actttttttt ggggggttata
6421 gaaaggcttgc getcttgcata ctggagggtc ttttttttgc
6481 gggcataatgg gttttttttt ctcttacttgc tggcc
6541 tggggctctg gggggagggg cctgttggga gcacatctgg
6601 aaaccaggcc tgggttgcac ccacaccccttcc
6661 ctgggggtt tetgggggttggggatgttgc
6721 gggggggat gtcggaaaaggaa tggggggat
6781 tggcattttt attatcttgc cccacccatc
6841 attgtttat gtttttttttgc ctcaatgg
6901 gccactaaatgg caggaggaaaatgg
6961 atctcttgc acacccacccatgg
7021 cccatcttgc acaatccatc
7081 acagggtttt ttttttttataat
7141 tccccccaca tacccttgc
7201 aggcttatttgc taatcttgc
7261 ccactgttgc
7321 tattttacttgc
7381 ggctgttgc
7441 gaaaacttgc
7501 gatataagg
7561 tgcttttgc
7621 tgtaatgc
7681 agatgttgc
7741 gggggaaaat
7801 aaaaacttgc
7861 ctgttttttgc
7921 cccatgttgc
7981 cccatgttgc
8041 accacccatc
8101 atttgc
8161 caataatag
8221 gactgttgc
8281 gatgttgc
8341 cccatgttgc
8401 cccatgttgc
8461 ttttttttgc
8521 gtttttttgc
8581 gtttttttgc
8641 gtttttttgc
8701 gtttttttgc
8761 gtttttttgc
8821 gtttttttgc
8881 gtttttttgc
8941 gtttttttgc
9001 gtttttttgc
9061 gtttttttgc
9121 gtttttttgc
9181 gtttttttgc
9241 gtttttttgc
9301 gtttttttgc
9361 gtttttttgc
9421 gtttttttgc
9481 gtttttttgc
9541 gtttttttgc
9601 gtttttttgc
9661 gtttttttgc
9721 gtttttttgc
9781 gtttttttgc
9841 gtttttttgc
9901 gtttttttgc
9961 gtttttttgc
10021 gtttttttgc
10081 gtttttttgc
10141 gtttttttgc
10201 gtttttttgc
10261 gtttttttgc
10321 gtttttttgc
10381 gtttttttgc
10441 gtttttttgc
10501 gtttttttgc
10561 gtttttttgc
10621 gtttttttgc
10681 gtttttttgc
10741 gtttttttgc
10801 gtttttttgc
10861 gtttttttgc
10921 gtttttttgc
10981 gtttttttgc
11041 gtttttttgc
11101 gtttttttgc
11161 gtttttttgc
11221 gtttttttgc
11281 gtttttttgc
11341 gtttttttgc
11401 gtttttttgc
11461 gtttttttgc
11521 gtttttttgc
11581 gtttttttgc
11641 gtttttttgc
11701 gtttttttgc
11761 gtttttttgc
11821 gtttttttgc
11881 gtttttttgc
11941 gtttttttgc
12001 gtttttttgc
12061 gtttttttgc
12121 gtttttttgc
12181 gtttttttgc
12241 gtttttttgc
12301 gtttttttgc
12361 gtttttttgc
12421 gtttttttgc
12481 gtttttttgc
12541 gtttttttgc
12601 gtttttttgc
12661 gtttttttgc
12721 gtttttttgc
12781 gtttttttgc
12841 gtttttttgc
12901 gtttttttgc
12961 gtttttttgc
13021 gtttttttgc
13081 gtttttttgc
13141 gtttttttgc
13201 gtttttttgc
13261 gtttttttgc
13321 gtttttttgc
13381 gtttttttgc
13441 gtttttttgc
13501 gtttttttgc
13561 gtttttttgc
13621 gtttttttgc
13681 gtttttttgc
13741 gtttttttgc
13801 gtttttttgc
13861 gtttttttgc
13921 gtttttttgc
13981 gtttttttgc
14041 gtttttttgc
14101 gtttttttgc
14161 gtttttttgc
14221 gtttttttgc
14281 gtttttttgc
14341 gtttttttgc
14401 gtttttttgc
14461 gtttttttgc
14521 gtttttttgc
14581 gtttttttgc
14641 gtttttttgc
14701 gtttttttgc
14761 gtttttttgc
14821 gtttttttgc
14881 gtttttttgc
14941 gtttttttgc
15001 gtttttttgc
15061 gtttttttgc
15121 gtttttttgc
15181 gtttttttgc
15241 gtttttttgc
15301 gtttttttgc
15361 gtttttttgc
15421 gtttttttgc
15481 gtttttttgc
15541 gtttttttgc
15601 gtttttttgc
15661 gtttttttgc
15721 gtttttttgc
15781 gtttttttgc
15841 gtttttttgc
15901 gtttttttgc
15961 gtttttttgc
16021 gtttttttgc
16081 gtttttttgc
16141 gtttttttgc
16201 gtttttttgc
16261 gtttttttgc
16321 gtttttttgc
16381 gtttttttgc
16441 gtttttttgc
16501 gtttttttgc
16561 gtttttttgc
16621 gtttttttgc
16681 gtttttttgc
16741 gtttttttgc
16801 gtttttttgc
16861 gtttttttgc
16921 gtttttttgc
16981 gtttttttgc
17041 gtttttttgc
17101 gtttttttgc
17161 gtttttttgc
17221 gtttttttgc
17281 gtttttttgc
17341 gtttttttgc
17401 gtttttttgc
17461 gtttttttgc
17521 gtttttttgc
17581 gtttttttgc
17641 gtttttttgc
17701 gtttttttgc
17761 gtttttttgc
17821 gtttttttgc
17881 gtttttttgc
17941 gtttttttgc
18001 gtttttttgc
18061 gtttttttgc
18121 gtttttttgc
18181 gtttttttgc
18241 gtttttttgc
18301 gtttttttgc
18361 gtttttttgc
18421 gtttttttgc
18481 gtttttttgc
18541 gtttttttgc
18601 gtttttttgc
18661 gtttttttgc
18721 gtttttttgc
18781 gtttttttgc
18841 gtttttttgc
18901 gtttttttgc
18961 gtttttttgc
19021 gtttttttgc
19081 gtttttttgc
19141 gtttttttgc
19201 gtttttttgc
19261 gtttttttgc
19321 gtttttttgc
19381 gtttttttgc
19441 gtttttttgc
19501 gtttttttgc
19561 gtttttttgc
19621 gtttttttgc
19681 gtttttttgc
19741 gtttttttgc
19801 gtttttttgc
19861 gtttttttgc
19921 gtttttttgc
19981 gtttttttgc
20041 gtttttttgc
20101 gtttttttgc
20161 gtttttttgc
20221 gtttttttgc
20281 gtttttttgc
20341 gtttttttgc
20401 gtttttttgc
20461 gtttttttgc
20521 gtttttttgc
20581 gtttttttgc
20641 gtttttttgc
20701 gtttttttgc
20761 gtttttttgc
20821 gtttttttgc
20881 gtttttttgc
20941 gtttttttgc
21001 gtttttttgc
21061 gtttttttgc
21121 gtttttttgc
21181 gtttttttgc
21241 gtttttttgc
21301 gtttttttgc
21361 gtttttttgc
21421 gtttttttgc
21481 gtttttttgc
21541 gtttttttgc
21601 gtttttttgc
21661 gtttttttgc
21721 gtttttttgc
21781 gtttttttgc
21841 gtttttttgc
21901 gtttttttgc
21961 gtttttttgc
22021 gtttttttgc
22081 gtttttttgc
22141 gtttttttgc
22201 gtttttttgc
22261 gtttttttgc
22321 gtttttttgc
22381 gtttttttgc
22441 gtttttttgc
22501 gtttttttgc
22561 gtttttttgc
22621 gtttttttgc
22681 gtttttttgc
22741 gtttttttgc
22801 gtttttttgc
22861 gtttttttgc
22921 gtttttttgc
22981 gtttttttgc
23041 gtttttttgc
23101 gtttttttgc
23161 gtttttttgc
23221 gtttttttgc
23281 gtttttttgc
23341 gtttttttgc
23401 gtttttttgc
23461 gtttttttgc
23521 gtttttttgc
23581 gtttttttgc
23641 gtttttttgc
23701 gtttttttgc
23761 gtttttttgc
23821 gtttttttgc
23881 gtttttttgc
23941 gtttttttgc
24001 gtttttttgc
24061 gtttttttgc
24121 gtttttttgc
24181 gtttttttgc
24241 gtttttttgc
24301 gtttttttgc
24361 gtttttttgc
24421 gtttttttgc
24481 gtttttttgc
24541 gtttttttgc
24601 gtttttttgc
24661 gtttttttgc
24721 gtttttttgc
24781 gtttttttgc
24841 gtttttttgc
24901 gtttttttgc
24961 gtttttttgc
25021 gtttttttgc
25081 gtttttttgc
25141 gtttttttgc
25201 gtttttttgc
25261 gtttttttgc
25321 gtttttttgc
25381 gtttttttgc
25441 gtttttttgc
25501 gtttttttgc
25561 gtttttttgc
25621 gtttttttgc
25681 gtttttttgc
25741 gtttttttgc
25801 gtttttttgc
25861 gtttttttgc
25921 gtttttttgc
25981 gtttttttgc
26041 gtttttttgc
26101 gtttttttgc
26161 gtttttttgc
26221 gtttttttgc
26281 gtttttttgc
26341 gtttttttgc
26401 gtttttttgc
26461 gtttttttgc
26521 gtttttttgc
26581 gtttttttgc
26641 gtttttttgc
26701 gtttttttgc
26761 gtttttttgc
26821 gtttttttgc
26881 gtttttttgc
26941 gtttttttgc
27001 gtttttttgc
27061 gtttttttgc
27121 gtttttttgc
27181 gtttttttgc
27241 gtttttttgc
27301 gtttttttgc
27361 gtttttttgc
27421 gtttttttgc
27481 gtttttttgc
27541 gtttttttgc
27601 gtttttttgc
27661 gtttttttgc
27721 gtttttttgc
27781 gtttttttgc
27841 gtttttttgc
27901 gtttttttgc
27961 gtttttttgc
28021 gtttttttgc
28081 gtttttttgc
28141 gtttttttgc
28201 gtttttttgc
28261 gtttttttgc
28321 gtttttttgc
28381 gtttttttgc
28441 gtttttttgc
28501 gtttttttgc
28561 gtttttttgc
28621 gtttttttgc
28681 gtttttttgc
28741 gtttttttgc
28801 gtttttttgc
28861 gtttttttgc
28921 gtttttttgc
28981 gtttttttgc
29041 gtttttttgc
29101 gtttttttgc
29161 gtttttttgc
29221 gtttttttgc
29281 gtttttttgc
29341 gtttttttgc
29401 gtttttttgc
29461 gtttttttgc
29521 gtttttttgc
29581 gtttttttgc
29641 gtttttttgc
29701 gtttttttgc
29761 gtttttttgc
29821 gtttttttgc
29881 gtttttttgc
29941 gtttttttgc
30001 gtttttttgc
30061 gtttttttgc
30121 gtttttttgc
30181 gtttttttgc
30241 gtttttttgc
30301 gtttttttgc
30361 gtttttttgc
30421 gtttttttgc
30481 gtttttttgc
30541 gtttttttgc
30601 gtttttttgc
30661 gtttttttgc
30721 gtttttttgc
30781 gtttttttgc
30841 gtttttttgc
30901 gtttttttgc
30961 gtttttttgc
31021 gtttttttgc
31081 gtttttttgc
31141 gtttttttgc
31201 gtttttttgc
31261 gtttttttgc
31321 gtttttttgc
31381 gtttttttgc
31441 gtttttttgc
31501 gtttttttgc
31561 gtttttttgc
31621 gtttttttgc
31681 gtttttttgc
31741 gtttttttgc
31801 gtttttttgc
31861 gtttttttgc
31921 gtttttttgc
31981 gtttttttgc
32041 gtttttttgc
32101 gtttttttgc
32161 gtttttttgc
32221 gtttttttgc
32281 gtttttttgc
32341 gtttttttgc
32401 gtttttttgc
32461 gtttttttgc
32521 gtttttttgc
32581 gtttttttgc
32641 gtttttttgc
32701 gtttttttgc
32761 gtttttttgc
32821 gtttttttgc
32881 gtttttttgc
32941 gtttttttgc
33001 gtttttttgc
33061 gtttttttgc
33121 gtttttttgc
33181 gtttttttgc
33241 gtttttttgc
33301 gtttttttgc
33361 gtttttttgc
33421 gtttttttgc
33481 gtttttttgc
33541 gtttttttgc
33601 gtttttttgc
33661 gtttttttgc
33721 gtttttttgc
33781 gtttttttgc
33841 gtttttttgc
33901 gtttttttgc
33961 gtttttttgc
34021 gtttttttgc
34081 gtttttttgc
34141 gtttttttgc
34201 gtttttttgc
34261 gtttttttgc
34321 gtttttttgc
34381 gtttttttgc
34441 gtttttttgc
34501 gtttttttgc
34561 gtttttttgc
34621 gtttttttgc
34681 gtttttttgc
34741 gtttttttgc
34801 gtttttttgc
34861 gtttttttgc
34921 gtttttttgc
34981 gtttttttgc
35041 gtttttttgc
35101 gtttttttgc
35161 gtttttttgc
35221 gtttttttgc
35281 gtttttttgc
35341 gtttttttgc
35401 gtttttttgc
35461 gtttttttgc
35521 gtttttttgc
35581 gtttttttgc
35641 gtttttttgc
35701 gtttttttgc
35761 gtttttttgc
35821 gtttttttgc
35881 gtttttttgc
35941 gtttttttgc
36001 gtttttttgc
36061 gtttttttgc
36121 gtttttttgc
36181 gtttttttgc
36241 gtttttttgc
36301 gtttttttgc
36361 gtttttttgc
36421 gtttttttgc
36481 gtttttttgc
36541 gtttttttgc
36601 gtttttttgc
36661 gtttttttgc
36721 gtttttttgc
36781 gtttttttgc
36841 gtttttttgc
36901 gtttttttgc
36961 gtttttttgc
37021 gtttttttgc
37081 gtttttttgc
37141 gtttttttgc
37201 gtttttttgc
37261 gtttttttgc
37321 gtttttttgc
37381 gtttttttgc
37441 gtttttttgc
37501 gtttttttgc
37561 gtttttttgc
37621 gtttttttgc
37681 gtttttttgc
37741 gtttttttgc
37801 gtttttttgc
37861 gtttttttgc
37921 gtttttttgc
37981 gtttttttgc
38041 gtttttttgc
38101 gtttttttgc
38161 gtttttttgc
38221 gtttttttgc
38281 gtttttttgc
38341 gtttttttgc
38401 gtttttttgc
38461 gtttttttgc
38521 gtttttttgc
38581 gtttttttgc
38641 gtttttttgc
38701 gtttttttgc
38761 gtttttttgc
38821 gtttttttgc
38881 gtttttttgc
38941 gtttttttgc
39001 gtttttttgc
39061 gtttttttgc
39121 gtttttttgc
39181 gtttttttgc
39241 gtttttttgc
39301 gtttttttgc
39361 gtttttttgc
39421 gtttttttgc
39481 gtttttttgc
39541 gtttttttgc
39601 gtttttttgc
39661 gtttttttgc
39721 gtttttttgc
39781 gtttttttgc
39841 gtttttttgc
39901 gtttttttgc
39961 gtttttttgc
40021 gtttttttgc
40081 gtttttttgc
40141 gtttttttgc
40201 gtttttttgc
40261 gtttttttgc
40321 gtttttttgc
40381 gtttttttgc
40441 gtttttttgc
40501 gtttttttgc
40561 gtttttttgc
40621 gtttttttgc
40681 gtttttttgc
40741 gtttttttgc
40801 gtttttttgc
40861 gtttttttgc
40921 gtttttttgc
40981 gtttttttgc
41041 gtttttttgc
41101 gtttttttgc
41161 gtttttttgc
41221 gtttttttgc
41281 gtttttttgc
41341 gtttttttgc
41401 gtttttttgc
41461 gtttttttgc
41521 gtttttttgc
41581 gtttttttgc
41641 gtttttttgc
41701 gtttttttgc
41761 gtttttttgc
41821 gtttttttgc
41881 gtttttttgc
41941 gtttttttgc
42001 gtttttttgc
42061 gtttttttgc
42121 gtttttttgc
42181 gtttttttgc
42241 gtttttttgc
42301 gtttttttgc
42361 gtttttttgc
42421 gtttttttgc
42481 gtttttttgc
42541 gtttttttgc
42601 gtttttttgc
42661 gtttttttgc
42721 gtttttttgc
42781 gtttttttgc
42841 gtttttttgc
42901 gtttttttgc
42961 gtttttttgc
43021 gtttttttgc
43081 gtttttttgc
43141 gtttttttgc
43201 gtttttttgc
43261 gtttttttgc
43321 gtttttttgc
43381 gtttttttgc
43441 gtttttttgc
43501 gtttttttgc
43561 gtttttttgc
43621 gtttttttgc
43681 gtttttttgc
43741 gtttttttgc
43801 gtttttttgc
43861 gtttttttgc
43921 gtttttttgc
43981 gtttttttgc
44041 gtttttttgc
44101 gtttttttgc
44161 gtttttttgc
44221 gtttttttgc
44281 gtttttttgc
44341 gtttttttgc
44401 gtttttttgc
44461 gtttttttgc
44521 gtttttttgc
44581 gtttttttgc
44641 gtttttttgc
44701 gtttttttgc
44761 gtttttttgc
44821 gtttttttgc
44881 gtttttttgc
44941 gtttttttgc
45001 gtttttttgc
45061 gtttttttgc
45121 gtttttttgc
45181 gtttttttgc
45241 gtttttttgc
45301 gtttttttgc
45361 gtttttttgc
45421 gtttttttgc
45481 gtttttttgc
45541 gtttttttgc
45601 gtttttttgc
45661 gtttttttgc
45721 gtttttttgc
45781 gtttttttgc
45841 gtttttttgc
45901 gtttttttgc
45961 gtttttttgc
46021 gtttttttgc
46081 gtttttttgc
46141 gtttttttgc
46201 gtttttttgc
46261 gtttttttgc
46321 gtttttttgc
46381 gtttttttgc
46441 gtttttttgc
46501 gtttttttgc
46561 gtttttttgc
46621 gtttttttgc
46681 gtttttttgc
46741 gtttttttgc
46801 gtttttttgc
46861 gtttttttgc
46921 gtttttttgc
46981 gtttttttgc
47041 gtttttttgc
47101 gtttttttgc
47161 gtttttttgc
47221 gtttttttgc
47281 gtttttttgc
47341 gtttttttgc
47401 gtttttttgc
47461 gtttttttgc
47521 gtttttttgc
47581 gtttttttgc
47641 gtttttttgc
47701 gtttttttgc
47761 gtttttttgc
47821 gtttttttgc
47881 gtttttttgc
47941 gtttttttgc
48001 gtttttttgc
48061 gtttttttgc
48121 gtttttttgc
48181 gtttttttgc
48241 gtttttttgc
48301 gtttttttgc
48361 gtttttttgc
48421 gtttttttgc
48481 gtttttttgc
48541 gtttttttgc
48601 gtttttttgc
48661 gtttttttgc
48721 gtttttttgc
48781 gtttttttgc
48841 gtttttttgc
48901 gtttttttgc
48961 gtttttttgc
49021 gtttttttgc
49081 gtttttttgc
49141 gtttttttgc
49201 gtttttttgc
49261 gtttttttgc
49321 gtttttttgc
49381 gtttttttgc
49441 gtttttttgc
49501 gtttttttgc
49561 gtttttttgc
49621 gtttttttgc
49681 gtttttttgc
49741 gtttttttgc
49801 gtttttttgc
49861 gtttttttgc
49921 gtttttttgc
49981 gtttttttgc
50041 gtttttttgc
50101 gtttttttgc
50161 gtttttttgc
50221 gtttttttgc
50281 gtttttttgc
50341 gtttttttgc
50401 gtttttttgc
50461 gtttttttgc
50521 gtttttttgc
50581 gtttttttgc
50641 gtttttttgc
50701 gtttttttgc
50761 gtttttttgc
50821 gtttttttgc
50881 gtttttttgc
50941 gtttttttgc
51001 gtttttttgc
51061 gtttttttgc
51121 gtttttttgc
51181 gtttttttgc
51241 gtttttttgc
51301 gtttttttgc
51361 gtttttttgc
51421 gtttttttgc
51481 gtttttttgc
51541 gtttttttgc
51601 gtttttttgc
51661 gtttttttgc
51721 gtttttttgc
51781 gtttttttgc
51841 gtttttttgc
51901 gtttttttgc
51961 gtttttttgc
52021 gtttttttgc
52081 gtttttttgc
52141 gtttttttgc
52201 gtttttttgc
52261 gtttttttgc
52321 gtttttttgc
52381 gtttttttgc
52441 gtttttttgc
52501 gtttttttgc
52561 gtttttttgc
52621 gtttttttgc
52681 gtttttttgc
52741 gtttttttgc
52801 gtttttttgc
52861 gtttttttgc
52921 gtttttttgc
52981 gtttttttgc
53041 gtttttttgc
53101 gtttttttgc
53161 gtttttttgc
53221 gtttttttgc
53281 gtttttttgc
53341 gtttttttgc
53401 gtttttttgc
53461 gtttttttgc
53521 gtttttttgc
53581 gtttttttgc
53641 gtttttttgc
53701 gtttttttgc
53761 gtttttttgc
53821 gtttttttgc
53881 gtttttttgc
53941 gtttttttgc
54001 gtttttttgc
54061 gtttttttgc
54121 gtttttttgc
54181 gtttttttgc
54241 gtttttttgc
54301 gtttttttgc
54361 gtttttttgc
54421 gtttttttgc
54481 gtttttttgc
54541 gtttttttgc
54601 gtttttttgc
54661 gtttttttgc
54721 gtttttttgc
54781 gtttttttgc
54841 gtttttttgc
54901 gtttttttgc
54961 gtttttttgc
55021 gtttttttgc
55081 gtttttttgc
55141 gtttttttgc
55201 gtttttttgc
55261 gtttttttgc
55321 gtttttttgc
55381 gtttttttgc
55441 gtttttttgc
55501 gtttttttgc
55561 gtttttttgc
55621 gtttttttgc
55681 gtttttttgc
55741 gtttttttgc
55801 gtttttttgc
55861 gtttttttgc
55921 gtttttttgc
55981 gtttttttgc
56041 gtttttttgc
56101 gtttttttgc
56161 gtttttttgc
56221 gtttttttgc
56281 gtttttttgc
56341 gtttttttgc
56401 gtttttttgc
56461 gtttttttgc
56521 gtttttttgc
56581 gtttttttgc
56641 gtttttttgc
56701 gtttttttgc
56761 gtttttttgc
56821 gtttttttgc
56881 gtttttttgc
56941 gtttttttgc
57001 gtttttttgc
57061 gtttttttgc
57121 gtttttttgc
57181 gtttttttgc
57241 gtttttttgc
57301 gtttttttgc
57361 gtttttttgc
57421 gtttttttgc
57481 gtttttttgc
57541 gtttttttgc
57601 gtttttttgc
57661 gtttttttgc
57721 gtttttttgc
57781 gtttttttgc
57841 gtttttttgc
57901 gtttttttgc
57961 gtttttttgc
58021 gtttttttgc
58081 gtttttttgc
58141 gtttttttgc
58201 gtttttttgc
58261 gtttttttgc
58321 gtttttttgc
58381 gtttttttgc
58441 gtttttttgc
58501 gtttttttgc
58561 gtttttttgc
58621 gtttttttgc
58681 gtttttttgc
58741 gtttttttgc
58801 gtttttttgc
58861 gtttttttgc
58921 gtttttttgc
58981 gtttttttgc
59041 gtttttttgc
59101 gtttttttgc
59161 gtttttttgc
59221 gtttttttgc

[0121]

[0122]

[0123]

[0124]

[0125]

23221 ccacccttt tggcctgtc ttccttggg cccttattt cacagcttgt ggaacccaca
 23281 ttttgtact gtgttgaaa acactgttt ctctcccg ggcttggga ctatgcctt
 23341 gtgtgtgaa ctgtcttcc ttgtgtttc ttggggaga ttgtactgt gaactgtgcc
 23401 cggctgtca aagccacca ccatcaacc aacgggggtt tgacacctat cgataaggcc
 23461 atctccacca tcaccaaaac catcagcag atcattgaga togaggacac ctttgagacc
 23521 ctccggtaa gggactgccc tgggtggagg ccaggtttt ggacacattt ctccccaaaga
 23581 gggccctag aggaacttt ctgcaggaga ggttaggat ggtctctgt ggggaaacata
 23641 gagcagggtt cctgaaatc ctttgcattca gggaaatca ttgacccagac attcagttt
 23701 acctaactt taaaattttt catctttttt ataaagtgtt cccttctttt cttcccttgg
 23761 aaaggctgtt ggtgtggc tgacagcaga cgtgtttt tgagccctt acctgtttt
 23821 tggcttccat aggtggcagt tcccatatgg gtacttggaa taaatggcctt atcaggctgt
 23881 gtgtgtttt ggtatcacat tcccccaccc aggacccctt ttccaaacat acgtatgtt
 23941 tcttggagcc cagaacacca gagaaggccac cagtgtggac acagaagtca agggctgtat
 24001 ttccagctt gtttctgtact ctggggggc cggcggaaatc cccatgtcc
 24061 agcaggccat tggcttacaa ctggggggg aggcatgtt cttttggcaa ggactgttca
 24121 ggaggaaatg gaggcgggtt gcccgttccat ggggttttggc ttgttcaag gagaacttcc
 24181 taaccacaaa ggtatcaatgtt ggggtggagg cggacccatc ctatgttccat
 24241 gagacacaaa cgttgggggtt ggttggcact gacagccatc gcaatgttgg atgggttta
 24301 gctggggatc tggctgttca agtcttccat ccatgtttt cttttttttt gtttgggg
 24361 cgggggttccat caagaaaatg atgttccac atagttggca gcacgttac agcaattgt
 24421 ccctttgtat cttttttttt tactgtttttag atttgtttaaatttgcatttcc
 24481 tgaccccttca ttttgcgtt ctttttttttataaaccatc atttacttgg tacctgttac
 24541 ttccgggtt ggcctatgtt ccaggatgtt agatgttac agggaaaggca aatgttattt
 24601 ctcagtagag ctaataactt atctggagag agacacacaaa caaatcaaca aggttagcc
 24661 gggctgtat aatgttggcgtt aatgttggggcgtt atgttggggcgtt gtttgggg
 24721 gatggaaatg tcaaggatgtt ctcttggggat ggggttttttttggatctgtca gctttttt
 24781 tgagaatggg tccattttttt aatgttggcgtt gggcaatgttca caccatgttgggg
 24841 aatagcaaaat gtcagggttca ggaaggccaa gggagggccat gtttttttttggatgtt
 24901 aaggccatccat aatggccaaat gacaaggccaa ggttggccat gcccatttttccat
 24961 cagaccccttgg aatgttggcgtt ttttttttttggatgttca gggatgttca gggccat
 25021 gaatgttccat ctggcgttca ttttttttttggatgttca gtttttttttggatgtt
 25081 atgttggatgttca ttttttttttggatgttca gtttttttttggatgttca
 25141 gttaggcacatc ctttttttttggatgttca ttttttttttggatgttca
 25201 agtttgcatttccat aatgttggggat ttttttttttggatgttca gggatgttca
 25261 gtaagggggaa agacacccat gggatgttca gggatgttca gggatgttca
 25321 gcaatgttca gggatgttca gggatgttca gggatgttca gggatgttca
 25381 tggggccat gtttttttttggatgttca ttttttttttggatgttca
 25441 gaaaggccatc ttttttttttggatgttca gggatgttca ttttttttttggatgtt
 25501 gccatgttca ttttttttttggatgttca gggatgttca ttttttttttggatgtt
 25561 ctttttttttggatgttca gggatgttca ttttttttttggatgttca
 25621 aggcttccat gggatgttca gggatgttca ttttttttttggatgttca
 25681 tgatggatgttca gggatgttca ttttttttttggatgttca
 25741 aagacactgttca ttttttttttggatgttca gggatgttca ttttttttttggatgtt
 25801 ctttttttttggatgttca gggatgttca ttttttttttggatgttca
 25861 agccacacatc ttttttttttggatgttca gggatgttca ttttttttttggatgtt
 25921 ctggatgttca gggatgttca ttttttttttggatgttca
 25981 aggcttccat gggatgttca ttttttttttggatgttca
 26041 gggggccat gggatgttca ttttttttttggatgttca
 26101 ctctgtgttca gggatgttca ttttttttttggatgttca
 26161 aggccatgttca ttttttttttggatgttca gggatgttca ttttttttttggatgtt
 26221 ctggatgttca gggatgttca ttttttttttggatgttca
 26281 atcaaaaaat ttttttttttggatgttca gggatgttca ttttttttttggatgtt
 26341 gggggccat gggatgttca ttttttttttggatgttca
 26401 gggggccat gggatgttca ttttttttttggatgttca
 26461 ttatgttca ttttttttttggatgttca gggatgttca ttttttttttggatgtt
 26521 gtttttttttggatgttca gggatgttca ttttttttttggatgttca
 26581 ttttttttttggatgttca gggatgttca ttttttttttggatgttca
 26641 ctttttttttggatgttca gggatgttca ttttttttttggatgttca
 26701 aatgttgggg ttttttttttggatgttca gggatgttca ttttttttttggatgtt
 26761 ttccaggatc acttggatgttca ttttttttttggatgttca
 26821 aaaatgttca atgttggatgttca gggatgttca ttttttttttggatgtt

[0126]

[0127]

30541 ctgagctgca gccccaggaa ggcagagaag ggggc当地 cttgtgc当地 cctgc当地
 30601 cctttaggg caaaaactcca aacacccttg attatetgga ttttccatag
 30661 aagatacccg atgttaaggaa atattggc当地 cttcacttgg ttttccatc cctgttcc
 30721 aactcaaggaa gggatggc当地 ttttcaactg atttatctc catcaactc ttcattgc
 30781 gacccatct ctctggaccc aaccatcacc ctttcttggta gatggaaecc ctc当地
 30841 tgccataca aggaatttgc ttoggaaacca cataattaaa gaccagctgg cctctaa
 30901 tctgtacccat ggacagaccc ttggaaactt gggc当地 aaactgagag ttttgg
 30961 tctgtatggc agttctgggct octaaatcatc gotcttgggaa agtcttac ttttgg
 31021 gtattatgtt aaaaaaaaaat gtcttcaata agcaggatgt tgc当地
 31081 acaaggaaagg aaataatcc ttggaaatat agataacaaa atgagatct gc当地
 31141 tggaaatctt ttttctggag gc当地 ttggaaatcc ataaaccacca
 31201 tgaaggaaata agtcccttgc ttggaaatcc ataaacaccc gggaggagg
 31261 gactcttgc gagcttatgc gaagagaagc cccctaaactt
 31321 cccaaaagggtt ctttcttctt ttttcttgc ttcaaaacca acaggta
 31381 tggaaatccaa aaaggaaatca caactcaaca tagcttgc当地 cccaggac
 31441 ttggctaaacat atggatgttac ttggtaaacaa aaaggaaatcc
 31501 tatttcaaca ttgtcaatgg acctcatgtg taactgtatc ttttcttgc
 31561 gtgactttat tggggocctt ctaaccgttcc tttecttcaag
 31621 ttttctggag aaaaatcatc attttaccc acggatccaa
 31681 cttcatcttc atggatatac acctgttac atgtcttgc
 31741 ggaaggatccaa ccaggatctt ttttcttgc
 31801 aacaggctgca tc当地 ggcc
 31861 cgggtgtcc
 31921 aggttaatttgc ttccatccc
 31981 tggggccca gctatttgc
 32041 tggacttgc
 32101 tacattggga
 32161 gggggacta
 32221 tccaaatgt
 32281 gtatctgtt
 32341 atttctgact
 32401 ctteagccac
 32461 cttggaggt
 32521 ctccctgt
 32581 gagctggagc
 32641 gtgcatttca
 32701 tccctggctg
 32761 gtatcttac
 32821 gggaggatgt
 32881 gagaaggag
 32941 gtatgtatcc
 33001 gatgttata
 33061 gaggccaa
 33121 gggaggatgt
 33181 gccaggcc
 33241 cagcccttcc
 33301 ggaggccact
 33361 agtagaaaa
 33421 gagacatct
 33481 aaagcttcc
 33541 ggtatctgt
 33601 tgggggggg
 33661 agccatgc
 33721 atgcctgt
 33781 agggaaagg
 33841 gagcagaa
 33901 ttctttat
 33961 gggaggatgt
 34021 atccccca
 34081 aggagggg
 34141 gggacagaga

[0128]

34201 accccagggg ctgggtggc tctgtacttc caggcaatat ttgttggaaag gggacacctg
34261 tcagtcocag gtttggatg ttggaaaata agttggatc cagtgcctcc atccctctggc
34321 aggcatgttg attttctaat aaccaagtgt actttccaaa aaatggtaaa actttcccc
34381 ttcttagttt caagatgtcg gaaatagtcg ttccataacgc ctggggaaat ttaccccttt
34441 ggctggtaat gggagttatcc gagatgagag ggcagctgga aacttttoga atgaccctcc
34501 acacttaattt tggttaatgtc ttccgcaccc ttatggccaa ccagatgtcc gcccacagggt
34561 ctggagacac tgatgtggc tggaaaaggat gtctggacgt gacgaggaga gatgtcgcc
34621 agggaaatac ooctccgcg ctgacccatc cggttccatc gtccctccac agtacatgt
34681 tctactcttt taagttctcc cttcaggaaa tagccatc tc aaacagaatg tgcatttgag
34741 ggccagaatgt gtaaaatattc ctaactgtg ttataaccgt caggggccat gctgtatgt
34801 aaacgttccca gacggcggtc ctggaaaaggat ccctgggtt ccaacaaat atttatctca
34861 tggaaacatg agtcataatc acagaggagt atggattaac tcccttcag cagccaggga
34921 gcccaccc ccagacacga tatTTaaaccc agaggccaaac tgactgtcg ggcagatttt
34981 tggcatgaa catgtgtttt gtgttcctcg accatgtacg agattgtggg tcacaaacgtt
35041 gatgtatatac tggggatcta ataatgtttt attccctggg caggaggttc ttccatcc
35101 gggtggccac ttatcatc tccctctggc cttcccttgac caggctaaattt accattttt
35161 ggatttaactc tttcttc tcccgcaacc tgccaggatgt gccaaggaaat ttgccaacat
35221 octgaaataac caatgtggt atggaaatgt gttagogga ggcatgggg coctgtgtgg
35281 gctaaatgtt ctcccaagggtt accaaactggg ggcttccatc gatgtgttcc ttcaaaatcaa
35341 aggtctggcta aatttcccca gggcagggtt ccaggacata ttcacccccc aggttggaaat
35401 tatacacaca caacttccaa tggtggccaa gaatctgtca gtgtatatttgc ttccaaaggaa
35461 aaagaaaaaa agaaaggagggtt cttaggggg atcaatgttgc atcatgttgc gacatgt
35521 agaaatctca gatttacaaag ggaatagacg atctgttttgc gatcttggaa gaggttattt
35581 gatottcottt ctcttaagga ggtttaggc aacttagttt gtgactgtttt agatcgtt
35641 gtatccacac ctatccccc ccccaaaatccggggccatc gatgtgttcc ttgcacatgg
35701 ccatcccaagg aggttttttgc agttctggc ctgttgccttgc gatcttcc ttgtcttgc
35761 cattgtatgt ataaatgttgc aactgtcaacta agagtgttcc taaaaggatg acagcccgca
35821 gctccaggaaa ttcccttgcg tgccacccgtca gaggccatcgg acccccttgcg ggaggggaccc
35881 ctcttcgtg tgggtgttgc ttctacttc tggcttcc ttttttttttccatc
35941 ttgtccacca gtttctcaeg aggacatgttgc gaaatgttgc atgttggggat gtttccatc
36001 ggatgtactt gtttacttttca gcaagggttcc caagaatctc ctgcacccatc
36061 ctgggttctt gtttctcaacca ggttttttgc ctcttcatc gatgtgttcc
36121 ctccctggaa ggttctggatgttgc gtttggggcc tccatgttgc
36181 ttggggcccc accggaaaaatggaaatgttgc tttttccatc
36241 ttccatgttgc tccacccatc tagtttttttca gaggccatc gatgtgttcc
36301 tcagtttttttcttctggatgttgc ttttttttca
36361 ttggactgttgc ttggatgttgc caaaaaatgttgc ttttttttca
36421 caggaggatgttgc gtttctggatgttgc ttttttttca
36481 cacccatgttgc tccatgttgc ttttttttca
36541 gtggatgttgc ttggatgttgc ttttttttca
36601 gaggatgttgc ttttttttca
36661 acaaaatgttgc ttttttttca
36721 caggaggatgttgc ttttttttca
36781 actccatgttgc ttttttttca
36841 cggaaaaatgttgc ttttttttca
36901 aatgttccatc ttttttttca
36961 aacaaggatgttgc ttttttttca
37021 accaaatgttgc ttttttttca
37081 ttttttttca
37141 catgttacccatgttgc ttttttttca
37201 ttggatgttgc ttttttttca
37261 ccaggatgttgc ttttttttca
37321 ccggatgttgc ttttttttca
37381 gtggatgttgc ttttttttca
37441 ctccatgttgc ttttttttca
37501 gaaatgttgc ttttttttca
37561 taatgttgc ttttttttca
37621 aaagggggatgttgc ttttttttca
37681 ccaggatgttgc ttttttttca
37741 ggccatgttgc ttttttttca
37801 aacttccatgttgc ttttttttca
37861 aatgttgc ttttttttca
37921 aatgttgc ttttttttca
37981 aatgttgc ttttttttca
38041 aatgttgc ttttttttca
38101 aatgttgc ttttttttca
38161 aatgttgc ttttttttca
38221 aatgttgc ttttttttca
38281 aatgttgc ttttttttca
38341 aatgttgc ttttttttca
38401 aatgttgc ttttttttca
38461 aatgttgc ttttttttca
38521 aatgttgc ttttttttca
38581 aatgttgc ttttttttca
38641 aatgttgc ttttttttca
38701 aatgttgc ttttttttca
38761 aatgttgc ttttttttca
38821 aatgttgc ttttttttca
38881 aatgttgc ttttttttca
38941 aatgttgc ttttttttca
39001 aatgttgc ttttttttca
39061 aatgttgc ttttttttca
39121 aatgttgc ttttttttca
39181 aatgttgc ttttttttca
39241 aatgttgc ttttttttca
39301 aatgttgc ttttttttca
39361 aatgttgc ttttttttca
39421 aatgttgc ttttttttca
39481 aatgttgc ttttttttca
39541 aatgttgc ttttttttca
39601 aatgttgc ttttttttca
39661 aatgttgc ttttttttca
39721 aatgttgc ttttttttca
39781 aatgttgc ttttttttca
39841 aatgttgc ttttttttca
39901 aatgttgc ttttttttca
39961 aatgttgc ttttttttca
40021 aatgttgc ttttttttca
40081 aatgttgc ttttttttca
40141 aatgttgc ttttttttca
40201 aatgttgc ttttttttca
40261 aatgttgc ttttttttca
40321 aatgttgc ttttttttca
40381 aatgttgc ttttttttca
40441 aatgttgc ttttttttca
40501 aatgttgc ttttttttca
40561 aatgttgc ttttttttca
40621 aatgttgc ttttttttca
40681 aatgttgc ttttttttca
40741 aatgttgc ttttttttca
40801 aatgttgc ttttttttca
40861 aatgttgc ttttttttca
40921 aatgttgc ttttttttca
41081 aatgttgc ttttttttca
41141 aatgttgc ttttttttca
41201 aatgttgc ttttttttca
41261 aatgttgc ttttttttca
41321 aatgttgc ttttttttca
41381 aatgttgc ttttttttca
41441 aatgttgc ttttttttca
41501 aatgttgc ttttttttca
41561 aatgttgc ttttttttca
41621 aatgttgc ttttttttca
41681 aatgttgc ttttttttca
41741 aatgttgc ttttttttca
41801 aatgttgc ttttttttca
41861 aatgttgc ttttttttca
41921 aatgttgc ttttttttca
42081 aatgttgc ttttttttca
42141 aatgttgc ttttttttca
42201 aatgttgc ttttttttca
42261 aatgttgc ttttttttca
42321 aatgttgc ttttttttca
42381 aatgttgc ttttttttca
42441 aatgttgc ttttttttca
42501 aatgttgc ttttttttca
42561 aatgttgc ttttttttca
42621 aatgttgc ttttttttca
42681 aatgttgc ttttttttca
42741 aatgttgc ttttttttca
42801 aatgttgc ttttttttca
42861 aatgttgc ttttttttca
42921 aatgttgc ttttttttca
43081 aatgttgc ttttttttca
43141 aatgttgc ttttttttca
43201 aatgttgc ttttttttca
43261 aatgttgc ttttttttca
43321 aatgttgc ttttttttca
43381 aatgttgc ttttttttca
43441 aatgttgc ttttttttca
43501 aatgttgc ttttttttca
43561 aatgttgc ttttttttca
43621 aatgttgc ttttttttca
43681 aatgttgc ttttttttca
43741 aatgttgc ttttttttca
43801 aatgttgc ttttttttca
43861 aatgttgc ttttttttca
43921 aatgttgc ttttttttca
44081 aatgttgc ttttttttca
44141 aatgttgc ttttttttca
44201 aatgttgc ttttttttca
44261 aatgttgc ttttttttca
44321 aatgttgc ttttttttca
44381 aatgttgc ttttttttca
44441 aatgttgc ttttttttca
44501 aatgttgc ttttttttca
44561 aatgttgc ttttttttca
44621 aatgttgc ttttttttca
44681 aatgttgc ttttttttca
44741 aatgttgc ttttttttca
44801 aatgttgc ttttttttca
44861 aatgttgc ttttttttca
44921 aatgttgc ttttttttca
45081 aatgttgc ttttttttca
45141 aatgttgc ttttttttca
45201 aatgttgc ttttttttca
45261 aatgttgc ttttttttca
45321 aatgttgc ttttttttca
45381 aatgttgc ttttttttca
45441 aatgttgc ttttttttca
45501 aatgttgc ttttttttca
45561 aatgttgc ttttttttca
45621 aatgttgc ttttttttca
45681 aatgttgc ttttttttca
45741 aatgttgc ttttttttca
45801 aatgttgc ttttttttca
45861 aatgttgc ttttttttca
45921 aatgttgc ttttttttca
46081 aatgttgc ttttttttca
46141 aatgttgc ttttttttca
46201 aatgttgc ttttttttca
46261 aatgttgc ttttttttca
46321 aatgttgc ttttttttca
46381 aatgttgc ttttttttca
46441 aatgttgc ttttttttca
46501 aatgttgc ttttttttca
46561 aatgttgc ttttttttca
46621 aatgttgc ttttttttca
46681 aatgttgc ttttttttca
46741 aatgttgc ttttttttca
46801 aatgttgc ttttttttca
46861 aatgttgc ttttttttca
46921 aatgttgc ttttttttca
47081 aatgttgc ttttttttca
47141 aatgttgc ttttttttca
47201 aatgttgc ttttttttca
47261 aatgttgc ttttttttca
47321 aatgttgc ttttttttca
47381 aatgttgc ttttttttca
47441 aatgttgc ttttttttca
47501 aatgttgc ttttttttca
47561 aatgttgc ttttttttca
47621 aatgttgc ttttttttca
47681 aatgttgc ttttttttca
47741 aatgttgc ttttttttca
47801 aatgttgc ttttttttca
47861 aatgttgc ttttttttca
47921 aatgttgc ttttttttca
48081 aatgttgc ttttttttca
48141 aatgttgc ttttttttca
48201 aatgttgc ttttttttca
48261 aatgttgc ttttttttca
48321 aatgttgc ttttttttca
48381 aatgttgc ttttttttca
48441 aatgttgc ttttttttca
48501 aatgttgc ttttttttca
48561 aatgttgc ttttttttca
48621 aatgttgc ttttttttca
48681 aatgttgc ttttttttca
48741 aatgttgc ttttttttca
48801 aatgttgc ttttttttca
48861 aatgttgc ttttttttca
48921 aatgttgc ttttttttca
49081 aatgttgc ttttttttca
49141 aatgttgc ttttttttca
49201 aatgttgc ttttttttca
49261 aatgttgc ttttttttca
49321 aatgttgc ttttttttca
49381 aatgttgc ttttttttca
49441 aatgttgc ttttttttca
49501 aatgttgc ttttttttca
49561 aatgttgc ttttttttca
49621 aatgttgc ttttttttca
49681 aatgttgc ttttttttca
49741 aatgttgc ttttttttca
49801 aatgttgc ttttttttca
49861 aatgttgc ttttttttca
49921 aatgttgc ttttttttca
50081 aatgttgc ttttttttca
50141 aatgttgc ttttttttca
50201 aatgttgc ttttttttca
50261 aatgttgc ttttttttca
50321 aatgttgc ttttttttca
50381 aatgttgc ttttttttca
50441 aatgttgc ttttttttca
50501 aatgttgc ttttttttca
50561 aatgttgc ttttttttca
50621 aatgttgc ttttttttca
50681 aatgttgc ttttttttca
50741 aatgttgc ttttttttca
50801 aatgttgc ttttttttca
50861 aatgttgc ttttttttca
50921 aatgttgc ttttttttca
51081 aatgttgc ttttttttca
51141 aatgttgc ttttttttca
51201 aatgttgc ttttttttca
51261 aatgttgc ttttttttca
51321 aatgttgc ttttttttca
51381 aatgttgc ttttttttca
51441 aatgttgc ttttttttca
51501 aatgttgc ttttttttca
51561 aatgttgc ttttttttca
51621 aatgttgc ttttttttca
51681 aatgttgc ttttttttca
51741 aatgttgc ttttttttca
51801 aatgttgc ttttttttca
51861 aatgttgc ttttttttca
51921 aatgttgc ttttttttca
52081 aatgttgc ttttttttca
52141 aatgttgc ttttttttca
52201 aatgttgc ttttttttca
52261 aatgttgc ttttttttca
52321 aatgttgc ttttttttca
52381 aatgttgc ttttttttca
52441 aatgttgc ttttttttca
52501 aatgttgc ttttttttca
52561 aatgttgc ttttttttca
52621 aatgttgc ttttttttca
52681 aatgttgc ttttttttca
52741 aatgttgc ttttttttca
52801 aatgttgc ttttttttca
52861 aatgttgc ttttttttca
52921 aatgttgc ttttttttca
53081 aatgttgc ttttttttca
53141 aatgttgc ttttttttca
53201 aatgttgc ttttttttca
53261 aatgttgc ttttttttca
53321 aatgttgc ttttttttca
53381 aatgttgc ttttttttca
53441 aatgttgc ttttttttca
53501 aatgttgc ttttttttca
53561 aatgttgc ttttttttca
53621 aatgttgc ttttttttca
53681 aatgttgc ttttttttca
53741 aatgttgc ttttttttca
53801 aatgttgc ttttttttca
53861 aatgttgc ttttttttca
53921 aatgttgc ttttttttca
54081 aatgttgc ttttttttca
54141 aatgttgc ttttttttca
54201 aatgttgc ttttttttca
54261 aatgttgc ttttttttca
54321 aatgttgc ttttttttca
54381 aatgttgc ttttttttca
54441 aatgttgc ttttttttca
54501 aatgttgc ttttttttca
54561 aatgttgc ttttttttca
54621 aatgttgc ttttttttca
54681 aatgttgc ttttttttca
54741 aatgttgc ttttttttca
54801 aatgttgc ttttttttca
54861 aatgttgc ttttttttca
54921 aatgttgc ttttttttca
55081 aatgttgc ttttttttca
55141 aatgttgc ttttttttca
55201 aatgttgc ttttttttca
55261 aatgttgc ttttttttca
55321 aatgttgc ttttttttca
55381 aatgttgc ttttttttca
55441 aatgttgc ttttttttca
55501 aatgttgc ttttttttca
55561 aatgttgc ttttttttca
55621 aatgttgc ttttttttca
55681 aatgttgc ttttttttca
55741 aatgttgc ttttttttca
55801 aatgttgc ttttttttca
55861 aatgttgc ttttttttca
55921 aatgttgc ttttttttca
56081 aatgttgc ttttttttca
56141 aatgttgc ttttttttca
56201 aatgttgc ttttttttca
56261 aatgttgc ttttttttca
56321 aatgttgc ttttttttca
56381 aatgttgc ttttttttca
56441 aatgttgc ttttttttca
56501 aatgttgc ttttttttca
56561 aatgttgc ttttttttca
56621 aatgttgc ttttttttca
56681 aatgttgc ttttttttca
56741 aatgttgc ttttttttca
56801 aatgttgc ttttttttca
56861 aatgttgc ttttttttca
56921 aatgttgc ttttttttca
57081 aatgttgc ttttttttca
57141 aatgttgc ttttttttca
57201 aatgttgc ttttttttca
57261 aatgttgc ttttttttca
57321 aatgttgc ttttttttca
57381 aatgttgc ttttttttca
57441 aatgttgc ttttttttca
57501 aatgttgc ttttttttca
57561 aatgttgc ttttttttca
57621 aatgttgc ttttttttca
57681 aatgttgc ttttttttca
57741 aatgttgc ttttttttca
57801 aatgttgc ttttttttca
57861 aatgttgc ttttttttca
57921 aatgttgc ttttttttca
58081 aatgttgc ttttttttca
58141 aatgttgc ttttttttca
58201 aatgttgc ttttttttca
58261 aatgttgc ttttttttca
58321 aatgttgc ttttttttca
58381 aatgttgc ttttttttca
58441 aatgttgc ttttttttca
58501 aatgttgc ttttttttca
58561 aatgttgc ttttttttca
58621 aatgttgc ttttttttca
58681 aatgttgc ttttttttca
58741 aatgttgc ttttttttca
58801 aatgttgc ttttttttca
58861 aatgttgc ttttttttca
58921 aatgttgc ttttttttca
59081 aatgttgc ttttttttca
59141 aatgttgc ttttttttca
59201 aatgttgc ttttttttca
59261 aatgttgc ttttttttca
59321 aatgttgc ttttttttca
59381 aatgttgc ttttttttca
59441 aatgttgc ttttttttca
59501 aatgttgc ttttttttca
59561 aatgttgc ttttttttca
59621 aatgttgc ttttttttca
59681 aatgttgc ttttttttca
59741 aatgttgc ttttttttca
59801 aatgttgc ttttttttca
59861 aatgttgc ttttttttca
59921 aatgttgc ttttttttca
60081 aatgttgc ttttttttca
60141 aatgttgc ttttttttca
60201 aatgttgc ttttttttca
60261 aatgttgc ttttttttca
60321 aatgttgc ttttttttca
60381 aatgttgc ttttttttca
60441 aatgttgc ttttttttca
60501 aatgttgc ttttttttca
60561 aatgttgc ttttttttca
60621 aatgttgc ttttttttca
60681 aatgttgc ttttttttca
60741 aatgttgc ttttttttca
60801 aatgttgc ttttttttca
60861 aatgttgc ttttttttca
60921 aatgttgc ttttttttca
61081 aatgttgc ttttttttca
61141 aatgttgc ttttttttca
61201 aatgttgc ttttttttca
61261 aatgttgc ttttttttca
61321 aatgttgc ttttttttca
61381 aatgttgc ttttttttca
61441 aatgttgc ttttttttca
61501 aatgttgc ttttttttca
61561 aatgttgc ttttttttca
61621 aatgttgc ttttttttca
61681 aatgttgc ttttttttca
61741 aatgttgc ttttttttca
61801 aatgttgc ttttttttca
61861 aatgttgc ttttttttca
61921 aatgttgc ttttttttca
62081 aatgttgc ttttttttca
62141 aatgttgc ttttttttca
62201 aatgttgc ttttttttca
62261 aatgttgc ttttttttca
62321 aatgttgc ttttttttca
62381 aatgttgc ttttttttca
62441 aatgttgc ttttttttca
62501 aatgttgc ttttttttca
62561 aatgttgc ttttttttca
62621 aatgttgc ttttttttca
62681 aatgttgc ttttttttca
62741 aatgttgc ttttttttca
62801 aatgttgc ttttttttca
62861 aatgttgc ttttttttca
62921 aatgttgc ttttttttca
63081 aatgttgc ttttttttca
63141 aatgttgc ttttttttca
63201 aatgttgc ttttttttca
63261 aatgttgc ttttttttca
63321 aatgttgc ttttttttca
63381 aatgttgc ttttttttca
63441 aatgttgc ttttttttca
63501 aatgttgc ttttttttca
63561 aatgttgc ttttttttca
63621 aatgttgc ttttttttca
63681 aatgttgc ttttttttca
63741 aatgttgc ttttttttca
63801 aatgttgc ttttttttca
63861 aatgttgc ttttttttca
63921 aatgttgc ttttttttca
64081 aatgttgc ttttttttca
64141 aatgttgc ttttttttca
64201 aatgttgc ttttttttca
64261 aatgttgc ttttttttca
64321 aatgttgc ttttttttca
64381 aatgttgc ttttttttca
64441 aatgttgc ttttttttca
64501 aatgttgc ttttttttca
64561 aatgttgc ttttttttca
64621 aatgttgc ttttttttca
64681 aatgttgc ttttttttca
64741 aatgttgc ttttttttca
64801 aatgttgc ttttttttca
64861 aatgttgc ttttttttca
64921 aatgttgc ttttttttca
65081 aatgttgc ttttttttca
65141 aatgttgc ttttttttca
65201 aatgttgc ttttttttca
65261 aatgttgc ttttttttca
65321 aatgttgc ttttttttca
65381 aatgttgc ttttttttca
65441 aatgttgc ttttttttca
65501 aatgttgc ttttttttca
65561 aatgttgc ttttttttca
65621 aatgttgc ttttttttca
65681 aatgttgc ttttttttca
65741 aatgttgc ttttttttca
65801 aatgttgc ttttttttca
65861 aatgttgc ttttttttca
65921 aatgttgc ttttttttca
66081 aatgttgc ttttttttca
66141 aatgttgc ttttttttca
66201 aatgttgc ttttttttca
66261 aatgttgc ttttttttca
66321 aatgttgc ttttttttca
66381 aatgttgc ttttttttca
66441 aatgttgc ttttttttca
66501 aatgttgc ttttttttca
66561 aatgttgc ttttttttca
66621 aatgttgc ttttttttca
66681 aatgttgc ttttttttca
66741 aatgttgc ttttttttca
66801 aatgttgc ttttttttca
66861 aatgttgc ttttttttca
66921 aatgttgc ttttttttca
67081 aatgttgc ttttttttca
67141 aatgttgc ttttttttca
67201 aatgttgc ttttttttca
67261 aatgttgc ttttttttca
67321 aatgttgc ttttttttca
67381 aatgttgc ttttttttca
67441 aatgttgc ttttttttca
67501 aatgttgc ttttttttca
67561 aatgttgc ttttttttca
67621 aatgttgc ttttttttca
67681 aatgttgc ttttttttca
67741 aatgttgc ttttttttca
67801 aatgttgc ttttttttca
67861 aatgttgc ttttttttca
67921 aatgttgc ttttttttca
68081 aatgttgc ttttttttca
68141 aatgttgc ttttttttca
68201 aatgttgc ttttttttca
68261 aatgttgc ttttttttca
68321 aatgttgc ttttttttca
68381 aatgttgc ttttttttca
68441 aatgttgc ttttttttca
68501 aatgttgc ttttttttca
68561 aatgttgc ttttttttca
68621 aatgttgc ttttttttca
68681 aatgttgc ttttttttca
68741 aatgttgc ttttttttca
68801 aatgttgc ttttttttca
68861 aatgttgc ttttttttca
68921 aatgttgc ttttttttca
69081 aatgttgc ttttttttca
69141 aatgttgc ttttttttca
69201 aatgttgc ttttttttca
69261 aatgttgc ttttttttca
69321 aatgttgc ttttttttca
69381 aatgttgc ttttttttca
69441 aatgttgc ttttttttca
69501 aatgttgc ttttttttca
69561 aatgttgc ttttttttca
69621 aatgttgc ttttttttca
69681 aatgttgc ttttttttca
69741 aatgttgc ttttttttca
69801 aatgttgc ttttttttca
69861 aatgttgc ttttttttca
69921 aatgttgc ttttttttca
70081 aatgttgc ttttttttca
70141 aatgttgc ttttttttca
70201 aatgttgc ttttttttca
70261 aatgttgc ttttttttca
70321 aatgttgc ttttttttca
70381 aatgttgc ttttttttca
70441 aatgttgc ttttttttca
70501 aatgttgc ttttttttca
70561 aatgttgc ttttttttca
70621 aatgttgc ttttttttca
70681 aatgttgc ttttttttca
70741 aatgttgc ttttttttca
70801 aatgttgc ttttttttca
70861 aatgttgc ttttttttca
70921 aatgttgc ttttttttca
71081 aatgttgc ttttttttca
71141 aatgttgc ttttttttca
71201 aatgttgc ttttttttca
71261 aatgttgc ttttttttca
71321 aatgttgc ttttttttca
71381 aatgttgc ttttttttca
71441 aatgttgc ttttttttca
71501 aatgttgc ttttttttca
71561 aatgttgc ttttttttca
71621 aatgttgc ttttttttca
71681 aatgttgc ttttttttca
71741 aatgttgc ttttttttca
71801 aatgttgc ttttttttca
71861 aatgttgc ttttttttca
71921 aatgttgc ttttttttca
72081 aatgttgc ttttttttca
72141 aatgttgc ttttttttca
72201 aatgttgc ttttttttca
72261 aatgttgc ttttttttca
72321 aatgttgc ttttttttca
72381 aatgttgc ttttttttca
72441 aatgttgc ttttttttca
72501 aatgttgc ttttttttca
72561 aatgttgc ttttttttca
72621 aatgttgc ttttttttca
72681 aatgttgc ttttttttca
72741 aatgttgc ttttttttca
72801 aatgttgc ttttttttca
72861 aatgttgc ttttttttca
72921 aatgttgc ttttttttca
73081 aatgttgc ttttttttca
73141 aatgttgc ttttttttca
73201 aatgttgc ttttttttca
73261 aatgttgc ttttttttca
73321 aatgttgc ttttttttca
73381 aatgttgc ttttttttca
73441 aatgttgc ttttttttca
73501 aatgttgc ttttttttca
73561 aatgttgc ttttttttca
73621 aatgttgc ttttttttca
73681 aatgttgc ttttttttca
73741 aatgttgc ttttttttca
73801 aatgttgc ttttttttca
73861 aatgttgc ttttttttca
73921 aatgttgc ttttttttca
74081 aatgttgc ttttttttca
74141 aatgttgc ttttttttca
74201 aatgttgc ttttttttca
74261 aatgttgc ttttttttca
74321 aatgttgc ttttttttca
74381 aatgttgc ttttttttca
74441 aatgttgc ttttttttca
74501 aatgttgc ttttttttca
74561 aatgttgc ttttttttca
74621 aatgttgc ttttttttca
74681 aatgttgc ttttttttca
74741 aatgttgc ttttttttca
74801 aatgttgc ttttttttca
74861 aatgttgc ttttttttca
74921 aatgttgc ttttttttca
75081 aatgttgc ttttttttca
75141 aatgttgc ttttttttca
75201 aatgttgc ttttttttca
75261 aatgttgc ttttttttca
75321 aatgttgc ttttttttca
75381 aatgttgc ttttttttca
75441 aatgttgc ttttttttca
75501 aatgttgc ttttttttca
75561 aatgttgc ttttttttca
75621 aatgttgc ttttttttca
75681 aatgttgc ttttttttca
75741 aatgttgc ttttttttca
75801 aatgttgc ttttttttca
75861 aatgttgc ttttttttca
75921 aatgttgc ttttttttca
76081 aatgttgc ttttttttca
76141 aatgttgc ttttttttca
76201 aatgttgc ttttttttca
76261 aatgttgc ttttttttca
76321 aatgttgc ttttttttca
76381 aatgttgc ttttttttca
76441 aatgttgc ttttttttca
7

```
41521 ttaccaagat gacctcgga accaaagagg tgatcagcat aagttttaaa gacccttaaa  
41581 tttaaagtaa aaatcaactac aggatccatt ataaatgcga aacactaaga tgtgttccc  
41641 cagtctccg ctccattgt ccctggccat ccctggccctg actttggcccc accccccatgt  
41701 aatgtgggtt ccacttatgt ctcccaactt tccccggaaa gaatcccttc ctgttgttga  
41761 ggacaaggcg cagcccttccc ctccccaccaa agaaggcttag attecccttt ttgggttecta  
41821 accatccata ccccttcttcc ttcatggaa agtccatgttcc aagccatcattt agggtctgcca  
41881 tcctggatgt ccaccctttag actctggggcc caacacttgtt atgt
```

다음은 TGFBI 유전자 단백질 산물 (β IG-H3 단백질 서열; NCBI 참조 번호 NG_012646.1) (서열 번호 63)을 보여준다.

MALFVRLALALALALGPAATLAGPAKSPYQLVLQHSLRGRHQHPNVCAVQKIGTNRKYFTNCQW
YQRKICGKSTVISECCPGYEKVPGEKCPAALPLSNSLYETLGVVGSTTQLYTDRTKEKLREPEMECPG
SFTIFAPSNEAWASLPAEVLDLSVSNVNIELLNALRYHMVGRRLTDELKHGMTLTSMYQNSNIQIHH
YPNGIVTVNCARLLKADHATNGVVLIDKVISTITNNIQIIIEIDTFETLRAAVASGLNTMLEGN
GQYTLTAAFTNEAFKIPSETLNRILGDEALRDLNNHILKSAMCAEAIAGLVSVEFTLEGTTLEVGCS
GDMLTINGKAIISNKDILATNGVHYIHEDELLIPODSAKTLFELAAESUVSTAIDLFRQAGLNGNHLSGSE
RLLTLAPLNSVFKDGTTPIDAHTRNLNRRNHIICKDQLASKYLYHGTLETLGKKLRLVFWYRNLSCLIE
SCIAAHDKRGRYGTLFTMDRVLTPPMGTVMDVLKGDNRFMSMLVAIIQSAGLTETLNREGVYTVFAPTN
EAFRALPPrERSRLLGDAKELANILKYHIGDEILVSGGIGALVRLKSLQGDKLEVSLKNNVVSVNKEP
WEYEDIMATNGVHVITNVLQPPANRQERGDELADSALEIFKQASAFSRASQRSVRLAPVYQKLLER
MCH

모든 제품과 섹션 명칭은 명확성 및 차주 목적 으로만 사용되며 어떤 실 으로든 제한하는 것으로 각주되거나

않는다. 예를 들면, 당업계의 숙련가들은 본원에 기술된 본 발명의 취지 및 범위에 따라 적절하게 상이한 제목들로부터 다양한 측면들을 조합하는 것이 유용하다는 것을 인지할 것이다.

[0135] 본원에 인용된 모든 참고 문헌은 각각의 개별 공보 또는 특허 또는 특허 출원이 모든 목적을 위해 전문이 참고로 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 지시된 것과 동일한 정도로 전체적으로 그리고 모든 목적을 위해 본원에 참고로 포함된다.

[0136] 당업계의 숙련가들에게 자명한 바와 같이, 본 출원의 취지 및 범위를 벗어나지 않으면서 본 출원의 많은 수정 및 변형이 이루어질 수 있다. 본원에 기술된 특정 실시양태 및 실시예는 단지 예로서 제공되며, 본 출원은 청구 범위가 자격을 부여하는 등가물의 전체 범위와 함께 첨부된 청구 범위의 용어에 의해서만 제한되어야 한다.

도면

도면 1a



도면 1b

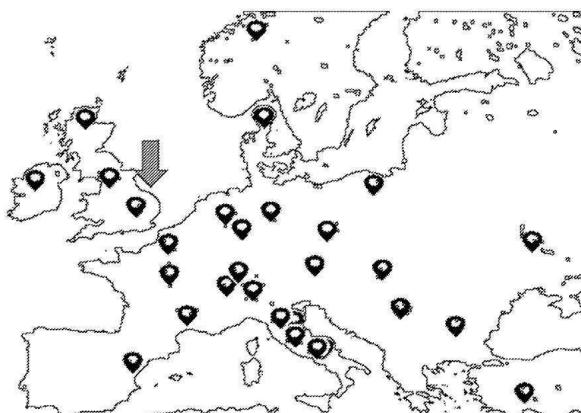
← 잉글랜드: G6234D; R124S; H40..

의료

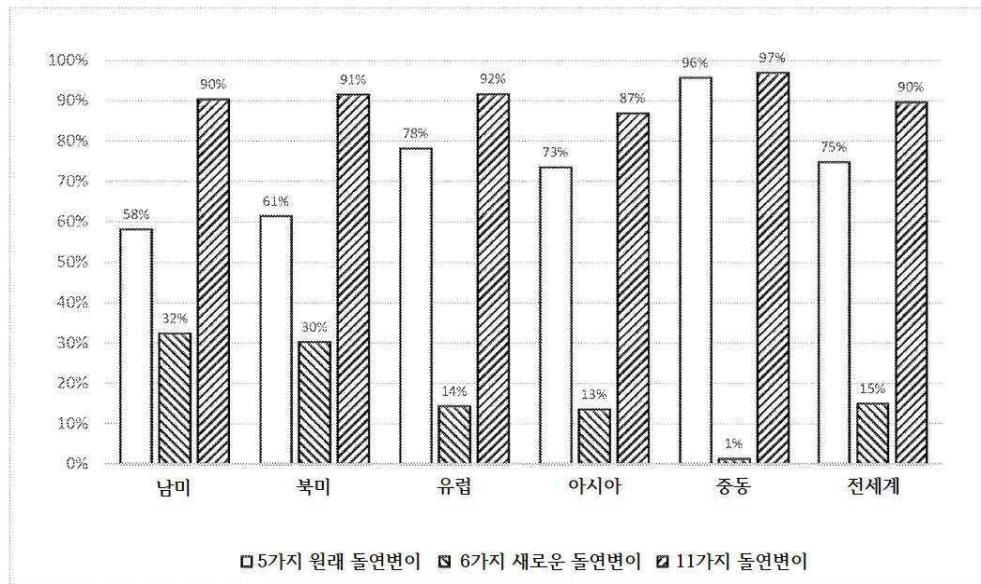
잉글랜드: G623D; R124S; H403Q; R124C; R124H;
GCD;

설명

인종: 잉글랜드인; 이란인(H403Q); 방글라데시인
(R124C)
G623D: 5
R124S: 6
H403Q: 1 (원주각막)
R124C: 3
R124H: 6
GCD: 1



도면2



도면3

돌연변이	보고된 사례 수
현재 유전자 검사 패널에서 가장 흔한 5가지 돌연변이	
R124C 격자 각막 이상증 타입 1	372
R555W 과립 각막 이상증 타입 1	338
R124H 과립 각막 이상증 타입 2	325
R124L 레이스-버클러 각막 이상증	110
R555Q 티엘-벵케 각막 이상증	75
확장된 검사 패널에서 6개의 추가 돌연변이	
H626R 격자 각막 이상증 서브타입 I/IIA	117
A546D 변종 격자 각막 이상증	48
H572R 격자 각막 이상증 서브타입 1	34
G623D 변종 레이스-버클러 각막 이상증	26
R124S 서브타입 과립 각막 이상증 타입 1	18
M502V 변종 각막 이상증 및 변종 티엘-벵케 각막 이상증	4

도면4

68개의 TGFBI CD를 가진 91명의 UK 인종적으로 다양한 코호트의 UCL/Moorfields % 검출						
일상 진단	사례#	사례%	TGFBI 돌연변이	돌연변이#	돌연변이%	의견
격자 각막 이상증	24	35%	R124C	19	28%	
			V625D	1	1%	아시아인
			H626R*	2	3%	
			A620D	1	1%	아시아인
			G623D*	1	1%	
과립 각막 이상증1	21	31%	R555W	13	19%	
과립 각막 이상증2			R124H	8	12%	
TB/RB CD	23	34%	R555Q	20	29%	
			R124L	1	1%	
			G623D*	2	3%	
총 TGFBI CD	68		보편적인 검사	61	90%	
			추가의 6가지 SNP*	5	7%	
			총 11가지 SNP	66	97%	

도면5a

코돈 번호	위치	dbSNP(총 19)	LT 분석 ID	표적 서열
R124S	135382095	rs121909210	ANMFXKJ	ACGAGACCTGGAGTCGTTGGATCCACCAACTCAGCTGTACAC GGAC(C/A)GCACGGAGAAGCTGAGGCCCTGAGATGGAGGGGCC GGCAGCTTACCATC 서열 번호 1
A546D	135392443	rs267607109	ANNKR6G	GACCTCAAC CGGG AAG GAGTCTACACAGTC TTT GCT CCC ACAAATGAAG(C/A)CTTCCGAGGCCCTGCCACCAAGAGAACGGAG CAG ACT CTT GGTTAAAGACC 서열 번호 2
H572R	135394815	no	ANPRKR6E	CTTGCCAACATCCTGAAATACC CCAAGGAACCTTGCAACATCCTGAAATACC(A/G)CATTGGTGTGATG AAATCCTGGTTAGCGGAGGCAT CGG GGC CCTGGTGCCTGCTA 서열 번호 3
G623D	135396587	rs121909215	ANRWFC	GAGTGTCAACAAGGAGCCTGTTGCCAGGCCTGACATCATGGCCA CAAATG(G/A)CGTGGTCCATGTATCACCAATGTTCTGCA GCC TCC AGG TAAGTGTGCGA 서열 번호 4 (AAGGAGCCTGTTCCGAGC)
H626R	135396596	no	ANTZ9V9	CTGACATCATGGCCACAAATGGCGTGGTCC(A/G)TGTATCACCA ATGTTCTGCAGCCTTC AGG TAA GTG TCGCATCCCCACTGA 서열 번호 5
M502V	135391462	rs188677757	ANRWFF6	CACGACAAGAGGGGGAGGTACGGGACCCCTGTTACGATGGACC GGGTGCTGACCCCCCA(A/G)TGGGACTGTATGGATGTCCTGA AGGGAGACA ATC GCT T TAGGTAATTA GTTCCATCCC 서열 번호 6

도면5ba

비전 1 (V1)

코돈 번호	프라이머 Fwd	프라이머 Rev	VIC 프로브(Norm)	FAM 프로브(Mut)	ABY 프로브(Norm) - NN 보체	JUN 프로브(Mut) HH 보체
R124S	CCACCAACTCAGCTGTA C 서열 번호 7 (Ver.1 V1 VIC/FAM 프로브로 작동함)	TCCATCTCAGGCCCTCAGC T 서열 번호 13 (Ver.1 V1 VIC/FAM 프로브로 작동함)	CTCCGTGCGGTCCTG 서열 번호 19 (Ver.1 V1 프라이머로 작동함)	TCTCCGTGCTGTCCTG 서열 번호 25 (Ver.1 V1 프라이머로 작동함)		
A546D	TCT ACA CAG TCT TTG CTC CCA CA 서열 번호 8 (Ver.1 V1 VIC/FAM 프로브로 작동함)	CTC CGT TCT CTT GGT GGC A 서열 번호 14 (Ver.1 V1 VIC/FAM 프로브로 작동함)	CTC GGA AGG CTT CAT T 서열 번호 20 (Ver.1 V1 프라이머로 작동함)	CTC GGA AGT CTT CAT T 서열 번호 26 (Ver.1 V1 프라이머로 작동함)	CTT GGT GGC AGG GCT CGG AAG GCT TCA TTT GT 서열 번호 31 (Ver.1 작동하지 않음)	CTT GGT GGC AGG GCT CGG AAG TCT TCA TTT GT 서열 번호 34 (Ver.1 어떠한 프라이머로도 작동하지 않음)
H572R	CCA AGG AAC TTG CCA ACAT T 서열 번호 9 (Ver.1 V1 VIC/FAM 프로브로 작동함)	CCT CCG CTA ACC AGG ATT TCA TC 서열 번호 15 (Ver.1 V1 VIC/FAM 프로브로 작동함)	CCT GAA ATA CCA CAT TGG 서열 번호 21 (Ver.1 V1 프라이머로 작동함)	CCT GAA ATA CCG CAT TGG 서열 번호 27 (Ver.1 V1 프라이머로 작동함)	C TTG CCA ACA TCC TGA AAT ACC ACA TTG GTG AT 서열 번호 32 (Ver.1 어떠한 프라이 미로도 작동하지 않음)	C TTG CCA ACA TCC TGA AAT ACC GCA TTG GTG AT 서열 번호 35 (Ver.1 어떠한 프라이 미로도 작동하지 않음)
G623D	TTG CCG AGC CTG ACA TCA 서열 번호 10 (Ver.1 V1 VIC/FAM 프로브 및 ABY/JUN 프로브로 작동함)	TGC AGA ACA TTG GTG ATG ACA TG 서열 번호 16 (Ver.1 V1 VIC/FAM 프로브 및 ABY/JUN 프로브로 작동함)	CACAAATGGCGTGGT C 서열 번호 22 (Ver.1 V1 프라이머로 작동함)	CCACAAATGACGTGGT C 서열 번호 28 (Ver.1 V1 프라이머로 작동함)	CA TCA TGG CCA CAA ATG GCG TGG TCC ATG TC 서열 번호 33 (Ver.1 V1 프라이머로 작동함)	CA TCA TGG CCA CAA ATG ACG TGG TCC ATG TC 서열 번호 36 (Ver.1 V1 프라이머로 작동함)

도면5bb

코드 번호	프라이머 Fwd	프라이머 Rev	VIC 프로브(Norm)	FAM 프로브(Mut)	ABY 프로브(Norm) - NN 보체	JUN 프로브 (Mut) HH 보체
H626R	CTGACATCATGGCCACAAATGG 서열 번호 11 (Ver.1 V1 VIC/FAM 프로브만으로 작동함)	GGAGGCTGCAGAACATTGGT 서열 번호 17 (Ver.1 V1 VIC/FAM 프로브만으로 작동함)	CGTGGTCCATGTCA 서열 번호 23 (Ver.1 V1 프라이머만으로 작동함)	TGGTCCTGTCATC 서열 번호 29 (Ver.1 V1 프라이머만으로 작동함)		
M502V	GGACCGG GTG CTG ACC 서열 번호 12 (Ver.1 V1 VIC/FAM 프로브만으로 작동함)	CTCCCTTCAGGACATCCA 서열 번호 18 (Ver.1 V1 VIC/FAM 프로브만으로 작동함)	TGACAGTCCCCATTGGG 서열 번호 24 (Ver.1 V1 프라이머 만으로 작동함) - G623D를 갖는 다중화 실험에서 사용됨	TGACAGTCCCCACTGGG 서열 번호 30 (Ver.1 V1 프라이머 만으로 작동함) - G623D를 갖는 다중화 실험에서 사용됨		

도면5ca

버전 2 (V2)

코드 번호	프라이머 Fwd	프라이머 Rev	VIC 프로브(Norm)	FAM 프로브 (Mut)	ABY 프로브(Norm) - NN 보체	JUN 프로브(Mut) HH 보체
R124S	GACCTCTGGAGTCGTTGGAT C 서열 번호 37 (Ver.2 V2 VIC/FAM 프로브로 작동하지 않음)	CCCGGCAGCTTACACATC 서열 번호 43 (Ver.2 V2 VIC/FAM 프로브로 작동하지 않음)	CGACTTCTCCGTGCGGT CCGT GTACAG 서열 번호 49 (Ver.2 작동하지 않음)	CGACTTCGACTT TCTCCGTGCTGTC CGT GTACAG GTACAG 서열 번호 53 (Ver.2 작동하지 않음)		
A546D	CGGGAAGGAGTCTACACAG TCTT 서열 번호 38 (Ver.2 V1 또는 V2 ABY/JUN 프로브로 작동 하지 않음)	AAGAGTCTGCTCCGTTCT T 서열 번호 44 (Ver.2 V1 또는 V2 ABY/JUN 프로브로 작동 하지 않음)			AGGGCTCGGAAGGCTTC ATT 서열 번호 56 (Ver.2 V1 프라이머 로 작동하지 않음)	AGGGCTCGGAAGGCTTC ATT 서열 번호 59 (Ver.2 V1 프라이머 로 작동하지 않음)
H572R	TGAAATACCCAAGGAACT TG 서열 번호 39 (Ver.2 V1 프로브로 작동하지 않음)	GCCCCGATGCCCTCGCTAAC CAGG 서열 번호 45 (Ver.2 V1 프로브로 작동하지 않음)			ACATCTGAAATACCGACA TTGG 서열 번호 57 (Ver.2 V2 프라이머로 작동함)	ACATCTGAAATACCGACA TTGG 서열 번호 60 (Ver.2 V2 프라이머로 작동함)
G623D	AGGAGCCTGTTGCCGAGC 서열 번호 40 (Ver.2 V1 또는 V2 프로브로 작동하지 않음)	CCTGGAGGCTGCAGAACAT TGGTG 서열 번호 46 (Ver.2 V1 또는 V2 프로브로 작동하지 않음)			CACAAATGCGTGGTC 서열 번호 58 (Ver. 2 V1 또는 V2 프라이머로 작동하지 않음)	CACAAATGACGTGGTC 서열 번호 61 (Ver. 2 V1 또는 V2 프라이머로 작동하지 않음)

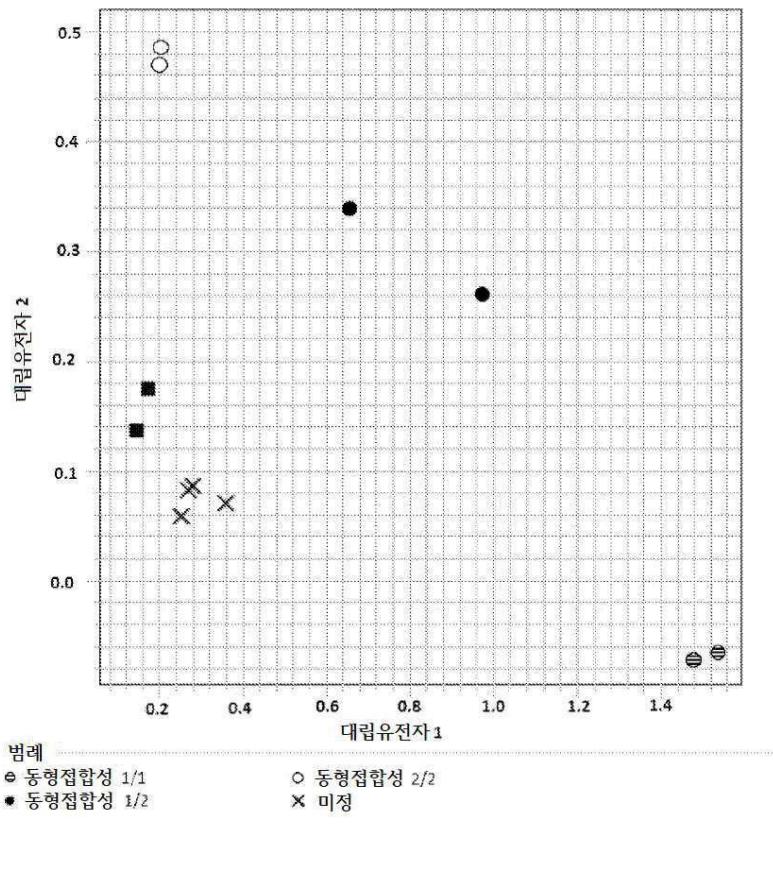
도면5cb

코드 번호	프라이머 Fwd	프라이머 Rev	VIC 프로브(Norm)	FAM 프로브(Mut)	ABY 프로브 (Norm) - NN 보체	JUN 프로브 (Mut) HH 보체
H626R	TTGCCGAGCCTGACATCATGGC 서열 번호 41 (Ver.2 V2 프로브로 작동함)	CACTTACCTGGAGGCGCAGA 서열 번호 47 (Ver.2 V2 프로브로 작동함)	TGGCGTGGTCCATGTC 서열 번호 50 (Ver.2 V2 프라이머로 작동함)	TGGCGTGGTCCGTGTC 서열 번호 54 (Ver.2 V2 프라이머로 작동함)		
M502V	GTTCACGATGGACCGG 서열 번호 42 (Ver.2 V2 프로브로 작동하지 않음)	AGCGATTGTCCTCCITCA 서열 번호 48 (Ver.2 V2 프로브로 작동하지 않음)	TCCCCATTGGGGGGGT 서열 번호 52 (Ver.2 V2 프라이머로 작동하지 않음)	TCCCCACTGGGGGGGT 서열 번호 55 (Ver.2 V2 프라이머로 작동하지 않음)		

도면6a

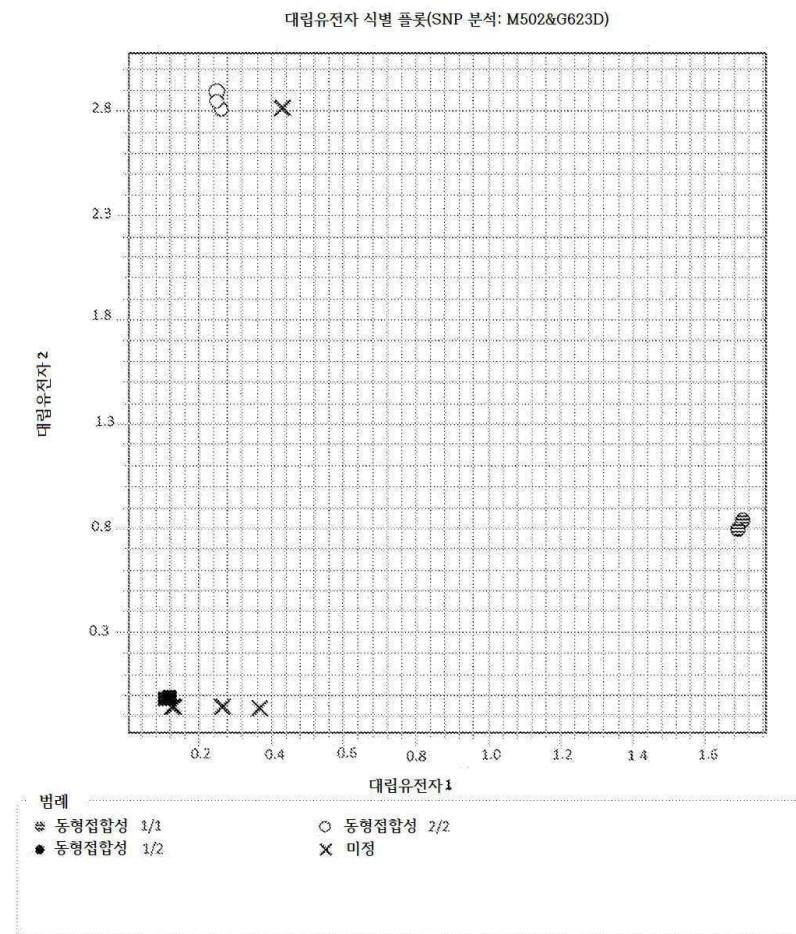
실시예 4로부터의 다중화 실험으로부터의 G623D 식별 플롯.

대립유전자 식별 플롯(SNP 분석: G623D)



도면6b

실시예 4로부터의 다중화 실험으로부터의 M502V 식별 플롯



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Avellino Lab USA, Inc.

<120> METHODS FOR MULTIPLEX DETECTION OF ALLELES ASSOCIATED WITH CORNEAL DYSTROPHY

<130> IPA191352-US

<150> US 62/483,588

<151> 2017-04-10

<150> US 62/573,537

<151> 2017-10-17

<150> US 62/624,660

<151> 2018-01-31

<150> US 62/624,661

<151> 2018-01-31

<160> 62

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R124S Target sequence

<220><221> misc_feature

<222>

> (50)..(50)

<223> n is c or a

<400> 1

acgagaccct ggagtgcgttg gatccaccac cactcagctg tacacggacn gcacggagaa	60
gctgaggcct gagatggagg ggcccgccag cttcaccatc	100

<210> 2

<211> 101

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> A546D Target sequence

<220><221> misc_feature

<222> (51)..(51)

<223> n is c or a

<400> 2

gaccctcaac cggyaaggag tctacacagt ctttgcctcc acaaatgaag ncttcgagc	60
cctgccacca agagaacgga gcagacttt gggtaaagac c	101

<210> 3

<211> 105

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H572R Target sequence

<220><221> misc_feature

<222> (53)..(53)

<223> n is a or g

<400> 3

cttgccaaca tcctgaata ccccaaggaa cttgccaaca tcctgaata ccncattggt	60
gatgaaatcc tggtagcgg aggcacatcggg gccctggtgc ggcta	105
<210> 4	
<211> 101	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> G623D Target sequence	
<220><221> misc_feature	
<222> (51)..(51)	
<223> n is g or a	
<400> 4	

gagtgtaaac aaggagcctg ttgccgagcc tgacatcatg gccacaaatg ncgtggtcca	60
tgtcatcacc aatgttctgc agcctccagg taagtgtcgc a	101
<210> 5	
<211> 101	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> H626R Target sequence	
<220><221> misc_feature	
<222> (50)..(50)	
<223> n is a or g	
<400> 5	

aaggagcctg ttgccgagcc tgacatcatg gccacaaatg gcgtggtccn tgtcatcacc	60
aatgttctgc agcctccagg taagtgtcgc atccccactg a	101
<210> 6	
<211> 121	

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> M502V Target sequence	
<220><221> misc_feature	
<222> (61)..(61)	
<223> n is a or g	
<400> 6	

cacgacaaga gggggaggta cgggaccctg ttcacgatgg accgggtgct gacccccc	60
ntggggactg tcatggatgt cctgaaggga gacaatcgct ttaggttaatt agttccatcc	120
c	121
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> R124S Primer Fwd	
<400> 7	
ccaccaccac tcagctgtac	20
<210> 8	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> A546D Primer Fwd	
<400> 8	
tctacacagt ctggctccc aca	23
<210> 9	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> H572R Primer Fwd	
<400> 9	
ccaaggaact tgccaacat	19
<210> 10	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> G623D Primer Fwd	
<400> 10	
ttgccgagcc tgacatca	18
<210> 11	
<211> 22	

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> H626R Primer Fwd	
<400> 11	
ctgacatcat ggccacaaat gg	22
<210> 12	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> M502V Primer Fwd	
<400> 12	
ggaccgggtg ctgacc	16
<210> 13	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> R124S Primer Rev	
<400> 13	
tccatctcag gcctcagct	19
<210> 14	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> A546D Primer Rev	
<400> 14	
ctccgttctc ttggtgcca	19
<210> 15	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> H572R Primer Rev	
<400> 15	
cctccgctaa ccaggatttc atc	23
<210> 16	

<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	G623D Primer Rev	
<400>	16	
tgcagaacat tggtgatgac atg		23
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	H626R Primer Rev	
<400>	17	
ggaggctgca gaacatttgt		20
<210>	18	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	M502V Primer Rev	
<400>	18	
ctcccttcag gacatcca		18
<210>	19	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	R124S VIC Probe (Norm)	
<400>	19	
ctccgtgcgg tccgt		15
<210>	20	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	A546D VIC Probe (Norm)	
<400>	20	

ctcggaaaggc ttcatt	16
<210> 21	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> H572R VIC Probe (Norm)	
<400> 21	
cctgaaatac cacatgg	18
<210> 22	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> G623D VIC Probe (Norm)	
<400> 22	
cacaaatggc gtggtc	16
<210> 23	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> H626R VIC Probe (Norm)	
<400> 23	
cgtggtccat gtcatc	16
<210> 24	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> M502V VIC Probe (Norm)	
<400> 24	
tgacagtccc cattggg	17
<210> 25	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> R124S FAM Probe (Mut)	

<400> 25	
tctccgtgct gtccgt	16
<210> 26	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> A546D FAM Probe (Mut)	
<400> 26	
cctcggaaatc ttcatt	16
<210> 27	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> H572R FAM Probe (Mut)	
<400> 27	
cctgaaatac cgcattgg	18
<210> 28	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> G623D FAM Probe (Mut)	
<400> 28	
ccacaaatga cgtggtc	17
<210> 29	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> H626R FAM Probe (Mut)	
<400> 29	
tggtccgtgt catc	14
<210> 30	
<211> 17	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence
<220><223> M502V FAM Probe (Mut)
<400> 30
tgacagttccc cactggg 17

<210> 31
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> A546D ABY Probe (Norm) - NN complement
<400> 31

cgttgtggca gggctcgaa ggcttcattt gt 32
<210> 32
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> H572R ABY Probe (Norm) - NN complement
<400> 32
cttgcacaaca tcctgaaata ccacattggat 33
<210> 33
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> G623D ABY Probe (Norm) - NN complement
<400> 33
catcatggcc acaaattggcg tggccatgt c 31
<210> 34
<211> 32

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> A546D JUN Probe (Mut) HH compliment
<400> 34
cttggcgtggca gggctcgaa gtcttcattt gt 32
<210> 35

<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> H572R JUN Probe (Mut) HH compliment
<400> 35
cttgc当地 aacaata cccatttgt gat 33
<210> 36
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> G623D JUN Probe (Mut) HH compliment
<400> 36

catcatggcc acaaatacgt tggccatgt c 31
<210> 37
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> R124S Primer Fwd
<400> 37
gaccctggag tcgttggatc 20
<210> 38
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> A546D Primer Fwd
<400> 38
cggaaggag tctacacagt cttt 24
<210> 39
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> H572R Primer Fwd
<400> 39

tgaaataccc caaggaactt g	21
<210> 40	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> G623D Primer Fwd	
<400> 40	
aggagcctgt tgccgagc	18
<210> 41	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> H626R Primer Fwd	
<400> 41	
ttgccgagcc tgacatcatg gc	22
<210> 42	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> M502V Primer Fwd	
<400> 42	
gttcacgatg gaccgg	16
<210> 43	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> R124S Primer Rev	
<400> 43	
cccgccagct tcaccatc	18
<210> 44	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> A546D Primer Rev	

<400> 44	
aagagtctgc tccgttctct t	21
<210> 45	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> H572R Primer Rev	
<400> 45	
cccccgatgc ctccgctaac cagg	24
<210> 46	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> G623D Primer Rev	
<400> 46	
cctggaggct gcagaacatt ggtg	24
<210> 47	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> H626R Primer Rev	
<400> 47	
cacttacctg gaggcgcaga	20
<210> 48	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> M502V Primer Rev	
<400> 48	
agcgattgtc tcccttca	18
<210> 49	
<211> 27	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> R124S VIC Probe (Norm)	
<400> 49	
cgacttctcc gtgcgtccg tgtacag	27
<210> 50	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> H626R VIC Probe (Norm)	
<400> 50	
tggcgtggtc catgtc	16
<210> 51	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> M502V VIC Probe (Norm)	
<400> 51	
tccccatgg ggggggt	17
<210> 52	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> R124S FAM Probe (Mut)	
<400> 52	
cgacttcgac ttctccgtc ctgtccgtt acaggtaac	40
<210> 53	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> H626R FAM Probe (Mut)	
<400> 53	
tggcgtggtc cgtgtc	16
<210> 54	

<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	M502V FAM Probe (Mut)	
<400>	54	
tccccactgg ggggggt		17
<210>	55	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	A546D ABY Probe (Norm) - NN complement	
<400>	55	
agggctcgga aggttcatt		20
<210>	56	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	H572R ABY Probe (Norm) - NN complement	
<400>	56	
acatcctgaa ataccacatt gg		22
<210>	57	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	G623D ABY Probe (Norm) - NN complement	
<400>	57	
cacaaatggc gtggtc		16
<210>	58	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	A546D JUN Probe (Mut) HH compliment	
<400>	58	
agggctcgga agtcttcatt		20

<210> 59

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H572R JUN Probe (Mut) HH compliment

<400> 59

acatcctgaa ataccgcatt gg 22

<210> 60

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G623D JUN Probe (Mut) HH compliment

<400> 60

cacaaatgac gtggtc 16

<210> 61

<211> 41924

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 61

agagggaaca gaagcatcta ggagagattt ggaaagaaca cctgcaggat cttggtgact 60

gattgcacgt gggggaccag agagcaggga caggcaaaac tgaatgcaag gtttccaacc 120

ttgagcggca ccacaggcaa gaatgaagaa atgaagaagg ggagctggac gaaagagcca 180

agggatttct gcattttgga atgaattgct gctgggttgt gtccatttcc ctgaaggcct 240

ttatcctacg tgcaagaaaa ctcgtggaa gcagaggaaa ggcatgtgt a gccaacaat 300

catctgtggg catccttcca ctaaagtatt tgaggtcagg caactaaagc aacctaaca 360

gtgcctctgg attttctta gatatttttag ctgagccaaa tcaatgaaac tctcatgaaa 420

aatcggttcc cctggaaaat gaaattgggt tctaaccac aagtagcatt tggcaggccc 480

tgattaagaa agccagtgtt tggagaagtt gtgaaaacag ccaagtcatt taagaaacta 540

aacactgggg cctaatgcca ttctagggtt gcgcacggctg ttctgttccc atcaattgca 600

gagccccgaag cctcaagttt gtttaagtt cctgccatta caaacctgtc gattatccca 660

gcctcccttg cgggcttga aaagagagaa gaatggaagg tgactgtggc caattcccc 720

tccctgtcca gtgtgtggaa gacactgaat atgcaactac tgaccttgtc cctggcattc 780

ttgaaggctc tccacaaagt gagctggcc tcagcgaag atgagagttc ctctgtggtc	840
acttcactgg tacacatTTT caggtgtatt tcgttctc catgcctaca taaattgaat	900
cctctgttaa ccacctctga gctcatagct atttaacatg accctgttagt cctgtgcata	960
caaatcacct tggatctgg tgaaaatgca gattcagtgg gtcttggag gttggaggt	1020
tataagattc cacgttctt catgagagct agaaaaataa aataaataaa taaaaattt	1080
ttaaatttc cacattcta atgaactctg gggttgtgct gatgatgctg tttgcagat	1140
cacatttga gtggcaagac tgtggaaaat ccttgagaaa tcaatccaaa atcccctaaa	1200
tggtaCTACA atcacacctt aatgttagta aactgagatg ttcttacct ttattttaa	1260
catgaaaaaa acaattactg tatatgaagt accattctaa gttctgtgt ttacacaagg	1320
gatggcaatt ttccccaaaa ttgattcac atctttcat ttggatatct cttgccaaaa	1380
ctcacctttt ttctcccta gcaagtctg gggagctgaa tttaagagc tctttatTTA	1440
gctatatggt ggcctctgaa aatgatttg actgtatctt ctgtctccat gtatgccaa	1500
gcatcaccag gaactttagg gagtaaggaa aaggcaggcc tgggtcagc tgggtcag	1560
atgcCAGTC tcCcAccAAC aggCCAGAA ccagttctt tcctagttc ctttgtaa	1620
aactgttgg aactactaat ttatcatgtat gcataaagct tgggtcata ccctacagta	1680
ttatTTCAA aacctgaatg ttttggta cctttcatgt gccacaaaaat gtaaaagcag	1740
tcattttta aaaagtgcTT gaaaaagtct agtaaagatt ctTCCAAGCA agcctcaTT	1800
tctccgttt agattgtta atctggagg aaaaaattct ttctcaaATG acagggttC	1860
tgggtcTCTG ttTTGcCTG gttggcTCTG ggtcaTCTGG ggatggaggg tccctgtct	1920
tacTCCAGC agcatcaTC ttgtctccaa agaAGCAGCA acctcaggTG ggagaatggT	1980
tataCTACa gcattCTGT tttcatgttt gaaAGAGGGG atgggtggTG gggcatggat	2040
gtgggatttt aaaaaatAT ctaaaccata aataaagtat tactgcaatc tctttactga	2100
gctcatggaa aaactcaagt catgaatgt tagtttgcA gactggagaa gtgaggtcca	2160
gtgaacttgc ttgacttgcc ctaaatcttgc ctagagagag agctggaaacc agatggcagg	2220
gctcctggcc tcttacatac aaggaggcatt ttccctagaa actgcaatgc agccaaattc	2280
tactggTCTC agggaaACT tggTCTGGGA gtcagcTGA gcttgaatcc ctTGGGTTc	2340
ttccCATTAT CCTATGCCA GCAgTCATGC tgaaACCAGA aaatgttttG ctttcaataa	2400
atgaaatgag catTTTcaga taatttattc tggtagttgtc caaaactatc atattgttC	2460
attgaaccct actatataga acaatgactg gggagaggta ataataataa tagcaatgca	2520

tatttattgg ccattttact tgaattgtat catgtaatct agtttagagt cctgtgaggt	2580
aggttttatt atccctctcta tgaggttgaa taacttgccc aagaccacac agcttaggaag	2640
tagaaagact ggtatttgaa cccatcttct cctttcttc tccttcctcc tcctcctctc	2700
ttccaacacc tgctcccaag gaagctcatc cagtgcata ctttagctac cacctgctcg	2760
tagtggtgac tcaaacttgc atctccaatc ctcatcata tcctgagctc aagaccttg	2820
aatatagctc ctcctgtcc atccctcctg gaaatgcagg tggcttgttc acacataatg	2880
tgaacacaaa tggaggactc tcctcacaca cccaaatgtg cacccatc accgtgcaca	2940
gcacaggcat cccttcctgc cagctatgag cctcgaggtt agctctactc cccctcccta	3000
accctgcattt cccaagggt ttccaagtct aatcaatgct accactaaaa tctccatcac	3060
acctgttccc tcctctccac tagcttgatc actccccatg cagggccctca gttgctttat	3120
gctctcagta ggcctcctc cagtgccac actctctccc ttctccttcc caccttctt	3180
ctaccagagt tctaacctct ccaagccccg ctgtcttt tcttccttg gctccatcc	3240
taactcgccc ctcccttct cagacaaget tctacatgct actcatctct ccatcaaacc	3300
accatattcg ggctttggcc atctgctctc cacagccaag tcccccagtgg cctctctgct	3360
tctgacacag tgaagccat tcagatctgt ctgttggca gcattcctca ctttgagcag	3420
cgcctccta ctaggatacc ctccttgac tacaacccca cattctctac ttccctggct	3480
cttcgtcac tggaggatga ctcccaggtg tgaatcttca tcccgctcc ctcactcaag	3540
cccccgatcc tcatatccag ctttatcttc atggatgct tcaccaggat gagtcataag	3600
cacccatcagac tcaggggtgc ccaaaccact catctacctg gcaagcctgc actctgcata	3660
tgcctcatc tgaacatggc accatcacct gctgcaatgt ccagaccaca aacaccctac	3720
aatatccttgc actctctttt ctcccttct ccctgtatac agactccaaa ttctattgag	3780
actattacctt ctcacacccca tcacatttgc ccagccctcc ccatctctgc ctctaccacc	3840
atagttcaag ctctccatg gtcccttctt ggttacctgt tcttcttgcc tccttaagcc	3900
tctcatgaca ctggccatgt cacttgcctc caccatcac ccgttaggtt cttagtggaa	3960
gtctggggcc tgcctacccctt ctccttcttcc tccctaccct tgactccacc tccctgtgt	4020
tcagccaaacc agataacttg agtttgcgtga atgcgtgcct cagttacact gattaactca	4080
ttttcatctt tcaggcctca gaggcaggat caccctgtca gggccagggtg cctcttctta	4140
gctcccaaag ccccgatctac tcttcatgga acatcattgg ctgggtac ggtatctccc	4200
aaattggagc ttttcacaa aggcttagg tctcactcat tctattaatc catctgtgtc	4260

tccccaggc tagcagtgcc aagtaactga caggtgatta atagatgctt gggtaagtat	4320
cacctttta ccatgtgaca atttgttac ctgcctttag ctcctccagg gcaggactct	4380
tgccttgca gaatctatct ggcaggtact gttcgagaga tgttactga agaaggaaat	4440
gaatttagtac caaggtgagg acccccaccc tccccacggg ctccaaaagc agcttagagc	4500
ccaacaaaac ctgccccaca ttttggcgt ttctgtggat cacacgattt actcatctgt	4560
ctttcaatga gcatgacagg tgggtgggg gtggagggat tagagattga ggagctgggg	4620
agggtggtca gctcctgggg tgcagaaaca agtctgatgg gccatggtgt tctggaaatc	4680
agcactgcct cccctcaccc ctccctgcag tgttttag cctcaagatc agtgaggaa	4740
tcttcggcc cccagcatgc aggaccgaag ccccccagac agtgcctt cagtc当地	4800
gtccccatcc ggaagcagcc acaggaggcc taagggaccc atacccttgg tttgaggaag	4860
actgtggcga gggagagagg gagggaggcc tggcagttag ggcaagggt gggaaaaactg	4920
agcacgggca cagtgcggga gcgggtgggt gcccaggca gccagggcg cacgggttgg	4980
gaggcgccag gcggcccgcc ctccctgcac gggccggccc agttccccg cccctggcgt	5040
ccgctccctc ccgctcgag cttaactaac ctggccggg cggcggaggc gctctactt	5100
ccctggagcc gcccgttgc ccgtcggtcg ctagctcgct cggtgcgcgt cgtcccgtc	5160
catggcgctc ttctgtcgcc tgctggctct cgccctggct ctggccctgg gccccgcgc	5220
gaccctggcg ggtcccgcca agtgcgccta ccagctggtg ctgcagcaca gcaggctccg	5280
gggcgcgcag cacggtaag ccgagccgcc tggccaggg ctgcggaaagg tcaggtagtc	5340
ggggctcgga ggcgaagccg ctggggcat tgaactggc tggggcgca gggacaaag	5400
ccgaactaa aaaccttgca gcatggagcg ctggacacc agccctgcac gcggtgaaag	5460
gagagaggga gggaggtgga ggaccatgga gggaaagcgg gaggccgcg cttttagaa	5520
gggagtgccc aagtggacca gagacttgc acgcaggcca agagccttag acggacagcg	5580
ctttcagctt ctccctccag ccactgcaga aaggggaaa tggcaactct ttggccataa	5640
tcaccgtggg agggtgc当地 gggcaagcc cacccagcag tacacctatt ccaacccagc	5700
caggcccccg gccagcgact ccagacaaga acctggccca cacacggtag cagcatctaa	5760
ggtgc当地 gctctgtgc tcctggccag gcccgcact cagacactgc tggcacccga	5820
cactgctctc tgggtacagc aaggcaatg tggcacttct tgcctgc当地 gatgaagagc	5880
aggagaatgc actggccct cacacacact gttcaaattgg ggaaacttag tcctgagtgg	5940
ttccacttcc acacagtctt gaagtgtgca ctggagccag gattggagtc tgtcttaaag	6000
taatagctgg gttgttaat ttaggacact atcattgc当地 gaattccctt gagaccctga	6060
agatgtgttg gctttaggag acaaactcaa gcagaaggc tggctgata gtggccctaa	6120

tactgaccca ggcagaggca ggcaacattt ctacctaaa aaccaggcca tacctgcgtc	6180
acaatataccc aggcttgct gcagcttcca gcctacctgg ttgcaccaac ttctttca	6240
taacttagta aaactatata tgagttagaat ctgttagtga ctccctcagag gaagcctaaa	6300
taccatcggtt gtcggcggtt cacacccaca agcaatgccc aaacctccaa gagacigggc	6360
agatctgtgc tcaaataaaa actcattgtt ggggtgata gagttgactt cacaggccct	6420
gaaagtcttg gtccttgca ctaggagtgc tctgggtacg ggtacaggct gccccttgc	6480
ggccatagtt gctctgttt cctctacttg tggcttatg gtctaggcct ttcaggagtt	6540
tgggctctg gcggagaggg cctgctggga gcacatctgg ccacccctgca gagtgaaatc	6600
aaaccaggcc tggctgcaac ctcaacaccc tcctggaaag aggagaatac tgggatatc	6660
ctgggtctt tctggaaatgt ggagaatcag ctgtacttg ggcagtgtgc agaatagagt	6720
gaggggggat gtcagaaaga tgagagggat atgaggccctc aacatcaaaa tgcaagcacc	6780
tggcatttt attatctctg cccacctctc cgttggcttc tctgccttgc ctgcaatga	6840
atttgttat gttgggtgc ctcaatttgc ctaggaggt tctatttctt ctgtatcttc	6900
gccactaagt caggagaaga tccttatagc atgccctgca acagtgtcac ctgtaaaggc	6960
atctctctgc acagccacag tgaaggatcc tcctggat tggggcttt ccatcaagag	7020
ccatctttac agcaaacctc ttcccttca gagcccgaa gagtgctgac cagctggaaa	7080
acagggttt ttcttaat gcagatgctc ttgattatga gttccagata ttagatcaac	7140
ttccccacca taccctgca ggcaagcct cttaatttgc ttccctgcagc acagctggaa	7200
aggcctattt taatctgtga tggcagagt aatctaagaa gtcacaggag cacccctgtc	7260
ccagtagaaat ctggatgcgc aggcacatga accatggcaa aatgggtgc ggcacagtt	7320
tatttactct gatctaactg tccctgttaa tgccacaggg ctgcctggcc tggcacacag	7380
ggctgtggcg ctttgcaaa atggataacg ttgttctagc tccagccctt cattcaaagt	7440
gaaaactgtt agaaaggaa ggaaaacttt gctattttaa ggaattttagt cgtgtgcct	7500
gatatgaagg aagaataaac agctgtgcct tgctgtgcg cagcactcga ttggcgctt	7560
tgcttcgac ctaccacaa cacagtgaga tctactgttc atgttcccat ttacaggag	7620
gtgaaaactgc agcttagtga ggttagaggt gacttagtgc agacacagaa tgctgttgg	7680
agagtaataa ctatgatatg gtctcttgc tccctgtat atctgtgttg ctataggaa	7740
ggggaaaaat aatactgaaa gagaagtaaa aatacaatca cacttccaaa catcaaccac	7800
caaaaactga actgaatttc ctgaagcact tggtttcaa atctaagctg aacatcaatg	7860
ctgttattct tgaggcccag aagcaacttg ctcatcaaa ttaagctca gcatgaactt	7920
cctatgtaca cageccaccc acactccccg atgtgagaag gagagggtca cagccgcccc	7980

cagcctctgc tgctgccaca aggacagcag cagtggaaac attcagcaaa ggaatgttg	8040
agccacatcc acaagagact cactgaagat tcgccaacg cctacggaaa gtggcaggga	8100
attcattgac agtaattgtt tcctgctga tcagattgaa gagcttctgg gattctgtaa	8160
caataaatag gaccggggc tggagtatgg ccagcaagga ctttcaggg gttattcagg	8220
gactgtctaa cctgtgaatc ctaggcagca aacagaacc aggtattcag aaatctggag	8280
gatttgtca gcccgacta ggactaggga ggcattggc tctgctggct gtggccctt	8340
ctccagcctt cacttctt ctccttagat ctttacatgg attcatatat gcttattgtc	8400
cctcctggc ccactcactt tcacctgtt aacaaaaaac tggccaagag gtgacagtca	8460
tatcacccga gaagagacag ggcagagaaa tgaagggca gaatggactc ccacccaaaa	8520
gcctgactt gaatatttga gaattgttca agttctgca gaggaaatcat gatgggaca	8580
gtaggtgtat ttttactgc aatattggtg ttttcttaac aaatcgtc cacatcaat	8640
gatgtctgt gatggcattc taaagtaac agggaaatg atgttaaga aatacttcat	8700
ccttgggtg atacctgaag ttctctgagc ttggaggct tttgaaagcc ctcagtattt	8760
tttggggat ttgtttctt ctgacttgc attcagtca atgcattgcct gcctctggct	8820
caggaagatc aaccctctcc tgactgacca cgcctctcct gactgaccac gttagcacagc	8880
agcttcctt ccctagggc tcctaataatgaa gctttcacaa tcacctggcc tgagcacagt	8940
ttgggtcagg acttggataa ctggaaaaaa acatgcaaaa ccaaaatctt gtgggtctgg	9000
aaaaggcttc ttacgagaac ccccgacat ttacactctg cttttcaca gggccctga	9060
ggattcttg gatctggta gtttgggag cagtatttca aacaaggtaa tttcggtctc	9120
cttctacacc ctgcctggat gctaggcccc atctagaatg tgaacaacag aacaaggcag	9180
aacacttgc ctcaagggttc ttttgatgt tagatgcaga gaagagacac ccccacctc	9240
cccgcatcac ttacaggaat tctgtttgaa acccaacatc aaataaggac cgtatccact	9300
gtcagaggat gggaaagcagc atgtcatctg ggacattgaa gaaaggctcc tggggaaagt	9360
gggactttag cttgtatcta agtaatgaa aactgagagt taaatgggag agcatcccct	9420
atcagggtcc ttagagcaac cagccatggt ttaaaccagc tataaaggctt cgggttata	9480
ggatagacag taacaatggc ttgttttgg gagccaagca gctggccag gcatgcagag	9540
catgtctgtt tggagagctg cctgagagat gctttgtt acacttatca attgcccatt	9600
tcaaagaagg atatgtacat gaagttacat cagttatgaa gagagatttt aacaatttt	9660
gcaggggaag cttagatggg ggctgtatggg aatcttagtta aacagaacca aagtctaaac	9720

ccaagatatac cccagtagcca agactgaaat gactctctcc tctatctcta gaaagttcca	9780
gtgacccaag gaggcaaca ccatggagt cattaaagtgggtggacgt gctgtatc	9840
tccctaattc tgctgctttt gtttcagcc ccaacgtgtg tgctgtgcag aaggttattg	9900
gcactaatag gaagtacttc accaactgca agcagtgta ccaaaggaaa atctgtggca	9960
aatcaacgtg agtatctgta accagccagg agaccaagct gtatgcacgc tggctgcagt	10020
tccccaggc ctggccagc cttctagaag gtcaggttgc ctaaaaagcc atgaagatgc	10080
atgtgcgaac atgtctggga cctgcgtgct agggagtggc attttagga agctggccaa	10140
ttttgttttgcatttttaag gctgctgaca agacttggag acattttca gggctggttt	10200
gggttigcaa gaaacatgaa acactgcgtg tgttgtgtg tgttgtgtt tctcaatcct	10260
cataaaataa tacagatatg cagtgagaa gccaccagca tgtgactctg gaaaagaaag	10320
cccatggtg aatctgtact aaagaatgcc atccctatct tacagtccta aggtaaacac	10380
cccaaaaaga ctttagagcac taaacatatg cagattatga gacagcatag catataatat	10440
ttgcacagac ttcttcattt aaacccttagc tctacctggg ccagtcgatt catctttaga	10500
accctccatt gcttacctg aaaagttcgtaataacaaaag gaccacccat atggggttgt	10560
tacaaggatt gaatgaaata atgtacataa gagactgaat atgggccca gcatatatca	10620
gtgctcaata aatgttagct actattatta ttatcacccct agatttgc当地 atctagacca	10680
cacaagcaga agtaagagtg ccaacgggt gtggaccagt gtggttacaa tagggcttgt	10740
tgtatgtctgtt tcagcaagg agggaggcag cttttacccc actgcccagc tccctgggg	10800
aatcagggtc atgttctaac aattctgggg aaacctaatac tgtttggca ctgtcaacag	10860
atctcaaagc tggctgtctc ctatagctgtaagatgtgt atgacaaatac tcctgagcca	10920
cttgcaggc cctgaccccttc ctccgtctc catacataat gggatgatta agaaactcta	10980
agccactctc ttaagcactt ttcaatgtta gggattttta agtttattgt tgtgacatttg	11040
ctttttagca gacatctcct ccaatttaat agccaactgaa aagaagagaa aatgtcttt	11100
ccttaaaactg tatgtggaaa taaatattcc aatgtgtgac cctgattatg tttaggcaatt	11160
agcaatctta atatgaatttggg aggaaatggg ggattcatgg cacagctggg gagataccag	11220
cagtcctgg gagectgtcc agggcaggc catggcagct tgctccatgc ctgattgaca	11280
gcccagcctg caagctaaaa gttgagtgag ctaggaggac acactgcca gattcagct	11340
acagacaccc agcgatattc ttgctgctat gaacaaaagg agactatgca aattatacac	11400
caccattct tccaggatgc ctgacttaaa aaataagaaa aaagatggc cgggcacagt	11460
ggctcacgcc tgaatccca acactttggg agggcggaggt gggcggatca caaggtcagg	11520
agacagagac catcctggct aacatggta aaccccgctc ctactaaaaa aataaaaaa	11580

tattagcggg cgtggtggcg ggcacctgta gtcccagcta ctggggaggc tgaggcagga	11640
gaatggcgt aacctggag gcggagctg cagttagcc agatcgtgcc actgcagtcc	11700
agcctgggt acagagttag acaccgtctc aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaag aaaagaaaaac	11760
cttttagtact gaitgatttt ttcccatgtg tgtatattat ctactcaaata taacaattaa	11820
ttacttaatt aaacacaaag ccaggcctca cctaattgct tcttgaaagg tgaccagagt	11880
gctagtgcca agcaaacaac tcttctataat ctcaagagcc ctggccttca gagggccatc	11940
tttttgtta attcaagttt ctctgaaaat ggagaccgtt ttatgtatgac aagctggcta	12000
cagggtagca tctgccacac tgggggggtt gtggcgctgg gctgaagcat ttgcccagct	12060
agttaaacaat agctcgataa cattccctat cagttccag gctgagaata ctgtcagtga	12120
tgagtcgcct tggctttgtt acctgttatct ttgtgtgcca ggacaaggca caagcaacag	12180
agctgtgtgt tgccaaaatgtt tcctgtatga gcaggtcaac ccctgggggg caggtttgga	12240
tatgataatgttggatgtgtgtggcgcagttcccttaccc agtgaggcaca aggggagtcc	12300
tcttaggaaaa ggaagaaatgttctggatgatgtggggagat ggggttcaga gtggactcag	12360
gcaaagcccg atgcccagtc ccagctgttgcctagtctc acaaagccag aaggatatga	12420
catttacattt caactcttga atttggccactgtttgg gcaacttcaa agagagaaaa	12480
tgaagataga aaaatattat ttgatataaa acttcttagga caagagaggc ctttcgttga	12540
acattacatgtt tagtattagg aaggtggagc tgccctggaa aagatccaga gaactcagag	12600
agaggaagag gtggaaaccca tctctgttct ttgtatgttgc tcaatggatgttggca	12660
gggcctctgtt gtacactgaga ccaagaccag tgaggaggct actgtctgac caccatacgg	12720
tcagaattca gtgcctatgggg tggcctggatgttggcggaggaggactgtgc tggctggagt	12780
tgtatgttataat ctggggaaatggg taggtcccta gatgccttta gttgatgttag gagcagactg	12840
ggaaatgggatggcgcacatgttggggca aaaaggactgtctctgcatttggatgttgc	12900
gcagttggaaatggatgttgc aagactccatgttggggcggaggcggaggatgttgc	12960
ggatgaaatggatgttgc aagactccatgttggggcggaggcggaggatgttgc	13020
aaccagaagg agaatttcac ctggaaagca gacaacgggtt accaagcata cagggaaata	13080
ctttgtgggtt agaggttacaca cagagataca ggagccgacc tggtgagaca ggaggcctggaa	13140
gccacactgccc tgcctttgttggggccatgttgc tccactgttgc atcatcaggtaatgttgc	13200
tgcctgcaca caaaatgtttt tctgcattt caaagatgttgc agggccatgttgc	13260
aatgcgttcaatgttgc gctgacatgttgc acatgttgc gttaccatgttgc ggtccatgttgc	13320
tagtggctgtt tattgttgc tttttgttgc gggatgttgc tttatgttgc atttcagatgttgc	13380
ctaaatagca ccggaggatgttgc acaatggcttca atcaaaatgttgc gggaggcagac	13440

agttagccat	aaaattttt	13500
acgtgtggca	ctttgagcaa	13560
gacaggctc	agggtgcagga	13620
ttagacatcat	aatttgtggc	13680
ggagggctgg	ttttgtgcta	13740
aattgtttca	gccccaggga	13800
ctggcagagc	ggggactggaa	13860
taatactcct	tagtcatacg	13920
tgcatggtcg	aggcataacac	13980
gggcactgg	atttcacaag	14040
ccacaacctt	tgcaagggctat	14100
ccagaccat	ttttttccct	14160
cttgaataat	ccatccatccc	14220
caaacgcctc	ttcatatccc	14280
ctgactagct	ttgtcagcc	14340
gggtaagac	ttttttttcc	14400
ctaattctgt	ttttttttccat	14460
aggatcataa	tttttttttttt	14520
gtacttaaaa	tttttttttttt	14580
gggagactga	tttttttttttt	14640
tgttttttttttt	tttttttttttt	14700
cctgttatcc	tttttttttttt	14760
aggttgtgt	tttttttttttt	14820
catctcaaaa	tttttttttttt	14880
gatgaaagct	tttttttttttt	14940
agctggaaag	tttttttttttt	15000
attttaaccc	tttttttttttt	15060
tgtatctcaag	tttttttttttt	15120
ggccttattt	tttttttttttt	15180

tctcatgtag ggtattgctt tcaatgaaga tattaacata gttcaactt taaggttat	15240
atctggagtt tctttagaa cttcacaact gaccacttag taaacagtaa gcatctgtta	15300
agtgttctc atatgttaagt tcattcaatt ctcacaatca cactataaga taaatatgtat	15360
tattagccca ttacagatg aggagacagg ctcaaaagac ttttatgcaa cctggtaaa	15420
gtcattcaact ggtaaagctga ggaggctgt ccacttcctt ttgctgcccc caggggtat	15480
caaggctggc agtttagtgtc agcgacttag gaggtgaaca agtgagcagg cctgtaggac	15540
ctggctaaac tgccccaggt ctctgtctac agcctcaaac ctgtggctgt gggtcccaga	15600
gacaaggcct cctcagcatc agagaaggat gccttgcct cagggtcata aacccctcc	15660
aggttgtca cccctgctg taaagggat ccccaagacc gtcatacaga caaggagtt	15720
gggaactgag gagacacagt cagcctccag gagtgcctaa aatgcctca catgtgcata	15780
acagattgcc acaaataaa tacatccaa ttctgaagac tctgtctca tcaccaacca	15840
ggctggcccc tggtgaggc tgtgtggtt gaggccttg ttggtagaca gtaggttaaa	15900
gcaagccatg atttctatt gggaggctt agaatcagct cagctgtgtt tccaagacca	15960
ggagggcaga aagcaaacca tcccaggcaaa gcagtcata ggcatagtca gatgtctaga	16020
cgttatgggt ctgtgtttgc tctgccattc ctctcgaaa ctatgtgcc ctgtatggtt	16080
tactttcagt cacaggtgac tggctacag ggccattct tggccaaacg acttctcgag	16140
tataattaaat ccccaggcat ttacggccag agcagccggc caaatccgtg aagtgcagtg	16200
gttggggattttaa attatattaa ctcttgaa acttattttt gggagagaaaa actcagttact	16260
tctctctatc caatctttagt taaaaatgtt agaaggact ggtggagagc ctcccagaca	16320
tccctacaca tagactttgg gttgacatta tctcttgca cttcccttga aactttttc	16380
taaatttaggt gcctcccta atttaggcac ctcccagta ctgtctgt acctgttagg	16440
aaccaggcca cacagcagga gttgagtgcc agggagtgag cattattgcc tgagctccgc	16500
ctccctgtcag atcagcagtg gcatttagatt ctcatagcag tccgaataact attgtgaact	16560
gtgcgtgtaa gggatctgc ttgtgcattc cttatgagaa tctaattgccc gatgtctga	16620
gatgaaagat ttccataccaa aaaccacccc ttccccctgc caccatctgg gggaaatattg	16680
tctaccacga aactgatccc tggtgccaaa aagggtgggg accgctgtcc taagggatct	16740
gcttttctg acctgaggtt tttctttatt agactgtatc tggctgagga gaaggctgaa	16800
gccttaatc ggaacagctt tggctgatga gattagattc agaaaccaac agatggct	16860
tttctatgca gggaaagccta ggaactgggg ggctatggct gggaaaggcccc ctattgtttc	16920
catcctttcc tatgttcatc ctggaggaat ggcatacagac ccatgcctct gtgattgctc	16980
ccagcccatc caaccacagc atctatgttc tgcctggac cagggccagg gagcatggca	17040

cactgagctg agtataagga gagtgagca ggccactgcc agcccagaaa atttggta	17100
aagtgcctg aaatcttc acgttcgt tcacagctgc tctctgctc tctggggcca	17160
tgcagaccag ttcaaaaaag agttaattt tggtggcagt tggaggcagg tggactgcca	17220
gcttgcacac ctccccagcc cacaggctgc tgcactgggg ctgaaggcgt ggctaacc	17280
tgcacaccta gagagtgaca gagatgccag actggcagc aggaaggcaa gaggattaag	17340
agagagcttc ctggctgaaa gccacactcg gttaaccagg aaaaagccct tggcacgaga	17400
agactcagtgc ctgtgaggga ctgagcctg gttgtggc atgtgctgca taagccatcc	17460
atgtgtgaca gttagtgta gtccagccac tgtggacat gggtgctgaa agaccacatg	17520
gagaggaaca gtgagtgtc acaaggcata gccttgatca cttggagac accccctgt	17580
tcttcttagat gtcagacttt ccaaattgtt ctgttatcct ccaaactgtc atttcaaga	17640
gcaatggaaa aaggattgga cttgatggaa tgcagcaaga gtcctaggc tgttactacc	17700
tacctatgac cttaagaaac tccttcaccc ctcagaaccc ttacagcttt ctttctgatt	17760
ctatccctgag ttactctact ccaagctgag actttctgc ttagatctat cccttcctcc	17820
taaaccccca acctccattt ctccgtgt ctttttac acacccctca gcatacacac	17880
acaccttagcc acaggaacca atgagttat atttgaggag ttgggtttct tttgtcctca	17940
atgagatcct ggtgaggcca cttgagctgt tcagtcct tgccgtatcc tggggatgga	18000
actcagaagc caacaatata gaaaaagagt cttggccag cttccctagg ggctccatgc	18060
catagagagt actgcacccg tgtgcacagg gggccctgac atgaggactt tgaggataac	18120
actattccctc caactctgct tcagcatctc catggattt cacacagaca ctttagaaaa	18180
gaaactaagt ttggggggac ttgaccta cccacatcac agccccagta atacagccct	18240
ggaattttatc acagaaagcc tagaatccca tgcatatccc atgcatatgc atccctagtc	18300
ctatgggttc aaggcttggc gctccctg gatttagctg ggaaaagttt gcagacagtt	18360
cttctctgat ttctagaaat atggactaga atcgtagtgc tgagatgca agtaactttt	18420
aaaatcatct agtttaactt cacccattt catagaccaa gaaactgaga ccagagagag	18480
aaatggactt tcaagttcac cctgcttagtt actgtatggat cacaagtcaa atctcctgat	18540
tctagcactg ttctcttac accacaccac ctttggaaatgtgtcaatca aatcttactt	18600
tagttgcaga ggtttttttt agtttctgaa gataaaatgt tggtcaatc aagatgagtc	18660
ccaagacaaat agcctgttta gcccttataa gttcaggat gaaaggtag aaagaaaacag	18720
gatggaagga ggactggaga aaaaaacaaa agaggaagga aggaggagga agcaaacagg	18780
aaaaaaaaaaag aatgtgcata gtttgcact cctcgtcat ttccctgggat cccatttctaa	18840
gcaaaatgtac agtgcactt ccctggccac ctgagcatct tagctgatct gtctctgaaa	18900

actgggtggc tggcaacccc aagccatccc catctccctc tgtgtctaaa cttggccctt	20700
tggagttcg tagggagaag agccataggc caggtggct cacccagagt cagcagagag	20760
tcccacaaat gttgcactg ggcgaaagac agcatggcac ctgtgaattt tattagagct	20820
tttccttttag tgcacacac aagtgactgt acagggagt tagtattttg ttttaatttt	20880
gaaatagagt catctttgg tatctgcggg ggattgattc taggaccat tctaggatgc	20940
catatcctca gatgttcaag tccctgataa aaagtggat agtatttgc tgtaatctat	21000
gcatattctt ccatgtactt taaatcatct caagattact tataatacca aatataatgt	21060
aaatcctatg taagtagttt ttataccctc ttttaaattt ttgtattttc ttttattgtt	21120
tttcaaaaaa tattttttgtt ccatgttttg ttgaatctgt gggtaagaa cccacagata	21180
cgaagggcca actgtattgg ctatttttt agttaagaat gtgagactga ggccaggcgc	21240
agtggctcat gccttgatt ccagcactt gggaggccaa gaggggacga tcacctgagc	21300
caagaattcg agaccagcag cccgtcaac atagtgagac ctgtctttt aaagattgt	21360
agactggct gggcacggtg gtcacgcct gtaatcttag cactttggg ggcaggca	21420
ggtggatcaa ctgaggtcag gagtttggaa tcagcctggc taacatagt aaactctgtc	21480
tctactaaaa atacaaaaaa attagctggg tgtgggttg ggcgcctata atccagcta	21540
ctcaggaggc tgaggcagga gaatcgctt tatccaggag gcggaggtt cagtgagctg	21600
agatagggcc gttgcactcc agcctggca agaagagcaa aactccatct caaaaataaa	21660
taataaaata aataaataaa tcatgagact gagacataac aggaaggagg gcaattttgt	21720
tggttccaag gttcctagag tatgtatgg gagaggttgg tgccgggtgg gccatggagg	21780
tactgactca agtggaggga caggtgggg aatgggatgg gaaaagaaga ttgaccttag	21840
aaggggagct caacctctga accctaattt cagacccttc aaaatgaata ttaagctcat	21900
tttggctaa gaaacaaaaa acaaataaac atgaaactca tttggcttt ataaggctgt	21960
agaaacccct tctaaacttc aagctgctt aagaataac attttattac ctgcaaatac	22020
acacagttact ttggagattt ataatagtct ctatctaa tagaagccat tagggacca	22080
gtttcaataa acaggtaat ctgttaagact agttttaat taggatatct gttccagtg	22140
tccattcctg cctctgttat ctaaatgtct ggaaacaaga gctgtgtct gctgtgttt	22200
aaatgattaa aatcaccaaa ttagttgagt tcacgtagac aggcatgttga cttatttgat	22260
tgttttaaga agactataac aagccttaag cccccagaa acagcctgtc tttggcttt	22320
cccacatgcc tcctcgtctt ctccacctgt agatgtaccg tgctctgtt cagagaaggg	22380
agggtgttgtt tgggtggac ccccaaggcc catccctct tctgtcttct gctcctgcag	22440
ccctaccact ctcaaaccctt tacgagaccc tggagtcgt tggatccacc accactcagc	22500

tgtacacgga ccgcacggag aagctgaggc ctgagatgga ggggccccgc agttcacca	22560
tcttcgcccc tagcaacgag gcctgggcct ctttgccagc tgtgagatga cttcgcttg	22620
cccgaaaaac tcttatgggg aactgcctta cttcccccag gggtgggcat gatgaatggg	22680
agtctgcagt catttccctac tgtttcagga agctttctcc ttaaccctt agaaaaggct	22740

gtggaaactg agctaaaata tgtttacca ggtgcgtct aatgccccc gttccctact	22800
gggcagaaag acttgggtgc ttccgtgagga gggatccttg gcagaagaga ggcctggct	22860
cacgagggtc gagaacaatgt ttcccgagt tgcaaggacc catctcttaa acacagagt c	22920
tgcagccccct aactgacacc ctgtccctcc tccttaggaag tgctggactc cctggtcagc	22980
aatgtcaaca ttgagcttgt caatgcctc cgctaccata tggtggcag gcgagtcctg	23040
actgatgagc taaaacacgg catgaccctc acctctatgt accagaattc caacatccag	23100
atccaccact atcctaattgg ggtagggat ccccagccat actgcattggc ccttggtgca	23160

taatgaaccc atttctgttc catgtgtggg ctggttctg gggtaaagg tgttagacaac	23220
ccacccttt tgtgcctgt ttccttggg cccctattt cacagcttgt ggaacccaca	23280
ttttgtact gtgtttgaaa acactgtttt ctcccccgg ggcttgga ctatgcctt	23340
gttgtgttga ctgctcatcc ttgctgttc tctggcaga ttgttaactgt gaactgtgcc	23400
cggctgctga aagccgacca ccatgcaacc aacgggtgg tgcacccat cgataaggc	23460
atctccacca tcaccaacaa catccagcag atcattgaga tcgaggacac ctttgagacc	23520
cttgggttaa ggactgtccc tgggtggagg cccaggcttg ggacacatgt cttccaaaga	23580

ggggcctagc aggaacttt ctgcaggaga ggttagaggat ggctcctgta ggggaacata	23640
gagcaggttc ccctgaatgc ccttgaacat ggagaattca ttgaccagac attcagctg	23700
acctaacctg taaaattctc catttttt ataaagtgtt ccttcccttg cctccctgg	23760
aaaggtcagt ggtgtgtggc tgcatcgac cagtgccctc tgagccctgg acctgcactg	23820
tggcttccag aggtggcagt tcccacatgg ggtactagaa taaatggcct atcaggctgt	23880
gtgtgcttg ggatcacatg tccccaccct aggaccctgg ttccaaccat acgcatgtc	23940
tcttggagcc cagaacagca gagaagccac cagttgtggac acagaagtca agggctgtat	24000

ttccagcctg gcttctgact gctctgggc cgcaggata cggttccttc ccccatgccc	24060
agcaggcatt tgtcttacaa ctggagggga aggcatgttc ctcttgccaa ggactgctca	24120
ggaggaagt gaggcaggct gccctgtcag gtttttgcc ttgattcaag gagaacttcc	24180
taaccacaaa ggatacaagt gggagtgagg cggaccctcc ctagagatct ccaacacaga	24240
gagacaaca cgtctggggct ggctggcact gacaggcctc gcaggtgtgg atggctgtta	24300
gctggggagct tcgctgtcta agctctctc ccatgctttt ctctgggtt gctcgaagga	24360

cgggggtctg caagaaaatg atgttccac atagttggca gcacgtgaac agcaatttatg	24420
cccttgcataccctct tactgttag atttgtaaa tatttcttcc ttccctttc	24480
tgaccctcca tttgccat cttccttct tataacacat acttactagg tacctgtac	24540
ttcccgggtggcctatgtgcaggagtat agaggtgaac aaggaaggca aagttctatt	24600
ctcagtagag ctaatactct atctggagag agacaacaaa caaatcaaca aggttagccag	24660
gggcgtgtat aatttatgtc aagtggcag gttaatcggg agtgacagta gtgcagggag	24720
gattggaaag tcagggagtt ctctctggag gaggtggctt ttgatctgca gcctaaaggaa	24780
tgagaatggg tccattatac aaaatgctgg ggcaagagca cacccagtag agggagagt	24840
aatagcaaag gtcaggcagaaggca ggaaggccaa gggagaggcc agtgggtgag gtcacatgt	24900
aaggcatac aatggccaa gacaaggcca gagtgccag gccaaatcct ccaggacttg	24960
cagacctggg aaagagtgcataccatcttggcagca gaaaccact caggcctta	25020
gaagatcctt ctggcagctg tgttagagaat gggtggtgtg atccttccat gcatggctc	25080
atgtacgtga ttaccagtaa ctgtcgatg acagtgtgag gaggcgtgca agccatgagt	25140
gtaggcacag cagacagact caccttgc tggcggtgag atgggtggg aagtgtgcca	25200
agttgaccc ccaaagaaat gatatttttag tggaagaatg aatagaatca gagaagcaaa	25260
gtaagaggga agagcagaga ggacagcagg gacaaggact tggggcagg aagaggaaag	25320
gcaggtaag gacatgaaag atggccaggg tggctggagc tcaggcccag caaggcccc	25380
tggggccat ggtcatgggt gagcttgggt ttggcttctg tttcgtctt gggctctgt	25440
gaaaggctcg acccttgcg gggaaaccagt gaagctgtgt gtgcacatctc tgtgggagt	25500
gccagagtct tcagggagca ctccatcttc tctccccc acaggctgct gtggctgcat	25560
caggcctaaca cactatgtttaaaggttaacg gccagtacac gctttggcc ccgaccaatg	25620
aggcctcga gaagatccct agtgagactt tgaaccgtat cctggcgac ccagaagccc	25680
tgagaggta gcatccttg gtcctgctg ctgcctcatt tgtgcagcta gattgagccc	25740
aagacctgct ctggtccaag atgaacatac cacctgcacat gaggtgaccc tcaggatatc	25800
cactgcagcc atgggctggg gtcatcctgt cctgttgctt cagctaaccg tgtctctagc	25860
agccacacta ctctgaggc tgaactacaga atccagcagc tttgtctgg gagagctgga	25920
ctgaagagag gcatagctgg agacccatag ctggccctgg ccagaaacag ggagagtcaa	25980
aggctggaaatg agccaaggcc agagcaaggc taataggttag agcaacagct tacaggtgt	26040
ggggtggcag atactggcac cttgaaatg gattcctcat gcccacgctt cactatttt	26100

ctctgtggct	aggggattta	tggataaac	aaaattacag	taaaaacca	gccataggcc	26160
aggcacagt	actcacgcct	ttaatatcg	cacttggga	ggacaagggt	ggcgatcac	26220
cttagatctg	gaatttggaa	ccagcctggc	caacatggcg	aaaccccatc	tctactaaa	26280
atacaaaaat	tagctggca	tgggggtgg	cacctgtaat	cccagttact	cagggctga	26340
ggcaggagaa	ccacttgaac	ccaggagggt	gaggttgcag	tgagccaagc	ttgcaccact	26400
gcactccagc	ctgggtgaca	cagcgacact	ccgtctcaag	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaacag	26460
ttatagtagt	caactttiga	ctctccattt	cagatttcgt	catgccctcc	tcaatgagct	26520
gctaagttag	gcagtgcatt	gattattgct	gcaggagagg	gaaggaagga	gctaacgtgt	26580
tttcacatgt	tttcctttg	gagatgagaa	aggaggactc	tgccttcccc	ctaccctgcc	26640
cctttctact	ccaggaccc	tgaaaggcca	tgagcacaaa	gctgcgtgcct	gagtccctgt	26700
aaatgcaggg	tacgccccag	gtctctgtat	tacccacca	cactttcct	ctcaaacata	26760
ttccaggatc	acttgatttc	ttttagatct	attnaaaccc	accgtgtcaa	tgtgttatata	26820
aaaatgtcta	atgcatttca	gacaccctat	acatctatac	attnaaagtg	tttccttct	26880
atctgtgcag	ggatggaaa	ggcatatattt	ctgaaagcac	agatggaaag	acgggatttg	26940
ttccgtgtcc	aggtgattat	ggtaacctcta	tgcgcctggc	cgccactggg	gacagaggcc	27000
atgaaaatga	atacagcaca	gccttgcct	ccaagaaact	taagacctag	tagaaatggc	27060
aggcttaaa	acaggttgtt	gggatctgtat	ttgggtgatgt	caatgacaga	gatactcaca	27120
gcacaaaatg	gggaatgagg	gccccatttgc	ggacacacat	agcctaagg	ggcccaaagg	27180
cttttagaac	tgtatccct	attnaaacat	gatttgcaca	gagcacattc	tttgctttgg	27240
agacctcaga	actccttact	ataggccggg	catggttata	atcccagcac	tttggaaagc	27300
caaggcggc	agatcacttg	aggctgagag	ttcaagagca	gcctggccaa	catggtaaaa	27360
ccccgtctct	actaaaaata	caaaaattag	ctgggtgtgg	tggtggccac	ctgtatccc	27420
agctacttag	gaggctgagg	taggagaatc	acttgaacct	gggaggcaga	agttgcaata	27480
agcccgatc	atgccactgc	actccagcct	ggcaacaaa	gctagactct	ctcaaaagaa	27540
aaaaacaaaa	caaaacaaaa	caaaacaaaa	aaaactcctt	attataaact	gtaagaaaaa	27600
aaaggccct	acttcgtccc	tttgcaaat	ctgcctttc	ctactacta	accagctgt	27660
tcagagcaag	gacactctgt	ttgggtccat	cgctgcagac	tggaaggaag	aggtccttgc	27720
cccacaccca	acagtctct	gctgttaccg	gcaggttggc	aggcaggcag	gcgagaagca	27780
gccagggctg	gtgggtgtc	cagttgaag	actagttcc	agccctggcc	ctgtatcccc	27840
tccaaatggc	cctggcagggt	tcctctacca	catcgatggac	ttcaccttcc	ttctctaaga	27900
agctcaatcc	ccaaggcctc	atcccatag	gccttctac	ctttttctt	tccctctggc	27960

tgaatgtggc cagcacgggc ttccaaggcc atcaactcg tgcagcagc cccatgcctt	28020
gcagggcctc agagcttcct cctgcctatg acagtgttgt tttggttccc acactggga	28080
ttagattgaa actcgccctcc gtggtgagaa tatggacat agacgcctcg tgaccttgtt	28140
gagcagcagt ccagccacc tgctcagcct ggggtgggg gggctccctc ctccctigact	28200
ggtccttgca ttgcctcca tccagcctgt ctggccttc cgaggcaatg gagaccagca	28260
ggagtcacga tgggtcagga gcccccttg ggcctcagcc ctgcctgcc ccctaaagta	28320
gcacttggat aagcaaataa attattatac ttactattt tgggtgttgt gaatgggatg	28380
gcaaaggcca agtcttactg atcaccaaac cttaaagat atcctggcag ctagtagacc	28440
cttggctaa atgaacagaa aactggacaa ataaagtgtt cacaataac tcaaagctgt	28500
cattgtaca ctttcgtct ttccctacta cagtttacat tttataaag gtgagtagat	28560
ttctaaaatc ccgtggtagg ctctctttag tttttttgtt atccctgaag ttcaagtcata	28620
aataagctaa tcactaacat ttgttgagca ttactctgt tgtcaggccc cgtgccgagt	28680
gctttaggtt cagaatttca tgtcatcccc acagcagccc taggagatga atgcaattct	28740
tatgtccact tgactgataa ggaagtttag gttcaaagag gctaaatgac tctccaggg	28800
tcccacagct gggaaagtggc cacaggccc cagctggttt tctaggcag caggcagaag	28860
gcggggagga tctggccct gtgggtcccc agcctcatct gagggtccctc atctgagaga	28920
acaggatcct cacagcatgg gcaggctgca agtggccctt gaggttatcg tggagtggac	28980
cctgacttga cctgagtcgt tttggacccc agacctgctg aacaaccaca tcttgaagtc	29040
agctatgtgt gctgaaggcca tcgttgcggg gctgtctgtt gagaccctgg agggcacgac	29100
actggagggtt ggctgcagcg gggacatgct cactatcaac gggaaaggcga tcatctccaa	29160
taaagacatc ctggccacca acggggtgat ccactacatt gatgagctac tcatcccaga	29220
ctcaggttagg ccaggccctcc gggggccttg gccctgcctg gccaccatc tcttctgcca	29280
tccttigtgg cgggggaggg gaaattcaga gatctttggg cgacttccct gcctggaccc	29340
agctcacagc ttctcgccca ctgcaaatgt gtgggttgt accagactga tgtgtcttga	29400
gtttcaggct tgcaggatgtca gtggagaggc agtggggagc tattgaaggg gtctggggac	29460
agactcaatc acagaggcct ttcagaagat ctgcctgctg tgcatggca aagagggcca	29520
cttgcgtacc tcagagcatg tgcttctca gtgtgccca agctgtccca tggtcactga	29580
cccgatgttga atgactgaat ggactttggc ttgtgtctca ttaggaatcc tagccccatt	29640
ctagtcctcc agtgagatct gtccatgagt gaaggaatct cacaggaaaa aacaaaatgc	29700
ttctatgggt gtgggtgctg gccttatcta caccacagaa gcccacac agactgttt	29760
tcttccctt gtttagaatgt gccctgacca agcagccac agggcctgg acagaggctg	29820

atctctgcct aactgagctc acctctcctc cctctccctc tgactggta gattttctag	29880
gtgactgttc ccctgatgac acaagccgc tggccccag cagtgttag aggggttgg	29940
gactcacgag atgacattcc tgctgatgtg tgtcatgcc tgggtggat gaatgataaa	30000
tgaaaacagc gctttaact tttgaaccca ctttctcctt cttgtagcc aagacactat	30060
ttgaattggc tgcagagtct gatgtgtcca cagccattga cttttcaga caagccggcc	30120
tcggcaatca tctctctgga agtgagcggt tgaccctcct ggctccctg aattctgtat	30180
tcaaaggtaa catgggaaag gcatccctgt tagatgtcc ctggaggcag cttccccacc	30240
cctgtcacct ccacaacact ctccgattta cagcacccca tggacattta gaacttccac	30300
tcagctcaac caaaaggcaga tgtgacttca gcagaaactt cagaggctct gttgttcat	30360
taggcagtgc agagaatgcc ttggggagc cgttccctag aactcaagac ttgacatctg	30420
ggaggcagcc gttccctaga actcaagact tgacatctgg gagagcagag cattcccttg	30480
ccttctatt tgcagggtca ctgccaatg tatagtcaag aggtcagagt gagggtacag	30540
ctgagctgca gcccaggaa ggcagagaag gggccaagt tgtgtgcgtg cctgcccttc	30600
cctcttaggg caaaaactcca aacacccttg attatctgga tcttctttaa ttctccatag	30660
aagataccag atgttaagga atattggcag cttcaattgg tttctcaatc cctgtttcca	30720
aactcaagga gggatggct ttttcaactgt atttatctct catcaactc ttcattgcag	30780
gagcacatct ctctggacct aaccatcacc ctttcttgc gatggaaaccc ctccaaatga	30840
tgcccataca aggaatttgc ttggaaacca cataattaaa gaccagctgg cctctaagta	30900
tctgtaccat ggacagaccc tggaaactct gggcgccaaa aaactgagag tttttgtta	30960
tcgtaatgta agttctgggt cctaaatcat gtcctggaa agtccttac tgtggactt	31020
gtatttagtgt aaaaaaaaaat gtcctcaata agcaggagtt tgcatgagaa ctggttgctg	31080
acaaggaagg aaataatttc tggaaaatat agataacaaa atgagatcct gcagaaggat	31140
tggaatctct ttttctggag gcctttgaga ataaaccaca caattatcca acctgtattg	31200
tgaaggaata agtccttctt gaattcagga attaacacct gggaggaggat atggagttca	31260
gactctttct gagcttatga gaagagaagc cccctaaact aaaatacagc ctccttggt	31320
ccaaaagggtg ctttctctct tctgctgtat cttttttttt tcaaaaccca acagttaccc	31380
tggaaatcaa aaaggaagta caactcaaca tagctcttgc ctggacccaa ccagcaccat	31440
ttggctaaag atggttatca tctgttaaac aaagaaataa ataaatgggt tcaacgtatt	31500
tatttcaaca ttgtcaatgg acctcatgtg taactgatata tctcattatg ggacctctgt	31560

gtgactttat tggggcctct ctaaccgttc tttcctaag gaagaccatt tattgttta	31620
tttcctggag aaaatacatc attttatccc agcctaata acccatccca gtgtatactc	31680
cttcatcttc atggataatg accctgtac atgcctgaa caaatcagga ggccctcg	31740
gaaagtataa ccagtcctt ctltcttgt ccctctctg tgcaagacct ctgcattgag	31800
aacagctgca tcgcggcca cgacaagagg gggaggtacg ggacctgtt cacatggac	31860
cgggtgtga ccccccaat ggggactgtc atggatgtcc tgaaggaga caatcgctt	31920
aggttaattag ttccatcccc gggtggagct tctgccagt ggtcatgtc gagtgggatg	31980
tggggccca gctatttgtc aagcttctt ctaccttggg gattcaatta acactagcag	32040
tgcacigctg cgaccccca gacttggat gggaaaagg caagggtcgc cttgaaagct	32100
tacattggga agaagggtta cttctaagag tgtaatcttc acatgcattgg gaagcaggaa	32160
ggggggacta cattttatg actgaagtgc aaggaaaaca tcaccctctc attgttaaggc	32220
tccaagttag ccaagagcac atagttaca gtgcacgatg agcctctcac tctctgcgc	32280
gtatctgttt attcaactg aagcacccctt gtgagtttg ttcttgccc ggctatctcc	32340
atttctgact tgctcattca ctttgggtg ctgtcatatt gaatgttcc ctgtcactga	32400
cttcagccac ctgcacaagg gcttggagac cacaccctc tgccctccca gaatcatatc	32460
cctggaggct cagctagtct ctgggtcagc catacctctg cccttcttt tccctcctt	32520
ctcctgtggc ctctgacgtc tggccattta acagagctta gcattttgc tgggtggaga	32580
gagctggagc ctggaatcac tcccttttg tgcatacgga gggcatgaaa accaagggt	32640
gtgcattcca gtggcctgga ctctactatc ctcagtggtg agtatttaa ggaaaatacc	32700
tctcagcgtg gtgaggtatt taaggaaaat acctgttgc aggtgacatt ttctgtgt	32760
gtatctacag catgctggta gtcgcattcc agtctgcagg actgacggag accctcaacc	32820
gggaaggagt ctacacagtc ttgctccca caaatgaagc ctcccgagcc ctgccaccaa	32880
gagaacggag cagactttg ggtaaagacc aacttaagta cacgtctcca ttttctaaa	32940
gtatgtatcc ctcaaggccc cagcagcaaa cagttggcac atcaaggatt gacttgaagg	33000
gattttatga caagactatt agtggaaagag tggcgccgac taaaggaaact agcaaaggat	33060
gaggccaacc agggacttagc aaccctggga agccttact accccttaggc ctggggat	33120
gggaggatga gagcaggaac caggaggtc atgagccttg gacaaggca cagaacagca	33180
gccagagcca tgtcagcca gccactgtca gaaccatgca agggggatca ctcagcggcc	33240
cagcctccct ctcagacagt tgccatctgg gtctttgtt ggctgtatgcg agagcaggag	33300
ggagcccaact gatgcgttc atagagctca gcctctggg cagggaaaccg ggcagagagg	33360
agttagaaaag attaagggt ggctgcgacc agcccagtca ctgaggcacg ttcccactg	33420

gagacctatg agcacagtga taataaagcc agttacctgc actgactatac cctccagaca	33480
aaagcttcc caagaagtta gtcattggc tgagagatct agttgaggat gtttggcagg	33540
ggatctatgt gtatcggtg gctaagaaaa atgaggaagg taagagtata ttgcagcctg	33600
tgttggagg attaaatagg atgccacaca cagggccagg cagacagcct ggtcagtaat	33660
agccatgacg atggggcg ggggagcagg aatggaggt gcagtgtta gctcagatgc	33720
atgcctgtga gagatgcttc cactctcaca gaaagatgag accaaggaaa aggaggagga	33780
agaggaagga ccttgacaaa cttggggcc cacatgtct acacccct tcctgctcta	33840
gagcagaata gaaagttcag gttgcaggca gctctaagtt gaattcgtgt cctgttaat	33900
tttcttatt gctaaatgaa tgcctgtgtc tgtgtatgtc acgtatgtt ctaaggagag	33960
gggagaagtt cattctgaac ataaactttt catcctctt ctgtccagca agaatggaat	34020
attccccaaag tggctgagc cagttggct ttcttttgt tttcaattat gtggagttg	34080
aggaggggaa tggaaaagc ttcccaaaca caccctcccc cagggcttag gcacccctgg	34140
gggacagaga gtgttagagg ttggtagagg tgtagagat attgaaagga catccatgc	34200
accccagggg ctgggtggc tctgtacttc caggcaatat ttgtggaag gggAACCTTG	34260
ttagctccag gttgtggatg ttgaaaatc agttggtacc cagtggtcc atcctgtgc	34320
aggcatgtgg atttgtcaat aaccaagtga actctccaaa ataagttaaa acttcctccc	34380
ttctcagttt caagatgctg gaaatagctg ttccataagcc ctggggaaat tttagccctt	34440
ggctggtaat gggagtagtcc gagatgagag ggcagctgga aactttcgga atgacccccc	34500
acacttaatt tggaaatgc ctctgcacct ttatggcaa ccagatgcct gccccagttg	34560
ctggagacac ttagtggc tggaaatggat gctgagacgt gacgaggaga gatgctgcgg	34620
agggaaatatac cccctcagcc ctgacctcat cggctccatg gctccctccac agtacagctg	34680
tctactcttt taagttctcc cttcaggaaa tagccatctc aaacagaatg tgcatggag	34740
ggcagaatgt gtaaatattt cactactgtg ttataaccgt caggagccat gctgtatgt	34800
aaacgtccca gatgccgggt ctggaaaggt ccctggctt ccaagcaaatttattctca	34860
tggaaacatg agtcataactc acagaggagt atggattaac tccttcag cagccaggga	34920
gcccagcatc ccagacagca tatttaaccc agaggccaa tgactgtgg ggcagatttg	34980
tggcatgaa catgtgcttt gtgtcctctg accattagac agattgtgg tcacaacgtt	35040
gagtatacag tggagctta ataagtgtt attccctggc cagggagttc ttcatggat	35100
gggtgaccac ttacatcttc tcctctggc ctccttgc caggctaaattt accatttttg	35160
ggattaaactc tatctcctt tcccgcaacc tgcaggagat gccaaggaac ttgccaacat	35220
cctgaaatac cacattggtg atgaaatcct ggttagcgga ggcattgggg ccctggcgc	35280

gctaaagtct ctccaaggtg acaagctgga agtcagctg gtaagtgtcc tgcaaatcaa	35340
aggctggcta aattccccca gggcaggcgt ccaggacata tctcaccccc aggatggaat	35400
tatacacaca caaccccaa gttcagcccc gaatctctga gtgttaattcg tccaaagaaa	35460
aagagaaaag agaagagggt cttcagggaa atcaagttag atcatagttt gacatgagta	35520
agaacttcca gatttacaag ggaatagagc atctgattt gcatctgaga gaggttattt	35580
gatcttcctt ctcttaagga ggttgttaggc aactagttat gtgactgaag agatcgtct	35640
gtactcacac catcccaccc cccaaaccca gggcttact gagttgtacc atgaaccaga	35700
ccatcccaag aggcttttg agttctgaca ctgcgttgtt ggccttccc ttgcctgca	35760
cattgtatgtataaactttgt aactgcacta agagtgttcc taaagcagat agccagccga	35820
gctccagaaa tctccctggc tgcacccgtca gaggccactg acccctctgt ggagggaccc	35880
ctcttcagtg tggtgtggc ttctactctc tgctctctc tcttggtctt cagccatcca	35940
ttgctcacca gtttctcacg aggagcatag gaagatatgc atgttagggag gttaggcacgg	36000
ggatgacttg ttigacttta gcaggtcatt caagaatctc ctgcacccgt gtttcagatg	36060
ctgggtcct gtctgtcaca ggcttctgtt ctccttaccc ctttagttt gtcacatggc	36120
ccttcaggaa ggccttagat agatttgcctt tgggtgggcc tcctatgaga aaatcttaag	36180
tgaggcaccc aggccaaatg gaaagagccct ttgcccaaga gcaggaagcc tgtcttccat	36240
ttccagctgt tccacccact tagctaaaaa gaggcacccgc gcctgtcttc agtctcagtc	36300
tcagtcctt ctctgtgga atggacaat aatatctact ctccttatca tacactgctg	36360
tgaggactga gtggatcaca caaaaaagca ttatgtaaat tgcaaatgtc taaatccaca	36420
caggagattt gaattaatcc accacactga aggtctgtca agggcaggga ctgtttcatt	36480
caccagagta tccccagtc aacacaggac ttggcatatg aaaagtgttc agtaggcgg	36540
gtgcagtggc tcatgcctgt aatcccagca ctttgggagg ccaaagtggg cgatcatct	36600
gaggtcagga gttcaagtcc agcctggcca acgtggtaa accacatctc tactaaaaat	36660
acaaaaattag ctggcggtgg tggcacatgc ctgtatcac agtactctg gaggctgagg	36720
caggagaatc acttgaaccc aggaggcgga ggttgcagt gtcgagatc atgcactgc	36780
acttcagccct gggcgacaag attgaaactc catctcaaaa acaaagaaca aggaaaaaaa	36840
cggaaaactgt tcaatgttcaaca cttgctgtatc gaataaaaata aatataaaa tgtataaata	36900
aatgtctac ttcaaccac tactctgtt ttcttttaga aaaacaatgt ggtgagtgtc	36960
aacaaggagc ctgttgcga gcctgacatc atggccacaa atggcgtggt ccatgtcatc	37020

accaatgttc tgccgcctcc aggttaagtgt cgcatcccc ctgactctgc agccagtcct	37080
tttcttcatg tggcagttgg tggagagaag aaaaactgtt ctaaacaatg atgagaataa	37140
catgttaattg tgatagttaa actgtgccta tgtgactgtat tgccaggatga attggagct	37200
gttggtttg aaigcaccac actaaggaaat gtgaggacac attgctctt gcggagtgc	37260
ccagctatat tagctcccct cggacacacgc ccagtttct gtattcgctgt ggtatgtc	37320
cgcgcgattc ccagcactcc tcttacagca tctcacctca gtgtatgttc ttgcctcca	37380
gtgcagttga acctcagttcc tgcctctct catgtgtgca ttcaccttcc ttgggtgtct	37440
ctccccatgg gccaaagtct accatgagtt atgaaacatt atggagaaaa catgttttg	37500
gaaatgtgag ccagaaagcc caccagtgcc cctcagtac ggttgttatg aatgacatgc	37560
taatggtttc actctggtca aacctgcctt ttcttcctc ttccagccaac agacccatgg	37620
aaagagggga tgaacttgca gactctgccc ttgagatctt caaacaaagca tcagcgttt	37680
ccagggttaag atgcctgcta gggttgcgc tagcctgagc agcctcaggt cctctgttt	37740
ggccatagag gaggctctcc agccccctgtc ttccctggct gctcccccagg gctctcttaa	37800
aactctccc cactccact gaggcatctt cagccccagc ctgtgtcaaa ttccagagtaa	37860
agaaccaagg caactccctg gcttcatgg gccaaagcgc aggcttcac accgaggcct	37920
ctgagcctca gatcatgggg aagtcaactgc tggagagaac agacatagct ctggaaagcca	37980
tctgccaag agggcagccc atcccaagtt catcttacag tggccaggcc tgccctgagc	38040
cggggcctct gggtaactct tctgtgtcc atggcattgc ccattctgg tgaggctgg	38100
gctctctgg gcaactgtatg tattctggat acagggatac tggcgtcgat atgtgtgtgg	38160
agccatccc tccttgccttcc agcccccacct ccctctcaaa ccctctctgg ctcttctga	38220
gcttccttcc ctgtccccca gcttgccag tgctcagtgcc cccacttgcc tctttgtca	38280
cttcgggtca ggtggagcct cttggaaatg tgaagtgcct tacagaaaga ttgcacttca	38340
agaggagagg ctgcaggagg ccattctaaa cccagaggcc tggagcttac tgtgtcactt	38400
tactttgtta cacaggggtc tccttagtgc cctcgagaag gattctggc cctgagcttc	38460
tactcctgag gccacccctg tgcagccccca gctccctcaa ctcttagtgc tagtctcgt	38520
gggaaagcct ggcttgggg tctccttagga atgtccacct gaaggcacac ttgtataggg	38580
cttgcacaac ttatgtctgc caaggccacc tgaggaactc cctgggtgcataaagttcca	38640
ccttccccctt cctttccctc gccccagcat ttttctgag taggggtggc aatggcaaa	38700
gccattgtca taagcagttg caggtataac tttcactaga aaacctgaca ctttgttgc	38760
tcttcagggc ttcccgagg tctgtgcgcac taggtgagtc tggctgggt ttgaagtcat	38820
tgcagacctg tttaggcctt accccccaaagc aagccccaaagc ctgcctatctg ctgtatata	38880

ataagaacat catggcgcag taaaagaagg ctggccttg gagtcagaac agcagggtga	38940
cttgggtca gaccagcgc accccatttc cttctctgtaa agatgaggat aataaggtaa	39000
acaacctttt aggttaagg tgagtttca gcttaggaag tctggaaata ttgcaaagg	39060
cttgcagga acccatggtg aggtatgtt tccaaggta tagtacaga aaaccagaac	39120
atcgggcctt gagtaaagag tgaagttca caaaccacaa agcacctgct atgtgcagga	39180
gagcatggca gaaggaggct gcttggccct ggctccttgcatttgcacatgatgtccatgac	39240
agacatgggg agatctgcac ctatggcacttaccaactt ctctttca gcccctgtct	39300
atcaaaagtt attagagagg atgaagcatt agcttgaagc actacaggag gaatgcacca	39360
cggcagctt ccgcaattt ctctcagatt tccacagaga ctgttgaat gtttcaaaa	39420
ccaagtatca cacttaatg tacatggcc gcaccataat gagatgtgag ctttgtcat	39480
gtgggggagg aggagagag atgtacttt taaatcatgt tccccctaaa catggcttt	39540
aaccactgc atgcagaaac ttggatgtca ctgcctgaca ttcaacttcca gagaggacct	39600
atcccaatg tggatttgc tgcctatgcc aagtccctgg aaaaggagct tcagtttgt	39660
ggggctata aaacatgaat caagcaatcc agcctcatgg gaagtccctgg cacagtttt	39720
gtaaaggccct tgcacagctg gagaatggc atcattataa gctatgagtt gaaatgttct	39780
gtcaaatgtt tctcacatct acacgtggct tggaggctt tatggggccc tgtccaggt	39840
gaaaagaaat ggtatgtaga gcttagattt ccctatttg acagagccat ggtgttttg	39900
taataataaa accaaagaaa catacgctt gtgtgcattt tacagtgtgc tgacctgagg	39960
ccgtcatgct cctccacacc tcaattctgc tctggagaag cttagaaagg agccccgagg	40020
gatggtttg gggagattcc agcagccagc cctcagacag ccagacagct catgggggtt	40080
tgagcctgtc ttggccaaac aggttttat ttccacccccc tccggccttg gggtttcaag	40140
ttttcagtgt tgccttcacc ccgcactta ttccctttt tacttggaaat taccttcctt	40200
ccagcatggt gatccctgc ctgtgtgtg gacttttagt tccctcagcac caaccgtgt	40260
agtggttgcc agcataatcc cattatgcag atgaggagac caaggccag ggaagggaga	40320
accaccagca gcacgtaaaa tagctgagct gggactggaa ctccacaccc tcgtactctca	40380
gtgaccacca ctgacaacag cataagtcca ggtttccag gcccatcccc tctgtgccaa	40440
cccacattca gattccttcc ccggctcccg taatctctgg catctagaat atcctcaggaa	40500
ctctgagagg tgatatcatgt tggttgggtt gccattggcc cttacccgttggcctgggg	40560
ccagtcgtgt gaccccccag ggtctccctt tctgtatag ggagatgacc gtcacatcta	40620
tttcatgggtt ccacgtgtgatgaaatgtat gatgtatgttataaaatgtt tggtacaaca	40680
tttaggtggcc ttattttat cctggcgctt gggactgctc aggtcaatg cgccagagag	40740

cctttatttg tgtttccc acaggtggc tggccactt tcctagagaa tggacagac 40800

ctccttcca cccacaccca tctctgcaa ggctgattca ctccagcagg cgagactcat 40860
 ttcaactcat gaaaccaatg acccaaagat atatccccag cactactgt ggtcagtcca 40920
 ctgctgctgg gaatacagca atggtagtgg cagacagagg ccctctta aatagctcc 40980
 agtctgagga aagagagata tgacatcaat ccattaaaat cattcatcca ttggttcac 41040
 aaatatttgt tgaggctac ctatgtcac cccatgtta gaccctggg aatagacatg 41100
 tcattctcat gaggctctc tactgatggg gggaaagaga attgtcaacc agataatggc 41160
 actacagcct gtgtgttctt agtgactctg aggatagcac tgtggttctg tgacagataa 41220

tgaaggattt ggaagcagga atgcccagga gctcccagaa gtggaaagag atgagagggaa 41280
 tggaaggaac ttacctgaag gtgaaggcat caggctaggg gaccaaggaa gaagggtgtcc 41340
 tgagaggtaa ggcttaacct tgggtgtcaa ttcaactccc gtcaactctcc catacgctcg 41400
 tcctgctgtt cccacccccc ctgcagccat gcggcttgg gcggctagt agggccttgc 41460
 tcatgtggg tatcctatgc tatgcttcac tttgagcacc taaaatacac acactgcact 41520
 ttaccaagat gacctcgaa accaaagagg ttagtgcac aagttttaaa gacccttaaa 41580
 tttaaagtaa aaatcactac aggttcatt ataaatgccaa aacactaaga tgtgtgttcc 41640

cagttctccc cttcatttg ccctgccact ccctgccctg acttgc(cc) accccctagt 41700
 aatgtggct ccactctatg ctccaaactc tccctggaga gaaatcctcc ctgtgggtga 41760
 ggacaaggcg cagccttccc ctcccaccaa agaaggctcag attcccttt ttgggtccta 41820
 accatccata ccccttctt tctcatgaag actcgggcta agcattcatt agggctgccaa 41880
 tctggaggat ggacccttag agctgagggg ccagcactgt gtgt 41924

<210> 62

<211> 683

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Cys Ala Val Gln Lys Val Ile Gly Thr Asn Arg Lys Tyr Phe Thr Asn
 50 55 60
 Cys Lys Gln Trp Tyr Gln Arg Lys Ile Cys Gly Lys Ser Thr Val Ile
 65 70 75 80
 Ser Tyr Glu Cys Cys Pro Gly Tyr Glu Lys Val Pro Gly Glu Lys Gly
 85 90 95
 Cys Pro Ala Ala Leu Pro Leu Ser Asn Leu Tyr Glu Thr Leu Gly Val
 100 105 110
 Val Gly Ser Thr Thr Thr Gln Leu Tyr Thr Asp Arg Thr Glu Lys Leu
 115 120 125
 Arg Pro Glu Met Glu Gly Pro Gly Ser Phe Thr Ile Phe Ala Pro Ser
 130 135 140
 Asn Glu Ala Trp Ala Ser Leu Pro Ala Glu Val Leu Asp Ser Leu Val
 145 150 155 160
 Ser Asn Val Asn Ile Glu Leu Leu Asn Ala Leu Arg Tyr His Met Val
 165 170 175
 Gly Arg Arg Val Leu Thr Asp Glu Leu Lys His Gly Met Thr Leu Thr
 180 185 190
 Ser Met Tyr Gln Asn Ser Asn Ile Gln Ile His His Tyr Pro Asn Gly
 195 200 205
 Ile Val Thr Val Asn Cys Ala Arg Leu Leu Lys Ala Asp His His Ala
 210 215 220
 Thr Asn Gly Val Val His Leu Ile Asp Lys Val Ile Ser Thr Ile Thr
 225 230 235 240
 Asn Asn Ile Gln Gln Ile Ile Glu Ile Glu Asp Thr Phe Glu Thr Leu
 245 250 255
 Arg Ala Ala Val Ala Ala Ser Gly Leu Asn Thr Met Leu Glu Gly Asn
 260 265 270
 Gly Gln Tyr Thr Leu Leu Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Glu Lys Ile
 275 280 285
 Pro Ser Glu Thr Leu Asn Arg Ile Leu Gly Asp Pro Glu Ala Leu Arg

290	295	300
Asp Leu Leu Asn Asn His Ile Leu Lys Ser Ala Met Cys Ala Glu Ala		
305	310	315
Ile Val Ala Gly Leu Ser Val Glu Thr Leu Glu Gly Thr Thr Leu Glu		
325	330	335
Val Gly Cys Ser Gly Asp Met Leu Thr Ile Asn Gly Lys Ala Ile Ile		
340	345	350
Ser Asn Lys Asp Ile Leu Ala Thr Asn Gly Val Ile His Tyr Ile Asp		
355	360	365
Glu Leu Leu Ile Pro Asp Ser Ala Lys Thr Leu Phe Glu Leu Ala Ala		
370	375	380
Glu Ser Asp Val Ser Thr Ala Ile Asp Leu Phe Arg Gln Ala Gly Leu		
385	390	395
Gly Asn His Leu Ser Gly Ser Glu Arg Leu Thr Leu Ala Pro Leu		
405	410	415
Asn Ser Val Phe Lys Asp Gly Thr Pro Pro Ile Asp Ala His Thr Arg		
420	425	430
Asn Leu Leu Arg Asn His Ile Ile Lys Asp Gln Leu Ala Ser Lys Tyr		
435	440	445
Leu Tyr His Gly Gln Thr Leu Glu Thr Leu Gly Gly Lys Lys Leu Arg		
450	455	460
Val Phe Val Tyr Arg Asn Ser Leu Cys Ile Glu Asn Ser Cys Ile Ala		
465	470	475
Ala His Asp Lys Arg Gly Arg Tyr Gly Thr Leu Phe Thr Met Asp Arg		
485	490	495
Val Leu Thr Pro Pro Met Gly Thr Val Met Asp Val Leu Lys Gly Asp		
500	505	510
Asn Arg Phe Ser Met Leu Val Ala Ala Ile Gln Ser Ala Gly Leu Thr		
515	520	525
Glu Thr Leu Asn Arg Glu Gly Val Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn		
530	535	540

Glu Ala Phe Arg Ala Leu Pro Pro Arg Glu Arg Ser Arg Leu Leu Gly
 545 550 555 560
 Asp Ala Lys Glu Leu Ala Asn Ile Leu Lys Tyr His Ile Gly Asp Glu
 565 570 575
 Ile Leu Val Ser Gly Gly Ile Gly Ala Leu Val Arg Leu Lys Ser Leu
 580 585 590
 Gln Gly Asp Lys Leu Glu Val Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser Val
 595 600 605
 Asn Lys Glu Pro Val Ala Glu Pro Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly Val
 610 615 620
 Val His Val Ile Thr Asn Val Leu Gln Pro Pro Ala Asn Arg Pro Gln
 625 630 635 640
 Glu Arg Gly Asp Glu Leu Ala Asp Ser Ala Leu Glu Ile Phe Lys Gln
 645 650 655
 Ala Ser Ala Phe Ser Arg Ala Ser Gln Arg Ser Val Arg Leu Ala Pro
 660 665 670
 Val Tyr Gln Lys Leu Leu Glu Arg Met Lys His
 675 680