



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0113047
(43) 공개일자 2018년10월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6886 (2018.05)

C12Q 2537/143 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0044237

(22) 출원일자 2017년04월05일

심사청구일자 2017년04월05일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

(72) 발명자

유한옥

서울특별시 강남구 압구정로29길 57, 204동 1002호 (압구정동, 현대아파트)

김구환

서울특별시 중랑구 망우로75길 19, 105동 803호 (망우동, 중랑금리가아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

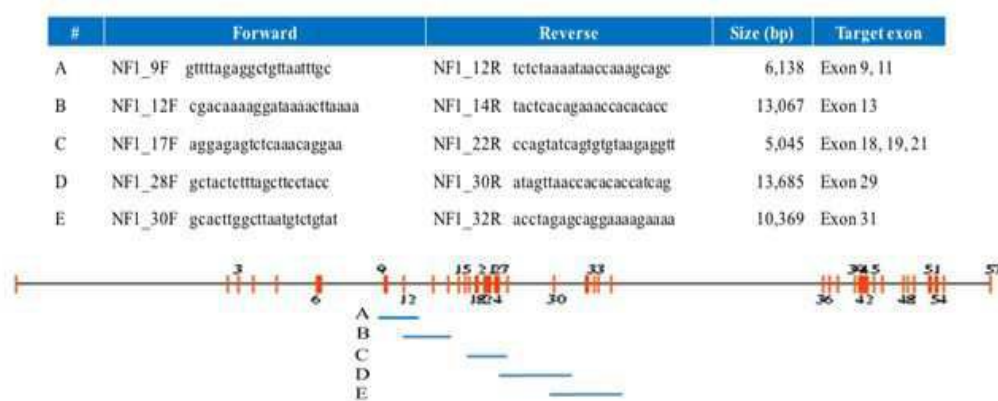
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 게놈 DNA 기반의 장 PCR 프라이머 세트를 포함하는 신경섬유종증 진단용 조성물

(57) 요약

본 발명은 게놈 DNA 기반의 장(long) PCR 프라이머 세트 포함하는 신경섬유종증 진단용 조성물 및 이를 이용한 신경섬유종증 진단방법에 관한 것으로서, 본 발명자들은 게놈 DNA에 기반하되 거짓 상동 염기서열이 동시에 증폭되지 않도록 프라이머를 고안하여, 장 PCR을 한 후 이 절편을 다중 프라이머로 작은 절편으로 재증폭한 후 이 절편들의 염기서열을 분석하였다. 이 게놈 DNA에 기반한 유전자 분석법을 통하여 88명의 환자를 대상으로 94%의 진단률을 확보할 수 있었다. 따라서, 상기 프라이머 세트들은 신경섬유종증 진단에 있어 유용하게 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12Q 2549/119 (2013.01)

C12Q 2600/16 (2013.01)

(72) 발명자

이범희

서울특별시 송파구 올림픽로 525, 104동 1605호 (풍납동, 현대아파트)

김재민

서울특별시 강동구 상암로3길 77, 102동 1204호 (암사동, 삼성광나루아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016M3A9B4915706

부처명 미래부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오원천기술개발사업

연구과제명 희귀유전질환의 새로운 발병기전의 이해를 통한 치료법 발굴 및 임상적 응용성 평가(1)

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2016.06.01 ~ 2017.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 프라이머 세트 및 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시되는 프라이머 세트에 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는 신경섬유종증 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 프라이머 세트는 게놈 DNA 기반의 장(long)-PCR 용 프라이머 세트인 것을 특징으로 하는 신경섬유종증 진단용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 신경섬유종증은 신경섬유종증 1형인 것을 특징으로 하는 신경섬유종증 진단용 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 신경섬유종증 진단 키트.

청구항 5

- (1) 신경섬유종증 환자로부터 분리된 시료를 주형으로 하여, 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 프라이머 세트 및 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시되는 프라이머 세트에 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및
- (2) 상기 PCR 증폭 산물을 염기서열 분석하는 단계를 포함하는 신경섬유종증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 PCR을 수행하는 단계는 상기 PCR 증폭 산물을 주형으로 포획 PCR(nested PCR)을 추가적으로 수행하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 신경섬유종증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 시료는 게놈 DNA인 것을 특징으로 하는 신경섬유종증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 신경섬유종증은 신경섬유종증 1형인 것을 특징으로 하는 신경섬유종증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 게놈 DNA 기반의 장(long) PCR 프라이머 세트 포함하는 신경섬유종증 진단용 조성물 및 이를 이용한 신경섬유종증 진단방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 신경섬유종증 1형 [Neurofibromatosis type I (NF1); OMIM #162220]은 다발성 커피 반점 및 다발성 섬유종이 신체의 다양한 부위에 생기는 유전질환이다. 본 질환은 인구 3천 명당 한 명의 꼴로 발생하는 질환으로 가장 흔한 유전 질환 중 하나이고, 17번 염색체에 존재하는 NF1 유전자의 이형접합자 돌연변이에 의해 발생한다. 그러나 NF1 유전자는 57개의 엑손으로 구성되어 2818 아미노산을 전사하는 매우 큰 유전자이다. 한편 NF1 유전자는 cystein-serine rich domain (CSD), GTPase related domain (GRD), homologous to Saccharomyces protein (Sep14p)와 andadenylated kinase pseudogene (AK3)의 거짓 상동 염기서열(pseudo-homologous sequence) 부위들이 존재하는데, 이 거짓 상동 염기서열은 게놈 DNA의 염기서열을 단순 분석할 경우 NF1 유전자와 같이 증폭되어 유전자 검사 시 오류를 일으킨다(Cell 1990;62:193-201)(도 1). 이 거짓 상동 염기서열은 2번, 12번, 14번, 15번, 18번, 21번, 22번 염색체에 분포되어 있다. CSD는 NF1의 12-16번 엑손, GRD는 21-27번 엑손, Sep14p는 NF1의 27-28번 엑손, AK3는 NF1의 39-41번 엑손과 겹친다. 따라서, 현재까지 게놈 DNA를 이용한 분석으로는 진단률이 61% 밖에 이르지 못하고 있다 (Friedman JM. Neurofibromatosis 1. 1998 Oct 2 [Updated 2014 Sep 4]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. GeneReviews® [Internet]). 한편 RNA를 이용한 상보적 DNA (complementary DNA)를 이용하면 거짓 상동 염기서열을 배제할 수 있어 유전 검사의 정확성을 높힐 수 있다. 이 상보적 DNA의 염기서열 분석과 엑손 결실을 진단하기 위한 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 분석법을 통하여 돌연변이 진단률이 95%에 이르는 것으로 알려져 있다. 따라서, 현재 NF1의 유전자 진단법은 상보적 DNA에 기반한 유전진단법을 시행할 것을 권유하고 있다(GeneReviews®). 그러나, 상보적 유전자 진단을 위해서는 환자에서 채혈 후 신선한 혈액에서 RNA를 뽑아야 하는 시간적 제한점이 있으며, RNA 분리 과정에서 오염을 방지하기 위한 주의가 필요하다. 또한 NF1 유전자의 RNA는 다양한 대체 유전자 접합(alternate splicing)이 발생하여 유전자 검사에 혼돈을 일으킬 수 있어, 상대적으로 높은 실패율을 보일 수 있다. 따라서, 많은 검체를 단기간에 처리해야 하는 검사실에서 노동과 시간 집약적인 상보적 DNA에 기반한 유전자 검사법은 일반 검사로 진행하기에 많은 제한점을 내포한다. 따라서 게놈 DNA에 기반한 좀 더 실용화할 수 있는 유전자 진단법 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0003] (특허문헌 0001) 미국공개특허 US 2003-0134272 (2003.07.17 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 게놈 DNA 기반의 장(long) PCR 프라이머 세트 포함하는 신경섬유종증 진단용 조성물 및 이를 이용한 신경섬유종증 진단방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0005] 상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 프라이머 세트 및 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시되는 프라이머 세트에 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는 신경섬유종증 진단용 조성물을 제공한다.

[0006] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 신경섬유종증 진단 키트를 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 (1) 신경섬유종증 환자로부터 분리된 게놈 DNA 시료를 주형으로 하여, 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 프라이머 세트 및 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시되는 프라이머 세트에 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및 (2) 상기 PCR 증폭 산물을 염기서열 분석하는 단계를 포함하는 신경섬유종증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명은 게놈 DNA 기반의 장(long) PCR 프라이머 세트 포함하는 신경섬유종증 진단용 조성물 및 이를 이용한 신경섬유종증 진단방법에 관한 것으로서, 본 발명자들은 게놈 DNA에 기반하되 거짓 상동 염기서열이 동시에 증폭되지 않도록 프라이머를 고안하여, 장 PCR을 한 후 이 절편을 다중 프라이머로 작은 절편으로 재증폭한 후 이 절편들의 염기서열을 분석하였다. 이 게놈 DNA에 기반한 유전자 분석법을 통하여 88명의 환자를 대상으로 94%의 진단률을 확보할 수 있었다. 따라서, 상기 프라이머 세트들은 신경섬유종증 진단에 있어 유용하게 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 NF1 유전자의 게놈 지도를 나타낸다. cystein-serine rich domain (CSD), GTPase related domain (GRD), homologous to Saccharomyces protein (Sep14p) 및 andadenylated kinase pseudogene (AK3)

도 2는 거짓 상동 염기서열 부위의 증폭을 피하기 위하여 디자인한 5종의 프라이머 세트를 나타낸다.

도 3은 게놈 DNA에서 장 PCR을 통한 유전자 진단의 실패를 나타낸다(환자 1).

도 4는 게놈 DNA에서 장 PCR을 통한 유전자 진단의 실패를 나타낸다(환자 2).

도 5는 게놈 DNA의 장 PCR 방법을 통해 발견된 NF1 유전자 돌연변이를 상보적 DNA 염기서열분석을 통해 검증한 실패를 나타낸다(IVS29-2A>G).

도 6은 게놈 DNA의 장 PCR 방법을 통해 발견된 NF1 유전자 돌연변이를 상보적 DNA 염기서열분석을 통해 검증한 실패를 나타낸다(엑손 29번과 엑손 30번 사이에 GTTAGA의 염기가 비정상적으로 삽입).

도 7은 게놈 DNA의 장 PCR 방법을 통해 발견된 NF1 유전자 돌연변이를 상보적 DNA 염기서열분석을 통해 검증한 실패를 나타낸다(6037 염기의 중복).

도 8은 게놈 DNA 장 PCR을 통해서 유전진단된 131명의 결과, 발견된 돌연변이의 분포 양상을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 프라이머 세트 및 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시되는 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는 신경섬유종증 진단용 조성물을 제공한다.

[0011] 바람직하게는, 상기 프라이머 세트는 게놈 DNA 기반의 장(long)-PCR 용 프라이머 세트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0012] 바람직하게는, 상기 신경섬유종증은 신경섬유종증 1형일 수 있다.

[0013] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 짧은 자유 3'-말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 짧은 핵산 서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머라제 또는 역전사효소) 및 상이한 4 가지의 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.

[0014] 본 발명에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)를 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)를 포함할 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 신경섬유종증 진단 키트를 제공한다.

[0016] 본 발명의 키트에는 상기의 프라이머 세트 이외에, PCR 키트에 포함되는 통상적인 구성성분을 포함할 수 있다. 상기 키트에 포함되는 통상적인 구성성분은 반응원충액, 중합효소, dNTP(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP) 및 Mg²⁺와 같은 조인자 등일 수 있다. 다양한 DNA 중합효소가 본 발명의 증폭 단계에 이용될 수 있으며, E. coli DNA 중합효소 I의 클레나우 단편, 열안정성 DNA 중합효소 및 박테리오파아지 T7 DNA 중합효소를 포함한다. 바람직하게는, 중합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 열안정성 DNA 중합효소이다. 상기 중합효소 대부분은 박테리아 그 자체로부터 분리될 수 있고 또는 상업적으로 구입할 수 있다.

- [0017] 또한, PCR이란 중합효소를 이용하여 표적 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트로부터 표적 핵산을 증폭하는 방법이다. 이러한 PCR 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 상업적으로 이용가능한 키트를 이용할 수도 있다.
- [0018] 또한, 본 발명은 (1) 신경섬유종증 환자로부터 분리된 시료를 주형으로 하여, 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 프라이머 세트 및 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시되는 프라이머 세트에 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및 (2) 상기 PCR 증폭 산물을 염기서열 분석하는 단계를 포함하는 신경섬유종증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0019] 상세하게는, 상기 PCR을 수행하는 단계는 상기 PCR 증폭 산물을 주형으로 포획 PCR(nested PCR)을 추가적으로 수행하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0020] 바람직하게는, 상기 시료는 게놈 DNA일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 바람직하게는, 바람직하게는, 상기 신경섬유종증은 신경섬유종증 1형일 수 있다.
- [0022] 상기 분리된 게놈 DNA 시료는 대상의 혈액, 피부세포, 점막 세포 및 모발 등 모든 세포로부터 분리될 수 있다. 해당 세포로부터 DNA를 추출하는 방법은 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 기술 또는 시판되고 있는 DNA 추출용 키트를 사용할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 방법은 상기 증폭 산물을 분석하는 단계를 포함한다. 상기 증폭 산물의 검출은 모세관 전기영동, DNA 칩, 젤 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있다. 증폭 산물을 검출하는 방법 중의 하나로서, 모세관 전기영동을 수행할 수 있다. 모세관 전기영동은 예를 들면, ABI Sequencer를 이용할 수 있다. 또한, 젤 전기영동을 수행할 수 있으며, 젤 전기영동은 증폭 산물의 크기에 따라 아가로스 젤 전기영동 또는 아크릴아미드 젤 전기영동을 이용할 수 있다. 또한, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출 가능한 형광 표지 물질로 표지되며, 이렇게 표지된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다. 또한, 방사성 측정 방법은 PCR 수행 시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하여 증폭 산물을 표지한 후, 방사성 측정기구, 예를 들면, 가이거 계수기(Geiger counter) 또는 액체섬광계수기(liquid scintillation counter)를 이용하여 방사성을 측정할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 방법은 염기 서열 분석이 수행될 수 있다. 서열분석은 당업계에 공지된 방법을 모두 이용할 수 있으며, 구체적으로는 이에 제한되는 것은 아니나, 자동염기서열분석기를 사용하거나, 파이로시퀀싱(pyrosequencing), PCR-RELP법(restriction fragment length polymorphism), PCRSSCP법(single strand conformation polymorphism), PCR-SSO법(specific sequence oligonucleotide), PCR-SSO법과 도트 하이브리드화법을 조합한 ASO(allele specific oligonucleotide) 하이브리드화법, TaqMan-PCR법, MALDI-TOF/MS법, RCA법(rolling circle amplification), HRM(high resolution melting)법, 프라이머 신장법, 서던 블롯 하이브리드화법 및 도트 하이브리드화법 등의 공지의 방법 중 선택된 어느 하나 이상을 사용할 수 있다.
- [0025] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0026] 하기의 실험예는 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.
- [0027] <실험예>
- [0028] 1. 장-중합효소연쇄반응(Long-PCR) 조건
- [0029] 주형으로 사용되는 게놈 DNA 50ng에, 정방향과 역방향의 개시체를 각각 5 pmole 농도로 추가하고, 중합효소 GoTaq® long PCR master (Promega, USA)를 포함하여 전체 용량을 10 μl 로 반응 용액을 만든다. 중합효소연쇄반응기기 Thermocycler (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여, 95℃에서 5분간 전-변성을 한 후에 95℃에서 30초 동안 변성시키고, 60℃에서 30초간 교잡반응을 거친 후, 그리고 68℃에서 13분 동안 신장반응을 한다. 이것을 1번의 cycle로 하여 30번 cycle을 반복한 후 마지막 신장반응으로 72℃에서 5분 동안 반응하여 중합효소연쇄반응 생성물을 얻는다.
- [0030] 거짓 상동 염기서열이 동시에 증폭되지 않도록 고안하여, 장(long)-PCR에 사용된 프라이머 세트는 표 1 및 도 2

에 나타냈다.

표 1

#	포워드	리버스	크기(bp)	표적 엑손
A	NF1_9F gtttttagaggctgttaatttgc (서열번호 1)	NF1_12R tctctaaaataaccaaagcagc (서열번호 2)	6,138	엑손 9, 11
B	NF1_12F cgacaaaaggataaaaacttaaaa (서열번호 3)	NF1_14R tactcacagaaccacacacc (서열번호 4)	13,067	엑손 13
C	NF1_17F aggagagtctcaaacaggaa (서열번호 5)	NF1_22R ccagtatcagtgtgtaagaggtt (서열번호 6)	5,045	엑손 18, 19, 21
D	NF1_28F gtactcttttagcttctacc (서열번호 7)	NF1_30R atagttaccacacaccatcag (서열번호 8)	13,685	엑손 29
E	NF1_30F gcacttggttaattgtctgtat (서열번호 9)	NF1_32R acctagagcaggaaaagaaaa (서열번호 10)	10,369	엑손 31

2. 포획중합효소연쇄반응(nested PCR) 조건

장-중합효소연쇄반응으로 얻어진 생성물을 사용하여 각 해당되는 엑손의 개시체를 사용하여 포획중합효소연쇄반응(nested PCR)을 수행한다. 포획중합효소연쇄반응의 조건은 장중합효소연쇄반응 생성물의 1/20을 주형으로 사용하고, 5 pmole의 정방향 역방향 개시체, 중합효소 GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, USA)를 포함하여 전체 용량을 10 μ l를 만들어 중합효소연쇄반응기기 Thermocycler에서 전-변성 95℃에서 5분을 한 후에 95℃에서 30초 동안 변성, 60℃에서 30초간 교잡, 그리고 72℃에서 45초 동안 신장 반응을 하고, 이것을 30 cycles 반복한 후 마지막 신장반응으로 72℃에서 5분동안 반응한다.

포획중합효소연쇄반응(nested PCR)에 사용된 프라이머 세트는 표 2에 나타냈다.

표 2

NF1_9F&R (359bp)- Sequence상에서 pseudogene sequence가 함께 나타나는 엑손	
LEFT PRIMER	gttttagaggctgttaatttgc (서열번호 1)
RIGHT PRIMER	aatgtagcaattatctttgaca (서열번호 11)
NF1_10F&R (331bp)	
LEFT PRIMER	gattttactgccatttgtgtg (서열번호 12)
RIGHT PRIMER	gaaataccgataaaagtgaacc (서열번호 13)
NF1_11F&R (280bp)- UCSC in silico PCR 상에서 chr.18 pseudogene 증폭	
LEFT PRIMER	tttttaaactttctatttgcgtt (서열번호 14)
RIGHT PRIMER	attcagaacctttttgaaaacc (서열번호 15)
NF1_12F&R (325bp)	
LEFT PRIMER	cgacaaaaggataaaaacttaaaa (서열번호 3)
RIGHT PRIMER	tctctaaaataaccaaagcagc (서열번호 2)
NF1_13F&R (295bp)- Sequence상에서 pseudogene sequence가 함께 나타나는 엑손	
LEFT PRIMER	ttttaaaagggttgatagctattat (서열번호 16)
RIGHT PRIMER	agctaaaaattatcctcaaggctt (서열번호 17)
NF1_14F&R (284bp)	
LEFT PRIMER	tcactgtctatttcttctcct (서열번호 18)
RIGHT PRIMER	tactcacagaaccacacacc (서열번호 4)
NF1_17F&R (320bp)	
LEFT PRIMER	aggagagtctcaaacaggaa (서열번호 5)
RIGHT PRIMER	ttaccaaatttcattcagaaaa (서열번호 19)
NF1_18F&R (402bp)- Sequence상에서 pseudogene sequence가 함께 나타나는 엑손	
LEFT PRIMER	acacacagtttattgcattgtt (서열번호 20)
RIGHT PRIMER	tacattctcaaaatcagatgcc (서열번호 21)

NF1_19F&R (286bp)- Sequence상에서 pseudogene sequence가 함께 나타나는 엑손	
LEFT PRIMER	atttgctctgctcttctact (서열번호 22)
RIGHT PRIMER	atcttggatttacttcaaaagc (서열번호 23)
NF1_20F&R (274bp)	
LEFT PRIMER	gaaacttggctgtagctgatt (서열번호 24)
RIGHT PRIMER	cagcttccacacagctatattt (서열번호 25)
NF1_21-1F&R (350bp)- Sequence상에서 pseudogene sequence가 함께 나타나는 엑손	
LEFT PRIMER	tttgctctttgtcatggaaga (서열번호 26)
RIGHT PRIMER	tttcctctgaagacatcac (서열번호 27)
NF1_21-2F&R (382bp)- Sequence상에서 pseudogene sequence가 함께 나타나는 엑손	
LEFT PRIMER	ctccagcagagaagcaattc (서열번호 28)
RIGHT PRIMER	atttaataatctgaaagaaaagg (서열번호 29)
NF1_22F&R (300bp)	
LEFT PRIMER	tgtgttttagatcagtcagtttca (서열번호 30)
RIGHT PRIMER	ccagtatcagtggtgaagaggtt (서열번호 6)
NF1_28F&R (332bp)	
LEFT PRIMER	gctactcttttagcttctacc (서열번호 7)
RIGHT PRIMER	accttaaaagaagacaatcagc (서열번호 31)
NF1_29F&R (282bp)- Sequence상에서 pseudogene sequence가 함께 나타나는 엑손	
LEFT PRIMER	gctgattgtcttcttttaaggt (서열번호 32)
RIGHT PRIMER	ttaatgatcaaggggagaag (서열번호 33)
NF1_30F&R (338bp)	
LEFT PRIMER	gcacttggcttaattgtctgtat (서열번호 9)
RIGHT PRIMER	atagttaaccacacacatcag (서열번호 8)
NF1_31 F&R (308bp)	
LEFT PRIMER	cctttgaactctttgttttcat (서열번호 34)
RIGHT PRIMER	ggaagtactgtaagaaagctga (서열번호 35)
NF1_32 F&R (354bp)	
LEFT PRIMER	gaggaatgtttgatttttaagt (서열번호 36)
RIGHT PRIMER	acctagagcaggaagaaagaaa (서열번호 10)

[0036] 3. 돌연변이 검증

[0037] 포획증합효소연쇄반응 방법 등으로 통해 게놈 DNA에서 확인된 돌연변이를 검증하기 위하여, 같은 환자의 말초혈액에서 RNA 분리시약, PAXgene Blood RNA Kit (Qiagen/BD company)을 사용하여 Total RNA를 추출한다. 추출된 RNA로부터 상보적 DNA를 합성하기 위하여, 역전사 증합효소연쇄반응 AMV reverse transcriptase (Promega, USA)를 1ug의 total RNA를 주형으로 하여, 4ul의 25mM MgCl₂, 2ul의 10mM dNTP 용액, 0.5ug의 oligo (dT)15를 첨가하여 최종용적 20ul로 하여 42℃에서 15분~60분간 반응시켜 상보적 DNA를 합성한다.

[0038] 합성된 상보적 DNA 1ul를 이용하여 NF1 유전자의 mRNA 염기서열에 적합하게 고안된 개시체를 이용하여 증합효소연쇄반응으로 NF1 상보적 DNA에 대한 산물을 얻고, 이를 염기서열 분석하여 돌연변이를 확인한다. 상보적 DNA에서 확인된 돌연변이를 동일한 대상자의 게놈 DNA에서 확인한 돌연변이와 비교하여 일치 여부를 확인한다.

[0039] 돌연변이 검증을 위해 사용된 프라이머 세트는 표 3에 나타났다.

표 3

cNF1_1 F&R (530bp)	
LEFT PRIMER	tcctcacctcagcctcc (서열번호 37)
RIGHT PRIMER	agctgagagaaaataaaacccc (서열번호 38)
cNF1_2 F&R (503bp)	
LEFT PRIMER	aaatctgccattttcttcacac (서열번호 39)
RIGHT PRIMER	atcctggattatttctggacac (서열번호 40)
cNF1_3 F&R (505bp)	
LEFT PRIMER	gacttgggtggatggttttg (서열번호 41)
RIGHT PRIMER	gatgattcgatggagtgaattt (서열번호 42)
cNF1_4 F&R (513bp)	
LEFT PRIMER	ggctcagaattcaccttctac (서열번호 43)

RIGHT PRIMER	tttctacaggagcatcaggatt (서열번호 44)
cNF1_5 F&R (511bp)	
LEFT PRIMER	agtcacacatgccagagattg (서열번호 45)
RIGHT PRIMER	accagaacagcttcagtgtca (서열번호 46)
cNF1_6 F&R (505bp)	
LEFT PRIMER	aagcccagaccaaaactagaagt (서열번호 47)
RIGHT PRIMER	actcctccaagggcacaaa (서열번호 48)
cNF1_7 F&R (527bp)	
LEFT PRIMER	ttgttaagaggcgaatgtcc (서열번호 49)
RIGHT PRIMER	ctagcttgccctagatgttcag (서열번호 50)
cNF1_8 F&R (501bp)	
LEFT PRIMER	tcaattttagaacaacacatagc (서열번호 51)
RIGHT PRIMER	gcactttcatcttcaacttact (서열번호 52)
cNF1_9 F&R (503bp)	
LEFT PRIMER	gatggaagccaaatcacagtta (서열번호 53)
RIGHT PRIMER	tagaaaacatgttcagagcag (서열번호 54)
cNF1_10 F&R (523bp)	
LEFT PRIMER	gttctcagtgggatgaactagc (서열번호 55)
RIGHT PRIMER	tctaaaaatccctgcttcatacg (서열번호 56)
cNF1_11 F&R (515bp)	
LEFT PRIMER	gtttccctcagaacagcatc (서열번호 57)
RIGHT PRIMER	tgaactggtaaggttaaggctg (서열번호 58)
cNF1_12 F&R (528bp)	
LEFT PRIMER	gaccttttgataagatggcaac (서열번호 59)
RIGHT PRIMER	ctatgaaaacaagccttttgct (서열번호 60)
cNF1_13 F&R (533bp)	
LEFT PRIMER	acgtctccgcagctctatatct (서열번호 61)
RIGHT PRIMER	acatcttttgccgaatctt (서열번호 62)
cNF1_14 F&R (521bp)	
LEFT PRIMER	gtgaagccattgtccagtctat (서열번호 63)
RIGHT PRIMER	tgggtacatctgtttttcattg (서열번호 64)
cNF1_15 F&R (532bp)	
LEFT PRIMER	tggctgtcaaactctagttcgt (서열번호 65)
RIGHT PRIMER	attaatgaccagtcctatgtgtg (서열번호 66)
c.NF1_16 F&R (505bp)	
LEFT PRIMER	agctcatcttcctacctcttc (서열번호 67)
RIGHT PRIMER	ctttatctgcccagagacact (서열번호 68)
cNF1_17 F&R (511bp)	
LEFT PRIMER	tagtcaaagatttgcatc (서열번호 69)
RIGHT PRIMER	aaggatgcctgtaccctttta (서열번호 70)
cNF1_18 F&R (514bp)	
LEFT PRIMER	ggatcattttgttgactcaat (서열번호 71)
RIGHT PRIMER	atcaaaacttttcttgttcca (서열번호 72)
cNF1_19 F&R (502bp)	
LEFT PRIMER	gagccaggaaatccatgag (서열번호 73)
RIGHT PRIMER	attccatggattggatttaaca (서열번호 74)
cNF1_20 F&R (386bp)	
LEFT PRIMER	tgtgcataatttgttgactc (서열번호 75)
RIGHT PRIMER	tgaggtcatggaattagaaagg (서열번호 76)
cNF1_21 F&R (381bp)	
LEFT PRIMER	ctgactcccacatctccttacc (서열번호 77)
RIGHT PRIMER	cggatgggttcattataaaaca (서열번호 78)

[0041] <실시예>

[0042] 계놈 DNA에 기반하되 거짓 상동 염기서열이 동시에 증폭되지 않도록 프라이머를 고안하여, 장(long) PCR을 한 후, 이 절편을 다중 프라이머로 작은 절편으로 재증폭한 후 이 절편들의 염기서열을 분석하였다.

- [0043] 거짓 상동 염기서열이 동시에 증폭되지 않도록, 표 1의 프라이머를 고안하였다(NF1_9F + NF1_12R, NF1_12F + NF1_14R, NF1_17F + NF1_22R, NF1_28F + NF1_30R, NF1_30F + NF1_32R). 엑손 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 28, 29 및 30에 거짓 상동 염기서열이 존재한다.
- [0044] 이후 증폭된 게놈 DNA 절편에 대하여 각각 엑손 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하고 분석하였다.
- [0045] **1. 게놈 DNA에서 장 PCR을 통한 유전자 진단의 실패**
- [0046] 환자 1의 경우, 일반적 PCR 방법으로 엑손 18번에서 거짓 상동 염기서열이 증폭되어, 도 3에 나타난 붉은 화살표와 같은 거짓 염기서열이 증폭된다. 그러나 게놈 DNA에 기반한 장 PCR을 이용한 염기서열 상에서는 거짓 염기서열이 증폭되지 않으면서, NF1 유전자의 엑손 18번에서 c.2072T>C (p.Leu691Pro) 돌연변이가 발견되었다(청색 화살표)(도 3).
- [0047] 환자 2의 경우, 상보적 DNA 검사로 엑손 20번의 결실이 발견된 환자에서 장PCR 방법을 이용한 게놈 디엔에이 검사를 통해 엑손 20번 및 인트론 20번의 경계의 첫째 염기 G가 A로 치환됨을 발견하였다(도 4).
- [0048] **2. 게놈 DNA의 장 PCR 방법을 통해 발견된 NF1 유전자 돌연변이를 상보적 DNA 염기서열분석을 통해 검증한 실패**
- [0049] 게놈 DNA 분석에서 IVS29-2A>G의 이전에 발견되지 않았던 돌연변이를 발굴하였고(도 5), 상보적 DNA에서 엑손 29번과 엑손 30번 사이에 GTTAGA의 염기가 비정상적으로 삽입됨을 확인하였다(도 6).
- [0050] 또한, 게놈 DNA 분석을 통해서 이전에 보고된 바 없던 6037 염기의 중복을 발견하였고, 상보적 DNA 분석을 통해서 같은 부위인 6037 염기의 중복이 있음을 검증하였다(도 7).
- [0051] 한편, 2017년 1월까지 게놈 DNA 장 PCR을 통해서 유전진단된 131명의 결과, 이전에 보고된 적 없는 돌연변이로 총 64개의 새로운 돌연변이를 발견할 수 있었다. 상기 돌연변이의 분포 양상은 도 8과 같다.
- [0052] 또한, 2017년 1월까지 검사한 총 156명에 대한 유전자 검사 양성률은 표 4와 같다.

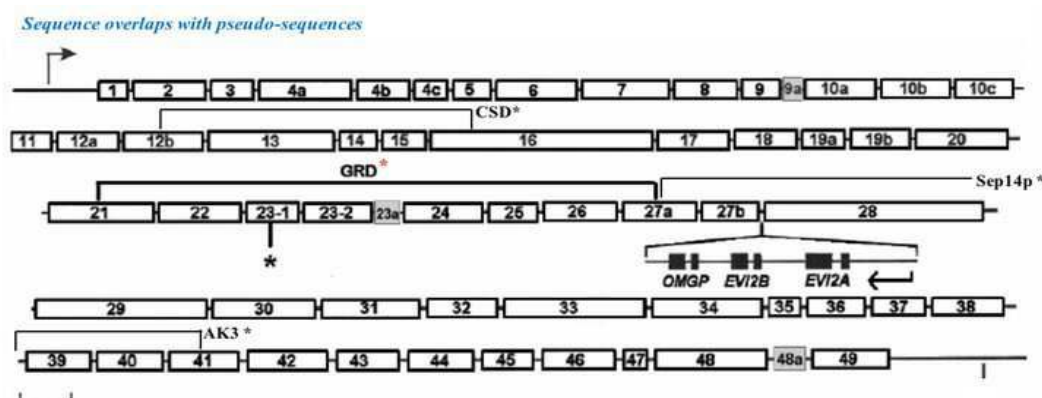
표 4

게놈 DNA 장PCR 분석	127명 (84%)
MLPA	9명 (6%)

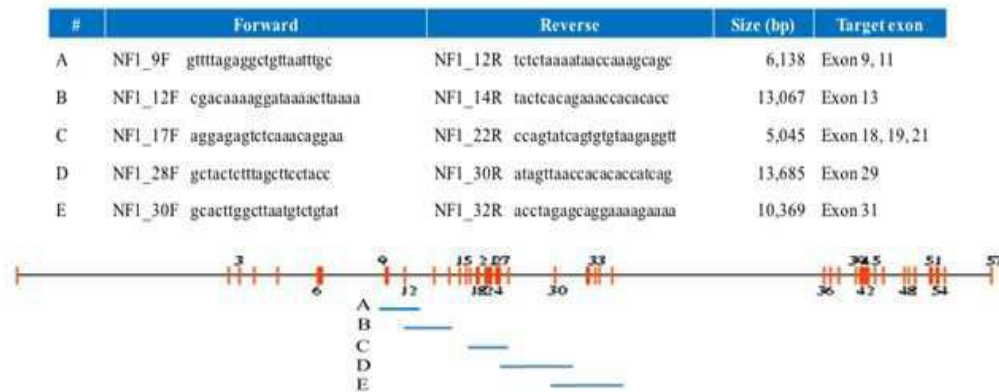
- [0054] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

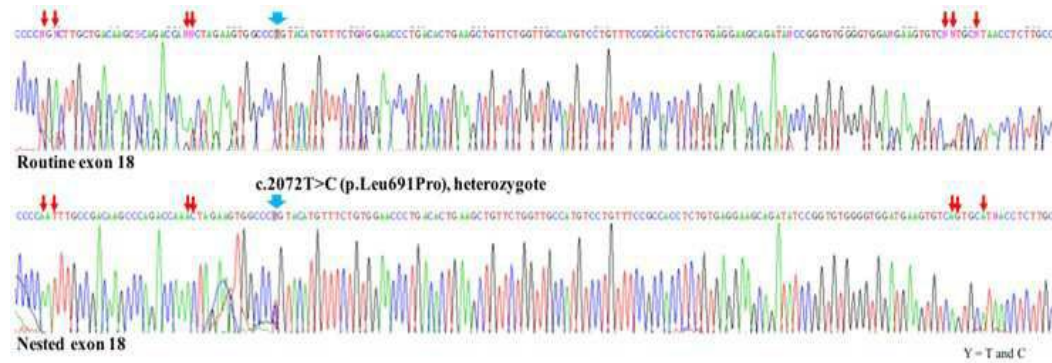
도면1



도면2

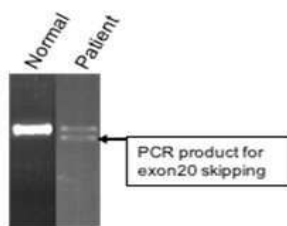


도면3

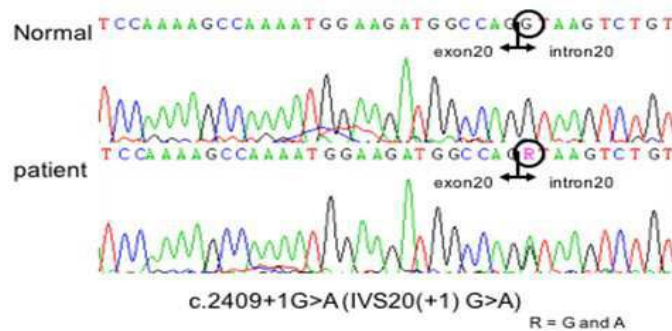


도면4

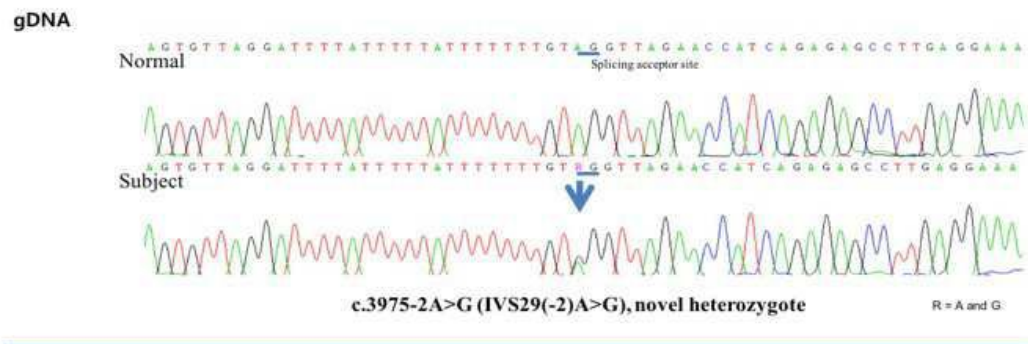
• cDNA PCR product



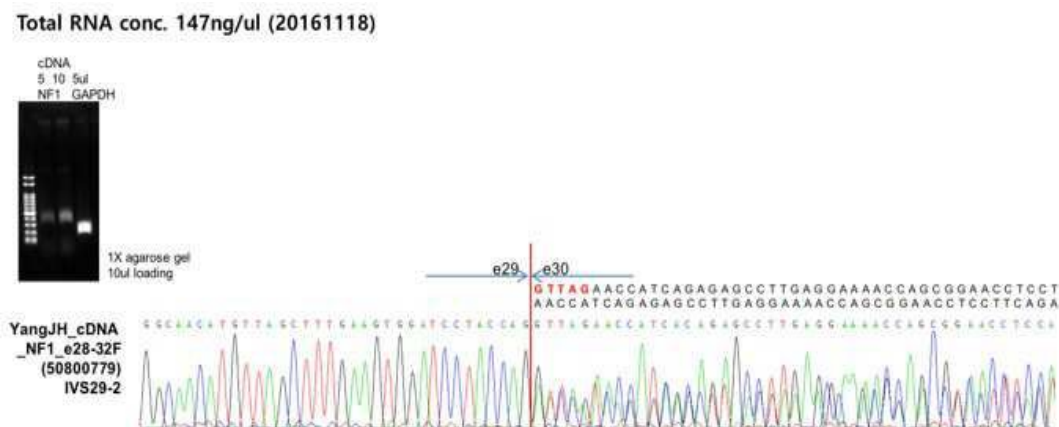
• Partial genomic seq. of NF1 gene



도면5

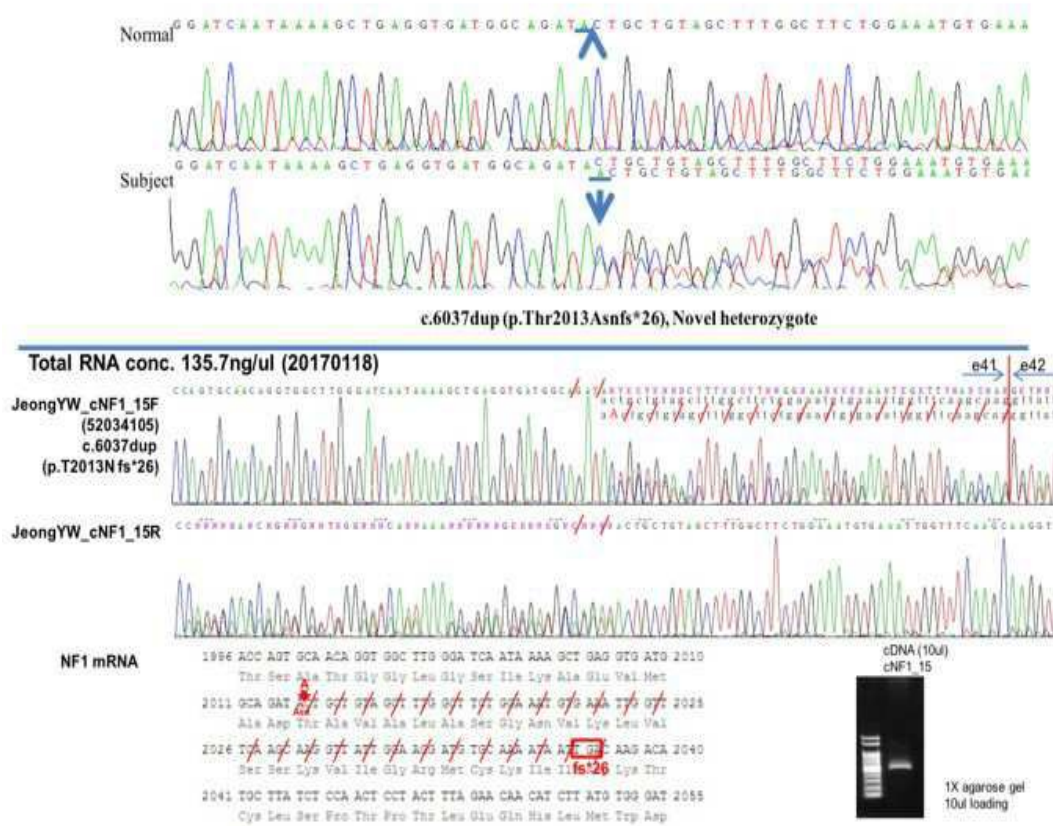


도면6

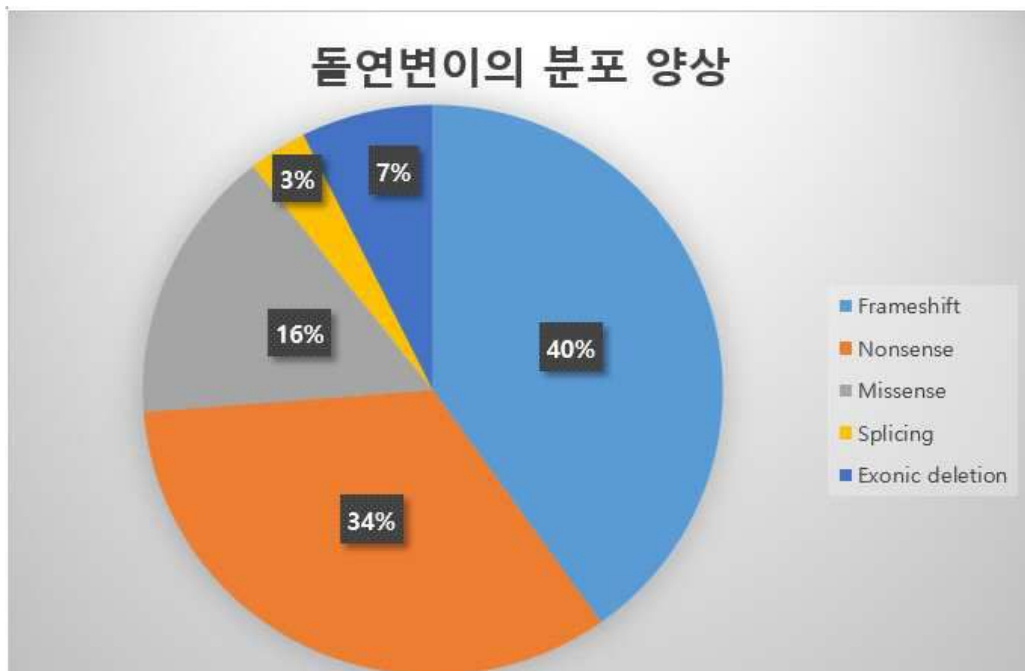


도면7

c. 6037dup (p.T2013N fs*26)



도면8



서열 목록

<110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

THE ASAN FOUNDATION

<120> Composition for diagnosis of neurofibromatosis comprising long
PCR primer set based on genomic DNA

<130> ADP-2017-0040

<160> 78

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

gttttagagg ctgttaattt gc 22

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

tctctaaaat aaccaaagca gc 22

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

cgacaaaagg ataaaactta aaa 23

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

tactcacaga aaccacacac c	21
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 5	
aggagagtct caaacaggaa	20
<210> 6	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 6	
ccagtatcag tgtgtaagag gtt	23
<210> 7	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 7	
gctactcttt agcttcctac c	21
<210> 8	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 8	
atagttaacc acacaccatc ag	22
<210> 9	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> primer
 <400> 9
 gcacttggct taatgtctgt at 22
 <210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 10
 acctagagca ggaaaagaaa a 21
 <210> 11
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 11
 aatgttagca attatctttg aca 23
 <210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 12
 gatattactg ccatttgtgt g 21
 <210> 13
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 13
 gaaataccga taaaagtga cc 22
 <210> 14
 <211> 24

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 14
 tttttaaact ttctatttgc tggt 24
 <210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 15
 attcagaacc tttttgaaaa cc 22
 <210> 16
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 16
 tttttaaagg ttggatagct attat 25

 <210> 17
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 17
 agctaaaaat tatcctcaag gtct 24
 <210> 18
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 18
 tcactgtcta tttcttcctc ct 22
 <210> 19

<211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 19
 ttaccaaatt tcattcagaa aa 22

<210> 20
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 20
 acacacagtt tattgcattg tt 22

<210> 21
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 21
 tacattctca aaatcagatg cc 22

<210> 22
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 22
 atttgctctg ctcttctac t 21

<210> 23
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 23

atcttggatt tacttcaaaa gc	22
<210> 24	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 24	
gaaacttggc ttagctgat t	21
<210> 25	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 25	
cagtcttcac acagctatat gtt	23
<210> 26	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 26	
tttgtacttt tgcacatgaa ga	22
<210> 27	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 27	
tttcctctg aagacatcac	20
<210> 28	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	

<400>	28	
ctccagcaga gaagcaattc		20
<210>	29	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	29	
atttaaataa tctgaaagaa aaagg		25
<210>	30	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	30	
tgtgtttaga tcagtcagtt tca		23
<210>	31	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	31	
accttaaaag aagacaatca gc		22
<210>	32	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	32	
gctgattgtc ttcttttaag gt		22
<210>	33	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	33	
ttaatgatca aggggagaag		20
<210>	34	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	34	
cctttgaact cttgttttc at		22
<210>	35	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	35	
ggaagtactg taagaaaagc tga		23
<210>	36	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	36	
gaggaatgtt tgatttttaa gt		22
<210>	37	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	37	
tcctcacct cagcctcc		18
<210>	38	

<211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 38
 agctgagaga aaataaaacc cc 22
 <210> 39
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 39
 aaatctgcca tttcttcac ac 22
 <210> 40
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 40
 atcctggatt atttctggac ac 22

 <210> 41
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 41
 gacttggtgg atggttttg 19
 <210> 42
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 42
 gatgattcga tggagtgaat tt 22

<210> 43
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 43
 ggctcagaat tcaccttcta c 21

<210> 44
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 44
 tttctacagg agcatcagga tt 22

<210> 45
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 45
 agtcacacat gccagagatt g 21

<210> 46
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 46
 accagaacag cttcagtgta a 21

<210> 47
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer

<400>	47	
aagcccagac caaactagaa gt		22
<210>	48	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	48	
actcctccaa gggcacaaa		19
<210>	49	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	49	
ttgttaagag gcgaatgtcc		20
<210>	50	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	50	
ctagcttgcc ctagatgttc ag		22
<210>	51	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	51	
tcaatttgta gaacaaacca tagc		24
<210>	52	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> primer
 <400> 52
 gcactttcat cttcaacttc act 23

<210> 53
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 53
 gatggaagcc aaatcacagt ta 22

<210> 54
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 54
 tagaaaacat gttccagagc ag 22

<210> 55
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 55
 gttctcagtg ggatgaacta gc 22

<210> 56
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 56
 tctaaaatcc ctgcttcata cg 22

<210> 57
 <211> 20

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	57	
	gtttccctca gaacagcatc	20
<210>	58	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	58	
	tgaactggta aggttaagc tg	22
<210>	59	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	59	
	gaccttttga taagatggca ac	22
<210>	60	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	60	
	ctatgaaaac aagccttttg ct	22
<210>	61	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	61	
	acgtctccgc agtctatac t	21

<210>	62	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	62	
	acatcttttg gccgaatctt	20
<210>	63	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	63	
	gtgaagccat tgtccagtct at	22
<210>	64	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	64	
	tgggtacatc tgtttttcat tg	22
<210>	65	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	65	
	tggctgtcaa atctagttcg t	21
<210>	66	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	66	

attaatgacc agtccatgtg tg	22
<210> 67	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 67	
agctcatctt ccctacctct tc	22
<210> 68	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 68	
ctttatctgc ccatgagaca ct	22
<210> 69	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 69	
tagctcaaag atttgcattc c	21
<210> 70	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 70	
aaggatgcct gtaccctttt a	21
<210> 71	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> primer
 <400> 71
 ggatcatttt gttggactca at 22
 <210> 72
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 72
 atcaaaactt ttccttggtc ca 22
 <210> 73
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 73
 gagccaggaa atccatgag 19
 <210> 74
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 74
 attccatgga ttggatttaa ca 22
 <210> 75
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 75
 tgtgcataat ttgttggtgact c 21
 <210> 76
 <211> 22
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 76

tgaggatcatg gaattagaaa gg

22

<210> 77

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 77

ctgactccca catctcctta cc

22

<210> 78

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 78

cggatgggtt cattataaaa ca

22