



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0106040
(43) 공개일자 2016년09월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2013.01)
C12Q 2527/143 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7006476
(22) 출원일자(국제) 2014년08월07일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2016년03월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/050076
(87) 국제공개번호 WO 2015/023503
국제공개일자 2015년02월19일
(30) 우선권주장
61/865,755 2013년08월14일 미국(US)

(71) 출원인
쿼아젠 맨스필드, 인코퍼레이티드
미국, 메사추세츠 02048, 맨스필드, 포베스 블레
바드 171, 스위트 1000
(72) 발명자
놀링 조크
미국 메사추세츠주 01747 호프데일 더치 스트리트
194
디바카르 키란 마다나할리
미국 메사추세츠주 01545 슈르즈베리 머큐리 درا
이브 27
(74) 대리인
문두현

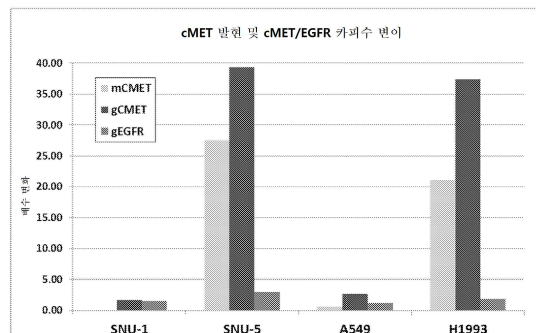
전체 청구항 수 : 총 54 항

(54) 발명의 명칭 cMET 핵산의 멀티모달 분석을 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

cMET 변경(예를 들어, 카피수 및 발현 수준의 변이, 및/또는 점 돌연변이를 포함한 돌연변이의 존재)의 검출과 관련되어 있는 방법 및 검정이 본 명세서에 기재되어 있다. 기존의 방법들은, 예를 들어 제한된 감도, 실험실간 불일치(inter-lab discordance), 또는 필요한 멀티플렉스 능력(multiplex ability)의 제공 불가능에 의해 그들의 임상적 유용성에 있어서 제한된다. 본 명세서에 제공된 방법 및 검정은 환자의 더 신속하고 더 비용-효과적인 검사 및 스크리닝을 위한 멀티모달 멀티플렉스 검정(multimodal, multiplex assaying)을 가능하게 하여 개선된 건강관리(healthcare)를 가능하게 한다.

대표도 - 도6



기준 유전자 SOD1/SPG21에 대해 데이터를 정규화하고 배수 변화로 표현하였음
SNU-5 및 H1993은 cMET의 유의한 증폭 및 과발현을 보여줌
EGFR의 증폭/과발현은 없음

(52) CPC특허분류

C12Q 2600/156 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

cMET 변형을 검출하기 위한 검정으로서,

핵산 샘플의 일부분을 두 세트의 프라이머들과 접촉시키는 단계로서, 제1 세트의 프라이머들은 cMET 유전자 카피수 변이의 변형을 검출하고, 제2 세트의 프라이머들은 cMET 유전자 발현 수준의 변화를 검출하며, 여기서

cMET 유전자 카피수 변이를 검출하기 위해 제1 세트의 프라이머들은 cMET의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열 및 적어도 둘의 기준 유전자들 각각의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하며, 여기서 하나의 기준 유전자는 염색체 7 상에 위치되고 하나의 기준 유전자는 염색체 7 상에 위치되지 않고,

제2 세트의 프라이머들은 cMET의 mRNA-특이적 서열 및 적어도 둘의 기준 유전자들의 mRNA-특이적 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하는 것인 단계;

샘플의 일부분 및 두 세트의 프라이머들을 포함하는 반응 혼합물에 대하여 가닥 분리, 프라이머 어닐링(annealing), 및 프라이머 신장(extension)의 사이클을 포함하는 PCR 증폭 계획(amplification regimen)을 수행하는 단계;

각 프라이머 쌍에 대하여 앰플리콘(amplicon)의 수준을 검출하는 단계;

기준 유전자 앰플리콘들에 대해 cMET 앰플리콘들의 수준을 정규화하는 단계; 및

cMET 앰플리콘들의 정규화된 수준을 기준 수준과 대비하는 단계로서, 기준 수준과 대비하여 gDNA-특이적 cMET 앰플리콘의 더 높은 수준은 샘플 내의 cMET의 유전자 증폭 변경의 존재를 나타내고, 기준 수준과 대비하여 mRNA-특이적 cMET 앰플리콘의 변경된 수준은 샘플 내의 cMET의 유전자 발현 수준 변경의 존재를 나타내는 것인 단계를 포함하는, 검정.

청구항 2

제1항에 있어서,

제1 세트의 프라이머들은 EGFR의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열을 증폭시키는 일 하위세트의 프라이머 쌍들을 추가로 포함하며,

상기 검정은 EGFR 앰플리콘들의 정규화된 수준을 기준 수준과 대비하는 단계를 추가로 포함하며; 여기서, 기준 수준과 대비하여 gDNA-특이적 EGFR 앰플리콘의 더 높은 수준은 샘플 내의 EGFR의 유전자 증폭 변경의 존재를 나타내는, 검정.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

염색체 7 상에 위치된 제1 프라이머 세트의 기준 유전자는 KDELR-2이고;

상기 검정은 KDELR-2 앰플리콘들의 정규화된 수준을 기준 수준과 대비하는 단계를 추가로 포함하며; 여기서, 기준 수준과 대비하여 gDNA-특이적 KDELR-2 앰플리콘의 더 높은 수준은 샘플 내의 KDELR-2의 유전자 증폭 변경의 존재를 나타내는, 검정.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

cMET, EGFR 및 KDELR-2의 유전자 증폭 변경의 존재는 염색체 7 증폭의 존재를 나타내는, 검정.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

염색체 7 상에 위치되지 않은 제1 프라이머 세트의 기준 유전자는 SOD1 또는 SPG21인, 검정.

청구항 6

제5항에 있어서,

제1 프라이머 세트는 SOD1 및 SPG21 각각의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하는, 검정.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

일 프라이머 세트가 각 유전자의 적어도 하나의 앰플리콘을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함하는, 검정.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

일 프라이머 세트가 각 유전자의 적어도 둘의 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함하는, 검정.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

일 프라이머 세트가 각 유전자의 적어도 셋의 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함하는, 검정.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

프라이머 세트들은 cMET, EGFR, 및 KDEL2-2 각각의 적어도 둘의 gDNA-특이적 앰플리콘들 및 cMET, SOD1 및 SPG21 각각의 적어도 둘의 mRNA-특이적 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함하는, 검정.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

프라이머 세트들은 cMET, EGFR, 및 KDEL2-2 각각의 적어도 셋의 gDNA-특이적 앰플리콘들 및 cMET, SOD1 및 SPG21 각각의 적어도 셋의 mRNA-특이적 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함하는, 검정.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

샘플의 제2 부분을 제3 세트의 프라이머 쌍들과 접촉시키는 단계로서, 제3 세트의 프라이머들은 서열 변이를 포함하는 cMET 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하는 것인 단계;

샘플의 제2 부분 및 제3 세트의 프라이머들을 포함하는 반응 혼합물에 대하여 가닥 분리, 프라이머 어닐링, 및 프라이머 신장의 사이클을 포함하는 PCR 증폭 계획을 수행하는 단계;

각 프라이머 쌍에 대하여 앰플리콘의 수준을 검출하는 단계로서, 앰플리콘의 존재는 그 프라이머 쌍이 특이적인 서열 변이의 존재를 나타내는 것인 단계를 추가로 포함하는, 검정.

청구항 13

제12항에 있어서,

cMET의 하나 이상의 서열 변이는 SNP인, 검정.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서,

cMET SNP는 S1058P; V1101I; H1112Y; H1124D; G1137V; M1149T; V1206L; L1213V; K1262R; M1268T; V1238I; Y1248C; 및 D1246N (서열 번호 131)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 검정.

청구항 15

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

S1058P; V1101I; H1112Y; H1124D; G1137V; M1149T; V1206L; L1213V; K1262R; M1268T; V1238I; Y1248C; 및 D1246N (서열 번호 131)이 검출되는, 검정.

청구항 16

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

동일한 PCR 열사이클링 계획이 두 반응 모두에 사용되는, 검정.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

핵산 샘플은 FFPE 종양 샘플로부터 준비되는, 검정.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

샘플은 위암; 직장암; 담관종; 폐암; 뇌암; 자궁경부암; 결장암; 두경부암; 간세포암; 비소세포 폐암; 흑색종; 중피종; 다발성 골수종; 난소암; 육종; 및 갑상선암으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환을 갖는 것으로 진단된 대상체로부터의 종양 세포를 포함하는, 검정.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

하나 이상의 프라이머가 이중 도메인 프라이머인, 검정.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

일 프라이머 하위세트의 둘 이상의 프라이머 쌍들로부터의 증폭된 산물들이 구별될 수 있는, 검정.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

일 프라이머 하위세트의 둘 이상의 프라이머 쌍들로부터의 증폭된 산물들은 뚜렷이 다른 크기(distinct size)들을 가짐으로써 구별되는, 검정.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

일 프라이머 하위세트의 둘 이상의 프라이머 쌍들로부터의 증폭된 산물들은 상이한 검출가능한 표지들로 표지됨으로써 구별되는, 검정.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

제1 세트의 프라이머들 및 제2 세트의 프라이머들로부터의 증폭된 산물들은 상이한 검출가능한 표지들로 표지됨

으로써 구별되는, 검정.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,
하나 이상의 프라이머가 서열 번호 1-83으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 검정.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,
하나 이상의 프라이머가 서열 번호 89-124 중 어느 하나의 서열을 포함하는, 검정.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,
프라이머들은 대략 표 2의 농도로 반응 혼합물 내에 존재하는, 검정.

청구항 27

cMET 변형을 검출하는 방법으로서,

핵산 샘플의 일부분을 cMET 유전자 카피수 변이의 변형을 검출하는 일 세트의 프라이머들과 접촉시켜 cMET 유전자 카피수 변이를 검출하는 단계로서,

일 세트의 프라이머들은 cMET의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열 및 적어도 둘의 기준 유전자들 각각의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하며, 여기서 하나의 기준 유전자는 염색체 7 상에 위치되고 하나의 기준 유전자는 염색체 7 상에 위치되지 않은 것인 단계;

샘플의 일부분 및 일 세트의 프라이머들을 포함하는 반응 혼합물에 대하여 가닥 분리, 프라이머 어닐링, 및 프라이머 신장의 사이클을 포함하는 PCR 증폭 계획을 수행하는 단계;

각 프라이머 쌍에 대하여 앰플리콘의 수준을 검출하는 단계;

기준 유전자 앰플리콘들에 대해 cMET 앰플리콘들의 수준을 정규화하는 단계; 및

cMET 앰플리콘들의 정규화된 수준을 기준 수준과 대비하는 단계로서, 기준 수준과 대비하여 gDNA-특이적 cMET 앰플리콘의 더 높은 수준은 샘플 내의 cMET의 유전자 증폭 변형의 존재를 나타내는 것인 단계를 포함하는, 방법.

청구항 28

제27항에 있어서,

일 세트의 프라이머들은 EGFR의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열을 증폭시키는 일 하위세트의 프라이머 쌍들을 추가로 포함하며,

상기 검정은 EGFR 앰플리콘들의 정규화된 수준을 기준 수준과 대비하는 단계를 추가로 포함하며; 여기서, 기준 수준과 대비하여 gDNA-특이적 EGFR 앰플리콘의 더 높은 수준은 샘플 내의 EGFR의 유전자 증폭 변형의 존재를 나타내는, 방법.

청구항 29

제27항 또는 제28항에 있어서,

염색체 7 상에 위치한 프라이머 세트의 기준 유전자는 KDEL2-28이고;

상기 방법은 KDEL2-2 앰플리콘들의 정규화된 수준을 기준 수준과 대비하는 단계를 추가로 포함하며; 여기서, 기준 수준과 대비하여 gDNA-특이적 KDEL2-2 앰플리콘의 더 높은 수준은 샘플 내의 KDEL2-2의 유전자 증폭 변형의 존재를 나타내는, 방법.

청구항 30

제27항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

cMET, EGFR 및 KDEL2R-2의 유전자 증폭 변경의 존재는 염색체 7 증폭의 존재를 나타내는, 방법.

청구항 31

제27항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,

염색체 7 상에 위치되지 않은 프라이머 세트의 기준 유전자는 SOD1 또는 SPG21인, 방법.

청구항 32

제31항에 있어서,

프라이머 세트는 SOD1 및 SPG21의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하는, 방법.

청구항 33

제27항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서,

핵산 샘플의 일부분을 제2 세트의 프라이머들과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하며, 제2 세트의 프라이머들은 cMET 유전자 발현 수준의 변화를 검출하며, 여기서

제2 세트의 프라이머들은 cMET의 mRNA-특이적 서열 및 적어도 둘의 기준 유전자들의 적어도 mRNA-특이적 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하고;

기준 수준과 대비하여 mRNA-특이적 cMET 앰플리콘의 변경된 수준은 샘플 내의 cMET의 유전자 발현 수준 변경의 존재를 나타내는, 방법.

청구항 34

제27항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서,

제1 프라이머 세트는 SOD1 및 SPG21 각각의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하는, 방법.

청구항 35

제27항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서,

일 프라이머 세트가 각 유전자의 적어도 하나의 앰플리콘을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함하는, 방법.

청구항 36

제27항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서,

일 프라이머 세트가 각 유전자의 적어도 둘의 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함하는, 방법.

청구항 37

제27항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서,

일 프라이머 세트가 각 유전자의 적어도 셋의 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함하는, 방법.

청구항 38

제27항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서,

프라이머 세트들은 cMET, EGFR, 및 KDEL2R-2 각각의 적어도 둘의 gDNA-특이적 앰플리콘들 및 cMET, SOD1 및 SPG21 각각의 적어도 둘의 mRNA-특이적 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함하는, 방법.

청구항 39

제27항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서,

프라이머 세트들은 cMET, EGFR, 및 KDEL2-2 각각의 적어도 셋의 gDNA-특이적 앰플리콘들 및 cMET, SOD1 및 SGP21 각각의 적어도 셋의 mRNA-특이적 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함하는, 방법.

청구항 40

제27항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서,

샘플의 제2 부분을 제3 세트의 프라이머 쌍들과 접촉시키는 단계로서, 제3 세트의 프라이머들은 서열 변이를 포함하는 cMET 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하는 것인 단계;

샘플의 제2 부분 및 제3 세트의 프라이머들을 포함하는 반응 혼합물에 대하여 가닥 분리, 프라이머 어닐링, 및 프라이머 신장의 사이클을 포함하는 PCR 증폭 계획을 수행하는 단계;

각 프라이머 쌍에 대하여 앰플리콘의 수준을 검출하는 단계로서, 앰플리콘의 존재는 그 프라이머 쌍이 특이적인 서열 변이의 존재를 나타내는 것인 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 41

제40항에 있어서,

cMET의 하나 이상의 서열 변이는 SNP인, 방법.

청구항 42

제39항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서,

cMET SNP는 S1058P; V1101I; H1112Y; H1124D; G1137V; M1149T; V1206L; L1213V; K1262R; M1268T; V1238I; Y1248C; 및 D1246N (서열 번호 131)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 43

제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서,

S1058P; V1101I; H1112Y; H1124D; G1137V; M1149T; V1206L; L1213V; K1262R; M1268T; V1238I; Y1248C; 및 D1246N (서열 번호 131)이 검출되는, 방법.

청구항 44

제39항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서,

동일한 PCR 열사이클링 계획이 두 반응 모두에 사용되는, 방법.

청구항 45

제39항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서,

핵산 샘플은 FFPE 종양 샘플로부터 준비되는, 방법.

청구항 46

제27항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서,

샘플은 위암; 직장암; 담관종; 폐암; 뇌암; 자궁경부암; 결장암; 두경부암; 간세포암; 비소세포 폐암; 흑색종; 중피종; 다발성 골수종; 난소암; 육종; 및 갑상선암으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환을 갖는 것으로 진단된 대상체로부터의 종양 세포를 포함하는, 방법.

청구항 47

제27항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서,

하나 이상의 프라이머가 이중 도메인 프라이머인, 방법.

청구항 48

제27항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서,

일 프라이머 하위세트의 둘 이상의 프라이머 쌍들로부터의 증폭된 산물들이 구별될 수 있는, 방법.

청구항 49

제27항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서,

일 프라이머 하위세트의 둘 이상의 프라이머 쌍들로부터의 증폭된 산물들은 뚜렷이 다른 크기들을 가짐으로써 구별되는, 방법.

청구항 50

제27항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서,

일 프라이머 하위세트의 둘 이상의 프라이머 쌍들로부터의 증폭된 산물들은 상이한 검출가능한 표지들로 표지됨으로써 구별되는, 방법.

청구항 51

제27항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서,

제1 세트의 프라이머들 및 제2 세트의 프라이머들로부터의 증폭된 산물들은 상이한 검출가능한 표지들로 표지됨으로써 구별되는, 방법.

청구항 52

제27항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서,

하나 이상의 프라이머가 서열 번호 1-83으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 53

제27항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서,

하나 이상의 프라이머가 서열 번호 89-124 중 어느 하나의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 54

제27항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서,

프라이머들은 대략 표 2의 농도로 반응 혼합물 내에 존재하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원과의 상호참조
- [0002] 본 출원은 2013년 8월 14일자로 출원된 미국 가출원 제61/865,755호에 대하여 35 U.S.C. § 119(e) 하에서 이득을 주장하며, 그의 내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.
- [0003] 서열 목록
- [0004] 본 출원은 ASCII 포맷으로 전자적으로 제출되고 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되는 서열 목록을 포함한다. 2014년 7월 31일에 생성된 상기 ASCII 복사본은 046264-077471-PCT_SL.txt로 명명되고 크기는 97,800 바이트이다.
- [0005] 본 명세서에 기재된 기술은 cMET 변경(예를 들어, 카피수 및 발현 수준의 변이, 및/또는 점 돌연변이를 포함한 돌연변이의 존재)의 검출을 가능하게 하는 검정(assay) 및 방법(method)에 관한 것이다.

배경 기술

- [0006] 개인맞춤형 의학(personalized medicine)의 발달은 교란되거나 변경될 때 질병에 기여할 수 있는 유전자의 확인으로 이어져 왔다. 그러나, 질병-연관 유전자는 다수의 방식으로 변경될 수 있는데, 예를 들어 야생형 또는 건강한 대상체와 비교할 때 주어진 질병을 갖거나 그것이 발생할 위험이 있는 대상체에서, 유전자의 발현 수준이 변경될 수 있고/있거나, 유전자를 인코딩하는 서열이 변경될 수 있고/있거나, 유전자의 게놈 카피(genomic copy)의 수(카피수 변이(copy number variation); "CNV")가 변경될 수 있다.
- [0007] 예를 들어, cMET는 암에 관여하고 있으며, 임의의 주어진 암 세포는 cMET의 이들 변경 중 하나 이상을 보여줄 수 있다. cMET 발현 산물 HGFR(hepatocyte growth factor receptor, 간세포 성장 인자 수용체)의 활성화는 세포 증식, 세포 생존, 침입, 세포 운동성, 전이, 및 혈관생성에 기여한다. HGFR의 활성화는 성장 인자 농도 불균형, 유전자 증폭, 및/또는 돌연변이로 인한 과발현에 의해 야기될 수 있다. cMET의 이들 변경은 고형 종양(예를 들어, 직장암, 위암(gastric cancer), 및 간세포암 종양), 선암종, 및 편평 대세포 및 소세포 암종에서 발견되어 왔다.
- [0008] 이들 유형의 변경들 각각의 검출은 전형적으로 대체 접근법들을 사용하여 행해지지만, 이들 접근법 각각은 임상적 유용성을 제한하는 취약함을 보여주고 있다. 예를 들어, 발현 수준은 종종 면역조직화학에 의해 검출되는데, 이는 낮은 항체 민감성이 문제가 될 수 있으며, 그 결과 양성 샘플이 약한 발현 수준으로 보이는 것을 나타내게 된다. CNV 및 유전자 발현 수준은 FISH에 의해 검출될 수 있지만, 이들 검정은 20% 이상의 실험실간 불일치(inter-lab discordance)를 나타낼 수 있다. 돌연변이 및 유전자 발현 검정은 RT-PCR에 의해 수행될 수 있지만, 기존의 기술은 종합적인 임상 진단학에 필요한 것보다 더 적은 멀티플렉스 능력(multiplex ability)을 제공한다. 멀티모달 멀티플렉스 검정(multimodal, multiplex assay)의 개발은 환자의 더 신속하고 더 비용-효과적인 검사 및 스크리닝을 가능하게 할 수 있어서 개선된 건강관리(healthcare)를 가능하게 한다.

발명의 내용

- [0009] 본 명세서에 기재된 기술은 cMET의 변경, 예를 들어 서열의 변경(돌연변이), 발현 수준의 변경, 및/또는 유전자 카피수의 변경을 검출하기 위한 방법 및 검정에 관한 것이다. 본 발명자들은 단일 멀티플렉스화(multiplexed) 반응 혼합물에서 cMET 카피수 및 cMET 발현 수준을 신뢰성 있게 결정하기 위한 검정을 개발하고 그렇게 하기 위한 방법을 찾아내었으며, 겨우 2개의 개별 반응들을 포함하는 단일 멀티플렉스화 검정에서 cMET 카피수, cMET 발현 수준, 및 cMET 돌연변이의 존재 또는 부재를 결정하기 위한 검정을 개발하고 그렇게 하기 위한 방법을 찾아내었다.
- [0010] 일 태양에서, cMET 변경을 검출하기 위한 검정이 본 명세서에 기재되며, 본 검정은 핵산 샘플의 일부분을 두 세트의 프라이머들과 접촉시키는 단계로서, 제1 세트의 프라이머들은 cMET 유전자 카피수 변이의 변경을 검출하고, 제2 세트의 프라이머들은 cMET 유전자 발현 수준의 변화를 검출하며, 여기서 cMET 유전자 카피수 변이를 검출하기 위해 제1 세트의 프라이머들은 cMET의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열 및 적어도 둘의 기준 유전자들 각각의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하며, 여기서 하나의 기준 유전자는 염색체 7 상에 위치되고 하나의 기준 유전자는 염색체 7 상에 위치되지 않고, 제2 세트의 프라이머들은 cMET의 mRNA-특이적 서열 및 적어도 둘의 기준 유전자들의 mRNA-특이적 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하는 것인 단계; 샘플의 일부분 및 두 세트의 프라이머들을 포함하는 반응 혼합물에 대하여 가닥 분리, 프라이머 어닐링(annealing), 및 프라이머 신장(extension)의 사이클을 포함하는 PCR 증폭 계획(amplification regimen)을 수행하는 단계; 각 프라이머 쌍에 대하여 앰플리콘(amplicon)의 수준을 검출하는 단계; 기준 유전자 앰플리콘들에 대해 cMET 앰플리콘들의 수준을 정규화하는 단계; 및 cMET 앰플리콘들의 정규화된 수준을 기준 수준과 대비하는 단계로서, 기준 수준과 대비하여 gDNA-특이적 cMET 앰플리콘의 더 높은 수준은 샘플 내의 cMET의 유전자 증폭 변경의 존재를 나타내고, 기준 수준과 대비하여 mRNA-특이적 cMET 앰플리콘의 변경된 수준은 샘플 내의 cMET의 유전자 발현 수준 변경의 존재를 나타내는 것인 단계를 포함한다.
- [0011] 일부 실시 형태에서, 제1 세트의 프라이머들은 EGFR의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열을 증폭시키는 일 하위세트의 프라이머 쌍들을 추가로 포함하며, 본 검정은 EGFR 앰플리콘들의 정규화된 수준을 기준 수준과 대비하는 단계를 추가로 포함하며; 여기서, 기준 수준과 대비하여 gDNA-특이적 EGFR 앰플리콘의 더 높은 수준은 샘플 내의 EGFR의 유전자 증폭 변경의 존재를 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 염색체 7 상에 위치된 제1 프라이머 세트의 기준 유전자는 KDELRL-2이고, 상기 검정은 KDELRL-2 앰플리콘들의 정규화된 수준을 기준 수준과 대비하는 단계를 추가로 포함하며; 여기서, 기준 수준과 대비하여 gDNA-특이적 KDELRL-2 앰플리콘의 더 높은 수준은 샘플 내

의 KDEL R-2의 유전자 증폭 변경의 존재를 나타낸다. 일부 실시 형태에서, cMET, EGFR 및 KDEL R-2의 유전자 증폭 변경의 존재는 염색체 7 증폭의 존재를 나타낸다.

- [0012] 일부 실시 형태에서, 염색체 7 상에 위치되지 않은 제1 프라이머 세트의 기준 유전자는 SOD1 또는 SPG21이다. 일부 실시 형태에서, 제1 프라이머 세트는 SOD1 및 SPG21 각각의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함한다.
- [0013] 일부 실시 형태에서, 일 프라이머 세트가 각 유전자의 적어도 하나의 앰플리콘을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 일 프라이머 세트가 각 유전자의 적어도 둘의 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 일 프라이머 세트가 각 유전자의 적어도 셋의 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함한다.
- [0014] 일부 실시 형태에서, 프라이머 세트들은 cMET, EGFR, 및 KDEL R-2 각각의 적어도 둘의 gDNA-특이적 앰플리콘들 및 cMET, SOD1 및 SPG21 각각의 적어도 둘의 mRNA-특이적 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 프라이머 세트들은 cMET, EGFR, 및 KDEL R-2 각각의 적어도 셋의 gDNA-특이적 앰플리콘들 및 cMET, SOD1 및 SPG21 각각의 적어도 셋의 mRNA-특이적 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함한다.
- [0015] 일부 실시 형태에서, 본 검정은 샘플의 제2 부분을 제3 세트의 프라이머 쌍들과 접촉시키는 단계로서, 제3 세트의 프라이머들은 서열 변이를 포함하는 cMET 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하는 것인 단계; 샘플의 제2 부분 및 제3 세트의 프라이머들을 포함하는 반응 혼합물에 대하여 가닥 분리, 프라이머 어닐링, 및 프라이머 신장의 사이클을 포함하는 PCR 증폭 계획을 수행하는 단계; 각 프라이머 쌍에 대하여 앰플리콘의 수준을 검출하는 단계로서, 앰플리콘의 존재는 그 프라이머 쌍이 특이적인 서열 변이의 존재를 나타내는 것인 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, cMET의 하나 이상의 서열 변이는 SNP이다. 일부 실시 형태에서, cMET SNP는 S1058P; V1101I; H1112Y; H1124D; G1137V; M1149T; V1206L; L1213V; K1262R; M1268T; V1238I; Y1248C; 및 D1246N으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시 형태에서, S1058P; V1101I; H1112Y; H1124D; G1137V; M1149T; V1206L; L1213V; K1262R; M1268T; V1238I; Y1248C; 및 D1246N이 검출된다.
- [0016] 일부 실시 형태에서, 동일한 PCR 열사이클링 계획이 두 반응 모두에 사용된다. 일부 실시 형태에서, 핵산 샘플은 FFPE 종양 샘플로부터 준비된다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 위암; 직장암; 담관종; 폐암; 뇌암; 자궁경부암; 결장암; 두경부암; 간세포암; 비소세포 폐암; 흑색종; 중피종; 다발성 골수종; 난소암; 육종; 및/또는 갑상선암으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환을 갖는 것으로 진단된 대상체로부터의 종양 세포를 포함한다.
- [0017] 일부 실시 형태에서, 하나 이상의 프라이머가 이중 도메인 프라이머이다. 일부 실시 형태에서, 일 프라이머 하위세트의 둘 이상의 프라이머 쌍들로부터의 증폭된 산물들은 구별될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 일 프라이머 하위세트의 둘 이상의 프라이머 쌍들로부터의 증폭된 산물들은 뚜렷이 다른 크기(distinct size)들을 가짐으로써 구별된다. 일부 실시 형태에서, 일 프라이머 하위세트의 둘 이상의 프라이머 쌍들로부터의 증폭된 산물들은 상이한 검출가능한 표지들로 표지됨으로써 구별된다. 일부 실시 형태에서, 제1 세트의 프라이머들 및 제2 세트의 프라이머들로부터의 증폭된 산물들은 상이한 검출가능한 표지들로 표지됨으로써 구별된다.
- [0018] 일부 실시 형태에서, 하나 이상의 프라이머가 서열 번호 1-83으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시 형태에서, 하나 이상의 프라이머가 서열 번호 89-124 중 어느 하나의 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 프라이머들은 대략 표 2의 농도로 반응 혼합물 내에 존재한다.
- [0019] 일 태양에서, cMET 변경을 검출하는 방법이 본 명세서에 기재되며, 본 방법은 핵산 샘플의 일부분을 cMET 유전자 카피수 변이의 변경을 검출하는 일 세트의 프라이머들과 접촉시켜 cMET 유전자 카피수 변이를 검출하는 단계로서, 일 세트의 프라이머들은 cMET의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열 및 적어도 둘의 기준 유전자들 각각의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열을 증폭시킬 수 있는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하며, 여기서 하나의 기준 유전자는 염색체 7 상에 위치되고 하나의 기준 유전자는 염색체 7 상에 위치되지 않은 것인 단계; 샘플의 일부분 및 일 세트의 프라이머들을 포함하는 반응 혼합물에 대하여 가닥 분리, 프라이머 어닐링, 및 프라이머 신장의 사이클을 포함하는 PCR 증폭 계획을 수행하는 단계; 각 프라이머 쌍에 대하여 앰플리콘의 수준을 검출하는 단계; 기준 유전자 앰플리콘들에 대해 cMET 앰플리콘들의 수준을 정규화하는 단계; 및 cMET 앰플리콘들의 정규화된 수준을 기준 수준과 대비하는 단계로서, 기준 수준과 대비하여 gDNA-특이적 cMET 앰플리콘의 더 높은 수준은 샘플 내의 cMET의 유전자 증폭 변경의 존재를 나타내는 것인 단계를 포함한다.
- [0020] 일부 실시 형태에서, 일 세트의 프라이머들은 EGFR의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열을 증폭시키는 일 하위세

트의 프라이머 쌍들을 추가로 포함하며, 본 검정은 EGFR 앰플리콘들의 정규화된 수준을 기준 수준과 대비하는 단계를 추가로 포함하며; 여기서, 기준 수준과 대비하여 gDNA-특이적 EGFR 앰플리콘의 더 높은 수준은 샘플 내의 EGFR의 유전자 증폭 변경의 존재를 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 염색체 7 상에 위치한 프라이머 세트의 기준 유전자는 KDEL2-2이고, 상기 방법은 KDEL2-2 앰플리콘들의 정규화된 수준을 기준 수준과 대비하는 단계를 추가로 포함하며; 여기서, 기준 수준과 대비하여 gDNA-특이적 KDEL2-2 앰플리콘의 더 높은 수준은 샘플 내의 KDEL2-2의 유전자 증폭 변경의 존재를 나타낸다. 일부 실시 형태에서, cMET, EGFR 및 KDEL2-2의 유전자 증폭 변경의 존재는 염색체 7 증폭의 존재를 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 염색체 7 상에 위치되지 않은 프라이머 세트의 기준 유전자는 SOD1 또는 SPG21이다. 일부 실시 형태에서, 일 프라이머 세트는 SOD1 및 SPG21의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함한다.

[0021] 일부 실시 형태에서, 본 방법은 핵산 샘플의 일부분을 제2 세트의 프라이머들과 접촉시키는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 제2 세트의 프라이머들은 cMET 유전자 발현 수준의 변화를 검출하며, 여기서 제2 세트의 프라이머들은 cMET의 mRNA-특이적 서열 및 적어도 둘의 기준 유전자들의 적어도 mRNA-특이적 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하고, 기준 수준과 대비하여 mRNA-특이적 cMET 앰플리콘의 변경된 수준은 샘플 내의 cMET의 유전자 발현 수준 변경의 존재를 나타낸다.

[0022] 일부 실시 형태에서, 일 프라이머 세트가 각 유전자의 적어도 하나의 앰플리콘을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 일 프라이머 세트가 각 유전자의 적어도 둘의 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 일 프라이머 세트가 각 유전자의 적어도 셋의 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함한다.

[0023] 일부 실시 형태에서, 프라이머 세트들은 cMET, EGFR, 및 KDEL2-2 각각의 적어도 둘의 gDNA-특이적 앰플리콘들 및 cMET, SOD1 및 SPG21 각각의 적어도 둘의 mRNA-특이적 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 프라이머 세트들은 cMET, EGFR, 및 KDEL2-2 각각의 적어도 셋의 gDNA-특이적 앰플리콘들 및 cMET, SOD1 및 SPG21 각각의 적어도 셋의 mRNA-특이적 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함한다.

[0024] 일부 실시 형태에서, 본 검정은 샘플의 제2 부분을 제3 세트의 프라이머 쌍들과 접촉시키는 단계로서, 제3 세트의 프라이머들은 서열 변이를 포함하는 cMET 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하는 것인 단계; 샘플의 제2 부분 및 제3 세트의 프라이머들을 포함하는 반응 혼합물에 대하여 가닥 분리, 프라이머 어닐링, 및 프라이머 신장의 사이클을 포함하는 PCR 증폭 계획을 수행하는 단계; 각 프라이머 쌍에 대하여 앰플리콘의 수준을 검출하는 단계로서, 앰플리콘의 존재는 그 프라이머 쌍이 특이적인 서열 변이의 존재를 나타내는 것인 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, cMET의 하나 이상의 서열 변이는 SNP이다. 일부 실시 형태에서, cMET SNP는 S1058P; V1101I; H1112Y; H1124D; G1137V; M1149T; V1206L; L1213V; K1262R; M1268T; V1238I; Y1248C; 및 D1246N으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시 형태에서, S1058P; V1101I; H1112Y; H1124D; G1137V; M1149T; V1206L; L1213V; K1262R; M1268T; V1238I; Y1248C; 및 D1246N이 검출된다.

[0025] 일부 실시 형태에서, 동일한 PCR 열사이클링 계획이 두 반응 모두에 사용된다. 일부 실시 형태에서, 핵산 샘플은 FFPE 종양 샘플로부터 준비된다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 위암; 직장암; 담관종; 폐암; 뇌암; 자궁경부암; 결장암; 두경부암; 간세포암; 비소세포 폐암; 흑색종; 중피종; 다발성 골수종; 난소암; 육종; 및/또는 갑상선암으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환을 갖는 것으로 진단된 대상체로부터의 종양 세포를 포함한다.

[0026] 일부 실시 형태에서, 하나 이상의 프라이머가 이중 도메인 프라이머이다. 일부 실시 형태에서, 일 프라이머 하위세트의 둘 이상의 프라이머 쌍들로부터의 증폭된 산물들은 구별될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 일 프라이머 하위세트의 둘 이상의 프라이머 쌍들로부터의 증폭된 산물들은 뚜렷이 다른 크기들을 가짐으로써 구별된다. 일부 실시 형태에서, 일 프라이머 하위세트의 둘 이상의 프라이머 쌍들로부터의 증폭된 산물들은 상이한 검출가능한 표지들로 표지됨으로써 구별된다. 일부 실시 형태에서, 제1 세트의 프라이머들 및 제2 세트의 프라이머들로부터의 증폭된 산물들은 상이한 검출가능한 표지들로 표지됨으로써 구별된다.

[0027] 일부 실시 형태에서, 하나 이상의 프라이머가 서열 번호 1-83으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시 형태에서, 하나 이상의 프라이머가 서열 번호 89-124 중 어느 하나의 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 프라이머들은 대략 표 2의 농도로 반응 혼합물 내에 존재한다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 본 명세서에 기재된 프라이머 표적들의 예시적인 실시 형태의 개략도를 묘사한다.
- 도 2 및 도 3은 위암 세포의 단일관 CNV 및 유전자 발현 분석을 보여주고, 표 2에 명시된 표 1의 프라이머들을 사용하는 검정의, 각각 TYE 및 FAM 채널에서의 검출을 묘사한다.
- 도 4 및 도 5는 폐암 세포의 단일관 CNV 및 유전자 발현 분석을 보여주고, 표 2에 명시된 표 1의 프라이머들을 사용하는 검정의, 각각 TYE 및 FAM 채널에서의 검출을 묘사한다.
- 도 6은 cMET 발현 및 CNV 수준에 대한 예시적인 검정의 정량화된 결과의 그래프를 묘사한다.
- 도 7은 염색체 7 다염색체성 분석의 그래프를 묘사한다.
- 도 8은 cMET 점 돌연변이(예를 들어, SNP)를 검출하기 위한 대안적인 프라이머 세트들의 개략도를 묘사한다. 도 8은 서열 번호 132를 개시한다.
- 도 9는 표 4의 더 짧은 앰플리콘 프라이머들을 사용한 개별 표적들에 대한 멀티플렉스 검정의 결과를 묘사한다.
- 도 10은 표 3의 더 긴 앰플리콘 프라이머들을 사용한 개별 표적들에 대한 멀티플렉스 검정의 결과를 묘사한다.
- 도 11은 실시예 1 및 실시예 2의 검정에서 사용된 열 사이클링 파라미터를 묘사한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 본 명세서에 기재된 기술의 실시 형태는 cMET의 변경, 예를 들어 서열의 변경(돌연변이), 발현 수준의 변경, 및/또는 유전자 카피수의 변경을 검출하기 위한 방법 및 검정, 및 특히 cMET 변경을 검출하는 멀티플렉스화 및 멀티모달 검정 및 방법에 관한 것이다.
- [0030] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "HGFR", "간세포 성장 인자 수용체", 또는 "cMET"는 간세포 성장 인자(HGF)에 결합됨으로써 활성화되는 티로신-키나제 활성을 갖는 막횡단 수용체를 지칭한다. cMET의 서열은 당업계에 잘 알려져 있다: 예를 들어, 인간 cMET(NCBI 유전자 ID: 4233; 서열 번호 84(mRNA); 서열 번호 125(폴리펩티드)).
- [0031] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "변경"은, 유전자 또는 유전자 발현 산물과 관련하여 사용되는 경우, 그 유전자 또는 유전자 발현 산물의 기준(예를 들어, 야생형) 버전과 비교하여 검출가능한 변화를 지칭하며, 이러한 변화에는 유전자 카피수의 변화, 발현 수준의 변화, 및/또는 서열의 변화(예를 들어, 서열 변이 또는 돌연변이)가 포함되지만 이로 한정되지 않는다.
- [0032] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "유전자 카피수"는 게놈에서 일어나는 주어진 유전자의 카피의 수를 지칭한다. 일부 실시 형태에서, 단일 유전자 및/또는 염색체의 영역이 중복될(duplicated) 수 있는데, 예를 들어 하나 이상의 유전자를 포함하는 핵산 서열의 카피가 게놈 내에서 또는 게놈 내의 다수의 영역들 내에서 서로의 옆에서 발견될 것이며, 반면 기준 게놈에서는, 그러한 서열의 1개의 카피가 관련 염색체 상에 존재한다(정상 이배체 게놈 내에서는 2개의 카피). 일부 실시 형태에서, 전체 염색체는 중복되며, 예를 들어 다염색체성(polysomy)이다.
- [0033] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "발현 수준"은 세포 또는 샘플 내에 존재하는 주어진 유전자에 의해 인코딩된 mRNA 분자의 수를 지칭한다. 발현 수준은 기준 수준에 대해 증가 또는 감소될 수 있다. cMET의 변경은 암에 관여되어 왔으며, 그러한 변경의 검출은 진단, 예후, 및/또는 치료의 선택에 사용될 수 있다.
- [0034] 일부 실시 형태에서, cMET 변경을 검출하기 위한 본 명세서에 기재된 검정 및/또는 방법은 핵산 샘플의 일부분을 cMET 유전자 카피수 변이의 변경을 검출하는 일 세트의 프라이머들과 접촉시켜 cMET 유전자 카피수 변이를 검출하는 단계로서, 일 세트의 프라이머들은 cMET의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열 및 적어도 둘의 기준 유전자들 각각의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열을 증폭시킬 수 있는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하며, 여기서 하나의 기준 유전자는 염색체 7 상에 위치되고 하나의 기준 유전자는 염색체 7 상에 위치되지 않은 것인 단계; 샘플의 일부분 및 일 세트의 프라이머들을 포함하는 반응 혼합물에 대하여 가닥 분리, 프라이머 어닐링, 및 프라이머 신장의 사이클을 포함하는 PCR 증폭 계획을 수행하는 단계; 각 프라이머 쌍에 대하여 앰플리콘의 수준을 검출하는 단계; 기준 유전자 앰플리콘들에 대해 cMET 앰플리콘들의 수준을 정규화하여 cMET 카피수의 상대 수준을 결정하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, cMET 카피수의 상대 수준은 기준 수준(예를 들어, 미리 정해진 기준 수준)과 대비될 수 있으며; 여기서, 기준 수준과 대비하여 하나 이상의 gDNA-특이적 cMET 앰플리콘의 더 높은 상대 수준은 샘플 내의 cMET의 유전자 증폭 변경의 존재를 나타낸다. 일부 실시 형태

에서, 본 방법 및 검정은 핵산 샘플의 일부분을 제2 세트의 프라이머들과 접촉시키는 단계로서, 제2 세트의 프라이머들은 cMET 유전자 발현 수준의 변화를 검출하며, 여기서 제2 세트의 프라이머들은 cMET의 mRNA-특이적 서열 및, 선택적으로, 적어도 둘의 기준 유전자들의 적어도 mRNA-특이적 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위 세트들을 포함하는 것인 단계; 및 기준 유전자 앰플리콘들에 대해 cMET 앰플리콘들의 수준을 정규화하여 cMET 발현의 상대 수준을 결정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, cMET 발현의 상대 수준은 기준 수준(예를 들어, 미리 정해진 기준 수준)과 대비될 수 있으며; 여기서, 기준 수준과 대비하여 하나 이상의 mRNA-특이적 cMET 앰플리콘의 더 높은 상대 수준은 샘플 내의 cMET의 유전자 발현 변경의 존재를 나타낸다.

[0035] 일부 실시 형태에서, cMET 변경을 검출하기 위한 본 명세서에 기재된 검정 및/또는 방법은 핵산 샘플의 일부분을 두 세트의 프라이머들과 접촉시키는 단계로서, 제1 세트의 프라이머들은 cMET 유전자 카피수 변이의 변경을 검출하고, 제2 세트의 프라이머들은 cMET 유전자 발현 수준의 변화를 검출하며, 여기서 cMET 유전자 카피수 변이를 검출하기 위해 제1 세트의 프라이머들은 cMET의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열 및 적어도 둘의 기준 유전자들 각각의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하며, 여기서 하나의 기준 유전자는 염색체 7 상에 위치되고 하나의 기준 유전자는 염색체 7 상에 위치되지 않고, 제2 세트의 프라이머들은 cMET의 mRNA-특이적 서열 및 적어도 둘의 기준 유전자들의 적어도 mRNA-특이적 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하는 것인 단계; 샘플의 일부분 및 두 세트의 프라이머들을 포함하는 반응 혼합물에 대하여 가닥 분리, 프라이머 어닐링, 및 프라이머 신장의 사이클을 포함하는 PCR 증폭 계획을 수행하는 단계; 각 프라이머 쌍에 대하여 앰플리콘의 수준을 검출하는 단계; 기준 유전자 앰플리콘들에 대해 cMET 앰플리콘들의 수준을 정규화하는 단계; 및 cMET 앰플리콘들의 정규화된 수준을 cMET의 기준 수준과 대비하는 단계로서, cMET의 기준 수준과 대비하여 gDNA-특이적 cMET 앰플리콘의 더 높은 수준은 샘플 내의 cMET의 유전자 증폭 변경의 존재를 나타내고, cMET의 기준 수준과 대비하여 mRNA-특이적 cMET 앰플리콘의 변경된 수준은 샘플 내의 cMET의 유전자 발현 수준 변경의 존재를 나타내는 것인 단계를 포함한다.

[0036] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 검정은 단일관 내에서 일어나며, 예를 들어 제1 및 제2 세트의 프라이머들은 단일 반응 혼합물 및/또는 베셀(vessel) 또는 용기(container) 내에 존재한다. 따라서, 상기 실시 형태에서는, 단일 증폭 계획이 유전자 카피수 및 유전자 발현 수준에 관한 데이터를 제공할 것이다.

[0037] 일부 실시 형태에서, 제1 세트의 프라이머들은 EGFR의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열을 증폭시키는 일 하위 세트의 프라이머 쌍들을 추가로 포함하며, 본 방법은 EGFR 앰플리콘들의 정규화된 수준을 기준 수준과 대비하는 단계를 포함하며; 여기서, 기준 수준과 대비하여 gDNA-특이적 EGFR 앰플리콘의 더 높은 수준은 샘플 내의 EGFR의 유전자 증폭 변경의 존재를 나타낸다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "EGFR" 또는 "표피 성장 인자 수용체(Epiderm Growth Factor Receptor)"는 표피 성장 인자 "EGF" 및 TGF α 를 포함한 리간드에 결합하는 막형 단 수용체를 지칭한다. 리간드 인식은 EGFR의 자가인산화를 야기하고 MAPK, Akt, 및/또는 JNK 경로를 활성화하며, 이는 세포 증식으로 이어진다. EGFR의 서열은 당업계에서 잘 알려져 있다: 예를 들어, 인간 cMEGFR(NCBI 유전자 ID: 1956; 서열 번호 85(mRNA); 서열 번호 126(폴리펩티드)).

[0038] EGFR의 변경, 예를 들어 EGFR의 유전 카피수의 증가는 암에 관여되어 왔으며, 그러한 변경의 검출은 진단, 예후, 및/또는 치료의 선택에 사용될 수 있다. 일부 실시 형태에서, cMET 및 EGFR의 유전자 카피수는 동일한 반응 혼합물 내에서, 예를 들어 동일한 관, 웰(well), 또는 베셀 내에서 검출된다.

[0039] cMET(및 선택적으로 EGFR)의 수준, 예를 들어 유전자 카피수 수준 및/또는 발현 산물 수준을 신뢰성 있게 검출하기 위하여, 하나 이상의 기준 유전자의 카피수 또는 발현 수준 각각에 대해 샘플 내의 cMET의 수준을 정규화할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 기준 유전자는 암 세포에서 전형적으로 변경을 겪지 않는 유전자일 수 있다. 이어서, 정규화된 수준은 표적 유전자에 대한 기준 수준, 즉 정상, 건강한, 및/또는 기준 샘플 내의 유전자의 수준과 대비될 수 있다.

[0040] 용어 "기준 수준" 및 "기준 샘플"은 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용되며, 제2 샘플(즉, 대상체로부터 얻어진 것)이 대비되는 기지의 샘플 내의 유전자의 카피수 신호의 발현 수준을 지칭한다. 기준 수준은, 예를 들어 핵산을 포함하는 생물학적 샘플 내의 cMET의 변경의 존재 및 크기를 결정하는 데 유용하다. 샘플 내의 변경의 존재, 부재 또는 정도를 추론하기 위하여 샘플이 적절한 표준에 대해 정규화될 수 있도록, 기준값이 비교를 위한 기준 수준으로서의 역할을 한다. 일부 실시 형태에서, 기준 수준은 미리 결정된 수준일 수 있으며, 예를 들어 기준 수준은 미리 결정될 수 또는 비밀 수 있고 본 명세서에 기재된 것과 동일하게 검정의 물리적 반복을 행하여 결정될 필요가 없다.

[0041] 기준 수준은, 예를 들어 대상체, 이를테면 암이 실질적으로 없는 대상체 및/또는 암을 갖는 것에 대한 어떠한

증상 또는 위험 인자도 나타내지 않는 대상체로부터의 기지의 생물학적 샘플로부터 얻어질 수 있다. 기지의 샘플은 또한 평균이 취해진 집단에 걸쳐 기준값 또는 기준값 범위를 생성하기 위하여 복수의 개체들로부터 샘플들을 풀링(pooling)함으로써 얻어질 수 있으며, 여기서 기준값은, 예를 들어 개체들의 집단(예를 들어, 암을 갖지 않는 개체들의 집단) 중에서의 유전자 카피수 또는 발현 수준의 평균 수준을 나타낸다. 따라서, 이러한 방식으로 얻어진 기준에서의 유전자 카피수 또는 유전자 발현의 수준은 암을 갖지 않는 개체들의 일반 집단에서의 평균 수준의 대표값이다. 일부 실시 형태에서, 기준값은 건강한 성인 대상체로부터 얻어진 등가 샘플 내의 수준일 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "건강한 성인 대상체"는 암의 어떠한 마커, 징후, 또는 증상도 나타내지 않는 자 및 암을 가질 위험에 있지 않은 자일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 건강한 성인 대상체들의 집단은 대상체와 유사한 인구학적 특성, 예를 들어 유사한 연령, 유사한 민족적 배경, 유사한 식습관 등을 갖는 대상체들을 포함할 수 있다.

[0042] 본 명세서에 기재된 방법 및 검정에서, 표적 유전자(예를 들어, cMET)의 상대 카피수 및/또는 발현 수준은 본 명세서에서 하기에 기재된 바와 같이 기준 유전자와 대비함으로써 결정될 수 있다. 바람직하게는, 기준 유전자는 건강한 세포와 대비하여 관심 질병에 의해 영향을 받은 세포에서 (발현 수준 또는 카피수 어느 것도) 전형적으로 변경되지 않은 것일 수 있다.

[0043] 기준 유전자는 건강한(예를 들어, 비암성(non-cancerous)) 세포와 대비하여 질병에 걸린 세포(예를 들어, 암 세포, 위암 세포, 직장암 세포, 담관종 세포, 폐암 세포, 뇌암 세포, 자궁경부암 세포, 결장암 세포, 두경부암 세포, 간세포암 세포, 비소세포 폐암 세포, 흑색종 세포, 중피종 세포, 다발성 골수종 세포, 난소암 세포, 육종 세포, 및/또는 갑상선암 세포)에서 변경을 겪지 않는 유전자일 수 있다.

[0044] 기준 유전자가, 염색체 7 상에 위치되지 않은 다염색체성 기준 유전자인 경우, 다염색체성 기준 유전자는 건강한(예를 들어, 비암성) 세포와 대비하여 질병에 걸린 세포(예를 들어, 암 세포, 위암 세포, 직장암 세포, 담관종 세포, 폐암 세포, 뇌암 세포, 자궁경부암 세포, 결장암 세포, 두경부암 세포, 간세포암 세포, 비소세포 폐암 세포, 흑색종 세포, 중피종 세포, 다발성 골수종 세포, 난소암 세포, 육종 세포, 및/또는 갑상선암 세포)에서 다염색체성을 겪지 않거나 다염색체성을 겪는 것으로 알려지지 않은 염색체 상에 위치되는 것이 바람직하다.

[0045] 표적 유전자(예를 들어, cMET)의 유전자 카피수 수준을 검출하는 경우, 표적 유전자의 gDNA-특이적 서열에 특이적인 프라이머 쌍 하위세트에 의해 생성된 앰플리콘들의 수준은 동일한 샘플로부터의 2개의 다염색체성 기준들 각각과 대비될 수 있다. 제1 다염색체성 기준은 표적 유전자와 동일한 염색체 상에 존재하는 유전자의 gDNA-특이적 서열에 특이적인 프라이머 쌍 하위세트에 의해 생성된 앰플리콘들의 수준이다. 제2 다염색체성 기준은 표적 유전자 및 제1 다염색체성 기준 유전자와 상이한 염색체 상에 존재하는 유전자의 gDNA-특이적 서열에 특이적인 프라이머 쌍 하위세트에 의해 생성된 앰플리콘들의 수준이다. 표적 유전자에 대해 검출되는 수준이 제1 다염색체성 기준 유전자에 대해 검출되는 수준보다 더 크다면, 이는 표적 유전자, 또는 표적 유전자는 포함하지만 동일-염색체 기준 유전자는 포함하지 않는 염색체의 일부분의 추가의 카피가 게놈 내에 존재함을 나타낸다. 표적 유전자 및 제1 기준 유전자에 대해 검출되는 수준들이 제2 기준 유전자에 대해 검출되는 수준보다 더 크다면, 이는 표적 유전자 및 제1 다염색체성 기준 유전자를 포함하는 염색체의 추가의 카피가 샘플 내에 존재함(예를 들어, 다염색체성이 표적 유전자를 포함하는 염색체에 대해 지시됨)을 나타낸다.

[0046] 예를 들어, 일부 실시 형태에서, cMET의 유전자 카피수 변경은 존재하지만 염색체 7 상에 존재하는 다염색체성 기준 유전자들 중 어느 것도 유전자 카피수 변경이 존재하지 않는다는 것은 cMET가 유전자 증폭을 겪었음을 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 염색체 7 상에 존재하는 다염색체성 기준 유전자(들)의 유전자 카피수 변경은 존재하지만 염색체 7 상에 존재하지 않는 다염색체성 기준 유전자들 중 어느 것도 유전자 카피수 변경이 존재하지 않는다는 것은 염색체 7의 다염색체성의 존재를 나타내며, 예를 들어 전체 염색체 7 또는 그의 일부들의 추가의 카피가 핵산 샘플을 얻은 세포(들) 내에 존재한다. 일부 실시 형태에서, 유전자 카피수 변경이 cMET 및 염색체 7 상에 존재하는 다염색체성 기준 유전자(들) 둘 모두에 대해 검출된다면, cMET(또는 cMET를 포함하는 영역)의 다염색체성 및 증폭 둘 모두가 핵산 샘플에 대해 지시될 수 있다. 주어진 유전자(예를 들어, cMET, EGFR, 및/또는 KDEL2-2)에 대한 gDNA-특이적 앰플리콘들의 수준이 다염색체성 기준 유전자 및/또는 다염색체성 기준 수준과 대비되는 경우, 염색체 7 상의 유전자의 유전자 카피수 수준과 기준 사이의 차이(배수 크기)의 수준의 크기가 결정될 수 있다.

[0047] 유사한 접근법이 유전자 발현 변경의 존재 및/또는 크기를 검출하는 데 사용될 수 있다. 표적 유전자(예를 들어, cMET)의 발현 수준을 검출하는 경우, 표적 유전자의 mRNA-특이적 서열에 특이적인 프라이머 쌍 하위세트에 의해 생성된 앰플리콘들의 수준은 동일한 샘플로부터의 적어도 하나의 기준 유전자의 발현 수준으로 정규화될

수 있다. 일단 기준 유전자(들)의 발현 수준으로 정규화되면, 표적 유전자의 발현 수준은 표적 유전자에 대한 기준 발현 수준, 예를 들어 건강한 비암성 세포 및/또는 조직 샘플 내의 표적 유전자의 발현 수준과 대비될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 기준 수준은 미리 결정될 수 있다.

[0048] 일부 실시 형태에서, cMET의 유전자 발현 수준을 결정하기 위한 기준 유전자는 SOD1 및/또는 SPG21일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 검정 또는 방법은 핵산 샘플 내의 SOD1 및/또는 SPG21 mRNA의 수준을 결정하는 단계, 예를 들어 샘플을 SOD1 및/또는 SPG21 서열에 특이적인 프라이머 세트들과 접촉시키는 단계, SOD1 및/또는 SPG21 표적(들)의 PCR 증폭을 수행하는 단계, 및 생성된 앰플리콘들의 수준을 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

[0049] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "수퍼옥사이드 디스무타제 1" 또는 "SOD1"은 수퍼옥사이드 라디칼을 파괴하는 디스무타제를 지칭한다. SOD1의 서열은 당업계에 잘 알려져 있다: 예를 들어, 인간 SOD1(NCBI 유전자 ID: 6647; 서열 번호 87(mRNA); 서열 번호 127(폴리펩티드)).

[0050] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "강직성 대마비(spastic paraplegia) 21" 또는 "SPG21"은 CD4에 직접 결합하는 CD4의 음성 조절자(negative regulator)를 지칭한다. SPG21의 서열은 당업계에 잘 알려져 있다: 예를 들어, 인간 SPG21(NCBI 유전자 ID: 51324; 서열 번호 88(mRNA); 서열 번호 128(폴리펩티드)).

[0051] 일부 실시 형태에서, cMET의 유전자 카피수 수준을 결정하기 위한 기준 유전자(들)는 염색체 7 상에 존재하는 적어도 하나의 기준 유전자 및 염색체 7 상에 존재하지 않는 적어도 하나의 기준 유전자를 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, cMET의 유전자 카피수 수준을 결정하기 위한 기준 유전자들은 염색체 7 상에 존재하는 하나의 기준 유전자 및 염색체 7 상에 존재하지 않는 하나의 기준 유전자를 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, cMET의 유전자 카피수 수준을 결정하기 위한 기준 유전자들은 염색체 7 상에 존재하는 둘의 기준 유전자 및 염색체 7 상에 존재하지 않는 둘의 기준 유전자를 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 염색체 7 상에 존재하는 기준 유전자(들)는 EGFR 및/또는 KDEL2일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 염색체 7 상에 존재하지 않는 기준 유전자(들)는 SOD1 및/또는 SPG21일 수 있다.

[0052] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "ER 내강 단백질 보유 수용체(ER lumen protein retaining receptor) 2" 또는 "KDEL2"는 테트라펩티드 신호(KDEL(서열 번호 130))를 통해 시스-골지(cis-Golgi) 또는 프리-골지(pre-Golgi) 구획 내의 단백질에 결합하여, 결합된 단백질이 ER 내강으로 이동되게 하는 수용체를 지칭한다. KDEL2의 서열은 당업계에 잘 알려져 있다: 예를 들어, 인간 KDEL2(NCBI 유전자 ID: 11014; 서열 번호 86(mRNA); 서열 번호 129(폴리펩티드)).

[0053] 일부 실시 형태에서, 염색체 7 상에 위치되지 않은 기준 유전자(들)는 SOD1 및/또는 SPG21일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 제1 세트의 프라이머들은 SOD1 또는 SPG21의 gDNA-특이적 서열에 특이적인 적어도 일 세트의 프라이머들을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 제1 세트의 프라이머들은 SOD1 및 SPG21 각각의 gDNA-특이적 서열에 특이적인 적어도 일 세트의 프라이머들을 포함한다.

[0054] 일부 실시 형태에서, KDEL2가 염색체 7 상의 기준 유전자이고, KDEL2 앰플리콘(들)의 정규화된 수준이 기준 수준과 대비되는 경우, 기준 수준과 대비하여 gDNA-특이적 KDEL2 앰플리콘(들)의 더 높은 수준은 샘플 내의 KDEL2의 유전자 카피수 변경의 존재 및/또는 염색체 7의 다염색체성의 존재를 나타낸다.

[0055] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 검정 및 방법의 정확도 및 신뢰성은 표적 유전자들 각각으로부터 그 표적 유전자 내의 다수의 서열들을 검출함으로써 개선될 수 있는데, 예를 들어 일 세트의 프라이머들은 동일한 유전자의 별개의 서열들에 특이적인 프라이머들의 다수의 하위세트들을 함유하여, PCR 증폭 후에, 각 표적 유전자로부터 유래되는 다수의 앰플리콘들이 존재하도록 할 수 있다. 이는 검정 정확도를 개선할 것으로 예상된다. 일부 실시 형태에서, 주어진 표적 유전자의 수준, 예를 들어 유전자 카피수 수준 또는 유전자 발현 수준은, 예를 들어 기준 수준에 대한 정규화 및 그와의 대비 전에 다수의 앰플리콘들의 수준의 기하 평균(geometric mean)을 구하고/구하거나 평균(average)을 넘으로써 결정될 수 있다.

[0056] 일부 실시 형태에서, 일 프라이머 세트가 각 유전자의 적어도 하나의 앰플리콘을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 일 프라이머 세트가 각 유전자의 적어도 둘의 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 일 프라이머 세트가 각 유전자의 적어도 셋의 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함할 수 있다.

[0057] 일부 실시 형태에서, 프라이머 세트들은 cMET, EGFR, 및 KDEL2 각각의 적어도 둘의 gDNA-특이적 앰플리콘들 및 cMET, SOD1 및 SPG21 각각의 적어도 둘의 mRNA-특이적 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을

포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 프라이머 세트들은 cMET, EGFR, 및 KDEL2-2 각각의 적어도 셋의 gDNA-특이적 앰플리콘들 및 cMET, SOD1 및 SGP21 각각의 적어도 셋의 mRNA-특이적 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함할 수 있다.

[0058] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 검정 및 방법은 cMET 내의 서열 변이의 존재를 검출하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "서열 변이"는 치환, 삽입, 결실, 중복, 또는 재배열을 지칭할 수 있다.

[0059] 예를 들어 점 돌연변이, 예를 들어 단일 뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)을 포함한 서열 변이는 표현형적으로 중립(phenotypically neutral)일 수 있거나, 또는 그 좌위(locus)에서 우세한 서열에 의해 나타나는 것과 그것을 구별하는 관련 변이체 표현형을 가질 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "중립 다형성"은 서열 변이가 유전자 기능을 변경시키지 않는 다형성을 지칭하고, "돌연변이" 또는 "기능적 다형성"은 유전자 기능을 변경시키고, 이에 따라 관련 표현형을 갖는 서열 변이를 지칭한다. 집단에서 일어나는 좌위의 서열 변이는 대립유전자(allele)로 지칭된다. 2개 이상의 대립유전자가 집단 내에서 발생하는 특이적 좌위에 관하여 개체의 유전자형을 언급하는 경우, "우세 대립유전자"는 대상이 되는 집단 내에서 가장 빈번하게 발생하는 것이다(즉, 2개의 대립유전자가 있는 경우, 집단의 50% 초과로 발생하는 대립유전자가 우세 대립유전자이고; 2개 초과인 대립유전자가 있는 경우, "우세 대립유전자"는 최고의 빈도로, 예를 들어 그 부위에서의 다른 대립유전자에 비하여 적어도 5% 더 높은 빈도로 대상 집단 내에서 발생하는 것이다). 용어 "변이형 대립유전자(variant allele)"는 그 집단에서의 우세 대립유전자보다 덜 빈번하게 발생하는 대립유전자 또는 대립유전자들을 지칭하기 위해 사용된다(예를 들어, 2개의 대립유전자가 있는 경우, 변이형 대립유전자는 대상 집단의 50% 미만으로 발생하는 것이고; 2개 초과인 대립유전자가 있는 경우, 변이형 대립유전자들은 우세 대립유전자보다 덜 빈번하게, 예를 들어 적어도 5% 덜 빈번하게 발생하는 것들 전부이다). 서열 변이는 유전자의 gDNA 및/또는 mRNA 내에 존재할(그리고 이에 따라 거기에서 검출될) 수 있다.

[0060] 일부 실시 형태에서, 서열 변이체는 점 돌연변이일 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "점 돌연변이"는 (삽입 및 결실을 포함한) 게놈 좌위의 돌연변이체 카피(mutant copy)에서의 돌연변이의 부위에 존재하는 뉴클레오타이드의 정체(identity)를 지칭하며, 즉 이는 야생형 서열로부터의 단일 염기 위치에서의 뉴클레오타이드의 서열의 변경을 지칭한다. SNP(단일 뉴클레오타이드 다형성)는 집단 내의 상이한 개체들 사이의 동일한 게놈 좌위에서 발생하는 점 돌연변이의 하나의 유형이다. 점 돌연변이는 이것이 동일한 개체 내의 상이한 세포들 사이에서 발생한다는 점에서 체세포 돌연변이일 수 있다.

[0061] 일부 실시 형태에서, 서열 변이는 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP)일 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "단일 뉴클레오타이드 다형성" 또는 "SNP"는 단일 뉴클레오타이드 결실, 삽입, 또는 염기 변화 또는 치환을 포함한 단일 뉴클레오타이드 잔기에서의 핵산 서열 변이를 지칭한다. SNP는 대립유전자 SPN일 수 있다. 일부 SNP는 명확한 표현형, 예를 들어 질병 표현형을 가지며, 한편 다른 것들은 어떠한 기지의 관련 표현형도 갖지 않는다. 본 명세서에 기재된 SNP 검출 방법은 표현형 특성의 예측, 예를 들어 약물에 대한 반응성 또는 민감성의 예측에 사용될 수 있다. 이에 관하여, 본 명세서에 기재되고 당업계에 알려진 SNP 유전자형 결정(genotyping)은 반드시 질병 또는 질병에 대한 감수성의 진단인 것은 아니다.

[0062] 기재된 바와 같이, 일부 실시 형태에서, 변경은 SNP를 포함한다. SNP 좌위의 적어도 4개의 대립유전자가 가능하지만, 표적 부위에 있는 2개의 뉴클레오타이드들 사이에서만 변동하는 SNP는 드물지 않다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 SNP 좌위의 단일 대립유전자를 검출할 수 있는 프라이머 쌍들의 하위세트에 관한 것이다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 SNP 좌위의 2개의 대립유전자를 검출할 수 있는 일 세트의 프라이머들에 관한 것이다(즉, 본 방법 및 조성물은 2개의 SNP 대립유전자의 긍정적 검출(affirmative detection), 또는 그러한 SNP의 "2상(biphasic)" 유전자형 결정을 가능하게 하는 검정에 관한 것일 수 있다). 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 SNP 좌위의 3개의 대립유전자를 검출할 수 있는 일 세트의 프라이머들에 관한 것이다(즉, 본 방법 및 조성물은 3개의 SNP 대립유전자의 긍정적 검출, 또는 그러한 SNP의 "3상(biphasic)" 유전자형 결정을 가능하게 하는 검정에 관한 것일 수 있다). 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 SNP 좌위의 4개의 대립유전자의 긍정적 검출을 가능하게 하는 검정에 관한 것이다(즉, 본 방법 및 조성물은 4개의 SNP 대립유전자의 멀티플렉스 검출, 또는 그러한 SNP의 "4상(quaduphasic)" 유전자형 결정을 가능하게 하는 검정에 관한 것일 수 있다). 일부 실시 형태에서, SNP의 우세 및/또는 야생형 대립유전자가 검출된다. 일부 실시 형태에서, SNP의 우세 및/또는 야생형 대립유전자가 검출되지 않는다. "긍정적으로 검출된다"란, 검정이 그러한 특이적 대립유전자의 증폭을 가능하게 함을 의미한다. 예를 들어 단지 2개의 가능성만이 SNP 부위에 존재하는 것으로 알려져 있는 경우에, 긍정

적 검출의 대안이 사용될 수 있다. 이러한 경우에, 검정은 2개의 변이체들 중 하나는 증폭되고, 다른 하나는 그렇지 않도록 설계될 수 있으며; 검정은 그러한 증폭된 변이체를 긍정적으로 검출하고 다른 하나는 소극적으로 검출할 수 있는데, 즉 산물의 결여는 다른 대립유전자 또는 변이체가 존재함을 의미한다.

[0063] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 검정 또는 방법은 샘플의 제2 부분을 제3 세트의 프라이머 쌍들과 접촉시키는 단계로서, 제3 세트의 프라이머들은 서열 변이를 포함하는 cMET 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하는 것인 단계; 샘플의 제2 부분 및 제3 세트의 프라이머들을 포함하는 반응 혼합물에 대하여 가닥 분리, 프라이머 어닐링, 및 프라이머 신장의 사이클을 포함하는 PCR 증폭 계획을 수행하는 단계; 및 각 프라이머 쌍에 대하여 애플리콘의 수준을 검출하는 단계로서, 애플리콘의 존재는 그 프라이머 쌍이 특이적인 서열 변이의 존재를 나타내는 것인 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 샘플의 제1 부분 및 제1(및 선택적으로, 제2) 프라이머 세트를 포함하는 반응 및 샘플의 제2 부분 및 제3 프라이머 세트를 포함하는 반응은 동일한 열사이클링 조건을 사용하여 수행될 수 있으며, 예를 들어 2개의 반응은 동일한 멀티-웰 플레이트의 별개의 웰들 내에서 동시에 수행될 수 있거나, 또는 동일한 세트의 열사이클링 조건을 사용하여 병렬 기계들 또는 동일한 기계 내의 별개의 관들 내에서 동시에 수행될 수 있다.

[0064] 일부 실시 형태에서, cMET 서열 변이(들)는 SNP일 수 있다. 일부 실시 형태에서, cMET SNP는 다음의 아미노산 잔기 변화를 가져오는 SNP일 수 있다: S1058P; V1101I; H1112Y; H1124D; G1137V; M1149T; V1206L; L1213V; K1262R; M1268T; V1238I; Y1248C; 및/또는 D1246N. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 검정 또는 방법은 다음의 아미노산 잔기 변화를 가져오는 SNP들 중 하나 이상을 특이적으로 증폭시킬 수 있는 제3 프라이머 세트를 포함한다: S1058P; V1101I; H1112Y; H1124D; G1137V; M1149T; V1206L; L1213V; K1262R; M1268T; V1238I; Y1248C; 및/또는 D1246N.

[0065] 다양한 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 적어도 일 세트의 올리고뉴클레오타이드 프라이머들을 사용하여 PCR 증폭 계획을 수행하는 것과 관련되어 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "프라이머"는, 폴리뉴클레오타이드 주형에 서열-특이적으로 어닐링하고 주형-의존성 중합효소에 대한 기질로서의 역할을 하는 3' 말단을 제공하여 폴리뉴클레오타이드 주형에 상보적인 신장 산물을 생성할 수 있는 DNA 또는 RNA 폴리뉴클레오타이드 분자 또는 이들의 유사체를 지칭한다. 개시 및 신장에 대한 조건은 통상, 적합한 완충액 중에서(이와 관련하여, "완충액"은 용매(일반적으로 수성)와 pH, 이온 강도 등에 영향을 주는 데 필요한 보조인자(cofactor) 및 시약을 포함함) 그리고 적합한 온도에서, 적어도 하나의, 그러나 더 바람직하게는 모든 4개의 상이한 데옥시리보뉴클레오타이드 삼인산염 및 중합 유도제, 예컨대 DNA 중합효소 또는 역전사효소의 존재를 포함한다. 본 명세서에 기재된 방법에 유용한 프라이머는 일반적으로 단일가닥이며, 프라이머 및 그의 보체를 어닐링하여 이중가닥 폴리뉴클레오타이드를 형성할 수 있다. 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물에 따른 프라이머는 300개 이하의 뉴클레오타이드 길이, 예를 들어 300, 또는 250, 또는 200, 또는 150, 또는 100, 또는 90, 또는 80, 또는 70, 또는 60, 또는 50, 또는 40개 이하, 그리고 바람직하게는 30개 이하, 또는 20개 이하, 또는 15개 이하, 그러나 적어도 10개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다.

[0066] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "세트"는 일 그룹의 핵산 샘플들, 프라이머들 또는 다른 실체(entity)들을 의미한다. 일 세트는 기지의 수의 그리고 적어도 2개의 그러한 실체들을 포함할 것이다. 일 세트의 프라이머들은 표적 서열에 특이적인 적어도 하나의 순방향 프라이머 및 적어도 하나의 역방향 프라이머를 포함한다. 일 세트의 프라이머들은 적어도 하나의 프라이머 쌍 하위세트, 예를 들어 일 프라이머 쌍 하위세트, 두 프라이머 쌍 하위세트들, 셋 프라이머 쌍 하위세트들, 넷 프라이머 쌍 하위세트들, 다섯 프라이머 쌍 하위세트들, 여섯 프라이머 쌍 하위세트들, 또는 그 이상의 프라이머 쌍 하위세트들을 포함할 것이다. 일 세트의 프라이머들은 동일한 유형의 변형을 검출하는 프라이머 쌍 하위세트들의 그룹, 예를 들어 유전자 카피수 수준, 발현 수준, 또는 서열 변이를 검출할 수 있는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함한다. 일 세트의 프라이머들은 상이한 유전자들에서 동일한 유형의 변형을 검출하는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함할 수 있으며, 예를 들어 일 프라이머 세트는 둘의 프라이머 쌍 하위세트들을 포함할 수 있으며, 이들 중 하나는 cMET에서의 유전자 카피수 수준을 검출하고, 이들 중 다른 하나는 KDELR-2에서의 유전자 카피수 수준을 검출한다.

[0067] 따라서, 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "일 프라이머 쌍 하위세트"는 순방향 프라이머 및 역방향 프라이머를 포함하는, 일 그룹의 적어도 2개의 프라이머들을 지칭하며, 이들 중 하나는 표적 핵산 서열의 제1 가닥에 어닐링되고, 이들 중 다른 하나는 제1 가닥의 보체에 어닐링된다. 일부 실시 형태에서, 일 프라이머 쌍 하위세트의 제1 프라이머는 표적 핵산 서열의 제1 가닥에 어닐링될 수 있고, 일 프라이머 쌍 하위세트의 제2 프라이머(예를 들어, 역방향 프라이머)는 그 가닥의 보체에 어닐링될 수 있다. 표적 및/또는 그의 보체에 어닐링될 때 프라이머들의 배향은, 프라이머 쌍 하위세트의 하나의 프라이머의 프라이머 신장으로부터 진행되는 핵산 합성이 프라

이며 쌍 하위세트의 제2 프라이머의 적어도 하나의 영역에 상보적인 핵산 서열을 생성하도록 하는 배향일 수 있다. 핵산 표적 및/또는 서열의 "제1 가닥"은 표적 뉴클레오타이드 및/또는 표적 부위 좌위의 서열을 포함하는 이중가닥 핵산의 어느 한 가닥일 수 있지만, 일단 선택되면, 제2 가닥으로서 그의 보체를 규정한다. 따라서, 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "순방향 프라이머"는 핵산 표적의 제1 가닥에 어닐링되는 프라이머이며, 한편 동일한 그 세트의 "역방향 프라이머"는 핵산 표적의 제1 가닥의 보체에 어닐링되는 프라이머이다.

[0068] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 표적 핵산에 특이적인 프라이머와 관련하여 사용될 때 "특이적"은, 어닐링 온도가 존재하도록 하는, 프라이머와 표적 사이의 상보성의 수준을 지칭하는데, 이때 어닐링 온도에서는 프라이머가 표적 핵산에 어닐링되어 그의 증폭을 매개하게 될 것이고 샘플 내에 존재하는 비표적 서열에 어닐링되지 않거나 그의 증폭을 매개하지 않게 될 것이다. 서열 변이를 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들과 관련하여, 하위세트의 프라이머들 중 적어도 하나는 서열 변이에 특이적이며, 예를 들어 이 프라이머 쌍 하위세트는 서열 변이를 포함하지 않는 야생형 서열을 증폭시키지 않을 것이다.

[0069] 일부 실시 형태에서, gDNA의 존재 하에서 mRNA 또는 cDNA를 특이적으로 검출하기 위하여, 하나 이상의 mRNA-특이적 프라이머는 인트론-스패닝(intron-spanning) 프라이머일 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 프라이머 쌍 하위세트는 그것이 mRNA 및/또는 cDNA로부터는 앰플리콘을 증폭시키지만 gDNA로부터는 그렇지 않다면, 또는 mRNA 및/또는 cDNA로부터 증폭된 앰플리콘이 gDNA로부터 증폭된 앰플리콘과 크기에 있어서 구별가능하다면 "mRNA-특이적"이다. mRNA 및/또는 cDNA로부터는 앰플리콘을 증폭시키지만 gDNA로부터는 그렇지 않은 mRNA-특이적 프라이머 쌍 하위세트는, 예를 들어 mRNA 또는 cDNA의 엑손-엑손 경계에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 프라이머를 포함할 수 있으며, 예를 들어 그것이 인트론이 제거된 mRNA 또는 cDNA에는 특이적으로 결합하지만 인트론이 존재하는 gDNA에는 그렇지 않을 수 있도록 할 수 있다. mRNA 및/또는 cDNA로부터 앰플리콘을 증폭시키고 gDNA로부터 증폭된 앰플리콘과 크기에 있어서 구별가능한 mRNA-특이적 프라이머 쌍 하위세트는, 예를 들어 하나 이상의 인트론 옆에 배치되는 서열들에 특이적으로 결합하는 프라이머들을 포함하여, 프라이머 쌍 하위세트에 의해 특이적으로 결합되는 서열들 사이의 거리가 하나 이상의 인트론이 결여되어 있는 mRNA 또는 cDNA에서 보다 gDNA에서 더 크게 되도록 할 수 있다. 일부 실시 형태에서, RNA 또는 cDNA의 존재 하에서 gDNA를 특이적으로 검출하기 위하여, 하나 이상의 gDNA-특이적 프라이머가 표적 핵산 서열의 인트론에 특이적으로 어닐링될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 프라이머 쌍 하위세트는 그것이 gDNA로부터는 앰플리콘을 특이적으로 증폭시키지만 mRNA 또는 cDNA로부터는 그렇지 않다면 "gDNA-특이적"이다. 일부 실시 형태에서, 짧은 표적 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, miRNA 또는 분해된 표적 폴리뉴클레오타이드)뿐만 아니라 더 긴 표적 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 게놈 DNA 내의 표적 부위 좌위 또는 mRNA)도 검출하기 위하여, 적어도 더 짧은 표적 폴리뉴클레오타이드에 대한 프라이머는 표적 서열보다 더 큰 별개의 크기의 증폭된 산물을 생성하는 태그 서열을 포함할 수 있다. 태그들은 반응에서의 모든 증폭된 산물들이 뚜렷이 다른 크기들을 갖게 되도록 설계될 수 있다.

[0070] 프라이머의 제조 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 다수의 상업적 공급원이 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물에 따른 프라이머를 제공하기에 적합한 올리고뉴클레오타이드 합성 서비스를 제공하는데, 예를 들어 미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재의 Life Technologies사의 INVITROGEN™ Custom DNA Oligos 또는 미국 아이오와주 코랄빌 소재의 IDT사로부터의 Custom DNA Oligos가 있다.

[0071] 일부 실시 형태에서, 하나 이상의 프라이머가 이중 도메인 프라이머일 수 있다. 이중 도메인 프라이머는 2013년 2월 22일에 출원된 PCT/US13/27383호에 상세히 기재되어 있으며, 이 출원의 내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0072] 프라이머의 예시적인 실시 형태가 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, 하나 이상의 프라이머가 서열 번호 1-83으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 제1 세트의 프라이머들의 하나 이상의 프라이머가 서열 번호 10-18 및 28-36으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 제2 세트의 프라이머들의 하나 이상의 프라이머가 서열 번호 1-10, 19-27, 및 37-45로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 제1 및 제2 세트의 프라이머들에 대한 예시적인 프라이머 쌍들의 하위세트들이 표 2에 묘사되어 있다. 일부 실시 형태에서, 제3 세트의 프라이머들의 하나 이상의 프라이머가 서열 번호 46-64로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 제3 세트의 프라이머들의 하나 이상의 프라이머가 서열 번호 64-83으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 프라이머들은 대략 표 2의 농도로 반응 혼합물(들) 내에 존재할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 하나 이상의 프라이머가 서열 번호 89-124 중 어느 하나의 서열을 포함한다.

[0073] 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 중합효소 연쇄 반응(PCR) 증폭 계획을 수행하는 것과 관련되어 있다. 본

명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "증폭 계획"은 관심 핵산 서열을 특이적으로 증폭시키는, 즉 그의 풍부도(abundance)를 증가시키는 과정을 지칭하며, 더 상세하게는, 이전 증합효소 신장의 산물들이 신장의 연속적 라운드를 위한 주형으로서의 역할을 할 때 일어나는 지수적 증폭을 지칭한다. 본 발명에 따른 PCR 증폭 계획은 적어도 2회, 그리고 바람직하게는 적어도 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35회 또는 그 이상의 반복 사이클을 포함하며, 여기서 각 사이클은 하기 단계를 포함한다: 1) 가닥 분리(예를 들어, 열 변성); 2) 주형 분자에 대한 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 어닐링; 및 3) 어닐링된 프라이머의 핵산 증합효소 신장. 이들 단계 각각에 대해 필요한 조건 및 시간은 당업자에 의해 안출될 수 있다. 본 명세서에 기재된 방법에 따른 증폭 계획은 바람직하게는 열 사이클러에서 수행되며, 이들 중 다수는 구매가능하다.

[0074] 일부 실시 형태에서, 핵산 샘플은, 예를 들어 mRNA의 수준이 본 명세서에 기재된 바와 같이 결정되어야 할 때, 본 명세서에 기재된 PCR 증폭 계획 전에 역전사를 거칠 수 있다. 역전사 프로토콜 및 시약은 당업계에 잘 알려져 있으며 구매가능하다. 역전사 계획의 예시적인 실시 형태는 다음과 같다: RNA 및 gDNA(예를 들어, 25 ng의 RNA 및 2.5 ng의 gDNA) 둘 모두를 포함하는 5 μ L의 핵산 샘플을 RT 완충액, 0.5 mM dNTP, 5 nM RT 프라이머, 및 20개 단위의 SuperScript III™ 역전사효소(RNA-의존성 DNA 증합효소)를 포함하는 반응 혼합물에 첨가한다. 이어서, 반응물을 50°C에서 30분 동안, 90°C에서 5분 동안, 그리고 4°C에서 5분 동안 인큐베이팅한다. 본 방법 및 검정에 사용하기에 적합한 RT 프라이머의 예시적인 실시 형태가 본 명세서의 실시예에 기재되어 있으며, 예를 들어 서열 번호 1-9의 것이다.

[0075] PCR은 핵산 증합효소의 사용을 필요로 한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 어구 "핵산 증합효소"는 뉴클레오타이드 삼인산염의 주형-의존성 증합을 촉매하여 주형 핵산 서열에 상보적인 프라이머 신장 산물들을 형성하는 효소를 지칭한다. 핵산 증합효소의 효소는 어닐링된 프라이머의 3' 말단에서 합성을 개시하고 주형의 5' 말단을 향하는 방향으로 진행한다. 다수의 핵산 증합효소가 당업계에 알려져 있으며 구매가능하다. 일 그룹의 바람직한 핵산 증합효소들은 열안정성이며, 즉 이들은 상보적인 핵산의 어닐링된 가닥을 변성시키기에 충분한 온도에 노출된 후에 기능을 보유하는데, 이러한 온도는, 예를 들어 94°C, 또는 때때로 그 이상이다. 일부 실시 형태에서, 증합효소는 델타-엑소-Apta Taq 증합효소일 수 있다.

[0076] 당업계에서 이해되는 바와 같이, PCR은 가닥 분리 단계를 포함하는 사이클을 필요로 하는데, 가닥 분리 단계는 일반적으로 반응 혼합물의 가열을 수반한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "가닥 분리" 또는 "가닥들을 분리하는"이란, 상보적인 이중가닥 분자들이 올리고뉴클레오타이드 프라이머에 대한 어닐링에 이용가능한 2개의 단일 가닥으로 분리되도록 핵산 샘플을 처리하는 것을 의미한다. 더 구체적으로는, 본 명세서에 기재된 방법에 따른 가닥 분리는 핵산 샘플을 그의 T_m 을 초과하여 가열함으로써 달성된다. 일반적으로, 핵산 증합효소에 적합한 완충액 중에 핵산 분자가 들어 있는 샘플의 경우, 94°C로의 가열이 가닥 분리를 달성하기에 충분하다. 예시적인 완충액은 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl(25°C에서 pH 8.8), 0.5 내지 3 mM MgCl₂, 및 0.1% BSA를 함유한다.

[0077] 당업계에서 또한 이해되는 바와 같이, PCR은 프라이머를 주형 핵산에 어닐링하는 것을 필요로 한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "어닐링"은 2개의 상보적인 또는 실질적으로 상보적인 핵산 가닥이 혼성화(hybridize)될 수 있게 하는 것을 지칭하며, 더 상세하게는, PCR과 관련하여 사용될 때, 주형-의존성 증합효소를 위한 프라이머 신장 기질이 형성되도록 혼성화하는 것을 지칭한다. 프라이머-표적 핵산 어닐링에 대한 조건은 프라이머의 길이 및 서열에 따라 변동하고, 프라이머에 대해 계산된 T_m 에 기초한다. 일반적으로, 증폭 계획에서의 어닐링 단계는 가닥 분리 단계 후에 온도를, 그러한 어닐링을 가능하게 하기에 충분한 시간 동안 프라이머 서열에 대해 계산된 T_m 에 기초한 온도까지 감소시키는 것을 수반한다.

[0078] T_m 은 다수의 널리 입수가능한 알고리즘들(예를 들어, OLIGO™(미국 콜로라도주 소재의 Molecular Biology Insights Inc.사) 프라이머 설계 소프트웨어 및 VENTRO NTI™(미국 캘리포니아주 소재의 Invitrogen, Inc.사) 프라이머 설계 소프트웨어, 및 Primer3 및 Oligo Calculator를 포함한 인터넷 상에서 입수가능한 프로그램들) 중 임의의 것을 사용하여 당업자에 의해 용이하게 예측될 수 있다. 예를 들어, T_m 은 NetPrimer 소프트웨어(미국 캘리포니아주 팔로알토 소재의 Premier Biosoft사; 및 월드 와이드 웹 상에서 <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/Help/xnetprlaunch.html>에서 무료로 입수가능함)를 사용하여 계산될 수 있다. 프라이머의 T_m 은 또한 다음 식을 사용하여 계산될 수 있는데, 이 식은 NetPrimer 소프트웨어에 의해 사용되고 문헌[Frieir et al. PNAS 1986 83:9373-9377]에 더 상세히 기재되어 있으며, 이 문헌은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

- [0079] $T_m = \Delta H / (\Delta S + R * \ln(C/4)) + 16.6 \log ([K^+]/(1 + 0.7 [K^+])) - 273.15$
- [0080] 이 식에서, ΔH 는 나선 형성을 위한 엔탈피이고; ΔS 는 나선 형성을 위한 엔트로피이고; R 은 몰 기체 상수 (molar gas constant)(1.987 cal/°C * mol)이고; C 는 핵산 농도이고; $[K^+]$ 는 염 농도이다. 대부분의 증폭 계획의 경우, 어닐링 온도는 예측된 T_m 보다 약 5°C 미만이도록 선택되지만, T_m 에 더 가깝거나 그를 초과하는 온도(예를 들어, 예측된 T_m 보다 1°C 내지 5°C 미만 또는 예측된 T_m 보다 1°C 내지 5°C 초과)가 선택될 수 있으며, 이는, 예를 들어 예측된 T_m 보다 5°C 초과 미만인 온도(예를 들어, 6°C 미만, 8°C 미만, 10°C 미만 또는 그보다 더 낮은 온도)일 수 있는 바와 같다. 일반적으로, 어닐링 온도가 T_m 에 더 가까울수록, 어닐링은 더 특이적이다. PCR 증폭 계획 동안 프라이머 어닐링을 가능하게 하는 시간은 반응의 부피에 크게 좌우되어 더 큰 부피는 더 긴 시간을 필요로 하지만, 또한 프라이머 및 주형 농도에도 좌우되어 주형에 대한 프라이머의 더 높은 상대 농도는 더 낮은 상대 농도보다 더 적은 시간을 필요로 한다. 부피 및 상대 프라이머/주형 농도에 따라, 증폭 계획에서의 프라이머 어닐링 단계는 1초 내지 5분 정도일 수 있지만, 일반적으로는 10초 내지 2분이며, 바람직하게는 30초 내지 2분의 정도일 것이다.
- [0081] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "실질적으로 어닐링하다"는 특이적으로 증폭된 산물의 검출가능한 수준을 생성하기에 충분한 PCR 증폭 계획 동안의 어닐링의 정도를 지칭한다.
- [0082] PCR은 또한 각 사이클에서 어닐링된 프라이머의 중합효소 신장에 의지한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "중합효소 신장"은 핵산 중합 효소에 의한 어닐링된 프라이머의 3' 말단 상에의 적어도 하나의 상보적인 뉴클레오타이드의 주형-의존성 혼입을 의미한다. 중합효소 신장은 바람직하게는 하나 초과 뉴클레오타이드, 바람직하게는 최대 주형의 전체 길이에 상응하는 뉴클레오타이드에 이르기까지 부가시킨다. 중합효소 신장에 대한 조건은 중합효소의 정체에 따라 변동한다. 중합효소 신장에 사용되는 온도는 일반적으로 그 효소의 알려진 활성 특성에 기초한다. 그렇기는 하지만, 어닐링 온도가, 예를 들어 효소에 대한 최적 온도보다 낮을 것을 필요로 하는 경우에, 더 낮은 신장 온도를 사용하는 것이 종종 허용될 것이다. 일반적으로, 효소는 그의 최적 신장 온도 미만에서 적어도 부분적인 활성을 보유하긴 하지만, 가장 일반적으로 사용되는 열안정성 중합효소(예를 들어, Taq 중합효소 및 그의 변이체)에 의한 중합효소 신장은 65°C 내지 75°C, 바람직하게는 약 68 내지 72°C에서 수행된다.
- [0083] 프라이머 신장은 어닐링된 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 신장을 가능하게 하는 조건 하에서 수행된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "신장 산물들이 생성되도록, 어닐링된 올리고뉴클레오타이드의 신장을 가능하게 하는 조건"은, 예를 들어 온도, 염 및 보조인자 농도, pH, 및 핵산 중합효소가 프라이머 신장을 촉매하는 효소 농도를 포함하는 조건 세트를 지칭한다. 그러한 조건은 사용되는 핵산 중합효소의 정체에 따라 변동하겠지만, 다수의 유용한 중합효소에 대한 조건이 당업자에게 잘 알려져 있다. 일 예시적인 조건 세트는 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl(25°C에서 pH 8.8), 0.5 내지 3 mM MgCl₂, 200 uM 각 dNTP, 및 0.1% BSA가 72°C에 있는 것으로, 이 온도 하에서 Taq 중합효소가 프라이머 신장을 촉매한다.
- [0084] 일부 실시 형태에서, 열사이클링 조건은 도 11에 묘사된 프로토콜에 따를 수 있다.
- [0085] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 방법 및 검정에 사용하기 위한 완충액은 Tris 완충액, 트레할로스, 아세트산칼륨, 글리세롤, 베타인, 염화마그네슘, 염화칼륨, 황산암모늄, DMSO, DTT, BSA, dNTP, Tween-20 및 중합효소를 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 방법 및 검정에 사용하기 위한 완충액은 10 내지 400 mM Tris 완충액(pH 7.5 내지 9.5), 2 내지 20% 트레할로스, 10 내지 300 mM 아세트산칼륨, 1 내지 7.5% 글리세롤, 100 mM 내지 2M 베타인, 2.5 내지 12.5 mM 염화마그네슘, 1 내지 10 mM 염화칼륨, 1 내지 10 mM 황산암모늄, 0.1 내지 2% DMSO, 1 내지 10 mM DTT, 10 내지 1,000 ug/mL BSA, 50 내지 400 mM dNTP, 0 내지 1% Tween-20 및 1 내지 10개 효소 단위의 중합효소를 포함할 수 있다.
- [0086] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "증폭된 산물" 또는 "앰플리콘"은 특정 표적 핵산 서열 및/또는 그의 상보적인 서열 - 이는 뉴클레오타이드 서열에서 주형 핵산 서열 및/또는 그의 상보적인 서열에 상응함 - 의 일부분의 카피인 PCR 반응으로부터 생성된 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 증폭된 산물은 일반적으로 이중가닥 DNA이겠지만, 그의 개별 가닥들을 언급할 수 있다.
- [0087] 본 명세서에 기재된 방법은 유전자 카피수 및 그의 변이를 정량화 또는 평가하기 위해서뿐만 아니라 유전자 발현 및/또는 유전자 돌연변이의 정량화 또는 평가를 위해서도 PCR을 사용한다. 본 명세서에 기재된 방법들 중

임의의 것에 있어서, 복수의 사이클에서 PCR 반응으로부터 샘플을 인출하여, 인출된 샘플 내의 앰플리콘들의 양을 분리하고 검출함으로써 정량화가 달성될 수 있다. 이러한 방식으로 측정된 각 앰플리콘에 대한 증폭 프로파일은 초기 주형의 정량화를 가능하게 한다. 예를 들어 미국 특허 제8,321,140호 및 미국 특허 출원 공개 제2013/0053274호를 참조하며; 이들은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0088] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 멀티플렉스 PCR과 관련되어 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "멀티플렉스 PCR"은 PCR의 변형을 지칭하는데, 여기서는 일 세트 내의 한 쌍 초과와 프라이머들(예를 들어, 적어도 하나 초과와 순방향 및/또는 하나 초과와 역방향 프라이머)을 사용함으로써, 하나의 반응 베셀 내에서의 하나 초과와 표적 핵산 서열의 동시 증폭 또는 다수의 산물들의 병행 검출이 달성될 수 있다. 멀티플렉스 증폭은 복수의 표적들의 존재를 검출하는 데 있어서 뿐만 아니라, 결실, 돌연변이, 및 다형성의 분석, 검출, 및/또는 유전자형 결정, 및/또는 발현 수준에 있어서도 유용하고/하거나 정량적인 검정에 있어서도 유용할 수 있다. 멀티플렉스는 단일 반응에서 2 내지 1,000개의 상이한 표적 서열들의 검출 및/또는 표적 핵산의 변형의 검출을 지칭할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 멀티플렉스는 단일 반응에서의 2 내지 1,000개, 예를 들어 5 내지 500개, 25 내지 1000개, 또는 10 내지 100개의 상이한 표적 서열들의 임의의 범위의 검출 등을 지칭한다. 비제한적인 예로서, 본 명세서에 기재된 방법의 일부로서의 멀티플렉스 PCR 반응은 단일 반응에서 적어도 2개의 상이한 대립유전자 표적 부위 좌위들에서의 적어도 2개의 SNP의 2개 이상의 가능한 대립유전자의 존재를 긍정적으로 검출할 수 있다. PCR에 적용될 때의 용어 "멀티플렉스"는 동일한 PCR 반응에서 적어도 2개의 상이한 표적 서열들에 특이적인 프라이머들이 존재함을 암시한다. 따라서, 2개의 상이한 표적 서열들에 특이적인 프라이머 세트들이 존재하는 반응이 멀티플렉스 증폭인 것으로 여겨지는데, 이는 실제로, 주어진 샘플에서 적어도 2개의 표적 서열들 중 단지 하나만이 검출된다 하더라도(또는 심지어는 어느 것도 검출되지 않는다 하더라도) 그러하다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 멀티플렉스 PCR은 또한 다수의 쌍들의 프라이머들을 포함하는 반응을 지칭할 수 있으며, 여기서 반응은 하나의 또는 다수의 표적들이 반응에 존재할 때 하나의 또는 다수의 특이적인 증폭된 산물들을 생성할 수 있다.

[0089] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 멀티모달 PCR과 관련되어 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "멀티모달"은 멀티플렉스 PCR의 변형을 지칭하는데, 여기서는 하나 초과와 유형 또는 부류의 분자의 동시 증폭 또는 변형이 하나의 반응 베셀 내에서 발생한다. 일부 실시 형태에서, 멀티모달 증폭은 유전자 카피수, 발현 수준, 및/또는 서열 변이의 분석에 유용할 수 있다. 멀티모달은 적어도 2개의 상이한 유형의 표적들, 즉 2개의 상이한 유형의 표적들, 또는 3개의 상이한 유형의 표적들의 검출을 지칭할 수 있다. 비제한적인 예로서, 멀티모달 PCR 반응은 단일 반응에서 유전자 카피수의 수준 및 mRNA 발현 산물들의 수준을 검출할 수 있으며, 이에겐 그러한 표적들의 정량화가 포함된다.

[0090] 예를 들어 증폭 반응 동안에 또는 그 후에 임의의 시간에서의 반복된 샘플링에 이어 증폭 산물들의 분리 및 검출을 행함으로써, 정량적 측면이 실시될 수 있다. 샘플링은, 예를 들어 반응의 분취물(aliquot)을 회수하는 것을 포함할 수 있다. 샘플링은, 예를 들어 매 사이클마다 종료 시에, 또는 수 회 사이클마다, 예를 들어 2회 사이클마다, 3회 사이클마다, 4회 사이클마다 등의 종료 시에 일어날 수 있다. 균일한 샘플링 간격이 대부분의 경우에 요구되겠지만, 샘플링이 균일한 간격으로 수행되는 것이 필요조건은 아니다. 단지 한 예로서, 샘플링 루틴은 최초의 5회 사이클에 대해서는 매 사이클 후마다 샘플링하고, 이어서 다른 사이클 후마다 샘플링하거나 또는 그 반대로 하는 것을 수반할 수 있다.

[0091] 증폭 반응으로부터의 분취물의 샘플링 또는 분배는 몇몇 상이한 일반적 포맷들 중 임의의 것으로 수행될 수 있다. 샘플링 또는 회수 방법은 이용가능한 장비, 분석하고자 하는 샘플들의 수, 및 샘플 수집(예를 들어, 병행적 대 순차적)에 따른 검출 시기를 포함하지만 이로 한정되지 않는 다수의 인자들 중 임의의 것에 좌우될 수 있다. 샘플의 회수 또는 추출의 정확한 방법은 반드시 본 명세서에 기재된 방법의 제한은 아니다. 샘플링은 바람직하게는, 특히 고처리량 응용의 경우, 자동화 장치를 사용하여 수행된다. 샘플링은 또한 PCR 반응으로부터 모세관 전기영동 장치 내로의 직접적인 동전학적 또는 수력학적 주입(direct electrokinetic or hydrodynamic injection)을 사용하여 수행될 수 있다. 본 방법에서 사용되는 샘플링 방법은 바람직하게는, 예를 들어 단회 분취물이 인출된 후에 처분되는 피펫팅 팁 또는 니들을 사용함으로써, 또는 동일한 PCR 반응 베셀로부터 샘플을 분배하기 위하여 동일한 팁 또는 니들을 사용함으로써 사이클링 반응(들)의 오염을 최소화하도록 되어 있다. 샘플링과 검출의 동시 수행을 위한 방법은 당업자에게 알려져 있다(예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2004/0166513호를 참조하며, 이는 본 명세서에 참고로 포함된다).

[0092] 샘플링 단계에서 분배되는 분취물의 부피 및/또는 핵산의 양은, 예를 들어 증폭 반응의 총 부피, 산물 검출의 감도, 및 사용되는 샘플링 및/또는 분리의 유형에 따라 변동할 수 있다. 증폭 부피는 수 마이크로리터로부터

수백 마이크로리터까지(예를 들어, 5 μl , 10 μl , 20 μl , 40 μl , 60 μl , 80 μl , 100 μl , 120 μl , 150 μl , 또는 200 μl 또는 그 이상), 바람직하게는 10 내지 150 μl 의 범위, 더 바람직하게는 10 내지 100 μl 의 범위로 변동할 수 있다. 증폭 반응의 정확한 부피는 본 발명의 제한이 아니다. 분취물 부피는 반응 혼합물의 0.01% 내지 30%로 변동할 수 있다. 모세관 전기영동 장치 내로의 동전학적 주입은 일반적으로 핵산을 로딩하지만 샘플링된 반응의 부피를 상당히 감소시키지는 않을 것이다. 증폭 계획은, 선택적으로 멀티웰 용기 내에서, 복수의 독립적인 핵산 증폭 혼합물들에 대해 수행될 수 있다. 증폭 반응(들)이 수행되는 용기(들)는 반드시 본 명세서에 기재된 방법의 제한은 아니다.

[0093] 다양한 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 각 표적 핵산 서열에 대해, 예를 들어 각 표적 변경에 대해 증폭된 산물들(예를 들어, 앰플리콘들)을 검출하는 것과 관련되어 있다. 일부 실시 형태에서, 각 표적 핵산 서열에 대해 증폭된 산물의 검출은 샘플 내의 표적 핵산 서열의 존재를 긍정적으로 지시한다. 일부 실시 형태에서, 각 표적 핵산 서열에 대해 증폭된 산물의 정량적인 검출은 샘플 내의 그러한 표적 핵산 서열의 수준을 긍정적으로 지시한다.

[0094] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 서로 구별가능해야 하는 둘 이상의 프라이머 쌍 하위세트들의 증폭된 산물들과 관련되어 있다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 둘 이상의 프라이머 쌍 하위세트들의 증폭된 산물들이 뚜렷이 다른 크기들을 가짐으로써 구별될 수 있는 PCR 증폭 계획과 관련되어 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 핵산은 그것이 상이한 크기의 핵산들로부터 분해가능하다면(resolvable) "뚜렷이 다른 크기"를 갖는다. "상이한 크기들"은 적어도 1개의 뉴클레오타이드 길이에 의해 상이한 핵산 분자들을 지칭한다. 일반적으로, 본 명세서에 기재된 방법에 따라 유용한 뚜렷이 다른 크기의 증폭 산물들은 주어진 분리 또는 검출 방법에 사용되는 분리 과정을 위한 분해 한계(limit of resolution) 이상의 뉴클레오타이드들의 수에 의해 상이하다. 예를 들어, 분리의 분해 한계가 1개의 염기인 경우, 뚜렷이 다른 크기의 증폭 산물들은 적어도 1개의 염기 길이에 의해 상이하지만, 2개의 염기, 5개의 염기, 10개의 염기, 20개의 염기, 50개의 염기, 100개의 염기 또는 그 이상에 의해 상이할 수 있다. 분해 한계가, 예를 들어 10개의 염기인 경우, 뚜렷이 다른 크기의 증폭 산물들은 적어도 10개의 염기에 의해 상이하겠지만, 11개의 염기, 15개의 염기, 20개의 염기, 30개의 염기, 50개의 염기, 100개의 염기 또는 그 이상에 의해 상이할 수 있다.

[0095] 일부 실시 형태에서, 프라이머들 또는 이들의 임의의 부분의 길이 및 이들이 어닐링되는 표적 핵산 서열의 세그먼트의 길이 둘 모두는 변동할 수 있다. 증폭된 표적 서열의 길이에 있어서, 예를 들어 더 멀거나 더 가깝게 떨어진 순방향 및 역방향 프라이머의 선택된 배치에 의한 변동은 상이한 표적들로부터의 산물들 사이의 용이한 구별을 보장하기 위한 간단한 접근법이다. 프라이머의 길이의 변동, 특히 이중 도메인 프라이머들의 5' 꼬리 영역들의 길이의 변동이 특히 효과적인데, 예를 들어 검정에서 주어진 표적 좌위의 특이적 대립유전자들의 산물들을 구별하는 것이다.

[0096] 일부 실시 형태에서, 증폭된 산물들은 상이한 검출가능한 표지들로 표지됨으로써 구별된다. 일부 실시 형태에서, 표지는 프라이머 내로 혼입된다. 일부 실시 형태에서, 표지는 프라이머에 접합된다.

[0097] 일부 실시 형태에서, 표지는 PCR 증폭 계획이 완료된 후에 프라이머에 결합된다. 일부 실시 형태에서, 표지는 프라이머에, 또는 그에 부착된 모이어티(moiety)에 특이적으로 결합하는 올리고뉴클레오타이드 또는 항체 또는 그 일부분에 접합된다.

[0098] 2개의 검출가능한 표지는 하나의 표지로부터의 신호가 다른 하나로부터의 신호와 구별될 수 있다면 상이한 것으로 여겨진다. 검출가능한 표지들은, 예를 들어 광-흡수 염료, 형광 염료, 또는 방사성 표지를 포함할 수 있다. 형광 염료가 바람직하다. 일반적으로, 형광 신호는 피크 방출 파장들이 적어도 20 nm만큼 분리되어 있다면 다른 형광 신호와 구별가능하다. 더 큰 피크 분리가 바람직하며, 좁거나 더 갑작스러운 피크들이 아니라, 주어진 반응에서의 형광단들의 방출 피크들이 넓은 경우에 특히 바람직하다.

[0099] 검출가능한 표지, 그의 검출 방법, 및 그를 증폭된 산물 내로 혼입하거나 그를 증폭된 산물에 커플링 및/또는 결합하는 방법이 당업계에 잘 알려져 있다. 다음은 비제한적인 예로 제공된다.

[0100] 일부 실시 형태에서, 검출가능한 표지는 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적, 전자기적, 방사화학적, 또는 화학적 수단, 예컨대 형광, 화학형광, 또는 화학발광, 또는 임의의 다른 적절한 수단에 의해 검출될 수 있는 표지를 포함할 수 있다.

[0101] 본 명세서에 기재된 방법에 사용되는 검출가능한 표지는 1차 표지(표지가 직접 검출가능한 모이어티 또는 직접 검출가능한 모이어티를 생성하는 모이어티를 포함하는 경우) 또는 2차 표지(검출가능한 표지가 다른 모이어티에

결합하여 검출가능한 신호를 생성하는 경우로서, 예를 들어 2차 및 3차 항체를 사용하는 면역학적 표지화에서 일반적인 바와 같음)일 수 있다.

- [0102] 검출가능한 표지는 공유 또는 비공유 수단에 의해 핵산에 연결될 수 있다. 대안적으로, 검출가능한 표지는, 예를 들어 리간드-수용체 결합 쌍 배열을 통해 다른 핵산에 대한 결합을 달성하는 분자 또는 다른 그러한 특이적 인식 분자들을 직접 표지화함으로써 연결될 수 있다. 검출가능한 표지는 방사성 동위원소, 생물발광 화합물, 발색단, 항체, 화학발광 화합물, 형광 화합물, 금속 킬레이트, 및 효소를 포함할 수 있지만 이로 한정되지 않는다.
- [0103] 일부 실시 형태에서, 검출가능한 표지는 형광 염료 분자 또는 형광단일 수 있으며, 이에 포함되지만 이로 한정되지 않는다: 플루오레세인, 피코에리트린, Cy3™, Cy5™, 알로피코시아닌, 텍사스 레드(Texas Red), 페리딘 클로로필, 시아닌, 탠덤 접합체(tandem conjugate), 예컨대 피코에리트린-Cy5™, 녹색 형광 단백질, 로다민, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC) 및 오레곤 그린(Oregon Green)™, 로다민 및 유도체(예를 들어, 텍사스 레드 및 테트라로다민 이소티오시아네이트(TRITC)), 비오틴, 피코에리트린, AMCA, CyDyes™, 6-카르복시플루오레세인(약어 FAM 및 F로 일반적으로 알려짐), 6-카르복시-2',4',7',4,7-헥사클로로플루오레세인(HEX), 6-카르복시-4',5'-디클로로-2',7'-디메톡시플루오레세인(JOE 또는 J), N,N,N',N'-테트라메틸-6카르복시로다민(TAMRA 또는 T), 6-카르복시-X-로다민(ROX 또는 R), 5-카르복시로다민-6G(R6G5 또는 G5), 6-카르복시로다민-6G(R6G6 또는 G6), 및 로다민 110; 시아닌 염료, 예를 들어 Cy3, Cy5 및 Cy7 염료; 쿠마린, 예를 들어 움벨리페론; 벤즈이미드 염료, 예를 들어 Hoechst 33258; 페난트리딘 염료, 예를 들어 텍사스 레드; 에티뒸 염료; 아크리딘 염료; 카르바졸 염료; 페녹사진 염료; 포르피린 염료; 폴리메틴 염료, 예를 들어 시아닌 염료, 예컨대 Cy3, Cy5 등; BODIPY 염료 및 퀴놀린 염료.
- [0104] 일부 실시 형태에서, 검출가능한 표지는 ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , ^{32}P , 및 ^{33}P 를 포함하지만 이로 한정되지 않는 방사성 표지(radiolabel)일 수 있다.
- [0105] 일부 실시 형태에서, 검출가능한 표지는 고추냉이 퍼옥시다제 및 알칼리성 포스파타제를 포함하지만 이로 한정되지 않는 효소일 수 있다. 효소적 표지(enzymatic label)는, 예를 들어 화학발광 신호, 색 신호, 또는 형광 신호를 생성할 수 있다.
- [0106] 일부 실시 형태에서, 검출가능한 표지는 루미놀, 루시페린 또는 루시게닌을 포함하지만 이로 한정되지 않는 화학발광 표지이다.
- [0107] 일부 실시 형태에서, 검출가능한 표지는 콜로이드성 금 또는 착색 유리 또는 플라스틱(예를 들어, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 및 라텍스) 비드를 포함하지만 이로 한정되지 않는 스펙트럼 비색 표지(spectral colorimetric label)일 수 있다.
- [0108] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 둘 이상의 프라이머 쌍 하위세트들의 증폭된 산물들이 서열화됨으로써 구별될 수 있는 PCR 증폭 계획과 관련되어 있다. 핵산의 서열화 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 시판되는 서열화 서비스가 널리 입수가 가능하다(예를 들어, 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재의 Genscript사).
- [0109] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 둘 이상의 프라이머 쌍 하위세트들의 증폭된 산물들이 용해-곡선 분석에 의해 구별될 수 있는 PCR 증폭 계획과 관련되어 있다. 용해-곡선 분석의 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Ririe et al. Analytical Biochemistry 1997 245:154-160]; 문헌[Wittwer et al. Clinical Chemistry 2003 49:853-860]; 및 문헌[Liew et al. Clinical Chemistry 2007 50:1156-1164]; 이들은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함됨).
- [0110] 크기-분리된 증폭 산물들의 직접 검출이 바람직하다. 그러나, 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 둘 이상의 프라이머 쌍 하위세트들의 증폭된 산물들이 올리고뉴클레오타이드 혼성화에 의해 구별될 수 있는 PCR 증폭 계획과 관련되어 있다. 당업자는, 표적 핵산 서열들의 서열 정보를 사용하여, 단일 표적에는 완전히 상보적이고 다른 표적 핵산 서열들에는 그렇지 않은 프로브(probe)를 설계할 수 있다. 혼성화 조건은 완전히 상보적이지 않은 혼성화에 의한 백그라운드 신호를 최소화하도록 일상적으로 최적화될 수 있다. 혼성화 프로브는 프라이머 서열, 또는 프라이머에 의해 포함되지 않은 증폭된 산물의 일부에 대해 혼성화하도록 설계될 수 있는데, 단 프로브가 혼성화할 서열은 반응에 존재하는 적어도 하나의 다른 증폭된 산물과 그것을 구별가능하다.

- [0111] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 PCR 증폭 계획은 멀티플렉스 및/또는 멀티모달 계획이다. 일부 실시 형태에서, 일 프라이머 쌍 하위세트의 증폭 산물은 다른 프라이머 쌍 하위세트들의 증폭 산물들과 적어도 2가지 접근법에 의해 구별될 수 있다. 비제한적인 예로서, cMET의 gDNA-특이적 표적들을 증폭시키는 일 세트의 프라이머들의 모든 산물들은 하나의 공통 표지로 표지화될 수 있으며, 각 고유의 증폭 산물은 동일한 세트의 프라이머들의 다른 증폭 산물들과 뚜렷이 다른 크기를 가짐으로써 구별될 수 있다.
- [0112] 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 표적 핵산 서열의 존재 및/또는 수준, 예를 들어 샘플 내의 유전자 변형의 존재 및/또는 수준의 검출과 관련되어 있다. 표적 핵산은 RNA 또는 DNA일 수 있다. 표적 핵산은 이중가닥(ds) 핵산 또는 단일가닥(ss) 핵산, 예를 들어 dsRNA, ssRNA, dsDNA, 또는 ssDNA일 수 있다. 본 명세서에 언급된 바와 같이, 본 명세서에 기재된 방법은 동일한 반응에서 이들 유형 중 하나 초과 유형의 표적의 검출 및/또는 정량화, 즉 멀티모달 증폭 및 검출을 가능하게 하는 것으로 구체적으로 고려된다. 표적 핵산의 비제한적인 예에는 핵산 서열, 돌연변이를 포함하는 핵산 서열, 결실을 포함하는 핵산 서열, 삽입을 포함하는 핵산 서열, 서열 변이체, 대립유전자, 다형성, 점 돌연변이, SNP, microRNA, 단백질 코딩 RNA, 비-단백질 코딩 RNA, mRNA, 병원체(예를 들어, 세균, 바이러스, 또는 기생충)로부터의 핵산, 질병과 관련되거나 또는 질병을 갖게 되거나 발생시킬 가능성(likelihood)과 관련된 핵산(예를 들어, 마커 유전자, 질병과 관련되거나 또는 질병을 갖게 되거나 발생시킬 가능성과 관련된 다형성, 또는 발현이 질병과 관련되거나 또는 질병을 갖게 되거나 발생시킬 가능성과 관련된 RNA)이 포함된다.
- [0113] 본 발명에 유용한 샘플은 핵산을 포함할 것이다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 단백질, 세포, 유체, 생물학적 유체, 보존제, 및/또는 다른 물질들을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 대상체로부터 얻어질 수 있다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 대상체로부터 얻어진 생물학적 샘플일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 대상체로부터 얻어진 진단용 샘플일 수 있다. 제한적인 예로서, 샘플은 볼 면봉채취물(cheek swab), 혈액, 혈청, 혈장, 가래, 뇌척수액, 소변, 눈물, 치조 단리물, 흉막액, 심막액, 낭액(cyst fluid), 종양 조직, 조직, 생검물, 타액, 흡인물, 또는 이들의 조합일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 절제(resection) 또는 생검으로부터 얻어질 수 있다.
- [0114] 일부 실시 형태에서, 샘플은, 예를 들어 원심분리에 의한, 청징화된 유체 샘플이다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 저속 원심분리(예를 들어, 3,000 x g 이하) 및 상청액의 수집에 의해 청징화되는데, 이때 상청액은 청징화된 유체 샘플을 포함한다.
- [0115] 일부 실시 형태에서, 샘플은 새로 수집될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물에 사용되기 전에 보관될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 처리되지 않은 샘플이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "처리되지 않은 샘플"은 용액 중의 회석 및/또는 현탁을 제외하고는 사전에 어떠한 샘플 전처리도 갖지 않은 생물학적 샘플을 지칭한다.
- [0116] 일부 실시 형태에서, 샘플은 대상체로부터 얻어지고 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물에 이용되기 전에 보존되거나 가공될 수 있다. 제한적인 예로서, 샘플은 파라핀 왁스 중에 포매되거나, 냉장되거나, 또는 냉동될 수 있다. 냉동된 샘플은 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물에 따라 핵산의 존재를 결정하기 전에 해동될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 가공되거나 처리된 샘플일 수 있다. 샘플을 처리 또는 가공하기 위한 예시적인 방법은 원심분리, 여과, 초음파 처리, 균질화, 가열, 냉동 및 해동, 보존제(예를 들어, 항응혈제 또는 뉴클레아제 억제제)와의 접촉 및 이들의 임의의 조합을 포함하지만 이로 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 화학적 및/또는 생물학적 시약으로 처리될 수 있다. 화학적 및/또는 생물학적 시약은 가공 및/또는 보관 동안 샘플 또는 샘플에 의해 포함된 핵산의 안정성을 보호 및/또는 유지하기 위해 사용될 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 화학적 및/또는 생물학적 시약은 샘플의 다른 성분들로부터 핵산을 방출하기 위해 사용될 수 있다. 제한적인 예로서, 혈액 샘플은 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물에 이용되기 전에 항응혈제로 처리될 수 있다. 숙련된 기술자는 핵산 분석을 위하여 샘플을 가공, 보존, 또는 처리하기 위한 방법 및 공정을 잘 알고 있다.
- [0117] 일부 실시 형태에서, 핵산 샘플은 FFPE 종양 샘플로부터 준비될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 위암; 직장암; 담관종; 폐암; 뇌암; 자궁경부암; 결장암; 두경부암; 간세포암; 비소세포 폐암; 흑색종; 중피종; 다발성 골수종; 난소암; 육종; 및/또는 갑상선암을 갖거나 이를 갖는 것으로 진단된 대상체로부터의 종양 세포를 포함할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Sattler et al. Ther Adv Med Oncol 2011 3:171-184]을 참조하며; 이는 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.
- [0118] 일부 실시 형태에서, 샘플 내에 존재하는 핵산은 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물에 이용되기 전에 단리되거나

나, 부화(enrich)되거나, 또는 정제된다. 샘플로부터 핵산을 분리, 부화, 또는 정제하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 제한적인 예로서, 다양한 샘플 유형들로부터 게놈 DNA를 분리하기 위한 키트는 구매가능하다(예를 들어, 카탈로그 번호 51104, 51304, 56504, 및 56404; 미국 매릴랜드주 저먼타운 소재의 Qiagen사).

[0119] 용어 "대상체" 및 "개체"는 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용되며, 샘플이 얻어지는 유기체를 지칭한다. 대상체는 유기체 내의 또는 그러한 유기체를 구성하거나 그 안에 함유되어 있는 하나 이상의 세포 내의 핵산의 존재를 결정하도록 요구되는 임의의 유기체일 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "대상체"는 유기체, 예를 들어 세균, 기생충, 식물, 또는 동물을 의미할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 인간 또는 동물일 수 있다. 통상, 동물은 영장류, 설치류, 가축 또는 사냥용 동물과 같은 척추동물이다. 영장류는 침팬지, 사이노몰로거스 원숭이, 거미 원숭이, 및 마카크, 예를 들어 벵골 원숭이를 포함한다. 설치류는, 예를 들어 마우스, 래트, 우드척(woodchuck), 페럿, 래빗 및 햄스터를 포함한다. 가축 및 사냥용 동물은 소, 말, 돼지, 사슴, 들소, 버팔로, 고양이과 종, 예를 들어 집고양이, 개과 종, 예를 들어 개, 여우, 늑대, 조류 종, 예를 들어 닭, 앵무, 타조, 및 어류, 예를 들어 송어, 메기 및 연어를 포함한다. 개체 또는 대상체는 전술된 것의 임의의 하위세트, 예를 들어 상기 전부를 포함한다.

[0120] 편의상, 본 명세서, 실시예, 및 첨부된 청구범위에 사용되는 일부 용어 및 어구의 의미가 이하에 제공된다. 달리 기재되거나 문맥으로부터 암시되지 않는 한, 하기의 용어 및 어구는 이하에 제공된 의미를 포함한다. 이들 정의는 특정 실시 형태를 설명하는 데 도움이 되기 위하여 제공되고, 청구된 본 발명을 제한하고자 하지 않는데, 그 이유는 본 발명의 범주는 단지 청구범위에 의해서만 제한되기 때문이다. 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 당업계에서의 용어의 용법과 본 명세서에 제공된 그의 정의 사이에 명백한 불일치가 있다면, 본 명세서에 제공된 정의가 우선할 것이다.

[0121] 편의상, 본 명세서, 실시예 및 첨부된 청구범위에서, 본 발명에서 사용되는 소정의 용어를 여기에 모아둔다.

[0122] 용어 "감소시키다", "감소된", "감소", 또는 "억제하다"는 모두 통계학적으로 유의한 양에 의한 감소를 의미하기 위하여 본 명세서에 사용된다. 일부 실시 형태에서, "감소시키다", "감소" 또는 "저하시키다" 또는 "억제하다"는 전형적으로 기준 수준(예를 들어, 주어진 처리의 부재)과 대비하여 적어도 10%만큼의 감소를 의미하며, 예를 들어 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 이상만큼의 감소를 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "감소" 또는 "억제"는 기준 수준과 대비하여 완전한 억제 또는 감소를 포함하지 않는다. "완전한 억제"는 기준 수준과 대비하여 100% 억제이다. 감소는 바람직하게는 주어진 장애를 갖지 않는 개체에 대해 정상의 범위 내에 있는 것으로 허용되는 수준으로 내려간 것일 수 있다.

[0123] 용어 "증가된", "증가시키다", "향상시키다", 또는 "활성화하다"는 모두 통계학적으로 유의한 양에 의한 증가를 의미하기 위하여 본 명세서에 사용된다. 일부 실시 형태에서, 용어 "증가된", "증가시키다", "향상시키다", 또는 "활성화하다"는 기준 수준과 대비하여 적어도 10%의 증가, 예를 들어 기준 수준과 대비하여 적어도 약 20%, 또는 적어도 약 30%, 또는 적어도 약 40%, 또는 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 60%, 또는 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90% 또는 최대 100%에 이르기까지의 증가 또는 10 내지 100%의 임의의 증가, 또는 기준 수준과 대비하여 적어도 약 2배, 또는 적어도 약 3배, 또는 적어도 약 4배, 또는 적어도 약 5배 또는 적어도 약 10배의 증가, 또는 2배 내지 10배 또는 그 이상의 임의의 증가를 의미할 수 있다. 마커 또는 증상과 관련하여, "증가"는 그러한 수준의 통계학적으로 유의한 증가이다.

[0124] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "변경된"은, 예를 들어 기준과 대비하여 수준 또는 수(예를 들어, 유전자 발현 수준 또는 유전자 카피수)의 통계학적으로 유의한 변화 또는 기준과 대비하여 서열의 변화, 예를 들어 핵산 서열의 적어도 단일 뉴클레오타이드 변화를 지칭할 수 있다.

[0125] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "정규화하다"는 제1 값을 제2 값으로 나누는 과정, 예를 들어 y의 수준에 대해 x의 수준을 얻는 과정을 지칭한다. x는 전형적으로 측정되는 것, 예를 들어 cMet의 카피수 또는 발현 수준이며, 한편 y는 기준, 예를 들어 기준 유전자의 카피수 또는 발현 수준이다. 정규화는, 다수의 샘플들 및/또는 반응들에서 측정된 수준들이, 예를 들어 샘플들 내에 존재하는 핵산의 수준을 제어할 뿐만 아니라 반응들 사이의 효율을 상이하게 함으로써, 비교될 수 있게 한다. 상이한 값들을 정규화하는 바람직한 수단 및 기준 유전자들의 선택은 본 명세서에서 어딘가 다른 곳에 기재되어 있다.

- [0126] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "부분"은 전체의 일부분 또는 일부, 예를 들어 전체 분자의 일부분 또는 일부를 지칭한다. 특정 분자는 다수의 부분들, 예를 들어 2개의 부분, 3개의 부분, 4개의 부분, 5개의 부분, 또는 그 이상의 부분을 가질 수 있다.
- [0127] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "단리된" 또는 "부분적으로 정제된"은, 핵산의 경우에, 핵산의 천연 공급원에서 발견되는 바와 같이 핵산과 함께 존재하고/하거나 세포에 의해 발현될 때 핵산과 함께 존재하게 될 적어도 하나의 다른 성분(예를 들어, 핵산 또는 폴리펩티드)으로부터 분리된 핵산을 지칭한다. 화학적으로 합성된 핵산 또는 시험관내(*in vitro*) 전사/번역을 사용하여 합성된 것은 "단리된" 것으로 여겨진다.
- [0128] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "핵산" 또는 "핵산 서열"은 리보핵산, 데옥시리보핵산 또는 그의 유사체의 단위들을 혼입시킨 중합체 분자를 지칭한다. 핵산은 단일가닥 또는 이중가닥일 수 있다. 단일가닥 핵산은 변성된 이중가닥 DNA의 한 가닥일 수 있다. 대안적으로, 이는 임의의 이중가닥 DNA로부터 유래되지 않은 단일가닥 핵산일 수 있다. 일 태양에서, 주형 핵산은 DNA이다. 다른 태양에서, 주형은 RNA이다. 적합한 핵산 분자는 DNA를 포함하며, 이에는 게놈 DNA 및 cDNA가 포함된다. 다른 적합한 핵산 분자는 RNA를 포함하며, 이에는 mRNA, rRNA 및 tRNA가 포함된다. 핵산 분자는 게놈 DNA에서와 같이 천연 발생될 수 있거나, 또는 이는 합성될 수 있으며, 즉 인간 활동에 기초하여 제조될 수 있거나, 또는 이들 둘의 조합일 수 있다. 핵산 분자는 또한, 소정의 개질, 예컨대 2'-데옥시, 2'-데옥시-2'-플루오로, 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸(2'-O-MOE), 2'-O-아미노프로필(2'-O-AP), 2'-O-디메틸아미노에틸(2'-O-DMAOE), 2'-O-디메틸아미노프로필(2'-O-DMAP), 2'-O-디메틸아미노에틸옥시에틸(2'-O-DMAEOE), 또는 2'-O--N-메틸아세트아미도(2'-O-NMA), 콜레스테롤 부가, 및 미국 특허 출원 공개 제20070213292호에 기재된 바와 같은 포스포로티오에이트 골격; 및 미국 특허 제6,268,490호에 기재된 바와 같은, 메틸렌 단위와, 2'-산소 원자와 4'-탄소 원자 사이에서 연결된 소정의 리보뉴클레오시드를 가질 수 있으며, 여기서 특허 및 특허 출원 둘 모두는 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.
- [0129] 용어 "유전자"는 적절한 조절 서열에 작동가능하게 연결될 때 시험관내 또는 생체내(*in vivo*)에서 RNA로 전사되는 (DNA인) 핵산 서열을 의미한다. 유전자는 코딩 영역에 선행하는 조절 영역 및 코딩 영역에 후행하는 조절 영역, 예를 들어 5' 비번역(5' UTR) 또는 "리더(leader)" 서열 및 3' UTR 또는 "테일러(trailer)" 서열뿐만 아니라 개별 코딩 세그먼트(엑손)들 사이의 개재 서열(인트론)도 포함할 수 있다.
- [0130] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "상보적"은 2개의 주어진 폴리뉴클레오티드들 또는 폴리뉴클레오티드 서열들이 서로 어닐링될 때, DNA에서 A는 T와 쌍을 이루고 G는 C와 쌍을 이루고, RNA에서 G는 C와 쌍을 이루고 A는 U와 쌍을 이루도록 하는, 뉴클레오티드 염기 G, A, T, C 및 U 이들 사이의 수소-결합 염기 쌍 형성 선호도의 계층구조(hierarchy)를 지칭한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "실질적으로 상보적인"은 제2 뉴클레오티드 서열과 프라이머의 전체 길이에 대하여 적어도 90%의 상보성을 갖는, 예를 들어 90% 상보적인, 95% 상보적인, 98% 상보적인, 99% 상보적인, 또는 100% 상보적인 프라이머를 지칭한다.
- [0131] 용어 "통계학적으로 유의한" 또는 "유의하게"는 통계학적 유의성을 지칭하며, 일반적으로 2 표준 편차(2SD) 또는 더 큰 차이를 의미한다.
- [0132] 작동 실시예에서 이외에, 또는 달리 지시된 경우 이외에, 본 명세서에 사용되는 반응 조건 또는 성분의 양으로 표현되는 모든 숫자는 모든 경우에 용어 "약"에 의해 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 용어 "약"은 백분율과 관련하여 사용될 때 $\pm 1\%$ 를 의미할 수 있다.
- [0133] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "포함하는" 또는 "포함하다"는 조성물, 방법, 및 그 방법 또는 조성물에 본질적인 이들의 각각의 구성요소(들)와 관련하여 사용되면서도 여전히, 본질적이지든 그렇지 않은 지정되지 않은 요소들의 포함에 대해 개방되어 있다.
- [0134] 용어 "이루어진"은 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물, 방법 및 이들의 각각의 구성요소들을 지칭하며, 이들은 그 실시 형태의 그러한 설명에서 언급되지 않은 어떠한 요소도 배제한다.
- [0135] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "본질적으로 이루어진"은 주어진 실시 형태에 필요한 요소들을 지칭한다. 이 용어는 그러한 실시 형태의 기본적인고 신규하거나 기능적인 특성(들)에 실질적으로 영향을 주지 않는 요소들의 존재를 허용한다.
- [0136] 단수형 용어("a", "an", 및 "the")는 문맥이 달리 명백히 나타내지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다. 유사하게, 단어 "또는"은 그 문맥이 달리 명백히 나타내지 않는 한 "및"을 포함하고자 한다. 본 명세서에 기재된 것들과 유사하거나 등가인 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있기는 하지만, 적합한 방

법 및 재료가 하기에 기재되어 있다. 약어 "예를 들어(e.g.)"는 라틴어(exempli gratia)에서 유래되며, 비제한적인 예를 나타내기 위해 본 명세서에서 사용된다. 따라서, 약어 "예를 들어"는 용어 "예컨대"와 동의어이다.

[0137] 세포 생물학 및 분자 생물학에서 공통된 용어들의 정의는 문헌["The Merck Manual of Diagnosis and Therapy", 19th Edition, published by Merck Research Laboratories, 2006 (ISBN 0-911910-19-0)]; 문헌[Robert S. Porter et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9)]; 문헌[Benjamin Lewin, Genes X, published by Jones & Bartlett Publishing, 2009 (ISBN-10: 0763766321)]; 및 문헌[Kendrew et al. (eds.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)]에서 찾을 수 있다.

[0138] 달리 기재되지 않는 한, 본 발명은, 예를 들어 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3 ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (2001)]; 문헌[Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (1995)]; 또는 문헌[Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques Vol.152, S. L. Berger and A. R. Kimmel Eds., Academic Press Inc., San Diego, USA (1987)]에 기재된 바와 같이 표준 절차를 사용하여 수행하였으며; 이들은 모두 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0139] 다른 용어들은 본 발명의 다양한 태양들의 설명에서 본 명세서에 정의되어 있다.

[0140] 본 출원 전체에 걸쳐 인용된 서적 참고문헌, 등록된 특허, 공개된 특허 출원, 및 공개류 중인 특허 출원을 포함한 모든 특허 및 다른 간행물은, 예를 들어 본 명세서에 기재된 기술과 관련하여 사용될 수 있는 그러한 간행물들에 기재된 방법론을 설명 및 개시하려는 목적을 위하여 명시적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 이들 간행물은 오로지 본 출원의 출원일 전의 그들의 개시 때문에 제공된다. 이에 관하여 어떤 것도, 본 발명자들이 종래 발명에 의해 또는 임의의 다른 이유로 그러한 개시보다 선행하지 않음을 인정하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 이들 문헌의 내용에 관한 표현 및 날짜에 관한 모든 진술은 본 출원인들이 이용가능한 정보에 기초하며, 이들 문헌의 내용 또는 날짜의 정확함에 대해 어떠한 것도 인정하는 것으로 여겨지지 않는다.

[0141] 본 발명의 실시 형태들에 대한 설명은 본 발명을 망라하거나 개시된 정확한 형태로 본 발명을 제한하고자 하지 않는다. 본 발명의 구체적인 실시 형태 및 그를 위한 실시예가 예시적인 목적으로 본 명세서에 기재되어 있지만, 관련 기술분야의 숙련자들이 인식하는 바와 같이, 다양한 등가의 변형이 본 발명의 범주 내에서 가능하다. 예를 들어, 방법 단계들 또는 기능들이 주어진 순서로 제시되어 있지만, 대안적인 실시 형태들이 상이한 순서로 기능들을 수행할 수 있거나, 또는 기능들이 실질적으로 동시에 수행될 수 있다. 본 명세서에 제공된 본 발명의 교시 내용은 적절한 경우에 다른 절차 또는 방법에 적용될 수 있다. 본 명세서에 기재된 다양한 실시 형태들을 조합하여 추가의 실시 형태들을 제공할 수 있다. 본 발명의 태양들은, 필요하다면, 상기 참고문헌들 및 출원의 조성물, 기능 및 개념을 사용하여 본 발명의 또 다른 추가의 실시 형태들을 제공하기 위하여 변형될 수 있다. 상세한 설명에 비추어, 이들 및 다른 변화가 본 발명에 대해 이루어질 수 있다. 모든 그러한 변형은 첨부된 청구범위의 범주 내에 포함되는 것이라고 한다.

[0142] 전술된 실시 형태들 중 임의의 것의 구체적인 요소들은 조합되거나 다른 실시 형태들 내의 요소들 대신 사용될 수 있다. 더욱이, 본 발명의 소정의 실시 형태들과 관련된 이점이 이들 실시 형태와 관련하여 기재되어 있지만, 다른 실시 형태들이 또한 그러한 이점을 나타낼 수 있으며, 본 발명의 범주 내에 속하기 위하여 모든 실시 형태들이 반드시 그러한 이점을 나타낼 필요는 없다.

[0143] 본 명세서에 기재된 기술은 하기의 실시예에 의해 추가로 예시되는데, 이러한 실시예는 어떤 식으로든 추가의 제한인 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0144] 본 명세서에 기재된 기술의 일부 실시 형태가 번호를 매긴 하기 단락들 중 어느 하나에 따라 정의될 수 있다:

[0145] 1. cMET 변경을 검출하기 위한 검정으로서,

[0146] 핵산 샘플의 일부분을 두 세트의 프라이머들과 접촉시키는 단계로서, 제1 세트의 프라이머들은 cMET 유전자 카피수 변이의 변경을 검출하고, 제2 세트의 프라이머들은 cMET 유전자 발현 수준의 변화를 검출하며, 여기서

[0147] cMET 유전자 카피수 변이를 검출하기 위해 제1 세트의 프라이머들은 cMET의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열 및 적어도 둘의 기준 유전자들 각각의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하며, 여기서 하나의 기준 유전자는 염색체 7 상에 위치되고 하나의 기준 유전자는 염색체 7 상에 위치

되지 않고,

- [0148] 제2 세트의 프라이머들은 cMET의 mRNA-특이적 서열 및 적어도 둘의 기준 유전자들의 mRNA-특이적 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하는 것인 단계;
- [0149] 샘플의 일부분 및 두 세트의 프라이머들을 포함하는 반응 혼합물에 대하여 가닥 분리, 프라이머 어닐링, 및 프라이머 신장의 사이클을 포함하는 PCR 증폭 계획을 수행하는 단계;
- [0150] 각 프라이머 쌍에 대하여 앰플리콘의 수준을 검출하는 단계;
- [0151] 기준 유전자 앰플리콘들에 대해 cMET 앰플리콘들의 수준을 정규화하는 단계; 및
- [0152] cMET 앰플리콘들의 정규화된 수준을 기준 수준과 대비하는 단계로서, 기준 수준과 대비하여 gDNA-특이적 cMET 앰플리콘의 더 높은 수준은 샘플 내의 cMET의 유전자 증폭 변경의 존재를 나타내고, 기준 수준과 대비하여 mRNA-특이적 cMET 앰플리콘의 변경된 수준은 샘플 내의 cMET의 유전자 발현 수준 변경의 존재를 나타내는 것인 단계를 포함하는, 검정.
- [0153] 2. 제1 세트의 프라이머들은 EGFR의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열을 증폭시키는 일 하위세트의 프라이머 쌍들을 추가로 포함하며,
- [0154] 상기 검정은 EGFR 앰플리콘들의 정규화된 수준을 기준 수준과 대비하는 단계를 추가로 포함하며; 여기서, 기준 수준과 대비하여 gDNA-특이적 EGFR 앰플리콘의 더 높은 수준은 샘플 내의 EGFR의 유전자 증폭 변경의 존재를 나타내는, 단락 1의 검정.
- [0155] 3. 염색체 7 상에 위치한 제1 프라이머 세트의 기준 유전자는 KDEL2-2이고;
- [0156] 상기 검정은 KDEL2-2 앰플리콘들의 정규화된 수준을 기준 수준과 대비하는 단계를 추가로 포함하며; 여기서, 기준 수준과 대비하여 gDNA-특이적 KDEL2-2 앰플리콘의 더 높은 수준은 샘플 내의 KDEL2-2의 유전자 증폭 변경의 존재를 나타내는, 단락 1 또는 단락 2의 검정.
- [0157] 4. cMET, EGFR 및 KDEL2-2의 유전자 증폭 변경의 존재는 염색체 7 증폭의 존재를 나타내는, 단락 1 내지 단락 3 중 어느 하나의 단락의 검정.
- [0158] 5. 염색체 7 상에 위치되지 않은 제1 프라이머 세트의 기준 유전자는 SOD1 또는 SPG21인, 단락 1 내지 단락 4 중 어느 하나의 단락의 검정.
- [0159] 6. 제1 프라이머 세트는 SOD1 및 SPG21 각각의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하는, 단락 5의 검정.
- [0160] 7. 일 프라이머 세트가 각 유전자의 적어도 하나의 앰플리콘을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함하는, 단락 1 내지 단락 6 중 어느 하나의 단락의 검정.
- [0161] 8. 일 프라이머 세트가 각 유전자의 적어도 둘의 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함하는, 단락 1 내지 단락 7 중 어느 하나의 단락의 검정.
- [0162] 9. 일 프라이머 세트가 각 유전자의 적어도 셋의 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함하는, 단락 1 내지 단락 8 중 어느 하나의 단락의 검정.
- [0163] 10. 프라이머 세트들은 cMET, EGFR, 및 KDEL2-2 각각의 적어도 둘의 gDNA-특이적 앰플리콘들 및 cMET, SOD1 및 SPG21 각각의 적어도 둘의 mRNA-특이적 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함하는, 단락 1 내지 단락 9 중 어느 하나의 단락의 검정.
- [0164] 11. 프라이머 세트들은 cMET, EGFR, 및 KDEL2-2 각각의 적어도 셋의 gDNA-특이적 앰플리콘들 및 cMET, SOD1 및 SPG21 각각의 적어도 셋의 mRNA-특이적 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함하는, 단락 1 내지 단락 10 중 어느 하나의 단락의 검정.
- [0165] 12.
- [0166] 샘플의 제2 부분을 제3 세트의 프라이머 쌍들과 접촉시키는 단계로서, 제3 세트의 프라이머들은 서열 변이를 포함하는 cMET 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하는 것인 단계;
- [0167] 샘플의 제2 부분 및 제3 세트의 프라이머들을 포함하는 반응 혼합물에 대하여 가닥 분리, 프라이머 어닐링, 및

프라이머 신장의 사이클을 포함하는 PCR 증폭 계획을 수행하는 단계;

- [0168] 각 프라이머 쌍에 대하여 앰플리콘의 수준을 검출하는 단계로서, 앰플리콘의 존재는 그 프라이머 쌍이 특이적인 서열 변이의 존재를 나타내는 것인 단계를 추가로 포함하는, 단락 1 내지 단락 11 중 어느 하나의 단락의 검정.
- [0169] 13. cMET의 하나 이상의 서열 변이는 SNP인, 단락 12의 검정.
- [0170] 14. cMET SNP는 S1058P; V1101I; H1112Y; H1124D; G1137V; M1149T; V1206L; L1213V; K1262R; M1268T; V1238I; Y1248C; 및 D1246N으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 단락 12 또는 단락 13의 검정.
- [0171] 15. S1058P; V1101I; H1112Y; H1124D; G1137V; M1149T; V1206L; L1213V; K1262R; M1268T; V1238I; Y1248C; 및 D1246N이 검출되는, 단락 12 내지 단락 14 중 어느 하나의 단락의 검정.
- [0172] 16. 동일한 PCR 열사이클링 계획이 두 반응 모두에 사용되는, 단락 12 내지 단락 15 중 어느 하나의 단락의 검정.
- [0173] 17. 핵산 샘플은 FFPE 종양 샘플로부터 준비되는, 단락 1 내지 단락 16 중 어느 하나의 단락의 검정.
- [0174] 18. 샘플은 위암; 직장암; 담관종; 폐암; 뇌암; 자궁경부암; 결장암; 두경부암; 간세포암; 비소세포 폐암; 흑색종; 중피종; 다발성 골수종; 난소암; 육종; 및 갑상선암으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환을 갖는 것으로 진단된 대상체로부터의 종양 세포를 포함하는, 단락 1 내지 단락 17 중 어느 하나의 단락의 검정.
- [0175] 19. 하나 이상의 프라이머가 이중 도메인 프라이머인, 단락 1 내지 단락 18 중 어느 하나의 단락의 검정.
- [0176] 20. 일 프라이머 하위세트의 둘 이상의 프라이머 쌍들로부터의 증폭된 산물들이 구별될 수 있는, 단락 1 내지 단락 19 중 어느 하나의 단락의 검정.
- [0177] 21. 일 프라이머 하위세트의 둘 이상의 프라이머 쌍들로부터의 증폭된 산물들은 뚜렷이 다른 크기들을 가짐으로써 구별되는, 단락 1 내지 단락 20 중 어느 하나의 단락의 검정.
- [0178] 22. 일 프라이머 하위세트의 둘 이상의 프라이머 쌍들로부터의 증폭된 산물들은 상이한 검출가능한 표지들로 표지됨으로써 구별되는, 단락 1 내지 단락 21 중 어느 하나의 단락의 검정.
- [0179] 23. 제1 세트의 프라이머들 및 제2 세트의 프라이머들로부터의 증폭된 산물들은 상이한 검출가능한 표지들로 표지됨으로써 구별되는, 단락 1 내지 단락 22 중 어느 하나의 단락의 검정.
- [0180] 24. 하나 이상의 프라이머가 서열 번호 1-83으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 단락 1 내지 단락 23 중 어느 하나의 단락의 검정.
- [0181] 25. 하나 이상의 프라이머가 서열 번호 89-124 중 어느 하나의 서열을 포함하는, 단락 1 내지 단락 24 중 어느 하나의 단락의 검정.
- [0182] 26. 프라이머들은 대략 표 2의 농도로 반응 혼합물 내에 존재하는, 단락 1 내지 단락 25 중 어느 하나의 단락의 검정.
- [0183] 27. cMET 변형을 검출하는 방법으로서,
- [0184] 핵산 샘플의 일부분을 cMET 유전자 카피수 변이의 변형을 검출하는 일 세트의 프라이머들과 접촉시켜 cMET 유전자 카피수 변이를 검출하는 단계로서,
- [0185] 일 세트의 프라이머들은 cMET의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열 및 적어도 둘의 기준 유전자들 각각의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하며, 여기서 하나의 기준 유전자는 염색체 7 상에 위치되고 하나의 기준 유전자는 염색체 7 상에 위치되지 않은 것인 단계;
- [0186] 샘플의 일부분 및 일 세트의 프라이머들을 포함하는 반응 혼합물에 대하여 가닥 분리, 프라이머 어닐링, 및 프라이머 신장의 사이클을 포함하는 PCR 증폭 계획을 수행하는 단계;
- [0187] 각 프라이머 쌍에 대하여 앰플리콘의 수준을 검출하는 단계;
- [0188] 기준 유전자 앰플리콘들에 대해 cMET 앰플리콘들의 수준을 정규화하는 단계; 및
- [0189] cMET 앰플리콘들의 정규화된 수준을 기준 수준과 대비하는 단계로서, 기준 수준과 대비하여 gDNA-특이적 cMET 앰플리콘의 더 높은 수준은 샘플 내의 cMET의 유전자 증폭 변형의 존재를 나타내는 것인 단계를 포함하는,

방법.

- [0190] 28. 일 세트의 프라이머들은 EGFR의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열을 증폭시키는 일 하위세트의 프라이머 쌍들을 추가로 포함하며,
- [0191] 상기 검정은 EGFR 앰플리콘들의 정규화된 수준을 기준 수준과 대비하는 단계를 추가로 포함하며; 여기서, 기준 수준과 대비하여 gDNA-특이적 EGFR 앰플리콘의 더 높은 수준은 샘플 내의 EGFR의 유전자 증폭 변경의 존재를 나타내는, 단락 27의 방법.
- [0192] 29. 염색체 7 상에 위치된 프라이머 세트의 기준 유전자는 KDELR-2이고;
- [0193] 상기 방법은 KDELR-2 앰플리콘들의 정규화된 수준을 기준 수준과 대비하는 단계를 추가로 포함하며; 여기서, 기준 수준과 대비하여 gDNA-특이적 KDELR-2 앰플리콘의 더 높은 수준은 샘플 내의 KDELR-2의 유전자 증폭 변경의 존재를 나타내는, 단락 27 또는 단락 28의 방법.
- [0194] 30. cMET, EGFR 및 KDELR-2의 유전자 증폭 변경의 존재는 염색체 7 증폭의 존재를 나타내는, 단락 27 내지 단락 29 중 어느 하나의 단락의 방법.
- [0195] 31. 염색체 7 상에 위치되지 않은 프라이머 세트의 기준 유전자는 SOD1 또는 SPG21인, 단락 27 내지 단락 30 중 어느 하나의 단락의 방법.
- [0196] 32. 프라이머 세트는 SOD1 및 SPG21의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하는, 단락 31의 방법.
- [0197] 33. 핵산 샘플의 일부분을 제2 세트의 프라이머들과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하며, 제2 세트의 프라이머들은 cMET 유전자 발현 수준의 변화를 검출하며, 여기서
- [0198] 제2 세트의 프라이머들은 cMET의 mRNA-특이적 서열 및 적어도 둘의 기준 유전자들의 적어도 mRNA-특이적 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하고;
- [0199] 기준 수준과 대비하여 mRNA-특이적 cMET 앰플리콘의 변경된 수준은 샘플 내의 cMET의 유전자 발현 수준 변경의 존재를 나타내는, 단락 27 내지 단락 32 중 어느 하나의 단락의 방법.
- [0200] 34. 제1 프라이머 세트는 SOD1 및 SPG21 각각의 적어도 하나의 gDNA-특이적 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하는, 단락 27 내지 단락 33 중 어느 하나의 단락의 방법.
- [0201] 35. 일 프라이머 세트가 각 유전자의 적어도 하나의 앰플리콘을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함하는, 단락 27 내지 단락 34 중 어느 하나의 단락의 방법.
- [0202] 36. 일 프라이머 세트가 각 유전자의 적어도 둘의 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함하는, 단락 27 내지 단락 35 중 어느 하나의 단락의 방법.
- [0203] 37. 일 프라이머 세트가 각 유전자의 적어도 셋의 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함하는, 단락 27 내지 단락 36 중 어느 하나의 단락의 방법.
- [0204] 38. 프라이머 세트들은 cMET, EGFR, 및 KDELR-2 각각의 적어도 둘의 gDNA-특이적 앰플리콘들 및 cMET, SOD1 및 SPG21 각각의 적어도 둘의 mRNA-특이적 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함하는, 단락 27 내지 단락 37 중 어느 하나의 단락의 방법.
- [0205] 39. 프라이머 세트들은 cMET, EGFR, 및 KDELR-2 각각의 적어도 셋의 gDNA-특이적 앰플리콘들 및 cMET, SOD1 및 SPG21 각각의 적어도 셋의 mRNA-특이적 앰플리콘들을 증폭시키는 프라이머 쌍 하위세트들을 포함하는, 단락 27 내지 단락 38 중 어느 하나의 단락의 방법.
- [0206] 40.
- [0207] 샘플의 제2 부분을 제3 세트의 프라이머 쌍들과 접촉시키는 단계로서, 제3 세트의 프라이머들은 서열 변이를 포함하는 cMET 서열을 증폭시키는 프라이머 쌍들의 하위세트들을 포함하는 것인 단계;
- [0208] 샘플의 제2 부분 및 제3 세트의 프라이머들을 포함하는 반응 혼합물에 대하여 가닥 분리, 프라이머 어닐링, 및 프라이머 신장의 사이클을 포함하는 PCR 증폭 계획을 수행하는 단계;
- [0209] 각 프라이머 쌍에 대하여 앰플리콘의 수준을 검출하는 단계로서, 앰플리콘의 존재는 그 프라이머 쌍이 특이적인

서열 변이의 존재를 나타내는 것인 단계를 추가로 포함하는, 단락 27 내지 단락 39 중 어느 하나의 단락의 방법.

- [0210] 41. cMET의 하나 이상의 서열 변이는 SNP인, 단락 40의 방법.
- [0211] 42. cMET SNP는 S1058P; V1101I; H1112Y; H1124D; G1137V; M1149T; V1206L; L1213V; K1262R; M1268T; V1238I; Y1248C; 및 D1246N으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 단락 39 내지 단락 41 중 어느 하나의 단락의 방법.
- [0212] 43. S1058P; V1101I; H1112Y; H1124D; G1137V; M1149T; V1206L; L1213V; K1262R; M1268T; V1238I; Y1248C; 및 D1246N이 검출되는, 단락 39 내지 단락 42 중 어느 하나의 단락의 방법.
- [0213] 44. 동일한 PCR 열사이클링 계획이 두 반응 모두에 사용되는, 단락 39 내지 단락 43 중 어느 하나의 단락의 방법.
- [0214] 45. 핵산 샘플은 FFPE 종양 샘플로부터 준비되는, 단락 39 내지 단락 44 중 어느 하나의 단락의 방법.
- [0215] 46. 샘플은 위암; 직장암; 담관종; 폐암; 뇌암; 자궁경부암; 결장암; 두경부암; 간세포암; 비소세포 폐암; 흑색 종; 중피종; 다발성 골수종; 난소암; 육종; 및 갑상선암으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환을 갖는 것으로 진단된 대상체로부터의 종양 세포를 포함하는, 단락 27 내지 단락 45 중 어느 하나의 단락의 방법.
- [0216] 47. 하나 이상의 프라이머가 이중 도메인 프라이머인, 단락 27 내지 단락 46 중 어느 하나의 단락의 방법.
- [0217] 48. 일 프라이머 하위세트의 둘 이상의 프라이머 쌍들로부터의 증폭된 산물들이 구별될 수 있는, 단락 27 내지 단락 47 중 어느 하나의 단락의 방법.
- [0218] 49. 일 프라이머 하위세트의 둘 이상의 프라이머 쌍들로부터의 증폭된 산물들은 뚜렷이 다른 크기들을 가지므로써 구별되는, 단락 27 내지 단락 48 중 어느 하나의 단락의 방법.
- [0219] 50. 일 프라이머 하위세트의 둘 이상의 프라이머 쌍들로부터의 증폭된 산물들은 상이한 검출가능한 표지들로 표지됨으로써 구별되는, 단락 27 내지 단락 49 중 어느 하나의 단락의 방법.
- [0220] 51. 제1 세트의 프라이머들 및 제2 세트의 프라이머들로부터의 증폭된 산물들은 상이한 검출가능한 표지들로 표지됨으로써 구별되는, 단락 27 내지 단락 50 중 어느 하나의 단락의 방법.
- [0221] 52. 하나 이상의 프라이머가 서열 번호 1-83으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 단락 27 내지 단락 51 중 어느 하나의 단락의 방법.
- [0222] 53. 하나 이상의 프라이머가 서열 번호 89-124 중 어느 하나의 서열을 포함하는, 단락 27 내지 단락 52 중 어느 하나의 단락의 방법.
- [0223] 54. 프라이머들은 대략 표 2의 농도로 반응 혼합물 내에 존재하는, 단락 27 내지 단락 53 중 어느 하나의 단락의 방법.
- [0224] **실시예**
- [0225] **실시예 1**
- [0226] ICEPlex 시스템과 양립가능한, cMET 및 EGFR 유전자의 증폭, cMET의 발현, 및 염색체 7의 다염색체성을 검출하도록 설계된 18-표적 단일관 멀티모달 검정을 개발하였다. 검정은 문헌에 이미 특성화되어 있는 세포주를 사용하여 시험하였다.
- [0227] cMET의 증폭은 세포주 SNU-5 및 H1993에 존재하는 것으로 알려져 있다. cMET의 과발현은 SNU-5에서 발생하는 것으로 알려져 있고, cMET의 어떠한 발현도 SNU-1에서는 보고되어 있지 않다. 염색체 7 다염색체성은 세포주 SNU-5의 경우에, 그리고 경우에 따라서는 H1993의 경우에도 존재하는 것으로 알려져 있다. 표 2에 나타난 농도를 사용하여 표 1의 프라이머들로 검정을 수행하였으며, 도 2 내지 도 7에 묘사된 바와 같이 세포주들의 사전 특성화(표 5)를 확인해 주었다.
- [0228] 또한, 본 명세서에 기재된 검정은 정상 조직 또는 단일 임상 FFPE 시료에서 cMET의 비정상 수준 또는 염색체 7 다염색체성을 보여주지 않았다(데이터는 도시되지 않음). 본 검정을 정상 폐 조직 및 정상 위 조직에 대해 또는 임상 FFPE 위암 시료에 대해 시험하였을 때, cMET, EGFR 또는 염색체 7의 비정상 상태를 보여주지 않았다(데이터는 도시되지 않음).

[0229] 적합한 완충액은 다음을 포함할 수 있다: Tris 완충액(50 내지 200 mM, pH 8 내지 9), 트레할로스(5 내지 15%), 아세트산칼륨(25 내지 150 mM), 글리세롤(1 내지 7.5%), 및 베타인(250 내지 1250 mM). 텔타-엑소-Apta Taq 중합효소를 사용하였다(PCR 반응당 1 내지 10 U). 열사이클링 조건은 도 11에 묘사되어 있다.

표 1

[0230] 프라이머 서열

프라이머	표적	표지	서열	염기	서열 번호
RT 프라이머					
cMET_e14e15_RT1	mM1		GTC TGT CAG AGG ATA CT	17	1
cMET_e5e6_RT1	mM3		TTG TCC CTC CTT CAA G	16	2
cMET_e8e9_RT1	mM2		GCT GGG GTA TAA CAT TC	17	3
mKDEL2-1_RT1	mKDEL-2 (서열 번호 130으로서 개시된 'KDEL')		AAA AAG ATC CAG GTA ACG	18	4
mKDEL2-2_RT1	mKDEL-1 (서열 번호 130으로서 개시된 'KDEL')		TTT CAG GTA GAT CAG GT	17	5
mSOD1-1_RT1	mSOD-2		AGA GGA TTA AAG TGA GGA	18	6
mSOD1-2_RT1	mSOD-1		ACT TTC TTC ATT TCC ACC	18	7
mSPG21-1_RT1	mSPG-2		GCC AGA TGA AAA ATT TCC	18	8
mSPG21-2_RT1	mSPG-1		CAT GGA ATT GCA GCA A	16	9
순방향 프라이머					
gCMET_e2-I-e3_F1-MTA1	gM1		AAC GCC CGC TTT ATT AAT ATT CTA TGT TCT TAT CTC CTC AGT	42	10
gCMET_e3-I-e4_F2-MTA3	gM2		TGA GTT ACC ATT AAA ATA ATA AAT TAA TTG GTT CCA TCC TAG CTC TT	47	11
gCMET_e5-I-e6_F2-MTA2	gM3		AGC TTA AAC GAA ATA TTA AAT ATT ATT ATT AAC TCA CCC ACT CTC TGA T	49	12
gEGFR_e1-I-e2_2_F1-MTA1	gE2		TCA GAA GGA CAA TAT TTT TAC CCA GTG ACT TAC CTA TG	38	13
gEGFR_e1-I-e2_F1-MTA2	gE3		TAT CGT AAC ATA ATT TAA TAA TAA AAT AAT TTA ATT ATT TCA AAT CTG GAA AGG ACA C	58	14
gEGFR_e3-I-e4_F2-MTA1	gE1		TCC TGC GCT GTA TAA ACT TCT GGG GAA GCT CAT T	34	15
gKDEL2_e1-I-e2_F3-MTA2	gKDEL (서열 번호 130으로서 개시된 'KDEL')		ACT TTG CCT AAA TAA ATA TTA ATA ATT AAT ATA TCA GCA TCT GAA ACC CAT AG	53	16
gSOD1_e2-I-e3_F2-MTA2	gSOD		TAA ACT CCC TAT AAA ATT AAA TTA ATA ATA TAT AAT ATT TTG TGC TCT GTG AAT GTC ATC	60	17
gSPG21_e7-I-e9_F2-MTA2	gSPG		TGT GGA GAT TAT AAA ATT AAT TAA TAA TAT ATA ATA TTT TTA CCC AGG TTT CCA GAA TAG	60	18

mCMET_e14e15_F1-MTA11	mM1		AAG CTT CGT GAT AAT TAA ATC TGT AGA CTA CCG AGC TAC	39	19
mCMET_e5e6_F2-MTA1	mM3		TAG GAT GGC CTA TTT TAA TAA AAT AAT TTT ATA ATT AAT CGG AGG AAT GCC TGA	54	20
mCMET_e8e9_F1-MTA11	mM2		AGA AGG ACC GTT TTA TTT ATT TTA TTA TAC TAA ACA GTG GGA ATT CTA GAC	51	21
mKDEL2_e1_e2_F1-MTA5	mKDEL-2 (서열 번호 130 으로서 개시된 'KDEL')		TTG AGA TGG CAT TAA TTA AAT TTT TAA TAA TAT TTA CTG CTG AAG ATC TGG AAG A	55	22
mKDEL2_e2_e3_F2-MTA11	mKDEL-1 (서열 번호 130 으로서 개시된 'KDEL')		ACT TTG CCT AAA TAT ATT TTT CTT CAT TTA TTT CAT TGT ATA ACA CA	47	23
mSOD1_e2_e3_F1-MTA2	mSOD-2		ATC TAT ATA AAT AAT TTT ATA AAA TAA TTT ATT AAA ATT AAA TAT ATG CAT TAA AGG ACT GAC TGA A	67	24
mSOD1_e4_e5_F1-MTA11	mSOD-1		ACC ATG GTT TAT AAT AAA TAT TAA GAT CTC ACT CTC AGG AGA	42	25
mSPG21_e6_e7_F2-MTA2	mSPG-2		AAG CAG CAG ATA ATT TAT TAT ATA ATT AAA AAT AAT TAT AAT TAA TAA AAT TTA AAC ACC TCT ATC TTC AAC CAA	75	26
mSPG21_e9_e10_F2-MTA2	mSPG-1		ACC ATC TCG GTA ATT AAT AAT TAA AAT AAT TTA ATT ATG CTC ATC TGA AAA CAG GAG	57	27
역방향 프라이머					
gCMET_e2-I-e3_R1 TYE	gM1	TYE	/5TYE665/TCA TTG CCC TTT TAA ATA AGC AGT GGC AGA AAT TC	35	28
gCMET_e3-I-e4_R2 TYE	gM2	TYE	/5TYE665/AGC ATG CGT ATT TAA GTT AAG AGG CAG AAG AGA AC	35	29
gCMET_e5-I-e6_R2 TYE	gM3	TYE	/5TYE665/ATA GCT GTT ATT TAA CAG GAT ATG CCA TGA ACA G	34	30
gEGFR_e1-I-e2_2_R2 TYE	gE2	TYE	/5TYE665/ATG ATG GAG TTT TAA CTG CCT GCT ACT GTA TGA	33	31
gEGFR_e1-I-e2_R1 TYE	gE3	TYE	/5TYE665/AGG CCA CCG TTT TAA TGT TAA AAG CCT ATT GGA GC	35	32
gEGFR_e3-I-e4_R2 TYE	gE1	TYE	/5TYE665/TTC ATG CAA TTT TAA CAT GTT GTG TGT ACA GAG T	34	33
gKDEL2_e1_I_e2_R3 TYE	gKDEL	TYE	/5TYE665/AGG AGA AGT CTT TTT ATA TTT ATT ATA TGG ACA TTT ATG TGG TGT G	46	34
gSOD1_e2_I_e3_R2 TYE	gSOD	TYE	/5TYE665/ACT AGT TGC TAT TAA TTA AAA TTT TTA TAT TTT GCT GCC TTA CAC AAC T	49	35
gSPG21_e7_I_e9_R2 TYE	gSPG	TYE	/5TYE665/ACT AGT TGC TAT TTA ATA ATA AAT TTA AAA ATA TCA GAA AAG TCA TCA GTG AGG	54	36
mCMET_e14e15_R1 FAM	mM1	FAM	/56-FAM/TTG CGA TCC CTT TAA GTC TGT CAG AGG ATA CTG C	34	37
mCMET_e5e6_R2 FAM	mM3	FAM	/56-FAM/AAA CTT CGC ATT TAA TTG TCC CTC CTT CAA GG	32	38
mCMET_e8e9_R1 FAM	mM2	FAM	/56-FAM/TCG CGC TAG ATT TAA GCT GGG GTA TAA CAT TCA AG	35	39

mKDEL2_e1_e2_R1 FAM	mKDEL-2 (서열 번호 130으로서 개시된 'KDEL')	FAM	/56-FAM/TTT ATG CCA TTT ATA ATA ATA TAA AAA AAA AGA TCC AGG TAA CGA G	46	40
mKDEL2_e2_e3_R2 FAM	mKDEL-1 (서열 번호 130으로서 개시된 'KDEL')	FAM	/56-FAM/AGG AGA AGT CTT TAA TTT CAG GTA GAT CAG GTA CA	35	41
mSOD1_e2_e3_R1 FAM	mSOD-2	FAM	/56-FAM/TTC CGT AAA CTT TAA AGA GGA TTA AAG TGA GGA CC	35	42
mSOD1_e4_e5_R1 FAM	mSOD-1	FAM	/56-FAM/AAC CAT ACG ATT TAA ACT TTC TTC ATT TCC ACC TT	35	43
mSPG21_e6_e7_R2 FAM	mSPG-2	FAM	/56-FAM/TGC ATA AGA ATT TAA TAG CCA GAT GAA AAA TTT CCA A	37	44
mSPG21_e9_e10_R2 FAM	mSPG-1	FAM	/56-FAM/AGG AGA AGT CTT TAA CAT GGA ATT GCA GCA AAT G	34	45

표 2

멀티플렉스 프라이머 쌍 세트들 및 농도의 예시적인 실시 형태

표적	증폭 크기	순방향	역방향	For(uM)	Rev(uM)
mM1	124	mCMET_e14e15_F1-MTA11	mCMET_e14e15_R1 FAM	1.3	1.3
mM2	135.5	mCMET_e8e9_F1-MTA11	mCMET_e8e9_R1 FAM	1.6	1.6
mM3	146.5	mCMET_e5e6_F2-MTA1	mCMET_e5e6_R2 FAM	1.6	1.6
gM1	127	gCMET_e2-I-e3_F1-MTA1	gCMET_e2-I-e3_R1 TYE	2	2
gM2	139	gCMET_e3-I-e4_F2-MTA3	gCMET_e3-I-e4_R2 TYE	2.2	2.2
gM3	144	gCMET_e5-I-e6_F2-MTA2	gCMET_e5-I-e6_R2 TYE	1.8	1.8
gE1	120	gEGFR_e3-I-e4_F2-MTA1	gEGFR_e3-I-e4_R2 TYE	2.5	2.5
gE2	132	gEGFR_e1-I-e2_2_F1-MTA1	gEGFR_e1-I-e2_2_R2 TYE	4	4
gE3	150	gEGFR_e1-I-e2_F1-MTA1	gEGFR_e1-I-e2_R1 TYE	2.8	2.8
mSPG2	165	mSPG21_e6_e7_F2_MTA2	mSPG21_e6_e7_R2 FAM	2.5	2.5
mSPG1	144	mSPG21_e9_e10_F2_MTA2	mSPG21_e9_e10_R2 FAM	2.5	2.5
gSPG	169.5	gSPG21_e7_I_e9_F2_MTA2	gSPG21_e7_I_e9_R2 TYE	3.8	3.8
mKDEL2 (서열 번호 130으로서 개시된 'KDEL')	151	mKDEL2_e1_e2_F1_MTA5	mKDEL2_e1_e2_R1 FAM	1.6	1.6
mKDEL1 (서열 번호 130으로서 개시된 'KDEL')	118	mKDEL2_e2_e3_F2_MTA11	mKDEL2_e2_e3_R2 FAM	1.5	1.5
gKDEL2	157	gKDEL2_e1_I_e2_F3_MTA2	gKDEL2_e1_I_e2_R3 TYE	4.5	4.5
mSOD2	158	mSOD1_e2_e3_F1_MTA2	mSOD1_e2_e3_R1 FAM	2	2
mSOD1	130	mSOD1_e4_e5_F1_MTA3	mSOD1_e4_e5_R1 FAM	1.8	1.8
gSOD	163	gSOD1_e2_I_e3_F2_MTA2	gSOD1_e2_I_e3_R2 TYE	2.7	2.7

실시예 2

실시예 1의 완충액, 효소, 및 열사이클링 파라미터를 사용하여 cMET 스니프(snip)들의 검출을 수행하였다. 두 대안적인 세트의 프라이머들(도 8) - 일 세트는 더 긴 앰플리콘들(표 3)을 증폭시키는 것이고, 일 세트는 더 짧은

애플리콘들(표 4)을 증폭시키는 것임 - 을 시험하였으며, 이는 도 9 및 도 10에 도시된 바와 같다.

실시예 3: cMET 및 EGFR 카피수 변이 및 cMET 유전자 발현의 상대 정량화(relative quantification)

cMET 및 EGFR 카피수 변이 및 cMET 유전자 발현의 상대 정량화를 델타-델타 Ct 방법을 사용하여 문헌[Livak and Schmittgen, 2001]에 따라 계산하였다. 상이한 표적들에 대해 90 내지 110% 범위의 유사한 PCR 효율을 얻도록 검정을 최적화하였으며, 카피수 변이 및 표적 발현에 대한 상대 정량화를 하기에 기재된 바와 같이 수행하였다:

단계 1: cMET 또는 EGFR CNV 표적들 또는 cMET 유전자 발현 표적들의 평균 Ct를 계산한다.

단계 2: 기준 유전자들의 평균 Ct를 계산한다. 카피수 변이 계산을 위해 2개의 유전자를 사용하고, cMET 유전자 발현을 측정하기 위해 각각 2개의 애플리콘들을 갖는 2개의 유전자를 사용하였다.

단계 3: 하기 식을 사용함으로써 상대 정량화를 계산한다:

cMET 또는 EGFR CNV 또는 cMET 유전자 발현에 있어서의 기준에 상대적인 배수 차이를 하기 식을 사용하여 계산하였다:

$$= 2^{-(cMET \text{ 또는 EGFR 또는 cMET 유전자 발현의 평균 Ct} - \text{기준 유전자들의 평균 Ct})}$$

표 3

cMET SNP의 검출을 위한 프라이머 - 더 긴 애플리콘

돌연변이	프라이머	코어 산물	산물 길이	서열 번호
<u>영역 1</u>	—	—	—	
S1058P-CF	aagggcaCCTAACTAGTGGGGACC	107	107+7+6 120 bp	= 46
cMET-1R	actcatCTACATGCTGCACTGCCTG			47
<u>영역 2</u>				
cMET-2F	ctccGAAGCTCATAAAGGGTTTGAT			48
V1110I-AR	cccggAACAAAGTCCCATGATATAT	115	115+5+4 124 bp	= 49
H1112Y-TR	ctgccGTCCAACAAAGTCCATA	119	119+5+4 128 bp	= 50
H1124D-GR	taatacataaacagt t tGGATTTCACAGCACAGTC	155	155+16+4 175bp	= 51
<u>영역 3</u>				
cMET-3F	ccattCATTTTCATTGCTCTTCTATCTA			52
G1137V-TR	acaaccgAGAAATTGGGAAACTTCTA	120	120+7+5= 132 bp	53
M1149T-CR	cacagcGGATGACTAAAATCTTTTCG	156	156+6+5 167 bp	= 54
<u>영역 4</u>				
cMET-4F	caaattcaaaatAGGTCAAAATTAGAACAGTAGATG			55
V1206L-TR	accttctcaTCATGCCTTTGGCTAA	115	115+9+12 136 bp	= 56
L1213V-GR3	ccccgAAACTTTTGGCTTGCtACA	138	138+5+12 155 bp	= 57
<u>영역 5</u>				
cMET-5F	cttcatataaattatTGTAGATATTCAGCATCATTGTA			58
V1238I-AR	acaaaacaaaatAAGACCAAAATCAGCAAT	113	113+12+15 = 140 bp	59
D1246N-AR	cgggcATAGTATTCTTTATCATACATGTT	143	143+5+15 163 bp	= 60
Y1248C-GR	ccccTGTACACTATAGTATTCTTTATCAC	151	151+5+15 171 bp	= 61
<u>영역 6</u>				
K1262R-GF	acactccataAACAAAACAGGTGCAAG	124	124+10+14 = 148 bp	62
M1268T-CF	ctttattattctatttactatttaCTGCCAGTGAAGTGGAC	106	106+24+14 = 144 bp	63

cMET-6R	ctcaaatatataatAAGTAAAAGAGGAGAACTCAGA			64
---------	--------------------------------------	--	--	----

표 4

[0242]

cMET SNP의 검출을 위한 프라이머 - 더 짧은 앰플리콘

cMET SNP 영 역	프라이머 명칭	프라이머 서열	코어 크기	ICEplexer 상에서의 실제 크기	서열 번호
영역 1	Genomic_Modified_S1058P-CF	TAGGATGGCCCCTAACTAGTGGGACC	107	117	65
	cMET-1R	/56-FAM/ttaCTACATGCTGCTGCTG			66
영역 2	cMET-2F	/56-FAM/AGAAGGACCGAAATTTTAAACGCAGTGCTAACCAAGTTCT			67
	Genomic_Modified_V1110I-AR	AAGCTTCGTGATAAAATTAATTAATAATATAATATTTTAACAAAGTCCCAGTATATAT	68	125	68
	Genomic_Modified_H1112Y-TR	ACCATGGTTTATAAAATTAATTAATAATATAATATTTTGTCCAACAAAGTCCCATA	72	129	69
	Genomic_Modified_H1124D-GR	ATCGGACTTCGGATTTCACAGCACAGTC	108	135	70
영역 3	cMET-3F	/56-FAM/ATCGGACTTCTATTTTAATAAAATAATTTTATAATTAACCTCCACTGGATTCTCAGG			71
	Genomic_Modified_G1137V-TR	AACTTCTGGGAATATTTTATATTAATAATATTTTAAATATTAATAAGAAATTTGGGAAACTTCTA	55	140	72
	Genomic_Modified_M1149T-CR	TGAGTTACCAATAAAAAGGATGACTAAAATCTTTCG	91	146	73
영역 4	cMET-4F	/56-FAM/TGGCAGTAGGATAAAATTAATTAATAATATAATATTTTGTACTGCAGAAATCCAACGT			74
	Genomic_Modified_V1206L-TR	AGGCCACCGTATATAATTTTAAAAAATATTAATATTATTTATTAATCATGCCTTTGGCTAG	64	152	75
	Genomic_Modified_L1213V-GR3	AACCATACGAATTAATTAATAATTTTATATTAACTTTTGCTTGCTACA	86	158	76
영역 5	cMET-5F	/56-FAM/TTCCGTAAACTAATTAATAATAAAATAATTTAATTATGTCTTTCTGTAGGCTGGATGA			77
	Genomic_Modified_V1238I-AR	AACCATACGAAATTTTAAAAATTTTATAAATAAATATTAAAAATTTAAATATTAATTTAAAAATTTAAAAAGACCAAAATCAGCAAT	57	164	78
	Genomic_Modified_D1246N-AR	TTGAGATGGCAATTTTATTATAAAATTTAATTTTAAATTAATATAGTATTCTTTATCATACATGTT	87	170	79
	Genomic_Modified_Y1248C-GR	AGGAGAAGTCTTTATTAATTAATTAATTTAATTTTAAATTTTGTACACTATAGTATTCTTTATCAC	95	175	80
영역 6	Genomic_Modified_K1262R-GF	TGTGGAGATTAATTTTAAAAATTTTATAAATAAATATTAAAAATTTAAATATTAATTTAATTAATAAATTTTATATAACAAAACAGGTGCAAG	86	185	81
	Genomic_Modified_M1268T-CF	TGTGGAGATTAATTTTAAAAATTTTATAAATAAATATTAAAAATTTAAATATTAATTTAATAATAATATTACTGCCAGTGAAGTGGAC	68	180	82
	cMET-6R	/56-FAM/AGGCCACCGTAAAAATTAATAAATAATTAATAAACCACATCTGACTTGGTGGTA			83

표 5

[0243]

샘플 특성

샘플	공급원	조직 기원	매트릭스	MET 카피수	MET 발현	염색체 7 다염색체성	기준*
A549	세포주	폐	신선 냉동	2	낮음	알려지지 않음	3

H1993	세포주	폐	신선 냉동	>10	높음	알려지지 않음	3
폐	조직	폐	신선 냉동	알려지지 않음	알려지지 않음	알려지지 않음	
SNU-1	세포주	위(Gastric)	신선 냉동	2	No	No	1, 2
SNU-5	세포주	위(Gastric)	신선 냉동	>10	높음	Yes	1, 2
위(Gastric)	조직	위(Stomach)	신선 냉동	알려지지 않음	알려지지 않음	알려지지 않음	
위(Gastric)	조직	위(Stomach) - 정	FFPE	알려지지 않음	알려지지 않음	알려지지 않음	
위(Gastric)	조직	위(Stomach) - 상					
위(Gastric)	조직	위(Stomach) - 압	FFPE	알려지지 않음	알려지지 않음	알려지지 않음	
*(1) 문헌[Catenacci D, Cancer BioTher, 2011, 12(1): 9-46] (2) 문헌[Smolen G, PNAS, 2006 103(7): 2316-2321] (3) 문헌[Lutterbach B, Cancer Res, 2007, 67: 2081]							

표 6

프라이머

[0244]

표적		서열 번호
역방향 프라이머		
gM1	ATA AGC AGT GGC AGA AAT TC	89
gM2	GTT AAG AGG CAG AAG AGA AC	90
gM3	CAG GAT ATG CCA TGA ACA G	91
gE2	CTG CCT GCT ACT GTA TGA	92
gE3	TGT TAA AAG CCT ATT GGA GC	93
gE1	CAT GTT GTG TGT ACA GAG T	94
gKDEL (서열 번호 130으로서 개시된 'KDEL')	TGG ACA TTT ATG TGG TGT G	95
gSOD	T GCT GCC TTA CAC AAC T	96
gSPG	CA GAA AAG TCA TCA GTG AGG	97
mM1	GTC TGT CAG AGG ATA CTG C	98
mM3	TTG TCC CTC CTT CAA GG	99
mM2	GCT GGG GTA TAA CAT TCA AG	100
mKDEL-2 (서열 번호 130으로서 개시된 'KDEL')	A AAA AGA TCC AGG TAA CGA G	101
mKDEL-1 (서열 번호 130으로서 개시된 'KDEL')	TTT CAG GTA GAT CAG GTA CA	102
mSOD-2	AGA GGA TTA AAG TGA GGA CC	103
mSOD-1	ACT TTC TTC ATT TCC ACC TT	104
mSPG-2	G CCA GAT GAA AAA TTT CCA A	105
mSPG-1	CAT GGA ATT GCA GCA AAT G	106
순방향 프라이머		
gM1	CTA TGT TCT TAT CTC CTC AGT	107
gM2	G GTT CCA TCC TAG CTC TT	108
gM3	AC TCA CCC ACT CTC TGA T	109
gE2	AC CCA GTG ACT TAC CTA TG	110
gE3	T TCA AAT CTG GAA AGG ACA C	111
gE1	CT TCT GGG GAA GCT CAT T	112
gKDEL (서열 번호 130으로서 개시된 'KDEL')	CA GCA TCT GAA ACC CAT AG	113
gSOD	G TGC TCT GTG AAT GTC ATC	114
gSPG	TA CCC AGG TTT CCA GAA TAG	115
mM1	C TGT AGA CTA CCG AGC TAC	116
mM3	T CGG AGG AAT GCC TGA	117
mM2	C TAA ACA GTG GGA ATT CTA GAC	118

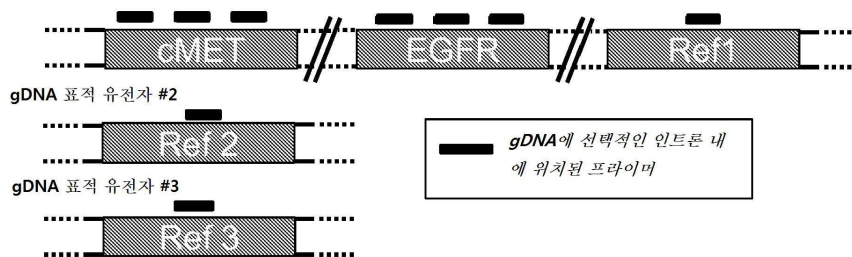
mKDEL-2 (서열 번호 130으로서 개시된 'KDEL')	CTG CTG AAG ATC TGG AAG A	119
mKDEL-1 (서열 번호 130으로서 개시된 'KDEL')	CTT CAT TTA TTT CAT TGT ATA ACA CA	120
mSOD-2	G CAT TAA AGG ACT GAC TGA A	121
mSOD-1	GAT CTC ACT CTC AGG AGA	122
mSPG-2	AC ACC TCT ATC TTC AAC CAA	123
mSPG-1	G CTC ATC TGA AAA CAG GAG	124

도면

도면1

cMET 및 EGFR 카피수 변이

염색체 7 상의 gDNA 유전자 표적

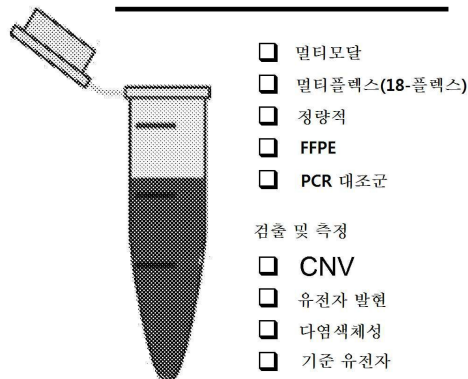


정량적인 cMET 유전자 발현 프로파일

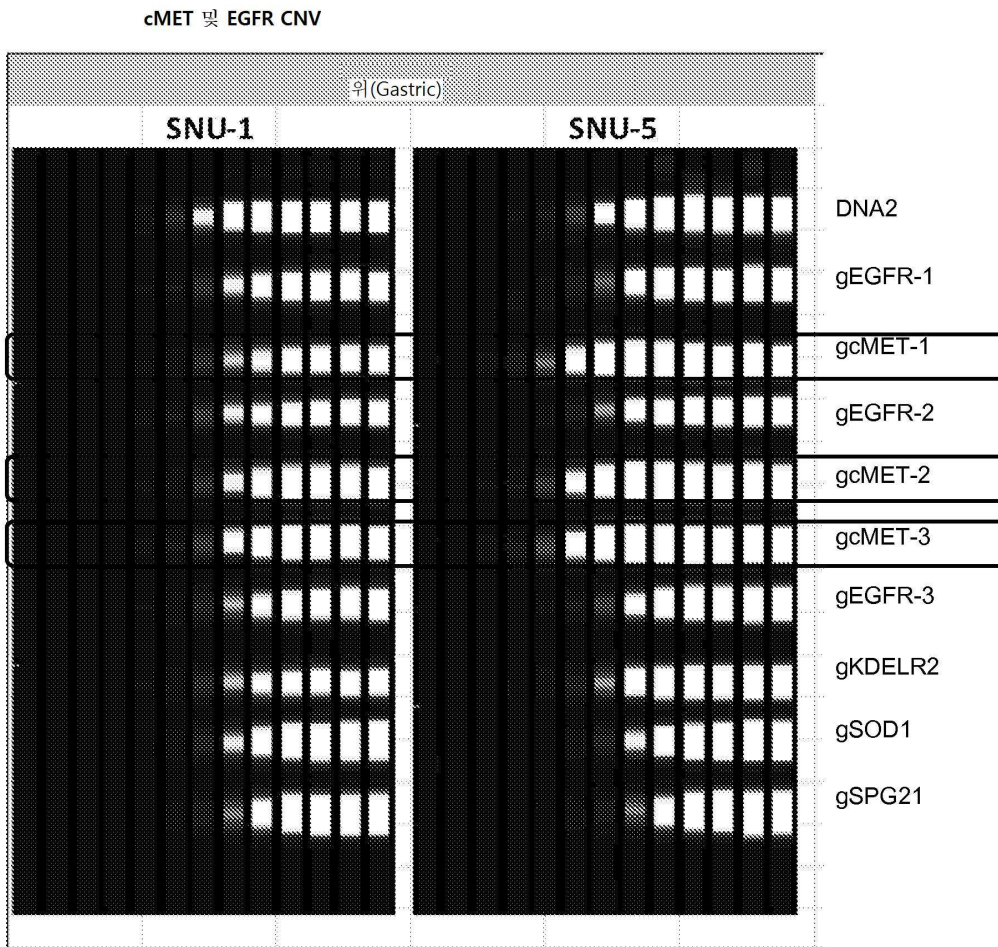
mRNA 표적 유전자 #1



단일 튜브 검정

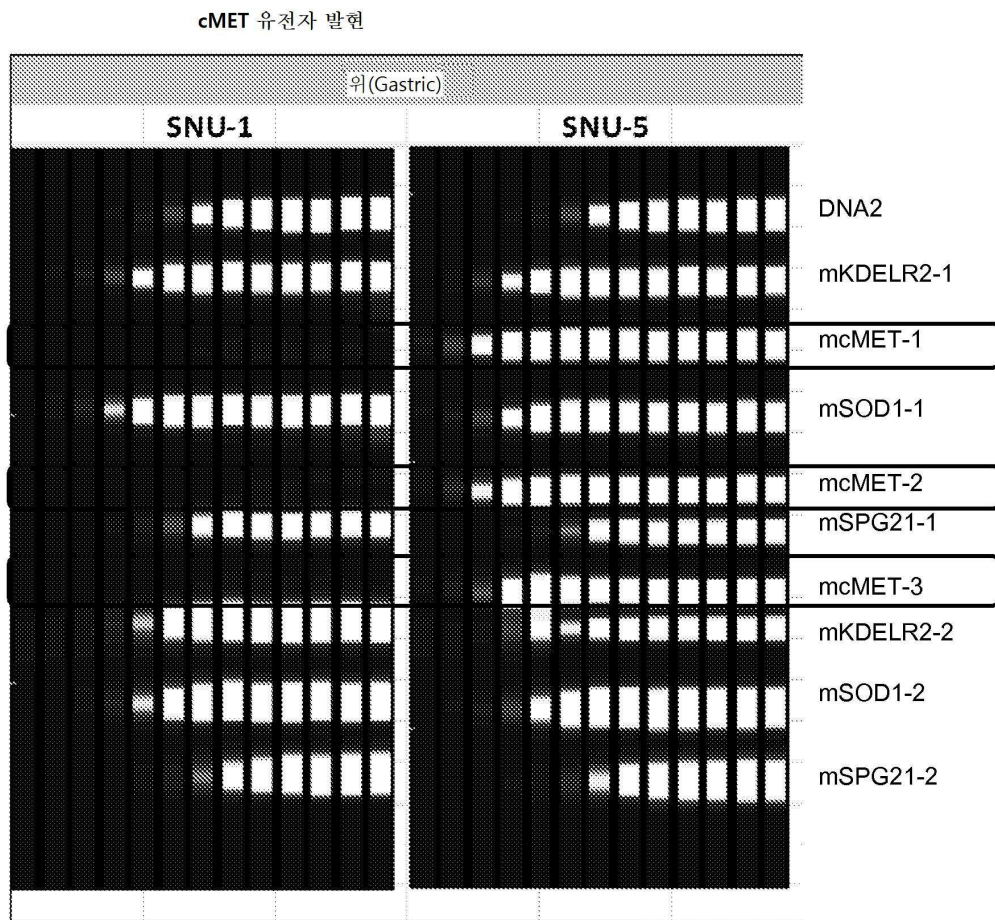


도면2



두 위 암종 세포주에서의 cMET/EGFR CNV 분석:
 각각의 cMET 및 EGFR에 대해 세 앰플리콘들
 TYE 채널에서의 기준 유전자 KDEL2, SOD1 및 SPG21 검출에 대해 각각 하나의 앰플리콘

도면3

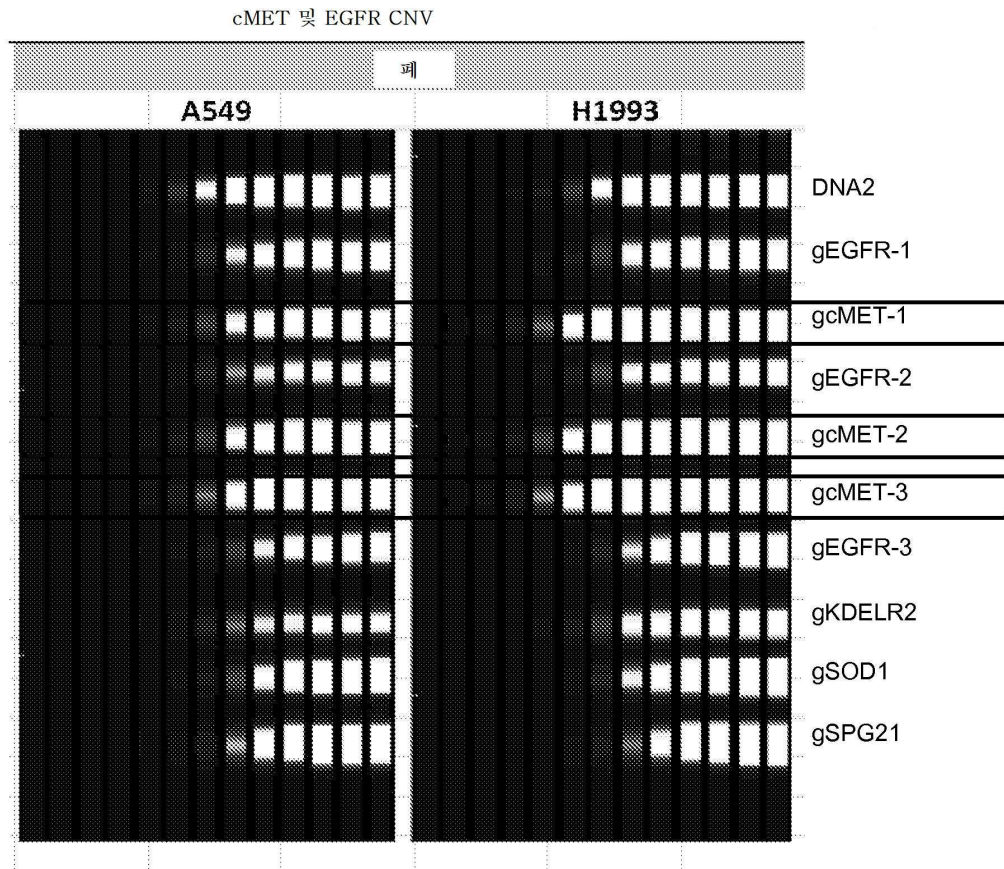


두 위 암종 세포주에서의 cMET 유전자 발현 분석:

cMET에 대해 세 앰플리콘들

FAM 채널에서의 기준 유전자 KDEL2, SOD1 및 SPG21 검출에 대해 각각 둘의 앰플리콘들

도면4

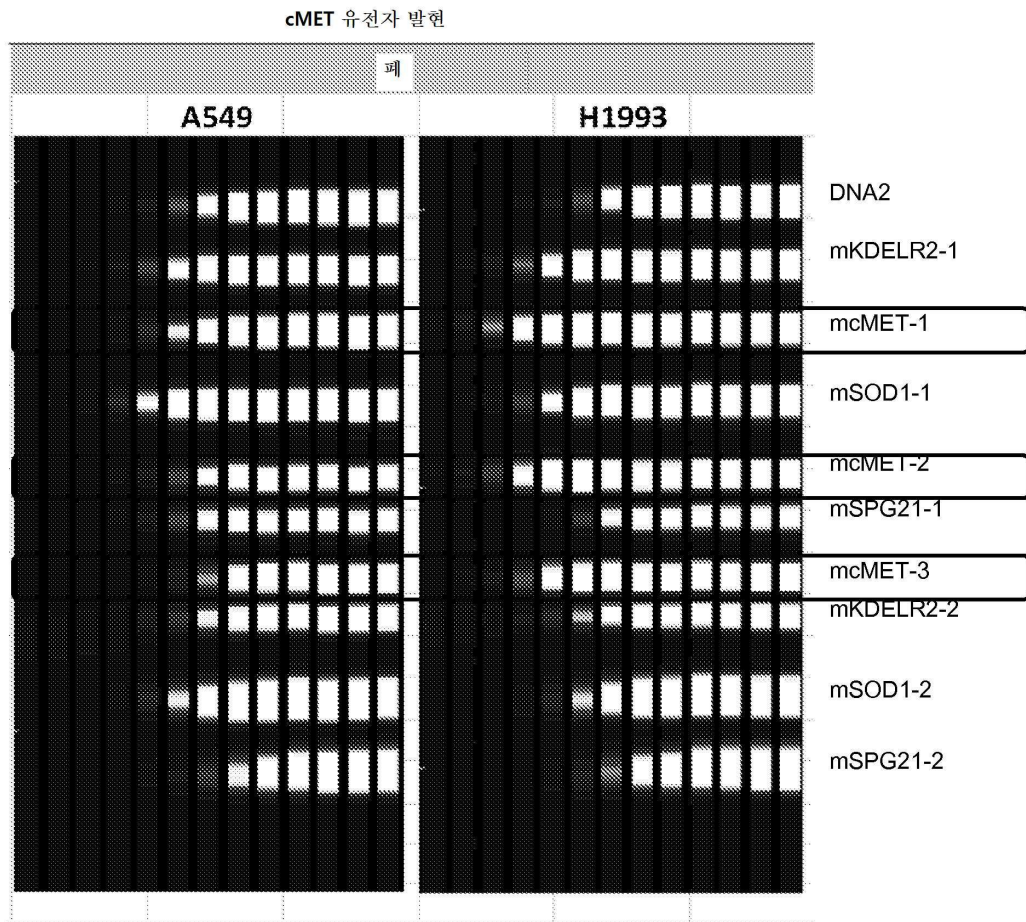


두 폐 암종 세포주에서의 cMET/EGFR CNV 분석:

각각의 cMET 및 EGFR에 대해 셋의 앰플리콘들

TYE 채널에서의 기준 유전자 KDEL2, SOD1 및 SPG21 검출에 대해 각각 하나의 앰플리콘

도면5

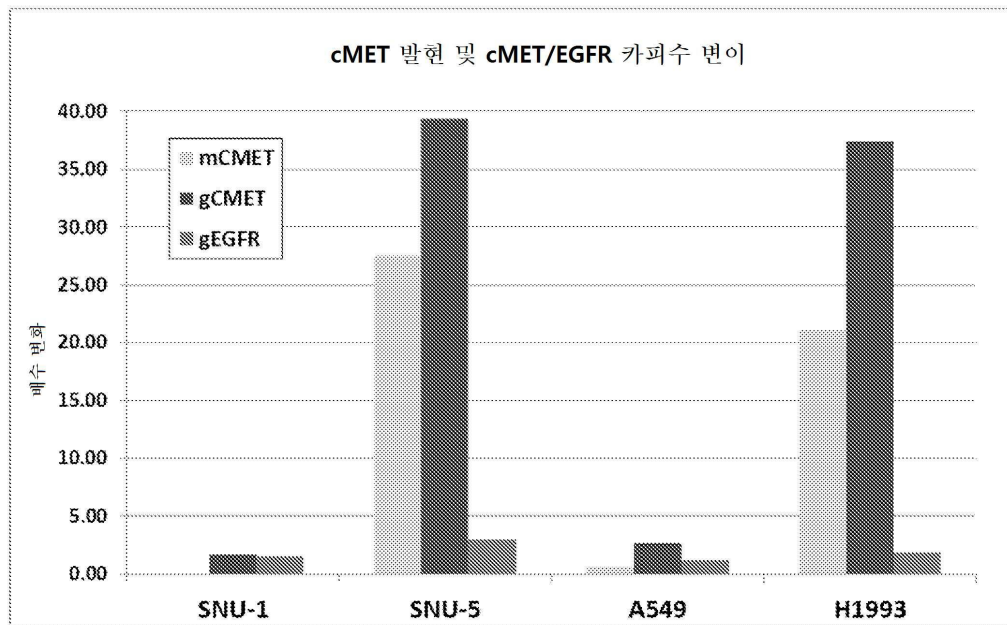


두 폐 암종 세포주에서의 cMET 유전자 발현 분석:

cMET에 대해 셋의 앰플리콘들

FAM 채널에서의 기준 유전자 KDEL2, SOD1 및 SPG21 검출에 대해 각각 둘의 앰플리콘들

도면6

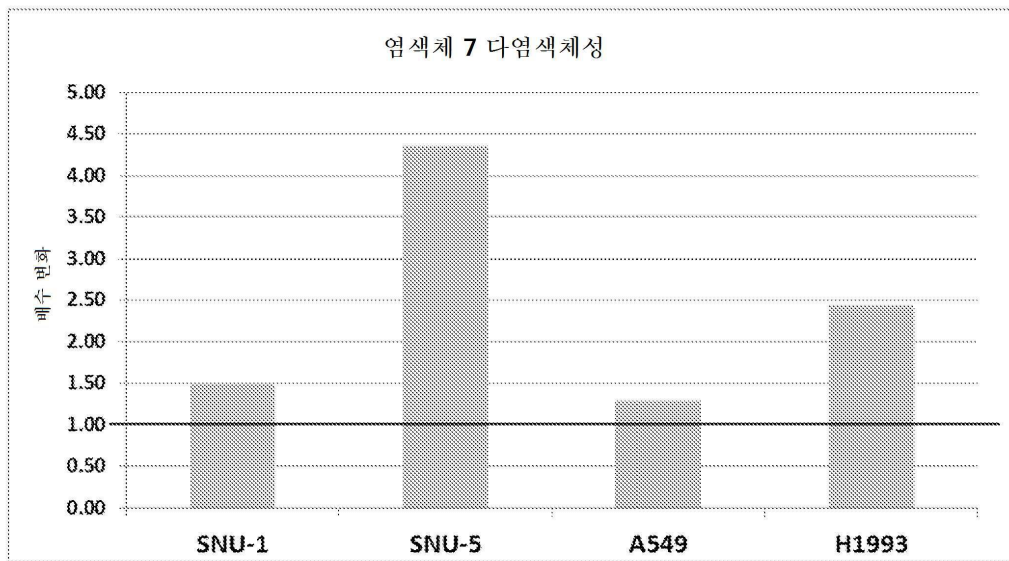


기준 유전자 **SOD1/SPG21**에 대해 데이터를 정규화하고 배수 변화로 표현하였음

SNU-5 및 **H1993**은 **cMET**의 유의한 증폭 및 과발현을 보여줌

EGFR의 증폭/과발현은 없음

도면7



gSOD1(Chr. 21) 및 gSPG21(Chr. 15)와 대비하여 염색체 7 표적(gKDEL2)의 검출
 SNU-5 및 H1993은 gKDEL2의 증가된 카피를 보여주며, 이는 염색체 7 다염색체성
 (SNU-5에서의 약 8개의 카피 및 H1993에서의 4개의 카피)을 시사함

도면8

점정 디자인: 더 긴 밧 더 짧은 애플리코트를

영역-1, JM-도메인

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	121
3,280	3,289	3,296	3,308	3,319	3,328	3,339	3,348	3,359	3,369	3,379	3,389	3,393	3,400
GTCCCCCATCCCAACTAGTGGGACTCTGATATATCCAGTCCATTACTGCGAAATATGCGACATTCAGTCTCTAAATCCAGAGCTGGTCCAGGCAGTCCAGCATCTAGTAGTATT MET 엑손 15													
소스 호모 사피엔스													
S158P-C-F <div> <div></div> <div>CHER</div> </div>													

영역-2, TK-도메인

40	60	80	100	120	140	160	180	200	220
1.263	1.303	1.323	1.343	1.363	1.383	1.403	1.423	1.443	1.463

□ CMT-2F □ 2F = 프라운hofer □ H11240-AR □ H11240-IR □ H11240-IR

영역-3, TK-도메인

Wavenumber (cm ⁻¹)	Assignment
2857	CH ₂ stretch
2897	CH ₂ stretch
2917	CH ₂ stretch
2937	CH ₂ stretch
2957	CH ₂ stretch
2977	CH ₂ stretch
2997	CH ₂ stretch
3017	CH ₂ stretch
3037	CH ₂ stretch
3057	CH ₂ stretch
3077	CH ₂ stretch
3097	CH ₂ stretch
3117	CH ₂ stretch
3137	CH ₂ stretch
3157	CH ₂ stretch
3177	CH ₂ stretch
3197	CH ₂ stretch
3217	CH ₂ stretch
3237	CH ₂ stretch
3257	CH ₂ stretch
3277	CH ₂ stretch
3297	CH ₂ stretch
3317	CH ₂ stretch
3337	CH ₂ stretch
3357	CH ₂ stretch
3377	CH ₂ stretch
3397	CH ₂ stretch
3417	CH ₂ stretch
3437	CH ₂ stretch
3457	CH ₂ stretch
3477	CH ₂ stretch
3497	CH ₂ stretch
3517	CH ₂ stretch
3537	CH ₂ stretch
3557	CH ₂ stretch
3577	CH ₂ stretch
3597	CH ₂ stretch
3617	CH ₂ stretch
3637	CH ₂ stretch
3657	CH ₂ stretch
3677	CH ₂ stretch
3697	CH ₂ stretch
3717	CH ₂ stretch
3737	CH ₂ stretch
3757	CH ₂ stretch
3777	CH ₂ stretch
3797	CH ₂ stretch
3817	CH ₂ stretch
3837	CH ₂ stretch
3857	CH ₂ stretch
3877	CH ₂ stretch
3897	CH ₂ stretch
3917	CH ₂ stretch
3937	CH ₂ stretch
3957	CH ₂ stretch
3977	CH ₂ stretch
3997	CH ₂ stretch
4017	CH ₂ stretch
4037	CH ₂ stretch
4057	CH ₂ stretch
4077	CH ₂ stretch
4097	CH ₂ stretch
4117	CH ₂ stretch
4137	CH ₂ stretch
4157	CH ₂ stretch
4177	CH ₂ stretch
4197	CH ₂ stretch
4217	CH ₂ stretch
4237	CH ₂ stretch
4257	CH ₂ stretch
4277	CH ₂ stretch
4297	CH ₂ stretch
4317	CH ₂ stretch
4337	CH ₂ stretch
4357	CH ₂ stretch
4377	CH ₂ stretch
4397	CH ₂ stretch
4417	CH ₂ stretch
4437	CH ₂ stretch
4457	CH ₂ stretch
4477	CH ₂ stretch
4497	CH ₂ stretch
4517	CH ₂ stretch
4537	CH ₂ stretch
4557	CH ₂ stretch
4577	CH ₂ stretch
4597	CH ₂ stretch
4617	CH ₂ stretch
4637	CH ₂ stretch
4657	CH ₂ stretch
4677	CH ₂ stretch
4697	CH ₂ stretch
4717	CH ₂ stretch
4737	CH ₂ stretch
4757	CH ₂ stretch
4777	CH ₂ stretch
4797	CH ₂ stretch
4817	CH ₂ stretch
4837	CH ₂ stretch
4857	CH ₂ stretch
4877	CH ₂ stretch
4897	CH ₂ stretch
4917	CH ₂ stretch
4937	CH ₂ stretch
4957	CH ₂ stretch
4977	CH ₂ stretch
4997	CH ₂ stretch
5017	CH ₂ stretch
5037	CH ₂ stretch
5057	CH ₂ stretch
5077	CH ₂ stretch
5097	CH ₂ stretch
5117	CH ₂ stretch
5137	CH ₂ stretch
5157	CH ₂ stretch
5177	CH ₂ stretch
5197	CH ₂ stretch
5217	CH ₂ stretch
5237	CH ₂ stretch
5257	CH ₂ stretch
5277	CH ₂ stretch
5297	CH ₂ stretch
5317	CH ₂ stretch
5337	CH ₂ stretch
5357	CH ₂ stretch
5377	CH ₂ stretch
5397	CH

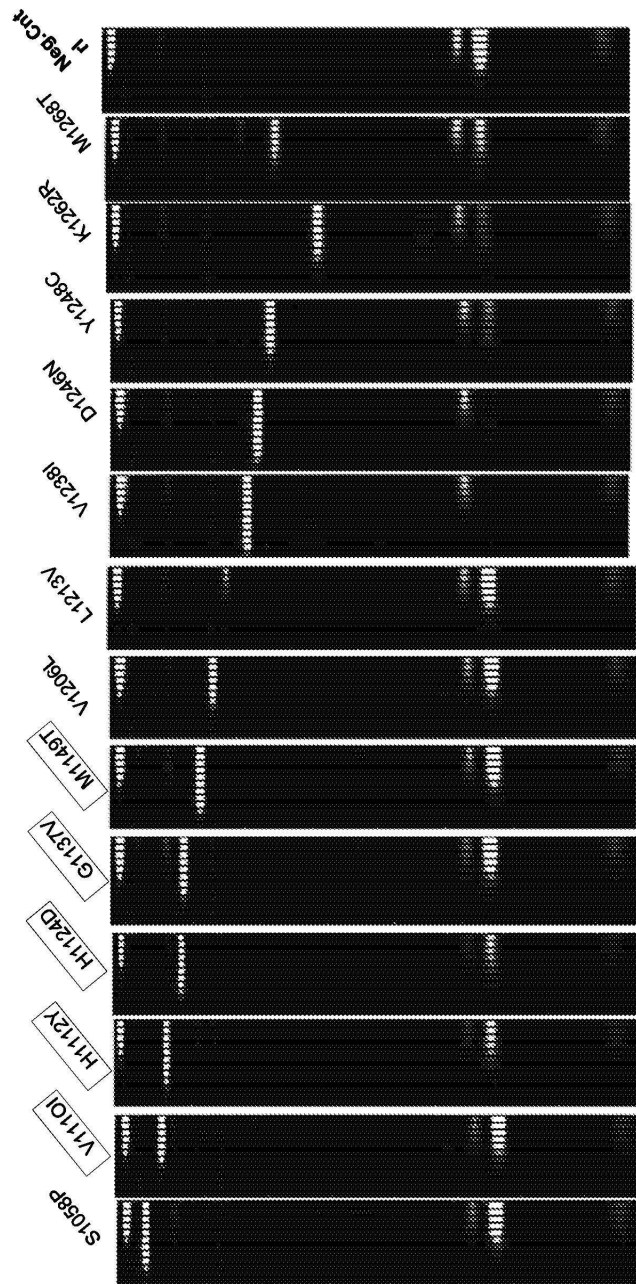
영역-4, TK-도메인

60	80	100	120	140	160	180	200	220
5,908	5,929	5,949	5,969	5,989	6,009	6,029	6,049	6,069
CMT-4F			V128L-CR			U128K-CR		
더 많은 프라이미-4F								

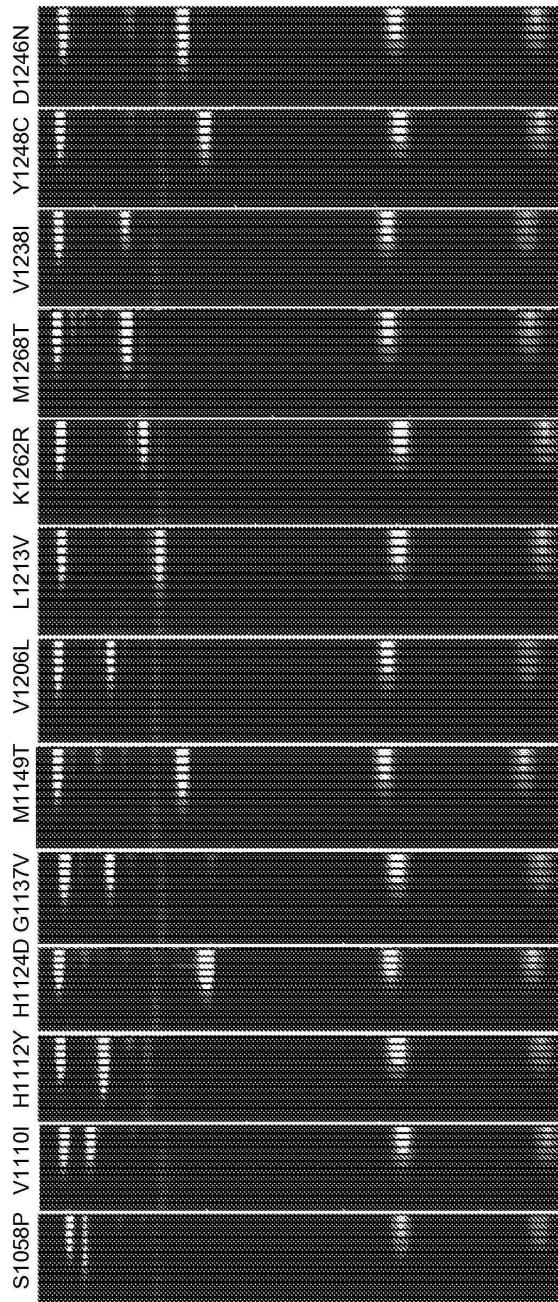
영역-5, TK-도메인

[illegible]

도면9



도면10



도면11

PCR 사이클: 42

모세관 분리: 12

요구된 시간: 3시간 3분

분석 시간: 15-20분

스테이지	에비-가열	반복	1	번		
단계			96.0	C	600	초
					+	-

스테이지	증폭	반복	2	번		
단계			54.0	C	45	초
					+	-
단계			72.0	C	45	초
					+	-
단계			96.0	C	20	초
					+	-

스테이지	증폭	반복	16	번		
단계			64.0	C	45	초
					+	-
단계			72.0	C	45	초
					+	-
단계			98.0	C	5	초
					+	-

스테이지	주입과 함께 증폭	반복	28	번			
단계			64.0	C	45	초	
					○ 주입	+	-
단계			72.0	C	100	초	
					○ 주입	+	-
단계			72.0	C	50	초	
					● 주입	+	-
단계			72.0	C	70	초	
					○ 주입	+	-
단계			96.0	C	10	초	
					○ 주입	+	-

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> PRIMERADIX INC.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR MULTIMODAL ANALYSIS OF CMET NUCLEIC

ACIDS

<130> 046264-077471-PCT

<140><141><150> 61/865,755

<151> 2013-08-14

<160> 132

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 1
 gtctgtcaga ggatact 17

<210> 2
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 2
 ttgtccctcc ttcaag 16

<210> 3
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 3
 gctggggtat aacattc 17

<210> 4
 <211> 18
 <212>
 > DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 4

aaaaagatcc aggtaacg 18

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 5

tttcaggtag atcaggt 17

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 6

agaggattaa agtgagga 18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 7

actttcttca ttccacc 18

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223>

> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"

<400> 8

gccagatgaa aaatttcc 18

<210> 9

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"

<400> 9

catggaattg cagcaa 16

<210> 10

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"

<400> 10

aacgcccgcgt ttattaatat tctatgttct tatctcctca gt 42

<210> 11

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"

<400> 11

tgagttacca ttaaaataat aaattaattg gttccatcct agctctt 47

<210> 12

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400

> 12

agcttaaagc aatatataaa tattattatt aactcaccca ctctctgat 49

<210> 13

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 13

tcagaaggac aatatattta ccagtgact tacctatg 38

<210> 14

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 14

tatcgtaaca taatttaata ataaaataat ttaattatgt caaatctgga aaggacac 58

<210> 15

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 15
 tcctgcgctg tataaacttc tggggaagct catt 34

<210> 16
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"

<400> 16
 actttgccta aataaatatt aataattaat atatcagcat ctgaaacca tag 53

<210> 17
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"

<400> 17
 taaactccct ataaaattaa attaataata tataatatTT tgtgctctgt gaatgtcatc 60

<210> 18
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"

<400> 18
 tgtggagatt ataaaattaa ttaataatat ataatatTT taccaggtt tccagaatag 60

<210> 19
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 19

aagcttcgtg ataattaaat ctgtagacta ccgagctac 39

<210> 20

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 20

taggatggcc tattttaata aaataatttt ataattaatc ggaggaatgc ctga 54

<210> 21

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 21

agaaggaccg ttttatttat tttattatac taaacagtgg gaattctaga c 51

<210> 22

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 22

ttgagatggc attaattaaa tttttaataa tatttactgc tgaagatctg gaaga 55

<210> 23

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 23

actttgccta aatatatttt tcttcattta ttccattgta taacaca 47

<210> 24

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 24

atctatataa ataattttat aaaataattt attaaaatta aatatatgca ttaaaggact 60

gactgaa 67

<210> 25

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223>

> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 25

accatggttt ataataaata ttaagatctc actctcagga ga 42

<210> 26

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 26
aagcagcaga taatttatta tataattaaa aataattata attaataaaa tttaaacacc 60
tctatcttca accaa 75
<210> 27
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 27
accatctcgg taattaataa ttaaaataat ttaattatgc tcactgaaa acaggag 57
<210> 28
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<220><221> source
<223> /note="5'-5TYE665"
<400> 28
tcattgccct tttaaataag cagtggcaga aattc 35
<210> 29
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<220><221> source
<223> /note="5'-5TYE665"
<400> 29

agcatgcgta tttaagttaa gaggcagaag agaac 35

<210> 30

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<220><221> source

<223> /note="5'-5TYE665"

<400> 30

atagctgtta tttaacagga tatgcatga acag 34

<210> 31

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<220><221> source

<223> /note="5'-5TYE665"

<400> 31

atgatggagt tttaactgcc tgctactgta tga 33

<210> 32

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<220><221> source

<223> /note="5'-5TYE665"

<400> 32

aggccaccgt tttaatgtta aaagcctatt ggagc 35

<210> 33

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<220><221> source

<223> /note="5'-5TYE665"

<400> 33

ttcacgaat tttaacatgt tgttgtaca gagt 34

<210> 34

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<220><221> source

<223> /note="5'-5TYE665"

<400> 34

aggagaagtc tttttatatt tattatatgg acatttatgt ggtgtg 46

<210> 35

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<220><221> source

<223> /note="5'-5TYE665"

<400> 35

actagttgct attaattaaa atttttatat ttgctgcct tacacaact 49

<210> 36

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<220><221> source

<223> /note="5'-5TYE665"

<400> 36

actagttgct atttaataat aaatttaaaa atatcagaaa agtcatcagt gagg 54

<210> 37

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<220><221> source

<223> /note="5'-56-FAM"

<400> 37

ttgcgatccc tttaagtcgt tcagaggata ctgc 34

<210> 38

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<220><221> source

<223> /note="5'-56-FAM"

<400> 38

aaacttcgca tttaattgtc cctccttcaa gg 32

<210> 39

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<220><221> source

<223> /note="5'-56-FAM"

<400> 39

tcgcgctaga tttaagctgg ggtataacat tcaag 35

<210> 40

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<220><221> source

<223> /note="5'-56-FAM"

<400> 40

tttatgcat ttataataat ataaaaaaaa agatccaggt aacgag 46

<210> 41

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<220><221> source

<223> /note="5'-56-FAM"

<400> 41

aggagaagtc ttttaatttca ggtagatcag gtaca 35

<210> 42

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<220><221> source

<223> /note="5'-56-FAM"

<400> 42

ttccgtaaac tttaaagagg attaaagtga ggacc 35

<210> 43

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<220><221> source

<223> /note="5'-56-FAM"

<400> 43

aaccatacga tttaaacttt cttcatttcc acctt 35

<210> 44

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<220><221> source

<223> /note="5'-56-FAM"

<400> 44

tgcataagaa tttaatagcc agatgaaaaa tttccaa

37

<210> 45

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<220><221> source

<223> /note="5'-56-FAM"

<400> 45

aggagaagtc tttacatgg aattgcagca aatg

34

<210> 46

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 46

aagggcacct aactagtggg gacc

24

<210> 47

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 47

actcatctac atgctgcact gcctg

25

<210> 48

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 48

ctccgaagct cataaagggt ttgat 25

<210> 49

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 49

cccggaacaa agtcccatga tatat 25

<210> 50

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 50

ctgccgtcca acaaagtccc ata 23

<210> 51

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 51

taatacataa cagtttggat ttcacagcac agtc 34

<210> 52
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 52
 ccattcattt cattgctctt cctatcta 28
 <210> 53
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 53
 acaaccgaga aattgggaaa cttcta 26
 <210> 54
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 54
 cacagcggat gactaaaatc ttctg 25
 <210> 55
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 55

caaattcaaa ataggtcaaa attagaacag tagatg 36

<210> 56

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 56

accttctcat catgcctttg gctaa 25

<210> 57

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400>

> 57

ccccgaaact ttttgcttgc taca 24

<210> 58

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 58

cttcataaa attattgtag atattcagca tcattgtaa 39

<210> 59

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 59

acaaaacaaa ataagaccaa aatcagcaat 30

<210> 60

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 60

cgggcatagt attctttatc atacatgtt 29

<210> 61

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 61

ccccctgtac actatagtat tctttatcac 30

<210> 62

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 62

acactccata aacaaaacag gtgcaag 27

<210> 63

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 63

ctttattatt ctatttacta ttactgccga gtgaagtgga c 41

<210> 64

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 64

ctcaaataata taataagtaa aagaggagaa actcaga 37

<210> 65

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 65

taggatggcc cctaactagt ggggacc 27

<210> 66

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<220><221> source
 <223> /note="5'-56-FAM"
 <400> 66
 ttactacatg ctgcactgcc tg 22
 <210> 67
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <220><221> source
 <223> /note="5'-56-FAM"
 <400> 67
 agaaggaccg aaattttaaa acgcagtgct aaccaagttc t 41
 <210> 68
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 68
 aagcttcgtg ataaaattaa ttaataatat ataatatattt aacaaagtcc catgatatat 60
 <210> 69
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 69
 accatggttt ataaaattaa ttaataatat ataatatattt gtccaacaaa gtcccata 58
 <210> 70

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 70

atcggacttc ggatttcaca gcacagtc 28

<210> 71

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<220><221> source

<223> /note="5'-56-FAM"

<400> 71

atcggacttc tattttaata aaataatattt ataattaact ccaccactgg atttctcagg 60

<210> 72

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 72

aacttctggg aatattttta tatttaaaaat atttaaaata ttaaataaga aattgggaaa 60

cttcta 66

<210> 73

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 73

tgagttacca aataaaagga tgactaaaat ctttcg 36

<210> 74

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<220><221> source

<223> /note="5'-56-FAM"

<400> 74

tggcagtagg ataaaattaa ttaataatat ataatatattt tgactgcaga atccaactgt 60

<210> 75

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 75

aggccaccgt atataatttt tttaaaaaat attaatatattt ttatttaatc atgcctttgg 60

ctag 64

<210> 76

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 76
aaccatacga attaattaaa atttttatat ttaaactttt tgcttgctac a 51
<210> 77
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<220><221> source
<223> /note="5'-56-FAM"

<400> 77
ttccgtaaac taattaataa taaaataatt taattattgt ctttctgta ggctggatga 60
<210> 78
<211> 88
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 78
aaccatacga aattttttta aattttataa ataaatattt aaaatttaaa tattaattta 60
aaattttaaa aagacaaaa tcagcaat 88
<210> 79
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 79
ttgagatggc aattttttat tataaatttt aattttttta ttaattatag tattctttat 60
catacatgtt 70

<210> 80

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 80

aggagaagtc tttattaaat tatataattt aattttaaat tttgtacac tatagtattc 60

tttatcac 68

<210> 81

<211> 97

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 81

tgtggagatt aattttttaa aattttataa ataaatattt aaaatttaaa tattaattta 60

attaattaaa atttttatat aacaaaacag gtgcaag 97

<210> 82

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 82

tgtggagatt aattttttaa aattttataa ataaatattt aaaatttaaa tattaattta 60

aataataata ttactgccag tgaagtggac 90

<210> 83

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<220><221> source

<223> /note="5'-56-FAM"

<400> 83

aggccaccgt aaaaattaaa aattaataaa tattaataaa ccacatctga cttggtgta 60

<210> 84

<211> 6695

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 84

gccctcgccg cccgcggcgc cccgagcgct ttgtgagcag atgcggagcc gagtggaggg 60

cgcgagccag atgcggggcg acagctgact tgctgagagg aggcggggag gcgcggagcg 120

cgcggtgtgt ccttgcgcgc ctgactttct cactggttcc tgggcaccga aagataaacc 180

tctcataatg aaggcccccg ctgtgcttgc acctggcctc ctctgtctcc tgtttacctt 240

ggtgcagagg agcaatgggg agtgtaaaga ggcaactagca aagtcgaga tgaatgtgaa 300

tatgaagtat cagcttccca acttcaccgc ggaaacaccc atccagaatg tcattctaca 360

tgagcatcac attttccttg gtgccactaa ctacatttat gttttaaatg aggaagacct 420

tcagaagggt gctgagtaca agactgggcc tgtgctggaa caccagatt gtttcccatg 480

tcaggactgc agcagcaaag ccaatttatc aggaggtgtt tggaaagata acatcaacat 540

ggctctagtt gtcgacacct actatgatga tcaactcatt agctgtggca gcgtcaacag 600

agggacctgc cagcgacatg tctttcccca caatcatact gctgacatac agtcggaggt 660

tcactgcata ttctccccac agatagaaga gcccagccag tgtcctgact gtgtggtgag 720

cgccctggga gccaaagtcc tttcatctgt aaaggaccgg ttcacaaact tctttgtagg 780

caataccata aattcttctt atttcccaga tcattcattg cattcgatat cagtgagaag 840

gctaaaggaa acgaaagatg gttttatgtt ttgacggac cagtcctaca ttgatgtttt 900

acctgagttc agagattctt accccattaa gtatgtccat gcctttgaaa gcaacaattt 960

tatttacttc ttgacggtcc aaagggaac tctagatgct cagacttttc acacaagaat 1020

aatcaggttc tgttccataa actctggatt gcattcctac atggaaatgc ctctggagtg 1080

tattctcaca gaaaagagaa aaaagagatc caciaagaag gaagtgttta atatacttca 1140

ggctgcgtat gtcagcaagc ctggggccca gcttgctaga caaataggag ccagcctgaa	1200
tgatgacatt cttttcgggg tgttcgcaca aagcaagcca gattctgccg aaccaatgga	1260
tcgatctgcc atgtgtgcat tccctatcaa atatgtcaac gactttttca acaagatcgt	1320
caacaaaaac aatgtgagat gtctccagca tttttacgga cccaatcatg agcactgctt	1380
taataggaca cttctgagaa attcatcagg ctgtgaagcg cgccgtgatg aatatcgaac	1440
agagtttacc acagctttgc agcgcggtga cttattcatg ggtcaattca gcgaagtcct	1500
cttaacatct atatccacct tcattaaagg agacctcacc atagctaatac ttgggacatc	1560
agagggtcgc ttcatgcagg ttgtggtttc tcgatcagga ccatcaaccc ctcatgtgaa	1620
ttttctcctg gactcccatc cagtgtctcc agaagtgatt gtggagcata cattaaacca	1680
aaatggctac acactgggta tcactgggaa gaagatcacg aagatcccat tgaatggctt	1740
gggctgcaga catttcagct cctgcagtca atgcctctct gccccaccct ttgttcagtg	1800
tggctggcgc cagcacaat gtgtgcatc ggaggaatgc ctgagcggga catggactca	1860
acagatctgt ctgcctgcaa tctacaaggt ttcccaaat agtgcacccc ttgaaggagg	1920
gacaaggctg accatatgtg gctgggactt tggatttcgg aggaataata aatttgattt	1980
aaagaaaact agagtctcc ttggaaatga gagctgcacc ttgactttaa gtgagagcac	2040
gatgaataca ttgaaatgca cagttggctc tgccatgaat aagcatttca atatgtccat	2100
aattatttca aatggccacg ggacaacaca atacagtaca ttctcctatg tggatcctgt	2160
aataacaagt atttcgccga aatacggctc tatggctggg ggcactttac ttactttaac	2220
tggaaattac ctaaacagtg ggaattctag acacatttca attggtggaa aaacatgtac	2280
tttaaaaagt gtgtcaaca gtattcttga atgttatacc ccagccaaa ccatttcaac	2340
tgagtttctg gttaaatga aaattgactt agccaaccga gagacaagca tcttcagtta	2400
ccgtgaagat cccattgtct atgaaattca tccaacaaa tcttttatta gtacttgggtg	2460
gaaagaacct ctcaacattg tcagttttct attttgcttt gccagtgggtg ggagcacaat	2520
aacaggtgtt gggaaaaacc tgaattcagt tagtgtcccg agaatggtca taaatgtgca	2580
tgaagcagga aggaacttta cagtggcatg tcaacatcgc tctaattcag agataatctg	2640
ttgtaccact cttccctgc aacagctgaa tctgcaactc cccctgaaaa ccaaagcctt	2700
tttcagtta gatgggatcc ttcccaata ctttgatctc atttatgtac ataactctgt	2760
gtttaagcct ttigaaaagc cagtgatgat ctcaatgggc aatgaaaatg tactggaaat	2820
taagggaat gatattgacc ctgaagcagt taaagtgaa gtgttaaaag ttggaaataa	2880
gagctgtgag aatatacact tacattctga agccgtttta tgcacggtcc ccaatgacct	2940

gctgaaattg aacagcgagc taaatataga gtggaagcaa gcaatttctt caaccgtcct	3000
tggaaaagta atagtccaac cagatcagaa ttccacagga ttgattgctg gtgttgctc	3060
aatatcaaca gcaactgttat tactacttgg gtttttcctg tggtgaaaa agagaaagca	3120
aattaaagat ctgggcagtg aattagtctg ctacgatgca agaglacaca ctctcattt	3180
ggataggctt gtaagtgcc gaagtgaag cccaactaca gaaatggtt caaatgaatc	3240
tgtagactac cgagctactt ttccagaaga tcagtttctt aattcatctc agaacggttc	3300
atgccgacaa gtgcagtatc ctctgacaga catgtccccc atcctaacta gtggggactc	3360
tgatatatcc agtccattac tgcaaaatac tgtccacatt gacctcagtg ctctaaatcc	3420
agagctggtc caggcagtgc agcatgtagt gattggggccc agtagcctga ttgtgcattt	3480
caatgaagtc ataggaagag ggcatttttg ttgtgtatat catgggactt tgttgacaa	3540
tgatggcaag aaaattcact gtgctgtgaa atccttgaac agaactcactg acataggaga	3600
agtttccaa ttctgaccg agggaaatcat catgaaagat tttagtcatc ccaatgtcct	3660
ctcgtcctg ggaatctgcc tgcgaagtga agggctctccg ctggtggtcc taccatacat	3720
gaaacatgga gatcttcgaa atttcattcg aaatgagact cataatccaa ctgtaaaaga	3780
tcttattggc ttigtcttc aagtagccaa aggcattgaaa tatcttgcaa gcaaaaagtt	3840
tgtccacaga gacttggtg caagaaactg tatgtggat gaaaaattca cagtcaaggt	3900
tgctgatttt ggctttgcca gagacatgta tgataaagaa tactatagtg tacacaacaa	3960
aacaggtgca aagctgccg tgaagtggat ggctttggaa agtctgcaaa ctcaaaagtt	4020
taccaccaag tcagatgtgt ggtccttttg cgtgctctc tgggagctga tgacaagagg	4080
agccccacct tatctgacg taaacacctt tgatataact gtttacttgt tgcaaggag	4140
aagactccta caaccgaat actgccaga ccccttatat gaagtaatgc taaaatgctg	4200
gcacctaaa gccgaaatgc gcccatcctt ttctgaactg gtgtcccga tatcagcgat	4260
cttctctact ttattgggg agcactatgt ccatgtgaac gctacttatg tgaacgtaaa	4320
atgtgtcgt ccgtatcctt ctctgttgc atcagaagat aacgtgatg atgaggtgga	4380
cacacgacca gcctccttct gggagacatc atagtctag tactatgtca aagcaacagt	4440
ccacactttg tccaatggtt ttttactgc ctgacctta aaaggccatc gatattcttt	4500
gctcttgcca aaatgcaat attataggac ttgtattgtt atttaatta ctggattcta	4560
aggaatttct tatctgacag agcatcagaa ccagaggctt ggtccacag gccacggacc	4620
aatggcctgc agccgtgaca acactcctgt catattggag tccaaaactt gaattctggg	4680

ttgaatTTTT taaaatcag gtaccacttg atttcatatg ggaaattgaa gcaggaaata	4740
ttgagggttt ctgatcaca gaaaactcag aagagatagt aatgctcagg acaggagcgg	4800
cagccccaga acaggccact catttagaat tctagtgttt caaaacactt ttgtgtgttg	4860
tatggTcaat aacatTTTT attactgatg gtgtcattca cccattaggt aaacattccc	4920
TTTTaatgt ttgtttgttt tttagacag gatctcactc tgttgccagg gctgtagtgc	4980
agtggTgtga tcatagctca ctgcaacctc cacctcccag gctcaagcct cccgaatagc	5040
tgggactaca ggcgcacacc accatccccg gctaattttt gtatTTTTg tagagacggg	5100
gttttgccat gttgccaagg ctggtttcaa actcctggac tcaagaaatc caccacctc	5160
agcctcccaa agtgctagga ttacaggcat gagccactgc gccagccct tataaatttt	5220
tgtatagaca ttcttttgtt tggaagaata ttataggca atacagtcaa agtttcaaaa	5280
tagcatcaca caaaacatgt ttataaatga acaggatgta atgtacatag atgacattaa	5340
gaaaatttgt atgaaataat ttagtcatca tgaatatatt agttgtcata taaaaacca	5400
ctgtttgaga atgatgctac tctgatctaa tgaatgtgaa catgtagatg ttttgtgtgt	5460
atTTTTtaa atgaaaactc aaaataagac aagtaatttg ttgataaata tttttaaga	5520
taactcagca tgtttgtaaa gcaggataca ttttactaaa aggttcattg gttccaatca	5580
cagctcatag gtagagcaaa gaaagggTgg atggattgaa aagattagcc tctgtctcgg	5640
tggcaggTtc ccacctcgca agcaattgga aacaaaactt ttggggagtt ttattttgca	5700
ttagggTgtg ttttatgtta agcaaaacat actttgaaa caaatgaaaa aggcaattga	5760
aaatcccagc tatttcacct agatggaata gccacctga gcagaacttt gtgatgcttc	5820
attctgtgga attttgtgt tgcTactgta tagtgcatgt ggtgtaggtt actctaactg	5880
gttttgTcga cgtaaacatt taaagtgtta tattttttat aaaaatgttt atttttaatg	5940
atatgagaaa aattttgtta ggccacaaaa aactgcact gtgaacattt tagaaaaggt	6000
atgtcagact gggattaatg acagcatgat ttTcaatgac tgtaaatTgc gataaggaaa	6060
tgtactgatt gccaatacac cccacctca ttacatcatc aggacttgaa gccaagggtt	6120
aaccagcaa gctacaaaga gggTgtgtca cactgaaact caatagtTga gtttggtgt	6180
tgttgCagga aaatgattat aactaaaagc tctctgatag tgcagagact taccagaaga	6240
cacaaggaat tgtactgaag agctattaca atccaaatat tgccgtttca taaatgtaat	6300
aagtaatact aattcacaga gtattgtaaa tggTggatga caaaagaaaa tctgctctgt	6360
ggaaagaaag aactgtctct accagggtca agagcatgaa cgcatcaata gaaagaactc	6420
ggggaaacat cccatcaaca ggactacaca ctTgtatata cattcttgag aacactgcaa	6480
tgtgaaaatc acgtttgcta ttataaact tgcctTtaga ttaatgtgtc tggacagatt	6540

gtgggagtaa gtgattcttc taagaattag atacttgtca ctgcctatac ctgcagctga	6600
actgaatggt acttcgtatg ttaatagttg ttctgataaa tcatgcaatt aaagtaaagt	6660
gatgcaacat cttgtaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa	6695
<210> 85	
<211> 5616	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 85	
ccccggcgca gcgcggccgc agcagcctcc gccccccgca cgggtgtgagc gcccgcgcgc	60
gccgaggcgg ccggagtccc gagctagccc cgccggccgc cgccgccag accggacgac	120
aggccacctc gtccggctcc ccccagctcc ccgctcgcc gccaacgcca caaccaccgc	180
gcacggcccc ctgactccgt ccagtattga tcgggagagc cggagcgcgc tcttcgggga	240
gcagcgatgc gaccctccgg gacggccggg gcagcgctcc tggcgctgct ggctgcgctc	300
tgccccgcca gtccggctct ggaggaaaag aaagtttgcc aaggcacgag taacaagctc	360
acgcagttgg gcacttttga agatcatttt ctgagcctcc agaggatgtt caataactgt	420
gaggtggctc ttgggaattt ggaaattacc tatgtgcaga ggaattatga tctttccttc	480
ttaaagacca tccaggaggt ggctggttat gtcctcattg ccctcaacac agtggagcga	540
attcctttgg aaaacctgca gatcatcaga ggaaatatgt actacgaaaa ttcctatgcc	600
ttagcagtct tatctaacta tgatgcaaat aaaaccggac tgaaggagct gcccattgaga	660
aatttacagg aaatcctgca tggcgccgtg cggttcagca acaaccctgc cctgtgcaac	720
gtggagagca tccagtggcg ggacatagtc agcagtgact ttctcagcaa catgtcgatg	780
gacttccaga accacctggg cagctgccaa aagtgtgatc caagctgtcc caatgggagc	840
tgctgggggtg caggagagga gaactgccag aaactgacca aaatcatctg tgcccagcag	900
tgctccgggc gctgccgtgg caagtcctcc agtgactgct gccacaacca gtgtgctgca	960
ggctgcacag gccccggga gagcgactgc ctggtctgcc gcaaattccg agacgaagcc	1020
acgtgcaagg acacctgccc cccactcatg ctctacaacc ccaccacgta ccagatggat	1080
gtgaaccccc agggcaataa cagcttttgt gccacctgcg tgaagaagtg tccccgtaat	1140
tatgtggtga cagatcacgg ctctgtcgtc cgagcctgtg gggccgacag ctatgagatg	1200
gaggaagacg gcgtccgcaa gtgtaagaag tgcgaagggc cttgccgcaa agtgtgtaac	1260
ggaataggta ttggtgaatt taaagactca ctctccataa atgctacgaa tattaaacac	1320
ttcaaaaact gcacctccat cagtggcgat ctccacatcc tgccggtggc atttaggggt	1380

gactccttca cacatactcc tcctctggat ccacaggaac tggatattct gaaaaccgta	1440
aaggaaatca cagggttttt gctgattcag gcttggcctg aaaacaggac ggacctccat	1500
gcctttgaga acctagaaat catacgcggc aggaccaagc aacatggtca gttttctctt	1560
gcagtcgtca gcctgaacat aacatccttg ggattacgct ccctcaagga gataagtgat	1620
ggagatgtga taatttcagg aaacaaaaat ttgtgctatg caaatacaat aaactggaaa	1680
aaactgtttg ggacctccgg tcagaaaacc aaaattataa gcaacagagg tgaaaacagc	1740
tgcaaggcca caggccaggt ctgccatgcc ttgtgctccc ccgagggtctg ctggggccccg	1800
gagcccaggg actgcgtctc ttgccggaat gtcagccgag gcagggaatg cgtggacaag	1860
tgcaaccttc tggagggtga gccaaaggag ttgtggaga actctgagtg catacagtc	1920
caccagagt gcctgcctca ggccatgaac atcacctgca caggacgggg accagacaac	1980
tgtatccagt gtgcccacta cattgacggc cccactgcg tcaagacctg cccggcagga	2040
gtcatgggag aaaacaacac cctggtctgg aagtacgcag acgccggcca tgtgtgccac	2100
ctgtgccatc caaactgcac ctacggatgc actgggccag gtcttgaagg ctgtccaacg	2160
aatgggccta agatcccgtc catcgccact gggatggtgg gggccctcct cttgctgctg	2220
gtggtggccc tggggatcgg cctcttcatg cgaaggcgcc acatcggttcg gaagcgcacg	2280
ctgcggaggc tgcctcagga gagggagctt gtggagcctc ttacaccagc tggagaagct	2340
cccaaccaag ctctcttgag gatcttgaag gaaactgaat tcaaaaagat caaagtgctg	2400
ggctccggtg cgctcggcac ggtgtataag ggactctgga tcccagaagg tgagaaagtt	2460
aaaattcccc tcgctatcaa ggaattaaga gaagcaacat ctccgaaagc caacaaggaa	2520
atcctcgatg aagcctacgt gatggccagc gtggacaacc cccacgtgtg cgcctgctg	2580
ggcatctgcc tcacctccac cgtgcagctc atcacgcagc tcatgccctt cggctgcctc	2640
ctggactatg tccgggaaca caaagacaat attggctccc agtacctgct caactggtgt	2700
gtgcagatcg caaaggcat gaactacttg gaggaccgtc gcttgggtgca ccgcgacctg	2760
gcagccagga acgtactggt gaaaacaccg cagcatgtca agatcacaga ttttgggctg	2820
gccaaactgc tgggtgcgga agagaaagaa taccatgcag aaggaggcaa agtgcctatc	2880
aagtggatgg cattggaatc aattttacac agaattataa cccaccagag tgatgtctgg	2940
agctacgggg tgaccgtttg ggagttgatg acctttggat ccaagccata tgacggaatc	3000
cctgccagcg agatctctc catcctggag aaaggagaac gcctccctca gccaccata	3060
tgtaccatcg atgtctacat gatcatggtc aagtgtgga tgatagacgc agatagtcgc	3120
ccaaagticc gtgagttgat catcgaattc tccaaatgg cccgagacc ccagcgctac	3180
cttgtcattc agggggatga aagaatgcat ttccaagtc ctacagactc caactttac	3240

cgtgccctga tggatgaaga agacatggac gacgtggtgg atgccgacga gtacctcatc	3300
ccacagcagg gcttcttcag cagccctcc acgtcacgga ctccctcct gagctctctg	3360
agtgcaacca gcaacaattc caccgtggct tgcattgata gaaatgggct gcaaagctgt	3420
cccatcaagg aagacagctt cttgcagcga tacagctcag accccacagg cgccttgact	3480
gaggacagca tagacgacac ctctctccca gtgcctgaat acataaacca gtccgttccc	3540
aaaaggcccg ctggctctgt gcagaatcct gtctatcaca atcagcctct gaaccccgcg	3600
cccagcagag acccacacta ccaggacccc cacagcactg cagtgggcaa ccccagtat	3660
ctcaacactg tccagccac ctgtgtcaac agcacattcg acagccctgc cactgggcc	3720
cagaaaggca gccaccaaat tagcctggac aacctgact accagcagga ctctttccc	3780
aaggaagcca agccaaatgg catctttaag ggctccacag ctgaaaatgc agaataccta	3840
agggtcgcgc cacaagcag tgaatttatt ggagcatgac cacggaggat agtatgagcc	3900
ctaaaaatcc agactcttc gatacccagg accaagccac agcaggctct ccatcccaac	3960
agccatgccc gcattagctc ttagaccac agactggttt tgcaacgttt acaccgacta	4020
gccaggaagt acttccact cgggcacatt ttgggaagtt gcattccttt gtcttcaaac	4080
tgtgaagcat ttacagaac gcatccagca agaataattgt cctttgagc agaaatttat	4140
ctttcaaaga ggtatattg aaaaaaaaa aaagtatatg tgaggatttt tattgattgg	4200
ggatcttga gtttttcatt gtcgtattg attttactt caatgggctc ttccaacaag	4260
gaagaagctt gctggtagca cttgtaccc tgagttcatc caggcccaac tgtgagcaag	4320
gagcacaagc cacaagtctt ccagaggatg cttgattcca gtggttctgc ttcaaggctt	4380
ccactgcaa aactaaaga tccaagaagg cttcatggc cccagcaggc cggatcggtg	4440
ctgtatcaag tcatggcagg tacagtagga taagccactc tgtcccttcc tgggcaaaga	4500
agaaacggag gggatggaat tcttcttag acttactttt gtaaaaatgt cccacggta	4560
cttactccc actgatggac cagtggtttc cagtcagag cgtagactg acttgtttgt	4620
cttcattcc attgtttga aactcagtat gctgcccctg tcttgctgc atgaaatcag	4680
caagagagga tgacacatca aataataact cggattccag cccacattgg attcatcagc	4740
atttgacca atagcccaca gctgagaatg tggaatacct aaggatagca ccgcttttgt	4800
tctcgaaaa acgtatctc taatttgagg ctcatgaa atgcatcagg tcctttgggg	4860
catagatcag aagactaca aaatgaagct gctctgaaat ctcttttagc catcaccca	4920
acccccaaa attagtttgt gttacttatg gaagatagtt ttctctttt acttcacttc	4980

aaaagctttt tactcaaaga gtatatgttc cctccaggtc agctgcccc aaacccctc 5040

 cttacgcttt gtcacacaaa aagtgtctct gccttgagtc atctattcaa gcacttacag 5100
 ctctggccac aacagggcatt tttaacaggc cgaatgacag tagcattatg agtagtgtgg 5160
 aattcaggta gtaaataatga aactaggggt tgaattgat aatgctttca caacatttgc 5220
 agatgtttta gaaggaaaaa agttccttcc taaaataatt tctctacaat tggaagattg 5280
 gaagattcag ctagtttaga gcccaccttt tttcctaate tgtgtgtgcc ctgtaacctg 5340
 actggttaac agcagtcctt tgtaaacagt gttttaaact ctctagtca atatccaccc 5400
 catccaattt atcaaggaag aaatggttca gaaaatattt tcagcctaca gttatgttca 5460

 gtcacacaca catacaaaat gttccttttg cttttaaagt aatttttgac tcccagatca 5520
 gtcagagccc ctacagcatt gttaagaaag tatttgattt ttgtctcaat gaaaataaaa 5580
 ctatattcat ttccactcta aaaaaaaaaa aaaaaa 5616

 <210> 86
 <211> 2874
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 86

 aggggtgcccc gcgcgcgcgc gcgcgcgcgcag ttccggccacg tccctggcca cgtcgcgggc 60
 gatctcgcca tcttcgcgcg ttcctctcag gggccgcgcg ctctgagcc gccagcccc 120
 ggggccgcgcg cgtcgcgcgc accgccaccg ccgccgcgcg catgaacatt ttccggtga 180

 ctggggacct gtcccacctg gcggccatcg tcctctgct gctgaagatc tggaagacgc 240
 gctctcgcg cggtatttct gggaaaagcc agcttctgtt tgacttggtc ttcacaactc 300
 gttacctgga tctttttact tcatattatt cattgtataa cacatctatg aaggttatct 360
 accttgctg ctctatgcc acagtgtacc tgatctacct gaaatttaag gcaacctacg 420
 atggaaatca tgatacttc cgagtggagt ttctggtggt cctgtggga ggcctctcat 480
 ttttagttaa tcacgatttc tctctcttg agatcctctg gaccttctcc atctacctgg 540
 agtccgtggc tatccttcg cagctattta tgatcagcaa gactggggag gccgagacca 600

 tcaccacca ctacctgttc ttctggggc tctatcgtgc tttgtatctt gtcaactgga 660
 tctggcgctt ctactttgag ggcttctttg acctcattgc tgtggtggcc ggcgtagtcc 720
 agaccatcct atactgtgac ttcttctact tgtacattac aaaagtactc aagggaaga 780
 agctcagttt gccagcataa gtgccaaga ccatcaccag catctgtcct tcagggtgct 840
 cggacagaat tcttaccaca gcaaaggcat aagatgcttg atacggaaaa tcagaaactt 900

aactcttttg ttgcagatag tcatcagtg cctctgtaaaa acgcagagga aaagagccag	960
aaggtttctg tttaatgcat cttgccttat ctttttttat tactgtgtac aaagattttt	1020
ttacacaaag aaacttaatg ctgtattaat aaattcagtg tgtagcttca attgggatag	1080
ttccaaaagt gaagattttg tgaggaataa gtgcaaattt tttttttatt ttaaaaaatt	1140
ctttgaaact cttaatgctt tgtgtctgca atgaaattgt actccttgac agttgataga	1200
ttatatattc ttccatccct caaacttgca ttccactata tttatTTTTT ggcaaaagat	1260
gagctgtatt tgtttgaat ctgagacact atgttcaatt ggatgtatct gttcaaattt	1320
attcccacgt gacgtggaag tccttcgttg gatgtcacia cactacattt aaggttggtta	1380
aggatgactt ggaggtccat ggTTTTcatt accaacaatt taagattctg aatgtcgatg	1440
gagtctcact gaagagtcac caaaggtgcc tgcctctctc ccctgctggg aagtgtcagt	1500
tggagactgt cccaagggtg ctgaagaatc cagtggcagg ggTtctggct gctttccatc	1560
tgagtgtggg atgggagggg tgTtcatgat catttgata tagcaatcta cctcgagaaa	1620
tggaacacaa ggagttacct atcactttca ctataattc caaaagatga ctacaacat	1680
gtccatgctc agattcaaac agTTTTccat atcacttttg ggtggttaaga tgatttaatt	1740
acagtttttt ttttaattgg cagcaccact aaccattcct tacattcttt ttgtatgtg	1800
tggTTTTctt tttatttaac ccgcagccga catcgtagtt tcttgttttg ttttgtttta	1860
cagagctgtt gcatgactta tgTtaccatc ctaaaaaaca ctatattaaa catggaataa	1920
attgtctttt tatgaattag gctttttgaa catcctgtgt tgggattttt ttgtttttca	1980
attggcaaca aaagctctgt agggctgcag acattttaag ttacacataat catctgtaag	2040
acattatgta ttttgtggaa atactagaat ttttttctg attttgcat tatatggatt	2100
tgctattttt tgattaatgc aaaagtatat gactttgttt tttatgtgat acaccataaa	2160
tattaaagtg ttgaatacta acagtgtctga ctacaagaag gatgtagtat ttTgctttc	2220
tgcattacaa cgtcttctgg aggaaggag caggatgggt ttcatTTgta tctagtgtgt	2280
gtcttaacat ctttctaaat cggcagtgta actgcatagt ttaacttcct gtctgtctcc	2340
ctcattttac tcttccctcc ttgtcttatg ttttggtttt tgtgtatcag agcatctttc	2400
tttgagcat cctagtcttg cttcagtttc tTggtctct tttcatcctg cttgaagatt	2460
cggagtgtgg aaggaggcta ggaagtctgg tgcagtaggt gagcagacct ctTgtgccc	2520
agcccagggt gggTggggcg cacacctgtc tttgtcatg caaatctgat acacctggcg	2580
catcctctgg agagcacaaac gcatggaaag gtctggaagc tctgtgtagc cattccttct	2640

gcagtcaccc tacccaagta aaagtaacct tggctatgtt accaccgttt tggtcaccca 2700

ggaggacatc ttagcaaggg tgcctgcgag ggagtgtggg actgggcctc atcctcgccg 2760

gcgttggaaa ccaaggcctt gtatgccacg ccttatgaag cactgtttca cagttacttt 2820

cacttcccga ataaaggta ccaggtaatt aatattttta aaaaaaaaaa aaaa 2874

<210> 87

<211> 981

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 87

gtttggggcc agagtgggag aggcgcggag gtctggccta taaagtagtc gcggagacgg 60

ggtgtcgttt tgcgtcgtag tctcctgcag cgtctggggt ttccgttgca gtctcggaa 120

ccaggacctc ggctggcct agcgagttat ggcgacgaag gccgtgtgcg tgctgaaggg 180

cgacggccca gtgcagggca tcatcaattt cgagcagaag gaaagtaatg gaccagtga 240

ggtgtgggga agcattaaag gactgactga aggcctgcat ggattccatg ttcattgatt 300

tggagataat acagcaggct gtaccagtgc aggtcctcac tttaatcctc tatccagaaa 360

acacggtggg ccaaaggatg aagagaggca tgttgagac ttgggcaatg tgactgctga 420

caaagatggt gtggccgatg tgtctattga agattctgtg atctactct caggagacca 480

ttgcatcatt ggccgcacac tgggtgtcca tgaaaaagca gatgacttgg gcaaaggtgg 540

aatgaagaa agtacaaaga caggaaacgc tggaagtcgt ttggcttgtg gtgtaattgg 600

gatcgcccaa taaacattcc cttggatgta gtctgaggcc ccttaactca tctgttatcc 660

tgctagtgtg agaatgtat cctgataaac attaaacact gtaatcttaa aagtgtatt 720

gtgtgacttt ttcagagttg ctttaaagta cctgtagtga gaaactgatt tatgatcact 780

tggaagattt gtatagtttt ataaaactca gttaaaatgt ctgtttcaat gacctgtatt 840

ttgccagact taaatcacag atgggtatta aacttgcag aatttctttg tcattcaagc 900

ctgtgaataa aaacctgtga tggcacttat tatgaggcta ttaaaagaat ccaaattcaa 960

actaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 981

<210> 88

<211> 1635

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 88

gggtgggtcgg tgtgcttgtg accctgcctt tgtgtggctg tcaccggtgg gactggcggg 60
 gagctgtgtg attaacctcc atttcagcta atcatgggag agattaaagt ctctcctgat 120
 tataactggt ttagaggtag agttccccctt aaaaagatta ttgtggatga tgatgacagt 180
 aagatatggt cgctctatga cgcgggcccc cgaagtatca ggtgtcctct catattcctg 240
 cccctgtca gtggaactgc agatgtcttt ttccggcaga ttttggctct gactggatgg 300
 ggttaccggg ttatcgcttt gcagtatcca gtttattggg accatctcga gtctctgat 360

ggattcagaa aactttttaga ccatttaca ttggataaag ttcactcttt tggcgcttct 420
 ttgggaggct ttttggccca gaaatttgct gaatacactc acaaatctcc tagagtccat 480
 tccctaatec tctgcaattc cttcagtgc accctctatct tcaaccaaac ttggactgca 540
 aacagctttt ggctgatgcc tgcatttatg ctcaaaaaaa tagttcttgg aaatttttca 600
 tctggcccg tggaccctat gatggctgat gccattgatt tcattgtaga caggctagaa 660
 agtttgggtc agagtgaact ggcttcaaga cttacctga attgtcaaaa ttcttatgtg 720
 gaacctcata aaattcggga catacctgta actattatgg atgtgtttga tcagagtgcg 780

ctttcaactg aagctaaaga agaaatgtac aagctgtatc ctaatgcccg aagagctcat 840
 ctgaaaacag gaggcaattt cccatacctg tgcagaagtg cagaggctca tctttatgta 900
 cagatacatt tctgcaatt ccatggaacc aaatacgcgg ccattgacct atcaatggtc 960
 agtgccgagg agcttgaggt gcagaaaggc agccttggca tcagccagga ggagcagtag 1020
 tgtgtctctc gctgtcaatg atgagttgac ccggtgtgtt cttgtatagt cagtggcatc 1080
 agcacccgtc agccggcctt ttcttcagg ttctgcaggc tcaccggttc tcaactgtgc 1140
 tgggaagtag gactgatggt catcttcatg acaggcggca tctccactaa gcctgtgtaa 1200

ctgttccctc tttggttttc ttagcttttg aatttgaaga agtacttttg aagactccca 1260
 ttttaagaac cgtgcagatt ttgctaccaa aagtcttcac cactgtgttc ttaagtgaat 1320
 gttattttct gaggtttggg actttgtgtt ggttttttct ttcttttctt ttccattctt 1380
 ctttctttct ttttatgttg ttgtctgtaa atgctgcaca tccagattgc atatcaggac 1440
 attggttatt ttatgcttcc ttggatataa ccatgatcag agtgccatgg ccactacccc 1500
 actgtttgct ctctgcaaa tcaactgctt ttaatttaca cttaacaaa ttgttttgag 1560
 tgttagctac tgcctttcta gatattagtc atttgggaata aaaattcaat ttcactgaaa 1620

aaaaaaaaaaaa 1635

<210> 89

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 89

ataagcagtg gcagaaattc 20

<210> 90

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 90

gtaagaggc agaagagaac 20

<210> 91

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 91

caggatatgc catgaacag 19

<210> 92

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 92

ctgcctgcta ctgtatga 18

<210> 93

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 93

tggttaaagc ctattggagc

20

<210> 94

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 94

catgttgtgt gtacagagt

19

<210> 95

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 95

tggacattta tgtggtgtg

19

<210> 96

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 96
 tgctgcctta cacaact 17
 <210> 97
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"

<400> 97
 cagaaaagtc atcagtgagg 20
 <210> 98
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"

<400> 98
 gtctgtcaga ggatactgc 19
 <210> 99
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"

<400> 99
 ttgtccctcc ttcaagg 17
 <210> 100
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 100

gctggggtat aacattcaag 20

<210> 101

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 101

aaaaagatcc aggtaacgag 20

<210> 102

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 102

tttcaggtag atcaggtaca 20

<210> 103

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 103

agaggattaa agtgaggacc 20

<210> 104

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 104

actttcttca ttccacctt 20

<210> 105

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 105

gccagatgaa aaatttcaa 20

<210> 106

<211>

> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 106

catggaattg cagcaaatg 19

<210> 107

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 107

ctatgttctt atctcctcag t 21

<210> 108

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 108

ggttccatcc tagctctt 18

<210> 109

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 109

actcaccac tctctgat 18

<210> 110

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 110

accagtgac ttacctatg 19

<210> 111

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 111
 ttcaaactgt gaaaggacac 20
 <210> 112
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 112
 cttctgggga agctcatt 18
 <210> 113
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 113
 cagcatctga aacccatag 19
 <210> 114
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 114
 gtgctctgtg aatgtcatc 19
 <210> 115
 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 115

tacccaggtt tccagaatag 20

<210> 116

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 116

ctgtagacta ccgagctac 19

<210> 117

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 117

tccgaggaat gcctga 16

<210> 118

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 118

ctaaacagtg ggaattctag ac 22

<210> 119

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 119

ctgctgaaga tctggaaga 19

<210> 120

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 120

cttcatttat ttcattgtat aacaca 26

<210> 121

<211>

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 121

gcattaaagg actgactgaa 20

<210> 122

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 122

gatctcactc tcaggaga

18

<210> 123

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 123

acacctctat cttaaccaa

20

<210> 124

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 124

gctcatctga aaacaggag

19

<210> 125

<211> 1408

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe

1 5 10 15

Thr Leu Val Gln Arg Ser Asn Gly Glu Cys Lys Glu Ala Leu Ala Lys

20 25 30

Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala

35 40 45

Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu
50 55 60

Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys
65 70 75 80

Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe
85 90 95

Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp
100 105 110

Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
115 120 125

Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His
130 135 140

Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys
145 150 155 160

Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val
165 170 175

Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe
180 185 190

Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp
195 200 205

His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp
210 215 220

Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu
225 230 235 240

Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn
245 250 255

Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln
260 265 270

Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu
275 280 285

His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg

290 295 300
 Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala
 305 310 315 320

 Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser
 325 330 335
 Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp
 340 345 350
 Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys
 355 360 365
 Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg
 370 375 380

 Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg
 385 390 395 400
 Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr
 405 410 415
 Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly
 420 425 430
 Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly
 435 440 445

 Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln
 450 455 460
 Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu
 465 470 475 480
 Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu
 485 490 495
 Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys
 500 505 510

 Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln
 515 520 525
 Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys
 530 535 540

Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile
 545 550 555 560
 Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu
 565 570 575

 Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg
 580 585 590
 Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu
 595 600 605
 Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys
 610 615 620
 Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile
 625 630 635 640

 Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp
 645 650 655
 Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly
 660 665 670
 Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg
 675 680 685
 His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn
 690 695 700

 Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe
 705 710 715 720
 Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe
 725 730 735
 Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser
 740 745 750
 Phe Ile Ser Thr Trp Trp Lys Glu Pro Leu Asn Ile Val Ser Phe Leu
 755 760 765

 Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn
 770 775 780
 Leu Asn Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala

785 790 795 800
 Gly Arg Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile
 805 810 815
 Ile Cys Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro
 820 825 830

 Leu Lys Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr
 835 840 845
 Phe Asp Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys
 850 855 860
 Pro Val Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly
 865 870 875 880
 Asn Asp Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly
 885 890 895

 Asn Lys Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys
 900 905 910
 Thr Val Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu
 915 920 925
 Trp Lys Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln
 930 935 940
 Pro Asp Gln Asn Phe Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser
 945 950 955 960

 Thr Ala Leu Leu Leu Leu Leu Gly Phe Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg
 965 970 975
 Lys Gln Ile Lys Asp Leu Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg
 980 985 990
 Val His Thr Pro His Leu Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser
 995 1000 1005
 Pro Thr Thr Glu Met Val Ser Asn Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ala
 1010 1015 1020

 Thr Phe Pro Glu Asp Gln Phe Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser
 1025 1030 1035

Cys Arg	Gln Val	Gln Tyr	Pro	Leu Thr	Asp Met	Ser	Pro Ile	Leu
1040			1045			1050		
Thr Ser	Gly Asp	Ser Asp	Ile	Ser Ser	Pro Leu	Leu	Gln Asn	Thr
1055			1060			1065		
Val His	Ile Asp	Leu Ser	Ala	Leu Asn	Pro Glu	Leu	Val Gln	Ala
1070			1075			1080		
Val Gln	His Val	Val Ile	Gly	Pro Ser	Ser Leu	Ile	Val His	Phe
1085			1090			1095		
Asn Glu	Val Ile	Gly Arg	Gly	His Phe	Gly Cys	Val	Tyr His	Gly
1100			1105			1110		
Thr Leu	Leu Asp	Asn Asp	Gly	Lys Lys	Ile His	Cys	Ala Val	Lys
1115			1120			1125		
Ser Leu	Asn Arg	Ile Thr	Asp	Ile Gly	Glu Val	Ser	Gln Phe	Leu
1130			1135			1140		
Thr Glu	Gly Ile	Ile Met	Lys	Asp Phe	Ser His	Pro	Asn Val	Leu
1145			1150			1155		
Ser Leu	Leu Gly	Ile Cys	Leu	Arg Ser	Glu Gly	Ser	Pro Leu	Val
1160			1165			1170		
Val Leu	Pro Tyr	Met Lys	His	Gly Asp	Leu Arg	Asn	Phe Ile	Arg
1175			1180			1185		
Asn Glu	Thr His	Asn Pro	Thr	Val Lys	Asp Leu	Ile	Gly Phe	Gly
1190			1195			1200		
Leu Gln	Val Ala	Lys Gly	Met	Lys Tyr	Leu Ala	Ser	Lys Lys	Phe
1205			1210			1215		
Val His	Arg Asp	Leu Ala	Ala	Arg Asn	Cys Met	Leu	Asp Glu	Lys
1220			1225			1230		
Phe Thr	Val Lys	Val Ala	Asp	Phe Gly	Leu Ala	Arg	Asp Met	Tyr
1235			1240			1245		
Asp Lys	Glu Tyr	Tyr Ser	Val	His Asn	Lys Thr	Gly	Ala Lys	Leu
1250			1255			1260		
Pro Val	Lys Trp	Met Ala	Leu	Glu Ser	Leu Gln	Thr	Gln Lys	Phe

1265 1270 1275
 Thr Thr Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu
 1280 1285 1290
 Leu Met Thr Arg Gly Ala Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn Thr Phe
 1295 1300 1305
 Asp Ile Thr Val Tyr Leu Leu Gln Gly Arg Arg Leu Leu Gln Pro
 1310 1315 1320

Glu Tyr Cys Pro Asp Pro Leu Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp
 1325 1330 1335
 His Pro Lys Ala Glu Met Arg Pro Ser Phe Ser Glu Leu Val Ser
 1340 1345 1350
 Arg Ile Ser Ala Ile Phe Ser Thr Phe Ile Gly Glu His Tyr Val
 1355 1360 1365
 His Val Asn Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys Cys Val Ala Pro Tyr
 1370 1375 1380

Pro Ser Leu Leu Ser Ser Glu Asp Asn Ala Asp Asp Glu Val Asp
 1385 1390 1395
 Thr Arg Pro Ala Ser Phe Trp Glu Thr Ser
 1400 1405

<210> 126

<211> 1210

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln
 20 25 30

Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe
 35 40 45
 Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn
 50 55 60

Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys
 65 70 75 80
 Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val
 85 90 95

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

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

 Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
 225 230 235 240
 Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp
 245 250 255
 Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
 260 265 270
 Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
 275 280 285

 Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
 290 295 300
 Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu

305 310 315 320
 Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val
 325 330 335
 Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn
 340 345 350

 Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
 355 360 365
 Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
 370 375 380
 Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu
 385 390 395 400
 Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp
 405 410 415

 Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln
 420 425 430
 His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu
 435 440 445
 Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser
 450 455 460
 Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu
 465 470 475 480

 Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu
 485 490 495
 Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro
 500 505 510
 Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn
 515 520 525
 Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly
 530 535 540

 Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro
 545 550 555 560

Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro
 565 570 575
 Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val
 580 585 590
 Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp
 595 600 605

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

 Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu
 675 680 685
 Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu
 690 695 700
 Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser
 705 710 715 720
 Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu
 725 730 735

 Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser
 740 745 750
 Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser
 755 760 765
 Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser
 770 775 780
 Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp
 785 790 795 800

 Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn

805	810	815
Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg		
820	825	830
Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro		
835	840	845
Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala		
850	855	860
Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp		
865	870	875
Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp		
885	890	895
Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser		
900	905	910
Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu		
915	920	925
Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr		
930	935	940
Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys		
945	950	955
Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln		
965	970	975
Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro		
980	985	990
Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp		
995	1000	1005
Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe		
1010	1015	1020
Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu		
1025	1030	1035
Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn		
1040	1045	1050

Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg
 1055 1060 1065
 Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp
 1070 1075 1080
 Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro
 1085 1090 1095
 Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln
 1100 1105 1110

Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro
 1115 1120 1125
 His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln
 1130 1135 1140
 Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala
 1145 1150 1155
 Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln
 1160 1165 1170

Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys
 1175 1180 1185
 Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln
 1190 1195 1200
 Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
 1205 1210

<210> 127

<211> 154

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 127

Met Ala Thr Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln
 1 5 10 15

Gly Ile Ile Asn Phe Glu Gln Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val
 20 25 30

Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe His Val

35 40 45
His Glu Phe Gly Asp Asn Thr Ala Gly Cys Thr Ser Ala Gly Pro His
50 55 60
Phe Asn Pro Leu Ser Arg Lys His Gly Gly Pro Lys Asp Glu Glu Arg
65 70 75 80

His Val Gly Asp Leu Gly Asn Val Thr Ala Asp Lys Asp Gly Val Ala
85 90 95
Asp Val Ser Ile Glu Asp Ser Val Ile Ser Leu Ser Gly Asp His Cys
100 105 110
Ile Ile Gly Arg Thr Leu Val Val His Glu Lys Ala Asp Asp Leu Gly
115 120 125
Lys Gly Gly Asn Glu Glu Ser Thr Lys Thr Gly Asn Ala Gly Ser Arg
130 135 140

Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile Ala Gln

145 150

<210> 128

<211> 308

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

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

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

His Leu Gln Leu Asp Lys Val His Leu Phe Gly Ala Ser Leu Gly Gly
100 105 110

Phe Leu Ala Gln Lys Phe Ala Glu Tyr Thr His Lys Ser Pro Arg Val
115 120 125

His Ser Leu Ile Leu Cys Asn Ser Phe Ser Asp Thr Ser Ile Phe Asn
130 135 140

Gln Thr Trp Thr Ala Asn Ser Phe Trp Leu Met Pro Ala Phe Met Leu
145 150 155 160

Lys Lys Ile Val Leu Gly Asn Phe Ser Ser Gly Pro Val Asp Pro Met
165 170 175

Met Ala Asp Ala Ile Asp Phe Met Val Asp Arg Leu Glu Ser Leu Gly
180 185 190

Gln Ser Glu Leu Ala Ser Arg Leu Thr Leu Asn Cys Gln Asn Ser Tyr
195 200 205

Val Glu Pro His Lys Ile Arg Asp Ile Pro Val Thr Ile Met Asp Val
210 215 220

Phe Asp Gln Ser Ala Leu Ser Thr Glu Ala Lys Glu Glu Met Tyr Lys
225 230 235 240

Leu Tyr Pro Asn Ala Arg Arg Ala His Leu Lys Thr Gly Gly Asn Phe
245 250 255

Pro Tyr Leu Cys Arg Ser Ala Glu Val Asn Leu Tyr Val Gln Ile His
260 265 270

Leu Leu Gln Phe His Gly Thr Lys Tyr Ala Ala Ile Asp Pro Ser Met
275 280 285

Val Ser Ala Glu Glu Leu Glu Val Gln Lys Gly Ser Leu Gly Ile Ser
290 295 300

Gln Glu Glu Gln

305

<210> 129

<211> 212

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 129

Met Asn Ile Phe Arg Leu Thr Gly Asp Leu Ser His Leu Ala Ala Ile

1 5 10 15

Val Ile Leu Leu Leu Lys Ile Trp Lys Thr Arg Ser Cys Ala Gly Ile

20 25 30

Ser Gly Lys Ser Gln Leu Leu Phe Ala Leu Val Phe Thr Thr Arg Tyr

35 40 45

Leu Asp Leu Phe Thr Ser Phe Ile Ser Leu Tyr Asn Thr Ser Met Lys

50 55 60

Val Ile Tyr Leu Ala Cys Ser Tyr Ala Thr Val Tyr Leu Ile Tyr Leu

65 70 75 80

Lys Phe Lys Ala Thr Tyr Asp Gly Asn His Asp Thr Phe Arg Val Glu

85 90 95

Phe Leu Val Val Pro Val Gly Gly Leu Ser Phe Leu Val Asn His Asp

100 105 110

Phe Ser Pro Leu Glu Ile Leu Trp Thr Phe Ser Ile Tyr Leu Glu Ser

115 120 125

Val Ala Ile Leu Pro Gln Leu Phe Met Ile Ser Lys Thr Gly Glu Ala

130 135 140

Glu Thr Ile Thr Thr His Tyr Leu Phe Phe Leu Gly Leu Tyr Arg Ala

145 150 155 160

Leu Tyr Leu Val Asn Trp Ile Trp Arg Phe Tyr Phe Glu Gly Phe Phe

165 170 175

Asp Leu Ile Ala Val Val Ala Gly Val Val Gln Thr Ile Leu Tyr Cys

180 185 190

Asp Phe Phe Tyr Leu Tyr Ile Thr Lys Val Leu Lys Gly Lys Lys Leu

195 200 205

Ser Leu Pro Ala

210

<210> 130

<211> 4

<212> PRT

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown: 'KDEL' family peptide motif"

<400> 130

Lys Asp Glu Leu

1

<210> 131

<211> 1408

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> VARIANT

<222>

> (1058)..(1058)

<223> /replace="Pro"

<220><221> VARIANT

<222> (1101)..(1101)

<223> /replace="Ile"

<220><221> VARIANT

<222> (1112)..(1112)

<223> /replace="Tyr"

<220><221> VARIANT

<222> (1124)..(1124)

<223> /replace="Asp"

<220><221> VARIANT

<222> (1137)..(1137)

<223> /replace="Val"

<220><221> VARIANT

<222> (1149)..(1149)

<223> /replace="Thr"

<220><221> VARIANT

<222> (1206)..(1206)

<223> /replace="Leu"

<220><221> VARIANT

```

<222> (1213)..(1213)
<223> /replace="Val"

<220
><221> VARIANT
<222> (1238)..(1238)
<223> /replace="Ile"
<220><221> VARIANT
<222> (1246)..(1246)
<223> /replace="Asn"
<220><221> VARIANT
<222> (1248)..(1248)
<223> /replace="Cys"
<220><221> VARIANT
<222> (1262)..(1262)
<223> /replace="Arg"
<220><221> VARIANT
<222> (1268)..(1268)
<223> /replace="Thr"
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(1408)
<223> /note="Variant residues given in the sequence have no
        preference with respect to those in the annotations
        for variant positions"

<400> 131
Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe
1           5           10           15
Thr Leu Val Gln Arg Ser Asn Gly Glu Cys Lys Glu Ala Leu Ala Lys
        20           25           30
Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala
        35           40           45
Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu
        50           55           60

Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys

```

65	70	75	80
Val	Ala	Glu	Tyr
Lys	Thr	Gly	Pro
Val	Leu	Glu	His
Pro	Asp	Cys	Phe
85	90	95	
Pro	Cys	Gln	Asp
Cys	Ser	Ser	Lys
Ala	Asn	Leu	Ser
Gly	Gly	Val	Trp
100	105	110	
Lys	Asp	Asn	Ile
Asn	Met	Ala	Leu
Val	Val	Asp	Thr
Tyr	Tyr	Asp	Asp
115	120	125	
Gln	Leu	Ile	Ser
Cys	Gly	Ser	Val
Asn	Arg	Gly	Thr
Cys	Gln	Arg	His
130	135	140	
Val	Phe	Pro	His
Asn	His	Thr	Ala
Asp	Ile	Gln	Ser
Glu	Val	His	Cys
145	150	155	160
Ile	Phe	Ser	Pro
Gln	Ile	Glu	Glu
Pro	Ser	Gln	Cys
Pro	Asp	Cys	Val
165	170	175	
Val	Ser	Ala	Leu
Gly	Ala	Lys	Val
Leu	Ser	Ser	Val
Lys	Asp	Arg	Phe
180	185	190	
Ile	Asn	Phe	Phe
Val	Gly	Asn	Thr
Ile	Asn	Ser	Ser
Tyr	Phe	Pro	Asp
195	200	205	
His	Pro	Leu	His
Ser	Ile	Ser	Val
Arg	Arg	Leu	Lys
Glu	Thr	Lys	Asp
210	215	220	
Gly	Phe	Met	Phe
Leu	Thr	Asp	Gln
Ser	Tyr	Ile	Asp
Val	Leu	Pro	Glu
225	230	235	240
Phe	Arg	Asp	Ser
Tyr	Pro	Ile	Lys
Tyr	Val	His	Ala
Phe	Glu	Ser	Asn
245	250	255	
Asn	Phe	Ile	Tyr
Phe	Leu	Thr	Val
Gln	Arg	Glu	Thr
Leu	Asp	Ala	Gln
260	265	270	
Thr	Phe	His	Thr
Arg	Ile	Ile	Arg
Phe	Cys	Ser	Ile
Asn	Ser	Gly	Leu
275	280	285	
His	Ser	Tyr	Met
Glu	Met	Pro	Leu
Glu	Cys	Ile	Leu
Thr	Glu	Lys	Arg
290	295	300	
Lys	Lys	Arg	Ser
Thr	Lys	Lys	Glu
Val	Phe	Asn	Ile
Leu	Gln	Ala	Ala
305	310	315	320

Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser
 325 330 335
 Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp
 340 345 350
 Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys
 355 360 365
 Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg
 370 375 380

 Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg
 385 390 395 400
 Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr
 405 410 415
 Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly
 420 425 430
 Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly
 435 440 445

 Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln
 450 455 460
 Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu
 465 470 475 480
 Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu
 485 490 495
 Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys
 500 505 510

 Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln
 515 520 525
 Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys
 530 535 540
 Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile
 545 550 555 560
 Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu

565					570					575						
Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	Ile	Cys	Gly	Trp	Asp	Phe	Gly	Phe	Arg	Arg	
580					585					590						
Asn	Asn	Lys	Phe	Asp	Leu	Lys	Lys	Thr	Arg	Val	Leu	Leu	Gly	Asn	Glu	
595					600					605						
Ser	Cys	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Glu	Ser	Thr	Met	Asn	Thr	Leu	Lys	Cys	
610					615					620						
Thr	Val	Gly	Pro	Ala	Met	Asn	Lys	His	Phe	Asn	Met	Ser	Ile	Ile	Ile	
625					630					635					640	
Ser	Asn	Gly	His	Gly	Thr	Thr	Gln	Tyr	Ser	Thr	Phe	Ser	Tyr	Val	Asp	
645					650					655						
Pro	Val	Ile	Thr	Ser	Ile	Ser	Pro	Lys	Tyr	Gly	Pro	Met	Ala	Gly	Gly	
660					665					670						
Thr	Leu	Leu	Thr	Leu	Thr	Gly	Asn	Tyr	Leu	Asn	Ser	Gly	Asn	Ser	Arg	
675					680					685						
His	Ile	Ser	Ile	Gly	Gly	Lys	Thr	Cys	Thr	Leu	Lys	Ser	Val	Ser	Asn	
690					695					700						
Ser	Ile	Leu	Glu	Cys	Tyr	Thr	Pro	Ala	Gln	Thr	Ile	Ser	Thr	Glu	Phe	
705					710					715					720	
Ala	Val	Lys	Leu	Lys	Ile	Asp	Leu	Ala	Asn	Arg	Glu	Thr	Ser	Ile	Phe	
725					730					735						
Ser	Tyr	Arg	Glu	Asp	Pro	Ile	Val	Tyr	Glu	Ile	His	Pro	Thr	Lys	Ser	
740					745					750						
Phe	Ile	Ser	Thr	Trp	Trp	Lys	Glu	Pro	Leu	Asn	Ile	Val	Ser	Phe	Leu	
755					760					765						
Phe	Cys	Phe	Ala	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Ile	Thr	Gly	Val	Gly	Lys	Asn	
770					775					780						
Leu	Asn	Ser	Val	Ser	Val	Pro	Arg	Met	Val	Ile	Asn	Val	His	Glu	Ala	
785					790					795					800	
Gly	Arg	Asn	Phe	Thr	Val	Ala	Cys	Gln	His	Arg	Ser	Asn	Ser	Glu	Ile	
805					810					815						

Ile Cys Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro
820 825 830

Leu Lys Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr
835 840 845

Phe Asp Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys
850 855 860

Pro Val Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly
865 870 875 880

Asn Asp Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly
885 890 895

Asn Lys Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys
900 905 910

Thr Val Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu
915 920 925

Trp Lys Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln
930 935 940

Pro Asp Gln Asn Phe Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser
945 950 955 960

Thr Ala Leu Leu Leu Leu Leu Gly Phe Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg
965 970 975

Lys Gln Ile Lys Asp Leu Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg
980 985 990

Val His Thr Pro His Leu Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser
995 1000 1005

Pro Thr Thr Glu Met Val Ser Asn Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ala
1010 1015 1020

Thr Phe Pro Glu Asp Gln Phe Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser
1025 1030 1035

Cys Arg Gln Val Gln Tyr Pro Leu Thr Asp Met Ser Pro Ile Leu
1040 1045 1050

Thr Ser Gly Asp Ser Asp Ile Ser Ser Pro Leu Leu Gln Asn Thr

1055	1060	1065
Val His Ile Asp Leu Ser Ala	Leu Asn Pro Glu Leu	Val Gln Ala
1070	1075	1080
Val Gln His Val Val Ile Gly	Pro Ser Ser Leu Ile	Val His Phe
1085	1090	1095
Asn Glu Val Ile Gly Arg Gly	His Phe Gly Cys Val	Tyr His Gly
1100	1105	1110
Thr Leu Leu Asp Asn Asp Gly	Lys Lys Ile His Cys	Ala Val Lys
1115	1120	1125
Ser Leu Asn Arg Ile Thr Asp	Ile Gly Glu Val Ser	Gln Phe Leu
1130	1135	1140
Thr Glu Gly Ile Ile Met Lys	Asp Phe Ser His Pro	Asn Val Leu
1145	1150	1155
Ser Leu Leu Gly Ile Cys Leu	Arg Ser Glu Gly Ser	Pro Leu Val
1160	1165	1170
Val Leu Pro Tyr Met Lys His	Gly Asp Leu Arg Asn	Phe Ile Arg
1175	1180	1185
Asn Glu Thr His Asn Pro Thr	Val Lys Asp Leu Ile	Gly Phe Gly
1190	1195	1200
Leu Gln Val Ala Lys Gly Met	Lys Tyr Leu Ala Ser	Lys Lys Phe
1205	1210	1215
Val His Arg Asp Leu Ala Ala	Arg Asn Cys Met Leu	Asp Glu Lys
1220	1225	1230
Phe Thr Val Lys Val Ala Asp	Phe Gly Leu Ala Arg	Asp Met Tyr
1235	1240	1245
Asp Lys Glu Tyr Tyr Ser Val	His Asn Lys Thr Gly	Ala Lys Leu
1250	1255	1260
Pro Val Lys Trp Met Ala Leu	Glu Ser Leu Gln Thr	Gln Lys Phe
1265	1270	1275
Thr Thr Lys Ser Asp Val Trp	Ser Phe Gly Val Leu	Leu Trp Glu
1280	1285	1290

Leu Met Thr Arg Gly Ala Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn Thr Phe
1295 1300 1305

Asp Ile Thr Val Tyr Leu Leu Gln Gly Arg Arg Leu Leu Gln Pro
1310 1315 1320

Glu Tyr Cys Pro Asp Pro Leu Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp
1325 1330 1335

His Pro Lys Ala Glu Met Arg Pro Ser Phe Ser Glu Leu Val Ser
1340 1345 1350

Arg Ile Ser Ala Ile Phe Ser Thr Phe Ile Gly Glu His Tyr Val
1355 1360 1365

His Val Asn Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys Cys Val Ala Pro Tyr
1370 1375 1380

Pro Ser Leu Leu Ser Ser Glu Asp Asn Ala Asp Asp Glu Val Asp
1385 1390 1395

Thr Arg Pro Ala Ser Phe Trp Glu Thr Ser
1400 1405

<210> 132

<211> 121

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 132

gtccccatc ctaactagt gggactctga tatatccagt ccattactgc aaaatactgt 60
ccacattgac ctcaagtctc taaatccaga gctggtccag gcagtcgagc atgtagtgat 120
t 121