



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I812047 B

(45)公告日：中華民國 112 (2023) 年 08 月 11 日

(21)申請案號：111108208

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 11 月 17 日

(51)Int. Cl. : C12Q1/68 (2018.01)

(30)優先權：2013/11/15 美國

61/905,051

(71)申請人：美商阿韋利諾美國實驗有限公司 (美國) AVELLINO LAB USA, INC. (US)
美國(72)發明人：趙 蕾 CHAO-SHERN, CONNIE (US) ; 趙善英 CHO, SUN-YOUNG (KR) ; 李津
LEE, GENE (KR)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

CN 101374850A

CN 102459593A

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：10 項 圖式數：8 共 129 頁

(54)名稱

用於多工偵測與眼科病況有關的對偶基因之方法

(57)摘要

本發明揭示一種用於偵測來自人類個體之檢體中至少兩個與角膜營養不良有關之基因組對偶基因的系統及方法，其中該個體之細胞(例如上皮細胞)黏著於基材之頂端。讓基材頂端在可溶解黏著於該基材之細胞的溶解溶液中攪拌。此攪拌完成後，自該溶解溶液中取出該基材。培育所得溶解溶液，隨後分離來自該溶解溶液之基因組 DNA，形成 gDNA 溶液。由此，使用至少兩對寡核苷酸引子及該 gDNA 溶液測定人類 TGFβ1 基因中所存在之至少兩個核苷酸的一致性。此至少兩個核苷酸位於 TGFβ1 基因中對應於與角膜營養不良有關之各別獨立單核苷酸多形現象(SNP)的各別獨立位置。

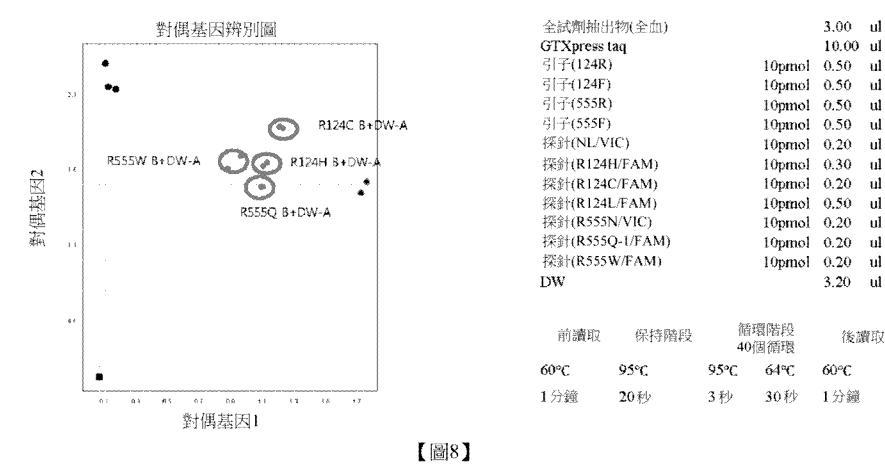
Systems and methods for detecting at least two genomic alleles associated with corneal dystrophy in a sample from a human subject are disclosed in which cells (e.g., epithelial) of the subject are adhered to a tip of a substrate. The tip of the substrate is agitated in a lysis solution that lyses cells adhered to the substrate. The substrate is removed from the lysis solution upon completion of this agitation. The resulting lysis solution is incubated and then genomic DNA from the lysis solution is isolated to form a gDNA solution. From this, identity of at least two nucleotides present in the human TGFβ1 gene is determined using at least two oligonucleotide primer pairs and the gDNA solution. These at least two nucleotides are located at respective independent positions of the TGFβ1 gene corresponding to respective independent single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with corneal dystrophy.

指定代表圖：

I812047

TW I812047 B

資料B >> LifeTech/7500FAST；快速模式





I812047

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於多工偵測與眼科病況有關的對偶基因之方法

【英文發明名稱】

METHODS FOR MULTIPLEX DETECTION OF ALLELES
ASSOCIATED WITH OPHTHALMIC CONDITIONS

【中文】

本發明揭示一種用於偵測來自人類個體之檢體中至少兩個與角膜營養不良有關之基因組對偶基因的系統及方法，其中該個體之細胞(例如上皮細胞)黏著於基材之頂端。讓基材頂端在可溶解黏著於該基材之細胞的溶解溶液中攪拌。此攪拌完成後，自該溶解溶液中取出該基材。培育所得溶解溶液，隨後分離來自該溶解溶液之基因組DNA，形成gDNA溶液。由此，使用至少兩對寡核苷酸引子及該gDNA溶液測定人類TGFβ1基因中所存在之至少兩個核苷酸的一致性。此至少兩個核苷酸位於TGFβ1基因中對應於與角膜營養不良有關之各別獨立單核苷酸多形現象(SNP)的各別獨立位置。

【英文】

Systems and methods for detecting at least two genomic alleles associated with corneal dystrophy in a sample from a human subject are disclosed in which cells (e.g., epithelial) of the subject are adhered to a tip of a substrate. The tip of the substrate is agitated in a lysis solution that lyses cells adhered to the substrate. The substrate is removed from the lysis solution upon completion of this agitation. The resulting lysis

solution is incubated and then genomic DNA from the lysis solution is isolated to form a gDNA solution. From this, identity of at least two nucleotides present in the human TGF β I gene is determined using at least two oligonucleotide primer pairs and the gDNA solution. These at least two nucleotides are located at respective independent positions of the TGF β I gene corresponding to respective independent single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with corneal dystrophy.

【指定代表圖】

圖8

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於多工偵測與眼科病況有關的對偶基因之方法

【英文發明名稱】

METHODS FOR MULTIPLEX DETECTION OF ALLELES
ASSOCIATED WITH OPHTHALMIC CONDITIONS

【技術領域】

本申請案大體上係關於分離及偵測與疾病有關之遺傳對偶基因的方法。詳言之，本申請案係關於一種用於偵測與阿韋利諾角膜營養不良(Avellino corneal dystrophy)有關之對偶基因的改良方法。

【先前技術】

可使用即時PCR偵測具有實質上一致序列之核酸序列之間的差異。經由使用經區別標記之螢光核酸探針(例如結合於野生型序列之探針及結合於突變體序列之探針)，可快速且可靠地偵測人類基因組中之單核苷酸變化。此解析能力已應用於醫學診斷，其中單核苷酸多形現象(SNP) (亦即蛋白質之編碼及/或非編碼序列內存在的單一鹼基變化)與人類疾病有關。

然而，即時PCR分析高度依賴於高品質檢體之收集及分離。不良檢體收集及/或分離需要使用較長分析條件及較大量之即時PCR試劑，兩者均造成成本增加及生產力降低。此外，即時PCR單核苷酸多形現象偵測分析的失敗可能使得需要再收集檢體，從而造成時間及資源的甚至更大損失。

因此，極其需要使檢體收集及分離改良之方法，該等方法改良

分析之總成功率，減少分析所需之試劑且降低對後續再收集檢體之要求。此外，用較少量之檢體物質執行即時PCR SNP偵測分析之方法亦降低與收集及分離高品質檢體有關的挑戰。

角膜營養不良可為一種常染色體顯性遺傳疾病，其最初在患者之角膜中心呈現出模糊視覺。模糊視覺逐漸朝角膜周邊擴散，從而隨著患者年齡增長而使其視覺惡化。已表徵數種類型角膜營養不良，包括阿韋利諾角膜營養不良、顆粒狀角膜營養不良、格子狀I型角膜營養不良、蒂爾-本克角膜營養不良(Thiel-Behnke corneal dystrophy)及瑞斯-巴克勒角膜營養不良(Reis-bucklers corneal dystrophy)。已知角膜營養不良至少在一些情形下藉由編碼 β IG-H3蛋白(亦稱為TGF β I蛋白、TGFBI蛋白及角膜上皮蛋白)之轉型生長因子 β 誘導(TGF β I)基因突變引起。

罹患阿韋利諾角膜營養不良之異型接合患者隨著年齡增長視覺喪失增加，從而在生命後期變得很嚴重。相比之下，同型接合患者在6歲呈現出嚴重至完全喪失視覺。在約1988年，首次將阿韋利諾角膜營養不良識別為獨特類型之角膜營養不良。在此之前，很可能將其錯分為顆粒狀角膜營養不良。現今，已知阿韋利諾角膜營養不良為世界範圍內基質角膜營養不良之最常見形式。在韓國，認為阿韋利諾角膜營養不良之發病率為870人中有約1人(參見Lee, J. H.等人, *Ophthalmic Epidemiol.*, 17:160, 2010；亦參見Holland, E. J.等人, *Ophthalmology*, 99:1564, 1992；Kennedy, S. M.等人, *Br. J. Ophthalmol.*, 80:489, 1996；Dolmetsch, A. M.等人, *Can. J. Ophthalmol.*, 31:29, 1996；Afshari, N. A.等人, *Arch. Ophthalmol.*, 119:16, 2001；Stewart, H. S.

Hum. Mutat., 14:126, 1999)。

先前發現異型接合個體(例如，具有一個野生型 β IG-H3對偶基因及一個突變體 β IG-H3對偶基因)在雷射近視手術(LASIK)手術後極易加速視覺喪失。值得注意地，術後兩年在侵襲性增加之此等患者中觀察到角膜混濁，從而最終造成視覺完全喪失(Jun, R. M. 等人, *Ophthalmology*, 111:463, 2004)。先前進行眼部手術以期望LASIK或準分子雷射術去除罹患角膜營養不良之患者的視覺模糊。以罹患阿韋利諾角膜營養不良之異型接合患者的最小估計值1/1000計，對於假設數量300,000例LASIK手術，將有300人喪失其視覺。經歷LASIK手術之患者主要在其20歲至30歲期間進行生產性活動；因此，其視覺喪失在社會及經濟方面引起嚴重問題。

另外，2000年美國批准LASIK手術後，已發現罹患阿韋利諾角膜營養不良且經歷LASIK手術之非洲裔美國人喪失眼部視力，從而推斷全世界可能存在大量類似病例。

因此，儘管需要精確診斷阿韋利諾角膜營養不良以藉由LASIK手術阻止阿韋利諾角膜營養不良之進展，但診斷阿韋利諾角膜營養不良僅藉由顯微鏡觀察(例如，裂隙燈檢查)角膜混濁進行，因此醫生經常未覺察患者潛在症狀而執行LASIK手術，從而造成視覺喪失。因此，需要快速且精確地遺傳診斷角膜營養不良。

開發出一種用於偵測 β IG-H3基因突變之DNA晶片，其中 β IG-H3基因突變會造成阿韋利諾角膜營養不良(韓國專利特許公開案第10-2007-0076532號)。然而，使用該DNA晶片診斷阿韋利諾角膜營養不良不利地需要數個步驟，包括擴增檢體中之DNA的步驟，將經擴增之

DNA與DNA晶片雜交之步驟，洗滌經雜交DNA晶片之步驟及偵測陽性反應之步驟。

鑒於以上先前技術，此項技術中需要用於偵測與角膜營養不良有關之多個突變對偶基因的改良方法。

【發明內容】

本發明提供用於偵測一或多個與人類疾病有關之對偶基因的改良方法。下述方法減少與執行獲得關於個體之醫學資訊的分析有關的時間及成本。舉例而言，在一些實施例中，改良方法使得可以對於患者降低之成本當天偵測與阿韋利諾角膜營養不良有關之基因組標記物。

在一些實施例中，本發明提供用於偵測來自個體之檢體中至少兩個與角膜營養不良有關之基因組對偶基因的方法，該方法包含：(A)提供個體之黏著於基材頂端的上皮細胞；(B)在溶解黏著於基材之細胞的溶解溶液中攪拌基材之頂端；(C)攪拌(B)完成後自溶解溶液取出基材；(D)取出(C)後，培育溶解溶液；(E)自溶解溶液分離基因組DNA，形成gDNA溶液；及(F)使用至少兩對寡核苷酸引子及gDNA溶液測定TGFβI基因中所存在之至少兩個核苷酸之一致性，其中至少兩個核苷酸位於TGFβI基因中對應於與角膜營養不良有關之各別獨立單核苷酸多形現象(SNP)之各別獨立位置。

在一些實施例中，在人類基因組中，TGFβI基因中所存在之至少兩個核苷酸由至少一個核苷酸分隔。

在一些實施例中，至少兩對寡核苷酸引子中之至少一對包含具有包含SEQ ID NO:1之核苷酸序列的正向PCR引子及具有包含SEQ ID

NO:2之核苷酸序列的反向PCR引子。

在一些實施例中，至少兩對寡核苷酸引子中之至少一對包含具有包含SEQ ID NO:43之核苷酸序列的正向PCR引子及具有包含SEQ ID NO:44之核苷酸序列的反向PCR引子。

在一些實施例中，至少兩對寡核苷酸引子包含第一對擴增引子及第二對擴增引子。第一對擴增引子包含具有包含SEQ ID NO:1之核苷酸序列的正向PCR引子及具有包含SEQ ID NO:2之核苷酸序列的反向PCR引子。第二對擴增引子包含具有包含SEQ ID NO:43之核苷酸序列的正向PCR引子及具有包含SEQ ID NO:44之核苷酸序列的反向PCR引子。

在一些實施例中，測定(F)進一步包含使用：(i)具有包含SEQ ID NO:25之核苷酸序列的第一野生型偵測探針及具有包含SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:49之核苷酸序列的第一突變體偵測探針；及(ii)具有包含SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:47之核苷酸序列的第二野生型偵測探針及具有包含SEQ ID NO:46或SEQ ID NO:50之核苷酸序列的第二突變體偵測探針。

在一些實施例中，本發明提供一種用於偵測角膜營養不良之方法，該方法包含：(A)使用包含至少第一對擴增引子及至少第二對擴增引子之反應混合物擴增來自人類個體之生物檢體的至少兩個TGFβI基因序列，該至少兩個TGFβI基因序列包括包含編碼胺基酸殘基124之核苷酸的第一TGFβI基因序列及包含編碼胺基酸殘基555之核苷酸的第二TGFβI基因序列；(B)使第一對偵測寡核苷酸探針之第一偵測探針與第一TGFβI基因序列雜交；(C)使第二對偵測寡核苷酸探針之第二

偵測探針與第二TGFβI基因序列雜交；及(D)基於使用包括第一對偵測寡核苷酸探針及第二對偵測寡核苷酸探針之至少兩對偵測探針偵測第一TGFβI基因序列及/或第二TGFβI基因序列中之一或多個突變。

在一些實施例中，偵測第一TGFβI基因序列及/或第二TGFβI基因序列中之一或多個突變包括偵測第一TGFβI基因序列及/或第二TGFβI基因序列中之兩個或兩個以上突變，且在人類基因組中該兩個或兩個以上突變由至少一個核苷酸分隔。

在一些實施例中，至少第一對擴增引子包含第一擴增引子及第二擴增引子，其中第一擴增引子包含核苷酸序列SEQ ID NO:1，且其中第二擴增引子包含核苷酸序列SEQ ID NO:2。

在一些實施例中，至少第二對擴增引子包含第三擴增引子及第四擴增引子，其中第三擴增引子由核苷酸序列SEQ ID NO:43表示，且其中第四擴增引子由核苷酸序列SEQ ID NO:44表示。

在一些實施例中，第一對擴增引子包含第一擴增引子及第二擴增引子，第一擴增引子包含核苷酸序列SEQ ID NO:1，第二擴增引子包含核苷酸序列SEQ ID NO:2，第二對擴增引子包含第三擴增引子及第四擴增引子，第三擴增引子包含核苷酸序列SEQ ID NO:43，且第四擴增引子包含核苷酸序列SEQ ID NO:44。

在一些實施例中，所編碼TGFβI蛋白質中之一或多個突變中之一者對應於胺基酸124之精胺酸突變為半胱胺酸(R124C)，精胺酸突變為組胺酸(R124H)，及/或精胺酸突變為白胺酸(R124L)。

在一些實施例中，所編碼TGFβI蛋白質中之一或多個突變中之一者對應於胺基酸555之精胺酸突變為色胺酸(R555W)及/或精胺酸突變

為麩醯胺酸(R555Q)。

在一些實施例中，至少兩對偵測寡核苷酸探針各個別地包括第一偵測寡核苷酸探針及第二偵測寡核苷酸探針，其中第一偵測寡核苷酸探針及第二偵測寡核苷酸探針包含個別地選自由以下組成之群的成對核苷酸序列：SEQ ID NO:25-26、SEQ ID NO:25及48、SEQ ID NO:25及49、SEQ ID NO:27-28、SEQ ID NO:29-30、SEQ ID NO:31-32、SEQ ID NO:33-34、SEQ ID NO:35-36、SEQ ID NO:37-38、SEQ ID NO:39-40、SEQ ID NO:41-42、SEQ ID NO:45-46及SEQ ID NO:46-47、SEQ ID NO:45及50以及SEQ ID NO:47及50。

在一些實施例中，第一對偵測寡核苷酸探針包含第一偵測寡核苷酸探針及第二偵測寡核苷酸探針，其中第一偵測寡核苷酸探針及第二偵測寡核苷酸探針分別包含成對核苷酸序列SEQ ID NO:25及SEQ ID NO:26。

在一些實施例中，第二對偵測寡核苷酸探針包含第三偵測寡核苷酸探針及第四偵測寡核苷酸探針，其中第三偵測寡核苷酸探針及第四偵測寡核苷酸探針分別包含成對核苷酸序列SEQ ID NO:45及SEQ ID NO:46。

在一些實施例中，第二對偵測寡核苷酸探針包含第三偵測寡核苷酸探針及第四偵測寡核苷酸探針，其中第三偵測寡核苷酸探針及第四偵測寡核苷酸探針分別包含成對核苷酸序列SEQ ID NO:47及SEQ ID NO:46。

在一些實施例中，第二對偵測寡核苷酸探針包含第三偵測寡核苷酸探針及第四偵測寡核苷酸探針，其中第三偵測寡核苷酸探針及第

四偵測寡核苷酸探針分別包含成對核苷酸序列SEQ ID NO:25及SEQ ID NO:48。

在一些實施例中，第二對偵測寡核苷酸探針包含第三偵測寡核苷酸探針及第四偵測寡核苷酸探針，其中第三偵測寡核苷酸探針及第四偵測寡核苷酸探針分別包含成對核苷酸序列SEQ ID NO:25及SEQ ID NO:49。

在一些實施例中，第二對偵測寡核苷酸探針包含第三偵測寡核苷酸探針及第四偵測寡核苷酸探針，其中第三偵測寡核苷酸探針及第四偵測寡核苷酸探針分別包含成對核苷酸序列SEQ ID NO:45及SEQ ID NO:50。

在一些實施例中，第二對偵測寡核苷酸探針包含第三偵測寡核苷酸探針及第四偵測寡核苷酸探針，其中第三偵測寡核苷酸探針及第四偵測寡核苷酸探針分別包含成對核苷酸序列SEQ ID NO:47及SEQ ID NO:50。

在一些實施例中，第一偵測探針與第一標記偶合，且第二偵測探針係與第二標記偶合。

在一些實施例中，第一標記為VIC，且第二標記為FAM。

在一些實施例中，雜交(B)及雜交(C)在相同溶液中同時進行。

在一些實施例中，雜交(B)及雜交(C)在相同溶液或不同溶液中同時或在不同時間進行。

在一些實施例中，本發明提供一種用於偵測人類個體之角膜營養不良的反應混合物，該反應混合物包含：(A)至少第一對擴增引子及第二對擴增引子，其用於擴增及測定(1)來自個體之生物檢體的至

少兩個TGFβI基因序列中之第一TGFβI基因序列，該序列包含編碼胺基酸殘基124之核苷酸及(2)來自個體之生物檢體的至少兩個TGFβI基因序列中之第二TGFβI基因序列，該序列包含編碼胺基酸殘基555之核苷酸；及(B)至少兩對偵測探針，其中該至少兩對偵測探針各者中之偵測探針與至少兩個TGFβI基因序列中之至少一者雜交。

在一些實施例中，第一對擴增引子包含第一擴增引子及第二擴增引子，第一擴增引子包含核苷酸序列SEQ ID NO:1，且第二擴增引子包含核苷酸序列SEQ ID NO:2。

在一些實施例中，第二對擴增引子包含第三擴增引子及第四擴增引子，第三擴增引子包含核苷酸序列SEQ ID NO:43，且第四擴增引子包含核苷酸序列SEQ ID NO:44。

在一些實施例中，使用至少兩對偵測探針中之至少一者偵測所編碼TGFBI蛋白質中對應於胺基酸124之精胺酸突變為半胱胺酸(R124C)、精胺酸突變為組胺酸(R124H)及/或精胺酸突變為白胺酸(R124L)的突變。

在一些實施例中，使用至少兩對偵測探針中之至少一者偵測所編碼TGFBI蛋白質中對應於胺基酸555之精胺酸突變為色胺酸(R555W)及/或精胺酸突變為麩醯胺酸(R555Q)的突變。

在一些實施例中，該至少兩對偵測探針中之每一對偵測探針個別地包括第一偵測寡核苷酸探針及第二偵測寡核苷酸探針，其中第一偵測寡核苷酸探針及第二偵測寡核苷酸探針包含個別地選自由以下組成之群的成對核苷酸序列：SEQ ID NO:25-26、SEQ ID NO:25及48、SEQ ID NO:25及49、SEQ ID NO:27-28、SEQ ID NO:29-30、SEQ ID

NO:31-32、SEQ ID NO:33-34、SEQ ID NO:35-36、SEQ ID NO:37-38、SEQ ID NO:39-40、SEQ ID NO:41-42、SEQ ID NO:45-46及SEQ ID NO:46-47、SEQ ID NO:45及50以及SEQ ID NO:47及50。

在一些實施例中，至少兩對偵測探針中之一者包含第一偵測寡核苷酸探針及第二偵測寡核苷酸探針，其中第一偵測寡核苷酸探針及第二偵測寡核苷酸探針分別包含成對核苷酸序列SEQ ID NO:25及SEQ ID NO:26。

在一些實施例中，至少兩對偵測探針中之一者包含第一偵測寡核苷酸探針及第二偵測寡核苷酸探針，其中第一偵測寡核苷酸探針及第二偵測寡核苷酸探針分別包含成對核苷酸序列SEQ ID NO:45及SEQ ID NO:46。

在一些實施例中，至少兩對偵測探針中之一者包含第一偵測寡核苷酸探針及第二偵測寡核苷酸探針，其中第一偵測寡核苷酸探針及第二偵測寡核苷酸探針分別包含成對核苷酸序列SEQ ID NO:47及SEQ ID NO:46。

在一些實施例中，至少兩對偵測探針中之一者包含第一偵測寡核苷酸探針及第二偵測寡核苷酸探針，其中第一偵測寡核苷酸探針及第二偵測寡核苷酸探針分別包含成對核苷酸序列SEQ ID NO:25及SEQ ID NO:48。

在一些實施例中，至少兩對偵測探針中之一者包含第一偵測寡核苷酸探針及第二偵測寡核苷酸探針，其中第一偵測寡核苷酸探針及第二偵測寡核苷酸探針分別包含成對核苷酸序列SEQ ID NO:25及SEQ ID NO:49。

在一些實施例中，至少兩對偵測探針中之一者包含第一偵測寡核苷酸探針及第二偵測寡核苷酸探針，其中第一偵測寡核苷酸探針及第二偵測寡核苷酸探針分別包含成對核苷酸序列SEQ ID NO:45及SEQ ID NO:50。

在一些實施例中，至少兩對偵測探針中之一者包含第一偵測寡核苷酸探針及第二偵測寡核苷酸探針，其中第一偵測寡核苷酸探針及第二偵測寡核苷酸探針分別包含成對核苷酸序列SEQ ID NO:47及SEQ ID NO:50。

在一些實施例中，至少兩個偵測探針中之第一偵測探針與第一標記偶合，且至少兩個偵測探針中之第二偵測探針係與第二標記偶合。

在一些實施例中，第一標記為VIC，且第二標記為FAM。

在一些實施例中，本發明提供一種用於偵測人類個體之角膜營養不良的反應混合物，該反應混合物包含：(A)至少第一對擴增引子，其用於擴增及測定來自個體之生物檢體的TGF β I基因序列；及(B)一組至少三個偵測探針，其中該一組至少三個偵測探針中的一個偵測探針在暴露於TGF β I基因序列時與TGF β I基因序列雜交。

在一些實施例中，TGF β I基因序列包含來自個體之生物檢體的編碼胺基酸殘基124的核苷酸。

在一些實施例中，一組至少三個偵測探針包括至少一個選自由SEQ ID NO:25-42及48-49組成之群的偵測探針。

在一些實施例中，一組至少三個偵測探針包括至少兩個或兩個以上選自由SEQ ID NO:25-42及48-49組成之群的偵測探針。

在一些實施例中，一組至少三個偵測探針包括至少三個或三個以上選自由SEQ ID NO:25-42及48-49組成之群的偵測探針。

在一些實施例中，一組至少三個偵測探針包括第一偵測探針SEQ ID NO:25及第二偵測探針SEQ ID NO:26。

在一些實施例中，一組至少三個偵測探針包括選自由SEQ ID NO:48及SEQ ID NO:49組成之群的第三偵測探針。

在一些實施例中，一組至少三個偵測探針包括不同於第三偵測探針且選自由SEQ ID NO:48及SEQ ID NO:49組成之群的第四偵測探針。

在一些實施例中，一組至少三個偵測探針包括兩個或兩個以上選自由SEQ ID NO:26及48-49組成之群的偵測探針。

在一些實施例中，第一對擴增引子包含第一擴增引子及第二擴增引子，第一擴增引子包含核苷酸序列SEQ ID NO:1，且第二擴增引子包含核苷酸序列SEQ ID NO:2。

在一些實施例中，反應混合物進一步包含：(C)至少第二對擴增引子，其用於擴增及測定來自生物檢體之第二TGF β I基因序列；及(D)第二組至少三個偵測探針，其中第二組至少三個偵測探針中的一個偵測探針在暴露於第二TGF β I基因序列時與第二TGF β I基因序列雜交。

在一些實施例中，第二TGF β I基因序列包含來自個體之生物檢體的編碼胺基酸殘基555的核苷酸。

在一些實施例中，第二組至少三個偵測探針包括至少一個選自由SEQ ID NO:45-47及50組成之群的偵測探針。

在一些實施例中，第二組至少三個偵測探針包括至少兩個或兩

個以上選自由SEQ ID NO:45-47及50組成之群的偵測探針。

在一些實施例中，第二組至少三個偵測探針包括至少三個或三個以上選自由SEQ ID NO:45-47及50組成之群的偵測探針。

在一些實施例中，第二組至少三個偵測探針包括為SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:47之第一偵測探針、為SEQ ID NO:46之第二偵測探針及為SEQ ID NO:50之第三偵測探針。

在一些實施例中，第二對擴增引子包含第三擴增引子及第四擴增引子，第三擴增引子包含核苷酸序列SEQ ID NO:43，且第四擴增引子包含核苷酸序列SEQ ID NO:44。

在一些實施例中，TGF β I基因序列包含來自個體之生物檢體的編碼胺基酸殘基555的核苷酸。

在一些實施例中，一組至少三個偵測探針包括至少一個選自由SEQ ID NO:45-47及50組成之群的偵測探針。

在一些實施例中，一組至少三個偵測探針包括至少兩個或兩個以上選自由SEQ ID NO:45-47及50組成之群的偵測探針。

在一些實施例中，一組至少三個偵測探針包括至少三個或三個以上選自由SEQ ID NO:45-47及50組成之群的偵測探針。

在一些實施例中，一組至少三個偵測探針包括為SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:47之第一偵測探針、為SEQ ID NO:46之第二偵測探針及為SEQ ID NO:50之第三偵測探針。

在一些實施例中，本發明提供一種用於偵測角膜營養不良之方法，其包含：(A-1)使用包含至少第一對擴增引子及一組至少三個偵測探針的反應混合物擴增來自人類個體之生物檢體的第一TGF β I基因

序列；(B-1)使一組至少三個偵測探針中的第一偵測探針與第一TGFβI基因序列雜交；及(C-1)基於(i)一組至少三個偵測探針中的第一偵測探針與第一TGFβI基因序列雜交及(ii)一組至少三個偵測探針中的第二及第三偵測探針與第一TGFβI基因序列雜交失敗偵測第一TGFβI基因序列中之突變。

在一些實施例中，該方法進一步包含：(A-2)使用相同反應混合物擴增來自生物檢體之第二TGFβI基因序列，其中該反應混合物包含至少第二對擴增引子及第二組至少三個偵測探針；(B-2)使第二組至少三個偵測探針中的第一偵測探針與第二TGFβI基因序列雜交；及(C-2)基於(i)第二組至少三個偵測探針中的第一偵測探針與第一TGFβI基因序列雜交及(ii)第二組至少三個偵測探針中的第二偵測探針及第三偵測探針與第一TGFβI基因序列雜交失敗偵測第二TGFβI基因序列中之突變。

在一些實施例中，用生物檢體之相同等分試樣進行擴增(A-1)、擴增(A-2)、雜交(B-1)、雜交(B-2)、偵測(C-1)及偵測(C-2)。

在一些實施例中，擴增第一TGFβI基因序列(A-1)與擴增第二TGFβI基因序列(A-2)同時進行。

在一些實施例中，雜交(B-1)與雜交(B-2)同時進行。

在一些實施例中，偵測(C-1)與偵測(C-2)同時進行。

在一些實施例中，反應混合物具有一些上述特徵。為簡潔起見，本文中不重複此類細節。

在一些實施例中，本發明提供以上任何部分中所述之反應混合物之用途，其用於經由偵測人類個體之異型接合角膜營養不良來預測

個體之眼部雷射手術後併發症之風險。

在一些實施例中，眼部雷射手術包含Lasik及準分子雷射手術。

在一些實施例中，本發明提供一種用於偵測來自人類個體之檢體中與角膜營養不良有關之基因組突變的方法，該方法包含：(A)提供人類個體之黏著於基材頂端的上皮細胞；(B)在溶解黏著於基材之細胞的溶解溶液中攪拌基材之頂端；(C)攪拌(B)完成後自溶解溶液取出基材；(D)取出(C)後，培育溶解溶液；(E)自溶解溶液分離基因組DNA，形成gDNA溶液；及(F)使用至少第一對引子、一組至少三個偵測探針及gDNA溶液藉由使gDNA溶液同時暴露於至少三個偵測探針來測定TGFβI基因中所存在之至少一個核苷酸的一致性，其中：該至少一個核苷酸位於TGFβI基因中對應於與角膜營養不良有關之單核苷酸多形現象(SNP)之特定位置，且一組至少三個偵測探針中的至少兩個偵測探針之組態分別在於偵測TGFβI基因之特定位置的不同突變。

在一些實施例中，方法進一步包含：(G)使用至少第二對引子、第二組至少三個偵測探針及gDNA溶液藉由使gDNA溶液同時暴露於一組至少三個偵測探針及第二組至少三個偵測探針來測定TGFβI基因中所存在之至少一個第二核苷酸之一致性，其中：該至少一個第二核苷酸位於第二特定位置，該位置與TGFβI基因中對應於與角膜營養不良有關之第二單核苷酸多形現象(SNP)的至少一個核苷酸之位置無關，且第二組至少三個偵測探針中的至少兩個偵測探針之組態在於偵測TGFβI基因之第二特定位置的各別突變。

在一些實施例中，測定(F)與測定(G)同時進行。

在一些實施例中，測定(F)與測定(G)使用相同gDNA溶液進行。

【圖式簡單說明】

圖 1A-1B說明用於根據一些實施例偵測與疾病有關之基因組對偶基因的改良方法100。

圖 2提供適用於根據一些實施例即時PCR偵測與阿韋利諾角膜營養不良有關之單核苷酸多形現象的正向及反向PCR引子對之序列(SEQ ID NO:1-24)的清單。

圖 3提供適用於根據一些實施例即時PCR偵測與阿韋利諾角膜營養不良有關之單核苷酸多形現象的野生型及成對突變體偵測探針的序列(SEQ ID NO:25-42)的清單。

圖 4提供圖5至圖8中所示之對偶基因偵測實驗中所用的探針序列及引子的清單。

圖 5提供關於使用圖4中所述之探針偵測 R124C、R124H、R124L、R555W及R555Q突變體之實驗資料。圖5A提供使用指定試劑混合物及指定循環條件(右側圖)獲得之對偶基因辨別趨勢圖(左側圖)。圖5B提供各種突變體相較於正常對照之即時PCR曲線。圖5C提供各種突變體相較於同型接合對照之即時PCR曲線。

圖 6提供關於使用圖4中所述之探針偵測 R124C、R124H、R124L、R555W及R555Q突變體的實驗資料。圖6A提供使用指定試劑混合物及指定循環條件(右側圖)獲得之對偶基因辨別趨勢圖(左側圖)。圖6B提供各種突變體相較於正常對照之即時PCR曲線。圖6C提供各種突變體相較於同型接合對照之即時PCR曲線。

圖 7提供關於使用圖4中所述之探針偵測 R124C、R124H、R124L、R555W及R555Q突變體的實驗資料。圖7提供使用指定試劑混

合物及指定循環條件(右側圖)獲得之對偶基因辨別趨勢圖(左側圖)。

圖 8 提供關於使用圖 4 中所述之探針偵測 R124C、R124H、R124L、R555W 及 R555Q 突變體的實驗資料。詳言之，圖 8 提供使用指定試劑混合物及指定循環條件(右側圖)獲得之對偶基因辨別趨勢圖。對偶基因辨別圖(左側圖)中之標示「B」表明在進行即時 PCR 分析前用溶解緩衝液預處理檢體。對偶基因辨別圖(左側圖)中之標示「DW-A」表明在進行即時 PCR 分析前用蒸餾水預處理檢體。不同檢體點周圍之環分別展示所偵測之各對偶基因的兩個相比檢體，「B」及「DW-A」(參見左側圖)；各環內有兩個點，一個用於檢體「B」，且一個用於檢體「DW-A」。

【實施方式】

I. 前言

偵測疾病相關之 SNP 為對於診斷及預後各種醫學病況愈來愈重要之手段。舉例而言，TGF β I 基因之外顯子 4 中單核苷酸變化之存在與阿韋利諾角膜營養不良極其有關。發現此 SNP 之異型接合個體在 LASIK 手術後視覺喪失之風險高。儘管 LASIK 為大大改良許多人生活品質之醫學程序，但對於攜帶 G/A TGF β I SNP 之個體，其通常經四至十八個月之時間引起逐步視覺損傷，從而可能導致視覺喪失。視覺損傷可在更長或更短時間內發生。幸而可進行篩選以鑑別應避免進行 LASIK 程序之攜帶該突變的個體。

本發明至少部分基於改良檢體分離、製備及分析之方法的發現。在一些實施例中，提供使得可再使用患者檢體(例如在分析失敗或需要進行另一後續測試時)之方法。在一些實施例中，此等改良方

法包括使帶有自患者口腔膜剝落之細胞的基材(例如，頂端為螺縈或頂端為棉花之塗藥器)在室溫下在溶解溶液中平緩渦旋30-45秒(而非在高溫下長時間培育20分鐘)。隨後在45℃下培育溶解溶液30分鐘以改良溶解且提高基因組檢體之產量。有利地，可隨後儲存(例如，冷凍或冷藏)頂端為螺縈或頂端為棉花之塗藥器以用於再分離基因組DNA而供再測試用。

在一些實施例中，本文所提供之改良經由使用較少量之基因組DNA模板進行即時PCR偵測分析來提供。在一些實施例中，其藉由增加所進行之即時PCR循環數(例如，約40個循環)及/或藉由在95℃下使用3秒變性循環時間來達成。有利地，因為所需檢體量藉由此等方法而減少，故對即時PCR試劑之需要亦減少。因為診斷分析中所用之多種試劑為專有的，故該等試劑可能很昂貴。減少所用試劑之量亦可顯著降低與該試劑有關之成本。

預期可使用用於進行各此等個別步驟之特定條件(例如，檢體處理、培育溫度、反應體積、反應循環數、反應循環時間、反應循環溫度)的所有組合執行本文所述之方法來偵測疾病相關之SNP，諸如TGFβ1基因之外顯子4中發現的阿韋利諾角膜營養不良相關之SNP。

II. 選擇定義

如本文所用之術語「本發明」並非意欲限於本發明之任何一個特定實施例，而是大體上適用於申請專利範圍及說明書中所述之本發明之任何及所有實施例。

除非上下文另外明確規定，否則如本文所用之單數形式「一(a)」、「一(an)」及「該」包括複數個參考物。因此，例如，提及「該

方法」包括一或多種本文所述類型之方法及/或步驟，其將在熟習此項技術者閱讀本發明後變得顯而易見。

如本文所用之術語「多形現象」及其變化形式指不同基因組或個體之間或不同基因組或個體中出現兩個或兩個以上替代性基因組序列或對偶基因。術語「遺傳突變」或「遺傳變化」及其變化形式包括多形現象。

如本文所用之術語「單核苷酸多形現象」(「SNP」)及其變化形式指一個核苷酸之位點在對偶基因之間變化。單核苷酸多形現象(SNP)為單一鹼基變化或點突變，但亦包括所謂「indel」突變(核苷酸插入或缺失)，從而引起個體之間的遺傳變化。構成所有人類遺傳變化之約90%的SNP在每30億個鹼基之人類基因組中有100至300個鹼基發生。然而，在其他生物(如病毒)中，SNP之發生可頻繁得多。SNP可在基因組之編碼區或非編碼區中發生。編碼區中之SNP可改變或可不改變蛋白質產物之胺基酸序列。非編碼區中之SNP可改變啟動子或加工位點且可影響基因轉錄及/或加工。知曉個體在相關基因組區域中是否具有特定SNP可提供足夠資訊來產生多種疾病之診斷、預防及治療應用。在一些實施例中，本發明係關於位於與阿韋利諾角膜營養不良有關之TGF β I基因之外顯子4中的鳥嘌呤向腺嘌呤變化之SNP的偵測。

術語「引子」及其變化形式指充當PCR反應中DNA合成之起始點的寡核苷酸。引子之長度通常為約15至約35個核苷酸且與互補於標靶序列之區域雜交。

術語「探針」及其變化形式(例如偵測探針)係指在PCR反應中與

標靶核酸雜交之寡核苷酸。標靶序列係指核酸之欲分析區域且包含相關多形位點。

除非另外定義，否則本文中所有技術及科學術語均具有與一般熟習本發明所屬技術者所通常瞭解相同之含義。儘管可使用與本文所述類似或等效之任何方法及材料來實踐或測試本發明，但本文特別描述方法及材料之各種實施例。

III. 檢體製備

在一些實施例中，本發明提供用於分離即時PCR單核苷酸多形現象偵測分析中所用之基因組檢體的改良方法。在一些實施例中，改良方法100使用圖1中所概述之步驟的組合。

在一些實施例中，方法包括提供來自個體之細胞的檢體。在一些實施例中，藉由使患者之細胞表面與能夠使細胞可逆地固定於基材上的基材接觸來收集細胞。

所揭示之方法適用於自多種檢體獲得之多種細胞類型。在一些實施例中，用於所揭示方法之細胞類型包括（但不限於）上皮細胞、內皮細胞、結締組織細胞、骨骼肌肉細胞、內分泌細胞、心肌細胞、尿細胞、黑素細胞、角質細胞、血細胞、白血球、白血球層、毛細胞（包括例如毛根細胞）及/或唾液細胞(salival cell)。在一些實施例中，細胞為上皮細胞。在一些實施例中，細胞為囊下血管周細胞(上皮細胞1型)；淺色細胞(上皮細胞2型)；中等顏色細胞(上皮細胞3型)；深色細胞(上皮細胞4型)；未分化細胞(上皮細胞5型)；及大髓質細胞(上皮細胞6型)。在一些實施例中，細胞為口腔上皮細胞(例如使用口腔抹拭收集之上皮細胞)。在一些實施例中，所揭示方法中所用之細胞

的檢體包括以上鑑別之細胞類型的任何組合。

在一些實施例中，該等方法包括提供(102)來自個體之細胞的檢體。在一些實施例中，所提供之細胞為口腔上皮細胞。

藉由許多種可以使個體細胞依可逆性結合於基材的方法中之任一者收集細胞檢體。在一些實施例中，所使用之基材係與含有個體之細胞的檢體呈物理性交互作用，以使細胞可逆性結合於基材。在一些實施例中，所使用之基材係直接與個體之身體呈物理性交互作用，以使細胞可逆性結合於基材。在一些實施例中，檢體為口腔細胞檢體且藉由使個體之口腔膜(例如，其臉頰之內部)與能夠使自膜移離之細胞可逆性固定之基材接觸，來收集口腔細胞之檢體。在該等實施例中，以等同於個人刷牙之力道(例如，較輕施力或加壓)，拿拭子摩擦個體臉頰內部。任何可使個體之細胞可逆性結合於基材之方法均可用於所揭示之方法。

在一些實施例中，宜以非侵入性方式收集檢體，因而此等檢體收集法可在任何地方且幾乎可由任何人完成。舉例而言，在一些實施例中，在醫師辦公室、在個體家中或在正進行或欲進行LASIK手術之設備中收集檢體。在一些實施例中，由患者、患者之醫生、護士或醫師之助理或其他臨床人員收集檢體。

在一些實施例中，基材由與細胞可逆地結合的多種材料中之任一者製成。例示性基材包括由以下製成之基材：嫻縈、棉花、二氧化矽、彈性體、蟲膠、琥珀、天然或合成橡膠、纖維素、膠木、耐綸、聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚丙烯腈或其他材料或其組合。在一些實施例中，基材為具有嫻縈頂端或棉花頂端之拭子。

隨後在溶解溶液中攪拌基材之頂端(例如螺縈拭子或棉花拭子之頂端)約10秒至60秒(1分鐘)、或約20秒至60秒、約20秒至約45秒、或約20秒至約30秒、約15秒至約60秒、約15秒至約45秒、或約15秒至約30秒、約10秒至約60秒、約10秒至約45秒、或約10秒至約30秒、約10秒至約15秒或約10秒至約20秒。在一些實施例中，攪拌進行約60秒或約1分鐘。在一些實施例中，攪拌進行小於1分鐘(例如小於60秒)。在一些實施例中，攪拌進行不超過15秒、20秒、30秒、45秒、60秒、90秒、120秒或120秒以上。在一些實施例中，攪拌進行不超過45秒。在一些實施例中，攪拌進行不超過30秒。在一些實施例中，攪拌進行不超過20秒。在一些實施例中，攪拌進行不超過15秒。

在一些實施例中，攪拌包括基材在溶解溶液中之任何移動。在一些實施例中，基材之頂端(例如螺縈拭子或棉花拭子之頂端)在溶解溶液中平緩地移動以使得複數個口腔細胞仍附著於基材而在後續時間及/或隨後時間進行分離。在溶解溶液中之此類移動包括渦旋運動、側向運動、上下運動及/或浸漬運動，或基材在溶解溶液中之使複數個口腔細胞仍附著於頂端同時使一些口腔細胞可分散於溶解溶液中的任何其他移動。

在一些實施例中，攪拌步驟在室溫下、例如在約15°C至約30°C、約18°C至約28°C、約18°C至約25°C或約20°C至約25°C之溫度下進行。

攪拌後，取出基材(例如具有螺縈頂端或棉花頂端之拭子)，且在一些實施例中儲存以在需要再測試或進一步(例如不同或另一)測試之情況下供後續使用。在一些實施例中，將基材(例如具有螺縈頂端或棉花頂端之口腔拭子)置放於容器中且冷凍儲存。在一些實施例中，

將基材(例如具有螺縈頂端或棉花頂端之口腔拭子)冷藏。在一些實施例中，將基材儲存在多種溫度中之任一者下歷時多種時間中之任一者而仍保持適用於一或多次額外提取。

在一些實施例中，將含有檢體之基材儲存0週、1週、2週、3週、4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週、11週或12週或12週以上。在一些實施例中，將含有檢體之基材儲存及/或含有檢體之基材可儲存0週至12週、1週至12週、2週至12週、3週至12週、4週至12週、5週至12週、6週至12週、7週至12週、8週至12週、9週、10週至12週或11週至12週。在一些實施例中，將含有檢體之基材儲存1、2、3、4、5、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、30或36個月或36個月以上。在一些實施例中，將含有檢體之基材儲存1個月至36個月、2個月至36個月、3個月至36個月、4個月至36個月、5個月至36個月、6個月至36個月、7個月至36個月、8個月至36個月、9個月至36個月、10個月至36個月、12個月至36個月、14個月至36個月、16個月至36個月、18個月至36個月。在一些實施例中，將含有檢體之基材儲存1個月至30個月、2個月至30個月、3個月至30個月、4個月至30個月、5個月至30個月、6個月至30個月、7個月至30個月、8個月至30個月、9個月至30個月、10個月至30個月、12個月至30個月、14個月至30個月、16個月至30個月或18個月至30個月。在一些實施例中，將含有檢體之基材儲存1個月至24個月、2個月至24個月、3個月至24個月、4個月至24個月、5個月至24個月、6個月至24個月、7個月至24個月、8個月至24個月、9個月至24個月、10個月至24個月、12個月至24個月、14個月至24個月、16個月至24個月、18個月至24個月。在一些實施例

中，將含有檢體之基材儲存1個月至22個月、2個月至22個月、3個月至22個月、4個月至22個月、5個月至22個月、6個月至22個月、7個月至22個月、8個月至22個月、9個月至22個月、10個月至22個月、12個月至22個月、14個月至22個月、16個月至22個月、18個月至22個月。在一些實施例中，將含有檢體之基材儲存1個月至20個月、2個月至20個月、3個月至20個月、4個月至20個月、5個月至20個月、6個月至20個月、7個月至20個月、8至20個月、9至20個月、10個月至20個月、12個月至20個月、14個月至20個月、16個月至20個月、18個月至20個月。在一些實施例中，將含有檢體之基材儲存1個月至18個月、2個月至18個月、3個月至18個月、4個月至18個月、5個月至18個月、6個月至18個月、7個月至18個月、8個月至18個月、9個月至18個月、10個月至18個月、12個月至18個月、14個月至18個月、16個月至18個月或17個月至18個月。在一些實施例中，將含有檢體之基材儲存1個月至12個月、2個月至12個月、3個月至12個月、4個月至12個月、5個月至12個月、6個月至12個月、7個月至12個月、8個月至12個月、9個月至12個月、10個月至12個月或11個月至12個月。

在一些實施例中，將含有檢體之基材儲存在約2°C、約3°C、約4°C、約5°C、約6°C、約7°C或約8°C下。在一些實施例中，將含有檢體之基材儲存在約2°C至約8°C、約3°C至約8°C、約4°C至約8°C、約5°C至約8°C、約6°C至約8°C或約7°C至約8°C下。在一些實施例中，將含有檢體之基材儲存在約-25°C、約-24°C、約-23°C、約-22°C、約-21°C、約-20°C、約-19°C、約-18°C、約-17°C、約-16°C或約-15°C下。在一些實施例中，將含有檢體之基材儲存在約-25°C至約-15°C、約-22°C至約-17°C、

約-20℃至約-15℃或約-25℃至約-20℃下。在一些實施例中，將含有檢體之基材儲存在約-90℃、約-89℃、約-88℃、約-87℃、約-86℃、約-85℃、約-84℃、約-83℃、約-82℃、約-81℃、約-80℃、約-79℃、約-78℃、約-77℃、約-76℃、約-75℃、約-74℃、約-73℃、約-72℃、約-71℃、約-70℃、約-69℃、約-68℃、約-67℃、約-66℃或約-65℃下。在一些實施例中，將含有檢體之基材儲存在約-90℃至約-65℃、約-85℃至約-65℃、約-80℃至約-65℃、約-75℃至約-65℃或約-70℃至約-65℃下。在一些實施例中，將含有檢體之基材儲存在-90℃至-65℃下。

在一些實施例中，將含有檢體之基材凍融一或多次(例如在冷凍後，將含有檢體之基材融化，根據本發明方法使用且再冷凍)及或用於本發明方法中。在一些實施例中，將含有檢體之基材凍融1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20次或20次以上。在一些實施例中，將含有檢體之基材用於本發明方法中1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20次或20次以上。在一些實施例中，將含有檢體之基材凍融1至20次、2至20次、3至20次、4至30次、5至20次、6至20次、7至20次、8至20次、9至20次、10至20次、11至20次、12至20次、13至20次、14至20次、15至20次、16至20次、17至20次、18至20次、19至20次、5至15次、5至10次、1至10次或1至5次。在一些實施例中，將含有檢體之基材用於本發明方法中1至20次、2至20次、3至20次、4至30次、5至20次、6至20次、7至20次、8至20次、9至20次、10至20次、11至20次、12至20次、13至20次、14至20次、15至20次、

16至20次、17至20次、18至20次、19至20次、5至15次、5至10次、1至10次、1至5次、1至4次、1至3次或1至2次。

在一些實施例中，將含有檢體之基材在室溫或約 15°C 至約 30°C 下儲存1週。在一些實施例中，將檢體在約 2°C 至約 8°C 或約 4°C 下儲存約1、2或3週。在一些實施例中，將含有檢體之基材在約 -25°C 至約 -15°C 或約 -20°C 下儲存約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12個月。在一些實施例中，將含有檢體之基材在約 -90°C 至約 -65°C 或約 -80°C 下儲存約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12個月。

有利地且出乎意料地，發現自基材提取之細胞數減少可藉由使自個體細胞之核酸提取增加來彌補。在一些實施例中，使提取增加藉由相較於標準實踐培育細胞較長時間、相較於標準實踐在高溫下培育細胞或兩者之組合來完成。

在一些實施例中，使細胞之核酸提取增加藉由相較於標準實踐進行提取培育增加或較長之時間來完成。在一些實施例中，進行提取培育約45分鐘，例如 45 ± 5 、 45 ± 10 、 45 ± 15 或 45 ± 20 分鐘。在一些實施例中，進行提取培育約25分鐘至約65分鐘、約30分鐘至約60分鐘、約35分鐘至約55分鐘、約45分鐘至約65分鐘、約45分鐘至約55分鐘或約40分鐘至約50分鐘。在一些實施例中，提取培育時間為約25分鐘、約30分鐘、約35分鐘、約40分鐘、約45分鐘、約50分鐘、約55分鐘、約60分鐘或約65分鐘。

在一些實施例中，使細胞之核酸提取增加藉由相較於標準實踐在增加或較高之溫度下進行提取培育來完成。在一些實施例中，在約 45°C (例如 $45\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、 $45\pm 5^{\circ}\text{C}$ 或 $45\pm 10^{\circ}\text{C}$)下進行提取培育。在一些實施

例中，提取培育溫度為約35°C至約55°C、約40°C至約50°C或約43°C至約47°C。在一些實施例中，提取溫度為約43°C、約44°C、約45°C、約46°C、約47°C、約48°C、約49°C、約50°C、約51°C、約52°C、約53°C、約54°C或約55°C。在一些實施例中，使用一個以上提取溫度。舉例而言，在一些實施例中，對於一部分提取使用標準溫度，且對於另一部分提取使用高溫。

在一些實施例中，自基材釋放實質上少量細胞以用於根據本發明之系統及方法進行後續溶解。在一些實施例中，在攪拌期間自基材釋放至少1個細胞、至少2個細胞、至少5個細胞、至少10個細胞、至少15個細胞、至少20個細胞、至少50個細胞、至少75個細胞、至少100個細胞、至少125個細胞、至少150個細胞、至少175個細胞、至少200個細胞、至少250個細胞、至少300個細胞、至少350個細胞、至少400個細胞、至少450個細胞、至少500個細胞或500個細胞以上。

在一些實施例中，用所述方法自單一個體使用(獲得)約1 ng/ μ L至約50 ng/ μ L、約1 ng/ μ L至約40 ng/ μ L、約1 ng/ μ L至約30 ng/ μ L、約1 ng/ μ L至約20 ng/ μ L、約1 ng/ μ L至約10 ng/ μ L、約1 ng/ μ L至約5 ng/ μ L、約1 ng/ μ L至約4 ng/ μ L、約1 ng/ μ L至約3 ng/ μ L或約1 ng/ μ L至約2 ng/ μ L核酸，其純度為約0.55至2.00、約0.6至約2.00、約0.7至約2.00、約0.8至約2.00、約0.9至約2.00、約1.0至約2.00、約1.1至約2.00、約1.2至約2.00、約1.3至約2.00、約1.4至約2.00、約1.5至約2.00、約1.6至約2.00、約1.7至約2.00、約1.8至約2.00或約1.9至約2.00。在一些實施例中，用所述方法自單一個體使用(獲得)1 ng/ μ L至50 ng/ μ L，其純度為約0.55至2.00。

IV. 溶解溶液

多種溶解溶液已描述且為熟習此項技術者所已知。此等熟知溶解溶液中之任一者可用於本發明方法以自檢體分離核酸。例示性溶解溶液包括可購得之溶解溶液，諸如由 INVITROGEN®、QIAGEN®、LIFE TECHNOLOGIES® 及其他製造商出售之溶解溶液，以及可由熟習此項技術者在實驗室環境中產生的溶解溶液。溶解緩衝液亦充分描述且多種溶解緩衝液可用於所揭示之方法，包括例如 Molecular Cloning (三卷裝, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012) 及 Current Protocols (Genetics and Genomics; Molecular Biology; 2003-2013) 中所述之溶解緩衝液，兩者均以引用的方式併入本文中以用於所有目的。

細胞溶解為自細胞內回收核酸之通常實踐方法。在諸多情形下，使細胞與溶解溶液接觸，該溶解溶液通常為包含清潔劑之鹼性溶液、或溶解酶之溶液。此類溶解溶液通常含有鹽、清潔劑及緩衝劑以及熟習此項技術者瞭解而使用之其他試劑。完全及/或部分溶解後，自溶解溶液回收核酸。

在一些實施例中，將細胞再懸浮於水性緩衝液中，該水性緩衝液之 pH 值在約 pH 4 至約 10、約 5 至約 9、約 6 至約 8 或約 7 至約 9 範圍內。

在一些實施例中，緩衝液鹽濃度為約 10 mM 至約 200 mM、約 10 mM 至約 100 mM 或約 20 mM 至約 80 mM。

在一些實施例中，緩衝液進一步包含螯合劑，諸如乙二胺四乙酸(EDTA)或乙二醇四乙酸(EGTA)。

在一些實施例中，溶解溶液進一步包含其他化合物以輔助自細

胞釋放核酸，諸如多元醇，包括例如（但不限於）蔗糖，以及糖醇，諸如麥芽糖醇、山梨糖醇、木糖醇、赤藻糖醇及/或異麥芽糖。在一些實施例中，多元醇在約2%至約15% w/w、或約5%至約15% w/w或約5%至約10% w/w範圍內。

在一些實施例中，溶解溶液進一步包含界面活性劑，諸如（但不限於）Triton X-100、SDS、CTAB、X-114、CHAPS、DOC及/或NP-40。在一些實施例中，此類界面活性劑在約1%至約5% w/w、約1%至約4% w/w或約1%至約3% w/w範圍內。

在實施例中，溶解溶液進一步包含離液劑，諸如（但不限於）尿素、十二烷基硫酸鈉及/或硫脲。在一些實施例中，所用離液劑之濃度在約0.5 M至8 M、約1 M至約6 M、約2 M至約6 M或約1 M至3 M範圍內。

在一些實施例中，溶解溶液進一步包含一或多種其他溶解試劑，且此類溶解試劑為此項技術中所熟知。在一些實施例中，此類溶解試劑包括細胞壁溶解酶，諸如（但不限於）溶菌酶。在一些實施例中，溶解試劑包含鹼性清潔劑溶液，諸如含有0.5%十二烷基硫酸鈉之0.1氫氧化鈉水溶液。

在一些實施例中，溶解溶液進一步包含糖水溶液，諸如蔗糖溶液；及螯合劑，諸如EDTA，例如STET緩衝液。在某些實施例中，藉由將細胞懸浮液與具有兩倍所要濃度(例如0.2氫氧化鈉、1.0%十二烷基硫酸鈉)之等體積溶解溶液混合來製備溶解試劑。

在一些實施例中，達成所要程度之溶解後，將包含溶解溶液及經溶解細胞之混合物與中和或淬滅試劑接觸以調節條件而使得溶解試

劑不會不利地影響所要產物。在一些實施例中，將pH調節為約5至約9、約6至約8、約5至約7、約6至約7或約6.5至7.5之pH以使細胞內含物、包括例如（但不限於）核酸之降解達最少及/或阻止其降解。在一些實施例中，當溶解試劑包含鹼性溶液時，中和試劑包含酸性緩衝液，例如鹼金屬乙酸鹽/乙酸緩衝液。在一些實施例中，溶解條件（諸如溫度及溶解試劑之組成）經選擇以使得溶解實質上完成而同時使所要產物、包括例如（但不限於）核酸之降解達最少。

在一些實施例中，將第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五或第二十種溶解溶液用於該等方法。在一些實施例中，所用溶解緩衝液之體積為約10 μL 、約20 μL 、約30 μL 、約40 μL 、約50 μL 、約60 μL 、約70 μL 、約80 μL 、約90 μL 、約100 μL 、約120 μL 、約130 μL 、約140 μL 、約150 μL 、160 μL 、約170 μL 、約180 μL 、約190 μL 、約200 μL 、約220 μL 、約230 μL 、約240 μL 、約250 μL 、約260 μL 、約270 μL 、約280 μL 、約290 μL 、約300 μL 、約320 μL 、約330 μL 、約340 μL 、約350 μL 、約360 μL 、約370 μL 、約380 μL 、約390 μL 、約400 μL 、約450 μL 、約500 μL 、約550 μL 、約600 μL 、約650 μL 、約700 μL 、約750 μL 、約800 μL 、約850 μL 、900 μL 、950 μL 、1000 μL 、1500 μL 或2000 μL 。在一些實施例中，溶解緩衝液為約10 μL 至約1000 μL 、約10 μL 至約800 μL 、約10 μL 至約600 μL 、約10 μL 至約400 μL 、約20 μL 至約400 μL 、約50 μL 至約300 μL 、約50 μL 至約200 μL 、約50 μL 至約400 μL 、約100 μL 至約400 μL 、約10 μL 至約300 μL 或約100 μL 至約200 μL 。

熟習此項技術者可使用以上之任何組合以及與其他已知及常規方法之組合，且本發明涵蓋此類組合。

V. 自溶解緩衝液純化核酸

在一些實施例中，在進行後續分析前自溶解緩衝液分離核酸，包括例如（但不限於）基因組DNA。在一些實施例中，在進行其他分析（諸如（但不限於）即時PCR分析）前自溶解緩衝液分離核酸。所揭示方法之各種實施例可使用適用於分離少量核酸之多種方法中之任一者。其包括（但不限於）沈澱、凝膠過濾、密度梯度及固相結合。此類方法亦描述於例如Molecular Cloning（三卷裝，Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012）及Current Protocols (Genetics and Genomics; Molecular Biology; 2003-2013)中，該等文獻均以引用的方式併入本文中用於所有目的。

核酸沈澱為熟習此項技術者已知的用於分離之熟知方法。此項技術中亦已知多種固相結合方法，包括（但不限於）利用珠粒（例如二氧化矽珠粒、磁性珠粒）、柱、膜形式或此項技術中已知的多種其他實體形式中之任一者的固相的固相結合方法。在一些實施例中，所揭示方法中所用之固相可逆地結合核酸。此類固相之實例包括所謂「混合床」固相，其為至少兩種不同固相之混合物，該兩種不同固相各具有在不同溶液條件下結合核酸之能力及在不同條件下釋放核酸之能力；諸如美國專利申請案第2002/0001812號中所述之固相，出於所有目的，其以全文引用的方式併入本文中。根據所揭示之方法，固相對核酸之親和力可經由通常用於使溶質結合於基材之多種方式中之任一者達成。此類方式之實例包括（但不限於）離子相互作用（例如陰離子交換

層析)及疏水性相互作用(例如反相層析)、pH值差異及變化、鹽差異及變化(例如濃度變化、離液鹽/試劑之使用)。基於pH值之例示性固相包括(但不限於)INVITROGEN ChargeSwitch標準化口腔套組磁性珠粒中所用之固相，其在低pH值(<6.5)下結合核酸且在高pH值(>8.5)下釋放核酸；及單胺基-N-胺基乙基(MANAE)，其在小於7.5之pH值下結合核酸且在大於8之pH值下釋放核酸。例示性基於離子交換之基材包括(但不限於)DEA-SEPHAROSE™、Q-SEPHAROSE™及DEAE-SEPHADEX™(來自PHARMACIA, Piscataway, N.J.)、DOWEX® I(來自The Dow Chemical Company, Midland, Mich.)、AMBERLITE®(來自Rohm & Haas, Philadelphia, Pa.)、DUOLITE®(來自Duolite International, In., Cleveland, Ohio)、DIALON TI及DIALON TII。

任何個別方法預期可用於單獨使用或與其他方法組合使用，且此類有用組合為熟習此項技術者所熟知且瞭解。

VI. 核酸分析

使用所揭示之方法分離核酸(諸如基因組DNA(gDNA))以用於多種核酸分析，包括基因組分析。在一些實施例中，此類分析包括偵測多種遺傳突變，其包括(但不限於)一或多個缺失、插入、轉換及顛換。在一些實施例中，突變為單核苷酸多形現象(SNP)。

用於分析此類經分離核酸(例如(但不限於)基因組DNA(gDNA))之多種方法為此項技術中已知，且包括PCR法(諸如即時PCR分析)、微陣列分析、雜交分析及核酸序列分析，以及分析核酸組成且為熟習此項技術者所已知的多種其他方法。參見例如Molecular Cloning (三卷裝, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012)及Current Protocols

(Genetics and Genomics; Molecular Biology; 2003-2013)。

a. 即時PCR

為設計即時PCR分析，協調數個部分，包括側接兩個引子且隨後擴增之DNA片段(通常稱為擴增子)、該兩個引子及欲使用之偵測探針。

即時PCR依賴於結合於短多核苷酸(稱為「偵測探針」)之螢光染料的視覺發光，該等短多核苷酸與基因組對偶基因以序列特異性方式締合。單核苷酸不同之即時PCR探針可在即時PCR分析中藉由結合及偵測在不同波長下發螢光之探針來區分。即時PCR可用於偵測應用(診斷應用)、定量應用及基因分型應用。

此項技術中揭示進行即時PCR之數種相關方法，包括依賴於以下之分析：TAQMAN®探針(美國專利第5,210,015號及第5,487,972號，及Lee等人, *Nucleic Acids Res.* 21:3761-6, 1993)、分子信標探針(美國專利第5,925,517號及第6,103,476號，及Tyagi及Kramer, *Nat. Biotechnol.* 14:303-8, 1996)、自探測擴增子(蠍形探針)(美國專利第6,326,145號，及Whitcombe等人, *Nat. Biotechnol.* 17:804-7, 1999)、Amplisensor (Chen等人, *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4210-6, 1998)、Amplifluor (美國專利第6,117,635號，及Nazarenko等人, *Nucleic Acids Res.* 25:2516-21, 1997)、置換雜交探針(Li等人, *Nucleic Acids Res.* 30:E5, 2002)、DzyNA-PCR (Todd等人, *Clin. Chem.* 46:625-30, 2000)、螢光限制酶偵測(Cairns等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318:684-90, 2004)及相鄰雜交探針(美國專利第6,174,670號，及Wittwer等人, *Biotechniques* 22:130-1, 134-8, 1997)。

在一些情況下，即時PCR可偵測多種基因突變，包括例如(但不限於)SNP。在一些實施例中，使用即時PCR基於藉由使用經繫栓淬滅部分使用分子內淬滅螢光分子來進行特定基因候選者中SNP之偵測。因此，根據例示性實施例，即時PCR法亦包括使用分子信標技術。分子信標技術利用具有經內淬滅螢光團之髮夾形分子，其螢光藉由結合於相關DNA標靶恢復(參見例如Kramer, R.等人, *Nat. Biotechnol.* 14:303-308, 1996)。在一些實施例中，使用分子信標探針與積聚之PCR產物的增加之結合來特異性偵測基因組DNA中所存在之SNP。

多種適合基因分型程序中之一者為TAQMAN®對偶基因辨別分析。在此分析之一些情況下，利用如下寡核苷酸探針，其在探針之5'端標記有螢光報導染料且在探針之3'端標記有淬滅染料。淬滅基因與完整探針之接近使報導基因保持低螢光。在PCR反應期間，DNA聚合酶之5'核酸酶活性使探針裂解且使染料與淬滅基因分離。從而使報導基因之螢光增加。藉由監測報導染料之螢光增加來直接偵測PCR產物積累。DNA聚合酶之5'核酸酶活性僅在探針與標靶雜交且在PCR期間擴增時才使報導基因與淬滅基因之間的探針裂解。探針經設計以僅在特定SNP對偶基因存在時才跨越標靶SNP位置且與核酸分子雜交。

舉例而言，為擴增位於TGFβ1基因之外顯子4中的阿韋利諾角膜營養不良相關SNP，如美國專利公開案第2012/0077200號中所述建構正向及反向PCR引子對(圖2中之SEQ ID NO:1至24)。在一些實施例中，本文所揭示之改良方法中使用其中所揭示之任何正向及反向引子對。在一較佳實施例中，本文所提供之改良方法中使用SEQ ID NO:1(正向)與SEQ ID NO:2(反向)之正向及反向引子對。

為偵測TGF β I基因之外顯子4中的鳥嘌呤向腺嘌呤之突變，如美國專利公開案2012/0077200中所述建構經螢光標記之即時PCR成對探針，以偵測具有圖3中所示之SEQ ID NO:25至42之核苷酸序列的野生型(「G」)及阿韋利諾角膜營養不良相關突變體(「A」)對偶基因。在一些實施例中，本文所揭示之改良方法中使用任何野生型及突變體探針。在一較佳實施例中，本文所提供之改良方法中使用SEQ ID NO:25(野生型)與SEQ ID NO:26(突變體)之野生型及突變體成對探針。為區分野生型對偶基因與疾病相關對偶基因，用VIC標記野生型探針且用FAM標記突變體探針。將小溝結合子(MGB)連接於探針以促進結合於互補基因片段。

b. 即時PCR循環

即時PCR法包括多個步驟或循環作為擴增方法之一部分。此等循環包括使雙股核酸變性，使正向引子、反向引子及標靶基因組DNA序列之偵測探針退火，及自經退火之正向引子及反向引子合成(亦即複製)第二股DNA。此三步過程在本文中稱為一個循環。

在一些實施例中，使用約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60個循環。在一些實施例中，使用約10至約60個循環、約20至約50個或約30至約40個循環。在一些實施例中，使用40個循環。

在一些實施例中，使雙股核酸變性之步驟在約80°C至100°C、約85°C至約99°C、約90°C至約95°C之溫度下進行約1秒至約5秒、約2秒至約5秒或約3秒至約4秒。在一些實施例中，使雙股核酸變性之步驟在95°C之溫度下進行約3秒。

在一些實施例中，使正向引子、反向引子及標靶基因組DNA序列

之偵測探針退火之步驟在約40°C至約80°C、約50°C至約70°C、約55°C至約65°C下進行約15秒至約45秒、約20秒至約40秒、約25秒至約35秒。在一些實施例中，使正向引子、反向引子及標靶基因組DNA序列之偵測探針退火之步驟在約60°C下進行約30秒。

在一些實施例中，自經退火之正向引子及反向引子合成(亦即複製)第二股DNA之步驟在約40°C至約80°C、約50°C至約70°C、約55°C至約65°C下進行約15秒至約45秒、約20秒至約40秒、約25秒至約35秒。在一些實施例中，使正向引子、反向引子及標靶基因組DNA序列之偵測探針退火之步驟在約60°C下進行約30秒。

在一些實施例中，發現可將約1 μ L、約2 μ L、約3 μ L、約4 μ L或約5 μ L根據本文所述之本發明方法製備之基因組DNA檢體與僅約0.05 μ L、約0.10 μ L、約0.15 μ L、約0.20 μ L、約0.25 μ L或約0.25 μ L 30 $\times$ 、35 $\times$ 、40 $\times$ 、45 $\times$ 、50 $\times$ 或100 $\times$ 即時PCR分析混合物及蒸餾水組合形成PCR主混合物。在一些實施例中，PCR主混合物之最終體積為約5 μ L、約6 μ L、約7 μ L、約8 μ L、約9 μ L、約10 μ L、約11 μ L、約12 μ L、約13 μ L、約14 μ L、約15 μ L、約16 μ L、約17 μ L、約18 μ L、約19 μ L或約20 μ L或20 μ L以上。在一些實施例中，發現可將2 μ L如上述製備之基因組DNA檢體與僅約0.15 μ L 40 $\times$ 即時PCR分析混合物及2.85 μ L蒸餾水組合而形成PCR主混合物。

儘管本文描述例示性反應，但熟習此項技術者應瞭解如何基於探針設計改變溫度及時間。此外，本發明方法涵蓋以上時間及溫度之任何組合。

c. PCR引子及引子設計

在一些實施例中，在實驗室環境中測試且設計引子。在一些實施例中，藉由基於電腦之電子雜交法設計引子。引子序列基於擴增子或欲擴增之標靶核酸序列之序列。相較於較長之擴增子，較短之擴增子通常更有效複製且引起更有效擴增。

在設計引子時，熟習此項技術者應瞭解需要基於所設計引子以及第二結構考慮(GC含量增加可產生增加之第二結構)之GC及AT含量考慮熔融溫度(T_m ；引子-標靶雙螺旋解離且變成單股之溫度，且其為雙螺旋穩定性之指示； T_m 增加表明穩定性增加)。 T_m 可使用此項技術中已知之多種方法計算，且熟習此項技術者可容易地瞭解此類用於計算 T_m 之各種方法；此類方法包括例如(但不限於)線上工具中可獲得之方法，諸如在全球資訊網(World Wide Web)之 promega.com/techserv/tools/biomath/calc11.htm上可獲得之 T_m 計算器。引子特異性由其完整序列與3'端序列之組合定義，該3'端序列為由Taq聚合酶拉長之部分。在一些實施例中，3'端應具有至少5至7個在標靶序列中之任何其他位置不會發現之獨特核苷酸以輔助降低不正確擴增產物之錯誤引發及產生。正向及反向引子通常以類似效率結合於標靶。在一些情況下，使用諸如NCBI BLAST(位於全球資訊網之 ncbi.nlm.nih.gov上)之工具來進行比對及輔助引子設計。

熟習此項技術者應完全知曉關於標靶核酸序列之引子設計的基礎，且多個參考手冊及教科書關於此類方法具有大量教示，包括例如Molecular Cloning (三卷裝, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012)及Current Protocols (Genetics and Genomics; Molecular Biology; 2003-2013)及Real-Time PCR in Microbiology: From Diagnostics to

Characterization (Ian M. MacKay, Calster Academic Press; 2007)；全球資訊網之 primerdigital.com/tools/PrimerAnalyser.html 上可獲得之 PrimerAnalyser Java工具及 Kalendar R等人 (*Genomics*, 98(2): 137-144 (2011))，其均全文併入本文中以用於所有目的。

引子設計之另一方面為引子複雜性或序列語法複雜性(參見 Kalendar R等人 (*Genomics*, 98(2): 137-144 (2011)))。具有較大序列語法複雜性(例如核苷酸排列及組成)之引子通常較有效。在一些實施例中，使用序列語法複雜性計算方法檢索比較序列之間的保守區以偵測低複雜性區域，包括簡單重複序列、正向或反向重複序列、多嘌呤及多嘧啶三股cDNA結構及四股結構(諸如G-四聚體)。在一些實施例中，使用字母表容量L-gram法(參見 A. Gabrielian, A. Bolshoy, *Computer & Chemistry* 23:263-274 (1999)及 Y.L. Orlov, V.N. Potapov, Complexity: an internet resource for analysis of DNA sequence complexity, *Nucleic Acids Res.* 32: W628-W633(2004))沿全序列長度進行語言複雜性(LC)量測，且以序列中1至L大小之字詞的所觀察範圍(xi)的總和除此序列長度之預期(E)值的總和的形式計算。一些富含G(及富含C)之核酸序列摺疊成含有G-四聚體之堆疊的四股DNA結構(參見全球資訊網之 quadruplex.org)。在一些情況下，此等四聚體藉由兩個或四個DNA分子之分子間締合、含有兩個G鹼基之序列二聚合或藉由含有四個鳥嘌呤之嵌段的單股的分子間摺疊形成(參見 P.S. Ho, *PNAS*, 91:9549-9553 (1994)；I.A. Il'icheva, V.L. Florent'ev, *Russian Journal of Molecular Biology* 26:512-531(1992)；D. Sen, W. Gilbert, *Methods Enzymol.* 211:191-199 (1992)；P.A. Rachwal, K.R. Fox,

Methods 43:291-301 (2007) ; S. Burge, G.N. Parkinson, P. Hazel, A.K. Todd, K. Neidle, *Nucleic Acids Res.* 34:5402-5415 (2006) ; A. Guédin, J. Gros, P. Alberti, J. Mergny, *Nucleic Acids Res.* 38:7858-7868 (2010) ; O. Stegle, L. Payet, J.L. Mergny, D.J. MacKay, J.H. Leon, *Bioinformatics* 25:i374-i382 (2009)) ; 在一些情況下，因為其低語言複雜性(對於(TTAGGG)₄，LC=32%)而將其自引子設計去除。

此等方法包括用於在具有 GC 偏移 $((G-C)/(G+C))$ 、AT 偏移 $((A-T)/(A+T))$ 、CG-AT 偏移 $((S-W)/(S+W))$ 或 嘌呤 - 嘧啶 $((R-Y)/(R+Y))$ 偏移之序列中關於 CG 含量及熔融溫度進行模式分析的各種生物資訊工具，且提供用於測定序列語法複雜性分佈之工具。舉例而言，對於滑動窗 n (其中 n 為正整數) 中之 GC 偏移，以一個鹼基為步長根據式 $(G-C)/(G+C)$ 來計算鹼基，其中 G 為窗口中所有序列之鳥嘌呤之總數且 C 為窗口中所有序列之胞嘧啶之總數 (Y. Benita 等人, *Nucleic Acids Res.* 31:e99 (2003))。正 GC 偏移值表明 G 鹼基過多，而負 GC 偏移值表示 C 鹼基過多。類似地，在序列中計算其他偏移。在一些實施例中，使用此類方法以及其他方法來測定引子複雜性。

根據非限制性例示性實施例，使用核酸外切酶引子 (TAQMAN® 探針) 進行即時 PCR。在該等實施例中，引子利用熱穩定聚合酶 (諸如 Taq) 之 5' 核酸外切酶活性來裂解擴增反應中所存在之雙標記探針 (參見例如 Wittwer, C. 等人, *Biotechniques* 22:130-138, 1997)。儘管與 PCR 產物互補，但此分析中所用之引子探針不同於 PCR 引子且用能夠發螢光之分子與能夠淬滅螢光之分子雙標記。當探針完整時，DNA 探針內螢光信號之分子內淬滅使信號極小。當在擴增期間藉由 Taq 之核酸外切

酶活性釋放螢光分子時，淬滅大大減少，從而使螢光信號增加。螢光探針之非限制性實例包括6-羧基-螢光素部分及類似部分。例示性淬滅基因包括Black Hole淬滅基因1部分及類似部分。

多種PCR引子可用於所揭示之方法。例示性引子包括(但不限於)本文所述之引子。適用於所揭示方法之引子亦見於美國專利公開案第20120077200號，其以引用的方式併入本文中以用於所有目的。在一些實施例中，適用於本發明方法之PCR引子包括(但不限於)表1中所列之以下引子且可用於偵測TGFβ1基因。表2及表3提供各引子之生物物理學參數，其使用全球資訊網之primerdigital.com/tools/PrimerAnalyser.html計算。

表1：TGFβ1基因之例示性引子

引子名稱	SEQ ID NO:	引子序列
ACD Fw引子	SEQ ID NO: 1	5'-TCC ACC ACC ACT CAG CTG TA
ACD Re引子	SEQ ID NO: 2	5'-CCA TCT CAG GCC TCA GCT T (60 bp)
AV Fw引子	SEQ ID NO: 3	5'-TGC AGC CCT ACC ACT CTC AA
AV Re引子	SEQ ID NO: 4	5'-AGG CCT CGT TGC TAG G (150 bp)
Real Fw引子	SEQ ID NO: 5	5'-TAG TCT CTT ATT CTA ATA GA
Real Re引子	SEQ ID NO: 6	5'-GCT GCA GAC TCT GTG TTT AA (860 bp)
ACD Fw2引子	SEQ ID NO: 7	5'-CCA TCC CTC CTT CTG TCT TCT G
ACD Re2引子	SEQ ID NO: 8	5'-CGG GCC CCT CCA TCT C (140 bp)
ACD Fw3引子	SEQ ID NO: 9	5'-CAG AGA AGG GAG GGT GTG GTT
ACD Re3引子	SEQ ID NO: 10	5'-GGG CGA AGA TGG TGA AGC T (190 bp)
ACD Fw4引子	SEQ ID NO: 11	5'-TCC TCG TCC TCT CCA CCT GTA
ACD Re4引子	SEQ ID NO: 12	5'-AGC TGG CAA GGA GGC CC
ACD Fw5引子	SEQ ID NO: 13	5'-TTT GGG CTT TCC CAC ATG C
ACD Re5引子	SEQ ID NO: 14	5'-GGC AGA CGG AGG TCA TCT CA
ACD Fw6引子	SEQ ID NO: 15	5'-GTA GTA CCG TGC TCT CTG
ACD Re6引子	SEQ ID NO: 16	5'-AGT TCC CCA TAA GAA TCC CCC
ACD Fw7引子	SEQ ID NO: 17	5'-GGC TGG ACC CCC AGA GG
ACD Re7引子	SEQ ID NO: 18	5'-ACC CCT CGG GGA AGT AAG G
ACD Fw8引子	SEQ ID NO: 19	5'-AAC CTT TAC GAG ACC CTG GGA

引子名稱	SEQ ID NO:	引子序列
ACD Re8引子	SEQ ID NO: 20	5'-GAC TCC CAT CCA TCA TGC CC
ACD Fw9引子	SEQ ID NO: 21	5'-AGT CGT TGG ATC CAC CAC CA
ACD Re9引子	SEQ ID NO: 22	5'-GAC GTC ATT TCC TAC TGT TTC AGG
ACD Fw10引子	SEQ ID NO: 23	5'-CCC CCC AGA AAC AGC CTG
ACD Re10引子	SEQ ID NO: 24	5'-TTC TAA GGG GTT AAG GAG AAA GCT T
GCD1 Fw引子	SEQ ID NO: 43	5'-ACA CAG TCT TTG CTC CCA CAA A
GCD1 Re引子	SEQ ID NO: 44	5'-ACT TAA GTT GGT CTT TAC CCA AGA GTC T

表2：正向引子之生物物理學參數

正向引子	長度	Tm1	Tm2	GC含量	複雜性%	PCR效率
SEQ ID NO:1	19	55.4	57.8	57.9	70	70
SEQ ID NO:3	20	57.1	58	55	81	66
SEQ ID NO:5	20	40.2	45.7	25	73	38
SEQ ID NO:7	22	55.9	60.2	54.5	62	43
SEQ ID NO:9	21	57.5	60.2	57.1	64	40
SEQ ID NO:11	21	57.6	60.2	57.1	66	57
SEQ ID NO:13	19	55.4	55.7	52.6	81	80
SEQ ID NO:15	18	50.6	55.3	55.6	75	66
SEQ ID NO:17	17	57.8	62.2	76.5	74	60
SEQ ID NO:19	21	56.6	58.2	52.4	82	73
SEQ ID NO:21	20	57.4	58	55	78	46
SEQ ID NO:23	18	56.5	59.9	66.7	69	69
平均值	19.67	54.96	57.80	56.05	72.69	59.85
中位值	20	56.55	58.1	55.3	73.5	63
標準偏差	1.50	5.00	4.24	11.78	6.84	14.10

表3：反向引子之生物物理學參數

反向引子	長度	Tm1	Tm2	GC含量	複雜性%	PCR效率
SEQ ID NO:2	19	55.5	57.8	57.9	72	52
SEQ ID NO:4	16	52.1	54.5	62.5	78	78
SEQ ID NO:6	20	52.4	53.9	45	84	41
SEQ ID NO:8	16	55.2	59.6	75	63	53
SEQ ID NO:10	19	56.5	57.8	57.9	78	69
SEQ ID NO:12	17	58.5	59.8	70.6	74	66
SEQ ID NO:14	20	57.6	60.1	60	84	74
SEQ ID NO:16	21	54.9	58.2	52.4	71	51
SEQ ID NO:18	19	56.6	60	63.2	78	60
SEQ ID NO:20	20	56.5	60.1	60	65	65
SEQ ID NO:22	24	55.5	58.7	45.8	88	67
SEQ ID NO:24	25	55.3	57.2	40	74	40
平均值	19.69	55.61	58.13	57.33	76.54	60.69
中位值	19.5	55.5	58.45	58.95	76	62.5
標準偏差	2.77	1.86	2.10	10.33	7.52	12.30

在一些實施例中，用於所揭示方法之即時PCR引子的序列語法複

雜性為至少70%、至少72%、至少75%、至少77%、至少80%、至少82%、至少85%、至少88%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%或至少99%。

d. 偵測探針設計及偵測探針

多種偵測探針可用於所揭示之方法且用於基因分型及或定量。熟習此項技術者通常使用之偵測探針包括(但不限於)水解探針(亦稱為TAQMAN®探針、5'核酸酶探針或雙標記探針)、雜交探針及蠍形引子(其將引子及偵測探針組合在一個分子中)。在一些實施例中，由熟習此項技術者依據所需之探針標靶來確定偵測探針設計，以使得探針與所用PCR引子相容(例如在即時PCR分析中，引子與探針不應干擾彼此之功能)。在一些實施例中，探針之設計應具有高於引子之 T_m ，以促進產生有效信號。可使用此項技術中已知多種方法及熟習此項技術者咸瞭解之彼等用於計算 T_m 之各種方法中之任何方法來計算 T_m ；此類方法包括例如線上工具中可獲得之方法，諸如在全球資訊網之promega.com/techserv/tools/biomath/calc11.htm上可獲得之計算器。在一些實施例中，增加偵測探針之 T_m 可以使該偵測探針在引子被聚合酶延長之前先結合。

在一些實施例中，偵測探針含有各種修飾。在一些實施例中，偵測探針包括經修飾之核酸殘基，諸如(但不限於)2'-O-甲基核糖核苷酸修飾、硫代磷酸酯主鏈修飾、二硫代磷酸酯主鏈修飾、胺基磷酸酯主鏈修飾、甲基膦酸酯主鏈修飾、3'端磷酸酯修飾及/或3'烷基取代。

在一些實施例中，偵測探針由於修飾而提高對標靶序列之親和力。此類偵測探針包括長度延長之偵測探針以及含有化學修飾之偵測

探針。此類修飾包括(但不限於)2'-氟(2'-去氧-2'-氟-核苷)修飾、LNA(鎖核酸)、PNA(肽核酸)、ZNA(拉鏈核酸)、嗎啉基、甲基膦酸酯、胺基膦酸酯、聚陽離子結合物及2'-芘修飾。在一些實施例中，偵測探針含有一或多個修飾，包括2'氟修飾(亦稱為2'-去氧-2'-氟-核苷)、LNA(鎖核酸)、PNA(肽核酸)、ZNA(拉鏈核酸)、嗎啉基、甲基膦酸酯、胺基膦酸酯及/或聚陽離子結合物。

在一些實施例中，偵測探針含有可偵測部分，諸如本文所述之可偵測部分以及熟習此項技術者已知之任何可偵測部分。此類可偵測部分包括例如(但不限於)螢光標記及化學發光標記。此類可偵測部分之實例亦可包括FRET對之成員。在一些實施例中，偵測探針含有可偵測實體。

螢光標記之實例包括(但不限於)AMCA、DEAC (7-二乙基胺基香豆素-3-甲酸)；7-羥基-4-甲基香豆素-3；7-羥基香豆素-3；MCA (7-甲氧基香豆素-4-乙酸)；7-甲氧基香豆素-3；AMF (4'-(胺基甲基)螢光素)；5-DTAF (5-(4,6-二氯三嗪基)胺基螢光素)；6-DTAF (6-(4,6-二氯三嗪基)胺基螢光素)；6-FAM (6-羧基螢光素；亦稱為FAM；包括TAQMAN® FAM™)；TAQMAN VIC®；5(6)-FAM屍胺；5-FAM屍胺；5(6)-FAM乙二胺；5-FAM乙二胺；5-FITC (FITC異構體I；螢光素-5-異硫氰酸酯)；5-FITC屍質鹼；螢光素-5-順丁烯二醯亞胺；5-IAF (5-碘乙醯胺基螢光素)；6-JOE (6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基螢光素)；5-CR110 (5-羧基若丹明110)；6-CR110 (6-羧基若丹明110)；5-CR6G (5-羧基若丹明6G)；6-CR6G (6-羧基若丹明6G)；5(6)-羧基若丹明6G屍胺；5(6)-羧基若丹明6G乙二胺；5-ROX (5-羧基-X-若丹明)；

6-ROX (6-羧基-X-若丹明)；5-TAMRA (5-羧基四甲基若丹明)；6-TAMRA (6-羧基四甲基若丹明)；5-TAMRA 屍胺；6-TAMRA 屍胺；5-TAMRA 乙二胺；6-TAMRA 乙二胺；5-TMR C6 順丁烯二醯亞胺；6-TMR C6 順丁烯二醯亞胺；TR C2 順丁烯二醯亞胺；TR 屍胺；5-TRITC；G 異構體(四甲基若丹明-5-異硫氰酸酯)；6-TRITC；R 異構體(四甲基若丹明-6-異硫氰酸酯)；丹磺醯屍胺(5-二甲基胺基萘-1-(N-(5-胺基戊基))磺醯胺)；EDANS C2 順丁烯二醯亞胺；胺螢；NBD；及吡咯亞甲基及其衍生物。

化學發光標記之實例包括(但不限於)用於南方墨點及西方墨點方案之彼等標記(參見例如 Sambrook 及 Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (第3版) (2001)；其以全文引用的方式併入本文中)。實例包括(但不限於)-(2'-螺金剛烷)-4-甲氧基-4-(3"-磷醯氧基)苯基-1,2-二氧雜環丁烷(AMPPD)；經吡啶酯及金剛烷基穩定之1,2-二氧雜環丁烷及其衍生物。

探針之標記為此項技術中已知。使用經標記探針在擴增期間在擴增區域內雜交。探針經修飾以避免其充當擴增用之引子。用兩個螢光染料標記偵測探針，一個螢光染料能夠淬滅其他染料之螢光。一個染料連接於探針之5'端且另一染料連接於固有位點以使得當探針呈非雜交狀態時發生淬滅。

通常，即時PCR探針由染料對(報導染料及受體染料)組成，該等染料參與螢光共振能量轉移(FRET)，由此受體染料淬滅報導染料之發光。一般而言，經螢光標記之探針提高擴增子定量之特異性。

如由熟習此項技術者鑒於本發明確定，用於所揭示方法之一些

實施例中的即時PCR亦包括使用一或多個雜交探針(亦即偵測探針)。作為非限制性實例，此類雜交探針包括(但不限於)所述方法中所提供之雜交探針中之一或多者。熟習此項技術者瞭解例示性探針，諸如HEX通道及/或FAM通道探針。

根據例示性實施例，偵測探針及引子宜例如使用電子雜交分析使用引子設計軟體且交叉引用寄存在美國國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information；NCBI) 的基因及基因組之可獲得的核苷酸資料庫來選擇。在一些實施例中，可使用一些其他準則來選擇引子及/或探針。舉例而言，在一些實施例中，引子及探針經選擇以使得其靠在一起但不重疊。在一些實施例中，引子可具有相同(或接近之 T_M)(例如在約58℃與約60℃之間)。在一些實施例中，探針之 T_M 比選用於引子之 T_M 者高約10℃。在一些實施例中，探針及引子之長度經選擇以在約17個鹼基對與39個鹼基對之間等。在一些情況下，熟習此項技術者使用此等及其他準則來選擇適當引子及/或探針。

適用於本發明方法之探針包括(但不限於)表4中所列之以下例示性探針。

表4：TGFBI基因之例示性探針

探針名稱	SEQ ID NO:	探針序列
正常探針1	SEQ ID NO: 25	VIC-CAC GGA CCG CAC GGA-NFQ (15 bp)
突變體探針1	SEQ ID NO: 26	FAM-CAC GGA CCA CAC GGA-NFQ
正常探針2	SEQ ID NO: 27	VIC-ACA CGG ACC GCA CG-NFQ
突變體探針2	SEQ ID NO: 28	FAM-ACA CGG ACC ACA CG-NFQ (14 bp)
正常探針3	SEQ ID NO: 29	VIC-TAC ACG GAC CGC A-NFQ
突變體探針3	SEQ ID NO: 30	FAM-TAC ACG GAC CAC A-NFQ (13 bp)
正常探針4	SEQ ID NO: 31	VIC-CTG TAC ACG GAC CGC ACG-NFQ

探針名稱	SEQ ID NO:	探針序列
突變體探針4	SEQ ID NO: 32	FAM-CTG TAC ACG GAC CAC ACG-NFQ (18 bp)
正常探針5	SEQ ID NO: 33	VIC-CTG TAC ACG GAC CGC ACG GAG-NFQ
突變體探針5	SEQ ID NO: 34	FAM-CTG TAC ACG GAC CAC ACG GAG-NFQ (21 bp)
正常探針6	SEQ ID NO: 35	VIC-GCT GTA CAC GGA CCG CAC GGA GAA-NFQ
突變體探針6	SEQ ID NO: 36	FAM-GCT GTA CAC GGA CCA CAC GGA GM-NFQ
正常探針7	SEQ ID NO: 37	VIC-ACC GCA CGG AGA AGC-NFQ
突變體探針7	SEQ ID NO: 38	FAM-ACC ACA CGG AGA AGC-NFQ
正常探針8	SEQ ID NO: 39	VIC-ACC GCA CGG AGA AGC TGA GGC-NFQ
突變體探針8	SEQ ID NO: 40	FAM-ACC ACA CGG AGA AGC TGA GGC-NFQ
正常探針9	SEQ ID NO: 41	VIC-ACC GCA CGG AGA AGC TGA GGC CTG-NFQ
突變體探針9	SEQ ID NO: 42	FAM-ACC ACA CGG AGA AGC TGA GGC CTG-NFQ
正常探針10	SEQ ID NO: 45	VIC-CAC CAA GAG AAC GGA-NFQ
突變體探針10	SEQ ID NO: 46	FAM-CAC CAA GAG AAT GG-NFQ
正常探針10a	SEQ ID NO: 47	VIC-CAC CAA GAG AAC GGA G-MGB NFQ
#TGFB1 R124C	SEQ ID NO: 48	FAM-CAC GGA CTG CAC GGA-MGB NFQ
#TGFB1 R124L	SEQ ID NO: 49	FAM-CAC GGA CCT CAC GGA-MGB NFQ
#TGFB1 R555Q-1	SEQ ID NO: 50	FAM-AC CAA GAG AACA GA G--MGB NFQ

VII. 診斷測試

在一些實施例中，使用診斷測試來藉由偵測多種突變中之任一者確定一或多個遺傳病況。在一些實施例中，在基於例如實體表現、病徵及/或症狀以及家族病史資訊懷疑特定病況時使用診斷測試來確認診斷。在一些實施例中，診斷測試之結果輔助熟習醫學技術者確定既定患者之適當治療方案且使得可獲得更個人化且更有效之治療方案。在一些實施例中，如由熟習此項技術者所確定，治療方案包括多種醫藥治療、手術治療、生活方式改變或其組合中之任一者。

藉由所揭示方法獲得之核酸適用於多種診斷測試，包括用於偵測突變(諸如缺失、插入、顛換及轉換)之測試。在一些實施例中，此類診斷適用於鑑別攜帶疾病之基因的一個複本的未感染個體，該疾病

需要兩個複本來進行疾病表現，鑑別攜帶疾病之基因的一個複本的未感染個體，其中該資訊可用於產生治療方案、移植前遺傳診斷、產前診斷測試、新生兒篩選、譜系DNA測試(用於遺傳譜系學目的)、用於預測成人發作型病症(諸如亨廷頓氏病(Huntington's disease))之症狀前測試、用於估計產生成人發作型癌症及阿茲海默氏病(Alzheimer's disease)之風險的症狀前測試、確認性診斷有症狀之個體及/或法醫/身分測試。在一些實施例中，本發明方法可用於偵測角膜營養不良。在一些實施例中，角膜營養不良例如經由偵測阿韋利諾角膜營養不良相關之SNP (諸如引起TGFβI基因中之R124突變的SNP，包括例如(但不限於) TGFβI基因之核苷酸418處由G向A轉變引起且亦稱為C(G/A)C SNP之R124H突變)來偵測。在一些實施例中，角膜營養不良例如經由偵測顆粒狀角膜營養不良相關之SNP (諸如引起TGFβI基因中之R555突變的SNP，包括例如(但不限於) TGFβI基因之核苷酸1663處由C向T轉變引起且亦稱為(C/T)GG SNP之R555W突變)來偵測。在一些實施例中，角膜營養不良例如經由偵測格子狀營養不良相關之SNP (諸如引起TGFβI基因中之R124及/或626突變的SNP，包括例如(但不限於) TGFβI基因之核苷酸417處由C向T轉變引起且亦稱為(C/T)GC SNP之R124C突變或TGFβI基因之核苷酸1924處由A向C轉變引起之H626P突變)來偵測。在一些實施例中，角膜營養不良例如經由偵測瑞斯-巴克勒角膜營養不良相關之SNP (諸如引起TGFβI基因中之R124突變的SNP，包括例如(但不限於) TGFβI基因之核苷酸418處由G向T轉變引起且亦稱為C(G/T)C SNP之R124L突變)來偵測。在一些實施例中，角膜營養不良例如經由偵測蒂爾-本克角膜營養不良相關之SNP (諸如引

起TGF β I基因中之R555突變的SNP，包括例如(但不限於) TGF β I基因之核苷酸1664處由G向A轉變引起且亦稱為C(G/A)G SNP之R555Q突變)來偵測。

在一些實施例中，新生兒篩選包括出生後立即使用以鑑別遺傳病症之任何遺傳篩選。在一些實施例中，新生兒篩選可用於鑑別遺傳病症以使得在生命早期確定治療方案。此類測試包括(但不限於)測試嬰兒之苯酮尿症及先天性甲狀腺功能低下。

在一些實施例中，使用攜帶者測試鑑別攜帶基因突變之單一複本者。在一些情形下，當存在於兩個複本中時，突變可引起遺傳病症。在一些情形下，一個複本足以引起遺傳病症。在一些情形下，存在兩個複本表明特定治療方案之禁忌症，諸如存在阿韋利諾突變及進行手術程序前之預篩選以確保對既定患者實行適當治療方案。在一些實施例中，此類資訊亦適用於考慮生育之個體且輔助個體做出經告知之決策以及輔助熟習醫學技術者向個別患者以及患者親屬提供重要建議。

在一些實施例中，使用預測型及/或症狀前型測試偵測與多種病症有關之基因突變。在一些情形下，此等測試有助於家族成員患有遺傳病症但在測試時可能未展現病症之特徵者。在一些實施例中，預測測試鑑別提高個人產生具有遺傳依據之病症(包括例如(但不限於)某些類型之癌症)的幾率的突變。在一些實施例中，症狀前測試適用於在任何實體病徵或症狀出現前判定個人是否會產生遺傳病症。預測及症狀前測試之結果提供關於個人產生特定病症之風險的資訊且輔助患者以及患者之親屬做出關於適當醫學治療方案之決策。在一些實施例

中，預測測試亦用於偵測表明某些治療方案之禁忌症的突變，諸如存在阿韋利諾突變表明進行LASIK手術及/或其他屈光程序(諸如(但不限於)光治療性角膜切除術(PTK)及/或屈光性角膜切除術(PRK))之禁忌症。舉例而言，展現阿韋利諾突變之患者不應進行LASIK手術或其他屈光程序。

在一些實施例中，診斷測試亦包括藥物基因組學，其包括確定遺傳變化對藥物反應之影響的遺傳測試。來自此類藥物基因組學分析之資訊可用於確定且開發適當治療方案。熟習醫學技術者使用關於遺傳變化存在及/或不存在之資訊設計適當治療方案。

在一些實施例中，使用本發明方法確定遺傳譜之疾病包括(但不限於)眼病、癌症、糖尿病、高血壓、精神分裂症及最常見之先天性畸形(諸如裂唇、裂顎、神經管缺陷、軟骨發育不全)、 α -1抗胰蛋白酶缺乏、抗磷脂症候群、自閉症、常染色體顯性多囊性腎病、恰克-馬利-杜斯氏症(Charcot-Marie-Tooth)、結腸癌、貓叫症候群(Cri du chat)、克羅恩氏病(Crohn's Disease)、囊腫性纖維化、德爾肯氏病(Dercum Disease)、唐氏症候群(Down Syndrome)、杜恩氏症候群(Duane Syndrome)、杜興氏肌肉萎縮症(Duchenne Muscular Dystrophy)、萊登第五因子易栓病(Factor V Leiden Thrombophilia)、家族性高膽固醇血症、家族性地中海熱、X脆折症候群、戈謝病(Gaucher Disease)、血色素沈著症、血友病、前腦無裂畸形、亨廷頓氏病(Huntington's disease)、克氏症候群(Klinefelter syndrome)、馬凡氏症候群(Marfan syndrome)、肌緊張性營養不良、神經纖維瘤、努南氏症候群(N Noonan Syndrome)、成骨不全、帕金森氏病(Parkinson's

disease)、苯酮尿症、波蘭氏異常(Poland Anomaly)、卟啉症、早老症、色素性視網膜炎、嚴重複合免疫缺乏(SCID)、鎌狀細胞疾病、脊髓性肌萎縮、泰薩二氏病(Tay-Sachs)、地中海貧血、三甲基胺尿症、特納症候群(Turner Syndrome)、顎心臉症候群(Velocardiofacial Syndrome)、WAGR症候群、威爾遜氏病(Wilson Disease)以及具有遺傳組分之任何其他疾病。眼病及/或包括眼科組分之病症包括(但不限於)瞼板腺囊腫、瞼腺炎、倒睫、瞼內翻、瞼外翻、兔眼、瞼炎、淚囊炎、眼眶蜂窩織炎、翼狀胬肉、翼狀胬肉角膜營養不良、結膜炎、新生兒眼炎、細菌性角膜潰瘍、真菌性角膜潰瘍、青光眼、富克斯氏營養不良(Fuchs Dystrophy)、圓錐形角膜、黃斑變性晚期、色素性視網膜炎、白內障、視網膜病、黃斑變性、糖尿病性眼部問題(例如糖尿病性視網膜病變)、瞼裂狹小-上瞼下垂-內眥贅皮倒轉症候群(BPES)、眼部皮膚白化症、馬凡氏症候群、斯蒂克勒症候群(Stickler syndrome)及CHARGE(眼組織缺損、心臟異常、後鼻孔閉鎖、生長及發育遲緩、生殖器/泌尿系統異常、耳部異常或聾)症候群。角膜營養不良包括(但不限於)阿韋利諾角膜營養不良、顆粒狀角膜營養不良、格子狀I型角膜營養不良、富克斯營養不良、蒂爾-本克角膜營養不良及瑞斯-巴克勒角膜營養不良。癌症包括(但不限於)癌瘤、肉瘤、母細胞瘤、淋巴瘤、白血病性生殖細胞腫瘤及未知病因之癌症。在一些實施例中，癌症包括(但不限於)頭頸癌、皮膚癌、結腸癌、口腔癌、神經膠母細胞瘤、乳癌、喉癌、食道癌、內皮癌、子宮內膜癌、卵巢癌、肺癌、泌尿生殖器癌、直腸癌、前列腺癌、腎臟癌、黑色素瘤、腎癌、胰臟癌、腸胃癌、血癌、肝癌、子宮癌及腦癌以及病毒誘發性

癌症(諸如乳頭狀瘤病毒誘發性癌症)。

在一些實施例中，本發明方法可藉由提供基因組DNA用於開發個人化醫學治療方案，該基因組DNA用於確定個體之遺傳譜。在一些實施例中，熟習此項技術者使用此類遺傳譜資訊來確定及/或開發治療方案。在一些實施例中，熟習此項技術者使用藉由所述方法分離之核酸中所鑑別之各種遺傳變化及突變的存在及/或不作為個人化醫學治療方案或計劃之一部分。舉例而言，在一些實施例中，將使用所揭示方法獲得之資訊與資料庫或其他現有資訊比較以確定對指定疾病之診斷及或確定治療方案。在一些情形下，將關於特定患者中遺傳突變之存在或不存在的資訊與資料庫或其他標準資訊來源比較以關於所提議之治療方案做出決定。在一些情形下，遺傳突變之存在表明實行特定治療方案。在一些情形下，遺傳突變之不存在表明不實行特定治療方案。

在一些實施例中，使用關於特定遺傳突變之存在及/或不存在的資訊確定對治療實體之治療的治療功效以及調適對治療實體之治療的治療方案。在一些實施例中，使用關於遺傳突變之存在及/或不存在的資訊判定是否實行治療方案。在一些實施例中，使用關於遺傳突變之存在及/或不存在的資訊判定是否繼續治療方案。在一些實施例中，使用遺傳突變之存在及/或不存在的資訊判定是否停止治療方案。在其他實施例中，使用遺傳突變之存在及/或不存在的資訊判定是否修改治療方案。在一些實施例中，使用遺傳突變之存在及/或不存在的資訊判定是否增加或減少作為治療方案之一部分投與之治療的劑量。在其他實施例中，使用遺傳突變之存在及/或不存在的資訊判定是否改變作為治療方案之

一部分投與之治療的給藥頻率。在一些實施例中，使用遺傳突變之存在及/或不存在的判定是否改變治療之每天、每週劑量數、每天之次數。在一些實施例中，使用遺傳突變之存在及/或不存在的判定是否改變治療之劑量。在一些實施例中，在開始治療方案前及/或在已開始治療方案後判定遺傳突變之存在及/或不存在的。在一些實施例中，判定遺傳突變之存在及/或不存在的且與關於遺傳突變之存在或不存在的預定標準資訊比較。

在一些實施例中，使用所揭示方法產生一個以上遺傳突變之存在及/或不存在的複合結果且此類複合結果包括關於一個以上遺傳突變之存在及/或不存在的任何資訊集合。在一些實施例中，檢測2個或2個以上、3個或3個以上、4個或4個以上、5個或5個以上、6個或6個以上、7個或7個以上、8個或8個以上、9個或9個以上、10個或10個以上、20個或20個以上、30個或30個以上個或40個或40個以上遺傳突變之存在或不存在的且用於產生複合結果。在一些實施例中，例示性資訊包括核酸或蛋白質資訊，或關於核酸及/或蛋白質遺傳突變之資訊兩者的組合。一般而言，複合結果包括關於遺傳突變之存在及/或不存在的資訊。在一些實施例中，使用此等複合結果與預定標準資訊比較以實行、維持或停止治療方案。

在一些實施例中，角膜營養不良例如經由偵測2、3、4或5個選自(但不限於)阿韋利諾角膜營養不良相關之SNP、顆粒狀角膜營養不良相關之SNP、格子狀營養不良相關之SNP、瑞斯-巴克勒角膜營養不良相關之SNP及/或蒂爾-本克角膜營養不良相關之SNP的SNP來偵測。在一些實施例中，角膜營養不良例如經由偵測阿韋利諾角膜營養不良

相關之SNP以及顆粒狀角膜營養不良相關之SNP、格子狀營養不良相關之SNP、瑞斯-巴克勒角膜營養不良相關之SNP及/或蒂爾-本克角膜營養不良相關之SNP來偵測。在一些實施例中，角膜營養不良例如經由偵測顆粒狀角膜營養不良相關之SNP以及阿韋利諾角膜營養不良相關之SNP、格子狀營養不良相關之SNP、瑞斯-巴克勒角膜營養不良相關之SNP及/或蒂爾-本克角膜營養不良相關之SNP來偵測。在一些實施例中，例如經由偵測格子狀營養不良相關之SNP以及阿韋利諾角膜營養不良相關之SNP、顆粒狀角膜營養不良相關之SNP、瑞斯-巴克勒角膜營養不良相關之SNP及/或蒂爾-本克角膜營養不良相關之SNP來偵測角膜營養不良。在一些實施例中，角膜營養不良例如經由偵測瑞斯-巴克勒角膜營養不良相關之SNP以及阿韋利諾角膜營養不良相關之SNP、顆粒狀角膜營養不良相關之SNP、格子狀營養不良相關之SNP及/或蒂爾-本克角膜營養不良相關之SNP來偵測。在一些實施例中，角膜營養不良例如經由偵測蒂爾-本克角膜營養不良相關之SNP以及阿韋利諾角膜營養不良相關之SNP、顆粒狀角膜營養不良相關之SNP、格子狀營養不良相關之SNP及/或瑞斯-巴克勒角膜營養不良相關之SNP來偵測。

在一些實施例中，角膜營養不良例如經由偵測2、3、4、5及/或6個選自阿韋利諾角膜營養不良相關之SNP的SNP來偵測。在一些實施例中，SNP包括在由人類TGF β I基因編碼之多肽之位置124、555及/或626處產生突變的SNP。此等突變包括引起TGF β I基因中之R124突變的突變(包括例如(但不限於)TGF β I基因之核苷酸418處由G向A轉變引起且亦稱為C(G/A)C SNP的R124H突變)；顆粒狀角膜營養不良相關之

SNP，諸如引起TGFβI基因中之R555突變的SNP(包括例如(但不限於)TGFβI基因之核苷酸1663處由C向T轉變引起且亦稱為(C/T)GG SNP的R555W突變)；格子狀營養不良相關之SNP，諸如引起TGFβI基因中之R124突變的SNP(包括例如(但不限於)TGFβI基因之核苷酸417處由C向T轉變引起且亦稱為(C/T)GC SNP的R124C突變)；瑞斯-巴克勒角膜營養不良之SNP，諸如引起TGFβI基因中之R124突變的SNP(包括例如(但不限於)TGFβI基因之核苷酸418處由G向T轉變引起且亦稱為C(G/T)C SNP的R124L突變)；及/或蒂爾-本克角膜營養不良之SNP，諸如引起TGFβI基因中之R555突變的SNP(包括例如(但不限於)TGFβI基因之核苷酸1664處由G向A轉變引起且亦稱為C(G/A)G SNP的R555Q突變)。在一些實施例中，角膜營養不良例如經由偵測阿韋利諾角膜營養不良相關之SNP(諸如引起TGFβI基因中之R124突變的SNP，包括例如(但不限於)TGFβI基因之核苷酸418處由G向A轉變引起且亦稱為C(G/A)C SNP的R124H突變)以及顆粒狀角膜營養不良相關之SNP(諸如引起TGFβI基因中之R555突變的SNP，包括例如(但不限於)TGFβI基因之核苷酸1663處由C向T轉變引起且亦稱為(C/T)GG SNP的R555W突變)來偵測。在一些實施例中，角膜營養不良例如經由偵測阿韋利諾角膜營養不良相關之SNP(諸如引起TGFβI基因中之H626P突變的SNP，包括例如(但不限於)TGFβI基因之核苷酸1924處由A向C轉變引起之H626P突變)來偵測。

在一些實施例中，角膜營養不良例如經由偵測R124C、R124H、R124L、R555W、R555Q及/或H626P中之2、3、4、5及/或6者來偵測。在一些實施例中，角膜營養不良例如經由偵測R124C、R124H、

R124L、R555W及/或R555Q中之2、3、4及/或5者來偵測。在一些實施例中，角膜營養不良例如經由偵測R124C以及R124H、R124L、R555W及/或R555Q中之一或多者來偵測。在一些實施例中，角膜營養不良例如經由偵測R124H以及R124C、R124L、R555W及/或R555Q中之一或多者來偵測。在一些實施例中，角膜營養不良例如經由偵測R555W以及R124C、R124H、R124L及/或R555Q中之一或多者來偵測。在一些實施例中，角膜營養不良例如經由偵測R555Q以及R124C、R124H、R124L及/或R555W中之一或多者來偵測。在一些實施例中，偵測R124H以及R555W。在一些實施例中，角膜營養不良例如經由偵測H262P以及R124C、R124H、R124L、R555W及/或R555Q中之一或多者來偵測。在一些實施例中，偵測R124C、R124H、R124L、R555W及/或R555Q中之全部。在一些實施例中，偵測R124C、R124H、R124L、R555W、R555Q及/或H626P中之全部。

VIII. 診斷套組

在一些實施例中，上述試劑中之任一者或全部封裝在診斷套組中。此類套組包括引子、探針、緩衝液及/或本文所述其他試劑之任何組合中的任一者及/或全部。在一些實施例中，套組包括用於偵測R124C、R124H、R124L、R555W、R555Q及/或H626P中之2、3、4、5及/或6者的試劑。在一些實施例中，套組包括用於偵測R124C、R124H、R124L、R555W及R555Q中之2、3、4及/或5者的試劑。在一些實施例中，套組包括用於偵測R124C、R124H及R124L之試劑。在一些實施例中，套組包括用於偵測R555W及R555Q之試劑。在一些實施例中，套組包括用於偵測R124C之試劑。在一些實施例中，套組包

括用於偵測 R124H 之試劑。在一些實施例中，套組包括用於偵測 R124L 之試劑。在一些實施例中，套組包括用於偵測 R555W 之試劑。在一些實施例中，套組包括用於偵測 R555Q 之試劑。

在一些實施例中，套組包括用於偵測 R124C、R124H、R124L、R555W、R555Q 及/或 H626P 中之 2、3、4、5 及/或 6 者的引子及探針。在一些實施例中，套組包括用於偵測 R124C、R124H、R124L、R555W 及 R555Q 中之 2、3、4 及/或 5 者的引子及探針。在一些實施例中，套組包括用於偵測 R124C、R124H 及 R124L 之引子及探針。在一些實施例中，套組包括用於偵測 R555W 及 R555Q 之引子及探針。在一些實施例中，套組包括用於偵測 R124C 之引子及探針。在一些實施例中，套組包括用於偵測 R124H 之引子及探針。在一些實施例中，套組包括用於偵測 R124L 之引子及探針。在一些實施例中，套組包括用於偵測 R555W 之引子及探針。在一些實施例中，套組包括用於偵測 R555Q 之引子及探針。在一些實施例中，套組包括用於偵測 H626P 之引子及探針。

在一些實施例中，試劑以凍乾粉形式包括在套組中。在一些實施例中，試劑以凍乾粉形式與復原說明一起包括在套組中。在一些實施例中，試劑以液體形式包括在套組中。在一些實施例中，試劑包括在塑膠及/或玻璃瓶或其他適當容器中。在一些實施例中，引子及探針均包含在套組中之個別容器中。在一些實施例中，引子一起封裝在一個容器中，且探針一起封裝在另一容器中。在一些實施例中，引子及探針一起封裝在單一容器中。

在一些實施例中，套組進一步包括對照 gDNA 及/或 DNA 檢體。在

一些實施例中，所包括之對照DNA檢體為正常TGFB1 R124。在一些實施例中，所包括之對照DNA檢體對應於所偵測之突變，包括R124C、R124H、R124L、R555W、R555Q及/或H626P。在一些實施例中，包括對應於正常TGFB1 R124之對照DNA檢體及對應於R124C、R124H、R124L、R555W、R555Q及/或H626P之突變體DNA檢體。在一些實施例中，包括對應於正常TGFB1 R124之對照DNA檢體及對應於R124C、R124H、R124L、R555W及/或R555Q之突變體DNA檢體。在一些實施例中，包括對應於正常TGFB1 R124之對照DNA及對應於R124C、R124H及/或R124L之突變體DNA檢體。在一些實施例中，包括對應於正常TGFB1 R124之對照DNA檢體及對應於R555W及/或R555Q之突變體DNA檢體。在一些實施例中，包括對應於正常TGFB1 R124之對照DNA檢體及對應於R124C之突變體DNA檢體。在一些實施例中，包括對應於正常TGFB1 R124之對照DNA檢體及對應於R124H之突變體DNA檢體。在一些實施例中，包括對應於正常TGFB1 R124之對照DNA檢體及對應於R124L之突變體DNA檢體。在一些實施例中，包括對應於正常TGFB1 R124之對照DNA檢體及對應於R555W之突變體DNA檢體。在一些實施例中，包括對應於正常TGFB1 R124之對照DNA檢體及對應於R555Q之突變體DNA檢體。在一些實施例中，包括對應於正常TGFB1 R124之對照DNA檢體及對應於H626P之突變體DNA檢體。在一些實施例中，對照DNA檢體之濃度為5 ng/ μ L、10 ng/ μ L、20 ng/ μ L、30 ng/ μ L、40 ng/ μ L、50 ng/ μ L、60 ng/ μ L、70 ng/ μ L、80 ng/ μ L、90 ng/ μ L、100 ng/ μ L、110 ng/ μ L、120 ng/ μ L、130 ng/ μ L、140 ng/ μ L、150 ng/ μ L、160 ng/ μ L、170 ng/ μ L、

180 ng/ μ L、190 ng/ μ L或200 ng/ μ L。在一些實施例中，對照DNA檢體之濃度為50 ng/ μ L、100 ng/ μ L、150 ng/ μ L或200 ng/ μ L。在一些實施例中，對照DNA檢體濃度為100 ng/ μ L。在一些實施例中，對照DNA檢體具有相同濃度。在一些實施例中，對照DNA檢體具有不同濃度。

在一些實施例中，套組可進一步包括緩衝液，例如 GTXpressTAQMAN®試劑混合物或任何等效緩衝液。在一些實施例中，緩衝液包括本文所述之任何緩衝液。

在一些實施例中，套組可進一步包括用於選殖之試劑，諸如載體(包括例如M13載體)。

在一些實施例中，套組進一步包括用於純化DNA之試劑。

在一些實施例中，套組進一步包括使用套組偵測個體之角膜營養不良的說明。在一些實施例中，此等說明包括本文所述之方案的各種態樣。

實例

實例1：DNA提取(DNA提取全試劑，ThermoFisher)

如下所述且根據本文所提供之揭示內容自口腔上皮或毛根或全血提取DNA。

為自口腔上皮或毛根提取DNA，首先在1×PBS 300 μ L中預處理檢體。隨後，將30 μ L溶解溶液添加至管中且使混合物渦旋。隨後在95°C下培育混合物3分鐘。接著，添加30 μ L DNA穩定溶液(來自Life Technologies/Thermo Scientific,USA)且使混合物渦旋。隨後將混合物在13,000 RPM下離心1分鐘。

為自全血提取DNA，以3 μL全血為起始物質，首先在1×PBS 300 μL中預處理檢體。隨後，將30 μL溶解溶液添加至管中且使混合物渦旋。隨後在95℃下培育混合物3分鐘。接著，添加30 μL DNA穩定溶液(來自Life Technologies/Thermo Scientific,USA)且使混合物渦旋。隨後將混合物在13,000 RPM下離心1分鐘。

以上程序完成後，使用市售 Tecan® Infinite® 200 PRO NanoQuant讀取DNA濃度。為進行定量，將100 μL溶離劑吸於透明96孔盤中。隨後，向孔H12中添加100 μL所製備之空白溶液。隨後使用與NanoQuant一起提供之製造商之說明讀取濃度。

使用以下在表5及6中所述之探針及引子製備反應混合物。

表5：探針序列

探針	序列
正常TGFB1 R124 (SEQ ID NO: 25)	VIC-CAC GGA CCG CAC GGA-MGB NFQ
TGFB1 R124H (SEQ ID NO:26)	FAM-CAC GGA CCA CAC GGA-MGB NFQ
TGFB1 R124C (SEQ ID NO: 48)	FAM-CAC GGA CTG CAC GGA-MGB NFQ
TGFB1 R124L (SEQ ID NO:49)	FAM-CAC GGA CCT CAC GGA-MGB NFQ
正常TGFB1 R555 (SEQ ID NO:45)	VIC-CAC CAA GAG AAC GGA-MGB NFQ
TGFB1 R555W (SEQ ID NO:46)	FAM-CAC CAA GAG AAT GG-MGB NFQ
TGFB1 R555Q (SEQ ID NO:50)	FAM-AC CAA GAG AAC AGA G-MGB NFQ

表6：引子序列

引子	序列
TGFB1 124 F (SEQ ID NO:1)	TCC ACC ACC ACT CAG CTG TA
TGFB1 124 R (SEQ ID NO:2)	CCA TCT CAG GCC TCA GCT T
TGFB1 555 F (SEQ ID NO:43)	ACA CAG TCT TTG CTC CCA CAA A
TGFB1 555 R (SEQ ID NO:44)	ACT TAA GTT GGT CTT TAC CCA AGA GTC T

例示性反應混合物中所用之組分及比率如下展示於表7中。

表7：反應混合物

全試劑抽出物(全血)		3.00 μl
GTXpress TaqMan®		10.00 μl
引子(124R) (反向)	10 pMol	0.50 μl
引子(124F) (正向)	10 pMol	0.50 μl
引子(555R) (反向)	10 pMol	0.50 μl

引子(555F) (正向)	10 pMol	0.50 µl
探針(NL/VIC)	10 pMol	0.20 µl
探針(R124H/FAM)	10 pMol	0.30 µl
探針(R124C/FAM)	10 pMol	0.20 µl
探針(R124L/FAM)	10 pMol	0.50 µl
探針(R555N/VIC)	10 pMol	0.20 µl
探針(R555Q-1/FAM)	10 pMol	0.20 µl
探針(R555W/FAM)	10 pMol	0.20 µl
DW		3.20 µl

例示性PCR循環條件如下展示於表8中。

表8：PCR循環

前讀取	保持階段	循環階段 40個循環		後讀取
60°C	95°C	95°C	64°C	60°C
1分鐘	20秒	3秒	30秒	1分鐘

使用以上方案產生圖4至圖8中所提供之即時PCR資料。

引用

所有標題及章節名稱僅用於清晰及參考目的，且不應認為以任何方式限制本發明。舉例而言，熟習此項技術者應瞭解根據本文所述之本發明之精神及範疇按需要組合來自不同標題之各種態樣的有用性。

本文中引用之所有參考文獻以全文引用之方式且出於所有目的併入本文中，其引用程度如同各個別公開案或專利或專利申請案經特別且個別地表明以全文引用的方式併入本文中以用於所有目的一般。

如熟習此項技術者顯而易見，在不背離本申請案之精神及範疇的情況下可對其進行多種修改及改變。本文所述之特定實施例及實例僅以實例方式提供，且本申請案僅由隨附申請專利範圍之各項以及申請專利範圍所授權之等效物的全部範疇限制。

【符號說明】

無

TGFβ1基因序列(NCBI參考編號NG_012646.1)

1 gcttgcccgt cggtcgctag ctgcgtcggt gcgcgtcgtc ccgctccatg gcgctcttcg
61 tgcggctgct ggctctcgcc ctggctcttg ccttggggcc ccgcgcgacc ctggcggttc
121 ccgccaagtc gccctaccag ctggtgctgc agcacagcag gctccggggc cgccagcacg
181 ggtaagccga gccgcctggc caggggctgc ggaaggtcag gtagtcgggg ctccgagcgc
241 aagccgctgg gggcattgaa ctgggctggg ggcgcgaggg acaaagcccc aactaaaaac
301 cttgcagcat ggagcgctcg gacaccagcc ctgcacgcgg tggaaaggaga gagggaggga
361 ggtggaggac catggaggga aagcgggagg ccgcgcgttt gtagaaggga gtggggaagt
421 ggaccagaga ctttcgacgc aggccaaagag cctgagacgg acagcgcttt cagcttctcc
481 tcccagccac tgcagaaagg gggaaatggc aactctttgg ccataatcac cgtgggaggg
541 tgccaagggc aaagcccacc cagcagtaca cctattccaa ccagccagg cccccggcca
601 gcgactccag acaagaacct gggccacaca cgggtggcagc atctaagggtg ccccaggctc
661 ctgtgctcct ggccaggccc tgcactcaga cactgctggc acccgacact gctctctggg
721 tacagcaagg gcaatgtggc acttcttgtc ctgcccgatg aagagcagga gaatgcactg
781 ggccctcaca cacactgttc aaatggggaa actgagtcct gagtgttcc actttcccac
841 agtcctgaag tgtgcaactg agccaggatt ggagtcctgtc ttaaagtaat agctgggttt
901 gtaaatgtag gacactatca ttgcaggaaat tcctttgaga ccctgaagat gtgttggett
961 taggagacaa actcaagcag aaggtctggt ctgatagtgg ccctaatact gaccaggca
1021 gaggcaggca acatttctac ctcaaaaaac aggccatacc tgcgtcacia ataccaggc
1081 tttgctgcag ctccagcct acctggttgc accaacttct ttttcataac taggtaaac
1141 tatatatgag tagaatcttg tagtgactcc tcagaggaag cctaaatacc atcggggtct
1201 ggcgttcaca ccacaagca atgcccacac ctccaagaga ctgggcagat ctgtgctcaa
1261 atcaaaaactc attgttgggg gtgatagagt tgacttcaca ggccctgaaa gtcttggtc
1321 ctgactagtg gactgctctg ggtacgggta caggctgccc ctgttagggc atagttgctc
1381 ttgtttcctc tactgttggc tttatgggtc aggcctttca ggagtgtgg gctctggcgg
1441 agagggcctg ctgggagcac atctggccac cctgcagagt gaaatcaaac caggcctggc
1501 tgcaacctca acaccctcct ggaaagagga gaatactggg gatatactgg ggtctttctg
1561 gaagtgggag aatcagcttt gacttgggca gtgtgcagaa tagagtgagg ggggatgtca
1621 gaaagatgag agggatatga ggcccaaca tcaaaatgca agcacctggc atttttatta
1681 tctctgccc cctctccgtt ggtctctctg cctttcctgc caatgaattg tgttatgttt
1741 ggggtgctca atttgcctag gagggttcta tttctctgt atcttcgcca ctaagtccag
1801 agaagatcct tatagcatgc cctgcaacag tgtcacctgt aagggcactc ctctgcacag
1861 ccacagtga ggatcctcaa aggtattgag ggctttccat caagagccat ctttacagca
1921 aacctctttc ccttcagagc ccagaagagt gctgaccagc tggaaaacag ggtttttttc
1981 ttaaatgcag atgctcttga ttatgagttc cagatattag atcaacttcc ccaccatacc
2041 cctgcaggca aagcctctta attagcttcc tgcagcacag ctggaaaggc ctattgtaat
2101 ctgtgatggg cagagtaatc taagaagtca caggagcacc cctgtcccag tagaatctgg
2161 atgcgcaggc acatgaacca tggcaaaatg gttgcaggca cagttgtatt tactctgatc
2221 taactgtccc tgttaatgcc acagggtgct ctggcctggc acacagggct gtggcgctt
2281 gtgcaaatgg ataacgttgt tctagctcca gcctttcatt caaagtgaac actgttagaa
2341 aggggaaggaa aactttgcta ttttaaggaa ttgtagcgtg ctgcctgata tgaaggaaga
2401 aataacagct gtgccttgct tgtgcgcagc actcgattgc cgcttttgct ttcgacctca
2461 ccacaacaca gtgagatcta ctgttcatgt tccattttta caggaggtga aactgcagct
2521 tagtgaggta gagagtgact tagttcagac acagaatgct gttgggagag taataactat
2581 gatatggtct cttgactccc agctatatct gtgttgctat agggaagggg aaaaataata
2641 ctgaaagaga agtaaaaata caatcacact tccaaacatc aaccaccaa aactgaactg
2701 aatttcctga agcacttggt tttcaaactc aagctgaaca tcaatgctgt tattcttgag
2761 gcccagaagc aacttgctca tttcaattaa gcttcagcat gaacttccta tgtacacagc
2821 ccaccacac tcccgatgt gagaaggaga gggtcacagc cggccccagc ctctgctgct
2881 gccacaagga cagcagcagt ggaaacattc agcaaaggaa tgttgaggcc acatccacaa
2941 gagactcact gaagattcgc caaacgccta cggaaagtgg cagggaattc attgacagta
3001 attgtttcct gcttgatcag attgaagagc ttctgggatt ctgtaacaat aaataggacc
3061 gggggctgga gtatggccag caaggactct tcagggggta ttcagggact gtctaacctg
3121 tgaatcctag gcagcaaaca gaaaccaggg attcagaaat ctggaggatt tggtcaggcc
3181 cagctaggac tagggaggca tgggcctctg ctggctgtgg tcccttctcc agccttcaact
3241 tctcttgtcc ctagatcctt acatggatcc attaatgctc attgtccctc ctgggccac
3301 tcactttcac ctgttgaaca aaaaactggc caagagggtg cagtcatatc accgcagaag
3361 agacagggca gagaaatgaa ggggcagaat ggactccac ccaaaagcct gactctgaat
3421 atttgagaat tgttcaagtt cctgcagagg aatcatgatg gggacagtag gtgtagtttt
3481 tactgcaata ttggtgtctt cttaaacaaat acgctgcaca tcaagtgatg tctgtggatg

3541 gcattctttaa agtaacaggg aaattgatgt taaagaaata cttcatcctt tgggtgatac
3601 ctgaagttct ctgagcttgg aggtcttgtg aaagcoctca gtattgtttg ttttatttgc
3661 tttcctctga cttgtgatcc agtcagatgc atgcctgcct ctggctcagg aagatcaacc
3721 ctctcctgac tgaccacgcc tctcctgact gaccaogtag cacagcagct tcctttccct
3781 aggggctcct aatgaagctt tcacaatcac ctggcctgag cacagtttgg gtcaggactt
3841 ggtatacttg aaaaaaacat gcaaaaccaa aatcctgtgg ttctggaaaa ggcttcttag
3901 cagaaccccc agacattttac actctgcttt ttcacagggg ccctgaggat tctttggatc
3961 tgggtagttt ggggagcagt attttcaaca agttcatttc gtgctccttc tacaccctgc
4021 ctggatgcta ggccccatct agaatgtgaa caacagaaca aggcagaaca cttgtcctca
4081 aggttctgtt gagtgttaga tgcagagaag agacaccccc cacctccccg catcacttac
4141 aggaattctg tttggaaccc aacatcaaat aaggaccgta tccactgtca gaggatggga
4201 agcagcatgt catctgggac attggagaaa ggctcctggg ggaagtggga cttgagctgt
4261 gatctaagta atgaacaact gagagttaaa tgggagagca tccctatca ggtcctgag
4321 agcaaccagc catggtttaa accagctata aagcctcggg tttatagga agacagtaac
4381 aatggcttgt ctttgggagc caagcagctg gtccaggcat gcagagcatg tctgtatgga
4441 gagctgcctg agagatgctt ttgtttacac ttatcaattg cccatgtcaa agaagatat
4501 gtacatgaag ttacatcagt atgtaagaga gatttttaaca atttttgcag gggaagcttt
4561 catgggggct gatgggaatc taggtaaaca gaaccaaagt ctaaaaccaa gatatcccca
4621 gtaccaagac tgaaatgact ctctcctcta tctctagaaa gttccagtga cccaaggagg
4681 caaacacgat gggagtcatc aaagtggggg ggacgtgctg atcatcttcc taattctgct
4741 gcttttgttt tcagcccca cgtgtgtgct gtgcagaagg ttattggcac taataggaag
4801 tacttcacca actgcaagca gtggtacca aggaaaatct gtggcaaatc aacgtgagta
4861 tctgtaacca gccaggagac caagctgtat gcacgctggc tgcagttccc cagggcctgg
4921 gccagccttc tagaaggta ggttgcctaa aaagccatga agatgcagtg gcgaacatgt
4981 ctgggacctg cgtgctaggg agtggcattt ttaggaagct ggccaatttt gttttgcatt
5041 ttttaaggctg ctgacaagac ttggagacat ttttcagggc tgggttgggt ttgcaagaaa
5101 catgaaacac tgctgtgtgt tgtgtgtgtg tgtgtttctc aatcctcata aaataatata
5161 gatatgcagt ggagaagcca ccagcatgtg actctggaaa agaaagccca ttggtgaatc
5221 tgtactaaag aatgccatcc ctatcttaca gtcttaagg gtcttaagg aaacacccca aaaagactta
5281 gagcaactaa catatgcaga ttatgagaca gcatagcata taatatttgc acagacttcc
5341 tcattcaaac cctagctcta cctgggccag tcgattcacc tttagaaccc tccattgctt
5401 tacctgaaaa gttcgtataa caaaaggacc caccttatgg ggttgttaca aggattgaat
5461 gaaataatgt acataagaga ctgaatatgg tgcccagcat atatcagtg tcaataaatg
5521 ctagctacta ttattattat caccctagat ttgcaaatct agaccacaca agcagaagta
5581 agagtgcaca cggggtgtgg accagtgtgg ttacaatagg gcttgttgat gtctgtttca
5641 gcaaggaggg aggcagcttt taccctactg ccagctccc tgggtggaatc aggtgcagtg
5701 tctaacaatt ctggggaaac ctaatctgtt ttggcactgt caacagatct caaagctggc
5761 tgtctcctat agctaggaag atgtgtatga caaatctcct gagccacttg tgaaggcctg
5821 accttctctc tgtctccata cataatggga tgattaagaa actctaagcc actctcttaa
5881 gcacttttca atgttaggga tttttaagtt tattgttgtg acattgcttt tgagcagaca
5941 tctctcccaa tttaatagcc aactgaaaga agagaaaatg ctcttctcct aaactgtatg
6001 tggaaataaa tattccaatg tgtgacctg attatgttag gcaattagca atcctaatat
6061 gaattgaggg aagttgggat tcatggcaca gctggggaga taccagcagt cctggggagc
6121 ctgtccaggg caggtccatg gcagcttgc ccatgcctga ttgacagccc agcctgcaag
6181 ctaaaagtgt agtgagctag gaggacacac tgccaagatt cagctaacag acaccagcg
6241 atattcttgc tgotatgaac aaaaggagac tatgcaaatt atacaccacc cattcttcca
6301 ggatgcctga cttaaaaaat aagaaaaaag atgggcccgg cacagtggct cagcctgta
6361 atcccaacac tttgggaggg cgaggtgggc ggatcacaag gtcaggagac agagaccatc
6421 ctggctaaca tggtgaaacc ccgtctctac taaaaaaata caaaaatatt agcgggctg
6481 gtggcgggca cctgtagtcc cagctactcg ggaggctgag gcaggagaat ggcgtgaacc
6541 tgggaggcgg agcttgcatg gagccaagat cgtgccactg cagtccagcc tgggtgacag
6601 agtgagacac cgtctcaaaa aaaaaaaaaa aaaaagaaaa gaaaaccttt agtactgatt
6661 gattttttcc catgtgtgta tattatctac tcaaattaac aattaattac ttaattaaac
6721 acaaaagcag gcctcaccta attgcttctt ggaaggtgac cagagtgtca gtgccaagca
6781 acaactctt ctatatctca agagccctgg gcttcagagg gccatcttt ttgttaattc
6841 aagtttctct gaaaatggag acccgtttat gatgacaagc tggctacagg gtgcatctg
6901 ccacactgtt tcgggggtgc cgctgggctg aagcatttgc ccagctagtt aacaatagct
6961 cgataacatt ccctatcagt gtccaggctg agaatactgt cagtgatgag tcgcttggc
7021 tcttgtacct gtatcttgt gtgccaggac aaggcacaag caacagagct gtgtgttgc
7081 aaaatgttcc tgatgagcag gtcaacccct cgggggcagg tttggalatg ataagtgtg
7141 gatgtggtgg cgcagctccc ttaccctagt agcacaaggg gagtctctca ggaaaaggaa

7201 gaaatgtctg gatgaggtgg ggagatgggg ttcagagtgg actcaggcaa agcccgatgc
7261 ccagtcaccag ctgtttggcct agtctcacaa agccagaagg atatgacatt tacattcaac
7321 tcttgaattt gtggccactg ctttgggcaa cttcaaagag agaaaatgaa gatagaaaaa
7381 tattattttga tataaaactt ctaggacaag agaggccctt cctggaacat tacatgtagt
7441 attaggaagg tggagctgcc ctggaaaaga tccagagaac tcagagagag gaagaggtgg
7501 aacccatctc tgttcttcta gagagctcag taagagtggc ttggcagggc tctgtgtac
7561 ctgagaccaa gaccagttag gaggctactg tctgaccacc atacggtcag aattcagtgc
7621 catgggtggg caggtgggaa ggggagagga ctgtgctggc tggagttgat gttatcctgg
7681 ggaaagtagg tccctagatg cctttagttg agtgaggagc agactgggaa atgggagcac
7741 agtagtggtt ggggcaaaaa ggactgtctc tgcattgaggt ccataggcag ttggaatttt
7801 ctcagcaaga ctccagagaa ggaggctgga gcagaggtgt atgttgggat gaaaaggagt
7861 aaagtatcat gggggaggag gcagctcagg ttgtcaaggg tcaagaaacc agaaggagaa
7921 tttcaccttg gaagcagaca acgggtacca agcatacagg ggaatacttt gtggtgagag
7981 gtcacacaga gatacaggag ccgacctggt gagacaggag cctggagcca cctgcctgct
8041 tttgtgaggc cccagactcc actgctatca tcaggtgaag ctctgtttgc tgcacacaaa
8101 agcttttctg catttacaac gagagaaggg cctgagtttc tgggtgcaatg cgtcaagctg
8161 acatatggac tttattacag gaagtgggta ccagtgggtc cctatttagt ggctgttatt
8221 gtgaatttta ttgttcggaa attcacttta gcattttatt cagatcctaa atagcaccgg
8281 agtgatacaa tggctaata aacaaagagg gctgtgggga gcagacagtc agcatcccc
8341 tctgtgattt caggccctgg tttgattagt agccataaaa ttttttacgt gtggcacttt
8401 gagcaaagggt gcaggaaatt gtggtcagga agcctggctg cctctcgaca ggcttccctt
8461 gtgctagccc cagggagagg aggcctatct aacagccaag tccaagttga catcatggga
8521 ctggaatagt catagcagga gctcagacat cataaacgtg gcatagggag ggctggtgga
8581 ggagctagcg ggtatgggtg gcagctatcc attccaaaag tcttgaaatt gtttcacgag
8641 caacacattt cacaagtgcg aagcccttct ctggagccaa gatgagctgg cagagcactc
8701 ctgtttctct agtagcaagt gttcctttgc ccaggggcaa aaatattaat actccttcag
8761 cactgcatta atgcttaaag atttaacttt taaagagatc agctggtgca tggtcgagct
8821 tttccatcag ctggcagggc tttttcagta ggtgtccttc tgggcagggc actggggaca
8881 gctgacgtga aggtgaagaa gagctgtcgt tttcctcctt tatatcccac aaccttggtc
8941 ccaagaggaa aaaaaagaag atggtgagaa gtcatccaag cagaccccag acccatacta
9001 gtgctcctt tctgttttca tatcctgtg cagccagctg ggatctcttg aataatctgc
9061 tctgggggca ctgagattgg acatacacca aacagcggag atcgaccaa cgcctctggt
9121 gggcaggtgt tctgaggtt tctgtcccat tctgtaaact aggaggtga ctagctgaca
9181 aggaatttta ttctgttggg tattttacatg aacctatgtg ccacctgggg taagaccctg
9241 tggtaggtag aaacatgact tcccaaaaat gtccacatcc taatctctaa ttctgtaaat
9301 atattccctt actggaaaaa gagactttgc aggtgtgatt aaattaagga tcataagagg
9361 gagagattat ccaggattat ttgatgagtc taatataatc atcagggtac ttaaaagagg
9421 gaggcaggct gtgcctggtg gttcacgcct ttaatcccag cactttggga gactgaggcg
9481 agcgggtcac gaggacagga gttggagacc agcctgacca acatggtgaa actccccctc
9541 tagtaaaaaa aaaaatacaa aaattagcca ggcattggtg tacacacctg taatcccagc
9601 tactcaggag gctgaggcgg gagaattgct tgaaccagag aggcagaggt tgtggtgagc
9661 tgagatcgca ccactgccct ccagcctggg caacagagca agactccatc tcaaaaaaaa
9721 aaaaagaggg aggcagtggg atcagagtca gagaaggcaa cgtgatgatg aaagctgaca
9781 tttgagtgat gcaaccacaa gccaaaggaat gcaggcagct tctcaaagct ggaaaggagc
9841 agcaatggat tottccctac agcctctgtg aggaatgcag cctttgattt taaccccata
9901 aggcogattt ctgactctag cctctggaat tgtaagataa tttgcatgat ctcaagccac
9961 taaattttgtg gtaattttgtc acagaaagca atgggaagcc aacacaggcc ttattttgtg
10021 acttatagat gcatttttct ttattttcaat gtacttttat caatgggtctc atgtagggta
10081 ttgctttcaa tgaagatatt aacatagttt caactttaag gttttatatc ggagtttctt
10141 tagaagcttc acaactgacc acttagtaaa cagtaagcat ctgttaagtg cttctcatat
10201 gtaagttcat tcaatttctca caatcacact ataagataaa tatgattatt agccatttta
10261 catgagagga gacaggctca aaagactttt atgcaacctg gtcaaagtca ttcactggta
10321 agctgaggag gtctgtccac ttctttttgc tgccccaggg ggggtatcaag cctggcagtt
10381 agtgtcagcg acttagggag tgaacaagtg agcaggcctg taggacctgg ctaaaactgc
10441 ccaggctctc gtctacagcc tcaaacctgt ggctgtgggt ccagagaca aggcctcctc
10501 agcatcagag aaggatgcct ttgtctcagg gtcatacaac ttctccaggt tgcaccccc
10561 ctgctgtaaa ggggatcccc aagaccgctc atcagacaag gagcttggga actgaggaga
10621 cacagtcagc ctccaggagt gcccaaatg cctcacaatg ctgcatacag attgccacaa
10681 ataaagtaca tccacattct gaagactctg tctcatcac caaccaggct ggccctggtt
10741 gagggctgta gtggttgagg cctttgttgg tagacagtag gttaaagcaa gccatgattt
10801 tctattggga ggcttcagaa tcagctcagc tgtgtttcca agaccaggag ggcagaaagc

10861 aaaccatccc aggcaagcag tccatggggc atgtcagatg tctagacgtt atgggtctgt
10921 gtttgctctg ccattcctct cggaaactat gatgccctgt atggttttacc ttcagtcaca
10981 ggtgactggc ctacaggggc attccttggt ccaacgactt ctcgagtata attaatcccc
11041 aggcattttac ggccagagca gccggccaaa tccgtgaagt gcagtggttg ttttaaatta
11101 tattaacttc ttggaaactt attttaggga gagaaaactc agtacttctc tctatccaat
11161 cttgagtaaa aatgttagaa gggactggtg gagagcctcc cagacatccc tacacataga
11221 ctttggttg acattatctc tttgcaacct ccttgaaact ttcttctaaa ttaggtgect
11281 tccctaattt aggcaccttc ccagtactag tctgtgacct gttaggaacc aggccacaca
11341 gcaggagttg agtggcaggg agtgagcatt attgcctgag ctccgcctcc tgtcagatca
11401 gcagtggcat tagattctca tagcagtcg aatactattg tgaactgtgc gtgtaaggga
11461 tctagcttgt gcattcctta tgagaatcta atgcccgatg gtctgagatg gaagagtttc
11521 ataccaaaac cacccttccc ccttgccacc atctggggaa atattgtcta ccacgaaact
11581 gatccctggt gccaaaaagg ttggggaccg ctgtcctaag ggatctgctt tttctgacct
11641 gaggtttttc tttattagac tgtatctggc tgaggagaag cctgaagcct ttaatcggaa
11701 cagctttggc tgatgagatt agattcagaa accaacagat tggctttttc tatgcaggga
11761 agcctaggaa ctggggggct atggtctgga agccccctat tgtttccatc ctttccatg
11821 ttcactctgg aggaatggca tcagacctat gcctctgtga ttgctcccag cccatccaac
11881 cacagcatct atgttctgcc tgggaccagg gccagggagc atggcacact gagctgagta
11941 taaggagagt ggagcaggcc actgccagcc cagaaaattt tggccaaagt tgctgaaat
12001 cttctcagcc ttcgattcac agctgctctc tgctgctctg gggccatgca gaccagttca
12061 gaaaagagtt aatttggttg ggcagttgga ggcaggtgga ctgccagctt tgacaccttc
12121 ccagcccaca ggctgctgca ctggggctga aggcgtggct aacccttgca cacctagaga
12181 gtgacagaga tgccagactg ggcagcagga aggcaagagg attaagagag agcttccctg
12241 ctgaaagcca cactcggtta accaggaaaa agcccttggc acgagaagac tcagtggcct
12301 gagggactga gccttggttg ttgggcatgt gctgcataag ccatccatgt gtgacagtag
12361 agtgtagtcc agccactgtg ggacatgggt gctgaaaagac cacatggaga ggaacagtga
12421 gtgctgacaa gggctagcct tgatcacttt ggagacaccc cctgtgtctt ctagatgtca
12481 gactttccaa atctgtctgc tctctccaa acgtgcattt tcaagagcaa tggaaaaagg
12541 attggaettg atggaatgca gcaagagtc taggtctgtt actacctacc tatgacctta
12601 agaaaactct tcacccctca gaacccttac agctttcttt ctgattctat cctgagttac
12661 tctactccaa gctgagactt ttctgcttag atctatccct tcttctaaa cccccaacct
12721 ccatttctcc tgggtctctt ctttacacac cctcagcat acacacacac ctagccacag
12781 gaaccaatga gttaatattt gaggagttgg ttttcttttg gatggaactc agaagccaac
12841 aggccacttg agctgttcag ctcccttgcg gtattttggg gatggaactc agaagccaac
12901 aatatagaaa aagagtcttt ggccagcttt cccaggggct ccatgccata gagagtactg
12961 caccctgttg cacagggggc cctgacatga ggaactttgag gataacacta ttcctccaac
13021 tctgcttcag catctccatg gattttcaca cagacacttt aggaaagaaa ctaagtttg
13081 ggggacttga cctaattcca catcacagcc ccagtaatac agccctggaa tttatcacag
13141 aaagcctaga atcccatgca tatcccatgc atatgcattc ctagtccat ggggtcaagg
13201 cttggagctc tccctggatt tagctgggaa aagttggcag acagttcttc tctgtcttct
13261 agaaatatgg actagaatcg tgagtgtgag attgcaagta acttttaaaa tcatctagtt
13321 taacttcacc ccatttcata gaccaagaaa ctgagaccag agagagaaat ggactttcaa
13381 gttcacctcg ctagtactg atggatcaca agtcaaactc cctgattcta gcactgtttc
13441 tcttacacca caccaccttt gaaagtgtgt caatcaaata ttactttagt tgcagaggat
13501 gacttttagtt tctgaagata aaattgtgag tcaatcaaga tgagtcctaa gacaatagcc
13561 tgttttagccc ttataagttc agggatgaaa ggttagaaaag aaacaggatg gaaggaggac
13621 tggagaaaaa aacaaaagag gaaggaagga ggaggaagca aacaggaaaa aaaaagaatg
13681 tgcatagctt gtcactcctc agtcatttcc tgggagccca tttctagcaa agtgacagct
13741 gcaactccct ggccacctga gcatcttagc tgatctgtct ctgaaacacc cctggagaa
13801 cagatgaatc aggttctatc ttgccttaac taagtcttcc ctgagacgac tccattttaa
13861 tgaacaagag caggatttcc tgggcacact gagagcacct tccagaggcc cctccagagc
13921 cctaaagcct gtatttcttc cagtcggcct gtttctttcc tgggtgatgtc attaaacgcc
13981 ctttgagagt cccacagtga gcagttctgc ggtaaaaacc gctgcaatta aagtctgagt
14041 ccttctctgt ctcaaaggcc atattcatat agaagaaaag aaaaggaaag actggctgtt
14101 tgcatttggt tccaggcctg ttgagtagag gtogtgctca ctccaccgaa ggtacagggt
14161 agccttcagc agaacctggg gatttggttt taagcaagtc tttcttaggt gtgggctttc
14221 agaacacttc cttccttgca atattatttg aaattctcag tgttttagcc gtcccagaa
14281 tattggttcg ttaaagctgt gtatttcaga tctccagaca gtggtcactg tttgtatatt
14341 ttcaatttca aaccagaaaa caaaagttct tattgattac tttttttatt taaaaataa
14401 aaagtaagta tcttcgtaag aggagctttg ttttaatttt aaagtttaaa atttgattgt
14461 gaagacagag aaaaacttga tgattgtaga tatattcccc tctttggcta ttcaatcaga

14521 gaactagaaa atcatgagag atttaatgac cactgcctga tacacatatg tgtttttacag
14581 atgaggaaac tgagaccacag agagatgatg aaattggctg aggatggccc agctgggtcag
14641 tgaaagactc agagccagag ctggtgcagg gctctttcta ttccttccctg ttccctttca
14701 ggaacactca ccatcggtt tccgtgtgaat aatggtgaga taaaatccctt ggtgcattat
14761 gttttctagt cacaacattg actaggctgc cagagtcctc tgttctccca gttggttggc
14821 tgtaggtgtt ggcagccgcc aggagcattc tacagaacag aggaggagtg agactctcct
14881 tgctcaggaa aggcagacct atgacttagc aaataactcc taagaggaga gtgtttccacc
14941 caccattcct ctctccttggc tgtggaggca acttagtgga gaggggccag atgacctgtg
15001 aggaacagtg aagccctgcc taacacaatg tatggttgtc ttgttacaga gtcatcagct
15061 acgagtgtcg tccctggatat gaaaaggctc ctggggagaa gggctgtcca gcagggtgaat
15121 gaatcctccg ggccttgccct gttggtgtgg gtggaaggga atgggtggag agaggagtac
15181 ccacataaaa ggcagcagag gctgaatggg ggcagtggca caaggacatg gcattctccc
15241 cacgtgcccc ctggccccag gctctatggc aggggctgag gaatggaagc tggaaacagc
15301 gcatttccctg agctgctcct cctggcctcc ttaccacact ggtggagttag actccaactg
15361 tggcctgtcc atgcccctcc cagcaggcac aggcctcaggc tcaggctcctt ggcctctgcc
15421 tctggctggg agtgattcta aacacatcca gcagggtcag cctgatagcc catcagtttc
15481 cgatcagctc tgctagagag ccgatgggat gtgggaggag ggggtcactg gtgggctggc
15541 aaccccaagc catccccatc tccctctgtg tctaaacttg gccctttgga gttcggtagg
15601 gagaagagcc ataggccagg tgggctcacc cagagtcagc agagagtcctc acaaattggtt
15661 gcaactggcg aaagacagca tggcacctgt gaattttatt agagcttttc ttttagtgct
15721 acacacaagt gactgtacag gggagttagt attttgtttt aattttgaaa tagagtcac
15781 ttttggtatc tgcgggggat tgattctagg acccattcta ggatgccata tccctcagatg
15841 ttcaagtccc tgatataaag tggatatagta tttgcatgta atctatgcat attcttccat
15901 gtactttaaa tcatctcaag attacttata ataccaaata taatgtaaat cctatgtaag
15961 tagttgttat accctctttt aaatttttgt attatctttt attgtatttc aaaaaatatt
16021 tttggtccat gtttagttga atctgtgggt gaagaacca cagatacgaa gggccaactg
16081 tattggctat ttttttagtt aagaatgtga gactgaggcc aggcgcagtg gctcatgcct
16141 ttgattccag cactttggga ggccaagagg ggacgatcac ctgagccaag aattcgagac
16201 cagcagcccg tgcaacatag tgagaccttg tctcttaaag attgtgagac tgggctgggc
16261 acggtggctc acgcctgtaa tccatgacct ttgggaggcc aaggcagggtg gatcaactga
16321 ggtcaggagt ttgagatcag cctggctaac atagtgaac tctgtctcta ctaaaaaatc
16381 aaaaaaatta gctgggtgtg gtggtggcg cctataatcc cagctactca gaggctgag
16441 gcaggagaat cgcttgatc caggagggcg aggttgcatg gagctgagat agggccgttg
16501 cactccagcc tgggcaagaa gagcaaaact ccatctcaaa aataaataaa taaataaata
16561 aataaatcat gagactgaga cataacagga aggagggcaa tttggttggg tccaaggttc
16621 cttagagtat tgatgggaga ggttggtgct ggtggggcca tggaggtagt gactcaagtg
16681 gagggacagg tggggaaatg ggatgggaaa agaagattga ccttagaagg ggagctcaac
16741 ctctgaaccc taatttcaga ccttcaaaa tgaatattaa gctcattttg gtctaagaaa
16801 caaaaaacaa atgaacatga aactcatttt ggtcttataa ggtctgagaa accccttcta
16861 aacttcaagc tgctttaaga aataacattt tattacctgc aaatacacac agtactttgg
16921 agatttataa tagtctotta ttctaataga agccattagg gaaccagttt caataaacag
16981 gtaaactctgt aagactagtt tgtaattagg atatctgttt ccagtgtcca ttcctgcctc
17041 tgttatctaa atgtctggga acaagagctg tgctctgctg tgtttaaaat gattaaaaat
17101 caccaattag ttgagttcac gtagacaggc atttgactta ttgagttgtt ttaagaagac
17161 tataacaagc cttaagcccc ccagaaacag cctgtctttg ggctttccca catgcctcct
17221 cgtcctctcc acctgtagat gtacogtgc ctctgtcaga gaaggagggt tgtggttggg
17281 ctggaccccc agaggccatc cctccttctg tctctgtctc ctgcagccct accactctca
17341 aacctttacg agaccctggg agtcgttggg tccaccacca ctgagctgta cacggaccgc
17401 acggagaagc tgaggccctga gatggagggg cccggcagct tcaccatctt cgcctctagc
17461 aacgaggcct gggcctcctt gccagctgtg agatgacctc cgtctgcccg ggggactctt
17521 atggggaact gccttacttc cccgaggggt gggcatgatg aatgggagtc tgcagtcatt
17581 tccactgttt tcaggaaagt ttctccttaa ccccttagaa aaggctgtgg aacttgagct
17641 aaaatatgtc ttaccaggtt gcgtctaatt ccccccgttc cctactgggc agaaagactt
17701 ggggtgcttc tgaggaggga tccctggcag aagagaggcc tgggctcacg agggctgaga
17761 acatgtttcc cagagttgca aggacccatc tcttaaaccac agagtctgca gccctaact
17821 gacacctgt ccttccctcc aggaagtgtt ggactccctg gtcagcaatg tcaacattga
17881 gctgctcaat gccctccgct accatatggg gggcaggcga gtccctgactg atgagctgaa
17941 acacggcatg accctcacct ctatgtacca gaattccaac atccagatcc accactatcc
18001 taatggggta ggggatcccc agccatactg catggccctt ggtgcataat gaaccatttt
18061 ctgttccatg tgtgggctgg tttctggggg ttaagctgta gacaaccac cctctttgtg
18121 cctgcttctc cttgggcccc ctattccaca gcttgtggaa cccacatttt gctactgtgt

18181	ttgaaaacac	tgtttttctcc	tcccggggct	ttgggactat	gcctctgttg	tgttgactgc
18241	tcattccttg	tgtttctctg	ggcagattgt	aactgtgaac	tgtgcccggc	tgttgaaagc
18301	cgaccaccat	gcaaccaacg	gggtggtgca	cctcatcgat	aagggtcatct	ccaccatcac
18361	caacaacatc	cagcagatca	ttgagatcga	ggacaccttt	gagacccttc	gggtaaggga
18421	ctgccctggg	tggaggccca	ggcttgggac	acattgcctc	ccaagagggg	cctagcagga
18481	actcttctgc	aggagaggta	gaggatggct	cctgtagggg	aacatagage	aggttccctt
18541	gaatgccctt	gaacatggag	aattcattga	ccagacattc	agcttgacct	aacctgtgaa
18601	attctccatc	ttctttataa	agtgttcctt	tccttgcttc	ccctggaaag	gtcagtgggtg
18661	tgtggctgca	gcagcacagt	gtcctctgag	ccctggacct	gcactgtggc	ttccagaggt
18721	ggcagttccc	acatggggta	ctagaataaa	tggcctatca	ggctgtgtgt	gctttgggat
18781	acatgtccc	cacctagga	ccctggttcc	aaccatacgc	atgttctctt	ggagcccaga
18841	acagcagga	agccaccagt	gtggacacag	aagtcaaggg	tctgatttcc	agcctggctt
18901	ctgactgctc	tggggccgca	ggaatacggg	tccttcccc	atgcccgca	ggcatttgct
18961	ttacaactgg	aggggaaggc	atgttcctct	tggcaaggac	tgctcaggag	gaagtggagg
19021	caggctgccc	tgtcagggtt	tttgccctga	ttcaaggaga	acttcctaac	cacaaaggat
19081	acaagtggga	gtgaggcgga	ccctccctag	agatctccaa	cacagagaga	caaacacgct
19141	ggggctggct	ggcactgaca	ggcctcgag	gtgtggatgg	ctgttagctg	ggagcttcgc
19201	tgtctaagct	cctctcccat	gcttttcttc	tgggttgctc	gaaggacggg	ggtctgcaag
19261	aaaatgatgt	tcccacatag	ttggcagcac	gtgaacagca	attgatccct	ttgcatacc
19321	tcctcttact	gttttagattt	ggtaaatatt	tcttcccttc	ctcttctgac	cctccatttt
19381	gccgatcttt	ccttcttata	acacatactt	actaggtacc	tgctaacttc	cgggtggggc
19441	tatgtgccag	gagtatagag	gtgaacaagg	aaggcaaagt	tctattctca	gtagagctaa
19501	tactctatct	ggagagagac	aacaaacaaa	tcaacaaggg	agccaggggc	tgtgataatt
19561	tatgtcaagt	gggcaggtaa	atcgggagtg	acagtagtgc	agggaggatt	ggaaagtcag
19621	ggagtctctt	ctggaggagg	tggcttttga	tctgcagcct	aaaggatgag	aatgggtcca
19681	ttatacaaaa	tgtcggggca	agagcacacc	cagtagaggg	gagagtaata	gcaaaggctc
19741	agggcaggaa	gggcaaggga	gaggccagtg	ggtgagggtca	catgtgaagg	gcatacaatg
19801	ggcaaagaca	aggccagagt	ggccaggccc	aatcctccag	gacttgacga	cctgggaaag
19861	agtgcattct	catcctggga	gcagcaggaa	accactcagg	cctttagaag	atccttcttg
19921	cagctgtgta	gagaatgggt	ggtgtgatcc	ttccatgcat	gggtcatgt	acgtgattac
19981	cagtaactgt	cgagtgcag	tgtgaggagg	gctgcaagcc	atgagtgtag	gcacagcaga
20041	cagactcacc	tttgtctggc	ggtgagatgg	ggtgggaagt	gtgccaagtt	gacctcccaa
20101	agaaatgata	ttttagtggg	agaatgaata	gaatcagaga	agcaaagtta	gagggaagag
20161	cagagaggac	agcagggaca	aggacttggg	ggcagggaaga	ggaaaggcag	gttaaggaca
20221	tgaagatgg	ccaggetggc	tggagctcag	gccagcaag	gccccctggg	ggccatggtc
20281	atgggtgagc	ttgggttttg	cttctgtttt	cgtcttgggc	ttctgtgaaa	gcctogagcc
20341	cttgcgggga	accagtgaag	ctgtgtgtgc	atcttctgtg	gggagtgcc	gagtcttcag
20401	ggagcactcc	atcttctctc	ctccccacag	gctgctgtgg	ctgcatcagg	gctcaacacg
20461	atgcttgaag	gtaacggcca	gtacacgctt	ttggccccga	ccaatgaggc	cttcgagaag
20521	atccctagtg	agactttgaa	cogtatcctg	ggcgaccacg	aagccctgag	aggtgagcat
20581	cctttggctc	ctgctgtctc	ctcatttgtg	cagctagatt	gagcccaaga	cctgctctgg
20641	tccaagatga	acataccacc	tgccatgagg	tgaccctcag	gatatccact	gcagccatgg
20701	gctggggctc	tcctgtcctg	ttgcttcagc	taaccgtgtc	tctagcagcc	acactactct
20761	gagggctgac	tacagaatcc	agcagctttt	gtctgggaga	gctggactga	agagaggcat
20821	agctggagac	ccatagctgg	ccctggccag	aaacagggag	agtgaaggc	tggaaatagcc
20881	aaggccagag	caaggctaat	aggtagagca	acagcttaca	ggtgtggggg	tggcagatac
20941	tggcaccctt	gaaatggatt	cctcatgccc	acgcttcact	attcttctct	gtggctaggg
21001	gatttatgga	ttaaaccaaaa	ttacagttaa	aaaccagcca	taggccaggc	acagtgaactc
21061	acgcctttta	tatcagcact	ttgggaggac	aagggtggcg	gatcacctga	gatctggaat
21121	ttgagaccag	cctggccaac	atggcgaaac	cccattctcta	ctaaaaatac	aaaaatttagc
21181	tgggcatggg	ggtgggcacc	tgtaatccca	gttactcagg	ggctgaggca	ggagaaccac
21241	ttgaaccagc	gaggtggagg	ttcagtgag	ccaagcttgc	accactgcac	tcagcctgg
21301	gtgacacag	gacactccgt	ctcaagaaaa	aaaaaaaaaa	aaacagttat	agtgtcaac
21361	ttttgactct	ccatttcaga	tttgcgtcatg	ccctcctcaa	tgagctgcta	agttaggcag
21421	tgcattgatt	attgctgcag	gagaggggaag	gaaggagcta	acgtgttttc	acatgttttc
21481	cttttgagga	tgagaaagga	ggactctgcc	ttccccctac	cctgccccct	tctactccag
21541	gacctctgaa	aggccatgag	cacaaagctg	ctgcctgagt	ccctgaaat	gcagggtacg
21601	ccccaggtct	ctgatgtacc	ccaccacact	tttctctcta	aacatattcc	aggatcactt
21661	gatttctttt	gaatctattt	aaaccacccg	tgtcaatgtg	ctatataaaa	tgtctaattgc
21721	atttcagaca	ccctatacat	ctatacattt	aaagtgttct	ccttctatct	gtgcagggat
21781	gggaaagggc	atattttctga	aagcacagat	gggaagacgg	gatttgttcc	gtgtccaggt

21841 gattatggta cctctatgcg cctggccggc actggggaca gaggccatga aaatgaatac
21901 agcacagcct ttgctccaa gaaacttaag acctagtaga aatggcaggc tttaaaacag
21961 gttgttggga tctgatttgg tgagtgaat gacagagata ctacagcac aaaatgggga
22021 atgagggcgg gcattgggac acacatagcc ttaaggggcc caaaggcttt tagaactgta
22081 ttccctatta aaacatgatt tgcacagagc acattctttg ctttggagac ctcagaactc
22141 cttactatag gccgggcatg gttataatcc cagcactttg ggaagccaag gccgggcagat
22201 cacttgaggc tgagagttca agaccagcct ggccaacatg gtaaaacccc gtctctacta
22261 aaaatacaaa aattagctgg gtgtggtggt ggccacctgt aatcccagct actcaggagg
22321 ctgaggtagg agaatcaact gaacctggga ggcagaagtt gcaataagcc cagatcatgc
22381 cactgcactc cagcctgggc aacaaagcta gactctctca aaagaaaaaa acaaaacaaa
22441 acaaaacaaa acaaaaaaaaaa ctcttatta taaactgtaa gaaaaaaaag gccctactt
22501 cgtccctttt gcaaatctgc cttttcctac tactaacca gctggttcag agcaaggaca
22561 ctctgtttgg tgccatcgct gcagactgga aggaagaggt ccttgcccca caccacacag
22621 tctcctgctg ttaccggcag gttggcaggc aggcaggcga gaagcagcca gggctggtgg
22681 tgtgtccagt ttgaagacta gtttccagcc ctggccctgc tcaccctcca agtggccctg
22741 gcaggttcct ctaccacatc ttggacttca ccttccttct ctaagaagct caatccocaa
22801 ggccctcatc ccataggcct tctcaccctt tttctttccc tctggtgaa tgtggccagc
22861 acgggcttcc aaggccatca actcgtctgc agcagcccca tgccctgcag ggccctcagag
22921 cttcctcctg cctatgacag tgtggttttg gttcccacac ttgggatcag attgaaactc
22981 gcctccgtgg tgagaatatg ggacatagag cctcggtgac cttggtgagc agcagtcacg
23041 gccacctgct cagcctgggg ttgggggggg ctctctctcc ttgactggtc cttgcatttg
23101 cctccatcca gcctgtctgg gctctccgag gcaatggaga ccagcaggag tcacgatggg
23161 tcaggagccc cctttgggcc tcagccctgc cctgcccct aaagtagcac ttggataagc
23221 aaataaatta ttatacttac tatttatggg tgtggtgaat gggatggcaa aggccaaagtc
23281 ttactgatca ccaaacctta agatataatc tggcagctag tagacccttg ggctaaatga
23341 acagaaaact ggacaaataa agtgtagaca aataactcaa agctgtcatt tgtacacttt
23401 tcgtcttttc ctactacagt ttacattttt ataaagggtg gtagatttct aaaatcccgt
23461 ggtaggctct cttgagtttt tcttgtatcc ctgaagttca gctacaaata agctaatac
23521 taacatttgt tgagcattta ctctgttgc aggccctagg agatgaatgc aattcttatg tccacttgac
23581 atttcatgtc atccccacag cagccctagg aatgactctc ccagggtccc acagctggaa
23641 tgataaggaa gttgaggttc aaagaggcta atgactctc cagaaggcga ggaggatctg
23701 agtggccaca gggccccagc tggttttcta gggcagcagg gagagaacag gatcctcaca
23761 ggccctgtgg tgccccagcc tcacttgagg gtccctcatc gtggaccctg acttgacctg
23821 gcactggcag gctgcaagtg gtccctgagg ttatcgtgga gtggaccctg acttgacctg
23881 agtctgtttg gaccccagac ctctgtaga accacatctt gaagtgcagt atgtgtgctg
23941 aagccatcgt tgccgggctg tctgtagaga ccctggaggg cagcacactg ggggtggct
24001 gcagcgggga catgctcact atcaacggga agcgatcat ctccaataaa gacatcctag
24061 ccaccaacgg ggtgatccac tacattgatg agctactcat ccagactca ggtaggccag
24121 gcctccgggg gccttgggcc tgccctggcc accatctctt ctgccatcct ttgtggcggg
24181 ggaggggaaa ttcagagatc tttgggcgac ttcctgcct ggaccagct cacagcttct
24241 cggccactgc aaatgtgtgg gttgtgacca gactgatgtg tcttgagctt caggcttgca
24301 agtgcagtgg agaggcagtg gggagctatt gaaggggtct ggggacagac tcaatcacag
24361 aggcctttca gaagatctgc ctgctgtgca tgggcaaaga gggccacttg ctgacctcag
24421 agcatgtgct ttctcagtag tgcccaagct gtcccatggt cactgaccca gttagaatga
24481 ctgaatggac tttggcttgt gtctcattag gaatcctagc cccattctag tottccagtg
24541 agatctgtcc atgagtgaag gaatctcaca ggaaaaaca aaatgcttct atgggtgtgg
24601 ttgctggcct tatctacacc acagaagcca tcacacagac tgtctttctt cccattgtta
24661 gaatgtgccc tgaccaagca gccacaggg cctgggacag aggetgatct ctgcctaact
24721 gagctcacct ctccctccctc tcctcctgac tggttagatt ttctagggtg ctgttcccct
24781 gatgacacaa gcccgctggg cccagcagct gtttagaggg gttgttgact cagagatga
24841 cattcctgct gatgtgtgtc atgccctggg gtggatgaat gataaatgaa aacagcgctt
24901 ttaacttttg aacccacttt ctccctcctt gtagccaaga cactatttga attggtgca
24961 gagtctgatg tgtccacagc cattgacctt ttcagacaag ccggcctcgg caatcatctc
25021 tctggaagtg agcggttgac cctcctggct ccctgaatt ctgtattcaa aggtaacatg
25081 ggggaaggcat ccctgttaga ttgtccctgg aggcagcttc cccacccctg tcacotocac
25141 aacactctcc gatttacagc accccatggg acattagaac ttccactcag tcaacocaaa
25201 agcagatgtg acttcagcag aaacttcaga ggctctgttg tttcattagg cagtgcagag
25261 aatgcctttg gggagccggt cctcagaact caagacttga catctgggag gcagccgttc
25321 ctcagaactc aagacttgac atctgggaga gcagagcatt cccttgccct tctatttgca
25381 gggctcacttg ccaatgtata gtcaagaggt cagagtggag gtacagctga gctgcagccc
25441 caggaaggca gagaaggggg ccaagttgtg tgcgtgcctg cccttccctc ttagggcaaa

25501 actccaaaca cccttgatta tctggatctt ctttaattct ccatagaaga taccagatgt
25561 taaggaatat tggcagcttc acttggtttc tcaatccctg tttccaaact caaggaggga
25621 tgggcttttt cactgtattt atctctcatc actctcttca ttgcaggagc acatctctct
25681 ggacctaacc atcacccttt cttgtagatg gaacccctcc aattgatgcc catacaagga
25741 atttgcttcg gaaccacata attaaagacc agctggcctc taagtatctg taccatggac
25801 agaccctgga aactctgggc ggcaaaaaac tgagagtttt tgtttatcgt aatgtaagtt
25861 ctgggtccta aatcatgctc ctgggaagct ccttactgtg ggacttgat tagtgtaaaa
25921 aaaaatgtcc tcaataagca ggagtttgca tgagaactgg ttgctgacaa ggaaggaaat
25981 aatttctgga aaatatagat aacaaaatga gatcctgcag aaggattgga atctcttttt
26041 ctggaggcct ttgagaataa accacacaat tatccaacct gtattgtgaa ggaataagtc
26101 cttcttgaat tcaggaatta acacctggga ggaggatgg agttcagact cttctgagc
26161 ttatgagaag agaagccccc taaactaaaa tacagccctc cttgggtccaa aagggtgcctt
26221 ctctcttctg ctgtatcttc tttgttttca aacccaacag ttaccctgga aatcaaaaag
26281 gaagtacaac tcaacatagc tcttgccctg gaccaaccag caccatttgg ctaaagatgg
26341 ttatcatctg ttaacaaaag aaataaataa atgggttcaa cgtattttatt tcaacattgt
26401 caatggacct catgtgtaac tgatattctc attatgggac ctctgtgtga ctttatttggg
26461 gcctctctaa ccgttctttc ctttaaggaa accattttatt gttttatttc ctggagaaaa
26521 tacatcattt tatcccagcc ttaataaccc atcccagtg atactccttc atcttcatgg
26581 ataatgaccc tgctacatgc tctgaacaaa tcaggaggcc cctcgtggaa gtataaccag
26641 tcctttcttt ctctgtccct cttctgtgca gagcctctgc attgagaaca gctgcacgc
26701 ggcccacgac aagaggggga ggtacgggac cctgttcacg atggaccggg tgcagacccc
26761 cccaatgggg actgtcatgg atgtcctgaa gggagacaat cgcttttaggt aattagttcc
26821 atccccgggt ggagcttctg cccagtggtc atgctggagt gggatgtggg gccccagcta
26881 tttgtcaagc tttcttctac cttggggatt caattaacac tagcagtgca ctgctgcgac
26941 cttccagact tgggatgggg aaaaggcaag ggtcgccctg aaagcttaca ttgggaagaa
27001 gggttacttc taagagtgt atcttcacat gcatgggaag cagggagggg ggactacatt
27061 tttatgactg aagtgaagg aaaacatcac cctctcattg taaagctcca agtgagccaa
27121 gagcacatag tttacagtgc acgatgagcc tctcactctc tgcgcagtat ctggtttattg
27181 caactgaagc acccttgtga gtttgttttc ttgcccggt atctccattt ctgacttget
27241 cattcacctt ggggtgctgt catattgaat gtttcctgt cactgacttc agccacctgc
27301 acaaggcctt ggagaccaca cccctctgcc ctcccagaat catatccctg gaggctcagc
27361 tagtctctgg gtcagccata cctctgccct tcttttccc tcctttctcc tgtggcctct
27421 gacgtctggc catttaacag agcttagcat ttttgcctgg tggagagagc tggagcctgg
27481 aatcactccc tctttgtgca tacggagggc atgaaaacca aggtgtgtgc attccagtgg
27541 cctggactct actatcctca gtggtgaggt atttaaggaa aatacctctc agcgtggtga
27601 ggtattttaag gaaaatacct gttgacaggt gacattttct gtgtgtgtat ctacagcatg
27661 ctggtagctg ccatccagtc tgcaggactg acggagaccc tcaaccggga aggagtctac
27721 acagtctttg ctcccacaaa tgaagccttc cgagccctgc caccaagaga acggagcaga
27781 ctcttgggta aagaccaact taagtacacg tctccatttt tctaaagtag tgatccctca
27841 gggccccagc agcaaacagt tggcacatca aggattgact tgaagggatt ttatgacaag
27901 actattagtg aaagagtggg cgggactaaa ggaactagca aaggatgagg ccaaccaggg
27961 actagcaacc ctgggaagcc tttactaccc ctaggcctgg gggaatggga ggatgagagc
28021 aggaaccagg gaggtcatga gccttggaca agggcacaga acagcagcca gagccatgtg
28081 cagccagcca ctgtcagaac catgcaaggg ggaacctca gcgcccagc ctcctctca
28141 gacagttgcc atctgggtct cttgttggct gatgcgagag caggaggagg cccactgatg
28201 cagttcatag agctcagcct cctgggcagg aaaccgggca gagaggagta gaaaagaatt
28261 aagggtggct gcgaccagcc cagtcaactga ggcacgtttc ccactggaga cctatgagca
28321 cagtataat aaagccagtt acctgcaact actatccctc cagacaaaag ctttcccaag
28381 aagttagtca tggctctgag agatctagtt gaggatgttt ggcaggggat ctagtggtta
28441 cgggtggcta agaaaaatga ggaaggtgag agtatcttgc agcctgtgtt gggaggatta
28501 aataggtatg cacacacagg gccaggcaga cagcctggtc agtaatagcc atgacgatgg
28561 gggcgggggg agcaggaatg ggagttgcag tgttttagctc agatgcacgc ctgtgagaga
28621 tgcttccact ctcacagaaa gatgagacca aggaaaagga ggaggaagag gaaggacctt
28681 gacaaacctt ggggccaca ttgtctacac ctcccttcc gctctagagc agaatagaaa
28741 gttcaggttg caggcagctc taagttgaat tctgttccctg ttttaattttc tttattgcta
28801 aatgaatgcc tgtgtctgtg atgtgacgt atgttccctaa ggagagggga gaagttcatt
28861 ctgaacataa acttttctac ctctctctgt ccagcaagaa tggaatatcc ccaagtggc
28921 ctgagccagc ttggctttct ttttgttttc aattatgtgg gagttgagga gggggatggg
28981 aaaagcttcc caaacacacc ctccccagg cctgaggcac cctggggga cagagagtgt
29041 tagaggttg tacaggtgtt agagatattg aaaggacatc ccatgcaccc caggggctgg
29101 tgtggctctg tacttccagg caatattttg tggaagggga accttgtcag ctccaggttg

29161 tggatgtttg aaaatcagtt ggtacccagt ggctccatcc tctggcaggc atgtggattt
29221 gtcaataacc aagtgaactc tccaaaataa gttaaaactt cctcccttct cagtttcaag
29281 atgotggaaa tagctgttca taagccctgg ggaaatttag ccctttggct ggtaatggga
29341 gtatccgaga tgagagggca gctggaaact ttcggaatga cctcccacac ttaatttggg
29401 aaatgcctct gcacctttat gggcaaccag atgcctgccc cagttgctgg agacactgat
29461 gtgggctgaa aggaatgctg agacgtgacg aggagagatg ctgcgagggg aatatcccc
29521 tcagccctga cctcatcggc tccatggctc ctccacagta cagctgtcta ctcttttaag
29581 ttctcccttc aggaaatagc catctcaaac agaatgtgca tttagaggga gaatgtgtaa
29641 atattgcact actgtgttat aaccgtcagg agccatgctg atgatgaaac gtcccagatg
29701 ccggtgctgg aaaggccctt ggctttccaa gcaaataatt atctcatgga aacatgagtc
29761 atactcacag aggagtatgg attaaactct tctcagcagc cagggagccc agcatcccag
29821 acagcatatt taacccagag gccaaactgac tgctggggca gatttgtggt atgaacatg
29881 tgccttctgt cctctgacca tttagacagat tgtgggtcac aacgttgagt atacagtggg
29941 agcttaataa gtgctttatc cctgggcagg gatttcttca tttcaggggg gaccacttac
30001 atcttctcct ctggggccctc cttgaccagg ctaattacca ttcttgggat taactctatc
30061 tccttttccc gcaacctgca ggagatgcc aaggacttgc caacatcctg aaataaccaca
30121 ttggtgatga aatcctgggt agcggaggga tggggccct ggtgaggcta aagtctctcc
30181 aaggtgacaa gctggaagtc agcttggtaa gtgtcctgca aatcaaaggc tggctaaatt
30241 tccccagggc agggctccag gacatatctc acccccagga tggattata cacacacaac
30301 cttcaagttg cagcccgaa ctctgagtg aattcgtcca aagaaaaaga gaaaagagaa
30361 gagggctctc agggaaatca agtgagatca tagttagaca tgagtaagaa cttccagatt
30421 tacaagggaa tagagcatct gatttggcat ctgagagagg ctattagatc ttctctctct
30481 taaggagggt gtaggcaact agttatgtga ctgaagagat cagtctgtac tcacaccatc
30541 ccacccccca aaccagggc ttactgagt cttcccttgc tctgcacatt cccaagaggc
30601 tttttgagtt ctgacacttg ctctgtgagc cttcccttgc tctgcacatt gatgatataa
30661 ctttgtaact gcaactaagag tgttcctaaa gcagatagcc agccgagctc cagaaatctc
30721 cctggctgca cctgcagagg ccactgaccc ctctgtggag ggaccgctct tcagtgtgtg
30781 gctggcttct actctctgct cctctctctt ggtcttcagc catccattgc tcaccagttt
30841 ctacagagga gcataggaag atatgcatgt agggaggtag gcacggggat gacttgtttg
30901 acttttagcag gtcattcaag aatctcctcg cacctggttt cagatgctgg ggtcctgtct
30961 gtcacaggct tctgtgcctc ctacccctt gagtttgtca catggccctt cagggaaggcc
31021 tgagatagat ttgcoctggg tgggcctcct atgagaaaat cttaagttag gcaccagggc
31081 aaaatggaaa gagccttttg ccagagcag gaagcctgtc ttccatttcc agctgttcca
31141 cctacttagc ttaaaagagg cacttcgct gtcttcagtc tcagtctcag tctcctcttc
31201 tgtggaatgg gacaataata tctactctcc ttatcataca ctgctgtgag gactgagtgg
31261 atcacacaaa aaagcattat gtaaattgca aagtgcataa tccacacagg agatttgaat
31321 taatccacca cactgaagg ctgtcaagg cagggactgt ttcatccacc agagtatccc
31381 cagtotaaca caggacttgg catatgaaaa gtgttcagta ggccgggtgc agtggetcat
31441 gcctgtaate ccagcacttt gggaggccaa agtgggcgga tcatctgagg tcaggagttc
31501 aagtcagacc tggccaacgt ggtgaaacca catctctact aaaaatacaa aattagctgg
31561 gcgtggtggc acatgcctgt aatcacagct actctggagg ctgaggcagg agaatacatt
31621 gaaccacagga ggcggagggt gcagtgagtc gagatcatgc cactgcactc cagcctgggc
31681 gacaagattg aaactccatc tcaaaaacaa agaacaagga aaaaaacgaa aactgttcag
31741 taaacacttg ctgaatgaat aaaataaata tataaatgta taaataaatg ctctactttc
31801 aaccactact ctgtttttct tttagaaaaa caatgtggtg agtgtcaaca aggagcctgt
31861 tgccgagcct gacatcatgg ccacaaatgg cgtgggtccat gtcacacca atgttctgca
31921 gcctccaggt aagtgtcgca tcccactgca ctctgcagcc agtccttttc ttcatgtggc
31981 agttggtgga gagaagaaaa actgttctaa acaatgatga gaataacatg taatttgtat
32041 agttaaactg tgccatgtg actgattgca gagtgaattg ggagctgttg gttttgaatg
32101 caccacacta aggaatgtga ggacacattg ctctttgcgg agttgcccag ctatatttagc
32161 tcccctcgga cacagcccag ttttctgtat tcgctggat gctgtccgag cgattcccag
32221 cactcctctt acagcatctc acctcagtg atgttcttg cctccagtgc agttgaacct
32281 agtctctgcc tctcctcatg tgtgcattca ctttcttgg tgctctctcc ccatgggcca
32341 agttctacca tgagttatga aacattatgg agaaaacatg tctttggaaa tctgagccag
32401 aaagccacc agtgccctc agtcacgggt gttatgaatg acatgctaag ggtttcactc
32461 tggtaaaacc tgccctttct ttctcttcca gccaacagac ctccaggaaag aggggatgaa
32521 cttgcagact ctgcgcttga gatcttcaaa caagcatcag cgttttccag ggtaagatgc
32581 ctgctagggt tgcccttagc ctgagcagcc tcaggctctc tgtttgggac atagaggagc
32641 ctctccagcc cctgtcttcc ttggctgtct cccagggtct tcttaaaact tctcccact
32701 cccactgagg catcctcagc cccagcctgt gtcaaattca gagtaaagaa ccaaggcaac
32761 tccttggett tcatgggcca aagcgcaggc tttcacaccg aggcctctga gcctcagatc

32821 atggggaagt cactgctgga gagaacagac atagctctgg aagccatctg cccaagaggg
32881 cagcccatcc caagttcatc ttacagtggc caggcctgcc ctgagccggg gcctctgggt
32941 cactcttctg ctgtccatgg cattgcccac cctgggtgag gctggggctc tccctgggcac
33001 tgtatgtatt ctggatacag ggatactggg ctgcgtatgt gtgtggagcc atcccttcc
33061 tgccccagcc ccacctccct ctcaaaccct ctctggctct ttctgagctt cctttcctgc
33121 tccccagctt gcccagtget cagtgcccc aattggctct ttgctacttc gggtcagggtg
33181 gagcctcttg ggaatgtgaa gtgccttaca gaaagattgc acttcaagag gagaggetgc
33241 agggagccat cctaaaccca gaggcctgga gcttactgtg tcactttact tttgtacaca
33301 ggggtctcct tagtgccctc gagaaggatt cttggccctg agcttctact cctgaggcca
33361 cctctgtgca gcccagctc cctcaactct aggcctgtag ctgagtgga aagcctggct
33421 tgggggtctc ctaggaatgt ccacctgaag gcacacttga taggggcttg cacaacttat
33481 gtctgccaa ggcacctgag gaactccctg gtgcctataa gttccacctt ccccttccctc
33541 ttccctgccc cagcattttt tctgagttag ggtggcaatg ggcaaagcca ttgtcataag
33601 cagttgcagg tataactttc actagaaaac ctgacacctt gtgttttctt tcaggcttcc
33661 cagaggtctg tgcgactagg tgagtctggt ctgggtttga agtcattgca gacctgttta
33721 ggccttacc ccaagcaagc ccaagcctgc catctgctgt atatagataa gaacatcatg
33781 gtgcagtaaa agaagcctgg cctttggagt cagaacagca gggtgacttg gggtcagacc
33841 cagagcacc catttccttc tctgtaagat gaggataata agagtaacaa ccttttaggg
33901 ttaaggtgag ttttcagctt aggaagtctg ggaatattgc aaagggcttg gcaggaaacc
33961 atgggtgagga tctagtcca agttgatagg tacagaaaac cagaacatcg ggccttgagt
34021 aaagagtga gtttcacaaa ccacaaagca cctgctatgt gcaggagagc atggcagaag
34081 gaggtgctt ggccctggtc cttgagattc tgacagtgtc ctgacagac atggggagat
34141 ctgcacctat ttgacgttac caacttctct ttttcagccc ctgtctatca aaagttatta
34201 gagaggatga agcattagct tgaagcacta caggaggaat gcaccacggc agctctccgc
34261 caatttctct cagatttcca cagagactgt ttgaatgtt tcaaaaccaa gtatcacact
34321 ttaatgtaca tgggcccgcac cataatgaga tgtgagcctt gtgcatgtgg gggaggaggg
34381 agagagatgt acttttttaa tcatgttccc cctaaacatg gctgttaacc cactgcatgc
34441 agaaacttg atgtcactgc ctgacattca cttccagaga ggacctatcc caaatgtgga
34501 attgactgcc tatgccaagt ccctggaaaa ggagcttcag tattgtgggg ctcataaaac
34561 atgaatcaag caatccagcc tcatgggaag tcctggcaca gtttttgtaa agcccttgca
34621 cagctggaga aatggcatca ttataagcta tgagttgaaa tgttctgtca aatgtgtctc
34681 acatctacac gtggcttgga ggcttttatg gggccctgtc caggtagaaa agaaatggta
34741 tgtagagctt agatttccct attgtgacag agccatggtg tgtttgtaat aataaaacca
34801 aagaaacata

TGFβI 基因蛋白質產物 (βIG-H3 蛋白質序列；NCBI 參考編號

NG_012646.1)

MALFVRLALALALALGPAATLAGPAKSPYQLVLQHSRLRGRQH
GPNVCAVQKVIGTNRKYFTNCKQWYQRKICGKSTVISYECCPGYEKVPGEKGC PAALP
LSNLYETLGVVGSTTTQLYTDRTKLRPEMEGPGSFTIFAPSNEAWASLPAEVLDSL
SNVNIELLNALRYHVMGRRVLTDELKHGMTLTSMYQNSNIQIHHPNGIIVTNCARLL
KADHHATNGVVHLIDKVIISTITNNIQQIIEIEDTFETLRAAVAASGLNTMLEGNGQYT
LLAPTNEAFEKIPSETLNRILGDPEALRDLLNNHILKSAMCAEAI VAGLSVETLEGTT
LEVGCSDMLTINGKAIISNKDILATNGVIHYIDELLI PDSAKTLFELAAESDVSTAI
DLFRQAGLGNHLSGSERLTLLAPLNSVFKDGT PPIDAHTRNLLRNHIIKDQLASKYLY
HGQTLET LGGKKLRV FVYRNSLCIENSCIAAHDKRGRYGT LFTMDRVLTPPMGTVMDV
LKGDNRFSMLVAAIQSAGLTETLNREGVYTVFAPTNEAFRALPPRERSRL LGDAKELA
NILKYHIGDEILVSGGIGALVRLKSLQGDKLEVSLKNNVSVNKEPVAEPDIMATNGV
VHVITNVLQPPANRPQERGDELADSALEIFKQASAFSRASQRSVRLAPVYQKLLERMK
H

【序列表】

<110> 美商阿韋利諾美國實驗有限公司 (AVELLINO LAB USA, INC.)

<120> 用於多工偵測與眼科病況有關的對偶基因之方法

<150> 61/905,051

<151> 2013-11-15

<160> 52

<170> Patentin version 3.2

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引子

<400> 1

tccaccacca ctcagctgta 20

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引子

<400> 2

ccatctcagg cctcagctt 19

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引子

<400> 3

tgcagcccta ccactctcaa 20

<210> 4

<211> 16

<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引子

<400> 4
aggcctcggt gctagg 16

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引子

<400> 5
tagtctctta ttctaataga 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引子

<400> 6
gctgcagact ctgtgtttaa 20

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引子

<400> 7
ccatccctcc ttctgtcttc tg 22

<210> 8
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引子

<400> 8
cgggccccctc catctc 16

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引子

<400> 9
cagagaaggg aggggtgtggt t 21

<210> 10
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引子

<400> 10
gggcgaagat ggtgaagct 19

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引子

<400> 11
tcctcgtcct ctccacctgt a 21

<210> 12
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引子

<400> 12
agctggcaag gagggccc 17

<210> 13
<211> 19
<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引子

<400> 13

tttgggcttt cccacatgc 19

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引子

<400> 14

ggcagacgga ggtcatctca 20

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引子

<400> 15

gtagtaccgt gctctctg 18

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引子

<400> 16

agttcccat aagaatcccc c 21

<210> 17

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引子

<400> 17

ggctggaccc ccagagg 17

- <210> 18
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> 人工

- <220>
- <223> 引子

<400> 18
accctcggg gaagtaagg 19

- <210> 19
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> 人工

- <220>
- <223> 引子

<400> 19
aacctttacg agaccctggg a 21

- <210> 20
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工

- <220>
- <223> 引子

<400> 20
gactcccatc catcatgccc 20

- <210> 21
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工

- <220>
- <223> 引子

<400> 21
agtcgttgga tccaccacca 20

- <210> 22
- <211> 24
- <212> DNA
- <213> 人工

<220>

<223> 引子

<400> 22

gacgtcattt cctactgttt cagg 24

<210> 23

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引子

<400> 23

ccccccagaa acagcctg 18

<210> 24

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引子

<400> 24

ttctaagggg ttaaggagaa agctt 25

<210> 25

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 探針

<400> 25

cacggaccgc acgga 15

<210> 26

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 探針

<400> 26

cacggaccac acgga 15

<210> 27
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 探針

<400> 27
acacggaccg cacg 14

<210> 28
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 探針

<400> 28
acacggacca cacg 14

<210> 29
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 探針

<400> 29
tacacggacc gca 13

<210> 30
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 探針

<400> 30
tacacggacc aca 13

<210> 31
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 探針

<400> 31
ctgtacacgg accgcacg 18

<210> 32
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 探針

<400> 32
ctgtacacgg accacacg 18

<210> 33
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 探針

<400> 33
ctgtacacgg accgcacgga g 21

<210> 34
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 探針

<400> 34
ctgtacacgg accacacgga g 21

<210> 35
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 探針

<400> 35
gctgtacacg gaccgcacgg agaa 24

<210> 36
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 探針

<400> 36
gctgtacacg gaccacacgg agaa 24

<210> 37
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 探針

<400> 37
accgcacgga gaagc 15

<210> 38
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 探針

<400> 38
accacacgga gaagc 15

<210> 39
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 探針

<400> 39
accgcacgga gaagctgagg c 21

<210> 40
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工

<220>

<223> 探針

<400> 40
accacacgga gaagctgagg c 21

<210> 41
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 探針

<400> 41
accgcacgga gaagctgagg cctg 24

<210> 42
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 探針

<400> 42
accacacgga gaagctgagg cctg 24

<210> 43
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 43
acacagtctt tgctcccaca aa 22

<210> 44
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 44
acttaagttg gtctttaccc aagagtct 28

<210> 45

<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正常探針 10

<400> 45
caccaagaga acgga 15

<210> 46
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 突變體探針 10

<400> 46
caccaagaga atgg 14

<210> 47
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正常探針 10a

<400> 47
caccaagaga acggag 16

<210> 48
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> #TGFBI R124C

<400> 48
cacggactgc acgga 15

<210> 49
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> #TGFBI R124L

<400> 49
cacggacctc acgga 15

<210> 50
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> #TGFBI R555Q-1

<400> 50
accaagagaa cagag 15

<210> 51
<211> 34810
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 基因序列

<400> 51
gcttgcccg t cggtcgctag ctgctcgg t gcgcgtcgtc ccgctccatg gcgctcttcg 60

tgcggctgct ggctctcgcc ctggctctgg ccttggggcc cgcgcgacc ctggcgggtc 120

ccgccaagtc gccctaccag ctggtgctgc agcacagcag gctccggggc cgccagcacg 180

ggtaagccga gccgcctggc caggggctgc ggaaggtcag gtagtcgggg ctcgagcgc 240

aagccgctgg gggcattgaa ctgggctggg ggcgcagggg acaaagcccg aactaaaaac 300

cttgcagcat ggagcgctcg gacaccagcc ctgcacgcgg tggaaggaga gagggaggga 360

ggtggaggac catggaggga aagcgggagg ccgccgcttt gtagaaggga gtggggaagt 420

ggaccagaga ctttcgacgc aggccaagag cctgagacgg acagcgcttt cagcttctcc 480

tcccagccac tgcagaaagg gggaaatggc aactctttgg ccataatcac cgtgggaggg 540

tgccaagggc aaagcccacc cagcagtaca cctattccaa ccagccagg cccccggcca 600

gcgactccag acaagaacct gggccacaca cggtggcagc atctaagg t cccagggctc 660

ctgtgtcctt ggccaggccc tgcactcaga cactgctggc acccgacact gctctctggg 720

tacagcaagg gcaatgtggc acttcttgtc ctgcccgatg aagagcagga gaatgcactg 780

ggccctcaca cacactgttc aaatggggaa actgagtcct gagtggttcc actttccac	840
agtcctgaag tgtgcactgg agccaggatt ggagtcctgc ttaaagtaat agctgggttt	900
gtaaatgtag gacactatca ttgcaggaat tcctttgaga cctgaagat gtgttggctt	960
taggagacaa actcaagcag aaggtctggt ctgatatgg ccctaatact gaccagga	1020
gaggcaggca acatttctac ctcaaaaacc aggccatacc tgcgtcaca ataccaggc	1080
tttctgcag cttccagcct acctggtgc accaacttct tttcataac taggtaaaac	1140
tatatatgag tagaatcttg tagtgactcc tcagaggaag cctaaatacc atcggggtct	1200
ggcgttcaca ccacaagca atgccc aaac ctccaagaga ctgggcagat ctgtgctcaa	1260
atcaaaactc attgttgggg gtgatatagt tgacttcaca ggccctgaaa gtcttggctc	1320
cttgactag gagtgtcttg ggtacgggta caggctgcc cttgtagggc atagtgtctc	1380
ttgtttctc tacttgtggc tttatggtct aggcctttca ggagtttggg gctctggcgg	1440
agagggcctg ctgggagcac atctggccac cctgcagagt gaaatcaaac caggcctggc	1500
tgcaacctca acacctcct ggaaagagga gaatactggg gatatcctgg ggtctttctg	1560
gaagtgggag aatcagcttt gacttgggca gtgtgcagaa tagagtgagg ggggatgtca	1620
gaaagatgag agggatatga ggcctcaaca tcaaatgca agcacctggc atttttatta	1680
tccttgccca cctctccgtt ggtctctctg cctttcctgc caatgaattg tgttatgttt	1740
gggtgcctca atttgcctag gaggttcta tttcttctgt atcttcgcca ctaagtcagg	1800
agaagatcct tatagcatgc cctgcaacag tgcacctgt aagggcatt ctctgcacag	1860
ccacagtga ggatcctcaa aggtattgag ggccttccat caagagccat ctttacagca	1920
aacctcttc cttcagagc ccagaagagt gctgaccagc tgaaaaacag ggttttttc	1980
ttaa atgcag atgctcttga ttatgagttc cagatattag atcaacttcc ccaccatacc	2040
cctgcaggca aagcctctta attagcttcc tgcagcacag ctggaaaggc ctattgtaat	2100
ctgtgatggg cagagtaatc taagaagtca caggagcacc cctgtcccag tagaatctgg	2160
atgcygaggc acatgaacca tggcaaaatg gttgcaggca cagttgtatt tactctgac	2220
taactgtccc tgtaaatgcc acagggtgc ctggcctggc acacagggt gtggcgctt	2280

gtgcaaatgg ataacgttgt tctagctcca gcctttcatt caaagtgaaa actgttagaa	2340
agggaaggaa aactttgcta ttttaaggaa ttgtagcgtg ctgcctgata tgaaggaaga	2400
aataacagct gtgcccttgc tgtgcgcagc actcgattgc cgcttttgct ttcgacctca	2460
ccacaacaca gtgagatcta ctgttcattgt tcccatttta caggagggtga aactgcagct	2520
tagtgaggta gagagtgact tagttcagac acagaatgct gttgggagag taataactat	2580
gatatggtct cttgactccc agctatatct gtgttgctat agggaagggg aaaaataata	2640
ctgaaagaga agtaaaaata caatcacact tccaaacatc aaccaccaa aactgaactg	2700
aatttcttga agcacttgg tttcaaactc aagctgaaca tcaatgctgt tattcttgag	2760
gcccagaagc aacttgctca tttcaattaa gcttcagcat gaacttccta tgtacacagc	2820
ccaccacac tccccgatgt gagaaggaga gggtcacagc cgccccagc ctctgctgct	2880
gccacaagga cagcagcagt ggaaacattc agcaaaggaa tgttgagcc acatccacaa	2940
gagactcact gaagattcgc caaacgccta cggaaagtgg cagggaattc attgacagta	3000
attgtttcct gcttgatcag attgaagagc ttctgggatt ctgtaacaat aaataggacc	3060
gggggctgga gtatggccag caaggactct tcaggggta ttcagggact gtctaacctg	3120
tgaatcctag gcagcaaaca gaaaccaggt attcagaaat ctggaggatt tggtcaggcc	3180
cagctaggac tagggaggca tgggcctctg ctggctgtgg tcccttctcc agccttact	3240
tctcttgccc ctagatcctt acatggattc attaatgtc attgtccctc ctgggccac	3300
tcactttcac ctgttgaaca aaaaactggc caagaggta cagtcatac accgcagaag	3360
agacagggca gagaaatgaa ggggcagaat ggactccac ccaaaagcct gactctgaat	3420
atttgagaat tgttcaagtt cctgcagagg aatcatgatg gggacagtag gtgtagtttt	3480
tactgcaata ttggtgtctt cttacaaaat acgctgcaca tcaagtgatg tctgtggatg	3540
gcattcttaa agtaacaggg aaattgatgt taaagaaata cttcatcctt tgggtgatac	3600
ctgaagtctt ctgagcttgg aggtcttgtg aaagccctca gtattgtttg ttttatttgc	3660
tttctctga cttgtgattc agtcagatgc atgcctgcct ctggctcagg aagatcaacc	3720
ctctcctgac tgaccacgcc tctcctgact gaccacgtag cacagcagct tcctttccct	3780

aggggctcct aatgaagctt tcacaatcac ctggcctgag cacagtttgg gtcaggactt	3840
ggtatacttg aaaaaaacat gcaaaaccaa aatcctgtgg ttctggaaaa ggcttcttag	3900
cagaaccccc agacatttac actctgcttt ttcacagggt cctgaggat tctttggatc	3960
tgggtagttt ggggagcagt attttcaaca agttcatttc gtgctccttc tacacctgc	4020
ctggatgcta ggccccatct agaatgtgaa caacagaaca aggcagaaca cttgtcctca	4080
aggttctgtt gagtgttaga tgcagagaag agacaccccc cacctccccg catcacttac	4140
aggaattctg tttggaaccc aacatcaaat aaggaccgta tccactgtca gaggatggga	4200
agcagcatgt catctgggac attggagaaa ggctcctggg ggaagtggga cttgagctgt	4260
gatctaagta atgaacaact gagagttaa tgggagagca tcccctatca gggtcctgag	4320
agcaaccagc catggtttaa accagctata aagcctcggg tttataggat agacagtaac	4380
aatggcttgt ctttgggagc caagcagctg gtccaggcat gcagagcatg tctgtatgga	4440
gagctgcctg agagatgctt ttgtttacac ttatcaattg cccatgtcaa agaaggatat	4500
gtacatgaag ttacatcagt atgtaagaga gattttaaca atttttgcag ggggaagcttt	4560
catgggggct gatgggaatc taggtaaaca gaaccaaagt ctaaacccea gatatcecca	4620
gtaccaagac tgaaatgact ctctcctcta tctctagaaa gttccagtga cccaaggagg	4680
caaacacgat gggagtcatt aaagtggggg ggacgtgctg atcatcttcc taattctgct	4740
gcttttgttt tcagccccaa cgtgtgtgct gtgcagaagg ttattggcac taataggaag	4800
tacttcacca actgcaagca gtggtacca aggaaaatct gtggcaaatc aacgtgagta	4860
tctgtaacca gccaggagac caagctgtat gcacgctggc tgcagttccc cagggcctgg	4920
gccagccttc tagaaggtea ggttgcctaa aaagccatga agatgcatgt gcgaacatgt	4980
ctgggacctg cgtgctaggg agtggcattt ttaggaagct ggccaatttt gttttgcatt	5040
tttaaggctg ctgacaagac ttggagacat ttttcagggc tggtttggtt ttgcaagaaa	5100
catgaaacac tgcgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtttctc aatcctcata aaataataca	5160
gatatgcagt ggagaagcca ccagcatgtg actctggaaa agaaagccca ttggtgaatc	5220
tgtactaaag aatgccatcc ctatcttaca gtccctaagggt aaacacccca aaaagactta	5280

gagcactaaa catatgcaga ttatgagaca gcatagcata taatatattgc acagacttcc	5340
tcattcaaac cctagctcta cctgggccag tcgattcadc tttagaacc cccattgctt	5400
tacctgaaaa gttcgtataa caaaaggacc cacccttatgg gggtgttaca aggattgaat	5460
gaaataatgt acataagaga ctgaatatgg tgcccagcat atatcagtg ccaataaatg	5520
ctagctacta ttattattat caccctagat ttgcaaatct agaccacaca agcagaagta	5580
agagtgccaa cgggggtgtgg accagtgtgg ttacaatagg gcttgttgat gtctgtttca	5640
gcaaggaggg aggcagcttt taccctactg cccagctccc tgggtggaatc aggtgcatgt	5700
tctaacaatt ctggggaaac ctaatctgtt ttggcactgt caacagatct caaagctggc	5760
tgtctctat agctaggaag atgtgtatga caaatctcct gagccacttg tgaaggcctg	5820
accttctcc tgtctccata cataatggga tgattaagaa actctaagcc actctcttaa	5880
gcacttttca atgttaggga tttttaagtt tattgtttg acattgcttt tgagcagaca	5940
tctctccaa tttaatagcc aactgaaaga agagaaaatg ctctttcctt aaactgtatg	6000
tggaaataaa tattccaatg tgtgacctg attatgttag gcaattagca atcctaatat	6060
gaattgaggg aagttaggat tcatggcaca gctggggaga taccagcagt cctggggagc	6120
ctgtccaggg cagggtccatg gcagcttct ccatgcctga ttgacagccc agcctgcaag	6180
ctaaaagttg agtgagctag gagcacacac tgccaagatt cagctaacag acaccagcg	6240
atattcttgc tgctatgaac aaaaggagac tatgcaaatt atacaccacc cattcttcca	6300
ggatgcctga cttaaaaaat aagaaaaaag atgggccggg cacagtggct cacgcctgta	6360
atcccaacac tttgggaggc cgagggtgggc ggatcacaa gtcaggagac agagaccatc	6420
ctggctaaca tggtgaaacc ccgtctctac taaaaaata caaaaatatt agcgggcgtg	6480
gtggcgggca cctgtagtcc cagctactcg ggaggctgag gcaggagaat ggcgtgaacc	6540
tgggaggcgg agcttgcagt gagccaagat cgtgccactg cagtccagcc tgggtgacag	6600
agtgagacac cgtctcaaaa aaaaaaaaaa aaaaagaaaa gaaaaccttt agtactgatt	6660
gattttttcc catgtgtgta tattatctac tcaaattaac aattaattac ttaattaaac	6720
acaaagccag gcctcaccta attgtctctt ggaagggtgac cagagtgcta gtgccaagca	6780

aacaactctt ctatatctca agagccctgg gcttcagagg gccatctttt ttgttaattc	6840
aagtttctct gaaaatggag acccgtttat gatgacaagc tggctacagg gtagcatctg	6900
ccacactgtt tcgggggtgc cgctgggctg aagcatttgc ccagctagtt aacaatagct	6960
cgataacatt ccctatcagt gtccaggctg agaatactgt cagtgatgag tcgccctggc	7020
tcttgtacct gtatctttgt gtgccaggac aaggcacaag caacagagct gtgtgttgcc	7080
aaaatgttcc tgatgagcag gtcaacccct cgggggcagg ttggatatg ataatgtggt	7140
gatgtggtgg cgcagctccc ttaccacgtg agcacaaggg gagtcctcta ggaaaaggaa	7200
gaaatgtctg gatgagggtg ggagatgggg ttcagagtgg actcaggcaa agcccgatgc	7260
ccagtccag ctgttggcct agtctcaca agccagaagg atatgacatt tacattcaac	7320
tcttgaattt gtggccactg ctttgggcaa ctcaaagag agaaaatgaa gatagaaaaa	7380
tattatttga tataaaactt ctaggacaag agaggccctt cctggaacat tacatgtagt	7440
attaggaagg tggagctgcc ctggaaaaga tccagagAAC tcagagagag gaagagggtg	7500
aaccatctc tgttcttcta gagagctcag taagagtggc ttggcagggc tcctgtgtac	7560
ctgagaccaa gaccagtgag gaggctactg tctgaccacc atacggtcag aattcagtgc	7620
catgggtggt caggctgggaa ggggagagga ctgtgctggc tggagttagt gttatcctgg	7680
ggaaagtagg tccttagatg ccttttagttg agtgaggagc agactgggaa atgggagcac	7740
agtagtggtt ggggcaaaaa ggactgtctc tgcatgaggt ccataggcag ttggaatttt	7800
ctcagcaaga ctccagagaa ggaggctgga gcagagggtg atgttgggat gaaaaggagt	7860
aaagtatcat gggggaggag gcagctcagg ttgtcaaggg tcaagaaacc agaaggagaa	7920
tttcaccttg gaagcagaca acgggtacca agcatacagg ggaatacttt gtggtgagag	7980
gtcacacaga gatacaggag ccgacctggt gagacaggag cctggagcca cctgcctgct	8040
tttgtaggc ccagactcc actgctatca tcaggtgaag ctctgttgcc tgcacacaaa	8100
agcttttctg catttacaaa gagagaaggg cctgagtttc tggtgcaatg cgtcaagctg	8160
acatatggac ttattacag gaagtggta ccagtgggtc cctatttagt ggctgttatt	8220
gtgaatttta ttgttcggaa attcacttta gcatttattt cagatcctaa atagcaccgg	8280

agtatacaa tggctaata aacaaagagg gctgtgggga gcagacagtc agcatcccc	8340
tctgtgattt caggccctgg ttigattagt agccataaaa ttttttacgt gtggcacttt	8400
gagcaaaggt gcaggaaatt gtggtcagga agcctggctg cctctcgaca ggcttccttt	8460
gtgctagccc caggagagg aggcctattt aacagccaag tccaagtga catcatggga	8520
ctggaatagt catagcagga gctcagacat cataaacgtg gcataggag ggctggtgga	8580
ggagctagcg ggtatgggtg gcagctattc attccaaaag tcttgaaatt gtttcacgag	8640
caacacattt cacaagtgcg aagcccttct ctggagccaa gatgagctgg cagagcactc	8700
ctgtttctct agtagcaagt gttcctttgc ccaggggcaa aaatattaat actccttcag	8760
cactgcatta atgcttaaag atttaacttt taaagagatc agctggtgca tggtcgagct	8820
tttccatcag ctggcagggc tttttcagta ggtgtccttc tgggcagggc actggggaca	8880
gctgacgtga aggtgaagaa gagctgtcgt tttcctccct tatatccac aaccttggtc	8940
ccaagaggaa aaaaaagaag atggtgagaa gtcattcaag cagaccccag acccatacta	9000
gtgcctcctt tctgtttca tatccctgtg cagccagctg ggatctcttg aataatctgc	9060
tctgggggca ctgagattgg acatacacca aacagcggag atcgaccaa cgcctctgtt	9120
gggcagtgtt tctgagggt tctgtcccat tctgtaaact aggaggctga ctagctgaca	9180
aggaatttta ttctgttggg tatttacatg aacctatgtg ccacctgggg taagacctg	9240
tggtaggtag aaacatgact tccccaaat gtccacatcc taatctctaa ttctgtaaat	9300
atattccctt actggaaaaa gagactttgc aggtgtgatt aaattaagga tcataagagg	9360
gagagattat ccaggattat ttgatgagtc taatataatc atcagggtac ttaaaagagg	9420
gaggcaggct gtgcctgggtg gttcacgcct ttaatccag cactttggga gactgaggcg	9480
agcgggtcac gaggacagga gttggagacc agcctgacca acatggtgaa actccccctc	9540
tagtaaaaaa aaaaatacaa aaattagcca ggcattgttg tacacacctg taatcccagc	9600
tactcaggag gctgaggcgg gagaattgct tgaaccagg aggcagaggt tgtgtgagc	9660
tgagatcgca ccactgccct ccagcctggg caacagagca agactccatc tcaaaaaaaaa	9720
aaaaagaggg aggcagtggg atcagagtca gagaaggcaa cgtgatgatg aaagctgaca	9780

tttgagtgat gcaaccacaa gccaaaggaat gcaggcagct tctcaaagct ggaaaggacg	9840
agcaatggat tcttccttac agcctctgtg aggaatgcag cctttgattt taaccccata	9900
aggccgattt ctgactctag cctctggaat tgtaagataa ttgcatgat ctcaagccac	9960
taaatttgtg gtaatttgtc acagaaagca atgggaagcc aacacaggcc ttatttgttg	10020
acttatagat gcatttttct ttatttcaat gtacttttat caatggcttc atgtagggta	10080
ttgctttcaa tgaagatatt aacatagttt caactttaag gtttatatct ggagtttctt	10140
tagaagcttc acaactgacc acttagtaaa cagtaagcat ctgttaagtg cttctcatat	10200
gtaagttcac tcaattctca caatcacact ataagataaa tatgattatt agcccattta	10260
cagatgagga gacaggctca aaagactttt atgcaacctg gtcaaagtca ttcactggta	10320
agctgaggag gtctgtccac ttccttttgc tgccccagg gggtatcaag cctggcagtt	10380
agtgtcagcg acttaggagg tgaacaagtg agcaggcctg taggacctgg ctaaactgcc	10440
ccaggctctt gtctacagcc tcaaacctgt ggctgtgggt ccagagaca aggcctcttc	10500
agcatcagag aaggatgcct ttgtctcagg gtcacaaacc ttctccaggt tgctacccc	10560
ctgctgtaaa ggggatcccc aagaccgtc atcagacaag gagcttggga actgaggaga	10620
cacagtcagc ctccaggagt gccccaaatg ccttcacatg ctgcatacag attgccacaa	10680
ataaagtaca tccacattct gaagactctg tctcatcac caaccaggct ggcccctggt	10740
gagggctgta gtggttgagg cctttgttg tagacagtag gttaaagcaa gccatgattt	10800
tctattggga ggcttcagaa tcagctcagc tgtgtttcca agaccaggag ggcagaaagc	10860
aaaccatccc aggcaagcag tccatgggcc atgtcagatg tctagacgtt atgggtctgt	10920
gtttgctctg ccattcctct cggaactat gatgccctgt atggtttacc ttcagtcaca	10980
ggtgactggc ctacagggcc attccttgtt ccaacgactt ctcgagtata attaatcccc	11040
aggcatttac ggccagagca gccggccaaa tccgtgaagt gcagtggttg ttttaaatta	11100
tattaacttc ttggaaactt attttaggga gagaaaactc agtacttctc tctatccaat	11160
cttgagtaaa aatgttagaa gggactggtg gagagcctcc cagacatccc tacacataga	11220
ccttgggttg acattatctc tttgcacctt ccttgaaact ttcttctaaa ttaggtgcct	11280

tcctaattt aggcacctt ccagtactag tctgtgacct gttaggaacc aggccacaca	11340
gcaggagttg agtggcaggg agtgagcatt attgcctgag ctccgcctcc tgtcagatca	11400
gcagtggcat tagattctca tagcagtcgg aatactattg tgaactgtgc gtgtaaggga	11460
tctagcttgt gcattcctta tgagaatcta atgcccgatg gtctgagatg gaagagtttc	11520
ataccaaaac cacccttcc ccttgccacc atctggggaa atattgtcta ccacgaaact	11580
gatccctggt gccaaaaagg ttggggaccg ctgtcctaag ggatctgctt tttctgacct	11640
gaggtttttc tttattagac tgtatctggc tgaggagaag cctgaagcct ttaatcgga	11700
cagctttggc tgatgagatt agattcagaa accaacagat tggcttttc tatgcaggga	11760
agcctaggaa ctggggggct atggctggga agccccctat tgttccatc ctttcctatg	11820
ttcatcctgg aggaatggca tcagacccat gcctctgtga ttgtcccag cccatccaac	11880
cacagcatct atgttctgcc tgggaccagg gccagggagc atggcacact gagctgagta	11940
taaggagagt ggagcaggcc actgccagcc cagaaaaatt tggtc aaagt tgcctgaaat	12000
cttctcagcc ttcgattcac agctgctctc tgcctgctctg gggccatgca gaccagttca	12060
gaaaagagtt aatttgttgg ggcagttgga ggcagggtgga ctgccagctt tgacaccttc	12120
ccagcccaca ggctgctgca ctggggctga aggcgtggct aaccctgca cacctagaga	12180
gtgacagaga tgccagactg ggcagcagga aggcaagagg attaagagag agcttcctgg	12240
ctgaaagcca cactcggtta accaggaaaa agcccttggc acgagaagac tcagtggcct	12300
gagggactga gccttggttg ttgggcatgt gctgcataag ccatccatgt gtgacagtag	12360
agtgtagtc agccactgtg ggacatgggt gctgaaagac cacatggaga ggaacagtga	12420
gtgctgacaa gggctagcct tgatcacttt ggagacaccc cctgtgtctt ctagatgtca	12480
gactttccaa atctgtctgc taccctccaa acgtgcattt tcaagagcaa tggaaaaagg	12540
attggacttg atggaatgca gcaagagtcc taggtctggt actacctacc tatgacctta	12600
agaaactcct tcaccctca gaaccttac agctttcttt ctgattctat cctgagttac	12660
tctactccaa gctgagactt ttctgcttag atctatccct tctcctaaa ccccaacct	12720
ccatttctcc tgggtgtctt ctttacacac cctcagcat acacacacac ctagccacag	12780

gaaccaatga gttaatat	gaggagtgg ttttctttg	tctcaatga gatcctggtg	12840
agggcacttg agctgttcag	ctcccttgcg gtattttggg	gatggaactc agaagccaac	12900
aatatagaaa aagagtc	ggccagcttt cccaggggct	ccatgccata gagagtactg	12960
cacccgtgtg cacagggggc	cctgacatga ggactttgag	gataaacata ttcctccaac	13020
tctgtttcag catctccatg	gattttcaca cagacacttt	aggaaagaaa ctaagtttgg	13080
ggggacttga cctaatecca	catcacagcc ccagtaatac	agccctggaa tttatcacag	13140
aaagcctaga atcccatgca	tatcccatgc atatgcatcc	ctagtcctat gggttcaagg	13200
cttgagctc tccctggatt	tagctgggaa aagttggcag	acagttcttc tctgtcttct	13260
agaaatatgg actagaatcg	tgagtgtgag attgcaagta	acttttaaaa tcatctagtt	13320
taacttcacc ccatttcata	gaccaagaaa ctgagaccag	agagagaaat ggactttcaa	13380
gttcaccctg ctagttactg	atggatcaca agtcaaatct	cctgattcta gcactgtttc	13440
tcttacacca caccaccttt	gaaagtgtgt caatcaaate	ttactttagt tgcagaggat	13500
gactttagtt tctgaagata	aaattgtgag tcaatcaaga	tgagtcccaa gacaatagcc	13560
tgtttagccc ttataagttc	agggatgaaa ggtagaaaag	aaacaggatg gaaggaggac	13620
tggagaaaaa aacaaaagag	gaagggaagga ggaggaagca	aacaggaaaa aaaaagaatg	13680
tgcatagctt gtcactctc	agtcatttcc tgggagccca	tttctagcaa agtgacagct	13740
gcaactccct ggccacctga	gcattcttagc tgatctgtct	ctgaaacacc ccctggagaa	13800
cagatgaatc aggttcac	ttcgtttaac taagtcttcc	ctgagacgac tccatttaaa	13860
tgaacaagag caggatttcc	tgggcacact gagagcacct	tccagaggcc cctccagagc	13920
cctaaagcct gtatttcttc	cagtcggcct gtttctttcc	tggatgatgtc attaaacgcc	13980
ctttgagagt cccacagtga	gcagttctgc ggtaaaacc	gctgcaatta aagtctgagt	14040
cttttctgt ctcaaagggc	atattcatat agaagaaagg	aaaaggaagg actggctgtt	14100
tgcatttggt tccaggcctg	ttgagtagag gtcgtgtca	ctccaccgaa ggtacagggt	14160
agccttcagc agaacctggg	gatttggttt taagcaagtc	tttcttaggt gtgggctttc	14220
agaacacttc cttccttgca	atattatttg aaattctcag	tgttttagcc gtccccagaa	14280

tattggttcg ttaaagctgt gtatttcaga tctccagaca gtggtcactg tttgtatatt	14340
ttcaatttca aaccagaaaa caaaagtctt tattgattac tttttttatt taaaaataa	14400
aaagtaagta tcttcgtaag aggagctttg ttttaatttt aaagtttaaa atttgattgt	14460
gaagacagag aaaaacttga tgattgtaga tatattcccc tctttggcta ttcaatcaga	14520
gaactagaaa atcatgagag atttaatgac cactgcctga tacacatatg tgttttacag	14580
atgaggaaac tgagaccag agagatgatg aaattggctg aggatggccc agctggtcag	14640
tgaaagactc agagccagag ctggtgcagg gctctttcta ttccttcctg ttccctttca	14700
ggaacactca ccatcggtt tctgtgaat aatgttgaga taaaatcctt ggtgcattat	14760
gttttctagt cacaacattg actaggctgc cagagtcctc tgttctccca gttggttggc	14820
tgtaggtgtt ggcagccgcc aggagcattc tacagaacag aggaggagtg agactctcct	14880
tgctcaggaa aggcagacct atgacttagc aaataactcc taagaggaga gtgtttcacc	14940
caccattcct cttccttggc tgtggaggca acttagtgga gaggggccag atgacctgtg	15000
aggaacagtg aagccctgcc taacacaatg tatggttgtc ttgttacaga gtcacagct	15060
acgagtgtg tcttgatat gaaaaggctc ctggggagaa gggctgtcca gcagtgtaat	15120
gaatcctccg ggccttgcct gttggtgtgg gtggaaggga atggtgggag agaggagtac	15180
ccacataaaa ggcagcagag tgtgaatggg ggcagtggca caaggacatg gcattctccc	15240
cacgtgccc ctggccccag gctctatgcg aggggctgag gaatggaagc tggaacagc	15300
gcatttctg agctgtcct cctggcctcc ttaccacact ggtggagtag actccaactg	15360
tggcctgtcc atgcccttcc cagcaggcac aggtcaggc tcaggctctt ggcctctgcc	15420
tctggctggg agtgattcta aacacatcca gcagggtcag cctgatatgcc catcagtttc	15480
cgatcagctc tgctagagag ccgatgggat gtgggaggag ggggtcactg gtgggctggc	15540
aacccaagc catccccatc tccctctgtg tctaaacttg gccctttgga gttcggtagg	15600
gagaagagcc atagccagg tgggctcacc cagagtcagc agagagtccc acaaatggtt	15660
gcactgggcg aaagacagca tggcacctgt gaattttatt agagcttttc ttttagtgct	15720
acacacaagt gactgtacag gggagttagt attttgttt aattttgaaa tagagtcac	15780

ttttggtatc tgcgggggat tgattctagg acccattcta ggatgccata tctcagatg	15840
ttcaagtccc tgatataaag tggatatagta tttgcatgta atctatgcat attcttccat	15900
gtacttttaa tcatctcaag attacttata ataccaaata taatgtaaat cctatgtaag	15960
tagttgttat accctctttt aaatttttgt attatctttt attgtatttc aaaaaatatt	16020
tttgggccat gtttagttga atctgtgggt gaagaaccca cagatacgaa gggccaactg	16080
tattggctat ttttttagtt aagaatgtga gactgaggcc aggcgcagtg gctcatgcct	16140
ttgattccag cactttggga ggccaagagg ggacgacac ctgagccaag aattcgagac	16200
cagcagcccc tgcaacatag tgagacctg tctcttaag attgtgagac tgggctgggc	16260
acggtggctc acgccgttaa tcttagcact ttgggaggcc aaggcaggtg gatcaactga	16320
ggtcaggagt ttgagatcag cctggctaac atagtgaac tctgtctcta ctaaaaatac	16380
aaaaaaatta gctgggtgtg gtggtgggcg cctataatcc cagctactca ggaggctgag	16440
gcaggagaat cgcttgtatc caggaggcgg aggttgagat gagctgagat agggccgttg	16500
cactccagcc tgggcaagaa gagcaaaact ccatctcaaa aataaataaa taaataaata	16560
aataaatcat gagactgaga cataacagga aggagggcaa tttggttgggt tccaaggttc	16620
ctagagtatg tgatgggaga ggttggtgcg ggtggggcca tggagggtact gactcaagtg	16680
gaggggacagg tggggaaatg ggatgggaaa agaagattga ccttagaagg ggagctcaac	16740
ctctgaacce taatttcaga cccttcaaaa tgaatattaa gctcattttg gtctaagaaa	16800
caaaaaacaa atgaacatga aactcatttt ggtcttataa ggtctgagaa accccttcta	16860
aacttcaagc tgctttaaga aataacattt tattacctgc aaatacacac agtactttgg	16920
agatttataa tagtctctta ttctaafaga agccattagg gaaccagttt caataaacag	16980
gtaaatctgt aagactagtt tgtaattagg atatctgttt ccagtgtcca ttctgcctc	17040
tgttatctaa atgtctggga acaagagctg tgctctgctg tgtttaaaat gattaaaaat	17100
caccaattag ttgagttcac gtagacaggc atttgactta ttgagttggt ttaagaagac	17160
tataacaagc cttaagcccc ccagaaacag cctgtctttg ggctttccca catgcctcct	17220
cgtcctctcc acctgtagat gtaccgtgct ctctgtcaga gaaggagggg tgtggttggg	17280

ctggaccccc agaggccatc cctccttctg tcttctgctc ctgcagccct accactctca	17340
aacctttacg agacctggg agtcgttga tccaccacca ctgagctgta cacggaccgc	17400
acggagaagc tgaggcctga gatggagggg cccggcagct tcaccatctt cggccctagc	17460
aacgaggcct gggcctcctt gccagctgtg agatgacctc cgtctgcccg ggggactctt	17520
atggggaaact gccttacttc cccgaggggt gggcatgatg aatgggagtc tgcagtcatt	17580
tcctactgtt tcaggaagct ttctccitaa ccccttagaa aaggctgtgg aacttgagct	17640
aaaatatgtc ttaccagggt gcgtctaata cccccgttc cctactgggc agaaagactt	17700
gggtgcttcc tgaggaggga tccttggcag aagagaggcc tgggctcacg agggctgaga	17760
acatgtttcc cagagttgca aggaccatc tcttaaacac agagtctgca gcccctaact	17820
gacacctgt ccttcctcct aggaagtgt ggactccctg gtcagcaatg tcaacattga	17880
gctgctcaat gccctccgt accatatggt gggcaggcga gtcctgactg atgagctgaa	17940
acacggcatg accctcacct ctatgtacca gaattccaac atccagatcc accactatcc	18000
taatggggta ggggatcccc agccatactg catggccctt ggtgcataat gaaccattt	18060
ctgttccatg tgtgggctgg ttcttgggggt ttaagctgta gacaaccac cctctttgtg	18120
cctgtttctc cttgggccct ctattccaca gcttgtggaa cccacatttt gctactgtgt	18180
ttgaaaacac tgttttctcc tcccggggct ttgggactat gcctctgttg tgttgactgc	18240
tcatecttgc tgcttctctg ggcagattgt aactgtgaac tgtgcccggc tgctgaaagc	18300
cgaccacat gcaaccaacg ggggtgtgca cctcatgat aaggtcatct ccaccatcac	18360
caacaacatc cagcagatca ttgagatcga ggacacctt gagacccttc gggtaaggga	18420
ctgccctggg tgagggccca ggcttgggac acattgcctc ccaagagggg cctagcagga	18480
actcttctgc aggagaggta gaggatggct cctgtagggg aacatagagc aggttccct	18540
gaatgccctt gaacatggag aattcattga ccagacattc agcttgacct aacctgtgaa	18600
attctccatc ttctttataa agtgttcct tccttgccct cctggaaag gtcagtgggtg	18660
tgtggctgca gcagcacagt gtcctctgag cctggacct gcactgtggc ttccagaggt	18720
ggcagttccc acatggggta ctagaataaa tggcctatca ggctgtgtgt gctttgggat	18780

cacatgtccc caccctagga ccttggttcc aaccatacgc atgtttctctt ggagcccaga	18840
acagcagaga agccaccagt gtggacacag aagtcaaggg tctgatttcc agcctggctt	18900
ctgactgctc tggggccgca ggaatacggc tccttccccc atgccagca ggcatttgtc	18960
ttacaactgg aggggaaggc atgttcctct tggcaaggac tgctcaggag gaagtggagg	19020
caggctgccc tgtcagggtt ttgtccctga ttcaaggaga acttcctaac caciaaggat	19080
acaagtggga gtgaggcggc ccttccctag agatctccaa cacagagaga caaacacgct	19140
ggggctggct ggcactgaca ggccctgcag gtgtggatgg ctgttagctg ggagcttcgc	19200
tgtctaagct cctctcccat gcttttcttc tgggttgctc gaaggacggg ggtctgcaag	19260
aaaatgatgt tcccacatag ttggcagcac gtgaacagca attgatccct ttgcatcacc	19320
tcctcttact gtttagattt ggtaaatatt tcttcttcc ctctctgac cctccatttt	19380
gccgatcttt ccttcttata acacatactt actaggtacc tgctacttcc cgggtgggcc	19440
tatgtgccag gagtatagag gtgaacaagg aaggcaaagt tctattctca gtagagctaa	19500
tactctatct ggagagagac aacaaacaaa tcaacaaggc agccaggggc tgtgataatt	19560
tatgtcaagt gggcaggtaa atcgggagt acagtagtgc agggaggatt ggaaagtcag	19620
ggagttctct ctggaggagg tggcttttga tctgcagcct aaaggatgag aatgggtcca	19680
ttatacaaaa tgctggggca agagcacacc cagtagaggg gagagtaata gcaaaggctc	19740
agggcaggaa gggcaaggga gaggccagtg ggtgaggcca catgtgaagg gcatacaatg	19800
ggcaaagaca aggccagagt ggccaggccc aatcctccag gacttgaga cctgggaaag	19860
agtgcatctc catcctggga gcagcaggaa accactcagg cctttagaag atccttctgg	19920
cagctgtgta gagaatgggt ggtgtgatcc ttccatgcat gggctcatgt acgtgattac	19980
cagtaactgt cgagtgcag tgtgaggagg gctgcaagcc atgagtgtag gcacagcaga	20040
cagactcacc tttgtctggc ggtgagatgg ggtgggaagt gtgccaagtt gacctccaa	20100
agaaatgata ttttagtgga agaataata gaatcagaga agcaaagtaa gagggaagag	20160
cagagaggac agcagggaca aggacttggg ggcaggaaga ggaaaggcag gttaaggaca	20220
tgaaagatgg ccagctggc tggagctcag gccagcaag gccccctggg ggccatggtc	20280

atgggtgagc ttgggtttgg ctctctgttt cgtcttgggc ttctgtgaaa gcctcgagcc	20340
cttgcgggga accagtgaag ctgtgtgtgc atcttctgtg gggagtgcc a gactcttcag	20400
ggagcactcc atcttctctc ctccccacag gctgctgtgg ctgcatcagg gctcaacacg	20460
atgcttgaag gtaacggcca gtacacgctt ttggccccga ccaatgaggc cttcgagaag	20520
atccctagtg agactttgaa ccgtatcctg ggcgaccag aagccctgag aggtgagcat	20580
cctttggctc ctgctgctgc ctcatftgtg cagctagatt gagcccaaga cctgctctgg	20640
tccaagatga acataccacc tgccatgagg tgaccctcag gatatccact gcagccatgg	20700
gctgggggtca tctgttctg ttgcttcagc taaccgtgtc tctagcagcc aactactct	20760
gagggctgac tacagaatcc agcagctttt gcttgggaga gctggactga agagaggcat	20820
agctggagac ccatagctgg ccctggccag aaacagggag agtgaaaggc tggaatagcc	20880
aaggccagag caaggcta at aggtagagca acagcttaca ggtgtggggg tggcagatac	20940
tggcaccctt gaaatggatt cctcatgccc acgcttcact attcttctct gtggctaggg	21000
gatttatgga taaacaaaa ttacagttaa aaaccagcca taggccaggc acagtgactc	21060
acgcctttaa tatcagcact ttgggaggac aaggtgggcg gatcacctga gatctggaat	21120
ttgagaccag cctggccaac atggcgaaac cccatctcta ctaaaaatac aaaaattagc	21180
tgggcatggt ggtgggcacc tgtaatccca gtactcagg ggtgaggca ggagaaccac	21240
ttgaaccag gaggtggagg ttgcagtgag ccaagcttgc accactgcac tccagcctgg	21300
gtgacacagc gacactccgt ctcaagaaaa aaaaaaaaaa aaacagttat agtagtcaac	21360
ttttgactct ccatttcaga ttctgtcatg cctcctcaa tgagctgcta agttaggcag	21420
tgcatgtatt attgtgcag gagagggaag gaaggagcta acgtgttttc acatgttttc	21480
cttttgaga tgagaaagga ggactctgcc tccccctac cctgcccctt tctactcag	21540
gacctctgaa aggccatgag cacaaagctg ctgcctgagt cccctgaaat gcagggtacg	21600
ccccaggtct ctgatgtacc ccaccacact ttctctctca aacatattcc aggatcactt	21660
gatttctttt gaatctatft aaaccaccg tgtcaatgtg ctatataaaa tgtctaatgc	21720
atttcagaca ccctatacat ctatacatft aaagtgttct cttctatct gtgcagggat	21780

gggaaagggc atatttctga aagcacagat gggaagacgg gatttgttcc gtgtccaggt	21840
gattatggta cctctatgcg cctggccggc actggggaca gaggccatga aaatgaatac	21900
agcacagcct ttgccctcaa gaaacttaag acctagtaga aatggcaggc tttaaaacag	21960
gttgttggga tctgatttgg tgagtgcaat gacagagata ctcacagcac aaaatgggga	22020
atgagggcgg gcattgggac acacatagcc ttaaggggcc caaaggcttt tagaactgta	22080
ttccctatta aaacatgatt tgcacagagc acattctttg ctttggagac ctcagaactc	22140
cttactatag gccgggcatg gttataatcc cagcactttg ggaagccaag gcgggcagat	22200
cacttgaggc tgagagttca agaccagcct ggccaacatg gtaaaacccc gtctctacta	22260
aaaatacaaa aattagctgg gtgtggtggt ggccacctgt aatcccagct actcaggagg	22320
ctgaggtagg agaatcactt gaacctggga ggcagaagtt gcaataagcc cagatcatgc	22380
cactgcactc cagcctgggc aacaaagcta gactctctca aaagaaaaaa acaaaacaaa	22440
acaaaacaaa acaaaaaaaaa ctccttatta taaactgtaa gaaaaaaaaag gccctactt	22500
cgtccctttt gcaaactctg cttttcctac tactaacca gctggttcag agcaaggaca	22560
ctctgtttgg tgccatcgt gcagactgga aggaagaggt ccttgcccca cacccaacag	22620
tctcctgctg ttaccggcag gttggcaggc aggcaggcga gaagcagcca gggctggtgg	22680
tgtgtccagt ttgaagacta gtttccagcc ctggccctgc tcacctcca agtggccctg	22740
gcaggttcc taccacatc gtggacttca cttccttct ctaagaagct caatcccaa	22800
ggcctcattc ccataggcct tctcaccctt tttctttccc tctggctgaa tgtggccagc	22860
acgggcttcc aaggccatca actcgtctgc agcagcccca tgccttgagc ggcctcagag	22920
cttcctctg cctatgacag tgtgttttg gtcccacac ttgggatcag attgaaactc	22980
gcctccgtgg tgagaatatg ggacatagag cctcggtgac cttggtgagc agcagtcag	23040
gccacctgct cagcctgggg ttgggggggg ctctctctcc ttgactggtc cttgcatttg	23100
cctccatcca gcctgtctgg gctctccgag gcaatggaga ccagcaggag tcacgatggg	23160
tcaggagccc ctttgggcc tcagccctgc cctgccccct aaagtagcac ttggataagc	23220
aaataaatta ttatacttac tatttatggg tgtggtgaat gggatggcaa aggccaaagtc	23280

ttactgatca ccaaacctta agatatatcc tggcagctag tagacccttg ggctaaatga	23340
acagaaaact ggacaaataa agtgtacaca aataactcaa agctgtcatt tgtacacttt	23400
tcgtcttttc ctactacagt ttacatTTTT ataaaggTga gtagatttct aaaatcccgt	23460
ggtaggctct cttgagtttt tcttgTatcc ctgaagtTca gctacaaata agctaatac	23520
taacatttgt tgagcatTTa ctctgtTgtc agggccccgtg ccgagtgtct taggttcaga	23580
atttcattgtc atccccacag cagccctagg agatgaatgc aattcttatg tccacttgac	23640
tgataaggaa gttgaggTtc aaagaggcta aatgactctc ccagggtccc acagctggaa	23700
agtggccaca gggccccagc tggTTTTcta gggcagcagg cagaaggcga ggaggatctg	23760
ggccctgtgg tgccccagcc tcacttgagg gtccctcatct gagagaacag gatccTcaca	23820
gcatgggcag gctgcaagtg gtccctgagg ttatcgtTga gtggaccctg acttgacctg	23880
agtctgtttg gaccccagac ctgctgaaca accacatctt gaagtcagct atgtgtgctg	23940
aagccatcgt tgcggggctg tctgtagaga ccttgagggg cagcagactg gaggtgggct	24000
gcagcgggga catgtcact atcaacggga aggcgatcat ctccaataaa gacatccTag	24060
ccaccaacgg ggtgatccac tacattgatg agctactcat ccagactca ggtaggccag	24120
gcctccgggg gccttgggcc tgcctggccc accatctctt ctgccatcct ttgtggcggg	24180
ggaggggaaa ttcagagatc tttgggGgac tTccctgcct ggaccagct cacagcttct	24240
cggccactgc aaatgtgtgg gttgtgacca gactgatgtg tcttgagctt caggcttgca	24300
agtgcagtgg agaggcagtg gggagctatt gaaggggtct ggggacagac tcaatcacag	24360
aggcctttca gaagatctgc ctgctgtgca tgggcaaaga gggccacttg ctgacctcag	24420
agcatgtgct ttctcagtag tgcccaagct gtcccatggt cactgacca gttagaatga	24480
ctgaatggac tttggcttgt gtctcattag gaatcctagc cccattctag tcttccagtg	24540
agatctgtcc atgagtgaag gaatctcaca ggaaaaaaca aaatgcttct atgggtgtgg	24600
ttgttgccct tatctacacc acagaagcca tcacacagac tgtctttctt cccattgtta	24660
gaatgtgccc tgaccaagca gccacaggg cctgggacag aggtgatct ctgcctaact	24720
gagctcacct ctctccctc tctcctgac tggttagatt ttctaggtga ctgttccct	24780

gatgacacaa	gcccgtggg	ccccagcagt	gtttagaggg	gttggtgact	cacgagatga	24840
cattcctgct	gatgtgtgtc	atgccctggg	gtggatgaat	gataaatgaa	aacagcgctt	24900
ttaacttttg	aaccacattt	ctccttcctt	gtagccaaga	cactatttga	attggctgca	24960
gagtcgatg	tgtccacagc	cattgacctt	ttcagacaag	ccggcctcgg	caatcatctc	25020
tctggaagtg	agcggttgac	cctcctggct	ccccgaatt	ctgtattcaa	aggtaacatg	25080
gggaaggcat	ccctgttaga	ttgtccctgg	aggcagcttc	cccacccctg	tcacctccac	25140
aacactctcc	gatttacagc	accccatggg	acattagaac	ttccactcag	ctcaacaaaa	25200
agcagatgtg	acttcagcag	aaacttcaga	ggctctgttg	tttcattagg	cagtgcagag	25260
aatgcctttg	gggagccgtt	cctcagaact	caagacttga	catctgggag	gcagccgttc	25320
ctcagaactc	aagacttgac	atctgggaga	gcagagcatt	cccttgcctt	tctatttgca	25380
gggtcacttg	ccaatgtata	gtcaagaggt	cagagtgagg	gtacagctga	gctgcagccc	25440
caggaaggca	gagaaggggg	ccaagtgtg	tgcgtgcctg	cccttccttc	ttagggcaaa	25500
actccaaaca	cccttgatta	tctggatctt	ctttaattct	ccatagaaga	taccagatgt	25560
taaggaatat	tggcagcttc	acttggtttc	tcaatccctg	tttccaaact	caaggaggga	25620
tgggcttttt	cactgtattt	atctctcadc	actctcttca	ttgcaggagc	acatctctct	25680
ggacctaacc	atcacctttt	cttgtagatg	gaacccctcc	aattgatgcc	catacaagga	25740
atttgcttcg	gaaccacata	attaaagacc	agctggcctc	taagtatctg	taccatggac	25800
agaccctgga	aactctgggc	ggcaaaaaac	tgagagtttt	tgtttatcgt	aatgtaagtt	25860
ctgggtccta	aatcatgctc	ctgggaagct	ccttactgtg	ggacttgtat	tagtgtaaaa	25920
aaaaatgtcc	tcaataagca	ggagtttgca	tgagaactgg	ttgctgacaa	ggaaggaaat	25980
aatttctgga	aaatatagat	aacaaaatga	gatcctgcag	aaggattgga	atctcttttt	26040
ctggaggcct	ttgagaataa	accacacaat	tatccaacct	gtattgtgaa	ggaataagtc	26100
cttcttgaat	tcaggaatta	acacctggga	ggagggatgg	agttcagact	ctttctgagc	26160
ttatgagaag	agaagcccc	taaactaaaa	tacagccctc	cttgggtccaa	aaggtcctt	26220
ctctcttctg	ctgtatcttc	tttgttttca	aaccaacag	ttacctgga	aatcaaaaag	26280

gaagtacaac tcaacatagc tcttgccctgg gaccaaccag caccatttgg ctaaagatgg	26340
ttatcatctg ttaaacaag aaataaataa atgggttcaa cgtattttatt tcaacattgt	26400
caatggacct catgtgtaac tgatatcttc attatgggac ctctgtgtga ctttattggg	26460
gcctctctaa ccgttctttc ctttaaggaag accattttatt gttttatttc ctggagaaaa	26520
tacatcattt tatcccagcc ttaataaccc atcccagtgt atactccttc atcttcattg	26580
ataatgacct tgctacatgc tctgaacaaa tcaggaggcc cctcgtggaa gtataaccag	26640
tcctttcttt ctctgtccct cttctgtgca gagcctctgc attgagaaca gctgcatcgc	26700
ggcccacgac aagaggggga ggtacgggac cctgttcacg atggaccggg tgctgacccc	26760
cccaatgggg actgtcatgg atgtcctgaa gggagacaat cgccttaggt aattagtcc	26820
atccccgggt ggagcttctg ccagtggtc atgctggagt gggatgtggg gccccagcta	26880
tttgtcaagc tttcttctac cttggggatt caattaacac tagcagtgc ctgctgcgac	26940
cttccagact tgggatgggg aaaaggcaag ggtcgccttg aaagcttaca ttgggaagaa	27000
gggttacttc taagagtgt atcttcacat gcatgggaag caggaggagg ggactacatt	27060
tttatgactg aagtgcaagg aaaacatcac cctctcattg taaagctcca agtgagccaa	27120
gagcacatag tttacagtgc acgatgagcc tctactctc tgcgcagtat ctgtttattg	27180
caactgaagc acccttgatga gtttgttttc ttgcccgct atctccattt ctgacttgct	27240
cattcacctt ggggtgctgt catattgaat gtttcctgt cactgacttc agccacctgc	27300
acaagggtt ggagaccaca cccctctgcc ctcccagaat catatccctg gaggtcagc	27360
tagtctctgg gtcagccata cctctgccct ttcttttccc tcctttctcc tgttgccctt	27420
gacgtctggc catttaacag agcttagcat ttttgctggg tgagagagc tggagcctgg	27480
aatcactccc tctttgtgca tacggagggc atgaaaacca aggtgtgtgc attccagtgg	27540
cctggactct actatcctca gtggtgaggt atttaaggaa aatacctctc agcgtggtga	27600
ggtatttaag gaaaatacct gttgacaggt gacattttct gtgtgtgtat ctacagcatg	27660
ctggtagctg ccatccagtc tgcaggactg acggagacc tcaaccggga aggagtctac	27720
acagtctttg ctcccacaaa tgaagccttc cgagccctgc caccaagaga acggagcaga	27780

ctcttgggta aagaccaact taagtacacg tctccatfff tctaaagtag tgatccctca	27840
gggccccagc agcaaacagt tggcacatca aggattgact tgaagggatt ttatgacaag	27900
actattagtg aaagagtggg cgggactaaa ggaactagca aaggatgagg ccaaccaggg	27960
actagcaacc ctgggaagcc ttactacct ctaggcctgg gggaatggga ggatgagagc	28020
aggaaccagg gaggtcatga gccttggaca agggcacaga acagcagcca gagccatgtg	28080
cagccagcca ctgtcagaac catgcaaggg ggaccactca gcgccccagc ctccctctca	28140
gacagttgcc atctgggtct cttgttggct gatgcgagag caggaggagg cccactgatg	28200
cagttcatag agctcagcct cctgggcagg aaaccgggca gagaggagta gaaaagaatt	28260
aagggtggct gcgaccagcc cagtcactga ggcacgttfc ccactggaga cctatgagca	28320
cagtgataat aaagccagtt acctgcactg actatccctc cagacaaaag ctttcccaag	28380
aagttagtca tggctctgag agatctagtt gaggatgttt ggcaagggat ctagtggtta	28440
cgggtggcta agaaaaatga ggaaggtaag agtatcttgc agcctgtgtt gggaggatta	28500
aataggatgc cacacacagg gccaggcaga cagcctggtc agtaatagcc atgacgatgg	28560
gggcgggggg agcaggaatg ggagttgcag tgtttagctc agatgcatgc ctgtgagaga	28620
tgtttccact ctcacagaaa gatgagacca aggaaaagga ggagggaagag gaaggacctt	28680
gacaaacctt ggggcccaca ttgtctacac ctcccttcct gctctagagc agaatagaaa	28740
gttcaggttg caggcagctc taagttgaat tcgtgtcctg tttaattttc ttatttgcta	28800
aatgaatgcc tgtgtctgtg atgctgacgt atgttcctaa ggagagggga gaagttcatt	28860
ctgaacataa acttttcac ctcctctctgt ccagcaagaa tggaatattc cccaagtggc	28920
ctgagccagc ttggctttct ttttgttttc aattatgtgg gagttgagga gggggatggg	28980
aaaagcttcc caaacacacc ctccccagg cctgaggcac ccctggggga cagagagtgt	29040
tagaggttgg tacagggtgt agagatattg aaaggacatc ccatgcaccc caggggctgg	29100
tgtggctctg tacttccagg caatatfttg tggaaaggga acctgtcag ctccaggttg	29160
tgatgtttg aaaatcagtt ggtaccagt ggctccatcc tctggcaggc atgtggattt	29220
gtcaataacc aagtgaactc tccaaaataa gttaaaactt cctcccttct cagtttcaag	29280

atgctggaaa tagctgttca taagccctgg ggaaatttag ccctttggct ggtaatggga	29340
gtatccgaga tgagagggca gctggaaact ttcggaatga cctcccacac ttaatttggg	29400
aaatgcctct gcacctttat gggcaaccag atgcctgccc cagttgctgg agacactgat	29460
gtgggctgaa aggaatgctg agacgtgacg aggagagatg ctgcggaggg aatatcccc	29520
tcagccctga cctcatcggc tccatggctc ctccacagta cagctgtcta ctcttttaag	29580
ttctcccttc aggaaatagc catctcaaac agaatgtgca tttagaggca gaatgtgtaa	29640
atattgcact actgtgttat aaccgtcagg agccatgctg atgatgaaac gtcccagatg	29700
ccggtgctgg aaaggtcctt ggctttccaa gcaaataatt atctcatgga aacatgagtc	29760
atactcacag aggagtatgg attaactcct tctcagcagc cagggagccc agcatcccag	29820
acagcatatt taaccagag gccaaactgac tgctggggca gatttgttgt catgaacatg	29880
tgcttttgtt cctctgacca ttagacagat tgtgggtcac aacgttgagt atacagtggg	29940
agcttaataa gtgcttattc cctgggcagg gagttcttca tticaggggt gaccacttac	30000
atcttctcct ctgggcccct cttgaccagg ctaattacca ttcttgggat taactctatc	30060
tccttttccc gcaacctgca ggagatgcca aggaacttgc caacatcctg aaataccaca	30120
ttggtgatga aatcctgggt agcggaggca tcggggccct ggtgcggcta aagtctctcc	30180
aagtgacaa gctggaagtc agcttggtaa gtgtcctgca aatcaaaggc tggctaaatt	30240
tccccagggc agggctccag gacatatctc acccccagga tggattata cacacacaac	30300
cttcaagttg cagcccgaat ctctgagtgt aattcgtcca aagaaaaaga gaaaagagaa	30360
gagggtcttc agggaaatca agtgagatca tagttagaca tgagtaagaa cttccagatt	30420
tacaagggaa tagagcatct gatttggcat ctgagagagg ctattagatc ttccttctct	30480
taaggaggtt gtaggcaact agttatgtga ctgaagagat cagtctgtac tcacaccatc	30540
ccacccccca aaccagggc ttcactgagt tglacatga accagaccat cccaagaggc	30600
tttttgagtt ctgacacttg ctctgtgagc ctcccttgc tctgcacatt gatgatataa	30660
ctttgtaact gcactaagag tgttcctaaa gcagatagcc agccgagctc cagaaatctc	30720
cctggctgca cctgcagagg ccactgacct ctctgtggag ggaccgctct tcagtgtgtg	30780

gctggettct actctctgct cctctctctt ggtcttcagc catccattgc tcaccagttt	30840
ctcacgagga gcataggaag atatgcatgt agggaggtag gcacggggat gacttgtttg	30900
actttagcag gtcattcaag aatctcctcg cacctggttt cagatgctgg ggtcctgtct	30960
gtcacaggct tctgtgcctc ctacccccctt gagtttgtca catggccctt caggaaggcc	31020
tgagatagat ttgccctggg tgggcccctt atgagaaaaa cttaagttag gcaccaggc	31080
aaaatggaaa gagccctttg cccagagcag gaagcctgtc ttccatttcc agctgttcca	31140
cctacttagc ttaaaaaggg cacttcgcct gtcttcagtc tcagtctcag tctcctcttc	31200
tgtggaatgg gacaataata tctactctcc ttatcataca ctgctgtgag gactgagtgg	31260
atcacacaaa aaagcattat gtaaattgca aagtgctaaa tccacacagg agatttgaat	31320
taatccacca cactgaagggt ctgtcaaggg cagggactgt ttcattcacc agagtatccc	31380
cagtctaaca caggacttgg catatgaaaa gtgttcagta ggccgggtgc agtggtcat	31440
gcctgtaatc ccagcacttt gggaggccaa agtgggcgga tcctctgagg tcaggagttc	31500
aagtccagcc tggccaacgt ggtgaaacca catctctact aaaaatacaa aattagctgg	31560
gcgtgggtggc acatgcctgt aatcacagct actctggagg ctgaggcagg agaatcactt	31620
gaaccagga ggcggagggt gcagttagtc gagatcatgc cactgcctc cagcctgggc	31680
gacaagattg aaactccatc tcaaaaacaa agaacaagga aaaaaacgaa aactgttcag	31740
taaacacttg ctgaatgaat aaaataaata tataaatgta taaataaatg ctctactttc	31800
aaccactact ctgtttttct tttagaaaaa caatgtgtg agtgtcaaca aggagcctgt	31860
tgccgagcct gacatcatgg ccacaaatgg cgtggtccat gtcatcacca atgttctgca	31920
gcctccaggt aagtgtcgca tccccactga ctctgcagcc agtccttttc ttcatgtggc	31980
agttggtgga gagaagaaaa actgttctaa acaatgatga gaataacatg taattgtgat	32040
agttaaactg tgcctatgtg actgattgca gagtgaattg ggagctgttg gttttgaatg	32100
caccacacta aggaatgtga ggacacattg ctctttgcgg agttgccag ctatattagc	32160
tccccctgga cacagcccag ttttctgtat tcgcgtggat gctgtccgcg cgattcccag	32220
cactcctctt acagcatctc acctcagtgt atgttccttg cctccagtgc agttgaacct	32280

cagtcctgcc	tctctcatg	tgtgcattca	ctttctttgg	tgtctctcc	ccatgggcc	32340
agttctacca	tgagttatga	aacattatgg	agaaaacatg	tctttggaaa	tgtgagccag	32400
aaagcccacc	agtccccctc	agtcacggtt	gttatgaatg	acatgcta	ggtttcactc	32460
tggicaaacc	tgccttttct	tctctctca	gccaacagac	ctcaggaaag	aggggatgaa	32520
cttgccagact	ctgcgcttga	gatcttcaaa	caagcatcag	cgttttccag	ggtaagatgc	32580
ctgctagggt	tgcgcctagc	ctgagcagcc	tcaggctctc	tgtttgggcc	atagaggagc	32640
ctctccagcc	cctgtcttcc	ttggctgctc	cccagggtc	tcttaaaact	tctccccact	32700
cccactgagg	catctcagc	cccagcctgt	gtcaaattca	gagtaaagaa	ccaaggcaac	32760
tccctggctt	tcatgggcc	aagcgcaggc	tttcacaccg	aggcctctga	gcctcagatc	32820
atggggaagt	cactgctgga	gagaacagac	atagctctgg	aagccatctg	ccaagagggt	32880
cagcccatcc	caagttcatc	ttacagtggc	caggcctgcc	ctgagccggg	gcctctgggt	32940
cactcttctg	ctgtccatgg	cattgccc	cctgggtgag	gctggggctc	tcttgggcac	33000
tgtatgtatt	ctggatacag	ggatactggg	ctcgtatgt	gtgtggagcc	atcccttct	33060
tgccccagcc	ccacctccct	ctcaaaccct	ctctggctct	ttctgagctt	cctttcctgc	33120
tccccagctt	gcccagtgt	cagtgcceca	cttggctctt	ttgtacttc	gggtcaggtg	33180
gagcctcttg	ggaatgtgaa	gtgccttaca	gaaagattgc	acttcaagag	gagaggctgc	33240
agggagccat	cctaaacce	gaggcctgga	gcttactgtg	tcactttact	tttgtacaca	33300
gggtctctct	tagtgccctc	gagaaggatt	cttggccctg	agcttctact	cctgaggcca	33360
cctctgtgca	gccccagctc	cctcaactct	aggctgtagt	ctcagtggga	aagcctggct	33420
tgggggtctc	ctaggaatgt	ccacctgaag	gcacattga	taggggcttg	cacaacttat	33480
gtctgccaa	gccacctgag	gaactccctg	gtgcctataa	gttccacctt	ccccctctc	33540
ttctctgccc	cagcatTTTT	tctgagtagg	ggtggcaatg	ggcaaagcca	ttgtcataag	33600
cagttgcagg	tataactttc	actagaaaac	ctgacacctt	gtgttttctt	tcaggcttcc	33660
cagaggctctg	tgcgactagg	tgagtctggt	ctgggtttga	agtcattgca	gacctgttta	33720
ggccttacc	ccaagcaagc	ccaagcctgc	catctgctgt	atatagataa	gaacatcatg	33780

gtgcagtaaa agaagcctgg cctttggagt cagaacagca gggtgacttg gggtcagacc	33840
cagagcaccc catttccttc tctgtaagat gaggataata agagtaacaa ccttttaggg	33900
ttaaggtgag ttttcagctt aggaagctcg ggaatatctg aaagggcttg gcaggaaccc	33960
atggtgagga tctagttcca agttgatagg tacagaaaac cagaacatcg ggccttgagt	34020
aaagagtgaa gtttcacaaa ccacaaagca cctgctatgt gcaggagagc atggcagaag	34080
gaggctgctt ggccctggtc cttgagattc tgacagtgtc ctagacagac atggggagat	34140
ctgcacctat ttgacgttac caacttctct ttttcagccc ctgtctatca aaagttatta	34200
gagaggatga agcattagct tgaagcacta caggaggaat gcaccacggc agctctccgc	34260
caatttctct cagatttcca cagagactgt ttgaatgttt tcaaaaccaa gtatcacact	34320
ttaatgtaca tgggccgcac cataatgaga tgtgagcctt gtgcatgttg gggaggaggg	34380
agagagatgt actttttaaa tcatgttccc cctaaacatg gctgttaacc cactgcatgc	34440
agaaacttgg atgtcactgc ctgacattca ctccagaga ggacctatcc caaatgtgga	34500
attgactgcc tatgccaagt ccttgaaaaa ggagcttcag tattgtgggg ctcataaaac	34560
atgaatcaag caatccagcc tcatgggaag tcctggcaca gtttttgtaa agcccttgca	34620
cagctggaga aatggcatca ttataagcta tgagttgaaa tgttctgtca aatgtgtctc	34680
acatctacac gtggcttgga ggcttttatg gggccctgtc caggtagaaa agaaatggta	34740
tgtagagctt agatttcctt attgtgacag agccatggtg tgtttgtaat aataaaacca	34800
aagaaacata	34810

<210> 52
<211> 683
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基因蛋白質產物

<400> 52

Met Ala Leu Phe Val Arg Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Leu
1 5 10 15

Gly	Pro	Ala	Ala	Thr	Leu	Ala	Gly	Pro	Ala	Lys	Ser	Pro	Tyr	Gln	Leu
20					25					30					
Val	Leu	Gln	His	Ser	Arg	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	His	Gly	Pro	Asn	Val
35					40					45					
Cys	Ala	Val	Gln	Lys	Val	Ile	Gly	Thr	Asn	Arg	Lys	Tyr	Phe	Thr	Asn
50					55					60					
Cys	Lys	Gln	Trp	Tyr	Gln	Arg	Lys	Ile	Cys	Gly	Lys	Ser	Thr	Val	Ile
65					70					75					80
Ser	Tyr	Glu	Cys	Cys	Pro	Gly	Tyr	Glu	Lys	Val	Pro	Gly	Glu	Lys	Gly
85					90					95					
Cys	Pro	Ala	Ala	Leu	Pro	Leu	Ser	Asn	Leu	Tyr	Glu	Thr	Leu	Gly	Val
100					105					110					
Val	Gly	Ser	Thr	Thr	Thr	Gln	Leu	Tyr	Thr	Asp	Arg	Thr	Glu	Lys	Leu
115					120					125					
Arg	Pro	Glu	Met	Glu	Gly	Pro	Gly	Ser	Phe	Thr	Ile	Phe	Ala	Pro	Ser
130					135					140					
Asn	Glu	Ala	Trp	Ala	Ser	Leu	Pro	Ala	Glu	Val	Leu	Asp	Ser	Leu	Val
145					150					155					160
Ser	Asn	Val	Asn	Ile	Glu	Leu	Leu	Asn	Ala	Leu	Arg	Tyr	His	Met	Val
165					170					175					
Gly	Arg	Arg	Val	Leu	Thr	Asp	Glu	Leu	Lys	His	Gly	Met	Thr	Leu	Thr
180					185					190					
Ser	Met	Tyr	Gln	Asn	Ser	Asn	Ile	Gln	Ile	His	His	Tyr	Pro	Asn	Gly
195					200					205					
Ile	Val	Thr	Val	Asn	Cys	Ala	Arg	Leu	Leu	Lys	Ala	Asp	His	His	Ala

210					215					220									
Thr	Asn	Gly	Val	Val	His	Leu	Ile	Asp	Lys	Val	Ile	Ser	Thr	Ile	Thr				
225					230					235					240				
Asn	Asn	Ile	Gln	Gln	Ile	Ile	Glu	Ile	Glu	Asp	Thr	Phe	Glu	Thr	Leu				
					245					250					255				
Arg	Ala	Ala	Val	Ala	Ala	Ser	Gly	Leu	Asn	Thr	Met	Leu	Glu	Gly	Asn				
					260					265					270				
Gly	Gln	Tyr	Thr	Leu	Leu	Ala	Pro	Thr	Asn	Glu	Ala	Phe	Glu	Lys	Ile				
					275					280					285				
Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Asn	Arg	Ile	Leu	Gly	Asp	Pro	Glu	Ala	Leu	Arg				
					290					295					300				
Asp	Leu	Leu	Asn	Asn	His	Ile	Leu	Lys	Ser	Ala	Met	Cys	Ala	Glu	Ala				
305					310					315					320				
Ile	Val	Ala	Gly	Leu	Ser	Val	Glu	Thr	Leu	Glu	Gly	Thr	Thr	Leu	Glu				
					325					330					335				
Val	Gly	Cys	Ser	Gly	Asp	Met	Leu	Thr	Ile	Asn	Gly	Lys	Ala	Ile	Ile				
					340					345					350				
Ser	Asn	Lys	Asp	Ile	Leu	Ala	Thr	Asn	Gly	Val	Ile	His	Tyr	Ile	Asp				
355					360					365									
Glu	Leu	Leu	Ile	Pro	Asp	Ser	Ala	Lys	Thr	Leu	Phe	Glu	Leu	Ala	Ala				
370					375					380									
Glu	Ser	Asp	Val	Ser	Thr	Ala	Ile	Asp	Leu	Phe	Arg	Gln	Ala	Gly	Leu				
385					390					395					400				
Gly	Asn	His	Leu	Ser	Gly	Ser	Glu	Arg	Leu	Thr	Leu	Leu	Ala	Pro	Leu				
					405					410					415				

Asn Ser Val Phe Lys Asp Gly Thr Pro Pro Ile Asp Ala His Thr Arg
420 425 430

Asn Leu Leu Arg Asn His Ile Ile Lys Asp Gln Leu Ala Ser Lys Tyr
435 440 445

Leu Tyr His Gly Gln Thr Leu Glu Thr Leu Gly Gly Lys Lys Leu Arg
450 455 460

Val Phe Val Tyr Arg Asn Ser Leu Cys Ile Glu Asn Ser Cys Ile Ala
465 470 475 480

Ala His Asp Lys Arg Gly Arg Tyr Gly Thr Leu Phe Thr Met Asp Arg
485 490 495

Val Leu Thr Pro Pro Met Gly Thr Val Met Asp Val Leu Lys Gly Asp
500 505 510

Asn Arg Phe Ser Met Leu Val Ala Ala Ile Gln Ser Ala Gly Leu Thr
515 520 525

Glu Thr Leu Asn Arg Glu Gly Val Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn
530 535 540

Glu Ala Phe Arg Ala Leu Pro Pro Arg Glu Arg Ser Arg Leu Leu Gly
545 550 555 560

Asp Ala Lys Glu Leu Ala Asn Ile Leu Lys Tyr His Ile Gly Asp Glu
565 570 575

Ile Leu Val Ser Gly Gly Ile Gly Ala Leu Val Arg Leu Lys Ser Leu
580 585 590

Gln Gly Asp Lys Leu Glu Val Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser Val
595 600 605

Asn Lys Glu Pro Val Ala Glu Pro Asp Ile Met Ala Thr Asn Gly Val

610

615

620

Val His Val Ile Thr Asn Val Leu Gln Pro Pro Ala Asn Arg Pro Gln
625 630 635 640

Glu Arg Gly Asp Glu Leu Ala Asp Ser Ala Leu Glu Ile Phe Lys Gln
645 650 655

Ala Ser Ala Phe Ser Arg Ala Ser Gln Arg Ser Val Arg Leu Ala Pro
660 665 670

Val Tyr Gln Lys Leu Leu Glu Arg Met Lys His
675 680

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種用於偵測人類個體之角膜營養不良的反應混合物，該反應混合物包含：

(A)至少第一對擴增引子，其用於擴增及測定來自該個體之生物檢體的第一TGF β I基因序列；及

(B)至少三個偵測探針之第一組偵測探針，其含有：

第一偵測探針，其包含SEQ ID NO:45或47之序列；

第二偵測探針，其包含SEQ ID NO:46之序列；及

第三偵測探針，其包含SEQ ID NO:50之序列。

【請求項2】

如請求項1之反應混合物，其進一步包含第二組偵測探針，其含有：

第四偵測探針，其包含SEQ ID NO:25之序列，及

一或二個選自由以下組成之群之偵測探針：

第五偵測探針，其包含SEQ ID NO:26之序列；

第六偵測探針，其包含SEQ ID NO:48之序列；及

第七偵測探針，其包含SEQ ID NO:49之序列；及

至少第二對擴增引子，其用於擴增及測定來自該個體之生物檢體的第二TGF β I基因序列。

【請求項3】

如請求項1之反應混合物，其中：

該第一對擴增引子包含第一擴增引子及第二擴增引子，該第

一擴增引子包含核苷酸序列SEQ ID NO:43，且該第二擴增引子包含核苷酸序列SEQ ID NO:44。

【請求項4】

如請求項1之反應混合物，其中：

該第一TGF β I基因序列包含來自該個體之該生物檢體的編碼胺基酸殘基555的核苷酸。

【請求項5】

如請求項2之反應混合物，其中：

該第一TGF β I基因序列包含來自該個體之該生物檢體的編碼胺基酸殘基555的核苷酸，且

該第二TGF β I基因序列包含來自該個體之該生物檢體的編碼胺基酸殘基124的核苷酸。

【請求項6】

如請求項5之反應混合物，其中：

該第一對擴增引子包含第一擴增引子及第二擴增引子，該第一擴增引子包含核苷酸序列SEQ ID NO:43，且該第二擴增引子包含核苷酸序列SEQ ID NO:44；且

該第二對擴增引子包含第三擴增引子及第四擴增引子，該第三擴增引子包含核苷酸序列SEQ ID NO:1，且該第四擴增引子包含核苷酸序列SEQ ID NO:2。

【請求項7】

一種用於偵測角膜營養不良的方法，其包含：

(A)使用反應混合物擴增來自人類個體之生物檢體的第一

TGF β I基因序列，該反應混合物包含：

至少第一對擴增引子，其用於擴增TGF β I基因序列；及

一組至少三個偵測探針，其含有：

第一偵測探針，其包含SEQ ID NO:45或47之序列；

第二偵測探針，其包含SEQ ID NO:46之序列；及

第三偵測探針，其包含SEQ ID NO:50之序列；

(B)使該一組至少三個偵測探針中的一個偵測探針與該第一TGF β I基因序列雜交；及

(C)依據以下(i)及(ii)來偵測該第一TGF β I基因序列中之突變：

(i)在步驟(B)中用於雜交之該一組至少三個偵測探針中的一個偵測探針與第一TGF β I基因序列之雜交；及

(ii)該一組至少三個偵測探針中的其他二個偵測探針與第一TGF β I基因序列之雜交失敗。

【請求項8】

如請求項7之方法，其中該反應混合物包含如請求項1至6中任一項之反應混合物。

【請求項9】

一種偵測來自人類個體之檢體中與角膜營養不良有關之基因組突變的方法，該方法包含：

(A)使用黏著於基材頂端之人類個體之上皮細胞；

(B)在裂解溶液中攪拌該基材之該頂端，該裂解溶液溶解黏著於該基材之細胞；

(C)在該攪拌(B)完成後，自該裂溶液中移除該基材；

(D)在該移除(C)後，培育該裂解溶液；

(E)自該裂解溶液分離基因組DNA，形成gDNA溶液；及

(F)使用用於擴增TGFβI基因之至少第一對引子、第一組至少三個偵測探針及該gDNA溶液，藉由同時暴露該gDNA溶液於該第一組至少三個偵測探針來測定TGFβI基因中所存在之至少一個核苷酸的特性，該第一組至少三個偵測探針含有：

第一偵測探針，其包含SEQ ID NO:45或47之序列；

第二偵測探針，其包含SEQ ID NO:46之序列；及

第三偵測探針，其包含SEQ ID NO:50之序列；

其中：

該至少一個核苷酸位於該TGFβI基因中對應於與角膜營養不良有關之單核苷酸多形現象(SNP)之特定位置。

【請求項10】

如請求項9之方法，其進一步包含：

(G)使用至少第二對引子、第二組偵測探針及該gDNA溶液，藉由同時暴露該gDNA溶液於該二組偵測探針來測定該TGFβI基因中所存在之至少一個第二核苷酸的特性，該第二組偵測探針含有：

第四偵測探針，其包含SEQ ID NO:25之序列，及

一或二個選自由以下組成之群之偵測探針：

第五偵測探針，其包含SEQ ID NO:26之序列；

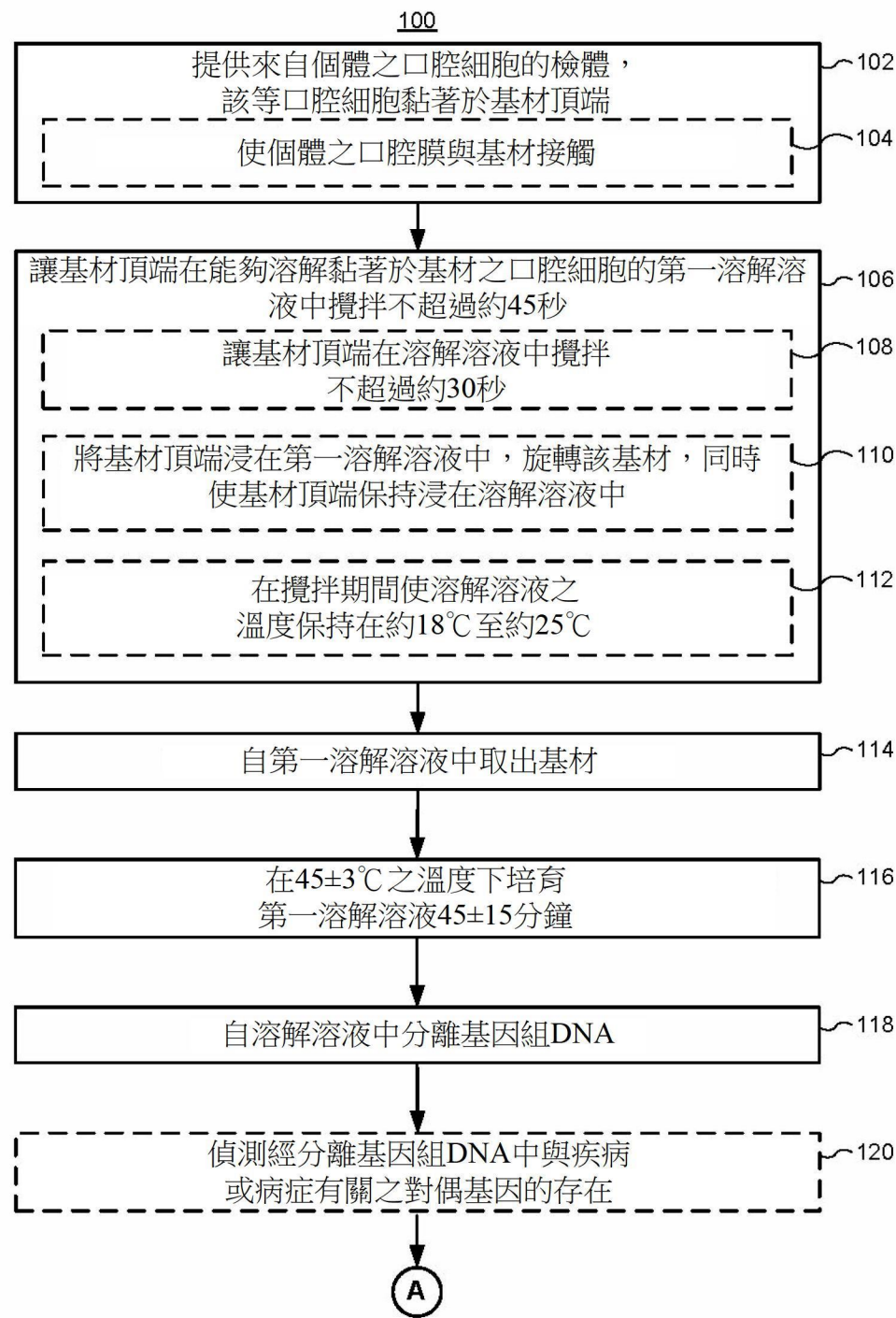
第六偵測探針，其包含SEQ ID NO:48之序列；及

第七偵測探針，其包含SEQ ID NO:49之序列；

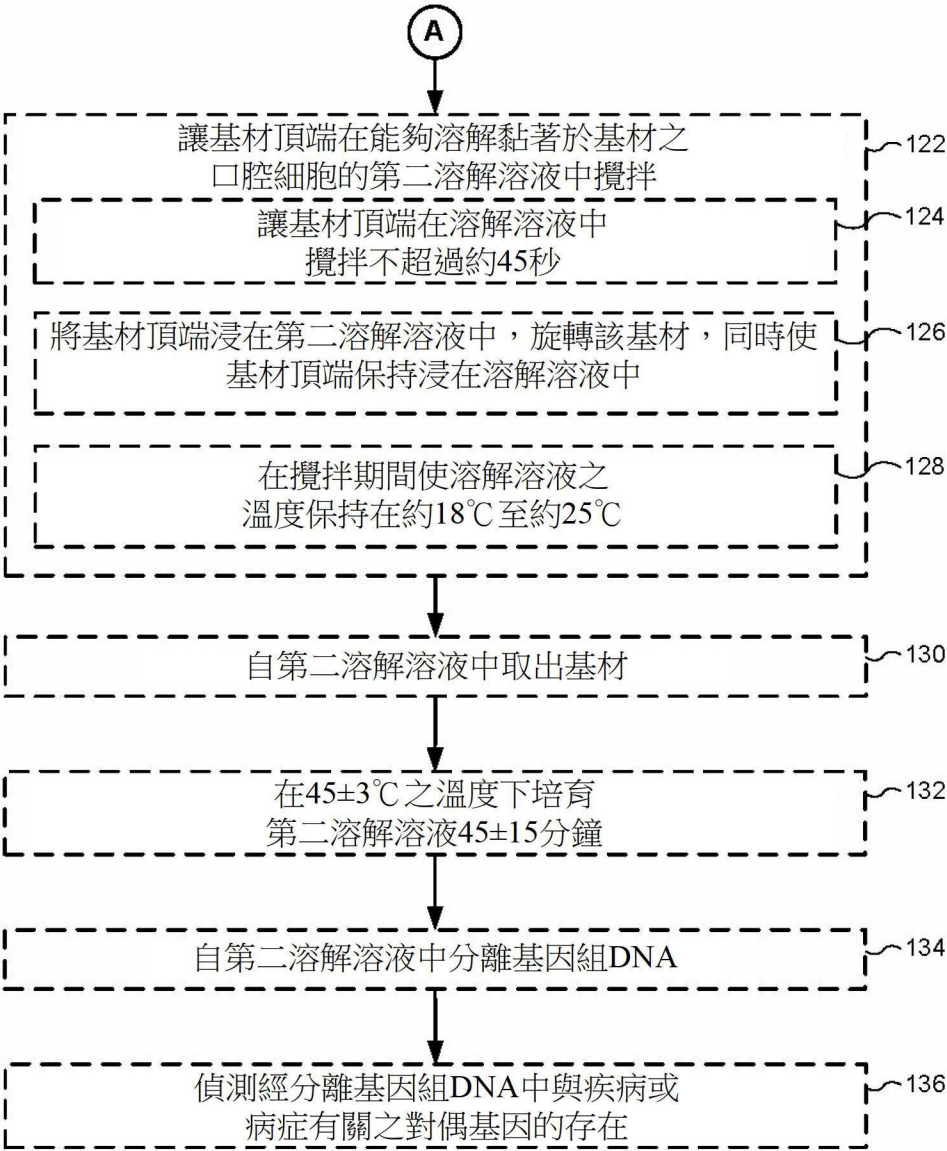
其中：

該至少一個第二核苷酸位於TGF β I基因中對應於與角膜營養不良有關之第二單核苷酸多形現象(SNP)之第二特定位置，其獨立於該至少一個核苷酸之位置。

【發明圖式】



【圖1A】



【圖1B】

ACD Fw 引子： (SEQ ID NO: 1) 5'-TCC ACC ACC ACT CAG CTG TA	ACD Fw5 引子： (SEQ ID NO: 13) 5'-TTT GGG CTT TCC CAC ATG C
ACD Re 引子： (SEQ ID NO: 2) 5'-CCA TCT CAG GCC TCA GCT T (60 bp)	ACD Re5 引子： (SEQ ID NO: 14) 5'-GGC AGA CGG AGG TCA TCT CA
AV Fw 引子： (SEQ ID NO: 3) 5'-TGC AGC CCT ACC ACT CTC AA	ACD Fw6 引子： (SEQ ID NO: 15) 5'-GTA GTA CCG TGC TCT CTG
AV Re 引子： (SEQ ID NO: 4) 5'-AGG CCT CGT TGC TAG G (150 bp)	ACD Re6 引子： (SEQ ID NO: 16) 5'-AGT TCC CCA TAA GAA TCC CCC
Real Fw 引子： (SEQ ID NO: 5) 5'-TAG TCT CTT ATT CTA ATA GA	ACD Fw7 引子： (SEQ ID NO: 17) 5'-GGC TGG ACC CCC AGA GG
Real Re 引子： (SEQ ID NO: 6) 5'-GCT GCA GAC TCT GTG TTT AA (860 bp)	ACD Re7 引子： (SEQ ID NO: 18) 5'-ACC CCT CGG GGA AGT AAG G
ACD Fw2 引子： (SEQ ID NO: 7) 5'-CCA TCC CTC CTT CTG TCT TCT G	ACD Fw8 引子： (SEQ ID NO: 19) 5'-AAC CTT TAC GAG ACC CTG GGA
ACD Re2 引子： (SEQ ID NO: 8) 5'-CGG GCC CCT CCA TCT C (140 bp)	ACD Re8 引子： (SEQ ID NO: 20) 5'-GAC TCC CAT CCA TCA TGC CC
ACD Fw3 引子： (SEQ ID NO: 9) 5'-CAG AGA AGG GAG GGT GTG GTT	ACD Fw9 引子： (SEQ ID NO: 21) 5'-AGT CGT TGG ATC CAC CAC CA
ACD Re3 引子： (SEQ ID NO: 10) 5'-GGG CGA AGA TGG TGA AGC T (190 bp)	ACD Re9 引子： (SEQ ID NO: 22) 5'-GAC GTC ATT TCC TAC TGT TTC AGG
ACD Fw4 引子： (SEQ ID NO: 11) 5'-TCC TCG TCC TCT CCA CCT GTA	ACD Fw10 引子： (SEQ ID NO: 23) 5'-CCC CCC AGA AAC AGC CTG
ACD Re4 引子： (SEQ ID NO: 12) 5'-AGC TGG CAA GGA GGC CC	ACD Re10 引子： (SEQ ID NO: 24) 5'-TTC TAA GGG GTT AAG GAG AAA GCT T

【圖2】

正常探針1： (SEQ ID NO: 25) VIC-CAC GGA CCG CAC GGA-NFQ (15 bp)	正常探針5： (SEQ ID NO: 33) VIC-CTG TAC ACG GAC CGC ACG GAG-NFQ
突變體探針1： (SEQ ID NO: 26) FAM-CAC GGA CCA CAC GGA-NFQ	突變體探針5： (SEQ ID NO: 34) FAM-CTG TAC ACG GAC CAC ACG GAG-NFQ (21 bp)
正常探針2： (SEQ ID NO: 27) VIC-ACA CGG ACC GCA CG-NFQ	正常探針6： (SEQ ID NO: 35) VIC-GCT GTA CAC GGA CCG CAC GGA GAA-NFQ
突變體探針2： (SEQ ID NO: 28) FAM-ACA CGG ACC ACA CG-NFQ (14 bp)	突變體探針6： (SEQ ID NO: 36) FAM-GCT GTA CAC GGA CCA CAC GGA GAA-NFQ
正常探針3： (SEQ ID NO: 29) VIC-TAC ACG GAC CGC A-NFQ	正常探針7： (SEQ ID NO: 37) VIC-ACC GCA CGG AGA AGC-NFQ
突變體探針3： (SEQ ID NO: 30) FAM-TAC ACG GAC CAC A-NFQ (13 bp)	突變體探針7： (SEQ ID NO: 38) FAM-ACC ACA CGG AGA AGC-NFQ
正常探針4： (SEQ ID NO: 31) VIC-CTG TAC ACG GAC CGC ACG-NFQ	正常探針8： (SEQ ID NO: 39) VIC-ACC GCA CGG AGA AGC TGA GGC-NFQ
突變體探針4： (SEQ ID NO: 32) FAM-CTG TAC ACG GAC CAC ACG-NFQ (18 bp)	突變體探針8： (SEQ ID NO: 40) FAM-ACC ACA CGG AGA AGC TGA GGC-NFQ
	正常探針8： (SEQ ID NO: 41) VIC-ACC GCA CGG AGA AGC TGA GGC CTG-NFQ
	突變體探針8： (SEQ ID NO: 42) FAM-ACC ACA CGG AGA AGC TGA GGC CTG-NFQ

【圖3】

TaqMan MGB探針

#TGFB1 R124NI	VIC-CAC GGA CCG CAC GGA- MGB NFQ
#TGFB1 R124H	FAM-CAC GGA CCA CAC GGA- MGB NFQ
#TGFB1 R124C	FAM-CAC GGA CTG CAC GGA- MGB NFQ
#TGFB1 R124L	FAM-CAC GGA CCT CAC GGA- MGB NFQ
#TGFB1 R555NI	VIC-CAC CAA GAG AAC GGA-MGB NFQ
#TGFB1 R555W	FAM-CAC CAA GAG AAT GG-MGB NFQ
#TGFB1 R555Q-1	FAM-AC CAA GAG AAC AGA G-MGB NFQ

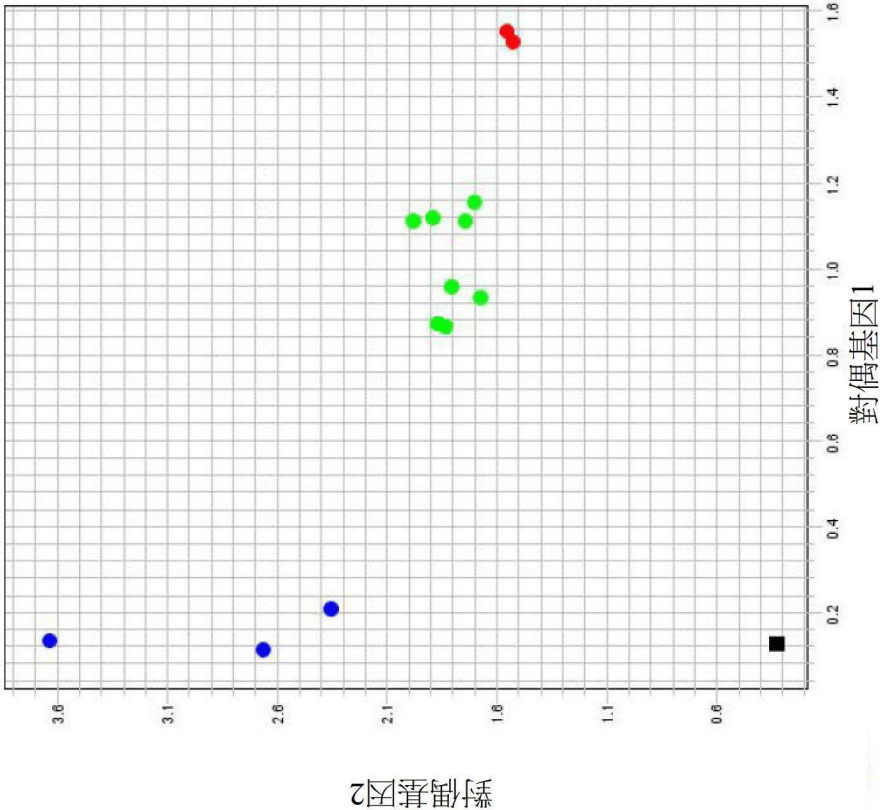
序列偵測引子

#TGFB1 124 F	TCC ACC ACC ACT CAG CTG TA
#TGFB1 124 R	CCA TCT CAG GCC TCA GCT T
#TGFB1 555 F	ACA CAG TCT TTG CTC CCA CAA A
#TGFB1 555 R	ACT TAA GTT GGT CTT TAC CCA AGA GTC T

【圖4】

資料A >> LifeTech/7500FAST；快速模式

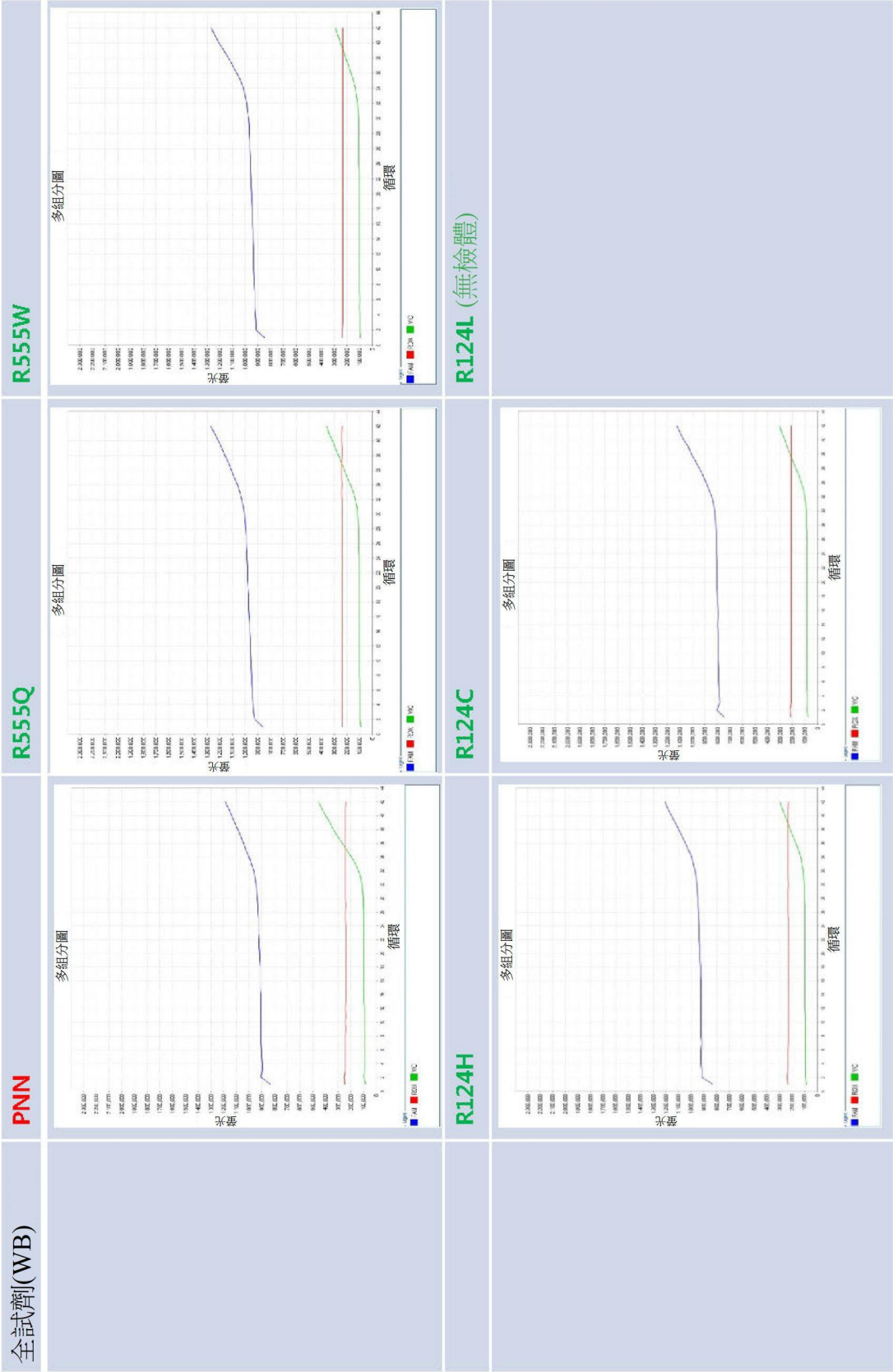
對偶基因辨別圖



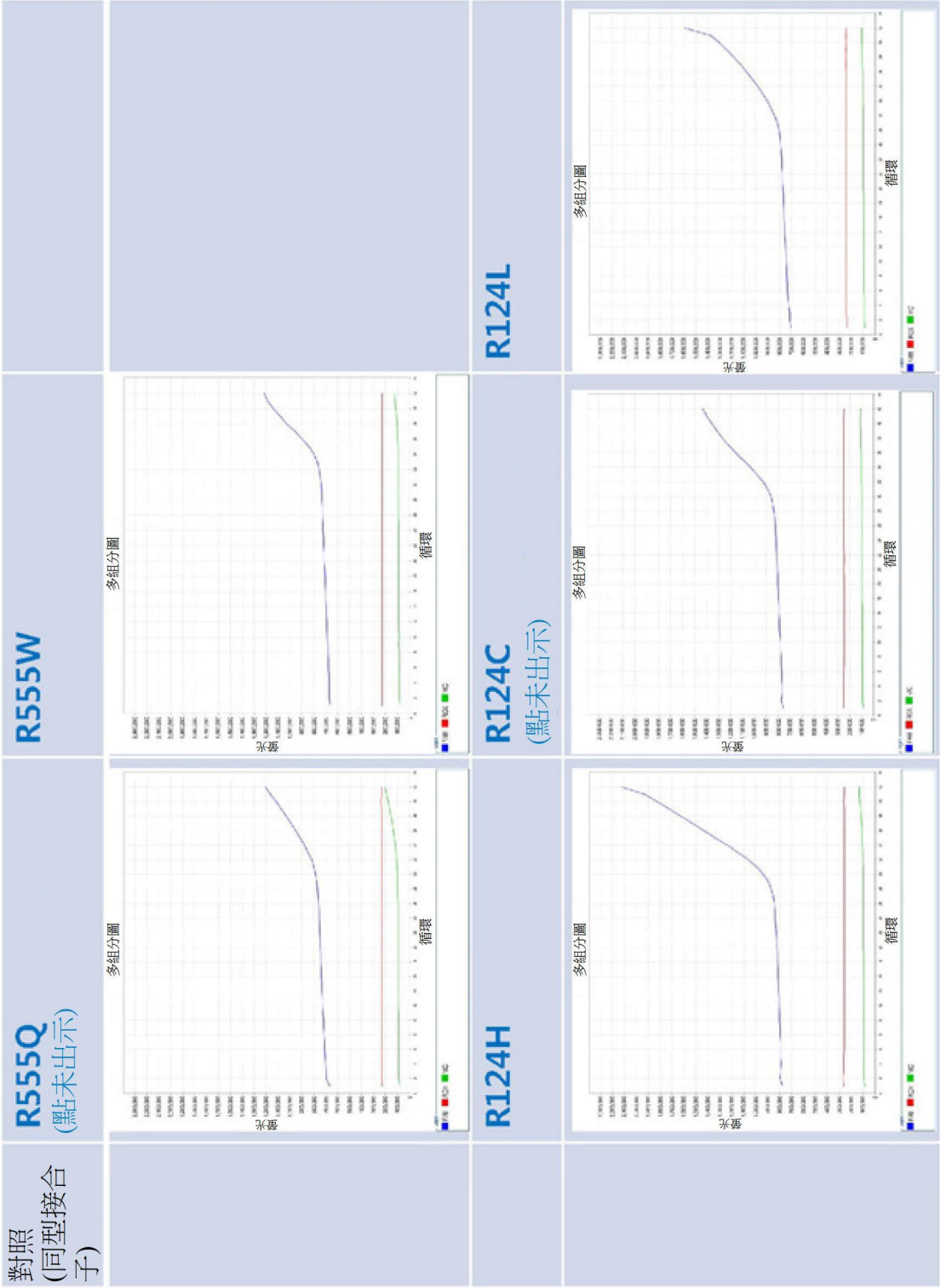
【圖5A】

全試劑抽出物(全血)		3.00	ul
GTXpress taq		10.00	ul
引子(124R)	10pmol	0.50	ul
引子(124F)	10pmol	0.50	ul
引子(555R)	10pmol	0.50	ul
引子(555F)	10pmol	0.50	ul
探針(NL/VIC)	10pmol	0.20	ul
探針(R124H/FAM)	10pmol	0.40	ul
探針(R124C/FAM)	10pmol	0.20	ul
探針(R124L/FAM)	10pmol	0.60	ul
探針(R555N/VIC)	10pmol	0.20	ul
探針(R555Q-1/FAM)	10pmol	0.20	ul
探針(R555W/FAM)	10pmol	0.20	ul
DW		3.00	ul

前讀取	保持階段	循環階段	後讀取
60°C	95°C	95°C 64°C	60°C
1分鐘	20秒	3秒 30秒	1分鐘



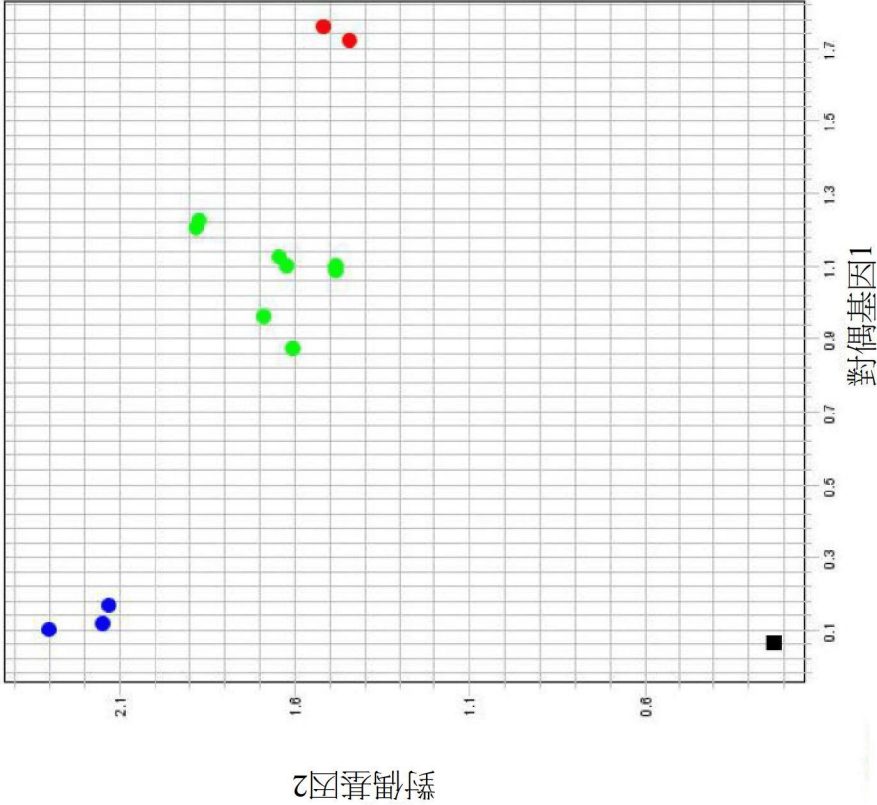
【圖5B】



【圖5C】

資料B >> LifeTech/7500FAST；快速模式

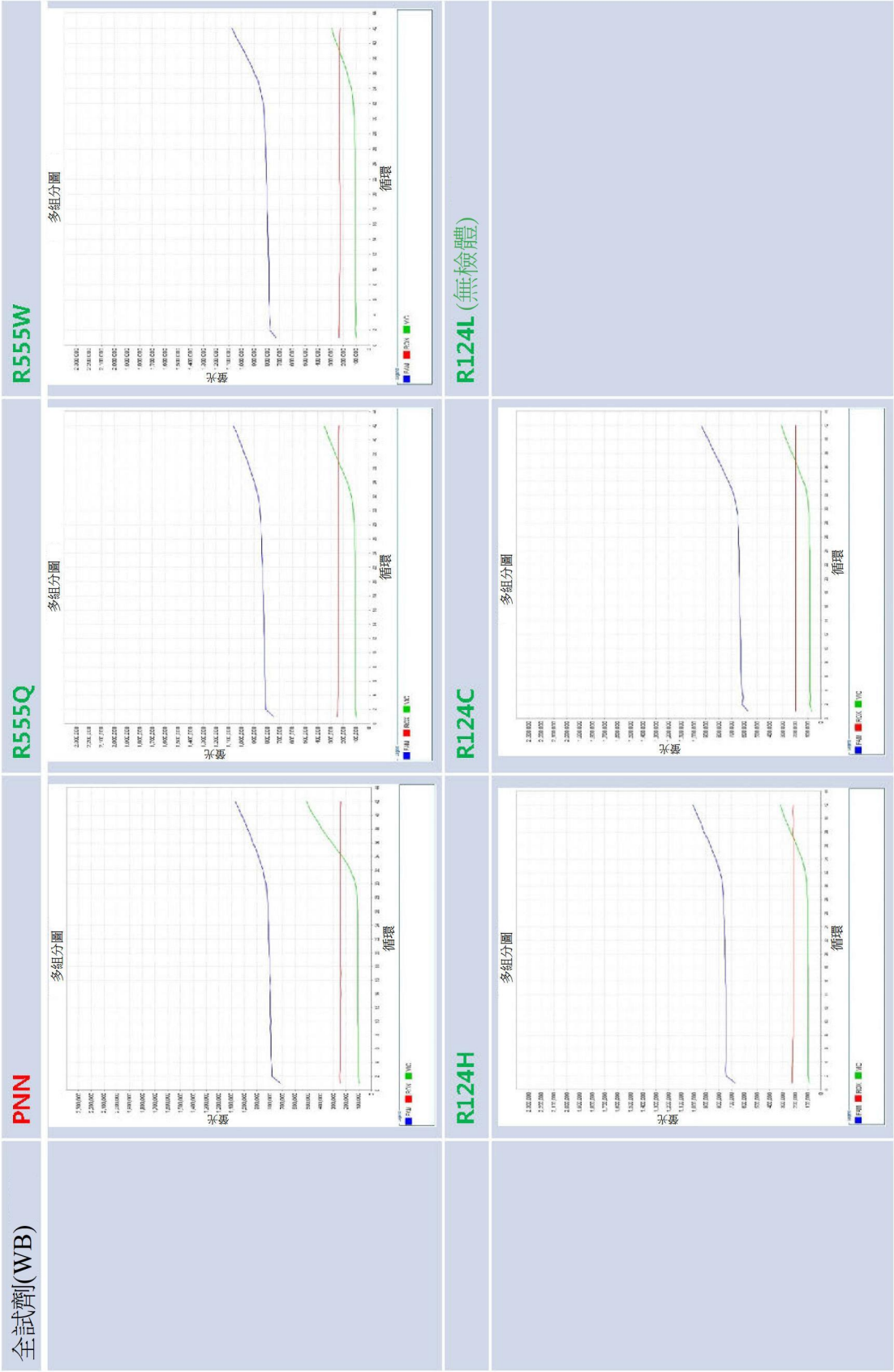
對偶基因辨別圖



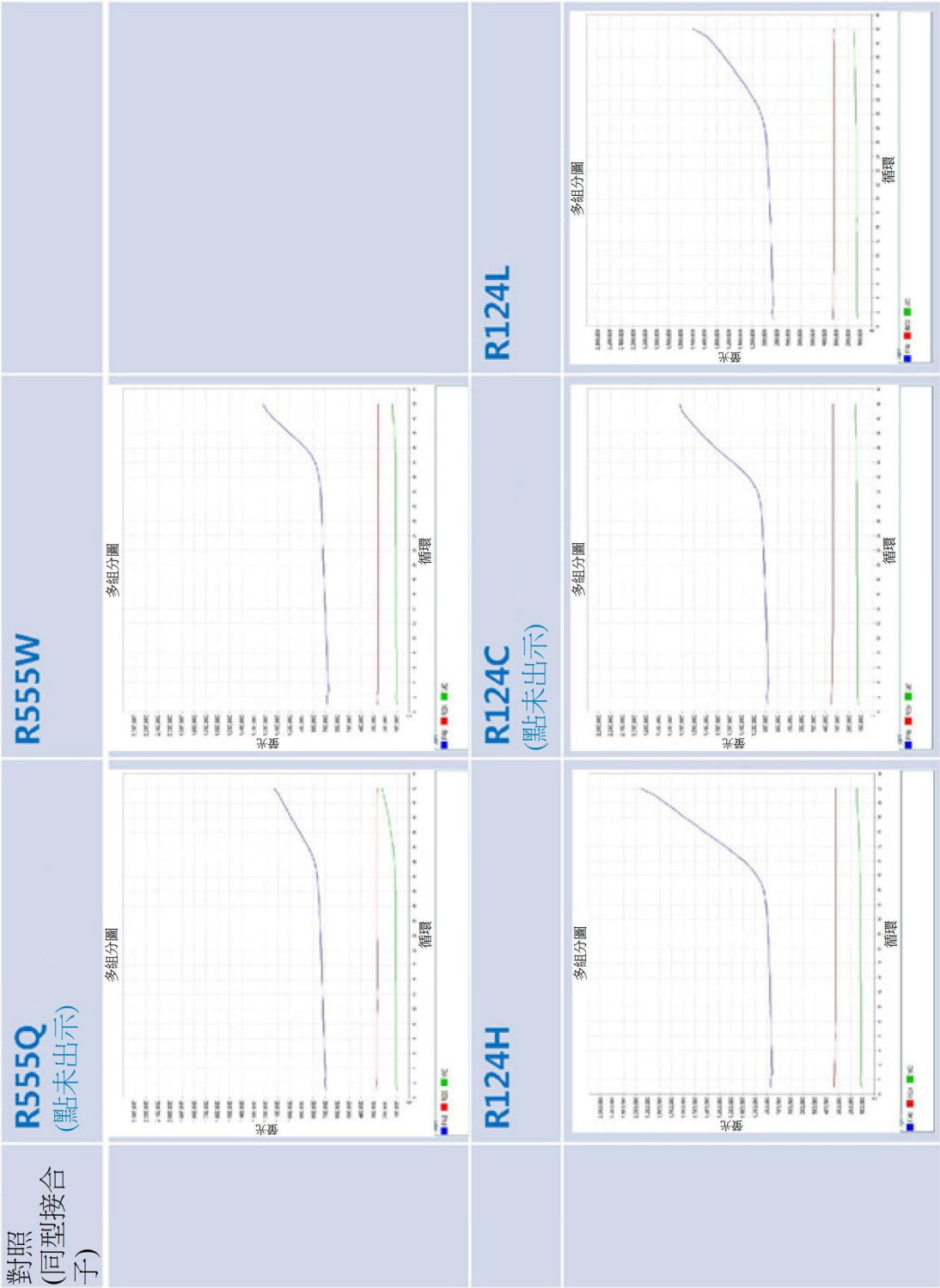
【圖6A】

全試劑抽出物(全血)			3.00	ul
GTExpress taq			10.00	ul
引子(124R)		10pmol	0.50	ul
引子(124F)		10pmol	0.50	ul
引子(555R)		10pmol	0.50	ul
引子(555F)		10pmol	0.50	ul
探針(NL/VIC)		10pmol	0.20	ul
探針(R124H/FAM)		10pmol	0.30	ul
探針(R124C/FAM)		10pmol	0.20	ul
探針(R124L/FAM)		10pmol	0.50	ul
探針(R555N/VIC)		10pmol	0.20	ul
探針(R555Q-1/FAM)		10pmol	0.20	ul
探針(R555W/FAM)		10pmol	0.20	ul
DW			3.20	ul

前讀取	保持階段	循環階段	後讀取
60°C	95°C	40個循環	60°C
1分鐘	20秒	3秒	1分鐘



【圖6B】

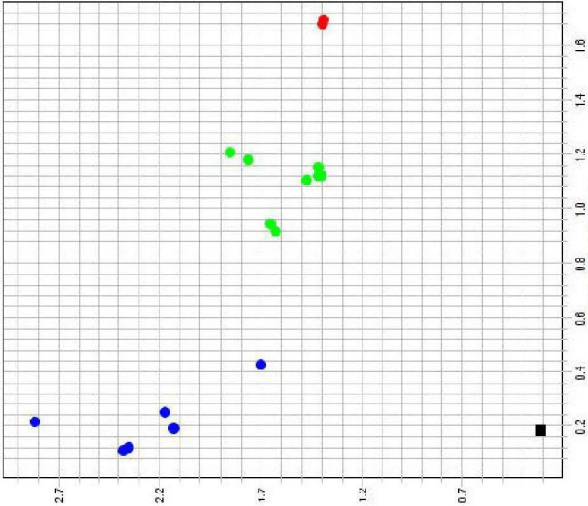


【圖6C】

資料C >> LifeTech/7500FAST；快速模式

前讀取	保持階段	循環階段	後讀取
60°C	95°C	40個循環	60°C
1分鐘	20秒	30秒	1分鐘
GTXpress taq			
引子(124R)		10pmol	10.00 ul
引子(124F)		10pmol	0.50 ul
引子(555R)		10pmol	0.50 ul
引子(555F)		10pmol	0.50 ul
探針(NL/VIC)		10pmol	0.20 ul
探針(R124H/FAM)		10pmol	0.20 ul
探針(R124C/FAM)		10pmol	0.20 ul
探針(R124L/FAM)		10pmol	0.50 ul
探針(R555N/VIC)		10pmol	0.20 ul
探針(R555Q-1/FAM)		10pmol	0.20 ul
探針(R555W/FAM)		10pmol	0.20 ul
DW			3.30 ul

對偶基因辨別圖

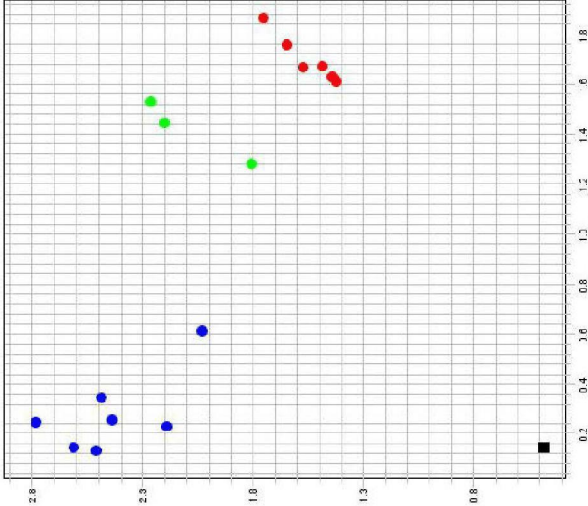


對偶基因1

全試劑抽出物

【圖7】

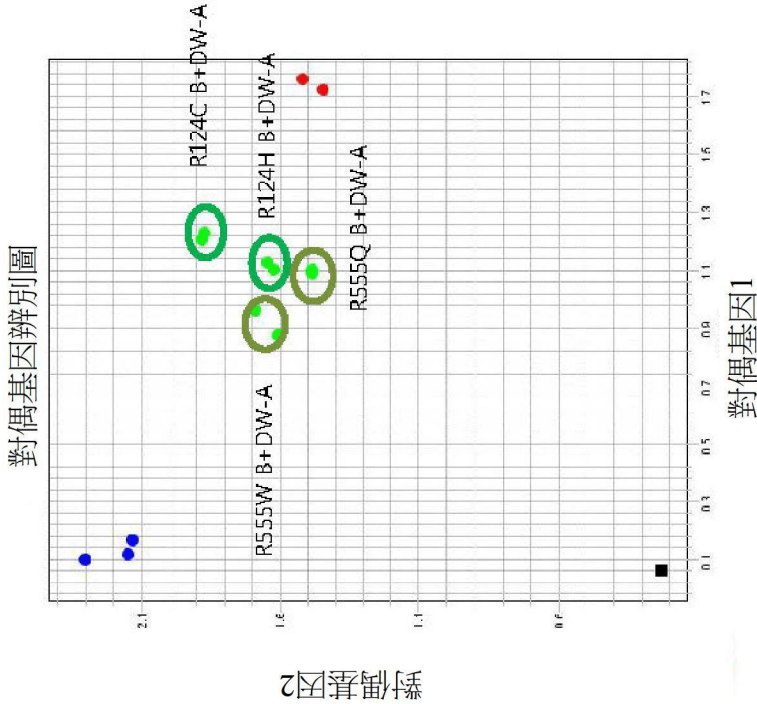
對偶基因辨別圖



對偶基因1

OMEGA套組抽出物

資料B >> LifeTech/7500FAST；快速模式



【圖8】

全試劑抽出物(全血)		3.00	ul
GTXpress taq		10.00	ul
引子(124R)	10pmol	0.50	ul
引子(124F)	10pmol	0.50	ul
引子(555R)	10pmol	0.50	ul
引子(555F)	10pmol	0.50	ul
探針(NL/VIC)	10pmol	0.20	ul
探針(R124H/FAM)	10pmol	0.30	ul
探針(R124C/FAM)	10pmol	0.20	ul
探針(R124L/FAM)	10pmol	0.50	ul
探針(R555N/VIC)	10pmol	0.20	ul
探針(R555Q-1/FAM)	10pmol	0.20	ul
探針(R555W/FAM)	10pmol	0.20	ul
DW		3.20	ul

前讀取	保持階段	循環階段	後讀取
60°C	95°C	40個循環 64°C	60°C
1分鐘	20秒	3秒	1分鐘