(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0084823
(43) 공개일자 2013년07월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0005701
(22) 출원일자 2012년01월18일
심사청구일자 2012년01월18일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
정태성
경상남도 진주시 평거동 하우스토리 203동 202호
차인석
경상남도 진주시 금산면 장사리 두산위브아파트 109동 1901호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

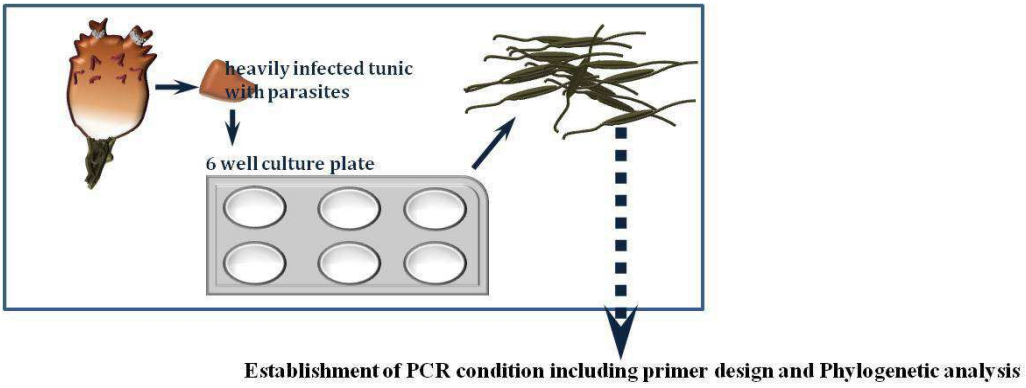
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **멍게 물렁병 진단용 마커 및 프라이머 세트**

(57) 요 약

본 발명은 멍게 물렁병 진단용 마커 조성물 및 상기 마커를 포함하는 멍게 물렁병 진단 키트 및 멍게 물렁병 진단 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 마커를 이용하면 빠르고 정확하게 멍게 물렁병의 진단이 가능하므로, 멍게 물렁병의 확산을 막을 수 있으며, 효과적인 방제가 가능하다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

노성원

경상남도 진주시 가좌동 주공2차 208동 706호

장호빈

경상남도 진주시 가좌동 풍경채 아파트 105동 905호

박성빈

경상남도 진주시 가좌동 주공2차 207동 1209호

김영림

경상남도 진주시 주약동 주약현대아파트 113동 602호

하미애

경상남도 진주시 하대동 500-1 명광빌라 301호

특허청구의 범위

청구항 1

멍게 물렁증의 원인체 (AsSTF)인 편모충의 알파-튜불린, 베타-튜불린, 액틴, 엔도 또는 60S 리보좀 단백질 (Ribosomal protein) L7으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 단백질의 일부 서열을 갖는 전방 프라이머 및 역방 프라이머 세트를 포함하는 멍게 물렁병 진단용 마커 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 프라이머 세트는 서열번호 1 및 2로 구성되는 프라이머 세트; 서열번호 3 및 4 로 구성되는 프라이머 세트; 서열번호 5 및 6 으로 구성되는 프라이머 세트; 서열번호 7 및 8 로 구성되는 프라이머 세트; 및 서열번호 9 및 10으로 구성되는 프라이머 세트;로 이루어진 군으로부터 1 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 멍게 물렁병 진단용 마커 조성물.

청구항 3

제 1항의 조성물을 포함하는 멍게 물렁병 진단용 키트.

청구항 4

(a) 멍게 시료로부터 DNA를 분리하는 단계;

(b) 상기 (a) 단계에서 분리된 DNA를 주형으로 하고 서열번호 1 및 2로 구성되는 프라이머 세트; 서열번호 3 및 4 로 구성되는 프라이머 세트; 서열번호 5 및 6 으로 구성되는 프라이머 세트; 서열번호 7 및 8 로 구성되는 프라이머 세트; 및 서열번호 9 및 10으로 구성되는 프라이머 세트;로 이루어진 군으로부터 1 이상 선택되는 프라이머 세트를 이용하여 DNA를 증폭하는 단계; 및

(c) 상기 (b) 단계에서 증폭된 산물을 분석하여 멍게 물렁병을 진단하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 멍게 물렁병의 진단 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 (c) 단계에서 증폭 산물의 확인은 전기영동을 통해 확인하는 것을 특징으로 하는 멍게 물렁병의 진단 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 멍게 물렁병 진단용 마커 조성물 및 상기 마커를 포함하는 멍게 물렁병 진단 키트 및 멍게 물렁병 진단 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 멍게는 우리나라, 일본의 북해도 지방 및 일부 아시아 국가의 기호식품으로서, 최근 멍게류에서 콜라겐, 바나듐, 식이섬유 및 콘드로이친 같은 생리활성 물질 외에 천연 항암 및 항생 물질이 다량 함유되어 있는 것으

로 밝혀짐에 따라 그 수요가 증가하고 있다.

[0003] 그러나 1970년대 후반부터 양식산 멍게가 일명 물렁병 또는 조그랑증 등의 질병으로 인해 대량 폐사가 발생하고 있으며, 이로 인해 폐사율이 연간 양식량의 최고 80%에 달하고, 연간 피해 금액이 약 200 ~400억 원이 이르는 것으로 추정되고 있다 (멍게수하식수협, 2007). 이러한 양식 멍게의 대량 폐사는 국내 멍게 양식업계에 막대한 직접적 경제적 손실을 가져올 뿐만 아니라 국내 생산 멍게의 해외수출에도 큰 장애가 되고 있다.

[0004] 멍게 물렁병으로 인해 대량 폐사되는 멍게는 멍게의 표면을 감싸고 있는 피낭이 연화되고, 비이상적으로 점액성 물질이 증가하며, 피낭이 괴사 또는 천공되어 내부조직이 유출되는 외형적 특징을 가지고 있다. 또 다른 폐사 원인으로 조그랑증으로 인해 대량 폐사되는 멍게는 피낭은 수하연(垂下延)에 붙어 있으나 육질부가 흘러내리고, 피낭이 쪼그라드는 증상을 나타낸다. 이와 같은 멍게 질병의 원인을 밝혀내기 위한 환경적 요인 조사(수온, 염분, 용존 산소, pH, 클로로필 α 함량 등), 생리적 요인 조사(산지별 멍게의 성장 상태), 세균학적 조사(소화선 내 총 세균수), 및 분자유전학적 접근 등 다학제적인 연구가 진행되고 있지만, 현재까지 대량 폐사의 원인이 명확히 밝혀지지 않아 이에 대한 예방 및 대책이 미비한 실정이다.

[0005] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 본 발명자들은 멍게 물렁병의 원인체를 밝히기 위하여 예의 노력한 결과 특정 편모충이 관련하고 있다는 사실을 알아냈으며, 이를 바탕으로 하여 멍게 물렁병 진단용 마커 조성물을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 국내특허출원번호 : 10-2009-0006515

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 멍게 물렁병 진단용 마커 조성물을 제공함에 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 멍게 물렁병 진단용 키트 및 멍게 물렁병 진단 방법을 제공함에 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 멍게 물렁증의 원인체 (AsSTF)인 편모충의 알파-튜불린, 베타-튜불린, 액틴, 엔도 또는 60S 리보좀 단백질 (Ribosomal protein) L7으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 단백질의 일부 서열을 갖는 전방 프라이머 및 역방 프라이머 세트를 포함하는 멍게 물렁병 진단용 마커 조성물을 제공한다.

[0010] 상기 프라이머 세트는 서열번호 1 및 2로 구성되는 프라이머 세트; 서열번호 3 및 4 로 구성되는 프라이머 세트; 서열번호 5 및 6 으로 구성되는 프라이머 세트; 서열번호 7 및 8 로 구성되는 프라이머 세트; 및 서열번호 9 및 10으로 구성되는 프라이머 세트;로 이루어진 군으로부터 1 이상 선택되는 것을 특징으로 한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 멍게 물렁병 진단용 키트를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 (a) 멍게 시료로부터 DNA를 분리하는 단계; (b) 상기 (a) 단계에서 분리된 DNA를 주형으로 하고 서열번호 1 및 2로 구성되는 프라이머 세트; 서열번호 3 및 4 로 구성되는 프라이머 세트; 서열번호 5 및 6 으로 구성되는 프라이머 세트; 서열번호 7 및 8 로 구성되는 프라이머 세트; 및 서열번호 9 및 10으로 구성되는 프라이머 세트;로 이루어진 군으로부터 1 이상 선택되는 프라이머 세트를 이용하여 DNA를 증폭하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 증폭된 산물을 분석하여 멍게 물렁병을 진단하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 멍게 물렁병의 진단 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에서 제공하는 마커를 이용하면 빠르고 정확하게 멍게 물렁병의 진단이 가능하므로, 멍게 물렁병의 확산을 막을 수 있으며, 효과적인 방제가 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 멍게 물렁병의 진단을 위한 본 발명의 실험 방법을 간략하게 도시한 것이다.

도 2는 total RNA로부터 cDNA를 만들기 위하여, total RNA 샘플의 성분비를 나타낸 것이다.

도 3은 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit를 이용하여 total RNA로부터 cDNA를 만들기 위한 조성물의 성분비를 나타낸 것이다.

도 4는 cDNA 합성 과정을 나타낸 것이다.

도 5는 멍게 물렁병의 원인체인 편모충을 동정한 결과이다.

도 6은 멍게 물렁병을 진단하기 위한 프라이머를 나타낸 것이다.

도 7은 멍게 물렁병을 진단하기 위한 PCR 조건을 나타낸 것이다.

도 8은 멍게 물렁증의 원인체 (AsSTF)인 편모충의 알파-튜불린 단백질을 확인하기 위한 프라이머를 설계한 것이다.

도 9는 멍게 물렁증의 원인체 (AsSTF)인 편모충의 베타-튜불린 단백질을 확인하기 위한 프라이머를 설계한 것이다.

도 10은 멍게 물렁증의 원인체 (AsSTF)인 편모충의 액틴 단백질을 확인하기 위한 프라이머를 설계한 것이다.

도 11은 멍게 물렁증의 원인체 (AsSTF)인 편모충의 엔도 단백질을 확인하기 위한 프라이머를 설계한 것이다.

도 12는 멍게 물렁증의 원인체 (AsSTF)인 편모충의 60S 리보좀 단백질 (Ribosomal protein) L7을 확인하기 위한 프라이머를 설계한 것이다.

도 13은 서열번호 1 및 2로 구성된 프라이머 세트 (alpha-tubulin) 를 이용하여 828bps에서 밴드를 확인한 결과이다.

도 14은 서열번호 3 및 4로 구성된 프라이머 세트 (beta-tubulin)를 이용하여 815bps에서 밴드를 확인한 결과이다.

도 15는 서열번호 5 및 6으로 구성된 프라이머 세트 (Actin)를 이용하여 897bps에서 밴드를 확인한 결과이다.

도 16은 서열번호 7 및 8로 구성된 프라이머 세트 (Endo-)를 이용하여 658bps에서 밴드를 확인한 결과이다.

도 17은 서열번호 9 및 10으로 구성된 프라이머 세트 (60S RP L7)를 이용하여 663bps에서 밴드를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[0016] 본 발명은 멍게 물렁증의 원인체 (AsSTF)인 편모충의 알파-튜불린, 베타-튜불린, 액틴, 엔도 또는 60S 리보좀 단백질 (Ribosomal protein) L7으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 단백질의 일부 서열을 갖는 전방 프라이머 및 역방 프라이머 세트를 포함하는 멍게 물렁병 진단용 마커 조성물을 제공한다.

[0017] 상기 프라이머 세트는 서열번호 1 및 2로 구성되는 프라이머 세트; 서열번호 3 및 4 로 구성되는 프라이머 세트; 서열번호 5 및 6 으로 구성되는 프라이머 세트; 서열번호 7 및 8 로 구성되는 프라이머 세트; 및 서열번호 9 및 10으로 구성되는 프라이머 세트;로 이루어진 군으로부터 1 이상 선택되는 것을 특징으로 한다.

[0018] 본 발명에서 사용하는 용어인 “마커”란 멍게 물렁병을 나타내는 멍게를 정상 멍게와 구분하여 진단할 수 있는

물질로, 정상 멍게와 비교하여 멍게 물렁병을 나타내는 멍게에서 특이적으로 존재하는 폴리펩타이드 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다.

[0019] 본 발명에서 용어, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 멍게 물렁병 발병 여부를 확인하는 것이다.

[0020] 본 발명에 있어서 "프라이머"란 짧은 자유 수산화기를 가지는 핵산서열로서 상보적인 템플레이트와 염기쌍을 형성할 수 있고, 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능하는 짧은 핵산서열을 말한다. 본 발명의 프라이머는 예를 들면, 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법과 같은 당 분야에 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 멍게 물렁병 진단용 키트를 제공한다.

[0022] 상기 멍게 물렁병 진단용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함하여 구성될 수 있다. 본 발명의 키트는 본 발명의 프라이머 세트 중 하나 이상, DNA 중합 효소 및 PCR 완충용액(buffer)을 포함하는 멍게 물렁병 진단용 키트를 제공한다. PCR 완충용액에 포함되는 성분들은 하기에 개시하고 있는 것과 같이 공지된 성분을 이용할 수 있으며, 이외에 PCR산물의 증폭 여부를 확인할 수 있는 전기영동 수행에 필요한 구성 성분들이 본 발명의 키트에 추가로 포함될 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명은 (a) 멍게 시료로부터 DNA를 분리하는 단계; (b) 상기 (a) 단계에서 분리된 DNA를 주형으로 하고 서열번호 1 및 2로 구성되는 프라이머 세트; 서열번호 3 및 4 로 구성되는 프라이머 세트; 서열번호 5 및 6으로 구성되는 프라이머 세트; 서열번호 7 및 8 로 구성되는 프라이머 세트; 및 서열번호 9 및 10으로 구성되는 프라이머 세트;로 이루어진 군으로부터 1 이상 선택되는 프라이머 세트를 이용하여 DNA를 증폭하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 증폭된 산물을 분석하여 멍게 물렁병을 진단하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 멍게 물렁병의 진단 방법을 제공한다.

[0024] 상기 DNA는 멍게의 게놈 DNA 또는 cDNA일 수 있다.

[0025] 상기 DNA의 증폭은 PCR(polymerase chain reaction) 을 사용하는 것이 바람직하다. 일반적인 PCR 수행 방법에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있다. 구체적으로, PCR 반응은 당업계에서 PCR반응에 필요하다고 알려진 여러 성분을 포함하는 PCR 반응액을 이용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 PCR 반응액은 분석하고자 하는 멍게로부터 유래된 DNA, 본 발명의 마커, 적당량의 DNA 중합 효소(예를 들면, Taq polymerase), dNTP 혼합물, PCR 완충용액(buffer) 및 물을 포함한다. 상기 PCR 완충용액은 KCl, Tris-HCl 및 MgCl2를 함유할 수 있다.

[0026] 본 발명에서 상기 증폭된 산물은 전기영동에 의해 확인하는 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 전기영동 시 사용하는 겔은 통상적으로 전기영동에서 사용할 수 있는 겔을 사용할 수 있고, 대표적인 예로 아가로스 겔 또는 폴리아크릴아미드 겔을 사용할 수 있다. 전기영동 후 실버 염색(silver staining)으로 전기영동 결과를 분석할 수 있다. 일반적인 전기영동 분석 방법에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있다.

[0027] 이하, 본 발명을 실시예에 의거하여 보다 구체적으로 설명한다. 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0028] **실시예 1. 멍게 물렁병의 원인체인 편모충의 분리**

[0029] 멍게 물렁병의 원인체 (AsSTF, AsSTS(soft tunic syndrome in ascidian, *Halocynthia roretzi*)-associated flagellate)를 분리하기 위하여 정상 멍게 및 멍게 물렁병 감염 개체 또는 감염 의심개체를 준비한 후, 상기 멍게의 외피 (tunic)을 제거하였다 (도 1). 이를 멸균한 후 0.22um에 여과된 해수에 3-4회 세척하였다. 상기 과정을 통해 하나의 개체로부터 분리하고 세척한 멍게의 외피 (tunic)를 2x3cm의 크기를 자르고, 6 웰 배양 플레이트에 넣은 후, 멸균 후 0.22um에 여과된 해수를 500 μl /well로 넣었다. 15-30분 후, 웰 내의 suspension 용액을 피펫으로 모으고, 이를 300g에서 3 분간 원심분리하여 상층액만을 수득하였다. 상기에서 수득한 상등액으로부터 TRIzol®Reagent를 이용하여 total RNA 분리하였다 (도 2). 이 후 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit를 이용하여 분리된 total RNA로부터 cDNA 합성하였다 (도 3 내지 도 4).

[0030] **실시예 2. 멍게 물렁병의 원인체인 편모충의 동정**

[0031] 실시예 1에서 분리한 멍게 물렁병의 원인체 (AsSTF)를 동정하기 위하여, pyrosequencing을 통해 유전자 서열을 확보한 후, metatranscriptome 으로부터, 한 개의 transcript을 이용한 동정이 아닌 여러 개의 transcript을 이용한 multimarker-based phylogenetic analysis를 수행하였다. 그 결과, 멍게 물렁증의 원인체 (Ascidian soft tunic syndrome-associated flagellate, AsSTF)는 Class level에서 kinetoplastida, Order level에서 Bodonidae, family level에서 Neobodo sp.에 가까운 종임을 확인하였다 (도 5).

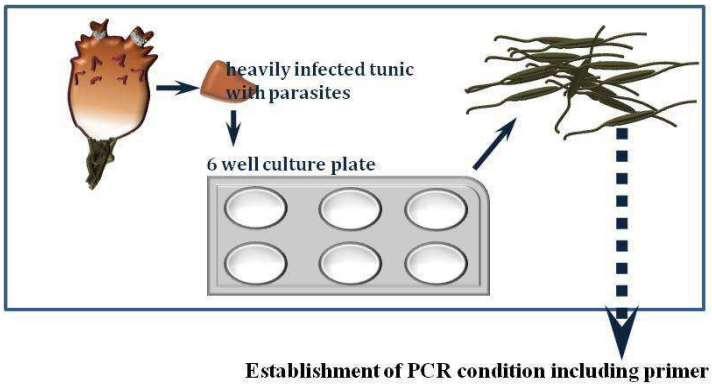
[0032] **실시예 3. 멍게 물렁병의 진단**

[0033] 실시예 1에서 수득한 각 멍게의 cDNA를 주형 (template)으로 하여, 본 발명의 서열번호 1 내지 10의 프라이머를 이용하여, PCR을 수행하였다 (도 6 내지 도 7). 서열번호 1 및 2로 구성되는 프라이머 세트; 서열번호 3 및 4로 구성되는 프라이머 세트; 서열번호 5 및 6 으로 구성되는 프라이머 세트; 서열번호 7 및 8 로 구성되는 프라이머 세트; 및 서열번호 9 및 10으로 구성되는 프라이머 세트;는 각각 멍게 물렁병의 원인체인 편모충의 알파-튜불린, 베타-튜불린, 액틴, 엔도 또는 60S 리보좀 단백질 (Ribosomal protein) L7의 일부 서열을 가진다 (도 8 내지 도 12).

[0034] 실험 결과, 도 13 내지 17에 나타낸 바와 같이, 정상 멍게 (증상으로 판단)의 조직/기관에서 분리한 cDNA에서는 어떠한 밴드도 나타나지 않았으나 (1. siphon muscle, 2. Tunic, 3. Muscle, 4. Intestine, 5. Gonad, 6. Pharyngeal basket), 멍게 물렁병 감염 개체 또는 감염 의심 개체에서 분리한 멍게 물렁병의 원인체인 편모충 (밴드 7)에서는 뚜렷한 밴드가 나타나, 본 발명의 프라이머가 멍게 물렁병의 진단 마커로 이용될 수 있음을 확인하였다. 음성대조군으로 증류수를 이용하였다 (con). 상기 실험 결과를 통하여, 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 멍게 물렁병을 진단할 수 있음을 확인하였다.

도면

도면1



도면2

component	volume
Total RNA	0.1ng-5ug (10 μl)
Random hexamer primer	1 μl
Water, nuclease-free	1 μl
Total volume	To 12 μl of final volume

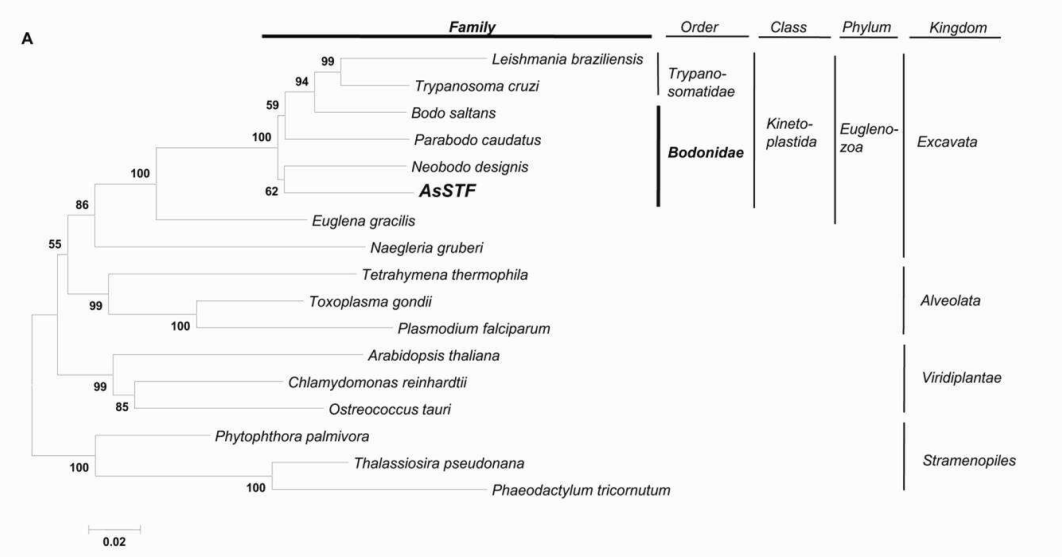
도면3

component	volume
sample	12 μl
5x reaction buffer	4 μl
RiboLock RNase Inhibitor (20u/μl)	1 μl
10mM dNTP Mix	2 μl
RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (200u/ul)	1 μl
Total volume	20 μl

도면4

Step1	Step2	Step3	Step4
25℃, 5min	42℃, 60min,	70℃, 5min	4℃, ∞

도면5



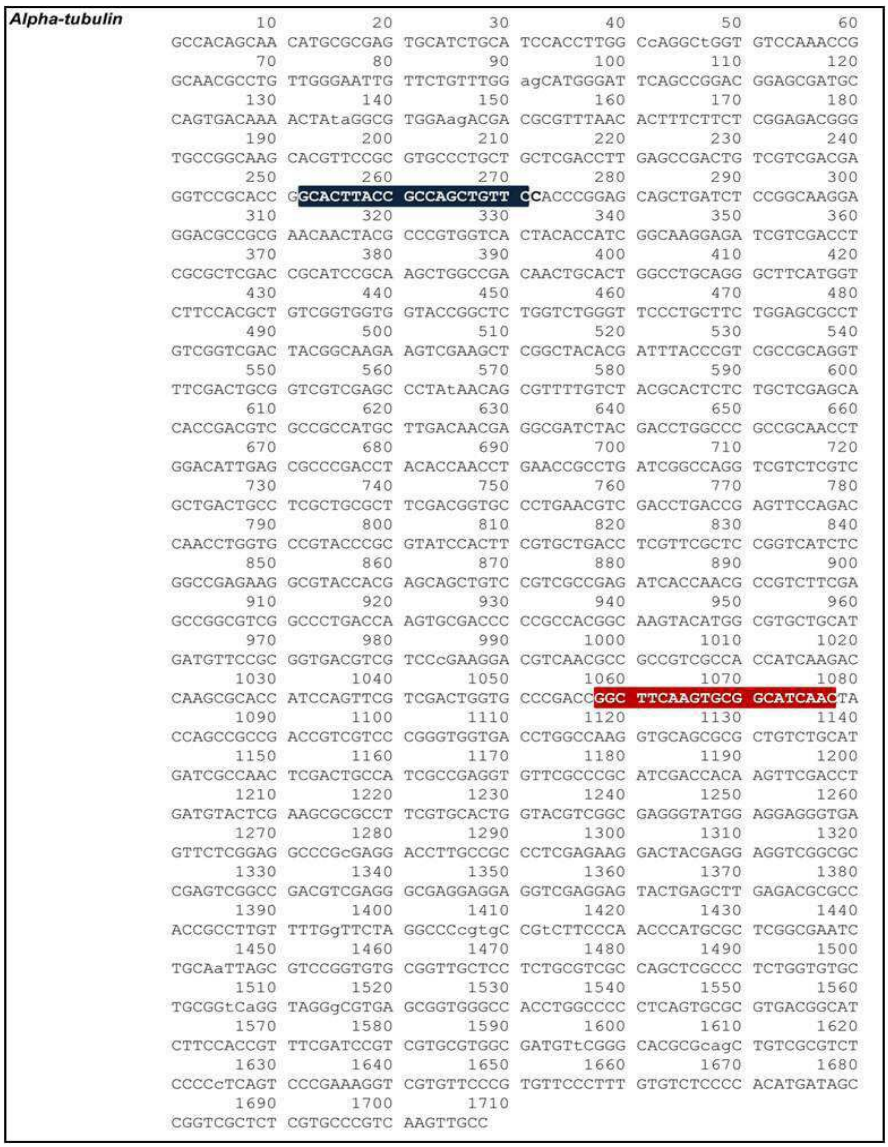
도면6

description	*Sequence*	*Tm (AT2CG4)*	*Exp.size*
Alpha-tubulin	**F: GCACTTACCGCCAGCTGTTC (서열번호 1) R: GTTGATGCCGCACTTGAAGCC (서열번호 2)**	**60**	**815**
beta-tubulin	**F: CGACGCGCTTGAACATCTC (서열번호 3) R: GAGCTGATTGACTCCGTCC (서열번호 4)**	**64**	**897**
Actin	**F: GTAGTCCGCCTTCGAAACCC (서열번호 5) R: GTGTACTGGCGCTTCGCTAC (서열번호 6)**	**64**	**828**
Endo-	**F: CAGCAGATGTTGCTGGTGATG (서열번호 7) R: GCTGAGTCCCAGTAAGGATAG (서열번호 8)**	**64**	**658**
60S RP L7	**F: CGCACAAGGTTCAGCAGTC (서열번호 9) R: GAAGCGGTTGATGAGGGTC (서열번호 10)**	**60**	**663**

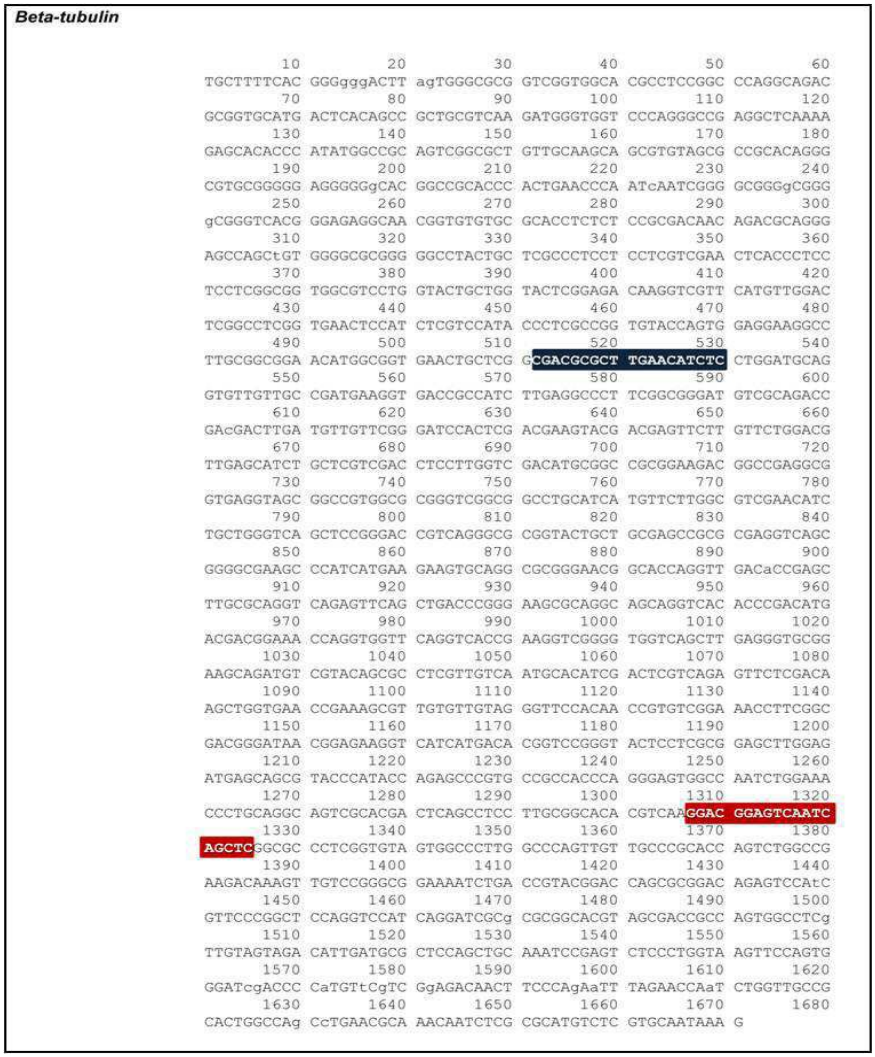
도면7

Initial denaturation		95℃ , 4min
DNA Amplification 40 cycles	Denaturation	95℃, 30s
	Annealing	50-60℃, 30s
	Extension	72℃, 1min30s
Final extension		72℃, 5min

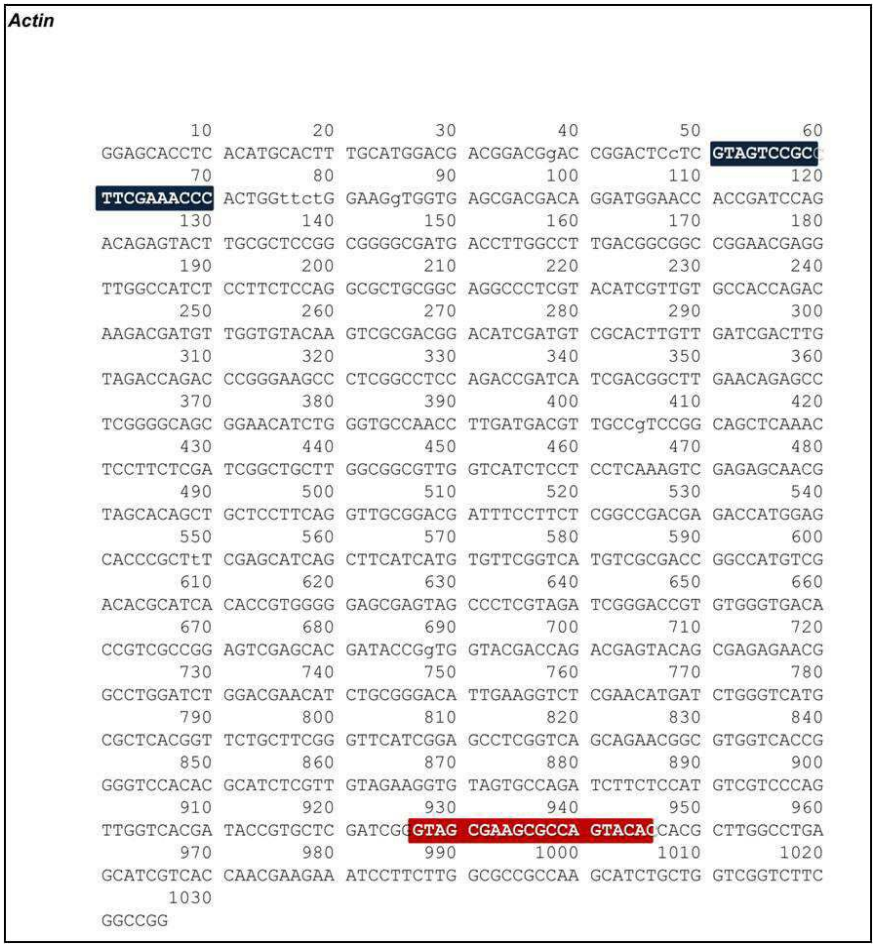
도면8


Alpha-tubulin
10 20 30 40 50 60
GCCACAGCAA CATGCGCGAG TGCATCTGCA TCCACCTTGG CcAGGCtGGT GTCCAAACCG
70 80 90 100 110 120
GCAACGCCTG TTGGGAATTG TTCTGTTTGG agCATGGGAT TCAGCCGGAC GGAGCGATGC
130 140 150 160 170 180
CAGTGACAAA ACTAtaGGCG TGGAagACGA CGCGTTTAAC ACTTTCTTCT CGGAGACGGG
190 200 210 220 230 240
TGCCGGCAAG CACGTTCCGC GTGCCCTGCT GCTCGACCTT GAGCCGACTG TCGTCGACGA
250 260 270 280 290 300
GGTCCGCACC GGCACTTACC GCCAGCTGTT CCACCCGGAG CAGCTGATCT CCGGCAAGGA
310 320 330 340 350 360
GGACGCCGCG AACAACTACG CCCGTGGTCA CTACACCATC GGCAAGGAGA TCGTCGACCT
370 380 390 400 410 420
CGCGCTCGAC CGCATCCGCA AGCTGGCCGA CAACTGCACT GGCCTGCAGG GCTTCATGGT
430 440 450 460 470 480
CTTCCACGCT GTCGGTGGTG GTACCGGCTC TGGTCTGGGT TCCCTGCTTC TGGAGCGCCT
490 500 510 520 530 540
GTCGGTCGAC TACGGCAAGA AGTCGAAGCT CGGCTACACG ATTTACCCGT CGCCGCAGGT
550 560 570 580 590 600
TTCGACTGCG GTCGTCGAGC CCTAtAACAG CGTTTTGTCT ACGCACTCTC TGCTCGAGCA
610 620 630 640 650 660
CACCGACGTC GCCGCCATGC TTGACAACGA GGCGATCTAC GACCTGGCCC GCCGCAACCT
670 680 690 700 710 720
GGACATTGAG CGCCCGACCT ACACCAACCT GAACCGCCTG ATCGGCCAGG TCGTCTCGTC
730 740 750 760 770 780
GCTGACTGCC TCGCTGCGCT TCGACGGTGC CCTGAACGTC GACCTGACCG AGTTCCAGAC
790 800 810 820 830 840
CAACCTGGTG CCGTACCCGC GTATCCACTT CGTGCTGACC TCGTTCGCTC CGGTCATCTC
850 860 870 880 890 900
GGCCGAGAAG GCGTACCACG AGCAGCTGTC CGTCGCCGAG ATCACCAACG CCGTCTTCGA
910 920 930 940 950 960
GCCGGCGTCG GCCCTGACCA AGTGCGACCC CCGCCACGGC AAGTACATGG CGTGCTGCAT
970 980 990 1000 1010 1020
GATGTTCCGC GGTGACGTCG TCCcGAAGGA CGTCAACGCC GCCGTCGCCA CCATCAAGAC
1030 1040 1050 1060 1070 1080
CAAGCGCACC ATCCAGTTCG TCGACTGGTG CCCGACCGGC TTCAAGTGCG GCATCAACTA
1090 1100 1110 1120 1130 1140
CCAGCCGCCG ACCGTCGTCC CGGGTGGTGA CCTGGCCAAG GTGCAGCGCG CTGTCTGCAT
1150 1160 1170 1180 1190 1200
GATCGCCAAC TCGACTGCCA TCGCCGAGGT GTTCGCCCGC ATCGACCACA AGTTCGACCT
1210 1220 1230 1240 1250 1260
GATGTACTCG AAGCGCGCCT TCGTGCACTG GTACGTCGGC GAGGGTATGG AGGAGGGTGA
1270 1280 1290 1300 1310 1320
GTTCTCGGAG GCCCGcGAGG ACCTTGCCGC CCTCGAGAAG GACTACGAGG AGGTCGGCGC
1330 1340 1350 1360 1370 1380
CGAGTCGGCC GACGTCGAGG GCGAGGAGGA GGTCGAGGAG TACTGAGCTT GAGACGCGCC
1390 1400 1410 1420 1430 1440
ACCGCCTTGT TTTGgTTCTA GGCCCcgtgC CGtCTTCCCA ACCCATGCGC TCGGCGAATC
1450 1460 1470 1480 1490 1500
TGCAaTTAGC GTCCGGTGTG CGGTTGCTCC TCTGCGTCGC CAGCTCGCCC TCTGGTGTGC
1510 1520 1530 1540 1550 1560
TGCGGtCaGG TAGGgCGTGA GCGGTGGGCC ACCTGGCCCC CTCAGTGCGC GTGACGGCAT
1570 1580 1590 1600 1610 1620
CTTCCACCGT TTCGATCCGT CGTGCGTGGC GATGTtCGGG CACGCGcagC TGTCGCGTCT
1630 1640 1650 1660 1670 1680
CCCCcTCAGT CCCGAAAGGT CGTGTTCCCG TGTTCCCTTT GTGTCTCCCC ACATGATAGC
1690 1700 1710
CGGTCGCTCT CGTGCCCGTC AAGTTGCC

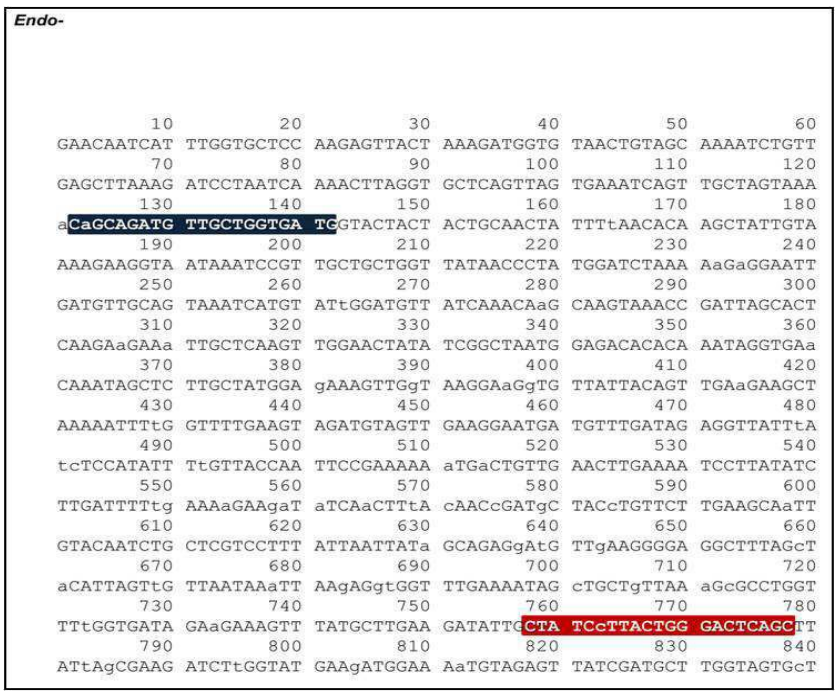
도면9


Beta-tubulin
10 20 30 40 50 60
TGCTTTTCAC GGGgggACTT agTGGGCGCG GTCGGTGGCA CGCCTCCGGC CCAGGCAGAC
70 80 90 100 110 120
GCGGTGCATG ACTCACAGCC GCTGCGTCAA GATGGGTGGT CCCAGGGCCG AGGCTCAAAA
130 140 150 160 170 180
GAGCACACCC ATATGGCCGC AGTCGGCGCT GTTGCAAGCA GCGTGTAGCG CCGCACAGGG
190 200 210 220 230 240
CGTGCGGGGG AGGGGGgCAC GGCCGCACCC ACTGAACCCA ATcAATCGGG GCGGGgCGGG
250 260 270 280 290 300
gCGGGTCACG GGAGAGGCAA CGGTGTGTGC GCACCTCTCT CCGCGACAAC AGACGCAGGG
310 320 330 340 350 360
AGCCAGCtGT GGGGCGCGGG GGCCTACTGC TCGCCCTCCT CCTCGTCGAA CTCACCCTCC
370 380 390 400 410 420
TCCTCGGCGG TGGCGTCCTG GTACTGCTGG TACTCGGAGA CAAGGTCGTT CATGTTGGAC
430 440 450 460 470 480
TCGGCCTCGG TGAACTCCAT CTCGTCCATA CCCTCGCCGG TGTACCAGTG GAGGAAGGCC
490 500 510 520 530 540
TTGCGGCGGA ACATGGCGGT GAACTGCTCG GCGACGCGCT TGAACATCTC CTGGATGCAG
550 560 570 580 590 600
GTGTTGTTGC CGATGAAGGT GACCGCCATC TTGAGGCCCT TCGGCGGGAT GTCGCAGACC
610 620 630 640 650 660
GAcGACTTGA TGTTGTTCGG GATCCACTCG ACGAAGTACG ACGAGTTCTT GTTCTGGACG
670 680 690 700 710 720
TTGAGCATCT GCTCGTCGAC CTCCTTGGTC GACATGCGGC CGCGGAAGAC GGCCGAGGCG
730 740 750 760 770 780
GTGAGGTAGC GGCCGTGGCG CGGGTCGGCG GCCTGCATCA TGTTCTTGGC GTCGAACATC
790 800 810 820 830 840
TGCTGGGTCA GCTCCGGGAC CGTCAGGGCG CGGTACTGCT GCGAGCCGCG CGAGGTCAGC
850 860 870 880 890 900
GGGGCGAAGC CCATCATGAA GAAGTGCAGG CGCGGGAACG GCACCAGGTT GACaCCGAGC
910 920 930 940 950 960
TTGCGCAGGT CAGAGTTCAG CTGACCCGGG AAGCGCAGGC AGCAGGTCAC ACCCGACATG
970 980 990 1000 1010 1020
ACGACGGAAA CCAGGTGGTT CAGGTCACCG AAGGTCGGGG TGGTCAGCTT GAGGGTGCGG
1030 1040 1050 1060 1070 1080
AAGCAGATGT CGTACAGCGC CTCGTTGTCA ATGCACATCG ACTCGTCAGA GTTCTCGACA
1090 1100 1110 1120 1130 1140
AGCTGGTGAA CCGAAAGCGT TGTGTTGTAG GGTTCCACAA CCGTGTCGGA AACCTTCGGC
1150 1160 1170 1180 1190 1200
GACGGGATAA CGGAGAAGGT CATCATGACA CGGTCCGGGT ACTCCTCGCG GAGCTTGGAG
1210 1220 1230 1240 1250 1260
ATGAGCAGCG TACCCATACC AGAGCCCGTG CCGCCACCCA GGGAGTGGCC AATCTGGAAA
1270 1280 1290 1300 1310 1320
CCCTGCAGGC AGTCGCACGA CTCAGCCTCC TTGCGGCACA CGTCAAGGAC GGAGTCAATC
1330 1340 1350 1360 1370 1380
AGCTCGGCGC CCTCGGTGTA GTGGCCCTTG GCCCAGTTGT TGCCCGCACC AGTCTGGCCG
1390 1400 1410 1420 1430 1440
AAGACAAAGT TGTCCGGGCG GAAAATCTGA CCGTACGGAC CAGCGCGGAC AGAGTCCAtC
1450 1460 1470 1480 1490 1500
GTTCCCGGCT CCAGGTCCAT CAGGATCGCg CGCGGCACGT AGCGACCGCC AGTGGCCTCg
1510 1520 1530 1540 1550 1560
TTGTAGTAGA CATTGATGCG CTCCAGCTGC AAATCCGAGT CTCCCTGGTA AGTTCCAGTG
1570 1580 1590 1600 1610 1620
GGATCgACCC CaTGTtCgTC GgAGACAACT TCCCAgAaTT TAGAACCAaT CTGGTTGCCG
1630 1640 1650 1660 1670 1680
CACTGGCCAg CcTGAACGCA AACAATCTCG CGCATGTCTC GTGCAATAAA G

도면10


Actin
10 20 30 40 50 60
GGAGCACCTC ACATGCACTT TGCATGGACG ACGGACGgAC CGGACTCcTC GTAGTCCGC
70 80 90 100 110 120
TTCGAAACCC ACTGGttctG GAAGgTGGTG AGCGACGACA GGATGGAACC ACCGATCCAG
130 140 150 160 170 180
ACAGAGTACT TGCGCTCCGG CGGGGCGATG ACCTTGGCCT TGACGGCGGC CGGAACGAGG
190 200 210 220 230 240
TTGGCCATCT CCTTCTCCAG GCGCTGCGGC AGGCCCTCGT ACATCGTTGT GCCACCAGAC
250 260 270 280 290 300
AAGACGATGT TGGTGTACAA GTCGCGACGG ACATCGATGT CGCACTTGTT GATCGACTTG
310 320 330 340 350 360
TAGACCAGAC CCGGGAAGCC CTCGGCCTCC AGACCGATCA TCGACGGCTT GAACAGAGCC
370 380 390 400 410 420
TCGGGGCAGC GGAACATCTG GGTGCCAACC TTGATGACGT TGCCgTCCGG CAGCTCAAAC
430 440 450 460 470 480
TCCTTCTCGA TCGGCTGCTT GGCGGCGTTG GTCATCTCCT CCTCAAAGTC GAGAGCAACG
490 500 510 520 530 540
TAGCACAGCT GCTCCTTCAG GTTGCGGACG ATTTCCTTCT CGGCCGACGA GACCATGGAG
550 560 570 580 590 600
CACCCGCTtT CGAGCATCAG CTTCATCATG TGTTCGGTCA TGTCGCGACC GGCCATGTCG
610 620 630 640 650 660
ACACGCATCA CACCGTGGGG GAGCGAGTAG CCCTCGTAGA TCGGGACCGT GTGGGTGACA
670 680 690 700 710 720
CCGTCGCCGG AGTCGAGCAC GATACCGgTG GTACGACCAG ACGAGTACAG CGAGAGAACG
730 740 750 760 770 780
GCCTGGATCT GGACGAACAT CTGCGGGACA TTGAAGGTCT CGAACATGAT CTGGGTCATG
790 800 810 820 830 840
CGCTCACGGT TCTGCTTCGG GTTCATCGGA GCCTCGGTCA GCAGAACGGC GTGGTCACCG
850 860 870 880 890 900
GGGTCCACAC GCATCTCGTT GTAGAAGGTG TAGTGCCAGA TCTTCTCCAT GTCGTCCCAG
910 920 930 940 950 960
TTGGTCACGA TACCGTGCTC GATCGGTAG CGAAGCGCCA GTACACCACG CTTGGCCTGA
970 980 990 1000 1010 1020
GCATCGTCAC CAACGAAGAA ATCCTTCTTG GCGCCGCCAA GCATCTGCTG GTCGGTCTTC
1030
GGCCGG

도면11

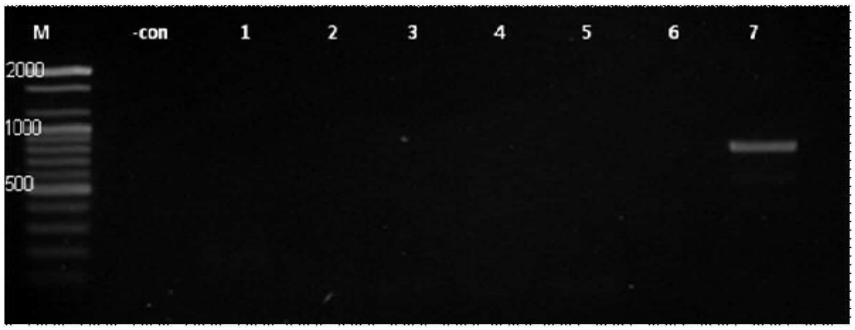

Endo-
10 20 30 40 50 60
GAACAATCAT TTGGTGCTCC AAGAGTTACT AAAGATGGTG TAACTGTAGC AAAATCTGTT
70 80 90 100 110 120
GAGCTTAAAG ATCCTAATCA AAACTTAGGT GCTCAGTTAG TGAAATCAGT TGCTAGTAAA
130 140 150 160 170 180
aCaGCAGATG TTGCTGGTGA TCGTACTACT ACTGCAACTA TTTtAACACA AGCTATTGTA
190 200 210 220 230 240
AAAGAAGGTA ATAAATCCGT TGCTGCTGGT TATAACCCTA TGGATCTAAA AaGaGGAATT
250 260 270 280 290 300
GATGTTGCAG TAAATCATGT ATtGGATGTT ATCAAACAaG CAAGTAAACC GATTAGCACT
310 320 330 340 350 360
CAAGAaGAAa TTGCTCAAGT TGGAACTATA TCGGCTAATG GAGACACACA AATAGGTGAa
370 380 390 400 410 420
CAAATAGCTC TTGCTATGGA gAAAGTTGgT AAGGAaGgTG TTATTACAGT TGAaGAAGCT
430 440 450 460 470 480
AAAAATTTtG GTTTTGAAGT AGATGTAGTT GAAGGAATGA TGTTTGATAG AGGTTATTtA
490 500 510 520 530 540
tcTCCATATT TtGTTACCAA TTCCGAAAAA aTGaCTGTTG AACTTGAAAA TCCTTATATC
550 560 570 580 590 600
TTGATTTTtg AAAaGAAgaT aTCAaCTTtA cAACcGATgC TACcTGTTCT TGAAGCAaTT
610 620 630 640 650 660
GTACAATCTG CTCGTCCTTT ATTAATTATa GCAGAGgAtG TTgAAGGGGA GGCTTTAGcT
670 680 690 700 710 720
aCATTAGTtG TTAATAAaTT AAgAGgtGGT TTGAAAATAG cTGCTgTTAA aGcGCCTGGT
730 740 750 760 770 780
TTtGGTGATA GAaGAAAGTT TATGCTTGAA GATATTGCTA TCcTTACTGG GACTCAGCTT
790 800 810 820 830 840
ATtAgCGAAG ATCTtGGTAT GAAgATGGAA AaTGTAGAGT TATCGATGCT TGGTAGTGcT

도면12

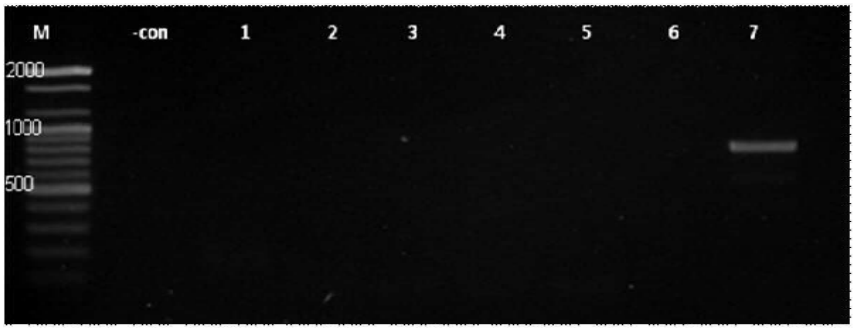
60S RP

```
        10         20         30         40         50         60
GCCAAGGCTG TCCCGGCGCC GGAGTCGGCG ATCAAGCGCG CTGCGCACAA GGTTCAGCAG
        70         80         90        100        110        120
TCGGACAACT TCAAGAAGGC CGTTGTCGCC AAGAAGGCCG AGGCGAAGAA GCTGAAGAAG
       130        140        150        160        170        180
CTTGCCTTCG AGCGTGCTCG CGACTACGCC CGCGCGTACA AGGCCGCTGA GGCCAAGAAG
       190        200        210        220        230        240
ATCACCCAGC GCCGCCAGGC CAAGACCCAC GGCAACTACT TCATGGAGGA GAAGCCGAAG
       250        260        270        280        290        300
GTCGCCGTCG TTGTCCGCAT CCGCGGTATC GCGAAGGTTG CGCCGAAGCA GCGCAAGGTC
       310        320        330        340        350        360
CTGCAGCTGC TCCGCCTGCG TCAGATCTTC AACGCCGTCT TCGTGAAGGT CAACAAGCCG
       370        380        390        400        410        420
ATCATCAACA TGCTGCGCAT GATCGAGCCG TACATCGCGT ACGGTTACCC GTCGCTCAAG
       430        440        450        460        470        480
ACCGTCCGCG CCATGATGTA CAAGCGCGGT AACCTGAAGA TCAACGGCCA GCGCATCAAG
       490        500        510        520        530        540
ATCAACGACA ACAAGCTGAT CAAGGACAAG TTCAACAACA ACGACGTTGT GTGCGTTGAG
       550        560        570        580        590        600
GATATGGTCA ACCAGATCTA CACCTGCGGC AAGCACTTCC GCACCGTCAC CAACGGTCTG
       610        620        630        640        650        660
TGGCCGTTCA AGCTGGCCCC GCCCAAGGGC GGTATGCGCC AGAAGCGCCG CCACTTCGTT
       670        680        690        700        710        720
GAGGGTGGTG ACTACGGTAA CCGCGAGACC CTCATCAACC GCTTCCTCGC CCGCATGATC
       730        740        750        760
TGAAGTGTCT GAGCAGCGAA CAACAGCATC CCCCcG
```

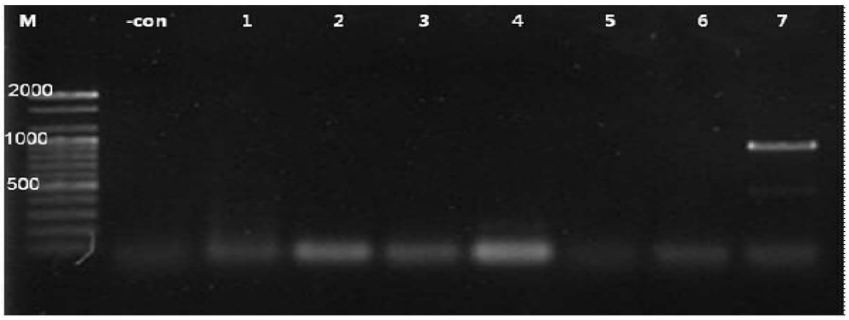
도면13



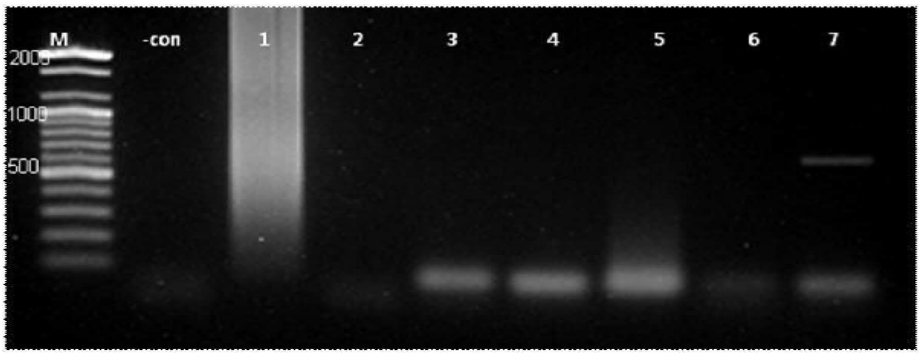
도면14



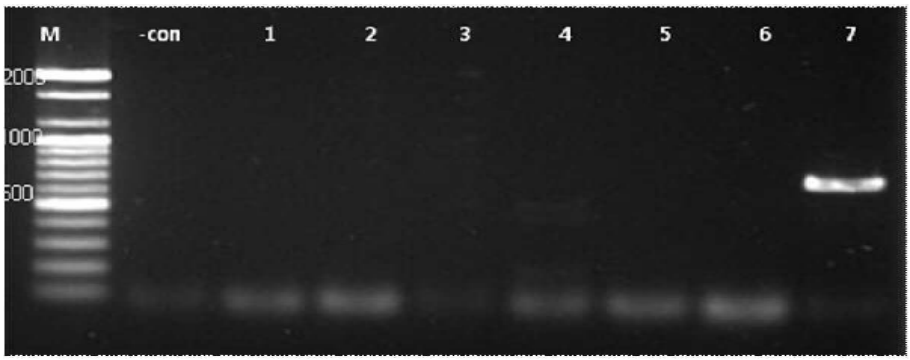
도면15



도면16



도면17



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Marker and primer set for diagnosis of soft tunic syndrome

<160> 10

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alpha-tubulin-F

<400> 1

gcacttaccg ccagctgttc 20

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alpha-tubulin-R

<400> 2

gttgatgccg cacttgaagc c 21

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Beta-tubulin-F

<400> 3

cgacgcgctt gaacatctc 19

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Beta-tubulin-R

<400> 4

gagctgattg actccgtcc 19

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Actin-F

<400> 5

gtagtccgcc ttcgaaaccc 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Actin-R

<400> 6

gtgtactggc gcttcgctac 20

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Endo-F

<400> 7

cagcagatgt tgctggtgat g 21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Endo-R

<400> 8

gctgagtccc agtaaggata g 21

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 60S RP L7-F

<400> 9

cgcacaaggt tcagcagtc 19

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 60S RP L7-R

<400> 10

gaagcggttg atgagggtc 19