(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0036944
(43) 공개일자 2008년04월29일

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0117345(분할)
(22) 출원일자 2007년11월16일
심사청구일자 2007년11월16일
(62) 원출원 특허 10-2006-0103481
원출원일자 2006년10월24일
심사청구일자 2006년10월24일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자
이호정
서울시 성북구 안암동 고려대학교 자연계캠퍼스 생명과학대학동관 309호
김기덕
서울시 성북구 안암동 고려대학교 자연계캠퍼스 생명과학대학서관 507호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

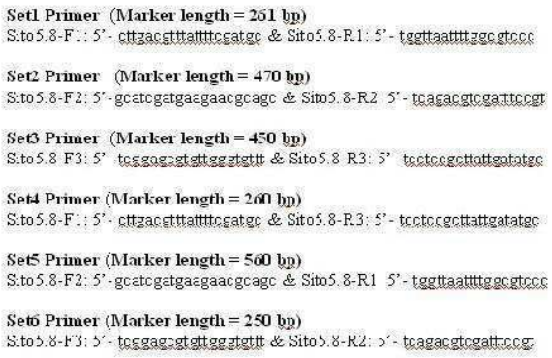
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 저장미 서식해충 (쌀바구미, 화랑곡나방, 보리나방) 의조기감별 분자마커의 개발

(57) 요 약

본 발명은 분자마커를 이용하여 저장미에 서식하는 쌀바구미, 화랑곡나방 및 보리나방을 조기에 진단하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 상기 해충 각각에 특이적인 서열에 대한 프라이머쌍, 그리고 그 프라이머쌍을 이용하여 적은 양의 쌀로부터 추출한 DNA를 PCR을 이용하여 증폭시키고, 그 결과 특정의 단일밴드가 나타나는지 여부를 전기영동을 통해 확인함으로써 상기 해충을 조기에 진단할 수 있는 진단방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 적은 양의 쌀로도 상기 해충에 의한 감염 여부를 확인하는 것이 가능하여 조기진단에 유용할 뿐 아니라, 그에 대한 해충방제를 적기에 소량으로 살포할 수 있어 경제적으로도 비용을 절감할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

류문일

서울시 성북구 안암동 고려대학교 자연계캠퍼스 생명과학대학서관 421호

정해준

서울시 성북구 안암동 고려대학교 자연계캠퍼스 생명과학대학동관 302호

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 24와 서열번호 25의 프라이머쌍에 의해 증폭시켜 보리나방 특정 뉴클레오티드 밴드를 발현시키는 단계를 포함하는 보리나방에 특이적인 염기서열에 특이적인 프라이머쌍을 이용한 농작물의 보리나방 해충 감염 진단방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 농작물이 쌀, 보리, 밀, 현미, 수수, 옥수수, 고추 및 콩으로 이루어진 군으로부터 선택된 농작물인 것을 특징으로 하는 해충 감염 진단방법.

청구항 3

보리나방 특정 뉴클레오티드 밴드를 발현시키는 서열번호 24와 서열번호 25로 이루어지는 프라이머쌍.

청구항 4

제3항의 프라이머쌍을 포함하는 농작물의 보리나방 해충 감염 진단용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 농작물이 쌀, 보리, 밀, 현미, 수수, 옥수수, 고추 및 콩으로 이루어진 군으로부터 선택된 농작물인 것을 특징으로 하는 진단용 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<16> 본 발명은 DNA 연쇄중합반응(PCR)을 이용하여 저장미의 서식 해충을 조기에 감별하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 쌀바구미, 화랑곡나방 및 보리나방 각각에 특이적인 DNA 마커 및 이를 이용하여 조기에 해충의 감염 여부를 감별하는 방법에 관한 것이다.

<17> 쌀과 보리 등은 우리 식생활에 꼭 필요한 중요한 곡물들이다. 그러나 이러한 저장 곡물들은 저장과정에서 쌀바구미, 화랑곡나방 및 보리나방과 같은 작은 곤충의 숙주로 이용될 수 있으며, 그 파괴 양상이 아주 심각하다.

<18> 쌀바구미(Sitophilus oryzae)의 암컷은 낟알에 구멍을 뚫고 대개 한 구멍에 1개씩 알을 낳으며 끈적끈적한 물질을 분비해 구멍을 막는데, 때로는 2~3개씩 낳는 경우도 있다. 알의 개수는 알을 낳는 시기에 따라 약간 다르나 암컷 1마리가 300~500개의 알을 낳으며, 알은 낟알 속에서 부화해 어른벌레가 될 때까지 그 안에서 자라며, 이때부터 시작하여 알 밖으로 나와서까지 낟알을 갉아먹는다. 성충과 애벌레는 딱딱한 먹이를 즐기는 습성이 있어서 쌀·보리·밀·수수·옥수수 등의 저장 곡물에 피해를 끼친다. 피해를 입은 곡물은 양적 손실뿐 아니라 낟알 안에서 자라고 있는 애벌레의 호흡으로 인해 수분이 높아지고 열이 발생해 변질·부패되어 질적으로 품질이 떨어진다.

<19> 화랑곡나방(Plodia interpunctella)의 성충은 한 해에 3 내지 4회 발생하며 애벌레 상태로 겨울을 보내며, 발생이 불규칙하여 계절에 상관없이 다양한 성장단계의 애벌레와 번데기, 어른벌레를 볼 수 있다. 어른벌레는 보통 짚가마니 위나 쌀통 주위에 알을 낳고, 평균산란수는 200여개이다. 애벌레는 입에서 실을 토해서 쌀이나 곡식알을 얽어매고 먼저 쌀눈을 먹은 다음 바깥부분을 갉아먹고, 성장을 마친 애벌레는 가마니 밖으로 기어나와 두께가 얇은 고치를 만들고 번데기가 된다. 비슷한 장소에서 같이 살아가는 쌀바구미보다 더 건조한 곡물이나 식품에서도 살 수 있다. 콩이나 고추에서 사는 경우 애벌레는 열매의 안을 갉아먹으면서 들어간 후 그 구멍을 통해서 밖으로 똥을 배출하며, 쌀과 콩, 고추 등의 상품 가치를 떨어뜨리는 농업 해충이다.

<20> 보리나방(Sitotroga cerealella)의 몸통은 회갈색이고 앞날개는 회황색, 뒷날개는 회색이거나 은백색이다. 앞날

개 뒷모서리에 몇 개의 검은 점이 흩어져 있다. 알은 납작한 타원형이며 애벌레는 머리가 황갈색이고 몸통의 제8마디 윗쪽에 흑자색의 둥근 점무늬가 1쌍 있다. 어른벌레는 한 해에 3회 발생하며 곡물 속에서 애벌레 상태로 겨울을 보낸다. 애벌레는 밀·보리·기장·옥수수·메밀·현미 등의 저장곡물을 가해하는데, 주로 저장 중인 보리 낟알의 눈(배젖[胚乳])을 먹는다. 4~5월에 번데기가 되는데, 저장 중인 현미에서 살던 애벌레는 현미 낟알을 몇 알씩 입에서 품은 실로 모아 붙인 다음 그 안에서 연한 노란색의 고치를 만들고 번데기가 된다. 어른벌레가 된 다음에는 구멍을 뚫고 나가는데 이때 보리는 완전히 빈 껍질만 남게 된다. 야생에서는 나방이 출수 후의 보리, 밀에 날아와서 이삭에 알을 낳는다. 부화한 애벌레는 곡물 낟알의 안을 갉아먹고 들어가 그 속에서 자라므로, 보리와 밀, 현미 등의 곡물의 상품 가치를 떨어뜨리는 주요 농업 해충이다.

<21> 따라서, 저장 곡물을 저장할 때 이들 곤충에 의한 피해를 감소시키려면 해충을 조기 감별하는 것이 매우 중요하다. 따라서 저장미에 서식하면서 저장미의 품질을 떨어뜨리는 쌀바구미, 화랑곡나방, 보리나방 등 해충에 대한 구제방법이 많이 연구되고 있는 실정이다. 그러나 해충방제를 위한 약제들은 해충 군집이 저장미에서 어느 정도 발견이 되어서야 사용되어 왔기 때문에, 이와 같이 이미 육안으로 해충의 존재를 파악한 뒤에 실시되는 구제는 그 효율이 현저히 떨어진다. 따라서, 해충이 서식하기 시작하는 초기에 그 존재를 진단할 수 있다면 훨씬 적은 양의 약제를 사용함으로써 해충을 박멸할 수 있으므로, 더욱 경제적이고 친환경적인 방법이라 할 수 있다. 그러나 상기 해충들의 조기 감별법은 아직 개발되지 않은 실정이다.

<22> 따라서 본 발명자들은 쌀바구미와 화랑곡나방, 그리고 보리나방을 특이적으로 보다 쉽게 찾을 수 있는 방법으로, 상기 해충에 대한 DNA마커를 개발하고자 수년 동안 연구한 결과, 농작물 자체의 특정한 프라이머 서열이 아닌 상기 곤충 각각의 게놈에서 특이하게 찾은 염기서열에 대한 프라이머를 찾게 되었고, 또한 분자마커에 의해 조기에 상기 곤충의 존재를 감별할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<23> 본 발명의 목적은 쌀바구미(Sitophilus oryzae)의 특이적인 염기서열에 대한 프라이머쌍을 이용하여 쌀바구미 감염의 진단방법을 제공하는데 있다.

<24> 본 발명의 다른 목적은 화랑곡나방(Plodia interpunctella)의 특이적인 염기서열에 대한 프라이머쌍을 이용하여 화랑곡나방 감염의 진단방법을 제공하는데 있다.

<25> 본 발명의 또 다른 목적은 보리나방(Sitotroga cerealella)의 특이적인 염기서열에 대한 프라이머쌍을 이용하여 보리나방 감염의 진단방법을 제공하는데 있다.

<26> 본 발명의 또 다른 목적은 쌀바구미, 화랑곡나방 및 보리나방 각각의 특정 뉴클레오티드 밴드를 발현시키는 특이적인 프라이머쌍을 제공하는데 있다.

발명의 구성 및 작용

<27> 하나의 양태로서, 본 발명은 (ⅰ)서열번호 2와 서열번호 3, 서열번호 8과 서열번호 9, 및 서열번호 10과 서열번호 11로 이루어진 그룹으로부터 선택된 프라이머쌍에 의해 증폭시켜 쌀바구미 특정 뉴클레오티드 밴드를 발현시키는 공정; 또는

<28> (ⅱ)서열번호 14와 서열번호 15, 서열번호 16과 서열번호 17, 서열번호 18과 서열번호 19, 및 서열번호 22와 서열번호 23으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 프라이머쌍에 의해 증폭시켜 화랑곡나방 특정 뉴클레오티드 밴드를 발현시키는 공정; 또는

<29> (ⅲ)서열번호 24와 서열번호 25의 프라이머쌍에 의해 증폭시켜 보리나방 특정 뉴클레오티드 밴드를 발현시키는 공정을 포함하는 각 해충에 특이적인 염기서열에 특이적인 프라이머쌍을 이용한 해충 감염의 진단방법에 관한 것이다.

<30> 본 발명은 바람직한 양태로서, 상기 해충이 쌀바구미인 것을 특징으로 하는 농작물의 해충 감염 진단방법을 제공한다.

<31> 쌀바구미의 5.8S 리보솜 RNA유전자 중 internal transcribed spacer 영역이 각 종마다 특이하다고 알려져 있다. 본 발명자들은 이러한 영역을 이용하면 쌀바구미에만 특이적으로 존재하는 DNA 서열을 특이하게 검출할 수 있는 프라이머를 설계할 수 있다는 것에 착안하여, 미국 생물정보 사이트 NCBI 유전자 뱅크에 개시된 쌀바구미의 염기서열로부터 쌀바구미에서만 특이적인 뉴클레오티드 밴드를 PCR 증폭시킬 수 있는 6종류의 프라이머쌍을 제작하였다. 그리고 이들 분자마커가 쌀바구미를 특이적으로 감별할 수 있는지 PCR을 통해 각 프라이머쌍마

다 실험을 수행하여, 세 쌍의 프라이머가 PCR 반응을 통해 최소 1g의 쌀에서도 정확하고 신속하게 뉴클레오티드 밴드를 증폭시켜 쌀바구미를 검출할 수 있음을 확인하였다. 따라서, 이러한 프라이머쌍은 본 발명에서 쌀바구미의 감염여부를 조기에 확인할 수 있는 진단용 마커로서 사용될 수 있다.

<32> 본 발명은 바람직한 양태로서, 상기 해충이 화랑곡나방인 것을 특징으로 하는 해충 감염의 진단방법을 제공한다.

<33> 본 발명에서 화랑곡나방에 대한 특이적인 분자마커를 개발하기 위하여, 각 종마다 특이적인 DNA 서열을 가지고 있다고 하는 부수체 서열(microsatellite sequence) 영역을 이용하게 되면, 화랑곡나방에만 특이적으로 존재하는 DNA 서열을 특이하게 검출할 수 있는 프라이머를 설계할 수 있다는 것에 착안하여, 미국 생물정보 사이트 NCBI유전자 뱅크에 개시된 화랑곡나방의 염기서열로부터 화랑곡나방에만 특이적인 뉴클레오티드 밴드를 PCR 증폭시킬 수 있는 5종류의 프라이머쌍을 제작하였다. 그리고 이들 분자마커가 화랑곡나방을 특이적으로 감별할 수 있는지 PCR을 통해 프라이머쌍 각각에 대한 실험을 수행하여, 세 쌍의 프라이머가 PCR 반응을 통해 뉴클레오티드 밴드를 증폭시켜 화랑곡나방의 애벌레뿐 아니라, 알의 형태도 검출할 수 있음을 확인하였다. 따라서, 이들 프라이머쌍은 본 발명에서 화랑곡나방의 감염여부를 조기에 확인할 수 있는 진단용 마커로서 사용될 수 있다. 화랑곡나방의 경우는 상당기간 알의 형태로 쌀에서 머무르게 되므로, 알도 검출할 수 있는 분자마커를 개발하는 것이 매우 유용한 바, 본 발명의 분자마커는 이러한 요구에도 부응할 수 있다(도 11).

<34> 본 발명은 바람직한 양태로서, 상기 해충이 보리나방인 것을 특징으로 하는 해충 감염의 진단방법을 제공한다.

<35> 본 발명에서 보리나방에 대한 특이적인 분자마커를 개발하기 위하여, 미국 생물정보 사이트 NCBI의 유전자 뱅크에 개시된 보리나방의 외부 표면 단백질 전구체(out surface protein precursor(WSP)) 영역의 서열로부터 보리나방에 특이적인 뉴클레오티드 밴드를 PCR 증폭시킬 수 있는 프라이머쌍을 제작하였다. 그리고 이 분자마커가 보리나방을 특이적으로 감별할 수 있는지를 PCR을 통해 실험을 수행한 결과, 보리나방에 분명한 PCR 산물이 생성됨을 알 수 있었다. 다만, 상기 PCR 수행시 쌀바구미에서도 뉴클레오티드 밴드가 형성됨을 살펴볼 수 있었으나, 보리나방의 경우 더욱 분명한 PCR 산물이 검출됨으로써, 보리나방의 존재를 검출할 수 있는 마커로 사용될 수 있음을 확인하였다.

<36> 상기와 같이, 쌀바구미, 화랑곡나방, 보리나방 각각에 대한 본 발명의 특이적인 프라이머쌍을 이용하여 쌀 샘플에 대해 각각 PCR 반응을 수행하는 경우, 상기 해충에 의해 감염된 경우는 그에 대한 PCR 산물이 생성된다. 이에 따라, 본 발명에 의해 제공되는 프라이머쌍을 사용하면 눈에 보이지 않는 정도의 해충이라 하더라도 감염 여부를 손쉽게 알 수 있어, 해충이 서식하기 이전에 이의 존재를 진단할 수 있어 저장 곡물의 해충에 의한 피해를 최소화할 수 있다. 이러한 본 발명의 방법은 쌀 이외에 상기 해충들이 서식할 수 있는 모든 곡물에 대해 적용될 수 있다. 그러한 곡물로는 쌀, 보리, 밀, 수수, 옥수수, 고추, 현미, 콩 등이 있으며, 이에 제한되지 않는다.

<37> 또한 본 발명은 바람직한 양태로서, 상기 해충 감염 진단방법에 사용되는 프라이머쌍을 제공한다.

<38> 이하 본 발명의 내용을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명의 내용을 이해하기 위해 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 이에 국한되는 것은 아니다.

<39> 실시예 1 : 쌀바구미(Sitophilus oryzae)의 DNA마커 개발과 그 성과

<40> 1. 쌀바구미에만 특이적으로 존재하는 DNA 서열 영역 조사 및 프라이머쌍의 제작

<41> 5.8S 리보솜 RNA 유전자 중 각 종마다 특이하다고 알려져 있는 internal transcribed spacer 영역의 DNA 서열을 이용하였다. 이것은 미국 생물정보 사이트 NCBI 유전자뱅크를 통해서 검색하였다. 이 영역 중에서, 쌀바구미에 특이적일 것으로 추정되는 아래와 같은 6종류의 프라이머쌍(서열번호 2 내지 서열번호 13)을 제작하였다(도 1).

<42> 프라이머쌍 1: 5'-CTTGACGTTTATTTTCGATGC-3'(서열번호 2) 및 5'-TGGTTAATTTTGGCGTCCC-3'(서열번호 3)

<43> 프라이머쌍 2: 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'(서열번호 4) 및 5'- TCAGACGTCGATTTCCGT-3'(서열번호 5)

<44> 프라이머쌍 3: 5'-TCGGAGCGTGTTGGGTGTTT-3'-(서열번호 6) 및 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'(서열번호 7)

<45> 프라이머쌍 4: 5'-CTTGACGTTTATTTTCGATGC-3'(서열번호 8) 및 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'-(서열번호 9)

<46> 프라이머쌍 5: 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'-(서열번호 10) 및 5'-TGGTTAATTTTGGCGTCCC-3'(서열번호 11)

<47> 프라이머쌍 6: 5'-TCGGAGCGTGTTGGGTGTTT-3'(서열번호 12) 및 5'-TCAGACGTCGATTTCCGT-3'(서열번호 13)

<48> 2. 추출한 쌀바구미 DNA에서 연쇄중합반응(PCR)을 이용하여 가장 특이적이고 명확한 DNA 마커 탐색

<49> 이들 분자마커가 쌀바구미를 특이적으로 감별할 수 있는지 PCR을 통해 프라이머쌍 각각에 대해 실험을 수행하였다(도 3, 도 4). 실험 결과 프라이머쌍 2(서열번호 4와 서열번호 5), 프라이머쌍 3(서열번호 6과 서열번호 7) 및 프라이머쌍 6(서열번호 12와 서열번호 13)의 경우는, 쌀바구미 뿐만 아니라 화랑곡나방 (Plodia)이나 쌀에서도 동일한 DNA 단편이 증폭된다는 것을 알 수 있었다. 그러나 프라이머쌍 1(서열번호 2와 서열번호 3), 프라이머쌍 4(서열번호 8과 서열번호 9) 및 프라이머쌍 5(서열번호 10과 서열번호 11)의 경우는, 쌀바구미에서만 특이적인 DNA 단편이 증폭되었다. 그리고 단편의 크기도 우리가 예상했던 크기와 동일하며 명확하게 나타난다는 것을 발견할 수 있었다.

<50> 증폭된 DNA 단편이 우리가 제작한 internal transcribed spacer 영역의 서열이 맞는지 확인한 결과 동일 영역임을 확인할 수 있었다(도 5). 이는 프라이머쌍 4(서열번호 8과 서열번호 9)를 통해서 확인하였다.

<51> 3. 쌀바구미에서 찾아낸 특이적인 프라이머쌍 1, 4 및 5 DNA 마커를 통한 쌀바구미 검출.

<52> 다양한 쌀 샘플을 이용하여, 본 발명의 DNA 마커를 이용하여 쌀바구미를 검출할 수 있는지 조사해 보았다(도 6). 쌀바구미의 감염 정도가 심각한 W-Rice (O)(바구미 감염 후 6개월), 쌀바구미의 감염이 이제 막 시작되어 겉보기에는 손상이 없는 W-Rice(N) (바구미 감염 후 1개월) 및 감염이 전혀 없는 정상적인 쌀 샘플(Rice)을 이용하여 실험을 수행하였다.

<53> 도 6을 보면 W-Rice(N)는 프라이머쌍 1(서열번호 2와 서열번호 3)에서 PCR 산물이 생겨 있음을 발견할 수 있다. 그러나 W-Rice(O)이나 정상적인 쌀에서는 PCR 산물이 생기지 않았다. 쌀바구미의 성충은 알을 쌀 안에 낳고 애벌레도 쌀 안에서 자란다. 그래서 무작위로 추출한 W-Rice (N) 안에 쌀바구미의 애벌레가 함께 들어 있었기 때문에 PCR 산물이 증폭될 수 있었음을 예측할 수 있다.

<54> 그러나 W-Rice (O)는 감염 이후 너무 오래되었기에, 이미 쌀 조직이 다 파괴되어 오히려 쌀바구미 애벌레가 살지 못하였음을 예측할 수 있었다. 이 실험에서도 알 수 있듯이, 쌀바구미로 감염 후 1개월 정도 된 쌀을 무작위로 추출하여 본 발명에서 제작한 프라이머쌍을 이용하면, 아주 적은 양의 쌀(쌀 1g)로도 감염여부를 효과적으로 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

<55> 4. 쌀바구미의 감별 감도

<56> 쌀바구미의 감별 감도를 조사하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다. 쌀 (쌀 1g)과 쌀바구미 애벌레 한마리를 섞어서 게놈 DNA를 추출한 후, 프라이머쌍 1(서열번호 2와 서열번호 3), 프라이머쌍 4(서열번호 8과 서열번호 9) 및 프라이머쌍 5(서열번호 10과 서열번호 11)로 검색할 수 있는지를 실험하였다(도 7). 3가지 프라이머쌍에서 PCR 산물이 생성됨을 관찰하였다. 특히 프라이머쌍 5는 굉장히 많은 양의 PCR 산물을 생성함을 알 수 있었다. 본 실험을 통해 쌀 1g당 쌀바구미 한 마리 정도의 양은, 비록 이 쌀바구미가 쌀 내부에 존재하여 눈에 보이지 않은 경우라 하더라도 본 발명의 프라이머쌍을 이용하면 충분히 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

<57> **실시예 2 : 화랑곡나방(Plodia interpunctella)에 특이적인 DNA마커 개발**

<58> 1. 화랑곡나방에만 특이적으로 존재하는 DNA 서열 영역의 조사와 그 프라이머쌍의 제작

<59> 각 종마다 특이적인 DNA 서열을 가지고 있다고 하는 부수체(microsatellite sequence)영역을 이용하여 아래와 같이, 5종류의 프라이머쌍을 제작하였다(도 8). 이는 미국 생물정보 사이트 NCBI 유전자뱅크를 통해 검색하였다.

<60> 프라이머쌍 1: 5'-CAGATGAGACAATAACGAAAC-3'(서열번호 14) 및 5'-GAACACCGCTCAAATTAC-3'(서열번호 15)

<61> 프라이머쌍 2: 5'-CGAGTCGCATTCACGTATGT-3'(서열번호 16) 및 5'-GTCACTAACTTCAACGGTGT-3'(서열번호 17)

<62> 프라이머쌍 3: 5'-GCACGCACAACGCTATGTA-3'(서열번호 18) 및 5'-TGGTCTTTTCCATCCGTT-3'(서열번호 19)

<63> 프라이머쌍 4: 5'-GCTCTTATTACCGCTGCGT-3'(서열번호 20) 및 5'-GAGGACAAACTTACTTTGGC-3'(서열번호 21)

<64> 프라이머쌍 5: 5'-CCGGTCTCAATTTTCGTT-3'(서열번호 22) 및 5'-CCAACATCGTGCTGATCA-3'(서열번호 23)

<65> 2. PCR을 이용한 화랑곡나방 특이적 DNA 마커 개발

<66> 각 프라이머쌍에 의해 화랑곡나방을 특이적으로 감별할 수 있는지 알아보기 위해 PCR을 수행하였다. 실험 결과, 뚜렷하고 선명한 PCR product가 화랑곡나방 DNA 샘플을 이용한 반응에서 나타남을 알 수 있다(도 9). 단, 프라

이머쌍 4(서열번호 20과 서열번호 21)의 경우, 쌀바구미에서도 PCR 산물이 생성되었는바, 이는 화랑곡나방만을 특이적으로 검출하기에는 알맞지 않은 것이라 판명하였다. 그러나 프라이머쌍 1(서열번호 14와 서열번호 15) 내지 프라이머쌍 3(서열번호 18과 서열번호 19) 및 프라이머쌍 5(서열번호 22와 서열번호 23)는 화랑곡나방에서만 특이적으로 검출되었다. 검출된 산물이 실시예 2.1에서 제작한 부수체(microsatellite) 서열이 맞는지 확인하기 위해, 프라이머쌍 2(서열번호 16과 서열번호 17)에 의해 검출된 PCR산물의 시퀀싱 분석을 수행하였다(도 10). 그 결과 검출된 산물과 제작한 부수체 서열이 일치함을 확인할 수 있었다.

<67> 3. 화랑곡나방 DNA marker를 통한 화랑곡나방 검출.

<68> 본 발명에서 제작된 화랑곡나방의 부수체(microsatellite)에 대한 프라이머가 화랑곡나방 애벌레의 게놈DNA에서도 검출되는지 실험하였다(도 11). 화랑곡나방의 성충은 알을 쌀에 뿌려 놓는데, 알은 상당 기간을 알의 형태로 있다. 따라서 화랑곡나방의 알을 검출할 수 있다면 화랑곡나방의 조기감염을 진단함에 있어서 매우 유용할 것이라고 생각되어 상기 실험을 수행하였다. 약 20개 정도의 알로부터 게놈 DNA를 추출하여 PCR을 수행하였다. PCR 수행 결과, 아주 옅은 밴드가 검출됨을 확인할 수 있었다. 도 11의 결과는 PCR 싸이클을 35번으로 하여 더욱 명확하고 정확한 밴드를 검색한 것을 보여주고 있다.

<69> **실시예 3 : 보리나방(Sitotroga cerealella)에 특이적인 DNA마커 개발**

<70> 1. 보리나방에만 특이적으로 존재하는 DNA 서열 영역의 조사와 프라이머쌍 제작

<71> 보리나방의 DNA 서열 중, NCBI의 유전자뱅크를 통해 밝혀진 외부 표면 단백질 전구체(out surface protein precursor (WSP)) 영역의 서열을 이용하여 아래와 같이, DNA 마커를 제작하였다(도 12).

<72> TAGCTGGTGGTGGTGCGTTT(서열번호 24)

<73> TCTCACCACCGCTTTTATCG(서열번호 25)

<74> 2. PCR을 이용한 보리나방 특이적 DNA 마커의 개발

<75> 상기 실시예 3.1에서 제작한 프라이머로 PCR을 수행한 결과, 보리나방에서 분명한 PCR 산물이 생성됨을 알 수 있었다(도 13). 그러나 쌀바구미에서도 아주 옅은 밴드가 형성되었다. 그러나 보리나방의 경우 생성된 PCR 산물이 보리나방의 경우보다 밴드가 더욱 명확하며, 또한 그 크기에 있어서도 차이가 있음을 확인할 수 있다. 또한 30분 정도 전기영동을 더 실시한 경우, 쌀바구미의 PCR 산물과는 구별되는, 분명한 PCR 산물을 검출할 수 있었다(도 13). 그리고 이렇게 검출된 PCR 산물은 시퀀싱 분석에 의해, 상기에서 제작된 외부 표면 단백질 전구체(WSP) 영역의 서열과 일치하다는 것도 확인할 수 있었다(도 14).

발명의 효과

<76> 상술한 바와 같이, 본 발명에서 제작한 프라이머쌍을 사용하는 경우, 중합연쇄반응(PCR)을 통하여 저장미 해충을 특이적으로 검출할 수 있으며, 아주 적은 양의 쌀로부터도 감염 여부를 검출할 수 있기 때문에, 이러한 특성은 저장미 해충의 조기감별에 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 쌀바구미의 5.8S 리보솜 RNA(ribosomal RNA) 유전자 중 internal transcribed spacer 영역의 DNA 서열을 나타낸 것이다.

<2> 도 2는 쌀바구미의 5.8S 리보솜 RNA 유전자 중 internal transcribed spacer 영역의 DNA 서열에서 만든 특이적인 6개의 프라이머쌍을 나타낸 것이다.

<3> 도 3의 (A)는 쌀바구미에서 제작된 프라이머쌍 중 프라이머쌍 1을 이용한 DNA 연쇄중합(PCR) 결과를 나타낸 것이고, 도 3의 (B)는 쌀바구미에서 제작된 프라이머쌍 중 프라이머쌍 2(서열번호 4와 서열번호 5)와 프라이머쌍 3(서열번호 6과 서열번호 7)을 이용한 DNA 연쇄중합반응(PCR) 결과를 나타낸 것이다.

<4> 도 4의 (A)는 쌀바구미에서 제작된 프라이머쌍 중 프라이머쌍 4(서열번호 8과 서열번호 9)와 프라이머쌍 5(서열번호 10과 서열번호 11)를 이용한 DNA 연쇄중합반응(PCR) 결과를 나타낸 것이고, 도 4의 (B)는 쌀바구미에서 제작된 프라이머쌍 중 프라이머쌍 6(서열번호 12와 서열번호 13)을 이용한 DNA 연쇄중합반응(PCR) 결과를 나타낸 것이다.

<5> 도 5는 쌀바구미에서 제작된 프라이머쌍 중 프라이머쌍 4(서열번호 8과 서열번호 9)의 PCR 반응 결과로 나타난

DNA 단편을 시퀀싱한 결과를 나타낸 것이다.

<6> 도 6은 쌀바구미의 감염이 없는 쌀(Rice), 쌀바구미에 의해 감염된 지 1개월 정도 된 쌀(W-Rice(N)), 쌀바구미에 의해 감염된 지 6개월이 넘어 거의 형체가 없어진 쌀(W-Rice(O))로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 추출하여 프라이머쌍 1(서열번호 2와 서열번호 3), 프라이머쌍 4(서열번호 8과 서열번호 9), 프라이머쌍 5(서열번호 10과 서열번호 11)로 DNA 연쇄중합반응(PCR)을 시킨 결과를 나타낸 것이다.

<7> 도 7은 쌀바구미의 양에 따른 DNA 연쇄중합반응 (PCR) 결과로, 쌀바구미 애벌레 1마리를 이용하여 프라이머쌍 1(서열번호 2와 서열번호 3), 프라이머쌍 4(서열번호 8과 서열번호 9), 프라이머쌍 5(서열번호 10과 서열번호 11)로 DNA 연쇄중합반응(PCR)을 시킨 결과를 나타낸 것이다.

<8> 도 8은 화랑곡나방의 부수체(microsatellite) 영역의 DNA 서열과 각각의 프라이머 제작에 관한 정보를 나타낸 것으로, 5가지 종류의 부수체(microsatellite) 영역에서 각각 1개씩 총 5개의 프라이머쌍을 제작한 것이다.

<9> 도 9는 화랑곡나방에서 제작된 프라이머쌍 1 내지 5를 이용한 DNA 연쇄중합반응(PCR) 결과를 나타낸 것이다.

<10> 도 10은 화랑곡나방에서 제작된 프라이머쌍 중 프라이머쌍 4(서열번호 20과서열번호 21)의 PCR 반응 결과로 나타난 DNA 단편을 시퀀싱한 결과를 나타낸 것이다.

<11> 도 11은 화랑곡나방 알에서 DNA를 추출하여 프라이머쌍 중 프라이머쌍 3(서열번호 18과 서열번호 19)을 사용하여 DNA 연쇄중합반응(PCR)시킨 결과를 나타낸 것이다.

<12> 도 12는 보리나방 외부 표면 단백질 전구체(out surface protein precursor (WSP)) 영역의 DNA 서열과 이것을 이용한 프라이머쌍을 나타낸 것이다.

<13> 도 13은 보리나방에서 제작된 프라이머쌍을 이용한 DNA 연쇄중합반응(PCR) 결과를 나타낸 것이다.

<14> 도 14는 보리나방에서 제작된 프라이머쌍의 PCR반응 결과로 나타난 DNA 단편을 시퀀싱한 결과를 나타낸 것이다.

<15> 도 15는 쌀바구미와 화랑곡나방, 보리나방 및 쌀에서 DNA를 추출하고 각각 제작된 대표 프라이머쌍(프라이머쌍 1: 쌀바구미, 프라이머쌍 2: 화랑곡나방, 프라이머쌍: 보리나방)으로 DNA 연쇄중합반응(PCR)한 결과를 나타낸 것이다.

도면

도면1

>gi|17998535|gb|AF237786.1|AF237785S2 *Sitophilus oryzae* 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

source 1..645 /organism="Sitophilus oryzae" /mol_type="genomic DNA"
rRNA <1..34 /product="5.8S ribosomal RNA"
misc_RNA 35..587 /product="internal transcribed spacer 2"
rRNA 588..>645 /product="28S ribosomal RNA"

(F2)GCATCGATGAAGAACGCAGCTAATTGCGCGTCAACTTGTGAACTGCAGGACACATGAACATCGACAT
TTCGAACGCACATTGCGGTCCTCGGATTCTGTTCCCGGACCACTCCTGGCTGAGGGTCGTATCTAACTTA
AAGACTGCTCGGTTTTTCTTTTTTTATATTATAAAAGAGAAAAACG(F3)TCGGAGCGTGTTGGGTGTTTACG
CGTCGTCCATAAGACGCGACACCTTAAAACGCGAAAGCGTCCGCACTCAGTCGTCGACATATCGACGAC
GGAGCGCGGTAAAATGCGAAACAACGATTCGAGAGCGGTGTTTGA(F1)CTTGACGTTTATTTTCGATGCAT
ATACGCGCTAGTACTTGATACCTGCACGTCGTCGTCGAACGTCGTCTCGTCGCGTCCGATCGTCG GTC
CGATATATTTTCGCGATTACGTCTCTATATATATATATATAGATGGATGAAATCGTTTAA(R2)ACGGAAATCG
ACGTCTGATCGGTAAGGCTACGAGACTAAGACGATAAAACGTCGTCACTGGCCCGTCTCACAATCGAATC
GTTC(R1)GGGACGCCAAAATTAACCACACATTAATTTTTCGACCTCAGAGCAGGTGAGACTACCCGCTGA
ATTTA(R3)AGCATATCAATAAGCGGAGGA

도면2

Set1 Primer (Marker length = 251 bp)
Sito5.8-F1: 5'- cttgacgtttatttttcgatgc & Sito5.8-R1: 5'- tggttaattttggcgtccc

Set2 Primer (Marker length = 470 bp)
Sito5.8-F2: 5'- gcatcgatgaagaacgcagc & Sito5.8-R2 5'- tcagacgtcgattccgt

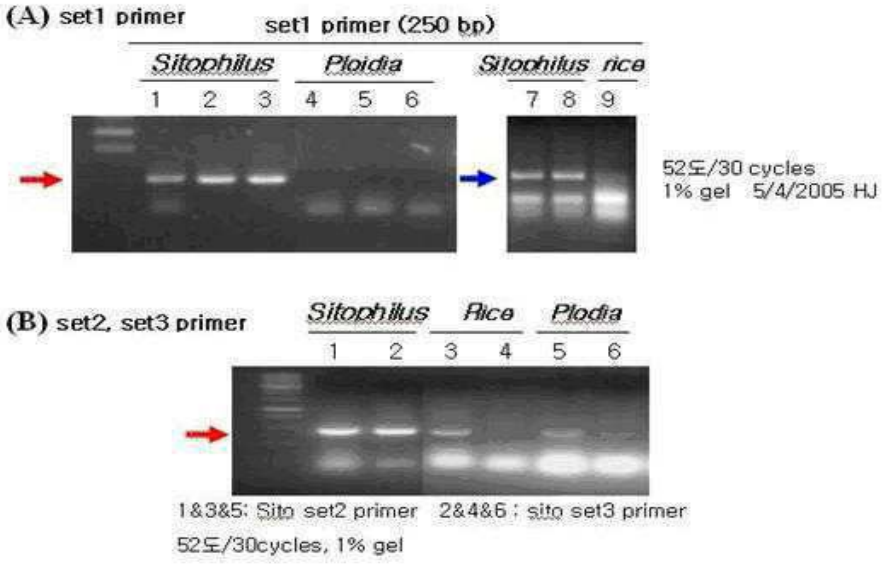
Set3 Primer (Marker length = 450 bp)
Sito5.8 F3: 5' tcggagtgttggtgttt & Sito5.8 R3: 5' tcctccgcttattgatatgc

Set4 Primer (Marker length = 260 bp)
Sito5.8-F1: 5'- cttgacgtttatttttcgatgc & Sito5.8-R3: 5'- tcctccgcttattgatatgc

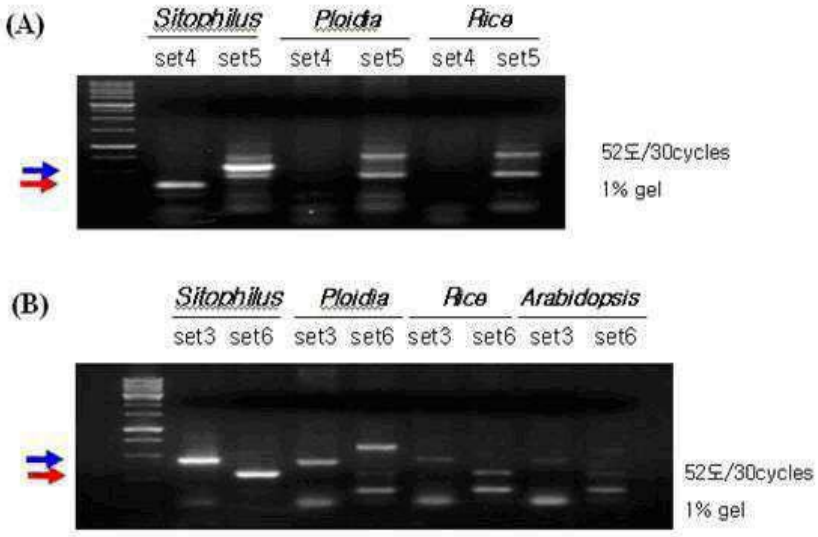
Set5 Primer (Marker length = 560 bp)
Sito5.8-F2: 5'- gcatcgatgaagaacgcagc & Sito5.8-R1 5'- tggttaattttggcgtccc

Set6 Primer (Marker length = 250 bp)
Sito5.8-F3: 5'- tcggagtgttggtgttt & Sito5.8-R2: 5'- tcagacgtcgattccgt

도면3



도면4



도면5

>gi|190[illegible]|gb|[illegible]| Sitophilus zeamais 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1518 Score = 438 bits (221), Expect = 4e-120 Identities = 233/236 (98%), Gaps = 2/236 (0%) Strand=Plus/Plus

Query 65 GTCCGATATATTTTCGCGATTACGTCTCTATTTATATAGATAGATGAAATCGTTTAAA 124
Sbjct 1285 GTCCGATATATTTTCGCGATTACGTCTCTATTTATATAGATAGATGAAATCGTTTAAA 1344

Query 125 CGGAAATCGACGTCTGATCGGTAAGGCTACGAGACCAAGACGATAAAACGTCGTCACTTG 184
Sbjct 1345 CGGAAATCGACGTCTGATCGGTAAGGCTACGAGACCAAGACGATAAAACGTCGTCACTTG 1404

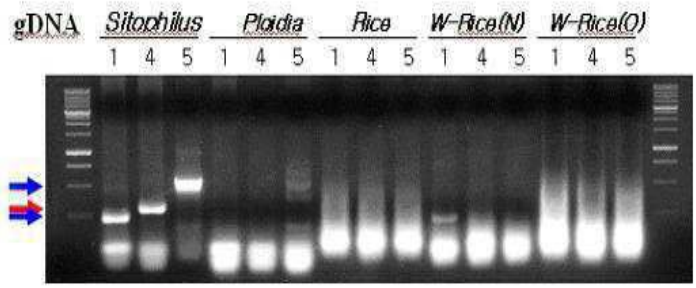
Query 185 CCCGTCTCGTACAATCGAATCGTTCGGGACGCCAAAATTAACCACACATTAATTTTTCGA 244
Sbjct 1405 CCCGTCTCGTACAATCGAATCGTTCGGGACGCCAAAATTAACCACACATTAATTTTTCGA 1464

Query 245 CCTCAGAGCAGGTGAGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATTCAAATAAGCGGAGGA 300
Sbjct 1465 CCTCAGAGCAGGTGAGACTACCCGCTGAATTTAAGCATAT--CAATAAGCGGAGGA 1518

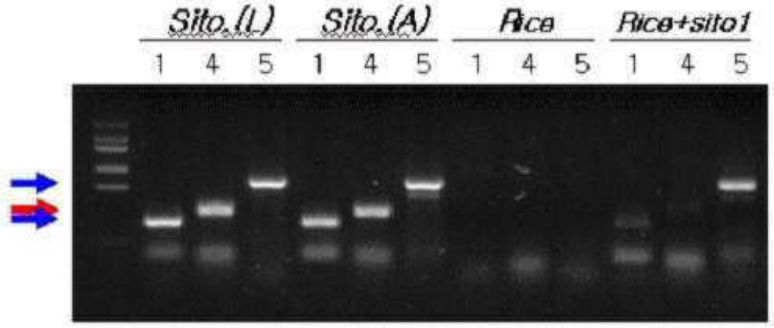
Score = 46.1 bits (23), Expect = 0.058 Identities = 23/23 (100%), Gaps = 0/23 (0%) Strand=Plus/Plus

Query 2 CGCGCTAGTACTTGATACCTGCG 24
Sbjct 1222 CGCGCTAGTACTTGATACCTGCG 1244

도면6


gDNA
Sitophilus
Ploidia
Rice
W-Rice(N)
W-Rice(O)
1 4 5 1 4 5 1 4 5 1 4 5 1 4 5

도면7


Sito.(I)
Sito.(A)
Rice
Rice+sito1
1 4 5 1 4 5 1 4 5 1 4 5

도면8

AY743340 226 bp DNA linear INV 17-MAY-2005 Plodia interpunctella clone IMM 319 microsatellite
CAGATGAGACAATAACGAAACTTCTATATAATAAATCTGTAAGTGTGCTATGTCTGT
ACATAGGAGATAAAAATATGGTGGGGGGGCTTCATGAGACTAATAGAAGCAAAAA
CATTTTTTTTAGAAATTTTGTCTGTCTGTCCGTCCGTCCGTCCGTCTGTCTGTCTGT
CTGTATTTATTCACGCATCACGCAAAAACTATATAGAT**GTAATTTGTAGCGGTGTTC**

Plodia M-F1 primer : CAGATGAGACAATAACGAAAC
Plodia M-R1 primer : GAACACCGCTCAAATTAC

AY743339 271 bp DNA linear INV 17-MAY-2005 Plodia interpunctella clone IMM 314 microsatellite
CGAGTCGCATTCACGTATGTGCCTATGTAGGCATGTATGGAGTTATTATTTCGATG
CATGGAATCTATATAATATAAAACATTTAATGAGTGACTGACTGACTGACTGACAG
ATAACGTACAGCCGAAACTACTGGGCGTAGAAAGCTGAAATTTGGCATGTAGTGG
AGTGTAGATGAGCACTAAGAGGATTTTCAGAAATTCCACCCCTAAGGGGGTGAAA
ACCTTTAATATTAAACTTCAACTTCT**ACACCGTTGAAGTTAGTGAC**TTC

Plodia M-F2 primer : CGAGTCGCATTCACGTATGT
Plodia M-R2 primer : GTCACTAACTTCAACGGTGT

AY743338 341 bp DNA linear INV 17-MAY-2005 Plodia interpunctella clone IMM 313 microsatellite sequence.
CATCAAGG**GCACGCACAACGCTATGTA**CAGCGGTGAGACCTTTACTACACCTATATTC
TACAATATTTGCGATATAAGACCATTCATTCAGTATCGTTCGTTCATTCATTCATTCATC
ATTTGTCCATCTTTCGTTCGTTAATTCGTTCATTCATTCATTCTTTCACTCTCTCACTCA
CTCATTCAGTCACTCATTCTCTCATTCATTCAGCCACTAGAAATTCTGTCATTCGTTCA
TTCACTCACATATTCAACCACTCATTAATTCATTCATTCATTCCCTCATTCATTCATTTAT
TCACTCAATCATTCTACAAA**ACGGATGGAAAAGACCA**AAGAC

Plodia M-F3 primer : GCACGCACAACGCTATGTA
Plodia M-R3 primer : TGGTCTTTTCCATCCGTT

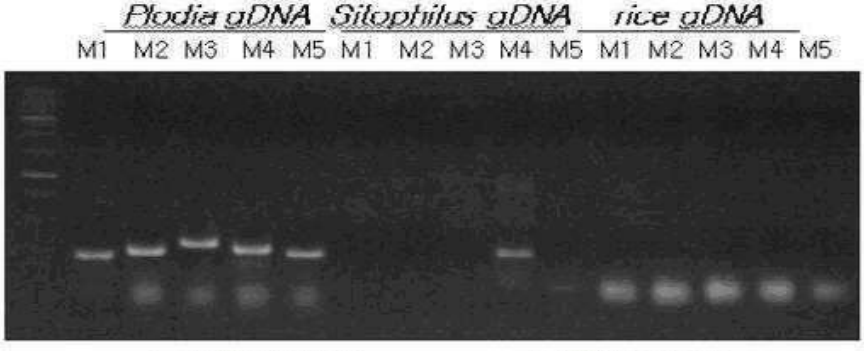
AY743333 289 bp DNA linear INV 17-MAY-2005 Plodia interpunctella clone IMM 214 microsatellite sequence.
GCTCTTATTACCGCTGCGTCTAGATCTAACTTGGCGTGAAGTTTACCAGCGTAGTTATT
GGTCTTGTCTGTTATCAAGACTCATTTTGAGGATAAAGTCTACAGTGCAAATGTAATAG
GAAATATCAATTATGAAGAATAAGATAATAAAGCAAATGAGAGAGACAGAGATAGAGA
GAGAGAAAGAGAATATGACATGCAAACAATGTGTCTAATCGCTCTAAACTAAAAACTT
AATCTAATATAATCCTAAAAAATATTATAAAT**GCCAAAGTAAGTTTGTCCTC**TTC

Plodia M-F4 primer : GCTCTTATTACCGCTGCGT
Plodia M-R4 primer : GAGGACAAACTTACTTTGGC

AY743335 251 bp DNA linear INV 17-MAY-2005 Plodia interpunctella clone IMM 218 microsatellite sequence.
CCGGTCTCAATTTTCGTTCGACTTCAATCACGTACTTTCGAATCTCAATTTAAACAA
GGAATAAGATTCTCTGTGACGTAAAGTATAAATTATTTTTTCATCTCATTAAAATCT
TATAACTTGTTCCACGCAACGGCTAGTGGTACATTGAACTCTATACATGTGTGTGT
GTGTGTTGTTGTTTGGGAAACTCGTAAACGCTGACGTGTGATAGTAACACTAACA
CATCTTC**TGATCAGCACGATGTTGG**

Plodia M-F5 primer: CCGGTCTCAATTTTCGTT
Plodia M-R5 primer: CCAACATCGTGCTGATCA

도면9



1. Plodia M1 primer
2. Plodia M2 primer
3. Plodia M3 primer
4. Plodia M4 primer
5. Plodia M5 primer

52도 /30 cycles
1% gel 7/4/2005 HJ

도면10

>gi|53801561|gb|AY743339.1| Plodia interpunctella clone IMM 314 microsatellite sequence Length=271
Score = 454 bits (229), Expect = 5e-125 Identities = 229/229 (100%), Gaps = 0/229 (0%)
Strand=Plus/Plus

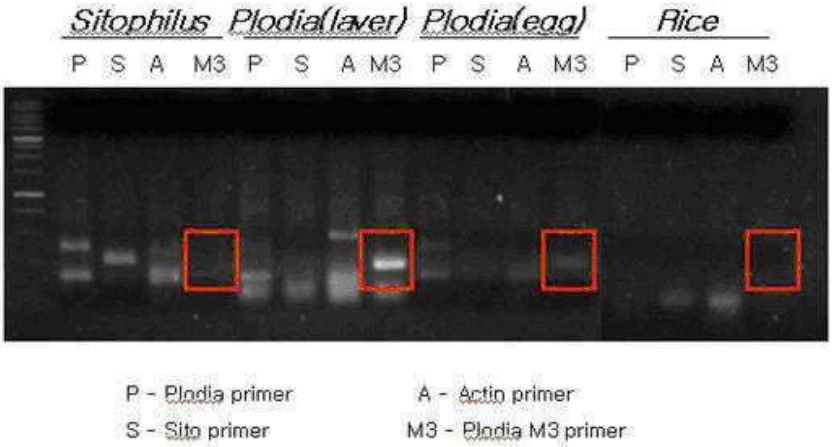
Query 1 TGTATGGAGTTATTATTTCGATGCATGGAATCTATATAATATAAAACATTTAATGAGTGA 60
Sbjct 34 TGTATGGAGTTATTATTTCGATGCATGGAATCTATATAATATAAAACATTTAATGAGTGA 93

Query 61 CTGACTGACTGACTGACAGATAACGTACAGCCGAAACTACTGGGCGTAGAAAGCTGAAAT 120
Sbjct 94 CTGACTGACTGACTGACAGATAACGTACAGCCGAAACTACTGGGCGTAGAAAGCTGAAAT 153

Query 121 TTGGCATGTAGTGGAGTGTAGATGAGCACTAAGAGGATTTTCAGAAATTCCACCCCTAAG180
Sbjct 154 TTGGCATGTAGTGGAGTGTAGATGAGCACTAAGAGGATTTTCAGAAATTCCACCCCTAAG 213

Query 181 GGGGTGAAAACCTTTAATATTAAACTTCAACTTCTACACCGTTGAAGTT 229
Sbjct 214 GGGGTGAAAACCTTTAATATTAAACTTCAACTTCTACACCGTTGAAGTT 262

도면11



도면12

>gi|27804476|gb|AY177735.1| 531 bp DNA linear
Wolbachia endosymbiont of Sitotroga cerealella outer surface protein precursor (wsp) gene, partial cds

GAAATTTTACCTCTTTTCACAAAAGTTGATGGTATTACCTATAAGAAAGACA
ATAGTGATTACAGTCCATTAAAAGCGTCTTTTC**TAGCTGGTGGTGGTGCGTT**
TGGTTACAAAATGGACGACATCAGGGTTCATGTTGAAGGAGTTTATTCATA
CCTAAACAAAAATAATGTTACAGATGCAAAATTTACGCCAGATACTATTGCA
GACAGTGTAACAGCAATTTCAGGCCTAGTTAACGTTTATTACGATATAGCA
ATTGAAGATATGCCTATCACTCCA ATGTTGGTGTTGGTGTTGGTGCAGCG
TATATTAGCACTCCTTTGAAAGACGCTGCGAATGATCAAAAAAGTAAATTTG
GTTTTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACTCCAGAAG
TCAAACTTTATGCTGGAGCTCGTTATTTCGGTTCTTATGGTGCTAATTT**CGA**
TAAAAGCGGTGGTGAGAAAGACAAAGGAGGACATACAGTCCTTTACAGCA
CTGTTGGTGCAGAAGCT

Sitotroga F1 TAGCTGGTGGTGGTGCGTTT
Sitotroga R1 : TCTCACCACCGCTTTTATCG

도면13



1. Arabidopsis UBQ3 primer
2. Arabidopsis UBQ14 primer
3. sitotroga primer

도면14

Sitotroga cerealella primer(SC primer) sequencing data

>gi|27804476|gb|AY177735.1| **Wolbachia endosymbiont of Sitotroga cerealella** outer surface protein precursor (wsp) gene, partial cds Length=531 Score = 706 bits (356), Expect = 0.0 Identities = 359/360 (99%), Gaps = 0/360 (0%) Strand=Plus/Plus

Query 8 TCAGGGTTGATGTTGAAGGAGTTTATTCATACCTAAACAAAAATAATGTTACAGATGCAA 67
Sbjct125 TCAGGGTTGATGTTGAAGGAGTTTATTCATACCTAAACAAAAATAATGTTACAGATGCAA 184

Query68 AATTTACGCCAGATACTATTGCAGACAGTGTAACAGCAATTTCAGGGCTAGTTAACGTTT 127
Sbjct185 AATTTACGCCAGATACTATTGCAGACAGTGTAACAGCAATTTCAGGGCTAGTTAACGTTT 244

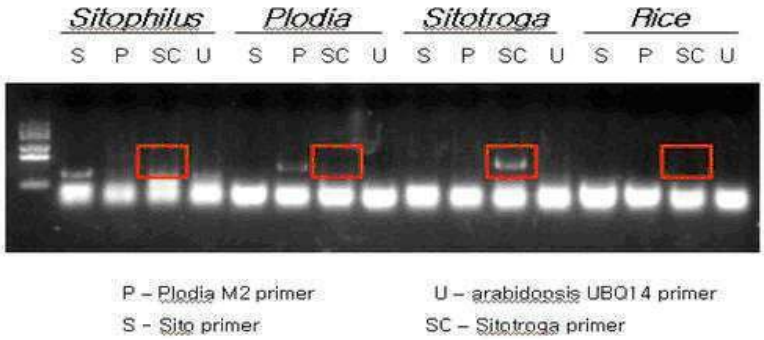
Query128 ATTACGATATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATATGTTGGTGTTGGTGTTGGTG 187
Sbjct 245 ATTACGATATAGCAATTGAAGATATGCCTATCACTCCATATGTTGGTGTTGGTGTTGGTG 304

Query188 CAGCGTATATTAGCACTCCTTTGAAAGACGCTGTGAATGATCAAAAAAGTAAATTTGGTT 247
Sbjct 305 CAGCGTATATTAGCACTCCTTTGAAAGACGCTGCGAATGATCAAAAAAGTAAATTTGGTT 364

Query248 TTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACTCCAGAAGTCAAACTTTATG 307
Sbjct 365 TTGCTGGTCAAGTAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACTCCAGAAGTCAAACTTTATG 424

Query308 CTGGAGCTCGTTATTTCGGTTCTTATGGTGCTAATTTCGATAAAAGCGGTGGTGAGAAAG 367
Sbjct 425 CTGGAGCTCGTTATTTCGGTTCTTATGGTGCTAATTTCGATAAAAGCGGTGGTGAGAAAG 484

도면15



서열목록

<110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation
<120> Molecular marker-assisted detection of rice weevil in stored rice

<130> PA9609-684/KR

<160> 25

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 645
<212> DNA
<213> Sitophilus oryzae

<400> 1
gcatcgatga agaacgcagc taattgcgcg tcaacttgtg aactgcagga cacatgaaca 60

tcgacatttc gaacgcacat tgcggtcctc ggattctgtt cccggaccac tcctggctga 120

gggtcgtatc taacttaaag actgctcggt ttttcttttt ttatattata aaagagaaaa 180

acgtcggagc gtgttgggtg tttacgcgtc gtccataaga cgcgacacct taaaacgcga 240

aagcgtccgc actcagtcgt cgacatatcg acgacggagc gcggtaaaat gcgaaacaac 300

gattcgagag cggtgtttga cttgacgttt attttcgatg catatacgcg ctagtacttg 360

atacctgcac gtcgtcgtcg aacgtcgtct cgtcgcgtcc gatcgtcgtg tccgatatat 420

tttcgcgatt acgtctctat atatatatat atagatggat gaaatcgttt aaacggaaat 480

cgacgtctga tcggtaaggc tacgagacta agacgataaa acgtcgtcac tggcccgtct 540

cacaatcgaa tcgttcggga cgccaaaatt aaccacacat taatttttcg acctcagagc 600

aggtgagact acccgctgaa tttaagcata tcaataagcg gagga 645

<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 2
cttgacgttt attttcgatg c 21

<210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 3
tggttaattt tggcgtccc 19

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 4
gcatcgatga agaacgcagc 20

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 5
tcagacgtcg atttccgt 18

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 6
tcggagcgtg ttgggtgttt 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 7
tcctccgctt attgatatgc 20

<210> 8
<211> 21

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 8
cttgacgttt attttcgatg c 21

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 9
tcctccgctt attgatatgc 20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 10
gcatcgatga agaacgcagc 20

<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 11
tggttaattt tggcgtccc 19

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 12
tcggagcgtg ttgggtgttt 20

<210> 13
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 13
tcagacgtcg atttccgt 18

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 14
cagatgagac aataacgaaa c 21

<210> 15
<211> 18
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 15
gaacaccgct caaattac 18

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 16
cgagtcgcat tcacgtatgt 20

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 17
gtcactaact tcaacggtgt 20

<210> 18
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 18

gcacgcacaa cgctatgta 19

<210> 19
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 19
tggtcttttc catccgtt 18

<210> 20
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 20
gctcttatta ccgctgcgt 19

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 21
gaggacaaac ttactttggc 20

<210> 22
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 22
ccggtctcaa ttttcgtt 18

<210> 23
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 23
ccaacatcgt gctgatca 18

<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 24
tagctggtgg tggtgcgttt 20

<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 25
tctcaccacc gcttttatcg 20