



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0025324
(43) 공개일자 2017년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) C40B 40/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6837 (2013.01)
C40B 40/08 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0121637
(22) 출원일자 2015년08월28일
심사청구일자 2015년08월28일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
송준임
서울특별시 종로구 자하문로 30길 14(청운동 106)
우선속
부산광역시 강서구 명지오션시티10로 16, 207-302
(74) 대리인
이원희

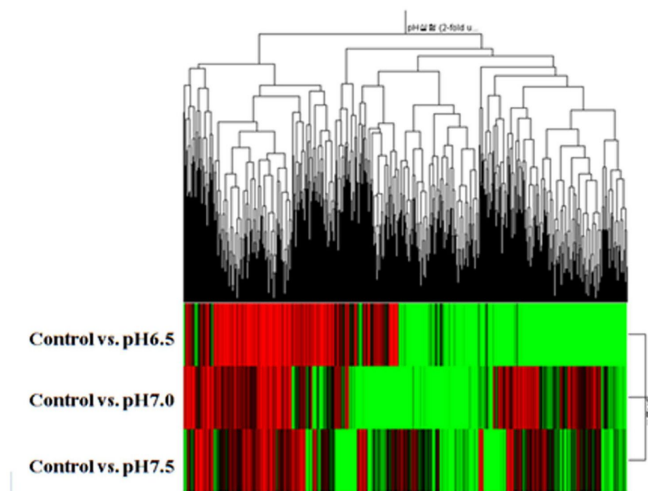
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 해양 산성화에 대응하는 큰수지맨드라미 유래 유전자 및 이를 이용한 해양 생태계 진단 방법

(57) 요약

본 발명은 해수의 산성도 변화에 대응하는 큰수지맨드라미(*Dendronephthya gigantea*) 유래 유전자 및 이를 이용한 해양 생태계 진단 방법에 관한 것으로, 구체적으로 큰수지맨드라미로부터 유래한 특정 유전자군은 해양 산성화 변화에 대응하여 특이적인 발현 변화를 나타내므로, 이들을 생체지표로 이용함으로써 해수의 산성도 변화에 의한 산성화된 해수에 대한 노출 여부를 확인할 수 있는 마이크로어레이 및 키트로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12Q 2561/113 (2013.01)

C12Q 2563/107 (2013.01)

C12Q 2600/142 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20083015

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 해양수산생명공학기술개발사업

연구과제명 해양산호자원 기탁등록보존기관

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2015.05.01 ~ 2016.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

하기의 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자의 핵산 서열의 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 상보가닥 분자가 집적된 산성화된 해수에 대한 노출 여부 확인용 마이크로어레이(microarray):

서열번호 1로 기재되는 유전자(Acetyl-CoA hydrolase), 서열번호 2로 기재되는 유전자(L-Asparaginase), 서열번호 3으로 기재되는 유전자(Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor), 서열번호 4로 기재되는 유전자(Calpain small subunit 1), 서열번호 5로 기재되는 유전자(DNA-directed RNA polymerase III subunit), 서열번호 6으로 기재되는 유전자(Dynactin subunit 1), 서열번호 7로 기재되는 유전자(FAD-dependent oxidoreductase), 서열번호 8로 기재되는 유전자(Ficolin), 서열번호 9로 기재되는 유전자(Myosin light polypeptide 6), 서열번호 10으로 기재되는 유전자(Phosphoenolpyruvate carboxykinase), 서열번호 11로 기재되는 유전자(Phosphoserine aminotransferase), 서열번호 12로 기재되는 유전자(polyketide synthase), 서열번호 13으로 기재되는 유전자(Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A), 서열번호 14로 기재되는 유전자(Pyrroline-5-carboxylate reductase), 서열번호 15로 기재되는 유전자(Transferrin receptor protein 2), 서열번호 16으로 기재되는 유전자(Alcohol dehydrogenase 1), 서열번호 17로 기재되는 유전자(Aquaporin TIP2-3), 서열번호 18로 기재되는 유전자(Deoxyribose-phosphate aldolase), 서열번호 19로 기재되는 유전자(Guanidinoacetate N-methyltransferase) 또는 서열번호 20으로 기재되는 유전자(Protein tyrosine phosphatase type IV A3).

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 유전자는 큰수지맨드라미(*Dendronephthya gigantea*)로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 산성화된 해수에 대한 노출 여부 확인용 마이크로어레이.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 산성화된 해수는 pH 6 내지 7.7인 것을 특징으로 하는 산성화된 해수에 대한 노출 여부 확인용 마이크로어레이.

청구항 4

- 1) 산성화된 해수에 노출된 실험군인 큰수지맨드라미와 대조군인 큰수지맨드라미에서 각각 RNA를 분리하는 단계;
- 2) 단계 1)의 실험군 및 대조군의 RNA에서 cDNA를 합성하면서 실험군과 대조군을 각기 다른 형광물질로 표지하는 단계;
- 3) 단계 2)의 각각 다른 형광물질로 표지된 cDNA를 제 1항의 마이크로어레이와 혼성화시키는 단계;
- 4) 반응한 마이크로어레이를 분석하는 단계; 및
- 5) 분석한 데이터에서 제 1항의 마이크로어레이에 집적된 유전자 발현정도를 대조군과 비교하여 확인하는 단계를 포함하는 산성화된 해수에 대한 노출 여부 확인 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 단계 2)의 형광물질은 Cy3, Cy5, FITC(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate),

RITC(rhodamine-B-isothiocyanate) 및 로다민(rhodamine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 산성화된 해수에 대한 노출 여부 확인 방법.

청구항 6

1) 산성화된 해수에 노출된 실험군인 큰수지맨드라미와 대조군인 큰수지맨드라미에서 각각 RNA를 분리하는 단계;

2) 단계 1)의 RNA를 주형으로 하고, 하기 각각의 유전자에 상보적이며 유전자 증폭이 가능한 프라이머 쌍을 사용하여 실시간 RT-PCR(Real-time reverse transcript polymerase chain reaction)을 수행하는 단계:

서열번호 1로 기재되는 유전자(Acetyl-CoA hydrolase), 서열번호 2로 기재되는 유전자(L-Asparaginase), 서열번호 3으로 기재되는 유전자(Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor), 서열번호 4로 기재되는 유전자(Calpain small subunit 1), 서열번호 5로 기재되는 유전자(DNA-directed RNA polymerase III subunit), 서열번호 6으로 기재되는 유전자(Dynactin subunit 1), 서열번호 7로 기재되는 유전자(FAD-dependent oxidoreductase), 서열번호 8로 기재되는 유전자(Ficolin), 서열번호 9로 기재되는 유전자(Myosin light polypeptide 6), 서열번호 10으로 기재되는 유전자(Phosphoenolpyruvate carboxykinase), 서열번호 11로 기재되는 유전자(Phosphoserine aminotransferase), 서열번호 12로 기재되는 유전자(polyketide synthase), 서열번호 13으로 기재되는 유전자(Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A), 서열번호 14로 기재되는 유전자(Pyrroline-5-carboxylate reductase), 서열번호 15로 기재되는 유전자(Transferrin receptor protein 2), 서열번호 16으로 기재되는 유전자(Alcohol dehydrogenase 1), 서열번호 17로 기재되는 유전자(Aquaporin TIP2-3), 서열번호 18로 기재되는 유전자(Deoxyribose-phosphate aldolase), 서열번호 19로 기재되는 유전자(Guanidinoacetate N-methyltransferase) 또는 서열번호 20으로 기재되는 유전자(Protein tyrosine phosphatase type IV A3); 및

3) 단계 2)의 유전자 산물을 대조군과 비교하여 발현 정도를 확인하는 단계를 포함하는 산성화된 해수에 대한 노출 여부 확인 방법.

청구항 7

제 1항의 마이크로어레이를 포함하는 것을 특징으로 하는 산성화된 해수에 대한 노출 여부 확인용 키트(kit).

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 산성화된 해수는 pH 6 내지 7.7인 것을 특징으로 하는 산성화된 해수에 대한 노출 여부 확인용 키트.

청구항 9

제 7항에 있어서, 스트렙타비딘-알칼리 탈인화효소 접합물질(streptavidin-like phosphatase conjugate), 화학형광물질(chemifluorescent) 및 화학발광물질(chemiluminescent)로 이루어진 형광물질 군으로부터 선택되는 어느 하나를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 산성화된 해수에 대한 노출 여부 확인용 키트.

청구항 10

제 7항에 있어서, 혼성화에 사용되는 완충용액, RNA로부터 cDNA를 합성하기 위한 역전사효소, dNTP 및 rNTP(사전 혼합형 또는 분리 공급형), 표식시약, 및 세척 완충용액으로 이루어진 반응시약 군으로부터 선택되는 어느 하나를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 산성화된 해수에 대한 노출 여부 확인용 키트.

청구항 11

하기 각각의 유전자에 상보적이고, 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 쌍을 포함하는 산성화된 해수에 대한 노출 여부 확인용 키트:

서열번호 1로 기재되는 유전자(Acetyl-CoA hydrolase), 서열번호 2로 기재되는 유전자(L-Asparaginase), 서열번호 3으로 기재되는 유전자(Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor), 서열번호 4로 기재되는 유전자(Calpain small subunit 1), 서열번호 5로 기재되는 유전자(DNA-directed RNA polymerase III subunit), 서열번호 6으로 기재되는 유전자(Dynactin subunit 1), 서열번호 7로 기재되는 유전자(FAD-dependent oxidoreductase), 서열번호 8로 기재되는 유전자(Ficolin), 서열번호 9로 기재되는 유전자(Myosin light polypeptide 6), 서열번호 10으로 기재되는 유전자(Phosphoenolpyruvate carboxykinase), 서열번호 11로 기재되는 유전자(Phosphoserine aminotransferase), 서열번호 12로 기재되는 유전자(polyketide synthase), 서열번호 13으로 기재되는 유전자(Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A), 서열번호 14로 기재되는 유전자(Pyrroline-5-carboxylate reductase), 서열번호 15로 기재되는 유전자(Transferrin receptor protein 2), 서열번호 16으로 기재되는 유전자(Alcohol dehydrogenase 1), 서열번호 17로 기재되는 유전자(Aquaporin TIP2-3), 서열번호 18로 기재되는 유전자(Deoxyribose-phosphate aldolase), 서열번호 19로 기재되는 유전자(Guanidinoacetate N-methyltransferase) 또는 서열번호 20으로 기재되는 유전자(Protein tyrosine phosphatase type IV A3).

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 산성화된 해수는 pH 6 내지 7.7인 것을 특징으로 하는 산성화된 해수에 대한 노출 여부 확인용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 해양 산성화에 대응하는 큰수지맨드라미(*Dendronephthya gigantea*) 유전자 및 이를 이용한 해양 생태계의 산성화를 진단하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 산업혁명 이후 인간 활동에 의해 대기 중 이산화탄소 농도가 100 ppm 이상 증가하였으며, 해양은 이렇게 대기로 추가 방출된 이산화탄소의 약 1/4 가량을 흡수하는 매우 중요한 이산화탄소의 흡수원 역할을 수행하고 있다. 해양으로 흡수된 이산화탄소는 해수 내에서 탄산(H_2CO_3)을 형성하게 되며, 추가적으로 흡수된 이산화탄소는 해수의 산성도를 증가시키고 있다.

[0003] 해양 산성화로 인해 해수의 산성도(수소이온농도)가 증가하면 탄산이온(CO_3^{2-})의 농도가 감소하기 때문에 탄산계 골격으로 이루어진 해양생물에 큰 영향을 미치게 된다. 미래에 해양 산성화로 인해 표층해수의 탄산이온 농도가 지속적으로 감소하여 탄산염 불포화 상태에 이르게 되면, 탄산염 골격을 이용하는 생물종들은 더 이상의 생명활동을 지속하지 못하고 멸종할 가능성이 있다

[0004] 전 해양에서 해양생물들의 산성화 영향은 다양하게 감지되고 있으며, 이러한 추세로 가면 몇 세기 내에 열대 해양에서는 산성화로 인해 산호류가 사라질 것이며, 대부분의 극지해역에서는 석회화 생물의 골격 형성이 어려워질 것으로 예측된다.

- [0005] 작년 한 해 동안 인류가 배출한 이산화탄소 양은 316억 톤으로 2010년과 비교하여 약 10억 톤 증가하였으며, 이산화탄소 양이 생태계 임계점을 넘어서면 생태계는 다시 돌아올 수 없는 심각한 변화를 가져온다. 최근에 우리나라 동해에서도 산업혁명 이후에 급속한 산성화가 진행되고 있다고 보고되었다. 이는 한국 근해에서도 해양 산성화가 심각하게 진행되고 있으며, 이는 앞으로 탄산칼슘을 골격으로 하는 생물상의 서식지가 줄어들 수 있음을 암시한다. 따라서 지역적인 규모에서 생태계 변화를 사전에 감지할 수 있는 생물학적 예보 시스템을 개발하는 것이 시급하다.
- [0006] 산호류는 다양한 해양생물들의 서식처로 이용되는 등 요람과 같은 역할을 하고 있으나, 기후 변화로 인한 해수온 상승 및 산성화에 따라 종 다양성 및 개체군이 급격히 감소하고 있으며, 인간 간섭으로 인한 서식지 파괴가 급격히 진행 중에 있어 산호류를 보전하기 위한 생태적인 모니터링과 더불어 분자생물학적 수준에서의 연구 접근이 필요하다.
- [0007] 큰수지맨드라미(학명: *Dendronephthya gigantea*)는 분류학적으로 자포동물문, 산호충강, 해계두목, 곤봉바다맨드라미과에 속하고, 제주 연안해역에 널리 분포하고 있는 연산호류의 일종이다. 수심 5 m 전후의 암반 조하대에서 주로 발견되고, 해류의 흐름이 다소 강한 곳을 선호하여 서식한다. 군체의 색상에는 변이가 많아서 자주색, 붉은색 및 분홍색 등 다양한 색상의 군체들이 발견되며, 성장하면 최대 높이 30cm 이상이 되기도 하여 연안의 해양생물 다양성 유지에 큰 역할을 하고 있다. 본 산호종은 환경부 고시목록(고시종)에 의해 법정관리동물로 지정되어 있으며, 국외반출승인대상 생물자원이다.
- [0008] 국내의 산호 연구는 1970년대 분류학적 연구를 시작으로 계통·진화/공생·생활사/증식·보전 등의 연구가 진행되어 왔으나, 해양 산성화나 기후 변화와 관련된 연구는 아직 시작단계이다.
- [0009] 유전자 발현변화를 이용한 생태계 건강성 평가방법은 환경 내 다양한 변화요인에 대하여 분자생물학적 기술의 접목으로 매우 빠른 속도로 발전하고 있는 유전체적인 기술을 대입시켜 외부 환경 스트레스에 대한 생물 내 반응을 분자수준에서 진단하여 위해도 또는 건강도 등을 평가하는 방법이다.
- [0010] 생물을 이용하여 유해성의 여부를 가늠하는 기존의 방법들(돌연변이 여부, 행동이상, 사망률 및 효소활성도 등)은 스트레스 물질에 이미 노출된 생물에 나타난 결과를 측정하는 방법들으로써, 노출된 자극의 정도가 상당히 높은 수준이어야 측정이 가능하다는 약점을 가지고 있다. 한편 유전자 발현변화를 이용한 평가방법은 외부 자극을 받고 난 후 유전자 정보가 단백질로 넘어가는 전사 수준에서 나타나는 변화를 이용하여 생물이 받고 있는 스트레스 수준을 평가하는 방법으로써, 매우 작은 외부의 자극까지도 감지해 낼 수 있다는 장점을 가지고 있어 적은 양의 환경 변화 또는 외부 자극에 장기간 노출되었을 때의 생물반응의 결과까지도 예측해 볼 수 있다. 이러한 유전자발현변화를 이용한 평가방법에 사용되는 유전자 바이오마커는 그 특이성을 통해 외부자극의 존재 여부 및 연관성을 말해 줄 수 있고, 생태계의 다양한 환경 변화에 대한 장기적 영향 및 그 환경 내 생물의 건강성까지 평가가 가능하도록 해주는 장점이 있으나, 현재까지 큰수지맨드라미를 이용한 해양 산성화 정도를 파악하는 방법에 대해서는 알려진 바 없다.
- [0011] 이에, 본 발명자들은 해양 산성화를 감지할 수 있는 생체지표를 발굴하던 중, 해양 생물다양성 유지에 큰 역할을 하고 있는 큰수지맨드라미에서 해양 산성화에 의한 특정 유전자의 발현량 변화를 규명하였고, 상기 규명한 유전자를 이용하여 큰수지맨드라미의 건강진단 및 해양 산성화 정도를 파악할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.
- [0012]
- 발명의 내용**
- 해결하려는 과제**
- [0013] 본 발명의 목적은 해양산성화에 대응하는 큰수지맨드라미(*Dendronephthya gigantea*) 유래의 유전자 및 이를 이

용한 해양 생태계 산성화 여부 확인 방법 또는 해양 생태계의 환경 변화 진단 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기의 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자의 핵산 서열의 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 상보가닥 분자가 집적된 산성화된 해수에 대한 노출 여부 확인용 마이크로어레이(microarray)를 제공한다:
- [0015] 서열번호 1로 기재되는 유전자(Acetyl-CoA hydrolase), 서열번호 2로 기재되는 유전자(L-Asparaginase), 서열번호 3으로 기재되는 유전자(Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor), 서열번호 4로 기재되는 유전자(Calpain small subunit 1), 서열번호 5로 기재되는 유전자(DNA-directed RNA polymerase III subunit), 서열번호 6으로 기재되는 유전자(Dynactin subunit 1), 서열번호 7로 기재되는 유전자(FAD-dependent oxidoreductase), 서열번호 8로 기재되는 유전자(Ficolin), 서열번호 9로 기재되는 유전자(Myosin light polypeptide 6), 서열번호 10으로 기재되는 유전자(Phosphoenolpyruvate carboxykinase), 서열번호 11로 기재되는 유전자(Phosphoserine aminotransferase), 서열번호 12로 기재되는 유전자(polyketide synthase), 서열번호 13으로 기재되는 유전자(Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A), 서열번호 14로 기재되는 유전자(Pyrroline-5-carboxylate reductase), 서열번호 15로 기재되는 유전자(Transferrin receptor protein 2), 서열번호 16으로 기재되는 유전자(Alcohol dehydrogenase 1), 서열번호 17로 기재되는 유전자(Aquaporin TIP2-3), 서열번호 18로 기재되는 유전자(Deoxyribose-phosphate aldolase), 서열번호 19로 기재되는 유전자(Guanidinoacetate N-methyltransferase) 또는 서열번호 20으로 기재되는 유전자(Protein tyrosine phosphatase type IV A3).
- [0016] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 산성화된 해수에 대한 노출 여부 확인 방법을 제공한다:
- [0017] 1) 산성화된 해수에 노출된 실험군인 큰수지맨드라미(*Dendronephthya gigantea*)와 대조군인 큰수지맨드라미에서 각각 RNA를 분리하는 단계;
- [0018] 2) 단계 1)의 실험군 및 대조군의 RNA로부터 cDNA를 합성하면서 실험군과 대조군을 각기 다른 형광물질로 표지하는 단계;
- [0019] 3) 단계 2)의 각각 다른 형광물질로 표지된 cDNA를 본 발명의 마이크로어레이와 혼성화시키는 단계;
- [0020] 4) 반응한 마이크로어레이를 분석하는 단계; 및
- [0021] 5) 분석한 데이터에서 본 발명의 마이크로어레이에 집적된 유전자 발현정도를 대조군과 비교하여 확인하는 단계.
- [0022] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 상기 마이크로어레이를 포함하는 산성화된 해수에 대한 노출 여부 확인용 키트를 제공한다.
- [0023] 아울러, 본 발명은 본 발명에 따른 상기 유전자들에 대해서 각 유전자에 상보적이고 유전자 증폭이 가능한 프라이머 쌍을 포함하는 산성화된 해수에 대한 노출 여부 확인용 키트를 제공한다.

발명의 효과

- [0024] 본 발명은 해수의 산성도 변화에 대응하는 큰수지맨드라미(*Dendronephthya gigantea*) 유래 유전자 및 이를 이용한 해양 생태계 진단 방법에 관한 것으로, 구체적으로 큰수지맨드라미로부터 유래한 특정 유전자군은 해양 산성화 변화에 대응하여 특이적인 발현 변화를 나타내므로, 이들을 생체지표로 이용함으로써 해수의 산성도 변화에 의한 산성화된 해수에 대한 노출 여부를 확인할 수 있는 마이크로어레이 및 키트로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 대조군(pH 8.0) 및 실험군(pH 6.5, 7.0 및 7.5)으로 마이크로어레이 실험 결과, 2배 이상 차등 발현한 유전자들 중 공통 유전자를 그룹화한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0027] 본 발명자들은 산성화된 해수에 대응하여 발현이 변화하는 큰수지맨드라미(*Dendronephthya gigantea*) 유래의 유전자를 발굴하였다. 따라서, 해수의 산성도 변화에 대응하여 발현량이 변화하는 상기 큰수지맨드라미 유래 유전자를 집적한 마이크로어레이를 산성화된 해수 노출 여부 검출 및 해양 생태계의 건강 상태를 진단하는 용도로 이용할 수 있다.
- [0028] 본 발명은 하기의 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자의 핵산 서열의 올리고뉴클레오티드 또는 그의 상보가닥 분자가 집적된 산성화된 해수에 대한 노출 여부 확인용 마이크로어레이(microarray)를 제공한다:
- [0029] 서열번호 1로 기재되는 유전자(Acetyl-CoA hydrolase), 서열번호 2로 기재되는 유전자(L-Asparaginase), 서열번호 3으로 기재되는 유전자(Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor), 서열번호 4로 기재되는 유전자(Calpain small subunit 1), 서열번호 5로 기재되는 유전자(DNA-directed RNA polymerase III subunit), 서열번호 6으로 기재되는 유전자(Dynactin subunit 1), 서열번호 7로 기재되는 유전자(FAD-dependent oxidoreductase), 서열번호 8로 기재되는 유전자(Ficolin), 서열번호 9로 기재되는 유전자(Myosin light polypeptide 6), 서열번호 10으로 기재되는 유전자(Phosphoenolpyruvate carboxykinase), 서열번호 11로 기재되는 유전자(Phosphoserine aminotransferase), 서열번호 12로 기재되는 유전자(polyketide synthase), 서열번호 13으로 기재되는 유전자(Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A), 서열번호 14로 기재되는 유전자(Pyrroline-5-carboxylate reductase), 서열번호 15로 기재되는 유전자(Transferrin receptor protein 2), 서열번호 16으로 기재되는 유전자(Alcohol dehydrogenase 1), 서열번호 17로 기재되는 유전자(Aquaporin TIP2-3), 서열번호 18로 기재되는 유전자(Deoxyribose-phosphate aldolase), 서열번호 19로 기재되는 유전자(Guanidinoacetate N-methyltransferase) 또는 서열번호 20으로 기재되는 유전자(Protein tyrosine phosphatase type IV A3).
- [0030] 상기 유전자는 연산호 유래인 것이 바람직하고, 큰수지맨드라미에서 유래되는 것이 보다 바람직하다.
- [0031] 상기 산성화된 해수는 pH 6 내지 7.7인 것이 바람직하고, pH 6.5 내지 7.5인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0032] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 산성화된 해수에 대한 노출 여부 확인 방법을 제공한다:
- [0033] 1) 산성화된 해수에 노출된 실험군인 큰수지맨드라미와 대조군인 큰수지맨드라미에서 각각 RNA를 분리하는 단계;
- [0034] 2) 단계 1)의 실험군 및 대조군의 RNA로부터 cDNA를 합성하면서 실험군과 대조군을 각기 다른 형광물질로 표지하는 단계;
- [0035] 3) 단계 2)의 각각 다른 형광물질로 표지된 cDNA를 본 발명의 마이크로어레이와 혼성화시키는 단계;
- [0036] 4) 반응한 마이크로어레이를 분석하는 단계; 및
- [0037] 5) 분석한 데이터에서 본 발명의 마이크로어레이에 집적된 유전자 발현정도를 대조군과 비교하여 확인하는 단계.
- [0038] 상기 단계 2)의 형광물질은 Cy3, Cy5, 폴리 L-라이신-플루오레세인 이소티오시아네이트(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate, FITC), 로다민-B-이소티오시아네이트(rhodamine-B-isothiocyanate, RITC) 및 로다민(rhodamine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0039] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 산성화된 해수에 대한 노출 여부 확인 방법을 제공한다:
- [0040] 1) 산성화된 해수에 노출된 실험군인 큰수지맨드라미와 대조군인 큰수지맨드라미에서 각각 RNA를 분리하는

단계;

- [0041] 2) 단계 1)의 RNA를 주형으로 하고, 하기 각각의 유전자에 상보적이며 유전자 증폭이 가능한 프라이머 쌍을 사용하여 실시간 RT-PCR(Real-time reverse transcript polymerase chain reaction)을 수행하는 단계;
- [0042] 서열번호 1로 기재되는 유전자(Acetyl-CoA hydrolase), 서열번호 2로 기재되는 유전자(L-Asparaginase), 서열번호 3으로 기재되는 유전자(Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor), 서열번호 4로 기재되는 유전자(Calpain small subunit 1), 서열번호 5로 기재되는 유전자(DNA-directed RNA polymerase III subunit), 서열번호 6으로 기재되는 유전자(Dynactin subunit 1), 서열번호 7로 기재되는 유전자(FAD-dependent oxidoreductase), 서열번호 8로 기재되는 유전자(Ficolin), 서열번호 9로 기재되는 유전자(Myosin light polypeptide 6), 서열번호 10으로 기재되는 유전자(Phosphoenolpyruvate carboxykinase), 서열번호 11로 기재되는 유전자(Phosphoserine aminotransferase), 서열번호 12로 기재되는 유전자(polyketide synthase), 서열번호 13으로 기재되는 유전자(Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A), 서열번호 14로 기재되는 유전자(Pyrroline-5-carboxylate reductase), 서열번호 15로 기재되는 유전자(Transferrin receptor protein 2), 서열번호 16으로 기재되는 유전자(Alcohol dehydrogenase 1), 서열번호 17로 기재되는 유전자(Aquaporin TIP2-3), 서열번호 18로 기재되는 유전자(Deoxyribose-phosphate aldolase), 서열번호 19로 기재되는 유전자(Guanidinoacetate N-methyltransferase) 또는 서열번호 20으로 기재되는 유전자(Protein tyrosine phosphatase type IV A3); 및
- [0043] 3) 단계 2)의 유전자 산물을 대조군과 비교하여 발현 정도를 확인하는 단계.
- [0044] 상기 서열번호 1 내지 서열번호 15로 기재되는 유전자는 대조군과 비교하여, 발현이 증가하고, 서열번호 16 내지 서열번호 20으로 기재되는 유전자는 대조군과 비교하여 발현이 감소한다.
- [0045] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 상기 마이크로어레이를 포함하는 산성화된 해수에 대한 노출 여부 확인용 키트를 제공한다.
- [0046] 상기 산성화된 해수는 pH 6 내지 7.7인 것이 바람직하고, pH 6.5 내지 7.5인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0047] 또한, 상기 키트는 스트렙타비딘-알칼리 탈인화효소 접합물질(streptavidin-like phosphatase conjugate), 화학형광물질(chemifluorescent) 및 화학발광물질(chemiluminescent)로 이루어진 형광물질 군으로부터 선택되는 어느 하나를 추가적으로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0048] 또한, 상기 키트는 혼성화에 사용되는 완충용액, RNA로부터 cDNA를 합성하기 위한 역전사효소, dNTP 및 rNTP(사전 혼합형 또는 분리 공급형), 표식시약, 및 세척 완충용액으로 이루어진 반응시약 군으로부터 선택되는 어느 하나를 추가적으로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0049] 아울러, 본 발명은 하기 각각의 유전자에 상보적이고, 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 쌍을 포함하는 산성화된 해수에 대한 노출 여부 확인용 키트를 제공한다:
- [0050] 서열번호 1로 기재되는 유전자(Acetyl-CoA hydrolase), 서열번호 2로 기재되는 유전자(L-Asparaginase), 서열번호 3으로 기재되는 유전자(Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor), 서열번호 4로 기재되는 유전자(Calpain small subunit 1), 서열번호 5로 기재되는 유전자(DNA-directed RNA polymerase III subunit), 서열번호 6으로 기재되는 유전자(Dynactin subunit 1), 서열번호 7로 기재되는 유전자(FAD-dependent oxidoreductase), 서열번호 8로 기재되는 유전자(Ficolin), 서열번호 9로 기재되는 유전자(Myosin light polypeptide 6), 서열번호 10으로 기재되는 유전자(Phosphoenolpyruvate carboxykinase), 서열번호 11로 기재되는 유전자(Phosphoserine aminotransferase), 서열번호 12로 기재되는 유전자(polyketide synthase), 서열번호 13으로 기재되는 유전자(Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A), 서열번호 14로 기재되는 유전자(Pyrroline-5-carboxylate reductase), 서열번호 15로 기재되는 유전자(Transferrin receptor protein 2), 서열번호 16으로 기재되는 유전자(Alcohol dehydrogenase 1), 서열번호 17로 기재되는 유전자(Aquaporin TIP2-3), 서열번호 18로 기재되는 유전자(Deoxyribose-phosphate aldolase), 서열번호 19로 기재되는 유전자(Guanidinoacetate N-methyltransferase) 또는 서열번호 20으로 기재되는 유전자(Protein tyrosine

phosphatase type IV A3).

- [0051] 상기 프라이머는 서열번호 21 내지 서열번호 60으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것이 바람직하다.
- [0052] 상기 산성화된 해수는 pH 6 내지 7.7인 것이 바람직하고, pH 6.5 내지 7.5인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0053] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 해수의 산성도 변화에 대응하는 큰수지맨드라미 유래의 유전자를 발굴하기 위하여, 큰수지맨드라미를 여러 pH의 해수에서 배양한 후, 상기 배양한 큰수지맨드라미 유래 cDNA를 합성하여 발현량이 변화하는 유전자들을 조사하였다. 구체적으로, pH 6.5, pH 7.0 및 pH 7.5에서 배양한 큰수지맨드라미의 조직에서 mRNA를 각각 분리한 후, 이를 주형으로 하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 Cy3-CTP 및 Cy5-CTP로 형광 표지한 뒤 이를 이용하여 마이크로어레이를 제작하였다. 상기 제작한 마이크로어레이를 액손 진픽스 4000B 스캐너(Axon GenePix 4000B scanner, Axon Instrument, 미국)를 이용하여 스캔한 뒤 이를 분석하였다. 그 결과, 대조군을 기준으로 실험군에서 발현량이 증가하는 유전자 15종(표 1 참조), 감소하는 유전자 5종(표 2 참조)을 확인하였다. 또한, 실험군에서 2배 이상 차등 발현한 상기 유전자들 중 공통 유전자들을 그룹화하였다(도 1 참조). 기후 변화는 해수의 산성도 변화를 유발하고, 이러한 환경의 변화에 따라 해양 생물은 생리 및 대사의 변화를 일으킨다. 그러므로 해양 생물인 큰수지맨드라미 유래 유전자 발현량의 변화를 확인함으로써 외부 환경 변화에 따른 스트레스 및 건강 상태를 확인할 수 있는 생체지표로 이용 가능하다.
- [0054] 따라서, 상기 유전자들은 해수의 산성도 변화에 따른 산성화된 해수에 대한 노출 여부의 확인을 위한 마이크로어레이 및 키트로 유용하게 사용할 수 있다.
- [0055] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- [0056] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해서 한정되는 것은 아니다.
- [0057] <실시예 1> 큰수지맨드라미(*Dendronephthya gigantea*)의 배양 및 산성화된 해수에 노출
- [0058] <1-1> 큰수지맨드라미의 배양
- [0059] 본 발명자들은 제주 연안 해역에서 큰수지맨드라미 시료를 채취하여 연구소에서 배양하였다.
- [0060] 구체적으로, 제주 연안에서 채취한 큰수지맨드라미를 100, 10 및 1 μ m 세 종류의 필터를 거친 자연해수에 배양하였다. 이때, 수온은 수중 히터를 사용하여 24℃로 고정하여 1주 이상 순치시켰고, 광주기는 14:10으로 조절하였다.
- [0061] <1-2> 산성화된 해수에 노출
- [0062] 상기 실시예 <1-1>의 방법으로 배양된 큰수지맨드라미를 산성화된 해수에 노출시켰다.
- [0063] 구체적으로, 큰수지맨드라미를 세 군으로 나누어 pH 7.5, pH 7.0 및 pH 6.5의 해수에서 48시간 동안 배양하였고, 대조군은 자연해수(pH 8.0)에서 48시간 동안 배양하였다. 또한, 곤봉바다맨드라미과의 분홍바다맨드라미 유전자후보군을 산성화해수 노출 실험 후 마이크로어레이 실험을 통해 선별하였고, 이와 큰수지맨드라미 유전자 염기서열을 비교하여 산성화노출대응 유전자 후보군을 선별하였다.
- [0064] <실시예 2> 산성화에 의한 큰수지맨드라미의 유전자 변화 측정
- [0065] <2-1> 큰수지맨드라미에서 RNA 분리
- [0066] 상기 실시예 <1-2>의 방법으로 산성화된 해수에 노출된 큰수지맨드라미의 유전자 변화를 측정하기 위하여, 본 발명자들에 의해 개발된 방법에 따라 RNA를 분리하였다.

[0067] 구체적으로, 상기 실험군 및 대조군의 큰수지맨드라미 조직을 막자사발에서 액체질소를 이용하여 분말로 만들고, 용해(lysis) 용액[35 mM EDTA, 0.7 M LiCl, 7% SDS, 200 mM Tris-Cl(pH 9.0)] 700 μ l를 첨가하여 균질화하였다. 상기 균질화된 시료에 동량의 페놀 용액을 첨가하고 잘 섞은 후, 10분간 원심분리하였고, 상층액을 취해 새 튜브로 옮기고 총 용량의 1/3의 8 M 염화리튬(LiCl)을 첨가하여 이를 잘 섞은 후에 4℃에서 2시간 이상 방치하였다. 상기 방치한 시료를 약 30분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 침전물을 취하여 300 μ l의 DEPC-처리수에 녹이고, 1/10 용량의 3 M 아세트산나트륨(pH 5.2)과 동량의 이소프로판올(isopropanol)을 첨가하여 약 30분간 원심분리 후 상층액을 제거하고 침전물을 취하였다. 상기 침전물에 70% 에탄올 용액 50 μ l를 넣어 5분간 원심분리한 뒤, 에탄올 용액을 제거하고 침전된 RNA를 건조시켜, 건조된 RNA를 적당량의 DEPC-처리수에 용해하였다.

[0068] <2-2> cDNA의 합성

[0069] 상기 실시예 <2-1>의 방법으로 분리한 큰수지맨드라미 RNA에서 cDNA를 합성하였다.

[0070] 구체적으로, 산성화된 해수에 대응하는 특이적인 유전자의 분리를 위하여 Tri-reagent(Molecular Research Center Inc., 미국)를 사용하였다. 상기 추출된 전체 mRNA(3.0 μ g)를 주형으로 하고, 역전사 효소를 사용하여 대조군과 실험군의 cDNA를 합성하였다.

[0071] <2-3> cDNA 시퀀싱(sequencing)

[0072] 상기 실시예 <2-2>에서 합성된 cDNA를 next-generation sequencing 테크닉을 이용하여 직접적으로 염기서열 시퀀싱을 수행하였고, 얻어진 염기서열부분은 대조군 genome을 이용하여 발현체의 전체 지도를 얻기 위해 align 하였다.

[0073] 구체적으로, poly(A) RNA를 얻고, oligo(dT) 또는 random hexamer를 이용하여 첫번째 가닥을 합성하였다. 그런 다음, 상기 첫번째 가닥에서 상보적인 두번째 가닥을 얻고 cDNA 합성을 완성하였다. DNA 이중가닥을 부분적으로 절단하여, 3' 말단에 deoxyadenine 염기를 덧붙이고, illumina 어댑터를 이용하여 접합하였고, PCR 방법으로 증폭한 다음 증폭된 산물을 사이즈별로 선별하고, 염기서열분석을 수행하였다.

[0074] <2-4> 혼성화(Hybridization) 및 스캐닝(scanning)

[0075] 본 발명자들은 큰수지맨드라미 cDNA 마이크로어레이를 제조하고 이를 혼성화시켜 스캐닝하였다.

[0076] 구체적으로, 1-2 μ g의 cDNA를 각각 실험군과 대조군에서 준비하고, 0.1 M 중탄산나트륨 완충용액(sodium bicarbonate buffer, pH 8.7)에 녹여, 40 nm의 Cy3 및 Cy5 형광물질과 혼합하여 암소에 90분간 방치하였다. 90분 후에 4 M 하이드록실아민(Hydroxylamine) 15 μ l를 첨가하고 15분간 암소에 방치하였다. 형광물질이 라벨링된 큰수지맨드라미의 cDNA 시료를 PCR 정제 키트(PCR purification kit, Qiagen, 독일)를 사용하여 정제하고, 증류수로 용출하였다. 정제된 형광표지-cDNA 시료를 혼성화 완충액(hybridization buffer)[3x SSC, 0.3% SDS, 50% 포름아미드(formamide), 20 μ g Cot-1 DNA, 20 μ g yeast tRNA]에 첨가한 후, microcon YM-30으로 농축하여 혼성화 혼합물을 만들었다. 상기 혼성화 혼합물을 95℃로 3분 동안 가열하여 변성시키고, 12,000 g에서 30초간 원심분리하여 가열된 혼성화 화합물의 온도를 떨어뜨렸다. 제조된 큰수지맨드라미 cDNA 마이크로어레이(microarray)에 커버슬립(coverlip)을 덮고, 변성시킨 혼성화 혼합물을 파이펫팅(pipetting)하였다. 마이크로어레이를 GT-Hyb 챔버(Chamber)에 넣고 65℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 혼성화가 끝난 후, 챔버에서 마이크로어레이를 꺼내어 세척과정을 수행하고, 마이크로어레이를 회전시켜 건조한 후 스캐닝(scanning)할 때까지 암실에서 보관하였다. 실험이 완료된 큰수지맨드라미 마이크로어레이를 액손 진픽스 4000B 스캐너(Axon GenePix 4000B scanner, Axon Instrument, 미국)를 사용하여 스캔하였다. 진픽스 프로 6.0 프로그램(GenePix Pro 6.0 program)에서, 스캔 이미지로부터 각 점을 그리딩 파일(griding file)을 이용하여 그리딩하고, 정량화하여 각 점의 Cy5/Cy3 강도 및 비율 등의 분석 값이 포함된 GPR 파일(GPR file)을 얻었다.

[0077] <2-4> 마이크로어레이 자료 분석

[0078] 진픽스 프로 6.0 프로그램에서 얻어진 GPR 파일로부터, 분석 프로그램인 진스프링 7.3.1(GeneSpring 7.3.1, Agilent Technologies, 미국)을 이용하여 아래와 같이 분석을 수행하였다. 표준화(normalization)는 LOWESS(locally weighted regression scatterplot smoothing)를 이용하여 수행하였고, 신뢰할 수 있는 유전자(reliable gene)는 중앙값의 합이 배경(background)보다 낮거나 각 화소(pixel) 값의 표준편차가 유의하지 않은 점을 플래그 아웃(flag-out)함으로써 얻었다. 또한, 유의한 유전자(Significant genes)는 평균화된 비율(normalized ratio) 값이 2 배 이상 차이를 보이는 점을 선별하였다.

[0079] 그 결과, 표 1 및 표 2에 나타난 바와 같이, 대조군과 비교하여 산성화 실험군(pH 6.5, 7.0, 7.5)에서 발현량이 2배 이상 유의하게 증가한 유전자 15종(표 1) 및 감소한 유전자 5종(표 2)을 발굴하여 총 20종의 유전자를 서열 번호 1 내지 20으로 기재하였다. 아울러, 도 1에 나타난 바와 같이, 실험군에서 2배 이상 차등 발현한 상기 유전자들 중 공통 유전자를 그룹화하였다(도 1).

표 1

[0080] 산성화된 해수에서 상향 조절된 유전자 목록 및 변화량

번호	유전자	변화량(배)
1	Acetyl-CoA hydrolase	6.82
2	L-Asparaginase	5.91
3	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor	15.34
4	Calpain small subunit 1	20.26
5	DNA-directed RNA polymerase III subunit	18.50
6	Dynactin subunit 1	28.53
7	FAD-dependent oxidoreductase	6.96
8	Ficolin	6.21
9	Myosin light polypeptide 6	5.40
10	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	6.97
11	Phosphoserine aminotransferase	6.22
12	polyketide synthase	11.56
13	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A	4.59
14	Pyrroline-5-carboxylate reductase	6.57
15	transferrin receptor protein 2	7.29

표 2

[0081] 산성화된 해수에서 하향 조절된 유전자 목록 및 변화량

번호	유전자	변화량(배)
1	Alcohol dehydrogenase I	-2.44
2	Aquaporin TIP2-3	-2.26
3	Deoxyribose-phosphate aldolase	-2.30
4	Guanidinoacetate N-methyltransferase mRNA	-9.30
5	Protein tyrosine phosphatase type IV A3	-11.84

표 3

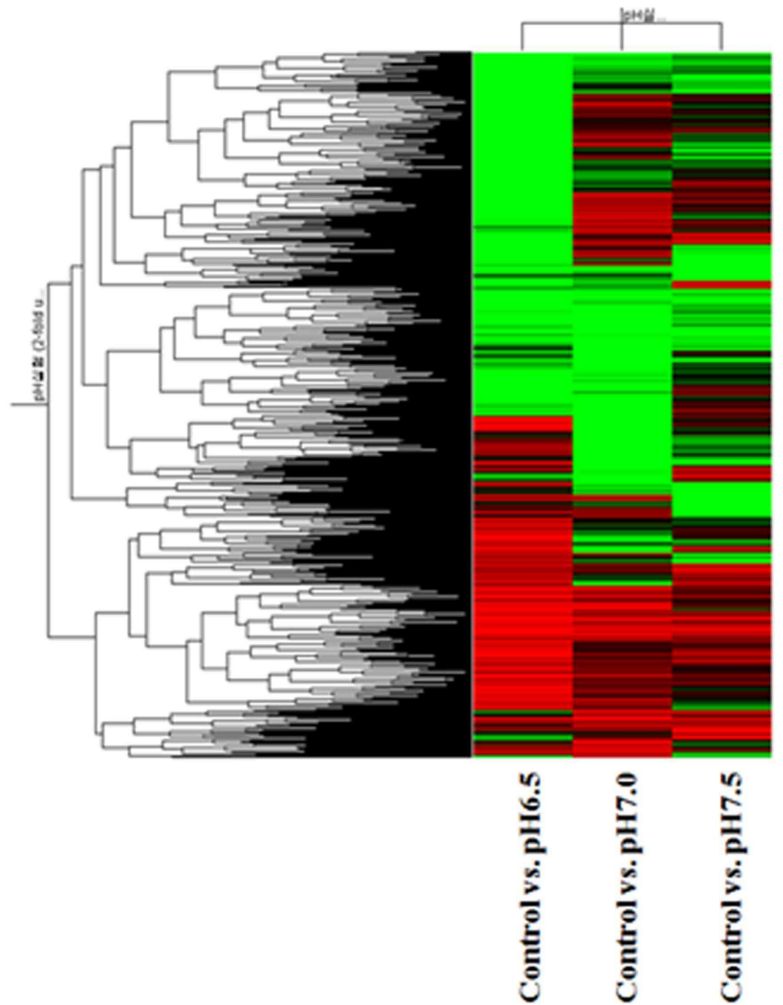
[0082] 본 발명의 산성화된 해수에서 발현 조절된 유전자의 검출용 프라이머 및 PCR 산물 크기

번호	유전자	프라이머	PCR 산물크기 (bp)
1	Acetyl-CoA hydrolase	F-AGATGAAGCATAACCCTCAA (서열번호 21) R-CTTAAGCTGGCAGACTTTT (서열번호 22)	188
2	Alcohol dehydrogenase I	F-AAACAAGCCACTCTGAAAGA (서열번호 23) R-CTTTCGGAATCTTCATCAG (서열번호 24)	249

3	Aquaporin TIP2-3	F-AGTCACAGCTTGAAACCACT (서열번호 25) R-CGTATTCTGGTACGCATCTT (서열번호 26)	251
4	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor	F-CAGAGGAATGTTTCTTCGAG (서열번호 27) R-TTGTGGAGAAGCAGTAGGT (서열번호 28)	205
5	Calpain small subunit 1	F-ACGACAAGGACTACAGCATT (서열번호 29) R-CCATAGACCAGCCAGTTTAG (서열번호 30)	230
6	Deoxyribose-phosphate aldolase	F-AACAAGAGTGCCTTGAAGTT (서열번호 31) R-TGAGATTTTTGTAGGGATGC (서열번호 32)	178
7	DNA-directed RNA polymerase III subunit	F-CGGACTACTTCAAGACGAAC (서열번호 33) R-CCGTGGTTGAGTGAGTAAGT (서열번호 34)	238
8	Dynactin subunit 1	F-AAGAAAGGAAAGCCAGAACT (서열번호 35) R-TGGTGGAGGAGTTAGAAGAA (서열번호 36)	220
9	FAD-dependent oxidoreductase	F-CGTTTCTTACAGCTCGTTCT (서열번호 37) R-ACTTTTCCACAACAGCAACT (서열번호 38)	230
10	Ficolin	F-CTACTCCACTTTCGAGTCGT (서열번호 39) R-CTCTTGTTGGAATCCAGATT (서열번호 40)	174
11	Guanidinoacetate N-methyltransferase	F-ACAGTTCCCTCAATGATTTC (서열번호 41) R-GTTATTGGGTGATCAGGAA (서열번호 42)	200
12	L-Asparaginase	F-ATCACTGACCCTCAATGTTC (서열번호 43) R-TTCCCTCAGAGTGCTGTTC (서열번호 44)	295
13	Myosin light polypeptide 6	F-CTGAGTTCCAAGACTCCAAG (서열번호 45) R-AGATCACCTTGCACTGATTC (서열번호 46)	174
14	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	F-ACACCAGGTACAAGATGCTC (서열번호 47) R-CTCCTTCTCCTTGATCTCCT (서열번호 48)	203
15	Phosphoserine aminotransferase	F-AATATCTTGCAATGGGATTG (서열번호 49) R-CGCAAATTTCTTTCTGTCTT (서열번호 50)	199
16	polyketide synthase	F-ACACAGCAGAAACAAGAGGT (서열번호 51) R-CATCTTCATTCAACCCAAAT (서열번호 52)	213
17	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A	F-AATACCAGTCAGTGGTCAGG (서열번호 53) R-AAGTCTCCAAATGTCTCCAA (서열번호 54)	229
18	Protein tyrosine phosphatase type IV A3	F-ATCAAAGCGCAGGAGAAG (서열번호 55) R-GAAGTCCACCTTTTCAGTG (서열번호 56)	206
19	Pyrroline-5-carboxylate reductase	F-TTTAGCCACTTCAGGACAAT (서열번호 57) R-GTTGTCTGAAATCGGAGTTG (서열번호 58)	191
20	transferrin receptor protein 2	F-CCTCGAAGTGAAGGACTA (서열번호 59) R-GGCACTGCTACTGAAGATGT (서열번호 60)	214

도면

도면1



서열 목록

- <110> Office of Research/Ewha University-Industry Collaboration Foundation
- <120> Ocean Acidification responsive genes in *Dendronephthya gigantea*
and the method for diagnosing marine ecosystem using the same
- <130> 2015P-06-002
- <160> 60
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 273
- <212> DNA
- <213> *Dendronephthya gigantea*
- <400> 1

ccaatcagat cgctccggcg gcagatgaag cataaccctc aatgcatcgg catgtccgca	60
cagctgcaga gcaagaaaac ttctggagcg acccaagcgg aaagagggtc acgcatcagg	120
tcgtctcacc atgcagagct tctcggcaca tcggccaatc aggaaaacaa ggcacaaagc	180
caatgcttgc aaaaagtctg ccagcttaag catgcaagcg ccagcaagag ctgggtggag	240
tcacgcgcac catcaaagta caggcgctc tga	273
<210> 2	
<211> 478	
<212> DNA	
<213> Dendronephthya gigantea	
<400> 2	
cccaaccccg atattccggt tggcaagggt ctgggaaata ttgccagcag aggcgtcatg	60
ttcgcgatct gtctcactct ggacaacaga gaccacggat cactgaccct caatgttctc	120
cagggccagc agcaggagca caggaacatg ccggtggatg acgctatgtc attcatctct	180
aaacagtttc ccagcctcgt gggcggagga ggaggtggga actctgtgat atctcgggac	240
gggtcagcac tgccggggccc ctccacacc ggccatctc cagacatcag caagatactc	300
agcttcctca cagacgacag acctctctcc atcatggagt atgacaagat gattaaatac	360
ctggtcacca agagaacaga cactctgagg gaagagtacg gagacagcat ccagcccac	420
ctgcagcatc caccagtggg gcctcaccag gatccagcca ccaaggccaa gcaggaag	478
<210> 3	
<211> 306	
<212> DNA	
<213> Dendronephthya gigantea	
<400> 3	
gggtgcctgc tggccgtttt gggctgcctc tccctcctgg cgggggcaca cggtacttt	60
atcacctgg acgcccagc agaggaatgt ttcttcgaga aggtgacggc gggtacaaaa	120
ttaggcctgg catttgaggt tgctgaggga ggcttccttg acatagacat caagatctac	180
aacctgaga tgaagacat ccatgagggc gagcgcgagt ccaacgggcg gtacaccttc	240
cctgccagca tggacggcgt ctacacctac tgcttctcca acaagatgtc caccatgacg	300
cccaag	306
<210> 4	
<211> 369	
<212> DNA	

<213> Dendronephthya gigantea

<400> 4

cttaaaattg acgacaagga ctacagcatt accttttcac tttatttcaa tgttcaatgg 60

tccgagccac gtttgaattt gtccaagag tttttcaaca gtgaaaacat cactactgat 120

gagcagctgg tgccagtga tctggagctc attcatgacc tttgggtgcc aaacatttac 180

atatacaacc tgaatcctt caaagtcatt gatgtcctct ctaaactggc tggctctatgg 240

attaacaaca agaaggaaat ctattatagc caagccactc acatcacctt catttgtcca 300

atgcttttcg actcgtttcc tctggatact caagtctgca agttccaagt tggcagctat 360

tcttacgac 369

<210> 5

<211> 366

<212> DNA

<213> Dendronephthya gigantea

<400> 5

aggtacaatg cccgcgggtt cgacatcaac cgcaacttcc cggactactt caagacgaac 60

aacaagcgat ctacgccga gactgaggcg gtgaaggagt ggctgtccaa gatccagttc 120

gtcttgctgg gcaacatcca cggcggcgcc ctggtggcct cctacccgtt cgacaacacg 180

ccaagctcca tcttcagctc ggtcctctcg tccccctcgc tcaccccgga cgacgacacc 240

ttcaaacc tggccacaac ttactcactc aaccacggac gcatgtatct tggggacccc 300

tgcaaggttg gcgcgccaca gttcggaaac gggacgacga acggagcggc gtggtaccgg 360

ctgact 366

<210> 6

<211> 423

<212> DNA

<213> Dendronephthya gigantea

<400> 6

atgtcaaagc gtggacgcgg tggtaaagga ggtggaaagt tccacatctc cctcgccctc 60

ccagttgctg ccgttatgaa ctgcgctgat aacctggcg ccaagtctct ctacgtcatc 120

gctgttgccg gcatcaaagg tcgattgaac cgactcccag ccgccggatc aggagatctc 180

gtcatggcct ccgtgaagaa aggaaagcca gaactccgaa agaaggtcca ccccgccgtc 240

gttgtccgac agtccaaggc tttccgaaga cgagacggta ccttcctgta cttcgaagat 300

aacgccggtg ttattgtcaa caacaaggga gaaatgaagg gctctgccgt cactggaccc	360
gtcgcgaagg aatgcgctga tctctggccc cgtatttctt ctaactcctc caccattgcc	420
taa	423
<210> 7	
<211> 987	
<212> DNA	
<213> Dendronephthya gigantea	
<400> 7	
cttgtggctc tgacatgtct ctacagggtg ctgtactggc aagtccacgc gatgtcacta	60
ggttgtgcgg tgggattgca aaggctgcgc tacacatgtg aagctatcgg ggccgagggc	120
tcaatccacg agtccatcga acagttgccg accttcgtgg ctggaccagc ccgacacggc	180
catggcctgg cgttggataa agacatgggc gtttcttaca gctcgttctt gggtgaggca	240
cctccgttga ggccacggca tgcggaaact gcgttcgacc agatgaccat ctacttcaag	300
ccacgcaagg aagcgtggt cgcccaggaa atgaaatgcg acgacgacat ggcttcttgc	360
tctcgcgaat gcgagcgtt atacggagac caagtcttca cgatgatgga accctgcaaa	420
gttgctgttg tgaaaaagta tgctgggtggc ggaggcggca gctgctttcc tgccaaggcc	480
gccgtctgga accagaacgt tggctgcac cgtatctcgg acgtgcgcat cggtgacgag	540
cttgagactg gcagcggcaa ctctgcgccg gttgtcggcc tactgcacgc tgatccggag	600
gcctgggtcg actacgtccg catctcgcac tctgccgggg aagacttgta catttcgcct	660
gcgcataacc tgcagcttct ttctcgcagt caagggccca cctgggtgcc cgccagcctt	720
gttcgcccag gcgataactt gaagtcctca gcagggccga ccttggtgaa cgctgtggac	780
accgtgcggc tgaagggcgc atacgcgcc ctgactgact cgggccagct gcttgtggag	840
ggcgtgctct gctcctgtta cgctccccg cagagctttg agctctcaca caatatctgc	900
cactgggcca tgtttcgct gcgcgtcttt cacgctttga ggggtgtggt ggcgtccgca	960
gtcctccgac gcgttttcgt caccgca	987
<210> 8	
<211> 1113	
<212> DNA	
<213> Dendronephthya gigantea	
<400> 8	
cccgtcctga tggaaaatct tcccacggac gcctgcctgc tcgttttcag gatcctcagt	60
gttctcggca tggcgtatcc caagattgcc agcattttcg tcctgggcat cgggactgcg	120

agaacttctc ggttgccaaa tggcgtcgcc gattacacgc taggcctcgt gcagctgcac 180
gcggagaaga ccgacggggc cctggctact gcgttccgca gtgaagatgc gccacagccc 240
gtggacgccg caagcagccc gattttggcg accgcggagg cggacaccaa atcgcagtgg 300
tgtttggctt cacaggcgaa ggcggtggag atgcatcagg aggtacagct gtccttggcg 360

cgaaatcgaa gcccgaacag taccgacgaa agccttatcc acatgaccta ctgcagctc 420
caggaaggcc cgcagtctcg tacccttgac gaagagcaga tgcttgtgga tatggagtca 480
acggagtcca ccgagaagtg cgatttgggc aacgaccttt ggttgctgaa ggacgaggtg 540
aatttcgctt cttgccctcc tgggaagtac ctccgtcatc agaccgcgga ggaccacaag 600
cgaaacgga tgcgcctcg gaagccctg tgccagtga agctgcgcgg cgcacggcca 660
tggaacaagc gcgagcggtc gttcttcagg gcgcggggct actccacttt cgagtcgtcg 720
gtgtggccga agttgcccg gtgcgcgtcc gtggtcgacg aaagctggta cagtgggcag 780

cacaagagct gggacatgcc cgccttcgc ccggacagcg cgcctccaca catgggcaag 840
ctggtccgcg ggaatctgga gttccacaag agctggaagg tggcatccac tggcttcccc 900
gactacttgc agtgcgagta tgacggcacc tggaaagagg ttccagtcac caacccggtt 960
gggcagggtc ccagtgtgtt cttgccgtg cgggagccta tcgggcgttg gatctccgtt 1020
gtgggcgagc tgttgagcg atccatcaac cattggtgcc caaacgggcc ttgcagtaag 1080
caggacggtt tcgacctgat gacgacaatg gat 1113

<210> 9

<211> 372

<212> DNA

<213> Dendronephthya gigantea

<400> 9

ccacggattg ccctgttcgc tgtttgctcg gcgctcgtgg ttcagctggg catgtcgagc 60
tctcttcgaa cgcaacctgc agtgaagggt gtggacgccc accagtcaa agtgatgtgc 120
cagcgtttg cgtaccgtt catgggccct gagttccaag actccaagag ccctacggac 180
tgctccaaga agtgcgagcg agtttacggg ggcgcttcgc caacgagcgc cctggaggtc 240
aaggctgaag tcaccgaccg caaggtgaa gtcaagcaac gcggtgtgga cgtgcatgat 300
gcgaatcagt gcaaggtgat ctgccagcgc ttcggcatgc cgatgcttgg tccggatatt 360

gaaggtatca ag 372

<210> 10

<211> 384

<212> DNA

<213> Dendronephthya gigantea

<400> 10

ggaggcgggt catgggagga ggactgggag gggatggtga ccagctccgt ggaggcggac 60

acccctgct tcatcctgtt cagactggat gagaaggaca gcgggggatg cttcctgtgg 120

acccttctct cctggtcacc tgacaccagc cacaccaggt acaagatgct ctacgcctcg 180

accaaggcca cttcaagaa gcagttcggg gcggggcaga tcaaggacga atactacgcc 240

aacctgaagg aggaggtcac cctggcggga tacaagaagc acctgagtgt cgaggcggca 300

cttggcccc tgaccagggc ggaggaggag gccaaggaga tcaaggagaa ggagtcccgg 360

gtcgagatta gcgtggactc caag 384

<210> 11

<211> 341

<212> DNA

<213> Dendronephthya gigantea

<400> 11

gttaatactt ctcaaggagt accaatatct tgcattggga ttgcacaagt aaaaattgaa 60

ggaaagaatc aagatatgct tgctaatagca tgcattgcagt ttcttggaat atcagaacat 120

gaaatccaac agattgcact tgaaactctt gaaggccatc aaagagcaat tatgggcaat 180

atgacagtgg aagaaattta ccaagacaga aagaaatttg cgaaagaggt gtttgaagtt 240

gcacgtcttg atcttctgca aatgggaata tatgttgtat catacacact gaaagatgtg 300

acagacaacg aaggatacct tgcagccctt ggaaaaaccc g 341

<210> 12

<211> 372

<212> DNA

<213> Dendronephthya gigantea

<400> 12

atggccatgg caatgcagaa aaaattgaat gtctgattac cccagaagt caatgcata 60

ctttacgtcc ggaatctacc atacaagatt acatcagaag aaatgtatga tatattcggg 120

aaatatggag ccatacgaca aatccgtgtt ggaaacacag cagaacaag aggtacagct 180

tttgtggtat atgaagatat ttttgatgca aagaatgctt gtgaccacct ttcgggtttt 240

aatgtttgca accgctatit agtagttctt tactatcagc ccacaaaagc cttcaagaag 300

gtagacacag ataaaaagaa agaagaaatc gagaaaatga aggccaaatt tgggttgaat 360

gaagatgaat aa	372
<210> 13	
<211> 405	
<212> DNA	
<213> Dendronephthya gigantea	
<400> 13	
atgctgcgaa ctgctgttct cgcatttatc tgcagttgct tggiccagac gacgtacggg	60
gggaccgtcg aagcgaagtt cctttcccg cggcaacgca gtgaagacga ggtgaagcac	120
gacaccgcg cccaatacca gtcagtggc aggccttcacg acaatgctga gaggaggctg	180
accagaatcg tcgtcgagtt gttgggtgtc gacgagtcgt aggtcaagcg tgatgcgagc	240
ttcgtggaag accttggcgc tgatgagctg gacacggtgg aactcgctgt ggcagtgggg	300
gaggagtttg gcttccaaat tccagatgat gacgcggagt cgttgagac atttgagac	360
ttggtcgact acgtgaataa ttacgaacac aacacagtcc gttga	405
<210> 14	
<211> 270	
<212> DNA	
<213> Dendronephthya gigantea	
<400> 14	
ggaggactca gccgggaaga tatcatatct ttagccactt caggacaatc gcttgggtgc	60
gacatgagtg agctggacga tgctggaact tactttgatc tgggattgcg caaagtgaca	120
atgccgggaa cttatcaata catgtgcacc cggaacaaca acttctcgaa ccggagtcag	180
aaaggaaagc tgggtgtcac caactccgat ttcagacaac agagcgttga ccaaaatggc	240
ggcgtcgtgg tcgtctccga cgtcgagtaa	270
<210> 15	
<211> 290	
<212> DNA	
<213> Dendronephthya gigantea	
<400> 15	
atggaacgca gcgagagcaa ccagttggag gctgcacctg tcctttgccg ggcgggctgc	60
ggcttctttg gctcctcgaa cactgaagga ctatgttcaa aatgttaca agaccaattg	120
aagaaaaagc agcaaccccc aaatcaaagc aataatactt cttcatccac tgcaacagca	180
cagccaacag ttccttctat cacaccgcaa ataagcgaaa gctcatccac atctcccacc	240

acatcctcta caactgcatc ggttgccaca tcttcagtag cagtccaag 290

<210> 16

<211> 426

<212> DNA

<213> Dendronephthya gigantea

<400> 16

tggagttatt ataattacc gttggtgtc ggtatgtcta catctctact gaaaaagagt 60

ttagaactct ttgatgaaga gggaaagacg gacagaacca aatcaaaca aggacgcct 120

gctcgtacca ttgtgaagaa taaacaagcc actctgaaag ataggaaagt gaagtcagca 180

ttagaatcat acacgaagaa gaaccgtaag gaagacagga cacttgaaa ttggctgtt 240

cttgaaaaga tatcgtgaa aaactctgtt agccaagact cggccaaca aattctgaaa 300

tatcatctgc agaagtctcg gaaagtgtg gaagctgagc caaagaaaga ggccgagaag 360

tctgtgttta ctgatgaaga ttccgaaag ttccagcagg aatattttgt caaaggaaag 420

atataa 426

<210> 17

<211> 1107

<212> DNA

<213> Dendronephthya gigantea

<400> 17

atgaacggct acggtgtgac cgccgagcag cggtctttgt tgaacagaaa cagtcacagc 60

ttgaaaccac tatccgtgc cggccacctc aacatctggc aggtggctgt gcaagccatc 120

gtaccgatec tcattctctt gttcgcgtc gggatcctga caatcacgcc acgtatttc 180

agccctgact ccgtgtccac gctctgcgcc attggccttt tcggcgcttt gctgtacccc 240

acgatctcct tctgtctggt ggtcgtaggg gttgtgtcaa cgaagatgcg taccagaata 300

cgctggcccc cagtcgtctt ctggatcatg tgccgtgct ggaagtctc cgctgtgtgt 360

ctcgcgcgct ttctgggcat cagcatcgcc aactacatct ggtacaagca gtcctgccc 420

taccaccaga tggaccgcct ccaggcata gacaatgtca acccttcga ggtgaccggc 480

actcggatgc aggacgccgg ggtcgtcgag ttcaagtcca ccaacggtgt ggatgcaca 540

cggactgggt gcatcaagaa tggtgccacc tactgcatcg cccctgtcgt gctgaatggc 600

aaggtggagc caggtgtggc accaggggag acgtacgact tcttcatggc agggaaggac 660

tgctgcagct gccccggcga gttccgttgt ggcgactgga acatgccgtc gccaactcta 720

ggtgggctgc gaatcgtgga ctcgggcgat cgcgccttct acaggctcgc cgcggagcag 780

tggggcagcc tgiacggcaa gcccgtggag caccgcgtgt tcttcacgtg gtcaacggat	840
ccggtggaga cctggcacga aatgcgcacg acagcgacac gtgaggcctg tctggccatg	900
ctcgtggtec catttttctt gatcacgtac gccttcctcg ctaatggtct gttgggcac	960
ctccacgac ggggctacgc ggcgcccaa gaggctccga tgccgcctgc gggcatgggg	1020
cgcgacatga ctgcgaagtt cctgccccag atgcacaagt acacggcaga ctgcgaggct	1080
cagcaggccg gcgcgaccgt gatctga	1107
<210> 18	
<211> 1821	
<212> DNA	
<213> Dendronephthya gigantea	
<400> 18	
atgtcggcaa cccctgcgcc gatcgtggag ggctgcccgg cgttctcgga aggatgcccg	60
ttctccaagc tcgacatcgc gctgctgcca caggatcatcc aggagggtgcc gaaggagatc	120
acggagaagt gccctgcatt tgagaagggc tgccttttca aggaggacga ctccgtggag	180
gcgctgtaca agcgcgatgc ggaaatgccg gcctcgcacc gcatgggcca ggagagcccc	240
tcaccgcggg cacagaaggt ggaggccacg ctgcgcctgg tgcacgagca gtccaaggcc	300
ttgaagtcca ggttgaaagc cacctgcccc gtcttcgcca catctgccc tttaagaca	360
gtaacctcgg acggccacgc cttggtgcac gagttggacg acgtcgtcga gaggtgggga	420
ctgaaggaga tcgaggaggt gatcacctct cctgtgtcag cgaacgccga gccgctctcc	480
aagaccatga aagctgggac caggctctgt caccgcgtg ccgagaacgt ccgatttgtc	540
cgcgacttcc tcaagggcac ggtgccccaa gacagctacg tggagctgtt gcgtgcgttg	600
taccatgtct acgacgccct ggagcgagct atccgaggcc tgccagagca ttgcagcac	660
tcgcacttca acaagtgtg gcgcaccgag accttgcttg ccgacctgtg ccactacacc	720
aacagcgcct acccagagac cccggaggct gtgagcagaa tcgtcgtgt tctttctcag	780
gtggcccagc agtacgtgga tcatttggac gctctcgggg agcaggagcc cctgctggtg	840
ttggcgcacg cctacacccg ctacctgggg gacttgagcg gcggccagat cctggcccga	900
gcggctgaga aggcgtacgg cctggagggc ggccgaggca ctgcattcta cagcttcgag	960
ctggtgggaa cagctcgcgc cgaggtaag gacttcaaga aagcgtacag agcgtccttg	1020
gacgcgttgc agctgaaaac acacgaggcg gacgcgttgg tggaggaggc caacatggct	1080
ttctttagta acatgtcct ctctgaggac cgggatgtcg ctgctggtca cctagcgcca	1140
gtgcggactc tggaagagcg tcgcgagctg gtggcagcga acaagagtgc gttgaagttc	1200

cagcaggcct acgttggggg tagcaccgca gcagggaagt gccccttctt gccgccgcca 1260
gagcagcggg gggccagtgg cgccagctgc ccctggccct tcttgtggct gcacgacccc 1320
cgcgcagcct tgatggggca tccctacaaa aatctcaccg gtgctctcgt ggcagcgggc 1380
ttcacgaagt ttgcatggga gcgtcctcgc agtgcagcgg tcgggtcttt gttgtgtgcc 1440

gtgggctgct acagcttgaa gccgacgcgc aatacccaag ccgggcgtgg cgtctgcccg 1500
ttcatgcctg catccacgaa cagcgcgtcg ccggcatcgc ggagcgcgc ccaagaacac 1560
catggcgacc gtgtgtgccc atggcctttc gtgtgcttcc acgacccccg tgctgcgttc 1620
cggggccacc cttgcaagaa cgcgtgcggt gtgtggcgga cggcgggctt tgcgaaggtc 1680
gcatgggagt accctcgag cgctgcggcc gggtcgctga tctgtgcgt ggggtgctac 1740
agtctgaagc caaagcgaa gagcatttcg aatgatcgg cgccagcctg tgaacctgcc 1800
gaccggatgc ttgccgcctg a 1821

<210> 19
<211> 204
<212> DNA
<213> Dendronephthya gigantea
<400> 19

tccgacagtt cctcaatga ttctctccat gcggactccg tcagcatagc ttccagctgg 60
ccctgcccc gatccacggg tgcgcccatt ggtatcctgg aaggctctga tcagcagatg 120
caccagccta ggaatggatc cattctcag gagcggcgca tgattggccg ggcacagagc 180
caagttcctg atcaacccaa taac 204

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Dendronephthya gigantea
<400> 20

agatgaagca taacctcaa 20

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic nucleotides
<400> 21

agatgaagca taaccctcaa	20
<210> 22	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic nucleotides	
<400> 22	
cttaagctgg cagacttttt	20
<210> 23	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic nucleotides	
<400> 23	
aaacaagcca ctctgaaaga	20
<210> 24	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic nucleotides	
<400> 24	
ctttcggaaa tcttcacag	20
<210> 25	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic nucleotides	
<400> 25	
agtcacagct tgaaaccact	20
<210> 26	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> synthetic nucleotides

<400> 26

cgtattcttg tacgcattt 20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic nucleotides

<400> 27

cagaggaatg ttcttcgag 20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic nucleotides

<400>

28

ttgttgaga agcagtaggt 20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic nucleotides

<400> 29

acgacaagga ctacagcatt 20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic nucleotides

<400> 30

ccatagacca gccagtttag 20

<210> 31

<

211> 20

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic nucleotides	
<400>	31	
aacaagagtg cgttgaagtt		20
<210>	32	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic nucleotides	
<400>	32	
tgagatTTTT gtaggatgc		20
<210>	33	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic nucleotides	
<400>	33	
cggactactt caagacgaac		20
<210>	34	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic nucleotides	
<400>	34	
ccgtggttga gtgagtaagt		20
<210>	35	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic nucleotides	
<400>	35	
aagaaaggaa agccagaact		20
<210>	36	

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic nucleotides	
<400>	36	
tggtggagga gttagaagaa		20
<210>	37	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic nucleotides	
<400>	37	
cgtttcttac agctcgttct		20
<210>	38	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic nucleotides	
<400>	38	
acttttccac aacagcaact		20
<210>	39	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic nucleotides	
<400>	39	
ctactccact ttcgagtcgt		20
<210>	40	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic nucleotides	
<400>	40	

ctctttgtgga actccagatt	20
<210> 41	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic nucleotides	
<400> 41	
acagttccct caatgatttc	20
<210> 42	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic nucleotides	
<400> 42	
gttattgggt tgatcaggaa	20
<210> 43	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic nucleotides	
<400> 43	
atcactgacc ctcaatgttc	20
<210> 44	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic nucleotides	
<400> 44	
ttccctcaga gtgtctgttc	20
<210> 45	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> synthetic nucleotides

<400> 45

ctgagttcca agactccaag 20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic nucleotides

<400>

46

agatcacctt gcactgattc 20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic nucleotides

<400> 47

acaccaggta caagatgctc 20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic nucleotides

<400> 48

ctccttctcc ttgatctcct 20

<210> 49

<

211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic nucleotides

<400> 49

aatatcttgc attgggattg 20

<210> 50

<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic nucleotides
 <400> 50
 cgcaaatttc tttctgtctt 20
 <210> 51
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic nucleotides
 <400> 51

 acacagcaga aacaagaggt 20
 <210> 52
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic nucleotides
 <400> 52
 catcttcatt caaccctaat 20
 <210> 53
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic nucleotides
 <400> 53
 aataccagtc agtggtcagg 20
 <210> 54
 <211> 20

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic nucleotides
 <400> 54
 aagtctccaa atgtctccaa 20

<210>	55	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic nucleotides	
<400>	55	
atcaaagcgc aggagaag		18
<210>	56	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic nucleotides	
<400>	56	
gaagtccacc ctttcagtg		19
<210>	57	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic nucleotides	
<400>	57	
ttagccact tcaggacaat		20
<210>	58	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic nucleotides	
<400>	58	
gttgtctgaa atcggagttg		20
<210>	59	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic nucleotides	

<400>	59	
cctcgaacac tgaaggacta		20
<210>	60	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic nucleotides	
<400>	60	
ggcactgcta ctgaagatgt		20