



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년11월21일
(11) 등록번호 10-1799788
(24) 등록일자 2017년11월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/689 (2013.01)
C12Q 2537/143 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0075877
(22) 출원일자 2017년06월15일
심사청구일자 2017년06월15일
(56) 선행기술조사문헌
JP2010081889 A
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
한국식품연구원
전라북도 완주군 이서면 농생명로 245
(72) 발명자
장지윤
광주광역시 남구 봉선2로 51-1, 101동 402호(봉선
동, 봉선지웰아파트)
이세희
광주광역시 서구 풍금로11번길 10-14 303호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 7 항

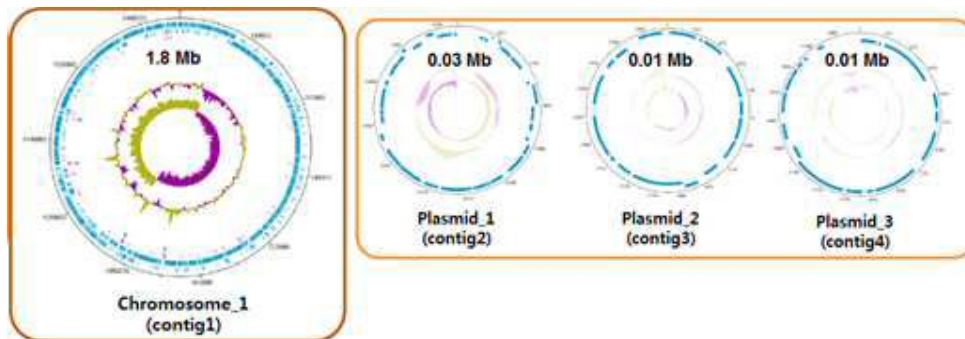
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33 검출용 프라이머 세트, 조성물 키트 및 이를 이용한 검출 방법

(57) 요약

본 발명에 따른 검출용 프라이머 세트를 이용하면 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33 균주를 특이적으로 검출할 수 있으므로, 동일 종(species)의 유산균 내에서도 상기 균주만을 신속하게 검출할 수 있으며 균주를 검출하는데 소요되는 시간 및 경비를 획기적으로 절감할 수 있다. 또한, 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33 균주의 신속하고 정확한 검출은 김치와 같은 발효식품의 품질 조절에 활용하여 발효식품의 관리 기술에 기여 및 발효식품 산업의 경쟁력을 강화시킬 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류	(56) 선행기술조사문헌
<i>C12Q 2600/16</i> (2013.01)	KR1020080077390 A
(72) 발명자	KR101660847 B1
송정희	KR100774540 B1
광주광역시 북구 신흥동 첨단자이 201동 1003호	KR1020140064499 A
이모은	
광주광역시 북구 동림동 우미2차 103동 1604호	

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711054808
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	세계김치연구소
연구사업명	세계김치연구소연구운영비지원
연구과제명	김치품질 향상을 위한 종균 산업화 기술 개발
기 여 율	1/1
주관기관	세계김치연구소
연구기간	2017.01.01 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

SEQ ID NO: 1 및 2의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍;

SEQ ID NO: 3 및 4의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍;

SEQ ID NO: 5 및 6의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍; 및

SEQ ID NO: 7 및 8의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍으로 이루어지는 프라이머 세트를 포함하는 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33(*Leuconostoc mesenteroides* WiKim33; 수탁번호 KFCC11640P)의 검출용 프라이머 세트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 SEQ ID NO: 1 및 2의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍은 SEQ ID NO: 9의 염기서열로 이루어지는 유전자를 특이적으로 검출하고,

상기 SEQ ID NO: 3 및 4의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍은 SEQ ID NO: 10의 염기서열로 이루어지는 유전자를 특이적으로 검출하며,

상기 SEQ ID NO: 5 및 6의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍은 SEQ ID NO: 11의 염기서열로 이루어지는 유전자를 특이적으로 검출하고,

상기 SEQ ID NO: 7 및 8의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍은 SEQ ID NO: 12의 염기서열로 이루어지는 유전자를 특이적으로 검출하는 것인 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33(*Leuconostoc mesenteroides* WiKim33; 수탁번호 KFCC11640P)의 검출용 프라이머 세트.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 따른 프라이머 세트를 포함하는 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33(*Leuconostoc mesenteroides* WiKim33; 수탁번호 KFCC11640P)의 검출용 조성물.

청구항 4

시료로부터 추출한 플라스미드 DNA를 제1항 또는 제2항에 따른 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하고 PCR 산물을 분석하는 단계를 포함하는 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33(*Leuconostoc mesenteroides* WiKim33; 수탁번호 KFCC11640P)의 검출 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

SEQ ID NO: 1 및 2의 염기서열로 이루어지는 프라이머 세트를 이용하여 585 bp의 PCR 산물이 증폭되거나;

SEQ ID NO: 3 및 4의 염기서열로 이루어지는 프라이머 세트를 이용하여 703 bp의 PCR 산물이 증폭되거나;

SEQ ID NO: 5 및 6의 염기서열로 이루어지는 프라이머 세트를 이용하여 884 bp의 PCR 산물이 증폭되거나; 또는

SEQ ID NO: 7 및 8의 염기서열로 이루어지는 프라이머 세트를 이용하여 1,217 bp의 PCR 산물이 증폭되는 경우, 시료 내 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33(*Leuconostoc mesenteroides* WiKim33; 수탁번호 KFCC11640P)가 함유된 것으로 결정하는 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33(*Leuconostoc mesenteroides* WiKim33; 수탁번호 KFCC11640P)의 검출 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 따른 프라이머 세트와 이의 PCR 반응 혼합물을 포함하는 류코노스톡 메센테로이드

WiKim33(*Leuconostoc mesenteroides* WiKim33; 수탁번호 KFCC11640P)의 검출용 PCR 키트.

청구항 7

제6항에 있어서,

PCR 반응 혼합물은 dNTP, DNA 폴리머라아제 및 버퍼를 포함하는 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33(*Leuconostoc mesenteroides* WiKim33; 수탁번호 KFCC11640P)의 검출용 PCR 키트.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33 균주의 검출용 프라이머 세트, 이를 포함하는 검출용 조성물, 키트 및 이를 이용한 상기 균주의 검출 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 김치는 비멸균 발효식품 중 하나이며, 원부재료에 존재하는 다양한 미생물의 상호작용에 의해 자연적으로 발효된다. 특히 미생물 군의 천이 양상과 군집발달은 김치품질을 결정하는 중요한 인자가 된다.
- [0003] 산업적으로 대량생산된 김치의 품질을 향상(품질유지기한 연장, 균일화, 위생성 향상, 기능성 부여 등) 시키기 위한 방법으로는 종균을 첨가하는 방법이 개발되고 있으며, 종균의 김치내 우점율 측정, 즉 종균의 관리 및 추적은 품질관리 및 유지 측면에서 대단히 중요한 문제로 여겨진다.
- [0004] 식품으로부터 특정 미생물, 즉 발효 종균을 확인 및 모니터링하는 방법으로는 평판배양법이 대표적으로 사용되고 있으나, 평판배양법은 배양시간이 오래 걸리고, 선택배지를 사용해야 하며, 배양조건을 정해주어야 한다는 단점이 있다. 특히, 평판배양법에 의해서 유산균을 식별하기에는 유산균들 간 영양요구성과 배양조건이 거의 비슷하기 때문에 상호 간 구별이 매우 힘든 단점이 있다.
- [0005] 이러한 평판배양법의 대안으로는 PCR(polymerase chain reaction, 중합연쇄반응)을 근간으로 하는 RADP-PCR(random amplified polymorphic DNA-PCR), PCR-PFLP(PCR-restriction fragment length polymorphism), 16S rDNA-based PCR 등이 알려져 있으며, 혼합과정 중 미생물 측정방법으로 PCR 조각을 DGGE(denaturing gradient gel electrophoresis)하는 방법이 알려져 있다. 상기과 같은 PCR 방법은 평판배양법에 비하여 민감하고, 선택적이고, 빠르고, 경제적이고, 편리한 특징이 있는데, 그 중 다중 PCR(multiplex-PCR)은 한번에 많은 수의 미생물 측정이 가능하고, 비슷한 미생물간의 구별이 가능한 장점이 있다.
- [0006] 한편, 현재까지 개발된 프라이머 세트를 포함하는 PCR 검출법은 식품으로부터 특정 미생물 종(species)을 검출하거나(예시, 김치내 *Weissella koreensis*; 특허문헌 1), 같은 종 중에서도 특정 균주(strain)만을 검출하기 위한 프라이머 세트(예시, *Bifidobacterium bifidum* BGN4)가 개시되어 있다(특허문헌 2). 이들 프라이머들은 타겟 미생물의 염색체 DNA 또는 16S rRNA 서열에만 특이적으로 결합할 수 있게 개발되었다. 그러나 유산균의 경우 종(species)간의 염색체 DNA 염기서열이나 16S rRNA 서열의 상동성이 매우 높아 특정 균주(strain)를 구별할 수 있는 특이적 염기서열을 찾기 어렵다.
- [0007] 플라스미드(plasmid)는 세균의 세포 내에 있는 염색체와는 별개로 존재하면서 독자적으로 증식할 수 있는 DNA로, 같은 종(species)의 유산균이라 하더라도 균주(strain)에 따라 세포내 존재하는 플라스미드의 개수나 사이즈가 다르다(즉 염기서열이 다름).
- [0008] 이에, 본 발명은 특정 유산균이 지니고 있는 플라스미드 염기서열에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 세트를 이용하여 시료 내 유산균을 신속하게 확인할 수 있는 기술을 제공하고자 한다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 한국 공개특허 제10-2013-0027604호

(특허문헌 0002) 한국 등록특허 제10-1346739호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33(*Leuconostoc mesenteroides* WiKim33; 수탁번호 KFCC11640P) 균주의 검출용 프라이머 세트, 검출용 조성물, 상기 균주의 검출방법, 상기 균주를 검출하기 위한 PCR 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명자들은 종(species) 간의 염색체 DNA 염기서열이나 16S rRNA 서열이 상동성이 높아 특정 균주(strain)를 구별하기 어려운 유산균에서 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33(*Leuconostoc mesenteroides* WiKim33)만을 특이적으로 검출하기 위해 연구를 진행하던 중, 특정 균주만이 지니고 있는 플라스미드 염기서열에 특이적으로 결합하는 다중 복합 프라이머 세트를 이용하면 같은 종(species)의 유산균이라고 하더라도 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33 균주만을 검출할 수 있다는 사실을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0013] 이하, 본 발명의 구성을 상세하게 설명한다.

[0014] 본 발명은 SEQ ID NO: 1 및 2의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍;

[0015] SEQ ID NO: 3 및 4의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍;

[0016] SEQ ID NO: 5 및 6의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍; 및

[0017] SEQ ID NO: 7 및 8의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍으로 이루어지는 프라이머 세트를 포함하는 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33(*Leuconostoc mesenteroides* WiKim33; 수탁번호 KFCC11640P)의 검출용 프라이머 세트를 제공한다.

[0018] 본 발명에 있어서, 상기 SEQ ID NO: 1 내지 SEQ ID NO: 8의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍은 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33 특이적 프라이머 쌍이다.

[0019] 한 구체예에서, 상기 SEQ ID NO: 1 및 2의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍은 SEQ ID NO: 9의 염기서열로 이루어지는 유전자를 특이적으로 검출할 수 있으며, PCR 수행 시 585 bp의 증폭 산물을 생성할 수 있다. 상기 SEQ ID NO: 3 및 4의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍은 SEQ ID NO: 10의 염기서열로 이루어지는 유전자를 특이적으로 검출할 수 있으며, PCR 수행 시 703 bp의 증폭 산물을 생성할 수 있다. 상기 SEQ ID NO: 5 및 6의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍은 SEQ ID NO: 11의 염기서열로 이루어지는 유전자를 특이적으로 검출할 수 있으며, PCR 수행 시 884 bp의 증폭 산물을 생성할 수 있다. 상기 SEQ ID NO: 7 및 8의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍은 SEQ ID NO: 12의 염기서열로 이루어지는 유전자를 특이적으로 검출할 수 있으며, PCR 수행 시 1,217 bp의 증폭 산물을 생성할 수 있다. 따라서, 상기 프라이머 세트를 이용하면 시료 내 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33 균주의 함유 여부를 확인할 수 있다.

[0020] 본 발명에 따른 검출용 프라이머 세트는 상기 SEQ ID NO: 1 및 2의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍; SEQ ID NO: 3 및 4의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍; SEQ ID NO: 5 및 6의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍; 및 SEQ ID NO: 7 및 8의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍으로 이루어지는 4종의 프라이머 세트를 모두 포함함으로써, 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33 균주만을 특이적으로 검출할 수 있다.

[0021] 본 명세서에서 사용된 용어, "프라이머"란 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다. 상기 프라이머의 길이 및 서열은 연장 산물의 합성을 시작하도록 허용해야 한다. 프라이머의 구체적인 길이 및 서열은 요구되는 DNA 또는 RNA 표적의 복잡도(complexity) 뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 의존할 것이다. 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)를 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드이며 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및

dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.

- [0022] 본 발명에서 이용되는 프라이머는 타겟 핵산에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 용어 "상보적"은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화 할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 완전히 상보적인 것을 의미한다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 시료란 류코노스톡 메센테로이드 균주를 함유하거나, 함유할 것으로 예상되는 모든 식품, 예컨대 김치와 같은 발효 식품 또는 김치 양념소와 같은 혼합 양념으로부터 얻은 시료일 수 있다. 한 구체예에서, 상기 시료는 김치로부터 얻은 시료일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 포함하는 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33(*Leuconostoc mesenteroides* WiKim33; 수탁번호 KFCC11640P)의 검출용 조성물을 제공한다.
- [0026] 한 구체예에서, 상기 조성물은 표적 핵산을 증폭하기 위한 조성물일 수 있다. 증폭은 핵산 증폭을 위하여 알려진 방법일 수 있다. 증폭은 예를 들면, DNA 증폭 또는 RNA 증폭일 수 있다. 증폭 방법은 열순환(thermal cycling)을 필요로 하는 것 또는 등온(isothermal)에서 수행되는 것일 수 있다. 상기 증폭방법은 폴리머라아제 연쇄 반응 (polymerase chain reaction: PCR), 핵산 서열-기초 증폭(nucleic acid sequence-based amplification: NASBA), 리가제 연쇄 반응(ligase chain reaction: LCR), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification: SDA), 롤링 서클증폭(rolling circle amplification: RCA) 등을 포함할 수 있다. 증폭 방법은 또한, RNA 증폭 방법을 포함할 수 있다. 예를 들면, 역전사(reverse transcription: RT) 또는 역전사-PCR을 포함할 수 있다. 증폭이란 표적 핵산 서열 또는 그에 상보적인 서열의 카피 수를 증가시키는 것일 수 있다. "PCR"은 중합효소를 이용하여 표적 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍으로부터 표적 핵산을 증폭하는 방법일 수 있다.
- [0027] 상기 조성물은 표적 핵산의 증폭에 요구되는 알려진 물질을 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 조성물은 핵산 폴리머라아제, 그의 활성화에 필요한 버퍼, 보조인자, 및/또는 기질을 더 포함할 수 있다. 상기 핵산 폴리머라아제는 DNA 폴리머라아제, RNA 폴리머라아제, 역전사 효소(reverse transcriptase) 및 이들의 조합일 수 있다. 역전사(reverse transcription)란 RNA를 주형으로 하여 RNA 서열에 상보적인 DNA 가닥을 합성하는 것일 수 있다.
- [0028] 상기 핵산 폴리머라아제는 가닥 치환 활성을 갖는 것일 수 있다. 예를 들면, 레트로바이러스, 예를 들면, HIV, MMLV, 및 AMV로부터 유래된 하나 이상의 역전사 효소일 수 있다. 상기 핵산 폴리머라아제는 3' → 5' 엑소뉴클레아제 활성(exonuclease activity)을 갖지 않는 것일 수 있다. 상기 조성물은 역전사 또는 PCR 증폭에 필요한 물질을 포함하는 것일 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명은 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33(*Leuconostoc mesenteroides* WiKim33; 수탁번호 KFCC11650P)의 검출 방법을 제공한다.
- [0031] 구체적으로, 시료로부터 추출한 플라스미드 DNA를 상기 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하고 PCR 산물을 분석하는 단계를 포함하는 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33의 검출 방법을 제공한다.
- [0032] 보다 구체적으로, 상기 검출 방법은
- [0033] 1) 시료로부터 플라스미드 DNA를 추출하는 단계;
- [0034] 2) SEQ ID NO: 1 및 2의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍, SEQ ID NO: 3 및 4의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍, SEQ ID NO: 5 및 6의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍 및 SEQ ID NO: 7 및 8의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍을 포함하는 프라이머 세트를 제작하는 단계;
- [0035] 3) 단계 1)에서 추출한 DNA를 주형으로 하고, 단계 2)의 프라이머 세트를 이용하여 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하는 단계; 및
- [0036] 4) 단계 3)의 PCR 수행에 의해 생성된 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0037] 상기 검출 방법에 있어서, 시료, SEQ ID NO: 1 내지 8의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트, PCR 반응에 대한 모든 내용은 위에서 기술한 내용을 모두 적용 또는 준용할 수 있다.

- [0038] 상기 단계 1)에서 시료로부터 플라스미드 DNA를 추출하는 단계는 통상적으로 사용되는 플라스미드 DNA 추출 방법을 사용할 수 있으며, 특별히 제한되는 것은 아니다. 본 발명에 있어서, “플라스미드 DNA”는 염색체 외에서 자체 복제 능력이 있는 원형의 DNA를 의미한다.
- [0039] 상기 단계 2)에서, 상기 SEQ ID NO: 1 및 2의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍은 SEQ ID NO: 9의 염기서열로 이루어지는 유전자를 특이적으로 검출할 수 있으며, 상기 SEQ ID NO: 3 및 4의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍은 SEQ ID NO: 10의 염기서열로 이루어지는 유전자를 특이적으로 검출할 수 있고, 상기 SEQ ID NO: 5 및 6의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍은 SEQ ID NO: 11의 염기서열로 이루어지는 유전자를 특이적으로 검출할 수 있으며, 상기 SEQ ID NO: 7 및 8의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍은 SEQ ID NO: 12의 염기서열로 이루어지는 유전자를 특이적으로 검출할 수 있다.
- [0040] 상기 단계 2)에서는 SEQ ID NO: 1 및 2의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍; SEQ ID NO: 3 및 4의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍; SEQ ID NO: 5 및 6의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍; 및 SEQ ID NO: 7 및 8의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍으로 이루어지는 4종의 프라이머 세트를 모두 제작할 수 있다.
- [0041] 상기 단계 3)의 PCR은 다중(multiplex) PCR일 수 있으나, 이에 제한하지 않는다.
- [0042] 상기 단계 3)의 PCR은 어닐링(annealing) 온도 50 내지 65℃로 수행되는 것일 수 있고, 바람직하게는 어닐링 온도 60℃로 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 PCR 반응 조건은 통상적인 조건으로 수행될 수 있다. 또한, 상기 PCR과 다중 PCR 반응은 동일한 조건으로 수행될 수 있으며, 예를 들어 초기 변성을 96℃에서 5분간 1회 수행 한 후, 변성(denaturation, 96℃에서 45초), 어닐링(annealing, 60℃에서 45초) 및 연장(extention, 72℃에서 60초)를 총 30 사이클 수행한 후, 최종 확장 반응을 72℃에서 5분 동안 실시할 수 있다. 예를 들어, 상기 SEQ ID NO: 1 및 2의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍, SEQ ID NO: 3 및 4의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍, SEQ ID NO: 5 및 6의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍 및 SEQ ID NO: 7 및 8의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍은 모두 PCR 수행시 어닐링 온도가 60℃로 동일할 수 있고, 이에 따라 다중 PCR 수행시 검출 효율이 우수할 수 있다.
- [0043] 상기 단계 4)의 증폭 산물은 SEQ ID NO: 1 및 2의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍에 의해 증폭된 585 bp의 증폭 산물; SEQ ID NO: 3 및 4의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍에 의해 증폭된 703 bp의 증폭 산물; SEQ ID NO: 5 및 6의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍에 의해 증폭된 884 bp의 증폭 산물; 또는 SEQ ID NO: 7 및 8의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍에 의해 증폭된 1,217 bp의 증폭 산물인 것일 수 있다.
- [0044] 따라서, SEQ ID NO: 1 및 2의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍을 이용하여 585 bp의 PCR 산물이 증폭되거나;
- [0045] SEQ ID NO: 3 및 4의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍을 이용하여 703bp의 PCR 산물이 증폭되거나;
- [0046] SEQ ID NO: 5 및 6의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍을 이용하여 884bp의 PCR 산물이 증폭되거나; 또는
- [0047] SEQ ID NO: 7 및 8의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍을 이용하여 1,217bp의 PCR 산물이 증폭되는 경우, 시료 내 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33(*Leuconostoc mesenteroides* WiKim33; 수탁번호 KFCC11640P)가 함유된 것으로 결정할 수 있다.
- [0048] 상기 PCR 산물 분석은 PCR 산물을 전기영동하여 산물의 크기를 비교하거나, PCR 산물이 증폭되는지 증폭되지 않는지를 확인하여 분석할 수 있다.
- [0049] 상기 전기영동은 증폭 산물의 크기에 따라 아가로스 겔 전기영동 또는 아크릴아마이드 겔 전기영동을 이용할 수 있으나, 전기영동법이 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 본 명세서에서 사용된 용어 "증폭 반응"은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응들이 당업계에 보고되어 있으며, 이는 중합효소 연쇄반응(PCR)(미국 특허 제4,683,195, 4,683,202, 및 4,800,159호), 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)(Sambrook 등, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), Miller, H. I.(WO 89/06700) 및 Davey, C. 등(EP 329,822)의 방법, 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR)(17, 18), Gap-LCR(WO 90/01069), 복구 연쇄 반응(repair chain reaction; EP 439,182), 전사-중재 증폭(transcription-mediated amplification; TMA)(19) (WO 88/10315), 자가 유지 염기서열 복제(self-sustained sequence replication)(20)(WO 90/06995), 타겟 폴리뉴클레오타이드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences)(미국 특허 제6,410,276호), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction; CPPCR)(미국 특허 제4,437,975호), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction; AP-

PCR)(미국 특허 제5,413,909호 및 제5,861,245호), 핵산 염기서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification; NASBA)(미국 특허 제5,130,238호, 제5,409,818호, 제5,554,517호, 및 제6,063,603호), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification)(21, 22) 및 고리-중재 항온성 증폭(loopmediated isothermal amplification; LAMP)(23)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 사용 가능한 다른 증폭방법들은 미국특허 제5,242,794, 5,494,810, 4,988,617호 및 미국 특허 제09/854,317호에 기술되어 있다.

[0051] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 4종의 프라이머 세트를 동시에 사용하여 PCR을 수행한 결과, 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33 균주만을 특이적으로 검출하였다(도 3).

[0053] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트와 이의 PCR 반응 혼합물을 포함하는 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33(*Leuconostoc mesenteroides* WiKim33; 수탁번호 KFCC11650P) 검출용 PCR 키트를 제공한다.

[0054] 상기 PCR 반응 혼합물로는 이 기술분야에서 널리 공지된 것 어느 것이나 포함될 수 있으며, 예를 들어, dNTP, DNA 폴리머라아제(polymerase) 및 버퍼 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0056] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

발명의 효과

[0057] 본 발명에 따른 검출용 프라이머 세트를 이용하면 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33 균주를 특이적으로 검출할 수 있으므로, 동일 종(species)의 유산균 내에서도 상기 균주만을 신속하게 검출할 수 있으며 균주를 검출하는데 소요되는 시간 및 경비를 획기적으로 절감할 수 있다. 또한, 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33 균주의 신속하고 정확한 검출은 김치와 같은 발효식품의 품질 조절에 활용하여 발효식품의 관리 기술에 기여 및 발효식품 산업의 경쟁력을 강화시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33의 유전체 지도로, WiKim33이 유전자의 길이가 1,894,793bp 정도인 크로모솜과 약 37,363bp, 18,960bp, 18,944bp에 해당되는 3개의 플라스미드로 구성되어 있음을 나타낸다.

도 2는 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33에 특이적인 본 발명의 프라이머 세트를 이용한 PCR 수행 결과를 나타낸 것으로, 585bp, 703bp, 884bp, 1217bp의 PCR product를 확인하였다.

도 3은 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33을 특이적으로 검출하는지 확인하기 위하여, 타 류코노스톡 메센테로이드 균주들을 이용하여 PCR을 수행한 결과이다.

도 4는 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33을 종균으로 사용하여 제조된 김치 내 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33를 검출한 결과를 나타낸 것으로, 김치는 6.5℃에서 12주간 발효하면서 김치 내 종균으로 사용한 WiKim33 존재 여부를 검증한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 이하, 본 발명을 실시예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0061] [실시예 1] 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33의 유전체 특징 분석

[0062] 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33(*Leuconostoc mesenteroides* WiKim33)에 특이적인 프라이머를 제작하기 위하여 유전체를 분석하였다.

[0063] 구체적으로, 수탁번호 KFCC11640P의 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33(*Leuconostoc mesenteroides* WiKim33)의 유전체 염기서열 분석을 하였다. WiKim33의 DNA는 QIAcube(QIAGEN, Canada)를 이용하여 추출하였으며, ㈜마크로젠(대한민국, 서울)에 의뢰하여 20kb SMRTbell Templates library를 지닌 Pacific Biosciences RS II platform을 사용하여 유전자 서열 정보를 분석하였다. Assembly는 RS hierarchical genome assembly process(HGAP) 프로토콜(ver.3.0)를 사용하여 진행하였다. 총 1,894,793bp의 크로모솜과 3개의 플라스미드(37,363bp, 18,960bp,

18,944bp)로 구성되어 있는 것을 확인할 수 있었으며(표 1), 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33의 유전체 지도를 도 1에 나타내었다.

표 1

Contig Name	Length (bp)	GC(%)	Alias
contig1	1,894,739	37.7	크로모솜
contig2	37,363	35.4	플라스미드 1
contig3	18,960	36.7	플라스미드 2
contig4	18,944	36.6	플라스미드 3
Total	1,970,060		

[실시예 2] 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33의 특이적 프라이머 제작

류코노스톡 메센테로이드 WiKim33 균주만을 선택적으로 검출하기 위한 특이적 프라이머를 제작하기 위하여 NCBI의 BlastN 프로그램을 이용하여, 기존에 염기서열 분석이 완료된 타 류코노스톡 메센테로이드 균주들과 상기 WiKim33의 크로모솜 염기서열 비교분석을 수행하였다. 크로모솜 비교 분석에서는 WiKim33과 타 류코노스톡 메센테로이드 균주의 크로모솜과의 ANI(Average Nucleotide identity) 값이 대부분 99% 이상으로 확인되어 크로모솜에서는 WiKim33 만의 특이적인 유전자를 찾을 수 없었다. 이에 크로모솜이 아닌 플라스미드 유전자를 이용하여 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33의 특이적 프라이머를 제작하였다. WiKim33 플라스미드에 특이적 프라이머 제작을 위하여 NCBI의 primer-BLASTER(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)를 사용하였으며, 총 4쌍의 프라이머를 제작하였다(표 2). 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33의 유전자를 추출하고 이를 주형으로 제작된 프라이머 4세트를 이용하여 PCR를 시행한 결과(도 2), P2_585F 및 R 프라이머 세트에 의해 특이적으로 검출되는 유전자 서열을 SEQ ID NO: 9로 나타내었고, P4_703F 및 R 프라이머 세트에 의해 특이적으로 검출되는 유전자 서열을 SEQ ID NO: 10으로 나타내었으며, P4_884F 및 R 프라이머 세트에 의해 특이적으로 검출되는 유전자 서열을 SEQ ID NO: 11로 나타내었고, P3_1217F 및 R 프라이머 세트에 의해 특이적으로 검출되는 유전자 서열을 SEQ ID NO: 12로 나타내었다.

표 2

서열번호	명칭	프라이머 종류	염기서열(5'→3')
1	P2_585F	정방향	AGGTCAGGTATGAATACAATAGCA
2	P2_585R	역방향	AGTGACGGTTTGCATAGCCA
3	P4_703F	정방향	AGTACATTCCTTAAATCAGGGGCT
4	P4_703R	역방향	AGCACATAGTCTTCCACGGC
5	P4_884F	정방향	CCTGTTGCAGCGGGTATTCT
6	P4_884R	역방향	TCGAGGCTAATATGTCAGTCTTCC
7	P3_1217F	정방향	CAGGATTTGGCAGAGAGTCCA
8	P3_1217R	역방향	GATGACGGTCAGCCCCTTAG

[실시예 3] 하나의 프라이머 세트를 이용한 PCR 검정

상기 실시예 2에서 제작한 각각의 프라이머가 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33를 특이적으로 검출하는지 확인하기 위하여, 여러 유사 류코노스톡 메센테로이드 균주들을 이용하여 PCR을 수행하였다. 실험에 이용한 류코노스톡 메센테로이드 균주의 종류는 아래 표 3에 나타내었다. 각각의 프라이머 세트에 의한 PCR 수행 결과는 도 3에 나타내었다.

WiKim33으로부터 DNA 추출은 MRS액체배지에서 18시간 배양한 후원심분리(13,000×g, 10 min)하여 얻은 균체를 멸균된 생리 식염수로 2회 세척한 후, DNA Prep kit (Quiagen, Valecia, CA, USA)를 사용하여 제조사의 protocol에 따라 DNA를 추출하였으며 중합연쇄반응을 위한 주형으로 사용하였다.

중합연쇄반응은 전체 반응액을 20 μ l로 하여 PCR 프리믹스(Taq DNA 폴리머라아제 1 U, dNTP 200 μ l, MgCl₂ 1.5mM) 10 μ l, 주형 DNA 10 ng, 10 pmol의 프라이머 세트를 각각 혼합하여 수행하였다. 중합연쇄반응 조건은 96℃에서 5분간 초기열처리(preheating)한 후, 96℃에서 45초 변성(denaturation), 60℃에서 45초간 어닐링

(annealing), 72℃에서 60초간 신장(extention) 반응, 총 30 사이클 수행한 후, 최종 확장 반응을 72℃에서 5분 동안 실시하였다. 수득한 PCR 증폭산물(product) 1.5% 아가로즈젤 상에서 전기영동하였고, UV상에서 EtBr(Ethidium bromide)의 발색량을 검출하여 분석하였으며, 분자량은 분자량 래더마커(ladder marker)와 비교하였다.

[0075] [실시예 4] 4종의 프라이머 세트를 동시에 이용한 다중 PCR 검정

[0076] 상기 실시예 2에서 제작한 4종의 프라이머 세트를 이용하여 타 류코노스톡 메센테로이드 균주들로부터 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33 만이 정확하게 검출 및 판별이 가능한지 확인하기 위하여 다중 PCR(multiplex PCR)을 수행하였다. 이때, 실험에 이용한 사용한 비교 류코노스톡 메센테로이드 균주는 표 3과 같다. 각각의 유산균 류코노스톡 메센테로이드 균주들로부터 DNA 추출방법 및 중합연쇄반응 조건은 상기 실시예 3과 같이 수행하였으며, 중합연쇄반응액은 전체 반응액을 20 μ l로 하여 PCR 프리믹스(Taq DNA 폴리머라아제 1 U, dNTP 200 μ l, MgCl₂ 1.5mM) 10 μ l, 주형 DNA, 각각의 프라이머를 2.5 pmol 농도로 모두 혼합하여 수행하였다.

표 3

Lane No.	균주(strain)
1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> WiKim33
2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> KACC12312
3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> KACC12313
4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> KACC12315
5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>suionicum</i> KACC17730

[0079] 도 3과 같이 WiKim33을 비롯하여 4종의 류코노스톡 메센테로이드 균주에 4종의 프라이머 세트로 다중 PCR을 시행한 결과, 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33을 제외한 다른 류코노스톡 메센테로이드 균주에는 4개의 밴드가 생성되지 않음을 확인함으로써, 4종의 프라이머 세트를 이용한 다중 PCR은 WiKim33 만을 검출하기 위한 방법임을 확인할 수 있었다.

[0081] [실시예 5] 4종 프라이머 세트-다중 PCR 검출법을 이용한 WiKim33 첨가 김치 내 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33 균주의 모니터링

[0082] 본 발명에 따른 4종의 프라이머 세트를 동시에 이용한 다중 PCR 법을 사용하여 김치 내 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33 균주를 모니터링하기 위하여 WiKim33 첨가 김치를 제조하였다.

[0083] 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33을 종균으로 첨가하여 제조된 김치는 '한국 등록특허 제10-1660847호'의 실시예 1-1 내지 1-3 내지 3-2의 방법으로 제조하였다. 이때, 대조군으로는 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33을 첨가하지 않은 김치를 제조하여 사용하였다. 김치는 6 ℃에서 12주 동안 발효시키면서 발효기간에 따른 김치 내 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33 균주를 모니터링하였다.

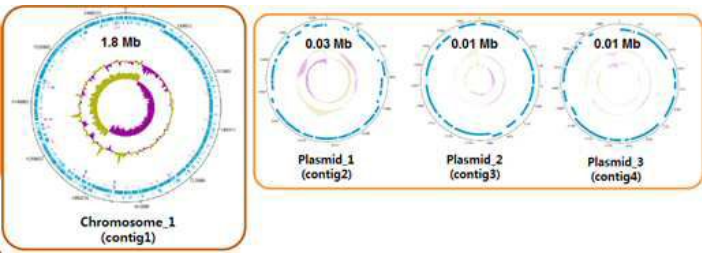
[0084] PCR 반응액은 각각의 김치 시료를 핸드 블렌더로 마쇄하여 얻은 김치여액 1 mL을 원심분리(13,000×g, 10 min)하여 얻은 pellet을 멸균된 생리 식염수로 2회 세척한 후, DNA Prep kit (Quiagen, Valecia, CA, USA)를 사용하여 제조사의 protocol에 따라 DNA를 추출하였으며 중합연쇄반응을 위한 주형으로 사용하였다. 중합연쇄반응 조건은 상기 실시예 4의 방법과 동일한 방법으로 시행하였다.

[0085] 본 발명에 따른 프라이머 4종 세트를 이용하여 다중 PCR 분석을 수행한 결과(도 4), WiKim33 첨가 김치에서는 종균으로 사용한 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33 균주가 김치발효 초기부터 발효 12주까지 발효기간 동안 지속적으로 존재함을 확인할 수 있었으며, 대조군인 WiKim33을 첨가하지 않은 종균비첨가 김치에서는 WiKim33 균주에서 생성되는 밴드가 나오지 않았다.

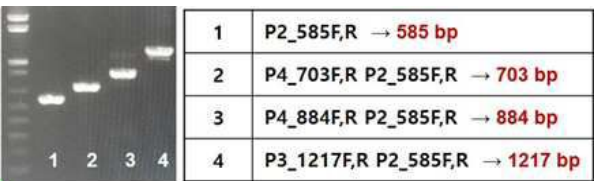
[0086] 따라서, 본 실시예를 통해 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33 균주의 플라스미드 특이적 프라이머 4종 세트를 이용한 다중 PCR 분석법은 류코노스톡 메센테로이드 WiKim33 균주만을 특이적으로 증폭함을 확인할 수 있었다. 이러한 플라스미드 특이적 프라이머를 이용한 PCR 방법은 종래의 도말 배양에 의한 콜로니의 형태나 수의 확인에 따르는 시간의 과다 소요뿐만 아니라 유산균 크로모솜 및 16S rRNA 염기서열 간의 매우 높은 상동성에 따른 검출의 부정확성을 극복할 수 있는 방법으로 특정 균주(strain)의 존재 여부를 손쉽게 정확하게 모니터링 할 수 있는 장점을 지닌다.

도면

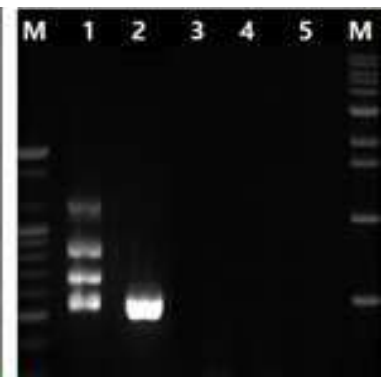
도면1



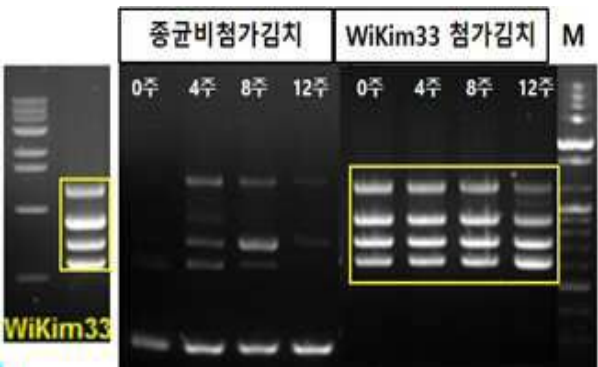
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Korea Food Research Institute
- <120> Primer set, composition and kit for detecting strains of

Leuconostoc mesenteroides WiKim33, and methods using the same

<130> P17R10C0263

<160> 12

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P2_585F

<400> 1

aggttcaggt atgaatacaa tagca 25

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P2_585R

<400> 2

agtgacgggt tgcataagcca 20

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P4_703F

<400> 3

agtacattcc ttaaatacagg ggct 24

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P4_703R

<400> 4

agcacatagt cttccacggc 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P4_884F

<400> 5

cctgttgag cgggtattct 20

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P4_884R

<400> 6

tcgaggctaa tatgtcagtc ttcc 24

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P3_1217F

<400> 7

caggatttgg cagagagtcc a 21

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P3_1217R

<400> 8

gatgacggtc agccccttag 20

<210> 9

<211> 585

<212> DNA

<213> Leuconostoc mesenteroides WiKim33 Target 1

<400> 9

aggttcaggt atgaatacaa tagcatatca gtatgaaaat atacaaaata ggtaaagag 60

atcagcagcg caaataaatg gaattgtcaa tatgattgat gaagagcgtc cttgtgaaga 120
ggtcgtcata cagttatctg ctgtcagagc aagtcttgat aaggcaataa agttagtatt 180

tgctgaaaat attagaaatt gttcagaagc agaacagga tctgagcaat atcaaaaggc 240
acttgaactg ttagttagag ttaaatagat aggaacatta aaatttaata tgaaaattta 300
acaaattaga aatgccaccg taaaaataga gtatagtgat caaaccttct tagtgatcc 360
catgctttct aaaaaagaaa cactggctgc tcgtatactg aaaatccgga cgcctttatt 420
tctagggcat aatccgagat aatcaagtat aggagttttt ttatattatg aaagctaagc 480
gatactcaac agaatttaaa tcatctattg ttgccttgca taacgagggc cgttctgcta 540
attctctagc caatgaatac ccatttggct atgcaaaccg tcaact 585

<210> 10

<211> 703

<212> DNA

<213> Leuconostoc mesenteroides WiKim33 Target 2

<400> 10

agtacattcc ttaaatcagg ggctataatt ataggatgac tcctaaatct aaaaagacaa 60
ggcccatataa tttattaact aataatattg aatttcaatt tcataggaaa actggtaaac 120
tattcaacac aatagttgaa aagggtgaaa gaaaatgttt gaacaagcag ttaactaaa 180
aatggacta tataaagaac tatctaaaat tggtaagggg ctaagcagtg atcgacgatt 240
agaaattctt gatcttttaa ctcaagcacc caaatcagtt gaaactattg ccaacggggt 300
cggaataagt gtagctaacg cctcacgcca tctacaaata ttgaaggaca gtcattctgt 360

taaaacaaaa cgaaaaggca atcatattat ttatagcctt agttctccca aaattagtga 420
ttttgtgcac ctattaaccg atattggcaa cagtgaactt tcagatatga aaacaattca 480
ggataaatca gagctcaag ataacgttaa aaccatttcc ttaaagcaag ctcaagaaga 540
atacaaaaat agctttgtcc ttgatgtacg accttctgat gaatatgcag caggccacat 600
acaatcgga attaatgtcc cattggaaac attaaaagaa tcaatgccca aattacctaa 660
agatcaaaaa attattgttt attgccgtgg aagactatgt gct 703

<210> 11

<211> 884

<212> DNA

<213> Leuconostoc mesenteroides WiKim33 Target 3

<400> 11

ccgtgtgcag cgggtattct ttatccattt acagggattt atattgatcc tctcattgca 60
gcagtcctga tgtcaatctc aaccgtgatt gtcgcaatca acgcgatggg attgaggtat 120
gataaaaaat agaagagcac atgctcttct atttttttca tactaattat gaaactttta 180
tcacttaaat atacctaaag attaactatg atatcacaca aatactaattg attgtaatga 240
tattttttaa tatggtttat ttttaaatga ttttagaatc tttcgttcat aatcatttaa 300
ttgactccct ttatgaacta aaaaataaat attacctcta agataacgat tagcatcaaa 360

aacatcaaag actccttgaa gtaaataatc tttagtatct tgaagcagtt tttttatttc 420
taatctaacc tcattagaat caagataaat atctatatct tccataaaca cttagatagct 480
ttttctctt ttaatttttc ttagcttttg tttagtaagg ctttcaaac taacgagtcc 540
atttctttca tagtgaactt cattcttctg ttcttcgttc catctcttcc caggatcttg 600
catcttttta agattatcca caatttgctt agtttccctt gctttttctt cactgcttct 660
ttctttatct gtttaggtt tattcttctc ttgattaaa aatatatcgt cttaaatttc 720
tgcctcttta tttgactca ttagttctct tcctttttgc tcagaagtca ataaattgga 780

ctatttttat tcagttactt aggcaacatt tgagatacga ttgcgattat aaaaattaat 840
ataccaacca atggctgctt ggaagactga catattagcc tcga 884

<210> 12

<211> 1217

<212> DNA

<213> Leuconostoc mesenteroides WiKim33 Target 4

<400> 12

caggatttgg cagagagtc aaaagtaatc taagagaaat tccttagatc actttttgtt 60
ttataaggat ttacacctt attttttgta agtgaagtgg aatttaaggt ggatccaaaa 120
tttatccata aaaaataaaa gttatgctat aggttacgaa ccaatacgtc taagtattat 180
tggtataaat gagtcaaaat tgttgacatt agaaaatc tatatatact tgtacctgaa 240

tctgatacaa caaaaaggaa aatagaaaat aatggatact aaattttcag tagcgtaca 300
cattttaata tacatttctg aaacagaaaa gacacatca tcagaaaatc tagctcagtc 360
agtcaacacc aatgccagtc atatccgaaa gatcactctc ttgctaaagc aagcaggtct 420
gattgctagc caacaaggga agtctgggtt ttacctagta aaagaaccg ctgatatttc 480
cttaaaagaa gtctaccaag cagtctatcc agaaaaact ctgctccacg tccacgaaga 540
tgccaatccc aactgtccag tcggtagtcg tatcgaacag gtgctcagcc cagtctttga 600
agacgcagaa gccagccttc tcaatgcct caaccaagaa aattgtcag atttaacac 660

tgatatgtat aaaatcaatt aagaaaagga aatcccatg aaagcagcac aattaacca	720
atataataaa aacaatatca aacttgaact cgttgacaca ccgatgcctg aacttggcgc	780
tcaagatgtc cttgtcaaag tcacagccgc aggagtcaat ccagttgata acatgatttc	840
acgaggacaa atcaagctcc tcattcccta caaactccca caaattgctg gtaatgaagt	900
cgttgggatt gtagaaaaag taggcacgca agtgacagga tttaaagttg gtgaccgtgt	960
ctttgcacgc atgccgcttg accgtatcgg tgcatttgcc gagtatacgg cgattaatta	1020
tcgagcgcta gcccatgtcc cagattatct aacggatgtt gaggcagcag cggtgccctt	1080
gactgtcttt acggttatgc aggcgcttga cctgatgggc gcgaaaaagg gcggtacctt	1140
ctttatgacg ggtggtacag gtgggtgtcg gtgccatggc gattcctatc gcaaaagcta	1200
aggggctgac cgtcatc	1217