



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0110594
(43) 공개일자 2016년09월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/6888 (2013.01)
C12Q 1/686 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0032472

(22) 출원일자 2015년03월09일
심사청구일자 2015년03월09일

(71) 출원인

제주대학교 산학협력단

제주특별자치도 제주시 제주대학로 102 (아라일동, 제주대학교)

한국해양과학기술원

경기도 안산시 상록구 해안로 787 (사동)

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)

(72) 발명자

한상현

제주특별자치도 제주시 도남로10길 37 501호 (도남동, 한솔아파트)

이영돈

제주특별자치도 제주시 조천읍 함덕5길 19-5 해양과학연구소 (함덕리, 제주대학교)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

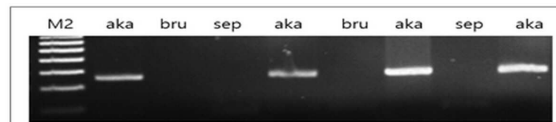
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 붉바리 종 판별용 P C R 프라이머 세트 및 이를 이용한 붉바리 종 판별 방법

(57) 요약

본 발명은 붉바리 종 판별용 프라이머 세트 및 이를 이용한 붉바리 종의 판별 방법에 관한 것이다. 본 발명의 붉바리 종 판별용 프라이머 세트를 이용하면 붉바리 종 특이적인 확인이 가능하므로, 다른 유사 어종과 붉바리 종을 구별하는 데 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/124 (2013.01)

(72) 발명자

오홍식

제주특별자치도 서귀포시 대정읍 글로벌에듀로145
번길 46 104동 301호 (구역리, 캐논스빌리지1단지)

백혜자

부산시 남구 분포로 113 236동 401호

노충환

부산시 동래구 온천3동 아시아드대로 234 107동
1701호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 213004-04-1-CG600

부처명 농림축산식품부, 해양수산부, 농촌진흥청, 산림청

연구관리전문기관 농림수산물기술기획평가원

연구사업명 Golden Seed Project

연구과제명 수출용 붉바리 종자 개발

기 여 율 1/1

주관기관 제주대학교 산학협력단

연구기간 2013.05.02 ~ 2022.05.02

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 및 2의 염기서열로 이루어지는 붉바리 종(*Ephinephelus akaara*) 판별용 프라이머 세트.

청구항 2

제1항의 프라이머 세트와 이의 PCR 반응 혼합물을 포함하는 붉바리 종 판별용 PCR 키트.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 PCR 반응 혼합물은 dNTP, DNA 폴리머라아제 및 버퍼를 포함하는 것인 붉바리 종 판별용 PCR 키트.

청구항 4

1) 분석시료의 DNA를 추출하는 단계;

2) 서열번호 1 및 2의 염기서열로 이루어지는 프라이머 세트를 제작하는 단계;

3) 상기 단계 1)에서 추출된 DNA를 상기 프라이머 세트를 이용하여 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하는 단계; 및

4) 상기 단계 3)의 PCR 산물을 전기영동으로 분리하는 단계를 포함하는 붉바리 종 판별 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 PCR은 어닐링(annealing) 온도가 60-64℃인 것을 특징으로 하는 붉바리 종 판별 방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 단계 1)의 분석시료는 어류 자체, 또는 상기 어류가 포함된 것으로 예상되는 식품인 것을 특징으로 하는 붉바리 종 판별 방법.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 PCR 산물은 247 bp 인 것을 특징으로 하는 붉바리 종 판별 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 붉바리 중 판별용 PCR 프라이머 세트 및 이를 이용한 붉바리 중 판별 방법에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 붉바리는 농어목 바리과의 바닷물고기로, 제주에서는 붉바리이라고도 한다. 온수성 어류로 연안의 암초지대에 서식하며 연안정착성으로 바위구멍이나 바위틈새에 숨어 있다. 산란기는 6~8월이며, 우리나라에서는 주로 제주도 일대에서 포획된다. 흰살 생선으로 살이 담백하고 깨끗하며 씹는 맛이 좋아 바리과 어류 중에서 고급종으로 취급되나 그 수가 매우 적은 것으로 알려져 있다.

[0003] 붉바리 종에 대한 판정은 생체에 대한 육안 확인 방법 외에는 방법이 없으며, 회나 요리를 위해 원형이 변질된 이후에는 육안판독이 불가능한 실정이다. 한편, DNA 판독 기술은 생체, 사후 절개된 조직이나 조리된 음식물 내에서도 원료 종의 판독이 가능한 것으로 보고되어, 동물성 원료 종의 동정을 위해 DNA 정보에 기반한 PCR 기법을 응용한 연구들이 보고된 바 있다. 현재, 붉바리 종 동정용 유전자 진단법은 보고되어 있지 않다.

[0004] 미토콘드리아는 세포소기관의 일종으로 세포에 따라 적게는 수십 개에서 많게는 수천 개가 하나의 세포 내에 존재하고, 각각의 미토콘드리아는 적어도 하나 이상의 DNA 분자를 가지고 있어, 아주 적은 양의 시료만으로도 종을 동정할 수 있고, 어느 정도의 부패가 진행되거나 열처리 등에 의해 조직이 변성된 이후에도 확인이 가능하다. 또한 미토콘드리아 DNA의 서열이 종 사이에서 일정 수준 이상의 염기서열의 상동성을 나타내기 때문에, 종 동정 (species identification)을 위해 가장 많이 사용되고 있는 표적 분자이다. *COI* 유전자는 종 내에서의 변이가 미토콘드리아 유전체의 다른 영역보다 적고, 범용 프라이머 쌍으로 많은 종을 증폭해 낼 수 있다는 점에서 DNA barcoding에 이용되고 있어, PCR 증폭 상에서 오류가 생기더라도 서열의 확인을 통하여 종을 동정할 수 있다. 특히 본 발명에서 프라이머의 고안에 이용한 서열이 *COI* 유전자의 단백질 암호화 영역 내에 존재하기 때문에 삽입/결실에 의한 프라이머-주형 DNA의 결합 오류(primer-template DNA misannealing)의 확률이 매우 낮아 종 식별의 정확성이 높다.

[0005] 이에 본 발명에서는 미토콘드리아 유전체 내에서 어류 DNA barcoding에 이용하는 표준 DNA 분자인 *cytochrome c oxidase subunit I (COI)* 유전자의 서열 중 근연종인 자바리, 능성어와 완전히 식별되는 서열을 이용하여 프라이머를 개발하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 중국 공개특허공보 102373283 (2012.03.14)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 붉바리 중 판별용 프라이머 세트를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 붉바리 중 판별용 PCR 키트를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 붉바리 중 판별 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 서열번호 1 및 2의 염기서열로 이루어지는 붉바리 종(*Ephinephelus akaara*) 판별용 프라이머 세트를 제공한다.

[0011] 상기 프라이머 세트는 붉바리 종의 *COI* (*cytochrome c oxidase subunit I*) 유전자를 특이적으로 검출할 수 있는 것이다.

[0012] 상기 붉바리(*Ephinephelus akaara*, Red spotted grouper)는 바리과(Serranidae)에 속하는 어종이다.

- [0013] 상기 *COI*(*cytochrome c oxidase subunit I*) 유전자는 세포 소기관인 미토콘드리아의 유전자로, *COI* 유전자의 DNA는 모계로만 유전이 되기 때문에 종 내 보존력이 높아 종을 판별하는 표지로 이용된다.
- [0014] 상기 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 프라이머 세트는 붉바리의 *COI* 유전자의 일부인 247 bp를 증폭시키는 프라이머 세트일 수 있다.
- [0015] 본 명세서에서 사용된 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 핵산의 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 핵산 주형의 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머라아제)의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다.
- [0016] 또한, 본 발명은 제1항의 프라이머 세트와 이의 PCR 반응 혼합물을 포함하는 붉바리 종 판별용 PCR 키트를 제공한다.
- [0017] 상기 PCR 반응 혼합물에는 이 기술분야에서 널리 공지된 것은 어느 것이나 포함될 수 있다. 예를 들면, PCR 반응 혼합물은 dNTP, DNA 폴리머라아제 및 버퍼 등이 포함될 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0018] 또한, 본 발명은
- [0019] 1) 분석시료의 DNA를 추출하는 단계;
- [0020] 2) 서열번호 1 및 2의 염기서열로 이루어지는 프라이머 세트를 제작하는 단계;
- [0021] 3) 상기 단계 1)에서 추출된 DNA를 상기 프라이머 세트를 이용하여 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하는 단계; 및
- [0022] 4) 상기 단계 3)의 PCR 산물을 전기영동으로 분리하는 단계를 포함하는 붉바리 종 판별 방법을 제공한다.
- [0023] 상기 PCR은 어닐링(annealing) 온도가 60-64℃인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.
- [0024] 상기 단계 1)의 분석시료는 어류 자체일 수 있고, 바람직하게는 붉바리 종일 것으로 예상되는 어류 자체일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 붉바리 자체, 또는 상기 어류 또는 붉바리가 포함된 것으로 예상되는 식품일 수 있다.
- [0025] 상기 붉바리가 포함된 것으로 예상되는 식품은 붉바리를 재료로 하여 만들 수 있는 음식물을 모두 포함하며, 예를 들어, 회, 매운탕, 찜 등이 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0026] 상기 PCR 산물이 247 bp 이면 붉바리 종임을 확인할 수 있다.
- [0027] 상기 전기영동은 증폭 산물의 크기에 따라 아가로스 겔 전기영동 또는 아크릴아미드 겔 전기영동을 이용할 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0028] 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 연쇄반응(ligase chain reaction; LCR)(17, 18), Gap-LCR(WO 90/01069), 복구 연쇄반응(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 연쇄반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction; CPPCR)(미국 특허 제4,437,975호), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄반응(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(loop mediated isothermal amplification; LAMP)(23)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 사용 가능한 다른 증폭방법들은 미국특허 제

5,242,794, 5,494,810, 4,988,617호 및 미국 특허 제09/854,317호에 기술되어 있다.

발명의 효과

[0029] 본 발명의 붐바리 종 판별용 프라이머 세트를 이용한 붐바리 종 판별 방법은 어류의 생체 또는 조리된 음식물 내에서도 붐바리 종을 특이적으로 판별하는 것이 가능하므로 다른 유사 어종과 붐바리 종을 구별하는 데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 프라이머 세트를 이용하여 증폭한 PCR 산물의 DNA 서열과 프라이머의 결합 위치를 나타낸 도이다.

도 2는 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 프라이머 세트를 이용한 붐바리, 자바리, 능성어 각각의 종에서의 PCR 증폭 결과를 나타낸 도이다:

레인 M2, 100 bp DNA ladder;

레인 aka, 붐바리 DNA(247bp);

레인 bru, 자바리; 및

레인 sep, 능성어.

도 3은 Ivanova 등이 개발한 프라이머 cocktail mix을 이용한 붐바리, 자바리, 능성어 각각의 종에서의 PCR 증폭 비교 시험 결과를 나타낸 도이다:

레인 M1, 100bp DNA ladder;

레인 aka, 붐바리 DNA(697bp);

레인 bru, 자바리 DNA(697bp); 및

레인 sep, 능성어 DNA(697bp).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하, 본 발명을 하기 실시예에서 보다 상세하게 기술한다. 다만, 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아니다. 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다.

[0032] <실시예 1> 붐바리 종 특이적 프라이머의 제작

[0033] 붐바리 종(Epinephelus akaara)의 COI (cytochrome c oxidase subunit I) 유전자(GenBank:NC_011113.1)를 타겟으로 하여 Primer3 v. 0.4.0(<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>)를 이용하여 프라이머를 설계하였다. 설계된 프라이머는 HKG_F2(서열번호 1)와 HKG_R2(서열번호 2)로 명명하여(표 1), 제작을 의뢰(Cosmogenetech, Korea)하였으며 PCR 산물의 크기는 247bp 이었다.

표 1

서열번호	프라이머 명칭	방향	서열(5'→3')	결합 온도	PCR 산물 길이(bp)
서열번호 1	HKG_F2	정방향	GGTAGAAGCCGGCGCTGGTACTGGT	62℃	247
서열번호 2	HKG_R2	역방향	GAGGGACAGGAGCAGTAGCACC		

[0035] <실시예 2> 붉바리 종 특이적 프라이머의 특이성 측정

[0036] <2-1> 시료의 준비 및 DNA 추출

[0037] 붉바리(*Epinephelus akaara*), 자바리(*Epinephelus bruneus*), 능성어(*Epinephelus septemfasciatus*)는 각각 제주도와 통영, 부산에서 어획되거나, 양식 후 출하된 개체들을 구입하여 준비하였다. 상기 준비한 시료에서 혈액 0.05ml, 꼬리지느러미 0.05mg, 근육 1mg 등을 분리한 후 DNeasy Blood & Tissue Kit(Qiagen, USA)를 이용하여 붉바리, 자바리, 능성어 각각의 DNA를 추출하였다.

[0038] <2-2> 붉바리 종 특이적 프라이머를 이용한 PCR 증폭 시험

[0039] 제작한 프라이머의 붉바리 종 특이성을 확인하기 위하여, 붉바리, 자바리, 능성어 시료에서 추출한 DNA를 <실시예 1>에서 제작한 서열번호 1 및 서열번호 2의 서열로 이루어지는 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 각각 수행하였다.

[0040] 구체적으로, <실시예 2-1>에서 추출한 DNA 100ng과 10nanomole의 <실시예 1>에서 제작한 서열번호 1 및 서열번호 2의 서열로 이루어지는 프라이머 세트 및 0.4unit의 DNA 중합효소를 10X PCR buffer(GenetBio, Korea)에 각각 첨가하여 PTC-200 thermal cycler (MJ Research, USA)를 이용하여 증폭하였다. 반응조건은 95℃에서 3분간 초기변성한 후 95℃에서 30초 변성, 62℃에서 45초 어닐링, 72℃에서 45초 신장을 35회 수행하고 마지막으로 72℃에서 5분간 최종 신장시키는 조건으로 수행하였다. 이는 붉바리, 자바리, 능성어의 추출 DNA 각각에 대하여 수행되었다. PCR 증폭 산물은 아가로스겔 상에서 100 bp DNA 래더(ladder; Bioneer, Korea)와 함께 전기영동한 후, EtBr로 염색하여 관찰하였다.

[0041] 도 2에 나타난 것과 같이, 붉바리 종 특이적인 247bp PCR 산물이 붉바리(aka) DNA에서만 증폭되고, 자바리(bru)와 능성어(sep)에서는 증폭산물이 관찰되지 않았다. 따라서, 붉바리 종(*Epinephelus akaara*)에서만 특이성이 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[0042] <2-3> PCR 증폭 산물의 염기서열 분석

[0043] 실시예 <2-2>에서 얻은 PCR 증폭 산물의 DNA 염기서열을 확인하였다. 구체적으로, 247 bp의 증폭 산물을 회수하여 분리정제한 뒤, pCR™2.1-TOPO TA vector(Invitrogen, USA)에 삽입하였다. 삽입된 증폭 산물은 형질전환용 대장균 세포 TOP10에 형질도입한 뒤, 배양하였다. 세포를 선별하고 회수하여 플라스미드 DNA를 분리한 후, vector inner 프라이머인 M13 forward primer(서열번호 3)와 M13 reverse primer(서열번호 4)를 이용하여 염기서열을 분석하였다(표 2). 그 결과, 붉바리 종 *COI* 유전자 부위 247 bp의 증폭 산물의 염기서열을 도 1에 나타내었다.

표 2

[0044]

서열번호	프라이머 명칭	방향	서열(5'→3')
서열번호 3	M13 forward primer	정방향	GTA AAA CGA CGG CCA GT
서열번호 4	M13 reverse primer	역방향	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G

[0045] <2-4> PCR 증폭 산물 서열의 NCBI BLAST 검색

[0046] PCR 밴드에서 얻은 증폭산물의 서열을 DNA database인 NCBI의 nucleotide database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) 상에서 BLAST 검색을 수행하였다. 검색 결과, 최고 유사서열 100개 모두 붉바리 속(*Epinephelus*)의 *COI* 서열로 확인되었고, 99.0% 이상의 동일성을 나타낸 종은 모두 붉바리(*Epinephelus akaara*) 1종뿐이었으며, 종이 다른 경우는 최대 유사도가 95% 이하로 확인되었다.

[0047] 또한, 99.0% 이상의 동일성을 나타낸 붉바리 종 *COI* 서열들에서 염기의 삽입/결실은 전혀 발견되지 않아서 PCR 산물의 길이는 모두 247bp임을 알 수 있고, 프라이머가 결합하는 위치에서는 염기치환에 의한 변이도 관찰되지 않았다. 따라서 본 발명에서 고안한 프라이머를 이용한 PCR 산물의 서열은 붉바리 종 특이적인 것이며, 이를 이용한 붉바리 종 식별이 가능함을 확인할 수 있었다.

[0048] <비교예 1> 붉바리, 자바리, 능성어 공통의 프라이머를 이용한 PCR 증폭 시험 예

[0049] 어류의 *COI* 유전자 증폭을 위해 Ivanova N.V., Zemlak T.S., Hanner R., Hebert P.D.N.(2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. Molecular Ecology Notes 7, 544-548.)에 의해 고안된 프라이머 cocktail mix(VF2_t1:FishF2_t1:FishR2_t1:FR1d_t1=1:1:1:1)를 이용하여 붉바리, 자바리, 능성어에서 PCR 증폭 시험을 하였다. VF2_t1(서열번호 5), FishF2(서열번호 6), FishR2_t1(서열번호 7), 및 FR1d_t1(서열번호 8) 프라이머의 구체적인 서열은 하기 표 3에 나타내었다.

[0050] 구체적으로, <실시예 2-1>에서 얻은 DNA 100ng과 상기 프라이머 cocktail mix 10nanomole 및 0.4unit의 DNA 증합효소를 10X PCR buffer(GenetBio, Korea)에 각각 첨가하여 PTC-200 thermal cycler (MJ Research, USA)를 이용하여 증폭하였다. 반응조건은 95℃에서 3분간 초기변성한 후 94℃에서 1분 변성, 50℃에서 1초 어닐링, 72℃에서 1분 신장을 35회 수행하고 마지막으로 72℃에서 10분간 최종 신장시키는 조건으로 수행하였다. 이는 붉바리, 자바리, 능성어의 추출 DNA 각각에 대하여 수행되었다. PCR 증폭 산물은 아가로스겔 상에서 100 bp DNA 래더(ladder; Bioneer, Korea)와 함께 전기영동한 후, EtBr로 염색하여 관찰하였다.

[0051] PCR 증폭 결과, 3종 모두 동일한 위치에서 697 bp의 PCR 산물이 관찰되었다(도 3). 따라서, 어류의 *COI* 유전자를 타겟으로 하는 기존의 프라이머 세트를 이용하여서는 붉바리 종을 자바리 종 및 능성어 종과 구별할 수 없었다. 반면, 본 발명의 프라이머 세트는 붉바리 종을 유사종인 자바리, 능성어 종과 구별할 수 있다는 점에서 우수한 종 특이성을 가진다.

표 3

[0052]

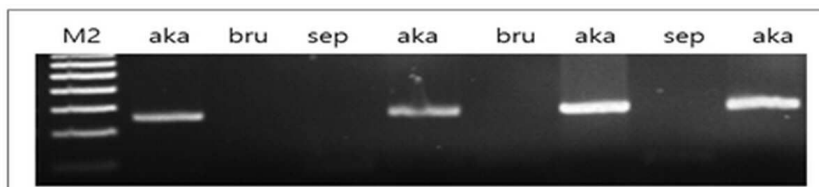
서열번호	프라이머 명칭	서열(5'→3')	결합 온도	PCR 산물 길이(bp)
5	VF2_t1	TGTAACGACGGCCAGTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	52℃	697
6	FishF2_t1	TGTAACGACGGCCAGTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC		
7	FishR2_t1	CAGGAACAGCTATGACACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA		
8	FR1d_t1	CAGGAACAGCTATGACACCTCAGGGTGTCGAARAAYCARAA		

도면

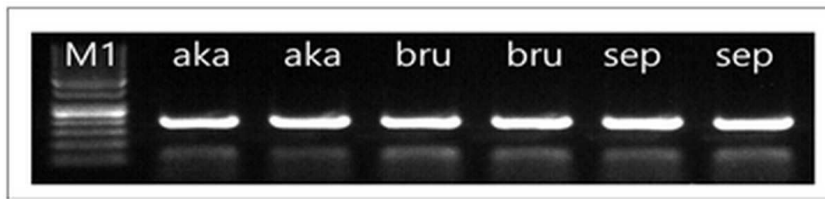
도면1

ggtagaagccggcgctggtactggt (HKG_F2 (5'→3'))
 GGTAGAAGCCGGCGCTGGTACTGGTTGAACAGTTTACCCCTCTAGCAGGAAACCTGGCCCATGCAGGTGCATCTGTAGACC
 TAACTATTTTCTCCCTACATCTGTCAGGGATTT CAT CAATTCTAGGGCAATTAAC TTCATTACAACCATCATCAACATGAAA
 CCCCCGCCACCTCTCAGTATCAAACACCCCTTGTGTATGGGTGTCTAATTACAGCGGTGCTACTGCTCCTGTCCCTC
 (HKG_R2 (5'→3')) gagggacaggagcagtagcacc

도면2



도면3



서열 목록

- <110> Jeju National University Industry-Academic Cooperation Foundation
Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation
Korea Institute of Ocean Science and Technology
- <120> PCR primer set for identifying red spotted grouper, and method
for identifying using the same
- <130> P14U19D0588
- <160> 8
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 25
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> HKG_F2
- <400> 1
- ggtagaagcc ggcgctggta ctggt 25
- <210> 2
- <211> 22
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> HKG_R2
- <400> 2
- gagggacagg agcagtagca cc 22
- <210> 3
- <211> 17
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> M13 forward primer
- <400> 3

gtaaaacgac ggccagt	17
<210> 4	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> M13 reverse primer	
<400> 4	
ggaaacagct atgacatg	19
<210> 5	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> VF2_t1	
<400> 5	
tgtaaaacga cggccagtca accaaccaca aagacattgg cac	43
<210> 6	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> FishF2_t1	
<400> 6	
tgtaaaacga cggccagtcg actaatcata aagatatcgg cac	43
<210> 7	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> FishR2_t1	
<400> 7	
caggaaacag ctatgacact tcagggtgac cgaagaatca gaa	43
<210> 8	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> FR1d_t1

<400> 8

caggaaacag ctatgacacc tcagggtgtc cgaaraayca raa

43