



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년01월20일

(11) 등록번호 10-2491092

(24) 등록일자 2023년01월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6888 (2018.01) C12Q 1/6858 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6888 (2018.05)

C12Q 1/6858 (2018.05)

(21) 출원번호 10-2021-0107914

(22) 출원일자 2021년08월17일

심사청구일자 2021년08월17일

(56) 선행기술조사문헌

KR102243942 B1

KR1020170122599 A

KR1020180029802 A

KR102206211 B1

기술이전 희망 : 기술양도

(73) 특허권자

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)

(주)더모아젠

대전광역시 유성구 대학로76번안길 19-12, 4층402호(궁동)

(72) 발명자

김군도

부산광역시 남구 분포로 113, 225동 704호(용호동, 엘지메트로시티)

최미진

부산광역시 사하구 비봉로 37, 102동 909호 (신평동, 삼창강변아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 이효진

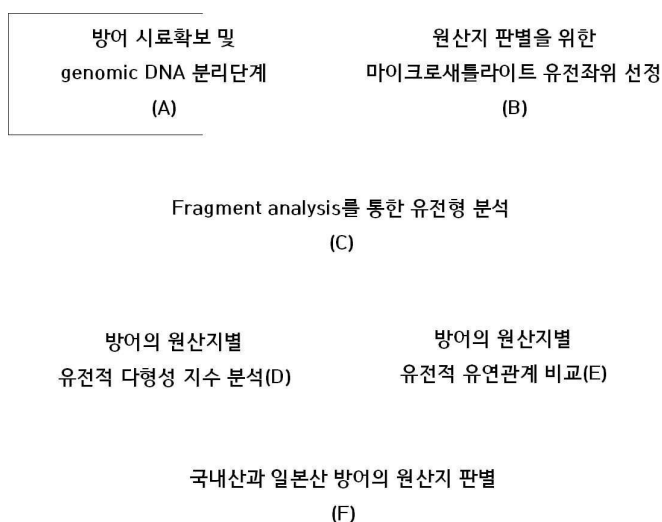
(54) 발명의 명칭 방어 원산지 판별용 마이크로세틀라이트 마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 국내에서 유통되는 일본산, 국내산 방어의 원산지 식별을 위한 마이크로세틀라이트 마커의 개발과 이를 이용한 원산지 판별에 관한 방법에 관한 것이다.

본 발명은 효과적인 방어의 원산지 판별을 위해 genotyping by sequencing 방법을 토대로 새롭게 개발된 마커 (뒷면에 계속)

대표도 - 도1



로새틀라이트 마커의 조합을 이용하여 방어의 집단별 유전형분석을 수행하는 것을 특징으로 하는 국내산 방어 및 일본산 방어 판별 방법에 관한 것이다.

본 발명은 마이크로새틀라이트 마커와 원산지별 집단 유연관계 분석 방법을 포함하며 이를 통하여 국내에서 유통되는 국내산과 일본산 방어를 구분할 수 있다. 뿐만 아니라 본 발명은 방어 활어의 경우에 소량의 지느러미 조직을 이용하여 개체를 희생시키지 않고도 효과적으로 원산지 판별할 수 있는 새로운 8개의 마이크로새틀라이트 마커와 이를 이용한 국내산과 일본산 방어의 원산지 판별 방법을 제공하는데 있다.

(52) CPC특허분류

C12Q 2600/124 (2013.01)

(72) 발명자

김종오

부산광역시 기장군 정관읍 정관3로 52, 103동 504호(정관신도시 롯데캐슬)

유승현

경상남도 양산시 물금읍 신주로 40, 109동 803호(우남퍼스트빌)

서용배

부산광역시 남구 용호로216번가길 10, 107동 1104호(용호동, 용호예가)

양지영

부산광역시 남구 수영로 345, 106동 1701호(대연동, 대연힐스테이트푸르지오)

김무상

부산광역시 동구 자성로116번길 2, 103동 2602호(범일동, 두산위브포세이돈Ⅱ)

강태욱

서울특별시 양천구 목동중앙로 143, 101동 406호(목동, 목동1차우성아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1525010911

과제번호 202004252

부처명 해양수산부

과제관리(전문)기관명 해양수산과학기술진흥원

연구사업명 차세대수산물품질관리및검역시스템구축(R&D)

연구과제명 수산생물 원산지 판별기술 및 현장단속 키트개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 부경대학교산학협력단

연구기간 2021.01.07 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

SqMS17, SqMS24, SqMS32, SqMS33, SqMS35, SqMS36, SqMS43 및 SqMS45로 이루어진 군에서 선택된 1개 이상의 국내산과 일본산 방어 판별용 마이크로새틀라이트 마커 세트.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 SqMS17은 서열번호 1로 표시되는 것이고, SqMS24는 서열번호 2로 표시되는 것이며, SqMS32는 서열번호 3으로 표시되는 것이고, SqMS33은 서열번호 4로 표시되는 것이며, SqMS35는 서열번호 5로 표시되는 것이고, SqMS36은 서열번호 6으로 표시되는 것이며, SqMS43은 서열번호 7로 표시되는 것이고, SqMS45는 서열번호 8로 표시되는 것을 특징으로 하는 국내산과 일본산 방어 판별용 마이크로새틀라이트 마커 세트.

청구항 3

SqMS17 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 9 및 10으로 표시되는 프라이머 쌍;

SqMS24 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 11 및 12로 표시되는 프라이머 쌍;

SqMS32 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 13 및 14로 표시되는 프라이머 쌍;

SqMS33 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 15 및 16으로 표시되는 프라이머 쌍;

SqMS35 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 17 및 18로 표시되는 프라이머 쌍;

SqMS36 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 19 및 20으로 표시되는 프라이머 쌍;

SqMS43 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 21 및 22로 표시되는 프라이머 쌍;

SqMS45 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 23 및 24로 표시되는 프라이머 쌍으로 이루어진 국내산과 일본산 방어 판별용 프라이머 세트.

청구항 4

제 3항의 프라이머 세트를 포함하는 국내산과 일본산 방어 판별용 키트.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 키트는 완충용액 및 DNA 중합효소를 포함하는 것인 키트.

청구항 6

(a) 분석하고자 하는 방어의 핵산 시료를 제 3항의 프라이머 세트를 이용하여 PCR 증폭하는 단계;

(b) 상기 (a) 단계에서 증폭된 산물의 각 좌위의 대립유전자를 분석하여 방어의 유전적 다양성을 분석하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 국내산과 일본산 방어 판별 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 유전적 다양성을 분석하는 단계는 방어 시료의 유전자좌당 대립유전자수, 관측이형접합률, 기대이형접합률, 다형정보지수, 대립유전자 풍부도 및 근친교배계수 중에서 선택된 하나 이상을 분석하는 것을 특징으로 하는 국내산과 일본산 방어 판별 방법.

청구항 8

- (a) 분석하고자 하는 방어의 핵산 시료를 제 3항의 프라이머 세트를 이용하여 PCR 증폭하는 단계;
- (b) 상기 (a) 단계에서 증폭된 산물의 각 좌위의 대립유전자를 분석하여 방어의 원산지별 유전적 유연관계를 비교하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 국내산과 일본산 방어 판별 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 원산지별 유전적 유연관계를 비교하는 단계는 Pairwise Fst 값, PCoA 결과 및 genotype likelihood matrix 분석결과 중에서 선택된 하나 이상을 비교하는 것을 특징으로 하는 국내산과 일본산 방어 판별 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 방어(*Seriola quinqueradiata*) 국내산과 일본산 판별이 가능한 마이크로새틀라이트 마커(microsatellite marker) 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 방어(*Seriola quinqueradiata*)는 전갱이목(*Carangiformes*) 전갱이과(*Carangidae*)에 속하는 온대성 어류로 우리나라 동해안, 일본, 대만, 하와이에 걸쳐 분포하며 수심 100m 이내에 서식하는 육식성 어종이다. 방어는 횃감, 선어회로서 겨울철 고급횃감으로 소비되는 경제적으로 중요한 어종이며 일본, 중국, 호주, 대만 등이 주생산국이다. 방어를 가장 많이 생산하는 국가는 일본이며 일본에서는 1960년대부터 자연에서 채집한 치어를 하여 중간양성하거나 또는 인공종묘생산을 통하여 꾸준히 양식되어 왔다. 국내에서는 1980년대부터 중간양성법을 통하여 방어를 생산하여 왔으며 2019년 어업을 통해 15,928톤(694억원)의 방어를 생산하였으며 양식생산량은 650톤(78억원)인 것으로 나타났다(대한민국 통계청). 현재 우리나라의 방어 수입량은 2015년 약 298톤(약 2,183,000달러)에서 2019년에는 약 2,240톤(약 20,278,000달러)으로 약 10배 증가하였으며, 국내에 유통되는 수입산 방어는 대부분 일본으로부터 수입되고 있다(대한민국 통계청). 하지만 국내산과 일본산 방어는 육안으로 식별이 어려워 이에 따른 일본산 어류에 대한 우려와 안전한 수산물 먹거리에 대한 수요가 증가하고 있는 실정이며 일부 부도덕한 유통업자들이 일본산을 국내산으로 둔갑시켜 유통하려는 사례가 발생하고 있기 때문에 부정유통을 방지하기 위한 수입, 검역과정에서의 객관적인 방어 원산지 감식 기준과 기법이 필요하다.
- [0003] DNA의 유전자 정보를 토대로 하여 수산물의 품종 판별 또는 집단 유전적 유연관계 분석에 쓰이는 대표적인 방법으로 마이크로새틀라이트(Microsatellite, MS) 마커, restriction fragment length polymorphism(RFLP), allozyme, mitochondrial DNA, random amplified polymorphic DNA(RAPD), amplified fragment length polymorphism(AFLP), single nucleotide polymorphism(SNP)등이 개발되어 왔다.
- [0004] 본 연구에서는 마이크로새틀라이트 마커 분석 방법으로 국내산과 일본산 방어의 원산지를 구분하는 방법을 개발하였다. 마이크로새틀라이트 마커는 1990년대부터 유전학에서 유전적 유연관계 분석에 널리 사용되는 분자마커로서 1에서 6개의 짧은 염기쌍(base pair, bp) 서열이 여러 번 반복되어 나타나는 DNA상 좌위로서 simple sequence repeat(SSR)이라고도 한다. 마이크로새틀라이트 마커는 멘델의 유전법칙을 따르며 높은 다형성(polymorphism)과 재현성(reproductivity)을 가지기 때문에 1990년대부터 포유류, 식물 등을 포함하는 다양한 생물체를 대상으로 한 혈통, 집단 유전적 관계 분석, 친자확인, 개체식별을 위한 유전형(genotyping) 분석 기술로서 이용되고 있으며 2000년 이후부터 소, 돼지, 연어 등의 동물에서 품종식별, 원산지 판별에 적용되는 유용한 분자마커이다.
- [0005] 본 발명자들은 국내산과 일본산 방어를 판별하기 위한 분자마커로서 GBS 정보를 활용하여 새로운 8개의 마이크로새틀라이트 마커를 개발하였으며 이를 통해 일본산, 국내산 방어의 유전형을 분석하여 유전적 다양성, 유전적 거리를 비교하는 방법을 개발하였다. 또한 효율적으로 원산지를 판별하기 위한 방법으로서 8개의 마커 가운데 5개(SqMS32, SqMS33, SqMS36, SqMS43, SqMS45) 또는 3개(SqMS32, SqMS36, SqMS43)의 마이크로새틀라이트 조합을 통해 방어의 유전형을 분석하였을 경우에 원산지 판별이 가능함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) KR 20120065147 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 국내에서 유통되는 국내산 방어와 일본산 방어를 식별하기 위한 새로운 마이크로새틀라이트 마커와 이를 활용한 유전형 분석을 통하여 원산지를 효과적으로 판별할 수 있는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 SqMS17, SqMS24, SqMS32, SqMS33, SqMS35, SqMS36, SqMS43 및 SqMS45로 이루어진 군에서 선택된 1개 이상의 방어 원산지 판별용 마이크로새틀라이트 마커를 제공한다.

[0009] 본 발명의 일 실시예에 있어서, “마이크로새틀라이트 마커”는 SqMS17은 서열번호 1로 표시되는 것이고, SqMS24는 서열번호 2로 표시되는 것이며, SqMS32는 서열번호 3으로 표시되는 것이고, SqMS33은 서열번호 4로 표시되는 것이며, SqMS35는 서열번호 5로 표시되는 것이고, SqMS36은 서열번호 6으로 표시되는 것이며, SqMS43은 서열번호 7로 표시되는 것이고, SqMS45는 서열번호 8로 표시되는 것을 특징으로 한다.

[0010] 또한 본 발명은 SqMS17 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 9 및 10으로 표시되는 프라이머 세트; SqMS24 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 11 및 12로 표시되는 프라이머 세트; SqMS32 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 13 및 14로 표시되는 프라이머 세트; SqMS33 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 15 및 16으로 표시되는 프라이머 세트; SqMS35 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 17 및 18로 표시되는 프라이머 세트; SqMS36 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 19 및 20으로 표시되는 프라이머 세트; SqMS43 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 21 및 22로 표시되는 프라이머 세트; SqMS45 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 23 및 24로 표시되는 프라이머 세트로 구성되는 군으로부터 선택되는 1쌍 이상의 방어 원산지 판별용 프라이머 세트를 제공한다.

[0011] 또한 본 발명은 상동의 프라이머 세트를 포함하는 방어 원산지 판별용 키트를 제공한다.

[0012] 본 발명의 일 실시예에 있어서, “방어 원산지 판별용 키트”는 완충용액 및 DNA 중합효소를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0013] 또한 본 발명은 분석하고자 하는 방어의 핵산 시료를 상동의 프라이머 세트를 이용하여 PCR 증폭하는 단계; 상기 단계에서 증폭된 산물의 각 좌위의 대립유전자를 분석하여 방어의 유전적 다양성을 분석하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방어 원산지 판별 방법을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일 실시예에 있어서, “방어 원산지 판별 방법”은 유전적 다양성을 분석하는 단계에 있어서 방어 시료의 유전자좌당 대립유전자수, 관측이형접합률, 기대이형접합률, 다형정보지수, 대립유전자 풍부도 및 근친교배계수 중에서 선택된 하나 이상을 분석하는 것을 특징으로 하는 것 일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0015] 또한 본 발명은 분석하고자 하는 방어의 핵산 시료를 상동의 프라이머 세트를 이용하여 PCR 증폭하는 단계; 상기 단계에서 증폭된 산물의 각 좌위의 대립유전자를 분석하여 방어의 원산지별 유전적 유연관계를 비교하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방어 원산지 판별 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, “방어 원산지 판별 방법”은 방어의 원산지별 유전적 유연관계를 비교하는 단계에 있어서 Pairwise Fst 값, PCoA 결과 및 genotype likelihood matrix 분석결과 중에서 선택된 하나 이상을 비교하는 것을 특징으로 하는 것 일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에서 제공하는 마이크로새틀라이트 개발과 이를 이용한 원산지 판별 방법은 소량의 지느러미 조직을 이

용하여 효과적이고 경제적인 방법으로 일본산, 국내산 방어의 유전적 거리 및 집단 분석을 수행하는 것으로서 원산지 판별이 가능함을 나타낸다. 따라서 본 발명을 이용해 유통 과정상 발생하는 부정행위를 단속할 수 있을 뿐만 아니라 수산물 원산지 관리에 대한 국민의 신뢰도 상승 및 어가 소득 증대에 도움을 줄 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 마이크로새틀라이트 마커를 이용하여 국내산, 일본산 방어를 판별하기 위한 방법을 설명하기 위한 도이다.
- 도 2는 GBS 데이터를 통해 새롭게 개발된 69개의 마이크로새틀라이트 마커의 적합성을 확인하고자 국내산 방어 및 일본산 방어 각 3 개체의 genomic DNA를 주형으로 하여 PCR 반응을 수행하고 그 산물을 아가로스 겔 전기영동 방법으로 확인한 결과에 대한 도이다.
- 도 3은 선정된 8개의 마이크로새틀라이트 마커를 이용해 국내산 방어 및 일본산 방어 내의 각 유전자 좌위를 증폭하고 그 PCR 산물의 DNA fragment 크기를 분석한 결과에 대한 도이다.
- 도 4는 DNA fragment 모세관전기영동법(capillary electrophoresis)을 통해 분석된 각각 8개의 마이크로새틀라이트 마커 좌위에 대한 국내산 방어 및 일본산 방어의 유전자형의 allele frequency를 나타낸 결과에 대한 도이다.
- 도 5는 8개의 각 마이크로새틀라이트에 대한 국내산 방어 및 일본산 방어의 유전적 변이 분포 및 관계를 나타내는 PCoA분석 결과에 대한 도이다.
- 도 6은 8개의 마이크로새틀라이트 마커 분석 결과를 바탕으로 Arlequin을 통해 국내산 방어 및 일본산 방어의 유전적 유연관계를 나타내는 genotype likelihood 산출값(도 6a)과 PCoA분석 결과(도 6b)를 도표화한 결과에 대한 도이다.
- 도 7은 Fst 값이 가장 높은 5개의 마이크로새틀라이트 마커 조합(SqMS32, SqMS33, SqMS36, SqMS43, SqMS45) 분석 결과를 바탕으로 Arlequin을 통해 국내산 방어 및 일본산 방어의 유전적 유연관계를 나타내는 genotype likelihood 산출값(도 7a)과 pCoA분석 결과(도 7b)에 대한 도이다.
- 도 8은 선정된 3개의 마이크로새틀라이트 마커 조합(SqMS32, SqMS36, SqMS43) 분석 결과를 바탕으로 arlequin을 통해 국내산 방어 및 일본산 방어의 유전적 유연관계를 나타내는 genotype likelihood 산출값(도 8a)과 PCoA분석 결과(도 8b)에 대한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0020] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0021] 본 발명은 SqMS17, SqMS24, SqMS32, SqMS33, SqMS35, SqMS36, SqMS43 및 SqMS45로 이루어진 군에서 선택된 1개 이상의 방어 원산지 판별용 마이크로새틀라이트 마커 제공을 목적으로 한다.
- [0022] 본 발명의 용어 ‘마이크로새틀라이트 마커’는 유전학에서 유전적 유연관계 분석에 널리 사용되는 분자마커로서 1에서 6개의 짧은 염기쌍(base pair, bp) 서열이 여러 번 반복되어 나타나는 DNA상 좌위로서 simple sequence repeat(SSR)이라고도 한다. 높은 다형성(polymorphism)과 재현성(reproductivity)을 가지기 때문에 다양한 생물체를 대상으로 한 혈통, 집단 유전적 관계 분석, 친자확인, 개체식별을 위한 유전형(genotyping) 분석 기술로서 이용되고 있으며 2000년 이후부터 소, 돼지, 연어 등의 동물에서 품종식별, 원산지 판별에 적용되는 유용한 분자마커이다.

- [0023] 본 발명은 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 9 및 10, 11 및 12, 13 및 14, 15 및 16, 17 및 18, 19 및 20, 21 및 22, 23 및 24의 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 쌍으로 구성되는 군으로부터 선택되는 1쌍 이상의 방어 원산지 판별용 프라이머 제공을 목적으로 한다.
- [0024] 본 발명의 용어 ‘프라이머(primer)’란 짧은 염기서열로 구성된 단일 가닥의 핵산 서열로 PCR 또는 DNA 합성에 있어서 주형(template)가닥에 상보적인 수소결합을 하여 시작점을 제공하는 역할을 한다.
- [0025] 또한 상기 8개의 마이크로새틀라이트 마커를 표적으로 한 PCR 산물들의 크기를 모세관전기영동법을 통해 결정함으로써 국내산과 일본산 방어의 유전자형을 분석하는 것을 특징으로 한다.
- [0026] 상기 8개의 마이크로새틀라이트 마커를 활용하여 유전형을 분석하고 방어의 원산지를 판별하는 방법에는 SqMS17를 증폭하는 서열번호 9 및 10의 프라이머, SqMS24를 증폭하는 서열번호 11 및 12의 프라이머, SqMS32를 증폭하는 서열번호 13 및 14의 프라이머, SqMS33를 증폭하는 서열번호 15 및 16의 프라이머, SqMS35를 증폭하는 서열번호 17 및 18의 프라이머, SqMS36를 증폭하는 서열번호 19 및 20의 프라이머, SqMS43를 증폭하는 서열번호 21 및 22의 프라이머, SqMS45를 증폭하는 서열번호 23 및 24의 프라이머가 포함된다.
- [0027] 또한, 본 발명의 프라이머는 형광물질로 표지될 수 있으며 서열번호 9 내지 24까지의 프라이머가 추가 또는 제외될 수도 있다.
- [0028] 본 발명은 마이크로새틀라이트 마커의 특이적인 서열번호 9 및 10, 11 및 12, 13 및 14, 15 및 16, 17 및 18, 19 및 20, 21 및 22, 23 및 24의 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 쌍으로 구성되는 군으로부터 선택되는 1쌍 이상의 방어 원산지 판별용 프라이머를 포함하는 방어 원산지 판별용 키트 제공을 목적으로 한다.
- [0029] 본 발명은 분석하고자 하는 방어의 핵산 시료를 SqMS17, SqMS24, SqMS32, SqMS33, SqMS35, SqMS36, SqMS43 또는 SqMS45로 이루어진 마이크로새틀라이트 마커 조성물에 특이적이며 서열번호 9 내지 24로 표시되는 염기서열로 이루어진 프라이머를 이용하여 PCR 증폭하는 단계; 상기 단계에서 증폭된 산물의 각 좌위의 대립유전자를 분석하여 방어의 유전적 다양성을 분석하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방어 원산지 판별 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0030] 마지막으로 본 발명은 분석하고자 하는 방어의 핵산 시료를 SqMS17, SqMS24, SqMS32, SqMS33, SqMS35, SqMS36, SqMS43, SqMS45로 이루어진 마이크로새틀라이트 마커 조성물에 특이적이며 서열번호 9 내지 24로 표시되는 염기서열로 이루어진 프라이머를 이용하여 PCR 증폭하는 단계; 상기 단계에서 증폭된 산물의 각 좌위의 대립유전자를 분석하여 방어의 원산지별 유전적 유연관계를 비교하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방어 원산지 판별 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0031] 즉, 8개의 마이크로새틀라이트를 바탕으로 하여 유전적 다형성 지수를 분석하는 방법과 유전적 거리 계산 프로그램을 통한 유전적 거리를 비교하여 원산지를 판별하는 방법을 포함한다.
- [0032] 또한 8개 마이크로새틀라이트 마커 중 5개의 마이크로새틀라이트 마커(SqMS32, SqMS33, SqMS36, SqMS43, SqMS45) 조합과 3개의 마이크로새틀라이트 마커(SqMS32, SqMS36, SqMS43) 조합을 이용한 유전자형을 분석할 수 있다.
- [0033] 상기 5개의 마이크로새틀라이트 마커를 이용해 방어의 원산지를 판별하는 방법에는 SqMS32를 증폭하는 서열번호 13 및 14의 프라이머, SqMS33를 증폭하는 서열번호 15 및 16의 프라이머, SqMS36를 증폭하는 서열번호 19 및 20의 프라이머, SqMS43를 증폭하는 서열번호 21 및 22의 프라이머, SqMS45를 증폭하는 서열번호 23 및 24의 프라이머가 포함된다.
- [0034] 3개의 마커를 이용해 방어의 원산지를 판별하는 방법에는 SqMS32를 증폭하는 서열번호 13 및 14의 프라이머, SqMS36를 증폭하는 서열번호 19 및 20의 프라이머, SqMS43를 증폭하는 서열번호 21 및 22의 프라이머가 포함된다.
- [0035] 또한 상기 5개와 3개의 마이크로새틀라이트 마커 조합을 바탕으로 하여 유전적 다형성 지수를 분석하는 방법과 유전적 거리 계산 프로그램을 통한 유전적 관계를 비교 분석하는 방법을 통하여 원산지를 판별하는 방법을 포함한다.
- [0036] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명

이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0038] 실시예 1. 마이크로새틀라이트 마커를 이용한 국내산, 일본산 방어의 원산지 판별 방법 개발

[0039] 본 발명에 따른 마이크로새틀라이트 마커를 이용한 국내산, 일본산 방어의 원산지 판별 방법은 방어 시료 확보 및 genomic DNA 분리, genotyping by sequencing을 통한 방어 원산지 판별용 마이크로새틀라이트 유전좌위 선정, 선정된 8개의 마이크로새틀라이트 마커를 이용하여 fragment analysis를 통한 방어 개체별 유전형 분석, 확보한 정보를 토대로 하여 방어의 원산지별 유전적 다형성 지수 분석, 방어의 원산지별 유전적 유연관계 비교, 국내산, 일본산 방어의 원산지 판별로 이루어진다(도 1).

[0041] 실시예 2. 방어 시료 확보 및 genomic DNA 분리

[0042] 원산지 판별을 위한 유전형(genotyping) 분석에 쓰인 국내산 방어 90마리는 부산 자갈치, 통영, 포항의 어시장에서 구입하였으며 일본산 방어 90마리는 수산물 전문 수입업체를 통해 구입하였다. 방어의 각 개체별 지느러미 또는 근육 조직을 샘플링 하여 분석 전까지 -80° C의 초저온냉동고에서 보관하였다. 절단된 약 0.5cm의 지느러미 또는 근육으로부터 지느러미 또는 근육으로부터 genomic DNA를 추출, 정제하기 위해 AccuPrep® Genomic DNA Extraction 키트(Bioneer, Korea)를 이용하였으며 사용 전 이를 회석하여 10ng/μl의 농도로 일정하게 조정하였다.

[0044] 실시예 3. 방어 원산지판별을 위한 마이크로새틀라이트 유전좌위 선정

[0045] GBS(Genotyping by sequencing) 라이브러리 구축을 통한 새로운 마이크로새틀라이트 마커 후보군을 확보하기 위해 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 GCA_002217815.1(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_002217815.1/) assembly를 레퍼런스로 이용하여 96개체(국내산 방어 48개체, 일본산 방어 48개체)를 분석하였다. GBS reads로부터 얻은 데이터베이스로부터 2826개의 마커를 확보하였으며 이 가운데 국내산과 일본산 방어 판별을 위한 69개의 후보 마이크로새틀라이트 마커를 선정하였다. 선별된 69개의 마이크로새틀라이트 마커의 적합성을 확인하기 위하여 국내산 3마리, 일본산 3마리의 방어 genomic DNA를 주형으로 한 PCR반응을 수행하여 1차 적합성 확인을 하였다.

[0046] 구체적인 PCR 반응조건으로, 주형 genomic DNA(10ng/μl) 1 μl, forward 프라이머(10 pmol) 1 μl, reverse 프라이머 (10 pmol) 1 μl, Genetbio사의 Prime Taq Premix(2X) 10 μl를 혼합한 조성액에 증류수를 첨가하여 최종 부피를 20 μl로 조정하였다. PCR 기기는 SimpliAmp™ Thermal Cycler(Applied biosystems)를 이용하였으며, PCR 반응의 온도 조건으로는 95° C에서 5분간 반응시킨 후, 94° C에서 30초, 60° C에서 30초, 72° C에서 1분간으로 구성된 반응조건을 1 사이클로 설정하여 40회 반복하였다. 그 후 72° C에서 7분간 연장(extension) 반응 후 PCR 산물 2μl를 2% 아가로스 겔에 전기영동하여 확인하였다(도 2). 전기영동 결과를 통해 PCR 산물의 크기 차이가 확인된 8개의 마이크로새틀라이트 유전좌위가 선정되었으며 이를 fragment analysis에 이용하였고 각 마커 및 프라이머에 대한 정보는 표 1 및 표 2에 요약하였다.

표 1

Locus	ID	Repeat motif	서열번호	염기서열	Size(bp)	Tm	Ta
SqMS17	seq_35676434	(AT) ₆	1	TGAACAGACCACTGTTACGCTCTGATATATATATA TACACACACATATATCCTCAGCCG	129-143	60.3	60
SqMS24	seq_36178528	(GT) ₈	2	TGTGTTTGAATTGGTTGTGTAGGAGTGTGTGTGT GTGTGTTGTATGTGTGGGATGGGCTCGACA	108-142	57.1	60
SqMS32	seq_11310468	(GAT) ₆	3	ACAGGCCCTGAAAGGTACGGTAACAGATGATGATG ATGATGATGTCACGGGGCTAATCGGGCTTTCT	111-133	61.3	60
SqMS33	seq_48953288	(ATG) ₈	4	AGCTGTTGCTCCTCTCATAACCGACATGATGATGA TGATGATGATGATGATACTGTCTGATGGATGCAGAGTTT	110-132	60.7	60
SqMS35	seq_19509187	(TC) ₁₁	5	AAATGTGCTGTCTATCCCTACCTCATCTCTCTCTC TCTCTCTCTCTCTGGGCTGTAGTTGTAGATTGTGT	97-103	60.1	60
SqMS36	seq_22704166	(AC) ₉	6	AATTTAAGAGGCAGGACATGGAATACACACACAC ACACACACATTCATCTGCTCTCTGGGGGGTCA	94-112	60.1	60
SqMS43	seq_62713477	(GT) ₂₀	7	AAGGTAAGGTGCACGGTATCATCAGTGTGTGTGT GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT TATGTGGGGTGCTGAGACTG	89-139	59.9	60

SqMS45	seq_6751989 4	(CA) ₁₇	8	ATCACCGCCCTCAATCTGAGAGACTCACACACACA CACACACACACACACACACAAACACATCCCC TTTTTTCACATCAA	121-150	59.7	60
--------	------------------	--------------------	---	--	---------	------	----

표 2

[0050]

Locus	서열번호	프라이머 서열
SqMS17	9	F: 5' - TGGCCCTGCTTCACATTGAT
	10	R: 5' - ACGGTGAGGATATATGTGTGT
SqMS24	11	F: 5' - ACGTCACAAACAGCTCACCT
	12	R: 5' - TCGAGCCCATCCACACAT
SqMS32	13	F: 5' - GCAGGAGGCAAAGAGAGGAG
	14	R: 5' - TAAGATCTGGCTTGCAGCGG
SqMS33	15	F: 5' - CACCAGTCCAGACAGAACCC
	16	R: 5' - TGAAACTCTGCATCCATCAGACA
SqMS35	17	F: 5' - TTCTTGCAAAGCTGTGTGAGT
	18	R: 5' - CGGATGACCACAATCTACAAC
SqMS36	19	F: 5' - ATTTAAGAGGCAGGACATGGAA
	20	R: 5' - TCCTCCTACTGAGCATCCCA
SqMS43	21	F: 5' - GCGTGTCTCTGTGGAGCAA
	22	R: 5' - TCAGTCTCAGCACCCACAT
SqMS45	23	F: 5' - ACCTCTGCACTGCTAGCTTC
	24	R: 5' - ACACAGAAAACAGACACACC

[0052]

실시예 4. Fragment analysis를 통한 유전형 분석

[0053]

실시예 3에서 선정된 8개의 마이크로새틀라이트 마커를 이용해 국내산 방어 90개체, 일본산 방어 90개체의 집단별 유전적 다양성을 확인하기 위한 fragment analysis를 진행하였다. 각 마커에 특이적인 5'-Fam(6-FAM)이 표시된 프라이머를 합성하여 PCR에 이용하였으며 PCR 산물은 capillary array가 장착된 ABI3730xL Genetic Analyzer(Applied Biosystems, USA)을 이용하여 유전자형을 분석하였으며 GeneMapper software 5(Applied Biosystems, CA, USA)를 이용하여 대립유전자들의 크기를 산출하였다. 증폭된 산물을 모세관전기영동법(capillary electrophoresis)을 이용하여 크기별로 분리하여 DNA fragment의 크기를 결정하였다(도 3). 증폭된 산물의 크기에 따라 각 개체의 유전자형을 결정하여 비교하였으며 결정된 유전자형을 통해 국내산(KR, n=90), 일본산(JP, n=90) 집단별 8개의 좌위에 대한 allele frequency를 막대그래프로 도면 4에 나타내었다.

[0055]

실시예 5. 방어의 원산지별 유전적 다형성 지수 분석

[0056]

대립유전자수(Na, number of alleles per locus), 관측이형접합률(Ho, observed heterozygosity), 기대이형접합률(He, expected heterozygosity), 다형정보지수(PIC, polymorphic information content)는 Cervus version 3.0.7 (Marshall et al., 1998)를 이용하여 계산하였다. 대립유전자 풍부도(Ar, allelic richness) 및 근친교배계수(Fis, inbreeding coefficient)는 FSTAT 2.9.4 program(Goudet 1995)을 이용하였다. 하디-바인베르크 평형 테스트 기댓값에 대한 p-value(pHWD)는 Arlequin 3.5.2.2(Excoffier et al., 2005)을 이용하여 산출하였다(표 3).

[0057]

8개의 마이크로새틀라이트 마커를 이용하여 국내산(KR, n=90), 일본산(JP, n=90) 총 180개체를 한 population으로 설정하여 genetic variability를 분석하였을 경우 총 103개의 대립유전자가 검출되었으며 유전자 좌위 전체 평균 대립 유전자의 수는 4에서 29개로 평균 12.9개로 나타났다. 좌위별로 보았을 때 SqMS35에서 4개의 가장 적은 대립유전자가 나타났으며 SqMS43에서는 29개로 가장 많은 수가 관찰되었다. 이와 마찬가지로 대립유전자 풍부도(AR)의 전체 평균은 11.607이며 SqMS43(AR: 25.155)이 가장 높은 값을 보였으며 SqMS35(AR: 3.664)에서 가장 낮은 값을 보였다.

[0058]

각 집단별 He값은 유전적 평형 상태에 있는 집단으로 가정하였을 때 예상되는 이형 접합도를 나타내며 Ho값은 실제로 관측된 이형접합상태에 있는 개체들의 이형 접합도를 나타낸다. 본 연구에서 분석된 총 180개체의 8개 locus에 대한 전체 평균 He값은 0.633, 전체 평균 Ho는 0.497였으며 SqMS45를 제외한 모든 좌위에서 Ho값이 He값보다 높게 나타났다. 또한 좌위별로 보았을 때 SqMS43에서 가장 높은 Ho(0.926)값을 기록하였다.

[0059] PIC값은 180개체 내에서 평균 0.612이며 마찬가지로 SqMS43에서 가장 높은 값을 나타내었다. Hardy-Weinberg평형의 이탈은 8개 좌위 가운데 SqMS17, SqMS24에서 두 원산지 집단 모두 평형의 이탈이 관찰되었다($p < 0.0001$). 또한 나머지 국내산 SqMS35, 일본산 SqMS43에서도 Hardy-Weinberg평형의 이탈이 관찰되는 것을 확인할 수 있다.

[0060] Fis는 국내산 평균 0.258, 일본산 평균 0.179로서 근친교배로 인한 이형접합자를 갖는 개체들이 비교적 적은 것을 알 수 있다. 8개의 마커를 이용하여 전반적으로 본 방어의 원산지별 집단 유전적 다양성 지수는 두 원산지 그룹들 사이에서 큰 차이를 보이지 않았다.

표 3

[0062]

Populations		SqMS17	SqMS24	SqMS32	SqMS33	SqMS35	SqMS36	SqMS43	SqMS45	Mean
KR (n=90)	Na	5	15	3	9	4	11	27	13	10.9
	Ar	5	12.989	2.433	7.897	3.328	9.042	20.810	10.696	9.024
	Ho	0.011	0.506	0.539	0.700	0.128	0.450	0.817	0.828	0.497
	He	0.280	0.840	0.411	0.728	0.147	0.536	0.923	0.829	0.587
	PIC	0.265	0.818	0.330	0.681	0.141	0.512	0.912	0.804	0.558
	HWE	0	0	0.493	0.241	0	0.001	0.084	0.552	0.172
	Fis	1	0.399	0.109	0.054	0.247	0.171	0.085	-0.005	0.258
	Anu11	0.216	0.179	0.030	0.020	0.031	0.058	0.038	-0.005	0.071
JP (n=90)	Na	6	12	8	8	3	11	23	14	10.6
	Ar	6	11.485	7.512	7.512	2.533	8.242	20.383	12.116	9.473
	Ho	0.021	0.506	0.711	0.711	0.144	0.456	0.788	0.822	0.520
	He	0.380	0.838	0.708	0.708	0.136	0.461	0.925	0.823	0.622
	PIC	0.360	0.814	0.658	0.658	0.127	0.423	0.913	0.799	0.594
	HWE	0	0	0.387	0.383	1.000	0.127	0	0.202	0.262
	Fis	0.946	0.397	-0.005	-0.005	-0.066	0.013	0.148	0.001	0.179
	Anu11	0.258	0.178	-0.004	-0.004	-0.009	0.002	0.068	-0.002	0.061
All populations (n=180)	Na	7	16	11	9	4	12	29	15	12.9
	Ar	7	14.174	9.862	8.657	3.664	10.764	25.155	13.579	11.607
	Ho	0.011	0.506	0.539	0.700	0.128	0.450	0.817	0.828	0.497
	He	0.338	0.838	0.780	0.717	0.141	0.500	0.926	0.826	0.633
	PIC	0.327	0.818	0.749	0.671	0.135	0.472	0.919	0.804	0.612

[0064] 실시예 6. 방어의 원산지별 유전적 유연관계 비교

[0065] 국내산과 일본산 방어의 유전적인 변이 분포를 이용하여 원산지 집단별 기하학적 관계를 2차원적으로 나타내기 위해 GenAlEx program(Peakall and Smouse 2006)을 이용하여 Principal Coordinate(PCoA) 분석을 수행하였다. 또한, 8개의 loci를 이용한 집단간 유전학적 유연관계를 분석하기 위해, Arlequin 3.5.2.2(Excoffier et al., 2005)을 이용하여 Pairwise Fst 값 및 genotype likelihood matrix 값을 산출하였으며 이를 OriginPro 8.5 소프트웨어(OriginLab, USA)를 이용하여 도표화하였다.

[0066] 원산지 집단간 Pairwise Fst 값은 SqMS32, SqMS17, SqMS43, SqMS36, SqMS45, SqMS33, SqMS35, SqMS24순으로 높게 나타났으나 Fst 최대값을 보이는 SqMS32와 SqMS43에서만 $p < 0.00001$, $p < 0.05$ 수준으로 유의적인 차이가 나타났다(표 4). 8개의 좌위에 대한 국내산, 일본산 방어간의 Fst 값은 0.11078($p < 0.00001$)으로 유의적인 차이가 나타났다(표 5). 또한 국내산, 일본산 두 집단 모두에서 Hardy-Weinberg평형의 이탈이 나타나는 SqMS17을 제외한 후 Fst 값이 높은 순서대로 5개의 마이크로새틀라이트 마커(SqMS32, SqMS33, SqMS36, SqMS43, SqMS45)에 대한 원산지 집단간 Fst 값을 비교한 결과 0.11347로 나타났으며($p < 0.00001$)(표 6), 상위 3개(SqMS32, SqMS36, SqMS43)마커에 관한 Fst 값은 0.18779로 더 높게 나타났다($p < 0.00001$)(표 7).

[0067] 마커별 pCoA분석 결과, Fst 값이 가장 높았던 SqMS32에서 총 변이도는 84.66%(각 성분별 48.80%, 19.18%, 16.68%)인 것으로 나타나며 2차원 그래프 상에서도 국내산(K)과 일본산(J)이 명확하게 구분되는 것으로 보이므로 SqMS32는 방어 원산지 구분을 위한 모든 마이크로새틀라이트 마커 조합에 필수적으로 포함하여 분석하였다

(도 5).

표 4

[0069]

Locus	Fst	P value
SqMS17	0.01695	0.25225
SqMS24	-0.00327	0.96396
SqMS32	0.44044	p<0.00001
SqMS33	-0.00199	0.56757
SqMS35	-0.00273	0.67568
SqMS36	0.00439	0.22523
SqMS43	0.0059	0.03604
SqMS45	-0.00036	0.42342

표 5

[0071]

Locus	Fst	P value
Total 8 markers	0.11078	p<0.00001

표 6

[0073]

Locus	Fst	P value
5 markers (SqMS32, SqMS33, SqMS36, SqMS43, SqMS45)	0.11347	p<0.00001

표 7

[0075]

Locus	Fst	P value
3 markers (SqMS32, SqMS36, SqMS43)	0.18779	p<0.00001

[0077]

실시예 7. 국내산, 일본산 방어의 원산지 판별

[0078]

본 분석에서 사용된 8가지 마이크로새틀라이트 마커를 이용한 유전형 분석결과를 바탕으로 arlequin을 통해 얻은 genotype likelihood 산출값을 2차원 상에서 도표화한 결과(도 6a) 국내산, 일본산 방어가 개체별로 명확하게 그룹화되는 것을 확인할 수 있으나 PCoA 결과(도 6b)에서는 국내산, 일본산 개체들이 mix되어 집단별로 그룹화되는 현상이 관찰되지 않았다.

[0079]

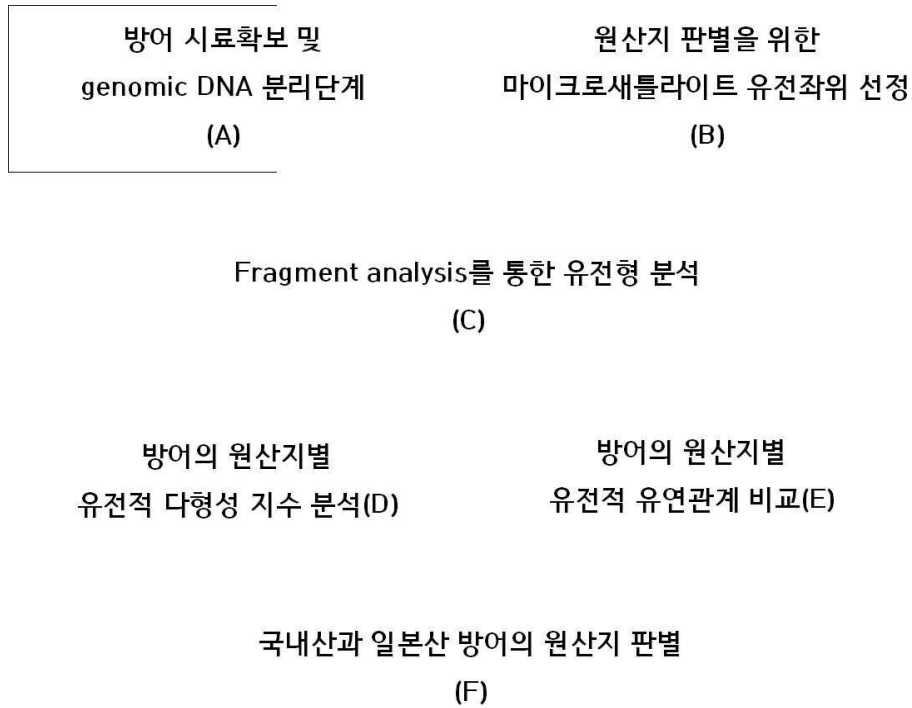
Fst 값을 기준으로 5개의 마이크로새틀라이트 마커(SqMS32, SqMS33, SqMS36, SqMS43, SqMS45)조합을 통하여 위와 같은 분석을 하였을 때 genotype likelihood(도 7a) 및 PCoA분석 결과(도 7b, 39.91%의 총 변이율), 국내산과 일본산 방어들이 집단별로 서로 다른 군집을 이루는 것으로 보인다. 또한 3개의 마이크로새틀라이트 마커(SqMS32, SqMS36, SqMS43) 조합을 이용하였을 경우에도 마찬가지로 genotype likelihood 분석(도 8a)에 있어서 원산지 판별이 가능한 것으로 보이며 PCoA 분석 결과(도 8b)에서도 46.95%의 총 변이율을 나타내어 국내산 및 일본산 방어 집단사이의 변이율을 다음 5개 또는 3개 마커 조합을 통하여 충분히 반영할 수 있는 것으로 예상된다.

[0080]

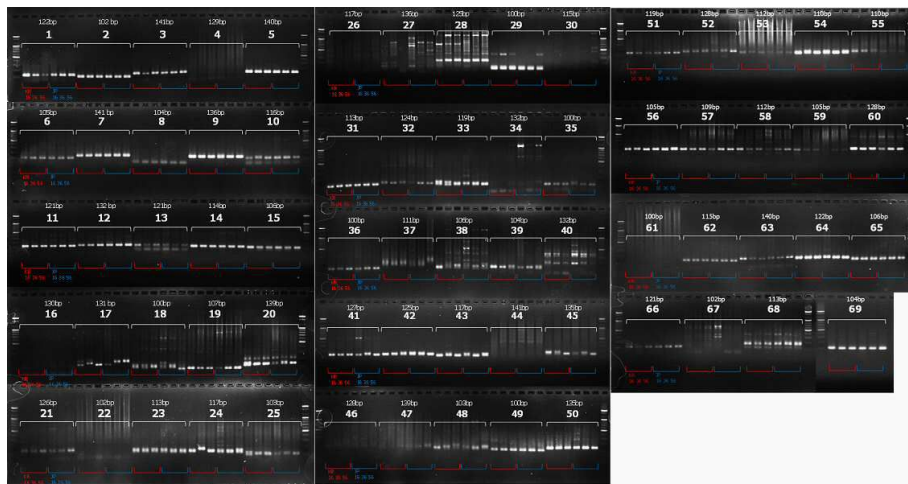
상기 결과로부터, 본 연구에서 GBS(genotyping by sequencing) 데이터베이스를 통하여 새롭게 개발된 8개의 마커를 이용해 국내산 및 일본산 방어의 유전형을 분석하여 집단내, 집단간 유전적 다양성 분석을 수행할 수 있으며 8가지의 마커 중 Fst 값을 토대로 하여 5개(SqMS32, SqMS33, SqMS36, SqMS43, SqMS45) 또는 3개(SqMS32, SqMS36, SqMS43)의 마커 조합을 선정하였고 이를 통해 얻은 genotype 정보로 PCoA, genotype likelihood matrix 분석을 수행함으로써 국내산 또는 일본산 방어를 효과적으로 판별할 수 있음을 확인하였다.

도면

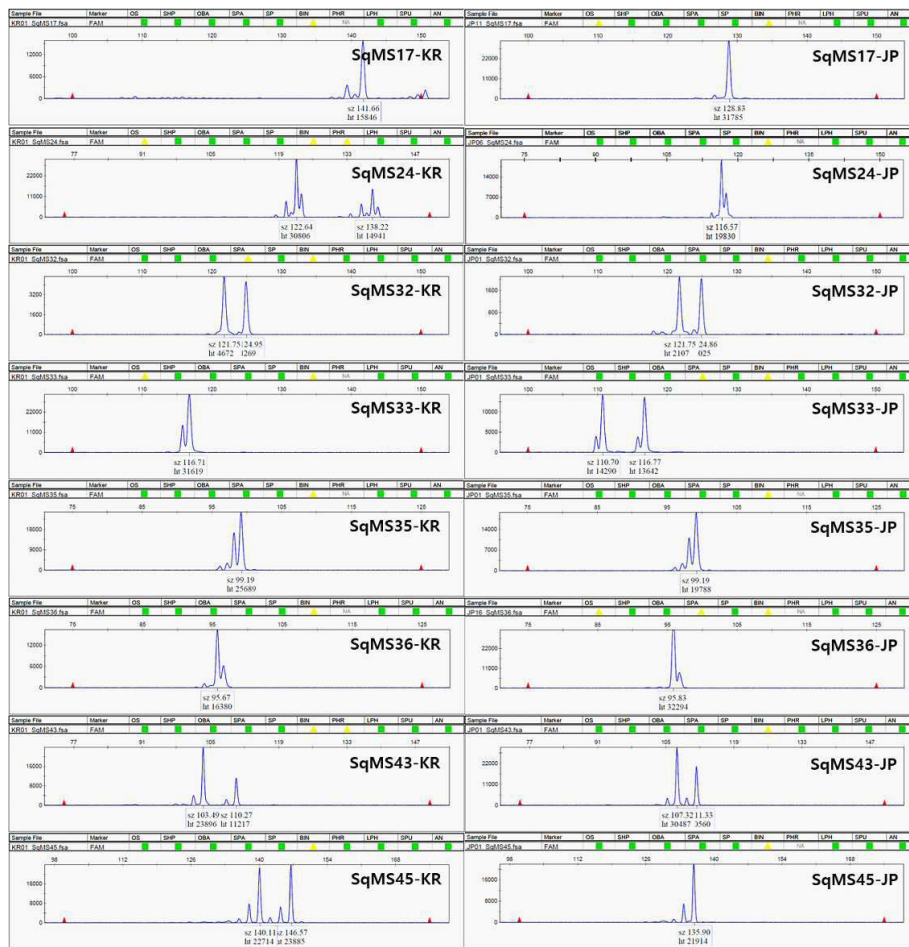
도면1



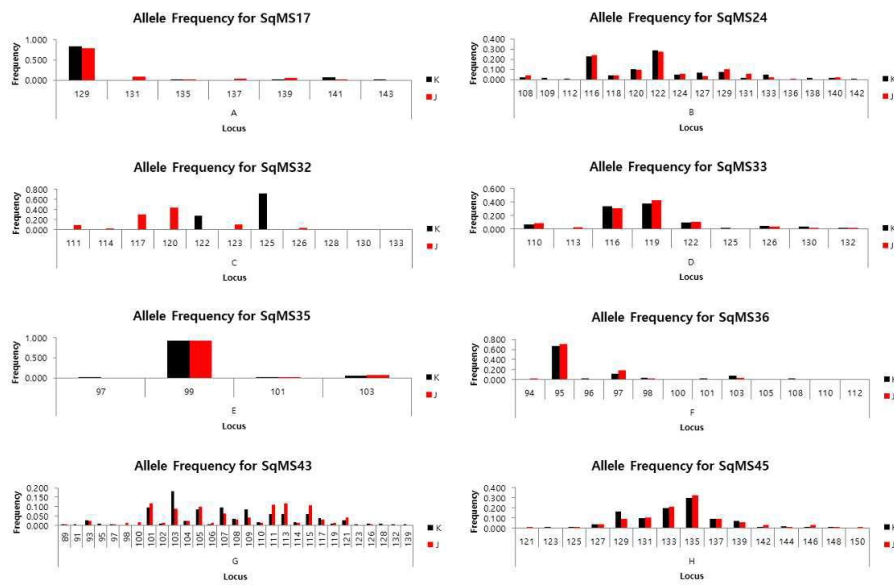
도면2



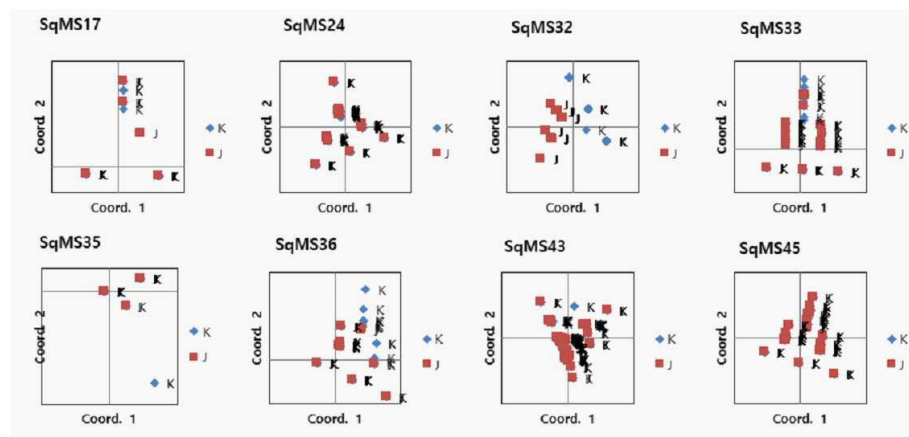
도면3



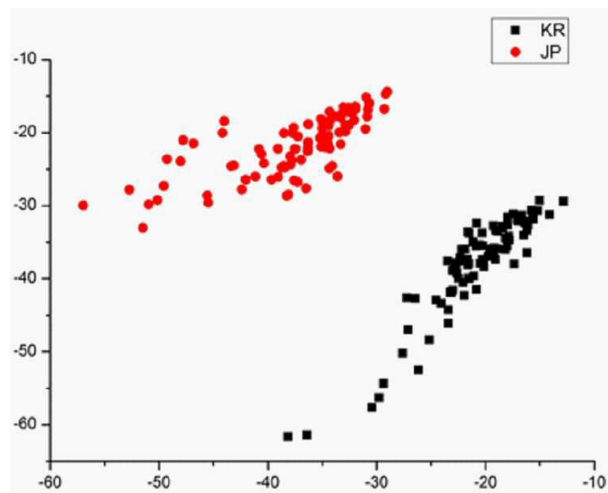
도면4



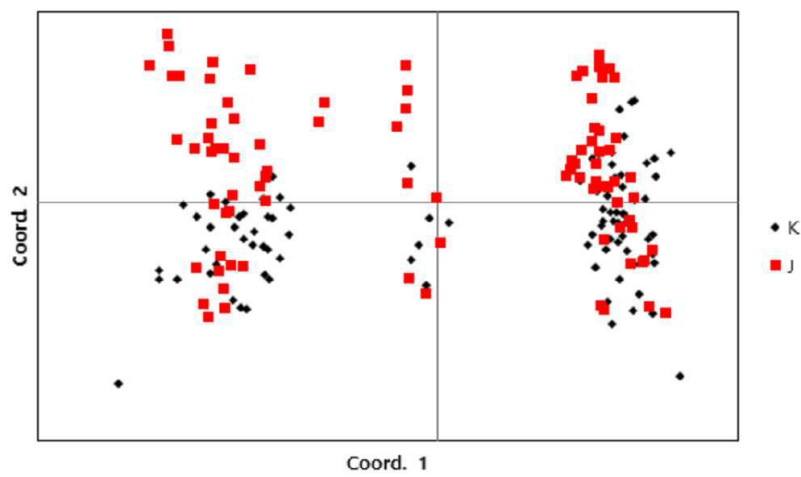
도면5



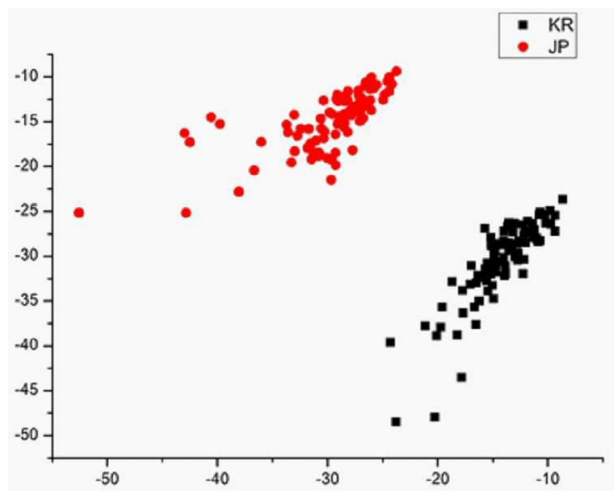
도면6a



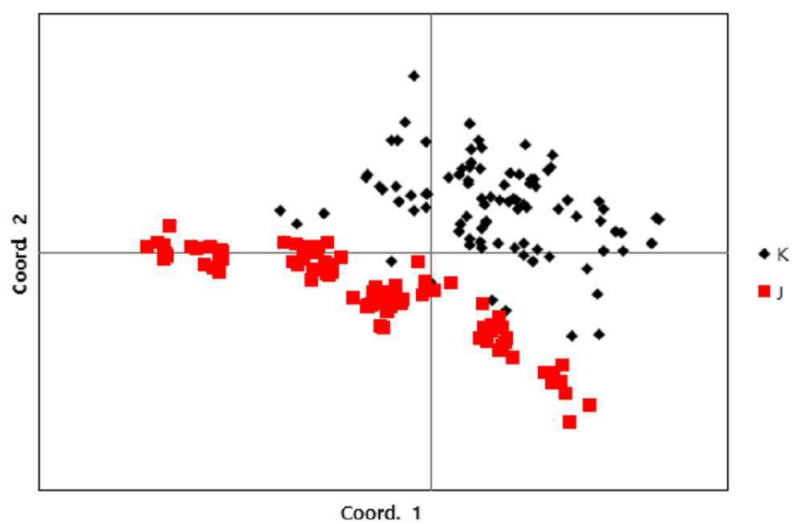
도면6b



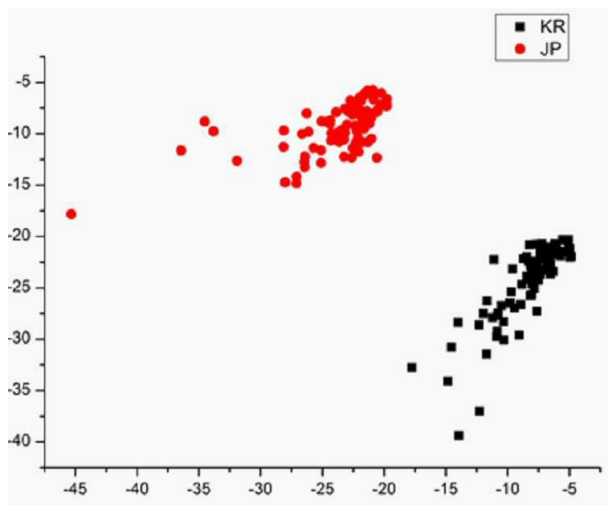
도면7a



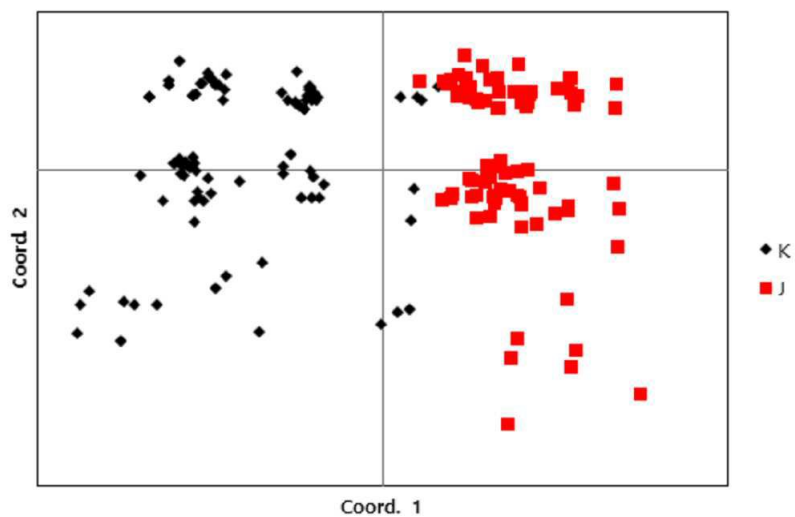
도면7b



도면8a



도면8b



서열 목록

- <110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation
- <120> microsatellite marker for identification of geographical origin
of *Seriola quinqueradiata* and its use
- <130> PN2108-385
- <160> 24
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 61

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SqMS17
 <400> 1
 tgaacagacc actgttcacg tctgatatat atatatacac acacacatat atcctcagcc 60
 g 61

<210> 2
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SqMS24
 <400> 2
 tgtgtttgaa ttggttggtg taggagtgtg tgtgtgtgtg tttgtatgtg tgggatgggc 60
 tcgaca 66

<210> 3
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SqMS32
 <400> 3
 acaggccctg aaaggtacgg taacagatga tgatgatgat gatgtcacgg ggcctaatacg 60
 ggctttct 68

<210> 4
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SqMS33
 <400> 4
 agctgttgct cctctcataa ccgacatgat gatgatgatg atgatgatga tactgtctga 60
 tggatgcaga gttt 74

<210> 5
 <211> 72
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SqMS35

<400> 5

aaatgtgctg tctatcccta cctcatctct ctctctctct ctctctctgg gtctgtagtt 60

gtagattgtg gt 72

<210> 6

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SqMS36

<400> 6

aatttaagag gcaggacatg gaaatacaca cacacacaca cacattcatc tgctctctgg 60

gggggtca 68

<210> 7

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SqMS43

<400> 7

aaggtaaagg tgcacgggat catcagtggtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 60

tgtgtttgtg tatgtggggt gctgagactg 90

<210> 8

<211> 84

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SqMS45

<400> 8

atcacgccc tcaatctgag agactcacac acacacacac acacacacac acacacacaa 60

acacatcccc tttttcaca tcaa 84

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SqMS17 F
 <400> 9
 tggccctgct tcacattgat 20
 <210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> SqMS17 R
 <400> 10
 acggctgagg atatatgtgt gt 22
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> SqMS24 F
 <400> 11
 acgtcacaaa cagctcacct 20
 <210> 12
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> SqMS24 R
 <400> 12
 tcgagcccat cccacacat 19
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> SqMS32 F
 <400> 13
 gcaggaggca aagagaggag 20
 <210> 14
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SqMS32 R
 <400> 14
 taagatctgg cttgcagcgg 20
 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SqMS33 F
 <400> 15
 caccagtcca gacagaaccc 20
 <210> 16
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SqMS33 R
 <400> 16
 tgaaactctg catccatcag aca 23
 <210> 17
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SqMS35 F
 <400> 17
 ttcttgcaaa gctgtgttga gt 22
 <210> 18
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SqMS35 R
 <400> 18
 cggatgacca caatctacaa ct 22

<210> 19
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SqMS36 F
 <400> 19
 atttaagagg caggacatgg aa 22
 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SqMS36 R
 <400> 20
 tcctcctact gagcatccca 20
 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SqMS43 F
 <400> 21
 gcgtgtctct gtggagcaaa 20
 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SqMS43 R
 <400> 22
 tcagtctcag caccacat 20
 <210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SqMS45 F
 <400> 23

acctctgcac tgctagcttc	20
<210> 24	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SqMS45 R	
<400> 24	
acacagaaaa cacagacaca cc	22