



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년02월08일
(11) 등록번호 10-1704382
(24) 등록일자 2017년02월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6895 (2013.01)
C12Q 2600/13 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0155782
(22) 출원일자 2015년11월06일
심사청구일자 2015년11월06일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020100068713 A
KR1020150056922 A
KR1020150063338 A
KR1020050087928 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
임용표
대전광역시 유성구 상대남로 26 트리폴시티아파트
903동 1602호
최수련
대전광역시 중구 태평로 80 삼부아파트1단지 408
동 141호
오상현
대전광역시 대덕구 증리서로 30, 105동 303호(증
리동, 영진로얄아파트)
(74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 5 항

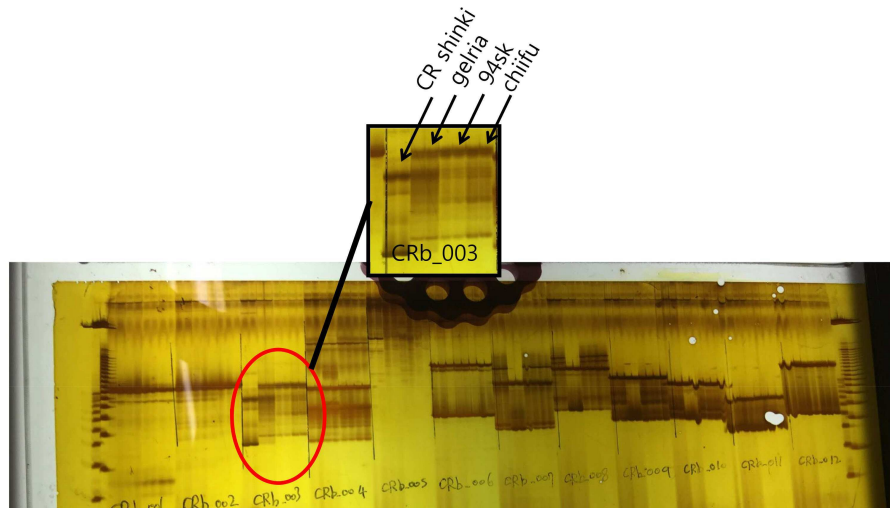
심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 배추 뿌리혹병 저항성 품종을 특이적으로 판별하기 위한 프라이머 세트 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 배추 뿌리혹병 저항성 품종을 특이적으로 판별하기 위한 프라이머 세트 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명을 통해 배추 뿌리혹병 저항성 품종에 대해 특이적 판별이 쉽고 빠르게 수행될 수 있으므로, 배추의 뿌리 관련 내병성 품종 육성 시 효율적으로 품종이나 계통들의 뿌리 관련 특성과 병 저항성을 평가함으로써 배추의 뿌리 관련 내병성 품종 육종에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 213002-04-3-SBI30

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 GoldenSeed프로젝트

연구과제명 분자 및 유전체육종 효율화 시스템 개발

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교

연구기간 2013.07.25 ~ 2022.05.02

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 5 및 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 33 및 34의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 35 및 36의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 37 및 38의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 및 서열번호 39 및 40의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 포함하는 배추 뿌리혹병 저항성 품종을 특이적으로 판별하기 위한 프라이머 세트.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 따른 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 배추 뿌리혹병 저항성 품종을 특이적으로 판별하기 위한 키트.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함하는 것인 키트.

청구항 5

분석 대상 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제1항에 따른 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 배추 뿌리혹병 저항성 품종을 특이적으로 판별하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 증폭 산물의 검출은 DNA 칩, 젤 전기영동, 방사성 측정, HRM (High resolution melting) 분석, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행되는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 배추 뿌리혹병 저항성 품종을 특이적으로 판별하기 위한 프라이머 세트 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 5종의 프라이머 세트를 포함하는 배추 뿌리혹병 저항성 품종을 특이적으로 판별하기 위한 프라이머 세트, 상기 프라이머 세트를 포함하는 배추 뿌리혹병 저항성 품종을 특이적으로 판별하기 위한 키트, 및 상기 프라이머 세트를 이용하여 배추 뿌리혹병 저항성 품종을 특이적으로 판별하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

현재 배추에서 뿌리혹병 저항성 형질관련 유전자좌는 총 9개(CRa, CRb, CRc, CRk, Crr1, Crr2, Crr3, Crr4 및 CRaki)가 보고되었다. 그 중 CRb 유전자좌는 Piao 등(2004, Theor Appl Genet 108:1458-1465)이 보고하였으며, CR shinki를 재료로 사용하여 AFLP/SCAR 마커를 사용하여 연관 지도 작성, QTL 분석으로 연구결과를 보고하였다. 이들 CRb 유전자좌 연관마커(TCR09, TCR05, TCR01)는 저항성 유전자좌 유무를 판단할 수 있는 지표로 사용 가능하였으나, 연관마커이므로 저항성 유전자좌와 물리적으로 거리가 있고, 정확한 저항성 유전자좌에 대한 정보가 부족하여 마커를 이용한 저항성 자원/개체 선발에 있어 어려움이 있었다.

[0003]

최근 CRb 유전자좌에 대하여 정밀 맵핑 결과가 보고되어(Teng et al., 2014 Mol Breeding 34:1173-1183) 보다

근접한 마커가 개발(TCR079, TCR108) 되어 선발의 효율성을 높일 수 있었으나 이러한 마커들은 마커 선발과정에서 PAGE(Polyacrylamide Gel Electrophoresis)를 해야 하며, 저항성과 이병성간의 차이가 근소하여 MAS(Marker assisted selection)로 사용하기에 다소 불편함이 있었다. 이에 보다 검출하기 용이하고, 궁극적으로 저항성 형질에 주로 관여하는 유전자를 이용한 마커 개발을 하고자 하였다.

[0004] 한편, 한국등록특허 제1095220호에서는 '배추 뿌리혹병 저항성 연관 분자표지 및 이의 용도'가 개시되어 있고, 한국공개특허 제2014-0023618호에서는 '배추뿌리혹병 진단용 프라이머 및 이를 이용한 검출 방법'이 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 '배추 뿌리혹병 저항성 품종을 특이적으로 판별하기 위한 프라이머 세트 및 이의 용도'에 대해서는 밝혀진 바가 전혀 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자는 현재 알려진 배추 뿌리혹병 저항성 형질에 관련된 CRb 유전자와 연관마커(TCR09, TCR05, TCR01)는 저항성 유전자와 유무를 판단할 수 있는 지표로 사용 가능하나, 연관마커이므로 저항성 유전자와 물리적으로 거리가 있고, 정확한 저항성 유전자좌에 대한 정보가 부족하여 마커를 이용한 저항성 자원/개체 선발에 있어 어려움이 있는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명은 배추 뿌리혹병 저항성 품종을 특이적으로 판별할 수 있는 프라이머를 개발하고자, 저항성 계통인 CR shinki와 감수성 계통인 94sk의 유전체 데이터를 대상으로 레퍼런스 기반 어셈블(reference assemble) 및 드 노보 어셈블(de novo assemble)의 두가지 분석 방법을 이용하여 배추 뿌리혹병 저항성 품종을 특이적으로 판별하기 위한 총 5종의 프라이머 세트를 개발함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 5 및 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 33 및 34의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 35 및 36의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 37 및 38의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 및 서열번호 39 및 40의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트;로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는 배추 뿌리혹병 저항성 품종을 특이적으로 판별하기 위한 프라이머 세트를 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 포함하는 배추 뿌리혹병 저항성 품종을 특이적으로 판별하기 위한 키트를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 이용하여 배추 뿌리혹병 저항성 품종을 특이적으로 판별하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에서는 최종선발된 총 5개의 프라이머 세트를 이용하여 배추 뿌리혹병 저항성 품종을 특이적으로 판별할 수 있는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명을 통해 배추 뿌리혹병 저항성 품종에 대해 특이적 판별이 쉽고 빠르게 수행될 수 있으므로, 배추의 뿌리 관련 내병성 품종 육성 시 효율적으로 품종이나 계통들의 뿌리 관련 특성과 병 저항성을 평가함으로써 배추의 뿌리 관련 내병성 품종 육성에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 레퍼런스 기반 어셈블(reference assemble) 및 드 노보 어셈블(de novo assemble) 방법을 통해 본 발명의 배추 뿌리혹병 저항성 품종을 특이적으로 판별하기 위한 프라이머 세트를 개발하는 방법을 개략적으로 나타내는 모식도이다.

도 2는 본 발명에서 사용한 레퍼런스 기반 어셈블의 경우 기준에 보고된 TCR079와 TCR108 마커 정보를 이용하여 이들 마커를 양끝으로 하는 유전체 영역을 타겟 영역으로 설정한 후 타겟 영역이 총 길이 84,945bp이었으며 유전자 예상 결과 15개의 유전자(위치는 초록색 표시)가 존재하는 것을 확인한 결과이다.

도 3은 본 발명에서 사용한 레퍼런스 기반 어셈블 분석을 통해 얻어진 총 15쌍의 프라이머를 이용하여 저항성 계통인 CR shinki, gelria 및 감수성 계통인 94SK, chiifu를 대상으로 PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis) 분석을 수행한 결과 CRb_003에서 저항성과 감수성이 구별 가능한 것을 확인한 결과이다.

도 4는 상기 도 3의 PCR 산물의 서열의 정보를 알기 위해 저항성 계통 CR shinki를 3 반복, 저항성 계통 Gelria를 4 반복을 진행하여 바이오니아사에 시퀀스 의뢰를 진행한 결과, Gelria 시퀀스는 2가지 타입이 나타났으며 서열 37bp 이후 지점에 AAAACCCCCACCTATC(서열번호 31)가 있는 것과 AAAACCCCCACCTATC(서열번호 31)가 없는 것을 확인한 결과이다.

도 5는 CRb_048 프라이머로 CR shinki, gelria, siloga, 94sk, chiifu를 PCR 검정하였으며 저항성 계통인 CR shinki, gelria는 가장 아래 밴드로 나타났고, 감수성 계통인 94SK와 chiifu는 위의 밴드로 나타나 앰플리콘 크기에서 다형성을 나타냈으며, 저항성 계통과 감수성계통이 구분이 되는 것을 확인한 결과이다.

도 6은 상기 도 5의 PCR 산물의 서열의 정보를 알기 위해 바이오니아에 CR shinki 2 반복, Gelria 2 반복, 94sk 1 반복 시퀀싱 분석의뢰를 하였고, 얻어진 각 서열을 정렬하였을 경우 감수성 계통(94sk, chiifu) 세 곳에 insertion이 있는 것을 확인한 결과이다.

도 7은 본 발명에서 개발한 CRb_057의 위치를 도시한 것이다.

도 8은 저항성 계통인 CR shinki와 Gelria, 감수성 계통인 94sk와 chiifu를 대상으로 CRb_057을 이용하여 PCR을 수행한 결과이다. 각 레인의 CR은 CR shinki, GE는 Gelria를 나타낸다.

도 9는 본 발명에서 개발한 CRb_057을 이용하여 뿌리혹병 관련 저항성, 감수성 생식질(germplasm)에 테스트를 해본 결과 CRb를 가지고 있다고 알려진 CR shinki, Gelria에서 밴드가 나타나고, 감수성으로 알려진 Chiifu, 94sk에서 다른 위치에 증폭된 것을 아가로스 겔(A), 자동전기영동장치(B) 및 HRM(C)으로 확인한 결과이다. 자동전기영동장치는 lifescience사의 Labchip GX를 사용하였다. 아가로스 겔에서 영동한 결과를 재현한 것으로 아가로스 겔로는 각 밴드와의 정확한 크기 차이를 알 수 없지만 이 기계를 사용함으로써 각 밴드와의 보다 정확한 bp를 알 수 있다.

도 10은 본 발명에서 개발한 CRb_065을 이용하여 뿌리혹병 관련 저항성, 감수성 생식질(germplasm)에 테스트를 해본 결과 CRb를 가지고 있다고 알려진 CR shinki, Gelria에서 밴드가 확인되었으며 감수성으로 알려진 Chiifu, 94sk에서 다른 위치에 증폭된 것을 확인한 결과이다. 상단 도면은 아가로스 겔 결과이며, 하단 도면은 자동전기영동장치로 영동한 결과이다.

도 11은 본 발명에서 개발한 CRb_065을 이용하여 뿌리혹병 관련 저항성, 감수성 생식질(germplasm)에 테스트를 해본 상기 도 10의 결과를 HRM 분석한 결과이다.

도 12는 본 발명에서 개발한 CRb_065의 위치(a) 및 이를 이용하여 저항성 계통인 CR shinki와 Gelria, 감수성 계통인 94sk와 chiifu를 대상으로 PCR을 수행한 결과(b)이다. 각 레인의 CR은 CR shinki, GE는 Gelria를 나타낸다.

도 13은 본 발명에서 개발한 CRb_060의 위치(a) 및 이를 이용하여 저항성 계통인 CR shinki와 Gelria, 감수성 계통인 94sk와 chiifu를 대상으로 HRM 분석을 수행한 결과(b)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 5 및 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 33 및 34의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 35 및 36의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 37 및 38의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 및 서열번호 39 및 40의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트;로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는 배추 뿌리혹병 저항성 품종을 특이적으로 판별하기 위한 프라이머 세트를 제공한다.

[0012] 상기 프라이머는 각 프라이머의 서열 길이에 따라, 서열번호 5, 6, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 및 40의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 서열번호 5의 프라이머는 서열번호 1의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며, 서열번호 6의 프라이머는 서열번호 2의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상, 25개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 서열번호 5, 6, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 및 40의 염기서열의 부가, 결실 또는 치환된 서열도 포함할 수 있다.

- [0013] 본 발명의 일 구현 예에 따른 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 서열번호 5 및 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 33 및 34의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 35 및 36의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 37 및 38의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 및 서열번호 39 및 40의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 포함하는 배추 뿌리혹병 저항성 품종을 특이적으로 판별하기 위한 프라이머 세트이다.
- [0014] 서열번호 5, 6, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 및 40의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 동시에 이용하면 배추 뿌리혹병 저항성 품종을 더욱 효율적으로 진단, 예측 또는 검출할 수 있다.
- [0015] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 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.
- [0016] 본 명세서에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)을 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)을 포함할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 배추 뿌리혹병 저항성 품종을 특이적으로 판별하기 위한 키트를 제공한다.
- [0018] 본 발명의 키트에서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs, 버퍼 등을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, PCR 완충액 제조 방법, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물이다. 안내서는 팜플렛 또는 진단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨, 및 키트를 포함하는 패키지의 표면에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0020] 분석 대상 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- [0021] 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 상기 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- [0022] 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 배추 뿌리혹병 저항성 품종을 특이적으로 판별하는 방법을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 방법은 분석 대상 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계를 포함한다. 상기 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, CTAB 방법을 이용할 수도 있고, wizard prep 키트(Promega 사)를 이용할 수도 있다. 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 일 실시예에 따른 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 프라이머로 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다. 표적 핵산을 증폭하는 방법은 중합효소연쇄반응(PCR), 리가아제 연쇄반응(ligase chain reaction), 핵산 서열 기재 증폭(nucleic acid sequence-based amplification), 전사 기재 증폭 시스템(transcription-based amplification system), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 또는 Q β 복제효소(replicase)를 통한 증폭 또는 당업계에 알려진 핵산 분자를 증폭하기 위한 임의의 기타 적당한 방법이 있다. 이 중에서, PCR이란 중합효소를 이용하여 표적 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍으로부터 표적 핵산을 증폭하는 방법이다. 이러한 PCR 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 상업적으로 이용가능한 키트를 이용할 수도 있다.
- [0024] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열은 검출가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 일 구현예에서, 상기 표지 물질은 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 표지 물질은 Cy-5 또는 Cy-3이다. 표적 서열의 증폭시 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다. 또한, 방사성 물질을 이용한 표지는 PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하면 증폭 산물이 합성되면서 방사성이 증폭 산물에 혼입되어 증폭 산물이 방사성으로 표지될 수 있다. 표적 서열을 증폭하기 위해 이용된 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 상기에 기재된 바와 같다.
- [0025] 본 발명의 방법은 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함한다. 상기 증폭 산물의 검출은 DNA 칩, 젤 전기영동,

HRM (High resolution melting) 분석, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 증폭 산물을 검출하는 방법 중의 하나로서, 겔 전기영동을 수행할 수 있다. 겔 전기영동은 증폭 산물의 크기에 따라 아가로스 겔 전기영동 또는 아크릴아미드 겔 전기영동을 이용할 수 있다. 또한, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지되며, 이렇게 표지된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다. 또한, 방사성 측정 방법은 PCR 수행 시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하여 증폭 산물을 표지한 후, 방사성 측정기구, 예를 들면, 가이거 계수기(Geiger counter) 또는 액체섬광계수기(liquid scintillation counter)를 이용하여 방사성을 측정할 수 있다.

[0027] 바람직하게는 서열번호 5 및 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트에 이루어진 CRb_003 및 서열번호 33 및 34의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트에 이루어진 CRb_048을 이용한 PCR 산물을 분석하는 경우 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(polyacrylamide gel electrophoresis) 분석 방법이 바람직하며, 서열번호 35 및 36의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트에 이루어진 CRb_057 및 서열번호 37 및 38의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트에 이루어진 CRb_065을 이용한 PCR 산물을 분석하는 경우 아가로스 겔 분석 방법이 바람직하며, 서열번호 37 및 38의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트에 이루어진 CRb_065 및 서열번호 39 및 40의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트에 이루어진 CRb_060을 이용한 PCR 산물을 분석하는 경우 HRM(high resolution melting) 분석 방법이 바람직할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0029] 실시예 1. 본 발명의 CRb 마커 개발을 위해 이용한 2가지 방법

[0030] CRb 마커 개발을 위해 저항성 계통인 CR shinki와 감수성 계통인 94sk의 유전체 재분석(re-sequence)을 Illumina의 Hi-seq 2000으로 수행하였다. 생산된 유전체 데이터는 두 가지로 가공되었는데, 한가지 방법은 레퍼런스(reference)를 기준으로 하여 short read를 배치하는 방법(reference genome assemble method)이며 그 외의 방법은 short read 자체 염기서열을 이용하는 방법(de novo assemble method)이다(도 1). 레퍼런스 기반 어셈블 방법의 경우 총 생산된 유전체 양은 277,083,473bp (277M)의 정보를 생성하였으며 유전체 총 적용범위(coverage)는 약 52.4%였다. 총 콘티그 수는 514,436개였고, 짧게는 22bp의 길이부터 길게는 10,813,819bp의 콘티그가 형성되었고, 이들의 평균 콘티그 크기는 36,724bp였다.

[0031] 드 노보 어셈블(de novo assemble) 방법의 경우 총 생산된 유전체 양은 235,018,193bp (235M)로 유전체 총 적용범위(coverage)는 약 44.4%였다. 총 콘티그 수는 459,971개였고, 짧게는 201bp의 길이부터 길게는 9,378bp의 콘티그가 형성되었고, 이들의 평균 콘티그 크기는 511bp였다.

[0032] 실시예 2. 본 발명의 레퍼런스 기반 어셈블(reference assemble) 결과를 이용한 CRb_003 마커 개발

[0033] 본 발명에서 마커 개발은 크게 레퍼런스 기반 어셈블 결과를 이용하는 방법과 드 노보 어셈블(de novo assemble) 결과를 이용하는 방법의 두 가지 방향으로 진행되었다.

[0034] 레퍼런스 기반 어셈블의 경우 기준에 보고된 TCR079와 TCR108 마커 정보를 이용하여 이들 마커를 양끝으로 하는 유전체 영역을 타겟 영역으로 설정하였다. 타겟 영역은 총 길이 84,945bp이었으며 유전자 예상 결과 15개의 유전자가 존재하였다(도 2). 먼저 타겟 영역을 query로 CR shinki (유전체 재분석(ref.seq) 결과 정보)를 블라스트 분석을 진행하였으며, 총 250개의 scaffold가 hit 되었다. 이중 A03에 위치하며 HSP 스코어 (gap이 없이 정렬되는 값_유사도가 높은 값)가 높은 scaffold를 선발 기준으로 하여 scaffold000013을 선별하였다. Scaffold000013을 타겟 영역과 정렬한 결과 총 20개의 SNP가 발견됐으며 이를 통해 하기 표 1의 15개의 프라이머를 제작하였다.

표 1

	프라이머 이름	정방향(서열번호)	역방향(서열번호)	타겟 (CR shinki/Chiifu)	크기
1	CRb_001	ATCACGAATTCTAGTTCGAACACC(1)	AATATGATAGTCGAGGACGAACGA(2)	A/T	141
2	CRb_002	GATGTTGAGCAAATAAACCGC(3)	GACATAATACAAGGTCAAGCTCCG(4)	T/A	108

3	CRb_003	ACGAGAAGACAGAGAGACAGTGGT(5)	GATAGAAACCACCACCGATAAAAAAC(6)	C/A	150
4	CRb_004	ATTGTAGGAGTAACCTCAGCCAA(7)	AGGAGACATGGTCTTTCATGTGAC(8)	S/G,A/T	96
5	CRb_005	TAAACGAACTCTCAATCGAACTCC(9)	TTCTCGACGCTCTAAGGTGAGTAT(10)	A/C	108
6	CRb_006	ATTTAGTGAATGCAGGCACATCTC(11)	TTACCCAATGGAGAAGACACTACC(12)	A/T	135
7	CRb_007	GTAGGGCAGTTAAATAGGACATGG(13)	CTTGCTTAAGCTACGACACTTTCT(14)	Y/G	136
8	CRb_008	AGGGTGGGTAGTAACCTCCTGTAT(15)	TACTTGGAACTACAACGAGTCAG(16)	C/T	133
9	CRb_009	CGTACCTATGCCACACTCTAGGA(17)	AAGTAACTTGGAGGAATGGGGTT(18)	C/A	129
10	CRb_010	AAAAAGCAATATCACGGAACCC(19)	CTTCCTAAGGGTCTTTGTGAGAAG(20)	C/A	138
11	CRb_011	TCCTTGACAGTTCAGCTCATAAT(21)	CTCCAAACGTAAGACTCCTTTGAC(22)	A/C	136
12	CRb_012	AAATCTTGGAGGAACACTGAGATG(23)	ATTGTCAGCGACTTACACATGAGA(24)	R/T	146
13	CRb_013	CATTTGAATAGCGTTAGGGATAG(25)	GAAACACTTGATCTGCATCTTGC(26)	S/A,T/G	134
14	CRb_014	ATCACAATGTCTTGAAGAGAACCC(27)	GTAAGGTAACATTATTTGCCGGG(28)	S/T,C/T	125
15	CRb_015	CCCACTCCATATTTACTCCAGAA(29)	CAACCCACTTCATATTTACTCC(30)	M/G,G/A	148

[0036] 상기 표 1의 총 15쌍의 프라이머를 이용하여 HRM(High-Resolution Melting) 분석을 하였다. 12쌍의 프라이머가 증폭되었으며 3쌍의 프라이머에서 증폭이 되지 않았다. 제작한 15쌍의 프라이머를 가지고 PAGE 분석결과 CRb_003에서 저항성과 감수성과 구별이 가능했다. 나머지 프라이머에서는 다형성이 나타나지 않았다. SNP 프라이머를 개발한 것과 달리 PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis) 결과는 PCR 산물간의 크기 차이가 발견되었고(도 3), 이를 통해 레퍼런스 기반 어셈블의 경우 CR shinki와의 서열과의 차이가 존재한다는 것을 알 수 있었다. PCR 산물의 서열의 정보를 알기 위해 바이오니아사에 시퀀스 의뢰를 진행하였다. 저항성 계통 CR shinki를 3 반복, 저항성 계통 Gelria를 4 반복을 진행하였다. Gelria 시퀀스는 2가지 타입이 나타났으며 서열 37bp 이후 지점에 AAAACCCACCTATC(서열번호 31)가 있는 것과 AAAACCCACCTATC(서열번호 31)가 없는 것으로 나타났다(도 4). 이를 통해 PAGE 결과 Gelria가 밴드가 2개가 보인 이유를 설명할 수 있다. 이것은 레퍼런스 기반 어셈블리는 실제 서열과 다르다는 것을 알려주며 다음 실험에서 드 노보 어셈블(de novo assemble)로 진행하였다.

[0037] 위의 CRb_003 프라이머를 가지고 실험실에서 진행하고 있는 SRC-152011에 마커 검정을 실행하여 기존에 사용하던 TCR_079와의 결과를 비교해 보았다. 결과를 비교해보면 TCR_079에서 저항성으로 나타난 밴드는 8번의 경우를 제외하고 CRb_003에서 저항성으로 뜨고 TCR_079에서 헤테로 타입(hetero type)으로 두 개의 밴드가 증폭된 개체는 감수성인 것으로 나타났다(표 2). 따라서 다형성 차이가 미미하여 PAGE에서 MAS로 사용하기에 어려움이 있었던 TCR_079 마커는 CRb_003로 대체가 가능하였다.

표 2

[0038]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
TCR_079	H	R	H	R	H	R	H	R	R	R	H	R	H	H	R	H	H	H	R	H	R
CRb_003	S	R	S	R	S	R	S	S	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	R
	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
TCR_079	R	H	R	R	H	H	H	H	R	H	H	R	H	H	R	H	-	H	H	H	R
CRb_003	-	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S	S	R
	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63
TCR_079	R	R	H	-	-	R	H	-	H	R	R	H	R	R	H	H	R	R	R	H	H
CRb_003	R	R	S	-	-	R	S	-	S	-	R	S	R	R	-	S	R	R	R	S	S
	64	65	66																		
TCR_079	R	R	H																		

CRb_003	R	R	S																
---------	---	---	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

실시예 3. 본 발명의 드 노보 어셈블(de novo assemble) 결과를 이용한 4종 마커 개발

타겟 영역인 TCR_079와 TCR_108 사이의 서열을 query로 CR shinki 드 노보 서열을 블라스트 분석하였다. 그 결과 250개의 콘티그가 hit 되었으며 HSP가 높은 순서대로 정렬을 실시하였다. 31개의 콘티그를 정렬해본 결과 C6605327 콘티그에서 indel과 SNP가 발견되었다(도 4).

타겟 영역(83.5 Kb)에서 CRb 유전자좌의 저항성 형질에 대한 후보유전자 중에 하나인 bra012540를 목표로 하여 염기서열상의 차이를 찾아보고 이를 이용하여 마커를 개발하고자 하였다. 저항성 계통인 CR shinki의 드 노보 정보에서 블라스트를 수행한 결과 총 143개의 콘티그가 hit 되었으며 그 중 C6605327, C6416411에서 다형성(InDel)을 확인하였다. InDel이 포함된 부분을 증폭하는 프라이머 CRb_048(정방향 프라이머 5'-TGTACTAGATGGCAACGAGAAGAA-3'(서열번호 33), 역방향 프라이머 5'-CAGTGGAGTAGACGTAGCTCATCA-3'(서열번호 34))을 제작하였으며 염기서열 정보를 바탕으로 하여 예측되는 PCR 앰플리콘 크기는 627bp이었다. CRb_048 프라이머로 CR shinki, gelria, siloga, 94sk, chiifu를 PCR 검정하였으며 저항성 계통인 CR shinki, gelria는 가장 아래 밴드로 나타났고, 감수성 계통인 94SK와 chiifu는 위의 밴드로 나타나 앰플리콘 크기에서 다형성을 나타냈으며, 저항성 계통과 감수성계통이 구분이 되었다(도 5).

PCR 산물의 증폭된 서열을 알기 위해 바이오니사에 CR shinki 2 반복, Gelria 2 반복, 94sk 1 반복 시퀀싱 분석 의뢰를 하였다. 각 서열을 정렬하였을 경우 감수성 계통(94sk, chiifu) 세 곳에 insertion이 있는 것을 확인할 수 있다(도 6). 또한 각각의 저항성 감수성 계통간에 빈번한 SNP를 발견할 수 있었다. 감수성에 있는 insertion의 경우 각각 29bp, 9bp, 16bp가 있었으며 총 54bp 차이가 있다. CRb_048 프라이머의 경우 제작한 앰플리콘 크기가 627bp이고 InDel이 54bp 차지한다. 이 경우 아가로스 겔로 확인이 어려워 PAGE로 영동을 해야 한다. 이를 해소하기 위해 앰플리콘 안의 염기서열을 이용하여 아가로스 겔 영동이 가능한 프라이머를 추가로 디자인하였다. 두개의 프라이머 쌍을 제작하였으며 각각 CRb_057, CRb_065로 표 3에 나타내었다. CRb_057의 경우 350bp 크기로 제작되었다. 그 위치는 도 7에 도시한 바와 같다. 저항성 계통인 CR shinki와 Gelria는 300bp로 나타나며, 감수성 계통인 94sk와 chiifu의 경우 350bp로 저항성 계통보다 더 큰 크기를 가지고 있다. 94sk의 경우 350bp 이외에 희미하게 300bp 위치에서 밴드가 증폭된 것으로 보인다(도 8). 이를 보완하기 위해 CRb_065를 제작하였다.

표 3

프라이머 이름	정방향(5'→3')(서열번호)	역방향(5'→3')(서열번호)
CRb_057	TGCGGTTTCTTACAGAGTTAGG(35)	TCTGTTCCCTGAAGAAAAATGG(36)
CRb_065	TGACATTGTTGATGTGCTGA(37)	AAATATGCCTTCAATTGCTTC(38)

CRb_057에 뿌리혹병 관련 저항성, 감수성 생식질(germplasm)에 테스트를 해본 결과 CRb를 가지고 있다고 알려진 CR shinki, Gelria에서 밴드가 확인되었으며 감수성으로 알려진 Chiifu, 94sk에서 다른 위치에 증폭된 것을 확인할 수 있었다(도 9). 이는 CRb_065에서도 동일한 결과를 보였다(도 10). CRb_065에 뿌리혹병 관련 저항성, 감수성 생식질(germplasm)에 테스트를 해본 결과 CRb를 가지고 있다고 알려진 CR shinki, Gelria에서 밴드가 확인되었으며 감수성으로 알려진 Chiifu, 94sk에서 다른 위치에 증폭된 것을 확인할 수 있었다(도 10 및 도 11). CRb_065의 경우 202bp 크기로 제작하였고, 그 위치는 도 12a에 도시한 바와 같다. CR shinki, Gelria 계통의 경우 148bp, 94sk, Chiifu 계통의 경우 202bp로 증폭되어 구분이 명확하게 되었고, 아가로스 겔에서 판별이 용이하였다(도 12b).

또한, 타겟 영역(83.5 Kb)에서 CRb 유전자좌의 저항성 형질에 대한 후보유전자 중 하나인 bra012541를 목표로 하여 염기서열상의 차이를 찾아보고 이를 이용하여 마커를 개발하고자 하였다. 저항성 계통인 CR shinki의 드 노보(de novo) 정보에서 블라스트를 수행한 결과 총 65개의 콘티그가 hit 되었으며 그 중 C6162466에서 3개의 다형성(SNP)를 확인하였다. SNP가 포함된 부분을 증폭하도록 하여 HRM으로 검출할 수 있는 프라이머 CRb_060(정방향 프라이머 5'-ATGACTTACTGCTTACAATGGGGA-3'(서열번호 39) 및 역방향 프라이머 5'-CTGGCTACCGTTTTGTACTTTA-3'(서열번호 40))을 제작하였으며 그 위치는 도 13a에 표시한 바와 같으며, 염기서열 정보를 바탕으로 하여 예측되는 PCR 앰플리콘 크기는 128bp였다. CRb_048 프라이머로 CR shinki, gelria,

siloga, 94sk, chiifu를 PCR 검정하였으며 저항성 계통인 CR shinki, gelria는 가장 아래 밴드로 나타났고, 94SK와 chiifu는 위의 밴드로 나타나 앰플리콘 크기에서 다형성을 나타냈으며, 저항성 계통과 감수성계통이 구분이 되었다(데이터 미제시). CR shinki, gelria 그리고 94sk, chiifu는 기본 설정 값에서는 구분이 되지 않았지만 curve shift 값을 0.05에서 0.00으로 낮춘 결과 저항성과 감수성 간에 차이가 있었으며 헤테로 타입도 구별이 가능했다. 저항성과 감수성간의 차이를 구별하기에 해상도가 많이 떨어진다. 하지만 저항성과 감수성의 gDNA를 섞어 인위적으로 섞어 헤테로 타입 밴드를 만들면 분석이 쉽게 가능하다.

[0046] 따라서, 요약하면, 본 발명에서 개발된 마커들은 모두 CRb를 구별할 수 있는 마커이며, CRb_003, CRb_048은 PAGE 영동을 통해 확인 가능하며 CRb_057, CRb_065의 경우 Agarose gel, CRb_065, CRb_060은 HRM 분석이 가능하다(표 4).

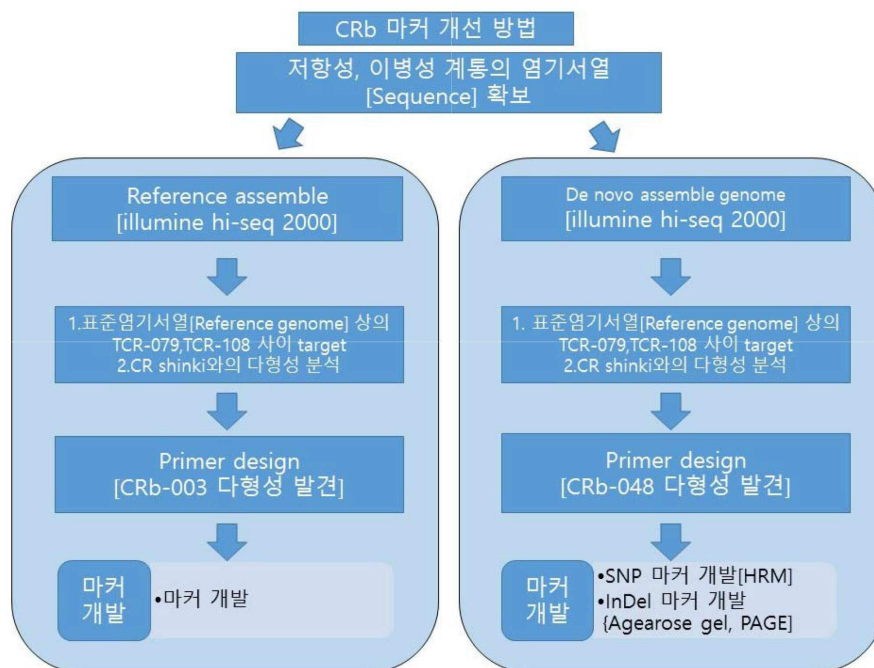
표 4

[0047]

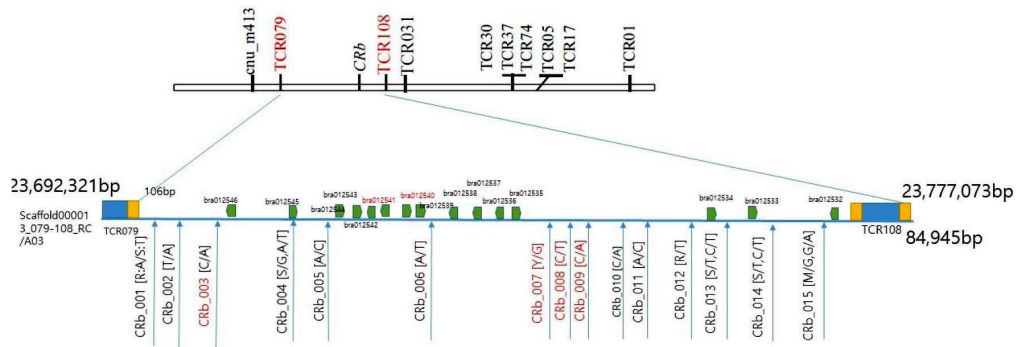
마커이름	identification of loci						
	Agarose gel	PAGE	HRM	CRb	CRa	CRaki	Crr1
CRb_003		+		+	-	-	-
CRb_048		+		+	-	-	-
CRb_057	+			+	-	-	-
CRb_065	+		+	+	-	-	-
CRb_060			+	+			

도면

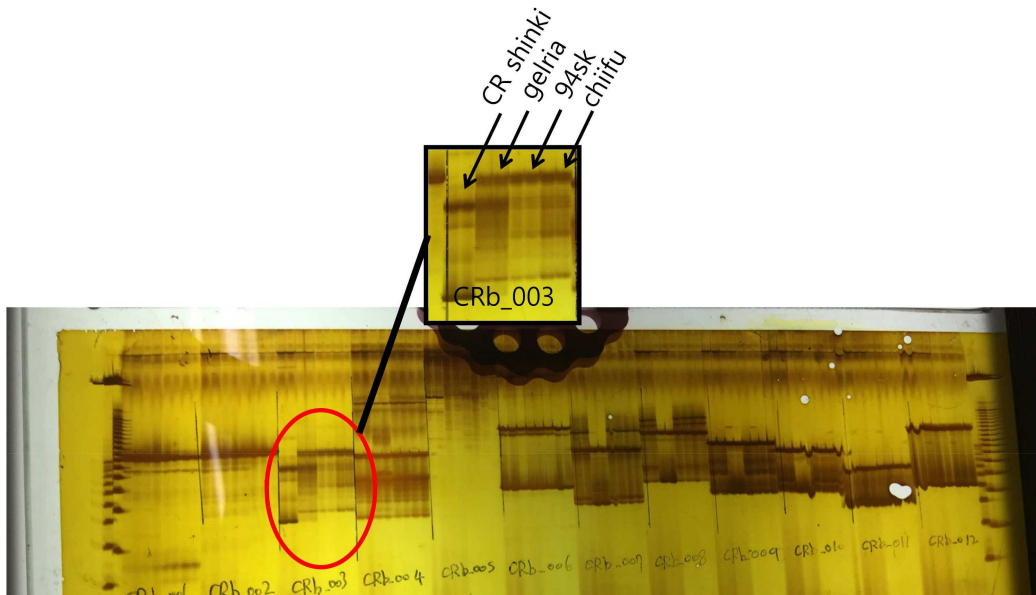
도면1



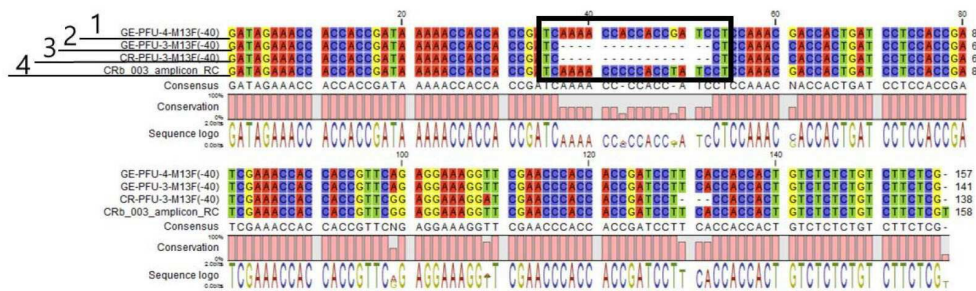
도면2



도면3

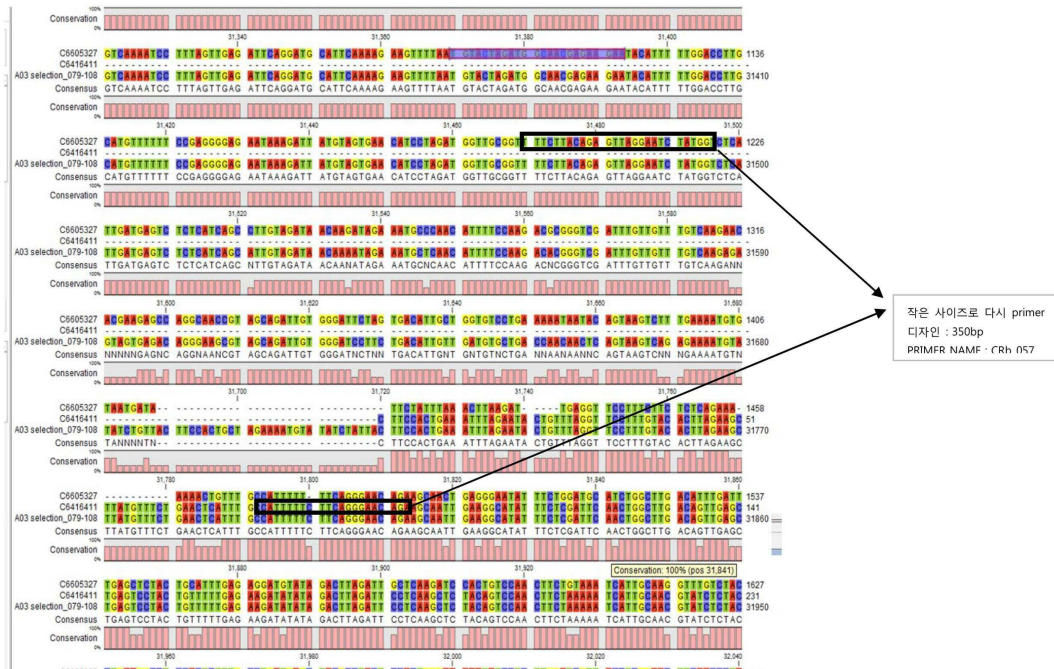


도면4

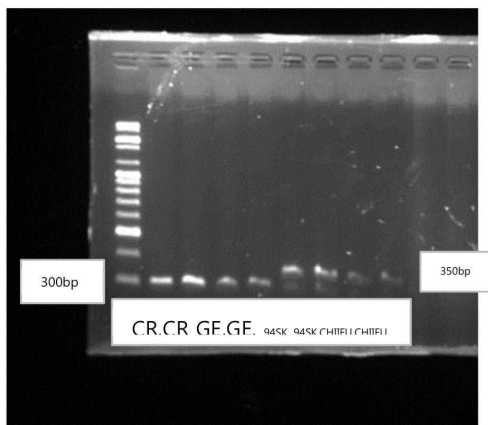


1. 시료 6(Gelria_3반복)
2. 시료 7(Gelria_4반복)
3. 시료 3(CR shinki_3반복)
4. chiifu

도면7



도면8

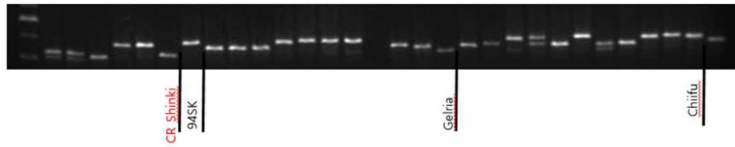


도면9

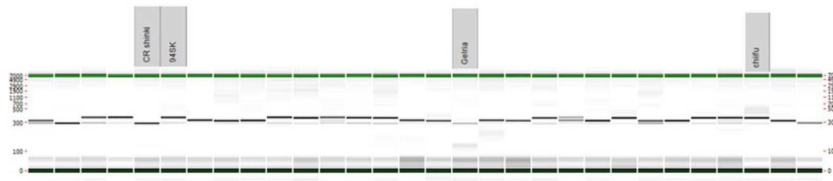
(A)

CRb_057

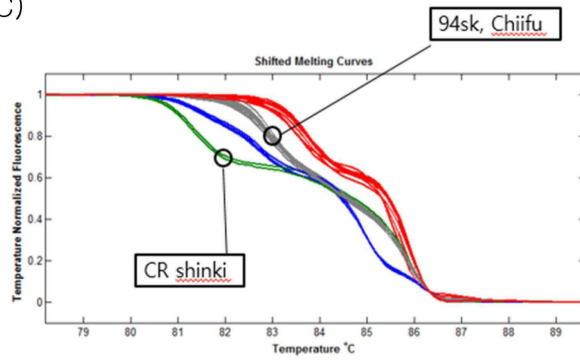
여러 유전자원에서 test→결과는 CRb는 구분가능하다



(B)

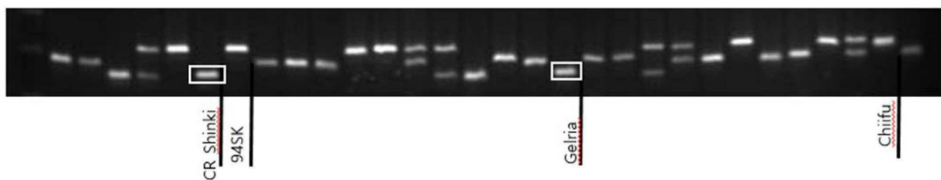


(C)



도면10

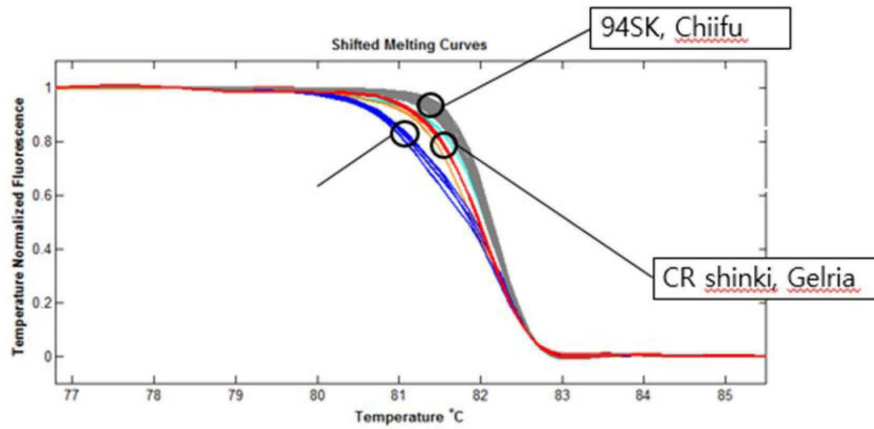
CRb_065



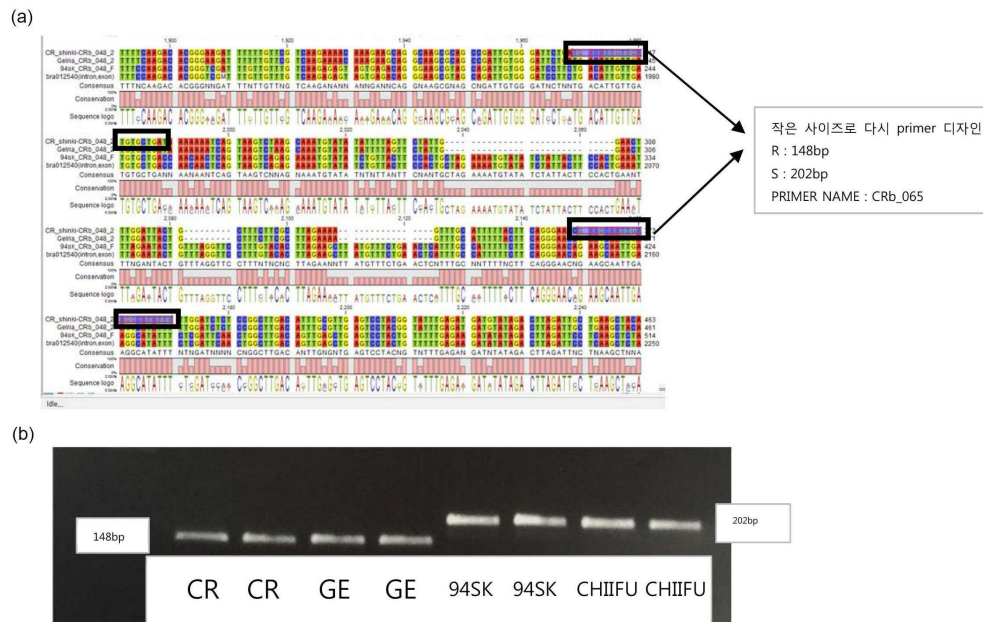
CRb_065



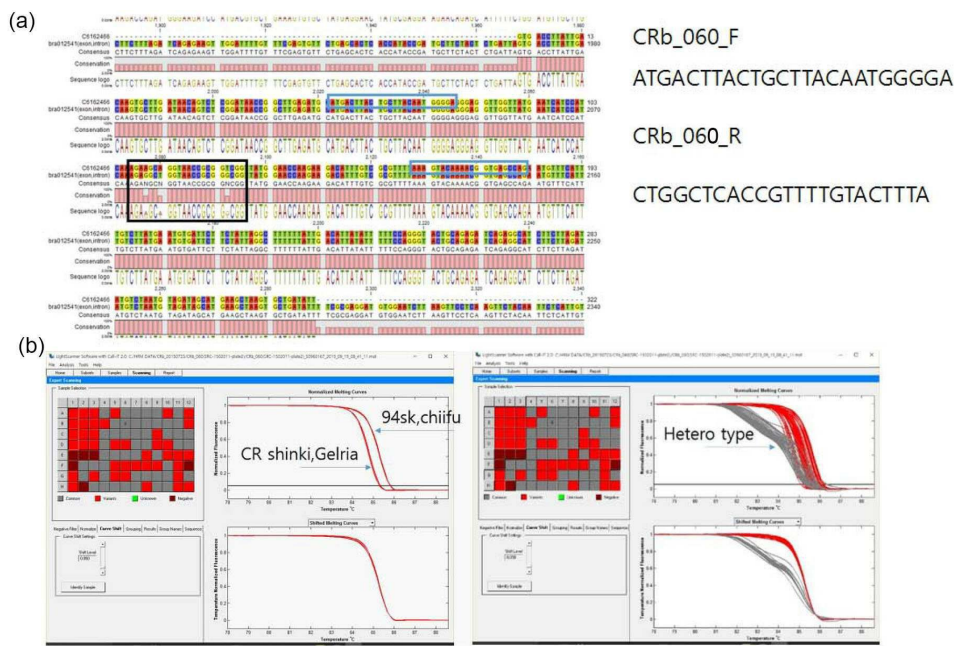
도면11



도면12



도면13



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Specific primer set for discrimination of cabbage clubroot disease-resistant cultivar and uses thereof
- <130> PN15348
- <160> 40
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 24
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> primer
- <400> 1
- atcacgaatt ctagtctgaa cacc
- <210> 2
- <211> 24
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> primer
- <400> 2

aatatgatag tcgaggacga acga	24
<210> 3	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 3	
gatgttgagc aaataaaacc gc	22
<210> 4	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 4	
gacataatac aaggtcaagc tccg	24
<210> 5	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 5	
acgagaagac agagagacag tggt	24
<210> 6	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 6	
gatagaaacc accaccgata aaaac	25
<210> 7	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	

<400>	7	
attttagga gtaacctcag ccaa		24
<210>	8	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	8	
aggagacatg gtctttcatg tgac		24
<210>	9	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	9	
taaacgaact ctcaatcgaa ctcc		24
<210>	10	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	10	
ttctcgacgc tctaaggtga gtat		24
<210>	11	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	11	
atttagtgaa tgcaggcaca tctc		24
<210>	12	
<211>	24	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

ttaccaaatg gagaagacac tacc 24

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

gtagggcagt taaataggac atgg 24

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

cttgcctaag ctacgacact ttct 24

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

agggtgggta gtaacctcct gtat 24

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

tacttgaac gtacaacgag tcag 24

<210> 17

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 17
 cgtacctatg ccacactcta gga 23
 <210> 18
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 18
 aagtaacttg gaggaatggg gtt 23
 <210> 19
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 19
 aaaaagcaat atcacggaac cc 22
 <210> 20
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 20
 cttcctaagg gtctttgtga gaag 24
 <210> 21
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 21
 tccttgacag ttccagctca taat 24

<210> 22
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 22
 ctccaaacgt aagactcctt tgac 24

<210> 23
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 23
 aaatcttgga ggaacactga gatg 24

<210> 24
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 24
 attgtcagcg acttacacat gaga 24

<210> 25
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 25
 catttggaat agcgtaggg atag 24

<210> 26
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer

<400>	26	
gaaacacttg atctgcatct tgc		23
<210>	27	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	27	
atcacaaatgt cttgaagaga accc		24
<210>	28	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	28	
gtaaggtaac attatttgcc ggg		23
<210>	29	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	29	
cccactccat attttactcc agaa		24
<210>	30	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	30	
caaccccact tcatatttta ctcc		24
<210>	31	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223>	primer	
<400>	31	
aaaacccccca	cctatc	16
<210>	32	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	32	
aaaacccccca	cctatc	16
<210>	33	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	33	
tgtactagat	ggcaacgaga agaa	24
<210>	34	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	34	
cagtggagta	gacgtagctc atca	24
<210>	35	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	35	
tgcggttttc	ttacagagtt agg	23
<210>	36	
<211>	22	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 36
 tctgttcct gaagaaaaat gg 22
 <210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 37
 tgacattgtt gatgtgctga 20

 <210> 38
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 38
 aaatatgcct tcaattgctt c 21
 <210> 39
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 39
 atgacttact gcttacaatg ggga 24
 <210> 40
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 40
 ctggctcacc gttttgtact tta 23