



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2013-0043439  
 (43) 공개일자 2013년04월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*G01N 33/74* (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)  
*G01N 33/52* (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2011-0107570  
 (22) 출원일자 2011년10월20일  
 심사청구일자 2011년10월20일

(71) 출원인  
**한국해양과학기술원**  
 경기도 안산시 상록구 해안로 787 (사동, 한국해양연구원)  
 (72) 발명자  
**염승식**  
 경남 거제시 고현동 고려4차아파트 504-1303  
**우선욱**  
 경남 거제시 고현동 고려4차아파트 504-1303  
**원효경**  
 경상남도 진주시 집현면 신당길208번길 10-28  
 (74) 대리인  
**이원희**

전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **17β-에스트라디올(17β-estradiol, E2) 노출에 대응하는 바다송사리 유전자 및 이를 이용한 환경 오염 진단 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 17β-에스트라디올(17β-estradiol, E2)의 노출에 대응하는 바다송사리의 유전자 및 이를 이용한 환경 오염 진단방법에 관한 것으로, 구체적으로, 바다송사리를 대상으로 해양환경오염에 대응하는 생체지표의 발굴을 시도하였으며, 17β-에스트라디올 노출에 대한 특이 유전자 후보의 확보 및 검출을 위해 HazChem Fish Array를 활용하여 17β-에스트라디올 노출 여부를 확인할 수 있는 생체지표 및 이들 유전자 생체지표들의 발현량 변화를 규명하였으므로, 이를 환경오염 진단 방법에 이용할 수 있다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	KORDI PM56202
부처명	국토해양부
연구사업명	해양생명공학기술개발사업
연구과제명	해양극한생물분자유전체연구
주관기관	한국해양연구원
연구기간	2010.01.01 ~ 2013.12.30

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

하기의 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자의 핵산 서열의 전부 또는 이의 단편인 올리고뉴클레오티드 또는 그의 상보가닥 분자가 집적된, 시료내 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부 검출 및 환경오염 진단용 마이크로어레이 칩:

서열번호 1로 기재되는 유전자(Dimethylglycine dehydrogenase), 서열번호 2로 기재되는 유전자(Fructose-bisphosphate aldolase B), 서열번호 3으로 기재되는 유전자(Fatty acid binding protein 10 liver basic), 서열번호 4로 기재되는 유전자(Claudin), 서열번호 5로 기재되는 유전자(Cytochrome P450 2P3), 서열번호 6으로 기재되는 유전자(Aldolase B), 서열번호 7로 기재되는 유전자(Cytochrome c-1, cycl), 서열번호 8로 기재되는 유전자(Selenoprotein M), 서열번호 9로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 10으로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 11로 기재되는 유전자(ATP citrate lyase isoform 2), 서열번호 12로 기재되는 유전자(Ribosomal protein L13a, rpl13a), 서열번호 13으로 기재되는 유전자(Cytochrome c oxidase subunit I), 서열번호 14로 기재되는 유전자(Pyrroline-5-carboxylate reductase 1, pyrcl), 서열번호 15로 기재되는 유전자(Exs-related protein), 서열번호 16로 기재되는 유전자(Cysteine-rich with EGF-like domains 2, creld2), 서열번호 17로 기재되는 유전자(Selenoprotein 15), 서열번호 18로 기재되는 유전자(Beta-galactoside-binding lectin), 서열번호 19로 기재되는 유전자(hv1 gene for histone H2 variant), 서열번호 20으로 기재되는 유전자(LAG1 longevity assurance 2), 서열번호 21로 기재되는 유전자(Inositol oxygenase), 서열번호 22로 기재되는 유전자(Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1), 서열번호 23으로 기재되는 유전자(Tetraspanin-3), 서열번호 24로 기재되는 유전자(Microsomal triglyceride transfer protein), 서열번호 25로 기재되는 유전자(Amino-terminal enhancer of split), 서열번호 26으로 기재되는 유전자(non-classical MHC class I antigen), 서열번호 27로 기재되는 유전자(NADH-cytochrome b5 reductase 3), 서열번호 28로 기재되는 유전자(rRNA 2-O-methyltransferase fibrillar), 서열번호 29로 기재되는 유전자(Vitellogenin II, vit-6), 서열번호 30으로 기재되는 유전자(Choriogenin H minor), 서열번호 31로 기재되는 유전자(Adenylosuccinate synthetase isozyme 2), 서열번호 32로 기재되는 유전자(Mannose-P-dolichol utilization defect 1b, mpdulb), 서열번호 33으로 기재되는 유전자(RAB3 GTPase activating protein subunit 2 (non-catalytic)), 서열번호 34로 기재되는 유전자(Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 1b), 서열번호 35로 기재되는 유전자(40S ribosomal protein S24-like protein), 서열번호 36으로 기재되는 유전자(Exosome complex exonuclease RRP4), 서열번호 37로 기재되는 유전자(Iduronate 2-sulfatase precursor), 서열번호 38로 기재되는 유전자(Vitellogenin 1, ol-vit1), 서열번호 39로 기재되는 유전자(Oligosaccharyltransferase complex subunit, ostc), 서열번호 40로 기재되는 유전자(Abhydrolase domain containing 11), 서열번호 41로 기재되는 유전자(B-cell antigen receptor complex-associated protein alpha-chain precursor), 서열번호 42로 기재되는 유전자(Alpha-2,3-sialyltransferase ST3Gal I), 서열번호 43으로 기재되는 유전자(Glutathione reductase (mitochondrial)), 서열번호 44로 기재되는 유전자(Choriogenin L), 서열번호 45로 기재되는 유전자(Integral membrane protein 1), 서열번호 46으로 기재되는 유전자(Complement control protein factor I-B), 서열번호 47로 기재되는 유전자(Glutamate receptor, ionotropic, delta 1, GRID1), 서열번호 48로 기재되는 유전자(Dolichyl-alpha-1,6-mannosyltransferase (alg12)), 서열번호 49로 기재되는 유전자(Macrosialin precursor), 서열번호 50으로 기재되는 유전자(Metalloreductase STEAP4), 서열번호 51로 기재되는 유전자(14-alpha demethylase (CYP51)) 서열번호 52로 기재되는 유전자(Bromodomain containing 2 (RING3)), 서열번호 53으로 기재되는 유전자(Apolipoprotein B), 서열번호 54로 기재되는 유전자(Glutamate dehydrogenase 1b), 서열번호 55로 기재되는 유전자(Glucose-6-phosphate dehydrogenase) 및 서열번호 56으로 기재되는 유전자(Transferrin).

### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 유전자는 바다송사리(*Oryzias javanicus*)로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부 검출 및 환경오염 진단용 마이크로어레이 칩.

**청구항 3**

제 1항에 있어서, 상기 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬은 17β-에스트라디올(17β-estradiol, E2)인 것을 특징으로 하는 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부 검출 및 환경오염 진단용 마이크로어레이 칩.

**청구항 4**

제 1항에 있어서, 서열번호 7로 기재되는 유전자(Cytochrome c-1, *cyc1*), 서열번호 8로 기재되는 유전자(Selenoprotein M), 서열번호 9로 기재되는 유전자(ATPase H+ transporting V1 subunit F, *atp6v1f*), 서열번호 10으로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, *CO I*), 서열번호 11로 기재되는 유전자(ATP citrate lyase isoform 2), 서열번호 12로 기재되는 유전자(Ribosomal protein L13a, *rpl13a*), 서열번호 13으로 기재되는 유전자(Cytochrome c oxidase subunit I), 서열번호 14로 기재되는 유전자(Pyrroline-5-carboxylate reductase 1, *pycr1*), 서열번호 15로 기재되는 유전자(Exs-related protein), 서열번호 16로 기재되는 유전자(Cysteine-rich with EGF-like domains 2, *creld2*), 서열번호 17로 기재되는 유전자(Selenoprotein 15), 서열번호 18로 기재되는 유전자(Beta-galactoside-binding lectin), 서열번호 19로 기재되는 유전자(*hvl* gene for histone H2 variant), 서열번호 20으로 기재되는 유전자(LAG1 longevity assurance 2), 서열번호 21로 기재되는 유전자(Inositol oxygenase), 서열번호 22로 기재되는 유전자(Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1), 서열번호 23으로 기재되는 유전자(Tetraspanin-3), 서열번호 24로 기재되는 유전자(Microsomal triglyceride transfer protein), 서열번호 25로 기재되는 유전자(Amino-terminal enhancer of split), 서열번호 26으로 기재되는 유전자(non-classical MHC class I antigen, 서열번호 27로 기재되는 유전자(NADH-cytochrome b5 reductase 3), 서열번호 28로 기재되는 유전자(rRNA 2-O-methyltransferase fibrillar), 서열번호 29로 기재되는 유전자(Vitellogenin II, *vit-6*), 서열번호 30으로 기재되는 유전자(Choriogenin H minor), 서열번호 31로 기재되는 유전자(Adenylosuccinate synthetase isozyme 2), 서열번호 32로 기재되는 유전자(Mannose-P-dolichol utilization defect 1b, *mpdulb*), 서열번호 33으로 기재되는 유전자(RAB3 GTPase activating protein subunit 2 (non-catalytic)), 서열번호 34로 기재되는 유전자(Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 1b), 서열번호 35로 기재되는 유전자(40S ribosomal protein S24-like protein), 서열번호 36으로 기재되는 유전자(Exosome complex exonuclease RRP4), 서열번호 37로 기재되는 유전자(Iduronate 2-sulfatase precursor), 서열번호 38로 기재되는 유전자(Vitellogenin 1, *ol-vit1*), 서열번호 41로 기재되는 유전자(B-cell antigen receptor complex-associated protein alpha-chain precursor), 서열번호 42로 기재되는 유전자(Alpha-2,3-sialyltransferase ST3Gal I), 서열번호 43으로 기재되는 유전자(Glutathione reductase (mitochondrial)), 서열번호 44로 기재되는 유전자(Choriogenin L), 서열번호 45로 기재되는 유전자(Integral membrane protein 1), 서열번호 46으로 기재되는 유전자(Complement control protein factor I-B), 서열번호 47로 기재되는 유전자(Glutamate receptor, ionotropic, delta 1, GRID1), 서열번호 48로 기재되는 유전자(Dolichyl-alpha-1,6-mannosyltransferase (*alg12*)), 서열번호 49로 기재되는 유전자(Macrosialin precursor), 서열번호 50으로 기재되는 유전자(Metalloreductase STEAP4), 서열번호 51로 기재되는 유전자(14-alpha demethylase (CYP51)) 및 서열번호 52로 기재되는 유전자(Bromodomain containing 2 (RING3))는 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출에 대응하여 발현이 증가하는 것을 특징으로 하는 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부 검출 및 환경오염 진단용 마이크로어레이 칩.

**청구항 5**

제 1항에 있어서, 서열번호 1로 기재되는 유전자(Dimethylglycine dehydrogenase), 서열번호 2로 기재되는 유전자(Fructose-bisphosphate aldolase B), 서열번호 3으로 기재되는 유전자(Fatty acid binding protein 10 liver basic), 서열번호 4로 기재되는 유전자(Claudin), 서열번호 5로 기재되는 유전자(Cytochrome P450 2P3), 서열번호 6으로 기재되는 유전자(Aldolase B), 서열번호 39로 기재되는 유전자(Oligosaccharyltransferase complex subunit, *ostc*) 및 서열번호 40로 기재되는 유전자(Abhydrolase domain containing 11)는 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출에 대응하여 발현이 감소하는 것을 특징으로 하는 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부 검출 및 환경오염 진단용 마이크로어레이 칩.

### 청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 마이크로어레이 칩은 하기의 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 외부 스트레스에 대한 자기 방어적 기작에 관련된 유전자의 핵산 서열의 전부 또는 이의 단편인 올리고뉴클레오티드 또는 그의 상보가닥 분자가 집적된 것을 특징으로 하는 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부 검출 및 환경오염 진단용 마이크로어레이 칩.:

서열 번호 5로 기재되는 유전자(Cytochrome P450 1A, CYP1A)), 서열 번호 8로 기재되는 유전자(Selenoprotein M), 서열번호 38로 기재되는 유전자(Vitellogenin 1), 서열 번호 53으로 기재되는 유전자(Apolipoprotein B), 서열 번호 54로 기재되는 유전자(Glutamate dehydrogenase 1b), 서열 번호 55로 기재되는 유전자(Glucose-6-phosphate dehydrogenase) 및 서열 번호 56으로 기재되는 유전자(Transferrin).

### 청구항 7

1) 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부를 확인하고자 하는 피검 시료를 처리한 실험군의 바다송사리와, 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬이 포함되지 않은 피검 시료를 처리한 대조군의 바다송사리에서 각각 RNA를 분리하는 단계;

2) 단계 1)의 실험군 및 대조군의 RNA로부터 cDNA를 합성하면서 실험군과 대조군을 각기 다른 형광물질로 표지하는 단계;

3) 단계 2)의 각기 다른 형광물질로 표지된 cDNA를 제 1항의 마이크로어레이 칩과 혼성화시키는 단계;

4) 반응한 마이크로어레이 칩을 분석하는 단계; 및

5) 분석한 데이터에서 제 1항의 마이크로어레이 칩에 집적된 유전자 발현 정도를 대조군과 비교하여 확인하는 단계를 포함하는, 시료내 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부 검출 및 환경오염 진단 방법.

### 청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 시료는 생체시료, 식품시료, 화학시료, 공업시료, 임상시료 및 환경시료로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부 검출 및 환경오염 진단 방법.

### 청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬은 17 $\beta$ -에스트라디올인 것을 특징으로 하는 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부 검출 및 환경오염 진단 방법.

### 청구항 10

제 7항에 있어서, 단계 2)의 형광물질은 Cy3, Cy5, 폴리 L-라이신-플루오레세인 이소티오시아네이트(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate, FITC), 로다민-B-이소티오시아네이트(rhodamine-B-isothiocyanate, RITC) 및 로다민(rhodamine)으로 이루어진 군으로부터 선택되어지는 것을 특징으로 하는 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부 검출 및 환경오염 진단 방법.

### 청구항 11

1) 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부를 확인하고자 하는 피검시료를 처리한 실험군의 바다송사리와, 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬이 포함되지 않은 피검 시료를 처리한 대조군의 바다송사리에서 각각 RNA를 분리하는 단계;

- 2) 단계 1)의 RNA를, 제 1항의 유전자에 상보적이고 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 쌍을 사용하여 실시간 RT-PCR(Real-time reverse transcript polymerase chain reaction)을 수행하는 단계; 및
- 3) 단계 2)의 유전자 산물을 대조군과 비교하여 발현 정도를 확인하는 단계를 포함하는, 시료내 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부 검출 및 환경오염 진단 방법.

#### 청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 시료는 생체시료, 식품시료, 화학시료, 공업시료, 임상시료 및 환경시료로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출에 따른 스트레스 검출 및 환경오염 진단 방법.

#### 청구항 13

제 11항에 있어서, 상기 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬은  $17\beta$ -에스트라디올인 것을 특징으로 하는 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부 검출 및 환경오염 진단 방법.

#### 청구항 14

제 1항의 마이크로어레이 칩을 포함하는, 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부 검출 및 환경오염 진단용 키트.

#### 청구항 15

제 14항에 있어서, 상기 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬은  $17\beta$ -에스트라디올인 것을 특징으로 하는 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부 검출 및 환경오염 진단용 키트.

#### 청구항 16

제 14항에 있어서, 스트렙타비딘-알칼리 탈인화효소 접합물질(streptavidin-like phosphatase conjugate), 화학형광물질(chemifluorescence) 및 화학발광물질(chemiluminescent)로 이루어진 형광물질군으로부터 선택되는 어느 하나를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부 검출 및 환경오염 진단용 키트.

#### 청구항 17

제 14항에 있어서, 혼성화에 사용되는 완충용액, RNA로부터 cDNA를 합성하기 위한 역전사효소, dNTPs 및 rNTP (사전 혼합형 또는 분리 공급형), 표식시약, 및 세척 완충용액으로 이루어진 반응시약군으로부터 선택되는 어느 하나를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부 검출 및 환경오염 진단용 키트.

#### 청구항 18

제 1항의 마이크로어레이 칩에 집적된 유전자에 상보적이고 상기 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 쌍을 포함하는, 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부 검출 및 환경오염 진단용 키트.

**청구항 19**

제 18항에 있어서, 상기 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬은 17β-에스트라디올인 것을 특징으로 하는 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부 검출 및 환경오염 진단용 키트.

**청구항 20**

제 18항에 있어서, RNA로부터 cDNA를 합성하기 위한 역전사효소, cNTPs 및 rNTP(사전 혼합형 또는 분리 공급형), DNA 중합효소 및, 세척 완충용액으로 구성된 반응시약군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부 검출 및 환경오염 진단용 키트.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 내분비계 장애물질(Endocrine disrupting chemical, EDC)의 일종인 17β-에스트라디올(17β-estradiol, E2)에 대한 노출 여부 확인, 환경오염 검출 또는 진단용 마이크로어레이 칩 및 이를 이용한 노출 여부 검출 및 환경오염 진단 방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 17β-에스트라디올(17β-estradiol, E2)은 포유동물의 가장 강력한 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬[에스트론(estrone, E1), 17β-에스트라디올 및 에스트리올(estriol, E3)]이다. 인간의 경우 가임기 여성의 난소와 태반에서 주로 형성되나, 남성 및 폐경 여성의 지방조직에서도 만들어진다. 합성된 형태의 17β-에스트라디올은 여성의 폐경과 관련된, 혈관운동장애, 외음부 및 질 수축장애, 골다공증 등과 같은 여러 가지 증상의 조절에 이용되고 있다. 인간 및 동물에 의해 분비된 17β-에스트라디올을 포함한 에스트론 및 에스트리올 등이 하수처리장 및 동물폐기물 등에 의해서 환경으로 배출된다. 이와 같이 배출된 스테로이드 호르몬들은 생태계의 안정에 위협이 되고 있다. 즉, 수컷 어류에서의 비텔로제닌(vitellogenin) 합성과 암컷화를 유도 등과 같은 작용을 통해 수컷의 정상적인 내분비계 기능을 저해되고, 이로 인해 수컷의 생식능력이 저하되어 생태계를 교란하는 결과를 초래할 것으로 예상된다. 따라서 17β-에스트라디올의 존재 여부를 예측하고, 이에 노출됨으로써 야기되는 생물학적 변화를 예측하고, 조기에 진단할 수 있는 방법의 개발이 필요하다.

[0003] 바다송사리(또는 자바송사리, *Oryzias javanicus*)는 지구에 존재하는 모든 수계(담수와 해수)에 서식 가능한 어류로서(Inoue와 Takei, *Zoological Sci.*, 19, 727-734, 2002), 담수와 해수의 유해화학물질에 대한 환경위해성 평가에 적용 가능할 것으로 예상된다. 현재까지 17β-에스트라디올 노출에 대한 생식력 변화와 수컷 간 조직에서의 비텔로제닌 단백질 농도 변화에 대한 연구(Imai 등, *Mar. Poll. Bull.*, 51, 708-714, 2005); 17β-에스트라디올 노출에 의한 수컷 간 조직에서의 코리오제닌(choriogenin) H 및 L 유전자의 발현변화(Yu 등, *Aquat. Toxicol.*, 77, 348-358, 2006), 다양한 중금속 노출에 대한 간 조직에서의 메탈로티오네인(metallothionein) 유전자의 발현량 변화(Woo 등, *Mar. Biotech.*, 8, 654-662, 2006) 및 환경내의 에스트론 노출에 의한 바다송사리의 생식력 및 간 조직내의 비텔로제닌 단백질 농도 변화(Imai 등, *Environ. Toxicol. Chem.*, 26, 726-731, 2007)에 대한 연구 결과가 보고된 바 있다. 또한 6종의 주요 중금속(Ag, Cd, Cr, Cu, Ni, Zn)에 노출된 이후(Woo 등, *Comp. Biochem. Physiol. C*, 149, 289-299, 2009) 유기인계 농약인 이프로벤포스(Iprobenfos) 노출(Woo 등, *Comp. Biochem. Physiol. C*, 149, 427-432, 2009) 및 폴리염화 캄펜인 독사펜(Toxaphene) 노출(Woo 등, *Comp. Biochem. Physiol. C*, 153, 355-361, 2011) 이후 나타나는 항산화효소 및 스트레스 관련 유전자들의 발현량 변화에 대한 연구보고가 있다.

[0004] 생물들은 환경오염, 기후변화 및 병원성 미생물의 감염 등과 같은 외부 환경변화에 대응하여, 항상성을 유지하기 위해 생체방어기작을 진화시켜왔다. 이 생체방어기작의 대부분은 특정 유전자의 발현량을 능동적으로 변화시켜, 특정 단백질의 양을 조절하는 것으로 나타난다. 따라서, 특정 변화에 대한 특이적인 유전자들을 발굴하여 이들의 발현량 변화를 모니터링하면, 특정지역의 환경변화에 관한 정보뿐만 아니라, 이러한 환경변화가 생명현상에 미치는 영향 및 생태계의 건강에 관한 정보를 얻을 수 있다. 현재까지 바다송사리의 17β-에스트라디올 노출에 대한 특이 유전자 후보의 확보 및 검출에 대해 연구된 바 없다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 바다송사리를 대상으로 해양환경오염에 대응하는 생체지표의 발굴을 시도하였으며, 구체적으로, 17β-에스트라디올 노출에 대한 특이 유전자 후보의 확보 및 검출을 위해 HazChem Fish Array를 활용하여 17β-에스트라디올 노출 여부를 확인할 수 있는 생체지표 및 유전자 생체지표들의 발현량 변화를 규명하였고, 이를 스트레스 검출 및 환경오염 진단에 이용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 17β-에스트라디올(17β-estradiol, E2) 노출에 대응하는 바다송사리(*Oryzias javanicus*)의 유전자 및 이를 이용한, 환경 오염에 대한 스트레스 검출 및 환경오염 진단 방법을 제공하는 것이다.

#### 과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출에 대응하여 발현이 증가 또는 감소하는 유전자 염기서열의 전부 또는 일부를 포함하는 올리고뉴클레오티드, 또는 상기 올리고뉴클레오티드에 상보적인 올리고뉴클레오티드 분자가 집적된, 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출에 따른 스트레스 검출 및 환경오염 진단용 마이크로어레이 칩을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 유전자를 이용한, 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출에 따른 스트레스 검출 및 환경오염 진단 방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 마이크로어레이 칩을 포함하는, 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출에 따른 스트레스 검출 및 환경오염 진단용 키트를 제공한다.

[0010] 아울러, 본 발명은 상기 유전자에 상보적이고 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 쌍을 포함하는, 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출에 따른 스트레스 검출 및 환경오염 진단용 키트를 제공한다.

#### 발명의 효과

[0012] 바다송사리를 대상으로 해양환경오염에 대응하는 생체지표의 발굴을 시도하였으며, 구체적으로, 17β-에스트라디올(17β-estradiol, E2)노출에 대한 특이 유전자 후보의 확보 및 검출을 위해 HazChem Fish Array를 활용하여 17β-에스트라디올 노출 여부를 확인할 수 있는 생체지표 및 이들 유전자 생체지표들의 발현량 변화를 규명하였으므로, 이를 환경오염 진단 방법에 이용할 수 있다.

#### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0014] 본 발명은 하기 군으로 구성된, 시료내 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부 검출 및 환경오염 진단용 유전자를 제공한다:

[0015] 서열번호 1로 기재되는 유전자(Dimethylglycine dehydrogenase), 서열번호 2로 기재되는 유전자(Fructose-bisphosphate aldolase B), 서열번호 3으로 기재되는 유전자(Fatty acid binding protein 10 liver basic), 서열번호 4로 기재되는 유전자(Claudin), 서열번호 5로 기재되는 유전자(Cytochrome P450 2P3), 서열번호 6으로 기재되는 유전자(Aldolase B), 서열번호 7로 기재되는 유전자(Cytochrome c-1, cyc1), 서열번호 8로 기재되는 유전자(Selenoprotein M), 서열번호 9로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 10으로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 11로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 12로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 13로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 14로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 15로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 16로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 17로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 18로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 19로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 20로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 21로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 22로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 23로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 24로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 25로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 26로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 27로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 28로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 29로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 30로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 31로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 32로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 33로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 34로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 35로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 36로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 37로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 38로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 39로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 40로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 41로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 42로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 43로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 44로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 45로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 46로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 47로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 48로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 49로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 50로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 51로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 52로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 53로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 54로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 55로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 56로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 57로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 58로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 59로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 60로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 61로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 62로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 63로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 64로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 65로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 66로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 67로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 68로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 69로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 70로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 71로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 72로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 73로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 74로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 75로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 76로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 77로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 78로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 79로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 80로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 81로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 82로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 83로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 84로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 85로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 86로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 87로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 88로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 89로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 90로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 91로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 92로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 93로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 94로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 95로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 96로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 97로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 98로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 99로 기재되는 유전자(ATPase H<sup>+</sup> transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 100로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I).

citrate lyase isoform 2), 서열번호 12로 기재되는 유전자(Ribosomal protein L13a, rpl13a), 서열번호 13으로 기재되는 유전자(Cytochrome c oxidase subunit I), 서열번호 14로 기재되는 유전자(Pyrroline-5-carboxylate reductase 1, pycr1), 서열번호 15로 기재되는 유전자(Exs-related protein), 서열번호 16로 기재되는 유전자(Cysteine-rich with EGF-like domains 2, creld2), 서열번호 17로 기재되는 유전자(Selenoprotein 15), 서열번호 18로 기재되는 유전자(Beta-galactoside-binding lectin), 서열번호 19로 기재되는 유전자(hv1 gene for histone H2 variant), 서열번호 20으로 기재되는 유전자(LAG1 longevity assurance 2), 서열번호 21로 기재되는 유전자(Inositol oxygenase), 서열번호 22로 기재되는 유전자(Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1), 서열번호 23으로 기재되는 유전자(Tetraspanin-3), 서열번호 24로 기재되는 유전자(Microsomal triglyceride transfer protein), 서열번호 25로 기재되는 유전자(Amino-terminal enhancer of split), 서열번호 26으로 기재되는 유전자(non-classical MHC class I antigen), 서열번호 27로 기재되는 유전자(NADH-cytochrome b5 reductase 3), 서열번호 28로 기재되는 유전자(rRNA 2-O-methyltransferase fibrillar), 서열번호 29로 기재되는 유전자(Vitellogenin II, vit-6), 서열번호 30으로 기재되는 유전자(Choriogenin H minor), 서열번호 31로 기재되는 유전자(Adenylosuccinate synthetase isozyme 2), 서열번호 32로 기재되는 유전자(Mannose-P-dolichol utilization defect 1b, mpdulb), 서열번호 33으로 기재되는 유전자(RAB3 GTPase activating protein subunit 2 (non-catalytic)), 서열번호 34로 기재되는 유전자(Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 1b), 서열번호 35로 기재되는 유전자(40S ribosomal protein S24-like protein), 서열번호 36으로 기재되는 유전자(Exosome complex exonuclease RRP4), 서열번호 37로 기재되는 유전자(Iduronate 2-sulfatase precursor), 서열번호 38로 기재되는 유전자(Vitellogenin 1, ol-vit1), 서열번호 39로 기재되는 유전자(Oligosaccharyltransferase complex subunit, ostc), 서열번호 40로 기재되는 유전자(Abhydrolase domain containing 11), 서열번호 41로 기재되는 유전자(B-cell antigen receptor complex-associated protein alpha-chain precursor), 서열번호 42로 기재되는 유전자(Alpha-2,3-sialyltransferase ST3Gal I), 서열번호 43으로 기재되는 유전자(Glutathione reductase (mitochondrial)), 서열번호 44로 기재되는 유전자(Choriogenin L), 서열번호 45로 기재되는 유전자(Integral membrane protein 1), 서열번호 46으로 기재되는 유전자(Complement control protein factor I-B), 서열번호 47로 기재되는 유전자(Glutamate receptor, ionotropic, delta 1, GRID1), 서열번호 48로 기재되는 유전자(Dolichyl-alpha-1,6-mannosyltransferase (alg12)), 서열번호 49로 기재되는 유전자(Macrosialin precursor), 서열번호 50으로 기재되는 유전자(Metalloreductase STEAP4), 서열번호 51로 기재되는 유전자(14-alpha demethylase (CYP51)), 서열번호 52로 기재되는 유전자(Bromodomain containing 2 (RING3)), 서열번호 53으로 기재되는 유전자(Apolipoprotein B), 서열번호 54로 기재되는 유전자(Glutamate dehydrogenase 1b), 서열번호 55로 기재되는 유전자(Glucose-6-phosphate dehydrogenase) 및 서열번호 56으로 기재되는 유전자(Transferrin).

[0016] 상기 유전자군에서 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬에 대응하여 발현이 증가하는 유전자는 하기의 유전자를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다:

[0017] 서열번호 7로 기재되는 유전자(Cytochrome c-1, cyc1), 서열번호 8로 기재되는 유전자(Selenoprotein M), 서열번호 9로 기재되는 유전자(ATPase H+ transporting V1 subunit F, atp6v1f), 서열번호 10으로 기재되는 유전자(Cytochrome oxidase subunit I, CO I), 서열번호 11로 기재되는 유전자(ATP citrate lyase isoform 2), 서열번호 12로 기재되는 유전자(Ribosomal protein L13a, rpl13a), 서열번호 13으로 기재되는 유전자(Cytochrome c oxidase subunit I), 서열번호 14로 기재되는 유전자(Pyrroline-5-carboxylate reductase 1, pycr1), 서열번호 15로 기재되는 유전자(Exs-related protein), 서열번호 16로 기재되는 유전자(Cysteine-rich with EGF-like domains 2, creld2), 서열번호 17로 기재되는 유전자(Selenoprotein 15), 서열번호 18로 기재되는 유전자(Beta-galactoside-binding lectin), 서열번호 19로 기재되는 유전자(hv1 gene for histone H2 variant), 서열번호 20으로 기재되는 유전자(LAG1 longevity assurance 2), 서열번호 21로 기재되는 유전자(Inositol oxygenase), 서열번호 22로 기재되는 유전자(Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1), 서열번호 23으로 기재되는 유전자(Tetraspanin-3), 서열번호 24로 기재되는 유전자(Microsomal triglyceride transfer protein), 서열번호 25로 기재되는 유전자(Amino-terminal enhancer of split), 서열번호 26으로 기재되는 유전자(non-classical MHC class I antigen, 서열번호 27로 기재되는 유전자(NADH-cytochrome b5 reductase 3), 서열번호 28로 기재되는 유전자(rRNA 2-O-methyltransferase fibrillar), 서열번호 29로 기재되는 유전자(Vitellogenin II, vit-6), 서열번호 30으로 기재되는 유전자(Choriogenin H minor), 서열번호 31로 기재되는 유전자(Adenylosuccinate synthetase isozyme 2), 서열번호 32로 기재되는 유전자(Mannose-P-dolichol utilization defect 1b, mpdulb), 서열번호 33으로 기재되는 유전자(RAB3 GTPase activating protein subunit 2 (non-catalytic)), 서열번호 34로 기재되는 유전자(Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding

protein 1b), 서열번호 35로 기재되는 유전자(40S ribosomal protein S24-like protein), 서열번호 36으로 기재되는 유전자(Exosome complex exonuclease RRP4), 서열번호 37로 기재되는 유전자(Iduronate 2-sulfatase precursor), 서열번호 38로 기재되는 유전자(Vitellogenin 1, ol-vit1), 서열번호 41로 기재되는 유전자(B-cell antigen receptor complex-associated protein alpha-chain precursor), 서열번호 42로 기재되는 유전자(Alpha-2,3-sialyltransferase ST3Gal I), 서열번호 43으로 기재되는 유전자(Glutathione reductase (mitochondrial)), 서열번호 44로 기재되는 유전자(Choriogenin L), 서열번호 45로 기재되는 유전자(Integral membrane protein 1), 서열번호 46으로 기재되는 유전자(Complement control protein factor I-B), 서열번호 47로 기재되는 유전자(Glutamate receptor, ionotropic, delta 1, GRID1), 서열번호 48로 기재되는 유전자(Dolichyl-alpha-1,6-mannosyltransferase (alg12)), 서열번호 49로 기재되는 유전자(Macrosialin precursor), 서열번호 50으로 기재되는 유전자(Metalloreductase STEAP4), 서열번호 51로 기재되는 유전자(14-alpha demethylase (CYP51)) 및 서열번호 52로 기재되는 유전자(Bromodomain containing 2 (RING3)).

[0018] 상기 유전자군에서 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬에 대응하여 발현이 감소하는 유전자는 하기의 유전자를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다:

[0019] 서열번호 1로 기재되는 유전자(Dimethylglycine dehydrogenase), 서열번호 2로 기재되는 유전자(Fructose-bisphosphate aldolase B), 서열번호 3으로 기재되는 유전자(Fatty acid binding protein 10 liver basic), 서열번호 4로 기재되는 유전자(Claudin), 서열번호 5로 기재되는 유전자(Cytochrome P450 2P3), 서열번호 6으로 기재되는 유전자(Aldolase B), 서열번호 39로 기재되는 유전자(Oligosaccharyltransferase complex subunit, ostc) 및 서열번호 40으로 기재되는 유전자(Abhydrolase domain containing 11).

[0020] 상기 마이크로어레이 칩은 하기의 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 외부 스트레스에 대한 자기 방어적 기작에 관련된 유전자의 핵산 서열의 전부 또는 이의 단편인 올리고뉴클레오티드 또는 그의 상보가닥 분자가 집적된 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다:

[0021] 서열 번호 5로 기재되는 유전자(Cytochrome P450 1A, CYP1A)), 서열 번호 8로 기재되는 유전자(Selenoprotein M), 서열번호 38로 기재되는 유전자(Vitellogenin 1), 서열 번호 53으로 기재되는 유전자(Apolipoprotein B), 서열 번호 54로 기재되는 유전자(Glutamate dehydrogenase 1b), 서열 번호 55로 기재되는 유전자(Glucose-6-phosphate dehydrogenase) 및 서열 번호 56으로 기재되는 유전자(Transferrin).

[0022] 상기 유전자는 바다송사리(*Oryzias javanicus*)로부터 유래되는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[0023] 상기 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬은 17β-에스트라디올(17β-estradiol, E2), 에스트론(estrone, E1) 및 에스트리올(estriol, E3)일 수 있고, 보다 구체적으로 17β-에스트라디올일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[0024] 상기 마이크로어레이 칩은 바다송사리의 17β-에스트라디올 오염에 대응하는 반응을 검출하는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[0025] 본 발명자들은 17β-에스트라디올 노출에 대응하는 바다송사리 유전자를 발굴하기 위하여, 바다송사리를 17β-에스트라디올 100 μg/L에 각각 24시간과 48시간 동안 노출한 후 바다송사리의 cDNA를 합성하여 발현량이 변화하는 유전자들을 조사하였다. 구체적으로, 일반해수에서 배양한 바다송사리(대조군) 또는 17β-에스트라디올을 포함하는 해수에서 배양한 바다송사리(실험군) 조직에서 mRNA를 각각 분리한 후, cDNA를 합성하였다. PCR을 이용하여 발현량이 변화한 유전자 단편을 증폭하였다. 그 결과, 17β-에스트라디올 노출에 대응하여 발현이 증가 또는 감소한 유전자 56개를 선별하였다. 17β-에스트라디올과 같은 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬은 수컷 어류에서의 비텔로제닌 합성과 암컷화를 유도함으로써 수컷의 정상적인 내분비계 기능이 저해되고, 이로 인해 수컷의 생식능력을 저하시켜 생태계를 교란하는 결과를 초래할 수 있다. 그러므로 생리 및 대사 변화의 원인인 유전자 발현량의 변화를 확인함으로써 외부 환경 변화에 따른 해양 생물의 스트레스 및 건강상태를 확인할 수 있고, 이들 유전자들을 환경 및 생물의 건강을 진단할 수 있는 생체지표로 이용할 수 있다.

[0026] 따라서, 상기 유전자들은 17β-에스트라디올 노출에 대응하여 유전자 발현에 유의적인 변화가 나타났으므로, 17β-에스트라디올과 같은 잔류성 독성 물질 오염에 따른 상태 진단 및 스트레스 검출을 위한 마커 유전자 및 이를 이용한 마이크로어레이 칩으로 유용하게 사용될 수 있다

[0027] 또한, 본 발명은

- [0028] 1) 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부를 확인하고자 하는 피검 시료를 처리한 실험군의 바다송사리와, 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬이 포함되지 않은 피검 시료를 처리한 대조군의 바다송사리에서 각각 RNA를 분리하는 단계;
- [0029] 2) 단계 1)의 실험군 및 대조군의 RNA로부터 cDNA를 합성하면서 실험군과 대조군을 각기 다른 형광물질로 표지하는 단계;
- [0030] 3) 단계 2)의 각기 다른 형광물질로 표지된 cDNA를 상기 마이크로어레이 칩과 혼성화시키는 단계;
- [0031] 4) 반응한 마이크로어레이 칩을 분석하는 단계; 및
- [0032] 5) 분석한 데이터에서 상기 마이크로어레이 칩에 집적된 유전자 발현 정도를 대조군과 비교하여 확인하는 단계를 포함하는, 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부 검출 및 환경오염 진단 방법을 제공한다.
- [0033] 상기 방법에 있어서, 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬은 17 $\beta$ -에스트라디올일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0034] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 형광물질은 Cy3, Cy5, 폴리 L-라이신-플루오레세인 이소티오시아네이트(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate, FITC), 로다민-B-이소티오시아네이트(rhodamine-B-isothiocyanate, RITC) 및 로다민(rhodamine)으로 이루어진 군으로부터 선택되어지는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않으며, 당업자에게 알려진 형광물질은 모두 사용 가능하다.
- [0035] 상기 방법에 있어서, 단계 4)의 마이크로어레이 칩은 상기 유전자가 탑재된 것이라면 모두 사용 가능하다. 상기 모든 절차는 일반적인 마이크로어레이 칩 실험 프로토콜에 따라 수행되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0036] 또한, 본 발명은
- [0037] 1) 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부를 확인하고자 하는 피검 시료를 처리한 실험군의 바다송사리와, 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬이 포함되지 않은 피검 시료를 처리한 대조군의 바다송사리에서 각각 RNA를 분리하는 단계;
- [0038] 2) 단계 1)의 RNA를, 상기 유전자에 상보적이고 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 쌍을 사용하여 실시간 RT-PCR(Real-time reverse transcript polymerase chain reaction)을 수행하는 단계; 및
- [0039] 3) 단계 2)의 유전자 산물을 대조군과 비교하여 발현 정도를 확인하는 단계를 포함하는, 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부 검출 및 환경오염 진단 방법을 제공한다.
- [0040] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 프라이머 쌍은 본 발명에서 선별된 유전자와 상보적이고, 상기 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 쌍이라면 모두 사용가능하다.
- [0041] 상기 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬은 17 $\beta$ -에스트라디올, 에스트론 및 에스트리올일 수 있고, 보다 구체적으로 17 $\beta$ -에스트라디올일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0042] 본 발명자들은 17 $\beta$ -에스트라디올 노출에 대응하여 발현이 증가 또는 감소하는 56개의 유전자군을 규명함으로써, 상기 유전자를 이용하여 17 $\beta$ -에스트라디올 노출에 따른 환경의 상태를 진단할 수 있음을 알 수 있었다. 따라서, 본 발명의 17 $\beta$ -에스트라디올 노출에 대응하는 유전자는 마이크로어레이 칩 또는 실시간 RT-PCR을 이용한 스트레스 검출 및 환경오염 진단에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0043] 또한, 본 발명은 상기 마이크로어레이 칩을 포함하는, 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부 검출 및 환경오염 진단용 키트를 제공한다.
- [0044] 상기 키트는 바다송사리를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0045] 상기 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬은 17 $\beta$ -에스트라디올, 에스트론 및 에스트리올일 수 있고, 보다 구체적으로 17 $\beta$ -에스트라디올일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0046] 상기 키트는 스트렙타비딘-알칼리 탈인화효소 접합물질(streptavidin-like phosphatase conjugate), 화학형광물질(chemifluorescence) 및 화학발광물질(chemiluminescent)로 이루어진 형광물질군으로부터 선택되는 어느 하

나를 추가적으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[0047] 상기 키트는 혼성화에 사용되는 완충용액, RNA로부터 cDNA를 합성하기 위한 역전사효소, dNTPs 및 rNTP(사전 혼합형 또는 분리 공급형), 표식시약, 및 세척 완충용액으로 이루어진 반응시약군으로부터 선택되는 어느 하나를 추가적으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[0048] 본 발명자들은 17β-에스트라디올 노출에 대응하여 발현이 증가 또는 감소하는 56개의 유전자군을 규명함으로써, 상기 유전자를 이용하여 17β-에스트라디올 노출에 대응하는 환경의 상태를 진단할 수 있음을 알 수 있었다. 따라서, 본 발명의 17β-에스트라디올 노출에 대응하는 유전자는 마이크로어레이 칩을 포함하는 스트레스 검출 및 환경오염 진단용 키트로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0049] 아울러, 본 발명은 마이크로어레이 칩에 집적된 유전자에 상보적이고 상기 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 쌍을 포함하는, 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부 검출 및 환경오염 진단용 키트를 제공한다.

[0050] 상기 프라이머 쌍은 상기 유전자에 상보적이고, 상기 유전자를 증폭할 수 있으며, 증폭 산물이 100 내지 300bp 가 되도록 설계된 정방향 및 역방향 프라이머쌍은 모두 사용가능하다.

[0051] 상기 키트는 바다송사리를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0052] 상기 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬은 17β-에스트라디올, 에스트론 및 에스트리올일 수 있고, 보다 구체적으로 17β-에스트라디올일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[0053] 상기 키트는 RNA로부터 cDNA를 합성하기 위한 역전사효소, cNTPs 및 rNTP(사전 혼합형 또는 분리 공급형), DNA 중합효소 및, 세척 완충용액으로 구성된 반응시약군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 추가적으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[0054] 본 발명자들은 17β-에스트라디올 노출에 대응하여 발현이 증가 또는 감소하는 56개의 유전자군을 규명함으로써, 상기 유전자를 이용하여 17β-에스트라디올 노출에 따른 환경의 상태를 진단할 수 있음을 알 수 있었다. 따라서, 본 발명의 17β-에스트라디올 노출에 대응하는 유전자에 대한 프라이머 쌍을 포함하는 에스트로겐 계열의 스테로이드 호르몬 노출 여부 검출 및 환경오염 진단용 키트로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0055] 이하 실시예를 통해 본 발명의 내용을 보다 상세히 설명한다.

[0056] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0057] <실시예 1> 바다송사리의 배양 및 17β-에스트라디올(17β-estradiol, E2) 노출

[0058] <1-1> 바다송사리의 배양

[0059] 바다송사리는 세 종류의 필터(100, 10 및 1 μm)를 거친 자연해수에 배양하였다. 수중 히터를 이용하여 수온은 25℃로 고정하였으며, 하루에 한번 아르테미아 살리나(*Artemia salina*) 유생을 먹이로 공급하였다.

[0060] <1-2> 17β-에스트라디올 노출

[0061] 배양수조에서 사육중인 바다송사리 수컷을 여과된 해수 2 L가 담긴 3 L 비커로 10 마리씩 옮기고, 24시간 동안 순치시켰다. 상기 실시예 <1-1>의 바다송사리 수컷 5 개체를 17β-에스트라디올 100 μg/L에 각각 24시간과 48 시간 동안 노출하였다. 바다송사리를 한 마리씩 얼음물로 옮겨, 순간적으로 기절시킨 후, 머리를 잘라내고, 배를 갈라, 간을 적출하였다.

[0062] <실시예 2> 17β-에스트라디올 노출에 의한 유전자 변화 측정

[0063] <2-1> RNA의 분리

[0064] 상기 실시예 <1-2>에서 수득한 17β-에스트라디올 노출 시험군(24 시간 및 48 시간) 및 노출하지 않은 대조군의

바다송사리 간에 TRI Reagent 용액(Molecular Research Center Inc) 1 ml을 넣고, 유리 균질기(glass homogenizer)를 이용하여 균질화하고, 실온에 5 분간 방치하였다. 클로로포름 (chloroform) 200  $\mu$ l를 첨가하여 혼합하고, 실온에서 10 분간 방치하였으며, 15 분간 12,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C 조건에서 원심분리하였다. 상층액을 수득하여, 이소프로판올(isopropanol) 500  $\mu$ l를 넣고, 상온에 5 분간 방치하였다. 약 20 분간 12,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C 조건에서 원심분리한 후, 용액을 제거하여 침전물을 수득하였다. 상기 침전물에 70 % 에탄올 용액 50  $\mu$ l를 넣어 5 분간 원심분리한 뒤, 에탄올 용액을 제거하고 침전된 RNA를 건조시켰다. 건조 후, 적당량의 디에틸피로카보네이트(diethylpyrocarbonate, DEPC)-처리수에 용해하였다.

[0065] <2-2> Cy3 및 Cy5 표지

[0066] 정제된 노출군 및 대조군의 전체 RNA는 Agilent's Low RNA Input Linear Amplification Kit Plus (Agilent Technologies)를 사용하여 하기와 같이 Cy3 및 Cy5로 표지하였다. 구체적으로, RNA 1  $\mu$ g을 dT-프로모터 프라이머(dT-promoter primer)와 MMLV-역전사효소(MMLV-Reverse transcriptase)와 혼합하여 40  $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 역전사반응을 수행하였다. 그런 다음, T7 중합효소(T7 polymerase)를 첨가하여 40  $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 선형 증폭(linear amplification)을 수행하였다. 이와 같은 증폭과정을 통해 실험군 및 대조군의 시료를 각각 Cy3-CTP와 Cy5-CTP로 표지하였다.

[0067] <2-3> 혼성화(Hybridization) 및 스캐닝(scanning)

[0068] 형광물질이 라벨링된 cRNA 시료를 Qiagen PCR purification kit을 사용하여 정제하고, 증류수로 용출하였다. 정제된 형광표지-cRNA 시료를 혼성화 완충액(hybridization buffer)(3x SSC, 0.3% SDS, 50% 포름아미드(formamide), 20  $\mu$ gCot-1 DNA, 20  $\mu$ g 효모균(yeast) tRNA)에 첨가한 후, microcon YM-30으로 농축하여 혼성화 혼합물을 만들었다. 혼성화 혼합물을 95 $^{\circ}$ C로 3분 동안 가열하여 변성시키고 12,000 $\times$ g에서 30초간 원심분리하며 온도를 식혔다. 제조된 바다송사리 cDNA 마이크로어레이(microarray)에 커버슬립(cover slip)을 덮고, 변성시킨 혼성화 혼합물을 파이펫팅(pipetting)하였다. 마이크로어레이를 GT-Hyb 챔버(Chamber)에 넣고 65 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 반응시켰다. 혼성화가 끝난 후, 챔버에서 마이크로어레이를 꺼내어 아래의 순서대로 세척과정을 수행하고, 마이크로어레이를 회전하여 건조한 후 스캐닝(scanning)할 때까지 암실에서 보관하였다. 실험이 완료된 바다송사리 마이크로어레이를 Axon GenePix 4000B scanner (Axon Instrument)를 사용하여 스캔하였다. GenePix Pro 6.0 프로그램에서, 스캔 이미지로부터 각 점을 그리딩 파일(griding file)을 이용하여 그리딩하고, 정량화하여 각 점의 Cy5/Cy3 강도 및 비율등의 분석값이 포함된 GPR 파일(GPR file)을 얻었다.

[0069] <2-4> 마이크로어레이 자료 분석

[0070] GenePix Pro 6.0 프로그램에서 얻어진 GPR 파일로부터, 분석 프로그램인 GeneSpring 7.3.1 (Agilent Technologies)을 이용하여 아래와 같이 분석을 수행하였다. 표준화(Normalization)는 LOWESS(locally weighted regression scatterplot smoothing)를 이용하여 수행하였다. 확실한(reliable) 유전자는 중앙값의 합이 배경(background)값보다 낮거나, 각 화소(pixel) 값의 표준편차가 유의하지 않은 점을 플래그-아웃(flag-out)함으로써 유의한 유전자를 얻었다. 유의한(Significant) 유전자로서 평균화된 비율 값이 10 배 이상 차이를 보이는 점(spot)을 선별하였다.

[0071] 그 결과, 24시간(표 1) 및 48시간(표 2) 동안의 17 $\beta$ -에스트라디올 노출에 의해 유전자 발현량이 대조군에 비해 2 배 이상 증가 또는 감소하는 유전자들을 확인하였으며, 이중 10 배 이상 발현량의 변화를 보이는 52 종을 서열번호 1 내지 52로 기재하며, 이들에 대한 핵산 서열은 하기와 같다.

표 1

[0072]

유전자 이름	배수 증가	서열 번호
하향조절		
Dimethylglycine dehydrogenase	20.2 $\pm$ 0.01	1
Fructose-bisphosphate aldolase B	14.3 $\pm$ 0.02	2
Fatty acid binding protein 10, liver basic	12.5 $\pm$ 0.08	3

	Claudin	10.0 ±0.02	4
	Cytochrome P450 2P3	10.0 ±0.03	5
	Aldolase B	10.2 ±0.05	6
상향조절			
	Cytochrome c-1 (cyc1)	10.3 ±0.03	7
	Selenoprotein M	10.3 ±0.03	8
	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, V1 subunit F (atp6v1f)	10.4 ±0.03	9
	Cytochrome oxidase subunit I (CO I) gene	10.7 ±0.06	10
	Similar to ATP citrate lyase isoform 2	11.4 ±0.03	11
	Ribosomal protein L13a (rpl13a)	11.7 ±0.09	12
	Cytochrome c oxidase subunit I	12.6 ±0.45	13
	Pyrraline-5-carboxylate reductase 1 (pycr1)	12.8 ±0.23	14
	Similar to Exs-related protein (LOC100150890)	13.0 ±0.05	15
	Cysteine-rich with EGF-like domains 2 (creld2)	13.2 ±0.02	16
	Selenoprotein 15	13.4 ±0.03	17
	Beta-galactoside-binding lectin	14.9 ±0.01	18
	hvl gene for histone H2 variant	14.9 ±0.05	19
	Similar to LAG1 longevity assurance 2	17.1 ±0.02	20
	Inositol oxygenase	17.1 ±0.06	21
	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	17.3 ±0.23	22
	Tetraspanin-3 (putative)	17.9 ±0.01	23
	Microsomal triglyceride transfer protein	18.1 ±0.01	24
	Amino-terminal enhancer of split (aes)	18.1 ±0.09	25
	non-classical MHC class I antigen (Orda-UDA)	18.2 ±0.03	26
	NADH-cytochrome b5 reductase 3	19.7 ±0.06	27
	rRNA 2-O-methyltransferase fibrillar (fbr1)	20.5 ±0.23	28
	Vitellogenin II (vit-6)	20.8 ±0.13	29
	Choriogenin H minor	21.5 ±0.03	30
	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	21.5 ±0.18	31
	Mannose-P-dolichol utilization defect 1b (mpdulb)	21.6 ±0.02	32
	RAB3 GTPase activating protein subunit 2 (non-catalytic)	23.7 ±0.03	33
	Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 1b	25.0 ±0.01	34
	40S ribosomal protein S24-like protein	26.8 ±0.02	35
	Exosome complex exonuclease RRP4	35.2 ±0.04	36
	Similar to Iduronate 2-sulfatase precursor (ids)	36.8 ±0.03	37
	Vitellogenin 1 (ol-vit1)	53.1 ±0.13	38

표 2

[0073]

	유전자 이름	배수 증가	서열번호
하향조절			
	Oligosaccharyltransferase complex subunit (ostc)	100.0±0.01	39
	Abhydrolase domain containing 11	11.1 ±0.06	40
	Fatty acid binding protein 10, liver basic	10.0 ±0.04	3
	Fructose-bisphosphate aldolase B	10.2 ±0.01	2
상향조절			
	B-cell antigen receptor complex-associated protein alpha-chain precursor	10.0 ±0.05	41
	Cytochrome oxidase subunit I (CO I)	10.5 ±0.01	10
	Alpha-2,3-sialyltransferase ST3Gal I	10.5 ±0.07	42
	Inositol oxygenase	11.5 ±0.03	21
	Glutathione reductase (mitochondrial)	11.7 ±0.02	43
	Pyrraline-5-carboxylate reductase 1 (pycr1)	11.8 ±0.01	14
	Choriogenin L	12.1 ±0.02	44
	Similar to integral membrane protein 1	12.3 ±0.02	45
	Complement control protein factor I-B	12.5 ±0.02	46
	Glutamate receptor, ionotropic, delta 1 (GRID1)	12.7 ±0.03	47

Dolichyl-alpha-1,6-mannosyltransferase (alg12)	12.7 ±0.03	48
Macrosialin precursor	13.3 ±0.02	49
hvl1 gene for histone H2 variant	13.6 ±0.06	19
Similar to ATP citrate lyase isoform 2	13.7 ±0.01	11
Selenoprotein M	13.9 ±0.01	8
40S ribosomal protein S24-like protein	14.6 ±0.03	35
Metalloreductase STEAP4	14.7 ±0.02	50
Vitellogenin II (vit-6)	14.9 ±0.01	29
NADH-cytochrome b5 reductase 3	16.4 ±0.02	27
Similar to Exs-related protein (LOC100150890)	16.7 ±0.05	15
RAB3 GTPase activating protein subunit 2 (non-catalytic)	17.2 ±0.01	33
Tetraspanin-3	17.4 ±0.08	23
Beta-galactoside-binding lectin	18.9 ±0.02	18
Similar to LAG1 longevity assurance 2	19.3 ±0.05	20
14-alpha demethylase (CYP51)	19.7 ±0.04	51
Exosome complex exonuclease RRP4	21.7 ±0.02	36
Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 1b	23.4 ±0.01	34
Mannose-P-dolichol utilization defect 1b (mpdulb)	23.6 ±0.01	32
Choriogenin H minor	23.9 ±0.02	30
Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	27.8 ±0.23	31
rRNA 2-O-methyltransferase fibrillarlin (fbrl)	31.7 ±0.12	28
Microsomal triglyceride transfer protein	37.1 ±0.08	24
Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	40.1 ±0.01	22
Bromodomain containing 2 (RING3)	45.2 ±0.03	52
Similar to Iduronate 2-sulfatase precursor (ids)	49.1 ±0.01	37
Vitellogenin 1 (ol-vit1)	59.1 ±0.02	38

[0074] <실시예 3> 선별된 유전자들의 발현량 변화 정량분석

[0075] <3-1> 외부 스트레스에 대한 자기 방어 기작과 관련된 유전자들의 선별

[0076] 상기 실시예 <2-4>에서 분리된 2배 이상 유전자 발현량이 변화되는 바다송사리의 유전자 중, 외부 스트레스에 대한 자기 방어 기작과 깊이 관련되어 있는, 하기 7 종의 유전자를 선별하였다.

[0077] 아포지방단백 B(Apolipoprotein B), 시토크롬 P450 1A(Cytochrome P450 1A, CYP1A), 글루탐산탈수소효소 1b(Glutamate dehydrogenase 1b), 포도당-6-인산탈수소효소(Glucose-6-phosphate dehydrogenase), 트랜스페린 (Transferrin), 비텔로제닌 1(Vitellogenin 1) 및 셀렌단백질 M(Selenoprotein M).

[0078] 이들에 대해서 실시간 정량적 PCR(Real-time quantitative PCR, qPCR)을 위한 프라이머를 디자인하고 합성하였다(표 3). 상기 유전자들의 발현량의 변화를 17β-에스트라디올에 48시간 동안 노출한 바다송사리의 간 시료를 대상으로 확인하였다.

표 3

유전자	프라이머의 염기서열	서열 번호
아포지방단백 B	F: 5' -AAGCTAATGCCGAGGTGATC-3'	57
	R: 5' -GGAGGCAGAGGACTTGAATG-3'	58
시토크롬 P450 1A(CYP1A)	F: 5' -TCAACCAGTGGCAGATAAACC-3'	59
	R: 5' -CTGGCACTTCCTCAAATCTC-3'	60
글루탐산탈수소효소 1b	F: 5' -CGATGCCAGGTCCGATGAAAC-3'	61
	R: 5' -GCCCAACACAGCCAGCACACAG-3'	52
포도당-6-인산탈수소효소	F: 5' -AGGTGTCCCACTATCGGTTC-3'	63
	R: 5' -CTTCATCTCCAGAGCTTGTC-3'	64
트랜스페린	F: 5' -CCTGGAATCTGACGACTACCA-3'	65
	R: 5' -CCTGGAATCTGACGACTACC-3'	66

비텔로제닌 1	F: 5' -ACAAAAGGTTCCACTCTCAGC-3' R: 5' -CCAACCTTAACCTCCATCTCC-3'	67 68
셀렌단백질 M	F: 5' -GGTCAAAGCTTTTGTGACTC-3' R: 5' -TCTGGCTTCTCCTTCTGTAG-3'	69 70

[0080] <3-2> cDNA 합성

[0081] 실시예 <2-1>의 방법으로 추출된 RNA를 주형으로 AB High Capacity RAN-to-cDNA Kit(Aplide Biosystems, US A)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. RNA 1 µg에 해당되는 양을 분주하고, 증류수를 첨가하여 9 µl가 되도록 적정하였다. 2×RT 버퍼 10, 20×enzyme Mix 1 µl를 넣고 잘 섞은 후, 원심분리하여 침전하고, 37 °C 에서 60 분 동안 반응시켰다. 반응 후, 95 °C로 5 분 동안 가열하여 반응을 종료시켰다. 합성된 cDNA는 -20 °C에 보관하였다.

[0082] <3-3> 실시간 정량적 PCR(Real-time quantitative PCR) 분석

[0083] 상기 합성된 cDNA 0.5 µg(약 10 ng/µl에 해당)에 해당 유전자의 프라이머쌍을 0.8 µl(10 pmol/µl), 2 SYBR1 혼합물을 10 µl 넣었다. 증류수를 이용하여 최종 양을 20 µl로 적정하였다. PCR의 온도조건은 95 °C 10 분, 95 °C 30 초, 60 °C 30 초, 72 °C 30 초의 조건으로 40 사이클을 수행하였다.

[0084] 각 시료에 대한 대조유전자(β-actin)와 관심유전자의 CT 값을 비교하고, 상대 표준 곡선(relative Standard Curve) 방법으로 관심 유전자의 발현 변화를 상대적인 값으로 정량하였다(표 4).

표 4

유전자	노출시간	서열번호
	24 시간	
아포지방단백 B	2.5배 감소	53
시토크롬 P450 1A(CYP1A)(CYP1A)	2.7배 감소	5
글루탐산탈수소효소 1b	5.2배 감소	54
포도당-6-인산탈수소효소	2.2배 감소	55
트랜스페린	3.6배 감소	56
비텔로제닌 1	59.1배 증가	37
셀렌단백질 M	7.7배 증가	8

산업상 이용가능성

[0086] 본 발명에서 제시한 17β-에스트라디올(17β-estradiol, E2) 노출에 대응하는 바다송사리의 유전자는 17β-에스트라디올 노출 특이 유전자로써, 내분비계장애물질 오염 및 이에 따른 환경의 상황을 모니터링하고 진단하기 위한 바이오센서로 유용하게 사용될 수 있고, 제시된 유전자들의 기능에 의거하여 본 생물의 대사/생리변화를 구체화함으로써 앞으로 일어날 수도 있는 병리적 현상을 예측할 수 있는 생체지표 및 센서로 이용할 수 있을 것이다. 또한 스트레스원 검출 또는 환경오염 진단 방법에 효과적으로 이용될 수 있다.

서열 목록

- <110> KOREA OCEAN RESEARCH AND DEVELOPMENT INSTITUTE
- <120> 17-beta-estradiol(E2) responsive genes in Oryzias javanicus and the method for diagnosing environment pollution using the same
- <130> 11p-09-008
- <160> 56
- <170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 812

<212> DNA

<213> *Oryzias javanicus*

<400> 1

aacctcaaga aagtccaacta tgacagtatc aagctgtacg agaccctgga ggaggaaact 60

ggacaggccg taggtttcca ccagcccggc agcgtccgca tcgcttcgac tgcagctcga 120

gtggatgaga tgaggtacca gatgactcgc acgcaactggc atgtgacgcc ccaatacttc 180

ataactccgg agaaggtcca ggaacttttc cctctgctga acatggacaa ggtgttggcc 240

gggctgtaca cccctggaga cggtcacatt gaccctgact ctctgacat ggctctggcg 300

gcgggagctc gcatgtacgg cccccagatc tacaaccccg ctccggtgag cgctctcact 360

ccgagatctg acggcaaatg ggacgtccag actcctcacg gcaccattcg ggctaaccgc 420

atcgtcaaca cggcaggttt ttgggctcgg gaagtcggac aaatgattgg gtttgatcat 480

cccacatcc ctgtgcatca ccagtatgtc gtgactgcga ctgtaccaga ggtgaaggct 540

ctgaagaag aactcgccgt catcagagat ctggaaggct cctactatct gcgtcaggag 600

agagatggat tgctatttgg gccgtatgag aagatggaga agatgggtct tcaggactcc 660

tgggtcaggg atggagtgcc tccaggcttc ggaaaagagc tgtttgagtc ggaccttgac 720

aggataatgg aacacattga aatggccatg gaaatggtcc cggtgctgaa gaaagctgac 780

atcatcaatg ttgtttctgg gcccataacg ta 812

<210> 2

<211> 785

<212> DNA

<213> *oryzias javanicus*

<400> 2

tcgggaagct gtgcagctcc gtgtgtcact tcacgtgtcc tcgttgaaaa aacaaccctc 60

aagatgacce atcagiatcc atacctgtct ccagagaaga agaaggagct ctctgacatt 120

gctcagagaa tcgttgcttc aggaaaggga atcctggctg cagatgaatc aacaggaacc 180

atggctaaac gectgcagaa gatcaagtg gagaacacag aggagaaccg ccgttgcttc 240

cgtgacattc ttttctccag cgatccgtcg atcgccaaca acattggtgg ggtcattttc 300

ttccacgaga ccctctacca gaaggcagac aacggcaagc ttttcctca ggtcatcaag 360

gagaaaggca ttgtttgttg tatcaagtg gacaaaggca cagctgaact tggcgggaact 420

aatggagaga caaccactca gggctttgat ggtctgtcgg agcgatgcgc ccagtacaag 480

aaagacggat gcgactttgc taagtggagg tgtgtgctga agatctccga tggctgcccg 540

tcagctctcg ccattgcaga gaacccaac gtcctcgcta gatacgccag tatctgcaa 600

cagaacggtc tggtgccaat tgtggagcct gagatcctgc ctgatggtga ccacgacctg 660

cagaagtgcc agtatgtgac agaaaaggc ctggctgcca cctacaaggc tctttcagat 720

caccacgtgt acctggaggg cactctgctg aagccaaca tggtgactgc tggacatgcc 780

tgctc 785

<210> 3

<211> 776

<212> DNA

<213> oryzias javanicus

<400> 3

acagctgtct cagcctctag ccgccgtggg gaaggaaaa ctcaaatct ttttaaaaa 60

atggacttca acggatcatg gcaggtgtac tcccaggaga actacgaggc gttcctcagg 120

gctttggaac tgtctgaaga tatcattaag ctggccaagg atgtcaagcc agttactgag 180

atcaaacaga caggcaacga cttcgtcatc acctccaaga ctctggaag aacctgacc 240

aactccttca ccatcgcaa ggaggctgaa atcaccacca tggatggcaa gaagctaaag 300

tgtgtgtca acattgaagg tggcaaactg gtctgcaaaa ctggcaaatt ttgcatgtg 360

caggagatca agggaggaga aatggttgag actatgaccg tcggttcaac aacctcatc 420

aggaaaagca aaaagatgtg aatttaaca caaagaaca ctttttaata aaaaatgtgc 480

ttaaaaaata aaaaaaaaa aaaaaaaaa acagctccgt gtgtcacttc acgtgtcctc 540

gttgaaaaaa caacctcaa gatgacccat cagtatccat acctgtctcc agagaagaag 600

aaggagctct ctgacattgc tcagagaatc gttgcttcag gaaagggaaat cctggctgca 660

gatgaatcaa caggaacat ggctaaacgc ctgcagaaga tcaaggaggga gaacacagag 720

gagaaccgcc gttgcttccg tgacattctt ttctccagcg atccgtcgat cgccaa 776

<210> 4

<211> 759

<212> DNA

<213> oryzias javanicus

<400> 4

aaatttaaca aaaaaacctc cctttattgt gcttaagaa ctttacaaaa ctgtacaaaa 60

aacacacaaa aataacattt gaataatfff gactttgttc atacttctgg tcatttcagc 120  
 tcagatcatic aatgattat gttttttttc agcgtacact atcaattaaa aatgaaaaca 180  
 ttcatcagg aaaagtaggg ggctttgtac aatgittaca aaaggacgtc cttgtattga 240  
 agtcaaacac gtgcagttgt gcttggttct ttccagttgt gtcattggacc aaaagttcca 300  
 atttaaacc acaacatgca tcagaaacag caacaaaaaa agaaaaacgt aggaaaatgt 360

ccccgtctt gtgtccttca gacgtaagcg tttcgtccat aagtgtggc gactacactt 420  
 ctggtcgggt ctgcaccgga gtaaaccgtt cctctggctt gatacgggat attgtatttt 480  
 tcctctctcg ccactttgca ggaacacgtg aggcagactc ccccgcgat ggcgagcact 540  
 ccggagcacc agccgatgta aagcccttct ccgatttcat accttatccc cggatagaaa 600  
 gggicaaaga aatcctgcgt gatgttgaag gcataccagg acaccgacac catggtgcac 660  
 aaaccttgaa gtataagaa gactccagca gtgccagca tcctcccttt gaggagatag 720  
 ttttccccct ctgctttgga gcaactggatc cctatgagg 759

<210> 5

<211> 773

<212> DNA

<213> oryzias javanicus

<400> 5

gttgctcat tcaagagaat tcaagtgact agagtcaatc cctttgctct agtgagtgc 60  
 tcagcaacca aagaccgtac aataagtcag gcagataaag ctgctcttta gtgagagttc 120  
 agagagaatt tgctcactct tggctaacaa tggaggcaat aactgctgtt ctgggattgg 180  
 aatggatcga caccaggagc attttgatat ttctgtttgt ctttctgttg ctgagtgatt 240  
 atttagtcaa caggcgacca aaaaactttc ctctggccc ccattctctt cctttcattg 300  
 gagatcttca tcacatcagc ccttcaggc ttcacctgca gctcacagag tttgcagaaa 360

aatatggaaa tgttttcagc cttcatctct ttggacaaag agcagtgatc ctgaatggac 420  
 acaagcaggt gaaagaggcc ttgatccaaa gaggggacga ctttgtggat cgtcccagcg 480  
 tccaatgtt tgagcagttt tattcaaaaa aaggcattgt ggggtcaagt ggttatccat 540  
 ggaagcaaca gaggagattt gctcttcata cactaagaaa ctttggttta ggcaagaaga 600  
 caatggagaa atatatccag gaggagtgcc actatctctc agaagctttt gcagagtaca 660  
 agggtaagcc cttaaatgcc caggcactga taaacaatgc agtgtcgaat atcatttggt 720  
 gccttgtttt tgggggaacg gtatgagtat tctgataaac agtaccagca aat 773

<210> 6

<211> 875

<212> DNA

<213> oryzias javanicus

<400> 6

```

gtcacttcac gtgtcctcgt tgaaaaaaca accctcaaga tgacccatca gtatccatac      60
ctgtctccag agaagaagaa ggagctctct gacattgctc agagaatcgt tgcttcagga      120
aagggaatcc tggctgcaga tgaatcaaca ggaacatgg ctaaaccct gcagaagatc      180
aaggtggaga acacagagga gaaccgccgt tgcttccgtg acattctttt ctccagcgat      240
ccgtcgatcg ccaacaacat tggtaggggc attttcttcc acgagaccct ctaccagaag      300
gcagacaacg gcaagctttt cctcaggtc atcaaggaga aaggcattgt tgttggtatc      360

aaggtggaca aaggcacagc tgaacttggc ggaactaatg gagagacaac cactcagggt      420
cttgatggtc tgtcggagcg atgcgccag tacaagaaag acggatgcga ctttgctaag      480
tggaggtgtg tgctgaagat ctccgatggc tgcccgtcag ctctcgccat tgcaagaaac      540
gccaacgtcc tcgctagata cgccagtatc tgccaacaga acggtctggt gccaattgtg      600
gagcctgaga tectgectga tggtagaccac gacctgcaga agtgccagta tgtgacagaa      660
aaggtcctgg ctgccaccta caaggtcttt tcagatcacc acgtgtacct ggagggcact      720
ctgctgaagc ccaacatggt gactgctgga catgctgct ctaagaaata caccctcaa      780

gaggttgcca tggctacggt gactgctctg aggcgcactg ttcccgcctc agtccttggc      840
atctgcttcc tgtctggagg ccagagtgag gagga                                  875

```

<210> 7

<211> 699

<212> DNA

<213> oryzias javanicus

<400> 7

```

ttcaaagatg gctgcgttgc gggttgtggc ggtgtcgggg agcgggagag ccctcctcgc      60
cgctccgaag gctcttcgtg cccccaggc gaacatgtcc ttgcccagcc tacciaattaa      120
gaagaagggt gccttgacga ctttgggtgt gatcacagct ggtggagcga gcctggcctt      180
gatgctgcac cagtctgtga aagcctcgga cttggagctc catccaccaa actaccctg      240

gagccacgcc ggacctctgt ctgcgctgga ccacgccagc atccgtcgtg ggtaccaggt      300
gtacaagcag gtgtgctcgg cctgccacag catggagtac ttggccttca gaaacctggt      360
cggggtgtct cacacggagg aggagatgaa ggccatagct gaggaggttg aagtgggtgga      420
tggacctgat gagaacggcg agatgttcac ccgtccagga aaactgtcgg actatttccc      480

```

aaagccctac gccaaccccc aggcagcacg tgtagccaac aacggggcgc tccctccgga 540

cctcagctac atcgttaacg ccagacacgg tggcgaggac tatgtgttca gcctcctcac 600

gggctactgc gaccgcctg caggggtcac cgtccgagaa ggactctact acaacccta 660

  

cttcctggc caggctatag gcatggcccc gcccatcta 699

<210> 8

<211> 858

<212> DNA

<213> oryzias javanicus

<400> 8

gtcaccttcg tgcactcgcg ggtcccggtt cgacaggaga accgatcctg acccgggagg 60

agaatgtggc tgatcgcgtt ggccgccgtt cttcagtgcg cctccggtta tgatgtcgac 120

gtgaagaagc tggagggaat ggcgcgcgcg cgggtggaga cctgtggtgg atgacagctc 180

aacaggctca gagaggtcaa agcttttctg actcaggata ttccacttta ccataacttg 240

gtgatgaagc acatccctgg agccgatcct gagcttgtcc tctcagtca ctattatgac 300

  

gaacttgata ggatcgtctt ttctcacatg acccgcactg agatcaatga gctcttgggg 360

gaactggggg tctacaagaa ggagaagcca gaagatgagg tgccagagga gttccgcttc 420

tccccgccca aagacagccc gtttaaagac gagccccage atacatcaac cacctctgag 480

ccgaaagcag aagctgagca cactgaccta taacctgcaa gaccaagacc atcatagctg 540

ctgacagaaa tgtttgtaat tccacaaaag aaatatctgg gaaatcttac atatatgtga 600

tggcctgtta aaggccctct ctgaataagc acctattttt cattccactt ttttggggtc 660

gtatcagggt attttgggg tgattttcta ctgtccaaac agaaattgca agtgtgtctg 720

  

tgaaatgatt tttatttccc ctttttctgc gttttccttc ctgctgtgga actgaatgaa 780

gcttcaggct gaaaatcttc tgactggcct gaggetgatg ctttttcttc tgctgggtag 840

gacggatgca cacactct 858

<210> 9

<211> 474

<212> DNA

<213> oryzias javanicus

<400> 9

agaaccgaac cgagcagtga tggcgggccc cgggaagctg atcggcgtga tcggggacga 60

ggacacgtgc acgggettcc tgctggggcg gatcgagag ctgaacaaga accggaagcc 120

gaacttcttg gtggtggaga aagacacgag cgtgacggag atcgaggaga cgttcaagag 180

cttctctggcg aggaacgaca tcggcatcat cctgatcaac cagttcatcg cagagatgat 240

ccggcacgcc atcgacgcgc acgtgcagtc catcccggcg gttctggaga tcccgtcaa 300

ggagcacccc tacgacgcgt ccaaggactc cactctgcgc cgcgccaagg gcatgttctc 360

tgcagaggac ttccgatgag ccgccacgcc gccacacggc gtgctgccgt cctccaggcg 420

ggtccggccc gttccactt cctgtttgtt cttgtttgta agtcttgaat gatt 474

<210> 10

<211> 238

<212> DNA

<213> oryzias javanicus

<400> 10

ttctcgacta aacattaaaa catcggtccc ctctatttat gttccgtgc ctgagcagga 60

ataatatgca ctgatctgac cctgccagtc cgagctgacc tgagtctccc cggttcccgc 120

ctgggatact accagattga taatggaat gttaccacac gtgcctttgt cttagttttc 180

tttccageta tgcctttat cattggagggt ttggaaact gactaatcac ttaaataga 238

<210> 11

<211> 707

<212> DNA

<213> oryzias javanicus

<400> 11

ccggatccac ctcatggac cacgtgctgc gctaccagga cactccaggg attaagatga 60

tcgtggtgtt gggagagatt ggaggaccg acgagtacca aatctgccag ggcatcaaag 120

agggccggat caccaaaccg gtggtgtgct ggtgtattgg aacctgcgcc accatgtttg 180

cttcagaggt tcagttcggc catgcaggag cctgcgcaa ccaggcctcc gaaaccgcgg 240

tggccaagaa ccaggccctg agggacgccg gcgcttacgt gccaggagc ttcgacgagc 300

tgggagacgt catcagaacc gtttatgatg aactggtggc cgacggtact attgttccag 360

ctcaggaggt tctctctccc acagtacca tggattactc ctgggctcgg gaggttgggtc 420

tgattcgtaa acccgcctcc ttcatgacga gcatctgcga cgagcgagga caggagctca 480

tctacgttgg catgggcate acggaggctc tcaaagagga gatggggata ggaggagttc 540

tgggtctgct ctggttccag cgcagactac cagcctacgc ctgccagttc atcgagatgt 600

gtctgatggt gacggcggac cacgggcccc ccgtctccgg agctcacaac accatcgtct 660

gtgctcgcgc tggcaaagac ctgatctcca gcctcacctc tggcttg	707
<210> 12	
<211> 634	
<212> DNA	
<213> oryzias javanicus	
<400> 12	
tgtgataga tggcaggggc catctattgg gccgctggc cgccattgtg gctaaacaag	60
ttcttcttgg gcacaaagtg gttattgtgc gatgtgaagg catcaacatt tctggcaact	120
tctatcgaaa caagctgaag tacctggctt tctcgcgcaa gaggatgaac accaacccct	180
ctcgtgggcc ataccatttc agagctccca gcaggatctt ttggaggaca gtttagaggca	240
tgttgcccca caaaaccaag agaggccagg ctgctctgga gaggctgaag gtgtttgatg	300
gcatcccacc cccctatgac aagagaaagc gcatggttgt gccagctgct ctcaaaattg	360
tgcgtctgaa gccctctcgc aagtttggcc tctcgggcg tctcgcacac gaggtcggct	420
ggaagtacca ggccatcaca gccactctgg aggagaagag aaaagagaag gccaagctcc	480
actatgtcaa gaaaaagact ttggttaagc taaccaagca ggcggagaag aacgtggagg	540
gcaagatcgc aaaatacaca gatgttctga aacagttcgg tgttcttctc taagctggta	600
gattctggca attaaagatg agtaaatgtt tatn	634
<210> 13	
<211> 152	
<212> DNA	
<213> oryzias javanicus	
<400> 13	
tttatcatct gggaagcatt cgcggccaaa cggaagtgc tttcgtgga gcttacggcc	60
acaaatgttg agtgattaca cggtgcctt ccccttacc acacattga ggagcccgt	120
ttgttcaga ttcagcaacc tcactactag ac	152
<210> 14	
<211> 861	
<212> DNA	
<213> oryzias javanicus	
<400> 14	
ccacgttggc ggcagcggag ttctgattcg gttcgttct gttcgaagga cgaacatctg	60
cagctccacg ttagcttcgg ctggatcatc agagggtgtaa ggggccacgt cacctggaag	120

gatgagcgtg gggttcatcg gagcgggaca gctggcgcgat gcgctggtga agggcttcac 180  
 tgcagcaggt gtgattgctg ctcaaggat cacagccagc gctccggaca cggacctgcc 240  
 caccgttagc agcctcagga aaatgggggt gagtctgacc accagcaaca aagagacggt 300  
 cagcaagagc gacgtgctgt tcttggctgt caaacctcac atcateccct ttgttctgga 360  
 cgagatcggc cgggacatcg aggaccgcca cctcatagtc tcgtgtgctg ctggagtac 420  
 catcagctcc atagagaaga agctgcttca gcaccgccc gctcctcgag tcatgaggtg 480  
 catgaccaac acccctgtgg tggtagagaga gggcgccact gtgtaccca caggaacaca 540

tgcagagggtg gaggacgggc ggctgctgga gcagctgatg gccagcgttg gtttctgcac 600  
 ggaggtggag gaggacctga tcgacgccgt caccggtctg agcggcagcg gccccgcta 660  
 cgcattcacg gctcttgacg ctctggcgga cggggcgctg aagatgggtc tgcccaggag 720  
 gctcggctc agacttggag ctcaggcctt actgggggca gcgaagatgc tactggagtc 780  
 ggagcagcac cggggccagt taaaggacaa cgtttctca ccagggggcg ccaccatcca 840  
 cgccttcac ttctggaga g 861

<210> 15

<211> 359

<212> DNA

<213> oryzias javanicus

<400> 15

ggactcttcc ctgctcacg cgtttttgtt ctgatgatc accgccgacc ttctacagga 60  
 cccggaatgg agagagcttg tattctgatg atttctccc tgatccttat tgtggctcca 120  
 gaattccaac caaacctccc catcaccaac accagctgtg gggatatcaa atactgcatt 180  
 acggaaccag ctaactgtga ccctgagggc aaccgcacct gtatgttcgg atcgctgaac 240  
 gtctgtccc aaactcttc acatggcatc aacctcaca accagctgag tggaaactcc 300  
 agcggataca tcgctctggg gctcactcca tcatggggga acacctcgt gtacatctg 359

<210> 16

<211> 817

<212> DNA

<213> oryzias javanicus

<400> 16

tacaaccagc atgtaaatat tacttccccg tgctttgcaa ggtaccgct atttataatt 60  
 taatgttagc agcggcttat ttagatgtgt cccagcgcta gaacgcttta gcagcagcgg 120  
 ggagtttctg tgtcagtggc ttattctgt gttgatgagt gagtgttgac tgagatgctg 180

tccgtcggtc cacagcagct ccgactgttg tctgtgtcg ctatcctttt atttttccac 240  
gccatcgtcg ccaaaaagga cttaaaaagc gcctgcagca cctgtcgaca aattactgat 300  
aacttcaaca agggttttga cagaacagca aagcagaact ttggaggagg caacacggct 360

tggaagaga ggaagctttc caagtatgag acaagtgaga ttcgcctggt ggagattctg 420  
gaggagctgt gtgagagcag cagcttcgat tgaatcgaa tggtagaaga aaacgaagag 480  
ctttttgaga cctgggtggtt caagaggaaa acgaaaaacc cggatctaca caagtggttc 540  
tgcattgaga ctcttaaagt gtgtgccca aagggaacat ttggggctga ttgtaccgcc 600  
tgtgtcgggg gatcggagaa gccctgccac ggacggggag tgtgcgacgg cgacgggaca 660  
cgcagcggga acgggaagtg cagctgcgac cacggttacg agggagacct ctgcttggac 720  
tgcacgaacg ggttcttcag cgccgagcgg aacgacacct tctctttgtg ctcagaatgc 780

gatgcagctt gcaagacctg cgacggtcca accagtc 817

<210> 17  
<211> 840  
<212> DNA  
<213> oryzias javanicus  
<400> 17

tttctgtta cgaagcagac tgcaagatgt cggctgaagt gaatctgctg tggcttattt 60  
cactactcca aacgtcctg gcctgtggag ccgagctgtc ctctgaggcc tgcagggatc 120  
tgggcttctc cagcaacctc ctgtgcagct cctgcgacct gctcggggag ttcagcctca 180  
ccaagctgca gccagactgc ggacaatgct gccagcaaga ggctcagatg gacggacgca 240  
agctctacgc aggcgccatc ctggagggtg gtggatgaaa attggggagg ttcctcaag 300

tccaagcttt tgtcaggagc gagaagccca agatcttcaa gggctctgcag atcaagtacg 360  
tgagaggctc cgatcctgtc ctcaagctcc tggacgataa cggaacatt gctgaggagc 420  
tcagcatcct caagtggaac accgacgcg tggaggagt tctgagtgag aagttggaac 480  
gcatataaac aagaagaaac ttgattttt ttcccctage ttgttttcat taatcacaaa 540  
aactgttttc tttctgatea gctgtttgtg ctcaagggtg aacaatgtct ctgaaatctc 600  
tgctccttat gaattctcc atgtcattat gtttgtgtgc aaatttgacc aatgacggt 660  
gagggccctg acgctcctc tcagaccatt ttcagttctg ttttctatgt aacgctcctc 720

agtttgacag aggagaagct ctgtcctggt tctctgcaa acgcaggcct cagcagagac 780  
acactgtgtg gaagacttca cagcaacct gatggaatgt gaactctgat gttactttgt 840  
840

<210> 18  
 <211> 523  
 <212> DNA  
 <213> oryzias javanicus  
 <400> 18  
 gacaacatcg cattgcactt caaccacgc ttgactcgg gatcagacgt caacaccatt 60  
 gtctgcaact ccaagctcgg gggaaagctgg ggtgaagagc agagggaggg acacttcccc 120  
 ttgacacgtg gagaggaatc aaagttttac atcaacttca ccatggagca attttacatc 180  
  
 aaacttcccc atgggaggat gatggacttt cccaaccggc tgggagaggt caagtacgac 240  
 tactttgaag tcaaggggga tgcagttttc catggagtca agatcaagta gaggctaagc 300  
 cctccttaa ccttgcccta aagcttgttc tgtccattgc tggaatagtt ttacattaat 360  
 gtgcacttgg ctgaaagcac agagttttgc tatgctggaa aaaaaaata ataataacat 420  
 cagtgagat gtaaaccgga gccgctaaga gatgatggcc tgatggigaa gctacagcat 480  
 attcacttg ttcatttggg gtctgagtac ggtaataaaa gct 523  
  
 <210> 19  
 <211> 866  
 <212> DNA  
  
 <213> oryzias javanicus  
 <400> 19  
 tgaaaaggat tgtagtttat taaaaaaaaat aatgtctttc ttccattgat gttattgatg 60  
 acaaatgatg agttgtagt ttagtttta tccacctgat ccttccccgc tgaatgacaa 120  
 tgtgtctaac tgaacctgt aataacatgc ttgttgctaa cctacaatta tcagagcctt 180  
 ggggtaagaa tagttgattc agtgaacaa actttatcat tgatagtga atacggttca 240  
 ctactgatat ttaagagaat cctcattgac acaaagtagc atataaaaa gtcaaatttt 300  
 ctagattgig tattccaaaa atgttggtt ttaaaggaaa aaaaatgcat cagtttacag 360  
  
 ctgttgcatg cttttagtct tctcaacaaa catctgttct catcattatt ccctactttt 420  
 gcttttgaga atatatatta tatcttttgg ctaccattct gcaacaacaa ttttgatttt 480  
 tttatacat ataattttca ggtttttttg ccttgcaaat attagatatg ggaataagca 540  
 gaaataaaaa gtatttcaaa aatagtaca aacaagcata taattaaata attgaatgta 600  
 ttctctgtaa tgaacaatg tgtttggtt tgattaaaaa cagtaaaaa aaaaagccaa 660  
 acgttttaca caaaaaagca aatgctagta attactaca tttttgagtt caatatattt 720

gtatttattt atttttgtaa atgagaacag tttgtttgaa gacaaaaaaaa tagtatgcaa 780

aaaaagcatt agtgacaaca agtgaaaaca cctaaaaacg ttcaatttga agctagacat 840  
acttccatga aagcgttttg agtttt 866

<210> 20  
<211> 832  
<212> DNA  
<213> oryzias javanicus  
<400> 20

taaaaaaaaat ttaaaaagtg gggaatgctt ccagagagtt cttaagacgt gcagcagtca 60  
ggaggggtgtg atctccagag aggacgagtg ggaggttggg atctcaggct ttctcaccag 120  
agtgactcca ccaagccaac aagaggaac acttacgac tagagtcca ttcgttagaa 180  
gagcgtata tggactgtct tcagtctcct ctgttgaaac ttgtcaagac aacaccgct 240

ccagtttggt ttcatatcca gtcaacttcc cttctgacta caaatctggt ggacagctaa 300  
aagtgccatg tttcagactg tcggcgagtg gttgtggtgg gacgctttgt ggctgcccg 360  
aaacgtctcc tggtcagatc tagaggacag caatgaccgt gtctacgcta aggctctca 420  
tctttacgcc accgtgccct gtgccctctg tctgctgctg gtcagataca cttttgaaag 480  
gtactttgcc acaccgtgg ctaatgcttg ggggatcaag gacaaagtac gtcttactgc 540  
tgagcagaat cccatcctgg aaaagtattt ctgcagtcaa gcacgaaatc cctcacagtt 600  
tgatgtgagg tctctgagta agaagaccgg ctggtcagag aggagagttg aaatctggtt 660

caggagaagg aggaaccagg agcggccggg gcttcggaaa aggttctgcg aggccagctg 720  
gagatgtggt ttttatcttt ttgcattttg cgggtggcatc gtggcccttt atgataaacc 780  
gtggctttat aatctcaaag aagtttgggc agaatttctt aaacagtcca tg 832

<210> 21  
<211> 871  
<212> DNA  
<213> oryzias javanicus  
<400> 21

gtcactgcag ctgctgggaa ccgcatcgat catgaggatc gtcagcatag gccctgacct 60  
gtcgttggca tatcggccaa atttgatgcc tgaagcaaaa gagaaggaag actacagaaa 120  
ctttaagact ggaagtctgt tcgaccgtgt ctataacacg tacaactga tgcacacaca 180

ccagacgctg gattttgtea aacaaaagca ctctgaatgg agctgctgca gccgactca 240

gatgagcatg atggaagcca tcatgtctct ggaccagctt gttgacgagt cggatccgga 300  
 cgtggacttc ccaaactctt tccacgcctt tcagacggct gaaggcatcc ggcaggccca 360  
 cccggacaaa gactggttcc agctggtggg tctgatccat gatgttggga agatcttagc 420  
 tctgtgggat gaaccacagt gggctgtggt gggcgacacc ttcctgtgg gctgcgagtt 480  
 tcaaaactca atcgtgttca gatccaactc cttccaggag aatccagatg acaaaaactc 540  
 tgcatacagg actaaatag gaactatga accaaactgt ggacttgaca acatctacat 600

gtcctggggc cacgatgaat atctttacag agttctaaag aaaaatgaat gttctgtccc 660  
 agaagagggg atgtacatga tccgctacca ttctttctac ccctggcatt cacatggaga 720  
 ctacatgcat ctgtgcaatg ataaggacct acagatgatg ccgtgggtcc aagagttcaa 780  
 taaatttgac ttgtacacaa aaaccaccga tctgccagac gtggataacc tgaagccata 840  
 ctaccagtca ctgatcgaca agtactgtcc t 871

<210> 22

<211> 839

<212> DNA

<213> oryzias javanicus

<400> 22

cggcccaagg ccctgccgcc gatgtatgac ctctcaggc agtcagttga agtggagggg 60

gaagattttg cgcggcgctc tgtttttaca gacgacggca gtttctgac tcacatttac 120  
 gacgacgcca taacgatgta cgagtccttc ctccaggggg ttaaagtctc ccaaacggt 180  
 ccgtgtttgg gctccaggaa accgaagcag ccgtatgagt ggatttctta tggcgaggtc 240  
 aaacaaagaa gtgagaacct gggctcagct tttctccata aaggacactc aaagagtgtg 300  
 gatccccaca ttggtatctt ctctcagaac aggctgagt ggacatgac ggagtggcg 360  
 tgtcacacat actcactggt gtcggtgect ctgtacgaca cgttgggaac ggaggccatc 420  
 tcttacctca taagcaaagc gtccatctcc accgtggtgt gtgacgtgaa ggataaggtc 480

aacctcatcc tggactgttt caaggactca aagcattcgt taaaacat agttttgatg 540  
 gaggagccgg atgaaagcct ggtggagagg gcgcgggaag ctgaaatcca gatcctaagt 600  
 ctgcaggaga tggaggcttt ggggagggcc aaccatcagc ggccaattcc cccacagccc 660  
 gaagacatgg cagtgatttg cttcaccagc ggaacaacag gaaacccaaa aggagccatg 720  
 ctgactcatg gaaatatcat gtcgaactgc tcgtcttttg ttaaactgac agagcttagc 780  
 tgtccatag atcacacaga cgtccacatt tcctatctgc ctctggctca tatgtttga 839

<210> 23

<211> 818

<212> DNA

<213> oryzias javanicus

<400> 23

aatagtgaga ttatcaactt ttttttaaat ttatgataaa cacaacaaag cagcaaaacta 60  
 aaagtagaac ctacataat acagttaact gaccataaaa tgacgtgtgt ttattcagct 120  
 ataagagtaa gccaaagtaa gagatcacag tctgaggtca ttcgatgaaa tacagtcaaa 180  
 gtctaaagaa tatcttcaag gtgcagcaga aagttacaat aaaagtcaaa atatacgatt 240  
 tttttccact ttttccttta tgtcaggaca acttccaag gatttagcag aaataagatg 300  
 ccgcatcacc ttcagaatat tatataaatt tcattttacg tgcattccta aagtataacc 360

ataactgggc tgcttifacta caccaaaagt gactgatgaa aatctcaaac aaaagaaatt 420  
 taaactaaca gaaaagcagg aatgtccacg tttcagaaaa aaaaaaacia gacacatatg 480  
 gaagccagct ctgatacaat ctcttttag attatggcaa aactttgatt aattgatatt 540  
 tctgtacaat aatgaggaag ctgaatatgg atgtttggc agaaggggtt tcaggcgtac 600  
 aggggctggt agccattcct ccgctgttg cttttacagg tgatcacaca cacgctcagc 660  
 attccaaaga actttatgat agcaaaacca agaaccacca gcatggcata agtcaaagca 720  
 tcctgaagga agcgcctccag tttgacctca caaccctctg tgtaaataag gttcagttga 780

tccagactgc cgggtgcactg tgtcacattg gacctgca 818

<210> 24

<211> 786

<212> DNA

<213> oryzias javanicus

<400> 24

gaaacaggag aggctecgac tegetttgcc cctctctect ctetttttcg gccttgttgg 60  
 agcccgtcag cactcactc tctgtggttg aacgatccgg ctgcagggag agtcacaat 120  
 gtttgctgtg gttctgacc tgetttgtgc tgctctctct gtctcagcat cagctaaaag 180  
 tgetgctgct ggacctcggc tacacaacia ccagctgtac aaattcagct acaccaccga 240  
 ggtccagctg gacaaggcca aggggtcaaa agagggcgga gctggctaca aaatctctc 300

tgaggteaac atcaacctgg tctggagggga tccaagcagc aaggatgacc agcttattca 360  
 actagctatc tcaaatgtga agattgagca cgtgtctcca agatcagaga agaaaaacat 420  
 cctccaagga tccacggttg aaagtgtctt gggtaaaggc aaactgacag atctgaccaa 480  
 accttctctg gtgcatctaa aaaaatggaaa gacaaaagcg ttttactctt actggacaga 540

acctgcagtt atcaagaacc taaaagagg actggctagc ttgttgcagt ttcagctcct 600  
 aactgggaag gttgtggaga atgacatttc tggaagatgc actgtccagt accaggcagc 660  
 taaagatcaa ataacaagaa ccaagatcct ggacacatgc aagacttcag aatctggatt 720

taccacacat agtaagggtg tgggtgtggg caggaagtcc agctctgtta cagttttcac 780  
 tcttga 786

<210> 25

<211> 763

<212> DNA

<213> oryzias javanicus

<400> 25

agatcagaca ttctttttaa cagcgttttc ttttctttcc actcatcgcc ttggtcgaaa 60  
 gagcgacctt tccgtaaac caagacgaca atctctgctt cccgccgctt cgacgttagc 120  
 taacgttatt ttaaaggatg acagagtaca aagtgtcagc agcgtctcgc ataattttat 180  
 aatatctggg gacttgtag cttagctagc tagctagctt ggcgtctcga ttagatcgta 240

aacgcgcagc gaaaccaaac actctgctga catgatgttt cctcaatcaa ggcaactcggc 300  
 atcctctcag tccagtcagc ccctgaagtt caccacttct gactcgtcgc atcgcatcaa 360  
 ggatgagttc cagttccttc aagcacagta tcacagtttg aagttggagt gtgacaaact 420  
 ggctctgag aagtctgaga tgcagcgtca ttatatcatg tattatgaaa tgtcttacgg 480  
 gctgaacatt gaaatgcaca agcaggctga aatagtgaag aggctgaatg ggatctgtgc 540  
 tcaggtgctg ccttacctgt cacaggagca tcagcagcaa gtcatgggcg ccattgagag 600  
 agccaagcag gtcactcctc ctgagatgaa ctccatcata cggcaacagc tgcaggttca 660

gcacctgtcc cagctccagg gcttggcgt gcccgtgacc ccgctgcccc tgggcctcac 720  
 cctccctcc ctgcccgcg tctctccag ctccggcctg ctg 763

<210> 26

<211> 830

<212> DNA

<213> oryzias javanicus

<400> 26

cgttatctat ccagagctgg tgaaggacct gcagtgctac ggctacacag caactataac 60  
 taaatgctcc tggttcccgg ccaccaacgc ttcagatgtg ggatttttct ggtatgcaca 120  
 ttagtgaatt gtctcacac acatttctc tgtgttcagc ccagatactc caggagtgtc 180

aaactcaatc acagaggggg caaaaatcca aaacaccctt taggtcacag actgaacagg 240

ataaactact tttttaaac tttaaaactg taacttttta acataattat gaactagaaa 300

tatatcatta cctgtgataa tgctagtgtt aatgctggga gatgaatttg gcctctgaag 360

atgctgaaat tgatagctga aaacactgag gctgatatct gaaaaagctg aagttgatag 420

ccagctaaaa tattagctaa atgccaaatt atccttaaaa aactaaacta aaaccttatc 480

ttagccaaaa caggtaatct gttgctgaat attttgctaa atttcaaat agcctaaaaa 540

aaagcctaaa ttagtcaaaa cagctagaat gtaaatatta gcttaacttt caaacagcct 600

aaaaatctta ttaaagcca aaatagtata acaagcttgt agaatgtcaa tttctaaaac 660

cttaaaactg tacattttta acataataat gaatgggaag aatattattc cagaataaat 720

caactttaaa cctaaataac ttaatatattt actcttcata aaaatatatt ttgtccaaat 780

tatacaagtt agaaatcagc gcaagataac atcaggacat taataacagt 830

<210> 27

<211> 690

<212> DNA

<213> oryzias javanicus

<400> 27

gaagatgagt cagtacctgg agagcctcaa gatcaacgaa accatcgact tcagaggccc 60

gagcggactc ctggcttaca aaggcagagg tgtttttgac gtccagcctg ataaaaagtc 120

tgcagcgggtg aagaagacgg ccaaacatgt gggcatgac gctggaggaa caggaatcac 180

tccgatgctg cagatcatca cagccatcat gaaggatcct caggacagca cgggtgtgtca 240

cctgctgttc gcaaaccaga cggagaagga catcctgctg cgaccggagc tggaggacat 300

ccaggtaag catccggacc gcttcaagct gtggttcacc gtggacagag cgcctctgga 360

ctgggagtac agtcagggtc tcatcagtga agaaatggtc cgggagcacc tgccccctcc 420

cggcaggac accctcgtct tgatgtgcgg cccccctccc atgatccagt tcgcctgcaa 480

cccaaacctg gacaaagtgg gtcactccga gagccgcagg ttaccttct gaagacctgc 540

tcagaagcac tacgttagct ggaatcgcac catttctgta tttgtttgcc gtgcaaagac 600

gacgtgaag gaccaagacg agggaagtgc cttaaacaca gcaaagcttt cgtaccttta 660

aaccgtttg tatgaacgtt tcaactgcaac 690

<210> 28

<211> 781

<212> DNA

<213> oryzias javanicus  
 <400> 28  
 cagcttcac gcgcggttgg agtcgtgaag agacaccgtg gtccacttcg cacgattttg 60  
 gagcgaaaat gaagccagga ttcagtcccc gtggagacag aggaggaaga ggtggaggac 120  
 gaggtggagg aagaggaggg tttggtgacc gtggaggaag aggcgggttc ggtgatcgtg 180  
 gaggaagagg cgggttcaga ggtggacgag gcggaggttt caggtccct gacggtggag 240  
  
 ggtttcgggg acgcgggggc ggcagaggaa cccaagagg aagaggaggg agaggaggcc 300  
 gtggaggatt tggaggaggg aagaaggtgg tgatagagcc acacagacat gaaggggtgt 360  
 ttatctgcag agggaaggag gatgccctgg tcaccaaaaa catggtggtg ggagagtcgg 420  
 tgtacggaga gaagaggatg agcgtggagg agggggatac taagatcgag tacagagcct 480  
 ggaatccatt ccgctccaag ctagcagctg caattcttgg aggagttgac cagattcaca 540  
 tcaagccagg gtcaaaggtc atgtacctg gagctgcac aggcaccacg gtgtcccacg 600  
 tctctgacat cgtcgggccg gacggactgg tctacgcagt ggaattctcc caccgatctg 660  
  
 gccgtgacct cctcaatggt gcaagaaac gcaccaacat catccccatc attgaagacg 720  
 cccgtcatcc gcacaagtac cgcagtctgg ttggcatggt ggacgtgac tttgctgatg 780  
 t 781  
 <210> 29  
 <211> 150  
 <212> DNA  
 <213> oryzias javanicus  
 <400> 29  
 ctgcattcgc tcacagctcg cagtcgatgag ggggctggtt cttgctctct ctctggccct 60  
 tgtggccgcc aaccaactga gcttaccgcc agaatttagc cctgggaaaa cctatgagta 120  
 caaatatgaa gcacatcttc tgggtggcct 150  
  
 <210> 30  
 <211> 827  
 <212> DNA  
 <213> oryzias javanicus  
 <400> 30  
 gcagttgctc tgcattggcca tctggcaat ggtcagggtg acaaggtagg tcatcagcct 60  
 cagtatcctt catatcctca gaagcctcag aatcctcagc aacctcagca gcctcagtat 120  
 cctcagcaac cccagcagcc tcagtatcct cagcaacctc agcagcctca gtatcctcag 180

caacctcagc agcctcagta tccccagaag cctcagcaac ctcagcagcc tcagtatcct 240  
cagcaacctc agcagcctca gtatccccag aatcctcagc aacctcagta tccccagaat 300  
cctcagcaac ctcagtatcc ccagaatcct aagcagcctc agaatcctca ggtgccaaca 360

tcaacatttc acaacttgtga agtggatgag caccataaga taccatgtgg ctectcaaac 420  
atcacctcct cegagtgtga tgctataaac tgctgctttg atggatacag ctgctactac 480  
ggcaaatatg tgactcttca gtgcaccaag gatggtcagt ttatcatagt aattgccaaa 540  
gatgctacac tacccecat tgacttggag acagtcagtt tcttgggagc aggtgctgag 600  
tgtcatcctg caggagccac ctcggctttt gctatttatc aatttccagt cacttctctg 660  
ggcacaatca tgagagatga gcctggtgtt attgtctatg agaaccgat gtcctccttt 720  
tatgaagtig ctattggacc tcgtggagcc attaccaggg acagtcattt tgacctgtct 780

gttcagtga gatatatgg tacttccggtt gaggccttag tcgttga 827

<210> 31  
<211> 798  
<212> DNA  
<213> oryzias javanicus  
<400> 31

ttgttttatt catagaagca agatgaggaa gtgtgtgacc ggcgttaagg ttggagaaat 60  
gaagatggac tctgtacatc atcttgtcct taaatttaca caaaccttca gccactctg 120  
ctgttttcag aaaactactt tttcattcac tcccgttaatt ttattttttt ttttacaatc 180  
taaacaagag atgtttctgg ttttaattcaa caataaaaca gtttttcttc acaaagttac 240  
aaaagctgga aatgtttggt gtcagcgtaa agtcctttca caaaaaggct tcaggtctgt 300

tcatcagcgg ctctagagta taaaacagaa caatgccaga ctaaaaccaa ctgtgcttta 360  
caataatggg aattattggc ctttttctac ctggttttaa atcaaacacc tcttaaaaat 420  
ggaatcgacg tgaagaagtt tcggctaaat ctgcagaaca ccagcaaacg ggacagaacc 480  
agcagctatg ggtccacagg tgggtctggt gaagctccta ggctccatcc aggcgttttc 540  
aacttgattg gagaggagtc gcccccctt aaaacagttt gatcatgett tctctggact 600  
tgccgactcc gaccacttc actggcactt gcaggaagtc ctcgatgaac cgaatgtaat 660  
tttgtgcctg tggaggaaga tctcgaagc tcttggccgt ctccgtgttg cagcaccagc 720

cgggcagcgt ctcgtagtcc accagcaccg gcgtcaacac gtccatgttt gctggaaaac 780  
ttggcagagg ctgccctg 798

<210> 32

<211> 443  
 <212> DNA  
 <213> oryzias javanicus  
 <400> 32

ccggacaaa cgggttttat ttcaccttc agtctaaaca aacccggaag ggaaacaaca 60  
 actttcccca aatctagga atctttacc aatcaaaggg ttaaactgat cggccctttg 120  
 attttcccc taaaccacc aaatcaaac cagaaaactg gacccaactt cttccccagc 180  
 agggggaaaa gaaatgggag gagtcaaat ctgcgtatcc cccacacaa agtccaaagt 240

cggatcaagt caaaaagtcc ggggggccct acccctctt cttcttctt tctgttggg 300  
 tttgcgggcc cggttccag aaaaacaaaa cctgcggggc aataatgctt ttgcaggggg 360  
 agaaaataac ttaagtcaag gccatcagcg tgtccccggt ttcttgatg gagtgaaaa 420  
 tccaagccag ggatccggca aac 443

<210> 33  
 <211> 831  
 <212> DNA  
 <213> oryzias javanicus  
 <400> 33

agacatcctg cgacgacacc tggctctgta actgtacaac caaggcctgg acctgcgcgc 60  
 tgaagagctg acgttagagg tggaggataa agacgtgttg ggctcccagc tgttggttct 120

gacgggtcag agactcagtt attctctgct gcacagccag agccagactc atgctgcat 180  
 ggagctgctg gcacgcctcc cccaacct ctgcacatgg ctgaaggcta tggaccccag 240  
 tgagctgcgg tgccccctag tgcctctgtc ccagaccagc cgcttgggta gccgctgat 300  
 tgaatcctg ccagaaaacc acgcccagta ctctctggcc ttacacctcc tggaggctgt 360  
 ggacgtcctc atcacggagg aggactgaag agccgggtcc tggctctgta tacagtcac 420  
 ctcatcatgt ctctgcata gaagctgctt ttaaagggtt tacttcatca ggttgagtgc 480  
 atgaatcaga atctggttga atctgtgggt taagcagagc gttgtcatag aagacttgg 540

cctctcgtgc cacatgagtt tagtttctct gctctctggt agtcaacatg taaataaaga 600  
 agagccttat ttttacctcg cctgtccctc tatgcccaac tgttttact aagaataaa 660  
 gagctatga gcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aactcgaaac tagactgctg ctagatcttt 720  
 tttttatitt taaaacaat aatcaatttg cacagcagcg actagcactt tatagagaag 780  
 attattctta gttttatcgc ttcgctacct ctgttttgcc cccgctgctt c 831

<210> 34

<211> 801

<212> DNA

<213> oryzias javanicus

<400> 34

gattttaaaa tggccatgtg gaactataaa ccattgtgga aaagcccctt ttcggaaatg 60

acgtaatggt gttattattc ccggaagaag acccagggaa agcactgaac tgcgtcaaca 120

atagtttctt caaattattt ggatttccat tgggcttgag aatgccagca agcaactgct 180

gaatgattta tggcactgat tctggatgga agcgctctaa gcaacgacat ggacagatcc 240

aactttgctc acgtggtctt ccaaaatggt gggaagagtt atctgcccga cgctgctctg 300

gagtgtcact acacctgac acagtttacc aaaccacatc caaaggactg ggttgggtata 360

tttaaggtg gttggagcac ggcgaggac gaatgcaact cggacatcct tgtggtcacc 420

accaaagccg gcttccttga gcaaaaggtg gaagaagcac agagagagaa agatgagctc 480

ctcaaaaata tggctgtcct ggagcaggag aaagagcagc tgcgagcaga gatggaggcc 540

ctgcagaagg agtgtgagca acagaaggag acctgcaccc ggctgagaag agagaaccaa 600

gaagtgcagc attcttccca agccctgctg gaggagaaaag aggaggccaa gaggagactg 660

gaggaggcca cagctaaaat tgtacagttg gaggaagatc tcattggggg cacacagaaa 720

ggccttcaaa aggaaacaga gttagacaac cttaaagata gaatgaagaa actcacaaca 780

gagaaggagg tccttgaaag t 801

<210> 35

<211> 877

<212> DNA

<213> oryzias javanicus

<400> 35

tcgttttagca gtcattggaa agtgtcgtgg tctgctact gccaggaaac tgcgcaatca 60

ccgccgtgag caaaaatggc atgacaaaaca gtacaagaag gcccatctgg gcaccgctct 120

aaaggccaac cccttcggag gagcttctca cgccaaggga attgtcctgg agaaagtgg 180

tgtggaagct aagcagccca actctgcat caggaagtgt gtgagagttc agctcatcaa 240

gaacggaaaag aagatcacag ccttcgtccc aaatgatggt tgcctcaact tcatcgagga 300

aaacgacgag gttcttggg ctggttttgg gcgaaaaggt cacgctgtgg gagacattcc 360

tggagtctgt ttcaaggtgg tcaagtggc caactgtct ctgctggcgc tctacaaggg 420

caaaaaggaa agaccaggt cataaactgt tgagaccaca gataaaaata aggtttcaat 480

tacaaaaaaaa aaaaaatcca tctcaagcca gattgtatcc agcgaagatt cttcttctga 540  
 tgaaatttcc tcagaaattc tggaggaaga tgacaaacac aaggttccat ccttgtctaa 600  
 gagatactgt gccaaagtacc gtgccattgg actcaaagcc tgcttcaagg tcgccactga 660  
 aaatgctgct ttcacccgtg actctgctct gtatagaatg gttggacgcc acaatgcttc 720  
 tttctctatc aaaccaattg aaggtgaagc tgcagttgag agactggaga tggaagttaa 780

agttggagct aaagcagcag agaagatcat taagcaaatc aacatgaatg ataaagcggg 840  
 aacagtgctg tccaagctca acaaaatcct gacttca 877

<210> 36  
 <211> 814  
 <212> DNA  
 <213> oryzias javanicus  
 <400> 36

gcaagtcgag tgaagttata tgctagcata atatacgggt tggttggcat ttattataat 60  
 ttgatcggat aatcactcgt tattattaat aataaaatat taaataacta tttacctcaa 120  
 ttgatgcttt ttatatggcc aatctgactt gaaatagtct gaaagaagtc ttaagcgaat 180  
 cagaagaggt gttgcgggaa gcagcatggc tcttgacatg agattaccga ctgtgaggaa 240

aactgtctct ctatcaactt cggctttcga tcgaaaggat ctggttgtgc caggagacat 300  
 aatcacttca gacacagggt ttatgagggg gcatggcacc tacgttgatg aagaaaagct 360  
 gacagcttca gtcgctggag aggtgcagag ggtggataaa ctcatctgtg tcagaccact 420  
 gaagaccagg ttagtcatga aaaatataaa ataatttcta gactaaccca ttcagattgg 480  
 actggcacta cttttgtaaa tattctataa catttggca taattttaga tttaatggig 540  
 aggttggaga tgttgggtt ggcagaatta ctgaggtgag ttattttaat tgttcatcaa 600  
 ggatgcaaga taaaatata attttttatt ttttgctaata aattttttta acctgtttgc 660

tttgatgggt tataaaaagg tgcaacagaa acgctggaag gtggaaacta attccagact 720  
 ggactccgtc ctgttgctct catcagtaaa ctgacctgga ggagagctga gaaggagatc 780  
 agcagaagat gagctgacca tgagagaata tctt 814

<210> 37  
 <211> 749  
 <212> DNA  
 <213> oryzias javanicus  
 <400> 37

aaaatgagtc tggcccctga ccccgacgtt cccaaactcc ttccagctgt ggcctacaac 60

ccctggacag atgttagaaa gagagaggac gtccaaaagc tcaacgttag cttcccgttt 120  
ggacccattc ctacagactt tcagttgggt atccgtcagc actactacgc tgccgtgtcg 180

tacatggacg ctcaggtggg gaggctgctc agtgctctgg atgggatggg gctaactgat 240  
agcaccatgg ttgttttcac atctgatcac ggttggctc taggcgagca cggcgaatgg 300  
gccaaatact caaacctcga cgtagcgacc cgcgtgcctc ttatcgcgtt cgttcccggc 360  
gtgaccgccg accataacgc accaacggaa ccatcatttc cttcataga cgtcttcagc 420  
ggatcagagc gccgcttcca aaatgataaa gttgtgagga acatggtgga gctgctggac 480  
gtctttccaa cgttttccgc tttggccggc ctcagagggc ccaaacactg tccggaagtc 540  
tccttcagcagg tggatttatg tgtggagggg aagagtctgg ccgccagctt taaacacaaa 600

gagaagaaga agaacgcgga gagaatcgcc ttcagtcagt acccgcgtcc cgccgacacg 660  
ccgcaggaga attctgacct tctgatctg aaagacatta aggtgatggg ttactcgtc 720  
cgcacctggg actacaggta cactctgtg 749

<210> 38  
<211> 839  
<212> DNA  
<213> oryzias javanicus  
<400> 38

ctctatgtct ggccctagtg gcttgttgat cctgtgatgc atggtttcac cggcatgggg 60  
ccgaaggacc agggagaaca agttgaggat atccctaaag cacttgaacc agagtggagt 120  
actcccatca agtttgaata caacaatggc attgtaggaa aaatctatac tcccgatggg 180

ttctcagata tagtgctgaa ctctacaaa gccgttctga acattcttca tcttaacatc 240  
aaaaagacac agaacattta tgatcttcag gaggatggaa ttcagggcgt gtgcaagaca 300  
ttctacactg taaatgaaga tgtaaggct gaccgcatcc tctgactaa aactagggac 360  
atgaacaact gtcagacaag gatctatagg gacatggggt tggcatacac tgagaaatgt 420  
gacaagtgcc aacaggaatc aaagaatcta aggggttcaa catcgtacag atatgccttg 480  
aaaccagttc ctagtggat catgatctg gaggcagatg taaatgagtt aatccagttc 540  
tcgccattct ctgagggtta cggagccgtt caaacagaga ccagtatact tgttttttt 600

ctttttacaa aacttaaga caaaccttgg tcttcgagga gattcaggat tccccattg 660  
caccaaaatc tgctgaatat catcactgtg gatctcttaa gtatgagttc tctgatgagt 720  
ttgagtggac accctttcag tttgtcaagg tcaactgataa acaggcccag attgaggagc 780  
ttctgaatca tetaactacc cacaactctg agaaggtcaa tgacaatgca cctctgaag 839

<210> 39  
 <211> 815  
 <212> DNA  
 <213> oryzias javanicus  
 <400> 39

aagtatggag actttattca gtgttcatt ctctgtgctg gagtgcga acattaaact 60  
 gaagaaaccg tcatggctgc acatgccgc ggctatgacc gtgtacgagg tcgtgatcgt 120

gtcctacttt ctcacacag gaggaatcat ctatgatgtt attgtagaac caccaagtgt 180  
 gggttcaatg acagatgaac atggacacca gcggccagtc gcctttttgg cgtacagagt 240  
 aaatgggcag tacattatgg aaggactggc ctccagtttc ctcttcacaa tgggaggttt 300  
 gggatttata atcctggatc gctccaacgc gcctaacatt cccaaactga accgcttcct 360  
 gttgctcttc attgggttcg tcagtgtcct gctcagcttc ttcattggcca gagtgttcat 420  
 gcgcatgaag ctgccaggat accttatggg ttaagaccac aaacggaagc aataatgaag 480  
 ttggcgtccc aatgcagtt tgagtcactg atgtaacgaa ttaccaaactc agaaattatg 540

gaaggaccgg gatcgggaagc accgacctg ttctggaaac tggattgaac gacagcgacc 600  
 gcgctgactt cccatctgct attgttgttg aattgaatat atatctcatt tgtgttacca 660  
 cttgtcttat attttgacca aactgaagag ttgactgcaa atgaaaaatg cagaataagg 720  
 aaatgaaagt taaactgagt caaagaagtc ttcattccaga ttcataatctt gcagtaaagt 780  
 ttaagtcac agattttgta tggaacgaat tgagt 815

<210> 40  
 <211> 780  
 <212> DNA  
 <213> oryzias javanicus  
 <400> 40

gctctctagc gtcgacttca ggcgctctga atgctcctc gctgcttctc agctgtcata 60

gtggaggttc cgaacgcac atgtttgtgg accgatctc atcggaacat atgctgtcat 120  
 gagcgtctg tctgccttg ttcagagggg gttgctgggc tctcgccgc cgctccgttt 180  
 gttccccgga cagcaggatg tttcgggat ggctctgacg gtcggagcg ccagttcatc 240  
 cagtcctgic aacctgacgt acgacgtttt cgatggaaag ggagagagca ctcccctggt 300  
 gtttctacac ggcccttttg gcagtaaact taacttccat tctattgcca agtccttagt 360  
 gcagcgcacc ggccgaaagg tgttgactgt cgatgccctg aaccacggca acagccctca 420

cagccccgta ctgacctatg aggccatggc cagtgatttg aaacacctcc ttagccaact 480

gcgaatcgag aagtgcgttc tcatcgcca cagcatggga gggaagacgg ccatgacgac 540

ggctctgaca caaccagtc tggtagcgc tttggtggtc gtggacatca gtccggcca 600

gtccgccacg cgcaccaact tccgacaata caccagcgc atgcaggaga tgaagatctc 660

cactgacatc ccgctctcca cagccagacg gatggccgag gaccagctgc gcagattagt 720

caaggagcgc tctgtgcgtc agttcctgct gactaacctg gtggagcaga atggacatta 780

780

<210> 41

<211> 841

<212> DNA

<213> oryzias javanicus

<400> 41

gcacgaggaa aaggtgaaa agtttattac gtctgagcat gtgaatgtga ctgatcatca 60

gagagaaaat aacatcattt gcagcatcct gacctttagt tcaagtgaagc tgaccgacac 120

tgggatgtac cattgccgac tgaacgggac ctccacgctc acacacggca cctacatgca 180

ggtctatgag ccgatggaaa aaacgatcaa cctcagcga agcaccacaaa acgtcatcct 240

gatgactgaa ggaatctcc tgttctgtg tgtgacggcg ccatctttcc tctttctgtt 300

taagaaaaaa catgaaaata aacgggcaat caagaagaa aaaatagaag aggaaaacat 360

ttaccaaggc ctagatttgg atgactgttg tgcagcatat gaccagattg aacgcctca 420

gggacatggt ctttacgagg atgtgggcac aactgtcaaa gagggggaag aaatccagct 480

ggaaaaacc tgaaggaaag tagagggaaa aaagccacca ggctctttgg aaattacaca 540

gtagctatat tgagcttttg ccaggagctt tgaaaatgcc tgttttgaga tcagtataac 600

tcgccattat aattttaag aaaagtgtt gtgcatttaa acaaatatat acgtgtttgc 660

aagaaattc atcacaagt tgaattttt tttttttaa agctgaaat gagttgtcaa 720

aatgtaaata atgaggttcc cttagcaaaa agtagtgac ttaaatttta ttttttaag 780

tatactttag tacaagtaat agaaagtta ctaggaatta tactaactgc atacttcttc 840

a 841

<210> 42

<211> 836

<212> DNA

<213> oryzias javanicus

<400> 42

agcagacaaa ctggctctca ctgaggacgt ccacggagaa gtgagggcag cttgttctca 60  
 gaggagcttc ttcgttctcg tcgtccgctc tcttgacat gggggggttg tctgctgac 120  
 tcccaaatg attcttgtct ggataggatg tctccactca ctcagaacaa attctgggct 180  
 tttttctcc tgtgctgcat cctcacctgc acgactctgc tgttcggcta caccttcgcc 240

gacccccct ttcatttctt caagtatgct tctcggattt ctggcagctt tttctccaaa 300  
 gacatctgtg catgtgatac gtgcgtggca gatgtggggg gcgacgcttg gttggctgac 360  
 cgcttcaatc agtccatact ccctctgatg accccggaca acagcgcctt ctctgatgac 420  
 acctacaggt ggtggcagtg gctgcagagg gaggggaacc cagcaaacata caccagggtg 480  
 gtggaggagc tgttccaact tatcccagat gaggggggtt tcgtggacgc cggcccgcag 540  
 cgctgcagga cgtgctctgt ggtggggaac tccgggaacc tgaaggggtc cagttatggg 600  
 aagctgatcg acaccagtga cctggtcata cggatgaaca aggcgcccac caaaggcttt 660

gagaaggacg tgggagccag aaccacacca tgtcatgtac ccagaaagtg cgatagatct 720  
 gagcaacacc accagtctag tgetggtccc cttcaagact ctggacctgc agtggatcat 780  
 tagtgccctg accaccgcea ctatcacggg aacatacatg cctgtgaagg cctgga 836

<210> 43

<211> 851

<212> DNA

<213> oryzias javanicus

<400> 43

cagcatggcc tcggattccg acgcgaccgg cttcgtattc ctggtgatcg gcggcgggtc 60  
 tggaggtctg gccggtgctc ggcgcgcggc ggagctcggg gccaacaccg ccgtgatcga 120  
 gagtcaaaaa ctcggaggta cctgcgttaa cgttggctgt gttcctaaaa aggttatgtg 180

gaatgcagct gtccatgcag agtatctaca cgaccactgt gactacggct ttgagactgc 240  
 aatgttctg ttcagctggg aagctcttaa agccaaaagg gatgcatata tagcccatct 300  
 aatcgcatt tatcgaaca atctagaaa ggctaaagtc accttcattc aaggtatgc 360  
 caggttcaca gacgacgctg agcccaccgt ggaggtcaac gggaaaaaat acacggcgcc 420  
 tcacatctc atctccactg gagggcagcc tttctgttctg agtgacgagg aagtccagg 480  
 ggcgagcctg ggcataata gtgatggctt ttttgaactg gagaccctcc caaagcgcag 540  
 cgtgattgtg ggcgctgggt atattgccgt ggaaatggct ggcattcttt gcaccctggg 600

ctccaaaacc tcctcatta tccggcagac gggagttttg agaaacttcg acgcctcat 660

aagcgcaaac tgcaccaaag aaatccaaaa caacgggatc gatttgtgga agaactccca 720  
 ggtgaagtca gtgtgcaaaa cggacaaaagg cctggaggtg accatcgtca ccaaagaccc 780  
 ggacaagagc aacgacgaga agatcagcgt catcgaggag gtggactgcc ttctgtgggc 840  
 catcgggagg c 851  
 <210> 44  
 <211> 496  
 <212> DNA  
 <213> oryzias javanicus  
 <400> 44  
 aaacatcttt ctgtctttaa ggaagttggt gggactttaa attttttttg acaagtttga 60  
  
 acatataaag ttgaggaaag gctaaataga gcagtataac ccaatgcaag ggtttatttt 120  
 gatgatcatt gcaacaccag gaaactatgt tacacatatg cctattaaac cccctttct 180  
 tcaaggggga tgggacccaa agggacatcc ccttgccatt ccaaaaacttc aaatttggat 240  
 gctgccc aaa ctttcttga aggtctgaa ggttttcaa atccgtgacc cccccacta 300  
 ataattgagg ggccagggga tactgctgta ttggtatgag ccgaaaatcc cctcaactca 360  
 cagggggcgc aaactggatc tgcaccactg acctcctcc atccattgac ataaaagcaa 420  
 cctttgtgtt caccgtcaag gggaaaagca acaaatgtcc ccttcccctg gcaggggatg 480  
  
 taaatcattc cgctgt 496  
 <210> 45  
 <211> 833  
 <212> DNA  
 <213> oryzias javanicus  
 <400> 45  
 cctcccagat ttaccagctt tttattttaga gtattttgtg gcaaaaaaaaa ataaaacaca 60  
 gtctccaaaa gcatataatt gaacagtgtc ttcccaca caatttagcaa attatgcctc 120  
 ctggtgagag agaaaaagac atccattagg catttgtcta ccccaaaaga taaaaaac 180  
 aaccaaaaa aaggtattct ttagactgc atggaaagtg ttcagtgcca tgcactcaa 240  
 ggttattgtc tccgccgtct gaagatttta tgccttgaa agacctcggg tgtcaagatc 300  
  
 tttcaccttg tatatctga ccagccagtg ctctgtgtg taggcctcct ccaacacatc 360  
 cagtcaaaag tctttgttac cgatctcagc gttccttact ctgtcgtagc caggtggtct 420  
 tttgccctct gtgtagacct gaccaaagcg atagtagcac atcttgtaca tcaggcagtt 480  
 gagaagcaca ggtgagcctt cacgatctac tctgaactct ccagtgggag tgtagtagtc 540

atgttctttg atatgtttgc ccgtctctgt gcttcctcca atgcggacca tccacagaaa 600  
 cttgttgata tcatctgaag agtagccagt gagtcctcca aagatgacga gaacataact 660  
 gacatccagc tcctcataa tctcataggc tctctctct gttgatgcca tggcctgtcc 720

aactctagag atatgcgtgt tgttccatgt gttgttgtcc actagaatag ttcgattcgc 780  
 catggctggt atctgatagc cgtaatccca ccatgacatg actttggcat cct 833

<210> 46

<211> 760

<212> DNA

<213> oryzias javanicus

<400> 46

gaatgtggcc tgcagggagg agcataacaa tccagaactg aaaagcaggg gtgcagcgtc 60  
 ggcccttacc gtggactact cccagatccg cggcggacag gagcagctcc cgcgacggtg 120  
 cgtcagggtc cgctgtcagg gcttcgagtc atctctggcc gagtgtgaga tctacaacaa 180  
 ggtggacatc ggtgacgggg cgggtggctgc agctaactgc agcgactcca aacctgagga 240

ctgcggcttc acctgtgcga acgacaagtg cgtgtctctg aagcagacgt gcgacggcgt 300  
 ggacgattgc ggcgaccgca gcgatgagat gtgctgcaaa caatgcagga atggagcgtt 360  
 ccgctgcaac acgggggtgt gcgtgcacgc cgacgccgtc ggcgacaacc agctggactg 420  
 tctggacggt gaagacgagt cgtccaaaca gctgaattcc ttcgctctca gaaccgcaa 480  
 acgaccagaa gaaccttcag actacgtctc tcgcaaaaac gagactgtaa cctccagacg 540  
 tctgctggag tccaaactga gctgtgggat tcccaacatg gacctggtgg atgataccga 600  
 ggagcaggcg cgtgggcaga gaagcagaaa gaaaagggtg gtgggggggc taccggccag 660

gcctaccag atccagtggc aggtggctct gcaggagtac aacaagatcg actgtggagg 720  
 agcttatgtg ggccgggtgct gggcatcac tgccgctcac 760

<210> 47

<211> 763

<212> DNA

<213> oryzias javanicus

<400> 47

aaataaagta gatgaattcc acatccttta tttttttaa gccagagatc tgagcaagag 60  
 atagaaagga aagattcatc tttatttaa aaaaacgaga gattcaggag gaggagactg 120  
 tgatgagatt cagaaagttg gagacaccta taggatctgc tttaaagtga aagaagatca 180

agaaagggtt ttgcaaaaga ggtcacacat catctgactg ttagcagcag cagctcctta 240  
  
 caggcctctg atcagccatc gacacgccac gggcagataa tcgccaagc aaacacaaaa 300  
 aaacttgaga agatttttca aattccaaaa gctaacaaaa gcagctcgat aaaatccact 360  
 gtagtctgag gttagatfff gatacagagg aggcagtggt gaaaggggat gttgtgaagg 420  
 aatcaggagg agcttttggg actgcagctg agaaatggga gcaccaggta gacaagatct 480  
 tcatcaatct cactgagaaa tatacttgct atcatgtgtt tgaacctaaa ctggtcaaga 540  
 agctacagca ggatctcagc aatgtggctg atgatataaa agtgtactct caggcaggtt 600  
 atgtcgtggt ggtgggagaa actgtttgtg tgaaggagat ggtttcagtt ttagagaagg 660  
  
 gtcttacaac caccatggag attccaatca cagagaaaca cctcaaaactg atagaagaag 720  
 agttcagaag agaaatgcaa gctgattctc cagaagttaa aat 763  
  
 <210> 48  
 <211> 845  
 <212> DNA  
 <213> oryzias javanicus  
 <400> 48  
  
 ttttattcac aaagtgtct ttttttttaa tagagaagtc catcggaggc attacctgta 60  
 gaaaaaatta ctttatttcg tcaacgctgg gggttagtct ttctctccat cagaacggtc 120  
 ttcttctcta gtcgtacgct ggcagggggg aagcgagcta ggtcgacggc gaggttgtgg 180  
 taaccttggg tgaaggctat cggctgatga gtgttccgga gcagctggat tctgttgcg 240  
  
 tcggcctcca tcaggagatg ggagaacatt tggatttcag ggetttgtggg gctcaagtct 300  
 tctcttttgt tatacttcca gattctgttt tgctgcaaga agcgtgatac tccagtttca 360  
 gctgcgtaag tgtcaatatg aagagaaaca tctgctgtgg ggggcagtat tctgtgcagc 420  
 tccagcatcc ctgctectec tgggtaattg ttggtgagaaa ttagagaca gacgccggag 480  
 tagagagcgt ttagcagcag ctgagcgacc acaactgctg aaccagttt gtacatcaa 540  
 gacttccgat agttgttcaa aataaaaagag cagccgcgcg ccgccaccaa actgaacacc 600  
 gggaagggtg agatgatgaa ggcagctcc ttgtgaggca gcagcgagta gatggcgatg 660  
  
 aagcccacgg cggggagcag cagcggcctc atccgcgcat caagaaggcc gaggggcacg 720  
 aagagcagcg tacagccgag gccacgctgc acggcggagt aaaagtacca cagaaaaggg 780  
 gaggttcccc agttggagct tttgttaagt atgggtttgt accacaacac ctgccctcgc 840  
 ggcca 845  
  
 <210> 49

<211> 850  
 <212> DNA  
 <213> oryzias javanicus  
 <400> 49  
 agccatcgaa gactgacact gaggggtgggt gcatgaagac agacgcigaa ttgaaactta 60  
 aattccaaga aggccttcata tatttcact ttaacaagag tggtagatg gtccacgtcg 120  
  
 atactctgtc ttttacctg aaataccct tagtgaaagg aggtatggaa tacagtgcct 180  
 ccagcaagtc cacgacattg ttctctgcac gcagcggaca ctcttattcc tgcaggagtc 240  
 agtctgtgaa catgggtgac ggactgtatc tggatgtgac tcaggctcaa atgcaggcct 300  
 ttgatttaca aaatggcaat ttgggtaaac ctgacgcctg cctgacggac cagccggact 360  
 accgtgttgc catcgcggtg ggggtgacc tgctggtagt catcgtggtg gtggtgatcg 420  
 tgtacttgcg gggctgcaga aagaggaccg acggctacca gtctctttaa gcaggggggg 480  
 cggagcttta cgaagatgct tactctatta atgtggcttt ttgtggcttt actgtcaccc 540  
  
 tgagaggaca ttgtattaa cctacttatt agagccctgg tttttcccg tcctggttc 600  
 ccatccacag aaagtcttt taaacaaaag tattgagcga gctactgagc acctactcc 660  
 acacagtcca gtctgataat gcaggctgat tgtcatttga tctaaaaat gtaattttat 720  
 tgtagacaca aaggcagttt caagttactt ctgccatgaa ttattaatg gatctttat 780  
 acaataaac aaccacggga agatagcaaa aaaaaatgaa tacaacaggt taaaaacga 840  
 tagccactga 850  
 <210> 50  
 <211> 855  
 <212> DNA  
  
 <213> oryzias javanicus  
 <400> 50  
 gttttaaaga accaacagcg ctcaagtttt ggacaatttg gagtcatatt tcaacacagc 60  
 tccttttctt tctccgaatc tgcactttgc tgagagttgt cggccagctg agcagcatgt 120  
 cagaggaggt gaaacctgat agcgtgttgc tctgctctgt caacacagca gccgtgccac 180  
 gacacgagct gttgtgcatc ttgggacgg gggacttggg gcgctctctg ggtcagcgcc 240  
 tgcctccagtg tggatacaaa gtggtctacg gcagccgagc acccggcagt tgtggccct 300  
 tgcctccagg aactcaggcg ctgaatcatg aggcagcagc tcaacatgcc catttgatct 360  
  
 ttatttgtgt tcaaagagaa cactacgact ttatggagcc gcttgcgcca caacttaag 420

gaaaggtggt ggtggatggt agcaataatc tcaagaaaaa tatgtacaca gactctaag 480  
 cagagtatct gcagaggctg atccctggag ctcatgtggt gaaagctttt aacacattgt 540  
 ctgcctgggc cctccagaac ggacccgcag atgctaacag acaggtgtac ctgtgtggaa 600  
 gcaatgctga ggccaagcaa gttgtggcag aaattgctac caaaatgggt ttcagtgttc 660  
 tggatagagg atctctgtct gcagccaggg aactggaaga ctcccccttg cagctgttcc 720  
 caggggtggag gctgcccatac aggtcgacca ttgggctcac tgctctgttt ttcttctatt 780  
  
 tgctccctag agatgtcgtg tactcctaca ttgtacaaca aaaggacatg tcctttccgg 840  
 atcatggtgt ctttg 855  
 <210> 51  
 <211> 733  
 <212> DNA  
 <213> oryzias javanicus  
 <400> 51  
  
 ttcttctgg ccagagacgg ctgctgcag gacgctgct acgccgagca gaaggcgggtg 60  
 tgtggagaag agcttctcc tctggacttt gatcagctga aggacctcag cttgctggag 120  
 cgctgtctga aggagacgct gaggctccgc ccacctatca tgaccatgat gagaatggcc 180  
 cgcacgcctc agacggcggc ggggttcacc atcccggcgg gacaccaggt gtgcgtctcg 240  
  
 ccgaccgtca accaccgctt gcgggacgcc tgggccaaga ggacggagtt cgaccccgac 300  
 cgctatctcc acgacaacc ggccgcccggg gagaagtctg cctacgtgcc gtttggagcc 360  
 ggccgccatc gctgcatcgg agagaacttc gcctacgtcc agatcaaac catctggtcc 420  
 acgtgctgc gcacctacca gttccagctg gtggacgggt acttcccctc catcaactac 480  
 agcaccatga tccacacgcc gcacaacccc gtcatccggt accggaggag gacggcgtga 540  
 gggggaggag cggggacggc gtgaggggag gagccgggac ggcgtgaggg ggagggaccg 600  
 ggacggcgtg aagaggggga ggagccggga cggcgtgagg ggtccaggaa gatccatgaa 660  
  
 tgactgaatg aaagcagatg ttttctgttt ccatgtttcc aaaaatgaag aaaaataact 720  
 catttttata ttg 733  
 <210> 52  
 <211> 863  
 <212> DNA  
 <213> oryzias javanicus  
 <400> 52  
  
 gaaggcggac atgttggag gaaacgtggt tgttaaaagt atcgaggtgg aagacgagat 60

gattattgga agaaaggttt cgcattgttt tggatttaca catcgatact tattaataat 120  
 ttaatttaaa tgctttttta aaaaacctaa aatctcgtta ttttcctttt ttgatTTTTT 180  
 ttaaatacaag gatttgtaa catgatcaaa ggatgactgg ttttggttgt ataaatttag 240

tcgtccatat tgTTTTctt catttcttag tgacattgtg gggaatatgt aaccttggtg 300  
 tgggggatgg gcctgttggg taggtaactt ttgttaagca cgatttaagt taattcaatt 360  
 taaatagatt gttttaatta ttttctgtta attcacgagt attgtgatct aaaatcttaa 420  
 tgtaattcac cagtgettat agagtatttt tttggggggt taaatttccc ccttttact 480  
 gtttttaata tgtattaatt agtctaaatt actcaccttc ttgttttatg tttcgttttt 540  
 tttgtttgaa ttttaatac aggtcgaggt cactttgtct aaagtgtctg gtcattctgt 600  
 tcgtgtagca cagcgacgtg accctctcaa tgttctctc tgcttgatgt aaatctgcgt 660

ttcagtactg tctgttcttt cttttctttt acgtttacag atattcgtat aggttgtata 720  
 atttattttt taagggttga tttttggcct ttacagcct tctttgtctg atctaaagat 780  
 tttgttttga cacgttttag atgttgggtga atgtagttag tgtatcattt tgtaaatgat 840  
 tttttttaat ttatttcaat tga 863

<210> 53  
 <211> 639  
 <212> DNA  
 <213> oryzias javanicus  
 <400> 53

ccatggataa aatttatgct caactgaagt acaactggaaa gaatgaagca aatctttttg 60  
 gcattgaaac cacaggaag cacagtgttc agaccaacat cgacctcaca ccatccgcag 120

gactaaaagc taatgccgag gttgatctgc atcagtcaag cactctgagt gaatttattt 180  
 acctcgagaa gctttctgct gatattacac tgteccaacca aaagatctct ttcgaaaaca 240  
 agcttgacag tctctttac tctcaaaaa atgaagtggc tttggagggc agttttcctg 300  
 cctacacggc agcattcaag tctctgctc ccaactccat cgttctcttg gaatatgatg 360  
 tagatgcttc tacttctgct aactttgaaa atgacctttt ggaagtactt aacaagtttg 420  
 cttttacaca cccaaaactg agagtgtctt ccaactattt aataacaaa gctttcagag 480  
 gacaaattga agatgacgac agctgctctc atcatgattt aaatgttggc atcaccagtc 540

ctttgttcac tgaagtcaac cttcgttatg gcgtacagaa atgtgccatc agtgcactctg 600  
 tatctactac ctctggttcc ctcatcggcc ttcagctca 639

<210> 54

<211> 797  
 <212> DNA  
 <213> oryzias javanicus  
 <400> 54

ggacacggtg aggagctgct gtgtctctca ttctaccccc tccgtgiagt ttagttcttt 60  
 tctatTTTT tctcgtttac atcggtagct tcttgtttta gtcattgtatc ggtatTTTgg 120  
 ggaactgttg agccgctctg cgggcagtgc cctggcctcg ggaaccgtgg actccgctct 180  
 ccccgTgtcg tCgtctctga tgcgggtccg tCgctatgcc gatgcggcca acgagccccga 240

cgaccccaac ttcttcagga tggtcgaggg cttctttgac cgcggcgcca ccatcgtcga 300  
 ggacaaaactg gtggaggacc tgaagaccag ggaaagcccc gagcagaaga gacatcgcgt 360  
 gcggggcatc ctgcgcatca tcaagccatg caaccacgtc ctgagcgtgt cgttcccgat 420  
 caagagggac aacggagagt gggaggtggt ggaggggtac cgcgccaac acagccagca 480  
 cagaacaccc tgcaaagggg gtatccgcta cagtacagat gtgtctgtgg atgaggtgaa 540  
 agccttggcc tctctgatga cctacaagtg tgctgttgtt gatgtgcat ttggtggagc 600  
 caaagctgga gttaaaatca accccaagaa ttattccgac aatgagctgg aaaaaatcac 660

cagaagattc actattgagc tggccaagaa gggtttcac ggacctggca tcgacgtccc 720  
 tgcaccggac atgagcaccg gcgagagggg gatgtcctgg atcgcggaca catacgccaa 780  
 caccattgca cacaccg 797

<210> 55  
 <211> 573  
 <212> DNA  
 <213> oryzias javanicus  
 <400> 55

ggtacctgaa ggtcggcctc tggcttttgt tttggggcgt ccaggtgtgc gtctgcctct 60  
 cgcgggtctt catcgcggt cacttcccgc accaggttgt cgctggtgtc atcacaggca 120  
 tgattgtggc cgaggccttc aaccgaacc agtggatcta cagcggcagc atgaagaaat 180

acttctacac cacgtcttc ctcacctct tcgcggttgg cttctacctc gtgctcaaag 240  
 ctctgggcgt ggacctgctg tggaccctgg acaaagccca gaagtgtgtc gtcaggcccc 300  
 agtgggtcca cctggacacc acgcccttcg ccagctctgt gcgcaacatg ggcacgctgt 360  
 tcggcttggg tctgggcctg cactcggccc tctacacaga aaccaaaaag agcaacagcg 420  
 ccgcggtcaa agcagggtgc atcatcagct ctttggctct cctgcactctg ttcgactcct 480  
 tcaagcccc caccacacc gccgtctct tctacctgct gtcttctgt aagagcgcca 540

cagtgcctct ggtcacggtt agcatcgtcc cgt

573

<210> 56

<211> 426

<212> DNA

<213> oryzias javanicus

<400> 56

ttcaggtgcc tggctgaggg agcaggcgat gtcgcattca tcaagcacac gattgttagt 60

gaaaacaccg atggtaaagg tcccgaatgg gctcgcagcc tggaatctga cgactaccag 120

ctgatctgcc ctggaaaggc tccaatggcc atctctgaat ttgctaattg taatttggcg 180

gttgtgcctg cacacgcagt agtgaccctt ccagagagcc gcagtgatgt tgtgcgcatac 240

ctccaggttc agcagacttt ctttggagcc agtgggagcg atccttcctt caaactcttc 300

caatcagaga atggaaacaa cctcctcttc aaggactcca ccaagtgtct ccaggaggtt 360

tctgctggaa agagcttcca tcagtttttg ggagccgagt acctcggccg cgaccacgct 420

aatcac 426