



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0097359
(43) 공개일자 2011년08월31일

<p>(51) Int. Cl. C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/52 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2010-0017165 (22) 출원일자 2010년02월25일 심사청구일자 2010년02월25일</p>	<p>(71) 출원인 한국해양연구원 경기 안산시 상록구 사동 1270번지</p> <p>(72) 발명자 염승식 경상남도 거제시 신협읍 양정리 고려 4차아파트 504-1303 우선속 경상남도 거제시 신협읍 양정리 고려 4차아파트 504-1303 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인 이원희</p>
--	---

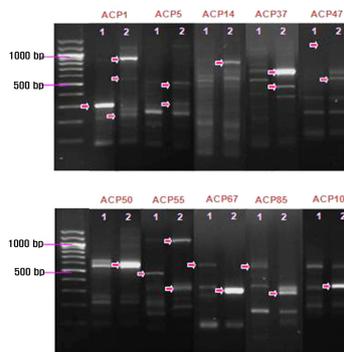
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 다환방향족탄화수소 노출에 대응하는 분홍바다맨드라미의 유전자 및 이를 이용한 연안 환경 오염 진단 방법

(57) 요약

본 발명은 다환방향족탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbons)의 노출에 대응하는 분홍바다맨드라미(*Scleronephthya gracillimum*)의 유전자 및 이를 이용한 연안 환경 오염 진단 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 분홍바다맨드라미로부터 유래한 특정 유전자군이 다환방향족탄화수소 노출에 의해 특이적인 발현 변화를 나타내어, 이들을 생체지표로 도입함으로써, 다환방향족탄화수소 노출에 따른 해양 생태계의 스트레스 검출 및 환경 시료에서 다환방향족탄화수소의 오염을 모니터링 및 판정하는데 유용하게 사용될 수 있으며, 다환방향족탄화수소에 의해 유발되는 독성 및 발암 작용 기작을 규명하는 도구로 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



· 1 : 대조군, 22℃ 여과해수에 24시간 배양한 분홍바다맨드라미
· 2 : 실험군, 다환방향족탄화수소(PAHs)에 24시간 노출된 분홍바다맨드라미
· ACP : 적용된 프라이머의 종류
· 특이적으로 나타나는 유전자 단편을 화살표로 표시함

(72) 발명자
이택건
경기도 안성시 석정동 우남퍼스트빌 107-301
전혜영
경남 하동군 고전면 대덕리 128-3

이종락
제주도 서귀포시 강정동 178 서호2차 현대맨션
202-303
송준임
서울특별시 종로구 청운동 106번지

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호
부처명 국토해양부(한국해양기술진흥원)
연구관리전문기관
연구사업명 해양과학기술연구개발사업
연구과제명 지속가능한 산호자원 보전 복원 기술개발
기여율
주관기관 이화여자대학교
연구기간 2009년 07월 01일 ~ 2014년 06월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

하기의 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자의 핵산 서열의 전부 또는 이의 단편인 올리고뉴클레오티드 또는 그의 상보 가닥 분자가 집적된, 유전독성 유발 수준의 다환방향족탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbons) 노출에 따른 해양 생태계의 스트레스 검출 및 건강 진단용 마이크로어레이 칩.

서열번호 1로 기재되는 유전자(calmodulin), 서열번호 2로 기재되는 유전자(cytosolic malate dehydrogenase), 서열번호 3으로 기재되는 유전자(40S ribosomal protein S23), 서열번호 4로 기재되는 유전자(protein disulfide isomerase), 서열번호 5로 기재되는 유전자(dipeptidyl aminopeptidase IV), 서열번호 6으로 기재되는 유전자(proteasome beta 3 subunit), 서열번호 7로 기재되는 유전자(ATP synthase F0 subunit 6), 서열번호 8로 기재되는 유전자(40S ribosomal protein S8), 서열번호 9로 기재되는 유전자(myosin heavy chain), 서열번호 10으로 기재되는 유전자(MAK10 homolog, amino-acid N-acetyltransferase subunit), 서열번호 11로 기재되는 유전자(heletron 5 helitron-like transposon replicase/helicase/endonuclease), 서열번호 12로 기재되는 유전자(ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1), 서열번호 13으로 기재되는 유전자(allene oxide synthase/8R-lipoxygenase fusion protein), 서열번호 14로 기재되는 유전자(triacylglycerol lipase-like protein), 서열번호 15로 기재되는 유전자(bromodomain adjacent to zinc finger domain 1A), 서열번호 16으로 기재되는 유전자(60S ribosomal protein L6), 서열번호 17로 기재되는 유전자(short-chain dehydrogenase/reductase 9), 서열번호 18로 기재되는 유전자(cardiac troponin C), 서열번호 19로 기재되는 유전자(calcium dependent mitochondrial carrier protein), 서열번호 20으로 기재되는 유전자(mannose-binding lectin 2), 서열번호 21로 기재되는 유전자{CXXC finger 1 (PHD domain), isoform}, 서열번호 22로 기재되는 유전자(myosin light chain kinase isoform 3A), 서열번호 23으로 기재되는 유전자(transcriptional regulator, XRE family), 서열번호 24로 기재되는 유전자(ubiquitin-ptotein ligase), 서열번호 25로 기재되는 유전자(astacin protease 4), 서열번호 26으로 기재되는 유전자{poly (ADP-ribose) polymerase 4}, 서열번호 27로 기재되는 유전자{ADAM metallopeptidase domain 28(ADAM28)}, 서열번호 28로 기재되는 유전자(Collagen, type X X V), 서열번호 29로 기재되는 유전자(eukaryotic translation initiation factor 4 gamma), 서열번호 30으로 기재되는 유전자(peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase), 서열번호 31로 기재되는 유전자(Ras-related and estrogen-regulated growth inhibitor) 및 서열번호 32로 기재되는 유전자(small acid-soluble spore protein).

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 유전자는 분홍바다맨드라미(*Scleronephthya gracillimum*)로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이 칩.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 서열번호 1로 기재되는 유전자(calmodulin), 서열번호 2로 기재되는 유전자(cytosolic malate dehydrogenase), 서열번호 3으로 기재되는 유전자(40S ribosomal protein S23), 서열번호 4로 기재되는 유전자(protein disulfide isomerase), 서열번호 5로 기재되는 유전자(dipeptidyl aminopeptidase IV), 서열번호 6으로 기재되는 유전자(proteasome beta 3 subunit), 서열번호 7로 기재되는 유전자(ATP synthase F0 subunit 6), 서열번호 8로 기재되는 유전자(40S ribosomal protein S8), 서열번호 9로 기재되는 유전자(myosin heavy chain), 서열번호 10으로 기재되는 유전자(MAK10 homolog, amino-acid N-acetyltransferase subunit), 서열번호 11로 기재되는 유전자(heletron 5 helitron-like transposon replicase/helicase/endonuclease), 서열번호 12로 기재되는 유전자(ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1), 서열번호 13으로 기재되는 유전자(allene oxide synthase/8R-lipoxygenase fusion protein), 서열번호 14로 기재되는 유전자(triacylglycerol lipase-like protein), 서열번호 15로 기재되는 유전자(bromodomain adjacent to zinc finger domain 1A), 서열번호 16으로 기재되는 유전자(60S ribosomal protein L6), 서열번호 17로 기재되는 유

전자(short-chain dehydrogenase/reductase 9) 및 서열번호 18로 기재되는 유전자(cardiac troponin C)는 다환방향족탄화수소 노출에 대응하여 발현이 증가하는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이 칩.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 서열번호 19로 기재되는 유전자(calcium dependent mitochondrial carrier protein), 서열번호 20으로 기재되는 유전자(mannose-binding lectin 2), 서열번호 21로 기재되는 유전자(CXXC finger 1 (PHD domain), isoform), 서열번호 22로 기재되는 유전자(myosin light chain kinase isoform 3A), 서열번호 23으로 기재되는 유전자(transcriptional regulator, XRE family), 서열번호 24로 기재되는 유전자(ubiquitin-protein ligase), 서열번호 25로 기재되는 유전자(astacin protease 4), 서열번호 26으로 기재되는 유전자{poly (ADP-ribose) polymerase 4}, 서열번호 27로 기재되는 유전자{ADAM metalloproteinase domain 28(ADAM28)}, 서열번호 28로 기재되는 유전자(Collagen, type XXV), 서열번호 29로 기재되는 유전자(eukaryotic translation initiation factor 4 gamma), 서열번호 30으로 기재되는 유전자(peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase), 서열번호 31로 기재되는 유전자(Ras-related and estrogen-regulated growth inhibitor) 및 서열번호 32로 기재되는 유전자(small acid-soluble spore protein)는 다환방향족탄화수소 노출에 대응하여 발현이 감소하는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이 칩.

청구항 5

- 1) 다환방향족탄화수소 노출 여부를 확인하고자 하는 해수를 처리한 실험군의 분홍바다맨드라미와, 다환방향족탄화수소가 포함되지 않은 해수를 처리한 대조군의 분홍바다맨드라미에서 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, 유전독성 유발 수준의다환방향족탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbons) 노출에 따른 해양 생태계의 스트레스 검출 및 건강 진단 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 단계 2)의 형광물질은 Cy3, Cy5, FITC(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate), RITC(rhodamine-B-isothiocyanate) 및 로다민(rhodamine)으로 이루어진 군으로부터 선택되어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

- 1) 다환방향족탄화수소 노출 여부를 확인하고자 하는 해수를 처리한 실험군의 분홍바다맨드라미와, 다환방향족탄화수소가 포함되지 않은 해수를 처리한 대조군의 분홍바다맨드라미에서 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, 유전독성 유발 수준의다환방향족탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbons) 노출에 따른 해양 생태계의 스트레스 검출 및 건강 진단 방법.

청구항 8

제 1항의 마이크로어레이 칩을 포함하는, 유전독성 유발 수준의 다환방향족탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbons) 노출에 따른 해양 생태계의 스트레스 검출 및 건강 진단용 키트.

청구항 9

제 8항에 있어서, 스트렙타비딘-알칼리 탈인화효소 접합물질(streptavidin-like phosphatase conjugate), 화학 형광물질(chemifluorescence) 및 화학발광물질(chemiluminescent)로 이루어진 형광물질군으로부터 선택되는 어느 하나를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 10

제 8항에 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 키트.

청구항 11

제 1항의 마이크로어레이 칩에 집적된 유전자에 상보적이고 상기 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 쌍을 포함하는, 유전독성 유발 수준의 다환방향족탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbons) 노출에 따른 해양 생태계의 스트레스 검출 및 건강 진단용 키트.

청구항 12

제 11항에 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 키트.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 다환방향족탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)의 노출에 대응하는 분홍바다맨드라미(*Scleronephthya gracillimum*)의 유전자 및 이를 이용한 연안 환경 오염 진단 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 분홍바다맨드라미(*Scleronephthya gracillimum*)는 제주 연안해역, 특히 서귀포 남쪽 연안의 연산호 군락에 널리 서식하고 있는 연산호의 일종으로, 일본 남부에서 동중국해까지 분포한다. 군체(몸)는 신축성이 매우 심하여 펼쳤을 때는 관목상이지만 수축했을 때는 통통한 덩어리 모양으로 변한다. 병부의 표면에는 가로 주름이 있으며, 관부에는 수축력이 심한 폴립들이 덩어리 모양으로 모여 나 있다. 몸은 연노란색, 적황색, 주황색 또는 분홍색 등이며, 폴립 덩어리는 분홍색 또는 주황색 등으로 다양하다. 수직벽이나 경사가 심한 암반에 무리지어 살며, 수심 3 ~ 4 m부터 15 m 전후에 분포한다. 다른 생물들의 서식처를 제공함으로써, 우리나라 해양생물 다양성에 큰 공헌을 하고 있는 생물이다. 따라서 제주 연안의 해양생물 다양성을 보존하기 위해서는 예상되는 연안 오염원에 대한 본 종의 반응을 이해하고, 이를 토대로 한 본 종의 건강 진단 또는 연안 오염의 진단이 필요하다.

[0003] 다환방향족탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH)는 여러 개의 벤젠고리를 지닌 방향족 탄화수소로서 많은 부류의 화합물로 이루어져 있다. 화석연료의 불완전연소 또는 산업활동에 의하여 생성되어 환경 및 인체에 대한 주요 오염원이 되고 있다. 미량으로도 암을 유발시키거나 돌연변이, 기형발생 등을 일으킬 수 있는 물질로서 몇몇의 주요 다환방향족탄화수소 물질은 독성 때문에 인체위해평가를 위한 특정오염물질 발암등급분류(IARC)에서 발암물질로 분류되고 있다. 환경발암물질로서 장기간 만성적인 노출이 급성노출보다 더 중요하게 여겨지고 있다.

[0004] 공업화된 지역의 담수 및 해양 침전물에서 많은 양의 다환방향족탄화수소가 전세계적으로 검출되고 있다. 다환방향족탄화수소는 물보다 유기용매에 용해성이 큰 물질로 수계 환경에서 수생생물에 흡수되거나, 부유물질에 흡착하고 수계 바닥으로 침전되어 저질토에 축적되어 저서생물의 돌연변이를 유발하거나 사멸시키는 등의 효과를 나타낸다(Varanasi 등, *Environ. Health Perspect.*, 90, 93-100, 1991).

[0005] 이러한 오염물질에 대응하기 위해, 해양 생물은 자신의 특정 유전자의 발현량을 조절하여 생리 또는 대사를 변화시킴으로써 능동적으로 대처한다. 그러므로 다환방향족탄화수소와 같은 오염물질로의 노출에 의해 발현량이 변화되는 유전자들을 발굴하여 생체지표로 이용함으로써, 특정지역의 다환방향족탄화수소에 대한 노출에 관한 정보뿐만 아니라, 이러한 오염물질로의 노출이 생명현상에 미치는 영향 및 해당 생물의 건강진단에 관한 정보를 얻을 수 있다. 이러한 기법은 분석화학적인 방법으로는 검출할 수 없는, 미세한 농도의 오염물질에 대한 노출도 감지 가능하고, 조기 진단적 가치를 가지며, 유전자 기능에 대한 고찰을 통해 미래 예측적 기능도 가능하다. 따라서 인간 활동에 의해 야기되는 급격한 지구환경변화를 이해하고 대응하기 위해서는 생명현상의 기본인 유전자와 핵산 물질의 분석을 통하여 환경변화의 영향과 생태계 파급효과를 진단하는 것과 같은 첨단기술 개발의 필요성이 절실하다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 다환방향족탄화수소 노출에 대응하는 생체지표를 발굴하던 중, 해양 생물다양성 유지에 큰 역할을 하고 있는 연산호의 일종인 분홍바다맨드라미(*Scleronephthya gracillimum*)에서 다환방향족탄화수소 노출로 인한 특정 유전자의 발현 변화를 규명하였고, 다환방향족탄화수소 노출에 대응하는 특이 유전자 후보군은 오염물질에 따른 환경 변화 정도 및 이에 따른 해양 생태계의 상태를 파악할 수 있는 바이오센서로서 유용하게 이용될 수 있음을 제시함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0007]

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 다환방향족탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbons) 노출에 대응하는 분홍바다맨드라미(*Scleronephthya gracillimum*)의 유전자 및 이를 이용한, 환경 오염에 대한 연안 생태계의 스트레스 검출 및 건강 진단 방법을 제공하는 것이다.

[0009]

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 다환방향족탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbons) 노출에 대응하여 발현이 증가 또는 감소하는 유전자 염기서열의 전부 또는 일부를 포함하는 올리고뉴클레오티드, 또는 상기 올리고뉴클레오티드에 상보적인 올리고뉴클레오티드 분자가 집적된, 유전독성 유발 수준의 다환방향족탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbons) 노출에 따른 해양 생태계의 스트레스 검출 및 건강 진단용 마이크로어레이 칩을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 유전자를 이용한, 유전독성 유발 수준의 다환방향족탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbons) 노출에 따른 해양 생태계의 스트레스 검출 및 건강 진단 방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 마이크로어레이 칩을 포함하는, 유전독성 유발 수준의 다환방향족탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbons) 노출에 따른 해양 생태계의 스트레스 검출 및 건강 진단용 키트를 제공한다.

[0013] 아울러, 본 발명은 상기 유전자에 상보적이고 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 쌍을 포함하는, 유전독성 유발 수준의 다환방향족탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbons) 노출에 따른 해양 생태계의 스트레스 검출 및 건강 진단용 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0014] 다환방향족탄화수소 노출에 의해 발현량의 변화를 나타내는 분홍바다맨드라미의 특정 유전자군의 발현량을 측정함으로써, 본 발명의 다환방향족탄화수소 노출에 대응하는 분홍바다맨드라미의 특정 유전자는 오염물질에 대한 노출에 따른 환경 변화뿐만 아니라 이에 따른 해양 생태계의 스트레스 검출 및 건강을 진단할 수 있는 바이오센서 및 진단 방법으로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 22℃의 여과해수 또는 다환방향족탄화수소 포함 해수(100 ppb)에서 배양한 분홍바다맨드라미의 유전자 발현의 차이를 나타낸 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0017] 본 발명은 하기 군으로 구성된, 유전독성 유발 수준의 다환방향족탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbons) 노출에 따른 해양 생태계의 스트레스 검출 및 건강 진단용 유전자를 제공한다:

[0018] 서열번호 1로 기재되는 유전자(calmodulin), 서열번호 2로 기재되는 유전자(cytosolic malate dehydrogenase), 서열번호 3으로 기재되는 유전자(40S ribosomal protein S23), 서열번호 4로 기재되는 유전자(protein disulfide isomerase), 서열번호 5로 기재되는 유전자(dipeptidyl aminopeptidase IV), 서열번호 6으로 기재되는 유전자(proteasome beta 3 subunit), 서열번호 7로 기재되는 유전자(ATP synthase F0 subunit 6), 서열번호 8로 기재되는 유전자(40S ribosomal protein S8), 서열번호 9로 기재되는 유전자(myosin heavy chain), 서열번호 10으로 기재되는 유전자(MAK10 homolog, amino-acid N-acetyltransferase subunit), 서열번호 11로 기재되는 유전자(heletron 5 helitron-like transposon replicase/helicase/endonuclease), 서열번호 12로 기재되는 유전자(ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1), 서열번호 13으로 기재되는 유전자(allene oxide synthase/8R-lipoxygenase fusion protein), 서열번호 14로 기재되는 유전자(triacylglycerol lipase-like protein), 서열번호 15로 기재되는 유전자(bromodomain adjacent to zinc finger domain 1A), 서열번호 16으로 기재되는 유전자(60S ribosomal protein L6), 서열번호 17로 기재되는 유전자(short-chain dehydrogenase/reductase 9), 서열번호 18로 기재되는 유전자(cardiac troponin C), 서열번호 19로 기재되는 유전자(calcium dependent mitochondrial carrier protein), 서열번호 20으로 기재되는 유전자(mannose-binding lectin 2), 서열번호 21로 기재되는 유전자{CXXC finger 1 (PHD domain), isoform}, 서열번호 22로 기재되는 유전자(myosin light chain kinase isoform 3A), 서열번호 23으로 기재되는 유전자(transcriptional regulator, XRE family), 서열번호 24로 기재되는 유전자(ubiquitin-ptotein ligase), 서열번호 25로 기재되는 유전자(astacin protease 4), 서열번호 26으로 기재되는 유전자{poly (ADP-ribose) polymerase 4}, 서열번호 27로 기재되는 유전자{ADAM metallopeptidase domain 28(ADAM28)}, 서열번호 28로 기재되는 유전자(Collagen, type XXV), 서열번호 29로 기재되는 유전자(eukaryotic translation initiation factor 4 gamma), 서열번호 30으로 기재되는 유전자(peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase), 서열번호 31로 기재되는 유전자(Ras-related and estrogen-regulated growth inhibitor) 및 서열번호 32로 기재되는 유전자(small acid-soluble spore protein).

[0019] 상기 유전자군에서 다환방향족탄화수소 노출에 대응하여 발현이 증가하는 유전자는 하기의 유전자를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[0020] 서열번호 1로 기재되는 유전자(calmodulin), 서열번호 2로 기재되는 유전자(cytosolic malate dehydrogenase), 서열번호 3으로 기재되는 유전자(40S ribosomal protein S23), 서열번호 4로 기재되는 유전자(protein

disulfide isomerase), 서열번호 5로 기재되는 유전자(dipeptidyl aminopeptidase IV), 서열번호 6으로 기재되는 유전자(proteasome beta 3 subunit), 서열번호 7로 기재되는 유전자(ATP synthase F0 subunit 6), 서열번호 8로 기재되는 유전자(40S ribosomal protein S8), 서열번호 9로 기재되는 유전자(myosin heavy chain), 서열번호 10으로 기재되는 유전자(MAK10 homolog, amino-acid N-acetyltransferase subunit), 서열번호 11로 기재되는 유전자(heletron 5 helitron-like transposon replicase/helicase/endonuclease), 서열번호 12로 기재되는 유전자(ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1), 서열번호 13으로 기재되는 유전자(allene oxide synthase/8R-lipoxygenase fusion protein), 서열번호 14로 기재되는 유전자(triacylglycerol lipase-like protein), 서열번호 15로 기재되는 유전자(bromodomain adjacent to zinc finger domain 1A), 서열번호 16으로 기재되는 유전자(60S ribosomal protein L6), 서열번호 17로 기재되는 유전자(short-chain dehydrogenase/reductase 9) 및 서열번호 18로 기재되는 유전자(cardiac troponin C).

[0021] 상기 유전자군에서 다환방향족탄화수소 노출에 대응하여 발현이 감소하는 유전자는 하기의 유전자를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[0022] 상기 서열번호 19로 기재되는 유전자(calcium dependent mitochondrial carrier protein), 서열번호 20으로 기재되는 유전자(mannose-binding lectin 2), 서열번호 21로 기재되는 유전자{CXXC finger 1 (PHD domain), isoform}, 서열번호 22로 기재되는 유전자(myosin light chain kinase isoform 3A), 서열번호 23으로 기재되는 유전자(transcriptional regulator, XRE family), 서열번호 24로 기재되는 유전자(ubiquitin-ptotein ligase), 서열번호 25로 기재되는 유전자(astacin protease 4), 서열번호 26으로 기재되는 유전자{poly (ADP-ribose) polymerase 4}, 서열번호 27로 기재되는 유전자{ADAM metallopeptidase domain 28(ADAM28)}, 서열번호 28로 기재되는 유전자(Collagen, type XXV), 서열번호 29로 기재되는 유전자(eukaryotic translation initiation factor 4 gamma), 서열번호 30으로 기재되는 유전자(peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase), 서열번호 31로 기재되는 유전자(Ras-related and estrogen-regulated growth inhibitor) 및 서열번호 32로 기재되는 유전자(small acid-soluble spore protein).

[0023] 상기 서열번호 1로 기재되는 유전자(calmodulin), 서열번호 18로 기재되는 유전자(cardiac troponin C), 및 서열번호 19로 기재되는 유전자(calcium dependent mitochondrial carrier protein)는 칼슘 결합 모티프(calcium binding motif)를 가지고 있는 EF-Hand 슈퍼패밀리 단백질 유전자이고, 상기 서열번호 3으로 기재되는 유전자(40S ribosomal protein S23), 서열번호 8로 기재되는 유전자(40S ribosomal protein S8), 및 서열번호 16으로 기재되는 유전자(60S ribosomal protein L6)는 라이보솜 단백질의 유전자로서, 라이보솜의 구성원 및 단백질의 생합성시 rRNA과 결합하여 구조적 안정화에 기여하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0024] 진핵생물 상동성 그루핑(The eukaryotic orthologous groups, KOG)에 기초한 상기 유전자의 기능적 분류에 따르면, 상기 서열번호 3으로 기재되는 유전자(40S ribosomal protein S23), 서열번호 8로 기재되는 유전자(40S ribosomal protein S8), 서열번호 16으로 기재되는 유전자(60S ribosomal protein L6), 서열번호 23으로 기재되는 유전자(transcriptional regulator, XRE family), 및 서열번호 29로 기재되는 유전자(eukaryotic translation initiation factor 4 gamma)는 번역,라이보솜 구조와 생합성에 관련된 유전자이고, 상기 서열번호 24로 기재되는 유전자(ubiquitin-ptotein ligase)는 RNA 프로세싱 및 변형에 관련된 유전자이고, 상기 서열번호 21로 기재되는 유전자{CXXC finger 1 (PHD domain), isoform} 및 서열번호 26으로 기재되는 유전자{poly (ADP-ribose) polymerase 4}는 전사에 관련된 유전자이고, 상기 서열번호 15로 기재되는 유전자(bromodomain adjacent to zinc finger domain 1A)는 크로마틴 구조 및 다이내믹스에 관련된 유전자이고, 상기 서열번호 11로 기재되는 유전자(heletron 5 helitron-like transposon replicase/helicase/endonuclease)는 세포주기 조절, 세포 분열, 염색체 분획에 관련된 유전자이고, 상기 서열번호 1로 기재되는 유전자(calmodulin), 서열번호 12로 기재되는 유전자(ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1), 서열번호 14로 기재되는 유전자(triacylglycerol lipase-like protein), 서열번호 18로 기재되는 유전자(cardiac troponin C), 서열번호 19로 기재되는 유전자(calcium dependent mitochondrial carrier protein), 및 서열번호 32로 기재되는 유전자(small acid-soluble spore protein)는 신호전달 기전에 관련된 유전자이고, 상기 서열번호 20으로 기재되는 유전자(mannose-binding lectin 2)는 방어기전에 관련된 유전자이고, 상기 서열번호 4로 기재되는 유전자(protein disulfide isomerase), 서열번호 5로 기재되는 유전자(dipeptidyl aminopeptidase IV), 서열번호 6으로 기재되는 유전자(proteasome beta 3 subunit), 서열번호 27로 기재되는 유전자{ADAM metallopeptidase domain 28(ADAM28)}, 서열번호 30으로 기재되는 유전자(peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase)는 단백질 합성 후 변형, 턴오버(turnover), 및 사페론에 관련된 유전자이고, 상기 서열번호 9로 기재되는 유전자(myosin heavy chain), 및 서열번호 22로 기재되는 유전자(myosin light chain kinase isoform 3A)는 세포골

격에 관련된 유전자이고, 상기 서열번호 28로 기재되는 유전자(Collagen, type X X V)는 세포의 구조에 관련된 유전자이고, 상기 서열번호 2로 기재되는 유전자(cytosolic malate dehydrogenase), 및 서열번호 7로 기재되는 유전자(ATP synthase FO subunit 6)는 에너지 생산 및 전환에 관련된 유전자이고, 상기 서열번호 13으로 기재되는 유전자(allene oxide synthase/8R-lipoxygenase fusion protein)는 탄수화물 수송 및 대사에 관련된 유전자이고, 상기 서열번호 17로 기재되는 유전자(short-chain dehydrogenase/reductase 9)는 이차대사산물 생합성, 수송, 및 이화작용에 관련된 유전자이며, 상기 서열번호 10으로 기재되는 유전자(MAK10 homolog, amino-acid N-acetyltransferase subunit), 서열번호 25로 기재되는 유전자(astacin protease 4), 및 서열번호 31로 기재되는 유전자(Ras-related and estrogen-regulated growth inhibitor)는 일반기능 예측에 관련된 유전자인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0025] 상기 유전자는 분홍바다맨드라미(*Scleronephthya gracillimum*)로부터 유래되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0026] 본 발명자들은 다환방향족탄화수소 노출에 대응하는 분홍바다맨드라미 유전자를 발굴하기 위하여, 분홍바다맨드라미를 다환방향족탄화수소 표준시약(Supelco, USA, 100 ppb)에서 24시간 동안 배양한 후 분홍바다맨드라미의 cDNA를 합성하여 발현량이 변화하는 유전자들을 조사하였다. 구체적으로, 22℃의 일반해수에서 배양한 분홍바다맨드라미(대조군), 또는 다환방향족탄화수소를 포함하는 대조군과 같은 온도의 해수에서 배양한 분홍바다맨드라미(실험군) 조직에서 mRNA를 각각 분리한 후, GeneFishing™ DEG kit(Seegene, 한국)를 사용하여 상기 정제된 mRNA로 cDNA를 합성하였다. PCR을 이용하여 발현량이 변화한 유전자 단편을 증폭하였다. 상기 증폭된 cDNA 단편을 T-벡터(vector)에 클로닝(cloning)하고, 플라스미드(plasmid)를 추출하여 염기서열 분석을 실시하였다. 그 결과, 다환방향족탄화수소 노출에 의하여 발현이 증가 또는 감소한 유전자 32개를 선별하였다. 다환방향족탄화수소와 같은 잔류성 유기독성물질은 생물에게 다양한 측면에서의 독성 반응을 유발하고 이러한 환경오염에 따라 해양 생물은 생리 및 대사의 변화를 일으킨다. 그러므로 생리 및 대사 변화의 원인인 유전자 발현량의 변화를 확인함으로써 외부 환경 변화에 따른 해양 생물의 스트레스 및 건강상태를 확인할 수 있고, 이들 유전자들은 해양 환경 및 해양 생물의 건강을 진단할 수 있는 생체지표로 이용 가능하다.

[0027] 따라서, 상기 유전자들은 다환방향족탄화수소 노출에 대응하여 유전자 발현에 변화가 나타났으므로, 연안 해역의 다환방향족탄화수소와 같은 잔류성 유기독성 물질 오염에 따른 해양 생태계의 상태 진단 및 스트레스 검출을 위한 마커 유전자로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명은 상기 유전자의 염기서열의 전부 또는 일부를 포함하는 cDNA 단편, 올리고뉴클레오티드, 상기 cDNA 단편에 상보적인 유전자 단편, 또는 상기 올리고뉴클레오티드에 상보적인 올리고뉴클레오티드 분자가 집적된 해양 생태계의 스트레스 검출 및 건강 진단용 마이크로어레이 칩을 제공한다.

[0029] 상기 마이크로어레이 칩은 분홍바다맨드라미의 유전독성 유발 수준의 다환방향족탄화수소 오염에 대응하는 해양 생태계 반응을 검출하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0030] 본 발명자들은 다환방향족탄화수소 노출에 대응하여 발현이 증가 또는 감소하는 32개의 유전자군을 규명함으로써, 상기 유전자를 이용하여 잔류성 유기독성오염물질인 다환방향족탄화수소 오염에 따른 해양 생태계의 상태를 진단할 수 있음을 알 수 있었다. 따라서, 본 발명의 잔류성 유기독성 오염물질의 노출에 대응하는 유전자는 스트레스 검출 및 건강 진단용 마이크로어레이 칩에 유용하게 사용될 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 상기 유전자를 이용한, 유전독성 유발 수준의 다환방향족탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbons) 노출에 따른 해양 생태계의 스트레스 검출 및 건강 진단 방법을 제공한다.

[0032] 구체적으로, 상기 방법은

[0033] 1) 실험군인 분홍바다맨드라미와 대조군인 분홍바다맨드라미에서 각각 RNA를 분리하는 단계;

[0034] 2) 단계 1)의 실험군 및 대조군의 RNA로부터 cDNA를 합성하면서 실험군과 대조군을 각기 다른 형광물질로 표시하는 단계;

[0035] 3) 단계 2)의 각기 다른 형광물질로 표시된 cDNA를 상기 유전자 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 그의 상보적인 올리고뉴클레오티드가 집적된 마이크로어레이 칩과 혼성화시키는 단계;

- [0036] 4) 단계 3)의 반응한 마이크로어레이 칩을 분석하는 단계; 및
- [0037] 5) 단계 4)의 분석한 데이터에서 본 발명의 유전자의 발현 정도를 대조군과 비교하여 확인하는 단계를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0038] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 실험군은 다환방향족탄화수소 노출 여부를 확인하고자 하는 해수를 처리한 분홍 바다맨드라미이고, 대조군은 다환방향족탄화수소가 포함되지 않은 해수를 처리한 분홍바다맨드라미인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0039] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 형광물질은 Cy3, Cy5, FITC(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate), RITC(rhodamine-B-isothiocyanate) 및 로다민(rhodamine)으로 이루어진 군으로부터 선택되어지는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에게 알려진 형광물질은 모두 사용 가능하다.
- [0040] 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.
- [0041] 또한, 상기 방법은
- [0042] 1) 실험군인 분홍바다맨드라미와 대조군인 분홍바다맨드라미에서 각각 RNA를 분리하는 단계;
- [0043] 2) 단계 1)의 RNA를, 본 발명의 유전자에 상보적이고 상기 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 쌍을 사용하여 실시간 RT-PCR(Real-time reverse transcript polymerase chain reaction, qRT-PCR)을 수행하는 단계; 및
- [0044] 3) 단계 2)의 유전자 산물을 대조군과 비교하여 발현 정도를 확인하는 단계를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0045] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 실험군은 다환방향족탄화수소 노출 여부를 확인하고자 하는 해수를 처리한 분홍 바다맨드라미이고, 대조군은 다환방향족탄화수소가 포함되지 않은 해수를 처리한 분홍바다맨드라미인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0046] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 프라이머 쌍은 본 발명에서 선별된 유전자와 상보적이고, 상기 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 쌍이라면 모두 사용가능하다.
- [0047] 본 발명자들은 다환방향족탄화수소 노출에 대응하여 발현이 증가 또는 감소하는 32개의 유전자군을 규명함으로써, 상기 유전자를 이용하여 다환방향족탄화수소 노출에 따른 해양 생태계의 상태를 진단할 수 있음을 알 수 있었다. 따라서, 본 발명의 다환방향족탄화수소 노출에 대응하는 유전자는 마이크로어레이칩 또는 실시간 RT-PCR을 이용한 해양 생태계의 스트레스 검출 및 건강 진단에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0048] 또한, 본 발명은 상기 마이크로어레이 칩을 포함하는 해양 생태계의 스트레스 검출 및 건강 진단용 키트를 제공한다.
- [0049] 상기 키트는 분홍바다맨드라미의 유전독성 유발 수준의 다환방향족탄화수소 노출에 대응하는 해양 생태계 반응을 검출하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0050] 상기 키트는 분홍바다맨드라미를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0051] 상기 키트는 추가적으로 형광물질을 포함할 수 있으며, 상기 형광물질은 스트렙타비딘-알칼린 포스파타제 접합 물질(streptavidin-alkaline phosphatase conjugate), 화학형광물질(chemifluorescent) 및 화학발광물질(chemiluminescent)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0052] 상기 키트는 추가적으로 반응 시약을 포함시킬 수 있으며, 상기 반응 시약은 혼성화에 사용되는 완충용액, RNA로부터 cDNA를 합성하기 위한 역전사효소, dNTPs 및 rNTP(사전 혼합형 또는 분리 공급형), 형광 염색제의 화학적 유도제와 같은 표식시약, 세척 완충용액 등으로 구성될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에게 알려진 혼성화 반응에 필요한 반응 시약은 모두 포함될 수 있다.
- [0053] 본 발명자들은 다환방향족탄화수소 노출에 대응하여 발현이 증가 또는 감소하는 32개의 유전자군을 규명함으로써, 상기 유전자를 이용하여 다환방향족탄화수소 노출에 변화에 따른 해양 생태계의 상태를 진단할 수 있음을 알 수 있었다. 따라서, 본 발명의 다환방향족탄화수소 노출에 대응하는 유전자는 마이크로어레이 칩을 포함하

는 해양 생태계의 스트레스 검출 및 건강 진단용 키트로서 유용하게 사용될 수 있다.

- [0054] 아울러, 본 발명은 상기 유전자에 상보적이고 상기 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 쌍을 포함하는 해양 생태계의 스트레스 검출 및 건강 진단용 키트를 제공한다.
- [0055] 상기 키트는 분홍바다맨드라미의 유전독성 유발 수준의 다환방향족탄화수소 노출에 대응하는 해양 생태계 반응을 검출하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0056] 상기 프라이머 쌍은 상기 유전자에 상보적이며, 상기 유전자를 증폭할 수 있으며 증폭 산물이 100 내지 300 bp 가 되도록 설계된 정방향 및 역방향 프라이머 쌍은 모두 사용 가능하다.
- [0057] 상기 키트는 분홍바다맨드라미를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0058] 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 포함할 수 있으나 이에 한정되지 않으며, 당업자에게 알려진 RT-PCR 반응에 필요한 반응 시약은 모두 포함할 수 있다.
- [0059] 본 발명자들은 다환방향족탄화수소 노출에 대응하여 발현이 증가 또는 감소하는 32개의 유전자군을 규명함으로써, 상기 유전자를 이용하여 다환방향족탄화수소 노출에 따른 해양 생태계의 상태를 진단할 수 있음을 알 수 있었다. 따라서, 본 발명의 다환방향족탄화수소 노출에 대응하는 유전자는 이에 대한 프라이머 쌍을 포함하는 해양 생태계의 스트레스 검출 및 건강 진단용 키트로서 유용하게 사용될 수 있다.
- [0060] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- [0061] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1

- [0062] **분홍바다맨드라미 배양 및 다환방향족탄화수소 노출**
- [0063] <1-1> 분홍바다맨드라미의 배양
- [0064] 서귀포 연안에서 채취된 분홍바다맨드라미(*Scleronephthya gracillimum*)를 세 종류의 필터(100, 10 및 1 μm)를 거친 자연해수에 배양하였다. 수온은 수중 히터를 이용하여 서귀포 지역의 연평균 수온인 22℃로 고정하였으며, 1주 이상 순치시켰다. 광주기는 14:10으로 조절하였다.
- [0065] <1-2> 분홍바다맨드라미의 다환방향족탄화수소 노출
- [0066] 상기 실시예 <1-1>과 같이 배양한 분홍바다맨드라미를 100 ppb의 다환방향족탄화수소 표준시료(Supelco, USA)에 노출하여 24시간 동안 배양하였고, 다환방향족탄화수소를 처리하지 않은 대조군은 22℃에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 다환방향족탄화수소의 정식명칭은 PAH Mix 525로서, 아세나프렌(acenaphthylene), 플루오렌(fluorene), 페난트렌(phenanthrene), 안트라센(anthracene), 파이렌(pyrene), 벤조(a)안트라센(Benzo(a)anthracene), 크리센(chrysene), 벤조(b)플로란센(Benzo(b)fluoranthene), 벤조(k)플로란센(Benzo(k)fluoranthene), 벤조(a)파이렌(Benzo(a)pyrene), 인데노(1,2,3-cd)파이렌(Indeno(1,2,3-cd)pyrene), 디벤조(a,h)안트라센(Dibenzo(a,h)anthracene), 벤소(ghi)페틸렌(Benxo(ghi)perylene)과 같은 대표적인 다환방향족탄화수소 13종이 각각 500 μg/ml의 농도로 혼합된 것이었다.

실시예 2

- [0067] **다환방향족탄화수소 노출에 의한 분홍바다맨드라미의 유전자 변화 확인**
- [0068] <2-1> RNA의 분리

[0069] 상기 실시예 <1-2>에서 수득한 다환방향족탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbons)에 노출한 실험군 또는 노출하지 않은 대조군의 분홍바다맨드라미 조직을 막자사발에서 액체질소를 이용하여 분말로 만들고, 용해(lysis) 용액[35 mM EDTA, 0.7 M LiCl, 7% SDS, 200 mM Tris-Cl(pH 9.0)] 700 μ l를 첨가하여 균질화하였다. 동량의 페놀 용액을 첨가하고 잘 섞은 후, 10분간 원심분리하여, 상층액을 취해 새 튜브로 옮기고 총 용량의 1/3의 8 M 염화리튬(LiCl)을 첨가하였다. 이를 잘 섞은 후에 4°C에서 2시간 이상 방치하였다. 방치 후, 약 30분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 침전물을 취하여 300 μ l의 침전수에 녹였다. 1/10 용량의 3 M 아세트산 나트륨(pH 5.2)과 동량의 이소프로판올(isopropanol)을 첨가하고 약 30분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 침전물을 취하였다. 상기 침전물에 70% 에탄올 용액 50 μ l를 넣어 5분간 원심분리한 뒤, 에탄올 용액을 제거하고 침전된 RNA를 건조시켰다. 건조 후, 상기 RNA를 적당량의 DEPC-처리수에 용해하였다.

[0070] <2-2> cDNA의 합성

[0071] 다환방향족탄화수소 노출에 대응하는 특이적인 유전자의 분리에 GeneFishing™ DEG kits(Seegene, 한국)를 사용하였다. 상기 실시예 <2-1>에서 추출된 총 mRNA(3.0 μ g)를 주형으로 사용하였고 dT-ACP1을 프라이머로, MMLV RT-ase를 반응효소로 사용하여 상기 실험군 및 대조군의 cDNA를 합성하였다.

[0072] <2-3> 특이 유전자 단편의 분리 및 염기서열 분석

[0073] 합성된 첫째 가닥(first strand) cDNA를 주형으로 dT-ACP2 및 arbitrary ACPs(120종)를 프라이머로 사용하여 증합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 실시하였다. 상기 PCR 조건은 94°C에서 1분; 50°C에서 3분; 72°C에서 1분을 실시하고, 94°C에서 40초; 65°C에서 40초; 72°C에서 40초를 40회 실시한 후, 72°C에서 5분간 실시하였다. PCR 산물은 2% 아가로스 젤을 이용하여 분리하였고, 이를 통해 확인된 특이적으로 증폭된 PCR 산물은 정제 후, T-벡터 시스템을 이용하여 클로닝(cloning) 하였고, 플라스미드(plasmid)를 추출하여 염기서열을 분석하였다.

[0074] 그 결과, 도 1에서 보는 바와 같이, 대조군에 비해 다환방향족탄화수소 노출에 의하여 발현이 증가 또는 감소하는 유전자 32개를 확인하였으며, 이중, 18개의 유전자는 발현이 증가하였고 14개의 유전자는 발현이 감소되었다. 또한, 유전자 염기서열의 분석을 통해 서열번호 1 내지 32로 기재되는 각각의 핵산 서열을 확인하였다.

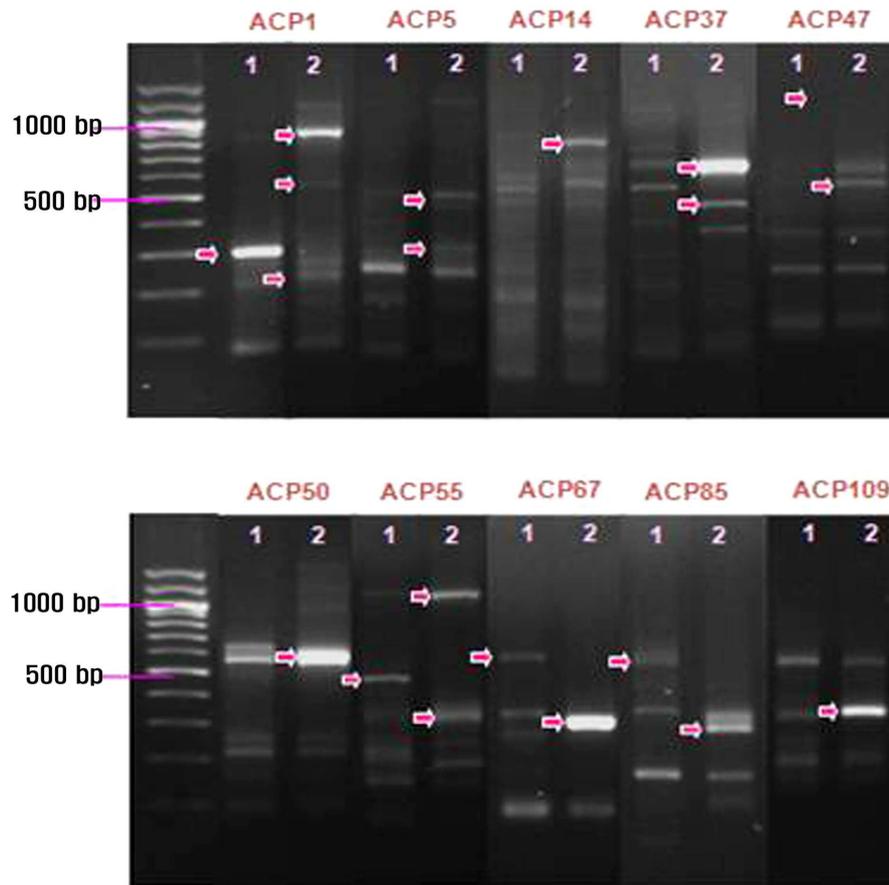
[0075]

산업상 이용가능성

[0076] 상기와 같이, 본 발명의 다환방향족탄화수소 노출에 대응하는 분홍바다맨드라미의 유전자는 다환방향족탄화수소 노출에 특이적인 유전자로써 잔류성 유기독성물질의 오염 정도 및 이에 따른 해양 생태계 상태를 모니터링하고 진단하기 위한 바이오센서로서 유용하게 사용될 수 있고, 해양 생태계의 스트레스 검출 및 건강 진단 방법에 효과적으로 이용될 수 있다.

도면

도면1



- * 1 : 대조군, 22°C 여과해수에 24시간 배양한 분홍바다맨드라미
- * 2 : 실험군, 다환방향족탄화수소(PAHs)에 24시간 노출된 분홍바다맨드라미
- * ACP : 적용한 프라이머의 종류
- * 특이적으로 나타나는 유전자 단편을 화살표로 표시함

서열 목록

- <110> Korea Ocean Research and Development Institute
- <120> Polycyclic aromatic hydrocarbons exposure responsive genes in Scleronephthya gracillimum and the method for diagnosing the coastal environment pollution using the same
- <130> 10p-01-44
- <160> 32
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 433
- <212> DNA

<213> Scleronephthya gracillimum
 <400> 1
 aattacgtca tgtgatgaca aatcttgggtg aaaaattgac agatgaagag gttgatgaga 60
 tgatcagaga agctgatatt gatggagatg gacaagttaa ctatgaagaa tttgtgaaaa 120

 tgatgacttc caagtagatg tttcaatttt acgacaagtt ctggttatga catggccacg 180
 aataatttct gatggctgac ttagctcctg cctcccatat taaataactt ttatttact 240
 tttcatttaa ttgtattttt atttaatgta agcactaggt taggaataag aatactatc 300
 aagcaatcta ttagttgaat atttatacgt aagtagatat tgttgcattg tgatatagat 360
 gtaaattata cttaatgtaa tttcctgtct tagtttccaa ccacaatgta attaaatacc 420
 cattttatta aaa 433

<210> 2
 <211> 500
 <212> DNA

<213> Scleronephthya gracillimum
 <400> 2
 gcacgaatta taaacctgtc aggggaattgg ttaacgatga ccaactggctg cacggagagt 60
 tcattacgac agtccaaaag cgtggcgcgg cagtcattgc cgctcgtaa ctctccagcg 120
 ctatgtctgc tgcaaacgcg atctgtgatc acatgagaaa ctggigggtt ggaacatctg 180
 aggtcgcttg ggtatccatg ggagtatatt ctgatggttc gttgtatgac ataccggagg 240
 gaatcattta ttccatgccc gtaacaattg atggcaatcg tgattataaa gttgtttccg 300
 acttgagcat tgacgatttc tctcgcgaga aaatggattt gaccgctcaa gaactcgtcg 360

 aagagaaaga agccgcattc gcttttctgt ctgcatgact agacggtgaa cattgtaaac 420
 tgtagaacag cggttgatag attgtaatag ggcttaatag aagaattgta tacaagagtt 480
 cgataataca ttctgattaa 500

<210> 3
 <211> 322
 <212> DNA

<213> Scleronephthya gracillimum
 <400> 3
 catgcgaagg gaatcgtact cgagaaagta ggtgtcgagg ccaaacagcc taactcggcc 60
 atccgtaagt gtgtcagggt ccagctcatc aagaacggaa agaaaatcac cgccttcgtg 120

ccccgtgatg gttgcctcaa ctacattgaa gagaacgacg aggtgttggg agccgggttc 180

ggtaggaagg gtcacgccgt gggagatac cccggagtac gattcaagat cgtcaaggtc 240

gccaacgtct cctactcgc cctgtacaag gagaagaagg agaggcctcg atcataaaca 300

ttctctacag ttatatacaa ta 322

<210> 4

<211> 549

<212> DNA

<213> Scleronephthya gracillimum

<400> 4

ggcggacatc gtaacaatt agccccaatc tgggacaaac tagctgaaaa atacaagat 60

gatgaaagtc ttgttattgc caagatggac gcaaccaaaa atgaaattga agaagttcgt 120

gttgatagct tccaacact caaatgggtc ccaaaagact ctgatgagat tgttgattac 180

actggtggac gaacactgga cgatctggta aaattcattg attctggtgg taaagatatg 240

cctgcagaag aacctgtcc tggagaagc gaggaggatg ctggggctga ggcagaggaa 300

ggagaggagg aggctgggta ggaagcagtc gaggaagaag atgttaaacc caaggacgaa 360

ctataaagga caacacaata atatgtgtac ggttgcctc cacaatttgg cgaacatgca 420

acatggacga ctgttttgg tcgcatgaat attatacgt tttcctttat aaattatfff 480

agatttaata ttctcttagg taagatatgt tttgatgcag ttgttgtgtg caataaagga 540

ctttttcag 549

<210> 5

<211> 355

<212> DNA

<213> Scleronephthya gracillimum

<400> 5

tggggaata gtcacaacag tctggttttc gtgtcaggaa acgatgtata ttggatagaa 60

tcggtagaac gaccaacgc cattcgtatt acgaagactg ggaaaaaag aatcatgttt 120

aatggcattc ctgattgggt ttacgaagag gaaatccttg gtaaaagacc tgcgcttgtt 180

gtttcccag acgacaaata tttgtgtttt gcgagtttta acgacacaga cgtgcgactt 240

ttcaaaatag cctactatgg taaacctata acagcgtaca cccgattca agatatcgt 300

tatccaaaac ctggaacgaa aaatctgat gtacatattt atatttacga tatca 355

<210> 6

<211> 337
 <212> DNA
 <213> Scleronephthya gracillimum
 <400> 6
 tgcagaagat tttgttgta gcggcacctg tactgagcag atgtatggta tgtgcgagtc 60
 gctatggcaa cctgatttgg cgccggacga tttgttcgag accatctcac aagcactcat 120
 gaacgcagtc gaccgtgatg ctgtcagtgg ttgggtgct gtggttcata ttgtcgaaaa 180
 agataagatc acgactcgcc atttaaagac aagaatggac tagtactaat atgcaaaaaa 240
 gtgataaaca atgttctgaa gtacttctgt aaaattctat gaacacatag tgaactctta 300
 ctaataaatg ttaaaaatcg ttttcaatgt aaaaaa 337

<210> 7
 <211> 547
 <212> DNA
 <213> Scleronephthya gracillimum
 <400> 7
 ggagccctac caacaatctc agcaatccta ttaagcctta taccattaaa tatattagga 60
 ctattacctt atacaatttc aataacatcc cacttaatga caactctatc attagggcta 120
 ccaatctgag gctcaataat tctcatctca ttagcaatta gcaggaaaac cactagggcg 180
 catttactcc ccccaaacac cccctcattt atggccaggt tcctgttact tgtagaagcc 240
 ctaagatctt taattcgccc cctgaccctc tctttccggt tagcagctaa catcagagct 300
 ggacacgtaa tcctaggaat aatatcatct ggtgccactt atctcatata tacacacca 360
 acagctgcta ttctaccaat aatagtaaga agcttttatt ttgtattcga gatcgcaatt 420
 tgcgcagtac aagcatttgt atttgttctt cttattgcta tgtactctaa tgattacatt 480
 agataacaca ataagcttaa attttaataa ttattccaaa ttacatactc caattatata 540
 accttat 547

<210> 8
 <211> 135
 <212> DNA
 <213> Scleronephthya gracillimum
 <400> 8
 ggccagagtg gtcgatgtga tggttatatac ttggaaggca aagaacttga gttctacgtc 60
 aagaaaatta gggcaaagaa gagcaaatag attgtaaaaa tgctgttcaa aacaaaataa 120

acaatttgaa aacaa 135

<210> 9

<211> 255

<212> DNA

<213> Scleronephthya gracillimum

<400> 9

gcgacgacgc taccgcaaga tgtgacacca gagaattggt atcgctgtta tccggaggaa 60

tgtgaggaag tatttgttct tgaagaactg ggcttggtgg aaactttata ccaagtgaa 120

accattgttg aacgtcgcgc gaactgaaga agaatgaaa cagaaagaag aggagtggc 180

aaaacttaaa gatgatttag caaaggagaa agaactgaga caatcacttg agaatgagaa 240

gacggaattg attca 255

<210> 10

<211> 394

<212> DNA

<213> Scleronephthya gracillimum

<400> 10

ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc 60

gcccaatacg caaacgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcacg 120

acaggtttcc cgactgaaa gcgggcagtg agcgaacgc aattaatgtg agttagctca 180

ctcattagge accccaggct ttacacttta tgettccggc tcgtatgttg tgtggaattg 240

tgagcggata acaatttcac acagaaaca gctatgacca tgattacgcc aagctattta 300

ggtgacacta tagaatactc aagctatgca tccaacgcgt tgggagctct cccataggt 360

cgacctgcag gcggccgca attcactagt gatt 394

<210> 11

<211> 211

<212> DNA

<213> Scleronephthya gracillimum

<400> 11

gactggtttt atagagtga gtatcaacaa agagattcgc ctcatattca tatgttaata 60

tggtagaaga tgctccagtt tttggtgtta ataatgacat acaagtgaca gcatttattg 120

ataaaataat tagctgtaaa aaaccatggg ataatcctca gttacttaaa cttgttaaca 180

ggcaagtgca tcgccattcc ctcaattgct a 211

<210> 12

<211> 398

<212> DNA

<213> *Scleronephthya gracillimum*

<400> 12

cgggttacaa aaacgacgga tgtacttgta gaagacacgc tcactttatc gggcgtccgt 60

cgtaaacag aggtatcggc gtttcgatgg tgcatacgg tcgaggagtc ggtctggtac 120

catcttgaaa ctgacattat agagatctat aatgctgca gccaaaatgg cagattttgt 180

taaacagtct gacgttacta tataaacttt aattgagtac gtaccacttg ttttggtaat 240

aacaatatat taataattat agaatgcaat atttccata aaattgtatc caaaactaat 300

ttctagattt gattgtattt tattgatac gtattttatt tttggtgatg agtttaaaaa 360

ccataacggtt ttgctcaata tagtaatcct caatggca 398

<210> 13

<211> 252

<212> DNA

<213> *Scleronephthya gracillimum*

<400> 13

agatttgcac gacgtaatcg tgcagggcaat ttccgaccta gatattatta acaaagtta 60

aatcatacct acacatttgg atgctaaata taaaattggt atttgatcga agcccaattc 120

atttccatcc agtcagattt cgctattcat ctaatgctga catcactgca gataatattg 180

gttgattag taacagattg attatattgt aaagcacctg tcaagttaca attgcttcca 240

agttttcata aa 252

<210> 14

<211> 529

<212> DNA

<213> *Scleronephthya gracillimum*

<400> 14

gaaagcacgg tcattgcata tgacagacaa acaccaaga acaacttgtt tctatacacc 60

tttggccagc caagagtcgg tgattaccaa tacgccttac aacatgatag actggtaccc 120

ataagcttta gggttacca ctatcgagat cccgtggttc acctgcccac ctgcaaaact 180

ctcttgctg gaacacctg tatgcatac accgggggac cctaccacca tggcaaggag 240

atttactatg gcaacacctg gatgacgaaa acatcgtctt atagaaagtg tcagggattg 300

ccacacaacg aagacctgaa atgcagtaac aaccctaagg tatgggtaaa gtgcttcacc 360

aacataaaga gctgtatcaa tgatcatcgg cagtatTTTg gagttcgtgt tggagctcgg 420

tggcgaggtt agagacacga agaagctaag aacaccaat atccttatat aaagagtgga 480

attagacatt taatctgcat gctTTTTctt gtgcaacgtt atagaacta 529

<210> 15

<211> 315

<212> DNA

<213> *Scleronephthya gracillimum*

<400> 15

acaaccatc aaaagaggTg tccttaccgt agttcattat acccgacata gccgcttggA 60

taatttatgt gatgaagttt tcaactatat acgagatcga taccaagaag gcgaagaagt 120

tgatgtaaaa tataaaggag agaagttggt tggctttatc cacaatgtta ttgaacctga 180

aattctaaca aatgggtttg actccccaa atcaaagaat aaactgaatt caccatctgg 240

taaactctgga aaatctcaag aagttattgt ctgggcaat gagaaaaatg aaagaacaga 300

agtacagagc cAAA 315

<210> 16

<211> 462

<212> DNA

<213> *Scleronephthya gracillimum*

<400> 16

gtggtcattc tcttggctgg aagacaccag ggcaaaagag ttatcttctt gaacaattg 60

cctggTggtt tgetccttgt cactggcccg tacaaaatca acggtgtacc cctccgtcgt 120

gtccccagt cctacgtgat tgccacacag accaagattg acatcagtgg tgtagacctt 180

ccagaacgtc tcgatgacga ttacttcaaa cgagagaaac ggcaaagaaa acgaactgag 240

gaaatgtttg aggaagagaa agaggaggTc actgttagtg atgaaaggaa ggaagatcaa 300

aaagccgtcg atgaacaact tgctcctttg atatcaaatg aagcacattt gaagaattac 360

ctcaagactt tgttcagttt gagaaaggga caatatcctc atgaaatgat cttctaatt 420

tgtacaagat taagctacta ataaaatcitt gccaacata aa 462

<210> 17

<211> 575

<212> DNA

<213> *Scleronephthya gracillimum*

<400> 17

gatgatgtct ggaagactg acgtgaaaac tacatgcctt tgtccgtaca tggcctcaaac 60

cccattgatt gggaagactt ctgcaagget tccgtcaatg tteccactgt tggagcccga 120

ctttgtggca aaagaattgg tggacggcat gctacggaac aagaacatgg tcatcctgcc 180

aaaaataatg accttgcatt tggcgttacc aatgttcatg ccagaaaacg gattgagaat 240

gctataccag tttatcgca taacagttga ggaggaaaac gcaacaacca tgtttcaacg 300

gcgagaacaa gctgctgcag tcgaggaaaa gaagtcggaa taagaatgca caaaattacg 360

tggcttaaac aaggaataga agaattgtca aaagcgaact ttgaaatgaa ttagttgtta 420

attgcttagg gagaaattga aactttagca tgcaaatatc tttagtacc gtccttagga 480

ggaacttgaa acittattct ttttaatgac aatatttta gctatcatgt attgtgtgta 540

tttattcttt tatggaatat attttaaat ttgaa 575

<210> 18

<211> 588

<212> DNA

<213> *Scleronephthya gracillimum*

<400> 18

gttggccgca gtaggtttgg ggtctggggc cttatctcgc tacagagtgt gtggcacgaa 60

gacggtgtat ttgtatccac agtgttggcc cactaatctg catcaggtag gggtacgggt 120

ttgttacaat acctatcgaa tctgcggccg taaacgatcg attggcagcc aaaacgacat 180

cgaagtgggt tttccctgca attttacgat atatgacacc gacaaagatg gatatatcac 240

cctaaaagag ttcaaggctg ccacaagatt agaggagaat gcggaggcca ttttcaaggg 300

tgcagacaag aacgacgacg gtcgaatcga ttgtgacgag ttcaagaaag caaaatggga 360

gtttgaatgc aaacctatcg gtggatgcaa cgacgaaacc caagatgagt cttggaattt 420

cgagtaatta acattcagca tttctgatta tatttcatat cgactaggac tataaccactc 480

ttaaatgata agtaacgtaa tttacttctt tttgtcatcg tttgcacatt atcgagcatt 540

ctcttgttgt aataagtaat gttctaataa aagatgcaca gacataaa 588

<210> 19

<211> 386

<212> DNA

<213> *Scleronephthya gracillimum*

<400> 19

gaatttgaga agtatgacac caacggcgat ggtaaaatca gcgaagaaga gtttaagaag 60
 accctgtctc tgcagataa ggatgcggcc gaccttttca aaagcttaga taaagatggt 120
 aatggcgtcg attgcaatga gttgacaaaa agcaacttgg agttcagatg taaaacaag 180
 gcatgcctg ataacaagaa tggaaaatcc caagatgagt ttttgaaga tgagtgaaat 240
 gaacagccct tcctttgitt caaccgtacc tcatttgaca tctaacgatt agtaatgcat 300
 gcaatttagg attaacTTTT tgtcataatc ataatgaact acagtagcta ctittaact 360

tttcaataaa tccttcttaa ggcaaa 386

<210> 20

<211> 334

<212> DNA

<213> Scleronephthya gracillimum

<400> 20

cgtttgcacg ttctaaaggc tcgcgacaaa cctgggttgg cgtttttagg cgatatgaca 60
 aacgttttat caacgtttaa gggagagacc aaacctacac caactggaac cgaggagaac 120
 caaacaacag cggcggtaac gagaactgtg ttgtcatgta taccaacct gctagatgga 180
 atgacgcaag ttgtactact cgccatgatt tcgtctgtga aatcaaactt tgattgtgtg 240
 cataaatcag ctaagtgagc tttttgtggc ctatacgtct gggcctacaa cgtatgttag 300

ctatttgcag taataataaa atcgtgattt aatc 334

<210> 21

<211> 465

<212> DNA

<213> Scleronephthya gracillimum

<400> 21

aagaggaaga agacgacact ggagatgaag aaaaagaatt gcaaccagta aagcaggatg 60
 aagaatccaa tgacgaggaa aaggaacctg agattgacgc aaaagacata tccgaggatg 120
 aaagtgacga gtctgatgag aaagatgaat tgctgaaaga aatggacaag gttggtgacg 180
 aaaccgaacc aaaagcggag accgaaccaa aagcggagac tgcagaaaat gacgaggagg 240
 aacgagaaga gaatgttctt gagccaatgg tagagaaaga tgaagaggaa actgatcctg 300

atgtacagga tcitttcgat gaaaagtaaa ttcagaattg gagctttcta aagaacagca 360

cccaatattt acttcgcgtt aaaatataga atgtagaat catgtagaac gttgtgtact 420

ttttagttta ctttggttat aatgtaattg tgctcacttt ttgta 465

<210> 22

<211> 339
 <212> DNA
 <213> *Scleronephthya gracillimum*
 <400> 22
 ttaccagcca gggtagtgtc cagagcctca acataaagaa tattcaaatt gatgacgagg 60
 gaatatatga atgtgtggct actaatgtcg caggaacggc taaatgtgac tgcgaggttc 120
 tagttaatga ttgaaaaacc agagcttgaa acaatggcat gatcgttaag ctgttaaata 180

 cttctattta atggcatgg atagaacagt taagctaaag cctgagaatt aggatatgac 240
 tattgacaat tttcttataa atttcttaac catagcaagt cacgcacaga tacaatttag 300
 catctgtata tctaggcaat taaaacactc tcacactta 339
 <210> 23
 <211> 232
 <212> DNA
 <213> *Scleronephthya gracillimum*
 <400> 23
 ggtccgcaag atagtagaag gtaaaacaga aggatgcaag aaggtagct gcaagtctcc 60
 cgacttctgc ctaaaactga aaccttcagc tggagatgct ggacaatatg tagctgtcgt 120
 tgaattggag ggcaaaagag tagtatcaga tccagttacc cttacagtgg tataaacaaa 180

 actgatgatg ccgtttaag cattttctga cttagtgcac tgtttcattt aa 232
 <210> 24
 <211> 382
 <212> DNA
 <213> *Scleronephthya gracillimum*
 <400> 24
 ggccggccgc ggaattcgat tgtctaccag gcattcgtt tgggggtgcc caagcgatgg 60
 tgtacattgc ctcttgaat gcgtcaagaa gcatggcccg ggaaccacca cggttataac 120
 aaagcccgtt ggtgatggcg actatgaagg agaaattggt ggagaggaaa ttgaaaaggt 180
 tcctaaaaag ttgatttgtg aaagcttaga tcaactccca agcggcaaga cgtgcataag 240
 aagattgtgc gtcccgtga acccttaaac caaacgcat gacaagaaaa ctgctgtcca 300

 aaattaattg ttagctttag tttggtgagg tttcatgcag tgattttatt atttcattat 360
 attaaagtac ataagtaaca ct 382
 <210> 25

<211> 413
 <212> DNA
 <213> *Scleronephthya gracillimum*
 <400> 25
 agtattgacg tcatcgaata cgtcatcagc tatgtcatca gatacgtcat caactacgtc 60
 atcagatacg tcaccaacaa ctttacaacc tggaacaacg gaagaaatca tgaaaaggac 120
 attgaagccg aaatcttcaa caacaacaac atcaaaaatt tcctctgaat ccaatgtttt 180
 accaacgttc cagcaaacaa catcaaatga aaatctaccg tttagaccag attgttctga 240

 caagagcgac agatgccctg agtttgccca aatagacggt tactgtaatt atcagcaaga 300
 attcatggaa agaaactgtc ctaaactatg tggtttctgc tcgtagatg ttgcaggagg 360
 tccaacttca aaagcgataa agccagacac accaacatct ttacctacta caa 413

 <210> 26
 <211> 306
 <212> DNA
 <213> *Scleronephthya gracillimum*
 <400> 26
 attcagtttt tctgctggt attggctcac acaaaatgat ttctaacaat atatccagtc 60
 aaatattgaa caaagatagt ctatgccct ctgtgaaatc gcttgttcat agcatttggc 120
 ccgacgcgat tggcgagcta agttcgttac ttagcgaacc ggttgaacgg ctgaaactgg 180

 aaaacattgc taaagctgaa ggaatattac aagctattcg cgaaattttg gacaaaaacg 240
 agccttctga tgaaaacttg aggaaatatt ccgaggaatt ttactctctc gttccacaca 300
 acgaaa 306

 <210> 27
 <211> 559
 <212> DNA
 <213> *Scleronephthya gracillimum*
 <400> 27
 tactgatcta aagacggtga atggtttacc ctgcaaaaat ggacagggat attgttataa 60
 aggggaatgt acaacgtata atgagcaatg taactatttg tggtttggcg gtggttttaa 120
 agcgaatgat gtttgttacc aaaggtataa tctacgtggc gatattcatg gttactgcaa 180

 aagatattca gcaacaagtt acaaggcttg tacaccagaa aatgttaaat gtggcaaatt 240
 atggtgtggt ggtaacggcc acttagaagc aaaaaatfff ggctttgta ttaaatggag 300

tcgtggact ataatggtc acacttgtcg ctctgctgtg atcaacatga atccaggtaa 360
accggcattg ggcactgtct tagatgggac aaaatgtggg agcggcaagg ttgtcaaga 420
caataagtgt gtgtcacttt cagcggctta tgggtggcag ccaaaatgca caataactg 480
taacggacat ggggtctgta atgagaaggg caactgccat tgtaatccag gatggaaatg 540
tcctgattgt tccaaatcg 559

<210> 28
<211> 398
<212> DNA
<213> Scleronephthya gracillimum
<400> 28

gccgggtcta cctggtatcc gtggataaaa aggattcccc ggaatccctg gttgtaaagg 60
tcaaccgggt gagcctgcta cagccaatgg cgcggttggg ttagatggac caccagggcc 120
cgaagtgat cgaggaccaa aaggtccaaa gggatgccc gtatctggtc ctacgccga 180
tcaaaaaggt agcaaggat cactgggtga tacaggagcc aaaggaatag agggaccaag 240
aggcagagct ggtccaaaag gtgatgtggg aaaaaagggt atcgatggtg agcagggtct 300
tgaagtgaa caagtgata ggggtaaac gggagattca cccaacagg tagatgaagt 360

tacagatcat ctgaaaggaa tgcggggaga ggaaggtg 398

<210> 29
<211> 518
<212> DNA
<213> Scleronephthya gracillimum
<400> 29

tgaggcgttg ttcgcccttc aggaaatcta tttgaaatat aataaaccca aagctatgct 60
gtcgaagttt tttgatacgc tgtatgatga agaagtcata acagaggagg cgtttatgaa 120
ttggaacaa gacgagaacc ccagcagaca agaagccaaa ggtcctgcac ttcagccgac 180
gtcttcgttt tttgattggc tccaatctgc tgcgtggac ggcgagaaat aactaatgc 240
gaaaagttaa atggctataa tttgaatgcg aacgcgaaga atgactgttg cagaggcat 300

gaattgtaat ccggaagaga aattagcaaa caagcctagt tagagtagaa atttgtttgc 360
tcaaactgta gaacatgta tacctgtcgc ctccaggac aaacttttc aaagtctta 420
tttatagaat ttatgttggc caagaatcta tcttatttcc tttttgggaa atggagatat 480
aaagtatact gtgaaaataa taaataattg attattgc 518

<210> 30

ctacatttg agataaagga atattacaa gaaataatca acaaacaccg tcaatctacg	180
gacggaattc gtgaagaatt atagataggt catagttaca gtatgtctat ctaagctagt	240
ggaatctaat tcctatctca tgccatttaa atgcttaaga tttgaatcaa tttccaatct	300
cacgcaaaaa	310