



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0015090
(43) 공개일자 2010년02월12일

(51) Int. Cl.

C12N 15/10 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0075999

(22) 출원일자 2008년08월04일

심사청구일자 2008년08월04일

(71) 출원인

한국해양연구원

경기 안산시 상록구 사동 1270번지

(72) 발명자

염승식

경남 거제시 신현읍 양정리 고려4차아파트
504-1303

우선욱

경남 거제시 신현읍 양정리 고려4차아파트
504-1303

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 벤조플로란센 노출 여부 확인용 바이오마커 및 이를 이용한 확인 방법

(57) 요약

본 발명은 벤조플로란센(benzo[k]fluoranthene)의 노출 여부 확인용 바이오마커(biomarker) 및 이를 이용한 확인 방법에 관한 것으로, 구체적으로 다환방향족탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH) 중의 하나인 벤조플로란센에 특이적으로 유전자 발현이 증가하는 바이오마커 및 이를 이용한 벤조플로란센에 대한 노출 여부를 확인하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 바이오마커는 바다송사리(*Oryzias javanicus*) 서브트랙티브 cDNA 라이브러리(subtractive cDNA library)를 통하여 선별된 반응 유전자들을 바이오마커로 이용하여 환경 시료에서 벤조플로란센의 오염을 모니터링 및 판정하는데 유용하게 사용될 수 있으며, 벤조플로란센에 의해 유발되는 독성 및 발암 작용 기작을 규명하는 도구로 이용될 수 있다.

(72) 발명자

이택견

경기 안성시 석정동 우남퍼스트빌 107-301

박홍석

대전시 유성구 반석동 반석마을5단지아파트
502-201

류재천

서울시 종로구 무악동 60 인왕산 I-Park 107-203

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 091-071-064

부처명 환경부

연구사업명 차세대핵심환경기술개발사업

연구과제명 자바송사리의 독성유전체를 활용한 수계환경 위해성 평가

주관기관 한국해양연구원

연구기간 2008년 4월 01일-2009년 03년 31일

특허청구의 범위

청구항 1

하기의 군으로부터 선택되는 유전자를 포함하는 벤조플로란센(benzo[k]fluoranthene)의 노출 여부 확인용 바이오마커:

서열번호 1로 기재되는 유전자(14 kDa apolipoprotein-like mRNA), 서열번호 2로 기재되는 유전자(adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit), 서열번호 3으로 기재되는 유전자(aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1), 서열번호 4로 기재되는 유전자(annexin A2a), 서열번호 5로 기재되는 유전자(apolipoprotein A1 precursor mRNA), 서열번호 6으로 기재되는 유전자(b2-microglobulin), 서열번호 7로 기재되는 유전자(C1q-like adipose specific protein), 서열번호 8로 기재되는 유전자(chaperonin containing TCP1, subunit 2), 서열번호 9로 기재되는 유전자(Complement component C3-1), 서열번호 10으로 기재되는 유전자(Complement component C3-2), 서열번호 11로 기재되는 유전자(complement factor bfc2), 서열번호 12로 기재되는 유전자(cytochrome c oxidase subunit 1), 서열번호 13으로 기재되는 유전자(cytochrome P450 2P3), 서열번호 14로 기재되는 유전자(fibrinogen beta chain precursor), 서열번호 15로 기재되는 유전자(fructose-bisphosphate aldolase B), 서열번호 16으로 기재되는 유전자(heat shock protein 60), 서열번호 17로 기재되는 유전자(liver-basic fatty acid binding protein), 서열번호 18로 기재되는 유전자(peroxiredoxin 4), 서열번호 19로 기재되는 유전자(pre-B-cell leukemia homeobox 3a), 서열번호 20으로 기재되는 유전자(receptor for activated protein kinase C), 서열번호 21로 기재되는 유전자(superoxide dismutase 3), 서열번호 22로 기재되는 유전자(transferrin).

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 바이오마커 유전자는 바다송사리(또는 자바송사리, *Oryzias javanicus*)로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 바이오마커.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 바이오마커 유전자는 벤조플로란센의 노출에 의해 발현이 증가하는 것을 특징으로 하는 바이오마커.

청구항 4

제 1항의 바이오마커 유전자 염기서열의 전부 또는 일부를 포함하는 cDNA 단편 또는 올리고뉴클레오티드, 상기 cDNA 단편에 상보적인 유전자 단편, 또는 상기 올리고뉴클레오티드에 상보적인 올리고뉴클레오티드 분자가 집적된 벤조플로란센의 노출 여부 확인용 마이크로어레이.

청구항 5

- 1) 실험군으로서 피검 물질에 노출시킨 바다송사리와 대조군으로서 노출시키지 않은 바다송사리를 준비하는 단계;
- 2) 단계 1)의 각 실험군 및 대조군의 바다송사리 유래 간세포에서 RNA를 분리하는 단계;
- 3) 단계 2)의 실험군 및 대조군의 RNA로부터 cDNA로 합성하면서 실험군과 대조군을 각기 다른 형광물질로 표지하는 단계;
- 4) 단계 3)의 각기 다른 형광물질로 표지된 cDNA를 제 4항의 마이크로어레이와 혼성화시키는 단계;
- 5) 단계 4)의 반응한 마이크로어레이를 분석하는 단계; 및
- 6) 단계 5)의 분석한 데이터에서 실험군의 바이오마커의 발현 정도를 대조군과 비교하여 확인하는 단계를 포함하는 피검 물질에 대한 벤조플로란센의 노출 여부 확인방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 단계 2)의 간세포는 간, 또는 간의 세포 및 조직에서 유래한 세포인 것을 특징으로 하는 벤조플로란센의 노출 여부 확인 방법.

청구항 7

상기 방법에 있어서, 단계 3)의 형광물질은 Cy3, Cy5, FITC(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate), RITC(rhodamine-B-isothiocyanate) 및 로다민(rhodamine)으로 이루어진 군으로부터 선택되어지는 것을 특징으로 하는 벤조플로란센의 노출 여부 확인 방법.

청구항 8

- 1) 실험군으로서 피검 물질에 노출시킨 바다송사리와 대조군으로서 노출시키지 않은 바다송사리를 준비하는 단계;
- 2) 단계 1)의 각 실험군 및 대조군의 바다송사리 유래 간세포에서 RNA를 분리하는 단계;
- 3) 단계 2)의 RNA를, 제 1항의 바이오마커 유전자에 상보적이고 바이오마커 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머를 사용하여 실시간 RT-PCR(Real-time reverse transcript polymerase chain reaction)을 수행하는 단계; 및
- 4) 단계 3)의 유전자 산물을 대조군과 비교하여 발현 정도를 확인하는 단계를 포함하는 피검 물질에 대한 벤조플로란센의 노출 여부 확인 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 단계 2)의 간세포는 간, 또는 간의 세포 및 조직에서 유래한 세포인 것을 특징으로 하는 벤조플로란센의 노출 여부 확인 방법.

청구항 10

제 4항의 마이크로어레이를 포함하는 것을 특징으로 하는 벤조플로란센의 노출 여부 확인용 키트.

청구항 11

제 10항에 있어서, 바다송사리 또는 바다송사리 유래 간세포를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 벤조플로란센의 노출 여부 확인용 키트.

청구항 12

제 10항에 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 벤조플로란센의 노출 여부 확인용 키트.

청구항 13

제 10항에 있어서, 혼성화에 사용되는 완충용액, RNA로부터 cDNA를 합성하기 위한 역전사효소, dNTPs 및 rNTP(사전 혼합형 또는 분리 공급형), 형광 염색제의 화학적 유도제와 같은 표식시약, 및 세척 완충용액으로 이루어진 반응시약군으로부터 선택되는 어느 하나를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 벤조플로란센의 노출 여부 확인용 키트.

청구항 14

제 1항의 바이오마커를 증폭할 수 있는 프라이머쌍을 포함하는 벤조플로란센의 노출 여부 확인용 키트.

청구항 15

제 14항에 있어서, 바다송사리 또는 바다송사리 유래 간세포를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 벤조플로란센의 노출 여부 확인용 키트.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 다환방향족탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH) 중의 하나인 벤조플로란센(benzo[k]fluoranthene)에 대한 노출 여부 확인용 바이오마커 및 이를 이용한 확인 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 다환방향족탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH)는 화석연료의 연소 또는 산업활동에 의하여 생성되는 오염물질로서, 많은 양의 다환방향족탄화수소가 공업화된 지역의 담수 및 해양 침전물에서 전세계적으로 검출되고 있다. 다환방향족탄화수소는 부유물질에 흡착하고 수계 바닥으로 침전되어 저질토에 축적되며, 고농도의 다환방향족탄화수소는 저서생물의 돌연변이를 유발하거나 사멸시키는 등의 효과를 나타낸다(Varanasi et al, *Environ. Health Perspect.*, 90, 93-100, 1991).

[0003] 벤조플로란센(benzo[k]fluoranthene)은 다환방향족탄화수소의 일종으로 화석연료에 포함되어 있고, 불완전연소에 의해 발생되며, 폐기물 처리지역의 토양, 지하수 및 지표수에서 발견된다. 위장, 폐 또는 피부로 흡수 가능할 것으로 예측되며, 동물실험을 통해 노출시켰을 경우, 피부암, 폐암 또는 간암 등이 유도되는 것으로 확인되었다(<http://www.epa.gov/iris/subst/0452.htm>).

[0004] 바다송사리(또는 자바송사리, 학명: *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 환경위해성평가에 적용 가능할 것으로 예상된다. 현재까지 17β-에스트라디올(estradiol)(E2) 노출에 대한 생식력 변화와 수컷 간 조직에서의 비텔로제닌(vitellogenin) 단백질 농도 변화에 대한 연구(Imai 등, *Mar. Poll. Bull.*, 51, 708-714, 2005); E2 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 메탈로타이오네인(metallothionein) 유전자의 발현량 변화(Woo 등, *Mar. Biotech.*, 8, 654-662, 2006); 환경내의 에스트론(estrone)(E1, 자연 estrogen) 노출에 의한 바다송사리의 생식력 및 간 조직내의 비텔로제닌(vitellogenin) 단백질 농도 변화(Imai 등, *Environ. Toxicol. Chem.*, 26, 726-731, 2007)에 대한 연구 결과가 보고된 바 있다.

[0005] 이에 본 발명자들은 벤조플로란센 노출에 대한 특이 유전자후보의 확보 및 검출을 위해, 바다송사리 서브트랙티브 cDNA 라이브러리(subtractive cDNA library)를 구축하였으며, 이를 이용하여 벤조플로란센에 의해 발현량이 증가되는 유전자를 발굴함으로써, 벤조플로란센 노출 여부를 확인할 수 있는 바이오마커 및 이를 이용한 노출 여부를 확인하는 방법을 확립하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 다환방향족탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH)의 일종인 벤조플로란센(benzo[k]fluoranthene)의 노출에 의해 과발현되는 바이오마커, 및 상기 바이오마커를 이용한 벤조플로란센에 대한 노출 여부를 확인하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 벤조플로란센(benzo[k]fluoranthene)의 노출에 의해 과발현되는 것을 특징으로 하는 벤조플로란센의 노출 여부 확인용 바이오마커를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커 유전자 염기서열의 전부 또는 일부를 포함하는 cDNA 단편 또는 올리고뉴클레오티드, 또는 상기 cDNA 단편에 상보적인 유전자 단편, 또는 상기 올리고뉴클레오티드에 상보적인 올리고뉴클레오티드가 집적된 벤조플로란센의 노출 여부 확인용 마이크로어레이를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커를 이용한 벤조플로란센의 노출 여부 확인 방법을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 마이크로어레이를 포함하는 벤조플로란센의 노출 여부 확인용 키트를 제공한다.

[0011] 아울러, 본 발명은 상기 바이오마커 유전자에 상보적이고 바이오마커 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머를 포함하는 벤조플로란센의 노출 여부 확인용 키트를 제공한다.

효과

[0012] 본 발명의 벤조플로란센(benzo[k]fluoranthene)의 노출 여부 확인용 바이오마커(biomarker) 및 이를 이용한 벤조플로란센 노출 확인 방법은 환경 시료에서 벤조플로란센의 오염을 모니터링 및 판정하는데 유용하게 사용될 수 있으며, 벤조플로란센에 의해 유발되는 독성 및 발암 작용 기작을 규명하는 도구로 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0013] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0014] 본 발명은 벤조플로란센(benzo[k]fluoranthene)의 노출에 의해 과발현되는 것을 특징으로 하는 벤조플로란센 노출 여부 확인용 바이오마커를 제공한다.

[0015] 본 발명은 하기와 같이 구성된 군에서 선택되어지는 것을 특징으로 하는 바이오마커를 제공한다:

[0016] 서열번호 1로 기재되는 유전자(14 kDa apolipoprotein-like mRNA), 서열번호 2로 기재되는 유전자(adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit), 서열번호 3으로 기재되는 유전자(aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1), 서열번호 4로 기재되는 유전자(annexin A2a), 서열번호 5로 기재되는 유전자(apolipoprotein A1 precursor mRNA), 서열번호 6으로 기재되는 유전자(b2-microglobulin), 서열번호 7로 기재되는 유전자(C1q-like adipose specific protein), 서열번호 8로 기재되는 유전자(chaperonin containing TCP1, subunit 2), 서열번호 9로 기재되는 유전자(Complement component C3-1), 서열번호 10으로 기재되는 유전자(Complement component C3-2), 서열번호 11로 기재되는 유전자(complement factor bfc2), 서열번호 12로 기재되는 유전자(cytochrome c oxidase subunit 1), 서열번호 13으로 기재되는 유전자(cytochrome P450 2P3), 서열번호 14로 기재되는 유전자(fibrinogen beta chain precursor), 서열번호 15로 기재되는 유전자(fructose-bisphosphate aldolase B), 서열번호 16으로 기재되는 유전자(heat shock protein 60), 서열번호 17로 기재되는 유전자(liver-basic fatty acid binding protein), 서열번호 18로 기재되는 유전자(peroxiredoxin 4), 서열번호 19로 기재되는 유전자(pre-B-cell leukemia homeobox 3a), 서열번호 20으로 기재되는 유전자(receptor for activated protein kinase C), 서열번호 21로 기재되는 유전자(superoxide dismutase 3) 및 서열번호 22로 기재되는 유전자(transferrin)(유전자 등록번호: DQ 660321).

[0017] 본 발명자들은 벤조플로란센의 노출 여부 확인용 바이오마커를 발굴하기 위하여, 바다송사리를 벤조플로란센에 노출시킨 후 간세포로부터 서브트랙티브 cDNA 라이브러리(subtractive cDNA library)를 구축하여 발현량이 변화하는 유전자들을 조사하였다. 구체적으로, 벤조플로란센이 노출되거나 노출되지 않은 바다송사리의 간을 적출하여 mRNA를 각각 분리한 후, PCR-selected™ cDNA Subtraction kit(CLONTECH, USA)를 사용하여 CLONTECH사의 프로토콜에 따라서 cDNA Subtraction을 수행하였다. 상기 정제된 mRNA로 cDNA를 합성하고, 단편화 과정을 거친 후, 발현량이 변화된 유전자 단편이 증폭될 수 있도록 혼성화하였고, PCR을 이용하여 발현량이 변화한 유전자 단편을 증폭하였다. 상기 증폭된 cDNA 단편을 T-벡터(vector)에 클로닝(cloning)하고, 적절한 대장균(*E. coli*)에 도입하여 서브트랙티브 cDNA 라이브러리를 완성하였다. 상기 완성된 cDNA 라이브러리를 앰피실린(ampicillin)과 X-gal이 포함된 아가 플레이트(agar plate)에 도말하여, 클론을 선별하였다. 상기 선별된 1,000종 이상의 클론들로부터 플라스미드(plasmid)를 정제하여, DNA 염기 분석을 실시하였다. 분석 결과, 벤조플로란센의 노출에 의하여 발현이 증가한 유전자 22개를 얻었다(표 1 참조). 따라서 상기 유전자들은 본 발명에서 사용한 벤조플로란센을 처리했을 때 유전자들의 발현에 변화가 있으므로, 벤조플로란센의 노출 여부를 검출할 수 있는 바이오마커(biomarker)로 기능할 수 있음을 알 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커 유전자 염기서열의 전부 또는 일부를 포함하는 cDNA 단편 또는 올리고뉴클레오티드, 상기 cDNA 단편에 상보적인 유전자 단편, 또는 상기 올리고뉴클레오티드에 상보적인 올리고뉴클레오티드가 집적된 벤조플로란센의 노출 여부 확인용 마이크로어레이를 제공한다.

[0019] 상기 올리고뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 올리고뉴클레오티드는 상기 바이오마커 유전자의 20 내지 50개의 핵산을 포함하고, 바람직하게는 25개의 핵산을 포함한다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커를 이용한 벤조플로란센의 노출 여부 확인하는 방법을 제공한다.

[0021] 본 발명은

[0022] 1) 실험군으로서 피검 물질에 노출시킨 바다송사리와 대조군으로서 노출시키지 않은 바다송사리를 준비하는 단계;

[0023] 2) 단계 1)의 각 실험군 및 대조군의 바다송사리 유래 간세포에서 RNA를 분리하는 단계;

- [0024] 3) 단계 2)의 실험군 및 대조군의 RNA로부터 cDNA로 합성하면서 실험군과 대조군을 각기 다른 형광물질로 표지하는 단계;
- [0025] 4) 단계 3)의 각기 다른 형광물질로 표지된 cDNA를 상기 본 발명의 마이크로어레이와 혼성화시키는 단계;
- [0026] 5) 단계 4)의 반응한 마이크로어레이를 분석하는 단계; 및
- [0027] 6) 단계 5)의 분석한 데이터에서 실험군의 바이오마커의 발현 정도를 대조군과 비교하여 확인하는 단계를 포함하는 피검 물질에 대한 벤조플로란센의 노출 여부 확인방법을 제공한다.
- [0028] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 간세포는 간, 또는 간의 세포 및 조직에서 유래한 세포인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0029] 상기 방법에 있어서, 단계 3)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.
- [0030] 상기 방법에 있어서, 단계 5)의 마이크로어레이는 상기 과발현되는 유전자(표 1 참조)가 탑재된 것이라면 모두 사용 가능하다. 상기 모든 절차는 일반적인 마이크로어레이 실험 프로토콜에 따라 수행되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0031] 또한, 본 발명은
- [0032] 1) 실험군으로서 피검 물질에 노출시킨 바다송사리와 대조군으로서 노출시키지 않은 바다송사리를 준비하는 단계;
- [0033] 2) 단계 1)의 각 실험군 및 대조군의 바다송사리 유래 간세포에서 RNA를 분리하는 단계;
- [0034] 3) 단계 2)의 RNA를, 본 발명의 바이오마커 유전자에 상보적이고 바이오마커 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머를 사용하여 실시간 RT-PCR(Real-time reverse transcript polymerase chain reaction)을 수행하는 단계; 및
- [0035] 4) 단계 3)의 유전자 산물을 대조군과 비교하여 발현 정도를 확인하는 단계를 포함하는 피검 물질에 대한 벤조플로란센의 노출 여부 확인 방법을 제공한다.
- [0036] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 간세포는 간, 또는 간의 세포 및 조직에서 유래한 세포인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0037] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 프라이머는 본 발명에서 탐색된 바이오마커 유전자와 상보적이고, 바이오마커를 증폭할 수 있는 프라이머라면 모두 사용가능하다.
- [0038] 또한, 본 발명은 상기 본 발명의 마이크로어레이를 포함하는 벤조플로란센의 노출 여부 확인용 키트를 제공한다.
- [0039] 상기 키트는 추가적으로 바다송사리 또는 바다송사리 유래 간세포를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] 상기 키트는 추가적으로 형광물질을 포함할 수 있으며, 상기 형광물질은 스트렙트아비딘-알칼린 포스파타제 접합물질(streptavidin-alkaline phosphatase conjugate), 화학형광물질(chemifluorescent) 및 화학발광물질(chemiluminescent)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 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 한정된 것은 아니며, 당업자에게 알려진 혼성화 반응에 필요한 반응 시약은 모두 포함시킬 수 있다.
- [0042] 아울러, 본 발명은 본 발명의 바이오마커에 상보적이고 상기 바이오마커를 증폭할 수 있는 프라이머를 포함하는 벤조플로란센의 노출 여부 확인용 키트를 제공한다.
- [0043] 상기 프라이머는 상기 바이오마커 유전자에 상보적이며, 바이오마커 유전자를 증폭할 수 있으며 증폭산물이 100 내지 300 bp가 되도록 설계된 정방향 및 역방향 프라이머쌍은 모두 사용 가능하다.

실시예

- [0044] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- [0045] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0046] <실시예 1> 물고기의 배양 및 화학물질 처리
- [0047] <1-1> 바다송사리의 배양
- [0048] 인천소재의 클릭피쉬사에서 구입한 바다송사리를 세 종류의 필터(100, 10 및 1 μm)를 거친 자연해수에 배양하였다. 수중 히터를 이용하여 수온은 25 $^{\circ}\text{C}$ 로 고정하였으며, 하루에 한번 아르테미아(Artemia) 유생을 먹이로 공급하였다.
- [0049] <1-2> 벤조플로란센의 처리
- [0050] 상기 실시예<1-1>의 바다송사리 숫컷을 벤조플로란센(benzo[k]fluoranthene) 10 ppb에 24시간 동안 노출하였다. 벤조플로란센은 0.1% DMSO에 녹여 1,000 ppm으로 적정하여, 100,000배 농축액을 만들었다. 바다송사리는 배양 수조에서 여과된 해수 1.5 L가 담긴 2 L 비이커로 10 마리씩 옮기고, 24시간 동안 순치시켰다. 실험군에는 100,000배 벤조플로란센 농축액 15 μL , 대조군에는 0.1% DMSO 15 μL 를 첨가하였다. 24시간 동안 배양 후, 바다송사리를 한 마리씩 얼음물로 옮겨, 순간적으로 기절시킨 후, 머리를 잘라내고, 배를 갈라서, 간을 적출하였다.
- [0051] <실시예 2> 벤조플로란센에 의한 유전자 변화 측정
- [0052] <2-1> RNA의 분리
- [0053] 상기 실시예<1-2>에서 수득한 벤조플로란센에 노출한 시험군 및 노출하지 않은 대조군의 간을 TriReagent(Molecular Research Center Inc.)에 넣고, 유리 분쇄기(glass homogenizer)를 이용하여 조직을 파쇄하였다. 상기 파쇄된 조직용액에 클로로포름을 첨가하여 RNA를 추출하고, 이소프로필 알콜로 침전시켜 75% 에탄올로 세척한 후 상온에서 건조시킨 후, DEPC-처리된 물에 녹였다. 추출한 전체 RNA는 농도를 측정 후 사용할 때까지 -70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. 상기 전체 RNA로부터 Oligotex mRNA mini Kit(Qiagen, CA, USA)를 사용하여 mRNA를 정제하였다. 즉, 추출한 전체 mRNA를 dC₁₀T₃₀ 올리고뉴클레오티드와 결합되어있는 폴리스티렌-라텍스(polystyrene-latex) 입자와 혼합하여, mRNA만을 선택적으로 입자에 결합시킨 후, 원심분리하였다. 침전된 mRNA-올리고텍스(oligotex) 결합물을 키트에 포함되어있는 세척용액으로 세척하고, 재현탁하여, 원심분리한 후, 상등액을 제거하였다. Kit에 포함되어있는 추출용액을 이용하여 mRNA와 올리고텍스를 분리시키고, 원심분리하여 상등액을 취하고, 아세트산 나트륨(sodium acetate)과 100% 에탄올로 침전시켜 70% 에탄올로 세척한 후 상온에서 건조시켜 DEPC-처리된 물에 녹였다. 추출한 mRNA 농도를 측정 후 사용할 때까지 -70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.
- [0054] <2-2> cDNA 합성 및 subtractive cDNA library의 작성
- [0055] PCR-selectedTM cDNA Subtraction kit(CLONTECH, USA)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라서 cDNA 서브트랙션(Subtraction)을 수행하였다. 구체적으로, 상기 실시예<2-1>에서 정제한 전체 mRNA(1.0 μg)를 주형으로, SMART IV 올리고뉴클레오티드 및 CDS III/3' PCR 프라이머를 프라이머로 이용하고, PowerScript RT-ase를 반응 효소로 사용하여, 대조군과 실험군의 cDNA를 합성하였다. 합성된 첫번째 가닥(first strand) cDNA를 주형으로 5' PCR 프라이머 및 CDS III/3' 프라이머로 폴리머라제 혼합물(polymerase mixture)을 효소로 이용하여 LD(long distance) PCR 반응을 수행하였다. 상기 PCR 반응물을 단백질분해효소 K(proteinase K digestion)로 처리하여 반응에 사용한 효소를 제거하였다. 상기와 같이 합성된 두번째 가닥(Second strand) cDNA를 4M NH₄OAC와 95% 에탄올로 침전시키고, 80% 에탄올로 세척한 후, 물 50 μl 에 녹여, 대조군과 실험군의 ds cDNA가 준비하였다. 합성된 대조군과 실험군의 ds cDNA를 제한효소 RsaI으로 각각 처리하여, 블런트-엔드(blunt-end)인 단편을 만들고, 실험군의 cDNA 시료를 둘로 나누어 각각에 다른 종류의 어댑터(adaptor)를 부가시켰다. 어댑터가 부가되지 않은 대조군의 cDNA와 어댑터가 부가된 두 종류의 실험군 1차 혼성화하고, 1차 혼성화(First Hybridization)된 두 종류의 시료를 섞어 2차 혼성화(Second Hybridization)하였다. 혼성화가 완료된 시료를 주형으로 두 종류의 어댑터에 특이적인 프라이머를 이용하여 1차 PCR을 수행하고, 네스티드(nested) 프라이머를 이용하여 2차 PCR을 수행하여, 벤조플로란센의 노출에 의해 발현량이 증가된 유전자 후보들을 증폭하였다. 증폭된 cDNA 단편들을 pGEM T-Easy vector(Promega Inc.)에 재조합하고, E. coli(DH5 α) 반응능세포(competent cell)에 도입하여, 형질전환함으로써 서브트랙티브 cDNA 라이브러리(subtractive cDNA library)를 완성하였다.

[0056] <2-3> 특이 유전자 후보의 염기서열 분석

[0057] 형질전환된 *E. coli*(DH5 α)를 X-Gal(20 mg/ml)과 IPTG(100 mM)가 첨가된 LB 플레이트에 도말하여 37°C에서 16시간 배양하였다. 배양된 콜로니(colony) 중 흰색 콜로니를 선별하여 암피실린(ampicillin)이 첨가된 200 μ l의 LB 배지를 넣은 96 웰 평판 플레이트에 접종하여 37°C에서 16시간 배양하였다. 선별된 1,000종 이상의 클론들로부터 플라스미드를 정제하여, DNA 염기분석을 실시하였다. 상기 과발현된 유전자들을 표 1에 나타내었으며, 이들 유전자들이 벤조플로란센을 검출할 수 있는 바이오 마커(biomarker)로 기능할 수 있음을 알 수 있다.

표 1

[0058]

등록번호	유전자명	서열
	14 kDa apolipoprotein-like mRNA	서열번호 1
	adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit	서열번호 2
	aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1	서열번호 3
	annexin A2a	서열번호 4
	apolipoprotein A1 precursor mRNA	서열번호 5
	b2-microglobulin	서열번호 6
	Clq-like adipose specific protein	서열번호 7
	chaperonin containing TCP1, subunit 2	서열번호 8
	Complement component C3-1	서열번호 9
	Complement component C3-2	서열번호 10
	complement factor bfc2	서열번호 11
	cytochrome c oxidase subunit 1	서열번호 12
	cytochrome P450 2P3	서열번호 13
	fibrinogen beta chain precursor	서열번호 14
	fructose-bisphosphate aldolase B	서열번호 15
	heat shock protein 60	서열번호 16
	liver-basic fatty acid binding protein	서열번호 17
	peroxiredoxin 4	서열번호 18
	pre-B-cell leukemia homeobox 3a	서열번호 19
	receptor for activated protein kinase C	서열번호 20
	superoxide dismutase 3	서열번호 21
DQ 660321	transferrin	서열번호 22

서열 목록

<110> Korea Ocean Research & Development Institute
 <120> The biomarkers for identification of exposure to benzo[k]fluoranthene and the identification method of benzo[k]fluoranthene exposure using the same biomarkers

<130> 8p-07-27

<160> 22

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 314
 <212> DNA
 <213> *Oryzias* sp.

<400> 1
 acctgcgccc ccacgtcggg gagtccttga gcaccggcat cgaccacatc aaggtctacc 60
 tggatgaaat catgcccgcc cagtgaagaa gatcacctgg acgaaaagaa gccctgtta 120
 aatgatagtt catagaattt agaccacaat agacaaaaga ggaacgacaa gatttctgtc 180
 cacttttttt taaatcatga tcttcaccaa gtcacgtctga gtcacgtctag gcatggcatg 240
 tcaacaccag ttctgcatgt gcagcgtttt gttggatcca ctaaccctaaa gcccatgtgt 300
 ctgtatgtgt ttgt 314

<210> 2
 <211> 340
 <212> DNA
 <213> *Oryzias* sp.

<400> 2
 acctggagct cagctacacg ttcccagtcc ttaccgcgg aatcaatctt ctgagacgtc 60
 actgttgctt acaacaactg gtccaattca acgcatggat cctctcacga atcttcaagt 120
 tgcaatcaag aacaatattg atgtatttta cttcagttgt cttgttccaa tgcacgttct 180
 tttcattgaa gctggacaaa tggatcgtaa agtgttctta gcgatgtgga aagacattcc 240
 agcatcaaat gaagtcaga aacaatttca ctgcaatgtc acctcagaaa tggcccagca 300
 aaaactcgca gcaacaatg tgtttactgt cgcaaaacgt 340

<210> 3
 <211> 226
 <212> DNA
 <213> *Oryzias* sp.

<400> 3
 acctgaggcg ctcaacgtgc acgattaact acagcaaaga tctcctctg gctcagggca 60

tcaagtttga gtgaggetca agctttgacc acaaaggaca aaaacacagt attctgaata 120

gtgaagtttc agtgtgagtg ctgaagattt gtcgtcattc atttgggtca gatcaaaactg 180

agtcattaaa aagttttgct tttggttgta aaaaaaaaa aaaaaa 226

<210> 4
 <211> 772
 <212> DNA
 <213> Oryzias sp.

<400> 4
 aaagacctca cagacaaatc tttgcgtcgt ctcagcatct acagtgacgg acattcaaga 60

tggctatggt atcagagttt cttggacagc tctcactcaa tgagactaca gaaaccaagt 120

atcccactgt actgcctgca gtgaactttg atccagacaa agatgctgca agaattgaaa 180

ctgctatcaa gacaaaaggt gtggatgaac agaccatcat cgacatcctc acaaagcgca 240

cctattccca gagacgagat atcgcatttg catatgagag gaaggcaaag aaggatatga 300

tctcagctct gaagggagcg ctgtcaggct cactggagag cgtgatcctt ggactgatga 360

agagcacggc ccagtttgat gccacagaga tcaaagggtc aatgaagggc ttaggaacag 420

atgaagaaac tctgattgag cttttatgct cacggagtga ctctgaactg gtccagatca 480

agaatgtcta caaagacttg tttaaaaagg agcttcacaa agacgttgca ggcgacacgt 540

cggggaactt ttgcaaactt ctcttagctc ttgtgcagac taaaagagct gagccgactt 600

ctgtttgtga ttatgggaaa atagatgaag atgccagggc tctctatgaa gctggagtga 660

agataaaggg aactgatgtg gccacatgga tctccatcat gtccgagaga agcgtccccc 720

acctgcagaa agtgttccag aagtataaaa gctacagccc ctacgacatg ca 772

<210> 5

<211> 515
 <212> DNA
 <213> Oryzias sp.

<400> 5
 acccgccaa gcaaccgct gacatggaag ctctgagagt caagatggag cccatcgtgg 60
 ccgagctgcg tcagaagatg rccaccaatg tggaggagac caaggccgcc ctgatgccca 120
 ttgtggagtc tgtgcgcgcc aagcttggtg agcgtctgga gcagctgaag cagatggctt 180
 ctccatagt tgaggaatac aaagagcagc tgaacaaggc ttactcccag gcacagtcca 240
 tcacagctga agatctggaa aacttgaagg ccaagatcac acctcttgct gaggaaatca 300
 aggaaaagtt tntagccatc ttcggggcca tctcagcaac cttcaacaag aactagatcc 360
 tcccagttcc ttagactaac cctgccttat gctgtcctt gacacattcc accttaattt 420
 ccactcttcc ttcgctcaca agcaggccca aagtaaactc gtgcctcgct gacaacaaca 480
 cggcaggact ttcctcttg cacacacaac aacgt 515

<210> 6
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Oryzias sp.

<400> 6
 acacctgcaa ggtcaccac agcggcgtgg ccaaatatta cacttatgag cccaacatgt 60
 aaccgtcatg gaggaagacc caggtgacc ccagctgtcc tggacagatc tacagcctca 120
 tcactcttcc aatcaaagca tctgtttcct cacttcaccc tcacaacat aacgtcaggt 180
 ttccaggtgg tggtcagctc tcagattacg ttgtatgatt tcagaggata gatttgaac 240
 tcaagtgttt tattaatct ggtgtttttt cagcctgtg tgacattcca aaactttatt 300
 acctgttctt tgttcgttat ctgt 324

<210> 7
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> Oryzias sp.

<400> 7
 actacggtta cgtggagcc ttcagtgcc tggctgaggg agcaggcgat gtcgccttca 60
 tcaagcacac gattgttagt gaaaacactg atggtaaagg tcccgaatgg gctcgcagcc 120
 tgaaatctga cgactaccag ctgatctgcc ctggaaagcc accaatggcc atctctgaat 180
 ttgctaattg taatctggcg gttgtgctg cacacgcagt agtgaccctg ccagagagcc 240
 gcagtgatgt tgtgcgcac cccaggttc agcagacttt ctttggagcc agtgggagcg 300
 atccttctctt caaactcttc caatcagaga atggaaacaa cctcctcttc aaggactcca 360
 ccaagtgtct ccaggaggtt tctgtggaa agagcttcga tcagtttttg ggagccgagt 420
 420

<210> 8
 <211> 776
 <212> DNA
 <213> Oryzias sp.

<400> 8
 taagatcaag atcttcggct ccagagtccg cgtggactcc acggccaagg tggcggagat 60
 cgagctcgcc gagaaggaga agatgaagga gaaggtggag cggatcctga agcacggcat 120
 caactgcttc atcaacagcg agctgatcta caactaccg gagcagctgt tcgctcagcg 180
 cggcgtcatg gccatcgagc acgccgactt cgcggcgtg gagegcctcg ctctggtcac 240
 aggcggggag atcacctcca ctttcgagca ccccagatg gtgaagctcg gccactgcaa 300

gctgatcgag gaggtgatga tcggagagga cacgctcadc cacttctccg gggtcgccat 360

gggtgaggcc tgcaccgtgg tcctgcgagg agcgactcag cagatcctgg acgaggcgga 420

gcgctcgctc cagcagcgc tctgcttctt ggctcagacg gtgaaggagc cgcgcaccgt 480

ctacggcgga ggctgctccg agatgctgat ggccaaagcg gtgaccgacc tggccaacag 540

gacgccgggc aaggaggcgg tcgccatgga gtccttcgcc aaagctctga ggatgctgcc 600

gaccatcadc gccgacaacg ccggctacga cagcggcgac ctggtggccc agctgagagc 660

ggcgcacacg gagaacaaga ccacgtccgg actgaacatg tcggaggcgc cgggtgggaga 720

catggtggag ctcgcatca ccgagtcctt ccaggtgaag cggcagatgc tgctga 776

<210> 9
 <211> 370
 <212> DNA
 <213> *Oryzias* sp.

<400> 9
 actctgattt accaacctc tggctgtgga gacgagaaca tgatccacat gaccctgcct 60

gtcattgcaa ccacgtatct ggacaaaacc aaccaatggg aagctgttgg ctttcagaaa 120

cgagctgagg ccctccagca cataaaaact ggttacaaca acgagctagc atacctaaaa 180

agtgatggct cttttgctgt atgggctaac catggaagca gcacctggtt aacagcttat 240

gttgtcaaag tgttttcctt ggccaacaac ctggtagcca tcaaaaagga acatatttgt 300

gatgctgtaa agttctgat cctcagagct cagcagcctg atggcgtttt cacagaagtt 360

ggaaaaatgt 370

<210> 10
 <211> 610
 <212> DNA

<213> Oryzias sp.

<400> 10

actatgccca acctcaagaa aaggaaagtg actgccagaa gtttgacgta tcagtgcagc 60

tgcttcaga taaaacaat ggagatcaaa aggtctacaa gcttcagata gaagttttat 120

acaagaacag cgaacgtgat gccaccatgt ccatcttaga catcggcttg ctgacaggct 180

tcaactccaaa cctggatgac ctgaaagctc tgtctggagg acgtgccccg atcattagca 240

agtatgaaat gaacacagct ctttcagaac gaggtcact catcatctac ctggataagg 300

tttctcacac cagaccagat gaaatcagtt tcaggctgca gcagaccatg caggtgggcg 360

ttcttcagcc agcagcagtg tctgtctatg aatattatga gcaaacacct tgtgtgaaat 420

tttaccatcc agagagggaa ggaggacagc tctgctggct ctgcagagat gatgagtgca 480

cgtgtgcaga agagaactgc agcatgcaga agagcggcca aatcagcaac gatgagcgaa 540

cacctaaaat ctgtgagagc acagagacca gtaaaattga gtatgcgtac ctcgcccgcg 600

accacgctaa 610

<210> 11

<211> 561

<212> DNA

<213> Oryzias sp.

<400> 11

gcgccatggc ggccgcggga attcgattag cgtggtcgcg gccgaggtac ccaggaaacc 60

aatgatgtcc tcgaactacc tggaatatca acctgcagcc agcaagagga gcttttgcta 120

aagaatcaac gggaaaaact caacttttta agtgcagaca gaggttggtg caatgaaaaa 180

gttgtccatg ccaagtttgg aaaaagcaga gatgtgtgca tccaaaagcg acaaaatgca 240

ctaggcatga ggatcaccca cccaacgggt gctgtgacgg ataactttct gtgcaactggt 300

ggggacggag accacatagc gtgtgcaggc gatggtggac aggctgtgtt caagattcat 360

cagaatcgtg cagtgcagat tggagtggtc agctggggaa cagaactcct ttgtcgaaga 420

ggacaaatgc aaaagtccac aaataattcc agagatttcc acattaatct tttcaaagt 480

gtttcttttc ttaaatctac tcttggaaat acaaatcagg atgaatatcc aacctgaca 540

tttttgagtg attaaaactc a 561

<210> 12
 <211> 607
 <212> DNA
 <213> *Oryzias* sp.

<400> 12
 ccatggcggc cgcgggaatt cgatttcgag cggcccggc ggcaggtact tctacttctt 60

tcctccccc tctggctgc aggaattacg atgcttttaa ctgaccgaaa ccttaacacc 120

acattcttcg accccgctgg aggaggagac ccgatccttt atcagcatct attttggttt 180

tttgccatc cagaagtta cattctaac ttaccaggct tcggtataat ctcccacatc 240

gtcgcctact actcaggaaa aaaagacct ttcggctaca tgggtatggt ttgggctata 300

atagcaattg gccttctagg ctttattgta tgggccatc acatatttac ttagggata 360

gatgttgaca cccgagctta ctttacgtcc gcaacaatga ttattgcat cctacgggg 420

gtaaaagtct tcagctgact ggccaccctc cacgggggct caattaaatg agagacacct 480

ctctatggg cactgggatt tattttctta ttacagtgg gaggcctaac aggcatgtt 540

ttagcgaact cgtccctaga tattatactt catgacacct attatgtagt agcccacttc 600

cactatg 607

<210> 13
 <211> 479
 <212> DNA
 <213> Oryzias sp.

<400> 13
 acaatgataa tcctactct aaactctgtc ctccatgatg agtccatgtg ggagactcca 60
 cactccttca accccaaca ctttctggac aaggatggaa aatttagaaa gagagaggcc 120
 ttcagtcctt ttggaggagg taaacgcgtg tgtctcgggg aacagctagc caggatggag 180
 ctgtttctgt tttcacctc cctccttcag aggttttcat tttcagtgcc tgcaggagaa 240
 caaccagtc tggagaacag gatgggagcc actcgtgcc ccaaacctta cgcctctgt 300
 gctgtccac gataaacctt ctaacatecc aaactgacac gttgttgatt gttttatgct 360
 tttatggagc tttctttttt cttacaatct ctggtcactc aagtcaaaga cttaaacata 420
 gatgtcctaa taaacatttt ccggctgcat tgttgttgta aagtttgtaa attgacagg 479

<210> 14
 <211> 152
 <212> DNA
 <213> Oryzias sp.

<400> 14
 accgccgctt tacggtccaa tcagagacgt ccaactttgt aatggccgtt gaaggctact 60
 ctggtaacgc cggcaactgc ttctggaag gatccccgga gctctttggg gaaaaccgaa 120
 ccatgacgat tcacaatggc atgatgttca gt 152

<210> 15
 <211> 255
 <212> DNA
 <213> Oryzias sp.

<400> 15
 accagaaaga cggatgcgac tttgctaagt ggaggtgtgt gctgaagatc tccgatggct 60

 gcccgtcagc tctcgccatt gcagagaacg ccaacgtcct cgctagatac accagtatct 120

 gccaacagaa tggctctggg cccatcgtgg agcctgagat cctgcctgat ggtgaccatg 180

 acctgcagaa gtgccagtat gtgacagaaa aggtcctggc tgccacctac aaggctcttt 240

 cagatcacca cgtgt 255

<210> 16
 <211> 662
 <212> DNA
 <213> Oryzias sp.

<400> 16
 gcggccgcgg gaattcgatt agcgtggtcg cggccgaggt acttcaacta gctgcaattc 60

 taaggaacta aaatttgggc gtgatggaag atctgctatg ttgaaagtg ttgatatctt 120

 agcagaagca gtttctgcca cacttggccc caagggacga aatgttatca ttgagcagtc 180

 atttggtggg cctaagatta caaaagatgg tgtgacagtt gcaaaagcag ttgatttagc 240

 agacaaatth caaaatcttg gagctcgatt agttcaagat gttgcaaata atacaaatga 300

 agaagctggt gatggcacia cgacagctac cattcttgca aaacatattg caaaagaagg 360

 ttttgagaag gtttccaggg gggccaatcc acaagaagtt cgacgaggcg tatttttggc 420

 aatgaacat gttgtaaacc atctgaaaga aatgtcaaag caagtaacca caccagaaga 480

 aatagctcag gttgcaacca tatcagccaa tggatgata agtgttgggg atcttatttc 540

 atcagcaatg aagaaagtgg ggaaaaatgg agtaatcaca gtcaaggacg gtaaaactct 600

 tcaagatgaa ttagagctga ttgaaggttt aaagtttgac cgtggttaca tatcgccgta 660

ct 662

<210> 17
 <211> 418
 <212> DNA
 <213> Oryzias sp.

<400> 17
 accctcagga gaactacgag gcgttcctca gggctttgga actgtctgaa gatatacatta 60

agctggccaa ggatgtcaag ccagttactg agatcaaaca gacaggcaac gacttcgtca 120

tcacctcaa gacacctgga agaaccgtga ccaactcctt caccatcggc aaggaggctg 180

aaatcaccac catggatggc aagaagctaa agtgtgttgt taacattgaa ggtggcaaac 240

tggtctgcaa aactggcaaa ttttccatg tcaggagat caagggagga gaaatggttg 300

gaactatgac cgtcggttca acaacactca tcaggaaaag caaaaagatg tgaatttaac 360

aacaaagaac aactttttaa taaaagatgt gccaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 418

<210> 18
 <211> 250
 <212> DNA
 <213> Oryzias sp.

<400> 18
 tgagacagat caccatgaat gaccttcag taggaagatc tgtagatgaa accttgaggc 60

tggttcaggc attccagtat actgacaaac acggagaagt gtgtccagca ggatggaaac 120

caggcagtga cacaatcatt cctgacctt caggaaagct gaagtacttt gataaattag 180

actgaacttt acttctcac tctgtgaaat ccatccaagt tcaataaaa ttgttttct 240

taaacttctg 250

<210> 19
 <211> 738
 <212> DNA
 <213> Oryzias sp.

<400> 19
 aaataagcca aaaaggagga catcctgtct ctaattttgc cggacaatcc cacagtcgtt 60
 taccctttcc gctcgcggca catgctatag ccgatatatg agtttttcaa tttgtgtggc 120
 tcagtgcaca gactctttag cggctactat ggacgatcaa gcccggatca tgcagtcgat 180
 cggcggggtg agtctggccg gccactcggg gcagggaggc atggcactgc cgcctccaca 240
 tggacacgat gggacagacg gagacgggag gaagcaggac atcggtgaca ttctgcatca 300
 aatcatgacc ataactgac aaagtctgga cgaggcga gcaaaaaaca gaaacatgg 360
 actgaactgt cacagaatga aaccagcact cttcagcgtt ctctgtgaaa tcaaagaaaa 420
 aacaggtcta agcattcgtg gcgcccagga ggaggacct ccagaccctc agcttatgcg 480
 tttagacaac atgctgctgg cagagggagt ggcgggacca gagaaaggcg gcggatcggc 540
 cgcagcggcg gcagccgctg ctgcctcggg cggggcggcc gacaactcca tcgaactc 600
 cgactacaga gccaaactca ccagatcag acagatttac cacacggagc tggagaata 660
 cgaacaggca tgtaacgagt tcaccacca tfgatgaat ctactaaggg aacaatctcg 720
 caccgaccc atctcgcc 738

<210> 20
 <211> 344
 <212> DNA
 <213> Oryzias sp.

<400> 20
 acaccctgga cagcggcgac gtcacaaacg cctctgctt cagccccaac cgttactggc 60

tttgtgccgc caccggcccc agcatcaaaa tctgggatct ggaagggaaa atcattgtgg 120
 atgagctgag acaggaagtg atcagcacia acagcaaagc tgaacccccca cagtgtactt 180
 ctctggcatg gtctgtgat ggacagacc tgtttgtgg ttacaccgat aacctgatca 240
 gagtgtggca ggcaccatt ggaactgat aagaagaatc catcactgaa ccaacttta 300
 ataaaaagac tgtttgcaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaa 344

<210> 21
 <211> 569
 <212> DNA
 <213> Oryzias sp.

<400> 21
 ttcgagcggc cgcccgggca ggtacggcca agttttgttt aagcaagatc aggcgcaggg 60
 aaagctccaa gtctctctgc agctcactgg ctctcccaca gatgagtctc cacagcccag 120
 agccgtgcac atccaccagt atggagatct gagccagggga tgcacttcta ctggtggaca 180
 ctacaacca tacgggggtgc atcaccccaa tcatccggga gactttggta actttgtggc 240
 caacgagggg agaatcggtg agcggataga atctgaagca acgctgttcg gtgggctgtc 300
 tgtgctcggga agagctgtag tggttcatga aacggtcgac gacttaggcc aaggtggaga 360
 tgcagggagt ctgttgcatt ggaatgcagg aagaagctg gcctgctgcg tcattggaat 420
 gtcttcttcc aatttatggg atgaactgag ctgaaaatga ggagaaagta gtcttgacac 480
 tagtggatt gatctgctcc aatcaccttt gggttaattc gctgatgtaa tcaaccaag 540
 aaagctgtac ctggcccgcg accacgcta 569

<210> 22
 <211> 420
 <212> DNA

<213> Oryzias sp.

<400> 22

actacggtta cgctggagcc ttcaggtgcc tggctgaggg agcaggcgat gtcgccttca	60
tcaagcacac gattgttagt gaaaacactg atggtaaagg tcccgaatgg gctcgcagcc	120
tgaaatctga cgactaccag ctgatctgcc ctggaaagcc accaatggcc atctctgaat	180
ttgctaattg taatctggcg gttgtgcctg cacacgcagt agtgaccctg ccagagagcc	240
gcagtgatgt tgtgcgcac cccaggttc agcagacttt ctttggagcc agtgggagcg	300
atccttcctt caaactcttc caatcagaga atggaaacaa cctcctcttc aaggactcca	360
ccaagtgtct ccaggaggtt tctgctggaa agagcttcga tcagtttttg ggagccgagt	420
	420