



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0009768
(43) 공개일자 2010년01월29일

(51) Int. Cl.

C12N 15/10 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0070551
(22) 출원일자 2008년07월21일
심사청구일자 2008년07월21일

(71) 출원인

한국해양연구원

경기 안산시 상록구 사동 1270번지

(72) 발명자

염승식

경상남도 거제시 신현읍 양정리 고려4차아파트
504-1303

우선욱

경상남도 거제시 신현읍 양정리 고려4차아파트
504-1303

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 15 항

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

(57) 요약

본 발명은 다환방향족탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH)중의 하나인 벤조파이렌(benzo[a]pyrene)에 대한 노출 여부 확인용 바이오마커(biomarker) 및 이를 이용한 확인 방법에 관한 것으로, 구체적으로 벤조파이렌에 특이적으로 유전자 발현이 증가하는 바이오마커 및 이를 이용한 벤조파이렌에 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 벤조파이렌의 오염을 모니터링 및 판정하는데 유용하게 사용될 수 있으며, 벤조파이렌에 의해 유발되는 독성 및 발암 작용 기작을 규명하는 도구로 이용될 수 있다.

(72) 발명자

이택건

경기도 안성시 석정동 우남퍼스트빌 107-301

박홍석

대전광역시 유성구 반석동 반석마을5단지아파트
502-201

심원준

경상남도 거제시 신현읍 수월리 1253 일성수월 아
리채 101-1201

류재천

서울특별시 종로구 무악동 60 인왕산 I-Park
107-203

특허청구의 범위

청구항 1

하기의 군으로부터 선택되는 유전자를 포함하는 벤조파이렌(benzo[a]pyrene)에 대한 노출 여부 확인용 바이오 마커:

서열번호 1로 기재되는 유전자(1-Cys peroxiredoxin), 서열번호 2로 기재되는 유전자[AdaPtin, Small chain(clathrin associated complex) family member(aps-2)(aps-2)], 서열번호 3으로 기재되는 유전자(Adaptor related protein complex 2), 서열번호 4로 기재되는 유전자(apolipoprotein A-IV3), 서열번호 5로 기재되는 유전자(ATP synthase beta-subunit), 서열번호 6으로 기재되는 유전자[Betaine aldehyde dehydrogenase(Aldh9A1)], 서열번호 7로 기재되는 유전자(Complement component C3-1 mRNA), 서열번호 8로 기재되는 유전자(Complement component C8 beta), 서열번호 9로 기재되는 유전자[Cytochrome P450 1A(CYP1A) mRNA], 서열번호 10으로 기재되는 유전자(Fibrinogen-like protein), 서열번호 11로 기재되는 유전자[Similar to Glucose-6-phosphatase(G6Pase)(G-6-Pase), transcript variant 1], 서열번호 12로 기재되는 유전자(Heat shock protein 70), 서열번호 13으로 기재되는 유전자[LBP/BPI-2 mRNA for LBP(LPS binding protein)/BPI(bactericidal/permeability-increasing protein) like-2], 서열번호 14로 기재되는 유전자[Legumain(lgmn)], 서열번호 15로 기재되는 유전자(NADH dehydrogenase subunit 5), 서열번호 16으로 기재되는 유전자[Similar to NPC1(Niemann-Pick disease, type C1, gene)-like 1 mRNA], 서열번호 17로 기재되는 유전자(PolyA binding protein), 서열번호 18로 기재되는 유전자(Receptor tyrosine kinase proto-oncogene), 서열번호 19로 기재되는 유전자(Ribosomal protein L9), 서열번호 20으로 기재되는 유전자(Ribosomal protein L15), 서열번호 21로 기재되는 유전자(Transferrin), 서열번호 22로 기재되는 유전자(Warm-temperature-acclimation-related-65), 서열번호 23으로 기재되는 유전자[Zinc finger RNA binding protein(zfr)].

청구항 2

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

청구항 3

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

청구항 4

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

청구항 5

- 1) 실험군인 바다송사리 유래 간세포와 대조군인 바다송사리 유래 간세포에서 각각 RNA를 분리하는 단계;
- 2) 단계 1)의 실험군 및 대조군의 RNA로부터 cDNA로 합성하면서 실험군과 대조군을 각기 다른 형광물질로 표지하는 단계;
- 3) 단계 2)의 각기 다른 형광물질로 표지된 cDNA를 제 4항의 마이크로어레이와 혼성화시키는 단계;
- 4) 단계 3)의 반응한 마이크로어레이를 분석하는 단계; 및
- 5) 단계 4)의 분석한 데이터에서 본 발명의 바이오마커의 발현 정도를 대조군과 비교하여 확인하는 단계를 포함하는 벤조파이렌의 노출 여부 확인방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 단계 1)의 간세포는 간, 또는 간의 세포 및 조직에서 유래한 세포인 것을 특징으로 하는 벤조파이렌에 대한 노출 여부 확인 방법.

청구항 7

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 것을 특징으로 하는 벤조파이렌에 대한 노출 여부 확인 방법.

청구항 8

- 1) 실험군인 바다송사리 유래 간세포와 대조군인 바다송사리 유래 간세포에서 각각 RNA를 분리하는 단계;
- 2) 단계 1)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
- 3) 단계 2)의 유전자 산물을 대조군과 비교하여 발현 정도를 확인하는 단계를 포함하는 벤조파이렌에 대한 노출 여부 확인 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 단계 1)의 간세포는 간, 또는 간의 세포 및 조직에서 유래한 세포인 것을 특징으로 하는 벤조파이렌에 대한 노출 여부 확인 방법.

청구항 10

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

청구항 11

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

청구항 14

제 1항의 바이오마커에 상보적이고 바이오마커를 증폭할 수 있는 프라이머를 포함하는 벤조파이렌에 대한 노출 여부 확인용 키트.

청구항 15

제 14항에 있어서, 제 1항의 바이오마커 유전자에 상보적이고 바이오마커 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 벤조파이렌에 대한 노출 여부 확인용 키트.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

본 발명은 다환방향족탄화수소(Polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH)중의 하나인 벤조파이렌(benzopyrene)에

[0001]

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 등, *Environ. Health Perspect.*, 90, 93-100, 1991).
- [0003] 벤조파이렌은 다환방향족탄화수소의 일종으로 유기물이 연소하거나 열분해시 생성된다. 독성 때문에 인체위해 평가를 위한 특정오염물질 발암등급분류(IARC)에서 발암물질로 분류하고 있다. 탄화수소, 아미노산, 전분 또는 지방산이 600℃ 이상 가열될 때 생성된다. 상온에서 노란색 결정의 고체형태를 띄고 있으며, 석탄타르 속에 존재하고 그 밖에 자동차의 배기가스, 담배 연기, 쓰레기 소각가스, 훈제식품 등에 매우 미량이 함유되어 있다.
- [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 벤조파이렌 노출에 대한 특이 유전자후보의 확보 및 검출을 위해, 바다송사리 서브트랙티브 cDNA 라이브러리(subtractive cDNA library)를 구축하였으며, 이를 이용하여 벤조파이렌에 의해 발현량이 증가되는 유전자를 발굴함으로써, 벤조파이렌 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 벤조파이렌(benzo[a]pyrene)의 노출에 의해 과발현되는 바이오마커, 및 상기 바이오마커를 이용한 벤조파이렌에 대한 노출 여부를 확인하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- [0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 벤조파이렌(benzo[a]pyrene)의 노출에 의해 과발현되는 것을 특징으로 하는 벤조파이렌 노출 여부 확인용 바이오마커를 제공한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커 유전자 염기서열의 전부 또는 일부를 포함하는 cDNA 단편, 올리고뉴클레오티드, 상기 cDNA 단편에 상보적인 유전자 단편, 또는 상기 올리고뉴클레오티드에 상보적인 올리고뉴클레오티드 분자가 집적된 벤조파이렌 노출 여부 확인용 마이크로어레이를 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커를 이용한 벤조파이렌 노출 여부 확인 방법을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 마이크로어레이를 포함하는 벤조파이렌 노출 여부 확인용 키트를 제공한다.
- [0011] 아울러, 본 발명은 상기 바이오마커 유전자에 상보적이고 바이오마커 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머를 포함하는 벤조파이렌 노출 여부 확인용 키트를 제공한다.

효과

- [0012] 본 발명의 벤조파이렌(benzo[a]pyrene)에 대한 노출 여부 확인용 바이오마커(biomarker) 및 이를 이용한 확인

방법은 환경 시료에서 벤조파이렌의 오염을 모니터링 및 관정하는데 유용하게 사용될 수 있으며, 벤조파이렌에 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 벤조파이렌(benzo[a]pyrene)의 노출에 의해 과발현되는 것을 특징으로 하는 벤조파이렌 노출 여부 확인용 바이오마커를 제공한다.
- [0015] 본 발명은 하기와 같이 구성된 군에서 선택되어지는 것을 특징으로 하는 바이오마커를 제공한다:
- [0016] 서열번호 1로 기재되는 유전자(1-Cys peroxiredoxin), 서열번호 2로 기재되는 유전자[AdaPtin, Small chain(clathrin associated complex) family member(aps-2)(aps-2)], 서열번호 3으로 기재되는 유전자(Adaptor related protein complex 2), 서열번호 4로 기재되는 유전자(apolipoprotein A-IV3), 서열번호 5로 기재되는 유전자(ATP synthase beta-subunit), 서열번호 6으로 기재되는 유전자[Betaine aldehyde dehydrogenase(Aldh9A1)], 서열번호 7로 기재되는 유전자(Complement component C3-1 mRNA), 서열번호 8로 기재되는 유전자(Complement component C8 beta), 서열번호 9로 기재되는 유전자[Cytochrome P450 1A(CYP1A) mRNA](DQ 660328), 서열번호 10으로 기재되는 유전자(Fibrinogen beta chain precursor), 서열번호 11로 기재되는 유전자[Similar to Glucose-6-phosphatase(G6Pase)(G-6-Pase), transcript variant 1], 서열번호 12로 기재되는 유전자(Heat shock protein 70)(DQ 660324), 서열번호 13으로 기재되는 유전자[LBP/BPI-2 mRNA for LBP(LPS binding protein)/BPI(bactericidal/permeability-increasing protein) like-2], 서열번호 14로 기재되는 유전자[Legumain(lgmn)], 서열번호 15로 기재되는 유전자(NADH dehydrogenase subunit 5), 서열번호 16으로 기재되는 유전자[Similar to NPC1(Niemann-Pick disease, type C1, gene)-like 1 mRNA], 서열번호 17로 기재되는 유전자(PolyA binding protein), 서열번호 18로 기재되는 유전자(Receptor tyrosine kinase proto-oncogene), 서열번호 19로 기재되는 유전자(Ribosomal protein L9), 서열번호 20으로 기재되는 유전자(Ribosomal protein L15)(DQ 660321), 서열번호 21로 기재되는 유전자(Transferrin), 서열번호 22로 기재되는 유전자(Warm-temperature-acclimation-related-65), 서열번호 23으로 기재되는 유전자[Zinc finger RNA binding protein(zfr)].
- [0017] 본 발명자들은 벤조파이렌에 대한 노출 여부 확인용 바이오마커를 발굴하기 위하여, 바다송사리를 벤조파이렌에 노출시킨 후 간세포로부터 서브트랙티브 cDNA 라이브러리(subtractive cDNA library)를 구축하여 발현량이 변화하는 유전자들을 조사하였다. 구체적으로, 벤조파이렌이 노출되거나 되지 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, 벤조파이렌의 노출에 의하여 발현이 증가한 유전자 23개를 얻었다(표 1 참조). 따라서 상기 유전자들은 본 발명에서 사용한 벤조파이렌을 처리했을 때 유전자들의 발현에 변화가 있으므로, 벤조파이렌의 노출 여부를 검출할 수 있는 바이오 마커(biomarker)로 기능할 수 있음을 알 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커 유전자 염기서열의 전부 또는 일부를 포함하는 cDNA 단편, 올리고뉴클레오티드, 상기 cDNA 단편에 상보적인 유전자 단편, 또는 상기 올리고뉴클레오티드에 상보적인 올리고뉴클레오티드 분자가 집적된 벤조파이렌 노출 여부 확인용 마이크로어레이를 제공한다.
- [0019] 상기 올리고 뉴클레오티드 또는 이의 상보가닥 분자는 상기 바이오마커 유전자의 20 내지 50개의 핵산을 포함하고, 바람직하게는 25개의 핵산을 포함한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커를 이용한 벤조파이렌의 노출 여부 확인하는 방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명은
- [0022] 1) 실험군인 바다송사리 유래 간세포와 대조군인 바다송사리 유래 간세포에서 각각 RNA를 분리하는 단계;

- [0023] 2) 단계 1)의 실험군 및 대조군의 RNA로부터 cDNA로 합성하면서 실험군과 대조군을 각기 다른 형광물질로 표지하는 단계;
- [0024] 3) 단계 2)의 각기 다른 형광물질로 표지된 cDNA를 상기 바이오마커 유전자 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 그의 상보적인 올리고뉴클레오티드가 집적된 마이크로어레이와 혼성화시키는 단계;
- [0025] 4) 단계 3)의 반응한 마이크로어레이를 분석하는 단계; 및
- [0026] 5) 단계 4)의 분석한 데이터에서 본 발명의 바이오마커의 발현 정도를 대조군과 비교하여 확인하는 단계를 포함하는 벤조파이렌의 노출 여부 확인방법을 제공한다.
- [0027] 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.
- [0028] 상기 방법에 있어서, 단계 4)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.
- [0029] 또한, 본 발명은
- [0030] 1) 실험군인 바다송사리 유래 간세포와 대조군인 바다송사리 유래 간세포에서 각각 RNA를 분리하는 단계;
- [0031] 2) 단계 1)의 RNA를, 제 1항의 바이오마커 유전자에 상보적이고 바이오마커 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머를 사용하여 실시간 RT-PCR(Real-time reverse transcript polymerase chain reaction, qRT-PCR)을 수행하는 단계; 및
- [0032] 3) 단계 2)의 유전자 산물을 대조군과 비교하여 발현 정도를 확인하는 단계를 포함하는 벤조파이렌에 대한 노출 여부 확인 방법을 제공한다.
- [0033] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 프라이머는 본 발명에서 탐색된 바이오마커 유전자와 상보적이고, 바이오마커를 증폭할 수 있는 프라이머라면 모두 사용가능하다.
- [0034] 또한, 본 발명은 상기 마이크로어레이를 포함하는 벤조파이렌의 노출 여부 확인용 키트를 제공한다.
- [0035] 상기 키트는 추가적으로 형광물질을 포함할 수 있으며, 상기 형광물질은 스트렙타비딘-알칼린 포스파타제 접합물질(streptavidin-alkaline phosphatase conjugate), 화학형광물질(chemifluorescent) 및 화학발광물질(chemiluminescent)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 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.
- [0037] 아울러, 본 발명은 상기 바이오마커에 상보적이고 바이오마커를 증폭할 수 있는 프라이머를 포함하는 벤조파이렌의 노출 여부 확인용 키트를 제공한다.
- [0038] 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

- [0039] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- [0040] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] <실시예 1> 물고기의 배양 및 화학물질 처리
- [0042] <1-1> 바다송사리의 배양
- [0043] 인천소재의 클릭피쉬사에서 구입한 바다송사리를 세 종류의 필터(100, 10 및 1 μm)를 거친 자연해수에 배양하였다. 수중 히터를 이용하여 수온은 25℃로 고정하였으며, 하루에 한번 아르테미아(Artemia) 유생을 먹이로 공

급하였다.

[0044] <1-2> 벤조파이렌의 처리

[0045] 상기 실시예<1-1>의 바다송사리 슷컷을 벤조파이렌 100 ppb에 24시간 동안 노출하였다. 벤조파이렌은 0.1% DMSO에 녹여 10,000 ppm으로 적정하여, 100,000배 농축액을 만들었다. 바다송사리는 배양수조에서 여과된 해수 1.5 L가 담긴 2 L 비이커로 10 마리씩 옮기고, 24시간 동안 순치시켰다. 실험군에는 100,000배 벤조파이렌 농축액 15 μ L, 대조군에는 0.1% DMSO 15 μ L를 첨가하였다. 24시간 동안 배양 후, 바다송사리를 한 마리씩 얼음물로 옮겨, 순간적으로 기절시킨 후, 머리를 잘라내고, 배를 갈라, 간을 적출하였다.

[0046] <실시예 2> 벤조파이렌에 의한 유전자 변화 측정

[0047] <2-1> RNA의 분리

[0048] 상기 실시예 <1-2>에서 수득한 벤조파이렌에 노출한 시험군 및 노출하지 않은 대조군의 간을 TriReagent(Molecular Research Center Inc.)에 넣고, glass homogenizer를 이용하여 조직을 과쇄하였다. 상기 과쇄된 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°C에서 보관하였다. 상기 전체 RNA로부터 Oligotex mRNA mini Kit(Qiagen, CA, USA)를 사용하여 mRNA를 정제하였다. 즉, 추출한 전체 mRNA를 dC₁₀T₃₀ 올리고뉴클레오티드와 결합되어있는 polystyrene-latex 입자와 혼합하여, mRNA만을 선택적으로 입자에 결합시킨 후, 원심분리하였다. 침전된 mRNA-oligotex 결합물을 kit에 포함되어있는 세척용액으로 세척하고, 재현탁하여, 원심분리한 후, 상등액을 제거하였다. Kit에 포함되어있는 추출용액을 이용하여 mRNA와 oligotex를 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°C에서 보관하였다.

[0049] <2-2> cDNA 합성 및 subtractive cDNA library의 작성

[0050] PCR-selected™ cDNA Subtraction kit(CLONTECH, USA)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라서 cDNA Subtraction을 수행하였다. 구체적으로, <2-1>에서 정제한 전체 mRNA(1.0 μ g)를 주형으로, SMART IV Oligonucleotide 및 CDS III/3' PCR Primer를 primer로 이용하고, PowerScript RT-ase를 반응 효소로 사용하여, 대조군과 실험군의 cDNA를 합성하였다. 합성된 first strand cDNA를 주형으로 5' PCR Primer 및 CDS III/3' 프라이머로 polymerase mixture를 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 Second strand cDNA를 4M NH₄OAc와 95% 에탄올로 침전시키고, 80% 에탄올로 세척한 후, 물 50 μ l에 녹여, 대조군과 실험군의 ds cDNA가 준비하였다. 합성된 대조군과 실험군의 ds cDNA를 제한효소 RsaI으로 각각 처리하여, blunt-end인 단편을 만들고, 실험군의 cDNA 시료를 둘로 나누어 각각에 다른 종류의 adaptor를 부가시켰다. Adaptor가 부가되지 않은 대조군의 cDNA와 adaptor가 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 adaptor에 특이적인 프라이머를 이용하여 1차 PCR을 수행하고, nested 프라이머를 이용하여 2차 PCR을 수행하여, 벤조파이렌 노출에 의해 발현량이 증가된 유전자 후보들을 증폭하였다. 증폭된 cDNA 단편들을 pGEM T-Easy vector(Promega Inc.)에 재조합하고, *E. coli*(DH5 α) 반응능 세포(competent cell)에 도입하여, 형질전환함으로써 subtractive cDNA library를 완성하였다.

[0051] <2-3> 특이 유전자 후보의 염기서열 분석

[0052] 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 앰피실린(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 벤조파이렌을 검출할 수 있는 바이오 마커(biomarker)로 기능할 수 있음을 알 수 있다.

표 1

[0053]

등록번호	유전자명	서열
	1-Cys peroxiredoxin	서열번호 1
	AdaPtin, Small chain (clathrin associated complex) family member (aps-2) (aps-2)	서열번호 2
	Adaptor related protein complex 2	서열번호 3
	apolipoprotein A-IV3	서열번호 4
	ATP synthase beta-subunit	서열번호 5
	Betaine aldehyde dehydrogenase(Aldh9A1)	서열번호 6
	Compleat component C3-1	서열번호 7
	Complement component C8 beta	서열번호 8
DQ 660328	Cytochrome P450 1A (CYP1A) mRNA	서열번호 9
	Fibrinogen beta chain precursor	서열번호 10
	Similar to Glucose-6-phosphatase(G6Pase)(G-6-Pase), transcript variant 1	서열번호 11
DQ 660324	Heat shock protein 70	서열번호 12
	LBP/BPI-2 mRNA for LBP (LPS binding protein)/BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) like-2	서열번호 13
	Legumain (lgmn)	서열번호 14
	NADH dehydrogenase subunit 5	서열번호 15
	Similar to NPC1(Niemann-Pick disease, type C1, gene)-like 1 mRNA	서열번호 16
	PolyA binding protein	서열번호 17
	Receptor tyrosine kinase proto-oncogene	서열번호 18
	Ribosomal protein L9	서열번호 19
DQ 660321	Ribosomal protein L15	서열번호 20
	Transferrin	서열번호 21
	Warm-temperature-acclimation-related-65	서열번호 22
	Zinc finger RNA binding protein(zfr)	서열번호 23

서열 목록

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

<130> 8p-05-59

<160> 23

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 395

<212> DNA

<213> 1-Cys peroxiredoxin from Oryzias javanicus

<400> 1

taccgccca ccacaggag gaactttgat gagatcctcc gagccatcga ctcctgcag

60

ctgactgcac agaagaaagt cgccacgccc gttgactgga agcccggcga taaggtcatg 120
 gtcattccct cccttttga cgctgaagct gcttcccttt tccctaacgg ggtgacgacc 180
 aaagattttc cttttgaaa gaaatactg cgttacactc agccctgaac acctggggtt 240
 ttgctggagc ttcatactg ataggctgag aaaattttac caatctcact ttgtgatttg 300
 gagaatcatt ttggtattta gcccgatcac tgtgaagtgc cttgtttacc taaaataaaa 360
 acacttttcc cagaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 395

<210> 2
 <211> 466
 <212> DNA
 <213> adaptin from *Oryzias javanicus*

<400> 2
 acgagacgcc aaacacacga attttgttga attcaggaat ttcaagattg tttatagaag 60
 atatgctggg ctatatttct gtatttgtgt tgatgttcag gacaacaacc tctattactt 120
 ggaagccata cacaactttg ttgaagtttt gaatgaattc tttcataatg tttgtgagct 180
 tgatttagta ttcaattttt ataaggttta tgcgtgttgt gatgaaatgt ttttagctgg 240
 ggagatccgt gagacaagcc agagtaaagt cctgaaacaa ctacaaatgc tgcaacaatt 300
 agaatgattc tttcatattt ttggaatatt taaaacagaa tgaagatatg cgtatgatat 360
 acacatatat ttgacagtga ttgactattt tgttgctgat agaaagctgt acctgcccgg 420
 gcggccgctg aaatcgaatt cccgcccggc ccatggcggc cggagc 466

<210> 3
 <211> 273
 <212> DNA
 <213> Adaptor related protein complex 2 from *Oryzias javanicus*

<400> 3
 gtacgagacg ccaaacacac gaattttgtt gaattcagga atttcaagat tgtttataga 60
 agatatgctg gtctatattt ctgtatttgt gttgatgttc aggacaacaa cctctattac 120
 ttggaagcca tacacaactt tgttgaagt tgaatgaat tctttcataa tgttttgag 180
 ctgatttag tattcaattt ttataagggt tatgctgttg ttgatgarat gtttttagct 240
 ggggagatcc gtgagacaag ccagagtaaa gtc 273

<210> 4
 <211> 711
 <212> DNA
 <213> apolipoprotein A-IV3 from *Oryzias javanicus*

<400> 4
 catatttate accttatttc aaataagtta cacaaattaa aaaacggtca cagttttgaa 60
 cttttttttg taaaacaat atttaccatgt ttgacaagtg cagagcttcc atcttttaag 120
 caataaatat ttccactgc gtaattgaaa ttatagcagc ccaagacatc taagctattg 180
 tgtatcaaag aaatgtaaac cagcaggcc aggatcttct tcagtttttag ttgcattga 240
 cataggactg gtagagagac atgagctggg cctggaggtc ctgtgcataa ggggccagct 300
 tttctctgag gtcttcagcg tagggcgcca ccatctgctt caccagattt gctcgtgac 360
 tgagctccag ctgaaccttc tcggatcatgg gggccacact tttttggaat ttctgcaggt 420
 gctgggccac ctctgcttg aggtcatcag tgaaggtcc cagctgggcc tgcaggtcct 480
 tcacactctg ctccaggttg gtcttcagct cctcgtcttt ctgcagcaag gttgctctca 540
 gggcctctga gtcggcgtaa ggggacaggt cctgcttgag tttttccacc ctctggtctc 600
 ctcccgtga ggaggaggag gagcaggcgg aacctgcagc cgcaccggcg gacggggacg 660

aggagcagca agctgctgat gaggagccca cggagaacgg ggagaaggcg g 711

- <210> 5
- <211> 503
- <212> DNA
- <213> ATP synthase beta-subunit from *Oryzias javanicus*

<400> 5
ccagccact ctggccacag acatggggac catgcaggag aggatcacca ccaccaagaa 60

gggtccatc acgtctgtgc aggccatcta cgtgcccgct gacgatctga ctgaccccg 120

cccggccacc accttcgctc acttggacgc caccaccgta ttgtcccgcg ccatcgccga 180

gctgggcate taccgccgctc tcgaccgct ggactccacc tcccgtatca tggaccctaa 240

catcgtcgge gccgagcact acgacgctgc ccgtggcgctc cagaaaatcc tccaggacta 300

caaatccctg caggacatca tcgccatcct gggaatggac gaggttgtccg aggaggacaa 360

gctgacggtg gcccgcgccc gcaagatcca gcgtttcctg tctcagcct tccaggtggc 420

cgaggtcttc accggtcacc tgggcaagct ggtgccctc aaagaaacca tcaaaggctt 480

caaagccatc ctggaggcg agt 503

- <210> 6
- <211> 719
- <212> DNA
- <213> betaine aldehyde dehydrogenase (Aldh9A1) from *Oryzias javanicus*

<400> 6
tcccctctgc ttgcatctct aacaaaatgt cgtggctac tctggactcg atggcgagg 60

cctccacggg gaccgtgaca gtgaccgagc agctcaactt ttgggccgga aagccttag 120

ggggtcggaa cagcgagcgc gcggagcccg tgttcgagcc tgccacaggc cgggtcctgt 180

gtcagatggt gccctgtgga gctgaggagg tggatgaagc cataaagagc gctcactctg 240

cctacgtgca gtggagcaag aaggctggca tggagagggc ccgggtgatg ctggaggcag 300

ctcgcataat cagggaagg agagagaaga tcgcaaagct ggaagtgatc aacaatggca 360

agtccatcac tgaagctctg gtggacatcg acatcgctg gcagtgatt gagtactatg 420

ccgtctggc tggactctt gcaggtcagc acgtccagct gcctgggga gcctttgctt 480

acactaggag ggagcccctt ggcgtgtgcg tgggaatcgg tgcgtggaac taccctttcc 540

agattgcagc gtggaagtcc gctccggctc tggcatgtgg gaacccatg gtgtttaagc 600

cgtecccctt cagcctgtg accgcagtca tactggcaga gatctacaaa gaggcggggg 660

tcctgatgg gctcttctgt gtcgtccagg gtggagcgga gacgggctcc ctgctgtgc 719

<210> 7
 <211> 767
 <212> DNA
 <213> Complement component C3-1 mRNA from *Oryzias javanicus*

<400> 7

ggctcttcaa ctgctgctgg cctctctggc cttggtgtct ctcattaatg cggaccact 60

gaacctgatg tctgccccca acctgctgcg agtgggaaca gcagaaaaca tctttgtgga 120

atgtcaggac tgcagcgggg cggaccaact cgtcaatatc tctgttaaaa acgttccgac 180

aaagaccaga acatttgcaa acacacaagt aacctcacc aatgcaaaa gcttccaagg 240

ctttgcaaag atctttatcg ctctgaaga attcagcaag gatccaactg taaaacagta 300

tgtctatattg gaagctgtgt tcccaggccg aacctggag aaagtcgtca tgggtctttt 360

ccgtctggg tacattttca tccaaaccga caagacgttg tacacccca acagcaaagt 420

gtattacaga atgtttggtt tgaccctca catggagcca gtagagagag ctaatggtgc 480

ccagactgac acctccatct ccatagagat tgagaccct gaaggtatca tcatgccatt 540

ggaccctagtc tcctccagtc caggaatgca ctctggagac taccagctga atgagattgt 600

cagtccagga ctttggaaaa ttgtggcaaa gttccagaac aaccacagg agagcttctc 660

tgcaaatttc gaggtcaaag aatatgtact cccagcttt gaggtgaagc tctcttcct 720

gagacctttc ttctacgtgg acagtgagac tttggagatt gacatta 767

<210> 8
 <211> 906
 <212> DNA
 <213> Complement component C8 beta mRNA from *Oryzias javanicus*

<400> 8
 acaggcagat cttcagagac tttggcacac actacatcac tgaggccgcc ctcgaggag 60

actttgagca cactatcacc ctaaacaagg agaagctggt gagctcagat tattctctgg 120

aggaatacaa gaattgtgtg caggctggcc ttaacatggg ggcaaacatt tatggacttt 180

acgtgtcagg aggggtttag ggtggatcct gcgacgggct tctgaacgaa atgggagagg 240

acaccaagaa gggcagcatg gtggaggact ttgtcgtgt cgtgaggggg gggagcagcg 300

aaagcatcac tgctttgctg tctaagaaac ttcccagccc acagctgatg aggctgtggg 360

gggaaggcgt gcactataac cccgacttca ttgcatgaa aacgcagccg ctgtatgagc 420

tggtggtctc cagagacttc agctatcatg atactctcaa aagaacctg aagagggccc 480

tgteggagca tctggctgaa tcgagctcgt gtcgctgccc tccctgccac aacaacggag 540

tggctgtttt gaaagtgacg cgggtgtgagt gcgtgtgccc tgtcggctac actggaagga 600

gctgtgaggt cactcaaagg ccaaaagata tctccatcga tggcagctgg agttgttggg 660

gtgctggtc gtcttggga ggtgggaaga agtcccggac cgcacagtgc aacaaccag 720
 cacccaaca cggaggactt gaatgctggg gactgcaaga ggagtcctcc aactgctttt 780
 aatcagcaaa atatggcaaa gatggggaat cgtttgttaa agaacaggtt tttttggct 840
 tgtgccccaa ttcattttaa tccaataaaa acataagaat caaaaaaaaa aaaaaaaaaa 900
 aaaaaa 906

<210> 9
 <211> 312
 <212> DNA
 <213> Cytochrome P4501A from *Oryzias javanicus*

<400> 9
 cgcggccgag gtctctgaat ggttactata tcctaaaga cacatgtgtc ttcacacacc 60
 agtggcagat aaaccatgac ccgaaactgt ggcaggatcc atcatccttt aaccagatc 120
 gtttctgaa tgaagatgga actgaggatca atcggctaga aggagagaaa gtgctggcct 180
 ttggtctggg aaagcgactg tgcatgggg aggtcatcgc acgaaatgaa gttttcctct 240
 ttttgcaat catgattcag aaattgagat ttgaggaagt gccaggggag cctatggact 300
 tgacccca ga gt 312

<210> 10
 <211> 384
 <212> DNA
 <213> Fibrinogen-like protein from *Oryzias javanicus*

<400> 10
 ggcgtttact taattgacc ggatggccaa ggttcattta aagtaagatg tgatagaca 60
 acatcaggag gaggatggac catctttcaa agacgtatcg atggcagtgt caactttctc 120
 cgcaagtgga aagattacaa gaatggtttt ggtgatcctg taagcgaata ttggcttgg 180

ctggataata ttaaacgact tacgaacagt ggttcaaaag ttcttcgaat tgacatggga 240
gacacaacag ggacctctaa gcacgctgaa tatagcttct ttgccattgc ttccgaagtt 300
gctaaataca aaatgagttt ggggacatat tcaggcacgg ccggtgatgc tcttgacaa 360
catcgtggaa tgaattcag tacc 384

<210> 11
<211> 573
<212> DNA
<213> Glucose-6-phosphatase from *Oryzias javanicus*

<400> 11
ggtacctgaa ggtcggcctc tggcttttgt tttggggcgt ccaggtgtgc gtctgcctct 60
cgcggttctt catcgggct cacttcccgc accaggttgt cgctggtgic atcacaggea 120
tgatttgge cgaggccttc aaccgaacc agtggatcta cagcgcagc atgaagaaat 180
actttacac cacgctcttc ctcaectct tgcgggttg cttctacctc gtgctcaaag 240
ctctgggcgt ggacctgctg tggaccctgg acaaagccca gaagtgggic gtcaggcccc 300
agtgggtcca cctggacacc acgcccctcg ccagtctgct gcgcaacatg ggcacgctgt 360
tcggcttggg tctgggcctg cactcggcgc tctacacaga aacaaaaag agcaacagcg 420
cccggtcaa agcagggtgc atcatcagct ctttggctct cctgcatctg ttgactcct 480
tcaagcccc cacccacacc gccgtcctct tctacctgct gtccttctgt aagagcgcca 540
cagtgcctct ggtcacggtt agcatcgtcc cgt 573

<210> 12
<211> 333
<212> DNA
<213> Heat Shock Protein 70 from *Oryzias javanicus*

<400> 12

gtaccagagt gctggtggca tgcctggagg aatgccagag ggcatgccag gaggcttccc 60
 tggagctggt ggtgctgctc ctggtggtgg atcatytgga ccaaccattg aagaagtga 120
 ctaaactc catggcttca cctaagatct ttgaagaaaa gaaacctct ttaagtgcatt 180
 gatgcaatct ataaagagtg taatgagtaa ccagttttct tttattgcta tgacttgagg 240
 aacaagtaat aacttggca ctctctatgg ggtgccatac ataactcatg cactctacaa 300
 taaaagctga aaccacaaaa aaaaaaaaaaaa aaa 333

<210> 13
 <211> 517
 <212> DNA
 <213> LBP BPI-2 from *Oryzias javanicus*

<400> 13
 acgtcaccga cgacatgac ccacgcagct cccccgtccg cctgagcacc tccacgtteg 60
 gcttttctat cccacagatt tcccagcagt tccccgtct gatgatgaag atgctggtga 120
 aggcgacaaa gaacctgtt gtgaagtcc aaccaaacac catgactgtc gacgccacag 180
 ccacagccac ggcttacgcc atccaaccaa acggcacgct gtcaccgctt ttcgtcctca 240
 acgtggagtc cagcgtcagc ggccagatgt cgtgagcaa cctgaagctt gccggacgca 300
 tctcactgga caaatgaaa ctgactctgg gtacctgcc gggcgccgc tcgaaatcga 360
 attcgggcc gcctgcaggt cgaccataig ggagagctcc caacgcgttg gatgcatagc 420
 ttgagtattc tatagtgtca cctaatagc ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct 480
 gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca cacaaca 517

<210> 14
 <211> 539
 <212> DNA

<213> Legumain from *Oryzias javanicus*

<400> 14

acgatgattt agcccataat cctccaatc caactcctgg tatagtcatt aacaagcctc 60
 atggaccaga tgttatcac ggagttccga aagattacac cggaaaggaa gtcactcaa 120
 agaacttttt gagtgcactg aaaggagaga gagacgcgtt gagaggaaaa ggcagtggga 180
 aagtaatcga cagtggccca aatgataatg tttttgtata ttttctgac cacggagccc 240
 ctgggttgat tgctttcct gatgttctc cagttttaaa aaagaacaa ctcttagacg 300
 ccttgaagtt catgcacgca aaaaataagc acctcggcgg cgaccacgct aatcactagt 360
 gaattcgagg ccgctgcag gtcgaccata tgggagagct cccaacgcgt tggatgcata 420
 gcttgagtat tctatagtgt cacctaata gcttggcgta atcatggtca tagctgtttc 480
 ctgttgaaa ttgtatccg ctcaaatc cacacaacat acgagccgga agcataaag 539

<210> 15

<211> 781

<212> DNA

<213> NADH dehydrogenase subunit 5 from *Oryzias javanicus*

<400> 15

tatcatatcc tcagcctca tctcacaact taccttacta gccctgccca tctttgggac 60
 ccttaaacc cgeccctact cggcctttg ggcattaaag gctgcaaaaa ctgcagtcaa 120
 agcatcattc tttgttagcc tctccccct atttattttc ctagaccaag gtactgagac 180
 cattgtaacc aactggcaat gaatgaacac actaatattt aatattagta tcagttcaa 240
 atttgacttg tactcaatta tttcacacc cgttgcctc tacgtgacct ggtctatfff 300
 agagtttggc tcttggata tacacagtga tcttgtatg aaccgcttct tcaagtatct 360

gctagtattt cttattgcca taattacct agtgacagcc aacaacatat ttcaaatctt 420
 catcggctga gaaggagtag gaatcatgic tttctgctc atcggctgat gattcggacg 480
 agccgacgcc aacaccgagg ccctacaggc cgtcgtatac aaccgggtcg gcgacatcgg 540
 gctaactttg gccatagcat gaatagcagt taagctaac tctgagaaa tacagcaact 600
 ctttgccctt tcagcagact acgacataac cctgcccta tttggcctcc tagtcgctgc 660
 aacaggcaaa tccgccaat ttggtctgca cccatggcta ccctcagcca tggaaagtcc 720
 tacgccggtc tctgccctac tgcattcaag caccatagtg gtagctggca tcttcctgct 780
 t 781

<210> 16
 <211> 451
 <212> DNA
 <213> NPC1 from *Oryzias javanicus*

<400> 16
 caggcggccg cgaattcgat tagcgtggtc gcggccgagg taccaggac ttctccagac 60
 tttgaagtgt tcacttacac gctgactaat gtgttttatg agcagtattt gaccattgtg 120
 ccagagggac tgitcaacat ctgcatgtgt ctgctgcaa ccttcgtggt gtgctgcctt 180
 ctgctgggtt tagatctcgc atctggcctg ctcaacctga tcaccatcat catgattgtt 240
 gtggacaccg tcggtgtcat gactttgtgg agcattgatt acaatgcagt gtccctgatc 300
 aatctggtga cggcgggtgg aatttcagtg gagtttgtgt cccacatgac cagatccttt 360
 gccctcagca ctaaaccac acgtgtagaa agagctgcag atgccacagc caacatgggt 420
 agtgcagtgt ttgctggtgt tgcaatgacc a 451

<210> 17

<211> 367
 <212> DNA
 <213> PolyA binding protein from *Oryzias javanicus*

<400> 17
 acaagatgaa tgcTgcagct ccaagtaact atccgatggc tacgctttat gtaggagatt 60
 tagctcctga tgTcaacgaa gctgttcttt ttgacaaatt cagtgcgact ggcccgtag 120
 tatcgattcg tgTttgccgt gatttggcaa ctgcagttc ttgggatata gcttatgtca 180
 attttcaaca atcggcagac gcggaagag cgctggatgc gatgaatTTT gaaccgatca 240
 agggccgacc atgtgcatt atgtggtgtc aacgtgatcc ttctttgcga agatctggcg 300
 tcggaatat ctttatcaag aatctagata agaatatcga taacaaggcc ttgtacctgg 360
 ccccggg 367

<210> 18
 <211> 633
 <212> DNA
 <213> Receptor tyrosine kinase proto-oncogene from *Oryzias javanicus*

<400> 18
 agagagaggt ggacggcaga tgtgtccagt gTcaccaga atgcttggTg aagactggga 60
 ccccgacctg ccacggaccg gggTcagacc agTgttccca gTgtgccac tTtaaagatg 120
 gTcTccactg cgtgctgagg Tgccccacg gagTtctcga Tgacgagagc acgccgattt 180
 ggaaatacgc Tgatccggag ggccagtgcc agctgtgcca Tcagaactgc actcaggggt 240
 gTaccggggcc aggactgtcg Tggtgcttga ggcagaggcg gTtctagcta gTttggcgt 300
 ggCaggactc agccagtcat gcctccctcc gaccaccaga gagagctctc gccagaattc 360
 tagctgctgc Tcaccttccc atcatgcacc agcctccggt cctcaccagc Tgattcccgt 420
 cacgtcatca ccaagactgt Tfacattctt ctttctctct ttcttctttg cgtagtctat 480

aaccgtgttc tcttgttcgt tcagctcag cgttttetta atgattgtct gcccggttc 540

tgaccttttg cctgtgttcc tcgctcccg cctcgtccct gcgcttgtt tttggactac 600

gaagctctct ttgtgattaa aacagttgat cct 633

- <210> 19
- <211> 410
- <212> DNA
- <213> Ribosomal protein L9 from *Oryzias javanicus*

<400> 19
 acatccgccg ggcagaatg agagctggig tgaattgttc agtgtccgct tcccagaagg 60

atgagctggt cctggagggt aatgacattg agctggttcc aaactctgct gccctgatcc 120

aacaggctac cacagtcaaa aataaggata tcagaaagtt cttggacggc atttacgttt 180

ctgagaaagg aacagtagtg gaaccagaac agtaaaagtt acatctgcac ttgtagagcg 240

gctttgatcc agcaggccac cacagtgaga aagaaggaca tcagaaagtt cttggatggc 300

atctatgtga gcgaaaggac cactgtggig gaaccagcca gtgaataaat gttcagattc 360

tgctatgacc aataaaataa cctttttcca gcttaaaaaa aaaaaaaaaa 410

- <210> 20
- <211> 461
- <212> DNA
- <213> Ribosomal protein L15 from *Oryzias javanicus*

<400> 20
 caaagggtcc acgtacggca agccagtgca ccacgggtgtg aaccagctca agtttgctcg 60

cagcctccag tcattgctg aggagcgtgc cggtegccac tgcggcgccc tgcgagtgct 120

caactcctac tgggtcgggg aggactccac ctacaagttc tttgaggtga tctgatcga 180

ccccttccac aaggccgtca gacgcaacc ggacaccag tggatcacia aggccgtgca 240
 caagcacagg gagatgcgcg ggctgacctc tgcaggaag aagagccgag gcctgggcaa 300
 gggccacaag ttccacctga ccatcggagg ctcccgccgc gccgctgga agaggcgcaa 360
 caccctgcag ctgcaccgtt atcgtaggc tgcgccacac gtctgtacct gcccgggcgg 420
 ccgctcgaaa tcgaattccc gcggccgcca tggcggccgg a 461

<210> 21
 <211> 426
 <212> DNA
 <213> Transferrin from *Oryzias javanicus*

<400> 21
 ttcagtgcc tggctgaggg agcaggcgat gtcgattca tcaagcacac gattgttagt 60
 gaaaacaccg atggtaaagg tcccgaatgg gctcgcagcc tggaatctga cgactaccag 120
 ctgatctgcc ctggaaagcg tccaatggcc atctctgaat ttgctaattg taatttgccg 180
 gttgtgcctg cacacgcagt agtgaccctg ccagagagcc gcagtgatgt tgtgcgcatc 240
 ctccaggttc agcagacttt ctttggagcc agtgggagcg atccttcctt caaactcttc 300
 caatcagaga atggaaacaa cctcctcttc aaggactcca ccaagtgtct ccaggaggtt 360
 tctgctggaag agagcttcga tcagtttttg ggagccgagt acctcggccg cgaccacgct 420
 aatcac 426

<210> 22
 <211> 732
 <212> DNA
 <213> Warm-temperature-acclimation-related-65 from *Oryzias javanicus*

<400> 22
 tccagcggga gacgacttca gcaggacaag gatggcgccg atcttcaaga ctgtctttgt 60

ggccctaag gtggccctca cacaggcggc cccattggag gattcagcag caggcgggtg 120

agatgccgct ttgccagatc gatgtcggg taccgagttt gatgcatca ccctgacga 180

caagggtcaa acitttttct tcaaagggga tcacgtttgg aaggccttg agggtgacgc 240

tcaaccagcc attcagtaact ttaaggagtt aaacggccat gttaatgctg ctttcctat 300

gcacaacca gagaaccaag gtgaccacga ccatactac ctttcctgg atgacaaagt 360

gttcagttac ttgatcaca ctcttgagga aggctatcca aaagaaatcc aagaggactt 420

tcctggagtt cccaccacc tggatgcggc tgtggagtgt cccaaggag agtgcgtcac 480

cgattccatt ttgttttca aaggtcagga tgtgcacgtt tatgatattg ccacaaagac 540

tgtgaagacc aagacatggc cccaacttcc tgectgtacc tccgtcttcc gctggttga 600

gcaactattat tgtttccatg gacacaactt cacccgtttt caacctgtaa cgggggaggt 660

gaccggtagt taccceaagg acgcccagag gtatttcatg cgctgccccg actttgtca 720

tggaggcga gc 732

<210> 23
 <211> 389
 <212> DNA
 <213> Zinc finger RNA binding protein

<400> 23
 acgaagtga gggatccatc caggaagcgg ccatcgttct gacgtcctgc ggcgatcaa 60

agatgcaagt gacaatcacg ctgacgtcgc ccgtcatccg ggaggaggcc ggtcgggaag 120

gagatgtaac ctcggtttg gtgaaagacc cagcggacgt cttggacagg caaaaatgcc 180

ttgacgtttt ggetgctctg cgccacgcta agtggttcca ggctagagcc gacggtcttc 240

agtctgtgt gatcatcacc cggatcctga gagacctctg ccagcgagtc tccacgtgtt 300

cccccttccc cggatgggcc atggagctgc tggaggaaaa ggccatcagc agcgctcgg 360

cgccctcag cccggggcgg ccgctcgaa 389