



등록특허 10-2525536



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년04월26일

(11) 등록번호 10-2525536

(24) 등록일자 2023년04월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6888 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6888 (2018.05)

C12Q 2531/113 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0013746

(22) 출원일자 2023년02월01일

심사청구일자 2023년02월01일

(56) 선행기술조사문헌

국립생물자원관 2018년도 최종보고서 차세대 염기서열 분석기반 동물자원 디지털염기서열 활용 연구 (2018.12.)

KR102366536 B1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

국립생태원

충청남도 서천군 마서면 금강로 1210 ()

(72) 발명자

차덕재

경상북도 영양군 영양읍 낙원로 60, 501호(신아아파트)

이혜린

경상북도 영양군 영양읍 영양창수로 91, 409호(은성그린아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인이룸리온

전체 청구항 수 : 총 8 항

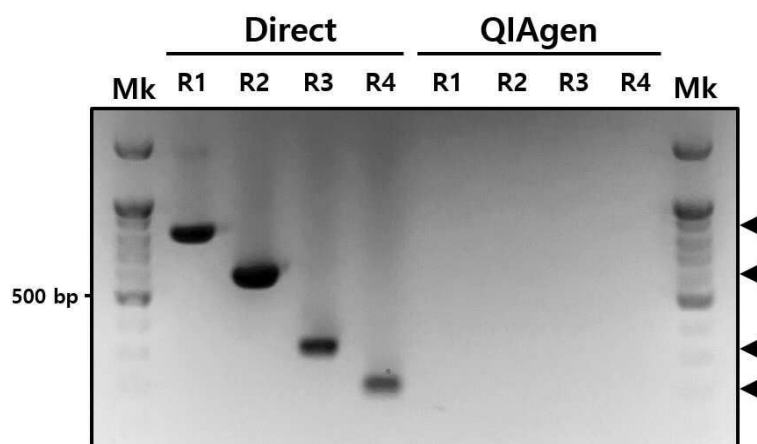
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 수염풍뎅이 동정용 프라이머 세트 및 이를 이용한 종 동정 방법

(57) 요약

본 발명은 수염풍뎅이(Polyphylla laticollis manchurica) 배설물 내 잔류 유전물질 동정용 프라이머 세트 및 이를 이용한 수염풍뎅이의 동정 방법에 관한 것으로, 본 발명의 프라이머 세트는 수염풍뎅이를 가해하지 않으면서 멸종위기종인 수염풍뎅이를 동정할 수 있는 프라이머 세트 및 종 동정 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/124 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

(72) 발명자

김황

경상북도 영양군 영양읍 시장2길 19, 401호(이다움
파크빌)

김만년

경기도 의정부시 추동로 45(신곡동, 극동·동성아
파트)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 이루어진 정방향 프라이머; 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 역방향 프라이머;를 포함하는 수염풍뎅이(*Polyphylla laticollis manchurica*) 동정용 프라이머 세트로서,

상기 프라이머 세트는 수염풍뎅이의 배설물을 시료로 하는, 수염풍뎅이 유충 배설물 동정용 프라이머 세트.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 배설물은 수염풍뎅이 체외로 분리된 상피세포를 포함하는, 수염풍뎅이 유충 배설물 동정용 프라이머 세트.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항 또는 제3항의 프라이머 세트를 포함하는, 수염풍뎅이 유충 배설물 동정용 키트.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 키트는 증폭 반응용 DNA 중합효소, dNTPs, 및 반응 버퍼를 추가로 더 포함하는 것을 특징으로, 수염풍뎅이 유충 배설물 동정용 키트.

청구항 7

i) 배설물로부터 gDNA를 분리하는 단계;

ii) 상기 단계 i)에서 분리한 gDNA를 주형으로 하고 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 정방향 프라이머; 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 프라이머 세트를 이용하여 표적 서열의 증폭 반응을 수행하는 단계; 및

iii) 상기 단계 ii)의 증폭된 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 수염풍뎅이 유충 배설물의 동정 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 단계 ii)에서 표적 서열은 수염풍뎅이 cytochrome B 인, 수염풍뎅이 유충 배설물의 동정 방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 iii) 단계 이후 iv) PCR 증폭 산물의 비교를 통한 수염풍뎅이와 사슴벌레와의 종 동정 확인 단계를 추가로 포함하는, 수염풍뎅이 유충 배설물의 동정 방법.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 iii) 단계의 검출은 전기영동을 통한 DNA 밴드 형성여부 또는 발광물질을 이용한 형광발색 여부를 확인하는, 수염풍뎅이 유충 배설물의 동정 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 수염풍뎅이의 종 특이적 프라이머 세트와 이를 이용한 비-손상 종 동정 방법에 관한 것이다. 구체적으로 본 발명은 대상종인 수염풍뎅이에 피해를 가하지 않고, 유전학적인 방법을 사용하여 수염풍뎅이와 근연종을 동정할 수 있는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 수염풍뎅이(Polyphylla laticollis manchurica)는 멸종위기 야생생물 I 급이자 국가적색목록(Red List)에서 위급(CR)으로 지정하여 관리하고 있는 종이다. 이들은 과거에는 우리나라 전 지역에 서식했지만, 현재는 금강 주변의 논산, 부여, 청주와 같이 일부 지역에서만 확인되고 있다. 수염풍뎅이의 몸 길이는 30~37mm로, 국내에 서식하는 검정풍뎅이과 중 가장 큰 종이다. 몸 색깔은 붉은 빛이 도는 짙은 갈색으로, 딱지날개에는 매우 짧은 회백색 내지 황백색의 비늘털이 얼룩무늬를 이루고 있다. 수염풍뎅이는 알에서 성충까지 약 3~4년이라는 긴 생활사를 가지고 있다. 유충은 땅 속에서 식물의 뿌리를 먹으며 생활하고, 다 자란 유충은 6월경 번데기 과정을 거쳐 그해 7월경 성충으로 탈피한다. 이러한 수염풍뎅이를 건강하게 인공증식하기 위해서는 누대사육에 의한 동일개체군의 교배에 따른 유전적 도태를 사전에 방지할 필요성이 있다. 그 방법으로는 유전적으로 다른 개체끼리 교배시켜 유전적 다양성을 풍부하게 유지하는 방법이 있다. 하지만 각 수염풍뎅이 개체에 대한 유전정보를 취득하기 위해서는 대상종 조직을 채취해야 하므로 폐사의 위험성이 높다. 따라서 일반적인 유전정보를 취득하기 위한 조직 시료 채취는 멸종위기종을 대상으로 적용하기는 적합하지 않다.

[0003] 이에, 수염풍뎅이에 피해를 가하지 않고 특정 유전서열을 증폭할 수 있는 방법의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-1395938호 (2014.05.09)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 수염풍뎅이 동정용 프라이머 세트를 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 프라이머 세트를 이용한 수염풍뎅이 동정 방법을 제공하는 것이다.

[0007] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명자들은 수염풍뎅이 유전서열 중 개체군 집단 변이를 확인할 수 있는 미토콘드리아 내 전자전달계 단백질 중 하나인 Cytochrome b 유전자 내 서열 중 수염풍뎅이의 유전서열에 선택적으로 반응하여 증폭되는 종 특이 프라이머를 개발하였으며 그 증폭 방법에 대해 정립하였다. 또한, 수염풍뎅이 배설물 내 잔류하는 유전물질을 추출하여 수염풍뎅이를 가해하지 않으면서 개체 분류를 할 수 있는 방법을 적용하였다. 본 발명의 수염풍뎅이 종 특이 프라이머 및 배설물을 활용한 비-손상 개체군 분류 방법을 통해 멸종위기종인 수염풍뎅이를 가해하지 않고 인공증식 시 유전적인 개체군 분류를 통해 멸종위기종인 수염풍뎅이의 건강한 개체군 복원·증식에 기여 효과가

있을 것으로 기대된다.

[0009] 따라서, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 정방향 프라이머; 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 역방향 프라이머;를 포함하는 수염풍뎅이(Polyphylla laticollis manchurica) 동정용 프라이머 세트를 제공한다.

[0010] 서열번호는 하기와 같다.

표 1

프라이머 명칭	서열정보(5'→3')	서열번호
PLM_CytB_SF_F1	TTAATTGACCTCCCCTCAC	1
PLM_CytB_SF_R1	GTTTATTGGGGATAGAGCGC	2
PLM_CytB_SF_R2	ATTCTGCTAGTTCCAAGTGG	3
PLM_CytB_SF_R3	ATCAGGAATAGGGTGAGTACAC	4
PLM_CytB_SF_R4	CATTGGCATGGATAGTTCGG	5

[0012] 일 실시예에 있어서, 상기 프라이머 세트는 수염풍뎅이의 배설물을 시료로 할 수 있다. 본 발명의 프라이머 세트가 시료로 하는 상기 배설물을 사용하는 경우, 멸종 위기종인 수염풍뎅이의 포획이나 물리적인 피해를 가하지 않으면서 효과적인 멸종위기종 서식지 발굴을 가능하게 할 수 있다.

[0013] 일 실시예에서 상기 배설물은 수염풍뎅이 체외로 분리된 상피세포를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0014] 일 실시예에 있어서, 상기 프라이머 세트는 수염풍뎅이 유충 또는 수염풍뎅이 성충을 동정할 수 있다.

[0015] 일 실시예에 있어서, 본 발명의 프라이머 세트를 사용하여 수염풍뎅이 개체를 선제적으로 분류하여 누대사육에 의한 유전적 도태를 사전 방지할 수 있다.

[0016] 본 발명은 또한, 상기의 프라이머 세트를 포함하는, 수염풍뎅이 동정용 키트를 제공한다.

[0017] 일 실시예에 있어서, 상기 키트는 증폭 반응용 DNA 중합효소, dNTPs, 및 반응 버퍼를 추가로 더 포함할 수 있으며, 통상적으로 종의 동정에 이용되는 시판되는 시약 및 반응에 필요한 고형 지지체 등을 추가적으로 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명은 또한, 하기 단계를 포함하는, 수염풍뎅이 동정 방법을 제공한다.

[0020] i) 수염풍뎅이의 시료로부터 gDNA를 추출하는 단계;

[0021] ii) 상기 단계 i)에서 추출한 gDNA를 주형으로 하고 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 정방향 프라이머; 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 역방향 프라이머를 이용하여 표적 서열의 증폭 반응을 수행하는 단계;

[0022] iii) 상기 단계 ii)의 증폭된 산물을 검출하는 단계.

[0023] 일 실시예에 있어서, 상기 i) 단계에서 수염풍뎅이의 시료는 배설물일 수 있으며, 바람직하게 유충의 배설물일 수 있다. 상기 프라이머 세트에서 전술한 바와 마찬가지로, 시료를 배설물을 사용하여, 멸종 위기종인 수염풍뎅이의 포획이나 물리적인 피해를 가하지 않으면서 효과적인 멸종위기종 서식지 발굴을 가능하게 할 수 있다.

[0024] 일 실시예에 있어서, 상기 단계 ii)에서 표적 서열은 수염풍뎅이 cytochrome B 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 수염풍뎅이와 그 근연종인 사슴벌레를 유전학적 방법을 통해 종 동정할 수 있는 본 발명자들은 수염풍뎅이와 사슴벌레 유전서열 중 상대적으로 변이가 많이 존재한 미토콘드리아 내 전자전달계 단백질 중 하나인 Cytochrome b 유전자 내 서열 중 수염풍뎅이의 유전서열에 선택적으로 반응하여 증폭되는 종 특이 프라이머를 개발하였으며 그 증폭 방법에 대해 정립하였다.

[0025] 수염풍뎅이 종 특이 프라이머 및 배설물을 활용한 종 동정 방법은 우리나라에서의 수염풍뎅이와 사슴벌레의 오동정이 발생할 수 있는 문제를 해결하고 멸종위기종인 수염풍뎅이 서식지 추가 발굴에 기여할 수 있다.

[0026] 일 실시예에 있어서, 상기 iii) 단계 이후 iv) PCR 증폭 산물의 비교를 통한 수염풍뎅이와 사슴벌레와의 종 동정 확인 단계를 추가로 포함할 수 있다. 도 6에 나타난 바와 같이, 수염풍뎅이와 사슴벌레 3령 유충은 형태학적으로 유사한 바, 유전자의 서열 비교를 통해 종 동정을 명확히 할 수 있다.

[0027] 일 실시예에 있어서, 상기 iii) 단계의 검출은 전기영동을 통한 DNA 밴드 형성여부 또는 발광물질을 이용한 형광

발색 여부를 확인하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어 본 발명은 PCR 증폭하여 생성된 증폭 산물을 육안으로 확인하기 위한 발광물질 첨가하는 단계를 더 실시할 수 있다. 즉, 본 발명의 프라이머 세트를 포함하는 반응액을 만들고, 여기에 시료를 첨가하여 DNA 합성을 진행한 후 발광물질을 첨가하는 것이 가능하다. 상기 발광물질은 일반적으로 사용되는 것을 적용할 수 있으나, 바람직하게는 에바그린(Evagreen), 사이버그린(SYBR green) 또는 피코그린(Picogreen)을 사용하는 것이 가능하다.

[0028] 이에 따라, 본 발명은 수염풍뎅이의 배설물을 대상으로 분자생물학적 방법인 PCR을 사용하여 수염풍뎅이를 근연 종과 구분할 수 있는 종 동정이 가능함을 확인하였으며, 수염풍뎅이 집단구조분석을 위한 유전학적 기초자료를 획득하는 데에 효과적으로 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0029] 본 발명의 수염풍뎅이 동정용 프라이머 세트 및 동정 방법을 이용하면, 인공증식 시 누대사육으로 인한 유전적 도태를 사전에 방지하여 건강한 개체군 증식을 가능하게 함으로서 멸종위기종인 수염풍뎅이의 원활한 인공증식 성공에 기여할 수 있다. 더 구체적으로 본 발명은 수염풍뎅이 조직 내 gDNA를 요구하지 않으므로, 멸종위기종인 수염풍뎅이를 죽이거나 물리적으로 가해하지 않으면서 개체 간 유전적 차이 비교가 가능하여 개체군 분류, 혈통 관리 및 집단-유전학적 연구가 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 본 발명의 대상인 수염풍뎅이 유충의 배설물 채취 및 배설물 내 gDNA 추출 방법에 대한 묘사를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 수염풍뎅이 Cytochrome b 유전서열 증폭 및 종 동정용 프라이머의 서열을 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 전기영동을 이용하여 수염풍뎅이 배설물 내 잔류 gDNA를 PCR하여 표적 서열을 증폭한 산물을 상업용 추출 방법과 비교한 결과이다. (*Mk: 100 base pair DNA marker, Direct: DAP 버퍼로 추출된 수염풍뎅이 3령 유충 배설물 잔류 gDNA 추출물, QIAGEN: Proteinase K 방법으로 추출된 수염풍뎅이 3령 유충 배설물 잔류 gDNA 추출물, R1: PLM_CytB_SF_F1 프라이머와 PLM_CytB_SF_R1 프라이머 조합 PCR 조건, R2: PLM_CytB_SF_F1 프라이머와 PLM_CytB_SF_R2 프라이머 조합 PCR 조건, R3: PLM_CytB_SF_F1 프라이머와 PLM_CytB_SF_R3 프라이머 조합 PCR 조건, R4: PLM_CytB_SF_F1 프라이머와 PLM_CytB_SF_R4 프라이머 조합 PCR 조건, 검은색 삼각형: 각 PCR 프라이머 조건의 증폭 산물)

도 4는 본 발명의 전기영동을 이용하여 수염풍뎅이 배설물 개수에 따른 추출 방법의 PCR 증폭 효율을 비교하기 위해 배설물 개수 및 각 종 특이 프라이머별로 PCR하여 비교한 결과이다. (*Mk: 100 base pair DNA marker, 1EA: 수염풍뎅이 3령 유충 배설물 1개를 300 μ L의 DAP 버퍼로 잔류 gDNA를 추출한 추출물, 2EA: 수염풍뎅이 3령 유충 배설물 2개를 600 μ L의 DAP 버퍼로 잔류 gDNA를 추출한 추출물, 3EA: 수염풍뎅이 3령 유충 배설물 3개를 900 μ L의 DAP 버퍼로 잔류 gDNA를 추출한 추출물, 4EA: 수염풍뎅이 3령 유충 배설물 4개를 1,200 μ L의 DAP 버퍼로 잔류 gDNA를 추출한 추출물, R1: PLM_CytB_SF_F1 프라이머와 PLM_CytB_SF_R1 프라이머 조합 PCR 조건, R2: PLM_CytB_SF_F1 프라이머와 PLM_CytB_SF_R2 프라이머 조합 PCR 조건, 검은색 삼각형: 각 PCR 프라이머 조건의 증폭 산물, 증폭량: 각 PCR 산물의 증폭량 비교도)

도 5는 본 발명의 전기영동을 이용하여 DAP 버퍼를 이용한 수염풍뎅이 3령 유충 배설물 내 잔류 gDNA를 추출한 추출물의 희석배율에 따른 PCR 증폭 효율을 비교하기 위해 4개의 희석배율 및 각 종 특이 프라이머별로 PCR하여 비교한 결과이다. (*Mk: 100 base pair DNA marker, 1/50: 수염풍뎅이 3령 유충 배설물 2개를 600 μ L의 DAP 버퍼로 추출한 추출물을 3차 증류수로 1/50배 희석한 희석물, 1/100: 수염풍뎅이 3령 유충 배설물 2개를 600 μ L의 DAP 버퍼로 추출한 추출물을 3차 증류수로 1/100배 희석한 희석물, 1/200: 수염풍뎅이 3령 유충 배설물 2개를 600 μ L의 DAP 버퍼로 추출한 추출물을 3차 증류수로 1/200배 희석한 희석물, 1/400: 수염풍뎅이 3령 유충 배설물 2개를 600 μ L의 DAP 버퍼로 추출한 추출물을 3차 증류수로 1/400배 희석한 희석물, R1: PLM_CytB_SF_F1 프라이머와 PLM_CytB_SF_R1 프라이머 조합 PCR 조건, R2: PLM_CytB_SF_F1 프라이머와 PLM_CytB_SF_R2 프라이머 조합 PCR 조건, 검은색 삼각형: 각 PCR 프라이머 조건의 증폭 산물, 증폭량: 각 PCR 산물의 증폭량 비교도)

도 6은 본 발명의 수염풍뎅이와 사슴벌레 3령 유충, 그리고 각 대상종의 배설물에 대한 묘사를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 전기영동을 이용하여 수염풍뎅이와 사슴벌레 3령 유충 배설물 추출물을 수염풍뎅이 종 특이 프라이머로 PCR하여 증폭 산물을 확인한 결과이다. (*Mk: 100 base pair DNA marker, R1: PLM_CytB_SF_F1 프

라이머와 PLM_CytB_SF_R1 프라이머 조합 PCR 조건, R2: PLM_CytB_SF_F1 프라이머와 PLM_CytB_SF_R2 프라이머 조합 PCR 조건, PLM: DAP 버퍼로 추출된 수염풍뎅이 3령 유충 배설물 2개의 잔류 gDNA 추출물의 1/200배 희석물, LM: DAP 버퍼로 추출된 사슴벌레 3령 유충 배설물 1개의 잔류 gDNA 추출물 1/200배 희석물, 검은색 삼각형: 각 PCR 프라이머 조합의 증폭 산물)

도 8은 본 발명의 잔류 gDNA를 DAP 버퍼를 사용하여 추출하는 방법의 신뢰도를 확인하기 위해 각 수염풍뎅이 3령 유충의 배설물을 각각 PCR하여 증폭 산물을 확인한 결과이다. (*Mk: 100 base pair DNA marker, C1~M3: 각 수염풍뎅이 3령 유충의 개체번호, 검은색 삼각형: PLM_CytB_SF_F1 프라이머와 PLM_CytB_SF_R2 프라이머 조합의 PCR 증폭 산물)

도 9은 본 발명의 수염풍뎅이 개체군별 Cytochrome b의 염기서열 내 변이를 나타내는 염기서열 비교 모식도이다. (PLM_Strain_C: 수염풍뎅이 Cytochrome b 내 114번째 염기서열 사이토신(C; Cytosine)인 개체군, PLM_Strain_T: 수염풍뎅이 Cytochrome b 내 114번째 염기서열 티민(T; Thymine)인 개체군, 붉은색 삼각형: 수염풍뎅이 Cytochrome b 내 114번째 염기서열 변이 위치)

도 10은 본 발명의 표적 서열을 증폭하는 PCR 증폭 산물의 시퀀싱을 분석한 결과, CytB 유전자 염기서열임을 보여주는 결과이다. (PLM_CytB_Strain_C1: Cytochrome b 내 114번째 염기서열이 사이토신인 1번 개체, PLM_CytB_Strain_C2: Cytochrome b 내 114번째 염기서열이 사이토신인 2번 개체, PLM_CytB_Strain_T1: Cytochrome b 내 114번째 염기서열이 티민인 1번 개체, PLM_CytB_Strain_T2: Cytochrome b 내 114번째 염기서열이 티민인 2번 개체)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0032] 상술한 바와 같이, 현재 국내 멸종위기종인 수염풍뎅이는 충청남도 부여와 논산, 충청북도 청주에만 서식하고 있는 것으로 확인되고 있다. 하지만 개체군에 대한 유전학적 연구는 미비하여 실내 인공증식을 위해 필수적인 건강한 개체군 유지를 위한 사전 연구 정보가 부족한 실정이다.
- [0033] 본 발명의 프라이머 세트, 바람직하게 PLM_CytB_SF_F1과 PLM_CytB_SF_R2 프라이머 조합으로 구성된 프라이머 세트는 수염풍뎅이에 특이적이고 민감도가 우수하여 사슴벌레 등 타 토양에서 서식하는 딱정벌레에는 반응하지 않아 수염풍뎅이만을 특이적으로 동정할 수 있다. 또한 수염풍뎅이 유충 배설물 내 잔류하는 상피세포 내 gDNA를 이용하기 때문에 종 동정 및 개체군 분류를 위해 멸종위기종인 수염풍뎅이 조직을 필요로 하지 않아 대상종에 물리적인 피해를 주지 않는다. 이에 본 발명은 수염풍뎅이 배설물에서 gDNA를 추출하여, 상기 gDNA를 PCR 방법을 이용하여 증폭하여 수염풍뎅이를 특이적으로 동정할 수 있으며 개체군 분류를 위한 유전학적 정보를 취득할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 수염풍뎅이 배설물에서 추출한 잔류 gDNA에서 표적 서열을 증폭하여, 수염풍뎅이를 사슴벌레와 같은 타 딱정벌레와 종 동정할 수 있으며, 개체군 분류를 위한 유전정보를 취득할 수 있다.
- [0035] 본 발명은 수염풍뎅이 동정 및 개체군 분류를 위한 유전서열 획득을 위해 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 이용하였다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 수염풍뎅이를 물리적으로 가해하지 않고 미토콘드리아 내 Cytochrome b 유전자 서열을 획득하기 위해 수염풍뎅이 유충의 배설물에서 수염풍뎅이 특화된 DAP 버퍼(20 mM Sodium Hydroxide, 10% Polyethylene glycol 200, 5% Dimethyl Sulfoxide)를 이용하여 gDNA를 추출하였고 (도 1), 상기 gDNA 내 Cytochrome b 유전자 염기서열을 증폭할 수 있는 프라이머 세트를 제작하였다 (도 2). 상기 증폭 프라이머는 수염풍뎅이 배설물 개수 및 추출물 희석배율에 따른 PCR 증폭 산물의 증폭량을 고려하여 본 발명에서는 서열명칭 PLM_CytB_SF_F1의 염기서열로 이루어진 정방향 프라이머; 및 서열명칭 PLM_CytB_SF_R2의 염기서열로 이루어진 역방향 프라이머;를 포함하는 프라이머 세트, 수염풍뎅이 배설물 내 미약하게 존재하는 수염풍뎅이 CytB 유전자를 최대한 증폭하기 위해, 수염풍뎅이 미토콘드리아 DNA (Mitochondrial DNA; mtDNA)의 CytB(Cytochrome b) 유전자에 특이적인 프라이머를 이용하였다. 상기 증폭 프라이머를 이용하여 수염풍뎅이 유충 배설물에서 추출한 gDNA를 주형으로 PCR하여 증폭한 결과, 약 593 base pair 크기의 최종 증폭 산물이 전기영동 상에서 확인되는 것을 확인하였다 (도 3, 도 4, 도 5, 도 7, 도 8). PCR 증폭 산물이 수염풍뎅이 특이적인 CytB 유전자 증폭 산물인지 확인하기 위해서 시퀀싱 분석한 결과 PCR 증폭 산물은 약 550 base pair 크기의 수염풍뎅이 CytB 유전자임을 확인할 수 있었다 (도 9).

[0037] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0039] **실시예 1. 수염풍뎡이 배설물 내 잔존 gDNA의 추출**

[0041] 수염풍뎡이 배설물 내 잔류 gDNA를 추출하는 방법은 도 1과 같다. 구체적인 배설물 내 잔류 gDNA 추출 방법은 다음과 같다.

[0042] 수염풍뎡이 배설물을 1.5 mL EP Tube에 넣고 배설물 10mg(수염풍뎡이 2령 유충 배설물 1개당 20mg, 3령 유충 배설물 1개당 30mg)당 100 μ L의 수염풍뎡이에 최적화된 추출버퍼(DAP 버퍼: 20 mM Sodium Hydroxide, 10% Polyethylene glycol 200, 5% Dimethyl Sulfoxide)를 넣는다. 상기 배설물 및 추출 버퍼 혼합물을 플라스틱 막자를 이용하여 분쇄한 후 상온(25° C)에 10분간 반응시킨다. 반응 후 침전물을 제외한 상층액 중 2 μ L를 398 μ L의 3차 증류수에 넣어 1/200배 희석한다. 상기 희석된 추출물 중 5 μ L를 PCR 반응물로 사용한다. 본 발명의 수염풍뎡이 배설물 내 잔류 gDNA 추출에 적합한 gDNA 추출 버퍼 선정을 위해 DAP 버퍼를 사용한 추출 방법과 QIAGEN사의 DNeasy Blood & Tissue Kit을 사용한 추출 방법을 비교하였다. QIAGEN사의 DNeasy Blood & Tissue Kit의 추출 방법은 다음과 같다. 수염풍뎡이 3령 유충 배설물 2개를 1.5 mL EP Tube에 넣은 후 360 μ L의 ATL 버퍼, 40 μ L의 Proteinase K 용액을 넣고 플라스틱 막자로 배설물을 갈아 혼합물을 만들었다. 상기 혼합물을 56° C에서 2시간 반응시키면서 30분마다 침전된 혼합물이 상층액과 다시 섞일 수 있도록 혼합해주었다. 상기 반응이 완료된 후, 상기 혼합물에 400 μ L의 AL Lysis 버퍼를 넣어주고 섞어 준 후 56° C에서 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 혼합물에 400 μ L의 99% 에탄올을 넣고 섞었다. 최종 혼합물이 든 1.5 mL EP Tube를 7,000 rpm의 속도로 3분간 원심분리하고 800 μ L의 상층액을 DNeasy Mini spin column에 넣고 7,000 rpm의 속도로 1분간 원심분리한 후 걸러진 용액을 버렸다. 상기 column에 650 μ L의 AW1 버퍼를 넣고 7,000 rpm의 속도로 1분간 원심분리한 후 걸러진 용액을 버린다. 그 후, 상기 DNeasy Mini spin column에 650 μ L의 AW2 버퍼를 넣고 7,000 rpm의 속도로 1분간 원심분리한 후 걸러진 용액을 버리고 7,000 rpm의 속도로 1분간 원심분리한다. 상기 원심분리가 끝난 DNeasy Mini spin column을 새로운 1.5 mL EP Tube에 옮긴다. 마지막으로 25 μ L의 AE 용액을 상기 DNeasy Mini spin column에 넣고 1분간 흡수시킨 후 7,000 rpm의 속도로 1분간 원심분리한다. 추출된 25 μ L의 추출물 중 5 μ L를 PCR 반응물로 사용하였다.

[0044] **실시예 2. 수염풍뎡이 배설물 내 잔류 gDNA 추출 방법 선정**

[0046] PCR 방법을 통한 수염풍뎡이 배설물 내 잔류 gDNA 증폭 방법을 정립하기에 앞서 추출 버퍼의 효율을 최적화하기 위해 수염풍뎡이 배설물 개수 및 3차 증류수 희석배율에 따른 PCR 증폭방법 최적화 및 종 특이 프라이머를 최종 선발하였다.

[0047] 첫 번째로 본 발명의 수염풍뎡이 배설물 내 잔류 gDNA 추출에 적합한 gDNA 추출 버퍼 선정을 위해 DAP 버퍼를 사용한 추출 방법과 QIAGEN사의 DNeasy Blood & Tissue Kit을 사용한 추출 방법을 비교하였다. 실시예 2의 방법대로 추출된 각 추출 버퍼를 사용하여 5 μ L의 추출물을 PCR 반응물로 사용하였으며, 또한 4쌍의 프라이머 조합 중 후보 중 특이 프라이머를 선발하기 위해 PCR 프라이머 조합은 서열명칭 PLM_CytB_SF_F1(서열번호 1: TTAATGACCTCCCTCAC) 정방향 프라이머와 PLM_CytB_SF_R1(서열번호 2: GTTATTGGGGATAGAGCGC) 역방향 프라이머 조합인 R1, 서열명칭 PLM_CytB_SF_F1 정방향 프라이머와 PLM_CytB_SF_R2(서열번호 3: ATTCTGGTAGTTCGAAGTGG) 역방향 프라이머 조합인 R2, 서열명칭 PLM_CytB_SF_F1 정방향 프라이머와 PLM_CytB_SF_R3(서열번호 4: ATCAGGAATAGGGTGAGTACAC) 역방향 프라이머 조합인 R3, 서열명칭 PLM_CytB_SF_F1 정방향 프라이머와 PLM_CytB_SF_R4(서열번호 5: CATTGGCATGGATAGTTCGG) 역방향 프라이머 조합인 R4로 총 4개의 프라이머 조합을 각 추출 방법별로 비교하였다. 상기 비교 실험을 수행하기 위해 PCR Tube에 50 μ L의 PCR 반응물별 [10 pmol/ μ L의 정방향 프라이머, 10 pmol/ μ L의 역방향 프라이머, 1 Tube의 AccuPower® PCR PreMix (Bioneer) 및 상기 각 추출 방법으로 추출한 잔류 gDNA의 최종 추출 산물 5 μ L, Nuclease free water 45 μ L] 을 넣고 잘 섞어 주었다. 상기 PCR 반응물이 담긴 PCR Tube를 PCR 기계 상에서 94° C 3분 처리 뒤, 94° C 30초, 58° C 30초, 72° C 1분의 반응을 50회 처리 후, 마지막으로 72° C 3분 반응하여 PCR 반응을 종료하였다. 각 프라이머 조합(R1: 815 base pair 크기, R2: 593 base pair 크기, R3: 319 base pair 크기, R4: 204 base pair 크기)에 따른 PCR 반응의 증폭 유무를 판단하기 위해 전기영동을 수행하였다. 그 결과 수염풍뎡이 배설물 내 잔류 gDNA 추출에 최적화된 DAP 버퍼 추출 방법에서는 4개의 프라이머 조합 모두 잔류 gDNA의 증폭을 확인할 수 있었으나 DNeasy Blood & Tissue Kit을 사용한 추출 방법에서는 잔류 gDNA가 증폭되지 않음을 알 수 있었다(도 3). 따라서 본 실험은 수염풍뎡이 배설물 내 잔류 gDNA 추출에 최적화된 DAP 버퍼 추출 방법을 추출 방법으로 선정하였으며, 전기영동 상 PCR 증폭 산물이 가장 높게 나타난 프라이머 조합인 R1 및 R2 조합을 종 특이 프라이머 세트 후보로

선발하였다.

[0049] 실시예 3. 수염풍뎡이 배설물 개수 및 회석배율 최적화를 통한 중 특이 프라이머 선발

[0051] 상기 실시예 2에서 선발된 후보 중 특이 프라이머 세트(R1 및 R2 조합)의 수염풍뎡이 배설물 개수 및 회석배율에 따른 증폭 효율을 비교하여 최종 수염풍뎡이 중 특이 프라이머를 선발하고자 하였다.

[0052] 첫 번째로 배설물 개수에 따른 각 프라이머 조합의 PCR 증폭 효율을 비교하였다. 구체적으로 수염풍뎡이 3령 유충 배설물 1~4개를 배설물 10mg 당 100 μ L의 DAP 버퍼(1개: 300 μ L의 DAP 버퍼, 2개: 600 μ L의 DAP 버퍼, 3개: 900 μ L의 DAP 버퍼, 4개: 1,200 μ L의 DAP 버퍼)에 넣고 상기 실시예 1과 실시예 2의 방법과 동일하게 추출물을 추출한 후 PCR 증폭 및 전기영동하여 PCR 증폭 산물의 증폭량을 비교하였다 (도 4). 실험 결과 프라이머 조합 R1과 R2 모두에서 배설물 2개를 사용하였을 때 증폭 효율이 가장 높게 나타났으며, 조합 R1보다 조합 R2에서 배설물 2개를 사용하였을 때 증폭 효율이 높음을 확인할 수 있었다. 따라서 본 발명에서는 배설물 내 잔류 gDNA 추출 시 배설물 2개(60mg)를 사용하는 방법을 선정하였다.

[0053] 두 번째로 DAP 버퍼를 이용한 배설물 추출 후 회석배율에 따른 증폭 효율 비교를 위해 수염풍뎡이 3령 유충 배설물 2개(60mg)를 600 μ L의 DAP 버퍼와 섞어 만든 혼합물을 각각 3차 증류수에 1/50배, 1/100배, 1/200배, 1/400배 회석물 5 μ L를 후보 중 특이 프라이머 조합 R1 및 조합 R2를 사용하여 PCR한 후 전기영동하여 증폭량에 따른 증폭 효율을 비교하였다. 실험 결과 조합 R1 및 조합 R2 모두에서 1/50배 회석의 경우 PCR 증폭 산물이 생성되지 않는 것을 확인할 수 있었으며, 조합 R1의 경우 1/100배, 1/200배, 1/400배 회석 순으로 증폭량이 감소함을 확인할 수 있었다. 반면, 조합 R2의 경우 1/100배, 1/200배, 1/400배 회석 순으로 증폭량이 증가함을 확인할 수 있었다(도 5). 본 발명에서는 추출 방법을 수염풍뎡이의 타 유전자 및 프라이머 조합에 대해서도 사용하기 위해 중간 회석배율인 1/200배를 최종 회석배율로 선정하였다. 최종적으로 본 실시예 3에서 수행한 실험 결과에 따라 수염풍뎡이 배설물 내 잔류 gDNA 추출을 위해 배설물은 3령 유충 기준 2개(60mg), 회석배율은 1/200배를 적용하여 추출 방법을 정립하였고, 본 발명의 최종 수염풍뎡이 중 특이 프라이머는 가장 증폭 효율이 높은 조합 R2(PLM_CytB_SF_F1 정방향 프라이머와 PLM_CytB_SF_R2 역방향 프라이머 조합)를 선정하였다.

[0055] 실시예 4. 수염풍뎡이와 사슴벌레의 배설물 내 잔류 gDNA의 증폭 및 동정

[0057] 본 발명의 수염풍뎡이 중 특이 프라이머가 수염풍뎡이에만 특이적으로 반응하여 표적 서열을 증폭하는지 확인하기 위해서 사슴벌레 3령 유충 배설물 추출물을 대조군으로 PCR하여 비교하였다 (도 6).

[0058] 배설물 내 잔류 gDNA 추출을 위해 수염풍뎡이 3령 유충 배설물 2개(60mg), 사슴벌레 3령 유충 배설물 1개(60mg)를 사용하였다. 각 대상종의 gDNA 추출 방법은 실시예 1의 DAP 버퍼 추출 방법을 사용하여 잔류 gDNA를 추출하였으며, 대조군에 따라 PCR 결과가 변동될 수 있으므로 후보 중 특이 프라이머인 조합 R1도 같이 PCR하여 비교하였으며, PCR 방법은 실시예 2와 동일하게 적용하였다. 실험 결과 본 발명의 수염풍뎡이 중 특이 프라이머 조합인 R2뿐만 아니라 조합 R1도 수염풍뎡이에서만 증폭 산물을 확인할 수 있었다(도 7).

[0060] 실시예 5. 수염풍뎡이 배설물 내 잔류 gDNA 증폭 신뢰성 검증

[0062] 본 발명의 배설물 내 잔류 gDNA 추출 방법 및 중 특이 프라이머(조합 R2)를 이용한 PCR 방법의 신뢰성을 확인하였다.

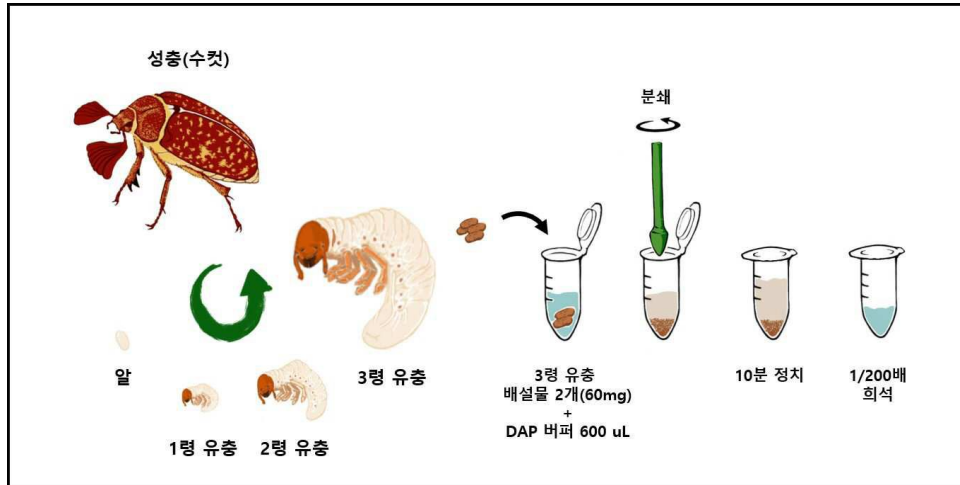
[0063] 구체적으로 각 수염풍뎡이 유충의 배설물을 무작위로 배설물 2개(60mg)를 사용 배설물 내 잔류 gDNA 추출하여 실시예 1 및 실시예 2의 DAP 버퍼를 사용한 잔류 gDNA 추출 및 PCR 방법을 사용하여 신뢰성을 검증하였다 (도 8). 각 수염풍뎡이 유충 배설물(C1~M3)에서 모두 PCR이 확인됨을 확인하여 본 발명의 배설물 내 잔류 gDNA 추출 및 중 특이 프라이머를 사용한 PCR 방법이 신뢰도 높게 재현됨을 확인할 수 있었다.

[0065] 실시예 6. 수염풍뎡이 CytB 증폭 산물 염기서열 확인을 통한 개체군 분류 방법

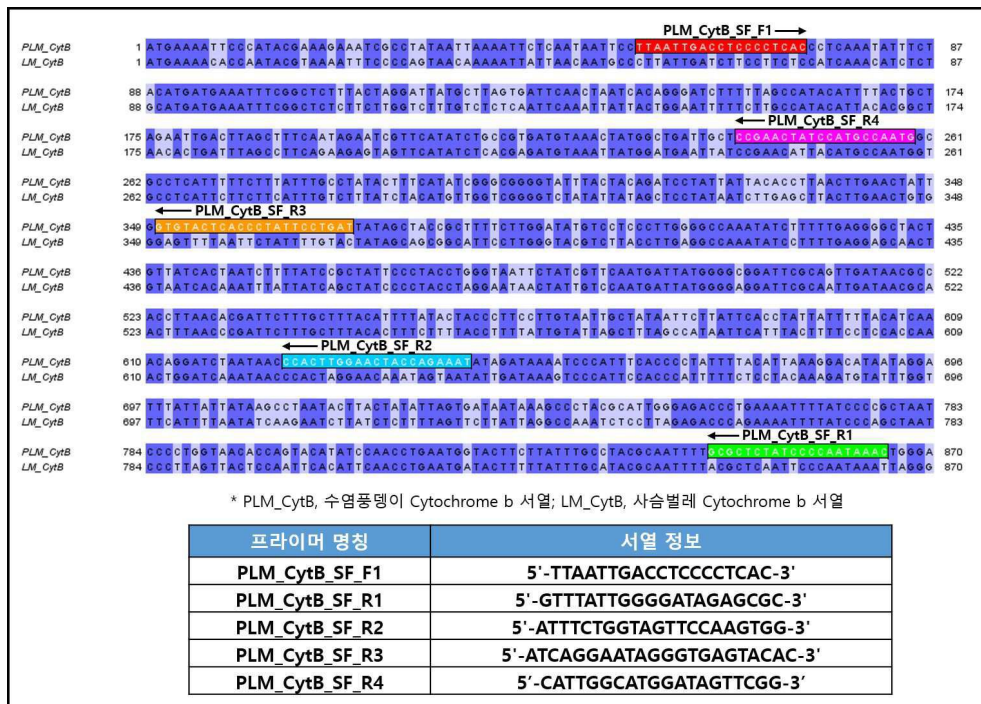
[0067] 본 발명의 중 특이 프라이머를 사용한 PCR 증폭 산물을 시퀀싱하여 수염풍뎡이 CytB(Cytochrome b) 유전자 내 종내 염기서열 변이가 있는지 확인하였다. 구체적으로 본 발명의 수염풍뎡이 CytB 증폭 산물의 염기서열 내 변이는 114번째(수염풍뎡이 Cytochrome b 유전자 전체 서열 중 114번째) 염기서열에서 사이토신(Cytosine)과 티민(Thymine)으로 구분되는 염기서열 변이가 1개 존재하는 것으로 확인되었다(도 9, 도 10). 이러한 염기서열 변이에 따라 개체군을 구분할 수 있고 이를 통해 누대사육에 따른 유전적 도태를 사전에 방지할 수 있는 기초자료로 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면

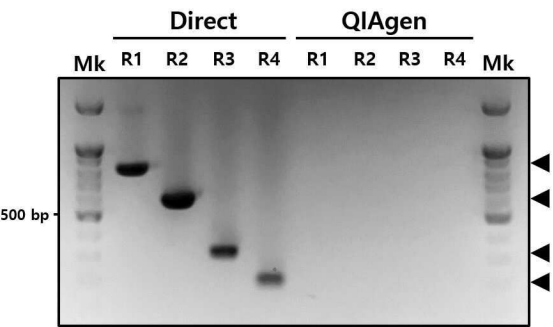
도면1



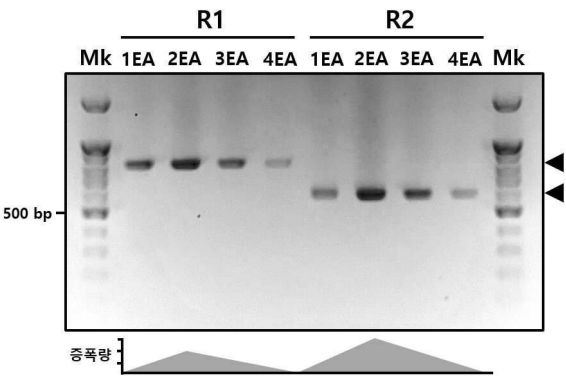
도면2



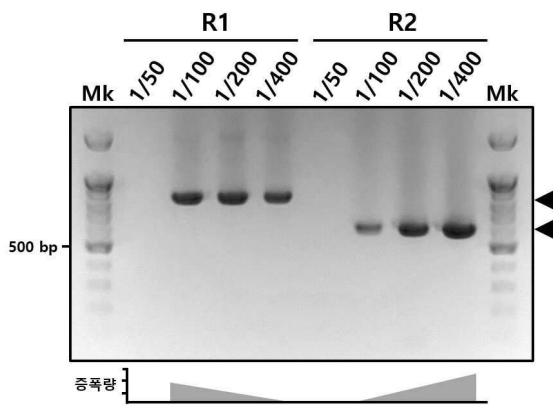
도면3



도면4



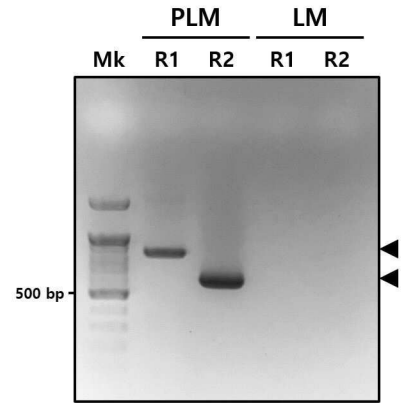
도면5



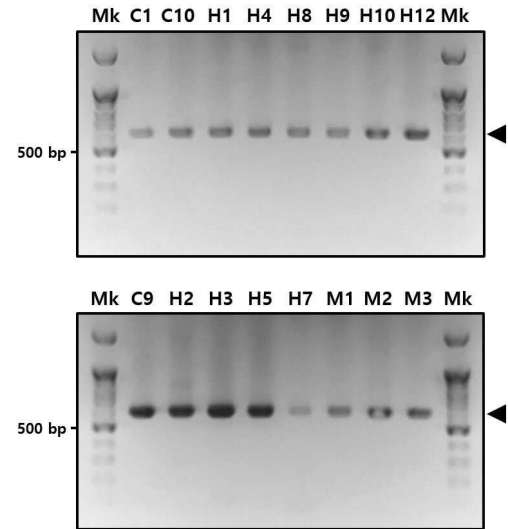
도면6



도면7



도면8



도면9

PLM_Strain_C	1	CCTCAAATATTTCTACATGATGAAATTTGCGCTCTTTACTGGGATTATGCTTAGTGATTCAACTAATCACAGGGATCTTTAGCCATACATTTTAC	77
PLM_Strain_T	1	CCTCAAATATTTCTACATGATGAAATTTGCGCTCTTTACTGGGATTATGCTTAGTGATTCAACTAATCACAGGGATCTTTAGCCATACATTTTAC	77
PLM_Strain_C	78	TTTTAGCCATACATTTTACTGCTAGAATTGACTTAGCTTTCAATAGAATCGTTTCATATCTGCGGTGATGTAAACTA	154
PLM_Strain_T	78	TTTTAGCCATACATTTTACTGCTAGAATTGACTTAGCTTTCAATAGAATCGTTTCATATCTGCGGTGATGTAAACTA	154
PLM_Strain_C	155	TGGCTGATTGCTCCGAACATCCATGCCAATGGCGCCTCATTCTTTTATTGCTTACTCTTCATATCGGGCGGG	231
PLM_Strain_T	155	TGGCTGATTGCTCCGAACATCCATGCCAATGGCGCCTCATTCTTTTATTGCTTACTCTTCATATCGGGCGGG	231
PLM_Strain_C	232	GATTTTACTACAGATCCTATTATTACACCTTAACTTGAACATTGGCGTACTCGGCCCTATTCTGATTATAGCTACG	308
PLM_Strain_T	232	GATTTTACTACAGATCCTATTATTACACCTTAACTTGAACATTGGCGTACTCGGCCCTATTCTGATTATAGCTACG	308
PLM_Strain_C	309	CTTTTCTTGGATATGCTCCCTGGGGCCAAATATCTTTTGAAGGGGCTACTGTTATCACTAATCTTTTATCGGG	385
PLM_Strain_T	309	CTTTTCTTGGATATGCTCCCTGGGGCCAAATATCTTTTGAAGGGGCTACTGTTATCACTAATCTTTTATCGGG	385
PLM_Strain_C	386	TATTCCTACCTGGGTAATTCATCGTTCAATGATTATGGGGCGGATTTCGAGTTGATAACGCCACCTTAACACGAT	462
PLM_Strain_T	386	TATTCCTACCTGGGTAATTCATCGTTCAATGATTATGGGGCGGATTTCGAGTTGATAACGCCACCTTAACACGAT	462
PLM_Strain_C	463	CTTTTCTTACATTTTATACCTACCTTCTTGTAAATGCTATAAATCTTATTCAGCTATTATTTTACATCAAAAC	539
PLM_Strain_T	463	CTTTTCTTACATTTTATACCTACCTTCTTGTAAATGCTATAAATCTTATTCAGCTATTATTTTACATCAAAAC	539
PLM_Strain_C	540	GGATCTAATAACCCACTTGGAACTACCAAGAAATATAGATAAAATGCCATTTCAGCCCTATTTTACATTAAAGGACAT	616
PLM_Strain_T	540	GGATCTAATAACCCACTTGGAACTACCAAGAAATATAGATAAAATGCCATTTCAGCCCTATTTTACATTAAAGGACAT	616
PLM_Strain_C	617	AATAGGATTTTATTATTAAGCCTAATCTTACTATATTAGTAATAATAAGCCCTACGCTTGGGGGACCCGTGAAA	693
PLM_Strain_T	617	AATAGGATTTTATTATTAAGCCTAATCTTACTATATTAGTAATAATAAGCCCTACGCTTGGGGGACCCGTGAAA	693
PLM_Strain_C	694	ATTTTATCCCGCTAATCCCTGGTGAACACCACTACATATCCAACCTGAATGATCTTCTTATTGCTTACGGC	766
PLM_Strain_T	694	ATTTTATCCCGCTAATCCCTGGTGAACACCACTACATATCCAACCTGAATGATCTTCTTATTGCTTACGGC	766

도면10

>PLM_CytB_Strain_C1			
CCTCAAATATTTCTACATGATGAAATTTGCGCTCTTTACTGGGATTATGCTTAGTGATTCAACTAATCACAGGGATCTTTAGCCATACATTTTAC			
TGCTAGAATTGACTTAGCTTTCAATAGAATCGTTTCATATCTGCCGTGATGTAAACTATGGCTGATTGCTCCGAACCTATCCATGCCAATGGCGCCTC			
ATTTTCTTTATTGCTATACCTTCATATCGGGCGGGGATTACTACAGATCCTATTATTACACCTTAACCTGAACATTGGCGTACTCGCCCTAT			
TCCTGATTATAGCTACCGCTTTCTTGATATGCTCCCTTGGGGCCAAATATCTTTTGAAGGGGCTACTGTTATCACTAATCTTTATCCGCTATT			
CCCTACCTGGGTAATCTATCGTTCAATGATTATGGGGCGGATTGCGAGTTGATAACGCCACCTTAACACGATTCTTTGCTTTACATTTTATCTAC			
CCTTCCTGTAAATGCTATAATCTTATTCACCTATTATTTTACATCAAAACAGGATCTAATAACCCACTTGGAACTACCGAAATATAGATAAAAT			
CCCATTTACCCCTATTTTACATTAAAGGACATAATAGGATTTATTATTAAAGCCTAATACTTACTATATTAGTAATAATAAAGCCCTACGCATTG			
GGGGACCTGAAAATTTTATCCCGCTAATCCCTGGTGAACACCACTACATATCCAACCTGAATGATCTTCTTATTGCTTACGCA			
>PLM_CytB_Strain_C2			
CCTCAAATATTTCTACATGATGAAATTTGCGCTCTTTACTGGGATTATGCTTAGTGATTCAACTAATCACAGGGATCTTTAGCCATACATTTTACT			
GCTAGAATTGACTTAGCTTTCAATAGAATCGTTTCATATCTGCCGTGATGTAAACTATGGCTGATTGCTCCGAACCTATCCATGCCAATGGCGCCTC			
ATTTTCTTTATTGCTATACCTTCATATCGGGCGGGGATTACTACAGATCCTATTATTACACCTTAACCTGAACATTGGCGTACTCGCCCTAT			
TCCTGATTATAGCTACCGCTTTCTTGATATGCTCCCTTGGGGCCAAATATCTTTTGAAGGGGCTACTGTTATCACTAATCTTTATCCGCTATT			
CCCTACCTGGGTAATCTATCGTTCAATGATTATGGGGCGGATTGCGAGTTGATAACGCCACCTTAACACGATTCTTTGCTTTACATTTTATCTAC			
CCTTCCTGTAAATGCTATAATCTTATTCACCTATTATTTTACATCAAAACAGGATCTAATAACCCACTTGGAACTACCGAAATATAGATAAAAT			
CCCATTTACCCCTATTTTACATTAAAGGACATAATAGGATTTATTATTAAAGCCTAATACTTACTATATTAGTAATAATAAAGCCCTACGCATTG			
GGGGACCTGAAAATTTTATCCCGCTAATCCCTGGTGAACACCACTACATATCCAACCTGAATGATCTTCTTATTGCTTACGCA			
>PLM_CytB_Strain_T1			
CCTCAAATATTTCTACATGATGAAATTTGCGCTCTTTACTGGGATTATGCTTAGTGATTCAACTAATCACAGGGATCTTTAGCCATACATTTTACT			
GCTAGAATTGACTTAGCTTTCAATAGAATCGTTTCATATCTGCCGTGATGTAAACTATGGCTGATTGCTCCGAACCTATCCATGCCAATGGCGCCTC			
ATTTTCTTTATTGCTATACCTTCATATCGGGCGGGGATTACTACAGATCCTATTATTACACCTTAACCTGAACATTGGCGTACTCGCCCTAT			
TCCTGATTATAGCTACCGCTTTCTTGATATGCTCCCTTGGGGCCAAATATCTTTTGAAGGGGCTACTGTTATCACTAATCTTTATCCGCTATT			
CCCTACCTGGGTAATCTATCGTTCAATGATTATGGGGCGGATTGCGAGTTGATAACGCCACCTTAACACGATTCTTTGCTTTACATTTTATCTAC			
CCTTCCTGTAAATGCTATAATCTTATTCACCTATTATTTTACATCAAAACAGGATCTAATAACCCACTTGGAACTACCGAAATATAGATAAAAT			
CCCATTTACCCCTATTTTACATTAAAGGACATAATAGGATTTATTATTAAAGCCTAATACTTACTATATTAGTAATAATAAAGCCCTACGCATTG			
GGGGACCTGAAAATTTTATCCCGCTAATCCCTGGTGAACACCACTACATATCCAACCTGAATGATCTTCTTATTGCTTACGCA			
>PLM_CytB_Strain_T2			
CCTCAAATATTTCTACATGATGAAATTTGCGCTCTTTACTGGGATTATGCTTAGTGATTCAACTAATCACAGGGATCTTTAGCCATACATTTTACT			
GCTAGAATTGACTTAGCTTTCAATAGAATCGTTTCATATCTGCCGTGATGTAAACTATGGCTGATTGCTCCGAACCTATCCATGCCAATGGCGCCTC			
ATTTTCTTTATTGCTATACCTTCATATCGGGCGGGGATTACTACAGATCCTATTATTACACCTTAACCTGAACATTGGCGTACTCGCCCTAT			
TCCTGATTATAGCTACCGCTTTCTTGATATGCTCCCTTGGGGCCAAATATCTTTTGAAGGGGCTACTGTTATCACTAATCTTTATCCGCTATT			
CCCTACCTGGGTAATCTATCGTTCAATGATTATGGGGCGGATTGCGAGTTGATAACGCCACCTTAACACGATTCTTTGCTTTACATTTTATCTAC			
CCTTCCTGTAAATGCTATAATCTTATTCACCTATTATTTTACATCAAAACAGGATCTAATAACCCACTTGGAACTACCGAAATATAGATAAAAT			
CCCATTTACCCCTATTTTACATTAAAGGACATAATAGGATTTATTATTAAAGCCTAATACTTACTATATTAGTAATAATAAAGCCCTACGCATTG			
GGGGACCTGAAAATTTTATCCCGCTAATCCCTGGTGAACACCACTACATATCCAACCTGAATGATCTTCTTATTGCTTACGCA			

서열목록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.