



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0129638  
(43) 공개일자 2012년11월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/11 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2011-0048020  
(22) 출원일자 2011년05월20일  
심사청구일자 2011년05월20일

(71) 출원인  
건국대학교 산학협력단  
서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)  
(72) 발명자  
유재란  
서울특별시 강남구 역삼로 306, 개나리 레미안 아파트 103동 403호 (역삼동)  
(74) 대리인  
구현서

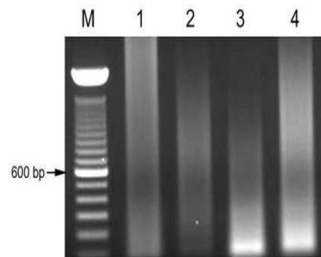
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 수인성 원충의 동시 검출을 위한 프라이머 및 그 프라이머를 이용한 검출방법

**(57) 요약**

본 발명은 수인성 원충의 동시 검출을 위한 프라이머 및 그 프라이머를 이용한 검출방법에 관한 것이다.

**대표도** - 도4



DNA of <i>Encephalitozoon intestinalis</i>	+	-	-	-
DNA of <i>Cyclospora cayetanensis</i>	-	+	-	-
DNA of <i>Cryptosporidium parvum</i>	-	-	+	-
Primers for <i>E. intestinalis</i>	-	+	+	+
Primers for <i>C. cayetanensis</i>	+	-	+	+
Primers for <i>C. parvum</i>	+	+	-	+

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

서열번호 1 내지 서열번호 12로 구성된 군으로부터 선택된 수인성 원충의 동시 검출을 위한 프라이머 세트.

**청구항 2**

제 1항에 있어서 상기 수인성 원충은 미포자충, 원포자충 또는 크립토스포리듐(Cryptosporidium)인 것을 특징으로 하는 수인성 원충의 동시 검출을 위한 프라이머 세트.

**청구항 3**

제 2항에 있어서, 상기 미포자충은 엔테로사이토존 비에네우시(Enterocytozoon bienewisi) 또는 엔세팔리토존 인테스티나리스(Encephalitozoon intestinalis)이고, 상기 크립토스포리듐(Cryptosporidium)은 크립토스포리듐 호미니스(Cryptosporidium hominis) 또는 크립토스포리듐 파르븀(Cryptosporidium parvum)인 것을 특징으로 하는 을 위한 프라이머 세트.

**청구항 4**

서열번호 1 내지 서열번호 12로 구성된 수인성 원충의 동시 검출을 위한 프라이머 세트.

**청구항 5**

제 1항의 프라이머 세트를 유효성분으로 포함하는 수인성 원충의 동시 검출을 위한 조성물.

**청구항 6**

제 4항에 있어서 상기 수인성 원충은 미포자충, 원포자충 또는 크립토스포리듐(Cryptosporidium)인 것을 특징으로 하는 수인성 원충의 동시 검출을 위한 조성물.

**청구항 7**

제 1항의 프라이머 세트를 유효성분으로 포함하는 동시 검출을 위한 키트.

**청구항 8**

중합효소연쇄반응(PCR)을 이용한 수인성 원충류의 검출방법에 있어서,  
 PCR 프라이머로 (a) 미포자충 검출용 PCR 프라이머쌍(서열번호 1 내지 서열번호 4);  
 (b) 원포자충 검출용 PCR 프라이머쌍 (서열번호 5 내지 8); 및  
 (c) 크립토스포리듐 검출용 PCR 프라이머쌍 (서열번호 9 내지 12)으로 이루어진 PCR 프라이머를 이용하여 다중 중합효소연쇄반응 (Multiplex-Polymerase Chain Reaction)으로 수인성 원충을 동시에 탐지하는 것을 특징으로 하는 수인성 원충의 검출방법.

**청구항 9**

제 8항에 있어서, 상기 방법은 두 번째 라운드 PCR 후 해당 PCR 산물을 BsaBI 또는 BsiEI을 처리하는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 수인성 원충을 동시에 탐지하는 것을 특징으로 하는 수인성 원충의 검출방법.

**명세서**

**기술분야**

본 발명은 수인성 원충의 동시 검출을 위한 프라이머 및 그 프라이머를 이용한 검출방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0001]

- [0002] 미포자충(microsporidia), *Cyclospora*, 및 *Cryptosporidium*와 같은 수인성 원충류(waterborne protozoa)는 전 세계적으로 인류 건강에 위협이 되고 있다. 이 원충류들은 생물학적으로 몇 가지 공통적 특성을 가진다. 그들의 주된 서식지는 장 상피 세포(intestinal epithelial cells)이고 그들 모두는 세포내 기생체이다(Goodgame RW. Ann Intern Med 1996; 124: 429-441). 또한 그들은 그들의 대변(stool)에서 숙주로부터 분비되는 감염성 포자를 생성한다(O'Donoghue PJ. Int J Parasitol 1995; 25: 139-195).
- [0003] 비록 이들 원충류들이 AIDS-감염된 환자들에 대한 문제이지만, 그들은 또한 면역력이 있는(immunocompetent) 대상에서도 중요한 감염체로 인식되고 있다(Goodgame RW. Ann Intern Med 1996; 124: 429-441; Sandfort J, Hannemann A, Gelderblom H, Stark K, Owen RL, Ruf B. Clin Infect Dis 1994; 19: 514-516; Lee JK, Song HJ, Yu JR. Korean J Parasitol 2005; 43: 111-114).
- [0004] 만성 설사를 가진 AIDS 환자 중에서, 약 50%가 미포자충에 감염된 것으로 진단되고, 10-20%는 *Cryptosporidium parvum* 에 감염되었다(Goodgame RW. Ann Intern Med 1996; 124: 429-441).
- [0005] 1993년에는 대규모 수인성 *C. parvum*의 발생이 일어났고(Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, Kazmierczak JJ, Addiss DG, Fox KR, Rose JB, et al. N Engl J Med 1994; 331: 161-167),
- [0006] 수입된 라스베리의 소비에 기인한 *Cyclospora*의 발생이 보고되었다(Herwaldt BL, Ackers ML. N Engl J Med 1997; 336: 1548-1556; Ortega YR, Roxas CR, Gilman RH, Miller NJ, Cabrera L, Taquiri C, Sterling CR. Am J Trop Med Hyg 1997; 57: 683-686).
- [0007] 미포자충은 3차 하수 방류(tertiary sewage effluent), 표면 수(surface water), 및 지하수에서 그것의 검출에 기반하여 수인성 원충류로 확인되었다(Dowd SE, Gerba CP, Pepper IL. Appl Environ Microbiol 1998; 64: 3332-3335).
- [0008] 미포자충 여러 속(genera) 중에서, *Enterocytozoon bienersi* 및 *Encephalitozoon intestinalis*는 인간의 위장관계 질환과 관련이 있다(Dowd SE, Gerba CP, Pepper IL. Appl Environ Microbiol 1998; 64: 3332-3335).
- [0009] 현재까지 한국에서 미포자충 *Cyclospora*, 및 *Cryptosporidium*의 감염상태에 관련된 활용할 수 있는 데이터는 매우 한정되어 있다.
- [0010] 따라서 이들 수인성 원충류에 대한 단순하고 신속하며 경제적인 검출 방법의 개발은 환자들 뿐만 아니라 사회에서도 감염률을 낮추는데 긴급하게 필요하다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0011] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 수인성 원충류에 대한 단순하고 신속하며 경제적인 검출 방법을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0012] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 12로 구성된 군으로부터 선택된 수인성 원충의 동시 검출을 위한 프라이머 세트를 제공한다.
- [0013] 본 발명의 일 구현예에 있어서 상기 수인성 원충은 미포자충, 원포자충 또는 *Cryptosporidium*인 것이 바람직하고,
- [0014] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 미포자충은 엔테로사이토준 비에네우시(*Enterocytozoon bienersi*) 또는 엔세팔리토준 인테스티나리스 (*Encephalitozoon intestinalis*)이고, 상기 크립토스포리듐(*Cryptosporidium*)은 크립토스포리듐 호미니스(*Cryptosporidium hominis*) 또는 크립토스포리듐 파르븀(*Cryptosporidium parvum*)인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0015] 또한 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 12로 구성된 수인성 원충의 동시 검출을 위한 프라이머 세트를 제공한다.

- [0016] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 프라이머 세트를 유효성분으로 포함하는 수인성 원충의 동시 검출을 위한 조성물을 제공한다.
- [0017] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 프라이머 세트를 유효성분으로 포함하는 동시 검출을 위한 키트를 제공한다.
- [0018] 또한 본 발명은 중합효소연쇄반응(PCR)을 이용한 수인성 원충류의 검출방법에 있어서,
- [0019] PCR 프라이머로 (a) 미포자충 검출용 PCR 프라이머쌍(서열번호 1 내지 서열번호 4);
- [0020] (b) 원포자충 검출용 PCR 프라이머쌍 (서열번호 5 내지 8); 및
- [0021] (c) 크립토스포리듐 검출용 PCR 프라이머쌍 (서열번호 9 내지 12)으로 이루어진 PCR 프라이머를 이용하여 다중 중합효소연쇄반응 (Multiplex-Polymerase Chain Reaction)으로 수인성 원충을 동시에 탐지하는 것을 특징으로 하는 수인성 원충의 검출방법을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 두 번째 라운드 PCR 후 해당 PCR 산물을 BsaBI 또는 BsiEI를 처리하는 단계를 더욱 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0023] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0024] 본 발명자들은 이들 세 종류의 주된 수인성 원충류를 검출하기 위하여 단순하고 신속하며 저렴한 multiplex PCR-기반 방법을 개발하였다.
- [0025] 환경 및 임상 샘플에서 이들 주된 수인성 원충류를 신속, 간단 그리고 경제적으로 검출하는 방법은 감염을 조절하고 공공의 건강을 개선하는데 필요하다.
- [0026] 본 발명에서, 본 발명자들은 동시에 이들 세종의 주된 수인성 원충류 모두를 검출할 수 있는 multiplex PCR 테스트를 개발하였다. multiplex PCR 방법의 검출 한계는  $10^1$ 에서  $10^2$  접합자낭(oocysts) 또는 포자의 범위이다.
- [0027] 본 발명에서 사용된 미포자충 또는 *Cryptosporidium*에 대한 프라이머는 각각 *Enterocytozoon bieneusi* 및 *Encephalitozoon intestinalis* 모두 또는 *Cryptosporidium hominis* 및 *Cryptosporidium parvum* 모두를 검출할 수 있다. BsaBI 또는 BsiEI로 PCR산물의 제한 효소 처리는 각각 두 종의 미포자충 또는 *Cryptosporidium*를 구별할 수 있게 한다. 이 단순하고 신속하며 경제적인 multiplex PCR 방법은 수인성 원충류 감염의 유행 또는 산발적인 케이스를 검출하는데 매우 유용할 것이다.
- [0028] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0029] 첫 번째 라운드 PCR 증폭으로부터 본 발명자들은 각각 미포자충, *C. cayetanensis*, 및 *Cryptosporidium*,에 대한 644~657 bp, 636 bp, 및 415~427의 예측된 크기의 산물을 얻었다(데이터 도시 안함). 두 번째 라운드 PCR로부터, 각각 미포자충, *C. cayetanensis*, 및 *Cryptosporidium*,에 대한 410~420 bp, 294 bp, and 171~183 bp의 예측된 크기의 PCR 산물을 얻었다(도 1). 각 개별 원충류로부터 유래한 주형 DNA로 수행된 nested PCR 증폭의 최저 검출 한계는 미포자충류에 대해서는  $10^2$  포자, *Cyclospora*에 대해서는  $10^0$  접합자낭, *Cryptosporidium*에 대해서는  $10^1$  접합자낭이었다(도 1).
- [0030] 각 개별 원충류로부터 유래한 주형 DNA로 수행된 multiplex PCR 증폭의 최저 검출 한계는 미포자충류 및 *Cyclospora*에 대해서는  $10^2$  이었고, *Cryptosporidium* 에 대해서는  $10^1$  이었다(도 2).
- [0031] 본 발명에서 사용된 미포자충 및 *Cryptosporidium*에 대한 프라이머들은 각각 *E. bieneusi* 및 *E. intestinalis* 그리고 *C. parvum* 및 *C. hominis*,를 모두 검출할 수 있다. 결과적 nested PCR 산물의 제한 효소 처리는 두 종의 미포자충과 *Cryptosporidium* spp를 구별할 수 있다. BsaBI으로 제한 효소 처리는 *E. intestinalis*에서 167 및 253 bp의 두 절편화된 밴드를 나타내었고(도 3a), BsiEI로 처리는 *C. parvum*에서 절편화된 밴드를 나타내지 않았다(도 3b).
- [0032] 본 발명에서 사용된 미포자충, *C. cayetanensis*, 및 *Cryptosporidium* 에 대한 프라이머 세트는 각각의 다른 기생 DNA와 교차 반응을 나타내지 않았다(도 4).
- [0033] 본 발명에서 개발한 Multiplex PCR은 미포자충 및 *Cryptosporidium*의 경우에서 개별 PCR법이 가지는 것과 같은 검출 민감도를 나타내었다. 두 번째 라운드 PCR 산물의 아가로스 젤 전기영동은 여기서 보고된 multiplex PCR

테스트를 적용할 때 모든 검출 결과를 제공한다.

[0034] 본 발명에서 개발한 multiplex PCR 테스트의 또 다른 잇점은 *E. bienersi* 및 *E. intestinalis*와 같은 두 종의 미포자충과 *C. parvum* 및 *C. hominis*,와 같은 두 종의 *Cryptosporidium*을 PCR 후에 제한 효소 처리로 구별할 수 있다는 것이다.

[0035] 본 발명자들은 본 발명에서 *E. bienersi* 및 *C. hominis*의 제한효소 처리된 PCR산물을 이들 두 생물체의 DNA가 안전하지 않기 때문에 보여주지 않았다. 대신에 본 발명자들은 제한 효소 절단 소프트웨어 프로그램(Clone Manager 6)을 사용하여 PCR 후에 이들 두 종의 생물체의 제한 효소처리 결과를 확인하였다 .

### 발명의 효과

[0036] 본 발명을 통해서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에서 개발된 multiplex PCR 테스트는 종종 수인성 설사 질환을 야기하는 미포자충 *Cyclospora*, 및 *Cryptosporidium*를 검출할 수 있다. 이 테스트는 매우 단순하고 신속하며 높은 민감도 및 특이성을 제공한다. 이 테스트는 기존에 검출의 어려움으로 인하여 알려지지 않은 병인론 (etiology)으로 간주되어 온 이들 주된 수인성 원충류에 감염에 기인한 유행성 또는 산발적인 설사 질환의 검출을 개선하는데 도움이 될 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 미포자충(1a), *Cyclospora cayetanensis* (1b), 및 *Cryptosporidium* (1c)에 대한 nested PCR 프라이머 세트의 민감도를 나타낸 사진. M, DNA 마커; N, 음성 대조군(DW).

도 2는 미포자충, *Cyclospora cayetanensis*, 및 *Cryptosporidium*에 대한 multiplex nested PCR의 민감도를 나타낸 사진. 각 타입의 원충류로부터 유래한 계대 희석된 주형 DNA를 혼합하고, 각 타입에 대한 세 종류의 프라이머 세트를 한 반응 튜브에 포함시켰다. M, DNA 마커; N, 음성 대조군(DW).

도 3은 BsaBI로 처리된 미포자충 (3a) 및 BsiEI로 처리된 *Cryptosporidium parvum* (3b)의 nested PCR산물의 제한 효소 처리에 대한 사진. M, DNA 마커; Ei, *E. intestinalis*; Cp, *C. parvum*.

도 4는 multiplex nested PCR 프라이머의 특이성을 나타내는 그림. 세 프라이머 세트를 다른 원충류로부터 유래한 DNA와 쌍을 만들 때 교차 반응된 PCR 밴드가 검출되지 않았다. Lane 4, 음성 대조군(DW).

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0039] *E. intestinalis* 포자는 ATCC (Cat. No. 50506)로부터 구입하여 제조업자의 지시에 따라서 BS-C-1 세포 (African green monkey kidney cells; Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)를 사용하여 인 비트로 배양을 통하여 유지하였다.

[0040] 요약하면, 3% 우태아 혈청(GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)이 공급된 2 mM L-글루타민, 1.5 g/L sodium bicarbonate, 0.1 mM 비필수 아미노산, 및 1.0 mM sodium pyruvate를 가지는 Eagle's 최소 필수 배지(Sigma, St. Louis, MO, USA )를 감염의 유지에 사용하였고, 세포를 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>로 배양하였다. Oocysts of *Cryptosporidium parvum* (KKU 분리)의 접합자낭을 Lee SU, Joung M, Ahn MH, Huh S, Song H, Park WY, Yu JR. Parasitol Res 2008; 102: 381-387에 기재된 것과 같이 감염된 실험실 마우스(C57BL6/J)로부터 얻어서 유지하였다.

[0041] 본 실험은 대한민국 서울 소재 건국대학교 실험동물관리위원회의 승인 하에 수행되었다.

[0042] 분변 검체로부터 DNA 추출을 위하여, QIAquick stool 미니 키트(QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA)를 사용하였다. *E. intestinalis* 및 *C. parvum* DNA를 위해서, 1 x10<sup>4</sup>에서 1x10<sup>0</sup>의 분리된 포자 또는 접합자낭을 500 μg의 비감염된 인간 대변에 혼합하고 10 ml 증류수(DW)와 혼합하였다. 100 xg에서 원심분리한 후 증류수로 2회 세척한 후, 펠렛은 그 키트에 포함된 ASL 라이시스 버퍼에 재부유하였다. 그 샘플들을 70°C에서 30 분간 배양하였다. 그 과정은 제조업자의 추천에 따라서 수행되었다. 그 추출된 DNA를 PCR의 주형으로 사용하였다.

*Cyclospora cayetanensis*의 DNA를 Yu JR, Sohn WM. J Korean Med Sci 2003; 18: 738-741에 공개된 케이스 연구의 대상인 감염된 환자의 대변으로부터 추출하였다.

[0043] 본 발명자들은 pGEM-T easy 벡터(Promega, Madison, WI, USA)를 사용한 *Cyclospora* 18s rRNA 유전자를 클로닝하고 그것을 기생체의 각 수와 동량으로 희석한 후 주형 DNA로 사용하였다.

[0044] 본 발명에 사용된 모든 프라이머들을 표 1에 나타내었다.

[0045] 첫 번째 라운드 multiplex PCR 증폭을 5  $\mu$ l 주형 DNA; 10 mM Tris-HCl (pH 8.3); 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 200  $\mu$ M의 각 dATP, dCTP, dGTP, 및 dTTP; 0.7  $\mu$ M의 각 프라이머(미포자충에 대해서는 0.7  $\mu$ M, *Cyclospora* 및 *Cryptosporidium*에 대해서는 1  $\mu$ M); 및 5 U Taq DNA polymerase (Promega)을 포함하는 70- $\mu$ l 부피에서 수행하였다. 두 번째 라운드 multiplex PCR 증폭은 30- $\mu$ l 최종 부피에서 사용된 2  $\mu$ l의 주형 DNA (첫 번째 라운드 PCR의 산물)을 제외하고는 동일한 조건 하에서 수행되었다. 양 증폭은 94°C에서 5 분간 초기 변성, 그 후 35 사이클의 94°C에서 30 sec, 53°C에서 30 sec, 및 72°C에서 90 sec 그리고 72°C에서 10 분간의 최종 확장을 수반하여 C-1000 DNA thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 수행하였다. 두 번째 라운드 PCR 사이클 조건은 어닐링 온도(55°C)만을 제외하고는 첫 번째 라운드와 동일하였다.

[0046] 증폭된 DNA를 2% (w/v) 아가로스 젤로 전기영동하고 ethidium bromide (0.5  $\mu$ g/ml)로 염색하고 ImageQuant300 (GE Healthcare, Giles, UK)하에서 육안화하여 분석하였다.

[0047] 분취량(5  $\mu$ l)의 *E. intestinalis* 또는 *C. parvum* 의 두 번째 라운드 PCR산물을 BsaBI 또는 BsiEI (New England BioLabs, MA, USA)로 60°C에서 2 시간 동안 효소 처리하는데 사용하였다. DNA 절편을 상기 기재한 것과 같이 2% (w/v) 아가로스 젤에서 전기영동하여 분석하였다.

[0048] 표 1은 multiplex PCR에 사용된 프라이머 세트를 나타낸 표이다.

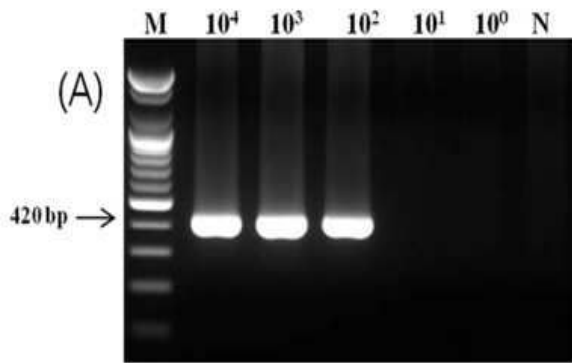
**표 1**

원충류	PCR	Primer name	서열	PCR 산물 크기
미포자충	1 <sup>st</sup>	Mic A	5'-GGAGCCTGAGAGATGGCT-3'(서열번호 1)	644~657 bp
		Mic E	5'-AACGGCCATGCACCAC-3' (서열번호 2)	
	2 <sup>nd</sup>	Mic C	5'-GGTGCCAGCAGCCGCGG-3' (서열번호 3)	410~420 bp
		Mic D	5'-GCACAATCCACTCCT-3' (서열번호 4)	
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	1 <sup>st</sup>	CYCF1E	5'-TACCCAATGAAAACAGTTT-3'(서열번호 5)	636 bp
		CYCR2B	5'-CAGGAGAAGCCAAGGTAGG-3'(서열번호 6)	
	2 <sup>nd</sup>	CYCF3E	5'-CCTTCCGCGCTTCGCTGCGT-3'(서열번호 7)	294 bp
		CYCR4B	5'-CGTCTCAAACCCCTACTG-3'(서열번호 8)	
<i>Cryptosporidium spp.</i>	1 <sup>st</sup>	cp2415F	5'-CCCACGCGAAGTTGAAGTAAC-3' (서열번호 9)	415~427 bp
		cp2415R	5'-CTTAGGTTGCTTGCTTGGAGTTGG-3' (서열번호 10)	
	2 <sup>nd</sup>	cp2171F	5'-CAACCCAGAAGTTGAGGTT-3' (서열번호 11)	171~183 bp
		cp2171R	5'-CTAGTATGCTTCAGACCATGAG-3' (서열번호 12)	

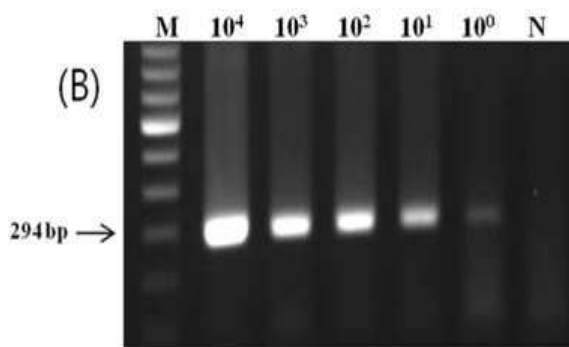
[0049]

도면

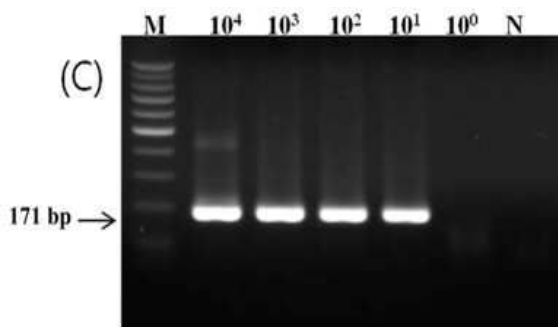
도면1a



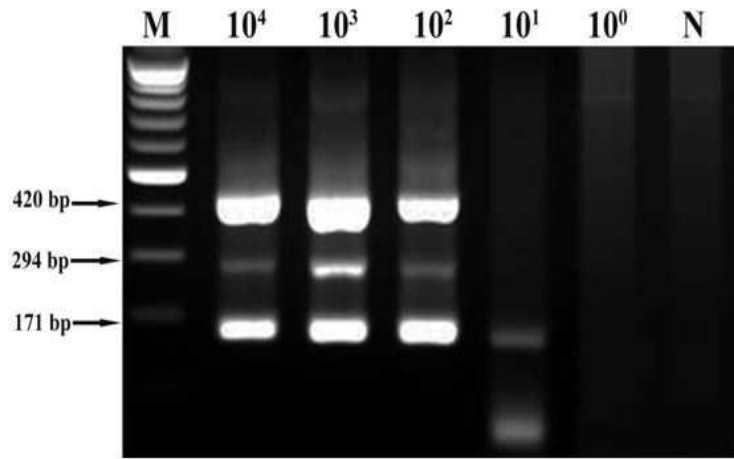
도면1b



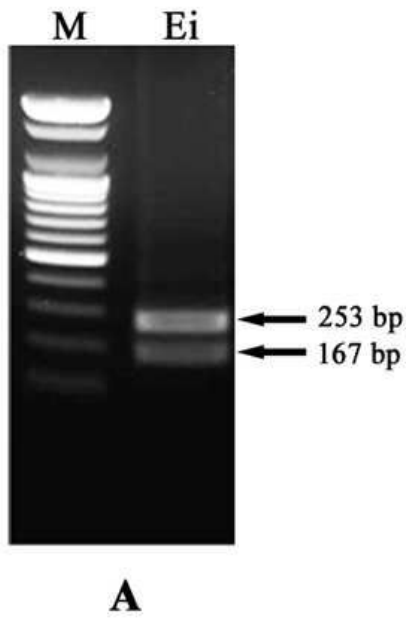
도면1c



도면2

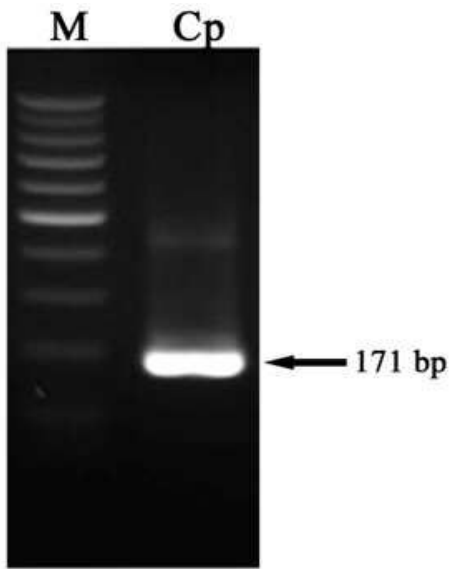


도면3a



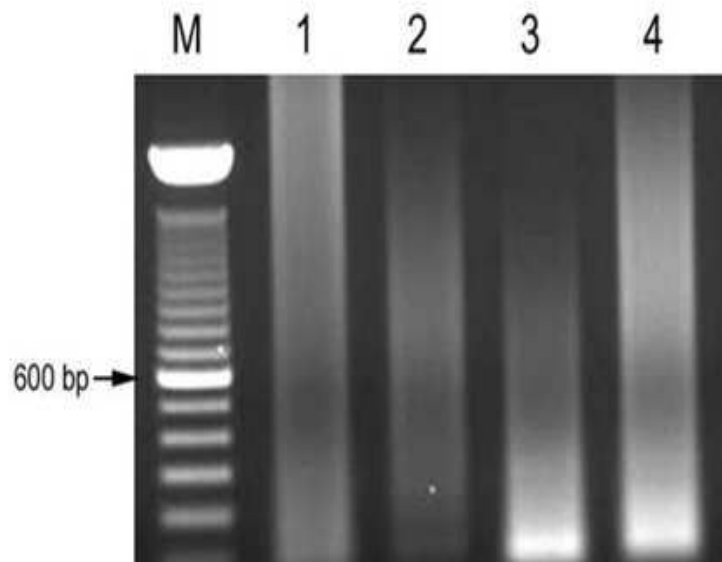


도면3b



**B**

도면4



DNA of <i>Encephalitozoon intestinalis</i>	+	-	-	-
DNA of <i>Cyclospora cayetanensis</i>	-	+	-	-
DNA of <i>Cryptosporidium parvum</i>	-	-	+	-
Primers for <i>E. intestinalis</i>	-	+	+	+
Primers for <i>C. cayetanensis</i>	+	-	+	+
Primers for <i>C. parvum</i>	+	+	-	+

<110> Konkuk University Industrial Cooperation Corp.

<120> Multiplex PCR detection of the waterborne intestinal protozoa

<160> 12

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

ggagcctgag agatggct 18

<210> 2

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

aacggccatg caccac 16

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

ggtgccagca gccgagg 17

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

gcacaatcca ctct 15

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 5  
 tacccaatga aaacagttt 19

<210> 6  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 6  
 caggagaagc caaggtagg 19

<210> 7  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 7  
 ctttcgcgcg ttcgctgcgt 20

<210> 8  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 8  
 cgtcttcaaa cccctactg 20

<210> 9  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 9  
 cccacgcaa gttgaagtaa c 21  
 <210> 10

<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> primer  
<400> 10  
cttaggttgc ttgcttggag ttgg 24  
<210> 11  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> primer  
<400> 11  
caaccagaa gttgaggtt 19  
  
<210> 12  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> primer  
<400> 12  
ctagtatgct tcagaccatg ag 22