

BSPN501-00-1630-3

해양유독식물플랑크톤의 유전자 자원화 기술개발  
연구

Technological development for harvesting genetic resources  
from harmful phytoplankton

한 국 해 양 연 구 원

BS  
PN  
501  
|  
00  
|  
16  
30  
|  
3

해양

유  
독  
식  
물  
플  
랑  
크  
톤  
의

유  
전  
자  
자  
원  
화

기  
술  
개  
발

연  
구

한  
국  
해  
양  
연  
구  
원

# 제 출 문

한국해양연구원장 귀하

본 보고서를 “ 해양 유독 식물플랑크톤의 유전자 자원화 기술개발 연구” 연구과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005. 08. 13.

총괄연구책임자 : 장 만

연 구 원 : 이택건, 최진우,  
신경순, 염승식,  
장민철, 이우진  
김소정, 최은석  
오로라, 윤희영  
김세희, 장풍국  
김선주, 이재도  
류태권, 황청희

## 보고서 초록

과제관리번호	2000-N-NL -01-C-266	해당단계 연구기간	2000. 06. 14 ~ 2005. 06. 13	단계 구분	2/2
연구사업명	국가지정연구실사업				
연구과제명	해양유독식물플랑크톤의 유전자 자원화 기술개발 연구				
연구책임자	장 만	해당단계 참여연구 원수	총 : 17 명 내부 : 7 명 외부 : 10 명	해당단계 연구비	정부: 1,576,721 천원 기업:            천원 계: 1,576,721 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국해양연구원 남해특성연구본부		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	205
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유독식물플랑크톤 유래 biotoxin 검출을 위한 바이오센서 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- GFP 유전자를 이용한 saxitoxin 검출용 바이오센서 개발</li> <li>- PSP, ASP, DSP, NSP 계열 biotoxin 항체 제조</li> <li>- 항원항체 반응을 이용한 PSP, ASP, DSP, NSP 계열 biotoxin 검출용 바이오센서 개발 기술 확보</li> </ul> </li> <li>○ 해양 유독 식물플랑크톤의 분리 및 분자생물학적 분류방법 확보 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 해양 식물플랑크톤 35종 중에서 biotoxin 생성 분류군인 와편모조류 20종을 확보</li> <li>- Saxitoxin 생성이 확인된 <i>Alexandrium</i> 종의 순수 배양.</li> <li>- 해양 식물플랑크톤의 SSU rDNA 염기서열 분석 통한 분자 계통학적 분석</li> </ul> </li> <li>○ Biotoxin 분석기법 확보 및 생합성 관련 유전자 분석 기술 확보 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 조류 배양액으로부터 biotoxin을 조정제하여 biotoxin 성분을 CE 및 PSP 검출키트를 이용하여 정량</li> <li>- Biotoxin 생성이 확인된 <i>Alexandrium tamarense</i>로부터 cDNA library를 제작</li> <li>- EST search를 통해 saxitoxin 생성 cycle에 관련된 유전자 탐색 및 클로닝</li> <li>- EST 클론의 분류 및 saxitoxin 관련 유전자의 발현 분석 기술 확보</li> </ul> </li> </ul>					
색인어 (각 5개 이상)	한글	유독식물플랑크톤, 바이오독신, 바이오센서, 유전자 발현, 와편모조류			
	영어	harmful phytoplankton, biotoxin, biosensor, gene expression, dinoflagellate			

# 요 약 문

## I. 제 목

해양 유독 식물플랑크톤의 유전자 자원화 기술개발 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 필요성

국내외적으로 해양식물플랑크톤을 단일배양하고 이를 이용하고자 하는 연구는 근래에 들어 매우 활발히 진행되고 있으며, 생물다양성 협약 이후로 그 가치가 증대되고 있다. 해양식물플랑크톤 은행을 통한 생리, 생태학적 연구뿐만 아니라 단편적이지만 분자생물학적 연구가 다각적으로 수행되고 있는 시점에서 해양식물플랑크톤에 독특하게 존재하고 있는 유전자를 이용하고자 하는 요구는 점차 증대되고 있다.

해양식물플랑크톤 유래 biotoxin의 이해 및 이용에 관한 연구에 있어서 가장 중요한 부분은 biotoxin을 손쉽게 빠르게 검출할 수 있는 기술의 부재와 biotoxin의 생합성 과정에 관해 거의 이해가 되지 않고 있다는 것이다. 기존의 해양식물플랑크톤 유래 biotoxin에 관한 연구방법은 HPLC나 GC 등을 이용한 biotoxin의 분석 방법이나 핵자기 공명, 질량분석 등의 방법이 이용되어 왔고, 일부 biotoxin에 대해 방사능으로 표지된 물질을 먹이고 이를 추적함으로써 연구하고자 하는 생화학적 방법이 적용되어 왔다. 그러나 이들의 방법으로는 복잡한 구조를 가진 해양식물플랑크톤 유래 biotoxin의 생합성 과정을 이해하기 어렵고, 많은 인력과 장비, 그리고 시간이 요구된다. 따라서 이제까지 알려져 있거나 알려져 있지 않은 biotoxin에 관한 유전자를 탐색하고, 이들의 유전자 은행을 구축하고 활용하는 것만이 biotoxin에 관한 연구 수행에 있어서 거의 유일한 방법으로 받아들여지고 있다.

특히 인간에 피해를 주고 있는 biotoxin에 대한 해독작용에 관한 연구의 미비와

biotoxin을 이용한 생리활성물질의 생산기술 부재는 biotoxin의 대량생산 기술이 없기 때문이다. 현재까지 이용 가능한 해양식물플랑크톤 유래 biotoxin은 해양식물플랑크톤으로부터의 추출에 기초하고 있기 때문에, 생산단가가 높고 따라서 집중적이고도 효과적인 연구가 어려운 실정이다. 따라서 biotoxin 연구의 활성화를 위해서는 biotoxin을 빠르고 정확하게 검출할 수 있는 시스템과 biotoxin 생합성 관련 유전자의 분리가 요구되고 있다.

## 2. 최종목표

- Seed bank를 통한 해양유독식물플랑크톤의 배양 및 유지
- 유독식물플랑크톤 유래 biotoxin 검출을 위한 바이오센서 개발
- Biotoxin 생합성관련 유전자의 탐색 및 분리
- Biotoxin 관련 유전자 발현 분석

## III. 연구개발의 내용 및 범위

### 1. 해양식물플랑크톤 유래 biotoxin 검출을 위한 바이오센서의 개발

- 유독식물플랑크톤 확보
- 박테리아 발광물질 유전자를 이용한 바이오센서 개발을 위한 기법 개발
- PSP, ASP, DSP, NSP 계열 biotoxin을 항원으로 하는 항체 개발 및 항원-항체반응을 이용한 바이오센서 개발
- 바이오센서 개발 기법의 확립

### 2. Biotoxin의 생화학적 특성 연구를 위한 분자생물학적 연구

- SSU rDNA 염기서열 분석을 통한 식물플랑크톤의 분자계통학적 분석
- Capillary electrophoresis 및 PSP 검출키트를 이용한 PSP toxin의 정량
- cDNA library 구축, EST 분석을 통한 biotoxin 관련 유전자의 탐색 및 클로닝
- Biotoxin 생합성 관련 유전자 분리 및 발현분석

#### IV. 연구개발결과

1. 유독식물플랑크톤 유래 biotoxin 검출을 위한 바이오센서 개발
  - GFP 유전자를 이용한 saxitoxin 검출용 바이오센서 개발
  - PSP, ASP, DSP, NSP 계열 biotoxin 항체 제조
  - 항원항체 반응을 이용한 PSP, ASP, DSP, NSP 계열 biotoxin 검출용 바이오센서 개발
2. 해양 유독 식물플랑크톤의 분리 및 분자생물학적 분류방법 확보
  - 해양 식물플랑크톤 35종 중에서 biotoxin 생성 분류군인 와편모조류 20종을 확보
  - Saxitoxin 생성이 확인된 *Alexandrium* 종의 순수 배양.
  - 해양 식물플랑크톤의 SSU rDNA 염기서열 분석 통한 분자 계통학적 분석
3. Biotoxin 분석기법 확보 및 생합성 관련 유전자 분석 기술 확보
  - 조류 배양액으로부터 독성 물질을 조정제하여 독성 물질 성분을 CE 및 PSP 검출키트를 이용하여 정량
  - Biotoxin 생성이 확인된 *Alexandrium tamarense*로부터 cDNA library를 제작
  - EST search를 통해 saxitoxin 생성 cycle에 관련된 유전자 탐색 및 클로닝
  - EST 클론의 분류 및 saxitoxin 관련 유전자의 발현 분석 기술 확보

#### V. 연구개발결과의 활용계획

1. 배양 중인 해양 유독식물플랑크톤 은행의 활용
  - 생리 및 분자생물학적 연구를 위한 해양유독식물플랑크톤의 확보
  - 타 기관으로의 분양 및 기술 지도를 통한 연구의 다변화 모색 및 국내 식물플랑크톤 연구의 활성화
  - 유독식물플랑크톤의 유전자 지도 작성을 위한 재료 확보

## 2. 해양식물플랑크톤의 분자계통학적 분석

- 해양식물플랑크톤의 SSU rDNA의 염기서열 분석을 통한 분자계통학적 연구를 통해 국내 해양식물플랑크톤의 정확한 분류를 위한 기반 구축
- 지역간, 시기간 유독식물플랑크톤 분자 계통도를 통한 적조발생 기작의 연구를 위한 자료 축적

## 3. Biotoxin 검출을 위한 바이오센서 개발

- 국내 바이오센서 개발을 위한 연구영역의 확대
- 첨단기법을 이용한 바이오센서 개발 연구 영역의 확대
- 현장에서의 간편하고 정확한 biotoxin 검출
- 적조 사전예측 및 수질감시를 위한 모니터링 시스템으로의 적용 가능
- 적조의 정확하고 빠른 탐지 및 예측을 통한 어민 피해감소
- PSP, ASP, DSP, NSP 계열 biotoxin 검출용 바이오센서 개발을 위한 기반기술 제공

## 4. Biotoxin 생합성 관련 유전자의 탐색 및 분리

- 전세계적으로 연구가 거의 되지 않고 있는 Biotoxin 생합성 과정, 작용기작, 해독작용 등 기반 연구의 활성화
- 식물플랑크톤 유전자 유전자목록작성 및 염기서열결정을 통한 식물플랑크톤 연구의 활성화 및 유용성분 추출 등과 같은 활용가능성 증대
- Biotoxin 생합성 관련 유전자의 확보 및 특허등록을 통한 국가 경쟁력 강화



## S U M M A R Y

### I . Title

Technological development for harvesting genetic resources from harmful phytoplankton.

### II . Necessity and objective of the study

#### 1. Needs

Many active researches are conducted on culturing and using marine microscopic algae. Since the Convention on Biological Diversity (CBD) the genetic diversity of microalgae is becoming more valuable. As physiological, ecological and basic molecular biological researches are conducted through the world, peculiar genetic resources of marine microalgae are great interests to scientists and others for their potential uses.

The most essential but missing components to understand and use toxic substances of marine microalgae are developing the fast, easy and economical determining technology for detecting those cells and the full understanding of process of synthesizing those toxins. The standard research techniques for studying marine microalgae toxins use HPLC or GC for analyzing toxic chemicals or use nuclear magnetic resonance and mass spectra. In addition, biochemical techniques are also utilized such as radioactive labeling and following the processes. However, all the available techniques are not enough to understand intracellular biosynthetic pathway of the biotoxin with intricate structure and demands laborious investment as well as multiple instrumentation of often time consuming and inefficient methods. Therefore, it is critical to explore genetic resources of toxic algae and compile in the genetic information and gene bank. For most of toxic algae scientists, this approach is received as only viable way in successfully carrying out

researches on toxic substances and algae which producing them.

Particularly, the researches on detoxification of the toxic substances harmful to human are still much to be desired due to the lack of appropriate technology. Also these technological deficiencies present scientists with enormous difficulties and challenges in developing suitable mass production methods of bioactive substances from toxic materials. Toxic materials from marine microalgae currently in use based on the extractions from the marine microalgae themselves, which in turn impose heavy production cost, hence making effective and focused works on those toxins impractical and often ineffectual. Thus, development of a fast and accurate detection system and isolation of genes relating to biotoxin biosynthesis are required for successfully carrying out biotoxin researches.

## 2. Ultimate goal

- Culture and maintenance of harmful marine phytoplankton by Seed bank
- Development of biosensor in extracting biotoxin from harmful phytoplankton
- The search and separation of Biotoxin biosynthesis related genes
- Expression of biotoxin biosynthesis related genes

## III. Scope of the study

1. Development of biosensor for detection of biotoxin from marine microalgae
  - The security of organisms (harmful microalgae) that cause red tide
  - Development of biosensors by using bacterial luminescence gene
  - Development of antibody that uses PSP, ASP, DSP, NSP biotoxin as an antigen and the development of biosensor using antigen-antibody reaction
  - Establishment of biosensor techniques
2. Molecular biological research for the close examination of biochemical

specificities in biotoxin

- Molecular phylogenetic analysis of microalgae by assaying SSU rDNA
- Quantitative analysis of PSP toxin using capillary electrophoresis and PSP detection kit
- Construction of the cDNA library, the search and cloning of toxin related genes by EST analysis
- Studies on isolation and expression of toxicity biosynthesis related genes

#### IV. Results of the study

1. Development of biosensor for detection of biotoxin from marine microalgae
  - Development of saxitoxin detection biosensor using the GFP gene
  - Development of an antibody using the PSP, ASP, DSP, NSP biotoxin
  - Development of biosensor for PSP, ASP, DSP, NSP biotoxin detection using the antigen-antibody reaction
  
2. The isolation of marine harmful microalgae and Security of molecular biological grouping of marine microalgae species
  - Security of 20 different dinoflagellates out of 35 marine microalgal species which secret toxins
  - Pure culture of the *Alexandrium* species which are affirmed to generate toxicity
  - Molecular taxonomical analysis of microalgae by assaying SSU rDNA
  
3. The assay of toxic materials and isolation of biotoxin synthesis related genes in harmful microalgae
  - Quantitative analysis of separating toxic material ingredients by CE and detection kit, refining biotoxin purified from algal medium
  - Construction of the cDNA library from *Alexandrium tamarense* which toxicity

production has been confirmed

- The search for PSP production cycle related gene by EST
- Classification of EST clone and studies on expression of saxitoxin related genes

## V. Application and Future Studies

### 1. Application of the marine harmful microalgae bank in culture

- Security of harmful microalgae for physiological and molecular biological studies
- Diversification by transferring and sharing the information and technologies to other institutes and activation of domestic research fields of plankton studies
- Security of genetic materials for genetic map construction of harmful microalgae

### 2. Phylogenetic analysis of marine microalgae

- System development for phylogenetic classification of domestic marine microalgae by using 18S rDNA sequence analysis
- Accumulation of materials and information about the mechanism of red tide blooming by analyzing the spatial and temporal distribution of harmful microalgae

### 3. Biosensor system development for detection of biotoxin

- Extension of research field about domestic biosensor development
- Extension of biosensor research field by applying high-technologies
- Simple and accurate diagnosis of biotoxins at the actual spots
- Application as a monitoring system for diagnosis of water quality and accurate forecast of red tide

- Decrease of fishery damage by using the rapid and accurate diagnosis and forecast system to the red tide
- Development of fundamental technology to develop the biosensor system for the diagnosis of PSP, ASP, DSP and NSP biotoxin

#### 4. Screening and isolation of the genes related in the toxin biosynthesis

- Activation of the research fields such as toxin biosynthesis, action mechanism and detoxification which have not focused in world-wide
- Activation of the research field in planktons and the extraction of useful materials through indexing the genes of planktons as well as sequencing the genes isolated
- Intensification of national competitive power through security of genes related in toxin biosynthesis and patent registration

# C O N T E N T S

Chapter 1. Introduction of this study .....	21
Part 1. Economical, social and technological importances of this researches and developments .....	23
1. A Technological side .....	23
2. A Economical and industrial side .....	26
3. A Social and cultural side .....	27
Chapter 2. Research status .....	29
Part 1. Abroad research status .....	35
Part 2. Domestic research status .....	38
Part 3. Problems in current research status .....	39
Chapter 3. Contents and results of the study .....	41
Part 1. Contents and methods of the study .....	43
1. Development of the biosensor for detection of biotoxin from harmful algal species 43	
A. Biosensor for detection of saxitoxin using green fluorescent protein (GFP) gene 43	
B. Developments of the biosensor for detection of saxitoxin using antigen-antibody reaction .....	48
C. Antibody preparation for development of biosensor detecting PSP, ASP, DSP, and NSP biotoxin .....	51
D. Development of biotoxin detection kit using rapid immunofilter paper assay (RIPA) .....	53
2. Molecular Researches for isolation and search of genes related the saxitoxin biosynthesis .....	54
A. Phylogenetic analysis of microalgae using alignments of SSU rDNA sequences 54	
B. Researches for biosynthetic pathway of biotoxin .....	60
C. Classification of STX-related genes from EST library .....	63
D. Analysis of saxitoxin-related genes .....	68

Part 2. Results of the study .....	71
1. Development of the biosensor for detection of biotoxin from harmful algal species	71
A. Biosensor for detection of saxitoxin using green fluorescent protein (GFP) gene	71
B. Developments of the biosensor for detection of saxitoxin using antigen-antibody reaction .....	74
C. Antibody preparation for development of biosensor detecting PSP, ASP, DSP, and NSP biotoxin .....	77
D. Development of biotoxin detection kit using rapid immunofilter paper assay (RIPA) .....	84
2. Molecular biological studies for isolation of STX biosynthesis-related genes .....	87
A. Phylogenetic Analysis of Marine Phytoplankton Species .....	87
B. Molecular analysis on biotoxin biosynthesis of <i>A. tamarense</i> JHW0004-12 .....	93
C. Differential display and RNA blot of synchronized cell .....	101
C. Classification of STX-related genes from EST library .....	104
D. Analysis of saxitoxin-related genes .....	109
Chapter 4. Achievement of the study goal and effects on related part .....	165
Part 1. A Technological side .....	167
Part 2. A Economical-industrial side .....	168
Chapter 5. Application and utilization plan of the results .....	171
Chapter 6. Abroad scientific informations obtained during processes of researches and developments .....	175
Chatper 7. References .....	183

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	21
제 1 절. 연구개발의 경제·사회·기술적 중요성 .....	23
1. 기술적 측면 .....	23
2. 경제·산업적 측면 .....	26
3. 사회·문화적 측면 .....	27
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	29
제 1 절. 국외의 기술동향 .....	35
제 2 절. 국내의 기술동향 .....	38
제 3 절. 현 기술상태의 취약성 .....	39
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	41
제 1 절. 연구 개발 수행 내용 및 연구 방법 .....	43
1. 유독식물플랑크톤 biotoxin 검출을 위한 바이오센서 개발 .....	43
가. Green fluorescent protein (GFP) 유전자를 이용한 saxitoxin 검출용 바이오센서 .....	43
나. 항원-항체 반응을 이용한 saxitoxin 검출용 바이오센서 개발 .....	48
다. STX 외 PSP, ASP, DSP 및 NSP에 대한 항체 제조 .....	51
라. RIPA를 이용한 biotoxin 검출 키트 개발 .....	53
2. Saxitoxin 생합성관련 유전자 탐색 및 분리를 위한 분자생물학적 연구 .....	54
가. SSU rDNA 염기서열 분석을 통한 식물플랑크톤의 분자계통학적 분석 .....	54
나. biotoxin 생합성 경로 연구 .....	60
다. EST library 로부터 STX 관련 유전자의 선별 .....	63
D라. Saxitoxin 관련 유전자의 발현분석 .....	68



제 2 절. 연구 수행 결과 및 연구 성과 .....	71
1. 유독식물플랑크톤 biotoxin 검출을 위한 바이오센서 개발 .....	71
가. GFP 유전자를 이용한 saxitoxin 검출용 바이오센서 개발 .....	71
나. 항원-항체 반응을 이용한 saxitoxin 검출용 바이오센서 개발 .....	74
다. PSP, ASP, DSP 및 NSP에 대한 항체 제조 .....	77
라. RIPA를 이용한 biotoxin 검출 키트 개발 .....	84
2. STX 생합성 관련 유전자 탐색 및 분리를 위한 분자생물학적 연구 .....	87
가. 해양식물플랑크톤종의 분자계통학적 분석 .....	87
나. <i>A. tamarense</i> JHW0004-12의 biotoxin 생합성에 대한 분자생물학적 분석	93
C. 동조배양세포의 differential display 및 RNA blot .....	101
다. EST library로부터 STX 관련 유전자의 선별 .....	104
라. Saxitoxin 관련 유전자의 발현분석 .....	109
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	165
제 1 절. 기술적 측면 .....	167
제 2 절. 경제·산업적 측면 .....	168
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	171
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	175
제 7 장 참고문헌 .....	183

## List of Figures

Figure 1. Proposed biochemical pathway of STX synthesis. ....	25
Figure 2. Saxitoxin derivatives .....	33
Figure 3. Structure of shellfish toxin for antibody preparation .....	52
Figure 4. Sampling sites for the isolation of harmful dinoflagellate strains...	58
Figure 5. Shellfish와 <i>Alexandrium tamarense</i> JHW0004-12 .....	66
Figure 6. Uni-ZAP XR vector와 pBluescript SK- vector의 map .....	67
Figure 7. pET-22b(+) expression vector inserted GFP gene .....	71
Figure 8. Death rate of transformed <i>E. coli</i> on STX .....	72
Figure 9. Transformed <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	73
Figure 10. Repellent of transformed <i>E. coli</i> on STX .....	73
Figure 11. Detection of STX-protein conjugate .....	74
Figure 12. Titration curve of anti-STX antiserum using ELISA .....	75
Figure 13. Titration curve of anti-STX antiserum on free STX using ELISA ...	76
Figure 14. Detection of domoic acid-protein conjugate .....	77
Figure 15. Detection of gonyautoxin-protein conjugate .....	78
Figure 16. Detection of neosaxitoxin-protein conjugate .....	78
Figure 17. Detection of okadaic acid-protein conjugate .....	79
Figure 18. Detection of pectenotoxin-protein conjugate .....	79
Figure 19. Titration curve of anti-domoic acid antiserum using ELISA .....	80
Figure 20. Titration curve of anti-gonyautoxin antiserum using ELISA .....	80
Figure 21. Titration curve of anti-neosaxitoxin antiserum using ELISA .....	81
Figure 22. Titration curve of anti-okadaic acid antiserum using ELISA .....	81
Figure 23. Titration curve of anti-pectenotoxin antiserum using ELISA .....	81
Figure 24. Schematic diagram of RIPA .....	85
Figure 25. Result of RIPA for saxitoxin .....	86
Figure 26. Genomic DNAs (A) and PCR products of SSU rDNA (B) .....	88
Figure 27. Molecular phylogenetic tree of dinoflagellates inferred from SSU rDNA region by Neighbor joining method .....	90
Figure 28. Molecular phylogenetic tree of dinoflagellates inferred from SSU rDNA region by Maximum parsimony method .....	91

Figure 29.	Molecular phylogenetic tree of dinoflagellates inferred from SSU rDNA region by Maximum likelihood method .....	92
Figure 30.	SEM photographs of <i>Alexandrium tamarens</i> JHW0004-12 showing morphology .....	93
Figure 31.	Cell densities in <i>A. tamarens</i> as a function of time and during synchronous growth on a 14:10 L/D cycle. ....	94
Figure 32.	Synchronization experiment by dark-induced block/release method	95
Figure 33.	Variation in the cell size distribution of <i>A. tamarens</i> during the first 48 hours of the synchronization experiment .....	95
Figure 34.	UV electro pherograms for each of the PSP toxins in standards (A) and <i>A. tamarens</i> cells (B) .....	96
Figure 35.	Calibration curves for STX, NEO, GTX1, GTX2, GTX3 and GTX4 obtained by CE-UV/DAD method .....	97
Figure 36.	UV electro pherograms for each of the PSP toxins in <i>A. tamarens</i> during synchronization culture .....	98
Figure 37.	Changes in total toxin concentration of the population in <i>A. tamarens</i> as a function of time and during synchronous growth on a 14:10 L/D cycle .....	99
Figure 38.	Changes in total toxin concentration per cell of <i>A. tamarens</i> as a function of time and during synchronous growth on a 14:10 L/D cycle .....	99
Figure 39.	Cell growth of <i>A. tamarens</i> nontoxic and toxic strains .....	100
Figure 40.	Saxitoxin quantification by percent absorbance of PSP kit in each <i>A. tamarens</i> strain .....	101
Figure 41.	Comparison of DD analysis of <i>A. tamarens</i> . Different cell cycle stages in synchronized cultures were analyzed .....	102
Figure 42.	DD comparing cells of <i>A. tamarens</i> in the light and dark phase while STX production was turned on or off .....	102
Figure 43.	Partial alignments of the differentially expressed protein of <i>A. tamarens</i> . S-Adenosylmethionine synthetase aligned with <i>A. castellanii</i> , <i>P. infestans</i> , and <i>Homo sapiens</i> . ....	103
Figure 44.	Partial alignments of the differentially expressed protein of <i>A. tamarens</i> . Histone-like protein aligned with two different histone-like protein sequences from <i>A. castellanii</i> and <i>P. infestans</i> . ....	103
Figure 45.	Flow Chart of cDNA library construction .....	105
Figure 46.	Electrophotography of EST library .....	105
Figure 47.	Functional clustering of <i>Alexandrium tamarens</i> ESTs .....	106
Figure 48.	Total RNA from <i>A. tamarens</i> .....	107

Figure 49. Dot blotting of ESTs between toxic and non-toxic strain of <i>Alexandrium tamarense</i> .....	108
Figure 50. Overview of GeneFishing™ kit of Seegene Co. ....	109
Figure 51. 2% agarose gel electrophoresis of differential expressed genes...	110
Figure 52. Multi-alignment of SAH hydrolase .....	118
Figure 53. Multi-alignment of glycine N-methyltransferase .....	119
Figure 54. Multi-alignment of SAMe decarboxylase .....	120
Figure 55. Multi-alignment of cystathionine beta-synthase .....	121
Figure 56. Semiquantitative RT-PCR of saxitoxin related clones .....	123
Figure 57. Semiquantitative RT-PCR of saxitoxin related clones .....	124

## List of Tables

Table 1.	Distribution of PSP producing microalgae .....	32
Table 2.	Known biotoxin from harmful microalgae and their toxicity .....	36
Table 3.	Genetic information center .....	38
Table 4.	Algal cultures used in this analysis .....	55
Table 5.	List of dinoflagellate strains examined in this study and GenBank accession numbers for their SSU rDNA sequences .....	56
Table 6.	Composition of culture media in this study .....	57
Table 7.	Primers used for PCR amplification and sequencing SSU rDNA ...	60
Table 8.	Hogness Freezing Medium .....	67
Table 9.	Sensitivity of anti-STX antiserum .....	76
Table 10.	Sensitivity of anti-domoic acid antiserum .....	82
Table 11.	Sensitivity of anti-gonyautoxin antiserum .....	82
Table 12.	Sensitivity of anti-neosaxitoxin antiserum .....	82
Table 13.	Sensitivity of anti-okadaic acid antiserum .....	83
Table 14.	Sensitivity of anti-pectenotoxin antiserum .....	83
Table 15.	Comparison of detection method for biotoxin .....	84
Table 16.	Characterization of RIPA .....	85
Table 17.	Increased clones from reverse Northern analysis .....	108
Table 18.	Primers for PCR of differential expressed genes .....	110
Table 19.	Blast search of 13 DEG clones .....	112
Table 20.	Nucleotide sequences of identified 13 DEG clones .....	113
Table 21.	Description of designed degenerate primer sequence .....	122
Table 22.	Primer description for semiquantitative RT-PCR .....	122
Table 23.	Different types of harmful algal blooms .....	180



## 제 1 장 연구개발과제의 개요





## 제 1 절. 연구개발의 경제·사회·기술적 중요성

본 기술은 해양식물플랑크톤에 대한 생명공학, 분자생물학 분야의 연구기법 개발과 유전공학적인 방법을 이용한 해양식물플랑크톤 유래 biotoxin의 생합성 관련 유전자 은행 구축 및 이용 기술 개발을 위한 기반기술이다. 본 연구는 biotoxin을 분비하거나 함유하여 어패류나 인간에게 피해를 주고 있는 독성 해양식물플랑크톤으로부터 biotoxin의 생합성에 관여하는 유전자를 클로닝하고, 이를 유전자 은행으로 구축하여 해양식물플랑크톤 유래 biotoxin에 관한 여러 가지 연구 수행을 위한 근간을 구축하고자 하는 것이며, 연구의 내용은 다음과 같이 요약할 수 있다.

1. 해양식물플랑크톤 유래 biotoxin의 검출을 위한 바이오센서의 개발
2. Biotoxin 생합성 관련 유전자의 클로닝
3. Biotoxin 생합성 경로 연구
4. 다양한 biotoxin 생합성 관련 유전자 은행 구축

해양식물플랑크톤 유래 biotoxin에 관한 연구는 다른 분야와는 달리 biotoxin의 구조 및 생체내 생합성 과정 등이 거의 알려져 있지 않은 실정이며, 주로 생화학적 기법을 이용한 biotoxin의 탐색, 정량 등의 연구에 국한되어 있다. 본 연구과제는 해양식물플랑크톤 유래 biotoxin을 손쉽게 빠르게 검출하는 기술을 개발하고, biotoxin의 생합성에 관련하고 있는 유전자를 확보하여 유전자 은행을 구축하고자 하는 것으로 정보통신산업 분야와 더불어 21세기에서 가장 유망한 국가적 정책산업으로 여겨지고 있는 생명공학산업, 특히 해양생물을 이용한 해양생명공학 산업의 근간이 될 수 있는 연구과제이다.

### 1. 기술적 측면

세계적으로 해양식물플랑크톤을 단일배양하고 이를 이용하고자 하는 연구는 근래에 들어 매우 활발히 진행되고 있으며, 생물다양성 협약 이후로 그 가치가 증대되고 있다. 해양식물플랑크톤은행을 통한 생리, 생태학적 연구뿐만 아니라 단편적이지만 분자생물학

적 연구가 다각적으로 수행되고 있는 시점에서 해양식물플랑크톤에 독특하게 존재하고 있는 유전자를 이용하고자 하는 요구는 점차 증대되고 있다.

해양식물플랑크톤 유래 biotoxin의 이해 및 이용에 관한 연구에 있어서 가장 중요한 부분은 biotoxin을 손쉽게 빠르게 검출할 수 있는 기술의 부재와 biotoxin의 생합성 과정에 관해 거의 이해가 되지 않고 있다는 것이다. 기존의 해양식물플랑크톤 유래 biotoxin에 관한 연구방법은 HPLC나 GC 등을 이용한 biotoxin의 분석 방법이나 핵자기 공명, 질량분석 등의 방법이 이용되어 왔고 (Murata et al., 1989; Yasumoto and Murata, 1993), 일부 biotoxin에 대해 방사능으로 표지된 물질을 먹이고 이를 추적함으로써 연구하고자 하는 생화학적 방법이 적용되어 왔다 (Shimizu et al., 1984; Douglas et al., 1992). 해양유독식물플랑크톤에 의해 합성되는 biotoxin 중 가장 많이 연구된 것은 saxitoxin(STX)이다. STX의 합성 경로는 아직까지 자세히 밝혀져 있지는 않지만 예상되는 경로는 Fig. 1과 같으며, arginine, S-adenosylmethionine, acetate 등이 관여하는 것으로 알려졌다 (Shimizu et al. 1990a, b; Shimizu 1993; Shimizu and Wrensford 1993). 어떠한 중간 산물이나 기질도 밝혀지지 않았지만 STX 분자로부터 arginine과 acetate 등이 관여함을 알 수 있다.

지금까지 보고된 연구 결과에 의하면 *Alexandrium fundyense*에서 초기 G1 phase에 toxin 생합성에 관련될 것으로 추정되는 유전자가 발현되었고, 이 시기에 발현된 유전자 들로는 S-adenosylhomocysteine hydrolase, methionine aminopeptidase, histone-like protein 등이다 (Gaspar et al., 2000). *Gonyaulax polyedra*에서 연구된 결과에 의하면 luciferin binding protein (LBP)이 cell cycle을 조절하여 G1 phase에서 toxin을 생합성 하는 데 관여할 것으로 예상하고 있다 (Machabee et al., 1994; Mittag et al., 1994). Peridinin chlorophyll a binding proteins와 chlorophyll a to c binding proteins 역시 STX 생합성에 관련된 유전자로 알려져 있다 (Johnsen et al., 1994; Jovine et al., 1992; Triplett et al., 1993). Cell cycle을 조절하는 단백질로 알려진 CDC2 kinase는 *Gambierdicus toxicus*에서 잘 연구되어 있는데 역시 toxin 생합성과 관련되었을 것으로 예상하고 있다 (Rodriguez et al., 1994; Van Dolah et al., 1995).

그러나 이들의 방법으로는 복잡한 구조를 가진 해양식물플랑크톤 유래 biotoxin의 생합성 과정을 이해하기 어렵고, 많은 인력과 장비, 그리고 시간이 요구된다. 따라서 이제 까지 알려져 있거나 알려져 있지 않은 biotoxin에 관한 유전자를 탐색하고, 이들의 유전자 은행을 구축하고 활용하는 것만이 biotoxin에 관한 연구 수행에 있어서 거의 유일한

방법으로 받아들여지고 있다.

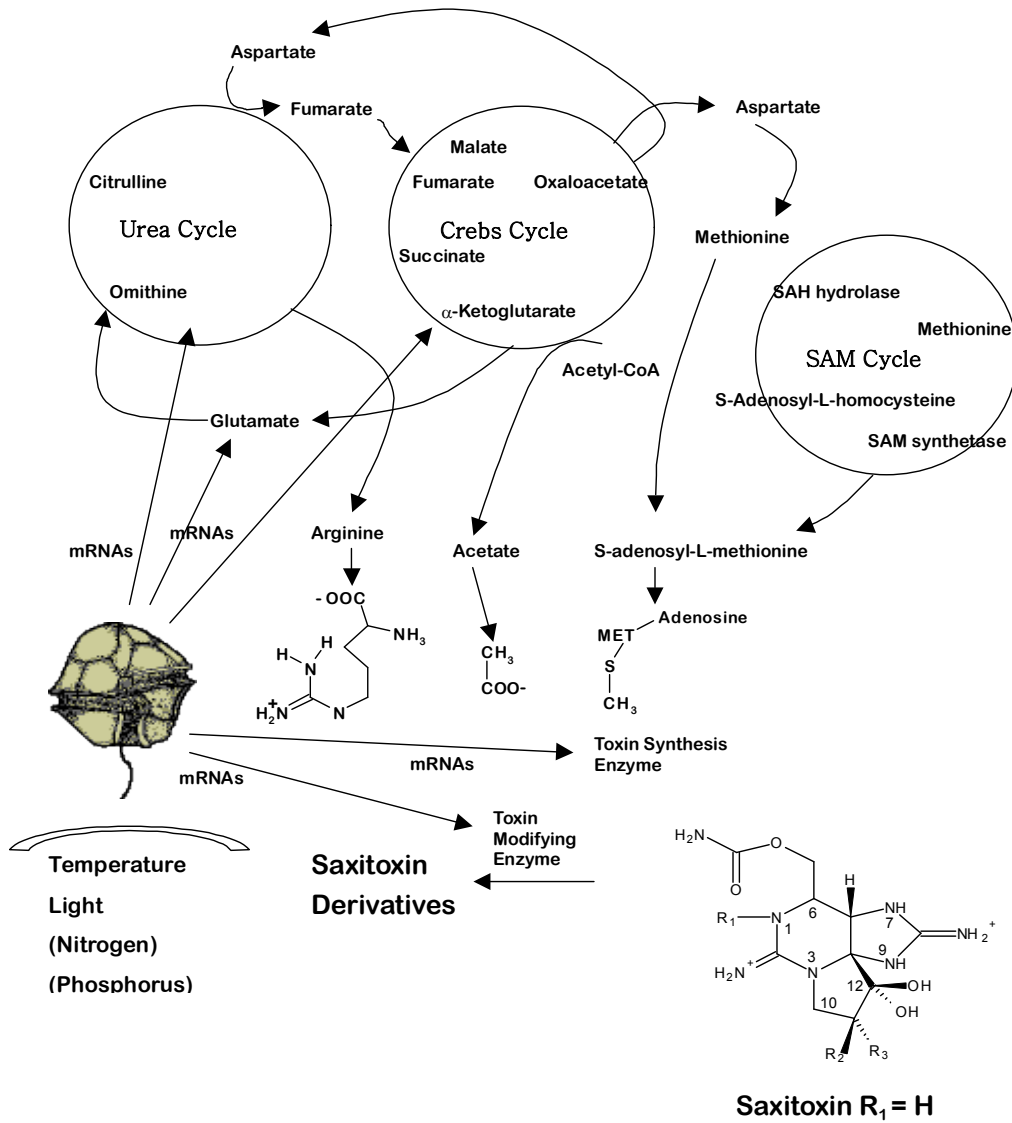


Figure 1. Proposed biochemical pathway of STX synthesis. The identification of STX precursors is based on references (Shimizu, 1993; Shimizu *et al.*, 1990a; Shimizu *et al.*, 1990b; Shimizu and Wrensford, 1993).

특히 인간에 피해를 주고 있는 biotoxin의 해독작용에 관한 연구의 미비와 biotoxin을 이용한 생리활성물질의 생산기술 부재는 biotoxin의 대량생산 기술이 없기 때문이다. 현재까지 이용 가능한 해양식물플랑크톤 유래 biotoxin은 해양식물플랑크톤으로부터의 추출에 기초하고 있기 때문에 생산단가가 높고 따라서 집중적이고도 효과적인 연구가 어려운

실정이다. 본 연구과제에 적용하게 될 biotoxin 검출방법은 박테리아의 발광물질 (luciferase) 유전자를 PCR 클로닝하여 박테리아에 형질전환시키고, 이를 이용하여 biotoxin을 검출하는 방법이다. 이러한 방법은 해양식물플랑크톤이나 휴면포자 등에 직접 사용하므로 실험이 간편하고, 빠르고, 저렴한 특징을 가진다. 위와 같은 biotoxin 검출방법을 이용하여 biotoxin을 합성하고 있는 해양식물플랑크톤으로부터 biotoxin의 생합성에 관련하는 유전자를 탐색하게 된다.

Biotoxin의 합성은 환경에 매우 민감하게 반응하는 것으로 알려져 있는데 (Hall, 1982; Anderson et al., 1990a, b), 온도, 광도, 저농도의 질소원 및 인산원 노출 등의 방법을 사용하여 biotoxin 합성을 유도한 후, biotoxin을 합성하는 세포와 biotoxin을 합성하지 않는 세포로부터 mRNA를 분리하고, cDNA를 만들어 subtractive hybridization 과 mRNA differential display 기법을 통해 biotoxin의 생합성에 관련된 유전자만을 분리하게 된다. 위와 같은 과정은 STX, domoic acid, okadaic acid, brevetoxin, ciguatoxin 및 ichthyotoxin 등과 같은 biotoxin에 대하여 각각 수행하게 될 것이며, 이를 통하여 해양식물플랑크톤으로부터 합성되는 가능한 모든 종류의 biotoxin에 대한 유전자 은행을 구축하고자 하는 것이 본 연구과제의 핵심사항이다.

## 2. 경제·산업적 측면

해양식물플랑크톤 유래 biotoxin은 알려진 어패류 및 인간에 유독하다고 하는 것 외에 해양식물플랑크톤 biotoxin의 의학관련 연구의 가능성으로 하여 최근에 연구의 관심이 되고 있다. 이들의 연구를 위해서는 biotoxin 생합성 관련 유전자의 분리 및 특성 연구는 필수적이며, 이들의 확보 및 분양 등을 통하여 위와 같은 연구가 활성화가 될 수 있을 것으로 판단하고 있다.

Biotoxin 생합성 관련 유전자는 박테리아 등으로의 형질전환을 통하여 대량생산체제를 갖출 수 있다. 또한 최근에 해양식물플랑크톤의 대발생(적조현상)은 전세계적으로 발생하여 양식산업, 해양환경, 인류건강, 관광 등에 심각하게 영향을 미치고 있는 전세계적인 문제이다. 한국 연안 역시 예외가 아니다. 이러한 현상은 1970년대 초에 발생하여 점점 발생빈도, 기간, 적조생물 농도 등이 증가하고 있는 추세이며, 최근에는 국내 전 해안에 퍼지고 있는 실정이다. 예를 들면 1995년에만 적조발생으로 인하여 국내 연안의 양식산업에 약 700억원 정도의 피해가 발생하였다. 그러나 이제까지 연구된 자료에 의하면

매년 남해 연안에 적조가 발생하는데도 불구하고 적조가 발생하고 소멸하는 신호는 거의 이해가 되지 않고 있다. 따라서 어패류, 수조산업 등에서 적조를 예측하고 검출할 수 있는 쉽고, 빠르고, 특이적이고, 값싼 기술의 개발이 요구되어 왔다.

### 3. 사회·문화적 측면

본 연구과제에서 개발하고자 하는 바이오센서와 biotoxin 관련 유전자를 이용한 신물질 개발 기술의 확보는 적조현상의 조기 탐지, 예측 및 대응을 통한 적조발생의 피해 감소를 유도할 수 있을 것이며, 해양식물플랑크톤 유래 biotoxin의 빠르고 특이적인 검출방법에 의해 biotoxin 함유 어패류 섭취를 감소시켜 국민 보건향상에 이바지 할 수 있을 것으로 판단된다.



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황





패류에서 문제가 되는 독소에는 마비성 패류독, 설사성 패류독, 기억 상실성 패류독, venerupin, ciguatera 등 몇 종의 독이 알려져 있으며 이 중 마비성 패류독은 중독 시 치사율이 높아 가장 주목되고 있다. 마비성 패류독은 진주 담치, 굴, 바지락, 피조개, 대합 및 가리비 등과 같이 여과 섭이를 하는 이매패류가 특정한 지역 및 시기에 발생하는 유독성 플랑크톤을 섭이하여 그 독이 체내에 축적되고 독이 다량 축적된 패류를 사람이 섭취함으로써 일어나는 식중독의 하나이다. 이 때 일어나는 주된 중독증상이 마비이므로 마비성 패류독이라고 부르고 있다.

마비성 패류독 식중독은 미국과 캐나다 등 북아메리카에서는 옛날부터 잘 알려져 왔으며 전 세계의 아열대와 온대지방 (남북위 30°~ 60°)에서 출현하고 있다. 가장 빈번하게 발생하는 곳은 북미 캘리포니아 연안에서 알래스카의 알류산열도에 이르는 해역이며 근래에 와서는 동남아시아, 일본, 유럽 등지의 연안에서도 자주 발생하고 있다. 또한 최근에는 열대지방에서도 대규모의 식중독이 발생하는 것으로 보고 되어 있어 (White et al., 1984) 패류를 주요 단백질 공급원으로 하고 있는 국가에서 패류의 독화는 수산물 가공업 등 관련 산업의 발전에 저해가 되는 것은 물론 공중 보건 상 커다란 사회문제로 되고 있다. 우리나라 진해만 일원에서는 유독 플랑크톤의 출현으로 춘계 수온 상승기에 진주 담치에서 마비성 패류독이 검출되어 패류 채취금지 등에 따른 경제적 피해는 물론 인명사고 발생에 따라 심각한 사회적 문제로 대두되고 있다.

마비성 패류독의 원인은 유독 플랑크톤을 패류가 섭이하여 그 독성분이 패류의 체내에 축적됨으로서 유독화 되며, 패류의 유독화가 플랑크톤에 기인한다는 것이 1937년 캐나다의 Sommer에 의하여 실험적으로 확인됨으로서 독화원인이 규명되었다. 따라서 본래 무독한 패류라도 유독성 플랑크톤이 출현하는 시기에는 이들 플랑크톤이 패류의 체내에 유입되므로 자연히 체내에 독을 축적하게 되어 독화된다.

마비성 패류독을 생산하는 플랑크톤은 Table 1 에 나타낸 바와 같이 여러 종류의 플랑크톤이 있으며 전 세계적으로 분포한다. (박 등, 1994). 우리나라를 비롯한 온대지역에서는 와편모조류의 *Alexandrium* 속과 *Gymnodinium* 속이 주로 출현하며, 열대지역에서는 *Pyrodinium* 속의 플랑크톤이 마비성 패류독을 생산한다. 한편, 담수에서는 남조류의 일부가 마비성 독을 생산한다. 이들 중 우리나라에서 문제가 되는 종은 현재까지 *A. tamarense*가 확인되어 있으며 (이 등, 1992) 그 외의 종이 패류독을 생산하는 예는 아직 보고된 바 없다.

Table 1. Distribution of PSP producing microalgae

원 인 생 물	분 포 수 역
<i>Alexandrium tamarense</i> ( <i>Protogonyaulax</i> )	북대서양 연안(New England, 캐나다), 북해 연안 (영국, 덴마크, 독일, 스웨덴) 기타 (한국, 일본)
<i>A. catenella</i>	미국 동부, Alaska, 일본, 칠레, Columbia
<i>A. cohoriticula</i>	태국
<i>A. acatenella</i>	남미
<i>Gymnodinium catenatum</i>	일본, 호주, 스페인
<i>Pyr. bahamense</i> var <i>compressa</i>	열대 Palau 제도, 파푸아 뉴기니
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	영국, 호주, 미국
<i>Jania</i> sp.	열대 산호초 지역

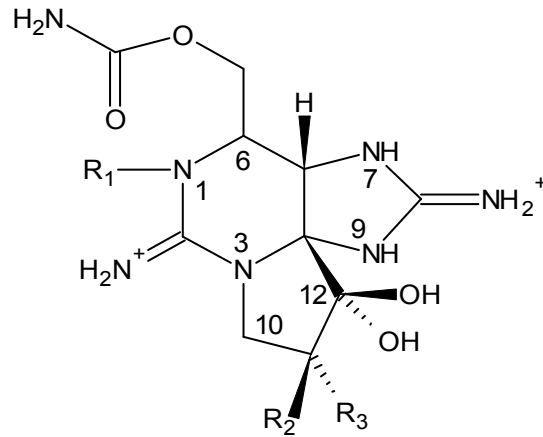
*A. tamarense* 는 20℃ 이하의 온도에서 잘 증식하며 내만성의 식물성 플랑크톤이다. 이 플랑크톤은 해수 1 l 당 200 cells 이상 존재하면 패류가 유독화 되는 것으로 보고 되고 있다. 세포의 크기는 길이 22~54 μm, 폭 24~56 μm로 일반적으로 폭이 길이보다 약간 크며 2개 또는 4개의 세포가 연쇄군체를 형성하는 경우도 있다. (김 등, 1993).

중독 증상은 보통 식후 30 분경에 나타나는데, 입술, 혀, 잇몸 및 안면의 감각에 이상이 나타나고 이어서 목, 팔, 사지로 퍼지면서 마비 증상으로 변하고 운동이 곤란하여진다. 중증일 때는 운동실조가 일어나고, 몸이 부상하는 것 같은 감을 느낀다. 언어장애, 침 흘림, 두통, 메스꺼움, 구토 등의 증세가 나타난다. 심하면 마비가 계속 진행되어 최후에는 호흡마비로 사망한다. 보통 사망은 12시간 이내에 일어나고 이것을 넘기면 세균성 식중독과는 달리 비교적 순조롭게 회복한다. 마비성 패류독의 치사 농도는 600~6,000 μg으로 연령, 건강상태, 신체조건에 따라 매우 차이가 심하다.

현재 마비성 패류독 성분으로서 STX, neoSTX, gonyautoxin (GTX1~GTX8) 등 10여 성분이 확인되어 있고 그 외에도 이들 유도체가 수종 존재하고 있음이 밝혀지고 있으며 이들 독성분의 종류와 구조 및 독성 등을 Fig. 2에 나타내었다(박 등, 1994).

이 중 가장 먼저 구조가 밝혀진 것은 STX으로 1957년 Schantz 등이 알래스카에서 생산된 개조개의 일종인 *Saxidomus giganteus*의 수관부에서 유독성분을 분리하여 조개의 학명에 연유하는 STX이라 명명하였다. 한편, 원인 플랑크톤에서 발견된 성분들은 각각 플랑크톤의 학명 *Gonyaulax* 에서부터 gonyautoxin (GTX) 이라고 명명하였다 (현재

는 플랑크톤의 학명을 *Alexandrium* 이라고 부르고 있음).



R1	R2	R3	Toxin Name	Abbreviation
H	H	H	Saxitoxin	STX
H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Gonyautoxin-2	GTX2
H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	Gonyautoxin-3	GTX3
OH	H	H	Neosaxitoxin	NEO
OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Gonyautoxin-1	GTX1
OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	Gonyautoxin-4	GTX4

Figure 2. Saxitoxin derivatives

이들은 모두 기본적인 골격 구조는 같은데 수산기나 황산기 등 붙어있는 관능기의 종류와 위치가 조금씩 다른 유도체들이지만, 독성이 매우 강한 성분이 있는가하면 독성이 약한 성분 등 여러 종류가 있으며, 마비성 패류독을 생산하는 이들 플랑크톤을 섭취한 패류의 체내에서 독성분이 대사 되어 독성이 서로 다른 심수종류의 성분들이 만들어지게 된다. 일반적으로 플랑크톤에서는 독성이 약한 C1, C2 등의 독이 많으며 패류에 있어서는 독성이 강한 성분인 GTX가 많다 (이 등, 1992). 그러나 패류의 체내에서 모두 같은 종류의 독성분이 만들어지는 것이 아니라 조개의 종류에 따라 대사경로가 달라 서로 다른 종류의 독성분이 만들어진다. 따라서 패류가 갖고 있는 독성분을 알면 어떤 플랑크톤에 의한 것인지, 역으로 패류가 독화한 시기에 출현하는 플랑크톤을 알면 어떤 성분들이 주로 많은지를 추측할 수 있다.

마비성 패류독에 독화되는 생물로서 우리나라에 확인된 것은 플랑크톤 식성인 진주

담치, 바지락, 비단가리비, 큰 가리비, 비단조개, 키조개, 피조개 등의 이매패류이며 (장 등, 1988 ; 전 등, 1988), 이들 중 특히 독이 빈번하게 검출되어 문제가 되는 것은 주로 2~5월에 진해만에서 양식하는 진주담치이다.

패류가 유독화하는 것을 막기 위한 근본적인 방법으로는 원인 플랑크톤의 생리 및 생태를 연구 조사한 후 이를 이용하여 유독 플랑크톤이 서식하지 못하도록 하거나 포자의 발아나 생성을 억제하는 방법, 플랑크톤의 분열 증식을 못하도록 하는 방법, 유독 플랑크톤의 출현시 물리·화학적 방법으로 제거하는 방법, 세균이나 바이러스 등에 의해 생물학적으로 제거하는 법, 또는 유독 플랑크톤이라도 종에 따라서는 무독한 종도 있으므로 유전학적 기법으로 무독종으로 변환시키는 것 등을 생각할 수 있다.

Biotoxin 유전자는 필연적으로 대장균, 효모 등 미생물 및 해양식물플랑크톤에 형질전환되어 biotoxin의 대량생산기술을 개발하게 될 것이다. 형질전환 생물을 이용하여 biotoxin이 대량생산되면 biotoxin에 대한 해독작용, biotoxin의 작용기작 등에 관한 연구가 활발해질 것이며, biotoxin을 이용한 생리활성물질 등 고부가가치 산물의 생산 등을 통해 산업 활성화 및 수입대체 효과가 발생하는 등 파급효과는 매우 클 것으로 예측된다.

사망, 질병, 혹은 경제적 손실을 예방할 수 있을 정도로 확실하고 신속히 음식물이나 식수의 치명적인 박테리아를 탐지하는 기술이나 환경 오염물질을 탐지하는 기술은 쉬운 일이 아니다. 한 예로서 최근 미국의 한 육류 가공공장은 미량의 박테리아가 검출된 일로 인해 2,500만 파운드의 햄버거를 회수하라는 강제명령을 받았다. 그러나 이제는 침단의 진단 및 탐지 기술이 개발되어 해로운 박테리아 뿐만이 아니라 biotoxin이나 환경호르몬과 같은 미량의 물질도 탐지할 수 있는 기술이 개발되고 있거나 시도 되고 있다. 가까운 미래에 새로운 바이오센서를 이용하여 바닷물에서 미량의 biotoxin을 검출하거나 또한 도살장에서부터 레스토랑에 이르기까지 극소량의 박테리아까지도 탐지가 가능하여 사전 조치를 취할 수 있게 된 것이다.

최근에 개발된 새로운 개념의 바이오센서는 미국 코넬 대학의 응용물리학 교수 Harold Craighead와 식품과학 교수 Carl Batt는 공동으로 개발하였으며 진단은 생명공학 분야의 항체공학 기술에 컴퓨터 기술을 접목한 새로운 바이오센서는 매우 단순하며, 마이크로 전자공학산업의 주요 기술을 응용했다. 이 센서는 슈퍼마켓에서 이용되는 바코드 판독과 유사한 방식으로 레이저 광선을 이용, 규칙적이며 반복적인 패턴으로 박테리아를 탐지해낸다. 이 기술은 출판인쇄와 원리가 같다. 즉, 표면의 항체를 찍음으로써 박테리

아가 센서에 달라붙어 패턴을 형성하면, 레이저로 이를 판독할 수 있는 이 기술은 박테리아를 탐지하기 위한 매우 신속하고 직접적인 방법이다.

이와 같이 현재 바이오센서 개발은 국내외 산업, 의료, 식품과 환경의 여러 분야에서 여러 목적으로 개발되고 있으며 항체공학분야가 발전하면서 가능한 작고 효율적인 항원 부위를 찾아 이 부위를 3차원적으로 분석하므로써 다양한 비슷한 구조물도 함께 진단할 수 있는 연고가 시도되고 있다. 아직까지는 국내 바이오센서 개발 분야는 선진국에 비하여 뒤진 것은 사실이나 국내 항체공학 분야의 발전속도와 진단 기술 그리고 IT분야의 약진으로 조만간 그 차이를 좁혀 질 것으로 예상된다.

## 제 1 절. 국외의 기술동향

미국, 영국, 독일, 일본, 캐나다 등 선진국에서는 해양식물플랑크톤의 잠재력을 높이 평가하여 국가적인 정책사업으로 해양식물플랑크톤을 배양하는 해양식물플랑크톤 은행을 구축하여 운영하고 있으며, 이를 통하여 다양한 생태, 생리, 분자생물학적 연구를 수행하고 있다. 특히 미국의 NCI, Scripps Institution of Oceanography, Institute for Marine Biotechnology, Harbor Branch Oceanographic Institute, 일본의 해양생물 산업화 연구센터, 일본 해양과학 연구센터, 호주의 Australian Institute of Marine Science 등은 해양식물플랑크톤으로부터 유용물질이나 생리활성물질을 탐색하고 산업화하는 연구를 수행하고 있다.

세계 각국의 유전자 정보 은행에 관한 연구로는 미국, 유럽, 일본 등에서 각각 미국 국립보건원 산하 생명공학 정보센터(NCBI), 유럽 생물정보기관(EBI), 일본 국립 유전학 연구소내 생물학 정보센터(CIB) 등이 설립되어 유전자 염기서열에 관한 데이터베이스를 운영하고 있으며 그외 DNA 연구를 병행하고 있다. 그러나 해양식물플랑크톤 유래 biotoxin에 관한 체계적이고도 특화된 연구는 거의 이루지지 않고 있는 실정이며, biotoxin에 의한 생태계 파괴 및 인류 건강 피해상황 파악 등을 위하여 biotoxin의 지속적인 monitoring과 분석 연구가 수행되어 오고 있을 뿐, 유전자를 확보하고, 생합성과정을 이해하고자 하는 연구는 거의 없는 것으로 알려져 있다.

이제까지의 해양식물플랑크톤 유래 biotoxin에 관한 연구는 주로 각 식물플랑크톤에서 검출되는 biotoxin의 종류 및 작용에 관한 것이었다 (Table 2). 특히 *A. catenella*

(Onoue et al., 1980, 1981a,b; Schantz et al., 1966), *A. tamarense* (Schmidt and Loeblich, 1979a,b; Franks and Anderson, 1992), *Cochlodinium polykrikoides* (Yuki and Yoshimatsu, 1989), *D. acuta*, *D. fortii* (Yasumoto, 1990), *G. breve* (McFarren et al., 1965; Baden, 1983), *G. mikimotoi* (Tangen, 1977; Takayama and Matsumoto, 1991; Hansen et al., 1992; Yasumoto et al., 1990), *G. sanguineum* (Woelke, 1961; Nightingale, 1936; Cardwell et al., 1990), *G. aureolum* (Shumway, 1990), *P. lima* (Marr et al., 1992; Nakajima et al., 1981; Tindall et al., 1984), *P. minimum* (Nakajima et al., 1981; Okaichi and Imatomi, 1979; Smith, 1975) 등은 국내에서도 빈번하게 적조를 유발하고 어패류 및 인간에 피해를 주고 있는 종으로 알려져 있으며, biotoxin에 관한 연구가 활발히 수행되고 있으나, 전술한 바와 같이 monitoring 이나 생화학적 기법에 국한된 결과를 보고하고 있다.

Table 2. Known biotoxin from harmful microalgae and their toxicity

유독와편모조류	DSP	NSP	PSP	Ciguatera	Fish kill	biotoxin	비고
<i>Alexandrium catenella</i>			○			○	
<i>A. tamarense</i>			○		○	○	
<i>Cochlodinium polykrikoides</i>						○	
<i>Dinophysis acuminata</i>	○					○	
<i>D. acuta</i>	○					○	
<i>D. fortii</i>	○					○	
<i>Gambierdiscus toxicus</i>				○		○	
<i>Gonyaulax polyedra</i>						○	
<i>Gymnodinium breve</i>		○			○	○	
<i>G. mikimotoi</i>					○	○	
<i>G. sanguineum</i>					○	○	
<i>Gyrodinium aureolum</i>					○	○	
<i>Prorocentrum balticum</i>				○	○	○	
<i>P. lima</i>	○					○	
<i>P. minimum</i>				○	○	○	

Modified from Steidinger (1993)

적조 원인 생물의 분류는 현미경을 사용한 형태적인 관찰에 의존하고 있으나 종간의 미세한 구조를 식별하는데 많은 어려움을 겪고 있다 (이 등, 1998). 이러한 문제점을 보완하기 위해서 그동안 생화학적 방법과 함께 rRNA 유전자들의 염기 서열을 이용한 방

법 등을 연구하고 있다 (Lenaers et al., 1988, 1989; Maroteux et al., 1985; Rowan and Powers, 1992).

최근에는 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 방법을 통하여 동일한 형태를 가지는 적조 원인 생물들 간에도 18S rRNA 및 24S rRNA 유전자의 염기 서열상에 유전적인 변이가 존재한다는 사실이 밝혀지면서 (Scholin and Anderson, 1994) 여러 가지 적조 원인 생물들의 18S rRNA 및 24S rRNA 유전자 염기 서열들이 분석되었다. 특히 rRNA 유전자의 염기 서열 분석은 *Pseudonitzschia* 종들의 경우 독성과 비독성 종의 구분까지 가능함을 보여주어 (Douglas et al., 1994; Scholin et al., 1994b) 이 분석 방법이 매우 유용하게 이용될 수 있음을 제시하고 있다.

그렇지만 아직까지 rRNA 유전자의 염기 서열이 밝혀진 적조 원인 생물은 많지 않아 *Alexandrium* 이나 *Prorocentrum* 속을 제외하고는 데이터베이스로서의 구실을 다하지 못하고 있다. 아울러 이들 적조 원인 생물의 rRNA 유전자 염기 서열은 발생 지역에 따라 약간의 변이를 보여주고 있다 (Scholin et al., 1994a).

ECOHAB, NOAA 등의 보고에 의하면 해양식물플랑크톤의 biotoxin은 STX, domoic acid, okadaic acid, brevetoxin, ciguatoxin 등 알려진 biotoxin 외에 알려지지 않은 잠재적인 biotoxin인 ichthyotoxin 등이 어패류 및 인간에 피해를 주고 있는 것으로 알려져 있는데, *Heterosigma carterae*와 *Pfisteria piscicida* 같은 종들은 어류를 사멸시키는 biotoxin을 만들지만 실제 화합물에 관하여는 거의 이해를 하지 못하고 있다 (Burkholder et al., 1992, 1995). 또한 일부 biotoxin의 생합성에 관한 연구가 보고되었는데, STX이 합성되는 과정에 arginine, acetate, s-adenosylmethionine이 참여한다고 하는 것이 방사능이 표지된 물질을 이용한 feeding 실험을 통해 연구되었고 (Shimizu et al., 1984; Douglas et al., 1992), 일부 STX 유전자를 이용한 실험이 기초적인 수준으로 수행되고 있다.

선진국의 연구보고에 의하면 해양식물플랑크톤 유래 biotoxin에 관한 연구를 위해서 향후 수행되어야 할 연구는 간편하고 저렴한 biotoxin 검출 방법의 개발, 유전자 활용 등의 방법이 제시되고 있다. 그러나 실질적인 유전자 확보를 통한 연구는 시작 단계인 것으로 알려져 있으며, Cowthron 연구소 등에서 biotoxin의 검출을 위해 박테리아의 발광물질을 이용한 유전적 검출방법이 개발된 바 있고, Division of Biomedical Marine Research에서 genetic fingerprinting와 DNA 염기서열 분석을 위한 계획이 수립된 바 있다.

## 제 2 절. 국내의 기술동향

국내의 해양식물플랑크톤 은행은 해양식물플랑크톤을 연구하는 연구소 및 대학들을 중심으로 구축, 운영되고 있으나, 아직도 해양식물플랑크톤을 본격적으로 유전자 자원화 하려는 연구 노력은 매우 빈약한 실정이다. 또한 현재 한국의 유전자 해석능력 역시 선진국에 비해 매우 빈약하다 (Table 3). 생명체에 대한 유전정보는 생명공학 발전의 잠재적인 자원이므로 유전정보의 확보 및 이를 이용한 연구의 활성화는 국가 경쟁력을 크게 제고시킬 수 있을 것으로 판단되고 있다.

국내의 유전자 은행을 구축하여 운영하고자 하는 것은 생명공학 연구소 유전체 사업단 (Gene Pool)이 유일하지만 이 역시 해양식물플랑크톤에 대해서는 아직 활성화되어 있지 않으며, DNA 해석능력도 선진국에 비해 크게 낮은 실정이다. 따라서 국내에서도 여러기관에서 독자적인 유전자 pool을 확보하고 이를 연계하여야 우리나라의 유전자 경쟁력이 제고될 수 있을 것으로 판단된다.

해양식물플랑크톤 유래 biotoxin에 관한 연구는 국내의 몇몇 대학교의 연구실과 한국화학연구소 등에서 biotoxin을 추출하고 이를 생물체에 투여하여 미치는 영향을 연구하고 있으며, 해양식물플랑크톤 유래 biotoxin 생합성과정 및 biotoxin의 의학적, 약학적 이용을 위한 대량생산 방법 등에 관해서는 거의 연구가 수행되지 않고 있는 실정이다.

Table 3. 유전정보센터

	미 국	유 럽	일 본	한 국
DNA 해석 데이터율	60 %	30 %	10 %	0.1 %
대표적인 유전자 정보센터	NCBI	EBI	CIB	생명공학연구소



### 제 3 절. 현 기술상태의 취약성

국내외에서의 biotoxin의 생합성과정 규명을 위한 연구나 biotoxin의 해독과정에 관한 연구, biotoxin의 작용기작 규명 및 biotoxin을 이용한 생리활성물질 개발 연구에 있어서의 가장 문제가 되고 있는 부분은 biotoxin을 검출하거나 추출하는데 너무 많은 인력과 장비, 자금이 소요된다는 점이다. 특히 biotoxin을 검출하기 위하여 HPLC, GC 뿐만 아니라 핵자기공명 질량분석기 등이 이용되어야 하기 때문에 많은 연구자들이 연구를 수행하기가 매우 어려웠다.

유전자를 이용한 gene biosensor의 개발은 세계적으로 초보적이 단계에 있으며, Cowthron 연구소 등에서 박테리아의 luciferase를 reporter 유전자로 이용하여 biotoxin을 검출하는 방법을 시도하고 있으나 아직까지 상용화되어 있지 않고 있는 실정이다. 또한 국내외적으로 해양식물플랑크톤 연구에 있어서의 분자생물학적 기법을 적용하는 연구가 아직까지는 매우 미흡한 수준에 머물러 있는 것이 사실이며, 해양식물플랑크톤 유전자의 특허 등록을 비롯한 일련의 작업이 늦어지고 있는 실정이다. 따라서 해양유독식물 플랑크톤 유전자 자원화에 대한 모든 관련 연구는 기술적으로 매우 낮은 수준에 있다.

전술한 바와 같이 세계적으로 해양식물플랑크톤의 biotoxin을 연구하고 산업적으로 이용하고자 하는데 있어서 가장 어려운 부분은 biotoxin의 생합성에 관한 연구가 거의 이루어지지 않고 있다는 것이다. biotoxin의 편리한 검출방법이 부재하고, biotoxin을 저렴하게 대량으로 얻을 수 있는 방법이 없다. 따라서 본 연구의 중점 분야인 biotoxin의 간편하고 빠른 검출방법의 확립 및 biotoxin 생합성 관련 유전자가 확보된다면 biotoxin을 작용기작 및 어패류 전이과정 등을 연구하고자 하는 연구자들에게 매우 편리한 연구기법이 제공될 수 있을 것이다. 또한 해양식물플랑크톤 독성 검출방법을 이용하여 국내 적조발생 및 피해정도를 예측하고, 피해를 줄일 수 있는 예보 시스템의 구축이 가능해 질 수 있을 것으로 기대하고 있다. 따라서 매년 국내 연안에서 수산양식업에 막대한 피해를 주고 있는 적조에 대한 효과적인 대처방안 수립에 중요한 역할을 담당할 수 있을 것으로 기대된다.

그리고 더욱 중요한 것은 STX, domoic acid, okadaic acid, brevetoxin, ciguatoxin, ichthyotoxin 등 다양한 biotoxin 생합성 관련 유전자의 확보를 통한 유전자 은행 구축을 통해 biotoxin의 생합성 과정을 이해할 수 있게 된다는 점이다. 따라서 해양식물플랑크톤의 biotoxin에 관한 연구 영역이 크게 확대될 수 있을 것이다. 특히 biotoxin은 이차대사

산물이므로 생물체의 이차대사산물에 관한 연구의 활성화에도 기여할 수 있을 것이다.

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과



## 제 1 절. 연구 개발 수행 내용 및 연구 방법

### 1. 유독식물플랑크톤 biotoxin 검출을 위한 바이오센서 개발

#### 가. Green fluorescent protein (GFP) 유전자를 이용한 STX 검출용 바이오센서 개발

##### (1) GFP 유전자 확보 및 형질전환 *E. coli* 제작

###### (가) Cell Culture of Vector Line

GFP segments는 pGFP expression vector (Clontech co.) 내의 GFP gene 을 이용하였고, GFP segments를 *E. coli*에 형질전환하기 위해서 pRSET series vector가 준비되었다. 실험실내에 보관 중인 pGFP strain과 pRSET strain stock (-80°C 보관) 각각을 4°C 상태에서 천천히 녹여 LB/amp plate에 도말하고 12 시간 배양한 뒤, 하나의 세포로부터 유도된 colony를 이쑤시개를 이용하여 peaking 하고, 3 ml LB/amp broth에 접종하여 shaking incubator에서 250 rpm, 37°C 상태로 overnight culture했다.

###### (나) Mini-scale Preparation of Vector DNA

3 ml culture한 sample을 8,000 rpm, 4°C, 5분간 원심분리하여 cell down 했다. 상층액 (LB/amp medium)을 최대한 없애기 위해서 e-tube 내의 moisture를 aspiration을 통해 제거하고, Kimwipes 위에 tube를 거꾸로 세워서 수 분간 둔 뒤 pellets에 soln I [50 mM glucose, 25 mM Tris·HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)] 100 ul를 첨가하여 격하게 vortexing한 뒤 RT에 5분 간 방치하였다. 신선하게 준비된 soln II (1% SDS, 0.2 N NaOH) 200 ul를 첨가하고, briefly inverting한 뒤 4°C에 5분간 두었다. soln III (3 M potassium/5 M acetate) 150 ul를 첨가하고, briefly inverting한 뒤 다시 4°C에 5분 동안 incubation한 뒤, 12,000 rpm, 4°C, 10분간 원심분리하였다. 상층액을 새로운

e-tube에 옮기고, PCI [Tris-saturated phenol (pH 8.0): chloroform: isoamylalcohol=25:24:1] solution을 1 volume (550 ul) 첨가하여 vortexing한 뒤, 12,000 rpm, 4°C, 10분간 원심분리하였다. 상층액을 새로운 eppendorf tube로 옮긴 뒤, 2 배 volume (1 ml)의 100% EtOH 첨가했다. 잘 섞이도록 5 회 정도 inverting 해 준 뒤, -20°C에서 30 분간 alcohol down을 실시했다. DNA를 회수하기 위해서 12,000 rpm, 4°C로 10분간 원심분리한 뒤 상층액을 버리고 형성된 pellets을 70% EtOH 500 ul로 세척하였다. Aspiration을 통해 EtOH moisture를 제거하고, 5분간 vacuum이 걸린 상태에서 dry를 실시했다. 최종적으로 pellets은 TE buffer 30 ul에 녹이고 RNase (20 ug/ul) 2 ul를 처리해서 37°C에서 30분 동안 incubation한 뒤 전기영동으로 확인하고, 다음 실험에 사용하기 위해서 4°C에 수 일간 보관하였다.

#### (다) Measurement of DNA Concentration

Spectrophotometry를 이용해 pGFP vector와 pRSET vector 각각을 260 nm 파장에서 OD 값을 측정했다.

#### (라) Restriction Enzyme Digestion

pGFP vector로부터 GFP segments를 얻기 위하여 *Bam*H1과 *Eco*R1 restriction enzyme을 이용하였다. 동시에 GFP segment와의 ligation을 위해서 pRSET vector도 같은 restriction enzyme으로 처리하였다. Template 10 ul에 10X K reaction buffer 2 ul를 첨가하고, ddH<sub>2</sub>O 6 ul를 첨가한 뒤에 잘 섞이도록 tapping 해주고, *Bam*H1과 *Eco*R1 각각을 1 ul씩 첨가하여 잘 섞은 뒤에 최종적으로 전체 20 ul volume으로 37°C에서 2 시간 30분 동안 반응시켰다. 전기영동으로 확인하였다.

#### (마) CIAPing for vector

원하지 않는 ligation product의 생성을 최소화하기 위해서 vector에 대한 CIAPing을 실시하였다. 먼저 restriction enzyme 활성을 억제하기 위해서 vector의 restriction digests를 65°C에 10분 동안 두었다. reaction buffer 3 ul와 restriction enzyme으로 처리된 reaction solution 20 ul, ddH<sub>2</sub>O 4 ul를 잘 섞

이도록 tapping하고 calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP) 3 ul 처리하여 전체 30 ul volume으로 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다.

#### (바) DNA Elution

Linearized DNA를 1.5% low melting agarose gel에 loading 하고 100 V의 전압을 주어 전기영동하였다. 700 bp 정도에 해당하는 band의 위치를 확인하고, low UV illumination 하에서 원하는 band를 획득하여 새로운 eppendorf tube로 옮겼다. 원하는 band의 DNA를 회수하기 위해서는 Geneclean turbo kit (BIO101 Co.)이 사용되었다. Spin down을 통해 획득한 gel slice의 volume을 확인하고, 동일한 volume의 Geneclean turbo salt solution을 첨가했다. Tapping을 통해 잘 섞어 준 다음, 55°C에서 5-10 분간 두어 gel을 녹였다. Agarose gel 이 완전히 녹은 것을 확인한 뒤 tube 내의 mixed solution을 Geneclean turbo cartridge에 옮겼다.

Cartridge를 catch tube에 loading한 뒤 5 초간 spin down 했다. 500 ul의 Geneclean turbo wash solution을 cartridge에 loading한 뒤 다시 5 초간 spin down하여 cartridge의 filter에 존재하는 DNA로부터 salt를 제거했다. 이 과정을 두 번 정도 반복한 뒤에 5 분 정도 텅 빈 cartridge를 spin down하여 filter를 dry시키고, Geneclean turbo elution solution을 30 ul filter에 떨구었다. 새로운 eppendorf tube에 Geneclean turbo cartridge를 loading하고, spin down하여, filter에 binding해 있는 DNA를 eppendorf tube내에 elution 시켰다. 이 과정을 몇 번 반복한 뒤, eppendorf tube내의 volume과 동일한 volume의 100% EtOH을 첨가하여 수 회 inverting한 뒤에 4°C에서 30 분간 alcohol down을 수행하고, 15,000 rpm, 4°C, 15분간 원심분리하였다. 상층액을 버리고, 70% EtOH로 세척한 뒤 60°C dry oven 상에 5-10분간 두어 건조시키고, 최종적으로 TE buffer (pH8.0) 20 ul 녹인 뒤, 다음 실험에 사용하기 위해서 4°C에 보관하였다.

#### (사) Ligation

3.9 kb의 linearized pRSET vector와 1 kb의 GFP segments는 다음과 같이 3:1의 ligation 비율을 통해서 ligation 반응을 수행하였다.

$$\frac{ng\ of\ pRSET \times kb\ size\ of\ GFP}{kb\ size\ of\ pRSET} \times GFP\ pRSET\ molar\ ratio = ng\ of\ GFP$$

$$= \frac{50\ ng \times 0.7\ kb}{2.9\ kb} \times \frac{3}{1} = 36\ ng$$

Ligation efficiency를 높이기 위해서 새로운 eppendorf tube 내에 insert 3 u l(35 ng DNA) 와 pRSET vector 1 ul (50 ng DNA)에 ddH<sub>2</sub>O 8.5 ul를 넣고 잘 섞어준 다음 55°C에서 5분간 둔 뒤에 실온에서 10분간 두고, 10X T4 DNA ligase buffer 1.5 ul와 T4 DNA ligase (Takara Co.) 1 ul를 넣고 tapping으로 잘 섞어 전체 15 ul volume으로 4°C에서 O/N reaction 시켰다.

#### (0) Butanol Down

Ligates에 TE buffer 40  $\mu$ l 첨가해서 volume을 50 ul로 맞추고, 10 배 volume (500 ul)의 N-butanol을 첨가했다. inverting 후, RT에서 5분간 둔 뒤 12,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리했다. 상층액을 제거하고 pellets을 70% EtOH로 세척한 뒤, aspiration으로 butanol moisture를 제거한 뒤, 5분간 vacuum을 걸어 pellets을 건조하고, ddH<sub>2</sub>O 10 ul로 녹여서 4°C에 보관했다.

#### (자) Competent Cell Preparation

*E. coli* DH5 $\alpha$ , JM109, XL1-Blue, JM107 strain stock (-80°C 보관)을 LB plate에 streaking해서 12 시간 배양한 뒤, 하나의 세포로부터 유도된 colony를 이쑤시개를 이용하여 peaking한 뒤 3 ml의 LB에 접종하고 shaking incubator에서 250 rpm, 37°C 상태로 overnight culture해 두었다. O/N culture된 균을 LB-broth 250 ml이 담긴 삼각 flask에 1% 접종한 뒤 2-2.5 시간 동안 O.D가 0.4 정도가 될 때까지 shaking incubator에서 250 rpm, 37°C 상태로 다시 키웠다.

O.D.<sub>600</sub>=0.4를 확인하고, 곧바로 flask를 얼음에 30 분간 박아두었다. 250 ml centrifuge tube에 cultured cell을 옮겨 담고 balancing을 조정한 뒤, 4,000 rpm, 4°C에서 10 분간 원심분리하여 cell down했다. 상층액을 버리고 10%



glycerol을 250 ml 채운 뒤 고루 섞이도록 suspension 하였다. 다시 4,000 rpm, 4°C에서 10 분간 원심분리하여 cell down하였다. 상층액을 버리고 10% glycerol 1 ml로 pipetting을 이용하여 resuspension한 뒤 eppendorf tube에 100  $\mu$ l씩 분주해서 deep freezer (-80°C)에 보관했다.

#### (차) Transformation by Electroporation

Electroporation 용 2 mm cuvette은 신선한 것으로 준비되었다. Electroporator (Hybaid Co.)의 전압을 1,800 V setting해 두고 ice buckets에 준비해 둔 DNA ligate sample과 cuvette, competent cell 미리 넣어두었다. Competent cell 100  $\mu$ l에 DNA ligate sample 10  $\mu$ l를 첨가하고 pipetting으로 잘 섞어준 뒤, cuvette에 transfer 한 뒤에 electroporator 상에 cuvette을 loading하였다. 2500 volts, 25  $\mu$ F로 electroporation pulse를 주었다. 미리 준비된 LB broth medium 1 ml을 재빨리 첨가하고, pipetting을 수초간 해 준 뒤에 culture tube에 옮겨 37°C, 250 rpm으로 shaking incubator에서 cell의 O.D<sub>600</sub> 값이 0.4-0.6 정도 되도록 1 시간 동안 culture했다.

#### (카) Blue-White Colony Screening of Transformants

Cell을 spreading 하기 30 분 전에 clean bench상에서 30 분간 UV를 조사시킨 LB/Amp plate에 X-gal (20  $\mu$ l of 50 mg/ml), IPTG (100  $\mu$ l of 100 mM)를 각각 spreading해 둔 뒤 37°C incubator에 넣어 두었다. Transformation을 실시한 cell의 O.D 값이 0.4가 되는 것을 확인한 후 3000 rpm, 4°C, 5 분간 원심분리하여 cell down하였다. 상층액에서 800  $\mu$ l 제거하고, 나머지 volume으로 pellet을 다시 녹여서 200  $\mu$ l의 cell을 LB/amp/X-gal/IPTG plate에 spreading 했다. 37°C incubator에 plate를 두고 24 시간 동안 colony 형성을 관찰하였다. 형성된 colony 중 white colony만을 peaking하여 3 ml LB broth에 접종한 뒤, 37°C 250 rpm으로 shaking incubator 안에서 O/N culture하였다. cultured transformants 중 1 ml을 새로운 eppendorf tube로 옮기고 80% glycerol 260  $\mu$ l를 첨가한 뒤 잘 섞이도록 inverting하고, -80 °C deep freezer에 보관하였다. 나머지 cultured transformants는 cloning의 확인을 위해서 mini-scale plasmid DNA preparation을 실시했다.

(2) STX에 대한 형질발현된 *E. coli*의 사멸을 측정

*E. coli* (DH5 $\alpha$ )을 plate에서 loop로 따서 배지 (LB)가 든 플라스크에 접종하였다. 12시간 동안 37°C 250 rpm으로 배양하고 흡광도가 1이 되도록 배지에 희석하였다. 1 ml 씩 따서 10 ml 튜브에 옮긴 후 0.1-25 u의 STX을 첨가하고 배양하였다. 다시 37°C 12시간 배양한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) *E. coli*에 대한 STX의 독성테스트

*E. coli*을 배지에 접종하여 대수기까지 배양하였다. 흡광도를 측정한 후 0.8% top agar를 준비하였다. 멸균된 시험관에 top agar를 3 ml 넣고 40-50°C 정도로 식혔다. 이 시험관에 *E. coli* 세포를 0.1 되도록 넣었다. 시험관을 즉시 잘 섞어준 후 LB 한천배지 플레이트에 붓고 잘 퍼지게 하였다. 한천배지가 잘 굳은 후 10분간 방치하고 STX을 농도별로 처리하였다. 약 8시간 배양한 후 관찰하였다

재조합 GFP 유전자의 *E. coli* 내 발현여부를 확인하기 위하여 형질전환된 *E. coli*을 항생제가 첨가된 LB 배지에 접종하여 37°C에서 배양하였다. 충분히 배양된 *E. coli*는 휴대용자외선 발생장치를 이용하여 GFP 유전자의 발현 여부를 확인하였다. GFP 유전자 발현 여부 확인 후 STX을 농도별로 처리하여 *E. coli*의 이동 정도를 확인하였다.

**나. 항원-항체 반응을 이용한 STX 검출용 바이오센서 개발**

(1) STX-단백질 conjugate의 제조

정제된 STX은 NRC-CNRC에서 구입하였으며, 단백질과의 conjugation은 Imject® Immunogen EDC conjugation kit (Pierce)를 사용하였다. 이 과정을 간단히 설명하면, carrier protein으로 사용될 Mariculture Keyhole Limpet Hemocyanin (mckLH) 및 ovalbumin (OVA)를 10 mg/ml의 농도가 되도록 deionized water에 녹였으며, STX는 conjugation buffer (0.1 M MES, 0.9 M NaCl, 0.02% Nan3, pH 4.7)에 4 mg/ml의 농도가 되도록 준비하였다. Conjugation을 위하여 500 u의 STX와 200 u의 carrier protein 용액을 섞은 후,

50 ul의 EDC (10 mg/ml) 용액을 섞어서 실온에서 2시간 동안 conjugation 반응을 수행하였다. 반응이 끝난 후에 conjugation이 되지 않은 STX와 carrier protein solution에 남아 있는 EDTA는 D-Salt™ desalting column을 사용하여 제거하였다. STX-carrier protein conjugate는 SDS-PAGE를 통하여, 이 단백질을 complex를 Bradford assay 용액을 이용한 단백질 정량 후에 적정량을 분주하여 20℃에 보관하였다.

## (2) Immunization

Polyclonal antiserum의 제조를 위하여 4 주령의 BALB/c mouse를 사용하였다. 첫번째 immunization에는 complete Freund's adjuvant를 사용하였으며, 두번째 immunization 부터는 incomplete Freund's adjuvant를 사용하였다. 각 immunization에는 mouse 한 마리당 50 g의 mKLH-STX conjugate가 되도록 sterile PBS에 희석하여 사용하였으며, intraperitoneal (i.p.) route로 injection 하였다. Immunization은 10 일에 한 번씩 실시하였다. 총 4 회의 immunization 후에 antibody titer를 측정하기 위하여 bleeding을 하였으며, blood clot을 원심분리에 의하여 제거한 후, 상층의 serum만을 사용하였다.

## (3) ELISA

### (가) Free STX의 고정화

Free STX의 immobilization을 위하여, 우선 96-well microtiter plate를 BSA (5 g/ml in 0.2 M carbonate buffer, pH 9.4, with 0.15 M NaCl, 200 l/well)로 free coating하였다. 실온에서 overnight으로 반응시킨 plate는 PBST (PBS with 0.05% (v/v) Tween 20)로 3 회 washing 후, 추가적으로 PBS로 3 회 washing 하였다. Free STX는 동일한 buffer에 25 M 용액으로 만들어 100 ul 씩 각 well에 분주하여 실온에서 overnight 반응하였다. Antiserum sensitivity의 측정을 위하여는 0-50 M 범위에서 serial dilution을 하여 동일한 방법으로 microtiter plate에 분주하였다. 반응 후, 남은 free STX는 PBST로 3 회 washing하여 제거하였으며, 2 % (w/v) BSA (in PBS)를 각 well에 200 l씩 분주하여 실온에서 3 시간 동안 반응시켜 blocking을 하였다. Blocking 후에 microtiter plate는 PBST

로 3 회 washing 하였다.

(나) OVA-STX conjugate의 고정화

OVA-STX의 고정화는 coating buffer (0.2 M carbonate buffer, pH 9.4)로 1 g/ml이 되도록 희석한 OVA-STX conjugate를 96-well microtiter plate에 100 ul 씩 분주하여 4°C에서 overnight 반응시켜 실시하였다. 반응 후, blocking 을 위하여 PBST에 2% (w/v)의 BSA 용액을 만들었으며, 각 well에 100 ul 씩 분주하여 37°C에서 1 시간 동안 반응하였다. Blocking 후에 microtiter plate는 PBST로 3 회 washing 하였다.

(다) Indirect ELISA using OVA-STX conjugate

Antiserum Titration: Free STX가 coating된 microtiter plate의 경우는 BSA (0.5 g/well) 만 coating되어 있는 well을, OVA-STX가 coating된 경우는 OVA (1 g/well) 를 coating시킨 well을 control로 사용하였다. Primary antibody binding을 위하여 mckLH-STX로 immunization 시킨 mouse에서 채취한 antiserum을 0.2% (w/v) BSA/PBST를 이용하여 1/1000부터 1/64000까지 1/2 씩 serial dilution하여 100 ul 씩 분주한 후, 37°C에서 1 시간 동안 반응시켰다. 각 항원에 대하여 duplication하여 실시하였으며, antiserum을 넣지않는 well을 negative control로 사용하였다. 반응이 끝난 후, PBST로 3회 washing을 하였 으며, secondary antibody로는 goat anti-mouse IgG-phosphatase conjugate (Sigma)를 0.2% (w/v) BSA/PBST로 1000-fold dilution하여 사용하였다. 각 well에 100 ul 씩 분주한 후, 37°C에서 1 시간 동안 반응시켰으며 PBST로 washing한 후에 pNpp를 사용하여 발색반응을 실시하였다. Microplate reader를 이용하여 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

Antiserum Sensitivity. 순차적으로 희석된 free STX를 고정화시킨 microtiter plate에 anti-mckLH-STX antiserum을 0.2% (w/v) BSA/PBST로 5000 배 희석 하여 100 ul 씩 분주하고 동일한 조건에서 실험을 진행하였다.

## 다. STX 외 Shellfish poisoning toxin에 대한 antibody 제조

### (1) Antibody 제조를 위한 target shellfish toxin 선택.

일반적으로 shellfish poisoning을 일으키는 toxin은 Paralytic shellfish poisoning (PSP), neurologic shellfish poisoning (NSP), diarrhetic shellfish poisoning (DSP), amnesic shellfish poisoning (ASP)의 4가지 증상으로 분류되는데, 선행된 실험에 의해 이들 중 PSP에 해당하는 saxitoxin의 antibody를 제조하는 데 성공하였다. 이를 기초로 다른 shellfish toxin에 적용하기 위하여, 각각의 toxin 범주에서 확보가 가능한 toxin중 polyclonal antibody를 만들 수 있는 hapten으로 유리한 5 개의 toxin를 우선적으로 선별하였다 (Fig. 3). PSP 계열의 toxin에서는 neo-saxitoxin과 gonyautoxin이 선정되었고, ASP 계열에서는 domoic acid를 선정하였다. 이들은 각각 size가 작아 hapten-carrier conjugate를 형성하는 데 유리하고, 또한 functional group으로 protein의 carboxyl 기와 hydroxyl 기를 많이 가지고, 있어서 conjugation에 유리할 것으로 생각되었다. 또한 DSP에서는 okadaic acid를 선정하였고, NSP는 확보가 불가능하여 선정하지 않았다. 그 외에 최근에 알려지고 있는 pectenotoxin-2를 항체생성을 위해 선정하였다. DSP의 경우 molecule 자체가 복잡하고, PSP나 ASP등에 비하여, 잔기의 carboxyl 기와 hydroxyl 기가 매우 적어 conjugation에는 용이하지 않을 것으로 생각되었다.

### (2) Carrier protein을 이용한 shellfish-toxin conjugate의 제조

정제된 각각의 shellfish toxin은 NRC-CNRC에서 구입하였으며, 단백질과의 conjugation은 Imject® Immunogen EDC conjugation kit (Pierce Co.)를 사용하였다. 먼저 Carrier protein으로 사용 될 Mariculture Keyhole Limpet Hemocyanin (이하 mcKLH) 및 ovalbumin (이하 OVA)를 10 mg/ml의 농도가 되도록 deionized water에 녹였으며, 각각의 shellfish toxin은 conjugation buffer (0.1 M MES, 0.9 M NaCl, 0.02% Nan3, pH 4.7)에 4 mg/ml의 농도가 되도록 준비하였다. Conjugation을 위하여 500 µl의 shellfish toxin과 200 µl의 carrier protein 용액을 섞은 후, 50 µl의 (이하 EDC) (10 mg/ml) 용액을 섞어서 실온에서 2시간 동안 conjugation 반응을 수행하였다. 반응이 끝난 후에 conjugation이 되지 않은

shellfish toxin과 carrier protein solution에 남아 있는 EDTA는 D-Salt TM desalting column을 사용하여 제거하였다. Shellfish toxin-carrier protein conjugation 여부는 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다.

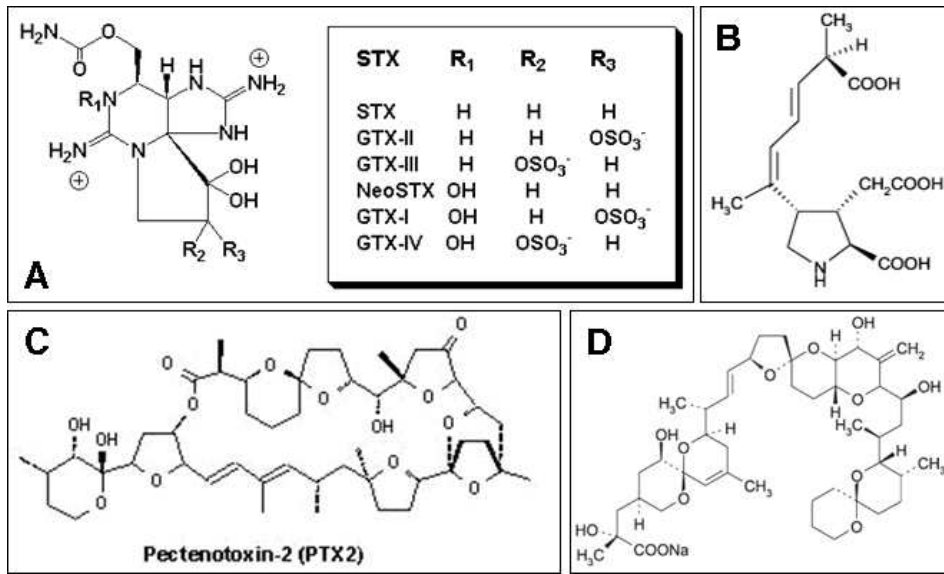


Figure 3. 항체 제작에 사용된 식물플랑크톤 유래 biotoxin. A, neosaxitoxin and gonyautoxin; B, domoic acid; C, pectenotoxin-2; D, okadaic acid

### (3) Shellfish toxin의 면역화

Polyclonal antiserum의 제조를 위하여 4 주령의 BALB/c mouse를 사용하였다. 첫 번째 immunization에는 complete Freund's adjuvant를 사용하였으며, 두 번째 immunization 부터는 incomplete Freund's adjuvant를 사용할 예정에 있다. 각 immunization에는 mouse 한 마리당 50 microgram의 mCKLH-STX conjugate가 되도록 sterile PBS에 희석하여 사용하였으며, intraperitoneal (i.p.) route로 injection 하였다. Immunization과 antibody titer 측정은 STX와 동일한 방법에 따라 실험되었다.

## 라. Rapid immunofilter paper assay (RIPA)를 이용한 식물플랑크톤 유래 biotoxin 진단기술 개발

### (1) 항체 부착 라텍스 및 immunofilter paper 제작

#### (가) 준비물

백색 라텍스(G24103, 직경 0.45  $\mu\text{m}$ ), 청색/핑크색 라텍스 (G0304, 직경 0.30  $\mu\text{m}$ ), filter paper GF/A,  $\gamma$ - globulin, 완충액 I (0.45% NaCl, 0.02%  $\text{NaN}_3$  를 함유한 0.05M Tris, pH 7.0), 소형원심분리기, 교반기, 진탕배양기, 마이크로 피펫, OHP 필름

#### (나) 방법

완충액 I 을 사용하여 0.5% 백색라텍스 및 1% 청색/핑크색 라텍스로 제조한 후 각각 0.5 ml을 튜브에 넣었다. 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석된  $\gamma$ - globulin 0.5 ml을 각각 라텍스가 들어 있는 원심 튜브에 혼합하였다. 이들 각각의 튜브를 진탕배양기에서 실온으로 강하게 (200 rpm) 2시간 동안 혼합하였다. 이들 튜브를 10,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 상층액은 버리고 침전물은 세척 완충액 (완충액 I +0.1% BSA) 1 ml로 용해하였고, 이를 3-4 회 반복하였다. Whatman GF/A 종이를 8×0.5 cm로 절단 후 OHP 필름을 밑에 깔고 항체가 결합된 백색 라텍스 원액 8  $\mu\text{l}$ 를 절단된 종이의 하단으로부터 1.5 cm 위에 선상으로 고정하였다. 이와 같은 방법으로 만들어진 여러 장의 immunofilter paper는 4°C에 보존하여 필요시 진단에 사용하였다.

### (2) 진단

#### (가) 준비물

Immunofilter paper, 항체 결합 착색 라텍스 원액, 희석완충액(완충액 I +0.1% BSA), 미세주류에서 추출한 완충액 (0.1% mercaptoethanol, 0.01M EDTA, 0.1% BSA, 0.15% PVP를 함유한 0.1M phosphate buffer, pH 7.0), 1.5 ml 튜브, 파라필름, 이쑤시게, 마이크로 피펫 또는 1 ml 주사기 가능

### (나) 방법

식물플랑크톤을 수확하여 0.4 ml 식물플랑크톤 추출 완충액을 넣어 튜브 내에서 직접 작은 plastic pestle을 이용하여 마쇄한다. 5×0.5 cm로 절단된 Whatman GF/A 종이를 즙액이 있는 튜브에 넣고 식물플랑크톤 즙액을 1차적으로 전개하였다. 1차 여과지의 선단 부위에 immunofilter paper를 올려 놓고 즙액이 1/3 정도 전개시켰다 (약 2-3분 소요). 즙액이 전개된 immunofilter paper의 하단부위(1-2 mm를 항체가 부착된 유색 라텍스 희석액 100 ul에 5분간 침지하였다. 이 때 유색 라텍스는 파라필름 위에 점적하였다. 유색 라텍스가 전개 완료 후 항체 부착 흰색 라텍스 선상에 유색 선이 나타나면 항체와 관련이 있는 toxin이 존재하는 것으로 판정하였다.

## 2. STX 생합성관련 유전자 탐색 및 분리를 위한 분자생물학적 연구

### 가. 18S rDNA 염기서열 분석을 통한 식물플랑크톤의 분자계통학적 분석

#### (1) 조류 종 및 배양

국내의 적조 발생 지역에서 채집한 적조 원인 생물들 (Table 4)을 순수 배양하고 이로부터 PCR을 이용해 약 1.8 kb에 해당되는 18S rRNA 유전자를 증폭하여 염기 서열을 분석하였다. 조류 종들에 대한 정보는 Table 5, 채집 지역은 Figure 4에 정리하였다. 조류의 성장을 위한 배지는 숙성해수 (filtered through a 0.1 $\mu$ m pore size filter, 31% salinity)를 이용한 F/2 배지와 SWII 배지 (Kim, 1995) (Table 6)를 이용하였다. 배양은 온도 20 $^{\circ}$ C, 조도 2000 Lux, 14 h:10 h (Light: Dark) 의 광주기로 조절되는 조류 배양기 (Je-il science, Korea)에서 수행하였고, 2주마다 계대 배양을 하였다. Cell의 관찰은 Axiovert 10 도립현미경을 사용하였다. Mid-exponential phase 에서 cell을 수확하여 genomic DNA를 분리하였다.



Table 4. Algal cultures used in this analysis

Species	Strain	Sampling site	Sampling date
<i>Alexandrium tamarense</i>	SJW 9704-15	Sujungri	1997. 4
<i>Alexandrium tamarense</i>	ULW 9903	Ulsan	1999. 3. 11
<i>Alexandrium catenella</i>		Kohyun bay	
<i>Alexandrium sp.</i>	Axsp_K03	Jangmok bay	1998
<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	KORIDI-8	Kohyun bay	2000. 9
<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	CP-0	Yosu	1997. 9
<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	CP PP-4	Yosu	2000. 9
<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	CP PP-6	Kohyun bay	
<i>Prorocentrum minimum</i>	PrMu 21	Kohyun bay	
<i>Prorocentrum triestinum</i>	PrTe 01		
<i>Gymnodinium sanguineum</i>	KORDI-11	Kohyun bay	
<i>Heterosigma akasiwo</i>	HtAk 01	Kohyun bay	
<i>Scrippsiella trochoidea</i>	SpTc 01	Anggang bay	
<i>Skeletonema costatum</i>	KORDI-4	Masan bay	

Table 5. List of dinoflagellate strains examined in this study and GenBank accession numbers for their SSU rDNA sequences

Species	Strain Code	Sampling Date	Sampling Site	Remark <sup>1</sup>	GenBank Acc. No.
<i>Akashiwo sanguinea</i>	GSW0207	Jul 2002	Gosung	bloom former	AY421770
<i>Akashiwo sanguinea</i>	Gsakor11	Sep 2000	Geojedo	bloom former	AY421771
<i>Alexandrium catenella</i>	Axsp-K01	Apr 1998	Jinhae Bay	PST producer	AY421772
<i>Alexandrium catenella</i>	Axsp-K03	Apr 1998	Geojedo	PST producer	AY421773
<i>Alexandrium catenella</i>	AxCt-K01	Apr 1994	Jinhae Bay	PST producer	AY421774
<i>Alexandrium catenella</i>	JHW9706	Jun 1997	Jinhae Bay	PST producer	AY421775
<i>Alexandrium fraterculus</i>	JHW0108-1	Aug 2001	Jinhae Bay	bloom former	AY421776
<i>Alexandrium tamarense</i>	JHW0004-12	Apr 2000	Jinhae Bay	PST producer	AY421777
<i>Alexandrium</i> sp.	AspAxp03	Apr 2000	Geojedo	bloom former	AY421778
<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	BSW0109	Sep 2001	Busan	harmful species	AY421779
<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	CP0	Sep 1997	Yeosu	harmful species	AY421780
<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	CP-PP4	Sep 2000	Geojedo	harmful species	AY421781
<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	CP-PP6	Sep 2000	Yeosu	harmful species	AY421782
<i>Gymnodinium catenatum</i>	JHW9910	Oct 1999	Jinhae Bay	PST producer	AY421783
<i>Gymnodinium catenatum</i>	DC99A44	Aug 1998	Deukryang Bay	PST producer	AY421784
<i>Gymnodinium catenatum</i>	GCSW962	Sep 1996	Jinhae Bay	PST producer	AY421785
<i>Gyrodinium instriatum</i>	JHW0007	Jul 2000	Jinhae Bay	bloom former	AY421786
<i>Heterocapsa triquetra</i>	GSW0206-2	Jun 2002	Gosung	bloom former	AY421787
<i>Lingulodinium polyedrum</i>	DRW0208	Aug 2001	Deukryang Bay	YTXs producer	AY421788
<i>Pheopolykrikos hartmanii</i>	JHC0203	Mar 2001	Jinhae Bay	bloom former	AY421789
<i>Prorocentrum minimum</i>	PmiPrMu21	Jul 1999	Geojedo	VST producer	AY421790
<i>Protoceratium reticulatum</i>	JHW0007-6	Jul 2000	Jinhae Bay	YTXs producer	AY421791
<i>Scrippsiella trochoidea</i>	GSW9808	Aug 1998	Gunsan	bloom former	AY421792

<sup>1</sup> See the text for the literatures cited; PST; paralytic shellfish toxin, VST; venerupin shellfish toxin, YST; yessotoxin.

Table 6. Composition of culture media in this study

SW II medium		f/2 medium	
Component	(per liter)	Component	(per liter)
KNO <sub>3</sub>	72.0 mg	NaNO <sub>3</sub>	880 um
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.5 mg	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	36 um
NA <sub>2</sub> -glycerophosphate	10.5 mg	Vitamin B12	0.3 ug
Fe-EDTA	0.5 mg	Biotin	1.0 mg
Vitamin B12	0.3 ug	Thiamine	0.1 ug
Biotin	1.0 mg	Metal mixed sol.	1.0 mg
Thiamine	0.1 ug	DW	193 ml
Tris	1.0 g	Tris	0.55 g
Soil ectracy	30.0 ml	Soil extract	5.0 ml
Sea water	970 ml	Sea water	800 ml
pH	7.85	pH	7.4

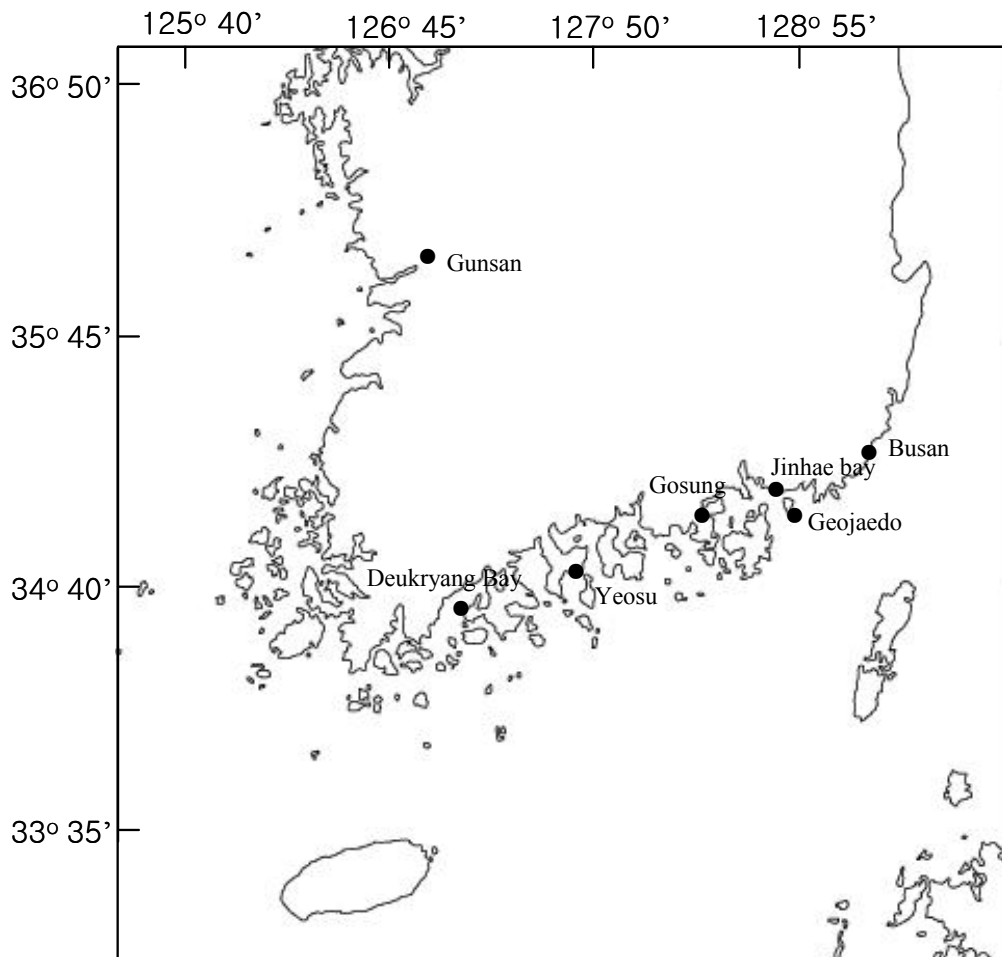


Figure 4. Sampling sites for the isolation of harmful dinoflagellate strains.

## (2) Genomic DNA의 분리

Genomic DNA는 지수함수기 후기에 있는 세포에서 추출하였으며, Aqua pure Genomic DNA isolation kit (Bio-Rad Co. USA)를 사용하였다. DNA의 양은 260 nm 에서 흡광도를 측정하였다 (Kim and Shin 1997).

## (3) SSU rDNA의 증폭 및 염기서열 분석

SSU rDNAs (*ca.* 1,790 nucleotides)는 DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer)에서 universal eukaryotic primer를 이용하여 PCR을 하였다. PCR 반응혼합액은 추출된 DNA 100ng, 각 primer 100 pmol, 2.5 mM dNTPs, 1× *Ex Taq*<sup>TM</sup> buffer, *Takara Ex Taq*<sup>TM</sup> (Takara, Japan) 0.5 unit을 혼합하여 total 50 µl로 하였다. PCR 최적 조건은, 95°C에서 3분간 denature 시킨 후, 95°C 30초간 denaturation; 55°C 30초간 annealing; 72°C 1분간 extension의 순환반응을 35회 시행하고, 72°C에서 7분간 extension 반응을 시행하였다. 이렇게 증폭된 PCR 산물은 QIAquick<sup>TM</sup> PCR Purification Kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 정제를 한 후, ABI PRISM BigDye<sup>TM</sup> Terminator v3.0 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Perkin Elmer)를 이용하여 염기서열을 분석하였다. ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)를 이용하여 PCR primer를 제작하였다 (Table 7). 이렇게 제작된 *A. tamarensis* JHW004-12의 PCR 산물은 많은 polymorphic site를 가지고 있기 때문에 pGEM<sup>®</sup>-T Vector System (Promega, USA)을 이용하여 형질전환 시켰다. 이 균주에서 Plasmid DNA를 추출하여, 8개의 plasmid DNA를 찾아냈으며, 위의 서술한 방법으로 염기서열 분석을 하였다. 이번 연구결과 새롭게 찾아낸 와편모조류의 SSU rDNA 염기서열 AY421770에서 AY421792는 GenBank database에 제출한 상태이다.

## (4) 염기서열 배열 및 계통 분석

정제된 DNA는 automated sequencer [Applied Biosystems Instruments (ABI) Foster City Cal]를 사용하여 염기 서열을 결정하였고 염기 서열들은 Genbank database에서 상동성을 비교하였다. 분석한 염기 서열은 Phydit program을 사용하여 배열하고 Neighbor joining 방법으로 계통도를 작성하였다.

Table 7. Primers used for PCR amplification and sequencing SSU rDNA.

Primer	Sequence (5'→3')	Source
18S-0009f <sup>1, 2</sup>	GATCCTGCCAGTAGTCATAT	this study
18S-0302f <sup>1, 3</sup>	AGTTTCTGACCTATCAG	this study
18S-0437r <sup>1, 3</sup>	GCGCCTGCTGCCTTCCTTA	this study
18S-0613f <sup>1, 3</sup>	GCGGTAAAAAGCTCGTAGT	this study
18S-0897f <sup>1, 3</sup>	AGAGGTGAAATTCTTGAT	this study
18S-1179f <sup>1, 3</sup>	CTTAATTTGACTCAACACG	this study
18S-1435f <sup>1, 3</sup>	AACAGGTCTGTGATGCCCTT	this study
18S-1797r <sup>1, 2</sup>	GATCCTTCYGCAGGTTACCTAC	this study
SSU5-0001f <sup>2</sup>	AACCTGGTTGATCCTGCCAG	12
E379-0379r <sup>3</sup>	TCAGGCTCCCTCTCCGG	13
E900-0900r <sup>3</sup>	AGAATTTACCTCTG	13
5a-1300f <sup>3</sup>	TAATTCGGTTAACGAACG	13
M3490-0140r <sup>3</sup>	TCAGTGTAGCGCGCGTGCGG	3
SSU3-1700r <sup>2</sup>	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC	12

<sup>1</sup>Primer nomenclature corresponds to *Prorocentrum micans* SSU rDNA position (Herzog and Maroteaux, 1986); “f” represents forward and “r” reverse.

<sup>2</sup> Primer set for PCR amplification and sequencing.

<sup>3</sup> Primers for sequencing.

#### 나. biotoxin 생합성 경로 연구

##### (1) 주사 전자 현미경 (Scanning Electron Microscopy)

주사전자현미경 (SEM) 사진을 찍기 위하여, 지수성장기의 *A. tamarense*를 원심분리하여 세포를 모은 후 1% osmium tetroxide에서 15분간 고정시켜 놓는다. 여과해수로 세포를 두 번 정도 씻어낸 다음, 0.2 um pore-size Nucleopore polycarbonate membrane filter로 여과를 한다. 탈수를 하기 위하여 단계별 에탄올에 담군 후,

critical-point 드라이하여, gold-palladium으로 코팅한다. 현미경은 HITACHI S-2400 (Japan) scanning electron microscope을 이용하여 사진 촬영을 하였다.

## (2) Synchronization 배양

A. *tamarensis* JHW0004-12를 dark-induced block/release (Taroncher-Oldenburg et al., 1997) 방법으로 synchronization 배양하였다. 멸균된 SW II 배지에 지수성장기에 있는 세포를  $\sim 200$  cells  $\text{ml}^{-1}$  접종하였다. 접종 후 3일 동안은 light cycle만 주어 500 cells  $\text{ml}^{-1}$  정도로 키운 다음, 왼쪽 부분은 82시간 동안 지속적으로 어둡게 하였다. 정상적인 14:10 L/D cycle 한 시간 전에 원래 상태로 한 다음, toxin 용으로 이 subsample을 보관하였다. Dark가 blocking된 기간에는 모든 세포가 한번 이상 분열을 하고, 세포주기에서  $G_1$  시기에 머물게 된다. Dark 상태에서 자란 세포들은 빛에 노출되지 않도록 dark room에서 red light를 켜 상태로 sampling을 하였다. Sample은 한시간 동안 선별하였다 [ -1(first day, am: 5), 8(first day, pm: 2), 13(first day, pm: 7), 29(second day, am: 11), 40(second day, pm: 10), 52(third day, am: 10)].

## (3) 세포 크기 결정

1.5 ml 배양된 샘플에 5% Formalin (v/v)을 넣고 4°C에서 보관하였다. 세포는 1,700  $\times g$ , 23°C, 3 분간 원심분리 한 후, pellet은 1 ml ice-cold methanol 에 풀어준 다음, 4°C에서 chlorophyll을 추출하였다. 이 Sample을 2,000  $\times g$ , 23°C, 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후, 1ml PBS (40 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 22 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 85 mM NaCl)에서 세포를 세척하였다. 원심분리 후, 아래 모아진 pellet을 0.5 ml propidium iodide (PI) staining solution (4 mg  $\text{ml}^{-1}$  PI, 250 units RNase A  $\text{ml}^{-1}$ )을 넣어 풀어준 다음, fluorescent microscope (Axioplan ZEISS)으로 분석하기 전 최소 2시간 정도 어두운 곳에서 react 시켰다. Cell diameter는 image analyzer program (GAIA Blue)을 이용하여 각 sample로부터 고정된 세포 (ca,  $3 \times 10^2$ )를 분석하여 결정하였다.

## (4) PSP 독성 분석

샘플로 대략  $8 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  cell을 모은 다음, 3,000  $\times g$ , 실온에서 원심분리하였다. 상층액은 버리고, 침전물은 15 ml vial에 옮겨 acetic acid (0.1 M, 1 ml)를 넣어

섞어주었다. 이 혼합물을 100 W에서 5분간 2회에 걸쳐 sonication하여 추출하였다. 상층액 부분을 취하여 동결건조시켜 biotoxin을 모아둔다. 나머지 잔유물에 0.1 mmol acetic acid를 넣어 다시 한 번 용해시킨 후, C18 cartridge (Waters Corporation)를 통과시켜 1.5–2.0 ml 정도를 분리하여 분석한다. C18 cartridge로 순수분리 한 다음, 0.45  $\mu$ m membrane (Minisart Sartorius)으로 여과 추출하고, diode array detection (DAD) system과 HP3D CHEMSTATION data system으로 분석한다. PSP toxin 분석을 위한 Calibration solution은 saxitoxin diacetate (440  $\mu$ M), gonyautoxin-2 acetate (300  $\mu$ M), gonyautoxin-3 acetate (73  $\mu$ M), gonyautoxin-1 acetate (180  $\mu$ M), gonyautoxin-4 acetate (79  $\mu$ M)를 이용한다. Formic acid, acetic acid (Junsei chemical Co.), morpholine (Sigma)은 guaranteed grade를 사용하였다.

#### (5) CE-UV를 이용한 PSP 독성분석

PSP toxin의 CE 분석은 Locke와 Thibault의 방법 (1994)을 변형시켜 이용하였다. Separation은 20 kV에서 uncoated capillary (72 cm  $\times$  50  $\mu$ m I.D)를 이용하였다. Sample은 capillary에 20% 정도로 들어갈 수 있을 정도의 압력(50 mbar)을 주었다. UV detector는 200 nm에서 측정하였다. Preconcentration은 50 mM morpholine에 formic acid를 첨가하여 pH 5로 맞추었다.

#### (6) PSP detection kit를 이용한 STX 정량

*A. tamarense*의 saxitoxin (Paralytic Shellfish Poisoning toxin; PSP toxin)정량 분석을 위해서 RIDASCREEN FAST PSP kit (R1902, R-biopharm Inc.)을 이용하였다. 각 *A. tamarense* 두 strain (Non-toxic, Toxic strain)을 100 ml의 L1 medium에 20일간 22°C, L:D=10:14 hr, 조건으로 배양하면서 이를 간격으로 sampling과 원심분리를 통해 harvesting하여 cell growth를 측정하고, 상층액을 제거한 cell harvest를 deep freezer (-80°C)에 보관하였다. Cell harvest에 1:1 비율로 0.1M HCl을 첨가한 뒤 homogenizer를 이용하여 균질화 시킨 뒤, 5분동안 stirring 하면서 100°C 끓는 물에서 끓였다. 3500 g, 4°C, 10분 동안 원심분리하고, 5N HCl을 이용하여 pH를 4.0이 넘지 않게 조절한 다음 100  $\mu$ l의 supernatant를 취하고, sample dilution buffer를 이용해서 희석률을 다르게 하여



1 ml이 되도록 하고, 50  $\mu$ l를 assay에 이용하였다. 분석을 위하여 PSP enzyme conjugate concentrate (200  $\mu$ l conjugate concentrate + 2 ml buffer for 4 microtiter strips)와 Anti-PSP antibody solution (200  $\mu$ l antibody concentrate + 2 ml buffer for 4 microtiter strips)를 준비하였다. 각 microtiter plate의 well 속에 standard [0 ppb (zero standard), 2.5 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 20 ppb, 40 ppb]와 준비된 sample solution을 50  $\mu$ l씩 분주하고, diluted PSP enzyme conjugate와 diluted Anti-PSP antibody를 50  $\mu$ l 씩 순서대로 첨가한 후 상온에서 15분 동안 plate를 rocking 하면서 잘 섞어 주었다. Rocking이 끝난 후에 well속에 있는 액체를 버리고, 수분이 완전히 제거 된 것을 확인한 후 멸균수를 이용하여 250  $\mu$ l씩 각 well에 첨가하고 버린 뒤 말리는 과정을 두 번 반복하였다. Substrate/chromogen solution을 각 well에 두 방울씩 떨어뜨린 후에 상온에서 15분 동안 빛이 차단되게 하여 plate를 rocking 한 뒤에 stop solution 두 방울을 각 well에 떨어뜨린 후 10분 이내에 air blank를 기준으로 450 nm에서 spectrophotometry에 의해 absorbance를 측정하였다. 측정된 결과는 다음 공식에 의해 % 흡광도로 환산되어 도표화 되었다.

$$\frac{\text{absorbance}[\text{standard}(\text{or sample})]}{\text{absorbance}[\text{standard}]_{\text{zero}}} \times 100 = \%( \text{absorbance} )$$

#### 다. EST library로부터 Saxitoxin 관련 유전자의 선별

##### (1) EST library 제작

##### (가) 세포 배양

*A. tamarense* (non-toxic strain)의 유지를 위하여 배양을 실시하였다. Isolated cell은 250 ml 플라스크를 이용하여, 100 ml의 f2/Si medium에 접종된 뒤 지수 성장을 위해서 20°C incubator에서 유지되었다. 광조건은 150 micromole photon  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 cool-white fluorescence lamp를 이용하여, 14시간의 광주기와 10시간의 암주기를 daily cycle로 주었다.

(나) total RNA의 분리

*A. tamarense*를 배양하여 지수성장기의  $10^7$  cell 상태가 된 것을 확인 후  $4,400\times g$ 로 5분 동안  $4^\circ C$ 에서 원심분리하여 세포를 회수하였다. Pellets을 액체 질소내에서 물리적으로 막자를 이용하여 곱게 갈아서 미세하게 세포를 파쇄하였다. 세포가 파쇄된 미세 분말 가루 (homogenate)에 Trizol reagent (Molecular Research Center Inc.) 5 ml을 첨가하였다. Homogenate를 50 ml polypropylene tube로 옮긴 후 pipetting을 반복하여 잘 섞어 준 뒤, 실온에 5분간 방치하여 핵단백질 복합체가 완전하게 해리되도록 하였다. 1 ml의 chloroform 원액을 첨가하고 15초 동안 격하게 tube를 흔들어서 잘 섞이도록 했다. 실온에서 5분 동안 반응시킨 후,  $12,000\times g$ 로 15분 동안  $4^\circ C$ 에서 원심분리하여 RNA와 protein을 분리하였다. 상층액을 회수하여 새로운 tube로 옮기고, 2.5 ml isopropanol을 첨가하고 실온에서 10분간 방치하여 RNA를 침전시켰다.  $12,000\times g$ 로 10분 동안  $4^\circ C$ 에서 원심분리한 뒤 상층액을 버리고, RNA pellet을 75% ethanol을 이용하여 세척한 뒤  $7,500\times g$ 로 5분 동안  $4^\circ C$ 에서 원심분리하였다. 에탄올 상층액을 버리고, 실온에 RNA pellet을 10분간 방치하여 공기 건조시켰다. 30  $\mu$ l의 depc-treated  $H_2O$ 를 첨가하여 RNA pellet을 녹이고, spectrophotometer를 이용하여  $A_{260}$ 의 값을 측정하여 정량한 후,  $-70^\circ C$ 에 보관하였다.

(다) mRNA의 분리

mRNA의 분리를 위해서 1 mg의 total RNA를 polyA Tract mRNA isolation kit (Promega Co.)을 이용하여 분리했다. Polysaccharide의 방해로 감소시키기 위해서 oligo (dT) cellulose column 대신에, biotinylated oligo (dT)와 paramagnetic particle이 mRNA의 분리에 사용되었다. 먼저 500  $\mu$ l의 total RNA를  $65^\circ C$ 에서 10분간 반응시킨 뒤, 3  $\mu$ l의 biotinylated oligo (dT) probe와 13  $\mu$ l의 20X SSC를 RNA에 첨가하고, 실온에서 cooling 하였다. Streptavidin paramagnetic particles (이하 SA-PMPs)을 resuspension할 때까지 tube를 tapping하면서 완전히 퍼지도록 하였다. 그런 후에 magnetic stand에 tube를 위치시키고 SA-PMPs가 tube의 한쪽면에 모아질때까지 두어 SA-PMPs를 capture하였다.

Washed SA-PMPs를 함유한 tube에 annealing 반응의 전체 반응물을 첨가하고 실온에서 10분간 반응시켰다. SA-PMPs는 magnetic stand를 사용하여 포획하였고, 0.3 ml의 0.1X SSC를 가지고 네 번 washing 하였다. SA-PMPs pellet에 0.1 ml의 RNase free water를 첨가하여 resuspension 시켰다. 회수된 mRNA 수용성 층은 멸균된 tube로 옮겨진 뒤, 다음 실험에 사용되거나, 계속적인 실험을 위하여 -80°C deep freezer에 보관하였다.

#### (라) EST library 제작

mRNA의 5 microgram을 lambda phage cDNA library 제작 (Zap cDNA cloning kit, Stratagene Co.)에 사용하였다. 1st cDNA는 Strata Script reverse transcriptase의 75 unit과 2.8 microgram의 linker primer를 사용해서 합성되었다. 2nd cDNA는 99 unit의 DNA polymerase I과 3 unit의 RNase H를 사용하여 합성하였다. 5 unit의 Pfu DNA polymerase를 사용하여 blunt termini를 형성시켰다. 전기영동에 의해서 500 bp 보다 큰 cDNA fragment들을 젤로부터 회수한 뒤 Uni-ZAP XR vector를 이용하여 ligation 반응을 수행하였다. Recombinant plasmid들은 E. coli속에서 형질전환되었고, ampicillin이 첨가된 LB agar plate상에 도말되었다.

### (2) EST library 염기서열 분석

#### (가) Insert 확인 및 분리

확보된 *A. tamarense* JHW0004 -12 (Fig. 5)의 EST library를 plasmid mini-prep을 통하여 확인하고자 하였다. 확보된 EST library의 cell stock은 lambda phage (pBluescript SK-) 유래의 cDNA library (Zap cDNA cloning kit: Stratagene, USA) 로 구성되어 있으며, 이 library에서 사용된 vector는 Uni-ZAP XR vector system (Fig. 6)으로써 ampicillin 항생제에 대한 저항성 유전자를 가지고 있기 때문에  $\alpha$ -complementation 원리에 의하여 vector가 cloning된 형질전환체는 ampicillin이 첨가된 LB medium에서 선별될 수 있는 특성을 가지고 있다. 또한 이 system에서 사용된 cell line은 X-L1 blue로써 827개의 EST library clone을 확인하기 위해서는 대량의 plasmid mini-prep

system을 이용하여 high-throughput screening을 실시할 필요가 있다. 이를 위해서 Core-One Plasmid HTS Prep Kit (PHTS-30; for 96 well format, Corebio)을 이용하였다. 96 well plate format으로 9개의 plate에 construction된 EST clone 3 u를 12 channel pipette (Finn Co.)을 이용하여 1 ml Hogness Freezing Medium (Table 8) 이 담긴 96 well deep well plate에 접종한 뒤 breathing paper로 덮고, 18시간 동안 37°C 혼탕배양기에서 250 rpm으로 fully culture하였다. 723개의 cultured EST clone은 Union 32R plus centrifuge (Hanil Co.)를 이용하여 plate 상태로 3,000 rpm, 4°C에서 원심분리하여 *E. coli* 세포만을 수집하였다.



Figure 5. Shellfish와 *Alexandrium tamarense* JHW0004-12

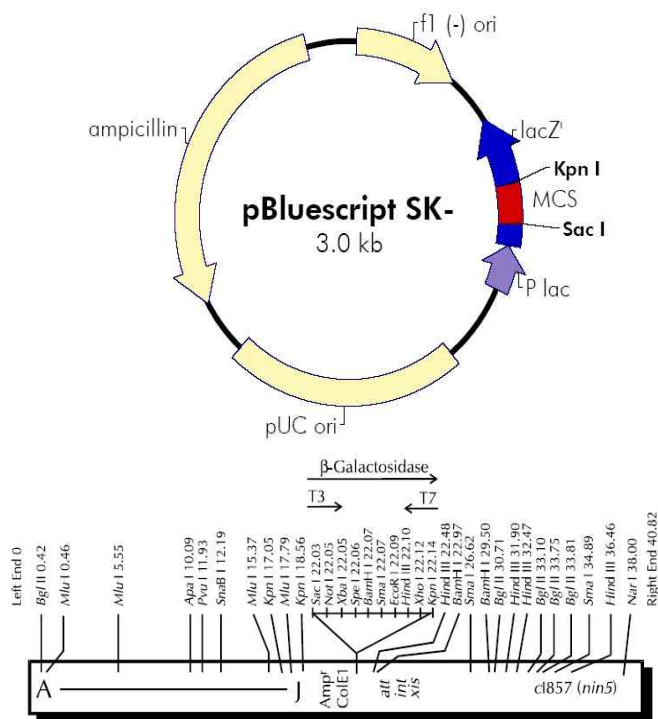


Figure 6. Uni-ZAP XR vector와 pBluescript SK- vector의 map

Table 8. Hogness Freezing Medium

Nutrients	Final concentration
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	36 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13.2 mM
MgSO <sub>4</sub>	0.4 mM
Na <sub>3</sub> -citrate	1.7 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6.8 mM
Glycerol	4.4%

원심분리 후 상층의 배양액을 버리고, 수집된 세포가 담긴 deep well plate를 종이 타월에 뒤집어서 3분간 방치하여 잔여 배양액을 제거하였다. 회수된 세포를 냉장 보관중인 1차 용액 (cell resuspension buffer) 100 ul를 첨가하고, 혼탕배양기에서 250 rpm으로 5분간 현탁시켰다. 안정하게 현탁 된 것을 확인한 후, 상온 보관된 120 ul의 2차 용액 (cell lysis buffer)를 첨가한 뒤, 다시 1분간 250

rpm 으로 혼탕배양기에 현탁 후 2분간 상온에 방치하였다. 2차 용액에 의해서 용융된 세포 용액에 150 ul의 3차 용액 (DNA binding buffer)를 첨가하고, 250 rpm 속도로 2분간 혼탕배양기에 현탁 후 deep well plate를 3,000 rpm 4°C에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 binding plate에 200 ul씩 옮겨 분주 한 뒤 상층액이 plate 하단의 filter에 잘 흡수되도록 5분간 방치시켰다.

진공장치를 이용하여 8 mich.의 압력으로 2분간 용액을 필터하였다. 진공이 계속 걸린 상태에서 95% 에탄올을 200 ul 씩 첨가하여 2회에 걸쳐 세척하였다. 세척후 1분간 방치하고, plate를 진공장치에서 분리하여, 종이타월 위에 두고, 세척액의 습기를 제거하였다. Alignment frame위에 plate를 두고 2,000 rpm 4°C로 5분간 원심분리하여 세척액을 완전히 제거하였다. 96 well round plate 위에 alignment frame을 놓고, binding plate를 맨 위에 위치시킨 후 3차 증류수를 70 ul 첨가형 5-10분간 방치시켰다. 2,000 rpm 4°C에서 10분간 원심분리하여 DNA를 회수하였다. 회수된 DNA가 담긴 plate를 55°C 건조기에 두어 완전 건조시켰다. 건조된 DNA를 40 ul의 멸균수를 첨가하여 녹였다. 회수된 plasmid DNA를 전기영동을 통하여 확인하였다.

#### (나) 염기서열 분석 및 GenBank를 통한 유전자 분석

선발된 모든 클론들은 각 유전자의 5'-말단 부위의 염기서열이 결정 되었으며 각 염기서열의 Data Base 조회결과 (NCBI Blast program)에 따라 유전자가 동정 되었다 (Appendix A).

### 라. Saxitoxin 관련 유전자의 동정 및 발현 양상 분석

#### (1) Dot blot hybridization

확보한 EST library 중 선행된 실험에서 132개의 *E. coli* clone을 각각 plasmid miniprep하여, 일정량 (2-3 ug)을 slot을 이용, nytran membrane에 blotting한 후 *A. tamarense* toxic strain과 non-toxic strain에서 분리한 total RNA를 이용하여 dot-blot hybridization을 수행하였다. *A. tamarense*의 total RNA로부터 mRNA를 분리하고 이 mRNA로부터 cDNA를 합성한 후 Random Primer DNA Biotinylation Kit

(Kirkegaard Perry Laboratories)를 이용하여 probe를 제조하였고 reverse Northern blot을 수행 하였다. 분리된 132개의 plasmid DNA를 96개 slot blot을 이용하여 blot을 만들고 reverse Northern을 수행하였다. Hybridizations은 high-SDS concentration buffer에서 overnight시켜 수행하였고 Blot은 실온에서 intensifying screens (DuPont)이 부착된 케이스에서 X-ray film (Kodak)에 노출시켜 확인하였다.

## (2) Difference Display Polymerase Chain Reaction

DD-PCR 방법은 기존의 방법을 이용하여 실험하였다 (Liang and Pardee, 1992; Liang et al., 1993). Reverse transcription과 PCR은 GeneFishing<sup>TM</sup> DEG 101 (Seegene, Korea)을 변형하여 사용하였다. *A. tamarensis* 두 strain (Toxic, Non-toxic strain) 으로부터 추출된 각각의 total RNA는 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega, USA) 200 unit, 2 mM dNTPs, 20  $\mu$ M anchor ACP-T를 혼합하여 역전사시켰다. 반응이 끝난 후에 94°C에서 2분간 끓여서 역전사 효소를 실활시키고, 2분 동안 얼음에 꽂은 뒤에 80  $\mu$ l의 DNase-free water를 첨가하여 PCR을 반응을 위해 희석한 뒤, -80°C에 보관하였다. 합성 된 first strand cDNA를 이용하여, [3  $\mu$ l Diluted first-strand cDNA (~50 ng), 2  $\mu$ l 5  $\mu$ M arbitrary ACP (Table 1; one of the arbitrary ACPs), 1  $\mu$ l 10  $\mu$ M dT-ACP2, 4  $\mu$ l Distilled water, 10  $\mu$ l 2X SeeAmp ACP Master Mix]를 PCR tube에 첨가하고, 94°C thermal cycler에 preheating 시킨 뒤, 다음과 같은 조건으로 PCR 반응을 수행하였다. 첫 번째 PCR 단계에선, 한 사이클을 arbitrary ACP를 이용하여 second-strand cDNA를 합성했다 : 94°C에서 3분간 denaturation, 50°C에서 3분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 하였다. 두 번째 단계에선 94°C에서 40초간 denaturation, 65°C에서 40초간 annealing, 72°C에서 40초간 extension을 40회 반복하였다. 마지막 extension 반응은 72°C에서 5분간 하였다. 이렇게 만들어진 PCR 산물은 2% agarose gel에 EtBr 염색하여 확인하였다.

## (3) 클로닝 및 염기서열 분석

두 strain (non-toxic, toxic)간에 차이가 나는 유전자라고 여겨지는 DD gel에서 분리된 밴드는 Gell Extraction Kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 추출해 내었다. PCR 산물은 pGEM-T Easy Vector Systems (Promega, USA)를 이용하여 클로닝 하였다.

클로닝된 조각들은 automated sequencing system을 이용하여 염기서열을 분석하였다. GenBank sequence database에서 핵산 (BLASTN) 및 아미노산 (BLASTX)의 염기서열을 비교하였으며, Basic Local Alignment Search Tool program (BLAST)을 이용하였다 (Altschul et al., 1990). universal genetic code를 이용하여 일치하는 아미노산 염기서열을 예측하였다.

#### (4) Saxitoxin 생합성 관련 유전자의 primer 설계

선행된 DD-PCR 실험에서 분리된 유전자의 partial sequence를 기초로 두 개의 primer를 설계하였다 (SAMe : S-adenosylmethionine synthetase, ornithine carbamoyltransferase). 이 외에 saxitoxin 생합성에 직접적으로 관련되어 있을 것으로 여겨지는 SAM cycle 내의 중요한 효소 중 4개를 선발하여 primer를 설계하였다 (SAH Hydrplase, Glycine Methyltransferase, SAMe Decarboxylase, Cystathionine beta-synthse).

#### (5) RT-PCR 분석으로 유전자 발현 확인

선행된 실험에 의하여 분리된 total RNA로부터 Reverse transcription에 의해서 1st cDNA를 만들고, 이로부터 이전 실험에서 선별된 두 개의 saxitoxin 관련 유전자와 새로 설계된 4개의 유전자에 대한 primer를 이용하여 *A. tamarense* toxic strain에 서만 발현이 되는 지를 확인하였다.



## 제 2 절. 연구 수행 결과 및 연구 성과

### 1. 유독식물플랑크톤 biotoxin 검출을 위한 바이오센서 개발

#### 가. GFP 유전자를 이용한 STX 검출용 바이오센서 개발

##### (1) GFP 유전자가 형질전환된 *E. coli* 제작

GFP 유전자를 제한효소인 *BamH* I과 *EcoR* I을 사용하여 pGFP 벡터에서 분리한 후 pET22b(+) 발현벡터에 삽입하였다 (Fig. 7). GFP 유전자가 삽입된 벡터는 전기충격장치를 이용하여 대장균 DH5 $\alpha$ 로 형질전환 되었고 형질전환된 대장균을 STX 검출용 미생물로 사용하였다.

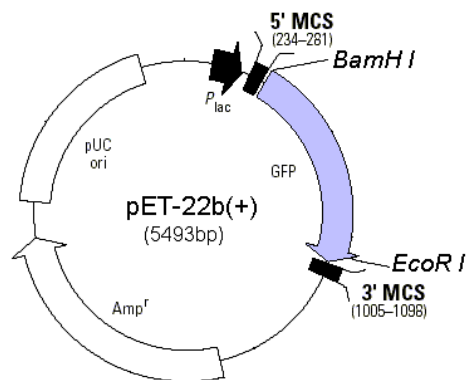


Figure 7. pET-22b(+) expression vector inserted GFP gene

(2) STX에 대한 형질발현된 *E. coli*의 사멸율 측정

형질전환된 대장균을 이용하여 STX을 검출하는 기법으로 활용하기 위해서는 먼저 STX에 의한 대장균의 사멸정도를 확인하고 사멸에 영향을 미치지 않는 농도를 결정하는 것이 중요하다. 배양된 대장균에 STX 용액을 농도별로 처리하여 흡광도를 확인하였는데, 10  $\mu$ l 이상의 STX에서는 대장균의 수가 1.0 이하로 감소하였다 (Fig. 8). 따라서 10  $\mu$ l의 STX이 대장균의 사멸을 결정하는 농도로 나타났다.

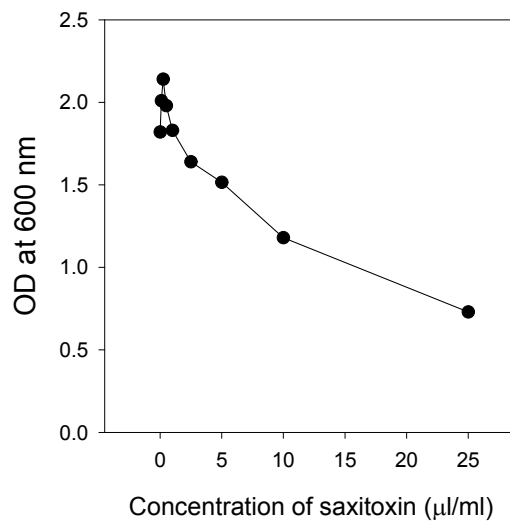


Figure 8. Death rate of transformed *E. coli* on STX

(3) *E. coli*에 대한 STX의 독성테스트

형질전환된 *E. coli*은 자외선 발생장치 하에서 녹색의 형광을 띄게 되는데 (Fig. 9), top agar에 *E. coli*을 도말하고, STX을 농도별로 처리한 후 배양하였을 때 농도에 따라 STX 처리 지역에서의 투명지역 (대장균이 이동하여 움직인 부분)이 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 10). 따라서 본 발명에서 사용한 GFP 유전자와, GFP 유전자가 형질전환된 *E. coli*, 그리고 *E. coli*의 biotoxin에 대한 회피성 등을 활용한 바이오센서 기법은 STX의 검출을 위한 기법으로 이용될 수 있음을 보여준다.

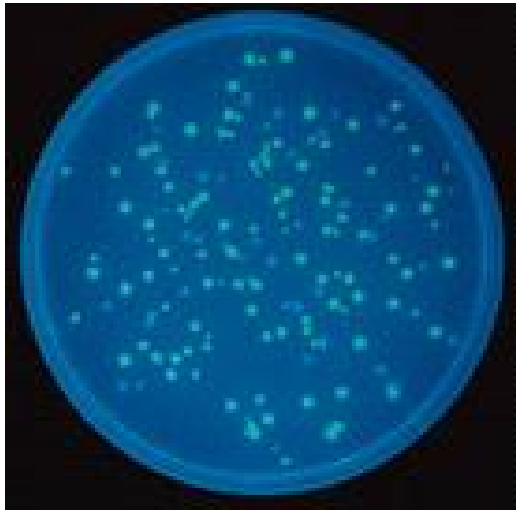


Figure 9. Transformed *E. coli* DH5 $\alpha$

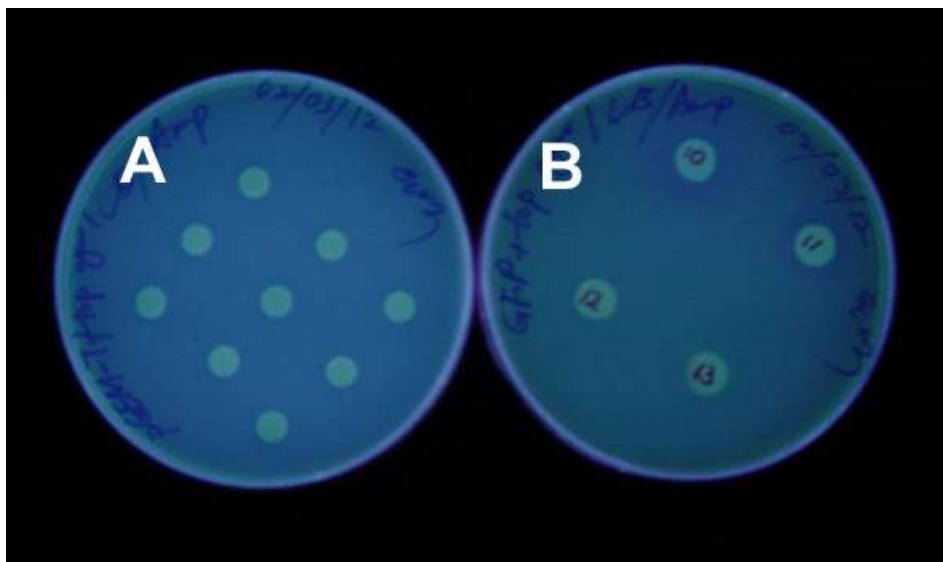


Figure 10. Repellent of transformed *E. coli* on STX  
A, *E. coli*; B, Transformed *E. coli*

## 나. 항원-항체 반응을 이용한 STX 검출용 바이오센서 개발

STX에 대한 항체를 개발하고 항원-항체 반응을 이용한 바이오센서를 개발하였다. 이를 위하여 STX을 mouse에 주사하여 얻어진 antiserum을 항원-항체 반응에 적용하였다. 이 바이오센서도 유독식물플랑크톤의 biotoxin을 검출할 수 있는 바이오센서로는 세계 최초이며 현재 특허출원이 되어 있고, GFP 분야와 마찬가지로 벤처기업인 (주)대현 하이테크와 사업화를 위한 구체적인 협의가 이루어지고 있다.

본 과제에서 개발한 STX 검정법은 아직까지 전세계적으로 체계적으로 시도되거나 개발되지 않은 개발기술로써 고가의 정밀분석기기의 이용과 함께 현장에서 독소의 조기정밀 기술이 확립된다면 이의 활용 가능성은 매우 높으며 또한 및 다른 유해독소의 조기정밀 진단에도 적용 가능하므로 발전 가능성은 매우 높다. 이에 대한 연구 결과는 다음과 같다.

### (1) STX-단백질 conjugate의 확인

정제된 STX은 Imject® Immunogen EDC conjugation kit (Pierce)를 사용하여 carrier protein에 conjugation 되었으며 STX-carrier protein conjugate는 Fig. 11 과 같이 SDS-PAGE를 통하여 conjugation 여부를 확인할 수 있었다. Negative control로 사용한 KLH와 비교하여 볼 때 확실히 STX가 carrier protein에 conjugation 되었음을 확인할 수 있었다.

Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4	Lane 5
Low Molecular Weight Marker	OVA	OVA-stx	KLH	KLH-stx

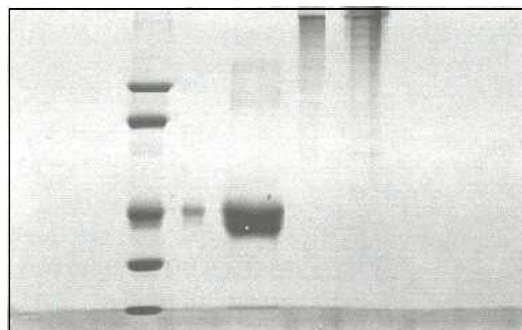


Figure 11. Detection of STX-protein conjugate

## (2) Anti-STX antiserum의 titration

mKLH-STX로 immunization 시킨 mouse로부터 획득한 antiserum의 titer를 알아보기 위하여, OVA-STX 및 OVA를 coating 시킨 micrititer plate를 이용하여 indirect ELISA를 실시하였다. Fig. 12에서 볼 수 있는 바와 같이, OVA-STX와 특이적으로 반응을 하며, OVA에는 반응하지 않는 것을 확인할 수 있으며, 1/10000 희석 조건에서도 상당히 높은 흡광도 값 ( $OD_{405} > 1$ )을 보이는 것으로 봐서 sensitivity 역시 높은 것을 알 수가 있다.

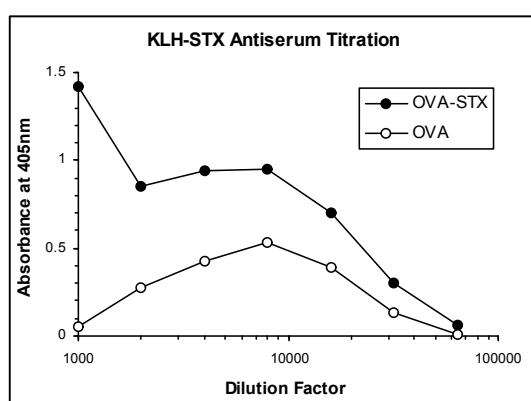


Figure 12. Titration curve of anti-STX antiserum using ELISA

## (3) Free STX에 대한 Anti-STX antiserum의 titration

(2)의 실험으로 확인한 antiserum에 대한 free STX의 titer를 알아보기 위하여, free-STX를 coating 시킨 micrititer plate를 이용하여 indirect ELISA를 실시하였다. Fig. 13에서 볼 수 있는 바와 같이, free-STX와 특이적으로 반응을 하며, 이 serum이 free-STX에는 반응하지 않는 것을 확인할 수 있으며, 1/16000 희석 조건에서도 상당히 높은 흡광도 값 ( $OD_{405} > 1$ )을 보이는 것으로 봐서 sensitivity 역시 높은 것을 알 수가 있다.

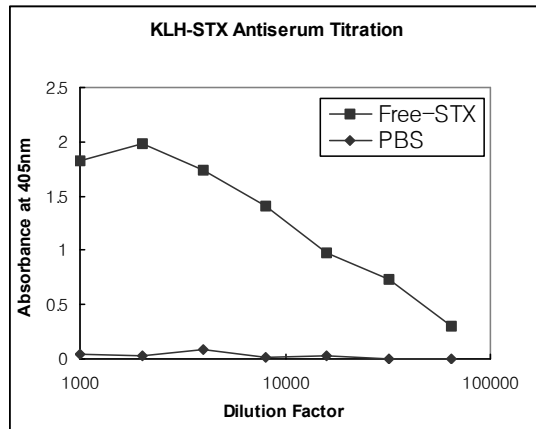


Figure 13. Titration curve of anti-STX antiserum on free STX using ELISA

(4) 현장적용을 위한 Anti-STX antiserum의 sensitivity 측정

(3)의 실험으로 Anti-STX antiserum이 1/16000 희석 조건에서도 상당히 높은 흡광도 값 ( $OD_{405} > 1$ )을 보이는 것으로 봐서 이 serum이 STX에 대해 높은 sensitivity를 보여주고 있고 현장에서 적용을 하였을 때 약 1.56 ug의 STX까지 효과적으로 감지할 수 있을 것으로 보여진다 (Table 9). 이로써 본 과제에서 제작한 anti-STX antiserum은 STX의 조기정밀 검정에 효과적인 방법임을 확인하였다.

Table 9. Sensitivity of anti-STX antiserum

DF	Free-STX	PBS
1000	1.823	0.043
2000	1.982	0.027
4000	1.732	0.084
8000	1.403	0.021
16,000	0.983	0.03
32,000	0.732	0.003
64,000	0.306	0.002

## 다. Shellfish poisoning toxin에 대한 antibody의 제조

### (1) Carrier protein을 이용한 shellfish-toxin conjugate의 제조

정제된 shellfish toxin 중 gonyautoxin, neosaxitoxin, domoic acid는 Imject® Immunogen EDC conjugation kit (Pierce)를 사용하여 carrier protein에 conjugation 되었으며 toxin hapten-carrier protein conjugate는 그림과 같이 SDS-PAGE를 통하여 conjugation 여부를 확인할 수 있었다 (그림 14, 15, 16). 반면 okadaic acid와 pectenotoxin-2는 Imject<sup>®</sup> PharmaLink<sup>™</sup> Immunogen Kit (PIERCE Co.) 사용하였고, SDS-PAGE를 통해 확인하였다 (Fig. 17, 18).

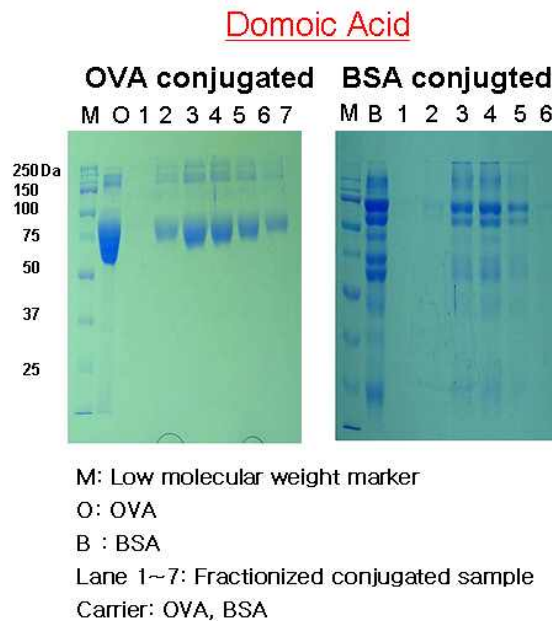
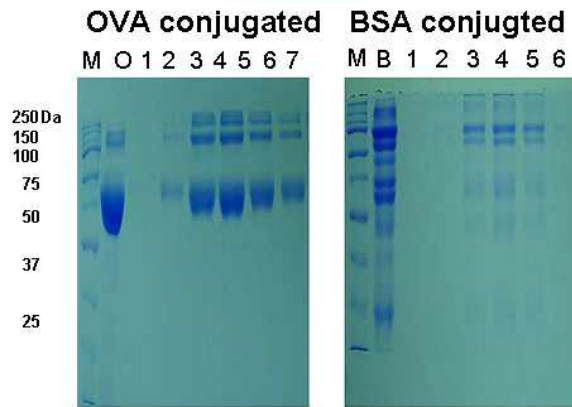


Figure 14. Detection of domoic acid-protein conjugate

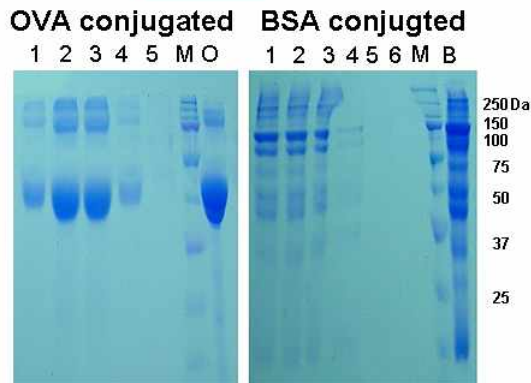
**GTX 2&3**



M: Low molecular weight marker  
O: OVA  
B : BSA  
Lane 1~7: Fractionized conjugated sample  
Carrier: OVA, BSA

Figure 15. Detection of gonyautoxin-protein conjugate

**NeoSTX**

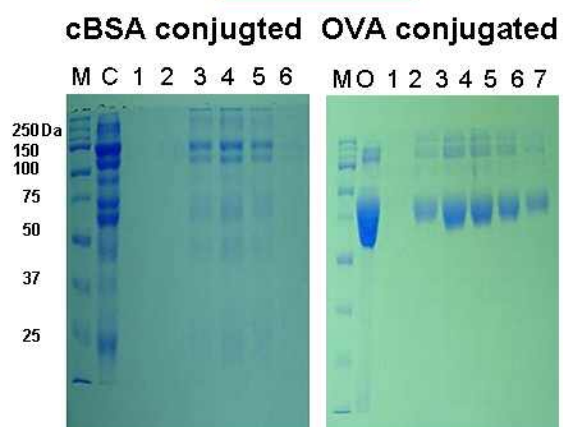


M: Low molecular weight marker  
O: OVA  
B : BSA  
Lane 1~6: Fractionized conjugated sample  
Carrier: OVA, BSA

Figure 16. Detection of neosaxitoxin-protein conjugate



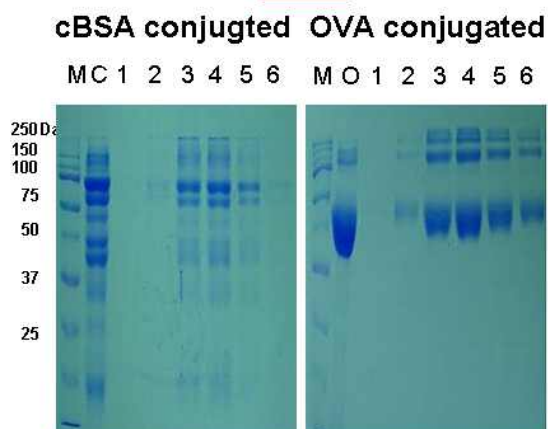
### Okadaic Acid



**M:** Low molecular weight marker  
**C:** cBSA  
**O:** OVA  
**Lane 1~7:** Fractionized conjugated sample

Figure 17. Detection of okadaic acid-protein conjugate

### PTX2



**M:** Low molecular weight marker  
**C:** cBSA  
**O:** OVA  
**Lane 1~6:** Fractionized conjugated sample

Figure 18. Detection of pectenotoxin-protein conjugate

(2) shellfish-toxin conjugate의 면역화

Polyclonal antiserum의 제조를 위하여 4 주령의 BALB/c mouse를 사용하였다. 첫번째 immunization에는 complete Freund's adjuvant를 사용하였고, 각 immunization에는 mouse 한 마리당 50 microgram의 mκKLH-STX conjugate가 되도록 sterile PBS에 희석하여 사용하였으며, intraperitoneal (i.p.) route로 injection 하였다. Immunization 후 anti-biotoxin antiserum을 titration 하였고, sensitivity를 결정하였다 (Figure 19-23, Table 10-14).

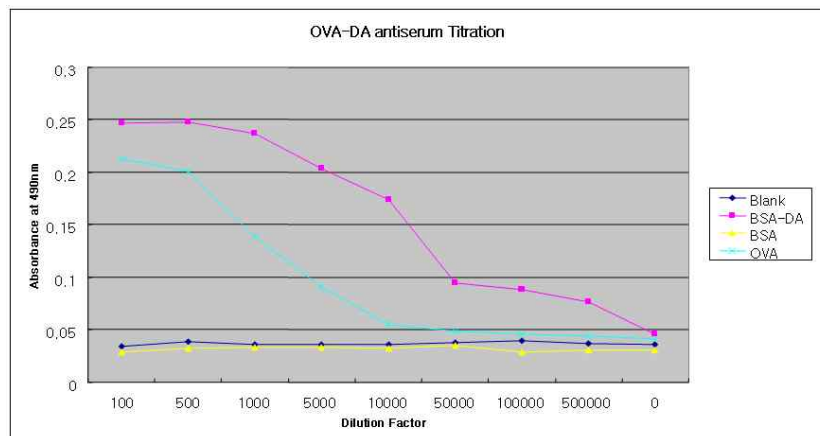


Figure 19. Titration curve of anti-domoic acid antiserum using ELISA

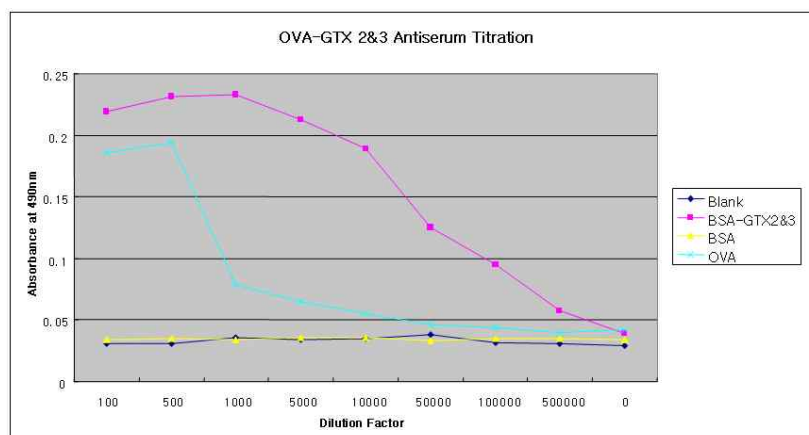


Figure 20. Titration curve of anti-gonyautoxin antiserum using ELISA

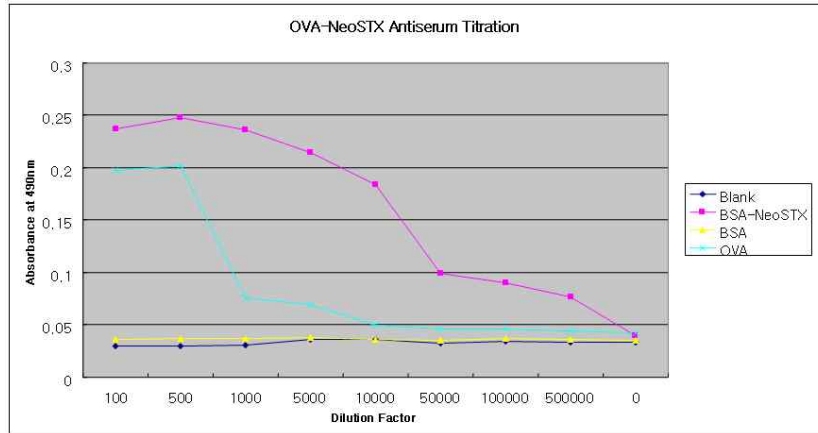


Figure 21. Titration curve of anti-neosaxitoxin antiserum using ELISA

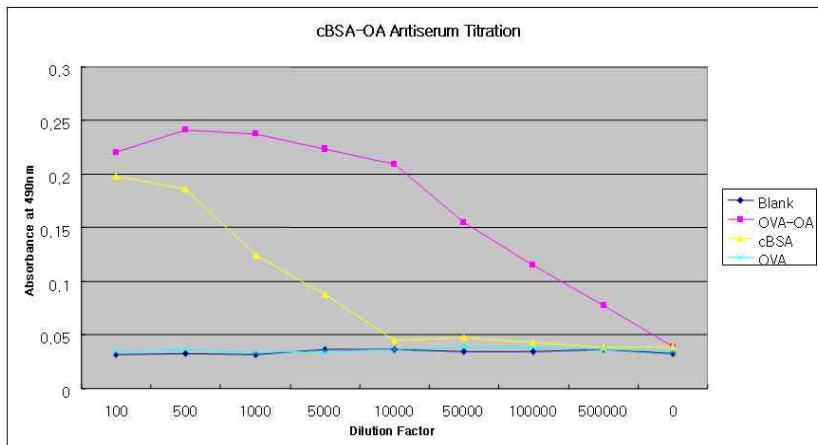


Figure 22. Titration curve of anti-okadaic acid antiserum using ELISA

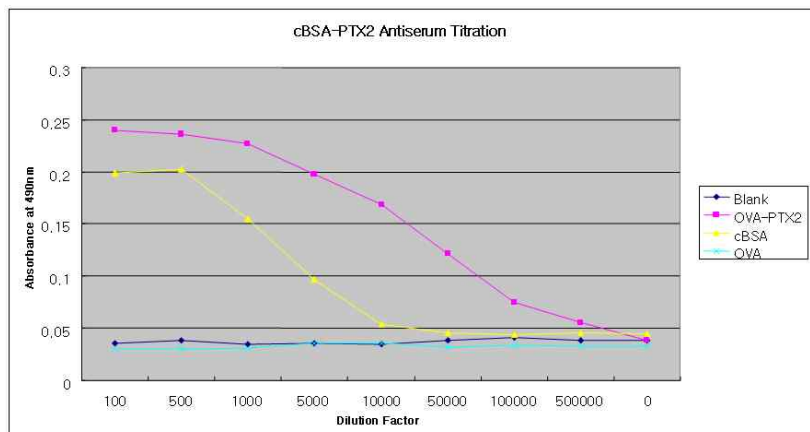


Figure 23. Titration curve of anti-pectenotoxin antiserum using ELISA

Table 10. Sensitivity of anti-domoic acid antiserum

Dilution Factor	Blank	BSA-DA	OVA	BSA
100	0.034	0.247	0.233	0.029
500	0.039	0.248	0.216	0.032
1000	0.036	0.237	0.189	0.033
5000	0.036	0.204	0.126	0.033
10000	0.036	0.174	0.091	0.032
50000	0.038	0.095	0.048	0.035
100000	0.04	0.088	0.046	0.029
500000	0.037	0.077	0.042	0.031
0	0.036	0.046	0.04	0.031

Table 11. Sensitivity of anti-gonyautoxin antiserum

Dilution Factor	Blank	BSA-GTX2	BSA	OVA
100	0.031	0.219	0.034	0.186
500	0.031	0.231	0.035	0.194
1000	0.036	0.233	0.034	0.079
5000	0.034	0.213	0.036	0.065
10000	0.035	0.189	0.036	0.055
50000	0.038	0.125	0.033	0.046
100000	0.032	0.095	0.035	0.044
500000	0.031	0.058	0.035	0.040
0	0.029	0.039	0.034	0.042

Table 12. Sensitivity of anti-neosaxitoxin antiserum

Dilution Factor	Blank	BSA-NeoSTX	BSA	OVA
100	0.030	0.237	0.036	0.197
500	0.030	0.248	0.037	0.202
1000	0.031	0.236	0.037	0.076
5000	0.036	0.214	0.038	0.069
10000	0.036	0.184	0.036	0.050
50000	0.032	0.099	0.035	0.046
100000	0.034	0.090	0.037	0.046
500000	0.033	0.077	0.036	0.044
0	0.033	0.04	0.035	0.042

Table 13. Sensitivity of anti-okadaic acid antiserum

Dilution Factor	Blank	OVA-OA	cBSA	OVA
100	0.032	0.221	0.198	0.035
500	0.033	0.241	0.186	0.036
1000	0.032	0.237	0.124	0.034
5000	0.036	0.223	0.088	0.035
10000	0.036	0.209	0.045	0.036
50000	0.035	0.155	0.048	0.038
100000	0.035	0.115	0.043	0.038
500000	0.036	0.078	0.038	0.036
0	0.033	0.039	0.039	0.035

Table 14. Sensitivity of anti-pectenotoxin antiserum

dilution factor	Blank	OVA-PTX2	cBSA	OVA
100	0.036	0.240	0.199	0.03
500	0.038	0.236	0.202	0.03
1000	0.035	0.227	0.155	0.031
5000	0.036	0.198	0.097	0.036
10000	0.035	0.169	0.054	0.036
50000	0.038	0.121	0.046	0.032
100000	0.041	0.075	0.044	0.034
500000	0.038	0.056	0.046	0.033
0	0.038	0.038	0.045	0.033

라. Rapid immunofilter paper assay (RIPA)를 이용한 식물플랑크톤 유래 biotoxin 진단 기술 개발

Rapid immunofilter paper assay(RIPA, 항체여과지진단)는 항원과 항체의 특이적 결합 반응을 이용하는 것으로 일반적인 항혈청 진단 원리와 동일하다. RIPA를 이용한 진단은 단순하며 단시간(10분내)에 검정이 가능하고, 특이성과 감도가 비교적 높은 특징이 있다. 또한 야외에서도 편리하게 활용할 수 있고 2종 이상의 toxin을 동시에 진단할 수 있는 장점이 있다(Table 15 & 16). RIPA에 사용되는 라텍스는 흰색과 유색(청색/핑크색)이 있으며 이들 각각의 라텍스에 특이적 항체를 결합하여 사용한다. 이들 중 항체와 결합된 흰색 라텍스를 종이에 고정한다. 이와 같이 제작된 종이를 immunofilter paper라고 한다. 항체가 결합된 유색 라텍스는 immunofilter paper에 식물체 즙액을 전개한 후 사용되며, 유색 선의 형성 유무로 항체와 특이적 toxin의 존재여부를 판정할 수가 있다. 항원 항체의 결합은 DAS-ELISA와 유사한 원리이다(Fig. 24).

Table 15. 진단법 비교

구 분	역전사핵산증폭반응	효소항체결합법	RIPA
검 정 한 계	10-12g	10-9g	10-9g
진 단 시 간	2일	2일	5분
진 단 과 정	복잡	보통	단순
진 단 시 설	PCR 기기 등 다수	판독기	-
진 단 장 소	실험실	실험실	실험실, 재배포장
소요금액(1점)	860원	1,200원(수입키트)	76원

Table 16. RIPA kit의 특징

구 분	효소결합항체진단(ELISA)	항체여과지진단(RIPA)
검출 한계	1 ng	10 ng
소 요 시 간	6-18 시간	5-10 분
진 단 기 술	전문가	비전문가
진 단 장 소	실험실	재배현장& 실험실

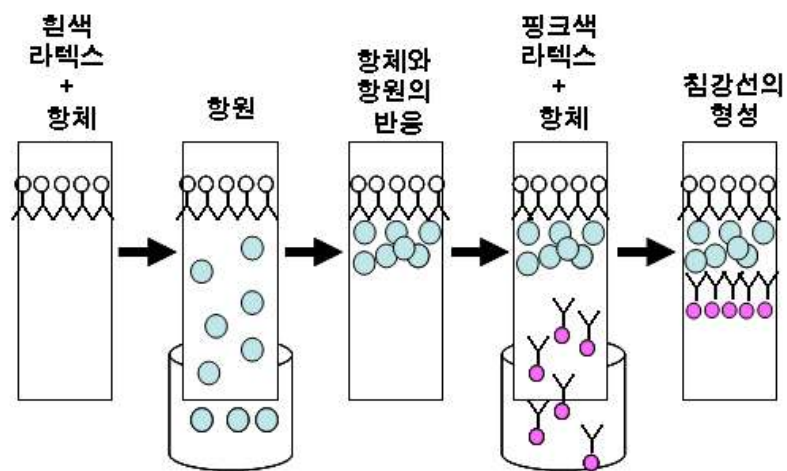


Figure 24. Rapid immunofilter paper assay의 원리

Rapid immunofilter paper assay를 이용하여 *A. tamarense* 중 saxitoxin을 합성하는 균주(toxic)와 합성하지 못하는 균주(non-toxic)를 검정한 결과, 각각 특이적인 침강선이 나타나며 saxitoxin은 100 ng까지 검정이 가능하였다(Fig. 25). 해양 식물플랑크톤의 toxin에 대한 RIPA법의 활용은 국내외적으로 아직 초기단계여서 kit로의 개발은 아직 보완하여야 할 부분이 있으나 현장에서 활용할 수 있는 기술개발 측면에서는 활용가능성이 높다고 할 수 있겠다. 현재 다양한 toxin을 생산하는 식물플랑크톤의 확보가 용이하지 않아 saxitoxin 이외의 다른 toxin에 대한 확인은 하지 못하였으나 향후 다양한 toxin의 활용을 위한 실험과 ELISA에 버금가는 sensitivity를 갖는 RIPA법의 개발이 필요하다.

Toxic strain    Non-toxic strain

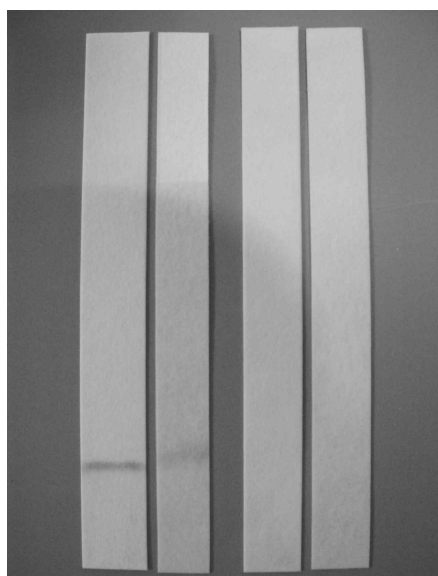


Figure 25. Saxitoxin의 RIPA 결과. 검은선은 양성반응



## 2. STX 생합성 관련 유전자 탐색 및 분리를 위한 분자생물학적 연구

### 가. 해양식물플랑크톤종의 분자계통학적 분석

와편모조류는 단세포생물이며 다양한 서식지에 분포하고, 다양한 행동과 섭식 행동을 보이는 미생물이다. 해양과 담수에 걸쳐 서식하며 수생생태계에서 중요한 일차생산자이자 소비자이다. 해양와편모조류는 HABs를 유발하며 인간 건강을 위협하는 biotoxin을 생산하거나 심대한 경제적 피해를 입히는 대량증식을 일으킨다 (Anderson, 1997; Hallegraeff, 1993).

HABs는 1970년대까지 우리나라에서는 드문 현상이었다. 1980년대에 HABs의 빈도와 기간이 점차 증가하기 시작하였고 지난 약 20여년간 우리나라 연안은 다양한 유독식물플랑크톤에 의해 위협받게 되었고, 지역의 수산업에 막대한 경제적 피해를 입히게 되었다 (Kim, 1997). 일반적인 HAB 모니터링 프로그램은 현장시료내의 식물플랑크톤을 동정하고 계수하고 그들의 시공간적 분포를 조사하고, 주변 해수와의 물리/화학적 특성의 연관관계를 조사하는데 머무르고 있었다. 그러나 HAB 유발종의 미세한 형태적인 특징 때문에 광학현미경 하에서의 종 분류는 매우 어렵다 (Steidinger and Tangen, 1996).

Ribosomal RNA (rRNA) 또는 coding gene (rDNA)은 다양한 생물체의 계통분류학적 유연관계를 연구하는데 많이 사용되어 왔다 (Soltis and Soltis, 1998; Cavalier-Smith, 1993). Small subunit (SSU) rDNA는 가장 conserved region일 뿐만 아니라 밀접하게 연관된 생물체를 구별하는데 매우 유용한 divergent region을 가지고 있다 (Wuyts *et al.*, 2002). 과거 수십년간 와편모조류의 유전적 특징에 대한 많은 연구가 수행되었고, 그들의 rDNA 염기서열이 계통분류학적 연구에 사용되어 왔다 (Daugbjerg, 2000; Saldarriaga *et al.*, 2001; Saunders *et al.*, 1997). 이 연구에서 우리는 우리나라 연안의 적조 동안 채집한 14종을 포함하여 23종의 와편모조류에 대해 SSU rDNA 염기서열을 분석하였다.

#### (1) Genomic DNA 분리와 SSU rDNA amplification

각 식물플랑크톤 strain으로부터 추출한 genomic DNA를 ethidium bromide로 염색된 agarose gel 상에 나타내었다 (Fig. 26). Universal primer set를 사용하여 SSU

rDNAs를 PCR 증폭하였을 때 일정한 약 1.8 Kb의 PCR band를 얻었다 (Fig. 26). PCR product의 염기서열을 분석한 결과 22 strains으로부터 거의 완벽한 SSU rDNA sequence를 얻었다. 그러나 *A. tamarense* JHW0004-12의 경우 SSU rRNA 유전자내의 extensive sequence polymorphism 때문에 깨끗한 전기영동 사진을 얻을 수 없었다.

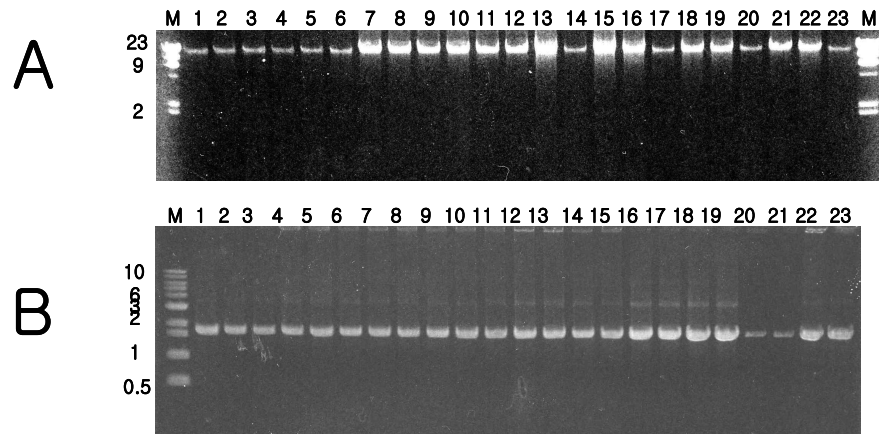


Figure 26. Genomic DNAs (A) and PCR products of SSU rDNA (B). M; Marker, 1; *Akashiwo sanguinea* GSW0207, 2; *Alexandrium catenella* Gsakor11, 3; *Alexandrium catenella* Axsp-K01, 4; *Alexandrium catenella* Axsp-K03, 5; *Alexandrium catenella* AxCt-K01, 6; *Alexandrium catenella* JHW9706, 7; *Alexandrium fraterculus* JHW0108-1, 8; *Alexandrium tamarense* JHW0004-12, 9; *Alexandrium* sp. AspAxp03, 10; *Cochlodinium polykrikoides* BSW0109, 11; *Cochlodinium polykrikoides* CP0, 12; *Cochlodinium polykrikoides* CP-PP4, 13; *Cochlodinium polykrikoides* CP-PP6, 14; *Gymnodinium catenatum* JHW9910, 15; *Gymnodinium catenatum* DC99A44, 16; *Gymnodinium catenatum* GCSW962, 17; *Gyrodinium instriatum* JHW0007, 18; *Heterocapsa triquetra* GSW0206-2, 19; *Lingulodinium polyedrum* DRW0208, 20; *Pheopolykrikos hartmanii* JHC0203, 21; *Prorocentrum minimum* PmiPrMu21, 22; *Protoceratium reticulatum* JHW0007-6, 23; *Scrippsiella trochoidea* GSW9808.

## (2) Sequence alignments

Final alignment는 23 dinoflagellates SSU rRNA gene sequences (Appendix)에 대해 1749 positions으로 구성되었다. Gsakor11 and GSW0207 strain의 염기서열은 *Akashiwo sanguinia* CCMP1321와 각각 99.27%와 98.49%의 identity를 보인다. 시공간적으로 떨어져 있었음에도 불구하고 종내 유전적 heterogeneities가 있다는것은 *Al. catenella*, *C. polykrikoides*와 *Gym. catenatum*. 같은 100% identity를 갖는 종과 비교하였을 때 흥미로운 결과이다.

이 연구에서 4종의 *Al. catenella* strains (Axsp-K01, Axsp-K03, Axct-K01, JHW9706)이 채집된 시기나 장소가 달랐다 (Table 4). 4 strain의 SSU rDNA sequence는 *Al. fundyense* 와 *Al. tamarensis* 와는 달리 어떠한 polymorphism도 없이 100% 유사하였다 (Scholin *et al.*, 1993; Scholin *et al.*, 1994). JHW0108-1의 SSU rDNA 염기서열은 SJW9709 (GenBank Acc. No.: AB088315), DPW9709 (AB088290) 와 100% 동일하였다.

## (3) 계통분류학적 분석

Outgroup taxon인 *Noctiluca scintillans*을 포함하여 25개의 대표적인 와편모조류 염기서열을 GenBank로부터 얻어 이 연구에 사용된 14종과 함께 계통분류학적 분석을 하였다. Tree topologies는 tree-making algorithms 즉 neighbor-joining (NJ) (Fig. 27), maximum-parsimony (MP) (Fig. 28), 그리고 maximum-likelihood (ML) 방법 (Fig. 29) 등에 따라 조금 달랐다. GTR + I + G model에 따른 ML tree는 true phylogeny를 반영하는 것으로 생각되었다.

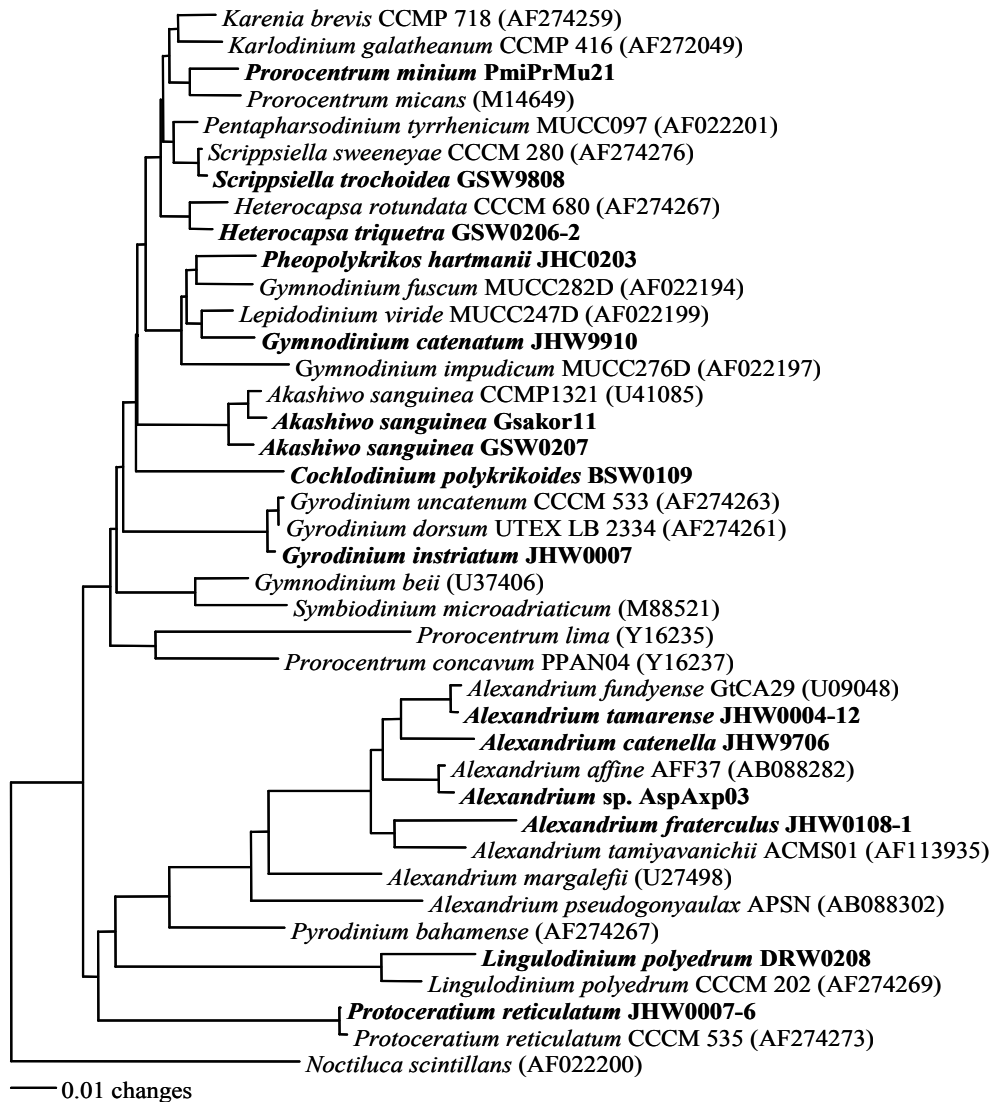


Figure 27. Molecular phylogenetic tree of dinoflagellates inferred from SSU rDNA region by Neighbor joining method.

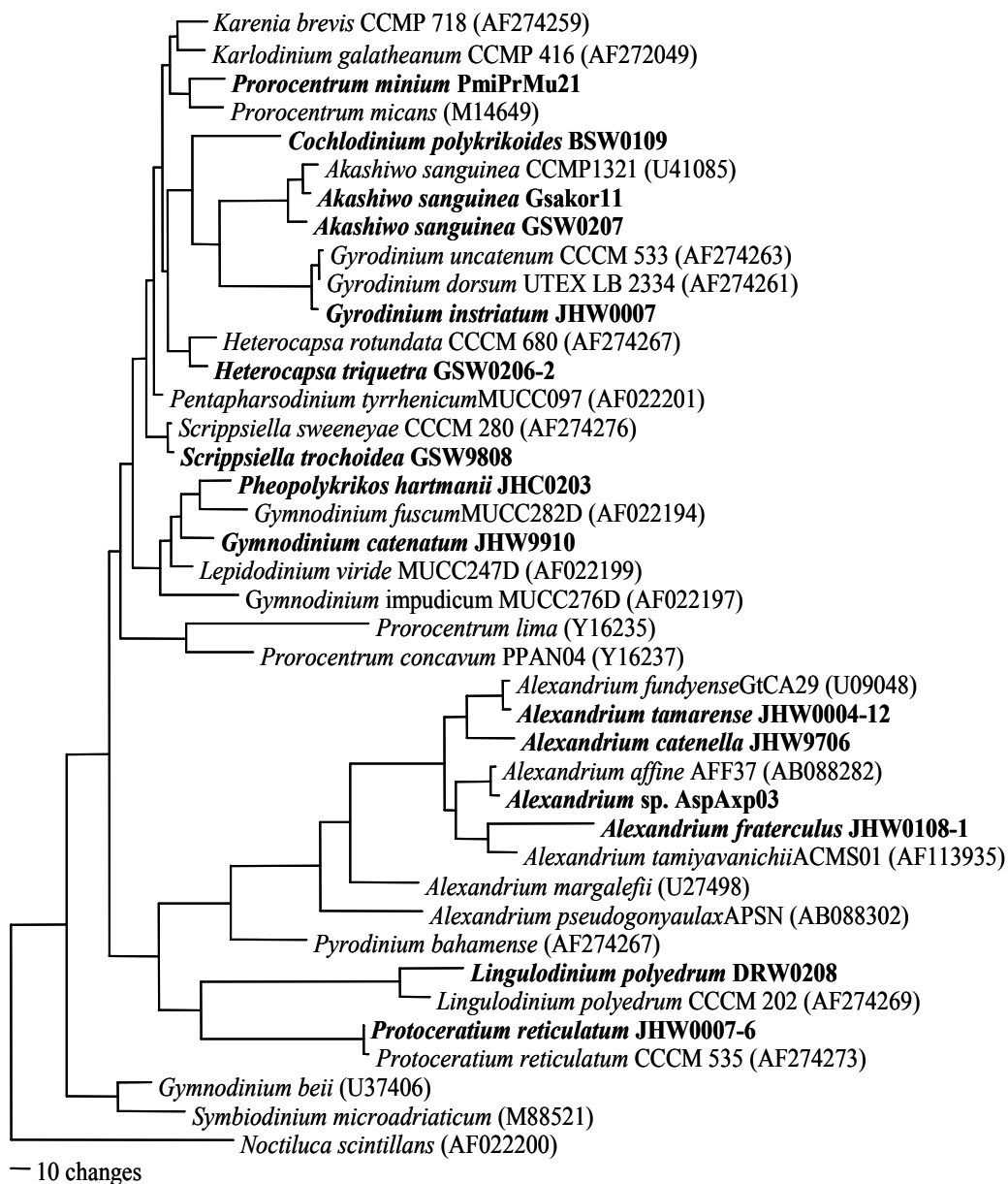


Figure 28. Molecular phylogenetic tree of dinoflagellates inferred from SSU rDNA region by Maximum parsimony method.

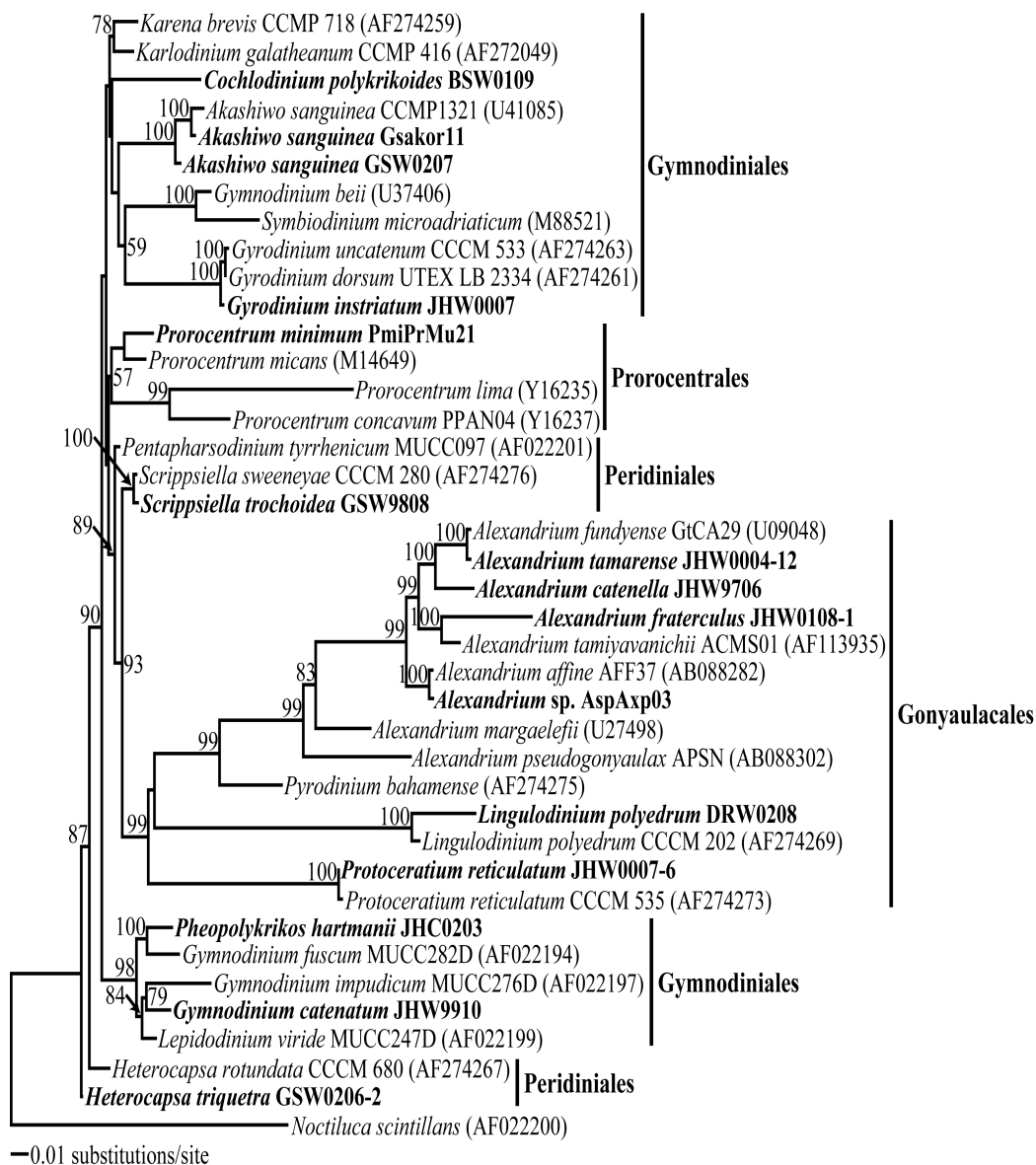


Figure 29. Molecular phylogenetic tree of dinoflagellates inferred from SSU rDNA region by Maximum likelihood method.

## 나. 해양식물플랑크톤 *A. tamarense* JHW0004-12의 biotoxin 생합성에 대한 분자생물학적 분석

biotoxin을 함유하는 *A. tamarense*는 우리나라 연안 도처에서 발견되고 (Leao *et al.*, 1998; Jovine *et al.*, 1992), 매년 PSP (paralytic shellfish poisoning)를 유발하는 대표적인 HAB-유발종 중의 하나이다 (Shimizu *et al.*, 1990b; Taroncher-Oldenburg 2000). 본 연구에 사용된 *A. tamarense* JHW0004-12는 진해만에서 분리하였다 (Fig. 30).

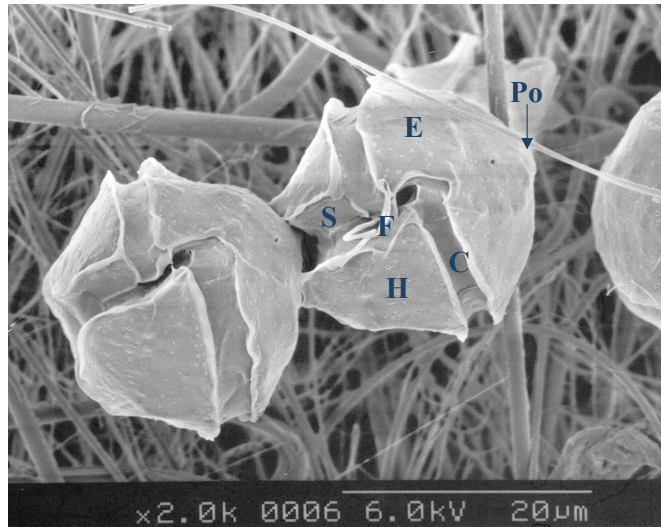


Figure 30. SEM photographs of *Alexandrium tamarense* JHW0004-12 showing morphology. Po; apical pore plate, E; Epitheca, C; Cingulum, S; Sulcus, F; Flagellar H; Hypotheca.

Biotoxin 생성률은 성장률에 비례한다 (Anderson *et al.*, 1990b). 따라서 배양되는 모든 세포는 동시에 분열하여야 한다. 빛은 생리적 과정을 활성화시키고 식물플랑크톤 내의 세포성장 시기를 조절하는 가장 중요한 요인이다 (Chisholm, 1981). 식물플랑크톤 세포는 충분한 광량하에서만 light-dependent block points에 있을 수 있다. 그러한 transition points는 *Chlamydomonas* (Spudich and Sager, 1980), *A. carterae* (Olson and Chisholm, 1986), 그리고 *Hymenomonas carterii* 및 *Thalassiosira weissflogii* 등

에서 잘 연구되었다 (Vaulot et al., 1986). 만약 세포에 최소한의 빛 요구도 주어지지 않고 one light-dependent transition point에만 있다면, 그리고 dark 시간이 전체 cell cycle과 같거나 길다면 모든 세포는 동일한 point에 있게 될 것이다. 일단 정상적인 light-dark cycle이 회복되면 synchronized population이 얻어진다.

본 연구에서는 dark 시간을 연장한 block-release approach를 사용하여 synchronized culture를 얻었다. mRNA expression patterns을 분석하기 위해 Differential display를 사용하였다. 식물플랑크톤의 분자생물학은 거의 연구된 바 없으며 알려져 있는 와편모조류 유전자도 거의 없다. 따라서 본 연구에서는 *A. tamarensis*의 생리학적, 그리고 발생학적 과정과 연관되는 유전자를 분리하고 동정하기 위해 EST search를 사용하였다.

#### (1) Synchronized culture와 세포 성장

정상적인 10:14 L/D cycle 회복 한시간 전에 세포 농도는  $805 \pm 15$  cell  $\text{ml}^{-1}$ 이었다 (Fig. 31). Dark 하에서의 배양을 10:14 L/D cycle로 전환하였을 때 세포 수는 8시간 까지 평균  $885 \pm 35$  cell  $\text{ml}^{-1}$ 로 조금 증가했다. 16시간 후에는  $1,052 \pm 67$  cell  $\text{ml}^{-1}$ 이 관찰되어 초기수준에 비해 약 31% 정도 증가하였다. 32시간 후에는  $1,818 \pm 95$  cell  $\text{ml}^{-1}$ 로 증가하였다.

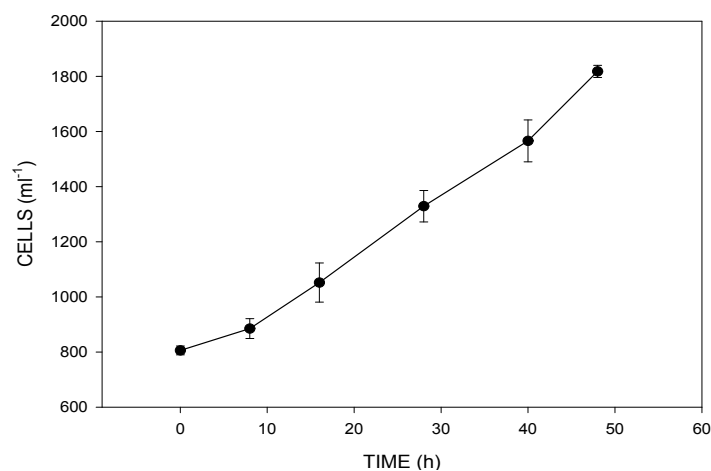


Figure 31. Cell densities in *A. tamarensis* as a function of time and during synchronous growth on a 14:10 L/D cycle. Error bars denote  $\pm$ SD.



## (2) Cell size 분포

세포직경을 -1시간부터 48시간까지 측정하였고 3가지 특징적인 종류로 나눌 수 있었다 (Fig. 32). Dark 하에 있던 세포는  $G_0$ 기에 해당하는  $25\mu\text{m}$  ( $\pm 1.3$ )이었다. 28시간까지는 세포크기가  $G_1$ 기에 해당하는  $35\mu\text{m}$  ( $\pm 2.3$ )가 되었다 (Fig. 33). 이 세포들은 크기가 증가하기 시작하여 40 시간에는  $41\mu\text{m}$  ( $\pm 1.7$ )에 도달하였고  $G_2 + M$ 기에 해당한다. 드 후 세포의 크기는  $34\mu\text{m}$  ( $\pm 1.7$ ) 까지 빠르게 감소하였다.

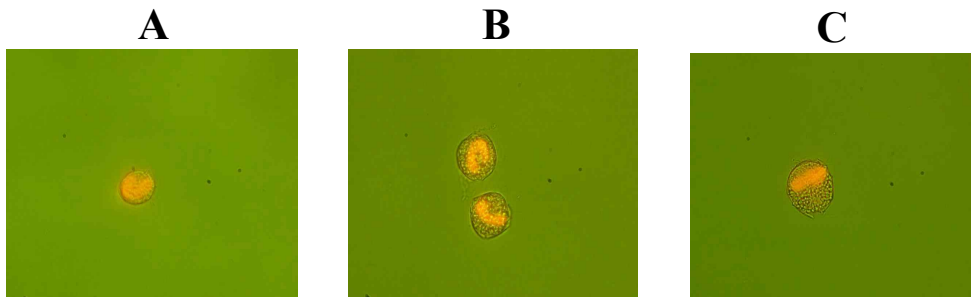


Figure 32. Synchronization experiment by dark-induced block/release method. A,  $G_0$  phase cell, B, light phase cell, C, dark phase cell.

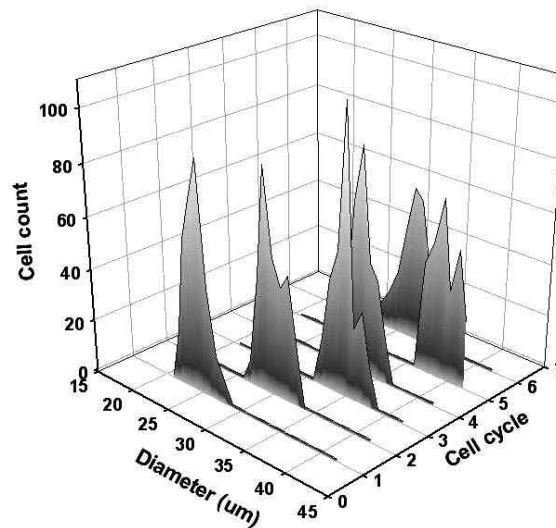


Figure 33. Variation in the cell size distribution of *A. tamarensis* during the first 48 hours of the synchronization experiment. Area with cell cycle 1, corresponds to cells in  $G_0$  ( $25\mu\text{m} \pm 1.3$ ), 2, corresponds to cells in light phase ( $31\mu\text{m} \pm 1.6$ ), 3, corresponds to cells in dark phase ( $35\mu\text{m} \pm 1.6$ ), 4, corresponds to second day of cells in light phase ( $34\mu\text{m} \pm 1.1$ ), 5, corresponds to second day of cells in dark phase ( $41\mu\text{m} \pm 1.7$ ), 6, corresponds to third day of cells in light phase ( $34\mu\text{m} \pm 1.7$ ).

### (3) CE system에 의한 biotoxin 함량 분석

CE separation의 효율은 추출과 시료준비에 있어서의 clean up이 중요하다 (Rodriguez *et al.*, 1998). 완충용액 농도와 전기영동시 전압의 영향을 정립하였다. 적정 완충용액은 50 mM morpholine buffer였으며, 20 kV at pH 5 조건이 biotoxin 분리에 최적의 조건이었다. STX, neoSTX 및 GTX 1-4 이 분석되었다 (Fig. 34). CE system의 calibration에는 STX, neoSTX, GTX2/3, GTX1/4 standard 용액을 사용하였다. 결과는 Fig. 35에 나타내었다.

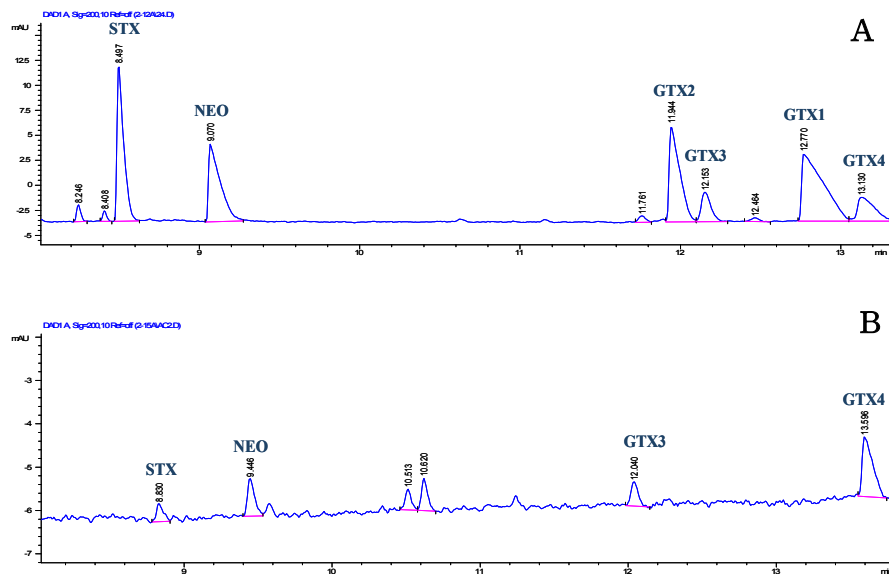


Figure 34. UV electro pherograms for each of the PSP toxins in standards (A) and *A. tamarense* cells (B).

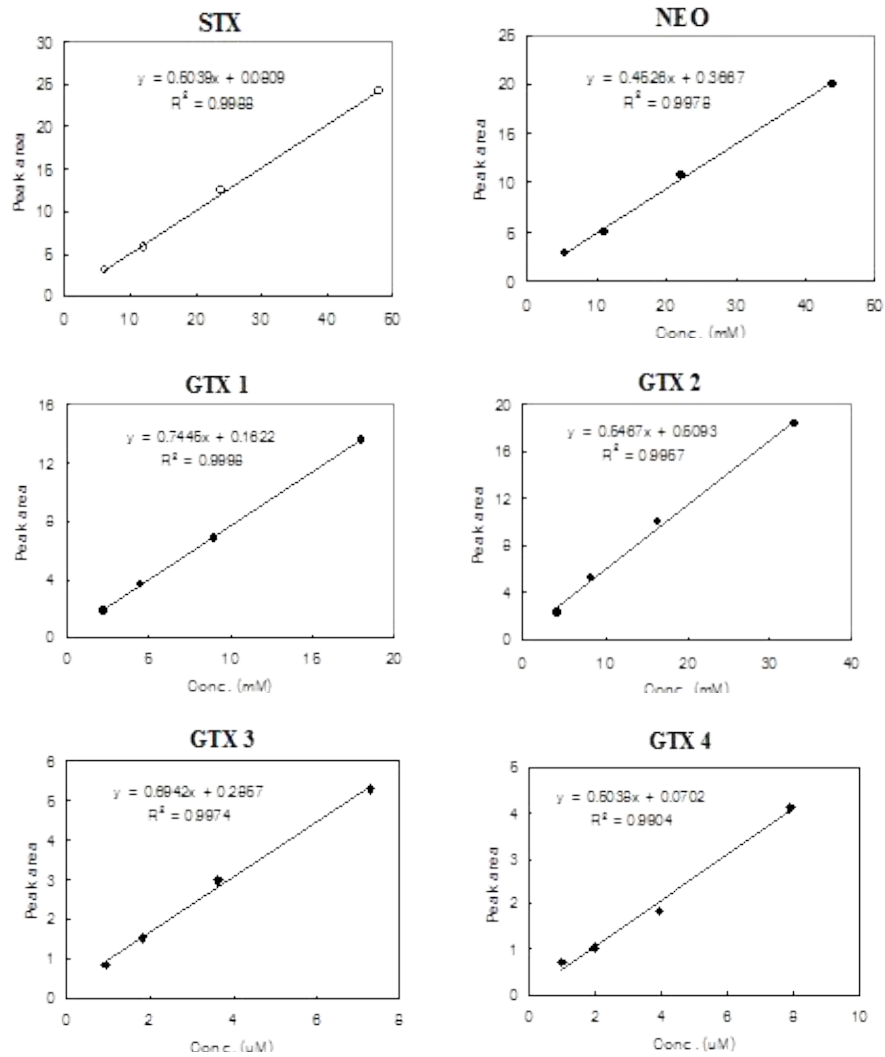


Figure 35. Calibration curves for STX, NEO, GTX1, GTX2, GTX3 and GTX4 obtained by CE-UV/DAD method.

세포를 동조배양에서 꺼내어 정상적인 light-dark cycle에 넣었을 때 배양액에서의 total biotoxin [toxin  $\text{ml}^{-1}$  ( $\pm\text{SD}$ )]은 0  $\text{pmol ml}^{-1}$ 에서 11.59 ( $\pm 1.3$ )  $\text{pmol ml}^{-1}$  까지 8 시간 동안 증가하였고 16시간 까지 변화가 없었다 (Fig. 36). 16시간 후 light 기간 동안 biotoxin의 12.62 ( $\pm 1.7$ )  $\text{pmol ml}^{-1}$ 까지 함량이 증가하였다. 그 후 L/D cycle이 진행되면서 biotoxin의 농도는 19.20 ( $\pm 1.4$ )  $\text{pmol ml}^{-1}$  and 20.75 ( $\pm 1.2$ )  $\text{pmol ml}^{-1}$  까지 증가하였다 (Fig. 37). 세포당 biotoxin 함량은 각 세대에 걸쳐 증가와 안정을 반복하는 경향을 보였다 (Fig. 38).

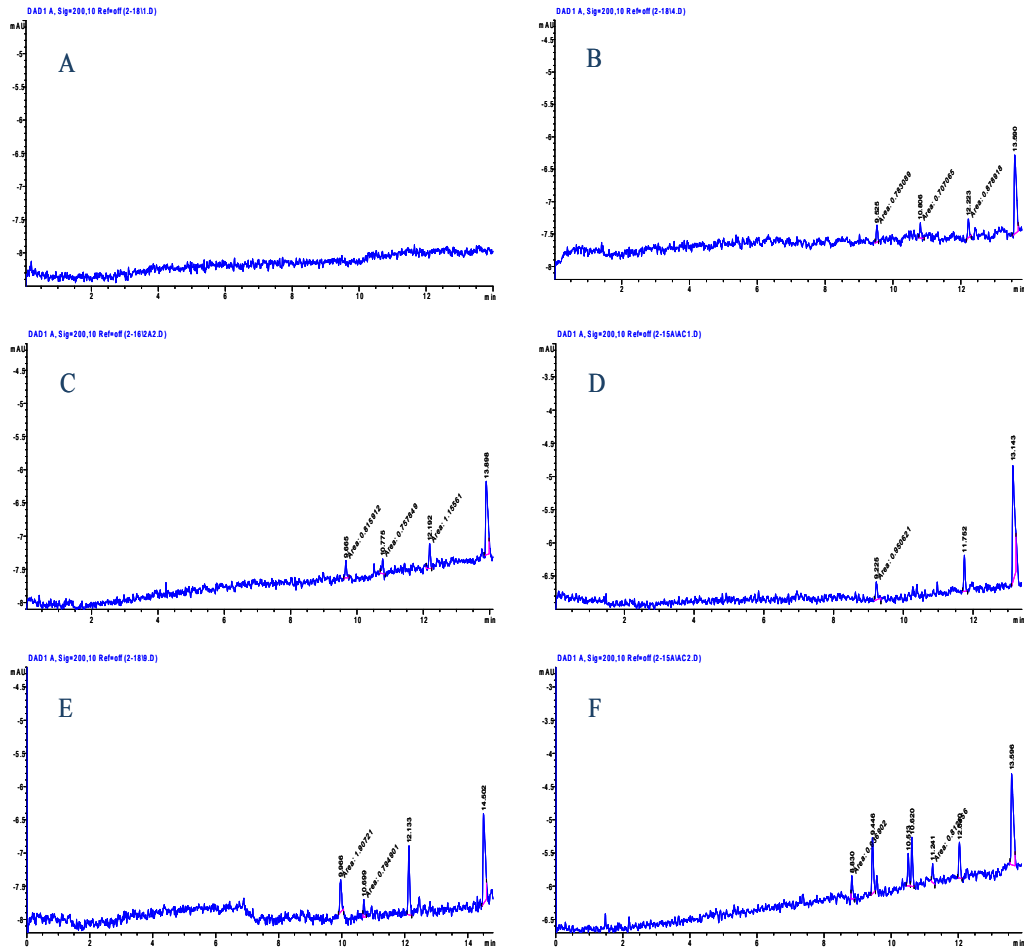


Figure 36. UV electro pherograms for each of the PSP toxins in *A. tamarense* during synchronization culture. A, G<sub>0</sub> phase cell B, light phase cell C, dark phase cell D, light phase cell E, dark phase cell F, light phase cell.

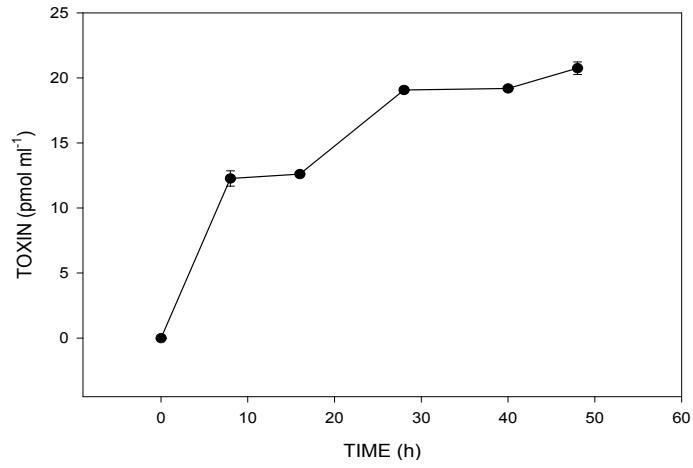


Figure 37. Changes in total toxin concentration of the population in *A. tamarense* as a function of time and during synchronous growth on a 14:10 L/D cycle. Error bars denote  $\pm$ SD.

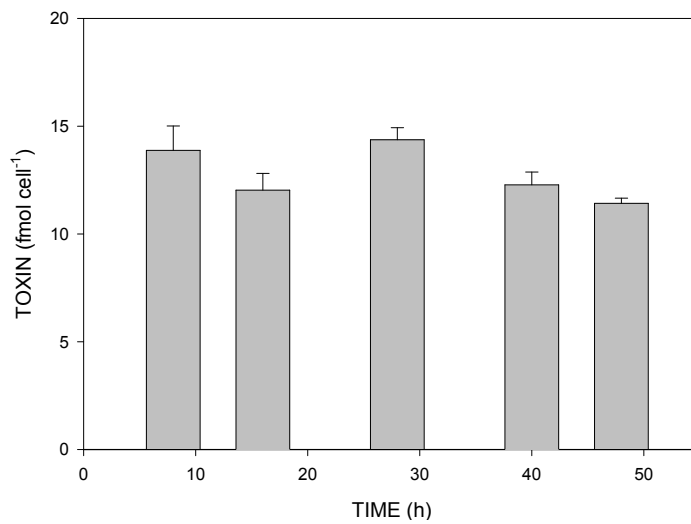


Figure 38. Changes in total toxin concentration per cell of *A. tamarense* as a function of time and during synchronous growth on a 14:10 L/D cycle.

#### (4) PSP detection kit를 이용한 STX 정량

분석 결과 sample의 농도가 높아 1/5000 희석 결과에서 값을 측정할 수 있었다. % 흡광도 값이 높을 수록 saxitoxin의 함량이 낮은 것으로 해석할 수 있는데, 측정결과 growth curve (Fig. 39)와 비교시 초기 계대 배양시 % 흡광도 값 (Fig. 40)이 낮은 것은 이미 exponential log phase에 있던 toxic strain의 계대 배양으로 인해서, saxitoxin의 함량이 높게 나왔던 것으로 추측되며, 2일에서 4일에 걸쳐 lag phase가 유지되면서 saxitoxin의 함량이 낮아졌다가 다시 log phase인 6일에 최대값을 가지고, exponential log phase에 해당하는 8일까지 saxitoxin의 함량이 높게 나타난 것으로 확인 된다. 이에 비해 non-toxic strain의 경우 거의 basal 한 수준의 saxitoxin 함량이 확인 되었으나, 이는 standard curve를 중심으로 볼 때, 100% 이상의 % 흡광도 값을 가진 것으로 saxitoxin의 함량이 극미하거나 없는 것으로 확인되었다. 또한 exponential log phase 후 late log phase에서부터 stationary log phase 까지 미량의 saxitoxin이 존재하는 것으로 검출되었다.

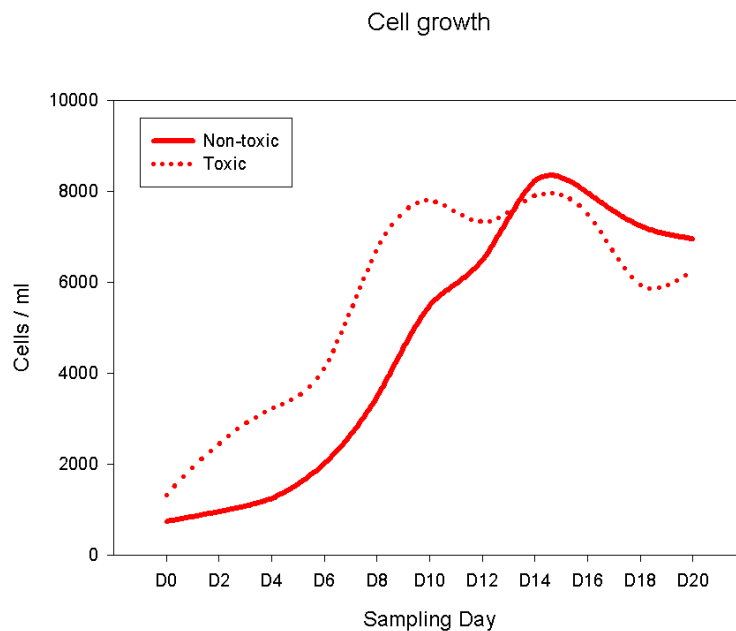


Figure 39. Cell growth of *Alexandrium tamarense* nontoxic and toxic strain

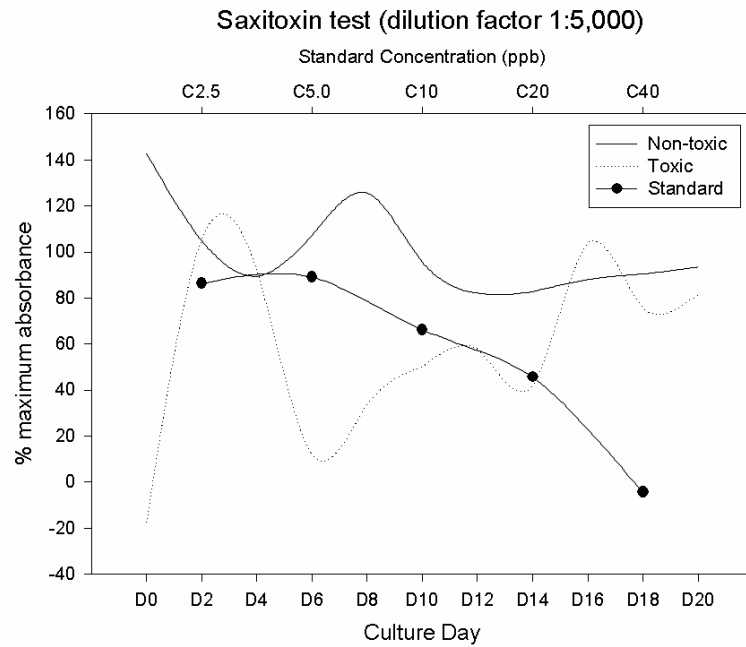


Figure 40. Saxitoxin Quantitation by percent absorbance of PSP toxin in each *Alexandrium tamarense* strain

#### 다. 동조배양세포의 DD 및 RNA blot 분석

mRNA의 DD는 여러 가지 cell stage에 있는 *A. tamarense* 동조배양세포에 적용하였다 (Taroncher-Oldenburg *et al.*, 1997). Biotoxin을 합성하는 light 하의 세포와 biotoxin을 합성하지 않는 dark 하의 세포를 모았다. 20가지 다른 anchor-plus-random primer combinations을 사용하였고 band 패턴을 분석하였다 (Fig. 41).

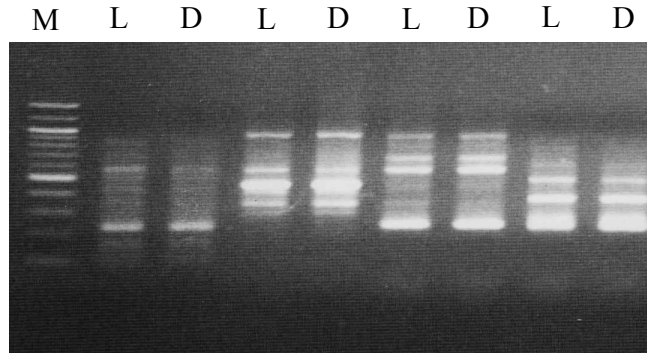


Figure 41. Comparison of DD analysis of *A. tamarense*. Different cell cycle stages in synchronized cultures were analyzed. L, light phase cell, D means dark phase cells.

2 밴드가 선택된 두가지 time points에서 다르게 발현되었다 (Fig. 42). 대부분의 밴드는 cell cycle 전반에 걸쳐 나타나는 밴드이다 (Fig. 41). 두 밴드는 광기에 유도되었고 암기에는 나타나지 않았다. Biotoxin 합성시 유도되는 밴드만을 분리하여 characterization에 사용하였다. 두 밴드를 절단하고 유전자 추출을 하고 클로닝 한 후 염기서열을 분석하였다. DD expression patterns은 또한 total RNA를 사용한 RNA blot 분석으로 확인하였다. 아래에 기술된 바와 같이 두 개의 유전자가 S-adenosylmethionine synthetase (Fig. 43), histone-like protein (Fig. 44)를 암호화하는 유전자와 유사하였다.

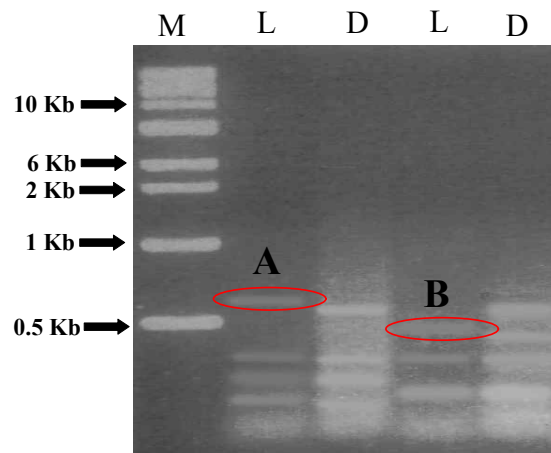


Figure 42. DD comparing cells of *A. tamarense* in the light and dark phase while STX production was turned on or off. L, light phase cell, D means dark phase cells.



```

A. tamarensis  THLHINPSGKFIIGGPQGDAGLTGRKIIDTY———KDPTKVDRSAAYICR
A. castellanii TIFHLNPSGRFVIGGPQGEAGLTGGKIIDTYGGWGAHGGGAFSGKDPSKVDRSAAYAAR
P. infestans   VYHLNPSGRFVIGGPHGDAGLTGRKIIDTYGGWGAHGGGAFSGKDTTKVDRSAAYAAR
Homo sapiens  TVYHLQPSGRFVIGGPQGDAGVTGRKIIDTYAAWGAHGGGAFSGKDPTKVDRSAAYAAR

A. tamarensis  MAKSVVKSGLCKRALVQLSYAIGVAKSLSLFFVETYGTEQGALTAEDITNVVIAFDCRP
A. castellanii WIAKSLVARGLANRALVQVSYAIGVSHPLSVFVDSYGTAGGRTDEDLLAISKNFDLRP
P. infestans   WVAKSVAKGLAHRLLVQLSYAIGVPLSIHVDSYGTVKEGVTDDDLVEIKKNFDLRP
Homo sapiens  WVAKSLVKAGLCRRVLVQVSYAIGVAEPLSISIFTYGTSQ

A. tamarensis  GAIAMSLALREPKYQETAAYCHFGR
A. castellanii GKIINDLQLRRPIYEKTAYHGHFGR
P. infestans   GMIQKTLQLKRPVMQKTAAYGHFGR

```

Figure 43. Partial alignments of the differentially expressed protein of *A. tamarensis*. S-Adenosylmethionine synthetase aligned with *A. castellanii*, *P. infestans*, and *Homo sapiens*.

```

A. tamarensis  LADAVATACEMKKKDVIKALASIAEIAEAVKKSQVFTLPGLFRIKSRKKPATKAGKKEI
L. polyedrum   IADALATQFELKKTVCGLINSLAEIATKEVKSSGVFTIPGVCKIKTRTKPATKAGKREI
C. cohnii     LCQAIADATENKKSIVKFMDALAEVTAEVKKTGKMTIPGVMTIKTRKKPATKAGKREM

A. tamarensis  FGKMCVVKAKPARTIVKAFPVAALKKEF*G
L. polyedrum   FGKTVVVKAKPARKVVKAFPVAALKKSI*G
C. cohnii     FGKWLKVAQPAKTVVKAFPVKALKTDF

```

Figure 44. Partial alignments of the differentially expressed protein of *A. tamarensis*. Histone-like protein aligned with two different histone-like protein sequences from *A. castellanii* and *P. infestans*.

첫 번째 band A (Fig. 42)는 toxigenesis 동안 upregulated 되었고, 진핵생물과 원핵생물 S-adenosylmethionine synthetase과 70% 유사성이 있었다. 또한 *Acanthamoeba* (*Acanthamoeba castellanii* X79205), 69% positives and 57% identity; potato late blight agent (*Phytophthora infestans* AF424664), 68% similarity and 57% identity; 그리고 a human (*Homo sapiens* D49357), 75% Similarity and 62% identity (Fig. 43)를 나타내었다.

두 번째 band B (Fig. 42)는 light phase 동안 발현되었다. Deduced protein 서열을 비교하였을 때 두 개의 다른 histon-like protein과 70%의 유사성을 보였다. 두 개의 histon-like protein은 *Lingulodinium polyedrum* (GenBank accession number AF482694)와 81%의 유사성을 보였고 68%의 identity를 보였다 또한 *Crypthecodinium cohnii* (GenBank accession number AY128510)와 80% similarity 그리고 59% identity를 나타내었다 (Fig. 44). DD bands에 대한 RNA blot 분석은 transcripts가 cell cycle에서 light phase에서 많다는 것을 보여주고 있다.

## 라. EST library로부터 Saxitoxin 관련 유전자의 선별

### (1) EST library의 제작 및 library 서열의 확인

#### (가) EST library의 확인

Biotoxin을 생성하는 *A. tamarense*로부터 추출한 mRNA의 poly-adenylated fraction을 사용하여  $2 \times 10^5$  pfu/ml clones의 cDNA library를 제작하였다 (Fig. 45). 확보된 827개의 EST library clone을 확인하기 위해서는 대량의 plasmid mini-prep system을 이용하여 high-throughput screening을 실시할 필요가 있다. 이를 위해서 Core-One Plasmid HTS Prep Kit을 이용하였다. Mini-prep에 의한 확인결과 총 827개의 clone중 786개의 clone에 insert가 정확히 삽입된 것으로 확인되었으며 (Fig. 46), 나머지 41개의 clone에 대해서는 재확인을 통해서 클로닝이 제대로 된 것을 확인하였으며, 각 클론들의 분석을 위해서 염기서열 분석을 실시하였다.

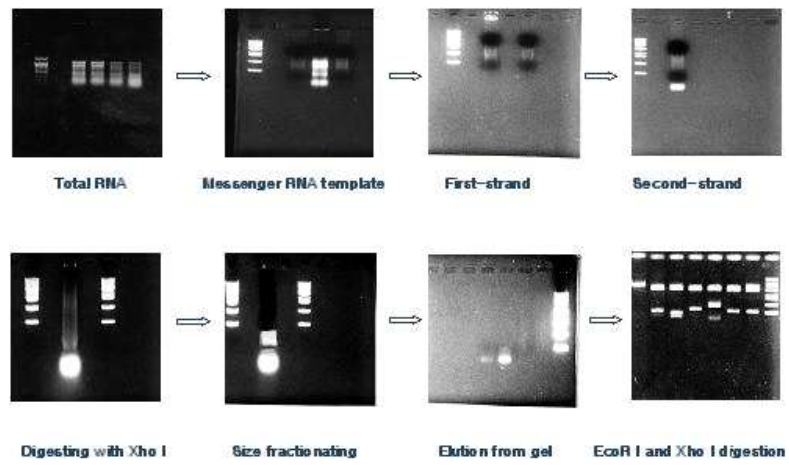


Figure 45. Flow Chart of cDNA library construction.

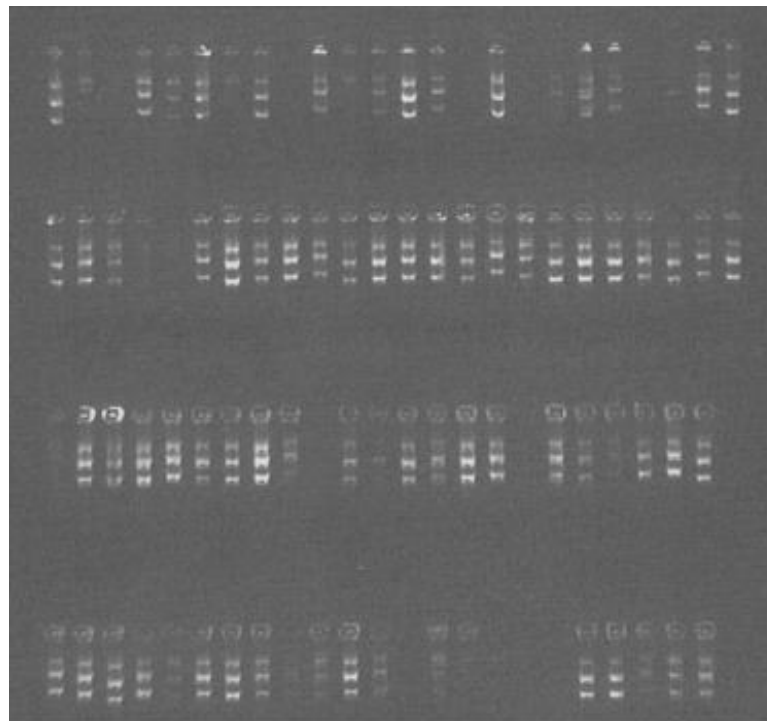


Figure 46. EST library의 plasmid mini-prep후 전기영동 결과.

(나) EST library 유전자 서열의 분석

전체 염기서열의 분석결과를 Genebank의 Blast program을 통해 조사한 결과, 대부분의 유전자들이 특정 생물체의 유전자와 homology를 갖는 putative clone으로 확인되었으며, 이를 통해 확보된 EST들의 functional clustering을 실시한 결과 전체 827 clone 중 564개의 EST에 대한 classification을 할 수 있었다. 대부분 cellular transport와 transport (6.69%), cell cycle과 DNA processing (8.37%), cellular environment에 대한 regulation 또는 interaction (1.26%), transcription (2.93%), energy (12.13%), cell rescue, defense, death와 aging (3.77%), cell metabolism (21.34%)과 cellular organization (30.54%) 등이 주요한 portion을 차지하였다 (Fig. 47).

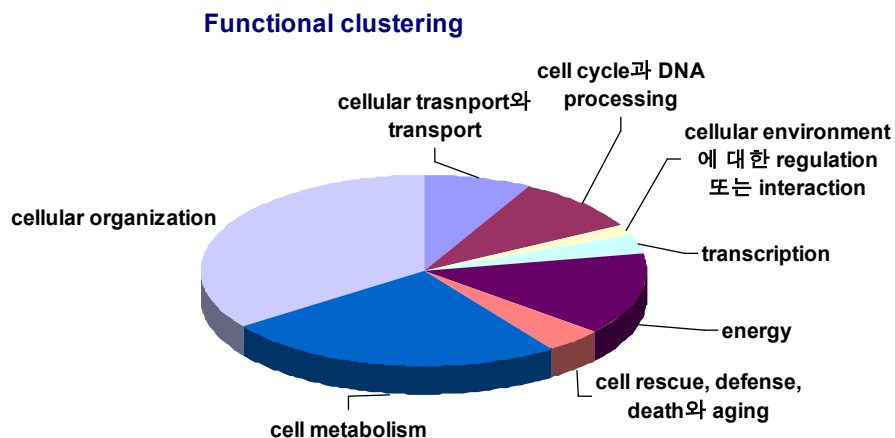


Figure 47. Functional clustering of *Alexandrium tarmarensis* ESTs

(다) EST library clone으로부터 주요 saxitoxin 관련 유전자의 분리

EST library에서 확보된 827개의 clone 중 132개의 유전자 (Appendix A)를 선발하여 toxic strain과 non-toxic strain의 Total RNA와 mRNA를 이용하여 reverse northern을 수행하였다(Fig. 48). 발현량이 증가되거나 감소된 클론을 *A. tarmarensis*의 saxitoxin 분비와 생합성에 관련된 유전자로 보는 것은 지금 가지고 있는 결과로는 무리가 있으나 EST library가 중복된 clone을 매우 많이 갖는 문제

로 발생할 수 있는 시간적 소모라는 단점을 생각할 때, 증감을 보이는 클론의 단계적인 분석을 saxitoxin 관련 유전자를 isolation 하기 위한 기초과정으로 보고 실험을 수행하였다. 이러한 이유로 132개의 선발된 클론의 발현을 재확인한 결과 8개의 clone에서 현격한 증감이 구분되어졌고 (Fig. 49), 이 결과를 EST library data와 비교 분석한 결과 12개의 유전자 모두가 saxitoxin을 분비하는 *A. tamarense* strain에서 특이적으로 발현량이 증가되는 유전자인 것으로 추측되었다. 그러나 Genbank를 이용한 염기서열 분석 결과와 마찬가지로 8개 모두 hypothetical protein 유전자로 규명되었다 (Fig. 49, Table 15). 따라서 EST 유전자를 이용한 modified macroarray 실험 결과로는 saxitoxin 생합성과 관련한 유전자를 분리하는 목적에는 이르지 못하였으나 saxitoxin을 합성하는 *A. tamarense* strain에서 특이적으로 발현하는 유전자를 분리함으로써 saxitoxin을 합성하는 *A. tamarense* strain을 동정할 수 있는 molecular marker를 선발한 것은 본 실험을 통하여 확보한 또 하나의 작은 결과이다. 향후 이 molecular marker의 full cDNA의 분리와 함께 이들 유전자의 기능구명과 함께 이들 marker를 보다 효과적인 toxin 생합성 식물플랑크톤의 조기정밀 진단을 위한 marker 개발에도 보완 실험이 필요하다.

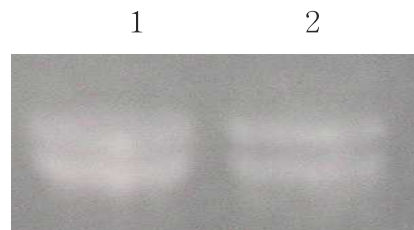


Figure 48. Total RNA isolation from *Alexandrium tamarense*  
 1: non-toxic strain *A. tamarense*,  
 2: toxic strain *A. tamarense* JHW0004 -12

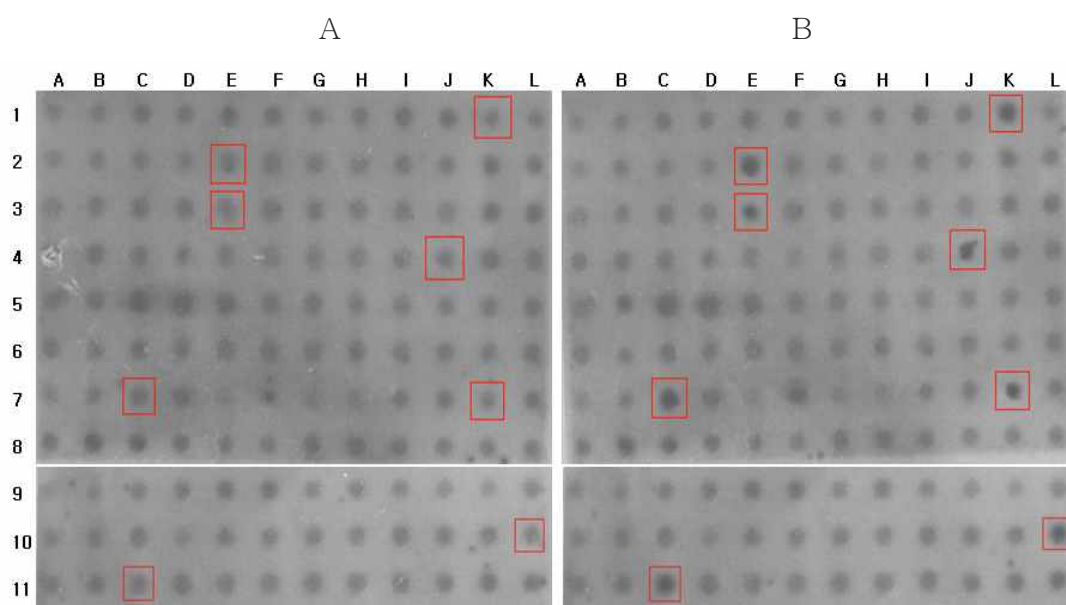


Figure 49. Dot blotting of ESTs between toxic and non-toxic strain of *Alexandrium tamarense*

A: non-toxic strain *A. tamarense*,

B: toxic strain *A. tamarense* JHW0004 -12

Closed box: increase of expression (12)

Table 15. Increased clones from Reverse Northern analysis

CLONE	Insert size	Putative identification	Organism	Homology (%) (amino acid)
94	438	hypothetical protein	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	50
194	658	hypothetical protein	Nostoc sp. PCC 7120	32
432	506	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	87
483	607	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	42
515	547	hypothetical protein	<i>Aeropyrum pernix</i>	68
593	555	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	98
612	519	hypothetical protein	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	91
718	403	hypothetical protein	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	71

## 마. Saxitoxin 관련 유전자의 동정 및 발현 양상 분석

### (1) Differential Display Polymerase Chain Reaction

*A. tamarense* strain중에서 saxitoxin을 합성하는 균주와 합성하지 못하는 균주를 이용하여 이들의 유전자 발현양상을 DEG kit를 이용하여 조사하였다(Fig. 50 & 51). 전기영동 결과 60개의 arbitrary primer set (Table 16)으로부터 특이적인 발현 변화를 보이는 11개의 differential expressed gene (DEG) segment를 확인하였고 이들 각각을 모두 cloning하였다.

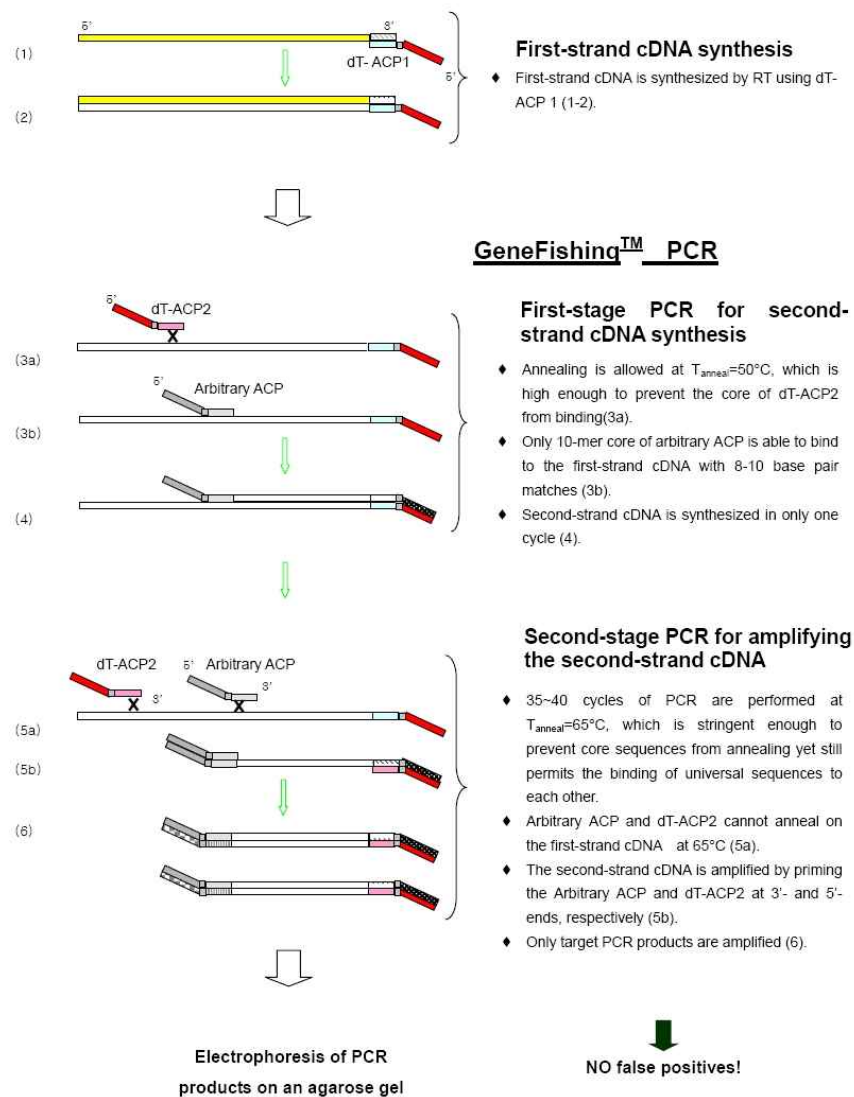


Figure 50. Overview of GeneFishing™ kit of Seegene Co.

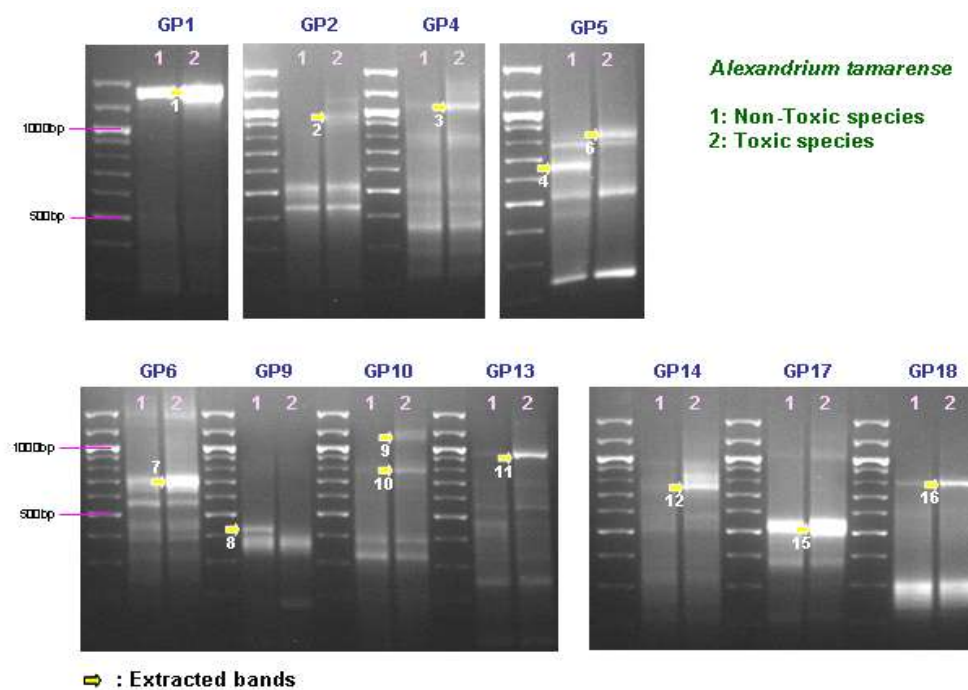


Figure 51. 2% agarose gel electrophoresis of differential expressed gene

Table 16. Primer set for PCR of differential expressed gene

dT-ACP1(10  $\mu$ M): 5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATXXXXX(T)18 -3'

dT-ACP2(10  $\mu$ M): 5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATXXXXX(T)15 -3'

ACP1 : 5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATXXXXXGCCATCGACC-3'

ACP2 : 5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATXXXXXAGGCGATGCC-3'

ACP3 : 5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATXXXXXCCGGAGGATG-3'

ACP4 : 5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATXXXXXGCTGCTCGCG-3'

ACP5 : 5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATXXXXXAGTGCCTCG-3'

ACP6 : 5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATXXXXXGGCCACATCG-3'

ACP7 : 5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATXXXXXCTGCGGATCG-3'

ACP8 : 5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATXXXXXGGTCACGGAG-3'

ACP9 : 5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATXXXXXGATGCCGCTG-3'

ACP10 : 5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATXXXXXTGGTCGTGCC-3'

ACP11 : 5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATXXXXXCTGCAGGACC-3'

ACP12 : 5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATXXXXXACCGTGGACG-3'

ACP13 : 5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATXXXXXGCTTCACCGC-3'

ACP14 : 5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATXXXXXGCAAGTCGGC-3'

ACP15 : 5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATXXXXXCACCGTGTG-3'

ACP16 : 5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATXXXXXGTCGACGGTG-3'

ACP17 : 5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATXXXXXCAAGCCACG-3'

ACP18 : 5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATXXXXXCGGAGCATCC-3'

ACP19 : 5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATXXXXXCTCTGCGAGC-3'

ACP20 : 5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATXXXXXGACGTTGGCG-3'



## (2) 분리된 유전자의 염기서열 결정 및 동정

확인된 11개의 differential expressed gene (DEG) segment를 sequencing하여 염기서열을 결정하고 각 clone의 염기서열을 이용하여 Blast 프로그램을 통해 검색한 결과(Table 17 & 18), 대부분 NCBI database 중 *A. tamarense*의 EST library data의 unknown function과 matching 되었으며, DEG1, 11, 16 clone의 경우 Ribulose 1, 6-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCo) large subunit (RbcL), S-adenosylmethionine synthetase (SAME), ornithine carbamoyltransferase chain I 과 match 되었으며, 이 중 RbcL 유전자의 경우 와편모조류인 *O. luteus*와 매우 유사한 유전자 서열을 가진 것으로 확인 되었고, SAME 유전자는 육상식물에서 많이 연구된 *Arabidopsis thaliana*와 매우 높은 유사성을 가진 서열을 가진 것으로 확인되었다. SAME 유전자의 경우 Saxitoxin 생합성 과정에서 전구물질로써 추측되고 있는 물질중의 하나로써, DEG 분석에 의해서도 Non-toxic strain과 Toxic strain에서 발현의 차이를 보이는 것으로 확인 되었다. Fig. 51을 보면 DEG 11의 경우 Non-toxic strain과는 달리 Toxic strain에서 발현량이 증가되는 것을 확인하였고, DEG 16의 경우 역시 DEG 11의 경우와 유사하였다. 전기영동 분석에 의해서, 발현의 차이가 일어나는 많은 유전자를 확인할 수 있었으나, 염기서열 확인 결과 아직 기능 분석이 동정되지 않은 hypothetical protein이 대부분이었다. RbcL 유전자의 경우 다양한 생리환경 조건에 의해서 발현량의 변화를 일으키는 key molecule로써 정확한 기작은 알 수 없으나, 두 strain간에 차이가 있는 것으로 보아 saxitoxin의 합성에 영향을 주는 것으로 추측되어진다. 따라서 saxitoxin 생합성에 관련된 분석을 유전자 수준에서 확인하기 위하여 DEG 결과를 바탕으로 NCBI로부터 검색된 다른 종들의 서열정보를 분석하여 *A. tamarense*의 SAME, ornithine carbamoyltransferase의 partial length gene cloning을 위한 primer를 설계하고 cloning을 해야 할 필요가 있다. Carbamoyltransferase는 toxin의 modification에 매우 중요한 역할을 하는 효소로써 saxitoxin에 carbamoyl moiety의 첨가로 saxitoxin의 toxicity가 매우 증가한다는 보고가 있어 toxin 생합성과 직접 연관은 없으나 toxin의 derivatives의 합성 및 toxicity에는 매우 밀접한 연관이 있는 것으로 생각된다.

Table 17. Blast search of 13 DEG clones

DEG No.	GeneBank Accession No.	Sequence homology search
DEG1	X61918	Similar to <i>O. luteus</i> chloroplast rbcL gene
DEG2	CX769768 CF947941	Similar to <i>A. tamarense</i> mRNA sequence Similar to <i>A. tamarense</i> mRNA sequence. (참고사항) Sequence 일치도 낮음
DEG3	CV554538	Similar to <i>A. tamarense</i> mRNA sequence. (참고사항) Sequence 일치도 낮음
DEG4	(Clone A) CK785803 CK432406	Similar to <i>A. tamarense</i> mRNA sequence. Similar to <i>A. tamarense</i> mRNA sequence. (참고사항) 일부분씩만 align 됨
	(Clone B) Clone A와 비교시 중간에 20bp 정도의 seq. 더 존재	391bp ~ 411bp까지 (splicing form)
DEG6	CF947959	Similar to <i>A. tamarense</i> mRNA sequence
DEG7	CK784787 CK784620	Similar to <i>A. tamarense</i> mRNA sequence Similar to <i>A. tamarense</i> mRNA sequence .
DEG8	CK786417	Similar to <i>A. tamarense</i> mRNA sequence
DEG9	CV555038	Similar to <i>A. tamarense</i> mRNA sequence
DEG10	CF947119	Similar to <i>A. tamarense</i> mRNA sequence
DEG11	NM_129243	Similar to <i>Arabidopsis thaliana</i> S-adenosylmethionine synthetase
DEG12	CK784594	Similar to <i>A. tamarense</i> mRNA sequence
	CV554000	Similar to <i>A. tamarense</i> mRNA sequence
DEG15	CK433852	Similar to <i>A. tamarense</i> mRNA sequence
DEG16	BX936398	Similar to <i>Yersinia pestis</i> ornithine carbamoyltransferase chain I



GNTTAAAAAATTTNNGNGGGAAACCTAAACCCCTTGGNCCNAANTTCCNNGTCNNAACCCCAANTTTTAAAAANNCCCC  
TGCCCANCAAAAAACCAAAGNTTNTNGGAAAAA

(reverse)

TTTTTTTTTTTTTTTTTTAGTCCCAAGAACCTATGGTTCATTGATGTGCAAGCTGATATTTCAAACCTTGGCGACTATGACATG  
CAATCTGGCACAAAGCTGTTGAATGTACACAACAATATATGATAAGCCACATGGGTTGGGCGAATTACATGTCACTTTGG  
ATCTGCATGGCAGGAGGCTTTGGCCACGCGAAGGCCATCGGCGACGTGATGCCAAGGGCGTTCTGCCCTTGAC  
GACTTGATTGCGATCAACTCGGCGATCGGCCACATGATCAAGTCATCGGGAGAGAGCTCGACTATGGGCACCTTCAA  
CGCCTTCAAGGGCATTTTGGCAGACTACATCCCCCTTCTACCTCTTGTCCTCCGTCAACCCTCTCGACGCGAAGGAAGC  
ATATGATGCGCTGCTTCAATTCAAGGATGTGGTGAAAGCTCGTAAGGTGAGATGCCTACAGTCTTTCAATCGTGCT  
GGAGGTCCCTGATTTCTAAATCGCGCTGGATGTCCTCTGTCCCTGAGGCGCCGCGCAACATCACGGGCTTCTGGTCT  
CGCTGAGGCGCGTGGGCCCACTGCTTCTGTACAGTCTTGACCGTGCCGCGGCTCCTGTGCCAAGGCGTGGTG  
CAAGTGCCTGGTGGCGGCAATCAAATGCAGGGACCATGTGTCATATAGNGCCTTGTCCCCTGTGCAANAATAA  
CCAATTGACCATCTTCAGCTGGNTTCTTGCTCCCTGGAAGTGGAGCTTCAACAAAAAACCNCNCTTTTCTGTTAACCT  
GCCCCCNNTTATCTTGAANAAGTTGCGGCATCANCAGNNGANATGTCCACATAGCCCTNCCCCTCTCCGANTTGT  
CGAGCACNCCNTCTTGTCAAAAAACGNAAACNCGNCCCTGGGATCCGAAAAACATGGGNAN

**DEG4** Clone A DEG4-4보다 중간에 20bp 정도의 GAP 존재 -splicing form

(reverse)

AACTGCGCCGACAACACCGGCGCCAAGAACCTCTACATCATCTCCGTGAAGGGCATCAAGGGTGCCTCAACCGTCT  
CCCGTCCCTTCACTCCCTCGAGGAGGACACCGCCACCGGCGACCCGCTCGCCGCGGAGGGCGCGCCG  
AGAAGGAGCGGAGGCTCGCGGAGGCGGAGGCGGGGGCGGAGGCGGCCTCCGGCGGACCGCCGGGCGGCGCGC  
TCACCGCGGAGCAGCGCGGCTCATCGAGCCAATCGGGCGACCGCTCTGGCACGGCGAGCGGCCAAGCTGAAG  
GACACGATCGAGGCGAAGCGGAGGAGCAGCTTGGAAGGCCTCCTCCAGCCTCTCGCGAAGGCGCTGATGCCAC  
AGCCAGTCTCACGCGAGAGTTGAGGATTCGCCCTGCGTAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCATACATCAC  
GTCCATGCGTGTGGATGCTTCCGGCGCAAGTTTAGTACATAGATTTATTTGTGCGACTTAACCATGTTTGTCTTAAAAA  
AAAAAAAAAAAAA

**DEG4** Clone B

(reverse)

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAGACAAACATGGTTAAGTGCACAAATAAATCTATGTACTAAACTTGGCGCGAAGCATC  
CACACGCATGGACGGTGTATGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTTAGCGCACGGGAATCCTCAACTCTCG  
CGTGAGACTGGCTGTGGCATCAGCGCCTTCGGCGAGAGGCTGGAGGAGGCCTTGCCAGAGCTGCCTCCCGCTTCG  
CCTCGATCGTGTCTTACGCTTGGCCGCTCGCCGTGCCAGAGCGGTGCCCCGATTGGGCTCGATGAGCGCGCGCT  
GCTCCGCGGTGAGCGCGCCGCGGCGGCTCTCCGACCTCCTCAGGAGTCCGCCGGAGGCCGCTCCGCCCCG  
CCTCCGCTCCGCGAGCCTCCGCTCCTTCTCGGGCCGGCCCTCCGCGGCGAGCGGGTCCCGGTGGCGGTGTCC  
TCCTCCGAGGGAGTGTGAAGGGAGGACGGGAGACGGTTGAGGCGACCCTTGATGCCCTTACGCGAGATGATGTAGA  
GGTCTTGGCGCCGGTGTGTCGGCGCAGT

**DEG6**

(forward)

TCTTCTATGAGCACACCTTATCTCTCACTGAAGCTCTCTGTGGGTTCCAGCTTGTCTGACCCATCTGGACAACAGGCA  
GCTTTTTTTTTTTTTTTTTTACCTCGTTGCTCCTCATCTTTGCCCTACGGGTACCATCCATAACTTGGCGACTTCAAG  
CATCTGCACATCAACCCCTCAGGCAAGTTCATCATCGGTGGGCTCAAGGCGATGCAGGCCCTCACAGGGAGAAAGAT  
TATCATTGACACGTATGGTGGCTGGGCTCATGGTGGTGGGCGCTTCTCAGGGAAGGATCCCACGAAAGTGGAC  
CGCTCTGCAGCCTATATCTGCCGTGAGTGCCAAAGTCCGTGTAAGAGCGGCTTGTGCAAGCGAGCTCTCGTGC  
AGCTCTCCTATGCTATTGGCGTTGCGAAGCCGCTTTCCCTCTTTGTGGAGACGTACGGCACTGAGCAAGGTGCGCTC  
ACCGCTGAGGACATACCAACGTCTCAAGATAGCATTGATTGCCCGTCCAGGTGCCATTGCCATGCTCCTTGGCTCT  
CAAATGTTGTCTAAACAATTTCCCANCTTTGTCTGAGGNTTNGCATCNAAAAAAAAAAAAA

**DEG7**

(forward)

ACCGGCGCGGCCAAGGCCGTTGCGCTGGTGCTGCCAACCTCAAGGGCAAGCTCAACGGGATCGCGCTCCGGGTG  
CCAACCCCGAACGCTCAAACACAGACTGGCGCTCCCCAGCGTCACGCTTTTGTGGCCGTGGCCTCTCCCATCGAA  
GTGCCTCCTCTCCACGAGGCGCAACTCCAACCTCGAGAGGCGCTGCGTGCAGTGTGCGGCAAGGAGG  
TGATTCCAGCACCATCGGATGCCATTGAGCTGCAAGCAACAACCTCATCGGGTGGATGCTGTCTTGCCTGAGGTCA  
AGGTCATCNCGTGNTACNATAACNANTGNNGTACTCCANANGNTCNINCANNTTGNNNANATTGTTNNN

(reverse)

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAATCTACATCAGAACCTGGCAAATGATAGGAGTATATATTACAGATGCNCAGCGTTGAG  
ACTTCCCTTACCAGGAGTGGCGCAGGCGGAAGGTGACGATCAGCTGTTAGGAATCTTTAGAGGTCAATGCGGAC  
AAGGCAGGCGACGGGCTTGGAGCCATTTAGTACGTTGCTGTTCTGACAAAGAGCGACATTACAGGAGGAGGCC  
GTGCCGCGGGTGAAGGAGGCTCCTCCGAGCGAGCTCGAGGCAAGACAGCATCCACCCGATGAGGTTGTGCTTGA

GCTCAATGGCATCCGATGGTGCTGGAATCACCTCCTTCGCCGCAGCAGTCGACGCAGCGGCCTCTCGAGGTTGGGA  
GTTGCGTGCCTCGTGGGAGGAGGAGGCACTTCGATGGGAGAGGCCACGGCCACAAAAGCGTGACGCTGGGGAGCG  
CCAGTCTGTGTTTGGGGCCATTTGAGGGGGCGCCAGCGGCCCGGTGGCAAACCACCTCTCGGGGGCCGTGGTGC  
CATCACACAGATCCCCCCCCGCGCCNNGGGGGANGNCGGCCCCCNNTGAANCGAATGCCTGGTAAAAAAGGNGAATT  
CTGCNAATATCCNTCCNCTGGNGGCCGCTCNAGCATGGCNTCTAAAGGGNCCAATTNCCCCCTNNANGGGNGTCN  
NAN

**DEG8**

(reverse)

TGTCTTCCACTGCTTCGAGGGGCGAGAACGCCGAGAACCATCCTCTCGTCAAGGAAGGCAAGCTTGCCAACTGCTCG  
CATGGCGAGCTGAGACATCGGTATAAAGAAAATCAGCGCCGTTCACTCCCTCGGCAATATCTTCTGTGAGGGTGATTT  
TGCCCCCGTTTTCTGTGCCAGTGCCTGACAACCTGATAACGAAGGCTTCTTGGCCAACAGGCTTTCGGTGCGACC  
AGGCGTAAATCCATTCTACCAGTGCGGCCGCTTCTAACAGGCTGTCCCATGTTATTACGTGTATACCGAGGTAC  
GCCAACGTCATTTTATTACGCGATTTATTGGGCAGATGTTCCCGCATCGTCAACAAAATCAGCCAGGATTTGGGTTGGA  
TGAAACTCATTGGTCAGGCCATTCCAGACCGGTACGCCGGCAAATTTGCGAGTGTTCACCACGCGTTGCCATA  
GCCACGGTATTGAATGCCGTACATACACGGCCTAATACGCGGGCGGTATCCTTGATTGATTCTTTATGCCAATCAG  
TTGTCAAAACTTATAAATAAGCATTTATTAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

**DEG9**

(forward)

CAAAGACGAGGCCAAGGTCGCGGATCTGCAGGAGGCCATCCACGCCAAGACTAAGAAGTACTATCCTGCCAGGCCAA  
CGGCTTACGCTCCCTGTACAACCTGGAAAATCTGAAAAGCCAGTTGTCCTGAACCAAAAGGCCAGCCTATCGGAATA  
CTGCGAGAAGGGTCCGGGTCCTTGACAGTGGTCTTCAAAGATTTAGGCCCGCAGGTCTACTACAGCACGCTCTTCTT  
CTGGGAATACGTGGGCCCTCTTTTCATCTACCCATATTTACTACTCCCGTCTACAATACTTTGGATACGAGGGGA  
GAGCGGGTCATCCACCCTGTTCCAGACCTATGCCATGTAATACTTTGCTTCCACTACTTCAAGAGGATCATGGAGACA  
TTCTTCGTCACCGCTTCAGCCACGCGACATCCCCCGTGTCAAAGCTTTCAGGAACTGCGCCTACTACTGGACCTT  
CGGAGCCTACATCGCCTACTACTGCAACCACCCGCTCTACACCCCGCTCAGCGACCTGCAGATGAAGATCGGGTTC  
GGCATCGGGGTCGTGTGCCAGATCGCAAATTTACTGCCACATCCTGCTTANGAACCTCAGGAGCCCCACCGGCA  
GCGGCGGATACCAGATCCCCCGGGGCTTCTGTTCAACATCGTTACGTGCGCGAACTACACCACCGAGATCTACCA  
GTGGCTGGGCTTCAACATCGCCACACAGACCGGGGCTGGNTACGTCTTCTCGCCGTCGCTGCGGCTATCATGAAC  
NACTGGGCTCTGGGAAGCACAGCCGTCTGAAGAACTGTTTGACGGAAAGACGGCAGGCCANTACCCTCNCCGGG  
GGNGATCCCCCNNTCTGGAAAANNNGGGCTNCGAAAANTTNGGATTCCAATTTNTNTGTNCCCCNTNNNNAN  
CCAAAGTCTTNGGTTTACCN

(reverse)

TTTTTTTTTTTTTTTTTGAACCATCCTTCGGATTAGAACAGTCGGACCATGGAACAGAGGTTTAAACAGCCAGTACAA  
GGCAGGATTAGTAGAAATGTTTGCCTAAACTCGATGACTTTTGGCTTACAATGCTGGAACAGAATAAATATGGAATCC  
CAGAGTCTTCCCGAAGCACCATGTCTTACAGGAATGGGGGGAGGATCACCCACCGGCGAGGGTACTTGGGCCTGC  
CGTCTTCCCGTCAAACAGCTTCTCAGACGGCTGTGCTTCCCAAGAGCCAGTTGGTCATGATAGCCCGCAGCGACG  
GCGAGGAAGACGTAGCCAGCCACGGTCTGTGTGGCGATGTTGAAGCCCAGCCACTGGTAGATCTCGGTGGTGTAGT  
TCGCGACGTAACGATGTTGAACAGGAAGCCCCGGGGATCTGGTATCCGCCGCTGCCGGTGGGGCTCCTGAGGTT  
CCTAAGCAGGATGTGGCAGTAGAAGTTTGCAGATCTGGCACACGACACCCCGATGCCGAACCCGATCTTCACTCTG  
CGCTGACGGGGGTGTAGAGCGGGTGGTTGCAGTAATANGCGATGTAGGCTCCGAAGGTCCAGTANTAGGCGCAGTT  
CCTGAANACGTTGGACACGGGGGATGTCCCGTGGCTGAANCGGTGNACAAAAAATGTCTCCNTGATCCTCTNGAANT  
AGTGAAGCAAAGTAGTACATGGCATAGGTCTGAANAGGGNNGGANGANCCCNCTCCCCCNATCCAANTATTTGT  
AAACGGGAGGTAATAANATGGGGTAAANNAAAAANGGCCCNTTTTCCAAAAAAAACGNGCTGNANAAAAANCTGCC  
GGCCTAANTTTTAAAAACNCTGTTCAAGGACCGGAANCCCTCCN

**DEG10**

(reverse)

GCTGACGAACGAAGTGCAGGCAGTGATGAGAGCTCTCGCCGTCGCTCGCCGTTGCGGGCTGGCGCAGCCCCG  
TCGTCGATGCCTCGTCGAGGTCCATCATGCCAGATGAGGAGCCAGCTACACACCTCCTTACGCGGCATCACCGTG  
CAGTGTCAACCCCTAAACCAGTCCCCTCACTGCGTCCCCGTTTCATCGTCCGGTGGTGGTGTGAGGCTTAAACCATC  
GATCCAGTTCATCCAGGGCAGGATGAGCAGACGATCCCAGCGTCCGCTGACCAAGTCCCAGCAGGCACGAA  
CGGGGTGGCTATCTTCGAGTTCGACCGCCGCTCGGTGTTTCACTCATCGGCAGAGCTCGGGGACATCACGGGGTTC  
TACATGATCGACGAGGAGGGCGTGTGCAGACAGTGACGTGAGCGCCAAGTTCGTCACCGGGAAGCCGGCGAGG  
GTGGAGGCCAAGTACGTGATGCGCACGGCCAGGGACTGGGACAGGTTTCATGAGGTTTCATGGAGAGGTACTCCCAGG  
CCAACGGCCTCCAGTTCCTCAAGAGTTGAGGTGATCCATGGATCGTCAACGAATGAATCTTCTTTTCGGTTCTTCTCT  
GGTTCTGGATTCTGAAAGACACTAGCTGCATTGAGTTCAGTCACTACTGTGACTGCTGATTGTGCTCTGTAGCTGCA  
ACATTGTTAANCATGAAATGCTTGCCTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

**DEG11**

(forward)

AGCAGCAGACTTCGACTGGAAGAAGACCGCTGAGCCTGTGATGAGGCTCTACACGGAGGCAACAGATGGTTCGTATA  
TCGAGCACAAAGGAAAGCGCGATAGTCTGGCATCACACGATGCAGATCCAGATTTTCGGTTCATGCCAGGCTAAAGAA  
CTGCTCGACCATCTGGAGAGCGTGCTTGCAGACGAGCCGGTCTGCTGAAGAGGGGCCAGCACATCGTGAAGTTA  
ATCCTCAGGGCATCAGCAAAGGCGTGGTCTGGAGAGCCTCCTGTCATCCATGGTGCGCAGCGGGAAGGCGCCGG  
ATTTCTGCTATGCATCGGGGACGACCGCTCCGACGAGGACATGTTTCGAGAGCATCGTGTGCCCGTCAATACCATC  
GTGAAGCTCTACGACCAGCGAGGTGTTGCCTGCACTGTCGGAAGAAGCCGAGCATGGCCAAGTACTACCTCG  
ACGACACGGTGGACGTCATCAAGATGCTGCAGGGGCTCGCCAATGCGCCGTCGCAACAGCAACGGCAATATCCGGT  
GCAGCTCCGGGTACCTTCGAAAGCACGGCGTGAGGAAGGAAGGAAAATTTCACTGCACAGTATAAACCACCCAAC  
CAGTGAGGGGGTCAATAACCAATATGAAGAAGATGATTCANTTCGTGTGGNTTATAGGATTANGCTGCAGCAGTTACAG  
GATAAACAGGNTCATTTCNCNTTTCNTTCCNCCTTTTTTTCGGGGTTACCNNTTNCNACTTCTTCTCTCACACATATAT  
ATGTATGCCNTATGANAANGGGTGAGANAAGAANGTTCNGTCNNTTGTNTTNTAGTNGACNATGACNATGAATCCNA  
AAAAAAAAAATGATTTTTNN

(reverse)

TTTTTTTTTTTTTTTTTAGCACGGCCGAAAGAATCATTTCCTTCTTCTTCTGATTTTCATCGTCATCGTCAACTATATATA  
CAATGTGACTGAAACCTTCTTCTCCTCACCCCTTATCATACGGGCATACATATATGTGTGAGAGAAGAAAGTTGGA  
AAGTAACACCGAAAAAAGAGGAAAAAGAAAAAGAAAAATGAACCTGTTTATCCTGTAACCTGCTGCAGCCTAATCCTA  
AAACCACACGAACTGAATCATCTTCTCATATTGGTTATTGACCCCTCACTGGTTGGGTTGGTTTATACTGTGCAGTG  
AAATTTTCTTCTTCTCCTCACGCCGTGCTTTCGAAGGTGACCCGGAGCTGCACCCGATATTGCCGTTGCTGTTGCGAC  
GGCGCATTGGCGAGCCCTGCAGCATCTTGATGACGTCCACCGTGTGCTCGAGGTAGTACTTGGCCATGCTCGGCT  
TCTTCCGACAGTGCAGGCGAACACCTCGCTGGTTCGTANAGAGCTTACGATGGTATTCGACGGGCACACGATGCTC  
TCGAACATGCTCCTCGTCCGANCGGTCTCCCCGATGCATAGCACGAAATCCNGGCGCCTTCCCGCTGCGCACCATG  
GAATGACAGGGAGGCTCTCCCCAACCCCNCTTGTGCTGANGNCCCTGAGGATNAACTTCCACGAANGNGTGGGC  
CCCTCTTACGAAAAACNGGTTTCGTTNNCAAGCACGCTCTCCANANGGTCNANCANT

**DEG12 Clone A**

(reverse)

ACGAACTTCGAGCCGAGCACCTATGAGGGGGAAGTCTCACTGAAATTGCTGCTGAAGCTGCGGACGTCGACCTCAA  
CTTGAGCATATCTCAACCATCTCCAGAGTCCCAAAGGGATAAAGGGCAGCCTGGGCTGCAAATCCATCATGGATC  
ATATCAAGCCTCTGAACTAAAGAGACCAAAGGTGATGCTCCCCCTGAGCTAGTTGCGCTTCTCATCGGTACCCCAT  
TCTGACCGAGCATCCTCCAATCTGGCATGGCCAATCATACCCTGTGTTTTAAATAATGAGGATGCAGCCAGAGATCAT  
AGCAGGAGGCCAGAGGTGGGCACAGGGGGTGTTCGAAGCTGGACATGGAGGTGAGCCACCCTCCTCCTGCACTA  
CCCTTGGCGCTTCTCTCGTCTCATCGTCCGCTGCAGCATCATCAGGATTCTCCAAAACCTCCACCGCGACAGCTGC  
CCCCGCGCCCAACCGGCCTCCTTCGGTTTGACCCAATGGCGCCATCATCATCGTCAAGCCACCAACACCGCTGA  
ATAGAAGCCACACTGTAANTTTCCGGGAAGCCGGTGTCTTTTTNCCCTTGGCGTTTCAGCGCCGGGGCGGTTTGTN  
GTANCANTTGNATNCATGACTGCNTTNGCCATGCTGCNTAANGNAANGNTCCTNCNNTNCCCAAAAAAAAAAAAAA

**DEG12 Clone B**

(reverse)

TCCGCGGTTATGGACTACTCAAGAGCACCGTGACTTGATCATAGACAACCTCCATTAATTGATAATAATTAATTGCGTAG  
TAAGTTAGCCTACTTGAATTGAATAACTCATAAAACTGCCTATCGAGTGCCTTCTTCTGCTGCTGCTGGGTTAA  
ACGAAAGGGTGATGACTTAGATGGGTATGTTTGGTGTAGTTGTAGTTGGTTATGATACGCTCTCTTATCCTCTCTATT  
AGACGGAAGTTGTAGCGTGTCTCTGTAGTGTGTTTGTAGTCTGCTGCTGCCGCTTAAACCTACCATATGGCCATAACGC  
CCGATGCGTCTCTCTTTTGTCTCGCTGAGTACGCTTTTGTACTCATACCCGTATATGCAATTACAGGTGAGTACGGTTA  
CGACTACGACTACGACTACCAGACAGGTGGATACTTTGTGGAGCACTCTGATGAGGACTACGAGGAGTAGGAGGGAA  
TCCTAGCACACTGCTGTGACTTGTGGTTACGGGTTCCATCATTTTTGTTTATGGCATCTTATGCCATTTGTACTCTTAT  
CCGTACTCGGATGATAACCACTTCGCTTCCGTATGATGATGATGTAATGTTGGGACATGTCTCCTTTCGNGCTATATA  
TTTATATTTGGATCNTGNCCANTGACNTTGGAAAAAANTTCAATTCCTGGGGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

**DEG15**

(reverse)

TAACACCCAGCGTTCATGTTTCTTCTCAGCTACTACTACTAGTACCGTGTGTTAGCGTGTGATGATGCTAGGTTAAT  
GGGTGCGCCGCGATGCAGATGGCATTGAGACATTCTGCACGGGCTTTTTAGGAGCGGATTACCTCCAAGCCTCTAATC  
CTTGTGGTTGCTGTTGTAGACTCTCCGATTGCTTTTGTGCTGGTAGGGTTTGGTTAGTCCCGGAGGGGGATGTAAGCC  
GGCGTTTTTGTGCCGGCGTCTGCTCCGGTGGTCCGTCAGTGGTCACTGGTCAAGTACACCGGCGGCTTCAAGTCTGTGTC  
CATCGTTTCTAGCTAGCTAGCTGCTGTTTCCGCTGCTCTGCGTATTGTAACAGTGGGTGAATGTCATGTAATAATTAG  
CTCCGTCAAAAAAGTGTGAATGTGGATTATGTTATATTGTTGCTAGTGTATATCATCAGTTTGTCTCTTGTAAATTTT

GTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

**DEG16**

(forward)

CCCAGTGATCTCAGCTGAAAGGCTTACCACGAGCAGCTCTCAGTTGCTGAGATCACCAACAGTGCCTTTGAGCCTTCC  
TCCATGATGGCCAAGTGTGACCCCGCCACGGCAAGTACATGGCCTGCTGTCTGATGTACCGTGGTGACGTTGTGCC  
CAAGGATGTGAACGCTGCTGTGGCCACCATTAAGACAAAGCGCACCATCCAGTTCGTGGACTGGTGCCCACTGGCT  
TCAAGTGTGGTATCAACTACCAGCCACCCAGCGTCGTCCCAGGTGGCGACCTTGCCAAGGTCCAGAGGGCTGTGTG  
CATGATCTCCAACCTCCACCAGTGTGTTGAGGTCTTCTCCCGCATCGACCACAAGTTCGACCTGATGTACGCCAAGCG  
TGCCCTTCGTCCTACTGGTACGTGGGTGAGGGTATGGAGGAAGGGGAGAGTTCTCTGAGGCACGTGAGGACCTTGCTGC  
CCTGGAGAAGGACTATGAAGAAGTTGGTGTGAGTTCGACGAGGGTGAGGATGGTGTGAGGGCGATGANTACTANA  
GCCTGCGTCTGCTGCTTTCCCAAGACCGACTACTACTGCTATCCAGTGATCTGCCCTAGTGGCTTTTATCTGNTTATC  
TATCTGTTTGAACCTTTCTTTGTGATGTTTGGNTTACAACCTGTTCCGTTGTAANAATCTGTGGTATGTTTGAANCTGCTT  
TGCACCTTGGTTAANATGCATGTTATGTGGNCNTTGTGTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCCCATCGTANTCNCANC  
ATTACANAAGGGCNANTCCANCACTGGCGGCGTTANTANTGGATCCAACCTCGGNACAANCTTGGNGNATCTGGN  
CNAACTGTTNNTGGGGGAATNTN

(reverse)

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGACACAAAGACCACATAACATGCATATTAACCAAGGTGCAAAGCAGGTTCAAACATACCA  
CAGATTCTTACAACGGAACAGGTTGTAACCAAACATCACAAAGAAAGGTTCAAACAGATAGATAAACAGATAAAAAGCC  
ACTAGGGCAGATCACTGGATAGCAGTAGTAGTCGGTCTTGGGAAAGCACCAGGACGCGAGGCTCTAGTACTCATCGCC  
CTCATCACCATCCTCACCCCTCGTGAACCTCAGCACCAACTTCTTCATAGTCCTTCTCCAGGGCAGCAAGGTCTCAGC  
TGCTCANAGAACTCTCCCTCCTCCATACCCTCACCCACGTACCAGTGGACGAAGGCACGCTTGGCGTACATCAGGT  
CGAACTTGTGGTTCGATGCGGGGAGAAGACCTCAACAACACTGGTGGAGTTGGAGATCATGCACACAGCCCTCTGGACC  
TTGGCAAGGTCGCCACCTGGGACGACGCTGGGTGGCTGGTAGTTGATACCACACTTGAAGCCAGTGGGGCACCAAGT  
CCACGAAGTGGATGGTGCCTTTGTCTTAATGGTGGCCACAGCAGCGTTCACATCCTTGGGCACAACGTCNCCACGG  
TACATCANACAGCAGGCCATGTACTTGCCGTGGCGGGGGTACACTTGGCCATCATGGGAGGAAGGCTCAAAGGCA  
CTGTTGGTGTCTCAGCAACTGAAAGCTGCTCGNGGTAAGCCNTCTCAGCTGAAATCACTGGGGCANANTCNGCCCC  
CCATGAANCGAATGCCTGGTAAACAAGGGCGAATTCTGCAAATTNCTNACTGGGGGNCGCTCGAGCATGCATCTA  
GAGGGNCCANTCNCCTATAGNGNGTCGNATNAAATNCTGGGCGTGGTTTTANACGTCNGNCTGGGAAAACCTGGG  
NTN

(3) Saxitoxin 생합성 관련 유전자의 발현 확인

(가) Saxitoxin 생합성 관련 유전자의 primer 설계

Toxin 생합성 회로를 분석하여 선발한 4개의 유전자(SAH Hydrplase, Glycine Methyltransferase, SAMe Decarboxylase, Cystathionine beta-synthse)의 발현양상을 분석하기 위하여 지금까지 조사된 saxitoxin의 전구물질과 가상의 생합성 회로를 분리하여 각각의 과정에 관여하는 효소를 선발하고 이들 효소의 유전자를 species를 초월하여 다양한 종에서 유전자의 아미노산 서열과 nucleotide 서열을 분석하여 그 homology 및 divergency를 조사하였으며, 이 결과를 토대로 degenerated primer를 제작하였다 (Fig. 52-55, Table 19). 또한 선행된 DEG 실험을 통해 발현의 증가가 확연히 나타난 유전자 중 S-adenosylmethionine synthetase (SAMe), ornithine carbamoyl -transferase chain I 과 높은 homoldgy가 있는 DEG 11,16의 염기서열을 이용하여 primer 3 프로그램을 사용하여 semi-quantitative RT-PCR용 primer를 설계하였다 (Table 20).

E 400 I 420 440 N  
 SAHH1 : DRVFPETKAGIIVLAEGRLLMNLGCATGHFSFVMSCSFNQVLAQIPLWNEKAS----GKYEKKVYVLPKHLDEKVALIH : 451  
 SAHH2 : DRVFPDINSGLIIVLAEGRLLMNLGCATGHFSFVMSCSFNQVLAQIPLWNEKSS----GKYEKKVYVLPKHLDEKVAALH : 451  
 Dr : DRIRMKNGRH-IIVLAEGRLLVNLGCAMGHFSFVMSNSFNQVLAQIPLWKNNSK-----FPLGVYVLPKHLDEBVAAAH : 399  
 Rn : DRLLKNGHR-IIVLAEGRLLVNLGCAMGHFSFVMSNSFNQVMAQIPLWTHPDK-----WPVGVHFLPKHLDEAVAEAH : 397  
 Dm : DRITMQSGKH-IIVLAEGRLLVNLGCAMGHFSFVMSNSFNQVLAQIPLWTKSDK-----YAVGVHVLPKHLDEBVASTH : 398  
 Sc : DRLLSSGRH-VILLANGRLVNLGCATGHFSFVMSCSFNQVLAQIPLWFKSNDK(12)GPEVGVHVLPKHLDEAVAKBH : 403  
 Pf : DRITLPLNGNK-IIVLAEGRLLNLCATGHFAFVMSFSFNQVLAQIPLWQNKDT----NKYENKVVYVLPKHLDEKVALIH : 445

A

101 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200  
 At AGTCTGTAARCGAGGGACCCAGCAAGCTTGTGACCAGATCTCTGATCGAGTCCCGATGCCGCCTTGAAACAGACCCCTGACAGCAAGTTGCTTG  
 Oryza AGTCTGTGATCGAGGGCCACCCAGCAAGCTTGCACCAAGTCTCAGATGCTGTGCTTGATGCCGCCTCGCCGAGGACCCCTGACAGCAAGTTGCTTG  
 Bean AGTCTGTGATCGAGGGCCACCCAGCAAGCTTGTGATCAGATATCTGATCGAGTCTTGATGCA GCCTTGAAACAGATCCAGATAGTAAAGTTGCCCTG  
 carrot AATCTGTAARCGAGGGACCCAGCAAGCTTGTGATCAGATTTCCGACCGAGTCCCTTGATGCCGCCTTGAAACAGACCCCTGACAGCAAGTTGCTTG  
 Droso TGTCCTGTGGCGAGGGTCACTCAGCAAAATCTGCGACCAATCAGCGACGCTATCTTGATGCCATCTGAAACAGGATCCAAACCGCAAGGTTGCCCTG  
 Hono AGTCTGTGGAGAGGGACCCGGATAAGATGTGTGACCAGATCAGTGTGATCGAGTCCCGATGCCATCTCAGCAAGACCCCAATGCCAGGTTGCCCTG  
 isensus agTCTGT.gg.GAGGGaCaCCaGAcAAgaTGTGtGAcCagATcag.GATGcAgTccTgGATGcc.atCT.aAgCAgAcCC.aAcgcaAgGtGc.TG

201 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300  
 At TGAACATGACCCAGACCAACATGGTCTATGGTCTTTGGTGAAGTCACTACCAAGGCTACTGTTGACTACGAGAGATTTGTCGTTGACACTGTCGCGCC  
 Oryza TGAACATGACCCAGACCAACATGGTCTATGGTCTTTGGTGAAGTCACTACCAAGGCTACTGTTGACTACGAGAGATTTGTCGTTGACACTGTCGCGCC  
 Bean TGAACATGACCCAGACCAACATGGTCTATGGTCTTTGGTGAAGTCACTACCAAGGCTACTGTTGACTACGAGAGATTTGTCGTTGACACTGTCGCGCC  
 carrot TGAACATGCTCAAGACCAACATGGTCTATGGTCTTTGGTGAAGTCACTACCAAGGCTACTGTTGACTACGAGAGATTTGTCGTTGACACTGTCGCGCC  
 Droso TGAACATGCTCAAGACCAACATGGTCTATGGTCTTTGGTGAAGTCACTACCAAGGCTACTGTTGACTACGAGAGATTTGTCGTTGACACTGTCGCGCC  
 Hono TGAACATGCTCAAGACCAACATGGTCTATGGTCTTTGGTGAAGTCACTACCAAGGCTACTGTTGACTACGAGAGATTTGTCGTTGACACTGTCGCGCC  
 isensus TGAACagtc.ccAAGACcggCATGgT.cTGcTgTgtGGtGAgATcAc.t.c.AagGcAtgGT.GAcTAcCAgaagTgT.cg.gAgAc.cccagcag

301 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400  
 At ATTGGATTTGTCCTGATGATGTTGGTCTTGATGCTGCAAAATGCAAGTCTTAGTCAACATTTGAGCAACAGAGCCAGACATTTGCTCAGGAGTTCCAGC  
 Oryza ATTGGATTTGTCCTGATGATGTTGGTCTTGATGCTGCAAAATGCAAGTCTTAGTCAACATTTGAGCAACAGAGCCAGACATTTGCTCAGGAGTTCCAGC  
 Bean ATTGGATTTGTCCTGATGATGTTGGTCTTGATGCTGCAAAATGCAAGTCTTAGTCAACATTTGAGCAACAGAGCCAGACATTTGCTCAGGAGTTCCAGC  
 carrot ATTGGATTTGTCCTGATGATGTTGGTCTTGATGCTGCAAAATGCAAGTCTTAGTCAACATTTGAGCAACAGAGCCAGACATTTGCTCAGGAGTTCCAGC  
 Droso ATTGGATTTGTCCTGATGATGTTGGTCTTGATGCTGCAAAATGCAAGTCTTAGTCAACATTTGAGCAACAGAGCCAGACATTTGCTCAGGAGTTCCAGC  
 Hono ATCGGCTACGATGACTCAGCCAGGGCTTTGACTCAGAGCTTGCACAGTGTGCAAGTCTTAGTCAACATTTGAGCAACAGAGCCAGACATTTGCTCAGGAGTTCCAGC  
 isensus ATtGG.tAtGatgactc.cccaagGG.tTcGAtttcaA.Ac.TGCAA.GTgctggTggc.tTgGAgCAaCAAtccCctGAtAttGGctcaggG.GtCCAtg

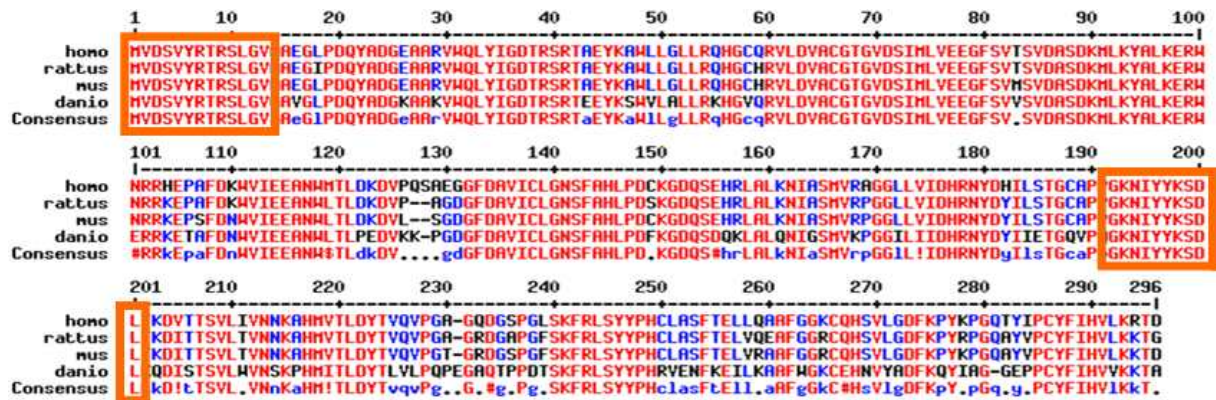
401 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500  
 At GTCACCTTACCAGATGCTCAGAGAAATGGAGCCGGTACCAGGGGCAATGTTGGTTATGACCACTGATGAAACCTGAGTTAATGCCCTTGAAGCA  
 Oryza GCCACCTTACCAGAGCCCTTGAAGGATTTGGTGTGGTACCAGGGGCAATGTTGGTTATGACCACTGATGAAACCTGAGTTAATGCCCTTGAAGCA  
 Bean GCCACCTTACCAGAGCCCTTGAAGGATTTGGTGTGGTACCAGGGGCAATGTTGGTTATGACCACTGATGAAACCTGAGTTAATGCCCTTGAAGCA  
 carrot GTCACTTACCAGAGCCCTTGAAGGATTTGGTGTGGTACCAGGGGCAATGTTGGTTATGACCACTGATGAAACCTGAGTTAATGCCCTTGAAGCA  
 Droso TCACCCGTGCCGAG-----GAGAGATCGGTGCCGAGATCAGGGTATTGTTGGTTATGACCACTGATGAAACCTGAGTTAATGCCCTTGAAGCA  
 Hono TGGACAGAAATGAG-----GAGAGATCGGTGCCGAGATCAGGGTATTGTTGGTTATGACCACTGATGAAACCTGAGTTAATGCCCTTGAAGCA  
 isensus t..Accg.accgAG.....GAgGA.at.GGtGC.GGAGAtCAGGt.t.ATGTTtGG.TATGcAcCgAcGAgAc.agGgTg.ATGCCCTTAcc.t

501 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

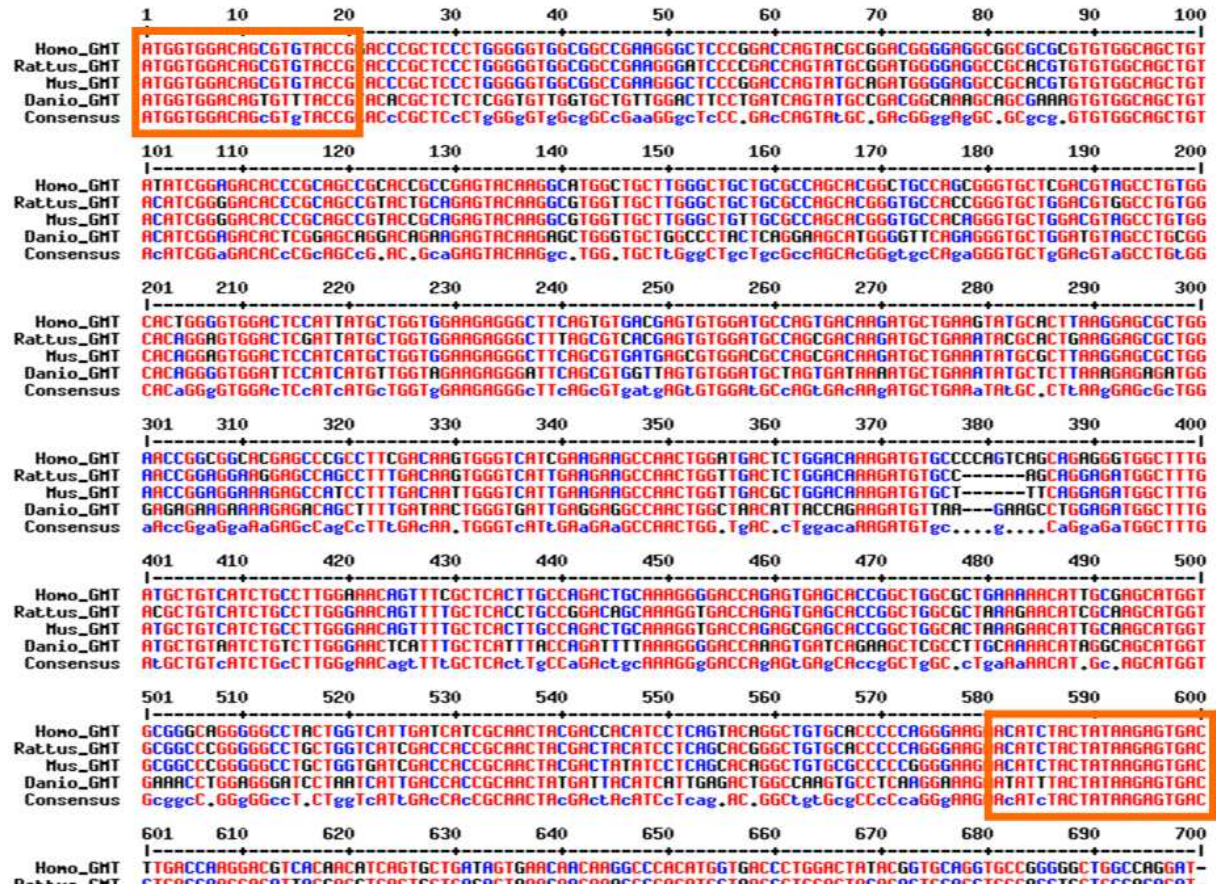
B

Figure 52. Multi-Alignment of sah hydrolase. A : Partial alignment of SAH hydrolases of Arabidopsis with other eukaryotic hydrolases. The alignment is representative of hydrolases of the eukaryotic type as defined by Kurowski and Bujnicki (2003) and corresponds to the region to which the hog1 substitutions map. The substituted residues are indicated in the top row; numbering corresponds to SAH hydrolase 1. SAHH1, SAH hydrolase 1; SAHH2, SAH hydrolase 2; Dr, *Danio rerio* (GI37681725); Rn, *Rattus norvegicus* (GI 38197378); Dm, *Drosophila melanogaster* (GI 7293098); Sc, *Saccharomyces cerevisiae* (GI 2950505); Pf, *Plasmodium falciparum* (GI 627050). An insertion in the *D. melanogaster* sequence is indicated. Invariant and highly conserved residues are highlighted.





A



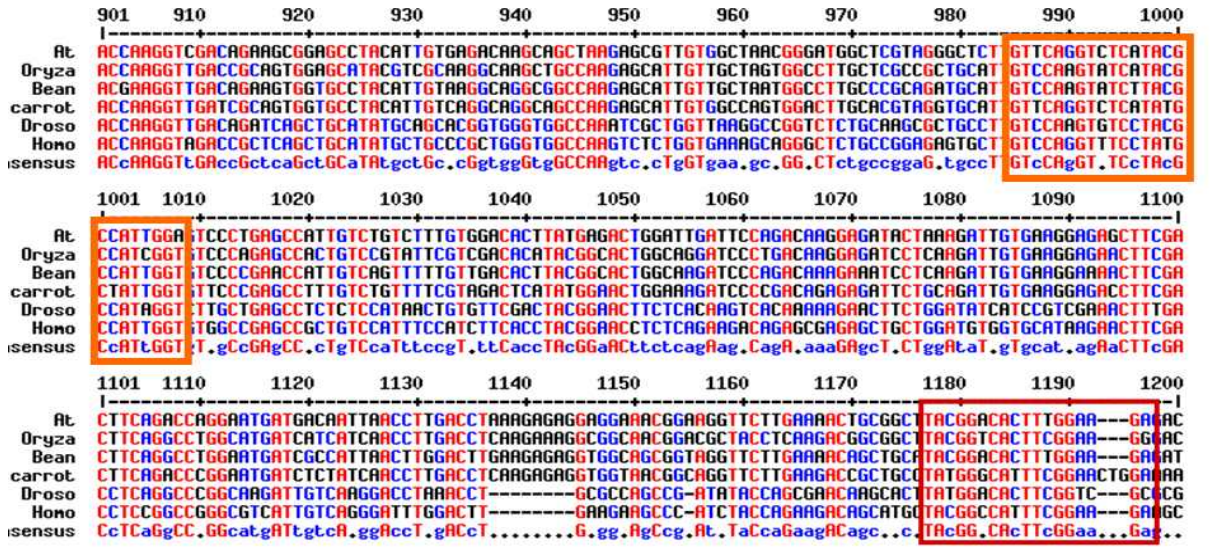
B

Figure 53. Multi-Alignment of glycine N-methyltransferase



Species	Accession	Position	Sequence	Position
<i>Zea mays</i>		1	MAVLSAADA...	100
<i>Triticum urgatum</i> subsp. (Tritordeum)		1	MAVLSAADA...	93
<i>Oryza sativa</i>		1	MAVLSVADS...	100
<i>Datura stramonium</i> (Jimsonweed)		1	MEMDLPVSA...	95
<i>Vicia faba</i> (Fava bean)		1	MAYSAIGFEG...	91
<i>Spinacia oleracea</i> (Spinach)		1	MALSAIGFEG...	91
<i>Brassica juncea</i> (India mustard)		1	MSLAIGFEG...	91
<i>Arabidopsis thaliana</i>		1	MAMSAIGFEG...	91
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		1	MTVNENGV...	94

A



B

Figure 54. Multi-Alignment of Sam decarboxylase



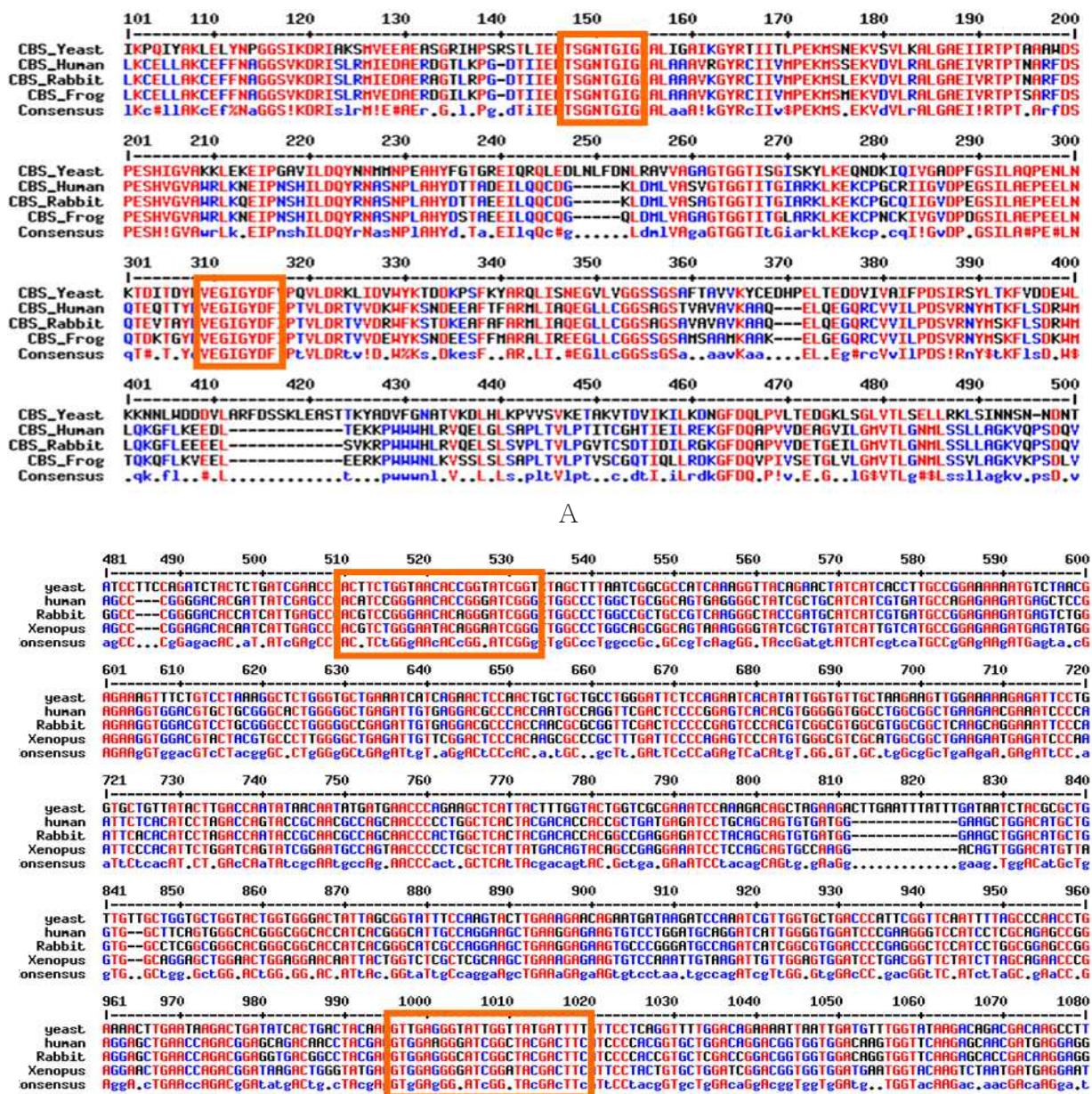


Figure 55. Multi-Alignment of cystathionine beta-synthase

Table 19. Description of designed degenerate primer sequence

Genes	Primers		Primer size	Expected product size
SAH hydrolase	SAHH_F	aag tty gay aay bti tay gg	20	460
	SAHH_B	tgd cci rtr gcr cai cc	17	
Glycine methyltransferase	GMT_F	atg gtt gac agy gtk tac cg	20	600
	GMT_B	aya tyt act ata aga gtg ac	20	
SAM decarboxylase	SAMD_F	aag wyi rtv mtb aar aci tgy gg	23	460
	SAMD_B	ccr cag ggy tcr aav tcr wag tc	23	
Cystathionine beta-synthase	CBS_F	acd tcy ggk aay acm ggd at	20	450
	CBS_B	gtk gar ggb aty ggh tay gg	20	

Table 20. Primer description for semiquantitative RT-PCR

Genes	Primers		Primer size	Expected product size
Ornithine carbamoyltrans	OCBT_F	gcc aga ttg ggc ata aag aa	20	240
	OCBT_B	gag gta cgc caa cgt cat tt	20	
S-adenosylmethionine synthetase	SAMe_F	atc cac ttg cag gga gat tg	20	170
	SAMe_B	tat gtc cct gat cac cag ca	20	

(나) RT-PCR 분석으로 유전자 발현 확인

선행된 DEG 실험 결과 도출된 두개의 유전자 발현에 대한 실험을 위하여 *A. tamarense*의 toxic strain 과 non-toxic strain 사이의 SAMe와 ornithine carbamoyltransferase의 발현양상을 semi-quantitative RT-PCR을 이용하여 비교 분석한 결과 이 두 유전자 모두 *A. tamarense*의 toxic strain에서 보다 많은 유전자의 발현을 확인하였다. 이는 두 유전자가 saxitoxin 생합성의 전구 물질의 합성과 toxin derivative의 합성에 부분적으로 관여함을 보여주었으며, 보다 정확한 기능 분석을 위해서는 이들 효소를 직접 분리하여 생화학적 특성을 규명해야하며, SAMe와 ornithine carbamoyltransferase의 knock-out *Alexandrium tamarense* mutant를 제작하여 toxin의 생합성과 modification에 관여함을 직접적으로 보여주는 실험이 필요하다 (Fig. 56).

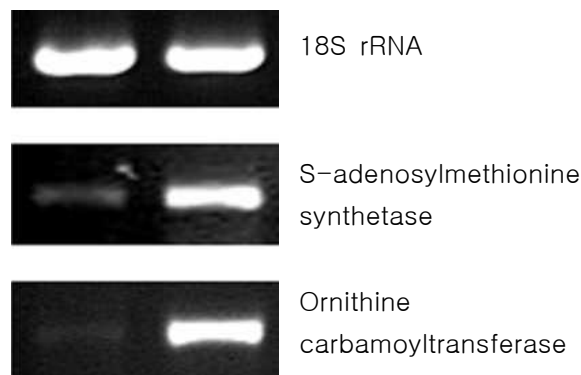


Figure 56. Semiquantitative RT-PCR of saxitoxin related clones.

또한 toxin 생합성 회로를 분석하여 선발한 4개의 유전자를 발현양상을 분석하였다. SAMe와 ornithine carbamoyltransferase의 실험에서와 같은 RNA를 이용하여 semi-quantitative RT-PCR을 수행하였으나 toxin의 생산여부와 상관없이 발현양상은 거의 비슷한 것으로 확인되었다 (Fig. 57). 따라서 임의로 선발한 toxin 생합성 관련 유전자는 본 실험에서는 직접적으로 관여하는 것으로 보이지는 않으나 gene regulation에 있어서 post-transcriptional regulation과 post translational modification에 의하여 효소활성은 변화하는 것이기에 향후에는 이들 효소 단백질의 항체를 이용한 western analysis 실험이 필요하다.

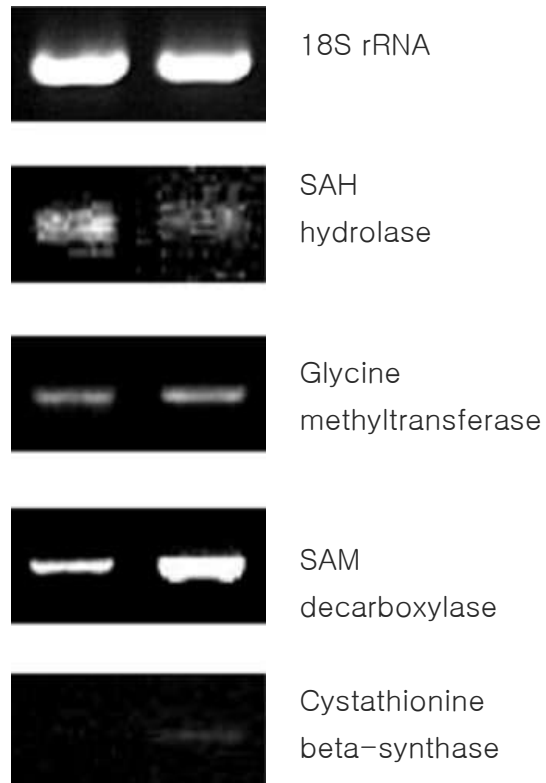


Figure 57. Semiquantitative RT-PCR of saxitoxin related clones.

## Appendix A

DNA sequences identified from the *Alexandrium tamarense* cDNA library

CLONE	Insert size	Putative identification	Organism	Homology (%) (amino acid)
3	428	protease P27	<i>Trichoderma harzianum</i>	74
4	533	luciferin-binding protein	<i>Cryptocodinium cohnii</i>	82
5	411	dnc gene product	<i>Drosophila melanogaster</i>	52
6	218	collectin-43	<i>Bos taurus</i>	63
7	336	LRG5 protein	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	51
8	255	DNA polymerase	<i>Hepatitis B virus</i>	64
10	311	conserved hypothetical protein	<i>Clostridium prefringens</i>	71
11, 12 36, 38	242	peridinin-chlorophyll a-binding protein PCP precursor	<i>Gonyaulax polyedra</i>	86
13	335	ribonucleotide reductase (Class I)	<i>Trypanosoma brucei</i>	79
14	455	calmin alpha	<i>Mus musculus</i>	47
15	378	Enolase 1	<i>Hevea brasiliensis</i>	81
16	450	Unknown (protein for MGC : 4584)	<i>Homo sapiens</i>	54
17	391	S-adenosylmethionine synthetase	<i>Brassica juncea</i>	85
20	435	isocitrate lyase	<i>Brassica napus</i>	70
21	297	xylanase	<i>Clostridium thermocellum</i>	53
22	450	small unclear ribonucleoprotein D2 polypeptide	<i>Homo sapiens</i>	88
23	442	hypothetical protein M117.4	<i>Caenorhabditis elegans</i>	56
24	363	SigH protein	<i>Streptomyces coelicolor</i>	64
25	410	probable ferredoxin	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	49



CLONE	Insert size	Putative identification	Organism	Homology (%) (amino acid)
26	361	goosecoid-like	<i>Homo sapiens</i>	75
27, 28	363	glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase	<i>Gonyaulax polyedra</i>	91
29	279	variant luciferin-binding protein	<i>Cryptocodinium cohnii</i>	86
30, 31	446	hypothetical protein	<i>Takifugu rubripes</i>	49
32	434	putative taste receptor TR1	<i>Rattus norvegicus</i>	62
33	386	mother against dpp (Mad) related protein	<i>Homo sapiens</i>	58
34	451	Peridinin-Chlorophyll a-binding protein	<i>Amphidinium carterae</i>	89
35	462	epidermal growth factor receptor substrate	<i>Homo sapiens</i>	57
37	490	Catechol-O-methyltransferase, soluble form	<i>Homo sapiens</i>	57
39	276	unknown	<i>Eufolliculina uhligi</i>	68
40	453	hypothetical protein	<i>Oryza sativa</i>	64
41	304	protein kinase C inhibitor	<i>maize</i>	68
42	273	nucleoporin 98-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	64
43	318	Probable transmembrane protein	<i>Palstonia solanacearum</i>	66
44	475	translation elongation factor	<i>Astasia longa</i>	67
45	208	unnamed protein product	<i>Macaca fascicularis</i>	52
46	283	predicted protein	<i>Sorghum bicolor</i>	54
48	309	flavoprotein subunit of succinate dehydrogenase	<i>Ascaris suum</i>	75
49	218	putative NADP dependent oxidoreductase	<i>Bos taurus</i>	63
50	148	Niemann-Pick type C1 protein	<i>Cricetulus griseus</i>	46
52	385	putative protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	54
53	241	hypothetical protein K10G6.3	<i>Caenorhabditis elegans</i>	45

CLONE	Insert size	Putative identification	Organism	Homology (%) (amino acid)
54	365	hypothetical protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	69
55	335	finger protein bowel – fruit fly	<i>Drosophila melanogaster</i>	40
56	343	hypothetical protein B0507.3	<i>Caenorhabditis elegans</i>	56
57	277	splicing factor, arginine/serine-rich 8	<i>drosophila</i>	56
58	255	luciferin-binding protein – dinoflagellate	<i>Gonyaulax polyedra</i>	63
59	264	luciferase	<i>Pyrocystis lunula</i>	75
60	432	elongation factor-2	<i>Cryptosporidium parvum</i>	65
61	413	enoyl-ACP reductase	<i>Petunia x hybrida</i>	69
62	424	Fucoxanthin-chlorophyll A-C binding protein B	<i>chloroplast precursor</i>	73
63	423	CYSTATHIONINE BETA-SYNTHASE	<i>SERINE SULFHYDRASE</i>	65
64	423	KIAA1855 protein	<i>Homo sapiens</i>	38
66	426	luciferin-binding protein – dinoflagellate	<i>Gonyaulax polyedra</i>	80
67	428	ADP,ATP CARRIER PROTEIN	<i>ADENINE NUCLEOTIDE TRANSLOCATOR</i>	63
68	381	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoform 2	<i>Gonyaulax polyedra</i>	92
69	425	CG1249 gene product	<i>Drosophila melanogaster</i>	87
70	373	S-ADENOSYLMETHIONINE SYNTHETASE	<i>ADOMET SYNTHETASE</i>	73
71	427	peridinin-chlorophyll a-binding protein PCP precursor	<i>Gonyaulax polyedra</i>	65
72	417	PEPTIDASE T	<i>TRIPEPTIDASE</i>	55
73	418	lymphocyte adaptor protein (Lnk)	<i>Homo sapiens</i>	49
75	426	luciferin-binding protein – dinoflagellate	<i>Crypthecodinium cohnii</i>	82
76	428	SCAND2	<i>Homo sapiens</i>	34
77	431	putative protein	<i>putative protein</i>	45

CLONE	Insert size	Putative identification	Organism	Homology (%) (amino acid)
78	433	elongation factor 1 alpha long form	<i>Monosiga brevicollis</i>	60
79	425	probable sterol methyltransferase	<i>Mesorhizobium loti</i>	45
80	426	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Gonyaulax polyedra</i>	84
81	424	(AF421536) actin	<i>Cryptocodinium m cohnii</i>	94
82	261	unknown	TT virus	82
83	420	light-harvesting chlorophyll A-C binding precursor - <i>Amphidinium carterae</i>	fragment	57
84	430	GMC-type oxidoreductase	<i>Mesorhizobium loti</i>	65
85	419	Hypothetical protein Y41D4A.1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	38
86	422	expressed protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	44
87	426	probable sterol methyltransferase	<i>Mesorhizobium loti</i>	50
88	426	variant luciferin-binding protein	<i>Cryptocodinium m cohnii</i>	71
89	420	GTP-binding protein Ran/TC4	dog	92
90	413	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoform 2	<i>Gonyaulax polyedra</i>	91
91	431	O-methyltransferase	<i>Nostoc sp. PCC 7120</i>	51
92	401	cytochrome b	<i>Pfiesteria piscicida</i>	81
93	429	luciferin-binding protein - dinoflagellate	<i>Gonyaulax polyedra</i>	87
94	438	hypothetical protein	<i>Synechocystis sp. PCC 6803</i>	50
97	407	tyrosinase-related protein 1	<i>Takifugu rubripes</i>	40
98	434	Photosystem I reaction centre subunit III, chloroplast precursor	PSI-F	52
99	434	T-COMPLEX PROTEIN 1, ALPHA SUBUNIT (TCP-1-ALPHA) (CCT-ALPHA)	<i>Cryptocodinium m cohnii</i>	69
100	305	Nitrate reductase	<i>Metarhizium anisopliae</i>	66
101	219	herc2 protein	mouse	57

CLONE	Insert size	Putative identification	Organism	Homology (%) (amino acid)
102	437	complement factor H	<i>Homo sapiens</i>	39
103	431	keratin associated protein 5-1; keratin	<i>Mus musculus</i>	41
105	434	hypothetical protein	<i>Mesorhizobium loti</i>	60
106	438	Hypothetical protein K02F3.11	<i>Caenorhabditis elegans</i>	48
108	407	bl gene product	<i>Drosophila melanogaster</i>	44
109	434	peridinin-chlorophyll a-binding protein PCP precursor	<i>Gonyaulax polyedra</i>	77
110	434	beta transducin-like protein HET-E2C*4	<i>Podospora anserina</i>	54
111	480	light-harvesting polyprotein precursor	<i>Amphidinium carterae</i>	82
112	356	Homeobox protein Hox-D10		45
113	354	(XM_031813) hypothetical protein XP_031813	<i>Homo sapiens</i>	47
114	523	luciferin-binding protein - dinoflagellate	<i>Gonyaulax polyedra</i>	79
115	503	luxR-family transcriptional regulatory protein	<i>Streptomyces avermitilis</i>	42
116	479	thioesterase	<i>Streptomyces avermitilis</i>	50
117	456	peridin-chlorophyll a protein precursor	<i>Amphidinium carterae</i>	63
119	504	gene product	<i>Drosophila melanogaster</i>	55
120	623	cerebral cell adhesion molecule	<i>Homo sapiens</i>	43
121	635	hypothetical protein	<i>Dictyostelium discoideum</i>	36
122	597	Peridinin-chlorophyll A binding protein, chloroplast precursor		74
123	538	peridin-chlorophyll a protein precursor	<i>Amphidinium carterae</i>	72
124	597	putative DNA-invertase	<i>Micrococcus sp. 28</i>	48
125	526	putative carrier protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	43
126	601	P2X2D receptor	<i>Homo sapiens</i>	42

CLONE	Insert size	Putative identification	Organism	Homology (%) (amino acid)
127	641	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Gonyaulax polyedra</i>	84
128	688	omega-6 desaturase	<i>Brassica napus</i>	56
129	642	peridin-chlorophyll a protein precursor	<i>Amphidinium carterae</i>	74
131	640	elongation factor 1 alpha long form	<i>Monosiga brevicollis</i>	77
132	601	split ends	<i>Drosophila melanogaster</i>	42
134	343	peridin-chlorophyll a protein precursor	<i>Amphidinium carterae</i>	70
135	649	135 peridin-chlorophyll a protein precursor	<i>Amphidinium carterae</i>	80
136	585	luciferin binding protein gen	<i>Gonyaulax polyedr</i>	95
137	643	probable membrane protein L3169.4	<i>Leishmania major</i>	45
138	558	actin	<i>Cryptocodinium m cohni</i>	84
139	591	luciferin-binding protein	<i>Cryptocodinium m cohni</i>	85
140	300	mitochondrial processing peptidase alpha subunit homolog	<i>Toxoplasma gondii</i>	58
141	571	L-methionine S-Adenosyltransferas	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	66
142	565	glycogen phosphorylas	<i>Trichomonas vaginalis</i>	57
144	463	phosphoribulokinase	<i>Odontella sinensi</i>	66
145	645	peridin-chlorophyll a protein precursor	<i>Amphidinium carterae</i>	90
146	412	sucA	<i>Rickettsia montanensi</i>	47
148	649	agCP15339	<i>Anopheles gambiae str. PE</i>	76
150	548	hypothetical protein	<i>Pseudomonas aeruginos</i>	58
151	628	prepro-acrosin	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	39
152	516	p14 protein alpha chain	<i>Cryptocodinium m cohni</i>	82
153	603	luciferin binding protein	<i>Gonyaulax polyedr</i>	81

CLONE	Insert size	Putative identification	Organism	Homology (%) (amino acid)
154	648	luciferin-binding protein	<i>Gonyaulax polyedr</i>	83
155	662	probable ATP citrate lyase subunit 1	<i>Neurospora crassa</i>	82
156	636	secreted frizzled-related protein	<i>Gallus gallus</i>	50
157	530	Uncharacterized protein	<i>Methanopyrus kandleri AV1</i>	51
158	748	Methionine synthase II	<i>Corynebacteriu m glutamicum</i>	61
160	681	alpha-tubulin	<i>Colpoda sp</i>	84
161	462	polymerase	<i>woolly monkey hepatitis B Virus</i>	34
162	573	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Gonyaulax polyedra</i>	81
163	644	luciferin-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	69
164	644	hiw gene product	<i>Drosophila melanogaster</i>	40
165	651	Elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha)	<i>Elongation factor Tu</i>	87
166	661	elongation factor 1 alpha long form	<i>Monosiga brevicollis</i>	80
167	656	luciferin-binding protein	<i>Cryptocodiniu m cohnii</i>	74
168	663	luciferin-binding protein	<i>Cryptocodiniu m cohnii</i>	69
169	655	translation initiation factor eIF4A	<i>Saccharomyce sc cerevisiae</i>	41
170	697	PotB	<i>Actinobacillus actinomycetem comitans</i>	43
171	560	notch protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	28
172	660	ELONGATION FACTOR 1-ALPHA	<i>Cryptosporidiu m parvum</i>	83
173	685	erythraea beta-ketoacyl synthase	<i>Streptomyces coriofaciens</i>	32
174	697	luciferin-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	74
175	641	semaF cytoplasmic domain associated protein 3	<i>Homo sapiens</i>	23
176	683	Peridinin-chlorophyll A protein 1	<i>Amphidinium carterae</i>	77

CLONE	Insert size	Putative identification	Organism	Homology (%) (amino acid)
177	685	encodes the first enzyme in cysteine biosynthesis	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	74
178	704	luciferin-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	79
180	687	hypothetical protein SC4G6.26	<i>Streptomyces coelicolor</i>	60
181	676	zonadhesin	<i>Mus musculus</i>	68
182	617	peridinin-chlorophyll a-binding protein PCP precursor	<i>Gonyaulax polyedra</i>	72
183	669	cryptophyte-like actin	<i>Pyrenomonas helgolandii</i>	80
184	687	aldolase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	69
185	603	testis-specific protein kinase 1	<i>Homo sapiens</i>	44
186	703	HSP80-2	<i>Triticum aestivum</i>	66
187	680	3-hydroxybutyrate dehydrogenase	<i>Rattus norvegicus</i>	77
188	632	hypothetical protein	<i>Aquifex aeolicus</i>	38
189	684	Peridinin-chlorophyll A protein 2	<i>Amphidinium carterae</i>	64
190	704	ankyrin 1	<i>Bos taurus</i>	86
191	555	probable glutamate decarboxylase	<i>Neurospora crassa</i>	50
192	702	Hypothetical protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	66
193	523	glycerate dehydrogenase	<i>Bacillus halodurans</i>	47
194	658	hypothetical protein	<i>Nostoc sp. PCC 7120</i>	32
195	634	glycine-rich protein	<i>Brassica napus</i>	71
196	688	kinesin-like protein	<i>Leishmania major</i>	25
197	672	agmatinase	<i>Mesorhizobium loti</i>	83
198	708	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	82
199	876	glycine-rich protein	<i>Brassica oleracea</i>	99

CLONE	Insert size	Putative identification	Organism	Homology (%) (amino acid)
200	764	minor ampullate silk protein MiSp1	<i>Nephila clavipes</i>	97
201	694	putative ankyrin	<i>Oryza sativa</i>	71
203	609	enolase 1	<i>Prionitis lanceolata</i>	29
204	703	hypothetical protein	<i>Mesorhizobium loti</i>	78
205	699	ATP synthase B chain	<i>Ochrosphaera neapolitana</i>	29
206	715	Superoxide dismutase	<i>Caenorhabditis elegans</i>	47
208	708	CG4335 gene product	<i>Drosophila melanogaster</i>	75
210	748	EBNA-1	<i>Cynomolgus Epstein-Barr Virus TsB-B6</i>	90
211	758	nuclear antigen EBNA1	<i>Human herpesvirus 4</i>	61
214	708	putative s-adenosylmethionine synthetase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	76
215	691	S-adenosylmethionine synthetase	<i>Caenorhabditis elegans</i>	53
216	692	unnamed protein product	<i>Macaca fascicularis</i>	37
217	696	PROBABLE ACULEACIN A ACYLASE TRANSMEMBRANE PROTEIN	<i>Ralstonia solanacearum</i>	40
218	693	protein phosphatase	<i>Cicer arietinum</i>	84
219	687	transferase	<i>Streptomyces coelicolor A3(2)</i>	55
220	708	uciferin-binding protein	<i>Cryptocodiniu m cohnii</i>	66
221	691	RIBOSOMAL PROTEIN S2	<i>Urechis caupo</i>	77
222	668	UIP2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	72
223	706	laminin	<i>Caenorhabditis elegans</i>	25
224	692	Fucoxanthin-chlorophyll A-C binding protein F	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	45
225	721	luciferin-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	75
226	701	gag-like protein	<i>Bombyx mori</i>	49



CLONE	Insert size	Putative identification	Organism	Homology (%) (amino acid)
227	691	hypothetical protein C54D2.3	<i>Caenorhabditis elegans</i>	86
228	696	peridin-chlorophyll a protein precursor	<i>Amphidinium carterae</i>	81
229	698	sulfotransferase-related protein SULT-X2	<i>Mus musculus</i>	68
230	713	luciferin-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	82
231	701	elongation factor EF1-alpha	<i>Hydra vulgaris</i>	74
232	699	luciferin-binding protein	<i>Cryptocodinium m cohnii</i>	68
233	628	Ribosomal protein L12	<i>Drosophila melanogaster</i>	26
234	693	peridinin-chlorophyll a protein	<i>Amphidinium carterae</i>	83
235	679	Hsp90	<i>Cryptocodinium m cohnii</i>	73
237	672	beta-galactosidase	<i>Shuttle vector pRES19</i>	23
238	682	predicted using Genefinder	<i>Caenorhabditis elegans</i>	27
239	678	ribonucleoside-diphosphate reductase large chain	<i>Neurospora crassa</i>	69
240	695	ADP/ADT translocator protein	<i>Homo sapiens</i>	67
242	661	hypothetical protein XP_104422	<i>Homo sapiens</i>	19
243	679	Peridinin-chlorophyll A binding protein	<i>Symbiodinium sp.</i>	80
244	694	Vegetative cell wall protein gp1 precursor	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	99
245	651	Cytochrome c-550 (C550)	<i>Cytochrome c-549</i>	39
246	673	CG6107 gene product	<i>CG6107 gene product</i>	30
247	688	Mitogen-activated protein	<i>Mus musculus</i>	44
248	668	granulin	<i>Rattus norvegicus</i>	35
249	682	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Pichia pastoris</i>	78
250	560	fumarate hydratase	<i>Mesorhizobium loti</i>	84

CLONE	Insert size	Putative identification	Organism	Homology (%) (amino acid)
251	665	AGR_C_4370p	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	82
252	558	peridinin-chlorophyll a-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	64
253	651	En/Spm-like transposon protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	73
254	602	luciferin-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	86
255	637	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	<i>Cryptococcus curvatus</i>	95
256	530	CG13483 gene product	<i>Drosophila melanogaster</i>	48
257	658	S-ADENOSYLMETHIONINE SYNTHETASE 1	<i>METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE 1</i>	97
359	568	Peridinin-chlorophyll A protein 2	<i>Amphidinium carterae</i>	97
360	483	cysteine proteinase	<i>Trypanosoma congolense</i>	75
361	511	luciferin-binding protein	<i>Crypthecodinium m cohnii</i>	98
362	523	integrin beta 6	<i>Mus musculus</i>	48
363	567	RpgG	<i>Dictyostelium discoideum</i>	85
364	564	S-adenosylmethionine synthetase	<i>Pinus contorta</i>	97
365	536	hypothetical protein	<i>Brucella melitensis</i>	63
366	444	3probable oxidoreductase	<i>Streptomyces coelicolor A3(2)</i>	97
367	490	Peridinin-chlorophyll A protein 2	<i>Amphidinium carterae</i>	87
368	547	ATP citrate lyase	<i>Cyanophora paradoxa</i>	81
369	558	putative aldolase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	67
371	597	probable phosphate transport protein MIR1	<i>Neurospora crassa</i>	97
372	601	chromokinesin	<i>Homo sapiens</i>	85
373	699	luciferin-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	91
374	512	peridinin-chlorophyll a-binding protein PCP precursor	<i>Gonyaulax polyedra</i>	56

CLONE	Insert size	Putative identification	Organism	Homology (%) (amino acid)
375	598	Adenine nucleotide translocase 2	<i>Drosophila melanogaster</i>	98
376	545	S-ADENOSYLMETHIONINE SYNTHETASE	<i>METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE</i>	90
377	433	RIKEN cDNA 2310069J12	<i>Mus musculus</i>	91
378	633	keratin like protein	<i>Caenorhabditis elegans</i>	50
379	507	DNA-binding protein HB	<i>Bacillus sp</i>	50
381	556	Spore coat protein SP96	<i>Dictyostelium discoideum</i>	89
382	540	peridinin-chlorophyll a-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	96
383	472	putative hyperpolarization-activated cation channel protein	<i>Oryza sativa</i>	47
384	584	putative notch receptor protein	<i>Branchiostoma floridae</i>	99
385	973	luciferin-binding protein	<i>Cryptocodiniu m cohnii</i>	97
386	531	laminin alpha 3b chain	<i>Homo sapiens</i>	57
387	507	Ser/Arg-related nuclear matrix protein	<i>Mus musculus</i>	82
388	602	peridinin-chlorophyll a-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	98
389	490	peridinin-chlorophyll a-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	53
390	659	At1g32359/F27G20	<i>Arabidopsis thaliana</i>	85
391	548	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	76
392	589	peridinin-chl a protein	<i>Heterocapsa pygmaea</i>	91
393	526	Peroxiredoxin 5	<i>Bos taurus</i>	86
394	557	7138.2	<i>Leishmania major</i>	87
395	348	capsid protein	<i>Rabbit hemorrhagic disease virus</i>	37
396	566	luciferin-binding protein	<i>Cryptocodiniu m cohnii</i>	97
397	435	KIAA1201 protein	<i>Homo sapiens</i>	61

CLONE	Insert size	Putative identification	Organism	Homology (%) (amino acid)
401	602	Prolidase	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	98
403	522	aldehyde reductase	<i>Vigna radiata</i>	97
404	404	precursor of peridinin-chlorophylla-protein	<i>Amphidinium carterae</i>	94
405	503	hypothetical protein	<i>Pyrococcus abyssi</i>	91
407	543	Peridinin-chlorophyll A protein 2	<i>Amphidinium carterae</i>	99
409	624	similar to ALR	<i>Homo sapiens</i>	72
410	588	Peridinin-chlorophyll A protein 1	<i>Amphidinium carterae</i>	98
411	533	chlorophyll a/c-binding protein	<i>Giraudyopsis stellifer</i>	44
412	638	beta-galactosidase alpha peptide	Cloning vector pUC1918	44
413	460	SH2 domain containing SOCS box protein	<i>Mus musculus</i>	51
414	575	HANSENULA MRAKII KILLER TOXIN-RESISTANT PROTEIN 1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	70
415	525	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	80
416	550	modified alpha peptide of E. coli beta-galactosidase	Cloning vector pKF297	35
418	586	oxoglutarate/malate translocator-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	96
419	601	hypothetical protein	<i>Streptomyces coelicolor A3(2)</i>	27
420	504	CG17168 gene product	<i>Drosophila melanogaster</i>	86
421	542	peridinin-chlorophyll a-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	92
422	545	L5204	<i>Leishmania major</i>	84
423	501	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	85
424	600	CG8142	<i>Drosophila melanogaster</i>	88
425	610	hypothetical protein	<i>Oryza sativa</i>	44
426	545	VRK3 for vaccinia related kinase 3	<i>Homo sapiens</i>	41

CLONE	Insert size	Putative identification	Organism	Homology (%) (amino acid)
427	503	SALIVARY GLUE PROTEIN	<i>Drosophila erecta</i>	93
428	580	potassium-dependent sodium/calcium exchanger	<i>Drosophila melanogaster</i>	88
429	559	Trk-fused gene	<i>Mus musculus</i>	56
430	519	Product of gene unknown	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	97
432	506	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	87
433	428	cAMP-dependant protein kinase	<i>Caenorhabditis elegans</i>	93
434	358	UDP-GalNAc	<i>Macaca fascicularis</i>	69
435	292	Peridinin-chlorophyll A protein 1	<i>Amphidinium carterae</i>	97
436	337	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	91
437	438	aspartate carbamoyltransferase regulatory chain	<i>Yersinia pestis</i>	80
438	391	R27-2 protein	<i>Trypanosoma cruzi</i>	92
439	465	RNA polymerase II largest subunit	<i>Aspergillus oryzae</i>	71
440	369	calmodulin-domain protein kinase 1	<i>Toxoplasma gondii</i>	88
441	473	peridinin-chlorophyll a-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	97
442	464	Peridinin-Chlorophyll-Protein	<i>Amphidinium Carterae</i>	86
444	498	probable sulfate adenylyltransferase	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	96
445	316	S-ADENOSYLMETHIONINE SYNTHETASE	<i>Musa acuminata</i>	66
447	131	peridinin-chlorophyll a-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	93
449	470	glycine-rich protein	<i>Brassica oleracea</i>	40
450	158	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Mucor racemosus</i>	75
451	230	luciferin-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	93
453	188	peridinin-chl a protein	<i>Heterocapsa pygmaea</i>	95

CLONE	Insert size	Putative identification	Organism	Homology (%) (amino acid)
454	336	PROBABLE PHOSPHOENOLPYRUVATE SYNTHASE	<i>Staphylothermu s marinus</i>	92
455	221	protein kinase-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	75
456	289	peridinin-chl a protein	<i>Heterocapsa pygmaea</i>	98
457	394	BETA-XYLOSIDASE	<i>Prevotella bryantii</i>	92
458	471	ORF4	<i>Streptomyces coelicolor A3(2)</i>	68
460	400	Protochlorophyllide reductase	<i>Avena sativa</i>	98
461	507	putative mitochondrial phosphate carrier protein	<i>Tuber magnatum</i>	91
462	373	Cytochrome C	<i>Thunnus thynnus</i>	76
464	361	aldehyde dehydrogenase	<i>Bacillus halodurans</i>	98
465	414	hypothetical protein	<i>Mycobacterium tuberculosis H37Rv</i>	99
466	352	serine protease	<i>Xylella fastidiosa 9a5c</i>	75
467	325	GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE	<i>Guillardia theta</i>	96
468	249	cytochrome P450	<i>Homo sapiens</i>	91
469	441	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	70
470	423	DNA-binding protein	<i>Bacillus sp</i>	60
471	525	DNA topoisomerase I	<i>Nostoc sp. PCC 7120</i>	44
473	404	luciferin-binding protein	<i>Cryptocodiniu m cohnii</i>	98
474	547	luciferin-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	92
475	183	transforming growth factor-beta	<i>Phocoena phocoena</i>	90
476	328	probable type II secretion system protein	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	64
477	401	ATP citrate lyase	<i>Caenorhabditis elegans</i>	97
478	396	Peridinin-chlorophyll A protein 2	<i>Amphidinium carterae</i>	84

CLONE	Insert size	Putative identification	Organism	Homology (%) (amino acid)
479	322	methionine adenosyltransferase II	<i>Homo sapiens</i>	90
480	442	luciferin-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	92
481	322	serine/threonine protein kinase	<i>Streptomyces coelicolor</i>	72
482	545	(AF258592) PP856	<i>Homo sapiens</i>	86
483	607	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	42
484	576	luciferin-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	90
486	538	S-adenosylmethionine synthetase	<i>Brassica juncea</i>	88
487	560	luciferin-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	96
488	351	geranylgeranyl reductase	<i>Zantedeschia aethiopica</i>	99
489	533	possible rad54-like helicase	<i>Leishmania major</i>	42
490	533	coproporphyrinogen III oxidase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
491	575	zinc finger protein	<i>Homo sapiens</i>	44
492	573	luciferin-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	94
493	530	luciferin-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	99
495	371	pV protein	<i>porcine adenovirus 5</i>	54
496	349	Y116F11B.8.p	<i>Caenorhabditis elegans</i>	66
497	394	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	96
498	553	luciferin-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	96
499	464	beta-galactosidase	<i>Cloning vector pGEM58Znt(-)</i>	71
500	410	Peridinin-chlorophyll A protein 2	<i>Amphidinium carterae</i>	97
502	188	peridinin-chl a protein	<i>Heterocapsa pygmaea</i>	94
503	518	cytosolic ascorbate peroxidase	<i>Mesembryanthe mum crystallinum</i>	57

CLONE	Insert size	Putative identification	Organism	Homology (%) (amino acid)
504	516	TRIOSE PHOSPHATE/PHOSPHATE TRANSLOCATOR	<i>Spinacia oleracea</i>	74
506	509	BRCA1	<i>Alouatta seniculus</i>	47
508	503	fatty acid omega-hydroxylase	<i>Fusarium oxysporum</i>	94
512	472	peridinin-chlorophyll a-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	97
513	529	CASP8 associated protein 2	<i>Homo sapiens</i>	62
514	549	cuticle collagen	<i>Caenorhabditis elegans</i>	63
515	547	hypothetical protein	<i>Aeropyrum pernix</i>	68
519	340	putative protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	62
520	532	fructose-bisphosphate aldolase isoenzyme 1	<i>Dunaliella salina</i>	86
521	565	probable transmembrane protein	<i>Streptomyces coelicolor A3(2)</i>	31
522	512	endoglucanase 45A	<i>Piromyces equi</i>	85
523	462	transcription termination factor	<i>Homo sapiens</i>	99
525	573	probable transketolase	<i>Schizosacchar omyces pombe</i>	93
526	560	microtubule-associated protein	<i>Rattus norvegicus</i>	83
559	479	luciferin-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	94
560	515	RIBOSOMAL PROTEIN L6	<i>Mesembryanthe mum crystallinum</i>	62
561	258	Peridinin-chlorophyll A protein 1	<i>Amphidinium carterae</i>	89
562	271	testis-specific protein kinase 1	<i>Homo sapiens</i>	79
567	268	squamous cell carcinoma antigen recognised	<i>Takifugu rubripe</i>	89
568	446	probable acyl-CoA dehydrogenase	<i>Glomus intraradices</i>	67
572	436	Peridinin-chlorophyll A binding protein	<i>Symbiodinium sp.</i>	99
574	477	ppg3	<i>Leishmania major</i>	69



CLONE	Insert size	Putative identification	Organism	Homology (%) (amino acid)
575	427	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	56
576	325	Pto kinase interactor	<i>Homo sapiens</i>	91
577	516	S-ADENOSYLMETHIONINE SYNTHETASE 1	<i>Hordeum vulgare</i>	96
578	536	lin0433	<i>Listeria innocua</i>	80
580	353	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	76
584	444	Pyruvate Kinase	<i>Bacillus licheniformis</i>	98
586	454	putative phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	99
588	492	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	78
593	555	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	98
596	207	RIKEN cDNA 1110031B11	<i>Mus musculus</i>	93
597	432	probable acyl-CoA dehydrogenase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98
598	531	peridinin-chlorophyll a-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	97
600	535	peridin-chlorophyll a protein	<i>Amphidinium carterae</i>	96
602	455	peridinin-chlorophyll a-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	83
603	519	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	48
604	488	Hedgehog protein	<i>Drosophila hydei</i>	84
605	457	PTH/PTHrP type I receptor	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	47
607	586	hypothetical protein	<i>Leishmania major</i>	40
609	520	cGMP dependent protein kinase type II	<i>Rattus norvegicus</i>	97
610	485	D-mannonate dehydratase	<i>Lactococcus lactis subsp.</i>	67
611	522	peridinin-chlorophyll a-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	64
612	519	hypothetical protein	<i>Mycobacterium tuberculosis H37Rv</i>	91

CLONE	Insert size	Putative identification	Organism	Homology (%) (amino acid)
613	520	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	53
637	509	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	76
638	572	myosin heavy chain	<i>Placopecten magellanicus</i>	89
639	594	CG8163 gene product	<i>Drosophila melanogaster</i>	67
640	586	cheerio	<i>Drosophila melanogaster</i>	54
641	539	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	89
642	505	peridinin-chlorophyll a-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	59
643	482	cyclic nucleotide-regulated ion channel	<i>Arabidopsis thaliana</i>	80
644	579	GMP synthase	<i>Lactococcus lactis subsp.</i>	95
645	57	polyprotein	<i>Rubella virus</i>	59
646	461	ferredoxin protein NapF	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
647	561	unknown protein	<i>Oryza sativa</i>	40
650	546	<i>Oryza sativa</i>	<i>Leishmania major</i>	40
651	527	ECOLIANTICODON NUCLEASE	<i>Escherichia coli</i>	51
653	582	hypothetical protein FLJ13612	<i>Homo sapiens</i>	48
654	410	putative dehydrogenase protein	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	68
655	566	Peridinin-chlorophyll A binding protein, chloroplast precursor	<i>Gonyaulax polyedra</i>	89
656	425	Peridinin-chlorophyll A binding protein	<i>Symbiodinium sp.</i>	96
657	583	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoform 2	<i>Gonyaulax polyedra</i>	93
658	393	luciferin-binding protein	<i>Cryptocodinium m cohnii</i>	82
659	535	luciferin-binding protein - dinoflagellate	<i>Gonyaulax polyedra</i>	95
660	581	keratin associated protein	<i>Homo sapiens</i>	41

CLONE	Insert size	Putative identification	Organism	Homology (%) (amino acid)
661	569	H2A histone family	<i>Homo sapiens</i>	72
662	563	cellobiohydrolase	<i>Neocallimastix patriciarum</i>	42
663	597	atrophin-related protein ARP	<i>Homo sapiens</i>	53
665	236	putative cytochrome p450	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	94
666	537	putative ankyrin-repeat containing protein	<i>Homo sapiens</i>	45
667	544	ferredoxin I	<i>Solanum tuberosum</i>	68
668	502	ABC-type cobalamin/Fe <sup>3+</sup> -siderophores transport systems	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	51
669	575	PHOSPHOGLYCERATE KINASE	<i>Candida maltosa</i>	76
670	510	luciferin-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	97
671	258	ribosomal protein	<i>Homo sapiens</i>	65
672	531	luciferin-binding protein	<i>Cryptocodinium cohnii</i>	89
674	418	14-3-3 protein homologue	<i>Toxoplasma gondii</i>	99
675	532	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	62
676	590	Isocitrate lyase	<i>Dendrobium crumenatum</i>	85
678	385	calcium-dependent protein kinase	<i>Oryza sativa</i>	95
679	579	proline-rich mucin homolog	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	73
680	592	7acomp protein	<i>Rattus sp.</i>	55
682	544	F22G5.33	<i>Arabidopsis thaliana</i>	69
683	540	translation elongation factor	<i>Methanopyrus kandleri AV19</i>	96
684	566	ferredoxin I	<i>Solanum tuberosum</i>	68
685	525	putative phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	83
686	565	PUTATIVE TRANSCRIPTION REGULATOR PROTEIN	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	53

CLONE	Insert size	Putative identification	Organism	Homology (%) (amino acid)
687	528	Peridinin–chlorophyll A protein	<i>Amphidinium carterae</i>	87
688	565	peridin–chlorophyll a protein	<i>Amphidinium carterae</i>	86
689	550	cathepsin E	<i>Homo sapiens</i>	82
690	578	hypothetical protein	<i>Escherichia coli O157</i>	77
692	534	PHB depolymerase	<i>Leptothrix sp. HS</i>	81
693	599	RIKEN cDNA 2300006N05	<i>Mus musculus</i>	95
694	427	hypothetical protein	<i>Plasmodium falciparum</i>	59
695	504	peridinin–chlorophyll a–binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	61
696	319	inhibin alpha subunit precursor	<i>Sus scrofa</i>	84
697	508	putative cuticular collagen	<i>Globodera pallida</i>	54
698	551	peridin–chlorophyll a protein	<i>Amphidinium carterae</i>	82
699	545	cytoplasmic intermediate filament protein	<i>Ascaris lumbricoides</i>	76
700	592	hypothetical protein	<i>Oryza sativa</i>	86
701	495	Ezy2	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	46
702	414	hypothetical protein	<i>Mycobacterium tuberculosis H37Rv</i>	86
703	564	heat shock protein 90	<i>Arabidopsis thaliana</i>	96
704	445	MIP–related peptide	<i>Aplysia californica</i>	78
705	481	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	41
706	495	2,4–dienoyl CoA reductase <sub>1</sub>	<i>Homo sapiens</i>	61
707	487	luciferin–binding protein	<i>Cryptocodinium cohnii</i>	95
708	505	hypothetical protein	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	78
709	230	dihydrolipoamide acetyltransferase	<i>Streptomyces seoulensis</i>	95

CLONE	Insert size	Putative identification	Organism	Homology (%) (amino acid)
710	512	Protein farnesyltransferase beta subunit	<i>Rattus norvegicus</i>	97
711	452	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	34
712	551	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	81
713	485	tenascin XB	<i>Mus musculus</i>	66
714	549	hypothetical protein	<i>Oryza sativa</i>	93
715	551	Peridinin-chlorophyll A binding protein	<i>Symbiodinium sp.</i>	94
717	581	phosphoglycerate kinase	<i>Dictyostellium discoideum</i>	59
718	403	hypothetical protein	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	71
719	547	GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	69
720	573	Lathosterol oxidase	<i>Mus musculus</i>	66
721	550	peridinin-chlorophyll a-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	91
723	552	peridinin-chlorophyll a-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	67
725	544	hypothetical protein	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	55
727	519	peridinin-chlorophyll a-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	61
728	565	peridinin-chlorophyll a-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	66
729	571	periplasmic protein	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	69
781	555	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	43
782	409	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	80
783	553	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	46
784	601	protein tyrosine kinase	<i>Ephydatia fluviatilis</i>	46
785	508	hypothetical protein	<i>Caulobacter crescentus CB15</i>	90
787	324	C2H2-type zinc finger protein-like	<i>Arabidopsis thaliana</i>	62

CLONE	Insert size	Putative identification	Organism	Homology (%) (amino acid)
788	525	DEATH ASSOCIATED PROTEIN	<i>Mus musculus</i>	28
789	496	Tenascin precursor	<i>Sus scrofa</i>	64
790	610	pr5	<i>rat cytomegalovirus Maastricht</i>	65
793	350	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	72
795	570	probable protein kinase TCTR2	<i>Lycopersicon esculentum</i>	74
799	584	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	71
800	553	SyrP-like protein	<i>Streptomyces avermitilis</i>	59
801	582	alpha-tubulin	<i>Paramecium tetraurelia</i>	97
802	490	SMALL NEUTRAL PROTEASE REGULATORY PROTEIN	<i>Streptomyces lividans</i>	50
803	537	ANKYRIN 1	<i>Dictyostelium discoideum</i>	54
804	577	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	52
805	459	hemK protein	<i>Haemophilus influenzae Rd</i>	41
806	592	similar to formate dehydrogenase	<i>Mesorhizobium loti</i>	44
807	353	terW	<i>Plasmid R478</i>	56
808	427	peridinin-chlorophyll a-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	54
810	582	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	59
811	550	putative cytochrome P450	<i>Arabidopsis thaliana</i>	92
813	610	isocitrate dehydrogenase	<i>NADP</i>	99
815	574	peridinin-chlorophyll a-binding protein	<i>Gonyaulax polyedra</i>	77
819	551	mucus-like protein	<i>Geodia cydonium</i>	36
820	563	hypothetical protein	<i>Lymphocystis disease virus 1</i>	57
821	506	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Gonyaulax polyedra</i>	97

CLONE	Insert size	Putative identification	Organism	Homology (%) (amino acid)
822	281	aspartate carbamoyltransferase	<i>Thermotoga maritima</i>	91
824	562	NADH dehydrogenase I	<i>Caulobacter crescentus CB15</i>	42
826	518	Tcc1j12.1	<i>Trypanosoma cruzi</i>	77
827	549	hypothetical protein	<i>Homo sapiens</i>	60

## Appendix B

### Sequence alignments of SSU rDNA region of dinoflagellates

Kbrevis TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCNTT-ACATG  
Kmicrum TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Ppod28S TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTTATTA AACAGTTATAGTTTA-TTT GGTGGTCATTTCATT-ACATG  
Gimpudicu TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GGTGGTCATTTCATT-ACATG  
Gfuscum TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GGTGGTCATTTCCT-ACATG  
Lviride TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GGTGGTCATTTCATT-ACATG  
Gcad04S TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GGTGGTCATTTCAGT-ACATG  
Cpod10S TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCGCTTCCT-ACATG  
PmiPrMu21 TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Pmicans TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Ptyrrheni TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Hrotundat TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Htrd61S TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Sweeneya TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Strd26S TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Ganguine TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Gsakor11 TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Asad51S TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Gbeii TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Smicroadr TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Guncatenu TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Gdorsum TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Gind17S TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Plima TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Pconcaum TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Afundyens TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Aca67S TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Atad66S TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Aaffine TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
AspAxp03 TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Afrd34S TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Atamiyava TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Amargalef TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Apseudogo TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Pbahamens TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Lpod18S TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Lpolyedru TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Pred20S TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Preticula TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG  
Nscintill TTAAGCCATGCATGTCTCAG TATAAGCTT-CTACACGGCG AAACCTGCGAATGGCTCATTAA AACAGTTATAGTTTA-TTT GATGGTCATTTCATT-ACATG

Kbrevis GATAACTTTGGAAATTTCTAG AGCTAATACATGCGCC-CAA ACCCGACTT-CITGGAAGGG TTGTGTTTATTAGATACAGA ACCAACCCAGGCCCTCGCCTG  
Kmicrum GATAACTGTGGTAATTTCTAG AGCTAATACATGCGCC-CAA ACCCGACTT-CITGGAAGGG TTGTGTTTATTAGATACAGA ACCAACCCAGGGTTCGCCCTG  
Ppod28S GATAACCATGGTAATTTCTAG AGCTAATACATGCGAC-CAA ACCCAACTT-CITGGAAGGG TTGTGTTTATTAGATACAGA ACCAACCCAGGGTTCGCCCTG



Gimpudicu GATAACCATGGTAATTCTAG AGCTAATACATGCGCC-CAG ACCCAACTT-CGTGGAAGGG TTGTGTTTATTAGGTACAGA ACCAACCAGGCTCTGCCTG  
Gfuscum GATAACCGTGGTAATTCTAG AGCTAATACATGCGCC-CAT ACCCAACTT-CTTGGGAAGGG TTGTGTTTATTAGGTACAGA ACCAACCAGGCTCTGCCTG  
Lviriide GATAACCATGGTAATTCTAG AGCTAATACATGCATC-CAG ACCCAACTT-CGTGGAAGGG TTGTGTTTATTAGGTACAGA ACCAACCAGGCTCTGCCTG  
Gcad04S GATAACCATGGTAATTCTAG AGCTAATACATGCGCC-CAG ACCCAACTT-TGTGGAAGGG TTGTGTTTATTAGGTACAGA ACCAACCAGGCTCTGCCTG  
Cpod10S GATAACCGTGGTAATTCTAG AGCTAATACATGCGCC-CAG ACCCGACTT-CGAGGAAGGG TTGCGTTTATTAGATACAGA ACCAACACAGGCTCTGCCTG  
PmiPrMu21 GATAACTGTGCTAATTGTAG AGCTAATACATGCGCC-CAA ACCCGACTT-ATAGGAAGGG TTGTGTTTATTAGTTACAGA ACCAGCCAGGCTCCGCCTG  
Pmicans GATAACTGTGCTAATTGTAG AGCTAATACATGCGCC-CAA ACCCGACTT-CGAGGAAGGG TTGTGTTTATTAGTTACAGA ACCAACCAGGCTCTGC-TG  
Ptyrrheni GATAACCGTGGTAATTCTAG AGCTAATACATGCGCC-CAA ACCCGACTT-CGTGGAAGGG TTGTGTTTATTAGNTACAGA ACCAACCAGGCTCTGCCTG  
Hrotundat GATAACCGTGGTAATTCTAG AGCTAATACATGCGCC-AAA ACCCGACTT-CTTGGGAAGGG TTGTGTTTATTAGTTACAAA ACCAACCAGGCTCCGCCTG  
Htrd61S GATAACCGTGGTAATTCTAG AGCTAATACATGCGCC-AAA ACCCGACTT-CTTGGGAAGGG TTGTGTTTATTAGTTACAAA ACCAACCAGGCTCCGCCTG  
Sweeneya GATAACTGTGCTAATTCTAG AGCTAATACATGCGCC-CAA ACCCGACTT-CGTGGAAGGG TTGTGTTTATTAGTTACAGA ACCAACCAGGCTCTGCCTG  
Strd26S GATAACTGTGCTAATTCTAG AGCTAATACATGCGCC-CAA ACCCGACTT-CGTGGAAGGG TTGTGTTTATTAGTTACAGA ACCAACCAGGCTCTGCCTG  
Gsanguine GATAACTGTGCTAATTCTAG AGCTAATACATGCGCC-CTA ACCCGACTT-CGTAGAAGGG TTGTGCTTATTAGACACAGA ACCAACCAGGCTCTGCCTG  
Gsakor11 GATAACTGTGCTAATTCTAG AGCTAATACATGCGCC-CGA ACCCGACTT-CGCAGAAGGG TTGTGCTTATTAGACACAGA ACCAACCAGGCTCTGCCTG  
Asad51S GATAACTGTGCTAATTCTAG AGCTAATACATGCGCC-CTA ACCCGACTT-CGCAGAAGGG TTGTGCTTATTAGACACAGA ACCAACCAGGCTCTGCCTG  
Gbei GATAACTGTGCTAATTCTAG AGCTAATACATGCACC-AAA ACCCAACTT-CGCAGAAGGG TTGTGTTTATTAGATACAGA ACCAACCAGGTT-CGCCTG  
Smicroadr GATAACTGTGCTAATTCTAG AGCTAATACATGCACC-AAA ACCCAACTT-CGCAGAAGGG TTGTATTATTAGATACAGA ACCAACCAGGCTCCGCCTG  
Guncatenu GATAACTGTGCTAATTCTAG AGCTAATACATGCACA-AAT TCCCAACTT-CGCGGAAGGG ATGTGTTTATTAGATACAGA ACCAACACAGGCTCTGCCTG  
Gdorsum GATAACTGTGCTAATTCTAG AGCTAATACATGCACA-AAT TCCCAACTT-CGCGGAAGGG ATGTGTTTATTAGATACAGA ACCAACACAGGCTCTGCCTG  
Gind17S GATAACTGTGCTAATTCTAG AGCTAATACATGCACA-AAT TCCCAACTT-CGCGGAAGGG ATGTGTTTATTAGATACAGA ACCAACACAGGCTCTGCCTG  
Plima GATACCCGTGGAATGCTAG AGCTAATACATGCGCT-CCT ACCCAACTT-AACAGAAGGG TTGTGTTTATTAGTTACAGA ACTAGCCAGGCT-TGCCTG  
Pconcauum GATAACCGTGGTAATTCTAG AGCTAATACATGCGCT-CTG ACCCAACTT-CATGGAAGGG TTGTGTTTATTAGTTACAGA ACCAACCAGGCT-GGCCTG  
Afundyens GATATCTGTGNAATTCTAT AGTTAATACATGCACT-AAA ACTTATCTT-TGGGAAAGG TTGTGGTCGTTAGTTACAGA ACCAATTCAAGCTATGCTTG  
Acad67S GATATCTGTGNAATTCTAT AGTTAATACATGCACTGAAA ACCTATCTT-TGGGAAAGG TTGTGGTCGTTGGTTGCAGA ACCAATTCAAGCATTGCTTG  
Atad66S GATATCTGTGNAATTCTAT AGTTAATACATGCACT-AAA ACTTATCTT-TGGGAAAGG TTGTGGTCGTTAGTTACAGA ACCAATTCAAGCTATGCTTG  
Aaffine GATATCTGTGNAATTCTAT AGCTAATACATGCAAC-TAA ACCTAACTT-TGTGGAAGG TTGTGGTCATTACITACAGA ACCAACTCAGGCTCAGCTTG  
AspAxp03 GATATCTGTGNAATTCTAT AGCTAATACATGCAAC-TAA ACCTAACTT-TGTGGAAGG TTGTGGTCATTAGTTACAGA ACCAACTCAGGCTCAGCTTG  
Afrd34S GATATTTGTGGAATTTCTGT AATTAATACATGTGTC-AAC ACCTGACTT-TGGGAAAGG TCGTGGTCGTTAGTTATAGA ACCACTTCAAGCACTGCTTG  
Atamiyava GATATTTGTGGAATTTCTAT AATTAATACATGCATC-AAC ACCTGACTT-TGGGAAAGG TTGTGGTCGTTAGTTATAGA ACCAACTCAAGCATTGCTTG  
Amargalef GATAACTTTGTAATTCTAC AGCTAATGCATGCAAC-CAA GCCNGACTT-TGCGGAAGG CTGAAGTCATTAGTTACAGA ACCAACCAGGCTCTGCTTG  
Apeudogo GATAACTGTGCTAATCCTAT AGCTAATACATGCACT-CAA ACCTGACTT-TGTGGAAGG TTGTGGTCATTAGTTGCAGA ACCAACCAGGCTCTGCTTG  
Pbahamens GATAACTGTGCTAATTCTAT AGCTAATACATGCTTA-CCA ACCCAACTT-CATGGAAGGG TTGTGGTTATTAGTTACAGA ACCAACCAGGCTTTGCTTG  
Lpod18S GATACTGTGCTAATTCTAG GGCTAATACATGCGTC-TAC ACCTGACTT-AGTGGGAAGG TTGTGCTTATTAGATTCAA ACCGATACAAGTTTGTCTTG  
Lpolyedru GATACTGTGCTAATTCTAG AGCTAATACATGCCA-CAC ACCTGACTT-AGTGGGAAGG TTGTGCTTATTAGATTCAA ACCAATACAAGCTTCGCTTG  
Pred20S GATAACTGTGCTAATTCTAG AGCTAATACATGCTTC-TTG GCCCGACTTTCGCGGAAGGG CTGTTTTTATTAGTTACAAA ACTAACCTAGACTCTGTCTA  
Preticula GATAACTGTGCTAATTCTAG AGCTAATACATGCTTC-TTG GCCCGACTTTCGCGGAAGGG CTGTTTTTATTAGTTACAAA ACTAACCTAGACTCTGTCTA  
Nscintill GATACCTTTGGTAATTCTAG AGCTAATACATGCATA-CAG ACCCGACTT-CAT-GAAGGG TTGTGTTTATTAGATTCCAA ACC-TTCCAACCTTCGGTTG

Kbrevis GTCTTTGTG-GTGATTCATAA TAACC-GAACGAATCGCATT GCATCAGCTGGCGATAGATC ATTCAAGTTTCTGACCTATC AGTTTCCGACGGTAGGGTAT  
Kmicrum GTATTTGTG-GTGATTCATAG TAACC-GAACGAATCGCATA GCTTCCGCTGGCGATAAATC ATTCAAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Ppod28S GTCTTTTG-GTGATTCATGG TAACC-GAACGAATCGCATA GCAACCGCTGGCGATGAACC ATTCAAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Gimpudicu GTCTTTTG-GTGATTCATAA TAACC-GAACGAATCGCATG GCCTCGCTAGCGATGGACT ATTCAAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Gfuscum GTCTTCTG-GTGATTCATGA TAACC-GAACGAATCGCATG GCATCCGCTGGCGATGTATC ATTCAAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Lviriide GTCTTCTG-GTGATTCATGA TAACC-GAACGAATCGCATG GCATCAGCTGGCGATGAATC ATTCAAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Gcad04S GTCTTTTG-GTGATTCATGA TAACC-GAACGAATCGCATG GCATCAGCTGGCGATGAATC ATTCAAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Cpod10S GCTTTGTTG-ATGATTCATAA TAACC-GATCGAATCGCATG GCATCCGCGCGATGACTC ATTCAAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGATAT  
PmiPrMu21 GTCTTTTG-GTGATTCATAA TAACC-GAACGAATCGCATA GCTTC-GCTGGCGATGAATC ATTCAAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Pmicans TCTTTGTTG-GTGATTCATAA TAACC-GAAGCAATCGCATG GCATCCGCTGGCGATGAATC ATTCAAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Ptyrrheni GTCTTTGTG-GTGATTCATAA TAACC-AAACGAATCGCATG GCATCAGCTGGCGATGAATC ATTCAAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Hrotundat GTCTTTGTG-GTGATTCATAA TAACC-GAACGAATCGCATG GCTCT-GCCGGCGATGAATC ATTCAAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Htrd61S GTCTTCTG-GTGATTCATAA TAACC-GAACGAATCGCATG GCATCCGCTGGCGATGAATC ATTCAAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Sweeneya GTCTTTGTG-GTGATTCATAA TAACC-GAATGAATCGCATT GCATCAGCTGGCGATGAATC ATTCAAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT

Strd26S GTCTTGTG-GTGATTCATAA TAACC-GAATGAATCGCATT GCATCAGCTGGCGATGAATC ATTCAAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGTAT  
Gsanguine GTCTTGTG-GTGAGTCATAA TAACT-GAACGAATCGCAT- GCATC-GCCGGCGATAAAATC ATTCAAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Gsakor11 GTCTTGTG-GTGAGTCATAA TAACT-GTACGAATCGCATG GCATC-GCCGGCGATAAAATC ATTCAAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Asad51S GTCTTGTG-GTGAGTCATAA TAACT-GTACGAATCGCATG GCATC-GCCGGCGATAGATC ATTCAAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Gbei GTTTTGTG-GTGACTCATAA TAACT-CGATGAATCGTGTA GCTTT-GCTGACGATGCATC ATTCAAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Smicroadr GT-TGTG-GTGATTCATGA TAACT-CGATGAATCGTG GCTTG-GCCGACGATGCATC TTTCAAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Guncatenu TTCTCATG-GTGACTCATAG TAACC-GAACGAATCGCATG GCATCTGCTGGCGATGAATC ATCCGAGCTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Gdorsum TTCTCATG-GTGACTCATAG TAACC-GAACGAATCGCATG GCATCTGCTGGCGATGAATC ATCCGAGCTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Gind17S TTCTCATG-GTGACTCATAG TAACC-GAACGAATCGCATG GCATCTGCTGGCGATGAATC ATCCGAGCTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Plima GTTACTCG-GTGACTCATGA TAATG-GAATTAGTCTGATG GCGTCTGCTGACGATAAACC ATTCAAGCTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Pconcauum GTCAATTG-GTGATTCATAA TAAGT-CAACGAATTGCGTA GCACCTGCTGGCGATGAATC ATTCAAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Afundyens GACACTTGAATGATTCACAA TGAC-AAATGAATTACATG GCAACAGCTGGTGATAATTC ATTCCAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Aca67S TATATTTGATTGAATCGCAA TGACA-AAATGAATTACATG GCAACAGCTGGTAATAATTC ATGCCAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Atad66S NACACTTGNATGATTCACAA TGAC-AAATGAANTGCATG GCAACAGCTGGTGATAATTC ATTCCNGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Aaffine AAGAATTGAATGATTCACAA TGACA-GAATGTATTACATG GCAACAGCTGGTAATAGTTC ATTCCAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
AspAxp03 AAGAATTGAATGATTCACAA TGACA-GAATGTATTACATG GCAACAGCTGGTAATAGTTC ATTCCAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Afrd34S ATTGTTTGTATGAATCACAA TGACG-GAATGAATTGCATG GCAGTGTCTGGAATCATGC ATTCCAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGATGGTAAGGTAT  
Atamiyava AATATTTGAATGATTCACAA TGACA-TAATGAATTACATG GCAACTGCTGGTAATAATTC ATTCCAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Amargalef GAATTTTG-GTGATTCACAT TGACT-GAATGAATTACATG GCATCTGCTGGTAATATATC ATTTCCAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Apseudogo GTATTTTG-GTGATTCACAT TGGCT-GAATGAATTACATG GCAATGCTGGTAATGCATC ATTTCCAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Pbahamens GTCTTTCG-GTGATTCATGA TGACT-GAATGAATTGCATG GCATT-GCTGGCGATATATC ATTCAAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Lpod18S CT-TTTTG-GTGATATATAG TGGCT-GCATGAATTGCATG GCGCCAGCTGGCTATGCGGC CTTTAAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGATGGTAGGGTAT  
Lpolyedru CTCCTTTG-GTGATACATAG TGCTT-GCATGAATTGCATG GCGCCAGCTGGCTATGCGC TTTTAAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGATGGTAGGGTAT  
Pred20S GTCTTTTG-GTGATTCATGA TGTTT-GGATGGATTGCATG GCAGCAGCTGGTGACACATC ATTCAAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Preticula GTCTTTTG-GTGATTCATGA TGTTT-GGATGGATTGCATG GCAGCAGCTGGTGACACATC ATTCAAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGACGGTAGGGTAT  
Nscintill TGTTCTTG-GTGATTCATGA TAA-AACTACTGATC-G CCTT-TGGCGACGAGTC TTTCAAGTTTCTGACCTATC AGCTTCCGATGGTAGGGTAT

Kbrevis TGGCCTACCGTGGCAATGAC GGGTAACGGAGAATTAGGGT TCGATTCCGAGAGGGAGCC TGAGAAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
Kmicrum TGGCCTACCGTGGCAATGAC GGGTAACGGAGAATTAGGGT TCGATTCCGAGAGGGAGCC TGAGAAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
Ppod28S TGGCCTACCGTGGCAATGAC GGGTAACGGAGAATTAGGGT TCGATTCCGAGAGGGAGCC TGAGAAAACGGCTACCAGATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
Gimpudicu TGGCCTACCGTGGCAATGAC GGGTAACGAGAGAATTAGGGT TCGATTCCGAGAGGGAGCC TGAGAAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
Gfuscum TGGCCTACCGTGGCAATGAC GGGTAACGGAGAATTAGGGT TCGATTCCGAGAGGGAGCC TGAGAGATGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
Lviride TGGCCTACCGTGGCAATGAC GGGTAACGGAGAATTAGGGT TCGATTCCGAGAGGGAGCC TGAGAAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
Gcad04S TGGCCTACCGTGGCAATGAC GGGTAACGGAGAATTAGGGT TCGATTCCGAGAGGGAGCC TGAGAAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
Cpod10S GGGCTTACCGTGGCAATGAC GGGTAACGGAGAATTAGGGT TCGATTCCGAGAGGGAGCC TGAGAAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
PmiPrMu21 TGGCCTACCGTGGCAATGAC GGGTAACGGAGAATTAGGGT TCGATTCCGAGAGGGAGCC TGAGAAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
Pmicans TGGCCTACCGTGGCAATGAC GGGTAACGGAGAATTAGGGT TCGATTCCGAGAGGGAGCC TGAGAAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
Ptyrrheni TGGCCTACCGTGGCAATGAC GGGTAACGGAGAATTAGGGT TCGATTCCGAGAGGGAGCC TGAGAAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
Hrotundat TGGCCTACCGTGGCAATGAC GGGTAACGGAGAATTAGGGT TCGATTCCGAGAGGGAGCC TGAGAAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
Htrd61S TGGCCTACCGTGGCAATGAC GGGTAACGGAGAATTAGGGT TCGATTCCGAGAGGGAGCC TGAGAAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
Sweeneya TGGCCTACCGTGGCAATGAC GGGTAACGGAGAATTAGGGT TCGATTCCGAGAGGGAGCC TGAGAAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
Strd26S TGGACTACCGTGGCAATGAC GGGTAACGGAGAATTAGGGT TCGATTCCGAGAGGGAGCC TGAGAAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
Gsanguine TGGCCTACCGTGGCAATGAC GGGTAACGGAGAATTAGGGT TCGATTCCGAGAGGGAGCC TGAGAAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
Gsakor11 TGGCCTACCGTGGCAATGAC GGGTAACGGAGAATTAGGGT TCGATTCCGAGAGGGAGCC TGAGAAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
Asad51S TGGCCTACCGTGGCAATGAC GGGTAACGGAGAATTAGGGT TCGATTCCGAGAGGGAGCC TGAGAAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
Gbei TGGCCTACCGTGGCAATGAC GGGTAACGGAGAATTAGGGT TCGATTCCGAGAGGGAGCC TGAGAAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
Smicroadr GGGCCTACCGTGGCAATGAC GGGTAACGGAGAATTAGGGT TCGATTCCGAGAGGGAGCC TGAGAAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
Guncatenu TGGCCTACCGTGGCAATGAC GGGTAACGGAGAATTAGGGT TCGATTCCGAGAGGGAGCC TGAGAAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
Gdorsum TGGCCTACCGTGGCAATGAC GGGTAACGGAGAATTAGGGT TCGATTCCGAGAGGGAGCC TGAGAAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
Gind17S TGGCCTACCGTGGCAATGAC GGGTAACGGAGAATTAGGGT TCGATTCCGAGAGGGAGCC TGAGAAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
Plima TGGCCTACCGCGGCTTTGAC GGGTAACGGAGAATTAGGGT TCGATTCCGAGAGGGAGCC TGAGAAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
Pconcauum TGGCCTACCGTGGCTTTGAC GGGTAACGGAGAATTAGGGT TCGATTCCGAGAGGGAGCC TGAGAAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG

Afundyens TGGCTTACCGTGGCAATGAC AGGTGACGGAGGATTAGGGT TTGATTCCGGAGAGGGAGCT TGAGAAATGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
 Acad67S TGGCTTACCGTGGCAATGAC AGGTGACGGAGGATTAGGGT TTGATTCCGGAGAGGGAGCT TGAGAAATGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
 Atad66S TGGCTTACCGTGGCAATGAC AGGTGACGGAGGATTAGGGT TTGATTCCGGAGAGGGAGCT TGANAAATGGCNACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
 Aaffine TGGCTTACCGTGGCAATGAC AGGTGACGGAGGATTAGGGT TTGATTCCGGAGAGGGAGCT TGAGAAATGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
 AspAxsp03 TGGCTTACCGTGGCAATGAC AGGTGACGGAGGATTAGGGT TTGATTCCGGAGAGGGAGCT TGAGAAATGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
 Afrd34S TGGCTTACCGTGGCAATGAC AGGTGACGGAGGATTAGGGT TTGATTCCGGAGAGGGAGCT TGAGAAATGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
 Atamiyava TGGCTTACCGTGGCAATGAC AGGTGACGGAGGATTAGGGT TTGATTCCGGAGAGGGAGCT TGAGAAATGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
 Amargalef TGGCTTACCGTGGCAATGAC GGGTACGGAGGATTAGGGT TTGATTCCGGAGAGGGAGCT TGAGAAATGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
 Apseudogo TGGCTTACTGTGTTTTGAC GGGTAACGGAGGATTAGGGT TTGATTCCGGAGAGGGAGCT TGACAAATGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
 Pbahamens TGGCTTACCGTGGCAATGAC GGGTAACGGAGGATTAGGGT TTGATTCCGGAGAGGGAGCC TGAGAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
 Lpod18S TGGCTTACTATGGCAATGAC GGGTAACGGAGAAATAGGGT TCGATTCCGGAGAGGGAGCC TGAGAAATGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
 Lpolyedru TGGCTTACTATGGCAATGAC GGGTAACGGAGAAATAGGGT TCGATTCCGGAGAGGGAGCC TGAGAAATGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
 Pred20S TGGCATACCGTGGCAATGAC GGGTAACGGAGAAATAGGGT TCGATTCCGGAGAGGGAGCC TGAGAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
 Preticula TGGCATACCGTGGCAATGAC GGGTAACGGAGAAATAGGGT TCGATTCCGGAGAGGGAGCC TGAGAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
 Nscintill TGGCTTACCATGGCAGTAC GGGTAACAGAGAATAGGGT TCGATTCTGGAGAGGGAGCC TGAGAAACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCG  
  
 Kbrevis CAAATTACCCAATCCTGACA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAG TAGAATTTAAATCCCTTTTC  
 Kmicrum CAAATTACCCAATCCTGACA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAG TAGAATTTAAATCCCTTTTC  
 Ppod28S CAAATTACCCAATCCTGACA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAA TAGAATTTAAATCCCTTTAT  
 Gimpudicu CAAATTACCCAATCCTGACA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAA TAGAATTTAAANCCCTTTAT  
 Gfuscum CAAATTACCCAATCCTGACA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAG TAGAATTTAAATCCCTTTAT  
 Lviride CAAATTACCCAATCCTGACA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAA TAGAATTTAAATCCCTTTAT  
 Gcad04S CAAATTACCCAATCCTGACA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAA TAGAATTTAAATCCCTTTAT  
 Cpod10S CAAATTACCCAATCCTGACA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAG TAGAATTTAAATCCCTTTAC  
 PmiPrMu21 CAAATTACCCAATCCTGACA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATAAT TGTCTTGAATTGGAATGAG TAGAATTTAAATCCCTTTAC  
 Pmicans CAAATTACCCAATCCTGACA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATATC TGTCTTGAATTGGAATGAG TAGAATTTAAATCCCTTTAC  
 Ppyrheni CAAATTACCCAATCCTGACA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAG TAGAATTTAAATCCCTTTAC  
 Hrotundat CAAATTACCCAATCCTGACA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAG TAGAATTTAAATCCCTTTAC  
 Htrd61S CAAATTACCCAATCCTGACA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAG TAGAATTTAAATCCCTTTAC  
 Ssweeneya CAAATTACCCAATCCTGACA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAG TAGAATTTAAATCCCTTTAT  
 Strd26S CAAATTACCCAATCCTGACA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAG TAGAATTTAAATCCCTTTAT  
 Gsanguine CAAATTACCCAATCC-GACA CGGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAG TAGAATTTAAATCCCTTTAC  
 Gsakor11 CAAATTACCCAATCCCGACA CGGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAG TAGAATTTAAATCCCTTTAC  
 Asad51S CAAATTACCCAATCCCGACA CGGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAG TAGAATTTAAATCCCTTTAC  
 Gbeii CAAATTACCCAATCCTGACA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAG TAGAATTTAAATCCCTTTAT  
 Smicroadr CAAATTACCCAATCCTGACA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAG TAGAATTTAAATCCCTTTAT  
 Guncatenu CAAATTACCCAATCCTGACA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAG TAGACTTTAAATCACITTTGC  
 Gdorsum CAAATTACCCAATCCTGACA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAG TAGACTTTAAATCACITTTGC  
 Gind17S CAAATTACCCAATCCTGACA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAG TAGACTTTAAATCACITTTGC  
 Plima CAAATTACCCAATCCTGACA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAG TAGAACTTTAAATCTCTTTGT  
 Pconcaum CAAATTACCCAATCCTGACA TAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCTT TGTCTTGAATTGGAATGAG TAGAACTTTAAATCCCTTTGC  
 Afundyens CAAATTACCCAATCCTGGCA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAAGGCATCCA TGTCTTGTACTTGAATGAA TGGATTTTAAACCTTTCTAT  
 Acad67S CAAATTACCCAATCCTGGCA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAAGGCATCCA TGTCTTGTACTTGAATGAT TGGACATCAAACCTTTCTAT  
 Atad66S CAAATTACCCAATCCTGGCA CAGGGAGGTANTGACAAGAA ATAACAATACAAGGCATCCA TGTCTTGTACTTGAATGAA TGGATTTTAAACCTTTCTAT  
 Aaffine CAAATTACCCAATCCTAGCA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAAGGCATCCA TGTCTTGTACTTGAATGAA TGGATATTAAACCTTTCTAT  
 AspAxsp03 CAAATTACCCAATCCTAGCA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAAGGCATCCA TGTCTTGTACTTGAATGAA TGGATATTAAACCTTTCTAT  
 Afrd34S CAAATTACCCAATCCTGGCA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAAGGCATCCA TGTCTTGTACTTGAATGAA TGGATACTAAACCTTTCTGT  
 Atamiyava CAAATTACCCAATCCTGGCA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAAGGCATCCA TGTCTTGTACTTGAATGAA TGGATATTAAACCTTTCTAT  
 Amargalef CAAATTACCCAATCCTGACA CATGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAAGGCATCCA TGTCTTGTACTTGAATGAA TGGATATTAAACCTTTCTAT  
 Apseudogo CAAATTACCCAATCCTGACA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAAGGCATCCA TGTCTTGTACTTGAATGAA TAGATTCTAAACCTTTCTAT  
 Pbahamens CAAATTACCCAATCCTGACA CTGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAAGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAA TGGAAATTTAAACCTTTTGT  
 Lpod18S CAAATTACCCAATCCTGACA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAAGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAG TATATCATAAACATCTTTAT

Lpolyedru CAAATTACCAATCTTGACA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAA TATATCATAAACTCTTTAT  
Pred20S CAAATTACCAATCTTGACA CAAGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAA TAGAATTCAAACCCCTTTTGT  
Preticula CAAATTACCAATCTTGACA CAAGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAA TAGAATTCAAACCCCTTTTGT  
Nscintill TAAATTACCAATCTTGACA CAGGGAGGTAGTGACAAGAA ATAACAATACAGGGCATCCA TGTCTTGAATTGGAATGAG TAAAAATTAATCTCTCTAC

Kbrevis GAGTATCAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Kmicrum GAGTATCAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Ppod28S GAGTATCGAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Gimpudicu GAGTATCGAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Gfuscum GAGTATCGAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Lviride GAGTATCGAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Gcad04S GAGTATCAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Cpod10S GAGTATCGAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
PmiPrMu21 GAGTATCAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Pmicans GAGTATCAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Ptyrheni GAGTATCGAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Hrotundat GAGTATCGAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Htrd61S GAGTATCGAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Ssweeneya GAGTATCGAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Strd26S GAGTATCGAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Gsanguine GAGTATCGAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Gskor11 GAGTATCGAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Asad51S GAGTATCGAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Gbeii GAGTATCAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Smicroadr GAGTATCAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Guncatemu AAGTATCGAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Gdorsum AAGTATCGAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Gind17S AAGTATCGAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Plima GAGTATCAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC ATATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTCGGA  
Pconcaum GAGTATCAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTCGGA  
Afundyens AAGTATCAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Acad67S AAGTATCAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Atad66S ANGTATCAATTGGAGGGCAA GINTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCANTAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Aaffine AAGTATCAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Aasp03 AAGTATCAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Afrd34S AAGTATCAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTCGGA  
Atamiyava AAGTATCAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTCGGA  
Amargalef GAGTATCAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Apseudogo TAGTATCAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Pbahamens AAGTATCGAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Lpod18S GAGTATCGAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Lpolyedru GAGTATCGAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Pred20S TAGTATCGAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Preticula TAGTATCGAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA  
Nscintill GAGTATCAATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCG GTAATTCAGCTCCAATAGC GTATATTAAGTTGTTGCGG TAAAAAGCTCGTAGTTGGA

Kbrevis TTCTGCGGAGGACGACCGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGTA TCTGGCTCGGCTTGGGCATC TTCTTGAGAACGTA-GCTG -CACTTGACTGTGTGGTGGC  
Kmicrum TTCTGCGGAGGACGACCGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGTA TCTGGCTCGGCTTGGGCATC TTCTTGAGAACGTA-TCTG -CACTTGACTGTGTGGTGGC  
Ppod28S TTCTGCTGAGGACGATCGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGTA TCTGGCTCGGCTTGGGCATC TTCTTGAGAACGTA-ACTG -CACTTGACTGTGTGGTGGC  
Gimpudicu TTCTGTTGGGACGACTGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGTA TCTAGCGCGCCCTGGCTTC TTCTTGAGAACGTT-GCTG -CACTTGACTGTGTGGTGGC  
Gfuscum TTCTGCTGAGGACGATCGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGTA TCTGACTCGGCTTGGGCATC TTCTTGAGAACGTT-ACTG -CACTTGATTGTGTGGTGGC  
Lviride TTCTGCTGAGGACGACCGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGTA TCTGGTTCGGCTTGGGCATC TTCTTGAGAACGTA-GCTG -CACTTGACTGTGTGGTGGC

Gcad04S TTTCTGTTGAGGACGATCGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGTA TCTGGTTCCGCTTGGCATC TTCTTGAGAACGTA-TCTG -CACTTGACTGTGTGGCGG  
Cpod10S TTTCTGCCGAGGACAACCGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGCA TCTGGTTTGGCTTGGCATC TTCTTGAGAACGCA-GCTG -CACTTGACTGTGTGGTGG  
PmiPrMu21 TTTCTGCCGAGGACGACCGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGTA TCTGGCTCGGCTGGGCATC TTCTTGAGAACGTA-GCTG -CACTTGACTGTGTGGTGG  
Pmicans TTTCTGCCGAGGACGACCGG TCCGCC-TCT-GGGTGAGTA TCTG-CTC-GCCTGG-CATC TTCTTGAGAACGTA-GCTG GCACCTTGACTGTGTGGTGG  
Ptyrrheni TTTCTGCTGAGGACGACCGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGTA TCTGGCTCGGCTGGGCATC TTCTTGAGAACGTA-GCTG -CACTTGACTGTGTGGTGG  
Hrotundat TTTCTGCCGAGGACGACCGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGCA TCTGGCTCGGCTGGGCATC TTCTTGAGAACGTA-TCTG -CACTTGACTGTGTGGTGG  
Htrd61S TTTCTGCCGAGGACGACCGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGTA TCTGGCTCGGCTGGGCATC TTCTTGAGAACGTA-ACTG -CACTTGACTGTGTGGTGG  
Ssweeneya TTTCTGCTGAGGACGACCGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGTA TCTGGCTCGGCTGGGCATC TTCTTGAGAACGTA-GCTG -CACTTGACTGTGTGGTGG  
Strd26S TTTCTGCTGAGGACGACCGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGTA TCTGGCTCGGCTGGGCATC TTCTTGAGAACGTA-GCTG -CACTTGACTGTGTGGTGG  
Gsanguine TTTCTGCCGAGAACGACCGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGTA TCTGGCTCGGCTGGGCATC TTCTTGAGAACGTA-GCTG -CACTTGACTGTGTGGTGG  
Gsakor11 TTTCTGCCGAGAACGACCGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGCA TCTGGCTCGGCTGGGCATC TTCTTGAGAACGTA-GCTG -CACTTGACTGTGTGGTGG  
Asad51S TTTCTGCCGAGAACGACCGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGCA TCTGGCTCGGCTGGGCATC TTCTTGAGAACGTA-GCTG -CACTTGACTGTGTGGTGG  
Gbeii TTTCTGCTGAGGATGACCGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGTA TCTGGCTCAGCCTGGGCATC TTCTGAGAACGTA-GCTG -CACTTGACTGTGTGGTGG  
Smicroadr TTTCTGTTGAGGATGACCGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGCA TCTGGCTCAGCCTGGGCATC TTCTGAGAACGTA-TCTG -CACTTGACTGTGTGGTGG  
Guncatemu TTTCTGCCAAGGACGATCGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGCA TCTGGCTCGGCTAGGCATC ATCTTGAGAGGCC-GCTG -CACTTGACTGTGTGGCAG  
Gdorsum TTTCTGCCAAGGACGATCGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGCA TCTGGCTCGGCTAGGCATC ATCTTGAGAGGCC-GCTG -CACTTGACTGTGTGGCAG  
Gind17S TTTCTGCCAAGGACGATCGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGCA TCTGGCTCGGCTAGGCATC ATCTTGAGAGGCC-GCTG -CACTTGACTGTGTGGCAG  
Plima TTTCTGCCGAGGACAACCGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGCA TCTGGCTGATCTGGGCATC TTCTTGAGAGCGTA-NCTG -CACTTGACTGTGTGGTGG  
Pconconvum TTTCTGCCGAGGACGACCGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGTA TCTGGCTCGGCTGGGCATC TTCTTGAGAGCGTG-GCTG -CACTTGACTGTGTGGCGG  
Afundyens TTTCTGCTGAGGATGGCTGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGTA TTTGGCACAGCCTGAGCATT TATCTTGAAAGTACA-ACTG -CACTTGACTGTGTGGTGTG  
Acad67S TTTCTGCTGAGGATGGCTGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGTA TTTGGCACAGCCTGAGCATT TATCTTGAAAGCACA-ACTG -CACTTGACTGTGTGGTGTG  
Atad66S TTTNTGCTGAGGATGGCTGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGTA TTTGGCACAGCCTGAGCATT TATCTTGAAAGTACA-ACTG -CACTTGACTGTGTGGTGTG  
Aaffine TTTCTGCTGAGGATGGCTGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGTA TTTGGCACAGCCTGAGCATT TATCTTGAAAGCACA-ACTG -CACTTGACTGTGTGGTGTG  
AspAxp03 TTTCTGCTGAGGATGGCTGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGTA TTTGGCACAGCCTGAGCATT TATCTTGAAAGCACA-ACTG -CACTTGACTGTGTGGTGTG  
Afrd34S TTTCTGCTGAGGATGGCTGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGTA TTTGGCACAGCCTGAGCATT TTTCTTGAAAGCACA-ACTG -CACTTGACTGTGTGGTGTG  
Atamiyava TTTCTGCTGAGGATGGCTGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGTA TTTGGCACAGCCTGAGCATT TATCTTGAAAGCACA-ACTG -CACTTGACTGTGTGGTGTG  
Amargalef TTTCTGCTGAGGATGGCTGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGTA TCTGGCACAGCCTGAGCATT TTTCTTGAAAGCGCA-ATTG -CACTTGACTGTGTGGTGTG  
Apsudogo TTTCTGCTGATGATGGCTGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGTA TCTGGCACAGCCTGAGCATT -TCCC-AAAACATA-ACTG -CACTTGACTGTGTGGTGTG  
Pbahamens TTTCTGCTAAGGATGGCTGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGTA TCTGGCACAGCCTGAGCATT TTTCTTGAGAACGTA-ACTG -CACTTGACTGTGTGGTGG  
Lpod18S CATCTGCGTTAGATGACCGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGTA CCGGCTGTCTGGGCATC TTCATGGGAAACGAA-ACTG -CACTTGACTGTGTGGATCG  
Lpolyedru CTCTGCTTTAGATGGCGG TCCGCCCTCT-GGGTGAGCA TCTGGCTTGTCTGGGCATC TTCATGGGAAACGAA-ACTG -CACTTGACTGTGTGGTGG  
Pred20S TTTCTGCTGAGGACAACCGG TCTGCCCTCT-GGGTGAGCA TCTGGTTTGGATTGGGCATC ATCTTGAGAACGTA-TCTG -CACTTGACTGTGTGGTGG  
Preticula TTTCTGCTGAGGACAACCGG TCTGCCCTCT-GGGTGAGCA TCTGGTTTGGATTGGGCATC ATCTTGAGAACGTA-TCTG -CACTTGACTGTGTGGTGG  
Nscintill TTTCTGCCGAGGACAGTCGG TCCGCCCTTGGGGTGAGCA TCTGAATGGCCTGGGCATC TTTTCGAAAGACTGTATCTG -CACTTGACTGTGTGGAGCG

Kbrevis GTATCCAGGACTTTTACTTT GAGGAAATTAGAGTGTTTCA AGCAGGCATAC-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA AGATAGGACCTCGGTTCTAT  
Kmicrum GTATCCAGGACTTTTACTTT GAGGAAATTAGAGTGTTTCA AGCAGGCACAC-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA AGATAGGACCTCGGTTCTAT  
Ppod28S GTATCCAGGACTTTTACTTT GAGGAAATTAGAGTGTTTCA AGCAGGCACAC-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA AGATAGGACCTCGGTTCTAT  
Gimpudicu GTATCTGGGACTTTTACTTT GAGGAAATTAGAGTGTTTCA AGCAGGCGTG-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATG AGATAGGACCTCGGTTCTAT  
Gfuscum GTATCCAGGACTTTTACTTT GAGGAAATTAGAGTGTTTCA AGCAGGCTGTG-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA AGATAGGACCTCGGTTCTAT  
Lviride GTATCCAGGACTTTTACTTT GAGGAAATTAGAGTGTTTCA AGCAGGCGCAC-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA AGATAGGACCTCGGTTCTAT  
Gcad04S GTATCCAGGACTTTTACTTT GAGGAAATTAGAGTGTTTCA AGCAGGCGCAC-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA AGATAGGACCTCGGTTCTAT  
Cpod10S GGGCCAGGACTTTTACTTT GAGGAAATTAGAGTGTTTCA AGCAGGCATG-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA AGACAGGACTCGGTTCTAT  
PmiPrMu21 GTATCCAGGACTTTTACTTT GAGGAAATTAGAGTGTTTCA AGCAGGCTTAC-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA AGATAGGACCTCGGTTCTAT  
Pmicans GTATCCAGGACTTTTACTTT GAGGAAATTAGAGTGTTTCA AGCCAG-TTAC-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA AGATAGGACCTCGGTTCTAT  
Ptyrrheni GTATCCAAGACTTTTACTTT GAGGAAATTAGAGTGTTTCA AGCAGGCACAC-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA AGATAGGACCTCGGTTCTAT  
Hrotundat GTATTCAGGACTTTTACTTT GAGGAAATTAGAGTGTTTCA AGCAGGCATAC-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA AGATAGGACCTCGGTTCTAT  
Htrd61S GTATTCAGGACTTTTACTTT GAGGAAATTAGAGTGTTTCA AGCAGGCACAC-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA AGATAGGACCTCGGTTCTAT  
Ssweeneya GTATCCAGGACTTTTACTTT GAGGAAATTAGAGTGTTTCA AGCAGGCACAC-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA AGATAGGACCTCGGTTCTAT  
Strd26S GTATCCAGGACTTTTACTTT GAGGAAATTAGAGTGTTTCA AGCAGGCGTG-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA AGATAGGACCTCGGTTCTAT  
Gsanguine GTATCCAGGACTTTTACTTT GAGGAAATTAGAGTGTTTCA AGCAGGCGTG-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA ATATAGGACCTTAATTCTAT  
Gsakor11 GTATCCAGGACTTTTACTTT GAGGAAATTAGAGTGTTTCA AGCAGGCGCAC-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA ATATAGGACCTTAATTCTAT

Asad51S GTATCCAGGACATTTACTTT GAGGAAATTAGAGTGTTTCA AGCAGGCGCAC-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA ATATAGGACCTCGATTCTAT  
 Gbeii GTATTTAGGACATTTACTTT GAGGAAATTAGAGTGTTTCA AGCAAGCGCAC-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA AGATAGGACCTCGTTCTAT  
 Smicroadr GTATTTAGGACATTTACTTT GAGGAAATTAGAGTGTTTCA AGCAAGCGGATT-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA AGATAGGACCTCAGTTCTAT  
 Guncatenu GTCTCCAGGACATTTACTTT GAGGAAATTAGAGTGTTTCA AGCAAGCGCAC-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA ATATAGGACTTCAGTTCTAT  
 Gdorsum GTCTCCAGGACATTTACTTT GAGGAAATTAGAGTGTTTCA AGCAAGCGCAC-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA ATATAGGACTTCAGTTCTAT  
 Gind17S GTATCCAGGACATTTACTTT GAGGAAATTAGAGTGTTTCA AGCAAGCGCAC-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA ATATAGGACTTCAGTTCTAT  
 Plima GTATCCAGGACATTTACTTT GAGGAAATTAGAGTGTTTCA AGCAGGCCAT-GCCATATA TACATTAGCATGGAATAATA AGGTAGGACCTACTCTCTAT  
 Pconcovum GTAGCCAGGCGCTTTACTTT GAGGAAATTAGAGTGTTTCA AGCAGGCGCAT-GCTTTGAA TACTTTAGCATGGAATAATA AGATAGGACCTCTGTTCTAT  
 Afundyens TTATTGAGAACATTTACTTT GAGGAAATCAGAGTGTTTCA AGCAGGTGTTTGGCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA AT-CAAGATCGTGGTTCTTT  
 Acad67S TTATTGAGAACATTTACTTT GAGGAAATCAGAGTGTTTCA AGCAGGTGTTTGGCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA AT-TAAGATCATGATTCT-T  
 Atad66S TTATTGAGAACATTTACTTT GAGGAAATCAGAGTGTTTCA AGCAGGTGTTTGGCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA TT-CAANATCGTGGTTNTTT  
 Aaffine TTATCCAGAACATTTACTTT GAGGAAATCAGAGTGTTTCA AGCAGGTGTTTAGCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA CT-CAAGACCGTGATTCTTT  
 AspAxp03 TTATCGAGAACATTTACTTT GAGGAAATCAGAGTGTTTCA AGCAGGTGTTTAGCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA CT-CAAGACCGTGATTCTTT  
 Afrd34S CTATTGAGAACATTTACTTT GAGGAAAACAGAGTGTTTCA AGCAGGTGATTGCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA CT-CAAGACCATGGTTCTTT  
 Atamiyava TTATTGAGAACATTTACTTT GAGGAAATCAGAGTGTTTCA AGCAGGTGTTTGGCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA CT-CAAGACCATGGTTCTTT  
 Amargalef GNGTTGAGAACCTTTACTTT GAGGAAATCAGAGTGTTTCA AGCAGGCGTCT-GCCTTGAA TACATTNGCATGGAATAATA TCATAGGCGCTAGGTTCTAT  
 Apsudogo GTATTGGGAAATTTACTTT GAGGAAATCAGAGTGTTTCA AGCAGGCATC-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA TTATAGGATCTTGGTTCTAT  
 Pbahamens GTATCGAGAACCTTTACTTT GAGGAAATCAGAGTGTTTCA AGCAGGTGTTT-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA ACATAGGACTTTGGTTCTAT  
 Lpod18S GTAGCCATGA-TTTTACTTT GAGGAAATCAATGTGTTTCA AGCAAGCATGC-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA TTATAGGACTGTGTTCTTT  
 Lpolyedu GTAGCCATGA-TTTTACTTT GAGGAAATCAGAGTGTTTCA AGCAAGCATGC-GCCTTGAA TACATTAGCATGGAATAATA TTATAGGCGCTGTGTTCTAT  
 Pred20S GTATCTTAGACTTTTACTTT GAGGAAATCAGAGTGTTTCA AGCAGGCGAAT-GCCTTGGA TACATTAGCATGGAATAATA TTTTAGGACCTTGGTTCTAT  
 Preticula GTATCTTAGACTTTTACTTT GAGGAAATCAGAGTGTTTCA AGCAGGCGAAT-GCCTTGGA TACATTAGCATGGAATAATA TTTTAGGACCTTGGTTCTAT  
 Nscintill GTATTCGGAACCTTTACTTT GAGGAAATTAGAGTGTTTCA GGCATGCGCTT-GTGGTGAA TACATTAGCATGGAATAATA AGATAGGACTCGTGGCCTAC  
  
 Kbrevis TTTGTTGGTTTCTAGAGCTG AGGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Kmicrum TTTGTTGGTTTCTAGAGCTG AGGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Ppod28S TTTGTTGGTTTCTAGAGCTG AGGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Gimpudicu TTTGTTGGTTTCTAGAGCTG AGGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Gfuscum TTTGTTGGTTTCTAGAGCTG AGGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Lviride TTTGTTGGTTTCTAGAGCTG AGGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Gcad04S TTTGTTGGTTTCTAGAGCTG AGGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Cpod10S TTTGTTGGTTTCTAGAGCTG AAGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 PmiPrMu21 TTTGTTGGTTTCTAGAGCTG AGGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Pmicans TTTGTTGGTTTCTAGAGCTG AGGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTCGGATTTGTTAAAGACGG  
 Ptyrheni TTTGTTGGTTTCTAGAGCTG AGGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Hrotundat TTTGTTGGTTTCTAGAGCTG AGGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Htrd61S TTTGTTGGTTTCTAGAGCTG AGGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Sweeneya TTTGTTGGTTTCTAGAGCTG AGGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Strd26S TTTGTTGGTTTCTAGAGCTG AGGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Gsanguine TTTGTTGGTTTCTAGAGCTG AGGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Gsakor11 TTTGTTGGTTTCTAGAGCTG AGGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Asad51S TTTGTTGGTTTCTAGAGCTG AGGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Gbeii TTTGTTGGTTTCTAGAGCTG AGGTAATGATTGATAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Smicroadr TTTGTTGGTTTCTAGAGCTG AGGTAATGGTCGATAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Guncatenu TTTGTTGGTTTCTAGAGCTG AGGTAATGATTACTAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Gdorsum TTTGTTGGTTTCTAGAGCTG AGGTAATGATTACTAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Gind17S TTTGTTGGTTTCTAGAGCTG AGGTAATGATTACTAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Plima TTTGTTGGTTTCTAGAGCAN AGGTAATGGTCAATGGGGAT AGTTGGGGTATTCTGATTT GACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTCAAGACGA  
 Pconcovum TTTGTTGGTTTCTAGAGCAG AGGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGA  
 Afundyens TTTGTTGGTTTCTAGAAATTG AGGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT GATTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Acad67S TTTGTTGGTTTCTAGAAATTG AGGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT GATTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Atad66S TTTGTTGGTTTCTAGAAATTG AGGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGCATTCTGATTT GATTG-TCAGAGGTGAAATT NTTGGANITGTTAAAGACGG

Aaffine TTTGTTGGTTTCTAGAATTG AGGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGGCATTCGTATTT GATTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 AspAxp3 TTTGTTGGTTTCTAGAATTG AGGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGGCATTCGTATTT GATTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Afrd34S TTTGTTGGTTTCTAGAACTG AGGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGGCATTCGTATTT GATTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGA  
 Atamiyava TTTGTTGGTTTCTAGAATCG AGGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGGCATTCGTATTT GATTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Amargalef TTTGTTGGTTTCTAGAACCA AGGTAATGATGAATAGGGAT AGTTGGGGGCATTCGTATTT AATTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Apseudogo TTTGTTGGTTTTTATAGCCG AGGTAATGACAAATAGGGAT AGTTGGGGGCATTCGTATTT AATTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTATTAAGACGG  
 Pbahamens TTTGTTGGTTTCTAGAACGA AAGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGGCATTCGTATTT AATTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTGAAGACGG  
 Lpod18S TTTGTTGGTTTATAGAATAA TAGTAATGATTGACAGGGAT AGTTGGGGTATTTGTATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACAT  
 Lpolyedru TTTGTTGGTTTCTAGAATAA TGTAAATGTTGACAGGGAT AGTTGGGGTATTTGTATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACAC  
 Pred20S TTTGTTGGTTTCTAGAATTG AGGTAACGTTTAATAGGGAT AATTGGGGGCATTCGTATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Preticula TTTGTTGGTTTCTAGAATTG AGGTAACGTTTAATAGGGAT AATTGGGGGCATTCGTATTT AACTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGG  
 Nscintill TTTGTTGGTTTTGTGTGCCAT AGGTAATGATTAATAGGGAT AGTTGGGGGCATTCGTATTT AATTG-TCAGAGGTGAAATT CTTGGATTTGTTAAAGACGA

Kbrevis ACTACTGTGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Kmicrum ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Ppod28S ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Gimpudicu ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Gfuscum ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Lviride ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Gcad04S ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Cpod10S ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 PmiPrMu21 ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Pmicans ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Ppyrrheni ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Hrotundat ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Htrd61S ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Sweeneya ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Strd26S ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Gsanguine ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Gsakor11 ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Asad51S ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Gbeii ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Smicroadr ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Guncatenu ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Gdorsum ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Gind17S ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Plima ACCAATGCGAAAGCATTTCG CAGAGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Pconcauum ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Afundyens ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Acad67S ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Atad66S ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AANAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Aaffine ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 AspAxp3 ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Afrd34S ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Atamiyava ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Amargalef ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Apseudogo ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Pbahamens ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Lpod18S ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Lpolyedru ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Pred20S ACCAATGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC  
 Preticula ACCAATGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CCTAGTCTTAACCATAAAACC

Nscintill ACTACTGCGAAAGCATTTCG CAAGGATGTTTTTCATTGATC AAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGT CGTAGTCTTAACCATAAACC

Kbrevis ATGCCGACTAGAGATTGGAG GTCGTTACTTATACGACTCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Kmicrum ATGCCGACTAGAGATTGGAG GTCGTTACTCATAAGACTCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Ppod28S ATGCCGACTAGAGATTGGAG GTCGTTAACTATACGACTCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Gimpudicu ATGCCGACTAGAGATTGGAG GTCGTTAATTATACGACTCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Gfuscum ATGCCGACTAGAGATTGGAG GTCGTTAACTATACGACTCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Lviride ATGCCGACTAGAGATTGGAG GTCGTTACTTATACGACTCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Gcad04S ATGCCGACTAGAGATTGGAG GCGGTTAACTATACGACTCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CACAAGTTCTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Cpod10S ATGCCGACTAGAGATTGGAG GTCGTTATCTGTACGACTCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
PmiPrMu21 ATGCCGACTAGAGATTGGAG GTCGTTATTTATACGACTCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Pmicans ATGCCGACTAGAGATTGGAG GTCGTTATCTATACGACTCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Ptyrrheni ATGCCGACTAGAGATTGGAG GTCGTTATCTNTACGACTCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Hrotundat ATGCCGACTAGAGATTGGAG GTCGTTATCCATACGACTCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Htrd61S ATGCCGACTAGAGATTGGAG GTCGTTATCATTACGACTCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Sweeneya ATGCCGACTAGAGATTGGAG GTCGTTATTTGTATGACTCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Strd26S ATGCCGACTAGAGATTGGAG GTCGTTATTTGTATGACTCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Gsanguine ATGCCGACTAGAGATTGGAG GTCGTTATCATTACGACTCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Gskor11 ATGCCGACTAGAGATTGGAG GTCGTTATCATTACGACTCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Asad51S ATGCCGACTAGAGATTGGAG GTCGTTATCATTACGACTCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Gbei ATGCCGACTAGAGATTGGAG GTCGTTATCTTACGACTCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Smicroadr ATGCCAACTAGAGATTGGAG GTCGTTACTTATACGACTCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Guncatenu ATGCCGACTAAGATTGGAG GTCGTTATTTGAACGACTCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Gdorsum ATGCCGACTAGAGATTGGAG GTCGTTATTTGAACGACTCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Gind17S ATGCCGACTAGAGATTGGAG GTCGTTATTTGAACGACTCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Plima ATGCCAACTAGAGATTGGAG GTCGTTATTTGTACGACTCT TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Pconcauum ATGCCAACTAGAGATTGGAG GTCGTTAGCTATACGACTCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Afundyens ATGCCAACTAGAGATTGGAG GTCGTTACTTGTATGACTTT TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Acad67S ATGCCAACTAGAGATTGAAG GTCGTTACTCGTATGACTTT TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Atad66S ATGCCAACTAGATATTGGAG GTCGTTACTTGTATGACTTN TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Aaffine ATGCCAACTAGAGATTGAAG GTCGTTACTTGTATGACTTC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
AspAxp03 ATGCCAACTAGAGATTGAAG GTCGTTACTCGTATGACTTT TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Afrd34S ATGCCAACTAGAGATTGAAG GTCGTTACTTGTATGACTTC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Atamiyava ATGCCAACTAGAGATTGAAG GTCGTTACTTGTATGACTTC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Amargalef ATGCCAACTAGAGATTGGAG GTCGTTATCTGTATGACTTC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Apseudogo ATGCCAACTAGAGATTGAAG GTCGTTATTTATATGATTC TTCAGTACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Pbahamens ATGCCAACTAGAGATTGGAG GTCGTTATTTGTACGACTCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Lpod18S ATGCCAACTAGAGATTGAAG GTCGTTATTCATATGACTTC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Lpolyedru ATGCCAACTAGAGATTGAAG GTCGTTATTCATATGACTTC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Pred20S ATGCCGACTAGAGATTGGAG GTCGTTATTTGTACGACCCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Preticula ATGCCGACTAGAGATTGGAG GTCGTTATTTGTACGACCCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC  
Nscintill ATGCCGACTAGAGATTGGG GTCGTTAGCTTTATGACTCC TTCAGCACCTTATGAGAAAT CA-AAGTCTTTGGGTTCCGG GGGGAGTATGGTCGCAAGGC

Kbrevis TGAAACTTAAAGGAATTGAC GGAAGGGCACCACCAGGAGT GGAGCCTGCGGCTTAATTTG ACTCAACACGGGAAACTTA CCAGGTCCAGACATAGTAAG  
Kmicrum TGAAACTTAAAGGAATTGAC GGAAGGGCACCACCAGGAGT GGAGCCTGCGGCTTAATTTG ACTCAACACGGGAAACTTA CCAGGTCCAGACATAGTAAG  
Ppod28S TGAAACTTAAAGGAATTGAC GGAAGGGCACCACCAGGAGT GGAGCCTGCGGCTTAATTTG ACTCAACACGGGAAACTTA CCAGGTCCAGACATAGTAAG  
Gimpudicu TGAAACTTAAAGGAATTGAC GGAAGGGCACCACCAGGAGT GGAGCCTGCGGCTTAATTTG ACTCAACACGGGAAACTTA CCAGGTCCAGACATAGTAAG  
Gfuscum TGAAACTTAAAGGAATTGAC GGAAGGGCACCACCAGGAGT GGAGCCTGCGGCTTAATTTG ACTCAACACGGGAAACTTA CCAGGTCCAGACATAGTAAG  
Lviride TGAAACTTAAAGGAATTGAC GGAAGGGCACCACCAGGAGT GGAGCCTGCGGCTTAATTTG ACTCAACACGGGAAACTTA CCAGGTCCAGACATAGTAAG  
Gcad04S TGAAACTTAAAGGAATTGAC GGAAGGGCACCACCAGGAGT GGAGCCTGCGGCTTAATTTG ACTCAACACGGGAAACTTA CCAGGTCCAGACATAGTAAG  
Cpod10S TGAAACTTAAAGGAATTGAC GGAAGGGCACCACCAGGAGT GGAGCCTGCGGCTTAATTTG ACTCAACACGGGAAACTTA CCAGGTCCAGACATAGTTAG  
PmiPrMu21 TGAAACTTAAAGGAATTGAC GGAAGGGCACCACCAGGAGT GGAGCCTGCGGCTTAATTTG ACTCAACACGGGAAACTTA CCAGGTCCAGACATAGTAAG





Guncatenu GATTGACAGATTGATAGCTC TTTCTTGATTCTATGGGTGG TGGTGCATGGCCGTTCTTAG TTGGTGGAGTGATTGTCTG GTTAATCCGTTAACGAACG  
 Gdorsum GATTGACAGATTGATAGCTC TTTCTTGATTCTATGGGTGG TGGTGCATGGCCGTTCTTAG TTGGTGGAGTGATTGTCTG GTTAATCCGTTAACGAACG  
 Gindl7S GATTGACAGATTGATAGCTC TTTCTTGATTCTATGGGTGG TGGTGCATGGCCGTTCTTAG TTGGTGGAGTGATTGTCTG GTTAATCCGTTAACGAACG  
 Plima GATTGACAGATTGATAGCTC TTTCTTGATTCTATGGGTGG TGGTGCATGGCCGTTCTTAG TTGGTGGAGTGATTGTCTG GTTAATCCGTTAACGAACG  
 Pconcauum GATTGACAGATTGATAGCTC TTTCTTGATTCTATGGGTGG TGGTGCATGGCCGTTCTTAG TTGGTGGAGTGATTGTCTG GTTAATCCGTTAACGAACG  
 Afundyens GATTGACAGATTGATAGCTT TTTCTTGATTCTATGGGTGG TGGTGCATGGCCGTTCTTAG TTGGTGGAGTGATTGTCTG GTTAATCCGTTAACGAACG  
 Acad67S GATTGACAGATTGATAGCTT TTTCTTGATTCTATGGGTGG TGGTGCATGGCCGTTCTTAG TTGGTGGAGTGATTGTCTG GTTAATCCGTTAACGAACG  
 Atad66S GATTGACAGATTGATAGCTT TTTCTTGATTCTATGGGTGG TGGTGCATGGCCGTTCTTAG TTGGTGGAGTGATTGTCTG GTTAATCCGTTAACGAACG  
 Aaffine GATTGACAGATTGATAGCTT TTTCTTGATTCTATGGGTGG TGGTGCATGGCCGTTCTTAG TTGGTGGAGTGATTGTCTG GTTAATCCGTTAACGAACG  
 AspAxp03 GATTGACAGATTGATAGCTT TTTCTTGATTCTATGGGTGG TGGTGCATGGCCGTTCTTAG TTGGTGGAGTGATTGTCTG GTTAATCCGTTAACGAACG  
 Afrd34S GATTGACAGATTGATAGCTT TTTCTTGATTCTATGGGTGG TGGTGCATGGCCGTTCTTAG TTGGTGGAGTGATTGTCTG GTTAATCCGTTAACGAACG  
 Atamiyava GATTGACAGATTGATAGCTT TTTCTTGATTCTATGGGTGG TGGTGCATGGCCGTTCTTAG TTGGTGGAGTGATTGTCTG GTTAATCCGTTAACGAACG  
 Amargalef GATTGACAGATTGATAGCTT TTTCTTGATTCTATGGGTGG TGGTGCATGGCCGTTCTTAG TTGGTGGAGTGATTGTCTG GTTAATCCGTTAACGAACG  
 Apseudogo GATTGACAGATTGATAGCTT TTTCTTGATTCTATGGGTGG TGGTGCATGGCCGTTCTTAG TTGGTGGAGTGATTGTCTG GTTAATCCGTTAACGAACG  
 Pbahamens GATTGACAGATTGATAGCTC TTTCTTGATTCTATGGGTGG TGGTGCATGGCCGTTCTTAG TTGGTGGAGTGATTGTCTG GTTAATCCGTTAACGAACG  
 Lpod18S GATTGACAGATTGATAGCTC TTTCTTGATTCTATGGGTGG TGGTGCATGGCCGTTCTTAG TTGGTGGAGTGATTGTCTG GTTAATCCGTTAACGAACG  
 Lpolyedru GATTGACAGATTGATAGCTC TTTCTTGATTCTATGGGTGG TGGTGCATGGCCGTTCTTAG TTGGTGGAGTGATTGTCTG GTTAATCCGTTAACGAACG  
 Pred20S GATTGACAGATTGATAGCTC TTTCTTGATTTTATGGGTGG TGGTGCATGGCCGTTCTTAG TTGGTGGAGTGATTGTCTG GTTAATCCGTTAACGAACG  
 Preticula GATTGACAGATTGATAGCTC TTTCTTGATTTTATGGGTGG TGGTGCATGGCCGTTCTTAG TTGGTGGAGTGATTGTCTG GTTAATCCGTTAACGAACG  
 Nscintill GATTGACAGATTGATAGCTC TTTCTTGATTCTATGGGTGG TGGTGCATGGCCGTTCTTAG TTGGTGGAGTGATTGTCTG GTTAATCCGTTAACGAACG

Kbrevis AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACACGTAACCTCGGTT ACGTGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-CGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Kmicrum AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACACGTAACCTCGGTT ACGTGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-CGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Ppod28S AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACGCATAAECTCGGTT ACGCGGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-TGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Gimpudicu AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACGCATAAECTCGGTT ACGCGGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-TGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Gfuscum AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACGCATAAECTCGGTT ACGCGGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-TGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Lviride AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACGCATAAECTCGGTT ACGCGGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-TATGTCTAATG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Gcad04S AGACCTTAGCCTGCTAAATA G-TTACGCATAAECTCGGTT ATGCGGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-TGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Cpod10S AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACATGCAGCTTCGGTT ACATGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-CGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 PmiPrMu21 AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACACGTAACCTCGGTT ACGTGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-CGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Pmicans AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACACGTAACCTCGGTT ACGTGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-CGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Ppyrrheni AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACACGTAACCTCGGTT ACGTGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-CGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Hrotundat AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACACGTAACCTCGGTT ACGTGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-CGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Htrd61S AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACACGTAACCTCGGTT ACGTGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-CGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Sweeneya AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACACGTAACCTCGGTT ACGTGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-CGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Strd26S AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACACGTAACCTCGGTT ACGTGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-CGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Gsanguine AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACACGTAACCTCGGTT ATGCGGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-TGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Gsakor11 AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACACGTAACCTCGGTT ATGCGGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-TGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Asad51S AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACACGTAACCTCGGTT ATGCGGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-TGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Gbeii AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACATGTAACCTCGGTT ACATGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-CGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Smicroadr AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACATGTAACCTCGGTT ACATGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-TGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Guncatenu AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACACATAAECTCGGTT ATGCGGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-CGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Gdorsum AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACACATAAECTCGGTT ATGCGGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-CGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Gindl7S AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACACATAAECTCGGTT ATGCGGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-CGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Plima AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACATCTAECTCGGTT ACATGGCAAGCTTCTTAGAG GGACTTTGCTGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Pconcauum AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACACGTAACCTCGGTT ACGTGGCAGCTTCTTAGAG GGACTTTGCTGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Afundyens AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACATGTAATTTTCGATT ATGCGGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-TGTGTATAATG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Acad67S AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACATGTAATTTTCGATT ATGCGGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-TGTGCATAATG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Atad66S AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACATGTAATTTTCGATT ATGCGGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-TGTGTATAATG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Aaffine AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACATGTAATTTTCGATT ATGCGGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-TGTGTATAATG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 AspAxp03 AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACATGTAATTTTCGATT ATGCGGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-TGTGCATAATG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
 Afrd34S AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACATGTAATTTTCGATT ATGCGGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-TGTGCATAATG CAAGGACGTTTGAGGCAATA

Atamiyava AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACATGTAATTTTCGATT ATGTGGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-TGTATATAATG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
Amargalef AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACACGTANTTTTCGATT ATGTGGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-TGTGTATAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
Apseudogo AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACACATAAATCCGGTT ATGTGGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-TGTGTATAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
Pbahamens AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACACATAAATCCGGTT ATGTGGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-TGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
Lpod18S AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACACGTAACCTCGGTT ATGCGGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-TGTGTCTAATG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
Lpolyedru AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACACGTAACCTCGGTT ACGCGGGCAACTTCTTAGAG GGACTTTG-TGTGTCTAATG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
Pred20S AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACGTTGTAATTTTGGTT ACATGGGCAACTTCTTAGAA GGACTTTG-TGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
Preticula AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TTACGTTGTAATTTTGGTT ACATGGGCAACTTCTTAGAA GGACTTTG-TGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA  
Nscintill AGACCTTAACCTGCTAAATA G-TGTCAAGTATGATTCT-AT-TTGATTACTTCTTAGAG GGACTTTG-TGTGTCTAACG CAAGGAAGTTTGAGGCAATA

Kbrevis ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCGCTCAA CGAGTTTTCGACCTTGCCCG GAAGGGTT-GGGTAATCT-T  
Kmicrum ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCGCTCAA CGAGTTTATGACCTTGTCCTG GAAAGGTT-GGGTAATCT-T  
Ppod28S ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCACTCAT CGAGTTTACGACCTTGCCCTG GAAAGGTT-GGGTAATCT-T  
Gimpudicu ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCACTCAA CGAGTTT-TTCCTTGTCCTG ACAGGATT-GGGTAATCT-T  
Gfuscum ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCACTCAA CGAGTTTACGACCTTGCCCTG GAAAGGTT-GGGTAATCT-T  
Lviride ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCACTCAA CGAGTTTACGACCTTGCCCG AGAGGGTT-GGGTAATCT-T  
Gcad04S ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCACTCAA CGAGTTTACGACCTTGTCCTG ACAGGATT-GGGTAATCT-T  
Cpod10S ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCGCTCAA CGAGTTT-TGCCCTTGCCCG GTAGGGTT-GGGTAATCT-T  
PmiPrMu21 ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCGTTCAA CGAGTTTATGACCTTGCCCTG GAAAGGTT-GGGTAATCT-T  
Pmicans ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCGTTCAA CGAGTTTATGACCTTGCCCG ATAGGGTT-GGGTAATCT-T  
Ptyrrheni ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCGCTCAA CGAGTTTATGACCTTGCCCG GAAAGGTT-GGGTAATCT-T  
Hrotundat ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCGCTCAA CGAGTTTACGACCTTGCCCG GAAAGGTT-GGGTAATCT-T  
Htrd61S ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCGCTCAA CGAGTTTATGACCTTGCCCG GAAAGGTT-GGGTAATCT-T  
Ssweeneya ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCGCTCAA CGAGTTTATGACCTTGCCCG GCAGGGTT-GGGTAATCT-T  
Strd26S ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCGCTCAA CGAGTTTATGACCTTGCCCG GCAGGGTT-GGGTAATCT-T  
Gsanguine ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCGGTCAA CGAGTTT-TGCGCTGGTCCG GCAGGATT-GGGTAATCT-T  
Gsakor11 ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCGGTCAA CGAGTTT-TGCGCTGGTCCG GCAGGATT-GGGTAATCT-T  
Asad51S ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCGGTCAA CGAGTTT-TGCGCTGGTCCG GCAGGATT-GGGTAATCT-T  
Gbeii ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCGGTCAA CGAGTTTACGATCTTGCCCTG AAAGGGCT-GGGTAATCT-T  
Smicroadr ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCGGTCAA CGAGTTTGAATCTTGCCCTG AAATGGCC-GGGTAATCT-T  
Guncatenu ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCGGTCAA CGAGTTTGTACCTTGCCCTG GAAAGGTT-GGGTAATCT-T  
Gdorsum ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCGGTCAA CGAGTTTGTACCTTGCCCTG GAAAGGTT-GGGTAATCT-T  
Gind17S ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCGGTCAA CGAGTTTGTACCTTGCCCTG GAAAGGTT-GGGTAATCT-T  
Plima ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCGGTCAA TGAGTTT-TTACCTTGCCCTG GTAAGGTT-GGGTAATCT-T  
Pconcavum ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCACTCAA CAAGTTTATGCGCTTGCCCTG GCAAGGTT-GGGTAATCT-T  
Afundyens ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGTTTCAA CGAGTTTTCACCTTGCCCTG GAAAGGTT-TGGTAATCT-T  
Acad67S ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGTTTCAA CGAGTTTTCACCTTGCCCTG GAAAGGTT-TGGTAATCT-T  
Atad66S ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGTTTCAA CGAGTTTTCACCTTGCCCTG GAAAGGTT-TGGTAATCT-T  
Aaffine ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGTTTCAA CGAGTTTTCACCTTGCCCTG GAAAGGTT-TGGTAATCT-T  
AspAxp03 ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGTTTCAA CGAGTTTTCACCTTGCCCTG GAAAGGTT-TGGTAATCT-T  
Afrd34S ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGTTTCAA CGAGTTT-TGCGCTTGCCCTG GCAAGGCT-TGGTAATCT-T  
Atamiyava ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGTTTCAA CGAGTT-TGACCTTGCCCTG GAAAGGTT-TGGTAATCT-T  
Amargalef ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGTTTCAA CGAGTT-TAACCTTGCCCTG GAAAGGTT-TGGTAATCT-T  
Apseudogo ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGTTTCAA TGAGTTT-TTCCTTGCCCTG GAAAGGTT-TGGTAATCT-T  
Pbahamens ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGTTTCAA CGAGTT-TGCGCTTGCCCTG GAAAGGCT-GGGTAATCT-T  
Lpod18S ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGTTTCAA CAAGTT-TCAACCTTGCCCTG AAAAGGTT-TGGTAATCT-T  
Lpolyedru ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGTTTCAA CAAGTT-TCAACCTTGCCCTG AAAAGGTT-TGGTAATCT-T  
Pred20S ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCGGTCAA CAAGTTT-TGACCTTGCCCTG GAAAGGTT-GGGTAATCT-T  
Preticula ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCGGTCAA CAAGTTT-TGACCTTGCCCTG GAAAGGTT-GGGTAATCT-T  
Nscintill ACAGGTCTGTGATGCCCTTA GATGTTCTGGGCTGCACGCG CGCTACACTGATGCAITCAA CGAGTTTATAACCTTGCCCTG AAAAGGTT-GGGTAATCT-T

Kbrevis TTTAAACGCATCGTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCGCGAGTCATCA GCTCGTCTGATTACGTCCC

Kmicrum TTTAAAACGCATCGTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCGCGAGTCATCA GCTCGTGCTGATTACGTCCC  
 Ppod28S CTTAAAATGCATCGTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCGCGAGTCATCA GCTCGTGCTGATTACGTCCC  
 Gimpudicu CTTAAAATGCATCGTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCGCGAGTCATCA GCTCGTGCTGATTACGTCCC  
 Gfuscum TTCAAAAATGCATCGTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCGCGAGTCATCA GCTCGTGCTGATTACGTCCC  
 Lviride TTTAAAATGCATCGTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCGCGAGTCATCA GCTCGTGCTGATTACGTCCC  
 Gcad04S TTAAAATGCATCGTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCGCGAGTCATCA GCTCGTGCTGATTACGTCCC  
 Cpod10S CTCAAAACGCATCGTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGTGCAGATCATCA GTTCGTGCTGATTACGTCCC  
 PmiPrMu21 TTTAAATCGCATCGTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCGCGAGTCATCA GCTCGTGCTGATTACGTCCC  
 Pmicans TTTAAATCGCATCGTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCGCGAGTCATCA GCTCGTGCTGATTACGTCCC  
 Ptyrrheni TTTAAAACGCATCGTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCGCGAGTCATCA GCTCGTGCTGATTACGTCCC  
 Hrotundat CTTAAAACGCATCGTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCGCAAGTCATCA GCTTGCAGTATTACGTCCC  
 Htrd61S CTTAAAACGCATCGTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCGCGAGTCATCA GCTCGTGCTGATTACGTCCC  
 Sweeneya CTTAAAACGCATCGTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCGCGAGTCATCA GCTCGTGCTGATTACGTCCC  
 Strd26S CTTAAAACGCATCGTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCGCGAGTCATCA GCTCGTGCTGATTACGTCCC  
 Gsanguine CTTAAATCGCATCGTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCGCGAGTCATCA GCTCGTGCTGATTACGTCCC  
 Gsakor11 CTCAAAATCGCATCGTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCGCGAGTCATCA GCTCGTGCTGATTACGTCCC  
 Asad51S CTTAAATCGCATCGTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCGCGAGTCATCA GCTCGTGCTGATTACGTCCC  
 Gbei TTTAAAACGCATCGTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCGCGAGTCATCA GCTCGTGCTGATTACGTCCC  
 Smicroadr TTTAAAATGCATCGTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCGCGAGTCATCA GCTCGTGCTGATTACGTCCC  
 Guncatenu GTGAAACTGCATCGTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCGTGAGTCATCA GCTCGTGCTGATTACGTCCC  
 Gdorsum GTGAAACTGCATCGTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCGTGAGTCATCA GCTCGTGCTGATTACGTCCC  
 Gind17S GTGAAACTGCATCGTGATGG GGATTGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCGTGAGTCATCA GCTCGTGCTGATTACGTCCC  
 Plima TCCAAAACGCATCGTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAATATGAGTCATCA ATTCGTGTTGATTACGTCCC  
 Pconcavum TTTAAAATGCATCGTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCGTGAGTCATCA GCTCGCTGATTACGTCCC  
 Afundyens TTGAACAGGCATCGTGATGG GGATTGTTTATTGCAATTAT TAACCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCTTGAGTCATCA GCTTGTGCTGATTATGTCCC  
 Acad67S -TGAACAGGCATCGTGATGG GGATTGTTTATTGTAATTAT TAATCTTAAACGAGGAATTC CTAGTAAGCTTGAGTCATCA GCTTGTGCTGATTATGTCCC  
 Atad66S -TGAACAGGCATCGTGATGG GGATTGTTTATTGCAATTAT TAACCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCTTGAGTCATCA GCTTGTGCTGATTATGTCCC  
 Aaffine -CGAACAGGCATCGTGATGG GGATTGATTATTGCAATTAT TAACCTTAAACGAGGAATTC CTAGTAAGCTTGAGTCATCA GCTTGTGCTGATTATGTCCC  
 AspAxp03 -CGAACAGGCATCGTGATGG GGATTGATTATTGCAATTAT TAACCTTAAACGAGGAATTC CTAGTAAGCTTGAGTCATCA GCTTGTGCTGATTATGTCCC  
 Afrd34S -TGAACAGGCATCGTGATGG GGATTGATTATTGCAATTAT TAACCTTGAACGAGGAATTC CTAGTAAGCTTGAGTCATCA GCTTGTGCTGATTATGTCCC  
 Atamiyava -TGAACAGGCATCGTGATGG GGATTGATTATTGCAATTAT TAACCTTAAACGAGGAATTC CTAGTAAGCTTGAGTCATCA GCTTGTGCTGATTATGTCCC  
 Amargalef -AGAAAATGCATCGTGATGG GGATTGATTATTGCAATTAT TAATCTTGAANGAGGAATTC CTAGTAAGCCTAAGTCATCA GCTTGTGCTGATTACGTCCC  
 Apseudogo TTTAAAATGCATCGTGATGG GGATTGATTATTGCAATTAT TAATCTTAAACGAGGAATTC CTAGTAAGCCTGAGTCATCA GCTTGTGCTGATTACGTCCC  
 Pbahamens TANAAAACGCATCGTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCCTGAGTCATCA GCTTGTGCTGATTACGTCCC  
 Lpod18S TTTAAACTGCGTCTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGTGCAGATCATCA GTTCGTGCTGATTATGTCCC  
 Lpolyedru TTCAAACGCGTCTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGTGCAGATCATCA GTTCGTGCTGATTATGTCCC  
 Pred20S TTGAACAGGCATCGTGATGG GGATAGCTTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCGTGAGTCATCA GCTCATGCTGATTACGTCCC  
 Preticula TTGAACAGGCATCGTGATGG GGATAGCTTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCGTGAGTCATCA GCTCATGCTGATTACGTCCC  
 Nscintill -GCAATGTGCATCGTGATGG GGATAGATTATTGCAATTAT TAATCTTCAACGAGGAATTC CTAGTAAGCGCGAGTCATCA GCTCGTGCTGATTACGTCCC  
  
 Kbrevis TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACTGCCGAGTGTTCAGATC -CTGAACGTTGCAGTGAAAA  
 Kmicrum TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACTGCAGCAGTGTTCAGTTC -CTGAACGTTGCAGCGGAAAA  
 Ppod28S TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGTTACCGTGAATAAATTCGG ACTGCAGCAATGTTTGATC -CCGAACGTTGCAGCGGAAAA  
 Gimpudicu TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGCTCAGTGAATAAATTCGG ACTGCGCAATGTTCCGGTAC GCTGAACGTTGCAGCGGAAAA  
 Gfuscum TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGAACCGTGAATAAATTCGG ACTGCGCGATGTTCCGGATC -CCGAACGTTGCAGCGGAAAA  
 Lviride TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACTGCAGCAATGTTTGATC -CCGAACGTTGCAGCGGAAAA  
 Gcad04S TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACTGCAGCAATGTTTGATC -CCGAACGTTGCAGCGGAAAA  
 Cpod10S TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACTGCAGCAGCTCCAGTTC -CTGGATGCTGCAGCGGAAAA  
 PmiPrMu21 TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACTGCTGCGGTGTCAGTTC -CTGGACCTGCTTCCGGAAAA  
 Pmicans TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACTGCAGCAGTGTTCAGTTC -CTGAACGTTGCAGCGGAAAA  
 Ptyrrheni TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACTGCAGCAGTGTTCAGTTC -CTGAACGTTGCAGTGAAAA  
 Hrotundat TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACTGCAGCAGTGTTCGG-CA -ACGAGCTTGCAGCGGAAAA

Htrd61S TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACTGCAGCAGTGTTCGG-TC -ACGAACGTTGCAGCGGAAA  
Sweeneya TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACTGCAGCAATGTTTCAGCTC -CTGAATGTTGCAGTGGAAA  
Strd26S TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACTGCAGCAATGTTTCAGCTC -CTGAATGTTGCAGTGGAAA  
Gsanguine TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACCAACCCAGGGCCAGTTA -CTGTGTCTGGGGTGGAAA  
Gskor11 TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACTCCCCAGGGCCAGTTA -CTGTGTCTGGGGAGGAAA  
Asad51S TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACTGCCGAGGTCTCAGTTC -CTGAGGTTGCAGCGGAAA  
Gbeii TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAACTCGG ACTGATGCAATTTTCAGCTT -CTGGAAGTTGCATCGGAAA  
Smicroadr TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACTGACGCAAGTGTTCAGCTT -CTGGAAGTTGCATCGGAAA  
Guncatenu TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACCGCAGCAGCGTTTGGTTC -CTGAATGCTGCCGTGGAAA  
Gdorsum TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACCGCAGCAGCGTTTGGTTC -CTGAATGCTGCCGTGGAAA  
Gind17S TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACCGCAGCAGCGTTTGGTTC -CTGAATGCTGCCGTGGAAA  
Plima TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAATTCAG ACTCT-GCAGCTCTCATCTC -GAGTGTTCGAATGGAAA  
Pconcauum TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCAG ACTGC-GCAGCTTTCAGTTC -CTGAGTGTTCAGTGGAAA  
Afundyens TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAN TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACTGTAGCAATGTTTCAGTTC -TTGAACAATGCAATGGCAA  
Acad67S TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACTGTAGCAATGTTTCAGTTC -TTGAACAACGCAATGGAAA  
Atad66S TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACTGTAGCAATGTTTCAGTTC -TTGAACAATGCAATGGCAA  
Aaffine TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACTGTAGCAATGTTTCAGTTC -TTGAACAATGCAATGGAAA  
AspAxp03 TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACTGTAGCAATGTTTCAGTTC -TTGAACAACGCAATGGAAA  
Afrd34S TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACTGTTCAGTGTTCAGTTC -TTAAACAITGCAATGGGAA  
Atamiyava TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCAG ACTGTTCGAATGTTTAGTTC -TTGAACACTGCAATGGAAA  
Amargalef TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACTGTAGCAGTGTTCAGTTC -TTGAACAATGCAATGGGAA  
Apseudogo TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACTGTAGCAGTGTTCAGTTC -TTGAACAATGCAATGGAAA  
Pbahamens TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACTGCAGCAGTGTTCAGTTC -TTGAACAACGCAATGGAAA  
Lpod18S TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGGTCCGGTGAATAAATTCGG ACTGCAACGCAATTCAGTTA -ATGAGTTTGTTCGTGGGAA  
Lpolyedru TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGGTCCGGTGAATAAATTCGG ACTGCAATGCAATTCAGTTA -ATGAGTTTGTTCGTGGGAA  
Pred20S TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACTGTGGCAATGTCTAGTTC -TAGACTTGTCTAGTAA  
Preticula TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG ACTGTGGCAATGTCTAGTTC -TAGACTTGTCTAGTAA  
Nscintill TGCCCTTTGTACACACCGCC CGTCGCTCCTACCGATTGAG TGATCCGGTGAATAAATTCGG AG-ATTGATTGTTTCAGCTT TGCAGAACATGTCTTCGAA

Kbrevis GTTTAGTGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
Kmicrum GTTTAGTGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
Ppod28S GTCTAGTGAACCTTAACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
Gimpudicu GTTTAGTGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
Gfuscum GTCTAGTGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
Lviride GTTTAGTGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
Gcad04S GTTTAGTGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
Cpod10S GTTTAGTAAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
PmiPrMu21 GTTTAGTGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
Pmicans GTTTAGTGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
Ptyrrheni GTTTAGTGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
Hrotundat GTTTAGTGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
Htrd61S GTTTAGTGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
Sweeneya GTTTAGTGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
Strd26S GTTTAGTGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
Gsanguine GTTTAGTGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
Gskor11 GTTTAGTGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
Asad51S GTTTAGTGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
Gbeii GTTTAGTGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
Smicroadr GTTTCATGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
Guncatenu GCTNCGTGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
Gdorsum GCTTCGTGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
Gind17S GCTTCGTGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT

Plima GTTTAGTGAGCCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
 Pconcaum GTTTAGTGAGCCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
 Afundyens ATTTAATGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
 Acad67S GTTTAATGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
 Atad66S ATTTAATGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
 Aaffine GTTTAATGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
 AspAxsp03 GTTTAATGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
 Afrd34S GTTTAATGAACCTTACCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
 Atamiyava GCTTAATGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
 Amargalef GTCTAATGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
 Apseudogo GTTTAATGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
 Pbahamens GTTTAATGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACATGGTTT  
 Lpod18S GCTTAGTGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
 Lpolyedru GTTTAGTGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTTGTA ACAAGGTTT  
 Pred20S ATCTTATGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
 Preticula ATCTTATGAACCTTATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT  
 Nscintill GTCTAGTGAACCTCATCACT TAGAGGAAGGAGAAGTCGTA ACAAGGTTT

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도





## 제 1 절. 기술적 측면

### 1. 기 보유중인 해양유독식물플랑크톤은행 활용의 극대화

본 연구원의 장목분원에 구축되어 있는 해양식물플랑크톤 은행을 이용하여 다양한 생리, 생태학적 연구를 수행하여 오고 있는데 이의 활용을 극대화하기 위해서는 식물플랑크톤을 배양하고 유지하는 기술의 확보뿐만 아니라, 이들을 반영구적으로 보관할 수 있는 기술이 요구된다. 따라서 이와 같은 필요를 충족시키기 위해서 각 식물플랑크톤의 유전자계놈의 보관이 필수적인데, 우선 본 연구에서는 근래에 들어 그 가치가 클 것으로 예상되는 해양유독 식물플랑크톤의 biotoxin 생합성 관련 유전자를 클로닝하여 보관하고 이를 통하여 biotoxin에 관한 연구를 수행한다면 보유중인 해양유독식물플랑크톤 은행 활용의 극대화가 이루어질 것이다.

### 2. 유전자를 이용한 바이오센서 연구 영역 확대

근래에 들어 우리나라 연안 뿐만 아니라 세계적으로 문제가 되고 있는 적조현상을 조기에 탐지하고 이를 예보할 수 있는 시스템이 개발되어 운영되고 있지만 간단히 누구나 해수에서 적조생물의 빈도 및 biotoxin의 생성여부를 검출할 수 있는 시스템은 아직까지 커다란 진전을 보이지 않고 있다. 따라서 본 연구를 통하여 개발된 바이오센서를 이용하여 정확하고 신속한 현장중심의 바이오센서의 개발이 가능할 것으로 예측된다.

특히 STX 외의 다른 biotoxin (domoic acid, okadaic acid, brevetoxin, ciguatoxin, ichthyotoxin 등)의 검출을 위한 바이오센서는 중요한 사회적 문제인 적조현상의 빠른 예측을 위한 종합적인 장치로써 활용될 것이며, 맹독성 biotoxin의 모니터링이 손쉽게 이루어질 것이다. 또한 biotoxin의 검출기법의 단순화를 이용하여 다른 toxin 관련 연구가 활성화될 수 있을 것으로 판단된다.

### 3. 해양식물플랑크톤 유래 biotoxin 기반연구의 활성화

Biotoxin 생합성 관련 유전자가 확보되면 biotoxin 생합성 과정 연구가 활성화될 것이

다. 특히 유전자를 antisense RNA 등의 기법을 이용하여 유전자 발현을 억제하거나 돌연변이체 제작 등을 통하여 생합성 과정 등이 연구될 것이다. 본 연구과제의 결과로 제작될 DNA chip은 최근에 생명공학 분야에서 매우 중요한 연구기법으로 인식되고 있는데 이를 이용하면 해양식물플랑크톤 유전자 연구의 획기적인 진보가 가능하게 될 수 있을 것이다. DNA chip은 biotoxin의 발현양상 연구뿐만 아니라 작용기작 등의 연구에 적용이 가능할 것이며, biotoxin 분야 뿐만 아니라 전반적인 식물플라옥톤 연구의 활성화에 기여하게 될 것이다. 또한 biotoxin의 특성연구나 대량생산 등의 기술이 이루어지면 해양식물플랑크톤의 biotoxin에 의한 중독 등에 대해 해독할 수 있는 기술이 획기적으로 발달할 수 있을 것으로 판단된다

## 제 2 절. 경제·산업적 측면

### 1. 적조의 정확하고 빠른 탐지 및 예측을 통한 어민 피해감소

바이오센서 기술의 산업체 이전을 통하여 간편하게 이용할 수 있는 휴대용 바이오센서의 개발이 가능해질 것으로 예상되며, 이를 통하여 정확하고 빠른 적조예측이 가능해질 것으로 생각된다. 따라서 현장에서의 적조 탐지 및 예측을 통한 빠른 대응이 가능해져 예상되는 적조피해를 크게 줄일 수 있을 것으로 판단된다.

### 2. Biotoxin을 이용한 생리활성물질 개발을 통한 산업활성화 기대

미래 인류식량자원의 보고인 해양에서 일차생산자로서의 중요한 위치를 차지하고 있는 해양식물플랑크톤을 이용한 생리활성물질 탐색 및 개발연구가 근래에 들어 그 가치가 증대되고 있는데, 해양식물플랑크톤의 biotoxin 생합성관련 유전자가 확보되면 이들의 대량생산이 가능해질 수 있을 것이다. 대량생산기술은 biotoxin을 이용한 생리활성물질 (특히약품 원료물질 등)의 개발을 가속화시킬 수 있을 것이다.

### 3. 유전자 특허등록을 통한 국가경쟁력 향상

전세계적으로 유전자의 특허등록은 가속화일로에 있으며 지적재산권 설정 등을 통하여 유전자 사용시 지불해야할 로열티는 실로 막대할 것으로 예상된다. 따라서 앞으로의 국가경쟁력 중 본 연구결과로 나타날 수 있는 유전자의 확보 및 특허등록은 매우 중요한 위치를 차지할 수 있을 것으로 판단된다.



## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획



## 제 1 절. 연구 개발 결과의 활용계획

### 1. biotoxin 검출을 위한 바이오센서 개발

- 가. 국내 바이오센서 개발을 위한 연구영역의 확대
- 나. 첨단기법을 이용한 바이오센서 개발 연구 영역의 확대
- 다. 현장에서의 간편하고 정확한 biotoxin 검출
- 라. 적조 사전예측 및 수질감시를 위한 monitoring 시스템으로의 적용 가능
- 마. 적조의 정확하고 빠른 탐지 및 예측을 통한 어민 피해감소
- 바. 해양식물플랑크톤 유래 PSP, ASP, DSP, NSP 계열 biotoxin 검출용 바이오센서 개발을 위한 기술 제공
- 사. 최근 미국 아칸소대학의 과학자들이 닭의 시체로부터 두 시간만에 살모넬라 세균을 감지할 수 있는 기술을 개발했다고 보고하였다. 이번에 개발된 기술을 응용하면 5,000 마리 정도에 불과한 적은 양의 세균을 감지하는 것이 가능하다. 또한 이번 기술은 식품 산업 분야뿐만이 아니라 환경과 의료 분야에서 사용 가능한, 감도가 향상된 biological sensors 개발로도 이어질 전망이다. 이와 같이 biological sensor의 개발은 의료, 환경 및 기타 여러 분야에서 활용도가 높으며 1차적으로는 대상 물질을 정확히 진단하는 기술이 필요하며 이를 빠른 시간안에 다량 검사하는 기술이 필요하다. 현재 국내외 여러 연구진들에 의해서 biosensor 개발에 관한 많은 시도가 추진 중에 있고 이러한 연구 결과는 부수적인 사업의 개발을 촉진할 것이다. 많은 분야에서 소규모의 그리고 손쉽게 대상 병원균 또는 biotoxin 등을 진단하는 기술이 개발된다면 이는 BT와 NT 및 IT의 접목을 필요로 하기에 산업화가 용이하고 또한 국가 기간 산업으로 육성이 가능하여 그 부대효과는 매우 크다.

### 2. Biotoxin 생합성 관련 유전자의 탐색 및 분리

- 가. 전세계적으로 연구가 거의 되지 않고 있는 biotoxin 생합성 과정, 작용기작, 해독작용 등 기반 연구의 활성화
- 나. 식물플랑크톤 유전자 유전자목록작성 및 염기서열결정을 통한 식물플랑크톤 연구의

활성화 및 유용성분 추출 등과 같은 활용가능성 증대

다. Biotoxin 유전자를 이용한 대량생산기술 연구를 통하여 biotoxin을 확보하고 이를 통한 생리활성물질의 개발 연구 가능

라. Biotoxin 연구를 위해 요구되는 정제된 biotoxin의 수입대체효과 유발

마. Biotoxin 생합성 관련 유전자의 확보 및 특허등록을 통한 국가 경쟁력 강화

### 3. 해양식물플랑크톤종의 분자계통학적 분석

가. 해양식물플랑크톤의 SSU rDNA의 염기서열 분석을 통한 분자계통학적 연구를 통해 국내 해양 식물플랑크톤 종의 정확한 분류를 위한 기반 구축

나. 지역간, 시기간 유독식물플랑크톤 분자 계통도를 통한 적조발생 기작의 연구를 위한 자료 축적

### 4. 배양중인 해양유독식물플랑크톤은행의 활용

가. 생리 및 분자생물학적 연구를 위한 해양유독식물플랑크톤의 확보

나. 타 기관으로의 분양 및 기술 지도를 통한 연구의 다변화 모색 및 국내 식물플랑크톤 연구의 활성화

다. 유독식물플랑크톤의 유전자 지도 작성을 위한 재료 확보

### 5. Biotoxin 생합성 관련 유전자 발현 분석 연구

가. 해양유독식물플랑크톤 biotoxin의 생합성 과정 연구의 활성화

나. Biotoxin 작용기작 연구의 활성화

다. Biotoxin 해독작용에 관한 연구의 활성화

마. Biotoxin을 이용한 생리활성물질 탐색의 용이 및 활용증대



## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보



## 1. 바이오센서 개발 연구 현황

항체를 이용한 바이오센서 개발 분야는 그 효용성과 빠른 진단 능력 때문에 세계적으로 매우 빠른 발전 속도를 보여주고 있다. 최근에 보고된 논문에 의하면 일본의 오사카부립대학의 연구진에 의해서 미소한 바이오센서를 집적, 다성분 물질을 분자레벨에서 한번에 인식해 여기에서 얻어진 물질 정보를 처리하여 진단이나 예지 등에 활용한기술이 소개 되었다. 이러한 인텔리전트 바이오센서의 개발을 오사카부립대학의 연구 그룹은 현재 10개 센서 소자의 집적에 목표를 두고 있으나 장래에는 소자 수를 50개 정도로 늘여 생체내 모니터링이나 biotoxin, 환경계측, 미생물의 진단 및 암의 조기 발견 등 컴퓨터와 연결된 폭 넓은 응용을 하려고 한다.

바이오 센서는 효소가 특정 분자를 식별하는 성질을 이용해 각종 타입의 개발이 진행되어 최근에는 당뇨병의 혈당치 센서, 유산 센서, 글루타민산 센서와 같이 시판되는 것도 나오고 있다. 그러나 현실적으로는 특정 성분만을 검출하는 단일 기능인 것만으로 복잡한 물질 정보를 인식하는 능력에는 거리가 있다.

오사카 대학의 연구진들은 효소나 항체의 "열쇠구멍 기능"를 사용하여 많은 화학 물질을 분자레벨에서 인식시켜 얻어진 물질 정보로부터 물질 상황의 판단이나 장래의 예측까지 가능하게 하는 센서 디바이스의 개발을 진행하고 있다. 바이오 센서를 집적해 인텔리전트화를 하는 데에는 소형, 고감도의 센서를 간단한 제법으로 싼 값에 만드는 것이 과제이다. 이를 위해 기초 레벨에서 효소(항체) 반응을 사용한 센서 소자의 졸-겔 법이나 전해 중합법 등에 의한 개발을 진행해 왔다. 졸-겔 법으로는 오르토규산 메틸의 자기 중합 과정에서 간단하게 효소가 들어간 박막이 되어 효소가 변하면 글루코스, 콜레스테롤, 갈락토스 등의 센서로 사용된다. 전해 중합법도 막내에 효소를 트랩하는 기전을 응용한 간단한 방법으로 수년 전부터 마이크로 바이오 센서의 제작에 일부 사용 되기 시작하고 있다. 미소화에서 주목되는 것은 도전성 폴리머를 사용한 분자 와이어 센서 소자이다. 이제까지의 효소 센서는 효소가 분자량이 큰 생체 고분자이기 때문에 전극과의 사이에서 직접적인 전자 이동이 일어나지 않아 산소나 다른 전자 전달물질(미디에이터)을 통해 전기 신호로써 들어 내고 있었다. 이러한 경우 산소의 양 등으로 감도가 극단적으로 좌우된다. 그러므로써 효소를 고정하는 담체로써 도전성 폴리머를 사용해 효소의 활성 부위와 폴리머와의 사이에서 전자 이동 반응을 직접하는 분자 와이어 기능을 발현했다. 이렇게 되면 감도도 높아지며 집적화도 쉽게 되었다. 동 그룹이 이 방법으로 시험제작한 혈

당치 센서는 시판되고 있는 당뇨병 센서에 비해 소형이며 감도가 100배 정도 높아 측정 시간을 30초로 단축하였다고 한다. 이 방법은 생체 매입용의 마이크로 프루브 센서로의 응용도 가능하다. 또한 동물 실험용의 시험제작이라는 단계이나 직경 0.6mm의 투석 프루브에 직경 50미리미크론의 섬유 센서를 조입하여 신경 전달 물질인 아세틸콜린이나 글루타민산 등을 뇌내에서 장시간 모니터링하는 센서 프로브도 개발하고 있다. 특히 뇌안에 극히 미량 밖에 존재하지 않는 신경전달 물질인 글루타민산의 측정에는 2개의 대응하는 효소 반응을 이용해 감도를 올리는 기질 리사이클링에 의한 증폭이 유효하다. 통상의 바이오 센서의 1,000배의 감도를 낼 수 있어  $10^{-10}$  M의 측정이 가능하게 되었다.

고기능 인텔리전트 센서를 목표로 하는 오사까 대학 연구진들은 "컴퓨터와 조합한 인텔리전트화에는 수년이 걸릴지도 모르나 품질관리, 환경, 의료 진단 등 순간적으로 물질 정보를 얻는 센서 기술의 혁신이 21세기를 위해 요구되고 있다. 스크린 프린팅 인쇄기술에 의한 소자의 양산화 등도 검토해 나간다"는 과학과 기술의 융합화를 목표로 하고 있다.

본 과제에서도 해수에 미세한 양으로 존재할 수 있는 다양한 biotoxin의 진단과 검정 기술이 필요하며 이를 위하여 일차적으로는 이들과 효율적으로 반응을 하는 항체를 개발하고 차후에 이 항체를 고집적화하여 미량으로 존재하는 다수의 biotoxin을 빠른 시간 안에 검정할 수 있는 기술의 접목이 필요하다.

## 2. 해양식물플랑크톤에 의한 적조발생 및 biotoxin 연구 현황

### 가. 해양식물플랑크톤의 특징 및 다양성

약 3,000 만년 전에 지구상에 처음 나타난 식물플랑크톤은 cyanobacteria (blue-green algae)이다 (Graham, 2000). 오늘날 식물플랑크톤은 해양과 담수환경에서 산소와 유기물을 만드는 중요한 생산자로서 존재해 왔고, 몇몇 식물플랑크톤은 육상에 생존하거나 다른 생물과 공생관계를 유지하기도 한다 (Tomas, 1997). 진화하는 동안에 식물플랑크톤은 다양한 광합성생물 그룹이 되었다. 식물플랑크톤은 세포구조, 세포배열, 색소 등에서 매우 다양한 특징을 가지게 되었다.

최근에 식물플랑크톤의 배양은 생리학, 분자생물학 뿐만 아니라 폐기물 처리나 의약

등 다양한 연구영역을 위해 요구되고 있다 (Cho, 1978). 수생환경에서 유기물과 산소의 생산자로서의 중요성 뿐만 아니라 일부 식물플랑크톤은 인간에 직접적으로 영향을 미치고 있다 (Smayda, 1990; Steidinger and Baden, 1984). 전세계 해양의 식물플랑크톤은 filter-feeding 하는 패류(oysters, mussels, scallops, clams) 뿐만 아니라 상업적으로 중요한 갑각류나 어류의 유생의 중요한 먹이가 된다. 일반적으로 식물플랑크톤의 증식은 양식이나 자연 어업에 도움이 된다. 그러나 어떤 상황 하에서 식물플랑크톤 대증식은 양식산업, 관광 및 인간의 건강에 심각한 영향을 미치고 있다.

#### 나. Harmful algal blooms (HABs)

최근에 연안에서의 유독와편모조류에 의한 harmful algal blooms (HABs)의 출현이 증가하고 있다. 와편모조류의 고농도 증식은 해수를 갈색 또는 적색으로 변화시키는 적조현상을 야기한다. 어떤 종은 biotoxin을 생산하여 분비함으로써 먹이사슬내에 축적하게 된다 (Steidinger, 1983; Steidinger and Baden 1984). 심각한 경우에 biotoxin은 어류를 죽이거나 연체동물이나 어류를 섭취한 인간에 영향을 주게 된다 (Steidinger and Baden 1984; Taylor 1985). 3가지 종류의 HABs가 발생하고 있고 그 대표적인 사례를 table 23에 정리하였다.

HABs는 예전부터 있어왔지만 공공보건이나 경제적 손실 등은 과거 십여년동안 빈도 및 강도가 크게 증가하였다. 1970년대까지 *Alexandrium (Gonyaulax) tamarensis* and *Alexandrium catenella*에 의한 적조가 유럽 및 북미와 일본 등에서 발생하였다 (Dale and Yentsch, 1978). 1990년대에는 이 현상이 South Africa, Australia, New Zealand, India, Thailand, Brunei, Sabah, the Philippines and Papua New Guinea 등에서 보고되었다 (Hallegraeff, 1993). *A. cohorticula* and *A. minutum* 같은 *Alexandrium* 속 뿐만 아니라 *Gymnodinium catenatum*과 *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* 등도 최근에 적조 발생이 보고되었다 (Steidinger, 1983). HABs에 대한 전세계적인 이슈는 HABs를 다루는 모두 주요한 학회 등에서 토픽으로 다루어지고 있다 (Anderson, 1999; Hallegraeff, 1993; Smayda, 1990).

우리나라에서 적조를 유발하는 주요 식물플랑크톤은 *Cochlodinium polykrikoides* (Han *et al.*, 1992)과 *A. tamarensis* 이다 (Daugbjerg *et al.*, Huelsenbeck and Ronquist, 2001).

Alexandrium 속에 속한 유독 식물플랑크톤에 의한 단종 HAB이 1997년 진해만에서 발생하였다 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001). 이 종에 의해 만들어진 마비성패독은 어패류에 심각한 문제를 야기하였고, 오염된 어패류의 소비로 인해 인간이 사망하게 되는 문제가 발생하였다. *Cochlodinium polykrikoides* 에 의한 적조는 1982년 이후 우리나라 연안에서 매년 발생하고 있으며 최근에는 발생범위가 매우 넓어지고 양식 어류의 대량폐사의 원인이 되었다 (Herzog and Maroteaux, 1986). *Cochlodinium polykrikoides* 에 의한 적조현상은 1995년 9월부터 10월까지 거의 2개월간 지속되었으며 약 US \$ 95.5 million의 경제적 피해를 야기한 바 있다 (Han *et al.*, 1992).

Table 23. Different types of harmful algal blooms

1. Species produce basically harmless water discolorations.
Examples: <i>Gonyaulax polygramma</i> , <i>Noctiluca scintillans</i> , <i>Scrippsiella trochoidea</i>
2. Species, which are non-toxic to humans, but harmful to fish and invertebrates.
Examples: <i>Gymnodinium mikimotoi</i> , <i>Heterosigma carterae</i> , <i>Chattonella antiqua</i>
3. Species which produce potent toxins.
Examples: PSP- <i>Alexandrium tamarense</i> , <i>A. fundyense</i> , <i>Gymnodinium catenatum</i> DSP- <i>Dinophysis acuta</i> , <i>D. acuminata</i> , <i>D. norvegica</i> , <i>Prorocentrum lima</i> ASP- <i>Pseudo-nitzschia multiseriata</i> , <i>P. pseudodelicatissima</i> , <i>P. australis</i> NSP- <i>Gymnodinium breve</i> , <i>G. cf. breve</i> (New Zealand) Ciguatera fish poisoning- <i>Gambierdiscus toxicus</i> Cyanobacterial toxin poisoning- <i>Anabaena circinalis</i>
(Anderson, 1989; Dale and Yentsch, 1978; Steidinger and Baden 1984).

#### 다. HABs에서의 외편모조류

인간의 질병이나 양식생물의 손상과 관련된 HABs에 대한 보고는 신문이나 과학서적등에서 관심이 증가하고 있다. 그러한 손상을 최소화시키거나 조절하기 위해서는 적조유발종의

조기 검출이나 동정이 중요하다. 기존의 HAB 모니터링 프로그램은 현장에서 채집된 식물플랑크톤을 동정하고, 계수하고, 그들의 시공간적 분포를 조사하고 주변 해수와의 물리 화학적 정보와의 연관관계를 분석하는 것이 주를 이루고 있었다. 그러나 적조유발종의 미세한 형태학적 특징은 광학현미경하에서의 종분류를 매우 어렵게 하고 있으며 형태적으로 매우 밀접한 종의 경우는 생리학적 또는 생화학적 특징만으로는 구별하기가 매우 어렵다 (Edgcomb *et al.*, 2002).

지난 10여년간 rRNA에 기초한 연구방법이 미생물 다양성의 연구에 적용되어 왔다 (Olsen *et al.*, Pace, 1997). 염기서열의 다양성 때문에 속간 또는 종간 수준에서의 비교가 가능하게 되었고 (Adachi *et al.*, 1996), 더 자세한 분석이 가능하게 되었다. 현재까지 SSU (small subunit) rDNA, LSU (large subunit) rDNA 또는 5.8S rDNA와 ITS (internal transcribed spacer) regions (Huelsenbeck *et al.*, 2001; Iwasaki, 1961) 등이 우리나라 적조유발종의 분석에 활용되었으나 단지 몇종에 국한된 연구결과만이 보고되고 있다.

## 라. Saxitoxin

약 20여종의 와편모조류가 인간의 질병을 유발하거나 경제적 손실을 초래하는 다양한 biotoxin을 생산하는 것으로 알려져 있다 (Cherest, 1978; Cheung *et al.*, 2000; Sun, 1996). 본래 각 식물플랑크톤은 여러 가지 biotoxin의 혼합물을 합성한다. 마비성 패독은 Alexandrium 종에 의해 생합성된 saxitoxin (STX)에 의해 유발된다. 인간 감염은 주로 와편모조류를 섭취한 연체동물에 축적되며 이를 섭취한 후 일어난다. 마비성패독은 인간의 근육을 약화시키고 호흡계마비를 일으킨다 (Hallegraeff, 1993). 인간과 환경에 대한 STX의 유해한효과 때문에 Alexandrium 종에 대한 생태학이나 STX 생합성에 대한 생리학적 연구뿐만 아니라 이종의 대량증식을 모니터링하고 예측하고자 하는 많은 연구가 수행되어오고 있다.

20 종류 이상의 STX 유도체가 알려져 있다 (Shimizu, 1993) (Figure 1). STX의 생합성 경로는 상대적으로 잘 알려져 있다. STX는 purines과 구조적으로 매우 유사하지만 (Figure 1),  $^{13}\text{C}$ - and  $^{15}\text{N}$ - 으로 표지된 기질의 섭취실험을 통한 결과는 STX가 purine 대사에서 유래된 것은 아님을 보여준다 (Shimizu 1990b; Shimizu, 1993). STX는 arginine, S-adenosylmethionine, acetate 및 기타 dkffuu 있지 않은 세포대사물을 포함하는 대사경로를 통해 합성된다 (Shimizu 1990a; Shimizu and Wrensford, 1993). STX 생합성에 관한

자료는 많지 않지만, 알려진 STX 생합성 경로는 (Fig. 1) arginine과 acetate가 STX 분자의 일부를 형성한다는 것을 나타내고 있다. 한편 STX 중간체의 화학구조는 이해되지 않고 있다. Oxidase 활성이 STX 유도체의 1-NH를 1-NOH로 바꾸는데 참여한다고 보고되어 있다 (Oshima, 1995).

#### 마. Light에 따른 biotoxin 함량 변화

Batch culture를 사용하여 일간 또는 주간 와편모조류의 biotoxin 함량 변화에 관한 많은 연구가 있다. Biotoxin의 함량은 양분고갈 (Boyer *et al.*, 1987; Anderson, 1990)과 염분 (White, 1978) 온도 (Anderson *et al.*, 1990b, Ogata *et al.*, 1987) 또는 광량 (Ogata *et al.*, 1987)의 변화에 따라 변화한다. 그러나 biotoxin 생합성에 관한 분자수준에서의 기작은 거의 알려진 바 없다. STX를 생성하는 와편모조류의 중요한 특징은 단일 종의 독성이 성장단계에 따라 매우 크게 변화한다는 것이다. 이러한 변화는 성장단계 동안 biotoxin 함량 (the integrated potency 또는 total molar content of toxin per cell)의 변화에 기인하지만 (Anderson *et al.*, 1990b; Boyer *et al.*, 1987) 또한 biotoxin의 조성 (the relative concentrations of the different STX derivatives)의 변화도 반영한다 (Anderson *et al.*, 1990a; Boczar *et al.*, 1988).

와편모조류 세포분열은 광주기에 따르며 dark-to-light transition 같은 제한된 주기에 따른다 (Chisholm, 1981). 배양주기가 다른 세포는 생리적으로 다른 상태를 갖게 된다 (Chisholm, 1981). 따라서 synchronized cultures가 필요하지만, 와편모조류에 적용하기에는 매우 어려운 것으로 알려져 있다.



## 제 7 장 참고문헌



- Abranhamson, M. S., R. R. Johnson, M. Hathway, and M. W. White. 1995. Identification of *Eimeria bovis* merozoite cDNAs using differential mRNA display. *Mol. Biochem. Parasitol.* 71: 183-191.
- Adachi, M., Sako, Y., Ishida, Y., 1996. Analysis of Alexandrium (Dinophyceae) species using sequences of the 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer regions. *J. Phycol.* 32, 424-432.
- Adachi, M., Y. Sako, and Y. Ishida. 1996. Identification of the toxic dinoflagellates *Alexandrium catenella* and *A. tamarensis* (Dinophyceae) using DNA probes and whole-cell hybridization. *J. Phycol.* 32: 1049-1052.
- Adachi, M., Y. Sako, and Y. Ishida. 1997. Analysis of *Gymnodinium catenatum* Dinophyceae using sequences of the 5.8S rDNA-ITS regions and random amplified polymorphic DNA. *Fish. Sci.* 63: 701-707.
- Akiba, T. and Y. Hattori. 1949. Food poisoning caused by eating asari (*Venerupis semidecussata*) and oyster (*Ostrea gigas*) and studies on the toxic substance, venerupin. *Jpn. J. Exp. Med.* 20: 271-284.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lpman. 1990. Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215:403-410
- Anderson, D. M. 1989. Toxic algal blooms and red tides: A global perspective. In: T. Okaichi, D. M. Anderson and T. Nemoto (eds.), *Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology*, pp. 11-16. Elsevier Science Publishing Co, New York.
- Anderson, D. M. 1990. Toxin variability in Alexandrium species. 41-51. In *toxic marine phytoplankton*. Proc. 4th Int. Conf. Elsevier.
- Anderson, D. M. 1997. Turning back the harmful red tide. *Nature* 388: 513-514.
- Anderson, D. M., Kulis, G. J., J. J. Sullivan and S. Hall. 1990a. Toxin composition variations in one isolate of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Toxicon* 28: 885-893
- Anderson, D.M., D.M. Kulis, J.J. Sullivan, S. Hall, and C. Lee (1990a) Dynamics and physiology of STX production by the dinoflagellates Alexandrium spp. *Mar. Biol.* 104: 511-524
- Baden, D. G. 1983. Marine food-borne dinoflagellate toxins. *Int. Rev. Cytol.* 82:

99–150

- Balech, E. 1995. *The genus Alexandrium (Dinoflagellata)*, 151 pp. Sherkin Island Marine Station, Co. Cork
- Boczar, B. A., J. Liston, and R. A. Cattolico. 1991. Characterization of satellite DNA from three marine dinoflagellates (Dinophyceae): *Glenodinium* sp. and two members of the toxic genus. *Protogonyaulax*. *Plant Physiol.* 97: 613-618
- Boczar, B. A., M. A. Beitler., J. Liston., J. J. Sullivan. and R. A. Cattolico. 1988. Paralytic shellfish toxins in *protogonyaulax tamarensis* and *protogonyaulax catenella* in axenic culture. *Plant Physiol.* 88: 1285-1290
- Bowers, H. A., T. Tengs, H. B. Glasgow Jr., J. M. Burkholder, P. A. Rublee, and D. W. Oldach. 2000. Development of real-time PCR assays for rapid detection of *Pfiesteria piscicida* and related dinoflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4641-4648.
- Boyer, G. L., J. J. Sullivan., R. J. Anersen., P. J. Harrison. and F. J. R. Taylor. 1987. Effects of nutrient limitation on toxin production and composition in the marine dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. *Mar. Biol.* 96: 123-128
- Burkholder, J. M., E. J. Noga, C. H. Hobbs, and H. B. Glasgow, Jr. 1992. New 'phantom' dinoflagellate is the causative agent of major estuarine fish kills. *Nature*, 358: 407–410.
- Burkholder, J. M., H. B. Glasgow, Jr., and K. A. Steidinger 1995. Stage transformations in the complex life cycle of an ichthyotoxic "ambush–predator" dinoflagellates. In P. Lassus, G. Arzul, E. Erard–Le Denn, P. Gentien, C. Marcaillou–Le Baut (eds.): 567–572. Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier Publishing, Paris.
- Callard, D., and L. Mazzoline. 1997. Identification of proliferation-induced genes in *Arabidopsis thaliana*. Characterization of a new member of the highly evolutionarily conserved histone H2A.F/Z variant subfamily. *Plant Physiol.* 115: 1385-1395.
- Cantoni, G. L. 1975. Biochemical methylations: selected aspects. *Annu. Rev. Biochem.* 44: 435-441
- Cardwell, R D., Olsen, S., Carr, M. I. and Sanborn, E. W. 1979. Causes of oyster

- mortality in South Puget Sound. NOAA Tech. Mem. ERL MESA p. 39.
- Carpenter, E. J., and J. Chang. 1988. Species-specific phytoplankton growth rates via diel DNA synthesis cycles. 1. Concept of the method. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 43: 105-111
- Cavalier-Smith, T. 1993. Kingdom Protozoa and its 18 phyla. *Microbiol. Rev.* 57: 953-994.
- Chang Hoon Kim, Yoshihiko Sako and Yuzaburo Ishida 1995. Inheritance of PSP Toxin composition in the Toxic Dinoflagellate *Alexandrium* spp. The Korean Journal of Phycology. 10(1): 59-67.
- Chang, J., and E. J. Carpenter. 1991. Species-specific phytoplankton growth rates via diel DNA synthesis cycles. 5. Application to natural populations in Long Island Sound. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 78: 115-122
- Cherest, H., Y. Surdin-Kerhan, F. Exinger, and F. Lacroute. 1978. S-Adenosylmethionine requiring mutants in *Saccharomyces cerevisiae*: evidences for the existence of two methionine adenosyl transferases. *Mol. Gen. Genet.* 163: 153-167
- Cheun, B. S., Loughran, M., Hayashi, T., Nagashima, Y., and Watanabe, E. 1998. Use of a channel biosensor for the assay of paralytic shellfish toxins. *Toxicon* 36, 1371-1381.
- Cheung, P., C. D. Allis. And P. Sassone-Corsi. 2000. Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 103: 263-271.
- Chisholm, S. W. 1981. Temporal patterns of cell division in unicellular algae. 150-181. In *Physiological bases of phytoplankton ecology*. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci. 210
- Cho, C. H. 1978. On the *Gonyaulax* red tide in Jinhae Bay. *Bull. Korean Fish. Soc.* 11: 111-114.
- Dale, B. Yentsch, C. M. 1978. Red tide and paralytic shellfish poisoning. *Oceanus*, 21: 41-49
- Daugbjerg, N., G. Hansen, J. Larsen, and Ø. Moestrup. 2000. Phylogeny of some of the major genera of dinoflagellates based on ultrastructure and partial LSU rDNA sequence data, including the erection of three new genera of unarmored dinoflagellates. *Phycologia* 39: 302-317.

- Douglas, D. J., D. Landry and S. E. Douglas. 1994. Genetic relatedness of toxic isolates of the marine diatom *Pseudonitzschia* (Bicillariophyceae) : phylogenetic analysis of 18S rRNA sequences. *Nat. Toxins*, 2: 166–174.
- Douglas, D. J., U. P. Ramsey, J. A. Walter, and J. L. C. Wright. 1992. Biosynthesis of the neurotoxin domoic acid by the marine diatom *Nitzschia pungens* forma multiseriis, determined with [<sup>13</sup>C] -labelled precursors and nuclear magnetic resonance. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*: 714–716
- Draisci, R., E. Ferretti, L. Palleschi, C. Marchiafava, R. Poletti, A. Milandri, A. Ceredi, and M. Pompei. 1999. High levels of yessotoxin in mussels and presence of yessotoxin and homoyessotoxin in dinoflagellates of the Adriatic Sea. *Toxicon* 37: 1187-1193.
- Dunahay, T. G. 1993. Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with silicon carbide whiskers. *BioTechniques* 15: 452-460
- Dunahay, T. G., E. E. Jarvis, and P. G. Roessler. 1995. Genetic transformation of the diatoms *Cyclotella cryptica* and *Navicula saprophila*. *J. Phycol.* 31: 1004-1012.
- Edgcomb, V. P., D. T. Kysela, A. Teske, A. de Vera Gomez, and M. L. Sogin. 2002. Benthic eukaryotic diversity in the Guaymas Basin hydrothermal vent environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 7658-7662.
- Fairey, E. R., Edmunds, J. S. G., and Ramsdell, J. S. (1997) A cell-based assay for brevetoxins, saxitoxins, and ciguatoxins using a stably expressed c-fos-luciferase reporter gene. *Analytical biochemistry* 251, 129–132.
- Faust, M. A. and R. A. Gullede. 2002. Identifying Harmful Marine Dinoflagellates. Smithsonian Contributions from United States National Herbarium. 42: 1-144.
- Fraga, S., I. Bravo, M. Delgado, J. M. Franco and M. Zapata, 1995. *Gyrodinium impudicum* sp. nov. (Dinophyceae), a non-toxic, chain-forming, red tide dinoflagellate. *Phycologia*, 34: 514–521.
- Franks, P. J. S. and Anderson, D. W. 1992. Alongshore transport of a toxic phytoplankton bloom in a buoyancy current – *Alexandrium tamarense* in the Gulf of Maine. *Mar. Biol.* 112: 153–164
- Fukuyo, Y. and H. Inoue 1990. *Alexandrium affine* (Inoue et Fukuyo) Balech, pp. 84-

85. In Y. Fukuyo, H. Takano, M. Chihara, and K. Matsuoka (eds.), *Red Tide Organisms in Japan: An Illustrated Guide*, Uchida Rokakuho, Tokyo.
- Gaspar T. O. and D. M. Anderson. 2000. Appl. Env. Microbiol. vol: 2105–2112
- Geraud, M.-L., Herzog, and M. O. Soyer-Gobillard. 1991. Nucleolar localization of rRNA coding sequences in *Prorocentrum micans* Her. (Dinomastigote, kingdom protocista) by *in situ* hybridization. *BioSystems* 26: 61-74.
- Gieser, L., Swaroop, A. 1992. Expressed sequence tags and chromosomal localization of cDNA clones from a subtracted retinal pigment epithelium library. *Genomics* 13: 873-876
- Graham, L. E. 2000. Introduction to the algae. In *Algae*, (ed.), L. E. Wilcox, 1-21. Prentice Hall, London.
- Hall, L. M., K. N. Taylor, and D. D. Jones. 1993. Expression of a foreign gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene* 124: 75-81.
- Hall, S. (1982) Toxins and toxicity of *Protogonyaulax* from the northeast Pacific. Ph.D. Thesis, Univ. of Alaska, Fairbanks. 196 pp
- Hall, S., G. Strichartz, E. Moczydlowski, A. Ravindran, and P. B. Reichardt. 1990. The saxitoxins: sources, chemistry and pharmacology. In *Marine toxins: origin, structure and molecular pharmacology*. S. Hall and G. Strichartz (eds.). American Chemical Society, Washington, D.C. 29-65.
- Hallegraeff, G. M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32: 79-99.
- Halstead, B. W. 1978. Invertebrate. In : *Poisonous and Venomous Marine Animals of the World* (revised ed.).
- Han, M. S., J. K. Jeon, and Y.-H. Yoon 1993. Distribution and toxin profiles of *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech (Dinoflagellata) in the southeastern coastal waters, Korea. *Korean J. Phycol.* 8: 7-13.
- Han, M. S., J. K. Jeon, and Y. O. Kim. 1992. Occurrence of dinoflagellate *Alexandrium tamarense*, a causative organism of paralytic shellfish poisoning in Chinhae Bay, Korea. *J. Plankton Res.* 14: 1581-1592.
- Hansen, P. J., Cembella, A. D. and Moestrup, O. 1992. The marine dinoflagellate

- Alexandrium ostenfeldi : paralytic shellfish toxin concentration, composition, and toxicity to a tintinnid ciliate. *J. Phycol.* 28: 597–603
- Herzog, M. and L. Maroteaux. 1986. Dinoflagellate 17S rRNA sequence inferred from the gene sequence: evolutionary implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8644-8648.
- Herzog, M. and M. O. Soyer. 1981. Distinctive features of dinoflagellate chromatin. Absence of nucleosomes in a primitive species, *Prorocentrum micans* E. *Eur. J. Cell Biol.* 23: 295-302
- Horiguchi, T. and R. N. Pienaar, 1994. Ultrastructure of a new marine sand-dwelling dinoflagellate, *Gymnodinium quadrilobatum* sp. nov. (Dinophyceae) with special reference to its endosymbiotic alga. *Env. J. Phycol.* 29: 237–245.
- Huelsenbeck, J. P. and F. Ronquist. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Huelsenbeck, J. P., F. Ronquist, R. Nielsen, and J. P. Bollback. 2001. Evolution- Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294: 2310-2314.
- Iwasaki, H. 1961. The life cycle of *Porphyra tenera* *in vitro*. *Biol. Bull.* 121: 173-187.
- James, S. A., M. D. Collins and I. N. Roberts. 1994. Genetic interrelationship among species of the genus *Zygosaccharomyces* as revealed by small-subunit rRNA gene sequence. *YEAST*. Vol. 10: 871–881.
- Johnsen, G., N. B. Nelson, R.V. M. Jovine, and B. B. Preselin 1994. Chromoprotein and pigment dependent modeling of spectral light absorption in two dinoflagellates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 114: 245-258
- Joseph, R., D. Dou, and W. Tsang. 1994. Molecular cloning of a novel mRNA (neuronatin) that is highly expressed in neonatal mammalian brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201: 1227-1234.
- Jovine, R. V. M., E. L. Triplett, N. B. Nelson, and B. B. Prezelin. 1992. Quantification of chromophore pigments, apoprotein abundance and isoelectric variants of peridinin chlorophyll a protein complexes (PCPs) in the



- dinoflagellates *Heterocapsa pygmea* grown under variable light conditions. *Plant Cell Physiol.* 33: 733-741
- Kelly, M.C., and E.M. MacDonald (1996) SOAEFD toxic algal monitoring report (1 January 1996 to 31 December 1996). Fisheries Research Service Report 2/97
- Kemp, P. F., S. Lee, and J. LaRoche. 1993. Estimating the growth rate of slowly growing marine bacteria from RNA content. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2594-2601
- Kerkhof, L., and B. B. Ward. 1993. Comparison of nucleic acid hybridization and fluorometry for measurement of the relationship between RNA/DNA ratio and growth rate in a marine bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1303-1309
- Kim, C. H. and J. B. Shin. 1997. Harmful and toxic red tide algal development and toxins production in Korean coastal waters. *Algae* 12: 269-276.
- Kim, H. G. 1997. Recent harmful algal blooms and mitigation strategies in Korea. *Ocean Res.* 19: 185-192.
- Kim, H. G., K. Matsuoka, S. G. Lee, and K. H. An. 1996. The occurrence of a dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from Chinhae Bay, Korea. *J. Korean Fish. Soc.* 29: 837-842.
- Kim, H. G., S. G. Lee, K. H. An, S. H. Youn, P. Y. Lee, C. K. Lee, E. S. Cho, J. B. Kim, H. G. Choi, and P. J. Kim. 1997. *Recent Red Tides in Korean Coastal Waters*, 280 pp. National Fisheries Research and Development Institute, Busan.
- Kim, K. Y., M. Yoshida, Y. Fukuyo, and C. H. Kim. 2002. Morphological observation of *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech, *A. catenella* (Whedon et Kofoid) Balech and one related morphotype (Dinophyceae) in Korea. *Algae* 17: 11-19.
- Kofoid, C. A. and O. Swezy. 1921. The free-living unarmored dinoflagellates. *Mem. Univ. Calif.* 5: 1-562.
- Kralovec, J. A., Laycock, M. V., Richards, R., and Usleber, E. (1996) Immobilization of small molecules on solid matrices: a novel approach to enzyme-linked immunosorbent assay screening for saxitoxin and evaluation of anti-saxitoxin antibodies. *Toxicon* 34, 1127-1140.
- Krishnan, G., Morabito, M. A., and Moczydlowski, E. (2001) Expression and characterization of Flag-epitope- and hexahistidine-tagged derivatives of

- saxiphilin for use in detection and assay of saxitoxin. *Toxicon* 39, 291–301.
- Leao, J. M., A. G. Martinez., J. A. Rogriguez Vazquez. 1998. Presented at the 5th International Symposium on Capillary Electrophoresis and second International Meeting on Capillary Electrochromatography. York. 26-28.
- Lee, S. G., J. S. Park, and H. G. Kim. 1993. Taxonomy of marine toxic flagellates occurring in the southern coastal waters of Korea. *Bull. Natl. Fish. Res. Dev. Agen.* 48: 1-23.
- Lenaers, G., H. Nielson, J. Engberg and M. Herzog, 1988. The secondary structure of large-subunit rRNA divergent domains, a marker for protist evolution. *Biosystems*, 21: 215–222.
- Lenaers, G., L. Maroteaux, B. Michot and M. Herzog, 1989. Dinoflagellates in evolution. A molecular phylogenetic analysis of large subunit ribosomal RNA. *J. Mol. Evol.*, 29: 40–51.
- Liang, P., and A. B. Pardee. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971
- Liang, P., L. Averboukh, and A. B. Pardee. 1993. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res.* 21: 3269-3275
- Llewellyn, L. E., Doyle, J., and Negri, A. P. (1998) A high-throughput, microtiter plate assay for paralytic shellfish poisons using the saxitoxin-specific receptor, saxiphilin. *Analytical biochemistry* 261, 51–56.
- Locke, S. J., P. Thibault. 1994. Improvement in detection limits for the determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish tissues using capillary electrophoresis /electrospray mass spectrometry and discontinuous buffer systems. *Anal. Chem.* 66: 3436-3446.
- Machabee, S., L. Wall and D. Morse. 1994. Expression and genomic organization of a dinoflagellates gene family. *Plant Mol. Biol.* 25: 23–31.
- Maroteaux, L., M. Herzog and M. O. Soyer-Gobillard, 1985. Molecular organization of dinoflagellate ribosomal DNA: evolutionary implications of the deduced 5.8S rRNA secondary structure. *Biosystems*, 18: 307–319.

- Marr, J. C., Jackson, A. E. and McLachlan, J. L. 1992. Occurrence of *Prorocentrum lima*, a DSP toxin-producing species from the Atlantic coast of Canada. *J. Appl. Phycol.* 4: 17-24
- Mato, J. M., F. J. Corrales., S. C. Lu. And M. A. Avila. 2002. S-Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. *FASEB J.* 16: 15-26
- Matsuoka, K. and Y. Fukuyo. 1986. Cyst and motile morphology of a colonial dinoflagellate *Pheopolykrikos hartmanii* (Zimmermann) comb. nov. *J. Plankton Res.* 8: 811-818.
- McFarren, E. F., Tanabe, H., Silva, F. J., Wilson, W. B., Campbell, J. E. and Lewis, K. H. 1965. The occurrence of a ciguatera-like poison in oysters, clams, and *Gymnodinium breve* cultures. *Toxicon* 3: 111-123.
- Mitchison, J. M. 1969. Enzyme synthesis in synchronous cultures. *Science* 165: 657-663
- Mitchison, J. M., J. Creanor, and B. Novak. 1991. Coordination of growth and division during the cell cycle of fission yeast. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 56: 557-565
- Mittag, M., D. H. Lee. and J. W. Hastings. 1994. Circadian expression of the luciferin-binding protein correlates with the binding of a protein to the 3' untranslated region of its mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 5257-5261
- Montresor, M., A. Zingone, and D. Marino. 1993. The calcareous resting cyst of *Pentaparsodinium tyrrhenicum* com. nov. (Dinophyceae). *J. Phycol.* 29: 223-230.
- Moon-van der Staay, S. Y., R. De Wachter and D. Vaultot. 2001. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature* 409: 607-610.
- Mountain, H. A., and P. E. Sudbery. 1990. The relationship of growth rate and catabolite repression with WH12 expression and cell size in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 136: 733-737
- Murata, M., A. M. Legrand, Y. Ishibashi, and T. Yasumoto. 1989. *J. Am. Chem. Soc.* 111: 8927.
- Nakajinma, I., Oshima, Y. and Yasumoto, T. 1981. Toxicity of benthic

- dinoflagellates in Okinawa. *Bull. Jpn Soc. Sci. Fish.* 47: 1029–1033.
- Newman, E. B., L. I. Budman, E. C. Chan., R. C. Greene., R. T. Lin., C. L. Woldringh, and R. D'ari. 1998. Lack of S-Adenosylmethionine results in a cell division defect in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 3614-3619
- Nightingale, W. H. 1936. Red Water Organisms. Their Occurrence and Influence Upon Marine Aquatic Animals With Special Reference to Shellfish in the Waters of the Pacific Coast. The Argus Press, Seattle, Washington.
- Ogata T., M. Kodama and J. Ishimaru 1987. Toxin production in the dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. *Toxicon* 25: 923-928
- Ogawa, H., Gomi, T., Mueckler, M. M., Fujioka, M., Backlund, P. S., Aksami, R. R., Unson, C. G. and Cantoni, G. L. 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 719-723
- Okada, G., H. Teraoka. and K. Tsukada. 1981. Multiple species of mammalian S-adenosylmethionine synthetase. Partial purification and characterization. *Biochemistry* 20: 934-940
- Okaichi, T. and Imatomi, Y. 1979. Toxicity of *Prorocentrum minimum* var. *mariae-lebouriae* assumed to be a causative agent of short-necked clam poisoning. In *Toxic Dinoflagellate Blooms* (Eds D. L. Taylor and H. H. Seliger), Elsevier/North Holland, New York: 385–388.
- Oldach, D. W., C. F. Delwiche, K. S. Jakobsen, T. Tengs, E. G. Brown, J. W. Kempton, E. F. Schaefer, H. A. Bowers, H. B. Glasgow Jr., J. M. Burkholder, K. A. Steidinger, and P. A. Rublee. 2000. Heteroduplex mobility assay-guided sequence discovery: Elucidation of the small subunit (18S) rDNA sequences of *Pfiesteria piscida* and related dinoflagellates from complex algal culture and environmental sample DNA pools. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97: 4303-4308.
- Olsen, G. J., D. J. Lane, S. J. Giovannoni, N. R. Pace, and D. A. Stahl. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* 40: 337-365.
- Olson, R. J., and S. W. Chisholm. 1986. Effects of light and nitrogen limitation on the cell cycle of the dinoflagellate *Amphidinium carteri*. *J. Plankton Res.* 8: 785-793
- Onoue, Y., Noguchi, T. and Hashimoto, K. 1980. Studies on paralytic shellfish

- poison from the oyster cultured in Senzaki Bay, Yamaguchi Prefecture. *Bull. Jpn Soc. Sci. Fish.* 46: 1031–1034.
- Onoue, Y., Noguchi, T., Maruyama, J., Hashimoto, K. and Ikeda, T. 1981a. New toxins separated from oysters and *Protogonyaulax catenella* from Senzaki Bay, Yamaguchi Prefecture. *Bull. Jpn Soc. Sci. Fish.* 47: 1643.
- Onoue, Y., Noguchi, T., Maruyama, J., Uneda, Y., Hashimoto, K. and Ikeda, T. 1981b. Comparison of PSP compositions between toxic oysters and *Protogonyaulax catenella* from Senzaki Bay, Yamaguchi Prefecture. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 47: 1347–1350.
- Oshima, Y. 1995. Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms, 475-480 In *Harmful marine algal blooms*, (eds.), P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentien, and C. Marcaillou. Lavoisier, Paris, France.
- Pace, N. R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276:734-740.
- Pardee, A. B., R. Dubron, J. L. Hamlin, and R. F. Klevtzien. 1978. Animal cell cycle. *Annu. Rev. Biochem.* 47: 715-750
- Price, C., K. Nasmyth, and T. Schuster. 1991. A general approach to the isolation of cell cycle regulated genes in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 218: 543-556.
- Proctor, N. H., S. L. Chan, and A. J. Trevor. 1975. Production of saxitoxin by cultures of *Gonyaulax catenella*. *Toxicon* 13: 1-9
- Ralling, G., S. Bodrug, and T. Linn. 1985. Growth rate-dependent regulation of RNA polymerase synthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 201: 379-386.
- Reinecke, P. 1967. *Gonyaulax grindleyi* sp. nov.: a dinoflagellate causing a red tide at Elands Bay, Cape Province, in December 1966. *J. South Afr. Bot.* 33: 157-160.
- Rizzo, P. 1991. The enigma of the dinoflagellate chromosome. *J. Protozool.* 38: 246-252.
- Rizzo, P. J. 1981. Comparative aspects of basic chromatin proteins in dinoflagellates. *BioSystems.* 14: 433-443
- Rizzo, P. J. 1987. Biochemistry of the dinoflagellate nucleus. 143-173. In *The biology of*

- dinoflagellates*. E. J. R. Taylor (eds.), Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, Calif.
- Rizzo, P. J., and R. L. Morris. 1984. Some properties of the histone-like protein from *Chrythecodinium cohnii* (HCc). *BioSystems*. 16: 211-216.
- Rodriguez, M., J. W. Cho, H. W. Sauer, and P. J. Rizzo. 1994. Evidence for the presence of CD2-2 like protein kinase in the dinoflagellate *Cayptecodinium cohmi*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 40: 91-96.
- Rodriguez, Vazquez. J. A., A. G. Martinez., J. M. Leao., N. Pineiro. 1998. Presented at Euroanalysis 10. Basel. 6-11
- Rowan, R. and D. A. Powers. 1992. Ribosomal RNA sequences and the diversity of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 3639-3643
- Sala-Rovira, M., M. L. Geraud, D. Caput, F. Jacques, M. O. Soyer-Gobillard, G. Vernet, and M. Herzog. 1991. Molecular cloning and immunolocalization of two variants of the major basic nuclear protein (HCc) from the histone-less eukaryote *Crythecodinium cohnii* (Pyrrophyta). *Chromosoma* (Berl.) 100: 510-518.
- Saldarriaga, J. F., F. J. R. Taylor, P. J. Keeling, and T. Cavalier-Smith. 2001. Dinoflagellate nuclear SSU rRNA phylogeny suggests multiple plastid losses and replacements. *J. Mol. Evol.* 53: 204-213.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual* (2nd edition).
- Satake, M., T. Ichimura, K. Sekiguchi, S. Yoshimatsu, and Y. Oshima. 1999. Confirmation of yessotoxin and 45,46,47-trinoryessotoxin productions by *Protoceratium reticulatum* collected in Japan. *Nat. Toxins* 7: 147-150.
- Saunders, G. W., D. R. A. Hill, J. P. Sexton, and R. A. Andersen. 1997. Small-subunit ribosomal RNA sequences from selected dinoflagellates: testing classical evolutionary hypothesis with molecular systematic methods, pp.237-259. *In* D. Bhattacharya (ed.), *Origins of Algae and their Plastids*, Springer, New York.
- Schantz, E. J., Lynch, J. M., Vayvade, G., Masumoto, K. and Rapoport, H. 1966. The purification and characterization of the poison produced by *Gonyaulax*

- catenella in axenic culture. *Biochemistry* 5: 1191–1195.
- Schmidt, R. J. and Loeblich III, A. R. 1979. A discussion of the systematics of toxic *Gonyaulax* species containing paralytic shellfish poison. In *Toxic Dinoflagellate Bloom* (Eds D. L. Taylor and H. H. Seliger), Elsevier/North Holland, New York: 83–88.
- Schmidt, R. J. and Loeblich III, A. R. 1979. Distribution of paralytic shellfish poison among Pyrrophyta. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 59. : 49–487.
- Schnepf, E. and M. Elbräechter. 1999. Dinophyta plastids and phylogeny: a review. *Grana* 38: 81-97.
- Scholin, C. A. and D. M. Anderson, 1994. Identification of group and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). I. RFLP analysis of ssu rRNA genes. *J. Phycol.*, 30. : 744–754.
- Scholin, C. A., D. M. Anderson, and M. Sogin. 1993. Two distinct small-subunit ribosomal RNA genes North American toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 29: 209-216.
- Scholin, C. A., M. C. Villac. K. R. Buck. J. M. Krupp, D. A. Powers, G. A. Frysell and F. P. Chavez. 1994a. Ribosomal DNA sequences discriminate among toxic and non-toxic *Pseudonitzschia* species. *Nat. Toxins.* 2: 152–165.
- Scholin, C. A., M. L. Roman, and P. E. Miller. 1996. DNA probe-based assays for rapid detection of toxic algal species in environmental samples. *J. Phycol.* 32: 43
- Scholin, C. A., M. Sogin and D. M. Anderson, 1994b. Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (dinophyceae). II. Sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA gene. *J. Phycol.* 30: 999–1011.
- Sharma, Y. K., and K. R. Davis. 1995. Isolation of a novel *Arabidopsis* ozone-induced cDNA by differential display. *Plant Mol. Biol.* 93: 1685-1698
- Shimizu Y. and G. Wrensford. 1993. Peculiarities in the biosynthesis of brevetoxins and metabolism of *Gymnodinium breve*: 919–923. In *toxic phytoplankton blooms in the sea. Proc. 5th. int. conf. on Toxic marine phytoplankton* Elsevier.

- Shimizu Y. and G. Wrensford. 1993. Peculiarities in the biosynthesis of brevetoxins and metabolism of *Gymnodinium breve*. 919-923. In *Toxic phytoplankton blooms in the sea*. Proc. 5th. int. conf. on Toxic marine phytoplankton Elsevier.
- Shimizu Y., S. Gupta and A. V. K. Prasad. 1990a. Biosynthesis of dinoflagellate toxins. In toxic marine phytoplankton Proc. 4th Int. Conf. Elsevier. 57: 62-73.
- Shimizu Y., S. Gupta and A. V. K. Prasad. 1990b. Biosynthesis of dinoflagellate toxins. 62-73. In *toxic marine phytoplankton* Proc. 4th Int. Conf. Elsevier.
- Shimizu Y., S. Gupta and H. N. chou. 1990a. Biosynthesis of red tide toxins. In *Marine toxins: Origin, structure, and molecular pharmacology*. Am. Chem. Soc. Symp. Ser. 418.
- Shimizu Y., S. Gupta and H. N. chou. 1990b. Biosynthesis of red tide toxins.
- Shimizu, Y. 1993. Microalgal metabolites. Chem. Rev. 93: 1685-1698.
- Shimizu, Y., M. Norte, A. Hori, A. Genenah, and M. Kobayashi 1984. Biosynthesis of saxitoxin analogues: the unexpected pathway. J. Am. Chem. Soc. 106: 6433-6434.
- Shumway, S. E. 1990. A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. J. World Aquacult. Soc. 21: 65-104.
- Sigeo, D. C. (1953) The dinoflagellate chromosome. *Adv. Bot. Res.* 12, 205-264.
- Siu, G. K. Y., M. L. C. Young, and D. K. O. Chan. 1997. Environmental and nutritional factors which regulate population dynamics and toxin production in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Hydrobiologia* 352: 117-140
- Smayda, T. J. 1990. Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: Evidence for a global epidemic. In: E. Graneli, B. Sundstrom, L. Edler and D. M. Anderson (eds.) *Toxic Marine Phytoplankton*, pp. 29-40. Elsevier Science Publishing Co, New York.
- Smayda, T. J. 1992. Global epidemic of noxious phytoplankton blooms and food chain consequences in large ecosystems. 275-307. In *Food chains models and management of large marine ecosystems*. (ed.). K. Sherman. Westview.
- Smith, G. B. 1975. Phytoplankton blooms and reef kills in the mid-eastern Gulf of Mexico. Fla Mar. Res. Publ. 8: 8
- Soltis, D. E. and P. S. Soltis. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene



- for phylogenetic analysis, pp. 1-42. *In* D. E. Soltis, P. S. Soltis, and J. J. Doyle (eds.), *Molecular Systematics of Plants II. DNA Sequencing*, Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Spudich, J., and R. Sager. 1980. Regulation of Chlamydomonas cell cycle by light and dark. *J. Cell Biol.* 85: 136-145
- Steidinger, K. A. 1983. A reevaluation of toxic dinoflagellate biology and ecology. *In* *Progress in Phycological Research*, vol. 2, (eds.), F. E. Round and D. J. Chapman, 147-188. Elsevier, New York.
- Steidinger, K. A. and D. G. Baden. 1984. Toxic marine dinoflagellates. *In* *Dinoflagellates*, (ed.), D. L. Spector, 201-261, Academic Press, Orlando.
- Steidinger, K. A. and K. Tangen. 1996. Dinoflagellates, pp. 387-598. *In* C. R. Tomas (ed.), *Identifying Marine Phytoplankton*, Academic Press, San Diego.
- Sun, C. J., W. -M., J. -J. Hwang., S. C. Stain. And S. C. Lu. 1996. Changes in S-Adenosylmethionine synthetase in human liver cancer: molecular characterization and significance. *Hepatology* 24: 1090-1097
- Swofford, D. L. 1998. *PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\* and many other methods)*. Version 4.08b. Sinauer, Sunderland, MA.
- Takayama, H. and Matsumoto, K. 1991. A reassessment of the specific characters of *Gymnodinium mikimotoi* Miyake et Kominami et Oda and *Gymnodinium nagasakiense* Takayama et Adachi. *Bull. Plankton Soc. jpn* 38: 53-68.
- Tangen, K. 1977. Blooms of *Gyrodinium aureolum*(Dinophyceae) in north European waters, accompanied by mortality n marine organisms. *Sarsia* 63: 123-133
- Taroncher-Oldenburg G., and Donald M. Anderson. 2000. Identification and characterization of three differentially expressed genes encoding S-Adenosylhomocysteine Hydrolase, Methionine aminopeptidase and a Histone-Like protein, in the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *AEM*. 2105-2112.
- Taroncher-Oldenburg, G., D. M. Kulis, and D. M. Anderson. 1997. Toxin variability during the cell cycle of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Limnol. Oceanogr.* 42: 1178-1188.
- Taylor, F. J. R. 1985. The taxonomy and relationships of red tide dinoflagellates. *In*

- Toxic Dinoflagellates*, (eds.), D. M. Anderson, A. W. White and D. G. Baden, 11-26: Elsevier, New York.
- Taylor, F. J. R. and Y. Fukuyo. 1998. The neurotoxicogenic dinoflagellate genus *Alexandrium* Halim: general introduction, pp. 3-11. *In* D. M. Anderson, A. D. Cembella, and G. M. Hallegraeff, (eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*, NATO ASI Series, Vol. 41, Springer-Verlag, Berlin.
- Tengs, T., H. A. Bowers, A. P. Ziman, D. K. Stoecker, and D. W. Oldach. 2001. Genetic polymorphism in *Gymnodinium galatheanum* chloroplast DNA sequences and development of a molecular detection assay. *Mol. Ecol.* 10: 515-523.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Tindall, D. R., Dickey, R. W., Carlson, R. D. and Morey-Gaines, G. 1984. Ciguatogenic dinoflagellates from the Caribbean Sea. *In* Seafood Toxins (Ed. E. Ragelis), ACS Symposium Series, Washington, DC: 225-240.
- Tobena R., S. Horikawa., V. Calvo. And S. Alemany. 1996. Interleukin-2 induces  $\gamma$ -S-daenosyl-L-methionine synthetase gene expression during T-lymphocyte activation. *Biochem. J.* 319: 929-933
- Tomas, C. R. 1997. Introduction and historical background. *In* *Identifying marine phytoplankton*, (ed.), G. R. Hasle, 1-4. Academic Press, California
- Toriumi, S. 1990. *Gyrodinium instriatum* Freudenthal et Lee, pp. 62-63. *In* Y. Fukuyo, H. Takano, M. Chihara, and K. Matsuoka (eds.), *Red Tide Organisms in Japan: An Illustrated Guide*, Uchida Rokakuho, Tokyo.
- Triplett, E. L., R. V. M. Jovine, N. S. Govind, S. J. Roman, S. S. Chang, and B. B. Prezelin. 1993. Characterization of two full-length cDNA sequences encoding apoproteins of peridinin-chlorophyll a-protein (PCP) complexes. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 2: 246-254.
- Turabo, A., L. Sidari, R. D. Loggia, and T. Yasumoto. 1998. Occurrence of yessotoxin-like toxins in phytoplankton and mussels from northern Adriatic Sea,

- pp. 470-472. In B. Reguera, J. Blanco, M. L. Fernández, and T. Wyatt, (eds.), *Harmful Algae*, Xunta de Galicia and Intergovernmental Commission of UNESCO.
- Utans, U., P. Liang, L. R. Wyne, M. J. Karnovsky, and M. E. Russell. 1994. Chronic cardiac rejection: identification of five upregulated genes in transplanted hearts by differential mRNA display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6463-6467
- van der Knaap, E., and H. Kende. 1995. Identification of a gibberellin induced gene in deepwater rice using differential display of mRNA. *Plant Mol. Biol.* 28: 589-592
- Van Dolah, F. M., T. A. Leighfield, H. D. Sandel, and C. K. Hsu. 1995. Cell division in the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* is phased to the diurnal cycle and accompanied by activation of the cell cycle regulatory protein cdc2 kinase. *J. Phycol.* 31: 395-400
- Vaulot, R. J. Olson, and S. W. Chisholm. 1986. Light and dark control of the cell cycle in two marine phytoplankton species. *Exp. Cell Res.* 167: 38-52.
- Wan, J.S., S. J. Sharp, G. M. -C. Poerier, P. C. Wagaman, J. Chambers, J. Pyati, Y. -L. Hom, J. E. Galindo, A. Huvar, P. A. Peterson, M. R. Jackson, and M. G. Erlander. 1996. Cloning differentially expressed mRNA. *Nat. Biotechnol.* 14: 1685-1691
- Weising, K., J. Schell, and G. Kahl. 1988. Foreign genes in plants; transfer, structure, expression, and applications. *Annu. Rev. Genet.* 22: 421-477.
- White, A. W. 1978. Salinity effects on growth and toxin content of *Gonyaulax excavate* a marine dinoflagellate causing paralytic shellfish poisoning. *J. phycol.* 14 : 475-479
- White, A. W., M. Anrak, and K. K. Hooi, 1984. Toxic red tides and shellfish in Southeast Asia. Proceedings of a consultative meeting, SEAFDEC, Singapore: 1-131
- Whyte, J. N. C., N. Haigh, N. G. Ginther, and L. J. Keddy. 2001. First record of blooms of *Cochlodinium* sp. (Gymnodiniales, Dinophyceae) causing mortality to aquacultured salmon on the west coast of Canada. *Phycologia* 40: 298-304.
- Williams, J. G. K., Hanafey, M. K., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymol.* 218: 704-740.

- Woelke, C. E. 1961. Pacific oyster *Crassostrea gigas* mortalities with notes on common oyster predators in Washington waters. *Proc. Nat. Shellfish Assoc.* 50: 53–66.
- Wuyts, J., Y. Van de Peer, T. Winkelmans, and R. De Wachter. 2002. The European small subunit ribosomal RNA database. *Nucleic Acids Res.* 30: 183-185.
- Yasumoto, T. 1990. Marine microorganisms toxins – an overview. In *Toxic Marine Phytoplankton* (Eds E. Graneli, B. Sundstrom, L. Edler and D. M. Anderson), Elsevier Science Publishing Co., New York: 3–8.
- Yasumoto, T., Underdal B., Aune, T., Hormazabal, V., Skulberg, O. M. and Oshima, Y. 1990. Screening for hemolytic and ichthyotoxic components of *Chrysochromulina polyepis* and *Gyrodinium aureolum* from Norwegian coastal waters. In *Toxic Marine Phytoplankton* (Eds E. Graneli, B. Sundstrom, L. Edler and D. M. Anderson), Elsevier Science Publishing Co., New York: 436–440.
- Yasumoto, T. and M. Murata. 1993. *Chem. Rev.* 93: 1897.
- Yeung, P. K. K., K. F. Kong, F. T. W. Wong and J. T. Y. Wong, 1996. Sequence data of two large subunit ribosomal RNA genes from an Asian strain of *Alexandrium catenella*. Direct Submission to Genbank (Accession No. U64434).
- Yoo, J. S., Y. Fukuyo, B. Cheun, S. G. Lee, and H. G. Kim. 2000. Toxic algal bloom caused by dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *J. Fish. Sci. Tech.* 3: 26-32.
- Yuki, K. and S. Yoshimatsu. 1989. Two fish-killing species of *Cochlodinium* from Harima-Nada, Seto Inland Sea, Japan, pp. 451-454. In T. Okaichi, D. M. Anderson, and T. Nemoto (eds.), *Red Tides: Biology, Environmental Science, and Toxicology*, Elsevier, New York.
- Yuki, K. and Yoshimatsu, S. 1989. Two fish-killing species of *Cochlodinium* from Harima Nada, Seto Inland Sea, Japan. In *Red Tides : Biology, Environmental Science and Toxicology* (Eds T. Okaichi, D. M. Anderson and t. Nemoto), Elsevier Science Publishing Co., New York: 451–454.
- Zardova, R., E. Costas, V. Lopez–Rodas, A. Garrido–Pertierra. and J. M. Baustista, 1995. Revised dinoflagellate phylogeny inferred from molecular analysis of large–subunit ribosomal RNA gene sequence. *J. Mol. Evol.*, 41: 637–645.

- Zhang, H. and S. Lin. 2002. Detection and quantification of *Pfiesteria piscicida* by using the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 989-994.
- 김학균, 박주석, 이상근, 안경호 1993. 한국 연안의 적조 생물, 국립 수산 진흥원, 51.
- 박영호, 장동석, 김선봉 1994. 수산가공학, 형설 출판사. pp. 241-243.
- 이수웅, 이희우, 박종규, 이진애, 박영식, 1998. 국내 남해안에 발생한 적조 원인 생물들의 24S rRNA 유전자 염기 서열 분석. 한국 해양 학회지 [바다], 3: 90-93.
- 이종수, 전중균, 한명수, Y. Oshima, T. Yasumoto. 1992. 진해만산 진주담치 및 *Alexandrium tamarense*의 마비성 패독, 한수지, 25: 144-150.
- 장동석, 신일식, 조학래, 김지희, 변재형, 박영호. 1988, 한국산 주요패류에 대한 독의 분포 특성 및 제독에 관한 연구, 1. 마비성 패류독의 제독에 관하여, 한수지, 21: 297-302.
- 전중균, 이순길, 허형택, 1988. 한국산 주요 이매패류의 마비성 패독 독화상황, 한국해양 학회지. 23: 123-129.



## 주 의

1. 이 보고서는 한국해양연구원에서 수행한 기본사업의 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 한국해양연구원에서 수행한 기본사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.