



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0103345
(43) 공개일자 2009년10월01일

(51) Int. Cl.

C12M 1/26 (2006.01) C12M 1/00 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01) C12Q 1/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0028886

(22) 출원일자 2008년03월28일

심사청구일자 2008년03월28일

(71) 출원인

한국과학기술연구원

서울 성북구 하월곡2동 39-1

(72) 발명자

정진영

서울 강남구 논현동 276 경복아파트 B-513

배효관

울산 남구 옥동 도성아파트 4동 309호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김영철, 김 순 영

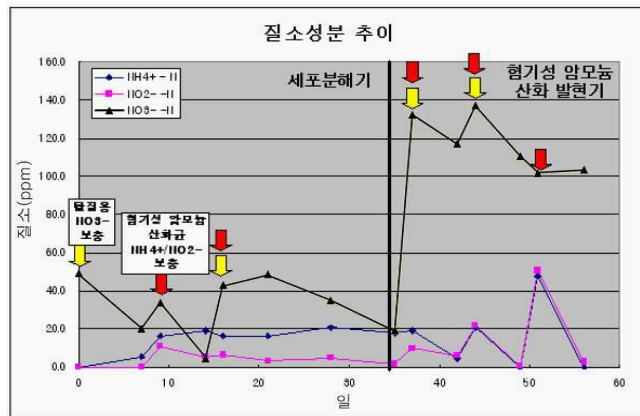
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 미생물 자원 내 혐기성 암모늄 산화균의 탐색 및 배양 방법

(57) 요약

미생물 자원 내에 존재하는 혐기성 암모늄 산화균을 탐색하고, 탐색된 혐기성 암모늄 산화균을 농후 배양하는 방법이 개시된다. 혐기성 암모늄 산화균을 체계적으로 탐색 후 농후 배양하는 것이 가능하고, 빠른 시간 내에 혐기성 암모늄 산화 반응을 유도할 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

김이중

서울 동작구 상도1동 566번지

정윤철

서울 도봉구 창1동 357 삼환빌라 104동 301호

상병인

서울 성북구 돈암1동 1-3

박경순

서울 금천구 독산본동 163-24

특허청구의 범위

청구항 1

미생물 자원 내에 존재하는 혐기성 암모늄 산화균을 탐색하고 탐색된 혐기성 암모늄 산화균을 농후 배양하는 방법으로서,

상기 방법은,

- (a) 한 종 이상의 미생물 자원을 채취하는 단계;
- (b) 상기 미생물 자원 내에 존재하는 혐기성 암모늄 산화균을 정량하여 혐기성 암모늄 산화균의 공급원으로서 적합한 미생물 자원을 선별하는 단계;
- (c) 상기 (b) 단계에서 선별된 미생물 자원에 존재하는 혐기성 암모늄 산화균 외의 미생물들을 조기 사멸시키는 단계; 및
- (d) 상기 혐기성 암모늄 산화균을 증폭 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 미생물 자원 내 혐기성 암모늄 산화균의 탐색 및 배양 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 방법은,

상기 (c) 단계 전에,

- (b-1) 상기 미생물 자원 내의 혐기성 암모늄 산화균의 군집 구조를 분석하여 유사한 군집들이 중복되어 배양되지 않도록 유사 군집을 배제하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 미생물 자원 내 혐기성 암모늄 산화균의 탐색 및 배양 방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

- 상기 (b) 단계는, 혐기성 암모늄 산화균의 16S rRNA 유전자를 증폭하여 혐기성 암모늄 산화균을 정량하는 것을 특징으로 하는 미생물 자원 내 혐기성 암모늄 산화균의 탐색 및 배양 방법.

청구항 4

제 2항에 있어서,

상기 (b-1) 단계는,

- 표지물질이 부착된 프라이머를 이용하여 혐기성 암모늄 산화균의 16S rRNA 유전자를 증폭한 후 DNA 제한효소를 처리하여 군집 구조를 판별하는 것을 특징으로 하는 미생물 자원 내 혐기성 암모늄 산화균의 탐색 및 배양 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 (b-1) 단계는,

서열번호 3의 정방향 프라이머;

서열번호 4의 역방향 프라이머; 및

Alu I 제한효소 및 Rsa I 제한효소 중 어느 하나 이상의 제한효소를 이용하며,

- 상기 정방향 프라이머는 표지물질이 부착된 것을 특징으로 하는 미생물 자원 내 혐기성 암모늄 산화균의 탐색 및 배양 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 (c) 단계는,

질산(NO_3^-)을 처리하는 것을 특징으로 하는 미생물 자원 내 혐기성 암모늄 산화균의 탐색 및 배양 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

<1> 본 발명은 미생물 자원 내 혐기성 암모늄 산화균의 탐색 및 배양 방법에 관한 것이다. 더 상세하게는, 미생물 자원 내에 존재하는 혐기성 암모늄 산화균을 조기 탐색하고, 탐색된 혐기성 암모늄 산화균을 농후 배양하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

<2> 하수 또는 폐수 내의 질소는 경제성과 안정성으로 인해 생물학적 공정을 통해 처리되었다. 암모니아(NH_4^+)는 아질산화 미생물에 의해 먼저 아질산(NO_2^-)으로 전환되고, 질산화 미생물에 의해 질산(NO_3^-)으로 최종적으로 전환된다.

<3> 아질산화 및 질산화 공정에서 이용되는 미생물은 호기성 독립영양 미생물로서 산소가 공급되는 조건에서 무기성 탄소를 에너지원으로 사용하게 된다. 따라서, 무기 탄소원이 충분한 조건에서 산소공급을 위한 폭기를 시행하여야 한다.

<4> 이후, 하수 및 폐수는 탈질소화 공정으로 이어지는데, 아질산 혹은 질산은 질소가스로 전환되어 공기 중으로 배출되어 결국 폐수 내의 총 질소량이 감소하게 된다. 탈질 공정에서 이용되는 미생물은 혐기성 종속영양 미생물로서 산소가 차단된 조건에서 충분한 유기탄소를 공급해주어야 한다.

<5> 상기와 같은 전통적인 생물학적 질소제거 공정을 운영할 때에는, 질산화 단계에서 폭기에 소요되는 에너지 비용이 크고, 탈질소화 공정에서는 부족한 유기 탄소원을 공급하기 위한 약품비가 많이 소요된다. 따라서, 운영비용을 절감할 수 있는 질소처리 공정 개발이 요구되고 있다.

<6> 이러한 에너지 및 비용상의 문제점들을 극복하기 위해서, 혐기성 암모늄 산화균을 질소처리 공정에 활용하기 위한 연구가 시도되었다. 혐기성 암모늄 산화균은, 혐기성 독립영양 조건에서 암모늄과 아질산을 기질로 사용하여 질소가스를 부산물로 생산하게 된다. 따라서, 폭기비용과 유기탄소 투하비용을 줄일 수 있는 경제적인 공정으로 인정받고 있다.

<7> 그러나, 혐기성 암모늄 산화균은 성장속도가 매우 느리다는 문제점을 가지고 있다. 이러한 문제점 때문에, 기존 활성 슬러지 및 혐기성 공정 슬러지에서 혐기성 암모늄 산화균을 발굴하는데 큰 어려움을 겪고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서, 연속 회분식 반응기(Sequencing Batch Reactor), 생물막 반응기(Membrane Bioreactor) 등의 기법들을 활용하여 혐기성 암모늄 산화균의 발굴 및 농후 배양을 시도하고 있으나, 아직까지 주목할 만한 성과는 없는 실정이다.

발명의 내용

해결하고자하는 과제

<8> 본 발명에 따른 첫 번째 목적은, 혐기성 암모늄이 다량 자생하고 있는 슬러지 및 미생물 자원을 선별하는 것이다.

<9> 본 발명에 따른 두 번째 목적은, 서로 상이한 균집을 이루고 있는 슬러지 및 미생물 자원을 농후 배양 함으로써 다양한 균주를 확보할 수 있는 확률을 높이는 것이다.

<10> 본 발명에 따른 세 번째 목적은, 혐기성 암모늄 산화균의 선택적 배양을 통해 혐기성 암모늄 산화균의 증식을 앞당기는 것이다.

과제 해결수단

- <11> 본 발명은 미생물 자원 내에 존재하는 혐기성 암모늄 산화균을 탐색하고 탐색된 혐기성 암모늄 산화균을 농후 배양하는 방법으로서,
- <12> 상기 방법은, (a) 한 종 이상의 미생물 자원을 채취하는 단계; (b) 상기 미생물 자원 내에 존재하는 혐기성 암모늄 산화균을 정량하여 혐기성 암모늄 산화균의 공급원으로서 적합한 미생물 자원을 선별하는 단계; (c) 상기 (b) 단계에서 선별된 미생물 자원 내에 존재하는 혐기성 암모늄 산화균 외의 미생물들을 조기 사멸시키는 단계; 및 (d) 상기 혐기성 암모늄 산화균을 증폭 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

효 과

- <13> 본 발명에 따른 혐기성 암모늄 산화균의 농후 배양 방법은, 혐기성 암모늄 산화균이 다량 자생하는 슬러지 및 미생물 자원을 분류하고 군집구조의 중복을 막아 효율적인 농후 배양을 가능하게 하는 효과가 있다. 또한, 혐기성 암모늄 산화균의 생장에 적절한 환경을 조성하여 혐기성 암모늄 산화 현상을 조기에 유도할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <14> 본 명세서에서 사용된 “미생물 자원” 이라 함은, 미생물을 공급하는 미생물 공급원을 의미하며 미생물을 공급하는 것이라면 그 종류에는 특별히 제한이 없다. 예컨대, 토양, 슬러지, 오수, 축산 폐기물 등을 들 수 있다.
- <15> 본 발명에 따른 미생물 자원 내 혐기성 암모늄 산화균의 탐색 및 배양 방법은, 하수처리공정, 산업폐수처리공정 또는 축산폐수처리공정 등에서 채취한 다양한 슬러지 및 미생물 자원에서 혐기성 암모늄 산화균을 선택적으로 농후 배양하기 위한 것이다.
- <16> 하나의 실시예에서, 상기 미생물 자원 내 혐기성 암모늄 산화균의 탐색 및 배양 방법은 하기의 단계들을 포함할 수 있다.
- <17> 상기 방법은,
- <18> (a) 한 종 이상의 미생물 자원을 채취하는 단계;
- <19> (b) 상기 미생물 자원 내에 존재하는 혐기성 암모늄 산화균을 정량하여 혐기성 암모늄 산화균의 공급원으로서 적합한 미생물 자원을 선별하는 단계;
- <20> (c) 상기 (b) 단계에서 선별된 미생물 자원 내에 존재하는 혐기성 암모늄 산화균 외의 미생물들을 조기 사멸시키는 단계; 및
- <21> (d) 상기 혐기성 암모늄 산화균을 증폭 배양하는 단계를 포함할 수 있다.
- <22> 먼저, 상기 (a) 단계는, 다양한 슬러지 및 미생물 자원을 채취하는 단계로써, 하수 및 폐수처리장의 기반 정보를 활용하여 공정과 대상 폐수 등을 최대한 다양화하고, 질소 처리 총량 및 처리 효율을 고려할 수 있다. 또한, 채취 지역을 다양화하여 생태계의 미생물 자원을 채취할 수 있다. 상기 슬러지는 오니(汚泥)라고도 하며, 하수처리장, 정수장, 공장폐수 처리시설 등에서 발생하는 액상 부유물질을 총칭하는 개념으로, 높은 함수율과 다량의 유기물을 함유하고 있는 것이 특징이다.
- <23> 상기 (a) 단계는, 종래에 개발되어 있는 다양한 시약 키트들을 사용하여, 미생물의 세포 파쇄 및 유전자 정제 과정을 포함할 수 있다. 사용 가능한 시약 키트로는, PowerSoil™ DNA KIT(MoBio Lab., USA) 등이 있으며, 정량 또는 정성 분석 과정에서 발생할 수 있는 실험 오차를 줄이는 효과가 있다.
- <24> 상기 (b) 단계는, 상기 미생물 자원 내에 존재하는 혐기성 암모늄 산화균을 정량하여 혐기성 암모늄 산화균의 공급원으로서 적합한 미생물 자원을 선별하는 단계이다.
- <25> 하나의 실시예에서, 상기 (b) 단계는, 혐기성 암모늄 산화균의 16S rRNA 유전자를 증폭하여 혐기성 암모늄 산화균을 정량할 수 있다. 이는, 혐기성 암모늄 산화균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머를 부착하여 PCR을 통해 증폭하게 된다. 보다 바람직하게는, 상기 PCR은 Real-time qPCR 기기를 이용할 수 있다. 상기 Real-time qPCR은 PCR 증폭산물의 증가를 실시간으로 모니터링하여 해석하는 기술이다. 이는, 종래의 PCR에 비하여 정확한 정량이 가능하고, 전기영동이 필요없이 신속하고 간편한 해석이 가능할 뿐만 아니라, 오염의 위험성이 적다는 장점이 있다.

- <26> 필요에 따라서는, 상기 (c) 단계 전에, (b-1) 상기 미생물 자원 내의 혐기성 암모늄 산화균의 군집 구조를 분석하여 유사한 군집들이 중복되어 배양되지 않도록 유사 군집을 배제하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 (b) 단계에서 PCR을 통해 증폭된 혐기성 암모늄 산화균의 유전자에 대하여 제한효소를 처리하여 절단하고, 절단된 조각들의 분포경향을 조사함으로써, 혐기성 암모늄 산화균의 군집구조를 분석하게 된다.
- <27> 하나의 실시예에서, 상기 (b-1) 단계는, 표지물질이 부착된 프라이머를 이용하여 혐기성 암모늄 산화균의 16S rRNA 유전자를 증폭한 후 DNA 제한효소를 처리하여 군집 구조를 판별할 수 있다.
- <28> 상기 (b-1) 단계는, 하나의 바람직한 예로서, 서열번호 3의 정방향 프라이머; 서열번호 4의 역방향 프라이머; 및 Alu I 제한효소 및 Rsa I 제한효소 중 어느 하나 이상의 제한효소를 이용하며, 상기 정방향 프라이머는 표지물질이 부착된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 정방향 프라이머는 amx368F(5'-TTC GCA ATG CCC GAA AGG-3', 서열번호 3), 역방향 프라이머는 809R(5'-AGT GCC CAT CGT TTA CGG C-3', 서열번호 4)일 수 있다. 또한, 상기 제한효소로서, Alu I 제한효소와 Rsa I 제한효소, 두 가지를 활용하여 중복검사가 되도록 설정함으로써, 오차를 줄이는 효과가 있다.
- <29> 상기 (c) 단계는, 상기 (b) 단계에서 선별된 미생물 자원에 존재하는 혐기성 암모늄 산화균과 경쟁하는 다른 미생물들을 조기에 사멸시키고 혐기성 암모늄 산화균의 성장에 적절한 환경을 조성하는 단계이다.
- <30> 하나의 실시예에서, 상기 (c) 단계는 질산(NO_3^-)을 처리하여 수행할 수 있다.
- <31> 바람직한 예에서, 혐기조건에서 독립탄소원과 질산(NO_3^-)을 투입하여 혐기성 암모늄 산화균 이외의 미생물이 조기에 사멸되도록 할 수 있다. 이러한 환경에서는, 중속영양 미생물과 호기성 독립영양 미생물이 사멸되고 세포질 내의 유기물들이 유출 된다. 동시에, 혐기성 탈질 미생물들이 투입된 NO_3^- -N을 탈질소화 시키기 위하여 유출된 유기물질들을 폭발적으로 소비하게 된다. 이러한 상태를 지속하게 되면, 반응기 내의 혐기성 암모늄 산화균과 경쟁하는 대부분의 미생물들이 사멸하게 되고, 유기물질의 잔존량이 낮아 혐기성 암모늄 산화균의 자생에 적절한 환경을 조성할 수 되게 된다.
- <32> 따라서, 혐기성 암모늄 산화균 이외의 미생물들을 사멸시키고 유기물 소모를 유도하기 위해서는, 고농도의 질산(NO_3^-)을 지속적으로 공급하여야 하며, NO_3^- -N의 농도는 50 ppm 이상인 것이 바람직하다. 여기서, NO_3^- -N의 농도는 NO_3^- 의 형태로 존재하는 물질 중의 질소(N)의 농도를 의미하는 것이다.
- <33> 마지막으로, 상기 (d) 단계는, 상기 혐기성 암모늄 산화균을 증폭 배양하는 단계이다. 본 단계에서는, 예를 들어, 혐기성 암모늄 산화균의 기질인 아질산(NO_2^-)과 암모니아(NH_4^+)를 투입하여 혐기성 암모늄 산화균을 증폭 배양할 수 있다. 특히, 혐기성 암모늄 산화균은 아질산(NO_2^-) 등에 민감하게 저해를 받기 때문에, 기질 농도를 서서히 높이는 것이 바람직하다.
- <34> 이하, 실시예 등을 통해 본 발명을 더욱 상술하지만, 하기의 실시예 등은 본 발명을 예시하기 위한 것이며, 본 발명의 범주가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.
- <35> [실시예 1] Real-time qPCR을 이용한 정량 시스템
- <36> Real-time qPCR은 Applied Biosystems 사의 7300 Real time PCR SYSTEM 모델을 사용하였고, 형광 발광시료이 포함된 증폭시약은 Applied Biosystems 사의 1× SYBR Green master mix를 사용하였다. 혐기성 암모늄 산화균 특이적 프라이머를 사용하여야만 정확한 정량이 가능한데, 이를 위하여 정방향 프라이머로 667F (5'- GAG AGT GGA ACT TCT GGT -3', 서열번호 1)를, 역방향 프라이머로 809R (5 '- AGT GCC CAT CGT TTA CGG C -3', 서열번호 2)을 사용하였다.
- <37> 정량을 위한 표준시료는 자체보유 중인 혐기성 암모늄 산화균 16S rRNA gene인 G1-80(기 발견되었던 planctomycetes KSU-1의 DNA와 유사)을 10배씩 희석하여 정량곡선을 구축하였다. 그 결과 10^1 copies부터 10^7 copies까지의 16S rRNA 유전자를 증폭할 수 있으며, 이를 하기 도 1에 나타내었다.
- <38> 도면 1에서 폭발적 증폭이 시작되는 시점인 Ct 값과 시료에 포함된 16S rRNA 유전자의 양은 양(+)의 상관관계가 있다. 이러한 원리를 이용한 표준곡선은 도면 2와 같고, 본 실시예에 따른 Real-time qPCR이용하면 혐기성 암

모늄 산화균의 16S rRNA 유전자를 10² copies부터 10⁷ copies까지 정량 가능하다.

<39> [실시예 2] T-RFLP를 이용한 군집구조 분석

<40> 정방향 프라이머로는 amx368F(5'-TTC GCA ATG CCC GAA AGG-3', 서열번호 3)를 사용하고, 역방향 프라이머는 809R(5'-AGT GCC CAT CGT TTA CGG C-3', 서열번호 4)을 사용하였다. 형광물질은 amx368F에 부착하였으며, T-RFLP 분석시에 amx368F 프라이머가 포함된 DNA 조각들이 검출되도록 하였다. DNA를 잘라주는 제한효소는 Alu I 과 Rsa I 두가지를 활용하였다.

<41> 본 실시예에서는, 16S rRNA 유전자가 저장되어 있는 인터넷 기반의 NCBI Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 검색된 혐기성 암모늄 산화균의 16S rRNA gene 염기서열을 이용하였다.

<42> 상기 프라이머와 제한효소의 조합을 이용하였을 경우, 혐기성 암모늄 산화균의 군집구조에 대하여 하기 표 1과 같은 결과를 얻었다.

표 1

<43>

Group	Name	Alu I	Rsa I
A	AY254882 Candidatus Scalindua wagnericloneEN5	66	460
	AB015552 partial sequence, clone: BD3-11.	404	460
	AY254883 Candidatus Scalindua brodae clone EN8	66	460
	AY257181 Candidatus Scalindua sorokinii	66	460
B	AJ250882 Anaerobic ammonium-oxidizing planctomycete KOLL2a partial S rRNA gene, isolate KOLL2a.	404	291
	AF202655 Anoxic biofilm clone Pla1-47	403	290
	AF202656 Anoxic biofilm clone Pla1-48	403	290
	AF202657 Anoxic biofilm clone Pla1-44	402	290
	AF202658 Anoxic biofilm clone Pla2-	403	290
	AF202659 Anoxic biofilm clone Pla1-	403	290
	AF202660 Anoxic biofilm clone Pla1-1	404	291
	AF202662 AnoxicbiofilmclonePla2-22	403	290
	AF202663 AnoxicbiofilmclonePla2-48	403	290
	AF375995 Candidatus Kuenenia stuttgartiensis	403	290
	AY769988 Uncultured planctomycete clone 3-8b6	122	291
	AB05254006 Uncultured anoxic sludge bacterium KU1	404	460
	AF202661 Anoxic biofilm clone Pla2-19	403	290
	C	AJ131819 anaerobic ammonium-oxidizing planctomycete	402
AF375994 Candidatus Brocadia anammoxidans		402	460
DQ459989 Candidatus Brocadia fulgida		284	460
AB176696 Uncultured Planctomycetales bacterium : HAuD-MB/2-35		404	460
D	AB057453 planctomycete KSU-1	122	460
	DQ317601 Candidatus Anammoxoglobus propionicus	122	91
	DQ301513 Candidatus Jettenia asiatica	122	460
	DQ304531 Uncultured Planctomycetales bacterium cloneP14	122	460

<44> 상기 표 1을 참조하면, A 그룹은 해수에 자생하는 혐기성 암모늄 산화균이며, Candidatus Scalindua wagneri로 대표된다. B, C, D 그룹은 담수에 자생하는 혐기성 암모늄 산화균으로, 각각 Candidatus Kuenenia stuttgartiensis, Candidatus Brocadia anammoxidans, Candidatus Anammoxoglobus propionicus로 대표된다. 상기 표 1의 결과를 실험대상 시료의 결과와 비교하면, 실험대상 혐기성 암모늄 산화균의 종을 판별할 수 있다.

<45> [실시예 3] 혐기성 암모늄 산화균 외 미생물의 사멸 및 혐기성 암모늄 산화의 증폭 배양

<46> 혐기성 암모늄 산화균을 농후 배양하기 위하여 500ml 부피의 연속 회분식 반응기를 구축하였다. 35 °C 항온반응기에서 100 rpm 속도로 교반하며 실험을 진행하였다.

<47> 혐기성 암모늄 이외의 미생물에 대한 세포분해를 촉진하기 위하여, 유기탄소원을 투여하지 않고 무기탄소원만을 투여하였다. 또한, 혐기성 암모늄 산화균의 사멸을 막기 위하여, 암모니아(NH₄⁺) 아질산(NO₂⁻)을 지속적으로 공급하였다.

<48> 동시에, 유기물 소모 및 탈질을 촉진하기 위하여 NO₃⁻-N 농도가 50 ppm인 질산(NO₃⁻)을 지속적으로 공급하였다.

<49> 상기 혐기성 암모늄 산화균의 산화 반응 여부를 관찰하였으며, 실험 개시 후 약 40일여 만에 산화 반응을 확인할 수 있었다. 이는, 기존에 보고된 연구 사례에 비하여 획기적으로 기간을 단축한 것이다.

도면의 간단한 설명

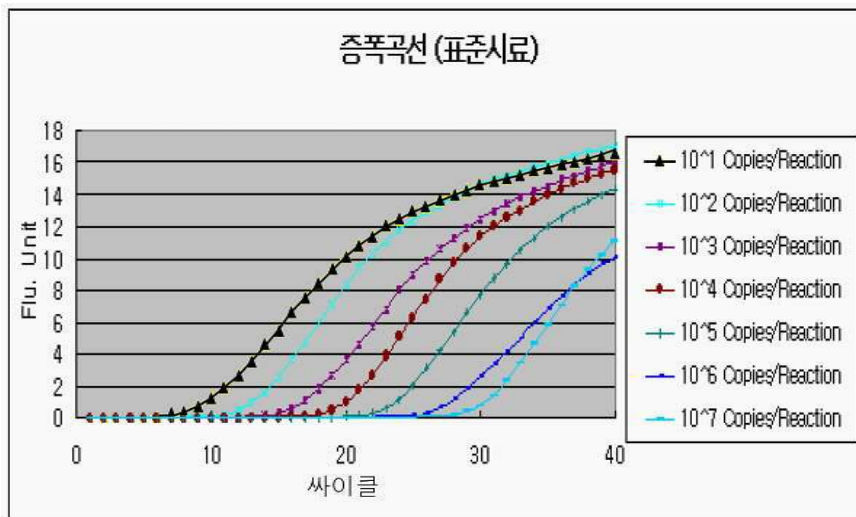
<50> 도 1은 Real-time qPCR을 이용한 혐기성 암모늄 산화균의 16S rRNA 유전자에 대한 증폭을 나타낸 그래프이다.

<51> 도 2는 Real-time qPCR을 이용한 정량시스템의 표준곡선을 나타낸 그래프이다.

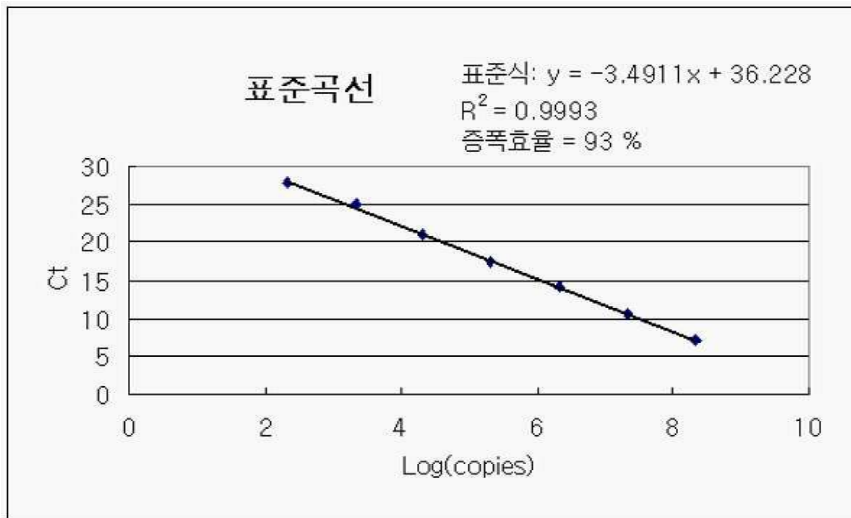
<52> 도 3은 고농도 질산(NO₃⁻) 투입을 통해 혐기성 암모늄 산화균의 산화 반응을 비교 확인한 그래프이다.

도면

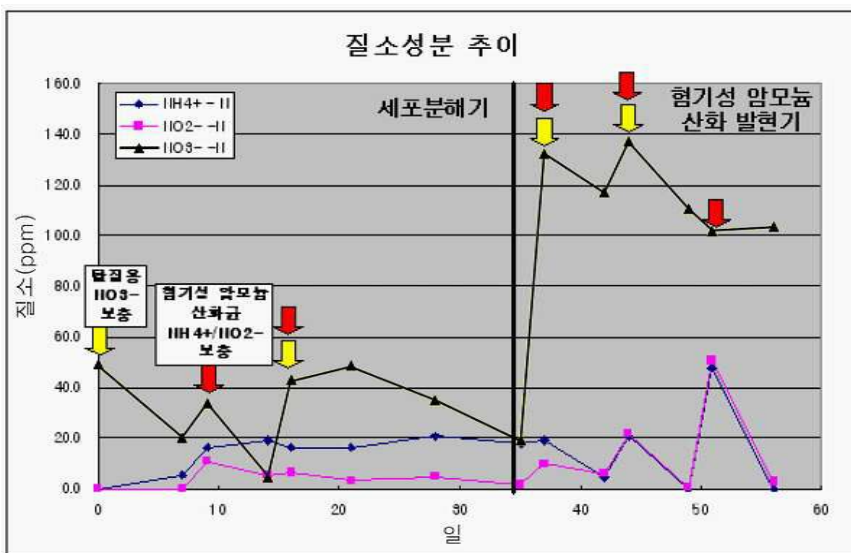
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
- <120> Methods for Identification and Culture of Anaerobic Oxidizer in Microbial Resources

- <160> 4

- <170> KopatentIn 1.71

<210> 1
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 1
 gagagtggaa cttctggt 18

<210> 2
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 2
 agtgcccatc gtttacggc 19

<210> 3
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 3
 ttcgcaatgc ccgaaagg 18

<210> 4
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 4
agtgcccatc gtttacggc

19