



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0026179
(43) 공개일자 2016년03월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01H 5/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0114211

(22) 출원일자 2014년08월29일

심사청구일자 없음

기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자

이현화

광주광역시 남구 서문대로701번길 21, 201동 1003호(진월동, 한신아파트)

김시욱

광주광역시 남구 제석로80번안길 11, 101동 1403호(봉선동, 한국아텔리움)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

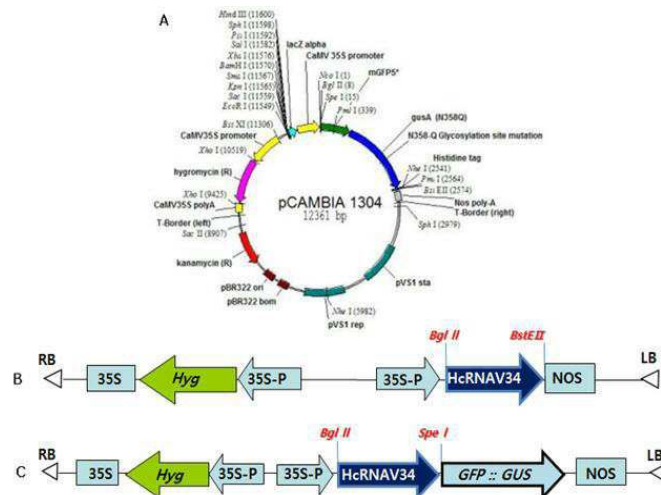
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **제조합 HcRNAV 34 바이러스 유사 입자 단백질을 발현하는 형질전환 담배**

(57) 요약

형질전환 식물체에서 총 단백질을 추출하여 HcRNAV34의 숙주인 *H. circularisquama* HU 9433-P와 HA 92-1, 비숙주인 *H. circularisquama* HY 9423과 HU 9436 및 *C. vulgaris*에 처리한 결과, 숙주인 HU 9433-P와 HA 92-1에서만 조류의 유동성이 정지되고, 형태의 변화가 일어나며, 세포가 파괴되는 결과를 관찰하였다. 또한 confocal 현미경으로 관찰하였을 때, *HcRNAV34* VLP와 함께 형질전환 된 *GFP*가 조류 내에서 발현되는 것으로 미루어 조류의 형태 변화 및 파괴는 HcRNAV34 VLP가 조류 내로 유입되어 발생하는 것으로 사료되며, HcRNAV34 VLP만으로도 숙주 특이적 살조능이 있는 것을 확인하였다. 따라서, 유해 조류에 특이적으로 감염되는 바이러스를 선별하여 그 일부를 식물체에 형질전환을 통해 대량생산하여 살조능을 확인한다면 이는 새로운 생물학적 적조 방제 방법으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다

대표도 - 도1



(72) 발명자

김미송

전라남도 장성군 삼서면 드림빌1길 4

김다솜

광주광역시 북구 일곡로 100-1, 301동 604호(일곡동, 현대 아파트)

정민주

광주광역시 동구 밤실로42번길 12, 301호(지산동, 동산 그린 빌라)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2011-0001752

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업> 첨단융합기술개발사업> 미래유망 융합기술 파이오니아사업

연구과제명 유해조류 제어를 위한 바이오나노 캡시드 제조 및 탑재 융합기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2011.03.01 ~ 2014.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

제조합 HcRNAV 34 VLP(virus like particle) 단백질을 발현하는 형질전환된 담배.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 제조합 HcRNAV 34 virus like particle 단백질을 발현하는 형질전환된 담배에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 적조는 바닷물에 부유 생물이 급증하여 산소가 부족하게 되거나 독성을 발생시키는 현상으로 물의 부영양화, 일사량, 수온 등 해양 환경이 적조 생물의 성장 조건에 맞을 때 대량으로 번식하여 발생한다(류 등, 2004; Kim *et al.*, 2006).

[0003] 적조 생물은 호흡과 사체 분해 과정을 통하여 수중의 용존 산소를 소비하여 다른 생물의 생존을 저해하고, 유해 물질 및 독소를 분비하여 어패류를 폐사시키거나 독화시켜 이를 섭취할 경우 마비나 설사성 중독을 일으켜 사람의 건강까지도 위협하고 있어 사회경제적으로 심각한 문제가 되고 있다(Kim, 1997; Imai *et al.*, 2006; 남, 2012).

[0004] 적조를 일으키는 주요 해양 생물로는 규조류와 편모조류를 포함하여 전 세계적으로 100여 종이 있고, 우리나라의 경우 약 43 종으로 담수종 4 종, 해산종인 규조류 13 종, 라피도조류 3 종, 편모조류 20 종이 있다. 특히 편모조류 중 *Gymnodinium mikimotoi*, *Cochlodinium polykrikoides*, *Gyrodinium* sp. 등 3 종은 수산 생물을 직접적으로 폐사시킬 수 있다 (박, 1995; Seo *et al.*, 2003; 류 등, 2004).

[0005] 우리나라의 경우 1963년 이후 산업도시 폐수의 과다 유입에 의한 해역의 부영양화 진행으로 적조의 대형화 현상이 보고되고 있으며, 육상의 공업화도시화에 따른 질소와 인의 다량 유입으로 1980년대부터 점차 증가하기 시작하여 주로 규조류에 의해 발생하였다 (박, 1995). 1990년대 중반부터는 유독성 *Cochlodinium*에 의한 단독 적조가 지속되고 있으며, 최근에는 수산 양식이 집중된 연안해역에서 적조의 출현 빈도가 증가하고, 원인종이 다양해지면서 독성이 강해지고 장기화광역화의 특징을 나타낸다 (류 등, 2004; 남, 2012). 지구 온난화로 인해 제주도 근해에는 열대 해역의 지표종인 여러 아열대성 와편모조류가 출현하였으며 최근 103종까지 증가하여 이들 중 32종은 국내에 처음 보고되는 미기록 종이다. 특히 저서성 종들의 증가로 맹독성을 가진 2종도 보고되었으며 (Kim *et al.*, 2008; Kim, 2010; Kim *et al.*, 2011; Chung, 2011) 거문도와 백도에서도 맹독성 와편모조류가 출현했음이 보고되었다 (Baek, 2012a; Baek, 2012b). 맹독성 와편모조류인 *Heterocapsa circularisquama* (*H. circularisquama*)는 최근 일본 해역에서 적조를 일으키는 주된 종으로서, 쌍각류조개에 가장 큰 피해를 미친다 (Horiguchi, 1995; Nagai *et al.*, 1996; Matsuyama *et al.*, 1997; Yamaguchi *et al.*, 1997; Matsuyama *et al.*, 1999; Uchida *et al.*, 1999). 어류를 폐사시키는 다른 종과 달리 trypsin에 의해 가수분해 되는 단백질 또는 polypeptide가 이매패류의 심장 또는 아가미를 공격하여 폐사시키며 그 독소가 주로 갑각류인 굴과 조개를 폐사시켜 양식업에 막대한 피해를 주고 있다 (Tarutani *et al.*, 2001; Nagasaki *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2003; Tomaru *et al.*, 2004; Imai *et al.*, 2006; Shiraishi *et al.*, 2007; Tomaru *et al.*, 2007; Shiraishi *et al.*, 2008).

[0006] 적조를 방제하는 방법은 물리화학생물학적 방법이 있으며, 물리적 방법은 초음파를 이용하여 원인 생물의 세포 파괴나 발생 수역에 고압의 오존 (O₃)을 투입하여 독성을 중화시키는 방법이 있으나 실용화 단계에는 이르지 못하였다. 화학적 방법은 황산구리 (CuSO₄), 이산화염소 (ClO₂) 등을 살포해 세포를 파괴하여 유발 조류를 제어하는 방법이 있으나 다른 해양 생물에게도 영향을 미쳐 생물 독성 및 부식의 문제를 일으킬 수 있고, 일시적 효과로 인해 반복 사용이 필요하며, 비교적 많은 양의 투여로 인한 높은 투자비용이 요구된다. 생물학적인 방법은 주로 천적 관계를 이용하는 방법이 있으나, 유해 조류 및 천적으로 사용되는 특정 종의 증식으로 인한 생태계 교란이 야기될 수 있다(Na *et al.*, 1996; Choi *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999a;

Matsuyama, 1999; Jeong *et al.*, 2000; Seo *et al.*, 2003; 류 등, 2004; Kim *et al.*, 2006; 남, 2012). 또한, 국내에서는 황토 살포법을 시행하고 있으나, 과량의 중금속 이온을 포함하고 있어 저질층 축적 및 생물학적 농축에 의해 중독을 유발하고 해수의 산성화, 광합성 생물의 생장 저해 등의 문제점이 나타나고 있다(Choi *et al.*, 1998; 류 등, 2004; Imai *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006).

[0007]

생태계에 영향을 미치지 않으면서 적조의 피해를 최소화하기 위한 제거 방법의 일환으로 살조 세균 *Micrococcus* sp. LG-1(Park *et al.*, 1998), *Altermonas* sp. SR-14(Kim *et al.*, 1999a) 등을 이용하거나(Mitsutani *et al.*, 1992; Jeong *et al.*, 2000; Jeoung *et al.*, 2012), 살조 능력을 가진 물질인 α -mannosidase(Lee *et al.*, 2000) 또는 항균성 펩타이드, Mastoparan B(Seo *et al.*, 2003) 등을 이용하는 방제법이 연구되고 있다(Wang *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2009). 또한 해양 미생물 또는 바이러스를 이용한 생물학적 방제에 대한 연구가 진행되고 있다(Park *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999a; Kim *et al.*, 1999b; Jeong *et al.*, 2000; Imai *et al.*, 2006; Jeoung *et al.*, 2012).

[0008]

우리나라에서 새롭게 출현하고 있는 유독성 와편모조류인 *H. circularisquama*의 사멸을 위하여 강활(*Notopterygii rhizoma*)로부터 분리된 falcariindiol(Tamura *et al.*, 2010)의 이용과 특이 감염되는 *Heterocapsa circularisquama* RNA virus(HcRNAV, Tamura *et al.*, 2004)를 이용한 외국의 연구들이 보고되고 있다.

[0009]

HcRNAV34는 적조 유발 조류인 *H. circularisquama* HU 9433-P, HA 92-1에만 특이적으로 감염되는 새로운 단일가닥 RNA 바이러스이다. 이 바이러스는 20 면체 구조로 직경은 30 nm, 외막과 꼬리 구조가 없고, 4.4 kb 단일가닥 RNA의 단일 분자를 포함하고 있다. Genome은 5' 말단의 cap 구조와 3' 말단의 poly (A) tail이 없는 완전한 단일가닥 RNA로 이루어져 있다. HcRNAV는 종 내 특이 감염성을 갖고, 세포질에서 복제되어 결정체로 배열되며, 핵을 표적으로 삼아 축적되고, 33-48 시간의 잠복기를 거쳐 용균 시 약 7,200-43,000 개가 방출되면서 숙주인 *H. circularisquama*를 사멸시킨다(Tomaru *et al.*, 2004; Nagasaki *et al.*, 2005; Mizumoto *et al.*, 2007; Tomaru *et al.*, 2007; Nagasaki, 2008; Wu *et al.*, 2012; Nakayama *et al.*, 2013).

[0010]

최근 바이러스의 특이 감염성과 관련된 virus like particle(VLP)은 다양한 분야에서 연구가 되고 있는데, 동물 세포, 효모, 식물세포 등을 포함하는 다양한 세포 배양 체계에서 생산될 수 있다(Santi *et al.*, 2006). 동물 세포와 미생물에서 만들어진 재조합 단백질을 항원으로 이용하는 경우, *Escherichia coli*(*E. coli*)를 비롯한 박테리아에서는 번역 후 변형이 일어나지 않아 native protein을 얻을 수 없고, 동물세포를 이용하는 경우 native protein 보다 더 유사한 항원을 얻을 수 있으나 비용이 많이 드는 단점이 있다. 따라서 최근에는 형질전환이 용이하고, 비용이 저렴하며, 먹을 수 있는 식물체에 바이러스 유전자를 도입하여 항원을 생산하는 방법이 시도되고 있다(Jeon, 1994; Ji, 2008).

[0011]

지난 몇 년간 식용이나 경구 투여를 위한 바이러스 백신 개발을 위해 식물 유전공학을 통한 형질전환 식물체 개발의 필요성이 증가되었다. 식물은 다양한 병원성 바이러스와 박테리아의 항원 단백질을 encoding하는 유전자를 통하여 적합한 항원 단백질을 생산할 수 있도록 발현, 접합, 조립, glycosylation 등을 통해 외래 단백질을 발현시킬 수 있다(Wycoff, 2005). 들판이나 온실에서 상대적으로 저렴하게 생산할 수 있고, 대규모 단백질 생산 확장의 용이함과 인간성 병원체에 의한 오염 위험의 부재 등의 장점으로 인해 외래 단백질의 발현을 위한 체계로써 식물의 이용은 백신 생산을 위한 전통적인 체계에 대한 저렴한 대안으로 제시되고 있다(Walmsley *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2003; Howard, 2005). 식물 기초 백신 생산에 관한 WHO의 승인은 형질전환 식물체의 이용이 인간과 가축 질병을 제어하기 위해 촉망되는 도구로 발달하고 있다는 것을 증명해준다(Lau *et al.*, 2009).

[0012]

식물 기초 백신은 고등생물인 식물을 이용하기 때문에 진핵생물에서 일어나는 번역 후 변형이 가능하다는 점에서 미생물 유래 백신 생산보다 유리한 점을 가지고 있으며, 생물 간의 차이에 따른 면역성 저하 문제를 해결할 수 있다(Kong *et al.*, 2001). 식물 기초 백신과 생물 약제는 발효 작용, 정제 과정 또는 저온 저장 및 멸균 수송 등과 연관된 비용이 들지 않는 장점이 있다(Mitchell *et al.*, 1993). 또한 다른 재조합 백신들에 비해 식물 조직 내에서 발현되어 소화 기관의 pH 등의 조건으로 인한 항원 단백질의 손상 가능성을 줄일 수 있고, 대량생산이 가능하며 일정한 환경 내에서 생산이 가능하다(Daniell *et al.*, 2001). 전통 농업의 대량생산 체계를 통해 많은 양의 항원을 저렴하게 생산할 수 있고, 별도 비용의 투자 없이도 개발도상국에 적용이 가능하다는 장점이 있다. 현재 토마토, 감자 등 채소들이 백신 생산에 이용되고 있는데, 토마토(Lou *et al.*, 2007; Paz *et al.*, 2009)나 당근(Kim *et al.*, 2011)은 조리 과정 없이 섭취할 수 있다는 점에서 발현시킨 단백질의 손상을 최소화할 수 있고, 감자는 섭취가 용이하기 때문에 많은 연구가 진행되고 있다(Kong *et al.*, 2001; Thanavala *et al.*, 2005). 잎을 섭취하는 양상추나 시금치 등의 식물들도 재조합 백신 개발의 대상으로 연구가 진행되고 있으

며, 옥수수 같은 식물 종자를 이용한 형질전환 백신은 가공과 섭취가 편리하며 건조된 종자이기 때문에 환경에 둔감하다는 장점이 있어 연구가 진행되고 있다(Yoshikazu *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2009). 하지만, 형질전환 식물체 안에서 발현되는 낮은 항원 발현량은 면역 유도가 어렵기 때문에 백신의 가치가 저하되고 (Modelska *et al.*, 1998), 섭취 요구량이 증가되며, 다른 체계에 비해 개발과 생산기간이 길다는 단점이 있다. 이에 대한 개선으로 식물체 내 단백질의 축적 또는 뿌리, 잎을 통한 분비 유도 체계나 엽록체, 바이러스 형질전환 체계 이용, 세포 및 조직 배양을 통한 대량생산 등의 방법으로 수확량 및 발현량의 증가와 재배 기간 단축을 유도하려는 연구가 진행되고 있다(Fischer *et al.*, 2004; Edward, 2010; Kim, 2012; Lee, 2013).

[0013]

담배(*Nicotiana tabacum*)는 다른 작물 종과 비교하여 높은 생물자원 수확량과 고 수용성 단백질 수준을 갖기 때문에 재조합 백신 생산을 위해 유망한 발현 체계로 활용이 가능하다(G.B. Sunil Kimar *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2007). 또한 경제적 이점 외에도, 항체, 백신 등을 포함하는 광범위한 치료 단백질을 생산할 수 있는 기능을 갖는다. 이러한 이유로 현재까지, 담배를 이용하여 구제역, 콜레라, severe acute respiratory syndrome(SARS) 바이러스 등에 대한 백신이 개발되고 있지만(Kim, 2012), 적조 조류 방제를 위해 해양 바이러스와 관련된 연구는 아직까지 보고된바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0014]

(특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2013-0054478호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015]

이에 본 발명자들은 담배의 형질전환을 통하여, 적조 유발 조류인 *H. circularisquama*에 특이적으로 감염되어 살조시키는 HcNAV 34 VLP의 대량 생산을 가능하도록 하였다.

[0016]

따라서 본 발명의 목적은 재조합 HcNAV 34 VLP(virus like particle) 단백질을 발현하는 형질전환된 담배를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017]

상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 재조합 HcNAV 34 VLP(virus like particle) 단백질을 발현하는 형질전환된 담배를 제공한다.

발명의 효과

[0018]

본 발명의 형질전환된 담배를 이용하여 재조합 HcNAV 34 VLP(virus like particle) 단백질을 대량으로 얻어 적조 방제에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019]

도 1은 재조합 식물 발현 벡터인 pCambia1304 binary 벡터(A) 및 HcNAV 34 VLP 유전자로 재조합된 pCambia1304 binary 벡터(B, C)의 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 HcNAV 34 VLP의 유전자 염기서열을 나타낸 것이다.

도 3은 HcNAV 34 VLP 유전자로 형질전환된 plasmid DNA를 추출하여 전기영동을 한 결과이다.

도 4는 HcNAV 34 VLP 유전자로 형질전환된 plasmid DNA를 추출하여 direct PCR(A) 및 restriction endonuclease digestion(B)을 통해 전기영동을 한 결과이다.

도 5는 형질전환된 담배의 생장을 나타낸 사진이다.

도 6은 형질전환된 담배의 유전자 도입 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 형질전환된 담배의 전사체 발현을 확인하기 위하여 총 RNA를 추출하여 RT-PCR 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 형질전환된 담배에 UV 광을 조사한 결과를 나타낸 사진이다.

도 9는 형질전환된 담배의 HcRNAV 34 VLP 발현 여부 확인을 위한 western blot 의 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 HcRNAV 34 VLP의 숙주 특이적 살조능을 광학현미경을 이용하여 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 HcRNAV 34 VLP가 포함된 총 단백질의 살조능(*H. circularisquama* HU 9433-P)을 관찰한 사진이다.

도 12는 HcRNAV 34 VLP가 포함된 총 단백질의 살조능(*H. circularisquama* HA 92-1)을 관찰한 사진이다.

도 13은 HcRNAV 34 VLP가 포함된 총 단백질의 살조능(*H. circularisquama* HY 9423)을 관찰한 사진이다.

도 14는 HcRNAV 34 VLP가 포함된 총 단백질의 살조능(*H. circularisquama* HU 9436)을 관찰한 사진이다.

도 15는 HcRNAV 34 VLP가 포함된 총 단백질의 살조능(*C. vulgaris*)을 관찰한 사진이다.

도 16은 HcRNAV 34 VLP가 포함된 총 단백질의 살조능(*H. circularisquama* HU 9433-P)을 GFP의 녹색형광 발현으로 관찰한 사진이다.

도 17은 *H. circularisquama* HU 9433-P에 형질전환된 담배로부터 추출된 총단백질을 처리한 후 사멸 정도를 trypan blue 염색법을 이용하여 관찰한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

재료준비

1. 식물재료

식물 형질전환을 위해서 담배(*Nicotiana tabacum* cv. Havana)를 사용하였다. 발아를 위해 종자는 70 % ethanol로 30 초간 표면을 1차적으로 세척한 후, 멸균수로 3 회 세척하여, 4 % NaOCl로 30 분간 2차 소독한 후 다시 멸균수를 이용하여 3 회 세척하여 준비하였다. 멸균 소독한 담배 종자는 MS 배지 (표 1, Murashige & Skoog, 1962)에 파종하여 25±1℃, 16시간의 광조건 및 8시간의 암조건으로 3-4 주간 무균 발아시켰다. 종자 발아 후, 본엽이 6 장 이상 된 건강한 담배의 잎을 실험에 이용하였다.

표 1

MS 배지

Component	Amount to add per 1 liter
Sucrose	30 g
Mes-monohydrate	0.5 g
Vitamin	4.4 g
pH 5.7	

2. 조류

해수종 *Heterocapsa circularisquama* HU 9433-P, HA 92-1, HY 9423, HU 9436 및 담수종 *Chlorella vulgaris*는 유해조류 제어융합연구단에서 분양 받아 사용하였다. 12시간의 광조건 및 12시간의 암조건으로 *H. circularisquama*는 f/2 media (표 2 내지 4, Guillard & Ryther, 1962)를 *C. vulgaris*는 BBM (Bold's Basal Medium, 표 5 및 6)을 이용하여 증식시켰다.

표 2

f/2 medium

Component	Stock solution (200 ml)	Final concentration	Amount to add per 1 liter
NaNO ₃	15 g	0.883 mM	1 ml

NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	1.13 g	0.036 mM	1 ml
Trace Elements Solution	표 3		1 ml
Vitamin mix Solution	표 4		0.1 ml
Sea water	-	-	up to 1 L
pH 8.0			

표 3

Trace Elements Solution

Component	Stock solution (200 ml)	Final concentration
Na ₂ EDTA	0.832 g	0.012 mM
FeCl ₃ , 6H ₂ O	0.63 g	0.017 mM
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.002 g	0.04 uM
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0.004 g	0.076 uM
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0.002 g	0.042 uM
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0.036 g	0.91 uM
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0.0012 g	0.025 uM

표 4

Vitamin Mix Solution

Component	Stock solution (200 ml)
Cyanocobalamin (Vitamin B12)	0.001 g
Thiamine HCl (Vitamine B1)	0.2 g
Biotin	0.001 g

표 5

Bold's Basal medium

Component	Stock solution (500 ml)	Amount to add per 1 liter
KH ₂ PO ₄	8.75 g	10 ml
CaCl ₂ , 2H ₂ O	1.25 g	10 ml
MgSO ₄ , 7H ₂ O	3.75 g	10 ml
NaNO ₃	12.5 g	10 ml
K ₂ HPO ₄	3.75 g	10 ml
NaCl	1.25 g	10 ml
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	5 g	1 ml
KOH	3.1 g	
FeSO ₄ , 7H ₂ O	2.49 g	1 ml
H ₂ SO ₄ (concentrated)	0.5 ml	
Trace Metal Solution	표 6	1 ml
H ₃ BO ₃	5.75 g	0.7 ml
pH 6.8		

표 6

[0030]

Trace Metal Solution

Component	Stock solution (1 L)
H ₃ BO ₃	2.86 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.222 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.390 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079 g
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.0494 g

[0031]

3. 식물 형질전환용 균주와 벡터

[0032]

본 실험에서 사용된 *Escherichia coli* (*E. coli*) strain DH5α는 DH5α Chemically Competent *E. coli* (Enzymonics, Korea)를 구매하여 재조합 plasmid의 형질전환 숙주로 이용하였다. 증식을 위하여 LB 배지 (Bacto-Trypton 10 g/L, Bacto-Yeast Extract 5 g/L, NaCl 10 g/L)를 이용하였다. 식물체에 형질전환하기 위해 사용한 *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101은 100 mg/L의 rifampicin과 50 mg/L의 gentamycin이 각각 포함된 YEP 배지 (Bacto-Peptone 10 g/L, Bacto-Yeast Extract 10 g/L, NaCl 5 g/L)에서 28±1℃, 암상태에서 2-3 일간 배양하여 이용하였다. 재조합 식물 발현 벡터는 pCAMBIA1304 binary 벡터를 이용하였다 (도 1A).

[0033]

<실험예 1>

[0034]

HcRNAV34 VLP의 벡터 구축 및 형질전환

[0035]

<1-1> 식물 형질전환용 벡터 구축

[0036]

본 발명에 사용되는 RNA 바이러스인 HcRNAV34의 VLP 유전자 염기서열은 Genebank (Assession No.: AB218608)를 바탕으로 인공 합성된 유전자 clone(도 2)을 유해조류 제어융합연구단에서 분양받아 사용하였다. HcRNAV34 VLP 유전자 발현을 위한 식물체 형질전환 벡터는 pCAMBIA1304 binary 벡터에 HcRNAV34 VLP와 HcRNAV34 VLP 유전자에 GFP를 결합시킨 두 가지 형태로 제작하였다. 이 때 사용한 primer는 34-BglII-F (5'-GAA GAT CTA TGA CCC GCC C-3'), 34-SpeI-R (5'-GGA CTA GTA GCA GCC ATC AGA G-3')와 34-BstEII-R (5'-GGG TTA CCC AGC AGC CAT CAG-3')을 Bionics(Korea)에서 제작하여 사용하였다. PCR 조건은 95℃ 에서 5 분 동안 변성시킨 후, 95℃ 30 초, 60℃ 45 초, 72℃ 1 분 조건으로 35 주기를 수행하고 72℃ 에서 5 분 동안 반응시켜준 후 종결하였다. HcRNAV34 VLP 유전자의 증폭은 1% agarose gel 전기영동을 수행하여 확인하였다. 그 후 증폭된 HcRNAV34 VLP 유전자와 pCAMBIA1304 binary 벡터를 T4 ligase (Takara, Japan)를 이용하여 4℃ 에서 overnight 동안 ligation 시켰다.

[0037]

<1-2> *Escherichia coli*(*E.coli*) 형질전환

[0038]

그 후, 얼음 위에서 lysate와 DH5α competent cell을 부드럽게 혼합하여 30 분 동안 반응시켰다. 42℃ 에서 30 초 동안 heat-shock을 가한 후 바로 얼음에서 2 분 동안 안정화시켰다. 37℃ 에서 예열된 S.O.C.(Super Optimal broth with Catabolite repression) media를 첨가하고 진탕 배양기를 이용하여 180-200 rpm으로 1 시간 진탕 배양 후 세포 부유액을 도말하여 37℃ 에서 16-18 시간 동안 배양하였다. 형질전환 된 세포주를 선별하기 위해, 배양 후 생성된 colony에서 DNA를 추출하여 direct colony PCR과 restriction endonuclease digestion을 수행하여 유전자 도입 여부를 확인하였다.

[0039]

<1-3> *Agrobacterium tumefaciens* 형질전환

[0040]

재조합 된 식물체 발현 벡터는 Freeze-Thaw 방법 (Horsch *et al.*, 1985)을 이용하여 *A. tumefaciens* GV3101에 도입시켰다. *A. tumefaciens* GV3101의 배양을 위해 rifampicin (100 mg/L), gentamycin (50 mg/L)이 포함된

YEP 배지에서 $28\pm1^{\circ}\text{C}$, 압조건으로 2-3 일간 진탕 배양하여 O.D._{600} 의 값을 약 0.7로 맞춰 이용하였다. 5000 rpm, 4°C , 5 분의 조건으로 원심분리 하여 상층액을 제거하고 0.15 M NaCl 1 에 녹인 후, 5000 rpm, 4°C , 5 분에서 다시 원심분리 후, 20 mM CaCl_2 200 에 녹이고 재조합 된 plasmid DNA 10 μl 를 첨가하여 얼음 상에서 30 분 동안 반응 시켰다. 반응 후 액체질소에 1 분 동안 두었다가 37°C water bath에 다시 5 분 동안 둔 후 YEP 배지를 1 ml 첨가하여 28°C 에서 2-4 시간 동안 진탕 배양시켰다. 3000 rpm에서 2 분 동안 spin down 시켜서 상층액을 제거한 후, YEP 액체배지 100 μl 로 재부유 시켜 rifampicin (100 mg/L), gentamycin (50 mg/L), kanamycin (50 mg/L)이 포함된 YEP 고체배지에 도말하여 2-3 일 동안 28°C 에서 배양하였다. 형질전환 된 세포주는 direct colony PCR을 통하여 1차 선별하였고, PCR을 통해 선별된 colony의 DNA를 추출하여 sequencing (Solgent, Korea)과 restriction endonuclease digestion을 수행하여 형질전환을 확인하였다.

<실험예 2>

Leaf-disk 법을 이용한 Agrobacterium 매개 담배 형질전환

담배 형질전환을 위해 *Agrobacterium*을 매개로 한 leaf-disk 형질전환 방법 (Odel *et al.*, 1987)을 이용하여 담배를 형질전환 시켰다. 무균 상태에서 키운 건강한 담배(*N. tabacum* cv. Havana) 잎의 잎맥을 제거한 후 0.7-1.0 cm^2 정도의 절편을 만들어 형질전환에 이용하였다. GV3101 세포주를 hygromycin (50 mg/L), rifampicin (100 mg/L) gentamycin (50 mg/L)이 첨가된 배지에서 2-3 일 동안 28°C 에서 배양하여 O.D._{600} 의 값을 약 0.7로 맞춘 후, 원심분리 하여 MS 액체배지로 $1/_{20}$ 로 희석하여 사용하였다. MS 배지에 담배 잎 절편을 30 분 동안 침지시킨 후, 잎 절편을 3MM paper 위에 가볍게 눌러 배지를 제거한 후 공동 배양 배지인 TCM (Transformation Co-Cultivation media, 표 7) 고체배지에 잎 뒷면이 배지에 닿도록 치상하여 2-3 일 동안 $26\pm1^{\circ}\text{C}$ 의 암상태에서 배양하였다. 2-3 일 후, 잎 절편에 남아있는 *Agrobacterium*을 제거하기 위해 MS 액체배지에 1 % cefotaxime sodium (100 mg/ml)을 첨가하여 잎 절편을 2-3 회 세척하였다. 세척된 잎 절편은 MS 액체배지에서 다시 한 번 세척한 후, 3MM paper 위에서 가볍게 건조시켜 cefotaxime sodium (250 mg/L)이 포함된 신허 유도 배지인 TSIM (Transgenic Shoot Induction media) I(표 8) 고체배지에 치상하여 7 일 동안 $26\pm1^{\circ}\text{C}$ growth chamber에서 배양시킨 후, cefotaxime sodium (250 mg/L)과 hygromycin (50 mg/L)이 포함된 TSIMII(표 9) 고체배지에 옮겨 계대배양을 통하여 신허를 유도하였다. 유도된 신허는 뿌리 유도 배지인 TRM (Transgenic Root Induction media, 표 10) 고체배지에 치상하여 뿌리를 유도한 후, 순화시켜서 온실에서 재배하였다.

표 7

TCM 배지

Component	Stock solution	Final concentration	Amount to add per 1 liter
MS liquid	-	-	1 L
Phyto agar	-	-	0.8 %
Indole Acetic Acid (IAA)	2 mM	0.5 μM	250 μl
6-Benzylaminopurine (BAP)	4 mM	2 μM	500 μl

표 8

TSIM I 배지

Component	Stock solution	Final concentration	Amount to add per 1 liter
MS liquid	-	-	1 L
Phyto agar	-	-	0.8 %
Indole Acetic Acid (IAA)	2 mM	0.5 μM	250 μl
6-Benzylaminopurine (BAP)	4 mM	2 μM	500 μl

Cefatoxime Sodium	250 mg/ml	500 mg/L	2 ml
-------------------	-----------	----------	------

표 9

TSIMII 배지

Component	Stock solution	Final concentration	Amount to add per 1 liter
MS liquid	-	-	1 L
Phyto agar	-	-	0.8 %
Indole Acetic Acid (IAA)	2 mM	0.5 uM	250 ul
6-Benzylaminopurine (BAP)	4 mM	2 uM	500 ul
Cefatoxime Sodium	250 mg/ml	500 mg/L	2 ml
Hygromycin	50 mg/ml	100 mg/L	2 ml

표 10

TRM 배지

Component	Stock solution	Final concentration	Amount to add per 1 liter
MS liquid	-	-	1 L
Phyto agar	-	-	0.8 %
1-Naphthalene acetic acid (NAA)	10 mM	0.5 uM	50 ul
Cefatoxime Sodium	250 mg/ml	500 mg/L	2 ml
Hygromycin	50 mg/ml	100 mg/L	2 ml

<실험예 3>

HcRNAV34 VLP 유전자 담배 형질전환체 분석

<3-1> 형질전환 식물체 genomic DNA 추출 및 PCR 분석

담배로부터 genomic DNA는 잎 조직 50-100 을 1.7 ml EP tube에 넣고 액체질소 상에서 플라스틱 막자를 이용하여 분쇄한 후 추출하였다. DNA 추출 용액 (1 M Tris-HCl, pH 7.5, 5 M NaCl, 0.5 M EDTA, 20 % SDS, 10 % RNase (10 mg/ml, Takara, Japan)) 400 μ l를 넣고 잘 혼합한 후, 60℃ 에서 10 분간 반응 후, 4℃, 13,000 rpm에서 15 분 동안 원심분리 하여 상층액을 새로운 EP tube로 옮기고, 상층액과 1:1 비율로 Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol (25:24:1)을 첨가하고 혼합하여 4℃, 13,000 rpm에서 10 분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 새로운 tube로 옮겨 isopropanol과 1:1 비율로 혼합하였다. 얼음에서 30 분 동안 반응시킨 후, 4℃, 13,000 rpm에서 20 분 동안 원심분리 하여 상층액을 제거하고, 미리 냉각시킨 70 % ethanol과 95 % ethanol로 세척하여 남은 수분을 제거한 후, 상온에서 건조시켜 pellet을 형성하였다. 3차 멸균수로 pellet을 녹인 후, 1 % agarose gel 전기영동을 수행하여 확인하였다.

Genomic DNA PCR은 형질전환체에서 추출한 genomic DNA를 주형으로 사용하였고, primer는 HcRNAV34 VLP 유전자에 대해 특이적으로 제작된 34-F (5'-ATG ACC CGC CCG CTG-3'), 34-R (5'-GCT CTG ATG GCT GCT TGA-3')과 GUS 유전자에 특이적으로 제작된 GUS-R (5'-CTT GTT TGC CTC CCT GCT-3')을 이용하였다. PCR 조건은 95 에서 5 분 동안 변성시킨 후, 95℃ 30 초, 60℃ 45 초, 72℃ 1 분 조건으로 35 주기를 수행하고, 추가적으로 72℃ 에서 5 분 동안 반응시켜준 후 종결하였다.

<3-2> 형질전환 식물체 total RNA 추출 및 Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction 분석

Total RNA는 담배 잎 조직 50-100 mg을 액체질소를 이용하여 분쇄한 후 1 ml Tri-reagent (Molecular Research

Center (MRC) Inc. USA)를 넣고 5 분 동안 실온에서 반응시킨 후 추출하였다. 0.2 ml chloroform을 넣고 15 초 동안 혼합한 후 15 분 동안 실온에서 반응시켰다. 4℃, 13,000 rpm에서 10 분 동안 원심분리시킨 후 상층액을 새 tube로 옮겨 0.5 ml isopropanol을 더해 10 분 동안 반응시킨 후, 4℃, 13,000 rpm에서 10 분 동안 원심분리 하여 ethanol을 제거하였다. 5 분 동안 공기 중에서 건조 후 1% DEPC (Diethyl Pyrocarbonate)가 처리된 멸균수에 녹인 후 -80℃ deep freezer에 보관하여 사용하였다.

[0055]

Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 수행 시, total RNA 500 ng을 주형으로 사용하였으며, total RNA로부터의 first strand 합성 (reverse transcription)은 RNA를 동일한 양으로 정량한 후, First strand cDNA synthesis kit (LeGene, USA)를 이용하여 65℃ 에서 5 분, 42℃ 에서 65 분, 95℃ 에서 10 분 조건에서 first strand cDNA로 역전사시켰다. 합성된 단일가닥 cDNA를 주형으로 사용하여 *HcRNAV34 VLP* 유전자를 증폭시키기 위해 2차 PCR을 수행하였으며, PCR 조건은 95℃ 에서 5 분 동안 변성시킨 후, 95℃ 에서 30 초, 60℃ 에서 45 초, 72℃ 에서 1 분 조건으로 27 주기를 수행하고, 추가적으로 72℃ 에서 5 분 동안 반응시켜 준 후 종결하였다. PCR 산물은 1 % agarose gel 상에서 확인하였으며, 이때 사용된 primer는 R34-F (5'-GAC GAA TGG TGG TAA CAC GAA-3')와 R34-R (5'-GGG ACC GTG TAA ACA TTG G-3'), actin-F (5'-CCA AAG GCC AAT AGA GAG AAG-3')와 actin-R (5'-CAG CTT CCA TTC CAA CAA GTG-3')을 이용하였다.

[0056]

<3-3> 형질전환 식물체 GFP 발현 분석

[0057]

형질전환체의 GFP (Green Fluorescence Protein) 발현은 형광현미경 (OLYMPUS, Japan)을 이용하여 관찰하였다. GFP 유전자가 도입된 식물체에 형광현미경 하에서 UV (360-400 nm)나 청색광 (440-480 nm)을 조사하여 삽입된 GFP 발현에 의한 녹색 형광을 확인하였다.

[0058]

<3-4> 형질전환 식물체 단백질 추출 및 western blot 분석

[0059]

담배 잎으로부터 총 단백질을 추출하기 위하여 액체질소를 이용하여 분쇄한 담배 조직 100mg 에 단백질 추출 용액 (RIPA buffer (Biosolution, Korea); 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1 % SDS, 1 % Triton X-100, 0.5 % Sodium deoxycholate; Protease inhibitor cocktail (Roche, Switzerland)) 800 ul 를 넣고 30 초 간격으로 vortex와 얼음에 두는 과정을 5 회 반복하고 4℃, 13,000 rpm에서 10 분 동안 원심분리한 뒤 상층액만 회수하여 BCA 단백질 정량 kit (PIERCE, Belgium)를 사용하여 단백질을 100 ug 으로 정량한 후 -20℃에 보관하며 사용하였으며, western blot 분석에 사용하였다. Western blot 분석을 위하여 추출한 총 단백질을 4x protein sample loading buffer (100 % Glycerol 400 ul/ml, 20 % SDS 200 ul/ml, 1 M Tris, pH 6.8, 10 % Bromo Phenol Blue 10 ul/ml, β -mercaptoethanol 100 ul/ml. dH₂O 90 ul/ml)와 혼합하여 5 분 동안 끓여 sample을 준비하였다.

[0060]

단백질 sample은 5 % stacking gel과 12 % separating gel의 acrylamide gel을 이용하였으며 gel running buffer (Glycine 14.4 g, Tris base 3 g, 0.1 % SDS (10%))를 이용하여 MINI-PROTEIN II (Bio-rad, USA)로 전기영동을 수행하였다. Gel running 시 stacking gel에서는 100 V로, separating gel에서는 120 V의 전류로 protein sample loading buffer가 gel 하부로 배출될 때까지 전기영동을 수행하였다. 전기영동을 수행한 후 Transfer buffer (Tris. base 3.03 g/l, Glycine 14.4 g/l, Methanol 200 ml/l)를 이용하여 Trans-Blot cell (Bio-rad, USA)에서 62 V로 4 시간 동안 0.45 um PVDF membrane (PALL Life Science, USA)에 blotting한 후 membrane을 Ponceau S solution (Sigma, USA)을 이용, 염색하여 transfer의 여부를 확인하였다. 확인이 완료된 membrane은 3차 증류수로 5 분 동안 2 회 세척한 후, TBS-T (TBS; 100 mM Tris-Cl, pH 7.6, 150 mM NaCl; 0.1 % Tween-20 (DaeJung, Korea))로 15 분씩 3 회 세척하였다. 세척이 종료된 membrane은 5 % skim milk solution (skim milk/TBS-T)을 이용하여 1 시간 동안 blocking을 수행한 후, TBS-T를 이용하여 15 분씩 3 회 세척하였다. 1차 항체는 HcRNAV34 VLP에 대해 특이적으로 제작된 HcRNAV34-R2 항체 (abfrontier, Korea)를 1:1,000의 비율로 5 % skim milk solution에 희석하여 4℃ 에서 overnight 동안 반응시킨 후 membrane을 TBS-T로 15 분씩 3 회 세척하였다. 2차 항체는 polyclonal anti-rabbit 항체 (Abcam, USA)를 1:4,000의 비율로 5 % skim milk solution 용액에 희석하여 상온에서 1 시간 동안 반응시키고, 반응 종료 후 TBS-T로 15 분 1 회, 5

분석 3 회 세척하였다. 모든 반응이 종료된 membrane은 Immobilon Western Chemilum ECL kit (Millipore, US A)를 이용하여 Luminescence analyzer (LAS 3000, Fujifilm, Japan)으로 확인하였다.

[0061] <실험예 4> HcRNAV34 VLP 살조능 분석

[0062] <4-1> HcRNAV34 VLP의 숙주 특이적 살조능 관찰

[0063] 형질전환체에서 추출한 총 단백질을의 숙주 특이적 살조능 관찰을 위해 *H. circularisquama* HU 9433-P와 HA 92-1, HY 9423, HU 9436 및 *C. vulgaris*를 이용하였다. 형질전환 식물체에서 추출한 HcRNAV34 VLP가 포함된 총 단백질 (2.5 ug/ul)을 조류 배양액 500 ul에 1 ul (2.5 ug/ul)를 처리하였다. 처리 후, 경과시간 별로 광학현미경 (Nikon, Japan)과 Laser scanning confocal microscope (Carl Zeiss, Germany)를 이용하여 숙주 특이적 살조능을 확인하였다.

[0064] <4-2> Trypan Blue 염색법을 이용한 살조능 검증

[0065] 형질전환체에서 추출한 총 단백질을 *H. circularisquama* HU 9433-P에 처리하여trypan blue 염색법을 통해 관찰하였다. Trypan blue (LPTB; 2.5 mg/ml trypan blue, 25% (w/v) lactic acid, 23% water-saturated phenol, 25% glycerol in H₂O)로 염색하여 경과시간에 따른 세포의 염색 정도를 광학현미경 (Nikon, Japan)으로 관찰하였다.

[0066] <실험예 5> HcRNAV34 VLP 식물체 발현 벡터 제작 및 형질전환

[0067] <5-1> 식물체 발현 벡터 제조

[0068] 식물체에 외부 유전자 도입에 관한 연구는 담배, 당근, 고추를 비롯한 쌍떡잎식물에서 주로 이루어져 왔으며, 식물체 binary 벡터를 이용하여 *A. tumefaciens*를 매개로 한 형질전환 방법은 1980 년대 이후에 보편화 된 식물 형질전환 방법이다 (Horsch *et al.*, 1985). 본 연구는 *A. tumefaciens* strain GV3101과 pCambia1304 binary 벡터를 이용하였는데 본 벡터의 T-DNA에는 식물체 게놈에 삽입되어 과발현을 유도하는 Cauliflower Mosaic virus 에서 유래한 CaMV 35s promoter를 가지고 있으며, *A. tumefaciens*의 nopaline 합성효소에서 유래한 Nos Poly-(A)를 지니고 있고, 식물체 내에 삽입되었을 경우 선택적 표지로 hygromycin 유전자가 있다. 또한 벡터 내에 Kanamycin 저항성 유전자가 삽입되어 *E. coli*에서의 선택적 표지로 이용할 수 있다 (도 1A).

[0069] 본 실험의 재료로 사용된 와편모조류인 *H. circularisquama*에만 특이적으로 부착되어 감염시키는 단일가닥 RNA 바이러스인 HcRNAV34는 RNA polymerase (ORF-1)와 VLP (ORF-2)로 발현되는 4.4 kb의 게놈을 가지고 있다 (Tomoru *et al.*, 2004; Nagasaki *et al.*, 2005; Mizumoto *et al.*, 2007; Nagasaki, 2008; Wu *et al.*, 2012). 이 중 인공 합성된 VLP 유전자 clone (1080 bp, 도 2)을 유해조류 제어융합연구단에서 분양 받아 식물체 발현 벡터를 제작하였다.

[0070] 담배 형질전환을 위한 재조합 벡터는 HcRNAV34 VLP 유전자만의 발현을 위한 벡터와 식물체 내의 HcRNAV34 VLP 유전자 발현을 확인하기 위한 reporter 유전자로 GFP유전자를 포함한 두 가지 벡터를 제작하였다. 첫 번째 재조합 벡터 제작을 위해 *Bgl* II와 *Bst* EII enzyme site를 이용하여 GFP::GUS 유전자를 제거한 후, HcRNAV34 VLP 유전자를 삽입하였다 (도 1B). 두 번째 재조합 벡터의 경우 *Bgl* II와 *Spe* I enzyme site가 부착된 primer로 HcRNAV34 VLP 유전자를 증폭하여 pCambia1304 binary 벡터 내 GFP 유전자 앞의 *Bgl* II와 *Spe* I 부분에 삽입시켜서 제작하였다 (도 1C). 재조합된 두 벡터를 *E. coli*에 형질전환 하여 direct colony PCR 을 통하여 형질전환이 확인된 세포주를 선별하였고, 선별된 세포주의 plasmid DNA를 추출하여 *Bgl* II/*Bst* EII (도 3A) 또는 *Bgl* II/*Spe* I

(도 3B)으로 처리하여 예상된 크기 (1080 bp)의 band를 통해 삽입 여부를 확인하였다 (도 3). 이를 각각 pCAM/34 VLP와 pCAM/34 GFP로 명명하였다.

[0071]

선별된 *E. coli* 세포주로부터 두 가지의 재조합 벡터 DNA를 추출하여 Freeze-Thaw 방법을 통해 *A. tumefaciens* GV3101 균주에 형질전환을 수행하였다. Freeze-Thaw 방법을 통한 *Agrobacterium*의 형질전환 효율은 대장균에 비하여 효율이 낮으므로 1 ug 이상의 DNA를 사용하여 시행하였으며, 이 방법은 형질전환 과정에서 일어날 수 있는 상동 재조합의 가능성을 줄여주고 실험방법이 비교적 간단하여 *Agrobacterium*에 외부 유전자를 도입하는 형질전환 방법으로 가장 널리 이용되고 있다 (Birnboim *et al.*, 1979).

[0072]

형질전환 된 세포주를 선별하기 위해 항생제 rifampicin (100 mg/L), gentamycin (50 mg/L), hygromycin (50 mg/L)에 저항성을 갖는 colony를 채취하였으며 direct colony PCR (도 4A)과 restriction endonuclease digestion (도 4B)를 통해 최종적으로 세포주를 선별하여 담배 형질전환에 사용하였다.

[0073]

<5-2> 식물체 형질전환

[0074]

*A. tumefaciens*를 이용한 식물체 형질전환법은 외떡잎식물과 쌍떡잎식물 모두 식물체에 외래 유전자를 삽입하는 가장 광범위하게 사용되는 방법이다. 바이러스 저항성 및 제초제에 대한 내성 식물체 개발, 웅성불임, 저온 스트레스 내성 등 다양한 식물의 형태, 생리, 유전적인 연구에 활용되고 있으며, 최근에는 토마토 및 당근 등에서 식용 및 활용 가능한 백신까지 생산하는 등 실생활에 유용한 식물체를 개발하는데 활용되고 있다.

[0075]

본 연구에서는 생물학적 적조 방제법의 일환으로 *H. circularisquama*에 특이적으로 감염되어 살조시키는 HcRNAV34 바이러스의 VLP 유전자를 도입하기 위해 제작한 벡터가 포함된 *A. tumefaciens* GV3101을 이용하여 leaf disk 방법을 통해 담배 잎을 형질전환 시켰다. Leaf disk 방법을 이용하여 형질전환 시킨 담배 잎 절편을 TCM 고체배지와 TSIMII 고체배지에 치상, 배양한 결과, 배양 일주일 후부터 일부의 잎들은 갈변되기 시작하였으나 배양 2주 후부터 담배 잎 절편으로부터 절단면이 부풀어 오르면서 부정아가 형성되기 시작하였다. 부정아 형성 후 신초가 분화되기 시작하였으며, 절편체로부터 신초 형성율은 300 개 중 270 개 이상, 약 90 % 이상임이 확인되었다. 그 후 형성되는 신초들 중에 가장 건강하게 자라는 것들을 선별하여 3-4 주 후에 발근을 유도하는 TRM 고체배지에 치상하여 뿌리를 유도하여 소식물체로 재분화 시킨 후, 온실로 옮겨 성체로 생장시켰다 (도 5). 성체로 생장하는 동안, 형질전환 담배와 비 형질전환 담배의 표현형을 관찰한 결과 외형과 생장률은 특별한 차이점을 보이지 않고 유사하게 생장하는 것을 확인하였다.

[0076]

<실험예 6> 담배 형질전환 식물체 분석 및 계통 선발

[0077]

형질전환 후 형성된 신초를 hygromycin 항생제 배지에서 1차적으로 선별한 후, 소식물체로 재생된 형질전환체에서 HcRNAV34 VLP 유전자 발현을 다음과 같은 실험으로 확인하였다.

[0078]

<6-1> 형질전환 식물체 genomic DNA PCR 분석

[0079]

형질전환 식물체들의 유전자 도입 여부를 확인하기 위해 수행한 genomic DNA PCR에서 pCAM/34 VLP가 도입된 형질전환체는 HcRNAV34 VLP 유전자에 대해 특이적으로 제작된 34-F와 34-R primer를 사용하였으며, pCAM/34 GFP가 도입된 형질전환체는 HcRNAV34 VLP 유전자에 대해 특이적으로 제작된 34-F와 GUS 유전자에 대해 특이적으로 제작된 GUS-R primer를 이용하였다. 각 유전자가 도입된 형질전환 식물체에서는 약 1.1 kb (도 6A)와 3.6 kb (도 6B)의 band를 확인할 수 있었다.

[0080]

이와 같은 결과로 미루어, band가 나타난 식물체는 담배의 게놈 내에 HcRNAV34 VLP 유전자가 삽입된 것으로 사료된다. 형질전환 된 잎의 genomic DNA를 이용한 PCR을 수행할 때 신초를 유기하는 과정의 배지로부터 *Agrobacterium*이 담배 잎에 기생하여 PCR 실험을 수행하는 과정에서 탐지되는 경우도 있으므로 주의를 기울여야 한다. 본 실험에서 negative control로 사용된 비 형질전환 식물체에서는 band가 합성되지 않은 결과로 미루어

형질전환체로 사료되는 신초에서만 *HcNAV34 VLP* 유전자의 도입을 확인할 수 있었다. Hygromycin 항생제 포함 배지에서 1차적으로 선별된 형질전환체 중 약 80 %의 식물체에서 *HcNAV34 VLP* 유전자의 도입을 확인할 수 있었고 또한 Varsani *et al* (2003)의 연구결과에서도 pART27 binary 벡터와 *Human papillomavirus(HPV)* type 16 외피 단백질 유전자를 재조합하여 *N. tabacum* cv. Xanthi에 삽입한 결과, 본 연구에서와 유사하게 80 % 정도의 형질전환체에서 유전자의 도입이 확인되었다.

[0081]

<6-2> 형질전환 식물체 RT-PCR 분석

[0082]

앞서 수행한 genomic DNA PCR 분석을 토대로 *HcNAV34 VLP* 유전자 도입이 확인된 담배 형질전환 식물체들의 전사체 발현을 확인하기 위하여 총 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였다. 비 형질전환 식물체 잎을 대조군으로 선정하였고, *HcNAV34 VLP* 유전자에 대해 특이적으로 제작된 primer인 R34-F와 R34-R을 이용하여 수행하였다. Control로 사용된 actin의 발현 양상은 모두 비슷하게 나왔으나, 특이적인 *HcNAV34 VLP* 유전자 primer를 사용한 결과는 비 형질전환 식물체로부터는 발현이 나타나지 않았으며, 형질전환 식물체라 예상된 담배에서만 약 522 bp의 위치에서 band를 통해 전사체의 발현을 확인할 수 있었다 (도 7). 실험 중 예상된 위치가 아닌 다른 위치에서 나타나는 band가 발견되기도 하였으며 동일한 위치에서도 발현양이 다른 경우도 있었다. 이는 선별된 신초의 장기간의 계대배양에 의해 삽입된 유전자의 변형이 일어났을 것으로 사료된다. 또한, positive control로 사용한 actin (480 bp)이 유사한 발현율을 나타내는 것을 통해 동일한 유전자가 삽입된 형질전환체이지만 개체에 따라 다른 발현율을 보이는 것을 확인하였다. Genomic DNA PCR을 통해 선별한 216 개의 형질전환체 중 100 개 (약 50 %)에서 정확한 크기의 band가 나타나는 형질전환체들을 선별하여, 계속적인 실험을 진행하였다.

[0083]

<6-3> 형질전환 식물체 GFP 발현 분석

[0084]

pCAM/34 GFP 벡터가 형질전환 된 담배 식물체 중에서 genomic DNA와 mRNA 발현 분석이 끝난 형질전환체를 선별하여 GFP 발현을 통해 *HcNAV34 VLP*의 발현을 형광현미경 (OLYMPUS, Japan)으로 관찰하였다. 형질전환 식물체와 비 형질전환 식물체의 잎 절편에서 형성된 신초를 채취하여 UV 광을 조사한 결과, 형질전환 식물체는 GFP의 발현에 의해 밝은 녹색의 형광을 발현하는 반면 (도 8B), 형질전환이 되지 않은 식물체는 다소 낮은 빛을 발현하는 것이 관찰되었다 (도 8A). 이는 식물체가 기본적으로 보유하는 자가형광 (Auto-fluorescence) 단백질이나 2차 대사산물로 사료된다. 형질전환체의 잎맥, 줄기 등에서 GFP 발현을 확인할 수 있었는데, 잎의 경우 엽육조직 전체에서 발현되고 있음을 확인하였고, 특히 GFP가 도입된 형질전환 담배의 신초에서는 UV 광 조사 전후로 반응의 차이를 나타내었다.

[0085]

<6-4> 형질전환 식물체 western blot 분석

[0086]

형질전환 식물체에서 *HcNAV34 VLP*의 발현 여부를 확인하기 위하여 선별된 형질전환체들을 대상으로 *HcNAV34-R2* 항체를 이용하여 western blot 분석을 수행하였다. *HcNAV34 VLP* 유전자는 총 360 개의 아미노산을 가지고 있으며 단백질 분자량은 약 38 kDa이다. 형질전환체의 예상 크기인 38 kDa에서 보다 약간 위쪽인 약 40 kDa에서 *HcNAV34 VLP*의 band가 발현되는 것을 확인하였다 (도 9). 이는 외래 유전자가 도입된 식물체에서 번역 후 변형작용에 의해 식물체 내에서 발현되는 단백질의 크기를 변형시키는 요인에 의한 것으로 사료된다 (Gomord *et al.*, 2004). 따라서, *HcNAV34 VLP*를 식물체 내에 발현시켰을 때 약간 증가된 단백질 발현은 유전자 발현 시 번역 과정 후 변형 과정에서 약간의 단백질의 크기가 증가되는 것으로 사료된다. 형질전환 식물체의 단백질 발현 정도에 대한 정확한 비교 분석을 위해 비 형질전환 식물체와 RT-PCR의 결과에 따라 선별된 다소 발현양이 높은 4, 5, 7, 8 번의 형질전환 개체만을 가지고 실험하였지만 각 개체에 따라 발현양에 차이가 나므로 추후 더 자세한 양적 검증이 필요할 것이라 사료된다.

[0087]

<실험예 7> HcRNAV34 VLP의 살조능 검증

[0088]

<7-1> HcRNAV34 VLP의 숙주 특이적 살조능 검증

[0089]

선발된 형질전환체로부터 총 단백질을 추출하여 HcRNAV34 VLP의 효능을 확인하고자 적조를 유발하는 해수종 와편모조류인 HcRNAV34 바이러스의 숙주 *H. circularisquama* HU 9433-P, HA 92-1과 비숙주 *H. circularisquama* HY 9423, HU 9436 및 담수종 *C. vulgaris*에 처리하였다. HcRNAV34는 *H. circularisquama* HU 9433-P와 HA 92-1 계통에만 특이적으로 감염된다는 연구 보고 (Nagasaki *et al.*, 2005)를 통해 숙주와 비숙주 균을 선정하였다.

[0090]

무처리군, 형질전환 담배 식물체에서 추출한 총 단백질을 처리한 군, 단백질 추출 용액인 RIPA buffer (50 %)를 처리한 군과 비 형질전환 담배 식물체의 추출한 총 단백질을 처리한 군의 총 4 가지 군을 선정하여 HcRNAV34 VLP가 포함된 총 단백질의 숙주 특이적 살조능을 관찰하였다. 단백질 추출 용액으로 사용한 RIPA buffer에는 SDS 등이 포함되어 있어 조류에 영향을 미칠 것으로 예상되어 RIPA buffer만을 처리한 대조군을 포함하였고, 사전 실험을 통해 RIPA buffer가 조류를 파괴시키지 않는 농도를 검정하여 50 %로 이용하였다. 조류 배양액 500 μ l (4×10^5 cell/ml)에 추출한 단백질을 1 μ l (2.5 μ g/ μ l)를 처리하여 1 시간 동안 15 분 간격으로 조류의 형태 변화와 유동성 및 세포 파괴 정도를 광학현미경을 이용하여 관찰하였다.

[0091]

먼저 시간대 별로 조류의 형태 변화와 유동성을 관찰한 결과 숙주 조류인 HU 9433-P의 경우 RIPA buffer를 처리한 군과 비 형질전환 담배 식물체의 총 단백질을 처리한 군에서는 반응 15 분 후부터 조류의 오목 들어간 가운데 부분이 약간씩 부풀어 오르는 형태 변화를 가져왔다 (도 11G, L). RIPA buffer를 처리한 군의 조류에서는 약 15-20 % 정도이며 비 형질전환 담배 식물체의 총 단백질을 처리한 군의 조류에서는 약 20 %의 형태 변화를 보였으며, 처리 30 분 후에 관찰한 결과 형태 변화를 일으켰던 조류들이 다시 본래의 형태로 회복되기 시작하였고 (도 11H, M), 처리 후 45 분 후에 관찰한 결과 형태가 변화된 조류들이 거의 관찰되지 않아 90 % 이상의 회복율을 관찰하였다 (도 11I, N). 조류의 유동성 관찰 결과, 단백질 처리 후 15 분에 RIPA buffer를 처리한 군과 비 형질전환 담배 식물체의 총 단백질을 처리한 군의 조류에서 모두 60-70 % 정도 유동성이 감소하였으며 (도 11G, L), 처리 후 45 분 후에 관찰한 결과 형태 변화와 유사하게 95 % 정도의 유동성이 회복되었다 (도 11I, N). 이러한 결과로 SDS 등이 포함된 RIPA buffer와 니코틴 같은 다양한 2차 대사물질들을 포함하는 비 형질전환 담배 식물체의 총 단백질은 일시적으로 유동성의 감소와 형태 변화를 가져오지만, 처리 후 30 분 이후부터 95 % 정도의 회복율을 보임으로써 숙주 조류의 파괴에 미치는 영향은 거의 없다고 사료된다.

[0092]

형질전환 담배 식물체에서 추출한 총 단백질을 처리한 실험군은 반응 15 분 후에 관찰한 결과 80 % 이상의 조류에서 형태 변화를 보였으며, 유동성은 0 %였다 (도 11Q). 반응 30 분 후에 관찰한 결과 모든 조류에서 형태 변화를 관찰하였으며 약 15 % 이상의 조류에서 세포막이 파괴되어 세포액이 용출되어지는 것을 관찰하였다 (도 11R). 반응 45 분 후에 관찰한 결과 조류의 약 50 % 정도가 파괴되었으며 (도 11S), 반응 후 60 분 후에 관찰한 결과 80-90 % 정도의 조류가 파괴됨 (도 11T)을 관찰하였다.

[0093]

광학현미경을 이용하여 관찰한 위의 결과를 그래프로 도식화하여 도 10에 나타내었다. 형질전환 된 담배에서 추출한 총 단백질의 농도 (10 μ g/ μ l)를 높여 처리하였을 경우 반응 30 분 후에 70 % 이상의 조류가 파괴되었고, 이러한 결과는 단백질 농도에 의존하여 조류의 살조능이 증가됨을 의미한다. 또한 *H. circularisquama* HA 92-1에서도 HU 9433-P와 유사한 양상을 나타내었다 (도 12).

[0094]

비숙주 조류인 *H. circularisquama* HY 9423에 RIPA buffer를 처리한 군과 비 형질전환 담배 식물체 단백질을 처리한 군에서는 반응 후 15 분에 관찰한 결과 약 20 %의 조류에서 형태 변화와 유동성이 감소되는 등 숙주 조류와 비슷한 양상을 나타내었으며 (도 13G, L), 반응 45 분 후에 관찰한 결과 90 % 이상의 조류에서 형태 변화와 유동성이 회복됨을 관찰하였다 (도 13I, N). 형질전환 담배 식물체 단백질을 처리한 군에서는 반응 15 분 후에 관찰한 결과 약 20 %의 형태변화와 50 % 정도의 유동성이 감소되었으나 (도 13Q), 반응 30 분에 관찰한 결과 형태 변화된 조류 중 약 50 % 조류의 형태가 회복되었으며, 유동성도 50 % 정도 회복되었다 (도 13R). 반응 45 분부터 관찰한 결과 숙주 조류인 *H. circularisquama* HU 9433-P나 HA 92-1과는 달리 90 %이상의 조류에서 형태와 유동성이 회복됨 (도 13S)을 관찰하였다. 이를 통해, 반응시간이 지날수록 형태가 회복됨에 따라 유동성도 증가됨을 알 수 있었다. 다른 비숙주 조류로 이용하였던 *H. circularisquama* HU 9436 (도 14) 또한 HY 9423과 유사한 양상을 나타내었다.

[0095] *C. vulgaris*는 담수에 존재하는 직경 2-10 μm 의 구형 단세포 미세조류로 녹조류의 일종이다. 본 실험에서는 담배 형질전환체에서 추출한 HcRNAV34 VLP가 *H. circularisquama* 외의 담수종에 대해 미치는 영향을 확인하기 위해 비숙주로 이용하였다. 위와 동일한 방법으로 실험을 진행한 결과, 모든 군에서 형태 변화나 파괴된 세포가 발견되지 않았다 (도 15). 이러한 결과는 HcRNAV34 VLP는 *H. circularisquama* 외에 다른 종에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료되며, 형질전환 된 담배에서 추출한 총 단백질을 숙주 조류인 *H. circularisquama* HU 9433-P, HA 92-1에만 특이적으로 감염되어 살조시키고, 비숙주 조류인 *H. circularisquama* HY 9423, HU 9436 및 *C. vulgaris*에는 감염을 일으키지 않는 것을 확인하였다.

[0096] 또한, 담배 형질전환체에 *HcRNAV34 VLP* 유전자와 함께 도입된 GFP의 녹색 형광 발현을 confocal 현미경을 이용하여 HcRNAV34 VLP의 살조능을 확인하고자 하였다 (Fig. 16). *HcRNAV34 VLP::GFP* 유전자가 형질전환 된 담배 식물체로부터 총 단백질을 분리하여 숙주 조류인 *H. circularisquama* HU 9433-P에 1 μl (2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 처리하여 15 분 후에 관찰한 결과 조류 내로 단백질이 유입되었고 (도 16A), 유입되어진 세포들은 대부분 부풀어 오르는 등의 형태 변화를 나타내었다 (도 16B). 처리 후 30 분 후부터 조류의 세포 파괴가 관찰되었으며 파괴된 조류의 세포 안에서 강한 GFP의 형광 발현이 관찰되었다(도 16C). Tartani *et al* (2001), Tomaru *et al* (2004) 및 Mizumoto *et al* (2007)의 연구에서 HcRNAV34는 *H. circularisquama*의 세포질 내에서 결정체로 배열되어 작용하는 것으로 보고되었으며, 본 논문의 결과를 통해서도 확인된 것처럼 형질전환 식물체에서 발현된 HcRNAV34 VLP 도 조류 내로 유입되어 세포 파괴에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

[0097] <7-2> Trypan Blue 염색법을 이용한 살조능 검증

[0098] 선발된 형질전환체로부터 총 단백질을 추출하여 숙주 조류인 *H. circularisquama* HU 9433-P에 처리 후 사멸 정도를 trypan blue 염색법을 이용하여 관찰하였다. Trypan blue는 세포막 손상이나 세포 사멸의 조직 화학적 지표제로 사용하는 시약으로써, trypan blue 입자는 세포막을 확산의 방법으로 통과하여 세포 내부로 유입되는데, 생세포는 ATP 에너지를 이용한 외포작용을 통해 trypan blue 입자를 다시 세포 외부로 배제하게 되나, 에너지를 발생할 수 없는 사세포는 외포작용을 할 수 없어 진한 푸른색으로 염색이 된다. 총 단백질 처리 15 분 후 관찰 시, 형태가 변화되면서 손상을 입어 염색된 조류가 관찰되었는데 (도 17B), 이는 총 단백질을 처리하여 광학현미경으로 관찰하였을 때는 형태의 변화만 확인되었으나 형태가 변화함으로써 조류의 내부는 손상을 입어 ATP 에너지를 발생시키지 못하여 염색되는 것으로 사료된다. 처리 30 분 후에는 세포막이 파괴되어 내부가 염색되는 것이 관찰되었으며 (도 17C), 45 분 후 파괴된 세포 주변에서는 용출 작용에 의해 방출된 trypan blue 입자와 세포 내재물질들이 관찰되었다 (도 17D).

[0099] 우리나라 연안에 발생하는 유해성 적조의 피해를 최소화하기 위해 적조 생물 제거 방법으로 현재 사용되어지고 있는 물리화학적 및 생물학적 방법은 다른 해양 생물에 영향을 끼쳐 많은 문제점을 나타내고 있으며, 이러한 문제를 해결하기 위하여 최근 해양 미생물 또는 바이러스를 이용한 생물학적 방제에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

[0100] HcRNAV34는 적조 유발 와편모조류인 *H. circularisquama*에 선택적으로 감염되어 파괴하므로, 담배 내에서 HcRNAV34의 VLP 발현 유도를 확인하고 대량생산 체계를 수립하여 숙주에 선택적으로 작용한다면 이러한 방법은 유해 조류 제어를 위한 생태계 교란 없는 생물학적 제어 방법이 될 것이다.

[0101] *HcRNAV34 VLP* 유전자를 식물 형질전환용 binary 벡터인 pCAMBIA1304를 이용하여, pCAM/34 VLP와 pCAM/34 GFP 두 가지 벡터를 재조합하였다. 재조합한 pCAM/34 VLP와 pCAM/34 GFP 벡터가 삽입된 *A. tumefaciens* GV3101 세포주를 이용하여 leaf-disk 방법으로 담배 (*N. tabacum* cv. Havana) 잎을 형질전환 시킨 후, hygromycin 항생제 저항성을 통하여 형질전환체를 선별하였다. 선별 결과, 형질전환 담배와 비 형질전환 담배의 표현형 및 생장률은 특별한 차이점이 나타나지 않았다.

[0102] 항생제 배지에서 선발된 형질전환체는 genomic DNA PCR 방법으로 *HcRNAV34 VLP* 유전자가 담배의 게놈에 삽입됨을 확인하였고, RT-PCR 분석으로 mRNA의 *HcRNAV34 VLP* 유전자가 발현됨을 확인하였으며, *HcRNAV34 VLP* 유전자와 함께 형질전환 된 GFP의 발현을 통하여 형질전환의 여부를 확인하였다. 최종적으로 선별된 형질전환 담배 식물체들에서 단백질을 추출해 HcRNAV34-R2 항체를 이용하여 western blot 분석을 수행 후, HcRNAV34 VLP (360

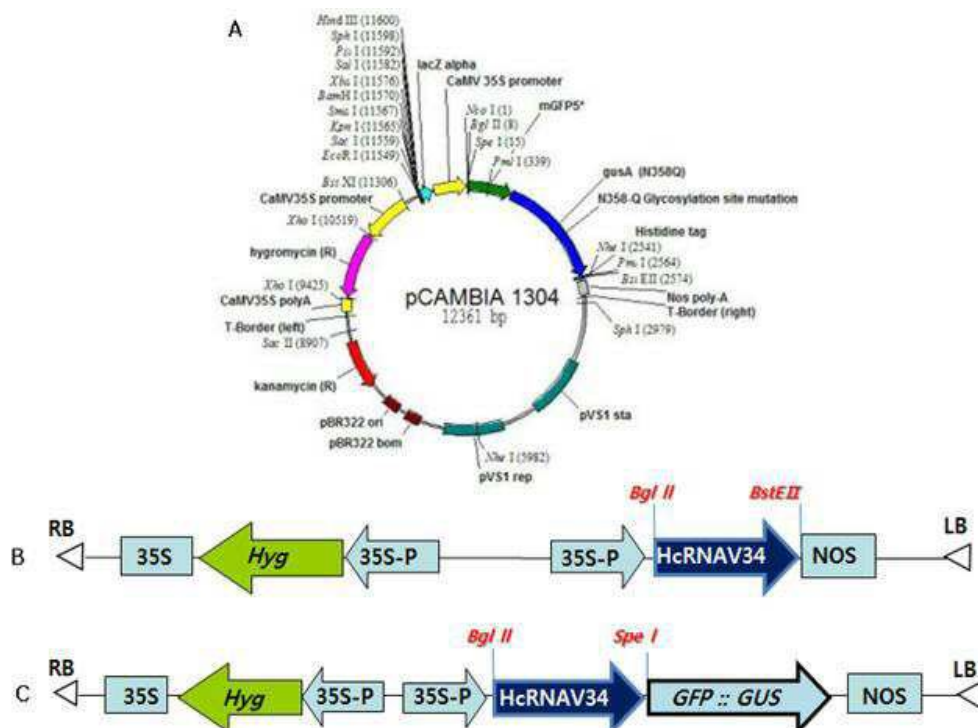
amino acids)는 예상 크기인 약 38 KDa에서 발현되는 것을 확인함으로써 HcRNAV34 VLP가 식물체 내에서 안정적으로 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

[0103] 형질전환 식물체에서 총 단백질을 추출하여 HcRNAV34의 숙주인 *H. circularisquama* HU 9433-P와 HA 92-1, 비숙주인 *H. circularisquama* HY 9423과 HU 9436 및 *C. vulgaris*에 처리한 결과, 숙주인 HU 9433-P와 HA 92-1에서만 조류의 유동성이 정지되고, 형태의 변화가 일어나며, 세포가 파괴되는 결과를 관찰하였다. 또한 confocal 현미경으로 관찰하였을 때, *HcRNAV34* VLP와 함께 형질전환 된 *GFP*가 조류 내에서 발현되는 것으로 미루어 조류의 형태 변화 및 파괴는 HcRNAV34 VLP가 조류 내로 유입되어 발생하는 것으로 사료되며, HcRNAV34 VLP만으로도 숙주 특이적 살조능이 있는 것을 확인하였다.

[0104] 따라서, 유해 조류에 특이적으로 감염되는 바이러스를 선별하여 그 일부를 식물체에 형질전환을 통해 대량생산하여 살조능을 확인한다면 이는 새로운 생물학적 적조 방제 방법으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면

도면1

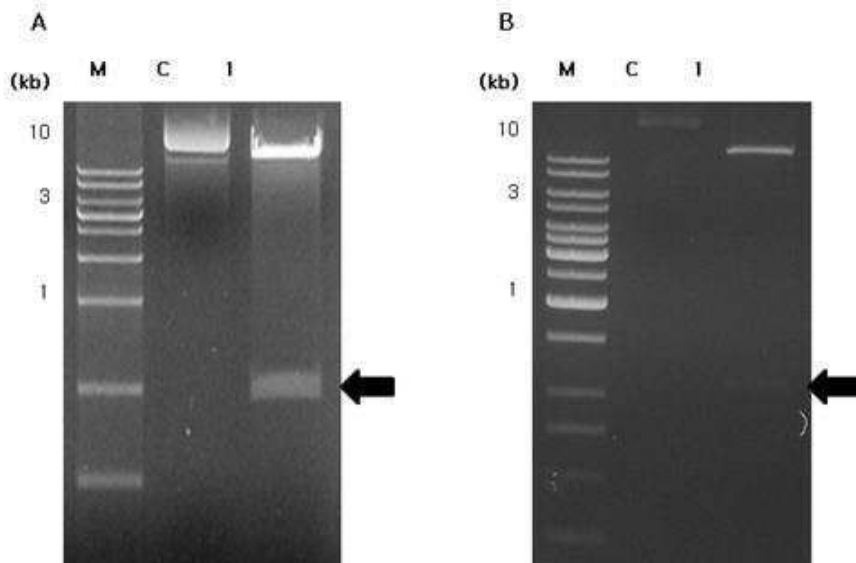


도면2

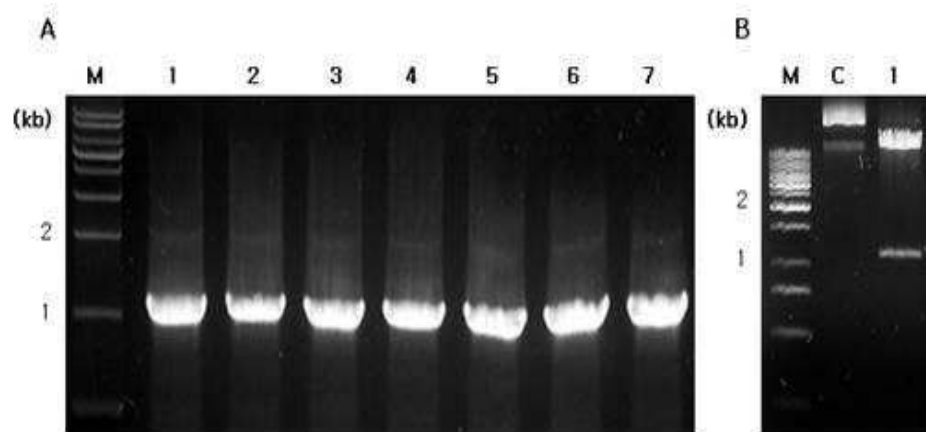
```

1  ATGACCCGCC CGCTGGCACT GACG ATGGT GGTAA TACG ATGGTGGTAA TAACGGTGGT AGCCGCCGCC GCCCGCCGG CCAACGTCGT CAGGGCCGTC
101 GCCGTAATCG CGCTGCCGC GGTGGCGGTG GCGGTCCGGC CAACAATGCC GCAATGGTC TGGCCCAAGG TGCAGGTAGT GTGCCGGCA TGCCGTTTGG
201 TTCTGGGCG AGTCGTCCA CCATGCCGC ATGGGATGCT TTCCATCCG AACATCTGCC GCTGCCGCT AGTGTGGGC CGTATTGCGT GGTTCCGACC
301 AGCTCTCTGA TACG GTTC CGACAAAGT ATGCTGTTG CCGCATGGT TGGCAGTGC GGTTCGTGC TGACCGCATG TGCTATGGC TCCCG TACG
401 AAGGCGGTGC GATCAACGGT CTGGATAACA CCAATGTTA GACG GTCCG TTTCCGGCA TTGCCAC TACG GTTCATCG ATCACCCTCG TGCCGSCAGC
501 TCTGAGCGTT CAGGTCATGA ACCGGAATCC GCTGATGAGC ACG GGCA TTTCCGGCG TACCGTCTC CAT TACG CAAC TGAACCTGGC GGGTCGTACC
601 GAA TACG TGGG ATGATTTTAG CATGGAAGT ATCTCTTCA TCGTCCGGC CCGATGTCA GCAGGCAAC TGCTCTGCG CGGCGTTCAG GGTGACTCGT
701 ATCCGCTGAA TATGTCAGCA CTGTCGAAT TCAATTGTCT GTCAGATGT GCTGAAGTA AACTGTCTG GACCGACAGC TCTGGTCACT ATCCGSCGG
801 TCTGGCCCCG CTGGTGTTC TTAACGAAGC AAAACAGACC ATGAATTACC TGGTCTCAGT GGAATGGCGT GTTCGCTTCG ATATTGGCAA TCCGSCCGTC
901 GCGCACAACG TCATCACGGT ATCAGCCCGG AATGGAATG GGATGACATG ATTA TACG GCGATCGCC GTGCCACGG TATTATGAC ATCGCGGAAC
1001 GCGTTGCAAA TGCTGGCTCT TTTGTTGCGA ATGCCGCTAT TGCTGCTCGT CGTGCGATGC CGGCTCTGAT GGCTGCTTGA
    
```

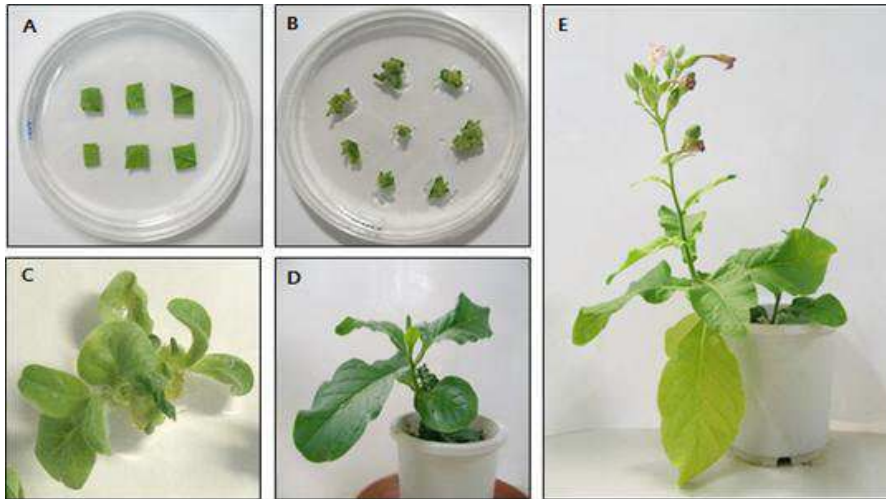
도면3



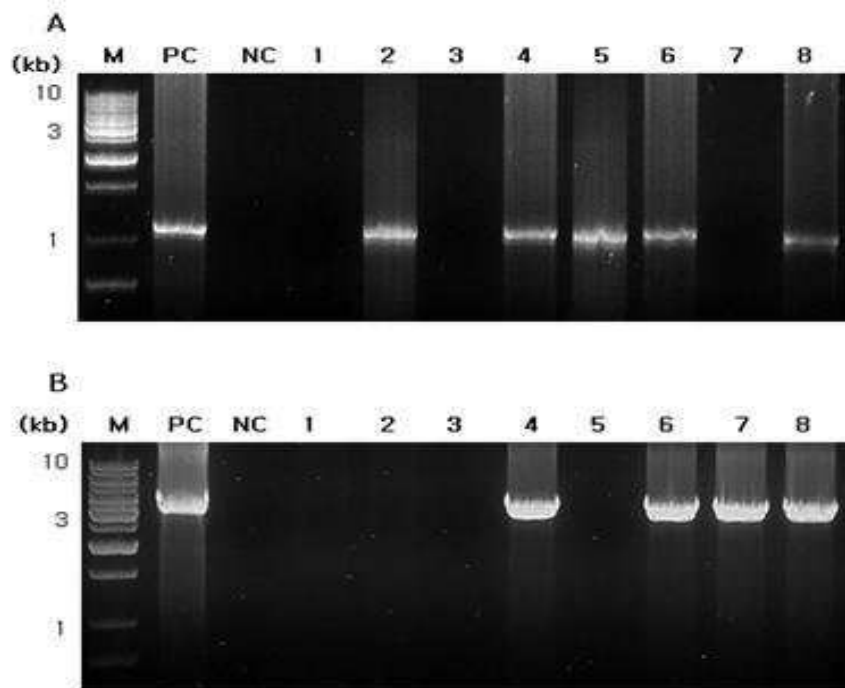
도면4



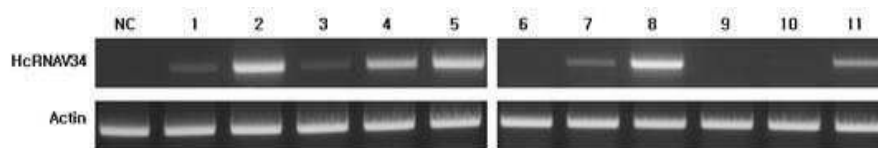
도면5



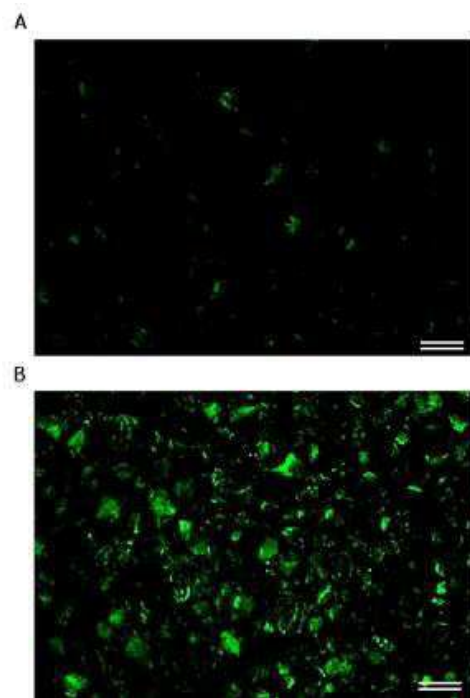
도면6



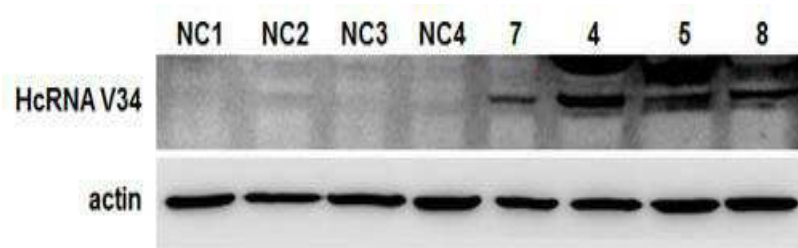
도면7



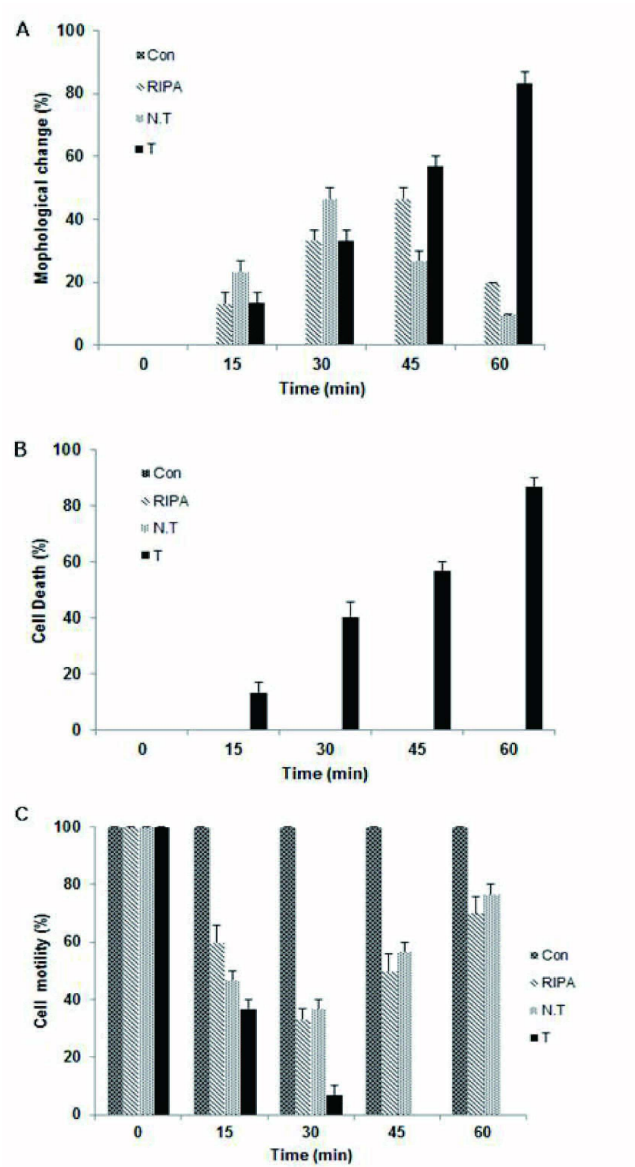
도면8



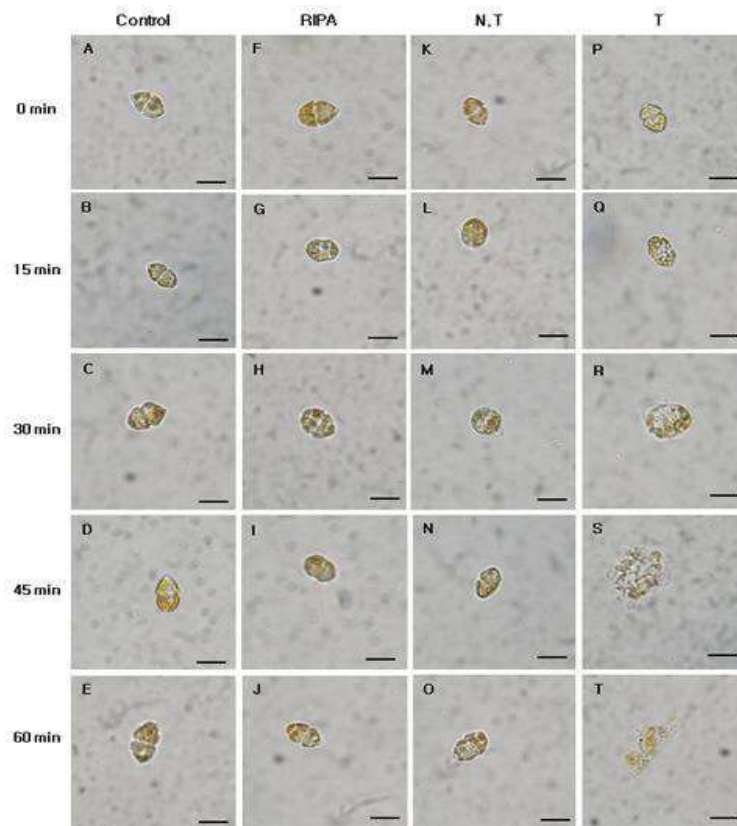
도면9



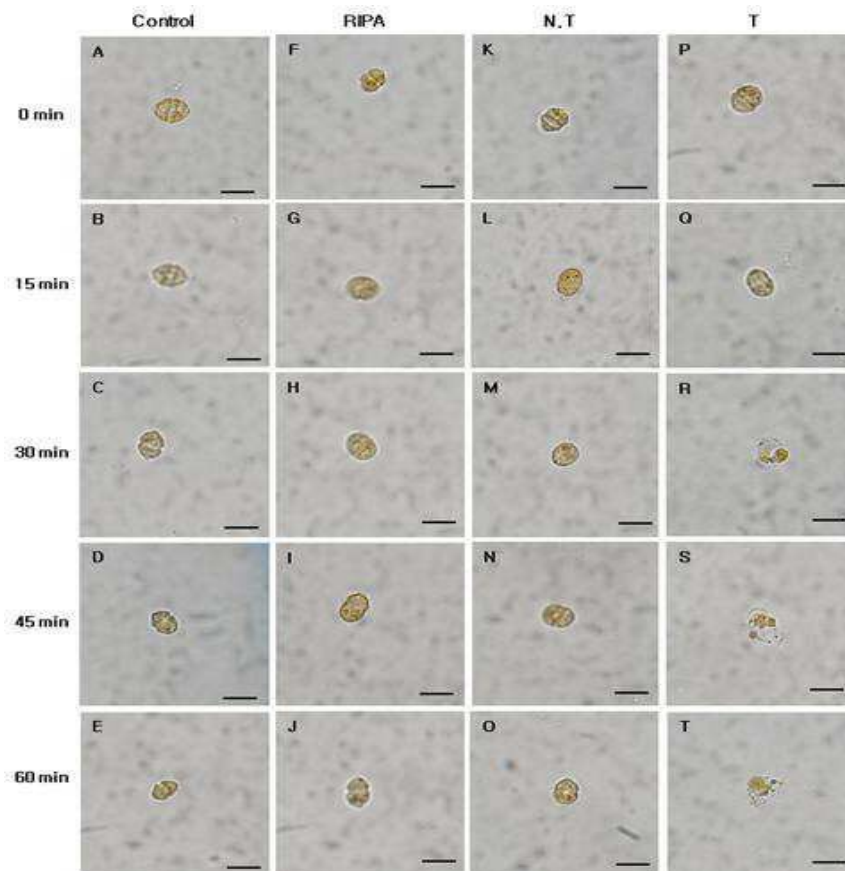
도면10



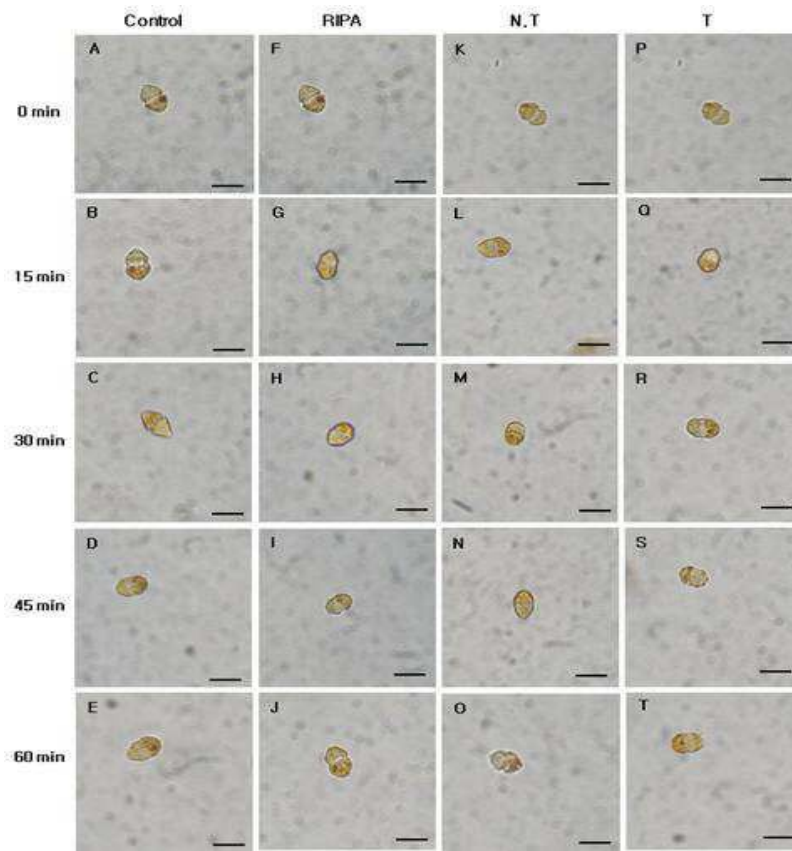
도면11



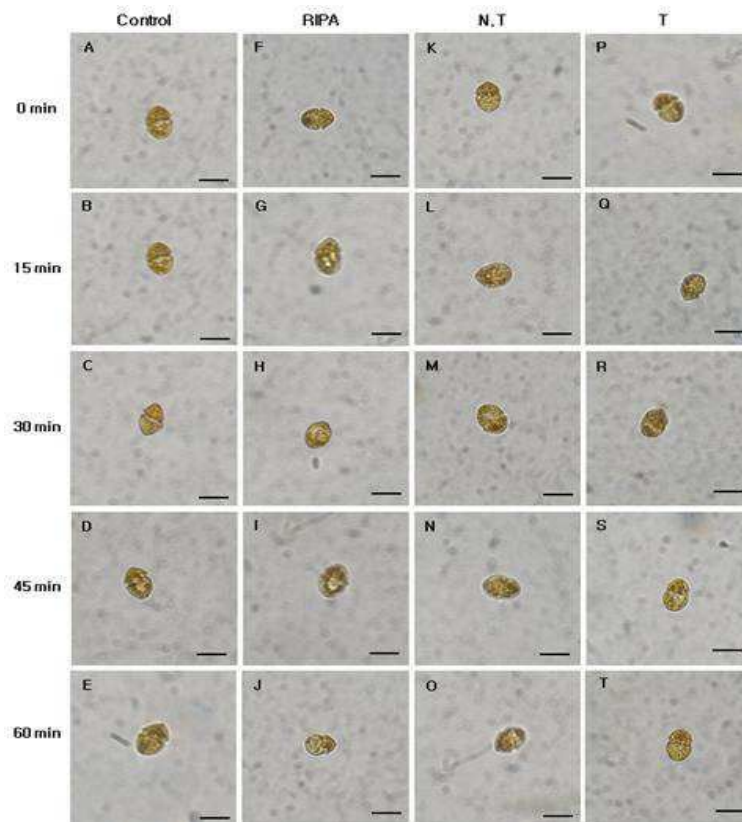
도면12



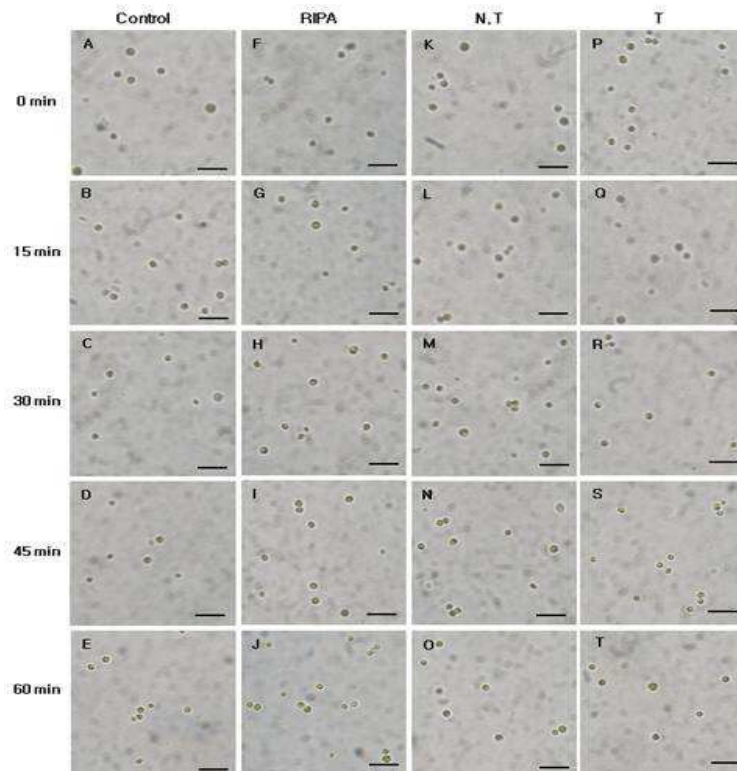
도면13



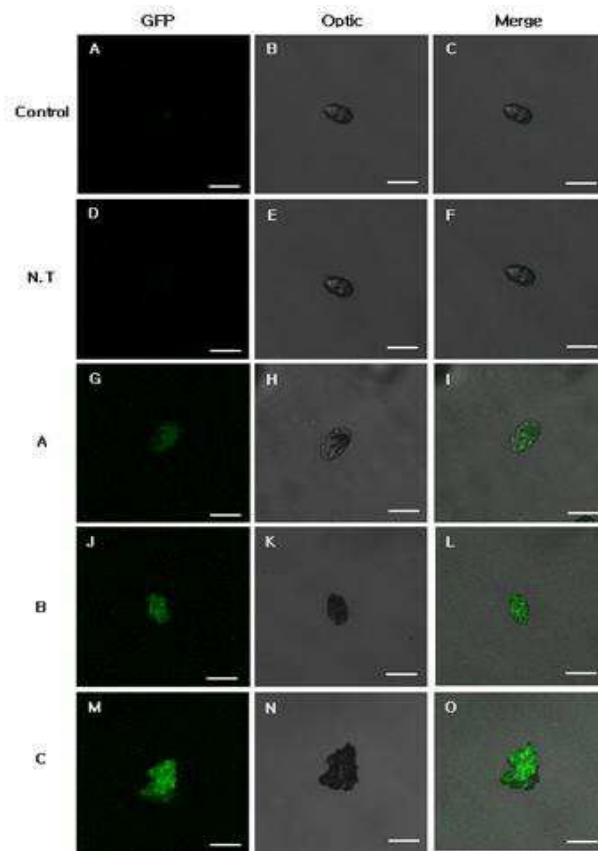
도면14



도면15



도면16



도면17

