



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0126654
(43) 공개일자 2016년11월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/70 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/701 (2013.01)

C12Q 2537/143 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0057981

(22) 출원일자 2015년04월24일

심사청구일자 2015년11월25일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

임현섭

대전광역시 유성구 가정로 266, 14동 302호 (가정동, 과기원교수아파트)

서은영

대전광역시 유성구 덕명서로 8번길 15, 301호(덕명동)

(74) 대리인

최규환

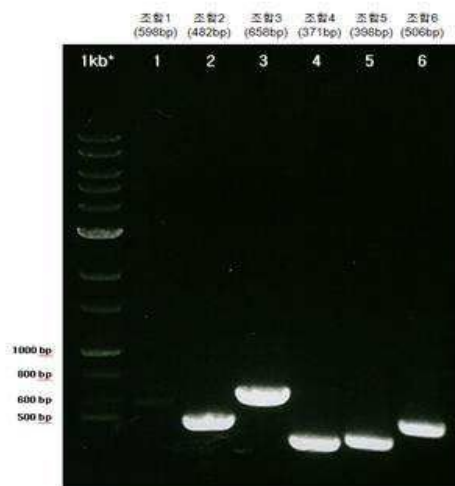
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 플란타인 모틀 바이러스 진단 또는 검출용 프라이머 세트 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 플란타인 모틀 바이러스의 진단 또는 검출용 프라이머 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로는 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 세트; 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머 세트; 서열번호 7 및 서열번호 8의 프라이머 세트; 서열번호 9 및 서열번호 10의 프라이머 세트; 및 서열번호 11 및 서열번호 12의 프라이머 세트로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는 플란타인 모틀 바이러스(Plantain mottle virus) 특이적 진단 또는 검출용 프라이머 세트, 상기 프라이머 세트를 포함하는 플란타인 모틀 바이러스(Plantain mottle virus) 특이적 진단 또는 검출용 키트 및 상기 프라이머 세트를 이용하여 플란타인 모틀 바이러스(Plantain mottle virus)를 특이적으로 진단 또는 검출하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12Q 2563/101 (2013.01)

C12Q 2563/107 (2013.01)

C12Q 2600/16 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012R1A1A2007417

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업

연구과제명 AltMV(Alternanthera mosaic virus)의 엽록소 이동 단백질(TGB3)을 이용한 엽록소 피사 및 엽육세포 원형질 연락사 구조이해

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교

연구기간 2012.05.01 ~ 2015.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 3 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 5 및 서열번호 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 7 및 서열번호 8의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 9 및 서열번호 10의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 및 서열번호 11 및 서열번호 12의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 포함하는 플란타인 모틀 바이러스(Plantain mottle virus) 특이적 진단 또는 검출용 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 3 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 5 및 서열번호 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 7 및 서열번호 8의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 9 및 서열번호 10의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 및 서열번호 11 및 서열번호 12의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 포함하는 플란타인 모틀 바이러스(Plantain mottle virus) 특이적 진단 또는 검출용 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 따른 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 플란타인 모틀 바이러스(Plantain mottle virus) 특이적 진단 또는 검출용 키트.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함하는 것을 특징으로 하는 플란타인 모틀 바이러스(Plantain mottle virus) 특이적 진단 또는 검출용 키트.

청구항 5

식물 시료에서 총 RNA를 분리하는 단계;

상기 분리한 총 RNA를 주형으로 하고, 제1항 또는 제2항에 따른 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 플란타인 모틀 바이러스(Plantain mottle virus)를 특이적으로 진단 또는 검출하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열은 형광, 인광 또는 방사성 측정을 발하는 물질로 표지되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 증폭 산물의 검출은 DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 플란타인 모틀 바이러스 진단 또는 검출용 프라이머 세트 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 서열번호 3 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 5 및 서열번호 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 7 및 서열번호 8의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 9 및 서

[0001]

열번호 10의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 및 서열번호 11 및 서열번호 12의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 포함하는 플란타인 모틀 바이러스(Plantain mottle virus) 특이적 진단 또는 검출용 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트, 상기 프라이머 세트 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 플란타인 모틀 바이러스(Plantain mottle virus) 특이적 진단 또는 검출용 키트 및 상기 프라이머 세트를 이용하여 플란타인 모틀 바이러스(Plantain mottle virus)를 특이적으로 진단 또는 검출하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 기후 온난화에 따른 생태계 변화, 식물과 바이러스의 진화 및 변이, 그리고 농산물 교역 확대에 따라 돌발 바이러스 및 새로운 바이러스 병의 출현 및 위험도는 점차 높아지고 있다. 지금까지 보고된 식물 바이러스는 전 세계적으로 약 1,000여 종이 알려져 있으며, 아직까지도 여러 가지 식물에서 새로운 바이러스들이 지속적으로 보고되고 있다. 현재 우리나라에서는 약 100여 종의 바이러스가 여러 가지 식물에서 보고되어 있다. 그러나 발생하는 바이러스에 대한 상세한 조사가 일부 작물에서만 이루어졌고, 대부분의 작물에서는 단편적인 조사만 이루어져 있다. 그리하여 아직까지 많은 주요 작물에서 어떤 바이러스 병이 발생하고 있는지 구체적으로 파악되지 못하고 있는 실정이다.

[0003] 식물병이란 식물기주에 대한 병원균 또는 환경요인의 지속적인 영향의 결과로 나타난 기주세포와 조직의 기능 이상으로서, 식물의 형태, 생리 등에 비정상적인 변화가 나타난 상태를 말하며, 그 결과 나타난 경제적 가치의 감소를 포함하기도 한다. 이러한 식물병을 일으키는 원인으로는 곰팡이(Fungi), 박테리아(Bacteria), 선충(Nematode), 마이코플라스마(Mycoplasma), 원생동물(Protozoa) 및 바이러스(Virus)가 있다. 그러나, 바이러스는 크기가 1 μ m 보다 작은 병원체로 광학현미경으로도 그 실체를 관찰할 수 없고, 전자현미경을 필요로 하기 때문에, 육안으로 식물체에 발생한 바이러스를 진단하는 것은 곤란하다.

[0004] 바이러스 진단법으로 과거에는 전자현미경과 혈청학적 방법을 주로 사용하였다. 전자현미경을 이용한 방법은 바이러스의 존재를 확인할 수는 있지만 형태적 특징으로 종을 진단하기는 불가능하다. 혈청학적 방법 중 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 방법은 가장 일반적으로 사용되는 진단 방법이나 PCR을 이용한 진단보다 검출 감도가 약 1,000배 정도 낮으며, 항체와 검사 시료의 비특이적 반응으로 진단에 실패하는 경우가 종종 발생한다. BPMV(Bean pod mottle virus)의 경우에도 바이러스 진단을 위해 ELISA를 주로 사용하고 있으나, 식물체 추출물과 항혈청의 비특이적 반응으로 인해 오진단하는 경우가 종종 있으며, 검사 시료에서 BPMV의 감염률이 낮은 경우에는 진단에 실패할 가능성이 크다. 또한, 검역 현장에서는 하나의 검사 시료에 대해 다양한 병원체의 진단을 수행해야 하므로 여러 가지 진단법을 사용할 경우 많은 노동력과 검사 비용이 소요된다. 이에 따라 바이러스를 진단하기 위한 다양한 방법들이 개발되어 사용되고 있다. 특히, 질경이 식물에 병을 일으키는 바이러스에 대한 연구가 필요한 실정이다.

[0005] 한편, 한국등록특허 제1093239호에는 마늘 알렉시바이러스의 진단용 특이 프라이머 및 이의 용도에 대해 개시되어 있고, 한국등록특허 제1491789호에는 강남콩쑥뚜리열록바이러스 진단용 프라이머 및 이의 용도가 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 '플란타인 모틀 바이러스 진단 또는 검출용 프라이머 세트 및 이의 용도'에 대해서는 밝혀진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자는 전자현미경 및 혈청학적 방법으로는 플란타인 모틀 바이러스에 감염된 식물을 진단하기 어렵기 때문에, 플란타인 모틀 바이러스를 특이적으로 진단 또는 검출할 수 있는 5개의 프라이머 세트를 제작하여, 이를 상기 바이러스에 감염된 식물 시료의 진단에 적용하여 특이성을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 3 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 5 및 서열번호 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 7 및 서열번호 8의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 9 및 서열번호 10의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 및 서열번호 11 및 서열번호 12의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이

머 세트를 포함하는 플란타인 모틀 바이러스(Plantain mottle virus) 특이적 진단 또는 검출용 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 플란타인 모틀 바이러스(Plantain mottle virus) 특이적 진단 또는 검출용 키트를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 이용하여 플란타인 모틀 바이러스(Plantain mottle virus)를 특이적으로 진단 또는 검출하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 플란타인 모틀 바이러스(Plantain mottle virus) 진단 또는 검출용 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트, 플란타인 모틀 바이러스 진단 또는 검출용 키트 및 PCR을 이용한 플란타인 모틀 바이러스 진단 방법을 이용하면, 플란타인 모틀 바이러스에 대한 감염 여부를 항혈청을 이용한 진단법에 비해 1000배 이상 정확하고, 빠르게 확인할 수 있으므로, 검역 현장에서 유용하게 이용될 수 있으며, 식물바이러스 PCR 진단 키트의 산업화와 질 경이를 포함하는 숙주 식물 무병주 보급 및 품질 향상에 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 플란타인 모틀 바이러스 진단을 위해 설계한 프라이머 지도를 나타낸 것이다. 프라이머 위치는 플란타인 모틀 바이러스 게놈을 기준으로 작성된 것이다.

도 2는 플란타인 모틀 바이러스 진단용 프라이머 조합(표 1 참고)의 PCR 분석결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 3 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 5 및 서열번호 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 7 및 서열번호 8의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 서열번호 9 및 서열번호 10의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 및 서열번호 11 및 서열번호 12의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 포함하는 플란타인 모틀 바이러스(Plantain mottle virus) 특이적 진단 또는 검출용 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 제공한다.

[0013] 본 발명의 플란타인 모틀 바이러스 진단 또는 검출용 프라이머 세트는 바람직하게는 상기 5개의 플란타인 모틀 바이러스 특이적 진단 또는 검출용 프라이머 세트로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상의 플란타인 모틀 바이러스 특이적 진단 또는 검출용 프라이머 세트를 포함하며, 가장 바람직하게는 5개의 상기 프라이머 세트, 즉, 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 세트; 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머 세트; 서열번호 7 및 서열번호 8의 프라이머 세트; 서열번호 9 및 서열번호 10의 프라이머 세트; 및 서열번호 11 및 서열번호 12의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 모두 포함할 수 있다.

[0014] 상기 5개의 프라이머 세트를 동시에 이용하면 플란타인 모틀 바이러스를 더욱 정확하게 진단할 수 있다.

[0015] 상기 프라이머는 각 프라이머의 서열 길이에 따라, 서열번호 3 내지 서열번호 12의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 서열번호 3의 프라이머(19개 올리고뉴클레오타이드)는 서열번호 3의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며, 서열번호 4의 프라이머(23개 올리고뉴클레오타이드)는 서열번호 4의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다. 상기 프라이머의 길이 및 서열은 연장 산물의 합성을 시작하도록 허용해야 한다. 프라이머의 구체적인 길이 및 서열은 요구되는 DNA 또는 RNA 표적의 복잡도(complexity)뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 의존할 것이다.

[0017] 본 명세서에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)을 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)을 포함할 수 있다.

- [0018] 또한, 본 발명은 상기 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 플란타인 모틀 바이러스(Plantain mottle virus)의 특이적 진단 또는 검출용 키트를 제공한다.
- [0019] 본 발명의 키트에서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 역전사효소(Reverse transcriptase), DNA 폴리머라제, dNTPs, 버퍼 등을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, PCR 완충액 제조 방법, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물이다. 안내서는 팜플렛 또는 진단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨 및 키트를 포함하는 패키지의 표면에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.
- [0020] 또한, 본 발명은
- [0021] 식물 시료에서 전체 RNA를 분리하는 단계;
- [0022] 상기 분리한 전체 RNA를 주형으로 하고, 상기 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- [0023] 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 플란타인 모틀 바이러스(Plantain mottle virus)를 특이적으로 진단 또는 검출하는 방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명의 방법에서 식물 시료에서 전체 RNA를 분리하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, 트리 시약(Tri Reagent, MRC사)을 이용할 수 있다. 상기 분리된 전체 RNA를 주형으로 하고, 본 발명의 일 실시예에 따른 하나 이상의 프라이머 세트를 프라이머로 이용하여 RT(Reverse transcriptase)-PCR을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다. 이러한 PCR 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 상업적으로 이용가능한 키트를 이용할 수도 있다.
- [0025] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열은 검출가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 일 구현 예에서, 상기 표지 물질은 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 표지 물질은 Cy-5 또는 Cy-3이다. 표적 서열의 증폭시 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다. 또한, 방사성 물질을 이용한 표지는 PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하면 증폭 산물이 합성되면서 방사성이 증폭 산물에 혼입되어 증폭 산물이 방사성으로 표지될 수 있다. 표적 서열을 증폭하기 위해 이용된 프라이머 세트는 상기에 기재된 바와 같다.
- [0026] 본 발명의 방법은 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함한다. 상기 증폭 산물의 검출은 모세관 전기영동, DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 증폭 산물을 검출하는 방법 중의 하나로서, 겔 전기영동을 수행할 수 있으며, 겔 전기영동은 증폭 산물의 크기에 따라 아크릴아미드 겔 전기영동 또는 아가로스 겔 전기영동을 이용할 수 있다. 또한, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지되며, 이렇게 표지된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다. 또한, 방사성 측정 방법은 PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하여 증폭 산물을 표지한 후, 방사성 측정기구, 예를 들면, 가이거 계수기(Geiger counter) 또는 액체섬광계수기(liquid scintillation counter)를 이용하여 방사성을 측정할 수 있다.
- [0027] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.
- [0028] **실험방법**
- [0029] **1. 샘플의 채집 및 총 RNA 추출**
- [0030] 식물 바이러스가 감염되었을 것으로 의심되는 138개 식물 샘플을 채집하였고, 모든 샘플을 각각 액체 질소를 이용하여 마쇄하였다. 마쇄한 모든 샘플은 초저온에서 보관하였다. 마쇄한 각각의 샘플을 동량으로 섞은 후 총

RNA를 추출하였으며, 총 RNA 추출은 트리 시약(Tri Reagent, MRC사)을 이용하여 제조사의 지시에 따라 추출하였다.

2. 리보솜 RNA 제거, 이중 가닥 cDNA 합성, 라이브러리 제작 및 시퀀싱

추출된 총 RNA에서 Ribo-Zero™ Magnetic Kit(plant leaf)(Epicentre)를 이용하여 리보솜 RNA를 제거하였다. 준비된 RNA는 짧은 단편으로 파쇄한 후, 이중 가닥 cDNA로 합성하였고, 합성된 이중 가닥 cDNA는 말단 수정(end-repair)하여 라이브러리 제작에 요구되는 클로닝을 위해서 어댑터(adapter)를 붙였다. 이러한 일련의 과정은 TrueSeqRNA 샘플 프랩 키트(Illumina)를 이용하여 진행하였다. BluePippin™ 2% 아가로스 겔 카세트(Sage Science)를 이용하여 정제된 적당한 크기의 삽입 DNA(insert DNA)를 PCR 증폭을 위해서 선별하였다. 최종적으로 라이브러리 제작에 적합한 삽입 DNA의 크기 및 양/질을 Agilent 2100 BioAnalyzer 2100(Agilent Technologies)를 이용하여 측정하였다. 라이브러리 제작이 완성되었으며, 라이브러리 절편 크기는 대략 350-450bp라는 것을 확인하였다. Illumina HiSeq 2500을 이용하여 라이브러리를 시퀀싱 하였으며, 페어-엔드 시퀀싱(paired-end sequencing) 방법을 이용하여 약 40Gbp의 로우 데이터(raw data)를 생성하였다.

3. 시퀀싱한 로우 데이터(raw data)의 가공 및 식물 바이러스 관련 콘티그(contig)의 제작

로우 데이터에서 양질의 데이터를 선별한 후, 식물 바이러스 관련 리드(reads)를 확보하여 콘티그를 만들었다. 이러한 일련의 과정은 데노보 합성 전사체 분석(de novo transcriptome analysis, SG-de novo Assembler) 방법을 통해서 진행되었다. 식물 바이러스 관련 염기서열을 갖는 약 7,000여 개의 콘티그를 확보하였다. 콘티그의 길이가 너무 짧거나(<500bp), 바이러스 관련 데이터베이스(DataBase)에서 비교했을 때 적용범위(coverage)가 낮은 데이터는 제거하여 최종 약 700여 개의 콘티그를 확보하였다.

4. 프라이머 제작 및 전체 게놈 규명

바이러스 관련 데이터베이스(DataBase)에서 비교했을 때, 약 85-90% 이상의 상동성을 보이는 콘티그를 제거하여 약 150여 개의 콘티그를 확보하였고, 이들 각각을 데이터베이스를 통해서 가장 상동성이 높은 바이러스를 확인하였으며, 같은 바이러스에 높은 상동성을 보이는 콘티그들을 그룹으로 각각 만들었다. 각각의 그룹에 속하는 콘티그들은 해당 식물 바이러스 게놈을 레퍼런스 시퀀스(reference sequence)로 해서 정렬하여 그 위치를 확인하였다.

이들 콘티그의 염기서열을 바탕으로 프라이머를 제작하였고, 제작된 프라이머를 이용하여 138개의 식물 샘플을 대상으로 PCR을 수행하였다. PCR 결과는 아가로스 겔 전기영동을 통해서 밴드를 확인하거나 밴드가 확인된 PCR 산물은 시퀀싱하여 염기서열을 확인하였다. 콘티그를 근거로 제작된 프라이머 세트의 PCR 결과를 통해서 얻어진 염기서열을 바탕으로 플란타인 모틀 바이러스의 총 염기서열(서열번호 13을 확보하였다).

5. 플란타인 모틀 바이러스 진단용 프라이머의 설계

신종바이러스로 예상되는 플란타인 모틀 바이러스를 특이적으로 진단할 수 있는 프라이머를 제작하기 위하여, 질경이 시료로부터 분리된 플란타인 모틀 바이러스의 게놈(genome)을 NCBI에서 BLAST한 후, 적용범위(coverage) 및 상동성(identity)이 다소 높은 유사 바이러스를 선별하였다. 본 발명의 플란타인 모틀 바이러스는 기존에 밝혀진 하베나리아 모자이크 바이러스(*Habenaria mosaic virus*)와만 유사성을 보였다(coverage 99% 및 identity 81%). 따라서, 본 발명의 플란타인 모틀 바이러스와 하베나리아 모자이크 바이러스의 전체 게놈을 얼라이먼트(alignment)한 후, 플란타인 모틀 바이러스에 특이적으로 작용할 수 있는 부분에서 6개의 프라이머 세트를 제작하였다(표 1).

표 1

[0040]

본 발명의 플란타인 모틀 바이러스 진단용 프라이머

구분		서열번호	염기서열	길이	Tm(℃)	위치
조합번호 1	플란타인 모틀 바이러스-정방향89	1	CTC TAT TAA AGT TTC ATA TAC GTC	24	56.7	89-112
	플란타인 모틀 바이러스-역방향686	2	CTC ATG TTC GGC ACG TCA ATG	21	61.3	666-686
조합번호 2	플란타인 모틀 바이러스-정방향402	3	GGT TGA AAA GGA TGT GGA C	19	55.2	402-420
	플란타인 모틀 바이러스-역방향883	4	AAC TTT GTG CAT CCA TCA GCA AG	23	61.1	861-883
조합번호 3	플란타인 모틀 바이러스-정방향2311	5	ACT GAT TTT CAT GCA AGA AGC C	22	58.4	2311-2332
	플란타인 모틀 바이러스-역방향2968	6	AAC ACC CTA CTA GTC TAC TCG	21	59.4	2948-2968
조합번호 4	플란타인 모틀 바이러스-정방향2942	7	ACC AAC GAG TAG ACT AGT AGG	21	59.4	2942-2962
	플란타인 모틀 바이러스-역방향3312	8	ATT ACC TTC GAG TTG CTT CAA C	22	58.4	3291-3312
조합번호 5	플란타인 모틀 바이러스-정방향4997	9	TAT TGG AGA ATT TGT GGA GCG	21	57.4	4997-5017
	플란타인 모틀 바이러스-역방향5394	10	ATC CAT AAC CTT GTT GAT AGT C	22	56.6	5373-5394
조합번호 6	플란타인 모틀 바이러스-정방향5646	11	CCG CAT TAT AGA TTC TGA TGG C	22	60.3	5646-5667
	플란타인 모틀 바이러스-역방향6151	12	ATT CGT GTT CAA CCT CAT GCC	21	59.4	6131-6151

[0041]

본 발명의 모든 프라이머 세트는 플란타인 모틀 바이러스의 게놈을 기준으로 도 1과 같이 위치하였으며, 제작된 6개의 프라이머들을 조합하여 PCR을 수행하였다. PCR 방법은 다음과 같다.

[0042]

PCR: (1) 전-변성(Pre-denature) 94℃ 및 5분, (2) 변성(denature) 94℃ 및 30초, (3) 어닐링(annealing) 56℃ 및 30초, (4) 연장(extension) 72℃ 및 30초의 온도 및 시간조건, (2)~(4)는 30회 반복하여 PCR을 수행하였으며, 식물 시료로부터 제작한 cDNA를 주형으로 이용하였다. PCR 산물은 1% 아가로스 겔(agarose gel)의 각각의 홈에 5μl씩을 넣고 30분 동안 전기영동하였다.

[0043]

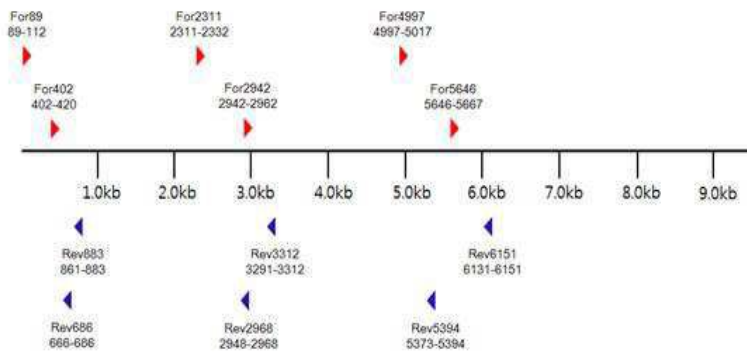
실시예 1. 플란타인 모틀 바이러스 진단용 프라이머의 특이성 확인

[0044]

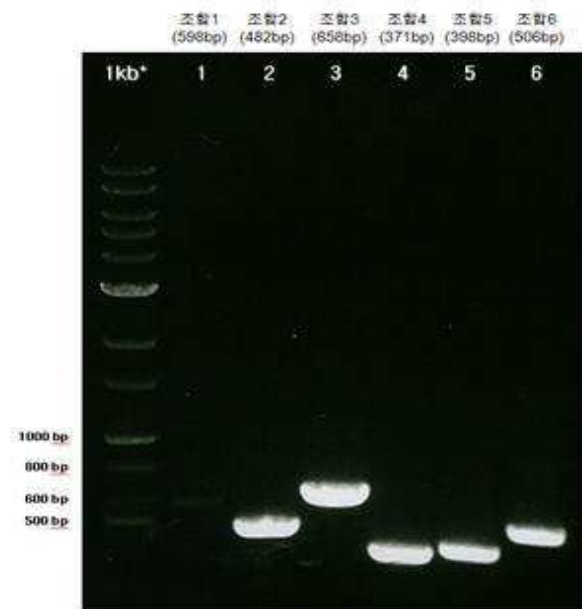
상기 실험방법 5의 PCR 산물을 전기영동한 다음, EtBr(Ethidium bromide) 염색을 통해 PCR 산물의 밴드를 확인한 결과, 도 2에 개시된 바와 같이 각각의 PCR 산물은 프라이머 제작 시 예상했던 사이즈와 동일하게 나타내었다(프라이머 조합 1: 598bp, 조합 2: 482bp, 조합 3: 658bp, 조합 4: 371bp, 조합 5: 398bp 및 조합 6: 506bp).

도면

도면1



도면2



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Primer set for diagnosing or detecting Plantain mottle virus and
uses thereof
- <130> PN15105
- <160> 13
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 1

ctctattaaa gtttcatata cgtc 24

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Primer

<400> 2

ctcatgttcg gcacgtcaat g 21

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 3

ggttgaaaag gatgtggac 19

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 4

aactttgtgc atccatcagc aag 23

<210> 5

<211> 22

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 5

actgatatttc atgcaagaag cc 22

<210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 6
 aacaccctac tagtctactc g 21
 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 7
 accaacgagt agactagtag g 21

 <210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 8
 attaccttcg agttgcttca ac 22
 <210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 9
 tattggagaa tttgtggagc g 21
 <210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 10

atccataacc ttgtgatag tc	22
<210> 11	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 11	
ccgcattata gattctgatg gc	22
<210> 12	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 12	
attcgtgttc aacctcatgc c	21
<210> 13	
<211> 9515	
<212> DNA	
<213> Plantain mottle virus	
<400> 13	
aaaatataaa aactcataca aacatacaga aaacaaacga attcaagcaa acaagcactc	60
aaagcattca caaagcattc aaaacaatct ctattaaagt ttcatatagc tcttaatact	120
ctctagcaat cagaaatggc aattcaattt ggaacaatta ctagtgaagt actggctgca	180
tgcaacgtga aaccgcagtt gacacacagc gaaatacttg atcgtgctat gatcgaaaag	240
tgcggagttg caaaaatatac tgtactaccg tacattaaga gtctgaatgt gcaagccccg	300
acaccacgca tccgtaaagc atggcgagtg gagaacaaag gttttgggga aacccaaata	360
gtggaacaa ttgtagatac ctttgataat catattgtca aggttgaaaa ggatgtggac	420
acgaagggtg aagttgtagc cacttcgttc aggacacgct ctgccaaggt tgcacgacca	480
attgtgcaat cattgggcga aaagaactcg ctactgcata aagtgtgtgc actagcgttt	540
aagcgaacaa taccagtgc attcatttgt aagcgaactg agcgtgttcg tgcagcacgc	600
cacgtgacat cgaacttctc ttgcatggca atagtaacac accaccatgc tgggaagaca	660
cgcaacattg acgtgccgaa catgagctca ttgcgtgata tggttgttag tgtcgcgcac	720

gcaacgtgga aaggtaacaa aatacacgaa cggaatatca aagttggtga tagtggttgc	780
attataccac gtgaaatgat tgaaggcact gtccactgtg acaaggatga tgtttttatt	840
gtgcgtggac gctacagtaa cttgctgatg gatgcacaaa gttacttacc gatgagttat	900
tgcaccaagg tagttccgta ctctacagca gagcaatact ggaaaggttt tgacgtggca	960
tttcgtgcga ataggagcaa ccaactaata cacgaacctg gggagaagct ggatgttgag	1020
caatgtgggt ctatcgagc aatactgcac cagtcatgtc taccctgttg taagattacg	1080
tgcaccactt gcagtaaaat tctcgaggag agcagtgtc aggaaacacg acaacgaatc	1140
gggcaaaccg caaggaaagg ggccgagctc attaggcgta attatcgtgg cttcgaacat	1200
gtctatcaac tgctaatgaa tcatgcgaat atgctagatt ctgttaacag caatcgagaa	1260
gcatgcggta aggtgcaata tataatcgga gagcgcacag atgcaccgtt cagtcatgta	1320
ctacgcata atgaaacact cataaaaggt aatcaagcca ctgcaagtga gttatcagca	1380
gcatctaata atctcctgga aattgcgcgt tatttgaaaa accgcacaga aaacattcag	1440
aagggtcac tgcgctcgtt ccgaaataaa gtttcagcaa aagctcatct aaatccacaa	1500
ttgctttgtg ataaccagtt ggatgcagat ggaaatttcg tgtggggtga tcgagcatac	1560
catgccaac gcttcttctc gaacttcttt gaggagataa atcctgaaca tgggtatgat	1620
aagtacataa tacgcaagtt tccgaatggt agtagaaaac tagcaatagg gcagttaata	1680
ctgtcaacaa atttagatcg gttacgtgaa cagttagtag gggaacccat aaaacccgaa	1740
ccgttaactg acgcatgtgt tagtaaaatt catgaaacat ttatataccc atgctcatgt	1800
gtaacgtatg acgacgggac accagticta tccgagatga aggcacccac gagcaatcac	1860
ctagtcttg taacgcaggg gattcaaagt acttggactt accgacagga agaggagatc	1920
gcatgttcat ttgcaaaaga aggttattgc tacatgaaca tctttttggc tatgcttgtt	1980
aatgttgata aagataaagc caaagatttt actaagtggg ttcgggatac aattgtgacg	2040
cagctaggcc aatggcctac aataacagat gtcgcactcg catgtttcca gctatccatt	2100
atgttcctt cagtgcgtaa tgcagaatta ccaagaatac tcgttgatca ccatacga	2160
acgttgcatg tcttggactc gtatggatca ttaactacag gttttcacat acttaagatg	2220
aacacggttg atcagctcat taaaatagct aatgaaactt tagagtctga gattaagcat	2280
tatagagttg gaggaactga ttatgctggc actgatcttc atgcaagaag cctaaaacaa	2340
glaatccgcg gagtataccg tccgagcgaa cttcgaagca tccatcaatca tgaccgtac	2400
atactgacga tggcactcct atcaccagca attctgacag gcttatttac aacaggatcc	2460
ctctaccaag ccactttgtc tctaattcct gaagatactt cagcgagaca tttagtgtgc	2520

ttattgactt cgctcgcggt tcgtgtttca cgattgaagg atttaccatga tcaagtcaat	2580
atcattgagg aaaatctagg agctttttcta gaaattttgt ctgttgggtga tcgtttagt	2640
tatgctcgag catttatgca gcgcacgata gaggcacggt tagaatcgat tagtgcggat	2700
gaagaactcg atgctagtgg gttcagaaca ctctgttga aatccgtcca agtgcaggaa	2760
aaaatttaca cagaggattt ggaggcttca tggcaagatt tgcagtttgt ggaaggtgc	2820
tatataatgt tgcaaaagt ggagtggtga aggcgtatta tagtagaact cagccaagaa	2880
agtgccatat ctttcaagaa ggtctacgag cattgcagca caggcttgca cctcgctatg	2940
aaaccaacga gtagactagt aggggtgtgt acaataaat ttggtaacgt agctaagagt	3000
gtgcataata gattgttag tggatttgc tatggtttca ggtgtgtatt ccgcgatcta	3060
tttcattttg ttcaagttt agctatttgt aatataattc ttatgatttt agattcgta	3120
ctacgtctta ggagtgcata tatagctaag gcacgccaag ttcattatat gcgtgaacaa	3180
cagaatagg ataaactaga aaaattgtat agtgcctca aacacaaact cggaatggag	3240
ccaacgttc atgaattcaa agagtttgtt agtggagtga atcctgaatt gttgaagcaa	3300
ctcgaaggta atgatgagt agaagtggag caccaggccg ttaagcgaga gagtgaagct	3360
cgactcgaac aaatcgtggc attcattgca ctggttctta tggatttcga taatgaacgt	3420
agtgactgtg tctatcgagt tatgaataaa ctaagaatg tagtgggtgt cgccgaccaa	3480
gatgtgaacc accagagcat ggacgatgag aatgaagtat ttgatgataa tgcaacaatc	3540
agctttgagc tggagtgtga agaccagtc cgtgcatacc cgagttcatc tacactcgag	3600
cagtgggtggg ataaccaact cgctctcaac agaacaatcc ctcatcacc aactgagggc	3660
tatttcatgg agttcacaag agctaactgc gcgcaagtta taaatgagat tgtgcacaac	3720
gagcacaagg atattctatt gagaggtgct gttggctctg gtaaatcaac tggtttacca	3780
gctggattgt cgaccgcggg aaaagtctta ctcttggaat caactaagcc actcagcaga	3840
aacgtgttta atcaactgag acaggatccc ttccatcttt caccatctct catgatgcgt	3900
gactccacta catttggttc aacaccgatc actatcatga cgagtgttga tgctttccac	3960
tactttgcaa acaatgcagg gaaacttca gattatcaat tcgttatgat agatgaatgt	4020
cacgtacttg acgcaaafgc catggcattc agatgtctac ttgaagaaca tgactaccaa	4080
gggaagatta ttaaagtgtc agcgacacca ccaggacggg aagtgaatt taccacgcaa	4140
cacaaagtgg aaatacgaat cgaggattcg ttatcattcc aacaatttgt cgccacactt	4200
ggcacaaaag gaaacgcaga cgtgactgat aaggccgaca acatccttgt atatgtagcg	4260

agctacaatg aagttgataa attatcaaag ctgctacaag agaagggtta tctggtgaca	4320
aaagttgacg ggaggactat gaagaatggt gttagcgacg ttgtaacaaa aggaacaccc	4380
acaaagaagc atttcatagt tgcaacgaac ataattgaga atggtgtcac tctggatatt	4440
gaagcagttg tagattttgg caccaaagta gtaccaactc tcgacacgga ctctcgaagg	4500
atactatact ctcacacatc cattagtatt ggggagcgca tacaacgatt gggtcgtgta	4560
ggaagattca aacctggtgt agcactaagg attgggcata cgcagaaaagg gatttgcgt	4620
attccctcaa taatcgcgac agaggctgcg ttcttgtgtt ttatttacgg tctaccagtt	4680
atgacatctc aggtaaagtac cagcctgctg cgaaagtgca cagtgcaca agcaagggtc	4740
atgaaactat tcgaattgcc cacatacttc atgcttgatt tagttaggca tgatggcaca	4800
atgcaccag atgttcacag attgtcact aaatataagt tgcgtgagag tgaaatcgta	4860
ttgaacagaa tggtatacc acatgcgca acatatcatt ggatggacgt gcggacatat	4920
aacgcttgtg gtaccaactt aacacttgca ccagacataa agataccgtt ctactgcaag	4980
gacttgctg agcaattatt ggagaatttg tggagcgta tccaagaaa taagggtgat	5040
gcaggttca gaactcttaa aagtcatgat gctgcaaaaa ttgcatacaa gctgcacact	5100
gatgagcact ccattcaacg aacagttgag atcattgatg cacttatcat tgaggaacag	5160
actaagaaag cacactttga ttgctagtt gtgaacacat gctcgagcgc ttctttctct	5220
ttgcaatcag ttagtaacgc gctgcgtgca agatataagc gaaacaacac aactgagaat	5280
ataagtgtgt taatggcagc gaaggcgag ttacttgact ttcaacactc ttgctatgag	5340
gaaagcattg ttataaaccc aggttcgca cggactatca acaaggttat ggataatgga	5400
gcccttgaaa ctgtcttgca tcaaagccgg gaagggataa tcaagagctt aaatctgcaa	5460
ggtaagtga aggaacggtt actcacaaga gatctattgg ttgctgctgg agttgcttgt	5520
ggtggtgtgt ggttgttata ccaatatgtt cagaatttca tgaatgaacc agtagagcac	5580
caagctaaaa acaagcgaca gaagcagaag cttaaatctc gcgatgcgcg cgatagaaaa	5640
gttgccgca ttatagattc tgatggctgt ggtgaagctg ttgaatggct ctttggtgat	5700
gcatacacga agaaaggcaa gcgcggtgga aaaacacgag gcatgggaac gaaaacacga	5760
aggtttgtga atatgtatgg ctttgatgaa gctgaattta catacatag cttcgtatg	5820
ccggtgacag gagaaatctt ggatgagagt gtgatgaccg acatctcgat agtgcaggat	5880
cattttggtg atctgaggag agagtacatt ggggaggata aaatttcacc acaggcactg	5940
tatagcaacc cggaatcaa agcctatctt gttagaata aaacatgcc agtgcttgag	6000
gttgatctta cactccatga accactcaag ctatgtgaca actcatcaac cattgcaggg	6060
ttcccagaga aggaaggaat tctaaggcag acaggtccag ccagacaaat caagtatgag	6120

gacatgcctg ggcatgaggt tgaacacgaa tctaaatcac tgaaccgtgg gcttcgcgat	6180
tacacgccaa tctcaaaatc catttgtttg ctgcaaaaca catcagatgg gtgcagcacc	6240
acaatacatg gcgttggata tggttcactc attgtttcaa atgcgcattt gttgaagcga	6300
aataacggca ccttgacaat aaagtcctatg catggggagt tcaaaattca gaatacaacg	6360
gcaattagaa tagcaccagt gccaattgt gatattaattg tcttaagatt gccaaaggac	6420
ttcccacat tttccacgaa gttaaagttc agagtgccag agtcaaatga gcaagtgtgt	6480
atggttggca ccaattttca ggagaagtgg atgtcgagta ccgtttcaag cacaagctac	6540
atacagcata tacctgggac acaattttgt aaacactgga ttgatacaaa ggatggacac	6600
tgcggcttcc caatgggtgc atcgaagat ggagcaattc ttggcttcca tagtttgact	6660
aatacaaac aagaataaa ctgctttgcc tccgccacga gtgtgttaat ggaaatacta	6720
gatgccccag agcatgctga ttggcgtaaa ggttggatgt acaaccctaa tgacatcagt	6780
tggggtttca tgcgcttgaa agagagtaca ccatctggtt tgtttaagcc tgctaaatcc	6840
attagggatt tagagctcga cattgttaat gagcaggcac aagtcagga acgttggttt	6900
aaaaaccagt tgcattgtaa ccttaaagct gttggacata gcgacagtca gcttgtgacg	6960
aagcacgtga taaaaggaaa gtgtccactc ttgaaacggt atttatgtga aactccgagc	7020
gctgcaaaat atttcagacc attaatgggt gcttaccaga aaagccgact aaatcgcgta	7080
gcatacgca aagatgcact caagtacga acaatcattg aatgcggttt agtcgagcca	7140
gaatcgtttg aacaggccat cgtgaatgtc atacaaattc tcaagaaggc tggcttctca	7200
gagtgtgcat acatcactga tccagaggaa atatttgcta atcttaacat gaaagcagca	7260
gtgggggcct tgiatgctgg gaagaagaag gattattttt ccgagtacac acaagagcag	7320
agagaagaaa tcctacaaca aagtgcggag cgtttgtata aaggtttcaa gggcgtgtgg	7380
aatggagcaa ttaaagcaga gctgcgaact cgtgagaaag tggaagcaga taaaacaagg	7440
actttcacgg cggcaccaat agacacatta ctgcaggca aaatatgtgt tgatgatttc	7500
aacctccagt tctatagctt acacactaaa gccccatgga gcgttggat ttctaaattc	7560
tcgtgtggat gggatgcgtt attacgtaag ctaccagatg ggtggatata ttgtgatgct	7620
gatggaagtc gcttcgacag ctcggtgact ccatacatta tcaatgcgat acctattatt	7680
cggcttgctt tcatggaaaa gtgggacatt ggtgaggtta tgatgcggaa cttatacaca	7740
gagatttgtt acaccccgat ccttactgca gatggcacga ttgtaaagaa gtttaaggc	7800
aataatagtg gacagccttc tacagttgtg gataatacac ttatggttct actggctatg	7860
caatatgcac tcgagcgact cagtatagat ttacagtgc aggaacaagt gtgcgtatat	7920
ttcgccaatg gtgatgatct tgtttagct gtagcacctg gatacgaaca cattctggac	7980

gcattgcagg gctacttctc tgagttgggt ttgaactacg atttatcaag tagacacaaa	8040
gaccgcgcaa atctctgggt tatgtcacac aaaggtgtaa taagagatgg tctatacata	8100
cccaaacttg agagtgaag gattgtatca atacttgaat ggacacgtgc taatgagcgg	8160
gctcatagat tggaggccat ttgtgcagct atggttgaag cgtgggggta taatgaactc	8220
ctgcatgaaa tacgtttgtt ctacaactgg attctccagc aacaaccata tgctacacta	8280
gctcaggaag gtaaagcacc ttacatttcg gagtgtgcat tacggagatt atacatggac	8340
aagttgatag agccgcacga atacgcaacg tatcttgaaa agttagtggc atccgtgcaa	8400
acttttgatg atagcgcgaa tttcatgatg catcaagcca gtgagcaaag agtggatgct	8460
actaaccat ttggaaaaca ggcacaaaaca aaagggctctg attctgaaag aagcagctca	8520
cgtgatgaac aacagaggaa cgaagataat cagcgcgcaaag attcagcacc actagcaccg	8580
gtaccagatc gggatataaa tgctggcaca acagggacat ttactgttcc aaagctcaag	8640
ggtatgagta caaagctcac aatacctaaa gtgaaaggaa aagtcgttgt gaatttaca	8700
cacttgctgc aatatacgcc agaccaggag aaactgtcaa acactttcgc aactgatgaa	8760
caatttgcca tatggtataa tgggtgtcaaa ggtgattatg aagtgtctga cgatgagatg	8820
caaataatat tgaatggctc aatgggtgtgg tgtattgaga atggcacctc accaaactta	8880
tctggagtgt gggttatgat ggatggggaa gaacaagtga cataccaat taaaccacta	8940
cttgatcatg cacaaccaac ttttaggcag atcatgcacc acttcagcaa cttggcagaa	9000
gcgtatatag aaaagcgtaa ttacattagt ccgtatatgc caagatatgg tcgtaatcgc	9060
aatcttaccg atatgtccct cgcacgctat gcattcgatt ttacgcagt aacttcgcgc	9120
acaccagagc gagcaaaaga ggcacatatg cagatgaagg ccgcagccct tcgtaatacc	9180
agtacacgaa tgtttgact ggacggtaag gtcggcacac aagcagagga cacggaaagg	9240
cacacagcag aggacgttaa ccgaaacatg cacaacctac taggtgtgcg tggcgtttaa	9300
agtgtgctat tagactggca tcgaacttat ataatatatt atgtaagagt ttaatcgta	9360
gtatcctcct tgccgtacgt atttttataa gcaaagagtg gttcgtccac gtacttatac	9420
tacatccgta catcgcttcc tatacttatg tcagacaaag tgagatttta tctcggtctg	9480
gggttttata gagagagaga aaaaaaaaaa aaaaa	9515