(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0051495
(43) 공개일자 2020년05월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) *C12N 15/66* (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 15/66 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0138666
(22) 출원일자 2019년11월01일
심사청구일자 2019년11월01일
(30) 우선권주장
1020180134494 2018년11월05일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
박만성
서울특별시 강남구 삼성로 417, 104동 704호 (대치동, 대치포스코더샵아파트)
김진일
서울특별시 동대문구 왕산로 244, 1동 502호 (전농동)
(74) 대리인
특허법인 무한

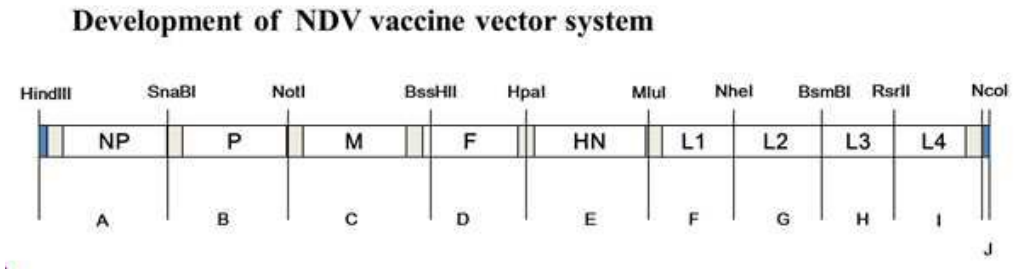
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **국내 야생 오리에서 분리된 뉴캐슬병 바이러스 재조합 벡터 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 국내 야생 오리에서 분리된 신규한 뉴캐슬병 바이러스 KU001 주 (수탁번호: KCTC18794P)의 전장 유전자를 삽입하여 제조한 재조합 벡터 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
C12N 2760/18141 (2013.01)
C12N 2760/18151 (2013.01)
C12N 2800/106 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 716002-7
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농림식품기술기획평가원
연구사업명 농림축산식품연구센터지원
연구과제명 바이러스성 가금질병 예방용 재조합 마커백신 개발 및 산업화
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2016.02.29 ~ 2018.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기의 단계를 포함하는 뉴캐슬병 바이러스 KU001 주(수탁번호: KCTC18794P)의 전장 유전자 서열이 삽입된 재조합 벡터의 제조방법으로서,

뉴캐슬병 바이러스로부터 추출된 RNA를 이용하여 cDNA를 합성하는 단계;

NP 단백질을 코딩하는 염기서열, P 단백질을 코딩하는 염기서열, M 단백질을 코딩하는 염기서열, F 단백질을 코딩하는 염기서열, HN 단백질을 코딩하는 염기서열 및 L 단백질을 코딩하는 염기서열을 순차적으로 플라스미드에 삽입하는 단계;

를 포함하고,

상기 재조합 벡터는 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 것인, 재조합 벡터의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 뉴캐슬병 바이러스 KU001 주는 국내 야생 오리에서 분리된 것인, 재조합 벡터의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 NP 단백질을 코딩하는 염기서열은 서열번호 2의 염기서열로 이루어지고, 상기 P 단백질을 코딩하는 염기서열은 서열번호 3의 염기서열로 이루어지고, 상기 M 단백질을 코딩하는 염기서열은 서열번호 4의 염기서열로 이루어지고, 상기 F 단백질을 코딩하는 염기서열은 서열번호 5의 염기서열로 이루어지고, 상기 HN 단백질을 코딩하는 염기서열은 서열번호 6의 염기서열로 이루어지고, 상기 L 단백질을 코딩하는 염기서열은 서열번호 7의 염기서열로 이루어지는, 재조합 벡터의 제조방법.

청구항 4

뉴캐슬병 바이러스 KU001 주(수탁번호: KCTC18794P)의 전장 유전자 서열이 삽입되고, 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는, 재조합 벡터.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 재조합 벡터는 플라스미드 벡터인, 재조합 벡터.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 국내 야생 오리에서 분리된 신규한 뉴캐슬병 바이러스의 전장 유전자를 삽입하여 제조한 재조합 벡터 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 뉴캐슬병 바이러스(NDV, Newcastle disease virus)는 음성(negative sense) 단일가닥 RNA 바이러스로 파라믹소비리다에(Paramyxoviridae) 과, 모노네가바이랄러스(Mononegavirales) 목, 아불라바이러스(Avulavirus) 속에 속하는 전염성 바이러스이다. 이 바이러스는 가금류, 특히 닭이나 오리에서 잘 발생하는 전염성이 강한 바이러스이며, 한국에서도 발병률이 높고 전 세계적으로 NDV에 대한 백신은 각국 정부가 의무적으로 접종도록 권고하고 있다. 유전체의 길이는 15,186 뉴클레오타이드다. NDV는 유전체 내에 다른 바이러스 단백질을 코딩하는 6개의 전사 단위체, 즉 뉴클레오캡시드 단백질(NP), 인단백질(P), 매트릭스 (M), 융합 단백질(F), 헤마글루티닌 뉴라미니다제(HN), 폴리머라제(L)를 가지고 있다. 이들 전사 단위체에 의하여 코딩되는 mRNA의 합성은 감염된 세포의 세포질에서 바이러스 RNA-의존성 RNA 폴리머라제가 촉매작용한다. 모든 전사 단위체는 보존된 유전자 개시점과 유전자 말단 서열에 플랭킹된다. 바이러스 복제 과정에서, mRNA 합성은 mRNA 전사의 기울기를 야기하는데, NP와 같은 3' 말단에 근접한 유전자가 L과 같은 3' 말단에서 멀리 위치한 유전자보다 더 많이 전사된다. 따라서, 새로운 전사 단위체의 발현 수준은 3' 말단에 대한 그것의 위치에 의존할 것이다.

[0004] 뉴캐슬병 바이러스는 외피(envelope)을 가지고 있으며 외피에는 바이러스가 숙주 세포에 결합할 수 있도록 해주는 HN 단백질과 외피와 숙주 세포의 융합을 일으키는 F 단백질이 있다. F 단백질과 HN 단백질은 글리코단백질(glycoprotein)로서 외피의 표면에 분포되어 있다.

[0005] F 단백질은 ° 형 막 글리코단백질(type 컂lycoprotein)로써 삼합체(trimeric) 구조를 형성한다. F 단백질은 비활성 전구체 형태(F0)로 만들어지고 골지막(Golgi membranes)을 통해 이동하는 동안 활성 형태인 F1과 F2로 절단된다. 이러한 과정은 F1 소단위체(subunit)의 아미노 말단에서 소수성 도메인을 노출시키고 이것은 성숙한 단백질의 생물학적 활성에 중요한 역할을 한다. 융합 펩티드(fusion peptide)라 불리는 소수성 도메인은 파라믹소바이러스(paramyxovirus) F 단백질에서 매우 보존되어 있고 막 융합을 매개하는데 직접적으로 관여하고 있을 것이라 여겨지고 있다. 파라믹소바이러스 F 단백질은 7개 반복(heptad repeats)을 포함하고 알파 헬릭스 구조를 형성할 가능성이 있는 두 지역을 포함하는 여러 개의 공통된 구조 형태를 갖고 있다. 두 반복중 가장 긴 7개 반복 A(heptad repeat A)는 F1의 아미노 말단에서 소수성 융합 펩티드와 인접해 있으며, 7개 반복 B는 막관통(transmembrane) 지역의 윗부분에 밀착하여 있다. 7개 반복 B는 매 7개 잔기마다 매우 보존된 류신 또는 이소류신의 연속으로 구성되어 있다.

[0006] NDV는 다양한 가금류 종들을 감염시킨다. 많은 종류의 가금류 종에 중증 호흡기 및 신경계 질환을 야기한다. NDV의 균주는 병독성(virulence)에 따라 분류되었다: 조류에 징후없는 감염을 야기시키는 약병원성 균주(lentogenic strain); 조류에 호흡기 질환을 야기시키는 중간병원성 균주(mesogenic strain); 조류에 종종 신경계 징후를 동반한 전격성 감염을 야기하는 강병원성 균주(velogenic strain). NDV의 몇몇 약병원성 균주는 최근 닭에 생약독화된 백신으로 사용되고 있다.

[0007] 감염질환으로부터 일반 대중 또는 가금류를 보호하기 위한 이상적인 백신은 쉽게 제조되고 강한 보호성 면역반응을 신속하게 야기하는 백신이다. 생바이러스 백신은 다양한 바이러스 질환에 대하여 효과적인 것으로 입증되었으며, 강한 지속성 체액성 면역반응 및 세포성 면역반응을 유도하였다. 재조합 NDV는 사람에 병원성이 없고, 사람은 그것에 대하여 전에 존재한 면역성을 가지고 있지 않으며, 대규모 생산을 위해 계태아(embryonated egg)에서 쉽게 자라기 때문에 생바이러스 백신 벡터로 사용하기 위한 좋은 후보이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 10-1099629호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 기존의 뉴캐슬병 바이러스 백신주로 사용되는 B1주 또는 Lasota주에 비해 생산성이 뛰어난 뉴

캐슬병 바이러스의 전장 유전자가 삽입된 재조합 벡터와 이의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 하기의 단계를 포함하는 뉴캐슬병 바이러스 KU001 주(수탁번호: KCTC18794P)의 전장 유전자 서열이 삽입된 재조합 벡터의 제조방법으로서, 뉴캐슬병 바이러스로부터 추출된 RNA를 이용하여 cDNA를 합성하는 단계; NP 단백질을 코딩하는 염기서열, P 단백질을 코딩하는 염기서열, M 단백질을 코딩하는 염기서열, F 단백질을 코딩하는 염기서열, HN 단백질을 코딩하는 염기서열 및 L 단백질을 코딩하는 염기서열을 순차적으로 플라스미드에 삽입하는 단계; 를 포함하고, 상기 재조합 벡터는 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 것인, 재조합 벡터의 제조방법이 제공된다.

[0013] 일 측에 따르면, 상기 NP 단백질을 코딩하는 염기서열은 서열번호 2의 염기서열로 이루어지고, 상기 P 단백질을 코딩하는 염기서열은 서열번호 3의 염기서열로 이루어지고, 상기 M 단백질을 코딩하는 염기서열은 서열번호 4의 염기서열로 이루어지고, 상기 F 단백질을 코딩하는 염기서열은 서열번호 5의 염기서열로 이루어지고, 상기 HN 단백질을 코딩하는 염기서열은 서열번호 6의 염기서열로 이루어지고, 상기 L 단백질을 코딩하는 염기서열은 서열번호 7의 염기서열로 이루어지는 것일 수 있다.

[0014] 일 측에 따르면, 상기 뉴캐슬병 바이러스 KU001 주는 국내 야생 오리에서 분리된 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 뉴캐슬병 바이러스 KU001 주(수탁번호: KCTC18794P)의 전장 유전자 서열이 삽입되고, 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는, 재조합 벡터가 제공된다.

[0016] 일 측에 따르면, 상기 재조합 벡터는 플라스미드 벡터일 수 있다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 재조합 벡터의 제조방법으로 제조된 벡터는 뉴캐슬병 바이러스의전장(full length) 유전자를 포함함으로써, 뉴캐슬병 뿐만 아니라 조류 인플루엔자 등의 질병을 예방할 수 있는 다가 백신의 제조를 위한 백본(backbone) 벡터로 이용될 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명의 재조합 벡터로부터 제조된 재조합 바이러스는 기존의 뉴캐슬병 바이러스 백신주로 사용되는 B1 주 또는 Lasota주에 비해 생산성이 뛰어나므로, 본 발명의 재조합 벡터를 이용한 재조합 바이러스의 대량생산 시 생산비용의 절감이 가능하다.

[0020] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 본 발명의 재조합 벡터의 모식도이다.

도 2는 본 발명의 재조합 벡터 구축 과정을 도식화한 것이다.

도 3은 뉴캐슬병 바이러스의 융합 단백질(F) 서열을 이용한 계통수 분석표를 나타낸다.

도 4는 PCR 기법을 이용하여 본 발명의 재조합 벡터 구축 여부를 확인한 것이다.

도 5는 RT-PCR 기법을 이용하여 본 발명의 재조합 벡터로부터 재조합 바이러스가 제조되는지 여부를 확인한 것이다.

도 6은 Genetic tag(NotI)을 이용하여 본 발명의 재조합 벡터로부터 재조합 바이러스가 제조되는지 여부를 확인한 것이다.

도 7은 기존 뉴캐슬병 바이러스(rNDV/B1/wt(rB1 wt), rNDV/Lasota/wt(rLasota wt))

와 본 발명의 재조합 벡터로 제조된 바이러스(rKU001)의 성장 특성을 비교한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 각 도면에 제시된 동일한 참조 부호는 동일한 부재를 나타낸다.

[0024] 아래 설명하는 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있다. 아래 설명하는 실시예들은 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 이들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0025] 실시예에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 실시예를 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0026] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0027] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조 부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0028] 본 발명에서 용어 "cDNA"는 mRNA와 상보적인 DNA를 의미하는 것으로, 바람직하게는 뉴캐슬병 바이러스의 mRNA에 상보적인 염기서열을 갖는 DNA를 의미한다.

[0029] 본 발명에서 용어 "벡터"란 외래 유전자를 도입하여 외래 유전자가 발현될 수 있게 하는 수단으로써, 스스로 자신을 복제할 수 있는 플라스미드(plasmid) 벡터, 코즈미드(cosmid) 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터 등을 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명에서 용어 "제한효소(restriction enzyme)"는 DNA 또는 RNA의 특정한 염기배열을 인식하고 염기사슬을 절단하는 핵산분해효소의 하나인 엔도뉴클레아제(endonuclease)로서 유전공학에서 재조합 DNA 또는 RNA를 만들기 위해서 사용하는 특수한 효소를 의미한다.

[0031] 본 발명에서 용어 "프라이머(primer)"는 합성하고자 하는 특정 유전자 서열에 대하여 상보적인 짧은 유전자 서열을 갖는 DNA 또는 RNA를 말하는 것으로, PCR, DNA sequencing 등에 이용할 목적으로 합성된 것을 의미한다.

[0032] 본 발명에서 용어 "프로모터(promotor)"는 RNA 중합효소가 특이적으로 결합하여 전사를 시작하는 DNA 상의 영역을 의미하며, 본 발명에서 프로모터는 전사에 필요한 기본인자(basal element) 뿐만 아니라, 발현의 촉진 및 조절에 사용될 수 있는 인핸서(enhancer)를 추가로 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 하기의 단계를 포함하는 뉴캐슬병 바이러스 KU001 주(수탁번호: KCTC18794P)의 전장 유전자 서열이 삽입된 재조합 벡터의 제조방법으로서, 뉴캐슬병 바이러스로부터 추출된 RNA를 이용하여 cDNA를 합성하는 단계; NP 단백질을 코딩하는 염기서열, P 단백질을 코딩하는 염기서열, M 단백질을 코딩하는 염기서열, F 단백질을 코딩하는 염기서열, HN 단백질을 코딩하는 염기서열 및 L 단백질을 코딩하는 염기서열을 순차적으로 플라스미드에 삽입하는 단계; 를 포함하고, 상기 재조합 벡터는 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 것인, 재조합 벡터의 제조방법이 제공된다.

[0034] 상기 NP 단백질을 코딩하는 염기서열은 서열번호 2의 염기서열로 이루어지고, 상기 P 단백질을 코딩하는 염기서열은 서열번호 3의 염기서열로 이루어지고, 상기 M 단백질을 코딩하는 염기서열은 서열번호 4의 염기서열로 이루어지고, 상기 F 단백질을 코딩하는 염기서열은 서열번호 5의 염기서열로 이루어지고, 상기 HN 단백질을 코딩하는 염기서열은 서열번호 6의 염기서열로 이루어지고, 상기 L 단백질을 코딩하는 염기서열은 서열번호 7의 염기서열로 이루어지는 것일 수 있다.

[0035] 상기 뉴캐슬병 바이러스 KU001 주는 국내 야생 오리에서 분리된 것으로, 2019년 10월 31일자로 한국생명공학연구원에서 수탁번호 KCTC18794P를 부여받은 균주를 의미한다. 유전형은 Genotype I에 해당한다(도 3). 본 발명의 재조합 벡터는 국내 야생 오리에서 분리된 NDV/KU001 주의 전장 유전자를 포함하므로, 이를 백본(backbone) 벡터로 이용하는 경우 국내에서 유행하는 뉴캐슬병 바이러스의 예방에 효과적인 재조합 바이러스 백신을 제조할 수 있다.

[0036] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 뉴캐슬병 바이러스 KU001 주(수탁번호: KCTC18794P)의 전장 유전자가 삽입되고, 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 재조합 벡터가 제공된다. 여기서, 상기 재조합 벡터는 플라스미드 벡터로서, pSL1180 벡터를 이용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명의 재조합 벡터는 역유전학법으로 재조합 바이러스를 제조하는데 사용될 수 있다. 구체적인 재조합 바이러스의 제조방법은 다음과 같다. 먼저, T7 RNA 중합효소를 제공하기 위하여, Modified Vaccinia Ankara 균주에서 T7 RNA polymerase를 발현하는 바이러스 (MVA/T7 바이러스)를 Hep-2 또는 A549 세포에 감염 시킨다. 이 Hep-2 또는 A549 세포에 NDV의 RNA 중합효소 단백질을 발현하는 3개의 플라스미드(NP, P. L)와 본 발명의 재조합 벡터 pNDV/KU001를 동시에 형질도입(transfection) 한다. Transfection 후 24시간 뒤, chicken embryo fibroblast(CEF) 세포와 동시배양(co-culture)을 수행한다. 48시간 이상 배양 후, 10일된 유정란에 세포 상층액을 주입하여 72시간 배양 후, 요수액을 취득한다.

[0039] 이하에서는, 본 발명의 실시예에서 사용된 실험 재료 및 방법에 대해 상세히 기술한다. 그러나 하기 실시예들은 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 발명의 범위가 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0040] **실시예 1: 재조합 벡터의 구축**

[0041] 본 발명의 재조합 벡터를 구축하기 위해 뉴캐슬병 바이러스 KU001주로부터 TRIzol (Invitrogen, 미국)을 이용하여 RNA를 추출한 다음, Superscript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, 미국)로 reverse transcription PCR 과정을 수행하여 cDNA를 합성하였다. 이후, 7개의 유전자 절편(절편 1, T7 promoter 부터 뉴클레오타이드 1,755번째 염기서열 까지; 절편 2, 뉴클레오타이드 1번 염기서열부터 3,321번째 서열 까지; 절편 3, 뉴클레오타이드 1,755번째 염기서열부터 6,580번째 서열 까지; 절편 4, 뉴클레오타이드 6,151번째 염기서열부터 10,210번째 서열 까지; 절편 5, 뉴클레오타이드 7,381번째 염기서열부터 11,351번째 서열 까지; 절편 6, 뉴클레오타이드 11,351번째 염기서열 부터 14,995번째 서열 까지; 절편 7, 뉴클레오타이드 14,701번째 염기서열부터 15,186번째 서열 까지)을 PCR 방법으로 얻어낸 뒤, hepatitis delta virus ribozyme, T7 terminator 유전자 서열을 절편 7 유전자에 이어서 삽입하였고, 전체 유전자 서열을 순서대로 pSL1180(Amersham Parmacia Biotech, 영국) 플라스미드에 삽입하여 pNDV/KU001 벡터를 완성하였다. 여기서, pNDV의 p는 plasmid를 의미한다.

[0043] **실시예 2: 재조합 벡터의 구축 여부 검증**

[0044] 상기 실시예 1에서 구축된 pNDV/KU001 벡터를 검증하기 위해 도 4의 (A)에 기재된 바와 같이 PCR 기법을 수행하였다. NP-P-M-F 절편과 HN-L 절편을 대조군으로 하였다. 사용된 프라이머는 P1/P2(도 4의 B), P4/P6(도 4의 C), P10/P12(도 4의 D) 이다. 사용된 프라이머 P1(forward 방향; 5'-ACCAAACAGAGAATCCGTGAG-3')은 NDV의 NP 유전자 앞의 염기서열 정보, P2(reverse 방향; 5'-AGATGAGGGGGTTCGTTTGTAG-3')는 NDV의 1701번째 이전 염기서열 정보, P4(forward 방향; 5'-CGCGCCGTCGCAGTGACC-3')는 4292번째, P6(reverse 방향; 5'-CGTTTCCCACCGAACCGC-3')는 7514번째, P10(forward 방향; 5'- ACCGACCCCAACACAGTTCC-3')은 13825번째, P12(reverse 방향; 5'- ACCAAACAAAGATTTGGTG-3')는 NDV의 마지막 염기서열 정보를 토대로 각각 디자인된 것이다. 그 결과, 도 4의 B 내지 D에 나타낸 바와 같이, F 단백질 코딩 염기서열과 HN 단백질 코딩 염기서열이 연결되어 있는 pNDV/KU001 플라스미드가 구축된 것을 확인할 수 있었다.

[0046] **실시예 3: 재조합 바이러스의 제조 여부 검증**

[0047] 상기 실시예 1에서 구축된 재조합 벡터를 이용하여 재조합 바이러스가 실제로 제조되는지 여부를 확인하였다. 이하에서 rNDV의 r은 recombinant를 나타내는 것으로, rNDV는 재조합 바이러스를 의미한다.

[0049] 3-1. RT-PCR 기법을 이용한 재조합 rNDV/KU001 바이러스의 제조 여부 검증

[0050] 이하에 설명된 역유전학법으로 rNDV/KU001 바이러스를 제조하였다. 먼저, T7 RNA 중합효소를 제공하기 위하여 Modified Vaccinia Ankara 균주에서 T7 RNA polymerase를 발현하는 바이러스 (MVA/T7 바이러스)를 Hep-2 또는 A549 세포에 감염 시켰다. 상기 실시예 1에서 구축된 pNDV/KU001 벡터 및 NP, P, L 단백질을 발현하는 3개의 플라스미드를 감염된 Hep-2 또는 A549 세포에 형질도입(transfection) 하였다. 48시간 이상 배양 후, chicken embryo fibroblast (CEF) 세포를 첨가하여 2-3일 동안 동시배양(co-culture)하였다. 다음으로, 세포상층액을 수득하여 9-10일령의 닭 유정란 요막강 내에 접종하고, 다시 2-3일 이후 요막강액을 수득하여 hemagglutination assay, hemagglutination-inhibition assay를 수행하여 바이러스 존재를 확인한다.

[0051] 본 발명의 재조합 벡터로부터 실제로 rNDV/KU001 바이러스가 제조되었는지 검증하기 위하여, 바이러스에서 total RNA를 추출한 후 random hexamer를 이용하여 cDNA를 제작하였다. 제작된 cDNA를 주형으로 하여, HN 유전자가 증폭되는 PCR을 수행하고(도 5의 A), KU001 주에만 존재하는 제한효소 XbaI를 사용하여 대조군 rNDV/Lasota/wt와 비교분석 하였다(도 5의 B)

[0052] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이 오직 KU001주의 HN 유전자만 절단되었으며, 이를 통해 제조된 바이러스가 본 발명의 재조합 벡터로부터 유래한 것임을 확인할 수 있었다.

[0054] 3-2. Genetic tag(NotI)을 이용한 재조합 rNDV/KU001 바이러스의 제조 여부 검증

[0055] 역유전학법으로 제작된 rNDV/KU001 바이러스는 wild type NDV KU001 주에 없는 NotI 제한효소 인식 부위를 가지고 있으므로, 야생형 바이러스와 역유전학법으로 제조된 재조합 바이러스의 구분을 위해 NotI을 유전학적 표지로 이용하였다.

[0056] 야생형 바이러스와 rNDV/KU001 바이러스의 RNA를 추출한 후 RT-PCR을 수행하여 NotI 제한효소가 포함된 PCR 유전자 산물을 얻은 다음(도 6의 A), 유전자 산물에 제한효소 NotI를 처리하였다(도 6의 B).

[0057] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이 rNDV/KU001 바이러스의 경우 제한효소NotI를 처리하면 PCR 산물이 절단되는 것이 확인되었다. 이를 통해 역유전학법으로 제조된 rNDV/KU001 바이러스는 wild type NDV KU001 주가 오염된 것이 아니며 본 발명의 재조합 벡터로부터 유래된 새로운 바이러스임을 확인할 수 있었다.

[0059] **실시예 4: 재조합 바이러스의 생산성 평가**

[0060] 상기 실시예 3에서 제조된 재조합 NDV KU001 바이러스와 기존 백신주로 사용되는 뉴캐슬병 바이러스 B1주 및 Lasota 주를 준비하여 각각의 바이러스를 100 $TCID_{50}$의 역가로 10일령 유정란에 감염시켰다. 바이러스 감염으로부터 12, 24, 48 및 72시간 이후 유정란으로부터 요수를 취득하고, Hemagglutinin assay(HA)로 바이러스 역가를 측정하여 도 7에 나타냈다.

[0061] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 재조합 바이러스의 성장 역가는 Lasota주와 비교하여 약 10^2 배, B1주와 비교하여 약 10^5 배 높은 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 본 발명의 재조합 벡터를 이용하여 백신을 대량생산하는 경우 생산 비용을 절감할 수 있음을 시사한다.

[0063] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

[0064] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 특허청구범위의 범위에 속한다.

수탁번호

[0066]

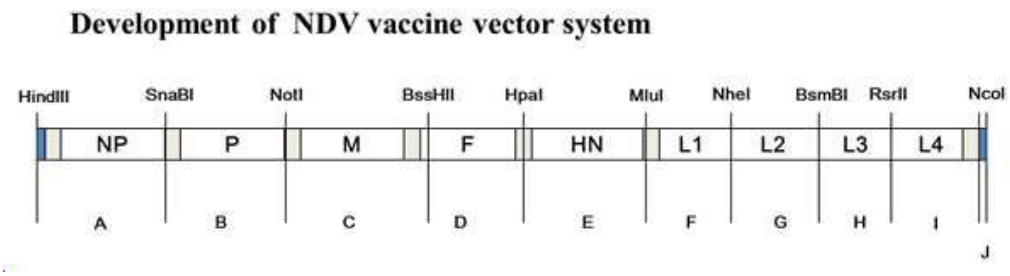
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18794P

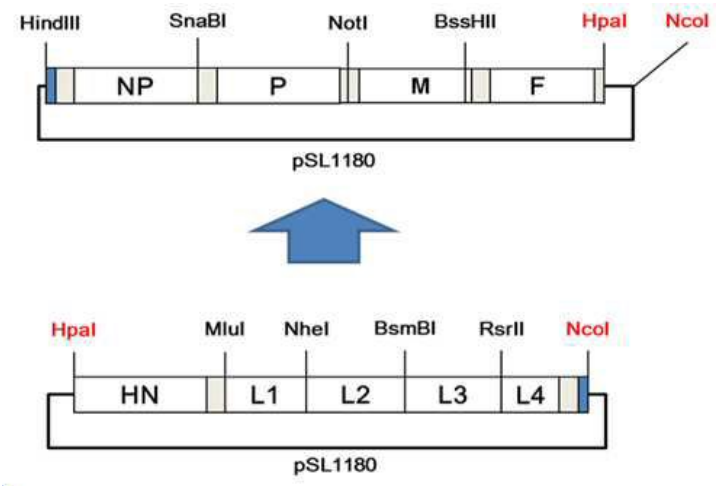
수탁일자 : 20191031

도면

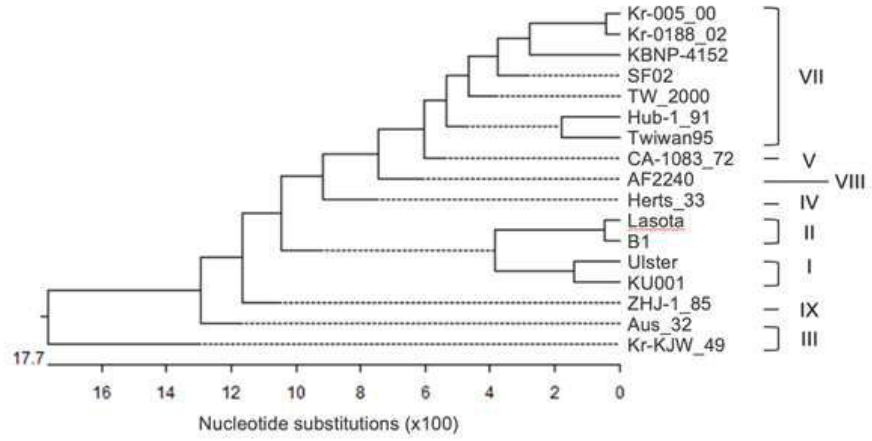
도면1



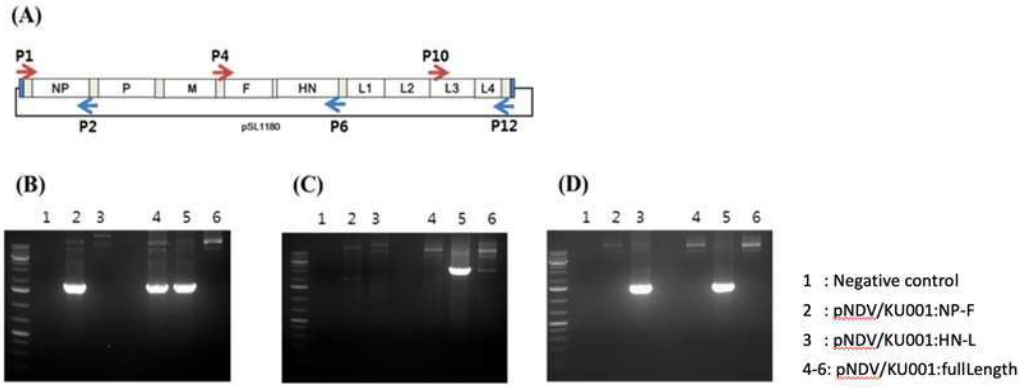
도면2



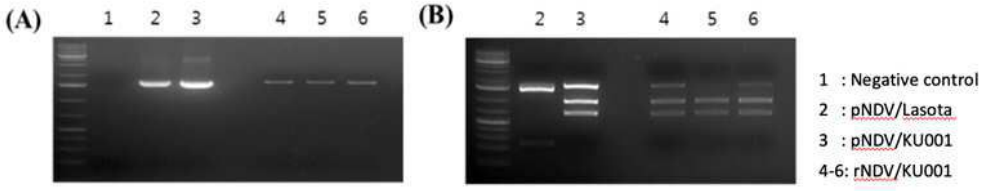
도면3


Kr-005_00
Kr-0188_02
KBNP-4152
SF02
TW_2000
Hub-1_91
Twiwan95
CA-1083_72
AF2240
Herts_33
Lasota
B1
Ulster
KU001
ZHJ-1_85
Aus_32
Kr-KJW_49
VII
V
VIII
IV
II
I
IX
III
17.7
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Nucleotide substitutions (x100)

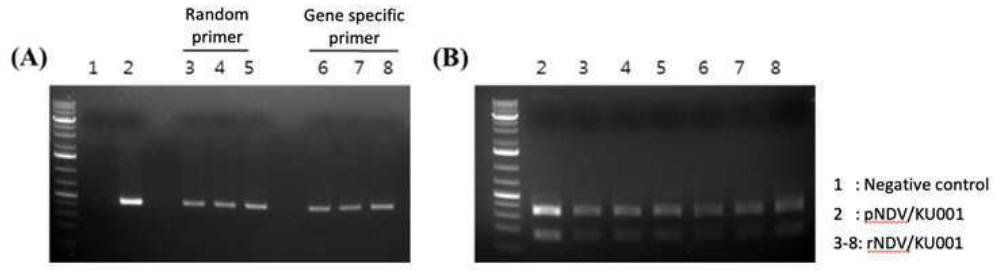
도면4


(A)
P1
P4
P10
NP
P
M
F
HN
L1
L2
L3
L4
P2
pSL1180
P6
P12
(B)
(C)
(D)
1 2 3 4 5 6
1 : Negative control
2 : pNDV/KU001:NP-F
3 : pNDV/KU001:HN-L
4-6: pNDV/KU001:fullLength

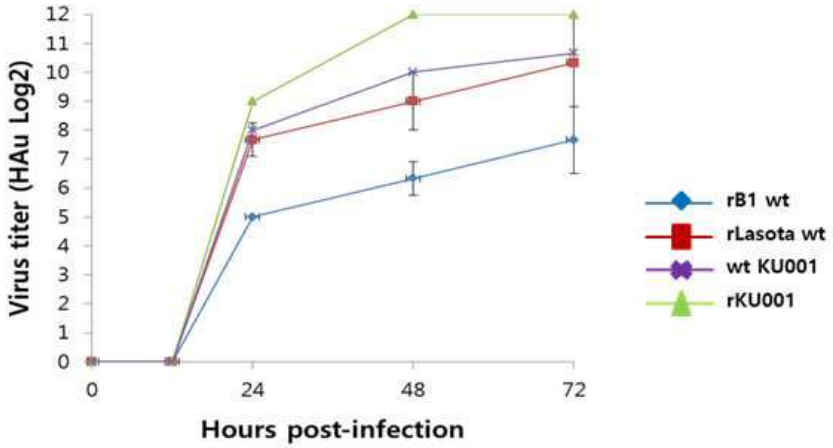
도면5


(A)
1 2 3 4 5 6
(B)
2 3 4 5 6
1 : Negative control
2 : pNDV/Lasota
3 : pNDV/KU001
4-6: rNDV/KU001

도면6



도면7



서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION

<120> Newcastle disease virus backbone vector using NDV KU001 strain and method for preparing thereof

<130> APC-2018-0568

<150> KR 10-2018-0134494

<151> 2018-11-05

<160> 13

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 15186

<212> DNA

<213> Newcastle disease virus

<400> 1

accaaacaga gaatccgtaa ggtacgatag aaggcgaagg agcaatcgaa gtcgtacggg 60

tagaaggtgt gaatctcgag tgcgagcccg aagctcaaac tcgagagagc cttctgccaa 120

aatgtcttct gtattcgatg agtacgagca gctcctcgcg gctcagactc gccccaatgg 180

agctcatggc ggaggagaga aggggagcac cttaaaggta gaagtcccgg tattcactct 240

caacagtgat gacccagaag atagatggaa ctttgcagtg ttttgtcttc ggattgctgt 300

tagcgaggat gccaacaaac cacttaggca aggtgctctc atatctctct tatgttccca 360

ctctcaagtg atgaggaacc atgttgccct tgcggggaaa cagaatgagg ccacactggc 420

tgttcttgag atcgatggtt ttaccaacgg cgtgccccag ttcaacaaca ggagtggagt 480

gtctgaagag agagcacaga gatttatgat gatagcaggg tctctccctc gggcatgcag 540

caacggtacc ccgttcgtca cagctggggt tgaagatgat gcaccagaag acattactga 600

taccctggag aggatcctct ctatccaggc tcaagtatgg gtcacggtgg caaaggccat 660

gactgcatat gagacagcag atgagtcaga aacaagaaga atcaataagt acatgcagca 720

aggcagggtc cagaagaagt acatcctcca ccccgtatgc aggagcgcaa tccaactcac 780

aatcagacag tctctggcgg tccgcatctt tttggttagc gagcttaaga gaggccgcaa 840

cacggcaggt gggacctcca cctattacaa cttggtgggg gatgtagact catacatcag 900

gaacactggg ctaactgcat tcttcctgac acttaaatat ggaattaaca ccaagacatc 960

agcccttgca cttagcagcc tctcaggcga tatccagaaa atgaagcagc tcatgcgctt 1020

gtatcggatg aaaggagata atgcgccgta catgacattg ctcggtgaca gtgaccagat 1080

gagctttgca cctgccgagt atgcacaact ttactccttt gccatgggta tggcatcagt 1140

cctagataaa ggaactagca aataccaatt tgccagggac tttatgagca catcattctg 1200

gagacttgga gtagagtacg ctcaggctca aggaagtagc atcaatgagg atatggccgc 1260

cgagctaaag ctaaccccag cagcaaggag aggcctggca gctgctgccc aaagagtgtc 1320

tgaggagacc agcagcatgg acatgcccac ccaacaagcc ggggtcctca ctggactcag 1380

cgacggaggc tcccaagccc cccaaggtgc actgaacaga tcacaagggc aaccggacac 1440

cggggatggg gagacccaat ttctggatct gatgagagcg gtggcaaata gcatgagaga 1500

agcgccaaac tctgcgcagg gcacccctca accggggcct cccccaaccc ctgggccctc 1560

tcaagacaat gacaccgact gggggtactg accgacagca cccagtttgc ttctatgagg 1620

tcatcccaat tcctctgccc acaccccacc cctcaatccg caatcccgca tggtcaaacc 1680

cacaaacgaa cccccctgtc tccctcctct cccccagccc cacaacccca cctgcccagg 1740

gcaacatagg tacaatgcga cccactaata atcaatacag ggccaaagaa attagaaaaa 1800

agtacgggta gaagggagac attcagagat cagggcgagt cacccgggtc tctgctctcc 1860

cttctaccta gtggattagg atggagatgg ccacctttac agatgcggag atcgacgagc 1920

tatttgagac cagtggaact gtcattgaca gcataattac ggcccaggga aaaccagtag 1980

agactgttgg aaggagtgca atcccacaag gcaaaactaa ggctttgagc gcagcatggg 2040

agaagcatgg gagcatccag tcaccagcca gccaagacac ccctgatcga caggacagat 2100

cagataaaca actgtccaca cccgagcaag cgagtccaaa cgacagcccc ccagccacat 2160

ccactgacca gcctcccact caggctgcag atgaggccgg cgatacacag ctcaagaccg 2220

gagcaagcaa ctctctgctg tcgatgcttg ataaactcag caataagtca tctaatgcta 2280

aaaagggccc agggtcgagc cctcaagaaa ggcatcatca acgtctgact caacaacagg 2340

ggagtcaaca aagccgcgga aacagccaag agagaccgca gaaccaggcc aaggccatcc 2400

ctggaaacca ggtcacagac gcgaacacag catatcatgg acaatgggag gagtcacaac 2460

tatcagctgg tgcaacccat catgctctcc gatcagagca gagccaagac aatactcctg 2520

cacctgtgga tcatgtccag ctacctgtcg actttgtgca ggcgatgatg tctatgatgg 2580

aggcgatatc acagagggta agtaaagttg actatcagct ggaccttgtc ttgaaacaga 2640

catcttctat ccccatgatg cggtctgaaa tccagcagct gaaaacgtct gttgcggtca 2700

tggaagccaa tttgggcatg atgaagatcc tggaccctgg ttgtgccaac gtttcatctc 2760

taagtgatct acgggcagtt gcccgatccc acccggtttt aatttctggc cccggagacc 2820

catctcctta tgtgacccaa gggggcgaaa tggcactcaa taaactttcg caaccggtgc 2880

aacacccctc tgaattgatt aaacccgcca cggcaagcgg gcctgatata ggagtggaga 2940

aagacactgt ccgtgcattg atcatgtcac gccctatgca tccgagctct tcagctaggc 3000

tcttgagcaa actggacgca gccggatcga ttgaggaaat cagaaaaatc aagcgccttg 3060

cactgaatgg ctaatcacca ccgcaacccg cagcagatcc ctgtccaccc agcaccacac 3120

ggtatctgca ccaagctcct ctctgcaaac ccaaggtcca acaccccgag cgacaaccct 3180

gtcctgcttc ctctgcccca ctaaatgatc gcgcagctgc aatcaattca gctatattaa 3240

ggattaagaa aaaatacggg tagaatcgga gtgccccgat tgtgccaaga tggactcatc 3300

taggacaatc gggctgtact ttgattctac ccttccttct agcaacctgc tagcattccc 3360

gatagtccta caagacacag gggacgggaa gaagcaaatc gccccgcaat acaggatcca 3420

gcgtcttgac tcgtggacag acagcaaaga agactcggta ttcatcacca cctatggatt 3480

catctttcag gttgggaatg aagaagccac tgtcggcatg atcaatgata atcccaagcg 3540

cgagttactt tccactgcca tgctatgcct agggagtgta ccaaatgtcg gagatcttgt 3600

tgagctggca agggcctgcc tcactatggt ggtaacatgc aagaagagtg caactaacac 3660

cgagagaatg gtcttctcag tagtgcaggc accccaggtg ctgcaaagct gtagggttgt 3720

ggcaaacaaa tactcgtcgg tgaatgcagt caagcacgtg aaagcaccag agaagattcc 3780

tgggagcgga accctagagt acaaagtgaa ctttgtctct ctgaccgtgg tgccaagaaa 3840

ggacgtctac aagataccaa ctgcagcact taaggtctct ggctcaagtc tgtacaatct 3900

tgcgctcaat gtcactattg atgtggaggt agacccgaag agcccgttgg tcaaatccct 3960

ttccaagtcc gacagtgggt actatgctaa tctcttctta catattgggc ttatgtccac 4020

tgtagataag aaggggaaga aagtgacatt tgacaagctg gaaaggaaga taaggagact 4080

tgatctatct gtagggctta gtgacgtgct cggaccttcc gtgcttgtaa aggcgagagg 4140

tgcacggact aagctgctgg cacctttctt ctctagcagt gggacagcct gctatcccat 4200

agcaaatgcc tctcctcagg tggccaagat actctggagc caaaccgcgt acctgcggag 4260

tgtaaaagtc attatccaag cgggcaccca gcgtgctgtc gcagtgaccg ccgaccacga 4320

ggttacctct actaagctgg agaaggggca taccattgcc aaatacaatc ccttcaagaa 4380

ataggctgca tctctgagat tgcactccgc ccatcttccc ggatcaccat gacactaaat 4440

aatgatctgt cttgattact tatagttagt tcgcctgtct atcaaattag aaaaaacacg 4500

ggtagaagat tctggatccc ggttggcgcc ttcaaggtgc aagatgggct ccagatcttc 4560

taccaggatc ccagtacctc tcatgctgac cgtccgagtc atgttggcac tgagttgcgt 4620

ctgtccgacc agcgcccttg atggcaggcc tcttgcagct gcagggattg tggtaacggg 4680

agacaaagca gtcaacatat acacctcatc tcagacaggg tcaatcataa tcaagttact 4740

cccaaatatg cccaaggata aagaggcgtg tgcaaaagcc ccgttggagg catacaacag 4800

gacattgact actttgctca ccccccttgg tgattctatc cgtaggatac aagagtctgt 4860

gaccacgtcc ggaggaggga aacagggacg tcttataggc gccattatcg gtggtgtagc 4920

tctcggggtt gcaaccgctg cacagataac agcagcctcg gctctgatac aagccaatca 4980

aaatgctgcc aacatactcc ggctaaaaga gagcattgct gcaaccaatg aggctgtgca 5040

cgaggtcact aatggattat cacaactagc agtggcagtt gggaagatgc agcaatttgt 5100

taatgaccag tttaataaaa cagctcagga attggactgt ataaaaatta cacagcaggt 5160

tggtgtagaa ctcaacctgt acctaactga attgactaca gtattcgggc cacaaatcac 5220

ttcccctgcc ttaactcagc tgactatcca ggcgctttac aatctagctg gtgggaatat 5280

ggattacttg ttgactaagt taggtgtggg gaacaaccaa ctcagctcat taattagtag 5340

tggcctgatc accggcaacc ctattctgta cgactcacag actcaactct tgggtataca 5400

ggtaacccta ccctcagtcg ggaacctaaa taatatgcgt gccacctacc tggaaacctt 5460

gtctgtaagt acaaccaaag gatttgcctc agcacttgtc ccaaaagtag tgacacaggt 5520

cggttccgtg atagaagagc ttgacacctc gtactgtata gagaccgatt tggatctata 5580

ttgtacaaga atagtgacat tccctatgtc tcctggtatt tattcctgtt tgagtggcaa 5640
tacatctgct tgcatgtact caaagactga aggcgcactc actacgccgt atatgaccct 5700
caaaggctca gttattgcta actgtaagat gacaacatgt agatgtgcag acccccccggg 5760
tatcatatcg caaaattatg gagaagctgt gtctctaata gataggcaat catgcaatat 5820
cttatcctta gacgggataa ctttgaggct cagtggggaa tttgatgcaa cttatcaaaa 5880
gaatatctca atacaagatt ctcaagtaat agtgacaggc aatcttgata tctcgactga 5940
gcttgggaat gtcaacaact cgataagtaa tgctttggat aagttagagg aaagcaacag 6000

caaactagat aaggtcaatg tcaaactgac cagcacatcc gctcttatta cctatatcgt 6060
tttaactgtc atatctcttg tatgtggtat acttagcctg gttctagcat gctacctgat 6120
gtacaagcaa aaggcgcaac agaagacctt gttgtggctt gggaataata ccctagacca 6180
gatgagggcc actacaaaaa tgtgaatgcg gatgagaggc agaaacatcc ccaatagcag 6240
tttgtgtgta aagtctgaca gcctgttaat tagaagaatt aagaaaaaac taccggatgt 6300
agatgaccaa agggcgatat acgggtagaa cggtcgggga ggccgtccct caatcgggag 6360
ccgggcctca caacatccgt tctaccgcat caccaatagc agttttcagt catggaccgc 6420

gcagttagcc aagttgcgct ggagaatgat gaaagagagg caaagaatac atggcgcttg 6480
gtattccgga tcgcaatcct actctcaacg gtggtgacct tagccatctc tgcagccgcc 6540
cttgcatata gcatggaggc cagcacacct agcgatcttg taggcatacc gactgcgatc 6600
tctagagcag aggaaaagat tacatctgca ctcggttcca atcaagatgt agtagatagg 6660
atatataagc aggtggccct cgaatctcca ctggcattgc taaacaccga atctacaatt 6720
atgaacgcaa taacgtctct ctcttatcga atcaatgggg ccgcaaatag cagcggatgt 6780
ggagcaccca ttcatgatcc agattatatt ggaggaatag gtaaagaact tattgtagat 6840

gatgctagcg acgtcacatc atactatccc tctgcgttcc aagaacacct gaactttatc 6900
ccggcgccta ctacaggatc aggttgcact cggataccct catttgacat gagcgctacc 6960
cactactgtt atactcacaa tgtgatatta tctggctgca gagatcactc gcactcacat 7020
caatatttag cacttggtgt gcttcggaca tctgcaacag ggagggtatt cttttccact 7080
ctgcgttcca tcaatctgga tgacacccaa aatcggaagt cttgcagtgt gagtgcaacc 7140
cccttgggtt gtgatatgct gtgctctaaa gtcacagaga ctgaagaaga ggattataac 7200
tcagctatcc ccacgtcgat ggtacatgga aggttagggt tcgacggcca ataccacgag 7260

aaggacctag atgtcacaac actattcgag gactgggtgg caaactaccc aggagtaggg 7320

ggcgggtctt ttattgacaa ccgcgtatgg ttcccagttt acggagggct aaaacccaat 7380

tcgcccagtg acaccgcaca agaagggaaa tatgtaatat acaagcgata caatgacaca 7440

tgtccagatg agcaagatta tcagattcaa atggctaagt cttcatataa gcctgggcgg 7500

tttggaggga aacgcgtaca gcaggccatc ttatctatca aagtgtcaac atccttgggc 7560

gaggacccgg tactgactgt accgcccaac acagtaacac tcatgggggc cgaaggcaga 7620

gttctcacag tagggacatc tcatttcctt tatcagcgag ggtcatcata cttctcccct 7680

gccctactat atcctatgat agtcagcaac aaaacagcca ctcttcatag tccttataca 7740

ttcaatgcct tcactcgacc aggtagtgtc ccttgccagg cttcagcaag atgccctaac 7800

tcatgtgtta ccggagtcta tactgatcca tatcccttgg tcttctatag gaaccacacc 7860

ttgcgagggg tattcgggac gatgcttgat gataaacaag caagactcaa ccctgtatct 7920

gcagtatttg acagcatatc ccgcagtcgc ataacccggg tgagttcaag cagcaccaag 7980

gcagcataca caacatcaac atgttttaaa gttgtaaaga ccaataaaac ctattgtctc 8040

agcattgccg aaatatccaa taccctcttc ggggaattca gaatcgtccc tttactagtt 8100

gagattctca aggatgatgg ggttagagaa gccaggtcta gccggttgag tcaactgcga 8160

gagggttgga aagatgacat tgtatcacct atcttttgcg acgccaagaa tcaaactgaa 8220

taccggcgcg agctcgagtc ctacgctgcc agttggccat aatcagctag tgctaatgtg 8280

attagattaa gtcttgtcgg tagtcacttg attaagaaaa aatgtgggtg gtagcgggat 8340

ataaggcaaa acaactcaag gaggatagca cgggtaggac atggcgagct ccggtcccga 8400

gagggcggag catcagatta tcctaccaga gtcacacctg tcttcaccat tagtcaagca 8460

caaactactc tattactgga aattaactgg gctaccactc cctgacgagt gtgacttcga 8520

ccacctcatt ctcagccgac aatggaagaa aatacttgaa tcggcctccc ctgacactga 8580

gagaatgata aaacttggaa gggcagtgca ccagactctc aaccacaatt ccaagataac 8640

cggagtactc catcccaggt gtttagaaga attggctagt attgaggttc ctgactcaac 8700

caacaagttt cggaagatcg agaagaaaat ccaaattcac aacacaaggt atggagaact 8760

gttcacaaga ctgtgcacgc atgtagagaa gaaattgttg ggatcatctt ggtctaataa 8820

tgtcccccgg tcagaagagt tcaacagcat ccgtacagat ccggcattct ggtttcactc 8880

aaaatggtcc acaactaagt ttgcatggct ccatataaaa cagattcaaa ggcatctgat 8940

tgtggcagca agaacaaggt ccgcagccaa caaattggtg acgctgaccc ataaggtagg 9000

ccaagtcttt gttactcctg agcttgtcat tgtgacacat acagatgaga acaagttcac 9060

gtgtcttacc caggaacttg tgttgatgta tgcagatatg atggagggca gagatatggt 9120

caacataata tcatccacgg cggcacatct caggagccta tcagagaaaa ttgatgacat 9180

tctgcggtta gtagatgccc tggcaaaaga tctgggtaat caagtctacg atgttgtagc 9240

actcatggag ggatttgcat acggcgccgt ccagctgctt gagccgtcag gtacattcgc 9300

aggggatttc ttcgcattca acctgcagga gctcaaagac actttgatcg gcctccttcc 9360

taaggatata gcagaatctg tgactcacgc aatagccact gtattctctg gcttagaaca 9420

aaatcaagcg gctgagatgc tgtgcctgtt gcgtctatgg ggccacccat tacttgagtc 9480

ccgtattgcg gcaaaagcag taaggagcca aatgtgcgca ccaaaaatgg tagactttga 9540

tatgatcctc caggtattgt ctttctttaa aggaacaatc atcaacggat acagaaagaa 9600

gaatgcaggt gtttggccac gtgtcaaagt agaaacgata tacgggaagg tcattgggca 9660

gctacacgct gattcagcgg agatttcaca cgatatcatg ttgagagagt acaagagttt 9720

atctgcgctt gaattcgagc catgtataga atacgaccct atcaccaatc tgagcatgtt 9780

tctaaaagac aaggcgatcg cacacccgaa agacaactgg ctcgccgcgt ttaggcgaaa 9840

ccttctctct gaggaccaga agaaacatgt aaaggaggca acctctacta accgtctctt 9900

gatagagttc ttagagtcaa atgattttga tccatataag gagatggaat atctgacgac 9960

ccttgagtac ctaagagatg acaatgtggc agtatcatac tcgctcaagg agaaggaagt 10020

gaaggttaat gggcggattt ttgctaagct aacaaagaaa ttaaggaact gtcaagtgat 10080

ggcggaaggg atcttagctg accagattgc acctttcttt caagggaatg gggtcattca 10140

ggatagcata tctttaacca agagtatgct agcgatgagt caattgtctt tcaacagcaa 10200

taagaaacgt atcactgact gcaaagaaag agtagcctca aaccgcaatc acgatcaaaa 10260

gagcaagaat cgtcggagag ttgccacttt tataacgact gacctgcaaa agtactgtct 10320

taattggaga tatcagacaa tcaaactgtt cgctcatgcc atcaatcagc tgatgggctt 10380

acctcacttc ttcgaatgga ttcatctaag actaatggat actacgatgt ttgtaggaga 10440

ccctttcaat cccccaagtg acccaactga ctgtgatctc tcaagagtcc caaatgatga 10500

catatatatt gtcagtgcta gaggggtat tgagggatta tgtcagaagc tatggacaat 10560

gatctcaatt gctgcaatcc aacttgctgc agcaagatca cattgtcgcg tcgcctgtat 10620

ggtacagggt gacaatcaag taatagctgt aacgagagag gtaaggtcag atgactcccc 10680

ggaaatggtg ttaacacaat tgcatcaagc cagtgataat ttcttcaagg aattgattca 10740

tgttaatcat ttgattggcc ataatttgaa ggatcgtgaa acaatcagat cagacacatt 10800

cttcatatac agcaaacgaa tattcaaaga tggagcaata ctcagtcaag tcctcaaaaa 10860

ttcatctaaa ttagtgctaa tatcaggcga ccttagtgaa aacaccgtaa tgtcctgtgc 10920

caacattgca tctactatag cacggctgtg cgagaacggg cttccaaagg atttctgtta 10980

ttacttaaac tacctgatga gttgcgtgca gacatacttt gattctgagt tttccatcac 11040

taacagctcg caccccgatt ctaaccagtc gtggattgaa gacatctctt ttgtgcactc 11100
atatgtcctg acccctgccc agctaggggg actgagcaac ctccaatact caaggctcta 11160
cacgaggaac atcggtgacc cgggaactac tgcttttgca gagatcaagc gattagaagc 11220
agtggggtta ctaagttcta gtattatgac taacatctta actaggccgc ctggaaatgg 11280
agattgggcc agtctgtgta acgaccctta ctctttcaat tttgagactg tcgcgagtcc 11340
aaatattgtc cttaagaaac atacacaaag agtcctattt gaaacttgtt caaatccctt 11400
attatctggc gtgcatacag aggataatga ggcagaagag aaggcgttgg ctgaattttt 11460

actcaatcaa gaagtaattc atccacgtgt cgcacatgct atcatggaag caagctctat 11520
aggtaggagg aagcagattc aagggcttgt tgacacaaca aacaccgtaa tcaagattgc 11580
attgactagg aggccacttg gcatcaagag gctgatgcgg atagttaact actcgagcat 11640
gcatgcaatg ctgtttagag acgatgtttt ctcatctaac aggtctaacc accccttagt 11700
ttcctctaat atgtgttctc tgacgctagc agactatgca cggaatagaa gctggtcacc 11760
attgacgggg ggtagaaaga tactgggtgt atctaatcct gatactatag aacttgtaga 11820
gggtgagatc cttagcgtca gcggaggatg cacaagatgt gacagcggag atgaacaatt 11880

cacttggttc catcttccga gcaatataga actgaccgat gacaccagca agaatcctcc 11940
gatgagagtg ccgtacctcg ggtcaaagac tcaagagagg agggccgcct cgcttgcgaa 12000
aatagctcat atgtcaccac atgtgaaagc tgctctaagg gcatcatccg tgttgatctg 12060
ggcttatgga gacaacgaag taaattggac tgctgctctt aaaattgcaa gatctcggtg 12120
caatataaac tcagagtatc ttcgactatt gtccccctta cccacagctg ggaatctcca 12180
acatagactg gatgacggca taactcagat gacattcacc cctgcatctc tctacagggt 12240
gtcaccttat attcacatat ccaatgattc tcaaaggtta ttcacggaag aaggagtcaa 12300

agagggaaat gtagtttatc agcaaatcat gctcttgggt ttatctctaa tcgaatcact 12360
cttcccgatg acgacaacca ggacatacga tgagatcaca ttgcacctcc acagtaaatt 12420
tagctgctgt atcagggaag caccggttgc agttcctttc gagttactcg ggatggcacc 12480
agaactaagg acagtgacct caaataagtt tatgtatgat cctagtcctg tatcggaggg 12540
tgactttgcg agacttgact tagctatctt taagagttat gagcttaatc tagaatcata 12600
tcccacaata gagctaatga acattctttc aatatccagc gggaagttaa tcggccagtc 12660
tgtggtttct tatgatgaag atacctccat aaagaatgac gccataatag tgtatgacaa 12720

cacccggaat tggatcagcg aagctcagaa ttcagatgtg gtccgcctat tcgagtatgc 12780

agcacttgaa gtgcttctcg actgttctta tcagctctac tatctgagag taagaggcct 12840

agacaatatc gtgttgtata tgagtgactt atataagaat atgccaggaa ttctactttc 12900

caacattgca gctacaatat ctcatcccat cattcattca agattgcatg cagtaggcct 12960

ggtcaatcac gacgggtcac accaacttgc agacacagat ttcatcgaaa tgtctgcaaa 13020

actattagtc tcttgcactc gacgcgtggt ctcaggttta tatgcaggga ataagtatga 13080

tctgctgttc ccgtctgtct tagatgataa cctgagtgag aagatgcttc agctgatatc 13140

tcggttatgc tgcctgtata cggtgctctt tgctacaaca agagagatcc cgaaaataag 13200

aggcttatct gcagaagaga agtgttcagt acttactgag tacctactgt cagatgctgt 13260

gaaaccatta cttagttctg agcaagtgag ctctatcatg tctcctaaca tagttacgtt 13320

cccagctaat ctatattaca tgtctcggaa gagccttaat ttgattaggg aaagagagga 13380

cagggacact atcttggcat tgttgttccc ccaagagcca ctacttgagt tccccttagt 13440

acaagatatt ggcgctcgag tgaaagatcc attcacccga caacctgcgg cgtttttaca 13500

agaattagat ttgagcgctc cagcaaggta tgacgcattt acacttagtc aggttcattc 13560

tgaacacaca tcaccaaatc cggaggacga ctacttagta cgatacctgt tcagaggaat 13620

agggaccgcg tcctcctctt ggtataaggc atctcacctt ctttctgtac ctgaggtcag 13680

atgtgcaagg cacgggaatt ccttatactt ggcagaagga agcggagcca ttatgagtct 13740

tctcgaactg catgtgccgc atgagactat ctattacaat acgctcttct caaacgagat 13800

gaacccccca cagcggcatt tcggaccgac cccaacacag tttctgaatt cagttgttta 13860

taggaatcta caggcggagg taccatgtaa ggatggattt gtccaggagt tccgtccatt 13920

atggagagag aatacagaag aaagcgatct gacctcagat aaagcagtgg gttacatcac 13980

atctgcagtg ccctaccggt ctgtatcatt gctgcactgt gacattgaga ttcctccagg 14040

atccaatcaa agcttactgg atcaactggc taccaatcta tctctgattg ccatgcattc 14100

tgtaagggag ggcggggtcg tgatcatcaa agtgttgtat gcaatgggat attacttcca 14160

tctactcatg aacttgttca ctccgtgttc tacgaaagga tatattctct ctaatggcta 14220

tgcatgtaga ggggatatgg agtgttacct ggtatttgtc atgggctatc gaggtgggcc 14280

tacatttgta catgaggtag tgaggatggc aaaaactcta gtgcagcggc acggtacact 14340

tttgtccaaa tcagatgaga tcacactgac taggttattt acctcacagc ggcagcgtgt 14400

aacagacatc ctatccagtc ctttaccgag actaataaag ttcttgagaa agaatatcga 14460

tactgcgcta attgaagccg ggggacaacc cgtccgtcca ttctgtgcag agagcttggt 14520

gaggacacta gcggacacaa ctcagatgac ccagatcatc gctagtcaca ttgacacagt 14580

cattcgatct gtgatctaca tggaggctga gggtgatctc gccgacacag tgttcttatt 14640

taccccctac aatctctcta cagacggtaa aaagagaaca tcacttaaac agtgcacaag 14700

gcagatctta gaggtcacaa tattgggtct tagagttgaa aatctcaata aagtaggtga 14760

tgtagtcagt ctagtactta aaggtatgat ttctctggag gacctgatcc ctctaagaac 14820

atacttgaag cgtagtacct gccctaagta tttgaagtct gttctaggta ttactaaact 14880

caaagaaatg tttacagaca cctctttatt atacttgact cgtgctcaac aaaaattcta 14940

catgaaaact ataggcaacg cagtcaaggg atactacagt aactgtgact cttaaaaata 15000

atcacatatt aataggctcc ttttctagtt aactgagccc ttgttgattt aatgatacta 15060

tattagaaaa aagttgcact ccgatccttt aggactcgtg ttcgaattca aataattgtc 15120

ttagaaaaaa gttgcgcgta attgttcttg aatgtagtcc tgtcattcac caaatctttg 15180

tttggt 15186

<210> 2

<211> 1470

<212> DNA

<213> Newcastle disease virus

<400> 2

atgtcttctg tattcgatga gtacgagcag ctcctcgcgg ctcagactcg ccccaatgga 60

gctcatggcg gaggagagaa ggggagcacc ttaaaggtag aagtcccggt attcactctc 120

aacagtgatg acccagaaga tagatggaac tttgcagtgt tttgtcttcg gattgctgtt 180

agcgaggatg ccaacaaacc acttaggcaa ggtgctctca tatctctctt atgttcccac 240

tctcaagtga tgaggaacca tgttgccctt gcggggaaac agaatgaggc cacactggct 300

gttcttgaga tcgatggttt taccaacggc gtgccccagt tcaacaacag gagtggagtg 360

tctgaagaga gagcacagag atttatgatg atagcagggt ctctccctcg ggcatgcagc 420

aacggtaccc cgttcgtcac agctggggtt gaagatgatg caccagaaga cattactgat 480

accctggaga ggatcctctc tatccaggct caagtatggg tcacggtggc aaaggccatg 540

actgcatatg agacagcaga tgagtcagaa acaagaagaa tcaataagta catgcagcaa 600

ggcagggtcc agaagaagta catcctccac cccgtatgca ggagcgcaat ccaactcaca 660

atcagacagt ctctggcggt ccgcatcttt ttggttagcg agcttaagag aggccgcaac 720

acggcaggtg ggacctccac ctattacaac ttggtggggg atgtagactc atacatcagg 780

aacactgggc taactgcatt cttcctgaca cttaaatatg gaattaacac caagacatca 840

gcccttgcac ttagcagcct ctcaggcgat atccagaaaa tgaagcagct catgcgcttg 900

tatcggatga aaggagataa tgcgccgtac atgacattgc tcggtgacag tgaccagatg 960

agctttgcac ctgccgagta tgcacaactt tactcctttg ccatgggtat ggcatcagtc 1020

ctagataaag gaactagcaa ataccaattt gccagggact ttatgagcac atcattctgg 1080

agacttggag tagagtacgc tcaggctcaa ggaagtagca tcaatgagga tatggccgcc 1140

gagctaaagc taaccccagc agcaaggaga ggcctggcag ctgctgccca aagagtgtct 1200

gaggagacca gcagcatgga catgcccacc caacaagccg gggtcctcac tggactcagc 1260

gacggaggct cccaagcccc ccaaggtgca ctgaacagat cacaagggca accggacacc 1320

ggggatgggg agacccaatt tctggatctg atgagagcgg tggcaaatag catgagagaa 1380

gcgccaaact ctgcgcaggg cacccctcaa ccggggcctc ccccaacccc tgggccctct 1440

caagacaatg acaccgactg ggggtactga 1470

<210> 3

<211> 1194

<212> DNA

<213> Newcastle disease virus

<400> 3

atggagatgg ccacctttac agatgcggag atcgacgagc tatttgagac cagtggaact 60

gtcattgaca gcataattac ggcccaggga aaaccagtag agactgttgg aaggagtgca 120

atcccacaag gcaaaactaa ggctttgagc gcagcatggg agaagcatgg gagcatccag 180

tcaccagcca gccaagacac ccctgatcga caggacagat cagataaaca actgtccaca 240

cccgagcaag cgagtccaaa cgacagcccc ccagccacat ccactgacca gcctcccact 300

caggctgcag atgaggccgg cgatacacag ctcaagaccg gagcaagcaa ctctctgctg 360

tcgatgcttg ataaactcag caataagtca tctaatgcta aaaagggccc agggtcgagc 420

cctcaagaaa ggcatcatca acgtctgact caacaacagg ggagtcaaca aagccgcgga 480

aacagccaag agagaccgca gaaccaggcc aaggccatcc ctggaaacca ggtcacagac 540

gcgaacacag catatcatgg acaatgggag gagtcacaac tatcagctgg tgcaacccat 600

catgctctcc gatcagagca gagccaagac aatactcctg cacctgtgga tcatgtccag 660

ctacctgtcg actttgtgca ggcgatgatg tctatgatgg aggcgatatc acagagggta 720

agtaaagttg actatcagct ggaccttgtc ttgaaacaga catcttctat ccccatgatg 780

cggtctgaaa tccagcagct gaaaacgtct gttgcggtca tggaagccaa tttgggcatg 840

atgaagatcc tggaccctgg ttgtgccaac gtttcatctc taagtgatct acgggcagtt 900

gcccgatccc acccggtttt aatttctggc cccggagacc catctcctta tgtgacccaa 960

gggggcgaaa tggcactcaa taaactttcg caaccggtgc aacacccctc tgaattgatt 1020

aaacccgcca cggcaagcgg gcctgatata ggagtggaga aagacactgt ccgtgcattg 1080

atcatgtcac gccctatgca tccgagctct tcagctaggc tcttgagcaa actggacgca 1140

gccggatcga ttgaggaaat cagaaaaatc aagcgccttg cactgaatgg ctaa 1194

<210> 4

<211> 1095

<212> DNA

<213> Newcastle disease virus

<400> 4

atggactcat ctaggacaat cgggctgtac tttgattcta cccttccttc tagcaacctg 60

ctagcattcc cgatagtcct acaagacaca ggggacggga agaagcaaat cgccccgcaa 120

tacaggatcc agcgtcttga ctcgtggaca gacagcaaag aagactcggt attcatcacc 180

acctatggat tcatctttca ggttgggaat gaagaagcca ctgtcggcat gatcaatgat 240

aatcccaagc gcgagttact ttccactgcc atgctatgcc tagggagtgt accaaatgtc 300

ggagatcttg ttgagctggc aagggcctgc ctcactatgg tggtaacatg caagaagagt 360

gcaactaaca ccgagagaat ggtcttctca gtagtgcagg caccccaggt gctgcaaagc 420

tgtagggttg tggcaaacaa atactcgtcg gtgaatgcag tcaagcacgt gaaagcacca 480

gagaagattc ctgggagcgg aaccctagag tacaaagtga actttgtctc tctgaccgtg 540

gtgccaagaa aggacgtcta caagatacca actgcagcac ttaaggtctc tggctcaagt 600

ctgtacaatc ttgcgctcaa tgtcactatt gatgtggagg tagacccgaa gagcccgttg 660

gtcaaatccc tttccaagtc cgacagtggg tactatgcta atctcttctt acatattggg 720

cttatgtcca ctgtagataa gaaggggaag aaagtgacat ttgacaagct ggaaaggaag 780

ataaggagac ttgatctatc tgtagggctt agtgacgtgc tcggaccttc cgtgcttgta 840

aaggcgagag gtgcacggac taagctgctg gcacctttct tctctagcag tgggacagcc 900

tgctatccca tagcaaatgc ctctcctcag gtggccaaga tactctggag ccaaaccgcg 960

tacctgcgga gtgtaaaagt cattatccaa gcgggcaccc agcgtgctgt cgcagtgacc 1020

gccgaccacg aggttacctc tactaagctg gagaaggggc ataccattgc caaatacaat 1080

cccttcaaga aatag 1095

<210> 5

<211> 1662

<212> DNA

<213> Newcastle disease virus

<400> 5

atgggctcca gatcttctac caggatccca gtacctctca tgctgaccgt ccgagtcatg 60

ttggcactga gttgcgtctg tccgaccagc gcccttgatg gcaggcctct tgcagctgca 120

gggattgtgg taacgggaga caaagcagtc aacatataca cctcatctca gacagggtca 180

atcataatca agttactccc aaatatgccc aaggataaag aggcgtgtgc aaaagccccg 240

ttggaggcat acaacaggac attgactact ttgctcaccc cccttggtga ttctatccgt 300

aggatacaag agtctgtgac cacgtccgga ggagggaaac agggacgtct tataggcgcc 360

attatcggtg gtgtagctct cggggttgca accgctgcac agataacagc agcctcggct 420

ctgatacaag ccaatcaaaa tgctgccaac atactccggc taaaagagag cattgctgca 480

accaatgagg ctgtgcacga ggtcactaat ggattatcac aactagcagt ggcagttggg 540

aagatgcagc aatttgttaa tgaccagttt aataaaacag ctcaggaatt ggactgtata 600

aaaattacac agcaggttgg tgtagaactc aacctgtacc taactgaatt gactacagta 660

ttcgggccac aaatcacttc ccctgcctta actcagctga ctatccaggc gctttacaat 720

ctagctggtg ggaatatgga ttacttgttg actaagttag gtgtggggaa caaccaactc 780

agctcattaa ttagtagtgg cctgatcacc ggcaacccta ttctgtacga ctcacagact 840

caactcttgg gtatacaggt aaccctaccc tcagtcggga acctaaataa tatgcgtgcc 900

acctacctgg aaaccttgtc tgtaagtaca accaaaggat ttgcctcagc acttgtccca 960

aaagtagtga cacaggtcgg ttccgtgata gaagagcttg acacctcgta ctgtatagag 1020

accgatttgg atctatattg tacaagaata gtgacattcc ctatgtctcc tggtatttat 1080

tcctgtttga gtggcaatac atctgcttgc atgtactcaa agactgaagg cgcactcact 1140

acgccgtata tgaccctcaa aggctcagtt attgctaact gtaagatgac aacatgtaga 1200

tgtgcagacc ccccgggtat catatcgcaa aattatggag aagctgtgtc tctaatagat 1260

aggcaatcat gcaatatctt atccttagac gggataactt tgaggctcag tggggaattt 1320

gatgcaactt atcaaaagaa tatctcaata caagattctc aagtaatagt gacaggcaat 1380

cttgatatct cgactgagct tgggaatgtc aacaactcga taagtaatgc tttggataag 1440

ttagaggaaa gcaacagcaa actagataag gtcaatgtca aactgaccag cacatccgct 1500

cttattacct atatcgtttt aactgtcata tctcttgtat gtggtatact tagcctggtt 1560

ctagcatgct acctgatgta caagcaaaag gcgcaacaga agaccttgtt gtggcttggg 1620

aataataccc tagaccagat gagggccact acaaaaatgt ga 1662

<210> 6

<211> 1851

<212> DNA

<213> Newcastle disease virus

<400> 6

atggaccgcg cagttagcca agttgcgctg gagaatgatg aaagagaggc aaagaataca 60

tggcgcttgg tattccggat cgcaatccta ctctcaacgg tggtgacctt agccatctct 120

gcagccgccc ttgcatatag catggaggcc agcacaccta gcgatcttgt aggcataccg 180

actgcgatct ctagagcaga ggaaaagatt acatctgcac tcggttccaa tcaagatgta 240

gtagatagga tatataagca ggtggccctc gaatctccac tggcattgct aaacaccgaa 300

tctacaatta tgaacgcaat aacgtctctc tcttatcgaa tcaatggggc cgcaaatagc 360

agcggatgtg gagcacccat tcatgatcca gattatattg gaggaatagg taaagaactt 420

attgtagatg atgctagcga cgtcacatca tactatccct ctgcgttcca agaacacctg 480

aactttatcc cggcgcctac tacaggatca ggttgcactc ggataccctc atttgacatg 540

agcgctaccc actactgtta tactcacaat gtgatattat ctggctgcag agatcactcg 600

cactcacatc aatatttagc acttggtgtg cttcggacat ctgcaacagg gagggtattc 660

ttttccactc tgcgttccat caatctggat gacacccaaa atcggaagtc ttgcagtgtg 720

agtgcaaccc ccttgggttg tgatatgctg tgctctaaag tcacagagac tgaagaagag 780

gattataact cagctatccc cacgtcgatg gtacatggaa ggttagggtt cgacggccaa 840

taccacgaga aggacctaga tgtcacaaca ctattcgagg actgggtggc aaactaccca 900

ggagtagggg gcgggtcttt tattgacaac cgcgtatggt tcccagttta cggagggcta 960

aaacccaatt cgcccagtga caccgcacaa gaagggaaat atgtaatata caagcgatac 1020

aatgacacat gtccagatga gcaagattat cagattcaaa tggctaagtc ttcatataag 1080

cctgggcggt ttggagggaa acgcgtacag caggccatct tatctatcaa agtgtcaaca 1140

tccttgggcg aggacccggt actgactgta ccgcccaaca cagtaacact catgggggcc 1200

gaaggcagag ttctcacagt agggacatct catttccttt atcagcgagg gtcatcatac 1260

ttctcccctg ccctactata tcctatgata gtcagcaaca aaacagccac tcttcatagt 1320

ccttatacat tcaatgcctt cactcgacca ggtagtgtcc cttgccaggc ttcagcaaga 1380

tgccctaact catgtgttac cggagtctat actgatccat atcccttggt cttctatagg 1440

aaccacacct tgcgaggggt attcgggacg atgcttgatg ataaacaagc aagactcaac 1500

cctgtatctg cagtatttga cagcatatcc cgcagtcgca taacccgggt gagttcaagc 1560

agcaccaagg cagcatacac aacatcaaca tgttttaaag ttgtaaagac caataaaacc 1620

tattgtctca gcattgccga aatatccaat accctcttcg gggaattcag aatcgtccct 1680

ttactagttg agattctcaa ggatgatggg gttagagaag ccaggtctag ccggttgagt 1740

caactgcgag agggttggaa agatgacatt gtatcaccta tcttttgcga cgccaagaat 1800

caaactgaat accggcgcga gctcgagtcc tacgctgcca gttggccata a 1851

<210> 7

<211> 6615

<212> DNA

<213> Newcastle disease virus

<400> 7

atggcgagct ccggtcccga gagggcggag catcagatta tcctaccaga gtcacacctg 60

tcttcaccat tagtcaagca caaactactc tattactgga aattaactgg gctaccactc 120

cctgacgagt gtgacttcga ccacctcatt ctcagccgac aatggaagaa aatacttgaa 180

tcggcctccc ctgacactga gagaatgata aaacttggaa gggcagtgca ccagactctc 240

aaccacaatt ccaagataac cggagtactc catcccaggt gtttagaaga attggctagt 300

attgaggttc ctgactcaac caacaagttt cggaagatcg agaagaaaat ccaaattcac 360

aacacaaggt atggagaact gttcacaaga ctgtgcacgc atgtagagaa gaaattgttg 420

ggatcatctt ggtctaataa tgtcccccgg tcagaagagt tcaacagcat ccgtacagat 480

ccggcattct ggtttcactc aaaatggtcc acaactaagt ttgcatggct ccatataaaa 540

cagattcaaa ggcatctgat tgtggcagca agaacaaggt ccgcagccaa caaattggtg 600

acgctgaccc ataaggtagg ccaagtcttt gttactcctg agcttgtcat tgtgacacat 660

acagatgaga acaagttcac gtgtcttacc caggaacttg tgttgatgta tgcagatatg 720

atggagggca gagatatggt caacataata tcatccacgg cggcacatct caggagccta 780

tcagagaaaa ttgatgacat tctgcggtta gtagatgccc tggcaaaaga tctgggtaat 840

caagtctacg atgttgtagc actcatggag ggatttgcat acggcgccgt ccagctgctt 900

gagccgtcag gtacattcgc aggggatttc ttcgcattca acctgcagga gctcaaagac 960

actttgatcg gcctccttcc taaggatata gcagaatctg tgactcacgc aatagccact 1020

gtattctctg gcttagaaca aaatcaagcg gctgagatgc tgtgcctgtt gcgtctatgg 1080

ggccacccat tacttgagtc ccgtattgcg gcaaaagcag taaggagcca aatgtgcgca 1140

ccaaaaatgg tagactttga tatgatcctc caggtattgt ctttctttaa aggaacaatc 1200

atcaacggat acagaaagaa gaatgcaggt gtttggccac gtgtcaaagt agaaacgata 1260

tacgggaagg tcattgggca gctacacgct gattcagcgg agatttcaca cgatatcatg 1320

ttgagagagt acaagagttt atctgcgctt gaattcgagc catgtataga atacgaccct 1380

atcaccaatc tgagcatgtt tctaaaagac aaggcgatcg cacacccgaa agacaactgg 1440

ctcgccgcgt ttaggcgaaa ccttctctct gaggaccaga agaaacatgt aaaggaggca 1500

acctctacta accgtctctt gatagagttc ttagagtcaa atgattttga tccatataag 1560

gagatggaat atctgacgac ccttgagtac ctaagagatg acaatgtggc agtatcatac 1620

tcgctcaagg agaaggaagt gaaggttaat gggcggattt ttgctaagct aacaaagaaa 1680

ttaaggaact gtcaagtgat ggcggaaggg atcttagctg accagattgc acctttcttt 1740

caagggaatg gggtcattca ggatagcata tctttaacca agagtatgct agcgatgagt 1800

caattgtctt tcaacagcaa taagaaacgt atcactgact gcaaagaaag agtagcctca 1860

aaccgcaatc acgatcaaaa gagcaagaat cgtcggagag ttgccacttt tataacgact 1920

gacctgcaaa agtactgtct taattggaga tatcagacaa tcaaactgtt cgctcatgcc 1980

atcaatcagc tgatgggctt acctcacttc ttcgaatgga ttcatctaag actaatggat 2040

actacgatgt ttgtaggaga ccctttcaat cccccaagtg acccaactga ctgtgatctc 2100

tcaagagtcc caaatgatga catatatatt gtcagtgcta gagggggtat tgagggatta 2160

tgtcagaagc tatggacaat gatctcaatt gctgcaatcc aacttgctgc agcaagatca 2220

cattgtcgcg tcgcctgtat ggtacagggt gacaatcaag taatagctgt aacgagagag 2280

gtaaggtcag atgactcccc ggaaatggtg ttaacacaat tgcatcaagc cagtgataat 2340

ttcttcaagg aattgattca tgttaatcat ttgattggcc ataatttgaa ggatcgtgaa 2400

acaatcagat cagacacatt cttcatatac agcaaacgaa tattcaaaga tggagcaata 2460

ctcagtcaag tcctcaaaaa ttcatctaaa ttagtgctaa tatcaggcga ccttagtgaa 2520

aacaccgtaa tgtcctgtgc caacattgca tctactatag cacggctgtg cgagaacggg 2580

cttccaaagg atttctgtta ttacttaaac tacctgatga gttgcgtgca gacatacttt 2640

gattctgagt tttccatcac taacagctcg caccccgatt ctaaccagtc gtggattgaa 2700

gacatctctt ttgtgcactc atatgtcctg acccctgccc agctaggggg actgagcaac 2760

ctccaatact caaggctcta cacgaggaac atcggtgacc cgggaactac tgcttttgca 2820

gagatcaagc gattagaagc agtggggtta ctaagttcta gtattatgac taacatctta 2880

actaggccgc ctggaaatgg agattgggcc agtctgtgta acgaccctta ctctttcaat 2940

tttgagactg tcgcgagtcc aaatattgtc cttaagaaac atacacaaag agtcctattt 3000

gaaacttgtt caaatccctt attatctggc gtgcatacag aggataatga ggcagaagag 3060

aaggcgttgg ctgaattttt actcaatcaa gaagtaattc atccacgtgt cgcacatgct 3120

atcatggaag caagctctat aggtaggagg aagcagattc aagggcttgt tgacacaaca 3180

aacaccgtaa tcaagattgc attgactagg aggccacttg gcatcaagag gctgatgcgg 3240
atagttaact actcgagcat gcatgcaatg ctgtttagag acgatgtttt ctcatctaac 3300
aggtctaacc accccttagt ttcctctaat atgtgttctc tgacgctagc agactatgca 3360
cggaatagaa gctggtcacc attgacgggg ggtagaaaga tactgggtgt atctaatcct 3420
gatactatag aacttgtaga gggtgagatc cttagcgtca gcggaggatg cacaagatgt 3480
gacagcggag atgaacaatt cacttggttc catcttccga gcaatataga actgaccgat 3540
gacaccagca agaatcctcc gatgagagtg ccgtacctcg ggtcaaagac tcaagagagg 3600

agggccgcct cgcttgcgaa aatagctcat atgtcaccac atgtgaaagc tgctctaagg 3660
gcatcatccg tgttgatctg ggcttatgga gacaacgaag taaattggac tgctgctctt 3720
aaaattgcaa gatctcggtg caatataaac tcagagtatc ttcgactatt gtccccctta 3780
cccacagctg ggaatctcca acatagactg gatgacggca taactcagat gacattcacc 3840
cctgcatctc tctacagggt gtcaccttat attcacatat ccaatgattc tcaaaggtta 3900
ttcacggaag aaggagtcaa agagggaaat gtagtttatc agcaaatcat gctcttgggt 3960
ttatctctaa tcgaatcact cttcccgatg acgacaacca ggacatacga tgagatcaca 4020

ttgcacctcc acagtaaatt tagctgctgt atcagggaag caccggttgc agttcctttc 4080
gagttactcg ggatggcacc agaactaagg acagtgacct caaataagtt tatgtatgat 4140
cctagtcctg tatcggaggg tgactttgcg agacttgact tagctatctt taagagttat 4200
gagcttaatc tagaatcata tcccacaata gagctaatga acattctttc aatatccagc 4260
gggaagttaa tcggccagtc tgtggtttct tatgatgaag atacctccat aaagaatgac 4320
gccataatag tgtatgacaa cacccggaat tggatcagcg aagctcagaa ttcagatgtg 4380
gtccgcctat tcgagtatgc agcacttgaa gtgcttctcg actgttctta tcagctctac 4440

tatctgagag taagaggcct agacaatatc gtgttgtata tgagtgactt atataagaat 4500
atgccaggaa ttctactttc caacattgca gctacaatat ctcatcccat cattcattca 4560
agattgcatg cagtaggcct ggtcaatcac gacgggtcac accaacttgc agacacagat 4620
ttcatcgaaa tgtctgcaaa actattagtc tcttgcactc gacgcgtggt ctcaggttta 4680
tatgcaggga ataagtatga tctgctgttc ccgtctgtct tagatgataa cctgagtgag 4740
aagatgcttc agctgatatc tcggttatgc tgcctgtata cggtgctctt tgctacaaca 4800
agagagatcc cgaaaataag aggcttatct gcagaagaga agtgttcagt acttactgag 4860

tacctactgt cagatgctgt gaaaccatta cttagttctg agcaagtgag ctctatcatg 4920

tctcctaaca tagttacgtt cccagctaat ctatattaca tgtctcggaa gagccttaat 4980

ttgattaggg aaagagagga cagggacact atcttggcat tgttgttccc ccaagagcca 5040

ctacttgagt tccccttagt acaagatatt ggcgctcgag tgaaagatcc attcacccga 5100

caacctgcgg cgtttttaca agaattagat ttgagcgctc cagcaaggta tgacgcattt 5160

acacttagtc aggttcattc tgaacacaca tcaccaaatc cggaggacga ctacttagta 5220

cgatacctgt tcagaggaat agggaccgcg tcctcctctt ggtataaggc atctcacctt 5280

ctttctgtac ctgaggtcag atgtgcaagg cacgggaatt ccttatactt ggcagaagga 5340

agcggagcca ttatgagtct tctcgaactg catgtgccgc atgagactat ctattacaat 5400

acgctcttct caaacgagat gaacccccca cagcggcatt tcggaccgac cccaacacag 5460

tttctgaatt cagttgttta taggaatcta caggcggagg taccatgtaa ggatggattt 5520

gtccaggagt tccgtccatt atggagagag aatacagaag aaagcgatct gacctcagat 5580

aaagcagtgg gttacatcac atctgcagtg ccctaccggt ctgtatcatt gctgcactgt 5640

gacattgaga ttcctccagg atccaatcaa agcttactgg atcaactggc taccaatcta 5700

tctctgattg ccatgcattc tgtaagggag ggcggggtcg tgatcatcaa agtgttgtat 5760

gcaatgggat attacttcca tctactcatg aacttgttca ctccgtgttc tacgaaagga 5820

tatattctct ctaatggcta tgcatgtaga ggggatatgg agtgttacct ggtatttgtc 5880

atgggctatc gaggtgggcc tacatttgta catgaggtag tgaggatggc aaaaactcta 5940

gtgcagcggc acggtacact tttgtccaaa tcagatgaga tcacactgac taggttattt 6000

acctcacagc ggcagcgtgt aacagacatc ctatccagtc ctttaccgag actaataaag 6060

ttcttgagaa agaatatcga tactgcgcta attgaagccg ggggacaacc cgtccgtcca 6120

ttctgtgcag agagcttggt gaggacacta gcggacacaa ctcagatgac ccagatcatc 6180

gctagtcaca ttgacacagt cattcgatct gtgatctaca tggaggctga gggtgatctc 6240

gccgacacag tgttcttatt tacccccctac aatctctcta cagacggtaa aaagagaaca 6300

tcacttaaac agtgcacaag gcagatctta gaggtcacaa tattgggtct tagagttgaa 6360

aatctcaata aagtaggtga tgtagtcagt ctagtactta aaggtatgat ttctctggag 6420

gacctgatcc ctctaagaac atacttgaag cgtagtacct gccctaagta tttgaagtct 6480

gttctaggta ttactaaact caaagaaatg tttacagaca cctctttatt atacttgact 6540

cgtgctcaac aaaaattcta catgaaaact ataggcaacg cagtcaaggg atactacagt 6600

aactgtgact cttaa 6615

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P1 primer

<400> 8

accaaacaga gaatccgtga g 21

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P2 primer

<400> 9

agatgagggg gttcgtttgt ag 22

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P4 primer

<400> 10

cgcgccgtcg cagtgacc 18

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P6 primer

<400> 11

cgtttcccac cgaaccgc 18

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P10 primer

<400> 12

accgacccca acacagttcc 20

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P12 primer

<400> 13

accaaacaaa gatttggtg 19