



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0090412
(43) 공개일자 2010년08월16일

(51) Int. Cl.

C12N 15/11 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)

A01H 1/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0009668

(22) 출원일자 2009년02월06일

심사청구일자 2009년02월06일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

신정섭

서울 성북구 길음동 대우푸르지오아파트 209동 501호

최준영

경기도 성남시 중원구 상대원동 849-1 14통

김해진

서울특별시 동대문구 제기2동 272-8번지 BF103호

(74) 대리인

김선애

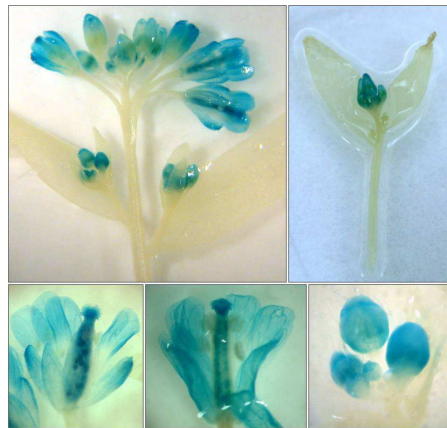
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 식물 꽃 조직 특이적 프로모터

(57) 요약

본 발명은 식물 꽃 조직에서 특이적으로 외래 유전자의 발현을 유도할 수 있는 애기장대에서 분리한 서열번호 1의 염기서열을 갖는 프로모터에 관한 것이다. 상기한 본 발명에 의한 꽃 조직 특이적 발현 유도 프로모터는, 생명공학 기법을 이용하여 기존의 화훼류 신품종 개발 기법의 단점을 보완할 수 있으며 특히 조직 및 시기 특이성이 뛰어나 우수한 품질 또는 새로운 형질을 갖는 화훼류 식물을 개발하는 데 매우 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도4



특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 식물 꽃 조직 특이적 프로모터.

청구항 2

제1항에 따른 프로모터를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 외래 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 4

제1항의 프로모터 또는 제2항에 따른 재조합벡터에 의해 형질전환된 미생물.

청구항 5

제1항의 프로모터 또는 제2항에 따른 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체.

청구항 6

서열번호 1의 염기서열을 포함하는 프로모터의 DNA 단편을 증폭하기 위한 서열번호 4 또는 서열번호 5로 표시되는 PCR용 프라이머.

청구항 7

서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 식물 꽃 조직 특이적 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결된 외래 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 구축하는 단계; 및

상기 재조합 벡터를 식물체에 도입하여 형질전환 시키는 단계를 포함하는 외래 유전자를 꽃 조직 특이적으로 발현시키는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식물 꽃 조직에서 특이적으로 외래 유전자의 발현을 유도할 수 있는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 유래된 프로모터에 관한 것으로, 생명공학 기법을 이용하여 우수한 품질 또는 새로운 형질 (꽃의 크기와 모양, 꽃의 수, 색상 패턴)을 가진 화훼류 식물을 개발하는데 매우 유용하게 이용할 수 있는 꽃 조직 특이적 프로모터에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 프로모터는 유전자의 발현을 조절하는 조절 유전자로서 특정 프로모터를 사용했을 경우 유용한 유전자를 적절한 시기에 또는 식물체의 특정한 부위에서 발현시킬 수 있어 생명공학을 이용한 새로운 품종 개발에 있어 중요한 기술이라고 할 수 있다. 특히나 조직 특이적 발현을 유도하는 프로모터의 개발은 그 활용도 및 중요성이 매우 크다 할 것이다. 따라서 관련 지적 재산권 확보를 위한 경쟁이 우리나라 뿐 만 아니라 전 세계적으로 광범위하게 이루어지고 있다.

[0003] 특히 외국 종자 회사의 화훼류에 대한 품종 등록건수가 증가함으로써 화훼류에 대한 신품종 개발 연구 및 그와 관련된 국내의 지적 재산권 확보가 매우 중요한 당면 과제가 되고 있다.

[0004] 만약 식물에서의 꽃 조직 특이적 프로모터를 개발하여 화훼류 식물체에 도입하면 고부가 가치의 산업에 유용하게 이용될 수 있다. 즉, 꽃 조직 특이적 프로모터는 국화, 카네이션, 장미 등의 화훼작물에 도입하여 화색과 화형 등을 변형하는 연구에 이용될 수 있으며, 또한 절화의 수명연장 또는 개화기 조절 연구 등에 이용될 수도 있

다. 이런 이유로 모델 식물인 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)를 이용하여 조직 특이적 발현을 조절하는 조절 유전자 부위인 프로모터에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

[0005] 한편, CaMV 35S 프로모터(Cauliflower mosaic virus 35S promoter)는 식물체 형질전환에 있어 가장 널리 사용하고 있으나, 전 조직에서, 발달 시기에 관계없이 발현이 되고 있어 기존의 형질을 유지하면서 특정 시기나 부위에 유전자 발현시켜 화훼류 신품종을 연구하고 개발하는 데에 이용하기에는 부적절하다. 또한 특허가 걸려있어 산업적으로 이용할 경우 막대한 로열티 지불이 예상된다. 따라서 식물체의 발육과 생장에는 전혀 영향을 미치지 않으면서, 산업적으로 이용할 수 있는 새로운 꽃 조직 특이적 발현을 유도하는 프로모터에 대한 요구가 끊임없이 있어왔다.

[0006] 최근 국내외에서 조직 특이적 발현을 유도하는 프로모터 개발을 위해 연구된 결과를 살펴보면, 2006년에 조직 특이적 프로모터를 개발하기 위하여 농촌진흥청 생명공학 연구소에서 400여개의 애기장대 프로모터를 확보하여 형질전환체를 구축하였고 조직 특이성을 조사하는 연구를 수행하였다(2006년 농업생명공학연구연보). 또한 독일의 SUNGENE과 같은 회사는 꽃 조직 특이적 프로모터를 개발하기 위하여 두 가지 다른 전위인자 구조를 이용하여 대량으로 스크리닝(screening) 하여 15개의 꽃 조직 특이적 프로모터를 찾아내는 연구를 수행하였다. 그 외 국내외 많은 연구자들이 조직 특이적 프로모터를 개발하기 위해 애쓰고 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 본 발명은 상기 종래기술의 문제점과 요구를 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 식물 꽃 조직에서만 특이적으로 발현을 유도하는 프로모터를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은, 상기 식물 꽃 조직 특이적 발현 프로모터를 포함한 재조합 벡터 및 이에 의해 형질전환된 식물체를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제 해결수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 꽃 조직 특이적 프로모터를 제공한다.

[0011] 또한 본 발명은 상기 프로모터를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0012] 나아가 본 발명은 상기 프로모터 또는 재조합 벡터를 포함하는 미생물 및 형질전환 식물체를 제공한다.

[0013] 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 프로모터의 DNA 단편을 증폭하기 위한 서열번호 4 또는 서열번호 5로 표시되는 PCR용 프라이머를 제공한다.

[0014] 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 식물 꽃 조직에 특이적으로 발현을 유도할 수 있는 분리된 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결된 외래 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 구축하는 단계; 및 상기 재조합 벡터를 식물체에 도입하여 형질전환 시키는 단계를 포함하는 외래 유전자를 꽃 조직 특이적으로 발현시키는 방법을 제공한다.

[0015] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

[0016] 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 꽃 조직 특이적 프로모터를 제공한다. 본 발명자들은 꽃 조직 특이적 발현 프로모터를 찾기 위해 꽃 조직 특이적 또는 꽃 조직 우성발현(flower specific or flower dominant) 할 것이라고 생각되는 유전자를 후보자로 선발하였고, 그 중 glycerol-3-phosphate acyltransferase (*AtGPAT6*)가 꽃 조직에서 특히나 꽃잎에서 아주 강하게 발현하는 것을 알아내었다. 꽃 특이적으로 발현할 것이라고 추정한 *AtGPAT6*의 발현이 실제로 꽃 조직에서만 발현이 되는지 알아보기 위해 조직별 RT-PCR을 수행한 결과 꽃 조직에서 아주 강하게 발현하는 것을 확인하였다 (도 1 참조).

- [0017] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 프로모터의 DNA 단편을 증폭하기 위한 서열번호 4 또는 서열번호 5로 표시되는 PCR용 프라이머를 제공한다. 즉, *AtGPAT6* 유전자의 프로모터를 분리하기 위해 약 1.5kb를 증폭할 수 있는 프라이머(표 2)를 제작하였고, PCR을 통해 애기장대의 gDNA로부터 *AtGPAT6* 프로모터를 분리하고 시퀀싱(sequencing)으로 프로모터 부위(promoter region)임을 확인하였다(도 2 참조).
- [0018] 본 발명은 상기 프로모터의 염기서열 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 외래 유전자를 포함하는 재조합 벡터(도 3 참조) 및 상기 재조합 벡터에 의해 형질전환된 미생물 및 식물체(도 4 참조)를 제공한다.
- [0019] 상기 외래 유전자는 상기 프로모터의 발현을 확인할 수 있는 리포터 유전자 등 목적에 따라 다양한 유전자가 연결될 수 있다. 이에 한정되는 것은 아니나, 외래 유전자로서 예를 들어 내생성, 내건조성 등 우수한 품질 또는 꽃의 크기와 모양, 꽃의 수, 색상 패턴 등의 형질을 결정하는 유전자 등 다양한 유전자가 연결될 수 있다. 따라서 본 발명의 프로모터는 생식기관의 형태나 생리적 현상을 인위적으로 개량하거나 다양한 유전자의 꽃 조직에 있어서의 기능을 분석하기 위해 이용될 수 있다. 특히 본 발명에 의한 프로모터는 화훼류 식물업계에서 새로운 색상 및 형태의 꽃을 가지는 고부가가치의 식물체를 개발하는 데 유용하게 활용될 수 있다.
- [0020] 본 발명에 의한 프로모터를 포함하는 재조합 벡터를 제조하고 이 재조합 벡터를 식물체 내로 도입시키기 위하여, 본 발명이 속하는 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 알려진 다양한 기술을 사용할 수 있다. 예를 들어 아그로박테리움-매개 형질전환을 이용할 수 있다(참고 문헌: Clough SJ and Bent AF, 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:735-43).
- [0021] 본 발명에 의한 식물 꽃 조직 특이적 발현을 유도할 수 있는 프로모터의 발현의 확인은, 관용의 방법 즉, 이 프로모터 서열에 β -글루코로니다아제(GUS) 유전자를 연결한 발현 카세트를 구축하여, 소정의 식물체에 도입하여 발현부위를 확인하는 것에 의해 할 수 있다. 일 실시예로서 본 발명에 의한 프로모터를 GUS 리포터 유전자가 삽입된 pBI101 벡터에 클로닝하였다(도 3 참조). 이 클로닝한 벡터를 아그로박테리움 GV3101을 이용하여 애기장대에 형질전환을 하였다. 이 형질전환체에서 GUS는 꽃잎, 꽃받침, 암술과 같은 꽃 조직에서만 특이적으로 발현되는 것을 확인하였다(도 4 참조).

효 과

- [0022] 상술한 바와 같이, 상기 애기장대에서 분리된 본 발명에 의한 신규한 프로모터는 다른 조직에서는 유전자의 발현을 유도하지 않고 꽃 조직 특이적으로 유전자 발현을 유도할 수 있는 효과를 도모할 수 있다.
- [0023] 따라서 본 발명에 의한 프로모터는 생명공학 기법을 이용하여 기존의 화훼류 신품종 개발 기법의 단점을 보완할 수 있으며, 특히 조직 및 시기 특이성이 뛰어나 생식기관의 형태나 생리적 현상을 인위적으로 개량하거나 다양한 유전자의 꽃 조직에 있어서의 기능을 분석하기 위해 유용하게 이용될 수 있다. 나아가 본 발명에 의한 프로모터는 우수한 품질 또는 새로운 형질을 갖는 고부가 가치의 화훼류의 신품종 육성에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[실시예 1. 신규한 꽃 특이적 발현 유전자(*AtGPAT6*)의 선발]

- [0026] 본 발명자들은 꽃 조직 특이적 발현 프로모터를 찾기 위해 Tair site 에서 꽃 조직 특이적(flower specific) 혹은 꽃 조직 우성 발현(flower dominant) 할 것으로 추정되는 유전자들을 찾고, 이 유전자들과 관련된 논문을 검색하여 발현 패턴을 확인하였다. 진베스티게이터(genevestigator)의 데이터 베이스와 비교하여 꽃 조직 특이적 또는 꽃 조직 우성 발현할 것이라고 생각되는 유전자를 후보자로 선발하였다. 그 중 glycerol-3-phosphate acyltransferase (*AtGPAT6*)가 꽃 조직에서 특히나 꽃잎에서 아주 강하게 발현하는 것을 알아내었다.

[0027] [실시예 2. 타겟 유전자(TAIR 제At2g38110호)의 RT-PCR]

[0028] 꽃 특이적으로 발현할 것이라고 추정된 *AtGPAT6*의 발현이 실제로 꽃 조직에서만 발현이 되는지 알아보기 위해 RT-PCR을 수행하였다.

[0029] RT-PCR에 이용할 표준 cDNA를 합성하기 위해 뉴클레오스핀 RNA 플랜트 키트(Nucleospin RNA plant kit, Macherey-Nagel)를 이용하여, 애기장대(*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia)의 각 조직, 즉 꽃(flower), 경생엽(cauline leaves), 근생엽(rosette leaves), 꽃줄기(inflorescence stem), 뿌리(root), 꽃봉오리(bud), 성숙한 꽃(mature flower), 꽃가루(pollen)의 전체 RNA(total RNA)를 추출하였다.

[0030] 정량한 총 RNA(total RNA) 5 μ g과 10mM의 dNTP 4 μ l, oligo-dT 1 μ l와 뉴클레아제가 없는(nuclease-free) 멸균수를 전체 13 μ l가 되도록 잘 섞은 다음 72°C에서 5분간 처리한 후, 그 튜브를 얼음에 옮겨 5X RT-PCR 버퍼(buffer) 4 μ l, RNase 저해제(RNase inhibitor) 1 μ l, 0.1 M DTT 1 μ l, 역전사효소(reverse transcriptase) 200 유닛(unit) 1 μ l를 넣고 첨가하여 52°C에서 60분간 처리하였다. 이후 역전사효소를 불활성화 시키기 위해 70°C에서 15분간 처리하였다. 위와 같은 방법으로 조직별 cDNA 풀(pool)을 만들었으며, 이 cDNA 풀(pool)을 RT-PCR의 주형(template)으로 사용하였다.

[0031] TAIR 사이트의 염기서열을 바탕으로 유전자의 엑손 연결부위에서 RT-PCR에 이용된 프라이머를 합성하였고 이 프라이머는 표 1에 구체적으로 나타나 있다. 그리고 이때 PCR 반응은 Gene Amp[®] PCR System 2700 (Perkin Elmer, USA)을 사용하여, 95°C에서 1분간 초기 변성 후, 95°C 20초, 62°C 20초, 72°C 30분 23회를 실시하였다. 표 1은 상기 RT-PCR에 이용된 타겟 유전자 특이 프라이머를 나타낸다.

표 1

[0032]

5'-GCAAGGAAGGTTACATGGTGCCACG (서열번호 2)	25-mer
5'-GCCGAGTGCACAGCTGTGACC (서열번호 3)	22-mer

[0033] 내적대조군(Internal control)으로는 *eIF4-a*를 사용하였으며, 조직별 cDNA 풀(pool)에서 비슷한 양이 발현되는 것을 확인하였다. 상기 타겟 유전자 특이 프라이머를 이용한 RT-PCR의 결과는 도 1과 같다. 도 1에 나타난 바와 같이 타겟 유전자가 꽃봉오리와 성숙한 꽃에서 강하게 발현하는 것을 확인할 수 있었다.

[0034] [실시예 3. 꽃 특이적 발현 유전자(TAIR 제At2g38110호)의 프로모터 염기서열 확인]

[0035] 상기 *AtGPAT6* 유전자(At2g38110)의 첫 번째 코돈(ATG) 바로 앞부분에 있는 5' UTR 을 포함하여 1528 염기쌍(base pair)을 이 유전자의 프로모터 부위라 추정하였다. 먼저 야생 애기장대의 게놈 DNA(gDNA)를 추출하고, 양 말단에 *Bam*HI 사이트를 포함하고 있는 서열번호 4 및 서열번호 5로 표시되는 프라이머를 합성하였다(표 2 참조). 표 2는 본 발명에 의한 프로모터 클로닝에 이용한 프라이머를 나타낸다.

표 2

[0036]

5'-GCGGATCCAGTTGAAGTATGTTATACCCCGGAAG (서열번호 4)	34-mer
--	--------

5'-GCGGATCCTAGTGAAGAAGTTGGAGAGAGGAGAAAAGAG (서열번호 5)	39-mer
---	--------

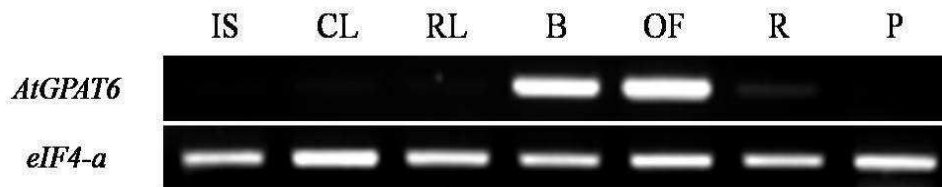
- [0037] 상기 gDNA를 주형(template)으로 하여, 합성한 상기 프라이머와 교정(proofreading) 기능을 갖는 DNA 중합효소(phusion, Finzyme)를 이용하여 프로모터 부위를 증폭하였다. 그리고 이때 PCR 반응은 Gene Amp® PCR System 2700 (Perkin Elmer, USA)을 사용하여, 95℃에서 5분간 초기 변성 후, 터치-다운(touch-down) PCR 방법으로, 95℃ 30초, 62℃ 30초, 72℃ 1분으로 5회 실시하고, 95℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 1분으로 다시 5회 실시, 그리고 95℃ 30초, 58℃ 30초, 72℃ 1분으로 25회 실시하여 전체 35회 PCR을 수행하였다.
- [0038] PCR로 얻은 산물을 *Bam*HI 제한효소로 말단을 자른 다음 GUS 리포터 유전자를 가지고 있는 pBI101 벡터(vector)에 클로닝하였다. 이 클론을 시퀀싱(sequencing)한 결과 정확한 염기서열이 클로닝되었음을 확인하였다(도 2 참조).
- [0039] **[실시예 4. 꽃 특이적 프로모터의 애기장대 형질전환]**
- [0040] 타겟 프로모터 클로닝에 이용한 pBI101 벡터는 레프트 보드(left board)와 라이트 보드(right board) 사이에 GUS(β -glucuronidase) 리포터 유전자를 가지고 있으며 식물에 형질전환 시킬 수 있는 바이너리 벡터(binary vector)이다(도 3 참조).
- [0041] 이 벡터를 아그로박테리움(*Agrobacterium*, GV3101)에 형질전환 시킨 후 꽃 침지(flower dipping, Clough *et al.*, Plant J., 16(6): 735 - 743, 1998) 방법으로 애기장대에 형질전환 시켰다. 형질전환 애기장대를 항생제 카나마이신으로 선별하였고, 선발된 형질전환 식물을 키운 후 각 조직별로 GUS(β -glucuronidase) 유전자의 기질인 X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronide)가 들어있는 수용액에서 GUS 염색(β -glucuronidase staining)을 수행하였다.
- [0042] 그 결과 도 4에 나타난 바와 같이 애기장대의 다른 조직에서는 GUS 발현이 관찰되지 않았고, 꽃 조직 특이적으로 GUS 염색(GUS staining)이 됨을 확인할 수 있었다. 즉, GUS 염색(GUS staining)이 어린 시기의 봉오리부터 성숙한 꽃이 될 때까지 계속해서 강하게 염색이 되는 것이 확인되었고, 또 꽃잎, 꽃받침, 암술을 포함하는 꽃 조직에서만 강하게 염색되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0043] 따라서 본 발명에 의한 프로모터는 꽃잎, 꽃받침, 암술을 포함하는 꽃 조직에서 특이적으로 유용한 형질의 외래 유전자를 발현시키도록 조절하는 작용을 하여 조직 특이성 및 시기 특이성이 우수한 것으로 나타났다.

도면의 간단한 설명

- [0044] 도 1은 식물 꽃 조직에서 특이적으로 발현되는 *AtGPAT6* 유전자의 발현을 RT-PCR을 통해 확인한 결과를 나타내는 도면. IS : inflorescence stem, CL : cauline leaf, RL : rosette leaf, B : Bud, OF : open flowers, R : root, P : pollen
- [0045] 도 2는 본 발명에 의한 식물 꽃 조직 특이적 발현을 유도하는 프로모터의 염기서열을 나타내는 도면.
- [0046] 도 3은 본 발명에 의한 식물 꽃 조직 특이적 발현을 유도하는 프로모터 클로닝에 사용된 pBI101 벡터와 클로닝 사이트를 나타내는 도면.
- [0047] 도 4는 본 발명에 의한 식물 꽃 조직 특이적 발현을 유도하는 프로모터에 의해 GUS 유전자가 식물의 꽃 조직에서만 발현되는 양상을 나타내는 도면.

도면

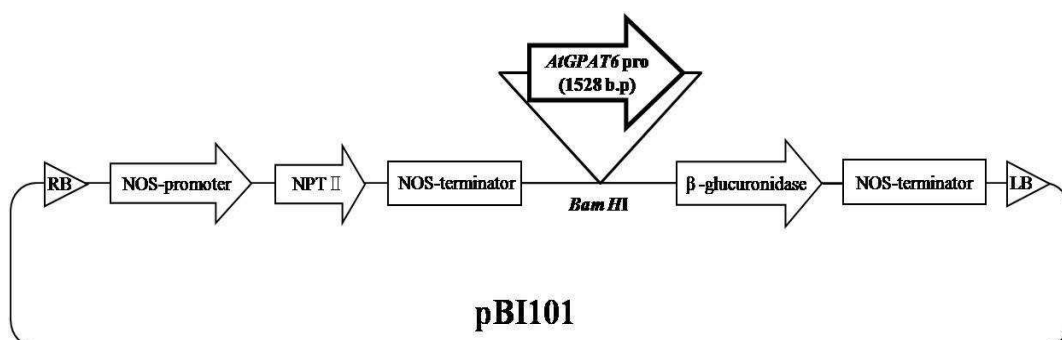
도면1



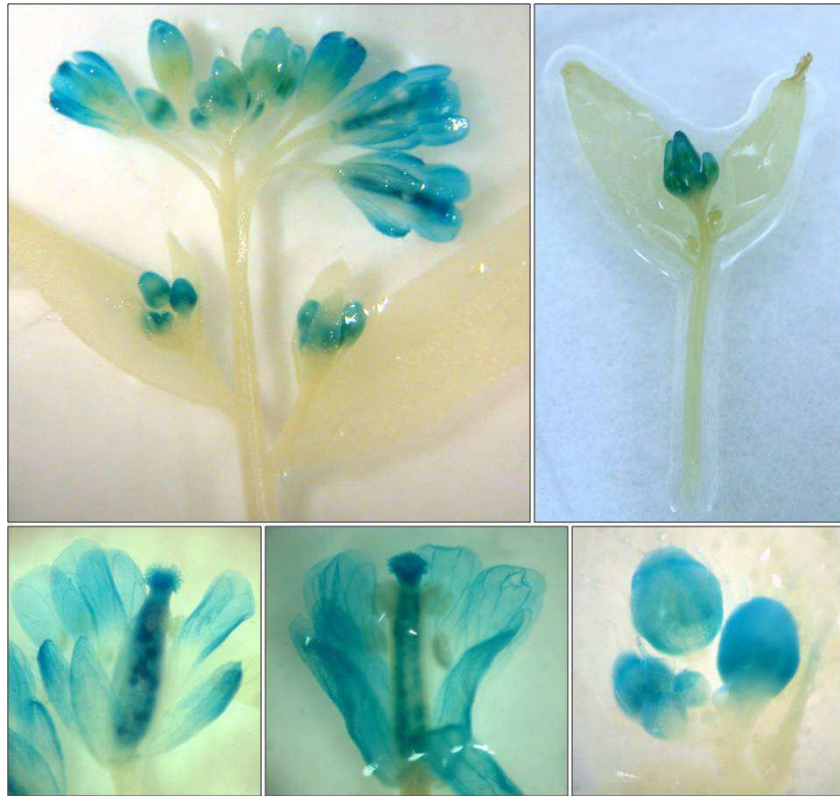
도면2

[illegible]

도면3



도면4



서열 목록

<110> Korea University Industrial and Academic Collaboration Foundation

<120> A novel flower-specific promoter

<130> P11-081230-01

<160> 5

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1528

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

tccagttgaa gtatgttata ccccggaagt tatctgatct ttgagcctaa gcaaccgtag

60

tttcaatggg tcagacaaac aacttaagaa ataacgataa tgtgttaaac aaaagtctca	120
ttagtttacc attcaaaaat tttaatgaga tttatTTTT cttgtcttc catcaatatt	180
ctaccgtaat tagcatgcaa cttgtTTTT ccacaaaatt ctatggtaaa tagcatgcaa	240
cttcttttta tttttgttat ggtgaatgat cttttagaaa attattatca atattcacia	300
gctgaaaaaa aaaactttaa aacgacgcgt aacatcaatc gtcaaaacat tgtgaacctt	360
taaatagtga aatgattatc ggataggtaa gcccaaaact gattgtagat ggagatgtgt	420
gagatttata gacagaaaca atggctagct caaaagtcaa aacgatgcag acacaataca	480
catgatatag atgcttcttc cagtttccat atagttttct ttaacatttt agtctagaat	540
ttgaacttta gattttagta caataagaga aagaggtatc atcaatcatt cttttagtta	600
tgtacaaaaa atcacctgg cgaccataat tacagtgact ccgattaatt ttcgattttt	660
tatttggcat taaacctatt tcggtcgtct aattaacggt tagtgatctt ttaaacctat	720
tagtatgact tgiatttgtt tgagggtcaa aagggtcaagt gtactttctc acaattttta	780
gtttaagatt aatattcaaa acgacgtaat ttaagttata ctacgagtct tttatgagtt	840
ggaagttagt ttigcatatt ttgttgatcg aagatacatt tacaatgggt ggatactatt	900
ttttttttt ttttttcaa tttctcaaat ctaaatataa agagaagtgg atgctctaac	960
tataaaacgg cggcgcgtgg gggccttcaa caacgtaaaa aacatctcaa ataggttttg	1020
gctattcaat acattggtgt cggctttcac caactttaac tctcctttct ctctacttca	1080
cacgtctcaa acaacttctt ctacaattaa ctattctccc taattaaaca tatttgatat	1140
ccactttatt ggcactatta tctcgaagat aacttcctta cgaatcaaga agatttacta	1200
cttagtttac atgacaacag ttatagtcac gcagatatig ttatctatta tgcatagtgt	1260

gttttatttt acctttgaaa aatcaacgcg tatatttctt tggcacacta atatcaaacc 1320

accacaacaa caatatcatg cccatttctt ctgcctctc tttatataaa caaacctccc 1380

aaaagtattc accaatccat atccattctc accttccaaa tctccccact ctctctctct 1440

ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctatctctct ctatctctct ctatctctct 1500

ttttctctc tctccaactt cttcacta 1528

<210> 2
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 2
gcaaggaagg ttacatgggtg ccacg 25

<210> 3
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 3
gccgagtgcg acagctgtga cc 22

<210> 4
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR PRIMER

<400> 4

gcggatccag ttgaagtatg ttataccccg gaag

34

<210> 5

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR PRIMER

<400> 5

gcggatccta gtgaagaagt tggagagagg agaaaagag

39