



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.	(45) 공고일자	2007년07월09일
<i>C12N 15/29</i> (2006.01)	(11) 등록번호	10-0737669
<i>C07K 14/415</i> (2006.01)	(24) 등록일자	2007년07월03일

(21) 출원번호	10-2006-0045409	(65) 공개번호
(22) 출원일자	2006년05월20일	(43) 공개일자
심사청구일자	2006년05월20일	

(73) 특허권자 고려대학교 산학협력단
 서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자 황병국
 서울 강남구 역삼2동 개나리아파트 42동 303호

 최형우
 서울 금천구 시흥3동 거상 장미아파트 102호

 이성철
 서울 구로구 구로5동 태영아파트 104동 201호

(74) 대리인 김선애

(56) 선행기술조사문헌	
KR1020000065524 A	KR1020020024732 A
KR1020020078820 A	WO0107635 A1

심사관 : 정의준

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 고추 씨에이피오2 유전자, 이를 이용한 식물병 및환경스트레스 저항성 탐색방법 및 형질전환 식물체

(57) 요약

본 발명은 고추 세균성 점무늬병에 대한 저항성을 조절하는 신규 유전자인 고추 CaPO2 유전자, 그리고 상기 유전자를 이용한 병원균 및 환경스트레스 저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 유전자를 이용한 식물병저항성과 환경스트레스 저항성 탐색방법도 제공한다. 상기한 본 발명에 의하면, 식물체병원균의 방어반응의 표지 및 환경스트레스 내성 식물의 분자육종을 위한 유전재료를 제공할 수 있고, 식물병 저항성 등의 탐색을 촉진시킬 수 있다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

고추 한별 품종(*Capsicum annuum* L. cv. Hanbyul)으로부터 분리된 서열번호 1의 염기서열을 갖는 식물병 저항성 단백질 유전자(CaPO2).

청구항 2.

제1항 기재의 유전자에 의해 코딩되는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 식물병 저항성 단백질.

청구항 3.

제1항 기재의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 4.

제1항 기재의 CaPO2 유전자를 pBIN35S에 삽입시켜 제조한 재조합벡터 pBIN35S::CaPO2.

청구항 5.

제1항 기재의 유전자 또는 제3항 기재의 재조합 벡터에 의해 형질전환된 애기장대.

청구항 6.

삭제

청구항 7.

식물체의 병저항성 및 환경스트레스 저항성 탐색방법에 있어서,

고추 세균성 점무늬병의 병원성 및 비병원성 세균 중 어느 하나를 접종한 고추 식물체로부터 RNA를 분리하여 전기영동시키고 나이론막(Hybond N+)으로 전이시킨 후, ^{32}P 를 처리한 제1항 기재의 CaPO2 유전자 프로브와 반응시켜 CaPO2 유전자의 차별적 발현을 확인함을 포함하여 구성되는, 식물체의 병저항성 및 환경스트레스 저항성 탐색방법.

청구항 8.

식물체의 병저항성 및 환경스트레스 저항성 탐색방법에 있어서,

앱시스산 또는 메칠비올로젠을 처리한 고추 식물체로부터 RNA를 분리하여 전기영동시키고 나이론막(Hybond N+)으로 전이시킨 후, ^{32}P 를 처리한 제1항 기재의 CaPO2 유전자 프로브와 반응시켜 CaPO2 유전자의 차별적 발현을 확인함을 포함하여 구성되는, 식물체의 병저항성 및 환경스트레스 저항성 탐색방법.

청구항 9.

식물체의 병저항성 및 환경스트레스 저항성 탐색방법에 있어서,

상처스트레스, 건조스트레스 및 저온스트레스 중 어느 하나를 처리한 고추 식물체로부터 RNA를 분리하여 전기영동시키고 나이론막(Hybond N+)으로 전이시킨 후, ^{32}P 를 처리한 제1항 기재의 CaPO2 유전자 프로브와 반응시켜 CaPO2 유전자의 차별적 발현을 확인함을 포함하여 구성되는, 식물체의 병저항성 및 환경스트레스 저항성 탐색방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 고추 세균성 점무늬병에 대한 저항성 관련 유전자인 CaPO2 유전자, 이를 이용한 식물체 병저항성 및 환경스트레스 저항성 탐색방법과 병원균 및 환경스트레스 저항성 형질전환 식물체 제작에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 고추 세균성점무늬병에 대해 저항성을 가진 것으로 알려진 고추 한별 품종(*Capsicum annuum* L. cv. Hanbyul)으로부터 신규 저항성 관련 유전자인 CaPO2 유전자를 분리하여 해독(Sequencing)하고, 여기에서 얻어진 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 제공함으로써, 생물적/화학적/물리적 저항성 유도 처리 시 저항성 관련 유전자 CaPO2의 발현 여부를 탐색하는 저항성 탐색방법을 제공하며, 더 나아가 이를 이용한 병원균 및 환경스트레스에 대해 저항성을 갖는 형질전환 식물체 제작에 관한 것이다.

담배, 토마토와 함께 대표적인 가지과 식물인 고추는 우리나라에서 오래전부터 향신료 또는 양념으로 사용되어 온 대표적인 작물로서, 그에 대한 병으로는 바이러스병, 세균병, 진균병 등이 다양하게 보고되어 있는데, 그중 치명적인 것으로는 난균류에 의한 역병과 진균에 의한 탄저병 및 세균에 의한 세균성 점무늬병 등을 들 수 있다.

이중 고추 세균성 점무늬병은 고추의 잎, 줄기, 과실에 반점을 형성하여 낙엽을 유발하고 수확량을 감소시키는 병으로서, 통상 더듬이병, 반점세균병 등으로 불리며, 고추가 우리나라의 재배작물에서 차지하는 비중을 볼 때 그 피해는 심각한 수준이라고 할 수 있다.

이러한 고추 세균성 점무늬병을 방제하기 위해 지금까지는 농약을 이용한 화학적 방제법이 주로 사용되어 왔는데, 그 독성으로 인하여 병원균뿐만 아니라 주변 생태계의 생물까지도 대량 살상하여 생태계를 파괴시키고 토양과 수질을 오염시키는 폐해가 있어 왔다.

따라서 앞으로는, 식물이 처해 있는 환경 및 조건을 고려하여 저항성 식물의 개발 및 생물학적 방제수단 등을 적절히 혼용함으로써 농약의 사용을 줄이는 방법을 사용하는 것이 바람직하다고 할 수 있으며, 이를 위해 병에 대해 저항성을 가지고 있는 저항성 품종의 개량 및 육종 등을 통해 병 발생 자체를 억제하는 방법을 찾는 것이 바람직하다고 할 수 있다.

사실, 그동안 농약을 사용하지 않고 병해충에 의한 피해를 감소시키기 위한 노력의 일환으로 고추를 비롯한 다양한 작물 및 병원균을 대상으로 병 저항성 작물의 육성 프로그램들이 꾸준히 진행되어 왔으며, 병 저항성에 대한 이해 및 이의 실제적 응용을 위해 병 저항성 식물에서의 저항성 기작에 대한 연구가 역시 고추를 비롯한 여러 가지 작물 및 모델식물을 대상으로 실시되어 왔다.

일단 식물 병에 감염되면, 기주식물은 여러 가지 세포내 대사 시스템을 작동시켜 방어기작을 시작하는데, 이러한 방어기작에 의해 병원균 감염 초기에 기주식물과 식물병원균간의 반응이 친화적 반응과 불친화적 반응으로 나뉘어 결정되고, 이에 따라 병의 진전을 제한시킬 수 있는지의 여부가 결정되는 것이다.

불친화적 반응에서, 감염된 식물은 자체의 인식작용에 의해 병원균의 침입을 인지하고, 이에 대하여 감염부위의 세포에 국부적 세포 죽음과 같은 과민성 반응(hypersensitive reaction), 캘러스(callose)의 축적, 리그닌(lignin)화에 의한 세포벽의 비후화 등의 반응을 나타내며, 피토알렉신(phytoalexin) 등 여러 종류의 항균성 물질을 생성하고, 소위 병생성 관련 단백질[pathogenesis related (PR) protein]이라 불리는 방어단백질을 생성하는 것으로 알려져 있다.

이러한 방어 기작들은 병원균이 침입하는 경우뿐만 아니라, 에틸렌이나 메틸자스모네이트 등 인위적인 화학적 자극에 의해서도 나타나며, 물리적 상처나 염도, 온도 등의 환경적 스트레스에 의해서도 나타난다고 보고되고 있다.

이렇게 인위적인 생물학적/물리적/환경적 스트레스를 줌으로써 유도되는 저항성을 일반적으로 유도저항성이라고 하는데, 이러한 저항성 유도 반응은 식물이 병원체에 대해 방어할 수 있는 능력에서 중요한 역할을 하는 신호전달경로로써 평가된다.

이것은, 이와 같은 유도저항성이 신호전달에 대한 모형으로서 흥미가 있으며 실용적인 가치가 있을 뿐만 아니라, 저항성을 일으키는 생화학적 변화를 이해함으로써, 병 저항성이 증진되는 유전공학적 식물을 개발하거나 식물의 저항성 유전기작을 촉진하도록 작동하는 식물보호 화학물질을 개발하는 데에 이용될 수 있기 때문이다.

근래, 이러한 유도저항성 연구는 유전공학적 기술의 개입에 의해 훨씬 더 그 발전 속도가 빨라졌는데, 종래에는 저항성 유도 처리를 한 후 저항성 발현 여부를 확인하기 위해 식물을 재배하고 병을 접종한 후 저항성이 나타나는지의 여부를 확인해야 했던 반면, 지금은 유도하고자 하는 저항성 관련 단백질을 코딩하는 유전자를 밝혀내고 이를 이용하여 실험실 수준에서 저항성 발현 여부를 확인할 수 있게 됨으로써, 포장(Field)에서의 작물재배, 병 접종, 병반 출현 여부 확인 등의 절차를 생략할 수 있게 되었기 때문이다.

이것은 전체적인 저항성 유도 시험의 주기를 단축함으로써 종래에 비해 더 짧은 시간 내에 더 많은 시험을 할 수 있게 되었음을 의미하며, 결국 더 우수한 저항성 품종을 개발할 수 있게 되었음을 의미한다.

그러나 이것은 유도하고자 하는 유전자 서열이 밝혀지고 이에 따라 해당 유전자의 클론이 확보되어 있다는 전제 하에 가능한 것으로서, 이러한 의미에서, 식물 병에 저항성을 나타내는 다양한 병생성 관련 단백질(PR protein)의 유전자 정보를 축적함으로써, 이를 이용한 식물병 저항성 탐색을 촉진하고 나아가 식물병 저항성 품종의 개발을 촉진시키는 것은 시급한 당면 과제라고 할 수 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 이와 같은 종래기술 상의 과제를 해결하기 위한 것으로서, 그 목적은, 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 대한 방어반응에 관여하는 것으로서 식물병저항성 관련 유전자의 하나인 CaPO2 단백질을 코딩하는 CaPO2 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 서열 정보 및 그에 따른 아미노산 서열 정보를 제공하는 것이다.

또한 본 발명은 상기 CaPO2 유전자를 이용하여 고추 세균성 점무늬병에 대한 저항성 존재 여부를 탐색하는 저항성 탐색 방법을 제공하고자 하는 것이다. 더 나아가, 이 유전자를 이용하여 식물병 또는 환경스트레스 저항성 형질전환 식물체를 제작하는데 그 목적이 있다.

발명의 구성

본 발명의 상기 목적은, 고추 세균성 점무늬병에 대해 저항성을 가진 것으로 알려진 고추 한별 품종(*Capsicum annuum* cv. Hanbyul)으로부터 mRNA를 분리한 다음 cDNA 라이브러리를 제조한 후 이를 스크린하여 신규 저항성 관련 유전자 CaPO2의 유전자를 선별한 후 그 염기서열을 결정하고, 고추에 병원균 또는 화학물질을 접종 또는 처리하여 상기 CaPO2 유전자의 발현 여부를 조사함으로써 달성하였다.

따라서 본 발명은, 실베스트리스 담배의 그 기능이 알려져 있지 않은 유전자와 85% 등의 상동성을 나타냄으로써 신규인 것으로 밝혀진 CaPO2 단백질을 코딩 유전자 CaPO2의 염기서열(서열번호 1) 및 아미노산 서열(서열번호 2)을 제공한다. 또한, 본 발명은 이 유전자를 이용하여 제조한 재조합 벡터 및 형질전환 식물을 제공한다.

나아가 본 발명은 세균, 화학물질 및 환경스트레스 중 어느 하나를 접종 또는 처리한 고추 식물체로부터 RNA를 분리하여 전기영동시키고 나이론막(Hybond N+)으로 전이시킨 후, ³²P를 처리한 제1항 기재의 CaPO2 유전자 프로브와 반응시켜 CaPO2 유전자의 차별적 발현을 확인함을 포함하여 구성되는, 식물체의 병저항성 및 환경스트레스 저항성 탐색방법을 제공한다.

이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구성을 상세하게 설명하면 다음과 같다.

먼저, 본 발명은 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균주 접종에 대해 저항성 반응인 과민성 반응을 나타내는 한별 고추 품종으로부터 mRNA를 분리하여 cDNA 라이브러리를 제작하고, 비병원성 균주를 접종한 고추식물의 잎과 접종하지 않은 건전한 고추식물에서 얻은 총 mRNA를 디옥시제닌(digoxigenin)으로 표지하여 프로브(Probe)를 만들고, 이 cDNA와 프로브를 이용 디퍼런셜 하이브리다이제이션(differential hybridization)을 수행하여 병저항성에 관련될 것으로 추정되는 유전자를 선발하여 클론을 수득하고, 이 클론 중 CaPO2 유전자로 확인된 유전자의 염기서열을 해독(Sequencing)함으로써, CaPO2로 명명하고 서열번호 1을 부여하였다(도 1 참조). 또한 본 발명은 본 발명에 의한 상기 CaPO2 유전자의 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열(서열번호 2)을 제공한다(도 1 참조).

고추 한별 품종(*Capsicum annuum* cv. Hanbyul)의 CaPO2 유전자는 고추 세균성 점무늬병에 대한 방어기작을 가지는 병생성 관련 단백질(PR protein)의 일종인 CaPO2 단백질을 코딩하는 유전자로써, 고추 식물에서 세균성 점무늬병에 대한 저항성 반응 동안 특이적으로 그 발현량이 급격히 증가되어 유지되는 것을 관찰할 수 있었다.

다음에, 본 발명은, 병원성 균주 또는 비병원성 균주를 접종한 고추 개체에서 선정된 기관에 대해 상기 CaPO2 단백질 유전자를 프로브로 이용하여 CaPO2 단백질 발현 여부를 확인하는 것으로 이루어지는, 식물병 및 환경스트레스 저항성 탐색방법을 제공하는 것에 관한 것이다.

또한, 본 발명은, 화학물질, 물리적 상처, 환경적 스트레스 등 병원성 세균이 아닌 비생물적 유도방법을 식물체에 적용하고, 이에 대하여 상기 저항성 탐색방법을 이용하여 CaPO2 단백질 발현 여부를 확인함으로써, 더 용이하고 시간을 절약할 수 있는 새로운 저항성 유도방법을 제공할 수도 있다.

본 발명에 의한 CaPO2 유전자가 다양한 식물병원균, 화학물질 또는 환경스트레스에 의해 차별적으로 유도 발현되는 것을 실험을 통해 확인하였다(도 3 내지 도 7 참조). 따라서 본 발명에 의한 CaPO2 유전자는 식물체의 저항성 탐색방법에 이용할 수 있다.

보다 구체적으로는 본 발명에 의한 식물체 병저항성 및 환경스트레스 저항성 탐색방법은 병원균, 화학물질 또는 환경스트레스 등을 접종 또는 처리한 식물체로부터 RNA를 분리하고 전기영동시키고 나일론막으로 전이시킨 후, ³²P를 처리한 상기 CaPO2 유전자 프로브와 반응시켜 CaPO2 유전자의 차별적 발현을 확인함을 포함하여 구성된다.

또한, 본 발명은 상기와 같이 염기서열이 제공된 CaPO2 유전자를 이용하여 재조합 벡터를 제조하여 식물체를 형질전환시켜, 병방어반응 및 환경스트레스 내성 증가를 통해 저항성 분자 육종의 재료를 제공할 수 있다.

보다 구체적으로는 본 발명에 의한 CaPO2 유전자를 아그로박테리움을 이용하여 애기장대 식물에 전이시켜 CaPO2 과다 발현 형질전환식물을 제조하여 식물병저항성 및 활성산소, 건조 등의 환경스트레스 저항성 생성여부를 확인하였다(도 8 내지 도 27 참조).

퍼옥시데이즈 유전자의 경우 현재 많은 수가 발견되고 클로닝 되었지만 병생성을 억제시킬 수 있는 퍼옥시데이즈의 보고는 그리 많지 않다. 대부분의 연구에서 퍼옥시데이즈들은 활성산소를 제거하는데 역할을 하는 것으로 알려져 있었으나 본 발명의 새로운 퍼옥시데이즈인 CaPO2의 경우 모델 식물인 애기장대풀을 이용한 실험 결과, 병원균 침입 시 특이적으로 활성 산소를 생성하고 식물체의 방어반응을 활성화 시켜줌으로써 병 생성을 억제시키는 것으로 나타났다(도 17 내지 20 참조).

또한 CaPO2를 과다 발현시킨 애기장대풀에 메틸비올로젠을 처리하여 활성산소 스트레스를 실험한 결과 퍼옥시데이즈의 본래 역할, 즉 활성산소를 제거하는 역할을 함으로써 식물체가 활성산소 스트레스에 내성을 지니게 되었고, 건조 스트레스에서도 또한 우수한 내성을 나타내었다(도 22 내지 도 27 참조). 따라서 본 발명은 새로운 저항성 형질전환 식물체의 제작에 기초가 될 것이다.

이하, 실시예들을 통해 본 발명을 더 구체적으로 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예들에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[실시예 1] 본 발명에 의한 CaPO2 유전자의 염기/아미노산 서열 결정

고추 세균성 점무늬병에 대한 병생성 관련 단백질(PR protein) 중 하나인 CaPO2 단백질 코딩 유전자 염기서열 및 그로부터 추론되는 아미노산 서열을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

고추 한별 품종(*Capsicum annuum* cv. Hanbyul)에 고추 세균성 점무늬병원균의 비병원성균주인 BV5-4a (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strain BV5-4a)를 접종하고 18시간 동안 습실 처리한 후 저항성 병반인 과민성반응이 나타난 식물체를 습실에서 꺼내어 잎을 수거하였다.

다음에, 수거된 잎 표본으로부터 mRNA를 추출하여 역전사한 후 이를 PCR(Polymerase Chain Reaction)증폭함으로써 cDNA 라이브러리를 제작하였다.

다음에, 이렇게 제작된 cDNA 라이브러리로부터 개개의 cDNA 클론을 제조하여 나이론막에 일정하게 흡착시킨 후, 각각 고추 세균성 점무늬병원균의 비병원성 균주를 접종한 고추식물의 잎과 접종하지 않은 건전한 고추식물의 잎에서 추출한 총 mRNA를 디옥시제닌(digoxigenin)으로 표지하여 프로브를 만든 다음, 디퍼런셜 하이브리다이제이션(differential hybridization)을 수행하였다.

하이브리다이제이션 결과 비병원성 균주 접종된 식물체의 mRNA 프로브에 대해서만 집중적으로 증폭되어 나타난 유전자를 병저항성에 관련된 유전자로 추정하고 클론을 수득하였다.

수득된 클론들을 해독(Sequencing)한 후, 블라스트 프로그램을 이용하여 그 5'-말단 서열을 GenBank에 등록된 유전자 데이터베이스와 비교함으로써 그 기능이 밝혀지지 않은 유전자임을 확인하고 CaPO2 유전자로 명명하였다.

이 유전자에서 유추한 아미노산 서열을 실베스트리스 담배에서 발견된 기능이 밝혀져 있지 않은 단백질의 아미노산 서열과 비교한 결과, 85 %의 상동성을 나타냄으로써 신규한 것임을 알 수 있었다.

확인된 CaPO2 유전자의 서열과 그로부터 추론된 아미노산 서열을 도 1에 나타내고, 각각 염기서열 1 및 염기서열 2로 표시하여 서열목록으로 제출하였다.

[실시예 2] 본 발명에 의한 CaPO2 유전자의 발현 탐색 방법

상기 실시예 1에서 수득한 CaPO2 유전자를 이용하여 식물체의 저항성을 탐색하기 위해 다음과 같이 시험하였다.

[실험예 1]

먼저 건전한 식물체에서 CaPO2 유전자의 발현을 살펴보기 위해 4엽기 고추식물체의 건전한 기관(잎, 줄기, 뿌리, 꽃, 푸른열매, 붉은열매)로부터 RNA를 분리하고, 분리한 RNA를 포름알데히드를 함유하는 겔 상에서 전기영동한 후 나이론막(Hybond N+)으로 전이시켰다.

다음에, 실시예 1에서 수득된 CaPO2 유전자를 제한효소 *EcoRI* 및 *XhoI*으로 각각 절단하고 삽입 DNA만을 회수하여 ^{32}P 로 표지한 후, 이를 반응액[0.25 M 인산완충액, 7% SDS, 1 mM EDTA, 5% 덱스트란 황산염(Dextran Sulfate)]에서 65℃로 16-24시간 동안 배양하여 하이브리다이제이션(hybridization)을 실시하였다.

이렇게 ^{32}P 로 표지된 상기 DNA 프로브는 나이론막에 붙어있는 mRNA에 붙게 되며 이 나이론막 위에 X-ray 필름을 얹게 되면 ^{32}P 로 표지된 DNA가 X-ray 필름을 감광시키므로, 이것으로 발현 여부를 알아볼 수 있게 하였다.

상기 노던블러팅 수행시 리보솜 RNA의 양을 모니터링 함으로써 동일량의 RNA 시료가 로딩되었음을 확인하였다.

이상의 실험결과를 도 2에 나타내었으며 CaPO2 유전자는 꽃에서 약한 발현을 보일뿐, 건전한 기관에서 발현을 살펴볼 수 없었다.

[실험예 2]

고추 세균성 점무늬병균 중 식물체와 친화적 반응을 나타내는 병원성균주 Ds1과 불친화적 반응을 나타내는 비병원성 균주 Bv5-4a를 배양한 후, 10^8 cfu/ml의 농도로 4엽기 고추식물체 1, 2엽의 뒷면에 주사기를 이용하여 인필트레이션(Infiltration)하여 접종하고, 접종 후에는 28°C, 100% 상대습도 조건에서 18시간 동안 습실처리 하였다.

접종 1, 5, 10, 15, 20, 25 시간 후에 각각 1, 2엽을 샘플링하여 RNA를 분리하고, 분리한 RNA를 포름알데히드를 함유하는 겔 상에서 전기영동한 후 나이론막 (Hybond N+)으로 전이시켰다.

다음에, 실시예 1에서 수득된 CaPO2 유전자를 제한효소 *EcoRI* 및 *XhoI*으로 각각 절단하고 삽입 DNA만을 회수하여 ^{32}P 로 표지한 후, 이를 반응액[0.25M 인산완충액, 7% SDS, 1mM EDTA, 5% 덱스트란 황산염(Dextran Sulfate)]에서 65°C로 16-24시간 동안 배양하여 하이브리다이제이션 (hybridization)을 실시하였다.

이렇게 ^{32}P 로 표지된 상기 DNA 프로브는 나이론막에 붙어있는 mRNA에 붙게 되며 이 나이론막 위에 X-ray 필름을 얹게 되면 ^{32}P 로 표지된 DNA가 X-ray 필름을 감광시키므로, 이것으로 발현 여부를 알아볼 수 있게 하였다.

상기 노던블러팅 수행시 리보솜 RNA의 양을 모니터링 함으로써 동일량의 RNA 시료가 로딩되었음을 확인하였다.

이와 같이 고추 세균성 점무늬병균의 병원성균주 접종 후 나타나는 친화적 반응과 비병원성균주 접종 후 나타나는 불친화적 반응에서 CaPO2 유전자의 발현 양상을 도 3에 나타내었다. 도 3에서 숫자는 접종한 후 고추잎 채취시까지의 경과시간을 나타낸다.

이상과 같은 시험 결과, 고추 세균성 점무늬병에 대한 고추식물의 저항성 반응은 병원성 균주와 비병원성 균주에 대하여 서로 대조적인 양상을 나타냈으며, 병원성 균주 즉, 친화적 반응에서는 CaPO2 유전자의 발현이 매우 약하게 관찰되었고, 비병원성 균주 즉, 불친화적 반응에서는, 5시간부터 발현하여 25시간째까지 그 발현양이 증가 유지되는 것을 관찰할 수 있었다.

[실시예 3] 화학적 유도체에 의한 본 발명에 의한 CaPO2 유전자의 유도 발현

본 발명에 의한 CaPO2 유전자가 통상 저항성 유도에 사용되는 화학적 유도체에 의해 유도될 수 있는지를 알아보고 그 구체적인 유도방법을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

[실험예 1]

먼저, CaPO2 유전자의 발현 유도에 유용한 유도체를 탐색하기 위하여, 식물병 저항성 발현의 유도에 관여한다고 알려진 화학물질들 중 앱시스산, 에틸렌, 메틸 자스모네이트, 살리실산, 비티에이치, β -아미노부티릭산 및 과산화수소를 사용하여 저항성 유도 시험을 실시하였다.

6엽기 고추식물 잎에 농도 100 μM 의 메틸 자스모네이트, 5 mM의 살리실산, 20 μM 의 비티에이치, 100 μM 의 앱시스산을 분무기로 고추잎의 앞뒷면에 뿌려 처리하였고, 이중 메틸 자스모네이트를 처리한 식물체는 비닐백으로 밀봉하였다. 앱시스산은 100 μM 의 앱시스산 수용액에 식물체의 뿌리를 담그고 같은 수용액을 고추잎에 스프레이하는 방법으로 처리하였으며, 과산화수소는 10mM의 과산화수소를 고추잎에 배침인필트레이션(vacuum-infiltration)하는 방법으로 처리하였고, 에틸렌은 농도 5 $\mu\text{l/L}$ 로 하여 기체상태로 식물체가 있는 밀폐된 유리 용기에 주입하는 방법으로 처리하였다.

처리 18시간 후 각각의 식물체에서 잎을 수거하였고, 대조구로 무처리한 식물체의 잎을 18시간 후에 함께 수거한 후, 각각의 샘플에서 RNA를 추출하였고 추출된 RNA를 이용하여 다음과 같이 노던블러팅을 수행하였다.

먼저, 추출된 RNA를 포름알데히드를 함유하는 겔 상에서 전기영동한 후 나이론막 (Hybond N+)으로 전이시켰다.

다음에, 실시예 1에서 수득된 CaPO2 유전자를 제한효소 *EcoRI* 및 *XhoI*으로 각각 절단하고 삽입 DNA만을 회수하여 ^{32}P 로 표지한 후, 이를 반응액[0.25 M 인산완충액, 7 % SDS, 1 mM EDTA, 5 % 덱스트란 황산염 (Dextran Sulfate)]에 첨가하고 65°C에서 16-24시간 동안 배양하여 하이브리다이제이션 (hybridization)을 실시하였다.

이때 ^{32}P 로 표지된 상기 DNA 프로브는 나이론막에 붙어있는 상보적 mRNA에 붙게 되며 이 나이론막 위에 X-ray 필름을 얹게 되면 ^{32}P 로 표지된 DNA가 X-ray 필름을 감광시키므로 이것으로 발현 여부를 알아볼 수 있다.

에틸렌, 메틸 자스모네이트, 살리실산, 앱시스산, 과산화수소에 대해서, CaPO2 유전자의 더 상세한 발현 양상을 알아보기 위해 각각의 유도물질을 처리하고 시간별로 유전자 발현 양상을 관찰하는 다음의 시험을 실시하였다.

각각의 시험에서 노던블러팅 수행시 리보솜 RNA의 양을 모니터링 함으로써 동일량의 RNA 시료가 로딩되었음을 확인하였으며, 대조구로서 어떤 물질도 처리하지 않은 건전잎을 사용하였다.

[실험예 2]

앱시스산의 처리 후 시간별 CaPO2 저항성 유도효과를 알아보기 위하여, 고추식물의 잎의 앞뒷면에 100 μM 농도의 앱시스산을 분무기로 골고루 분무 처리하고 비닐백으로 밀봉한 다음, 각각 1, 5, 10, 15, 20, 25시간 후에 잎을 수거하였다.

각각의 샘플에서 RNA를 추출한 후, 상기 실험예 1에서와 동일한 방법으로 노던블러팅을 수행함으로써, 앱시스산 처리후 CaPO2의 시간별 발현양상을 알아보았으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

시험 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, CaPO2 유전자는 처리 후 1시간부터 축적되기 시작하여 25시간까지 유지되었다.

[실시예 4] 환경적 스트레스에 의한 CaPO2 유전자의 유도 발현

본 발명의 CaPO2 유전자가 환경적 스트레스에 의해 유도될 수 있는지를 알아보고 그 구체적 유도방법을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

각각의 시험에서 노던블러팅 수행시 리보솜 RNA의 양을 모니터링 함으로써 동일량의 RNA 시료가 로딩되었음을 확인하였으며, 대조구로서 어떤 스트레스도 처리하지 않은 건전잎을 사용하였다.

[실험예 1]

본 발명의 CaPO2 유전자가 상처 스트레스에 의해 유도될 수 있는지를 알아보고 그 구체적 유도방법을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

고추식물에 상처 스트레스를 처리하기 위해 식물체의 잎을 바늘로 찔러 잎 전체에 걸쳐 상처를 낸 후 각각 1, 5, 10, 15, 20, 25시간이 지나 잎을 수거하였다.

각각의 샘플에서 RNA를 추출한 후, 상기 실시예 3의 실험예 1에서와 동일한 방법으로 노던블러팅을 수행함으로써, 상처 스트레스 처리 후 시간경과에 따른 CaPO2의 발현양상을 알아보았으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

시험 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, CaPO2 유전자는 처리 후 1시간부터 발현되기 시작하여 25시간까지 유지되었다.

[실험예 2]

본 발명의 CaPO2 유전자가 건조 스트레스에 의해 유도될 수 있는지를 알아보고 그 구체적 유도방법을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

건조 처리 후 시간별 CaPO2 저항성 유도효과를 알아보기 위하여, 고추식물체의 뿌리에서 흙을 제거하고, 각각 1, 5, 10, 15, 20, 25시간 후에 잎을 수거하였다.

각각의 샘플에서 RNA를 추출한 후, 상기 실시예 3의 실험예 1에서와 동일한 방법으로 노던블러팅을 수행함으로써, 건조 스트레스 처리 후 CaPO2의 시간별 발현양상을 알아보았으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

시험 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, CaPO2 유전자는 잎에서 1시간부터 발현하여 25시간까지 그 발현량이 유지되었다.

[실험예 3]

본 발명의 CaPO2 유전자가 저온 스트레스에 의해 유도될 수 있는지를 알아보고 그 구체적 유도방법을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

저온처리를 위해 고추 식물체를 4 ℃로 유지되는 냉장실에 보관하면서 각각 1, 5, 10, 15, 20시간 후에 잎을 수거하였다.

각각의 샘플에서 RNA를 추출한 후, 상기 실시예 3의 실험예 1에서와 동일한 방법으로 노던블러팅을 수행함으로써, 저온 스트레스 처리 후 시간경과에 따른 CaPO2의 발현양상을 알아보았으며, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

시험 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, CaPO2 유전자는 잎에서 1시간대에 처음으로 발현하여 20시간까지 유지되는 경향을 나타내었다.

[실시예 5] 식물 세포 내에서 본 발명에 의한 CaPO2 단백질의 위치 확인

식물 세포 내에서 CaPO2 단백질이 어디로 이동하게 되는지 알아보기 위하여 실시예 1에서 수득한 CaPO2 유전자의 3'-말단에 그린플루오레센트 단백질을 퓨전하여 양과 표피세포에서 발현시킨 후 24시간 뒤 콘포컬(confocal)현미경을 이용하여 관찰하였다. 그 결과 도 8에서 나타난 것처럼 CaPO2 단백질이 세포간극으로 이동하는 것을 관찰할 수 있었다.

[실시예 6] CaPO2 유전자를 이용한 형질전환 식물체의 제조 및 CaPO2 유전자 과다 발현에 의한 식물체의 병 저항성 유도

식물체에서의 CaPO2 유전자 과다 발현시 다른 병발생관련 유전자들의 유도 여부, 세균성 병에 대한 저항성의 증가 여부 및 환경스트레스에 대한 내성의 증가 여부를 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수득한 CaPO2 유전자를 Stratagene에서 제공하는 pBIN35S 벡터에 도입시켜 재조합벡터 pBIN35S::CaPO2을 제조하고 그 지도를 도 9에 나타내었다.

이렇게 제조한 재조합벡터 pBIN35S::CaPO2를 아그로박테리움 튜메파이엔스(*Agrobacterium tumefaciense* strain EHA105)에 전기천공법(electroporation)을 통하여 도입하고 다시 재조합벡터가 들어가 있는 EHA105균주를 꽃침지(floral dipping) 방법을 이용하여 애기장대에 도입함으로써 CaPO2 유전자를 과다 발현시켰다. 도 10은 본 발명에 의한 CaPO2 유전자를 과다 발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 CaPO2 유전자가 과다 발현되는 것을 관찰한 결과를 나타내는 도면이고, 도 11은 본 발명에 의한 CaPO2 유전자를 과다 발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 퍼옥시다아제 활성이 증가된 것을 관찰한 결과를 나타내는 도면이다.

상기와 CaPO2 유전자를 과다 발현시키고 하기와 같은 식물체의 병 저항성 유도시험을 수행하였다.

[실험예 1]

CaPO2 유전자가 과다 발현된 식물체에서 세균성 병에 대한 저항성이 증가하였는지의 여부를 알아보기 위하여 상기 CaPO2 유전자가 과다 발현된 애기장대와 대조구로서의 야생형 애기장대 식물체에 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 균주를 접종하여 그 결과를 도 12 및 도 13에 나타내었다. 상기 도면에서 여기서 #2, #11, #13은 시험에 사용된 형질전환 식물의 계통 번호를 나타낸다.

도 12는 본 발명에 의한 CaPO2 유전자를 과다 발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 세균성 흑반병원균인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000) 균주에 대한 병저항성이 나타난 식물체의 사진이다.

또한 도 13은 상기 균주 접종일과 3일 후에 잎을 수거하여 1그램당 세균수를 측정하여 그 결과를 나타낸 그래프이다. 시험 결과, 0, 1, 3, 5일 후 모든 형질전환계통 식물이 야생형에 비해 세균성 병에 대한 병저항성을 가지고 있는 것으로 나타났다.

[실험예 2]

CaPO2 유전자가 과다 발현된 식물체에서 저항성 반응이 나타나는 이유를 알아보기 위해 트리판블루 염색(trypan blue staining), 댁 염색(DAB staining), 전기전도도 측정(ion leakage) 등을 수행하였다. 도 14와 도 15에 나타난 것처럼 트리판블루 염색결과 CaPO2 유전자가 과다 발현된 식물체에서 저항성 식물에서 나타나는 과민성 세포사멸 반응이 관찰되었으며, 도 16에 나타난 것처럼 전기전도도가 형질전환 애기장대 식물계통에서 야생형보다 높게 나타나는 것을 볼 수 있었다. 이때 퍼옥시데이즈의 활성화에 의해 활성 산소의 증가가 나타나는 것을 도 17에 나타내었다.

이때 애기장대풀에서 저항성 관련 유전자로 알려진 AtNPR1, AtPR1, AtPR5의 발현 정도를 알티-피시알(RT-PCR)과 리얼타임 알티-피시알(Real time RT-PCR)을 통해 살펴본 결과를 도 18에 나타내었다. 그 결과 CaPO2 유전자가 과다 발현된 식물체에서 특이적으로 AtNPR1, AtPR1, AtPR5 유전자의 발현이 증가되는 것을 관찰하였다.

[실험예 3]

CaPO2 유전자가 과다 발현된 식물체에서 세균성 흑반병균의 비병원성 균주 (*avrRpm1*, *avrRpt2*)에 대한 저항성 증가 여부를 관찰하기 위해 트립판 블루 스테이닝, 전기전도도 측정을 수행하고 애기장대의 저항성 관련 대표 유전자인 AtPR1의 발현을 노던블러팅을 통해 살펴보았다. 도 19에서 나타난 것처럼 CaPO2 유전자가 과다 발현된 애기장대 식물체에서 세포사멸(Cell Death)의 증가로 인한 트립판 블루 스테이닝이 더 많이 나타나는 것을 관찰할 수 있었고, 마찬가지로 전기전도도가 더욱 빨리 증가하는 것을 도 20에 나타내었다. 이때 도 21에 나타났듯이 AtPR1 유전자 발현을 살펴본 결과 에이브이알알피엠원(*avrRpm1*)을 가지는 세균성 흑반병균 접종시 발현의 속도나 양에서 큰 차이가 없었지만 에이브이알알피티투(*avrRpt2*)를 가지는 세균성 흑반병균을 접종했을 경우 발현 속도가 5시간 앞당겨지는 것을 관찰할 수 있었다.

[실시예 6] 본 발명에 의한 CaPO2 유전자 과다발현에 의한 식물체의 환경스트레스 내성 유도

CaPO2 유전자가 과다 발현된 식물체에서 환경스트레스에 대한 내성이 증가하였는지 여부를 알아보기 위하여, CaPO2 유전자가 과다 발현된 식물체를 메틸비올로젠을 처리하여 얻어진 결과를 도 22, 23, 24, 25에서 나타내었고 건조 스트레스를 처리하여 내성을 보임을 나타내는 결과가 도 26, 27에 보여주고 있다.

시험 결과, 본 발명에 의한 CaPO2 유전자가 과다 발현된 식물체는 메틸비올로젠과 건조조건에 대하여 내성을 가지는 것으로 나타났다.

발명의 효과

상술한 바와 같이, 본 발명이 완성됨으로써, 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 대한 방어반응에 관여하는 것으로서 식물병저항성 관련 유전자의 하나인, 그 기능이 퍼옥시다아제 단백질을 코딩하는 CaPO2 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 서열 정보 및 그에 따른 아미노산 서열 정보를 제공함과 동시에, 이 유전자를 이용하여 식물병저항성과 환경스트레스저항성 탐색방법을 제공할 뿐 아니라 저항성 식물 육종 및 형질전환 식물체 제작에 기여할 수 있게 된 것이다. 따라서 본 발명은 저항성 품종 개발을 촉진시킬 수 있는 효과가 있으므로 식물육종 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 의한 고추 한별 품종(*Capsicum annuum* L. cv. Hanbyul)으로부터 클로닝한 CaPO2 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸 도면이고,

도 2는 고추 한별 품종의 각 기관에서의 본 발명에 의한 CaPO2 유전자 발현 결과를 나타낸 도면이고,

도 3은 고추 한별 품종에 병원성의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)과 비병원성 고추 세균성 점무늬병균을 접종하였을 때 접종된 잎과 접종되지 않은 잎에서의 본 발명에 의한 CaPO2 유전자 발현 유도 결과를 나타낸 도면이고,

도 4는 앱시스산(Abscisic acid)을 처리한 후 시간별로 본 발명에 의한 CaPO2 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸 도면이고,

도 5는 상처 스트레스를 처리한 후 시간별로 본 발명에 의한 CaPO2 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸 도면이고,

도 6은 건조 스트레스를 처리한 후 시간별로 본 발명에 의한 CaPO2 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸 도면이고,

도 7은 저온 처리를 한 후 시간별로 본 발명에 의한 CaPO2 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸 도면이고,

도 8은 그린 플루오레센트 단백질(Green Fluorescent Protein: GFP)이 퓨전 된 본 발명에 의한 CaPO2 단백질을 양파의 표피세포에서 과다 발현시켜, CaPO2 단백질이 세포 간극으로 이동한 것을 관찰한 결과를 나타내는 도면이고,

도 9는 본 발명에 의한 CaPO2 유전자가 삽입된 재조합 벡터 pBIN35S::CaPO2의 지도 (Vector map)이고,

도 10은 본 발명에 의한 CaPO2 유전자를 과다 발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 CaPO2 유전자가 과다 발현되는 것을 관찰한 결과를 나타내는 도면이고,

도 11은 본 발명에 의한 CaPO2 유전자를 과다 발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 퍼옥시다아제 활성이 증가된 것을 관찰한 결과를 나타내는 도면이고,

도 12는 본 발명에 의한 CaPO2 유전자를 과다 발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 세균성 흑반병원균인 수도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000) 균주에 대한 병저항성이 나타난 식물체의 사진이고,

도 13은 본 발명에 의한 CaPO2 유전자를 과다 발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 세균성 흑반병원균인 수도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 균주에 대한 병저항성 검정 결과를 나타낸 도면이고,

도 14는 본 발명에 의한 CaPO2 유전자를 과다 발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 세균성 병원균인 수도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 균주에 대한 병저항성 과정 중 세포사멸이 일어난 것을 관찰한 사진이고,

도 15는 도 14에서 관찰한 세포사멸의 정도를 숫자화 하여 그래프로 표현한 도면이며,

도 16은 세포사멸 과정 중 본 발명에 의한 애기장대 형질전환 식물체에서 전기전도도가 증가하는 것을 관찰한 도면이고,

도 17은 본 발명에 의한 CaPO2 유전자를 과다 발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 세균성 흑반병원균인 수도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 균주를 접종하였을 때 활성산소(Reactive Oxygen Species: ROS)가 증가하는 것을 관찰한 결과를 나타낸 도면이고, 이때 퍼옥시다제(Peroxidase)와 엔에이디피에이치 옥시데이즈(NADPH oxidase) 효소의 억제제인 포타슘싸이아나이드(KCN)와 디페닐렌아이오도늄 클로라이드(Diphenyl-eneiodonium chloride: DPI)를 각각 처리하여 병원균 접종시 활성산소의 증가가 엔에이디피 옥시데이즈가 아닌 퍼옥시다제에 의한 것임을 DAB 염색방법을 사용하여 살펴 본 결과이고,

도 18은 본 발명에 의한 CaPO2 유전자를 과다 발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 세균성 흑반병원균인 수도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 균주를 접종하였을 때 저항성 관련 애기장대 유전자인 *AtNPR1*, *AtPR1*, *AtPR5*의 발현이 증가되는 것을 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

도 19는 본 발명에 의한 CaPO2 유전자를 과다 발현시킨 형질전환 애기장대 식물에 세균성 흑반병원균인 수도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000의 비병원성 균주를 접종하였을 때, 세포사멸이 CaPO2 유전자를 과다 발현시키지 않은 애기장대 식물(대조구)에 비해 증가되는 것을 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

도 20은 본 발명에 의한 CaPO2 유전자를 과다 발현시킨 형질전환 애기장대 식물에 세균성 흑반병원균인 수도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000의 비병원성 균주를 접종하였을 때, 세포사멸의 속도와 양을 전기전도도를 측정함으로써 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

도 21은 본 발명에 의한 CaPO2 유전자를 과다 발현시킨 형질전환 애기장대 식물에 세균성 흑반병원균인 수도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000의 비병원성 균주를 접종하였을 때, 세포사멸 과정 중 저항성 관련 애기장대 유전자인 *AtPR1*의 발현을 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

도 22는 100 μ M(마이크로몰)농도의 메틸비올로젠(methyl violgen)을 함유한 엠에스(MS) 배지에서 본 발명에 의한 형질 전환 식물체의 발아율이 증가하는 것을 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

도 23은 1 μ M(마이크로몰)농도의 메틸비올로젠을 처리하였을 때 본 발명에 의한 형질전환 식물체에서 클로로필의 파괴가 지연되는 것과, 활성산소 (H_2O_2)의 축적이 억제되는 것을 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

도 24는 도 23에서 나타난 결과를 클로로필의 함량을 측정함으로써, 저항성을 정량한 결과를 나타낸 도면이며,

도 25는 1 μ M의 메틸비올로젠을 처리한 후 발명에 의한 형질전환 식물체에서 AtGST1 애기장대 유전자의 발현정도를 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

도 26은 본 발명에 의한 CaPO2 유전자를 과다 발현시킨 형질전환 애기장대 식물과 과다 발현시키지 않은 대조 식물 간에 증산율의 차이를 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

도 27은 본 발명에 의한 CaPO2 유전자를 과다 발현시킨 형질전환 애기장대 식물과 비형질전환 대조 식물을 15일간 물을 주지 않고 키운 뒤, 건조에 대한 생존율을 검증한 결과를 나타낸 도면이다.

도면

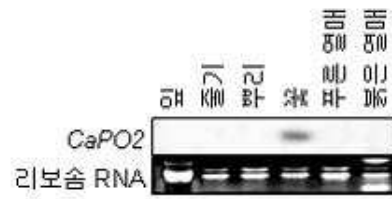
도면1

```

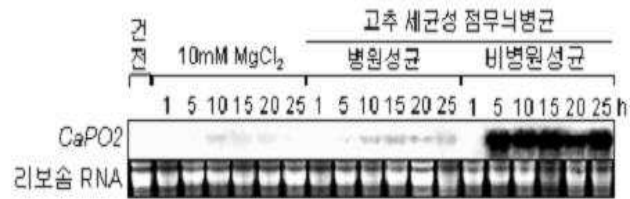
ggcaccgaagttcgaatgagctatttcaaacactctttgcccgtgttgcctctatatt 60+
      ■ S I S N N S F A A V A A I F
TCTCTTGTCTACTCTGTAGCATGCAATGTCATGCACAACTTTCTCCACATTCTATGAT 120+
S L V L L C S M Q C H A Q L S S T F Y D
CGTGCTTGCCTAATGCCACTCAACACGATTCTGTAAGTGTAGACAAGCAGTTTCAGCT 180+
R A C P N A L N T I R K S V R Q A V S A
GAACGTCGGATGGCTGCATCCCTCATTCCGCTTCATTTCATGATTGCTTTGTTACGGGT 240+
E R R M A A S L I R L H F H D C F V Q G
TGTGATGCTTCTATCTTACTTGATGAGACCCACTATTGTCAGTGACAAAACGGCATTG 300+
C D A S I L L D E T P T I V S E K T A L
CCAAATCTGGATCAGTTAGAGGATATGGTATTATAGAAGATGCTAAAAGAGAGCTTGAA 360+
P N L G S V R G Y G I I E D A K R E L E
AAAACATGTCAGGAATTGTATCATGTGCTGACATACTGTCAGTTGCTGCCAGGGATGCG 420+
K T C P G I V S C A D I L A V A A R D A
TCGACTCTCGTTGGAGGTCCATCATGGACAGTGAACCTTGAAGAAGAGATTCTACCACT 480+
S T L V G G P S W T V K L G R B D S T I
GCAAGTCATACTCTTGCAAAAACGGATCTCCCTGGTCTTTTGATCCTCTTACTAGGCTT 540+
A S H T L A E T D L P G P F D P L T R L
ATTTCCTGGCTTTGCCAAAAGGCTTAGCACAAGGGACATGGTTGCTTTATCAGGATCA 600+
I S G F A K K G L S T R D M V A L S G S
CATTCAATAGGTCAAGCACAATGTTCTCTTCCGTGATAGGATTTACAGTAATGGAACA 660+
H S I G Q A Q C F L F R D R I Y S N G T
GACATTGATGCTGGATTTGCTAGCACTAGAAGACGTGGGTGCTCCTCAAGAAGATCAAAAT 720+
D I D A G F A S T R R R R C P Q E D Q N
GGAAACCTAGCTCCACTTGATTTGGTCACACCAATCAATTGGATAACAACATTTTCAAG 780+
G N L A P L D L Y T P N Q L D N N Y F K
AACTTGAGGCAAGAAAAGGTCTTCTTCAATCTGATCAAGTCTTTTGAGTGGTGGATCT 840+
N L R Q R K G L L Q S D Q V L L S G G S
ACCGATGATATTGTTTAGAATAGCAATAGCCCTCGAGCATTGCTCTGATTTTCGCT 900+
T D D I V L E Y S N S P R A F A S D F A
GCTGCCATGATTAGAATGGGAGATATCAGTCCCTTAAGTGGTTCAATGGAATCATAAGA 960+
A A M I R M G D I S P L T G S N G I I R
ACTGTGTGTGGAGCTATAAATTAACTTTTCAAAAGCCTATGCTTAAATGTTTCAAAAGTT 1020+
I V C G A I N *
atttaattacattcatattgattctttatccatagatttttcaataaaatgaata 1080+
aattcttcttattgctccctttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1121+

```

도면2



도면3



도면4



도면5



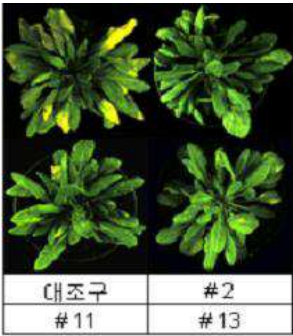
도면6



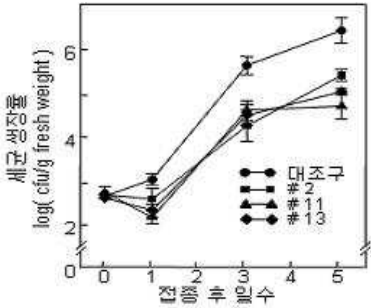
도면7



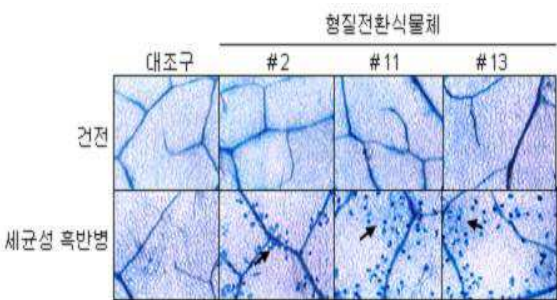
도면12



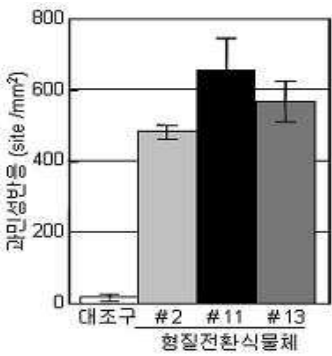
도면13



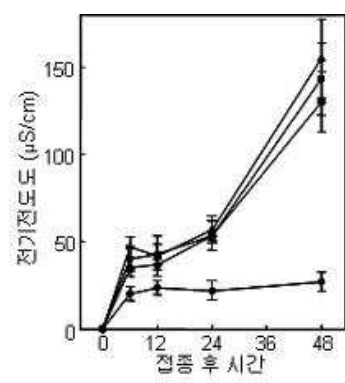
도면14



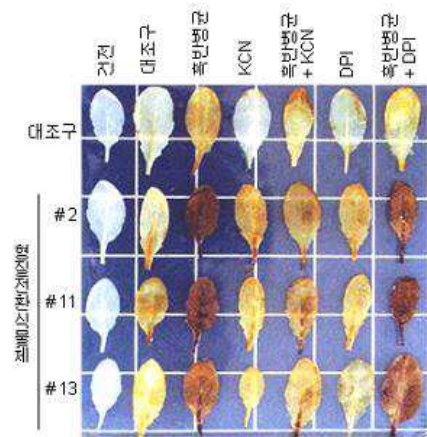
도면15



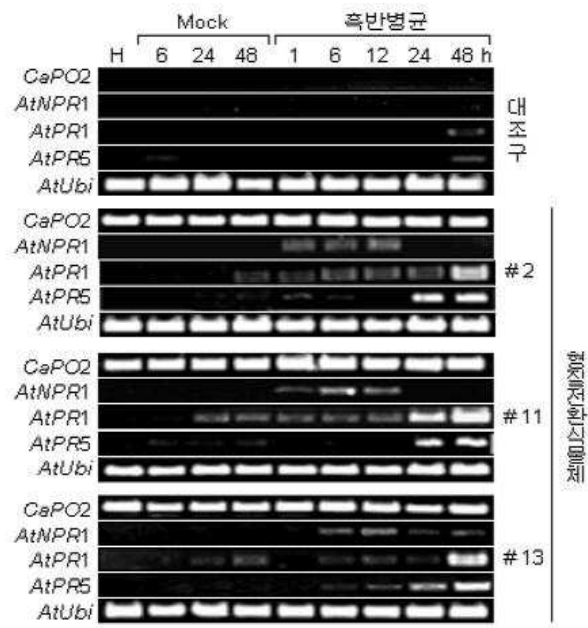
도면16



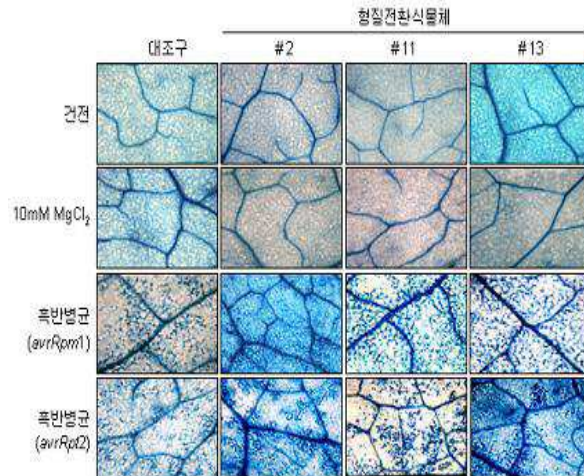
도면17



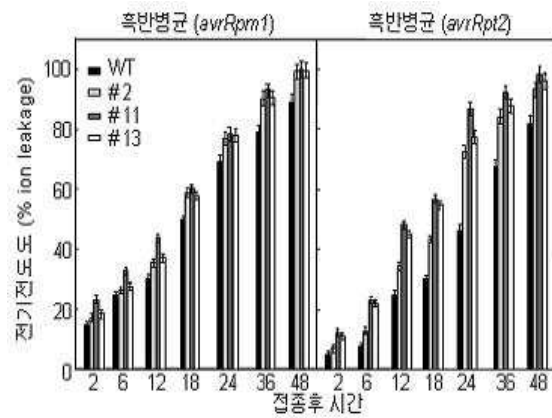
도면18



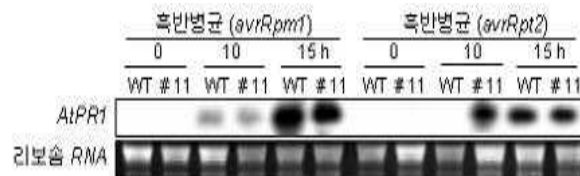
도면19



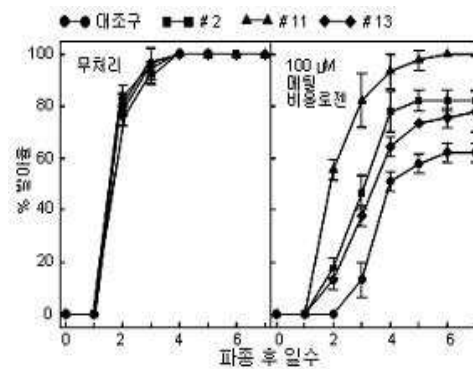
도면20



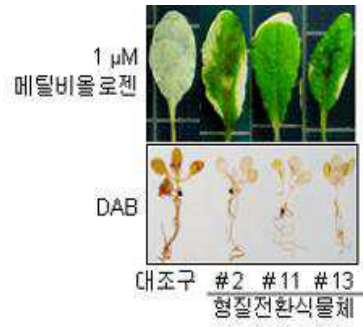
도면21



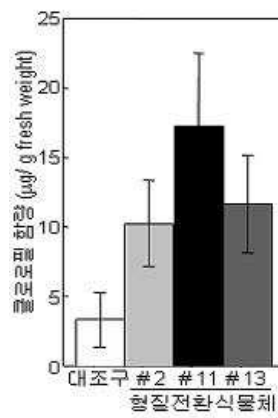
도면22



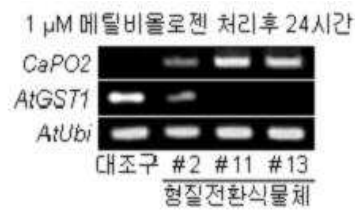
도면23



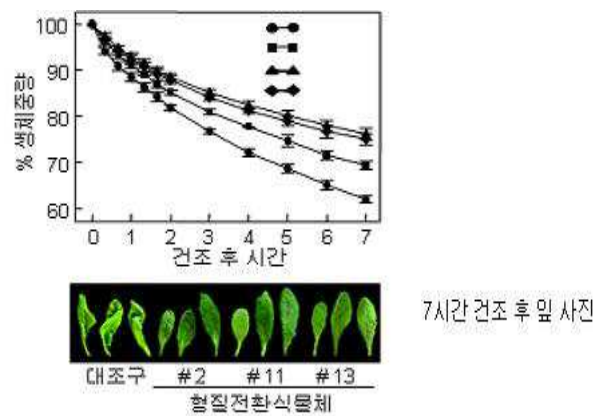
도면24



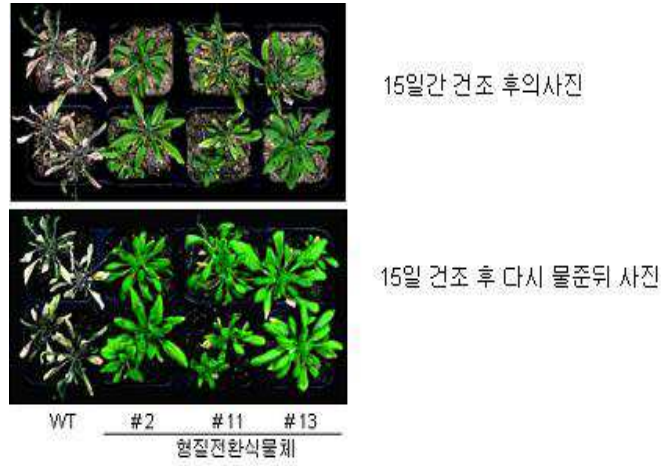
도면25



도면26



도면27



서열목록

서열목록 전자파일 첨부