

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2013년 10월 17일 (17.10.2013)



(10) 국제공개번호  
WO 2013/154233 A1

- (51) 국제특허분류:  
A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/29 (2006.01)  
C12N 15/86 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/006480
- (22) 국제출원일: 2012년 8월 14일 (14.08.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2012-0037952 2012년 4월 12일 (12.04.2012) KR  
10-2012-0081327 2012년 7월 25일 (25.07.2012) KR
- (71) 출원인 (US을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 곽
- (75) 발명자/출원인 (US에 한하여): 문제선 (MOON, Jae Sun) [KR/KR]; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 이수현 (LEE, Su Heon) [KR/KR]; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 김성욱 (KIM, Sung Uk) [KR/KR]; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 유란희 (YOO, Ran Hee) [KR/KR]; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 임승모 (LIM, Seung Mo) [KR/KR]; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 임현섭 (LIM,

Hyoun Sub) [KR/KR]; 305-335 대전시 유성구 대학로 79, Daejeon (KR). 황인규 (HWANG, In Gyu) [KR/KR]; 137-836 서울시 서초구 방배 4동 840-1 샤인힐 6차 401호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 최규환 (CHOI, Kyu Whan); 302-120 대전시 서구 한밭대로 745 12층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

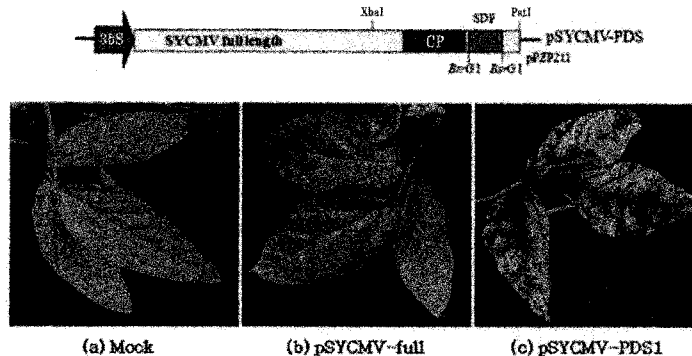
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: SYCMV-DERIVED RECOMBINANT VIRUS VECTOR, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: SYCMV 유래의 재조합 바이러스 벡터 및 이의 용도

[Fig. 7]



(57) Abstract: The present invention relates to a soybean yellow common mosaic virus (SYCMV)-derived recombinant virus vector comprising a promoter and a full-length SYCMV nucleic acid sequence, and comprising a restriction enzyme site for inserting exotic genes into shell protein coding genes of the full-length SYCMV sequence or between shell protein coding genes and the 3'-end of the SYCMV sequence. The present invention also relates to: a method for analyzing the function of exotic genes using the recombinant virus vector and a method for over-expressing exotic genes; a method for producing a plant body having silenced exotic genes using the recombinant virus vector and a method for producing a plant body having over-expressed exotic genes; and a plant body produced by the method; the seeds of the plant body; and the SYCMV genes consisting of the base sequence of sequence number 1.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

**규칙 4.17 에 의한 선언서:**

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

**공개:**

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 프로모터 및 전장 (full length) SYCMV (soybean yellow commom mosaic virus) 핵산 서열을 포함하고, 상기 전장 SYCMV 서열 중 외피 단백질 코딩 유전자 내 또는 외피 단백질 코딩 유전자와 SYCMV 서열의 3'-말단 사이에 외래 유전자를 삽입할 수 있는 제한효소 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 SYCMV 유래의 재조합 바이러스 벡터, 상기 재조합 바이러스 벡터를 이용한 외래 유전자의 기능을 분석하는 방법 및 외래 유전자 과발현 방법, 상기 재조합 바이러스 벡터를 이용한 외래 유전자가 침묵된 식물체의 제조 방법 및 외래 유전자가 과발현된 식물체의 제조 방법, 상기 방법으로 제조된 식물체 및 이의 종자 및 서열번호 1 의 염기 서열로 이루어진 SYCMV 유전자에 관한 것이다.

## 명세서

### 발명의 명칭: SYCMV 유래의 재조합 바이러스 벡터 및 이의 용도

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 SYCMV 유래의 재조합 바이러스 벡터 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 프로모터 및 전장 (full length) SYCMV (soybean yellow commom mosaic virus) 핵산 서열을 포함하고, 상기 전장 SYCMV 서열 중 외피 단백질 코딩 유전자 내 또는 외피 단백질 코딩 유전자와 SYCMV 서열의 3'-말단 사이에 외래 유전자를 삽입할 수 있는 제한효소 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 SYCMV 유래의 재조합 바이러스 벡터, 상기 재조합 바이러스 벡터를 이용한 외래 유전자의 기능을 분석하는 방법 및 외래 유전자 과발현 방법, 상기 재조합 바이러스 벡터를 이용한 외래 유전자가 침묵된 식물체의 제조 방법 및 외래 유전자가 과발현된 식물체의 제조 방법, 상기 방법으로 제조된 식물체 및 이의 종자 및 서열번호 1의 염기 서열로 이루어진 SYCMV 유전자에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 콩은 전 세계에서 경제적으로 매우 중요한 작물이다. 우리가 항상 섭취하는 음식과 사료용으로 많이 이용하고 있으며 더욱이 최근에는 바이오 디젤의 원료로서 많은 연구가 진행되고 있다. 따라서 전 세계 연구원들은 콩이 가지고 있는 수많은 유용 유전자들의 발굴과 연구로 인한 품종 개발에 집중하고 있으며, 특허를 통한 원천기술을 선점하기 위해 노력하고 있다.
- [3] 작물이 가지고 있는 유전자들의 기능을 연구하기 위해서는 유전자들 각각의 돌연변이체가 필요하다. 지금까지는 이러한 대량의 돌연변이체를 얻기 위해 T-DNA 녹아웃 돌연변이체 (knockout mutant) 등을 주로 사용하였으며, 몇몇 작물에서는 식물 바이러스를 이용한 VIGS (Virus-induced gene silencing) 방법을 사용하였다. 하지만 T-DNA 녹아웃 돌연변이체를 얻기 위해서는 형질전환기술이 반드시 필요하며, 불행히도 콩에서는 아직 대량으로 형질전환할 수 있는 기술이 전무하다. 또한, 외래 유전자를 도입하여 신기능의 작물을 개발함에 있어서 외래 유전자 도입에 따른 효과를 가시적으로 얻기 위해서는 도입 유전자의 안정적이고 높은 발현 수준 및 목적 유전자가 도입된 돌연변이체가 필요하다. 따라서 콩에서 유용 유전자 연구 및 유용 단백질 생산을 위해서는 대량의 효율적인 형질전환이 가능하고, 콩에서 사용 가능한 효과적인 바이러스 벡터가 반드시 필요하다.
- [4] 콩에서 사용할 수 있는 바이러스 벡터의 개발을 위해서는 콩에 발생하는 새로운 바이러스의 탐색이 필요하다. 모든 바이러스들은 각각의 병원성, 기주 범위 및 침묵현상 억제자 (silencing suppressor)의 효율이 모두 다르므로 끊임없는 VIGS 벡터의 탐색과 연구가 반드시 필요하다. 또한 바이러스로 인한 기주의

병징이 나타나지 않게 하는 것이 중요하다. 이것은 바이러스에 대한 수많은 품종별 병징 조사를 통하여 정상적으로 바이러스의 증식은 이루어지면서 병징이 나타나지 않는 품종을 선별함으로써 해결할 수 있다.

- [5] 식물 바이러스 내 유전자에는 식물체 내에서 일어나는 침묵현상을 억제하는 억제자 (suppressor)가 존재하는데 이들 유전자로 인하여 실제로 VIGS 효과가 효율적으로 일어나기 어려운 경우가 많이 있으며 이들 억제자의 기작과 능력은 바이러스별로 조금씩 다르다고 알려져 있다. 또한 VIGS 실험에서 중요한 점은 식물체에서 벡터로 사용한 바이러스의 병징과 VIGS로 인한 표현형(phenotype)의 혼돈을 일으키지 않아야 한다는 것이다. 따라서 이러한 조건을 모두 만족시키는 바이러스 벡터의 개발이 필요하다.
- [6] 현재 여러 작물에서 VIGS를 이용하여 유전자 기능 분석을 진행하고 있으며, 담배, 토마토, 고추, 애기장대 등에서 담배 래틀 바이러스 (Tobacco rattle virus; TRV) 벡터를 주로 이용하고 있다 (Ratcliff F. et al., Plant J. Jan;25(2):237-45, 2001). 콩의 경우에는 TRV 벡터와 같이 강력한 침묵 효과를 기대할 수 있는 바이러스 벡터가 아직 없으며, 현재 미국에서 강낭콩 꼬투리 얼룩 바이러스 (Bean pod mottle virus; BPMV) 벡터가 개발되어 연구가 진행되고 있다 (US 2007/0214518 A1 (Ghabrial, S. A.) Sep. 13, 2007).
- [7] 콩에서 VIGS 벡터 또는 재조합 단백질 발현 벡터로 사용할 수 있는 바이러스의 발굴을 위해서는 기존에 보고된 바이러스만을 가지고는 한계가 있다. 많은 연구에서 이미 보고된 바이러스들의 벡터로서의 가능성에 대한 연구를 대부분 끝마쳤기 때문에 지속적인 새로운 바이러스의 탐색이 필요하다. SYCMV (soybean yellow common mosaic virus)는 단일 가닥 양성 RNA 게놈 (single strand positive RNA genome)을 갖는 최근 국내에서 처음 발견된 바이러스로 아직 그 연구가 미진한 상태이다. 지금까지의 VIGS 벡터는 대부분 두 가닥의 RNA 바이러스 (담배 래틀 바이러스, 강낭콩 꼬투리 얼룩 바이러스 등)를 이용하였으며 SYCMV와 같이 한 가닥의 RNA 바이러스를 이용한 예는 극히 드물다. 따라서 새로운 바이러스인 SYCMV를 이용한 VIGS 벡터에서 지금까지 개발된 VIGS 벡터보다 더욱 효과적인 유전자 침묵 (silencing) 효과가 요구된다. 또한, 콩 식물의 효율적인 형질전환을 통해 경제적으로 가치있는 유용 단백질을 발현하는 콩 식물체 및 기능성 콩의 생산에 SYCMV 유래의 재조합 벡터가 사용될 수 있는지 검증이 필요하다.
- [8] 한국등록특허 제0795367호에는 '병원균에 저항성을 갖는 고추의 전사 조절 유전자를 담배 래틀 바이러스 벡터에 삽입시켜 구축한 VIGS 벡터'가 개시되어 있으며, 한국등록특허 제1122955호에는 '콩 모자이크 바이러스의 감염성 클론을 이용한 식물체 내에서의 외래 유전자 과발현 방법'이 개시되어 있다. 그러나 본 발명에서와 같이 SYCMV 유래의 재조합 바이러스 벡터에 대해서는 기재된 바가 전혀 없다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [9] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 형질전환 효율이 매우 낮은 콩의 유용 유전자 분석 및 유용 단백질 발현을 위한 돌연변이체의 생산을 위해 콩에서 분리된 SYCMV (soybean yellow common mosaic virus)를 이용하여 재조합 VIGS (virus-induced gene silencing) 벡터 및 발현 벡터를 구축하였고, 상기 VIGS 벡터가 식물체에서 효과적으로 유전자 침묵현상을 나타내며, 발현 벡터에 삽입된 유전자가 식물체에서 발현되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

### 과제 해결 수단

- [10] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 프로모터 및 전장 (full length) SYCMV (soybean yellow common mosaic virus) 핵산 서열을 포함하고, 상기 전장 SYCMV 서열 중 외피 단백질 코딩 유전자 내 또는 외피 단백질 코딩 유전자와 SYCMV 서열의 3'-말단 사이에 외래 유전자를 삽입할 수 있는 제한효소 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 SYCMV 유래의 재조합 바이러스 벡터를 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은 상기 재조합 바이러스 벡터를 이용한 외래 유전자의 기능을 분석하는 방법 및 외래 유전자 과발현 방법을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 상기 재조합 바이러스 벡터를 이용한 외래 유전자가 침묵된 식물체의 제조 방법 및 외래 유전자가 과발현된 식물체의 제조 방법, 상기 방법으로 제조된 식물체 및 이의 종자를 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 염기 서열로 이루어진 SYCMV 유전자를 제공한다.

### 발명의 효과

- [14] 본 발명에 따르면, 콩에서 수많은 유전자들의 특성을 분석하기 위한 도구로서 VIGS가 가장 커다란 대안으로 부각되고 있으며 여기에 SYCMV를 이용한 재조합 VIGS 벡터를 이용함으로써, 원하는 유전자를 효율적으로 침묵 (silencing)시켜 유전자의 고유 기능 연구, 경제적으로 가치 있는 유용 유전자 탐색에 매우 유용할 것으로 여겨진다. VIGS 벡터로 탐색된 유용 유전자가 삽입된 SYCMV 유래 재조합 발현 벡터를 콩(soybean)의 형질전환에 이용하여 신품종 콩 육성을 기대할 수 있으며 특허를 통한 원천기술 확보에도 유용할 것으로 기대된다. 또한, 유용한 외래 유전자를 콩에서 발현시킴으로써 현재 세계적으로 활용되는 콩의 기능적 유용성에서 나아가 경제적으로 가치 있는 유용 단백질을 발현하는 콩 식물체 및 기능성 콩을 생산하는데 이바지할 것으로 여겨진다.

### 도면의 간단한 설명

- [15] 도 1은 콩에서 분리한 새로운 바이러스인 SYCMV (soybean yellow common mosaic virus)의 모식도를 나타낸다.

- [16] 도 2는 SYCMV를 이용하여 제작한 감염성 클론의 모식도를 나타낸다.
- [17] 도 3은 SYCMV 표준 균주 (SYCMV type strain) 및 SYCMV 감염성 클론을 콩에 접종하여 병원성을 조사한 결과를 나타낸다.
- [18] 도 4는 RT-PCR을 이용하여 SYCMV를 접종한 콩 잎에서 SYCMV를 검출한 결과를 나타낸다. 레인 1: 버퍼 접종, 레인 2: SYCMV 즙액 (sap) 접종, 레인 3: SYCMV 감염성 클론 (pSYCMVT7-full) 접종.
- [19] 도 5는 Single-joint PCR을 이용한 SYCMV VIGS 벡터의 제작 모식도이다.
- [20] 도 6은 SYCMV VIGS 벡터의 클로닝 사이트를 나타낸다.
- [21] 도 7은 대두에서 SYCMV VIGS 벡터를 이용한 바이러스 유도 유전자 침묵 현상 (Virus-induced gene silencing)을 확인한 결과를 나타낸다. (a) 버퍼 접종, (b) SYCMV 바이러스 벡터 (pSYCMV-full) 접종, (c) gmPDS 단편이 삽입된 SYCMV 바이러스 벡터 (pSYCMV-PDS) 접종.
- [22] 도 8은 돌콩에서 SYCMV VIGS 벡터를 이용한 바이러스 유도 유전자 침묵 현상을 확인한 결과를 나타낸다.
- [23] 도 9는 SYCMV 재조합 발현 벡터의 MCS (multiple cloning site)를 나타낸다.
- [24] 도 10은 돌콩에서 SYCMV 외래 단백질 발현 벡터를 이용한 FMDV (foot-and-mouth disease virus) O1Campos strain의 항원 결정기 단백질 발현을 웨스턴 블롯으로 확인한 결과를 나타낸다.

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [25] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 프로모터 및 전장 (full length) SYCMV (soybean yellow commom mosaic virus) 핵산 서열을 포함하고, 상기 전장 SYCMV 서열 중 외피 단백질 코딩 유전자 내 또는 외피 단백질 코딩 유전자와 SYCMV 서열의 3'-말단 사이에 외래 유전자를 삽입할 수 있는 제한효소 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 SYCMV 유래의 재조합 바이러스 벡터를 제공한다.
- [26] 본 발명의 재조합 바이러스 벡터에서, 상기 프로모터는 시험관 내 전사 또는 형질전환에 적합한 프로모터들로서, 바람직하게는 T7 프로모터, SP6 프로모터, CaMV 35S 프로모터, 액틴 프로모터, 유비퀴틴 프로모터, pEMU 프로모터, MAS 프로모터 또는 히스톤 프로모터일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 T7 프로모터, SP6 프로모터 또는 CaMV 35S 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 중합효소가 결합하는 DNA 분자를 말한다.
- [27] 본 발명의 재조합 바이러스 벡터는 전장 SYCMV 서열 뒤에 터미네이터를 포함할 수 있다. 상기 터미네이터는 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제 (NOS), 벼  $\alpha$ -아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린 (phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스 (agrobacterium tumefaciens)의 옥토파인 (Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에

한정되는 것은 아니다.

- [28] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 단편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.
- [29] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다.
- [30] 본 발명의 재조합 바이러스 벡터는 기능을 분석하고자 하는 외래 유전자 또는 발현시키고자 하는 유용 유전자 각각의 서열 및 적당한 전사/번역 조절 신호를 포함하여 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관 내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술, 생체 내 재조합 기술 및 시험관 내 전사 (in vitro transcription) 등을 포함할 수 있다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 발현 벡터는 번역 개시 부위로서 리보솜 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.
- [31] 본 발명의 재조합 바이러스 벡터의 바람직한 예는 본 발명에 따른 유전자를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 SYCMV 유래의 단일 가닥 바이러스 벡터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이러한 식물 바이러스 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.
- [32] 재조합 바이러스 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트 (glyphosate) 또는 포스피노트리신 (phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신 (kanamycin), 하이그로마이신 (hygromycin), 클로람페니콜 (chloramphenicol), G418, 블레오마이신 (Bleomycin)과 같은 항생제 내성 유전자, aadA 유전자 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [33] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 재조합 바이러스 벡터는 재조합 VIGS (Virus-induced gene silencing) 벡터 또는 재조합 발현 벡터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [34] 본 발명에서 VIGS (Virus-induced gene silencing)는 바이러스 벡터에 식물유전자를 도입한 후 식물체를 감염시키면, 그 도입된 유전자의 내인성 식물유전자가 발현이 억제되는 현상을 말한다. 이는 PTGS (Post-transcriptional gene silencing)의 일종으로서, 전사-후 (post-transcriptional), RNA 턴오버 (RNA

turnover) 및 뉴클레오티드 서열 특이적 (nucleotide sequence-specific) 이라는 특징들을 가진다. 따라서, VIGS를 이용하면 도입유전자의 기능을 신속하고 간편하게 대량으로 분석할 수 있다.

- [35] 본 발명에서 재조합 발현 벡터는 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있으며, 상기 발현 벡터의 중요한 특성은 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절 요소 (translation control element)를 가지는 것이다.
- [36] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 바이러스 벡터에서, 전장 SYCMV 핵산 서열은 서열번호 1의 염기 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 염기 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열 (추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제 (즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [37] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 VIGS 벡터에서, 상기 제한효소 부위는 외래 유전자를 삽입할 수 있는 부위로서, 외피 단백질 (coat protein) 코딩 유전자 내 또는 외피 단백질 코딩 유전자와 SYCMV 서열의 3'-말단 사이에 위치할 수 있다. 상기 외피 단백질 (coat protein) 코딩 유전자 내의 제한효소 부위는 바람직하게는 외피 단백질 코딩 유전자의 3'-말단에 위치할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 외피 단백질 코딩 유전자의 3'-말단에 위치한 MCS (multiple cloning site)의 *BsrGI*, *MluI*, *SpeI* 또는 *SalI* 사이트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 외피 단백질 코딩 유전자와 SYCMV 서열의 3'-말단 사이에 위치한 제한효소 부위는 바람직하게는 *BsrGI* 사이트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [38] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 발현 벡터에서, 상기 제한효소 부위는 외래 유전자를 인-프레임(in-frame)으로 삽입할 수 있는 부위로서, 외피 단백질 (coat protein) 코딩 유전자 내에 위치할 수 있으며, 바람직하게는 외피 단백질 코딩 유전자의 3'-말단에 위치할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 외피 단백질 코딩 유전자의 3'-말단에 위치한 MCS (multiple cloning site)의 *BsrGI*, *MluI*, *SpeI* 또는 *SalI* 사이트, 또는 외피 단백질 코딩 유전자의 3'-말단에 위치한 *SacII* 사이트 및 3' UTR에 위치하는 *BsrGI* 사이트일 수 있으며, 가장 바람직하게는 외피 단백질 코딩 유전자의 3'-말단에 위치한 MCS (multiple cloning site)의 *BsrGI*, *MluI*, *SpeI* 또는 *SalI* 사이트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [39] 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 바이러스 벡터 내의 외피 단백질 (coat protein) 코딩 유전자 내 또는 외피 단백질 코딩 유전자와 SYCMV 서열의 3'-말단 사이에 PDS (phytoene desaturase) 유전자가 안티센스 방향으로 삽입된 것을

특징으로 하는 PDS 단편이 삽입된 재조합 VIGS 벡터를 제공할 수 있으며, 재조합 VIGS 벡터 내의 외피 단백질 (coat protein) 코딩 유전자 내 또는 외피 단백질 코딩 유전자와 SYCMV 서열의 3'-말단 사이에 안티센스 방향으로 삽입 가능한 유전자는 이에 제한되지 않는다.

- [40] 본 발명의 일 구현예에서, VIGS의 성공 여부를 확인하기 위해 광합성 관련 유전자인 PDS 유전자를 마커로 사용하였다. PDS 유전자는 카로티노이드 생합성에 관여하는 효소를 코딩하고 있으므로, 이 유전자가 억제되는 경우 식물 잎의 백화현상을 관찰할 수 있다.
- [41] 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 바이러스 벡터 내의 외피 단백질 코딩 유전자의 3'-말단에 FMDV (foot-and-mouth disease virus) 01Campos strain의 항원 유전자가 삽입된 것을 특징으로 하는 FMDV 단편이 삽입된 재조합 발현 벡터를 제공할 수 있으며, 재조합 발현 벡터 내의 외피 단백질 코딩 유전자의 3'-말단에 삽입 가능한 유전자는 이에 제한되지 않는다.
- [42] 상기 재조합 발현 벡터 내에 삽입 가능한 유전자는 식물체 내에서 발현되기를 원하는 유용 유전자로서, 이에는 제초제 저항성 유전자, 질병 저항성 유전자, 살충제 저항성 유전자, 곡식 또는 과실의 품질에 영향을 주는 유전자, 스크리닝 가능한 표식 유전자, 환경 또는 스트레스 저항성 유전자 등이 포함될 수 있다. 더욱 상세하게는 제초제 글리포세이트 (Glyphosate)의 저항성 유전자인 5-EPSP 신타아제 (5-Enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase), 제초제 비알라포스(바스타) (bialaphos(Basta))의 저항성 유전자인 포스포노트리신 아세틸트랜스퍼라제 (phosphinothricin acetyltransferase), 바이러스 저항성 단백질인 외피 단백질 (coat protein)을 코딩하는 유전자, 해충 저항성 유전자인 바실러스 투린지엔시스 (*Bacillus thuringiensis*)로부터 분리한 Bt 독소 (Bt toxin) 생성 유전자, 과실 완숙 방지를 위한 ACC 디아미나아제 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase) 유전자, 바이러스 저항성 식물을 용이하게 선발할 수 있는 식물체 세포의 괴사유발 유전자인 INF1 (*Phytophthora infestans* elicitor gene) 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [43] 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 바이러스 벡터에 기능을 분석하고자 하는 외래 유전자를 삽입하여 재조합 VIGS 벡터를 제작하는 단계;
- [44] 외래 유전자가 삽입된 재조합 VIGS 벡터를 절단 후, 시험관 내 전사 (in vitro transcription)를 수행하여 RNA 전사체를 제조하는 단계;
- [45] 상기 RNA 전사체를 식물체에 접종하여 외래 유전자를 침묵시키는 단계; 및
- [46] 외래 유전자가 침묵된 식물체의 표현형을 분석하는 단계를 포함하는 외래 유전자의 기능을 분석하는 방법을 제공한다.
- [47] 본 발명의 외래 유전자의 기능을 분석하는 방법에서, 시험관 내 전사는 예를 들면, T7 RNA 중합효소 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명에서 사용되는 접종 방법은 식물체 내로 유전자를 도입하는 방법 중의

하나로 도입하고자 하는 유전자 (RNA 전사체 또는 벡터)를 가진 접종액을 상처 낸 식물체에 접촉시켜 식물체 내로 유전자를 도입하는 방법일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

- [48] 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 바이러스 벡터에 기능을 분석하고자 하는 외래 유전자를 삽입하여 재조합 VIGS 벡터를 제작하는 단계;
- [49] 외래 유전자가 삽입된 재조합 VIGS 벡터를 식물체에 형질전환하여 외래 유전자를 침묵시키는 단계; 및
- [50] 외래 유전자가 침묵된 식물체의 표현형을 분석하는 단계를 포함하는 외래 유전자의 기능을 분석하는 방법을 제공한다.
- [51] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 외래 유전자의 기능을 분석하는 방법은 본 발명의 재조합 VIGS 벡터에 기능을 분석하고자 하는 외래 유전자를 삽입하는 단계를 포함한다. 이때, 상기 외래 유전자는 바람직하게는 외피 단백질 (coat protein) 코딩 유전자 내 또는 외피 단백질 코딩 유전자와 SYCMV 서열의 3'-말단 사이에 삽입될 수 있다. 상기 외피 단백질 (coat protein) 코딩 유전자 내의 외래 유전자의 삽입 위치는 바람직하게는 외피 단백질 코딩 유전자의 3'-말단에 위치할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 외피 단백질 코딩 유전자의 3'-말단에 위치한 MCS (multiple cloning site)의 *BsrGI*, *MluI*, *SpeI* 또는 *SalI* 사이트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 외피 단백질 코딩 유전자와 SYCMV 서열의 3'-말단 사이에 외래 유전자의 삽입 위치는 바람직하게는 *BsrGI* 사이트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 삽입되는 방향은 안티센스 방향으로 삽입될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [52] 본 발명의 외래 유전자의 기능을 분석하는 방법은 상기 RNA 전사체를 식물체에 접종하여 외래 유전자를 침묵시키는 단계를 포함한다. "침묵"이란 일반적으로 유전자의 발현이 하향조절 (downregulation) 또는 완전히 억제 (suppression)되는 현상을 말한다. 본 발명에 따른 재조합 VIGS 벡터를 이용하여 분석가능한 유용 유전자는 식물 생장 유전자, 병 저항성 유전자, 환경 스트레스 관련 유전자 등일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [53] 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 바이러스 벡터에 발현시키고자 하는 외래 유전자를 삽입하여 재조합 발현 벡터를 제작하는 단계; 및
- [54] 외래 유전자가 삽입된 재조합 발현 벡터를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는 SYCMV 감염성 클론을 이용한 식물체 내에서의 외래 유전자 과발현 방법을 제공한다.
- [55] 본 발명의 SYCMV 감염성 클론을 이용한 식물체 내에서의 외래 유전자 과발현 방법은 외래 유전자가 삽입된 재조합 발현 벡터로 형질전환된 아그로박테리움 튜머파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)를 이용한 아그로박테리움 침윤 (agro-infiltration) 방법 또는 매개 생물 등의 매개 없이 병든 잎의 즙액이나 바이러스액을 직접 피접종 식물조직에 인공적으로 접종하는 식물 바이러스 접종법인 립-접종 (rub-inoculation) 방법이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지

않는다.

- [56] 본 발명에서 사용되는 '아그로박테리움 침윤 (Agro-infiltration)'이라는 용어는 식물체 내로 유전자를 도입하여 발현시키거나 식물체 내에서 원하는 단백질을 생산하기 위한 방법을 의미한다. 이동시키고자 하는 유전자를 가진 아그로박테리움의 현탁액을 바늘이 없는 주사기를 사용해서 압력을 줌으로써 식물의 잎에 주입하여 식물체 세포로 원하는 유전자를 이동시키는 방법이다. 이는 전통적인 식물 형질전환과 비교하면 신속하고 편리하다는 장점이 있다.
- [57] 본 발명에서 사용되는 '럽-접종 (rub-inoculation)'이라는 용어는 식물체 내로 유전자를 도입하는 방법 중의 하나로 즙액 (sap) 접종, 도말 접종 또는 기계적 접종 (mechanical inoculation)이라고도 부른다. 이 방법은 일반적으로 카보런덤 (carborundum)과 같은 마찰제로 식물체에 상처를 낸 후, 도입하고자 하는 유전자를 가진 접종액 (백터)을 상처 낸 식물체에 접촉시켜 식물체 내로 유전자를 도입하는 방법이다. 그밖에 바늘을 다발로 만들어 병든 잎을 접종 엽면과 겹쳐서 찌르는 자침(刺針) 접종, 병든 잎을 겹쳐서 예리한 칼날로 절단한 후에 마찰제를 미리 처리한 접종 엽면에 절단면을 직접 칠하는 신속법, 즙액을 가압분무하는 방법 등이 있다. 자침법이나 신속법은 즙액 접종이 곤란한 활성화하기 어려운 바이러스 접종에 사용될 수 있다.
- [58] 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 바이러스 백터에 발현시키고자 하는 외래 유전자를 삽입하여 재조합 발현 백터를 제작하는 단계; 및
- [59] 외래 유전자가 삽입된 재조합 발현 백터를 식물체에 형질전환시키는 단계를 포함하는 식물체 내에서 외래 유전자 과발현 방법을 제공한다.
- [60] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 외래 유전자는 전장 SYCMV 서열 중 외피 단백질 (coat protein) 코딩 유전자 내에 인-프레임(in-frame)으로 삽입될 수 있으며, 바람직하게는 외피 단백질 코딩 유전자의 3'-말단에 인-프레임(in-frame)으로 삽입될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 외피 단백질 코딩 유전자의 3'-말단에 위치한 MCS (multiple cloning site)의 *BsrGI*, *MluI*, *SpeI* 또는 *SalI* 사이트, 또는 외피 단백질 코딩 유전자의 3'-말단에 위치한 *SacII* 사이트와 3' UTR에 위치하는 *BsrGI* 사이트 사이에 인-프레임(in-frame)으로 삽입될 수 있으며, 가장 바람직하게는 외피 단백질 코딩 유전자의 3'-말단에 위치한 MCS (multiple cloning site)의 *BsrGI*, *MluI*, *SpeI* 또는 *SalI* 사이트에 인-프레임(in-frame)으로 삽입될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 삽입되는 방향은 센스 방향으로 삽입될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [61] 본 발명의 재조합 바이러스 백터 (재조합 VIGS 백터 또는 재조합 발현 백터)는 외래 유전자를 도입한 식물체 내에서 일시적으로 발현시킬 수 있는 일시적 (transient) 발현 백터 및 외래 유전자가 도입된 식물체에서 영구적으로 발현시킬 수 있는 식물 발현 백터로 사용할 수 있다. 식물 발현 백터의 바람직한 예는 아그로박테리움 튜머파시엔스와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 백터이다. 다른

유형의 Ti-플라스미드 벡터 (EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리 (binary) 벡터이다.

- [62] 본 발명의 재조합 바이러스 벡터에 이용될 수 있는 바이너리 벡터는 아그로박테리움 튜머파시엔스의 Ti 플라스미드와 함께 존재 시 식물체를 형질전환시킬 수 있는 T-DNA의 RB (right border)과 LB (left border)을 함유하는 어떤 바이너리 벡터도 될 수 있으나, 바람직하게는 당업계에서 자주 사용되는 pBI101, pBIN19, pBI121, pCAMBIA 벡터 등을 사용하는 것이 좋다.
- [63] 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은 미세주입법 (Capecchi, M.R., *Cell*, 22:479.1980), 칼슘포스페이트 침전법 (Graham, F.L. *et al.*, *Virology*, 52:456. 1973), 전기천공법 (Neumann, E. *et al.*, *EMBO J.*, 1:841. 1982), 리포솜-매개 형질감염법 (Wong, T.K. *et al.*, *Gene*, 10:87. 1980), DEAE-덱스트란 처리법 (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190. 1985), 아그로박테리움 매개 형질전환법 (Chilton MD *et al.*, *Cell*, 2:263-71, 1977) 또는 유전자 밤바드먼트 (Yang *et al.*, *Proc.Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572. 1990) 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있으며, 바람직하게는 아그로박테리움 매개 형질전환법 또는 유전자 밤바드먼트를 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [64] 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 바이러스 벡터에 침묵시키고자 하는 외래 유전자를 삽입하여 재조합 VIGS 벡터를 제작하는 단계;
- [65] 외래 유전자가 삽입된 재조합 VIGS 벡터를 절단 후, 시험관 내 전사 (in vitro transcription)를 수행하여 RNA 전사체를 제조하는 단계; 및
- [66] 상기 RNA 전사체를 식물체에 접종하여 외래 유전자를 침묵시키는 단계를 포함하는 외래 유전자가 침묵된 식물체의 제조 방법을 제공한다.
- [67] 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 바이러스 벡터에 침묵시키고자 하는 외래 유전자를 삽입하여 재조합 VIGS 벡터를 제작하는 단계;
- [68] 외래 유전자가 삽입된 재조합 VIGS 벡터를 식물체에 형질전환시키는 단계를 포함하는 외래 유전자가 침묵된 식물체의 제조 방법을 제공한다.
- [69] 본 발명의 외래 유전자가 침묵된 식물체의 제조 방법에서, 각 단계는 외래 유전자의 기능을 분석하는 방법에서 기재된 바와 같다.
- [70] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조된 외래 유전자가 침묵된 식물체 및 이의 종자를 제공한다. 상기 SYCMV에 의해 감염된 식물체 또는 SYCMV 재조합 VIGS 벡터로 형질전환된 식물체는 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 쌍자엽 식물, 더 바람직하게는 콩과 (Fabaceae) 식물, 더욱 바람직하게는 콩 (*Glycine max*)일 수 있다.
- [71] 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 바이러스 벡터에 발현시키고자 하는 외래 유전자를 삽입하여 재조합 발현 벡터를 제작하는 단계; 및

- [72] 외래 유전자가 삽입된 재조합 발현 벡터를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는 SYCMV 감염성 클론을 이용한 외래 유전자가 과발현된 식물체의 제조 방법을 제공한다.
- [73] 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 바이러스 벡터에 발현시키고자 하는 외래 유전자를 삽입하여 재조합 발현 벡터를 제작하는 단계; 및
- [74] 외래 유전자가 삽입된 재조합 발현 벡터를 식물체에 형질전환시키는 단계를 포함하는 외래 유전자가 과발현된 식물체의 제조 방법을 제공한다.
- [75] 본 발명의 외래 유전자가 과발현된 식물체의 제조 방법에서, 각 단계는 외래 유전자의 과발현 방법에서 기재한 바와 같다.
- [76] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조된 외래 유전자가 과발현된 식물체 및 이의 종자를 제공한다. 상기 SYCMV에 의해 감염된 식물체 또는 SYCMV 재조합 발현 벡터로 형질전환된 식물체는 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 쌍자엽 식물, 더 바람직하게는 콩과 (Fabaceae) 식물, 가장 바람직하게는 콩 (*Glycine max*)일 수 있다.
- [77] 본 발명은 또한, 서열번호 1의 염기 서열로 이루어진 SYCMV 유전자를 제공한다. 또한, 상기 염기 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다.
- [78]
- [79] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [80]
- [81] **실시예 1. 콩 (soybean)에서 분리한 새로운 바이러스인 SYCMV**
- [82] 콩 (soybean)으로부터 SYCMV (Soybean yellow common mosaic virus)를 국내에서 처음으로 분리하여, 바이러스의 전체 염기서열을 분석하였다. SYCMV는 한가닥의 RNA 게놈을 가지고 있으며 총 4,152bp의 염기로 이루어져 있다. 전체 ORF는 4개로 구성되어 있으며, 5'-UTR과 3'-UTR은 각각 77bp와 122bp이다. ORF1 (nt 78-566)은 18kDa의 단백질을 코딩하고 있으며, 소베모바이러스 (Sobemovirus)에 속하는 종들과 낮은 서열 유사성을 가지고 있다. 두 번째 ORF2a (nt 524-2248)는 63kDa의 단백질을 코딩하며, N-말단 부위에 두 개의 트랜스멤브레인 도메인 (transmembrane domain)을 가지고 있다. 이 단백질은 단백질 분해효소 (serine protease)와 바이러스의 게놈 연결 단백질 (viral genome-linked protein)을 포함하고 있는 다기능단백질 (polyprotein)이다. ORF2b(nt 1852-3417)는 RNA 중합효소 (RNA-dependent RNA polymerase)를 코딩하고 있으며, GDD 모티프 (motif)를 가지고 있다. 마지막 ORF3 (nt 3227-4030)는 CP(coat protein) 단백질을 코딩한다 (도 1).
- [83]

- [84] 실시예 2. SYCMV를 이용한 감염성 클론의 제작
- [85] 콩에서 분리된 SYCMV의 재조합 바이러스 벡터로서의 가능성을 알아보기 위해 아래와 같이 SYCMV를 이용하여 감염성 클론 (infectious clone)을 제작하였다. 바이러스의 5' 말단 부위에 T7 프로모터를 결합시켰으며, 각각 두 부분으로 나누어서 클로닝 한 후에 최종적으로 pUC19 벡터에 결합하였다. SYCMV를 이용한 감염성 클론의 제작은 PCR을 이용하여 두 개의 겹쳐지는 (overlapping) 단편을 *XbaI* 부위를 중심으로 제작하였다. 두 개의 단편은 각각 5'-단편과 3'-단편으로 구성되며, 각각 2.4kb와 1.9kb의 크기를 가진다. 5'-단편은 SYCMV-T7-*SmaI*-U (5'-AAAGTCGACAATACGACTCACTATAGGGAGACAAAATATAAGAACAAA GAGTCTG-3'; 서열번호 2) 프라이머와 SYCMV-C24 (5'-TCGACCATTTC AACGGGAGTAA-3'; 서열번호 3) 프라이머로 증폭하였으며, *SmaI*부위와 T7 프로모터를 가지고 있다. 3'-단편은 SYCMV-N23 (5'-CAGTTTGTGCTCTTTGTGTGA-3'; 서열번호 4) 프라이머와 SYCMV-End-*PstI*-L (5'-AAACTGCAGACATTTGGATTACGCTCCATTTC-3'; 서열번호 5) 프라이머로 증폭하였으며, *PstI* 부위를 가지고 있다 (도 2).
- [86] SYCMV의 감염성 클론은 *PstI*을 이용하여 한 가닥의 플라스미드로 만든 후에, T7-RNA 중합효소를 이용하여 RNA를 합성한 후 합성된 RNA를 접종원으로 사용하였다. 콩은 파종한 지 10일이 지난 후 2개의 본엽에 접종을 하였다. 도 3에서와 같이 (a)는 버퍼를 접종 (Mock)하였으며, (b)는 SYCMV 표준 균주 (SYCMV type strain)를 접종하였고, (c)는 SYCMV 감염성 클론 (pSYCMVT7-full)을 접종하였다. 접종 일주일 이후부터 서서히 병징이 나타나기 시작하였으며, 15일이 지난 후에는 명확한 병징을 확인할 수 있었는데, 버퍼를 접종한 콩에서는 병징이 전혀 보이지 않았으며, SYCMV 표준 균주와 SYCMV 감염성 클론을 접종한 콩에서는 명확한 병징을 확인할 수 있었다 (도 3). 또한 접종한 바이러스가 식물체 내에서 정상적으로 복제와 이동을 하는지 RT-PCR을 통해 확인한 결과, 바이러스를 접종하지 않은 윗잎에서도 바이러스가 검출되었다. 따라서 SYCMV 즙액 (sap)을 접종한 것과 SYCMV 감염성 클론을 접종한 식물 모두에서 바이러스가 정상적으로 작동한다는 것을 알 수 있었다 (도 4).
- [87]
- [88] 실시예 3. SYCMV 감염성 클론을 이용한 VIGS 벡터의 제작
- [89] SYCMV 바이러스를 이용한 VIGS 벡터로의 가능성을 연구하기 위해 SYCMV의 5'말단 부위에 single-joint PCR을 이용하여 35S 프로모터를 붙였다. pSNU1 벡터를 바탕으로 하여 35S 프로모터를 증폭하였으며, 35S 프로모터의 일부분을 포함한 SYCMV의 5' 단편을 PCR을 통하여 각각 증폭하였다. 이들 각각의 단편은 두 번째 PCR을 통하여 결합시켰으며 최종적으로 PSNU35S-SJ2-EcoR-1U 프라이머

(5'-AAAGAATTCAAGTTTGCATGCCTGCTGCT-3'; 서열번호 6)와 SYCMV-C24 프라이머 (서열번호 2)를 통하여 SYCMV의 5'-말단에 35S 프로모터가 결합된 단편을 얻을 수 있었다. 이 단편은 Rz-NOS를 붙인 SYCMV 3'-말단 단편과 다시 결합하여 바이너리 벡터인 pPZP211에 클로닝 하였다 (도 5).

[90]

[91] 실시예 4. 대두에서 pSYCMV를 이용한 VIGS 벡터로의 이용 가능성 확인

[92] pSYCMV를 이용하여 VIGS 벡터의 가능성을 조사하기 위해 SYCMV의 CP 뒷부분에 single point mutation을 이용하여 제한효소 (*BsrGI*) 자리를 만든 후에 콩에서 증폭한 gmPDS 단편을 역방향으로 삽입하였다 (도 6). SYCMV VIGS 벡터인 pSYCMV-full, pSYCMV-PDS 클론을 아그로박테리움에 각각 형질전환하였으며, 아세토실린곤 (Acetocyringon)으로 바이너리 벡터 (binary vector) 내에 위치한 병원성 유전자 (*vir gene*)를 활성화시킨 후에 주사기를 사용하여 콩의 잎 뒷면에 접종하였다. 접종할 때는 대조구로 한쪽은 버퍼 (buffer)를 접종하고 다른 한쪽은 PDS 유전자를 삽입하지 않은 SYCMV 바이러스 벡터를 접종하였다. 접종한 후 약 2주가 지나기 시작하면서 pSYCMV-full을 접종한 식물에서 바이러스 병징이 조금씩 나타나기 시작했으며, 3주가 지나면서 pSYCMV-PDS를 접종한 식물에서는 PDS에 의한 침묵 효과가 나타나기 시작했다. 접종 후, 약 4주가 지나면 도 7에서와 같이 콩의 잎이 흰색으로 변하는 백화 (photo bleaching) 현상을 확인할 수 있었다.

[93] 이것은 SYCMV를 이용한 VIGS 벡터가 콩의 유용유전자 기능 검정에 이용 가능하다는 것을 나타낸다.

[94]

[95] 실시예 5. 돌콩 (Glycine soja)에서 pSYCMV를 이용한 VIGS 벡터로의 가능성 확인

[96] pSYCMV를 이용하여 VIGS 벡터의 가능성을 조사하기 위해 SYCMV VIGS 벡터인 pSYCMV-full과 pSYCMV-PDS 클론을 아그로박테리움에 각각 형질전환을 하였으며, 아세토실린곤 (Acetocyringon)을 이용하여 바이너리 벡터 (binary vector) 내에 위치한 병원성 유전자 (*vir gene*)를 활성화시킨 후에 주사기를 사용하여 돌콩의 잎 뒷면에 접종하였다. 접종할 때 대조구로 한쪽은 버퍼 (buffer)를 접종하고 다른 한쪽은 PDS 유전자를 삽입하지 않은 SYCMV 바이러스 벡터를 접종하였다. 접종한 후 약 2주가 지나기 시작하면서 pSYCMV-full을 접종한 식물에서 바이러스 병징이 조금씩 나타나기 시작했으며, 3주가 지나면서 pSYCMV-PDS를 접종한 식물에서는 PDS에 의한 침묵 효과가 나타나기 시작했다. 접종 후, 약 4주가 지나면서 도 8에서와 같이 돌콩의 잎이 흰색으로 변하는 백화 현상을 확인할 수 있었다.

[97]

[98] 실시예 6. pSYCMV를 이용한 외래 단백질 발현 벡터로서의 가능성 조사

[99] pSYCMV를 이용하여 외래 단백질 발현 벡터로서의 가능성을 조사하기 위해

SYCMV의 5' 말단 부위에 35S 프로모터를 연결시켰으며, 3' 말단 부위에는 Rz-NOS를 결합시켜 바이너리 벡터인 pPZP211에 클로닝하였다 (도 10). 외래 유전자로 FMDV (foot-and-mouth disease virus) O1Campos strain의 항원 결정기 일부 서열을 삽입하고자 하였으며, 오버랩 PCR을 통해서 DNA 서열을 합성하였다. 항원 결정기 서열은 기존에 보고된 문헌에서 인용되었으며, FMDV O1C VP1의 아미노산 서열순서 135-160으로부터 최종 단백질 산물을 발현한다 (P. ZAMORANO et al., *Virology*, 212:614-621, 1995). CP 종결 코돈의 바로 앞에 외래 유전자를 삽입하기 위해서 CP에 위치하는 *Sac* II 사이트부터 3' UTR에 위치하는 *Bsr*GI 사이트까지의 DNA 서열도 외래 유전자 앞과 뒤에 추가로 합성하였으며, 클로닝 과정에서 기존의 *Sac* II 사이트부터 *Bsr*GI 사이트까지의 서열을 제거한 후 합성한 서열을 삽입하였다. SYCMV 외래 유전자 단백질 발현 벡터인 pSYCMV-FMDV 클론을 아그로박테리움 (*Agrobacterium*)에 형질전환을 하였으며 아세토시린곤 (*Acetocyringon*)을 이용하여 바이너리 벡터 (binary vector) 내에 위치한 병원성 유전자 (*vir* gene)을 활성화시킨 후에 주사기를 사용하여 돌콩의 잎 뒷면에 접종하였다. 접종할 때는 대조구로 버퍼 (buffer) 및 pSYCMV-full을 접종하였다. 접종 후 약 2주가 지나면서 pSYCMV-FMDV와 pSYCMV-full을 접종한 식물에서 바이러스 병징이 조금씩 나타나기 시작하였다.

- [100] pSYCMV-FMDV를 접종한 식물에서 외래 단백질 발현 여부를 확인하기 위해서 웨스턴 블랏을 수행하였다. 그 결과 대조구에서는 단백질 발현을 확인할 수 없었으며, pSYCMV-FMDV를 접종한 식물에서 원하는 크기의 단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있었다 (도 10). 돌콩의 초생엽에 pSYCMV-FMDV를 접종한 후 상엽인 trifoliate leaves를 각각 웨스턴 블랏으로 확인해 본 결과, 네 번째 trifoliate leaves에서 예상 크기의 단백질이 발현하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 바이러스가 기주를 감염하고 복제를 통해서 증식하는 과정과 단백질을 발현하는 과정에 있어서 충분한 시간이 요구되기 때문이다. 따라서, 약 접종 2주 후에 생성되는 네 번째 trifoliate leaves 정도에서 충분히 복제된 바이러스의 RNA로부터 단백질의 원활한 발현이 야기되는 것으로 생각된다. 이러한 결과를 미루어 봤을 때, SYCMV가 외래 단백질 발현 벡터로서 이용될 수 있다는 것을 보여준다.

## 청구범위

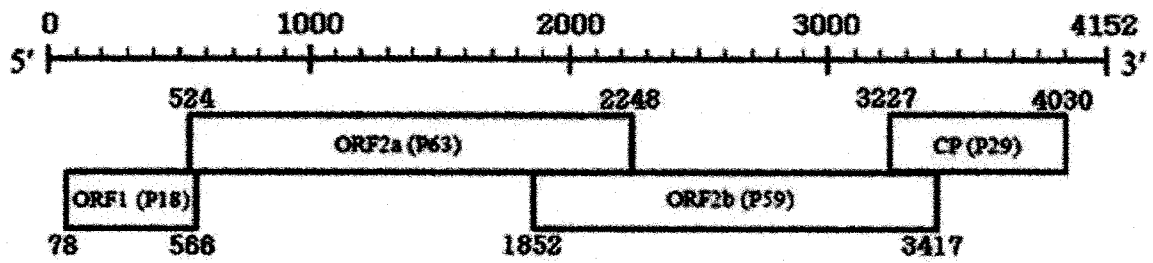
- [청구항 1] 프로모터 및 전장 (full length) SYCMV (soybean yellow common mosaic virus) 핵산 서열을 포함하고, 상기 전장 SYCMV 서열 중 외피 단백질 코딩 유전자 내 또는 외피 단백질 코딩 유전자와 SYCMV 서열의 3'-말단 사이에 외래 유전자를 삽입할 수 있는 제한효소 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 SYCMV 유래의 재조합 바이러스 벡터.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 재조합 바이러스 벡터는 재조합 VIGS (Virus-induced gene silencing) 벡터 또는 재조합 발현 벡터인 것을 특징으로 하는 재조합 바이러스 벡터.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 전장 SYCMV 핵산 서열은 서열번호 1의 염기 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 재조합 바이러스 벡터.
- [청구항 4] 제1항의 재조합 바이러스 벡터 내의 외피 단백질 코딩 유전자 내 또는 외피 단백질 코딩 유전자와 SYCMV 서열의 3'-말단 사이에 PDS (phytoene desaturase) 유전자가 안티센스 방향으로 삽입된 것을 특징으로 하는 PDS 단편이 삽입된 재조합 VIGS 벡터.
- [청구항 5] 제1항의 재조합 바이러스 벡터 내의 외피 단백질 코딩 유전자의 3'-말단에 FMDV (foot-and-mouth disease virus) 01Campos strain의 항원 유전자가 삽입된 것을 특징으로 하는 FMDV 단편이 삽입된 재조합 발현 벡터.
- [청구항 6] 제1항의 재조합 바이러스 벡터에 기능을 분석하고자 하는 외래 유전자를 삽입하여 재조합 VIGS 벡터를 제작하는 단계;  
외래 유전자가 삽입된 재조합 VIGS 벡터를 절단 후, 시험관 내 전사 (in vitro transcription)를 수행하여 RNA 전사체를 제조하는 단계;  
상기 RNA 전사체를 식물체에 접종하여 외래 유전자를 침묵시키는 단계; 및  
외래 유전자가 침묵된 식물체의 표현형을 분석하는 단계를 포함하는 외래 유전자의 기능을 분석하는 방법.
- [청구항 7] 제1항의 재조합 바이러스 벡터에 기능을 분석하고자 하는 외래 유전자를 삽입하여 재조합 VIGS 벡터를 제작하는 단계;  
외래 유전자가 삽입된 재조합 VIGS 벡터를 식물체에 형질전환하여 외래 유전자를 침묵시키는 단계; 및  
외래 유전자가 침묵된 식물체의 표현형을 분석하는 단계를 포함하는 외래 유전자의 기능을 분석하는 방법.
- [청구항 8] 제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 외래 유전자는 외피 단백질 코딩 유전자 내 또는 외피 단백질 코딩 유전자와 SYCMV 서열의

- 3'-말단 사이에 안티센스 방향으로 삽입되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 9] 제1항의 재조합 바이러스 벡터에 발현시키고자 하는 외래 유전자를 삽입하여 재조합 발현 벡터를 제작하는 단계; 및 외래 유전자가 삽입된 재조합 발현 벡터를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는 SYCMV 감염성 클론을 이용한 식물체 내에서의 외래 유전자 과발현 방법.
- [청구항 10] 제1항의 재조합 바이러스 벡터에 발현시키고자 하는 외래 유전자를 삽입하여 재조합 발현 벡터를 제작하는 단계; 및 외래 유전자가 삽입된 재조합 발현 벡터를 식물체에 형질전환시키는 단계를 포함하는 식물체 내에서 외래 유전자 과발현 방법.
- [청구항 11] 제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 외래 유전자는 외피 단백질 코딩 유전자 내에 센스 방향으로 삽입되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 12] 제1항의 재조합 바이러스 벡터에 침묵시키고자 하는 외래 유전자를 삽입하여 재조합 VIGS 벡터를 제작하는 단계; 외래 유전자가 삽입된 재조합 VIGS 벡터를 절단 후, 시험관 내 전사 (in vitro transcription)를 수행하여 RNA 전사체를 제조하는 단계; 및 상기 RNA 전사체를 식물체에 접종하여 외래 유전자를 침묵시키는 단계를 포함하는 외래 유전자가 침묵된 식물체의 제조 방법.
- [청구항 13] 제1항의 재조합 바이러스 벡터에 침묵시키고자 하는 외래 유전자를 삽입하여 재조합 VIGS 벡터를 제작하는 단계; 외래 유전자가 삽입된 재조합 VIGS 벡터를 식물체에 형질전환시키는 단계를 포함하는 외래 유전자가 침묵된 식물체의 제조 방법.
- [청구항 14] 제12항 또는 제13항의 방법에 의해 제조된 외래 유전자가 침묵된 식물체.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 식물체는 콩인 것을 특징으로 하는 식물체.
- [청구항 16] 제14항에 따른 식물체의 종자.
- [청구항 17] 제1항의 재조합 바이러스 벡터에 발현시키고자 하는 외래 유전자를 삽입하여 재조합 발현 벡터를 제작하는 단계; 및 외래 유전자가 삽입된 재조합 발현 벡터를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는 SYCMV 감염성 클론을 이용한 외래 유전자가 과발현된 식물체의 제조 방법.
- [청구항 18] 제1항의 재조합 바이러스 벡터에 발현시키고자 하는 외래

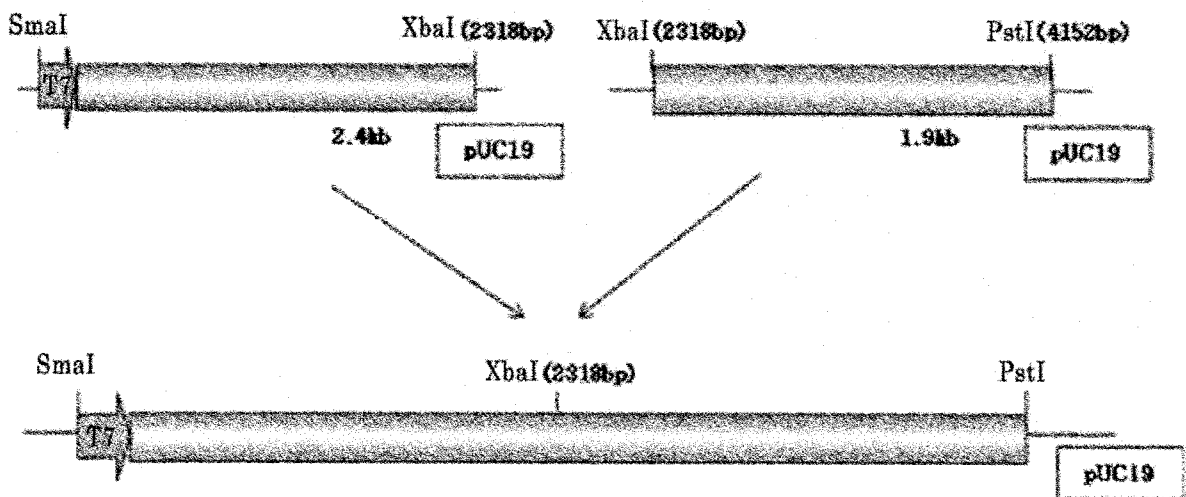
유전자를 삽입하여 재조합 발현 벡터를 제작하는 단계; 및  
외래 유전자가 삽입된 재조합 발현 벡터를 식물체에  
형질전환시키는 단계를 포함하는 외래 유전자가 과발현된  
식물체의 제조 방법.

- [청구항 19] 제17항 또는 제18항의 방법에 의해 제조된 외래 유전자가  
과발현된 식물체.
- [청구항 20] 제19항에 있어서, 상기 식물체는 콩인 것을 특징으로 하는 식물체.
- [청구항 21] 제19항에 따른 식물체의 종자.
- [청구항 22] 서열번호 1의 염기 서열로 이루어진 SYCMV 유전자.

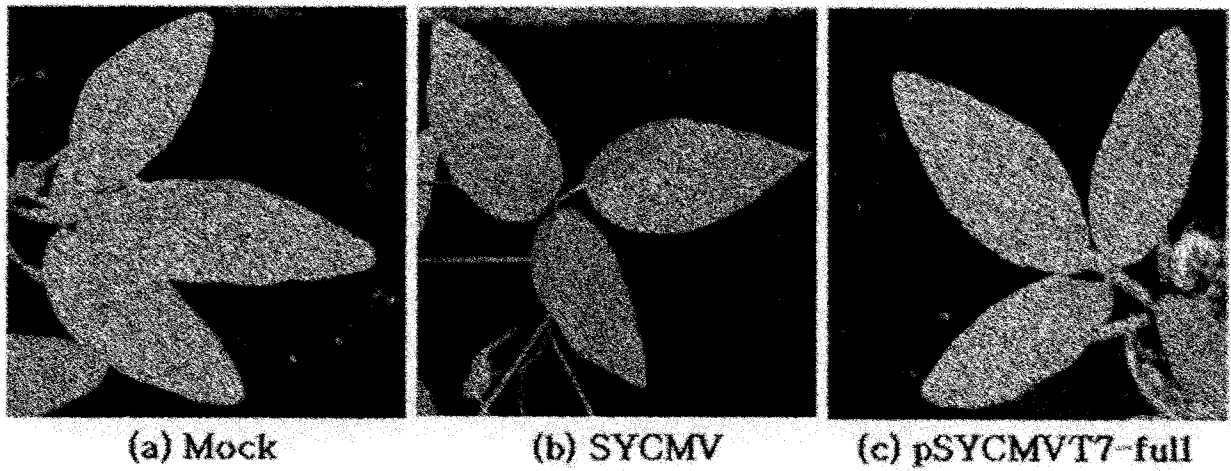
[Fig. 1]



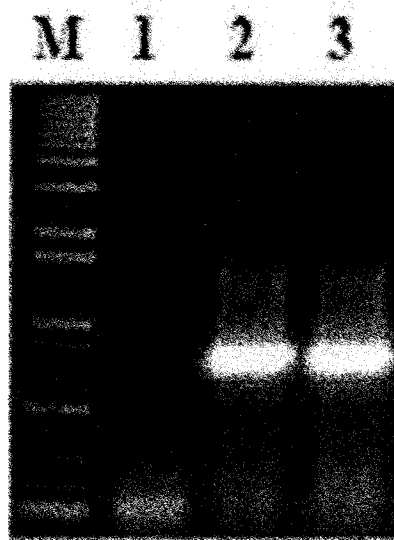
[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]

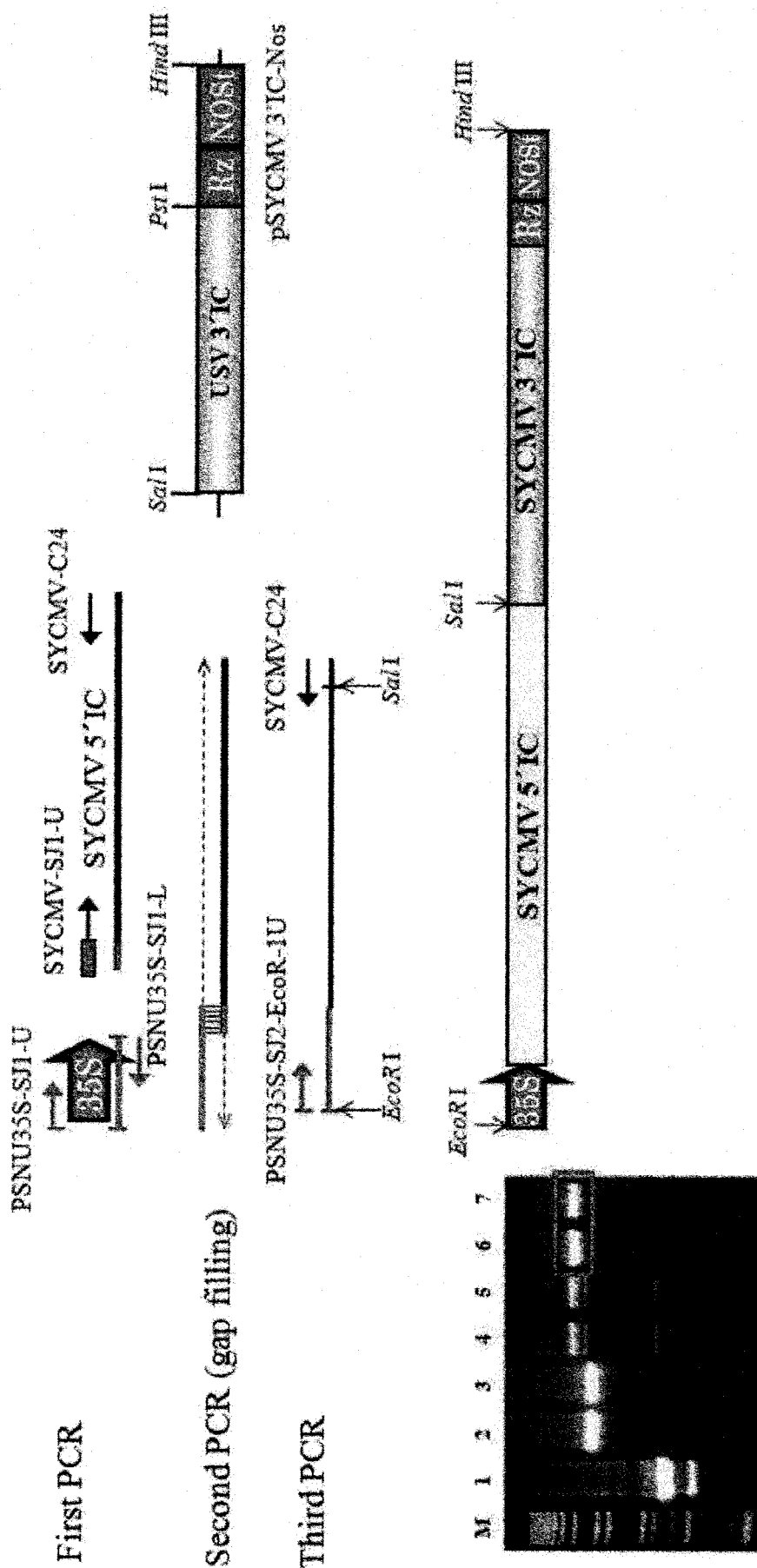


Lane 1 : Mock

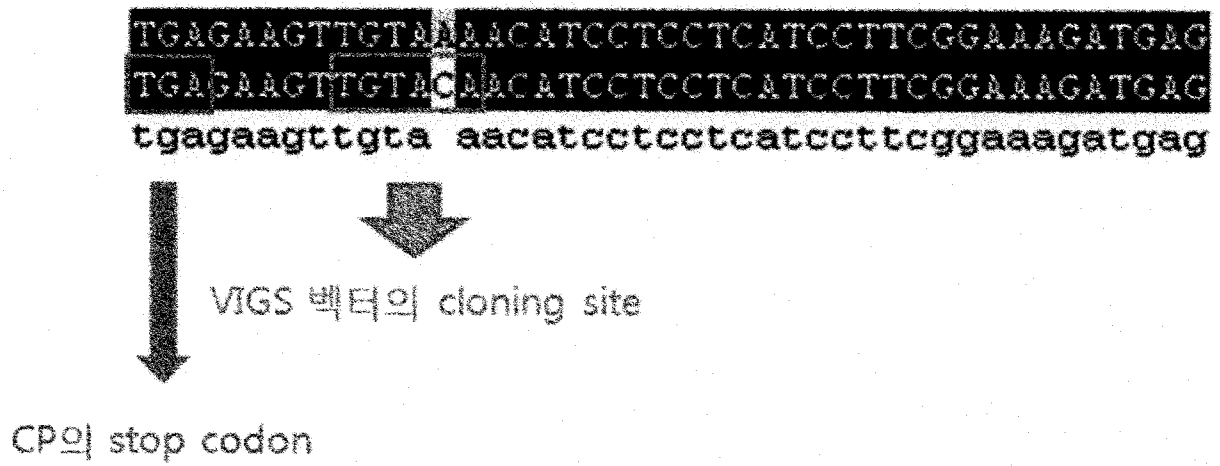
Lane 2 : SYCMV sap inoculation

Lane 3 : pSYCMVT7-full

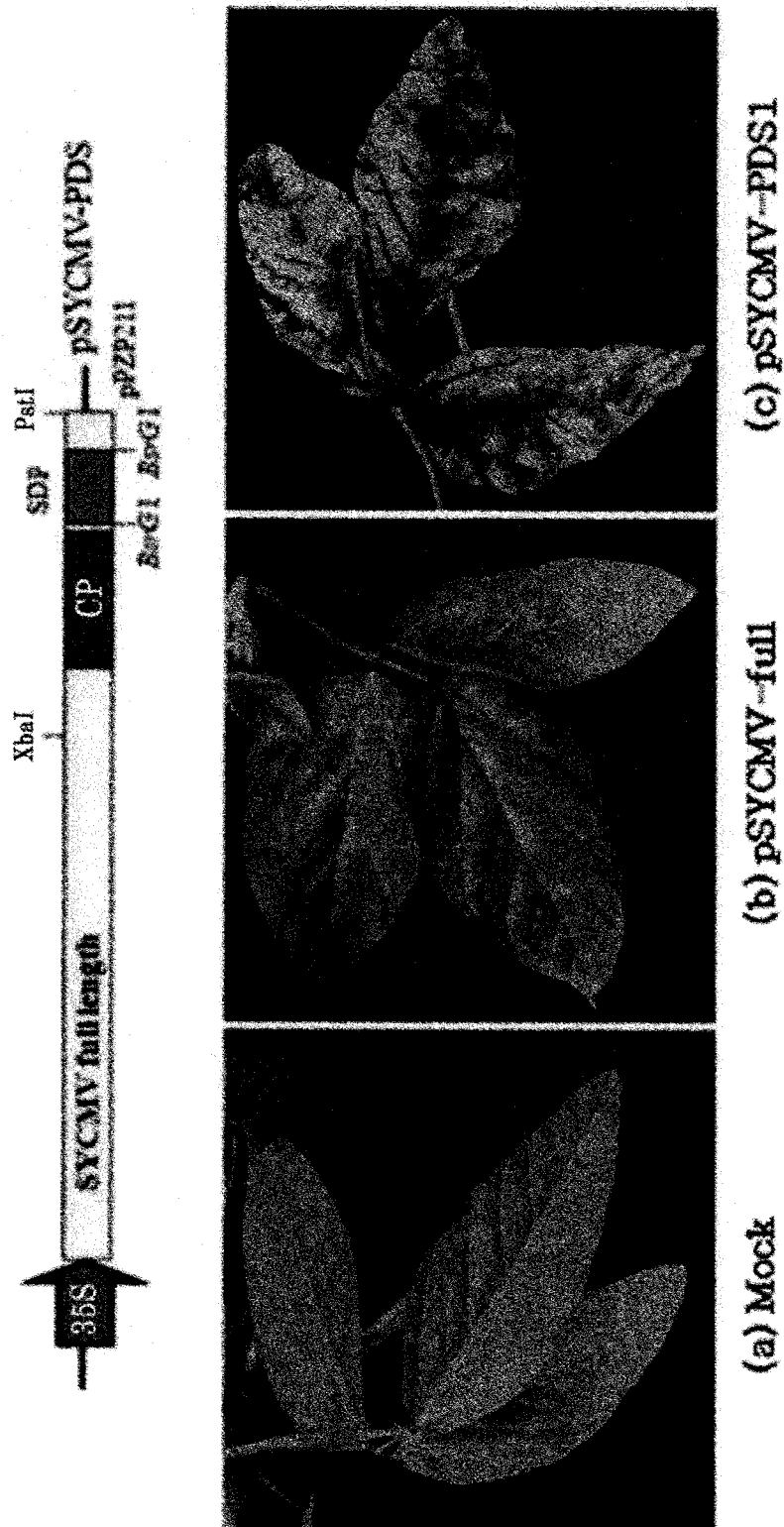
[Fig. 5]



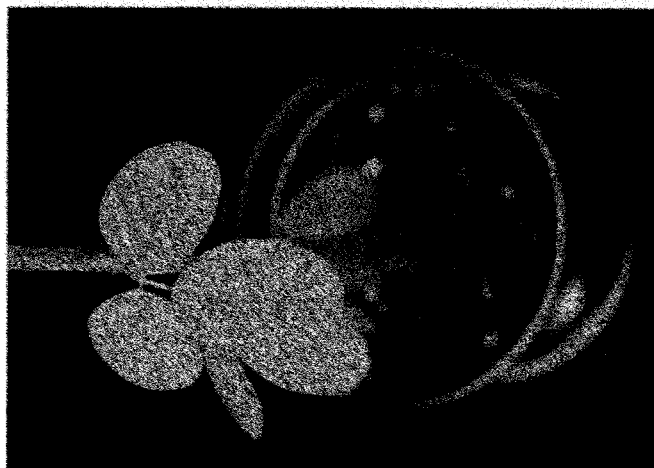
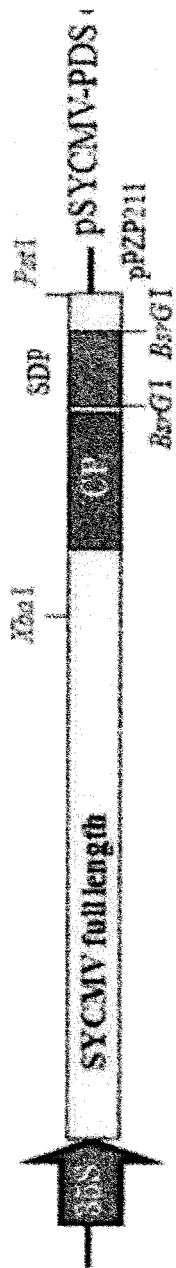
[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]



(a) Mock

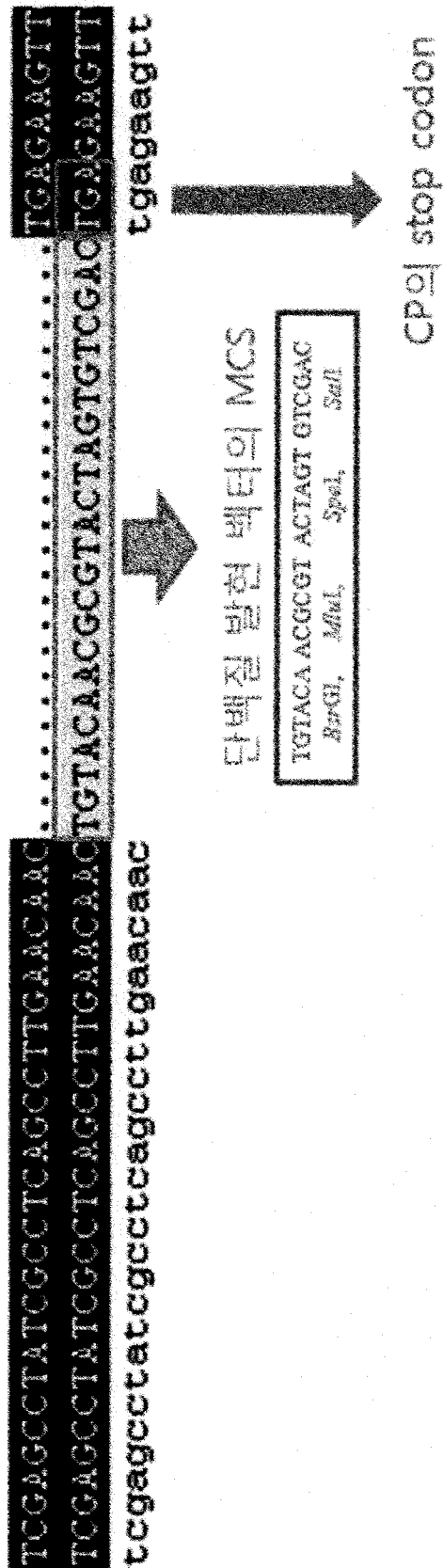


(b) pSYCMV-full

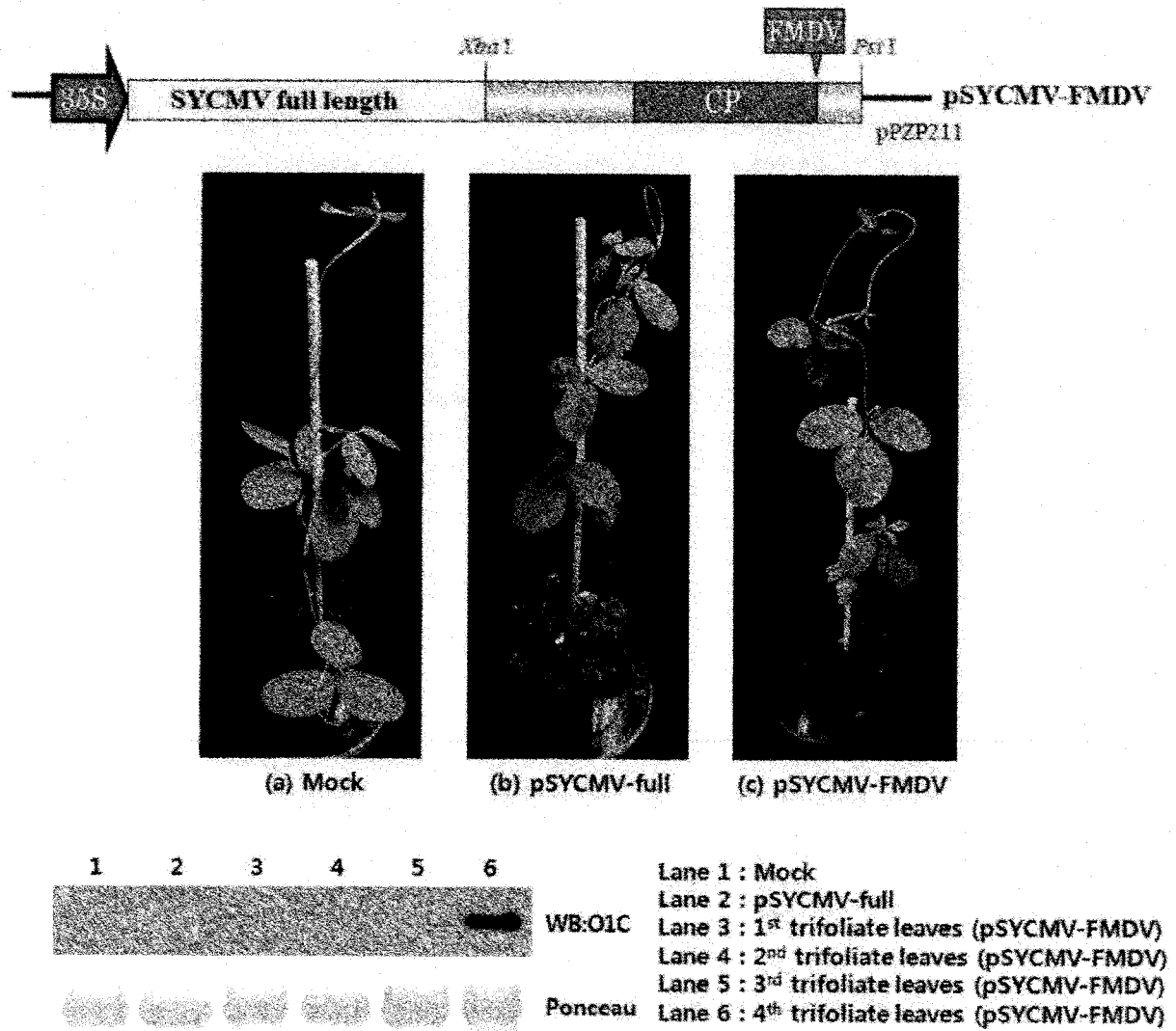


(c) pSYCMV-PDS1

[Fig. 9]



[Fig. 10]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2012/006480****A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A01H 5/00(2006.01)i, C12N 15/86(2006.01)i, C12N 15/29(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01H 5/00; C12N 15/09; C12N 15/33; C12N 15/83

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) &amp; Keywords: soybean, bean, SYCMV, contagious cloning, plant virus, restriction enzyme, PDS, FMDV, VIGS vector, SYCMV infectious clone

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                          | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | Suheon Lee, "Evaluation on characteristics of SYMMV mutant and Development on Function Detoxifying Carrier of Soybean Gene", Research report of Rural Development Administration (2007)<br>See pages 407, 408 and figure 7. | 1-21                  |
| Y         | NAM, Moon et al., "Biological and molecular characterization of Soybean yellow common mosaic virus, a new species in the genus Sobemovirus", Virus Research, vol. 163(1), pp. 363-367 (19 August 2011)                      | 1-21                  |
| X         | See abstract and page 364.                                                                                                                                                                                                  | 22                    |
| Y         | NAGAMATSU, Atsushi et al., "Functional analysis of soybean genes involved in flavonoid biosynthesis by virus-induced gene silencing", Plant Biotechnology Journal, vol. 5, pp. 778-790 (2007)                               | 6-21                  |
| A         | See abstract, figure 3 and page 786.                                                                                                                                                                                        | 1-5,22                |
| A         | KR 10-2009-0071350 A (SEOUL WOMEN'S UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) 01 July 2009<br>See abstract and claims 1-11.                                                                                    | 1-22                  |
| A         | JP 2007-510423 A (ICON GENETICS AG, MUNCHEN) 26 April 2007<br>See abstract and claims 1-57.                                                                                                                                 | 1-22                  |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 FEBRUARY 2013 (15.02.2013)

Date of mailing of the international search report

**15 FEBRUARY 2013 (15.02.2013)**

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office  
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,  
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

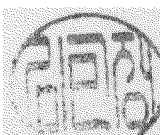
Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2012/006480**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Publication<br>date                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------------------------------|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| KR 10-2009-0071350 A                      | 01.07.2009          | US 2010-0251430 A1<br>WO 2009-082085 A2<br>WO 2009-082085 A3                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 30.09.2010<br>02.07.2009<br>02.07.2009                                                                                                                                                                                                                                               |
| JP 2007-510423 A                          | 26.04.2007          | AT 469231 T<br>AU 2004-291658 A1<br>AU 2004-291658 B2<br>CA 2541294 A1<br>DE 602004027403 D1<br>DK1682667T3<br>EP 1682667 A2<br>EP 1682667 B1<br>EP 2184363 A1<br>ES 2346224 T3<br>ES 2346224 T4<br>IL173859D0<br>JP 05-096743 B2<br>JP 2007-510423 T<br>JP 2011-024591 A<br>US 2007-0044170 A1<br>WO 2005-049839 A2<br>WO 2005-049839 A3<br>WO 2005-049839 A3<br>WO 2006-012906 A1 | 15.06.2010<br>02.06.2005<br>03.09.2009<br>02.06.2005<br>08.07.2010<br>23.08.2010<br>26.07.2006<br>26.05.2010<br>12.05.2010<br>13.10.2010<br>01.06.2011<br>05.07.2006<br>28.09.2012<br>26.04.2007<br>10.02.2011<br>22.02.2007<br>02.06.2005<br>03.11.2005<br>02.06.2005<br>09.02.2006 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b><br><br><b>A01H 5/00(2006.01)i, C12N 15/86(2006.01)i, C12N 15/29(2006.01)i</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                            |
| <b>B. 조사된 분야</b><br>조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)<br>A01H 5/00; C12N 15/09; C12N 15/33; C12N 15/83<br><br>조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌<br>한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC<br>일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC<br><br>국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))<br>eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 대두, 콩, SYCMV, 전염성복제, 식물바이러스, 제한효소, PDS, FMDV, VIGS 벡터, SYCMV 감염성클론                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                            |
| <b>C. 관련 문헌</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                            |
| 카테고리*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                                                                               | 관련 청구항                                                                                                                     |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 이수현, 'SYMMV 변종 특성 구명 및 콩 유전자 기능해독운반체 개발', 농촌진흥청 연구보고서 (2007) 페이지 407, 408 및 도면 7 참조.                                                                                                     | 1-21                                                                                                                       |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 남문 외 10명, 'Biological and molecular characterization of Soybean yellow common mosaic virus, a new species in the genus Sobemovirus', Virus Research, Vol.163(1), pp.363-367 (2011.08.19) | 1-21                                                                                                                       |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 요약 및 페이지 364 참조.                                                                                                                                                                         | 22                                                                                                                         |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | ATSUSHI NAGAMATSU 외 8명, 'Functional analysis of soybean genes involved in flavonoid biosynthesis by virus-induced gene silencing', Plant Biotechnology Journal, Vol.5, pp.778-790 (2007) | 6-21                                                                                                                       |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 요약, 도면 3 및 페이지 786 참조.                                                                                                                                                                   | 1-5, 22                                                                                                                    |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | KR 10-2009-0071350 A (서울여자대학교 산학협력단) 2009.07.01<br>요약 및 청구항 1-11 참조.                                                                                                                     | 1-22                                                                                                                       |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | JP 2007-510423 A (아이콘 유전학 약 체인 이익 사회) 2007.04.26<br>요약 및 청구항 1-57 참조.                                                                                                                    | 1-22                                                                                                                       |
| <input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                            |
| * 인용된 문헌의 특별 카테고리:<br>“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌<br>“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌<br>“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌<br>“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌<br>“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌<br>“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌<br>“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.<br>“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.<br>“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌 |                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                            |
| 국제조사의 실제 완료일<br>2013년 02월 15일 (15.02.2013)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                          | 국제조사보고서 발송일<br><b>2013년 02월 15일 (15.02.2013)</b>                                                                           |
| ISA/KR의 명칭 및 우편주소<br> 대한민국 특허청<br>(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,<br>4동 (둔산동, 정부대전청사)<br>팩스 번호 82-42-472-7140                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                          | 심사관<br>김민정<br>전화번호 82-42-481-5550<br> |

국제조사보고서에서  
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2009-0071350 A

2009.07.01

US 2010-0251430 A1

2010.09.30

WO 2009-082085 A2

2009.07.02

WO 2009-082085 A3

2009.07.02

JP 2007-510423 A

2007.04.26

AT 469231 T

2010.06.15

AU 2004-291658 A1

2005.06.02

AU 2004-291658 B2

2009.09.03

CA 2541294 A1

2005.06.02

DE 602004027403 D1

2010.07.08

DK1682667T3

2010.08.23

EP 1682667 A2

2006.07.26

EP 1682667 B1

2010.05.26

EP 2184363 A1

2010.05.12

ES 2346224 T3

2010.10.13

ES 2346224 T4

2011.06.01

IL173859D0

2006.07.05

JP 05-096743 B2

2012.09.28

JP 2007-510423 T

2007.04.26

JP 2011-024591 A

2011.02.10

US 2007-0044170 A1

2007.02.22

WO 2005-049839 A2

2005.06.02

WO 2005-049839 A3

2005.11.03

WO 2005-049839 A3

2005.06.02

WO 2006-012906 A1

2006.02.09