



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0094027
(43) 공개일자 2020년08월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/40 (2006.01) C12Q 1/6804 (2018.01)
G01N 33/53 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/40 (2013.01)
C12Q 1/6804 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2019-0011490
(22) 출원일자 2019년01월29일
심사청구일자 2019년01월29일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
대한민국(산림청 국립산림과학원장)
서울특별시 동대문구 회기로 57 (청량리동)
(72) 발명자
고영호
경기도 안양시 동안구 흥안대로223번길 47, 101동
1404호(호계동, 샘마을대우, 한양아파트)
이시혁
서울특별시 마포구 월드컵북로 501, 907동 203호
(상암동, 상암월드컵파크9단지)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김남혁

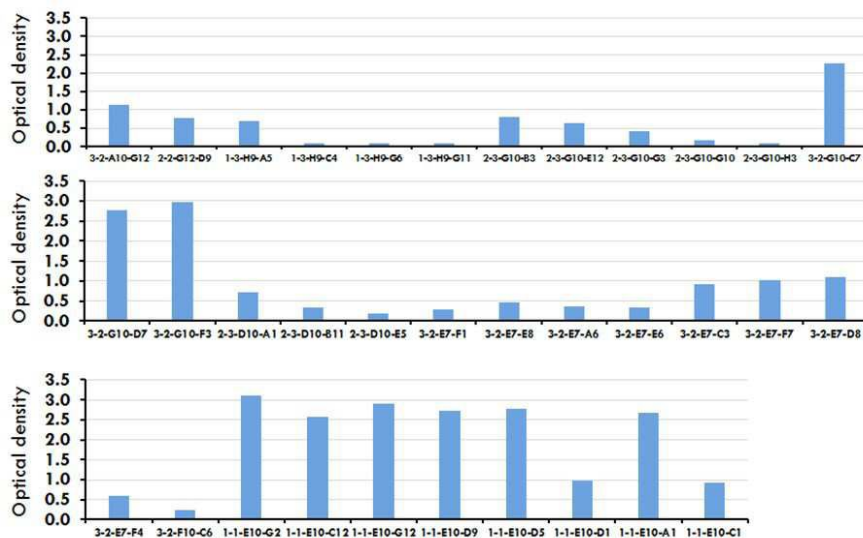
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 소나무 재선충 및 재선충 감염목의 항원으로 소나무 재선충 알도즈리덕테이즈1 에 대한 특이적인 항체를 이용한 재선충과 재선충 감염목 진단방법 및 소나무 재선충 알도즈리덕테이즈1 유전자를 이용한 진단 방법

(57) 요약

본 발명의 단클론항체는 소나무 재선충이 분비하는 단백질을 인식하는 것을 특징으로 한다. 상기 단클론항체를 포함하는 진단용 시약, 진단용 키트, 및 상기 단클론항체를 이용하는 진단 방법을 실시하는 경우, 소나무의 재선충 감염 여부를 신속하고 정확하게 진단할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

G01N 33/5308 (2013.01)

G01N 2333/902 (2013.01)

G01N 2800/26 (2013.01)

(72) 발명자

김아영

인천광역시 남동구 호구포로739번길 82-1, 3동 202
(구월동, 롯데환타빌)

최보혜

경기도 남양주시 도농로 34, 402동 505호(도농동,
부영그린타운)

윤경재

서울특별시 관악구 신원로 35 삼모더프라임타워
1112호

김지혜

경기도 포천시 가산면 감암3길 39

한혜림

서울특별시 강남구 도곡로57길 12

고상현

경기도 수원시 장안구 정자로42번길 52, 739동 80
3호(천천동, 비단마을 베스트타운)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 H20180345

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 국립산림과학원

연구사업명 ICT기반 소나무 재선충병 예찰 및 감염목 탐지기술 개발

연구과제명 소나무재선충 감염목의 항원 및 항체 기반 진단 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 국립산림과학원

연구기간 2018.04.20 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

소나무 재선충이 분비하는 단백질을 인식하는 단클론항체.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 단클론항체는 서열번호 1 내지 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열 중 하나 이상을 포함하는 것인 단클론항체.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 소나무 재선충은 *Bursaphelenchus xylophilus*인 것인 단클론항체.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 단백질은 알도오즈 환원효소인 것인 단클론항체.

청구항 5

제 3 항에 있어서,

상기 알도오즈 환원효소는 알도오즈 환원효소1인 것인 단클론항체.

청구항 6

제 2 항에 있어서,

상기 서열번호 1 내지 서열번호 3은 소나무 재선충이 분비하는 알도오즈 환원효소로부터 유래하는 것인 단클론항체.

청구항 7

소나무 재선충이 분비하는 단백질을 인식하는 단클론항체를 포함하는 소나무 재선충 감염 여부 진단용 조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 단클론항체는 서열번호 1 내지 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열 중 하나 이상을 포함하는 것인 소나무 재선충 감염 여부 진단용 조성물.

청구항 9

제 7 항에 있어서,

상기 소나무 재선충은 *Bursaphelenchus xylophilus*인 것인 소나무 재선충 감염 여부 진단용 조성물.

청구항 10

제 8 항에 있어서,

상기 서열번호 1 내지 서열번호 3은 소나무 재선충이 분비하는 알도오즈 환원효소로부터 유래하는 것인 소나무

재선충 감염 여부 진단용 조성물.

청구항 11

제 7 항의 소나무 재선충 감염 여부 진단용 조성물을 포함하는 소나무 재선충 감염 여부 진단용 키트.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

상기 키트는 RT-PCR 키트 또는 DNA 칩 키트인 것인 키트.

청구항 13

(a) 제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 기재된 단클론항체와 시료 중의 알도오즈 환원효소 또는 이의 상동체를 접촉시켜, 항체-항원 복합체를 형성하는 단계; 및

(b) 상기 단계 (a)에서 항체-항원 복합체의 형성을 확인하거나, 상기 단계 (a)에서 수득된 항체-항원 복합체 중, 항체-항원 복합체를 형성한 당해 단클론항체의 양을 측정하는 단계

를 포함하는 소나무 재선충 감염 여부를 진단하는 방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서,

(c) 알도오즈 환원효소의 존재를 확인하는 단계를 더 포함하는 소나무 재선충 감염 여부를 진단하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 소나무 재선충 알도오즈 환원효소로부터 유래된 염기서열에 특이적인 단클론항체 및 이를 이용한 소나무 재선충 감염 여부 진단용 조성물, 키트 및 진단 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 소나무 재선충(*Bursaphelenchus xylophilus*)은 구대륙이 원산지인 소나무과에 속하는 소나무 및 잣나무를 고사시키는 심각한 식물병원성 선충이다. 소나무 재선충은 북미대륙이 원산지로서 1934년도에 최초로 보고되었다. 다만, 모든 소나무류가 재선충에 감염이 되는 것은 아니며, 북미 대륙이 원산지인 3엽송 소나무류들은 저항성을 가지고 있어서 재선충에 의한 심각한 피해를 입지 않으나, 아시아와 유럽이 원산지 2엽송 소나무류들은 재선충에 의하여 심각한 피해를 입는다. 그러한 소나무류들은, 예컨대, *Pinus densiflora*, *P. koraiensis*, *P. parviflora*, *P. pinaster*, *P. radiata*, *P. thunbergii*, *P. sylvestris* 등이다.

[0003] 재선충이 소나무를 고사시킨다는 것은 1972년도 일본에서 규명되었지만, 이미 1905년도부터 소나무 시들음병이 일본의 나가사키 항구 근처에서 보고되었다. 이후 재선충은 1980년대에 중국, 대만, 한국에 전파되었다. 그리고 중남미의 경우 이미 1993년도에 멕시코에서의 발병이 보고되었고 유럽에는 1999년에 포르투갈을 시작으로 현재 스페인까지 퍼진 것으로 보고되고 있다.

[0004] 1972년 일본에서 재선충 소나무 시들음병의 원인이 선충이라는 것이 밝혀진 이후로 소나무 재선충에 대한 기초 및 방제 연구가 지속적으로 수행되어져 왔다. 소나무 재선충은 매개충이 소나무 가지를 가해를 할 때 소나무 내로 침입한 후, 감수성 소나무 안에서는 매우 빠르게 증식을 하여 수목의 원활한 생리활성을 어렵게 하여 고사시킨다고 알려져 있다. 소나무가 고사되면 매개충은 고사된 나무에 산란을 하면 부화된 알이 유충과 번데기를 고사목 내에서 진행을 한 후, 다음 해에 소나무 재선충을 가지고 있는 성충이 우화한다. 우화한 성충은 주변의 다른 건강한 소나무를 감염시킨다. 매개충은 지역에 따라서 차이가 있지만, *Monocampus* 속에 속하는 1년생 하늘소들로 알려져 있다.

[0005] 재선충의 감염 후 나타나는 소나무의 시들음 현상을 설명하는 다양한 가설이 존재를 하지만, 공통적으로 동의하는 전제 조건은 재선충이 소나무에서 급속도로 증식을 하여야 한다는 것이다.

[0006] 최근에 소나무 재선충이 소나무를 분해할 때 분비하는 단백질들에 대한 연구결과들이 보고되고 있으며, 이를 이

용한 소나무 재선충의 감염 여부 진단에 대한 논의와 개발이 지속적으로 이루어지고 있다.

- [0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허 문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) Futai, K., Pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. Annu. Rev. Phytopathol. 2013; 51, 61-83

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 소나무 재선충이 소나무를 감염시킨 후 분비하는 단백질인 알도오스 환원효소(aldose reductase)와 상동성을 갖는 단백질의 확인을 통하여 소나무 재선충의 감염여부를 확인할 수 있는 단클론항체, 이를 이용한 소나무 재선충 감염 여부 확인을 위한 조성물, 키트, 및 진단 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명자들은 소나무 재선충이 소나무를 가해할 때 분비할 것이라고 예상되는 항원들을 발굴하고, 그 중 하나가 알도오스 환원효소와 상동성이 높음을 발견하고, 이를 인식하는 단클론항체를 제작하여 재선충 감염목 및 건진목 추출물에 대한 반응성을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0011] 본 발명의 일 양태는, 소나무 재선충이 분비하는 단백질을 인식하는 단클론항체를 제공한다.
- [0012] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 단클론항체는 서열번호 1 내지 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열 중 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0013] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 소나무 재선충은 *Bursaphelenchus xylophilus*일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 단백질은 알도오스 환원효소일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 알도오스 환원효소는 알도오스 환원효소1일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 서열번호 1 내지 서열번호 3은 소나무 선충이 분비하는 알도오스 환원효소로부터 유래하는 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 다른 일 양태는 소나무 재선충이 분비하는 단백질을 인식하는 단클론항체를 포함하는 소나무 재선충 감염 여부 진단용 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 단클론항체는 서열번호 1 내지 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열 중 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 소나무 선충은 *Bursaphelenchus xylophilus*일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 서열번호 1 내지 서열번호 3은 소나무 선충이 분비하는 알도오스 환원효소로부터 유래하는 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 일 양태는 상기 소나무 재선충 감염 여부 진단용 조성물을 포함하는 소나무 재선충 감염 여부 진단용 키트를 제공한다.
- [0022] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 키트는 RT-PCR 키트 또는 DNA 칩 키트일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 일 양태는 (a) 제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 기재된 단클론항체와 시료 중의 알도오스 환원효소 또는 이의 상동체를 접촉시켜, 항체-항원 복합체를 형성하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)에서 수득된 항체-항원 복합체 중, 항체-항원 복합체를 형성한 당해 단클론항체의 양을 측정하는 단계를 포함하는 소나무

무 재선충 감염 여부를 진단하는 방법을 제공한다.

[0024] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 소나무 재선충 감염 여부를 진단하는 방법은 (c) 알도오즈 환원효소의 존재를 확인하는 단계를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0025] 본 발명에 따른 단클론항체는 소나무 재선충에 의해 감염된 소나무 개체 내에 분비되는 소나무 재선충 알도오즈 환원효소 또는 이의 이성질체에 대하여 특이적인 활성을 갖는 항체로서, 표적 항원인 소나무 재선충 알도오즈 환원효소, 예를 들어 알도오즈 환원효소1의 특정 부위를 에피토프로 하여 이에 대해 친화력을 가지는 항체를 제공한다.

[0026] 상기 단클론항체를 포함하는 진단용 시약, 진단용 키트, 및 상기 단클론항체를 이용하는 진단 방법을 실시하는 경우, 소나무의 재선충 감염 여부를 신속하고 정확하게 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 Bx-AR1의 아미노산 서열을 상동성이 높은 10 개의 단백질과 비교 분석한 결과를 나타낸다.

도 2는 바큇로바이러스 발현 시스템(Baculovirus Expression System)을 이용하여 발현 및 정제된 Bx-AR1을 나타낸다. 여기서, 각 영문자가 나타내는 바는 다음과 같다: M - 마커, C - 대조군, D1- 형질도입 후 1 일차, D2 - 형질도입 후 2 일차, D3 - 형질도입 후 3 일차, P - FPLC로 정제한 Bx-AR1.

도 3은 한계희석 후 선별된 단클론항체들의 항원에 대한 반응성 조사 결과를 나타낸다.

도 4는 34 개의 단클론항체들의 Bx 추출물에 대한 반응성 관찰 결과를 나타낸다.

도 5는 34 개의 단클론항체들의 PWN 감염목 추출물과 건전목에 대한 반응성 차이를 나타낸다.

도 6은 9 개의 Bx-AR1 단클론항체들의 4 종의 선충들에 대한 반응성 비교 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하, 첨부 도면을 참조하여 본 발명에 따른 실시 양태에 대하여 상세하게 설명한다. 이하 설명은 본 발명에 실시 양태들을 용이하게 이해하기 위한 것일 뿐이며, 보호범위를 제한하기 위한 것은 아니다.

[0029] 본 발명자들은 소나무 재선충이 소나무를 가해할 때 분비할 것이라고 예상되는 항원들을 발굴하고, 그 중 하나가 알도오즈 환원효소와 상동성이 높음을 발견하고, 이에 특이적인 단클론항체를 제작하여 재선충 감염목 및 건전목 추출물에 대한 반응성을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0030] 즉, 본 발명은, 이하에 기재된 항 알도오즈 환원효소, 구체적으로는 항 알도오즈 환원효소1 단클론항체, 상기 단클론항체를 사용한 재선충 감염목의 진단용 조성물, 이를 포함하는 재선충 감염목의 진단용 키트, 및 상기 단클론항체 등을 사용하는 재선충 감염목의 진단 방법을 제공한다.

[0031] 본 발명의 항체는 소나무 재선충 알도오즈 환원효소1에 대하여 특이적 결합능력을 갖는다.

[0032] 본 명세서에서 “단클론항체”는 단일 항원성 부위에 대해서 지시되는 고도의 특이적인 항체를 의미한다. 통상적으로, 상이한 에피토프(epitope)들에 대해 지시되는 상이한 항체들을 포함하는 다클론항체와는 다르게, 단클론항체는 항원 상의 단일 에피토프에 대하여 지시된다.

[0033] 상기 단클론항체는 당업계에서 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method)(문헌[Kohler 및 Mislstein, European Journal of Immunology 6:511-519, 1976] 참조) 또는 파지 항체 라이브러리 기술(문헌[Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991] 등 참조)을 이용하여 제조될 수 있다.

[0034] 일반적으로, 단클론항체를 분비하는 하이브리도마 세포는 면역학적으로 적합한 숙주 동물, 예를 들어 마우스에 항원 단백질을 주사하여 수득된 면역 세포와 암 세포를 융합함으로써 제조된다. 이런 두 집단의 세포 융합은 폴리에틸렌글리콜과 같이 당업계에 공지되어 있는 방법을 이용하여 융합시키고 항체 생산 세포를 표준적인 배양 방법에 의해 증식시킨다. 한계 희석법(limited dilution)에 의한 서브 클로닝을 실시하여 균일한 세포 집단을 수득하고 난 후 항원에 특이적인 항체를 생산할 수 있는 하이브리도마 세포를 시험관 또는 생체 내에서 대량으로 배양한다.

- [0035] 본 발명의 단클론항체는 정제하지 않고 사용할 수 있으나, 최선의 결과를 얻기 위해서는 당업계에 널리 공지된 방법에 따라 고순도, 예를 들어, 95% 이상으로 정제하여 사용하는 것이 바람직하다. 이러한 정제 기술에는, 예를 들어 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 크로마토그래피 등이 포함될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 단클론항체는 소나무 재선충 알도오즈 환원효소1, 또는 이에 상동성을 나타내는 단백질을 항원으로 하여 마우스 등에 면역 접종함으로써 제조될 수 있다.
- [0037] 본 명세서에서 “항체”는 소나무 재선충 알도오즈 환원효소1에 대하여 특이적인 항체로서, 항체의 완전한 형태 뿐만 아니라 항체 분자의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0038] 완전한 형태의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며, 각각의 경쇄는 하나의 중쇄와 디설파이드 결합으로 연결되어 있다. 중쇄 불변 영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타입을 가지고 서브클래스로 감마1($\gamma 1$), 감마2($\gamma 2$), 감마3($\gamma 3$), 감마4($\gamma 4$), 알파1($\alpha 1$) 및 알파2($\alpha 2$)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다.
- [0039] 본 명세서에서 “항원 결합 단편”은 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 scFv(single-chain Fv) 등을 포함한다. 항체 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫번째 불변 영역(CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. F(ab')는 중쇄 CH1 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 F(ab')의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 다이설파이드 결합을 이루면서 생성된다. scFv는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 scFv 단편을 생성하는 재조합 기술은 국제 공개 WO 88/10649, WO 88/106630, WO 88/07085, WO 88/07086 및 WO 88/09344에 개시되어 있다.
- [0040] 본 발명에서 항체, 구체적으로 단클론항체는 바람직하게는 Fab 형태이거나 항체의 완전한 형태이다.
- [0041] 본 명세서에서 “중쇄”는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 VH 및 3 개의 불변 영역 도메인 CH1, CH2 및 CH3를 포함하는 전체길이 중쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다. 또한 본 명세서에서 “경쇄”는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 VL 및 불변 영역 도메인 CL을 포함하는 전체길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다.
- [0042] 본 명세서에서 “CDR(complementarity determining region)”은 면역글로블린 중쇄 및 경쇄의 고가변영역(hypervariable region)의 아미노산 서열을 의미한다. 중쇄 및 경쇄에는 각각 3개의 CDR (중쇄(CDRH1, CDRH2 및 CDRH3) 및 경쇄(CDRL1, CDRL2 및 CDRL3))이 포함되어 있다. CDR은 항체가 항원 또는 에피토프에 결합하는 데 있어서 주요한 접촉 잔기를 제공한다.
- [0043] 본 명세서에서 “대상”은 재선충의 감염 여부 판단이 수행되는 객체를 의미한다. 대상은 식물, 예를 들어, 침엽수, 예를 들어, 소나무과, 예를 들어, 소나무 또는 잣나무일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0044] 본 명세서에서 대상으로부터 얻은 “시료”는 소나무로부터 수득한 조직, 및 이의 변형물 또는 추출물 등을 포함한다.
- [0045] 본 명세서에서 “진단”은 특정 소나무 개체에 대하여 재선충이 이미 감염되었는지 여부를 판별하는 것을 의미한다.
- [0046] 본 발명은 상기 단클론항체를 포함하는 소나무 재선충 감염 여부 진단용 조성물을 제공한다.
- [0047] 본 발명에서 소나무 재선충 감염 여부 진단에 유효한 것으로 선별된 단클론항체는 단클론항체-1-1-E10-D5 (mAb-1; 서열번호 1), 단클론항체-1-1-E10-G2 (mAb-2; 서열번호 2), 단클론항체-1-3-A5-C7 (mAb-3; 서열번호 3), 단클론항체-2-3-D10-A1 (mAb-4), 단클론항체-2-3-D10-E5 (mAb-5), 단클론항체-3-2-E7-E6 (mAb-6), 단클론항체-3-2-G10-C7 (mAb-7), 단클론항체-3-2-G10-D7 (mAb-8), 단클론항체-3-2-G10-F3 (mAb-9), 총 9개의 단클론항체이다. 이 중, 상기 mAb-1 및 mAb-2는 소나무 재선충(*Bursaphelenchus xylophilus*, Bx)에 대하여 높은 반응성을 나타냈고, mAb-3 내지 mAb-9는 Bx에 대한 반응성이 mAb-1 및 mAb-2에 비해 낮았으나(0.4 이하), 다른 선충들에 대한 반응성은 0.1 이하로서, 소나무 재선충과 구별할 수 있는 정도의 수준 차를 갖는다(도 6 참조).
- [0048] 소나무 재선충 감염 여부를 보다 신속하게 진단할 수 있도록 단클론항체들의 최적 쌍(pair), 예를 들어, (i) mAb-1 및 mAb-2에서 선택되는 어느 하나의 단클론항체; 및 (ii) mAb-3, mAb-4, mAb-5, mAb-6, mAb-7, mAb-8 및

mAb-9로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 단클론항체를 포함하는 소나무 재선충 감염 여부 진단용 조성물을 제공할 수 있다. 이 경우, 그룹 (i)의 단클론항체에 의해 소나무 재선충을 포함하는 선충의 감염 여부를 확인하고, 그룹 (ii)의 단클론항체에 의해 다른 선충이 아닌 소나무 재선충에 감염됨을 확인할 수 있어, 보다 신속하고 신뢰성 높게 소나무 재선충 감염 여부를 진단할 수 있는 항체기반 진단용 조성물을 제공할 수 있다.

[0049] 또한 본 발명은 상기 소나무 재선충 감염 여부 진단용 조성물을 포함하는 소나무 재선충 감염 여부 진단용 키트를 제공한다.

[0050] 본 발명의 진단용 키트에는 본 발명의 단클론항체뿐만 아니라, 소나무 재선충을 선별적으로 인지할 수 있는 다른 항체, 예를 들어, 다클론항체, 키메라-항체, 인간화-항체, 또는 단클론항체의 단편 등도 함께 사용될 수 있다.

[0051] 본 발명의 진단용 키트에는 면역학적 분석에 사용되는 도구 및 시약이 포함될 수 있다. 상기 도구 및 시약에는 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 용해제, 세정제 등이 포함될 수 있다. 상기 표지 물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 함께 포함할 수 있다. 상기 담체는 가용성 담체, 예를 들어, 당업계에 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어, 인산염 완충액; 불용성 담체, 예를 들어, 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로오스 및 이들의 조합일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0052] 본 발명의 진단용 키트는 검정 시스템, 예를 들어, ELISA 플레이트, 딥-스틱 디바이스, 면역크로마토그래피 시험 스트립, 방사분할 면역검정 디바이스, 플로우-쓰로우(flowthrough) 디바이스 등에 적용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0053] 본 발명은 (a) 상기 단클론항체와 시료 중의 알도오즈 환원효소, 예를 들어 소나무 재선충 알도오즈 환원효소 1(Bx-AR1), 또는 이의 상동체를 접촉시켜, 항체-항원 복합체를 형성하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)에서 항체-항원 복합체의 형성을 확인하거나, 상기 단계 (a)에서 수득된 항체-항원 복합체 중, 항체-항원 복합체를 형성한 당해 단클론항체의 양을 측정하는 단계를 포함하는 소나무 재선충 감염 여부를 진단하는 방법을 제공한다.

[0054] 본 발명에서 "항원-항체 복합체"는 시료 중의 소나무 재선충 알도오즈 환원효소 1(Bx-AR1) 또는 이의 상동체의 존재 또는 부재를 확인하기 위한, 소나무 재선충 알도오즈 환원효소 1(Bx-AR1) 또는 이의 상동체와 이를 인지하는 항체의 결합물을 지칭한다. 바람직하게는, 상기 항원-항체 복합체는 재선충 알도오즈 환원효소 1(Bx-AR1)과 본 발명에 따른 단클론항체의 복합체이다.

[0055] 상기 항원-항체 복합체의 형성을 확인하기 위하여, 효소면역분석법(ELISA), 웨스턴 블로팅(Western Blotting), 면역형광(Immunofluorescence), 면역조직화학염색(Immunohistochemistry staining), 유세포 분석법(Flow cytometry), 면역세포화학법, 방사능면역분석법(RIA), 면역침전분석법(Immunoprecipitation Assay), 면역확산 분석법(Immunodiffusion assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 단백질 칩(Protein Chip) 또는 키트 등에 의해 이루어질 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0056] 항원-항체 복합체의 형성을 정성 또는 정량적으로 측정 가능토록 하는 라벨링 요소에는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 나노골드(nano-gold) 또는 나노실버(nano-silver)와 같은 미세입자(micro- or nano-particle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0057] 상기 효소는 β 글루쿠로니다제, β 글루코시다제, β 갈락토시다제, 우레아제, 퍼옥시다아제, 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코오스 옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코오스 옥시다제 와 루시퍼라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제, 포스포에놀피루베이트 데카복실라제, β 라타마제 등을 포함한, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 형광물은 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈데히드, 플루오레스카민, 유로폼 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 리간드는 바이오틴 유도체 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 발광물은 아크리리늄 에스테르, 루시페린, 루시퍼라아제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 미소입자는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 레독스 분자는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논, $K_4W(CN)_8$, $[Os(bpy)_3]^{2+}$, $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, $[MO(CN)_8]^{4-}$ 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

상기 방사성 동위원소는 3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re 등을 포함하나, 이

에 한정되는 것은 아니다.

[0059] 이하 하나 이상의 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다.

[0061] 실시예

[0062] 1. 재선충에 대한 특이 항원의 확인

[0063] 재선충에 대한 특이 항원을 발굴하기 위하여, 발명자들은 재선충과 3종의 *Bursaphelenchus*속 선충들의 발현 유전체 분석을 수행하여, 재선충에서만 높은 비율로 발현되는 유전자들을 밝혀내었다. 구체적으로, 발명자들은 *Bursaphelenchus xylophilus* (Bx), *B. mucronatus* (Bm), *B. doui* (Bd), *B. thailandae* (Bt) 등 4종의 선충의 발현 유전체를 비교하였다. 이 중에서, Bx에서만 높은 수준으로 발현되는 유전자를 밝혀내었다. 그 중 하나가 소나무를 분해할 때 분비되는 분비단백질에 속한다고 알려진 알도오스 환원효소1(aldose reductase 1, AR1, 서열번호 6)과 상동성이 매우 높은 단백질이었다.

[0064] 발명자들이 밝혀낸 결과와 최근에 재선충의 분비 단백질에 대한 분석 연구를 수행한 연구 결과들을 함께 분석을 진행하여, 재선충이 소나무에 침입하여 조직을 분해할 때 특이적으로 분비할 것이라고 예상되는 분해효소들을 발굴하였다.

[0065] 그 중 Bx에서 높은 발현량을 보이는 하나의 유전자의 아미노산 서열을 NCBI blast로 분석을 수행하였다. 분석된 결과들 중에서 가장 상동성이 높은 10개의 단백질에 대한 아미노산의 서열을 확보하여 비교 분석한 결과 *Caenorhabditis*속과 *Ancylostoma*속, *Pristinochus*속과 *Toxocara*속 선충들의 알도오스 환원효소 또는 알코올 탈수소효소(alcohol dehydrogenase)와 동일성(identity)은 49 ~ 51%, 유사도(similarity)는 64 ~ 67%, 갭(gap)은 0 ~ 1%의 상동성을 보여주었다. 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 비교대상 10개의 단백질 간의 유사성이 Bx-AR1에 대한 유사성보다 높았다. 그리고, Bx-AR1의 경우 다른 비교대상 단백질들에 비하여 C-말단에 12 ~ 13개의 아미노산이 결실(deletion)되어 있는 것으로 보아, 발명자들이 찾아낸 단백질 서열은 여러 개의 스플라이싱 이성질체(splicing isoform) 중의 하나로 추측되었다.

[0066] Bx-AR1의 아미노산 서열(서열번호 7)을 이용하여 PWN 데이터베이스에서 BLAST를 진행한 결과, e-value가 10^{-5} 보다 낮은 값을 갖는 유전자들은 총 25개, 그리고 10^{-25} 보다 낮은 값을 보이는 유전자들이 총 16개가 밝혀졌다(하기 표 1 참조). 이 결과로부터 Bx의 계놈에 존재하는 다양한 종류의 알도오스 환원효소(AR) 중에서 Bx-AR1은 소나무를 분해할 때 분비되는 효소일 가능성이 높음을 확인할 수 있었다.

표 1

[0067]

Bx 데이터베이스 ID.	High Score	Probability
BUX_s00116.517.1 (AR1)	1695	8.8e-176
BUX_s01198.204.1	952	4.7e-97
BUX_s01143.144.1	806	1.4e-81
BUX_s01143.143.1	758	1.7e-76
BUX_s01069.1.1	710	2.1e-71
BUX_s01259.99.1	620	2.1e-61
BUX_s00713.273.1	611	6.5e-61
BUX_s00813.88.1	483	2.4e-47
BUX_s00912.1.1	473	2.7e-46
BUX_s00813.28.1	443	4.1e-43
BUX_s00116.823.1	412	7.9e-40
BUX_s00116.160.1	361	2.0e-34
BUX_s00116.416.1	357	5.3e-34
BUX_s00116.822.1	312	3.1e-29
BUX_s00460.45.1	292	4.1e-27
BUX_s00397.107.1	285	2.3e-26
BUX_s01198.105.1	282	4.7e-26
BUX_s00813.89.1	257	2.1e-23
BUX_c03252.1.1	244	5.0e-22

BUX_s00713.1114.1	235	4.5e-21
BUX_s00116.885.1	182	5.0e-19
BUX_s00460.44.1	212	1.2e-18
BUX_s00252.37.1	208	3.8e-18
BUX_s00713.986.1	195	1.3e-16
BUX_s00713.1108.1	121	2.5e-08
BUX_c03929.1.1	90	6.3e-05

2. 바큘로바이러스 발현 시스템을 이용한 발현 및 정제

발현유전체 분석에서 확보한 염기서열을 바탕으로 하기 표 2에 기재된 서열의 프라이머를 합성하여 Bx cDNA 라이브러리에서 PCR을 수행하여 증폭된 DNA 단편들을 TA 클로닝하였다. 클로닝된 DNA 단편이 Bx-AR1의 전장염기서열임을 캐필러리 시퀀싱(capillary sequencing)을 수행하여 확인하였다. 그 후, 상기 DNA 단편을 바큘로바이러스(Baculovirus) 발현 벡터인 pBacPAK8 발현 벡터(Clontech, 미국 캘리포니아)에 서브클로닝하였다.

표 2

프라이머	서열	서열번호
정방향	5'-GAATCTAGAATGACCACTCCATTCTACACATTGAA-3'	4
역방향	5'-CTTGGTACCGACAACCTCGAATGGTGGTAAAG-3'	5

Bx-AR1의 전장 단백질을 발현시키기 위하여, 발명자들은 바큘로바이러스 발현 시스템(Baculovirus expression system)을 활용하였다(도 2).

Bx-AR1 유전자를 포함하는 pBacPak8-Bx-AR1 플라스미드를 E.coli에 삽입하여 배양한 후, 플라스미드 미니프렙 키트(plasmid miniprep kit; Qiagen, 독일)를 이용하여 DNA를 분리 정제함으로써 이를 확보하였다. Bx-AR1의 발현과 정제는 BacPAK™ 바큘로바이러스 발현 시스템(클론테크(Clontech))의 제조사에서 제공한 프로토콜에 따라 수행하였다. 구체적으로, 1 ml의 TC-100 배지(media, 웰진(WelGene), 대한민국)에 5.0×10^4 cells/ml 단위의 Sf9 세포를 접종하여 30 분 동안 안착시켰다. 안정화된 Sf9 cell들의 형질전환을 위하여 pBacPAK8-Bx-AR1 plasmid DNA와 pBacPAK6 viral DNA와 Bacfectin(클론테크)의 혼합물을 접종한 후 25 °C에서 5 시간 동안 1차 배양을 실시하였다. 그 후 10% FBA가 첨가된 TC-100 배지 1 ml를 추가한 후, 27 °C의 세포배양기에서 5 일 동안 배양하였다. 배양된 세포들은 부유상태로 만든 후, 6000 rpm에서 5 분 동안 원심분리를 시켜 바이러스 스톡(Virus stock)인 상층액을 확보하였다. 회수된 상층액 500 μ l를 10 ml (5.0×10^6 Sf9 cells/ml)에 접종을 한 후, 5 일 동안 배양하였다. 이후 세포를 부유 상태로 만들어 3,300 rpm에서 원심분리하여 세포를 침전시킨 후, 용해 완충액(lysis buffer)으로 균질화 시키고, Banson Sonifier (Banson Sonifier, Danbury, CT, USA)로 단백질을 용출시켰다. 용해된 용액은 12,000 x g에서 10 분간 원심분리를 시킨 후 상층액을 회수하고, HisTrap HP 컬럼(GE 헬스케어(GE Healthcare), 미국)이 장착된 AKTAprime plus(GE 헬스케어)를 이용하여 정제하였다. 용출된 Bx-AR1를 포함한 용액은 아미콘 울트라 센트리퓨갈 필터(Amicon Ultra Centrifugal filter tube, 머크 밀리포어(Merck Millipore, 미국)를 이용하여 농축을 진행하였다.

pBacPAK8-Bx-AR1 플라스미드로 형질전환된 Sf9 세포들은 대조군 세포와 비교하면 2 일부터 35 kDa의 밴드 하나의 양이 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 Sf9 세포의 RIPA 추출물을 HisTrap 컬럼을 이용하여 분리한 결과, 양이 증가된 밴드만이 농축됨을 확인하였다. 그러므로 HiTrap 컬럼으로 농축된 단백질을 항원으로 사용하여 연구를 진행하였다.

3. 단클론항체의 제작

본 연구는 한림대학교 동물윤리 위원회의 승인(No. HMC 2017-00431-7)을 받은 후 진행을 하였다.

상기 2에서 수득된 정제된 Bx-AR1을 항원으로 이용하여 기존에 공지된 방법에 따라서 항체를 제작하였다.

구체적으로, 총 4 마리의 Balb/C 마우스에 항원 100 μ l (50 μ g Bx-AR1)를 보조제 100 μ l와 함께 1 회 주사한 후, 항원만 100 μ l만을 1 회 더 주사를 하여 면역가를 높였다. 면역성을 가지는 마우스의 비장을 적출하여

세포를 분리한 후, SP2/0 세포와 융합을 시켜 총 1,546개의 융합 하이브리도마 세포주를 제작하고, 효소면역분석법(ELISA)을 수행하여 Bx-AR1 항원에 대한 반응성을 갖는 34 개의 세포주를 선별하여, 그 중 Bx-AR1을 높은 역가로 인식하는 9 개의 하이브리도마 융합 클론을 선별하였다.

[0079] 선별된 세포주들 중에서 소나무 재선충 감염목 추출물과 Bx 추출물에 높은 반응성을 보이는 9 개의 세포주들에 대하여, 한계희석법(limited dilution)을 수행하였다. 9 개 세포주들에 대한 한계희석 클론 총 964개의 클론을 스크리닝하여 높은 역가를 보이는 총 34 개의 클론을 확보하였다(도 4 및 5).

[0080] 본 연구의 목표는 Bx-AR1을 인식하는 항체 중, Bx나 PWN 감염목을 확인할 수 있는 항체를 발굴하는 것이다. 그러므로, 발명자들은 34 개의 하이브리도마 융합 세포들의 선충들에 대한 반응성과 PWN 감염목 추출물에 대한 반응성을 조사하는 연구를 진행하였다.

[0082] 4. PWN 감염목과 건전목의 추출액 제조 방법

[0083] 문헌[Kim et al. (2017)]에 개시된 방법과 같이, 30 ml의 인산완충용액(Phosphate buffered saline, PBS, pH 7.2, 0.01 M Na₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl)을 이용하여 77개의 PWN 감염목과 22개의 건전목의 목편 3g에서 단백질 등을 포함한 수용성 물질들을 추출하였다. 77개의 PWN 감염목과 22개의 건전목의 추출액을 합쳐서 각각의 표준용액으로 사용하였다.

[0085] 5. 4종의 선충 배양 및 단백질 추출 방법

[0086] Bx, Bm, Bd 및 Bt를 이전에 공지된 방법에 따라서 배양하였다. 선충들을 HaltTMProtease Inhibitor Cocktail (써모피셔 사이언티픽(ThermoFisher Scientific), 미국)을 포함하는 RIPA 완충액(20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% 디옥시콜산 나트륨(sodium deoxycholate), 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 미국)을 이용하여 균질화시킨 후, 상층액을 침전물에서 분리하기 위하여 냉장된 원심분리기를 이용 13,000 rpm에서 15 분간 회전시켰다. 상층액의 단백질 농도를 BCA 방법(Bio-Rad, 미국)으로 정량 진행한 후, 10 µg/ml의 농도로 보정하여 ELISA의 항원으로 사용하였다.

[0088] 6. ELISA의 수행

[0089] 상기 수득된 Bx-AR1, PWN 감염목 추출물, 건전목 추출물, 또는 선충 추출물들을 ELISA 코팅 용액(0.4 M 카보네이트 완충액, pH 9.6)으로 희석한 후에, 96-웰 플레이트(SPL 라이프 사이언시즈(Life Sciences), 대한민국)에 일정량을 분주하고, 4 °C에서 밤새 방치하였다. 항원 용액을 완벽하게 제거한 후, 블로킹 용액(Stabilcoat Immunoassay Stabilizer, Surmodics IVD, Inc., 미국)을 분주하여 1 시간 동안 상온에서 반응시켜 비특이적인 반응성을 억제하였다. 블로킹 용액을 완벽하게 제거한 후, 1차 항체(primary antibody)를 분주하고 상온에서 1 시간 동안 교반하였다. 세척 용액(0.01 M PBS + 0.05% Tween20)으로 3회 세척한 후, 블로킹 용액을 이용하여 2차 항체(secondary antibody, HRP-conjugated anti-mouse-단클론항체 antibody, 써모피셔)를 1:5,000으로 희석한 후, 96-웰 플레이트에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 교반하였다. 세척 용액으로 5회 세척한 후, TMB 용액(시그마-알드리치)을 첨가하여 상온에서 15 분 동안 반응시킨 후, 2 M 황산(sulfuric acid, 대정화금, 대한민국)을 첨가하여 반응을 종결시켰다. Epoch 마이크로플레이트 리더(EPOCH microplate reader, BioTek, 미국)를 이용하여 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

[0090] Bx의 인식 여부를 확인하기 위하여, Bx 추출물을 이용하여 ELISA를 수행한 결과, 총 10개의 클론이 분비한 단클론항체가 광학 농도(optical density)가 2.0 이상의 값을 보였다. 이 결과를 통해, Bx-AR1이 Bx에서 발현이 되고, 발현된 Bx-AR1에 반응성이 높은 항체들이 존재함을 확인할 수 있었다.

[0091] 또한 PWN 감염목에 대한 34 개 단클론항체들에 대한 반응성을 확인하는 연구를 수행하였다. 그 결과, 34 개의 단클론항체 중에서 24개의 단클론항체들은 PWN 감염목 추출물과 건전목 추출물에 대한 OD 수치가 0.1 미만으로 차이가 없었다.

[0092] PWN 감염목 추출물에 가장 높은 민감성을 보이는 단클론항체는 1-1-E10-G2였다. 단클론항체 Bx-AR1-1-1-E10-G2는 또한 건전목에 대한 반응성도 높았지만, PWN 추출물에 비하여 43.4% 낮았다. 이 결과를 통해 민감도 다른

단클론항체를 조합으로 이용하면 PWN 감염목을 진단할 수 있을 것임을 추측할 수 있었다.

[0093]

나아가, 상기 34 개의 단클론항체중에서 Bx에 대한 민감도와 PWN 감염목 추출물과 건전목 추출물에 대한 민감도를 바탕으로 총 10개의 단클론항체를 선정하여 4종의 선충 추출물에 대한 반응성을 조사를 하였다.

[0094]

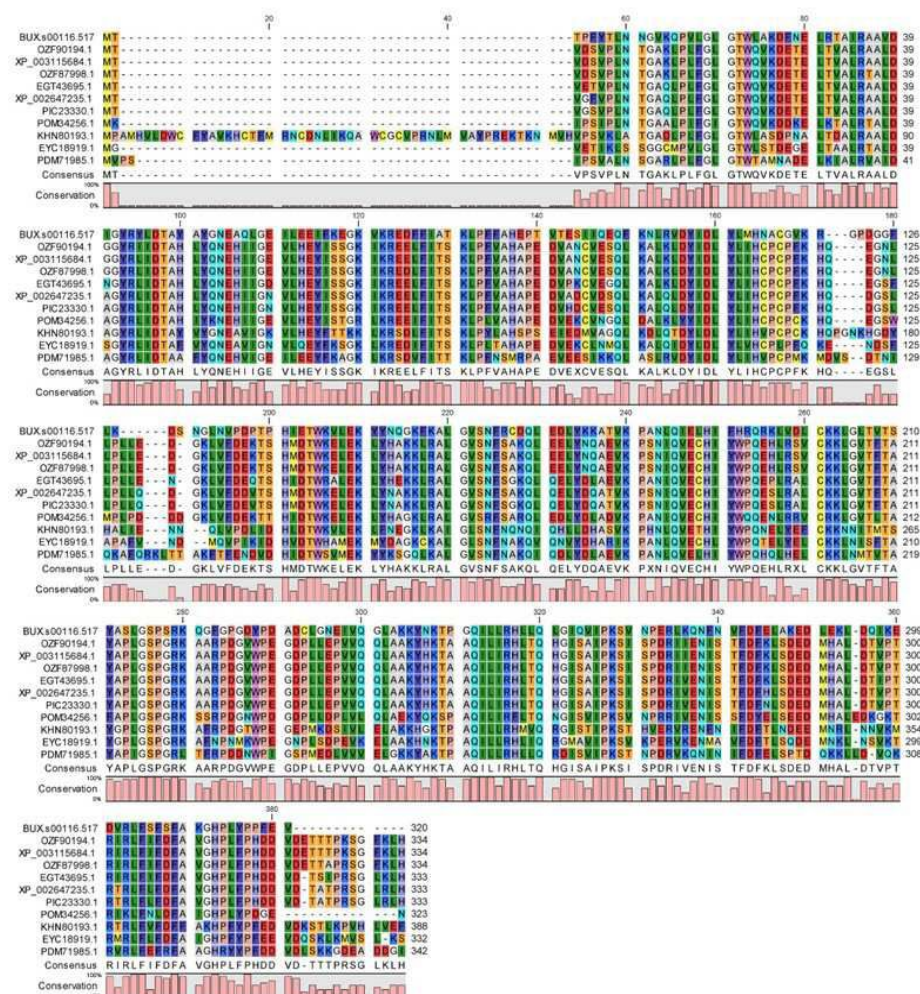
그 결과, 단클론항체-1-1-E10-D5와 단클론항체-1-1-E10-G2의 경우는 모든 선충에 대해서 높은 반응성을 보였고, 나머지 7개의 클론은 Bx에 대한 반응성은 0.4 내외로 낮았지만, 다른 선충들에 대한 반응성은 0.1 이하로 배경(background) 수준이었다. 이 결과를 통해, 단클론항체들의 최적 쌍(pair)를 찾는다면 Bx들 신속하게 진단할 수 있는 항체기반 진단키트를 제작할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0096]

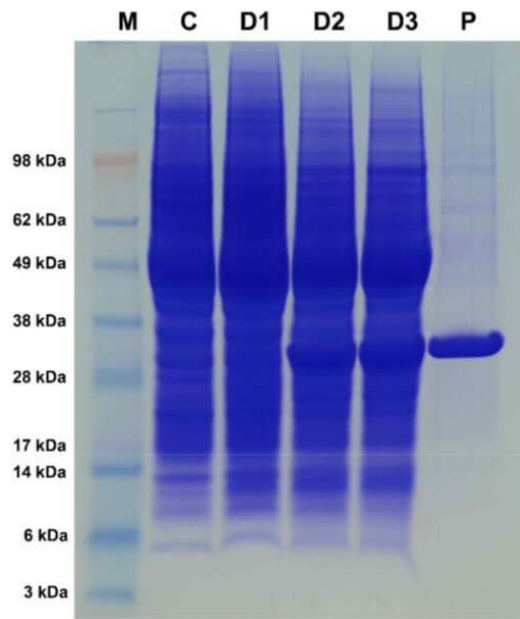
이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로, 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

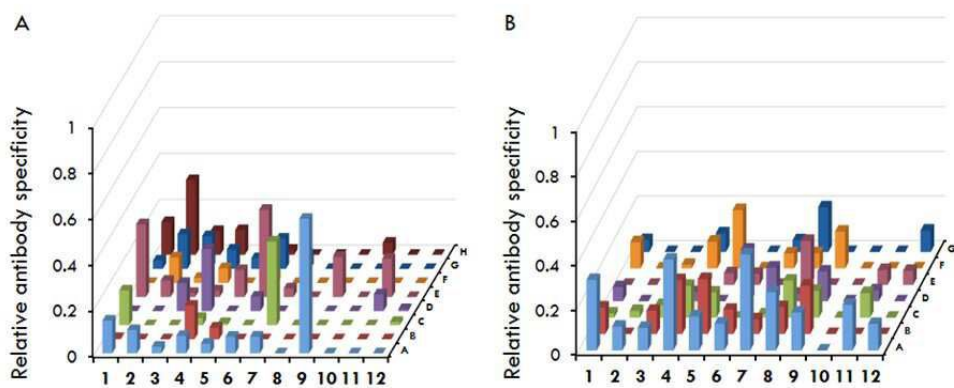
도면1



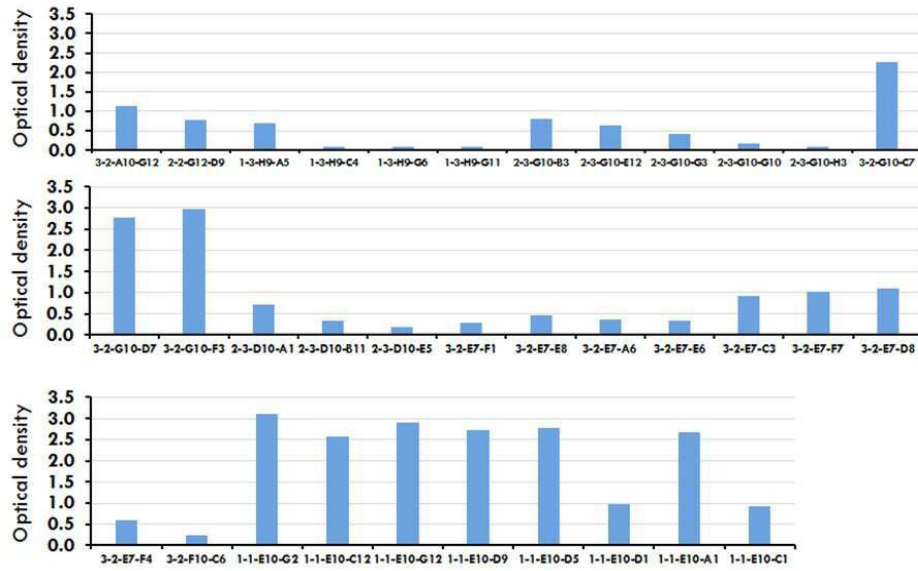
도면2



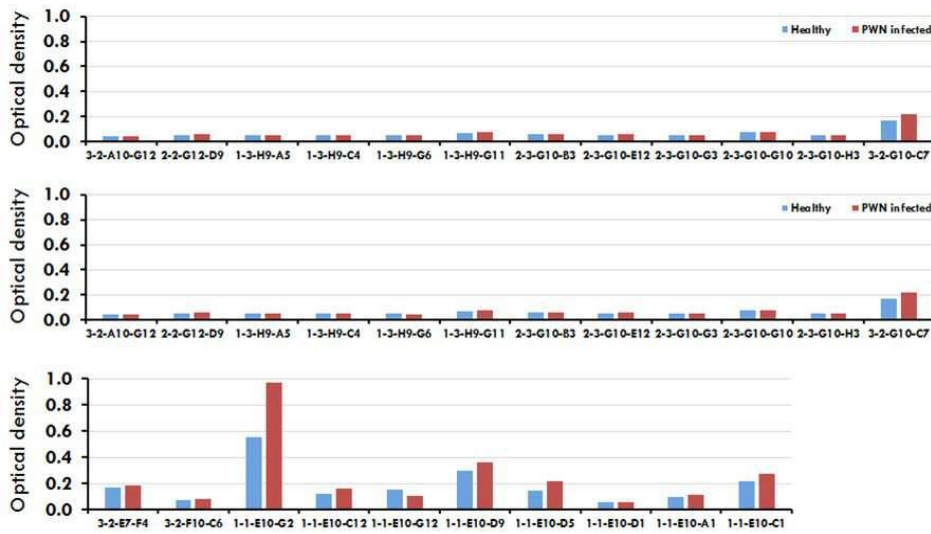
도면3



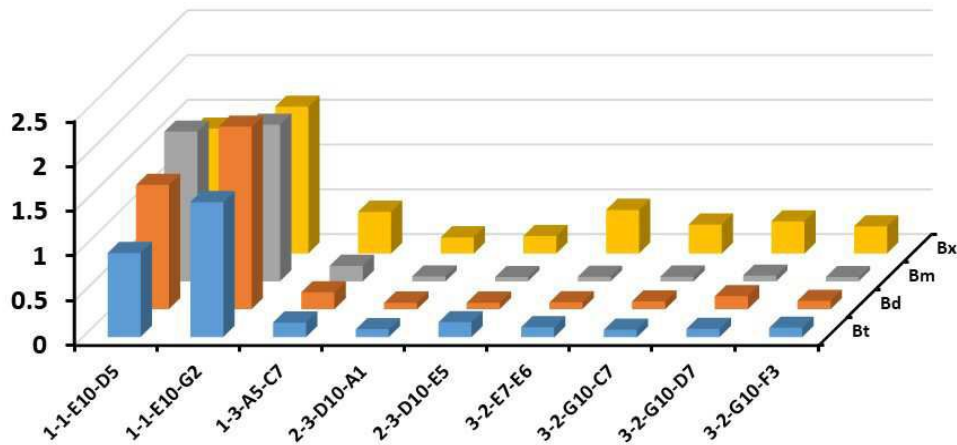
도면4



도면5



도면6



서열 목록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> METHOD FOR DIAGNOSING PINE WOOD NEMATODE AND NAMATODE-INFECTED TREES USING GENE SPECIFIC FOR PINE WOOD NEMATODE ALDOSE REDUCTASE 1 AND METHOD FOR DIAGNOSE USING GENE OF PINE WOOD NEMATODE ALDOSE REDUCTASE 1

<130> 190001

<160> 7

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 455

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bx-AR1-1-1-E10-D5

<400> 1

acattgtcga acgcgttggg agctctccca tatggtcgac ctgcaggcgg ccgcgaattc 60

actagtatt agatctagg accaagggat agacagatgg tagcttcgcc ccattggctc 120

ctcagccaag cacatacacc aaatgtctga acctgcggtt cctctcgtac tgagcaggat 180

taccatggca acaacacatc atcagtaggg taaaactaac ctgtctcagc acggtctaaa 240

cccagctcac gttccctatt agtgggtgga caatccaacg cttggtgaat tctgcttcac 300

aatgatagga agagccgaca tcgaaggatc aaaaagcgac gtcgctatga acgcttggcc 360

gccacaagcc agttaccctg tggttaacttt tctgaatcga attcccgcgg ccgcatggc 420

ggccgggagc atgcgacgtc gggcccaatt cgccc 455

<210> 2

<211> 388

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bx-AR1-1-1-E10-G2

<400> 2

tgggcgagtc gcatgctccg gccgccatgg cggccgcggg aattcgatta gatctaggga 60

ccaagggata gacagatggt agcttcgccc cattggctcc tcagccaagc acatacacca 120

aatgtctgaa cctgcggttc ctctcgtact gaggcaggatt accatggcaa caacacatca 180

tcagtagggt aaaactaacc tgtctcacga cggcttaacc cagctcacgt tccctattag 240

tgggtgaaca atccaacgct tggtaggatt tgcttcacaa tgataggaag agccgacatc 300

gaaggatcaa aaagcgacgt cgctatgaac gcttggccgc cacaagccag ttaccctgtg 360

gtaacttttc tgaatcacta gtgaattc 388

<210> 3

<211> 459

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bx-AR1-1-3-A5-C7

<400> 3

gggcgaattg ggcccgacgt cgcagctcc cggccgccat ggccggccgc ggaattcgat 60

tagatctagg gaccaaggga tagacagatg gtagcttcgc cccattggct cctcagccaa 120

gcacatacac caaatgtctg aacctgcggt tcctctcgta ctgagcagga ttaccatggc 180

aacaacacat catcagtagg gtaaaactaa cctgtctcac gacggtctaa cccagctca 240

cgctccctat tagtgggtga acaatccaac gcttggtgaa ttctgcttca caatgatagg 300

aagagccgac atcgaaggat caaaaagcga cgtcgctatg aacgcttggc cgccacaagc 360

cagttacct gtggtaactt ttctgaatca ctagtgaatt cgcggccgcc tgcaggtcga 420

ccatatggga gagctccaa cgcgtttgat ttccaatgt 459

<210> 4

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (fwd)

<400> 4

gaatctagaa tgaccactcc attctacaca ttgaa 35

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (rev)

<400> 5

cttggtaccg acaacttcga atggtgggta aag 33

<210> 6

<211> 966

<212> DNA

<213> Bursaphelenchus xylophilus

<400> 6

atgaccactc cattctacac attgaataat ggcgttaagc aaccagtctt gggactggga 60

acttggttgg ccaaggattt taacgaattg aggactgccca ttagagcggc cgttgacatc 120

ggatacacat atttggacac tgcctatgcc tatgggaacg aagcacagct tggagagatt 180

ctggaggaga tcttcaagga gggaaaggtc aaaagagagg acttcttcat tgccacgaag 240

ttgccattct ttgctcatga gccaccgta actgagtcaa ttattcaaga gcaattcaaa 300

aatctccgtg tggattatat tgatctatat ttgatgcaca atgcctgtgg agtcaagaga 360

ggccctgatg ggggatttct gaaggattcg aatggactga acgtccccga cccaactcct 420

cacattgaaa ccitggaaagt attggagaaa tattacaatc aaggaaagtt caaggctttg 480

ggagtctcca atttccgatg tgatcaactg gaagatctct acaagaaggc taccgtaaaa 540

ccggccaacc ttcagattga acttcacatc ttccacagac agaggaaact ggttgacttg 600

tgtaagaagt tgggactgac agtcacctct tatgcttcat tgggatcgcc atcaaggaaa 660

caagggtttg ggcctggtga ttaccccgat gctgattgtt tgggcaatga aattgttcaa 720

ggattggcca aaaagtacaa taaaactcct ggacagatcc ttctgagaca ctttctccaa 780

ctcggtatcc aggtcattcc caaaagtgt aatccagaga gactgaagca gaatttcaat 840

gtatttgact tcgaattggc aaaggaagat ctggaaaaat tggatcagat caaagaagat 900

gtccgactgt tctccttttc ctttgcgaaa ggacaccccc ttaccacc accgaagtt 960

gtctaa

966

<210> 7

<211> 966

<212> PRT

<213> Bursaphelenchus xylophilus

<400> 7

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

20 25 30

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

35 40 45

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

50 55 60

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

65 70 75 80

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

85 90 95

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

100 105 110

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

115 120 125

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

130 135 140

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

145 150 155 160

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

165 170 175

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

180 185 190

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

[illegible]

450 455 460
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
465 470 475 480
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

485 490 495
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
500 505 510
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
515 520 525
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
530 535 540
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
545 550 555 560

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
565 570 575
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
580 585 590
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
595 600 605
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
610 615 620
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

625 630 635 640
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
645 650 655
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
660 665 670
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
675 680 685
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
690 695 700

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
705 710 715 720
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
725 730 735
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
740 745 750
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
755 760 765
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
770 775 780
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
785 790 795 800
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
805 810 815
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
820 825 830
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
835 840 845
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
850 855 860
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
865 870 875 880
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
885 890 895
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
900 905 910
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
915 920 925
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
930 935 940
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
945 950 955 960

Ala Ala Ala Ala Ala Ala

965