



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년02월20일
(11) 등록번호 10-0805376
(24) 등록일자 2008년02월13일

(51) Int. Cl.

C12N 15/29 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0106796

(22) 출원일자 2006년10월31일

심사청구일자 2006년10월31일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020020042640 A

JP09313186 A

US20030226166 A1

논문1995.03

(73) 특허권자

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

(72) 발명자

박영두

경기 용인시 수지구 성북동 성동마을 수지 자이 1차아파트 108동702호

정귀미

경기 용인시 기흥구 보라동 민속마을쌍용아파트 107동 1802호

(74) 대리인

이덕록

전체 청구항 수 : 총 2 항

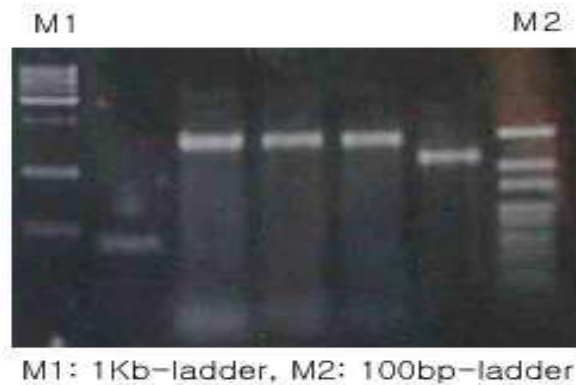
심사관 : 김기연

(54) **쑥갓의 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성에 관여하는 에스아데노실 엘 메티오닌 합성효소를 코딩하는 유전자 및 그분리방법**

(57) **요약**

본 발명은 쑥갓(*Chrysanthemum coronarium L.*)으로부터 분리된 진핵 및 원핵 생물 내에 존재하는 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase)를 코딩하는 유전자 및 그 분리방법에 관한 것이다. 본 발명 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소를 코딩하는 유전자는 식물의 성장속도를 조절함으로써 안정적인 쑥갓 공급을 제공하는 뛰어난 효과가 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

- a) 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소를 코딩하는 유전자를 분리하기 위해 에스 아데노실 엘 메티오닌 효소 유전자를 크로닝하는 서열번호 1 내지 4에 기재된 염기서열로 구성된 폴리뉴클레오티드 프라이머를 제작하는 단계;
 - b) 상기 a) 단계에서 제작된 프라이머를 이용하여 역전사-중합연쇄반응을 하고 쪽갓(*Chrysanthemum coronarium* L.)으로부터 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소 유전자를 분리하는 단계;
 - c) 상기 b) 단계에서 분리된 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소 유전자의 전체 염기서열을 확인하는 단계;
 - d) 아그로박테리움을 이용하여 쪽갓(*Chrysanthemum coronarium* L.)의 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소 유전자를 식물체 내로 형질전환하는 단계;
 - e) 상기 d) 단계의 형질전환물의 슈트 또는 뿌리를 유도하는 단계 및
 - f) 쪽갓(*Chrysanthemum coronarium* L.)의 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소유전자의 안정성을 확인하는 단계로
- 구성됨을 특징으로 하는 쪽갓(*Chrysanthemum coronarium* L.)의 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase)를 코딩하는 유전자 분리방법.

청구항 3

서열번호 5에 기재된 쪽갓(*Chrysanthemum coronarium* L.)의 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소 유전자를 코딩하는 유전자 염기서열.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <6> 본 발명은 쪽갓(*Chrysanthemum coronarium* L.)으로부터 분리된 세포성장 및 스트레스 반응에 관여하는 파이토호르몬인 에틸렌과 폴리아민 합성 단계에서 중요한 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소를 코딩하는 유전자 및 그 분리방법에 관한 것이다.
- <7> 일반적으로 에스 아데노실 엘 메티오닌(S-adenosyl-L-methionine synthetase)은 황(sulfur-)에 메틸기(-CH₃)를 갖는 화합물로서 미생물, 식물, 동물 등의 다양한 종에서 공통적으로 발견되고 있으며, 식물의 2차 대사물질, 단백질, 탄수화물, 핵산, 지질의 합성에 관여하고 에틸렌(ethylene)과 폴리아민(polyamine)의 전구체이기도 하며 식물체의 세포벽 형성에 관여한다고 알려져 있다.
- <8> 이러한 에스 아데노실 엘 메티오닌(S-adenosyl-L-methionine)은 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase)에 의해 아데노신 트리포스페이트(adenosine triphosphate; ATP)와 엘 메티오닌(L-methionine)이 가수분해되어 생성되며, 동시에 파이로포스페이트(pyrophosphate)와 이노제닉 오르토포스페이트(inorganic orthophosphate)를 방출한다. 이렇게 생성된 에스 아데노실 엘 메티오닌은 다양한 자극에서 조직 특이적 또는 유전자 특이적으로 발현이 조절되며, 식물의 성장과 노화에 여러 가지의 변화를 유도한다. 특히 식물의 성장과 생장에 있어서 중요한 호르몬인 에틸렌(ethylen)은 에스 아데노실 엘 메티오닌으로부터 ACCase로 인하여 생성되며, 마찬가지로 세포 분화와 생장, 노화를 조절하는 폴리아민(polyamine)인 스퍼미딘(spermidine)과 스퍼민(spermine)은 에스 아데노실 엘 메티오닌으로부터 생성된다.

- <9> 쑥갓은 국화가 작물로 영양면으로 높은 함량의 비타민과 플라보노이드는 물론 신선하고 독특한 향을 지녀 훌륭한 기능성 채소로 각광받고 있는 작물 중의 하나이다. 그러나 쑥갓(*Chrysanthemum coronarium* L.)유래의 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase)를 코딩(coding)하는 유전자나 아미노산 서열에 관해서는 보고된 바 없다.
- <10> 따라서, 본 발명은 상기와 같은 점들을 감안하여 안출한 것으로, 본 발명의 목적은 쑥갓으로부터 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소를 코딩하는 유전자를 분리하여 그의 전체 염기서열을 제공함에 있다.
- <11> 본 발명의 다른 목적은 상기의 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소를 코딩하는 유전자의 크로닝할 수 있는 프라이머 및 이를 이용하여 쑥갓으로부터 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소의 분리방법을 제공함에 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <12> 본 발명의 상기 목적은 쑥갓으로부터 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소 유전자를 크로닝하는 프라이머를 작성하고 상기 프라이머를 이용하여 쑥갓으로부터 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소유전자를 분리하여 전체 염기서열을 확인하였으며 상기 쑥갓의 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소유전자를 아그로박테리움을 이용하여 식물체 내로 형질전환하여 식물체 내로 도입한 후 안정성을 확인함으로써 달성하였다.
- <13> 이하 본 발명의 구성을 실시예를 들어 더욱 상세히 설명하지만 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니다.

<14>

발명의 구성 및 작용

- <15> 본 발명은 채소작물의 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소 염기서열들의 상동성을 기초로 에스 아데노실 엘 메티오닌 효소유전자를 크로닝할 수 있는 프라이머를 제작하는 단계; 상기 제작된 프라이머를 이용하여 쑥갓으로부터 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소유전자를 분리하는 단계; 상기 분리된 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소유전자의 전체 염기서열을 확인하는 단계; 상기 염기서열을 함유하는 재조합 벡터를 제조하여 이를 아그로박테리움에 형질전환시켜 식물체를 형질전환시키는 단계; 상기 형질전환물의 슈트 및 뿌리를 유도하는 단계 및 상기 식물체 내로 도입된 쑥갓의 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소유전자의 안정성을 확인하는 단계로 구성된다.
- <16> 본 발명에 사용된 쑥갓(*Chrysanthemum coronarium* L.)은 무균상태에서 키운 것에서 채취하여 RNA를 분리하였다.
- <17> **실시예 1: 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소 유전자를 분리하기 위한 프라이머 제작**
- <18> 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 유전자(S-adenosyl-L-methionine synthetase; 이하 SAMS)의 공통된 부분을 찾기 위하여 기존에 발표되어 있는 작물별 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 유전자를 National Center for Biotechnology Information(NCBI) Genbank에서 검색하였다. 유전자의 전체 염기서열을 수집하기 위해 Entrez program을 사용하였다. 검색방법으로는 유전자명을 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase)를 검색어로 선정하였다.
- <19> 수집된 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase) 유전자 가운데, 갓(*Brassica Juncea*), 애기장대(*Arabidopsis thaliana*), 그리고 보리수나무(*Elaeagnus umbellata*)등의 염기서열을 선별, 염기서열의 상동성을 많이 보이는 부분을 BLAST program 으로 찾은 뒤 그 부분을 중심으로 표 1과 같이 프라이머를 제작하였다.

- <20> [표 1] 쑥갓의 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소유전자를 분리하기 위해 제작된 프라이머의 염기서열

<21>

서열번호	프라이머	염기서열
서열번호 1	MetSyn-F	5'-tgt caa cga ggg aca tcc aga c-3'
서열번호 2	MetSyn-R	5'-cca agt ttg gtg gcg agg ac-3'
서열번호 3	Nested-MetsynF	5'-aag gtc aca tgt tgc ggt atg-3'
서열번호 4	Nested-MetsynR	5'-tca tca gtg gcg taa cca aa-3'

- <22> **실시예 2: 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소유전자의 분리**

- <23> SAMS 유전자의 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 cDNA를 합성한 뒤 Generacer™의 oligo dT로 중합연쇄반응으로 분리하였다. cDNA합성 프로그램 조건은 1μg의 RNA를 oligo dT primer와 70℃에서 두어 RNA 이차 구조를 제거한 뒤 42℃에서 30분간 역전사시키고 그 사용된 역전사효소를 불활성화시키기 위해 75℃에서 10분간 두었다. 그 후 합성된 cDNA 2 μg을 사용하여 SAMS 유전자의 3' -end 를 얻기 위해 제작된 프라이머와 태크 중합효소(tag polymerase)와 함께 중합연쇄반응하였다. 상기 중합연쇄반응 조건은 94℃에서 2분간 초기 변성 시간을 둔 뒤 94℃에서 30초, 60℃에서 40초, 72℃에서 1분으로 34회 순환(cycle) 실행하고 마지막으로 72℃에서 7분간 최종 연장시킨 후 4℃를 유지하여 전체 반응을 종료하였다. 또한, SAMS 유전자의 5'-end 부분은 총 RNA의 5' -end는 T4 RNA ligase를 사용하여 Generacer™ RNA oligo 의 3'-end 와 특이적으로 결합시켰다. Generacer™ 5 primer 또는 Generacer™ 5' Nested primer와 제작된 Metsyn R 또는 Nested-Metsyn R 프라이머로 정확한 5' clone를 얻었다(도 1 참조).
- <24> **실시예 3: 썩갯의 에스 아테노실 엘 메티오닌 합성효소유전자의 전체 염기서열 확인**
- <25> 염기서열 분석용 pGEM-T easy vector 내부에 크로닝하고 중합연쇄반응을 이용하여 분리된 단편의 염기서열 분석은 GenBank BLAST program을 사용하였다. 그 결과 SAMS 유전자의 5' 시작부분은 Metsyn F(서열번호 1)와 Metsyn R(서열번호 2) 프라이머로 증폭된 417bp 산물, Generacer™ 5' 와 Metsyn R(서열번호 2) 프라이머로 증폭된 457bp 산물, Generacer™ 5' Nested 프라이머와 Nested-Metsyn R(서열번호 4) 프라이머로 증폭된 400bp 산물, Metsyn F(서열번호 1)와 Racer-dT 프라이머로 증폭된 약 1444bp 산물, Metsyn F(서열번호 1)와 Racer 3' 프라이머로 증폭된 1400bp 산물, Metsyn F(서열번호 1)와 Racer 3' nested 프라이머로 증폭된 1400bp 산물, 그리고 Nested-Metsyn F(서열번호 3)와 Racer 3' nested 프라이머로 증폭된 1200bp 산물 각각의 염기서열과 아미노산 서열을 분석한 결과 도 2a와 같다.
- <26> 본 발명 썩갯의 에스 아테노실 엘 메티오닌 합성효소의 시작 코돈과 종료 코돈을 결정한 후 처음과 끝에 각각의 제한효소 자리를 시작 코돈 쪽에는 *XbaI* 절단서열을 종료 코돈 쪽에는 *EcoRI* 절단서열을 부착한 뒤 새롭게 전체 유전자를 한꺼번에 크로닝하기 위하여 프라이머를 제작하여 썩갯의 cDNA로부터 태그 중합효소를 이용하여 중합연쇄반응을 이용하여 전체 유전자를 염기서열 분석용 pGEM-T easy vector 내부에 크로닝한 다음 본 발명 SAMS를 코딩하는 유전자의 염기서열을 확보하였다(서열번호 5).
- <27> 그리고 본 발명 썩갯의 에스 아테노실 엘 메티오닌 합성효소유전자와 담배(*Nicotiana tabaccum*), 토마토(*Lycopersicon esculentum*) 및 겨자(*Brassica juncea*)의 에스 아테노실 엘 메티오닌 합성효소의 상동성을 비교한 결과 도 2b와 같이 토마토(*L. esculentum*)의 에스 아테노실 엘 메티오닌 합성효소와 93%의 높은 상동성을 보였다.
- <28> 썩갯의 RNA를 대상으로 3' - 프라이머와 5' - RACE 프라이머를 이용하여 역전사-중합연쇄반응 결과, 본 발명 썩갯의 에스 아테노실 엘 메티오닌 합성효소의 전체 유전자가 확보되었음을 확인할 수 있었다.
- <29> **실시예 4: 아그로박테리움을 이용한 썩갯의 에스 아테노실 엘 메티오닌 합성 효소 유전자의 식물체 내로 삽입**
- <30> 본 발명 썩갯의 SAMS 유전자를 식물체 내로 삽입하기 위한 발현 재조합 벡터를 만들었다. 상기 삽입(insert)될 썩갯의 전체 에스 아테노실 엘 메티오닌 합성효소를 코딩하는 유전자를 포함하고 있는 pGEM-T easy vector를 *EcoRI* 과 *XbaI*으로 절단하고 전기영동으로 유전자 단편의 크기를 확인한 후 겔(gel)에서 추출하는 방법으로 삽입(insert)하였다.
- <31> 상기와 같은 방법으로 pILTAB 357 벡터도 *EcoRI*과 *XbaI*으로 절단하고 DNA 단편의 크기를 확인하고 겔(gel)에서 추출하는 방법으로 벡터(이하 pCSAMS 로 지칭)를 준비하였다. 상기 준비된 벡터와 삽입물을 적정농도로 혼합한 후 T4 DNA 리가아제(ligase)를 이용하여 결합시키고 DH5α (*E.coli*)에 형질전환시켰다. 형질전환을 통해 얻은 콜로니를 배양하여 재조합 DNA를 추출하고 상기 DNA를 *EcoRI*과 *XbaI*으로 절단하고 전기영동으로 벡터와 삽입물의 크기와 존재를 확인하고 중합연쇄반응과 시퀀싱(sequencing)을 하여 제대로 결합했는지 확인하였다.
- <32> 벡터와 삽입물의 결합이 확인된 발현 벡터를 아그로박테리움 튜마페이션스 EHA105(*A. tumefaciens* EHA105)에 Freeze-thaw법에 의하여 형질전환시켰다. 형질전환 후 아그로박테리움 역시 콜로니를 배양하여 재조합 벡터가 제대로 포함되었는지 중합연쇄반응으로 확인하였다. 이때 중합연쇄반응은 플라스미드(plasmid)를 주형(template)으로 넣는 대신 태그(Tag) 중합효소, 유전자전체를 분리할 수 있는 프라이머 즉, START: 5' tct aga atg gag acc ttc ttg ttc aca tcc 3', STOP: 5' gaa ttc tca agc ttt agg ctt gag aac ctt aac 3'와 10X tag buffer, 염화마그네슘 용액이 포함된 액체에 콜로니가 찍힌 이쑤시개를 넣어 액체 속에 그 콜로니가 녹게 한 뒤

상기 혼합물을 중합연쇄반응을 이용하여 발현 벡터(vector)의 도입이 확인된 아그로박테리움 투마페이선스 EHA105를 썬갓 형질전환에 사용하였다.

<33> **실시예 5: 슈트 및 뿌리 유도**

<34> 썬갓에 접종하는 형질전환 매개체로는 상기 실시예 4의 식물형질전환용 벡터 를 함유하고 있는 아그로박테리움 투마페이선 EHA105를 사용하였다.

<35> 썬갓의 잎 절편체를 아그로박테리움 투마페이선으로 접종시킬 때 형질전환의 효율을 높이기 위해, 먼저 형질전환용 운반체를 함유하고 있는 아그로박테리움 투마페이선(*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404/pRCV2)을 카나마이신(kanamycin) 50 mg/L가 함유된 고체 YEP 배지에 평판배양하여 28℃에서 48시간 배양하였고, 배양된 아그로박테리움 투마페이선 세포 중 몇몇 콜로니(colony)를 찍어 카나마이신 50mg/L가 함유된 5mL 액체 YEP 배지에 접종하여 28℃에서 48시간 현탁 배양하였다. 배양된 현탁액에서 700 μ L를 추출한 다음 pH가 5.6으로 조정된 50mL 액체 YEP 배지에 첨가하여 28℃에서 OD 600이 1.0이 될 때까지 현탁 배양하였다. 마지막으로 배양된 현탁액은 원심분리기에서 4000rpm으로 15분간 원심분리시켜 25mL 액체 YEP 배지로 재현탁되어 썬갓 잎 절편체의 접종에 사용되었다.

<36> 썬갓 잎 절편체는 썬갓 종자를 무균상태에서 발아시킨 뒤 5 내지 10 mm로 자르고, 상기 아그로박테리움 투마페이선 현탁액에 10분간 침지시켜 접종하였다. 접종된 절편은 공동배양배지(MS기본배지, 3% sucrose, 0.8% plant agar, 0.5 mg/L BA, 0.2 mg/L NAA, pH 5.6)에서 3일간 공동배양하였다. 이 후 썬갓 잎 절편체를 액체 공동배양 배지로 세척하여 아그로박테리움 투마페이선을 씻어낸 후 슈트 유도배지(MS기본배지, 3% sucrose, 0.8% plant agar, 0.5 mg/L BA, 0.2 mg/L NAA, 30 mg/L kanamycin, 200 mg/L cefotaxime, pH 5.6)에 형질전환된 썬갓 잎 절편체를 배양하여 형질전환된 조직에서만 슈트가 유도되도록 하였다(도 3a 참조).

<37> 슈트 유도배지에 옮겨 배양하여 유도된 형질전환 슈트 (도 3b 참조)는 뿌리 유도배지(1/2 MS기본배지, 3% sucrose, 0.7% plant agar, 200 mg/L cefotaxime, pH 5.8)로 옮겨 뿌리 발생을 유도하였다. 뿌리가 생성된 형질전환체는 순화전 기내에서 1 내지 2주 동안 배양 후 순화를 실시하였다 (도 3c 참조).

<38> **실시예 6: 형질전환체와 그 후대에서 유전자 삽입 및 안정성 확인**

<39> 본 발명에서 사용한 하이그로마이신 저항성 유전자가 본 발명 썬갓의 SMAS 유전자의 형질전환 개체에 성공적으로 삽입되었는지 확인하기 위하여 썬갓 형질전환체에서 genomic DNA를 분리하고 중합연쇄반응으로 확인하였다. 이때 카나마이신 유전자가 삽입되었는지를 확인하는 프라이머는 카나마이신 유전자 내부에서 증폭될 수 있는 프라이머(primer) 쌍을 중합연쇄반응으로 증폭시켰다. 이 결과 도 4와 같이 형질전환 썬갓에서 0.7kb 크기의 밴드(band)가 생성되어 카나마이신 유전자가 썬갓 게놈(genome) 내부에 안정적으로 삽입된 것을 확인하였다.

발명의 효과

<40> 본 발명 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase)를 코딩하는 유전자는 식물 형질전환시 식물의 성장속도를 조절할 수 있으므로 식물육종산업 및 화훼산업에 있어서 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 본 발명의 정확한 5'-, 3'- RACE 단편을 nested-PCR로써 GeneRacer™ primer kit, MetSyn-F(서열번호 1) 및 MetSyn-R(서열번호 2) 프라이머를 사용하여 RT-PCR하고 썬갓으로부터 증폭된 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소를 코딩하는 유전자의 단편을 전기영동한 사진이다.

<2> 도 2a는 썬갓에서 RNA를 추출한 다음 역전사-중합연쇄반응을 하고 분리된 본 발명 썬갓의 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소유전자의 아미노산 시퀀스 결과이다.

<3> 도 2b는 본 발명 썬갓의 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소유전자의 아미노산 시퀀스와 담배(*Nicotiana tabacum*), 토마토(*Lycopersicon esculentum*) 및 겨자(*Brassica juncea*) 각각의 시퀀스간의 상동성 비교 결과이다.

<4> 도 3a는 본 발명의 아그로박테리움에 의한 썬갓의 형질전환 과정 중 캘러스 유도배지에서 형질전환된 캘러스(callus)가 유도되는 과정을 나타낸 것이며, 도 3b는 아그로박테리움에 의한 썬갓의 형질전환 과정 중 슈트 분화배지에서 슈트(shoot)가 발달하는 과정을 나타낸 것이며, 도 3c는 아그로박테리움에 의한 썬갓의 형질전환 과

정 중 슈트로부터 뿌리(root)가 생성되는 과정을 나타낸 것이다.

<5>

도 4는 본 발명 쪽작 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소유전자가 전이된 형질전환 개체를 중합연쇄반응으로 확인한 그림이다.

도면

도면1



도면2a

```

METFLFTSESVNEGHPDKLCDQVSDAILDACLEQDPESKVACETCTKTNMVMVFGEITTKATVDYEKIVRDTCREIGFTSADVGLDADNCKVL
VNIEQQSPDIAQGVHGLTKKPEDIGAGDQGHMFGYATDEPELMPLTHVLATKLGAKLEVRKNNTCPWLRPDGKTQVTVEYHNDNGAMVPT
RVHTVLISTQHDETVTNDQIAADLKEHVIKPVIPAQYLDNTIFHLNPSGRFVIGGPHGDAGLTGRKIIIDTYGGWGAHGGGAFSGKDPTKVD
RSGAYIVRQAASIVASGLARRCIVQVSYAIGVAEPLSVFVDYTKGTIPDKDILVLIKENFDFRPGMAINLDLKRGGNFRYQKTAAYGHFG
REDPDFTWETVKVLKPKA*
    
```

도면2b

```

P03B_tabacoouna do MBTPLP T383VNB0KPD ELC DQ V3D A I L D A C L B Q D P B 3 E V A C B T C T E T N H V H V P 0 B I T T E 60
P03B_tonatoa do MBTPLP T383VNB0KPD ELC DQ V3D A I L D A C L B Q D P B 3 E V A C B T C T E T N H V H V P 0 B I T T E 60
P03B_ohryaa do MBTPLP T383VNB0KPD ELC DQ V3D A I L D A C L B Q D P B 3 E V A C B T C T E T N H V H V P 0 B I T T E 60
P03B_nuatar da do MBTPLP T383VNB0KPD ELC DQ V3D A I L D A C L B Q D P B 3 E V A C B T C T E T N H V H V P 0 B I T T E 60
-----,
P03B_tabacoouna do A T V D Y B E I V R D T C R B I 0 P T 3 A D V 0 L D A D N C E V L V N I B Q Q 3 P D I A Q 0 V H 0 H L T E E P B B I 0 A 120
P03B_tonatoa do A T V D Y B E I V R D T C R B I 0 P V 3 A D V 0 L D A D N C E V L V N I B Q Q 3 P D I A Q 0 V H 0 H L T E E P B B I 0 A 120
P03B_ohryaa do A T V D Y B E I V R D T C R B I 0 P T 3 A D V 0 L D A D N C E V L V N I B Q Q 3 P D I A Q 0 V H 0 H L T E E P B B I 0 A 120
P03B_nuatar da do A E V D Y B E I V R 3 T C R B I 0 P I 3 A D V 0 L D A D E C N V L V N I B Q Q 3 P D I A Q 0 V H 0 H L T E E P B B I 0 A 120
- , -----, --- --- -----: -: -----: ---
P03B_tabacoouna do 0 D Q 0 H M P 0 Y A T D B T P B L M P L T H V N A T E L 0 A E L T B V R E N E T C P H L R P D 0 E T Q V T V B Y E N D N 180
P03B_tonatoa do 0 D Q 0 H M P 0 Y A T D B T P B L M P L T H V N A T E L 0 A E L T B V R E N E T C P H L R P D 0 E T Q V T V B Y E N D N 180
P03B_ohryaa do 0 D Q 0 H M P 0 Y A T D B T P B L M P L T H V N A T E L 0 A E L T B V R E N E T C P H L R P D 0 E T Q V T V B Y E N D N 180
P03B_nuatar da do 0 D Q 0 H M P 0 Y A T D B T P B L M P L T H V N A T E L 0 A E L T B V R E N E T C P H L R P D 0 E T Q V T V B Y E N D N 180
-----: -:
P03B_tabacoouna do 0 A M V P I R V H T V L I 3 T 0 H D B T V T N D Q I A Q D L E B H V I E P V I P A Q Y L D B N T I P H L N P 3 0 R P V I 240
P03B_tonatoa do 0 A M V P I R V H T V L I 3 T 0 H D B T V T N D Q I A Q D L E B H V I E P V I P A E Y L D B N T I P H L N P 3 0 R P V I 240
P03B_ohryaa do 0 A M V P T R V H T V L I 3 T 0 H D B T V T N D Q I A Q D L E B H V I E P V I P A Q Y L D B N T I P H L N P 3 0 R P V I 240
P03B_nuatar da do 0 A M I P I R V H T V L I 3 T 0 H D B T V T N D B I A V D L E B H V I E P V I P A E Y L D B N T I P H L N P 3 0 R P V I 240
---: - -----: -- -- -----: -: ---
P03B_tabacoouna do 0 0 P H 0 D A 0 L T 0 R E I I I D T Y 0 0 H 0 A H 0 0 0 A P 3 0 E D P T E V D R 3 0 A Y I V R Q A A E 3 V V A 3 0 L A R 300
P03B_tonatoa do 0 0 P H 0 D A 0 L T 0 R E I I I D T Y 0 0 H 0 A H 0 0 0 A P 3 0 E D P T E V D R 3 0 A Y I V R Q A A E 3 V V A 3 0 L A R 300
P03B_ohryaa do 0 0 P H 0 D A 0 L T 0 R E I I I D T Y 0 0 H 0 A H 0 0 0 A P 3 0 E D P T E V D R 3 0 A Y I V R Q A A E 3 V V A 3 0 L A R 300
P03B_nuatar da do 0 0 P H 0 D A 0 L T 0 R E I I I D T Y 0 0 H 0 A H 0 0 0 A P 3 0 E D P T E V D R 3 0 A Y I V R Q A A E 3 V V A 3 0 L A R 300
-----: -: ---
P03B_tabacoouna do R C I V Q V 3 Y A I 0 V A B P L 3 V P V D T Y E T 0 T I P 0 E D I L V L I E B N P D P R P 0 H M 3 I N L D L L R 0 0 N P 360
P03B_tonatoa do R C I V Q V 3 Y A I 0 V A B P L 3 V P V D T Y E T 0 T I P 0 E D I L V L I E B N P D P R P 0 H M 3 I N L D L L R 0 0 N Y 360
P03B_ohryaa do R C I V Q V 3 Y A I 0 V A B P L 3 V P V D T Y E T 0 T I P 0 E D I L V L I E B N P D P R P 0 H M A I N L D L E R 0 0 N P 360
P03B_nuatar da do R C I V Q V 3 Y A I 0 V P B P L 3 V P V D T Y E T 0 T I P 0 E D I L V L I E B A P D P R P 0 H M A I N L D L E R 0 0 N P 360
-----, -----: -----: -----: ---
P03B_tabacoouna do R Y Q E T A A Y 0 K P 0 R 0 D P D P T M B T V E V L E P E A 390
P03B_tonatoa do R Y Q E T A A Y 0 K P 0 R 0 D P D P T M B T V E V L E P E A 390
P03B_ohryaa do R Y Q E T A A Y 0 K P 0 R 0 D P D P T M B T V E V L E P E A 390
P03B_nuatar da do R P Q E T A A Y 0 K P 0 R 0 D P D P T M B V I E P L E P E A 390
-:-----:-----: --, : - -----

```

도면3a



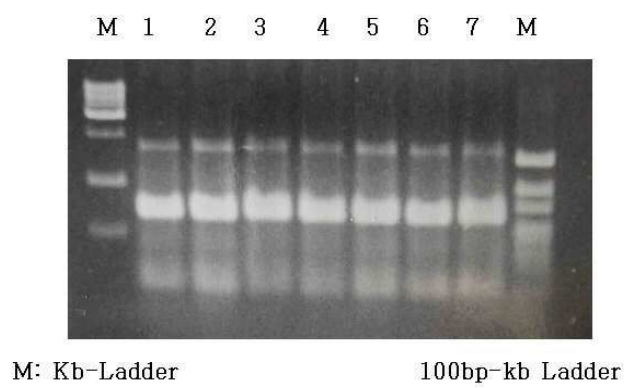
도면3b



도면3c



도면4



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)