



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0043226
(43) 공개일자 2019년04월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/82 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/8261 (2013.01)

C12N 15/8205 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0135007

(22) 출원일자 2017년10월18일

심사청구일자 2017년10월18일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

임현섭

대전광역시 유성구 가정로 266, 14동 302호 (가정동, 과기원교수아파트)

(74) 대리인

최규환

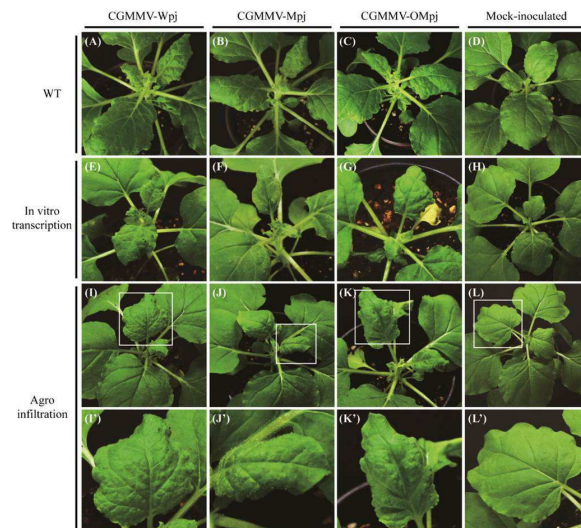
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 감염률을 증가시키는 CGMMV 감염성 재조합 클론 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 감염률을 증가시키는 CGMMV 감염성 재조합 클론 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 본 발명의 제조 방법을 통해, 감염률이 증가된 CGMMV-OMPj의 감염성 클론을 제조할 수 있으므로, 현재까지 오이 녹반 모틀 모자이크 바이러스의 감염성 클론의 감염률이 현저히 떨어지는 현상을 보완할 수 있으며, 병원성 관련 바이러스 단백질을 이용한 병 저항성 품종 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

C12N 15/8283 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ011113

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오21

연구과제명 다입자성 RNA 바이러스를 이용한 보리, 옥수수, 콩 신속한 형질전환 방법 개발

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2015.01.15 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

5'→3' 방향으로 35S 프로모터, T7 프로모터, 전장(full-length) CGMMV(Cucumber green mottle mosaic virus) 핵산 서열 및 HDV(hepatitis delta virus) 리보자임 부위를 포함하는 CGMMV 감염성 재조합 클론.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 CGMMV 핵산은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 CGMMV 감염성 재조합 클론.

청구항 3

- 1) 제1항의 CGMMV 감염성 재조합 클론을 주형으로 하여 시험관 내 전사를 수행하여 CGMMV 전사체를 제조하는 단계; 및
- 2) 상기 제조된 CGMMV 전사체를 식물에 접종하는 단계를 포함하는 CGMMV에 대한 감염률이 증가된 식물체의 제조 방법.

청구항 4

- 1) 제1항의 CGMMV 감염성 재조합 클론으로 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)를 형질전환하여 형질전환체를 얻는 단계; 및
- 2) 상기 형질전환체를 식물체에 접종하는 단계를 포함하는 CGMMV에 대한 감염률이 증가된 식물체의 제조 방법.

청구항 5

제3항 또는 제4항의 방법으로 제조된 CGMMV(Cucumber green mottle mosaic virus)에 대한 감염률이 증가된 식물체.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 식물은 담배(*Nicotiana benthamiana*)인 것을 특징으로 하는 CGMMV에 대한 감염률이 증가된 식물체.

청구항 7

5'→3' 방향으로 35S 프로모터, T7 프로모터, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 전장(full-length) CGMMV(Cucumber green mottle mosaic virus) 핵산 서열 및 HDV(hepatitis delta virus) 리보자임 부위를 포함하는 CGMMV 감염성 재조합 클론을 유효성분으로 포함하는 식물체의 CGMMV에 대한 감염률을 증가시키기 위한 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 감염률을 증가시키는 CGMMV 감염성 재조합 클론 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근까지 국내외에 알려져 있는 식물 바이러스병은 약 1,000여 종에 달하며, 바이러스에 의한 피해액은 세계적으로 연간 200억 불 정도로 추정된다. 식물 바이러스는 농작물을 포함하여 살아있는 모든 식물체를 가해할 수 있을 뿐 아니라, 이병 식물체(diseased plant)의 즙액이나 오염된 종자와 토양은 물론 매개충 체내에서 증식이 가능하여 대면적 발생의 위험이 연중 상존한다. 우리나라에서도 벼와 맥류를 비롯한 각종 작물의 바이러스병이

증가하고 있는 실정이며, 특히, 수박, 호박, 박, 오이, 메론, 참외 등 경제적 부가가치가 높은 시설재배 박과 작물에 바이러스 병의 피해가 늘어가고 있는 실정이다. 곰팡이나 세균병과는 달리 바이러스에 일단 감염되면 실질적으로 치료가 불가능하고 방제할 수 있는 약제가 없다.

[0003] 상기 수박, 호박 등의 박과 작물에서 발생하는 바이러스병으로는 오이 모자이크 바이러스(cucumber mosaic virus; CMV), 오이 녹반 모자이크 바이러스(cucumber green mottle mosaic virus; CGMMV), 규리 녹반 모자이크 바이러스(kyuri green mottle mosaic virus; KGMMV), 수박 모자이크 바이러스(watermelon mosaic virus; WMV), 호박 모자이크 바이러스(zucchini yellow mosaic virus; ZYMV) 및 토마토 반점 위조 바이러스(tomato spotted wilt virus; TSWV) 병 등이 있으며, 그 중에서도 CGMMV 병이 발생하는 분포지역이 가장 넓고 그 피해 또한 가장 크다.

[0004] 상기 CGMMV 병을 일으키는 CGMMV는 토바모바이러스 그룹(Tobamovirus group)의 일종으로서, ssRNA로 구성되어 있는 300nm의 막대기형 바이러스이다. 1935년 영국에서 처음 발견된 이래 미주와 아프리카를 제외한 전 세계적으로 발생 분포되어 있다. CGMMV는 종자전염, 토양전염, 접촉전염 등 그 감염 경로가 매우 다양하다. 최근 중국의 산둥지역을 포함하는 많은 지역이 CGMMV에 의해 몇 년째 상당한 피해를 입은 것으로 보고된 바 있다. 국내에서는 1989년 처음으로 경남 함안 및 진주의 수박 재배 농가들에서 상기 CGMMV에 의한 피해가 보고되었으며, 매년 지역별로 피해가 증가하다가 1998년 이후부터는 수박뿐만 아니라 오이, 호박에서도 심한 피해 현상이 나타났다. 2000~2001년에 참외, 메론 등을 포함하는 모든 박과 작물로 CGMMV 감염의 폭이 넓어짐으로써 뚜렷한 방제 대책을 형성하지 못한 우리나라의 현 실정으로는 농가에서의 피해가 앞으로도 계속 증가할 수밖에 없다.

[0005] 현재까지는 CGMMV에 특이적인 방제 방법이 보고되어 있지 않다. 선진 외국에서는 초기 방제 대책으로 토양 관리나 무병 종자생산 또는 관계기관의 지도 및 교육에 의존하고 있다. 채종지가 중국 또는 동남아에 의존하고 있는 우리나라에서는 항구적인 종합 방제 대책이 필요하나, 1999년 10월에야 비로소 농업진흥청, 종자관리소, 각 종묘회사에서 대책협의회를 구성하여 방제 대책을 위한 여러 연구과제를 시작한 실정이다. 앞으로 종합 방제 대책이 확립되기까지는 많은 시간이 걸리고 또한 대책이 수립되었다 하더라도 채종지에서의 감염을 근절하기는 어려운 실정임으로 궁극적으로는 CGMMV 저항성 품종을 선발 또는 개발해야 한다. 현재까지 저항성 품종 개발에 있어, 오이 녹반 모틀 모자이크 바이러스의 감염성 클론은 식물에 접종하더라도 감염률이 현저히 떨어지는 문제점이 있었다.

[0006] 한편, 한국등록특허 제1342084호는 오이과실모틀모자이크바이러스 핵산부터 유래된 약독 바이러스 및 이의 전장 재조합 클론을 개시하고 있으며, 한국등록특허 제0982593호는 오이 모자이크 바이러스의 감염성 클론을 이용한 식물체 내에서의 외래 유전자 과발현 방법을 개시하고 있다. 하지만, 본 발명의 감염률을 증가시키는 CGMMV 감염성 재조합 클론 및 이의 용도에 대해 아직까지 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 국내의 수박, 멜론 및 오리엔탈 멜론의 잎으로부터 3개의 CGMMV 분리체(Wpj, Mpj 및 Ompj)를 분리하였으며, 35S 프로모터 및 T7 프로모터를 동시에 모두 포함하고 HDV(hepatitis delta virus) 리보자임 부위를 포함하는 3개(CGMMV-Wpj, CGMMV-Mpj 및 CGMMV-Ompj)의 CGMMV 감염성 클론을 각각 제작하여 담배 식물체에 접종하였을 때, CGMMV 안정성 및 감염률이 증가되고, CGMMV-Ompj의 감염성 클론이 CGMMV-Wpj 및 CGMMV-Mpj의 감염성 클론에 비해 심각한 병징(disease symptom)과 성장저해 효과를 나타냄으로써, CGMMV-Ompj의 감염성 클론이 CGMMV-Wpj 및 CGMMV-Mpj의 감염성 클론보다 감염률이 현저히 우수한 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 5'→3' 방향으로 35S 프로모터, T7 프로모터, 전장(full-length) CGMMV(Cucumber green mottle mosaic virus) 핵산 서열 및 HDV(hepatitis delta virus) 리보자임 부위를 포함하는 CGMMV 감염성 재조합 클론을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 1) 상기 CGMMV 감염성 재조합 클론을 주형으로 하여 시험관 내 전사를 수행하여 CGMMV 전사체를 제조하는 단계; 및 2) 상기 제조된 CGMMV 전사체를 식물에 접종하는 단계를 포함하는 CGMMV에 대한 감염률이 증가된 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 1) 상기 CGMMV 감염성 재조합 클론으로 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)를 형질전환하여 형질전환체를 얻는 단계; 및 2) 상기 형질전환체를 식물체에 접종하는 단계를 포함하는 CGMMV에 대한 감염률이 증가된 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 CGMMV(Cucumber green mottle mosaic virus)에 대한 감염률이 증가된 식물체를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 5'→3' 방향으로 35S 프로모터, T7 프로모터, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 전장(full-length) CGMMV(Cucumber green mottle mosaic virus) 핵산 서열 및 HDV(hepatitis delta virus) 리보자임 부위를 포함하는 CGMMV 감염성 재조합 클론을 유효성분으로 포함하는 식물체의 CGMMV에 대한 감염률을 증가시키기 위한 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 제조 방법을 통해, 감염률이 증가된 CGMMV-OMPj의 감염성 클론을 제조할 수 있으므로, 현재까지 오이 녹반 모틀 모자이크 바이러스의 감염성 클론의 감염률이 현저히 떨어지는 현상을 보완할 수 있으며, 병원성 관련 바이러스 단백질을 이용한 병 저항성 품종 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명의 일 구현 예에 따른 pJY 벡터의 구조 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 구현 예에 따른 CGMMV 전장 cDNA 클론의 구조 모식도를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 구현 예에 따른 CGMMV-Wpj, CGMMV-Mpj 및 CGMMV-OMPj의 감염성 클론 간의 아미노산 서열에서 차이가 나는 위치를 화살표로 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 구현 예에 따른 CGMMV-Wpj, CGMMV-Mpj 및 CGMMV-OMPj에 대한 계통발생분석(Phylogenetic analysis) 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일 구현 예에 따른 jPY 벡터에 의해 생산된 양성 센스 가닥 RNA 유래의 PCR 산물의 구조 모식도(A)와 상기 PCR 산물에 대해 비바이러스성 서열을 포함하고 있는지 확인한 결과를 나타낸 것이다. (1), (2), (3), (4) 및 (5)는 아그로박테리움-침윤방법으로 감염된 담배 식물체로부터 추출한 RNA를 증폭하기 위해 사용한 프라이머의 방향과 위치를 나타내고, 예상되는 PCR 산물의 사이즈와 위치를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 구현 예에 따른 CGMMV-Wpj, CGMMV-Mpj 및 CGMMV-OMPj의 시험관 내 전사체(in vitro transcript) 및 아그로박테리움-침윤(agroinfiltration) 방법으로 담배 식물체에 각각 접종하였을 때, 병 발생 정도를 비교한 것이다. (A), (B) 및 (C)는 야생형(WT) CGMMV 분리체를 접종한 대조군이며, (E), (F) 및 (G)는 감염성 클론(CGMMV-Wpj, CGMMV-Mpj 및 CGMMV-OMPj)의 시험관 내 전사체를 접종한 실험군이며, (I), (J), (K), (L), (I'), (J') 및 (K')는 아그로박테리움-침윤방법을 통해 감염성 클론을 접종한 실험군이며, (D), (H), (L) 및 (L')는 모의(mock) 접종 대조군이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 5'→3' 방향으로 35S 프로모터, T7 프로모터, 전장(full-length) CGMMV(Cucumber green mottle mosaic virus) 핵산 서열 및 HDV(hepatitis delta virus) 리보자임 부위를 포함하는 CGMMV 감염성 재조합 클론을 제공한다.

[0016] 상기 HDV 리보자임 부위는 비바이러스성 서열(non-viral sequence)을 제거하고 CGMMV 감염성을 증대시키는 역할을 하며, 바람직하게는 서열번호 26의 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 용어 "프로모터"는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 중합효소가 결합하는 DNA 분자를 말한다.

[0018] 용어 "재조합"은 세포가 이중의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이중의 펩티드 또는 이중의 핵산에 의해 암호화된 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.

- [0019] 본 발명의 일 구현 예에 따른 CGMMV 감염성 재조합 클론에서, 상기 전장 CGMMV 핵산은 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 전장 CGMMV 핵산 서열은 각각 서열번호 1의 염기서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교영역에서의 폴리뉴클레오타이드 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.
- [0020] 또한, 본 발명은
- [0021] 1) 상기 CGMMV 감염성 재조합 클론을 주형으로 하여 시험관 내 전사를 수행하여 CGMMV 전사체를 제조하는 단계; 및
- [0022] 2) 상기 제조된 CGMMV 전사체를 식물에 접종하는 단계를 포함하는 CGMMV에 대한 감염률이 증가된 식물체의 제조 방법을 제공한다.
- [0023] 또한, 본 발명은
- [0024] 1) 상기 CGMMV 감염성 재조합 클론으로 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)를 형질전환하여 형질전환체를 얻는 단계; 및
- [0025] 2) 상기 형질전환체를 식물체에 접종하는 단계를 포함하는 CGMMV에 대한 감염률이 증가된 식물체의 제조 방법을 제공한다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 CGMMV(Cucumber green mottle mosaic virus)에 대한 감염률이 증가된 식물체를 제공한다.
- [0027] 본 발명에 따른 상기 식물체는 담배, 멜론, 수박, 오이 등의 CGMMV 기주 식물일 수 있으며, 바람직하게는 담배이다.
- [0028] 또한, 본 발명은 5'→3' 방향으로 35S 프로모터, T7 프로모터, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 전장(full-length) CGMMV(Cucumber green mottle mosaic virus) 핵산 서열 및 HDV(hepatitis delta virus) 리보자임 부위를 포함하는 CGMMV 감염성 재조합 클론을 유효성분으로 포함하는 식물체의 CGMMV에 대한 감염률을 증가시키기 위한 조성물을 제공한다.
- [0029] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.
- [0030] **재료 및 방법**
- [0031] **1. CGMMV(Cucumber green mottle mosaic virus) 분리**
- [0032] 본 발명에 사용된 오이 녹반 모틀 모자이크 바이러스(CGMMV; Cucumber green mottle mosaic virus)는 경상북도 성주군 및 칠곡군에서 재배되는 모자이크 및 반점 증상을 나타내는 CGMMV에 감염된 수박(*Citrullus lanatus*), 멜론(*Cucumis melo*) 및 참외(*C. melo*)의 잎으로부터 분리하였다.
- [0033] **2. 총 RNA 추출 및 cDNA 합성**
- [0034] 총 RNA는 트리졸 시약(TRIZOL[®] Reagent; Life Technologies, USA)를 사용하여 CGMMV에 감염된 수박, 멜론 및 참외의 잎으로부터 각각 추출하였으며, 추출된 총 RNA는 -70℃에서 보관하였으며, 다운스트림 프라이머로 cDNA 합성을 위한 주형으로 사용하였다. cDNA는 제1가닥 cDNA 합성 시스템(LeGene Biosciences, USA)으로 제조하였다.
- [0035] **3. CGMMV의 전장 cDNA 클론 구축**
- [0036] 전장 cDNA 클론 구축은 단일 6.4kb의 단편으로서 전장 CGMMV 이중가닥의 cDNA를 생산하기 위해, RT-PCR에 대해 5'-말단 및 3'-말단 바이러스 특이적 프라이머를 이용하여 수행하였다. 구체적으로, 프라이머 세트는 레퍼런스 분리체인 CGMMV-SH(Accession NO: NC-001801)의 서열을 기초로 설계되었으며, 업스트림 프라이머(5'-AAACTCGAGTAATACGACTCACTATAGGGGTTTAATTTTATAATTAACAACAACA-3'; 밑줄 친 부분은 XhoI 제한효소 부위이다)

(서열번호 23) 및 다운스트림 프라이머(5'-AAAGGATCCTGGGCCCTACCGGGGAAA-3'; 밑줄 친 부분은 BamHI 제한효소 부위이다)(서열번호 24)로 구성되어 있으며, 상기 업스트림 프라이머는 이에 포함된 T7 프로모터(5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')(서열번호 25)로부터 시험관 내 전사를 용이하게 하도록 설계되었다. PCR은 상기 cDNA 및 KOD FX 네오 DNA 폴리머라아제를 이용하여 진행하였으며, PCR 조건은 (1) 2분 동안 94℃; 및 (2) 10초 간 98℃; 6분 30초간 68℃로 35 사이클로 진행하였다. 최종 RT-PCR 산물은 0.8% 아가로오스 겔로 전기영동을 통해 분석되었으며, 상기 프라이머 세트로 증폭하여 6.4kb의 CGMMV 산물을 얻었으며, 이를 XhoI 및 BamHI 제한효소로 절단하고, 플라스미드 pJY의 XhoI 및 BamHI 부위에 클로닝시켰다. 본 발명의 pJY 벡터는 pGD 벡터 유래의 35S 프로모터와 다중 클로닝 부위(MCS; multiple cloning site)가 추가된 pBR35s-HDVagrz 벡터로부터의 HDV 리보자임 부위를 포함하도록 제작하였다(도 1).

표 1

[0037] 본 발명에 사용된 프라이머

프라이머	염기서열(5'-3')	PCR 산물 사이즈(bp)
CGMMV Fw XhoI T7 F ^a	AAACTCGAGTAATACGACTCACTATAGGGTT TTAATTTTATAATTAACAACAACAA C(서열번호 4)	61
CGMMV B BamHI R ^a	AAAGGATCCTGGGCCCTACCGGGGAAA(서열번호 5)	29
CGMMV Seq Bw 0 ^b	TCTCAGCCCTAGCGGCTG(서열번호 6)	18
CGMMV Seq Fw 1 ^b	TTATGACATCGGCGGTAAC(서열번호 7)	20
CGMMV Seq Bw 1 ^b	GATTGTAAGCCATCTTCAAA(서열번호 8)	20
CGMMV Seq Fw 2 ^b	AAGGTGTGATACCAAGTTT(서열번호 9)	21
CGMMV Seq Bw 2 ^b	CAACGAGTTCTCGACTGAC(서열번호 10)	19
CGMMV Seq Fw 3 ^b	GAGATGGGTGCTTCTGTG(서열번호 11)	19
CGMMV Seq Bw 3 ^b	TGGGAAGAGATCTGAGAA(서열번호 12)	20
CGMMV Seq Fw 4 ^b	GAGTGCCGGGTGTGGCAA(서열번호 13)	19
CGMMV Seq Bw 4 ^b	CATTAATTGCTATTTGGTAGG(서열번호 14)	21
(1) CGMMV_35s_P ^c	AGTAGAAAAGGAAGGTGGCA(서열번호 15)	20
(2) CGMMV_T7_P ^c	AGATCTCGAGTAATACGACTC(서열번호 16)	21
(3) CGMMV_NC_P ^c	GTTTAAATTTTATAATTAACAACA(서열번호 17)	27
(4) CGMMV_140_N ^c	TCGTCATACCCCTTTTGGAC(서열번호 18)	21
(5) CGMMV_270_N ^c	CTTGGTGGCGGTAAAGCTAAT(서열번호 19)	21
CGMMV_RdRp_F ^d	AAACTCGAGAAATGGCAAACATTAATGAACAAATCAAC (서열번호 20)	38
CGMMV_RdRp_R ^d	AAAGGATCCTTACTTAGAGACATCTATGTAAAGACT (서열번호 21)	36
CGMMV_RdRp_R_W ^d	AAAGGATCCCTATTTGGTAGGCACAGTGGTAGCAAACAT (서열번호 22)	39

[0038] a는 감염성 클론 증폭에 사용함.

[0039] b는 전체 게놈 시퀀싱에 사용함.

[0040] c는 아그로박테리움-침윤(Agro-infiltrated) 방법으로 CGMMV에 감염된 식물체에서 바이러스 복제에 T7 및 35S 프로모터 단편의 부재를 확인하기 위해 사용함.

[0041] d는 RdRp 클로닝에 사용함.

[0042] 4. 시험관 내 전사(in vitro transcription) 및 감염성 분석

[0043] 전사반응을 위한 주형으로 사용된 CGMMV의 전장 cDNA 클론은 유출전사법(run-off transcription)을 위해 BamHI 제한효소를 사용하였으며, 전장 cDNA의 RT-PCR 산물도 전사반응을 위해 주형 DNA로 직접 사용하였다. 전사반응은 T7 RNA 폴리머라아제(Promega, USA)를 이용한 캡 아날로그의 존재하에 수행하였으며, RNA 전사체의 품질과 양은 0.8 % 아가로오스 겔로 전기영동을 통해 평가하였다. 상기 RNA 전사체는 50mM의 인산 나트륨 완충액(pH 7.0)으로 희석한 후, 4-5의 잎 단계의 담배(*N.benthamiana*) 식물체의 잎 당 10 μ l의 전사체를 접종하였으며, 감염 여부는 접종된 담배 식물체의 잎으로부터 총 RNA를 추출한 후, RT-PCR 분석을 통해 확인하였으며, RNA 전사체를 접종한 식물체의 바이러스 증상의 모양과 발달을 기록하고 분리체 간에 비교하였다.

[0044] 5. 아그로박테리움 침윤(Agroinfiltration) 및 감염성 분석

[0045] 본 발명의 CGMMV의 cDNA 감염성 클론으로 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) GV2260 균주를 형질전환시켰으며, 형질전환된 아그로박테리움은 50mg/l의 카나마이신과 50mg/l의 리팜피신을 함유한 LB 고체 배지에서 30℃에서 48시간 동안 배양하였으며, 상기 배양액으로부터 회수한 아그로박테리움 세포를 침윤 완충액(10mM MES, 10mM MgCl₂ 및 100 μ M 아세토시린곤)에 최종 OD₆₀₀ 농도가 1.0이 될 때까지 현탁시킨 후, 이를 4-5의 잎 단계에서 담배(*N. benthamiana*) 잎에 접종하였다.

[0046] 6. CGMMV의 전체 게놈 시퀀싱

[0047] CGMMV의 감염성 클론의 전장 서열은 초기 벡터 시퀀싱 프라이머(표 1)로부터 단계별로 얻은 서열로부터 설계된 CGMMV-특이적 시퀀싱 프라이머 세트를 이용하여 밝혔다(Macrogen Inc., Korea).

[0048] 실시예 1. CGMMV(Cucumber green mottle mosaic virus) 분리 및 이의 감염성 클론 제조

[0049] 본 발명에서는 CGMMV 유행에 대해 조사하는 동안 국내 칠곡(수박에서 Wpj 및 메론에서 Mpj) 및 상주(참외에서 Ompj)에서 CGMMV에 감염된 식물 조직들을 수집하여 3개의 CGMMV 분리체(CGMMV-Wpj, CGMMV-Mpj 및 CGMMV-Ompj)를 분리하였다. 상기 분리체의 완전한 뉴클레오티드 서열(CGMMV-Ompj: 서열번호 1, CGMMV-Wpj: 서열번호 2, CGMMV-Mpj: 서열번호 3)은 상기 3개의 CGMMV 분리체의 감염성 cDNA 클론으로부터 얻었으며, 수박, 메론 및 참외로부터 분리한 상기 3개의 CGMMV 전체 서열은 레퍼런스 분리체인 CGMMV-SH(Accession No: NC-001801)를 토대로 설계한 특이적 프라이머들을 이용하여 증폭시키고, 바이너리 벡터 pJY로 클로닝하였다(도 2). 이렇게 구축된 클론을 CGMMV-Ompj(Accession No: KX443592), CGMMV-Mpj(Accession No: KX443591) 및 CGMMV-Wpj(Accession No: KX443593)로 명명하였으며, 구축된 감염성 cDNA 클론의 서열은 아데닌 25.6%; 시토신 19.4%; 구아닌 23.9%; 및 우라실 31.1%로 구성되어 있었다. 각 분리체의 CGMMV RNA 서열은 6424nt이고 4개의 ORF(open reading frames)을 포함하며, 처음 2개의 ORF는 128kDa 및 186kDa 단백질을 암호화하며, ORF 3은 MP(movement protein)에 관여하는 29kDa 단백질을 암호화하고 ORF 4는 17.4kDa CP(coat protein)를 암호화한다. CGMMV에 대한 4개의 단백질들 사이에는 중첩된 접합부가 있으며, 186kDa 단백질 및 MP 영역과 MP 및 CP 영역의 교차점은 이전에 보고된 바와 같이 다른 리딩 프레임에서 중첩된다. 또한, 본 발명의 CGMMV-Wpj, CGMMV-Mpj 및 CGMMV-Ompj 분리체와 레퍼런스 분리체인 CGMMV-SH 간의 아미노산 서열에서 총 7개의 아미노산 잔기가 다른 것을 확인하였다. 구체적으로, 128K/186K 단백질의 558(D), 765(S), 910(S), 1212(K) 및 1238(K)의 잔기에서, MP의 129(S) 및 251(G)의 잔기에서 차이가 있었으며, 각 분리체는 234(Ompj에서 V), 649(Ompj에서 T), 778(Wpj에서 N) 및 1529(Mpj에서 V) 및 65(Ompj에서 V) 잔기에서 뚜렷한 차이를 보였다(도 3).

[0050] 또한, CGMMV-Wpj, CGMMV-Mpj 및 CGMMV-Ompj를 대상으로 계통발생분석(Phylogenetic analysis)을 수행한 결과, 도 4에 개시한 바와 같이 3개 CGMMV-Wpj, CGMMV-Mpj 및 CGMMV-Ompj는 그룹 1에 속하는 것을 확인할 수 있었다.

[0051] 실시예 2. pJY 벡터로부터 생산된 양성 센스 CGMMV RNA의 불필요한 비바이러스성 서열 존재 확인

[0052] 35S 프로모터로 조절되는 pJY 벡터에 의해 생산된 전장 CGMMV RNA는 시험관 내 RNA 전사체(in vitro RNA transcript)와 달리, CGMMV의 복제 또는 발병에 악영향을 미칠 수 있는 불필요한 서열을 포함하고 있다. 따라서 pJY CGMMV는 T7 프로모터 서열과 다기능 클로닝 부위의 일부를 포함하는 35S 프로모터 다음으로 불필요한(비바이러스성) RNA 서열을 생산할 것으로 예상하였다. 따라서 본 실시예 2에서는 아그로박테리움 침윤(Agroinfiltration) 방법에 의해 감염이 확립된 후에 CGMMV RNA 복제를 수행하였을 때, 불필요한 비바이러스성 서열을 포함하지 않는 것을 확인하기 위해, 20 dpi의 잎으로부터 총 RNA를 추출하였으며, 128kDa 서열 내에 프라이머를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 임의의 비바이러스성 서열뿐만 아니라, CGMMV의 5'-말단 서열을 검출하도록 고안된 프라이머 세트를 사용하여 증폭시켰다(도 5A). 그 결과, 35S 전사체에 의해 감염된

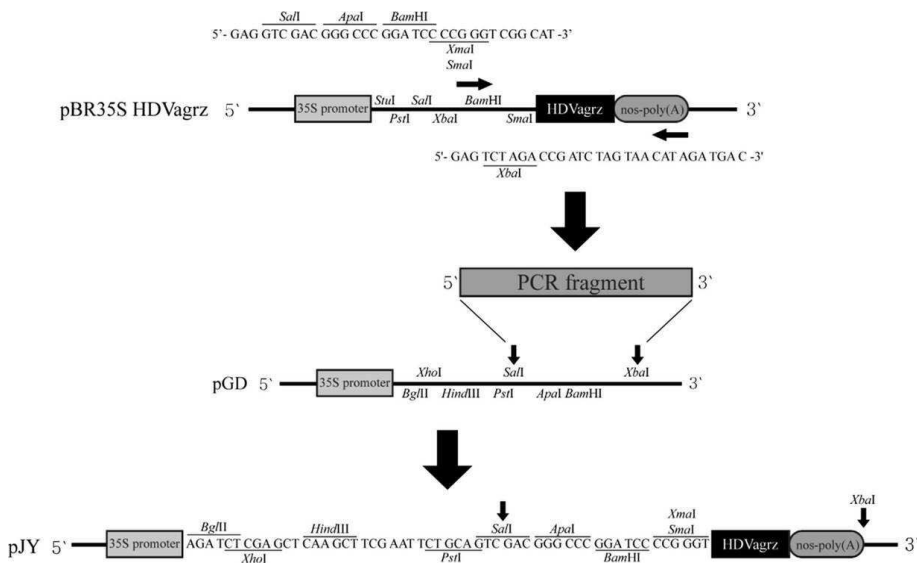
상태에서 복제된 CGMMV에 pJY 벡터의 불필요한 비병원성 서열이 존재하지 않는 것을 확인함으로써, 비바이러스성 서열의 증폭이 없는 것을 확인하였다(도 5B).

[0053] 실시예 3. CGMMV-Wpj, CGMMV-Mpj 및 CGMMV-OMPj의 감염성 클론의 감염성 비교

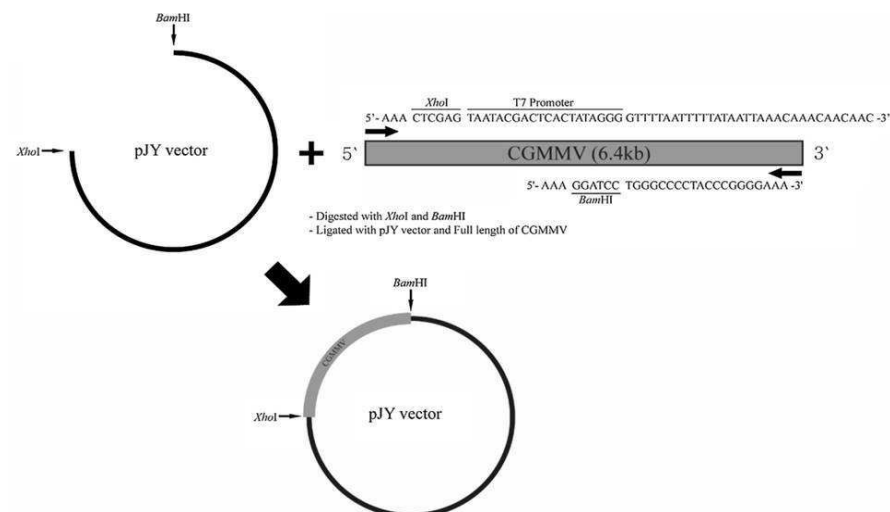
[0054] 본 발명의 CGMMV-Wpj, CGMMV-Mpj 및 CGMMV-OMPj의 감염성 클론은 시험관 내 전사(in vitro transcription) 및 아그로박테리움-침윤(agroinfiltration) 방법을 통해 담배(*N.benthamiana*) 식물체에 각각 접종하였다. 그 결과, 도 6에 개시한 바와 같이 시험관 내 전사체(In vitro transcript)를 접종한 경우, 아그로박테리움-침윤(agroinfiltration) 방법보다 4~5일 일찍 병징이 발생하였으나, 병징의 패턴은 10 dpi까지 차이가 없었다. 하지만, CGMMV-Wpj, CGMMV-Mpj 및 CGMMV-OMPj 분리체간에 병징 정도의 차이를 나타내었다. CGMMV-Wpj는 가벼운 모자이크 증상을 유발하였으며, CGMMV-Mpj는 잎에서 약간의 왜곡(distortion)과 모자이크 증상을 유발하였고, CGMMV-OMPj는 강한 모자이크 증상과 강한 왜곡을 보였다. 또한, 3개의 CGMMV 분리체들 중에 CGMMV-OMPj 분리체가 가장 심각한 병징을 보였으며, 성장저해 정도도 가장 심각한 것을 확인할 수 있었다(도 6).

도면

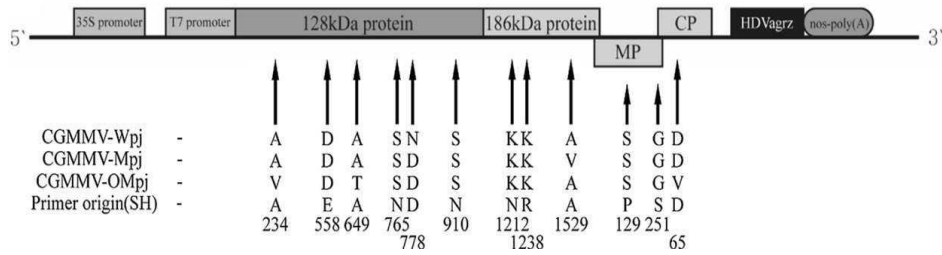
도면1



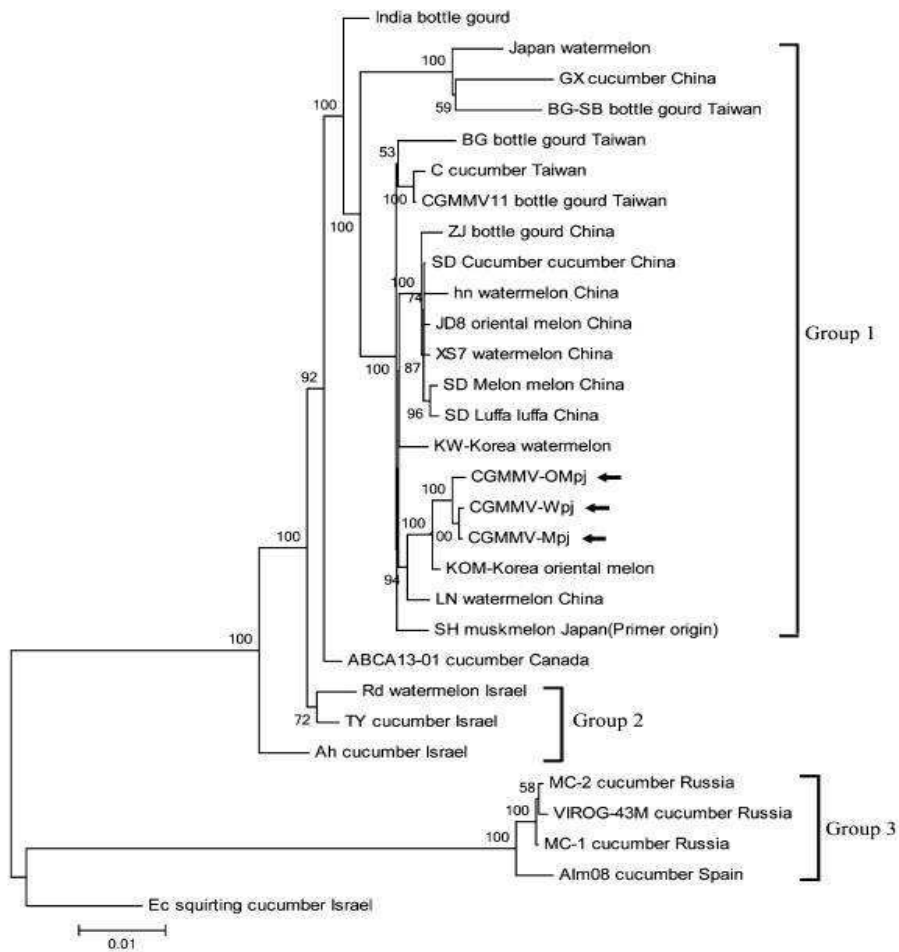
도면2



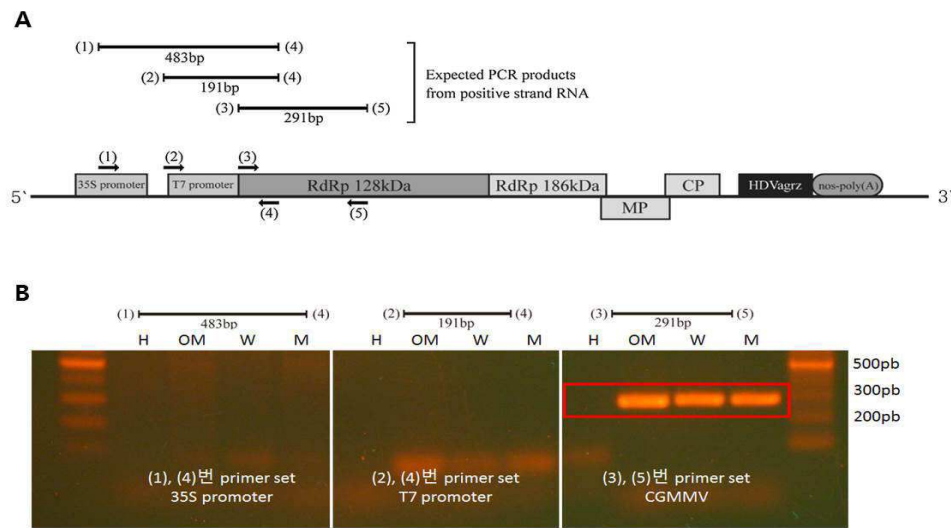
도면3



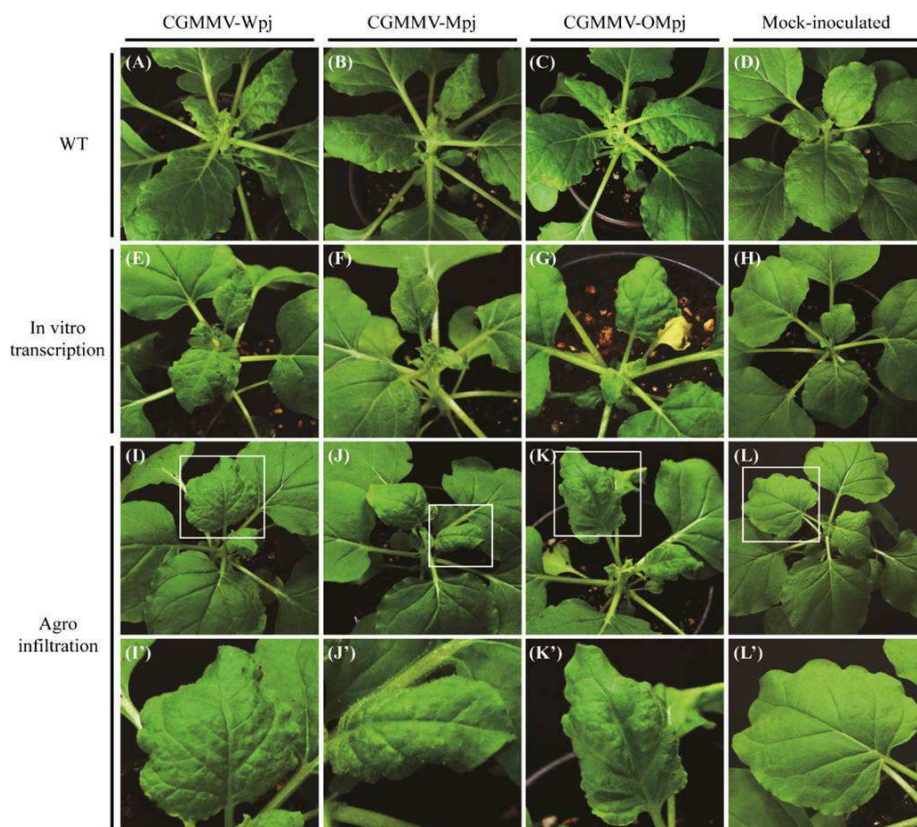
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Infectious recombinant clone increasing infection ratio for cucumber green mottle mosaic virus and uses thereof
- <130> PN17351

<160> 26
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 6423
 <212> DNA
 <213> Cucumber green mottle mosaic virus
 <400> 1

gttttaattt ttataattaa acaacaaca acaacaaca caaacaattt taaaacaaca 60
 atggcaaaca ttaatgaaca aatcaacaac caacgtgacg ccgcggctag cgggagaaac 120

aatctcgta gccaaactggc gtcaaaaagg gtgtatgacg aggcgtgttcg ctctgttgat 180
 catcaagaca gacgcccga aatgaacttt tctcgtgtgg tcagcacaga gcacaccagg 240
 ctgttaactg atgcgtatcc ggagttttcg attagcttta ccgccaccaa gaactctgta 300
 cactccctcg cgggtggtct gaggtttctt gaattggaat atatgatgat gcaagtcccc 360
 tacggctcac ctgttatga catcgccggt aactatacgc agcacttggt caaaggtaga 420
 tcatatgtgc attgtgcaa tccgtgccta gatcttaaag atgttgcgag gaatgtgatg 480
 tacaacgata tgatcacga acatgtacag aggcacaagg gatctggcgg gtgcagacct 540

cttccaactt tccagataga tgcattcagg aggtacgata gttctccgtg tgcggtcacc 600
 tgttcagacg tttttcaaga gtgttcctat gattttggga gtggtaggga taatcatgca 660
 gtctcgttgc attcaatcta cgatatccct tattcttcga tcggacctgc tcttcatagg 720
 aagaatgtgc gagtttgta tgcagccttt cacttctcgg aggtattgct tttaggttcg 780
 cctgtaggta atctaaatag tattggggct cagtttaggg tcgatggtga tgatgtgcat 840
 tttcttttta gtgaagagtc tactttgcat tatactcata gtttagaaaa tatcaagtta 900
 atcgtaatgc gtacttactt tctgtctgat gataggtttg tataatattaa ggagttcatg 960

gttaagcgtg tggatacttt tttctttagg ttggttagag cagatacaca catgcttcat 1020
 aaatctgtgg ggcactattc gaaatcgaag tctgagtact tcgcgctgaa taccctccg 1080
 atcttccaag ataaagccac gttttctgtg tggtttcttg aagcgaagcg caaggtgttg 1140
 ataccaagt ttgaacttic gagattcctt tctgggaatg taaaaatctc caggatgctt 1200
 gtcgatgctg atttcgtcca taccattatt aatcacatta gcacgtatga taacaaggcc 1260
 ttagtgtgga agaattgtca gtcctttgtg gaatccatac gttcaagagt aattgtaaac 1320
 ggagtttccg tgaatctga gtggaacgta ccggttgatc agtccactga tatctcgttc 1380

tcgatattcc ttctcgtgaa ggtaggaag gtacagatcg agttaatgtc tgataaagtt 1440

gtgatcgagg cgaggggttt gcttcggagg ttcgcagaca gtcttaaatc tgccgtagaa	1500
ggactaggtg attgcgtcta tgatgctcta gtccaaccg gctggtttga cacctctagc	1560
gacgaactga aagtattgct acctgaaccg tttatgacct tttcggatta tcttgaaggg	1620
atgtacgagg ccgatgcaaa gatcgagaga gagagtgtct ctgagttgct cgcttccggt	1680
gatgatttgt tcaagaaaat cgatgagata agaaacaatt acagtgaggt cgattttgat	1740
gtagagaaat tccaagaatt ttgcaaggaa ctgaatgtta atcctatgct aattggccat	1800
gttatcgaag ctatTTTTTc gcagaaggct ggggtaacag taacgggtct gggcacgctc	1860
tctcctgaga tgggtgcttc tgttgcgtta tccagtacct ctgtagatac atgtgaagat	1920
atggatgtaa ctgaagatat ggaggatata gtgttgatgg cggacaagag tcattcttac	1980
atgtcccctg aaatggcgag atggacagat gttaaatatg gcaacaataa aggggctcta	2040
gtcgagtaca aagtcggaac ctcgatgact ttacctgcca cctgggcaga gaaagtaag	2100
gctgtcttac cgttgtcggg gatctgtgtg aggaaacccc aattttcgaa gccgcttgat	2160
gaggaagatg acttgagggt atcaaacatg aatttcttta aggtgagcga tctaaagttg	2220
aagaagacta tcactccagt cgtttacct gggaccattc gagagaggca aatgaagaat	2280
tatatgtatt acttatcggc ctctcttggg tccacgctgg gcaatctgga gagaatcgtg	2340
cggagtgtat ggagtggtag tgaggagagt atgcaaactg ttgggttgta tgattcgaa	2400
aagtgaagt gggtattgtt accagctgag aagaagcacg catgggccgt ggttctggca	2460
agtgtagata ccacccgat aatcttctt tcatatgacg aatctggttc tcctataatt	2520
gataagaaaa actggaagcg attcgtgtc tgttccgaga ccaaagtcta tagtgtaatt	2580
cgtagttag aggttttaaa taaggaagcg atagtcgacc ccggggttca cataacatta	2640
gttgacggag tgccgggttg tggaagacc gccgagatta tagcgagggt caattggaaa	2700
actgatctag tattgactcc cgggaggagg gcggctgcta tgattaggcg gagagcctgc	2760
gccctgcaca agtcacctgt ggcaaccagt gacaacgtca gaactttcga ttttttgtg	2820
atgaatagga aaatctttaa gtttgacgt gtctatgttg acgagggtct gatgggtccat	2880
acgggattac ttaattttgc gttaaagatc tcgggttgta aaaaagcctt cgtctttggt	2940
gatgctaagc aaatcccgtt tataaacaga gtcatgaatt ttgattatcc taaggagtta	3000
agaactttaa tagtcgataa tgtagagcgt aggtatgtca cccataggtg tcctagagat	3060
gtcactagtt ttcttaatac tatctataaa gccgctgtcg ctactactag tccggttgta	3120
cattctgtga aggcaattaa agtgtcgggg gccggtattc tgaggcctga gttgacaaag	3180
atcaaaggaa agataataac gtttactcaa tctgataagc agtccttgat caagagtggg	3240
tacaatgatg tgaatactgt gcatgaaatt caggagaaaa cctttgagga gacggcggtt	3300

gtgcgtgccca ccccgactcc aataggtttg attgcccggtg attcaccaca tgtactagt	3360
gccttaacta ggcacactaa ggcaatggtg tattatactg ttgtattcga tgcagttaca	3420
agtataatag cggatgtgga aaaggtcgat cagtcgatct tgaccatgtt tgctaccact	3480
gtgcctacca aatagcaatt aatgcagaat tcgctgtatg tccatcgtaa tattttcctc	3540
cctgttagta aaacgggggt ttatacagac atgcaggagt tctacgatag atgccttcct	3600
gggaattcct tcgtactgaa tgatttcgat gccgtaacca tgcggttgag ggacaacgaa	3660
tttaacttac aacctttag gctaaccttg agtaaattag atccggtacc cgctttgatc	3720
aagaatgaag cgcagaattt tctgatcccc gttttgcgta cggcctgtga aaagccgcgt	3780
attccgggtc ttcttgagaa tctttagct atgataaaga ggaatatgaa tactcctgat	3840
ttagctggga ccgtagatat aactaacatg tcgatttcta tagtagataa tttctttct	3900
tcctttgtta gggacgaggt tctgcttgat cacttagatt gtgttagggc tagttccatt	3960
caaagttttt ctgattggtt ttctgtcag ccaacctcag cggttggcca gttggcta	4020
ttcaatttca tagatttgcc tgcctttgat acttatatgc atatgattaa gaggcaaccc	4080
aagagtcggt tagatacttc gattcagctt gaatatccgg ccttgcaaac tattgtttat	4140
caccctaaag tggtaaatgc agtttttggg ccggttttca agtatttgac cactaagttt	4200
cttagtatgg tagatagttc taagtttttc ttttacta ggaaaaaacc agaagatctg	4260
caggaatfff tctcagatct ctcttcccat tctgattatg agattcttga gcttgatgtt	4320
tctaaatatg acaagtcgca atccgatttc catttctcta ttgagatggc aatttgggaa	4380
aaattggggc tggacgatat tttggcttgg atgtgggtcta tgggtcaca aagaactata	4440
ctgcaagatt tccaagccgg gataaagacg ctcatctact atcaacggaa gtctggtgat	4500
gtaactactt ttataggtaa tacctttatt atcgacagct gtgtagctag tatgttgccg	4560
ttagataagt gttttaagc tagtttttgt ggtgatgatt cgctgatcta ccttcctaag	4620
ggcttggagt atcctgatat acaggctact gccaaccttg tttggaattt tgaggcgaaa	4680
cttttccgaa agaagtatgg ttacttctgc gggaagtata taattcacca tgccaacggc	4740
tgtattgttt accctgaccc tttaaaatta attagtaaat taggtaataa gagtcttgta	4800
gggtatgagc atgttgagga gtttcgtata tcctcctcg acgttgctca tagtttgttt	4860
aatggtgctt atttccatct actcgacgat gcaatccacg aattatttcc taatgctggg	4920
ggttgaggtt ttgtaattaa ttgtttgtgt aagtatttga gtgataagcg cttttccgt	4980
agtctttaca tagatgtctc taagtaaggt gtcagtcgag aactcgttga aacctgagaa	5040
gtttgtcaaa atctcttggg tcgataagtt gtcctcctaac tatttttcca ttcttaagta	5100

tttatctata actgacttta gtgtagtcaa agctcagagc tatgaatccc tcgtgcctgt 5160

caagttgttg cgtgggtgtg atcttataaa acacctttat gtcacattgt tgggcgttgt 5220

ggttttctggt gtatggaacg taccggaatc ctgtaggggt ggtgctactg ttgctctggt 5280

tgacacaagg atgcattctg ttgcagaggg aactatatgc aaattttcag ctcccgccac 5340

cgtccgcgaa ttctctgtta ggttcatacc taattattct gtcgtggctg cggatgcctt 5400

tcgcgacctt tggcttttat ttgtgagact gtctaattgt ggatcaaaag atggtttcca 5460

tcctttgact ttagaggctg cttgtttagt cgctacaact aactctatta tcaaaaaggg 5520

tcttagagct tctgtagtgc agtctgtcgt ctcttccgat cagtctattg tcttagattc 5580

tttatccgag aaagtgaac ctttctttga caaagttcct attcagcgg ctgtaatggc 5640

aagagatccc agttataggt ctaggtcgca gtctgtcggg ggtcgtggtg agcggcattc 5700

taaacctcca aatcggaggt tggactctgc ttctgaagag tccggttctg tttcctttga 5760

agatggctta caatccgac acacctagca aacttattgc gtttagtgct tcttatgttc 5820

ccgtcaggac ttacttaat ttctagttag cttcacaagg taccgctttc cagactcaag 5880

cgggaagaga ttctttccgc gagtcctgtg ctgcgttacc ctctctgtc gtagatatta 5940

attctagatt cccagttcgc ggtttttacg ctttccctca cggtcctgtg ttgaggccta 6000

tcttcgtttc gcttctcagc tccacggata cgcgtaatag ggtcattgag gtgtagatc 6060

ctagcaatcc tacgactgct gagtcgctta acgctgtaaa gcgtactgat gacgcgtcta 6120

cagccgctag ggctgagata gataatttaa tagagtctat ttctaagggt ttgatgttt 6180

acgatagggc ttcatattga gccgcgtttt cggtagtctg gtcagaggct accacctcga 6240

aagcttagtt tcgagggtct tctggcgggt gtgcacacca aagtgcatag tgctttcccg 6300

ttcacttaaa tcgaacggtt tgctcattgg ttgcggaac cctctcacgt gtgacgttga 6360

agtttctatg ggcagtaatt ctgcaagggg ttgcaatccc ccttttcccc gggtaggggc 6420

cca 6423

<210> 2

<211> 6424

<212> DNA

<213> Cucumber green mottle mosaic virus

<400> 2

gttttaattt ttataattaa acaacaaca acaacaaca caaacaattt tgaaacaaca 60

atggcaaaca ttaatgaaca aatcaacaac caacgtgacg ccgcggttag cgggagaaac 120

aatctcgtta gccaaactggc gtcaaaaagg gtgtatgacg aggctgttcg ctctgttgat 180

catcaagaca gacgcccga aatgaacttt tctcgtgtgg tcagcacaga gcacaccagg	240
cttgtaactg atgcgtatcc ggagttttcg attagcttta ccgccacaa gaactctgta	300
cactccctcg cgggtggctt gaggtttctt gaattggaat atatgatgat gcaagtgcc	360
tacggctcac ctgttatga catcggcggc aactatacgc agcacttggt caaaggtaga	420
tcatatgtgc attgctgcaa tccgtgccta gatcttaaag atgttgcgag gaatgtgatg	480
tacaacgata tgatcacgca acatgtacag aggcacaagg gatctggcgg gtgcagacct	540
cttccaactt tccagataga tgcatcagg aggtacgata gttctccgtg tgcggtcacc	600
gtttcagacg tttttcaaga gtgttcctat gattttggga gtggtaggga taatcatgca	660
gtctcgttgc attcaatcta cgatatccct tattcttcga tcggacctgc tcttcatagg	720
aagaatgtgc gagtttgta tgcagccttt cacttctcgg aggcattgct tttaggttcg	780
cctgtaggta atctaaatg tattggggct cagtttaggg tcgatggtga tgatgtgcat	840
tttcttttta gtgaagagtc tactttgcat tatactcata gtttagaaaa tatcaagtta	900
atcgtaatgc gtacttactt tcttctgat gataggtttg tatatattaa ggagttcatg	960
gttaagcgtg tggatacttt tttctttagg ttggtcagag cagatacaca catgcttcat	1020
aaatctgtgg ggcactatc gaaatcgaag tctgagtact ttgcgctgaa taccctccg	1080
atcttccaag ataaagccac gttttctgtg tggtttctg aagcgaagcg caaggtgttg	1140
ataccaagt ttgaactttc gagattcctt tctgggaatg tgaaaatctc caggatgctt	1200
gtcgatgctg atttcgtcca taccattatt aatcacatta gcacgtatga taacaaggcc	1260
ttagtgtgga agaattgtca gtctttgtg gaatccatac gttcaagagt aattgtaaac	1320
ggagtttccg tgaatctga gtggaacgta ccggttgatc agctcactga tatctcgttc	1380
tcgatattcc tttcgtgaa ggttaggaag gtacagatcg agttaatgtc tgataaagtt	1440
gtgatcgagg cgaggggttt gcttcggagg ttgcagaca gtcttaaate tgccgtagaa	1500
ggactagggt attgcgtcta tgatgctcta gttcaaaccg gctggtttga cacctctagc	1560
gacgaactga aagtattgct acctgaaccg tttatgacct tttcgatta tcttgaagg	1620
atgtacgagg ccgatgcaa gatcgagaga gagagtgtct ctgagttgct cgcttccggt	1680
gatgatttgt tcaagaaaat cgatgagata agaaacaatt acagtggagt cgattttgat	1740
gtagagaaat tccaagaatt ttgcaaggaa ctgaatgtta atctatgct aattggccat	1800
gttatcgaag ctattttttc gcagaaggct ggggtaacag taacgggtct gggcacgctc	1860
tctctgaga tgggtgcttc tgttcgtta tccagtacct ctgtagatac atgtgaagat	1920

atggatgtaa ctgaagatat ggaggatata gtgttgatgg cggacaagag tcattcttac	1980
atgtccctg aaatggcgag atgggcagat gttaaataatg gcaacaataa aggggctcta	2040
gtcgagtaca aagtcggaac ctcatgact ttacctgcca cctgggcaga gaaagtaag	2100
gctgtcttac cggtgtcggg gatctgtgtg aggaaacccc aattttcgaa gccgcttgat	2160
gaggaagatg acttgaggtt atcaaacatg aattttctta aggtgagcga tctaaagttg	2220
aagaagacta tcactccagt cgtttacct gggaccattc gagagaggca aatgaagaat	2280
tatattgatt atttatcggc ctctcttggg tccacgtgg gcaacctgga gagaatcgtg	2340
cggagtgatt ggagtggtag tgaggagagt atgcaaactg ttgggttgta taattgcgaa	2400
aagtgcgaagt ggttatgtt accagctgag aagaagcacg catgggccgt ggttctggca	2460
agtgatgata ccaccgcat aatcttctt tcatatgacg aatctggttc tcctataatt	2520
gataagaaaa actggaagcg attcgccgtc tgttccgaga ccaaagtcta tagtgtaatt	2580
cgtagtttag aggtttttaa taaggaagcg atagtcgacc ccgggggttca cataacatta	2640
gttgacggag tgccgggttg tggcaagacc gccgagatta tagcgagggt caattggaaa	2700
actgatctag tattgactcc cgggaggag gcggctgcta tgattaggcg gagagcctgc	2760
gccctgcaca agtcacctgt ggcaaccagt gacaacgtca gaactttcga ttcttttggtg	2820
atgaatagga aaatctttaa gtttgacgt gtctatgttg acgagggtct gatggccat	2880
acgggattac ttaattttgc gttaaagatc tcgggttgta aaaaagcctt cgtctttggt	2940
gatgctaagc aaatcccgtt tataaacaga gtcataaatt ttgattatcc taaggagtta	3000
agaactttaa tagtcgataa tgtagagcgt aggtatgtca cccatagggt tcctagagat	3060
gtcactagtt ttcttaatac tatctataaa gccgtgtcgc ctactactag tccggttgta	3120
cattctgtga aggcatttaa agtgtcgggg gccggtattc tgaggcctga gttgacaaag	3180
atcaaaggaa agataataac gtttactcaa tctgataagc agtccttgat caagagtggg	3240
tacaatgatg tgaatactgt gcatgaaatt caggagaaaa cctttgagga gacggcggtt	3300
gtgcgtgcca ccccgactcc aataggtttg attgccgtg attcaccaca tgtactagt	3360
gccttaacta ggcacactaa ggcaatggtg tattatactg ttgtattcga tgcagttaca	3420
agtataatag cggatgtgga aaagtcgat cagtcgatct tgaccatgtt tgctaccact	3480
gtgcctacca aatagcaatt aatgcagaat tcgctgtatg tccatcgtaa tattttcctc	3540
cctgttagta aaacgggggtt ttatacagac atgcaggagt tctacgatag atgccttcct	3600
gggaattcct tcgtactgaa tgatttcgat gccgtaacca tgcggttgag ggacaacgaa	3660

ttaaacttac aacctttag gctaaccttg agtaaattag atccggtacc cgctttgatt	3720
aagaatgaag cgcagaattt tctgatcccc gttttgcgta cggcctgtga aaagccgcgt	3780
attccgggtc ttcttgagaa tctttagct atgataaaga ggaatatgaa tactcctgat	3840
ttagctggga ccgtagatat aactaacatg tcgatttcta tagtagataa ctcttttct	3900
tcttttgta gggacgaggt tctgcttgat cacttagatt gtgttagggc tagttccatt	3960
caaagtttt ctgattggtt ttcgtgtcag ccaacctcag cggttggcca gtggcctaat	4020
ttcaatttca tagatttgcc tgcctttgat acttatatgc atatgattaa gaggcaaccc	4080
aagagtcggt tagatacttc gattcagtct gaatatccgg ccttgcaaac tattgtttat	4140
caccctaaag tggtaaagtc agtttttggc cgggttttca agtatattgac cactaagttt	4200
cttagtatgg tagatagttc taagtttttc ttttacta ggaaaaaacc agaagatctg	4260
caggaatttt tctcagatct ctcttcccat tctgattatg agattcttga gcttgatgtt	4320
tctaaatatg acaagtcgca atccgatttc catttctcta ttgagatggc aatttgggaa	4380
aaattggggc tggacgatat tttggcttgg atgtggtcta tgggtcacia aagaactata	4440
ttgcaagatt tccaagccgg gataaagacg ctcatctact atcaacggaa gtctggtgat	4500
glaactactt ttataggtaa taccittatt atcgacgct gtgtagctag tatgttgccg	4560
ttagataagt gttttaagc tagtttttgt ggtgatgatt cgctgatcta ccttcctaag	4620
ggcttggagt atcctgatat acaggctact gccaaccttg tttggaattt tgaggcgaaa	4680
cttttccgaa agaagtatgg ttacttctgc gggaagtata taattcacca tgccaacggc	4740
tgtattgttt accctgaccc tttaaaatta attagtaaat taggtataa gagtcttga	4800
gggtatgagc atgttagga gtttctata tccctcctcg acgttctca tagtttgttt	4860
aatggtgctt atttccatct actcgacgat gcaatccacg aattatttcc taatgctggg	4920
ggttgcagtt ttgtaattaa ttgtttgtgt aagtatttga gtgataagcg ccttttccgt	4980
agtctttaca tagatgtctc taagtaaggt gtcagtcgag aactcgttga aacctgagaa	5040
gtttgtcaaa atctcttggg tcgataagtt gtccttaac tatttttcca ttcttaagta	5100
tttatctata actgacttta gtgtagtcaa agctcagagc tatgaatccc tcgtgcctgt	5160
caagtgttg cgtgggtgtg atcttcaaaa acacctttat gtcacattgt tgggcgttgt	5220
ggtttctggt gtatggaacg taccggaatc ctgtaggggt ggtgctactg ttgctctggt	5280
tgacacaagg atgcattctg ttgcagaggg aactatatgc aaattttcag ctcccgccac	5340
cgcccgcaa ttctctgtta ggttcatacc taattattct gtcgtggctg cggatgccct	5400
tcgcgatcct tggcttttat ttgtgagact gtctaattgt ggtatcaaag atggtttcca	5460
tcctttgact ttagaggtcg ctgttttagt cgctacaact aactctatta tcaaaaaggg	5520

tcttagagct tcgttagtcg agtcgtcgt ctcttcggat cagtcattg tcctagattc	5580
tttatccgag aaagttgaac tttcttttga caaagttcct atttcagcgg ctgtaatggc	5640
aagagatccc agttataggt ctaggtcgca gtctgtcggg ggtcgtggta agcggcattc	5700
taaacctcca aatcggaggt tggactctgc ttctgaagag tccggttctg tttcttttga	5760
agatggctta caatccgac acacctagca aacttattgc gtttagtgct tcttatgttc	5820
ccgtcaggac ttacttaat tttctagttg cttcacaagg taccgcttc cagactcaag	5880
cgggaagaga ttctttccgc gaggcctgt ctgcgttacc ctctctgtc gtagatatta	5940
attctagatt ccagatgcg ggtttttacg ctttctcaa cggctctgtg ttgaggccta	6000
tcttcgttgc gcttctcagc tccacggata cgcgtaatag ggtcattgag gttgtagatc	6060
ctagcaatcc tacgactgct gaggcctta acgctgtaaa gcgtactgat gacgcgtcta	6120
cagccgctag ggctgagata gataatttaa tagagtctat ttctaagggt ttgatgttt	6180
acgatagggc ttcatattga gccgcgtttt cggtagtctg gtcagaggct accacctga	6240
aagcttagtt tcgagggtct tctggcgggt gtgcacacca aagtgcatag tgctttccc	6300
ttcacttaaa tcgaacggtt tgctcattgg ttgcccga cctctcacgt gtgacgttga	6360
agtttctatg ggcagtaatt ctgcaagggg ttgcaatccc cctttttccc cgggtagggg	6420
ccca	6424
<210> 3	
<211> 6424	
<212> DNA	
<213> Cucumber green mottle mosaic virus	
<400> 3	
gttttaattt ttataattaa acaacaaca acaacaaca caaacaattt taaaacaaca	60
atggcaaaca ttaatgaaca aatcaacaac caacgtgacg ccgaggctag cgggagaaac	120
aatctcgta gccaaactgg gtcaaaaagg gtgtatgacg aggtgttctg ctctgttgat	180
catcaagaca gacgcccga aatgaacttt tctcgtgtgg tcagcacaga gcacaccagg	240
cttgtaactg atgcgtatcc ggagttttcg attagcttta ccgccacaa gaactctgta	300
cactccctcg cgggtgggtc gaggtttctt gaattggaat atatgatgat gcaagtcccc	360
tacggctcac ctgttatga catcgccggt aactatacgc agcattgtt caaagtaga	420
tcatatgtgc attgtgcaa tccgtgccta gatcttaaag atgttgcgag gaatgtgatg	480
tacaacgata tgatcacgca acatgtacag aggcacaagg gatctggcgg gtgcagacct	540
cttccaactt tccagataga tgcatcagg aggtacgata gttctccgtg tgcggtcacc	600

tggttcagacg tttttcaaga gtgttcctat gattttggga gtggtaggga taatcatgca	660
gtctcgttgc attcaatcta cgatatccct tattcttcga tcggacctgc tcttcatagg	720
aagaatgtgc gagtttgta tgcagccttt cacttctcgg aggcattgct tttaggttcg	780
cctgtaggta atctaaatag tattggggct cagtttaggg tcgatggtga tgatgtgcat	840
tttcttttta gtgaagagtc tactttgcat tatactcata gtttagaaaa tatcaagtta	900
atcgtaatgc gtacttactt tcctgctgat gataggtttg tataatattaa ggagtcatg	960
gttaagcgtg tggatacttt tttctttagg ttggtcagag cagatacaca catgcttcat	1020
aaatctgtgg ggcactattc gaaatcgaag tctgagtact ttgcgctgaa taccctccg	1080
atcttccaag ataaagccac gttttctgtg tggtttcctg aagcgaagcg caagggttg	1140
ataccaagt ttgaacttc gagattcctt tctgggaatg tgaaaatctc caggatgctt	1200
gtcgatgctg atttcgtcca taccattatt aatcacatta gcacgtatga taacaaggcc	1260
ttagtggtga agaattgtca gtcctttgtg gaatccatac gttcaagagt aattgtaaac	1320
ggagtttccg tgaatctga gtggaacgta ccggttgatc agctcactga tatctcgttc	1380
tcgatattcc ttctcgtgaa gggttaggaag gtacagatcg agttaatgtc tgataaagtt	1440
gtgatcgagg cgaggggttt gcttcggagg ttgcgagaca gtcttaaatc tgccgtagaa	1500
ggactaggtg attgcgtcta tgatgctcta gttcaaaccg gctggtttga cacctctagc	1560
gacgaactga aagtattgct acctgaaccg tttatgacct tttcggatta tcttgaaggg	1620
atgtacgagg ccgatgcaa gatcgagaga gagagtgtct ctgagttgct cgcttccggt	1680
gatgatttgt tcaagaaaat cgatgagata agaaacaatt acagtggagt cgattttgat	1740
gtagagaaat tccaagaatt ttgcaaggaa ctgaatgtta atcctatgct aattggccat	1800
gttatcgaag ctattttttc gcagaaggct ggggtaacag taacgggtct gggcacgctc	1860
tctctgaga tgggtgcttc tgttcggtta tccagtacct ctgtagatac atgtgaagat	1920
atggatgtaa ctgaagatat ggaggatata gtgttgatgg cggacaagag tcattcttac	1980
atgtccctg aaatggcgag atgggcagat gttaaatatg gcaacaataa aggggctcta	2040
gtcgagtaca aagtcggaac ctcgatgact ttacctgcca cctgggcaga gaaagtaag	2100
gctgtcttac cgttgtcggg gatctgtgtg aggaaacccc aattttcgaa gccgcttgat	2160
gaggaagatg acttgaggtt atcaaacatg aatttcttta aggtgagcga tctaaagttg	2220
aagaagacta tcactccagt cgtttacct gggaccattc gagagaggca aatgaagaat	2280
tatattgatt atttatcggc ctctcttggt tccacgtcgg gcaatctgga gagaatcgtg	2340
cggagtgatt ggagtggtag tgaggagagt atgcaaactg ttgggttgta tgattcgaa	2400
aagtgcgaat ggttactgtt accagctgag aagaagcacg catgggccgt ggttctggca	2460

agtgatgata ccacccgcat aatcttccit tcatatgacg aatctggttc tcctataatt	2520
gataagaaaa actggaagcg attcgccgtc tgttccgaga ccaaagtcta tagtgtaatt	2580
cgtagtttag aggtttttaa taaggaagcg atagtcgacc ccggggttca cataacatta	2640
gttgacggag tgccgggttg tggcaagacc gccgagatta tagcgagggt caattggaaa	2700
actgatctag tattgactcc cgggagggag gcggctgcta tgattaggcg gagagcctgc	2760
gccctgcaca agtcacctgt ggcaaccagt gacaacgtca gaactttcga ttcttttgtg	2820
atgaatagga aaatctttaa gtttgacgtc gtctatgttg acgagggtct gatgggccat	2880
acgggattac ttaattttgc gttaaagatc tcgggttgta aaaaagcctt cgtctttggt	2940
gatgctaagc aaatcccgtt tataaacaga gtcataaatt ttgattatcc taaggagtta	3000
agaactttaa tagtcgataa tgtagagcgt aggtatgtca cccatagggt tcctagagat	3060
gtcactagtt ttcttaatac tatctataaa gccgtgtctg ctactactag tccggttgta	3120
cattctgtga aggcaattaa agtgtcgggg gccggtattc tgaggcctga gttgacaaag	3180
atcaaaggaa agataataac gtttactcaa tctgataagc agtccttgat caagagtggg	3240
tacaatgatg tgaatactgt gcatgaaatt caggagagaaa cctttgagga gacggcgggt	3300
gtgcgtgccca ccccgactcc aataggtttg attgccctg attcaccaca tgtactagt	3360
gccttaacta ggcacactaa ggcaatggtg tattatactg ttgtattcga tgcagttaca	3420
agtataatag cggatgtgga aaaggtcgat cagtcgatct tgaccatgtt tgctaccact	3480
gtgcctacca aatagcaatt aatgcagaat tcgctgtatg tccatcgtaa tattttcctc	3540
cctgttagta aaacgggggt ttatacagac atgcaggagt tctacgatag atgccttcct	3600
gggaattcct tcgtactgaa tgatttcgat gccgtaacca tgcggttgag ggacaacgaa	3660
tttaacttac aaccttgtag gctaaccttg agtaaattag atccggtacc cgttttgatt	3720
aagaatgaag cgcagaattt tctgatcccc gttttgcgta cggcctgtga aaagccgct	3780
attccgggtc ttcttgagaa tctttagct atgataaaga ggaatatgaa tactcctgat	3840
ttagctggga ccgtagatat aactaacatg tcgatttcta tagtagataa ctcttttct	3900
tcctttgtta gggacgagggt tctgcttgat cacttagatt gtgttagggc tagttccatt	3960
caaagtttt ctgattggtt ttcgtgtcag ccaacctcag cggttggcca gttggcta	4020
ttcaatttca tagatttgcc tgccttgat acttatatgc atatgattaa gaggcaacc	4080
aagagtcggt tagatacttc gattcagtct gaatatccgg ccttgcaaac tattgtttat	4140
caccctaaag tggtaaatgc agtttttgggt ccggttttca agtatttgac cactaagttt	4200

cttagtatgg tagatagttc taagtttttc ttttacacta ggaaaaaacc agaagatctg	4260
caggaatttt tctcagatct ctcttcccat tctgattatg agattcttga gcttgatgtt	4320
tctaaatatg acaagtcgca atccgatttc catttctcta ttgagatggc aatttgggaa	4380
aaattggggc tggacgatat tttggcttgg atgtggctca tgggtcacia aagaactata	4440
ttgcaagatt tccaagccgg gataaagacg ctcatctact atcaacggaa gtctgtgat	4500
gtaactactt ttataggtaa tacctttatt atcgacagct gtgtagctag tatgttgccg	4560
ttagataagt gttttaagc tagtttttgi ggtgatgatt cgctgatcta ccttcctaag	4620
ggcttggagt atcctgatat acaggttact gccaaccttg tttggaattt tgaggcgaaa	4680
cttttccgaa agaagtatgg ttacttctgc gggaagtata taattcacca tgccaacggc	4740
tgtattgttt accctgaccc tttaaaatta attagtaaat taggtaataa gagtcttga	4800
gggtatgagc atgttgagga gtttctgata tccctctctg acgttgcctca tagtttgttt	4860
aatggtgctt atttccatct actcgacgat gcaatccacg aattatttcc taatgctggg	4920
ggttgcagtt ttgtaattaa ttgtttgtgt aagtatttga gtgataagcg cttttccgt	4980
agtctttaca tagatgtctc taagtaaggt gtcagtcgag aactcgttga aacctgagaa	5040
gtttgtcaaa atctcttggg tcgataagtt gctccctaac tatttttcca ttcttaagta	5100
tttatctata actgacttta gtgtagtcaa agctcagagc tatgaatccc tcgtgcctgt	5160
caagttgttg cgigggtgtg atcttaciaaa acacctttat gtcacattgt tgggcgttgt	5220
ggtttctggt gtatggaacg taccggaatc ctgtaggggt ggtgctactg ttgctctggt	5280
tgacacaagg atgcattctg ttgcagaggg aactatatgc aaattttcag ctcccgccac	5340
cgtcgccgaa ttctctgtta ggttcatacc taattattct gtcgtggctg cggatgccct	5400
tcgcgatcct tggcttttat ttgtgagact gtctaattgt ggtatcaaag atggtttcca	5460
tcctttgact ttagaggctg cttgtttagt cgtacaact aactctatta tcaaaaagg	5520
tcttagagct tctgtagtcg agtctgtcgt ctcttccgat cagtctattg tcttagattc	5580
tttatccgag aaagttgaac ctttctttga caaagtccct atttcagcgg ctgtaatggc	5640
aagagatccc agttataggt ctaggtcgca gtctgtcggg ggtcgtggta agcggcattc	5700
taaacctcca aatcggaggt tggactctgc ttctgaagag tccggttctg tttcttttga	5760
agatggctta caatccgac acacctagca aacttatgac gtttagtget tcttatgttc	5820
ccgtcaggac ttiacttaat tttctagtig cttcacaagg taccgcttc cagactcaag	5880
cgggaagaga ttctttccgc gagtccctgt ctgcgttacc ctctctgtc gtagatatta	5940

attctagatt cccagatgcg gggtttttacg ctttctctcaa cggtcctgtg ttgaggccta 6000
tcttcgtttc gcttctcagc tccacggata cgcgtaatag ggtcattgag gttgtagatc 6060
ctagcaatcc tacgactgct gagtcgctta acgctgtaaa gcgtactgat gacgcgtcta 6120
cagccgctag ggctgagata gataatttaa tagagtctat ttctaagggt ttgatgttt 6180
acgatagggc ttcatattgaa gccgcgtttt cggtagtctg gtcagaggct accacctga 6240
aagcttagtt tcgagggtct tctggcgggtg gtgcacacca aagtgcatag tgctttcccg 6300
ttcacttaaa tcgaacgggt tgctcattgg ttgcggaaa cctctcacgt gtgacgttga 6360

agtttctatg ggcagtaatt ctgcaagggg ttcgaatccc cccctttccc cgggtagggg 6420
ccca 6424

<210> 4
<211> 61
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer

<400> 4
aaactcgagt aatacgactc actatagggg ttttaatttt tataattaaa caaacaacaa 60
c 61

<210> 5
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer

<400> 5
aaaggatcct gggcccctac ccggggaaa 29

<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer

<400> 6
tctcagccct agcggctg 18

<210> 7
<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

ttatgacatc ggcgctaact 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

gattgtaagc catcttcaaa 20

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

aaggtgttga tacccaagtt t 21

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

caacgagttc tcgactgac 19

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

gagatgggtg cttctgttg 19

<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	12	
	tggaagaga gatctgagaa	20
<210>	13	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	13	
	gagtgccggg ttgtggcaa	19
<210>	14	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	14	
	cattaattgc tatttgtag g	21
<210>	15	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	15	
	agtagaaaag gaaggtggca	20
<210>	16	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	16	

agatctcgag taatacgact c	21
<210> 17	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 17	
gttttaattt ttataattaa acaaaca	27
<210> 18	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 18	
tcgtcataca ccctttttga c	21
<210> 19	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 19	
cttggtggcg gtaaagctaa t	21
<210> 20	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 20	
aaactcgaga aatggcaaac attaatgaac aaatcaac	38
<210> 21	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> primer
 <400> 21
 aaaggatcct tacttagaga catctatgta aagact 36
 <210> 22
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 22
 aaaggatccc tatttggtag gcacagtggg agcaaacaat 39
 <210> 23
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 23
 aaactcgagt aatacgactc actatagggg ttttaatttt tataattaaa caaacaaca 59
 <210> 24
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 24
 aaaggatcct gggcccctac ccggggaaa 29
 <210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 25
 taatacgact cactataggg 20
 <210> 26
 <211> 85

<212> DNA

<213> Hepatitis Delta Virus

<400> 26

gggtcggcat ggcattcca ctcctcgcg gtccgacctg ggcattcgaa ggaggacgca 60

cgtccactcg gatggctaag ggaga 85