(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0058609
(43) 공개일자 2009년06월10일

(51) Int. Cl.
C07K 14/415 (2006.01) *C12N 15/29* (2006.01)
C12N 15/33 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0125245
(22) 출원일자 2007년12월05일
심사청구일자 2007년12월05일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 서석동 375, 조선대학교 산학기획팀
(72) 발명자
정현숙
광주 북구 일곡동 롯데아파트 107동 404호
박영민
광주 북구 동림동 우미아파트 103동 1110호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

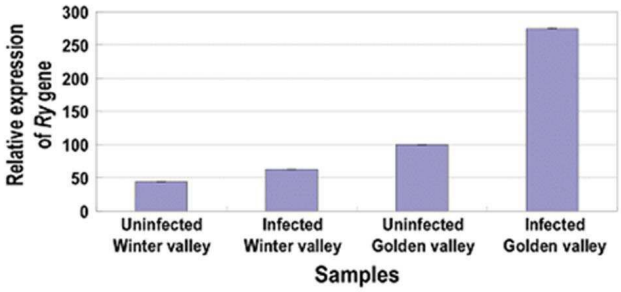
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 병원균의 감염에 의해 특이적으로 발현되는 골든밸리유래의 단백질 R y

(57) 요 약

본 발명은 병원균의 감염에 의해 특이적으로 발현되는 골든밸리 유래의 단백질 Ry에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 병원균의 감염에 의해 특이적으로 발현되는 골든밸리(Golden Valley) 유래의 Ry(Resistance Potato virus Y) 단백질; 상기 Ry 단백질을 코딩하는 유전자; 상기의 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

박재영

광주 남구 월산5동 광남연립주택 201호

박윤경

전남 장성군 장성남면 분향리 876-3

함경수

서울특별시 서대문구 대현동 럭키아파트 104동 603호

임학태

강원도 춘천시 효자2동 강원대학교 농2호관 307호

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진, 병원균의 감염에 의해 특이적으로 발현되는 골든밸리(Golden Valley) 유래의 Ry(Resistance Potato virus Y) 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 병원균은 PVY^{0}(Potato Virus Y^{0})인 것을 특징으로 하는 단백질.

청구항 3

제1항의 Ry 단백질을 코딩하는 유전자.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 5

제3항의 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 벡터는 도 4에 기재된 pBI121::Ry 벡터.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 병원균의 감염에 의해 특이적으로 발현되는 골든밸리 유래의 단백질 Ry에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 감자는 인체에 필요한 영양소와 비타민을 가장 고루 함유하고 있는 알칼리성 식품이다. 감자는 국내에서뿐만 아니라 전 세계 130여 개국에서 재배되고 있고 그 생산량이 많아 전략적 가치가 높은 작물이다. 또한, 감자는 생감자를 조리해 먹는 것 외에도 가공식품으로도 널리 쓰이고 있다.

<3> 감자는 많은 종류의 바이러스에 감염될 수 있고, 다음 세대로 쉽게 전이된다. 그러므로 감자의 바이러스 감염을 피하기는 쉽지 않다.

<4> PVY(Potato virus Y)는 바이러스 그룹인 포티비리대(potyviridae)에 속하는데, 감자(Solanum tuberosum)에 쉽게 감염되어 경제적으로 큰 손실을 유발하는 바이러스이다. PVY는 감자가 자랄 수 있는 모든 지역에서 기계, 운반체 또는 환경적 수단으로 쉽게 전이되며, 감자 재배종과 바이러스의 종류에 따라 감자 생산량에 대한 손실량은 30%에서 80%로 다양하게 나타난다.

<5> 감자 바이러스 균주는 일반적으로 PVY^{0}, PVY^{C} 와 PVY^{N}으로 나뉜다. PVY^{0} 균주는 감자를 생산하는 나라에서 대부분 감염되는 종류이다. 이러한 PVY^{0} 의 감염으로 감자 식물체는 괴사, 얼룩, 잎의 황변을 나타낸다.

<6> 한국 감자 재배종은 PVY^{0} 감염에 민감도가 다양하게 나타난다. 단지 골든밸리와 같은 몇몇의 감자 재배종은 PVY^{0}에 내성을 보인다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<7> 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 본 발명은 PVY^0가 감염된 감자 골든밸리(Golden Valley) 식물체에서 특이적으로 발현량이 증가하는 *Ry* (Resistance Potato Virus Y) 유전자를 분리하였고, 이를 통하여 *Ry* 유전자는 병원균 저항성에 관여할 것이라는 정보를 제공하고자 한다.

과제 해결수단

<8> 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 병원균의 감염에 의해 특이적으로 발현되는 골든밸리(Golden Valley) 유래의 Ry(Resistance Potato Virus Y) 단백질을 제공한다.

<9> 본 발명은 또한, 상기 Ry 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.

<10> 본 발명은 또한, 상기의 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터를 제공한다.

효 과

<11> 본 발명은 감자 바이러스 저항성에 관여하는 유전자를 분리하고 이를 분자적 수준에서 조절하여 바이러스 저항성이 증가된 감자 재배종을 육종함으로써 바이러스 질병으로 인한 감자 생산량의 감소를 극복하고자 한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<12> 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진, 병원균의 감염에 의해 특이적으로 발현되는 골든밸리(Golden Valley) 유래의 Ry(Resistance Potato virus Y) 단백질을 제공한다. 상기 병원균은 PVY^0 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. *Solanum tuberosum subsp. andigena* 시퀀스는 *Ry* 유전자의 길이가 3,534 bp였으며, 골든밸리(Golden valley, *Solanum tuberosum* L. *Golden valley*)의 *Ry* 유전자는 3,545 bp로 약간의 차이가 있었다. 특히, NCBI gene bank에 있는 *Solanum tuberosum subsp. andigena* 과 비교해보니 염기서열 상동성이 3249/3570 (≒91%)로 상당히 높았으며 이는 종에 따라 *Ry* 유전자가 약간의 차이점이 있는 것처럼 보인다.

<13> 본 발명에 따른 Ry 단백질의 범위는 감자로부터 분리된 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 식물체 내에서 병원균의 감염에 의해 특이적으로 발현되는 활성을 의미한다.

<14> 본 발명은 또한 상기 Ry 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.

<15> 본 발명의 유전자는 Ry 단백질을 코딩하는 게놈 DNA와 cDNA를 모두 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다.

<16> 또한, 상기 염기 서열의 변이체가 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.

<17> 본 발명은 본 발명의 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터를 제공한다. 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 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로써 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

<18> 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. 용어 "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵

산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.

<19> 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 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. 본 발명에 따른 DNA를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.

<20> 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 것이다. 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(포스피노트리신)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(Kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

<21> 본 발명의 일 구현예에 따른 식물 발현 벡터에서, 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "구성적(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 구성적 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.

<22> 상기 터미네이터는, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 벼 α-아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(agrobacterium tumefaciens)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알고 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.

<23> 본 발명의 일 구현예에 따른 상기 벡터는 도 4에 기재된 pBI121::Ry 벡터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

<24> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<25> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<26> **실험방법**

<27> **1. 감자에 PVY^0를 처리하여 PVY^0 저항성 감자식물체 선별**

<28> PVY^0 바이러스 앰플은 한국의 서울 여자대학교, 식물 바이러스 진뱅크로부터 획득하였다. 획득된 샘플은 즉시 액체 질소에서 동결하였고, 막자와 막자사발로 분말화시켰다. 분말화된, 동결된 조직은 0.1M 소디움 포스페이트 버퍼 (pH 7.0)로 1:200 (W/V)로 녹였다. 실리콘 카바이드(400 메쉬)를 뿌린 감자 잎에 준비한 PVY^0 로 접종하였다. PVY^0 접종 후 3주가 지난 각각의 감자 식물체의 어린 잎 단면 끝을 PVY^0 가 감염되었는지 RT-PCR로 확인하여 선별하였다. RT-PCR을 통하여 선별된 PVY^0에 감염된 12종의 감자를 대상으로 바이러스의 *CP*(Coat Protein) 유전자와 *Ry*(Resistance Potato virus Y) 유전자의 발현량을 측정하여 저항성이 있는 감자종인 골든벨리(Golden valley)와 감염이 가장 잘되는 감자종인 윈터벨리(Winter valley)를 선별하였다.

<29> **2. 골든 단백질(Golden protein) 획득방법**

<30> *Ry* 유전자가 형질전환된 감자 식물체의 잎을 액체 질소로 동결한 후 막자와 막자사발로 균일하게 갈아서, 정제되지 않은 단백질(crude protein)을 분리하였다. 이 균일물을 50mM Tris-HCl (pH 7.4), 1mM EDTA, 10mM NaCl, 5mM MgCl2, 1% Triton X-100 및 2% 2-mercaptoethanol이 포함된 추출 버퍼로 녹여 4℃에서 한시간 동안 반응시

켰다. 4℃에서 12,000 rpm 으로 15분간 원심분리하여 얻은 상층액을 동결건조하여 분말을 얻고, 이 단백질 분말은 사용전에 증류수에 녹여 사용하였다.

<31> **3. RNA 추출**

<32> TRIzol reagent (Life Technologies)을 이용하여 감염된 잎조각으로부터 추출하였다. 잎조각은 멸균한 막자와 막자사발에 넣고 액체질소를 이용하여 곱게 갈았다. 분말상태의 잎조직(약 100㎎)을 제조사(Life Technologies)의 지시대로 모든 RNA를 추출하였다. 모든 RNA는 20㎕ RNase-free water로 녹였다. RNA 농도는 분광광도계((Bio-Rad, Smart Spec TM 3000)) 260㎚에서 흡광도를 측정하여 정량하였고, 1% 아가로스 젤에서 확인하였다.

<33> **4. cDNA 합성**

<34> cDNA는 Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies)을 이용하여 합성하였다. 2ug의 모든 RNA와 1ul의 oligo dT (500 ug/ml)을 반응튜브에 넣고 잘 섞고, 65℃의 열을 10분동안 가하여 비활성화 시킨 후 얼음에 튜브를 꽂아둔다. 5ㅅfirst strand buffer와 0.1 M DTT를 첨가하여 잘 섞은 후 42℃에서 2 분동안 반응시킨다. 1ul (200 units)의 Superscript II를 반응튜브에 넣고, 42℃에서 50분동안 반응시킨 뒤 70℃에서 15분동안 유지시킴으로써 반응을 중지시킨다. 합성된 cDNA는 -20℃에 보관한다.

<35> **5. RT-PCR**

<36> *CP* 유전자를 증폭하기 위하여, 정방향 프라이머, 5'-AGGCACATCTGGGACACATACTGTGCCGA-3' (서열번호 3)와 역방향 프라이머 5'-TGACTCCAAGTAGAGTATGCATACTTGGA-3' (서열번호 4)를 사용하였다. PCR 조건은 다음과 같다(변성 94℃, 5분; 증폭 94℃, 30 초; 57℃, 30초; 72℃, 1분, 35회; 마지막 증폭 72℃, 5분).

<37> *Ry* 유전자를 증폭하기 위하여, 정방향 프라이머, 5'-TTGAAGAAAGTTCTAGTTGTGCT-3' (서열번호 5)와 역방향 프라이머 5'-TGAAATGCTTGTCTCTCGTTGTTG-3' (서열번호 6)를 사용하였다. PCR 조건은 다음과 같다(변성 94℃, 5분; 증폭 94℃, 30 초; 52℃, 30초; 72℃, 7분, 35회; 마지막 증폭 72℃, 4분). 20ul RT-PCR 반응물은 0.25mM dNTPs, 0.5uM 각각의 양방향 프라이머, 1xTaq 버퍼, 1ul cDNA 및 1 unit Taq DNA polymerase을 포함한다.

<38> **6. 실시간 PCR (Real-time PCR)**

<39> Quantitative-PCR은 감염된 감자 잎으로부터 추출한 cDNA로 수행하였다. *Ry* 유전자는 NCBI accession number AJ300266를 기초로 하여 정방향 프라이머인 RyRF 5'-TTGAAGAAAGTTCTAGTTGTGCT-3'(서열번호 5)와 역방향 프라이머인 RyRR 5'-TGAAATGCTTGTCTCTCGTTGTTG-3'(서열번호 6)으로 수행하였다. 프라이머들은 PRIME 프로그램으로 분석하여 선택하였다. passive reference dye로써 ROX를 갖는 2× SYBR Green PCR Master Mix, HotStarTaq DNA Polymerase 및 dNTP Mix를 포함하는 QuantiTect SYBR Green PCR Kit (QIAGEN)를 사용하였다. 5 pmol 양방향 프라이머 (정방향 및 역방향), 1 ㎕ cDNA와 RNase-free water를 첨가하였다. PCR 조건은 다음과 같다(변성 95℃, 15분; 증폭 95℃, 10 초; 52℃, 20초; 72℃, 30초, 40회; 마지막 증폭 72℃, 5분). Ry 유전자의 발현량은 real-time DNA 검출 시스템(Corbett co, RG-3000, Australia)으로 측정하였다.

<40> **7. ELISA 테스트**

<41> Agdia Inc. 제공하는 방법으로 DAS-ELISA(double-antibody sandwich ELISA) (Agdia, Inc., Elkhart, IN)를 이용하였다. 모든 시약은 Agdia, Inc.으로부터 구입하여 사용하였다. 잎조직 샘플은 적절한 버퍼(Agdia general extract buffer)로 1:10으로 희석하여 추출하였고, microtiter 플레이트에 첨가하기 전에 12,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 제조사의 지시(Agdia, Inc)에 따라서 ELISA를 수행하였다. ELISA Reader (Bio-Rad, USA)를 이용하여 분광광도계 650 nm의 흡광도를 측정하였다. 모든 분석을 세 번 반복하여 수행하였다.

<42> **8. *Ry* 유전자 과발현 벡터 제작**

<43> **8-1. *Ry* 유전자 PCR**

<44> *Ry* 유전자의 두 개의 절편은 다음의 프라이머를 이용하여 사용하였다; 정방향 (RyF10) 5'-ATCCCGGGATGGCATCATCATCTTCTTC-3'(서열번호 7), 역방향 (RyIR) 5'-AAGCATGCAATATCTAGAAATATCTCTTG A-3'(서열번호 8), 정방향 (RyIF) 5'-TTGCATGCTTCTTAAGAGGGAGAA AACAAA-3'(서열번호 9), 역방향 (RyR10) 5'-TACCCGGGCTCACATTGT CAACATCTTCAGT-3'(서열번호 10). 20ul PCR 반응물은 0.25 mM dNTPs, 0.5uM 양방향 프라이머, 1x Taq 버퍼, 1ul cDNA 및 1 unit Taq DNA polymerase이 포함되어 있다. Thermocycler를 이용한 PCR 수행 조건은 다음과 같다(변성;94℃, 5분; 증폭 35회 94℃, 30초; 50℃, 1분; 72℃, 5분; 마지막 증폭 72℃, 5분).

<45> **8-2. 벡터(pBI121)와 효소절단**

<46> 벡터 pBI121 (≒14.7 kb)은 제한효소 XmaI으로 절단하였다. 벡터의 절단을 위한 반응물 20ul에는 1x NEB buffer 4, 1x BSA, 제한효소 (XmaI)을 첨가하여 반응시켜 절단하였다. 상기 7-1에서 얻어진 두 개의 *Ry* 유전자 절편은 XmaI와 SphI으로 절단하였다. 효소 절단을 위한 반응물은 37℃에서 48시간동안 반응시킨 후, 65℃에서 20분동안 비활성화시켰다.

<47> **8-3. 벡터(pBI121)와 삽입절편의 연결**

<48> 상기 7-2에서 절단된 벡터 pBI121와 삽입될 절편은 T4 DNA ligase (New England Biolabs)로 연결하였다. 20ul 연결 반응물에는 1x ligation buffer, T4 DNA 라이게이즈, pBI121벡터와 두 개의 다른 절편을 포함한다.

<49> 반응물은 16℃에서 24시간동안 반응시켜 pBI121::Ry을 완성시킨 후, 65℃에서 10분동안 비활성화시킨다(**도 4**).

<50> <실시예 1. PVY^0 저항성 감자 재배종에서 *Ry* 유전자의 발현>

<51> 1-1. *CP* 유전자의 발현

<52> 피막단백질(Coat protein, *CP*) 유전자는 바이러스 파티클을 조립(assembly)하는 기능이 있고, 진딧물에 의한 바이러스 전달을 조절하는 것으로 알려져 있다. 최근에, 피막단백질은 세포 대 세포 이동에 의한 바이러스 전파에 관여하는 것으로 알려졌다. *CP* 유전자는 플라스모데스마타(plasmodesmata)의 SEL(size exclusion limit)를 증가시킬 수 있는 가능성이 제기되었고, 바이러스 RNA의 세포 대 세포 이동을 용이하게 할 것으로 추정되었다.

<53> 서열번호 3과 서열번호 4인 프라이머로 PVY^0 피막 단백질(coat protein) 영역을 증폭하여 PVY^0가 접종된 잎들의 *CP* 유전자에 대한 RT-PCR을 수행한 결과, 얼리밸리, 윈터밸리, 태복밸리에서 예상되는 크기인 690 bp를 확인하였으며, 그 중 윈터밸리에서 강하게 검출되었다(**도 1**).

<54> 1-2. *Ry* 유전자의 발현

<55> *Ry* 유전자는 서열번호 5와 서열번호 6인 프라이머로 증폭하였다. 많은 재배종에서 *Ry* 유전자는 검출되지 않았다(data not shown). 그러나, 골든밸리에서는 154 bp 밴드가 강하게 검출되었다(**도 1**).

<56>

<57> <실시예 2. PVY^0 접종 전과 후의 골든밸리와 윈터밸리에서의 *Ry* 유전자의 발현량 분석>

<58> RT-PCR을 통해 PVY^0에 가장 감염이 잘되는 감자종인 윈터밸리와 가장 저항성이 높은 감자종인 골든밸리에 각각 바이러스를 처리하고 실시간 PCR을 통해 *Ry* 유전자의 발현량을 확인한 결과 윈터밸리는 바이러스를 처리함에 따라 *Ry* 유전자의 발현량에 큰 차이를 보이지 않은 반면 골든밸리는 *Ry* 유전자의 발현량이 상대적으로 높아졌다(**도 2**). 이는 골든밸리에서 발현되는 *Ry* 유전자가 바이러스 의존적인 방어기작이라는 것을 보여주고, 각 종마다 특징을 갖고 있다는 것을 알 수 있다.

<59> <실시예 3. 골든밸리 단백질을 처리한 후에 PVY^0 를 접종한 윈터밸리와 PVY^0 를 접종하지 않은 윈터밸리에서의 CP(Coat Protein) 발현량 분석>

<60> PVY^0에 감염이 잘되는 감자종인 윈터밸리에 골든밸리의 단백질을 주입시켜 바이러스의 피막단백질(Coat protein)을 ELISA 테스트로 확인한 결과 골든밸리 단백질을 주입시킨 윈터밸리는 바이러스의 피막단백질(Coat protein)이 현저히 감소했다는 것을 알 수 있었다(**도 3**). 이는 골든밸리의 단백질이 PVY^0 감염에 큰 효과를 보여준다는 것을 볼 수 있다.

도면의 간단한 설명

<61> **도 1**은 PVY^0 저항성 감자 재배종에서 *CP* 유전자와 *Ry* 유전자의 발현을 관찰한 그림이다(레인 1: 얼리밸리, 레인 2: 고구밸리, 레인 3: 퍼플밸리, 레인 4: 윈터밸리, 레인 5: 태동밸리, 레인 6: 썸머밸리, 레인 7: 태복밸리, 레인 8: cv. Jopung valley, 레인 9: 쥬스밸리, 레인 10: 알칩밸리, 레인 11: 골든밸리, 레인 12: cv. Superior valley).

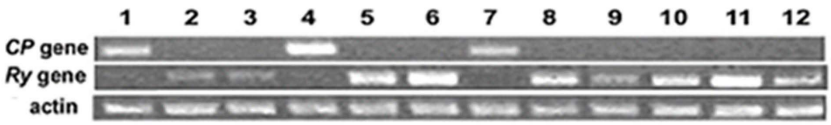
<62> **도 2**는 PVY^0 접종 전과 후의 골든밸리와 윈터밸리에서 *Ry* 유전자의 발현량을 정량적 Real-Time PCR(quantitative Real-Time PCR)을 이용하여 측정한 결과를 나타내는 그림이다. cDNAs량은 엑틴을 기준으로 정량하였다. 데이터는 독립적인 3개의 실험 반복구의 평균값을 보여준다.

<63> **도 3**은 골든밸리 단백질을 처리한 후에 PVY^0 를 접종한 윈터밸리와 골든밸리 단백질을 처리하지 않은 후에 PVY^0 를 접종한 윈터밸리의 OD_{650}값으로 PVY^0 감염정도를 측정한 ELISA 분석결과이다 (A : PVY^0 을 접종하지 않은 윈터밸리, B : PVY^0 을 접종한 윈터밸리, C : 골든밸리 단백질을 처리한 후에 PVY^0 을 접종한 윈터밸리).

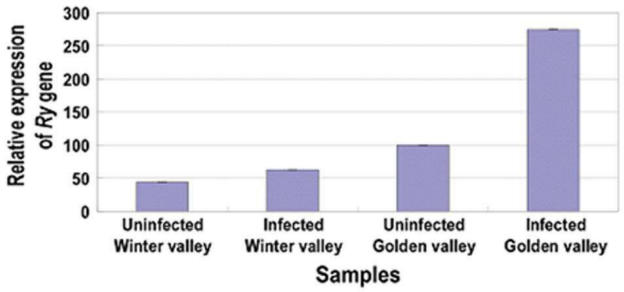
<64> **도 4**는 *Ry* gene을 pBI121 바이너리 벡터에 삽입한 **pBI121::Ry** 벡터의 모식도이다.

도면

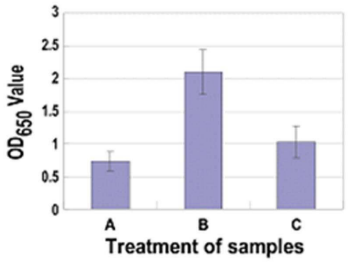
도면1



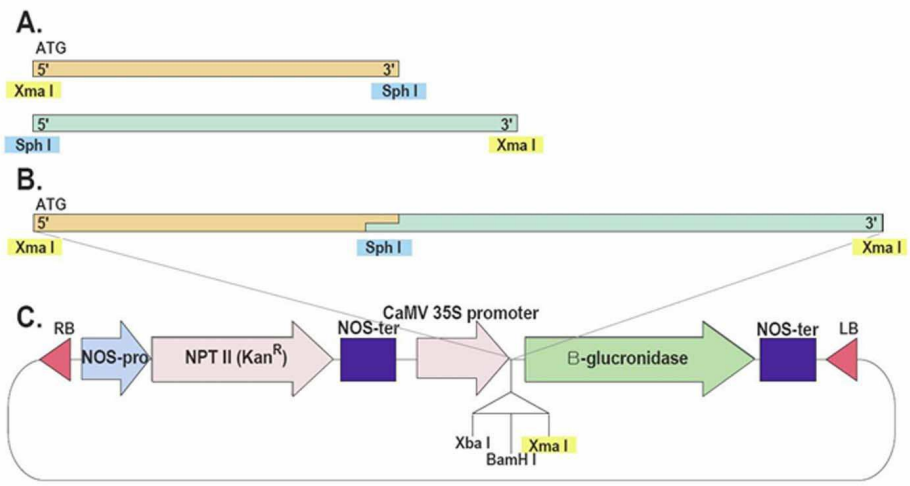
도면2



도면3



도면4



서 열 목 록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Chosun University
<120> Fermentation solution of pine tree leaves for promotion of digestion

<160> 10

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 3545
<212> DNA
<213> Solanum tuberosum

<400> 1
atggcatcat catcttcttc ttctgagagt aattcacagt attcatgtcc tcaacggaag 60

tacaagtacg atgtgtttct aagttttaga ggtaaagata ctcgcagaaa ttttacaagt 120

cacttgtacg aacgtttgga taacagggga atattcacct ttctagatga taaaaggcta 180

gagaatggtg attccctctc gaaagaacta gtgaaagcta taaaagagtc tcaagttgct 240

gtaatcatct tctcaaagaa ttatgctacg tcgaggtggt gcctgaatga agtagtgaag 300

attatggaat gcaaggaaga gaatggacaa ttagtcatac cagtcttcta tgatgtggat 360

ccatcagatg ttcggaagca aacgaagagc tttgcagaag cctttgccga acacgaatcg 420

aggtataagg atgatgttga aggaatgcag aaggtgcaac gatggaggac tgctctaagt 480

gaagctgcag atctaaaagg atatgatatc cgtgaaagga ttgaatcaga atgtattggg 540

gaacttgtta atgaaatttc gcccaaatta tgcgagactt ctttatctta tttgacagat 600

gttgtgggaa tagatgctca tttaaagaaa gtcaactccc ttctagagat gaaaatcgat 660

gatgttcgga ttgtgtggat ctggggaatg gggggagttg gtaaaacgac aatagcaaga 720

gctatttttg atatactctc atctaaattt gatggtgctt gtttccttcc ggacaataaa 780

gaaaacaagt atgaaataca ttctctgcaa agtatccttc tctctaaact ggtaggggaa 840

aaagaaaatt gtgtgcatga taaggaggac gggaggcacc tgatggctcg tagacttcgt 900

ttgaagaaag ttctagttgt gcttgataac atagatcatg aagaccaatt gaaataccta 960

gcaggggatc ttggttggtt tggcaatggc accagaatta ttgcaacaac gagagacaag 1020

catttcattc ggaaaaatga tgccgtatat cctgtgacta cactacttga acatgatgct 1080

gttcagttgt tcaaccaata tgctttcaaa aatgaagttc cagataagtg tttcgaggag 1140

ataacgttgg aggtagtaag tcatgctgaa ggccttcctt tagccctgaa agtgtggggt 1200

tcttccttac ataagaagga tatacatgtg tggaggagtg ctgttgatcg aataaagagg 1260

aaccctagtt caaaagttgt tgaaaacctc aaagtaagtt atgatgggtt ggagcgcgaa 1320

gatcaagaga tatttctaga tattgcatgc ttcttaagag ggagaaaaca aaccgagatc 1380

aagcaaattc ttgagagctg tgattttgga gctgatgacg gattgagggt gctgattgac 1440

aagtctcttg tgttcatctc tgaatatgat acgattcaaa tgcatgactt aatacaagag 1500

atgggtaaat acatagtgac aatgcaaaag gatcggggag aagtcactag actatggctc 1560

actcaagatt tcgaaaaatt ctcaaatgca aaaatacaag ggaccaaggc tatcgaagca 1620

atctggatac cagaaattca agacctaagc tttagaaaaa aggccatgaa agatgtggaa 1680

aagcttagga tattatacat caatggtttt catacacctg atggctccaa cgatcagtac 1740

cttcccagca acttgcgctg gttcgactgt tgtaagtatc cttgggaatc attgccagcc 1800

aaatttgatc ctgacatgct tgttcatctt gatctccagc agagttcact gtttcattta 1860

tggactggaa caaagaaatt tccttttcta cggaggctag atctcagcag ctgtgcaaac 1920

ctgatgcgaa caccagattt cacggatatg ccaaatttgg agtatttggg tctggaagag 1980

tgtagtaatc ttaaagaggt tcatcattcc ctgagatgtt ccaaaaaact cattaagtta 2040

aatttgagag attgtaaaaa ccttgagagt tttagctatg tttgttggga atctcttgaa 2100

tgtctacatc tacaaggttg ctctaattta gagaaatttc cgaggatccg gggaaaattg 2160

aagccggaga tagagattca agtgcaacgc tctgggataa ggaaactacc atcagctatt 2220

attcagcacc agtctagtct tacagagcta gatttgagtg gcatgaaaaa ccttgcaaca 2280

ctttcatgca gcattggcga gttgaaaagt ttggtgatgc taaaagtgtc ctactgctca 2340

aaactcaaaa gcttgccaga agagataggt gatttagaaa acttggagat acttaaggcc 2400

ggatatactc taatctcaca acctccgtct tccatcgttc gcttgaacag gcttaaattt 2460

ttgacttttg caaaacaaaa atcagaagta ggcctcgaag atgaagtgca ctttgtcttc 2520

cctccggtga atcagggatt atgctcattg aaaactttga atctcagtta ctgcaatcta 2580

aaagacgaag gacttccgca agacatcgga agcttatcct ctttggaagt gttgaatctg 2640

aggggaaata attttgagca tttgcctcaa agcttgaccc gacttagttc tcttcagtcc 2700

ttggacttat tagattgcaa gagtcttaca cagctgccgg aatttccacg gcaattagac 2760

acaatatatg cagattggaa caatgattcg atctgtaatt cgttgtttca aaatatctca 2820

tcattccagc atgacatctg tgcttcagat tccttgtcac taagagtgtt taccaatgag 2880

tggaaaaata tcccgagatg gttccaccat cagggaaaag ataaaagtgt atcagtcaaa 2940

ttgcctgaaa attggtatgt gtgcgataac ttcttgggat ttgctgtatg ttactctggc 3000

tgcttaattg aaaccacagc tcaattctta tgtgatgagg ggatgccgtg tatcacacag 3060

aaacttgcct tacccaaaca ttcagaagaa tttccagaat ctgctattca ttttttcttg 3120

gtaccttctg ctggcttatt ggatacatct aaggcaaacg gaaaaacacc aaatgattat 3180

aggcacatta tgttatcttt ttcggaagag ttgaaggagt ttggacttcg tttgttgtat 3240

agagatgaat ctaagcttaa ggccttgttt aaaatgacgg aaaataatga tgaaccaaca 3300

gaatattgcg tcgtgaaaag gaggggtcaa tatgatgagg ccagatgctc ctcttctaag 3360

aaacaaaggt cacagctcta atatttgtct ttgagaatct gcagcaacaa ccagtctcgt 3420

cacaaatttg cagctctcgt ctccacttct gctgagccat ggcctgtgca gttgctgagg 3480

agtttccgcg gcagttgcac tgtaactcag caggagcaag agactgagat gttgacaatg 3540

tgagc 3545

<210> 2
<211> 1126
<212> PRT
<213> Solanum tuberosum

<400> 2
Met Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Glu Ser Asn Ser Gln Tyr Ser Cys
1 5 10 15

Pro Gln Arg Lys Tyr Lys Tyr Asp Val Phe Leu Ser Phe Arg Gly Lys
20 25 30

Asp Thr Arg Arg Asn Phe Thr Ser His Leu Tyr Glu Arg Leu Asp Asn
35 40 45

Arg Gly Ile Phe Thr Phe Leu Asp Asp Lys Arg Leu Glu Asn Gly Asp
50 55 60

Ser Leu Ser Lys Glu Leu Val Lys Ala Ile Lys Glu Ser Gln Val Ala
65 70 75 80

Val Ile Ile Phe Ser Lys Asn Tyr Ala Thr Ser Arg Trp Cys Leu Asn
85 90 95

Glu Val Val Lys Ile Met Glu Cys Lys Glu Glu Asn Gly Gln Leu Val
100 105 110

Ile Pro Val Phe Tyr Asp Val Asp Pro Ser Asp Val Arg Lys Gln Thr
115 120 125

Lys Ser Phe Ala Glu Ala Phe Ala Glu His Glu Ser Arg Tyr Lys Asp
130 135 140

Asp Val Glu Gly Met Gln Lys Val Gln Arg Trp Arg Thr Ala Leu Ser
145 150 155 160

Glu Ala Ala Asp Leu Lys Gly Tyr Asp Ile Arg Glu Arg Ile Glu Ser
165 170 175

Glu Cys Ile Gly Glu Leu Val Asn Glu Ile Ser Pro Lys Leu Cys Glu
180 185 190

Thr Ser Leu Ser Tyr Leu Thr Asp Val Val Gly Ile Asp Ala His Leu
195 200 205

Lys Lys Val Asn Ser Leu Leu Glu Met Lys Ile Asp Asp Val Arg Ile
210 215 220

Val Trp Ile Trp Gly Met Gly Gly Val Gly Lys Thr Thr Ile Ala Arg
225 230 235 240

Ala Ile Phe Asp Ile Leu Ser Ser Lys Phe Asp Gly Ala Cys Phe Leu

245 250 255

Pro Asp Asn Lys Glu Asn Lys Tyr Glu Ile His Ser Leu Gln Ser Ile
260 265 270

Leu Leu Ser Lys Leu Val Gly Glu Lys Glu Asn Cys Val His Asp Lys
275 280 285

Glu Asp Gly Arg His Leu Met Ala Arg Arg Leu Arg Leu Lys Lys Val
290 295 300

Leu Val Val Leu Asp Asn Ile Asp His Glu Asp Gln Leu Lys Tyr Leu
305 310 315 320

Ala Gly Asp Leu Gly Trp Phe Gly Asn Gly Thr Arg Ile Ile Ala Thr
325 330 335

Thr Arg Asp Lys His Phe Ile Arg Lys Asn Asp Ala Val Tyr Pro Val
340 345 350

Thr Thr Leu Leu Glu His Asp Ala Val Gln Leu Phe Asn Gln Tyr Ala
355 360 365

Phe Lys Asn Glu Val Pro Asp Lys Cys Phe Glu Glu Ile Thr Leu Glu
370 375 380

Val Val Ser His Ala Glu Gly Leu Pro Leu Ala Leu Lys Val Trp Gly
385 390 395 400

Ser Ser Leu His Lys Lys Asp Ile His Val Trp Arg Ser Ala Val Asp
405 410 415

Arg Ile Lys Arg Asn Pro Ser Ser Lys Val Val Glu Asn Leu Lys Val
420 425 430

Ser Tyr Asp Gly Leu Glu Arg Glu Asp Gln Glu Ile Phe Leu Asp Ile
435 440 445

Ala Cys Phe Leu Arg Gly Arg Lys Gln Thr Glu Ile Lys Gln Ile Leu
450 455 460

Glu Ser Cys Asp Phe Gly Ala Asp Asp Gly Leu Arg Val Leu Ile Asp
465 470 475 480

```
Lys Ser Leu Val Phe Ile Ser Glu Tyr Asp Thr Ile Gln Met His Asp
                485                 490                 495

Leu Ile Gln Glu Met Gly Lys Tyr Ile Val Thr Met Gln Lys Asp Arg
            500                 505                 510

Gly Glu Val Thr Arg Leu Trp Leu Thr Gln Asp Phe Glu Lys Phe Ser
        515                 520                 525

Asn Ala Lys Ile Gln Gly Thr Lys Ala Ile Glu Ala Ile Trp Ile Pro
    530                 535                 540

Glu Ile Gln Asp Leu Ser Phe Arg Lys Lys Ala Met Lys Asp Val Glu
545                 550                 555                 560

Lys Leu Arg Ile Leu Tyr Ile Asn Gly Phe His Thr Pro Asp Gly Ser
                565                 570                 575

Asn Asp Gln Tyr Leu Pro Ser Asn Leu Arg Trp Phe Asp Cys Cys Lys
            580                 585                 590

Tyr Pro Trp Glu Ser Leu Pro Ala Lys Phe Asp Pro Asp Met Leu Val
        595                 600                 605

His Leu Asp Leu Gln Gln Ser Ser Leu Phe His Leu Trp Thr Gly Thr
    610                 615                 620

Lys Lys Phe Pro Phe Leu Arg Arg Leu Asp Leu Ser Ser Cys Ala Asn
625                 630                 635                 640

Leu Met Arg Thr Pro Asp Phe Thr Asp Met Pro Asn Leu Glu Tyr Leu
                645                 650                 655

Gly Leu Glu Glu Cys Ser Asn Leu Lys Glu Val His His Ser Leu Arg
            660                 665                 670

Cys Ser Lys Lys Leu Ile Lys Leu Asn Leu Arg Asp Cys Lys Asn Leu
        675                 680                 685

Glu Ser Phe Ser Tyr Val Cys Trp Glu Ser Leu Glu Cys Leu His Leu
    690                 695                 700

Gln Gly Cys Ser Asn Leu Glu Lys Phe Pro Arg Ile Arg Gly Lys Leu
705                 710                 715                 720
```

Lys Pro Glu Ile Glu Ile Gln Val Gln Arg Ser Gly Ile Arg Lys Leu
725 730 735

Pro Ser Ala Ile Ile Gln His Gln Ser Ser Leu Thr Glu Leu Asp Leu
740 745 750

Ser Gly Met Lys Asn Leu Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ile Gly Glu Leu
755 760 765

Lys Ser Leu Val Met Leu Lys Val Ser Tyr Cys Ser Lys Leu Lys Ser
770 775 780

Leu Pro Glu Glu Ile Gly Asp Leu Glu Asn Leu Glu Ile Leu Lys Ala
785 790 795 800

Gly Tyr Thr Leu Ile Ser Gln Pro Pro Ser Ser Ile Val Arg Leu Asn
805 810 815

Arg Leu Lys Phe Leu Thr Phe Ala Lys Gln Lys Ser Glu Val Gly Leu
820 825 830

Glu Asp Glu Val His Phe Val Phe Pro Pro Val Asn Gln Gly Leu Cys
835 840 845

Ser Leu Lys Thr Leu Asn Leu Ser Tyr Cys Asn Leu Lys Asp Glu Gly
850 855 860

Leu Pro Gln Asp Ile Gly Ser Leu Ser Ser Leu Glu Val Leu Asn Leu
865 870 875 880

Arg Gly Asn Asn Phe Glu His Leu Pro Gln Ser Leu Thr Arg Leu Ser
885 890 895

Ser Leu Gln Ser Leu Asp Leu Leu Asp Cys Lys Ser Leu Thr Gln Leu
900 905 910

Pro Glu Phe Pro Arg Gln Leu Asp Thr Ile Tyr Ala Asp Trp Asn Asn
915 920 925

Asp Ser Ile Cys Asn Ser Leu Phe Gln Asn Ile Ser Ser Phe Gln His
930 935 940

Asp Ile Cys Ala Ser Asp Ser Leu Ser Leu Arg Val Phe Thr Asn Glu

945 950 955 960

Trp Lys Asn Ile Pro Arg Trp Phe His His Gln Gly Lys Asp Lys Ser
965 970 975

Val Ser Val Lys Leu Pro Glu Asn Trp Tyr Val Cys Asp Asn Phe Leu
980 985 990

Gly Phe Ala Val Cys Tyr Ser Gly Cys Leu Ile Glu Thr Thr Ala Gln
995 1000 1005

Phe Leu Cys Asp Glu Gly Met Pro Cys Ile Thr Gln Lys Leu Ala Leu
1010 1015 1020

Pro Lys His Ser Glu Glu Phe Pro Glu Ser Ala Ile His Phe Phe Leu
1025 1030 1035 1040

Val Pro Ser Ala Gly Leu Leu Asp Thr Ser Lys Ala Asn Gly Lys Thr
1045 1050 1055

Pro Asn Asp Tyr Arg His Ile Met Leu Ser Phe Ser Glu Glu Leu Lys
1060 1065 1070

Glu Phe Gly Leu Arg Leu Leu Tyr Arg Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala
1075 1080 1085

Leu Phe Lys Met Thr Glu Asn Asn Asp Glu Pro Thr Glu Tyr Cys Val
1090 1095 1100

Val Lys Arg Arg Gly Gln Tyr Asp Glu Ala Arg Cys Ser Ser Ser Lys
1105 1110 1115 1120

Lys Gln Arg Ser Gln Leu
1125

<210> 3
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 3
aggcacatct gggacacata ctgtgccga 29

<210> 4
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 4
tgactccaag tagagtatgc atacttgga 29

<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 5
ttgaagaaag ttctagttgt gct 23

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 6
tgaaatgctt gtctctcgtt gttg 24

<210> 7
<211> 28

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 7
atcccgggat ggcatcatca tcttcttc 28

<210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 8
aagcatgcaa tatctagaaa tatcttcttga 30

<210> 9
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 9
ttgcatgctt cttaagaggg agaaaacaaa 30

<210> 10
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 10
tacccgggct cacattgtca acatcttcag t 31