(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.[6]
C12N 15/29

(11) 공개번호 특2000-0029896
(43) 공개일자 2000년05월25일

(21) 출원번호 10-1999-7001075
(22) 출원일자 1999년02월09일
번역문제출일자 1999년02월09일
(86) 국제출원번호 PCT/EP1997/04340 (87) 국제공개번호 WO 1998/06750
(86) 국제출원출원일자 1997년08월08일 (87) 국제공개일자 1998년02월19일
(81) 지정국 AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 가나 짐바브웨

EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄

EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투칼 스웨덴

OA OAPI특허 : 부르키나파소 베넹 중앙아프리카 콩고 코트디브와르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고

국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바이잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나다 스위스 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀랜드 영국 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 케냐 키르기즈 북한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 레소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽고 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 슬로베니아 슬로바키아 타지키스탄 투르크메니스탄 터어키 트리니다드토바고 우크라이나 우간다 미국 우즈베키스탄 베트남 폴란드 포르투칼 루마니아 러시아 수단 스웨덴 싱가포르 시에라리온 가나 유고슬라비아

(30) 우선권주장 96401764.4 1996년08월09일 EPO(EP)
97401101.7 1997년05월16일 EPO(EP)

(71) 출원인 키진 엔.브이. 자뷰 마크
네덜란드 엔엘-6700 에이이 웨이제닝엔 피.오. 박스216 아그로비지니스 파크 90

(72) 발명자 보스피터
네덜란드엔엘-3927비디렌스우드도르프스트라트22
자베우마크
벨기에비-9000겐트에펠스텍70
시몬스거스
네덜란드엔엘-6715제이엘에드조에텐달11
비즈브랜디젤레
네덜란드엔엘-6702에이비바게닌겐트로엘스트라베크95

(74) 대리인 나영환, 이상섭

심사청구 : 없음

(54) 선충및/또는진딧물에대한내성유전자

요약

본 발명은 선충 및/또는 진딧물에 대한 내성을 부여할 수 있는 유전자에 관한 것이다. 본 발명의 바람직한 핵산 서열은 도면에 제시된 DNA 서열의 최소한 일부 또는 이에 대해 상동성이 있는 DNA 서열이다. 본 발명은 상기 핵산을 포함하는 벡터, 세포 및 종자와 선충 및/또는 진딧물에 내성이 있는 유전자적으로 형질전환된 식물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 올리고뉴클레오티드, 프라이머, 진단 키트 및 폴리펩티드에 관한 것이다.

명세서

기술분야

본 발명은 내성 유전자와, 이 내성 유전자를 포함하는 DNA 작제물, 미생물, 식물 세포 및 식물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 선충 및/또는 진딧물에 대한 내성이 있는 유전자적으로 형질전환된 식물에 관한 것이다. 또, 본 발명은 내성 유전자를 동정하기 위한 프로브 및 프라이머와 상기 프로브 및/또는 프라이머를 포함하는 진단 키트에 관한 것이다. 마지막으로, 본 발명은 상기 내성 유전자가 암호하는 폴리펩티드와 이 폴리펩티드의 용도에 관한 것이다.

배경기술

식물 병원체는 식물체를 감염시켜 식물과 식물 생산물에 실질적인 손실을 유발한다. 식물 병원체 또는 해충에 의한 식물 감염의 결과로서 발생하는 식물병은 식물 및/또는 식물 생산물에 손상을 유발하고, 생산물과 수율을 감소시키며, 특정 지역에서 성장할 수 있는 식물의 종류를 제한하므로써 결과적으로 심각한 (재정적) 손실을 증가시킨다.

식물에 기생하는 선충은 전세계적으로 발생하며 이들 대부분은 대개 표토에서 생활한다. 식물 뿌리상에 선충이 직접 공급되어 발생하는 손실은 덜 중요하지만, 몇가지 종, 멜로이도진(Meloidogyne; 혹선충) 종에 속하는 뿌리혹선충, 헤테로데라(Heterodera) 종 및 글로보데라(Grobodera) 종에 속하는 시스트선충, 나콥부스(Nacobbus) 종과 같은 기타 선충은 심각한 손상과 경제적인 작물 손실을 유발한다. 또한 뿌리혹선충은 전세계적으로 발생하나 온난한 기후를 지닌 지역과 온실에서 더 자주 빈번하게 발견된다. 가장 중요한 멜로이도진 종은 엠. 인코그니타(M.incognita; 고구마혹선충), 엠. 아레나리아(M.arenaria; 아레나리아혹선충), 엠.하플라(M.hapla; 당근혹선충) 및 엠.자바니카(M.javanica)이며, 이중 엠.하플라는 더 광범위한 온도 기후 구간에서도 발생한다.

토양의 기계적 경작, 선충제거제 및 해충제거제 등의 살충제를 이용한 화학적 처리, 또는 윤작과 같이 식물 병원체를 조절하기 위한 여러 수단이 있다. 그러나, 특정 식물 병원체, 특히 선충의 경우, 이들 조절 수단은 감염으로부터 식물을 보호하기에 불충분하여 질병을 일으킨다. 유일하게 효과적인 조절 수단은 식물 숙주 내성과 관련이 있다(Russell, 1978, Plant Breeding for pest and disease resistance, Butterworths edit, 485 p). 살충에 대한 요구를 감소시키거나 또는 궁극적으로 제거하기 위해서, 일반 식물 병원체에 대한 내성이 있는 재배종을 개발하는 것이 현재 식물 육종인들의 주 목적이다. 매년 전세계적으로 토양내로 주입되거나 또는 농작물, 나무 등으로 분무되는 다량의 살충제가 환경에 미치는 영향은 점점 심각해지고 있다. 더구나, 서양 국가의 정부 규정은 특정 살충제의 사용을 제한하거나 금지하고 있다. 따라서, 1종 이상의 병원체에 대해 내성이 있거나, 또는 발병원에 대한 감소된 감수성을 가지는 식물에 대한 요구가 점점 더 증가하고 있다. 내성 식물의 개발은 현 식물 육종 프로그램의 중요한 목적 중 하나이다. 특정 병원체에 대해 감수성이 있는 식물 유전자형을 내성 식물 유전자형과 교배시켜 육종주내로 내성 표현형을 도입시킨다.

뿌리혹선충에 의한 손상은 주로 식물과 양립관계에 있어 번식가능한 자성으로 발육하는 유충이 식물 뿌리에 침입하므로써 발생한다. 침입 후에, 유충은 뿌리 세포를 양분을 공급할 수 있는 거대세포로 발육하게 한다. 감염시 충영 또는 혹이 뿌리에 형성되고 그렇지 않은 경우 식물 뿌리에 장해가 생기고, 두꺼워지며 발육이 저해된다. 따라서, 뿌리계의 물 및 영양소 흡수에 부작용이 생겨 식물 성장 및 발육에 손상을 준다. 종종 감염 식물의 손상은 약화된 뿌리 조직을 공격하는 기생충 진균류에 의해 증가된다. 감염 식물은 성장이 감소하고 더 작고 여린 색상의 잎을 나타내며, 작고 저질의 열매를 형성하거나 또는 열매가 없기도 하며, 더 온난한 기후에서 시드는 경향이 있다(Agrios, 1988: Plant Pathology Academic Press, Inc.). 전세계 총 농업 생산물에서 뿌리혹선충에 의해 발생하는 손상 및/또는 수확 감소는 상당하다. 각각의 입목에서, 수확 손실은 25%~50%로 높으며, 심지어 작물이 죽을 수도 있다.

온실에서는 선충제거제를 이용하여 토양을 스팀 멸균하거나 또는 토양 훈증하여 뿌리혹선충을 구제할 수 있다. 지면 조건하에서는, 선충제거제를 사용하여 구제할 수 있다. 그러나, 일부 경우 이러한 제거제를 사용하면 분해하기 어렵고, 화학물질이 점점 더 쟁점이 되고 있으며, 일부 나라에서는 특정 선충제거제의 사용을 금지시키고 있다.

유전자적으로 내성인 유전자형을 육종하는 것이 뿌리혹 질병을 조절하는 가장 확실하고 효과적인 방법이다. 여러 작물 종의 경우, 관련 유전자원내 내성의 효력이 예컨대 감자, 면화, 담배, 밀, 콩, 토마토, 가지, 일반 콩 및 앨패퍼 등에서 보고되어 있다. 첫째 이용가능한 유전자원내의 (공지된) 내성 유전자가 제한적으로 발생해야 하며, 둘째 일부 식물 종에서 경작 재배종과 내성 보유 관련 종 사이에 교배 장해가 존재하고, 세째 선충에 대한 감수성 대 내성의 검색 시험이 많은 노력을 요하며 종종 믿을만 하지 않기 때문에 내성 육종에 어려움이 있다. 따라서, 내성 육종은 매우 어렵거나, 또는 수행할 수 없으며, 가능하다고 해도 시간이 많이 걸린다.

성공적인 내성 유전자의 도입이 토마토에서 실현되었다. 배아 배양을 이용하여 관련 야생종 엘. 페루비아눔(PI 128657)과 교배시킨 후에, 내성 유전자 Mi(멜로이도진 인코그니타(Meloidogyne incognita))를 재배 토마토, 리코퍼시콘 에스컬렌툼(Lycopersicon esculentum) 내로 도입시켰다. Mi 유전자는 여러 멜로이도진 종에 대한 내성을 부여한다(Fassuliotis, 1991: Genletic Improvement of Tomato, Springer Verlag edit). Mi 내성 유전자는 일유전자 우성 유전자로 보고되어 있으며(Gilbert 및 McGuire, 1956, Proc.Am.Soc.Hortic.Sci. 68, 437-442) 토마토 염색체 6에 위치하고 있다. 또한 Mi 유전자좌를 포함하는 유전자 이입된 영역이 토마토 진딧물(마크로시품 유포비아(Macrosiphum euphorbia))에 대한 내성 부여와 관련이 있는 것으로 보고 있다(Kaloshian 등, 1995, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 92, 622-625).

식물은 병원체의 침입과 감염에 대한 복잡한 방어 기작을 발달시켰다. 현재까지, 방어계의 정확한 기작이 밝혀지지 않았다.

토마토의 선충 내성은 침투후에 발현된다. 유충이 뿌리에 유입된 후 양분 공급 부위에 위치하며, 선충의 머리에 인접한 과민 반응(HR)이 촉발되어 숙주 세포를 국부적으로 치사시킨다. 또한 역으로 선충은 HR에

의해 영향을 받아 죽게 된다(Fassuliotis, 1991: Genetic Improvement of Tomato, Springer Verlag edit). 기타 식물-병원체 관계에서 내성이 HR-불화합성에 기초하는 경우에 흔한 현상인 유전자-대-유전자 관계 sensu Flor(1956, Adv.Gen.8, 29-54)가 존재하는지는 알려져 있지 않다.

유전자 생산물을 모르고 식물 유전자를 분리하는 것은 매우 힘들고 어려운 일인 데, 이는 식물 종의 게놈 크기가 거대하기 때문이다: 예컨대 토마토의 게놈 크기는 1000 Mb(10^9 염기쌍의 핵 DNA)이고, 옥수수의 게놈 크기는 3000 Mb이며, 밀은 16×10^9 이상의 염기쌍을 가진다. 이들 수백만의 염기쌍중 특정 유전자를 검색하는 것은 (1) 해당 유전자에 충분한 분자 마커가 견고하게 결합된 경우 및 (2) 이용가능한 우수한 유전 물질인 경우에만 실행할 수 있다(Tanksley 등, 1995, Trends in Genetics, 11, P63-68).

몇몇 내성 유전자가 분리된 것으로 보고되었지만, 이들 내성 유전자들중 숙주 식물에 선충 또는 진딧물에 대한 내성을 부여할 수 있는 것은 없다. 분리된 내성 유전자의 예는 다음과 같다: 아라비돕시스(Arabidopsis)에서 분리한 RPS2(avrRpt2를 발현하는 슈도모나스 시린재(Pseudomonas syringae)에 대한 내성, 담배에서 분리한 N(담배 모자이크 바이러스에 대한 내성), 토마토에서 분리한 Cf-9(avr9를 보유하는 잎 진균 병원체 클래도스포리움 펄붐(Cladosporium fulvum)에 대한 내성) 및 아마로부터 분리한 L^6(해당 녹병 진균속에 대한 내성)(Dangl, 1995, Cell 80, 363-366).

본 발명은 처음으로 분리된 선충 내성 유전자를 제공하며, 또한 처음으로 분리된 진딧물 내성 유전자를 제공한다. 더우기, 본 발명은 선충 및 진딧물, 바람직하게는 각각 멜로이도진 인코그니타 및 마크로시품 유포비아에 대한 감수성을 감소시키는 2 기능 내성 유전자에 관한 것이다.

발명의 상세한 설명

발명의 개요

본 발명의 제1목적은 식물에 존재하고 발현되어 선충 및/또는 진딧물에 대한 내성을 식물에 부여할 수 있는 Mi 내성 유전자를 포함하는 핵산에 관한 것이다. 본 발명의 제2목적은 DNA 서열이 본원에 개시된 Mi 내성 유전자에 관한 것이다. 본 발명의 제3목적은 Mi 내성 유전자가 암호하는 유전자 생산물에 관한 것이다. 본 발명의 제4목적은 Mi 내성 유전자를 포함하는 DNA 작제물, 코스미드, 벡터, 박테리아 균주, 효모 세포 및 식물 세포에 관한 것이다. 본 발명의 제5목적은 선충에 대한 내성이 있는, 유전자적으로 형질전환된 식물에 관한 것이며, 선충은 형질전환되지 않은 식물을 감염시킬 수 있다. 본 발명의 제6목적은 Mi 내성 유전자에 대해 상동성이 있으며, 식물내에 존재할 때 병원체 감염에 대해 식물에 내성을 부여할 수 있는 내성 유전자에 관한 것이다.

또한, 본 발명의 제7목적 식물내에 존재하는 경우 상기 식물에 진딧물에 대한 식물의 감수성을 감소시킬 수 있는 Meu-1 내성 유전자를 포함하는 핵산에 관한 것이다. 특히, Meu-1 내성 유전자는 Mi 내성 유전자에 해당한다. 구체적으로 Meu-1 내성 유전자는 Mi 내성 유전자와 동일한 뉴클레오티드 서열을 가진다. 따라서, 본 발명은 유전자적으로 형질전환된 식물에 관한 것이며, 이 식물은 감수성이 감소하고 바람직하게는 진딧물, 특히 감자 진딧물에 내성이 있다.

마지막으로, 본 발명의 제8목적은 상기 내성 유전자 서열 또는 그 일부 서열에 해당하는 올리고뉴클레오티드와, 이 올리고뉴클레오티드를 포함하는 검출 키트에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 크기가 각각 570, 500 및 470 kb인 YAC 1/1172, YAC 2/1256 및 YAC 1/1084의 물리적 지도이다. SfiI 및 BssHII 제한 부위의 위치와 제한 단편의 크기가 나타나있다. 제한 단편상에 각종 AFLP 마커의 위치가 표시되어 있다.

도 2는 YAC 1/546의 코스미드 라이브러리를 작제하는 데 사용되는 이원 코스미드 벡터 pJJ04541의 개략도이다. 플라스미드 pRK290(20 kb 크기)(Ditta 등, 1980, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 77, 7347-7351)을 출발 벡터로서 사용하였다. "tet"는 테트라사이클린에 대한 내성을 부여하는 유전자를 의미한다. "LB"는 T-DNA의 왼쪽 경계 반복 서열을 의미하며, "RB"는 오른쪽 경계 반복 서열을 의미한다. 꽃양배추 모자이크 바이러스 35S 프로모터 서열은 "p35S"로 표시하고 "ocs3"은 옥토핀 신타아제 3' 말단을 나타낸다. "NPT"는 네오마이신 포스포트랜스퍼라제를 나타내며, "cos"는 시험관내 패키징을 할 수 있는 박테리오파지 람다 cos 부위를 의미한다. "pDBS"는 pBluescript(Stratagene, 미국 캘리포니아 라졸라에 소재)의 폴리링커를 나타낸다.

도 3A는 YAC 1/1172, YAC 2/1256 및 YAC 1/1084상에 AFLP 마커의 상세한 위치의 개략도이다. 정위는 여러 한정 영역에 대해 작제된 코스미드 콘티그를 기초한 것이다.

도 3B는 Mi 내성 유전자를 포함하는 영역의 코스미드 콘티그의 개략도이다. 코스미드 Mi-32, Mi-30, Mi-11, Mi-18, Mi-01 및 Mi-14는 수평선으로 나타내었다. AFLP 마커 PM14 및 PM25의 위치가 나타나있다.

도 4는 제한 효소 PstI의 코스미드 Mi-32, Mi-30, Mi-11, Mi-18, Mi-01 및 Mi-14의 물리적인 상세 지도이다. PstI 단편의 크기(kb)가 나타나있다. 시험관내 질병 분석에서 확인되는 바와 같이 각종 코스미드를 포함하는 R_0 식물의 Mi 표현형은 도면의 오른쪽 말단부에 나타나있다. 뉴클레오티드 서열이 결정된 DNA 분절이 이중선의 양방향 화살표로 표시되어 있다.

도 5는 AFLP 마커 PM14 주변에 있는 약 9.9 kb의 DNA 분절의 뉴클레오티드 서열과 Mi 내성 유전자의 추정 아미노산 서열을 나타낸다. 개시 코돈(ATG 위치 3263-3265)에 밑줄을 그었고 종지 코돈(TAG 위치 7109-7111)에는 이중선을 그었으며, 이는 1257 아미노산(도 7A)의 폴리펩티드를 암호하는 개방해독틀(ORF1)을 나타낸다. Mi 내성 유전자는 2개의 인트론 서열(이탤릭체로 표시)을 포함하며; 이중 하나는 위치 1936 내지 위치 3241의 1306 뉴클레오티드 인트론이며 다른 하나는 위치 3305 내지 위치 3379의 75 뉴클레오티드

인트론이다.

제1 개시 코돈과 함께 틀내에 존재하는 제2 개시 코돈(ATG 위치 3491-3493)은 1206 아미노산(도 7B)의 절두된 폴리펩티드를 암호하는 제2 개방 해독틀(ORF2)내에 발생한다.

AFLP 마커 PM14의 위치는 뉴클레오티드 위치 6921(5'-TGCAGGA-3') 내지 뉴클레오티드 위치 7034(5'-AGATTA-3')이다.

도 6은 코스미드 Mi-11 및 Mi-18의 물리적 지도와 코스미드 Mi-11의 결정된 뉴클레오티드 서열을 보여준다. 서열은 4개의 콘티그로 나뉜다:con25(5618 bp), con10(898 kb), con62(2495 bp) 및 Mi(9870bp). 도면의 아래 부분은 여러 유전자 백그라운드(YAC 클론 2/1256, 코스미드 Mi-11을 함유하는 이.콜리(E.coli), 코스미드 Mi-11을 함유하는 에이.투메페이시언스(A.tumefaciens), 코스미드 Mi-18을 함유하는 이.콜리, 코스미드 Mi-18을 함유하는 에이.투메페이시언스, 내성 토마토주 E22, 감수성 토마토주 52201, 코스미드 Mi-11로 형질전환된 R_0 식물 및 코스미드 Mi-18로 형질전환된 R_0식물)에서 표 오른쪽 편의 상이한 길이를 가지는 수평선으로 나타낸, 도 5의 DNA 분절의 일부에 해당하는 몇가지 PCR 단편의 존재("+") 또는 부재("-")를 나타낸다.

코스미드 Mi-11 및 코스미드 Mi-18의 뉴클레오티드 서열. 여러 콘티그 분석.

도 7A는 ORF1이 암호하는 폴리펩티드의 추정 아미노산 서열을 나타낸다.

도 7B는 ORF2가 암호하는 절두된 폴리펩티드의 추정 아미노산 서열을 나타낸다.

도 8은 Mi 내성 유전자의 구조를 나타내는 개략도이다.

도 9는 Mi-내성 유전자계의 개략도이다.

발명의 상세한 설명

하기의 상세한 설명 및 실시예에서, 여러 용어가 사용되었다. 주어진 용어에 대한 범위를 비롯하여 명세서 및 청구항을 명확하고 일관성 있게 이해할 수 있도록, 하기와 같이 정의한다.

- 핵산: 2본쇄 DNA 분자. 핵산은 게놈 DNA, cDNA, 합성 DNA 또는 임의의 기타 DNA일 수 있다;

-올리고뉴클레오티드: 짧은 1본쇄 DNA 분자;

-프라이머: 일반적으로, 프라이머는 DNA 합성을 촉진할 수 있는 1본쇄 DNA 분자를 의미한다;

-핵산 하이브리드화: 나일론 막 또는 니트로셀룰로스 여과지와 같은 지지체상에 1본쇄 DNA를 하이브리드화하여 관련 DNA 서열을 검출하는 방법. 상보적인 염기 서열을 가지는 핵산 분자는 적절한 조건하에 용액내에 혼합된 경우 2본쇄 구조를 형성한다. 2본쇄 구조는 하나가 지지체상에 고정되어 있더라도 2개의 상보적인 1본쇄 핵산사이에 형성된다. 서던 하이브리드화 과정에서는 하나가 지지체상에 고정되어 있는 상황에서 발생한다;

하이브리드화 프로브: 서던 하이브리드화 과정에서 특정 DNA 서열을 검출하기 위해서, 표지된 DNA 분자 또는 하이브리드화 프로브를 나일론 막 또는 니트로셀룰로스 여과지 등의 지지체상에 결합된 분할 DNA에 반응시킨다. 표지된 DNA 프로브에 상보적인 DNA 서열을 보유하는 필터의 영역이 재어닐링 반응의 결과로서 표지된다. 사용한 표지의 유형에 따라 표지를 나타내는 필터 영역을 검출할 수 있다. 일반적으로 하이브리드화 프로브는 특정 DNA 서열의 분자 클로닝 또는 합성 올리고뉴클레오티드를 합성하여 생성할 수 있다.

-상동 서열: 비교되는 핵산 서열의 길이가 일반적으로 120 이상의 뉴클레오티드, 바람직하게는 200 이상의 뉴클레오티드, 더욱 바람직하게는 300 이상의 뉴클레오티드이며, 비교되는 폴리펩티드의 서열 길이가 일반적으로 40 이상의 아미노산 잔기, 바람직하게는 65 이상의 아미노산 잔기, 더욱 바람직하게는 100 이상의 아미노산 잔기인 경우, 특정 서열과 50% 이상, 바람직하게는 60% 이상, 더욱 바람직하게는 70% 이상, 가장 바람직하게는 80% 이상, 심지어 90% 이상 동일한 서열. 또한, 상동 서열은 엄중한 조건하에 특정 서열에 하이브리드화할 수 있는 서열 및/또는 특정 DNA 서열이 암호하는 폴리펩티드와 실질적으로 동일한 특성을 가지는 폴리펩티드를 암호하는 DNA 서열 및/또는 특정 DNA 서열이 암호하는 폴리펩티드와 동일한 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드를 암호하는 DNA 서열 및/또는 상기 폴리펩티드의 주요 특성에 실질적으로 영향을 주지 않고 특정 폴리펩티드의 아미노산 서열에 대해 일부 아미노산 잔기가 변화된 아미노산 서열을 의미한다.

-엄중한 조건: 핵산 서열을 특정 서열에 하이브리드화 할 수 있는 하이브리드화 조건을 의미한다. 일반적으로 높은 엄중 조건은 약 1M 염을 포함하는 용액, 바람직하게는 6×SSC 또는 비교할 만한 이온 강도를 지닌 임의의 기타 용액중 약 65℃에서 50 이상의 뉴클레오티드, 바람직하게는 약 200 이상의 뉴클레오티드의 핵산 서열을 특정 서열에 하이브리화시키고, 약 0.1M 염 이하를 포함하는 용액, 바람직하게는 0.2×SSC 또는 비교할만한 이온 강도를 지닌 임의의 기타 용액중 약 65℃에서 세척하는 하이브리드화 조건을 의미한다. 이들 조건에서는 약 90% 이상 서열 동일성을 가지는 서열을 검출할 수 있다. 일반적으로 낮은 엄중 조건은 약 1M 염을 포함하는 용액, 바람직하게는 6×SSC 또는 비교할만한 이온 강도를 지닌 임의의 기타 용액중 약 45℃에서 50 이상의 뉴클레오티드, 바람직하게는 약 200 이상의 뉴클레오티드의 핵산 서열을 특정 서열에 하이브리화시키고, 약 1M 염을 포함하는 용액, 바람직하게는 6×SSC 또는 비교할만한 이온 강도를 지닌 임의의 기타 용액중 약 실온에서 세척하는 하이브리드화 조건을 의미한다. 이들 조건에서는 최대 50% 서열 동일성을 가지는 서열을 검출할 수 있다. 당업자라면 하이브리드화 조건을 변형하여 동일성이 50% 내지 90%로 다양한 서열을 동정할 수 있을 것이다.

-프로모터: 인접한 암호 서열의 전사에 필요한 조절 서열을 포함하는 암호 서열의 업스트림에 있는 전사 조절 영역이며 mRNA의 리더 서열이라 불리는 5' 비전사 영역을 포함한다;

-종지신호: 폴리-아데닐화 신호를 포함하고 3' 비전사 영역이라 불리우는 전사의 종지를 유도하는 암호

서열의 다운스트림 영역;

-내성 유전자: 도 5에 도시된 암호 서열 또는 그 일부, 또는 임의의 해당 서열이나 상동 서열을 포함하는 핵산;

-선충(들): 멜로이도진 종, 예를 들어 멜로이도진 인코그니타, 엠.아레나리아 또는 엠.자바니카 또는 본 발명의 내성 유전자를 가지는 숙주를 감염시킬 수 없는 임의의 유전자형, 예컨대 엠. 하플라와 같은 뿌리혹선충, 헤테로데라 종 및 글로보데라종과 같은 시스트 선충, 또는 나코부스 종과 같은 기타 선충, 곤충, 예컨대 감자 진딧물 또는 임의의 식물 병원체나 해충.

-내성 유전자 생산물: 도 5의 아미노산 서열 또는 그 일부, 또는 임의의 상동성이 있는 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드.

-R_0 식물: 형질전환 실험으로 생성된 1차 재생물, 형질전환된 식물이나 돌연변이 식물을 의미;

-R_1 주: 자화수분 R_0 식물의 자손;

-R_2 주: 자화수분 R_1 식물의 자손;

-R_1BC 주:형질전환 실험에 처음 사용된 유전자형의 식물과 R_1 식물 사이의 역교배 자손.

본 발명은 멜로이도진 인코그니타(Mi) 내성 유전자를 동정 및 분리한다. 유전자는 멜로이도진 인코그니타에 대한 내성이 있는 토마토 유전자형으로부터 클론시켰다. 아그로박테리움 (Agrobacterium) 매개 형질전환법 또는 임의의 기타 공지된 형질전환법을 사용하여 감수성이 있는 숙주 식물내로 본 발명의 분리된 Mi 내성 유전자를 전달하며, 식물 병원체, 특히 선충에 대한 내성을 식물에 부여하는 것과 관련이 있다. 숙주 식물은 토마토나 또는 식물 병원체에 의해 감염되는 임의의 기타 유전자형이다.

또한, 본 발명은 도 5에 도시된 Mi 내성 유전자를 포함하는 핵산 서열을 제공한다.

본 발명의 Mi 내성 유전자를 이용하여 식물 병원체 및/또는 해충을 효과적으로 조절할 수 있는 데, 이는 유전자를 사용하여 감수성이 있는 식물 유전자형을 형질전환시키므로써 감수성이 감소되거나 또는 바람직하게는 식물 병원체나 해충에 대한 내성이 있는 유전자적으로 형질전환된 식물을 생산할 수 있기 때문이다. 특히, 본 발명의 Mi 내성 유전자로 유전자적 형질전환시킨 식물은 뿌리혹선충에 대한 감수성이 감소되었다.

바람직한 일양태에서, Mi 내성 유전자는 도 5의 암호 서열 또는 임의의 해당 서열이나 상동 서열 또는 cDNA 서열을 포함하며, 이 서열의 앞에는 프로모터 영역이 있고 뒤에는 종지신호 영역이 있다. 프로모터 영역은 식물 세포에서 작용해야 하며, 바람직하게는 Mi 내성 유전자의 자연 프로모터 영역에 해당한다. 그러나, 식물 세포에서 작용하는 한 임의의 이종 프로모터 영역이 암호 서열과 접합하여 사용될 수 있다는 것을 인지해야 한다. CaMV 35 S 프로모터 또는 T-DNA 프로모터 등의 구조 프로모터가 사용되는 것이 바람직하며, 이는 당업자들에게 공지되어 있다. 또한, 적절한 종지신호 영역은 당업자에게 공지된 식물 세포에서 작용한다.

또한 본 발명은 본 발명의 Mi 내성 유전자가 암호하고 도 5 및 도 7A에 제시된 추정 아미노산 서열을 가지는 Mi 내성 유전자 생산물, 또는 추정 아미노산 서열 또는 그 일부에 상동성이 있는 Mi 내성 유전자 생산물을 제공한다. 또한, 도 7B에 제시된 절두된 폴리펩티드 또는 Mi 내성 유전자 생산물을 사용하여 이에 대한 항체를 증가시킬 수 있으며, 이 항체는 Mi 내성 유전자 생산물의 존재를 검출하는 데 사용할 수 있다.

본 발명은 Mi 내성 유전자를 사용하여 도 5의 DNA 서열 1가닥 또는 이의 일부에 상보성이 있고, 하이브리드화 프로브로서 사용할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 고안하고, 검출을 위해 표지하고 상동 유전자에 대한 게놈 DNA 또는 cDNA 라이브러리를 검색한다. 엄중 하이브리드화 조건하에서 프로브에 대해 하이브리드화할 수 있고, 통상적으로 식물에게 식물을 감염시키는 식물 병원체에 대한 내성 또는 감소된 감수성을 식물에 부여하는 것과 관련된 유전자 생산물을 암호하는 상동 서열도 본 발명에 속한다.

또한, 본 발명은 서던 분석에서 하이브리드화 프로브로서 사용할 수 있도록 Mi 내성 유전자 서열에 기초하여 올리고뉴클레오티드를 고안할 수 있다. 이들 프로브는 내성 유전자를 가지는 식물 유전자형과 내성 유전자가 결핍된 식물 유전자형을 구별하는 분자 마커로서 사용할 수 있다. 이들 프로브를 선별을 위한 추가의 도구로서 사용할 수 있다. 본 발명의 바람직한 일양태에서, 올리고뉴클레오티드는 Mi 내성 유전자에 기초하여 고안하였기 때문에, 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 등의 증폭 반응에서 프라이머로서 사용할 수 있고, 증폭 생산물의 형성은 특정 식물 유전자형에서 Mi 내성 유전자의 존재를 나타내는 것이다. 본 발명의 특정 일양태에서, 프라이머는 분자 마커라고 불리우는 다형성 단편의 증폭을 유도하며, Mi 내성 유전자에 긴밀하게 결합되어 있다. 바람직한 일양태에서, 상기 프라이머는 AFLP 마커를 동정하기 위한 선택적인 제한 단편 증폭에 사용되며, Mi 내성 유전자에 긴밀하게 결합되어 있다. 또한, 본 발명은 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 연구중인 유전자형 내에 있는 Mi 내성 유전자의 존재 또는 부재를 검출하기 위한 진단 키트를 제공한다. 이 진단 키트는 내성 유전자가 있거나 또는 없는 유전자형을 검색하기 힘든 질병 분석에 사용할 수 있다.

또한, 본 발명은 식물 세포에서 작용하는 조절 서열 및 Mi 내성 유전자의 암호 서열에 해당하는 DNA 서열을 포함하는 DNA 작제물에 관한 것이며, 상기 DNA 서열은 게놈 DNA, cDNA, 합성 DNA 또는 임의의 기타 기원의 DNA일 수 있다. 상기 조절 서열은 Mi 내성 유전자의 암호 서열에 동종 또는 이종일 수 있다. 상기 DNA 작제물은 도 5에 제시된 핵산 서열 또는 그 일부를 포함하는 것이 바람직하다.

본 발명은 또한 조절 서열, 바람직하게는 조절 서열에 이종인 구조 유전자 서열과 함께 Mi 내성 유전자의 프로모터 영역을 포함하는 DNA 작제물에 관한 것이다.

본 발명은 DNA 작제물을 포함하는 DNA 벡터에 관한 것이다. 적절한 벡터는 클로닝 벡터, 형질전환 벡터,

발현 벡터 등이며, 당업자에게 공지되어 있다.

또한, 도 5의 서열 또는 이의 일부, 또는 이에 대한 상동물에 해당하는 DNA 서열을 함유하는 벡터 보유 세포도 본 발명에 속한다. 더구나, 본 발명의 DNA 작제물을 보유하는 세포도 본 발명에 속한다.

본 발명의 바람직한 일양태에서, 표준 형질전환 기술을 사용하여 Mi 내성 유전자를 선충에 대한 감수성이 있는 식물 게놈내로 도입하여 유전자적으로 형질전환된 식물은 얻을 수 있으며, 유전자적으로 형질전환된 식물은 선충에 대한 내성을 가진다.

또 다른 일양태에서, 공지된 형질 전환 기술을 사용하여 Mi 내성 유전자를 이종계내로 전달할 수 있으며, 이종계의 비제한적인 예로는 메론, 담배, 아라비돕시스 탈리아나(Arabidopsis thaliana), 감자, 사탕무우, 평지씨, 오이, 후추, 가지가 있다. 이종계는 내성 유전자가 분리된 식물 종과는 다른 식물종을 의미한다.

본 발명의 또 다른 일양태에서, Mi 내성 유전자는 마크로시폼 유포비아(Meu-1) 내성 유전자에 해당하며, 본 발명의 유전자로 형질전환된 식물에게 곤충과 특히 진딧물에 대한 내성을 부여하는 것과 관련이 있다.

본 발명의 Mi 내성 유전자를 포함하는 DNA 서열은 여러가지 용도를 가지며, 이중 일부는 본원에 개시되어 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명은 뿌리혹선충에 내성이 있는 토마토 주에 존재하는 Mi 내성 유전자의 분리를 상세하게 기술할 것이다. Mi 내성 유전자를 분리하기 위해서, 본 발명자들은 하기의 단계를 포함하는, 지도를 기초로 한 클로닝(위치 클로닝) 방법을 사용하였다:

(1) Mi 내성 유전자에 결합된 분자 마커의 동정,

(2) 분자량이 큰 게놈 YAC 라이브러리의 작제,

(3) YAC 클론상에 분자 마커의 물리적 지도 작성 및 YAC 콘티그 설정,

(4) 결합된 분자 마커를 보유하는 YAC 클론의 코스미드 라이브러리 작제,

(5) 물리적 상세 지도 작성과 코스미드 콘티그 설정,

(6) 뿌리혹 선충에 감수성이 있는 토마토 돌연변이체의 유전적 특성화,

(7) 콘티그 형성 코스미드를 이용한 감수성 식물의 형질 전환.

(8) 상보성 분석.

분자 마커를 동정하기 위해서, 본 발명자들은 선택적인 제한 단편 증폭 기술(이하 AFLP™ 기술로 칭함)을 사용하였으며, 이 기술은 여러 DNA 단편의 복합 혼합물로부터 얻은 DNA 단편의 서브세트를 무작위적으로 증폭시키고, 증폭된 단편은 분석될 수 있는 핑거프린트를 형성한다. 일반적으로, 동일한 식물종의 여러 유전자형의 총 DNA에 AFLP 기술을 수행하고 상이한 유전자형으로부터 얻은 여러 AFLP 핑거프린트를 비교한다. 하나의 유전자형에 존재하고 다른 유전자형에는 존재하지 않는 단편은 다형성 단편이며 AFLP 마커이다. AFLP 반응에서의 선택성은 제한 효소 부위의 뉴클레오티드에 바로 인접한 PCR 프라이머 3' 말단에서 무작위적으로 선택된 선별 뉴클레오티드르 사용하여 얻어진다. AFLP 검색에서, 연구하고자 하는 DNA에 여러 프라이머 조합을 수행한다. 사용할 수 있는 여러 프라이머의 총량은 3' 말단에 첨가되는 다수의 선별 뉴클레오티드에 의해 결정된다(1개의 선별 뉴클레오티드의 경우 4 프라이머, 2개의 선별 뉴클레오티드의 경우 16 프라이머, 3개의 선별 뉴클레오티드의 경우 64 프라이머). 2개의 다른 제한 효소가 사용되면, 프라이머의 양은 2배가 된다. 이들 프라이머는 상이하게 조합하여 사용할 수 있다. 모든 가능한 조합이 AFLP 검색에 사용되는 경우, 존재하는 모든 단편은 프라이머 조합중 하나로 증폭시킨다(Zabeau 및 Vos, EP 0534858).

Mi 내성 유전자에 결합된 AFLP 마커를 동정하기 위해서, 여러 토마토주에서 AFLP 검색을 실시하였다. 제1단계에서, 하기의 프라이머를 사용한 AFLP 핑커프린팅으로 2 세트의 거의 동질인 유전자 주에서 선충 내성 대 감수성에 대해 분석하였다.

PstI-프라이머: 5'-GACTGCGTACATGCAGNN-3'

MseI-프라이머: 5'-GATGAGTCCTGAGTAANNN-3'

N은 각종 선별 뉴클레오티드를 나타낸다. AFLP 검색에서, PstI-프라이머로 가능한 16 프라이머와 MseI-프라이머로 가능한 64 프라이머를 2 세트의 거의 동질인 유전자 주에서 사용하였으며, 총 16×64=1024 시험 프라이머 조합을 제공한다. AFLP 핑거프린트 분석시 Mi 내성 유전자에 결합된 총 30개의 해당 AFLP 마커를 동정하였다. 이어서, 선충 내성 토마토주 및 선충 감수성 토마토주의 패널상에서 Mi 좌에 대한 결합 길이와 구조에 대해 해당 마커를 시험하였다. 1944년에 리코퍼시콘 페루비아눔(Lycopersicon peruvianum)으로부터 재배 토마토내로 Mi 내성 유전자를 이입시켰다. 선충 내성 토마토주는 Mi 내성 유전자와 리코퍼시콘 페루비아눔에서 유래한 작은 이입 영역을 형성할 것으로 예상되는 다수의 교배 사이클을 수행하였다. 토마토 유전자형에 대한 해당 AFLP 마커를 시험하면 Mi 좌에 밀접한 결합을 평가할 수 있는 우수한 시험이 될 것으로 기대된다. 해당 AFLP 마커를 이용하여 7개의 내성 토마토 유전자형 및 11개의 감수성 토마토 유전자형 패널을 시험하였다. 총 20 AFLP 마커가 모든 내성 주에는 존재하고 감수성 주에는 존재하지 않는 것으로 보이며 이를 Mi 결합 AFLP 마커로 부른다.

이어서, 4개의 AFLP 마커를 고분자량 게놈 라이브러리에서 검색하였다. 효모의 거대 인공 염색체로서의 매우 거대한 DNA 분절의 클로닝은 위치 클로닝을 통한 유전자 분리에 필수 단계가 되었다. YAC 벡터의 클로닝으로 최대 100만 염기쌍 길이의 DNA단편을 분리할 수 있다. Mi좌에 대해 동형접합성인 토마토주 리코퍼시콘 에스컬렌툼(Lycopersicon esculentum) E22는 YAC 라이브러리를 작제하기 위한 DNA 공급원으로 사용하였다. 본 발명자들은 평균 삽입체의 크기가 520 kb인 3840 클론을 포함하는 YAC 라이브러리를 얻었으

며, 이는 토마토 게놈의 약 2.2 게놈 등가물을 나타낸다. Mi 결합 AFLP 마커, 1/1084, 1/1172 및 2/1256을 이용한 AFLP 검색 후에 3가지 양성 YAC 클론을 얻었다. 따라서, 모든 Mi 결합 마커의 존재는 3개의 YAC 클론에서 결정하였다. 모든 마커는 3 개의 YAC 클론 중 하나 이상에 존재하는 것으로 나타났으며, 각종 Mi 결합 AFLP 마커의 제1 정위를 수행할 수 있다. AFLP 자료는 3개의 YAC 클론이 약 1.4 Mb의 중복 콘티그를 구성할 수 있다는 것을 보여준다(도 1 참조).

Mi 결합 AFLP 마커를 포함하고 YAC 클론 1/1084, 1/1172 및/또는 2/1256에 포함된 Mi 좌의 물리적 크기를 결정하기 위해서, 장범위의 YAC 콘티그 제한 지도를 작제하였다. Mi 결합 AFLP 마커가 위치한 약 700 kb의 Mi 좌를 포함하는 DNA 분절을 규정하였다(도 1 참조).

크기가 700 kb이면 Mi 내성 유전자를 직접 정위하기에는 너무 크다. 거대 삽입체는 식물 세포로 직접 형질전환시킬 수 없다. 따라서, 코스미드 라이브러리는 아그로박테리움 매개 형질전환에 적절한 코스미드 벡터를 사용하여 YAC 1/1172를 함유하는 효모 균주와 YAC 2/1256을 함유하는 효모 균주로 작제하였다. 이원 코스미드 벡터의 크기는 29 kb이며 도 2에 개략적으로 나타내었다. 파지 람다 패키징 추출물을 사용한 이원 코스미드 벡터의 클로닝 능력은 9 내지 24 kb내에 있다. 각각 약 250,000 코스미드 클론의 2개 뱅크를 크기 분할된 효모 DNA로부터 얻었다. 코스미드 뱅크는 표지된 YAC 제한 단편을 프로브로서 사용하여 콜로니 하이브리드화로 검색하였다. 양성 코스미드 클론을 동정하고, Mi 영역을 보유하는 7개의 한정된 영역으로 코스미드를 나누었다.

다음 단계에서, 제한 단편 증폭을 이용하여 7개의 한정된 영역의 코스미드 세트를 핑거프린팅하여 상대적인 순서를 결정하였다. 약 700 kb의 DNA 분절을 보유하는 코스미드 콘티그를 작제할 수 있다. 이어서, 코스미드 콘티그중 Mi 결합 AFLP 마커의 존재를 결정하였다. 각종 Mi 결합 AFLP 마커의 위치와 Mi 내성 유전자를 포함하는 DNA 분절의 물리적 지도를 얻었다(도 3 참조).

총 96개의 중복 코스미드가 Mi 내성 유전자를 포함하는 DNA 분절을 구성하였다. 코스미드의 거대 세트와 Mi 내성 유전자를 동정하기 위한 상보성 분석은 매우 힘드는 일이다. 따라서, 코스미드 콘티그상에서 Mi 내성 유전자의 위치는 돌연변이 토마토주를 사용하여 결정하였다. 이들 돌연변이주는 공통 선조로부터 유래하고 야생형(선충 내성) Mi 유전자형이나 돌연변이 선충 감수성 표현형을 나타내는 구성원이다. 다수의 돌연변이주상에서 Mi 결합 AFLP 마커 세트로 분석시, 3개의 Mi 결합 AFLP 마커는 대부분의 돌연변이주에는 없는 것으로 보였다. 따라서, 이들 AFLP 마커는 다른 17개의 AFLP 마커와 대조적으로 AFLP Mi 유전자형 및 Mi 표현형 사이에 우수한 상호관계를 나타내었다. 이들 2개의 AFLP 마커 PM14와 PM25는 이웃하고 있으며, 이들 마커 주변의 영역이 Mi 내성 유전자에 대한 위치일 가능성이 가장 높은 것으로 추정되고 있다. 상보성 분석을 위해 AFLP 마커 PM14 및 PM 25 부근의 약 50 kb의 DNA 분절을 규정하는 6개의 중복 코스미드 세트를 선택하였다(도 4 참조).

위치 클로닝을 통한 Mi 내성 유전자를 동정하는 마지막 단계는 해당 감수성 표현형의 상보성 분석이다. 해당 Mi 영역에서 유래한 6개의 코스미드를 3-양친 교배로 접합 전달을 통해 아그로박테리움 투메페이시언스내로 도입시켰다. 에이.투메페이시언스 균주중 코스미드의 존재는 각종 제한 효소 패턴 뿐 아니라 에이.투메페이시언스의 DNA 핑커프린트를 코스미드 함유 이.콜리 균주와 비교하여 결정하였다. 해당 이.콜리 배양물과 동일한 DNA 패턴을 가지는 에이.투메페이시언스 배양물만을 사용하여 감수성 토마토주를 형질전환시켰다. 표준 형질 전환법을 사용하여 코스미드 Mi-32, Mi-30, Mi-11, Mi-18 Mi-01 및 Mi-14로 감수성 토마토주를 형질전환시켰다.

내성 유전자를 가진 코스미드를 동정하기 위해서 시험관내에서 성장한 형질전환된 R_0 식물의 뿌리를 질병 증상에 대해 시험하였다. 뿌리 외식물을 페트리 접시내의 고화 배지상에 옮기고 뿌리혹선충 멜로이도진 인코그니타의 무균성 선충 배양물로부터 10개 충영을 접종하였다. 접종 6주 후에 질병 증상을 등급화한다. 돌연변이 식물은 뿌리 배양물에서 충영이 관찰되지 않거나 1개 관찰되는 경우 내성이 있는 것으로 간주한다. 돌연변이 식물은 2개 이상의 혹이 뿌리 배양물에 유도된 경우 감수성으로 간주한다. 시험관 질병 분석의 관찰 결과 2개의 코스미드가 감수성 표현형을 상보할 수 있다는 것이 밝혀졌다. 내성 R_0 식물중 AFLP 마커 PM14의 존재는 코스미드 Mi-11 및 Mi-18에 존재하는 게놈 삽입체가 R_0 식물에도 존재하며, R_0 식물에 멜로이도진 인코그니타에 대한 내성을 부여하는 것과 관련이 있다.

형질 전환 실험의 1차 재생물(R_0 식물)은 질병 증상을 시험할 R_1 주를 얻을 수 있는 종자 세트를 위해 온실에서 성장시켰다. 질병 분석은 묘목에서 수행하였다. 따라서, 종자를 뿌리거나 작은 뿌리가 있는 소식물체를 멜로이도진 인코그니타로 감염된 토양에 옮기고 질병 증상을 접종 4 내지 8주 후에 등급화한다. 3개 이하의 충영이 뿌리에서 관찰되는 경우 내성이 있는 것으로 간주한다. 3개 이상의 충영이 뿌리에 형성되는 경우 감수성이 있는 것으로 간주한다. 생체내 질병 분석의 관찰 결과는 내성 R_0 식물이 코스미드 Mi-11 형질전환체에 해당한다는 것을 보여준다.

Mi 내성 유전자가 돌연변이 R_0 식물의 게놈내로 안정하게 통합되었는 지를 확인하기 위해서, 내성 식물 R_1 주를 자화수분시키고 R_2 주를 얻을 수 있는 종자 세트를 위해 온실에서 성장시켰다. R_2 주의 묘목에서 선충 질병 분석을 수행하였다. 얻은 결과로 내성 유전자가 안정하게 유전된다는 것을 알 수 있다.

마지막으로, 코스미드 Mi-11 및 Mi-18내에 삽입체를 추가로 특성화하였다. 서열 분석으로 3621 뉴클레오티드의 거대 개방 해독틀(ORF2)이 밝혀졌다. DNA 서열은 도 5에 목록화되어 있다.

인트론 서열의 존재를 결정하기 위해서 Mi 내성 유전자를 포함하는 DNA 서열에서 전사 지도작성 연구를 수행하였다. 이들 전사 지도작성 연구는 일반적으로 공지된 방법으로 수행하여 게놈 DNA 서열을 cDNA 서열과 비교하였다. cDNA 서열과 게놈 서열을 비교하여 2개의 인트론 서열이 Mi 내성 유전자에 존재한다는 것을 밝혀내었다. 도 5 에 도시된 바와 같이 제1 인트론은 1306 뉴클레오티드이며 뉴클레오티드 위치 1936 내지 3241에 위치하고, 제2 인트론은 75 뉴클레오티드이며 뉴클레오티드 위치 3305 내지 3379에 위치한다. 전사 개시 부위의 위치는 뉴클레오티드 1880 또는 그의 업스트림에 존재하는 것으로 추정된다. 제1 ATG 개시 코돈은 제2 인트론의 52 뉴클레오티드 업스트림에 있는 뉴클레오티드 위치 3263에

위치하며, 1257 아미노산(도 7A)의 폴리펩티드를 암호하는 거대 개방 해독틀(ORF1)을 제공한다.

상동성 연구는 본 발명의 폴리펩티드가 식물 내성 단백질의 LRR 부류에 속한다는 것을 보여준다(Staskawicz 등, 1995, Science, 268, 661-667). 또한, 단백질은 A 내지 D로 불리는 4개의 영역으로 나눌 수 있다: 영역 A는 다량의 로이신 잔기를 포함하며, 영역 B는 뉴클레오티드 결합 부위 모티프를 포함하며, 영역 C는 공통 서열 a--aa-NL-L-a-----a--a/S--(Jones 및 Jones, 1997, Advances in Botanical Research, 24, 89-167)을 가지는 13 반복부를 포함하는 LRR 영역이며 영역 D는 임의의 공지 단백질에 대해 상동성이 없는 부분을 나타낸다.

본 발명에 속하는 상동 서열을 동정 및 분리하기 위해서, 엄중 하이브리드화 조건하에서 프로브로서 Mi 내성 유전자의 암호서열을 사용하여 게놈 및 cDNA 라이브러리를 검색하였다. 양성 클론을 분리하고 상보성 분석에 사용하였다.

Mi 내성 유전자의 암호 서열의 내부 PstI 단편을 사용하여 YAC 콘티그상에 서던 블롯 하이브리드화를 수행하였다. 3개의 추가 상동성 영역을 동정하였다: 2개는 YAC 1/1172, 하나는 YAC 1/1084에 존재. 각 영역은 2 내지 3개의 Mi 상동물을 포함하며, 이는 Mi 유전자계가 약 10 내지 12개의 구성원으로 이루어진다는 사실을 나타내는 것이다.

놀랍게도, 진딧물 질병 분석으로 코스미드 Mi-11로 형질전환된 R_0 식물이 멜로이도진 인코그니타에 대한 내성 뿐 아니라 마크로시품 유포비아에 대한 내성이 있다는 것이 밝혀졌으며, 이는 코스미드 Mi-11에 존재하는 게놈 삽입체가 R_0 식물의 선충에 대한 내성 부여와 관련이 있을 뿐 아니라 R_0 식물의 진딧물에 대한 내성 부여와도 관련이 있다는 것을 나타낸다. 특히, 본 발명의 내성 유전자로 형질전환된 식물은 적어도 1종 이상의 병원체, 특히 뿌리혹선충 및/또는 진딧물에 대해 감소된 감수성을 가진다.

진딧물 내성의 유전을 확인하기 위해서, (i) 선충 내성 코스미드 Mi-11 형질전환체에서 유래한, 이전에 얻은 R_1 토마토주, (ii) 자가수분 선충 내성 R_1 식물로부터 유래한 R_2 주 및 (iii) 감수성 토마토주 52201과 역교배한 선충 내성 R_1 식물로부터 얻은 R_1BC 주에서 엠.유포비아에 대한 내성을 시험하였다. 얻은 결과는 진딧물 내성이 유전된다는 것을 나타낸다.

일반적으로 공지된 형질전환법에 따라 코스미드 Mi-11을 사용하여 담배와 감자의 선충 감수성 유전자형을 형질전환시켰다. 시험관내에서 성장한 담배 및 감자의 형질전환 R_0 식물의 뿌리에서 전술한 바와 같이 질병 증상에 대해 시험하였다. 형질전환된 식물의 뿌리 배양물 질병 분석 관찰 결과는 형질전환 식물의 선충에 대한 감수성을 감소시키는 데 코스미드가 관련되어 있다는 것을 보여준다. 본 발명의 내성 유전자는 선충, 바람직하게는 멜로이도진 종, 특히 멜로이도진 인코그니타에 대한 이종 식물 종의 감수성을 감소시키는 데 효과적이다.

또한, 담배 형질전환체를 진딧물 내성에 대해 시험하였고, 내성 R_0 식물을 동정할 수 있었다.

본 발명의 내성 유전자는 2기능을 가지며 이종계에서 효과적이다.

코스미드 Mi-11은 기탁 번호 CBS 822.96으로 네델란드 바른의 Centraalbureau voor Schimmelculture에 플라스미드 pKGMi-11로서 1996년 8월 5일에 기탁하였다.

코스미드 Mi-18은 기탁 번호 CBS 821.96으로 네델란드 바른의 Centraalbureau voor Schimmelculture에 플라스미드 pKGMi-18로서 1996년 8월 5일에 기탁하였다.

실시예

하기의 실시예는 본 발명을 추가로 예시하는 것이며, 본 발명은 이들 실시예에 한정되지 않는다.

실시예

실시예 1: 질병 분석

뿌리혹선충 멜로이도진 인코그니타의 무균 배양물을 토마토 재배종 머니메이커(Moneymaker)의 멸균 뿌리상에 유지시킨다. 뿌리 배양물을 호르몬이 없는 2% 사카로즈 함유 고화 B5 배지(Gamborg 등, 1968, Experimental Cell Research 50:151-158)에서 성장시킨다.

시험관내에서 성장한 돌연변이 토마토 식물에서 유래한 뿌리 외식체(1~5㎝)를 전술한 고화 B5 배지로 이전하여 뿌리 배양을 개시한다. 동시에, 무균 선충 배양물로부터 10개의 충영을 사용하여 각 뿌리 외식체를 접종한다. 뿌리 외식체로부터 수 ㎝에 충영을 둔다. 뿌리 및 충영이 있는 페트리 접시를 25℃의 암실에서 배양한다. 4 내지 6주 후에, 뿌리 배양물에 형성된 충영을 계수하여 감염 정도를 결정한다.

엠.인코그니타에 대한 내성/감수성의 평가는 하기와 같다:

돌연변이 식물의 뿌리 배양물에 충영이 없거나 또는 2개 미만으로 관찰되는 경우 내성이 있는 것으로 간주한다. 뿌리 배양물에 2개 이상의 충영이 발생하는 경우 이 돌연변이 식물은 감수성인 것으로 간주한다.

실시예 2: Mi 내성 유전자를 포함하는 DNA 분절에 결합된 AFLP 마커의 동정

토마토주(리코퍼시콘 에스컬렌툼)

멜로이도진 인코그니타에 대한 내성이 있는 9개의 토마토주와 엠.인코그니타에 감수성인 13개의 토마토주를 사용하여 AFLP 마커를 동정하였다. 먼저 AFLP 검색을 2개 세트의 거의 동질인 유전자주 83M-R(내성) 및 83M-S(감수성)와, Motelle(내성) 및 Mobox(감수성)에서 수행하였다. 제1 검색에서 얻은 해당 마커를 7개의 엠.인코그니타 내성주와 11개의 엠.인코그니타 감수성 주에서 제2 검색으로 확인하였다.

2세트의 거의 동질인 유전자주:

1. 83M-R내성De Ruiter Zonen C.V., Bergschenhoek,

네델란드(이하 "De Ruiter")

2. 83M-S감수성De Ruiter

3. Motelle내성INRA, Montfavet, 프랑스

4. Mobox감수성INRA, Montfavet, 프랑스

확인을 위한 7개의 엠.인코그니타 내성주와 11개의 엠.인코그니타 감수성주

5. DR30내성De Ruiter

6. DR17내성De Ruiter

7. E22내성Enza Zaden, de Enkhuizer Zaadhandel B.V.,

Enkhuizen, 네델란드(이하 "Enza Zaden")

8. E1내성Enza Zaden

9. DR6내성De Ruiter

10. DR10내성De Ruiter

11. 1872내성Royal Sluis B.V., Enkhuizen, 네델란드

(이하 "Royal Sluis")

12. Moneymaker감수성Agricultural University Wageningen

13. DR12감수성De Ruiter

14. DR23감수성De Ruiter

15. GT감수성De Ruiter

16. RZ3 감수성Rijk Zwaan Zaadteelt en Zaadhandel B.V.,

De Lier, 네델란드(이하 "Rijk Zwaan")

17. RZ5감수성Rijk Zwaan

18. E3감수성Enza Zaden

19. E7감수성Enza Zaden

20. E16감수성Enza Zaden

21. RS1감수성Royal Sluis

22. RS2감수성Royal Sluis

DNA의 분리 및 변형

전술한 22개 주로부터 얻은 전체 토마토 DNA를 Bernatzki 및 Tanksley에 개시된 방법으로 어린 잎에서 분리하였다(Theor. Appl. Genet. 72, 314-321). 통상적인 수율은 새로운 잎 재료 1g 당 50～100㎍이었다. 효소 조합물 PstI-MseI을 이용한 AFLP 분석에 대한 주형 DNA를 Zabeau 및 Vos(유럽 특허 출원, EP 0534858)에 개시된 방법으로 제조하였으며, 하기에 간단히 기술하였다:

40 ㎕의 10 mM 트리스.HAc(pH 7.5), 10 mM의 MgAc, 50 mM의 KAc, 5 mM의 DTT, 50 ng/㎕의 BSA중 PstI 5 유니트와 MseI 5 유니트를 이용하여 37℃에서 1시간 동안 0.5 ㎍의 토마토 DNA를 항온처리하였다. 이어서, 10 mM 트리스.HAc(pH 7.5), 10 mM의 MgAc, 50 mM의 KAc, 5 mM의 DTT, 50 ng/㎕의 BSA중 5 pMol의 PstI-어뎁터, 50 pMol의 MseI-어뎁터, 1 유니트의 T4 DNA-리가아제, 1 mM의 ATP를 함유하는 10 ㎕ 용액을 첨가하고, 37℃에서 3시간 동안 항온처리를 계속하였다. 어뎁터는 하기와 같다.

PstI-어뎁터의 구조는 다음과 같다:

5'-CTCGTAGACTGCGTACATGCA-3'

3'-CATCTGACGCATGT-5'

MseI-어뎁터의 구조는 다음과 같다:

5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'

3'-TACTCAGGACTCAT-5'

양 가닥을 동몰로 첨가하여 어뎁터를 제조하였다; 어뎁터는 인산화되지 않았다. 결찰 후에, 10 mM 트리스.HCl, 0.1 mM EDTA(pH 8.0)을 사용하여 반응 혼합물을 500 ㎕로 희석하고 -20℃에서 저장하였다. 희석된 반응 혼합물을 주형 DNA라고 칭한다.

AFLP 반응

AFLP 검색에 사용된 프라이머는 하기와 같다:

PstI-프라이머: 5'-GACTGCGTACATGCAGNN-3'

MseI-프라이머: 5'-GATGAGTCCTGAGTAANNN-3'

프라이머중 N은 프라이머중 이 부분이 가변된다는 것을 의미한다. AFLP 검색에서, 모두 16개의 가능한 프라이머를 PstI-프라이머로서 사용하였고, 모두 64개의 가능한 프라이머를 MseI-프라이머로서 사용하였다. 이는 PstI-프라이머 및 MseI-프라이머의 총 16×64 조합으로 1024 프라이머 조합을 제공한다. 모두 1024 프라이머 조합을 Mi 결합 AFLP 마커에 대한 AFLP 검색에 사용하였다. AFLP 반응을 하기의 방법으로 수행하였다.

AFLP 반응은 방사능 표지된 PstI-프라이머 및 표지되지 않은 MseI-프라이머를 사용하였다. PstI-프라이머는 (γ-^{33}P)ATP와 T4 폴리뉴클레오티드 키나아제를 사용하여 말단 표지하였다. 표지화 반응은 50 ㎕의 25 mM 트리스.HCl pH7.5, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 0.5 mM 스퍼미딘.3HCl중에서 500 ng의 올리고뉴클레오티드 프라이머, 100 μCi(γ-^{33}P) 및 10 유니트의 T4 폴리뉴클레오티드 키나아제를 사용하여 수행하였다. AFLP 분석에서 PstI-프라이머(표지 반응 혼합물로부터 얻은 0.5 ㎕), 30 ng MseI-프라이머, 5 ㎕ 주형-DNA, 0.4 유니트 Taq-폴리머라제, 10 mM 트리스.HCl(pH8.3), 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0.2 mM의 모든 4 dNTP를 포함하는 20 ㎕의 반응 혼합물을 제조하였다. AFLP 반응은 하기의 사이클 프로필을 사용하여 수행하였다: 94℃에서 30 초 DNA 변성 단계. 30초 어닐링 단계(하기 참조), 및 72℃에서 1분 연장 단계. 제1 사이클의 어닐링 온도는 65℃이고, 연속하여 다음 12 사이클에서 각 사이클당 0.7℃씩 감소시켰으며, 남은 23 사이클에서 56℃를 유지하였다. 모든 증폭 반응은 PE-9600 써머사이클러(미국 코네티컷 노워크에 소재하는 퍼킨 엘머 코오포레이션)에서 수행하였다.

AFLP 반응 생성물의 겔 분석

증폭 후에, 반응 생성물을 동 부피(20 ㎕)의 포름아미드 염료(98% 포름아미드, 10 mM EDTA pH 8.0, 점착 염료로서 브로모페놀 블루 및 크실렌 시아놀)와 혼합하였다. 생성 혼합물을 90℃에서 3분 동안 가열한 후, 얼음에서 급속히 냉각시켰다. 2㎕의 각 시료를 5% 변성(서열결정) 폴리아크릴아미드 겔에 적재하였다(Maxam 및 Gilbert, Methods in Enzymology 65, 499-560). 50 mM 트리스/50 mM 붕산/1 mM EDTA중 5% 아크릴아미드, 0.25% 메틸렌비아크릴, 7.5 M 우레아를 사용하여 겔 매트릭스를 제조하였다. 100 ㎖의 겔 용액에, 500 ㎕의 10% APS 및 100 ㎕의 TEMED를 첨가하고 SequiGen 38×50 cm 겔 장치를 사용하여 겔을 주조하였다(미국 캘리포니아주 헤르큘레스에 소재하는 바이오라드 래보러터리즈 인코오포레이티드). 상어치아빗을 사용하여 SequiGen 겔 유니트상에 97 레인을 제공하였다. 100 Mm 트리스/100 Mm 붕산/2 mM EDTA를 전개 완충액으로 사용하였다. 일정한 전압 110와트에서 약 2시간 동안 전기영동을 수행하였다. 전기영동 후, 겔을 10% 아세트산에서 30분 동안 고정시키고, 유리판에서 건조시킨 후 16시간 동안 후지 포스포 영상 스크린에 노출시켰다. 핑거프린트 패턴은 Fuji BAS-2000 포스포 영상 분석계(일본에 소재하는 후지 포토 필름 컴패니 리미티드)를 사용하여 가시화하였다.

결합된 마커에 대한 AFLP 검색

2세트의 거의 동질인 유전자주에서 모든 가능한 1024 PstI-MseI 프라이머 조합을 사용하여 AFLP 검색을 수행하였다. 이 검색의 목적은 두개의 감수성주에는 존재하지 않지만 두개의 내성주에는 존재하는 AFLP 마커를 동정하기 위한 것이다. AFLP 겔은 4개의 동질유전자 주의 24개 프라이머 조합의 AFLP 핑거프린트를 포함하며, 이는 총 43 겔을 제공한다. 내성주에는 존재하고 감수성주에는 존재하지 않는 총 30개의 AFLP 마커를 동정하였다. 이들 마커를 해당 Mi 결합 AFLP 마커라고 칭한다.

이어서, 7개의 내성 토마토주와 11개의 감수성 토마토주에서 30개의 해당 마커의 존재를 결정하기 위해서 AFLP 반응을 수행하였다. 30개의 해당 마커중 20개의 마커가 7개의 내성주에서는 존재하고 11개의 감수성주에서는 존재하지 않는 것으로 나타났다. 이들 20개 마커를 연구에 사용하여 Mi 내성 유전자의 지도를 작성하였다. 20개의 PstI-MseI 마커를 동정하는 데 필요한 프라이머 조합은 표 1에 나타나있다. 프라이머 조합을 나타낸 컬럼에서, "PstI-"은 서열 5'-GACTGCGTACATGCAG-3'을 의미하며, "MseI-"는 서열 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'을 의미한다. 예를 들어, 마커 PM14는 5'-GACTGCGTACATGCAGGA-3'의 서열을 가지는 PstI-프라이머와 5'-GATGAGTCCTGAGTAATCT-3'의 서열을 가지는 MseI-프라이머를 사용하여 동정하였다.

[표 1]

마커	선택적인 연장물을 사용한 프라이머 조합(NN/NNN)
PM02	PstI-AT/MseI-AAA
PM07	PstI-AA/MseI-TAC
PM08	PstI-CT/MseI-ACT
PM10	PstI-CA/MseI-TCT
PM11	PstI-TA/MseI-TGA
PM13	PstI-GA/MseI-ATC
PM14	PstI-GA/MseI-TCT
PM15	PstI-GT/MseI-GAC
PM16	PstI-GT/MseI-TCT
PM17	PstI-AT/MseI-AAG
PM18	PstI-AT/MseI-TAG
PM19	PstI-GG/MseI-ATT
PM20	PstI-TG/MseI-AAT
PM21	PstI-TG/MseI-TTT
PM22	PstI-TG/MseI-GCT
PM23	PstI-GT/MseI-GAA
PM24	PstI-AA/MseI-CTG
PM25	PstI-AC/MseI-GTG
PM27	PstI-AA/MseI-CTA
PM29	PstI-TA/MseI-GGA

실시예 3: 토마토 YAC 라이브러리의 작제 및 검색

재료

Mi좌의 토마토주 리코퍼시콘 에스컬렌툼 E22(Enza Zaden) 동형접합자를 DNA원으로 사용하여 YAC 라이브러리를 작제하였다. 프로토플라스트를 Van Daelen 등의 문헌[Plant Mol. Biol. 12, 341-352]에 개시된 방법으로 2 또는 3주령의 시험관내 새순의 잎에서부터 분리하였다.

생존 프로토플라스트(1 ㎖당 5천만 프로토플라스트의 농도)를 수거하고 동부피의 아가로스(1%, Seaplaque, 미국 메인 록크랜드에 소재하는 FMC 바이오프로덕츠)와 혼합하여 플러그를 형성하였다. 플러그에 매립된 프로토플라스트를 용해 혼합물(0.5 M EDTA, 1% N-라우릴사코시네이트 및 1 ㎎/㎖ 프로테인아제 K, pH=8.0)로 용해시켰다. 용해 후에, 사용할 때까지 플러그를 저장 완충액(새로운 용해 혼합물)중 4℃에서 저장하였다. 약 4.5 ㎕의 염색체 DNA를 얻기 위해서 플러그당 약 3천만 프로토플라스트를 추가의 연구에 사용하였다. 유일한 EcoRI 클로닝 부위를 함유하는 플라스미드 pYAC4를 클로닝 벡터로서 사용하고 효모 균주 AB1380을 숙주로서 사용하였다(Burke 등, Science 236, 806-812).

YAC 라이브러리 작제

고분자량 DNA 분리, EcoRI 메틸라제의 존재하에 EcoRI를 이용한 부분적인 분해, 게놈 DNA에 벡터 암의 결찰, 펄스 필드 겔 전기영동에 의한 크기 선별 및 효모 숙주의 형질전환을 Burke 등의 문헌[Science 236, 806-812] 및 Larin 등의 문헌[Proc Natl Acad Sci USA 88, 4123-4127]에 개시된 바와 같이 수행하였다.

모든 표준 조작은 Molecular cloning:a laboratory manual by Sambrook 등(Cold Spring Harbor Laboratory Press)에 개시된 바와 같이 수행하였다.

최종적으로 2.2 게놈 등가물에 해당하는 평균 삽입체의 크기가 520kb인 3840 클론을 얻었고, 각각의 클론을 75㎕ YPD 용액(1% 효모 추출물, 2% 펩톤 및 2% 덱스트로스)를 함유하는 40개의 96웰 미량역가판에 저장하였다.

YAC 라이브러리 검색

취급 시료의 수를 감소시키기 위해서, Ross 등의 문헌[Nucleic Acids Res., 19, 6053]에 개시된 바와 같이 96-웰 미량역가판의 세포를 모으고(플레이트푸울) DNA를 분리하는 데 사용하였다. 2.2 게놈 등가물 토마토 YAC 라이브러리는 40개의 96-웰 미량역가 웰로 구성되어 있으며, 결과적으로 40개의 플레이트푸울의 DNA를 실시예 2에 계시된 AFLP 프로토콜을 사용하여 AFLP 마커 PM10, PM13, PM21 및 PM25로 검색하였다. PM10, PM13, PM21 및 PM25는 이들 마커가 효모 균주 AB1380의 백그라운드 밴드와 간섭하지 않기 때문에 YAC 플레이트푸울을 검색하기 위해 선택되었다. 40개중 3개의 양성 플레이트푸울을 표 2에 제시된 4개의 AFLP 마커로 동정하였다. 이어서, 각 플레이트의 96 개개 YAC 클론의 4개의 AFLP 마커(PM10, PM13, PM21

및 PM25)를 이용한 2차 검색으로 YAC 클론의 옳은 위치를 발견하였다. 3개의 각 YAC 클론을 동정하고 1/1084, 1/1172 및 2/1256(표 2)이라고 명명하였다. 그 다음, 3개의 각 YAC 클론을 남은 AFLP 마커로 분석하였다. 동정된 마커 PM02 내지 PM29는 모두 이들 3개의 YAC 클론중 하나 이상에서 존재하였다(표 3). YAC 클론의 크기는 등고-고정 균일 전기장을 사용하여 펄스 필드 겔 전기영동(PFGE) 분석으로 결정하였으며 각각 470 kb(1/1084), 570 kb(1/1172) 및 500 kb(2/1256)으로 나타났다.

[표 2]

플레이트푸울 번호	PM10	PM13	PM21	PM25	검출된 YAC (크기 kb)
2	-	-	+	-	YAC 1/1172(570 kb)
16	+	+	-	+	YAC 2/1256(500 kb)
4	-	+	-	+	YAC 1/1084(470 kb)

[표 3]

마커	1/1172	2/1256	1/1084
PM02	-	-	+
PM07	-	+	-
PM08	-	+	+
PM10	-	+	-
PM11	-	+	-
PM13	-	+	+
PM14	+	+	-
PM15	-	+	-
PM16	+	-	-
PM17	-	+	-
PM18	-	+	+
PM19	-	+	-
PM20	-	+	-
PM21	+	-	-
PM22	-	+	+
PM23	-	+	-
PM24	-	+	-
PM25	-	+	-
PM27	-	+	-
PM29	-	+	-

실시예 4: Mi YAC 콘티그와 AFLP 마커 위치의 장범위 물리 지도 작성

제한 효소 SfiI 및 BssHII의 농도를 증가시키면서 3개의 YAC 클론 1/1172, 2/1256 및 1/1084를 부분적으로 분해하였다. Burke 등의 문헌[Science 236, 806-812]에 개시된 바와 같이 시료를 PFGE로 분할하여 Gene Screen Plus 막(미국 매사츄세츠주 보스톤에 소재하는 듀퐁)에 옮기고 간접적인 말단 표지 지도작성을 위한 프로토콜에 따라 말단-인접 서열 프로브를 사용하여 하이브리드화로 분석하였다. 효소 SfiI 및 BssHII에 대한 YAC 1/1172, 2/1256 및 1/1084 의 물리 지도를 도1에 도시된 바와 같이 작성하였다. 여러 YAC 클론사이의 중복 부분은 3개의 YAC 클론의 분해시 프로브로서 수득한 제한 단편을 사용한 서던 분석으로 결정하였다. 크기가 1.4 Mb인 YAC콘티그를 작제하였다. YAC 단편을 분리하기 위해서 분해물을 PFGE 상에 전개시켰다. SfiI을 이용한 YAC 1/1172의 분해 결과 2개의 단편(200 Kb 및 370 Kb)이 생긴다. BssHII로 YAC 1/1256을 분해하면 4개의 단편(40 Kb, 90 Kb, 110 Kb 및 260 Kb)이 형성되는 반면 BssHII로 YAC 1/1084를 분해하면 크기가 70 kb 및 400 kb인 2개의 단편이 생긴다. 결과적으로, 1.4 Mb YAC 콘티그는 3개의 YAC 클론으로부터 얻은 8개의 제한 단편에 해당하는 8개 영역으로 나눌 수 있으며, 이는 완전한 Mi 영역과 인접 서열을 포함한다.

물리적 지도상에 이들 8개의 영역내의 여러 AFLP 마커를 정위하기 위해서, YAC 클론 1/1172, 2/1256 및 1/1084의 부분적인 SfiI 분해물 및 완전한 SfiI 분해물과 BssHII의 분해물에서 AFLP 마커를 하이브리드화 프로브로서 사용하였다. 따라서, 각 AFLP 마커 단편을 건조 겔로부터 절제하고 0.5 M 아세트산암모늄, 10 mM 아세트산마그네슘, 1 mM EDTA(pH=8.0), 0.1% SDS를 함유하는 완충액에서 확산시켜 용출시키고, 해당하는 비표지된 AFLP 마커 프라이머로 재증폭시킨 후 Feinberg 및 Vogelstein의 문헌[Anal. Biochem. 132,

6-10]에 개시된 랜덤 프라이머 방법으로 ^{32}P를 사용하여 표지하였다. 각 AFLP 마커를 표 4 및 도 1에 요약한 바와 같이 8개의 영역중 하나 이상의 영역에 할당하였다.

[표 4]

YAC 단편	하이브리드화에 의해 검출되는 Mi 결합 AFLP 마커
200 kb SfiI-단편 1/1172	-
370 kb SfiI-단편 1/1172	PM14, PM16, PM21
260 kb BssHII-단편 2/1256	PM10, PM11, PM17, PM19, PM23, PM24, PM29
90 kb BssHII-단편 2/1256	PM07, PM27
110 kb BssHII-단편 2/1256	PM08, PM13, PM14, PM15, PM20, PM22, PM25
40 kb BssHII-단편 2/1256	PM18
70 kb BssHII-단편 1/1084	PM08, PM13, PM22
400 kb BssHII-단편 1/1084	PM02, PM18

실시예 5: YAC 클론 1/1172 및 2/1256의 코스미드 라이브러리 작제

재료

이원 코스미드 벡터 pJJ04541은 pJJ1881(존스 등, Transgenic Research 1, 285-297)의 유도체이며 에스케리치아 콜리(Escherichia coli) 및 아그로박테리움 투메페이시언스내에 선별을 위한 테트라사이클린 내성 유전자를 함유하는 플라스미드 pRK290에 기초로 한 것이다. pRK290의 유일한 EcoRI 부위내로,

-박테리오파지 람다의 cos 부위

-발현이 꽃양배추 모자이크 바이러스 35S 프로모터 서열(Odell 등, Mol Gen Genet 223 369-378)에 의해 유도되는 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 유전자(Beck 등, Gene 19, 327-336), 및

-pBluescript(미국 캘리포니아 라졸라에 소재하는 스트라타젠) 폴리링커 서열에 인접한 서열(LB; 왼쪽 경계 반복부, RB는 오른쪽 경계 반복부를 나타냄)을 보유하는 T-DNA를 도입하였다.

pJJ04541의 크기는 29 kb이며, 도 2에 개략적으로 도시되어 있다. 파지 람다 패키징 추출물을 사용하여 이원 코스미드 벡터의 클로닝 용량은 9~24 kb이다.

라이브러리 작제

자이몰라제를 사용하여 YAC 1/1172를 함유하는 사카로마이시스 세레비시아(Saccharomyces cerevisae) 균주 AB1380의 총 DNA와 YAC 2/1256을 함유하는 사카로마이시스 세레비시아 균주 AB1380의 총 DNA을 분리하여 Green 및 Olsen의 문헌[Proc Natl Acad Sci USA 87, 1213-1217]에 개시된 방법으로 프로토플라스트를 제조하였다.

DNA 분액물을 PFGE에서 분석하였다. DNA 분리물의 크기는 ≥100kb로 나타났다.

약 15㎍의 각 DNA는 Sau3A로 부분 분해하여 평균 크기가 15~25 kb인 분자를 생성하였다. 그 다음, 20℃, 22,000 rpm의 벡크만 SW41 로터에서 22 시간 동안 10%~35% 수크로즈 구배로 시료를 원심분리하였다. 원심분리관의 바닥에 관통된 바늘을 사용하여 0.5㎖의 분획물을 수거하였다. 이들 분획물의 분액을 0.7% 아가로스 겔에서 분석하였다. 크기가 약 20 kb인 DNA 분자를 포함하는 분획물을 모으고 에탄올 침전법으로 농축시켰다.

그 다음, Korch의 문헌[Nucleic Acids Res. 15, 3199-3220] 및 Loftus 등의 문헌[Biotechniques 12, 172-176]에 개시된 방법을 사용하여 유형 II 제한 엔도뉴클레아제에 의해 생성된 DNA의 5'-연장물로 부분적으로 충전하는 방법을 사용하여 점착 말단을 dATP 및 dGTP로 부분 충전시켰다.

이원 코스미드 벡터 pJJ04541을 XhoI로 완전히 분해시키고 선형 단편은 Korch등의 문헌[Nucleic Acids Res. 15, 3199-3220]에 개시된 방법을 사용하여 dTTP 및 dCTP로 부분 충전시켰다.

20 kb 단편을 코스미드 벡터에 결찰시키고, 제조업자가 추천한 바와 같이 파지 람다 Gigapack II XL 패키징 추출물(미국 캘리포니아주 라졸라에 소재한 스트라타젠)을 사용하여 이.콜리 균주 XL-1 Blue MR(미국 캘리포니아주 라졸라에 소재한 스트라타젠)에 형질도입시켰다. 10 ㎎/ℓ의 테트라사이클린을 함유하는 LB(1% 박토트립톤, 0.5% 박토-효모 추출물 및 1% NaCl, pH7.5) 아가로즈 평판상에서 선별하였다. 뱅크당 약 250,000 코스미드 클론인 2개의 뱅크를 각각 YAC 클론 1/1172와 2/1256의 2~3㎍의 크기 분획된 효모 DNA로부터 제조하였다.

그 다음, 이들 형질전환체를 미량역가판의 웰(96-웰, 10㎎/ℓ의 테트라사이클린을 함유하는 100 ㎕의 LB 배지)에 저장하였다. 미량역가판의 코스미드 클론의 96-웰 격자 레플리카를 Gene Screen Plus 막 필터(NEN 듀퐁)상에 찍고 배지에서 콜로니로 증식시켰다. 삼브룩 등의 문헌[Molecular cloning: a laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press]에 개시된 바와 같이 ^{32}P-표지된 YAC 클론 1/1172 및 2/1256을 사용한 콜로니 하이브리드화로 양성 코스미드를 밝혀내었다. YAC 1/1172의 약 10,000 콜로니 중 약 200 양성 코스미드 클론을 동정하였다. YAC 2/1256의 약 20,000 콜로니중 300개의 양성 코스미드 클론을 동정하였다.

실시예 6

Mi 내성 유전자 분절의 상세 지도 작성 및 AFLP 마커의 정위

한정된 영역에서 코스미드 분할

7개의 한정된 영역으로 코스미드를 분할하기 위해서, 실시예 4에 요약되어 있는 바와 같이 YAC 1/1172의 200개 양성 코스미드 클론과 YAC 2/1256의 300개 양성 코스미드 클론을 8개의 제한 단편(YAC 단편)중 7개와 하이브리드화시켰다(표 4 및 도 1 참조). 7개의 YAC 단편 각각에 대한 양성 코스미드를 동정하였다. 또한, 2개의 다른 YAC 클론의 중복 제한 단편과 양성 반응을 나타내는 코스미드를 동정할 수 있다.

Mi 내성 유전자 분절의 코스미드 콘티그 작제

여러 한정 영역내에 양성으로 동정된 모든 코스미드의 코스미드 콘티그를 작제하기 위해서 제한 단편 증폭을 사용하였다. 약 500 ng의 각 코스미드를 주형 제조에 사용하였고 제한 단편의 증폭시 프라이머는 실시예 2에 개시된 방법에 따라 선별 뉴클레오티드가 없는 EcoRI-프라이머 5'-GACTGCGTACCAATTC-3'과 선별 뉴클레오티드가 없는 MseI-프라이머 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'였다. EcoRI-프라이머를 5'말단에 표지하고 EcoRI/MseI-프라이머 세트를 사용하여 모두 500개의 코스미드를 증폭시켰다. DNA 핑거프린트는 약 8 내지 20개의 증폭 단편을 포함하였다. 동일한 크기의 증폭 단편을 포함하는 코스미드 세트를 각 영역으로부터 선별하고 한정된 영역의 모든 증폭 단편의 인접 배열이 구조화될 때까지 실시예 2에 개시된 바와 같이 폴리아크릴아미드 겔상에서 코스미드 세트를 재전개하였다. 또한, 한 영역에서의 코스미드 콘티그를 인접 영역과 정렬하여 Mi좌의 코스미드 콘티그를 작제하였다. 이러한 방법으로 약 800 kb의 Mi좌에 걸쳐진 96개 코스미드의 코스미드 콘티그를 작제하였다.

코스미드 콘티그상에 Mi 결합 AFLP 마커의 상세한 정위

코스미드 콘티그 상에 20개의 Mi 결합 AFLP 마커의 위치를 결정하기 위해서, 96개의 코스미드를 PstI로 분해한 후 문헌[Southern, J.Mol.Biol, 98, 503-515]에 개시된 대로 서던 블롯 분석을 수행하였다.

코스미드의 96개의 PstI 분해물의 서던 블롯상에 실시예 4에 개시된 바와 같이 하이브리드화 프로브로서 AFLP 마커를 사용하였다. 마커 PM02를 제외한 Mi 결합 AFLP 마커의 정확한 위치는 도 3A에 도시되어 있다.

실시예 7: Mi 돌연변이체의 유전자 분석

Enza Zaden을 통해 입수용이한 돌연변이 토마토주를 제조하였다. 이들 주는 Mi 내성 유전자에 대해 F_1 하이브리드 이종접합자와 Aps-1 유전자(산 포스파타제-1을 암호)의 이종접합자로부터 유도되었으며, Mi에 긴밀하게 결합되어 있다(Stevens 및 Rick, 1986: The Tomato Crop, Anterton 및 Rudich 편저). Aps-1 유전자의 다른 대립유전자는 이소자임 분석으로 결정할 수 있다(Vallejos, 1983: Isozymes in plant genetics and breeding, Tanksley 및 Orton 편저, 파트 A, Elsevier, Amsterdam, 469-515). $Aps\text{-}1^1$ 대립유전자는 엘.페루비아눔(L. peruvianum)에서 유래한 것이며 Mi 내성 유전자와 동시분리하여 몇몇 선충 내성 토마토 유전자형내로 이입시켰다. 이들 돌연변이주의 개요는 다음과 같다.

F_1 -하이브리드(이종접합자 Aps-1, Mi 내성 표현형)

↓자화수분

F_2 -주(Aps-1 1:2:1 분리, Mi 내성 3:1 분리)

↓이종접합자(Aps-1) F_2 식물의 자화수분

F_3 -주(Aps-1 1:2:1 분리, Mi 내성 3:1 분리)

↓이종접합자(Aps-1) F_3 식물의 자화수분

F_4 -주(Aps-1 1:2:1 분리, Mi 내성 3:1 분리)

↓이종접합자(Aps-1) F_4 식물의 자화수분

F_5 -주(Aps-1 1:2:1 분리, Mi 감수성)

↓이종접합자(Aps-1) F_5 식물의 자화수분

F_6 -주($Aps\text{-}1^1$ 1:2:1 분리, Mi 감수성)

↓동형접합자(Aps-1) F_6 식물의 자화수분

F_7 -주(모두 $Aps\text{-}1^1$, Mi 감수성)

↓동형접합자($Aps\text{-}1^1$) F_7 식물의 자화수분

F_8 -주(모두 $Aps\text{-}1^1$, Mi 감수성)

이 가계의 F_1, F_2, F_3 및 F_4주에서, $Aps\text{-}1^1$ 대립 유전자의 존재는 Mi 내성 표현형과 상호관련이 있는 반면 $Aps\text{-}1^1$ 대립 유전자의 부재는 Mi 감수성 표현형과 상호관련이 있다. F_5와 그 자손에서, 상호관계가 상실된

다:모든 식물은 Aps-1 대립 유전자의 존재에도 불구하고 선충에 대한 감수성을 나타낸다.

각 F_2, F_3, F_4, F_5, F_6, F_7 및 F_8 세대에서 유래한 20개 각각을 선충 내성, Aps-1 대립유전자의 존재 및 Mi 결합 AFLP 마커의 존재에 대해 시험하였다. 묘목의 선충 검사는 엠.인코그니타의 뿌리 충영으로 오염된 토양에서 수행하였다. 선충 내성 결과는 상기 개략도에 나타난 바와 같다: F_2, F_3 및 F_4 식물에서 3:1 분리와 F_5 및 자손 개체군에서 감수성. 대부분의 Mi 결합 AFLP 마커는 Aps-1 이소자임 마커와 동일한 Mi 유전자형을 나타내었다. 그러나, 3개의 AFLP 마커 PM14, PM16 및 PM25는 Mi 표현형과 분리되는 것으로 보인다: 대부분의 F_5, F_6, F_7 및 F_8 식물에서, Mi 감수성은 이들 마커의 부재에 의해 나타났다. AFLP 마커 PM14, PM16 및 PM25는 돌연변이체중 AFLP Mi 유전자형 및 Mi 표현형 사이의 상관관계를 보여주었다. 마커 PM14 및 PM25는 도 3B에 도시된 물리 지도에 인접해 있으므로, 이들 AFLP 마커 주변의 영역은 Mi 내성 유전자를 포함하는 우수한 해당 영역이다.

실시예 8: Mi 내성 유전자를 포함하는 중복 코스미드 클론의 물리적 지도

Mi 결합 AFLP 마커 PM14 및 PM25와 하이브리드한 코스미드 동정을 실시예 6에 개시한 바와 같이 수행하였다. PM14로 코스미드 Mi-11, Mi-18 및 Mi-01을 동정하고 PM25로 코스미드 Mi-18 및 Mi-01을 동정하였다.

그 다음, 코스미드 Mi-11, Mi-18 및 Mi-01 주변의 작은 코스미드 배열은 실시예 6에 개시된 코스미드 콘티그로부터 선택하였다. 3개의 동정된 코스미드와 인접 코스미드를 포함하는 6개의 코스미드 콘티그를 선별하였다. 이들 6개의 코스미드는 Mi-32, Mi-30, Mi-11, Mi-18, Mi-01 및 Mi-14이다. 이들 6개의 코스미드의 물리적 상세 지도를 작성하기 위해서, 코스미드 콘티그 DNA 시료를 PstI로 분해한 다음 0.8% 아가로스 겔에서 전기영동하였다. 여러 코스미드사이의 물리적 중복부를 결정할 수 있다. 이들 자료와 코스미드 콘티그상에 Mi 결합 AFLP 마커의 상세한 정위로 얻은 자료(실시예 6)를 조합하여 도 4에 도시된 바와 같이 PM14 및 PM25의 위치를 가지는 물리적 상세 지도를 작성하였다. AFLP 마커 PM14 및 PM25 부근의 코스미드 콘티그는 약 50 kb인 것으로 계산되었다.

실시예 9: 형질전환

아그로박테리움 투메페이시언스로의 코스미드 전달

Deblaere 등의 문헌[Methods in Enzymology 153, 277-292]에 따라 헬퍼 균주 HB101(pRK2013)를 사용하여 Mi-32, Mi-30, Mi-11, Mi-18, Mi-01, Mi-14 및 대조군 클론 pJJ04541을 삼-부모 교배의 접합 전달로 아그로박테리움 투메페이시언스에 도입시켰다. 이.콜리를 5 ㎎/ℓ 테트라사이클린이 보충된 37℃의 LB 배지(1% 박토-트립톤, 0.5% 박토-효모 추출물 및 1% NaCl, pH7.5)에서 증식시켰다. 헬퍼 균주 HB101(pRK2013)을 동일한 조건하에 100 ㎎/ℓ 카나마이신 설페이트가 보충된 LB 배지에서 증식시켰다.

아그로박테리움 투메페이시언스 균주 AGL1(Lazo 등, Bio/Technology, 9, 963-971, 1991)을 100 ㎎/ℓ 카베니실린이 보충된 28℃의 LB 배지에서 증식시켰다. 밤새 배양한 배양물을 임의의 항생제가 없는 LB 배지에서 1:100으로 희석하고, 증식 6시간 후에, 0.1 ㎖의 각 아그로박테리움 배양물, 헬퍼 균주 배양물 및 코스미드 균주 배양물을 혼합하고 LB 아가 평판에서 항생제 없이 평판배양하였다. 28℃에서 밤새 항온처리한 후에, 접합완료체를 검색하기 위해서 100 ㎎/ℓ 카베니실린 및 10 ㎎/ℓ 테트라사이클린을 함유하는 LB 배지 아가 평판에서 혼합물을 평판배양하였다. 평판을 28℃에서 3일 내지 4일 동안 항온처리하였다. 선별 아가 평판을 통한 2개의 일련의 계대배양을 수행하여 단일 접합완료체 아그로박테리움 콜로니를 선별하였다.

에이.투메페이시언스 접합완료체의 특성화

선별 콜로니로부터 소규모의 배양물을 증식시키고 10㎎/ℓ 테트라사이클린을 함유하는 LB 배지에서 증식시켰다. Ish-Horowicz 등의 문헌[Nucl.Acads Res. 9, 2989-2997, 1981]에 개시된 방법을 이용하여 플라스미드 DNA를 알카리 용해시켜 분리하고, 표준 기술을 사용하여 BglII로 분해시켰다. 또한, 실시예 6에 개시된 바와 같이 선별 뉴클레오티드가 없는 프라이머 및 EcoRI/MseI 효소 조합을 이용하여 에이.투메페이시언스의 미니프렙 DNA상에 제한 단편 증폭을 수행하였다. 그 다음, BglII 제한 효소 패턴과 에이.투메페이시언스 접합완료체의 DNA 핑거프린트를 코스미드를 포함하는 이.콜리 균주의 미니프렙 DNA의 것과 비교하였다. 해당 이.콜리 배양물과 동일한 DNA 패턴을 가지는 코스미드를 보유하는 에이.투메페이시언스 접합완료체를 사용하여 감수성 토마토주를 형질전환시켰다.

감수성 토마토주의 형질전환

감수성 토마토주 52201의 종자(Rijk Zwaan, De Lier, 네델란드)를 10분 동안 2% 하이포아염소산나트륨에서 표면 멸균시키고, 멸균 증류수로 3회 세정하고, 유리병 또는 폴리프로필렌 배양 용기중 발아 배지(1%(w/v) 슈크로즈 및 0.8% 아가를 함유하는 Murashige 및 Skoog의 문헌[Physiol. Plant. 15, 473-497]에 따른 1/2 강도 MS 배지로 구성)상에서 평판 배양하였다. 8일 동안 발아하도록 두었다. 배양 조건은 25℃였고, 광자 플럭스 밀도는 30 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$이고, 광주기는 16/24 h였다.

토마토의 형질전환은 Koornneef 등(1986)의 문헌[Tomato Biotechnology, 169-178, Alan R. Liss, Inc.,]에 개시된 방법으로 수행하였으며, 하기에 간단히 기술되어 있다. 10.7 μM α-나프탈렌아세트산 및 4.4 μM 6-벤질아미노푸린이 보충된 MS20 배지(2%(w/v) 슈크로즈 및 0.8% 아가를 함유하는 Murashige 및 Skoog의 문헌[1962, Physiol. Plant. 15, 473-497]에 따른 배양 배지)상에 평판배양된 페투니아 하이브리다(Petunia hybrida) 현탁 세포의 공급층을 포함하는 페트리 접시에서 24시간 동안 8일령 자엽 외식체를 예비배양하였다. 이어서, 코스미드 클론 Mi-32, Mi-30, Mi-11, Mi-18, Mi-01 및 Mi-14 또는 코스미드 벡터 pJJ04541을 포함하는 아그로박테리움 투메페이시언스의 밤새 배양한 희석된 배양물로 5~10분 동안 감염시키고, 멸균 여과지에 건조 블롯팅하고 기존 공급층 평판에서 48 시간 동안 동시배양하였다. 배양 조건은 전술한 바와 같다. 아그로박테리움 투메페이시언스의 밤새 배양물을 액상 MS20 배지(2%(w/v) 슈크로즈를 함유하는 Murashige 및 Skoog의 문헌(1962)에 따른 배지)로 희석하여 $O.D._{600}$가 0.8이 되도록 하였다.

동시 배양후에, 자엽 외식체를 4.56 μM 제아틴, 67.3 μM 반코마이신, 418.9 μM 세포탁심 및 171.6 μM 카나마이신 설페이트가 보충된 MS20으로 이루어진 선별 배지가 있는 페트리접시로 옮기고, 전술한 배양 조건하에서 배양하였다. 외식체는 새로운 배지에서 매 3주 마다 계대배양하였다. 나온 새순을 하부 칼러스로부터 절단하고 제아틴이 없는 선별 배지가 들어 있는 유리병에 옮겨 뿌리를 형성시켰다. 카나마이신 설페이트를 함유하는 배지에서의 뿌리 형성은 해당 새순의 돌연변이 특성을 나타내는 것으로 간주한다. 돌연변이 재생물은 정상 분열조직 및 보조 싹을 제아틴이 없는 새로운 선별 배지가 있는 유리병내로 계대 배양하여 시험관내에서 번식시켰다.

실시예 10: 상보성 분석

형질전환된 식물 뿌리에서의 내성을 검색하여 Mi 내성 유전자로 코스미드를 동정하는 방법

실시예 1에 개시된 바와 같은 질병 분석을 시험관내에서 성장시킨 형질전환된 R_0 식물의 뿌리에서 실시하였다. 각 형질전환체로부터 2개의 뿌리 외식체를 분석하였다. 7개의 다른 코스미드 형질전환체의 총 72개 R_0 식물을 시험하였다; 토마토 삽입 DNA를 보유하는 6개의 코스미드와 토마토 삽입 DNA가 없는 1개의 코스미드, pJJ04541. 결과는 표 5에 나타나있다. 충영이 2개의 뿌리 배양물중 하나 이상에서 형성되었기 때문에 63개의 돌연변이 R_0 식물는 감수성인 것으로 보인다. 9개의 R_0 식물은 충영이 뿌리 배양물에서 발견되지 않았기 때문에 내성으로 분류하였다. 7개의 내성 식물은 코스미드 Mi-11을 이용한 형질전환체로부터 유도된 것이며 2개의 내성 식물은 코스미드 Mi-11과 대부분 중첩되는 코스미드 Mi-18을 이용하여 유도한 것이다. 코스미드 Mi-11 및 Mi-18을 추가의 분자 분석에 사용하였다.

[표 5]

코스미드	R_0 식물	
	내성	감수성
Mi-32	0	8
Mi-30	0	11
Mi-11	7	4
Mi-18	2	8
Mi-01	0	10
Mi-14	0	15
pJJ04541	0	7

내성 표현형을 가지는 형질전환된 식물의 분자 분석

중복 코스미드 Mi-11 및 Mi-18을 이용한 돌연변이 R_0 식물의 내성 표현형이 여러 코스미드에 존재하는 게놈 삽입체에 의해 결정된다는 것을 증명하기 위해서, AFLP 마커 PM14를 이용한 AFLP 분석을 수행하였다. 코스미드 Mi-11 및 Mi-18로 형질전환된 R_0 식물에 대한 마커 PM14를 동정하는 프라이머 조합을 사용하여 선별 제한 단편 증폭을 수행하였다. 얻은 DNA 핑거프린트는 내성 식물내의 마커 PM14의 존재를 보여주며, 이는 코스미드 Mi-11 및 Mi-18내에 존재하는 게놈 삽입체가 R_0 식물에도 존재하며 2개의 동정된 중복 코스미드 Mi-11 및 Mi-18이 Mi 내성 유전자를 포함한다는 것을 나타낸다.

코스미드 Mi-11 및 Mi-18내의 삽입체 및 한 쪽의 인접 코스미드 Mi-32, Mi-30과 다른 쪽의 코스미드 Mi-01 및 Mi-14내의 삽입체를 추가로 특성화하였다. 코스미드 Mi-11 및 Mi-18 사이에 중복부를 기초로 Mi-내성 유전자를 포함하는 DNA 영역은 약 16~18 kb로 추정되었다. 코스미드 Mi-30내에 존재하는 삽입체를 가지는 R 식물의 감수성에 근거하여 이 영역을 약 120 kb로 국한시켰다. 코스미드 Mi-30 및 Mi-11의 오른쪽 말단에 인접한 영역에 해당하는 Mi 내성 유전자를 포함하는 DNA 분절을 서열결정하였다(도 4 참조).

실시예 11: 토마토에서 유래한 Mi 내성 유전자의 뉴클레오티드 서열과 추정 아미노산 서열

중복 DNA 분절의 서브클로닝

Mi 내성 유전자를 포함하는 코스미드 Mi-11 및 Mi-18내의 중복 DNA 분절의 서열을 결정하기 위해서, 삽입체의 크기가 약 2kb인 랜덤 서브클론 세트를 생성하였다. 물이 충진된 컵 호른(유형 431A)이 설치된 Misonix(미국 뉴욕주 파밍데일에 소재하는 미소닉스) 초음파기(유형 XL2020)를 사용하여 4℃에서 15% 프로브 힘으로(40㎕의 10 mM 트리스-아세테이트, 10 mM의 Mg-아세테이트 및 50 mM의 K-아세테이트중) 10초 동안 코스미드 Mi-11 및 Mi-18의 CsCl 정제된 DNA 7.5㎍을 전단 변형시켰다. 그 다음, DNA를 60℃에서 10분 동안 가열하고 실온으로 냉각시켰다. 10㎕의 복원 혼합물(10 mM 트리스-아세테이트, 10 mM Mg-아세테이트, 50 mM K-아세테이트, 10U 클레노우 DNA 폴리머라제, 10U T_4DNA 폴리머라제 및 2 mM의 모든 dNTP)을 첨가하여 DNA 단편의 말단을 복구한 후 20℃에서 30분 동안 항온처리하였다. 전단 변형시킨 DNA를 1% Seakem GTG 아가로스 겔(미국 메인주 록랜드에 소재하는 FMC 바이오 프로덕츠)상에서 전기영동시켜 분리하였다. 크기가 1.8-2.2 kb인 분획을 겔로부터 젤제한 후 겔 슬라이스를 제조업자(미국 매사츄세츠주 비벌리에 소재하는 뉴잉글랜드 바이오랩 인코오포레이티드)의 프로토콜에 따라 β-아가라제 I로 분해시키고 DNA를 침전시켰다.

변형된 pUC19 벡터(pStuc로 명명)를 사용하여 1.8~2.2 kb 분획을 클론시켰다. 이 벡터에서, 삼브룩 등의 문헌[Molecular cloning:a laboratory manual, 1989, Cold spring Harbor Laboratory Press]에 개시된 바와 같이 2개의 올리고뉴클레오티드 프라이머와 표준 클로닝 기술을 사용하여 pUC19의 BamHI/SalI 단편을

StuI, SpeI 및 SalI 제한 부위를 포함하는 DNA 단편으로 대체하였다. 1.8~2.2 kb 분획을 StuI 분해되고 탈인산화된 pStuc 벡터내에 16℃에서 결찰시켰다. 이어서, 결찰 혼합물을 Epicurian Coli XL2-Blue MRF 울트라콤피턴트 세포(미국 캘리포니아 라졸라주에 소재한 스트라타젠)로 형질전환시킨다. 각 콜로니를 384-웰 미량역가판(100 ㎎/ℓ의 카베니실린을 함유하는 100㎕의 LB 배지)내에서 증식 및 저장하였다.

Mi 내성 유전자를 포함하는 코스미드 Mi-11 및 Mi-18내에 중복 DNA 영역을 나타내는 클론을 분리하기 위해서, 코스미드 클론 Mi-18의 8.6 kb와 4.5 kb PstI 단편(도 4 참고) 뿐 아니라 AFLP 마커 PM14를 사용하여 콜로니 하이브리드화시 하이브리드화 프로브로서 사용하였다. 따라서, 미량역가판내의 384-웰 격자 클론의 레플리카를 Gene Screen Plus 막 필터(미국 매사츄제츠주 보스톤에 소재하는 듀퐁)에 옮기고 배지에서 콜로니로 증식시켰다. Ish-Horowicz 등의 문헌[Nucl.Acids Res. 9, 2989-2997]에 개시된 알카리 용해법으로 84개의 양성 클론을 사용하여 플라스미드 DNA를 분리하였다.

서열 분석

ABI PRISM 염료 종지 사이클 서열화 준비 반응 키트를 사용하여 Gene-Amp PCR 시스템 모델 9600(미국 캘리포니아주 포스터 시티에 소재하는 퍼킨-엘머)에서 서열화 반응을 수행하였다. 표준 M13의 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머를 사용하였다. 반응 생성물을 ABI 프리즘 277의 48 cm 겔에서 분석하였다. 표준 정방향 서열결정 프라이머 및 역방향 서열결정 프라이머를 사용하여 84개의 선별된 클론의 DNA 서열을 결정하였다. 서열 어셈블리 및 분석은 STADEN 서열 분석 프로그램(Dear 및 Staden, 1991, Nucl.Acids Res. 19, 3907-3911)의 1994년형을 사용하여 수행하였다. 약 9.9kb 뉴클레오티드의 인접 DNA 서열을 형성하였으며 도 5에 도시하였다. 1206 아미노산의 절두된 폴리펩티드(도 7B)를 암호하는 3621 뉴클레오티드의 거대 개방해독틀(ORF2)을 추정하였다.

실시예 12: 뿌리혹선충 감염: 토양 접종

뿌리혹선충 멜로이도진 인코그니타로 감염시킨 토양을 하기와 같이 준비하였다: 다수의 충영(또는 혹)으로 심하게 감염된 토마토 식물 뿌리계를 조각으로 절단하여 새로운 토양과 혼합하였다.

종자를 뿌리거나 작은 뿌리를 가진 소식물체를 감염된 토양에 이전시켰다. 25℃의 온실에서 식물을 성장시켰다. 4 내지 8주 후에, 식물이 토양 밖으로 나오면 뿌리를 물로 세척하여 부착된 흙을 제거한다. 감염 정도는 형성된 충영을 계수하여 결정하였다.

3개 이하의 혹이 식물 뿌리에 나타나는 경우 내성이 있는 것으로 간주한다. 3개 초과의 충영이 뿌리계에 형성되는 경우 식물은 감수성인 것으로 간주한다.

실시예 13: 상보성 분석

형질전환 식물의 자화수분된 자손에서의 내성 검색에 의한 Mi 내성 유전자를 지닌 코스미드 동정

종자 세트를 얻기 위해 형질전환 실험의 1차 재생체(R_0 세대)를 종자 세트의 온실에서 성장시켰다. 각 코스미드에서, 10 내지 15개의 재생체를 성장시키고 R_1 종자를 수확하였다. 각 코스미드의 7개 이상의 R_0 식물의 R_1 주에서 멜로이도진 인코그니타에 대한 내성을 검사하여 내성 유전자를 가진 코스미드를 동정하였다. 20 내지 30 개의 묘목 또는 소식물체 각 R_1주를 접종하고 실시예 12에 개시된 방법으로 평가하였다.

7개의 상이한 코스미드 형질전환 R_1주 총 63개를 시험하였다: 6개의 코스미드는 토마토 삽입 DNA 보유하고 하나의 코스미드, pJJ04541은 토마토 삽입 DNA를 보유하지 않는다. 결과는 표 6에 나타나있다. 충영이 시험한 모든 각 R_1 식물에서 형성되었기 때문에 54개의 돌연변이 R_0 식물은 감수성인 것으로 보인다. 9개의 R_0 식물은 각 R_1 주 식물의 1/2 이상이 3개 이하의 혹을 가지므로 내성이 있는 것으로 보인다. 하나의 R_1 주는 완전히 내성이며, 6개의 R_1 주는 약 3:1(내성 소식물체 대 감수성 소식물체)로 분리되며, 2개의 R_0 식물의 자손은 1:1로 분리되었다. 모두 9개의 내성 R_0 식물은 코스미드 Mi-11을 이용한 형질전환으로부터 유도되었다.

코스미드 Mi-11상에 Mi 내성 유전자의 존재에 대한 추가의 유전자 증거는 다음 세대에서 얻었다. 내성 R_1 식물을 자화수분시켰다. 4개의 상이한 R_0 식물에서 유래한 14개의 생성 R_2주에서 엠.인코그니타에 대한 내성을 시험하였다. 각 R_2 주의 20개 내지 30개 묘목을 접종하여 실시예 12에 개시된 방법으로 평가하였다. 결과는 표 7에 나타나있다. 5개의 R_2 주는 완전히 내성이며, 부모 R_1 식물은 Mi 내성 유전자에 대해 동형접합자였다. 8개의 R_2 주는 3:1로 분리되었으며, 이는 부모 R_1 식물이 Mi 내성 유전자에 대해 이종접합자임을 의미한다. 1개의 R_2 주는 약 1:1로 분리되었으며, 시험한 어떤 주도 완전히 감수성을 나타내지 않았다. 이들 결과는 코스미드 Mi-11로 형질전환시킨 몇가지 식물에서 유래한 선택된 R_1 식물이 기능성이 있는 Mi 내성 유전자를 포함한다는 것을 입증한다.

[표 6]

코스미드	시험한 독립 R_0 식물의 R_1 주의 수				
	총계	분리 비율 R:S(내성:감수성)			
		1:0	3:1	1:1	0:1

Mi-32	7	0	0	0	7
Mi-30	9	0	0	0	9
Mi-11	9	1	6	2	0
Mi-18	8	0	0	0	8
Mi-01	10	0	0	0	10
Mi-14	9	0	0	0	9
pJJ04541	11	0	0	0	11

[표 7]

코스미드	시험한 독립 R_1 식물의 R_2 주의 수				
	총계	분리 비율 R:S(내성:감수성)			
		1:0	3:1	1:1	0:1
Mi-11	14	5	8	1	0

실시예 14: 감자 진딧물 감염 분석

잎에 5개 내지 8개의 암컷 진딧물을 놓아두므로써 작은 토마토 식물(4주령)에 감자 진딧물(마크로시품 유포비아)를 접종하였다. 식물을 18℃~20℃의 온실에서 성장시켰다. 1주 내지 2주후에, 새로 생긴 진딧물을 계수하여 내성 정도를 결정하였다.

생존 진딧물이 줄기나 잎에 존재하지 않는 경우 식물은 내성이 있는 것으로 간주한다. 새로 생긴 진딧물이 존재하는 경우 식물은 감수성이 있다.

실시예 15: 상보성 분석

형질전환 식물의 자화수분된 자손에서의 내성 검색에 의한 Meu-1 내성 유전자를 지닌 코스미드 동정

실시예 13에서 얻은 R_1 주의 서브세트에서 마크로시품 유포비아에 대한 내성을 시험하여 Meu-1 내성 유전자를 지닌 코스미드를 동정하였다. 각 R_1 주의 10~15개의 소식물체를 접종하고 실시예 14에 개시된 바와 같이 평가하였다. 7개의 상이한 코스미드 형질전환 R_1주 총 41개를 시험하였다: 6개의 코스미드는 토마토 삽입 DNA 보유하고 하나의 코스미드, pJJ04541은 토마토 삽입 DNA를 보유하지 않는다. 결과는 표 8에 나타나있다. 수십개의 진딧물이 각 R_1주의 거의 모든 식물에서 증식하였기 때문에 36개의 돌연변이 R_0 식물은 감수성인 것으로 보인다. 5개의 R_0 식물은 각 R_1 주 식물의 1/2 이상이 생존 진딧물이 없으므로 내성이 있다. 이들 5개의 내성 R_0 식물을 코스미드 Mi-11로 형질전환시켰다.

얻은 결과는 코스미드 Mi-11을 이용한 형질전환으로 유도된 R_0 식물이 기능이 있는 Meu-1 내성 유전자를 포함한다는 것을 보여준다.

[표 8]

코스미드	시험한 독립 R_0 식물의 R_1 주의 수				
	총계	분리 비율 R:S(내성:감수성)			
		1:0	3:1	1:1	0:1
Mi-32	4	0	0	0	4
Mi-30	7	0	0	0	7
Mi-11	7	1	2	2	2
Mi-18	7	0	0	0	7
Mi-01	6	0	0	0	6
Mi-14	5	0	0	0	5
pJJ04541	5	0	0	0	5

코스미드 Mi-11내에 Meu-1 내성 유전자의 존재에 대한 추가의 유전자 증거는 다음 세대에서 얻었다. 9개의 상이한 R_0 식물에서 유래한, 선충 내성 R_1 식물(실시예 13 참조)의 자화수분으로 얻은 24개의 R_2 주에서 엠.유포비아에 대한 내성을 시험하였다. 각 R_2 주의 11개 내지 15개 묘목을 접종하여 실시예 14에 개시된 방법으로 평가하였다. 결과는 표 9에 나타나있다. 1개의 R_2 주는 3:1로 분리되었으며, 8개의 R_2 주는 약 1:1로 분리되었다. 이들 9개의 주에서, 감자 진딧물 내성 표현형을 명백하게 볼 수 있다. 5개의 R_2 주는 완전한 감수성으로 보인다. 남아 있는 10개의 R_2 주를 중간 등급으로 하였다: 이 주들은 약 1:3의 비율

로 분리되었다. 이들 결과는 코스미드 Mi-11로 형질전환시킨 R_0 식물에서 유래하고 멜로이도진 인코그니타에 대한 내성이 있는 몇몇 R_1 식물이 기능성이 있는 Meu-1 내성 유전자를 포함한다는 것을 보여준다.

또한, 감수성 토마토주 52201과 역교배한 선충 내성 R_1 식물에서 얻은 8개의 R_1BC주에서 엠.유포비아에 대한 내성을 시험하여, 이입된 Meu-1 내성 유전자가 유전된다는 것을 확인하였다. 각 R_1BC 주의 12개 내지 15개 묘목을 접종하고 실시예 14에 개시된 방법으로 평가하였다. 결과는 표 10에 나타나있다.

표 9 및 표 10에 나타낸 분리 비율은 내성 표현형의 유전을 예시하고자 한 것이다.

[표 9]

코스미드	시험한 독립 R_1 식물의 R_2 주의 수					
	총계	분리 비율 R:S(내성:감수성)				
		1:0	3:1	1:1	1:3	0:1
Mi-11	24	0	1	8	10	5

[표 10]

코스미드	시험한 독립 R_1 식물의 R_1BC 주의 수					
	총계	분리 비율 R:S(내성:감수성)				
		1:0	3:1	1:1	1:3	0:1
Mi-11	8	0	1	5	2	0

실시예 6: 전사 지도 작성

전사 지도작성 연구를 수행하여 Mi 내성 유전자의 5'말단과 3'말단을 지도작성하고 Mi 내성 유전자가 임의의 인트론을 포함하는지 여부를 결정하였다. 이를 위해 Mi 내성 유전자로부터 전사체 일부를 증폭시키기 위한 폴리머라제 연쇄 반응을 사용하였다.

내성 토마토 재배종 E22의 잎 조직에서 얻은 총 RNA를 삼브룩 등의 문헌[Molecular cloning:a laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press]에 개시된 바와 같이 고온 페놀법으로 분리하였다. 제조업자의 지시에 따라 Dynabeads M-280 스트렙타비딘(노르웨이 오슬로에 소재하는 DYNAL A.S.)에 결합된 비오틴화시킨 올리고(dT)를 사용하여 폴리 A+ RNA를 분리하였다. 미국 매사츄세츠주 게티스버그에 소재하는 라이프 테크놀러지에서 구입한 Superscript Rnase H Reverse Transcriptase cDNA 키트와 제조업자의 프로토콜을 이용하여 cDNA 라이브러리를 작제하였다.

클론테크(미국 캘리포니아주 파올로 알토에 소재)에서 입수한 Marathon cDNA 증폭 키트를 사용하여 5' 및 3' RACE 생성물을 얻었다. 사용한 프라이머는 게놈 Mi-서열, 특히 ORF2 암호 서열의 5' 말단상을 기초로 고안하였다. 그 다음, 각종 5' 및 3'-RACE 단편을 TA 클로닝 벡터 pCRII(미국 캘리포니아주 샌디에고에 소재하는 인비트로겐 코오포레이션)내로 클론시키고 표준 프로토콜을 사용하여 서열결정하였다. 얻은 뉴클레오티드 서열을 9.9 kb 게놈 서열로 정렬하고 2개의 인트론 서열을 Mi 내성 유전자의 5' 말단에 대해 추정하였다. 1306 뉴클레오티드의 하나의 인트론은 뉴클레오티드 위치 1936 내지 3241에 위치시키고 두번째 인트론은 뉴클레오티드 3305 내지 3379에 위치시켰다(도 5).

최대 Mi-전사체는 뉴클레오티드 위치 1880에서 Marathon cDNA 증폭 키트를 사용하여 검출하였다. 따라서, 본 발명자들은 Mi 전사 개시 부위가 뉴클레오티드 1880 또는 그 업스트림에 위치하는 것으로 결론지었다. 5' cDNA내에서 검출할 수 있는 제1 ATG 코돈은 뉴클레오티드 3263, 제2 인트론의 52 뉴클레오티드 업스트림에 위치하고, 1257 아미노산의 폴리펩티드를 암호하는 거대 개방해독틀(ORF1)을 추정할 수 있으며 도 7A에 도시되어 있다. 결과적으로, 제2 인트론은 Mi-내성 유전자 생산물의 아미노산 14와 15 사이에 위치한다.

실시예 17: Mi-11 및 Mi-18 형질전환 식물의 PCR 분석

형질전환 식물의 뿌리에서의 상보성 분석(실시예 10)으로 얻은 결과는 Mi 내성 유전자가 코스미드 Mi-30에 해당하는 DNA 분절외에 코스미드 Mi-11 및 Mi-18사이에 중첩되는 DNA 분절상에 위치하고 있으며, 이들 형질전환체는 모두 감수성이라는 것을 보여준다. 이 영역은 약 12 kb로 추정되었다. 그러나, 형질전환 식물의 자화수분된 자손에서의 상보성 분석에서, 코스미드 Mi-11 형질전환 식물만이 내성인 것으로 나타났다(실시예 13 및 15). Mi-18 형질전환 식물이 왜 감수성인지의 문제를 해결하기 위해서, 형질전환 Mi-11 및 Mi-18 식물에서 추정 Mi-ORF의 존재 또는 부재에 대한 PCR 분석을 수행하였다.

하기 DNA 시료를 분석하였다:

1. YAC 클론 2/1256.

2-3. 각각 이.콜리 및 에이.투메페이시언스 중 코스미드 Mi-11 .

4-5. 각각 이.콜리 및 에이.투메페이시언스 중 코스미드 Mi-18 .

6. 토마토 주 E22(내성).

7. 토마토 주 52201(감수성).

8-12. 코스미드 Mi-11로 형질전환시킨 5개의 식물.

13-17. 코스미드 Mi-18로 형질전환시킨 5개의 식물.

DNA를 PstI로 분해하고 PstI-어뎁터를 결찰시켰다. 이어서, PstI 부위를 확인하는 프라이머와 추가의 선별 뉴클레오티드 또는 마커 PM14 및 PM14의 업스트림에 위치한 각종 PCR 프라이머로 효소 rTh 폴리머라제(Gene Amp XL PCR 키트; 퍼킨 엘머)를 사용하여 PCR 분석을 수행하였다. 형성된 생성물은 크기가 443 내지 6110 bp로 다양하며 추정 Mi-ORF의 완전한 PM14 업스트림 영역을 포함하였다(참고 도 6).

모든 주형은 코스미드 Mi-18로 형질전환시킨 5개의 식물외에 예상 크기의 PCR 생성물을 얻었다. 가장 작은 PCR 생성물(443 bp)을 형성하였다. 이들 자료는 대부분의 완전한 PM14 업스트림 영역이 코스미드 Mi-18로 형질전환시킨 식물에는 존재하지 않는다는 것을 보여준다. 이.콜리 또는 에이.투메페이시언스에 존재하는 코스미드 Mi-18에서는 결실이 발생하지 않지만 형질전환 식물에서는 발생한다. 따라서, 결실은 Mi-18 형질전환 식물의 멜로이도진 인코그니타 및/또는 마크로시품 유포비아에 대한 감수성 표현형의 원인이다.

실시예 18: 코스미드 Mi-11의 뉴클레오티드 서열

코스미드 Mi-11로 형질전환시킨 식물만이 내성 표현형을 나타내었다는 관찰 결과는 Mi-11에 존재하는 추가의 개방 해독틀이 선충 및/또는 진딧물에 대한 내성을 암호할 수 있다는 것을 제시한다. 따라서, 가정한 ORF1의 업스트림 영역의 뉴클레오티드 서열을 결정하여 추가의 개방 해독틀을 동정하였다. 실시예 11에 개시된 바와 같이 콜로니 하이브리드화에서 코스미드 클론 Mi-11의 2.1kb, 4.7kb 및 2.9kb PstI 단편을 하이브리드화 프로브로서 사용하여 삽입 크기가 2kb인 랜덤 서브클론 세트를 분리하였다.

표준 정방향 서열 프라이머와 역방향 서열 프라이머를 사용하여 49개의 양성 클론으로 DNA 서열을 결정하였다. 서열 어셈블리 및 분석은 실시예 11에 개시된 바와 같이 수행하였다.

크기가 5618 bp(con25), 898 bp(con10) 및 2495 bp(con62)인 3개의 인접 DNA 확장물을 추정하였다. 이들 DNA 확장물과 추정 Mi-ORF를 포함하는 9870 bp DNA 서열(도 6) 사이의 차이는 PCR을 사용하여 계산하였으며 50 bp~200 bp로 다양하였다.

6개의 가능한 틀중 종지 코돈의 분포에 대해 3개의 결정된 콘티그(con25, con10 및 con62)를 분석하였다. 크기가 120 아미노산 이상인 중요한 ORF 틀은 가정할 수 없었다. 또한, 추정 ORF1과의 DNA 상동성은 검출되지 않았다. 따라서, 유일하게 코스미드 Mi-11상에 존재하는 중요한 ORF 는 도 5에 개시된 바와 같이 ORF1이었다. 이들 결과를 근거로, ORF1이 암호하는 폴리뉴클레오티드는 선충 뿐 아니라 진딧물에 대한 내성을 부여하며, 따라서 Mi 내성 유전자 및 Meu-1 내성 유전자는 도 5에 도시된 암호 서열과 동일한 것을 위미한다고 결론지었다.

실시예 19: 담배의 형질전환 및 상보성 분석

담배의 형질전환

Horsch 등의 문헌[Science 227, 1229-1231, 1985]에 개시된 프로토콜을 사용하여 담배 재배종 페티트 하바나(Petit Havana), 유형 SR1을 코스미드 Mi-11 또는 코스미드 벡터 pJJ04541로 형질전환시켰다.

상보성 분석: 형질전환 담배 식물의 뿌리 배양물에서의 선충 내성 검색

시험관에서 성장한 담배의 형질전환 R_0 식물의 뿌리를 실시예 1에 개시된 바와 같이 질병 분석하였다. 31개의 형질전환체 각각으로부터 2개 이상의 뿌리 외식체를 분석하였다. 또한, 크기가 823 염기쌍(뉴클레오티드 4824 내지 5646, 도 5 참조)인 내부 단편을 검색하여 추정 Mi ORF1의 존재에 대해 PCR을 사용하여 모두 17개의 Mi-11 형질전환체를 분석하였다. 단편에 대한 단순한 PCR 프라이머를 도 5에 도시된 서열로부터 추정하였다. 사용한 프라이머는 하기의 서열을 가진다:

프라이머 S21: 5'-CCAAGGACAGAGGTCTAATCG-3'

프라이머 S22: 5'-TTGAGGTGATGTGGTAAATGG-3'

프라이머 S21은 뉴클레오티드 위치 4824 내지 4844의 서열을 표적으로 하며, 프라이머 S22는 뉴클레오티드 위치 5626 내지 5646을 표적으로 한다(도 5 참조).

시험관내 질병 분석과 PCR 분석 결과(내부 PCR 단편의 존재 "+" 또는 부재 "-")는 표 11에 나타나있다. PCR 분석(전술)으로 결정되는 바와 같이 "Mi-11"은 추정 Mi ORF1을 포함하는 형질전환된 식물을 나타내며, "Mi-11△"은 추정 Mi ORF1에 결실이 있는 형질변형 식물을 의미한다. 29개의 R_0 식물체는 충영이 시험한 뿌리 배양물의 하나 이상에서 형성되었기 때문에 감수성이 있다. 일반적으로 담배 뿌리상에 충영 형성 속도는 감수성 토마토 뿌리상에서보다 약간 느리다. 2개의 R_0 식물은 혹이 뿌리 배양물에서 발견되지 않기 때문에 멜로이도진 인코그니타에 대한 내성이 있다. 2개의 내성 식물은 내부 PCR 단편을 포함하는 코스미드 Mi-11로 형질전환시켰으며, 이는 Mi 내성 유전자의 존재를 나타낸다.

[표 11]

유전자형	PCR 단편	R_0 식물	
		내성	감수성
Mi-11	+	2	7
Mi-11△	-	0	8
pJJ04541	-	0	14

상보성 분석: 형질전환 담배 식물의 꺾꽂이의 진디물 내성 검색

담배의 형질전환 R_0 식물의 뿌리가 있는 꺾꽂이를 접종하여 실시예 14에 개시된 바와 같이 평가하였다. 23개의 형질전환체 각각으로부터의 2 내지 3개의 꺾꽂이에서 마크로시품 유포비아에 대한 내성을 분석하였다. 감염 분석 결과 및 PCR 분석(전술) 결과는 표 12에 나타나있다. 21개의 R_0 식물체는 몇몇 생존 진딧물을 하나 이상의 시험할 꺾꽂이에서 계수할 수 있기 때문에 감수성이다. 일반적으로, 담배상의 진딧물 증식 정도가 감수성 토마토 식물과 비교하여 낮다. 2개의 R_0 식물은 모든 꺾꽂이에 살아있는 진딧물이 없기 때문에 내성이 있다. 진딧물 내성 식물은 Mi 내성 유전자를 포함하는 코스미드 Mi-11로 형질전환시켰으며, 이는 내부 PCR 단편의 존재로 알 수 있다.

[표 12]

유전자형	PCR 단편	R_0 식물	
		내성	감수성
Mi-11	+	2	3
Mi-11△	-	0	6
pJJ04541	-	0	12

실시예 20: 감자의 형질전환 및 상보성 분석

감자의 형질전환

감자 변종 디아만트(Diamant)(Cebeco Zaden B.V., Vlijmen, 네델란드)를 사용하여 형질전환시켰다. Ooms 등의 문헌[Theor. Appl. Genet. 73, 744-750]에 개시된 프로토콜을 사용하여 시험관내에서 성장한 식물의 절간 외식체를 코스미드 Mi-11 또는 코스미드 벡터 pJJ04541로 형질전환시켰다.

상보성 분석: 형질전환 식물의 뿌리 배양물에서의 선충 내성 검색

시험관에서 성장한 감자 형질전환 R_0 식물의 뿌리에서 실시예 1에 개시된 바와 같이 질병 분석을 수행하였다. 31개의 형질전환체 각각으로부터 2개 이상의 뿌리 외식체를 분석하였다. 또한, 실시예 19에 개시된 바와 같이 프라이머 S21 및 S22를 사용하여 26개 모두 Mi-11 형질전환체를 PCR로 분석하였다. 시험관내 질병 분석과 PCR 분석 결과(내부 PCR 단편의 존재 "+" 또는 부재 "-")는 표 13에 나타나있다. PCR 분석(전술)으로 결정되는 바와 같이 "Mi-11"은 추정 Mi ORF1을 포함하는 형질전환된 식물을 나타내며, "Mi-11△"은 추정 Mi ORF1에 결실이 있는 형질변형 식물을 의미한다. 28개의 R_0 식물체는 충영이 시험한 뿌리 배양물중 하나 이상에서 형성되었기 때문에 감수성이 있다. 일반적으로 감자 뿌리상에 충영 형성 속도는 감수성 토마토 뿌리상에서보다 느리다. 3개의 R_0 식물은 충영이 뿌리 배양물에서 발견되지 않기 때문에 멜로이도진 인코그니타에 대한 내성이 있다. 이들 내성 식물은 내부 PCR 단편을 포함하는 코스미드 Mi-11로 형질전환시켰으며, 이는 Mi 내성 유전자의 존재를 나타낸다.

[표 13]

유전자형	PCR 단편	R_0 식물	
		내성	감수성
Mi-11	+	3	17
Mi-11△	-	0	6
pJJ04541	-	0	5

상보성 분석: 형질전환 식물의 꺾꽂이에서의 진디물 내성 검색

감자의 Mi-11 형질전환 R_0 식물의 뿌리가 있는 꺾꽂이를 접종하여 실시예 12에 개시된 바와 같이 평가하였다. 19개의 형질전환체 각각으로부터 1 내지 3개의 꺾꽂이에서 멜로이도진 인코그니타에 대한 내성을 분석하였다. 결과는 표 14에 나타나있다. 또한, 36개의 형질전환되지 않은 감자 식물(변종 디아만트)의 뿌리가 있는 꺾꽂이를 분석하였고(감수성 대조군으로서) 모두 감수성이었다. 하나의 R_0 식물체는 뿌리계에서 충영이 발견되지 않기 때문에 멜로이도진 인코그니타에 대해 내성이 있다.

[표 14]

유전자형	PCR 단편	R_0 식물	
		내성	감수성
Mi-11	+	1	12
Mi-11△	-	0	6
형질전환되지 않은 대조군	-	0	1

(57) 청구의 범위

청구항 1

DNA 서열이 도 5에 기재된 DNA 또는 그 일부이거나 또는 도 5에 기재된 DNA 서열에 상동성이 있는 DNA 서열인 것을 특징으로 하는 핵산.

청구항 2

제1항에 있어서, 식물 병원체에 대해 감수성이 있는 숙주 식물로 전달되는 경우 식물 병원체에 대한 내성을 숙주 식물에 부여하는 것을 특징으로 하는 핵산.

청구항 3

핵산의 DNA 서열이 최소한 도 5에 도시된 DNA 서열의 일부에 대응하는 cDNA인 핵산.

청구항 4

제1항 또는 제3항에 있어서, 숙주 식물로 전달되는 경우 숙주 식물에 선충에 대한 내성을 부여하는 것을 특징으로 하는 핵산.

청구항 5

제1항 또는 제3항에 있어서, 숙주 식물로 전달되는 경우 숙주 식물에 진딧물 대한 내성을 부여하는 것을 특징으로 하는 핵산.

청구항 6

제1항 또는 제3항에 있어서, 숙주 식물로 전달되는 경우 숙주 식물에 선충 및 진딧물에 대한 내성을 부여하는 것을 특징으로 하는 핵산.

청구항 7

DNA 서열이 도 5에 기재된 서열의 뉴클레오티드 3263에서 시작하여 뉴클레오티드 7111에서 종료되는 서열 또는 이에 상동성이 있는 임의의 DNA 서열에 해당하는 것을 특징으로 하는 핵산.

청구항 8

DNA 서열이 뉴클레오티드 3263의 5' 업스트림에 위치한 프로모터 서열 또는이에 대해 상동성이 있는 임의의 DNA 서열에 해당하는 것을 특징으로 하는 핵산.

청구항 9

제1항 또는 제3항에 있어서, DNA 서열이 코스미드 Mi-11내에 존재하는 게놈 삽입체의 최소한 일부분, 또는 이에 대해 상동성이 있는 임의의 DNA 서열인 것을 특징으로 하는 핵산.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에 기재된 핵산을 포함하는 재조합 DNA 작제물.

청구항 11

제10항에 있어서, 핵산이 식물 세포에서 작용하는 프로모터의 조절하에 있으며, 프로모터가 상기 식물 세포에 대해 내인성이거나 외인성이고 식물 세포에서 DNA 서열의 전사를 조절하는 데 효과적인 것을 특징으로 하는 재조합 DNA 작제물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 프로모터가 도 5에 제시된 뉴클레오티드 3263의 5' 업스트림에 위치한 프로모터 서열, 또는 이에 대해 상동성이 있는 임의의 DNA 서열에 해당하는 것을 특징으로 하는 재조합 DNA 작제물.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 기재된 DNA 작제물을 포함하는 식물 세포를 형질전환시키는 데 적절한 벡터.

청구항 14

기탁 번호 CBS 822.96으로 기탁된 플라스미드 pKGMi-11.

청구항 15

기탁 번호 CBS 821.96으로 기탁된 플라스미드 pKGMi-18.

청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 기재된 벡터 또는 플라스미드를 포함하는 박테리아 세포.

청구항 17

제10항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 기재된 DNA 작제물이 내부에 삽입된 재조합 식물 게놈.

청구항 18

제10항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 기재된 DNA 작제물을 포함하는 식물 세포.

청구항 19

제18항에 기재된 식물 세포를 포함하는 식물.

청구항 20

제19항에 있어서, 선충에 대한 감수성이 감소된 것을 특징으로 하는 식물.

청구항 21

제20항에 있어서, 선충이 뿌리혹선충, 특히 멜로이도진 인코그니타 (Meloidogyne incognita)인 것을 특징으로 하는 식물.

청구항 22

제19항에 있어서, 진딧물, 특히 마크로시품 유포비아(Macrosiphum euphorbiae)에 대한 감수성이 감소한 것을 특징으로 하는 식물.

청구항 23

제10항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 기재된 DNA 작제물을 포함하는 종자.

청구항 24

제17항에 있어서, 식물 세포 환경내에 존재하는 재조합 식물 게놈.

청구항 25

i) 제10항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 기재된 DNA 작제물을 식물 세포 게놈 내로 삽입시키는 단계,

ii) 형질전환 식물 세포를 얻는 단계,

iii) 상기 형질전환된 식물 세포로부터 유전자적으로 형질전환된 식물을 재생시키는 단계, 및

iv) 임의적으로 상기 식물을 번식시키는 단계를 포함하여, 병원체에 대한 감수성이 감소된 식물을 얻는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 병원체가 선충, 바람직하게는 뿌리혹선충, 특히 멜로이도진 인코그니타인 것이 특징인 방법.

청구항 27

제25항에 있어서, 병원체가 진딧물, 바람직하게는 마크로시품 유포비아인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

i) 제10항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 기재된 DNA 작제물이 있는 식물의 게놈을 제공하는 단계, 및

ii) 상기 식물을 성장시키는 단계를 포함하여, 재배시 식물을 병원체 감염에 대해 보호하는 방법.

청구항 29

i) 제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에 기재된 DNA 서열을 이용하여 식물의 게놈 또는 cDNA 라이브러리를 검색하는 단계,

ii) 상기 DNA 서열에 하이브리드화한 양성 클론을 동정하는 단계,

iii) 양성 클론을 분리하는 단계를 포함하여, 제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 기재된 핵산을 분리하는 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 라이브러리가 1차 식물에서 유래하고 DNA 서열이 2차 식물에 속하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

도 3에 도시된 바와 같은 AFLP 마커 PM02 내지 PM29 중 하나 이상을 동정하는 프라이머 조합체를 사용하여 제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에 기재된 핵산을 확인하기 위한 선택적 제한 단편 증폭 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 프라이머 조합체로 AFLP 마커 PM14를 확인하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33

제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에 기재된 핵산의 최소한 일부에 해당하는 DNA 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 34

제33항에 있어서, 엄중한 하이브리드화 조건하에서 제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에 기재된 DNA 서열에 선택적으로 하이브리드하기에 충분한 크기인 올리고뉴클레오티드.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 DNA 서열이 뉴클레오티드 6921에서 시작하여 뉴클레오티드 7034에서 종료되는 서열에 해당하는 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 36

제35항에 있어서, DNA 서열이 3' 말단에 위치하고, 바람직하게는 서열 5'-TGCAGGA-3'에 해당하며, DNA 합성을 촉진할 수 있는 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 37

제35항에 있어서, DNA 서열이 3' 말단에 위치하고, 바람직하게는 서열 5'-TAATCT-3'에 해당하며, DNA 합성을 촉진할 수 있는 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 38

제36항에 기재된 제1 올리고뉴클레오티드와 제37항에 기재된 제2 올리고뉴클레오티드를 포함하는 프라이머 조합체.

청구항 39

제33항 내지 제37항 중 어느 하나의 항에 기재된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 진단 키트.

청구항 40

제38항에 기재된 프라이머 조합을 포함하는 진단 키트.

청구항 41

제39항 또는 제40항에 기재된 진단 키트를 사용하여, 특히 식물 DNA내에서 제1항 내지 제9항에 기재된 DNA 서열의 존재 또는 부재를 검출하는 방법.

청구항 42

제1항 내지 제13항 중 어느 하나의 항에 기재된 재조합 DNA의 핵산 발현 생성물인 폴리펩티드.

청구항 43

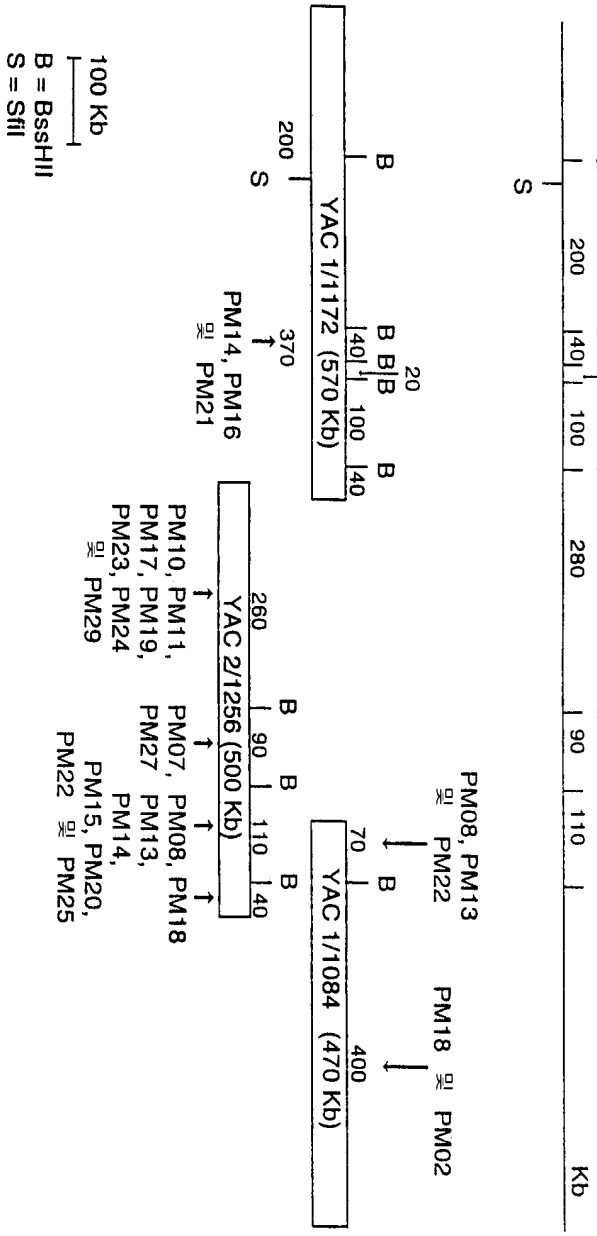
제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 기재된 대응하는 상동 서열에 의해 암호되거나 또는 도 7A에 제시된 서열을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드.

청구항 44

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 기재된 일부 또는 전체 DNA 서열의 전사체인 리보핵산 서열을 가지는 RNA.

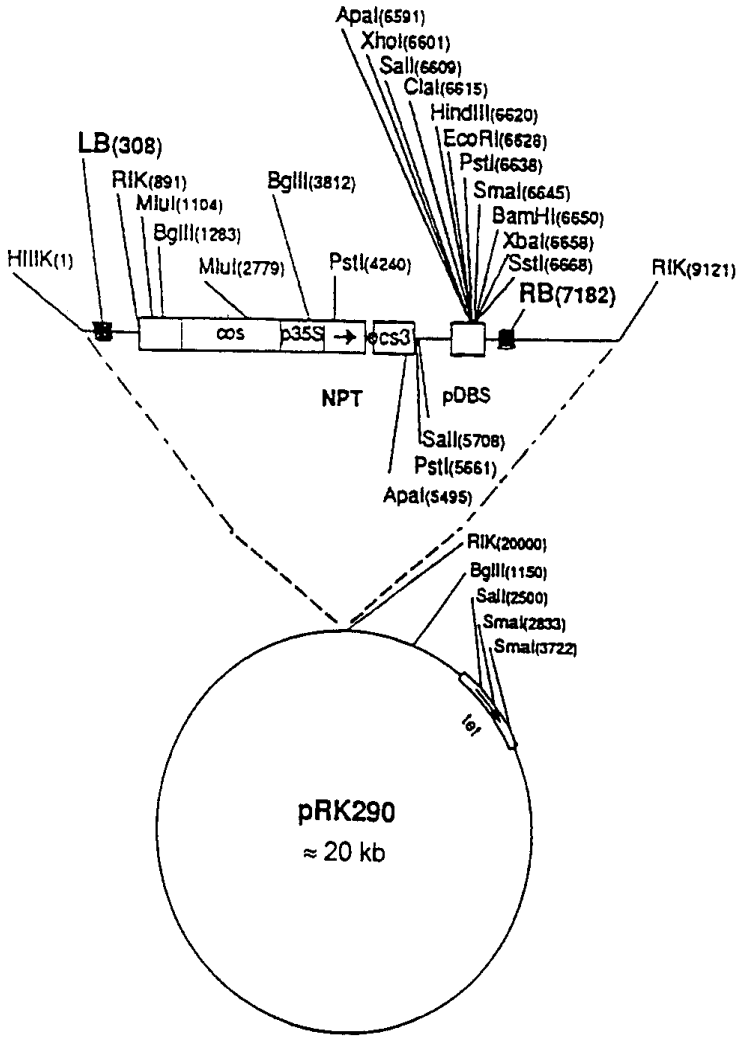
도면

도면1

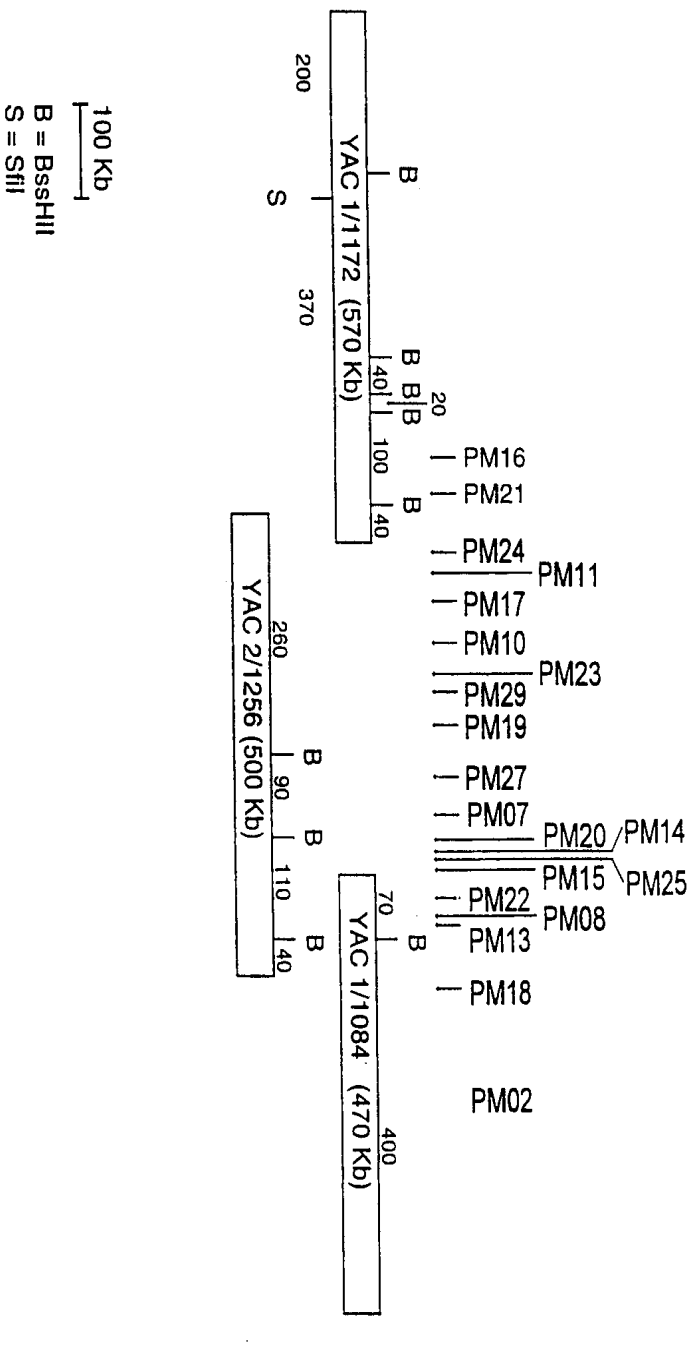


100 Kb
B = BssHII
S = SfiI
YAC 1/1172 (570 Kb)
YAC 2/1256 (500 Kb)
YAC 1/1084 (470 Kb)
PM14, PM16 및 PM21
PM10, PM11, PM17, PM19, PM23, PM24 및 PM29
PM07, PM08, PM18 PM27 PM13, PM14, PM15, PM20, PM22 및 PM25
PM08, PM13 및 PM22
PM18 및 PM02
Kb

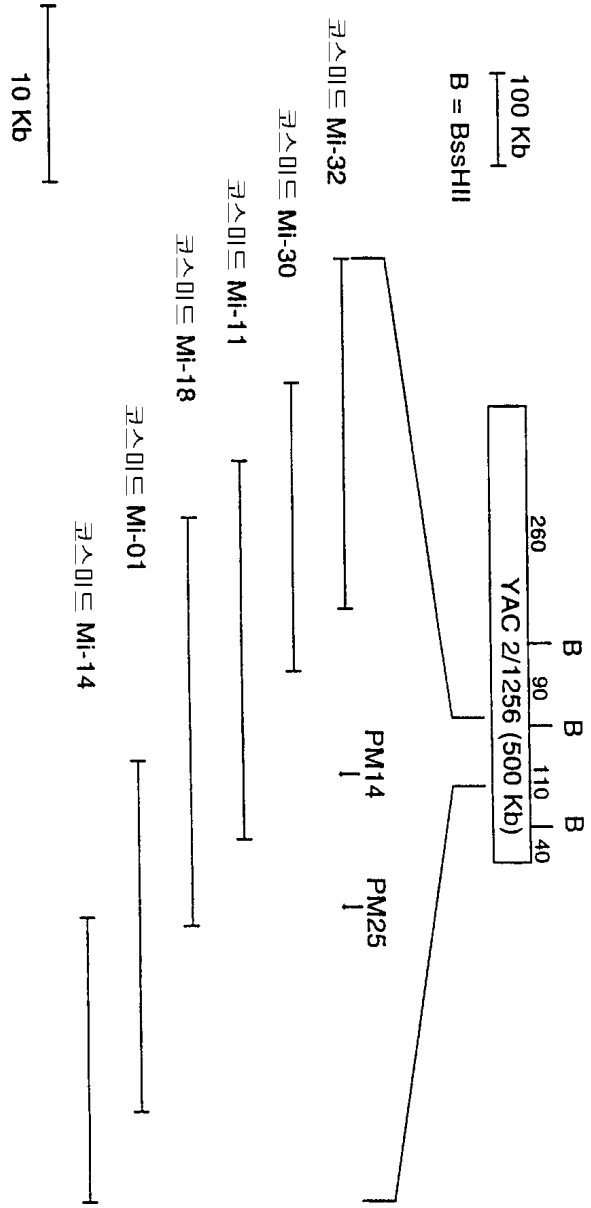
도면2


ApaI(6591)
XhoI(6601)
SalI(6609)
ClaI(6615)
HindIII(6620)
EcoRI(6628)
PstI(6638)
SmaI(6645)
BamHI(6650)
XbaI(6658)
SstI(6668)
RB(7182)
LB(308)
RIK(891)
MluI(1104)
BglII(1283)
MluI(2779)
BglII(3812)
PstI(4240)
HIIIK(1)
RIK(9121)
cos
p35S
ocs3
NPT
pDBS
SalI(5708)
PstI(5661)
ApaI(5495)
RIK(20000)
BglII(1150)
SalI(2500)
SmaI(2833)
SmaI(3722)
lol
pRK290
≈ 20 kb

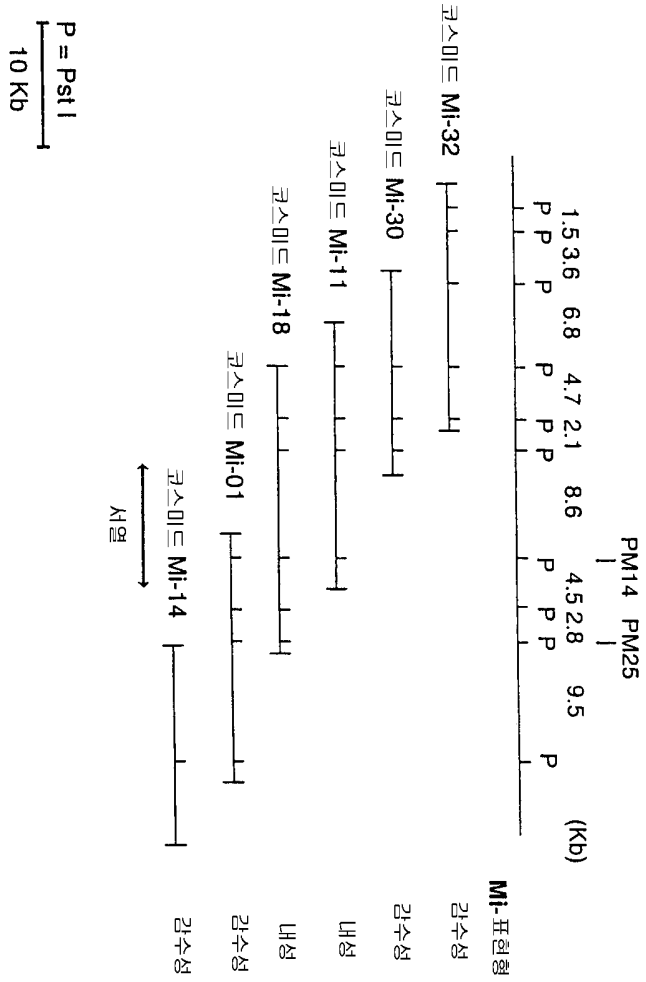
도면3A


100 Kb
B = BssHII
S = SfiI
YAC 1/1172 (570 Kb)
YAC 2/1256 (500 Kb)
YAC 1/1084 (470 Kb)
PM16
PM21
PM24
PM11
PM17
PM10
PM23
PM29
PM19
PM27
PM07
PM20
PM14
PM15
PM25
PM22
PM08
PM13
PM18
PM02

도면38


100 Kb
B = BssHII
YAC 2/1256 (500 Kb)
260
90
110
40
B
B
B
PM14
PM25
코스미드 Mi-32
코스미드 Mi-30
코스미드 Mi-11
코스미드 Mi-18
코스미드 Mi-01
코스미드 Mi-14
10 Kb

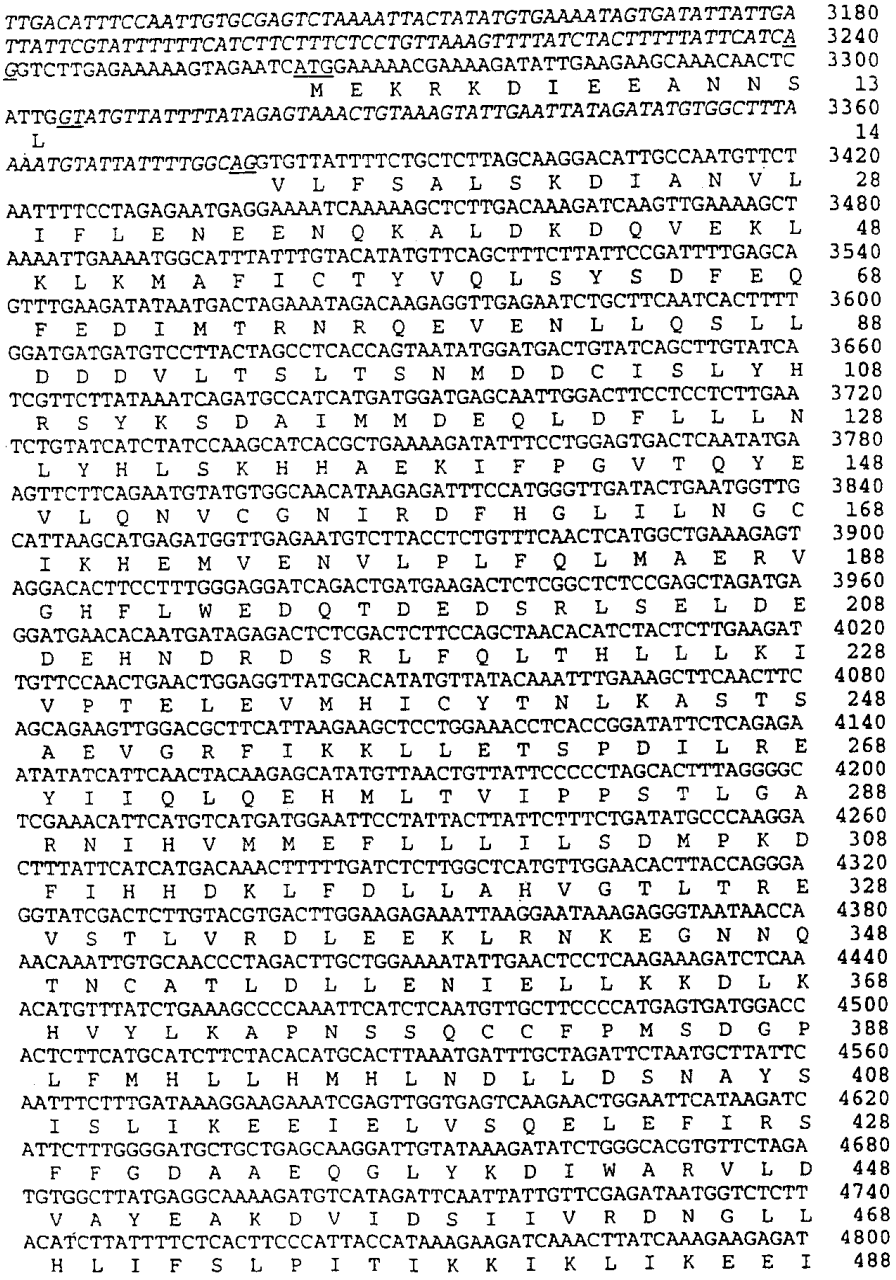
도면4


PM14 PM25
1.5 3.6 6.8 4.7 2.1 8.6 4.5 2.8 9.5 (Kb)
P P P P P P P P P P
Mi-표현형
코스미드 Mi-32 감수성
코스미드 Mi-30 감수성
코스미드 Mi-11 내성
코스미드 Mi-18 내성
코스미드 Mi-01 감수성
코스미드 Mi-14 감수성
서열
P = Pst I
10 Kb

도면5a

```
5'-TTTTCCTCTTCATATAACTTTTTCCTTAACCCCTCTCATGAATAATATAATTGATGTGGA     60
   TAAAGTATTATCCTTTATGATAAATAACGAAATTTAATAATTTAAAGGGTGCAAATCTAT    120
   AAAATGGAGACGCACATTGATAATGTCCTCTTGATTATTATTAAAGAATTACTCTAGCTT    180
   CACAAATTTAAATTCATTAATGCTTAATTACATGATAAAAACTTTAGTTGTTCTTTTTAC    240
   ATGGTTTGCTAACTTTAATTTTTTTTCTTCATATTCTTCATTTGTTTATTATTATTTTCT    300
   AATTACTTATTTAACTTTTATACTCTTAATATTCATAACTCTCATCTTTTCATATTCATA    360
   ACCTCCAAATATTTAAACTAAAACTTTAAGATATCTTTTGATATTTGTTCAATAATAAAT    420
   TCAACTTCTTTATCTTATGAAACCCCTACCAAGATTATTAGGCTATTATTTTTTATTCTA    480
   TAGTAAAAACAAATGATGAAGATTCTTGAATTTTATAGGATATGAAAGAAGTCGATAAAA    540
   TCTCAGAGAGTTATGTACTAATTTTGTACTTATTTTTTCATCTATATATACATAAATCTT    600
   ATAAGAATAATGTCTATATTGTATTTTTTTCTTAAATATTATGTTTCTTTTTAATTTTTT    660
   TTCACTCTGTTAGACTTCTTAATTTAGTTTTCTATGAATGTTTTATTGCCGTAAGTCTTT    720
   GAATTTTGTAATTGTTACATTTTATTATTCATTACGATTTACATATATATTTCCATGAGA    780
   TTTGGTCATTCTAACGTATCTATAAAAATTCACATGAAACACACGTGTGAAGCGCATCCT    840
   CAGAAAAACTAGTGTATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATA     900
   TATATATATATATATATATATATATATTATTCTTATTAAAAAAGAATGTCCTTATTTCAT    960
   TTTTAATCTGGTTAAAAAAGAATAATCTCTTTCCTTTTTTGACAATATTTTAACTTTAAC   1020
   TTTCCACGTAACATGTTTAAGACAACAAAATTAAATGACATTTTAATCTTGTAACATAGA   1080
   AAAGTAACATATGATAATTGTCGTTGTCCCTAAACATGATAGATGTATAATTCAAAAGTC   1140
   AATGAATTGTATTTTAGTATTATATTATGAATGAACAAACTGTCAAGATGTGTATATATA   1200
   TATATATTTTATTCTTGTTAATTTGGCCTTTCAAGTAATTAATTCATTGTTAGGCAGTTG   1260
   AATTAATAATCTCTTTTAGGAATCTTCCCATGTGAATAACAAGACTTATAATAATAATAA   1320
   TAAAGTCCAGATCTTGTTTCAATTGGATCATTTGGCAAACAATTACTCTGTTTCTGAAAC   1380
   AAGGAATAGGGCTTCTAATATTGTAGGGGATTTTTTTTTCTTCATTAATTTATACTTATG   1440
   ATATTAATTATTGTTTTTGAGTACATATTTTAAACTCTGTTGTTTATTTTTCTGCAAAGT   1500
   TTCTCCGGTTATATTGAACATATACACATATAGTACATATATTTATTGTAAAAAAAATAA   1560
   TTATTATACTCCATTTCAAGAAATTATGTTTTGATATTATATATTAAATTCTATAATGTG   1620
   GAAATTGTCAATGTCTACAATGTGTTTGATGAAATGACAACCACTTGTTTTTATCTGCAA   1680
   CAGTATAAAAATTGGCTTTGCTTCTTTTAGATTAATATAATATTTTACAGGTCACATATT   1740
   ATATTTATATTGTGAAAGACAAGAGATATTGATTAAAAAAAGACTTATGGGTTTGTATTT   1800
   TAATATTTCATTCTTCTTCATTACTAAAAGACTTGTATCGTATATTTCAACTACTACACT   1860
   TGTTTTCTTATCCAATAGCTTCAACATTATTTCTCAAACAAAGGGTTCTCTAGCTAAACT   1920
   TCAGCCTGTGTAAAGGTAACATCTTCTTTATTCACAGCATAATAACAATGAATTTGGTCG   1980
   ATGTTTGAAGTAAGCTTGAAATTTTCTCTTTCTAAGTTTGTTTGATCCATTTAGATTCTT   2040
   TTAAATACTTTTGGTATTTAAAGGACTTGTGAAGTCAATGAATTGTATTTTAGTAATCTT   2100
   GCAATTCTAGATCTAGCTATTTGTTGTTCTCCTTTCAACCAAACTACTTCTTCAATTTGT   2160
   CTAACAAAAATATGTCAAAAAGGTATGAACATGCTTAATCGGAGATCTTTATTGATTCTA   2220
   CTTCAGCTACTCTAAAAAAAAATCTTTTTTCCATTAAGCCCAAGTCGAGATAGGAGAAAA   2280
   ATATTATTAGAGAGATTATTAATTTAATGACATTTTACTCTAGTTTTTTATCAAAATAAG   2340
   GGAATAATATCCTGTTATTTAACTACCTTTTAAGCATTATGGGTGGAAAGTAGAAAGAAG   2400
   AAACATAACAGAACAGACAGTAAGTTATGCTTTAATGAGTAGATCTGTATAGGATTACAT   2460
   ATTTGTTTGACTTTTCGGTGTTTCGATTAGAAAACTTACAAGTTTTTAATACATGTATCA   2520
   TTTGTTGATTTGTCCGTTTGGCACGTCATCTGTGGTTACAAGTCACATATGAAGTATGTC   2580
   CACGAGACACACCGAATGTCAAGTATAGATTTCTACTTGATCATACACAACTTTATCTGA   2640
   GGTTGATGCCAAATTTAAATGACTACCTAAAGCTGATATTTTAAACATTAATCTTGTACA   2700
   CGAAAACATTATTCCTATTACTGTTTTCTTTACCTTTACCTTATAGACTTTTTTGGCAGA   2760
   AAAAAGTTAGACAGATACATTTGATGATGTTTACCATTCTCATTCTCTCTTTATTTTATT   2820
   TTCTTTACATTCACACGCACAATAATTTTCTTGTAGGTTCCTTATATGCCATATGCACAT   2880
   AGACGAATCTAGGATTTGATATTTACAAGTTTCTATGTCGACGTCATATTAATATCAATA   2940
   ATAATTAGATTGACAATCACATATTTATAATATTAAGTCGATAACTTTCTTCTTTGTATA   3000
   GGTTGGAAAAGTAATGGTAAACGAGCAGGACTCCTTTTTCTTTTTTTTGTAAATAATTAA   3060
   CAGTTGTGAGATTTTATGTTTGTGACTTCATGTCATAAACATTTTGATGTGTGATTAAGA   3120
```

도면5b


TTGACATTTCCAATTGTGCGAGTCTAAAATTACTATATGTGAAAATAGTGATATTATTGA 3180
TTATTCGTATTTTTTCATCTTCTTTCTCCTGTTAAAGTTTTATCTACTTTTTATTCATCA 3240
GGTCTTGAGAAAAAGTAGAATCATGGAAAAACGAAAAGATATTGAAGAAGCAAACAACTC 3300
M E K R K D I E E A N N S 13
ATTGGTATGTTATTTTATAGAGTAAACTGTAAAGTATTGAATTATAGATATGTGGCTTTA 3360
L 14
AAATGTATTATTTTGGCAGGTGTTATTTTCTGCTCTTAGCAAGGACATTGCCAATGTTCT 3420
V L F S A L S K D I A N V L 28
AATTTTCCTAGAGAATGAGGAAAATCAAAAAGCTCTTGACAAAGATCAAGTTGAAAAGCT 3480
I F L E N E E N Q K A L D K D Q V E K L 48
AAAATTGAAAATGGCATTTATTTGTACATATGTTCAGCTTTCTTATTCCGATTTTGAGCA 3540
K L K M A F I C T Y V Q L S Y S D F E Q 68
GTTTGAAGATATAATGACTAGAAATAGACAAGAGGTTGAGAATCTGCTTCAATCACTTTT 3600
F E D I M T R N R Q E V E N L L Q S L L 88
GGATGATGATGTCCTTACTAGCCTCACCAGTAATATGGATGACTGTATCAGCTTGTATCA 3660
D D D V L T S L T S N M D D C I S L Y H 108
TCGTTCTTATAAATCAGATGCCATCATGATGGATGAGCAATTGGACTTCCTCCTCTTGAA 3720
R S Y K S D A I M M D E Q L D F L L L N 128
TCTGTATCATCTATCCAAGCATCACGCTGAAAAGATATTTCCTGGAGTGACTCAATATGA 3780
L Y H L S K H H A E K I F P G V T Q Y E 148
AGTTCTTCAGAATGTATGTGGCAACATAAGAGATTTCCATGGGTTGATACTGAATGGTTG 3840
V L Q N V C G N I R D F H G L I L N G C 168
CATTAAGCATGAGATGGTTGAGAATGTCTTACCTCTGTTTCAACTCATGGCTGAAAGAGT 3900
I K H E M V E N V L P L F Q L M A E R V 188
AGGACACTTCCTTTGGGAGGATCAGACTGATGAAGACTCTCGGCTCTCCGAGCTAGATGA 3960
G H F L W E D Q T D E D S R L S E L D E 208
GGATGAACACAATGATAGAGACTCTCGACTCTTCCAGCTAACACATCTACTCTTGAAGAT 4020
D E H N D R D S R L F Q L T H L L L K I 228
TGTTCCAACTGAACTGGAGGTTATGCACATATGTTATACAAATTTGAAAGCTTCAACTTC 4080
V P T E L E V M H I C Y T N L K A S T S 248
AGCAGAAGTTGGACGCTTCATTAAGAAGCTCCTGGAAACCTCACCGGATATTCTCAGAGA 4140
A E V G R F I K K L L E T S P D I L R E 268
ATATATCATTCAACTACAAGAGCATATGTTAACTGTTATTCCCCCTAGCACTTTAGGGGC 4200
Y I I Q L Q E H M L T V I P P S T L G A 288
TCGAAACATTCATGTCATGATGGAATTCCTATTACTTATTCTTTCTGATATGCCCAAGGA 4260
R N I H V M M E F L L L I L S D M P K D 308
CTTTATTCATCATGACAAACTTTTTGATCTCTTGGCTCATGTTGGAACACTTACCAGGGA 4320
F I H H D K L F D L L A H V G T L T R E 328
GGTATCGACTCTTGTACGTGACTTGGAAGAGAAATTAAGGAATAAAGAGGGTAATAACCA 4380
V S T L V R D L E E K L R N K E G N N Q 348
AACAAATTGTGCAACCCTAGACTTGCTGGAAAATATTGAACTCCTCAAGAAAGATCTCAA 4440
T N C A T L D L L E N I E L L K K D L K 368
ACATGTTTATCTGAAAGCCCCAAATTCATCTCAATGTTGCTTCCCCATGAGTGATGGACC 4500
H V Y L K A P N S S Q C C F P M S D G P 388
ACTCTTCATGCATCTTCTACACATGCACTTAAATGATTTGCTAGATTCTAATGCTTATTC 4560
L F M H L L H M H L N D L L D S N A Y S 408
AATTTCTTTGATAAAGGAAGAAATCGAGTTGGTGAGTCAAGAACTGGAATTCATAAGATC 4620
I S L I K E E I E L V S Q E L E F I R S 428
ATTCTTTGGGGATGCTGCTGAGCAAGGATTGTATAAAGATATCTGGGCACGTGTTCTAGA 4680
F F G D A A E Q G L Y K D I W A R V L D 448
TGTGGCTTATGAGGCAAAAGATGTCATAGATTCAATTATTGTTCGAGATAATGGTCTCTT 4740
V A Y E A K D V I D S I I V R D N G L L 468
ACATCTTATTTTCTCACTTCCCATTACCATAAAGAAGATCAAACTTATCAAAGAAGAGAT 4800
H L I F S L P I T I K K I K L I K E E I 488

도면5c

```
CTCTGCTTTAGATGAGAACATTCCCAAGGACAGAGGTCTAATCGTTGTGAACTCTCCCAA   4860
  S  A  L  D  E  N  I  P  K  D  R  G  L  I  V  V  N  S  P  K    508
GAAACCAGTTGAGAGAAAGTCATTGACAACTGATAAAATAATTGTAGGTTTTGAGGAGGA   4920
  K  P  V  E  R  K  S  L  T  T  D  K  I  I  V  G  F  E  E  E    528
GACAAACTTGATACTTAGAAAGCTCACCAGTGGACCCGCAGATTTAGATGTCATTTCGAT   4980
  T  N  L  I  L  R  K  L  T  S  G  P  A  D  L  D  V  I  S  I    548
CACCGGTATGCCGGGTTCAGGTAAAACTACTTTGGCATACAAAGTATACAATGATAAGTC   5040
  T  G  M  P  G  S  G  K  T  T  L  A  Y  K  V  Y  N  D  K  S    568
AGTTTCTAGACATTTTGACCTTCGTGCATGGTGCACGGTCGATCAAGGATATGACGACAA   5100
  V  S  R  H  F  D  L  R  A  W  C  T  V  D  Q  G  Y  D  D  K    588
GAAGTTGTTGGATACAATTTTCAGTCAAGTTAGTGGCTCAGATTCAAATTTGAGTGAGAA   5160
  K  L  L  D  T  I  F  S  Q  V  S  G  S  D  S  N  L  S  E  N    608
TATTGATGTTGCTGATAAATTGCGGAAACAACTGTTTGGAAAGAGGTATCTTATTGTCTT   5220
  I  D  V  A  D  K  L  R  K  Q  L  F  G  K  R  Y  L  I  V  L    628
AGATGATGTGTGGGATACTACTACATTGGATGAGTTGACAAGACCTTTTCCTGAAGCTAA   5280
  D  D  V  W  D  T  T  T  L  D  E  L  T  R  P  F  P  E  A  K    648
GAAAGGAAGTAGGATTATTTTGACAACTCGAGAAAAGGAAGTGGCTTTGCATGGAAAGCT   5340
  K  G  S  R  I  I  L  T  T  R  E  K  E  V  A  L  H  G  K  L    668
GAACACTGATCCTCTTGACCTTCGATTGCTAAGACCAGATGAAAGTTGGGAACTTTTAGA   5400
  N  T  D  P  L  D  L  R  L  L  R  P  D  E  S  W  E  L  L  E    688
GAAAAGGACATTTGGTAATGAGAGTTGCCCTGATGAACTATTAGATGTCGGTAAAGAAAT   5460
  K  R  T  F  G  N  E  S  C  P  D  E  L  L  D  V  G  K  E  I    708
AGCCGAAAATTGTAAAGGGCTTCCTTTGGTGGCTGATCTGATTGCTGGAGTCATTGCTGG   5520
  A  E  N  C  K  G  L  P  L  V  A  D  L  I  A  G  V  I  A  G    728
GAGGGAAAAGAAAAGGAGTGTGTGGCTTGAAGTTCAAAGTAGTTTGAGTTCTTTTATTTT   5580
  R  E  K  K  R  S  V  W  L  E  V  Q  S  S  L  S  S  F  I  L    748
GAACAGTGAAGTGGAAGTGATGAAAGTTATAGAATTAAGTTATGACCATTTACCACATCA   5640
  N  S  E  V  E  V  M  K  V  I  E  L  S  Y  D  H  L  P  H  H    768
CCTCAAGCCATGCTTGCTTCACTTTGCAAGTTGGCCGAAGGACACTCCTTTGACAATCTA   5700
  L  K  P  C  L  L  H  F  A  S  W  P  K  D  T  P  L  T  I  Y    788
TTTGTTGACTGTTTATTTGGGTGCTGAAGGATTTGTGGAAAAGACGGAGATGAAGGGTAT   5760
  L  L  T  V  Y  L  G  A  E  G  F  V  E  K  T  E  M  K  G  I    808
AGAAGAAGTGGTGAAGATTTATATGGATGATTTAATTTCCAGTAGCTTGGTAATTTGTTT   5820
  E  E  V  V  K  I  Y  M  D  D  L  I  S  S  S  L  V  I  C  F    828
CAATGAGATAGGTGATATACTGAATTTCCAAATTCATGATCTTGTGCATGACTTTTGTTT   5880
  N  E  I  G  D  I  L  N  F  Q  I  H  D  L  V  H  D  F  C  L    848
GATAAAAGCAAGAAAGGAAAATTTGTTTGATCGGATAAGATCAAGTGCTCCATCAGATTT   5940
  I  K  A  R  K  E  N  L  F  D  R  I  R  S  S  A  P  S  D  L    868
GTTGCCTCGTCAAATTACCATTGATTATGATGAGGAGGAGGAGCACTTTGGGCTTAATTT   6000
  L  P  R  Q  I  T  I  D  Y  D  E  E  E  E  H  F  G  L  N  F    888
TGTCATGTTCGATTCAAATAAGAAAAGGCATTCTGGTAAACACCTCTATTCTTTGAGGAT   6060
  V  M  F  D  S  N  K  K  R  H  S  G  K  H  L  Y  S  L  R  I    908
AAATGGAGACCAGCTGGATGACAGTGTTTCTGATGCATTTCACCTAAGACACTTGAGGCT   6120
  N  G  D  Q  L  D  D  S  V  S  D  A  F  H  L  R  H  L  R  L    928
TATTAGAGTGTTGGACCTGGAACCCTCTTTAATCATGGTGAATGATTCTTTGCTGAATGA   6180
  I  R  V  L  D  L  E  P  S  L  I  M  V  N  D  S  L  L  N  E    948
AATATGCATGTTGAATCATTTGAGGTACTTAAGAATTCGGACACAAGTTAAATATCTGCC   6240
  I  C  M  L  N  H  L  R  Y  L  R  I  R  T  Q  V  K  Y  L  P    968
TTTCTCTTTCTCAAACCTCTGGAATCTAGAAAGTCTGTTTGTGTCTAACAAAGGATCAAT   6300
  F  S  F  S  N  L  W  N  L  E  S  L  F  V  S  N  K  G  S  I    988
CTTGGTACTATTACCGAGAATTTTGGATCTTGTAAAGTTGCGAGTGCTGTCCGTGGGTGC   6360
  L  V  L  L  P  R  I  L  D  L  V  K  L  R  V  L  S  V  G  A   1008
```

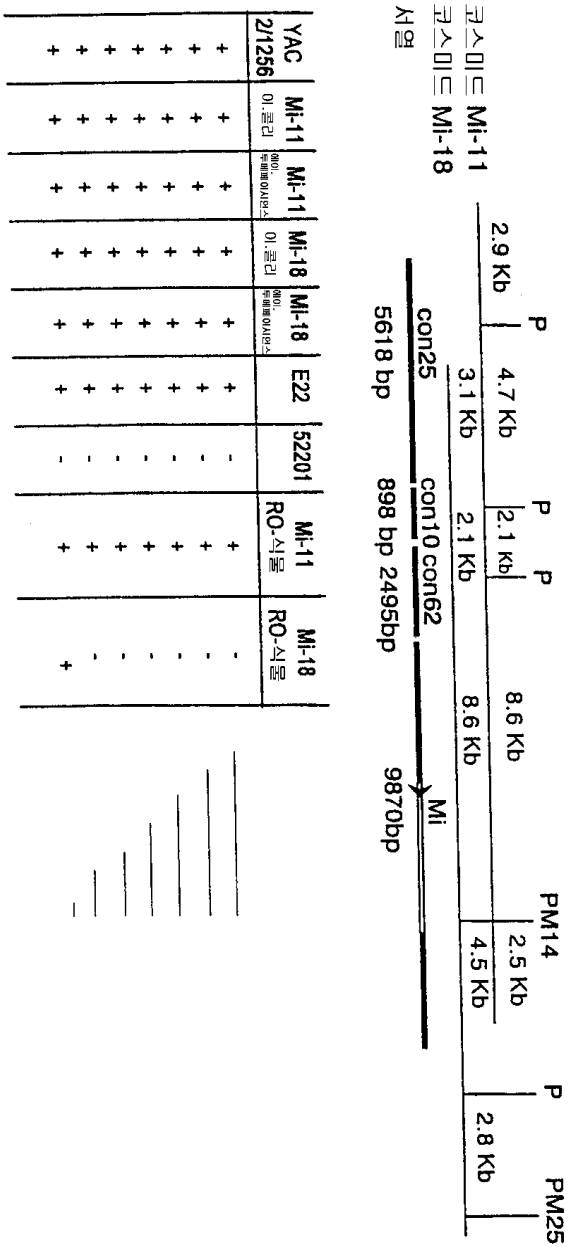
도면5d

```
TTGTTCTTTCTTTGATATGGATGCAGATGAATCAATATTGATAGCAAAGGACACAAAGTT  6420
  C  S  F  F  D  M  D  A  D  E  S  I  L  I  A  K  D  T  K  L  1028
AGAGAACTTGAGAATATTAGGGGAACTGTTGATTTCCTATTCGAAAGATACAATGAATAT  6480
  E  N  L  R  I  L  G  E  L  L  I  S  Y  S  K  D  T  M  N  I  1048
TTTCAAAAGGTTTCCCAATCTTCAGGTGCTTCAGTTTGAACTCAAGGAGTCATGGGATTA  6540
  F  K  R  F  P  N  L  Q  V  L  Q  F  E  L  K  E  S  W  D  Y  1068
TTCAACAGAGCAACATTGGTTCCCGAAATTGGATTGCCTAACTGAACTAGAAACACTCTG  6600
  S  T  E  Q  H  W  F  P  K  L  D  C  L  T  E  L  E  T  L  C  1088
TGTAGGTTTTAAAAGTTCAAACACAAACCACTGTGGGTCCTCTGTTGCGACAAATCGGCC  6660
  V  G  F  K  S  S  N  T  N  H  C  G  S  S  V  A  T  N  R  P  1108
GTGGGATTTTCACTTCCCTTCAAATTTGAAAGAACTGTTGTTGTATGACTTTCCTCTGAC  6720
  W  D  F  H  F  P  S  N  L  K  E  L  L  L  Y  D  F  P  L  T  1128
ATCCGATTCACTATCAACAATAGCGAGACTGCCCAACCTTGAAAATTTGTCCCTTTATGA  6780
  S  D  S  L  S  T  I  A  R  L  P  N  L  E  N  L  S  L  Y  D  1148
TACAATCATCCAGGGAGAAGAATGGAACATGGGGGAGGAAGACACTTTTGAGAATCTCAA  6840
  T  I  I  Q  G  E  E  W  N  M  G  E  E  D  T  F  E  N  L  K  1168
ATTTTTGAACTTGCGTCTACTGACTCTTTCCAAGTGGGAGGTTGGAGAGGAATCCTTCCC  6900
  F  L  N  L  R  L  L  T  L  S  K  W  E  V  G  E  E  S  F  P  1188
CAATCTTGAGAAATTAAAACTGCAGGAATGTGGTAAGCTTGAGGAGATTCCACCTAGTTT  6960
  N  L  E  K  L  K  L  Q  E  C  G  K  L  E  E  I  P  P  S  F  1208
TGGAGATATTTATTCATTGAAATTTATCAAAATTGTAAAGAGTCCTCAACTTGAAGATTC  7020
  G  D  I  Y  S  L  K  F  I  K  I  V  K  S  P  Q  L  E  D  S  1228
TGCTCTCAAGATTAAGAAATACGCTGAAGATATGAGAGGAGGGAACGAGCTTCAGATCCT  7080
  A  L  K  I  K  K  Y  A  E  D  M  R  G  G  N  E  L  Q  I  L  1248
TGGCCAGAAGAATATCCCCTTATTTAAGTAGCATTTTGGTTGAACTTTGCTTGGTGATAT  7140
  G  Q  K  N  I  P  L  F  K  ---                               1257
TGTATATGATTAAAATATCCTGTGATGAGATTCCTCTTAGTTTCTTTTAACAAAAAATAT  7200
AATTTTTATAAGTACACATATCGTTTGTTAATTTGTCCATTTGTGATTGCAAGTCACACA  7260
TGAGGTATGTTCGTATTATGGGTTTCAACTTGATCAGACGTAATTTTAAGATAAGTGCTT  7320
ATATGATGTTGCATGCCAGATGGAAGTGACTATGTGAAGTTTATATTTTAAACATTAATC  7380
TTGTATACCAAACTACTATTCCTATGCTATGTTGTTTGCCATTGTCGTTCTCTCTTTATT  7440
TTTTTTCTTTCCATTCACACACACATTAATTTTCTAGTAGACCGCATATTACTACATCTG  7500
TATTGTCCGTATACAAGACGAATCCAGGATTTGATGTTTACAAGTATTTGTGAAGAATCC  7560
AGGATTTGATGTTTACAAGACAATTAGATTCATATATGTATAGGATTTTGACAGAAACTG  7620
AGGGATTCACATGACAATTACTCTGTGGATTTGCCTTTGGCTGTCCAAACCTCCTTTGTG  7680
TCTAACTTCGTCTGAAGTCCCATTTATATGCTCAAAGCTCAGTCAAGGTACTGATTCAAA  7740
AGCTAGGCTGTGAAGTAAACTTTAAAATGATATTGCTGCAAAGTCGCTCAACAAAGGGTC  7800
ATAACCATCACTACAACTACACAAGCTCAAGCAAGTAAACGCGGGTGAAAGATTAACATA  7860
GATCGCTATCCCCTGCAAAAGCTAAGGAAAGCATCTCTAACTTCTTAGCATGTACTCAAA  7920
CACACGATCTGTAAGGATGCCAGAAAGAGAAAGTTACGTTGCCGCAATTCCTTACAGTGT  7980
TGCACAATGTCCCCAAAACCAACATCACACTACAAAAAAAGGCTCAAATTCTGGGGGTTA  8040
TAATTAGACGGTCAATAACCCCTGCAATTTAGTGTTGTGGAGGTTGAATAAACTCCTCCA  8100
ATTAGGAGTGTCACAATTAAGTCGCGTGGGATTCTTGGCACATCCCGGTAAGGTTAACTA  8160
GCGGGGGTTTTGAACCCCAACCGCATTTCAAACTAGGAGTCGAAACCCCAACGATTTGTG  8220
AACTCGGGGGAGTCAAAAACCCCCGCAATAAATGATTTTTACATTAAAATTAATAGGAGC  8280
TTGGACCCCTGTGATTTATGAAATATAACTTTTTGTAGCATTTGCCAGAAATATTCAATT  8340
TTAGATACTAATAATAAATTAATTAACTAACATGTGCATCATTATTCAAAGGACATATTA  8400
GTATTAAGAAATAATACAATATTCAACACAAAAGTACCCAAACTCAAGATAGGATCAGTT  8460
TATGGAACTTCAACTAGTTTCACTATAATTATTGTCACTAACATCAGCTGGCTGCAAAGG  8520
AGAATACATAATAAGTGACTTTATCCAAACTCAAAATCATGGCTGAATGTAGTAAAACAC  8580
CAAAGATTATAATAATTTCCATTAATTATCATATACTACACAACAACAAACTTAAAACAA  8640
TATAGAAAAGGATTAAACCATTTACACAAGCAATGATTCTATACCATTTCAAAACGACAA  8700
CATACTGTACTACTAAACAAGACACCATCAAACTGATTTGGACAAATATTAACAATAGTT  8760
```

도면5e

```
AAAACATGAACAAAGAATCTCAGGTTTCTTGTCAGTAGAAAAGAGACAGACTAGGAACTG   8820
GAGTGCTATTTTTCTTATAAGAGACAATTAATGTTTACTTCTTTATATTTTGACTATAAG   8880
TTGATTGGTTATAATGTTTACGAGGTTGTATATAATCCGATGTTCAATGATATGACTTTC   8940
CTATTGACTGAAATGCTTGAACGCAAACAGTATATCTAGATTAAGAATGAGGACGAATTA   9000
CCTCTAGAGGCATGGGTAATGGAAGCATAACTCCTTGATAATGGTTGTTAGCCCACTGCA   9060
AGTCACAAAACAAAACATCCGTAATATTAACATACTAAGGTTGTAAGCACTAAACGACAA   9120
CAACTATGCCTCAATCCCAACTAAGTTGGAATCGACTATATGAATACTCACAATTTCGAT   9180
TTATAGACAAAGATACTAGTAGAAATGACGTCTTTCCTTTCTATGTTAACACTTGGACAG   9240
AGAATGTTAAAGACTTACAACAACAGAAAAGAGTTAAAATCATTTAATTGAGCAAGGATT   9300
TCAAAACGACAACACAATATACTCAATTTTTCGACGGAAACAACTGGTTGGACAACAGTG   9360
CTATTTGTAACTCCAATGAACAACACTGCAACGTACATGTATCTCATTGCACTAAATAAA   9420
TCCCGTTGAGAGTAACATATCAATAGTTACGAACAATATGATCACGACAAAGGATTGTAA   9480
GTACCACAGGACAAGTCATGCTTGCATGAAAAACGGATATGTAAAGAACCAAAATCCTGC   9540
TGCTGAAATAAGCAGTTATGATTATCCAAAAATCATGAATACACATGCACTTGAGTTTGT   9600
TCCAAGAAAAACACAACCAACTACTGTCGCAAGTGAAGATTCAAAAGTGACTATTGATGT   9660
TAATTCTTCCACAAGGTTGAATAATTTTGTCACTATAGGATTTAAGACGAAGAAGAAACA   9720
GGCGACAATTTTGTAAGCATAGACCTTCTTATGCAACTATGAGCTGGTATGCTATTCATT   9780
TTCTTTACTCGTAAAAATCGTTGATACTAAAGAATGCCAATCCAGTCCTGCTGAATAGGC   9840
GCCAGGTGACTGGTTGCTGTTAATAATTTT-3'                              9870
```

도면6



	YAC 2/1256	Mi-11 아 콜리	Mi-11 염색체 특이적 DNA 라이브러리	Mi-18 아 콜리	Mi-18 염색체 특이적 DNA 라이브러리	E22	52201	Mi-11 RO-식물	Mi-18 RO-식물
	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	+	+	+	+	+	+	-	+	+

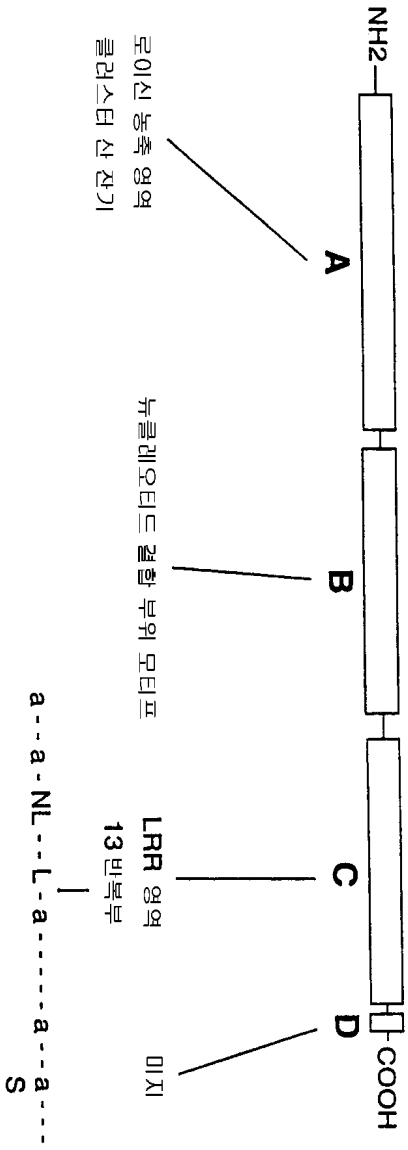
도면7A

```
MEKRKDIEEA NNSLVLFSAL SKDIANVLIF LENEENQKAL DKDQVEKLKL KMAFICTYVQ
LSYSDFEQFE DIMTRNRQEV ENLLQSLLDD DVLTSLTSNM DDCISLYHRS YKSDAIMMDE
QLDFLLLNLY HLSKHHAEKI FPGVTQYEVL QNVCGNIRDF HGLILNGCIK HEMVENVLPL
FQLMAERVGH FLWEDQTDED SRLSELDEDE HNDRDSRLFQ LTHLLLKIVP TELEVMHICY
TNLKASTSAE VGRFIKKLLE TSPDILREYI IQLQEHMLTV IPPSTLGARN IHVMMEFLLL
ILSDMPKDFI HHDKLFDLLA HVGTLTREVS TLVRDLEEKL RNKEGNNQTN CATLDLLENI
ELLKKDLKHV YLKAPNSSQC CFPMSDGPLF MHLLHMHLND LLDSNAYSIS LIKEEIELVS
QELEFIRSFF GDAAEQGLYK DIWARVLDVA YEAKDVIDSI IVRDNGLLHL IFSLPITIKK
IKLIKEEISA LDENIPKDRG LIVVNSPKKP VERKSLTTDK IIVGFEEETN LILRKLTSGP
ADLDVISITG MPGSGKTTLA YKVYNDKSVS RHFDLRAWCT VDQGYDDKKL LDTIFSQVSG
SDSNLSENID VADKLRKQLF GKRYLIVLDD VWDTTTLDEL TRPFPEAKKG SRIILTTREK
EVALHGKLNT DPLDLRLLRP DESWELLEKR TFGNESCPDE LLDVGKEIAE NCKGLPLVAD
LIAGVIAGRE KKRSVWLEVQ SSLSSFILNS EVEVMKVIEL SYDHLPHHLK PCLLHFASWP
KDTPLTIYLL TVYLGAEGFV EKTEMKGIEE VVKIYMDDLI SSSLVICFNE IGDILNFQIH
DLVHDFCLIK ARKENLFDRI RSSAPSDLLP RQITIDYDEE EEHFGLNFVM FDSNKKRHSG
KHLYSLRING DQLDDSVSDA FHLRHLRLIR VLDLEPSLIM VNDSLLNEIC MLNHLRYLRI
RTQVKYLPFS FSNLWNLESL FVSNKGSILV LLPRILDLVK LRVLSVGACS FFDMDADESI
LIAKDTKLEN LRILGELLIS YSKDTMNIFK RFPNLQVLQF ELKESWDYST EQHWFPKLDC
LTELETLCVG FKSSNTNHCG SSVATNRPWD FHFPSNLKEL LLYDFPLTSD SLSTIARLPN
LENLSLYDTI IQGEEWNMGE EDTFENLKFL NLRLLTLSKW EVGEESFPNL EKLKLQECGK
LEEIPPSFGD IYSLKFIKIV KSPQLEDSAL KIKKYAEDMR GGNELQILGQ KNIPLFK
//
```

도면7B

```
MAFICTYVQL SYSDFEQFED IMTRNRQEVE NLLQSLLDDD VLTSLTSNMD DCISLYHRSY
KSDAIMMDEQ LDFLLLNLYH LSKHHAEKIF PGVTQYEVLQ NVCGNIRDFH GLILNGCIKH
EMVENVLPLF QLMAERVGHF LWEDQTDEDS RLSELDEDEH NDRDSRLFQL THLLLKIVPT
ELEVMHICYT NLKASTSAEV GRFIKKLLET SPDILREYII QLQEHMLTVI PPSTLGARNI
HVMMEFLLLI LSDMPKDFIH HDKLFDLLAH VGTLTREVST LVRDLEEKLR NKEGNNQTNC
ATLDLLENIE LLKKDLKHVY LKAPNSSQCC FPMSDGPLFM HLLHMHLNDL LDSNAYSISL
IKEEIELVSQ ELEFIRSFFG DAAEQGLYKD IWARVLDVAY EAKDVIDSII VRDNGLLHLI
FSLPITIKKI KLIKEEISAL DENIPKDRGL IVVNSPKKPV ERKSLTTDKI IVGFEEETNL
ILRKLTSGPA DLDVISITGM PGSGKTTLAY KVYNDKSVSR HFDLRAWCTV DQGYDDKKLL
DTIFSQVSGS DSNLSENIDV ADKLRKQLFG KRYLIVLDDV WDTTTLDELT RPFPEAKKGS
RIILTTREKE VALHGKLNTD PLDLRLLRPD ESWELLEKRT FGNESCPDEL LDVGKEIAEN
CKGLPLVADL IAGVIAGREK KRSVWLEVQS SLSSFILNSE VEVMKVIELS YDHLPHHLKP
CLLHFASWPK DTPLTIYLLT VYLGAEGFVE KTEMKGIEEV VKIYMDDLIS SSLVICFNEI
GDILNFQIHD LVHDFCLIKA RKENLFDRIR SSAPSDLLPR QITIDYDEEE EHFGLNFVMF
DSNKKRHSGK HLYSLRINGD QLDDSVSDAF HLRHLRLIRV LDLEPSLIMV NDSLLNEICM
LNHLRYLRIR TQVKYLPFSF SNLWNLESLF VSNKGSILVL LPRILDLVKL RVLSVGACSF
FDMDADESIL IAKDTKLENL RILGELLISY SKDTMNIFKR FPNLQVLQFE LKESWDYSTE
QHWFPKLDCL TELETLCVGF KSSNTNHCGS SVATNRPWDF HFPSNLKELL LYDFPLTSDS
LSTIARLPNL ENLSLYDTII QGEEWNMGEE DTFENLKFLN LRLLTLSKWE VGEESFPNLE
KLKLQECGKL EEIPPSFGDI YSLKFIKIVK SPQLEDSALK IKKYAEDMRG GNELQILGQK
NIPLFK
//
```

도면8


NH2
A
B
C
D
COOH
로이신 농축 영역
클러스터 산 잔기
뉴클레오티드 결합 부위 모티프
LRR 영역
13 반복부
미지
a - - a - NL - - L - a - - - - a - - a - - -
S

도면9

