(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년12월16일
(11) 등록번호 10-1687008
(24) 등록일자 2016년12월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/70 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/701 (2013.01)
C12Q 2563/101 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0165163
(22) 출원일자 2015년11월25일
심사청구일자 2015년11월25일
(56) 선행기술조사문헌
Virus Research 143 (2009) 61-67
Journal of Plant Pathology (2005), 87(3), 173-177
Journal of Virological Methods 154 (2008) 48-55

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
임현섭
대전광역시 유성구 가정로 266, 14동 302호
서은영
대전광역시 유성구 덕명서로8번길 15, 301호
(74) 대리인
최규환

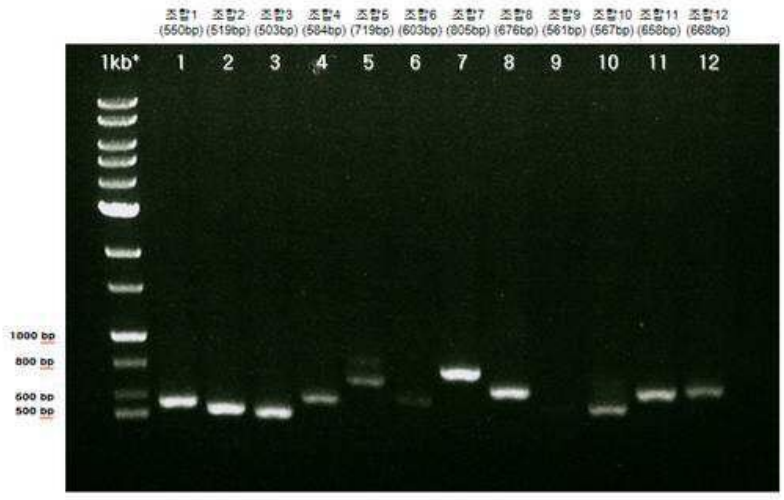
전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 **복숭아 황반 클로스테로바이러스 검출용 프라이머 세트 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 복숭아 황반 클로스테로바이러스의 검출용 프라이머 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로는 9개의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함하는 복숭아 황반 클로스테로바이러스(Peach yellow mottle closterovirus) 특이적 검출용 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트, 상기 프라이머 세트를 포함하는 복숭아 황반 클로스테로바이러스(Peach yellow mottle closterovirus) 특이적 검출용 키트 및 상기 프라이머 세트를 이용하여 복숭아 황반 클로스테로바이러스(Peach yellow mottle closterovirus)를 특이적으로 검출하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12Q 2563/103 (2013.01)
C12Q 2563/107 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ01113
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 국립농업과학원 GM작물개발사업단
연구사업명 차세대바이오그린21 사업
연구과제명 다입자성 바이러스를 이용한 옥수수 및 콩의 신속한 형질전환 기술 개발
기 여 율 1/1
주관기관 충남대학교 산학협력단
연구기간 2015.01.15 ~ 2017.12.31
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 및 서열번호 2의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 3 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 5 및 서열번호 6의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 7 및 서열번호 8의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 13 및 서열번호 14의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 15 및 서열번호 16의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 19 및 서열번호 20의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 21 및 서열번호 22의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 및 서열번호 23 및 서열번호 24의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함하는 복숭아 황반 클로스테로바이러스(Peach yellow mottle closterovirus) 특이적 검출용 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 1 및 서열번호 2의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 3 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 5 및 서열번호 6의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 7 및 서열번호 8의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 13 및 서열번호 14의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 15 및 서열번호 16의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 19 및 서열번호 20의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 21 및 서열번호 22의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 및 서열번호 23 및 서열번호 24의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함하는 복숭아 황반 클로스테로바이러스(Peach yellow mottle closterovirus) 특이적 검출용 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 따른 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 복숭아 황반 클로스테로바이러스(Peach yellow mottle closterovirus) 특이적 검출용 키트.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함하는 것을 특징으로 하는 복숭아 황반 클로스테로바이러스(Peach yellow mottle closterovirus) 특이적 검출용 키트.

청구항 5

식물 시료에서 총 RNA를 분리하는 단계;

상기 분리한 총 RNA를 주형으로 하고, 제1항 또는 제2항에 따른 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 복숭아 황반 클로스테로바이러스(Peach yellow mottle closterovirus)를 특이적으로 검출하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열은 형광, 인광 또는 방사성 측정을 발하는 물질로 표지되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 증폭 산물의 검출은 DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 복숭아 황반 클로스테로바이러스 검출용 프라이머 세트 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 9개의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함하는 복숭아 황반 클로스테로바이러스(Peach yellow mottle closterovirus) 특이적 검출용 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트, 상기 프라이머 세트를 포함하는 복숭아 황반 클로스테로바이러스(Peach yellow mottle closterovirus) 특이적 검출용 키트 및 상기 프라이머 세트를 이용하여 복숭아 황반 클로스테로바이러스(Peach yellow mottle closterovirus)를 특이적으로 검출하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 기후 온난화에 따른 생태계 변화, 식물과 바이러스의 진화 및 변이, 그리고 농산물 교역 확대에 따라 돌발 바이러스 및 새로운 바이러스 병의 출현 및 위험도는 점차 높아지고 있다. 지금까지 보고된 식물 바이러스는 전 세계적으로 약 1,000여 종이 알려져 있으며, 아직까지도 여러 가지 식물에서 새로운 바이러스들이 지속적으로 보고되고 있다. 현재 우리나라에서는 약 100여 종의 바이러스가 여러 가지 식물에서 보고되어 있다. 그러나 발생하는 바이러스에 대한 상세한 조사가 일부 작물에서만 이루어졌고, 대부분의 작물에서는 단편적인 조사만 이루어져 있다. 그리하여 아직까지 많은 주요 작물에서 어떤 바이러스 병이 발생하고 있는지 구체적으로 파악되지 못하고 있는 실정이다.

[0003] 식물병이란 식물기주에 대한 병원균 또는 환경요인의 지속적인 영향의 결과로 나타난 기주세포와 조직의 기능이상으로서, 식물의 형태, 생리 등에 비정상적인 변화가 나타난 상태를 말하며, 그 결과 나타난 경제적 가치의 감소를 포함하기도 한다. 이러한 식물병을 일으키는 원인으로는 곰팡이(Fungi), 박테리아(Bacteria), 선충(Nematode), 마이코플라스마(Mycoplasma), 원생동물(Protozoa) 및 바이러스(Virus)가 있다. 그러나, 바이러스는 크기가 1㎛ 보다 작은 병원체로 광학현미경으로도 그 실체를 관찰할 수 없고, 전자현미경을 필요로 하기 때문에, 육안으로 식물체에 발생한 바이러스를 진단하는 것은 곤란하다.

[0004] 바이러스 진단법으로 과거에는 전자현미경과 혈청학적 방법을 주로 사용하였다. 전자현미경을 이용한 방법은 바이러스의 존재를 확인할 수는 있지만 형태적 특징으로 종을 진단하기는 불가능하다. 혈청학적 방법 중 ELISA 방법은 가장 일반적으로 사용되는 진단 방법이나 PCR을 이용한 진단보다 검출 감도가 약 1,000배 정도 낮으며, 항체와 검사 시료의 비특이적 반응으로 진단에 실패하는 경우가 종종 발생한다. BPMV(Bean pod mottle virus)의 경우에도 바이러스 진단을 위해 ELISA를 주로 사용하고 있으나, 식물체 추출물과 항혈청의 비특이적 반응으로 인해 오진단하는 경우가 종종 있으며, 검사 시료에서 BPMV의 감염률이 낮은 경우에는 진단에 실패할 가능성이 크다. 또한, 검역 현장에서는 하나의 검사 시료에 대해 다양한 병원체의 진단을 수행해야하므로 여러 가지 진단법을 사용할 경우 많은 노동력과 검사 비용이 소요된다. 이에 따라 바이러스를 진단하기 위한 다양한 방법들이 개발되어 사용되고 있다. 특히, 복숭아 식물에 병을 일으키는 바이러스에 대한 연구가 필요한 실정이다.

[0005] 한편, 한국등록특허 제1093239호에는 마늘 알렉시바이러스의 진단용 특이 프라이머 및 이의 용도에 대해 개시되어 있고, 한국등록특허 제1491789호에는 강낭콩꼬투리얼룩바이러스 진단용 프라이머 및 이의 용도가 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 '복숭아 황반 클로스테로바이러스 검출용 프라이머 세트 및 이의 용도'에 대해서는 밝혀진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자는 전자현미경 및 혈청학적 방법으로는 복숭아 황반 클로스테로바이러스에 감염된 식물을 진단하기 어렵기 때문에, 복숭아 황반 클로스테로바이러스를 특이적으로 검출할 수 있는 12개의 프라이머 세트를 제작하여, 이를 상기 바이러스에 감염된 식물 시료의 진단에 적용하여 특이성을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 9개의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함하는 복숭아 황반 클로스테로바이러스(Peach yellow mottle closterovirus) 특이적 검출용 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 복숭아 황반 클로스테로바이러스(Peach yellow mottle closterovirus) 특이적 검출용 키트를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 이용하여 복숭아 황반 클로스테로바이러스(Peach yellow mottle closterovirus)를 특이적으로 검출하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 복숭아 황반 클로스테로바이러스(Peach yellow mottle closterovirus) 검출용 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트, 복숭아 황반 클로스테로바이러스 검출용 키트 및 PCR을 이용한 복숭아 황반 클로스테로바이러스 검출 방법을 이용하면, 복숭아 황반 클로스테로바이러스에 대한 감염 여부를 항혈청을 이용한 진단법에 비해 1000배 이상 정확하고, 빠르게 확인할 수 있으므로, 검역 현장에서 유용하게 이용될 수 있으며, 식물바이러스 PCR 진단 및 검출 키트의 산업화와 복숭아를 포함하는 숙주 식물 무병주 보급 및 품질 향상에 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 복숭아 황반 클로스테로바이러스 검출을 위해 설계한 프라이머 지도를 나타낸 것이다. 프라이머 위치는 복숭아 황반 클로스테로바이러스 게놈을 기준으로 작성된 것이다.

도 2는 복숭아 황반 클로스테로바이러스 검출용 프라이머 조합(표 1 참고)의 PCR 분석결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 3 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 5 및 서열번호 6의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 7 및 서열번호 8의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 13 및 서열번호 14의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 15 및 서열번호 16의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 19 및 서열번호 20의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 21 및 서열번호 22의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 및 서열번호 23 및 서열번호 24의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함하는 복숭아 황반 클로스테로바이러스(Peach yellow mottle closterovirus) 특이적 검출용 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 제공한다.

[0013] 본 발명의 복숭아 황반 클로스테로바이러스 검출용 프라이머 세트는 바람직하게는 상기 9개의 복숭아 황반 클로스테로바이러스 특이적 검출용 프라이머 세트로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상의 복숭아 황반 클로스테로바이러스 특이적 검출용 프라이머 세트를 포함하며, 가장 바람직하게는 9개의 상기 프라이머 세트, 즉, 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 세트; 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 세트; 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머 세트; 서열번호 7 및 서열번호 8의 프라이머 세트; 서열번호 13 및 서열번호 14의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 15 및 서열번호 16의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 19 및 서열번호 20의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 21 및 서열번호 22의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 및 서열번호 23 및 서열번호 24의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 모두 포함할 수 있다.

[0014] 상기 9개의 프라이머 세트를 동시에 이용하면 복숭아 황반 클로스테로바이러스를 더욱 정확하게 검출할 수 있다.

[0015] 상기 프라이머는 각 프라이머의 서열 길이에 따라, 서열번호 1 내지 서열번호 8, 서열번호 13 내지 서열번호 16 및 서열번호 19 내지 서열번호 24의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상, 25개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 서열번호 1의 프라이머(20개 올리고뉴클레오티드)는 서열번호 1의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있으며, 서열번호 2의 프라이머(21개 올리고뉴클레오티드)는 서열번호 2의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다. 상기 프라이머의 길이 및 서열은 연장 산물의 합성을 시작하도록 허용해야 한다. 프라이머의 구체적인 길이 및 서열은 요구되는 DNA 또는 RNA 표적의 복

합도(complexity)뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 의존할 것이다.

[0017] 본 명세서에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오티드는 또한 뉴클레오티드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)를 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)를 포함할 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 복숭아 황반 클로스테로바이러스(Peach yellow mottle closterovirus)의 특이적 검출용 키트를 제공한다.

[0019] 본 발명의 키트에서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 역전사효소(Reverse transcriptase), DNA 폴리머라제, dNTPs, 버퍼 등을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, PCR 완충액 제조 방법, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물이다. 안내서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨 및 키트를 포함하는 패키지의 표면상에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.

[0020] 또한, 본 발명은

[0021] 식물 시료에서 전체 RNA를 분리하는 단계;

[0022] 상기 분리한 전체 RNA를 주형으로 하고, 상기 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

[0023] 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 복숭아 황반 클로스테로바이러스(Peach yellow mottle closterovirus)를 특이적으로 검출하는 방법을 제공한다.

[0024] 본 발명의 방법에서 식물 시료에서 전체 RNA를 분리하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, 트리 시약(Tri Reagent, MRC사)을 이용할 수 있다. 상기 분리된 전체 RNA를 주형으로 하고, 본 발명의 일 실시예에 따른 하나 이상의 프라이머 세트를 프라이머로 이용하여 RT(Reverse transcriptase)-PCR을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다. 이러한 PCR 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 상업적으로 이용가능한 키트를 이용할 수도 있다.

[0025] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열은 검출가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 일 구현 예에서, 상기 표지 물질은 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 표지 물질은 Cy-5 또는 Cy-3이다. 표적 서열의 증폭시 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다. 또한, 방사성 물질을 이용한 표지는 PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하면 증폭 산물이 합성되면서 방사성이 증폭 산물에 혼입되어 증폭 산물이 방사성으로 표지될 수 있다. 표적 서열을 증폭하기 위해 이용된 복숭아 황반 클로스테로바이러스 특이적 검출용 프라이머 세트는 상기에 기재된 바와 같다.

[0026] 본 발명의 방법은 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함한다. 상기 증폭 산물의 검출은 모세관 전기영동, DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 증폭 산물을 검출하는 방법 중의 하나로서, 겔 전기영동을 수행할 수 있으며, 겔 전기영동은 증폭 산물의 크기에 따라 아크릴아미드 겔 전기영동 또는 아가로스 겔 전기영동을 이용할 수 있다. 또한, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지되며, 이렇게 표지된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다. 또한, 방사성 측정 방법은 PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하여 증폭 산물을 표지한 후, 방사성 측정기구, 예를 들면, 가이거 계수기(Geiger counter) 또는 액체섬광계수기(liquid scintillation counter)를 이용하여 방사성을 측정할 수 있다.

[0027] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0028] **실험방법**

[0029] **1. 샘플의 채집 및 총 RNA 추출**

[0030] 식물 바이러스가 감염되었을 것으로 의심되는 138개 식물 샘플을 채집하였고, 모든 샘플을 각각 액체 질소를 이용하여 마쇄하였다. 마쇄한 모든 샘플은 초저온에서 보관하였다. 마쇄한 각각의 샘플을 동량으로 섞은 후 총 RNA를 추출하였으며, 총 RNA 추출은 트리 시약(Tri Reagent, MRC사)을 이용하여 제조사의 지시에 따라 추출하였다.

[0031] **2. 리보솜 RNA 제거, 이중 가닥 cDNA 합성, 라이브러리 제작 및 시퀀싱**

[0032] 추출된 총 RNA에서 Ribo-ZeroTM Magnetic Kit(plant leaf)(Epicentre)를 이용하여 리보솜 RNA를 제거하였다. 준비된 RNA는 짧은 단편으로 파쇄한 후, 이중 가닥 cDNA로 합성하였고, 합성된 이중 가닥 cDNA는 말단 수정(end-repair)하여 라이브러리 제작에 요구되는 클로닝을 위해서 어댑터(adapter)를 붙였다. 이러한 일련의 과정은 TrueqRNA 샘플 프렙 키트(Illumina)를 이용하여 진행하였다. BluePippin™ 2% 아가로스 겔 카세트(Sage Science)를 이용하여 정제된 적당한 크기의 삽입 DNA(insert DNA)를 PCR 증폭을 위해서 선발하였다. 최종적으로 라이브러리 제작에 적합한 삽입 DNA의 크기 및 양/질을 Agilent 2100 BioAnalyzer 2100(Agilent Technologies)를 이용하여 측정하였다. 라이브러리 제작이 완성되었으며, 라이브러리 절편 크기는 대략 350-450bp라는 것을 확인하였다. Illumina HiSeq2500을 이용하여 라이브러리를 시퀀싱 하였으며, 페어-엔드 시퀀싱(paired-end sequencing) 방법을 이용하여 약 40Gbp의 로우 데이터(raw data)를 생성하였다.

[0033] **3. 시퀀싱한 로우 데이터(raw data)의 가공 및 식물 바이러스 관련 콘티그(contig)의 제작**

[0034] 로우 데이터에서 양질의 데이터를 선발한 후, 식물 바이러스 관련 리드(reads)를 확보하여 콘티그를 만들었다. 이러한 일련의 과정은 데노보 합성 전사체 분석(de novo transcriptome analysis, SG-de novo Assembler) 방법을 통해서 진행되었다. 식물 바이러스 관련 염기서열을 갖는 약 7,000여 개의 콘티그를 확보하였다. 콘티그의 길이가 너무 짧거나(<500bp), 바이러스 관련 데이터베이스(DataBase)에서 비교했을 때 적용범위(coverage)가 낮은 데이터는 제거하여 최종 약 700여 개의 콘티그를 확보하였다.

[0035] **4. 프라이머 제작 및 전체 게놈 규명**

[0036] 바이러스 관련 데이터베이스(DataBase)에서 비교했을 때, 약 85-90% 이상의 상동성을 보이는 콘티그를 제거하여 약 150여 개의 콘티그를 확보하였고, 이들 각각을 데이터베이스를 통해서 가장 상동성이 높은 바이러스를 확인하였으며, 같은 바이러스에 높은 상동성을 보이는 콘티그들을 그룹으로 각각 만들었다. 각각의 그룹에 속하는 콘티그들은 해당 식물 바이러스 게놈을 레퍼런스 시퀀스(reference sequence)로 해서 정렬하여 그 위치를 확인하였다.

[0037] 이들 콘티그의 염기서열을 바탕으로 프라이머를 제작하였고, 제작된 프라이머를 이용하여 138개의 식물 샘플을 대상으로 PCR을 수행하였다. PCR 결과는 아가로스 겔 전기영동을 통해서 밴드를 확인하거나 밴드가 확인된 PCR 산물은 시퀀싱하여 염기서열을 확인하였다. 콘티그를 근거로 제작된 프라이머 세트의 PCR 결과를 통해서 얻어진 염기서열을 바탕으로 복숭아 황반 클로스테로바이러스의 총 염기서열(서열번호 25)을 확보하였다.

[0038] **5. 복숭아 황반 클로스테로바이러스 검출용 프라이머의 설계**

[0039] 신종바이러스로 예상되는 복숭아 황반 클로스테로바이러스를 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머를 제작하기 위하여, 복숭아 시료로부터 분리된 복숭아 황반 클로스테로바이러스의 게놈(genome)을 NCBI에서 BLAST한 후, 적용범위(coverage) 및 상동성(identity)이 다소 높은 유사바이러스를 선발하였다. 본 발명의 복숭아 황반 클로스테로바이러스는 기존에 밝혀진 리틀 체리 바이러스 1(*Little cherry virus 1*)와만 유사성을 보였다(coverage 100% 및 identity 78%). 따라서, 복숭아 황반 클로스테로바이러스와 리틀 체리 바이러스 1의 전체 게놈을 얼라이먼트(alignment)한 후, 복숭아 황반 클로스테로바이러스에 특이적으로 작용할 수 있는 부분에서 12개의 프라이머 세트를 제작하였다(표 1).

표 1

[0040] 본 발명의 복숭아 황반 클로스테로바이러스 검출용 프라이머

구분		서열 번호	서열	길이	Tm (℃)	위치
조합번호1	복숭아 황반 클로스테로바이러스-정방향87	1	CAC CTC TGT TGT CGA AAC CC	20	60.5	87-106
	복숭아 황반 클로스테로바이러스-역방향636	2	GAG TTT TGA CTC AGG GAC AGC	21	61.3	616-636
조합번호2	복숭아 황반 클로스테로바이러스-정방향305	3	GTG CTG ATC GTC TGA TCG ATG	21	61.3	305-325
	복숭아 황반 클로스테로바이러스-역방향823	4	GGT AGA CAT ATC CTG ACT TAT TC	23	59.3	801-823
조합번호3	복숭아 황반 클로스테로바이러스-정방향616	5	GCT GTC CCT GAG TCA AAA CTC	21	61.3	616-636
	복숭아 황반 클로스테로바이러스-역방향1118	6	CGG GCG TGA CCT GTC TGT G	19	63.8	1100-1118
조합번호4	복숭아 황반 클로스테로바이러스-정방향801	7	GAA TAA GTC AGG ATA TGT CTA CCC	24	61.8	801-824
	복숭아 황반 클로스테로바이러스-역방향1384	8	TAG GAT GTC CGA TGT CCG TC	20	60.5	1365-1384
조합번호5	복숭아 황반 클로스테로바이러스-정방향1843	9	TTA CAT AAA ACT GGC AAT TTA CTC	24	56.7	1843-1866
	복숭아 황반 클로스테로바이러스-역방향2561	10	ATA AAA TCA AGA CGA ATC GTC TG	23	57.5	2539-2561
조합번호6	복숭아 황반 클로스테로바이러스-정방향3549	11	AAT AGA AAA ATT TAT AAC TGG GCT G	25	57.6	3549-3573
	복숭아 황반 클로스테로바이러스-역방향4151	12	TCT TCC ATA GCA CTT AAA TTT CC	23	57.5	4129-4151
조합번호7	복숭아 황반 클로스테로바이러스-정방향4480	13	AAG TCT ATA TAT GAA GTG TTA TGC	24	56.7	4480-4503
	복숭아 황반 클로스테로바이러스-역방향5284	14	CAT TTG TAG TGT CTT CAC CTG C	22	60.3	5263-5284
조합번호8	복숭아 황반 클로스테로바이러스-정방향5263	15	GCA GGT GAA GAC ACT ACA AAT G	22	60.3	5263-5284
	복숭아 황반 클로스테로바이러스-역방향5938	16	CAC GAT TGG ATG TCA CTG AAA G	22	60.3	5917-5938
조합번호9	복숭아 황반 클로스테로바이러스-정방향9798	17	GTT TGA AAG GAA CAA TGC GAC C	22	60.3	9798-9819
	복숭아 황반 클로스테로바이러스-역방향10358	18	GAA CTA GAT TTC CAA AAA ATC	24	56.7	10335-10358
조합번호10	복숭아 황반 클로스테로바이러스-정방향12046	19	TTT TAT TCA TCT AAT GGC GAG TC	23	57.5	12046-12068
	복숭아 황반 클로스테로바이러스-역방향12612	20	ACG AAC TGA TCT CTA GTA TTA TC	23	57.5	12590-12612
조합번호11	복숭아 황반 클로스테로바이러스-정방향13917	21	GAA TTT ACT AAA TAG TAA TTT GAA TG	26	55.3	13917-13942
	복숭아 황반 클로스테로바이러스-역방향14574	22	CAA ATC GCT TAC TCC TAT C	22	58.4	14553-14574
조합번호12	복숭아 황반 클로스테로바이러스-정방향14089	23	TAT TGG ATA GGA ATT GGA AAC G	22	56.6	14089-14110
	복숭아 황반 클로스테로바이러스-역방향14756	24	TCA ACA GTA GTT AAG ACA CTA GG	23	59.3	14734-14756

[0041] 본 발명의 모든 프라이머 세트는 복숭아 황반 클로스테로바이러스 게놈을 기준으로 도 1과 같이 위치하였으며, 제작된 24개의 프라이머를 조합하여 PCR을 수행하였다. PCR 방법은 다음과 같다.

[0042] PCR: (1) 전-변성(Pre-denature) 94℃ 및 5분, (2) 변성(denature) 94℃ 및 30초, (3) 어닐링(annealing) 56℃ 및 30초, (4) 연장(extension) 72℃ 및 30초의 온도 및 시간조건, (2)~(4)는 30회 반복하여 PCR을 수행하였으며, 식물 시료로부터 제작한 cDNA를 주형으로 이용하였다. PCR 산물은 1% 아가로스 겔(agarose gel)의 각각의

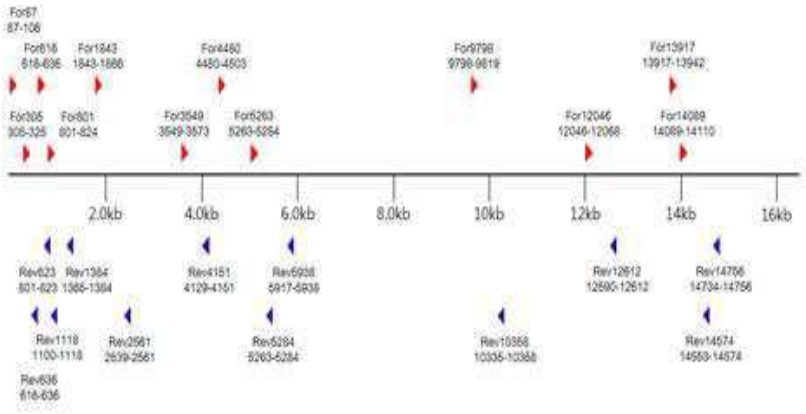
홈에 5㎕씩을 넣고 30분 동안 전기영동하였다.

[0043] **실시예 1. 복숭아 황반 클로스테로바이러스 검출용 프라이머의 특이성 확인**

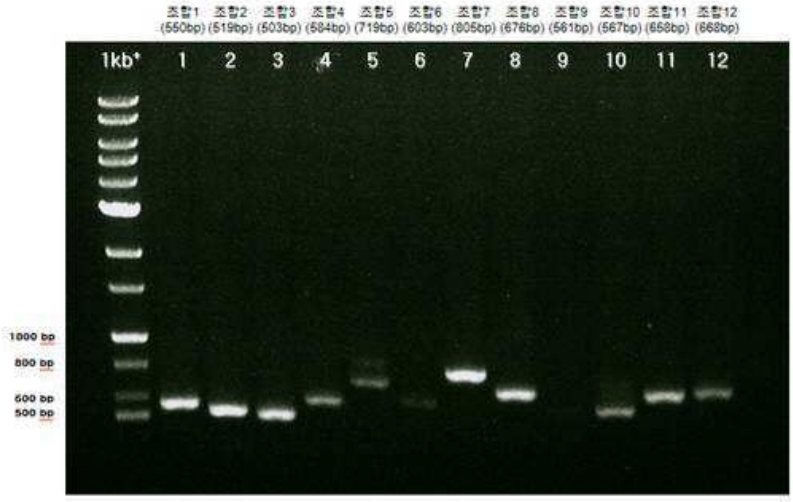
[0044] 상기 실험방법 5의 PCR 산물을 전기영동한 다음, EtBr(Ethidium bromide) 염색을 통해 PCR 산물의 밴드를 확인한 결과, 도 2에 개시된 바와 같이 각각의 PCR 산물은 프라이머 제작 시 예상했던 사이즈와 동일하게 나타내었다(프라이머 조합 1: 550bp, 조합 2: 519bp, 조합 3: 503bp, 조합 4: 584bp, 조합 7: 805bp, 조합 8: 676bp, 조합 10: 567bp, 조합 11: 658bp, 조합 12: 668bp).

도면

도면1



도면2



서 열 목 록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Primer set for diagnosing or detecting Peach yellow mottle closterovirus and uses thereof

<130> PN15107

<160> 25

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 1

cacctctgtt gtcgaaaccc 20

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 2

gagttttgac tcagggacag c 21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 3

gtgctgatcg tctgatcgat g 21

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 4

ggtagacata tcctgactta ttc 23

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 5

gctgtccctg agtcaaaact c 21

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 6

cgggcgtgac ctgtctgtg 19

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 7

gaataagtca ggatatgtct accc 24

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 8

taggatgtcc gatgtccgtc 20

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 9

ttacataaaa ctggcaattt actc 24

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 10

ataaaatcaa gacgaatcgt ctg 23

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 11

aatagaaaaa tttataactg ggctg 25

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 12

tcttccatag cacttaaatt tcc 23

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 13

aagtctatat atgaagtgtt atgc 24

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 14

catttgtagt gtcttcacct gc 22

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 15

gcaggtgaag acactacaaa tg 22

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 16

cacgattgga tgtcactgaa ag 22

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 17

gtttgaaagg aacaatgcga cc 22

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 18

gaactagatt tccaaaaaat c 21

<210> 19

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 19

ttttattcat ctaatggcga gtc 23

<210> 20

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 20

acgaactgat ctctagtatt atc 23

<210> 21

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 21

gaatttacta aatagtaatt tgaatg 26

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 22

caaatcgctt actcctatc 19

<210> 23

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 23

tattggatag gaattggaaa cg 22

<210> 24

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 24

tcaacagtag ttaagacact agg 23

<210> 25

<211> 16910

<212> DNA

<213> Peach yellow mottle closterovirus

<400> 25

ttttatctcc cagctttgtg cctaagagat attaaatcaa attttaaatt ttcgcaactt 60

tcctttcctg caatggcatc tcttttcacc tctgttgtcg aaaccccccа tttcacctgc 120

atttcaccca atataaaaat atcaaaaaca aaagttccta catctgcata cctcaagctg 180

atgaaacgcg aaattgaaaa atttcttgca ttggctgacg ctcgttctgc tccaaagatc 240

agcgttcctg ttactggtcc catcaccccc actgcagtga agacgttctc tgagtcttct 300

gattgtgctg atcgtctgat cgatgctctc cctcgattca atatcaaatt atctagggaa 360

gctgtttttg acaagcgtat gcacttgact aagaaccatg agaatactcg tgggttcttc 420

aaatgcatgc ctgttagcga acctcagccg atcctgaaac agcgtccggt taagacagct 480

gttcgcgctg caaaattatc atttaatgaa gcgttttcaa atgctgatgt tactgacagg 540

acatctaagt ccaaactcaa cactcctgct caactggcag ccctttttc acctgatatc 600

aaagttggcg cagttgctgt ccctgagtca aaactccatt ggacttatga cgcggacatc 660

atcagggctc aactccctcg tgggttgatt tgtgaaatct acgttccaaa tcctgtagac 720

aagctgttcc tcaagcttgt ttctagcttt gacaagaact tccctgaact tctgattgct 780

gaagttaaca ttcccaaacc gaataagtca ggatatgtct accctgttgt taactttgtt 840

atcgccccgt ctgacggtgt caaatcgaag ttgcagaggt cgttcaaact ctacagtcca 900

tctgggcact ttgaaaccct gattaactac ttaatcattc ataacactcg ccctttgaa 960

gacgtcgtgc aggctctaaa tctgtacaag cctgataggt ttcatattgc ccaacactat 1020

aggaactttt gtgtcaacca tctggtagat gttgggaaca atattctctt caactctggg 1080

agggctcttc gccgaccaac acagacaggt cacgcccgta aaccattttt acgcgctaat 1140

caggcaattc aaactgctaa ggtctatagt tctttttccg aattttctgt ggccttagag 1200

aaacaaaaag ccaccactgc tgcatcttct attcaatttg gtagcctcgt ttctgtggaa 1260

ttaccaaagg tggttaagga aaacatctct tatgcccaag cattgacatc gaacctttca 1320

attgatacga gacttttgag tcctaatacc aaagttacca ccaagacgga catcggacat 1380

cctattgcga agaaagagtc cggagctaaa tctgagctta cgaagcgggc gattgatatt 1440

gcctctcgtg ctaaaaattt ttcctcagat gaagtttttc ccacctcttt taaccaacaa 1500

attgatattt catctggtgg gtcgttagtt cgccatttct tgaatggagt ctgtaggtct 1560

ttcactctta atcgcagcga tgggcgagta tttaatatac tcaacaacaa gaatgcggct 1620

aaactgatgt tcaacctttc tttaaaacaa cataaattct atgttgatgg gtattgtaga 1680

accccttctg gaaaactctt ctccgaattt gacaacgggt tttgctggtt agacgctttt 1740

gccatgtttg ggaagatcat ccccactttt gtccctttg ttcctaactt gaatattggt 1800

tatatgctcg attccggatt accaaaatct tgtttgaagt atttacataa aactggcaat 1860

ttactctacc attttgatcc gaataaaatt aataaaattt ttcatcagaa tttaaatttc 1920

tttgttggtt ctgcaatcaa cgacaataaa gacatcttgg agtctgataa tattgatctg 1980

attgttgagg gtttcacaaa acaagttatt gccaaagctt accctaaatc cgacaaccag 2040

gccgtcacaa acattcttaa tcgtgtcggt tgtcgcataa acacttggtg tgatagaaag 2100

aatgatttga tgatttttgt ctacttaaat actagacaga agaaaattgt ctgtgactta 2160

tttcctcact taaaattcga attcaaggag acaactcaaa gtggtcatcc agtttttaat 2220

gttgtaagga ctgtgtcaaa ctttattctt tataagatgc aggagggtcg acactttgtt 2280

gactttggtg gtaatgttgg cactgtcatt actagtgaat gtgacgacgt gcatatttgc 2340

aatcctgttg ctgattctcg tgatgctaaa agacacgttg acaacggttt atttttagca 2400

aaaagtgttg gagttacaaa caatatatct gtttgcaaca aattggctca acattgcagt 2460

cataaatctg acagagctgt catggttgaa gtctatgaca tgacattgac cgagatgtgt 2520

caagctatgt tatctcatca gacgattcgt cttgatttta tgatgctttt acctggagat 2580

cttctcgaag acttcaacac gataacaatt tttgagggtg ggtgtaagat tactagagat 2640

ggagataaag tttactatta ttacggtgat gccgcagaag cttataccca tgaattgaat 2700

aatcttcgca acattatgac agacaatctt gtttgtgtta acggagttgc atttaagaaa 2760

actttagaga ccagttatgg tcctttccgt catttctcat tagttaaatt ggaaactttc 2820

ccaagtggta aagttgaatt cctcacaatg tacgataagt gtgaaaggaa taaaatgctt 2880

gtcaaagtac caatgagaaa cattaatgga atggtgactc tacatgattt gattgtggat 2940

cgatcaatgt tgatgaattt aattgagtat tgcgccaatt gcgttgaaaa ttttaacagg 3000

aaggggtttg aacatatcat gtctcaatac cgttctagaa agaattacgt tatttataat 3060

ggtaaggtca tccatgatca agttgacatt ccattagatt tattaccggg atttattggt 3120

gtttgcttat ctgagggaat acggctagct gaaaaagttc attttctagc aaagtactca 3180

tactatcagt actatgcccc cggaatattc aattgtatga tttacagtat tcgccaattg 3240

ttcttatatt gtaagacaat ttgctatgaa aaggttttgg atctgatgga tttcttattc 3300

ggggaatgga ttactaccac agctcggaat tcgggaacga agatttttga tatatcagca 3360

tctgtagttg tcaaacaaag tttgatgata agtgcagatg gtgatgttca ttcaattttt 3420

acagagaatt ttgaaaaata tcaagagaga tgcgccgatc ttagtaacta tcattctgat 3480

tatgacgttg cttcaaactt atctgatgct gtcgattcgg gaggaatggg tgtctcagat 3540

ttaaaaataa tagaaaaatt tataactggg ctggctgaat taggattcgg tgaacgaaat 3600

gttctaagat tttcagcaaa gttgttctct tgtttcgact ggttgcgtcg tcaagtagat 3660

gatgaatcac tacttcgaaa agtattgaga ttcttcaagt ctttgtttac tctttcaact 3720

ttgaagaata tattgctttc cccttatctg attattaaat ggatttgtga ttgtggaaaa 3780

gctggtttta aaacctttgt atccggtctt ttgaaagttt tccaaacatt ttccgaccga 3840

ataaatttct tggtcaaaat cgcacttgac tcagatgaag acttcaagaa tgaggtcgtg 3900

tctgttttta ggaaacatga tctagaatgt ttagataata ctttagggat agttatcaca 3960

aaagactttg atgttgtagt gtctgatgaa ctcacaaaga aaaagatttt gaatatcatc 4020

gatgatgaac tttcttatgg gcgtgggata gaagtcgaca tagatcaagt taaatctgaa 4080

atcttagcta acacttcagc agataatgta ccaatagtaa caaaagttgg aaatttaagt 4140

gctatggaag acgcattaga aaataatatc agacattcag ttcaagatat tcaacttaga 4200

aaagaagtta ttaggatgat cgatgaagat cttgaagccg ccttggaatg tggtggtggt 4260

ggtaaatcta aattgtgtga aaaaattttt aattatatat tagatcgttt agatttattc 4320

aagcaatata ttacttcaaa attcggatgg ggtttgtatg atattctact cgaatcgttt 4380

gacgaggtta aagttcgtaa gtcatccatt ctttgtgctt attatgatga tttgtcagat 4440

atatacactg ataatggttt ggttttgaaa ccattgaata agtctatata tgaagtgtta 4500

tgcgcccgat tgagcgcaaa aatcaggttc gtttacagaa atttcatgac tgagttcata 4560

ccgagtatgc gatttttgag tgagattaaa agaaggatat tttcttatat taataacgct 4620

gagaatagac aggctatttt cgacaaatgc ttagatgcct ctttgacaat ttcttgcacg 4680

gctgcagctc aagtttttgg aggaaatttt tgcccagtta gactgatact atcgccggtt 4740

ttaagtgcgt atttgaagag agcttggaca aaatattatg gtggacatga tgggatgatt 4800

agcactataa ttgcatctac cttgttaggg ggtggcaatt atggcgtaaa taagttggcc 4860

atagtttccg gttcttattt ccactttaaa ccttacttct gtaataaagt catgcagtat 4920

acatctttta agaagtatgt tattgattat atcgctcgtc acaatttttt cacgacaatg 4980

aagacatcaa ttgggctgat aacttctcca gcgggcgttg ccgttttaac agttggagta 5040

ctgtctgggg taaacccttt tgcggcaatt ttctttttg tagcggctag ccactacgat 5100

aaattttatc aaaaattggt tcgcgtctct aatatagcta ttgcaactgg agattcatta 5160

ctccacttaa aacctattgg agctttgaag aaagcaatta ataaggtgaa gagaatgaag 5220

tttaagaatt ccaacatcac tcaagattca aaggttgtat cggcaggtga agacactaca 5280

aatgttgctg atgacaaaga agatttgaaa tctgagtcat ccaacatccc ttttgaagaa 5340

gtagagaacg aagatgacga taatgagatt gtcgacatct atatgcggag atctccgaag 5400

aagaaaatgc ctatacagaa ttatattgcc caatctaatg aacccggagt taaacaagct 5460

ttaaaaaatc aaattttaaa ggactcggag actcacattg gtgaatcatc accttacagt 5520

actggggata ttgatcactt acctgttgac ggaaaatatc aatctgtttt cgatattaag 5580

aagaatcaca agggacctga tattacagtt aagttgtgtg atgaactccc catgtgtgag 5640

ataatgagaa attacccagc tagtaagaat attgtcttcc aacagacggt gagtgatgtt 5700

gagaactcaa tccaagaatt tgttcagatt gagagtttga ctctccttct aaattttaag 5760

aaattagaga ctactcttga caaatacgat tctgggatga agagctacaa gcaacttcaa 5820

acgctagtta atgacagcac tcagtttatg tatgtgaagg gaaaagattg ggtaccgctt 5880

tctctcatcc atagcgatgt tcctcagact attgagcttt cagtgacatc caatcgtgtg 5940

ttgtctagat ttgactctca cggtgacgaa gttcaattca ctactgttga attcgctgct 6000

gggttttcaa ataaaaaatt aatctcgatg gatagatttc ggcagagcgc caatataatt 6060

gatgattaca gactttctac aatgaaaata attaacaaac ctcctggcag tggaaaaacc 6120

actcagatca gtgagatgat gtttgattgt catatcaagg gaaaaacttg tttggcttta 6180

acatcaacca aagttggaaa gaatgagtta attgagaaat tgaagaattt aattattggt 6240

gcgaaaccaa agaatgttaa aacagtagac gctttcaaca tgaacggtaa gaaagttatc 6300

gttgatgaat tgtttatcga tgaatgttac atgtctcatt caggtgctat ccttatggca 6360

ttatcaaaca ttgatttcac taattgcaaa ttctttggtg acgaaaacca gatcccctat 6420

tctgtcagat tgacaggatt tgaagcacta tttaccacga cagtcttcaa gttttgcaag 6480

gtcactcacg attctataag ttatcgatgc cctgcagacg tttgctattt gctttctcaa 6540

gctgaggaca gagccggtag taagatgtat tctaatggag tgcatgctgt cagaaatcag 6600

agacttcgta ctatgaatct taattctttg accggtgttg ctaacattcc gattagagaa 6660

gatacagtgt acgctgcttt cactcaaggt gaaaaagatg aattaaatag gtttgctaag 6720

aagaatattg ccaagactgt taatgaactt caaggaggta cttttaagaa tctcattgtc 6780

tttagattga gattacacaa taacactctg tacaatgata ccagacaatt cataacagct 6840

atttctagac atactgaaac atttaattat ttttgtcctt cgaatgctat gaatgacagt 6900

atcagcaatg cgataaacaa actcaacact attgaggaca atgtaattgc ccagttcggg 6960

tttagacaga gcgtttgacg aatataggtt gattttagaa gacagacctt tctgtgtttc 7020

tcctgcaaag cctagtttat cgagtgttca cgctgtaaat gactttatgg atttgacctt 7080

taacggtttg tcttctgtag attatctgac taggactctt cgattcgagt attctgatat 7140

tgatctacct tgtcttgagg atcttctgtt aactccatca aaatctaagc cttatcaagc 7200

agttaattgt aaggtgccta ttcttatagg caaaggtgag cgaagtagac cagatacttg 7260

gaaacaagtt attttatctt tatctaaacg aaattttgca gcacccagac tgaatgagga 7320

tctttccatt gatgaaactg ctaatagatt acttaatagt ttgatgaggt gcatggaacc 7380

cagccgtttg gctgagtatt atgatgtcgt tgaacctgat gttaataaaa ttaattcttg 7440

gttactatcc agagacagga ggaagtatgg taacgttttg agggggttcg atgggaatga 7500

ttggtcaacg aaactgttta acttgaagtt gatggttaag ggtgatatga aaccgaaact 7560

tgatatgtct ggtgtctccg aatattcacc agcttcaaat attatttact atcaaactat 7620

gataaatatg tttttcagcc ccatcttcct tgagattttt ggcagaatta agtactgtct 7680

aggcgataaa gttatttttat tttccggtat gaaccttgat gaaatgggag atctccttga 7740

aagtcgtttg tgttatcctt taaattctta caattttgtg gaagttgact ttagcaaatt 7800

tgataaatca caaggtcatg tgatcaagct ttatgaggag ttggtttaca aaatctttaa 7860

attcagccca aatctttacg acaattttaa acttagtgag tatttctgcc gtgcttccgc 7920

tacttgtggt gtcaatttag acttgtattg tcagcgaagg accggctcac ccaatacttg 7980

gttatcaaat tctttggcga ctttagctat gctggcaagt gtgtacgatt tggatgaaat 8040

tgatctgatt attgtttctg gggatgattc tttgattatc agtcgtaatg cgattgaaaa 8100

taagtgtctt gagattaata atgacttcgg tatggatgcc aaatttcttg ctaacccagt 8160

cccttatttt tgttcgaagt ttatagttca agtagacaat agaattagat tggttcctga 8220

tcctgtcaga tttttcgaaa aattgagtac tccagtgact ttagttcaat tagagcatcc 8280

cactttactc cgtgagcgct tcacttctta tcgtgatctc atgggagctt attttgatga 8340

aaatattatc gtagcagttg aaaggtttgt tagtttgaag tataacacac caatgggtag 8400

tggttacgct gctttttgct ttattcattg tcttctgtct agctataaaa atttttaac 8460

gatctttgac aacgacatta gtattcagtt gtgatttaat ggttgttgtt gtgtgggttt 8520

gtgttttctc ggtggtttgt tattttatta caccttccaa cattggttta gaaaagttca 8580

ctcgatttgg ttaatctgat gtctgttaag gttggtattg attttgggac tacgttctca 8640

acaatttctg gttttgttaa tggatctttt attactttgt tggtggataa gtccccttt 8700

gtaccttccg tactggcaat ctttgatgga aataacgtag ttcttggtga acaagcaaag 8760

gtgattgatc ggttatcgaa cgattatgtc aaatactttg atttaaaacg ctgggtaggg 8820

gtaagtgaaa agaatttcca agttttgaaa aagaaaattt ctcccaaata tgattgtgtt 8880

tttaaattta atgactgtta tattagtggt ttaggaacgc acacacgtga attaccgatc 8940

agatcgctca tctactggta tctaaaaatt ttgatcaatt tatttgaaga tcaacataaa 9000

cttaaggtga tagaggtgaa tgtttctgtg ccggcggatt acacaactcg gcagcgattg 9060

tatatgagat ctatagtaga ccttttaggt atccctgtta gacgaattat aaatgaaccc 9120

tctgctgctg ctatgcatca attgttcgtt aatcctaaag aggaagattt tgtcgtttat 9180

gatttcggtg gtggtacttt cgatgtatct tatattaaga aacacgggaa aatcgttagt 9240

attatcgaca ctgctggcga tttgtttctc ggtggtagag acatcgatag atctttagca 9300

agttttatcg cacaaaagac tggacattct tgtgatgatt tatttataaa ccatctaaaa 9360

gaatcgatca cgcctggagt ttcaaagaat tataaatttg ttgacaattc aggtgttctt 9420

cgatcaatag acataaatct ttccgatttg aattccgtag cccaaccatt tatagataga 9480

agtttggagt tattggattc tgtgatacag cgaaatcata ttacgaaagc tttagtttgc 9540

atggtaggtg ggtcatcact acttgatgga acttacaatt ccgttacgaa ttattgtagg 9600

tcgaaaaatc tcagtgtgtt tcgttccgaa catctacgtt cagccgtagc tttcggttgt 9660

gctattttgc atgattttga ctccgacaaa gaatttatat atgtcgatgt taattcacat 9720

ggtttgttag atgttgggca tcatttcgta ccacgtataa ttatgcgaaa acccctatca 9780

attccatatt caatttcgtt tgaaaggaac aatgcgacca agtatgccac agccgcctgt 9840

gtttatgagg gagacagctt aaattttctt gaagatgatt tactggttaa tgcaagtttt 9900

ttcacagacg aagtgtctga attaggtagt ggttataaat tgacttatag ttacgatata 9960

gagggaaagt tgagtgtttc aattagttcg cttgatgata ccaaaactaa gaaattagac 10020

aacaaaattg atagtaattt tgacttggtg aagttagatt tagtacaaac tcaactatcg 10080

agtagtgcta tctatagtgt tgtagtgtca ctgtcaaaat attggggcat caacactgag 10140

ttaaatcatt tgactgttga gtttccttat ttaataaaag attttataga taaaaatgga 10200

ggacttgaca attatgtcaa acgaattagg aatgaaattg gagactttcg ttgaacctga 10260

taatgaacgc tttgtagttc gattattgtt tatattagac ggagtgttta aattttatta 10320

cttgagtaat aatagatttt ttgttggaaa tctagttctg ttaactgtta cggacttcga 10380

tacattcgaa gatttgttta ataaatttcc ttatattaaa gaggaatgga gatagaaagc 10440

aaaaattttt tcagaatact ttcagcactt ctttttaaat cagatatttc tgaagaatct 10500

gcaaagttta aaaaattttt gtcgagcgat aaagttttaa ataaaacttt cactggaatt 10560

agtgggagtg atagtcaaga aataaagttt ttaggaaaca taaaaaataa taaagttttg 10620
ataaatgatg acgatattat ctctatcatc tttctctgct gcttatactt caatgaaatc 10680
gatgaaagat ataaagataa atctgcatat cctattgaga atatattgtg tttttacgat 10740
catccgtcag atactataga attggaaagg tttaaagggg aaagtttgtt gacgtattgc 10800
gaaaaacacc caaacattgg atgtaaattt tccatagaca gtgtaagaga gaaataccca 10860
aacttgaata gctcagattt atatttctct tacagattat cgaattgttt gggagagtta 10920
actaatgttt tgagctctaa atcaaaaaat ttttcaatct taaggaaagt gccaaccata 10980

ttatcaaacg agaaatatgc tgatcaatct gatttgttaa catcttgtgt taattacatg 11040
gattgctact cagaagtaag ctcatctgaa tcattactac ctttgtacac tcaaagttta 11100
ccgttgtgca atttaattta tttactactt ccgatagatg agagagataa attatattct 11160
aatgagattt tcttaggttg tctgtatact ttgttgagag attatgtcga tgaaaaggac 11220
actttaaaac taagagtaaa cattctaaac aattttatag acgatcactt aagcacttta 11280
aagaaacttt tctcatttgg atttgaaact gactttagaa aagtgattaa atctgaagaa 11340
ttctcagcgc gtcaactatt tgaggtcaat gaattgagac agttactatt agaagaatct 11400

gctaaaagtg tgaacgcgaa gtcttatgca caatctttaa gtgacaagtc tgatttagtg 11460
atggaaaaga taattagtga ttattttaag atttatttta atataaacca tcctgaatta 11520
gcagtggcgc taactctagt tttcttctct ttcatgtcaa cttctccaaa tataaggaag 11580
agaagcgaag aatttaaatt taactacatt gcagatgatg gtagagaaag ggttggaaag 11640
ataaaatcta aacatttcgt cggttatatt gattctagaa agaacgaatt gtctttaaga 11700
gacaaggaca gaaattatat aagattgttt tgttcgaaaa gagctaattt agctatacgt 11760
gtcaatgaga aatttaagtt tcaacccact gtgatggata agtgtccgaa agttctccct 11820

tatatgaaga tagactttta caaaggactt aaggctactc tactaacgaa ggaggagact 11880
gaaagtttag ctcatttgaa gttgtacaca gattatgtgt ccaacaattc aaagtttagt 11940
aaagacaggt attttgatta tttgatgaaa cccacataaa gtgagtgttg aggttataaa 12000
cagctcgata taaattaact tgtttctgtt aagagtattt aaaaatttta ttcatctaat 12060
ggcgagtcta gctttcacga aaacctttga tagattgaag caattgcttc caattgtcaa 12120
acctatttgg ttaattccca atgctaatag aagttcgcaa caaaaatctg acgttgggga 12180
gttcgaatcc ttaatacaat ctctgataaa tacacatatt attcataata aagaagattt 12240

gattaaagta tgtgatttgg atataggtac gaatgctcct gaagaagtta agaaactcct 12300

ggtagatttg agaaattgca gtggaaaggt agatgcaagt tactctgagg tggtaaaaaa 12360

ttttagagaa tatgtgagat tgatcgcaaa gcccttgtca gacaggagaa ctgaagatac 12420

taatcttatc gaaagttttg aagaaaattt gaaacttctg acaaacaaaa aatcgactct 12480

gattgatgat gaacttaaat tcttaagtta tttcaacata cagagcatcc ctgaacaaca 12540

gcaaaatgaa tttaaagata ttttaaaaga ttttgttgat gtcaaacgtg ataatactag 12600

agatcagttc gtcgagtcag ttgaagaacc tactagtcgt ctaaattttg acaaactaga 12660

tttttcgcaa gtgaaaaaca taaagagtca agccagtaat gagctaactg atgaattgac 12720

tgacgaattt ttgaaattat tagaagaaca tttcagagat attgtcttca agaaaagttc 12780

tggtgtacaa ctgactcctg ctgaatggac ttctgcttta gtttcatatt ttacttcttt 12840

atatgaacaa tcgaccacaa ctaagttggc cgatagtaaa gatgcattga attcgtttaa 12900

tgttggaaaa atcaaatatg aatggcaaag aggtccagtg acaaagagaa tgaccgaaca 12960

tttcagaact aaatatggag ttgaaaacgc tgagagacga ttcgctaaga aagagtataa 13020

ctctattcaa gctgcattag ctgctgctgg gtatgtgagt tctgaaagat tggcagcgaa 13080

atggggtgct gctcctaaca aaagagggaa agtttctgat gctactccga tgcataaagc 13140

tcatatgacg tttgatgaac aatctgttca attggctagc acagattatg ctactgatac 13200

tgatacgact agctcgaagg gagctcttca tgtttcgcaa gtattgggac cacgtcgcgg 13260

tagaagaaat taagaactat gaatttctat gatagttaca ttataacaag agtacctttc 13320

gatgctatcg aagtgaaaat aagtttgtct aatatcgaaa catgcatcgc tgtggacaaa 13380

acttattatg taatgatagg agatggtaac aataacgtaa aatttttatt gctatctcca 13440

gatcatgttt cactgagttg gagatttaga gtcgaaatag ttgaaaatag caatctgttg 13500

aacgcagagc aatctaataa atatatttttt aataattctg atttagatgt ttcaaatgta 13560

gatccgactg actttaaatt ctcagccagc ggattcaata gtactataac tatcgcagtg 13620

aatggagtta aattatttaa tttaaaacct tcttttatca ctcgtagtga tatagcttac 13680

ggggttgatg agttctataa caagaattta ctaagaattt tggatgaact tgtaagcact 13740

aatgctataa ttaagtctgc aagacataat ttcaatatat ttctagatgg aaaaccatat 13800

ttaggtagtt ggtacttaaa tgacggaccc tcacataaat ctattgctta cgttcgcgat 13860

aaggttgaaa atgttagaac aattttagac ttgataccag ttaacttaag taaagtgaat 13920

ttactaaata gtaatttgaa tgaatcaata gaattggaag tgaatttaaa taacaataaa 13980

tgtcttagaa tttatgatgt tattaactgc tcagatgaat ctcatgaggc tgtcactttg 14040

tgtaaattac aaaccactga caataaaaca ctaaatgtaa tttttcaata ttggatagga 14100

attggaaacg atatattaga gtttgtttta aggtgtaaga actcttacta caattgtgaa 14160

gtttggaaaa attctcgtgg gaaatattcc aggttatcag aatttataag atatcacagt 14220

tttacgaaag attacagttc tggaaatatt tttgtagggt tttactacga tgataagact 14280

cttagttatg tcttcacaat aaatggaatt ataacttgta tagtaaaaag tgatctatta 14340

gactcaaatt atgaagttgg gtttgaatat caaatttttg gagaagggaa tgaaactttt 14400

aatttcaagg atttcaaacg aataaaatct gacaacgcaa tctttagaat attgagatat 14460

ccttatgctt tgaaaagacc taaaaatacc gatatgacaa accatcatat caataataat 14520

gttcaaaccg attctgaaat atctcttaca gagataggag atgtaagcga tttgttcaaa 14580

atacctcaat cgagacctac tttggaatct aagaaccaag gtaaagaaac aaaaagaccg 14640

agagttgaat ccgatgatga tgaggaattt gttcggacat caccgcagat taaagaacaa 14700

acgttagacg taaggttcgt caatacaaat caacctagtg tcttaactac tgttgataac 14760

tcaccagtcg agtcgaaacc caattacact tgggtgttcg aatattctaa cgaatgcgat 14820

caagtcattg ctacaattgc aaaagccatt caaatatcaa ctgtcgattc gaaattggtt 14880

gtttttcaaa tggcgatttg ttgtggtaca tcaatcgaat ctgttcatga taaacatacc 14940

tctttaatat ttaatttttt aaataataag aagatcttct tgagattcgt tgctacttgt 15000

ttctttagga aaaaccctag aatcaatctc tttagaagat atatgagatc ttgtacagta 15060

gaagtattag aactgctcag aattggaaag ttgagtccaa gttatggtag ggctatagtt 15120

ttggggatac cgaagcaatt tgctttctta gcctgcgatt tttggaattt tgatgaaatg 15180

aagttaacaa ctcaagagca cgaagtgatt ggaaatttga aatcggtaag taagacaaat 15240

caaagaatac atttgttaaa atcataagat gatgaacact tttgagcatg atggcacatt 15300

cgcaaataaa aggattgaca cgtttgcatc gcaagtaagt aagaaactac ttgagtttat 15360

gcataatgtt gtcgcagctc tcacagggag aaatttgtct ataaacgaat tgcgtggaat 15420

gttgcctcaa gtactggagt gtaaacgatt ctttgaagct cgaaaggatg agactttgga 15480

aactattggt aataggtcta agttattctc tagtgaaata ttagaaattg atgaggacac 15540

agttaatgag tttaaggaat tgtttttgat gcgaattccg ttgaaatcgt tgattcaata 15600

ctgtgatgat ttcatattag ttttcgacat attaaaaaat tttttcgaca aaacattaat 15660

cgacgaaagg gatataagtg aaatgttcga taaatttggt actaatgtga aattgaaaat 15720

gctgtcagaa gaattgactg agataatatt gcgaaataag caaccgtcaa ataatctaaa 15780

attttcattg aaagttaaat ctgaatgtct gagaggtttc acaaccactt taagtagtct 15840

gttcatgtac aacaaaggac gtagaaatgc ctacgctaaa gcaataacat tgaatctaca 15900

actatttata gaacattctg gaatattaaa tggtgaatta gcttatagtt tagttgttgg 15960

ttaatacttc aggttaccat taaagtagaa gtagaaaatt atgtttaagt tttgtgcatt 16020

taaaaaattt tcttttcaag aaaaagaaag aaaggaaaat ggccaattcg actttcttct 16080

caaacagcat ggatactgta gtgaatgaca tcttggcatt tctcacagtg cttgtgaaca 16140

tgattaacag gaatactttc gaaaagatgt tctgcattta ttctgatata gaaaatttaa 16200

aattttctct gaactatctg acgacacttg aagtgaaacc caaaatattc tattctaata 16260

gtagtacttt gagctgggac gatggaaatg tgaacggtga gtttgagcat gatgctgaag 16320

gacatttggg gattccgttg aattatgatg ctttcatatg tctgttcaaa gacattctga 16380

atttgtttcg tttgaagcat ttgattcaat ctcgaaacct gatagcaact gaatttgtaa 16440

ataaccaatt gcttaaaggt agaagcgaca tgattgaaaa tatcaataaa atgttaagga 16500

aagagggtgg aaaagaattc aattacgtac atgcaagtgc ttacgtcaaa ttgaatgcta 16560

acccacaagt tagcaagaaa gtgcgcgatt caattggttg ggaagatggc gtagatatac 16620

ttgctgaaat tatggagata ctacatcaaa atgtagttat cgaattcact gctagtgaaa 16680

aagatgacat gtttatcatg tcaaccatat tgcacattag ttaagtttat aataagtttc 16740

tgtattatga atatattatt attaagtgtt ataattaaat aaagaggagg gtttttatac 16800

cgcttacctt ctctagtcat aaactggttt ttccgagtgt ttattataaa atctaaataa 16860

aatgcaactt taaatagttt atctgttaag ataaaccacc taagatgcat 16910