(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월08일
(11) 등록번호 10-1955220
(24) 등록일자 2019년02월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *C07K 14/005* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8283 (2013.01)
C07K 14/005 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0123940
(22) 출원일자 2017년09월26일
심사청구일자 2017년09월26일
(56) 선행기술조사문헌
Archives Virology. Vol. 160, No. 11, 페이지 2867-2872(2015.09.01.)*
Genbank Accession number AB000709(2017.09.09.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
충남대학교 산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
임현섭
대전광역시 유성구 가정로 266, 14동 302호 (가정동, 과기원교수아파트)
(74) 대리인
최규환

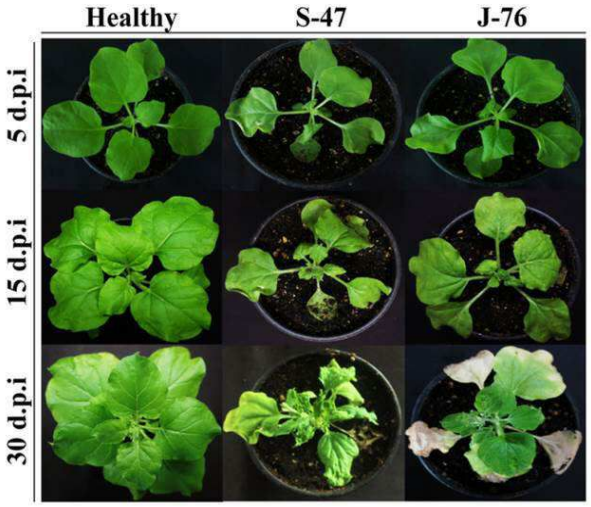
전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 최준호

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

(57) 요 약

본 발명은 감염률이 증가된 PMMoV 감염성 재조합 클론 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 본 발명의 제조 방법을 통해, 감염률이 증가된 PMMoV J47의 감염성 클론을 제조할 수 있으므로, 현재까지 고추 마일드 모틀 바이러스의 감염성 클론의 감염률이 현저히 떨어지는 현상을 보완할 수 있으며, 병원성 관련 바이러스 단백질을 이용한 병 저항성 품종 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
C12N 2760/10131 (2013.01)
C12N 2770/00031 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ011113
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오21
연구과제명 다입자성 RNA 바이러스를 이용한 보리, 옥수수, 콩 신속한 형질전환 방법 개발
기 여 율 1/1
주관기관 충남대학교 산학협력단
연구기간 2015.01.15 ~ 2017.12.31
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

1) 5'→3' 방향으로 T7 프로모터, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 전장(full-length)의 PMMoV(Pepper mild mottle virus) 핵산 서열 및 HDV(hepatitis delta virus) 리보자임 부위를 포함하는 PMMoV 감염성 재조합 클론을 제조하는 단계;

2) 상기 제조된 PMMoV 감염성 재조합 클론을 주형으로 하여 시험관 내 전사를 수행하여 PMMoV 전사체를 제조하는 단계; 및

3) 상기 제조된 PMMoV 전사체를 식물에 접종하는 단계를 포함하는 PMMoV에 대한 감염률이 증가된 식물체의 제조 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 식물은 담배(*Nicotiana benthamiana*)인 것을 특징으로 하는 PMMoV에 대한 감염률이 증가된 식물체의 제조 방법.

청구항 4

제1항 또는 제3항의 방법으로 제조된 PMMoV(Pepper mild mottle virus)에 대한 감염률이 증가된 식물체.

청구항 5

1) 5'→3' 방향으로 T7 프로모터, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 전장(full-length)의 PMMoV(Pepper mild mottle virus) 핵산 서열 및 HDV(hepatitis delta virus) 리보자임 부위를 포함하는 PMMoV 감염성 재조합 클론을 제조하는 단계;

2) 상기 제조된 PMMoV 감염성 재조합 클론을 주형으로 하여 시험관 내 전사를 수행하여 PMMoV 전사체를 제조하는 단계; 및

3) 상기 제조된 PMMoV 전사체를 식물에 접종하는 단계를 포함하는 식물체의 PMMoV에 대한 감염률을 증가시키는 방법.

청구항 6

5'→3' 방향으로 T7 프로모터, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 전장(full-length)의 PMMoV(Pepper mild mottle virus) 핵산 서열 및 HDV(hepatitis delta virus) 리보자임 부위를 포함하는 PMMoV 감염성 재조합 클론을 유효성분으로 포함하는 식물체의 PMMoV에 대한 감염률을 증가시키기 위한 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

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

배 경 기 술

[0002] PMMoV(*pepper mild mottle virus*)는 토바모바이러스(tobamovirus) 속에 속하며, 이 바이러스 속은 단일가닥의 (+) RNA 게놈을 가지고 있고, 이 게놈은 단단한 막대모양 입자들 안에 단일 종류의 외피 단백질로 싸여있다. 이 게놈 RNA는 5'-cap 및 3'-tRNA와 같은 구조를 가지고 있으며, 4개의 폴리펩티드를 암호화한다. PMMoV는 전 세계

적으로 분포하며 특히 미대륙, 유럽 및 동북아시아에서 큰 피해를 주고 있으며, 오염된 종자나 기계적인 접촉에 의해 쉽게 전염되어 경제적으로 큰 피해를 주고 있다. 기주 범위도 넓어 22과 200여 종에서 감염이 보고되었으며, 고추에서는 특히 생육 초기에 큰 피해를 주고 있다. PMMoV에 감염되면 잎 또는 줄기 조직에서 황화 현상이 나타나거나 생육 속도가 감소해 생장이 둔화되는 병징이 나타나며, 과실에서도 뒤틀림 현상이 나타나 상품의 가치를 떨어뜨리기도 한다.

[0003] PMMoV를 방제하는 방법은 그동안 주로 살충제와 물리적 방제를 통한 매개충을 방제하는데 초점이 맞추어왔다. 그러나 지속적인 살충제 사용으로 인해 담배가루이(*Bemisia tabaci*)가 살충제 저항성을 나타내는 문제점 외에도 친환경재배의 중요성이 부각됨에 따라 살충제를 사용한 방제에는 한계가 있다. 방충망을 이용한 물리적 방제 방법 또한 통풍이 불량해 고추 생육에 지장을 주는 문제점이 있다. 따라서 PMMoV 피해를 줄이는 가장 효과적인 방법은 고추 저항성 품종을 재배하는 것이다. 저항성 품종 개발에 있어, 현재까지 고추 마일드 모틀 바이러스의 감염성 클론은 식물에 접종하더라도 감염률이 현저히 떨어지는 문제점이 있어 감염률을 증가시키는 고추 마일드 모틀 바이러스의 감염성 클론의 개발이 요구되고 있다.

[0004] 한편, 한국등록특허 제0982593호는 오이 모자이크 바이러스의 감염성 클론을 이용한 식물체 내에서의 외래 유전자 과발현 방법을 개시하고 있으며, 한국등록특허 제1773365호는 콩 모자이크 바이러스를 이용한 두 종의 외래 유전자 동시발현용 유전자 전달 벡터를 개시하고 있다. 하지만, 본 발명의 감염률을 증가시키는 PMMoV 감염성 재조합 클론 및 이의 용도에 대해 아직까지 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 국내 고추에서 분리한 2개의 PMMoV 분리체(S47 및 J47)를 대상으로 전체 염기서열 분석을 통하여 T7 프로모터로 조절되는 각각의 감염성 클론을 제작하였으며, 이로부터 전사체를 제조하여 고추 및 담배 식물체에 각각 접종하였을 때, 특히 담배 식물체에서 PMMoV J47의 감염성 클론이 PMMoV S47의 감염성 클론에 비해 심각한 병징(disease symptom)을 나타내어, PMMoV J47의 감염성 클론이 PMMoV S47의 감염성 클론보다 감염률이 현저히 우수한 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 1) 5'→3' 방향으로 T7 프로모터, 전장(full-length)의 PMMoV(*Pepper mild mottle virus*) 핵산 서열 및 HDV(hepatitis delta virus) 리보자임 부위를 포함하는 PMMoV 감염성 재조합 클론을 제조하는 단계; 2) 상기 제조된 PMMoV 감염성 재조합 클론을 주형으로 하여 시험관 내 전사를 수행하여 PMMoV 전사체를 제조하는 단계; 및 3) 상기 제조된 PMMoV 전사체를 식물에 접종하는 단계를 포함하는 PMMoV에 대한 감염률이 증가된 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 PMMoV(*Pepper mild mottle virus*)에 대한 감염률이 증가된 식물체를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 1) 5'→3' 방향으로 T7 프로모터, 전장(full-length)의 PMMoV(*Pepper mild mottle virus*) 핵산 서열 및 HDV(hepatitis delta virus) 리보자임 부위를 포함하는 PMMoV 감염성 재조합 클론을 제조하는 단계; 2) 상기 제조된 PMMoV 감염성 재조합 클론을 주형으로 하여 시험관 내 전사를 수행하여 PMMoV 전사체를 제조하는 단계; 및 3) 상기 제조된 PMMoV 전사체를 식물에 접종하는 단계를 포함하는 식물체의 PMMoV에 대한 감염률을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 5'→3' 방향으로 T7 프로모터, 전장(full-length)의 PMMoV(*Pepper mild mottle virus*) 핵산 서열 및 HDV(hepatitis delta virus) 리보자임 부위를 포함하는 PMMoV 감염성 재조합 클론을 유효성분으로 포함하는 식물체의 PMMoV에 대한 감염률을 증가시키기 위한 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 제조 방법을 통해, 감염률이 증가된 PMMoV J47의 감염성 클론을 제조할 수 있으므로, 현재까지 고추 마일드 모틀 바이러스의 감염성 클론의 감염률이 현저히 떨어지는 현상을 보완할 수 있으며, 병원성 관련 바이러스 단백질을 이용한 병 저항성 품종 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 고추에서 분리한 PMMoV(*pepper mild mottle virus*) J47 및 PMMoV S47 분리체를 이용하여 구축한 감염성 클론의 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 고추에서 분리한 PMMoV J47 및 PMMoV S47 분리체 간의 아미노산 서열에서 차이가 나는 7개의 위치를 화살표로 나타낸 것이다.

도 3은 고추에서 분리한 PMMoV J47 및 PMMoV S47 분리체에 대한 계통발생분석(Phylogenetic analysis) 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 고추에서 분리한 PMMoV J47 및 PMMoV S47의 전사체를 담배 식물체에 각각 접종하였을 때, 병 발생 정도를 비교한 것이다. Healthy는 모의(mock) 접종 실험군이다.

도 5는 고추에서 분리한 PMMoV J47 및 PMMoV S47의 전사체를 고추 식물체에 각각 접종하였을 때, 병 발생 정도를 비교한 것이다. Healthy는 모의(mock) 접종 실험군이다.

도 6은 고추에서 분리한 PMMoV J47 및 PMMoV S47의 전사체를 고추 식물체에 접종하였을 때, 생장 정도를 비교한 것이다. Healthy는 모의(mock) 접종 실험군이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0013] 1) 5'→3' 방향으로 T7 프로모터, 전장(full-length)의 PMMoV(*Pepper mild mottle virus*) 핵산 서열 및 HDV(hepatitis delta virus) 리보자임 부위를 포함하는 PMMoV 감염성 재조합 클론을 제조하는 단계;

[0014] 2) 상기 제조된 PMMoV 감염성 재조합 클론을 주형으로 하여 시험관 내 전사를 수행하여 PMMoV 전사체를 제조하는 단계; 및

[0015] 3) 상기 제조된 PMMoV 전사체를 식물에 접종하는 단계를 포함하는 PMMoV에 대한 감염률이 증가된 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0016] 상기 HDV 리보자임 부위는 비바이러스성 서열(non-viral sequence)을 제거하고 PMMoV 감염성을 증대시키는 역할을 하며, 바람직하게는 서열번호 14의 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

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

[0018] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 단편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한, 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0019] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 PMMoV 핵산은 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 염기 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 PMMoV 감염성 재조합 클론은 서열번호 1의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열 추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제 즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 PMMoV(*Pepper mild mottle virus*)에 대한 감염률이 증가된 식물체를 제공한다.

[0021] 본 발명에 따른 상기 식물체는 담배, 고추 등의 PMMoV 기주 식물일 수 있으며, 바람직하게는 담배이다.

[0022] 또한, 본 발명은

[0023] 1) 5'→3' 방향으로 T7 프로모터, 전장(full-length)의 PMMoV(*Pepper mild mottle virus*) 핵산 서열 및

HDV(hepatitis delta virus) 리보자임 부위를 포함하는 PMMoV 감염성 재조합 클론을 제조하는 단계;

[0024] 2) 상기 제조된 PMMoV 감염성 재조합 클론을 주형으로 하여 시험관 내 전사를 수행하여 PMMoV 전사체를 제조하는 단계; 및

[0025] 3) 상기 제조된 PMMoV 전사체를 식물에 접종하는 단계를 포함하는 식물체의 PMMoV에 대한 감염률을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0026] 또한, 본 발명은 5'→3' 방향으로 T7 프로모터, 전장(full-length)의 PMMoV(*Pepper mild mottle virus*) 핵산 서열 및 HDV(hepatitis delta virus) 리보자임 부위를 포함하는 PMMoV 감염성 재조합 클론을 유효성분으로 포함하는 식물체의 PMMoV에 대한 감염률을 증가시키기 위한 조성물을 제공한다. 상기 PMMoV 핵산은 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[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] **재료 및 방법**

[0029] **1. PMMoV(*pepper mild mottle virus*) 수집**

[0030] 국내에서 종자전염 바이러스(seed-borne virus)에 감염된 고추 식물을 채취하기 위해, 2014년 6월에서 10월까지 5개월 동안 고추 생산지역으로부터 바이러스 감염 증상을 나타내는 고추 식물의 잎을 수집하였으며, 추가적으로 2015년에도 수집하였다. 울릉도와 제주도는 연구에서 배제하였다. 바이러스 감염 증상은 모자이크(mosaic), 반점(mottle), 괴사(necrosis) 및 왜화(dwarfing)를 포함하며, 이들 샘플은 전국 각지의 소규모 농장 등 181곳에서 수집하였으며, RT-PCR을 통해 PMMoV 에 대해 테스트하였다.

[0031] **2. PMMoV의 RNA 추출, DNA 증폭 및 토포이소머라아제(topoisomerase) 클로닝**

[0032] 총 RNA는 트리졸(Trizol) 시약 방법(H.S. Lim et al. 2005, Plant Physiol. Biochem., 43, 1014~1021)을 이용하여 추출하였으며, 레버트라 ACE-α cDNA 합성 키트(TOYOBO)를 이용한 cDNA 합성에 사용하기 전에 -70℃에 보관하였다. 랜덤 프라이머들은 PMMoV의 검출용 cDNA 합성에 사용하였으며, PMMoV 검출용 프라이머들은 PMMoV(Accession number: KP345899)의 외피 단백질(CP; coat protein) 뉴클레오티드 서열에 기초하여 설계하였다(표 1). 예상되는 산물의 사이즈는 492bp(PMMoV CP)이며, RT-PCR 조건은 다음과 같다; (1) 5분 동안 94℃; (2) 30초 동안 94℃; 30초 동안 59℃; 및 1분간 72℃로 30 사이클 (3) 5분간 72℃. 전장(full-tength) PMMoV cDNA를 합성하기 위해, 본 발명에서는 제조사(TOYOBO, Japan)의 지침에 따라 레버트라 에이스-α를 이용하여 랜덤 프라이머와 3'-특이적 프라이머(5'-GAG CCC *GGG TGG GCC GCT ACC CGC GGT T C*-3'; 밑줄 친 부분은 XmaI 제한효소 부위이며, 이탤릭체는 바이러스-특이적 염기서열을 나타낸 것이다)(서열번호 12)의 혼합물을 사용하였다. DNA 증폭은 T7 프로모터(밑줄 친 부분)를 포함한 업스트림 프라이머(5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG TAA ATT TTT CAC ATT TAA CAA CAA C-3')(서열번호 13)와 3'-특이적 프라이머를 이용하여 수행하였다. 상기 프라이머들은 NCBI에서 제공하는 PMMoV 염기서열 배열에 근거하여 설계하였으며, PCR은 KOD FX 네오 DNA 폴리머라아제로 수행하였다. DNA 증폭은 3단계로 진행되며 그 과정은 다음과 같다; (1) 2분 동안 94℃; (2) 10초간 95℃; 30초간 58℃; 4분 30초간 68℃로 7 사이클 (3) 10초 동안 95℃; 30초간 58℃; 5분간 68℃로 28 사이클.

[0033] 전장 PCR 산물에 대한 분석은 0.8% 아가로오스 겔을 이용한 전기영동을 통해 수행하였으며, 산물은 Wizard® SV Gel 및 PCR 클린-업 시스템 키트(Promega, USA)를 이용하여 정제하고, 정제된 PMMoV의 PCR 산물을 대장균(*Escherichia coli* DH5a)에 형질전환시키기 전에 1시간 동안 4℃에서 T-Blunt 벡터(Solgent, T-bluntTM PCR Cloning Kit)에 연결시켰다.

표 1

[0034] 본 발명에 사용된 프라이머

프라이머	염기서열	PCR 산물 사이즈(bp)
T7 promoter PMMoV full forward	5'-TAATACGACTCACTATAGTAAATTTTTCACATTTAACAACAAC-3'(서열번호 3)	6356
PMMoV full XmaI reverse	5'-GAGCCCGGGTGGGCCGCTACCCGCGGTT-3'(서열번호 4)	-
PMMoV_CP_SalI_F	5'-AAAGTCGACATGGCTTACACAGTTTCCAG-3'(서열번호 5)	492

PMMoV_CP_BamHI_R	5'-AAAGGATCCTTAAGGAGTTGTAGCCCAGG-3'(서열번호 6)	-
PMMoV MP forward	5'-AAA GTC GAC ATG GCG TTA GTAGTCAAGGA-3'(서열번호 7)	774
PMMoV MP reverse	5'-AAA GGA TCC TTA AAA CGA AGAAGACTCGG-3'(서열번호 8)	-
PMMoV RdRp 126kDa forward	5'-GAGCTGCAGAAATGGCTTACACACAAC AAGC-3'(서열번호 9)	3454
PMMoV RdRp 126kDa reverse	5'-GAGCCCGGGCTATTGAGTCGACACATCAAC-3''(서열번호 10)	-
PMMoV RdRp 180kDa reverse	5'-GAGCCCGGGTTACTCCAAAAACAA TGTTTGAAATAAC-3'(서열번호 11)	4839

[0035] **3. 계통발생 분석(Phylogenetic analysis)**

[0036] 계통발생분석을 위해 본 발명에서 분리한 PMMoV J47 및 PMMoV S47 분리체의 서열 이외에 NCBI로부터 18개의 PMMoV 전장 서열을 선택하여 계통발생 분석을 수행하였다. 계통수 작성은 근연접합법(neighbor-joining method; boot trap, n = 1,000)으로 수행되었으며, MEGA ver. 6(Molecular Evolutionary Genetic Analysis ver. 6) 소프트웨어를 이용하여 구축하였다. BLASTN 분석은 NCBI 데이터 베이스에 대해 새로운 PMMoV 전체 서열을 비교하는데 사용되었다.

[0037] **4. 시험관 내 전사(in vitro transcription) 및 감염성 분석**

[0038] PMMoV의 전장 cDNA 감염성 클론은 *XmaI*가 삽입된 플라스미드의 선상화(linearization) 후에 시험관 내 전사의 주형으로 사용하였으며, 전사 반응은 T7 RNA 폴리머라아제(Promega, USA)를 이용한 캡 아날로그의 존재하에 수행하였다. 상기 RNA 전사 산물은 50mM의 인산 나트륨 완충액(ph 7.0)으로 500ng/㎕로 조절한 후, 4~5의 잎 단계의 담배(*N.benthamiana*) 및 고추 식물체를 대상으로 각각의 잎 당 10㎕(500ng/㎕)의 전사체를 접종하였으며, 접종 20일 후에 어린 잎 조직으로부터 총 RNA를 추출한 후, 외피 단백질(CP; coat protein) 프라이머(표 1)들을 이용하여 RT-PCR을 통해 전사체의 감염성을 확인하였다.

[0039] **5. 감염된 담배 및 고추의 진단**

[0040] 상기 시험관 내 전사체의 감염 진단은 다른 발달과정에서 PMMoV의 전신확산을 확인하기 위해, 담배(*N.benthamiana*) 및 고추(*C.annuum*) 식물체에 대해 7, 15 및 30 dpi(days post-inoculation)에서 수행하였다. 상기와 같이 총 RNA를 추출하고, 역전사시켰으며, 진단용 프라이머(표 1)는 NCBI의 PMMoV MP(Movement protein)의 뉴클레오티드 서열을 기반으로 설계되었다. RT-PCR은 2㎕의 cDNA, 10pmol의 프라이머, 2㎕의 10×버퍼, 2㎕의 10 mMdNTP 및 1 unit의 Prime taq 폴리머라아제를 포함하여 총 20㎕의 부피로 맞추어 수행하였으며, RT-PCR 조건은 다음과 같다; (1) 5분 동안 94℃; (2) 30초 동안 94℃; 30초간 59℃ 및 1분간 72℃로 30 사이클; (3) 5분 동안 72℃.

[0041] **실시예 1. 고추로부터 PMMoV(*pepper mild mottle virus*) 분리**

[0042] 본 발명에서는 2014년부터 2015년까지 국내의 주요 고추 생산 지역에서 자란 고추를 대상으로 바이러스와 유사한 병징을 나타내는 181개의 잎 샘플을 수집하여 RT-PCR을 통해 종자전염 바이러스인 PMMoV 감염을 검사하였다. 그 결과, 하기 표 2에 개시한 바와 같이 7개의 샘플이 PMMoV에 대해 양성반응(3.86%)을 나타내었으며, 이로부터 2개의 PMMoV 분리체를 선별하여 전장(full-length) 감염성 클론을 제조하였다. 각 PMMoV 분리체의 뉴클레오티드 서열 내에서 변이는 관찰되지 않았으며(시퀀싱된 분리체 당 5개의 클론), 검출된 모든 분리체들의 CP(coat protein) 아미노산 서열은 동일하였다.

표 2

[0043] 국내 주요 고추 생산지역에서 분리한 PMMoV의 RT-PCR 결과

분리 지역	샘플 수	PMMoV	비고
경기	16	-	-
강원	10	1	정선-1
충청북도	14	-	-
충청남도	31	-	-
전라북도	30	1	군산-1
전라남도	28	-	-
경상북도	42	-	-

경상남도	10	5	진주-2, 산청-3, 산청-4
총(%)	181	7(3.86)	-

[0044] **실시예 2. 고추에서 분리한 2개의 PMMoV 분리체(PMMoV J47 및 PMMoV S47)의 전장 감염성 클론(full-length infectious clone) 제조**

[0045] 상기 실시예 1에서 선별한 2개의 PMMoV 분리체(PMMoV J47 및 PMMoV S47)에 감염된 잎으로부터 총 RNA를 추출하였으며, 이를 T7 프로모터 서열을 포함하는 5'-프라이머 및 *Xma*I I 제한효소 부위를 포함하는 3'-프라이머를 이용한 싱글 PCR 산물로서 감염성 클론을 생산하기 위해 사용하였으며(표 1 및 도 1), 전장 cDNA를 T-blunt 벡터에 클로닝시켰다. PMMoV J47 및 PMMoV S47 분리체의 시험관 내 전사체(in vitro transcript)를 담배 묘목에 접종시킨 후, 20 dpi에 RT-PCR을 통해 감염 유무를 확인하였다. 본 발명의 PMMoV J47 및 PMMoV S47의 감염성 클론의 전체 서열을 밝혔으며, GenBank에 각각 KX399389(서열번호 1) 및 KX399390(서열번호 2)으로 등록하였다. PMMoV J47 및 PMMoV S47의 서열 비교에 따르면, 전체 뉴클레오티드 99.52% 동일성과 아미노산 수준에서 외피 단백질(CP; coat protein) 100% 동일성(five silent nt substitutions)을 보였으며, 뉴클레오티드 서열 차이로 인해 126kDa, 183kDa 및 MP 단백질에서 각각 99.73%, 99.81% 및 98.44% 아미노산 동일성을 보였다. PMMoV J47 및 PMMoV S47의 전장 아미노산 서열 간에 7개의 아미노산이 달랐으며, 이 중에 126kDa 단백질에서는 3개(아미노산 잔기 142, 583 및 931), MP에서는 4개(아미노산 잔기 134, 192, 227 및 250)의 아미노산이 다른 것을 확인하였다(도 2).

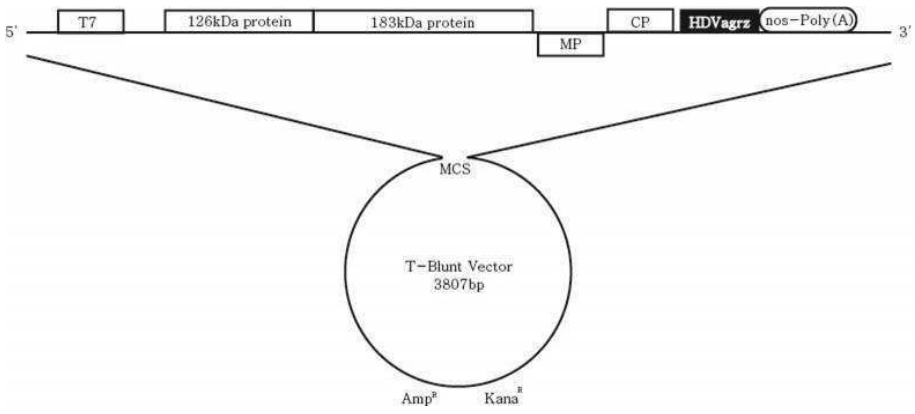
[0046] 또한, PMMoV J47 및 PMMoV S47를 대상으로 계통발생분석(Phylogenetic analysis)을 수행한 결과, 도 3에 개시한 바와 같이 PMMoV J47 및 PMMoV S47은 그룹 3에 속하였으며, 분리체 그룹과 지리적 기원간의 상관관계는 없었다.

[0047] **실시예 3. PMMoV J47 및 PMMoV S47의 감염성 클론의 감염성 확인**

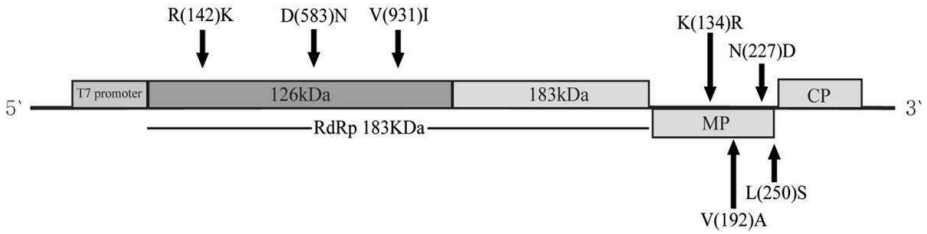
[0048] 본 발명의 PMMoV J47 및 PMMoV S47 감염성 클론의 감염성을 확인 및 비교하기 위해, PMMoV J47 및 PMMoV S47 각각의 전사체를 담배(*N. benthamiana*) 및 고추(*C. annuum*) 식물체에 접종하였다. 그 결과, 도 4에 개시한 바와 같이 PMMoV J47 및 PMMoV S47은 담배 식물체에서 다른 병징들을 나타내었다. 구체적으로, 5 dpi에서 뚜렷한 차이점 없이 PMMoV J47 및 PMMoV S47 모두 병징을 나타내었지만, PMMoV J47에 감염된 식물의 접종 잎은 15 dpi에서 과민반응(HR; Hypersensitivity Reaction)을 보였고, 30 dpi에서 완전히 괴사(necrotic)가 되었으며, 위쪽 잎들은 황백화 반점(chlorotic mottle)을 나타내었다(도 4). 이와 대조적으로, PMMoV S47에 감염된 식물의 잎은 녹색을 유지하고, 위쪽 잎들은 약간의 왜곡(distortion)과 황백화 반점만을 보였다. 고추의 경우, 담배와 달리 5 dpi에서 병징을 발견하지 못하였으며, 15 dpi일 때, PMMoV J47 및 PMMoV S47 모두에 감염된 잎에서 반점을 발견하였다(도 5). 하지만, 이러한 병징들은 고추보다 담배 식물체에서 더 심하였으며, 2개의 분리체 모두 고추에서 매우 경미한 병징을 나타내었다. 또한, 30 dpi일 때, 모의(mock) 접종 대조군에 비해 2개의 PMMoV J47 및 PMMoV S47에 감염된 고추에서 식물 생장이 현저히 감소되었으며, 특히 PMMoV J47에 감염된 고추에서 생장 저해 현상이 더 심한 것을 확인할 수 있었다(도 6).

도면

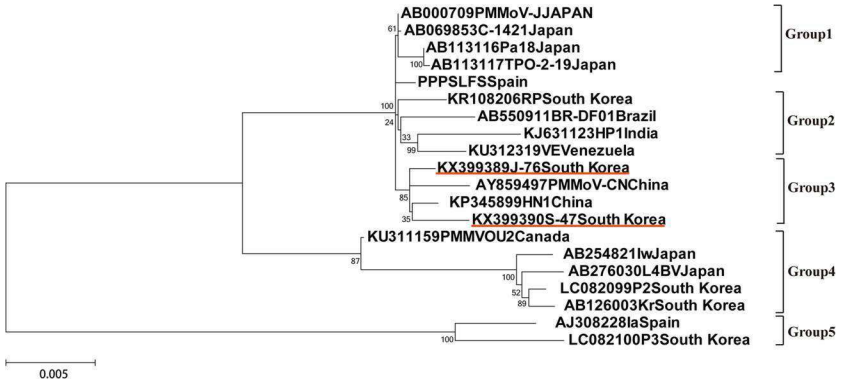
도면1



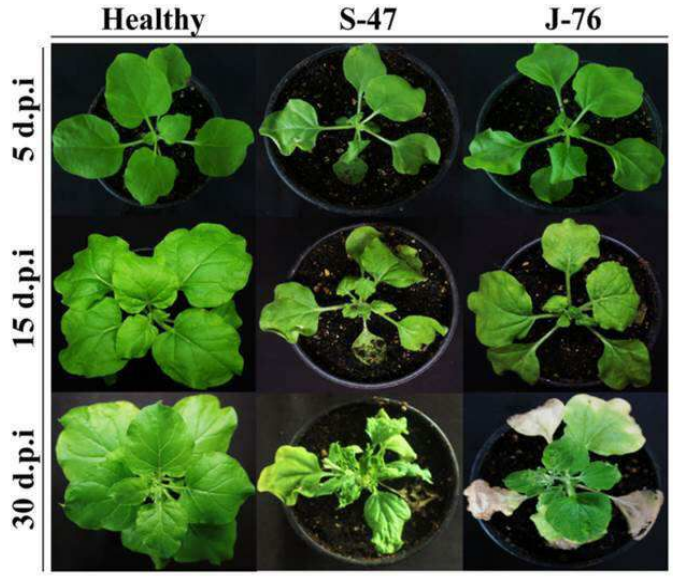
도면2


R(142)K
D(583)N
V(931)I
K(134)R
N(227)D
T7 promoter
126kDa
183kDa
CP
5`
3`
RdRp 183KDa
MP
L(250)S
V(192)A

도면3


AB000709PMMoV-JJAPAN
AB069853C-1421Japan
AB113116Pa18Japan
AB113117TPO-2-19Japan
PPPSLFSSpain
KR108206RPSouth Korea
AB550911BR-DF01Brazil
KJ631123HP1India
KU312319VEVenezuela
KX399389J-76South Korea
AY859497PMMoV-CNChina
KP345899HN1China
KX399390S-47South Korea
KU311159PMMVOU2Canada
AB254821IwJapan
AB276030L4BVJapan
LC082099P2South Korea
AB126003KrSouth Korea
AJ308228IaSpain
LC082100P3South Korea
Group1
Group2
Group3
Group4
Group5
0.005

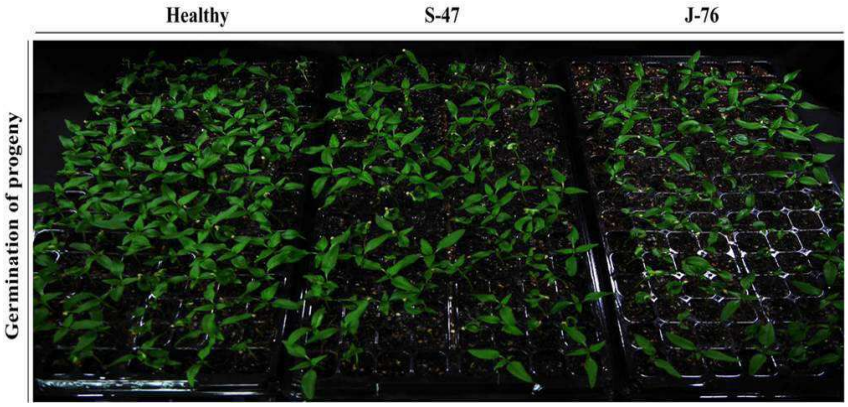
도면4


Healthy
S-47
J-76
5 d.p.i
15 d.p.i
30 d.p.i

도면5



도면6



서 열 목 록

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

<120> Infectious recombinant clone increasing infection ratio for pepper mild mottle virus and uses thereof

<130> PN17352

<160> 14

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 6356

<212> DNA

<213> Pepper mild mottle virus

<400> 1

gtaaattttt cacaatttaa caacaacaac acaaacaaca aacaacatta caaacaaaat 60

acaactacaa tggcttacac acaacaagct accaacgccg cattagcaag tactctccga 120

gggaataacc ccttggtgaa cgatcttgct aatcggagac tgtacgaatc agcggtcgaa 180
caatgcaatg cacatgaccg caggcccaag gttaattttt taaggtcgat aagcgaagag 240
cagacgctta tcgcaactaa ggcctaccct gagttccaaa tcacgttcta caacacgcag 300
aacgctgtgc acagtctcgc aggtggactt cggtccttgg aactagaata cttgatgatg 360
cagatcccct acggttcaac gacatatgat atcgggggaa attttgctgc tcacatgttt 420
aaaggtcgtg actacgttca ttgctgcatg cctaacatgg acttacgtga cgtcatgcgt 480
cacaatgctc aaaaggatag cattgaactg tacctttcaa agcttgcgca aaagaaaaag 540

gtaataccgc catatcaaaa gccatgcttt gataaataca cggacgatcc gcaatcagta 600
gtgtgctcga aacctttcca gcactgcgaa ggcgtttcgc actgcacgga taaagtatac 660
gctgtcgctt tgcacagttt atacgacatt ccagcagatg aatttggggc agcacttctg 720
aggagaaatg ttcatgtctg ctatgctgcc ttccactttt ctgagaatct tcttttagaa 780
gattcgtatg tcagtcttga cgacataggc gctttcttct cgagagaggg cgatatgttg 840
aacttttctt ttgtagcaga gagcacttta aattatactc attcctatag taatgtgctt 900
aagtatgtgt gtaagactta cttccccgct tctagtagag aagtgtacat gaaggagttt 960

ttggtaacta gggtaaatac ttggttttgt aagttttcaa ggttagatac ctttgtacta 1020
tatagaggtg tataccacag aggtgtagac aaggagcaat tttacagtgc aatggaagat 1080
gcttggcatt acaaaaagac tttggcgatg atgaatagcg aaagaatcct cttagaggat 1140
tcatcgtctg ttaattattg gtttccaaag atgaaagata tggtgatagt acctttgttc 1200
gacgtatctt tacagaacga ggggaaaagg ttagcaagaa aggaggtcat ggtcagcaag 1260
gacttcgttt atactgtgct taatcatatt cgcacatacc agtcgaaagc gcttacttac 1320
gccaatgtat tatcgttcgt tgagtcgata agatcaagag tgataatcaa tggggtgact 1380

gcgcgctcag agtgggatgt ggataaggct ttgttgcagt ccctgtcaat gacttttttc 1440
ttgcagacca aattggccat gctcaaggat gacctcgtgg ttcagaaatt ccaagtgcat 1500
tccaaatcgc tcactgagta tgtctgggat gagattactg ctgcttttca caattgtttt 1560
cctacaatca aggagaggtt gattaacaag aaactcataa ctgtttcgga aaaggctctt 1620
gaaattaaag tacctgattt gtatgtaact ttccacgata gattggttaa ggagtacaag 1680
tcttcggtgg aaatgccggt actggacgtt aaaaagagct tggaagaagc agaagtgatg 1740
tacaatgctt tgtcggaaat ctcaattctt aaagacagtg acaagtttga tgttgatgtt 1800

ttttcccgga tgtgtaatac attaggcgta gatccattgg tggcagcaaa ggtaatggta 1860

gctgtggttt caaatgagag tggtttgacc ttaacgtttg agaggcctac cgaagcaaat 1920

gtcgcacttg cattgcaacc gacaattaca tcaaaggagg aaggttcgtt gaagattgtg 1980

tcgtcagacg taggtgagtc ctcaatcaag gaagtggttc gaaaatcaga gatttctatg 2040

cttggtctaa caggcaacac agtgtccgat gagttccaaa gaagtacaga aatcgagtcg 2100

ttgcagcagt tccatatggt atccacagag acgattatcc gtaaacagat gcatgcgatg 2160

gtgtatactg gtccgctaaa agttcaacaa tgcaagaact atttagacag cctggtagcc 2220

tcgctctctg ctgcggtatc aaacctgaag aagataatca aagacacagc tgctatagat 2280

ctcgagacta aggaaaaatt tggagtctac gacgtgtgcc ttaagaaatg gttggtgaaa 2340

cctctatcaa aaggacatgc ttggggtgtg gtgatggact cagactataa gtgctttgtt 2400

gcgcttctca catacgatgg cgagaacatt gtatgcggag agacatggcg tagagtcgca 2460

gtgagctccg aatctttggt gtattcagat atggggaaga taagagctat acgctctgtg 2520

cttaaagacg gtgaacccca tataagcagt gcaaaggtta cacttgttga tggtgttcct 2580

ggttgcggaa agacaaagga gattctttcg agggtcaact ttgacgaaga tctagttctg 2640

gtaccaggaa aacaggctgc tgaaatgata agaagaaggg caaacagttc tggtttaatc 2700

gtggcgacca aggagaatgt aaggacggta gactctttct taatgaatta cggtcgaggt 2760

ccgtgccaat acaaaaggct gtttctggat gaaggtctaa tgttacaccc tggttgtgtt 2820

aattttctgg ttggcatgtc tctatgctcc gaggctttta tttatggaga cacccagcag 2880

attccttaca tcaacagagt tgcaactttt ccctatccta agcatttgag tcaactcgag 2940

gtcgatgctg ttgaaactcg cagaacaacg ttgcggtgtc cagcggatat caccttcttc 3000

ttgaatcaga agtacgaagg gcaagttatg tgcacatcaa gtgttacacg ctcggtgtca 3060

cacgaggtca tccaaggtgc agcggtaatg aatccagtgt ctaaaccact taaagggaag 3120

gtgattacat tcactcagtc agacaagtca ttgctgctct cgaggggtta cgaagatgtg 3180

cataccgttc atgaggtgca aggggaaacg tttgaagacg tctcactagt gaggctgacg 3240

cctacacccg tgggaataat ttcaaagcag agtccgcacc tgttggtctc attgtctagg 3300

catacaaggt cgatcaaata ttacacagtt gtgctagatg cagtcgtttc agtgcttaga 3360

gatctggagt gtgtgagtag ttacctgtta gatatgtaca aagttgatgt gtcgactcaa 3420

tagcaattac agatagaatc ggtgtacaaa ggtgttaacc ttttcgtcgc agcaccaaaa 3480

acaggagatg tttctgacat gcaatattat tacgacaagt gtttgccggg aaacagtact 3540

atactcaatg agtatgatgc tgtaaccatg caaatacgag agaatagttt gaatgtcaag 3600

gattgtgtgt tggatatgtc gaaatcggtg cctcttccga gagaatctga gacgacattg 3660

aaacctgtga tcaggactgc tgctgaaaaa cctcgaaaac ctggattgtt ggaaaatttg 3720

gtcgcgatga tcaaaagaaa tttcaactct cccgaattag taggggttgt tgacatcgaa 3780

gacaccgctt ctctagtagt agataagttt tttgatgcat acttaattaa agaaaagaaa 3840

aaaccaaaaa atatacctct gctttcaagg gcgagtttgg aaagatggat cgaaaagcaa 3900

gagaagtcaa caattggcca gttggctgat tttgacttta ttgatttacc agccgttgat 3960

caatacaggc acatgatcaa gcagcagccg aaacagcgtt tggatcttag tattcaaact 4020

gaatacccgg ctttgcaaac tattgtgtat catagcaaga aaatcaacgc gctttttggt 4080

cctgtatttt cagaattaac aagacagctg ctagagacaa ttgacagttc aagattcatg 4140

ttttatacaa ggaaaacgcc tacacagatc gaagaatttt tctcagatct ggactctaat 4200

gttcctatgg acatattaga gctagacatt tccaagtatg acaaatcaca gaacgaattt 4260

cattgtgcag tcgagtatga gatttggaaa aggttaggct tagacgattt cttggctgaa 4320

gtttggaaac acgggcatcg gaagacaacg ttgaaagact acacagccgg aataaaaacg 4380

tgtttgtggt accagaggaa aagcggtgat gtcaccacat tcattggaaa cacgatcatt 4440

attgctgcat gtctgtcctc tatgctaccg atggagagat tgattaaagg tgccttttgt 4500

ggtgatgata gtatattata ctttccaaag ggcactgatt tccccgatat tcaacagggc 4560

gcaaaccttc tctggaattt tgaagccaag ttgtttagga agagatatgg ttacttttgc 4620

ggtaggtaca taattcacca tgacagaggc tgtattgtat attatgaccc tctaaaattg 4680

atctcgaaac tcggtgcaaa acacatcaag aatagagaac atttagagga atttaggacc 4740

tctctttgtg atgttgctgg gtcgttgaac aattgtgcgt actatacaca tttggacgac 4800

gctgtcggtg aggttattaa gaccgcacct cctggttcgt ttgtttatag agcattagtt 4860

aagtacttgt gtgataaaag gttatttcaa acattgtttt tggagtaaat ggcgttagta 4920

gtcaaggacg acgttaagat ttctgagttc atcaatttgt ctgccgctga gaaattctta 4980

cctgctgtta tgacttcggt caagacggta cgaatttcga aagttgacaa agtgattgca 5040

atggaaaacg attcgttatc cgatgtggat ttgcttaaag gtgtaaagct tgttaaggat 5100

ggttatgtgt gtttagcagg gttagttgtg tccggggagt ggaacctacc cgacaactgc 5160

agaggtggag taagcgtttg tttggttgat aagagaatgc aaagagatga cgaagcaaca 5220

cttggatctt atagaaccag tgcagctaag aaacgatttg ccttcaaatt gatcccgaat 5280

tatagcatta ctaccgccga tgctgagaga aaagtttggc aagttttagt taatattaga 5340

ggtgtcgcca tggaaaaggg tttctgtcct ttatctttgg agtttgtctc agtttgtatt 5400

gtacacaaat ccaatataaa attaggcttg agagagaaaa ttactagtgt gtcagaagga 5460

ggacccgttg aacttacaga agcagtcgtt gatgagttca tcgaatcagt tccaatggct 5520

gacagattac gtaaatttcg caatcaatct aagaaaggaa gtaataagta tgtaggtaag 5580

agaaatgata ataagggttt gaataaggaa gggaagctgt ttgataaggt tagaattggg 5640

cagaactcgg agtcatcgga cgccgagtct tcttcgtttt aactatggct tacacagttt 5700

ccagtgcaaa tcaattagtg tatttaggtt ctgtatgggc tgatccatta gagttacaaa 5760

atctgtgtac ttcggcgtta ggcaatcagt ttcaaacaca acaggctaga actacggttc 5820

aacagcagtt ctctgatgtg tggaagacta ttccgaccgc tacagttaga tttcctgcta 5880

ctggtttcaa agtttttcga tacaatgccg tcctagattc tctagtgtcg gcacttctcg 5940

gagcctttga tactaggaac aggataatag aagttgaaaa tccgcaaaat cctacaactg 6000

ccgagacgct tgatgcgacg aggcgggtag atgatgcgac ggtggccatt agggccagta 6060

taagtaacct catgaatgag ttagttcgtg gcacgggaat gtacaatcaa gctctgttcg 6120

agagcgcgag tggactcacc tgggctacaa ctccttaaac atgatggcat aaataagttg 6180

gacgaacatt aaacgtccgt ggcgagtacg ataactcgta gtgtttttcc ctccacttaa 6240

atcgaagggt tgtcgttggg atggaacgca attaaataca tgtgtgacgt gtatttgcga 6300

acgacgtaat tattttcagg ggttcgaatc ccccccgaac cgcgggtagc ggccca 6356

<210> 2

<211> 6356

<212> DNA

<213> Pepper mild mottle virus

<400> 2

gtaaattttt cacaatttaa caacaacaac acaaacaaca aacaacatta caaacaaaat 60

acaactacaa tggcttacac acaacaagct accaacgccg cattagcaag tactctccga 120

gggaataacc ccttggtgaa cgatcttgct aatcggagac tgtacgaatc agcggtcgaa 180

caatgcaatg cacatgaccg caggcccaag gttaattttt taaggtcgat aagcgaagag 240

cagacgctta tcgcaactaa ggcctaccct gagttccaaa tcacgttcta caacacgcag 300

aacgctgtgc acagtctcgc aggtggactt cggtccttgg aactagaata cctgatgatg 360

cagatcccct acggttcaac gacatatgat atcgggggaa attttgctgc tcacatgttt 420

aaaggtcgtg actacgttca ttgctgcatg cctaacatgg acttacgtga tgtcatgcgt 480

cacaatgctc aaagggatag cattgaactg tacctttcaa agcttgcgca aaagaaaaag 540

gtaataccgc catatcaaaa gccatgcttt gataaataca cggacgatcc gcaatcagta 600

gtgtgctcga aacctttca gcactgcgaa ggcgtttcgc actgcacgga taaagtatac 660

gctgtcgctt tgcacagttt atacgacatt ccagcagatg aatttggggc agcacttctg 720

aggagaaatg ttcatgtctg ctatgctgct ttccactttt ctgagaatct tcttttagaa 780

gattcgtatg tcagtcttga cgacataggc gctttcttct cgagagaggg cgatatgttg 840

aacttttctt ttgtagcaga gagtacttta aattatactc attcctatag taatgtgctt 900

aagtatgtgt gtaagactta cttccccgct tctagtagag aagtgtacat gaaggagttt 960

ttggtaacta gggtaaatac ttggttttgt aagttttcaa ggttagatac ctttgtacta 1020

tatagaggtg tataccacag aggtgtagac aaggagcaat tttacagtgc aatggaagat 1080

gcttggcatt acaaaaagac tttggcgatg atgaatagcg aaagaatcct cttagaggat 1140

tcatcgtctg ttaattattg gtttccaaag atgaaagata tggtgatagt acctttgttc 1200

gacgtatctt tacagaacga ggggaaaagg ttagcaagaa aggaggtcat ggtcagcaag 1260

gacttcgttt atactgtgct taatcatatt cgcacatacc agtcgaaagc gcttacttac 1320

gccaatgtat tatcgttcgt tgagtcgata agatcaagag tgataatcaa tggggtgact 1380

gctcgctcag agtgggatgt ggataaggct ttgttgcagt ccctgtcaat gactttttc 1440

ttgcagacca aattggccat gctcaaggat gacctcgtgg ttcagaaatt ccaagtgcat 1500

tccaaatcgc tcactgagta tgtctgggat gagattactg ctgcttttca caattgtttt 1560

cctacaatca aggagaggtt gattaacaag aaactcataa ctgtttcgga aaaggctctt 1620

gaaattaaag tacctgattt gtatgtaact ttccacgata gattggttaa ggagtacaag 1680

tcttcggtgg aaatgccggt actggacgtt aaaaagagct tggaagaagc agaagtgatg 1740

tacaatgctt tgtcagaaat ctcaattctt aaagacagtg acaagtttga tgttgatgtt 1800

ttttcccgga tgtgtgatac attaggcgta gatccattgg tggccgcaaa ggtaatggta 1860

gctgtggttt caaatgagag tggtttgacc ttaacgtttg agaggcctac cgaagcaaat 1920

gtcgcacttg cattgcaacc gacaattaca tcaaaggagg aaggttcgtt gaagattgtg 1980

tcgtcagacg taggtgagtc ctcaatcaag gaagtggttc gaaaatcaga gatttctatg 2040

cttggtctaa caggcaacac agtgtccgat gagttccaaa gaagtacaga aattgagtcg 2100

ttgcagcagt tccatatggt atccacagag acgattatcc gtaaacagat gcatgcgatg 2160

gtgtatactg gtccgctaaa agttcaacaa tgcaagaact atttagacag cctggtagcc 2220

tcgctctctg ctgcggtatc aaacctgaag aagataatca aagacacagc tgctatagat 2280

ctcgagacta aggaaaaatt tggagtctac gacgtgtgcc ttaagaaatg gttggtgaaa 2340

cctctatcaa aaggacatgc ttggggtgtg gtgatggact cagactataa gtgctttgtt 2400

gcgcttctca catacgatgg cgagaacatt gtatgcggag agacatggcg tagagtcgca 2460

gtgagctccg aatctttggt gtattcagat atggggaaga taagagctat acgctctgtg 2520

cttaaagacg gtgaacccca tataagcagt gcaaaggtta cacttgttga tggtgttcct 2580

ggttgcggaa agacaaagga gattctttcg agggtcaact ttgacgaaga tctagttctg 2640

gtaccaggaa aacaggctgc tgaaatgata agaagaaggg caaacagttc tggtttaatc 2700

gtggcgacca aggagaatgt aaggacggta gactctttct taatgaatta cggtcgaggt 2760

ccgtgccaat acaaaaggct gtttctggat gaaggtctaa tgttacaccc tggttgtgtt 2820

aattttctgg ttggcatgtc tctatgctcc gaggcttttg tttatggaga cacccagcag 2880

attccttaca tcaacagagt tgcaactttt ccctatccta agcatttgag tcaactcgag 2940

gtcgatgctg ttgaaactcg cagaacaacg ttgcggtgtc cagcggatat caccttcttc 3000

ttgaatcaga agtacgaagg gcaagttatg tgcacatcaa gtgttacacg ctcggtgtca 3060

cacgaggtca tccaaggtgc agcggtaatg aatccagtgt ctaaaccact taaagggaag 3120

gtgattacat tcactcaatc agacaagtca ttgctgctct cgaggggtta cgaagatgtg 3180

cataccgttc atgaggtgca aggggaaacg tttgaagacg tctcactagt gaggctgacg 3240

cctacacccg tgggaataat ttcaaagcag agtccgcacc tgttggtctc attgtctagg 3300

catacaaggt cgatcaaata ttacacagtt gtgctagatg cagtcgtttc agtgcttaga 3360

gatctggagt gtgtaagtag ttacctgtta gatatgtaca aagttgatgt gtcgactcaa 3420

tagcaattac agatagaatc ggtgtacaaa ggtgttaacc ttttcgtcgc agcaccaaaa 3480

acaggagatg tttctgacat gcaatattat tacgacaagt gtttgccggg aaacagtact 3540

atactcaatg agtatgatgc tgtaaccatg caaatacgag agaatagttt gaatgtcaag 3600

gattgtgtgt tggatatgtc gaaatcggtg cctcttccga gagaatctga gacgacattg 3660

aaacctgtga tcaggactgc tgctgaaaaa cctcgaaaac ctggattgtt ggaaaatttg 3720

gtcgcgatga tcaaaagaaa tttcaactct cccgaattag taggggttgt tgacatcgaa 3780

gacaccgctt ctctagtagt agataagttt tttgatgcat acttaattaa agaaaagaaa 3840

aaaccaaaaa atatacctct gctttcaagg gcgagtttgg aaagatggat cgaaaagcaa 3900

gagaagtcga caattggcca gttggctgat tttgacttta ttgatttacc agccgttgat 3960

caatacaggc acatgatcaa gcagcagccg aaacagcgtt tggatcttag tattcaaact 4020

gaatacccgg ctttgcaaac tattgtgtat catagcaaga aaatcaatgc gctttttggt 4080

cctgtatttt cagaattaac aagacagctg ctagagacaa ttgacagttc aagatttatg 4140

ttttatacaa ggaaaacgcc tacacagatc gaagaatttt tctcagatct ggactctaat 4200

gttcctatgg acatattaga gctagacatt tccaagtatg acaaatcaca gaacgaattt 4260

cattgtgcag tcgagtatga gatttggaaa aggttaggct tagacgattt cttggctgaa 4320

gtttggaaac acgggcatcg gaagacaacg ttgaaagact acacagccgg aataaaaacg 4380

tgtttgtggt accagaggaa aagcggtgat gtcaccacat tcattggaaa cacgatcatt 4440

attgctgcgt gtctgtcctc tatgctaccg atggagagat tgattaaagg tgccttttgt 4500

ggtgatgata gtatattata ctttccaaag ggcactgatt tccccgatat tcaacagggc 4560

gcaaaccttc tctggaattt tgaagccaag ttgtttagga agagatatgg ttacttttgc 4620

ggtaggtaca taattcacca tgacagaggc tgtattgtat attatgaccc tctaaaattg 4680

atctcgaaac tcggtgcaaa acacatcaag aatagagaac atttagagga atttaggacc 4740

tctctttgtg atgttgctgg gtcgttgaac aattgtgcgt actatacaca tttggacgac 4800

gctgtcggtg aggttatcaa gaccgcacct cctggttcgt ttgtttatag agcattagtt 4860

aagtacttgt gtgataaaag gttatttcaa acattgtttt tggagtaaat ggcgttagta 4920

gtcaaggacg acgttaagat ttctgagttc atcaatttgt ctgccgctga gaaattctta 4980

cctgctgtta tgacttcggt caagacggta cgaatttcga aagttgacaa agtgattgca 5040

atggaaaacg attcgttatc cgatgtggat ttgcttaaag gtgtaaagct tgttaaggat 5100

ggttatgtgt gtttagcagg gttagttgtg tccggggagt ggaacctacc cgacaactgc 5160

agaggtggag taagcgtttg tttggttgat aagagaatgc aaagagatga cgaagcaaca 5220

cttggatctt atagaaccag tgcagctaag aaacgatttg ccttcaaatt gatcccgaat 5280

tatagcatta ctaccgccga tgctgagaaa aaagtttggc aagttttagt taatattaga 5340

ggtgtcgcca tggaaaaggg tttctgtcct ttatctttgg agtttgtctc agtttgtatt 5400

gtacacaaat ccaatataaa attaggcttg agagagaaaa ttactagtgt gtcagaagga 5460

ggacccgttg aacttacaga agtagtcgtt gatgagttca tcgaatcagt tccaatggct 5520

gacagattac gtaaatttcg caatcaatct aagaaaggaa gtaataagta tgtaggtaag 5580

agaaataata ataagggttt gaataaggaa gggaagctgt ttgataaggt tagaattggg 5640

cagaactcgg agtcattgga cgccgagtct tcttcgtttt aactatggct tacacagttt 5700

ccagtgccaa tcaattagtg tatttaggtt ctgtatgggc tgatccatta gagttacaaa 5760

atctgtgtac ttcggcgtta ggcaatcagt ttcaaacaca acaggctaga actacggttc 5820

aacagcagtt ctctgatgtg tggaaaacta ttccgaccgc tacagttaga tttcctgcta 5880

ctggtttcaa agttttccga tataatgccg tgctagattc tctagtgtcg gcacttctcg 5940

gagcctttga tactaggaac aggataatag aagttgaaaa tccgcaaaat cctacaactg 6000

ccgagacgct tgatgcgacg aggcgggtag atgatgcgac ggtggccatt agggccagta 6060

taagtaacct catgaatgag ttagttcgtg gcacgggaat gtacaatcaa gctctgttcg 6120

agagcgcgag tggactcacc tgggctacaa ctccttaaac atgatggcat aaataagttg 6180

gacgaacaat aaacgtccgt ggcgagtacg ataactcgta gtgtttttcc ctccacttaa 6240

atcgaagggt tgtcgttggg atggaacgca attaaataca cgtgtgacgt gtatttgcga 6300

acgacgtaat tattttcagg ggttcgaatc ccccccgaac cgcgggtagc ggccca 6356

<210> 3

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

taatacgact cactatagta aatttttcac atttaacaac aac 43

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

gagcccgggt gggccgctac ccgcggtt 28

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

aaagtcgaca tggcttacac agtttccag 29

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

aaaggatcct taaggagttg tagcccagg 29

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

aaagtcgaca tggcgttagt agtcaagga 29

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

aaaggatcct taaaacgaag aagactcgg 29

<210> 9

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

gagctgcaga aatggcttac acacaacaag c 31

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

gagcccgggc tattgagtcg acacatcaac 30

<210> 11

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

gagcccgggt tactccaaaa acaatgtttg aaataac 37

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

gagcccgggt gggccgctac ccgcggttc 29

<210> 13

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

taatacgact cactatagta aatttttcac aatttaacaa caac 44

<210> 14

<211> 85

<212> DNA

<213> Hepatitis Delta Virus

<400> 14

gggtcggcat ggcatctcca cctcctcgcg gtccgacctg ggcatccgaa ggaggacgca 60

cgtccactcg gatggctaag ggaga 85