(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0061748
(43) 공개일자 2021년05월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8218 (2013.01)
C12N 15/8205 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0149650
(22) 출원일자 2019년11월20일
심사청구일자 2019년11월20일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
임현섭
경기도 성남시 분당구 내정로165번길 38, 101동 401호(수내동, 양지마을청구금호아파트)
호문별
대전광역시 유성구 대학로 99 충남대학교 농업생명공학관 307호
서은영
대전광역시 유성구 반석서로 98, 606동 503호(반석동, 반석마을6단지아파트)
(74) 대리인
최규환

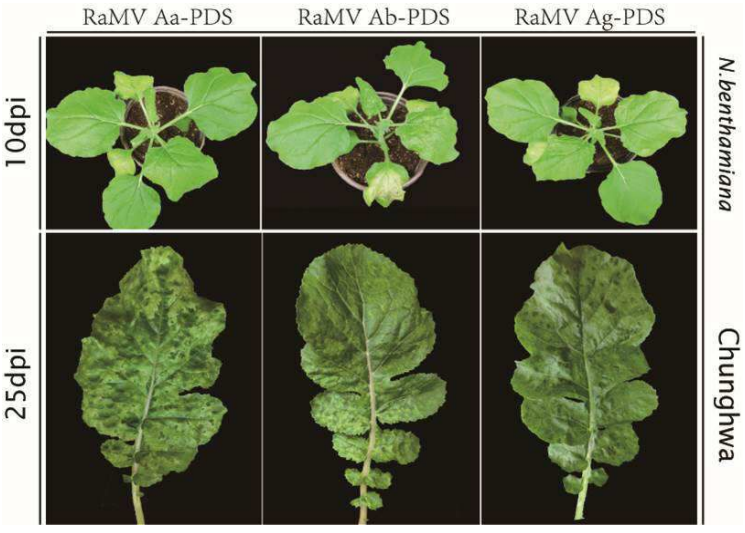
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **십자화과 작물에서 유용 유전자의 기능 분석을 위한 RaMV 유래의 재조합 VIGS 벡터 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 십자화과 작물에서 유용 유전자의 기능 분석을 위한 RaMV 유래의 재조합 VIGS 벡터 및 이의 용도에 관한 것으로, RaMV(Radish mosaic virus)를 이용한 재조합 VIGS 벡터를 제공함으로써, 원하는 유전자를 효율적으로 침묵시켜 유전자의 고유 기능 연구를 가능하게 할 뿐만 아니라 경제적으로 가치 있는 유용 유전자들의 탐색에 매우 유용할 것으로 여겨지며, 유용 유전자들을 이용한 무의 새로운 품종 육성을 기대할 수 있다.

대 표 도 - 도8



(52) CPC특허분류
C12N 15/8279 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ01365501
부처명 농촌진흥청
과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린21사업
연구과제명 제한적 guide RNA 와 선택적 guide RNA 발현기술을 통한 옥수수, 콩, 보리, 채소류(고추, 수박, 토마토)의 생명공학기술 적용 바이러스벡터 개발 및 기초기술 확립
기 여 율 1/1
과제수행기관명 충남대학교
연구기간 2018.02.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

RaMV RNA2 감염성 재조합 클론에 목적 유전자를 삽입할 수 있는 MCS(multiple cloning site) 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 RaMV RNA2 유래의 재조합 VIGS(Virus-induced gene silencing) 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 RaMV RNA2 감염성 재조합 클론은 5'→3' 방향으로 프로모터; 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 RaMV RNA2 핵산 서열; 및 아데닐산중합반응신호(Polyadenylation signal) 부위;를 포함하는 것을 특징으로 하는 RaMV RNA2 유래의 재조합 VIGS(Virus-induced gene silencing) 벡터.

청구항 3

1) 제1항의 RaMV RNA2 유래의 재조합 VIGS 벡터에 목적 유전자를 삽입하는 단계;

2) 상기 목적 유전자가 삽입된 RaMV RNA2 유래의 재조합 VIGS 벡터 및 RaMV RNA1 감염성 재조합 클론을 주형으로 각각 시험관 내 전사를 수행하여 RaMV RNA2 VIGS 전사체 및 RaMV RNA1 전사체를 제조하는 단계; 및

3) 상기 제조된 RaMV RNA2 VIGS 전사체 및 RaMV RNA1 전사체를 식물체에 혼합 접종하여 목적 유전자를 침묵시키는 단계;를 포함하는 목적 유전자가 침묵된 식물체의 제조 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 RaMV RNA1 감염성 재조합 클론은 5'→3' 방향으로 프로모터; 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 RaMV(Radish mosaic virus) RNA1 핵산 서열; 및 아데닐산중합반응신호(Polyadenylation signal) 부위;를 포함하는 것을 특징으로 하는 목적 유전자가 침묵된 식물체의 제조 방법.

청구항 5

제4항의 방법에 의해 제조된 목적 유전자가 침묵된 식물체.

청구항 6

1) 제1항의 RaMV RNA2 유래의 재조합 VIGS 벡터에 목적 유전자를 삽입하는 단계;

2) 상기 목적 유전자가 삽입된 RaMV RNA2 유래의 재조합 VIGS 벡터 및 RaMV RNA1 감염성 재조합 클론으로 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)를 각각 형질전환하여 RaMV RNA2 VIGS의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체 및 RaMV RNA1의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체를 얻는 단계; 및

3) 상기 획득한 RaMV RNA2 VIGS의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체 및 RaMV RNA1의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체를 식물체에 혼합 접종하여 목적 유전자를 침묵시키는 단계;를 포함하는 목적 유전자가 침묵된 식물체의 제조 방법.

청구항 7

제6항의 방법에 의해 제조된 목적 유전자가 침묵된 식물체.

청구항 8

1) RaMV RNA1, RaMV RNA3 및 RaMV RNA4 감염성 재조합 클론으로 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)를 각각 형질전환하여 RaMV RNA1의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체, RaMV RNA3의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체 및 RaMV RNA4의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체를 얻는 단계 및

2) 상기 획득한 RaMV RNA1의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체;와 RaMV RNA3의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체 또는 RaMV RNA4의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체;를 식물체에 혼합 접종하는 단계를

포함하는 RaMV에 대한 병원성이 증가된 식물체의 제조 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 RaMV RNA1, RaMV RNA3 및 RaMV RNA4 감염성 재조합 클론은 각각 순서대로 5'→3' 방향으로 프로모터; 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 RaMV RNA1 핵산 서열, 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 RaMV RNA3 핵산 서열 또는 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 RaMV RNA4 핵산 서열; 및 아데닐산중합반응신호(Polyadenylation signal) 부위;를 포함하는 것을 특징으로 하는 RaMV에 대한 병원성이 증가된 식물체의 제조 방법.

청구항 10

제8항의 방법에 의해 제조된 RaMV에 대한 병원성이 증가된 식물체.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 십자화과 작물에서 유용 유전자의 기능 분석을 위한 RaMV(Radish mosaic virus) 유래의 재조합 VIGS 벡터 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 배추 유전체 해독이 완료됨에 따라 유전체에 암호화되어 있는 유용 유전정보를 확보하고자 하는 노력이 잇따르고 있다. 배추 내 유용물질을 암호화하는 유전체의 확보는 고품질 배추 육종을 위한 밑거름이라 할 수 있다. 또한, 고품질 배추 육성과 관련된 유용 유전체 기능분석 기술 개발은 안정된 먹거리 제공 및 고부가가치 종자 산업에 기여하는 바가 클 것으로 기대된다. 이러한 유전정보 기능분석은 경쟁적으로 진행되고 있으며, 이에 대한 대표적인 기술은 T-DNA 삽입 후, 돌연변이 유도를 통한 유전자 위치 및 기능분석기술, 특이유전자 과발현 형질전환 배추 생산을 통한 유전자 기능분석, 유전자 침묵(gene silencing)을 유도한 형질전환 배추를 통한 유전자 기능분석, 크리스퍼(CRISPR; 3세대 유전자 가위)를 통한 유전자 교정 후 표현형을 통해 교정된 유전자의 기능 분석 등이 있으며, 기술의 핵심은 돌연변이를 유도한 후 그의 표현형을 통하여 역으로 유전자기능을 파악하는 역유전학(Reverse Genetics)이라 할 수 있다.

[0003] 하지만 앞서 설명한 기술들은 조직배양을 통하여 얻어진 T_1 식물에서 그 결과를 파악할 수 있기 때문에 유전자 기능을 확인하기까지 긴시간이 소요되며 생장에 절대적으로 필요한 유전자에 대해서는 상기의 기술적용에 불가능하다는 단점을 갖고 있다. 따라서 배추 외에 타 작물에서는 유전체 기능검색을 위해 쉽고, 유전자 기능 확인 시간이 짧은 VIGS(Virus Inducing Gene Silencing) 벡터를 적용하고 있다. 대표적으로, 담배, 애기장대, 콩 등에서 TSV(Tobacco streak virus), PVX(Potexvirus X) 또는 BPMV(Bean pod mottle virus)를 각각 이용해왔다. 그 외의 작물에서는 적당한 식물바이러스 벡터 개발이 어려워 적용한 예를 찾을 수 없다. VIGS 벡터는 대상작물을 기주로 하는 바이러스를 이용하여야 하는데 배추 및 무를 기주로 하는 바이러스는 현재까지 TuMV(Turnip mosaic virus), CMV(Cucumber mosaic virus) 등이 보고되어 있으나, 유전자 침묵을 저해하는 단백질 발현이 매우 강한 바이러스로 VIGS 벡터로 사용하기 어려운 바이러스이다. 따라서 신속하며 우수한 유전자 기능 탐색 기술인 VIGS 벡터를 배추, 무 등에 적용하기 어려웠다.

[0004] 본 발명자는 국내 배추 및 무 재배단지에서 채취한 3개의 RaMV(Radish mosaic virus) 분리체의 병원성 기작을 비교 연구하여 무 유전체 검색을 위한 VIGS 벡터와 유용단백질 발현용 식물바이러스 벡터를 발명하였다. RaMV는 세코비리대(Secoviridae) 코모바이러스속(*Comovirus* sp.)으로 딱정벌레나 감염된 식물의 즙액을 통해 전염하여 십자화과 식물을 감염시킨다. 약 30nm 크기의 구형 바이러스로 6.4kb(RNA1) 및 3.8kb(RNA2) 두 개의 RNA로 구성되어 있는 2분절 양성 센스(bipartite positive sense) RNA 바이러스이다. RNA1은 바이러스의 복제, 단백질 관리에 관여하는 단백질을, RNA2는 외피단백질(CP), 세포 내 이동에 관여하는 단백질을 암호화한다. 코모바이러스속에는 콩을 기주로 하는 BPMV VIGS 벡터가 세포 내 이동, 유전자 침묵기능에 관하여 많은 연구가 진행되어 있다. 코모바이러스속 연구보고에 따르면, 약한 유전자 침묵 억제 단백질이 외피단백질 중 SCP(small CP)에 존재한다고 보고하고 있으나 기능은 매우 미미한 것으로 알려져 있다.

[0005] VIGS 벡터로 활용하고자 하는 바이러스는 RNA의 복제가 효율적으로 진행되어야 하며, 기주 내에서 유전자 침묵 현상을 저해하는 바이러스 단백질 발현이 거의 없어야한다. 본 발명자는 병징의 차이를 보이는 3개의 RaMV RNA2

분리체의 병원성 기작을 비교하여 전술한 바와 같은 조건을 충족시키는 최적의 VIGS 벡터 발명을 완료하였다.

[0006] 한편, 한국등록특허 제1478113호에는 '콩에서 유용 유전자의 기능 분석을 위한 SYCMV 유래의 재조합 VIGS 벡터 및 이의 용도'에 대해 개시하고 있으며, 한국등록특허 제1352039호에는 '콩에서 유용 유전자의 기능 분석을 위한 콩 황반 모자이크 바이러스 유래의 재조합 VIGS 벡터 및 이의 용도'에 대해 개시하고 있다. 하지만, 본 발명의 '십자화과 작물에서 유용 유전자의 기능 분석을 위한 RaMV 유래의 재조합 VIGS 벡터 및 이의 용도'에 대해서는 아직까지 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 무 잎으로부터 3개의 RaMV 분리체(Aa, Bb 및 Gg)를 분리하였으며, T7 프로모터 및 35S 프로모터를 동시에 모두 포함하고 아데닐산중합반응신호(Polyadenylation signal; PAS) 부위를 포함하는 1개의 RaMV RNA1(A) 감염성 클론과 3개의 RaMV RNA2(a), RaMV RNA3(b) 및 RaMV RNA4(g) 감염성 클론을 각각 제작한 후 1개의 RaMV RNA1(A) 감염성 클론에 3개의 RaMV RNA2(a), RaMV RNA3(b) 및 RaMV RNA4(g) 감염성 클론을 조합(RaMV Aa, RaMV Ab 및 RaMV Ag)하여 담배, 무 및 배추에 접종하였을 때, 무에서 RaMV Ab 및 RaMV Ag의 감염성 클론 조합이 RaMV Aa의 감염성 클론 조합과 비교하여 강한 병징을 나타내는 것을 확인하였으며, 3개의 RaMV RNA2(a), RaMV RNA3(b) 및 RaMV RNA4(g) 감염성 클론에 무의 색소 생합성 유전자를 각각 삽입하여 RaMV VIGS 벡터를 구축하고, 이를 RaMV RNA1(A) 감염성 클론과 조합(RaMV Aa-PDS, RaMV Ab-PDS 및 RaMV Ag-PDS)하여 아그로박테리움 침윤을 통해 담배 및 무 식물체에 접종한 결과, RaMV RNA1 감염성 클론과 RaMV RNA2 VIGS 벡터의 조합(RaMV Aa-PDS) 처리시 무 식물체에서 유전자 침묵 현상이 효율적으로 나타나는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 RaMV RNA2 감염성 재조합 클론에 목적 유전자를 삽입할 수 있는 MCS(multiple cloning site) 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 RaMV RNA2 유래의 재조합 VIGS(Virus-induced gene silencing) 벡터를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 1) 상기 RaMV RNA2 유래의 재조합 VIGS 벡터에 목적 유전자를 삽입하는 단계; 2) 상기 목적 유전자가 삽입된 RaMV RNA2 유래의 재조합 VIGS 벡터 및 RaMV RNA1 감염성 재조합 클론을 주형으로 각각 시험관 내 전사를 수행하여 RaMV RNA2 VIGS 전사체 및 RaMV RNA1 전사체를 제조하는 단계; 및 3) 상기 제조된 RaMV RNA2 VIGS 전사체 및 RaMV RNA1 전사체를 식물체에 혼합 접종하여 목적 유전자를 침묵시키는 단계;를 포함하는 목적 유전자가 침묵된 식물체의 제조 방법 및 상기 제조 방법에 의해 제조된 목적 유전자가 침묵된 식물체를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 1) 상기 RaMV RNA2 유래의 재조합 VIGS 벡터에 목적 유전자를 삽입하는 단계; 2) 상기 목적 유전자가 삽입된 RaMV RNA2 유래의 재조합 VIGS 벡터 및 RaMV RNA1 감염성 재조합 클론으로 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)를 각각 형질전환하여 RaMV RNA2 VIGS의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체 및 RaMV RNA1의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체를 얻는 단계; 및 3) 상기 획득한 RaMV RNA2 VIGS 형질전환체 및 RaMV RNA1 형질전환체를 식물체에 혼합 접종하여 목적 유전자를 침묵시키는 단계;를 포함하는 목적 유전자가 침묵된 식물체의 제조 방법 및 상기 제조 방법에 의해 제조된 목적 유전자가 침묵된 식물체를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 1) RaMV RNA1, RaMV RNA3 및 RaMV RNA4 감염성 재조합 클론으로 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)를 각각 형질전환하여 RaMV RNA1의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체, RaMV RNA3의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체 및 RaMV RNA4의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체를 얻는 단계 및 2) 상기 획득한 RaMV RNA1의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체;와 RaMV RNA3의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체 또는 RaMV RNA4의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체;를 식물체에 혼합 접종하는 단계를 포함하는 RaMV에 대한 병원성이 증가된 식물체의 제조 방법 및 상기 제조 방법에 의해 제조된 RaMV에 대한 병원성이 증가된 식물체를 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명은 RaMV(Radish mosaic virus) 유래의 재조합 VIGS 벡터를 제공함으로써, 원하는 유전자를 효율적으로

침묵시켜 유전자의 고유 기능 연구를 가능하게 할 뿐만 아니라 경제적으로 가치 있는 유용 유전자들의 탐색에 매우 유용할 것으로 여겨지며, 유용 유전자들을 이용한 무의 새로운 품종 육성을 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 RaMV RNA1 전장 cDNA 클론의 제작 모식도를 나타낸 것이다. ▼ 바이러스가 암호화하는 프로테아제에 의해 바이러스 게놈이 하나의 단백질로 번역된 후 각각의 기능 단백질로 절단되는 부위이다.

도 2는 RaMV RNA2 전장 cDNA 클론의 제작 모식도를 나타낸 것이다. ▼ 바이러스가 암호화하는 프로테아제에 의해 바이러스 게놈이 하나의 단백질로 번역된 후 각각의 기능 단백질로 절단되는 부위이다.

도 3은 3개의 RaMV RNA2(a, b 및 g) 전장 cDNA 클론에 MCS(Multi cloning site) 부위를 삽입하여 VIGS(Virus induced gene silencing) 벡터의 제작 모식도를 나타낸 것이다.

도 4는 RaMV RNA1(A) 및 3개의 RaMV RNA2(a, b 및 g) 감염성 클론의 구조 모식도이며, 3개의 RaMV RNA2의 감염성 클론 간의 아미노산 서열 차이의 위치를 화살표로 나타낸 것이다. ▲ 바이러스가 암호화하는 프로테아제에 의해 바이러스 게놈이 하나의 단백질로 번역된 후 각각의 기능 단백질로 절단되는 부위이다.

도 5는 RaMV RNA1(A) 감염성 클론과 3개의 RaMV RNA2(a, b 및 g) 감염성 클론 간의 혼합 접종 모식도를 나타낸 것이다. ▼ 바이러스가 암호화하는 프로테아제에 의해 바이러스 게놈이 하나의 단백질로 번역된 후 각각의 기능 단백질로 절단되는 부위이다.

도 6은 RaMV RNA1(A)와 3개의 RaMV RNA2(a, b 및 g) 감염성 클론 간의 혼합(RaMV Aa, RaMV Ab 및 RaMV Ag) 접종 후, 담배(*N. benthamiana*), 배추(*Brassica campestris*) 및 무(*Raphanus sativus*) 식물체에서의 병징의 발현 차이를 나타낸 것이다. CR victory: 배추(*Brassica campestris*), Chunghwa: 무(*Raphanus sativus*), lljin: 무(*Raphanus sativus*).

도 7은 3개의 RaMV RNA2(a, b 및 g) 유래 VIGS 벡터의 MCS 영역에 무(*Raphanus sativus*)의 색소 생합성 유전자인 *PDS*(phytoene desaturase) 부위를 삽입하는 모식도를 나타낸 것이다. ▼ 바이러스가 암호화하는 프로테아제에 의해 바이러스 게놈이 하나의 단백질로 번역된 후 각각의 기능 단백질로 절단되는 부위이다.

도 8은 RaMV RNA1(A) 감염성 클론과 3개의 RaMV RNA2(a, b, g) 유래 VIGS 벡터 간의 혼합(RaMV Aa-PDS, RaMV Ab-PDS 및 RaMV Ag-PDS) 접종 후, 담배 및 무 식물체에서의 *PDS* 유전자의 발현 억제에 따른 표현형을 나타낸 것이다. Chunghwa: 무(*Raphanus sativus*).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 RaMV RNA2 감염성 재조합 클론에 목적 유전자를 삽입할 수 있는 MCS(multiple cloning site) 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 RaMV RNA2 유래의 재조합 VIGS(Virus-induced gene silencing) 벡터를 제공한다.

[0015] 본 발명의 RaMV RNA2 유래의 재조합 VIGS(Virus-induced gene silencing) 벡터에서, 상기 RaMV RNA2 감염성 재조합 클론은 5'→3' 방향으로 프로모터; 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 RaMV RNA2 핵산 서열; 및 아데닐산 중합반응신호(Polyadenylation signal) 부위;를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0016] 본 명세서에서, RaMV RNA1 감염성 클론은 RaMV RNA1(A)을 의미하고, RaMV RNA2 감염성 클론은 RaMV RNA2(a)를 의미하며, RaMV RNA3 감염성 클론은 RaMV RNA2(b)를 의미하고, RaMV RNA4 감염성 클론은 RaMV RNA2(g)를 의미한다.

[0017] 상기 아데닐산중합반응신호 부위는 RaMV RNA의 3' 말단에 RNA 중합효소에 의한 아데닐중합반응에 기여하는 역할을 하며, 바람직하게는 서열번호 26의 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0018] 용어 "프로모터"는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 중합효소가 결합하는 DNA 분자를 말하며, 본 발명의 T7 프로모터는 바람직하게는 서열번호 25의 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0019] 본 발명의 재조합 벡터는 프로모터를 포함할 수 있다. 상기 프로모터는 시험관 내 전사 또는 형질전환에 적합한 프로모터들로서, 바람직하게는 T7 프로모터, SP6 프로모터, CaMV 35S 프로모터, 액틴 프로모터, 유비퀴틴 프로모터, pEMU 프로모터, MAS 프로모터 또는 히스톤 프로모터일 수 있으며, 바람직하게는 T7 프로모터 및 SP6 프로

모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 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.

[0021] 상기 재조합 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스피노트리신과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신, G418, 블레오마이신 (Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin) 또는 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] VIGS는 바이러스 벡터에 식물유전자를 도입한 후 식물체를 감염시키면, 그 도입된 유전자의 내인성 식물유전자가 발현이 억제되는 현상을 말한다. 이는 PTGS(Post-transcriptional gene silencing)의 일종으로서, 전사-후(post-transcriptional), RNA 턴오버(RNA turnover) 및 뉴클레오티드 서열 특이적(nucleotide sequence-specific)이라는 특징들을 가진다. 따라서 VIGS 벡터를 이용하면 도입유전자의 기능을 신속하고 간편하게 대량으로 분석할 수 있다.

[0023] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다.

[0024] 본 발명의 VIGS 벡터에 삽입될 수 있는 목적 유전자에는 어떠한 제한도 없다. 상기 목적 유전자는 바람직하게는 유용 단백질을 코딩하는 유전자 또는 기능을 알 수 없는 단백질을 코딩하는 유전자일 수 있다. 유용 단백질은 현재, 식물 생명공학을 이용하여 상업적으로 생산이 이루어지고 있는 의약 및 산업용 등의 모든 단백질로 고부가가치의 유용 단백질로, 예컨대 효소, 호르몬, 항체, 사이토카인 등의 의학적 활용성이 있거나, 사람을 포함한 동물의 건강을 증진시킬 수 있는 영양성분을 다량 축적할 수 있는 단백질이나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 제초제 저항성 유전자, 질병 저항성 유전자, 살충제 저항성 유전자, 곡식 또는 과실의 품질에 영향을 주는 유전자, 스크리닝 가능한 표식 유전자, 환경 또는 스트레스 저항성 유전자 등이 포함될 수 있다.

[0025] 본 발명의 일 구현 예에서, 목적 유전자로서 색소 생합성 관련 유전자인 *PDS*(phytoene desaturase) 유전자를 사용하였으며 VIGS의 성공 여부를 확인하였다. *PDS* 유전자는 카로티노이드 생합성에 관여하는 효소를 코딩하고 있으므로, 이 유전자가 억제되는 경우 식물 잎의 백화현상을 관찰할 수 있다. 본 발명은 *PDS* 유전자를 안티 센스 방향으로 재조합 VIGS 벡터에 삽입하여 식물체에 감염 후, 식물체의 표현형에 변화(백화현상)가 나타나는 것을 확인하였다(도 8).

[0026] 본 발명의 재조합 벡터에서, 상기 MCS(multiple cloning site) 부위는 침묵시키고자 하는 목적 유전자를 삽입할 수 있는 부위이다.

[0027] 본 발명은 또한,

[0028] 1) 상기 RaMV RNA2 유래의 재조합 VIGS 벡터에 목적 유전자를 삽입하는 단계;

[0029] 2) 상기 목적 유전자가 삽입된 RaMV RNA2 유래의 재조합 VIGS 벡터 및 RaMV RNA1 감염성 재조합 클론을 주형으로 각각 시험관 내 전사를 수행하여 RaMV RNA2 VIGS 전사체 및 RaMV RNA1 전사체를 제조하는 단계; 및

[0030] 3) 상기 제조된 RaMV RNA2 VIGS 전사체 및 RaMV RNA1 전사체를 식물체에 혼합 접종하여 목적 유전자를 침묵시키는 단계;를 포함하는 목적 유전자가 침묵된 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0031] 본 발명의 목적 유전자가 침묵된 식물체의 제조 방법에서, 상기 RaMV RNA1 감염성 재조합 클론은 5'→3' 방향으로 프로모터; 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 RaMV(Radish mosaic virus) RNA1 핵산 서열; 및 아데닐산중합 반응신호(Polyadenylation signal) 부위;를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0032] 본 발명은 또한 상기 방법에 의해 제조된 목적 유전자가 침묵된 식물체를 제공한다.

[0033] 본 발명은 또한,

[0034] 1) 상기 RaMV RNA2 유래의 재조합 VIGS 벡터에 목적 유전자를 삽입하는 단계;

[0035] 2) 상기 목적 유전자가 삽입된 RaMV RNA2 유래의 재조합 VIGS 벡터 및 상기 RaMV RNA1 감염성 재조합 클론으로 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)를 각각 형질전환하여 RaMV RNA2 VIGS의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체 및 RaMV RNA1의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체를 얻는 단계; 및

[0036] 3) 상기 획득한 RaMV RNA2 VIGS의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체 및 RaMV RNA1의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체를 식물체에 혼합 접종하여 목적 유전자를 침묵시키는 단계;를 포함하는 목적 유전자가 침묵된 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0037] 용어 "침묵"이란 일반적으로 유전자의 발현이 하향조절(downregulation) 또는 완전히 억제(suppression)되는 현상을 말한다.

[0038] 본 발명의 목적 유전자가 침묵된 식물체의 제조 방법에서, 상기 RaMV RNA2 유래 제조한 VIGS 벡터 및 RaMV RNA1은 전술한 것과 같다.

[0039] 또한, 상기 목적 유전자는 유용 단백질을 코딩하는 유전자 또는 기능을 알 수 없는 단백질을 코딩하는 유전자일 수 있으며, 상기 유용 단백질을 코딩하는 유전자는 전술한 바와 같다.

[0040] 본 발명은 또한, 상기 제조 방법으로 제조된 목적 유전자가 침묵된 식물체를 제공한다. 상기 식물체는 바람직하게는 무(*Raphanus sativus*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0041] 본 발명은 또한,

[0042] 1) RaMV RNA1, RaMV RNA3 및 RaMV RNA4 감염성 재조합 클론으로 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)를 각각 형질전환하여 RaMV RNA1의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체, RaMV RNA3의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체 및 RaMV RNA4의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체를 얻는 단계 및

[0043] 2) 상기 획득한 RaMV RNA1의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체;와 RaMV RNA3의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체 또는 RaMV RNA4의 아그로박테리움 투메파시엔스 형질전환체;를 식물체에 혼합 접종하는 단계를 포함하는 RaMV에 대한 병원성이 증가된 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0044] 본 발명의 RaMV에 대한 병원성이 증가된 식물체의 제조 방법에서, 상기 RaMV RNA1, RaMV RNA3 및 RaMV RNA4 감염성 재조합 클론은 각각 순서대로 5'→3' 방향으로 프로모터; 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 RaMV RNA1 핵산 서열, 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 RaMV RNA3 핵산 서열 또는 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 RaMV RNA4 핵산 서열; 및 아데닐산중합반응신호(Polyadenylation signal) 부위;를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0045] 본 발명은 또한, 상기 방법으로 제조된 RaMV에 대한 병원성이 증가된 식물체를 제공한다. 상기 식물체는 바람직하게는 무(*Raphanus sativus*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0046] 이하, 본 발명의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0047] **재료 및 방법**

[0048] **1. RaMV(Radish mosaic virus) 분리**

[0049] 광주와 제주에서 채집한 무 및 배추로부터 RaMV 바이러스 병징(잎 모자이크/괴사)을 나타내는 시료를 채집하여 RaMV 5'-특이적 프라이머(5'-GGGATTAATCCTTATGGMATGG-3'; 서열번호 5)와 RaMV 3'-특이적 프라이머(5'-TTTCCAGCATACCAMGCTTCTA-3; 서열번호 6)을 사용하여 RaMV 유무를 진단하였다. 무 시료에서 RaMV 진단에 대한 양성반응이 나타났고, 해당 시료를 본 발명에 사용하였다.

표 1

[0050] 본 발명에 사용된 프라이머

프라이머	염기서열(서열번호)	PCR 산물 사이즈(bp)
RaMV_RdRp_F	GGGATTAATCCTTATGGMATGG (서열번호 5)	833
RaMV_RdRp_R	TTTCCAGCATACCAMGCTTCTA (서열번호 6)	

RNA1_PstI_T7_F	GAGACTGCAGTAATACGACTCACTATAGGGTATTAAAATTTTATTGAAATTTTAATAAACCGC (서열번호 7)	6,145
RNA1_PAS_XmaI_R	CCCGGGAAAAAAAAGAAATAATTATGTAATTAAAAAAAAGAAAATTTATTAAAATAACCAAATATCTATA (서열번호 8)	
RNA2_XhoI_T7_F	GAGACTCGAGTAATACGACTCACTATAGGGTATTAAAATTTTATTGAAATTTTGATAAACCGC (서열번호 9)	4,073
RNA2_PAS_XmaI_R	CCCGGGAAAAAAAAGAAATAATTATGTAATTAAAAAAAAGAAAATTTATTGAAAAGAAAACACACTCAAT (서열번호 10)	
RNA2-3UTR-MCS-F	AAAGGGCCCACGCGTGTCGACATTGGTTTCTTT TGRACACCTTYTCCAG (서열번호 11)	11,567
RNA2-3UTR-MCS-R	GGGGGCCCTTAGAATGCAAATTTATTGTTGAAGCCACG (서열번호 12)	
PDS-Rs-94-Sal1-F	AAAGTCGACGGAGGCTGTGATTTAATGGGAC (서열번호 13)	460
PDS-Rs-514-Apa1-R	AAAGGGCCCCCTTCCACTGCAACCGATC (서열번호 14)	
RNA1_seq_1	CAGATAAACATGTTACATGGC (서열번호 15)	-
RNA1_seq_2	GAATGGAATCTAGATTCTTG (서열번호 16)	-
RNA1_seq_3	CATACTTATGGAGATTTGTTCTC (서열번호 17)	-
RNA1_seq_4	GATACAACAAGATTCTTTCAAAG (서열번호 18)	-
RNA1_seq_5	GAGAAGCCCAAAACACGGTG (서열번호 19)	-
RNA1_seq_6	CTGGGTTTCCTCTCACTGTG (서열번호 20)	-
RNA2_seq_1	GATGGTGCAAGACAAAGTATC (서열번호 21)	-
RNA2_seq_2	GTAGTTTTCATAGAACGCTTG (서열번호 22)	-
RNA2_seq_3	ATCTGGAGCATCCTTGCAGC (서열번호 23)	-
RNA2_seq_4	ATGACTGTGCAGGATCGACC (서열번호 24)	-

[0051] *밑줄 친 부분: 제한효소 자리

[0052] **2. 총 RNA 추출 및 cDNA 합성**

[0053] 총 RNA는 트리졸 시약(TRIzol® Reagent; Life Technologues, USA)을 사용하여 상기 RaMV 진단에 대한 양성반응을 나타낸 시료로부터 추출하였다. 추출된 총 RNA는 -70℃에서 보관하였으며, 총 RNA와 다운스트림 프라이머, 리버트라 ACE-α cDNA 합성 키트(ReverTra Ace-α-®, TOYOBO, JAPAN)를 이용하여 cDNA를 합성하였다.

[0054] **3. RaMV RNA1 및 RNA2의 전장 cDNA 클론 구축**

[0055] RaMV는 6.4kb(RNA1) 및 3.8kb(RNA2) 두 개의 RNA로 구성되어 있는 2분절 양성 센스(bipartite positive sense) RNA 바이러스이다. 전장 cDNA 클론 구축을 위해 RaMV RNA1 및 RNA2의 5'-말단 및 3'-말단 바이러스 특이적 프라이머를 제작하였다. 구체적으로, RaMV RNA1 전장 cDNA 구축을 위해, 프라이머 세트는 레퍼런스 분리체(Accession NO: NC_010709.1)의 서열을 기초로 설계되었으며, 업스트림 프라이머(서열번호 7) 및 다운스트림 프라이머(서열번호 8)로 구성되어 있으며, 상기 업스트림 프라이머는 이에 포함된 T7 프로모터(5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')(서열번호 25)로부터 시험관 내 전사를 용이하게 하도록 설계되었으며, 상기 다운스트림에는 아데닐산중합반응신호(Polyadenylation signal; PAS)(5'-AAAAAAAAGAAATAATTATGTAATTAAAAAAAAGAAAATTTATT-3')(서열번호 26)가 포함된다. PCR은 상기 cDNA 및 KOD FX 네오 DNA 폴리머라아제를 이용하여 진행하였으며, PCR 조건은 (1) 2분 동안 94℃; 및 (2) 10초간 98℃; 6분 30초간 68℃로 35 사이클로 진행하였다. 최종 RT-PCR 산물은 0.8% 아가로오스 겔로 전기영동을 통해 분석하였으며, 상기 프라이머 세트로 증폭하여 6.4kb의 RaMV RNA1 산물을 얻었으며, 이를 *PstI* 및 *XmaI* 제한효소로 절단하고, 플라스미드 pGD의 *PstI* 및 *XmaI* 부위에 클로닝시켰다(도 1). 또한, RaMV RNA2 전장 cDNA 구축을 위해, 프라이머 세트는 레퍼런스 분리체(Accession NO: NC_010710.1)의 서열을 기초로 설계되었으며, 업스트림 프라이머(서열번호 9) 및 다운스트림 프라이머(서열번호 10)로 구성되어 있으며, 상기 업스트림 프라이머는 이에 포함된 T7 프로모터(서열번호 25)로부터 시험관 내 전사를 용이하게 하도록 설계되었으며, 상기 다운스트림에는 상기 다운스트림에는 아데닐산중합반응신호(Polyadenylation signal; PAS)(서열번호 26)가 포함된다. PCR은 상기 cDNA 및 KOD FX 네오 DNA 폴리머라아제를 이용하여 진행하였으며, PCR 조건은 (1) 2분 동안 94℃; 및 (2) 10초간 98℃; 4분 30초간 68℃로 35 사이클로 진행하였다. 최종 RT-PCR 산물은 0.8% 아가로오스 겔로 전기영동을 통해 분석하였으며, 상기 프라이머 세트로 증폭하여 4.0kb의 RaMV RNA2 산물을 얻었으며, 이를 *XhoI* 및 *XmaI* 제한효소로 절단하고, 플라스미드 pGD의 *XhoI* 및 *XmaI* 부위에 클로닝시켰다(도 2).

[0056] **4. RaMV RNA2의 VIGS(Virus induced gene silencing) 벡터 구축**

[0057] RaMV RNA2를 식물 내 유전자 침묵현상을 유도하는 바이러스 벡터로 개발하기 위하여, RNA2 cDNA 클론에 MCS(Multi cloning site)를 제작하였다(도 3). RaMV RNA2의 3'UTR 부분에 제한효소 *ApaI*, *MluI* 및 *SalI* 염기서열을 삽입하기 위해, 2개의 프라이머(서열번호 11 및 서열번호 12)를 이용하여 역 PCR(Inverse Polymerase Chain Reaction)을 수행하였다. 선상화 상태인 PCR 산물은 T4 DNA 리가아제(Promega, USA)를 이용하여 원형의 플라스미드로 만들어 대장균(*E.coli*)에 형질전환 후, VIGS 벡터로 사용되었다.

[0058] **5. 시험관 내 전사(*in vitro* transcription) 및 감염성 분석**

[0059] 시험관 내 전사법(*in vitro* transcription)를 위해 RaMV RNA1과 3개의 RNA2(a, b, g; 'RNA2, RNA3 및 RNA4'라 칭함)의 전장 cDNA 클론은 *XmaI* 제한효소를 사용하여 플라스미드의 선상화(linearization)를 주형으로 사용하였으며, 전사반응은 T7 RNA 폴리머라제(Promega, USA)를 이용한 캡 아날로그의 존재하에 수행하였다. 상기 RNA 전사체는 50mM의 인산 나트륨 완충액(pH 7.0)으로 500㎍/㎕로 조절한 후, 4~5의 잎 단계의 담배(*Nicotiana benthamiana*) 및 배추(*Brassica rapa*) 식물체를 대상으로 각각의 잎 당 10㎕(500㎍/㎕)의 전사체를 접종하였으며, 접종 20일 후에 어린 잎 조직으로부터 총 RNA를 추출한 후, RaMV 특이적 프라이머 세트(표 1; 서열번호 5 및 서열번호 6)를 이용하여 RT-PCR을 통해 감염성을 확인하였다.

[0060] **6. 아그로박테리움 침윤(Agroinfiltration) 및 감염성 분석**

[0061] 본 발명의 RaMV의 cDNA 감염성 클론으로 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) GV2260 균주를 형질전환시켰으며, 형질전환된 아그로박테리움은 50mg/ℓ의 카나마이신과 50mg/ℓ의 리팜피신을 함유한 LB 고체 배지에서 30℃에서 48시간 동안 배양하였으며, 상기 고체배지로부터 회수한 아그로박테리움 세포를 침윤 완충액(10mM MES, 10mM $MgCl_2$ 및 100uM 아세토시린곤)에 최종 OD_{600} 농도가 1.0이 될때까지 현탁시킨 후, 이를 4-5의 잎 단계의 담배(*N. benthamiana*) 잎에 접종하였다. 접종 20일 후에 어린 잎 조직으로부터 총 RNA를 추출한 후, RaMV 특이적 프라이머 세트(표 1; 서열번호 5 및 서열번호 6)를 이용하여 RT-PCR을 통해 감염성을 확인하였다.

[0062] **7. 감염된 담배, 무 및 배추의 진단**

[0063] 담배, 무 및 배추 식물체에 대해 접종 20일 후에 상위 잎을 채집하여 전술한 바와 같이 총 RNA를 추출하고, 역전사시켰으며, RaMV 특이적 프라이머(표 1; 서열번호 5 및 서열번호 6)를 이용하여 진단하였다. 상기 RaMV 특이적 프라이머는 NCBI의 Accession NO: NC_010709.1의 뉴클레오티드 서열을 기반으로 설계하였다. RT-PCR은 2㎕의 cDNA, 10pmol의 프라이머, 2㎕의 10×버퍼, 2㎕의 10mM dNTP 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℃.

[0064] **8. RaMV의 전체 게놈 시퀀싱**

[0065] RaMV의 감염성 클론의 전장 서열은 업스트림으로부터 순차적으로 RaMV RNA1과 RNA2(a, b, g; 이하 각각 'RNA2, RNA3 및 RNA4'라 칭함)의 염기서열을 얻고 이를 이용하여 RaMV 특이적 시퀀싱 프라이머(표 1; 서열번호 15 내지 24)를 제작하는 단계를 반복하여 전장의 염기서열을 밝혔다(Macrogen Inc., Korea).

[0066] **실시예 1. RaMV(Radish mosaic virus) 분리 및 이의 감염성 클론 제조**

[0067] 본 발명에서는 2014년부터 2018년까지 전국에서 십자화과 작물(무 및 배추)에 감염하는 바이러스 조사를 진행하였고, 광주 및 제주도에서 채집한 무 시료로부터 3개의 RaMV(Radish mosaic virus) 분리체(Aa, Bb 및 Gg)를 확보하였다. 상기 분리체의 완전한 뉴클레오티드 서열(RaMV RNA1_A; 서열번호 1, RaMV RNA2_a; 서열번호 2, RaMV RNA2_b; 서열번호 3, RaMV RNA2_g; 서열번호 4)은 상기 3개의 RaMV 분리체의 감염성 cDNA 클론으로부터 얻었다. 서열번호 1의 RaMV RNA1_A는 Aa 분리체의 6.4kb 크기의 RNA이고, 서열번호 2의 RaMV RNA2_a는 Aa 분리체의 3.8kb 크기의 RNA이며, 서열번호 3의 RaMV RNA2_b는 Bb 분리체의 3.8kb 크기의 RNA이고, 서열번호 4의 RaMV RNA2_g는 RaMV Gg 분리체의 3.8kb 크기의 RNA이다.

[0068] **실시예 2. 무에서 분리한 3개의 RaMV 분리체(RaMV_Aa, RaMV_Bb, RaMV_Gg)의 전장 감염성 클론(full-length infectious clone) 제조**

[0069] 상기 실시예 1에서 얻은 3개의 RaMV 분리체(RaMV_Aa, RaMV_Bb, RaMV_Gg)에 감염된 잎으로부터 총 RNA를 추출하였으며, 이를 T7 프로모터 서열과 *PstI* 제한효소 부위를 포함하는 5'-프라이머 및 아데닐산중합반응신호

(Polyadenylation signal)와 *XmaI* 제한효소 부위를 포함하는 3'-프라이머를 이용하여 증폭하고 바이너리 벡터 pGD에 클로닝하였다(도 1 및 도 2). 이를 통해 총 세쌍의 RaMV 분리체(RaMV_Aa, RaMV_Bb, RaMV_Gg)를 제작하였고 각각의 쌍을 아그로박테리움-침윤(agroinfiltration) 방법을 통해 담배(*N. benthamiana*) 식물체에 각각 접종하였다. 그 결과, RaMV_Aa의 RNA1(A)을 제외한 RaMV_Bb, RaMV_Gg RNA1(B, G)을 포함하는 감염성 클론 쌍에서는 감염성이 없음을 확인하였다. RaMV_Aa의 RNA1(A)을 포함하여 RaMV_Aa의 RNA2(a), RaMV_Bb의 RNA2(b), RaMV_Gg의 RNA2(g)를 각각 조합(RaMV Aa, RaMV Ab, RaMV Ag)하여 접종하였을 때에는 서로 다른 병징을 나타냄을 확인하였고, 이를 토대로 서로 다른 RaMV RNA2 감염성 클론의 특성에 의해 RaMV의 병원성이 달라짐을 확인하였다(데이터 미제시).

[0070] **실시예 3. RaMV_Aa, RaMV_Ab 및 RaMV_Ag 감염성 클론 조합의 병원성 비교**

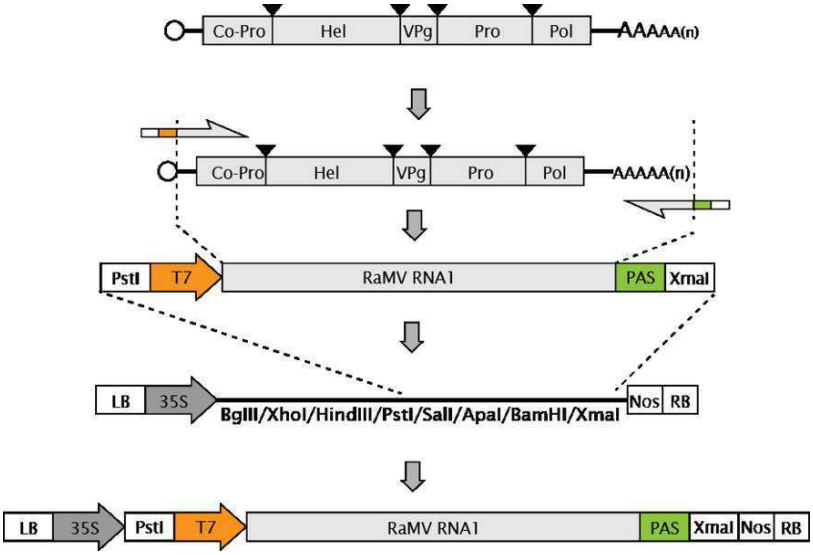
[0071] 본 발명의 RaMV_Aa의 RNA1을 상기 실시예 2에서와 같이 3개의 RNA2(a, b, c; RNA2, RNA3 및 RNA4라 칭함)와 각각 교차로 조합(RaMV RNA1 및 RaMV RNA2 조합: RaMV Aa, RaMV RNA1 및 RaMV RNA3: RaMV Ab, RaMV RNA1 및 RaMV RNA4 조합: RaMV Ag)을 이루어 아그로박테리움-침윤 방법을 통해 담배 식물체에 각각 접종하였으며(도 4 및 도 5), 담배에 접종한 10일 후 그 즙액을 배추와 무에 각각 접종하여 28일 및 18일 후에 확인하였다. 그 결과, 배추에서는 RNA2 분리체 간의 병징 차이가 뚜렷하게 나타나지 않았고, 담배에서는 RNA2 분리체 간에 유사한 병징이 나타났으며, 무에서는 RaMV Aa 감염성 클론 조합에서 가벼운 모자이크 증상을 유발하였으며, RaMV Ab 및 RaMV Ag 감염성 클론 조합에서는 강한 모자이크 증상과 괴사를 보였다(도 6).

[0072] **실시예 4. RaMV Aa_PDS, RaMV Ab_PDS, RaMV Ag_PDS 조합의 VIGS 효율 비교**

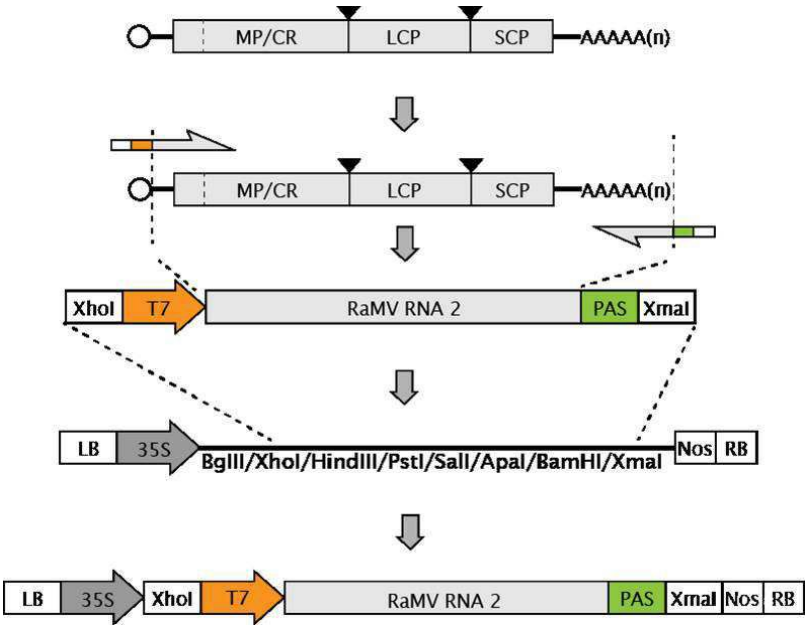
[0073] 본 발명의 실시예 2에서와 같이 무에 대하여 병원성이 서로 다른 RaMV Aa, RaMV Ab 및 RaMV Ag 조합의 VIGS 벡터 효율을 확인하고자 무의 색소 생합성 유전자인 *PDS*(phytoene desaturase)의 특정 영역을 3개의 RaMV RNA2(a, b 및 c; RNA2, RNA3 및 RNA4라 칭함) 감염성 클론의 MCS 영역에 각각 클로닝하였다(도 7). 무의 *PDS* 유전자의 특정 영역을 증폭하기 위해, 프라이머(표 1; 서열번호 13 및 서열번호 14)는 NCBI의 무(*Raphanus sativus*) 15-cis-phytoene desaturase(Accession NO: XM_018591809.1)의 뉴클레오티드 서열을 기반으로 설계하였다. 증폭된 무의 *PDS* 유전자 단편은 제한효소 *ApaI* 및 *SalI*을 처리하여, 동일하게 *ApaI* 및 *SalI*을 처리한 RaMV RNA2 VIGS 벡터에 T4 DNA 리가아제를 이용하여 각각 클로닝하였다. RaMV RNA1 감염성 클론과 제작된 3개의 RaMV RNA2, RaMV RNA3 및 RaMV RNA4 VIGS 벡터 조합(RaMV RNA1 및 RaMV RNA2 VIGS 벡터 조합: RaMV Aa_PDS, RaMV RNA1 및 RaMV RNA3 VIGS 벡터 조합: RaMV Ab_PDS, RaMV RNA1 및 RaMV RNA4 VIGS 벡터 조합: RaMV Ag_PDS)으로 담배(*N. benthamiana*)에 아그로박테리움-침윤 방법을 이용하여 접종하였으며, 담배에 접종한 10일 후 그 즙액을 무에 각각 접종하고 25일 후에 확인하였다. VIGS 벡터 간의 *PDS* 유전자 침묵 현상의 차이는 담배에서는 나타나지 않았으며, 무에서 RaMV Aa_PDS에 의해 *PDS* 유전자 침묵 현상이 강하게 나타나 잎 표면에서 하얀색으로 색소의 합성이 저해된 표현형을 확인할 수 있었다. 반면, RaMV Ab_PDS 및 RaMV Ag_PDS가 접종된 무에서는 기존의 모자이크와 괴사 병징이 나타나고 RaMV Ab_PDS 접종에서 백화 현상이 약하게 나타나는 것을 확인하였다(도 8).

도면

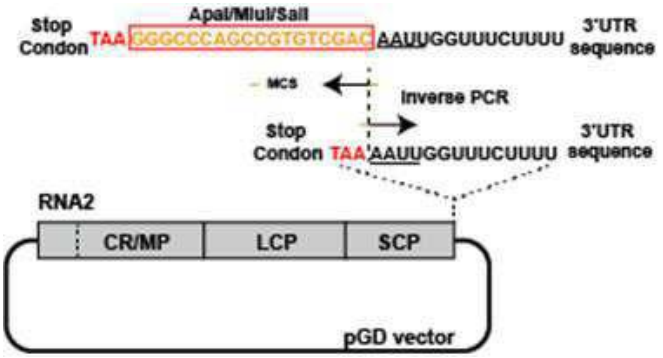
도면1



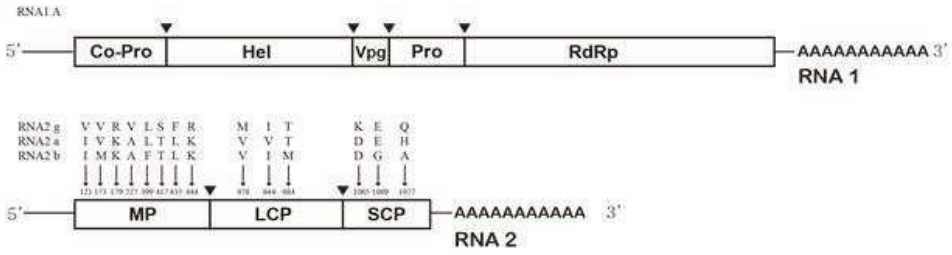
도면2



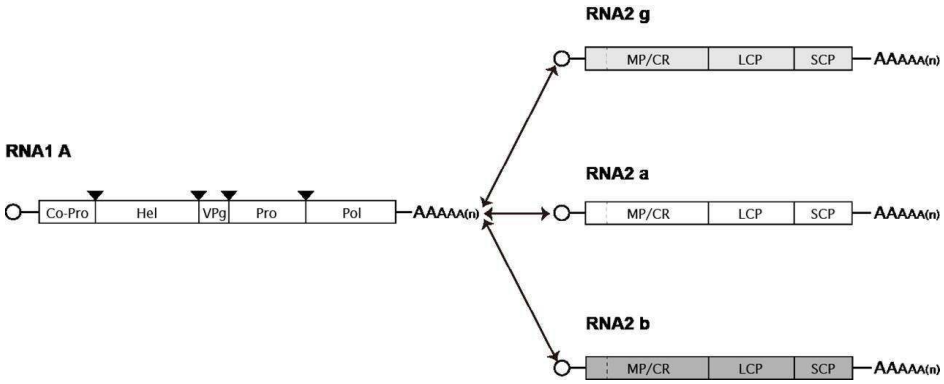
도면3



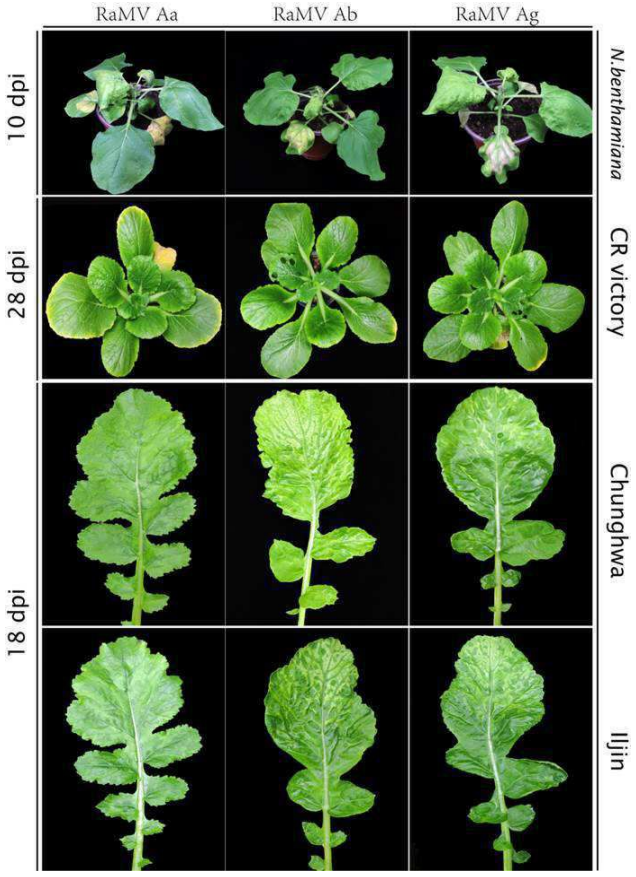
도면4


RNA1 A
5'
Co-Pro
Hel
Vpg
Pro
RdRp
AAAAAAAAAA 3'
RNA 1
RNA2 g
RNA2 a
RNA2 b
MP
LCP
SCP
AAAAAAAAAA 3'
RNA 2

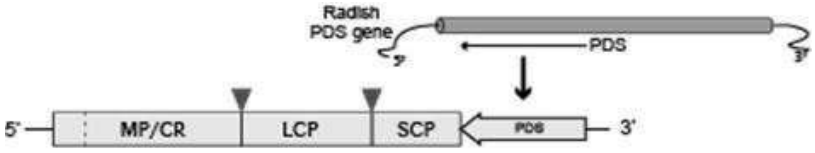
도면5


RNA2 g
MP/CR
LCP
SCP
AAAAA(n)
RNA1 A
Co-Pro
Hel
VPg
Pro
Pol
AAAAA(n)
RNA2 a
RNA2 b

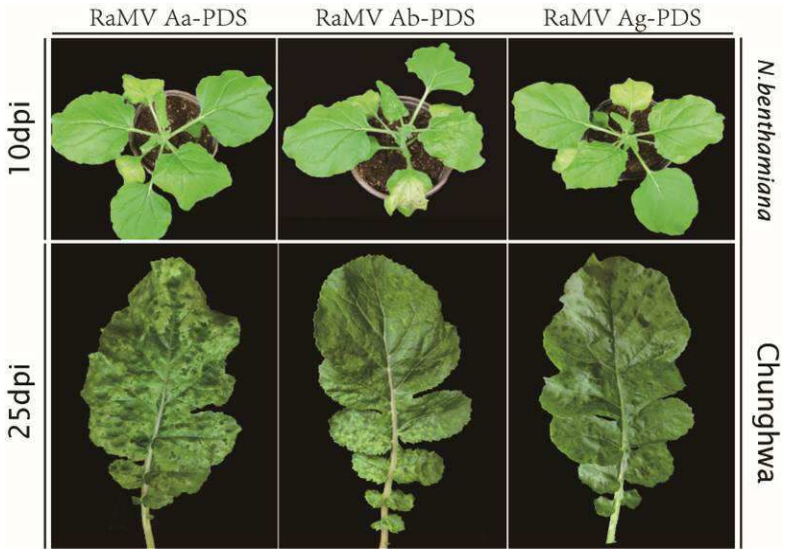
도면6


RaMV Aa
RaMV Ab
RaMV Ag
10 dpi
28 dpi
18 dpi
N.benthamiana
CR victory
Chunghwa
Iljin

도면7



도면8



서 열 목 록

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

<120> Recombinant virus-induced gene silencing vector from RaMV for functional analysis of useful genes in Brassicaceae cultivar and uses thereof

<130> PN19404

<160> 26

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 6065

<212> DNA

<213> Radish mosaic virus

<400> 1

tattaaaatt ttattgaaat tttaataaac cgcaatcagg accagtgtcc gaccagttac 60

aattacattc tcatttactt gtgaaggtag gtaaggggct cagaaacctc tcagactact 120

attgagattg gagactttgt ttcgcgtttt ctcaagcttt cttgagcaag ccattttgtg 180

cttgccagtt ggattgttat tgagaactta agtgttgtta gttattctgc gtttacatca 240

ttgctgtgcc cttcgttaaa ggaatatcag atattgtttg tgaacaccgt tacgcatttg 300

cttggttcaa atataccgca ggctttaagc cattaaaata atggcctgtg ttactttgga 360

tcgagatcaa cagagctatg ctctgatccc gtacgttaca gataaacatg ttacatggct 420

tctgaagtgt tatgttcgag taaacacttt tgatcctgat ttcccggtta ccaagcgtct 480

tgagcgccta agacagcatc attttgatct gttgtgctta ggttatgggg cgtttgttat 540

gcataggaat gccatggcac atgtgcctcg cacagtggag actgctgatt ttattttcga 600

agattatcat cagtttctct gtgatttggt gacaggaaat gctggaatca cccgccttag 660

aaaatacata aatgtttgct atggcactta cttggacatg gttcttgagt ttagtgcatg 720

cacacttgat gatgaagggg atgaagactt cgagctgcaa ggccttaaaa gttgtttaca 780

cagtctggct aattacatac catccacttt ggatagggcc atttcatggt caactaacaa 840

ggttattgac ggtatccgag cgcgcttcga agaggtggtt gctgaatggt gccctatggc 900

aatgcaggca tgttcctgga tttctaatat ctgggataaa gttactttgt gggtgcaaga 960

gtctatagag gcaatgcgct ggtttttgaa aggagcccgc gagttgtttt actatggagt 1020

atccattttg acggccagtt gtgttattgg gattgtggag aaaatattgg ttgctaccaa 1080

cttgttggct cctaatcgtg gacttgttga agccttttta tcaagtgctg ctctgactgg 1140

ggcatttatg tcattcaaga agaaagagga tccaacaccc atgataacaa tgatttccgt 1200

tcttgctgga gtggtttcag ctgctgttac tgccatgttt ggcgcgccct gcgttgctgt 1260

gcttcaaggc ccagttgagt tgttggagag tgctgctacc gcacttggga ttttctgcga 1320

aacgacattg ttgtccatgg gaaaaacctg ccaagcggtg aatcaaatta gtacatgtgc 1380

tggaaatttg aaagcgatgg caggaaaact ctttggaatt ttgcaggatt ttatttggaa 1440

ggtgtttgga atggaatcta gattcttgcg tgatgcgtcc cttatgtttg aggaagacgt 1500

tgaccaatgg ttgaaagata ttgcagagtg ccaggattca tatctggcaa aagcttattc 1560

ctcccaggat gacattatga aaatgcaggc cctgatcaag aaagggcatg acatgcgttc 1620

taaagtgtta aaagtcacta gccgcatctc cccagttctg gcaaatacag ttacacgggg 1680

tgtagagtcg gtggagaagc ttttacgaga gtctctgtgc cagggagtga aggcaacgag 1740

gaaaattcct tttgttgtgt atgcctatgg ggaatccaga actggtaaga cgttggttgt 1800

agacaagctc attacagact ttcagaacca ttttggtctt gggaaagaca ctgtttacag 1860

taggaatccc attgatcaat attggagtgg gtatcgaaga cagcccattg tgagcattga 1920

tgatttcgga gctgtggctt gtgacccttc tatggaagct cagatgatac cactggtatc 1980

gagcgcacct ctgcctttaa ctatggctgc tattgaggag aaaggaatga tgtttgactc 2040

aaagttcatc ttttgttctt ccaatttatt ggaggcaagc cctgagagca agctgcaaga 2100

taaccaggct ttccgtaata ggaggcatgt tctgataaat gtcaagctgg atgctaccaa 2160

gccatacaac atgcatgatt ttacggagaa tcagatctac cagattctga agtatgacaa 2220

tggtacgtat gttgttcagg ctgaattcca tacttatgga gatttgttct cttactgtct 2280

ggagagatgg gagaagcatg aaaatgagca aacagcgaat cttgctaata gtttggaaga 2340

gccaaaggca gatggagatt tcattaactt tgagttcttg atgcacacgc ttattaggcg 2400

gaatcttcct gacaaaatgg ttgatgttat ttttgaggag agaactaaga cgcagtttgt 2460

gcctcttgtt acctacaggc gaaaaggaaa gctctggagt tattacgtca gtcctgaagg 2520

aagaattcaa acaatagctg aatcagtgga ggatcctaag gcccttgcaa aggaagttga 2580

atcaatggac tttctgcggc ggatgtatga gatgctgaga tacaatgagg aaacagactt 2640

aatagtgaag atgcatctca aagatttagc cagagaggat ttctatgatg acaaaatgaa 2700

ctacattggc acctttggaa acgagagaga acacgcgcta atgcggtcta cttttgactc 2760

tatggcaggc tggcataagg tcgtgttgtg tggaatggga gttctccaag accgatgctc 2820

ctctgtgaag tggtatgatg gcataattga gaaaatccag gacaccatgt acacgttgta 2880

cagcaaggaa ataagtgagt ggccaatggg actaaagatt gttgttggag ttttgctcac 2940

atcgcttttt ggagctggac tttggaagtt aatgggagtt cttcagggaa caggtagcgt 3000

agctgccttg ggagttactg ctgccactca ttttggccac gagcatggag gagctaaagc 3060

tactgcacag agtcgaaaac ctaatcgata tgatgtggcg cagtacaagt acaggaatgt 3120

tcccatcacc aagcgagctt gggcacaggg agacatgcca atcagtcatg caacggcaat 3180

gatttttgat cgcatcaaag caagctggca atacggacac acggaagccc aaattgctat 3240

ggtacctgga agacgtttca ttggatatgc ccatttcttt cgcacgatag aacgcccaat 3300

tcaggtgcga atacacacag ctagtggctc tcagcccttg ttctacaagc ctgagaacat 3360

gcattacttt gaggagagtg agctttgcgt gtatgaagat agtgcgctcc aggacatagc 3420

acacacgtgc tgggatctat ttgagtggga ttttgagcag atacaacaag attctttcaa 3480

agcgttgttt ctttcatgca aaaggaagag cagcactgga caaccaaatc cagagtgggc 3540

tgatatagat gtaaggacac gttcagaatc acttatggtg caagaaggag agtactcacg 3600

tgttctccca cgctatctgg aatacacggc gccaacagtt aaccacgatt gtggttcttt 3660

aattgtggct gaagtgaaca aaacgttcaa gatcattggt attcatgtgg ctggttctgg 3720

tggtaccaaa gggtacgctt gtctgttgcc cccacttgtc aagaaggtcc aagcacagca 3780

tgcacagaag ttttttgatt atttgccgtt tgcggagaaa gaaggtgagg gcatagaaaa 3840

ggttgccatg ctacaaaaag gcatccacat ccccttgccc acaaagacag ctctggttga 3900

gacacccgtt gagtggcatt tggacacgcc ttgtgataag taccccagta ttttatctaa 3960
tgaagatcct cgcttggagg tatctggtca aactgactat gatccattca aagctggcat 4020
tttaaaatac aaagacccca tgggtgtttt ggacaataag ttgctggtgg aggtctgtga 4080
ggagattgaa cagagctggc tagactgtaa agaggaagga gaaacttttg aagaagtgag 4140
cttggaacaa gccattaatg gagtcaaaga tgttgattac atggacagaa tcccacttgc 4200
gacatcagaa ggatttcccc acattttgtc tcgagcacac ggtgagaaag gcaagatacg 4260
ttttgtggaa ggtgactctg aggaaatgat gttgattcca ggaaccagtg tgtcagaagc 4320

tctcgacatt atggaggctc agctggaaaa agaggttcca actttaattg gaatagagtg 4380
ccccaaagac gagaagctgc cacatcggaa aatatttgag aagcccaaaa cacgttgctt 4440
ttccatttta ccaatggaat acaacttgtt ggtgcgcagg aggtttttga cttttgtccg 4500
ttttatcatg cgaaatagaa atgtgctacc gtgtcaagtt gggattaatc cttatggcat 4560
ggagtggacg gatttggcaa tgcgtttgaa gagaaagggc aacaacatct tatgctgtga 4620
ttacaatagt ttcgatgggt tgctttccaa gcaagtgatg aaagccatgt ctgacgtgat 4680
aaacaacttc tgtggtggta gtgagagttc taaacggaaa cgcgagcact tgctgatggc 4740

gtgttgttct cgatatgcca tttgcaagaa tacagtatgg aaagttgaat gtggtattcc 4800
atctgggttt cctctcactg tgatatgtaa ctccattttc aatgagatcc tgatccgata 4860
cagcttcaaa gcaattttgc gttctcagaa gatacctgac atgatttctg tgagctttga 4920
tgagtatgtg agcatggttg tttatggaga tgacaatttg ctgtcggtga gtgaggttat 4980
caagccctac tttgatggta aacgactgaa ggagttttta gccactctcc atattaccat 5040
cactgacggg aaagacaaga caagcccttt tcttcaattt cgacgtttgg aggactgtga 5100
ttttctcaag agaggtttca aaaaccgagg tttgtactgg gatgccccag aagagaagga 5160

gagtttgtgg gcacagcttc actatgtgaa cgctaacaac cttgagaagc atgaagccta 5220
caagacaaat cttgtgactg ttttacgtga gctgttcatg tgggacaaga atgagtgtgc 5280
tgagcttaga agaaaggcat tacagagaat ttcatggttg gagccgagtg atttacagac 5340
agttgctcag atagaagctt ggtatgctgg aaatagggga aaatatctac cagactcgag 5400
tgatagcata agcatgcttc tccagaagga gaacttagga cctttgttag caccccaagg 5460
agagcagagg ggaatagaaa tcacacccag ggtaaggact gccaatctgg cacacgaaag 5520
ttttaaaacg gctaaagatg atgaggtctg gatcttgtgt caaacaatgt atccacatgg 5580

gcgtttacca gagggagtta ttgctgttaa ctggccagtt ggaacaggaa gaggtggctt 5640

gccaacatca acttggatgg atgagaactt caagcgtccc acgtccgagc ttcggaaaaa 5700

attaagatgt gctttggata atggcaagag gttggtcttt gccacacgtg aaggaatttt 5760

gccgtgtaac attatggctg tgttgctttt agtacttgag aagaagatga agccagaaga 5820

gagcaatgtt cttttgtctg ccgctatttt acaatgtaag tcgttaggtt atttgcctag 5880

agagtgtgat tttgcttttt agactttgta gatcttcttt gtgcatttga aagtctgtgg 5940

aaatgcactg gttcatggaa caggaccacc taggaggtag gactctgggt tttattgttc 6000

ttgtgtgcta tatataaatt accataaata tcattttagc ttctatatag atatttggtt 6060

atttt 6065

<210> 2

<211> 3993

<212> DNA

<213> Radish mosaic virus

<400> 2

tattaaaatt ttattgaaat tttgataaac cgcaatcagg accagtgtcc gaactgttac 60

ttttgaactc agttttcaac gaaggcaggt aattggctta caaaccgatc agactgtcat 120

tgagaacaaa agaatcaggt tacgctaaag taaggacact cgtattgttc cattggtgct 180

tctgcatctt tgggcactac agttaccttg ttgtttgcat tcctaaccag acgaaggtgg 240

gtaacgagct tttaaacttg tcagaccacc acaggaaacg atagtgcgat ttcacattgc 300

tgtgcctctc agagaatatc agatattgtg gaagcgtgcg ccggggtttg aagttacgcc 360

cgtctaaaat caattaaatc attggacgtg aatgacttac ttttcccctc aaaatcattt 420

tgtgaattac atattagcta ggcacggttg cgacgaggat tcaggggact tccgagtctc 480

tcctcaacag aaatacaacg aattactagt gcaatctcct ttaaagtttg ttttctttat 540

tttctttttc cattttgtag ttttcataga acgcttgttt ggatttcggt ttgccgcaga 600

cagttggtta tcgtaccgtt ttcaaggttt gtggagaagt ttgagaaagc ccatagagtt 660

caccaaagct cgaaaggctg ccctagcaga attcgcacca caaccatttg ttttttaga 720

tcccattatc acatattcag cagatagtgt tatagatatg gaacaggtta tggaacgtgg 780

agttgcagca aaagccttga tggtgcaaga caaagtatca atcaacaaga aacataagta 840

cgaaggcatc aaggattgca ttccatcagg aaaggacatg tacgtttttc gtcagaagat 900

gtttgacatg ttgatgcgcc gaagaaagag caaggaagtt gacatcactc gcattgaagg 960

gagtgagata atagaaatga aacacatgga cgttgggact ttaactcctg gtgaaaatgt 1020

tgtgctaaat gtcaagcttg ttgatgacga tagcgttttg agcgctaaag ccagtgatta 1080

cactcttcac cattccgtac gtgaatcaaa gtatgctaca gccatgcatg ttggagctat 1140

tgaagtcatt tttgatagtt ttgcgtcccc ttctagtgac atagttgggg gagtggttct 1200

agtggataca gctcataaaa cagttgaaaa tgctgtgcgg agtgtatttg tgacagggct 1260

agcaggtgga aagatgatac gtgtgctcat gtacccaaac acactagtcg agattggacc 1320

taagatgaat gagagattca aactagtgtg taccacttct aacagcgaca ttgcagatgg 1380

ttttaatcta gctgcagtca aagtaaatgt ggtgggctgt actcagagct taactgcacg 1440

atacgtgccg caaccattct tggaacaatg cctcaatgaa gagcgtggca ccgttgttga 1500

gtacttagga cagatgtctt acgtgatgca caattctaac gagatatctg aagaatttct 1560

ggcacaacag acaatggcgt ttgactttgg gagcaacctg cgtctgcaag gatcttcatc 1620

tggagcatcc ttgcagcgta ccacctcaat gagatatttg gttggcccaa gacaaagttt 1680

taaacaactg gagctagata aagaaccatc agcatttgaa aagaaaagac ttgaggcaaa 1740

ggacggggca gacaaattcc gtgactcaac gtttgtggac cctgtgtatg ggaagacaag 1800

aagagctttc ggtcagactt ctgtgacgcg ctctttgctt aacagatttt cctctgccaa 1860

tgaaacagaa gggactcccc ttgacaccaa gatagcaaga acaaaaattt tgctcacaaa 1920

agttatggca ggaggaaaga tcttgtacac ggcgcgtttg agcgacgttc ttctaaataa 1980

agaccagagg gctgctattt cttttcagag aacccatgtc caacacagga aattggtggc 2040

tttagcaact ttgggagtac cagaaaacac tgggtgtgct ttaatgatgt gttacaacag 2100

tggagtacga ggaaaagcgg ttgttgatgc ttatacagcg tcggcagagg ctagtgtgat 2160

ttggaatcct gcctgtcagc ggcaagcaat gttggaaata gatgtcaatc cgtgccagag 2220

tggatggagc tatcagtatc tcagacagac caacagctac tttaatgtgg tatgcatttc 2280

gggttggacg acaactcctt taacagattt gtctatgacc atagattggt atctaagctc 2340

tgaagaaagt gtgacttcta tatactatgc ttcaggagga aatcctgtga taaagctgaa 2400

caggtggatg gggcgattga ttttcccaca gggaactgaa atgacaatgc aacgcatgcc 2460

cttggccata ggaggtggag ctggaggaaa tggattggtg tatatgaata tgccaaatgc 2520

cttgtgctct ttatggaggt acatcaaagg aggagttaag tttgaggtga tcaagctgag 2580

ctctccctat gtaaaggcaa ccatagcttt ctttatagct tttactgacg ttgatgcaac 2640

actacccaat cttgaagcat atccacataa gcttgttcag ttcgcagaga ttcaagacag 2700

agtgacgatt gaatttgata aagatgaatt tgtcatggcc tggtcttcac aagttcacac 2760

caatgtacct atagatcagg atgggtgtcc ttatttgtat gctgtggttc acgactgtgc 2820

aggatcgacc attcccggtg atttcaacat aggagttgtt ttgaaagaga tggttgatgt 2880

ggaagctata ggaagacatc caggatggaa aggggctcgc cctctgccag cgtcgcctca 2940

ggggttgcgt aagagttcgt caggtgtatg gaatgagttg tacacaatta gaggccctcc 3000

tgaggctaaa tccactgagg ttgttcagtt cgcaattgat ctcataggtg tcggtatttc 3060

taccgcagga cgcggaacat ggtcactgga aactagtaat agccctatga acaatttgct 3120

gcgtacggct acatggaaga gcggaacaat ccattttcaa gttcttatgg aagggaatcc 3180

tttgattaag aggggagatt gggcttctta ctgtgagatt tcattggtcc agagtgctaa 3240

agatacaaca ctgtcaagtc gtaattgggt catgaaagat ccttcctcat gggagctgga 3300

gtttgatatt aagattgaag gacctaatgc tggttttgaa aattgggagg cccacttgag 3360

caaccaaaca agttggtatt tgacgtttgc ggtttataac cctgatcaaa ccactgtgtt 3420

tactgtgaat ggtatgctta atgatgattt ctgctgtgct ggtaacacac tgatgcctcc 3480

tttcttagag ccacaaagtt tagcttcaga taggacacct ttgtcacaga tgacctttag 3540

ctatgaggac aacttggtaa gggatgttga tccgccagac ccagataacg ttcagggaag 3600

gccagaaact agcagtgatc aagaacgtag actgcagcag cagaggaagc gtggcttcaa 3660

caataaattt gcattctaaa ttggtttctt ttggacacct tctccagttt tctttagttt 3720

tggtgtattt gcagttcact tgtttccttt cgttttctta tctagagatt tttaggtttt 3780

agtatttatc ttctttcaat ttgtgtgttt gcaagttttt tatgttagtt tgaatattag 3840

agtaaatctt ctttggatgt ttgaaagtct gtggaaacat tccggttcag ggagcaggac 3900

cgcctaggag gtaggactct gggtttagtt gctctcacat gttataaata gaatacattt 3960

gcttactttt gttattgagt gtgttttctt ttc 3993

<210> 3

<211> 3992

<212> DNA

<213> Radish mosaic virus

<400> 3

tattaaaatt ttattgaaat tttgataaac cgcaatcagg accagtgtcc gaactgttac 60

ttttgaattc aattttcaac gaaggcaggt aattggctta caaaccgatc agactgtcat 120

tgagaacaaa agaatcagat tacgctaaag taaggacact cgtattgttc cattggtgct 180

tctgcatctt tgggcactac agttaccttg ttgtttgcat tcctaaccag acgaaggtgg 240

gtaacgagct tttaaacttg tcagaccacc acaggaaacg atagtgcgat ttcacattgc 300

tgtgcctctc agagaatatc agatattgtg gaagcgtgcg ccggggtttg aagttacgcc 360

cgtctaaaat caattaaatc attggacgtg aatgacttac ttttcccctc aaaatcattt 420

tgtgaattac atattagcta ggcacggttg cgacgaggat tcaggggact tccgagtctc 480

tcctcaacag aaatataacg aattactagt gcaatctcct ttaaagtttg ttttcttcat 540

tttctttttc cattttgtag ttttcataga acgcttgttt ggatttcggt ttgccgcaga 600

cagttggtta tcgtaccgtt ttcaaggttt gtggagaagt ttgagaaagc ccatagagtt 660

caccaaagct cgaaaggctg ccctagcaga atttgcacca caaccatttg tttttctaga 720

tcccattatc acgtattcag cagatagtgt tatagatatg gaacaggtta tggaacgtgg 780

agttgcagca aaagccttga tggtgcaaga caaagtatca atcaacaaga aacataagta 840

cgaaggcatc aaggattgca ttccatcagg aaaggacatg tacgtttttc gtcagaagat 900

gtttgacgtg ttgatgcgcc gaagaaagag caaggaagtt gacatcactc gcattgaagg 960

gagtgagata atagaaatga aacacatgga cgttgggact ttaactcctg gtgaaaatgt 1020

tgtgctaaat gtcaagcttg ttgatgacga tagcgttttg agcgctaaag ccagtgatta 1080

cactcttcac cattccgtac gtgaatcaaa gtatgctaca gccatgcatg tcggagctat 1140

tgaagtcatt tttgatagtt ttgcgtcccc ttctagtgac atagttgggg gagtggttct 1200

agtggataca gctcataaaa cagttgaaaa tgctgtgcgg agtgtatttg tgacagggct 1260

agcaggtgga aagatgatac gtgtgctcat gtacccaaac acactagtcg agattggacc 1320

taagatgaat gagagattca aactagtgtg taccacttct aacagcgaca ttgcagatgg 1380

ttttaaccta gctgcagtta aagtaaatgt ggtgggctgt actcagagct taactgcacg 1440

atacgtgccg caaccattct tggaacaatg cctcaatgaa gagcgtggca ccgttgttga 1500

gtacttagga cagatgtctt acgtgatgca caattctaac gagatatctg aagaatttct 1560

ggcacaacag acaatggcgt ttgaccttgg gagcaacctg cgtctgcaag gatcttcatc 1620

tggagcatcc ttgcagcgta ccacctcaat gagatatttg gttggcccaa gacaaagttt 1680

taaacaactg gagctagata aagaaccatc agcatttgaa aagaaaagac ttgaggcaaa 1740

ggacggggca gacaaattcc gtgattcaac gtttgtggac cctgtgtatg ggaagacaag 1800

aagagctttc ggtcagactt ctgtgacgcg ctctttgctt aacagatttt cctctgccaa 1860

tgaaacagaa gggactcccc ttgacaccaa gatagcaaga acaaaaattt tgctcacaaa 1920

agttatggca ggaggaaaga tcttgtacac ggcgcgtttg agcgacgttc ttctaaataa 1980

agaccagagg gctgctattt cttttcagag aacccatgtc caacacagga aattggtggc 2040

tttagcaact ttgggagtac cagaaaacac tgggtgtgct ttaatgatgt gttacaacag 2100

tggagtacga ggaaaagcag ttgttgatgc ttatacagcg tcggcagagg ctagtgtgat 2160

ttggaatcct gcctgtcagc ggcaagcaat gttggaaata gatgtcaatc cgtgccagag 2220

tggatggagc tatcagtatc tcagacagac caacagctac tttaatgtgg tatgcatttc 2280

gggttggacg acaactcctt taacagattt gtctatgacc gtagattggt atctgagctc 2340

tgaagaaagt gtgacttcta tatactatgc ttcaggggga aatcctgtga taaagctgaa 2400

caggtggatg gggcgattga ttttcccaca gggaactgaa acgacaatgc aacgcatgcc 2460

cttggccata ggaggtggag ctggaggaaa tggattggtg tatatgaata tgccaaatgc 2520

cttgtgctct ttatggaggt acatcaaagg aggagttaag tttgaggtga tcaagctgag 2580

ctctccctat gtaaaggcaa ccatagcttt ctttatagcc tttactgacg ttgatgcaac 2640

actacccaat cttgaagcat atccacacaa gcttgttcag ttcgcagaga ttcaagacag 2700

agtgacgatt gaatttgata aagatgaatt cgtcatggcc tggtcttcac aagttcatac 2760

caatgtacct atagatcagg atgggtgtcc ttatttgtat gctgtggttc acgactgtgc 2820

aggatcgacc attcccggtg atttcaacat aggagttgtt ttgaaagaga tggttgatgt 2880

ggaagctata ggaagacatc caggatggaa aggggctcgc cctctgccag cgtcgcctca 2940

ggggttgcgt aagagttcgt caggtgtatg gaatgagttg tacacaatta gaggccctcc 3000

tgaggctaag tccactgagg ttgttcagtt cgcaattgat ctcataggtg tcggtatttc 3060

taccgcagga cgcggaacat ggtcactgga aactagtaat agccctatga acaatttgct 3120

gcgtacggct acatggaaga gcggaacaat ccattttcaa gttcttatgg aagggaatcc 3180

tttgattaag aggggagatt gggcctctta ctgtgagatt tcattggtcc agagtgctaa 3240

agatacaaca ttgtcaagtc gtaattgggt catgaaagat ccttcctcat gggagctgga 3300

gtttgatatt aagattgaag gacccaatgc tggttttgaa aattgggagg cccacttgag 3360

caaccaaaca agttggtatt tgacgtttgc ggtttataac cctgatcaaa ccactgtgtt 3420

tactgtgaat ggtatgctta atgatgattt ctgctgtgct ggtaacacac tgatgcctcc 3480

tttcttagag ccacaaagtt tagcttcaga taggacacct ttgtcacaga tgaccttcag 3540

ctatgaggac aacttggtaa gggatgttga tccgccagac ccagataacg ttcaggaaag 3600

gccagaaact agcagtgatc acgaacgtag actgcagcag cagaggaagc gtggcttcaa 3660

caataaattt gcattctaaa ttggtttctt ttggacacct tctccagttt tctttagttt 3720

tggtgtattt gtagttcact tgtttccttt cgttttctta tctagagatt tttaggtttt 3780

agtatttatc ttctttcaat ttgtgtgttt acaagttttt atgttagttt gaatattaga 3840

gtaaatcttc tttggatgtt tgaaagtctg tggaaacatt ccggttcagg gagcaggacc 3900

gcctaggagg taggactctg ggtttagttg ctctcacatg ttataaatag aatacatttg 3960

cttacttttg ttattgagtg tgttttcttt tc 3992

<210> 4

<211> 3992

<212> DNA

<213> Radish mosaic virus

<400> 4

tattaaaatt ttattgaaat tttgataaac cgcaatcagg accagtgtcc gaactgttac 60

ttttgaactc agtttttaac gaaggcagat aattggctta taaaccgatc agactgtcat 120

tgagaacaaa acaatcaggt tacgctaaag taaggacact tgtattgttc cattggtgct 180

tttgcatctt tgggcactac agttaccttg ttgtttgcat tcctaaccag acgaaggtgg 240

gtaacgagct tttaaacttg tcagaccacc acaggaaacg atagtgcgat ttcacattgc 300

tgtgcctctt agagaatatc agatattgtg aaagcgtgcg ccggggtttg aagttacgcc 360

cgtctaaaat caattaaatc attggacgtg aatgacttac ttttcccctc aaaatcattt 420

tgtgaattac atattagcta ggcacggttg cgacgaggat tcaggggact tccgagtctc 480

tcctcaacag aaatacaacg aactactagt gcaatctcct ttaaagtttg ttttctttat 540

tttctttttc cattttgtag ttttcataga acgcttgttt ggatttcggt ttgccgcaga 600

cagttggtta tcgtaccgtt ttcaaggttt gtggagaagt ttaagaaagc ccatagagtt 660

taccaaagct cgaaaggctg ccctagcaga atttgcacca caaccatttg tttttctaga 720

tcccattatc acgtattcag cagatagtgt tgtcgatatg gaacaggtta tggaacgtgg 780

agttgcagca aaagccttga tggtgcaaga caaagtatca atcaacaaga aacataagta 840

tgaaggcatc aaggattgca ttccatcagg aaaggacatg tacgtttttc gtcagaagat 900

gtttgacgtg ttgatgcgcc gaagaaggag caaggaagtt gacatcactc gcattgaagg 960

gagtgagata atagaaatga aacacatgga cgttgggact ctaactcctg gtgaaaatgt 1020

tgtgctgaat gtcaagctcg ttgatgatga tagtgttttg agcgctaaag tcagtgatta 1080

cactcttcac cattccgtac gtgaatcaaa gtacgctaca gccatgcatg ttggagctat 1140

tgaagtcatt tttgatagtt ttgcgtcccc ttctagtgac atagttgggg gagtggttct 1200

agtggacaca gctcataaaa cagttgaaaa tgctgtgcgg agtgtgtttg tgacagggtt 1260

ggcaggtgga aagatgatac gtgtgctcat gtacccaaac acactagtcg aaattggacc 1320

taagatgaat gagagattca aactagtgtg cactacttct aacagcgata ttgcagatgg 1380

ttttaaccta gctgcagtca aagtaaacgt ggtgggctgt acccagagct taactgcacg 1440

atacgtgccg caaccatttt tggaacaatg cctcaatgag gagcgtggca ccgtagttga 1500

gtacttagga cagatgtctt acgtgatgca caattccaac gaaatatctg aagaatttct 1560

ggcacaacag acaatggcgt ttgaccttgg gagcaacctg cgtctgcaag ggtcttcatc 1620

tggagcatcc ttgcagcgct ctacctcaat gagatatttg gttggcccaa gacaaagttt 1680

taaacaactg gagccagata aagaaccgtc agcatttgaa aggaaaagac ttgaggcaaa 1740

ggacggggca gacaaattcc gtgactcaac gtttgtggat cctgtgtatg ggaagacaag 1800

aagagctttt ggtcagactt ctatgacgcg ctctttgctt aacagatttt cctctgccaa 1860

tgaaacagaa gggacccccc ttgacaccaa gatagcaaga acaaaaattt tgcttacaaa 1920

agttatggcg ggaggaaaga tcttgtacac ggcgcgtttg agcgacgttc ttctgaataa 1980

agaccagagg gctgctattt cttttcagag aacccatgtc caacacagga aattggtggc 2040

tttagcaact ttgggagtac cagaaaacac tgggtgtgct ttaatgatgt gttacaacag 2100

tggagtacga ggaaaggcgg ttgttgatgc ttatacagcg tcggcagagg ctagtgtgat 2160

ctggaatcct gcctgtcagc ggcaagcaat gttagaaata gacgtcaatc catgccagag 2220

tggatggagc tatcagtatc tgagacagac caacagctac tttaatgtgg tatgcatttc 2280

gggttggaca acaactcctt taacggattt gtctatgacc atagattggt atttgagctc 2340

tgaagaaagt gtgacctcta tatactatgc ttcaggagga aatcctgtga taaagctgaa 2400

caggtggatg gggcgattga ttttcccaca gggaactgaa acgacaatgc aacgcatgcc 2460

cttggccata ggaggtggag ctggaggaaa tggattggtg tatatgaata tgccaaatgc 2520

cttgtgctcc ttatggaggt atatcaaagg aggtgttaag tttgaggtga tcaagctgag 2580

ctctccttat gtaaaggcaa ctatagcttt cttcatagct tttactgacg tcgatgcaac 2640

actacccaat cttgaagcat atccacacaa gcttgttcag ttcgcagaga ttcaagacag 2700

agtgacgatt gagtttgata aagatgaatt cgtcatggcc tggtcttcac aagttcacac 2760

caatgtacct atagatcagg atgggtgtcc ttatttgtat gctgtggttc atgactgtgc 2820

aggatcgacc attcccggtg atttcaacat aggagttgtc ttgaaagaga tggttgacgt 2880

ggaagctata ggaagacatc caggatggaa aggggctcgc cctttgccag cgtcacctca 2940

agggttgcgt aagagttcat caggtgtatg gaatgaatta tacacaatta gaggtcctcc 3000

tgaggctaaa tccaccgagg ttgttcagtt tgcaattgat ctcataggtg tcggtatttc 3060

taccgcagga cgcggaacat ggtcactgga aactagtaat agccctatga acaatttgct 3120

gcgtacggcc acgtggaaga gtggaacaat ccattttcaa gttcttatgg aagggaatcc 3180

tttgatcaag agaggagatt gggcttctta ctgtgagatt tcattggtcc agagtgctaa 3240

agacaccaca ctatcaagtc gcaattgggt catgaaagat ccttcctcat gggagctgga 3300

gtttgatatt aagattgaag gacctaatgc tggttttgaa aattgggagg cccatttgag 3360

caaccaaaca agctggtatt tgacgtttgc ggtttataac cccgatcaaa ccactgtgtt 3420

tactgtgaat ggtatgctta acgatgattt ctgctgtgct ggtaacacgc tgatgcctcc 3480

tttcttggaa ccacaaagct tagcttcaga cagaacacct ttgtcacaga tgaccttcag 3540

ctatgaggac aacttggtaa gggatgttga tccgccagac ccaaacaacg ttcaggaaag 3600

gccagaaact agcagtgatc aagaacgtag actgcagcag cagaggaagc gtggcttcaa 3660

caataaattt gcattctaaa ttggtttctt ttgaacacct tttccagttt tctttagttt 3720

tggtgtgttt gtagtccact tgtctccttt cattttctta tctaaagatt tttaggttct 3780

agtatttatc ttctttcagt ttgtgtgttt acaagttttt atgttagttt aaacattaga 3840

gtaaatcttc tttggatgtt tgaaagtctg tggaaacatt ccggttcagg gagcaggacc 3900

gcctaggagg taggactctg ggtttatttg ctctcacatg ttataaatag aacacatttg 3960

cttacttttg ttattgagtg tgttttcttt tt 3992

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

gggattaatc cttatggmat gg 22

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

tttccagcat accamgcttc ta 22

<210> 7

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

gagactgcag taatacgact cactataggg tattaaaatt ttattgaaat tttaataaac 60

cgc 63

<210> 8

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

cccgggaaaa aaaagaaata attatgtaat taaaaaaaag aaaatttatt aaaataacca 60

aatatctata 70

<210> 9

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

gagactcgag taatacgact cactataggg tattaaaatt ttattgaaat tttgataaac 60

cgc 63

<210> 10

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

cccgggaaaa aaaagaaata attatgtaat taaaaaaaag aaaatttatt gaaaagaaaa 60

cacactcaat 70

<210> 11

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

aaagggccca cgcgtgtcga cattggtttc ttttgracac cttytccag 49

<210> 12

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

gggggccctt agaatgcaaa tttattgttg aagccacg 38

<210> 13

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

aaagtcgacg gaggctgtga tttaatggga c 31

<210> 14

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

aaagggcccc cttccactgc aaccgatc 28

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

cagataaaca tgttacatgg c 21

<210> 16

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

gaatggaatc tagattcttg 20

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 17

catacttatg gagatttgtt ctc 23

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 18

gatacaacaa gattctttca aag 23

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 19

gagaagccca aaacacggtg 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 20

ctgggtttcc tctcactgtg 20

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 21

gatggtgcaa gacaaagtat c 21

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 22

gtagttttca tagaacgctt g 21

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 23

atctggagca tccttgcagc 20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 24

atgactgtgc aggatcgacc 20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> T7 promoter

<400> 25

taatacgact cactataggg 20

<210> 26

<211> 44

<212> DNA

<213> Polyadenylation signal

<400> 26

aaaaaaaaga ataattatg taattaaaaa aaagaaaatt tatt 44