



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0141225
(43) 공개일자 2014년12월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/60 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0062728
(22) 출원일자 2013년05월31일
심사청구일자 2013년05월31일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
고영호
경기 안양시 동안구 관평로170번길 15, 801호 (관양동, 일송빌딩)
강재순
서울특별시 서대문구 수색로 100 DMC 래미안 e-편한세상 109동 1501호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강성혜

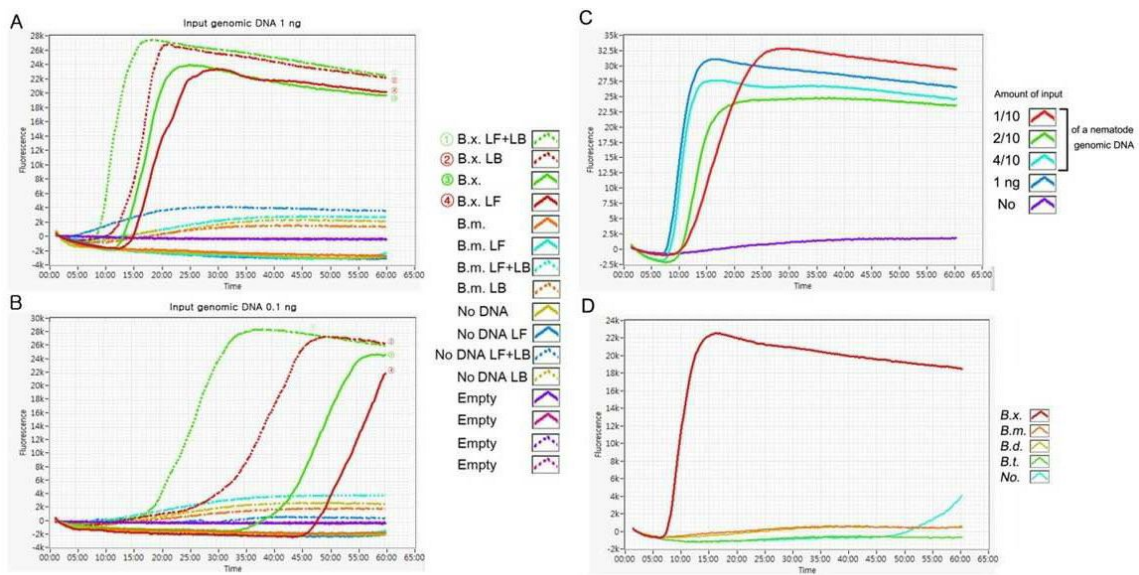
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 소나무 재선충병 탐지용 바이오마커 및 이를 이용한 소나무 재선충병 탐지방법

(57) 요약

새로운 펙테이트 라이에이즈 3 (Bx-PEL3) 유전자가 버사펠렌쿠스 자일로필러스의 단계 특이적으로 발현되는 서열 태그 라이브러리로부터 클론되었다. Bx-PEL1 및 Bx-PEL2는 정량적 실시간 PCR 분석에서 Bx-PEL3보다 상대적으로 많았다. 다른 생애단계에 따른 다양한 Bx-PELs의 발현수준은 각 Bx-PEL이 발병에서 각기 다른 생화학적 기능을 (뒷면에 계속)

대표도



수행함을 제시한다. 재조합 Bx-PEL3는 폴리갈락투론산에 대한 활성을 나타내며 최적 pH와 최적 Ca^{2+} 농도는 각각 9.0 및 0.5 mM였다. 상동관계 모델링을 통해 Bx-PELs는 구조적으로 바실러스속 KSM P-15의 PEL과 유사하며 칼슘 결합부위 및 촉매활성에 필수적인 잔기를 공유하는 것으로 나타났다. Bx-PEL3는 다른 Bx-PELs와 같이 식도샘 근처에서 발현되는 것으로 나타나, Bx-PEL3가 침에서 분비되어 세포벽 분해에 관여할 것임을 가리킨다. 데이터들은 새로운 PEL3 유전자가 생화학적으로 기능적인 추정 발병인자임을 제시한다.

본 발명자들은 소나무 재선충병의 원인인 병원성 버사펠렌쿠스 자일로필러스를 탐지하는 두 가지 LAMP 프로토콜을 발명하였다. 먼저, 본 발명자들은 LAMP 탐지 키트를 개발하기 위해 바이오마커로서 B. 자일로필러스와 구조적으로 매우 유사한 비병원성 선충들과 상동관계를 갖지 않는 펙테이트 라이에이즈 3 유전자를 확인하였다. Genie II와 *Geobacillus sp. M 2.0* 큰 단편 (GspM 2.0) DNA 폴리머레이즈를 포함하는 등온성 마스터 믹스를 이용하는 첫 번째 LAMP 프로토콜은 형광 금속 지시약 칼세인과 가공된 *Bacillus stearothermophilus* DNA 폴리머레이즈 I, 큰 단편 (*Bst* 2.0 DNA 폴리머레이즈)를 이용한 다른 LAMP 프로토콜과 비교하여 배양시간이 짧고 민감도가 ~ 10배 정도 높다. 그렇지만, 칼세인과 *Bst*2.0 폴리머레이즈를 이용한 LAMP 반응은 경제적이다.

(72) 발명자

한혜림

서울 강남구 선릉로 221, 208동 401호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)

문일성

서울 도봉구 마들로 859-19, 109동 308호 (도봉동, 도봉한신아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 없음

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자

연구과제명 Torsin family 단백질에 의한 UPR활성과 신경가소성 조절기작연구

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2013.05.01 ~ 2014.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 17로 표시되는 버사펠렌쿠스 자일로필러스의 펙테이트 라이에이즈 3 유전자.

청구항 2

서열번호 32로 표시되는 버사펠렌쿠스 자일로필러스의 펙테이트 라이에이즈 3 단백질.

청구항 3

서열번호 17로 표시되는 버사펠렌쿠스 자일로필러스의 펙테이트 라이에이즈 3 유전자, 상기 유전자의 센스 프라이머 및 상기 유전자의 안티센스 프라이머 중 1종 이상을 포함하는, 소나무 재선충병 진단용 조성물.

청구항 4

서열번호 32로 표시되는 버사펠렌쿠스 자일로필러스의 펙테이트 라이에이즈 3 단백질을 포함하는, 소나무 재선충병 진단용 조성물.

청구항 5

서열번호 32로 표시되는 버사펠렌쿠스 자일로필러스의 펙테이트 라이에이즈 3 단백질에 대한 항체를 포함하는, 소나무 재선충병 진단용 조성물.

청구항 6

서열번호 17로 표시되는 버사펠렌쿠스 자일로필러스의 펙테이트 라이에이즈 3 유전자의 일부 또는 전부를 이용하여 소나무 재선충병 감염을 탐지하는 방법.

청구항 7

서열번호 32로 표시되는 버사펠렌쿠스 자일로필러스의 펙테이트 라이에이즈 3 단백질 또는 이 단백질에 대한 항체를 이용하여 소나무 재선충병 감염을 탐지하는 방법.

청구항 8

a) DNA 폴리머레이즈를 포함하는 등온성 마스터 믹스 (Isothermal Master Mix)에 프라이머와 시료 게놈 DNA를 혼합하여 PCR 반응 혼합물을 제조하는 단계;

b) 버사펠렌쿠스 펙테이트 라이에이즈 3에 대한 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머;

정방향 내부 프라이머 (forward internal primer; FIP) 및 역방향 내부 프라이머 (backward internal primer; BIP);

루프 정방향 프라이머 (loop forward primer) 및 루프 역방향 프라이머 (loop backward primer) 중 하나 또는 양자 모두;를 a) 단계에서 제조된 PCR 반응 혼합물에 가해 주는 단계;

- c) b) 단계에서 얻은 혼합물을 Genie[®] II에 넣어 시료 게놈 DNA를 증폭하는 단계; 및
- d) 증폭된 DNA 중 버사펠렌쿠스 자일로필러스 펙테이트 라이에이즈 3 유전자를 확인하는 단계;를 포함하는, LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)를 이용한 소나무 재선충병 탐지방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 a) 단계의 DNA 폴리머레이즈는 Gsp (*Geobacillus sp.*) M 2.0 큰 단편 (GspM 2.0), Bst2.0 웜스타트 DNA 폴리머레이즈, Bst (*Bacillus stearothermophilus*) 2.0 DNA 폴리머레이즈 큰 단편, Bst (*Bacillus stearothermophilus*) DNA 폴리머레이즈 큰 단편, Bst (*Bacillus stearothermophilus*) DNA 폴리머레이즈 전장 (full length), Gsp (*Geobacillus sp.*) M DNA 폴리머레이즈 큰 단편, GspM 2.0 DNA 폴리머레이즈 큰 단편, GspSSD DNA 폴리머레이즈 큰 단편, Tin DNA 폴리머레이즈 큰 단편 및 시판 등온성 마스터 믹스 내에 포함된 DNA 폴리머레이즈 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는, LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)를 이용한 소나무 재선충병 탐지방법.

청구항 10

a) 완충액, 이중가닥 DNA에 결합하여 형광을 내는 표지제, 베타인, dNTPs, MnCl₂, DNA 폴리머레이즈, 칼슘 지시약, 시료 게놈 DNA 및 프라이머를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계;

b) a) 단계에서 얻은 반응 혼합물을 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 반응시켜 시료 게놈 DNA를 증폭하는 단계; 및

c) 증폭된 DNA 중 버사펠렌쿠스 자일로필러스 펙테이트 라이에이즈 3 유전자를 확인하는 단계;를 포함하는, LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)를 이용한 소나무 재선충병 탐지방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서,

상기 a) 단계의 DNA 폴리머레이즈는 Gsp (*Geobacillus sp.*) M 2.0 큰 단편 (GspM 2.0), Bst2.0 웜스타트 DNA 폴리머레이즈, Bst (*Bacillus stearothermophilus*) 2.0 DNA 폴리머레이즈 큰 단편, Bst (*Bacillus stearothermophilus*) DNA 폴리머레이즈 큰 단편, Bst (*Bacillus stearothermophilus*) DNA 폴리머레이즈 전장 (full length), Gsp (*Geobacillus sp.*) M DNA 폴리머레이즈 큰 단편, GspM 2.0 DNA 폴리머레이즈 큰 단편, GspSSD DNA 폴리머레이즈 큰 단편, Tin DNA 폴리머레이즈 큰 단편 및 시판 등온성 마스터 믹스 내에 포함된 DNA 폴리머레이즈 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는, LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)를 이용한 소나무 재선충병 탐지방법.

청구항 12

청구항 10에 있어서,

이중가닥 DNA에 결합하여 형광을 내는 표지제는 SYBR 그린을 포함하는 사이아나인 (Cyanine) 염색제, 5,5'-(6,22-dioxo-11,14,17-trioxa-7,21-diazaheptacosane-1,27-diyl)bis(3,8-diamino-6-phenylphenanthridin-5-ium) iodide (젤 레드) 및 10,10'-(6,22-dioxo-11,14,17-trioxa-7,21-diazaheptacosane-1,27-diyl)bis(3,6-bis(dimethylamino)acridin-10-ium) iodide (젤 그린) 중 선택된 것임을 특징으로 하는, LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)를 이용한 소나무 재선충병 탐지방법.

청구항 13

청구항 10에 있어서,

칼슘 지시약은 칼세인 및 하이드록시나프톨 블루 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는, LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)를 이용한 소나무 재선충병 탐지방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 소나무 재선충병 탐지용 바이오마커 및 이를 이용한 소나무 재선충병 탐지방법에 관한 것으로서, 좀 더 구체적으로는 소나무 재선충병의 원인인 버사펠렌쿠스 자일로필러스의 펙테이트 라이에이즈 3 유전자 또는 단백질을 바이오마커로 선택하고, LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 반응을 이용하여 시료 게놈 DNA를 증폭함으로써 야외 현장에서도 손쉽게 빠르게 감염 여부를 확인할 수 있는 탐지방법을 제공한다.

[0002]

배경기술

[0003] 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 (*Bursaphelenchus xylophilus*; 이하 "*B. xylophilus*"와 혼용함) 니켈은 소나무 재선충병을 일으키고 (Steiner and Buhner, 1934), 솔수염하늘소 (pine sawyer beetle) 모노카무스 얼터네이즈 (*Monochamus alternates*)에 의해 전이된다 (Linit, 1988). 버사펠렌쿠스 자일로필러스는 한국, 일본, 중국 및 타이완을 포함하는 동아시아국가에서 큰 경제적 손실을 일으킨다 (Leal et al., 1988). 버사펠렌쿠스 자일로필러스가 처음으로 보고된 것은 부산이었고, 감염면적은 북쪽으로 확산되었다. 일단 버사펠렌쿠스 자일로필러스가 M. 얼터나투스 (*M. alternatus*)에 의해 생긴 상처를 통해 소나무를 감염시키면, 먼저 실질세포 (parenchymal cells)로 들어가서 다양한 조직으로 빠르게 이동하여 표피세포에 손상을 입힌다. 버사펠렌쿠스 자일로필러스가 감염된 숙주의 도관 시스템은 실질세포에 의해 생산된 수지로 막힌다. 뿐만 아니라, 공동 (cavitation)은 휘발성 물질이 과생산됨으로 인하여 물의 수송을 교란시킨다 (Fukuda, 1997). 버사펠렌쿠스 자일로필러스가 감염된 숙주에서 목질부의 변화는 감염 2-3주 후에 관찰할 수 있다.

[0004] 세포벽을 파괴하는 글루카네이즈 (Gao et al., 2002), 익스팬신 (Qin et al., 2004) 및 펙테이트 라이에이즈 (pectate lyases; PELs) (Kikuchi et al., 2006)와 같은 효소들은 숙주 식물의 감염에 연관되어 있다고 생각되고 있다. 식물 세포벽의 주요 구성요소인 펙틴은 갈락투론산으로 구성된 골격을 갖는 헤테로다당류이며 펙테이트 라이에이즈의 타겟으로 알려져 있다. 세균과 곰팡이에서 발견된 펙테이트 라이에이즈 (Barras et al., 1994)들은 기질로서 펙틴을 분해하여 숙주 내로 세포벽을 파괴하여 들어가 콜로니를 형성한다 (Davis et al., 2004). 동물 내의 *PEL1* 유전자는 감자 씨스트 선충 (potato-cyst nematode) 글로보데라 로토키엔시스 (*Globodera rotochiensis*) (Popeijus et al., 2000)에서 처음 확인되었고, 이후 다른 씨스트 선충 헤테로데라 글리신즈 (*Heterodera glycines*) (de Boer et al., 2002) 및 뿌리혹 선충 멜로이도자인 속 (*Meloidogyne* spp.) (Doyle and Lambert, 2002)을 포함하는 식물병원균 선충으로부터도 보고되었다. 펙테이트 라이에이즈들은 식물 샘플에서 생산되어 침 (stylet)으로 분비된다. 이들은 식물 감염 및 기생에서 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

[0005] 다른 비병원성 선충으로부터 병원성 버사펠렌쿠스 자일로필러스를 구별하는 것은 어렵다: 숙주식물 내에 형태학적으로 유사한 비병원성 버사펠렌쿠스 무크로나투스 (*B. mucronatus*)와 공존하며 구별하기 위해서는 전문가의 현미경 관찰이 필요하다. 병원성 버사펠렌쿠스 자일로필러스를 초기에 소나무에서 정확히 탐지하는 것은 매우 중요하다. 종 특이적 RNA 내부 전사 스페이스 정보 (species-specific RNA internal transcribed spacer information) (Cao et al., 2005) 및 열충격 단백질 70 유전자 (Leal et al., 1988)가 다른 밀접하게 관련된 선충으로부터 버사펠렌쿠스 자일로필러스를 분류하기 위해 이용되었다. 정확도를 개선하기 위해, 게놈 DNA 하이브리다이제이션과 같은 DNA 기반 진단법 (Tares et al., 1993), PCR-제한 조각 길이 다형성 (PCR-restriction fragment length polymorphism) (Iwahori et al., 2000) 및 종 특이적 PCR (species-specific PCR) (Kang et al., 2004)도 응용하였다. 비록 상기 방법들이 다른 선충들, 특히 버사펠렌쿠스 무크로나투스로부터 버사펠렌쿠스 자일로필러스의 구분을 개선했지만, PCR에 기반한 전략으로부터 오류 양성신호의 가능성을 배제하지는 못하였다.

[0006] 본 발명자들은 최근 단백질 수준에서 새로운 접근법으로서 버사펠렌쿠스 자일로필러스를 특이적으로 인식하는

단일클론항체를 개발하였다 (Lee et al., 2011). 따라서, B. 자일로필러스가 발현되었을 때만 밀접하게 관련된 다른 비병원성 선충으로부터 B. 자일로필러스를 구분하는 바이오마커로서 병원성 인자들도 이용될 수 있다. 새로운 추정 병원성 인자들의 확인은 병인을 이해하는 것뿐만 아니라, 새로운 바이오마커 개발에도 힌트를 줄 수 있을 것이다.

[0007] 소나무 재선충병은 유라시아에서 숲을 가장 황폐화시키는 질병 중 하나이다. 일본에서 처음 발견된 후 한국, 대만, 중국, 포르투갈 및 스페인으로 퍼져나갔다. 소나무 재선충병의 원인은 북아메리카 토종인 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스이다. 북아메리카 침엽수는 소나무 재선충병에 저항을 나타내기 때문에 미국에서 수입된 나무에 존재하는 B. 자일로필러스가 일본 및 다른 나라에 퍼졌을 것으로 추정되고 있다. 모노카무스 속의 솔수염 하늘소와 같은 곤충에 의한 소나무 재선충병 확산은 국지적 지역 내에 한정되는 것으로 생각되었다. 따라서, 다른 먼 지역, 나라 또는 대륙에서 소나무 재선충병의 돌연한 출현은 B. 자일로필러스 감염된 나무 또는 그 부산물 수출때문인 것으로 보인다.

[0008] 유럽에서 B. 자일로필러스의 경제적 영향에 대한 최근 연구에 따르면 포르투갈, 스페인, 남부 프랑스 및 북서부 이태리의 소나무 재선충병에 취약한 침엽수들은 2014-2019 기간 동안 많이 감염될 것으로 예측되고 있다. 2008-2030년의 22년 동안 소나무 재선충병에 의한 경제적 손실은 220억 유로에 달할 것으로 예상된다. 해부학적 특성을 이용하여 B. 자일로필러스를 확인하여 왔으나, 종 특이적 분자 마커를 이용하여 확인하는 방법이 개발되고 있다. B. 자일로필러스 특이적 유전자에 대한 통상의 PCR 프라이머 또는 실시간 PCR 프라이머 세트 [Kang J.S. et al., *Nematology* 2009, **11**(2):289-299, Lee D-W et al., *Plant Pathol J* 2012, **28**:409-417] 또는 마이크로샷틀라이트 마커 [Mallez S. et al., *PLoS ONE* 2013, **8**(3):e591657]와 같은 다양한 B. 자일로필러스 특이적 분자마커들이 최근 보고되었다. 뿐만 아니라, 본 발명자들은 B. 자일로필러스 특이적 단일클론항체 및 그 항원을 제조하고 특성을 규명하였다 [Lee D-W et al., *Mol Cell Proteomics* 2011, **10**(2):M900521-MCP900200]. 그러나, 그러한 방법들은 소나무 재선충병의 온사이트 (on-site) 진단에 적용하기에는 아직 한계가 있는데, 현장에서 PCR 반응을 수행하는 데는 복잡한 장치가 필요하고 B. 자일로필러스에 대한 빠른 진단 키트를 기초로 한 항원-항체 개발에는 많은 투자가 필요하기 때문이다.

[0009] LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 방법은 실험실에서 일반적으로 이용되는 다른 통상의 PCR 방법과 비교할 때 몇 가지 독특한 장점이 있다 [Tomita N. et al., *Nature Protocols* 2008, **3**(5):877-882]. LAMP의 가장 큰 장점은 복잡한 온도 사이클러를 필요로 하지 않는다는 점인데, 이 반응은 5' to 3' 폴리머레이즈와 이중가닥 치환 활성을 갖는 효소를 이용하여 일정 온도에서 수행할 수 있기 때문이다 [Aliotta J.M. et al., *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 1996, **12**(5):185-195]. 뿐만 아니라, LAMP 반응은 튜브에서 Gel-red [Nakao R. et al., *BMC Microbiology* 2010, **10**(1):1-11] 및 SYBR green [Goto M. et al., *Biotechniques* 2009, **46**:167-172]과 같은 이중가닥 DNA 특이적 형광물질로 직접 표지할 수 있고 UV 조명 없이도 맨눈으로 탐지할 수 있는 이중가닥 DNA를 다량 합성할 수 있다. 온사이트 진단 수단으로서 LAMP의 가능성을 증가시키기 위한 또다른 방법은 이중가닥 DNA 산물의 성공적인 증폭을 위한 간접적 리포터로서 형광 금속 지시약인 칼세인 [Tomita N. et al., *Nature Protocols* 2008, **3**(5):877-882] 또는 칼로리미터 금속 지시약인 하이드록실나프톨 [Goto M. et al., *Biotechniques* 2009, **46**:167-172]을 이용하는 것이다.

[0010] B. 자일로필러스에 대한 LAMP 탐지방법은 종 (species) 수준에서 높은 변이도를 나타내는 구조 리보솜 RNA (structural ribosomal RNA) 부위 [Kikuchi T. et al., *Phytopathology* 2009, **99**(12):1365-1369]의 ITS (internal transcribed spacer)를 이용하여 개발되었다. rRNA 부위의 ITS는 지리적 종족을 확인하는데 이용될 수 있는데, 이들은 종 내에서도 변이가 있기 때문이다. B. 자일로필러스에 대한 곤충 벡터 및 숙주 나무들은 지리적 구역과 나라가 전혀 다르기 때문에 B. 자일로필러스 rRNA의 ITS로 개발된 LAMP 탐지 키트는 일본 내에서도 소나무 재선충으로 확인된 나무로부터 병원균을 탐지할 수 없었고 [Kanetani S. et al., *Forest Pathology* 2011, **41**(5):387-391], 좀더 보존적인 유전자를 이용한 다른 LAMP 탐지 키트가 개발될 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 소나무 재선충병의 병원균인 B. 자일로필러스를 특이적이고 민감하게 탐지할 수 있는 바이오마커를

제공하는데 그 목적이 있다.

- [0012] 또한, 본 발명은 야외 현장에서 소나무 재선충병의 병원균인 B. 자일로필러스를 특이적이고 민감하게 탐지할 수 있는 탐지방범 및 탐지 키트를 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명자들은 B. 자일로필러스의 EST 데이터베이스로부터 새로운 펙테이트 라이에이즈 3 ("PEL3")를 확인하고 병원성 인자로서뿐만 아니라 추정 바이오마커로서의 가능성을 시험하기 위해 생화학적 특성을 분석하였다.

- [0014] 또한, 본 발명자들은 B. 자일로필러스 펙테이트 라이에이즈 3 (Pectatylase 3; PEL3) 유전자에 대한 새롭고 효과적인 LAMP 분석법을 발명하였다.

- [0015] 펙테이트 라이에이즈 (Pectate lyase; PEL)는 세포벽 구성요소 펙틴의 소화에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Kikuchi et al., 2006). Bx-PEL1이 신호 펩타이드의 존재에 의하여 식도샘에서 발현되고 침으로부터 분비되기 때문에 B. 자일로필러스는 소나무의 수지관을 통해 이동하며 수지관 주위의 실질조직세포 (parenchyma cells)로부터 공급되고 (Mamiya, 1983), Bx-PEL1은 발병인자인 것으로 생각되었다. 본 발명자들은 Bx-PEL3 전사체가 식도샘에 위치하며 그것이 암호화한 단백질은 Bx-PEL1의 것과 유사한 신호 펩타이드를 가진다 (도 1). 그렇지만, Bs-PEL3 발현수준은 Bx-PEL1 및 PEL2와 비교하여 비교적 낮다 (도 2). 그리하여, 본 발명자들은 Bx-PEL3가 생물학적으로 기능적인 PEL을 암호화하는지를 시험하였다. 기생성 선충 내의 PELs가 수평 또는 수직 유전자 전이를 통하여 원핵생물로부터 전이되는 것으로 알려져 있기 때문에 (Danchin et al., 2010), 본 발명자들은 E. 콜라이 발현 시스템을 채용하였다. E. 콜라이 발현 시스템은 발현 시스템이 비교적 간단하고 문제점들을 극복할 다양한 방법이 있기 때문에 인간부터 원핵생물까지 다양한 단백질의 생화학적 특성을 시험하기 위하여 이용되어 왔다. E. 콜라이에서 발현되는 많은 단백질들은 인클루전 바디를 형성하는 것으로 알려져 있지만, 일단 단백질이 인클루전 바디상태로부터 용해되어 재폴딩되고 생물학적 활성을 가지는 구조가 될 수 있으므로 생화학적 특성을 발휘함에 방해가 되지 않는다 (Singh and Panda, 2005). 실제로, 본 발명자들은 세 개의 Bx-PELs로부터 PEL 활성을 탐지할 수 있었고, Bx-PEL3의 활성이 pH 및 Ca^{2+} 이온 의존적임을 밝혔다 (도 3).

- [0016] Bx-PEL3의 특성을 좀더 규명하기 위해 3D 상동관계 모델링을 수행하였다. Bx-PEL3는 클래스 III PEL의 특징인 구조상 4개의 보존된 도메인을 가진다. 대전된 잔기들이 보존 부분에서 발견된다: 보존된 도메인 II의 D와 K 잔기 및 도메인 III의 K 잔기 (Bx-PEL3에서 R로 대체됨). 대전된 잔기들과 같은 보존된 잔기들은 촉매활성에 관여할 가능성이 높을 것으로 기대된다 (Shevchik et al., 1997; Popeijus et al., 2000). 3D 상동관계 모델링은 상동관계의 단백질들이 유사한 3차원 구조를 가진다는 사실에 기초하여 관심 있는 단백질의 3D 구조를 예측하는 개선되고 유용한 방법이다. 관심 있는 단백질의 상동체가 입수 가능한 경우 3D 주형 동등체 (coordinate)와 아미노산 서열 배열로부터 모델을 형성할 수 있다. 3D 상동관계 모델링은 관심 있는 단백질의 구조적 특징과 기능을 이해하는데 이용될 수 있다 (Jaroszewski, 2009). 종합하면, Bx-PEL3는 PEL는 PEL 활성을 나타내는 기능성 단백질이다.

- [0017] 병원성 B. 자일로필러스를 높은 특이성 및 민감성으로 탐지하는 방법의 개발이 본 발명의 목표 중 하나이다. 이 목표를 달성하기 위하여 본 발명자들은 먼저 병원성 B. 자일로필러스에만 특이적으로 존재하고 다른 썩은 소나무에 존재하는 선충에는 없는 타겟 유전자를 서치하였다. B. 자일로필러스의 전체 게놈 서열은 최근에서야 보고되었지만 [Kikuchi T. et al., *Plos Pathogens* 2011, **7**:e1002219], *B. mucronatus*, *B. doui* 또는 *B. thailandae*와 같은 다른 비병원성 선충의 게놈 전 서열은 아직 밝혀지지 않았다. 따라서, 본 발명자들은 B. 자일로필러스와 가장 근접한 관련을 갖는 선충인 B. 무크로나투스 (Mucronatus)의 유전자와 높은 유사성을 나타내지 않는 B. 자일로필러스의 펙테이트 라이에이즈들 중 하나에 초점을 맞추었다. 본 발명자들은 LAMP 탐지 키트를 개발하기 위하여 타겟으로 PEL3를 이용하였다. 실제로, LAMP 탐지를 위해 디자인된 프라이머 셋트들은 *B. mucronatus* (도 9A 및 9B), *B. doui* 및 *B. thailandae* (도 9A, 9B 및 9D)와 같은 썩은 나무에 존재하는 선충 유래 유전자가 아니라, 병원성 B. 자일로필러스 유래 PEL3 유전자를 특이적으로 증폭시켰다.

- [0018] LAMP의 특이적인 장점으로 인해 임상과 농업에서 감염병의 원인을 탐지하기 위해 LAMP 탐지도구를 개발하는 것은 매우 중요하다. LAMP의 첫 번째 장점은 특이적 DNA 단편에 대해서 디자인된 4~6 개의 프라이머 세트가 필요하기 때문에, 타겟 DNA에 대한 민감도와 특이성이 높다는 점이다. 다른 PCR의 문제점과 비슷하게, LAMP 또한 낮은 어닐링 온도에서 도 7A 및 7B에 나타난 것과 같이 프라이머 짝짓기에 의해 비특이적 이중가닥 DNA가 형성된다. 그렇지만, 그러한 문제들은 증폭온도를 높임으로써 (도 7C) 또는 등온성 (isothermal) DNA 폴리머레이즈를 교체함으로써 (도 8D) 피할 수 있다. 등온성 마스터 믹스 (isothermal master mix) (Optigene)는 증폭속도를 높이기 위해 가공된 *Geobacillus* sp. M 2.0 큰 단편 (GspM 2.0) DNA 폴리머레이즈를 포함한다 (http://www.optigene.co.uk/reagent_type/dna-polymerase-enzymes/). 그렇지만, 형광 금속 지시약 칼세인을 포함하는 LAMP 프로토콜은 가공된 바실러스 스테아로써모필러스 DNA 폴리머레이즈 I, DNA 폴리머레이즈 큰 단편 (Bst 2.0)과 함께 수행하였다 (도 8)[Tomita N. et al., *Nature Protocols* 2008, **3**(5):877-882]. 본 발명에서는 최적 온도 65 °C인 GspM2.0 DNA 폴리머레이즈와 비교하여 Bst2.0 DNA 폴리머레이즈는 칼세인 존재 하에 60 °C에서 가장 강한 활성을 나타내었다 (도 7 및 도 8).
- [0019] 칼세인을 포함하는 LAMP 프로토콜의 다른 장점은 경제성이다. Optigene의 등온성 마스터 믹스를 이용하기 위해서는, 운반에 적합하게 그리고 야외에서 사용이 가능하게 디자인된 경량의 매우 컴팩트한 장비인 Genie II가 필요하다. 반면, 칼세인을 포함하는 LAMP 프로토콜을 수행하기 위해서는 복잡한 장치가 필요하지 않다. 등온성 블록이 60°C만 유지할 수 있으면 LAMP 반응을 수행하기에 충분하다. 그러나, 이 LAMP 프로토콜의 민감도는 Genie II로 수행한 LAMP의 1/10이다. 뿐만 아니라, 이 LAMP 반응은 Genie II를 이용한 LAMP 프로토콜보다 좀더 긴 배양시간이 필요하다.
- [0020] 결론적으로, 본 발명자들은 병원성 B. 자일로필러스를 탐지하는 두 가지 LAMP 탐지 프로토콜을 발명하였다. 야외에서 Genie II와 같은 복잡한 장비를 이용할 수 있다면, GspM 2.0 DNA 폴리머레이즈를 이용한 LAMP 프로토콜이 더 우선적인데, 그것은 짧은 시간 내에 좀더 민감도가 높기 때문이다. 그렇지만, 복잡한 장비의 이용이 어려운 상황일 때는 칼세인과 Bst 2.0 DNA 폴리머레이즈를 이용하는 LAMP 프로토콜이 경제적이고 효과적으로 탐지 가능하다.
- [0021] 본 발명자들은 B. 자일로필러스의 새로운 PEL3를 확인하였다. qrtPCR, 효소활성 측정 및 인시투 형광 하이브리디제이션과 같은 생화학적 분석 결과는 Bx-PEL3가 기능적으로 활성을 나타내며 소나무 세포벽의 주요 요소인 펙틴 절단에 기여하는 것으로 나타났다. 뿐만 아니라, Bx-PEL3의 3D 상동관계 모델은 Bx-PEL3가 Ca^{2+} 이온 결합을 위한 보존잔기를 가지며 촉매활성을 나타내고, B. 자일로필러스의 바이오마커로 이용될 수 있는 추정 병원성 요소로 기능할 것임을 뒷받침해준다. 나아가, Bx-PELs에 관한 연구는 소나무 마름병을 탐지하는 새로운 접근을 가능하게 할 것이다.
- [0022] 본 발명은 서열번호 17의 핵산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 펙테이트 라이에이즈 3 유전자에 관한 것이다.
- [0023] 또한, 본 발명은 서열번호 32의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 펙테이트 라이에이즈 3 단백질에 관한 것이다.
- [0024] 또한, 본 발명은 서열번호 17의 핵산 서열을 갖는 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 펙테이트 라이에이즈 3 유전자를 포함하는 소나무 재선충병 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0025] 또한, 본 발명은 서열번호 32의 아미노산 서열을 갖는 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 펙테이트 라이에이즈 3 단백질을 포함하는 소나무 재선충병 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0026] 또한, 본 발명은 서열번호 32의 아미노산 서열을 갖는 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 펙테이트 라이에이즈 3 단백질에 대한 항체를 포함하는 소나무 재선충병 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0027] 본 발명의 펙테이트 라이에이즈 3 '유전자'라 함은 이 유전자의 DNA 또는 mRNA를 말하며, DNA 또는 mRNA의 전부 또는 일부를 모두 포함하는 개념이다.
- [0028] 본 발명의 소나무 재선충병 진단용 조성물은 상기 유전자 외에도 핵산의 구조를 안정하게 유지시키는 증류수 또는 완충액을 포함할 수 있다.

- [0029] 상기 펙테이트 라이에이즈 3 유전자는 숙주세포에서 특이적으로 발현이 증가한다. 따라서 상기 유전자의 발현 정도를 조사하면 소나무 재선충병을 진단할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 펙테이트 라이에이즈 3 유전자는 숙주 나무에서 다량 발현되므로, 상기 유전자의 억제제를 투여하여 상기 유전자의 발현을 저해시키면 소나무 재선충병을 예방 또는 억제할 수 있다.
- [0031] 따라서 본 발명은 또한 상기 유전자의 억제제의 소나무 재선충병 치료 용도 및 유효량의 상기 유전자의 억제제를 숙주 나무에 투여하는 단계를 포함하는 소나무 재선충병 방제방법을 제공한다. 본 발명에 있어서 소나무 재선충병 방제는 예방 및 억제를 포함한다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 펙테이트 라이에이즈 3 유전자에 대한 억제제는 상기 유전자의 mRNA에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0033] 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 생체 내뿐만 아니라 생체 외에서도 유전자-특이적 억제를 달성하기 위해 성공적으로 사용되어 왔다. 안티센스 뉴클레오타이드는 특정 DNA 또는 RNA 타겟에 대해 안티센스(또는 상보)인 짧은 길이의 DNA 합성 가닥(또는 DNA 아날로그)이다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 타겟에 결합하고 전사, 번역 또는 스플라이싱의 단계에서 발현을 멈추게 함으로써 DNA 또는 RNA 타겟에 의해 인코딩된 단백질의 발현을 막기 위해 제안되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 세포 배양 및 질병의 동물 모델에서도 성공적으로 이용되어 왔다(Hogrefe, 1999). 올리고뉴클레오타이드가 분해되지 않도록 더욱 안정하고 저항적이 되게 하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 또 다른 변형이 당업자에게 알려져 있고 이해된다. 여기서 사용된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 이중나선 또는 단일나선 DNA, 이중나선 또는 단일나선 RNA, DNA/RNA 하이브리드, DNA 및 RNA 아날로그 및 염기, 당 또는 백본(backbone) 변형을 지닌 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 올리고뉴클레오타이드는 안정성을 증가시키고 뉴클레아제 분해에 대한 저항성을 증가시키기 위해 본 발명이 속하는 기술분야에 알려진 방법에 의해 변형된다. 이들 변형은 본 발명 분야에 알려져 있는 올리고뉴클레오타이드 백본의 변형, 당 부분의 변형 또는 염기의 변형을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다.
- [0034] 또한, 펙테이트 라이에이즈 3 유전자에 대한 억제제는 상기 유전자의 siRNA(Small Interfering RNA)일 수 있다.
- [0035] 즉, 상기 siRNA의 염기서열은 펙테이트 라이에이즈 3 유전자(mRNA)의 염기서열 중 각각의 서열에서 연속된 19~23개의 연속된 염기서열일 수 있다.
- [0036] 상기 siRNA의 서열은 편의상 정방향 서열(sense strand)을 나타낸 것으로, 실제 유전자 억제효과를 나타내는 역방향 서열(antisense strand)과 함께 이중리보핵산체를 구성하게 된다.
- [0037] siRNA는 세포 배양 및 생체 내에서 오래 지속되는 효과, 생체 내에서 세포를 트랜스펙션시키는 능력 및 혈청 내 분해에 대한 저항력의 측면에서 생체 내에서 특정한 유전자의 발현의 저해에 대해 매우 강한 약물이 되는 잠재력을 지닌다(Bertrand et al., 2002). siRNA의 전달 및 siRNA를 포함한 발현 컨스트럭트/벡터는 당업자에게 알려져 있다. 예를 들어, 미국 출원 제2004/106567 및 2004/0086884는 바이러스성 벡터, 비바이러스성 벡터, 리포솜 전달 운반체, 플라스미드 주입 시스템, 인공 바이러스 엔벨로프 및 폴리라이신 컨쥬게이트를 포함한 전달 메커니즘뿐만 아니라 많은 발현 컨스트럭트/벡터를 제공하고 있다.
- [0038] siRNA는 상대적으로 낮은 농도로도 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의해 얻을 수 있는 효과와 동등하거나 높은 효과를 얻을 수 있기 때문에 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 대안으로 제시되고 있다(Thompson, 2002). siRNA의 이용은 질병의 동물 모델에 있어서 유전자 발현을 저해하는 데 대중성을 나타내고 있다. 당업자는 당해 기술 분야에 공지된 방법을 이용하여 원하는 방식대로 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 siRNA를 합성하고 변형시킬 수 있다(Andreas Henschel, Frank Buchholz1 and Bianca Habermann (2004) DEQOR: a web-based tool for the design and quality control of siRNAs. Nucleic Acids Research 32(Web Server Issue):W113-W120 참조). 또한 당업자는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA를 지닌 발현 컨스트럭트/벡터에 유용한 조절 서열(예컨대, 구성적 프로모터, 유도성 프로모터, 조직-특이적 프로모터 또는 그의 결합)을 잘 이해하고 있다.
- [0039] 소나무 재선충병 방제를 위해 사용되는 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA는 약제학적으로 허용되는 담체를 추가적으로 포함한 조성물의 형태로 투여될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 예를 들어 하나 이상의 물, 식염수, 인산 완충 식염수, 텍스트린, 글리세롤, 에탄올뿐만 아니라 이들의 조합을 포함한다. 이러한 조성물은 투여 후 활성 성분의 빠른 방출, 또는 지속적이거나 지연된 방출을 제공하도록 제제화될 수 있다.

- [0040] 상기 유전자의 저해제는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA 외에도 상기 유전자의 발현을 억제하는 물질이면 어떤 것이든 가능하다. 따라서 종래 당해 기술 분야에서 상기 유전자의 저해제로 알려진 화합물 또한 이용 가능하다.
- [0041] 본 발명은 또한 펙테이트 라이에이즈 3 유전자로부터 발현된 단백질에 대한 억제제를 포함하는 소나무 재선충병 방제용 조성물을 제공한다. 본 발명의 유전자를 억제하면 그에 따른 단백질의 발현이 억제되어 소나무 재선충병 및 소나무 마름병이 억제되는 것이므로, 상기 유전자의 단백질을 저해하면 소나무 재선충병 및 소나무 마름병을 억제할 수 있다.
- [0042] 따라서 본 발명은 상기 단백질에 대한 억제제의 소나무 재선충병 및 소나무 마름병 방제 용도 및 유효량의 상기 단백질의 억제제를 숙주 나무에 투여하는 단계를 포함하는 소나무 재선충병 및 소나무 마름병 방제방법을 제공한다. 본 발명에 있어서 소나무 재선충병 및 소나무 마름병 방제는 예방 및 억제를 포함한다.
- [0043] 상기 단백질에 대한 억제제는 본 발명의 유전자로부터 발현된 단백질에 대한 항체일 수 있다. 상기 단백질에 대한 모노클론 항체는 당업계에서 통상적인 모노클론 항체 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있고, 시판되는 것을 사용할 수 있다. 또한, 모노클론 항체 대신에 상기 단백질을 인식하는 폴리클론 항체를 사용할 수도 있고 이는 당업계에 통상적인 항혈청 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있다. 또한, 항원결합성을 갖는 것이면 모노클론 항체 또는 폴리클론 항체의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고, 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다.
- [0044] 상기 항체는 본 발명의 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 단백질의 부분 펩타이드도 포함하며, 본 발명의 부분 펩타이드로는 최소한 7개 이상, 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다.
- [0045] 본 발명의 소나무 재선충병 방제용 조성물은 방제를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 허용되는 담체를 1종 이상 포함하여 농약 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 단백질에 대한 억제제가 항체일 경우 허용되는 담체는 결합 단백질의 저장 수명 또는 유효성을 증가시키는 습윤제 또는 유화제, 방부제 또는 완충액과 같은 최소량의 보조 물질로 구성될 수 있다.
- [0046] 또한 본 발명의 소나무 재선충병 방제용 조성물은 하나 또는 그 이상의 소나무 재선충병 또는 소나무 마름병 방제제와 함께 사용될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 소나무 재선충병 방제용 조성물은 상기 유효 성분 외에도 농약학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 포함할 수 있으며, 이러한 보조제로는 부형제, 붕해제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 가용화제 등이 있다.
- [0048] 또한 본 발명의 조성물은 방제를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용되는 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 방제 방법에 있어서, "유효량"은 소나무 재선충병 또는 소나무 마름병을 억제하는 효과를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 본 발명의 유효 성분의 "유효량"은 식물병의 종류, 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 식물의 일반 상태, 방제 방법, 방제기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.
- [0050] 본 발명에 있어서, 상기 펙테이트 라이에이즈 3 유전자는 서열번호 17의 염기서열 중 하나 이상의 염기가 결실, 치환 또는 삽입된 염기서열일 수 있다.
- [0051] 상기 펙테이트 라이에이즈 3 유전자의 센스 및 안티센스 프라이머쌍, 및 상기 유전자의 siRNA 서열은 당업자라면 용이하게 생성할 수 있다. 상기 서열들에 대해 실질적인 서열 동일성 또는 실질적인 서열 상동성을 지닌 서열 또한 본 발명의 범주에 포함된다. 여기서 사용된 "실질적인 서열 동일성" 또는 "실질적인 서열 상동성"이라는 용어는 서열이 또 다른 서열과의 실질적인 구조적 또는 기능적 동일성을 나타냄을 표현하기 위해 사용된다. 이러한 차이는 예를 들어 다른 종 간의 코돈 용법의 고유의 변이에 기인한다. 2 이상의 다른 서열 사이의 유의적인 양의 서열 중복 또는 유사성이 있는 경우 이들 서열의 길이 또는 구조가 다르더라도 유사한 물리적 특성을 지니는 경우 구조적 차이는 무시할만한 정도가 된다.
- [0052] 본 발명에서 유전공학 기술과 관련된 사항은 샘브룩 등의 문헌(Sambrook, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)) 및 프레드릭 등의 문헌(Frederick M. Ausubel et al., Current protocols in molecular biology volume 1, 2, 3, John

Wiley & Sons, Inc. (1994))에 개시되어 있는 내용에 의해 좀더 명확해진다.

- [0053] 본 발명은 또한 상기 유전자의 소나무 재선충병 진단 용도 및 상기 조성물과 소나무 재선충병 의심 식물로부터 얻은 시료 간의 반응을 확인하여 소나무 재선충병을 진단하는 방법을 제공한다.
- [0054] 본 발명의 진단 방법에서 상기 유전자를 포함하는 조성물과 시료 간의 반응의 확인은 DNA-DNA, DNA-RNA, DNA-단백질 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들, 예컨대 DNA 칩, 단백질 칩, 중합효소 연쇄반응(PCR), 노던 블롯팅, 서던 블롯팅, ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent assay), 효모 이중 혼성법(yeast two-hybrid), 2-D 겔 분석 및 시험관 내 결합 에세이(in vitro binding assay) 등을 이용할 수 있다. 예컨대 상기 유전자의 전부 또는 일부를 프로브로 사용하여 대상 식물로부터 분리한 핵산과 혼성화(hybridization)한 후 본 발명이 속하는 기술분야에 공지된 다양한 방법, 예컨대 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerases chain reaction), 서던 블롯팅, 노던 블롯팅 등으로 이를 검출함으로써 소나무 재선충병 의심 식물에서 상기 유전자가 고발현된 상태인지를 조사하면 소나무 재선충병의 발생 여부를 판단할 수 있다. 상기 프로브를 방사선 동위원소 또는 효소 등으로 표지하면 용이하게 유전자의 존재를 확인할 수 있다. 상기 프로브의 염기서열은 상기 유전자의 염기서열과 70% 이상의 유사성이 있으면 족하다. 상기 프로브는 본 발명의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용한 유전자 증폭법에 의해 제조할 수 있다.
- [0055] 또한, 본 발명은 상기 유전자의 센스 및 안티센스 프라이머쌍을 포함하는 소나무 재선충병 진단용 조성물을 제공한다.
- [0056] 상기 센스 및 안티센스 프라이머쌍은 상기 유전자에 대한 상보적인 염기서열을 갖는 서열번호 5~6 또는 서열번호 11~12의 프라이머쌍일 수 있다. 상기 프라이머쌍은 표 1에 정리하였다. 본 발명에서 '상보적'이란 프라이머의 염기서열에서 완전히 상보적인 것과 80% 이상의 상동성이 있는 것을 포함하는 개념이다.
- [0057] 상기 센스 프라이머 및 안티센스 프라이머를 이용하여 공지의 방법, 예컨대 RT-PCR 방법 등으로 상기 유전자의 발현량을 측정할 수 있다.
- [0058] 본 발명은 또한 상기 유전자로부터 발현된 단백질을 포함하는 소나무 재선충병 진단용 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 상기 단백질 외에도 단백질의 구조를 안정하게 유지시키는 증류수 또는 완충액을 포함할 수 있다. 앞서 언급한 바와 같이, 상기 껍데이트 라이에이즈 3 유전자는 소나무 재선충병 숙주 세포에서 특이적으로 발현이 증가하므로 상기 유전자로부터 발현된 단백질을 이용하여 상기 유전자 또는 단백질의 과발현 여부를 조사하면 소나무 재선충병을 진단할 수 있다.
- [0059] 본 발명은 또한 상기 단백질의 소나무 재선충병 진단 용도 및 상기 조성물과 대상체로부터 얻은 시료 간의 반응을 확인하여 소나무 재선충병을 진단하는 방법을 제공한다.
- [0060] 본 발명의 진단 방법에서 상기 단백질을 포함하는 조성물과 시료 간의 반응의 확인은 DNA-단백질, RNA-단백질, 단백질-단백질 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들, 예컨대 DNA 칩, 단백질 칩, 중합효소 연쇄반응(PCR), 노던 블롯팅, 서던 블롯팅, 웨스턴 블롯팅, ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent assay), 특이적 면역염색(histoimmunostaining), 효모 이중 혼성법(yeast two-hybrid), 2-D 겔 분석 및 시험관 내 결합 에세이(in vitro binding assay) 등을 이용할 수 있다. 예컨대 상기 유전자들로부터 발현된 단백질의 전부 또는 일부를 프로브로 사용하여 대상시료로부터 분리한 핵산 또는 단백질과 혼성화한 후 본 발명이 속하는 기술분야에 공지된 다양한 방법, 예컨대 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerases chain reaction), 웨스턴 블롯팅(western blotting) 등으로 이를 검출함으로써 대상체에서 상기 유전자가 고발현된 상태인지 조사하면 소나무 재선충병의 발생 여부를 판단할 수 있다. 상기 프로브를 방사선 동위원소 또는 효소 등으로 표지하면 용이하게 유전자의 존재를 확인할 수 있다.
- [0061] 또한, 본 발명의 조성물은 상기 단백질 대신 상기 단백질에 대한 특이적 항체를 포함할 수 있다. 껍데이트 라이에이즈 3 유전자는 소나무 재선충병 숙주 세포에서 특이적으로 발현이 증가하여 상기 유전자로부터 발현된 단백질의 양 또한 증가하게 된다. 따라서 상기 유전자로부터 발현된 단백질에 대한 항체를 이용하는 경우, 항원-항체 반응을 통해 상기 단백질을 검출해 내어 소나무 재선충병을 진단할 수 있다.
- [0062] 상기 단백질에 대한 모노클론 항체는 당업계에서 통상적인 모노클론 항체 제작 방법을 통해 제작되어 사용할 수도 있고, 시판되는 것을 사용할 수 있다. 상기 단백질에 대한 모노클론 항체는 일반적으로 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase, AP) 또는 호스래디쉬 퍼옥시다제(horseradish peroxidase, HRP) 등의 효소가 결합된 2차 항체 및 이들의 기질을 사용하여 발색 반응시킴으로써 정량 분석할 수도 있고, 아니면 직접 상기 단백질에 대한 모노클론 항체에 AP 또는 HRP 효소 등이 결합된 것을 사용하여 정량분석할 수도 있다. 또한, 모노클론 항

체 대신에 상기 단백질을 인식하는 폴리클론 항체를 사용할 수도 있고 이는 당업계에 통상적인 항혈청 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있으며, 항원결합성을 갖는 것이면 모노클론 항체 또는 폴리클론 항체의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고, 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다.

- [0063] 상기 항체는 본 발명의 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 단백질의 부분 펩타이드도 포함하며, 본 발명의 부분 펩타이드로는 최소한 7개 이상, 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다.
- [0064] 또한 본 발명은 상기 펩타이드 라이에이즈 3 유전자, 상기 유전자의 센스 및 안티센스 프라이머쌍, 상기 유전자로부터 발현된 단백질, 또는 상기 단백질에 대한 항체를 포함하는 소나무 재선충병 진단용 키트를 제공한다.
- [0065] 상기 소나무 재선충병 진단용 키트는 지지체, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질액, 또는 1,6-N-아세틸글루코사민 당쇄까지 변화를 측정하기 위한 L4-PHA, 폴리(A) RNA 분리시약 등을 더 포함할 수 있다.
- [0066] 상기 지지체는 니트로셀룰로오즈막, 폴리비닐수지로 합성된 96웰플레이트(96 well plate), 폴리스티렌수지로 합성된 96웰플레이트, 또는 유리로 된 슬라이드글라스 등일 수 있고, 상기 발색 효소는 퍼옥시다아제(oxidase), 또는 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase) 등일 수 있으며, 상기 형광물질은 FITC, 또는 RITC 등일 수 있고, 상기 발색 기질액은 ABTS(2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzenothiazoline-6-sulfonic acid)), OPD(o-Phenylenediamine), 또는 TMB(Tetramethyl Benzidine) 등일 수 있다.
- [0067] 또한, 본 발명은
- [0068] a) DNA 폴리머레이즈를 포함하는 등온성 마스터 믹스 (Isothermal Master Mix)에 프라이머와 시료 게놈 DNA를 혼합하여 PCR 반응 혼합물을 제조하는 단계;
- [0069] b) 버사펠렌쿠스 펩타이드 라이에이즈 3에 대한 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머;
- [0070] 정방향 내부 프라이머 (forward internal primer; FIP) 및 역방향 내부 프라이머 (backward internal primer; BIP);
- [0071] 루프 정방향 프라이머 (loop forward primer) 및 루프 역방향 프라이머 (loop backward primer) 중 하나 또는 양자 모두;를 a) 단계에서 제조된 PCR 반응 혼합물에 가해 주는 단계;
- [0072] c) b) 단계에서 얻은 혼합물을 Genie[®] II에 넣어 시료 게놈 DNA를 증폭하는 단계; 및
- [0073] d) 증폭된 DNA 중 버사펠렌쿠스 자일로필러스 펩타이드 라이에이즈 3 유전자를 확인하는 단계;를 포함하는, LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)를 이용한 소나무 재선충병 탐지방법에 관한 것이다.
- [0074] 또한, 본 발명은 상기 a) 단계의 DNA 폴리머레이즈가 Gsp (*Geobacillus sp.*) M 2.0 큰 단편 (GspM 2.0), Bst2.0 웜스타트 DNA 폴리머레이즈, Bst (*Bacillus stearothermophilus*)2.0 DNA 폴리머레이즈 큰 단편, Bst (*Bacillus stearothermophilus*) DNA 폴리머레이즈 큰 단편, Bst (*Bacillus stearothermophilus*) DNA 폴리머레이즈 전장 (full length), Gsp (*Geobacillus sp.*) M DNA 폴리머레이즈 큰 단편, GspM 2.0 DNA 폴리머레이즈 큰 단편, GspSSD DNA 폴리머레이즈 큰 단편, Tin DNA 폴리머레이즈 큰 단편 및 시판 등온성 마스터 믹스 내에 포함된 DNA 폴리머레이즈 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 한다.
- [0075] 뿐만 아니라 본 발명은
- [0076] a) 완충액, 이중가닥 DNA에 결합하여 형광을 내는 표지제, 베타인, dNTPs, MnCl₂, DNA 폴리머레이즈, 칼슘 지시약, 시료 게놈 DNA 및 프라이머를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계;
- [0077] b) a) 단계에서 얻은 반응 혼합물을 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 반응시켜 시료 게놈 DNA를 증폭하는 단계; 및
- [0078] c) 증폭된 DNA 중 버사펠렌쿠스 자일로필러스 펩타이드 라이에이즈 3 유전자를 확인하는 단계;를 포함하는, LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)를 이용한 소나무 재선충병 탐지방법에 관한 것이다.
- [0079] 본 발명에서 상기 a) 단계의 DNA 폴리머레이즈는 Gsp (*Geobacillus sp.*) M 2.0 큰 단편 (GspM 2.0), Bst2.0 웜스타트 DNA 폴리머레이즈, Bst (*Bacillus stearothermophilus*)2.0 DNA 폴리머레이즈 큰 단편, Bst (*Bacillus*

stearothermophilus) DNA 폴리머레이즈 큰 단편, *Bst* (*Bacillus stearothermophilus*) DNA 폴리머레이즈 전장 (full length), *Gsp* (*Geobacillus sp.*) M DNA 폴리머레이즈 큰 단편, *GspM* 2.0 DNA 폴리머레이즈 큰 단편, *GspSSD* DNA 폴리머레이즈 큰 단편, *Tin* DNA 폴리머레이즈 큰 단편 및 시판 등온성 마스터 믹스 내에 포함된 DNA 폴리머레이즈 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 한다.

[0080] 또한, 본 발명에서 이중가닥 DNA에 결합하여 형광을 내는 표지제는 SYBR 그린 등을 포함하는 사이아나인 (Cyanine) 염색제, 5,5'-(6,22-dioxo-11,14,17-trioxa-7,21-diazaheptacosane-1,27-diyl)bis(3,8-diamino-6-phenylphenanthridin-5-ium) iodide (젤 레드) 및 10,10'-(6,22-dioxo-11,14,17-trioxa-7,21-diazaheptacosane-1,27-diyl)bis(3,6-bis(dimethylamino)acridin-10-ium) iodide (젤그린) 중 선택된 것임을 특징으로 한다.

[0081] 또한, 본 발명에서 칼슘 지시약은 칼세인 및 하이드록시나프톨 블루 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0082] 본 발명은 버사펠러스 자일로필러스에서 새로운 펙테이트 라이에이즈 3 유전자 및 단백질을 발견하였고, 이 단백질은 침에서 분비되어 세포벽 분해에 관여하는 것으로 밝혀졌다. 본 발명자들은, 새로운 펙테이트 라이에이즈 3 유전자가 생화학적으로 기능적인 추정 발병인자임을 밝혔다.

[0083] 신규 Bx-PEL3 유전자를 이용하면 소나무 재선충병을 민감하게 진단할 수 있었다.

[0084] 본 발명자들이 발명한 *Genie II*와 *Geobacillus sp. M* 2.0 큰 단편 (*GspM* 2.0) DNA 폴리머레이즈를 포함하는 등온성 마스터 믹스를 이용하는 첫 번째 LAMP 프로토콜은 배양시간이 짧고 매우 높은 민감도로 소나무 재선충병을 탐지할 수 있다.

[0085] 또한, 본 발명자들이 발명한 형광 금속 지시약 칼세인과 가공된 *Bacillus stearothermophilus* DNA 폴리머레이즈 I, 큰 단편 (*Bst* 2.0 DNA 폴리머레이즈)를 이용한 LAMP 프로토콜은 경제적이다.

[0086] 이 LAMP 탐지법을 이용하면 소나무 재선충병을 현장에서 짧은 시간 내에 경제적으로 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0087] 도 1은 선충, 세균 및 곰팡이 유래 펙테이트 라이에이즈의 배열을 나타낸다. 흑색 선은 다당류 라이에이즈 패밀리의 3의 특성을 나타내는 보존부위를 나타낸다. 동일 잔기들이 흑색으로 강조되어 있다. 모든 보존적 잔기들은 별표 (*)로 표시되었다. B. 자일로필러스 펙테이트 라이에이즈 3 (Bx-PEL3) 내의 점선과 붉은 박스는 각각 추정 글라이코실화 부위 및 신호 펩타이드이다. 각 펙테이트 라이에이즈 등록번호는 다음과 같다: Bx-PEL1 (BAE48369), Bx-PEL2 (BAE48370), Bx-PEL3 (KC408376), Bm-PEL1 (BAE48373), Bm-PEL2 (BAE48375), 글로보테라 로스토키엔시스 (*Globodera rostochiensis*) (Gr)-PEL1 (AAF80746), Gr-PEL2 (AAM21970), 헤테로테라 글리신스 (*Heterodera glycines*) (Hg)-PEL1 (AY026357), Hg-PEL2 (AF520566), 헤테로테라 스카티 (*Heterodera schachtii*) (Hs)-PEL2 (ABN14272), 멜로이도자인 인코그니타 (*Meloidogyne incognita*) (Mi)-PEL (AY327873), Mi-PEL1 (AY515702), Mi-PEL2 (AY327873), Mi-PEL3 (AY861685) 및 멜로이도자인 자바니카 (*Meloidogyne javanica*)(Mj)-PEL-1 (AF455757).

도 2는 다른 성장조건에서 cDNA (A) 및 게놈 DNA (B) 및 정량적 실시간 PCR 분석 (C)으로 Bx-PEL3를 탐지한 것을 나타낸다. (A, B), M: 1 Kb DNA 크기 마커. 내부 대조군으로서 튜블린을 이용하였다. 병원성 B. 자일로필러스의 모든 펙테이트 라이에이즈들이 탐지된 반면, 비병원성 B. 무크로나투스에서는 유일하게 Bm-PEL1만 탐지되었다. (C), 본 연구에서 B. 자일로필러스의 생존단계는 확산, 증식 및 미디어 단계로 나누어진다. 각 Bx-PEL은 생존 조건에 따라 다른 발현 패턴을 나타내며, 이는 이들이 병을 일으킴에 있어서 다른 생화학적 역할을 수행함을 나타낸다.

도 3은 Bx-PEL3의 활성의 발현 (A) 및 최적의 물리적 조건을 나타낸다. (A), 다양한 온도 (20-37 °C)에서 0.2 mM의 IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 가했을 때 Bx-PEL3의 발현을 시험하였다. SDS-PAGE에서 화살표는 Bx-PEL3를 나타낸다. M: 분자크기 마커, C: 음성 대조군으로서 *E. coli* BL21, 1~3: Bx-PEL3를 발현하

는 형질전환체들, 1: 용균액 전체, 2: 불용성 단백질 (인클루전 바디), 3: 수용성 단백질. (B), 음과 처리 이후 얻어진 수용성 재조합 Bx-PEL들은 비록 용해도는 같지 않지만 폴리갈락투론산에 대해 활성을 나타내었고 (C 및 D), 각각 다양한 pH (C) 및 Ca^{2+} 농도에 대한 Bx-PEL3 활성에 대한 최적 조건을 나타낸다. (E), Bx-PEL3의 형광 인시투 하이브리다이제이션을 나타낸다. Bx-PEL3 전사체는 식도샘 근처에서 탐지되었다. 결과는 Bx-PEL3가 분비되며, 세포벽 파괴와 B. 자일로필러스의 발병에 연관되어 있음을 제시한다. 크기막대는 100 μm 길이를 나타낸다.

도 4는 Bx-PEL3의 3차원 상동관계 모델들을 나타낸다. Bx-PEL1 (B), Bx-PEL2 (C) 및 B-PEL3 (D)의 리본 모델은 상동관계 모델링을 통해 생성하였고, 최적 주형은 바실러스 KSM P-15의 PEL (PEL-15)이었다 (A). PEL들의 촉매 활성을 위해서는 Ca^{2+} 이온이 필수적이라고 알려져 있고, 칼슘이온의 역할은 산성 기질의 중성화이다. PEL-15에서 세 개의 잔기로 이루어진 Ca^{2+} 이온 결합부위가 확인되었다: pH 6.5 (녹색)에서 D⁸⁰, V⁸¹ 및 K¹⁰³, pH 9.5 (청색)에서 D⁶³, E⁸³ 및 D⁸⁴. PEL-15의 이 잔기들은 모든 Bx-PEL들에서 보존적이다. 적색 막대 잔기들은 촉매에 의한 염기성 잔기들을 나타낸다.

도 5는 Bx-PELs의 게놈 DNA 서열을 나타낸다. 밑줄친 부분은 인트론 서열을 나타낸다. 짧은 글자들과 이탤릭체 글자들은 각각 개시코돈과 종결코돈을 나타낸다.

도 6은 Bx-PELs의 추정 3차원 상동관계 모델 주형들의 예상되는 잔기당 오류를 나타낸다. (A) 1EE6A, (B) 3B8YA, (C) 3B4NB 및 (D) 3B90B. 청색은 예측 잔기 오류가 잔기당 0.1 nm 이하로 좀더 신뢰할 만한 부분을 나타내며, 적색은 잔기당 예측 오류가 0.35 nm 이상으로 잠재적으로 신뢰성이 낮은 부분을 나타낸다.

도 7은 Genie II 내에서 65 °C로 LAMP PCR을 수행한 결과이다. 60 °C 및 62 °C (A 및 B)로 수행한 결과와 비교할 때 B. 자일로필러스의 펙테이트 라이에이즈 3에 대해 디자인된 F3, B3, FIP 및 BIP 프라이머들은 Genie II 내에서 65 °C (C)로 증폭할 때 오류 양성을 나타내지 않았다.

도 8은 LAMP 산물을 눈으로 확인하고 전기영동으로 분리한 사진이다. A: 60 °C로 배양하기 전 형광 지시약 칼세인을 포함하는 LAMP 반응혼합물을 함유하는 모든 튜브가 비슷하게 흐린 노란색을 보이고 있다. B: LAMP 반응 혼합물을 두 시간 동안 60 °C로 배양할 때 B. 자일로필러스 유래 게놈 DNA를 담은 튜브에서 녹색형광이 관찰되었고, B. 무크로나투스 (*B. mucronatus*)에서는 관찰되지 않았다. 강한 형광은 UV 하에서 더 선명하게 관찰되었다. C: PEL3를 증폭하기 위해 F3 및 B3를 이용하였을 때 B. 무크로나투스 (*B. mucronatus*)가 아닌 B. 자일로필러스의 게놈 DNA로부터 197 bp 근처의 단일 띠만이 선명하게 나타났다. D: 2.5% 아가로즈 젤에서 LAMP 산물이 분리되었을 때 많은 양의 이중가닥 DNA가 탐지되었다. 증폭된 DNA는 레인에 나타났고, 검은 화살표로 표시된 것과 같이 전형적인 계단 유사 구조를 나타내었다.

도 9는 루프 프라이머를 가하여 개선된 LAMP의 민감도를 보여준다. LAMP 측정법의 민감도는 LF 또는 LB 중 하나 또는 둘을 가하였을 때 현저히 증가하였다. A: 게놈 DNA 1 ng을 사용했을 때 피크에 달하는 시간은 루프 프라이머가 없을 때 30분과 비교하여 17.5분 (LB+LF), 22분 (LB) 및 25분 (LF)으로 감소하였다. B: 그러한 개선은 0.1 ng의 게놈 DNA를 사용하였을 때 좀더 분명해졌다. LAMP 반응이 피크에 달하는 시간은 37.5분 (LB+LF), 50분 (LB) 및 57.5분 (LF)이었지만, 루프 프라이머가 없을 때는 LAMP 반응이 피크에 도달하지 못하였다. C: 하나의 재선충에서 추출한 게놈 DNA의 1/10은 LAMP 반응을 수행하기에 충분하였다. 한 재선충 유래 게놈 DNA의 2/10 또는 4/10으로 LAMP 반응을 수행했을 때 피크에 도달하는 시간은 B. 자일로필러스 유래 게놈 DNA 1ng으로 반응 수행시 피크도달시간과 유사하였다. LAMP의 여섯 개 프라이머 세트는 다른 비병원성 나무에 존재하는 재선충은 인식하지 못하였고, B. 자일로필러스 유래 PEL3 유전자를 특이적으로 인식하였다. B.x.; *B. 자일로필러스*, B.m.; *B. 무크로나투스*, B.d; *B. 도우이*(doui), B.t; *B. 타일랜드* (*thailandae*), LB; Loop Backward primer, LF; Loop Forward primer.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재범위 내로 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

버사펠렌쿠스속 배양

경남 진주의 죽은 소나무에서 분리한 버사펠렌쿠스 속을 국립산림과학연구소 (서울)에서 입수하였다. 선충은

PDA (potato-dextrose-agar) 배지 상에 배양한 보트리티스 시네리아 (*Botrytis cinerea*) 론 상에서 25 °C로 배양하였고, 종래 방법 (Chawla and Prasad, 1975)에 따라 추출하였다. 수집한 선충은 4°C 증류수에 보관하였다.

[0091] 세균 균주

[0092] *E. coli* 균주 수용성 세포 (competent cell)인 JM109 (Takara Korea Medical Inc., Seoul, Korea) 및 BL21 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 각각 클로닝 및 발현 실험에 이용하였다. 제한 엔도뉴클라아제와 변형효소는 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하였다.

[0093] 총RNA 추출 및 cDNA 합성

[0094] 트리졸제 (Invitrogen)로 다른 3개의 생애단계로부터 총RNA를 추출하고 (Chomczynski and Sacchi, 1987) 제조사의 지시에 따라 SuperScriptIII™ (Invitrogen)으로 단일 가닥 cDNA를 합성하였다. 분산 단계의 B. 자일로필러스는 죽은 소나무에서 채취한 모노카무스 얼터라투스 (*Monochamus alteratus*)에서 분리하였다. 증식단계 B. 자일로필러스는 소나무 마름병 소나무에서 분리하였다. 미디어 단계의 B. 자일로필러스는 실험실에서 배양한 B. 자일로필러스이다.

[0095] 펙테이트 라이에이즈 유전자 클로닝

[0096] Bx-PELs를 증폭하기 위해 특이적 프라이머들 (Bioneer Inc., Daejeon, Korea; 표 1)을 사용하였다. 총RNA 추출 및 cDNA 합성은 위의 기재와 같이 수행하였다. Bx-PELs 증폭을 위한 PCR 조건은 다음과 같다: 95 °C로 1분, 그 후 40 cycles at 95 °C로 30초, 58 °C로 30초 및 68 °C로 1분간을 40 회전하였다. 모든 PCR은 AccuPrime™ *Pfx Taq* polymerase (Invitrogen)로 수행하였다. 결과로 얻어지는 PCR 산물은 크기별로 시험한 후 pGEMT-Easy vector (Promega) 내로 클로닝하였다. Bx-PELs 양 가닥의 서열을 밝혔다.

[0097] 게놈 DNA와 cDNA에서 Bx-PELs 탐지

[0098] B. 자일로필러스의 게놈 DNA를 종래 방법과 같이 추출하였다 (Zhou et al., 2007). 게놈 DNA에서 PELs를 탐지하기 위해 특이적 프라이머 (표 1)를 사용하였다. PCR의 다음과 같이 수행하였다: 95 °C로 5분간 유지한 다음, 95 °C로 1분, 58 °C로 1분, 그리고 68 °C로 2분간을 40회전하였다. 총RNA 추출, cDNA 합성 및 유전자 증폭은 위의 기재와 같이 수행하였다. 그 결과 얻어지는 PCR 산물은 pGEMT-Easy vector (Promega) 내로 클로닝하여 서열을 밝혔다.

[0099] 정량적 실시간 PCR

[0100] 3 개의 다른 생애단계로부터 총RNA 추출과 cDNA 합성은 상기 기재와 같이 수행하였다. 각 Bx-PEL의 상대적 발현 수준을 결정하기 위한 정량적 실시간 PCR (qrtPCR)을 위해, 최적 qrtPCR 반응혼합물 (20 μ l)은 20 ng cDNA (총 RNA 양), 0.25 μ M 특이적 프라이머들 및 SuperScript™ HS SYBR Green qPCR master mix (Finnzymes, Espoo, Finland)로 이루어진다. qrtPCR 증폭은 표 1의 특이적 프라이머를 이용하여 수행하였다. 참고로서 B. 자일로필러스 유래 튜블린 (GenBank accession no. AB500150)은 표 1의 특이적 프라이머를 이용하여 증폭시켰다. qrtPCR에 이용되는 회전 프로파일은 다음과 같다: 95 °C로 15분간 유지한 다음, 95 °C로 10초, 58 °C로 10초, 그리고 72 °C로 20초간을 40회전하였다. 모든 qrtPCR은 세 번 반복하여 수행하였다. 효율이 1.8 이상인 Ct (cycle thresholds) 값을 나타내는 경우에만 데이터 분석에 이용하였고, Bx-PELs의 상대적 전사수준은 $2^{-\Delta Ct}$ 방법 (Pfaffl, 2001)을 이용하여 계산하였다. PCR 산물의 특이도는 녹는점 곡선 분석으로 결정하였다. 통계학적 차이점을 탐지하기 위해 ANOVA에 SigmaStat Ver. 3.5 소프트웨어 (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였고, 이후 Duncan의 중복지교시험을 수행하였다.

[0101] Bx-PEL 재조합 단백질 발현 및 최적 조건을 찾기 위한 활성 측정

[0102] pGEMT-easy 벡터 내의 Bx-PEL은 pGEX-4T-1 벡터 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) 내로 즉시 서브클론되었고, 이어 발현 분석을 위해 *E. coli* BL21 균주 (Invitrogen)로 형질전환되었다. 결과로 얻어진 재조합 단백질은 N-말단이 글루타치온 S-트랜스퍼레이즈와 융합된 Bx-PELs이며, 이 발현은 다양한 온도 (20-37 °C) 및 0.2 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) (Sigma, St. Louis, MO, USA) 조건에서 수행하였다. 발현된 단백질이 수용성인지를 확인하기 위해 세포는 매 3 시간마다 모았다. 총 단백질 10 μg을 12% 트리스-글라이신 SDS-PAGE를 이용하여 분리하였다. PEL 활성은 폴리갈락투론산 (PGA; Sigma)으로부터 불포화 산물의 생성을 232 nm에서 분광학적으로 측정하여 분석하였다 (Collmer et al., 1988). 표준 분석 혼합물은 40 μl의 3% PGA (Sigma), 200 μl의 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 40 μl의 10 mM CaCl₂ 및 10 μl의 적절하게 희석된 효소용액으로 구성되며, 총 부피가 0.4 ml가 되도록 하였다. 실온에서 232 nm에서의 흡광도가 점차 증가하는 것이 4분 이상 관찰되었다. Ca²⁺의 영향은 0 내지 5 mM의 CaCl₂를 가하여 시험하였다. 이 완충액들의 pH 값은 실온에서 확인하였다. 아세트산 나트륨 완충액 (pH 5.0), Tris-HCl 완충액 (pH 7.0 내지 9.0) 및 글라이신-NaOH 완충액 (pH 11)을 이용하여 최적 pH를 결정하였다. 각 완충액 농도는 50 mM였다.

[0103] PELs의 다중 배열 (multiple alignment)

[0104] Bx-PEL3의 아미노산 서열을 선충, 세균 및 곰팡이 유래 PEL의 서열과 비교하였는데, ClustalW of MegAlign (Ver. 7.0.0.; DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)으로 이들을 중복 배열하였다.

[0105] 상동관계 모델링을 통한 단백질 구조 예측

[0106] Bx-PELs의 주형 확인은 Swiss Model Workspace (<http://swissmodel.expasy.org/workspace>)을 이용하여 수행하였다. Bx-PELs의 예측된 3차원 구조는 QMEAN (Qualitative Model Energy Analysis) 서버 (<http://swissmodel.expasy.org/qmean>)를 이용하여 평가하였다. 추정 주형의 잔기당 예측 오류 또한 고려되었다. 가장 높은 QMEAN 점수를 받고 잔기당 예측 오류가 가장 적은 상동관계 모델은 Bx-PELs의 3차원 구조를 나타내는데 이용되었다. 모델과 구조의 시각화 및 변형은 Swiss PDB viewer 4.0.1. (Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, Switzerland)을 이용하여 수행하였다.

[0107] 형광 인시투 하이브리디제이션

[0108] Bx-PEL3 전사체의 입체적 위치는 종래기술을 변형하여 형광 인시투 하이브리디제이션으로 시험하였다 (de Bore et al., 1998). Bx-PEL3, 에 특이적인 센스 (음성 대조군) 및 안티센스 DNA 프로브를 합성하기 위해 각각 qRT-PEL3-F 및 qRT-PEL3-R을 이용하였다. 센스 및 안티센스 프로브는 각각 Chromatide-Texas Red-12-dUTP 및 Chromatide-Fluorescein-12-dUTP (Invitrogen)로 표지하였다. 앞서 4\$ 파라포름알데하이드로 4 °C에서 오버나이트하여 고정시킨 혼합단계 B. 자일로필러스에 프로브를 혼성화하고 실온에서 30분간 프로테아제 K (Qiagen Inc.)로 처리하여 투과성을 높였다. 시료는 10초간 음파처리하고 PBST (phosphate buffered saline + 0.1% Tween 20)로 세척한 다음 혼성화 완충액 (0.9 M NaCl, 20 mM Tris, pH 7.4 및 0.01% SDS)으로 옮겼다. 혼성화는 46 °C에서 밤새 수행하였다. 시료들은 48 °C에서 한 시간 동안 세척 완충액 (혼성화 완충액에 5 mM EDTA을 가한 것)으로 다섯 번 세척하였다. 시료들은 Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)로 현미경에 올리고, BX-PEL3 전사체에 결합하는 프로브 부분은 형광현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

[0109] 재선충

[0110] B. 자일로필러스 (*B. xylophilus*), B. 무크로나투스 (*B. mucronatus*), B. 도우이 (*B. doui*) 및 B. 타일랜드 (*B. thailandae*)는 경남 진주의 죽은 소나무에서 채취하여 국립산림과학원 (서울)에 보존 중인 것을 이용하였다. 형태 및 분자마커를 근거로 분류된 *B. xylophilus*, *B. mucronatus*, *B. doui* 및 *B. thailandae*는 PDA (potato-dextrose-agar) 플레이트에서 25 °C로 키운 *Botrytis cinerea* 론 상에서 배양하였다 [15].

[0111] 계놈 DNA 제조

[0112] *B. xylophilus*, *B. mucronatus*, *B. doui* 및 *B. thailandae*의 게놈 DNAs는 제조자의 지시대로 DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 약 10,000 개의 재선충으로부터 추출하였다. DNA 농도는 Nanodrop2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE)으로 측정하였다. 하나, 둘 또는 네 개의 *B. xylophilus*로부터 게놈 DNA를 추출하기 위해 DNeasy Blood and Tissue Kit를 이용하였다.

[0113] **LAMP용 프라이머**

[0114] Tomita et al. [Tomita N. et al., *Nature Protocols* 2008, **3**(5):877-882]의 가이드라인에 따라 PEL3에 대한 여섯 개의 프라이머가 디자인되었다. 표 1은 PEL3의 코딩 DNA 서열 내 각 프라이머의 위치와 서열을 나타낸다. 정방향 3 프라이머 (F3)와 역방향 3 프라이머 (B3)에 의해 증폭된 DNA 조각의 예상 크기는 197bp였다.

[0115] **PEL3의 PCR, 클로닝 및 서열 확인**

[0116] PEL3의 DNA 조각을 증폭하기 위한 PCR 반응은 20 μ l 혼합액 내에 10 pmol F3 및 B3, 1X PCR 마스터 믹스 (Elpis bio., Daejeon, Korea) 및 *B. xylophilus* 또는 *B. mucronatus*의 게놈 DNAs를 넣고 진행한다. 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성시킨 후 PCR 증폭 사이클링은 94 $^{\circ}$ C로 40초간 변성, 60 $^{\circ}$ C로 30초간 어닐링 및 72 $^{\circ}$ C로 30초간 연장을 40회 반복하였다. 반응 산물은 2.5% 아가로스 젤 (0.5X TBE)에서 분리하였고, SYBR Green (Life Technologies, Grand Island, NY)으로 시각화하였다. 띠는 오려내어 제조자의 지시대로 pGEMT easy vector (Promega, Madison, WI) 내로 클로닝하였다. 클로닝한 PCR 산물은 캐필러리 시퀀싱하여 확인하였다 (데이타 나타내지 않음).

[0117] **Genie[®] II용 LAMP 조건**

[0118] 25 μ l의 PCR 반응 혼합물을 만들기 위해 Isothermal Master Mix (Optigene, West Sussex, United Kingdom)에 4, 5 또는 6 개의 프라이머를 게놈 DNA와 함께 혼합한 후 Genie[®] II (Optigene)를 이용하여 증폭하였다. 10 pmol의 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머, 40 pmol의 정방향 내부 프라이머 (forward internal primer; FIP) 및 역방향 내부 프라이머 (backward internal primer; BIP)를 이용하였다. 20 pmol의 루프 정방향 프라이머 (LF) 및 루프 역방향 프라이머 (LB) 중 하나 또는 양자 모두를 LAMP의 민감도를 향상시키기 위해 가해 주었다.

[0119] 상기 정방향 프라이머 (F3), 역방향 프라이머(B3), 정방향 내부 프라이머 (FIP), 역방향 내부 프라이머 (BIP), 루프 정방향 프라이머 (LF) 및 루프 역방향 프라이머 (LB) 서열을 표 4에 나타내었다. 그러나, 표 4에 제시된 서열은 예시일 뿐 반드시 이에 한정되는 것은 아니며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 가이드라인에 따라 다양한 프라이머들을 디자인하거나 표 1 또는 표 4에 제시된 서열 중 일부를 변경하여 LAMP 반응시 프라이머로 이용할 수 있음은 자명하다.

[0120] **형광 지시약을 넣을 때의 LAMP 조건**

[0121] PCR 반응 혼합물은 총 25 μ l의 혼합물 내에 1 X *Bst* 폴리머레이즈 완충액 (New England Biolabs, Ipswich, MA), 1.6M 베타인 (Betaine; Sigma-Aldrich), 2mM dNTP (New England Biolabs), 1mM $MnCl_2$ (Sigma-Aldrich), 8 단위의 *Bst* DNA 폴리머레이즈 (New England Biolabs) 및 50 mM 칼세인 (Sigma-Aldrich)으로 이루어졌다. 상기와 같은 프라이머 농도를 사용하였다. 60 $^{\circ}$ C에서 PCR 혼합물을 배양하는 것이 62 $^{\circ}$ C 또는 65 $^{\circ}$ C에서 배양하는 것보다 가장 강한 형광신호를 내므로, 모든 반응은 60 $^{\circ}$ C에서 수행하였다.

[0122] **결과 1: B. 자일로필러스의 세 종류 펙테이트 라이에이즈**

[0123] B. 자일로필러스의 PEL 유전자들을 비교하고 특징짓기 위하여 본 발명자들은 단계 특이적 EST 라이브러리로부터 세 종류의 PEL들을 클론하였다: Bx-PEL1, Bx-PEL2 및 Bx-PEL3 (Kang et al., 2009). Bx-PEL3의 뉴클레오타이드 서열, 발현 패턴 및 기능은 아직 밝혀지지 않았다. Bx-PEL3는 Bx-PEL1 및 Bx-PEL2와 각각 61.2% 및 59.8%의 서

열유사성을 나타내었다. Bx-PEL3를 포함하는 T3-1679 EST 클론은 길이가 1160 bp이고, 264개 아미노산의 오픈리딩프레임에 결합하였다. 길이 30개 아미노산의 신호 펩타이드는 SignalP 3.0 server로 예측하였다 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>; 도 1). Bx-PEL3는 특이한 추정 당쇄화 부위 (NGS¹⁰⁵)를 가지며 앞서 보고된 Bx-PEL들과 같이 게놈 DNA에 인트론 부위를 공유하였다 (도 1, 도 5) (Kikuchi et al., 2006).

[0124]

Bx-PELs의 전체 길이는 특이적 프라이머로 증폭시켰다. 게놈 DNA 및 cDNA로부터 증폭된 PCR 산물들은 병원성 B. 자일로필러스 및 비병원성 B. 무크로나투스 간에 전혀 다른 패턴을 보여주었다. 게놈 DNA와 cDNA로부터 모든 Bx-PELs가 증폭된 반면 Bm-PEL1만이 발견되었다 (도 2A 및 2B). 정량적 실시간 PCR 분석은 세 개의 다른 생애 단계, 분산 단계, 증식 단계 및 미디어 성장단계에서 Bx-PEL3보다 Bx-PEL1 및 Bx-PEL2가 좀더 우세함을 나타내었다 (도 2C). 분산 단계에서 Bx-PEL1의 발현 수준은 다른 Bx-PEL들보다 매우 높았던 반면, Bx-PEL2는 증식 단계 및 미디어에서 가장 높은 발현수준을 나타내었다. 생애단계와 관련 없이 Bx-PEL3 발현은 상대적으로 낮은 수준으로 유지되었다.

[0125]

결과 2: Bx-PEL3 유전자는 기능적 단백질을 코딩한다.

[0126]

새로운 Bx-PEL3 유전자가 기능이 있는지 그렇지 않은지를 시험하기 위하여 전장 Bx-PEL들을 발현 벡터 내에 서브클론하였다. 모든 Bx-PEL들은 발현되지만 인클루전 바디를 형성하였다. 낮은 온도 (20 °C)에서 각 Bx-PEL을 발현하는 *E. coli* 유래 소량의 수용성 단백질은 음파처리 후 얻었다 (도 3A). N-말단이 글루타치온 S-트랜스퍼레이즈와 융합된 모든 재조합 Bx-PEL들은 비록 음파처리에 의한 용해도가 균일하지는 않았지만, PGA (polygalacturonic acid)에 대한 활성을 나타내었다 (도 3B). 재조합 Bx-PEL3는 광범위한 염기 pH 범위 내에서 PGA에 활성을 나타내었다. 활성은 pH 9.0 이상까지 높은 염기 조건에서도 빠르게 증가하였다 (도 3C). 음성 대조군으로서, 빈 벡터를 포함한 *E. coli* BL21 균주는 PGA에 활성을 나타내지 않았다 (데이터 제시하지 않음). Ca^{2+} 이온은 PELs의 촉매활성에 필수적인 것으로 알려져 있다 (Kikuchi et al., 2006). 그리하여, Ca^{2+} 이온이 효소 활성에 미치는 영향을 농도를 달리하여 시험하였다 (도 3D). Ca^{2+} 이온이 없는 경우 활성은 탐지할 수 없었다 (데이터 제시하지 않음). 0.25와 0.5 mM $CaCl_2$ 사이에서 효소 활성은 최대였고, 더 높은 농도에서는 효소 활성이 감소하였다. Bx-PEL3는 다른 다당류 라이에이즈 패밀리 3 멤버들에서 찾아볼 수 있는 것과 같이 Ca^{2+} 및 염기성 반응조건과 같은 특정 이온 요구와 같은 생화학적 특성을 나타내었다 (도 3C 및 3D).

[0127]

결과 3: 식도샘에서의 Bx-PEL3 전사

[0128]

배지에서 배양한 B. 자일로필러스에서 Bx-PEL3의 분포를 시험하기 위해 플루오레신-12-dUTP로 표지한 Bx-PEL3의 안티센스 DNA 프로브로 인시투 하이브리다이제이션을 수행하였다. 강한 형광은 B. 자일로필러스의 전방 몸체 (anterior body), 식도샘 근처에서 탐지된 반면, 음성 대조군인 센스 DNA 프로브에서는 신호가 없었다 (도 3E). 이 결과는 Bx-PEL3가 내생적 선충 유전자 유래이고, 다른 공생 미생물에서 유래한 것이 아님을 말해주며, B. 자일로필러스가 숙주를 감염시킬 때, Bx-PEL3가 분비되고 이것은 타겟 조직에서 세포벽을 파괴하는데 관여함을 말해준다. 식물병원균 선충은 식물병 유발 인자로서 세포벽 분해효소를 생산하고 분비하는 것으로 알려져 있다 (Rosso et al., 1999; Gao et al., 2002; Qin et al., 2004). Bx-PEL3가 추정 식물병 유발인자가 될 수 있다는 가능성은 N-말단의 신호펩타이드의 존재에서 찾아볼 수 있으며, 이는 이 단백질이 침투와 이동을 촉진시키기 위해 분비됨을 암시한다 (도 1) (Kikuchi et al., 2006).

[0129]

결과 4: Bx-PELs의 3D 구조는 세균 PELs의 구조와 유사하다.

[0130]

PELs의 3D 구조를 밝히기 위해 Swiss-Model Workspace (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>)를 이용하여 3D 상동관계 모델링을 수행하였다. 주형의 질은 QMEAN 스코어로 분석하였다. 전체 모델의 포괄적인 점수를 나타내는 QMEAN 스코어는 0부터 1까지의 예측된 모델 신뢰도를 나타낸다 (Benkert et al., 2009). 바실러스 아속 유래 PEL인 KSM P-15 ((PEL-15; PDB ID: 1EE6A)는 확인된 주형 후보들 중 가장 높은 QMEAN 스코어를 나타내었다 (보충 표 1)(Akita et al., 2001). Bx-PELs 예측 3D 상동관계 모델 주형의 예상되는 잔기당 오류 또한 고려되었다 (보충 도 2). 각 Bx-PEL은 PEL-15와 37.9 내지 46.1%의 서열 상동성을 나타내었다. Bx-PELs의 전체 구조는 PEL-15와 유사하다: 이들은 β 사슬로만 이루어져 있고 (도 4) PEL-15 서열 배열 (보충 표 2)에 기초하

여 8 회전의 병렬 β 나선을 나타내었다 (Akita et al., 2001). 각 β 나선 한 회전은 S1, S2 및 S3로 표시되는 세 개의 β 가닥을 포함한다 (보충 표 2). 세 개의 β 나선들은 측면 부분 T1, T2 및 T3로 연결된다. 따라서, 하나의 나선 회전은 S1-T1-S2-T2-S3-T3 순서로 구성된다. Ca^{2+} 이온은 PEL 촉매활성에 필수적인 것으로 알려져 있고 (Kikuchi et al., 2006), 그 역할은 산성 기질의 중화이다. PEL-15 내에서 세 개의 잔기로 구성된 두 개의 Ca^{2+} 이온 결합부위는 pH 6.5에서 D^{80} , V^{81} 및 K^{103} 이고, pH 9.5에서 D^{63} , E^{83} 및 D^{84} 로 확인되었다. PEL-15의 이 잔기들은 Bx-PELs에서 보존적이며 (도 4), 이는 Bx-PEL3가 광범위한 pH에서 PGA에 활성을 나타냄을 설명해준다. PEL-15에서 D^{63} 및 E^{83} 의 돌연변이는 효소 활성을 나타내지 않았으며 (Akita et al., 2001), 이것은 이 잔기들이 효소 활성에 중요한 역할을 수행함을 가리킨다. Ca^{2+} 이온 결합부위가 T3 부위에만 존재한다는 사실은 그들이 Ca^{2+} 이온과 기질 간의 상호작용을 매개함을 암시한다. 촉매활성을 위한 세 개의 염기성 잔기들 (K^{107} , K^{129} 및 R^{132})은 부위 특이적 돌연변이 유발을 통해 PEL-15에서 발견되었고 (Hatada et al., 2000) Bx-PEL1 및 Bx-PEL2에서도 보존적이었다. PEL-15의 K^{107} 잔기는 Ca^{2+} 이온결합에 관여하는 산성 잔기 (V^{81} 및 D^{84}) 근처에 존재하며 반응 중간산물을 안정화시키기 위해 필요하다 (Akita et al., 2001). K^{129} 잔기는 기질과의 상호작용에 관여하는 것으로 보인다. 그렇지만, Bx-PEL3의 R^{167} 잔기는 K^{129} 잔기에 대응하며, 재조합 Bx-PEL3는 PGA에 대한 활성을 보유하였다. R^{132} 잔기는 베타 엘리미네이션 기질로부터 C5 양자를 분리하는 핵심 잔기로 알려져 있다 (Gerlt et al., 1991; Gerlt and Gassman, 1993).

[0131] **결과 5: B. 자일로필러스의 PEL3 유전자는 두 개의 다른 LAMP 프로토콜로 탐지된다.**

[0132] 병원성 B. 자일로필러스를 통상적인 DNA에 기초하여 탐지하는 방법을 개발하기 위해 PEL3 유전자에 대해 LAMP 탐지방법을 위해 비병원성 B. mucronatus와 상동관계가 없는 네 개의 프라이머 (표 1)를 디자인하였다 [16]. PEL3에 대한 프라이머들의 특이성과 증폭효과를 평가하기 위해, B. 자일로필러스의 게놈 DNA를 넣고 또는 넣지 않고 형광신호 변화 (도 7)로 증폭된 이중가닥 DNA 조각을 탐지하는데 Genie II를 이용하였다.

[0133] LAMP 분석에 다른 어닐링 온도를 갖는 네 개의 프라이머가 사용되기 때문에 B. 자일로필러스 게놈 DNA (1 ng)의 존재 하 또는 부재 상태로 LAMP 혼합물은 LAMP 반응에 최적의 온도를 확인하기 위해 Genie II를 이용하여 세 개의 다른 온도에서 배양하였다. 60 °C와 62 °C에서 게놈 DNA가 있을 때 형광 신호의 최대 피크는 각각 35분 (도 7A) 및 36분 (도 7B)에 도달하였다. 비록 최대 형광신호에 도달하는 시간이 지연되고 그 피크의 높이가 낮지만, 두 온도에서는 오류양성 형광신호가 탐지되어 LAMP의 정확성에 문제가 제기되었다. 이러한 결과들은 4 프라이머 중 비특이적 어닐링이 이중가닥 DNA 조각을 증폭시킬 정도로 충분함을 암시한다. 65 °C로 배양온도를 높이면 LAMP 반응의 특이성과 민감성이 개선되었다. 게놈 DNA를 넣지 않았을 때 반응은 27분 내에 최대피크에 도달하였고, 한 시간 내 형광신호의 현저한 증가가 없었다 (도 1C).

[0134] **결과 6: LAMP 증폭의 리포터로 형광 금속 지시약 칼세인을 이용할 수 있다.**

[0135] LAMP의 가장 큰 장점은 타겟 생물의 DNA 존재를 복잡한 장치 없이 매우 특이하고 민감하게 탐지할 수 있다는 점이다. B. 자일로필러스의 PEL3 유전자를 Genie II와 같이 복잡한 장치 없이 탐지하기 위해 LAMP 프라이머 셋트를 이용할 수 있는지를 시험하기 위해 가역적인 형광 금속 지시약인 칼세인과 일정온도유지 블록 (isothermal block)을 사용하였다. Mn^{2+} 가 결합된 칼세인을 LAMP 혼합액에 가했을 때 튜브에서는 녹색형광이 나타나지 않았다 (도 8A). 모든 튜브에서는 비형광 칼세인의 존재로 인해 비슷하게 약한 노란색이 나타났다. 두 시간 동안 60 °C에서 배양한 후 병원성 B. 자일로필러스 게놈 DNA를 넣은 튜브에서는 맨눈으로 관찰 가능한 강한 녹색형광신호가 나타났다 (도 8B). 이 신호는 UV 램프 하에서 훨씬 더 선명하게 보였다 (도 8B). 그러나, B. 무크로나투스 게놈 DNA를 넣은 튜브 또는 0.25 ng의 B. 자일로필러스 게놈 DNA를 넣은 튜브에서는 변화가 없었다.

[0136] Pfu 폴리머레이즈와 함께 B3 및 F3를 사용한 통상의 PCR은 B. 자일로필러스 또는 B. 무크로나투스 게놈 DNA를 넣고 수행하였다 (도 8C). 통상적인 PCR에서 얻어진 강한 단일 띠 (도 8C)와 비교하여 LAMP 반응에서는 흑색 화살표로 표시된 계단과 같은 구조를 나타내는 이중가닥 DNA를 더 많이 함유하고 있고, 2.5% 아가로스 젤로 분리하였을 때 레인을 따라 좀더 얼룩이 생겼다 (도 8D). 이러한 결과들은 PEL3 LAMP 프라이머 셋트가 형광신호를

변화시킴으로써 병원성 B. 자일로필러스의 존재를 탐지하는 진단도구로서 이용될 수 있음을 제시한다.

[0137] **결과 7: 루프 프라이머를 가하면 LAMP의 민감성이 증대된다.**

[0138] LAMP 반응의 민감성을 향상시키는 한 가지 방법은 루프 프라이머를 가하는 것이다. 그리하여 본 발명자들은 표 1에 나타낸 것과 같이, 루프 정방향 프라이머 (LF) 및 루프 역방향 프라이머 (LB)를 디자인하였다. LAMP 반응은 루프 프라이머를 하나 또는 두 개 모두 가했을 때 현저히 증가하였다. 1.0 ng의 게놈 DNA를 주형으로 이용했을 때 루프 프라이머를 가하지 않았을 때의 30분과 비교하여 피크 형광강도에 도달하기까지의 배양시간은 17.5분 (LB+LF), 22분 (LB) 또는 25분 (LF)이었다 (도 9A). LAMP 반응의 증대된 효율은 주형으로서 게놈 DNA 0.1 ng을 사용했을 때 좀더 분명히 나타났다 (도 9B). 루프 프라이머를 가하면 B. 무크로나투스과 같이 비병원성 나무에 존재하는 선충의 게놈 DNA로 오류양성 반응을 유도하지 않았다 (도 9A 및 B). B. 무크로나투스 게놈 DNAs로 수행한 LAMP 반응의 기울기는 게놈 DNA 또는 빈 튜브 없이 진행한 LAMP 반응의 기울기와 비슷하였다. 이러한 결과는 루프 프라이머를 가하였을 때 LAMP 반응의 특이성 저하 없이 민감성을 개선할 수 있음을 제시한다.

[0139] **결과 8: LAMP는 단일 선충 유래 1/10의 게놈 DNA를 탐지할 수 있다.**

[0140] LAMP 탐지방법이 단일 선충 유래 게놈 DNA를 탐지할 수 있는지를 시험하기 위하여 본 발명자들은 1, 2 또는 4개의 선충으로부터 게놈 DNA를 추출하였고 그런 다음 주형으로서 추출된 게놈 DNA의 1/10만을 이용하였다. 흥미롭게도, 하나의 선충에서 유래한 게놈 DNA의 단지 1/10이면 27.5분 내에 이 LAMP 탐지기술로 탐지하기에 충분하였다. 하나의 선충의 게놈 DNA의 2/10 또는 4/10은 피크까지의 시간이 각각 20분 및 15분 소요되었다. 피크에 도달하는 배양시간은 1ng 게놈 DNA를 이용한 LAMP 반응의 시간과 유사하였다 (도 9C). 이러한 결과들은 LAMP 반응이 병원성 선충 유래 게놈 DNA의 매우 적은 양도 탐지할 수 있음을 암시한다. 본 발명자들은 6 개의 프라이머 셋트를 이용한 PEL3 LAMP 탐지방법이 B. 무크로나투스, B. 도우이, B. 타일랜드와 같은 다른 썩은 소나무에 존재하는 선충을 증폭시킬 수 없는지를 시험하였다 (도 9D). 네 종의 다른 선충 유래 게놈 DNA 1ng을 주형으로 이용하였을 때 병원성 B. 자일로필러스만 PEL3 LAMP 탐지방법으로 탐지되었다 (도 9D). 종합하면, 루프 프라이머를 가하면 특이성을 감소시키지 않고 LAMP 반응의 민감성이 현저히 증대되었다.

표 1

Primer	Sequence	Experiment
PEL1-F	5'-GCATGCATGGTCCAATTCGCCATTATAACC	Expression/ detection in cDNA and genomic DNA
PEL1-R	5'-AAGCTTTCAAGCCTTGATGTCGCTGGTC	
PEL2-F	5'-GCATGCATGGCCCTGTTCTCTCTTGC	
PEL2-R	5'-AAGCTTTTAAACAGCAGTGACATCAGC	
PEL3-F	5'-GCATGCATGTCGCGACCTACGCCCTT	
PEL3-R	5'-AAGCTTTCAAACTTCTTCACGTCGG-3	
qPEL1-F	5'-GGTCCAATTCGCCATTATAACC	qRT-PCR
qPEL1-R	5'-CTTGTCCTTCAGCTTGAGAACC	qRT-PCR
qPEL2-F	5'-CACCGTCTCCGAAAAATGTTG	qRT-PCR
qPEL2-R	5'-TGCCGTCACCATCTTGCC	qRT-PCR
qPEL3-F	5'-TATCGGGCCTTGCTCTCTCTT	qRT-PCR/ FISH
qPEL3-R	5'-CGGCAACATATAGTTGGTTGACC	qRT-PCR/ FISH
Tubulin-F	5'-TCCGTACCCTGAAGTTGGCTAACC	qRT-PCR
Tubulin-R	5'-AAGTGAGACGAGGGAATGGAACC	qRT-PCR

[0141]

표 2

Bx-PEL3 model	Qmean score ¹	Protein	Species
1EE6A ²	0.750	Pectatelyase	<i>Bacillus</i> KSMP-15
3B8YA	0.710	Pectatelyase	<i>Erwinia</i> chrysanthemi
3B4NB	0.678	Pectatelyase	<i>Erwinia</i> chrysanthemi
3B90B	0.638	Pectatelyase	<i>Erwinia</i> chrysanthemi

1. QMEAN score represents a global score of a whole model, reflecting the predicted model reliability ranging from 0 to 1.

2. The QMEAN score of 1EE6A, a template for Bx-PEL3 homology model

[0142]

표 3

Turn	Gene	start	S1	T1	S2	T2	S3	T3	end
	PEL-15	1				AP	TV	VHET	8
	Bx-PEL1	26				ST	TK	VPKK	33
	Bx-PEL2	25				GS	TK	VPKK	32
	Bx-PEL3	39				ST	QK	VPKT	46
1	PEL-15	9	IRV	PAGQ	TFD	GKGQ	TYV	ANPNTLGDG	34
	Bx-PEL1	34	ITV	KSGQ	TYD	GKNG	RFV	AGFAGG-DG	58
	Bx-PEL2	33	MVI	KAGE	VFD	GKNQ	RFV	SGWG--GG	55
	Bx-PEL3	47	IEV	KAGT	VFD	GKME	RYV	SGFA--DG	69
2	PEL-15	44	FRL	EAGA	SLK	NV	VI	GAPAADG	64
	Bx-PEL1	68	FEL	QAGA	KIV	NV	VL	GNPAADG	89
	Bx-PEL2	65	FEL	EAGA	SIK	NV	VI	GAPAADG	86
	Bx-PEL3	79	FLL	GDGA	TIQ	NL	VI	SYPAADG	100
3	PEL-15	65	VHC	YGD	CTIT	NV	IW	EDVGEDA	85
	Bx-PEL1	90	IHC	LGA	CEIE	NV	WW	EDVGEDA	110
	Bx-PEL2	87	IHC	MGs	CDIT	NV	FW	EDVGEDA	107
	Bx-PEL3	101	IHC	NGS	CKIE	NV	WW	EDVGEDA	121
4	PEL-15	86	LTL	K-SSGT	VNIS	GG	AAY	KAYDKV	108
	Bx-PEL1	111	ATF	KGKSGDT	YSVT	GG	GAK	KADDKV	135
	Bx-PEL2	108	ATF	KGKASDK	YNII	GG	GAK	KADDKV	132
	Bx-PEL3	122	ATF	LGEKNAV	YSVT	GG	GAK	KGHDKV	146
5	PEL-15	109	FQI	NAAG	TINIR	NF	RAD	DIGKL	130
	Bx-PEL1	136	FQH	NGGG	TLTIK	NF	QTQ	DIGKL	157
	Bx-PEL2	133	FQH	NGGG	TVTIK	NF	DAQ	DIGKL	154
	Bx-PEL3	147	FQH	NGGG	TLTIK	NF	QGE	DIGRL	168
6	PEL-15	131	VR	QNG---G- TTYKV	VMNVE	NC	NIS	RVKDAI	157
	Bx-PEL1	158	YR	SCGNCKNNG-FDRHV	IDTVK	LS	GAT	KVIAGV	190
	Bx-PEL2	155	YR	SCGNVCNNG-FDRHV	MDGVT	VS	GKM	LVLAV	187
	Bx-PEL3	169	YR	SCGNCNNGKFDRHVI	IDNVK	VI	GPC	LSLACV	202
7	PEL-15	158	LR	TDSSTS	TGRIV	NT	RYS	NVPTL	180
	Bx-PEL1	191	NG	KDSATL	RNIEI	AG	SVK	TVCEN	215
	Bx-PEL2	188	NG	GDTATL	TNVKI	P-	AGG	TACEN	211
	Bx-PEL3	203	NG	GDSATL	TNVQI	SG	AVT	SICQD	227
8	PEL-15	181	FK	GFKSGN	TT	ASGN	TQ	Y	197
	Bx-PEL1	216	FQ	GTNNNN	QE	PKSV	RK	Y	232
	Bx-PEL2	212	FK	GVNDNK	VE	PKG	AS	Y	228
	Bx-PEL3	228	TQ	G-NNVE	TL	PPVN	QL	Y	243

[0143]

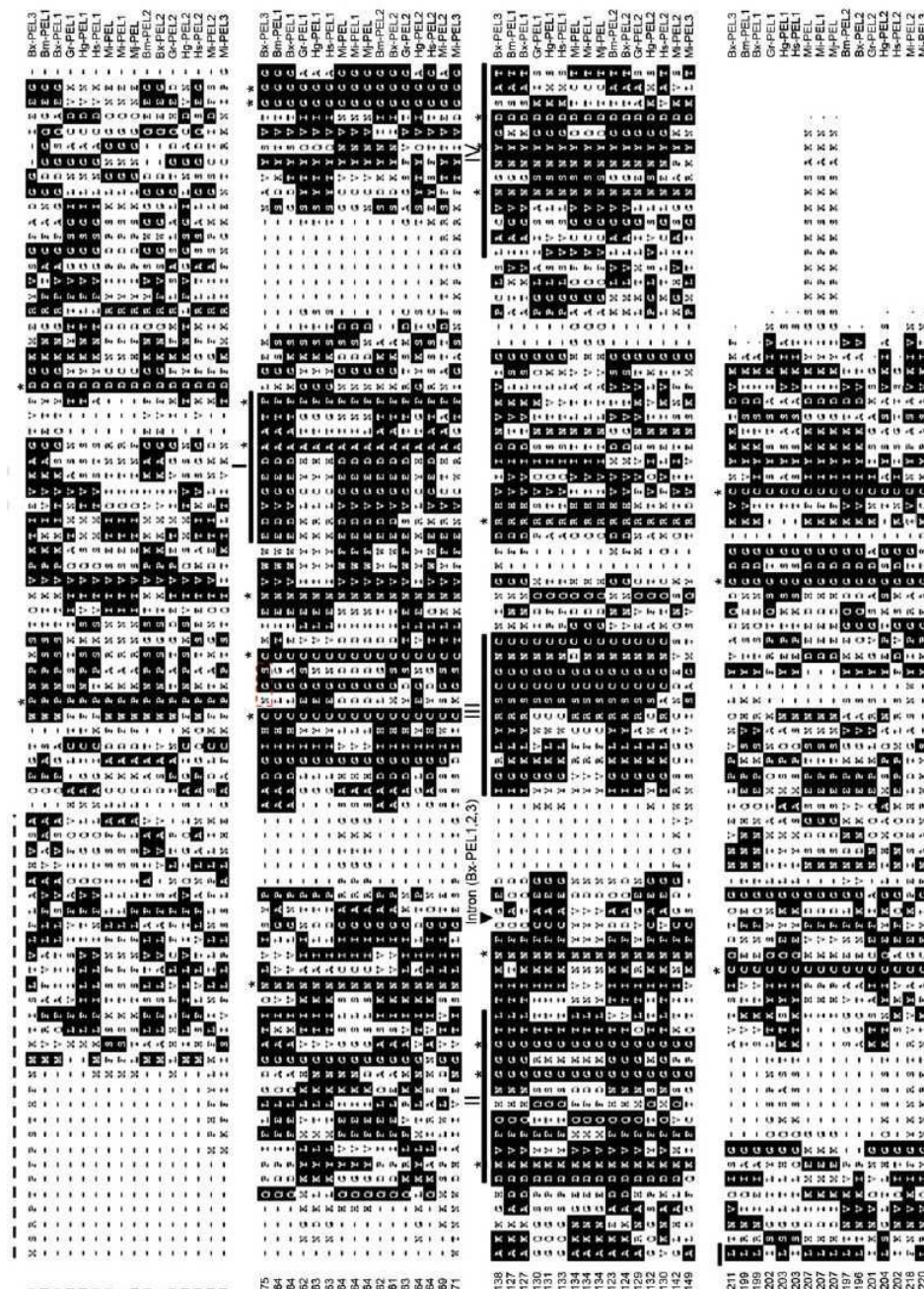
표 4

Name	Sequence
F3	CGTCTTGCGGTAACGTG
B3	CCGGTGGAAGGGTCTCAA
FIP	GGCCAAGGAGAGACAAGGCCGGAAGTTCGACCGTCACG
BIP	CGGAAATTATGGGGACAGCGCTTCTTGGGTATCTTGGCAGA
LoopF	CGATAACCTTAACGTTGTC
LoopB	CGGATGTGCAATCTCCGGA

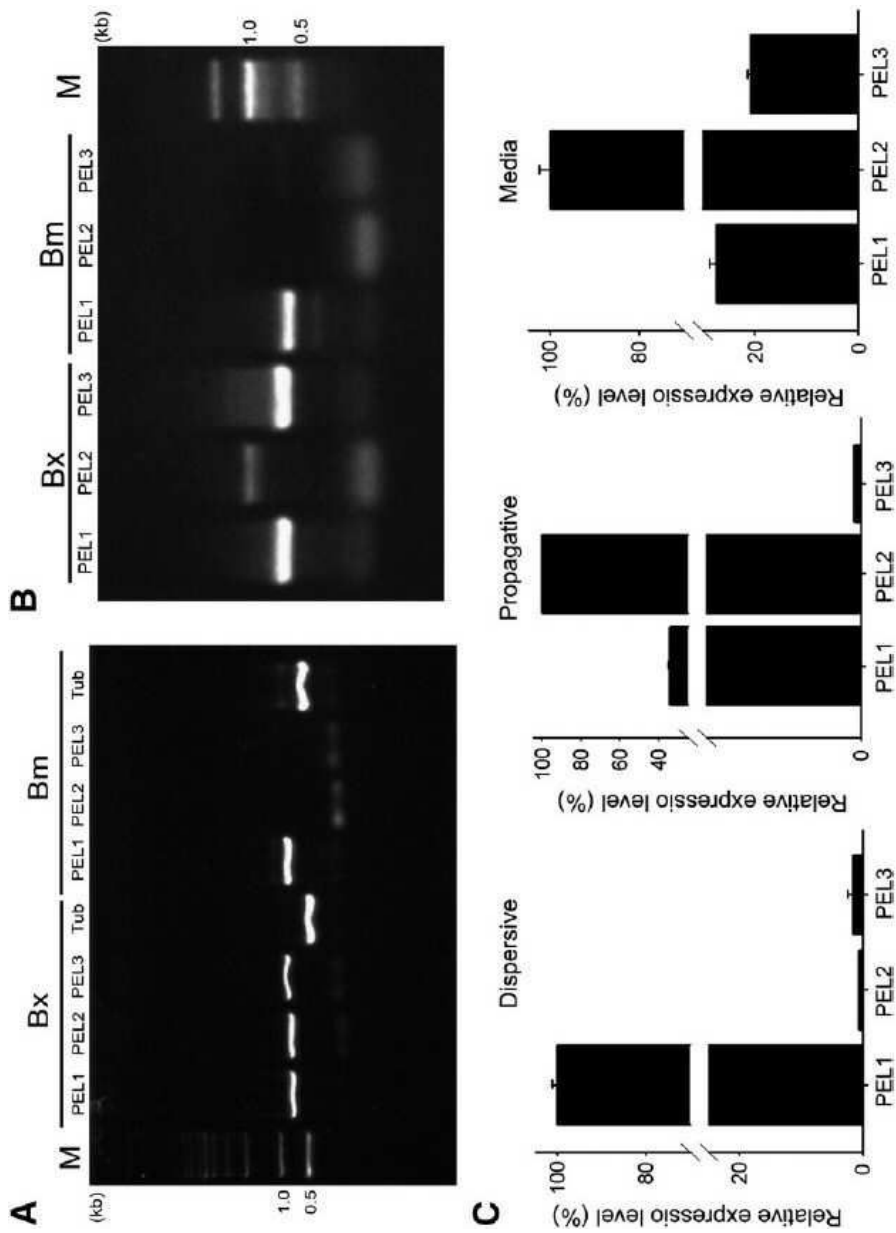
[0144]

도면

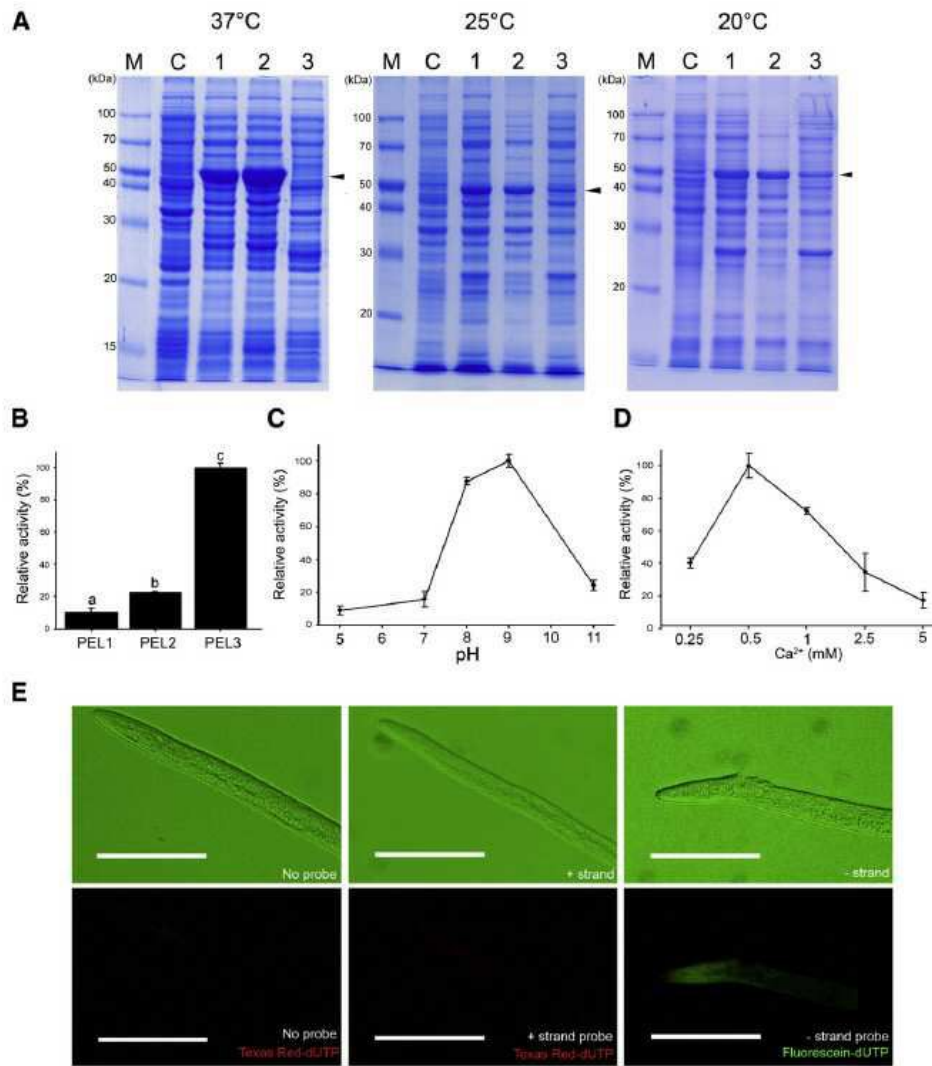
도면1



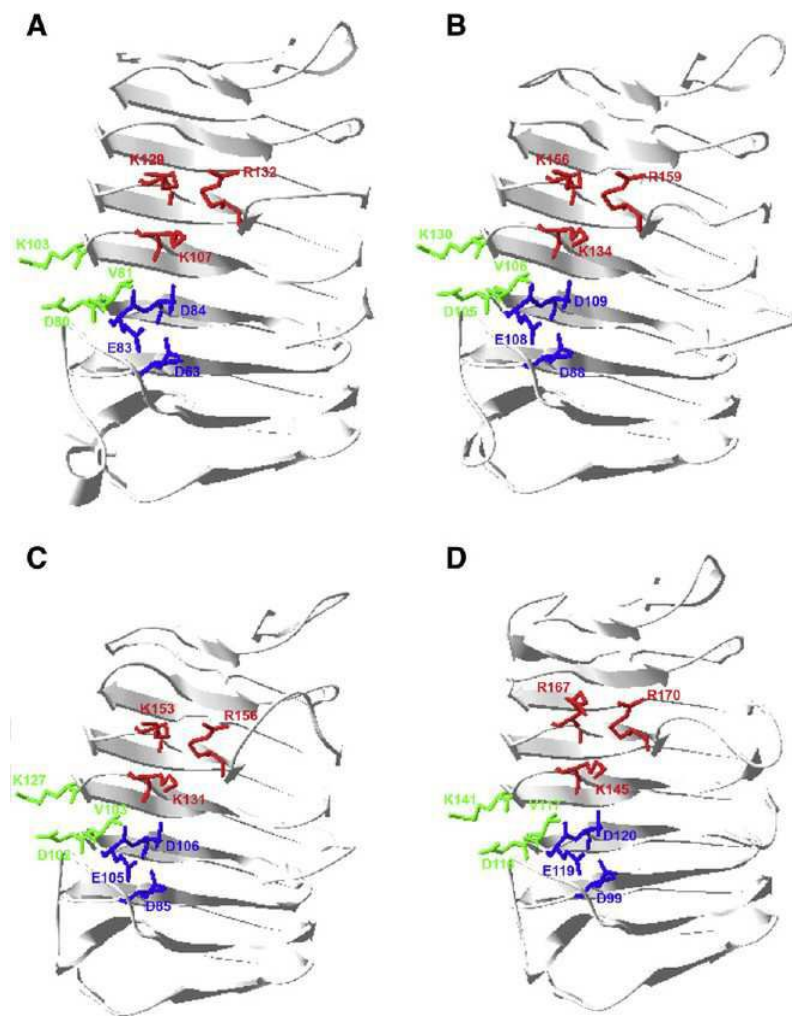
도면2



도면3



도면4



도면5

Bx-PEL1 genomic sequence

ATGGTCCAATTGCGCCATTATAACCTTACTCTCTGTTGCCGTTGTTTCGGCTCAGTTTGGAGCTTG
GCCCCAACCAAGCTCCACCACCAAGGTGCCAAGAAGATCACCGTGAAGAGCGGACAGACCTA
CGATGGTAAGAATGGCCGATTCTGTCGCTGGATTTGCCGGTGGTGACGGTTCTCAAGCTGAAGGA
CAAGACCCAATTTTGTAGTTGCAAGCAGGCGCAAGATTGTCAATGTTGTTGGGGAATCCAGC
TGCCGATGGAATTCATTGTCTGGGTGCCTGCGAAATCGAGAACGTCTGGTGGGAGGACGTGCG
AGAAGACGCGGCCACATTTAAGGGCAAAAGCGGCGACACGTATTCTGTAAACCGAGGTGGTGC
CAAGAAGGCCGACGACAAGGTCTTCCAGCACAAACGGAGGTGGCACCTTGACCATCAAGAAATTC
CAGGTAGACGGCTTTCCGCAGACCACATCGTATATCATCTTTTAGACTCAAGACATTGGAAAGCT
CTATCGTTCTTGGGAAACTGCAAAAACAACGGCTTTGACCGTCATGTTGTACTGATACCGTGA
AACTCTCCGGAGCCACGAAAGTCATTGCCGGAGTCAATGGGAACTACAAAGATTCTGCCACGTT
GAGGAACATCGAAATGTCAGGCAGTGTCAAGACGGTTTGTGAGAACTTCAGGGAACCAACAAC
AACCACCAGGAACCAAAAGCGTCAGGAAGTACACAAGCCAAGAGAATGGAGATGGCAAGATCT
GCATCTACAAGACCAGCGACATCAAGGCTTGA

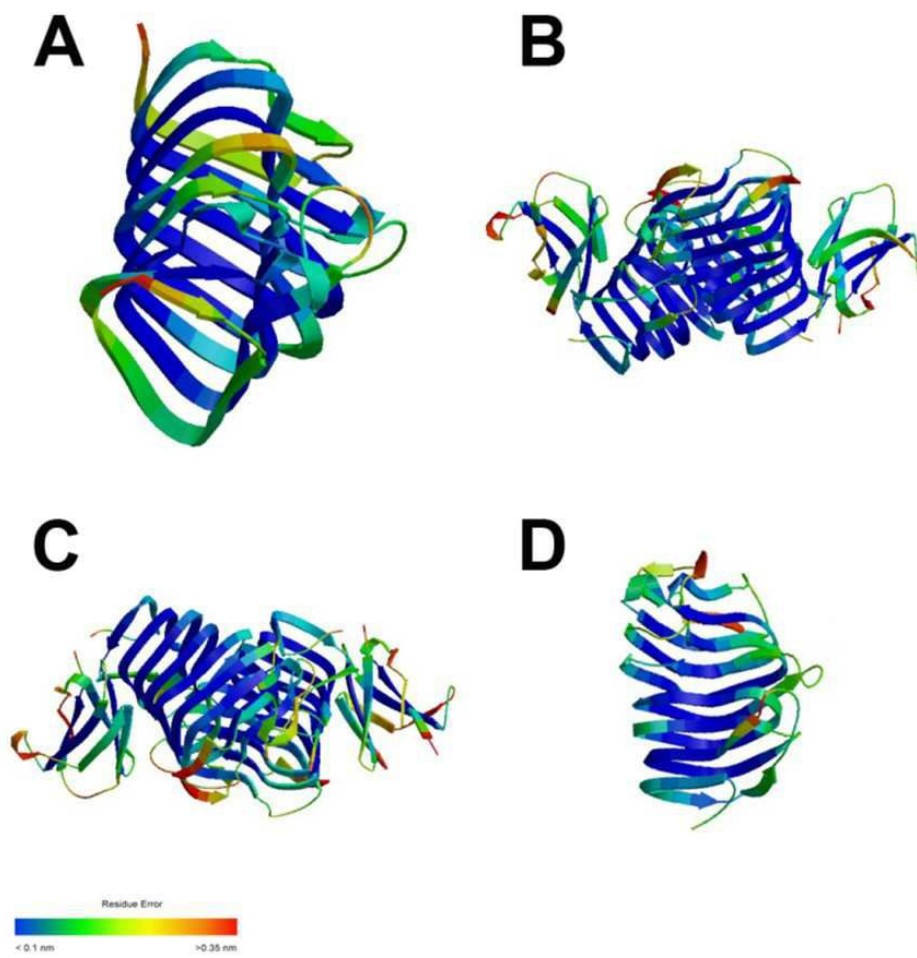
Bx-PEL2 genomic sequence

ATGGCCCTGTTCTCTCTTGGCGTTTGGCATTCTCAGTTGTAGCGGTGATTCCGCTGTTTGGCC
CAACCCCTCCGGGTGACCAAAGTCCCAAAGAAGATGGTGATTAAAGCTGGCGAAGTGTTGAC
GGAAAGAACCAGCGATTTGTGAGCGGTTGGGGCGGTGGTGACCAAGAAGAAGGCCAAGACCCC
ATCTTTGAACTGGAAGCCGGAGCTTCCATCAAGAACGTTGTTATCGGAGCCCCCGCAGCCGATG
GTATCCACTGTATGGGATCGTGTGACATCACCATGTCTTCTGGGAGGATGTTGGAGAAGATGCC
GCCACCTTCAAAGGCCAAAGCCTCAGACAAGTACAACATCATGGCGGAGGCGCAAAGAAGGCTG
ATGACAAGGTCTTCCAACACAATGGAGGCGGTACTGTTACCATCAAGAACTTTGATGTAGGTTGAA
GAGGAGGAGTTAAAGGCTTTCAAAAAAATTTTTGGTTTACAAGGGAAGTACCCAAGTGCGAGG
CTCAGATTTCTTTAAATTTGCACACACTTTGGGCATAGACTAAGCATAATTCTCAAAGTTTAGC
TTGCGCTTTGAAGGTGAGGCCCAGATATTCAACGATCTTTCGGGCCGAGAGAGTACGCTAAACGC
GGAGAGCGGTGAGAGAGAAAAACACTTTAAGCCATAACATGCTAGTTTCGTCCGGAACCTT
CATTTTTTTGGAAACATTAACCTTTACGATAGAAACAAAGATGCAAATTTTCGTGCCGAAATTGAA
AAAAGTCTAAAATTTTGTACCTTTTCGACCAAAAAATCTCGGCGGTTTCTGCAAAGCGCGAATCA
GGATTGTGCGGTATATTTAGAAAAATATTTCTAAATTTTGCCAAGTTTCATCAAAATCTGAGCGT
CGCACTTTGGGGTACTTCCCAATTAGTTTCAGCCAAAATCTGTCTGTGACTCAATTCCTCGTATTTA
GGCCCAAGACATCGGAAAACGTACCGCTCTTGTGGAAACTGCGTTAACAACGGCTTCGATCGTC
ACGTGTTATGGATGGCGTCACCGTCTCCGAAAAATGTTGGTGCTCGCCGGTGTCAACGGAAAT
TACGGCGACACCGCCACCTTGACCAATGTGAAAATCCCCGCCGGAGGAACGGCTTGCGAAAAC
TCAAAGGAGTCAACGACAACAAAGTTGAGCCAAAAGGAGTGGCCTCGTACAAGCAGGGCCAAGA
TGGTGATGGCAAGGTTTGCATCTACAAGAAGGCTGATGTCACTGCTGTTTAA

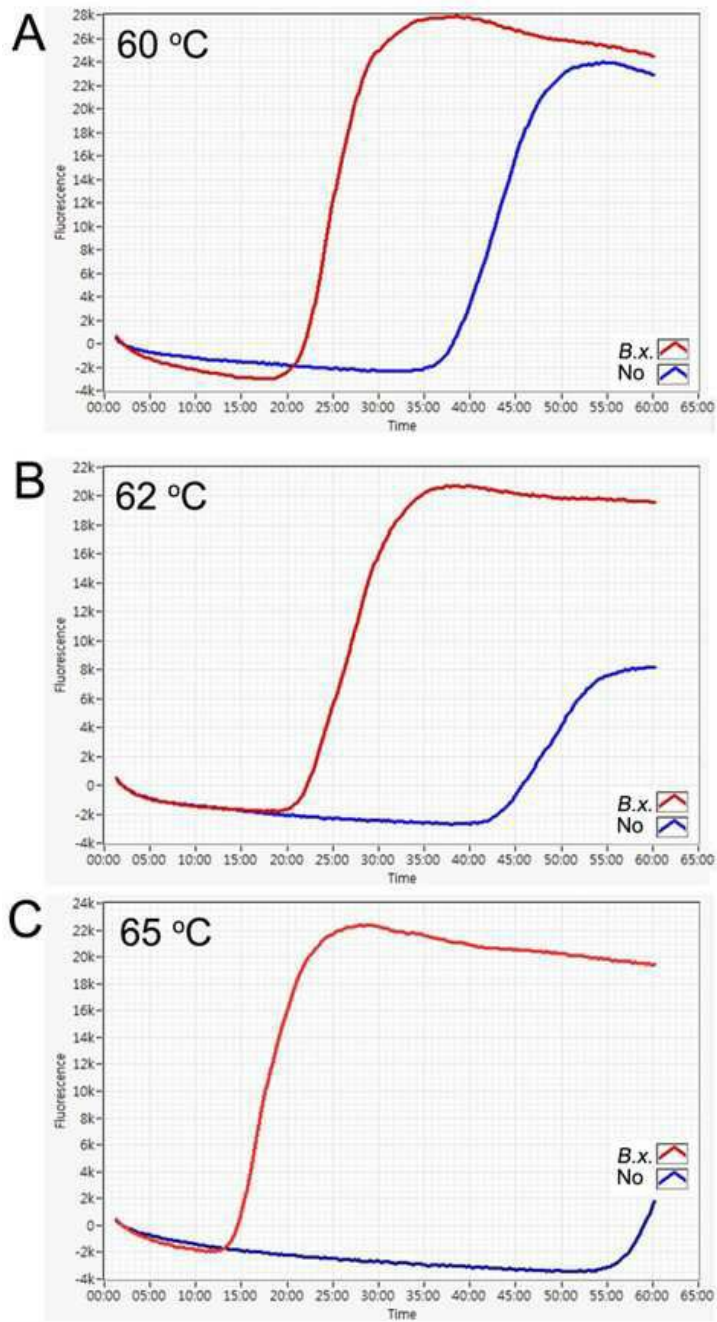
Bx-PEL3 genomic sequence

ATGTCGCGACCTACGCCCTTCCCATCCACACATTTCAATATGAAGACTATTTCCCTCACTGTTCTCT
TCCTCGCGGCCACGTTTCGGCCCAATTGCGCACATGGCCCAATCCGAAGTCCACGCAAAAGGT
GCCCAAGACGATCGAAGTGAAAGCCGGCACTGTCTTCGATGGCAAGATGGAGCGCTACGTCTCC
GGCTTCGCCGATGGTGGCATTGAAGAAGGACAGCCACCAATTTCTGCTGGGTGACGGTGCCA
CCATCCAAAATCTAGTCATTTATATCCAGCGGCCGATGGAATCCACTGCAACGGCAGCTGTAAGA
TCGAGAATGTCTGGTGGGAGGATGTGCGAGAGGACGCTGCTACCTTCTGGGAGAAAAGAATGC
TGTGTACAGTGTGACTGGAGGAGGTGCGAAGAAAGGGCATGACAAAGTCTTCCAGCACAAATGGA
GGAGGCACCTTGACCATCAAGAACTTCCAAGTAAGTGCCCTCAGGGAGAATTTCAACACTCTTTT
AGGGAGAAGACATCGGAAGACTCTACCGCTCTTGGCGTAACTGTAATATCAATGGAAAGTTGAC
CGTCACGTATCATAGACAACGTTAAGGTTATCGGGCCTTGTCTCTCTTGGCCTGTGTCAACGG
AAATTATGGGGACAGCGCTACTCTGACGGATGTGCAAATCTCCGGAGCTGTAACTCAATCTGCC
AAGATACCAAGGAAATAACGTTGAGACCTTCCACCGGTCAACCAACTATATGTTGCCGACCAA
GATGGCGATGGAAAGGTTTGCAACTACAAGAAAACCGACGTGAAGAAGTTTGA

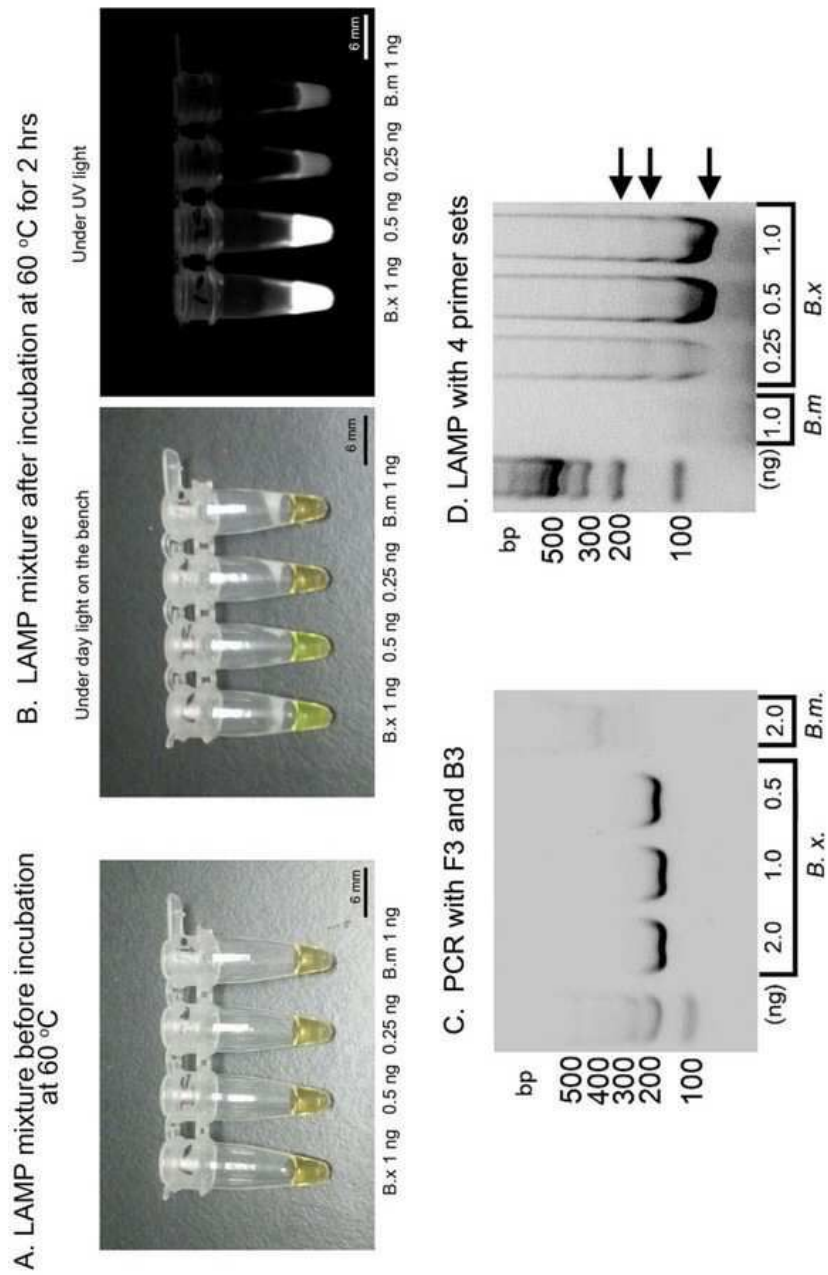
도면6



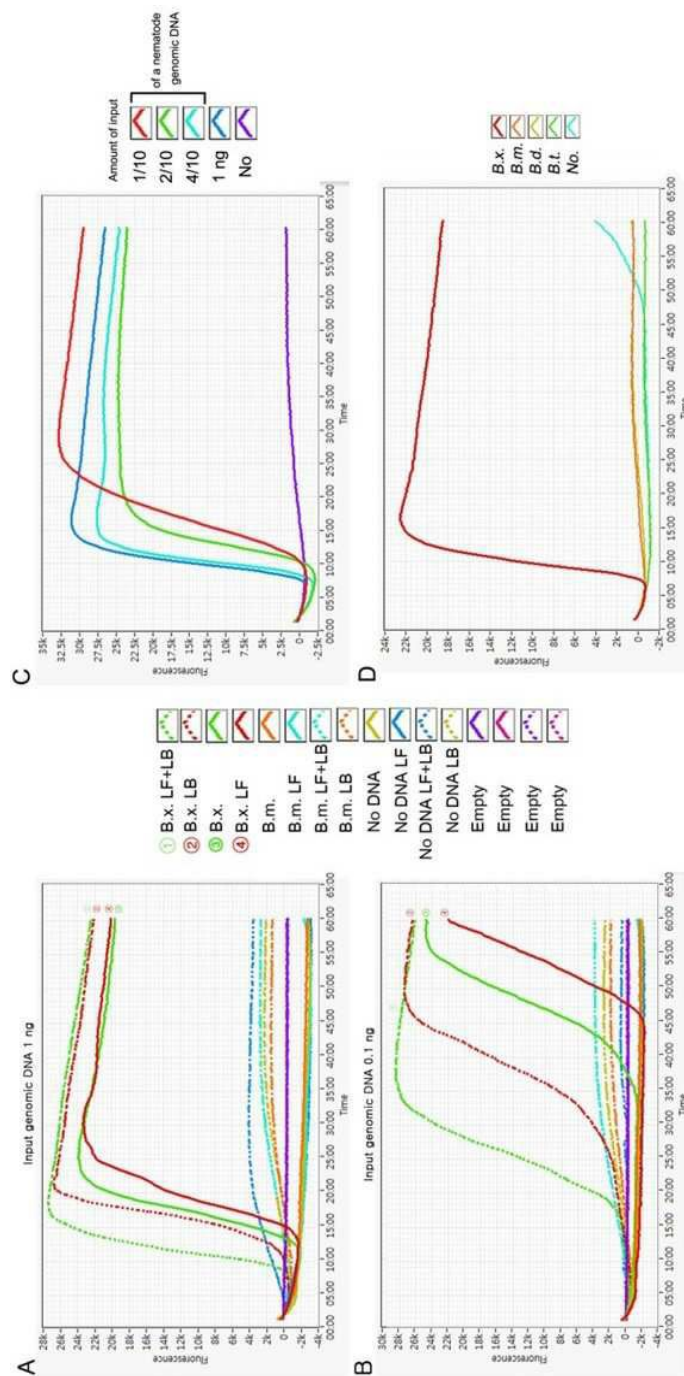
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Industry-Academic cooperation foundation, Hallym University
- <120> biomarker for detecting pine wilt disease and detecting methods for pine wilt disease using thereof
- <130> Hallym-Koyoungho-BxPEL3
- <160> 32
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1

<211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 1
 gcatgcatgg tccaattcgc cattataacc 30
 <210> 2
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 2
 aagctttcaa gccttgatgt cgctggtc 28
 <210> 3
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 3
 gcatgcatgg ccctgttctc tcttgc 26
 <210> 4
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 4
 aagcttttaa acagcagtga catcagc 27
 <210> 5
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 5

gcatgcatgt cgcgacctac gccctt	26
<210> 6	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 6	
aagctttcaa aacttcttca cgtcgg	26
<210> 7	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 7	
ggtccaattc gccattataa cc	22
<210> 8	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 8	
cttgtccttc agcttgagaa cc	22
<210> 9	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 9	
caccgtctcc ggaaaaatgt tg	22
<210> 10	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	

<400>	10	
tgccgtcacc atcttgccc		20
<210>	11	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	11	
tatcgggcct tgtctctcct t		21
<210>	12	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	12	
cggcaacata tagttggttg acc		23
<210>	13	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	13	
tccgtaccct gaagttggct aacc		24
<210>	14	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	14	
aagtggagac gagggaatgg aacc		24
<210>	15	
<211>	801	
<212>	DNA	

<213> Bursaphelenchus xylophilus

<400> 15

atggtccaat tgcattat aaccttactc tctgttgccg ttgtttcggc tcagtttga 60
gtttggccca acccaagctc caccaccaag gtgccaaga agatcaccgt gaagagcgga 120
cagacctacg atggttaagaa tggccgattc gtcgctggat ttgccggtgg tgacggttct 180

caagctgaag gacaagacc aatttttgag ttgcaagcag gcgcaaagat tgtcaatgtt 240
gtcttgggga atccagctgc cgatggaatt cattgtctgg gtgcctgcga aatcgagaac 300
gtctgtgtgg aggacgtcgg agaagacgcg gccacattta agggcaaaag cggcgacacg 360
tattctgtaa ccggagggtg tgccaagaag gccgacgaca aggtcttcca gcacaacgga 420
ggtggcacct tgaccatcaa gaatttccag gtagacggct ttccgcagac cacatcgtat 480
atcatctttt agactcaaga cattggaaag ctctatcgtt cttgcggaaa ctgcaaaaac 540
aacggctttg accgtcatgt tgttactgat accgtgaaac tctccggagc cacgaaagtc 600

attgccggag tcaatgggaa ctacaaagat tctgccacgt tgaggaacat cgaaattgca 660
ggcagtgta agacggtttg tgagaacttc cagggaacca acaacaacca ccaggaaccc 720
aaaagcgtca ggaagtacac aagccaagag aatggagatg gcaagatctg catctacaag 780
accagcgaca tcaaggcttg a 801

<210> 16

<211> 1292

<212> DNA

<213> Bursaphelenchus xylophilus

<400> 16

atggccctgt tctctcttgc cgttttggca ttctcagttg tagcggtcga ttccgctgtt 60
tggccaacc cticcgggtc gaccaaagtc ccaaagaaga tgggtattaa agctggcgaa 120

gtgttcgacg gaaagaacca gcgatttgtc agcggttggg gcggtggtga ccaagaagaa 180
ggccaagacc ccattcttga actggaagcc ggagcttcca tcaagaacgt tgttatcgga 240
gccccgcag ccgatggtat ccactgtatg ggatcgtgtg acatcaccaa tgtcttctgg 300
gaggatgttg gagaagatgc cgccaccttc aaaggcaaag cctcagacaa gtacaacatc 360
attggcggag gcgcaaagaa ggctgatgac aaggctcttc aacacaatgg aggcggtact 420
gttaccatca agaactttga tgtaggttga agaggaggag ttaaaggctt tcaaaaaaa 480
ttttttggtt tacaaggga gtaccaagt gcgaggtca gattttcttt aaattttgca 540

cacactttgg gcatagacta agcataattc ctcaaagttt tagcttgccg tttgaagggtg 600

aggcccagat attcaacgat ctttcgggcc gagagagtac gctaaacgcg gagagcggtc 660
agagagaaaa acacttttaa gccataacat tgctagtttc gtccggaaaa acttcatttt 720
tttgaaaca ttaaccttta cgatagaaac aaagatgcaa attttcgtgc cgaaattcga 780
aaaaagtcta aaatttttgt cacctttcga ccaaaaaatc tcggcgggtt ctgcaaagcg 840
cgaactagga ttgtcgcgta tattttagaa aatattattc taaatttttg ccaagtttca 900
tcaaaatctg agcgtcgcac ttgggggtact tccccaatta gtttcagcca aaatctgtct 960

gtgactcaat tctcgtatt taggccaag acatcggaac actglaccgc tcttgaggaa 1020
actgcgttaa caacggcttc gatcgtcacg tcgttatgga tggcgtcacc gtctccggaa 1080
aaatgttggg gtctgccggg gtcaacggaa attacggcga caccgccacc ttgaccaatg 1140
tgaaaatccc cgccggagga acggcttgcg aaaacttcaa aggagtcaac gacaacaaag 1200
ttgagccaaa aggagtggcc tcgtacaagc agggccaaga tggatgatgc aaggtttgca 1260
tctacaagaa ggctgatgtc actgctgttt aa 1292

<210> 17
<211> 832
<212> DNA

<213> Bursaphelenchus xylophilus
<400> 17

atgtcgcgac ctacgccctt cccatccaca catttcaata tgaagactat ttccctcact 60
gttctcttcc tcgcgcccca cgtttcggcc caattcggca catggcccaa tccgaagtc 120
acgcaaaagg tgcccaagac gatcgaagtg aaagccggca ctgtcttcga tggcaagatg 180
gagcgtacg tctccggctt cgccgatggt ggcatggaag aaggacagcc accaattttc 240
ctgtcgggtg acggtgccac catccaaaat ctagtcatct catatccagc ggccgatgga 300
atccactgca acggcagctg taagatcgag aatgtctggt gggaggatgt cggagaggac 360

gctgctacct tcttgggaga aaagaatgct gtgtacagtg tgactggagg aggtgcgaag 420
aaaggcatg acaaagtctt ccagcacaat ggaggaggca ccttgacat caagaacttc 480
caagtaagtg ccttcaggga gaatttcaac actctttcag ggagaagaca tcggaagact 540
ctaccgtctt tcggttaact gtaatatcaa tggaaagtgc gaccgtcacg tcatcataga 600
caacgttaag gttatcgggc cttgtctctc cttggcctgt gtcaacggaa attatgggga 660
cagcgtact ctgacggatg tgcaaatctc cggagctgta acctcaatct gccaaagatac 720
ccaaggaaat aacgttgaga cccctccacc ggtcaaccaa ctatatgttg ccgaccaaga 780

tgccgatgga aaggtttgca actacaagaa aaccgacgtg aagaagtttt ga 832

<210> 18
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> Bursaphelenchus mucronatus
 <400> 18

Met Val Arg Phe Ala Phe Val Ala Leu Leu Phe Val Ala Val Ala Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Phe Ala Ser Trp Pro Asn Pro Ser Ser Thr Thr Lys Val Pro
 20 25 30

Lys Lys Ile Val Val Lys Ala Gly Glu Thr Tyr Asp Gly Lys Asn Gly
 35 40 45

Arg Phe Thr Ala Gly Phe Ala Asn Gly Asp Gly Gly Gln Gly Glu Gly
 50 55 60

Gln Asp Pro Ile Phe Glu Leu Gln Ala Gly Ala Lys Ile Val Asn Val
 65 70 75 80

Val Leu Gly Ala Pro Ala Ala Asp Gly Ile His Cys Leu Gly Gly Cys
 85 90 95

Thr Ile Glu Asn Val Trp Trp Glu Asp Val Gly Glu Asp Ala Ala Thr
 100 105 110

Phe Lys Gly Ser Ser Ser Asp Lys Tyr Thr Val Thr Gly Gly Gly Ala

115 120 125
 Lys Lys Ala Asp Asp Lys Val Phe Gln His Asn Gly Gly Gly Thr Leu

130 135 140
 Thr Ile Thr Asn Phe Gln Ala Gln Asp Ile Gly Lys Leu Tyr Arg Ser

145 150 155 160
 Cys Gly Asn Cys Lys Asn Asn Gly Phe Asp Arg His Val Val Ile Asp

165 170 175
 Thr Val Lys Leu Ser Gly Ala Thr Lys Val Ile Ala Gly Val Asn Gly

180 185 190

Asn Tyr Lys Asp Ser Ala Thr Leu Arg Asn Ile Gln Ile Ala Gly Thr
 195 200 205

Val Lys Thr Val Cys Glu Asn Phe Glu Gly Thr Asn Asn Asn His Gln

210 215 220
 Glu Pro Lys Ser Val His Lys Tyr Thr Ser Asn Glu Asn Gly Asp Gly
 225 230 235 240
 Lys Val Cys Val Tyr Lys Thr Ser Asp Ile Lys Ala
 245 250
 <210> 19
 <211> 250
 <212> PRT
 <
 213> Bursaphelenchus mucronatus
 <400> 19
 Met Ala Leu Phe Ser Leu Thr Val Leu Ala Phe Thr Ala Ile Val Ala
 1 5 10 15
 Val Asp Ala Ala Thr Trp Pro Asn Pro Ser Gly Ser Thr Lys Val Pro
 20 25 30
 Lys Lys Met Val Ile Lys Ala Gly Glu Val Phe Asp Gly Lys Asn Gln
 35 40 45
 Arg Tyr Val Ser Gly Trp Gly Gly Gly Asp Gln Glu Glu Gly Gln Asp
 50 55 60

 Pro Ile Phe Glu Leu Gln Ala Gly Ala Ser Ile Lys Asn Val Val Ile
 65 70 75 80
 Gly Ala Pro Ala Ala Asp Gly Ile His Cys Leu Gly Gly Cys Asp Ile
 85 90 95
 Thr Asn Val Tyr Trp Glu Asp Val Gly Glu Asp Ala Ala Thr Phe Lys
 100 105 110
 Gly Lys Ala Ser Asp Lys Tyr Asn Ile Ile Gly Gly Gly Ala Lys Glu
 115 120 125
 Ala Asp Asp Lys Val Phe Gln His Asn Gly Gly Gly Thr Val Thr Ile

 130 135 140
 Lys Asn Phe Asp Ala Gln Asn Ile Gly Lys Leu Tyr Arg Ser Cys Gly
 145 150 155 160
 Asn Cys Val Asn Asn Gly Met Asp Arg His Val Val Met Asp Gly Val
 165 170 175

Thr Val Ser Gly Lys Met Leu Val Leu Ala Gly Val Asn Gly Asn Tyr
180 185 190

Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Asn Val Lys Val Pro Ser Gly Gly Val
195 200 205

Ala Cys Glu Asn Phe Leu Gly Val Asn Asp Asn Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Gly Val Ala Ser Tyr Lys Glu Gly Gln Asp Gly Asp Gly Lys Val Cys
225 230 235 240

Ile Tyr Xaa Lys Thr Asp Val Thr Ala Val
245 250

<210> 20
<211> 261
<212> PRT
<213> Globodera rostochiensis
<400> 20

Met Leu Phe Val Ile Ile Ser Ile Val Phe Ala Gln Ile Phe Gln Val
1 5 10 15

His Ala Leu Cys Thr Phe Pro Ser Ser Thr Lys Thr Ile Thr Val Gln
20 25 30

Ala Thr Met Asn Val Ala Ser Asn Thr Asp Tyr Lys Tyr Thr Thr Phe
35 40 45

Val Gly Gly Ser Gly Ile Leu Asn Gly Ala Cys Asp Val Lys Asn Gly
50 55 60

Lys Met Lys Tyr Leu Met Val Leu Lys His Gly Val Thr Ile Lys Asn
65 70 75 80

Ala Ile Ile Asn Thr Pro Gly Leu Gly Ile Tyr Cys Glu Gly Ser Cys
85 90 95

Val Leu Glu Asn Ile Tyr Tyr Lys Lys Leu Cys Tyr His Ala Thr Gly
100 105 110

Phe Gly Tyr Lys Ser Thr Gly Thr Ser Tyr Thr Tyr Gln Val Ile Gly
115 120 125

Gly Ala Gly Gln Gly Ser Pro Asp Lys Tyr Phe Thr Gln Ser Gly Arg

130 135 140
 Gly Thr Thr Ile Ile Lys Asn Phe Cys Ala Glu Gly Lys Tyr Gly Lys
 145 150 155 160

 Val Trp Cys Ser Cys Gly Asn Cys Ile Asp Gln Met Pro Arg Ser Val
 165 170 175
 Gln Ile Ser Asn Thr Lys Ile Gln Gly Pro Gly Leu Ala Ile Ile Ser
 180 185 190
 Ala Asn Ser Asn Tyr Gly Asp Lys Ile Ser Ile Ser Gly Leu Thr Leu
 195 200 205
 Tyr Gly Gln Gly Ser Pro Asn Thr Leu Thr Lys Tyr Ile Cys Gln Ser
 210 215 220
 Tyr Asn Gly Leu Thr Thr Met Ala Thr Met Gln Pro Asn Ala Lys Phe

 225 230 235 240
 Arg Pro Thr Gln Ser Gly Thr Gly Thr Cys Ser Tyr Ser Thr Ser Ala
 245 250 255
 Ile Lys Ile Val Asn
 260
 <210> 21
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> Globodera rostochiensis
 <400> 21
 Met Leu His His Leu Phe Val Leu Cys Phe Phe Phe Ala Asn Leu Thr
 1 5 10 15
 Pro Ile Phe Ala Asn Trp Pro Thr Ala Thr Gly Asp Glu Thr Val Pro

 20 25 30
 Glu Thr Met Ile Ile Val Gly Gly Ile Lys Asp Phe Lys Phe Lys Arg
 35 40 45
 Leu Ser Ala Ser Leu Ala Leu Gly Thr Gly Asp Gln His Glu Asp Gln
 50 55 60
 Lys Arg Leu Phe Val Pro Lys Lys Gly Ala Val Ile Lys Asn Leu Ile
 65 70 75 80

Ile Gly Lys Asn Gly Ala Asp Gly Ile His Cys Tyr Asp Ser Cys Thr
85 90 95

Leu Glu Asn Val Trp Phe Glu Ser Val Gly Glu Asp Ala Thr Thr Phe
100 105 110

Arg Thr Ser Lys Asp Cys Gly Ala Gly Ser Phe Val Val Thr Gly Gly
115 120 125

Gly Ala Arg Asn Ala His Asp Lys Val Phe Gln Met Asn Gly Gly Gly
130 135 140

Gln Leu Thr Ile Arg Asn Tyr Val Gly Glu Asn Ile Gly Lys Leu Ala
145 150 155 160

Arg Ser Cys Gly Asn Cys Glu Val Gln Cys Lys Asn Arg Lys Phe Val

165 170 175

Val Glu Asn Val Lys Val Thr Gly Leu Lys Thr Met Leu Ile Gly Leu
180 185 190

Asn Glu Asn Tyr Gly Asp Ala Ala Ser Ile Lys Asn Val Gln Val Asn
195 200 205

Gly Lys Thr Ser Ala Ile Cys Cys Glu Phe Ile Ala Asn Asn Gln Gln
210 215 220

Gln Glu Pro Lys Leu Val Arg Ser Tyr Gly Val Gly Ser Ala Gly Asp
225 230 235 240

Ala Lys Asn Cys Ile Ile Ser Gly Ala Lys Ser Gly

245 250

<210> 22

<211> 262

<212> PRT

<213> Heterodera glycines

<400> 22

Met Leu Phe Ile Leu Leu Val Ile Thr Phe Val Gln Ile Gly Gln Leu
1 5 10 15

Asn Ala Gly Ile Cys Thr Phe Pro Asn Pro Ser Lys Ser Val Thr Val
20 25 30

Gln Ser Met Met Thr Val Ser Ser Ser Thr Asp Tyr Lys Asn Thr Leu

35 40 45
 Phe Val Gly Gly Ser Gly Ile Leu Asn Gly Ala Cys Asp Val Asn Asn
 50 55 60
 Asp Lys Leu Lys Tyr Leu Met Thr Leu Lys Asn Gly Val Thr Ile Lys
 65 70 75 80
 Asn Ala Ile Leu Asp Thr Pro Gly Leu Gly Ile Tyr Cys Glu Gly Asn
 85 90 95
 Cys Val Leu Glu Asn Ile Tyr Tyr Lys Arg Leu Cys Tyr His Ala Thr
 100 105 110
 Gly Phe Gly Tyr Lys Ser Thr Ser Thr Ser Tyr Thr Tyr Gln Val Ile
 115 120 125
 Gly Gly Ala Gly Gln Gly Ser Pro Asp Lys Tyr Phe Thr Gln Ser Gly
 130 135 140
 Lys Gly Thr Thr Ile Ile Lys Asn Phe Cys Ala Glu Gly Lys Tyr Gly
 145 150 155 160
 Lys Leu Trp Cys Ser Cys Gly Asn Cys Pro Phe Gln Thr Ala Arg Thr
 165 170 175
 Val Gln Ile Ser Asn Thr Val Leu Lys Gly Pro Gly Leu Ser Val Val
 180 185 190
 Ser Leu Asn Ser Asn Tyr Gly Asp Lys Met Ser Leu Ser Gly Leu Thr
 195 200 205
 Leu His Gly Gln Lys Ser Ala Ser Thr Lys Thr Ser Tyr Ile Cys Gln
 210 215 220
 Glu Tyr Lys Gly Leu Thr Tyr Met Ala Ala Met Ser Pro Gln Ala Asn
 225 230 235 240
 Tyr Glu Pro Thr Lys Ser Gly Ser Gly Thr Cys Ala Tyr Ser Ala Ser
 245 250 255
 Ala Val Lys Ile Ala Ser

260

<210> 23

<211> 263

<212> PRT

<213> Heterodera glycines

<400> 23

Met Ile Leu Phe Ile Leu Leu Val Ile Thr Phe Val Gln Ile Gly Gln

1 5 10 15

Leu Ser Ala Gly Ile Cys Lys Phe Pro Asn Pro Ser Lys Ser Val Thr

20 25 30

Val Gln Ser Met Met Thr Val Ser Ser Asn Thr Asp Tyr Lys Asn Thr

35 40 45

Leu Phe Val Gly Gly Ser Gly Ile Leu Asn Gly Ala Cys Asp Val Asn

50 55 60

Asn Gly Lys Leu Lys Tyr Leu Met Thr Leu Lys Asn Gly Val Thr Ile

65 70 75 80

Lys Asn Ala Ile Leu Asp Thr Pro Gly Leu Gly Ile Tyr Cys Glu Gly

85 90 95

Asn Cys Val Leu Glu Asn Ile Tyr Tyr Lys Arg Leu Cys Tyr His Ala

100 105 110

Thr Gly Phe Gly Tyr Lys Ser Thr Ser Thr Ser Tyr Thr Tyr Gln Val

115 120 125

Ile Gly Gly Ala Gly Gln Gly Ser Pro Asp Lys Tyr Phe Thr Gln Ser

130 135 140

Gly Lys Gly Thr Thr Ile Ile Lys Asn Phe Cys Ala Glu Gly Lys Tyr

145 150 155 160

Gly Lys Leu Trp Cys Ser Cys Gly Asn Cys Ala Phe Gln Thr Ala Arg

165 170 175

Thr Val Gln Ile Ser Asn Thr Val Leu Lys Gly Pro Gly Leu Ser Val

180 185 190

Val Ser Leu Asn Ser Asn Tyr Gly Asp Lys Met Ser Leu Ser Gly Leu

195 200 205

Thr Leu His Gly Gln Lys Ser Ser Ser Thr Lys Thr Asn Tyr Ile Cys

210 215 220

Gln Glu Tyr Lys Gly Leu Thr His Met Ala Ala Met Ser Pro Gln Ala

225 230 235 240
 Asn Tyr Glu Pro Thr Lys Ser Gly Ser Gly Thr Cys Ala Tyr Ser Ala
 245 250 255
 Ser Ala Val Lys Ile Ala Ser
 260
 <210> 24
 <211> 252

 <212> PRT
 <213> Heterodera schachtii
 <400> 24
 Met His Ser Phe Leu Val Leu Thr Val Leu Phe Ala Asn Leu Ala Ala
 1 5 10 15
 Asn Ala Phe Gly Gln Gln Trp Pro Lys Ala Thr Ser Glu Glu Thr Val
 20 25 30
 Lys Ala Thr Ile Lys Val Ser Gly Gly Val Lys Asp Phe Gly Phe Lys
 35 40 45
 Arg Leu Thr Ala Ser Ser Ala Leu Gly Ser Gly Asp Gln Ser Glu Gly
 50 55 60

 Gln Lys Ala Leu Ile Arg Ala Glu Lys Asn Ala Val Ile Lys Asn Leu
 65 70 75 80
 Ile Ile Gly Gln Asn Gly Ala Asp Gly Ile His Cys Tyr Asp Gly Cys
 85 90 95
 Thr Leu Gln Asn Val Trp Trp Glu Lys Val Gly Glu Asp Ala Ala Thr
 100 105 110
 Phe Arg Ser Ser Ser Gly Cys Lys Glu Tyr Ser Phe Thr Val Thr Gly
 115 120 125
 Gly Gly Val Lys Asn Ala Lys Asp Lys Val Phe Gln Met Asn Gly Gly

 130 135 140
 Gly Thr Leu Thr Ile Lys Asn Phe Val Ala Glu Gly Ile Gly Lys Leu
 145 150 155 160
 Ala Arg Ala Cys Gly Asn Cys Lys Thr Gln Cys Gln Lys Arg Lys Phe
 165 170 175

Val Leu Glu Asn Ile Lys Val Thr Gly Leu Lys Thr Leu Leu Cys Gly
180 185 190

Leu Asn Glu Asn Tyr Gly Asp Val Ala Thr Ile Lys Asn Val Gln Ile
195 200 205

Thr Gly Ser Lys Lys Val Cys Ala Glu Phe Gln Gly Asn Asn Gln Gln
210 215 220

Lys Glu Pro Pro Met Leu Arg Ser Phe Asp Val Gly Ser Lys Gly Asp
225 230 235 240

Gly Lys Asn Cys Ile Ile Ser Gly Thr Thr Ser Gly
245 250

<210> 25
<211> 280
<212> PRT
<213> Meloidogyne incognita
<400> 25

Met Pro His Phe Tyr Leu Lys Phe Leu Ile Asn Leu Ile Leu Leu Asn
1 5 10 15

Leu Phe Pro Leu Leu Ile Lys Ser Asp Leu Cys Lys Phe Pro Thr Ala
20 25 30

Lys Gly Asn Gln Thr Val Asp Glu Thr Ile Pro Leu Asn Lys Asp Lys
35 40 45

Asp Phe Gly Phe Ile Arg Leu Ile Ala Ser Pro Lys Leu Gly Ser Cys
50 55 60

Thr Ile Asp Phe Ser Lys Lys Met Ser Pro Ile Leu Trp Leu Ser Asp
65 70 75 80

Gly Val Thr Val Ser Asn Leu Ile Ile Gly Thr Glu Ser Ser Ser Gly
85 90 95

Ile Trp Cys Ser Gly Ser Cys Thr Leu Lys Asn Val Tyr Phe Glu Arg
100 105 110

Val Cys Thr His Ala Ala Ala Phe Asn Ala Thr Thr Asp Phe Thr Lys
115 120 125

Thr Asp Arg Arg Ser Phe Thr Tyr Thr Val Glu Gly Gly Ala Gly Leu

130 135 140
 His Ala Leu Asp Lys Met Phe Val Gln Ser Gly Pro Gly Lys Thr Ile
 145 150 155 160

 Ile Asn Asn Phe Cys Gly Asp Gly Phe Gln Lys Val Trp Arg Ser Cys
 165 170 175
 Gly Thr Cys Asn Asp Glu Val Ser Gln Asn Ser Lys Gln Arg Thr Val
 180 185 190
 Thr Ile Thr Asn Ser Asn Phe Thr Gly Lys Gly His Val Ile Ala Ser
 195 200 205
 Gly Asn Ala Pro Tyr Lys Asp Lys Val Ser Phe Asn Asn Val Lys Ile
 210 215 220
 Phe Gly Tyr Lys Asn Arg Ser Thr Arg Val Val Tyr Ala Cys Gly Glu

 225 230 235 240
 Val Lys Pro Glu Ile Ser Glu Asp His Leu Asp Thr Gly Ala Ser Asn
 245 250 255
 Trp Tyr Ile Pro Gly Arg Ala Gly Thr Gly Thr Val Cys Asn Tyr Pro
 260 265 270
 Ala Ser Ala Val Lys Ile Val Asn
 275 280
 <210> 26
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> Meloidogyne incognita
 <400> 26
 Met Phe Ser Ser Lys Thr Ser Phe Asn Phe Leu Leu Leu Ile Ser Ser

 1 5 10 15
 Phe Ala Leu Cys Lys Ala Asp Phe Trp Pro Lys Ala Arg Asn Asn Ile
 20 25 30
 Thr Val Ser Glu Thr Ile Gln Ile Thr Asn Arg Asp Cys Asn Phe Asp
 35 40 45
 Arg Tyr Ile Pro Asp Pro Ser Lys Leu Gly Asn Gly Gly Gln Asn Glu
 50 55 60

His Gln Gly Tyr Val Phe Glu Ile Lys Asn Gly Gly Ser Leu Ser Asn
65 70 75 80

Cys Ile Ile Gly Ala Arg Pro Gly Thr Lys Gly Ser Ala His Gly Val
85 90 95

Leu Cys Asp Gly Asp Cys Asp Ile Asn Asn Val Trp Phe Glu Asp Val
100 105 110

Gly Glu Asp Ala Ile Asn Phe Asn Gly Asp Ser Asp Gly Cys Val Tyr
115 120 125

Asn Val Asn Gly Gly Gly Ala Lys Asn Gly Glu Asp Lys Val Met Gln
130 135 140

Phe Asp Gly Lys Gly Thr Leu Asn Val Asn Asn Tyr Tyr Val Asp Asn

145 150 155 160
Tyr Val Arg Phe Cys Arg Ser Cys Gly Asn Cys Gly Asp Gln His Gln
165 170 175

Arg His Ile Val Ile Thr Asn Leu Thr Ala Val His Gly Gln Ala Gly
180 185 190

Gln Phe Val Cys Gly Val Asn Ser Asn Tyr Gln Asp Thr Cys Thr Leu
195 200 205

His Asp Ile Lys Met Glu Lys Gly Ile His Pro Cys Lys Val Phe Asp
210 215 220

Gly Asn Ser Asp Gly Ser Glu Pro Thr Ser Asn Asn Asp Glu Glu Asp
225 230 235 240

His Gly Asp Gly Lys Phe Cys Ile Tyr Lys Lys Gly Asp Ile Lys Tyr
245 250 255

Ile Gly Ser Lys Pro Lys Pro Lys Ser Lys Lys Ser Ala Lys Asn
260 265 270

<210> 27

<211> 280

<212> PRT

<213> Meloidogyne incognita

<400> 27

Met Pro His Phe Tyr Leu Lys Phe Leu Ile Asn Leu Ile Leu Leu Asn

1 5 10 15

Leu Phe Pro Leu Leu Ile Lys Ser Asp Leu Cys Lys Phe Pro Thr Ala

20 25 30

Lys Gly Asn Gln Thr Val Asp Glu Thr Ile Pro Leu Asn Lys Asp Lys

35 40 45

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

50 55 60

Thr Ile Asp Phe Ser Lys Lys Met Ser Pro Ile Leu Trp Leu Ser Asp

65 70 75 80

Gly Val Thr Val Ser Asn Leu Ile Ile Gly Thr Glu Ser Ser Ser Gly

85 90 95

Ile Trp Cys Ser Gly Ser Cys Thr Leu Lys Asn Val Tyr Phe Glu Arg

100 105 110

Val Cys Thr His Ala Ala Ala Phe Asn Ala Thr Thr Asp Phe Thr Lys

115 120 125

Thr Asp Arg Arg Ser Phe Thr Tyr Thr Val Glu Gly Gly Ala Gly Leu

130 135 140

His Ala Leu Asp Lys Met Phe Val Gln Ser Gly Pro Gly Lys Thr Ile

145 150 155 160

Ile Asn Asn Phe Cys Gly Asp Gly Phe Gln Lys Val Trp Arg Ser Cys

165 170 175

Gly Thr Cys Asn Asp Glu Val Ser Gln Asn Ser Lys Gln Arg Thr Val

180 185 190

Thr Ile Thr Asn Ser Asn Phe Thr Gly Lys Gly His Val Ile Ala Ser

195 200 205

Gly Asn Ala Pro Tyr Lys Asp Lys Val Ser Phe Asn Asn Val Lys Ile

210 215 220

Phe Gly Tyr Lys Asn Arg Ser Thr Arg Val Val Tyr Ala Cys Gly Glu

225 230 235 240

Val Lys Pro Glu Ile Ser Glu Asp His Leu Asp Thr Gly Ala Ser Asn

245 250 255
 Trp Tyr Ile Pro Gly Arg Ala Gly Thr Gly Thr Val Cys Asn Tyr Pro
 260 265 270
 Ala Ser Ala Val Lys Ile Val Asn
 275 280
 <210> 28
 <211> 279
 <212> PRT
 <213> *Meloidogyne incognita*

 <400> 28
 Met Lys Phe Phe Ile Ile Ile Ser Ile Val Phe Leu Leu Pro Leu Ser
 1 5 10 15
 Ser Leu Ala Leu Asn His Glu Gly Ala Ala Phe Cys Lys Phe Pro Lys
 20 25 30
 Pro Thr Ser Thr Gln Thr Ile Thr Lys Thr Leu Thr Ile Val Lys Asn
 35 40 45
 Thr Asp Phe Lys Met Lys Arg Ile Ile Phe Asn Gly Lys Glu Asn Thr
 50 55 60
 Cys Arg Lys Asn Ile Pro Gly Trp Thr Asn Asn Trp Asp His Ala Ile

 65 70 75 80
 Ile Val Glu Asn Gly Val Thr Ile Ser Asn Leu Ile Leu Gly Glu Ser
 85 90 95
 Pro Ile Gly Thr Ser Ser Asp Ile Ile Cys Lys Gly Ser Cys Thr Leu
 100 105 110
 Lys Asn Val Phe Phe Glu Asn Val Cys Trp Arg Ala Gly Thr Phe Ile
 115 120 125
 Gly Ala Ser Asn Ser Lys Pro Gly Asp Lys Arg Lys Phe Thr Tyr Ile
 130 135 140

 Val Asp Gly Gly Gly Ala Leu Asp Gly Phe Gln Lys Ile Phe Cys Thr
 145 150 155 160
 Gly Gly Pro Gly Gln Thr Ile Val Lys Asn Phe Cys Ser Val Asn Asn
 165 170 175

Ser Ile Gly Val Ile Ser Ala Gly Met Thr Ser Val Gln Tyr Thr Arg
180 185 190

Asp Val Thr Val Glu Asn Ser Lys Phe Met Gly Pro Met Leu Thr Ile
195 200 205

Ile Gly Gly Asn Arg Lys Tyr Asn Asp Lys Leu Thr Leu Arg Asn Val
210 215 220

Gln Ile Tyr Gly Asn Asn Lys Pro Glu Thr Asn Ile Lys Phe Ala Cys
225 230 235 240

Cys Glu Tyr Leu Gly Glu Asn Ala Ala Asn Pro Trp Lys Tyr Ser Tyr
245 250 255

Lys Pro Gly Glu Ala Gly Thr Ser Asp Lys Cys Cys Lys Tyr Pro Ala
260 265 270

Ser Ala Val Lys Ile Ile Asn
275

<210> 29

<211>
279

<212> PRT

<213> Meloidogyne javanica

<400> 29

Met Lys Phe Phe Ile Ile Ile Ser Ile Val Phe Leu Leu Pro Leu Ser
1 5 10 15

Ser Leu Ala Leu Asn His Glu Gly Ala Ala Phe Cys Lys Phe Pro Lys
20 25 30

Pro Thr Ser Thr Gln Thr Ile Thr Lys Thr Leu Thr Ile Val Lys Asn
35 40 45

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

Cys Arg Lys Asn Ile Pro Gly Trp Thr Asn Asn Trp Asp His Ala Ile
65 70 75 80

Ile Val Glu Asn Gly Val Thr Ile Ser Asn Leu Ile Leu Gly Glu Ser
85 90 95

Pro Ile Gly Thr Ser Ser Asp Ile Ile Cys Lys Gly Ser Cys Thr Leu

100 105 110
 Lys Asn Val Phe Phe Glu Asn Val Cys Trp Arg Ala Gly Thr Phe Ile
 115 120 125
 Gly Ala Ser Asn Ser Lys Pro Gly Asp Lys Arg Lys Phe Thr Tyr Ile

 130 135 140
 Val Asp Gly Gly Gly Ala Leu Asp Gly Phe Gln Lys Ile Phe Cys Thr
 145 150 155 160
 Gly Gly Pro Gly Gln Thr Ile Val Lys Asn Phe Cys Ser Val Asn Asn
 165 170 175
 Ser Ile Gly Val Ile Ser Ala Gly Met Thr Ser Val Gln Tyr Thr Arg
 180 185 190
 Asp Val Thr Val Glu Asn Ser Lys Phe Met Gly Pro Met Leu Thr Ile
 195 200 205

 Ile Gly Gly Asn Arg Lys Tyr Asn Asp Lys Leu Thr Leu Arg Asn Val
 210 215 220
 Gln Ile Tyr Gly Asn Asn Lys Pro Glu Thr Asn Ile Lys Phe Ala Cys
 225 230 235 240
 Cys Glu Tyr Leu Gly Glu Asn Ala Ala Asn Pro Trp Lys Tyr Ser Tyr
 245 250 255
 Lys Pro Gly Glu Ala Gly Thr Ser Asp Lys Cys Cys Lys Tyr Pro Ala
 260 265 270
 Ser Ala Val Lys Ile Ile Asn

275
 <210> 30
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> Bursaphelenchus xylophilus
 <400> 30
 Met Val Gln Phe Ala Ile Ile Thr Leu Leu Ser Val Ala Val Val Ser
 1 5 10 15
 Ala Gln Phe Gly Ala Trp Pro Asn Pro Ser Ser Thr Thr Lys Val Pro
 20 25 30

Lys Lys Ile Thr Val Lys Ser Gly Gln Thr Tyr Asp Gly Lys Asn Gly
 35 40 45
 Arg Phe Val Ala Gly Phe Ala Gly Gly Asp Gly Ser Gln Ala Glu Gly
 50 55 60
 Gln Asp Pro Ile Phe Glu Leu Gln Ala Gly Ala Lys Ile Val Asn Val
 65 70 75 80
 Val Leu Gly Asn Pro Ala Ala Asp Gly Ile His Cys Leu Gly Ala Cys
 85 90 95
 Glu Ile Glu Asn Val Trp Trp Glu Asp Val Gly Glu Asp Ala Ala Thr
 100 105 110
 Phe Lys Gly Lys Ser Gly Asp Thr Tyr Ser Val Thr Gly Gly Gly Ala
 115 120 125
 Lys Lys Ala Asp Asp Lys Val Phe Gln His Asn Gly Gly Gly Thr Leu
 130 135 140
 Thr Ile Lys Asn Phe Gln Thr Gln Asp Ile Gly Lys Leu Tyr Arg Ser
 145 150 155 160
 Cys Gly Asn Cys Lys Asn Asn Gly Phe Asp Arg His Val Val Ile Asp
 165 170 175
 Thr Val Lys Leu Ser Gly Ala Thr Lys Val Ile Ala Gly Val Asn Gly
 180 185 190
 Asn Tyr Lys Asp Ser Ala Thr Leu Arg Asn Ile Glu Ile Ala Gly Ser
 195 200 205
 Val Lys Thr Val Cys Glu Asn Phe Gln Gly Thr Asn Asn Asn Asn Gln
 210 215 220
 Glu Pro Lys Ser Val Arg Lys Tyr Thr Ser Gln Glu Asn Gly Asp Gly
 225 230 235 240
 Lys Ile Cys Ile Tyr Lys Thr Ser Asp Ile Lys Ala
 245 250
 <210> 31
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Bursaphenchus Xylophilus

<400> 31

Met Ala Leu Phe Ser Leu Ala Val Leu Ala Phe Ser Val Val Ala Val

1 5 10 15
 Asp Ser Ala Val Trp Pro Asn Pro Ser Gly Ser Thr Lys Val Pro Lys
 20 25 30
 Lys Met Val Ile Lys Ala Gly Glu Val Phe Asp Gly Lys Asn Gln Arg
 35 40 45
 Phe Val Ser Gly Trp Gly Gly Gly Asp Gln Glu Glu Gly Gln Asp Pro
 50 55 60
 Ile Phe Glu Leu Glu Ala Gly Ala Ser Ile Lys Asn Val Val Ile Gly
 65 70 75 80

Ala Pro Ala Ala Asp Gly Ile His Cys Met Gly Ser Cys Asp Ile Thr
 85 90 95
 Asn Val Phe Trp Glu Asp Val Gly Glu Asp Ala Ala Thr Phe Lys Gly
 100 105 110
 Lys Ala Ser Asp Lys Tyr Asn Ile Ile Gly Gly Gly Ala Lys Lys Ala
 115 120 125
 Asp Asp Lys Val Phe Gln His Asn Gly Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys
 130 135 140
 Asn Phe Asp Ala Gln Asp Ile Gly Lys Leu Tyr Arg Ser Cys Gly Asn

145 150 155 160
 Cys Val Asn Asn Gly Phe Asp Arg His Val Val Met Asp Gly Val Thr
 165 170 175
 Val Ser Gly Lys Met Leu Val Leu Ala Gly Val Asn Gly Asn Tyr Gly
 180 185 190
 Asp Thr Ala Thr Leu Thr Asn Val Lys Ile Pro Ala Gly Gly Thr Ala
 195 200 205
 Cys Glu Asn Phe Lys Gly Val Asn Asp Asn Lys Val Glu Pro Lys Gly
 210 215 220

Val Ala Ser Tyr Lys Gln Gly Gln Asp Gly Asp Gly Lys Val Cys Ile
 225 230 235 240

Tyr Lys Lys Ala Asp Val Thr Ala Val

245

<210> 32

<211> 264

<212> PRT

<213> Bursaphelchus Xylophilus

<400> 32

Met Ser Arg Pro Thr Pro Phe Pro Ser Thr His Phe Asn Met Lys Thr

1 5 10 15

Ile Ser Leu Thr Val Leu Phe Leu Ala Ala His Val Ser Ala Gln Phe

20 25 30

Gly Thr Trp Pro Asn Pro Lys Ser Thr Gln Lys Val Pro Lys Thr Ile

35 40 45

Glu Val Lys Ala Gly Thr Val Phe Asp Gly Lys Met Glu Arg Tyr Val

50 55 60

Ser Gly Phe Ala Asp Gly Gly Ile Glu Glu Gly Gln Pro Pro Ile Phe

65 70 75 80

Leu Leu Gly Asp Gly Ala Thr Ile Gln Asn Leu Val Ile Ser Tyr Pro

85 90 95

Ala Ala Asp Gly Ile His Cys Asn Gly Ser Cys Lys Ile Glu Asn Val

100 105 110

Trp Trp Glu Asp Val Gly Glu Asp Ala Ala Thr Phe Leu Gly Glu Lys

115 120 125

Asn Ala Val Tyr Ser Val Thr Gly Gly Gly Ala Lys Lys Gly His Asp

130 135 140

Lys Val Phe Gln His Asn Gly Gly Gly Thr Leu Thr Ile Lys Asn Phe

145 150 155 160

Gln Gly Glu Asp Ile Gly Arg Leu Tyr Arg Ser Cys Gly Asn Cys Asn

165 170 175

Ile Asn Gly Lys Phe Asp Arg His Val Ile Ile Asp Asn Val Lys Val

180 185 190

Ile Gly Pro Cys Leu Ser Leu Ala Cys Val Asn Gly Asn Tyr Gly Asp

195	200	205	
Ser Ala Thr Leu Thr Asp Val Gln Ile Ser Gly Ala Val Thr Ser Ile			
210	215	220	
Cys Gln Asp Thr Gln Gly Asn Asn Val Glu Thr Leu Pro Pro Val Asn			
225	230	235	240
Gln Leu Tyr Val Ala Asp Gln Asp Gly Asp Gly Lys Val Cys Asn Tyr			
245	250	255	
Lys Lys Thr Asp Val Lys Lys Phe			
260			