(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.⁷
C12N 15/53
C12N 9/02
A01H 1/00
C12N 15/82

(11) 공개번호 10-2004-0091124
(43) 공개일자 2004년10월27일

(21) 출원번호 10-2004-7014250
(22) 출원일자 2004년09월10일
번역문 제출일자 2004년09월10일
(86) 국제출원번호 PCT/US2003/007430
(86) 국제출원출원일자 2003년03월12일
(87) 국제공개번호 WO 2003/078577
(87) 국제공개일자 2003년09월25일

(30) 우선권주장 60/363,684 2002년03월12일 미국(US)

(71) 출원인 유.에스.스모크리스 토바코 컴퍼니
미합중국, 코넥티컷주 06830, 그린위치, 웨스트 푸트남 애버뉴 100

(72) 발명자 주동메이
미국 켄터키 40391 윈체스터 피.오. 박스 237

(74) 대리인 차윤근

심사청구 : 없음

(54) 니코티아나 사이토크롬 P450 유전자의 클로닝

요약

본 발명은 니코티아나 P450 효소 및 P450 효소를 암호화하는 핵산 서열, 그리고 식물 표현형을 바꾸기 위하여 이 효소와 핵산 서열을 사용하는 방법에 관한 것이다.

대표도

도 1

색인어

니코티아나, P450 효소, 핵산, 표현형, 트랜스제닉 식물

명세서

기술분야

본 발명은 니코티아나(*Nicotiana*) 식물의 사이토크롬(cytochrome) P450 효소(이하 P450 및 P450 효소라 함)를 암호화하는 핵산 서열과, 식물의 표현형을 바꾸기 위해 이 핵산 서열을 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

사이토크롬 P450은 생체내 및 생체외(xenobiotic) 기질의 산화 대사, 과산화 대사, 그리고 환원 대사를 포함하는, 화학적으로 유사하지 않은 광범위한 기질에 대한 효소 반응을 촉매한다. 식물에서 P450은 페닐프로파노이드, 알칼로이드, 터페노이드, 지질, 시아노겐 글리코사이드, 및 글루코시놀레이트와 같은 식물 생성물의 합성을 포함하는 생화학적 경로에 참여한다(Chappel, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 198, 49:311-343). 사이토크롬 P450은 P450 헴-티올레이트 단백질로도 알려져 있으며, P450 함유 단일산소화효소계로 불리는 다성분 전자 전달 사슬에서 마지막 산화효소로서 보통 활동한다. 촉매되는 구체적인 반응으로는 탈메틸화, 하이드록실화, 에폭시화, N-산화, 설포산화, N-, S-, 및 O-탈알킬화, 탈설페이트화, 탈아민화, 및 아조기, 니트로기, 및 N-옥사이드기의 환원이 있다.

니코티아나 식물 P450 효소의 다양한 역할에는 여러가지 식물 대사물, 예컨 대 페닐프로파노이드, 알칼로이드, 터페노이드, 지질, 시아노겐 글리코사이드, 글루코시놀레이트 및 다수의 다른 종류의 화학적 성분에 영향을 미치는 것이 포함된다. 최근 들어, 일부 P450 효소가 식물에서 식물 대사물의 조성에 영향을 미칠 수 있음이 분명해지고 있다. 예를 들면, 당업자는 재배하는 동안에 특정 지방산의 성질을 변화시킴으로써 식물의 향이나 향기를 개량하고자 오랫동안 소망하여 왔으나, 이러한 잎 성분의 함량을 조절하는 데에 관련된 메커니즘에 관해서는 거의 알려진 바가 없었다. 지방산의 변형과 관련된 P450 효소의 하향 조절작용은 한층 바람직한 잎 표현형 품질을 제공하는 바람직한 지방산의 축적을 촉진할 수 있다. P450 효소의 기능과 식물 성분에서의 이의 광범위한 역할은 지금도 연구되고 있다. 예를 들면, 특정 부류의 P450 효소는 지방산을 휘발성 물질인 C6- 및 C9-알데하이드 및 -알콜로 분해하는 것을 촉매하는 것으로 밝혀졌는데, 이 성분들은 과일과 야채의 '상큼한(fresh green)' 냄새에 주로 기여한다. 새로 연구된 다른 종류의 P450 함량을 변경시키면, 니코티아나 잎의 지질 조성 및 관련된 분해 대사물을 변형시켜 잎 성분의 품질을 향상시킬 수 있다. 잎에 있는 몇가지 이러한 성분은 잎 품질 특성의 성숙을 자극하는 노쇠(senescence)에 의해 영향 받는다. 다른 연구에서는, P450 효소가 식물-병원균 상호작용 및 질병 저항에 관련된 지방산을 변경시키는 데 있어 기능적 역할을 하는 것으로 보고된 바도 있다.

다른 예로, P450 효소는 알칼로이드 생합성에 관여하는 것으로 추측되어 왔다. 노르니코틴은 니코티아나 타바쿰(담배, *Nicotiana tabaccum*)에서 발견되는 작은(minor) 알칼로이드이다. 니코틴이 P450을 매개로 탈메틸화되면 노르니코틴이 만 들어지고, 이어서 N 위치에서 아실화 및 니트로소화되면 일련의 N-아실노르니코틴 및 N-니트로소노르니코틴이 생성되는 것으로 가정되어 왔다. 추정상의 P450 탈메틸화효소에 의해 촉매되는 N-탈메틸화가 니코티아나 내 노르니코틴 생합성의 주요 원리인 것으로 사료된다. 효소는 마이크로좀내에 있는 것으로 생각되지만, 니코틴 탈메틸화효소 효소 분리에 성공하지도 못했거니와, 관련된 유전자 또한 분리해내지 못한 상태이다.

또한, 비록 증명되지는 않았지만, P450 효소의 활성은 유전자 수준에서 조절되고 또한 환경적 인자에 의해 강한 영향을 받는다는 가설이 수립되었다. 예를 들면, 니코티아나내 니코틴의 탈메틸화는 식물이 성숙 단계에 이르렀을 때 실질적으로 증가되는 것으로 사료된다. 게다가, 탈메틸화효소 유전자는 존재하는 경우 RNA의 해독을 억제할 수 있는 전이 인자(transposable element)를 포함하는 것으로 사료된다.

본 발명 이전에는 P450 효소의 매우 다양한 형태, 제각기 다른 구조 및 기능 때문에 니코티아나 P450 효소에 대한 연구가 매우 어려웠다. 뿐만 아니라, 이러한 막-국재성 단백질이 대개 낮은 빈도로 존재하고 종종 정제하기에는 불안정했기 때문에 P450 효소의 클로닝이 적어도 부분적으로는 어려움을 겪어왔다. 따라서 식물에서의 P450 효소 및 이러한 P450 효소와 관련된 핵산 서열을 동정할 필요가 있다. 구체적으로 들어가면, 극히 소수의 니코티아나 사이토크롬 P450 단백질만이 담배 식물에서 보고된 바 있다. 본원 발명에는 서열 동일성에 근거한 몇가지 군의 P450 종류에 상응하는, 실질적인 수의 사이토크롬 P450 단편의 발견이 수반된다.

요약

본 발명은 식물의 P450 효소에 관한 것이다. 본 발명은 또한 니코티아나 식물 P450 효소에 관한 것이다. 본 발명은 또한 발현이 에틸렌 및/또는 식물 노쇠에 의해 유도되는 식물내 P450 효소에 관한 것이다. 본 발명은 또한 효소 활성, 예컨대 산소화효소, 탈메틸화효소 또는 기타의 효소 활성을 갖는 식물내 핵산 서열과, 이러한 효소의 발현을 감소시키거나 침묵시키기 위한 이러한 서열의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 노르니코틴 함량이 낮은 식물보다는, 노르니코틴 함량이 높은 식물에서 발견된 P450 효소에 관한 것이다.

일 구체예에서, 본 발명은 서열번호(SEQ. ID. No.) 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145 및 147로서 기재되는 핵산 서열에 관한 것이다.

이와 관련된 두번째 구체예에서, 사이토크롬 P450 모티프 GXRXCX(G/A) 다음에 오는 첫번째 핵산 서열부터 정지 코돈까지에 상응하는 영역에서의 동일성에 따라, 핵산 서열 동일성이 75%보다 큰 단편을 군(group)으로 나누었다. 대

표적인 핵산 군 및 각각의 종류는 표 1에 나열하였다.

세번째 구체예에서, 본 발명은 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146 및 148로서 기재되는 아미노산 서열에 관한 것이다.

이와 관련된 네번째 구체예에서, 사이토크롬 P450 모티프 GXRXCX(G/A) 다음에 오는 첫번째 아미노산부터 정지 코돈까지에 상응하는 영역에서의 상호 동일성에 따라, 아미노산 서열 동일성이 71%보다 큰 단편을 군으로 나누었다. 대표적인 아미노산 군 및 각각의 종류는 표 2에 나열하였다.

본 발명의 다섯번째 구체예에서, 본 발명은 서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145 및 147로서 기재되는 핵산 서열의 용도에 관한 것이다.

이와 관련된 여섯번째 구체예에서는 니코티아나 식물에서 P450 효소를 감소시키거나 제거하는 것을 RNA 바이러스 시스템을 사용하여 일시적으로 수행할 수 있다. 생성된 형질전환되었거나 감염된 식물을 표현형 변화에 대해 평가하는데, 평가 항목에는 당업자라면 공통적으로 사용하는 기술을 사용한 내생성 P450 RNA 전사체, P450을 발현한 펩타이드, 및 식물 대사물 농도의 분석이 포함되고, 이에 국한되지는 않는다.

일곱번째 구체예에서, 본 발명은 변경된 P450 효소 활성 정도를 갖는 트랜스제닉 니코티아나 라인(line)의 발생에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 이러한 트랜스제닉 라인은 특정 효소의 발현을 감소시키거나 침묵시키는데 유효한 핵산 서열을 포함하여, 니코티아나에서 표현형 효과를 초래한다. 이러한 핵산 서열에는 서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145 및 147이 포함된다.

매우 중요한 본 발명의 여덟번째 구체예에서, 하향 조절능력을 갖는 본 발명의 핵산을 포함하는 식물 컬티바(cultivar)는 대조군 식물에 비해 변경된 대사물 특성을 가지게 된다.

아홉번째 구체예에서, 본 발명은 교시된 핵산 서열과 실질적으로 핵산 동일성이 있는 유전자를 가진 식물, 더욱 바람직하게는 니코티아나를 스크리닝하는 것에 관한 것이다. 본 발명은 식물이 전통적 변종 또는 트랜스제닉 변종에 대한 재배 프로그램, 돌연변이유발 프로그램, 또는 천연 발생적인 다양한 식물 군집에 속하는 경우, 완전한 동일성 또는 실질적인 동일성을 갖는 핵산 서열을 함유하는 식물을 동정하고 선별해내는 데 사용하면 유리할 것이다. 실질적인 핵산 동일성에 대해서 식물을 스크리닝하는 것은 핵산 검출 프로토콜과 함께 핵산 탐침을 사용하여 식물 핵산 물질을 평가함으로써 수행할 수 있고, 상기 핵산 검출 프로토콜에는 핵산 하 이브리드화와 PCR 분석이 포함되나, 이에 국한되는 것은 아니다. 핵산 탐침은 서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145 및 147에 상응하는 교시된 핵산 서열 또는 이들의 단편으로 이루어질 수 있다.

열번째 구체예에서, 본 발명은 교시된 핵산 서열에 상응하는 실질적인 아미노산 동일성을 공유하는 식물 유전자, 더욱 바람직하게는 니코티아나를 동정하는 것에 관한 것이다. 이런 cDNA 및 게놈 클론의 cDNA 및 게놈종(바람직하게는, 니코티아나 유래)을 모두 포함하는 식물 유전자를 동정하는 것은, 핵산 검출 프로토콜과 함께 핵산 탐침을 사용하여 식물 cDNA 라이브러리를 스크리닝함으로서 수행할 수 있고, 상기 핵산 검출 프로토콜에는 핵산 하이브리드화 및 PCR 분석이 포함되나 이에 국한되는 것은 아니다. 핵산 탐침은 서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145 및 147에 상응하는 핵산 서열 또는 이들의 단편으로 구성될 수 있다.

마지막으로 열한번째 구체예에서는, 교시된 아미노산 서열의 일부 또는 전부 에 관한 항체를 사용하여, 펩타이드를 발현하는 cDNA 발현 라이브러리를 스크리닝할 수 있다. 이러한 아미노산 서열에는 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146 및 148이 포함된다.

도면의 간단한 설명

도 1은 핵산 서열번호 1 및 아미노산 서열번호 2를 보이고 있다.

도 2는 핵산 서열번호 3 및 아미노산 서열번호 4를 보이고 있다.

도 3은 핵산 서열번호 5 및 아미노산 서열번호 6을 보이고 있다.

도 4는 핵산 서열번호 7 및 아미노산 서열번호 8을 보이고 있다.

도 5는 핵산 서열번호 9 및 아미노산 서열번호 10을 보이고 있다.

도 6은 핵산 서열번호 11 및 아미노산 서열번호 12를 보이고 있다.

도 7은 핵산 서열번호 13 및 아미노산 서열번호 14를 보이고 있다.

도 8은 핵산 서열번호 15 및 아미노산 서열번호 16을 보이고 있다.

도 9는 핵산 서열번호 17 및 아미노산 서열번호 18을 보이고 있다.

도 10은 핵산 서열번호 19 및 아미노산 서열번호 20을 보이고 있다.

도 11은 핵산 서열번호 21 및 아미노산 서열번호 22를 보이고 있다.

도 12는 핵산 서열번호 23 및 아미노산 서열번호 24를 보이고 있다.

도 13은 핵산 서열번호 25 및 아미노산 서열번호 26을 보이고 있다.

도 14는 핵산 서열번호 27 및 아미노산 서열번호 28을 보이고 있다.

도 15는 핵산 서열번호 29 및 아미노산 서열번호 30을 보이고 있다.

도 16은 핵산 서열번호 31 및 아미노산 서열번호 32를 보이고 있다.

도 17은 핵산 서열번호 33 및 아미노산 서열번호 34를 보이고 있다.

도 18은 핵산 서열번호 35 및 아미노산 서열번호 36을 보이고 있다.

도 19는 핵산 서열번호 37 및 아미노산 서열번호 38을 보이고 있다.

도 20은 핵산 서열번호 39 및 아미노산 서열번호 40을 보이고 있다.

도 21은 핵산 서열번호 41 및 아미노산 서열번호 42를 보이고 있다.

도 22는 핵산 서열번호 43 및 아미노산 서열번호 44를 보이고 있다.

도 23은 핵산 서열번호 45 및 아미노산 서열번호 46을 보이고 있다.

도 24는 핵산 서열번호 47 및 아미노산 서열번호 48을 보이고 있다.

도 25는 핵산 서열번호 49 및 아미노산 서열번호 50을 보이고 있다.

도 26은 핵산 서열번호 51 및 아미노산 서열번호 52를 보이고 있다.

도 27은 핵산 서열번호 53 및 아미노산 서열번호 54를 보이고 있다.

도 28은 핵산 서열번호 55 및 아미노산 서열번호 56을 보이고 있다.

도 29는 핵산 서열번호 57 및 아미노산 서열번호 58을 보이고 있다.

도 30은 핵산 서열번호 59 및 아미노산 서열번호 60을 보이고 있다.

도 31은 핵산 서열번호 61 및 아미노산 서열번호 62를 보이고 있다.

도 32은 핵산 서열번호 63 및 아미노산 서열번호 64를 보이고 있다.

도 33은 핵산 서열번호 65 및 아미노산 서열번호 66을 보이고 있다.

도 34는 핵산 서열번호 67 및 아미노산 서열번호 68을 보이고 있다.

도 35는 핵산 서열번호 69 및 아미노산 서열번호 70을 보이고 있다.

도 36은 핵산 서열번호 71 및 아미노산 서열번호 72를 보이고 있다.

도 37은 핵산 서열번호 73 및 아미노산 서열번호 74를 보이고 있다.

도 38은 핵산 서열번호 75 및 아미노산 서열번호 76을 보이고 있다.

도 39는 핵산 서열번호 77 및 아미노산 서열번호 78을 보이고 있다.

도 40은 핵산 서열번호 79 및 아미노산 서열번호 80을 보이고 있다.

도 41은 핵산 서열번호 81 및 아미노산 서열번호 82를 보이고 있다.

도 42은 핵산 서열번호 83 및 아미노산 서열번호 84를 보이고 있다.

도 43은 핵산 서열번호 85 및 아미노산 서열번호 86을 보이고 있다.

도 44는 핵산 서열번호 87 및 아미노산 서열번호 88을 보이고 있다.

도 45는 핵산 서열번호 89 및 아미노산 서열번호 90을 보이고 있다.

도 46은 핵산 서열번호 91 및 아미노산 서열번호 92를 보이고 있다.

도 47은 핵산 서열번호 93 및 아미노산 서열번호 94를 보이고 있다.

도 48은 핵산 서열번호 95 및 아미노산 서열번호 96을 보이고 있다.

도 49는 핵산 서열번호 97 및 아미노산 서열번호 98을 보이고 있다.

도 50은 핵산 서열번호 99 및 아미노산 서열번호 100을 보이고 있다.

도 51은 핵산 서열번호 101 및 아미노산 서열번호 102를 보이고 있다.

도 52는 핵산 서열번호 103 및 아미노산 서열번호 104를 보이고 있다.

도 53은 핵산 서열번호 105 및 아미노산 서열번호 106을 보이고 있다.

도 54는 핵산 서열번호 107 및 아미노산 서열번호 108을 보이고 있다.

도 55는 핵산 서열번호 109 및 아미노산 서열번호 110을 보이고 있다.

도 56은 핵산 서열번호 111 및 아미노산 서열번호 112를 보이고 있다.

도 57은 핵산 서열번호 113 및 아미노산 서열번호 114를 보이고 있다.

도 58은 핵산 서열번호 115 및 아미노산 서열번호 116을 보이고 있다.

도 59는 핵산 서열번호 117 및 아미노산 서열번호 118을 보이고 있다.

도 60은 핵산 서열번호 119 및 아미노산 서열번호 120을 보이고 있다.

도 61은 핵산 서열번호 121 및 아미노산 서열번호 122를 보이고 있다.

도 62는 핵산 서열번호 123 및 아미노산 서열번호 124를 보이고 있다.

도 63은 핵산 서열번호 125 및 아미노산 서열번호 126을 보이고 있다.

도 64는 핵산 서열번호 127 및 아미노산 서열번호 128을 보이고 있다.

도 65는 핵산 서열번호 129 및 아미노산 서열번호 130을 보이고 있다.

도 66은 핵산 서열번호 131 및 아미노산 서열번호 132를 보이고 있다.

도 67은 핵산 서열번호 133 및 아미노산 서열번호 134를 보이고 있다.

도 68은 핵산 서열번호 135 및 아미노산 서열번호 136을 보이고 있다.

도 69는 핵산 서열번호 137 및 아미노산 서열번호 138을 보이고 있다.

도 70은 핵산 서열번호 139 및 아미노산 서열번호 140을 보이고 있다.

도 71은 핵산 서열번호 141 및 아미노산 서열번호 142를 보이고 있다.

도 72는 핵산 서열번호 143 및 아미노산 서열번호 144를 보이고 있다.

도 73은 핵산 서열번호 145 및 아미노산 서열번호 146을 보이고 있다.

도 74는 핵산 서열번호 147 및 아미노산 서열번호 148을 보이고 있다.

도 75는 PCR에 의한 사이토크롬 P450 cDNA 단편 클로닝 절차를 보이고 있다. 서열번호 149-156이 보이고 있다.

도 76a-d는 군 구성원의 아미노산 동일성을 설명하고 있다.

발명의 상세한 설명

정의

별달리 언급하지 않으면, 본원에 사용된 모든 기술용어 및 과학용어는 본 발명이 속하는 업계의 당업자라면 공히 이해할 수 있는 바와 같은 의미를 갖는다. 본 발명에 사용된 여러가지 용어의 일반적인 사전으로서는 Singleton et al.(1994) Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, second edition, John Wiley and Sons (New York)를 사용하면 된다. 본원에 언급된 모든 특허문서 및 공개문헌은 본원에 참조로서 인용된다. 본 발명의 목적상, 다음 용어는 하기와 같이 정의된다.

'효소 활성'에는 탈메틸화, 하이드록실화, 에폭시화, N-산화, 설포산화, N-, S-, 및 O-탈알킬화, 탈설페이트화, 탈아미노화, 및 아조기, 니트로기 및 N-옥사이드기의 환원이 포함되는 것을 의미한다. '핵산'이라는 용어는 단일- 또는 이중-가닥 형태, 또는 센스나 안티센스인 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 중합체를 말하며, 특별히 한정하지 않는 한, 천연 발생 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 핵산과 하이브리드화되는 공지된 천연 뉴클레오타이드의 유사체도 포함된다. 달리 표시하지 않았다면 특정 핵산 서열에는 이의 상보적 서열도 포함된 다. '기능적으로 연결된', '기능적인 결합' 및 '기능적인 순서'라는 용어는 핵산 발현 조절 서열(예컨대 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사 인자 결합 부위 어레이(array)와 같은)과 다른 핵산 서열간의 기능적 연결을 말하는 것이며, 여기에서 발현 조절 서열이라 함은, 상기의 다른 서열에 해당하는 핵산의 전사 및/또는 해독에 영향을 주는 서열을 말한다.

세포에 관하여 언급할 때 '재조합'이라는 용어는 세포가 이종성 핵산을 복제하고, 상기 핵산을 발현하거나, 상기 이종성 핵산에 의해 암호화된 이종성 펩타이드인 펩타이드, 또는 단백질을 발현하는 것을 지칭한다. 재조합 세포는 세포의 천연(즉, 비재조합 형태) 형태에서는 발견되지 않는 센스 또는 안티센스 형태인 유전자 또는 유전자 단편을 발현할 수 있다. 재조합 세포는 또한 세포의 천연 형태에서 발견되는 유전자를 발현할 수도 있지만, 단 이 때 유전자는 인공적인 수단에 의해 변형된 후 세포에 재도입된 것을 말한다.

'구조 유전자'라 함은, 단백질, 폴리펩타이드 또는 이의 일부를 암호화하는 DNA 절편을 포함하지만, 전사의 시작을 지휘하는 5' 서열은 포함하지 않는 유전자 부분을 말하는 것이다. 구조 유전자는 해독불가능한 산물을 암호화할 수도 있다. 이러한 구조 유전자는 세포에서 일반적으로 발견되는 것이거나, 세포나 세포내 장소에서 일반적으로 발견되지 않는, 도입된 것일 수 있는데, 후자의 경우에는 '이종성 유전자'라 한다. 이종성 유전자는 당업자에게 공지된 임의의 출처로부터의 전부분 또는 일부분에서 유래할 수 있고, 상기 출처에는 박테리아 게놈 또는 에피좀, 진핵생물의 핵 또는 플라스미드 DNA, cDNA, 바이러스 DNA 또는 화학합성된 DNA가 포함된다. 구조 유전자는 생물학적 활성 또는 이의 특징, 발현 산물의 생물학적 활성 또는 화학적 구조, 발현 속도 또는 발현 조절 방식에 영향을 줄 수 있는 하나 이상의 변형을 함유할 수 있다. 이러한 변형에는 하나 이상의 뉴클레오타이드의 돌연변이, 삽입, 결실 및 치환이 포함되나, 이에 국한되는 것은 아니다. 구조 유전자는 단절되지 않은 암호화 서열을 구성할 수 있고, 또는 적당한 스플라이스 틈(junction)에 의해 결합된 하나 이상의 인트론을 포함할 수도 있다. 구조 유전자는 해독가능 유전자 또는 해독불가능 유전자(안티 센스 방향(orientation) 포함)일 수 있다. 구조 유전자는 다수개의 출처 및 다수개의 유전자 서열(천연 발생 또는 인공 서열로서, 여기에서 인공이라 함은, 화학합성된 DNA를 뜻한다)에서 유래한 절편의 복합체일 수도 있다.

'~에서 유래하였다'라는 것은 출처(화학적 및/또는 생물학적 출처)로부터 취해지고, 수득되고, 받고, 얻어지고, 복제되었거나 전해진 것을 말할 때 사용한다. 유도체는 최초의 소스(source)를 화학적 또는 생물학적으로 조작함으로써(치환, 부가, 삽입, 결실, 추출, 분리, 돌연변이화 및 복제를 포함하나, 이에 국한되는 것은 아님) 생성될 수 있는 것이다.

DNA 서열과 관련하여 '화학합성된'이라는 것은, 시험관내(in vitro)에서 구성 성분인 뉴클레오타이드 부분이 조립된 것을 의미한다. DNA 수동 화학 합성은 잘 정립되어 있는 절차(Caruthers, Methodology of DNA and RNA Sequencing, (1983), Weissman (ed.), Praeger Publishers, New York, Chapter 1)를 사용하여 수행할 수 있고, 자동 화학 합성은 시판되는 여러 기계 중 하나를 사용하여 수행할 수 있다.

비교하기 위해 서열을 최적으로 얼라인먼트(alignment)하는 것은, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)의 국부적 상동성 알고리즘으로, Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)의 상동성 얼라인먼트 알고리즘으로, Pearson and Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:2444 (1988)의 유사도 검색 방법으로, 이러한 알고리즘의 컴퓨터 계산식(위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575 소재의, 제네틱스 컴퓨터 그룹의 위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지에서의 GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA)으로, 또는 정밀조사하여 수행할 수 있다.

서열 분석 프로그램인 blastp, blastn, blastx, tblastn 및 tblastx와 관련하여 사용할 용도의 NCBI 베이직 로컬 얼라인먼트 서치 툴(BLAST)(Altschul et al., 1990)은 국립생물정보센터(NCBI, 메릴랜드 베데스다 소재)와 인터넷을 포함한 여러 공급원에서 구할 수 있다. 이는 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/에서 접근가능하다. 이 프로그램을 사용하여 서열 동일성을 검사하는 방법에 대한 설명은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast help.html에 있다.

아미노산 서열에 사용되는 것으로서 본원에 사용된 '실질적인 아미노산 동일성' 또는 '실질적인 아미노산 서열 동일성'이라는 용어는 폴리펩타이드의 특성을 나타내는데, 여기에서 펩타이드는 사이토크롬 P450 모티프 GXRXCX(G/A) 다음에 오는 첫번째 아미노산에서부터 해독된 펩타이드의 정지 코돈까지에 상응하는 영역에서 참조군에 비해 적어도 70%의 서열 동일성, 바람직하게는 80%의 아미노산 서열 동일성, 더욱 바람직하게는 90%의 아미노산 서열 동일성, 가장 바람직하게는 적어 도 99 내지 100%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

핵산 서열에 사용되는 것으로서 본원에 사용된 '실질적인 핵산 동일성' 또는 '실질적인 핵산 서열 동일성'이라는 용어는 폴리뉴클레오타이드 서열의 특성을 나타내는데, 여기에서 폴리뉴클레오타이드는 사이토크롬 P450 모티프 GXRXCX(G/A) 다음에 오는 첫번째 핵산에서부터 해독된 펩타이드의 정지 코돈까지에 상응하는 영역 에서 참조군에 비해 적어도 75%의 서열 동일성, 바람직하게는 81%의 서열 동일성, 더욱 바람직하게는 91% 내지 99%의 서열 동일성, 가장 바람직하게는 적어도 99 내지 100%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

두 뉴클레오타이드 분자가 엄중(stringent) 조건에서 서로 하이브리드화되는 경우에도, 이 뉴클레오타이드 서열은 실질적으로 동일하다고 할 수 있다. 엄중 조건은 서열에 따라 다르고, 환경이 달라지면 또한 달라질 것이다. 일반적으로, 엄중 조건은 정해진 이온 세기 및 pH에서 특정 서열에 대한 열 용융점(Tm)보다 약 5 내지 약 20℃, 보통은 약 10 내

지 약 15℃가 더 낮은 온도로 선택된다. Tm은 (정해진 이온 세기 및 pH에서) 표적 서열의 50%가 상응하는 탐침에 하이브리드화되는 온도를 말한다. 전형적으로는, 엄중 조건은 염 농도가 pH 7에서 약 0.02 몰이고, 온도는 적어도 약 60℃인 것을 말한다. 예를 들면 표준 써던 하이브리드화 방법에서, 엄중 조건은 42℃에서 6xSSC로 최초 세척한 뒤, 적어도 약 55℃, 전형적으로는 약 60℃, 보통은 약 65℃의 온도에서 0.2xSSC로 1회 이상 세척하는 것을 포함할 것이다.

뉴클레오타이드 서열은 또한, 암호화하는 폴리펩타이드 및/또는 단백질이 실 질적으로 동일한 경우에 본 발명의 목적상 실질적으로 동일하다. 따라서, 일 핵산 서열이 다른 핵산 서열과 실질적으로 동일한 폴리펩타이드를 암호화하는 경우에, 유전 암호가 허용하는 축퇴로 인해 엄중 조건하에 하이브리드화되지 않는다 하더라도, 이 두 핵산 서열은 실질적으로 동일한 것이다(참고: Darnell et al. (1990) Molecular Cell Biology, Second Edition Scientific American Books W.H. Freeman and Company New York for an explanation of codon degeneracy and the genetic code). 단백질 순도 또는 균질도는 단백질 샘플을 폴리아크릴아미드 겔 전기영동한 다음에 염색하여 가시화하는 바와 같은, 당업계에 익히 공지되어 있는 여러가지 수단에 의해 표시될 수 있다. 특정 목적을 위해서는, 높은 해상도가 필요할 수 있고, HPLC나 유사한 정제 수단이 활용될 수도 있다.

본원에 사용된 '벡터'라는 용어는 DNA 절편을 세포에 전달하는 핵산 분자와 관련하여 사용된다. 벡터는 DNA를 복제하는 작용을 할 수 있고, 숙주 세포에서 독립적으로 생식할 수도 있다. '비히클'이라는 용어는 가끔 '벡터'라는 용어와 혼용된다. 본원에 사용된 '발현 벡터'라는 용어는, 바람직한 암호 서열과 특정 숙주 유기체에서 기능적으로 연결되어 있는 암호 서열의 발현을 위해서 필요한 적당한 핵산 서열을 함유하는 재조합 DNA 분자를 말한다. 원핵생물에서 발현하기 위해 필요한 핵산 서열에는 보통 프로모터, 오퍼레이터(임의적), 및 리보좀 결합 부위와, 가끔은 다른 서열도 함께 포함한다. 진핵세포에서는 프로모터, 인핸서, 및 종결 및 폴리아데닐화 시그널을 활용하는 것으로 알려져 있다.

유전자 조작된 식물을 뿌리까지 완전하게 재생하기 위해서는, 예를 들면 생 체내 주입과 같은 임의의 기술 또는, 임의 공지된 시험관내 조직 배양 기술을 사용하여 핵산을 식물 세포에 삽입함으로써, 완전한 식물체로 재생될 수 있는 형질전환된 식물 세포를 제조할 수 있다. 따라서, 예를 들어 식물 세포에 삽입하는 것은 병원성 또는 비병원성 에이. 투메파시엔스(*A. tumefaciens)* 를 사용하여 시험관내 주입함으로써 이루어질 수 있다. 이러한 조직 배양 기술 중 다른 기술도 사용할 수 있다.

'식물 조직'에는 분화 및 미분화된 식물의 조직이 포함되는데, 여기에는 뿌리, 줄기, 잎, 화분, 종자, 종양 조직 및 다양한 형태의 배양 세포, 예컨대 단세포, 원형질체(protoplast), 배 및 캘러스(callus) 조직이 포함되며, 이에 국한되는 것은 아니다. 식물 조직은 식물내(*in planta*) 또는 기관, 조직 또는 세포 배양체내 존재하는 것일 수 있다.

본원에 사용된 ' 식물 세포'에는 식물내 식물 세포, 배양액내 식물 세포 및 원형질체가 포함된다. 'cDNA' 또는 '상보적 DNA'는 일반적으로 RNA 분자에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 단일 가닥 DNA 분자를 일컫는다. cDNA는 RNA 주형에 대한 역전사효소의 작용에 의해 형성된다.

<u>핵산 서열 획득 전략</u>

본 발명에 따르면, RNA는 컨버터(converter) 및 비컨버터(non-converter) 니코티아나 라인인 니코티아나 조직으로부터 추출된다. 추출된 RNA는 이어서 cDNA를 만드는데 사용된다. 이어서, 다음의 두가지 전략을 사용하여 본 발명의 핵산 서열을 만든다.

첫번째 전략에서는, 폴리 A 풍부 RNA를 식물 조직으로부터 추출하고, 역전사 PCR을 사용하여 cDNA를 만든다. 단일 가닥 cDNA를 사용하여, 축퇴성 프라이머 + 올리고 d(T) 역방향 프라이머로 P450 특이적 PCR 군집을 만든다. 프라이머 디자인은 P450의 고도 보전 모티프에 기초하여 이루어진다. 구체적인 축퇴성 프라이머의 예는 도 1에 나와있다. 적당한 크기의 삽입체를 함유하는 플라스미드로부터 서열 단편을 추가로 분석한다. 이러한 삽입체의 크기는 전형적으로는 사용된 프라이머에 따라 약 300 내지 약 800 뉴클레오타이드 범위이다.

이와 다른 두번째 전략에서는, cDNA 라이브러리를 먼저 작제한다. 플라스미드내의 cDNA를 사용하여, 축퇴성 프라이머 + 역방향 프라이머로서 플라스미드 상의 T7 프라이머로 p450 특이적 PCR 군집을 만든다. 첫번째 전략에서와 같이, 적당한 크기의 삽입체를 함유하는 플라스미드 유래의 서열 단편을 추가로 분석한다.

다량의 노르니코틴을 생성하는 것으로 알려진 니코티아나 식물 라인(컨버터)과, 검출불가능한 양의 노르니코틴을 갖는 식물 라인을 출발 재료로서 사용할 수 있다.

식물에서 잎을 떼어낸 다음, 본원에서 규정한 P450 효소 활성을 내게 하기 위하여 에틸렌으로 처리할 수 있다. 당업계에 알려져 있는 기술을 사용하여 전체 RNA를 추출한다. 이어서 도 1에 묘사된 바와 같이 올리고 d(T) 프라이머로 PCR(RT-PCR)하여 cDNA 단편을 만들 수 있다. 그 다음에는, 본원의 실시예에 보다 상세히 기재되어 있는 바와 같이

cDNA 라이브러리를 작제할 수 있다.

P450형(type) 효소의 보전 영역은 축퇴성 프라이머에 대한 주형으로서 사용 될 수 있다(도 75). 축퇴성 프라이머를 사용하면, P450 특이적 밴드를 PCR로 증폭시킬 수 있다. P450과 유사한 효소를 나타내는 밴드는 DNA 서열분석으로 동정할 수 있다. BLAST 서치, 얼라인먼트 또는 다른 도구를 사용하여 PCR 단편을 특징분석함으로써, 적당한 후보를 동정해낼 수 있다.

동정된 단편으로부터의 서열 정보는 PCR 프라이머를 개발하기 위하여 사용될 수 있다. 이러한 프라이머는 컨버터 및 비컨버터 라인의 에틸렌 처리된 식물 조직의 RNA로부터 정량적 RT-PCR을 수행하는데 사용된다. 컨버터 라인에서 고발현되는 것을 나타내는 고밀도 밴드 또는 컨버터 라인 유래 적절한 크기의 DNA 밴드(300 내지 800 bp)만을 추가로 특징분석하는데 사용했다. 대규모 역 써던 분석법을 수행하여, 획득된 모든 클론에 대한 차등 발현을 검사했다. 본 발명의 이러한 측면에서, 상기 대규모 역 써던 분석법은 클로닝된 삽입체 모두를 스크리닝하기 위하여 클로닝된 DNA 단편과 하이브리드화하는 탐침으로서, 상이한 조직 유래의 표지된 전체 cDNA를 사용하여 수행될 수 있다.

P450 단편 클론을 특징분석하는데 비방사선 노던 블로팅 분석 또한 사용하였다.

상술된 바와 같이 동정된 핵산 서열은 바이러스 유도성 유전자 침묵화 기술을 사용하여 검사할 수 있다(VIGS, Baulcombe, Current Opinions in Plant Biology, 1999, 2:109-113).

본 발명의 다른 측면에서는, 본 발명의 니코티아나 식물내 사이토크롬 P450 효소 활성을 추가로 특징분석하는데 RNA 인터퍼링(interfering) 기술(RNAi)을 사용 한다. 이 기술을 설명하고 있는 하기의 참조문헌은 본원에 참조로서 인용된다: Smith et al., Nature, 2000, 407:319-320; Fire et al., Nature, 1998, 391:306-311; Waterhouse et al., PNAS, 1998, 95:13959-13964; Stalberg et al., Plant Molecular Biology, 1993, 23:671-683; Baulcombe, Current Opinions in Plant Biology, 1999, 2:109-113; 및 Brigneti et al., EMBO Journal, 1998, 17(22):6739-6746. RNAi 기술, 안티센스 기술, 또는 설명되어 있는 다른 여러가지 기술을 사용하여 식물을 형질전환할 수 있다.

식물 세포에 외래 유전 물질을 도입하고, 도입된 유전자를 안정하게 유지 및 발현하는 식물을 수득하기 위한 여러가지 기술이 있다. 이러한 기술에는 마이크로입자 상에 코팅되어 있는 유전 물질을 세포로 직접 가속화하는 기술이 포함된다(Cornell의 미국 특허 4,945,050 및 DowElanco의 5,141,131). 아그로박테리움 기술을 사용하여 식물을 형질전환할 수도 있는데, 여기에 관해서는 하기의 참조문헌을 참조하라: Toledo 대학의 미국 특허 5,177,010 및 Texas Aamp;M의 5,104,310, Schilperoot의 유럽 특허 출원 0131624B1, 유럽 특허 출원 120516, 159418B1, 유럽 특허 출원 120516, 159418B1 및 176,112, 미국 특허 5,149,645, 5,469,976, 5,464,763 및 4,940,838과 4,693,976, MaxPlanck의 유럽 특허 출원 116718, 290799, 320500, Japan Nicotiana의 유럽 특허 출원 604662 및 627752, Ciba Geigy의 유럽 특허 출원 0267159, 및 0292435 및 미국 특허 5,231,019, Calgene의 미국 특허 5,463,174 및 4,762,785, 그리고 Agracetus의 미국 특허 5,004,863 및 5,159,135. 다른 형질전환 기술로는 위스커스(whiskers) 기술이 있고, 이에 대해서 는 Zeneca의 미국 특허 5,302,523 및 5,464,765를 참조하라. 식물을 형질전환하는데에는 일렉트로포레이션(Electroporation) 기술도 사용할 수 있는데, 이에 대해서는 Boyce Thompson Institute의 WO 87/06614와, Dekalb의 5,472,869 및 5,384,253, PGS의 WO9209696 및 WO9321335를 참조하라. 이러한 형질전환에 관한 특허 및 공개문헌은 모두 본원에 참조로서 인용된다. 다수의 식물 형질전환 기술 뿐 아니라, 외래 유전자와 접촉되는 조직의 유형 또한 다양할 수 있다. 이러한 조직에는 배조직, I형 및 II형 캘러스 조직, 하배축, 분열조직 등이 있고, 이에 국한되지는 않는다. 거의 대부분의 식물 조직을 당업자의 적절한 기술을 사용하여 탈분화 도중에 형질전환할 수 있다.

식물에 도입된 외래 유전 물질에는 선별 마커가 포함될 수 있다. 특정 마커에 대한 선호도는 당업자의 재량이겠지만, 하기 임의의 선별 마커를, 선별 마커로서 기능할 수 있는 본원에 기재되지 않은 다른 유전자와 함께 사용할 수 있다. 이러한 선별 마커에는 트랜스포존 Tn5의 아미노글리코사이드 포스포트랜스퍼라아제 유전자(Aph II)(항생제 카나마이신, 네오마이신 및 G418에 대해 내성인 것을 암호화함) 뿐 아니라 글리포세이트; 하이그로마이신; 메토트렉세이트; 포스피노트리신(bar); 이미다졸리논, 설포닐우레아 및 트리아졸로피리미딘 제초제, 예컨대 클로로설퓨론; 브로목시닐, 달라폰 등에 대한 내성인 것을 암호화하는 유전자가 포함되지만, 이에 국한되는 것은 아니다.

선별 마커 외에도, 리포터 유전자를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 일부 경우에 리포터 유전자는 선별 마커 없이 사용될 수 있다. 리포터 유전자는 전형적 으로는 수용 유기체 또는 수용 조직내에 존재하지 않거나 여기에서 발현되지 않는 유전자이다. 리포터 유전자는 대개 일부 표현형 변화 또는 효소 특성을 나타내는 단백질을 암호화한다. 이러한 유전자의 예는 본원에 참조로 인용되는 K. Weising et al. Ann. Rev. Genetics, 22, 421 (1998)에 제공되어 있다. 바람직한 리포터 유전자에는 글루쿠로나이다아제(GUS) 유전자 및 GFP 유전자가 있지만, 이에 국한되는 것은 아니다.

일단 식물 조직에 도입이 되면 구조 유전자의 발현은 당업계에 알려져 있는 임의의 수단에 의해 분석될 수 있으며, 발현은 전사된 mRNA, 합성된 단백질, 또는 발생한 유전자 침묵현상의 정도로서 가늠될 수 있다(참조: 본원에 참조로서

인용되는 미국 특허 제5,583,021). 온전한 식물로 재생시키기 위한 시험관내 식물 조직 배양 기술 및 다수의 사례는 공지되어 있다(유럽 출원번호 88810309.0). 도입된 발현 복합체를 상업적으로 유용한 컬티바에 전달하는 방법도 당업자에게 익히 공지되어 있다.

일단 바람직한 정도의 P450 효소를 발현하는 식물 세포가 수득되면, 식물 조직 및 온전한 식물체를 당업계에 잘 알려져 있는 방법 및 기술을 사용하여 재생시킬 수 있다. 재생된 식물은 통상적인 수단에 의해 생식가능하며, 도입된 유전자는 통상적인 식물 재배술에 의해 다른 스트레인 및 컬티바에 전달될 수 있다.

실시예

하기의 실시예는 본 발명을 수행하기 위한 방법을 설명하고 있으며, 첨부되는 청구의범위로 규정되는 본 발명의 범위를 설명하고자 하는 것으로 이해되어야 할 것이며, 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.

실시예 1: 식물 조직 발육 및 에틸렌 처리

식물 성장

식물을 화분에 심고, 4주간 온실에서 키웠다. 4주가 된 실생식물을 각각의 화분으로 분갈이하고, 온실에서 2개월간 키웠다. 키우는 동안에 식물에는 150 ppm NPK 비료가 함유된 물을 하루에 두번 주었다. 자란 잎을 식물에서 채취하여 하기에 설명한 바와 같이 에틸렌 처리하였다.

세포 라인 78379

담배 라인 78379(켄터키 대학이 보급한 벌리종이다)를 식물 재료 급원으로서 사용하였다. 100그루의 식물을 담배 재배 업계의 표준 방법에 따라 배양한 뒤 옮겨심고, 각각 숫자로 표지하였다(1-100). 비료 및 토양 관리는 권장되는 바대로 수행하였다.

100그루의 식물 중 3/4이 니코틴의 20 내지 100%를 노르니코틴으로 전환하였다. 100그루의 식물 중 1/4은 니코틴의 5% 미만을 노르니코틴으로 전환하였다. 식물 번호 87은 최저 전환율(2%)을 나타낸 반면, 식물 번호 21은 100%의 전환율을 나타냈다. 3% 미만의 전환율을 나타내는 식물은 비컨버터로 분류하였다. 식물 번호 87 및 식물 번호 21의 자가 수분한 종자 및 교배한(21 x 87 및 87 x 21) 종자를 만들어 유전자 차이 및 표현형 차이를 연구하였다. 자가수분한 21의 식물은 컨버터였고, 87을 자가수분한 것의 99%는 비컨버터였다. 자가 수분한 87로부터의 식물 중 나머지 1%는 저전환율(5 내지 15%)을 보였다. 상호 교배한 식물은 모두 컨버터였 다.

세포 라인 4407

니코티아나 라인 4407(벌리종)을 식물 재료 공급원으로 사용하였다. 일정한 대표 식물(100)을 선택하고 표지했다. 100그루 식물 중에, 97그루는 비컨버터였고, 3그루는 컨버터였다. 식물 번호 56은 최소 전환율(1.2%)을 보였고, 식물 번호 58은 최고 전환율(96%)을 보였다. 이들 두 식물로 자가 수분한 종자 및 교배한 종자를 만들었다.

자가 수분한 58로부터의 식물은 컨버터 대 비컨버터 비 약 3:1로 분리되었다. 58-33 및 58-25는 각각 동종접합성 컨버터 및 비컨버터 식물 라인으로 확인되었다. 다음 세대의 자손을 분석한 결과, 58-33의 안정한 전환율이 확인되었다.

에틸렌 처리 절차

2-3개월간 온실에서 키운 식물에서 녹색 잎을 채취하여 0.3% 에틸렌 용액(Prep 브랜드 Ethephon(Rhone-Poulenc))을 분무하였다. 각 분무처리된 잎을 습도계가 구비되고 플라스틱 뚜껑이 있는 큐링 랙(curing rack)에 걸어두었다. 처리하는 동안에는 샘플 잎에 주기적으로 에틸렌 용액을 분무하였다. 에틸렌 처리를 하고나서 대략 24 내지 48시간 후에 RNA를 추출하기 위해 잎들을 수집하였다. 잎의 대사물 농도 및 더욱 구체적인 해당 성분, 예컨대 각종 알칼로이드의 농도를 측정하기 위하여 대사물 성분 분석용으로 또다른 서브 샘플을 취했다.

예를 들어보면, 알칼로이드 분석은 하기와 같이 수행할 수 있다. 샘플(0.1 g)을 0.5 ml 2N NaOH, 및 내부 표준인 퀴놀린 및 메틸 t-부틸 에테르가 함유된 5 ml 추출 용액과 함께 150 rpm으로 교반하였다. 샘플을 FID 검출기가 장착된 HP 6890 GC에서 분석하였다. 검출기와 주입기에는 250℃의 온도가 사용되었다. 5% 페놀과 95% 메틸 실리콘으로 가교결합된 융합 실리카로 구성된 HP 컬럼(30m-0.32nm-1m)을 110-185℃의 온도에서 분당 10℃의 온도 구배로 사용하였다. 담체 기체로서 헬륨을 사용하여 2 · 1 주입 용적, 40:1의 갈라짐 비, 100℃에서 1.7 ㎤분 $^{-1}$ 의 유속으로

컬럼을 작동시켰다.

실시예 2: RNA 분리

RNA 추출을 위해서, 2개월간 온실에서 키운 식물의 중간 잎을 상술한 바와 같이 에틸렌으로 처리하였다. 0시간 및 24-48시간된 샘플을 RNA 추출에 사용하였다. 일부 경우에는, 노쇠가 진행되고 있는 잎 샘플을 꽃머리를 제거한 후 10일째 되는 식물에서 취하기도 하였다. 이러한 샘플 또한 추출에 사용하였다. Rneasy Plant 미니 키트(캘리포니아주 발렌시아 소재의 Qiagen, Inc.)를 사용하여 제조업자의 프로토콜에 따라 전체 RNA를 분리해냈다.

조직 샘플을 DEPC 처리된 모르타르와 막자를 사용하여 액체 질소하에서 미세한 분말로 분쇄하였다. 대략 100 mg의 분쇄된 조직을 멸균처리한 1.5 ml 들이 에펜도르프 튜브에 옮겨담았다. 샘플이 다 모아질 때까지 이 샘플 튜브를 액체 질소에 두었다. 이어서, 키트로서 제공되는(β-머캅토에탄올이 첨가된 형태) 완충액 RLT 450 ul를 각각의 튜브에 첨가하였다. 샘플을 격렬하게 와동하고, 56℃에서 3분간 배양하였다. 분해물을 2-ml 들이 수집 튜브에 장치된 QIAshredder 스핀 컬럼에 적용한 다음, 최대 속도로 2분간 원심분리하였다. 흘러나오는 것을 수집하고, 에탄올 0.5 용적을 정화된 분해물에 첨가하였다. 샘플을 잘 혼합하고 2 ml 들이 수집 튜브에 장치된 Rneasy 미니 스핀 컬럼에 옮겨담았다. 샘플을 10,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 다음에, 완충액 RWI 700 ul를 Rneasy 컬럼 상에 피펫팅하고, 1분간 10,000 rpm으로 원심분리하였다. 새 수집 튜브에 있는 Rneasy 컬럼 상에 완충액 RPE를 피펫팅하고, 1분간 10,000 rpm으로 원심분리하였다. 완충액 RPE를 다시 Rneasy 스핀 컬럼에 첨가하고, 2분간 최대 속도로 원심분리하여 막을 건조시켰다. 임의의 에탄올을 제거하기 위하여, 막을 별도의 수집 튜브에 배치하고, 최대 속도로 1분 더 원심분리하였다. Rneasy 컬럼을 1.5 ml 짜리 새 수집 튜브에 옮기고, 40 ul의 Rnase가 없는 물을 Rneasy 막에 직접 피펫팅하였다. 이 최종 용출 튜브를 1분간 10,000 rpm에서 원심분리하였다. 전체 RNA의 질과 양을 변성 포름알데히드 겔 및 분광광도계로 분석하였다.

Oligotex 폴리 A RNA 정제 키트(Qiagen Inc.)를 사용하여 제조업자의 프로토콜에 따라 폴리(A)RNA를 분리하였다. 최대 용적 250 ul 중에 전체 RNA 약 200 ug이 사용되었다. 완충액 OBB 250 ul와, Oligotex 현탁액 15 ul를 250 ul의 전체 RNA에 첨가하였다. 내용물을 피펫팅을 통해 완전히 혼합하고, 가열 블록 상에서 70℃에서 3분간 배양하였다. 이어서, 샘플을 실온에 약 20분간 두었다. Oligotex:mRNA 복합체를 최대 속도로 2분간 원심분리함으로써 펠릿화하였다. 상층액의 거의 모두인 50 ul를 마이크로원심분리 튜브에서 제거하였다. 샘플을 OBB 완충액으로 다시 처리하였다. Oligotex:mRNA 펠릿을 OW2 완충액 400 ul에서 흔들어 재혼탁시켰다. 이 혼합물을 새 튜브에 위치한 소형 스핀 컬럼에 옮겨담고, 최대 속도로 1분간 원심분리하 였다. 스핀 컬럼을 새 튜브에 옮겨담고, 완충액 OW2를 400 ul 더 컬럼에 추가하였다. 튜브를 최대 속도로 1분간 원심분리하였다. 스핀 컬럼을 마지막으로 1.5 ml 짜리 마이크로원심분리 튜브에 옮겨담았다. 샘플을 60 ul의 뜨거운(70℃) 완충액 OEB로 용출시켰다. 폴리 A 산물을 변성 포름알데히드 겔 및 분광광도계 분석으로 분석하였다.

실시예 3: 역 전사 PCR

SuperScript 역전사효소를 사용하여 제조업자의 프로토콜(캘리포니아주 칼스바드 소재의 Invitrogen)에 따라 첫번째 가닥 cDNA를 제조하였다. 폴리 A 풍부 RNA/올리고 dT 프라이머 혼합물은 5 ug 미만의 전체 RNA, 1 ul의 10 mM dNTP 혼합물, 1 ul의 올리고 d(T) $_{12-18}$ (0.5 ug/ul), 최대 10 ul의 DEPC-처리수로 이루어진다. 각 샘플을 65℃에서 5분간 배양한 다음에, 적어도 1분간 얼음 위에 두었다. 각 성분을 다음 순서대로 첨가하여 반응 혼합물을 제조했다: 2 ul 10X RT 완충액, 4 ul의 25 mM $MgCl_2$, 2 ul의 0.1M DTT, 및 1 ul의 RNase OUT 재조합 RNase 억제제. 추가로 9 ul의 반응 혼합물을 각 RNA/프라이머 혼합물에 피펫팅하고, 부드럽게 혼합했다. 이것을 2분간 42℃에서 배양하고, Super Script II RT 1 ul를 각 튜브에 첨가했다. 튜브를 42℃에서 50분간 배양했다. 반응을 15분간 70℃에서 종결시키고, 얼음 위에서 냉각시켰다. 원심분리하여 샘플을 수집하고, RNase H 1 ul를 각 튜브에 넣은 뒤, 20분간 37℃에서 배양했다. 두번째 PCR을 순방향 프라이머(도 75에서와 같은 축퇴성 프라이머, 서열번호 149 내지 156)의 200 pmol과, 역방향 프라이머(18 nt 올리고 d(T) 다음에, 1개의 무작위 염기로 이루어지는 혼합물) 100 pmol로 수행하였다.

반응 조건은 94℃에서 2분간이었고, 그 다음에 94℃에서 1분간, 45℃ 내지 60℃에서 2분간, 72℃에서 3분간의 주기로 40회 PCR을 실시하고, 10분 더 72℃에서 연장시켰다.

증폭된 샘플 10 ul를 1% 아가로스 겔을 사용하여 전기영동함으로써 분석하였다. 정확한 크기의 단편을 아가로스 겔로부터 정제하였다.

실시예 4: PCR 단편 집단의 제조

실시예 3의 PCR 단편을 제조업자의 지시사항에 따라 pGEM-T Easy 벡터(위스콘신주 매디슨 소재의 Promega)에 연결하였다. 연결된 것을 JM109 컴피턴트 세포로 형질전환하고, 청색/백색 선별을 위해 LB 배지 위에 두었다. 콜로

니를 선별하여 1.2 ml의 LB 배지가 함유된 96웰 플레이트에서 37℃에서 밤새 성장시켰다. 모든 선별된 콜로니에 대한 냉동 스톡을 만들었다. 플레이트로부터의 플라스미드 DNA를 Wizard SV 미니프렙 키트(Promega)와 함께 Beckman's Biomeck 2000 미니프렙 로보틱을 사용하여 정제하였다. 플라스미드 DNA를 100 ul의 물로 용출하고, 96 웰 플레이트에 보관하였다. 플라스미드를 EcoR1으로 분해하고, 1% 아가로스 겔을 사용하여 분석하여, DNA 양과 삽입체의 크기를 확인하였다. 400 내지 600 bp 삽입체를 함유하는 플라스미드를 CEQ 2000 서열분석기(캘리포니아주 플러톤 소재의 Beckman)를 사용하여 서열분석하였다. 서열을 BALST 서치를 사용하여 GenBank 데이터베이스와 맞추어보았다. P-450 관련 단편을 동정하여, 추가로 분석하였다.

실시예 5: cDNA 라이브러리 작제

에틸렌 처리된 잎으로부터 다음과 같이 전체 RNA를 준비함으로써 cDNA 라이브러리를 작제하였다. 먼저, 변형된 페놀 산 및 클로로포름 추출 프로토콜을 사용하여 담배 라인 58-33의 에틸렌 처리된 잎으로부터 전체 RNA를 추출하였다. 분쇄된 다음 5 ml의 추출 완충액(100 mM Tris-HCl, pH 8.5; 200 mM NaCl; 10 mM EDTA; 0.5% SDS)에서 와동처리된 1 g의 조직을 사용하기 위하여 5 ml의 페놀(pH 5.5)과 5 ml의 클로로포름이 첨가되도록 프로토콜을 변형시켰다. 추출된 샘플을 원심분리하고, 상층액을 남겨 두었다. 이 추출 단계는 상층액이 투명해질 때까지 2-3회 더 반복했다. 대략 5 ml의 클로로프롬을 첨가하여 미량의 페놀을 제거했다. ETOH의 3배 용적과 3M NaOAc(pH 5.2)의 1/10 용적을 첨가하고, 1시간 동안 -20℃에서 보관하여, 혼합된 상층액 분획으로부터 RNA를 침전시켰다. Corex 유리 용기에 전달한 다음에, 45분간 4℃에서 9,000 RPM으로 원심분리하였다. 펠릿은 70% 에탄올로 세척하고, 4℃에서 9,000 RPM으로 5분간 회전시켰다. 펠릿을 건조시킨 다음에, 펠릿화된 RNA를 0.5 ml의 RNase가 없는 물에 용해시켰다. 펠릿화된 RNA를 0.5 ml의 RNase가 없는 물에 용해시켰다. 전체 RNA의 질과 양은 각각 변성 포름알데히드 겔 및 분광광도계로 분석하였다.

생성된 전체 RNA를 올리고(dT) 셀룰로스 프로토콜(Invitrogen) 및 Microcentrifuge 스핀 컬럼(Invitrogen)을 사용하여 프로토콜에 따라 폴리 A+ RNA에 대해 분리하였다. 전체 RNA 중 대략 20 mg을 2회 정제하여 질높은 폴리 A + RNA를 수득하였다. 폴리 A + RNA 산물을 변성 포름알데히드 겔과, 이에 이은 공지 길 이 유전자의 RT-PCR을 수행하여 분석함으로써, mRNA의 질을 높였다. 뿐만 아니라, 에틸렌 처리된 비컨버터 잎, 0시간째의 에틸렌 처리된 컨버터 잎 및 에틸렌 처리된 컨버터 잎으로부터, 탐침으로서 전체 길이 P450을 사용하여 폴리 A+RNA에 대해 노던 분석을 수행하였다. 이 방법은 각 샘플에 대해 폴리A+RNA 1.8 ug을 사용하여 제조업자의 지시사항(메릴랜드 게티스버그 소재의 KPL RNADetector 노던 블롯팅 키트)에 의해 제공된 프로토콜을 기초로 하였다. 전달(transfer) 완충액으로서 20X SSC를 사용하여, RNA 함유 겔을 밤새 전달했다.

다음에는, cDNA 합성 키트, ZAP-cDNA 합성 키트, 및 ZAP-cDNA Gigapack III 골드 클로닝 키트(캘리포니아 라졸라 소재의 Stratagene)를 사용하여 cDNA 라이브러리를 만드는데 폴리 A+ RNA를 주형으로서 사용하였다. 이 방법은 명시된 제조업자의 프로토콜에 따르는 것이 포함된다. 대략 8 ug의 폴리 A+ RNA를 cDNA 라이브러리를 작제하는 데 사용하였다. 1차 라이브러리 분석 결과는 약 2.5 x 10^{6} 내지 1 x 10^{7} pfu인 것으로 드러났다. 라이브러리의 질을 시험하기 위한 배경 시험은 IPTG 및 X-gal을 사용한 보완 분석에 의해 완성되었는데, 여기에서는 재조합 플라크가 배경 반응보다 100배 더 많이 발현하였다.

랜덤 PCR에 의한 라이브러리의 심화된 정량 분석은 삽입체 cDNA의 평균 크기가 대략 1.2 kb임을 보여주었다. 2단계 PCR 방법에 사용된 방법은 다음과 같다. 1단계에서는, P450 단편에서 얻어진 예비 서열 정보에 기초하여 역방향 프라이머를 고안하였다. 고안된 역방향 프라이머 및 T3(순방향) 프라이머를 cDNA 라이브러리로 부터 해당 유전자를 증폭시키는 데 사용하였다. PCR 반응물을 아가로스 전기영동하고, 고분자에 해당하는 밴드를 잘라내어 정제, 클로닝 및 서열분석했다. 2단계에서는, 5'UTR로부터, 또는 P450의 출발 암호화 영역으로부터 순방향 프라이머로서 고안된 신규 프라이머를 역방향 프라이머(P450의 3'UTR로부터 고안된 것)와 함께, 이어지는 PCR에서 사용하여 전체 길이 P450 클론을 수득하였다.

역방향 프라이머를 제외하고 실시예 3에 기술된 바와 같이 하여 작제된 cDNA 라이브러리로부터 PCR 증폭함으로써, P450 단편을 제조하였다. cDNA 삽입체의 플라스미드 하류에 위치한 T7 프라이머(도 75 참조)를 역방향 프라이머로서 사용하였다. PCR 단편을 실시예 4에 기술된 바와 같이 분리, 정제 및 서열분석하였다.

본 발명의 실시에 있어 다양한 변형 및 변화는 전술한 발명의 상세한 설명을 고려하면, 당업자에게 일어날 수 있는 것으로 예상된다. 결론적으로, 이러한 변형 및 변화는 청구의 범위내에 속하는 것으로 생각된다.

실시예 6: 클로닝된 단편의 특징분석 - 역 써던 블롯팅 분석

비방사선 대규모 역 써던 블롯팅 분석을 상기 실시예에서 동정된 모든 P450에 대해 수행하여, 차등 발현을 검출하였다. 상이한 P450 클러스터 간의 발현 수준은 매우 상이하다는 것이 관찰되었다. 추가로, 고발현 되는 것에 대해 실시간 검출을 수행하였다.

비방사선 써던 블롯팅 절차를 다음과 같이 수행하였다.

1) 실시예 2에 설명된 바와 같이 Qiagen Rnaeasy 키트를 사용하여 에틸렌 처리된 컨버터(58 내지 33) 및 비컨버터(58 내지 25)로부터 전체 RNA를 추출하였다.

2) 탐침은, 상기 1)단계에서 생성된 폴리 A 풍부 RNA에서 유래한 단일 가닥 cDNA의 테일에 바이오틴으로 표지하여 만들었다. 프라이머로서 바이오틴화 올리고 dT(Promega)를 사용한 것을 제외하고는 실시예 3에 기술된 바와 같이 컨버터 및 비컨버터 전체 RNA를 RT-PCR 함으로써(Invitrogen), 이 표지된 단일 가닥 cDNA를 만들었다. 프라이머로서의 바이오틴화 올리고 dT는 클로닝된 DNA와 하이브리드화 하기 위한 탐침으로서 사용되었다.

3) 플라스미드 DNA를 EcoR1 제한 효소로 분해하고, 아가로스 겔에 걸었다. 겔은 건조되는 동시에 두 장의 나일론 막(Biodyne B)에 전달되었다. 한 장의 막은 컨버터 탐침과 하이브리드시키고, 다른 한 장의 막은 비컨버터 탐침과 하이브리드화시켰다. 막들을 하이브리드화하기 전에 UV-가교결합시켰다(자동 가교결합 세팅, 254 nm, Stratagene, Stratalinker).

대안적으로는, 프라이머로서 p-GEM 플라스미드의 양쪽 끝에 위치한 서열인 T3 및 SP6를 사용하여 각 플라스미드로부터 삽입체를 PCR 증폭시켰다. PCR 산물을 96웰 레디-투-런(ready-to-run) 아가로스 겔에 걸어 분석하였다. 확인된 삽입체는 두 장의 나일론 막에 점으로 나타났다. 한 장의 막은 컨버터 탐침과 하이브리드화시키고, 다른 한 장은 비컨버터 탐침과 하이브리드화시켰다.

4) 막은, 세척 정도를 달리한 제조업자의 지시사항(세척의 엄중도(stringency)를 변형시켰다)(뉴욕주 파밍데일 소재의 Enzo Diagnostics, Inc.)에 따라 막을 하이브리드화하고 세척하였다. 막은 하이브리드화 완충액(계면활성제 및 하이브리드화 향상제를 함유하는 2 x SSC 완충 포름아미드)으로 42℃에서 30분간 예비하이브리드화시키고 42℃에서 밤새 10 ul 변성된 탐침과 하이브리드화시켰다. 이어서 막을 1 x 하이브리드화 세척 완충액으로 실온에서 10분간 1회 세척한 다음에, 68℃에서 15분간 4회 세척하였다. 이제 막은 검출 단계에 들어가면 된다.

5) 제조업자의 검출 방법(Enzo Diagnostics, Inc.)에 기술된 바와 같이, 알칼라인 포스파타아제 표지하고, NBT/BCIP 색상 검출함으로써 세척된 막을 검사하였다. 막을 1 x 차단 용액으로 실온에서 1시간 동안 차단시키고, 1 x 검출 시약으로 10분간 3회 세척한 다음에, 1 x 예비현상 반응 완충액으로 5분간 2회 세척한 다음에, 점이 나타날 때까지 30 내지 45분간 현상 용액으로 점을 현상하였다. 모든 시약은 제조업자(Enzo Diagnostics, Inc.)가 제공한 것이었다.

일부 경우에는, P450 단편에 특이적인 프라이머를 사용하여 단일 단계 RT-PCR(캘리포니아주 칼스바드 소재의 Gibco kit)을 비컨버터(58 내지 25) 및 컨버터(58 내지 33)로부터의 전체 RNA에 대해 수행하였다. 비교 RT-PCR을 다음과 같이 수행하였다.

1) 실시예 2에 기술된 바와 같이, 에틸렌 처리된 컨버터(58-33) 및 비컨버터(58-25) 식물 잎으로부터 전체 RNA를 추출하였다.

2) 실시예 2에 기술된 바와 같이, Qiagen 키트를 사용하여 전체 RNA로부터 폴리(A) RNA를 추출하였다.

3) 제조업자의 방법(Invitrogen)에 따라 클로닝된 P450에 특이적인 프라이머를 사용하여 단일 단계 RT-PCR을 수행하였다. 반응 혼합물에 폴리 A 풍부 RNA를 25 ul의 2X 반응 혼합물, 1 ul의 10 uM 센스 프라이머, 1 ul의 10 uM 안티센스 프라이 머, 1 ul의 RT/플래티넘 taq 혼합물, 및 최대 50 ul의 물과 함께 첨가하였다. 반응 조건은 20분간 50℃ 다음에 2분간 94℃였고, 그 이후 30초간 94℃, 30초간 55℃, 1분간 70℃의 주기로 40회 PCR 실시하고, 10분 더 72℃에서 연장시켰다. 증폭된 샘플 10 ul를 1% 아가로스 겔을 사용하여 전기영동으로 분석하였다.

실시예 7: 클로닝된 단편의 특징분석 - 노던 블롯 분석

써던 블롯 분석 대신에, 노던 블롯팅 분석의 예에서 기술된 바와 같이 일부 막을 하이브리드화하여 검사했다. 노던 하이브리드화는 니코티아나에서 차등 발현된 mRNA를 검출하는 데 사용되었으며, 다음과 같다.

1단계-탐침제조: 무작위 프라이밍 방법을 사용하여 클로닝된 p450 DNA 단편으로부터 탐침을 제조하였다(랜덤 프라이머 DNA 바이오틴화 키트, KPL). 0.5 ug DNA 주형(5 내지 10분간 수조에서 가열한 뒤 사용하기 전에 얼음 위에서 냉각시킨 것); 1X 랜덤 프라이머 용액; 1X dNTP 혼합물; Klenow 10 유닛을 혼합하고 물을 첨가하여 반응물을 50 ul가 되게 하였다. 혼합물을 37℃에서 1 내지 4시간 동안 배양했다. 200 mM EDTA 2 ul를 사용하여 반응을 중단시켰다. 사용하기 전에 탐침을 5분간 95℃에서 배양하여 변성시켰다.

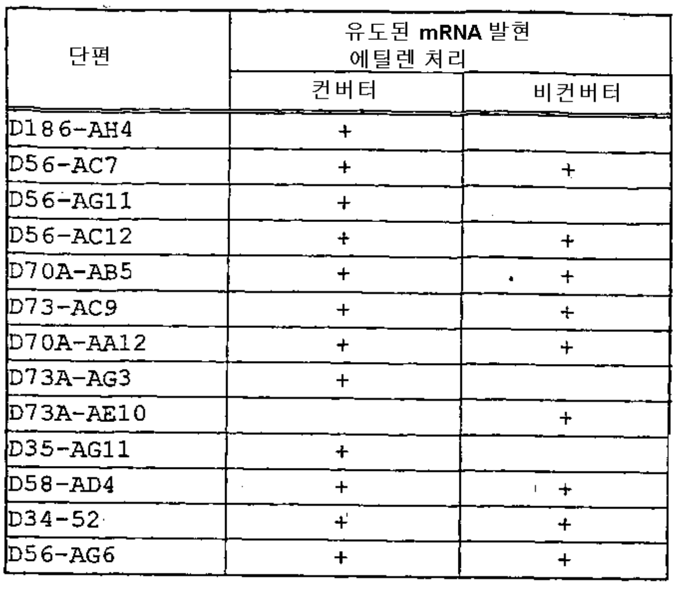
2단계-샘플 준비: 에틸렌 처리 및 에틸렌 비처리 싱싱한 잎, 시든 잎으로부터 RNA 샘플을 준비했다. 일부 경우에는 폴리 A 풍부 RNA를 사용하였다. 대략 15 ug의 전체 RNA 또는 1.8 ug의 mRNA(RNA 및 mRNA 추출법은 실시예 5에 설명되어 있다)를 DEPC H_2O(5-10 ul)를 사용하여 동일한 용적이 되게 하였다. 동일한 용적의 로딩 완충액(1 x MOPS; 18.5% 포름알데히드; 50% 포름알데히드; 4% Ficol1400; 브 로모페놀 블루) 및 0.5 ul EtBr(0.5 ug/ul)을 첨가하였다. 샘플을 5분간 90℃에서 가열한 뒤 얼음 위에서 냉각시켰다.

3단계-전기영동에 의한 RNA 분리: 1xMOP 완충액(0.4 M 모폴리노프로판설폰산; 0.1 M Na-아세테이트-3 x H_2O; 10 mM EDTA; NaOH로 pH를 7.2로 조정)으로, 포름알데히드 겔(1% 아가로스, 1 x MOPS, 0.6 M 포름알데히드) 상에서 샘플을 전기영동하였다. RNA를 10 X SSC 완충액(1.5 M NaCl; 0.15M Na-시트레이트)에서 24시간 동안 Hybond-N+막(나일론, Amersham Pharmacia Biotech)에 모세관 방법으로 전달하였다. RNA 샘플이 붙어 있는 막을 UV-가교결합(자동 가교결합 장치, 254 nm, Stratagene, Stratalinker)처리한 뒤 하이브리드화시켰다.

4단계-하이브리드화: 막을 1-4시간 동안 42℃에서 5-10 ml의 예비하이브리드화 완충액(5 x SSC; 50% 포름아미드; 5 x Denhardt 용액; 1% SDS; 100 ug/ml 열 변성 절단된 비상동성 DNA)으로 예비하이브리드화하였다. 이미 사용한 예비하이브리드화 완충액은 버리고, 사용하지 않은 예비하이브리드화 완충액과 탐침을 첨가했다. 하이브리드화는 42℃에서 밤새 수행하였다. 막을 실온에서 2 x SSC로 15분간 세척한 다음에, 2 x SSC, 0.1% SDS로 65℃에서 2회 세척하고, 0.1 x SSC로 마지막으로 세척하거나, 0.1 x SDS로 65℃에서 더 세척하기도 하였다(임의적).

5단계-검출: 하이브리드화 시그널을 검출하는데는 AT-스트렙타비딘 및 CDP-Star를 사용하였다(KPL의 DNA 디텍터 노던 블롯팅 키트). 실온에서 30분간 1x 디텍터 차단액으로 막을 차단했다. 차단 완충액을 버리고, 막을 1시간 동안 실온에서 1:10,000의 AT-SA가 함유된 새 1X 디텍터 차단액에서 배양했다. 막을 1X 포스파타 아제 세척액으로 3회 세척한 다음, 1X 포스파타아제 분석 완충액으로 2회 세척했다. CDP-Star 화학발광 기질을 사용하여 시그널을 검출했다. 젖은 막을 saran ™ 랩 아래에서 엑스선 필름에 노출시켰다. 결과를 분석하고 기록하였다.

본 발명의 주요내용은 에틸렌 처리의 결과로서 유도될 수 있거나, 담배 잎의 품질 및 성분에서 중요한 역할을 하는 신규 유전자의 발견이다. 아래 표에서도 보이는 바와 같이, 에틸렌 처리에 의해 유도되지 않은 식물에 비해, 에틸렌 처리에 의해 유도된 유전자를 검사하는 데에는 노던 블롯이 유용하다. 흥미롭게도, 모든 단편이 컨버터 및 비컨버터에서 유사하게 영향을 받은 것은 아니었다. 해당 사이토크롬 P450 단편을 부분적으로 서열분석하여, 이들의 구조적 관련성을 조사했다. 이 정보는 이후에 전체 길이 유전자 클론을 분리하고 서열분석하는 데 사용하였다. 전체 식물에서 유전자 단편으로 하향 조절 방법을 활용하여 기능적 분석을 수행하였다.



단편	유도된 mRNA 발현 에틸렌 처리	
	컨버터	비컨버터
D186-AH4	+	
D56-AC7	+	+
D56-AG11	+	
D56-AC12	+	+
D70A-AB5	+	+
D73-AC9	+	+
D70A-AA12	+	+
D73A-AG3	+	
D73A-AE10		+
D35-AG11	+	
D58-AD4	+	+
D34-52	+	+
D56-AG6	+	+

실시예 8: 분리된 핵산 단편의 핵산 동일성 및 구조적 관련성

100개가 넘는 클로닝된 P450 단편을 서열분석하고 노던 블롯 분석함으로써 이들의 구조적 관련성을 검토하였다. 사용된 접근법은 P450 유전자의 카르복실 말단 근처에 위치한 두개의 공통적인 P450 모티프 중 하나에 기초한 순방향 프라이머를 활용하였다. 순방향 프라이머는 도 1에 표시된 바와 같이 사이토크롬 P450 모티프 FXPERF 또는 GRRXCP(A/G)에 상응한다. 역방향 프라이머는 pGEM 플라스미드의 양쪽 끝에 위치한 SP6 또는 T7로부터의, 또는 폴리 A 테일로부터의 표준 프라이머를 사용하였다. 사용된 프로토콜은 다음과 같다.

출발 두가닥 DNA의 농도를 측정하기 위하여 제조업자의 프로토콜(Beckman Coulter)에 따라 분광광도계를 사용하였다. 주형을 물을 사용하여 적절한 농도로 희석시키고, 2분간 95℃에서 가열함으로써 변성시킨 다음, 얼음 위에 두었다. 서열분석 반응은 0.5 내지 10 ul의 변성된 DNA 주형, 2 ul의 1.6 pmol 순방향 프라이 머, 8 ul의 DTCS Quick Start Master Mix와, 나머지는 총 용적이 20 ul가 될 때까지 물을 사용하여 얼음 위에서 준비하였다. 열순환 프로그램은 30회의 다음과 같은 주기로 구성된다: 20초간 96℃, 20초간 50℃, 4분간 60℃ 다음에, 4℃ 유지.

중단 완충액(동일 용적의 3M NaOAc 및 100 mM EDTA 그리고, 1 ul의 20 mg/ml 글리코겐)을 5 ul 첨가하여 절차를 중단시켰다. 60 ul의 차가운 95% 에탄올로 샘플을 침전시키고, 6분간 6000 g로 원심분리했다. 에탄올을 버렸다. 펠릿을 200 ul의 차가운 70% 에탄올로 2회 세척했다. 펠릿을 건조시킨 다음에, 40 ul의 SLS 용액을 첨가하여 펠릿을 재현탁시켰다. 미네랄 오일 층이 생겼다. 이어서 샘플을 CEQ 8000 자동 서열분석기에 넣어 추가로 분석하였다.

핵산 서열을 검증하기 위하여, 핵산 서열을 P450 유전자의 FXPERF 또는 GRRXCP(A/G) 영역에 대한 순방향 프라이머나, 플라스미드 또는 폴리 A 테일에 대한 역방향 프라이머를 사용하여 양방향으로 재서열분석하였다. 모든 서열분석은 양방향으로 적어도 2회 실시하였다.

사이토크롬 P450 단편의 핵산 서열을 GRRXCP(A/G) 모티프를 암호화하는 영역 다음의 첫 핵산에 상응하는 암호화 영역에서부터 정지코돈까지 상호 비교하였다. 이 영역은 P450 단백질 중 유전적 다양성의 지표로 선택된 것이다. 다른 식물 종과 마찬가지로 다양한 수의 유전적으로 상이한 P450 유전자(70개가 넘는다)가 관찰되었다. 핵산 서열을 비교해보았더니, 서열 동일성에 근거한 구별되는 서열군으로 유전자를 분류할 수 있다는 사실이 발견되었다. 그 중 가장 독특한 P450 구성원의 분류는 75% 이상의 핵산 동일성(표 1에 보여진 것과 같음)을 갖는 서열의 군임이 발 견되었다. 동일성 정도를 낮출수록 상당히 더 큰 군이 생성되었다. 바람직한 분류는 81% 이상의 핵산 동일성, 더욱 바람직하게는 91% 이상의 핵산 동일성, 가장 바람직하게는 99% 이상의 핵산 동일성을 갖는 서열의 군으로 관찰되었다. 대부분의 군에는 적어도 2개의 구성원과, 보통은 3개 이상의 구성원이 포함되었다. 다른 공통적인 점은 발견되지 않았는데, 이것은 이 접근법으로, 사용된 조직에서 저발현 및 고발현되는 mRNA 모두를 분리할 수 있었음을 암시한다.

75% 이상의 핵산 동일성에 기초하면, 두개의 사이토크롬 P450군은 군 내에서 유전적으로 상이한, 이전의 담배 사이토크롬 유전자와 핵산 서열 동일성을 갖는 것으로 발견되었다. 표 1에 사용된 항목 중에서 제23군은 각각 Czernic et al. 및 Ralston et al에 의한 GenBank 서열인 GI:1171579(CAA64635) 및 GI:14423327(또는 AAK62346)과 핵산 동일성을 나타내었다. GI:1171579는 제23군의 구성원에 대해 96.9 내지 99.5% 범위의 서열 동일성을 나타낸 반면에, GI:14423327은 이 군에 대해 95.4 내지 96.9% 범위의 서열 동일성을 나타내었다. 제31군의 구성원은 Ralston et al이 GenBank에 발표한 서열인 GI:14423319(AAK62342)에 대해 76.7% 내지 97.8% 범위의 서열 동일성을 보였다. 표 1의 나머지 P450 동일성 군은 Ralston et al., Czernic et al., Wang et al 또는 LaRosa 및 Smigocki가 발표한 니코티아나 P450 유전자에 대해 표 1에 사용된 바와 같은 동일성을 보이지 않았다.

도 76에 제시된 바와 같이, 니코티아나 식물의 각 군의 추가적인 구성원을 바람직하게 동정하고 분리하기 위해서, 적절한 핵산 축퇴성 탐침을 사용하여 컨센서스 서열을 군에서 도출해낼 수 있었다.

표 1: 니코티아나 P450 핵산 서열 동일성 군

군	단편
1	D58-BG7 (SEQ ID No.:1), D58-AB1 (SEQ ID No.:3); D58-BE4 (SEQ ID No.:7)
2	D56-AH7 (SEQ ID No.:9); D13a-5 (SEQ ID No.:11)
3	D56-AG10 (SEQ ID No.:13); D35-33 (SEQ ID No.:15); D34-62) (SEQ ID No.:17)
4	D56-AA7 (SEQ ID No.:19); D56-AE1 (SEQ ID No.:21); 185-BD3 (SEQ ID No.:143)
5	D35-BB7 (SEQ ID No.:23); D177-BA7 (SEQ ID No.:25) D56A-AB6 (SEQ ID No.:27); D144-AE2 (SEQ ID No.:29)
6	D56-AG11 (SEQ ID No.:31); D179-AA1 (SEQ ID No.:33)
7	D56-AC7 (SEQ ID No.:35); D144-AD1 (SEQ ID No.:37)
8	D144-AB5 (SEQ ID No.:39)
9	D181-AB5 (SEQ ID No.:41); D73-Ac9 (SEQ ID No.:43)
10	D56-AC12 (SEQ ID No.:45)
11	D58-AB9 (SEQ ID No.:47); D56-AG9 (SEQ ID No.:49); D56-AG6 (SEQ ID No.:51); D35-BG11 (SEQ ID No.:53); D35-42 (SEQ ID No.:55); D35-BA3 (SEQ ID No.:57); D34-57 (SEQ ID No.:59); D34-52 (SEQ ID No.:61); D34-25 (SEQ ID No.:63)
12	D56-AD10 (SEQ ID No.:65)
13	56-AA11 (SEQ ID No.:67)
14	D177-BD5 (SEQ ID No.:69); D177-BD7 (SEQ ID No.:83)
15	D56A-AG10 (SEQ ID No.:71); D58-BC5 (SEQ ID No.:73); D58-AD12 (SEQ ID No.:75)
16	D56-AC11 (SEQ ID No.:77); D35-39 (SEQ ID No.:79); D58-BH4 (SEQ ID No.:81); D56-AD6 (SEQ ID No.:87)

17	D73A-AD6 (SEQ ID No.:89); D70A-BA11 (SEQ ID No.:91); D70A-BB5 (SEQ ID No.:93)
18	D70A-AB5 (SEQ ID No.:95); D70A-AA8 (SEQ ID No.:97)
19	D70A-AB8 (SEQ ID No.:99); D70A-BH2 (SEQ ID No.:101); D70A-AA4 (SEQ ID No.:103)
20	D70A-BA1 (SEQ ID No.:105); D70A-BA9 (SEQ ID No.:107); D176-BG2 (SEQ ID No.:141)
21	D70A-BD4 (SEQ ID No.:109)
22	D181-AC5 (SEQ ID No.:111); D144-AH1 (SEQ ID No.:113); D34-65 (SEQ ID No.:115)
23	D35-BG2 (SEQ ID No.:117)
24	D73A-AH7 (SEQ ID No.:119)
25	D58-AA1 (SEQ ID No.:121); D185-BC1 (SEQ ID No.:133); D185-BG2 (SEQ ID No.:135)
26	D73-AE10 (SEQ ID No.:123)
27	D56-AC12 (SEQ ID No.:125)
28	D177-BF7 (SEQ ID No.:127); D185-BE1 (SEQ ID No.:137); 185-BD2 (SEQ ID No.:139)
29	D73A-AG3 (SEQ ID No.:129)
30	D70A-AA12 (SEQ ID No.:131); D176-BF2 (SEQ ID No.:85)
31	D176-BC3 (SEQ ID No.:145)
32	D176-BB3 (SEQ ID No.: 147)
33	D186-AH4 (SEQ ID No.:5)

실시예 9: 분리된 핵산 단편의 관련 아미노산 서열 동일성

실시예 8의 사이토크롬 P450 단편에 대해 수득된 핵산 서열의 아미노산 서열을 유추하였다. 유추된 영역은 GXRXCP (A/G) 서열 모티프 바로 다음의 아미노산에서부터 카르복실 말단, 또는 정지 코돈 까지의 아미노산 서열에 상응한다. 단편의 서열 동일성을 비교해본 결과, 70% 이상의 아미노산 동일성을 갖는 서열에 대한 독특 한 군이 관찰되었다. 80 % 이상의 아미노산 동일성, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 아미노산 동일성, 가장 바람직하게는 99% 이상의 아미노산 동일성을 갖는 서열에 대한 바람직한 군이 관찰되었다. 군 및 군의 구성원의 해당하는 아미노산 서열은 도 2에 제시되어 있다. 독특한 핵산 서열중 몇몇은 다른 단편과 완전한 아미노산 동일성을 갖는 것으로 발견되었고, 이에 따라 동일한 아미노산을 가진 단 하나의 구성원만이 보고되었다.

표 2의 제19군에 대한 아미노산 동일성은 핵산 서열에 근거하면 서로 다른 3개의 군에 상응한다. 각 군 구성원의 아미노산 서열 및 이의 동일성은 도 77에 제시되어 있다. 아미노산 차이는 적절히 표시하였다.

각 아미노산 동일성군의 적어도 하나의 구성원을 식물을 이용한 유전자 클로닝 및 기능적 연구를 위해 선택하였다. 뿐만 아니라, 에틸렌 처리에 의해 상이하게 영향받거나 노던 및 써던 분석에 의해 평가 하였을 때 생물학적 차이를 보이는 구성원을 유전자 클로닝 및 기능적 연구를 위해 선택하였다. 유전자 클로닝, 발현 연구 및 전체 식물 평가를 보조하기 위하여 동일 및 상이한 서열에 대한 펩타이드 특이적 항체를 제조할 것이다.

표 2: 니코티아나 P450 아미노산 서열 동일성 군

군	단편
1	D58-BG7 (SEQ ID No.:2), D58-AB1 (SEQ ID No.:4)
2	D58-BE4 (SEQ ID No.:8)
3	D56-AH7 (SEQ ID No.:10); D13a-5 (SEQ ID No.:12)
4	D56-AG10 (SEQ ID No.:14); D34-6 (SEQ ID No.:18)
5	D56-AA7 (SEQ ID No.:20); D56-AE1 (SEQ ID No.:22); 185-BD3 (SEQ ID No.:144)
6	D35-BB7 (SEQ ID No.:24); D177-BA7 (SEQ ID No.:26); D56A-AB6 (SEQ ID No.:28); D144-AE2 (SEQ ID No.:30)
7	D56-AG11 (SEQ ID No.:32); D179-AA1 (SEQ ID No.:34)
8	D56-AC7 (SEQ ID No.:36); D144-AD1 (SEQ ID No.:38)
9	D144-AB5 (SEQ ID No.:40)
10	D181-AB5 (SEQ ID No.:42); D73-Ac9 (SEQ ID No.:44)
11	D56-AC12 (SEQ ID No.:46)
12	D58-AB9 (SEQ ID No.:48); D56-AG9 (SEQ ID No.:50); D56-AG6 (SEQ ID No.:52); D35-BG11 (SEQ ID No.:54); D35-42 (SEQ ID No.:56); D35-BA3 (SEQ ID No.:58); D34-57 (SEQ ID No.:60); D34-52 (SEQ ID No.:62)
13	D56AD10 (SEQ ID No.:66)
14	56-AA11 (SEQ ID No.:68)
15	D177-BD5 (SEQ ID No.:70); D177-BD7 (SEQ ID No.:84)
16	D56A-AG10 (SEQ ID No.:72); D58-BC5 (SEQ ID No.:74); D58-AD12 (SEQ ID No.:76)
17	D56-AC11 (SEQ ID No.:78); D56-AD6 (SEQ ID No.:88)
18	D73A-AD6 (SEQ ID No.90:); D70A-BB5 (SEQ ID No.:94)
19	D70A-AB5 (SEQ ID No.:96); D70A-AB8 (SEQ ID No.:100); D70A-BH2 (SEQ ID No.:102); D70A-AA4 (SEQ ID No.:104); D70A-BA1 (SEQ ID No.:106); D70A-BA9 (SEQ ID No.:108); D176-BG2 (SEQ ID No.:142)
20	D70A-BD4 (SEQ ID No.:110)
21	D181-AC5 (SEQ ID No.:112); D144-AH1 (SEQ ID No.:114); D34-65 (SEQ ID No.:116)
22	D35-BG2 (SEQ ID No.:118)

23	D73A-AH7 (SEQ ID No.:120)
24	D58-AA1 (SEQ ID No.:122); D185-BC1 (SEQ ID No.:134); D185-BG2 (SEQ ID No.:136)
25	D73-AE10 (SEQ ID No.:124)
26	D56-AC12 (SEQ ID No.:126)
27	D177-BF7 (SEQ ID No.:128); 185-BD2 (SEQ ID No.:140)
28	D73A-AG3 (SEQ ID No.:130)
29	D70A-AA12 (SEQ ID No.:132); D176-BF2 (SEQ ID No.:86)
30	D176-BC3 (SEQ ID No.:146)
31	D176-BB3 (SEQ ID No.:148)
32	D186-AH4 (SEQ ID No.:6)

실시예 10: 전체 길이 cDNA P450 클론의 클로닝

에틸렌 처리된 잎으로부터 다음과 같이 전체 RNA를 준비함으로써 cDNA 라이브러리를 작제하였다. 먼저, 변형된 페놀 산 및 클로로포름 추출 프로토콜을 사용하여 에틸렌 처리된 잎으로부터 전체 RNA를 추출하였다. 분쇄된 다음 5 ml의 추출 완충액(100 mM Tris-HCl, pH 8.5; 200 mM NaCl; 10 mM EDTA; 0.5% SDS)에서 와동처리된 1 g의 조직을 사용하기 위하여 5 ml의 페놀(pH 5.5)과 5 ml의 클로로포름이 첨가되도록 프로토콜을 변형시켰다. 추출된 샘플을 원심분리하고, 상층액을 남겨 두었다. 이 추출 단계는 상층액이 투명해질 때까지 2-3회 더 반복했다. 대략 5 ml의 클로로프롬을 첨가하여 미량의 페놀을 제거했다. ETOH의 3배 용적과 3M NaOAc(pH 5.2)의 1/10 용적을 첨가하고, 1시간 동안 -20℃에서 보관하여, 혼합된 상층액 분획으로부터 RNA를 침전시켰다. Corex 유리용기에 전달한 다음에, 45분간 4℃에서 9,000 RPM으로 원심분리하였다. 펠릿은 70% 에탄올로 세척하고, 4℃에서 9,000 RPM으로 5분간 회전시켰다. 펠릿을 건조시킨 다음에, 펠릿화된 RNA를 0.5 ml의 RNase가 없는 물에 용해시켰다. 펠릿화된 RNA를 0.5 ml의 RNase가 없는 물에 용해시켰다. 전체 RNA의 질과 양은 각각 변성 포름알데히드 겔 및 분광광도계로 분석하였다.

생성된 전체 RNA를 올리고(dT) 셀룰로스 프로토콜(Invitrogen) 및 Microcentrifuge 스핀 컬럼(Invitrogen)을 사용하여 프로토콜에 따라 폴리 A+ RNA에 대해 분리하였다. 전체 RNA 중 대략 20 mg을 2회 정제하여 질높은 폴리 A + RNA를 수득하였다. 폴리 A + RNA 산물을 변성 포름알데히드 겔과, 이에 이은 공지 길이 유전자의 RT-PCR을 수행하여 분석함으로써, mRNA의 질을 높였다. 뿐만 아니라, 에틸렌 처리된 비컨버터 잎, 0시간째의 에틸렌 처리된 컨버터 잎 및 에틸렌 처리된 컨버터 잎으로부터, 탐침으로서 전체 길이 P450을 사용하여 폴리 A+RNA에 대해 노던 분석을 수행하였다. 이 방법은 각 샘플에 대해 폴리A+RNA 1.8 ug을 사용하여 제조업자의 지시사항(메릴랜드 게티스버그 소재의 KPL RNADetector 노던 블롯팅 키트)에 의해 제공된 프로토콜을 기초로 하였다. 전달(transfer) 완충액으로서 20X SSC를 사용하여, RNA 함유 겔을 밤새 전달했다.

다음에는, cDNA 합성 키트, ZAP-cDNA 합성 키트, 및 ZAP-cDNA Gigapack III 골드 클로닝 키트(캘리포니아 라졸라 소재의 Stratagene)를 사용하여 cDNA 라이브러리를 만드는데 폴리 A+ RNA를 주형으로서 사용하였다. 이 방법은 명시된 제조업자의 프로토콜에 따르는 것이 포함된다. 대략 8 ug의 폴리 A+ RNA를 cDNA 라이브러리를 작제하는 데 사용하였다. 1차 라이브러리 분석 결과는 약 2.5 x 106 내지 1 x 107 pfu인 것으로 드러났다. 라이브러리의 질을 시험하기 위한 배경 시험은 IPTG 및 X-gal을 사용한 보완 분석에 의해 완성되었는데, 여기에서는 재조합 플라크가 배경 반응보다 100배 더 많이 발현하였다.

랜덤 PCR에 의한 라이브러리의 심화된 정량 분석은 삽입체 cDNA의 평균 크기가 대략 1.2 kb임을 보여주었다. 2단계 PCR 방법에 사용된 방법은 다음과 같다. 1단계에서는, P450 단편에서 얻어진 예비 서열 정보에 기초하여 역방향 프라이머를 고안하였다. 고안된 역방향 프라이머 및 T3(순방향) 프라이머를 cDNA 라이브러리로부터 해당 유전자를 증폭시키는 데 사용하였다. PCR 반응물을 아가로스 전기영동하고, 고분자에 해당하는 밴드를 잘라내어 정제, 클로닝 및 서열분석했다. 2단계에서는, 5'UTR로부터, 또는 P450의 출발 암호화 영역으로부터 순방향 프라이머로서 고안된 신규 프라이머를 역방향 프라이머(P450의 3'UTR로부터 고안된 것)와 함께, 이어지는 PCR에서 사용하여 전체 길이 P450 클론을 수득하였다.

전체 길이 p450 유전자를 작제된 cDNA 라이브러리에서 PCR 방법으로 분리하였다. 전체 길이 유전자를 클로닝하기 위하여 2단계 PCR이 사용되었다. 1단계 PCR에서, 비특이적 역방향 프라이머(T3) 및 특이적 순방향 프라이머(P450

의 하류 서열로부터 만든 것)를 cDNA 라이브러리로부터 P450의 5'말단을 클로닝하기 위해 사용하였다. PCR 단편을 분리, 클로닝 및 서열분석하여, 다음 단계 PCR에서의 순방향 프라이머를 디자인하였다. 두개의 특이적 프라이머를 2단계 PCR에서 전체 길이 p450 클론을 클로닝하는 데 사용하였다. 그 다음에 클론을 서열분석하였다.

본 발명의 실시에 있어 다양한 변형 및 변화는 전술한 본 발명의 상세한 설 명을 고려하면, 당업자에게 일어날 수 있는 것으로 예상된다. 결론적으로, 이러한 변형 및 변화는 청구의 범위내에 속하는 것으로 생각된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147 또는 149로 이루어지는 군에서 선택되는 핵산 서열을 포함하는 것이 특징인 분리된 핵산 분자.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 상기 핵산 분자는 사이토크롬 P450 유전자의 단편을 포함하는 것이 특징인 분리된 핵산 분자.

청구항 3.

제 1 항의 핵산 분자와 적어도 75%의 동일성을 갖는, 분리된 핵산 분자.

청구항 4.

제 1 항의 핵산 분자와 적어도 91%의 동일성을 갖는, 분리된 핵산 분자.

청구항 5.

제 1 항의 핵산 분자와 적어도 99%의 동일성을 갖는, 분리된 핵산 분자.

청구항 6.

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 핵산 분자를 포함하는 트랜스제닉 식물.

청구항 7.

제 6 항에 있어서, 상기 식물이 담배 식물인 것이 특징인 트랜스제닉 식물.

청구항 8.

(i) 제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 핵산 분자를 당해 식물에서 기능성인 프로모터에 기능적으로 연결하여 식물 형질전환 벡터를 만드는 단계;

(ii) 단계 (i)의 식물 형질전환 벡터로 상기 식물을 형질전환하는 단계;

(iii) 상기 형질전환 벡터로 형질전환된 식물 세포를 선별하는 단계;

(iv) 단계 (iii)의 식물 세포로부터 식물을 재생시키는 단계를 포함하는, 트랜스제닉 식물의 제조방법.

청구항 9.

제 8 항에 있어서, 핵산 분자가 안티센스 방향의 것인 트랜스제닉 식물의 제조방법.

청구항 10.

제 8 항에 있어서, 핵산 분자가 센스 방향의 것인 트랜스제닉 식물의 제조방법.

청구항 11.

제 8 항에 있어서, 핵산은 RNA 간섭 방향의 것인 트랜스제닉 식물의 제조방법.

청구항 12.

제 11 항에 있어서, 핵산 분자가 이중가닥 RNA 분자로서 발현되는 것이 특징 인 트랜스제닉 식물의 제조방법.

청구항 13.

제 11 항에 있어서, 이중가닥 RNA 분자가 약 15 내지 25 뉴클레오타이드 길이인 것이 특징인 트랜스제닉 식물의 제조방법.

청구항 14.

제 8 항에 있어서, 식물이 담배 식물인 것이 특징인 트랜스제닉 식물의 제조방법.

청구항 15.

서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145 또는 147로 이루어지는 군에서 선택되는 핵산 서열의 존재에 대해 식물을 분석하는 것이 특징인, 핵산 분자를 함유하는 식물의 선별 방법.

청구항 16.

제 15 항에 있어서, 식물을 DNA 하이브리드화에 의해 분석하는 것이 특징인 식물의 선별 방법.

청구항 17.

제 15 항에 있어서, 식물을 PCR 검출에 의해 분석하는 것이 특징인 식물의 선별 방법.

청구항 18.

제 16 항에 있어서, DNA 하이브리드화가 서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145 또는 147로 이루어지는 군에서 선택된 핵산 탐침을 포함하는 것이 특징인 식물의 선별 방법.

청구항 19.

제 15 항에 있어서, 식물이 트랜스제닉 식물인 것이 특징인 식물의 선별 방법.

청구항 20.

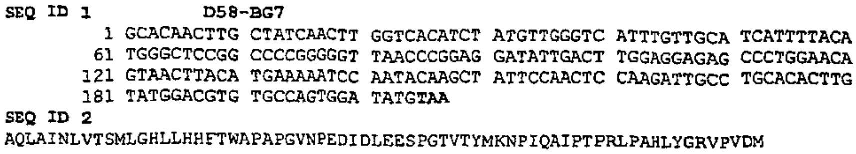
제 15 항에 있어서, 식물이 돌연변이유발 집단으로부터 선택되는 것이 특징인 식물의 선별 방법.

청구항 21.

제 15 항에 있어서, 식물이 재배 집단으로부터 선택되는 것이 특징인 식물의 선별 방법.

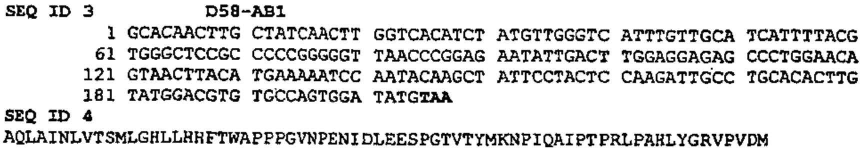
도면

도면1



```
SEQ ID 1            D58-BG7
         1 GCACAACTTG CTATCAACTT GGTCACATCT ATGTTGGGTC ATTTGTTGCA TCATTTTACA
        61 TGGGCTCCGG CCCCGGGGGT TAACCCGGAG GATATTGACT TGGAGGAGAG CCCTGGAACA
       121 GTAACTTACA TGAAAAATCC AATACAAGCT ATTCCAACTC CAAGATTGCC TGCACACTTG
       181 TATGGACGTG TGCCAGTGGA TATGTAA
SEQ ID 2
AQLAINLVTSMLGHLLHHFTWAPAPGVNPEDIDLEESPGTVTYMKNPIQAIPTPRLPAHLYGRVPVDM
```

도면2



```
SEQ ID 3            D58-AB1
         1 GCACAACTTG CTATCAACTT GGTCACATCT ATGTTGGGTC ATTTGTTGCA TCATTTTACG
        61 TGGGCTCCGC CCCCGGGGGT TAACCCGGAG AATATTGACT TGGAGGAGAG CCCTGGAACA
       121 GTAACTTACA TGAAAAATCC AATACAAGCT ATTCCTACTC CAAGATTGCC TGCACACTTG
       181 TATGGACGTG TGCCAGTGGA TATGTAA
SEQ ID 4
AQLAINLVTSMLGHLLHHFTWAPPPGVNPENIDLEESPGTVTYMKNPIQAIPTPRLPAHLYGRVPVDM
```

도면3

```
SEQ ID 5            D186-AH4
          1 ATGAATTATT CATTGCAAGT GGAACACCTT TCAATTGCTC ATATGATCCA AGGTTTCAGT
         61 TTTGCAACTA CGACCAATGA GCCTTTGGAT ATGAAACAAG GTGTGGGTTT AACTTTACCA
        121 AAGAAGACTG ATGTTGAAGT GCTAATTACA CCTCGCCTTC CTCCTACGCT TTATCAATAT
        181 TAA
SEQ ID 6
MNYSLQVEHLSIAHMIQGFSFATTTNEPLDMKQGVGLTLPKKTDVEVLITPRLPPTLYQY
```

도면4

```
SEQ ID 7            D58-BE4
          1 GCACAACTTG CTATCAACTT GGTCACATCT ATGTTGGGTC ATTTGTTCAT CATTTTACAT
         61 GGGCTCCGGC CCCGGGGGTT AACCCGGAGG ATATTGACTT GGAGGAGAGC CCTGGAACAG
        121 TAACTTACAT GA
SEQ ID 8
AQLAINLVTSMLGHLFIILHGLRPRGLTRRILTWRRALEQ
```

도면5

```
SEQ ID 9            D56-AH7
          1 GAAGGATTGG CTGTTCGAAT GGTTGCCTTG TCATTGGGAT GTATTATTCA ATGTTTTGAT
         61 TGGCAACGAA TCGGCGAAGA ATTGGTTGAT ATGACTGAAG GAACTGGACT TACTTTGCCT
        121 AAAGCTCAAC CTTTGGTGGC CAAGTGTAGC CCACGACCTA AAATGGCTAA TCTTCTCTCT
        181 CAGATTTGA
SEQ ID 10
EGLAVRMVALSLGCIIQCFDWQRIGEELVDMTEGTGLTLPKAQPLVAKCSPRPKMANLLSQI
```

도면6

```
SEQ ID 11           D13a-5
          1 GAAGGATTGG CTATTCGAAT GGTTGCATTG TCATTGGGAT GTATTATTCA ATGCTTTGAT
         61 TGGCAACGAC TTGGGGAAGG ATTGGTTGAT AAGACTGAAG GAACTGGACT TACTTTGCCT
        121 AAAGCTCAAC CTTTAGTGGC CAAGTGTAGC CCACGACCTA TAATGGCTAA TCTTCTTTCT
        181 CAGATTTGA
SEQ ID 12
EGLAIRMVALSLGCIIQCFDWQRLGEGLVDKTEGTGLTLPKAQPLVAKCSPRPIMANLLSQI
```

도면7

```
SEQ ID 13           D56-AG10
          1 ATAGGTTTTG CGACTTTAGT GACACATCTG ACTTTTGGTC GCTTGCTTCA AGGTTTTGAT
         61 TTTAGTAAGC CATCAAACAC GCCAATTGAC ATGACAGAAG GCGTAGGCGT TACTTTGCCT
        121 AAGGTTAATC AAGTTGAAGT TCTAATTACC CCTCGTTTAC CTTCTAAGCT TTATTTATTT
        181 TGA
SEQ ID 14
IGFATLVTHLTFGRLLQGFDFSKPSNTPIDMTEGVGVTLPKVNQVEVLITPRLPSKLYLF
```

도면8

```
SEQ ID 15           D35-33
          1 ATAGGCTTTG CGACTTTAGT GACACATCTG ACTTTTGGTC GCTTGCTTCA AGGTTTTGAT
         61 TTTAGTAAGC CATCAAACAC GCCAATTGAC ATGACAGAAG GCGTAGGCGT TACTTTGCCT
        121 AAGGTTAATC AAGTTGAAGT TCTAATTACC CCTCGTTTAC CTTCTAAGCT TTATTTAT
SEQ ID 16
IGFATLVTHLTFGRLLQGFDFSKPSNTPIDMTEGVGVTLPKVNQVEVLITPRLPSKLYL
```

도면9

```
SEQ ID 17           D34-62
          1 ATAAATTTTG CGACTTTAGT GACACATCTG ACTTTTGGTC GCTTGCTTCA AGGTTTTGAT
         61 TTTAGTACGC CATCAAACAC GCCAATAGAC ATGACAGAAG GCGTAGGCGT TACTTTGCCT
        121 AAGGTAAATC AAGTGGAAGT TCTAATTAGC CCTCGTTTAC CTTCTAAGCT TTATGTATTC
        181 TGA
SEQ ID 18
INFATLVTHLTFGRLLQGFDFSTPSNTPIDMTEGVGVTLPKVNQVEVLISPRLPSKLYVF
```

도면10

```
SEQ ID 19           D56AA7
          1 ATTATACTTG CATTGCCAAT TCTTGGCATC ACTTTGGGAC GTTTGGTTCA GAACTTTGAG
         61 CTGTTGCCTC CTCCAGGCCA GTCGAAGCTC GACACCACAG AGAAAGGTGG ACAGTTCAGT
        121 CTCCACATTT TGAAGCATTC CACCATTGTG TTGAAACCAA GGTCTTTCTG A
SEQ ID 20
IILALPILGITLGRLVQNFELLPPPGQSKLDTTEKGGQFSLHILKHSTIVLKPRSF
```

도면11

```
SEQ ID 21           D56-AE1
          1 ATTATACTTG CATTGCCAAT TCTTGGCATT ACTTTGGGAC GTTTGGTTCA GAACTTTGAG
         61 CTGTTGCCTC CTCCAGGCCA GTCGAAGCTC GACACCACAG AGAAAGGTGG ACAGTTCAGT
        121 CTCCATATTT TGAAGCATTC CACCATTGTG TTGAAACCAA GGTCTTGCTG A
SEQ ID 22
IILALPILGITLGRLVQNFELLPPPGQSKLDTTEKGGQFSLHILKHSTIVLKPRSC
```

도면12

```
SEQ ID 23           D35-BB7
      1 ATTGCACTTG GGGTTGCATC AATGGAACTT GCATTGTCAA ATCTTCTTTA TGCATTTGAT
     61 TGGGAGTTAC CTTTTGGAAT GAAAAAAGAA GACATTGACA CAAACGCCAG GCCTGGAATT
    121 ACCATGCATA AGAAAAACGA ACTTTATCTT ATCCCTAAAA ATTATCTATA G
SEQ ID 24
IALGVASMELALSNLLYAFDWELPFGMKKEDIDTNARPGITMHKKNELYLIPKNYL[PSKLYLF]
```

도면13

```
SEQ ID 25           D177-BA7
      1 ATTGCACTTG GGGTTGCATC CATGGAACTT GCTTTGTCAA ATCTTCTTTA TGCATTTGAT
    121 TGGGAGTTAC CTTACGGAGT GAAAAAAGAA AACATTGACA CAAATGTCAG GCCTGGAATT
    181 ACCATGCATA AGAAAAACGA ACTTTGCCTT ATCCCTAGAA ATTATCTATA G
SEQ ID 26
IALGVASMELALSNLLYAFDWELPYGVKKENIDTNVRPGITMHKKNELCLIPRNYL
```

도면14

```
SEQ ID 27           D56A-AB6
      1 ATTGCACTTG GGGTTGCATC CATGGAACTT GCTTTGTCAA ATCTTCTTTA TGCATTTGAT
     61 TGGGAGTTGC CTTATGGAGT GAAAAAAGAA GACATCGACA CAAACGTTAG GCCTGGAATT
    121 GCCATGCACA AGAAAAACGA ACTTTGCCTT GTCCCAAAAA ATTATTTATA A
SEQ ID 28
IALGVASMELALSNLLYAFDWELPYGVKKEDIDTNVRPGIAMHKKNELCLVPKNYL
```

도면15

```
SEQ ID 29           D144-AE2
      1 ATTGCACTTG GGGTTGCATC CATGGAACTT GCTTTGTCAA ATCTTCTTTA TGCATTTGAT
     61 TGGGAGTTGC CTTATGGAGT GAAAAAAGAA GACATCGACA CAAACGTTAG GCCTGGAATT
    121 GCCATGCACA AGAAAAACGA ACTTTGCCTT GTCCCAAAAA AATTATTTAT AAATTATATT
    181 GGGACGTGGA TCTCATGCTA G
SEQ ID 30
IALGVASMELALSNLLYAFDWELPYGVKKEDIDTNVRPGIAMHKKNELCLVPKKLFINYIGTWISC
```

도면16

```
SEQ ID 31           D56-AG11
      1 ATTTCGTTTG GTTTAGCTAA TGCTTATTTG CCATTGGCTC AATTACTTTA TCACTTTGAT
     61 TGGGAACTCC CCACTGGAAT CAAACCAAGC GACTTGGACT TGACTGAGTT GGTTGGAGTA
    121 ACTGCCGCTA GAAAAAGTGA CCTTTACTTG GTTGCGACTC CTTATCAACC TCCTCAAAAC
    181 TGA
SEQ ID 32
ISFGLANAYLPLAQLLYHFDWELPTGIKPSDLDLTELVGVTAARKSDLYLVATPYQPPQN
```

도면17

```
SEQ ID 33           D179-AA1
      1 ATTTCGTTTG GCTTAGCTAA TGCTTATTTG CCATTGGCTC AATTACTATA TCACTTCGAT
     61 TGGAAACTCC CTGCTGGAAT CGAACCAAGC GACTTGGACT TGACTGAGTT GGTTGGAGTA
    121 ACTGCCGCTA GAAAAAGTGA CCTTTACTTG GTTGCGACTC CTTATCAACC TCCTCAAAAG
    181 TGA
SEQ ID 34
ISFGLANAYLPLAQLLYHFDWKLPAGIEPSDLDLTELVGVTAARKSDLYLVATPYQPPQK
```

도면18

```
SEQ ID 35           D56-AC7
      1 ATGCTATTTG GTTTAGCTAA TGTTGGACAA CCTTTAGCTC AGTTACTTTA TCACTTCGAT
     61 TGGAAACTCC CTAATGGACA AAGTCATGAG AATTTCGACA TGACTGAGTC ACCTGGAATT
    121 TCTGCTACAA GAAAGGATGA TCTTGTTTTG ATTGCCACTC CTTATGATTC TTATTAA
SEQ ID 36
MLFGLANVGQPLAQLLYHFDWKLPNGQSHENFDMTESPGISATRKDDLVLIATPYDSY
```

도면19

```
SEQ ID 37           D144-AD1
      1 ATGCTATTTG GTTTAGCTAA TGTTGGACAA CCTTTAGCTC AGTTACTTTA TCACTTCGAT
     61 TGGAAACTCC CTAATGGACA AACTCACCAA AATTTCGACA TGACTGAGTC ACCTGGAATT
    121 TCTGCTACAA GAAAGGATGA TCTTATTTTG ATTGCCACTC CTGCTCATTC TTGA
SEQ ID 38
MLFGLANVGQPLAQLLYHFDWKLPNGQTHQNFDMTESPGISATRKDDLILIATPAHS
```

도면20

```
SEQ ID 39           D144-AB5
      1 TTATTATTCG GTTTAGTTAA TGTAGGACAT CCTTTAGCTC AATTGCTTTA TCACTTCGAT
     61 TGGAAGACTC TTCCTGGGAT AAGTTCAGAT AGTTTCGACA TGACTGAAAC AGATGGAGTA
    121 ACTGCCGGAA GAAAGGATGA TCTTTGTTTA ATTGCTACTC CTTTTGGTCT CAATTAA
SEQ ID 40
LLFGLVNVGHPLAQLLYHFDWKTLPGISSDSFDMTETDGVTAGRKDDLCLIATPFGLN
```

도면21

```
SEQ ID 41           D181-AB5
        1 ATGTCGTTTG GTTTAGTTAA CACTGGGCAT CCTTTAGCTC AGTTGCTCTA TTTCTTTGAC
       61 TGGAAATTCC CTCATAAGGT TAATGCAGCT GATTTTCACA CTACTGAAAC AAGTAGAGTT
      121 TTTGCAGCAA GCAAAGATGA CCTCTACTTG ATTCCAACAA ATCACATGGA GCAAGAGTAG
SEQ ID 42
MSFGLVNTGHPLAQLLYFFDWKFPHKVNAADFHTTETSRVFAASKDDLYLIPTNHMEQE
```

도면22

```
SEQ ID 43           D73-AC9
        1 ATGTCGTTTG GTTTAGTTAA CACAGGGCAT CCTTTAGCCC AGTTGCTCTA TTGCTTTGAC
      121 TGGAAACTCC CTGACAAGGT TAATGCAAAT GATTTTCGCA CTACTGAAAC AAGTAGAGTT
      181 TTTGCAGCAA GCAAAGATGA CCTCTACTTG ATTCCCACAA ATCACAGGGA GCAAGAATAG
SEQ ID 44
MSFGLVNTGHPLAQLLYCFDWKLPDKVNANDFRTTETSRVFAASKDDLYLIPTNHREQE
```

도면23

```
SEQ ID 45           D56-AC12
        1 ATGCAATTTG GTTTGGCTCT TGTTACTCTG CCATTGGCTC ATTTGCTTCA CAATTTTGAT
       61 TGGAAACTTC CCGAAGGAAT TAATGCAAGG GATTTGGACA TGACAGAGGC AAATGGGATA
      121 TCTGCTAGAA GAGAAAAAGA TCTTTACTTG ATTGCTACTC CTTATGTATC ACCTCTTGAT
      181 TAA
SEQ ID 46
MQFGLALVTLPLAHLLHNFDWKLPEGINARDLDMTEANGISARREKDLYLIATPYVSPLD
```

도면24

```
SEQ ID 47           D58-AB9
        1 ATGACTTATG CATTGCAAGT GGAACACCTA ACAATGGCAC ATTTGATCCA GGGTTTCAAT
       61 TACAGAACTC CAACTGATGA GCCCTTGGAT ATGAAAGAAG GTGCAGGCAT AACTATACGT
      121 AAGGTAAATC CTGTGAAAGT GATAATTACG CCTCGCTTGG CACCTGAGCT TTATTAA
SEQ ID 48
MTYALQVEHLTMAHLIQGFNYRTPTDEPLDMKEGAGITIRKVNPVKVIITPRLAPELY
```

도면25

```
SEQ ID 49           D56-AG9
        1 ATGACTTATG CATTGCAAGT GGAACACCTA ACAATGGCAC ATTTAATCCA GGGTTTCAAT
       61 TACAAAACTC CAAATGACGA GGCCTTGGAT ATGAAGGAAG GTGCAGGCAT AACTATACGT
      121 AAGGTAAATC CTGTGGAACT GATAATAGCG CCTCGCCTGG CACCTGAGCT TTATTAA
SEQ ID 50
MTYALQVEHLTMAHLIQGFNYKTPNDEALDMKEGAGITIRKVNPVELIIAPRLAPELY
```

도면26

```
SEQ ID 51           D56-AG6
        1 ATGACTTATG CATTGCAAGT GGAACACCTA ACAATGGCAC ATTTAATCCA GGGTTTCAAT
       61 TACAAAACTC CAAATGACGA GGCCTTGGAT ATGAAGGAAG GTGCAGGCAT AACAATACGT
      121 AAGGTAAATC CAGTGGAATT GATAATAACG CCTCGCTTGG CACCTGAGCT TTACTAA
SEQ ID 52
MTYALQVEHLTMAHLIQGFNYKTPNDEALDMKEGAGITIRKVNPVELIITPRLAPELY
```

도면27

```
SEQ ID 53           D35-BG11
        1 ATGACTTATG CATTGCAAGT GGAACACTTA ACAATGGCAC ATTTGATCCA AGGTTTCAAT
       61 TACAGAACTC CAAATGACGA GCCCTTGGAT ATGAAGGAAG GTGCAGGCAT AACTATACGT
      121 AAGGTAAATC CTGTGGAACT GATAATAGCG CCTCGCCTGG CACCTGAGCT TTATTAA
SEQ ID 54
MTYALOVEHLTMAHLIQGFNYRTPNDEPLDMKEGAGITIRKVNPVELIIAPRLAPELY
```

도면28

```
SEQ ID 55           D35-42
        1 ATGACTTATG CATTGCAAGT GGAACACTTA ACAATGGCAC ATTTGATCCA AGGTTTCAAT
       61 TACAGAACTC CAAATGACGA GCCCTTGGAT ATGAAGGAAG GTGCAGGCAT AACTATACGT
      121 AAGGTAAATC CTGTGGAACT GATAATAGCG CCCCTGGCAC CTGAGCTTTA TTAA
SEQ ID 56
MTYALQVEHLTMAHLIQGFNYRTPNDEPLDMKEGAGITIRKVNPVELIIAPLAPELY
```

도면29

```
SEQ ID 57           D35-BA3
        1 ATGACTTATG CATTGCAAGT GGAACACTTA ACAATGGCAC ATTTGATCCA AGGTTTCAAT
       61 TACAGAACTC CAAATGACGA GCCCTTGGAT ATGAAGGAAG GTGCAGGCAT AACTATACGT
      121 AAGGTAAATC CTGCGGAACT GATAATAGCG CCTCGCCTGG CACCTGAGCT TTATTAA
SEQ ID 58
MTYALQVEHLTMAHLIQGFNYRTPNDEPLDMKEGAGITIRKVNPAELIIAPRLAPELY
```

도면30

```
SEQ ID 59          D34-57
           1 ATGACTTATG CATTACAAGT GGAACACCTA ACAATAGCAC ATTTGATCCA GGGTTTCAAT
          61 TACAAAACTC CAAATGACGA GCCCTTGGAT ATGAAGGAAG GTGCAGGATT AACCATACGT
         121 AAAGTAAATC CTGTAGAAGT GACAACTACG GCTCGCCTGG CACCTGAGCT TTATTAA
SEQ ID 60
MTYALQVEHLTIAHLIQGFNYKTPNDEPLDMKEGAGLTIRKVNPVEVTTTARLAPELY
```

도면31

```
SEQ ID 61          D34-52
           1 ATGACTTATG CATTACAAGT GGAACACCTA ACAATAGCAC ATTTGATCCA GGGTTTCAAT
          61 TACAAAACTC CAAATGACGA GCCCTTGGAT ATGAAGGAAG GTGCAGGATT AACTATACGT
         121 AAAGTAAATC CTGTAGAAGT GACAATTACG GCTCGCCTGG CACCTGAGCT TTATTAA
SEQ ID 62
MTYALQVEHLTIAHLIQGFNYKTPNDEPLDMKEGAGLTIRKVNPVEVTITARLAPELY
```

도면32

```
SEQ ID 63          D34-25
           1 ATGACTTATG CATTACAAGT GGAACACCTA ACAATAGCAC ATTTGATCCA GGGTTTCAAT
          61 TACAAAACTC CAAATGACGA GCCCCTGGAT ATGAAGGAAG GTGCAGGATT AACTATACGT
         121 AAAGTAAATC CTGTAGAAGT GACAATTACG GCTCGCCTGG CACCTGAGCT TTATTAA
SEQ ID 64
MTYALQVEHLTIAHLIQGFNYKTPNDEPLDMKEGAGLTIRKVNPVEVTITARLAPELY
```

도면33

```
SEQ ID 65          D56AD10
           1 TATAGCCTTG GACTTAAGGT TATCCGAGTA ACATTAGCCA ACATGTTGCA TGGATTCAAC
          61 TGGAAATTAC CTGAAGGTAT GAAGCCAGAA GATATAAGTG TGGAAGAACA TTATGGGCTC
         121 ACTACACATC CTAAGTTTCC TGTTCCTGTG ATCTTGGAAT CTAGACTTTC TTCAGATCTC
         181 TATTCCCCCA TCACTTAA
SEQ ID 66
YSLGLKVIRVTLANMLHGFNWKLPEGMKPEDISVEEHYGLTTHPKFPVPVILESRLSSDLYSPIT
```

도면34

```
SEQ ID 67          D56-AA11
           1 TACAGTCTTG GGATTCGTAT AATTAGGGCA ACTTTAGCTA ACTTGTTGCA TGGATTCAAC
          61 TGGAGATTGC CTAATGGTAT GAGTCCAGAA GACATTAGCA TGGAAGAGAT TTATGGGCTA
         121 ATTACACACC CCAAAGTCGC ACTTGACGTG ATGATGGAGC CTCGACTTCC CAACCATCTT
         181 TACAAATAG

SEQ ID 68
YSLGIRIIRATLANLLHGFNWRLPNGMSPEDISMEEIYGLITHPKVALDVMMEPRLPNHLYK
```

도면35

```
SEQ ID 69          D177-BD5
           1 ATTAATTTTT CAATACCACT TGTTGAGCTT GCACTTGCTA ATCTATTGTT TCATTATAAT
         121 TGGTCACTTC CTGAAGGGAT GCTAGCTAAG GATGTTGATA TGGAAGAAGC TTTGGGGATT
         181 ACCATGCACA AGAAATCTCC CCTTTGCTTA GTAGCTTCTC ATTATACTTG TTGA
SEQ ID 70
INFSIPLVELALANLLFHYNWSLPEGMLAKDVDMEEALGITMHKKSPLCLVASHYTC
```

도면36

```
SEQ ID 71          D56A-AG10
           1 ATGCAACTTG GGCTTTATGC ATTGGAAATG GCTGTGGCCC ATCTTCTTCA TTGTTTTACT
          61 TGGGAATTGC CAGATGGTAT GAAACCAAGT GAGCTTAAAA TGGATGATAT TTTTGGACTC
         121 ACTGCTCCAA AAGCTAATCG ACTCGTGGCT GTGCCTACTC CACGTTTGTT GTGTCCCCTT
         181 TATTAA
SEQ ID 72
MQLGLYALEMAVAHLLHCFTWELPDGMKPSELKMDDIFGLTAPKANRLVAVPTPRLLCPLY
```

도면37

```
SEQ ID 73       58-BC5
           1 ATGCAACTTG GGCTTTATGC ATTAGAAATG GCAGTGGCCC ATCTTCTTCT TTGCTTTACT
          61 TGGGAATTGC CAGATGGTAT GAAACCAAGT GAGCTTAAAA TGGATGATAT TTTTGGACTC
         121 ACTGCTCCAA GAGCTAATCG ACTCGTGGCT GTGCCTAGTC CACGTTTGTT GTGCCCACTT
         181 TATTAA
SEQ ID 74
MQLGLYALEMAVAHLLLCFTWELPDGMKPSELKMDDIFGLTAPRANRLVAVPSPRLLCPLY
```

도면38

```
SEQ ID 75            D58-AD12
          1 ATGCAACTTG GGCTTTATGC ATTGGAAATG GCTGTGGCCC ATCTTCTTCA TTGTTTTACT
         61 TGGGAATTGC CAGATGGTAT GAAACCAAGT GAGCTTAAAA TGGATGATAT TTTTGGACTC
        121 ACTGCTCCAA GAGCTAATCG ACTCGTGGCT GTGCCTACTC CACGTTTGTT GTGTCCCCTT
        181 TATTAA
SEQ ID 76
MQLGLYALEMAVAHLLHCFTWELPDGMKPSELKMDDIFGLTAPRANRLVAVPTPRLLCPLY
```

도면39

```
SEQ ID 77            D56-AC11
          1 ATGCTTTGGA GTGCGAGTAT AGTGCGCGTC AGCTACCTAA CTTGTATTTA TAGATTCCAA
         61 GTATATGCTG GGTCTGTGTT CAGAGTAGCA TGA
SEQ ID 78
MLWSASIVRVSYLTCIYRFQVYAGSVFRVA
```

도면40

```
SEQ ID 79            D35-39
          1 ATGCTTTGGA GTGCGAGTAT AGTGCGCGTC AGCTACCTAA CTTGTATTTA TAGATTCCAA
         61 GTATATGCTG GGTCTGTGTT CAGAGTAGCA TGA
SEQ ID 80
MLWSASIVRVSYLTCIYRFQVYAGSVFRVA
```

도면41

```
SEQ ID 81            D58-BH4
          1 ATGCTTTGGA GTGCGAGTAT AGTGCGCGTC AGCTACCTAA CCTGTATTTA TAGATTCCAA
         61 GTATATGCTG GGTCTGTGTT CAGAGTAGCA TGA
SEQ ID 82
MLWSASIVRVSYLTCIYRFQVYAGSVFRVA
```

도면42

```
SEQ ID 83            D177-BD7
          1 ATTAATTTTT CAATACCACT TGTTGAGCTT GCACTTGCTA ATCTATTGTT TCATTATAAT
         61 TGGTCACTTC CTGAGGGGAT GCTACCTAAG GATGTTGATA TGGAAGAAGC TTTGGGGATT
        121 ACCATGCACA AGAAATCTCC CCTTTGCTTA GTAGCTTCTC ATTATAACTT GTTGTGA
SEQ ID 84
INFSIPLVELALANLLFHYNWSLPEGMLPKDVDMEEALGITMHKKSPLCLVASHYNLL
```

도면43

```
SEQ ID 85            D176-BF2
          1 ATATCATTTG GTTTGGCTAA TGTTTATTTG CCACTAGCTC AATTGTTATA TCATTTTGAT
        121 TGGAAACTCC CTACTGGAAT CAATTCAAGT GACTTGGACA TGACTGAGTC GTCAGGAGTA
        181 ACTTGTGCTA GAAAGAGTGA TTTATACTTG ACTGCTACTC CATATCAACT TTCTCAAGAG
        241 TG A
SEQ ID 86
ISFGLANVYLPLAQLLYHFDWKLPTGINSSDLDMTESSGVTCARKSDLYLTATPYQLSQE
```

도면44

```
SEQ ID 87            D56-AD6
          1 ATGCTTTGGA GTGCGAGTAT AGTGCGCGTC AGCTACCTAA CTTGTATTTA TAGATTCCAA
         61 GTATATGCTG GGTCTGTGTC CAGAGTAGCA TGA
SEQ ID 88
MLWSASIVRVSYLTCIYRFQVYAGSVSRVA
```

도면45

```
SEQ ID 89            D73A-AD6
          1 CTGAATTTTG CAATGTTAGA GGCAAAAATG GCACTTGCAT TGATTCTACA ACACTATGCT
         61 TTTGAGCTCT CTCCATCTTA TGCACATGCT CCTCATACAA TTATCACTCT GCAACCTCAA
        121 CATGGTGCTC CTTTGATTTT GCGCAAGCTG TAG
SEQ ID 90
LNFAMLEAKMALALILQHYAFELSPSYAHAPHTIITLQPQHGAPLILRKL
```

도면46

```
SEQ ID 91            D70A-BA11
          1 CTGAATTTTG CAATGTTAGA GGCAAAAATG GCACTTGCAT TGATTCTACA ACACTATGCT
        121 TTTGAGCTCT CTCCATCTTA TGCACACGCT CCTCATACAA TTATCACTCT GCAACCTCAA
        181 CATGGTGCTC CTTTGATTTT GCGCAAGCTG TAG
SEQ ID 92
LNFAMLEAKMALALILQHYAFELSPSYAHAPHTIITLQPQHGAPLILRKL
```

도면47

```
SEQ ID 93          D70A-BB5
          1 AA TAATTTTGCA ATGTTGGAAA CTAAGATTGC CTTAGCAATG
        121 ATCCTACAGC GTTTTGCTTT CGAGCTTTCT CCATCTTACG CTCATGCACC TACTTATGTC
        181 GTCACTCTTC GACCTCAGTG TGGTGCTCAC TTAATCTTGC AAAAATTATA GGTCCTTAAT
        241 CTGGATTTCC CATTATTGAG TAGTGCCTAA TAAATCTTCT CTATCACTAT TTTTCCATCT
        301 TTCA
SEQ ID 94
NNFAMLETKIALAMILQRFAFELSPSYAHAPTYVVTLRPQCGAHLILQKL
```

도면48

```
SEQ ID 95          D70A-AB5
          1 CAAAACTTCG CGATTTTGGA AGCAAAAATG GCTATAGCTA TGATTCTACA ACGCTTCTCC
         61 TTCGAGCTCT CCCCATCTTA TACACACTCT CCATACACTG TGGTCACTTT GAAACCCAAA
        121 TATGGTGCTC CCCTAATAAT GCACAGGCTG TAG
SEQ ID 96
QNFAILEAKMAIAMILQRFSFELSPSYTHSPYTVVTLKPKYGAPLIMHRL
```

도면49

```
SEQ ID 97          D70A-AA8
          1 CAAAACTTCG CGATTTTGGA AGCAAAAATG GCTATAGCTA TGATTCTACA ACGCTTCTCC
         61 TTCGAGCTCT CTCCATCTTA TACACACTCT CCATACACTG TGGTCACTTT GAAACCCAAA
        121 TATGGTGCTC CCCTAATAAT GCACAGGCTG TAG
SEQ ID 98
QNFAILEAKMAIAMILQRFSFELSPSYTHSPYTVVTLKPKYGAPLIMHRL
```

도면50

```
SEQ ID 99          D70A-AB8
          1 CAAAATTTTG CCATGTTAGA AGCAAAGATG GCTCTGTCTA TGATCCTGCA ACGCTTCTCT
         61 TTTGAACTGT CTCCGTCTTA TGCACATGCC CCTCAGTCCA TATTAACCGT TCAGCCACAA
        121 TATGGTGCTC CACTTATTTT CCACAAGCTA TAA
SEQ ID 100
QNFAMLEAKMALSMILQRFSFELSPSYAHAPQSILTVQPQYGAPLIFHKL
```

도면51

```
SEQ ID 101         D70A-BH2
          1 ATAAACTTTG CAATGACAGA AGCGAAGATG GCTATGGCTA TGATTCTGCA ACGCTTCTCC
         61 TTTGAGCTAT CTCCATCTTA CACACATGCT CCACAGTCTG TAATAACTAT GCAACCCCAA
        121 TATGGTGCTC CTCTTATATT GCACAAATTG TAA
SEQ ID 102
INFAMTEAKMAMAMILQRFSFELSPSYTHAPQSVITMQPQYGAPLILHKL
```

도면52

```
SEQ ID 103         D70A-AA4
          1 ATAAACTTTG CAATGGCAGA AGCGAAGATG GCTATGGCTA TGATTCTGCA ACGCTTCTCC
         61 TTTGAGCTAT CTCCATCTTA CACACATGCT CCACAGTCTG TAATAACTAT GCAACCCCAA
        121 TATGGTGCTC CTCTTATATT GCACAAATTG TAA
SEQ ID 104
INFAMAEAKMAMAMILQRFSFELSPSYTHAPQSVITMQPQYGAPLILHKL
```

도면53

```
SEQ ID 105         D70A-BA1
          1 CAAAACTTTG CAATGATGGA AGCAAAAATG GCAGTAGCTA TGATACTACA AAAATTTTCC
         61 TTTGAACTAT CCCCTTCTTA TACACATGCT CCATTTGCAA TTGTGACTAT TCATCCTCAG
        121 TATGGTGCTC CTCTGCTTAT GCGCAGACTT TAA
SEQ ID 106
QNFAMMEAKMAVAMILQKFSFELSPSYTHAPFAIVTIHPQYGAPLLMRRL
```

도면54

```
SEQ ID 107         D70A-BA9
          1 CAAAACTTTG CAATGATGGA AGCAAAAATG GCAGTAGCTA TGATACTACA TAAATTTTCC
         61 TTTGAACTAT CCCCTTCTTA TACACATGCT CCATTTGCAA TTGTGACTAT TCATCCTCAG
        121 TATGGTGCTC CTCTGCTTAT GCGCAGACTT TAA
SEQ ID 108
QNFAMMEAKMAVAMILHKFSFELSPSYTHAPFAIVTIHPQYGAPLLMRRL
```

도면55

```
SEQ ID 109         D70A-BD4
          1 CAAAATTTTG CTATGTTAGA GGCTAAAATG GCAATGGCTA TGATTCTGAA AACCTATGCA
         61 TTTGAACTCT CTCCATCTTA TGCTCATGCT CCTCATCCAC TACTACTTCA ACCTCAATAT
        121 GGTGCTCAAT TAATTTTGTA CAAGTTGTAG
SEQ ID 110
QNFAMLEAKMAMAMILKTYAFELSPSYAHAPHPLLLQPQYGAQLILYKL
```

도면56

```
SEQ ID 111         D181-AC5
      1 TATAGCATGG GGCTCAAGGC GATTCAAGCT AGCTTAGCTA ATCTTCTACA TGGATTTAAC
     61 TGGTCATTGC CTGATAATAT GACTCCTGAG GACCTCAACA TGGATGAGAT TTTTGGGCTC
    121 TCTACACCTA AAAAATTTCC ACTTGCTACT GTGATTGAGC CAAGACTTTC ACCAAAACTT
    181 TACTCTGTTT GA
SEQ ID 112
YSMGLKAIQASLANLLHGFNWSLPDNMTPEDLNMDEIFGLSTPKKFPLATVIEPRLSPKLYSV
```

도면57

```
SEQ ID 113         D144-AH1
      1 TATAGCTTGG GGCTCAAGGA GATTCAAGCT AGCTTAGCTA ATCTTCTACA TGGATTTAAC
     61 TGGTCATTGC CTGATAATAT GACTCCTGAG GACCTCAACA TGGATGAGAT TTTTGGGCTC
    121 TCTACACCTA AAAAATTTCC ACTTGCTACT GTGATTGAGC CAAGACTTTC ACCAAAACTT
    181 TACTCTGTTT GA
SEQ ID 114
YSLGLKEIQASLANLLHGFNWSLPDNMTPEDLNMDEIFGLSTPKKFPLATVIEPRLSPKLYSV
```

도면58

```
SEQ ID 115         D34-65
      1 CATAGCTTGG GGCTCAAGGT GATTCAAGCT AGCTTAGCTA ATCTTCTACA TGGATTTAAC
     61 TGGTCATTGC CTGATAATAT GACTCCTGAG GACCTCAACA TGGATGAGAT TTTTGGGCTC
    121 TCTACACCTA AAAAATTTCC ACTTGCTACT GTGATTGAGC CAAGACTTTC ACCAAAACTT
    181 TACTCTGTTT GA
SEQ ID 116
HSLGLKVIQASLANLLHGFNWSLPDNMTPEDLNMDEIFGLSTPKKFPLATVIEPRLSPKLYSV
```

도면59

```
SEQ ID 117         D35-BG2
      1 CTGTGCTTTC CATGTTTAAT CTCTAGTTAT ATACTGGCTT TGAATGTGAA TCTGTATCAT
     61 AATTTCTTGC AAATTTCTCC TTCCATTTCT TATTAA
SEQ ID 118
LCFPCLISSYILALNVNLYHNFLQISPSISY
```

도면60

```
SEQ ID 119         D73A-AH7
      1 TCTGGACTTG CTCAATGTGT GGTTGGTTTA GCTTTAGCAA CTCTAGTGCA GTGTTTTGAG
     61 TGGAAAAGGG TAAGCGAAGA GGTGGTTGAT TTGACGGAAG GAAAAGGTCT CACTATGCCA
    121 AAACCCGAGC CACTCATGGC TAGGTGCGAA GCTCGTGACA TTTTTCACAA AGTTCTTTCA
    181 GAAATATCTT AA
SEQ ID 120
SGLAQCVVGLALATLVQCFEWKRVSEEVVDLTEGKGLTMPKPEPLMARCEARDIFHKVLSEIS
```

도면61

```
SEQ ID 121         D58-AA1
      1 TTGGGCTTGG CAACGGTGCA TGTGAATTTG ATGTTGGCCC GAATGATTCA AGAATTTGAA
     61 TGGTCCGCTT ACCCGGAAAA TAGGAAAGTG GATTTTACTG AGAAATTGGA ATTTACTGTG
    121 GTGATGAAAA ATCCTTTAAG AGCTAAGGTC AAGCCAAGAA TGCAAGTGGT GTAA
SEQ ID 122
LGLATVHVNLMLARMIQEFEWSAYPENRKVDFTEKLEFTVVMKNPLRAKVKPRMQVV
```

도면62

```
SEQ ID 123         D73A-AE10
      1 TATGCTTTGG CTATGCTTCA TTTAGAGTAC TTTGTGGCTA ATTTGGTTTG GCATTTTCGA
     61 TGGGAGGCTG TGGAGGGAGA TGATGTTGAT CTTTCAGAAA AGCTAGAATT CACCGTTGTG
    121 ATGAAGAATC CACTTCGAGC TCGTATCTGC CCCAGAGTTA ACTCTATTTG A
SEQ ID 124
YALAMLHLEYFVANLVWHFRWEAVEGDDVDLSEKLEFTVVMKNPLRARICPRVNSI
```

도면63

```
SEQ ID 125         D56A-AC12
      1 CAGCAAGTTG GACTTCTTAG AACAACCATT TTCATCGCCT CATTACTGTC TGAATATAAG
     61 CTGAAACCTC GCTCACACCA GAAACAAGTT GAACTCACCG ATTTAAATCC AGCAAGTTGG
    121 CTTCATTCGA TAAAAGGCGA ACTGTTAGTC GATGCGATTC CTCGAAAGAA GGCGGCATTT
    181 TAA
SEQ ID 126
QQVGLLRTTIFIASLLSEYKLKPRSHQKQVELTDLNPASWLHSIKGELLVDAIPRKKAAF
```

도면64

```
SEQ ID 127         D177-BF7
      1 ATCACATTTG CTAAGTTTGT GAATGAGCTA GCATTGGCAA GATTAATGTT CCATTTTGAT
    121 TTCTCGCTAC CAAAAGGAGT TAAGCATGAG GATTTGGACG TGGAGGAAGC TGCTGGAATT
    181 ACTGTTAGAA GGAAGTTCCC CCTTTTAGCC GTCGCCACTC CATGCTCGTG A
SEQ ID 128
ITFAKFVNELALARLMFHFDFSLPKGVKHEDLDVEEAAGITVRRKFPLLAVATPCS
```

도면65

```
SEQ ID 129          D73A-AG3
          1 CAGAGGTATG CTATAAACCA TTTGATGCTC TTTATTGCGT TGTTCACGGC TCTGATTGAT
        121 TTCAAGAGGC ACAAAACGGA CGGCTGTGAT GATATCGCGT ATATTCCAAC CATTGCTCCA
        181 AAGGATGATT GTAAAGTGTT CCTTTCACAG AGGTGCACTC GATTCCCATC TTTTTCATGA
SEQ ID 130
QRYAINHLMLFIALFTALIDFKRHKTDGCDDIAYIPTIAPKDDCKVFLSQRCTRFPSFS
```

도면66

```
SEQ ID 131          D70A-AA12
          1 ATGTCATTTG GTTTAGCTAA TCTTTACTTA CCATTGGCTC AATTACTCTA TCACTTTGAC
         61 TGGAAACTCC CAACCGGAAT CAAGCCAAGA GACTTGGACT TGACCGAATT ATCGGGAATA
        121 ACTATTGCTA GAAAGGGTGA CCTTTACTTA AATGCTACTC CTTATCAACC TTCTCGAGAG
        181 TAA
SEQ ID 132
MSFGLANLYLPLAQLLYHFDWKLPTGIKPRDLDLTELSGITIARKGDLYLNATPYQPSRE
```

도면67

```
SEQ ID 133          D185-BC1
          1 TTGGGCTTGG CAACGGTGCA TGTGAATTTG ATGTTGGCCC GAACGATTCA AGAATTTGAA
         61 TGGTCCGCTT ACCCGGAAAA TAGGAAAGTG GATTTTACTG AGAAATTGGA ATTTACTGTG
        121 GTGATGAAAA ACCCTTTAAG AGCTAAGGTC AAGCCAAGAA TGCAAGTGGT GTAA
SEQ ID 134
LGLATVHVNLMLARTIQEFEWSAYPENRKVDFTEKLEFTVVMKNPLRAKVKPRMQVV
```

도면68

```
SEQ ID 135          D185-BG2
          1 TTGGGCTTGG CAACGGTGCA TGTGAATTTG ATGTTGGCCC GAATGATTCA AGAATTTGAA
         61 TGGTCCGCTT ACCCGGAAAA TAGGAAAGTG GATTTACTGA GAAATTGGAA TTTACTGTGG
        121 TGA
SEQ ID 136
LGLATVHVNLMLARMIQEFEWSAYPENRKVDLLRNWNLLW
```

도면69

```
SEQ ID 137          D185-BE1
          1 ATCACATTTG CTAAGTTTGT GAATGAGCTA GCATTGGCAA GATTAATGTT CCATTTTGAT
         61 TTCTCGCTAC CAAAAGGAGT TAAGCATGAG GATTTGGACG TGGAGGAAGC TGCTGGAATT
        121 ACTGTTAGGA GGAAGTTCCC CCTTTTAGCC GTCGCCACTC CATGCTCGTG A
SEQ ID 138
ITFAKFVNELALARLMFHFDFSLPKGVKHEDLDVEEAAGITVRRKFPLLAVATPCS
```

도면70

```
SEQ ID 139          D185-BD2
          1 ATCACATTTG CTAAGTTTGT GAATGAGCTA GCATTGGCAA GATTAATGTT CCATTTTGAT
         61 TTCTCGCTAC CAAAAGGAGT TAAGCATGCG GATTTGGACG TGGAGGAAGC TGCTGGAATT
        121 ACTGTTAGAA GGAAGTTCCC CCTTTTAGCC GTCGCCACTC CATGCTCGTG A
SEQ ID 140
ITFAKFVNELALARLMFHFDFSLPKGVKHADLDVEEAAGITVRRKFPLLAVATPCS
```

도면71

```
SEQ ID 141          D176-BG2
          1 CA AAATTTTGCC ATGTTAGAAG CAAAGACTAC TTTGGCTATG
        121 ATCCTACAAC GCTTCTCCTT TGAACTGTCT CCATCTTATG CACATGCTCC TCAGTCCATA
        181 ATAACTTTGC AACCCCAGTA TGGTGCTCCA CTTATTTTGC ATAAAATATA G
SEQ ID 142
QNFAMLEAKTTLAMILQRFSFELSPSYAHAPQSIITLQPQYGAPLILHKI
```

도면72

```
SEQ ID 143          D185-BD3
          1 ATTATCCTTG CACTGCCAAT TCTTGGCATT ACCTTGGGAC GCTTGGTGCA GAACTTTGAG
         61 TTGTTGCCTC CTCCAGGACA GTCAAAGCTT GACACAACAG AGAAAGGCGG GCAATTCAGT
        121 CTGCACATTT TGAAGCATTC CACCATTGTG ATGAAACCAA GATCTTTTTA A
SEQ ID 144
IILALPILGITLGRLVQNFELLPPPGQSKLDTTEKGGQFSLHILKHSTIVMKPRSF
```

도면73

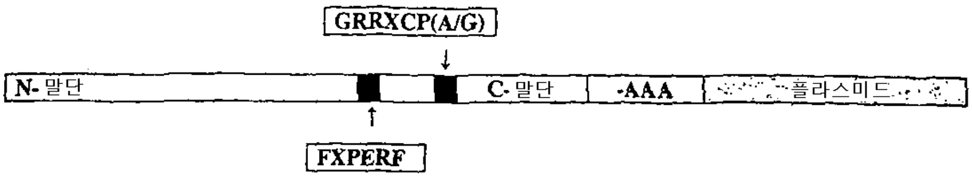
```
SEQ ID 145          D176-BC3
          1 CAAAATTTTG CCATGTTAGA AGCAAAGACT ACTTTGGCTA TGATCCTACA ACGCTTCTCC
         61 TTTGAACTGT CTCCATCTTA TGCACATGCT CCTCAGTCCA TAATAACTTG CAACCCCAGT
        121 ATGGTGCTCC ACTTATTTTG CATAAAATAT AGTTTATTAC TTGTAAGTAG TGTCTCGTTT
        181 TATGTTAAGC ATGAGTCCAA AATGTTAAGG CTTGTAGAAC TGCAAAATGG GAATGCATTT
        241 GCACTCGTGC ACTGTAGATT GTTGTAA
SEQ ID 146
QNFAMLEAKTTLAMILQRFSFELSPSYAHAPQSIITCNPSMVLHLFCIKYSLLLVSSVSFYVKHESKMLRLVELQNGNA
FALVHCRLL
```

도면74

```
SEQ ID 147          D176-BB3
          1 GCTGATATGG GGTTGCGAGC AGTTTCTTTG GCATTAGGTG CACTTATTCA ATGCTTTGAC
         61 TGGCAAATTG AGGAAGCGGA AAGCTTGGAG GAAAGCTATA ATTCTAGAAT GACTATGCAG
        121 AACAAGCCTT TGAAGGTTGT CTGCACTCCA CGCGAAGATC TTGGCCAGCT TCTATCCCAA
        181 CTCTAA
SEQ ID 148
ADMGLRAVSLALGALIQCFDWQIEEAESLEESYNSRMTMQNKPLKVVCTPREDLGQLLSQL
```

도면75

PCR에 의한 사이토크롬 P450 cDNA 단편의 클로닝



DM	FXPERF –for	5'TTYIIICCIGARMGITTY-3'	SEQ. ID. NO. 149
DM4	GRRXCP(A/G)-for	5'-GGIMGIMGIIIITGYCCIGS-3'	SEQ. ID. NO. 150
DM12	FKPERF-for	5'-TTYAARCCTGAGAGATT-3'	SEQ. ID. NO. 151
DM13	PERFL-for	5'-CCAGARAGATTCTTG-3'	SEQ. ID. NO. 152
DM17	GRRMCP-for	5'-GGRMGRMGRATGTGYCC-3'	SEQ. ID. NO. 153
OLIGO d(T)		5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTN-3'	SEQ. ID. NO. 154
T7		5'-ATTATGCTGAGTGATATCCC-3'	SEQ. ID. NO. 155
SP6		5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'	SEQ. ID. NO. 156

I = 데옥시이노신 ; Y = C, T; M = A,C; R = A,G; S = C,G; N= A,T,C,G

도면76a

군의 구성원의 아미노산 동일성

```
제 1군
LAINLVTSMLGHLLHHFTWAPAPGVNPEDIDLEESPGTVTYMKNPIQAIPTPRLPAHLYGRVPVDM    SEQ ID No.:2 D58-BG7
                            |                                                       (98.5)
LAINLVTSMLGHLLHHFTWAPPPGVNPENIDLEESPGTVTYMKNPIQAIPTPRLPAHLYGRVPVDM    SEQ ID No.:4 D58-AB1

제 2군
AINLVTSMLGHLFIILHGLRPRGLTRRILTWRRALEQ                                 SEQ ID No.:8 D58-BE4

제 3군
LAVRMVALSLGCIIQCFDWQRIGEELVDMTEGTGLTLPKAQPLVAKCSPRPKMANLLSQI          SEQ ID No.:10 D56-AH7
  |                     |   |                      |                                 (93.5)
LAIRMVALSLGCIIQCFDWQRLGEGLVDKTEGTGLTLPKAQPLVAKCSPRPIMANLLSQI          SEQ ID No.:12 D13a-5

제 4군
FATLVTHLTFGRLLQGFDFSKPSNTPIDMTEGVGVTLPKVNQVEVLITPRLPSKLYLF            SEQ ID No.:14 D56-AG10
                    |                          |        |                             (93.3)
FATLVTHLTFGRLLQGFDFSTPSNTPIDMTEGVGVTLPKVNQVEVLISPRLPSKLYVF            SEQ ID No.:18 D34-62

제 5군
ALPILGITLGRLVQNFELLPPPGQSKLDTTEKGGQFSLHILKHSTIVLKPRSF                 SEQ ID No.:20 D56-AA7
                                               |                                     (98.2)
ALPILGITLGRLVQNFELLPPPGQSKLDTTEKGGQFSLHILKHSTIVMKPRSF                 SEQ ID No.:144 D185-BD3
                                               |    |                                (96.4)
ALPILGITLGRLVQNFELLPPPGQSKLDTTEKGGQFSLHILKHSTIVLKPRSC                 SEQ ID No.:22 D56-AE1

제 6군
GVASMELALSNLLYAFDWELPFGMKKEDIDTNARPGITMHKKNELYLIPKNYL                 SEQ ID No.:24 D35-BB7
                     | |        |            |                                       (92.8)
GVASMELALSNLLYAFDWELPYGVKKENIDTNVRPGITMHKKNELCLIPRNYL                 SEQ ID No.:26 D177-BA7
                                     |         |                                     (96.4)
GVASMELALSNLLYAFDWELPYGVKKEDIDTNVRPGIAMHKKNELCLVPKNYL                 SEQ ID No.:28 D56A-AB6
                                                  |||                                (94.6)
GVASMELALSNLLYAFDWELPYGVKKEDIDTNVRPGIAMHKKNELCLVPKKLFINYIGTWISC       SEQ ID No.:30 D144-AE2

제 7군
GLANAYLPLAQLLYHFDWELPTGIKPSDLDLTELVGVTAARKSDLYLVATPYQPPQN             SEQ ID No.:32 D56-AG11
                  |  |  |                               |                             (93.3)
GLANAYLPLAQLLYHFDWKLPAGIEPSDLDLTELVGVTAARKSDLYLVATPYQPPQK             SEQ ID No.:34 D179-AA1

제 8군
GLANVGQPLAQLLYHFDWKLPNGQSHENFDMTESPGISATRKDDLVLIATPYDSY               SEQ ID No.:36 D56-AC7
                        | |                  |     ||                                (91.2)
GLANVGQPLAQLLYHFDWKLPNGQTHQNFDMTESPGISATRKDDLILIATPAHS                SEQ ID No.:38 D144-AD1
```

도면76b

제 9군

```
FGLVNVGHPLAQLLYHFDWKTLPGISSDSFDMTETDGVTAGRKDDLCLIATPFGLN     SEQ ID No.:40 D144-AB5
```

제 10군

```
FGLVNTGHPLAQLLYFFDWKFPHKVNAADFHTTETSRVFAASKDDLYLIPTNHMEQE    SEQ ID No.:42 D181-AB5
               |    | |    |  |                      |                          (89.8)
FGLVNTGHPLAQLLYCFDWKLPDKVNANDFRTTETSRVFAASKDDLYLIPTNHREQE    SEQ ID No.:44 D73-Ac9
```

제 11군

```
FGLALVTLPLAHLLHNFDWKLPEGINARDLDMTEANGISARREKDLYLIATPYVSPLD   SEQ ID No.:46 D56-AC12
```

제 12군

```
YALQVEHLTMAHLIQGFNYRTPTDEPLDMKEGAGITIRKVNPVKVIITPRLAPELY     SEQ ID No.:48 D58-AB9
                   |  |  |                 ||  |                               (89.6)
YALQVEHLTMAHLIQGFNYKTPNDEALDMKEGAGITIRKVNPVELIIAPRLAPELY     SEQ ID No.:50 D56-AG9
                                               |                               (98.2)
YALQVEHLTMAHLIQGFNYKTPNDEALDMKEGAGITIRKVNPVELIITPRLAPELY     SEQ ID No.:52 D56-AG6
                   |     |                     |                               (94.8)
YALQVEHLTMAHLIQGFNYRTPNDEPLDMKEGAGITIRKVNPVELIIAPRLAPELY     SEQ ID No.:54 D35-BG11
                                                 |                             (98.3)
 ALQVEHLTMAHLIQGFNYRTPNDEPLDMKEGAGITIRKVNPVELIIAP-LAPELY     SEQ ID No.:56 D35-42
                                                 |                             (98.3)
 ALQVEHLTMAHLIQGFNYRTPNDEPLDMKEGAGITIRKVNPAELIIAPRLAPELY     SEQ ID No.:58 D35-BA3
         |         |              |       | |||||                              (84.5)
 ALQVEHLTIAHLIQGFNYKTPNDEPLDMKEGAGLTIRKVNPVEVTTTARLAPELY     SEQ ID No.:60 D34-57
                                              |                                (98.3)
 ALQVEHLTIAHLIQGFNYKTPNDEPLDMKEGAGLTIRKVNPVEVTITARLAPELY     SEQ ID No.:62 D34-52
```

제 13군

```
 GLKVIRVTLANMLHGFNWKLPEGMKPEDISVEEHYGLTTHPKFPVPVILESRLSSDLYSPIT   SEQ ID No.:66 D56-AD10
```

제 14군

```
 GIRIIRATLANLLHGFNWRLPNGMSPEDISMEEIYGLITHPKVALDVMMEPRLPNHLYK      SEQ ID No.:68 D56-AA11
```

제 15군

```
 SIPLVELALANLLFHYNWSLPEGMLAKDVDMEEALGITMHKKSPLCLVASHYTC      SEQ ID No.:70 D177-BD5
                          |                          ||                       (94.7)
 SIPLVELALANLLFHYNWSLPEGMLPKDVDMEEALGITMHKKSPLCLVASHYNLL     SEQ ID No.:84 D177-BD7
```

제 16군

```
GLYALEMAVAHLLLCFTWELPDGMKPSELKMDDIFGLTAPRANRLVAVPSPRLLCPLY   SEQ ID No.:74 D58-BC5
             |                                   |                               (96.7)
GLYALEMAVAHLLHCFTWELPDGMKPSELKMDDIFGLTAPRANRLVAVPTPRLLCPLY   SEQ ID No.:76 D58-AD12
                                        |                                        (98.4)
GLYALEMAVAHLLHCFTWELPDGMKPSELKMDDIFGLTAPKANRLVAVPTPRLLCPLY   SEQ ID No.:72 D56A-AG10
```

제 17군

```
SASIVRVSYLTCIYRFQVYAGSVFRVA                                  SEQ ID No.:78 D56-AC11
                        |                                                   (96.7)
```

도면76c

```
SASIVRVSYLTCIYRFQVYAGSVSRVA                         SEQ ID No.:88 D56-AD6F
```

제 18군

```
AMLEAKMALALILQHYAFELSPSYAHAPHTIITLQPQHGAPLILRKL     SEQ ID No.:90 D73A-AD6
```

제 19군

```
AILEAKMAIAMILQRFSFELSPSYTHSPYTVVTLKPKYGAPLIMHRL     SEQ ID No.:96 D70A-AB5
 |      ||              | | |||| || |      | |                   (72.0)
AMLEAKMALSMILQRFSFELSPSYAHAPQSILTVQPQYGAPLIFHKL     SEQ ID No.:100 D70A-AB8
  |     ||              |     || |         |                      (82.0)
AMTEAKMAMAMILQRFSFELSPSYTHAPQSVITMQPQYGAPLILHKL     SEQ ID No.:102 D70A-BH2
  |                                                               (98.0)
AMAEAKMAMAMILQRFSFELSPSYTHAPQSVITMQPQYGAPLILHKL     SEQ ID No.:104 D70A-AA4
  |     |    ||             |||| ||       ||||                    (70.0)
AMMEAKMAVAMILHKFSFELSPSYTHAPFAIVTIHPQYGAPLLMRRL     SEQ ID No.:108 D70A-BA9
             |                                                    (98.0)
AMMEAKMAVAMILQKFSFELSPSYTHAPFAIVTIHPQYGAPLLMRRL     SEQ ID No.:106 D70A-BA1
```

제 20군

```
AMLEAKMAMAMILKTYAFELSPSYAHAPHPLLLQPQYGAQLILYKL      SEQ ID No.:110 D70A-BD4
```

제 21군

```
LKAIQASLANLLHGFNWSLPDNMTPEDLNMDEIFGLSTPKKFPLATVIEPRLSPKLYSV     SEQ ID No.:112 D181-AC5
  |                                                                              (96.8)
LKEIQASLANLLHGFNWSLPDNMTPEDLNMDEIFGLSTPKKFPLATVIEPRLSPKLYSV     SEQ ID No.:114 D144-AH1
  |                                                                              (96.8)
LKVIQASLANLLHGFNWSLPDNMTPEDLNMDEIFGLSTPKKFPLATVIEPRLSPKLYSV     SEQ ID No.:116 D34-65
```

제 22군

```
CLISSYILALNVNLYHNFLQISPSISY                         SEQ ID No.:118 D35-BG2
```

제 23군

```
QCVVGLALATLVQCFEWKRVSEEVVDLTEGKGLTMPKPEPLMARCEARDIFHKVLSEIS     SEQ ID No.:120 D73A-AH7
```

제 24군

```
TVHVNLMLARMIQEFEWSAYPENRKVDLLRNWNLLW                       SEQ ID No.:136 D185-BG2
                           |||||||||                                         (77.5)
TVHVNLMLARMIQEFEWSAYPENRKVDFTEKLEFTVVMKNPLRAKVKPRMQVV      SEQ ID No.:122 D58-AA1
          |                                                                  (98.2)
TVHVNLMLARTIQEFEWSAYPENRKVDFTEKLEFTVVMKNPLRAKVKPRMQVV      SEQ ID No.:134 D185-BC1
```

도면76d

제 25군

```
LAMLHLEYFVANLVWHFRWEAVEGDDVDLSEKLEFTVVMKNPLRARICPRVNSI     SEQ ID No.:124 D73A-AE10
```

제 26군

```
VGLLRTTIFIASLLSEYKLKPRSHQKQVELTDLNPASWLHSIKGELLVDAIPRKKAAF     SEQ ID No.:126 D56A-AC12
```

제 27군

```
FAKFVNELALARLMFHFDFSLPKGVKHEDLDVEEAAGITVRRKFPLLAVATPCS     SEQ ID No.:128 D177-BF7
                           |                                                (98.2)
FAKFVNELALARLMFHFDFSLPKGVKHADLDVEEAAGITVRRKFPLLAVATPCS     SEQ ID No.:140 D185-BD2
```

제 28군

```
YAINHLMLFIALFTALIDFKRHKTDGCDDIAYIPTIAPKDDCKVFLSQRCTRFPSFS     SEQ ID No.:130 D73A-AG3
```

제 29군

```
FGLANLYLPLAQLLYHFDWKLPTGIKPRDLDLTELSGITIARKGDLYLNATPYQPSRE     SEQ ID No.:132 D70A-AA12
                         |||   |  |  | |   |    |     | |                 (80.0)
FGLANVYLPLAQLLYHFDWKLPTGINSSDLDMTESSGVTCARKSDLYLTATPYQLSQE     SEQ ID No.:86 176-BF2
```

제 30군

```
                                                                    SEQ ID No.:146 D176-BC3
FAMLEAKTTLAMILQRFSFELSPSYAHAPQSIITCNPSMVLHLFCIKYSLLLVSSVSFYVKHESKMLRLVELQNGNAFALVHCRLL
```

제 31군

```
GLRAVSLALGALIQCFDWQIEEAESLEESYNSRMTMQNKPLKVVCTPREDLGQLLSQL     SEQ ID No.:148 D176-BB3
```

제 32군

```
SLQVEHLSIAHMIQGFSFATTTNEPLDMKQGVGLTLPKKTDVEVLITPRLPPTLYQY     SEQ ID No.:6 D186-AH4
```

가장 연관성 있는 짝 간의 동일성 %는 (0.0%)로 표시한다. 각 군은 다른 군의 구성원과 적어도 70%의 동일성을 가졌다. 제 19군은 최저의, 70.0%의 동일성 %를 보였다.

도면77a

서열 군의 비교

제 1군의 얼라인먼트

```
D58-BG7         GCACAACTTGCTATCAACTTGGTCACATCTATGTTGGGTCATTTGTTGCATCATTTTACA  SEQ ID Nc
                                                               |
D58-AB1         GCACAACTTGCTATCAACTTGGTCACATCTATGTTGGGTCATTTGTTGCATCATTTTACG  SEQ ID Nc
                                                               |
D58-BE4         GCACAACTTGCTATCAACTTGGTCACATCTATGTTGGGTCATTTGTT-CATCATTTTACA  SEQ ID Nc
                *********************************************** ************

D58-BG7         TGGGCTCCGGCCCCGGGGGTTAACCCGGAGGATATTGACTTGGAGGAGAGCCCTGGAACA
                         |                    |
D58-AB1         TGGGCTCCGCCCCCGGGGGTTAACCCGGAGAATATTGACTTGGAGGAGAGCCCTGGAACA
                         |                    |
D58-BE4         TGGGCTCCGGCCCCGGGGGTTAACCCGGAGGATATTGACTTGGAGGAGAGCCCTGGAACA
                ********* ******************** *****************************

D58-BG7         GTAACTTACATGAAAAATCCAATACAAGCTATTCCAACTCCAAGATTGCCTGCACACTTG
                                                    |
D58-AB1         GTAACTTACATGAAAAATCCAATACAAGCTATTCCTACTCCAAGATTGCCTGCACACTTG)
                             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
D58-BE4         GTAACTTACATGA-----------------------------------------------
                *************

D58-BG7         TATGGACGTGTGCCAGTGGATATGTAA

D58-AB1         TATGGACGTGTGCCAGTGGATATGTAA
                |||||||||||||||||||||||||||
D58-BE4         ---------------------------
```

제 1군의 동일성 %

	D58-BG7	D58-BE4	D58-AB1	
D58-BG7	***	96.2	98.1	SEQ ID No 1
D58-BE4		***	94.0	SEQ ID No 7
D58-AB1			***	SEQ ID No 3

제 2군의 얼라인먼트

```
D56-AH7         GAAGGATTGGCTGTTCGAATGGTTGCCTTGTCATTGGGATGTATTATTCAATGTTTTGAT  SEQ
ID No 9
                            |             |                          |
D13a-5          GAAGGATTGGCTATTCGAATGGTTGCATTGTCATTGGGATGTATTATTCAATGCTTTGAT  SEQ
ID No 11
                ************ ************* ************************** ******

D56-AH7         TGGCAACGAATCGGCGAAGAATTGGTTGATATGACTGAAGGAACTGGACTTACTTTGCCT
                         | |  |    |           |
D13a-5          TGGCAACGACTTGGGGAAGGATTGGTTGATAAGACTGAAGGAACTGGACTTACTTTGCCT
                ********* * ** **** *********** ****************************
```

도면77b

```
D56-AH7         AAAGCTCAACCTTTGGTGGCCAAGTGTAGCCCACGACCTAAAATGGCTAATCTTCTCTCT
                              |                         |               |
D13a-5          AAAGCTCAACCTTTAGTGGCCAAGTGTAGCCCACGACCTATAATGGCTAATCTTCTTTCT
                ************** ************************* *************** ***

D56-AH7         CAGATTTGA

D13a-5          CAGATTTGA
                *********
```

제 2군의 동일성 %

	D56-AH7	D13a-5	
D56-AH7	***	93.7	SEQ ID No 9
D13a-5		***	SEQ ID No 11

제 3군의 얼라인먼트

```
D56-AG10        ATAGGTTTTGCGACTTTAGTGACACATCTGACTTTTGGTCGCTTGCTTCAAGGTTTTGAT  SEQ ID
No 13
                     |
D35-33          ATAGGCTTTGCGACTTTAGTGACACATCTGACTTTTGGTCGCTTGCTTCAAGGTTTTGAT  SEQ ID
No 15
                   |||
D34-62          ATAAATTTTGCGACTTTAGTGACACATCTGACTTTTGGTCGCTTGCTTCAAGGTTTTGAT  SEQ ID
No 17
                ***   ******************************************************

D56-AG10        TTTAGTAAGCCATCAAACACGCCAATTGACATGACAGAAGGCGTAGGCGTTACTTTGCCT

D35-33          TTTAGTAAGCCATCAAACACGCCAATTGACATGACAGAAGGCGTAGGCGTTACTTTGCCT
                       |                  |
D34-62          TTTAGTACGCCATCAAACACGCCAATAGACATGACAGAAGGCGTAGGCGTTACTTTGCCT
                ******* ****************** *********************************

D56-AG10        AAGGTTAATCAAGTTGAAGTTCTAATTACCCCTCGTTTACCTTCTAAGCTTTATTTATTTTGA
                                                                          ||
D35-33          AAGGTTAATCAAGTTGAAGTTCTAATTACCCCTCGTTTACCTTCTAAGCTTTATTTAT-----
                     |        |             |                         |   ||
D34-62          AAGGTAAATCAAGTGGAAGTTCTAATTAGCCCTCGTTTACCTTCTAAGCTTTATGTATTCTGA
                ***** ******** ************* ************************* ***
```

제 3군의 동일성 %

	D56-AG10	D35-33	D34-62	
D56-AG10	***	98.9	95.1	SEQ ID No 13
D35-33		***	94.4	SEQ ID No 15
D34-62			***	SEQ ID No 17

도면77c

제 4군의 얼라인먼트

```
D56-AA7         ATTATACTTGCATTGCCAATTCTTGGCATCACTTTGGGACGTTTGGTTCAGAACTTTGAG
                                             |
D56-AE1         ATTATACTTGCATTGCCAATTCTTGGCATTACTTTGGGACGTTTGGTTCAGAACTTTGAG
                     |      |                   |        |     |
D185-BD3        ATTATCCTTGCACTGCCAATTCTTGGCATTACCTTGGGACGCTTGGTGCAGAACTTTGAG
                ***** ****** **************** ** ******** ***** ************

D56-AA7         CTGTTGCCTCCTCCAGGCCAGTCGAAGCTCGACACCACAGAGAAAGGTGGACAGTTCAGT

D56-AE1         CTGTTGCCTCCTCCAGGCCAGTCGAAGCTCGACACCACAGAGAAAGGTGGACAGTTCAGT
                |                |     |     |     |           |     |
D185-BD3        TTGTTGCCTCCTCCAGGACAGTCAAAGCTTGACACAACAGAGAAAGGCGGGCAATTCAGT
                 **************** ***** ***** ***** *********** ** ** ******

D56-AA7         CTCCACATTTTGAAGCATTCCACCATTGTGTTGAAACCAAGGTCTTTCTGA
                     |
D56-AE1         CTCCATATTTTGAAGCATTCCACCATTGTGTTGAAACCAAGGTCTTGCTGA
                  |  |                        |          |    || |
D185-BD3        CTGCACATTTTGAAGCATTCCACCATTGTGATGAAACCAAGATCTTTTTAA
                ** ** ************************ ********** ****  * *
```

제 4군의 동일성 %

	D56AA7	D56-AE1	D185-BD3	
D56AA7	***	98.2	87.7	SEQ ID No 19
D56-AE1		***	87.1	SEQ ID No 21
D185-BD3			***	SEQ ID No 143

도면77d

제 5군의 얼라인먼트

```
D56A-AB6        ATTGCACTTGGGGTTGCATCCATGGAACTTGCTTTGTCAAATCTTCTTTATGCATTTGAT   SEQ ID
No 27
                                    |           |
D35-BB7         ATTGCACTTGGGGTTGCATCAATGGAACTTGCATTGTCAAATCTTCTTTATGCATTTGAT   SEQ ID
No 23
                                    |           |
D177-BA7        ATTGCACTTGGGGTTGCATCCATGGAACTTGCTTTGTCAAATCTTCTTTATGCATTTGAT   SEQ ID
No 25

D144-AE2        ATTGCACTTGGGGTTGCATCCATGGAACTTGCTTTGTCAAATCTTCTTTATGCATTTGAT   SEQ ID
No 29
                ******************** *********** ***************************

D56A-AB6        TGGGAGTTGCCTTATGGAGTGAAAAAAGAAGACATCGACACAAACGTTAGGCCTGGAATT
                        |    |    |                |          ||
D35-BB7         TGGGAGTTACCTTTTGGAATGAAAAAAGAAGACATTGACACAAACGCCAGGCCTGGAATT
                             ||   |           |             | |
D177-BA7        TGGGAGTTACCTTACGGAGTGAAAAAAGAAAACATTGACACAAATGTCAGGCCTGGAATT
                        |     |               |    |        |
D144-AE2        TGGGAGTTGCCTTATGGAGTGAAAAAAGAAGACATCGACACAAACGTTAGGCCTGGAATT
                ******** ****  *** *********** **** ******** *  ************

D56A-AB6        GCCATGCACAAGAAAAACGAACTTTGCCTTGTCCCAAAAAA-TTATTTATAA-----
                |       |.               ||   |    |          |    |
D35-BB7         ACCATGCATAAGAAAAACGAACTTTATCTTATCCCTAAAAA-TTATCTATAG-----
                                         ||          |
D177-BA7        ACCATGCATAAGAAAAACGAACTTTGCCTTATCCCTAGAAA-TTATCTATAG-----
                |       |                     |    | |   |    |    ||||||
D144-AE2        GCCATGCACAAGAAAAACGAACTTTGCCTTGTCCCAAAAAAATTATTTATAAATTAT
                 ******* ****************  *** **** * *** **** ****

D56A-AB6        ------------------------

D35-BB7         ------------------------

D177-BA7        ------------------------
                ||||||||||||||||||||||||
D144-AE2        ATTGGGACGTGGATCTCATGCTAG
```

제 5군의 동일성 %

	D56A-AB6	D35-BB7	D144-AE2	D177-BA7	
D56A-AB6	***	90.6	97.1	91.8	SEQ ID No 27
D35-BB7		***	87.7	93.0	SEQ ID No 23
D144-AE2			***	88.9	SEQ ID No 29
D177-BA7				***	SEQ ID No 25

도면77e

제 6군의 얼라인먼트

```
D56-AG11        ATTTCGTTTGGTTTAGCTAATGCTTATTTGCCATTGGCTCAATTACTTTATCACTTTGAT
                           |                                   |        |
D179-AA1        ATTTCGTTTGGCTTAGCTAATGCTTATTTGCCATTGGCTCAATTACTATATCACTTCGAT
                *********** *********************************** ******** ***

D56-AG11        TGGGAACTCCCCACTGGAATCAAACCAAGCGACTTGGACTTGACTGAGTTGGTTGGAGTA
                   |       ||        |
D179-AA1        TGGAAACTCCCTGCTGGAATCGAACCAAGCGACTTGGACTTGACTGAGTTGGTTGGAGTA
                *** *******  ******** **************************************

D56-AG11        ACTGCCGCTAGAAAAAGTGACCTTTACTTGGTTGCGACTCCTTATCAACCTCCTCAAAACTGA
                                                                           |
D179-AA1        ACTGCCGCTAGAAAAAGTGACCTTTACTTGGTTGCGACTCCTTATCAACCTCCTCAAAAGTGA
                *********************************************************** ***
```

제 6군의 동일성 %

```
            SEQ ID No 31   SEQ ID No 33
            D56-AG11            D179-AA1
D56-AG11    ***            95.6     SEQ ID No 31
D179-AA1                   ***      SEQ ID No 33
```

제 7군의 얼라인먼트

```
D56-AC7         ATGCTATTTGGTTTAGCTAATGTTGGACAACCTTTAGCTCAGTTACTTTATCACTTCGAT   SEQ
ID No 35

D144-AD1        ATGCTATTTGGTTTAGCTAATGTTGGACAACCTTTAGCTCAGTTACTTTATCACTTCGAT   SEQ
ID No 37

                ************************************************************

D56-AC7         TGGAAACTCCCTAATGGACAAAGTCATGAGAATTTCGACATGACTGAGTCACCTGGAATT
                                      |   || |
D144-AD1        TGGAAACTCCCTAATGGACAAACTCACCAAAATTTCGACATGACTGAGTCACCTGGAATT
                ********************** ***  * ******************************

D56-AC7         TCTGCTACAAGAAAGGATGATCTTGTTTTGATTGCCACTCCTTATGATTCTTATTAA
                                        |                 || |
D144-AD1        TCTGCTACAAGAAAGGATGATCTTATTTTGATTGCCACTCCTGCTCATTCTTGA
                ************************ *****************  * ******
```

제 7군의 동일성 %

```
            D144-AD1    D56-AC7
D144-AD1    ***         94.3       SEQ ID No 37
D56-AC7F                ***        SEQ ID No 35
```

도면77f

제 9군의 얼라인먼트

```
D181-AB5        ATGTCGTTTGGTTTAGTTAACACTGGGCATCCTTTAGCTCAGTTGCTCTATTTCTTTGAC   SEQ
ID No 41
                                       |              |             |
D73-AC9         ATGTCGTTTGGTTTAGTTAACACAGGGCATCCTTTAGCCCAGTTGCTCTATTGCTTTGAC   SEQ
ID No 43
                *********************** ************** ************* *******

D181-AB5        TGGAAATTCCCTCATAAGGTTAATGCAGCTGATTTTCACACTACTGAAACAAGTAGAGTT
                      |     | |            ||        |
D73-AC9         TGGAAACTCCCTGACAAGGTTAATGCAAATGATTTTCGCACTACTGAAACAAGTAGAGTT
                ****** ***** * ************  ******** **********************

D181-AB5        TTTGCAGCAAGCAAAGATGACCTCTACTTGATTCCAACAAATCACATGGAGCAAGAGTAG
                                                   |          |         |
D73-AC9         TTTGCAGCAAGCAAAGATGACCTCTACTTGATTCCCACAAATCACAGGGAGCAAGAATAG
                *********************************** ********** ********* ***
```

제 9군의 동일성 %

	D181-AB5	D73-AC9	
D181-AB5	***	92.8	SEQ ID No 41
D73-AC9		***	SEQ ID No 43

제 11군의 얼라인먼트

```
D58-AB9         ATGACTTATGCATTGCAAGTGGAACACCTAACAATGGCACATTTGATCCAGGGTTTCAAT   SEQ ID N
                                                            |
D56-AG9         ATGACTTATGCATTGCAAGTGGAACACCTAACAATGGCACATTTAATCCAGGGTTTCAAT   SEQ ID N
                                           |                      |
D35-BG11        ATGACTTATGCATTGCAAGTGGAACACTTAACAATGGCACATTTGATCCAAGGTTTCAAT   SEQ ID N
                              |            |       |              |
D34-25          ATGACTTATGCATTACAAGTGGAACACCTAACAATAGCACATTTGATCCAGGGTTTCAAT   SEQ ID N
                              |            |       |              |
D35-BA3         ATGACTTATGCATTGCAAGTGGAACACTTAACAATGGCACATTTGATCCAAGGTTTCAAT   SEQ ID N
                              |            |       |              |
D34-52          ATGACTTATGCATTACAAGTGGAACACCTAACAATAGCACATTTGATCCAGGGTTTCAAT   SEQ ID N
                              |                    |        |
D56-AG6         ATGACTTATGCATTGCAAGTGGAACACCTAACAATGGCACATTTAATCCAGGGTTTCAAT   SEQ ID N
                                           |                |     |
D35-42          ATGACTTATGCATTGCAAGTGGAACACTTAACAATGGCACATTTGATCCAAGGTTTCAAT   SEQ ID N
                              |            |       |              |
D34-57          ATGACTTATGCATTACAAGTGGAACACCTAACAATAGCACATTTGATCCAGGGTTTCAAT   SEQ ID N
                ************** ************ ******* ******** ***** *********
```

도면77g

```
D58-AB9     TACAGAACTCCAACTGATGAGCCCTTGGATATGAAAGAAGGTGCAGGCATAACTATACGT
                |        |   |                 |
D56-AG9     TACAAAACTCCAAATGACGAGGCCTTGGATATGAAGGAAGGTGCAGGCATAACTATACGT
                |                |
D35-BG11    TACAGAACTCCAAATGACGAGCCCTTGGATATGAAGGAAGGTGCAGGCATAACTATACGT
                |                   |                      ||
D34-25      TACAAAACTCCAAATGACGAGCCCCTGGATATGAAGGAAGGTGCAGGATTAACTATACGT
                |                   |                      ||
D35-BA3     TACAGAACTCCAAATGACGAGCCCTTGGATATGAAGGAAGGTGCAGGCATAACTATACGT
                |                                          ||
D34-52      TACAAAACTCCAAATGACGAGCCCTTGGATATGAAGGAAGGTGCAGGATTAACTATACGT
                                 |                         ||
D56-AG6     TACAAAACTCCAAATGACGAGGCCTTGGATATGAAGGAAGGTGCAGGCATAACAATACGT
                |                |                               |
D35-42      TACAGAACTCCAAATGACGAGCCCTTGGATATGAAGGAAGGTGCAGGCATAACTATACGT
                |                                          ||    |
D34-57      TACAAAACTCCAAATGACGAGCCCTTGGATATGAAGGAAGGTGCAGGATTAACCATACGT
            **** ******** *** *** ** ********** ***********  **** ******

D58-AB9     AAGGTAAATCCTGTGAAAGTGATAATTACGCCTCGCTTGGCACCTGAGCTTTATTAA
                           |  |        |        |
D56-AG9     AAGGTAAATCCTGTGGAACTGATAATAGCGCCTCGCCTGGCACCTGAGCTTTATTAA

D35-BG11    AAGGTAAATCCTGTGGAACTGATAATAGCGCCTCGCCTGGCACCTGAGCTTTATTAA
              |           |   |       ||  |
D34-25      AAAGTAAATCCTGTAGAAGTGACAATTACGGCTCGCCTGGCACCTGAGCTTTATTAA
              |          ||           ||  |
D35-BA3     AAGGTAAATCCTGCGGAACTGATAATAGCGCCTCGCCTGGCACCTGAGCTTTATTAA
              |          ||   |       ||  |
D34-52      AAAGTAAATCCTGTAGAAGTGACAATTACGGCTCGCCTGGCACCTGAGCTTTATTAA
              |        |  |   |       |   |     |                |
D56-AG6     AAGGTAAATCCAGTGGAATTGATAATAACGCCTCGCTTGGCACCTGAGCTTTACTAA
                       |      |        |    | |||                |
D35-42      AAGGTAAATCCTGTGGAACTGATAATAGCGCCCC---TGGCACCTGAGCTTTATTAA
              |               |   |  |||  | | |||
D34-57      AAAGTAAATCCTGTAGAAGTGACAACTACGGCTCGCCTGGCACCTGAGCTTTATTAA
            ** ******** *   ** *** **   ** * *   **************** ***
```

제 11군의 동일성 %

	D58-AB9	D56-AG9	D56-AG6	D35-BG11	D35-42	D35-BA3	D34-57	D34-52	D34-25	
D58-AB9	***	93.8	93.2	94.3	90.8	93.2	90.9	92.0	91.5	SEQ ID No 47
D56-AG9		***	96.6	97.2	94.2	96.6	91.5	92.6	92.0	SEQ ID No 49
D56-AG6			***	93.8	90.2	92.6	90.3	90.9	90.3	SEQ ID No 51
D35-BG11				***	97.1	99.4	90.9	92.0	91.5	SEQ ID No 53
D35-42					***	96.5	87.3	88.4	87.9	SEQ ID No 55
D35-BA3						***	90.3	91.5	90.9	SEQ ID No 57
D34-57							***	98.9	98.3	SEQ ID No 59
D34-52								***	99.4	SEQ ID No 61
D34-25									***	

도면77h

제 14군의 얼라인먼트

```
D177-BD7        ATTAATTTTTCAATACCACTTGTTGAGCTTGCACTTGCTAATCTATTGTTTCATTATAAT   SEQ
ID No 83

D177-BD5        ATTAATTTTTCAATACCACTTGTTGAGCTTGCACTTGCTAATCTATTGTTTCATTATAAT   SEQ
ID No 69
                ************************************************************

D177-BD7        TGGTCACTTCCTGAGGGGATGCTACCTAAGGATGTTGATATGGAAGAAGCTTTGGGGATT
                              |         |
D177-BD5        TGGTCACTTCCTGAAGGGATGCTAGCTAAGGATGTTGATATGGAAGAAGCTTTGGGGATT
                ************** ********* ***********************************

D177-BD7        ACCATGCACAAGAAATCTCCCCTTTGCTTAGTAGCTTCTCATTATAACTTGTTGTGA
                                                              |       |||
D177-BD5        ACCATGCACAAGAAATCTCCCCTTTGCTTAGTAGCTTCTCATTATA-CTTGTTGA--
                ********************************************** *******
```

제 14군의 동일성 %

```
                D177-BD7                D177-BD5
D177-BD7        ***             96.0    SEQ ID No 83
D177-BD5                        ***     SEQ ID No 69
```

제 15군의 얼라인먼트

```
D56A-AG10       ATGCAACTTGGGCTTTATGCATTGGAAATGGCTGTGGCCCATCTTCTTCATTGTTTTACT   SEQ
ID No 71

D58-AD12        ATGCAACTTGGGCTTTATGCATTGGAAATGGCTGTGGCCCATCTTCTTCATTGTTTTACT   SEQ
ID No 75
                                       |        |                |   |
D58-BC5         ATGCAACTTGGGCTTTATGCATTAGAAATGGCAGTGGCCCATCTTCTTCTTTGCTTTACT   SEQ
ID No 73
                *********************** ******** **************** *** ******

D56A-AG10       TGGGAATTGCCAGATGGTATGAAACCAAGTGAGCTTAAAATGGATGATATTTTTGGACTC

D58-AD12        TGGGAATTGCCAGATGGTATGAAACCAAGTGAGCTTAAAATGGATGATATTTTTGGACTC

D58-BC5         TGGGAATTGCCAGATGGTATGAAACCAAGTGAGCTTAAAATGGATGATATTTTTGGACTC
                ************************************************************

D56A-AG10       ACTGCTCCAAAAGCTAATCGACTCGTGGCTGTGCCTACTCCACGTTTGTTGTGTCCCCTT
                          |
D58-AD12        ACTGCTCCAAGAGCTAATCGACTCGTGGCTGTGCCTACTCCACGTTTGTTGTGTCCCCTT
                                                     |               |  |
D58-BC5         ACTGCTCCAAGAGCTAATCGACTCGTGGCTGTGCCTAGTCCACGTTTGTTGTGCCCACTT
                ********** ************************** *************** ** ***
```

도면77i

```
D56A-AG10          TATTAA

D58-AD12           TATTAA

D58-BC5            TATTAA
                   ******
```

제 15군의 동일성 %

	D56A-AG10	D58-AD12	D58-BC5	
D56A-AG10	***	99.5	95.7	SEQ ID No 71
D58-AD12		***	96.2	SEQ ID No 75
D58-BC5			***	SEQ ID No 73

제 16군의 얼라인먼트

```
D56-AD6            ATGCTTTGGAGTGCGAGTATAGTGCGCGTCAGCTACCTAACTTGTATTTATAGATTCCAA   SEQ
ID No 87

D56-AC11           ATGCTTTGGAGTGCGAGTATAGTGCGCGTCAGCTACCTAACTTGTATTTATAGATTCCAA   SEQ
ID No 77

D35-39             ATGCTTTGGAGTGCGAGTATAGTGCGCGTCAGCTACCTAACTTGTATTTATAGATTCCAA   SEQ
ID No 79
                                                             |
D58-BH4            .ATGCTTTGGAGTGCGAGTATAGTGCGCGTCAGCTACCTAACCTGTATTTATAGATTCCAA  SEQ
ID No 81
                   ***************************************** ******************

D56-AD6            GTATATGCTGGGTCTGTGTCCAGAGTAGCATGA
                                      |
D56-AC11           GTATATGCTGGGTCTGTGTTCAGAGTAGCATGAD35-39
GTATATGCTGGGTCTGTGTTCAGAGTAGCATGA

D58-BH4            GTATATGCTGGGTCTGTGTTCAGAGTAGCATGA
                   ******************* *************
```

제 16군의 동일성 %

	D56-AC11	D56-AD6	D58-BH4	D35-39	
D56-AC11	***	98.7	98.7	98.7	SEQ ID No 77
D56-AD6		***	98.7	98.7	SEQ ID No 87
D58-BH4			***	98.7	SEQ ID No 81
D35-39				***	SEQ ID No 79

도면77j

제 17군의 얼라인먼트

```
D73A-AD6       CTGAATTTTGCAATGTTAGAGGCAAAAATGGCACTTGCATTGATTCTACAACACTATGCT   SEQ
ID No 89

D70A-BA11      CTGAATTTTGCAATGTTAGAGGCAAAAATGGCACTTGCATTGATTCTACAACACTATGCT   SEQ
ID No 91
               ************************************************************

D73A-AD6       TTTGAGCTCTCTCCATCTTATGCACATGCTCCTCATACAATTATCACTCTGCAACCTCAA
                                         |
D70A-BA11      TTTGAGCTCTCTCCATCTTATGCACACGCTCCTCATACAATTATCACTCTGCAACCTCAA
               ************************** *********************************

D73A-AD6       CATGGTGCTCCTTTGATTTTGCGCAAGCTGTAG

D70A-BA11      CATGGTGCTCCTTTGATTTTGCGCAAGCTGTAG
               *********************************
```

제 17군의 동일성 %

```
           D73A-AD 70A-BA11
D73A-AD6     ***     99.3    SEQ ID No 89
D70A-BA11            ***     SEQ ID No 91
```

제 18군의 얼라인먼트

```
D70A-AB5       CAAAACTTCGCGATTTTGGAAGCAAAAATGGCTATAGCTATGATTCTACAACGCTTCTCC   SEQ
ID No 95

D70A-AA8       CAAAACTTCGCGATTTTGGAAGCAAAAATGGCTATAGCTATGATTCTACAACGCTTCTCC   SEQ
ID No 97
               ************************************************************

D70A-AB5       TTCGAGCTCTCCCCATCTTATACACACTCTCCATACACTGTGGTCACTTTGAAACCCAAA
                                            |
D70A-AA8       TTCGAGCTCTCTCCATCTTATACACACTCTCCATACACTGTGGTCACTTTGAAACCCAAA
               ***************************** ******************************

D70A-AB5       TATGGTGCTCCCCTAATAATGCACAGGCTGTAG
D70A-AA8       TATGGTGCTCCCCTAATAATGCACAGGCTGTAG
               *********************************
```

제 18군의 동일성 %

```
          D70A-AB5     D70A-AA8
D70A-AB5  ***          99.6          SEQ ID No 95
D70A-AA8               ***           SEQ ID No 97
```

도면77k

제 19군의 얼라인먼트

```
D70A-AB8          CAAAATTTTGCCATGTTAGAAGCAAAGATGGCTCTGTCTATGATCCTGCAACGCTTCTCT    SEQ
ID No 99
                  ||   |     |   ||      |         |  |       |              |
D70A-BH2          ATAAACTTTGCAATGACAGAAGCGAAGATGGCTATGGCTATGATTCTGCAACGCTTCTCC    SEQ
ID No 101
                                 |
D70A-AA4          ATAAACTTTGCAATGGCAGAAGCGAAGATGGCTATGGCTATGATTCTGCAACGCTTCTCC    SEQ
ID No 103
                    *** ***** ***  ****** ****   ** ** ******* ** ************

D70A-AB8          TTTGAACTGTCTCCGTCTTATGCACATGCCCCTCAGTCCATATTAACCGT-CAGCCACAA
                       |  |     |     |        |  |     |   |    || |  |  |
D70A-BH2          TTTGAGCTATCTCCATCTTACACACATGCTCCACAGTCTGTAATAACTATGCAACCCCAA

D70A-AA4          TTTGAGCTATCTCCATCTTACACACATGCTCCACAGTCTGTAATAACTATGCAACCCCAA
                  ***** ** ***** *****  ******* ** *****  ** ****  * ** ** **

D70A-AB8          TATGGTGCTCCACTTATTTTCCACAAGCTATAA
                             |     |  |     || |
D70A-BH2          TATGGTGCTCCTCTTATATTGCACAAATTGTAA
D70A-AA4          TATGGTGCTCCTCTTATATTGCACAAATTGTAA
                  *********** ***** ** ** **  * **
```

제 19군의 동일성 %

	D70A-AB8	D70A-AA4	D70A-BH2	
D70A-AB8	***	77.8	77.8	SEQ ID No 99
D70A-AA4		***	99.3	SEQ ID No 101
D70A-BH2			***	SEQ ID No 103

제 20군의 얼라인먼트

```
D70A-BA1          CAAAACTTTGCAATGATGGAAGCAAAAATGGCAGTAGCTATGATACTACAAAAATTTTCC    SEQ
ID No 105
                                                                    |
D70A-BA9          CAAAACTTTGCAATGATGGAAGCAAAAATGGCAGTAGCTATGATACTACATAAATTTTCC    SEQ
ID No 107
                  ************************************************** *********

D70A-BA1          TTTGAACTATCCCCTTCTTATACACATGCTCCATTTGCAATTGTGACTATTCATCCTCAG

D70A-BA9          TTTGAACTATCCCCTTCTTATACACATGCTCCATTTGCAATTGTGACTATTCATCCTCAG
                  ************************************************************

D70A-BA1          TATGGTGCTCCTCTGCTTATGCGCAGACTTTAA

D70A-BA9          TATGGTGCTCCTCTGCTTATGCGCAGACTTTAA
                  *********************************
```

도면77l

제 20군의 동일성 %

	D70A-BA1	D70A-BA9	
D70A-BA1	***	99.4	SEQ ID No 105
D70A-BA9		***	SEQ ID No 107

제 22군의 얼라인먼트

```
D144-AH1        TATAGCTTGGGGCTCAAGGAGATTCAAGCTAGCTTAGCTAATCTTCTACATGGATTTAAC   SEQ
ID No 113
                |                  |
D34-65          CATAGCTTGGGGCTCAAGGTGATTCAAGCTAGCTTAGCTAATCTTCTACATGGATTTAAC   SEQ
ID No 115
                |     |            |
D181-AC5        TATAGCATGGGGCTCAAGGCGATTCAAGCTAGCTTAGCTAATCTTCTACATGGATTTAAC   SEQ
ID No 111
                 *****:************ ****************************************

D144-AH1        TGGTCATTGCCTGATAATATGACTCCTGAGGACCTCAACATGGATGAGATTTTTGGGCTC

D34-65          TGGTCATTGCCTGATAATATGACTCCTGAGGACCTCAACATGGATGAGATTTTTGGGCTC

D181-AC5        TGGTCATTGCCTGATAATATGACTCCTGAGGACCTCAACATGGATGAGATTTTTGGGCTC
                ************************************************************

D144-AH1        TCTACACCTAAAAAATTTCCACTTGCTACTGTGATTGAGCCAAGACTTTCACCAAAACTT

D34-65          TCTACACCTAAAAAATTTCCACTTGCTACTGTGATTGAGCCAAGACTTTCACCAAAACTT

D181-AC5        TCTACACCTAAAAAATTTCCACTTGCTACTGTGATTGAGCCAAGACTTTCACCAAAACTT
                ************************************************************

D144-AH1        TACTCTGTTTGA

D34-65          TACTCTGTTTGA

D181-AC5        TACTCTGTTTGA
                ************
```

제 22군의 동일성 %

	D34-65	D181-AC5	D144-AH1	
D34-65	***	98.4	99.0	SEQ ID No 115
D181-AC5		***	99.0	SEQ ID No 111
D144-AH1			***	SEQ ID No 113

도면77m

제 25군의 얼라인먼트

```
D58-AA1         TTGGGCTTGGCAACGGTGCATGTGAATTTGATGTTGGCCCGAATGATTCAAGAATTTGAA   SEQ
ID No 121
                                                           |
D185-BC1        TTGGGCTTGGCAACGGTGCATGTGAATTTGATGTTGGCCCGAACGATTCAAGAATTTGAA   SEQ
ID No 133
                                                           |
D185-BG2        TTGGGCTTGGCAACGGTGCATGTGAATTTGATGTTGGCCCGAATGATTCAAGAATTTGAA   SEQ
ID No 135
                ******************************************* ****************

D58-AA1         TGGTCCGCTTACCCGGAAAATAGGAAAGTGGATTTTACTGAGAAATTGGAATTTACTGTG

D185-BC1        TGGTCCGCTTACCCGGAAAATAGGAAAGTGGATTTTACTGAGAAATTGGAATTTACTGTG
                                                  |
D185-BG2        TGGTCCGCTTACCCGGAAAATAGGAAAGTGGATTT-ACTGAGAAATTGGAATTTACTGTG
                ********************************** *************************

D58-AA1         GTGATGAAAAATCCTTTAAGAGCTAAGGTCAAGCCAAGAATGCAAGTGGTGTAA
                           |
D185-BC1        GTGATGAAAAACCCTTTAAGAGCTAAGGTCAAGCCAAGAATGCAAGTGGTGTAA
                     |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
D185-BG2        GTGA--------------------------------------------------
                ****
```

제 25군의 동일성 %

	D58-AA1	D185-BG2	D185-BC1	
D58-AA1	***	95.9	98.9	SEQ ID No 121
D185-BG2		***	95.1	SEQ ID No 135
D185-BC1			***	SEQ ID No 133

제 28군의 얼라인먼트

```
D177-BF7        ATCACATTTGCTAAGTTTGTGAATGAGCTAGCATTGGCAAGATTAATGTTCCATTTTGAT   SEQ
ID No 127

D185-BD2        ATCACATTTGCTAAGTTTGTGAATGAGCTAGCATTGGCAAGATTAATGTTCCATTTTGAT   SEQ
ID No 139

D185-BE1        ATCACATTTGCTAAGTTTGTGAATGAGCTAGCATTGGCAAGATTAATGTTCCATTTTGAT   SEQ
ID No 137
                ************************************************************
```

도면77n

```
D177-BF7        TTCTCGCTACCAAAAGGAGTTAAGCATGAGGATTTGGACGTGGAGGAAGCTGCTGGAATT
                                            |
D185-BD2        TTCTCGCTACCAAAAGGAGTTAAGCATGCGGATTTGGACGTGGAGGAAGCTGCTGGAATT
                                            |
D185-BE1        TTCTCGCTACCAAAAGGAGTTAAGCATGAGGATTTGGACGTGGAGGAAGCTGCTGGAATT
                **************************** *******************************

D177-BF7        ACTGTTAGAAGGAAGTTCCCCCTTTTAGCCGTCGCCACTCCATGCTCGTGA

D185-BD2        ACTGTTAGAAGGAAGTTCCCCCTTTTAGCCGTCGCCACTCCATGCTCGTGA
                        |
D185-BE1        ACTGTTAGGAGGAAGTTCCCCCTTTTAGCCGTCGCCACTCCATGCTCGTGA
                ******** ******************************************
```

제 28군의 동일성 %

	D177-BF7	D185-BD2	D185-BE1	
D177-BF7	***	99.4	99.4	SEQ ID No 127
D185-BD2		***	98.8	SEQ ID No 139
D185-BE1			***	SEQ ID No 137

제 30군의 얼라인먼트

```
D70A-AA12       ATGTCATTTGGTTTAGCTAATCTTTACTTACCATTGGCTCAATTACTCTATCACTTTGAC    SEQ
ID No 131
                  |           |      |    |  |   | |        || |     |     |
D176-BF2        ATATCATTTGGTTTGGCTAATGTTTATTTGCCACTAGCTCAATTGTTATATCATTTTGAT    SEQ
ID No 85
                ** *********** ****** **** ** *** * ********  * ***** *****

D70A-AA12       TGGAAACTCCCAACCGGAATCAAGCCAAGAGACTTGGACTTGACCGAATTATCGGGAATA
                           |  |        ||    |         |    |  | ||  |   |
D176-BF2        TGGAAACTCCCTACTGGAATCAATTCAAGTGACTTGGACATGACTGAGTCGTCAGGAGTA
                *********** ** ********  **** ********* **** ** *  ** *** **

D70A-AA12       ACTATTGCTAGAAAGGGTGACCTTTACTTAAATGCTACTCCTTATCAACCTTCTCGAGAGTAA
                   ||          |    || |     | |         |       |     |     |
D176-BF2        ACTTGTGCTAGAAAGAGTGATTTATACTTGACTGCTACTCCATATCAACTTTCTCAAGAGTGA
                ***  ********** ****  * ***** * ********* ******* ***** ***** *
```

제 30군의 동일성 %

	D176-BF2	D70A-AA12	
D176-BF2	***	77.0	SEQ ID No 85
D70A-AA12		***	SEQ ID No 131