



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0072349
(43) 공개일자 2024년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 63/60 (2020.01) A01P 7/04 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A01N 63/60 (2022.01)
A01P 7/04 (2021.08)
(21) 출원번호 10-2022-0151742
(22) 출원일자 2022년11월14일
심사청구일자 2022년11월14일

(71) 출원인
대한민국(농촌진흥청장)
전라북도 전주시 덕진구 농생명로 300 (중동)
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
박홍현
전라북도 완주군 이서면 농생명로 166
고영호
서울특별시 영등포구 버드나루로 55, 도현연구센터 1005
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인(유한)아이시스

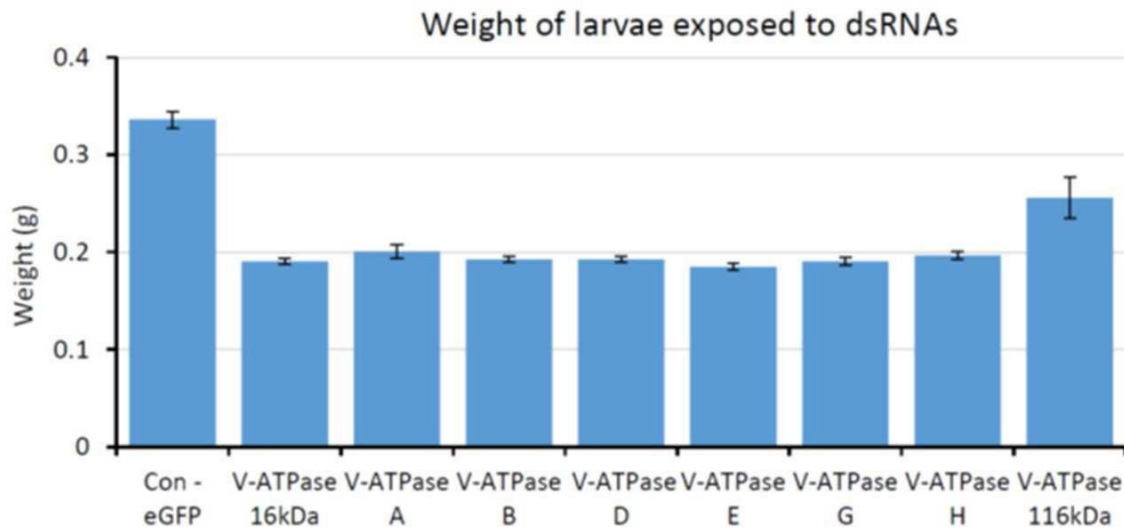
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 V-ATPase 서브유닛 유전자를 표적하는 dsRNA를 포함하는 열대거세미나방 방제용 조성물

(57) 요약

본 발명은, V-ATPase 서브유닛 유전자를 표적하는 dsRNA를 포함하는 열대거세미나방 방제용 조성물 및 이를 이용한 방제방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, V-ATPase 서브유닛 유전자를 표적하는 dsRNA를 포함하는 조성물을 처리하는 경우, 열대거세미나방의 발육 억제 효과가 우수함을 확인하였는 바, 열대거세미나방의 방제에 활용될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12N 15/113 (2013.01)

C12Y 306/03014 (2013.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

(72) 발명자

김아영

서울특별시 영등포구 버드나루로 55, 도현연구센터
1005

뉴엔 띠 푸엥

서울특별시 영등포구 버드나루로 55, 도현연구센터
1005

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395073459

과제번호 PJ014845032022

부처명 농촌진흥청

과제관리(전문)기관명 농촌진흥청

연구사업명 생물다양성위협외래생물관리기술개발사업(농진청)

연구과제명 침입해충 방제제의 방제효율 증대 기술 개발(3공동)

기 여 율 1/1

과제수행기관명 한림대학교 산학협력단

연구기간 2020.01.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

V-ATPase(Vacuolar-type H⁺-ATPase) 서브유닛 유전자를 표적하는 dsRNA(double stranded-RNA)를 포함하는, 열대거세미나방(*Spodoptera frugiperda*) 방제용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 V-ATPase 서브유닛은 V-ATPase 16kDa, V-ATPase_A, V-ATPase_B, V-ATPase D, V-ATPase_E, V-ATPase_G, V-ATPase_H 및 V-ATPase 116kDa으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인, 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 dsRNA의 주형 DNA 서열은 서열번호 1 내지 8의 염기서열로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인, 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 조성물 내 dsRNA의 농도는 5 내지 1000 ng/ml인, 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 상기 열대거세미나방의 성장을 억제하는 것인, 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 섭식을 통해 상기 열대거세미나방의 유충에 전달되는 것인, 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 부형제를 더 포함하는 것인, 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 수화제, 입상수화제, 액상수화제, 액제, 수용제, 수용성입제 및 캡슐화제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 제형인, 조성물.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 수간주사 조성물, 생물제제 조성물, 비료 조성물, 영양 조성물, 식물 강화 조성물, 식물 보호 조성물, 토양 개량 조성물(soil conditioner composition), 식품첨가물(food additives) 및 생산량 증가 조성물(yield enhancer composition)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인, 조성물.

청구항 10

청구항 1의 구성물을 식물 또는 상기 식물이 식재된 토양에 처리하는 단계를 포함하는, 열대거세미나방 (*Spodoptera frugiperda*)을 방제하는 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 구성물은 섭식을 통해 상기 열대거세미나방의 유충에 전달되는 것인, 방법.

청구항 12

청구항 10에 있어서, 상기 식물은 벼과, 배추과, 박과 또는 가지과 작물인 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, V-ATPase 서브유닛 유전자를 표적하는 dsRNA를 포함하는 열대거세미나방 방제용 조성물 및 이를 이용한 방제방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 열대거세미나방(*Spodoptera frugiperda*)은 아메리카대륙의 열대와 아열대 지역에 존재하는 해충이다. 겨울철 평균 온도가 10℃ 이하인 곳에서는 월동이 불가능하지만, 열대거세미나방은 뛰어난 비행 능력을 가지고 있어, 미국의 텍사스나 플로리다에서부터 2,000km 떨어진 캐나다의 온타리오와 퀘벡에서도 발견된다. 아메리카대륙 이외에서 열대거세미나방이 발견된 보고는 2016년 1월에 아프리카의 나이지리아 남서부지방과 가나가 처음이고, 열대거세미나방은 뛰어난 비행 능력으로 사하라 사막 이남의 아프리카 국가들로 확산이 되었다. 아시아에서는 2018년 인도에서 처음으로 보고된 후, 열대거세미나방은 방글라데시, 태국, 미얀마, 스리랑카등지에서 발견되었다. 그리고 2018년도 말에 중국 남부의 광둥성과 복건성과 절강성에서 열대거세미나방이 발생이 보고된 바 있으며, 대한민국에서는 중국에서 보고되고 6개월 후 제주도와 전라남도의 영광에서 열대거세미나방 성충이 포집되었다. 대한민국에서 발견되는 열대거세미나방은 아마도 중국에서 날아온 성충이 대부분을 차지 할 것으로 예측된다.

[0004] 열대거세미나방은 광식성 해충으로 옥수수, 수수, 벼 등 벼과 작물과 배추과, 박과, 가지과 식물에도 가해를 한다. 열대거세미나방의 피해를 줄이기 위해서는 열대거세미나방의 피해를 조기 발견하여 등록된 약제를 이용해서 신속하게 방제를 하는 것이 최선이다. 열대거세미나방의 애벌레와 성충은 모두 야행성이기 때문에 방제 작업은 해 뜨기 전이나 해가 진 뒤에 방제하는 것이 효과적이고, 발육 단계가 낮을수록 방제 효과가 높은 것으로 알려져 있다. 방제 작업에 사용할 수 있는 약제는 인독사카브(Indoxacarb)와 클로란트란릴리프롤(Chlorantraniliprole) 성분이 포함된 제품으로 옥수수 등 26개 작물별로 53개 농약 품목이 열대거세미나방의 방제용 약제로 등록되어 있다.

[0005] 그러나, 작물 보호제의 피할 수 없는 문제점은 다른 곤충 종이나 환경에 대해서 비특이적인 독성이 있다는 점과, 동일한 작물 보호제를 반복적으로 사용하는 경우 저항성 계통이 나타날 수 있다는 것이다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 작물 보호제와는 다른 방법으로 열대거세미나방을 제어할 수 있는 방법의 개발이 필요하다.

[0006] RNAi(RNA interference) 기술이란, 세포내에 특정 유전자의 dsRNA(double stranded RNA)가 들어가게 되면 다이스(Dicer)라는 효소가 dsRNA를 인지하여 21-23bp의 길이인 siRNA(small interfering RNA)를 생성하게 되며, 이 잘려진 siRNA를 RISC(RNA-induced silencing complex)가 인지하고 결합하여 특정서열을 가진 mRNA의 분해를 유도하여 유전자의 발현 및 단백질 합성을 억제하는 현상을 의미한다.

- [0007] 이러한 RNAi 기술은 최근 형질전환 작물체 개발기술과 접목되어 해충군 관리의 대안으로 각광을 받고 있으며, RNAi 기술을 이용하여 주요 해충군을 관리하기 위하여 dsRNA/siRNA를 개발하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다.
- [0008] 이에, 본 연구자들은 상기와 같은 문제점들을 해결하기 위해 열대거세미나방의 에너지 대사와 관련된 유전자들을 타겟으로 하여, dsRNA/siRNA 기술을 이용한 열대거세미나방 방제용 조성물을 개발하기에 이르렀다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-2226556호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 일 양상은 V-ATPase(Vacuolar-type H⁺-ATPase) 서브유닛 유전자를 표적하는 dsRNA(double stranded-RNA)를 포함하는, 열대거세미나방(*Spodoptera frugiperda*) 방제용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 양상은 상기 조성물을 식물 또는 상기 식물이 식재된 토양에 처리하는 단계를 포함하는, 열대거세미나방(*Spodoptera frugiperda*)을 방제하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명의 일 양상은 V-ATPase(Vacuolar-type H⁺-ATPase) 서브유닛 유전자를 표적하는 dsRNA(double stranded-RNA)를 포함하는, 열대거세미나방(*Spodoptera frugiperda*) 방제용 조성물을 제공한다.
- [0015] 상기 용어 "V-ATPase(Vacuolar-type H⁺-ATPase)"는 ATP를 에너지원으로 이용하여 H⁺를 이동시켜 세포막과 세포 소기관 막의 안쪽과 바깥 쪽 간의 전위차를 만들어내는 효소를 의미한다. 또한, 진핵 생물들의 세포 원형질막(plasma membrane) 또는 세포 내 소기관들의 막(membrane)에 존재하고, 상기 V-ATPase는 ATP를 분해하는 V1 domain과 H⁺를 이동시키는 V0 domain으로 구성되어 있다.
- [0016] 상기 용어 "dsRNA(double stranded-RNA)"는 센스(sense) 및 안티센스(antisense)가 결합된 것으로, 실질적으로 상보적인 2개의 핵산 가닥을 포함하는 이중체(duplex) 구조를 갖는 리보핵산 분자의 복합체를 의미한다. 상기 dsRNA는 세포내로 도입시, 단일 가닥으로 분리되어, siRNA의 형태로 표적 전사 RNA에 결합하여, 이로부터 단백질 합성되는 것을 방해한다.
- [0017] 상기 용어 "상보적"은 두 가닥의 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드가 특정 조건 하에 혼성화하여 이중체 구조를 형성할 수 있는 능력을 의미한다.
- [0018] 상기 용어 "열대거세미나방(*Spodoptera frugiperda*)"은 아메리카대륙의 열대와 아열대 지역에 존재하는 광식성 해충을 의미하고, 상기 열대거세미나방은 옥수수, 수수, 벼 등 벼과 작물과 배추과, 박과, 가지과 식물에 피해를 준다.
- [0019] 또한, 상기 열대거세미나방은 선호 기주 식물과 시토크롬 c 산화효소(COI: Cytochrome C oxidase I)의 대립유전자의 변이에 따라서 옥수수형(Corn strain) 또는 쌀형(Rice strain)으로 나뉘거나, 삼탄당인산 이소메라아제(Triose isomerase)의 유전형에 따라 Ca1와 Ca2 대립유전자들을 동일하게(homotypes) 또는 상이하게(heterotypes) 가지는 유전형으로 나뉠 수 있다.
- [0020] 상기 용어 "방제"란 작물에 피해를 주는 각종 병해충 또는 미생물을 예방하고 구제하는 것을 의미한다.
- [0021] 일 양상에 있어서, 상기 V-ATPase 서브유닛은 V-ATPase 16kDa, V-ATPase_A, V-ATPase_B, V-ATPase_D, V-ATPase_E, V-ATPase_G, V-ATPase_H 및 V-ATPase 116kDa으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있고,

V-ATPase 16kDa, V-ATPase_A, V-ATPase_B, V-ATPase_D, V-ATPase_E, V-ATPase_G, V-ATPase_H 및 V-ATPase 116kDa일 수 있다.

- [0022] 일 양상에 있어서, 상기 dsRNA의 주형 DNA 서열은 서열번호 1 내지 8의 염기서열로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0023] 일 양상에 있어서, 상기 열대거세미나방의 RNA 서열은 SRR3406020, SRR3406031, SRR3406036, SRR3406052, SRR3406053, SRR3406054 및 SRR3406055으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0024] 일 양상에 있어서, 상기 조성물 내 dsRNA의 농도는 5 내지 1000 ng/ml, 5 내지 500 ng/ml, 5 내지 100 ng/ml, 10 내지 1000 ng/ml, 10 내지 500 ng/ml, 10 내지 100 ng/ml, 15 내지 1000 ng/ml, 15 내지 500 ng/ml 또는 15 내지 100 ng/ml일 수 있다.
- [0025] 일 양상에 있어서, 상기 조성물 내 dsRNA의 농도가 5 ng/ml 미만인 경우, 열대거세미나방의 방제 효과가 유효하게 나타나지 않을 수 있고, 상기 조성물 내 dsRNA의 농도가 1000 ng/ml 초과인 경우, 열대거세미나방의 방제에 비경제적일 수 있다.
- [0026] 일 양상에 있어서, 상기 조성물은 상기 열대거세미나방의 성장을 억제하는 것일 수 있다.
- [0027] 일 양상에 있어서, 상기 조성물은 섭식을 통해 상기 열대거세미나방의 유충에 전달되는 것일 수 있다.
- [0028] 일 실시예에서는 8종의 목표 유전자들의 dsRNA들의 열대거세미나방에 대한 독성 효과를 확인하기 위해 20 ng/ml의 농도로 열대거세미나방 2령충을 노출시킨 결과, 음성대조군으로 eGFP(enhanced green fluorescence protein)의 dsRNA를 처리한 결과와 비교하여, 발육 억제 효과가 훨씬 우수함을 확인하였다.
- [0029] 또한, dsRNA를 섭취한 열대거세미나방 유충은 정상적인 발달이 이루어지지 않으므로, 도태될 수 있음을 알 수 있고, 상기 8종의 목표 유전자를 이용하여 제작한 dsRNA들이 열대거세미나방의 방제에 효과적으로 이용될 수 있음을 확인하였다(실시예 7 참조).
- [0030] 상기 용어 "유충"은 곤충의 미성숙한 아성체를 의미하고, 내시류 곤충에 있어서는 내시류 곤충이 번데기가 되기 전의 모습을 의미한다.
- [0031] 일 양상에 있어서, 상기 조성물은 부형제를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0032] 상기 부형제는 미생물 농약에 사용되는 것을 특정의 것에 한정하지 않고 사용할 수 있으므로, 부형제에 관한 설명은 생략하기로 한다. 일례로, 일 양상에 따른 방제용 조성물은 실제 포장에서 사용하기 적합한 안정적인 제제화를 목적으로 생화학 농약으로 사용가능한 계면활성제 또는 증량제 등을 부형제로 사용할 수 있다.
- [0033] 예를 들어, 상기 계면활성제는 알킬(C8~C12)아릴설포네이트, 디알킬(C3~C6)아릴설포네이트, 디알킬(C8~C12)설포숙시네이트, 리그닌설포네이트, 나프탈렌설포네이트축합물, 나프탈렌설포네이트포르말린축합물, 알킬(C8~C12)나프탈렌설포네이트포르말린축합물, 폴리옥시에틸렌알킬(C8~C12)페닐설포네이트와 같은 설포네이트 화합물의 나트륨염 또는 칼슘염, 알킬(C8~C12)설페이트, 알킬(C8~C12)아릴설페이트, 폴리옥시에틸렌알킬(C8~C12)설페이트, 폴리옥시에틸렌알킬(C8~C12)페닐설페이트와 같은 설페이트 화합물의 나트륨염 또는 칼슘염, 폴리옥시알킬렌숙시네이트와 같은 숙시네이트화합물의 나트륨염 또는 칼슘염, 나트륨 벤조에이트, 알킬카르복실레이트 등의 음이온성 계면활성제, 폴리옥시에틸렌알킬(C8~C12)에테르, 폴리옥시에틸렌알킬(C8~C12)페닐에테르, 폴리옥시에틸렌알킬(C8~C12)페닐폴리머, 에틸렌옥사이드 프로필렌옥사이드 코폴리머와 같은 비이온성 계면활성제, 폴리카복실레이트, 트리톤 100 및 트윈 80으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0034] 또한, 상기 증량제로는 벤토나이트(bentonite), 활석, 클레이, 카올린, 탄산칼슘, 규사, 경석, 규조토, 산성 백토, 제올라이트, 펄라이트, 화이트 카본, 암모늄 설페이트, 요소, 포도당, 덱스트린(dextrin), 콩가루, 쌀, 밀, 황토, 포도당 및 전분, 물 등이 단독으로 또는 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0035] 일 양상에 있어서, 상기 조성물은 수화제, 입상수화제, 액상수화제, 액제, 수용제, 수용성입제 및 캡슐화제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있다. 이들은 공지된 방법으로 제조될 수 있고, 예를 들어, 임의로 계면활성제(유화제, 분산제 또는 포움 형성제)를 사용하여 활성 화합물을 증량제(액체 용매 또는 고형 담체)와 혼합하여 제조될 수 있다.
- [0036] 상기 용어 "수화제"란 물에 녹지않는 농약 원제를 활석이나 카올린 등의 광물질 증량제와 계면활성제를 첨가하여 분쇄한 가는 가루를 의미한다.

- [0037] 상기 용어 “수용제”란 물에 잘 녹는 농약원제와 설탕 또는 유안과 같이 물에 잘 녹는 물질을 증량제로 제조한 것을 의미한다.
- [0038] 상기 용어 “수용성입제”란 emamectin과 같은 수용성 원제와 수용성 보조제를 이용하여 입상화한 제제를 의미한다.
- [0039] 상기 용어 “캡슐화제”란 보호 매트릭스 등을 이용하여, 예민한 재료를 물리적으로 포장하는 제제를 의미한다.
- [0040] 일 양상에 있어서, 상기 조성물은 수간주사 조성물, 생물제제 조성물, 비료 조성물, 영양 조성물, 식물 강화 조성물, 식물 보호 조성물, 토양 개량 조성물(soil conditioner composition), 식품첨가물(food additives) 및 생산량 증가 조성물(yield enhancer composition)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0041] 상기 용어 “수간주사”란 나무의 병을 치료하는 내과적 치료법의 일종으로 나무의 줄기에 주사를 꽂거나 구멍을 뚫어 약물이 주입될 수 있도록 하는 방법을 의미한다.
- [0042] 또한, 상기 조성물은 미량 영양소, 천연 원소, 천연 오일 추출물 등을 포함할 수 있다.
- [0043] 상기 용어 “미량 영양소”는 극히 적은 양이기는 하나 식물의 생육에 없어서는 안 될 원소를 의미하고, 예를 들어, 아연, 철, 망간, 구리, 보론, 코발트, 마나듐, 셀레늄, 실리콘, 니켈 등이 있다.
- [0044] 상기 용어 “천연 원소”는 인공적인 핵반응으로 새로 생성된 원소가 아닌 것을 의미하고, 예를 들어, 테크네튬, 프랑슘, 아스타틴 등이 있다.
- [0045] 상기 용어 “천연 추출물”은 정제된 단일 성분들에 비하여 많은 세부 성분들이 섞여서 존재하는 혼합물을 의미한다.
- [0046] 상기 용어 "식품 첨가물"은 식품공전에 등록이 되어 있는 사카린나트륨(saccharin sodium)을 포함한 6백가지 이상의 인간의 식품에 사용이 허가된 물질들을 의미한다.
- [0047] 본 발명의 다른 양상은 상기 조성물은 식물 또는 식물이 식재된 토양에 처리하는 단계를 포함하는, 열대거세미나방(*Spodoptera frugiperda*)을 방제하는 방법을 제공한다.
- [0048] 상기 "조성물", "열대거세미나방", "방제" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.
- [0049] 일 양상에 있어서, 상기 조성물은 섭식을 통해 상기 열대거세미나방의 유충에 전달되는 것일 수 있다.
- [0050] 일 양상에 있어서, 상기 식물은 벼과, 배추과, 박과 또는 가지과 작물일 수 있다.
- [0051] 상기 용어 "벼과"는 벼목에 속하는 과로 고등 식물 중 가장 큰 과의 하나를 의미하고, 예를 들어, 벼, 밀, 옥수수, 수수 등이 있다.
- [0052] 상기 용어 "배추과"는 십자화목의 과를 의미하고, 예를 들어, 배추, 겨자 등이 있다.
- [0053] 상기 용어 "박과"는 박목의 과를 의미하고, 예를 들어, 박, 오이, 수박, 참외, 수세미 등이 있다.
- [0054] 상기 용어 "가지과"는 가지목의 과를 의미하고, 예를 들어, 가지, 감자, 토마토 등이 있다.
- [0055] 일 양상에 있어서, 상기 조성물이 상기 토양에 처리되는 경우, 상기 조성물은 상기 식물의 뿌리를 통해 흡수되는 것일 수 있다.
- [0056] 또한, 상기 조성물이 상기 토양에 처리되는 경우, 상기 조성물은 증발에 의해 줄기 또는 잎 등으로 흡수되어, 상기 열대거세미나방이 상기 조성물을 섭취함으로써, 방제 효과를 나타내는 것일 수 있다.
- [0057] 일 양상에 있어서, 상기 처리는 상기 조성물을 직접적 또는 간접적으로 처리하는 것일 수 있고, 예를 들어, 주사제를 이용하여 주사하거나, 다른 액체와 희석하여 이용하거나, 스프레이를 이용하여 분사하는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0059] 본 발명에 따르면, V-ATPase 서브유닛을 표적하는 dsRNA를 포함하는 조성물을 처리하는 경우, 열대거세미나방의 발육 억제 효과가 우수함을 확인하였는 바, 열대거세미나방의 방제에 활용될 수 있으며, 쉽게 내성이 생기는 화학합성 살충제를 대체할 수 있는 효과가 있다. 또한 본 발명의 dsRNA 단편은 종 특이성이 높으므로 본 발명의

dsRNA로 형질전환된 식물은 이상적인 열대거세미나방 방제모델이 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0061] 도 1은 열대거세미나방(*Spodoptera frugiperda*)의 Genomic DNA를 주형(template)으로 이용하여 8종의 목표 유전자를 증폭한 결과를 나타내는 도이다(M = molecular ladder, 16kDa = V-ATPase 16 kDa, E = V-ATPase E subunit, 116kDa = V-ATPase 116kDa, D = V-ATPase D subunit, H = V-ATPase H subunit, B = V-ATPase B subunit, G = V-ATPase G subunit, A = V-ATPase A subunit).
- 도 2는 dsRNA 생성을 위해 T7-promotor 프라이머를 이용하여 8종의 template DNA를 증폭한 결과를 나타내는 도이다(M = molecular ladder, 16kDa = V-ATPase 16 kDa, E = V-ATPase E subunit, 116kDa = V-ATPase 116kDa, D = V-ATPase D subunit, H = V-ATPase H subunit, B = V-ATPase B subunit, G = V-ATPase G subunit, A = V-ATPase A subunit).
- 도 3은 8종의 목표 유전자들에 대하여 열대거세미나방의 1령부터 6령까지의 발육 단계별 발현양의 변화를 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- 도 4는 8종의 목표 유전자들에 대한 dsRNA가 각각 열대거세미나방의 발달을 저해함을 확인한 결과를 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0062] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0064] 실시예

[0065] 1. 열대거세미나방(*Spodoptera frugiperda*) 중 특이 방제기법을 개발하기 위한 8종의 목표유전자 선별

- [0066] 열대거세미나방(*Spodoptera frugiperda*) 중 특이 방제기법을 개발하기 위한 목표 유전자를 선별하기 위해 8종의 열대거세미나방 RNA-seq dataset를 NCBI에서 확보를 하였다(NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GESP000000000.1>, SRR3406020, SRR3406031, SRR3406036, SRR3406052, SRR3406053, SRR3406054, SRR3406055 및 SRR3406059). 이 중 SRR3406059는 연구에 적절하지 않아, 7종(SRR3406020, SRR3406031, SRR3406036, SRR3406052, SRR3406053, SRR3406054 및 SRR3406055)의 열대거세미나방의 dataset을 이용하였다. Trinity program을 이용하여 총 22,745개의 contig를 제작하였다. 총 387,000개의 나비목 단백질 Refseq을 GenBank에서 확보한 후, BLASTX를 진행하여 각각 단백질들에 대한 annotation을 수행하였다.

- [0067] 총 387,000개의 나비목 단백질 Refseq을 GenBank에서 확보한 후, BLASTX를 진행하여 각각 단백질들에 대한 annotation을 수행한 결과, 열대거세미나방의 V-ATPase(Vacuolar-type H⁺-ATPase)의 V1 domain 또는 V0 domain을 구성하는 subunit들 중에서 8종의 subunit의 서열을 확인하였다. 상기 서열을 바탕으로 V-ATPase subunit들의 발현을 double stranded RNA(dsRNA)를 이용하여 감소시켜 열대거세미나방의 발달 저해 효과를 확인하였다.

[0069] 2. dsRNA 제작을 위한 목표 유전자들의 서열 확인

- [0070] 8종의 dsRNA 제작을 위한 목표 유전자들의 서열을 표 1에 나타내었다.

- [0071] 구체적으로, 1번 V-ATPase 16kDa 유전자의 coding DNA sequence (CDS)는 총 471개의 bp로 구성되어 있고, 이론적인 pI는 8.96이고, 분자량(MW)이 15.934 kDa의 단백질로 발현됨을 확인하였다. 2번 V-ATPase A유전자의 CDS는 1851개의 bp로 구성되어 있고, 이론적인 pI는 5.22이고, MW이 68.105 kDa의 단백질로 발현됨을 확인하였다. 3번 V-ATPase B유전자의 CDS는 1485개의 1,485bp로 구성되어 있고, 이론적인 pI는 5.26이고 MW이 54.942 kDa의 단백질로 발현됨을 확인하였다. 4번 V-ATPase D유전자의 CDS는 741개의 741bp로 구성되어 있고, 이론적인 pI는 9.46이고, MW이 27.491 kDa의 단백질로 발현됨을 확인하였다. 5번 V-ATPase E유전자의 CDS는 681개의 681bp로 구성되어 있고, 이론적인 pI는 8.70이고, MW이 26.16 kDa의 단백질로 발현됨을 확인하였다. 6번 V-ATPase G유전

자의 CDS는 354개의 354bp로 구성되어 있고, 이론적인 pI는 9.40이고 MW이 13.684 kDa의 단백질로 발현됨을 확인하였다. 7번 V-ATPase H유전자의 CDS는 1425개의 1,425bp로 구성되어 있고, 이론적인 pI는 6.19이고, MW이 55.119 kDa의 단백질로 발현됨을 확인하였다. 8번 V-ATPase 116kDa유전자의 CDS는 2523개의 2,523bp로 구성되어 있고, 이론적인 pI는 5.29이고, MW이 96.27 kDa의 단백질로 발현됨을 확인하였다.

표 1

[0072]

Gene name	Contig No.	Annotation
No.1. V-ATPase 16kDa	SfCon01362	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit XP_021182666.1 proton-transporting V-type ATPase, V0 domain
>SfCon01362 CDS ATGGCCGAAAAACCAATCTACGGACCCTTCTTTGGAGTTATGGGGCGGCGTCTGCTATCATCTTTAGCGCGTGGGAGTGCCTATGGAAC TGCTAAGTCAGGCACCGGTATCGCGCCATGTCGGTGATGCGGCGGAGCTCATGAAGTCCATATTCCCGTCGTCATGGCGGGTATCA TTGCCATCTACGGTCTGGTAGTGGCTGTCCTGATTGCAGGATCCTTGGACGCCCCGTCCAACAACCTACACCTTTACAAGGGTTTCATCCAC CTGGCGCTGGTCTCGCGGTAGGTTTCTCCGGTCTAGCGCGCGGCTTCGCCATTGGTATCGTGGGTGACGCTGGTGTCCGTGGTACCGCGCA ACAGCCAGGTTATTCGTCGGAATGATCCTTATCCTCATTTTCGCTGAAGTATTGGGTCTATACGGTCTCATGTCGCCATCTACCTTTACA CGAAACAGTAA Amino acid sequences MAENPIYGPFFGVMAASAIIFSALGAAYGTAKSGTGIAAMSVMRPELIMKSIIPVVMAGIIAIYGLVVAVLIAGSLDAPSNNYLYKGF I H LGAGLAVGFSGLAAGFAIGIVGDAGVRGTAQPRLFVGMILILIFAENVGLYGLIVAIYLYTKQ		
No.2. V-ATPase_A	SfCon13042	V-type proton ATPase catalytic subunit A XP_022826560.1
>SfCon13042 CDS ATGAGCAAAAGCGGTTTGAAGACAATCGCTGATGAGGACAGGGAGGAAAAGTTCGGATTCTGCTTCGCCGTATCCGGACCCGTCGTAACGGC GGAGAAAATGTCCGGATCGGCTATGTACGAGTTGGTGCGTGTGCGCTACCACGAGCTGGTCGGAGAGATCATCCGTCTTGAGGGTGACATGG CCACCATCCAGGTATACGAAGAAACATCAGGTGTAAGTGTAGGTGACCCCGTGTGCGTACCGGCAAGCCCTGTCCGTAGAGCTGGGTCTCT GGTATCCTCGGCTCCATCTTTGACGGTATCCAGCGGCCACTGAAGGACATCAACGAGCTCACACAGTCCATCTACATCCCCAAGGGTGTCAA CGTACCCCTGGCTTGGACGTGATGTACCTGGGAATCAACCCCTTGAATGTTAAGGTGCGGTCCACATCACCGGAGGAGACTTGTACGGTA TCGTACACGAGAACAACATTGGTTAAGCATAGATGTTGATCCCAACCAAGGCAAGGGTACCGTACCTACGTGCGGCCCTCCGGCAACTAC AAAGTCACTGACGTAGTGTGGAGACGGAGTTCGACGGCGAGAAGGAGAAGTACACCATGTTGCAAGTATGGCCGGTGCGCCAGCCCCGCC CGTCACTGAGAAGCTGCCGCCAACACCCCTGTCTACCGGACAGAGAGTGTGACTCTCTCTTCCCTTGTGTCCAGGGTGGTACCACGG CCATCCCCGCGCCTTCGGTTGTGGCAAGACTGTGCTCTCACAGGCTCTGTCCAAGTACTCCAACCTCTGACGTATCATCTACGTCCGATGC GGTGAACGTGGTAACGAGATGTCTGAGGTACTGCGTGACTTCCCGAGCTGACGGTGGAGATCGAGGGCATGACCGAGTCCATCATGAAGCG TACCGCGCTCGTCGCAACACCTCCAACATGCCTGTAGCCGCCGAGAGGCTTCCATCTACACCGGTATCACCTCTCCGAGTACTTCCGTG ACATGGGTACAACGTGTCATGATGGCTGACTCCACCTCTCGTGGGCCGAGGCTCTTCGTGAGATCTCAGGTGCTGGCTGAGATGCCT GCCGATCCGGTTACCCCGCTACCTGGGAGCCCCGTCTGGCCTCGTTCTACGAGCGTGCAGGACGTGTGAAGTGCCTGGGTAAACCCGACAG GGAGGGCTCCGTGTCATCGTGGGCGCGTGTGCGCGCCGAGGTGACTTCTCCGACCCGTGACGGCGGCCACGCTGGGTATCGTGCAGG TGTTCTGGGGTTGGACAAGAAGCTCGCGCAGCGCAAGCACTTCCCCGCCATCAACTGGCTCATCTCTACAGCAAGTACATGCGAGCGCTG GATGACTTCTATGAGAAGAACTACCCGAGTTCGTGCCCTCAGGACCAAGGTCAAGGAGATCCTGCAGGAAGAAGAGGATCTCTCAGAAAT CGTGACGCTGGTCCGTAAGGCGTCGCTTGCCGAGACTGACAAAATCACCTTGTAGGTTGCCAAGCTGCTCAAAGACGACTTCTTGCAACAAA ACAGTACTCGTCATACGATCGTTTCTGTCCGTTTACAAGACCGTGGGCATGTTGAAGAACATCATCGATTCTACGACATGTCCCGACAC GCCGTCGAGTCCACCGCGCAGTCCGACAACAAGTCACTGGAACGTCATCCGTGACGCCATGGGCAACGTACTCTACCGCTCTCCTCCAT GAAGTTCAAGGACCCGTGAAGAAGGCGAGGCTAAGATCAAGGCGACTTCGACCAACTCTGGAAGACATGGCGGCCGCTTCCGCAACC TCGAGGACTAG Amino acid sequences MSKSLKTIADREEEKFGVFVAVSGPVVTAEKMSGAMYELVRVGYHELVEIIRLEGDMATIQVYEETSGVTVGDPVLRGTGKPLSVELGP GILGSIFDGIQRPLKDINELTQSIYIPKGVNVPCLGRDVTWFEFNPLNVKVGSHITGGDLYGIVHENTLVKHKMLIPPKAKGTVTYVAPSGNY KVTDVVLETEFDGEKEKYTMLQVWPVRQPRPVTEKLPANHPLL TGQVRVLDLSLFPVQGGTTAIPGAFGCGKTVVSQALSKYSNSDVIIYVGC GERGNEMSEVL RDPPELTVEIEGMTESIMKRTALVANTSMPVAAREASITYGITLSEYFRDMGVNVSMMADSTSRWAEALREISGRLEAMP ADSGYPAYLGARLASFYERAGRVKCLGNPDREGSVSIVGAVSPPGGDFSDPVTATLGIVQVFWGLDKKLAQRKHFPAINWLI SYSKYMRAL DDFYEKNYPFVPLRTKVKELIQEEEDLSEIVQLVGKASLAETDKITLEVAKLLKDDFLQNSYSSYDRFCPFYKTVGMLKNI IAFYDMSRH AVESTAQSDNKVTWNVIRDAMGNVLYQLSSMKFKDPVKEGEAKIKADFQDLEDMAA AFRNLED*		
No.3. V-ATPase_B	SfCon08146	V-type proton ATPase subunit B, XP_022827405.1

>SfCon08146 CDS ATGGCAAAAACCTTACGTCTTCCCAAGCGACTAAGGAACATGTCTTGGCTGTATCCCGGGACTTCATATCCCAGCCCGTCTCACTTACAA GACGGTGTGGGTGTGAACGGGCTCTGGTCATCTTGGACGAGGTCAAGTTCCTCCGAGATCGTGACGCTCAGACTCGCTGATG GCACCTTCGCTCCGGTCAGGTGCTCGAGGTCAGCGGCACCAAGGCCGTGGTCCAGGTGTTCAAGGTACATCAGGTATCGACGCCAAGAAC ACTCTCTGTGAGTTACGGGCGACATCTCGGTACTCCCGTGTCTGAAGATATGTTGGGTGCTGATTCAACGCTCCGGCAAGCCATTGA CAAGGGTCCCCAATCTCGCCGAGGACTCTTGGACATCCAGGACAGCCCATCAACCCATGGTCCCGTATCTACCTGAGGAGATGATCC AGACTGGTATCTCCGCTATTGACGTGATGAACCTCATCGCTCGTGGTCAGAAGATCCCCATCTTCTCCGCTGCTGGTCTGCCCCACAACGAA ATTGCGCCAGATCTGTAGACAGGCCGCTTGTCAAGATCCCGGCAATCAGTGTGGATGACCACGAGGACAACTTCGCCATCGTGT CGCCGCTATGGGTGTGAACATGGAACCGCCGCTTCTCAAAGAGGACTTCGAAGAGAACGGTTCATGGAGAACGCTGCTCTTCTTGA ACTTGGCCAACGACCTACCATTGAGAGAATTATCACACCCGCTGCTGCTGACTGCCGCGAGTTCTTGGCTACCAGTGCGAGAAACAC GTGTTGGTCATCTTGACTGACATGTCTCATACGCCGAGGCTCTGCGTGAGGTGTCGCCGCCGCTGAGGAGGTGCCCGACGTCTGGTTT CCCAGTTACATGTACACGATTGGCCACCATCTACGAGCGTGCCGCCGCTGTGGAGGGCAGGAACGGCTCCATCACCCAGATCCCCATTC TTACTATGCCCAACGACGACATCACCCATCTTCTGACTTGACGGGTATATTAAGTACGAGGACAGATCTACGTAGACCGTCAGCTCCAC AACAGACAGATCTACCCGCCAGTGAACGTGCTGCCCTCTCTGTACGTTTGTGAAGTCTGCCATCGGTGAGGACATGACCCGCAAGGACCA CTCTGATGTCTCAACAGCTGTACGCTTGTACGCCATCGTAAGGACGTGACGCGATGAAGGCCGCTGCTGGTGAGGAGGCGCTACCC CTGATGACTTGTCTCGATTCTCTACCAAGTTCGAGAAGGACTTCATCTCCAGGTAACACGAGAACCGCACAGTGTTCGAGTCC CTGGACATCGGCTGGCAGCTGCTGCTATCTTCCGAAGGAGATGTTGAAGCGTATCCCCGCTCCATCTCGCCGAGTTCTACCCGCGCA CTCCCGCCACTAG Amino acid sequences MAKTLTSSQATKEHVLAVSRDFISQRLTYKTVSGVNGPLVILDEVKPKFSEIVQLRLADGTLRSGQVLEVSGTKAVVQVFEGTSGIDAKN TLCEFTGDI LRTPVSEDMLGRVFNLSGKPIDKGPPILAEDFLDIQQGPINPWSRIYPEEMIQTGISAIDVMNSIARGQKIPISAAGLPHNE IAAQICRQAGLVKIPGKSVLDDHEDNFAIVFAAMGVNMTARFFKQDFEENGSMENVCLFLNLANPTIERIITPRLLATAAEFLAYQCEKH VLVILTDMSSYAEALREVSAAREEVPGRRGFPGYMYTDLAT IYERAGRVEGRNGSITQIPILTMPNDIITHPIPDLTGYITEGQIYVDRQLH NRQIYPPVNVLPSSLRLMKSIAIGEGMTRKDHSDVSNQLYACYAIGKDVQAMKAVVGEEALTPDLLYLEFLTKFEKNFISQNYENRTVFES LDIGWQLLRIFPKEMLRIPASILAIFYPRDSRH*		
No.4. V-ATPase D	SfCon05268	V-type proton ATPase subunit D, XP_022826791.1
>SfCon05268 CDS ATGTCGTGAAAAGATAGGCTAGCGATTTTCCCTTCTCGGGGTGCTCAGATGTTGATAAAGGCTCGTCTGGCTGGAGCACAGAAAGGCCATGG TCTCTGAAAGAAGGCTGACGCCCTCCAAAGTGAAGTTCCGTATGATCTGAGCAAAATATCGAGACAAAAACCTTATGGGTGAGGTGA TGAAAGAGGCTGCATTCTCTCTGGCGGAAGCCAAGTTCACTACTGGAGATTCAACCAGGTTGTGCTGCAGAAATGTCACTAAGGCTCAAATC AAGATCCGCTCAAAGAAAGACAATGTTGCTGGTGTGACCTCCCGATCTTCGAGTCATACACTGATGGTACTGACACATATGAAGTGGCTGG TCTGGCCCGAGGTGGTCAACAGCTGACCAAGCTGAAGAAGAACTTCCAAAGTGTGTGAACTGCTGGTCGAGTTGGCTCGCTGCAGACTT CTTTCGTGACCTCGATGAGGTCATCAAGATCACCAACAGACGTGTCAATGCTATTGAGCATGTAATCATTCCCGACTGGAGCGTACCCTC GCTTACATCATTTCCGAGCTGGATGAGTTGGAACGTGAGGAGTTCTACCGGTGAAGAAGATCCAGGACAAGAAGAAGATCATCAAGGAGAA GGCGGAAGCGCGTAAACAAGCAGCACTGCTTGCCGCCAGGACTTGCCGACGCTGCCAACTTGTGGACGAAGGCGACGAGGACCTGCTGT TCTAG Amino acid sequences MSGKDLRI FPSRGAQMLIKARLAGAQKHGHLKKKADALQVRFRMILSKI IETKTLMEVMKEAASFSLAEAKFTTGDFNQVVLQNVTKAQI KIRSKKDNVAGVTLP I FESYTDGTDYELAGLARGGQQLTKLKNFQSAVKLLVELASLQTSFVTLDEVIKITNRRVNAIEHVIIPRLERTL AYII SELDELEREEFYRLKKIQDKKKI I KEKAEARKQAALLAGQDLADAANLLDEGDEDLF*		
No.5. V-ATPase_E	SfCon01382	XP_022815239.1 V-type proton ATPase subunit E
>SfCon01382 CDS ATGGCGCTCAGCGATGCAGATGTTCAAAAACAGATCAAGCACATGATGGCCTTCATCGAGCAAGAAGCCAATGAAAAGGCTGAGGAAATCGA TGCAAAGGCCGAGGAGGAGTTCAACATCGAAAAGGGGCGCTGGTCCAGCAGCAGAGGTTGAAGATCATGGAGTACTATGAGAAGAAGGAAA AGCAGGTGCAACTCCAGAAAAAGATCAATCCTCAAACATGCTGAACAGGCTCGTCTCAGGGTGTCAAAGTACGTGAAGACCATGTACGC AACCTGTTGGACGAGGCCCGCAAGCGCCTGGCTGAAGTACCCAAAGACCAGAAGCTGTACACTGACCTGCTGACCGCACTCATCGTACAGGC CCTCTTCCAGCTGATGGAGCCCGCAGTGACCCTGCGTGTCCGTGAGGACAGCAAGTCCTTGGTGGAGTCAAGTCTGTCAAAGGCCAGAGCG ACTACAAAGCTCAGATCAAGAAGGACACTGTATTGAAGATCGACACTGACAACTGGCTGTACCTGACACCTGCGGTGGAATCGAGCTTATC GCTCTCAAGGGACGCATCAAGATCTGCAACACCCCTGGAGTCTCGCTGGAGTTAATCGCCAGCAGCTGCTGCCTGAGATCCGTACCGCCCT CTTCGGCCGCAACCTAACCGTAAATTAACGATTAA Amino acid sequences MALSDADVQKQIKHMMAFIEQEANEKAEIDAKAEFEFNIEKGRLVQQQLKIMEYVEKKEKQVELQKKIQSSNMLNQARLRVLKVREDHVR NLLDEARKRLAEVPKDQKLYTDLLTALIVQALFQLMEPAVTLRVRQADKSLVESVLSKAQSDYKAQIKKDTVLKIDTDNWLSPDTCGGIELI ALKGRIRIKCNTLESRLLEIAQQLPEIRTAIFGRNPNRKFND		
No. 6. V-ATPase_G	SfCon09201	V-type proton ATPase subunit G XP_022818379.1

>SfCon09201 CDS ATGGCGAGTCAGACACAGGGAATCCAACAACGTGTTGGCGGCTGAAAAGCGCGCTGCCGAAAAGGTTTCAGAGGCCAGGAAGCGGAAAGCAAA ACGCCTAAAGCAGGCTAAGGAGGAGGCCAAGATGAGGTGGAAGTACAGACAGGAGCGTGAGAGGCAGTTCAAAGAGTTTCAGAGGCCAAGC ACATGGGCACCCGGGAAGGTGTTGCTGCTAAGATCGAAGCTGAGACCAAGATCAAGATCGAAGAGATGAACAAAATGGTGAAGGCACAGCAA GAGGCCGTGATCAAGGATATCCTCAACCTGGTGTACGACATCAAGCCAGAAGTGCACACCAACTACCGCATCTCTAA Amino acid sequences MASQTQGIQQLLAAEKRAAEKVSEARKRKAKRLKQAKEEAQDEVEKYRQERERQFKEFEAKHMGTRGVAAKIEAETKIKIEEMNKMVKAQQ EAVIKDILNLVYDIKPELHTNYRIL*		
No.7. V-ATPase_H	SfCon11694	V-type proton ATPase subunit H XP_022822595.1
>SfCon11694 CDS ATGGCTAACATGGGTGATGAAAATGTTAGTCAGGTAATGCCGTCGCTGGGTGATGAAAAATCGACATGATTGCGGCCACCAGCGTCTTGCA AATCCGCGCCAGTGAAATCCGCCAGACTCAGATCAACTGGCAATCTTATCTGCAGTCTCAGATGATCAGTCAGCGTGACCATGACTTCATTG TGAACCTGGACCAGCGTGGCATGAAGGAGTTGCCCGACAGGAACCCAGAAACTTGTGCTGAAGTCTTCTGAACTTGCTCACACATATCAGC AAGGATCATACCATCCAGTACTTGCTTGTACTGATGGATGACATCTTTCTGAGGATAAAGGCAGAGTGAAGATCTCCGTGAAGCTAGGAT GGGTAAACCCGTGGCAGCCATTCTGAACTTGCTGAATCGCCAGGATGAGTTTGTTCAGCACATGACGGCCCGTATCATCGCTAAGCTGGCCT GCTGGCATCCAAACCTGATGGAGAAGAGTGATCTCCACTTCTACCTCTCCTGGCTTAAGGACCAACTTAAGATGAACAACAATGAATACATC CAATCTGTGGCTCGCTGCCTGCAATGATGCTGCGCGTCGACGAGTACCGCTTCGCGTTCCTGTCTGTTGACGGCATCTCCACCTTGCTGTC TATCTGGCTTCCAGAGTCAACTTCCAGGTGCAATACCAGCTTGTGTTCTGCTTGTGGGTGCTGACATTCAACCCCTGTTGGCCGAGAAGA TGAACAAGTTCAATGCCATCCCATCCTCGCCGACATCCTCAGCGACTCCGTCAGGAGAAGGTACGCGCATCGTGTCTGCTGTGTTTCAGG AACCTGATCGAAAAACCTGAAGACCATCAGGTTGCCAAGGAGCACTGCATCGCCATGGTACAGTGAAGGTCTGAAAGCAATTGATGATCCT GCAGCAGAAGCGCTCTGACGATGAAGACATCATGAACGATGTGGACTTCTGAACGAACGCCTGCAGACTTCAGTACAAGACCTCAGCTCAT TCGACCAGTACGCTACTGAAGTCAAGAGCGGCCGTCTGGAATGGTCGCCCGTCCACAAATCCGCTAAGTCTGCGCGCAGAACGCTGCTCGT CTGAACGAGCGCGCCAGGAGTTGCTCCGTACCTGGTGACCTGCTGGAGAGGAGTAACGACCCCGTCTGCTCGCGTCTGCTGCTACGA CATCGGTGAATACGTCCGCCACTACCCACGAGGCAACACATTATCGAGCAGCTGGGCGGTAAACAACGCGTCATGTACCTGCTGAGCCACG AAGACCCCAACGTCCGATACGAAGCTCTACTCGCGTCCAGAAATTGATGGTCCACAAGTGGGAATACCTTGGCAAGCAATTGGAGAAAGAA CAATCGACAAGCAGGCGGCACTGTTGTGCGAGCTAAAGCTTAA Amino acid sequences MANMGDENVSQVMPSLGDEKIDMIAATSVLQIRASEIRQTQINWQSYLQSQMI SQRDHFIVNLDQRGMKELPDRNPETCAEVFLNLLTHIS KDHTIQYLLVLMDDILSEDKGRVKIFREARMGNPWQPFLLNLRQDEFVQHMTARI IAKLACWHPNLMKESDLHFYLSWLKDQLKMNNNEY I QSVARCLQMLRVDEYRFAFLSVDGISLTLASILASRVNFQVQYQLVFCLWVLTFNPLLA EKMKNKFNAIPILADILSDSVKEKVTRI VLAVFR NLIEKPEDHQVAKEHC I AMVQCKVLKQLMILQQKRSDDEDI MNVDVFLNERLQTSVQDLSSFDQYATEVKSGRLEWSPVHKSAKFWRENAAR LNERGQELLRTL VHL LERSNDPVVLAVACYDIGEYVRHYPRGKHI IEQLGGKQRMVYLLSHEDPNVRYEALLAVQKLMVHNWEYLGKQLEKE QIDKQAGTVVGAKA*		
No.8. V-ATPase 116kDa	SfCon13042	V-type proton ATPase catalytic subunit A XP_022826560.1

>SfCon03647
CDS
ATGGGGTCGTTGTTAGGAGTGAAGAAATGACATTATGTCAACTTTTCTGCAGAGCGAAGCCGCGTATGCATGCGTGTCTGAACTCGGAGA
GCTGGGTCTCGTGCAGTTCGAGATTAAACCCAGACGTGAACGCTTTCCAACGCAAGTTCGTCAATGAAGTACGTCGTTGTGATGAGATGG
AGCGAAAGCTCCGATACTTGGAGAAGGAGATTCCCGGTGATGGGATCCCCATGCTCGAGATCCCGGGCGAATGCCCGAGGCCCAACCG
AGGGAGATGATCGATCTTGGAGCTACCTTCGAAAAGTTGGAGAATGAACTCCGTGAGGTCAACCAGAACGCTGAAGCTCTAAAGAGAACTA
CCTTGAGCTCACAGAACTCAAGCACATTCTTAGAAAAACACAAGTTTCTTTGACGAGATGGCGGACCCGTCGCGGAGGAGGAACAAGTGA
CCCTACTAGGGGAGGAGGGGCTCATGGCGGGCGGGCAAGCTCTCAAGCTGGGTTTCGTGGCTGGAGTGATCCTTCGTGAGCGCATTCCTGCT
TTTGAGCGCATGTTATGGCGCGCCTGCAGAGGAATGTGTTCTCCGCCAGGAGAGATCGACACACCCTTGGAAAGACCCCTCATCTTCGGA
CCAGGTGTACAAGTCGAGTGTTCATCATCTTCTTCCAAGGAGACAGCTGAAGACCCGCGTGAAGAAGATCTGCGAAGGTTTCGTTGCGACCC
TCTACCCCTTCCCCGAGGACCCGCTGACAGACGGGAGATGGCCATGGGAGTTATGACCAGGATCGAGGATTTGAACACGGTACTAGGTCAG
ACCAAGACCACCGTCACCGGTACTGGTGGCAGTGCAGAAGACATTAAGAAGTGGTTCGTGAAGGTTGCAAGATCAAGGCTATCTACCA
CACGTGAACCTGTTCAACTTGGATGTCACCCAGAAATGTCTCATCGTGTGAGTGCTGGGTGCCGCTCTTGATCTGGAACACCTTACGCTGG
CTCTGAGGAGGGGACGAGGCGCAGTGGTAGCTCGGTGCTCCGATCTGAACCGCATGGAGACGTTAGAGGACCCGCGACTTACAACCGC
ACCAACAAGTTCACGTCGGCCTTCCAGAACCTCATCTACGCGTACGGTGTGCCACCTACCGGGAGGTCAATCCTGCCCGCTACACCATCAT
CAGTTCCCGTTCCTGTTGCGCGTGTGTTTCGGAGACCTCGGCCACGGCGCGCTGATGGCCATCTTCGGATTCTGGATGTGCTACAAGGAGA
AACCATGTACAAGCAAGCAAAATTCACAGCGAGATCTGGAACATATTCTTCGGTGGTGGTGCATCATCATATGCTGCGAAGGTTTCGATG
TACACTGGCCTCATCTACAACGACATCTTCTCCAAAAGTCTGAATATCTTCGGCTCTCTGAGGGAACAACCTACAACAGTCCACCTGGA
AAGCAACAAGCTACTGAACTCAACCTGATTAGAAGATTATATCCAACTCCTTATCCGTTTGGTATCGATCCTGTTTGGCAGTGGCTG
AAGCGAACAAGATTATCTTCATGAACGCGTACAAGATGAAGATCTCCATCATCATCGAGTGTTCACATGTTGTTGGTGTCTGCATGTCG
CTCTGAACCATCTGTACTTCAAGCGTCGTATCAGCGTGTACGTGGAGTTTATCCCCAGATCCTGTTCTCTGACGCTGCTGTTCTTCTACAT
GGTGTGCTCATGTTATCAAGTGGACACGTACGGTTCACCCACCATTCTACGCGAGTGTGACCTGAGATCGTGAAGACGAGTGGCT
ACTGCGCGCGCTCGATCCTGATCAGTTCATCAACATGATGTTGTTCAAGCAGCAGCCAACACGCGCCCGCTCTGCGACGACACCATGTAC
GCCGCGCAGATGGGCATACAGAAGTTCTTCGTGATCCTGGCTCTGATGTGCGTGGTGGTGTGTTGTTTCGGCAAGCCTTACTTTCATCATGAA
GGAGCAGAAGCAGAGGGCTCTGGCGCGCCAAGGCCACGACAGTACAGGGCGCGCGGAGAACGGCAACGAGGCGGAGCCGCGCGCGCCG
CCGCGCATCATCAGCAGGAGCATTACTGAAGTCTTATCCATCAGGGTATCCACAGATCGAGTACGTGCTGGGACGCGTGTCCACACG
GCGTGTACCTGCGTCTGTGGGCACTGTGCTGGCACACGACAGCTCGCCGAGGTGCGATGGAACATGTTGCTCAGGAAAGTCTGATGTC
GACGACTTCCAGGGCGGTATCTTCTGTACATAGTGTTCGCCGCTGGGCCCATCTCCGTGTCTATCCTCGTCTCATGAGGGGCTCT
CCGATTTCTACACACCTGCGTCTGCACTGGGTGGAGTTCAGAGTAAGTTCTACCAGGGTGAGGGTACCTCTTCCAGCCGTTCTCCTTC
GAGGTGATCTCGACTCGGCGGGACAGACGGAAGAATAA

Amino acid sequences
MGS LFRSEEMTL CQLFLQSE AAYACVSELGELGLVQFRDLNPDVNAFQRKFVNEVRRCDemerKLRYLEKE IRRDGI PMLEIPGECPEAPQP
REMI DEATFEKLENELEVNQNAEALKRNYLELTELKHLRKTVQVFFDEMADPSREEEQVTLLGEEGLMAGGQALKLGFVAGVILRERIPA
FERMLWRACRGNVFLRQAEIDTLPEDPSSSDQVYKSVFIFFQGDQLKTRVKKICEGFRATLYPCPEAPADREMAMGVMTRIEDLNTVLGQ
TQDHRHRVLA AAKNIKNWFKVRKIKAIYHTLNLFNLDVTQKCLIAECWVPALDLETIQLALRRGTERSGSSVPPILNRMETLEDPPTYNR
TNKFTSAFQNL IYAYGVATYREVNPAPYTIITFPFLFAVMFGDLGHGALMAIFGFWMCYKEKPLQAKKIDSEIWNIFFGGRI ILLMGLFSM
YTGLIYNDIFSLSLNI FGSSWRNNYNQSTLESNKLQLNPDSEDI IQTPYPFGIDPVWQLAEANKI IFMNAYKMKISIIIGVFHMLFGVCM
LWNHLYFKRRISVYVEFIPQILFLTLLFFYVLLMFIKWTTYGSTPPFYGSDDPEIVKTSAYCAPSILITFNMMLFKHDANTRPVCDTMY
AGQMG IQKFFVILALMCVPVMLFGKPYFIMKEQKQRALARQGHQPVEGAENGNAGGAAAPAAHHHDEDITEVFIHQGIHTIEYVLGSVSH
ASYLRLWALS LAHAQLAEVAVNMLLRKGLMSTDFQGGIFLYIVFAGWAAISVSILVMEGLSAFLHTLRLHWWVEFQSKFYQGEGLYLPQPF
SEVILDSAGQTEE

[0074] 3. 목표 유전자들의 dsRNA 제조를 위한 DNA fragment의 증폭

[0075] dsRNA를 제조하기 위해 열대거세미나방의 6령 유충으로부터 total RNA를 Trizol을 이용하여 추출하였다. 추출된 total RNA에 DNase I을 처리하여 오염된 genomic DNA를 제거하여 실험에 이용하였다. 또한, Superscript IV를 이용하여 cDNA를 제작한 후, 유전자 증폭을 위한 PCR의 주형(template)로 이용하였다.

[0076] 8종의 유전자들을 유전자의 프라이머 쌍을(표 2) 이용하여 PCR을 진행하였다. 20 μ l의 PCR 반응액에는 cDNA template 1 μ l, 한 쌍의 Primer를 각각 1 μ l 및 5x rTag PCR master mix 4 μ l를 넣고, 증류수(DW: distilled water) 13 μ l를 넣은 후 반응을 시켰다. 반응은 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 배양(incubation)시킨 후, 95 $^{\circ}$ C에서 10초, 56 $^{\circ}$ C에서 10초 및 72 $^{\circ}$ C 10초간씩 배양을 진행하는 것을 30 사이클 동안 반복한 후, 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 배양시킨 후 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다. PCR 반응물은 2% 아가로스 겔(Agarose gel)에서 분리한 후, Neogreen을 이용하여 DNA fragment를 염색하고 촬영하였다. 그 결과, 200 내지 300 bp크기의 DNA fragments가 증폭됨을 확인하였다(도 1).

표 2

[0077]

Oligomers name	Oligomer sequences	T7-oligomer sequences
V-ATPase 16kDa-F	CAA TCT ACG GAC CCT TCT TTG GA	TAATACGACTCACTATAGGGAG-CAA TCT ACG GAC CCT TCT TTG GA
V-ATPase 16kDa-R	TAA AGG GTG TAG TTG TTG GAC GG	TAATACGACTCACTATAGGGAG-TAA AGG GTG TAG TTG TTG GAC GG
V-ATPase A-F	AG CTC ACA CAG TCC ATC TAC ATC	TAATACGACTCACTATAGGGAG-AG CTC ACA CAG TCC ATC TAC ATC
V-ATPase A-R	TG CAA CAT GGT GTA CTT CTC CTT	TAATACGACTCACTATAGGGAG-TG CAA CAT GGT GTA CTT CTC CTT
V-ATPase B-F	CTG TAT CCC GGG ACT TCA TAT CC	TAATACGACTCACTATAGGGAG-CTG TAT CCC GGG ACT TCA TAT CC
V-ATPase B-R	ACC CAA CAT ATC TTC AGA CAC GG	TAATACGACTCACTATAGGGAG-ACC CAA CAT ATC TTC AGA CAC GG
V-ATPase D-F	TAG GCT AGC GAT TTT CCC TTC TC	TAATACGACTCACTATAGGGAG-TAG GCT AGC GAT TTT CCC TTC TC
V-ATPase D-R	CAC ACC AGC AAC ATT GTC TTT CT	TAATACGACTCACTATAGGGAG-CAC ACC AGC AAC ATT GTC TTT CT
V-ATPase E-F	CAA TCC TCA AAC ATG CTG AAC CA	TAATACGACTCACTATAGGGAG-CAA TCC TCA AAC ATG CTG AAC CA
V-ATPase E-R	GAT CTG AGC TTT GTA GTC GCT CT	TAATACGACTCACTATAGGGAG-GAT CTG AGC TTT GTA GTC GCT CT
V-ATPase G-F	GAG TCA GAC ACA GGG AAT CCA AC	TAATACGACTCACTATAGGGAG-GAG TCA GAC ACA GGG AAT CCA AC
V-ATPase G-R	ATA TCC TTG ATC ACG GCC TCT TG	TAATACGACTCACTATAGGGAG-ATA TCC TTG ATC ACG GCC TCT TG
V-ATPase H-F	ATG AGT TTG TTC AGC ACA TGA CG	TAATACGACTCACTATAGGGAG-ATG AGT TTG TTC AGC ACA TGA CG
V-ATPase H-R	TAT TGC ACC TGG AAG TTG ACT CT	TAATACGACTCACTATAGGGAG-TAT TGC ACC TGG AAG TTG ACT CT
V-ATPase 116kDa-F	TTC GGA TTCT GGA TGT GCT ACA A	TAATACGACTCACTATAGGGAG-TTC GGA TTCT GGA TGT GCT ACA A
V-ATPase 116kDa-R	AAA CAG GAT CGA TAC CA A ACG GA	TAATACGACTCACTATAGGGAG-AAA CAG GAT CGA TAC CA A ACG GA

[0079]

4. 증폭된 목표 유전자들의 DNA fragment 서열 확인

[0080]

증폭된 DNA fragment들을 정제한 후, 증폭된 DNA fragment들의 서열(sequence)을 확인한 결과, 목표 유전자와 유전자 서열이 동일함을 capillary sequencing을 수행함으로써 확인하였다.

[0081]

정제된 PCR product들을 주형(template)으로 이용하고, T7-promoter를 가진 primer쌍을 이용하여 dsRNA 생성을 위한 Template DNA를 증폭하였다(도 2). 20 μ l의 PCR 반응액에는 증폭된 DNA template 1 μ l, 한 쌍의 T7-promoter primer를 각각 1 μ l 및 5x rTag PCR master mix 4 μ l를 넣고, 증류수(DW: distilled water) 13 μ l를 넣은 후 반응을 시켰다. 반응은 95℃에서 3분간 배양시킨 후, 95℃에서 10초, 68℃에서 10초 및 72℃ 10초간씩 배양을 진행하는 것을 30 사이클 동안 반복한 후, 72℃에서 7분간 배양시킨 후 4℃에 보관을 하였다.

[0082]

PCR 반응물은 2% 아가로스 겔(Agarose gel)에서 분리한 후, Neogreen을 이용하여 DNA fragment를 염색하고 촬영하였다. 증폭된 T7-promoter를 포함한 DNA fragment들을 정제한 후, Capillary sequencing을 수행하여, T7-promoter sequence의 존재 여부를 확인하였다. 그 결과, 8종의 모든 PCR product는 T7-promoter sequences를 5' 말단과 3' 말단에 가지고 있음을 확인하였다.

[0084]

5. 증폭된 목표 유전자들의 DNA fragment를 이용한 dsRNA의 제조

[0085]

T7-promoter를 가진 증폭된 DNA fragment를 주형(template)으로 이용하고, T7-promoter sequence를 포함하고 있는 목표 유전자의 primer를 이용하고, MEGascript[®] RNAi Kit (Invitrogen[®], ThermoFisher Scientific)를 이용하여 dsRNA를 제작하였다.

[0086] 2 μg 의 template DNA에 4 μL 의 10x T7 reaction buffer, 4 μL 의 ATP solution, 4 μL 의 CTP solution, 4 μL 의 GTP solution, 4 μL 의 UTP solution 및 4 μL 의 T7 Enzyme mix를 넣고, 증류수를 추가하여 40 μL 로 만든 후, 잘 혼합하고 quick spin으로 용액을 튜브로 모은 후 37°C에서 8시간 또는 20시간 동안 반응을 시킨다. 그 후, DNA를 제거하고 dsRNA만을 분리하기 위해, dsRNA 합성 용액 20 μL 에 5 μL 의 digestion buffer 및 2 μL 의 DNase1을 처리한 후, 증류수를 추가하여 총 50 μL 로 만든 후, 37°C에서 1시간동안 반응을 시킨다. 합성된 dsRNA를 분리하기 위해 dsRNA를 흡착하는 필터카트리지(filter cartridge)에 용액을 잘 섞어서 넣은 후, 13,000 rpm에서 2분간 원심분리하였다. 이후, 에탄올(Ethanol)이 포함된 세척 용액 500 μL 로 두 번 세척한 후, 50 μL 의 추출 용액으로 두 번 추출하였다. 분광 광도법(Spectrophotometer)을 이용하여 dsRNA의 농도를 측정한 후, 1.25 ml를 2% 아가로스 겔(Agarose gel)에 분리하여 dsRNA의 크기와 농도를 확인하였다(표 3). 그 후, 1번 elute과 2번 elute을 합쳐 dsRNA를 이용한 방제 실험에 이용하였다.

표 3

[0087]

dsRNA ID	gene ID	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/ μL	elute
FAW DsRNA 1	Sf VATPASE E F-5/R5	0.136	0.085	0.04	0.094	0.044	2.141	75.489	1st Elute
FAW DsRNA 2	Sf VATPASE F F-4/R4	0.096	0.071	0.047	0.046	0.022	2.104	36.416	
FAW DsRNA 3	Sf VATPASE 16KDa F-1/R1	0.156	0.096	0.041	0.116	0.055	2.117	92.489	
FAW DsRNA 4	Sf VATPASE D F-5/R5	0.07	0.057	0.042	0.024	0.012	1.914	18.824	
FAW DsRNA 5	Sf VATPASE H F-10/R10	0.186	0.109	0.04	0.15	0.071	2.12	120.346	
FAW DsRNA 6	Sf VATPASE B F-8/R8	0.157	0.096	0.04	0.12	0.057	2.113	95.637	
FAW DsRNA 7	Sf VATPASE G F-4/R4	0.242	0.134	0.039	0.212	0.099	2.142	169.371	
FAW DsRNA 8	Sf VATPASE A F-5/R5	0.137	0.086	0.039	0.099	0.047	2.106	79.036	
FAW DsRNA 1	Sf VATPASE E F-5/R5	0.115	0.077	0.042	0.071	0.033	2.134	56.711	2nd Elute
FAW DsRNA 2	Sf VATPASE F F-4/R4	0.086	0.064	0.043	0.039	0.018	2.099	30.976	
FAW DsRNA 3	Sf VATPASE 16KDa F-1/R1	0.093	0.066	0.04	0.05	0.024	2.095	39.842	
FAW DsRNA 4	Sf VATPASE D F-5/R5	0.062	0.056	0.046	0.011	0.007	1.554	8.616	
FAW DsRNA 5	Sf VATPASE H F-10/R10	0.108	0.072	0.038	0.069	0.033	2.112	55.136	
FAW DsRNA 6	Sf VATPASE B F-8/R8	0.092	0.065	0.04	0.05	0.024	2.092	39.641	
FAW DsRNA 7	Sf VATPASE G F-4/R4	0.141	0.088	0.039	0.103	0.049	2.121	82.731	
FAW DsRNA 8	Sf VATPASE A F-5/R5	0.115	0.076	0.041	0.073	0.035	2.103	58.574	

[0089] 6. 목표 유전자들의 발현 양상 확인

[0090] 목표 유전자들에 대해 dsRNA를 이용하여 방제하기 위해서는 목표 유전자들이 유충시기에 발현이 되어야 한다. 이를 확인하기 위하여 Real time Quantitative PCR을 이용한 유전자들의 발현 양상 비교 연구를 수행하였다.

[0091] 열대거세미나방의 1령 유충부터 6령 유충의 총체에서 상기 실시예 3에 기재된 방법으로 total RNA를 추출한 후, poly-A oligomer를 이용하여 cDNA를 합성하고, 8종의 목표 유전자들의 발현 양상을 비교하였다.

[0092] 그 결과, 모든 목표 유전자들이 1령충일 때 8종의 목표 유전자들의 발현양이 가장 높고, 이후 6령충일때까지 상기 발현양이 유지됨을 확인하였다(도 3).

[0094] 7. dsRNA의 열대거세미나방에 대한 독성 확인

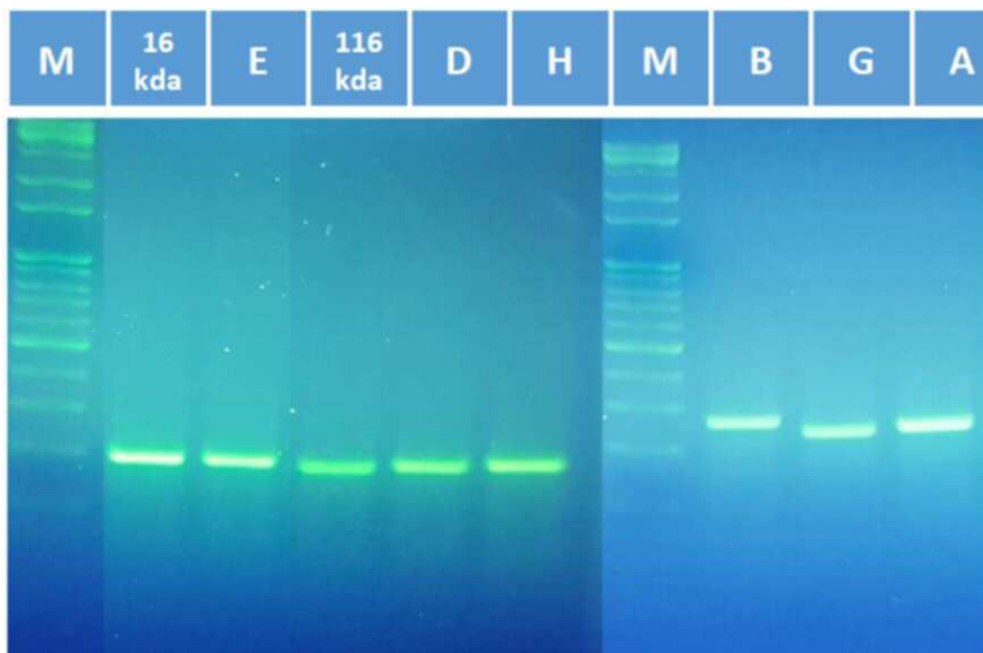
[0095] 8종의 목표 유전자들의 dsRNA들의 열대거세미나방에 대한 독성 효과를 확인하기 위해 20 ng/ml의 농도로 열대거세미나방 2령충을 노출시킨 결과, 음성대조군으로 eGFP(enhanced green fluorescence protein)의 dsRNA를 처리한 결과와 비교하여, 발육 억제 효과가 훨씬 우수함을 확인하였다(도 4).

[0096] 상기와 같은 결과는 dsRNA를 섭취한 열대거세미나방 유충은 정상적인 발달이 이루어지지 않으므로, 도태될 수 있음을 알 수 있고, 상기 8종의 목표 유전자를 이용하여 제작한 dsRNA들이 열대거세미나방의 방제에 효과적으로 이용될 수 있음을 알 수 있다.

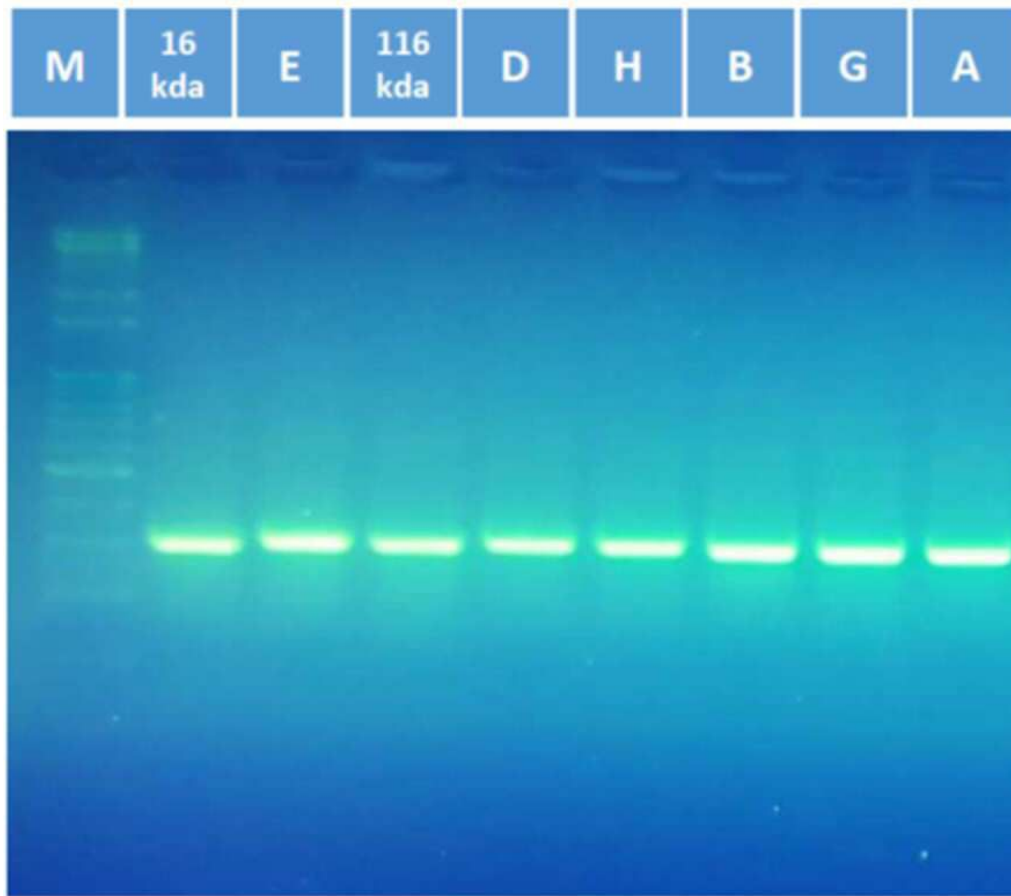
[0098] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해되어야 한다.

도면

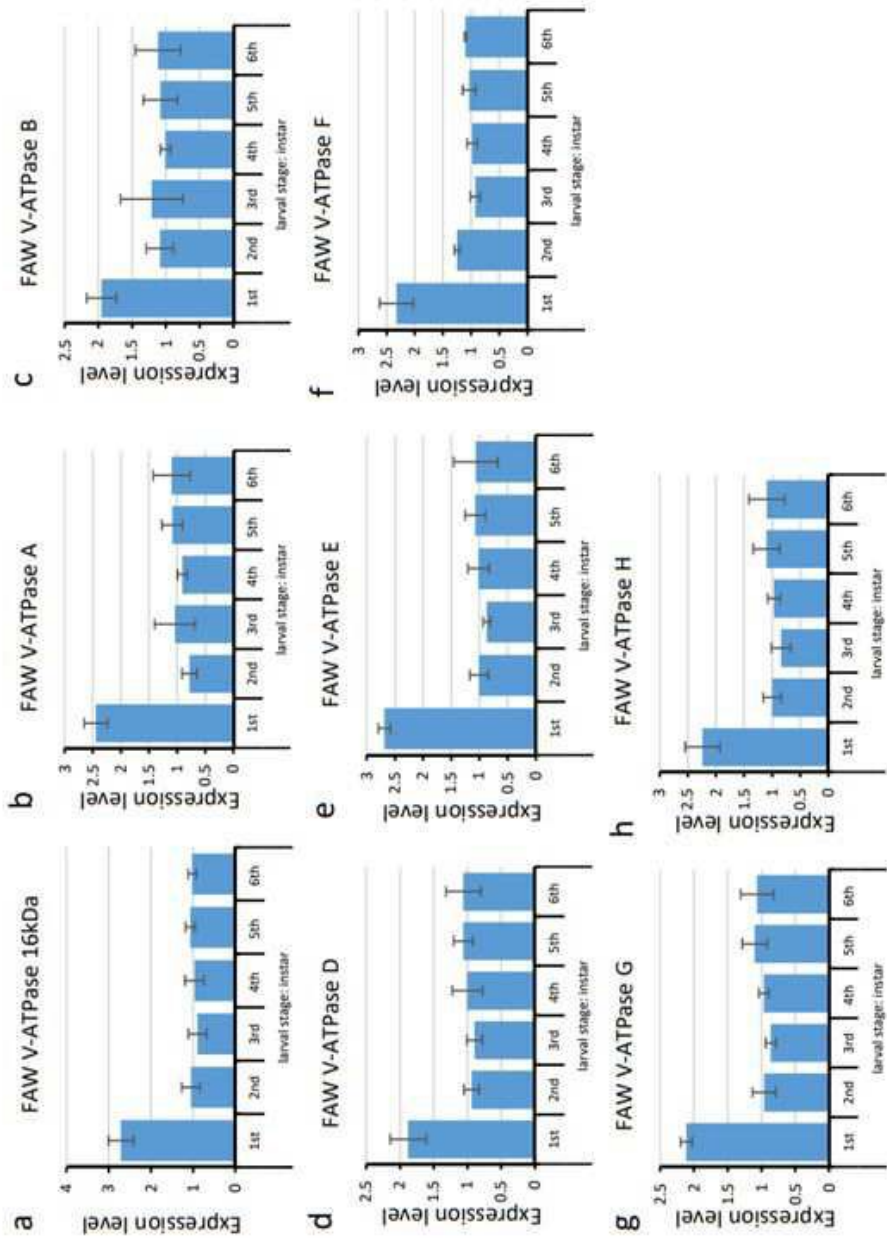
도면1



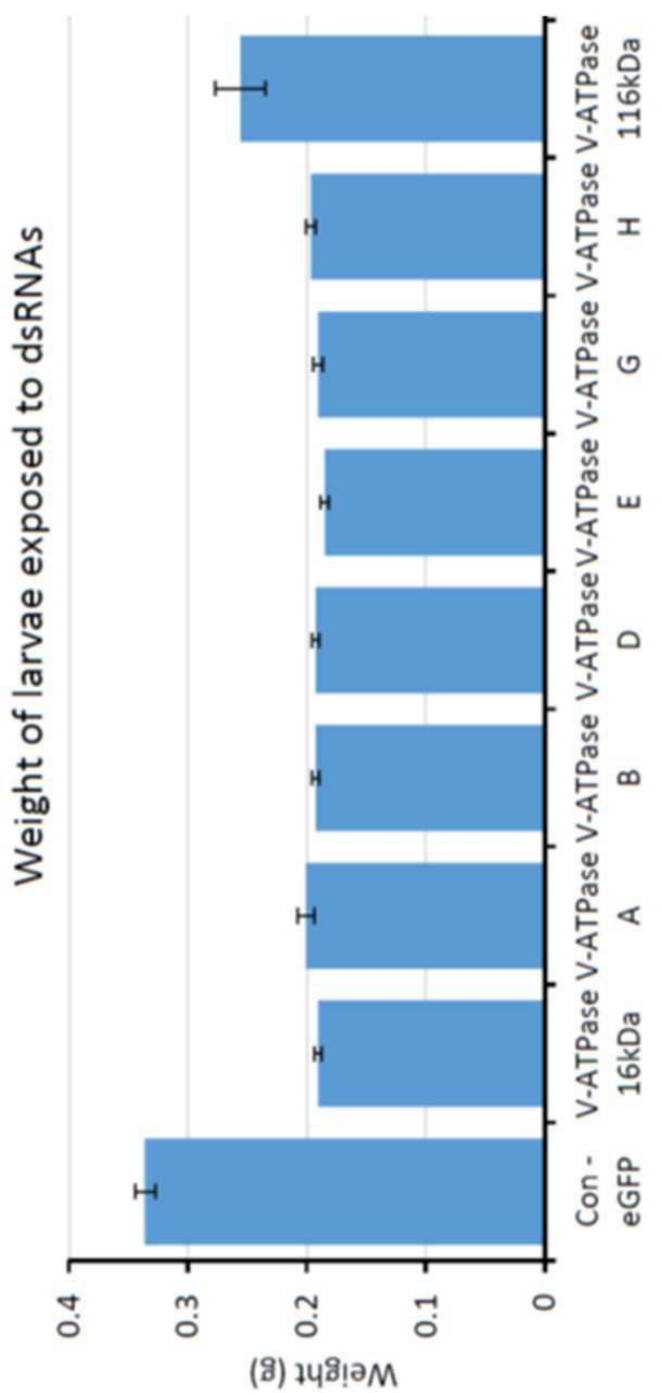
도면2



도면3



도면4



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.