

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 (43) 공개일자	10-2010-0103003 2010년09월27일
(51)	Int. Cl.	(71)	출원인
	<i>C12N 15/29</i> (2006.01) <i>C07K 14/415</i> (2006.01)		경희대학교 산학협력단
	<i>C12N 15/63</i> (2006.01)		경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내
(21)	출원번호 10-2009-0021354	(72)	발명자
(22)	출원일자 2009년03월12일		박영두
	심사청구일자 2009년03월12일		경기도 용인시 수지구 성북동 성동마을 수지자이 1차아파트 108동 702호
			오연이
			경기도 안산시 상록구 본오1동 977-5 301호
		(74)	대리인 특허법인다울

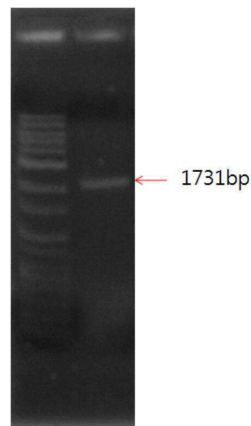
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 배추 유래의 약 특이적 프롤린 풍부 단백질 및 이를 코딩하는 유전자

(57) 요약

본 발명은 약 발생과정에 특이적으로 작용하는 배추(*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*) 유래의 프롤린 풍부 단백질에 관한 것이다. 또한, 프롤린 풍부 단백질 검출용 프라이머를 제작하고 이를 사용하여 식물로부터 프롤린 풍부 단백질을 코딩하는 유전자를 분리하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1b



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20070301-034-037-009-01

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관

연구사업명 바이오그린21사업

연구과제명 배추 삽입돌연변이 집단 분석 및 유용 유전자를 이용한 우량 계통 육성

기여율

주관기관 경희대학교

연구기간 2007.04.01~2010.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

약 형태형성 과정에 특이적으로 작용하는 서열번호 9의 아미노산 서열을 가지는, 배추(*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*) 유래의 프롤린 풍부 단백질을.

청구항 2

제 1항의 프롤린 풍부 단백질을 코딩하는 핵산 서열로 이루어지는 유전자.

청구항 3

제 2항에 있어서, 핵산 서열은 서열번호 8의 핵산서열을 가지는 것인 유전자.

청구항 4

제 2항의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 5

제 4항의 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체.

청구항 6

제 1항의 프롤린 풍부 단백질의 세포내 발현 수준을 증가 또는 감소시켜 배추의 약 형태형성 과정을 조절하는 방법.

청구항 7

(i) 서열번호 1 내지 7에 기재된 프라이머를 제작하는 단계; (ii) 검사 대상 식물의 RNA로부터 합성한 cDNA를 상기 제작된 서열번호 1 내지 7에서 선택되는 프라이머 쌍을 사용하여 PCR을 수행하여 프롤린 풍부 단백질에 대한 유전자 단편을 분리하는 단계; 및 (iii) 분리된 유전자 단편을 이용하여 프롤린 풍부 유전자의 전체 서열을 확보하는 단계를 포함하는, 식물로부터 프롤린 풍부 단백질을 코딩하는 유전자를 분리하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 검사 대상 식물이 배추인 것인 방법.

청구항 9

서열번호 1 내지 7에서 선택되는 프롤린 풍부 단백질 검출용 프라이머.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 식물로부터 프롤린 풍부 단백질을 분리하는 방법과 상기 방법으로 분리된 배추 유래의 약 특이적 프롤린 풍부 유전자 및 그 단백질에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 꽃을 구성하는 주요 기관인 수술(stamen)에서 꽃가루를 실제로 만드는 장소인 약(anther)은 일반적으로 두 개의 화분낭(pollen sac)으로 이루어져 있으며 이 두 개의 화분낭은 내부적으로 다시 두 개로 나뉘어 있기 때문에 실제로 꽃가루는 네 곳의 장소에서 만들어진다. 충분히 성숙한 약의 일정 부분이 터지거나 구멍이 나면서 꽃가루는 방출된다. 여러 수술의 약이 서로 붙어 있는 경우도 있는 등 약의 형태와 크기는 다양하다. 약의 형태는 식물을 분류하는 데 중요한 기준이 된다.
- [0003] 약에 특이적으로 작용하는 것으로 알려진 프롤린 풍부 단백질은 약 형태형성과정(morphogenesis)과 세포구조(cytoskeletal) 구성물과 상호작용을 하거나 특정한 세포벽 구조에서 세포들을 형성하는 데 역할을 하는 것으로 추정된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0004] 배추의 약 형태형성 과정을 규명하고 배추의 교배육종 시 모본증식과 순종을 얻는 데 이상적인 융성불임성 배추를 제공하기 위하여, 배추의 프롤린 풍부 단백질을 및 이의 유전자의 분리방법을 제공하기 위한 것이다.

과제 해결수단

- [0005] 본 발명은 약 형태형성과정에 특이적으로 작용하는 서열번호 9의 아미노산 서열을 가지는, 배추(*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*) 유래의 프롤린 풍부 단백질에 관한 것이다.
- [0006] 본 발명의 "배추 유래 프롤린 풍부 단백질" 분리를 위해 프라이머쌍을 제작하여 사용하였다. 제작된 프라이머쌍을 사용하여 배추로부터 프롤린 풍부 단백질에 해당하는 유전자 단편을 분리하고 분리된 유전자 단편을 이용하여 RT-PCR을 수행하여 프롤린 풍부 유전자의 전체 서열을 확보하는 방법으로 분리하였다.
- [0007] 본 발명의 프롤린 풍부 단백질은 서열번호 9로 기재된 아미노산 서열을 가진다. 또한, 하나 이상의 위치에서 일부 아미노산 서열이 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의한 변이된 변이체도 본 발명의 범주에 포함한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 서열번호 9의 아미노산 서열을 가지는 배추 유래의 프롤린 풍부 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 유전자에 관한 것이다.
- [0009] 본 발명의 서열번호 9의 아미노산 서열을 가지는 프롤린 풍부 단백질을 코딩하는 유전자는 바람직하게는 서열번호 8의 핵산서열을 가지는 유전자이다.
- [0010] 프롤린 풍부 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있다. 상기 핵산 서열 변이체 또한, 본 발명의 범주에 포함된다.
- [0011] 본 발명에 의해 약 특이적으로 작용하는 프롤린 풍부 단백질과 이에 대한 유전자의 서열이 배추로부터 모두 밝혀졌으므로, 프롤린 풍부 단백질의 세포내 발현 수준을 증가 또는 감소시켜 배추의 약 형태형성 과정을 효과적으로 조절할 수 있다. 또한, 본 발명에서 밝혀진 배추의 약 특이적으로 작용하는 프롤린 풍부 단백질을 조절하여 융성불임성 배추 등을 제작할 수 있다.
- [0012] 또한, 본 발명은 프롤린 풍부 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터에 관한 것이다.

- [0013] 본 발명에서 "재조합 벡터"란 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물로, 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함한 통상의 모든 벡터를 포함한다.
- [0014] 본 발명의 벡터는 프롤린 풍부 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 발현조절 서열과 기능적으로 연결되어 있다. 예를 들어, 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터는 선택성 마커를 포함할 수 있다. 또한, 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다. 본 발명의 벡터는 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 프롤린 풍부 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질 전환된 형질전환체에 관한 것이다.
- [0016] 숙주세포로의 벡터 도입은 숙주 세포에 적합한 방법을 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 전기충격유전자전달법(electroporation), 인산칼슘(CaPO_4) 침전, 염화칼슘(CaCl_2) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아 매개된 형질전환, 입자총법, 원형질 세포법, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 등의 공지된 방법으로 수행할 수 있다.
- [0017] 숙주세포로는 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)와 같은 원핵 숙주 세포가 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다. 또한, 진균(예를 들어, 아스페르길러스(*Aspergillus*)), 효모(예를 들어, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 슈조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*), 곤충 세포, 식물 세포, 포유 동물 등의 진핵 생물 유래의 세포가 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 또한, 본 발명의 프롤린 풍부 단백질은 식물 개체내로 형질전환 될 수 있다. 식물로의 형질전환 법은 바람직하게는 아그로박테리움법, 원형질세포법, 입자총법 등이 있다. 형질전환되는 식물은 바람직하게는 배추이다.
- [0019] 또한, 본 발명은 약 형태형성 과정에 특이적으로 작용하는 서열번호 9의 아미노산 서열을 가지는 프롤린 풍부 단백질의 세포내 발현 수준을 증가 또는 감소시켜 식물, 바람직하게는 배추의 약 형태형성 과정을 조절하는 방법에 관한 것이다.
- [0020] 예를 들어, 프롤린 풍부 단백질을 코딩하는 재조합 벡터로 식물, 보다 구체적으로 배추를 형질전환 시킴으로써 프롤린 풍부 단백질의 세포내 발현 수준을 증가시킬 수 있다. 프롤린 풍부 단백질을 코딩하는 재조합 벡터는 상술한 바와 같다. 또한, 프롤린 풍부 단백질을 코딩하는 게놈 유전자의 엑손으로 하나 이상의 외생 핵산 서열을 도입시켜 유전자를 불활성화시켜 프롤린 풍부 단백질의 세포내 발현 수준을 억제 및 차단시킬 수 있다. 본 발명에서 용어, "외생(Exogenous) 핵산 서열"이란 숙주세포에서 정상적으로 발견되지 않는 핵산 서열을 의미하고, 외생 핵산서열을 유전자 게놈의 엑손으로 삽입함으로써 유전자의 불활성을 유도할 수 있다.
- [0021] 상기에서 예시한 방법으로, 목적에 맞게 식물, 바람직하게는 배추의 프롤린 풍부 단백질의 발현을 효과적으로 조절할 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명은 (i) 서열번호 1 내지 7에 기재된 프라이머를 제작하는 단계; (ii) 검사 대상 식물의 RNA로부터 합성한 cDNA를, 상기 제작된 서열번호 1 내지 7에서 선택되는 프라이머 쌍을 사용하여 PCR을 수행하여 프롤린 풍부 단백질에 대한 유전자 단편을 분리하는 단계; 및 (iii) 분리된 유전자 단편을 이용하여 RT-PCR을 수행하여 프롤린 풍부 유전자의 전체 서열을 확보하는 단계를 포함하는, 식물로부터 프롤린 풍부 단백질을 코딩하는 유전자를 분리하는 방법에 관한 것이다.
- [0023] 각 단계를 각각 살펴보면 다음과 같다.
- [0024] 상기 단계 (i) 전에 식물에 대한 공지된 프롤린 풍부 단백질의 유전자에 대한 서열을 수집하고 유전자 코딩 서열을 정렬하는 단계와 상기 정렬된 서열 중 상동성이 높은 영역을 선택하는 단계를 먼저 수행할 수 있다. 이 때 식물에 대한 공지된 프롤린 풍부 단백질의 유전자에 대한 서열은 NCBI GenBank 등으로부터 획득할 수 있으며, 상동성 비교는 육안으로나 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있다.

- [0025] 그 다음에 상기 (i) 단계의 프라이머를 제작하게 되는데, 상기 상동성이 높은 영역에 특이적인 프라이머쌍을 제작하게 된다. 본 발명에서, 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 프라이머의 길이는 특별히 제한되지 않으며, 10 내지 50, 보다 바람직하게는 10 내지 40개의 염기서열을 가진다. 구체적으로, 본 발명에서 사용된 프라이머의 서열은 서열번호 1 내지 7로 기재되었다.
- [0026] 단계 (ii)에서, 시료로부터 RNA 분리와 RT-PCR은 일반적인 방법으로 수행할 수 있다. 상기 단계 (iii)에서 분리된 유전자 단편을 이용하여 T-벡터에 넣어 이것을 이용하여 염기 서열을 확인 할 수 있는데, 상기 유전자 단편의 T-벡터의 도입은 공지된 일반적인 방법으로 수행할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 방법으로 프롤린 풍부 단백질 분리에 사용될 수 있는 식물의 종류는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 식량작물류, 채소작물류, 특용작물류, 과수류, 화훼류 및 사료작물류에 속하는 다양한 식물체를 시료로 사용할 수 있다.
- [0028] 구체적으로, 본 발명에서 프롤린 풍부 단백질의 분리에 사용된 배추(*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*)의 서울(Seoul) 품종은 기내의 무균상태에서 키운 것에서 샘플을 채취하여 RNA를 분리하였다.
- [0029] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 7에서 선택되는 프롤린 풍부 단백질 검출용 프라이머를 제공한다.
- [0030] 본 발명에서 제공하는 프라이머들은 식물의 프롤린 풍부 단백질 간에 상동성이 높은 영역을 선택적으로 인지하므로, 다양한 식물에서 프롤린 풍부 단백질의 검출에 효율적으로 사용될 수 있는 프라이머들이다.
- [0031] 서열번호 1 내지 7에서 선택되는 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 쌍은 적절한 완충용액 및 온도에서 중합 반응을 위한 효소 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시하게 된다.
- [0032] 본 발명의 프라이머 서열은 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적 또는 화학적 수단에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 표지로는 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼린 포스파타아제 등과 같은 효소; ³³P과 같은 방사성 동위원소; cy3, cy5 등의 형광성 분자; 바이오틴과 같은 화학그룹을 예로 들 수 있다.

효 과

- [0033] 본 발명의 방법으로 약 형태형성 과정에 특이적으로 작용하는 프롤린 풍부 단백질을 식물체로부터 효과적으로 분리할 수 있다. 또한, 본 발명의 방법으로 밝혀진 배추 유래의 프롤린 풍부 단백질의 발현을 조절하여, 약 발달을 감소시키는 방법으로 배추의 교배육종 시 모본증식과 순종을 얻는 이상적인 융성불임성 배추 제작에 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0034] 이하에서는, 본 발명의 구성을 실시예를 들어 더욱 상세히 설명하지만 본 발명의 권리범위가 하기 실시예로만 한정되는 것은 아니다.
- [0035] **실시예 1: 약 특이적인 프롤린 풍부 단백질 (anther specific proline rich protein) 유전자를 분리하기 위한 프라이머의 제작**
- [0036] 약 특이적인 프롤린 풍부 단백질 유전자의 공통된 부분을 찾기 위하여 공지된 있는 작물별 약에 특이적으로 나타나는 프롤린 풍부 단백질의 유전자를 "National Center for Biotechnology Information(NCBI) Genbank"에서 검색하였다. 유전자의 전체 염기서열을 수집하기 위해 Entrez 프로그램을 사용하였다. 검색방법으로는 유전자명을 약에 특이적인 프롤린 풍부 단백질의 유전자를 검색어로 선정하였다.
- [0037] 수집된 약에 특이적으로 나타나는 프롤린 풍부 단백질의 유전자 가운데, 같은 배추과 식물인 유채(*Brassica napus*) 그리고 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)등의 염기서열을 선발, 염기서열의 상동성을 많이 보이는 부분을 BLAST 프로그램으로 찾은 뒤 그 부분에 대한 프라이머를 제작하였다. 제작된 프라이머들의 서열은 표 1에 기재된 바와 같다.

표 1

[0038]

프라이머	염기서열
APG-1F (서열번호 1)	5'-TTG GGG ATT CGC TCG TAG ACA CAG GA-3'
APG-1R (서열번호 2)	5'-CCG CAG GGT TTT CTA GAA TCT GAC TG-3'
APG 1R-1 (서열번호 3)	5'-CGC AGG GCT TTC TAG AAT TTT ACT G-3'
APG 5'-1 (서열번호 4)	5'-ATG CAA TCT TCT ATG GTC CAT-3'
APG 5'-2 (서열번호 5)	5'-ATG CCT TGG CCG TAT CCA TG-3'
APG 3'-1 (서열번호 6)	5'-TCA GAT ATA ACG GAG GTA TTT TTT-3'
APG M-1 (서열번호 7)	5'-AGC TGC CCC AAC TCC-3'

[0039]

실시예 2: 약 특이적인 프롤린 풍부 단백질 (anther specific proline rich protein)의 유전자 분리

[0040]

배추(Brassica campestris ssp. pekinensis)의 서울(Seoul) 품종으로부터 RNA의 분리는 GibcoBRL회사에서 제공된 트리졸(Trizol) 시약을 사용하여 수행하였다. 배추의 잎을 액체질소를 이용하여 파쇄한 다음, 1ml 트리졸(Trizol) 용액을 첨가하고 잘 섞은 후 5분 동안 상온에 두었다. 다음, 200 μ l의 클로로포름(chloroform)을 첨가하여 섞은 다음 다시 4℃에서 13,000 rpm으로 10분 동안 원심분리한 뒤 그 혼합액의 상등액을 새 튜브로 옮겼다. 이소프로페놀 (isopropanol)을 500 μ l를 넣고 13,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 침전시켰다. 다음, 이소프로페놀을 제거하고 침전물을 75% 에탄올로 세척한 다음, 에탄올이 없도록 잘 건조시킨 후 DEPC 처리된 멸균 증류수에 녹여 사용하였다.

[0041]

약 특이적인 프롤린 풍부 단백질의 유전자 분리는 확보된 RNA를 주형으로 oligo dT 프라이머(primer)와 역전사 효소(reverse transcriptase)를 이용, cDNA를 합성한 뒤 작성한 프라이머로 PCR하여 분리하였다. cDNA합성 프로그램 조건은 1 μ g의 RNA를 oligo dT 프라이머와 70℃에서 2분 RNA 이차구조를 제거한 뒤 42℃에서 30분간 역전사 시키고 그 사용된 역전사효소를 불활성화 시키기 위해 75℃에서 10분간 두었다. 그 후 합성된 cDNA 1 μ g을 사용, 표 1에 기재된 프라이머쌍과 태크 중합효소(tag polymerase)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 96℃에서 2분간 초기 변성 시간을 둔 뒤 96℃에서 30초, 54.5℃에서 30초, 72℃에서 1분으로 40 순환(cycle) 실행하고 마지막으로 72℃에서 10분간 최종 연장시킨 후 4℃를 유지하여 전체 반응을 종료하였다.

[0042]

각각의 프라이머들로 증폭된 단편들은 그 각각의 염기서열을 분석하기 위해 PCR 산물용 벡터 pGEM-T easy 벡터에 크로닝하고 삽입된 자리에 근접한 T7 프로모터와 T3 프로모터에 결합하는 T7과 T3 프라이머를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

[0043]

실시예 3: 약 특이적인 프롤린 풍부 단백질 (anther specific proline rich protein)에 대한 유전자의 단편 확인

[0044]

염기서열 분석용 pGEM-T easy 벡터 내부에 클로닝 된 PCR 단편의 염기서열 분석은 GenBank BLAST 프로그램을 사용하여 이루어졌다. 결과 APG-1F (서열번호 1)와 APG-1R (서열번호 2) 프라이머로 증폭된 약 730B 산물, APG 5'-2 (서열번호 5)와 APG 1R-1 (서열번호 3) 프라이머로 증폭된 약 1.302KB 산물과 아미노산 서열을 분석한 결과, 여러 식물의 약에 특이적으로 나타나는 프롤린이 많은 단백질 유전자와 상동성을 보였다. 즉, RNA를 대상으로 APG-1F/1R, APG 5'-2/1R-1을 이용해 RT-PCR을 수행한 결과 배추의 약에 특이적으로 나타나는 프롤린이 많은 단백질 유전자의 대부분이 증폭된다는 것을 확인할 수 있었다.

[0045]

실시예 4: 약 특이적인 프롤린이 풍부 단백질의 유전자 전체 서열의 확보

[0046]

상기 실시예 2 및 3을 통해 분리한 약 특이적인 프롤린 풍부 단백질의 유전자의 단편을 기본으로 유전자 전체를 확보하기 위해 RT-PCR을 이용하였다.

[0047]

APG 5'-1 (서열번호 4)을 작성하여 RNA 5'쪽에 부착한 뒤 그 부분으로부터 또한 APG 3'-1 (서열번호 6)을 작성

하여 RT-PCR을 진행하고, 전체 염기서열을 확보하였다.

[0048] 이렇게 확보한 단편도 마찬가지로 염기서열 분석용 pGEM-T easy 벡터 내부에 클로닝한 뒤 그 염기서열을 확인한 결과 배추(*Brassica rapa*) 약에 특이적인 프롤린이 풍부 단백질의 유전자와 가장 높은 상동성을 보여, 서울 배추 기원의 약에 특이적인 프롤린 풍부 단백질의 전체 유전자가 확보되었음을 확인하였다. 단백질의 전체유전자를 읽을 때 사용한 프라이머의 염기서열을 서열번호 7로 기재하였다. 서울 배추 기원의 약에 특이적인 프롤린 풍부 단백질의 서열은 서열번호 9로 나타내었으며, 단백질에 대한 유전자 서열은 서열번호 8로 나타내었다.

도면의 간단한 설명

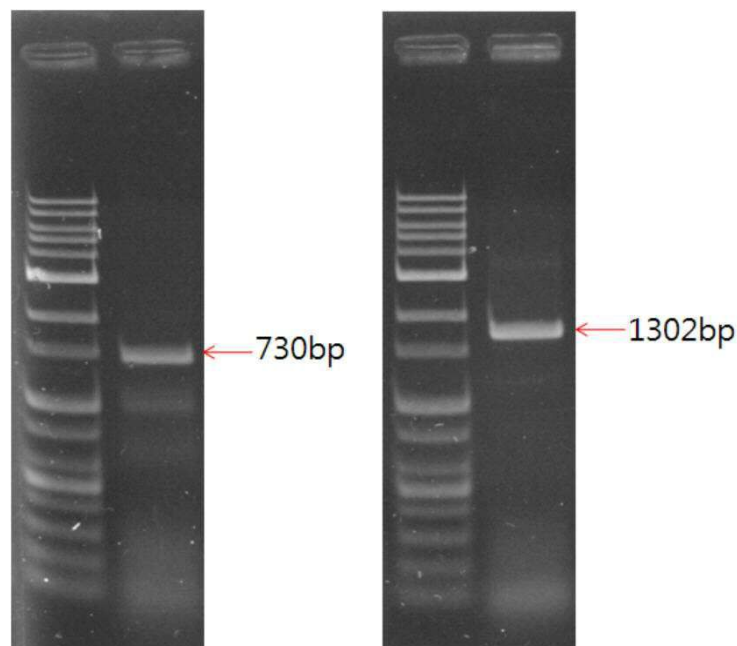
[0049] 도 1a는 APG-1F/ APG-1R와 APG 5'-2/ APG 1R-1 프라이머를 사용한 RT-PCR에 의해 배추의 서울 품종으로부터 증폭된 약에 특이적으로 나타나는 프롤린이 풍부한 단백질을 코딩하는 유전자의 단편을 전기영동한 사진이다.

[0050] 도 1b는 APG 5'-2/ APG 3'-1 프라이머를 사용한 RT-PCR에 의해 배추의 서울 품종으로부터 증폭된 약에 특이적으로 나타나는 프롤린이 풍부한 단백질을 코딩하는 전체 유전자 단편을 전기 영동한 사진이다.

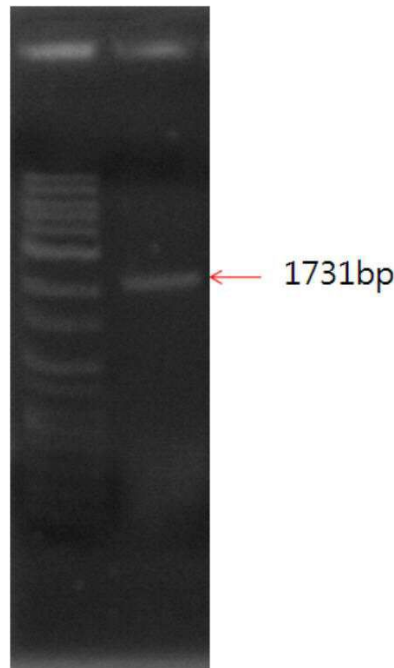
[0051] 도 2는 RT-PCR 의해 분리된 배추의 서울 품종에서 약에 특이적으로 나타나는 프롤린이 많은 단백질 유전자의 아미노산 시퀀스와 배추의 Wenzhoupancai 품종에서 약에 특이적으로 나타나는 프롤린이 많은 단백질 유전자의 아미노산 시퀀스 간에 상동성 비교 결과이다.

도면

도면1a



도면1b



도면2

Query	1	MKQSSMVHSCSMLFRFVVFLISFCIFFATTSHAQVHRLWPWPSIPWPSMPWPYPWPME	60
Sbjct	1	MKQSSMVHSCSMLFRFVVFLISFCIFFATTSHAQVHRLWPWPSIPWPSMPWPYPWPME	60
Query	61	PPESGPPPGSPNPGPPSGSPRPFLPPKPQPKPSAPGPSACPPIPPKQPKPPAPGP	120
Sbjct	61	PPESGPPPGSPNPGPPSGSPRPFLPPKPQPKPSAPGPSACPPIPPKQPKPPAPGP	120
Query	121	SQCPPPKQPKPPPPGPSACPPKQKPPPPGPSACPPIPPKQPKPPAPAPTTCPP	180
Sbjct	121	SQCPPPKQPKPPPPGPSACPPKQKPPPPGPSACPPIPPKQPKPPAPAPTTCPP	180
Query	181	QPPKPQKPPPTPAPSPKPGSPPPPPPPSPAPKVPVPPAPSPKPSPPAPSPKPKSPFA	240
Sbjct	181	QPPKPQKPPPTPAPSPKPGSPPPPPPPSPAPKVPVPPAPSPKPSPPAPSPKPKSPFA	240
Query	241	PLPPKPNKTIPAVFFFGDSIPDTGNNNLKSKIKSNYRPTGMDPPSRVATGRFSNGKVA	300
Sbjct	241	PLPPKPNKTIPAVFFFGDSIPDTGNNNLKSKIKSNYRPTGMDPPSRVATGRFSNGKVA	300
Query	301	SDYISTYLGVKEIVPAYLDQKLQQNLQRSDDLTVGSFASGGAGFDPETSESVEVIPMLD	360
Sbjct	301	SDYISTYLGVKEIVPAYLDQKLQQNLQRSDDLTVGSFASGGAGFDPETSESVEVIPMLD	360
Query	361	QLSYFQDYIKRVKKLVGKKEAKRIVSKGVAIVVAGGTDLIYTYFGIGAHLKTDIDSYTT	420
Sbjct	361	QLSYFQDYIKRVKKLVGKKEAKRIVSKGVAIVVAGGTDLIYTYFGIGAHLKTDIDSYTT	420
Query	421	SMADSAASFVLQLYGYGARRIGVIGTTPPLGCTPSQVRVDKKICDEEINYAAQLFNSKLAI	480
Sbjct	421	SMADSAASFVLQLYGYGARRIGVIGTTPPLGCTPSQVRVDKKICDEEINYAAQLFNSKLAI	480
Query	481	ILSQLSETLRNSTLVYMDIYSIPSKILESPAHYGFEEVKKPCCKIGLTGGGVFCCKKTSK	540
Sbjct	481	ILSQLSETLRNSTLVYMDIYSIPSKILESPAHYGFEEVKKPCCKIGLTGGGVFCCKKTSK	540
Query	541	ICPNTSSYLFWGHAHPTERAFETLNKKLVKKYLRYI	576
Sbjct	541	ICPNTSSYLFWGHAHPTERAFETLNKKLVKKYLRYI	576

서열목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
 <120> Anther specific proline rich protein of Brassica campestris ssp. pekinensis

<160> 9

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> APG-1F primer

<400> 1

ttggggattc gctcgtagac acagga

26

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> APG-1R primer

<400> 2

ccgcagggtt ttctagaatc tgactg

26

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> APG 1R-1 primer

<400> 3

cgcagggtt tctagaattt tactg

25

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> APG 5'-1 primer

<400> 4

atgcaatctt ctatggtcca t

21

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> APG 5'-2 primer

<400> 5

atgccttgge cgtatccatg

20

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> APG 3'-1 primer

<400> 6

tcagatataa cggaggtatt tttt

24

<210> 7

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> APG M-1 primer

<400> 7

agctgccccca actcc

15

<210> 8
<211> 1731
<212> DNA
<213> Brassica campestris ssp. pekinensis

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1728)

<400> 8
atg aag caa tct tct atg gtc cat tct tgt tcg atg cta ttt cgt ttt 48
Met Lys Gln Ser Ser Met Val His Ser Cys Ser Met Leu Phe Arg Phe
1 5 10 15

gtt gtc ttt ctc ata tcc ttt tgt atc ttc ttt gcg aca acg tcc cat 96
Val Val Phe Leu Ile Ser Phe Cys Ile Phe Phe Ala Thr Thr Ser His
20 25 30

gcc caa gta gtc cac cga cgg ctc tgg ccg tgg cca tca ata cct tgg 144
Ala Gln Val Val His Arg Arg Leu Trp Pro Trp Pro Ser Ile Pro Trp
35 40 45

cca tca atg cct tgg ccg tat cca tgg cca atg gaa cca cca gaa tct 192
Pro Ser Met Pro Trp Pro Tyr Pro Trp Pro Met Glu Pro Pro Glu Ser
50 55 60

ggc cca cca cca ggc cca tca cca aat cct ggt cca cca tct ggc cca 240
Gly Pro Pro Pro Gly Pro Ser Pro Asn Pro Gly Pro Pro Ser Gly Pro
65 70 75 80

tct cca cgc cca cca tta cca cct aag ccg caa cca aag cca tca cca 288
Ser Pro Arg Pro Pro Leu Pro Pro Lys Pro Gln Pro Lys Pro Ser Pro
85 90 95

gcg cct ggt cca tcg gca tgt cca cca ata cca cct aag cct caa cca 336
Ala Pro Gly Pro Ser Ala Cys Pro Pro Ile Pro Pro Lys Pro Gln Pro
100 105 110

aaa cca cca cca gcc cct ggt cca tct caa tgc cca cca cct aag ccg 384
Lys Pro Pro Pro Ala Pro Gly Pro Ser Gln Cys Pro Pro Pro Lys Pro
115 120 125

caa cca aag cca cca cca ccg cct ggt cca tcg gca tgt cca cct aag Gln Pro Lys Pro Pro Pro Pro Gly Pro Ser Ala Cys Pro Pro Lys 130 135 140	432
cct caa cca aag cca cca cca ccg cct ggt cca tcg gca tgt ccg cca Pro Gln Pro Lys Pro Pro Pro Pro Gly Pro Ser Ala Cys Pro Pro 145 150 155 160	480
ata cca cct aag cct cag cca aag cca cca cca gca cct gcc cca act Ile Pro Pro Lys Pro Gln Pro Lys Pro Pro Pro Ala Pro Ala Pro Thr 165 170 175	528
cca tgc cca cct caa cca cca aag ccg caa cca aag cca cca cca aca Pro Cys Pro Pro Gln Pro Pro Lys Pro Gln Pro Lys Pro Pro Pro Thr 180 185 190	576
cct gct cca tca cca aag cca ggc cca tca ccg cca cca ccg cca cca Pro Ala Pro Ser Pro Lys Pro Gly Pro Ser Pro Pro Pro Pro Pro Pro 195 200 205	624
cct agt cca gct ccg aaa cct gta cca cca cct gcc ccg tcg cca aaa Pro Ser Pro Ala Pro Lys Pro Val Pro Pro Pro Ala Pro Ser Pro Lys 210 215 220	672
cct agc cca cct gct cca tcg cca aaa cca aaa cct agc cca cct gcc Pro Ser Pro Pro Ala Pro Ser Pro Lys Pro Lys Pro Ser Pro Pro Ala 225 230 235 240	720
cca tta cca cct aag cca gaa aac aaa act ata ccg gcc gtg ttt ttc Pro Leu Pro Pro Lys Pro Glu Asn Lys Thr Ile Pro Ala Val Phe Phe 245 250 255	768
ttc ggg gat tcg ata ttt gac aca ggg aat aac aat aat tta aag tca Phe Gly Asp Ser Ile Phe Asp Thr Gly Asn Asn Asn Asn Leu Lys Ser 260 265 270	816
aag ata aaa agt aac tat cgt ccc tat ggt atg gat ttt cct tcc aga Lys Ile Lys Ser Asn Tyr Arg Pro Tyr Gly Met Asp Phe Pro Ser Arg 275 280 285	864
gta gcc acc ggt aga ttc agc aac gga aag gtc gct tct gat tat ata Val Ala Thr Gly Arg Phe Ser Asn Gly Lys Val Ala Ser Asp Tyr Ile 290 295 300	912
tct aca tat ttg gga gta aaa gaa ata gta ccc gca tat tta gac cag	960

Ser Thr Tyr Leu Gly Val Lys Glu Ile Val Pro Ala Tyr Leu Asp Gln	
305 310 315 320	
aag cta caa caa aac caa tta caa cga agc gat cta ctt acg ggc gtc	1008
Lys Leu Gln Gln Asn Gln Leu Gln Arg Ser Asp Leu Leu Thr Gly Val	
325 330 335	
tct ttt gct tcg ggt ggt gct ggc ttc gat cct gaa aca tct gaa tca	1056
Ser Phe Ala Ser Gly Gly Ala Gly Phe Asp Pro Glu Thr Ser Glu Ser	
340 345 350	
gtg gag gtt ata cca atg ttg gac caa ttg tca tat ttt caa gac tac	1104
Val Glu Val Ile Pro Met Leu Asp Gln Leu Ser Tyr Phe Gln Asp Tyr	
355 360 365	
ata aag aga gta aag aag cta gta ggg aaa aaa gag gct aaa cga ata	1152
Ile Lys Arg Val Lys Lys Leu Val Gly Lys Lys Glu Ala Lys Arg Ile	
370 375 380	
gtg tcc aaa gga gta gcc att gtg gtc gca gga ggc acc gat ctg att	1200
Val Ser Lys Gly Val Ala Ile Val Val Ala Gly Gly Thr Asp Leu Ile	
385 390 395 400	
tat aca tat ttt gga att ggt gct caa cac ctt aaa act gac atc gac	1248
Tyr Thr Tyr Phe Gly Ile Gly Ala Gln His Leu Lys Thr Asp Ile Asp	
405 410 415	
tct tac acc acc agc atg gct gac tct gct gcc agt ttc gtt ttg caa	1296
Ser Tyr Thr Thr Ser Met Ala Asp Ser Ala Ala Ser Phe Val Leu Gln	
420 425 430	
ctg tat gga tat gga gca aga cgt ata gga gtg atc gga aca cca ccg	1344
Leu Tyr Gly Tyr Gly Ala Arg Arg Ile Gly Val Ile Gly Thr Pro Pro	
435 440 445	
ctt ggt tgt aca cca tca caa agg gtt aag gac aaa aaa att tgt gat	1392
Leu Gly Cys Thr Pro Ser Gln Arg Val Lys Asp Lys Lys Ile Cys Asp	
450 455 460	
gaa gag ata aat tat gct gct cag ctt ttt aat tct aag ctc gct att	1440
Glu Glu Ile Asn Tyr Ala Ala Gln Leu Phe Asn Ser Lys Leu Ala Ile	
465 470 475 480	
att ttg agt caa ctg tcg gaa acc cta cga aat tct aca ttg gtt tac	1488
Ile Leu Ser Gln Leu Ser Glu Thr Leu Arg Asn Ser Thr Leu Val Tyr	

485	490	495	
atg gac atc tac tct atc ttc agt aaa att cta gaa agc cct gcg cac			1536
Met Asp Ile Tyr Ser Ile Phe Ser Lys Ile Leu Glu Ser Pro Ala His			
500	505	510	
tat gga ttt gag gag gta aag aaa ccg tgc tgc aaa atc gga tta acg			1584
Tyr Gly Phe Glu Glu Val Lys Lys Pro Cys Cys Lys Ile Gly Leu Thr			
515	520	525	
gga gga ggt gta ttc tgc aaa aag aag aca tca aaa att tgt ccc aat			1632
Gly Gly Gly Val Phe Cys Lys Lys Lys Thr Ser Lys Ile Cys Pro Asn			
530	535	540	
aca tcg tct tat ttg ttc tgg gac ggt gcc cac ccc act gag aga gct			1680
Thr Ser Ser Tyr Leu Phe Trp Asp Gly Ala His Pro Thr Glu Arg Ala			
545	550	555	560
ttt gaa acc tta aac aaa aaa ctt gtt aaa aaa tac ctc cgt tat atc			1728
Phe Glu Thr Leu Asn Lys Lys Leu Val Lys Lys Tyr Leu Arg Tyr Ile			
565	570	575	
tg a			1731
<210> 9			
<211> 576			
<212> PRT			
<213> Brassica campestris ssp. pekinensis			
<400> 9			
Met Lys Gln Ser Ser Met Val His Ser Cys Ser Met Leu Phe Arg Phe			
1	5	10	15
Val Val Phe Leu Ile Ser Phe Cys Ile Phe Phe Ala Thr Thr Ser His			
20	25	30	
Ala Gln Val Val His Arg Arg Leu Trp Pro Trp Pro Ser Ile Pro Trp			
35	40	45	
Pro Ser Met Pro Trp Pro Tyr Pro Trp Pro Met Glu Pro Pro Glu Ser			
50	55	60	
Gly Pro Pro Pro Gly Pro Ser Pro Asn Pro Gly Pro Pro Ser Gly Pro			

65	70	75	80
Ser Pro Arg Pro Pro Leu Pro Pro Lys Pro Gln Pro Lys Pro Ser Pro	85	90	95
Ala Pro Gly Pro Ser Ala Cys Pro Pro Ile Pro Pro Lys Pro Gln Pro	100	105	110
Lys Pro Pro Pro Ala Pro Gly Pro Ser Gln Cys Pro Pro Pro Lys Pro	115	120	125
Gln Pro Lys Pro Pro Pro Pro Pro Gly Pro Ser Ala Cys Pro Pro Lys	130	135	140
Pro Gln Pro Lys Pro Pro Pro Pro Pro Gly Pro Ser Ala Cys Pro Pro	145	150	155
Ile Pro Pro Lys Pro Gln Pro Lys Pro Pro Pro Ala Pro Ala Pro Thr	165	170	175
Pro Cys Pro Pro Gln Pro Pro Lys Pro Gln Pro Lys Pro Pro Pro Thr	180	185	190
Pro Ala Pro Ser Pro Lys Pro Gly Pro Ser Pro Pro Pro Pro Pro	195	200	205
Pro Ser Pro Ala Pro Lys Pro Val Pro Pro Pro Ala Pro Ser Pro Lys	210	215	220
Pro Ser Pro Pro Ala Pro Ser Pro Lys Pro Lys Pro Ser Pro Pro Ala	225	230	235
Pro Leu Pro Pro Lys Pro Glu Asn Lys Thr Ile Pro Ala Val Phe Phe	245	250	255
Phe Gly Asp Ser Ile Phe Asp Thr Gly Asn Asn Asn Asn Leu Lys Ser	260	265	270
Lys Ile Lys Ser Asn Tyr Arg Pro Tyr Gly Met Asp Phe Pro Ser Arg	275	280	285
Val Ala Thr Gly Arg Phe Ser Asn Gly Lys Val Ala Ser Asp Tyr Ile	290	295	300

Ser Thr Tyr Leu Gly Val Lys Glu Ile Val Pro Ala Tyr Leu Asp Gln
305 310 315 320

Lys Leu Gln Gln Asn Gln Leu Gln Arg Ser Asp Leu Leu Thr Gly Val
325 330 335

Ser Phe Ala Ser Gly Gly Ala Gly Phe Asp Pro Glu Thr Ser Glu Ser
340 345 350

Val Glu Val Ile Pro Met Leu Asp Gln Leu Ser Tyr Phe Gln Asp Tyr
355 360 365

Ile Lys Arg Val Lys Lys Leu Val Gly Lys Lys Glu Ala Lys Arg Ile
370 375 380

Val Ser Lys Gly Val Ala Ile Val Val Ala Gly Gly Thr Asp Leu Ile
385 390 395 400

Tyr Thr Tyr Phe Gly Ile Gly Ala Gln His Leu Lys Thr Asp Ile Asp
405 410 415

Ser Tyr Thr Thr Ser Met Ala Asp Ser Ala Ala Ser Phe Val Leu Gln
420 425 430

Leu Tyr Gly Tyr Gly Ala Arg Arg Ile Gly Val Ile Gly Thr Pro Pro
435 440 445

Leu Gly Cys Thr Pro Ser Gln Arg Val Lys Asp Lys Lys Ile Cys Asp
450 455 460

Glu Glu Ile Asn Tyr Ala Ala Gln Leu Phe Asn Ser Lys Leu Ala Ile
465 470 475 480

Ile Leu Ser Gln Leu Ser Glu Thr Leu Arg Asn Ser Thr Leu Val Tyr
485 490 495

Met Asp Ile Tyr Ser Ile Phe Ser Lys Ile Leu Glu Ser Pro Ala His
500 505 510

Tyr Gly Phe Glu Glu Val Lys Lys Pro Cys Cys Lys Ile Gly Leu Thr
515 520 525

Gly Gly Gly Val Phe Cys Lys Lys Lys Thr Ser Lys Ile Cys Pro Asn
530 535 540

Thr Ser Ser Tyr Leu Phe Trp Asp Gly Ala His Pro Thr Glu Arg Ala
 545 550 555 560

Phe Glu Thr Leu Asn Lys Lys Leu Val Lys Lys Tyr Leu Arg Tyr Ile
 565 570 575