

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2010-0027490 (43) 공개일자 2010년03월11일
(51) Int. Cl. <i>C12N 15/29</i> (2006.01) <i>C12N 15/10</i> (2006.01) <i>C12N 15/09</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2008-0086427 (22) 출원일자 2008년09월02일 심사청구일자 2008년09월02일	(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내 (72) 발명자 박영두 경기 용인시 수지구 성북동 성동마을 수지자이1차 아파트 108동 702호 이기호 부산 동래구 온천1동 153-8 SK 허브스카이 102동 2206호 (74) 대리인 이덕록	

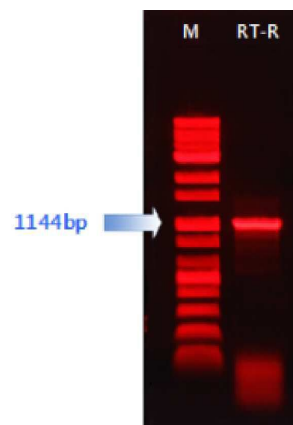
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 배추의 노화 및 해독 작용과 관여하는 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1을 코딩하는 유전자

(57) 요약

본 발명은 배추로부터 분리해 낸 식물의 노화 및 해독 작용과 관여하는 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrkapto-pyruvate sulfertransferase 1)의 유전자에 관한 것으로, 이를 이용하여 과발현 벡터(over-expression vector)를 만들어 식물 형질전환 시, 노화 지연에 효과적인 기능성 배추를 제공할 수 있으며, 이에 따라 배추의 수확 후 관리 비용을 절감 하여 경제적으로 유용한 배추를 제공할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20070301034037

부처명 농촌진흥청

연구사업명 바이오그린 21사업

연구과제명 배추 삼입돌연변이 집단 분석 및 유용 유전자를 이용한 신품종 육성

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2007년 4월 1일 ~ 2010년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1과 2에 기재된 프라이머 세트를 이용하여 RT-PCR 과정을 거쳐 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)로부터 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrkapto-pyruvate sulfertransferase 1)의 전체 유전자를 분리하는 단계를 포함하는, 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrkapto-pyruvate sulfertransferase 1) 유전자를 코딩하는 유전자를 분리하는 방법.

청구항 2

서열번호 3의 염기서열을 갖는, 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrkapto-pyruvate sulfertransferase 1)을 코딩하는 유전자.

청구항 3

서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는, 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrkapto-pyruvate sulfertransferase 1)을 코딩하는 유전자.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)로부터 분리해 낸 배추의 노화 및 해독 작용과 관여하는 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1(mrkapto-pyruvate sulfertransferase 1)을 코딩하는 유전자에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 설퍼트랜스퍼라아제(sulfertransferase, ST)는 동물, 식물뿐만이 아니라 미생물 등에서까지 황 원자를 수용기질에게 전달하는 역할을 하는 가장 대표적인 효소이다. ST에 속하는 유전자로는 thiosulfate:cyanide ST(rhodanese, EC 2.8.1.1), 3-mercaptopyruvate:(di)thiol ST(EC 2.8.1.2), thiosulfate:thiol ST(EC 2.8.1.3)와 thiosulfate:dithiol ST(EC 2.8.1.5)가 있다. ST의 주요 생리적 특징은 시아나이드(cyanide)의 해독 작용을 가지고 있는 것으로 보고 되어있으며(Westley, 1973; Vennesland 외, 1982), 황성산소를 이용하는 생물에서 산소 조직 부위의 세포 독성을 조절한다(Nandi 외, 2000). 그 뿐만 아니라 황 대사과정에 관여 하며(Westley, 1973, 1981), Fe-S 클러스터의 생합성 및 수복을 위한 황의 전달과정에 관여하는 중요한 효소이다(Bonomi 등, 1977; Pagani 등, 1984). 특히 본 효소의 가장 큰 특징인 티오-설퍼레이트(thiosulfate)의 황을 시아나이드(cyanide)로 옮겨주어 티오-시아나이드로 바꾸어 주며 해당 기작은 다음과 같다(Westley, 1973).

[0003]
$$\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + \text{Rhod} \rightarrow \text{SO}_3^{2-} + \text{Rhod-S}$$

[0004]
$$\text{Rhod-S} + \text{CN}^- \rightarrow \text{Rhod} + \text{SCN}^-$$

[0005] 또한 파펜브록과 슈미트(Papenbrock & Schmidt)(2000)에 의하여 식물체가 노화가 진행될수록 ST 효소의 활성이 증가함이 보고되었다. 현재까지 이 현상에 관한 가장 자명한 사실로 인정되는 가설로는 식물체가 노화가 진행됨에 따라 노화된 잎에 존재하는 황 원소를 새로 자라나는 잎 또는 과실과 종자에 전달하기 위함으로 알려져 있다.

[0006] ST는 식물의 노화와 관련 있는 여러 유전자 중 하나이다. 특히 식물체가 노화가 진행되면서 발생하는 가스 상태의 식물 호르몬인 에틸렌(ethylene)이 합성 되는 가운데 부산물로 만들어지는 독성 물질인 시아나이드(cyanide)를 해독하는 역할을 한다. 즉, 에틸렌의 생합성 과정의 ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid)가 ACC 옥시다아제(oxidase)에 의하여 발생하는 산화 반응으로 제공되어 지는 시아노포믹 산(cyanoformic acid)이 CO₂와 공유 결합 반응이 일어나서 시아나이드(cyanide, HCN)가 합성된다고 보고되어 있다(Yang과 Hoffmann, 1984; Kende, 1993). Kende(1993)의 보고에 따르면 시아나이드의 합성이 아미노산의 산화 과정 등 여러 곳에서 일어나지만 에틸렌의 생합성 과정에서 발생하는 것이 가장 많다고 하였다.

- [0007] 프레이저(Peiser) 등(1984)과 필룽(Pirrung)(1985)에 의하여 시아나이드(cyanide)는 세포 내에서 강한 독성 물질로 보고되었다. 시아나이드는 금속 이온 효소(metalloenzyme)를 강하게 억제할 뿐만 아니라, 광합성 과정 중의 전자전달계(photosynthetic electron transport)를 막을 뿐만 아니라 리블로오즈-비스포스페이트 카르복실라아제(ribulose-bisphosphate carboxylase)와 카탈라아제(cathlase)의 활성을 50% 정도 감소 시킨다는 보고가 있다(Solomanson, 1982).
- [0008] 즉 시아나이드는 식물의 여러 대사 과정에 중요한 영향을 미치는 물질로 볼 수 있다. 식물의 노화와 관련된성은 솔로모스와 라티에스(Solomos & Laties)(1976)에 의하여 시아나이드가 호흡급등형(climacteric) 작물인 아보타도에서 에틸렌과 같은 효과를 나타낸다는 보고가 있었으며, 필룽과 브라우만(Pirrung & Brauman)(1987)은 호흡급등형 조직에서 시아나이드가 에틸렌의 합성을 촉진하는 것을 확인 하였다. 또한 시아나이드의 축적은 대체 호흡 과정인 시아나이드 저항 대사 과정(cyanide-resistance pathway)를 촉진하여, 식물체내 자유 라디칼(free radical)을 증가 시키게 되고, 이것이 ACC 옥시데이제(oxidase)를 촉진하게 되어 에틸렌 합성이 증가됨으로 보고되었다(Pirrung과 Brauman 1987).
- [0009] 또한 증가된 자유 라디칼은 노화와 큰 관련이 있다고 보고 되어있는 활성산소종(active oxygen species, AOS)와 밀접한 관련이 있다(Dhindsa 외 1982, Harman 외 1981, Lin 외 1988). AOS는 미토콘드리아(mitochondria)의 활성과 관련이 있어 식물체의 노화를 야기 시키게 되는 데, 이는 미토콘드리아의 노화로 인하여 AOS가 효과적 제거하지 못하여 생기는 산화적 피해이다. 이에 의하여 식물체는 자가 방어 시스템을 작동하여 보호하지만, 그 한계를 넘을 경우 식물체는 노화하기 시작하는 것이다(Wei 외, 1998; De Gre 외, 1997).
- [0010] 시아나이드는 위와 같이 식물체의 생장 및 노화에 큰 영향을 미치기 때문에 조속한 해독이 필요하다. 식물에서의 이 역할을 수행하는 것이 머캅토-피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1(mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1; ST1)과 β -시아노-L-알라닌 신타아제(β -cyano-L-alanine synthase)(CAS, EC 4.4.1.9)이다. 특히 ST1의 경우 독성 시아나이드를 저독성인 티오시아네이트로 전환시켜 줌으로써 해독을 하는 것으로 보고되어 있다(Nagahara 등.1999; Ressler과 Tataka, 2001).
- [0011] 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)는 한국에서 소비되고 있는 4대 작물 중 하나로 특히 김치의 주재료로써 한국인의 식생활 속에서 빠질 수 없는 식품이다. 그렇기 위해서는 연중 공급이 필요하나, 배추의 재배 생리 및 우리나라의 기후가 이러한 사업적 가치를 떨어뜨릴 수 있다. 이 때 배추는 저장을 통하여 수급이 조정되며 겨울 배추의 저장 판매가 배추 공급의 한 부분을 차지하게 되었다 (Kim 1996). 식 김치의 주원료인 배추는 자연 조건 및 시기적 상황에 따른 생산 수급이 고르지 못하고, 가격 변동이 심하다. 더욱이 배추 자체의 저장성이 낮고, 유통과정 중에 부패 및 상품의 손실이 심하다. 특히 한국의 김치의 세계화 및 보급을 위한 수출이 가능하려면 김치의 원료인 배추의 연중 생산 및 공급의 안정화가 필수적이며, 또한 배추의 생산과 수확에는 시기적 차이가 있기 때문에 같은 품종의 배추로 공급하는 것은 어려운 실정이다. 이에 따라 대량 생산 및 품질의 고급화를 위하여 배추의 노화 방지 및 저장 기한의 연장은 저장 및 유통 비용의 절감과 품질 향상에 영향을 준다. 그러나 배추에서의 노화 및 해독 작용에 관여하는 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1)을 코딩(coding)하는 유전자에 관해서는 보고된 바 없다.
- [0012] 본 발명자들은 배추 유래의 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1)을 코딩하는 유전자를 규명하고, 이를 이용하여 노화 지연에 효과적인 기능성 배추를 제공하고, 이로 인하여 배추의 수확 후 관리 비용을 절감 하여 경제적으로 유용한 배추 품종 육성을 도모하고자 한다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0013] 따라서 본 발명의 목적은, 한국의 4대 채소 가운데 하나인 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)로부터 노화 및 해독 작용에 관여하는 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1)을 코딩하는 유전자를 분리하여 그 염기서열을 제공하는 것이다.
- [0014] 또한 본 발명의 목적은, 배추의 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1을 코딩하는 유전자를 크로닝할 수 있는 프라이머 및 이를 이용하여 배추로부터 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1을 분리하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- [0015] 본 발명은 서열번호 3의 염기서열을 갖는, 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)로부터 분리된 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1)을 코딩하는 유전자를 제공한다.
- [0016] 본 발명은 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는, 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)로부터 분리된 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1)을 코딩하는 유전자를 제공한다.
- [0017] 또한 본 발명은 상기 유전자를 클로닝 할 수 있는 프라이머 및 이를 이용하여 배추로부터 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1)을 분리하는 방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명에서는 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)로부터 분리된 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1)을 코딩하는 유전자를 분리하기 위해, 우선 프라이머를 작성하고, 상기 프라이머를 이용하여 RT-PCR 과정을 거쳐 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)로부터 분리된 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1)을 코딩하는 전체 유전자의 염기서열을 밝혔다.
- [0019] 본 발명은, 기존에 발표되어 있는 채소작물의 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1) 염기서열들의 상동성을 기초로, 배추의 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1) 유전자를 클로닝할 수 있는 프라이머를 작성하는 단계; 상기 프라이머를 이용한 RT-PCR 방법으로 배추로부터 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1)의 유전자 단편과 전체 유전자를 얻는 단계로 이루어진다.
- [0020] 본 발명에 사용된 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)는 기내의 무균상태에서 키운 것에서 샘플을 채취하여 RNA 분리에 사용하였다. 본 발명의 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1)의 유전자를 분리하는 과정은 다음과 같다.
- [0021] 첫째, 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1) 유전자 조사는 하기와 같이 수행하였다.
- [0022] (1) NCBI GenBank를 통해 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1) 유전자의 시퀀스를 수집한다.
- [0023] (2) 수집된 유전자 시퀀스 중 채소작물에 속하는 작물들을 우선 대상으로 하여 코딩 지역만을 분리한 뒤 유전자 코딩 지역만을 정렬(alignment)한다.
- [0024] (3) 정렬(alignment)한 결과 중 상동성 빈도가 높은 곳을 택하여 프라이머를 작성한다. 상기와 같이 작성된 프라이머 세트는 프라이머 1과 2에 해당한다.
- [0025] 둘째, 배추로부터 RNA의 분리는 GibcoBRL회사에서 제공된 트리졸(Trizol) 시약을 사용하여 하기와 같이 수행하였다.
- [0026] (1) 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 잎을 액체질소를 이용하여 파쇄 한다.
- [0027] (2) 1mL 트리졸(Trizol) 용액을 첨가하고 잘 섞은 후 5분 동안 상온에 둔다.
- [0028] (3) 그것에 200 μ L의 클로로포름(chloroform)을 넣고 섞은 다음 다시 4에서 13,000rpm으로 10분 동안 원심분리한 뒤 그 혼합액의 상등액을 새 튜브로 옮긴다.
- [0029] (4) 이소프로페놀 (isopropanol)을 500 μ L를 넣고 13,000rpm으로 15분간 원심 분리하여 침전시킨다.
- [0030] (5) 그 후, 이소프로페놀을 제거하고 침전물을 75% 에탄올로 세척한 다음, 에탄올이 없도록 잘 건조시킨 후 DEPC 처리된 멸균 증류수에 녹여 사용한다.
- [0031] 셋째, *E.coli* DH5a의 형질전환은 하기와 같이 수행하였다.
- [0032] (1) 대장균 DH5a를 LB 50mL에 접종시켜 37에서 OD₅₇₀= 0.375~0.400이 되도록 배양한다.
- [0033] (2) 균주배양액을 3000rpm에서 10분간 원심분리하고 얻어진 침전물은 0.1M CaCl₂ 용액으로 풀어준 후 30분간 얼음에 둔다.
- [0034] (3) 3000rpm에서 7분간 원심분리한 후 0.1M CaCl₂ 에 침전물을 녹인다.

- [0035] (4) 재조합 플라스미드를 함께 섞어 얼음에 30분간 두었다가 42에서 90초간 열 충격을 준다.
- [0036] (5) 10분간 얼음에 두었다가 LB 배지 700 μ L를 첨가하여 37에서 1시간 진탕배양한다.
- [0037] (6) 배양액을 12000rpm으로 수초간 원심분리한 후 100 μ L만 남기고 상등액을 제거하였으며 그 상등액으로 침전 물을 녹인다.
- [0038] (7) 엠페실린(Ampicillin) (50mg/L), X-gal (200mg/L in N-N dimethylformamide) IPTG (200mg/L)가 첨가된 고 체 LB 배지에 전개하여 37에서 12시간 배양한다.
- [0039] (8) 고체배지에서 저항성을 보이며 흰색의 콜로니를 형성하는 형질 전환된 것을 선발하여 배양한다.
- [0040] (9) 재조합 플라스미드 DNA를 분리, 정제하여 PCR과 제한 효소처리로 벡터 내 유전자 삽입여부를 확인한다.
- [0041] 넷째, 플라스미드 DNA의 분리는 하기와 같이 수행하였다.
- [0042] (1) 항생제가 첨가된 LB배지 3mL에 콜로니를 감염시킨 후 37에서 12시간 배양한다.
- [0043] (2) 콜로니가 진탕배양된 배양액을 4에서 12,000rpm으로 10분간 원심분리한다.
- [0044] (3) Solution I(200 μ L/mL)을 첨가하여 보텍스(vortex)를 수초간 실행한다.
- [0045] (4) Solution II(200 μ L/mL)를 첨가하여 조심스럽게 섞은 후 실온에서 5분간 방치한다.
- [0046] (5) Solution III(200 μ L/mL)를 첨가하여 잘 섞은 후 얼음에서 10분간 둔 뒤 12000rpm, 4에서 10분간 원심분리 한다.
- [0047] (6) 이에서 얻어진 상등액을 취하여 1/10양의 NaOAC를 첨가한 후 2.5배의 100% 에탄올을 첨가하여 -20에서 2시 간 침전시킨 후 원심 분리하여 침전물을 70% 에탄올로 세척한 후 멸균 증류수에 녹인 후 사용한다.
- [0048] 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1)을 코딩하는 유전자를 클로닝 할 수 있는 프라이머는 프라이머 1과 2로 나타내었다.
- [0049] 또한 상기 프라이머를 이용하여 얻어진 배추의 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1)의 유전자를 코딩하는 유전자의 전체 염기서열은 서열번호 3에 기재되었으며, 아미노산 서 열은 서열번호 4에 기재되었다.

효 과

- [0050] 본 발명은 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)로부터 분리해낸 식물의 노화 및 해독 작용과 관여하는 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1) 유전자의 분리에 관한 것으로, 이 를 이용하여 과발현 벡터(over-expression vector)를 만들어 식물 형질전환 시, 시아나이드(cyanide)의 해독 능 력 촉진 및 그로인한 저장 기간의 증진을 도모할 수 있으며, 이는 배추의 수확 후 관리 비용을 절감 하여 경제 적으로 유용한 배추 품종 육성 및 제공하는 효과가 있어, 식물육종산업상 매우 유용한 발명이라 할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0051] 이하에서는, 본 발명의 구성을 실시예를 들어 더욱 상세히 설명하지만 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니다.
- [0052] **실시예 1: 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1)의 유전자 효소를 분리하기 위한 프라이머의 작성**
- [0053] 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1) 유전자의 공통된 부분을 찾 기 위하여 기존에 발표되어 있는 작물별 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1)의 유전자를 "National Center for Biotechnology Information(NCBI) Genbank"에서 검색 하였다. 유전자의 전체 염기서열을 수집하기 위해 Entrez program을 사용하였다. 검색방법으로는 유전자명을 머 캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1)을 검색어로 선정하였다.
- [0054] 수집된 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1) 유전자 가운데, 같 은 배추과 식물인 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 염기서열을 선발, 염기서열의 상동성을 많이 보이는 부분 을 BLAST program으로 찾은 뒤 그 부분을 중심으로 프라이머를 제작하였다. 작성된 프라이머는 하기 표 1과 같

다.

<표 1>

프라이머	염기서열
ST1-F (서열번호 1)	5'-ATG GCT TCG ACC CTT TTC-3'
ST1-R (서열번호 2)	5'-TCA TGA AGA AGA ATC TTC CCC-3'

실시예 2: 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1) 유전자의 분리

머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1) 유전자의 분리는 확보된 RNA를 주형으로 oligo dT 프라이머(primer)와 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용, cDNA를 합성한 뒤 작성한 프라이머로 PCR하여 분리하였다. cDNA합성 프로그램 조건은 1의 RNA를 oligo dT primer와 70에서 두어 RNA 이차구조를 제거한 뒤 45에서 30분간 역전사 시키고 그 사용된 역전사효소를 불활성화 시키기 위해 94에서 5분간 두었다. 그 후 합성된 cDNA 1 마이크로그램을 사용, 작성한 프라이머와 테크 중합효소(tag polymerase)로 PCR하였는데 그 프로그램은 94에서 2분간 초기 변성 시간을 둔 뒤 94에서 30초, 57에서 30초, 72에서 1분 30초로 40 반복(cycle) 실행하고 마지막으로 72에서 10분간 최종 연장시킨 후 4를 유지하여 전체 반응을 종료하였다.

각각의 프라이머들로 증폭된 단편들은 그 각각의 염기서열을 분석하기 위해 PCR 산물용 벡터 pGEM-T 이지 벡터에 클로닝하고 삽입된 자리에 근접한 T7, SP6 프라이머를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

실시예 3: 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1) 유전자의 전체의 확인

염기서열 분석용 pGEM-T 이지 벡터 내부에 크로닝 된 PCR 단편의 염기서열 분석은 GenBank BLAST 프로그램을 사용하여 이루어졌다. 그 결과 ST1-F(서열번호 1)와 ST1-R(서열번호 2) 프라이머로 증폭된 1144bp 산물의 염기서열과 아미노산 서열을 분석한 결과, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 식물의 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1) 유전자와 상동성을 보였으며, 특히 애기장대의 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1) 유전자와는 84%의 높은 상동성을 보였다. 즉, RNA를 대상으로 ST1-F와 ST1-R 프라이머를 이용해 RT-PCR을 수행한 결과 배추의 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1) 유전자의 전체 유전자가 증폭된다는 것을 확인할 수 있었다.

또한 NCBI Conserved Domain program을 이용하여 분리한 유전자에 티오설페이트 설퍼트랜스퍼라아제 (Thiosulfate sulfurtransferase: TST)의 N-터미널(N-terminal)부분과 C-터미널(C-terminal)부분이 각각의 E-value가 8e-43, 2e-35로 정확하게 존재하며, 이는 로덴제이즈 관련 설퍼트랜스퍼라아제(Rhodanese-related sulfurtransferase)의 도메인이 E-value가 9e-72로 정확하게 포함 되는 것으로 그 정확도가 높음을 확인하였다. 확인된 염기 서열을 바탕으로 시작 코돈(codon)과 종료 코돈을 결정한 후, 그것이 배추로부터 분리된 전체 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1) 유전자로 결정, 서열번호 3에 그 염기서열을 제시하고 서열번호 4에 아미노산 서열을 제시한다.

도면의 간단한 설명

도 1a의 사진은 각 ST1-F와 ST1-R을 사용한 RT-PCR에 의해 배추로부터 증폭된 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1)을 코딩하는 유전자의 단편을 전기영동한 사진이다.

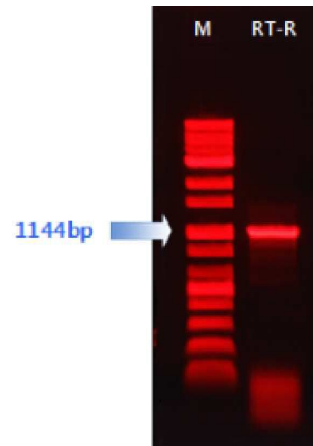
도 1b의 사진은 각 ST1-F와 ST1-R을 사용한 RT-PCR에 의해 배추로부터 증폭된 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1)을 코딩하는 유전자를 pGEM-T 이지 벡터에 넣은 후 정확한 삽입을 확인하기 위해 EcoRI를 처리하여 확인한 사진이다.

도 1c는 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 머캅토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1)을 코딩하는 유전자의 시퀀스를 GenBank BlastX program을 사용하여 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 시퀀스간에 상동성 비교 결과이다.

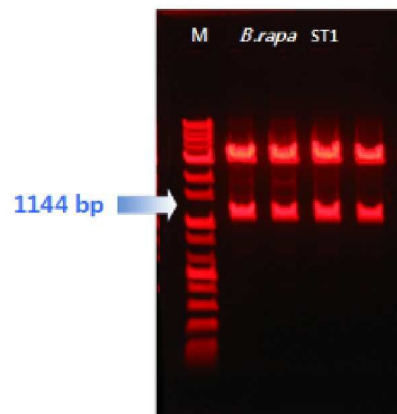
- [0066] 도 2a는 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 머캡토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1)을 코딩하는 유전자의 염기서열 및 아미노산 시퀀스 결과이다.
- [0067] 도 2b는 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 머캡토 피루베이트 설퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1)을 코딩하는 유전자를 NCBI Conserved Domain program을 이용하여 분석한 결과이다.

도면

도면1a



도면1b



도면1c

GENE ID: 844264_ST1 | ST1 (MERCAPTOPYRUVATE SULFURTRANSFERASE 1)
 (Arabidopsis thaliana) (10 or fewer PubMed links)

Score = 653 bits (1685), Expect = 0.0
 Identities = 325/383 (84%), Positives = 353/383 (92%), Gaps = 8/383 (2%)
 Frame = +3

Query	3	MASTLFSRTFLAATHRLITPSLLPQKPLHLASFLTRRVFFSQLGSSYSTAYRSA---RAM	170
Sbjct	1	MASTLFSRTFLAA+HRLITPSL PQR + A+FL+R + SQLG3 STAY+S RAM	58
Query	171	ASAGTGARAGYSTSSSVATNEPVVSVDWLHSNLRPEOLKVLDAWYMPDEQRNP IQEYQV	350
Sbjct	59	ASTGVETKAGYSTSS-VSTSEPVVSVDWLHANLRPEOLKILDAWYMPDEQRNP IQEYQV	117
Query	351	AHIFGALFFDLGSDRSTSLPHMLPSEEAFAAGCSALGIENKDGVVVYDAKGIFSAARV	530
Sbjct	118	AHIF ALFFDLGSDR TSLPHMLP+EEAFAAGCSALGI+NKD VVVYD KGIFSAARV	177
Query	531	WMFRVFGHDKVWVLDGGLPRWRASGYDVESASGDAILKASAASEAIEKIYQGHVSPI	710
Sbjct	178	WMFRVFGHEKVWVLDGGLPRWRASGYDVESASGDAILKASAASEAIEKIYQGTVSPI	237
Query	711	TFQTKFQPHLVWTLQVKNMEDQTYQHVDARSKARFDGTAFPRKGIRSGHIPGKQCV	890
Sbjct	238	TFQTKFQPHLVWTLQVKNMEDPTYQHIDARSKARFDGTAFPRKGIRSGHIPGSKCIP	297
Query	891	YPQSFDSASQTLLEAEELKKRFQEIEISLDRPILASCGTGVIACILAMGLHRVGKTDVFP	1070
Sbjct	298	+PQ FDS + TLLEAE+LKKRF+QE+ISLDRPI+ASCGTGVIACILAMGLHR+GKTDVP+	356
Query	1071	YDGSWTEWATQPDLPMEGEDSSS	1139
Sbjct	357	YDGSWTEWATQPDLP+E +SSS	379

도면2a

```

      M A S T L F S R T F L A A T H R L I T P S L L P Q K P L H
5' ATATGGCTCGACCCCTTTCTCCAGAACTTTCTAGCTGCAACCCACCGCTTGATCACTCCTTCTCTCCCTCAAAAGCCCTTCATC 90
  ..>>>.....))).....

      L A S F L T R R V F F S Q L G S Y S T A Y R S A R A M A S A
5' TCGCCTCCTTTCTTACTAGGAGAGTGTCTCTCTCAGTTAGGCTCTTACTCTACAGCTTATAGATCAGCTCGAGCTATGGCTTCTGCTG 180
  .....>>>.....

      G T G A R A G Y S T S S S V A T N E P V V S V D W L H S N L
5' GAACTGGGCAAGAGCAGGCTACTCGACTTCATCATCTGTAGCAACTAATGAGCCTGTTGTTTCTGTTGATTGGCTTCTTCTAATCTTA 270
  .....

      R E P D L K V L D A S W Y M P D E Q R N P I Q E Y Q V A H I
5' GAGAGCCTGATTGAAGGTTTGGATGCGTCATGGTACATGCCAGATGAGCAGAGGAATCCATCCAAGAATATCAGGTTGCTCATATTC 360
  .....))).....>>>.....

      P G A L F F D L D G I S D R S T S L P H M L P S E E A F A A
5' CTGGTCTCTCTTCTTGGATTGGATGGAATATCAGATCGATCAACAAGTTTGGCCATATGTTGCCGCTGAGGAAGCTTTTCTGCTG 450
  .....))).....>>>))).....

      G C S A L G I E N K D G V V V Y D A K G I F S A A R V W W M
5' GTTGCTCTGCTCTTGGAAATGAGAACAGGATGGATGGTGTATTGATGCAAGGATATCTTTAGTGCAGCTCGTGTATGGTGGATGT 540
  .....>>>.....

      F R V F G H D K V W V L D G G L P R W R A S G Y D V E S S A
5' TCCGATGTTTTGGACATGACAAAGTGTGGTGCTGATGGAGGACTACCGAGATGGCGTGCTTCAGGATATGATGTTGAATCTAGTGCAT 630
  .....

      S G D A I L K A S A A S E A I E K I Y Q G H S V S P I T F Q
5' CAGGTGATGCTATTTTGAAGCCAGTGTGCAAGTGAGGCTATTGAGAAAATCTATCAAGGACATTCCGTGAGTCCAATAACCTTTTCA 720
  .....))).....

      T K F Q P H L V W T L D Q V K N N M E D Q T Y Q H V D A R S
5' CCAAGTCCAGCCACATCTAGTGTGGACACTTGATCAGGTGAAGAACAATATGGAGGATCAAACATATCAACACGTAGACGCACGTTCCA 810
  .....>>>.....

      K A R F D G T A P E P R K G I R S G H I P G K Q C V P Y P Q
5' AAGCCAGGTTTGATGGTACAGCTCCAGAACCCCGTAAGGGAATAAGAAGTGGTCATATCCCTGGAAGCAGTGTGTCCTTATCCTCAGT 900
  .....

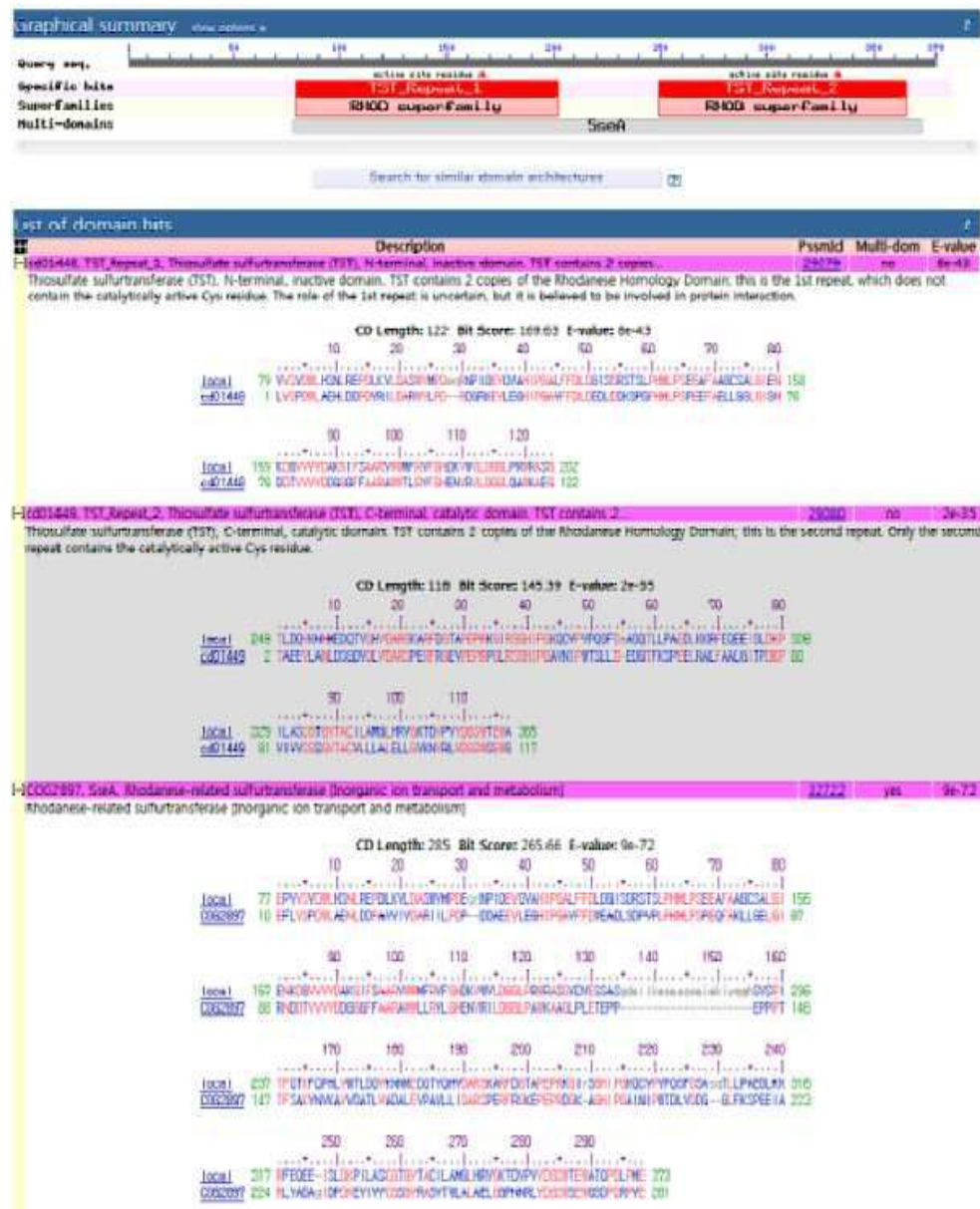
      S F D S A S Q T L L P A E D L K K R F E Q E E I S L D K P I
5' CGTTTGATTCTGCTTCTCAAACTGTTACCAGCAGAAGACCTGAAGAAACGGTTTGAACAAGAGAGATCTCATTGGACAAGCCTATTC 990
  .....))).....))).....))).....

      L A S C G T G V T A C I L A M G L H R V G K T D V P V Y D G
5' TGGCCTCGTGTGGCACTGGTGTAAACAGCTTGCATCCTGGCAATGGGGCTTACCAGAGTGGGAAAACTGATGTGCCAGTCTACGATGGCT 1080
  .....))).....>>>.....

      S W T E W A T Q P D L P M E G E D S S S *
5' CGTGGACTGAATGGGCAACACAACCAGACTTGCCTATGGAAGGGGAAGATTCTTCTTCATGAAA 1144
  .....))).....>>>.....***..

```

도면2b



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation of KyungHee University
- <120> A gene for coding mercapto-pyruvate sulfertransferase 1 gene involved in senscence and detoxification of Brassica rapa ssp. pekinensis
- <160> 4
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <400> 1

000

<210> 2
<400> 2
000

<210> 3
<211> 1144
<212> DNA
<213> A gene for coding mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1 of Brassica rapa ssp. pekinensis

<400> 3
atatggcttc gacccttttc tccagaactt ttctagctgc aaccaccgc ttgatcactc 60

cttctcttct cctcaaaag ccccttcac tcgcctcctt tcttactagg agagtgttct 120

tctctcagtt aggtctttac tctacagctt atagatcagc tcgagctatg gcttctgctg 180

gaactggggc aagagcaggc tactcgactt catcatctgt agcaactaat gagcctgttg 240

tttctgttga ttggcttcat tctaacttia gagagcctga tttgaaggtt ttggatgcgt 300

catggtacat gccagatgag cagaggaatc ccatccaaga atatcaggtt gctcatattc 360

ctggtgctct cttctttgat ttggatggaa tatcagatcg atcaacaagt ttgccacata 420

tgttgccgtc tgaggaagct tttgtgctg gttgctctgc tcttgaatt gagaacaagg 480

atggagtggg tgtttatgat gcaaagggtg tctttagtgc agtcgtgta tggatgatgt 540

tccgagtttt tggacatgac aaagtgtggg tgctcgatgg aggactaccg agatggcgtg 600

cttcaggata tgatgttgaa tctagtgcac caggtgatgc tattttgaaa gccagtgtg 660

caagtgagc tattgagaaa atctatcaag gacattccgt gattccaata acctttcaga 720

ccaagttcca gccacatcta gtgtggacac ttgatcaggt gaagaacaat atggaggatc 780

aaacatatca acacgtagac gcacgttcca aagccaggtt tgatggtaca gctccagaac 840

cccgttaaggg aataagaagt ggtcatatcc ctggaaagca gtgtgtccct taccctcagt 900

cgtttgattc tgctttctcaa acactgttac cagcagaaga cctgaagaaa cggtttgaac 960

aagaagagat ctcatcggac aagcctattc tggcctcgtg tggcactggg gtaacagctt 1020

gcacccctggc aatggggcctt caccgagtgg gaaaaactga tgtgccagtc tacgatggct 1080

cgtggactga atgggcaaca caaccagact tgcctatgga aggggaagat tctttctcat 1140

gaaa 1144

<210> 4
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> A gene for coding mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1 of Brassica rapa ssp. pekinensis

<400> 4
 Met Ala Ser Thr Leu Phe Ser Arg Thr Phe Leu Ala Ala Thr His Arg
 1 5 10 15

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

Phe Leu Thr Arg Arg Val Phe Phe Ser Gln Leu Gly Ser Tyr Ser Thr
 35 40 45

Ala Tyr Arg Ser Ala Arg Ala Met Ala Ser Ala Gly Thr Gly Ala Arg
 50 55 60

Ala Gly Tyr Ser Thr Ser Ser Ser Val Ala Thr Asn Glu Pro Val Val
 65 70 75 80

Ser Val Asp Trp Leu His Ser Asn Leu Arg Glu Pro Asp Leu Lys Val
 85 90 95

Leu Asp Ala Ser Trp Tyr Met Pro Asp Glu Gln Arg Asn Pro Ile Gln
 100 105 110

Glu Tyr Gln Val Ala His Ile Pro Gly Ala Leu Phe Phe Asp Leu Asp

115	120	125	
Gly Ile Ser Asp Arg Ser Thr Ser Leu Pro His Met Leu Pro Ser Glu			
130	135	140	
Glu Ala Phe Ala Ala Gly Cys Ser Ala Leu Gly Ile Glu Asn Lys Asp			
145	150	155	160
Gly Val Val Val Tyr Asp Ala Lys Gly Ile Phe Ser Ala Ala Arg Val			
165	170	175	
Trp Trp Met Phe Arg Val Phe Gly His Asp Lys Val Trp Val Leu Asp			
180	185	190	
Gly Gly Leu Pro Arg Trp Arg Ala Ser Gly Tyr Asp Val Glu Ser Ser			
195	200	205	
Ala Ser Gly Asp Ala Ile Leu Lys Ala Ser Ala Ala Ser Glu Ala Ile			
210	215	220	
Glu Lys Ile Tyr Gln Gly His Ser Val Ser Pro Ile Thr Phe Gln Thr			
225	230	235	240
Lys Phe Gln Pro His Leu Val Trp Thr Leu Asp Gln Val Lys Asn Asn			
245	250	255	
Met Glu Asp Gln Thr Tyr Gln His Val Asp Ala Arg Ser Lys Ala Arg			
260	265	270	
Phe Asp Gly Thr Ala Pro Glu Pro Arg Lys Gly Ile Arg Ser Gly His			
275	280	285	
Ile Pro Gly Lys Gln Cys Val Pro Tyr Pro Gln Ser Phe Asp Ser Ala			
290	295	300	
Ser Gln Thr Leu Leu Pro Ala Glu Asp Leu Lys Lys Arg Phe Glu Gln			
305	310	315	320
Glu Glu Ile Ser Leu Asp Lys Pro Ile Leu Ala Ser Cys Gly Thr Gly			
325	330	335	
Val Thr Ala Cys Ile Leu Ala Met Gly Leu His Arg Val Gly Lys Thr			
340	345	350	

Asp Val Pro Val Tyr Asp Gly Ser Trp Thr Glu Trp Ala Thr Gln Pro
 355 360 365

Asp Leu Pro Met Glu Gly Glu Asp Ser Ser Ser ***
 370 375 380