(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0105024
(43) 공개일자 2013년09월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/29 (2006.01) *C07K 14/415* (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0027100
(22) 출원일자 2012년03월16일
심사청구일자 2012년03월16일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
박영두
경기도 용인시 수지구 성복동 760 힐스테이트 3차 305동 1404호
강윤지
경기도 수원시 영통구 영통1동 1030-10 302호
박지현
경기도 수원시 영통구 영통1동 1018-12 102호
(74) 대리인
이덕록

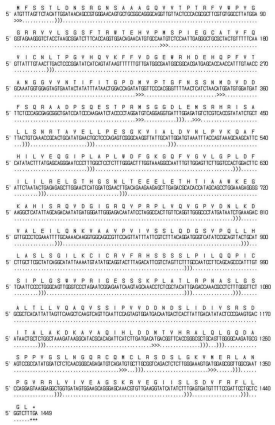
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **배추에서 화기 및 종자형성에 관여하는 수크로오스 비-발효성 4 단백질 및 그의 코딩 유전자**

(57) 요 약

본 발명은 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) 유래의 SNF4 (Sucrose non-fermenting 4) 단백질을 코딩하는 유전자에 관한 것으로, 이를 이용하여 종자수량 증대 및 종자 생산량 증가 배추를 제공할 수 있는 뛰어난 효과가 있다.

대 표 도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ008076
부처명	GM작물실용화 사업단
연구사업명	차세대바이오그린21사업
연구과제명	유용 유전자를 이용한 한국형 유용 GM 배추 개발 및 우량계통 육성
주관기관	경희대학교
연구기간	2011.05.01 ~ 2014.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) 유래의 SNF4 (Sucrose non-fermenting 4) 단백질을 코딩하는 프라이머 유전자.

청구항 2

서열번호 7의 염기서열로 구성되는 배추 유래의 SNF4 단백질을 코딩하는 유전자.

청구항 3

서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어지는 배추 유래의 SNF4 단백질.

청구항 4

제2항 기재의 SNF4 유전자를 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 제작된 재조합 벡터.

청구항 5

서열번호 3 및 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 배추 유래의 SNF4 유전자를 pB7GWIWG2(Ⅱ)에 클로닝하여 제작된 발현 억제 재조합 벡터.

청구항 6

배추 유래의 SNF4 유전자가 도입되어 발현된 형질전환 배추.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)로부터 분리된 수크로오스 비-발효성 4(Sucrose non-fermenting 4) 단백질을 코딩하는 유전자에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 수크로오스 비-발효성 4(Sucrose non-fermenting 4, SNF4) 유전자는 포도당 조절에 관여하는 유전자로써 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 효모에서 SNF 패밀리계인 수크로오스 비-발효성 1(Sucrose non-fermenting 1) 유전자와 결합하여 탄수화물과 지질 물질대사에 핵심 효소 역할을 하는 것으로 보고되었다. 또한 수크로오스 비-발효성 4(SNF4)가 파괴되면 효모에서는 글루코스(glucose) 대사뿐만 아니라 염 스트레스에 의하여 생장 결점이 나타나며 포유류에서는 에너지 합성이 활성화되지 못하여 에이엠피케이(AMPK) 조절에서 영양적 제한 스트레스(nutrient limitation stress) 반응에 관여한다.

[0003] 앞서 보고 되어진 효모에서 SNF4 유전자는 세포안에서 당(glucose) 함량이 낮을 시 SNF1에 결합해 부족한 당의 수준을 외부로부터 유입하여 그 수준을 맞춰주는 역할을 한다. 식물체에서는 현재 광합성으로 생성되어진 당 합

성에 영향을 미치는 것으로 알려져 식물체의 주요 에너지원 합성에 관련된 유전자로 보고되었다.

[0004] 이러한 SNF4가 발현되지 않은 돌연변이체는 자당, 라피노오스, 갈락토스, 맥아당 또는 비-발효성(nonfermentable) 탄소원 수준을 맞출 수 없어 필요시 에너지원을 충분히 사용할 수 없는 문제가 발생한다.

[0005] SNF4가 결합하는 수크로오스 비-발효성 1-관련 키나아제(SNF1-related kinase)는 식물체 잎이나 줄기가 아닌 화기 및 종자에서 가장 중요한 인자(factor)로 작용한다. 또한 이러한 수크로오스 비-발효성 1-관련 키나아제(SNF1-related kinase)는 종자 결실 및 성숙(maturation) 그리고 종자 발아에 중요한 역할을 하는데 이는 에이비에이 호르몬 시그널 페스웨이(ABA hormon signal pathway)에 직접적인 영향을 주게 된다. 수크로오스 비-발효성 1-관련 키나아제(SNF1-related kinase)가 식물체에서 작용을 하려면 세포내에서 SNF4와 인산이 결합하여야 하며 SNF4는 수크로오스 비-발효성 1-관련 키나아제(SNF1-related kinase)의 스위치 역할을 하여 그 기능을 조절하는 것으로 보고되었다.

[0006] 이러한 SNF4가 소실되면 수분시기에 화기 및 종자에서 인자(factor)로 작용하는 수크로오스 비-발효성 1-관련 키나아제(SNF1-related kinase)가 작동하지 못해 식물체에서 그 기능을 하지 못하게 되고 이에 따라 종자 발달 시기에 필요한 당을 합성하지 못해 에이비에이 시그널링(ABA signalling)에 영향을 주어 종자 발달 및 성숙에 영향을 주게 된다.

[0007] 배추는 김치의 주재료로서 국이나 쌈 등에도 이용되는 한국의 4대 채소 가운데 하나이며 유채속(Brassica)에 포함되어 있다. 유채속(Brassica)에는 유채, 겨자등 산업적 경제성이 우수한 작물이 포함되어 있어 외국에서도 중요한 작물이다.

[0008] 현재 종자발달 및 성숙 관련 유전자인 SNF4(Sucrose non-fermenting 4) 단백질을 식물체에서 분리 연구한 사례는 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)가 전부이며 그 기능을 파악하고 분석하는 것이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)로부터 화기 및 종자형성에 관여하는 SNF4(Sucrose non-fermenting 4) 단백질 및 이를 코딩하는 유전자를 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 SNF4 유전자를 클로닝 할 수 있는 프라이머 및 이를 이용하여 배추로부터 SNF4 유전자를 분리하는 방법을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 배추로부터 분리한 SNF4 유전자를 이용하여 발현 억제된 형질전환 벡터를 제공하고 이를 이용하여 신규한 돌연변이 담배를 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 상기 목적은 기존에 발표되어 있는 채소작물의 SNF4(Sucrose non-fermenting 4) 염기서열들의 상동성을 기초로하여 배추의 SNF4 유전자를 클로닝할 수 있는 프라이머를 작성하는 단계와; 상기 프라이머를 이용한 RT-PCR 방법으로 배추로부터 SNF4 유전자의 단편 및 전체 유전자를 획득하는 단계를 통하여 달성하였다.

발명의 효과

[0013] 본 발명은 배추 유래의 화기 및 종자형성에 관여하는 SNF4 유전자를 분리하여 제공하는 효과가 있고, 상기 분리한 SNF4 유전자를 이용한 과발현(over-expression) 벡터를 만들어 식물 형질전환시 배추의 종자수량을 기존보다 증가시킴으로써 같은 조건 내에서 종자확보 및 수량이 증가된 유용한 배추를 제공하는 뛰어난 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 각 SNF4-F와 SNF4-R을 사용한 RT-PCR에 의해 배추로부터 증폭된 SNF4 유전자의 단편을 전기영동한 사진이다.

도 2는 각 SNF4-F와 SNF4-R을 사용한 RT-PCR에 의해 배추로부터 증폭된 SNF4 유전자를 pGEM-T easy vector에 넣은 후 정확한 삽입을 확인하기 위해 EcoRI을 처리하여 확인한 사진이다.

도 3은 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 SNF4를 코딩하는 유전자의 시퀀스를 GenBank BlastX program을 사용하여 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 시퀀스와 상동성을 비교한 결과이다.

도 4는 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 SNF4를 코딩하는 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열 결과이다.

도 5는 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 SNF4를 코딩하는 유전자를 NCBI Conserved Domain program을 이용하여 분석한 결과이다.

도 6은 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 SNF4 유전자를 억제하는 RNA*i* 단편의 증폭 결과이다.

도 7은 pCR®8/GW/TOPO® 벡터에 도입된 SNF4 유전자를 억제하는 RNA*i* 단편을 제한효소 EcoRI을 이용하여 확인한 결과이다.

도 8은 SNF4 유전자의 발현 억제 RNAi 벡터(SNF4 RNA*i*)를 나타낸 그림이다.

도 9는 SNF4 유전자 단편이 도입된 SNF4 RNA*i* 벡터(SNF4*i*)를 제한효소 AvrⅡ을 이용하여 확인한 결과이다.

도 10은 SNF4 RNA*i* 벡터가 도입된 담배의 사진이다.

도 11은 SNF4 RNA*i* 벡터가 담배로 도입되었는지 확인하기 위해 벡터 내부 염기서열을 사용하여 PCR을 통해 도입된 벡터의 내부 단편을 전기영동한 사진이다.

이하, 본 발명의 구체적인 내용을 바람직한 실시예와 실험예를 통하여 상세히 설명한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명에 사용된 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)는 기내의 무균상태에서 키운 것에서 샘플을 채취하여 RNA 분리에 사용하였다. 이하에서, 본 발명의 SNF4(Sucrose non-fermenting 4) 유전자 분리과정을 설명한다.

[0016] **실시예 1 : SNF4(Sucrose non-fermenting 4) 유전자 조사**

[0017] 수크로오스 비-발효성 4(Sucrose non-fermenting 4) 유전자의 공통된 부분을 찾기 위하여 기존에 발표되어 있는 작물별 수크로오스 비-발효성 4(Sucrose non-fermenting 4) 유전자를 "National Center for Biotechnology Information(NCBI) Genbank"에서 검색하였다. 유전자의 전체 염기서열을 수집하기 위해 Entrez program을 사용하였다. 검색방법으로는 유전자명을 수크로오스 비-발효성 4 (Sucrose non-fermenting 4)를 검색어로 선정하였다.

[0018] 수집된 수크로오스 비-발효성 4(Sucrose non-fermenting 4) 유전자 가운데, 같은 배추과 식물인 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 염기서열을 선발하여 상동성을 많이 보이는 부분을 BLAST program으로 찾은 뒤 그 부분을 중심으로 프라이머를 제작하여 SNF4-F(서열번호 1) 및 SNF4-R(서열번호 2) 프라이머로 하기 [표 1] 에 나타내었다.

표 1

[0019]

프라이머	염기서열
SNF4-F (서열번호 1)	5'-AGG GGA TGT TTA GTT CTA CAT TGG-3'
SNF4-R (서열번호 2)	5'-AGT CAA AGA CCG AGC AGG AAT-3'

[0020] **실시예 2 : 배추로부터 RNA 분리**

[0021] 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 잎을 액체 질소를 이용하여 파쇄한 후 1 ㎖ 트리졸(Trizol, Gibco BRL) 용액을 첨가하여 잘 섞은 다음 5분 동안 상온에서 방치하였다. 200 ㎕의 클로로포름(chloroform)을 넣고 섞은 다음 4℃에서 13,000 rpm으로 10분 동안 원심분리한 뒤 그 혼합액의 상등액을 새 튜브로 옮겼다. 이소프로페놀(isopropanol) 500 ㎕를 넣고 13,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 침전시킨 뒤 이소프로페놀을 제거하고 침전물을 75% 에탄올로 세척한 다음, 에탄올이 없도록 잘 건조시킨 후 DEPC(diethyl pyrocarbonate) 처리된 멸균 증류수에 녹여 사용하였다.

[0022] **실시예 3: SNF4 유전자의 분리**

[0023] SNF4 유전자의 분리는 상기 확보된 RNA를 주형으로 oligo dT 프라이머(primer)와 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 cDNA를 합성한 뒤 [표 1]에 작성된 프라이머로 PCR하여 분리하였다.

[0024] cDNA 합성 프로그램 조건은 1 ㎍의 RNA를 oligo dT primer와 70℃에서 두어 RNA 이차구조를 제거한 뒤 45℃에서 30분간 역전사시키고 그 사용된 역전사효소를 불활성화 시키기 위해 94℃에서 5분간 두었다. 그 후 합성된 cDNA 1 ㎍을 사용하여 상기 작성한 프라이머와 태그 중합효소(tag polymerase)로 PCR하였는데 그 프로그램은 94℃에서 2분간 초기 변성 시간을 둔 뒤 94℃에서 30초, 61℃에서 30초, 72℃에서 1분 30초로 40 반복(cycle) 실행하고 마지막으로 72℃에서 10분간 최종 연장시킨 후 4℃를 유지하여 전체 반응을 종료하였다.

[0025] 실험결과 증폭된 SNF4 유전자의 단편은 전기영동을 통해 확인하였다(도 1). 각각의 프라이머들로 증폭된 단편들은 그 각각의 염기서열을 분석하기 위해 PCR 산물용 벡터 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 재조합 벡터를 구축하였다.

[0026] **실험예 1 : 재조합 벡터를 이용한 E.Coli DH5α의 형질전환**

[0027] 대장균 DH5α를 LB 50 ㎖에 접종시켜 37℃에서 OD_{570}= 0.375~0.400이 되도록 배양한 후 균주배양액을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여, 얻어진 침전물은 0.1M $CaCl_2$ 용액으로 풀어준 뒤 30분간 얼음에 두었다. 그 후 3,000 rpm에서 7분간 원심분리한 뒤 0.1M $CaCl_2$ 에 침전물을 녹인 다음 상기에서 구축한 재조합 벡터를 함께 섞어 얼음에 30분간 두었다가 42℃에서 90초간 열 충격을 주었다. 10분간 얼음에 방치한 후 LB 배지 700 ㎕를 첨가하여 37℃에서 1시간 진탕배양하였다. 배양액을 12,000 rpm으로 수초간 원심분리한 후 100 ㎕만 남기고 상등액을 제거하였으며 남은 상등액으로 침전물을 녹였다. 이후 앰피실린(Ampicillin) (50 mg/ℓ), X-gal (200 mg/ℓ in N-N dimethylformamide) 및 IPTG (200 mg/ℓ)가 첨가된 고체 LB 배지에 녹인 침전물을 전개하여 37℃에서 12시간 배양한 후 고체 배지에서 저항성을 보이며 흰색의 콜로니를 형성하는 형질전환된 것을 선발하였다.

[0028] **실험예 2 : 재조합 DNA 분리 및 유전자 삽입 여부 조사**

[0029] 항생제가 첨가된 LB 배지 3 ㎖에 상기에서 선발한 형질전환 콜로니를 접종한 후 37℃에서 12시간 배양한 뒤 배양액을 4℃에서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 침전된 균 덩어리에 Solution Ⅰ (200 ㎕/㎖)을 첨가하여 보텍스(vortex)를 수초간 수행하여 충분히 풀어준 뒤 Solution Ⅱ (200 ㎕/㎖)를 첨가하여 조심스럽게 섞어 세포막이 완전히 깨어지도록 실온에서 5분간 방치하였다. 이후 Solution Ⅲ (200 ㎕/㎖)를 첨가하여 잘 섞은 다음 얼음에서 10분간 방치한 뒤 12,000 rpm으로 4℃에서 10분간 원심분리하여 상등액을 획득하였다. 획득한 상등액의 1/10 양의 NaOAc와 2.5배의 100% 에탄올을 첨가하여 -20℃에서 2시간 동안 재조합 DNA를 침전시킨 후 원심

분리하여 침전물을 얻었다. 70% 에탄올로 침전물을 세척한 다음 멸균 증류수에 녹여 사용하였다.

[0030] 배추로부터 증폭된 SNF4 유전자의 pGEM-T easy vector 내로의 삽입 여부를 확인하기 위해서 제한효소 EcoR Ⅰ을 상기 분리한 재조합 DNA에 처리하여 확인하였다(도 2). 삽입된 자리에 근접한 T7 및 SP6 프라이머를 이용하여 염기서열을 조사하였다.

[0031] **실험예 3 : SNF4 유전자 전체의 확인**

[0032] 염기서열 분석용 pGEM-T easy vector 내부에 클로닝 된 PCR 단편의 염기서열 분석은 GenBank BLAST program을 사용하여 이루어졌다. SNF4-F(서열번호 1)와 SNF4-R(서열번호 2) 프라이머로 증폭된 1456 bp 산물의 염기서열과 아미노산 서열을 분석한 결과(도 4), 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 SNF4 유전자와 91%의 높은 상동성을 보였다(도 3). 즉, RNA를 대상으로 SNF4-F와 SNF4-R 프라이머를 이용해 RT-PCR을 수행한 결과 배추의 SNF4 유전자의 전체 유전자가 증폭된다는 것을 확인할 수 있었다(도 4). 또한 NCBI Conserved Domain program을 이용하여 분리한 유전자에 AMP-활성화 단백질 키나아제 베타 서브유닛 글리코겐 결합 도메인(AMP-activated protein kinase beta subunit glycogen binding domain)이 있는 것을 확인하였으며 E-value가 5.60e-27로 그 정확도가 높음을 확인하였다(도 5). 확인된 염기서열을 바탕으로 시작 코돈(codon)과 종료 코돈을 결정한 후, 그것이 배추로부터 분리된 전체 SNF4 유전자로 결정하여 서열번호 7에 그 염기서열을 제시하고 서열번호 8에 아미노산 서열을 제시한다.

[0033] **실시예 4: SNF4 유전자의 발현 억제 RNA*i* 벡터 제작**

[0034] 식물발현용 RNA*i* 벡터 제작을 위해 Gateway® system(invitrogen, USA)을 포함하고 있는 pB7GWIWG2(Ⅱ) 벡터(VIB-Ghent University, USA)를 이용하였다. SNF4 유전자의 효과적인 발현 억제 RNA*i* 벡터 구축을 위하여, NCBI Conserved Domain 프로그램을 이용한 분석 결과를 바탕으로 SNF4 유전자를 특징지을 수 있는 AMP-activated protein kinase (AMPK) beta subunit glycogen binding 부위로 SNF4-i-F(서열번호 3)와 SNF4-i-R(서열번호 4) 프라이머로 하기 [표 2] 에 나타내었다.

표 2

[0035]

프라이머	염기서열
SNF4-i-F (서열번호 3)	5'-ATG TTT AGT TCT ACA TTG GAT AAC AGC-3'
SNF4-i-R (서열번호 4)	5'-GTC CAG TGG ACC AAG AAC TC-3'

[0036] 실시예 3에서 염기서열 분석용 pGEM-T easy vector 내부에 클로닝 된 SNF4 유전자 1 ㎍과 상기 작성한 프라이머를 이용하여 태그 중합효소와 함께 PCR하였. PCR 프로그램은 94℃에서 2분간 초기 변성 시간을 둔 뒤 94℃에서 30초, 58℃에서 30초, 72℃에서 1분으로 40 반복(cycle) 실행하고 마지막으로 72℃에서 10분간 최종 연장시킨 후 4℃를 유지하여 전체 반응을 종료하였다.

[0037] 실험결과 증폭된 627 bp의 SNF4 유전자 발현 억제 RNA*i* 벡터 단편을 전기영동을 통해 확인하였다(도 6). 이후, 각각의 프라이머들로 증폭된 단편들은 그 각각에 Gateway® system(invitrogen, USA)을 적용하기 위하여, pCR® 8/GW/TOPO® 벡터에 클로닝하였다. 올바른 유전자가 삽입되었는지 확인하기 위하여 제한효소 EcoRI을 상기 재조합 RNA*i* 벡터에 처리하여 확인하였다 (도 7). 상기 유전자가 삽입된 자리에 근접한 T7 및 T3 프라이머를 이용하여 염기서열을 조사하였다.

[0038] 상기에서 제작한 SNF4 발현 억제 RNA*i* 벡터 단편을 Gateway® LR Clonase™ Ⅱ enzyme mix (invitrogen, USA)를

이용하여, pB7GWIWG2(Ⅱ) 벡터에 sense 및 anti-sense 방향으로 삽입되도록 하였다(도 8). 이후, 제한효소 AvrⅡ로 정확한 도입을 확인하였으며 그 실험결과는 도 9에 나타내었다.

[0039] **실험예 4: SNF4 유전자가 억제된 돌연변이 담배의 형질전환 여부 확인**

[0040] 배추의 SNF4 유전자가 억제된 돌연변이 담배의 형질전환 여부를 확인하기 위하여 pB7GWIWG2(Ⅱ) 벡터 내부의 염기서열로 프라이머를 제작하여 각각 P35S-F(서열번호 5)와 P35S-R(서열번호 6) 프라이머로 하기 [표 3]에 나타내었다.

표 3

[0041]

프라이머	염기서열
P35S-F (서열번호 5)	5'-TGC AGT CCT CTC CAA ATG AA-3'
P35S-R (서열번호 6)	5'-GTT CTG TTA GAT CCT CGA TC-3'

[0042] 확보된 돌연변이 담배의 DNA를 주형으로, 태그 중합효소(tag polymerase)로 PCR하였는데 그 프로그램은 94℃에서 2분간 초기 변성 시간을 둔 뒤 94℃에서 30초, 58℃에서 30초, 72℃에서 1분으로 40 반복(cycle) 실행하고 마지막으로 72℃에서 10분간 최종 연장시킨 후 4℃를 유지하여 전체 반응을 종료하였다.

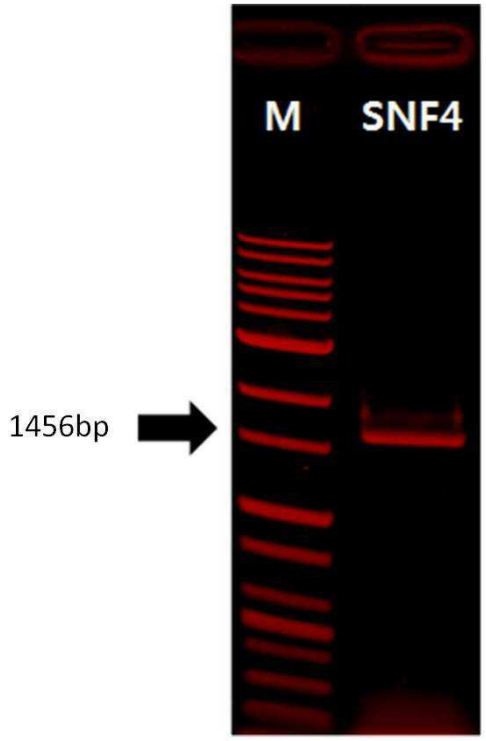
[0043] 실험결과 SNF4 유전자가 억제된 돌연변이 담배의 사진은 도 10에 나타내었다. 각각의 프라이머들로 증폭된 단편들은 전기영동을 통하여 밴드(band)의 유무를 확인하였다(도 11).

산업상 이용가능성

[0044] 이상에서 설명한 바와 같이 본 발명은 배추 유래의 SNF4 (Sucrose non-fermenting 4) 유전자를 제공하는 효과가 있고 이 유전자를 이용한 종자 수량 및 건실 종자를 획득할 수 있는 배추를 제공함으로서 경제적으로 유용한 배추 품종 육성을 도모하는 뛰어난 효과가 있으므로 식물육종산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

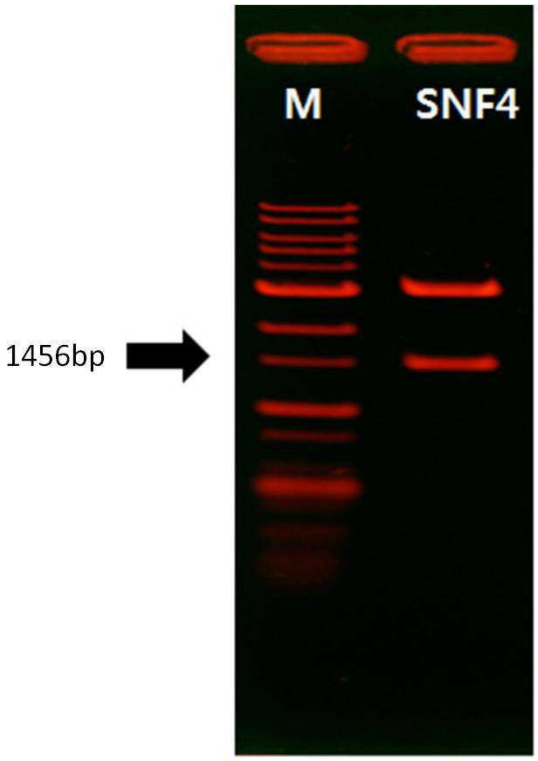
도면

도면1



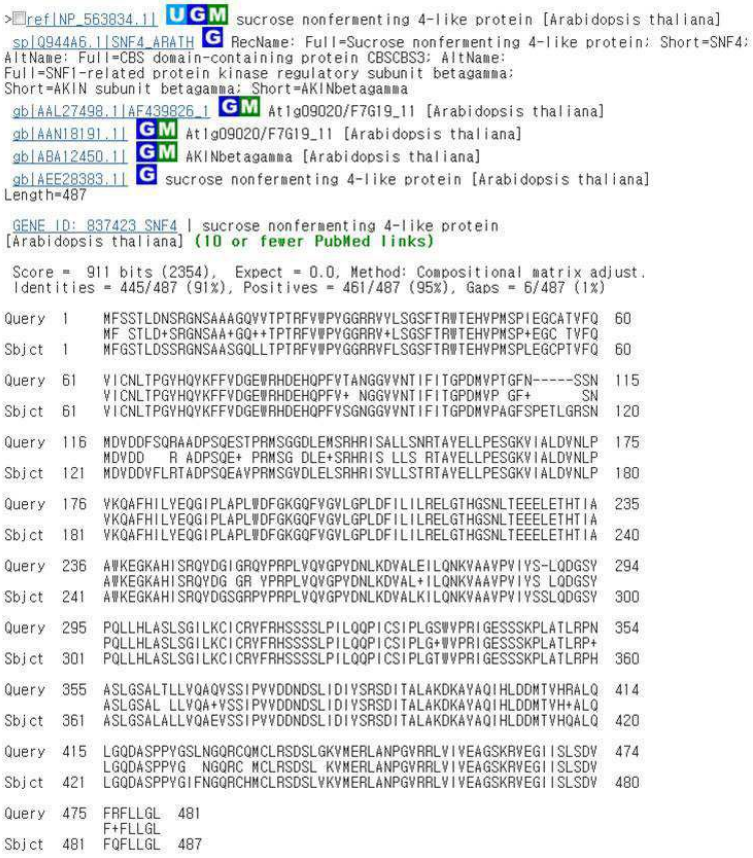
[주] M, 1kb Size 분자 마커
SNF4, Sucrose non-fermenting 4

도면2



[주] M, 1kb Size 분자 마커
SNF4, Sucrose non-fermenting 4

도면3



>ref|NP_563834.1| sucrose nonfermenting 4-like protein [Arabidopsis thaliana]
sp|Q944A6.1|SNF4_ARATH RecName: Full=Sucrose nonfermenting 4-like protein; Short=SNF4; AltName: Full=CBS domain-containing protein CBSCBS3; AltName: Full=SNF1-related protein kinase regulatory subunit betagamma; Short=AKIN subunit betagamma; Short=AKINbetagamma
gb|AAL27498.1|AF439826_1 At1g09020/F7G19_11 [Arabidopsis thaliana]
gb|AAN18191.1| At1g09020/F7G19_11 [Arabidopsis thaliana]
gb|ABA12450.1| AKINbetagamma [Arabidopsis thaliana]
gb|AEE28383.1| sucrose nonfermenting 4-like protein [Arabidopsis thaliana]
Length=487

GENE ID: 837423 SNF4 | sucrose nonfermenting 4-like protein [Arabidopsis thaliana] (10 or fewer PubMed links)

Score = 911 bits (2354), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 445/487 (91%), Positives = 461/487 (95%), Gaps = 6/487 (1%)

```
Query  1    MFSSTLDNSRGNSAAAGQVVTPTRFVWPYGGRRVYLSGSFTRWTEHVPMSPIEGCATVFQ  60
            MF STLD+SRGNSAA+GQ++TPTRFVWPYGGRRV+LSGSFTRWTEHVPMSP+EGC TVFQ
Sbjct  1    MFGSTLDSSRGNSAASGQLLTPTRFVWPYGGRRVFLSGSFTRWTEHVPMSPLEGCPTVFQ  60

Query  61   VICNLTPGYHQVKFFVDGEWRHDEHQPFVTANGGVVNTIFITGPDMVPTGFN-----SSN  115
            VICNLTPGYHQYKFFVDGEWRHDEHQPFV+ NGGVVNTIFITGPDMVP GF+      SN
Sbjct  61   VICNLTPGYHQYKFFVDGEWRHDEHQPFVSGNGGVVNTIFITGPDMVPAGFSPETLGRSN  120

Query  116  MDVDDFSQRAADPSQESTPRMSGGDLEMSRHRISALLSNRTAYELLPESGKVIALDVNLP  175
            MDVDD   R ADPSQE+ PRMSG DLE+SRHRIS LLS RTAYELLPESGKVIALDVNLP
Sbjct  121  MDVDDVFLRTADPSQEAVPRMSGVDLELSRHRISVLLSTRTAYELLPESGKVIALDVNLP  180

Query  176  VKQAFHILVEQGIPLAPLWDFGKGQFVGVLGPLDFILILRELGTHGSNLTEEELETHTIA  235
            VKQAFHILVEQGIPLAPLWDFGKGQFVGVLGPLDFILILRELGTHGSNLTEEELETHTIA
Sbjct  181  VKQAFHILVEQGIPLAPLWDFGKGQFVGVLGPLDFILILRELGTHGSNLTEEELETHTIA  240

Query  236  AWKEGKAHISRQYDGIGRQVPRPLVQVGPYDNLKDVALEILQNKVAAVPVIYS-LQDGSY  294
            AWKEGKAHISRQYDG GR VPRPLVQVGPYDNLKDVAL+ILQNKVAAVPVIYS LQDGSY
Sbjct  241  AWKEGKAHISRQYDGSGRPVPRPLVQVGPYDNLKDVALKILQNKVAAVPVIYSSLQDGSY  300

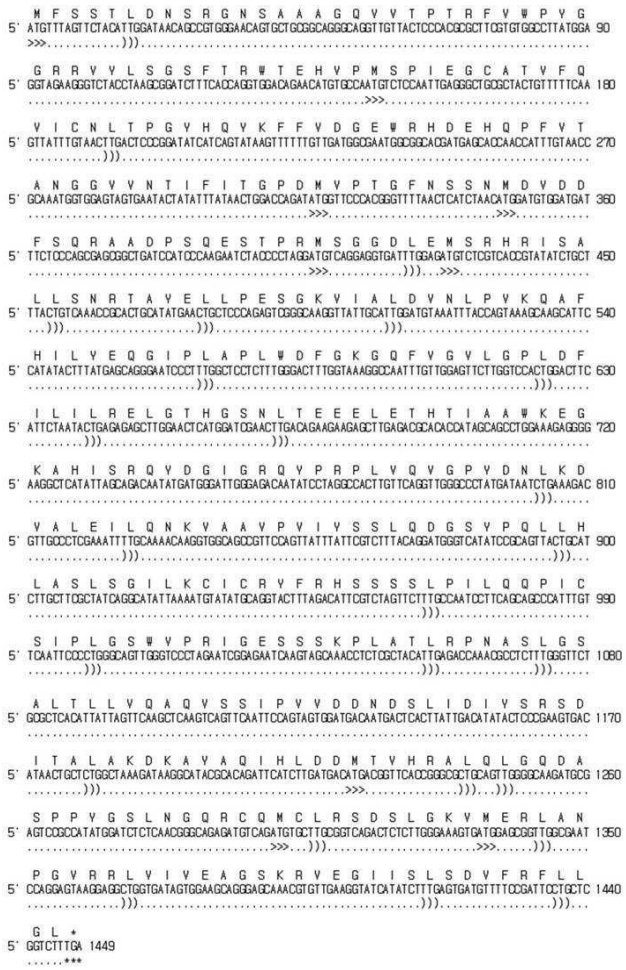
Query  295  PQLLHLASLSGILKCICRYFRHSSSSLPILQQPICSIPLGSWVPRIGESSSKPLATLRPN  354
            PQLLHLASLSGILKCICRYFRHSSSSLPILQQPICSIPLG+WVPRIGESSSKPLATLRP+
Sbjct  301  PQLLHLASLSGILKCICRYFRHSSSSLPILQQPICSIPLGTWVPRIGESSSKPLATLRPH  360

Query  355  ASLGSALTLLVQAQVSSIPVVDDNDSLIDIYSRSDITALAKDKAYAQIHLDDMTVHRALQ  414
            ASLGSAL LLVQA+VSSIPVVDDNDSLIDIYSRSDITALAKDKAYAQIHLDDMTVH+ALQ
Sbjct  361  ASLGSALALLVQAEVSSIPVVDDNDSLIDIYSRSDITALAKDKAYAQIHLDDMTVHQALQ  420

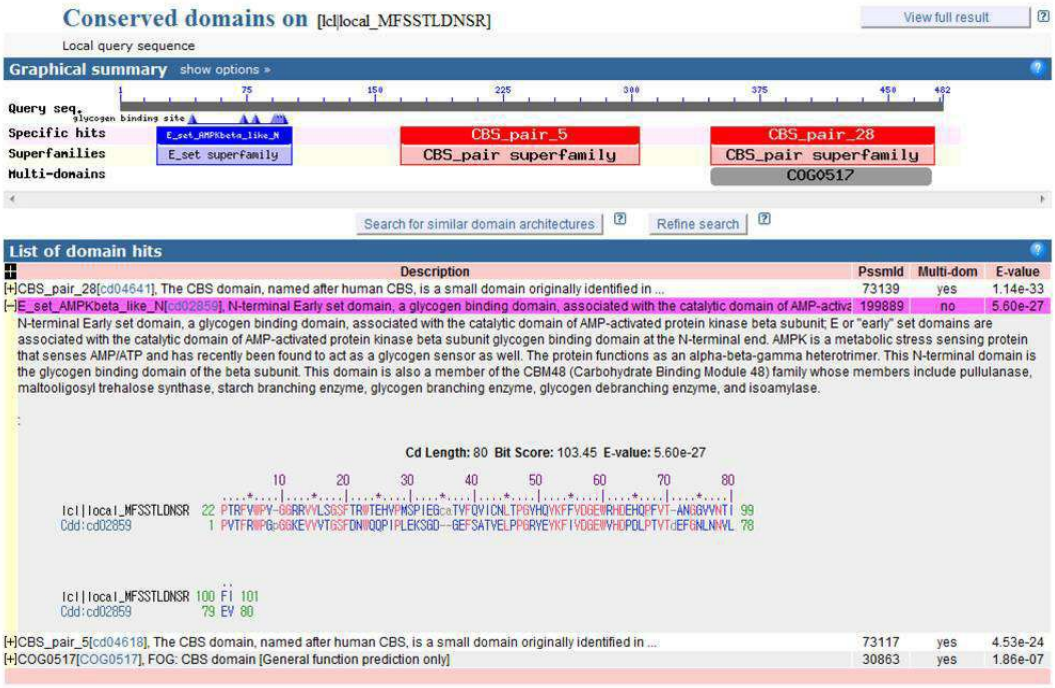
Query  415  LGQDASPPVGSLNGQRCQMCLRSDSLGKVMERLANPGVRRLVIVEAGSKRVEGIISLSDV  474
            LGQDASPPVG  NGQRC MCLRSDSL KVMERLANPGVRRLVIVEAGSKRVEGIISLSDV
Sbjct  421  LGQDASPPVGIFNGQRCHMCLRSDSLVKVMERLANPGVRRLVIVEAGSKRVEGIISLSDV  480

Query  475  FRFLLGL  481
            F+FLLGL
Sbjct  481  FQFLLGL  487
```

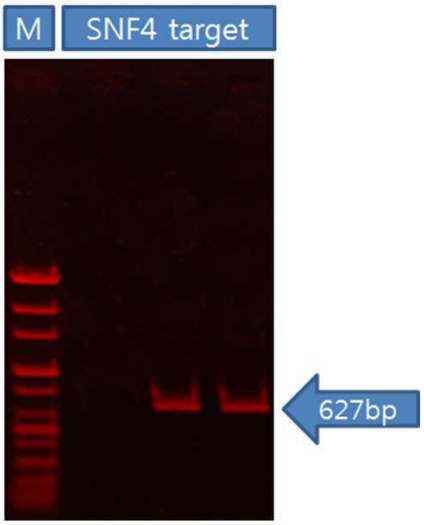
도면4



도면5

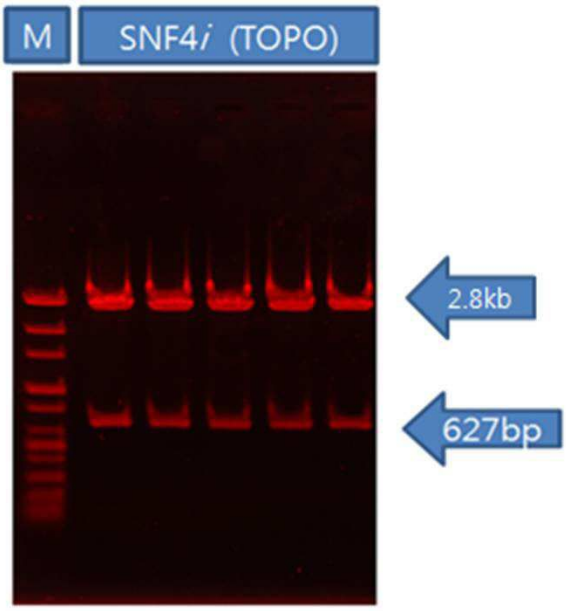


도면6



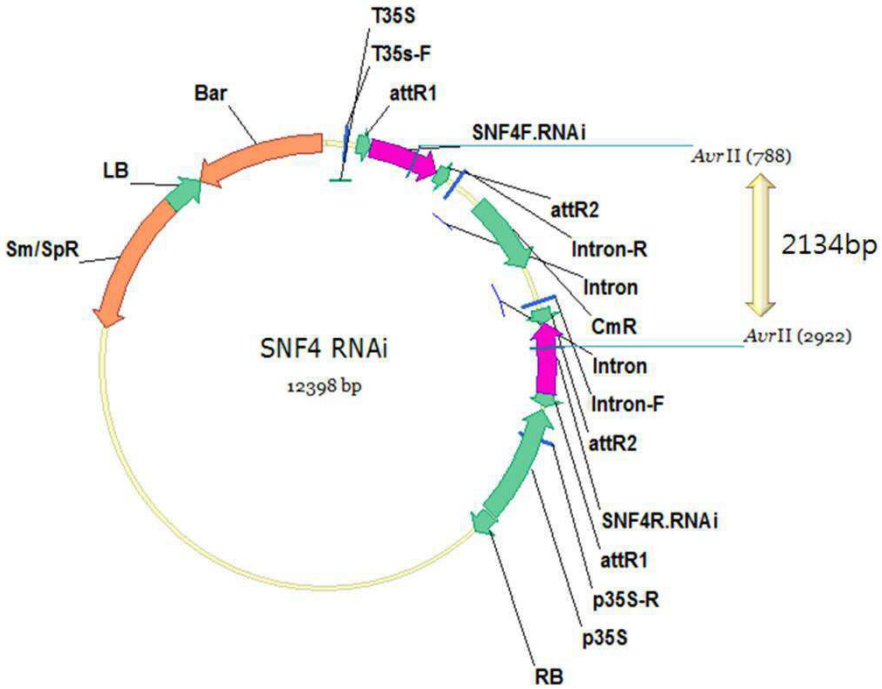
[주] M, 100bp size 분자 마커
SNF4 target, SNF4 RNAi 단편

도면7



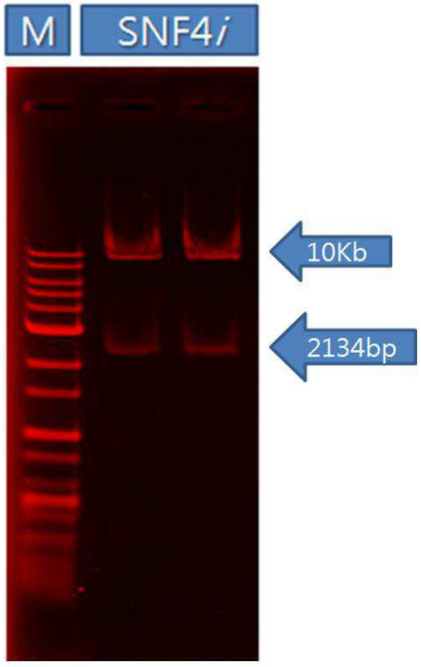
[주] M, 100bp size 분자 마커
SNF4i (TOPO), SNF4 RNAi 단편이 도입된 pCR®8/GW/TOPO® 벡터

도면8



[주] Sm/SpR, streptomycin/spectinomycin 저항성 Sm/SpR 유전자
LB, T-DNA의 좌측 보더
RB, T-DNA 우측 보더
Bar, 제초제 저항성 Bar 유전자
P35S, 콜리플라워 모자이크 바이러스(CaMV) 35S 프로모터
T35S, CaMV 35S의 종결자
CmR, 콜로람페니콜(chloramphenicol) 저항성 CmR 유전자

도면9

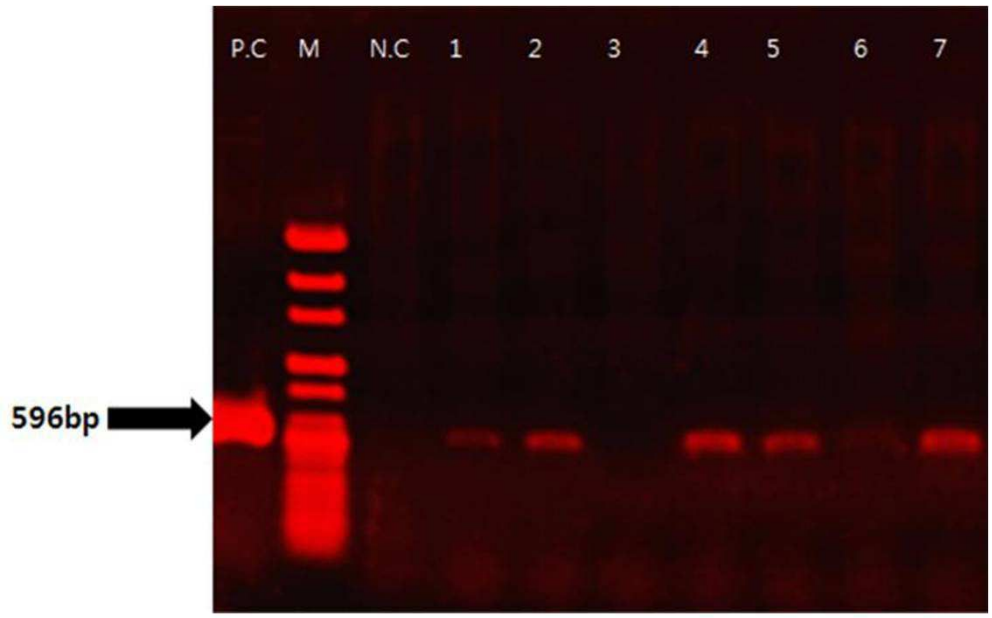


[주] M, 1kb size 분자 마커
SNF4i, SNF4 RNAi 단편이 도입된 벡터

도면10



도면11



[주] M, 1kb Size 분자 마커
P.C, SNF4 RNA*i* 벡터(SNF4*i*)
N.C, 비형질전환 담배 gDNA
Line 1, 2, 4, 5, 6, 7 형질전환 담배

서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Sucrose non-fermenting 4 involved in flower and seed formations of Brassica rapa ssp. pekinensis and a gene encoding the same

<130> 5104

<160> 8

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Brassica rapa ssp. pekinensis

<400> 1

aggggatgtt tagttctaca ttgg 24

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Brassica rapa ssp. pekinensis

<400> 2

agtcaaagac cgagcaggaa t 21

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Brassica rapa ssp. pekinensis

<400> 3

atgtttagtt ctacattgga taacagc 27

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Brassica rapa ssp. pekinensis

<400> 4

gtccagtgga ccaagaactc 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> vector sequence

<400> 5

tgcagtcctc tccaaatgaa 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> vector sequence

<400> 6

gttctgttag atcctcgatc 20

<210> 7

<211> 1456

<212> DNA

<213> Brassica rapa ssp. pekinensis

<400> 7

aggggatgtt tagttctaca ttggataaca gccgtgggaa cagtgctgcg gcagggcagg 60

ttgttactcc cacgcgcttc gtgtggcctt atggaggtag aagggtctac ctaagcggat 120

ctttcaccag gtggacagaa catgtgccaa tgtctccaat tgagggctgc gctactgttt 180

ttcaagttat ttgtaacttg actcccggat atcatcagta taagtttttt gttgatggcg 240

aatggcggca cgatgagcac caaccatttg taaccgcaaa tggtggagta gtgaatacta 300

tatttataac tggaccagat atggttccca cgggttttaa ctcatctaac atggatgtgg 360

atgatttctc ccagcgagcg gctgatccat cccaagaatc tacccctagg atgtcaggag 420

gtgatttgga gatgtctcgt caccgtatat ctgctttact gtcaaaccgc actgcatatg 480

aactgctccc agagtcgggc aaggttattg cattggatgt aaatttacca gtaaagcaag 540

cattccatat actttatgag cagggaatcc ctttggctcc tctttgggac tttggtaaag 600

gccaatttgt tggagttctt ggtccactgg acttcattct aatactgaga gagcttggaa 660

ctcatggatc gaacttgaca gaagaagagc ttgagacgca caccatagca gcctggaaag 720

aggggaaggc tcatattagc agacaatatg atgggattgg gagacaatat cctaggccac 780

ttgttcaggt tgggccctat gataatctga aagacgttgc cctcgaaatt ttgcaaaaca 840

aggtggcagc cgttccagtt atttattcgt ctttacagga tgggtcatat ccgcagttac 900

tgcatcttgc ttcgctatca ggcatattaa aatgtatatg caggtacttt agacattcgt 960

ctagttcttt gccaatcctt cagcagccca tttgttcaat tcccctgggc agttgggtcc 1020

ctagaatcgg agaatcaagt agcaaacctc tcgctacatt gagaccaaac gcctctttgg 1080

gttctgcgct cacattatta gttcaagctc aagtcagttc aattccagta gtggatgaca 1140

atgactcact tattgacata tactcccgaa gtgacataac tgctctggct aaagataagg 1200

catacgcaca gattcatctt gatgacatga cggttcaccg ggcgctgcag ttggggcaag 1260

atgcgagtcc gccatatgga tctctcaacg ggcagagatg tcagatgtgc ttgcggtcag 1320

actctcttgg gaaagtgatg gagcggttgg cgaatccagg agtaaggagg ctggtgatag 1380

tggaagcagg gagcaaacgt gttgaaggta tcatatcttt gagtgatgtt ttccgattcc 1440

tgctcggtct ttgact 1456

<210> 8

<211> 482

<212> PRT

<213> Brassica rapa ssp. pekinensis

<400> 8

Met Phe Ser Ser Thr Leu Asp Asn Ser Arg Gly Asn Ser Ala Ala Ala
1 5 10 15

Gly Gln Val Val Thr Pro Thr Arg Phe Val Trp Pro Tyr Gly Gly Arg
20 25 30

Arg Val Tyr Leu Ser Gly Ser Phe Thr Arg Trp Thr Glu His Val Pro

35 40 45

Met Ser Pro Ile Glu Gly Cys Ala Thr Val Phe Gln Val Ile Cys Asn

50 55 60

Leu Thr Pro Gly Tyr His Gln Tyr Lys Phe Phe Val Asp Gly Glu Trp

65 70 75 80

Arg His Asp Glu His Gln Pro Phe Val Thr Ala Asn Gly Gly Val Val

85 90 95

Asn Thr Ile Phe Ile Thr Gly Pro Asp Met Val Pro Thr Gly Phe Asn

100 105 110

Ser Ser Asn Met Asp Val Asp Asp Phe Ser Gln Arg Ala Ala Asp Pro

115 120 125

Ser Gln Glu Ser Thr Pro Arg Met Ser Gly Gly Asp Leu Glu Met Ser

130 135 140

Arg His Arg Ile Ser Ala Leu Leu Ser Asn Arg Thr Ala Tyr Glu Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

Lys Gln Ala Phe His Ile Leu Tyr Glu Gln Gly Ile Pro Leu Ala Pro

180 185 190

Leu Trp Asp Phe Gly Lys Gly Gln Phe Val Gly Val Leu Gly Pro Leu

195 200 205

Asp Phe Ile Leu Ile Leu Arg Glu Leu Gly Thr His Gly Ser Asn Leu

210 215 220

Thr Glu Glu Glu Leu Glu Thr His Thr Ile Ala Ala Trp Lys Glu Gly

225 230 235 240

Lys Ala His Ile Ser Arg Gln Tyr Asp Gly Ile Gly Arg Gln Tyr Pro

245 250 255

Arg Pro Leu Val Gln Val Gly Pro Tyr Asp Asn Leu Lys Asp Val Ala

260 265 270

Leu Glu Ile Leu Gln Asn Lys Val Ala Ala Val Pro Val Ile Tyr Ser

275 280 285

Leu Gln Asp Gly Ser Tyr Pro Gln Leu Leu His Leu Ala Ser Leu Ser

290 295 300

Gly Ile Leu Lys Cys Ile Cys Arg Tyr Phe Arg His Ser Ser Ser Ser

305 310 315 320

Leu Pro Ile Leu Gln Gln Pro Ile Cys Ser Ile Pro Leu Gly Ser Trp

325 330 335

Val Pro Arg Ile Gly Glu Ser Ser Ser Lys Pro Leu Ala Thr Leu Arg

340 345 350

Pro Asn Ala Ser Leu Gly Ser Ala Leu Thr Leu Leu Val Gln Ala Gln

355 360 365

Val Ser Ser Ile Pro Val Val Asp Asp Asn Asp Ser Leu Ile Asp Ile

370 375 380

Tyr Ser Arg Ser Asp Ile Thr Ala Leu Ala Lys Asp Lys Ala Tyr Ala

385 390 395 400

Gln Ile His Leu Asp Asp Met Thr Val His Arg Ala Leu Gln Leu Gly

405 410 415

Gln Asp Ala Ser Pro Pro Tyr Gly Ser Leu Asn Gly Gln Arg Cys Gln

420 425 430

Met Cys Leu Arg Ser Asp Ser Leu Gly Lys Val Met Glu Arg Leu Ala

435 440 445

Asn Pro Gly Val Arg Arg Leu Val Ile Val Glu Ala Gly Ser Lys Arg

450 455 460

Val Glu Gly Ile Ile Ser Leu Ser Asp Val Phe Arg Phe Leu Leu Gly

465 470 475 480

Leu ***