(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0028768
(43) 공개일자 2013년03월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *C12N 15/63* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0020838(분할)
(22) 출원일자 2013년02월27일
심사청구일자 2013년02월27일
(62) 원출원 특허 10-2010-0060924
원출원일자 2010년06월28일
심사청구일자 2010년06월28일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
임용표
대전광역시 유성구 궁동 220 충남대학교 KT&G 농업생명공학관 316호
허윤강
경기도 성남시 분당구 서현동 292 임광아파트 315동 601호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

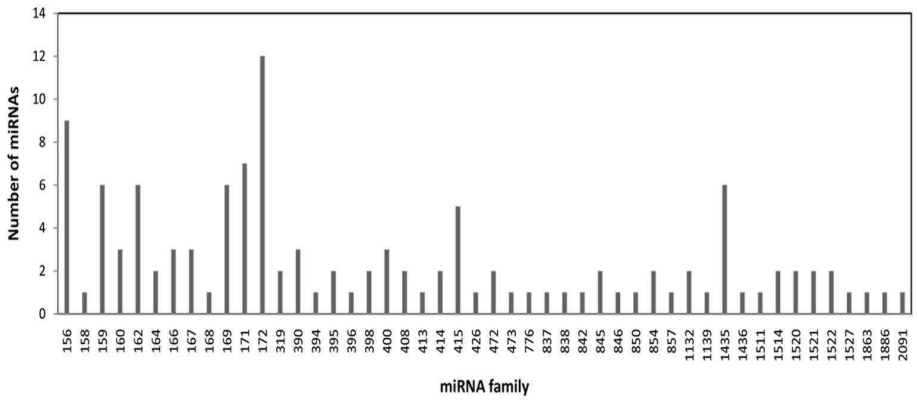
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 **배추에서 분리된 신규 m i R N A인 BrMiR 156b**

(57) 요 약

본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 73으로 기재되는 군에서 선택되는 어느 하나의 염기서열 및 상기 염기서열과 상보적인 염기서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 염기서열로 이루어진 배추(*Brassica rapa*)로부터 분리된 miRNA 분자 및 상기 miRNA 분자를 포함하는 벡터에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

비그네쉬 단다파늘

대전광역시 유성구 궁동 220 충남대학교 KT&G 농업생명공학관 316호

람치어리 니랄라

대전광역시 유성구 궁동 220 충남대학교 KT&G 농업생명공학관 316호

김준기

대전광역시 유성구 노은동 515-9번지 205호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	607003-05-3-SB110
부처명	농림수산식품기술기획평가원
연구사업명	배추분자마커연구사업단
연구과제명	대량 유전자 분자표지 발굴
주관기관	충남대학교 산학협력단
연구기간	2007.07.30 ~ 2012.07.29

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2의 염기서열 또는 상기 염기서열과 상보적인 염기서열로 이루어진, 배추(Brassica rapa)로부터 분리된 miRNA 분자.

청구항 2

제1항의 miRNA 분자를 포함하는 벡터.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 배추에서 분리된 신규 miRNA에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 서열번호 1 내지 서열번호 73으로 기재되는 군에서 선택되는 어느 하나의 염기서열 및 상기 염기서열과 상보적인 염기서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 염기서열로 이루어진 배추(*Brassica rapa*)로부터 분리된 miRNA 분자 및 상기 miRNA 분자를 포함하는 벡터에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 일반적으로 생물체에서 대부분의 유전자 발현은 전사 수준(transcriptional level)과 전사후 수준(post-transcriptional level)에서 조절되어 진다. 이러한 유전자를 조절하는 요소들은 다양한 실험적 증거를 통해 증명되어 왔다 (Depicker and Montagu, 1997, Current Opinion in Cell Biology 9:373-382). miRNA는 전사후 수준에서 유전자의 발현을 조절하는 하나의 요소로서 최근에 밝혀졌으며 단백질을 암호화하지 않는 작은 조각의 RNA로 구성되어 있다. 성숙 miRNA는 통상적으로 18 내지 24 nt(뉴클레오티드)의 길이로 구성되어 있으며 식물과 동물에 걸쳐 광범위한 분포를 갖고 있는 것으로 밝혀졌다. miRNA는 표적유전자의 mRNA (messenger RNA)의 상보적인 부위에 결합하여 해당 유전자의 전사 및 번역의 활성을 억제하여 유전자 발현을 조절한다(Bartel, 2004, Cell 116, 281-297). 식물에서 miRNA의 전사는 RNA 중합효소 II에 의해 이루어지며 성숙 miRNA를 포함하는 pri miRNA는 안정적인 헤어핀 구조(hairpin loop structure)를 형성한다. 캡핑(Capping), 스플라이싱(splicing) 및 폴리-아데닐화(poly-adenylation)와 같은 miRNA 서열의 가공과정은 RNase III 타입의 엔도뉴클리아제(endonuclease)에 의해 핵내에서 완성되어 진다. 식물의 RNase III 타입 효소인 HASTY5 단백질은 메틸화된 miRNA/miRNA 이중체를 세포질로 수송하는 역할을 수행한다(Bartel, 2004, Cell 116, 281-297). 성숙 miRNA는 이후 ARGONAUT 단백질을 포함하는 RNA-induced silencing complex (RISC)와 결합하고 이들 복합체는 표적유전자의 상보적인 부위에 결합하여 표적유전자의 mRNA의 전사나 번역 과정을 억제한다(Voinnet, 2009, Cell 136, 669-687).

[0003] 현재 miRNA를 찾아내는 방법은 크게 두 가지로 분류되어 진다. 첫 번째는 기존에 구조가 알려진 성숙 miRNA의 서열을 기반으로 컴퓨터를 이용하여 유전체의 서열을 비교하여 잠재적인 miRNA를 찾아내는 방법이고 (Wang et al, 2004, Genome Biol. 5, 1-15), 두 번째는 small RNA 라이브러리 제작을 통해 miRNA를 분리하는 직접적인 방법이다 (Zhang et al., 2006, Dev Biol 289, 3-16). 첫 번째 방법은 유전체의 구조 예측을 위하여 전체 또는 부분 서열이 요구되어 진다. 두 번째 방법은 이용가능한 유전체 서열이 없는 생물을 대상으로 선호되어 지는 방법이다. 이들 두 방법을 이용하여 현재까지 애기장대(Wang et al, 2004, Genome Biol. 5, 1-15), 메디카고 트룬쿨라타(Jagadeeswaran et al., 2009, New Phytol 184, 85-98), 벼 (Wang et al., 2004, Nucleic Acids Res 32, 1688-1695), 포플러(Li et al., 2009, Biochem Biophys Res Commun 388, 272-277), 옥수수(Zhang et al., 2006, FEBS Lett, 580, 3753-3762), 면(Qiu et al., 2007, Gene 395, 49-61), 감귤류(Song et al., 2009, Planta 230, 671-685), 유채(Xie et al., 2007, FEBS Letters 581, 1464-1474), 밀(Jin et al. 2008, J Plant Res 121, 351-355) 및 대두(Chen et al. 2009, J Integr Plant Biol 51, 1071-1079) 등에서 광범위한 수의 miRNA가 분석되어 졌다. 최근까지 많은 수의 miRNA가 식물에 있어 다양한 생물학적 기능을 수행하는 것이 보고되어 졌다. 다양한 실험적 증거들을 토대로 miRNA는 전사 인자(transcriptional factor)와 다양한 유전자들의 조절을 통해 식물에 있어 영양단계에서 생식단계로의 전이 (Wu and Poethig, 2006, Development 133, 3539-3547), 꽃 기관의 발생 (Chen 2004, Science 303, 2022-2025), 잎의 형성, 줄기의 발생 (Mallory et al.

2004, Curr. Biol. 14, 1035-1046), 뿌리의 발생 (Guo et al. 2005, Plant Cell 17, 1376-1386), 신호 전달, 자웅 생식기관의 발생 (Wu and Poethig 2006, Development 133, 3539-3547) 및 다양한 세포내 대사과정에 관여함을 보여주었다 (Zhang et al. 2007, Gene 397, 26-37). 더불어 식물에 있어 miRNA의 발현 조절은 바이러스, 곰팡이 및 박테리아의 감염과 같은 생물학적 스트레스도 관여함이 보고되어 졌다. 최근의 연구를 통해 식물에서 miRNA의 발현 조절은 비생물적 스트레스인 저온, 가뭄, 고염성 및 UV-B (Sunkar et al. 2008, BMC Plant Biol. 29, 8-25)와 인산염 및 황산염 등의 고갈 그리고 기타 영양 요구성 결핍에 의해 이루어짐이 보고되어 졌다 (Bartel 2004, Cell 116, 281-297). 그러나 이러한 다양한 연구에도 불구하고 배추에서의 miRNA의 분리와 그 특성 분석에 관한 연구는 매우 제한적으로 수행되어 왔다 (He et al. 2008, FEBS Letters 582, 2445-2452). 배추(Brassica rapa)에서의 miRNA의 연구는 배추 및 그 아종 사이에서 miRNA에 의해 조절되어 지는 서로 다른 유전자의 발현 기작을 기반으로 이들의 유전적, 형태학적 다양성을 연구하는데 중요한 자료를 제공할 수 있을 것이다. 배추는 중요한 작물의 하나로서 다양한 형태학적 특성을 보이는 아종을 갖고 있으며 주로 식용(예: 배추 및 청경채), 지방종자(예: Yellow sarson 종, Brown sarson 종 및 Toria 종) 및 사료 작물(예: 순무)로 재배되어 진다. 이러한 배추의 다양한 종들은 동일한 유전자원을 갖고 있음에도 불구하고 잎의 형태 등 다양한 형태학적 변이를 보여주고 있다. 배추의 경제적 중요성으로 인해 2003년에 배추의 게놈 시퀀싱 프로젝트가 수행되기 시작했으며, 이를 통해 배추의 서로 다른 조직과 발생 단계에서 많은 수의 genome survey sequence (GSS), expressed sequence tags (EST) 및 다양한 정보의 유전체 정보들이 확보되어 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에 등록되어 있다. 본 연구에서는 NCBI에서 이용할 수 있는 배추의 GSS, EST, mRNA 및 cDNA와 같은 유전체 정보를 이용하여 배추의 miRNA를 분리하기 위하여 수행되었다.

[0004] 한국등록특허 제10-0860087호에는 인간 배아줄기세포에서 분리된 miRNA가 개시되어 있으며, 한국공개특허 제2010-0012295호에는 마우스 프리온 유전자에 대한 miRNA가 개시되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 배추의 GSS, EST, mRNA 및 cDNA와 같은 유전체 정보를 이용하여 배추의 miRNA를 분리함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 73으로 기재되는 군에서 선택되는 어느 하나의 염기서열 및 상기 염기서열과 상보적인 염기서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 염기서열로 이루어진, 배추(*Brassica rapa*)로부터 분리된 miRNA 분자를 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 상기 miRNA 분자를 포함하는 벡터를 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명의 전체 47개의 패밀리에 속하는 109개의 배추 miRNA는 식물의 분화 및 대사과정 등 배추 유전체의 기능에 포함된 전사후 조절을 이해하는데 유용할 것으로 사료된다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 배추에서 새로운 잠재적 miRNAs의 동정을 위한 모식도를 나타낸다.

도 2는 배추의 47 miRNA 패밀리에서 동정된 miRNA의 수를 보여준다.

도 3은 성숙 miRNAs의 다른 길이에 대한 동정된 miRNA의 수를 보여준다.

도 4는 대표적 miRNA 패밀리의 스템 루프 헤어핀 구조를 보여준다. 적색 서열은 성숙 miRNA 서열을 나타낸다.

도 5는 배추에서 전구체 miRNA 길이에 대한 동정된 miRNAs의 수를 보여준다.

도 6은 다른 식물과 비교했을 때, 배추 miRNA162 전구체 서열이 12번째 뉴클레오티드 위치에서 하나의 뉴클레오티드에 차이가 있음을 보여준다. BrMiR: 배추 miRNA, Bnp: 유채, Bol: 브라시카 올레라세아(*Brassica oleracea*), Sly: 솔라눔 라이코펠시쿰(*Solanum lycopersicum*), Vvi: 포도(*Vitis vinifera*), Osa: 벼(*Oryza sativa*), Ath: 애기장대(*Arabidopsis thaliana*), Cpa: 카리카 파파야(*Carica papaya*).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 73으로 기재되는 군에서 선택되는 어느 하나의 염기서열; 및

[0011] 상기 염기서열과 상보적인 염기서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 염기서열로 이루어진, 배추(*Brassica rapa*)로부터 분리된 miRNA 분자를 제공한다.

[0012] 본 발명에서는 배추(*Brassica rapa*)로부터 miRNA를 분리하였다. 본 발명에 따른 miRNA는 표 1 내지 표 5에 기재된 바와 같이 서열번호 1 내지 서열번호 73으로 이루어진 군에서 선택되는 염기서열을 가질 수 있다. 또한, 본 발명은 표 1 내지 표 5에 기재된 miRNA 염기서열과 상보적인 염기서열을 갖는 핵산 분자도 포함한다.

[0013] 본 발명에 따른 miRNA 분자는 바람직하게는 17 내지 22 뉴클레오티드의 길이를 가질 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0014] 본 발명에 따른 핵산 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태로 존재할 수 있다. miRNA는 주로 단일 가닥 분자인 반면, pre-miRNAs는 주로 이중 가닥 부분을 형성할 수 있는 적어도 부분적으로 자가-상보적인 분자(예: 스템- 및 루프- 구조)이다.

[0015] 또한 본 발명의 핵산 분자는 RNA, DNA, 당- 또는 골격-변형 리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드와 같은 핵산 유사체 분자(analog molecules)일 수 있다. 또한 PNA(peptide nucleic acids) 또는 LNA(locked nucleic acids)와 같은 다른 핵산 유사체 분자일 수도 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0016] 본 발명의 핵산 분자는 적어도 하나의 변형된 핵산 유사체를 포함하는, 즉 자연적으로 생성되는 리보뉴클레오티드 또는 데옥시뉴클레오티드가 비자연적으로 생성되는 뉴클레오티드로 변형된 RNA- 또는 DNA 분자일 수 있다. 상기 변형된 핵산 유사체는 예컨대 핵산 분자의 5'-말단 및/또는 3'-말단에 위치할 수 있다.

[0017] 바람직한 핵산 유사체는 당- 또는 골격-변형 리보뉴클레오티드이다. 또한 뉴클레오베이스(nucleobase)-변형 리보뉴클레오티드, 즉 다음과 같은 자연적으로 발생하는 뉴클레오베이스 대신 비-자연적으로 발생하는 뉴클레오베이스를 포함하는 리보뉴클레오티드가 적합하다고 보고되었다: 예를 들면, 5' 위치에 변형된 우리딘 또는 시티딘(예: 5-(2-,아미노)프로필 우리딘, 5-브로모 우리딘); 8-위치에 변형된 아데노신 및 구아노신(예:8-브로모 구아노신); 데아자(deaza)뉴클레오티드(예: 7-데아자-아데노신); 및 O- and N-알킬화(O- and N-alkylated) 뉴클레오티드(예: N6-메틸 아데노신). 바람직한 당-변형 리보뉴클레오티드에서 2'-OH 그룹은 H, OR, R, 할로(halo), SH, SR, NH2, NHR, NR2 또는 CN(여기서, R은 C1-C6 알킬, 알케닐 또는 알키닐이고 할로는 F, Cl, Br 또는 I임)으로 이루어진 군에서 선택되는 그룹에 의해 치환될 수 있다. 바람직한 골격-변형 리보뉴클레오티드에서 인접한 리보뉴클레오티드에 연결되어 있는 포스포에스터 그룹은 변형된 그룹, 예컨대, 포스포티오에이트 그룹으로 치환될 수 있다. 또한, 상기 기재된 변형이 조합될 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 miRNA 분자를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0019] 본 발명의 miRNA 분자는 발현 조절 서열에 작동적으로 연결되어 벡터 내에 삽입될 수 있다. 상기에서 발현은 전사 또는 위에 기재한 바와 같은 miRNA 분자 또는 miRNA 전구체 분자를 야기하는 임의적인 부가 프로세싱을 말한다. 상기 벡터는 바람직하게는 DNA 벡터, 예컨대, 바이러스성 벡터 또는 플라스미드일 수 있다.

[0020] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0021] **miRNA와 배추 염기서열의 레퍼런스 세트**

[0022] 애기장대(Arabidopsis thaliana), 유채(Brassica napus), 대두(Glycine max), 벼(Oryza sativa), 포플러(Populus trichocarpa), 밀(Triticum aestivum), 포도(Vitis vinifera) 및 옥수수(Zea mays)에서 밝혀진 1280개의 알려진 miRNA 서열은 miRBase (Griffiths-Jones et al. 2008, *Nucleic Acids Res* 36, D154-D158)에서 얻었다. 이들 1280개의 miRNA 중 658개의 반복된 정보는 Perl script (http://www.perl.org/)를 이용하여 제거하였다. 남은 622개의 miRNA는 최종 레퍼런스 세트로 사용되어 졌다. 배추의 전체 397,600개의 GSS, EST 및 mRNA 서열은 NCBI (ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genbank/)의 유전자은행 데이타베이스에서 확보하였고 12,098개의 cDNA 서열은 본 연구실과 배추 게놈 시퀀싱 프로젝트 사이트(www.brassica-rapa.org, www.brassica.info)에서 확보

하였다.

[0023] **miRNA 및 표적유전자 탐색을 위해 사용된 소프트웨어**

[0024] 배추의 염기서열 (GSS, EST, mRNA 및 cDNA)에서 기존에 보고된 miRNA 서열과 유사한 서열을 탐색하기 위하여 BLAST-2.2.20 (Camacho et al. 2009, BMC Bioinformatics 10, 421)을 이용하였고, RNA의 안정성과 이차구조를 예측하기 위하여 Mfold-3.1.2 (Zuker et al. 2003, *Nucleic Acids Res,* 31, 3406-3415)를 사용하였다. 그리고 찾아낸 miRNA의 표적 유전자의 추정은 miRU (Zhang 2005, Nucleic Acids Res, 33, W701-W704)를 사용하였고, 각각의 성숙 miRNA의 반복구조는 Perl scripts를 사용하여 제거하였다.

[0025] **miRNA의 식별**

[0026] 배추의 유전체 서열에서 miRNA를 찾기 위해 최근에 개발된 컴퓨터기반 탐색기법을 사용하였다 (Ambros et al. 2003, RNA, 9, 277-279). 비중복성 성숙 miRNA 서열은 배추의 유전체 염기서열에서 동족체를 찾기 위한 기본서열로 사용되어 졌으며 이는 NCBI의 BLASTN 프로그램을 사용하여 수행하였다. 이전에 보고된 식물의 miRNA와 비교하여 4개 이하의 불일치 서열을 갖고 있는 배추의 잠재적인 miRNA를 사용하여 BLASTX를 수행하였고, 결과적으로 단백질을 암호화하고 있는 서열을 제거하였다. 이를 통해 얻어진 비단백질 암호성 배추 miRNA는 Mfold 프로그램을 이용하여 헤어핀 구조(hairpin structure)를 예측하였다. miRNA의 선별은 다음의 기준에 따라 수행하였다(Ambros et al. 2003, RNA, 9, 277-279): a) 기존에 보고된 식물 miRNA와 비교하였을 때 4개 이하의 불일치를 보일 것, b) 1차 전구체 miRNA는 스템-루프(stem-loop) 헤어핀 이차 구조를 형성할 것, c) 성숙 miRNA는 헤어핀 2차 구조의 스템 부분에 위치할 것, d) 성숙 miRNA는 헤어핀 구조에서 상보적인 부분과 6개 이하의 불일치를 보일 것, e) 추정된 전구체 miRNA의 2차 구조는 high negative MFE (Minimal Folding free Energy)와 higher MFEIs (Minimal Folding free Energy Indexes) 값을 가질 것.

[0027] 또한 miRNA의 중복성을 피하고 표적유전자의 서로 다른 패밀리 멤버를 확인하기 위하여, 찾아낸 전체 전구체 miRNA 서열을 배추의 유니진(unigene)과 애기장대의 유전자 데이타베이스(http://www.arabidopsis.org)에서 비교 검색하였다.

[0028] **miRNA의 표적유전자 예측**

[0029] miRNA는 표적유전자의 상보적인 서열에 완전일치 또는 부분일치의 양상으로 결합하는 것으로 알려져 있다. 이러한 현상은 컴퓨터를 이용한 표적유전자의 탐색을 용이하게 한다. NCBI에서 확보한 배추의 염기서열과 본 연구를 통해 찾아낸 성숙 miRNA의 서열을 이용하여 표적유전자 검색을 시도하였다. miRNA와 표적유전자의 설정은 빈 간격(gap)이 없이 표적유전자 서열과 4개 이하의 불일치를 보일 경우만 허용하였다. 애기장대에서 표적유전자를 확인하기 위하여 miRU (http://bioinfo3.noble.org/psRNATarget; Zhang 2005, Nucleic Acids Res, 33, W701-W704)와 TAIR BLAST (http://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp) 소프트웨어를 사용하였다. 표적유전자의 정확성을 확인하기 위하여 애기장대 유전자의 전체 표적유전자와 miRNA 서열을 비교하였고 애기장대에서 표적유전자를 동정하였다.

[0030] **실험에 사용된 식물재료**

[0031] miRNA의 발현 분석은 각기 다른 식물의 기관에서 유래된 조직을 사용하였다. Chinese cabbage inbred lines Chiifu 401, Korea Brassica Resource Bank에서 분양된 Kenshin, Woo Ri Seed Co.(Korea)에서 구입한 Wheessen, 위스콘신 대학의 Tom Osborn 교수에게 분양받은 IBM 218 DH rcb, male sterile (AB02-1) 및 fertile (AB02-2) line이 본 실험에 사용되었다. Wheessen line은 2009년 봄부터 필드에서 배양하여 외잎과 내잎을 추대전, 시작 및 후의 세 단계로 나누어 수확하였다. Male sterile (AB02-1) 및 fertile (AB02-2) line은 2009년 가을부터 온실에서 배양하였다. 불임성(S) 및 임성(F) 봉오리는 각기 다른 시기에 수확하여 실험에 사용하였고 각 단계는 다음과 같다; S1/F1 봉오리 크기 <1.5 mm, S2/F2 봉오리 크기 1.5≤ 봉오리 크기 ≤2.5 mm, S3/F3 봉오리 크기 > 2.5 mm, F4 봉오리 크기 > 5 mm. 유묘 식물체(seedling plant)의 전체 조직에서 miRNA를 분석하기 위해 Chiifu-401 및 RCBr 식물체를 식물 생장 챔버(100 μmol/m^2/s^1 의 광양자 플럭스 밀도를 가지는 22℃,

16시간 광/8시간 암의 광주기)에서 배양하였다. 각 식물체의 신초는 발아 3, 6, 9, 12 및 15일 후에 수확하여 각각의 RNA 추출에 사용하였다. 잎 조직의 white 및 yellow part에서의 miRNA의 발현분석을 위해 Kenshin (white part) 및 Wheessen (yellow leaves) line을 사용하였다. Kenshin inbred line은 광합성이 진행된 잎의 miRNA 발현 분석의 재료로 사용되었다. 광합성이 진행된 잎의 수확은 3번째 잎을 재료로 하였으며 오전 7시, 오후 1시 및 오후 7시로 나누어 서로 다른 시기에 수확하였다. 모든 샘플은 액체 질소에 급속 동결하여 -70℃에서 사용 전까지 보관하였다.

[0032] **miRNA의 발현 분석**

[0033] miRNA의 발현 분석은 해당 miRNA가 포함된 EST가 발현된 조직에서 Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) 방법을 사용하여 수행되었다. qRT-PCR 분석을 위하여 각각의 프라이머는 miRNA를 포함하여 PCR 산물이 80 내지 150 bp가 되도록 Primer Quest 컴퓨터 프로그램 (http://eu.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/)을 사용하여 디자인하였다. 전체 RNA는 TriZol을 이용하여 추출하였고 이후 DNase I을 처리하여 염색체 DNA를 제거하였다. 추출한 전체 RNA는 Total RNA Purification Kit (Macherey-Nagel, Germany)를 사용하여 정제하였다. cDNA는 iScript Select cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad)를 사용하여 합성하였고, qRT-PCR은 SYBR Green RT-PCR kit (IQ Sybr Green Super Mix, BR170-8880)으로 MiniOption detection system (Bio-Rad)을 이용하여 수행하였다. 실험결과는 Bio-Rad 소프트웨어 (GeneXpression Macro Chromo4)를 이용하여 분석하였다.

[0034] **실시예 1: 배추 miRNAs의 동정**

[0035] 본 연구에서 배추의 miRNA의 분리과정은 도 1에 도식화하였다. 기존에 구조를 알고 있는 622개의 식물 miRNA와 배추의 염기서열 (GSS, EST 및 mRNA)을 BLASTN으로 분석해 miRNA를 포함하는 387개의 서열을 골라내었다. 이후 반복 구조나 단백질 암호화 서열을 제거하여 234개의 서열을 선별하였다. 선별된 서열들은 Mfold 프로그램을 사용하여 스템 루프 구조를 형성하는지 확인하여 최종적으로 109개의 성숙 miRNA를 선별하였다. 109개의 배추 miRNA는 47개의 패밀리로 구성되어 있으며 추가로 13개의 패밀리에 속하는 27개의 miRNA를 배추 EST에서 분리하였다. 47개의 패밀리에 다양한 수의 miRNA들이 검색되었으며 이는 표 1 내지 표 5 및 도 2에 나타내었다. BrMiRNA 172 패밀리에서 최대 11개의 miRNA가 검색되었고, BrMiR156에서 9개, BrMiR162, BrMiR169 및 BrMiR1435에서 6개, BrMiR159 및 BrMiR415에서 5개, BrMiR166, BrMiR390 및 BrMiR400에서 3개, BrMiR160, BrMiR171, BrMiR319, BrMiR395, BrMiR398, BrMiR408, BrMiR414, BrMiR472, BrMiR845, BrMiR854, BrMiR1132, BrMiR1514, BrMiR1520, BrMiR1521 및 BrMiR 1522에서 2개의 순으로 관찰되었다. 남은 22개의 패밀리에서는 1개씩의 miRNA가 확인되었다. 성숙 miRNA의 길이는 17 내지 21개의 nt(뉴클레오티드)의 범위 내에 있었으며, 보다 자세히는 20 nt가 21.48%, 19 nt가 18.18%, 18 nt가 15.70%, 17 nt가 8.26% 그리고 22 nt가 1.65% 순으로 나타났다 (표 1 내지 5 및 도 3). 이러한 다양성은 선별된 miRNA의 생성 과정 다양한 경로를 통해 조절되고 다양한 식물의 표적 유전자를 갖고 있음을 보여주고 있다. 성숙 miRNA에서 사용되어진 뉴클레오티드의 비율은 A(아데닌)가 29.26%, U(우라실)가 26.05%, G(구아닌)가 23.61% 그리고 C(시토신)가 21.16% 순으로 나타났다.

표 1

동정된 배추 miRNA의 세부정보

miRNA family	Br-GSS/EST	Br-Unigene	At-gene	Mature miRNA	ML	Len(Pre)	GC%	MFE	AMFE
BrMiR 156a	ED524353		AT5G55835.1	UUGACAGAAGAAAGAGAGCAC (서열번호 1)	21	109	48.62	42.9	39.36
BrMiR 156b	AJ858639		AT4G30972.1	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC (서열번호 2)	20	151	46.36	64.8	42.91
BrMiR 156c	DU829396		AT4G30972.1	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC (서열번호 2)	20	92	47.83	30.9	33.59
BrMiR 156d	DU831758		AT4G30972.1	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC (서열번호 2)	20	98	45.92	39	39.80
BrMiR 156e	DU121870		AT5G10945.1	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC (서열번호 2)	20	111	36.94	39.5	35.59
BrMiR 156f	CT021695			UGACAGAAGAUAGAGAG (서열번호 3)	17	339	35.1	45.7	13.48
BrMiR 156g	AJ859176			GACAGAACAGAGUGAGCAC (서열번호 4)	19	211	33.65	50.8	24.08
BrMiR 156h	ED529145			GACAGAAUAGAGUGAGCAC (서열번호 5)	19	209	32.5	47.7	22.82
BrMiR 156i	DX011343			UGACAGAAGAGAGAGAGC (서열번호 6)	18	241	47.72	75.4	31.29
BrMiR 158	CT015463		AT3G10745.1	CCAAAUGUAGACAAAGCA (서열번호 7)	18	88	37.5	25.8	29.32
BrMiR 159b	EX050542.1		AT1G73687.1	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA (서열번호 8)	21	71	36.62	15.1	21.27
BrMiR 159c	EX048967.1		AT1G73687.1	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA (서열번호 8)	21	71	36.62	15.1	21.27
BrMiR 159d	EX047628.1		AT1G73687.1	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA (서열번호 8)	21	71	36.62	15.1	21.27
BrMiR 159e	ED525625	BRU10298	AT1G18075.1	UUGGAUUGAAGGGAGCUC (서열번호 9)	18	73	35.62	15.6	21.37
BrMiR 159f	CT016164		AT5G61730.1	UUGCAUGCCCCAGGAGCU (서열번호 10)	18	70	48.57	16.6	23.71
BrMiR 160b	EX044968.1		AT2G39175.1	UGCCUGGCUCCCUGUAUGCCA (서열번호 11)	21	94	51.06	39.9	42.45
BrMiR 160c	DX016569	BRU25317	AT1G77850.1	UGCCUGGCUCCCUGCAUGCCA (서열번호 12)	21	186	51.61	54	29.03
BrMiR 162a	ED527680	BRU12250	AT5G08185.3	UCGAUAAACCUGUGCAUCCAG (서열번호 13)	21	108	42.59	31.1	28.80
BrMiR 162b	EX133401.1		AT5G08185.3	UCGAUAAACCUGUGCAUCCAG (서열번호 13)	21	108	42.59	31.1	28.80
BrMiR 162c	EX071919.1		AT5G08185.3	UCGAUAAACCUGUGCAUCCAG (서열번호 13)	21	107	42.99	33.3	31.12
BrMiR 162d	EX071254.1		AT5G08185.3	UCGAUAAACCUGUGCAUCCAG (서열번호 13)	21	108	42.59	31.1	28.80
BrMiR 162e	EX069816.1		AT5G08185.3	UCGAUAAACCUGUGCAUCCAG (서열번호 13)	21	108	42.59	31.1	28.80
BrMiR 162f	AC189332.2		AT5G08185.3	UCGAUAAACCUGUGCAUCCAG (서열번호 13)	21	99	43.43	30.4	30.71
BrMiR 164a	CW984396		AT2G47585.1	UGGAGAAGCAGGGCACGUGCA (서열번호 14)	21	108	50	51.1	47.31

[0036]

[0037] Br: 배추, At: 애기장대, ML: 성숙 miRNA 길이, MFE: Minimum folding free energy, AMFE: Adjusted minimum folding free energy.

표 2

동정된 배추 miRNA의 세부정보

miRNA family	Br-GSS/EST	Br-Unigene	At-gene	miRNA	ML	Len(Pre)	GC%	MFE	AMFE
BrMiR 166a	DX911364	BRU25274	AT3G61897.1	UCGGACCAGGCUUCAUUCCCC (서열번호 15)	21	140	41.43	33.9	24.21
BrMiR 166b	EX063968.1		AT2G46685.1	UCGGACCAGGCUUCAUUCCCC (서열번호 15)	21	140	41.43	33.9	24.21
BrMiR 166c	EX063242.1		AT2G46685.1	UCGGACCAGGCUUCAUUCCCC (서열번호 15)	21	140	41.43	33.9	24.21
BrMiR 168	DU984956		AT5G45307.1	UCGCUUGGUGCAGGUCGGGAA (서열번호 16)	21	111	57.66	31	27.93
BrMiR 169a	DX901870		AT3G13405.1	CAGCCAAGGAUGACUUGCCGA (서열번호 17)	21	186	33.87	51.4	27.63
BrMiR 169b	DU982154		AT1G53687.1	CAGCCAAGGAUGACUUGCCGA (서열번호 17)	21	109	33.03	40.6	37.25
BrMiR 169c	DU988169		AT3G13405.1	CAGCCAAGGAUGACUUGCCGA (서열번호 17)	21	112	33.04	41.1	36.70
BrMiR 169d	ED535040		AT3G26818.1	AGCCAAGGAUGACUUGCC (서열번호 18)	18	139	36.69	27.2	19.57
BrMiR 169e	KFRT-048E03	BRU22876	AT5G12840.3	AGCCAAGAAUGAUUUGCCGG (서열번호 19)	20	271	43.91	63.5	23.43
BrMiR 169f	ED527257		AT3G26812.1	UAGCCAAGGAGACUGCCUA (서열번호 20)	19	161	36.02	43	26.71
BrMiR 171f	DU827625		AT3G51375.1	UGAUUGAGCCGCGCCAAUAUC (서열번호 21)	21	126	44.44	38.4	30.48
BrMiR 171g	DY013547.1		AT1G11735.1	UUGAGCCGUGCCAAUAUCACG (서열번호 22)	21	89	38.2	32.8	36.85
BrMiR 172b	DX011558		AT5G59505.1	GAAUCUUGAUGAUGCUGCAU (서열번호 23)	20	90	42.22	36	40.00
BrMiR 172c	DX034851		AT2G28056.1	GAAUCUUGAUGAUGCUGCAU (서열번호 23)	20	99	41.41	35.6	35.96
BrMiR 172d	DX078594		AT5G59505.1	GAAUCUUGAUGAUGCUGCAU (서열번호 23)	20	89	42.7	39.1	43.93
BrMiR 172e	ED520082		AT5G59505.1	GAAUCUUGAUGAUGCUGCAU (서열번호 23)	20	86	41.86	36	41.86
BrMiR 172f	ED525000		AT5G59505.1	GAAUCUUGAUGAUGCUGCAU (서열번호 23)	20	116	44.83	46	39.66
BrMiR 172g	ED516998		AT2G28056.1	GAAUCUUGAUGAUGCUGCAU (서열번호 23)	20	109	45.87	30	27.52
BrMiR 172h	ED526567		AT5G59505.1	GAAUCUUGAUGAUGCUGCAU (서열번호 23)	20	91	41.76	40.6	44.62
BrMiR 172i	EX060396.1		AT2G39730.3	GAAUCUUGAUGAUGUUACA (서열번호 24)	19	111	48.65	29.7	26.76
BrMiR 172j	EX059018.1		AT2G39730.3	GAAUCUUGAUGAUGUUACA(서열번호 24)	19	111	48.65	29.7	26.76
BrMiR 172k	EX057674.1		AT2G39730.3	GAAUCUUGAUGAUGUUACA(서열번호 24)	19	111	48.65	29.7	26.76
BrMiR 172l	EX019450.1		AT2G39730.3	GAAUCUUGAUGAUGUUACA(서열번호 24)	19	111	48.65	29.7	26.76
BrMiR 319a	DX903478		AT4G23713.1	UUGGACUGAAGGGAACUCCCU (서열번호 25)	21	176	40.91	66.9	38.01
BrMiR 319b	AJ856769		AT2G40805.1	UUGGACUGAAGGGAGCUC (서열번호 26)	18	202	40.1	68.7	34.01
BrMiR 390a	DU830650		AT5G58465.1	AAGCUCAGGAGGGAUAGCGCC (서열번호 27)	21	96	43.75	30.3	31.56
BrMiR 390b	DX059137		AT2G38325.1	AAGCUCAGGAGGGAUAGCGCC (서열번호 27)	21	97	43.3	31.3	32.27

[0038]

표 3

동정된 배추 miRNA의 세부정보

miRNA family	Br-GSS/EST	Br-Unigene	At-gene	miRNA	ML	Len(Pre)	GC%	MFE	AMFE
BrMiR 390c	DX890076		AT5G58465.1	AAGCUCAGGAGGGAUAGCGCC (서열번호 27)	21	139	41.73	58.3	41.94
BrMiR 394	DU120003		AT1G20375.1	UUGGCAUUCUGUCCACCUCC (서열번호 28)	20	100	39	26.7	26.70
BrMiR 395a	DX020424		AT1G26973.1	CUGAAGUGUUUGGGGGAACUC (서열번호 29)	21	88	44.32	32.8	37.27
BrMiR 395b	DU832403		AT1G26975.1	CUGAAGUGUUUGGGGGGACUC (서열번호 30)	21	115	40	39.8	34.61
BrMiR 396	DX897816	BRU23296	AT3G52910.1	UCCACAGGCUUUCUUGAAC (서열번호 31)	19	85	51.76	21	24.71
BrMiR 398a	AJ861920	BRU10255	AT5G14565.1	UGUGUUCUCAGGUCACCCCU (서열번호 32)	20	121	47.11	32.7	27.02
BrMiR 398b	KBFS-048E02, EX049578.1		AT5G14545.1	UGUGUUCUCAGGUCACCCCU (서열번호 32)	20	126	46.83	41.5	32.94
BrMiR 400a	ED535204		AT1G32582.1	UAUGAGAGUAUUAUAAGUCAC (서열번호 33)	21	134	32.84	46.6	34.78
BrMiR 400b	DX912125		AT1G64580.1	UAUGAGAGUAUUAUACGUCAC (서열번호 34)	21	221	46.61	60.4	27.33
BrMiR 400c	DU827877		AT1G62680.1	AUGAGAGUAUUAUAACUCAC (서열번호 35)	20	124	45.16	29.1	23.47
BrMiR 408a	DX037057		AT2G47015.1	AUGCACUGCCUCUUCCCUGGC (서열번호 36)	21	149	42.95	38.2	25.64
BrMiR 408b	KHLW-07G09, EX141550.1	BRU15514	AT2G02850.1	AUGCACUGCCUCUUCCCU (서열번호 37)	18	151	54.3	43.9	29.07
BrMiR 413	AJ857954	BRU20598	AT3G26165.1	CUAGUUUCACUUGCUCUG (서열번호 38)	18	82	42.68	14.5	17.68
BrMiR 414a	DX027619			UCAUCCUCAUCAUCAUCG (서열번호 39)	18	269	33.46	49.5	18.40
BrMiR 414b	KBCD-095H09	BRU16587	AT5G55310.1	UCAUCUUCAUCAUCAUCGUC (서열번호 40)	20	97	38.14	19.2	19.79
BrMiR 415a	DX905021		AT1G18740.1	AACAGAGCAGAAACAGAACA (서열번호 41)	20	156	32.05	32.9	21.09
BrMiR 415b	KHRT-21D11, EX132487.1	BRU06315	AT1G17180.1	AACAGAGCAGAAACAAAACAU (서열번호 42)	21	374	39.84	88.9	23.77
BrMiR 415c	CT021545			AACAGAGCAGAAACAGAACA (서열번호 41)	20	291	31.96	60.2	20.69
BrMiR 415d	EX134130.1		AT1G17180.1	AACAGAGCAGAAACAAAACAU (서열번호 42)	20	97	38.14	19.2	19.79
BrMiR 415e	EX133017.1		AT1G17180.1	AACAGAGCAGAAACAAAACAU (서열번호 42)	20	97	38.14	19.2	19.79
BrMiR 426	CT016376	BRU03234	AT3G17940.1	UUUUGGAGAUUUGUCCUUAC (서열번호 43)	20	71	29.58	9.4	13.24
BrMiR 472a	ED514754		AT1G14850.1	UCCCUACUCCACUCAUCCC (서열번호 44)	19	241	43.15	63.9	26.51
BrMiR 472b	CX271339.1		AT1G14850.1	UCCCUACUCCACUCAUCCC (서열번호 44)	19	241	43.15	63.9	26.51
BrMiR 473	DU120348			UCUCCCUCAAGGUUUCCA (서열번호 45)	18	179	34.64	29.6	16.54
BrMiR 776	DX019504	BRU25582		UCUAAGUCUUCUUUUGAU (서열번호 46)	18	251	22.31	29.2	11.63

[0039]

표 4

동정된 배추 miRNA의 세부정보

miRNA family	Br-GSS/EST	Br-Unigene	At-gene	miRNA	ML	Len(Pre)	GC%	MFE	AMFE
BrMiR 837	DX902366		AT4G16143.2	AUCAGUUUCUUGUUCUUUUC (서열번호 47)	20	202	29.21	25.9	12.82
BrMiR 838	DU127124	BRU11698	AT1G65590.1	UUUUCUUAUACUUCUUGCA (서열번호 48)	19	280	43.57	59.4	21.21
BrMiR 842	DX012634	BRU25451	AT2G14370.1	AUGGUCAGAUCGGUCAUC (서열번호 49)	18	196	53.57	52.6	26.84
BrMiR 845a	CT021891	BRU26308	AT5G04290.1	GGCUCUGAUACCAAUUGA (서열번호 50)	18	139	53.24	40.2	28.92
BrMiR 845b	DX897026		AT4G31200.1	UGGCUCUGAUACCAACUGAUG (서열번호 51)	21	141	32.62	50.3	35.67
BrMiR 846	ED536287		AT1G52110.1	UUGAACUGAAGUGCUUGAAU (서열번호 52)	20	195	32.82	42.9	22.00
BrMiR 850	DU832285		AT1G32990.1	GAUCCGGACUAAAACAAAG (서열번호 53)	19	83	43.37	17.3	20.84
BrMiR 854a	DX017286		AT2G44710.1	UGAGGAGAGGGAGGAGGAG (서열번호 54)	19	305	40	62.9	20.62
BrMiR 854b	DX899834		AT5G58490.1	GAGGAGAGGGAGGAGGAG (서열번호 55)	18	98	63.27	32	32.65
BrMiR 857	DX077868		AT1G30400.2	UUUUGCAUGUUGAAGGUGU (서열번호 56)	19	109	37.61	22.6	20.73
BrMiR 1132a	DX047066			CAUUAAGGAACGGAAGGAG (서열번호 57)	19	271	19.93	42.3	15.61
BrMiR 1132b	DX910272		AT3G26570.2	AUUAUGAAACGGAAGGAG (서열번호 58)	18	255	22.35	46.3	18.16
BrMiR 1139	AJ855061			AGAGUAAAAUACACUAGUA (서열번호 59)	19	85	29.4	10.1	11.88
BrMiR 1435a	KFYP-092B01	BRU04476	AT5G65310.1	UUCUUAAGUCAAACUUU (서열번호 60)	17	131	44.27	24.2	18.47
BrMiR 1435b	EX140988.1	BRU04476	AT5G65310.1	UUCUUAAGUCAAACUUU (서열번호 60)	17	131	44.27	24.2	18.47
BrMiR 1435c	EX112582.1	BRU04476	AT5G65310.1	UUCUUAAGUCAAACUUU (서열번호 60)	17	125	44.8	24.2	19.36

[0040]

표 5

동정된 배추 miRNA의 세부정보

miRNA family	Br-GSS/EST	Br-Unigene	At-gene	miRNA	ML	Len(Pre)	GC%	MFE	AMFE
BrMiR 1435d	EX075806.1, EX074152.1, EX073405.1, EX072646.1	BRU04476	AT5G65310.1	UUCUUAAGUCAAACUUU (서열번호 60)	17	131	44.27	24.2	18.47
BrMiR 1435e	EX029736.1	BRU04476	AT5G65310.1	UUCUUAAGUCAAACUUU (서열번호 60)	17	131	44.27	24.2	18.47
BrMiR 1435f	CV432766.1	BRU04476	AT5G65310.1	UUCUUAAGUCAAACUUU (서열번호 60)	17	131	45.04	23.6	18.02
BrMiR 1436	DX082315		AT5G49680.2	UUAUGGGACGGAAGGAGU (서열번호 61)	18	214	22.43	30.7	14.35
BrMiR 1511	DX048995		AT5G25045.1	CAGGCUCUGAUACCAUG (서열번호 62)	17	117	38.46	19.5	16.67
BrMiR 1514a	AJ856072			UUCAUUUUUAAAAUAGA (서열번호 63)	17	81	27.16	11.8	14.57
BrMiR 1514b	DX899429		AT2G45560.1	UUCAUUUUUAUAAAUAGACAUU (서열번호 64)	22	183	18.03	19.8	10.82
BrMiR 1520a	DX016618			AGAACUUGACACGUGACAA (서열번호 65)	19	164	31.1	25.7	15.67
BrMiR 1520b	ED528582			AGAACUUGACACGUGACAA (서열번호 65)	19	153	28.1	23.6	15.42
BrMiR 1521a	CW982899		AT1G79580.3	CUGUUAAUGGAAAAAGUUG (서열번호 66)	19	136	36.03	17.1	12.57
BrMiR 1521b	CT022839		AT5G39862.1	CUGUUGAUGGAAAAUGUU (서열번호 67)	18	268	41.33	69.2	25.82
BrMiR 1522a	DX016213			AUUGCUUAAAAUGAAAU (서열번호 68)	17	84	23.81	11	13.10
BrMiR 1522b	AJ858836		ATMG00110.1	UUUAUUUCUUAAAAUGAAA (서열번호 69)	19	166	32.53	32	19.28
BrMiR 1527	DX023754			AACUCAACCUUACAAAAC (서열번호 70)	18	167	34.73	34.5	20.66
BrMiR 1863	DX895479		AT2G36990.1	AGCUCUGAUACCAUGUUAGAUU (서열번호 71)	22	236	30.08	40.5	17.16
BrMiR 1886	KBFL-140B03	BRU02032	AT5G53120.1	UGAGAGAAGUGAGAAGAAA (서열번호 72)	19	124	44.88	24.6	19.84
BrMiR 2091	DX017320		AT5G65683.1	AACCGAGCCGAAGAGGAG (서열번호 73)	18	96	52.08	33.1	34.48

[0041]

[0042] 동정된 miRNA의 다양성은 성숙 miRNA 서열 내에서도 관찰되어 진다 (도 4). 이전의 연구에서 "우라실"은 성숙 miRNA의 5' 쪽에 주로 위치하는 것이 보고되어 왔다. 109개의 성숙 miRNA 중 61개의 miRNA에서 5'쪽에 "우라

실"이 위치하고 있었으며, 59개의 miRNA는 전구체의 스템 루프의 3' 쪽에 "우라실"이 위치하고 있었다. 전체 miRNA 중 57.85%의 성숙 miRNA가 5'쪽에 U를 갖고 있었으며, 나머지는 A가 19.01%, G가 14.05% 그리고 C가 2.48% 순으로 나타났다. 이전의 연구에서 하나의 DNA 염기서열에서 정방향과 역방향 전사를 통해 miRNA가 생성되는 것이 보고되어 졌다. 본 연구에서 BrMir 172에서 정방향과 역방향 전사를 통해 miRNA의 생성이 가능한 것으로 예측되었다.

[0043] **실시예 2: 전구체 서열의 특성**

[0044] 109개의 miRNA는 다양한 크기의 전구체 서열을 갖고 있었다. 각각의 서열은 70 내지 374 nt의 길이를 보였으며 전체 전구체 평균길이는 141.25 ± 64.21 nt 이었다(표 1 내지 6). 이중 전체 77.69%의 전구체가 81 내지 202 nt 범위내에 위치하고 있었다(표 6 및 도 5). 전구체 서열 내에서 A는 29.68%, U는 29.95% G는 20.48% 그리고 C는 19.19%의 빈도로 사용되었다. 또한 전구체 내의 GC 비율은 18.33% 내지 63.36%의 범위 내에 있었고 평균은 40.81%였다(표 6). 낮은 minimal folding free energy (MFE)는 miRNA의 전구체의 2차 스템 루프의 구조적 안정성에 중요한 역할을 수행하는 것으로 보고되고 있다 (Zhang et al 2008, Planta 229, 161-82). 본 연구에서 109개의 miRNA는 -88.9 내지 -9 kcal/mol 범위 내의 MFE값을 갖고 있었으며 평균은 -35.80 ± 15.12 kcal/mol로 나타났다. 기존의 MFE 값은 DNA/RNA의 길이에 따른 값의 변화가 유도되어 좀 더 보안된 방법인 Adjusted minimal folding free energy (AMFE) 방법을 적용하였다 (Zhang et al 2008, Planta 229, 161-82). 각 전구체의 AMFE는 -47 내지 -10 kcal/mol 범위 내에 있었으며 평균값은 -26.64 ± 8.67 kcal/mol 이었다. Minimal folding free energy index (MFEI)는 miRNA와 다른 RNA를 구별하는 중요한 기준이다(Zhang et al. 2006, Dev Biol 289, 3-16). 본 연구에서 전구체 miRNA의 MFEI는 0.349 내지 1.128 범위 내에 있었고 평균은 0.665 ± 0.184로 나타났다(표 6). MFEL 값이 0.85 이상일 경우 실제 miRNA로써의 가능성이 높아지게 된다 (Zhang et al. 2006, Dev Biol 289, 3-16). 본 연구에서 109개의 배추 miRNA 중 23개 (19.01%)에서 0.85 이상의 MFEI값을 보였다. 나머지는 0.3 내지 0.4에서 2개(1.65%), 0.41 내지 0.50에서 18개(14.88%), 0.51 내지 0.60에서 40개(33.06%), 0.61 내지 0.70에서 10개(8.26%), 그리고 0.71 내지 0.80에서 11개(9.09%)의 빈도로 나타났다(데이터 미제시).

표 6

[0045] 동정된 배추 전구체 miRNAs의 특성

특징	최소값	최대값	중간값	평균	표준편차
서열 길이(nt)	70	374	116	141.25	64.20
A(%)	16.47	45.82	30.28	29.68	5.49
C(%)	8.55	32.43	20.55	19.92	4.87
G(%)	7.38	35.71	20.71	20.45	4.79
U(%)	14.58	44.81	28.78	29.95	6.28
G+C(%)	18.03	63.27	41.43	40.38	7.836
A+U(%)	36.73	81.97	58.57	85.68	7.836
MFE(-kcal/mol)	9.4	88.9	32.8	35.8	15.11
AMFE(-kcal/mol)	10.81	47.31	26.51	26.63	8.66
MFEI	0.349	1.128	0.605	0.665	0.184

[0046] **실시예 3: 배추에서 새롭게 발견된 miRNA**

[0047] 109개의 miRNA는 47개의 패밀리에 속한다. 이 중 17개의 패밀리는 기존에 알려진 miRNA이며(He et al. 2008, FEBS Letters 582, 2445-2452), 남은 30개의 패밀리는 본 연구에서 새롭게 찾아낸 miRNA다. 또한 일부 miRNA는 기존의 보고된 패밀리내의 새로운 멤버로 확인되었다. 이전의 연구에서는 miRNA 157, miRNA 159, miRNA 164, miRNA 167, miRNA 390 및 miRNA 1885에서 1개, miRNA 1885에서 2개, 그리고 miRNA 172 및 miRNA 398에서 각각 3개씩의 멤버만 보고되어 졌다 (He et al. 2008, FEBS Letters 582, 2445-2452). 본 연구에서 BrMir159에서 5개, miRNA 164에서 1개, miRNA 160에서 2개, miRNA 390 및 miRNA 398에서 각각 3개, 그리고 miRNA 172에서 11개의 멤버를 확인하였다(표 1 내지 5). miRBase 내의 기존에 보고된 miRNA와 본 연구에서 찾아낸 miRNA 패밀리에 대한 추가 분석을 통해 109개의 miRNA가 47개의 패밀리에 속하며 이중 27개의 패밀리에 속하는 40개의 miRNA는 서로 다른 하나 이상의 식물에서도 관찰되었으나 나머지는 배추에서 특이적으로 나타나는 miRNA로 추정되어

진다. 일례로 BrMir 162의 성숙 miRNA의 12번째 뉴클레오티드는 다른 식물 종에서는 "C"로 대부분 잘 보존된데 반해 배추에서는 "G"의 서열을 보이고 있다 (도 6).

[0048] **실시예 4: 배추 miRNA의 발현분석**

[0049] 배추 miRNA의 발현은 두 가지 방법으로 확인하였다. 첫 번째로 miRNA를 분리해낸 본래의 EST 추출 조직에서의 발현을 보았다. 전체 12개의 패밀리에서 배추의 서로 다른 조직에서의 발현을 확인하였다. BrMiR 159, BrMiR160, BrMiR167, BrMiR 398 및 BrMiR 1886은 꽃봉오리에서, BrMiR 162, BrMiR 415 및 BrMiR 1435는 뿌리에서, BrMiR 1435는 캘러스에서, BrMiR 162는 유묘에서, BrMiR 408, BrMiR 1435 및 BrMiR 166은 잎에서, BrMiR 172는 염 처리를 한 식물에서 각각 발현이 확인되었다(표 7). 이러한 결과는 확인된 배추 miRNA가 조직 특이적 발현이 가능함을 보여준다. 두 번째로 배추의 다양한 조직에서 miRNA의 발현은 마이크로어레이 데이터를 사용하여 확인하였다. 8개의 패밀리에 속하는 12개의 miRNA는 배추의 50 K DNA 칩에서 각각의 발현을 확인하였다(데이타 미제시). 마이크로어레이 데이타를 확인하기 위하여 8개의 miRNA 패밀리의 발현을 qRT-PCR로 확인하였다(표 8). 8개의 miRNA 패밀리에 대해 23개의 서로 다른 조직에서의 발현을 확인한 결과 BrMiR408및 BrMiR 415는 모든 조직에서 높은 발현을 보였다(표 8). BrMiR160은 LBB, DBB, LSB 및 DSB에서 중간 수준의 발현을 보였으나, 다른 조직에서는 매우 낮은 수준의 발현을 보였으며 이는 miRNA의 조직특이성을 보여준다(표 8). BrMiR159은 조사된 모든 조직에서 매우 낮은 수준의 발현을 보였다. BrMiR167은 오전 7시, 오후 1시 및 오후 7에 수확한 중륵(sin)에서 강한 발현을 보였다. BrMiR398은 오전 7시의 중륵에서 가장 높은 발현을 보였고, 오후 1시 및 7시의 sou 및 중륵에서 중간 수준의 발현을 보였으며, 다른 조직에서는 매우 낮은 발현을 보였다. BrMiR408은 오전 7시 및 오후 7시의 중륵에서 낮은 수준의 발현을 보였고, 오후 1시의 sou에서 중간 수준의 발현을 보였다. 또한 오전 7시 및 오후 7시의 sou에서의 발현은 매우 낮은 수준이었다. 반면 남은 조직에서의 발현은 매우 강한 수준으로 나타났다. BrMiR414는 꽃봉오리에서 중간 수준 이상의 발현을 보였고, BrMiR415는 오전 7시의 중륵 그리고 LBB 및 LSB 에서 높은 발현을 보였고, 오후 7시의 sou에서 중간 수준의 발현을 보였으며 다른 조직에서는 강한 발현을 보였다. BrMiR1435는 LBB 에서 강한 발현을 그리고 DBB 및 DSB 에서는 높은 발현을 보였다. 그러나 Chiifu 신초와 잎의 황심(yel)에서는 발현이 거의 나타나지 않았다.

[0050] 배추는 중요한 농작물 중 하나로 다른 배추과 식물에 비해 상대적으로 작은 유전체 크기를 갖고 있어 Brassica A 게놈 염기서열 분석의 모델 식물로 사용되었다(www.brassica-rapa.org, www.brassica.info). 비록 이전의 두 연구에서 배추의 miRNA의 동정과 분석에 관한 연구가 있었지만 (He et al. 2008, FEBS Letters 582, 2445-2452), 연구의 진척이 많이 이루어지진 않고 있다. 유전자 은행에 GSS, EST, mRNA 및 cDNA와 같이 매일 많은 수의 유전정보가 축적되고 있다. 본 연구에서 애기장대, 유채, 대두, 벼, 포플러(Populus trichocarpa), 밀(Triticum aestivum), 포도(Vitis vinifera) 및 옥수수(Zea mays)에서 밝혀진 miRNA 서열을 바탕으로 배추의 EST, mRNA, cDNA 및 GSS 자료를 검색하여 전체 47개의 패밀리에 속하는 109개의 배추 miRNA를 찾아냈다. 본 연구를 통해 얻어진 결과는 식물의 분화 및 대사과정 등 배추 유전체의 기능에 포함된 전사후 조절을 이해하는데 많은 도움이 될 것이다. 비록 이전의 연구에서 배추에서 새로운 miRNA를 보고하였지만 본 연구에서 새로운 miRNA를 추가로 찾아내었다. 본 연구에서 찾아낸 47개의 miRNA 패밀리중 30 패밀리는 이전의 배추 miRNA에서 발견되지 않은 새로운 miRNA이다.

표 7

EST로부터 유래한 배추 miRNA 및 이의 발현 조직

Brassica rapa miRNA	*Brassica rapa* EST	Expressing tissue
BrMiR 159b	EX050542.1	Floral buds
BrMiR 159c	EX048967.1	Floral buds
BrMiR 159d	EX047628.1	Floral buds
BrMiR 160c	EX044968.1	Floral buds
BrMiR 162b	EX133401.1	Root
BrMiR 162c	EX071919.1	Seedling
BrMiR 162d	EX071254.1	Seedling
BrMiR 162e	EX069816.1	Seedling
BrMiR 166b	EX063968.1	Etiolated mature leaf
BrMiR 166c	EX063242.1	Etiolated mature leaf
BrMiR 167c	EX041799.1	Floral buds
BrMiR 172i	EX060396.1	Salt-treated whole plant
BrMiR 172j	EX059018.1	Salt-treated whole plant
BrMiR 172k	EX057674.1	Salt-treated whole plant
BrMiR 172l	EX019450.1	Light-chilled whole plant
BrMiR 398b	EX049578.1	Floral buds
BrMiR 408b	EX141550.1	Primary leaf
BrMiR 414b	EX023666.1	Light-chilled whole plant
BrMiR 415b	EX134130.1	Root
BrMiR 415d	EX133017.1	Root
BrMiR 415e	EX132487.1	Root
BrMiR 1435b	EX140988.1	Primary leaf
BrMiR 1435c	EX112582.1	Whole plant
BrMiR 1435d	EX029736.1	Callus
BrMiR 1435e	EX075806.1, EX074152.1, EX073405.1, EX072646.1	Root
BrMiR 1435f	CV432766.1	Root
BrMiR 1886	EX045038.1	Floral buds

[0051]

표 8

각기 다른 23개의 배추 조직에서 qRT-PCR를 이용한 8개의 miRNA 패밀리의 발현 분석 결과

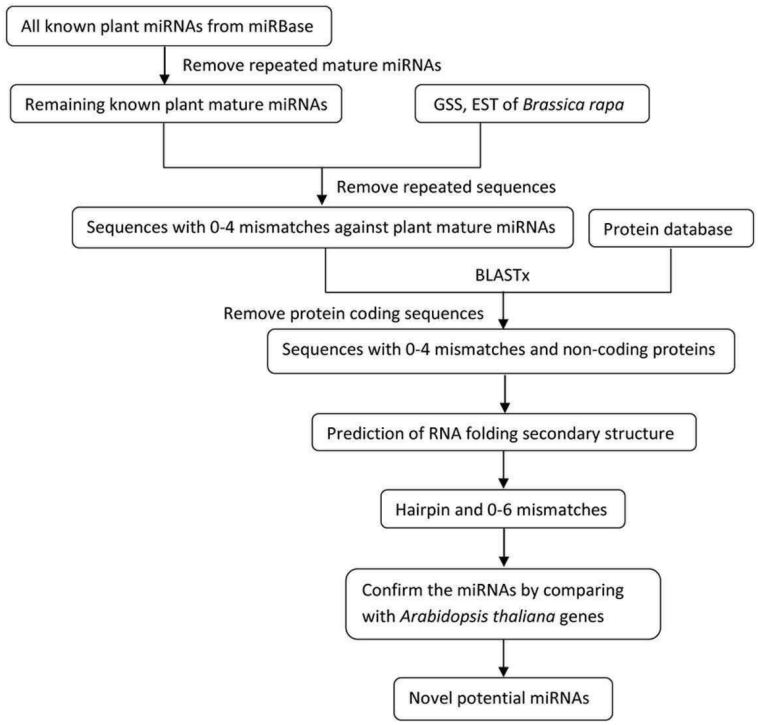
	LBB	DBB	LSB	DSB	LAB	DAB	S1	S2	S3	F1	F2	F3	F4	Chiffu	RCBr	whi	yel	Sou 7am	Sin 7am	Sou 1pm	Sin 1pm	Sou 7pm	Sin 7pm
BrMiR159a	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
BrMiR160a	me	me	me	me	ne	le	le	ne	ne	le	le	ne	le	ne	ne	ne	le	le	ne	ne	ne	le	ne
BrMiR167c	me	ne	me	ne	ne	ne	ne	ne	le	ne	ne	ne	me	he	me	le	me	he	se	le	se	le	se
BrMiR398b	le	le	le	le	le	le	me	le	me	me	me	me	me	ne	ne	le	ne	se	he	me	me	me	me
BrMiR408b	se	se	se	se	se	se	se	se	se	se	se	se	se	se	se	se	se	ne	le	me	se	ne	le
BrMiR414b	le	le	le	le	he	le	he	me	he	me	he	me	me	me	le	le	ne	se	he	se	me	se	me
BrMiR415b	he	se	he	se	se	se	se	se	se	se	se	se	se	se	se	se	se	se	se	he	se	me	se
BrMiR1435a	se	he	me	he	le	me	ne	le	me	le	le	le	me	ne	le	me	ne	le	me	le	me	le	me

[0052]

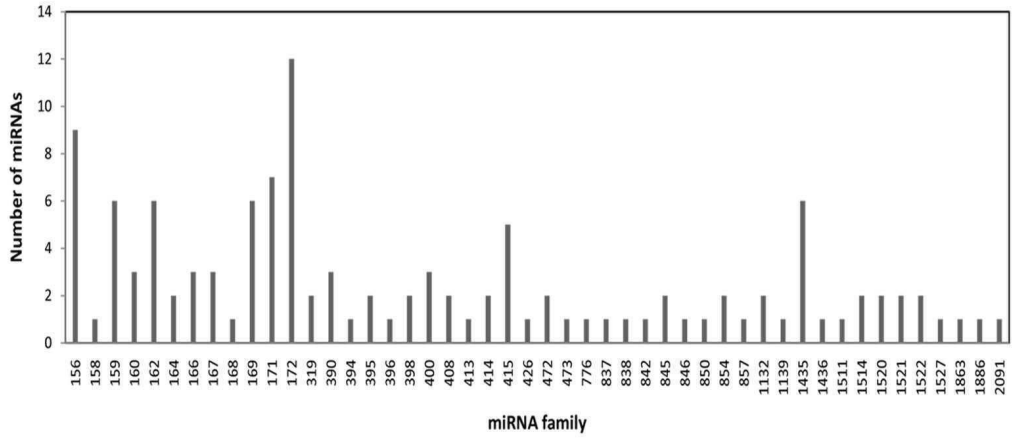
[0053] he (high expression): 높은 발현, le (low expression): 낮은 발현, me (moderate expression): 중간 발현, ne (no expression): 발현 없음, se (strong expression): 강한 발현, LBB (Leaf before bolting): 추대 전 잎, DBB (Dome before bolting): 추대 전 정단분열조직, LSB (Leaf at the start of bolting): 추대 시작시기의 잎, DSB (Dome leaf at the start of bolting): 추대 시작시기의 어린 잎, LAB (Leaf after bolting): 추대 후 잎, DAB (Dome after bolting): 추대 후 정단분열조직, whi (white) : 백심, yel (yellow): 황심, sou (photosynthetic leaf, source): 광합성이 진행된 녹색 잎, sin (photosynthetic midrib, sink): 중륵, S1 (sterile plant bud size < 1.5 mm): 크기가 1.5 mm 이하인 불임성 꽃 봉오리, S2 (sterile plant bud size 1.5 ≤ 2.5 mm): 크기가 1.5에서 2.5 mm 사이의 불임성 꽃 봉오리, S3 (sterile plant bud size > 2.5 mm): 크기가 2.5 mm 이상인 불임성 꽃 봉오리, F1 (fertile plant bud size < 1.5 mm): 크기가 1.5 mm 이상인 임성 꽃 봉오리, F2 (fertile plant bud size 1.5 ≤ 2.5 mm): 크기가 1.5에서 2.5 mm 사이의 임성 꽃 봉오리, F3 (fertile plant bud size 2.6 ≤ 5 mm): 크기가 2.6에서 5 mm 사이의 임성 꽃 봉오리, F4 (fertitle plant bud size > 5 mm): 크기가 5 mm 이상인 임성 꽃 봉오리.

도면

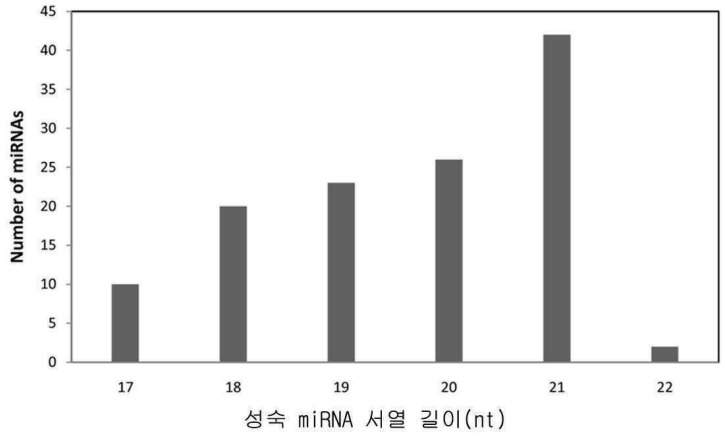
도면1



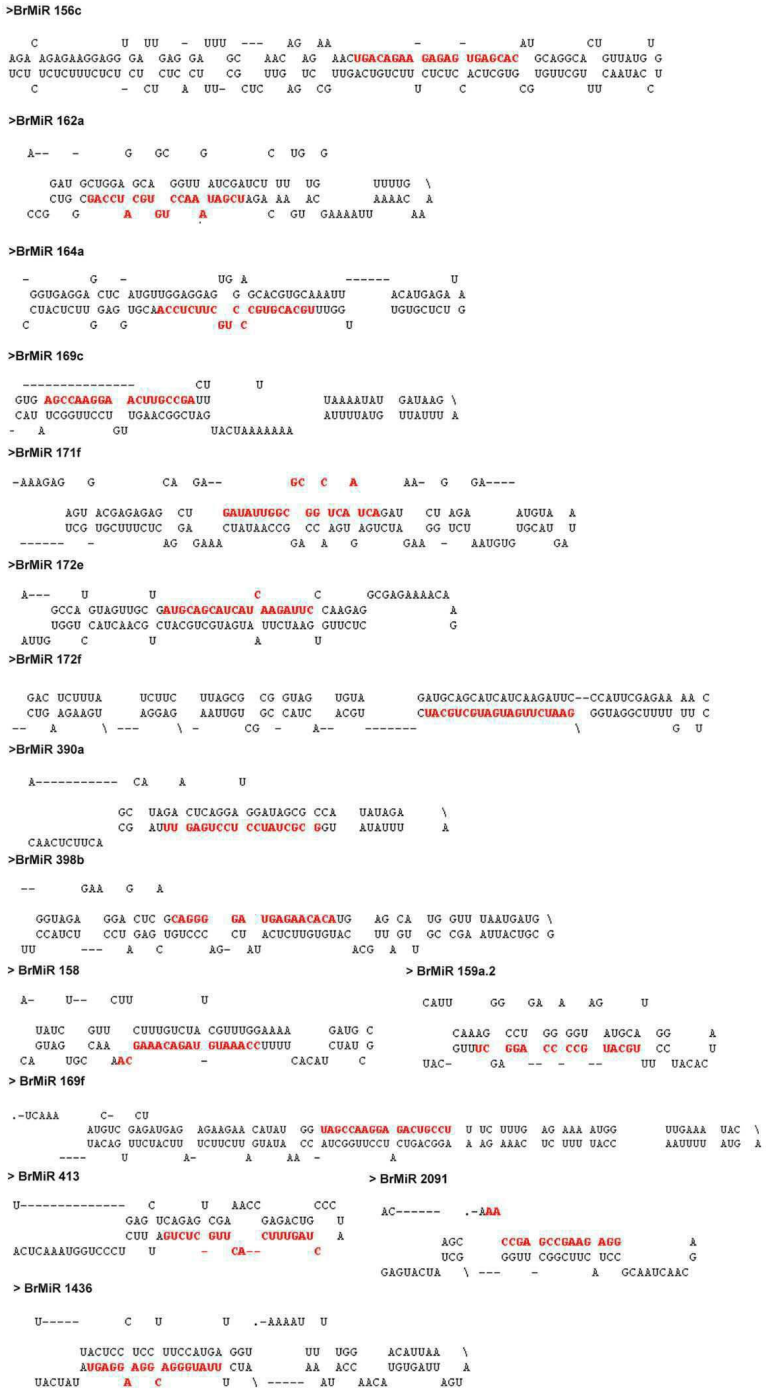
도면2


Number of miRNAs
0
2
4
6
8
10
12
14
156 158 159 160 162 164 166 167 168 169 171 172 319 390 394 395 396 398 400 408 413 414 415 426 472 473 776 837 838 842 845 846 850 854 857 1132 1139 1435 1436 1511 1514 1520 1521 1522 1527 1863 1886 2091
miRNA family

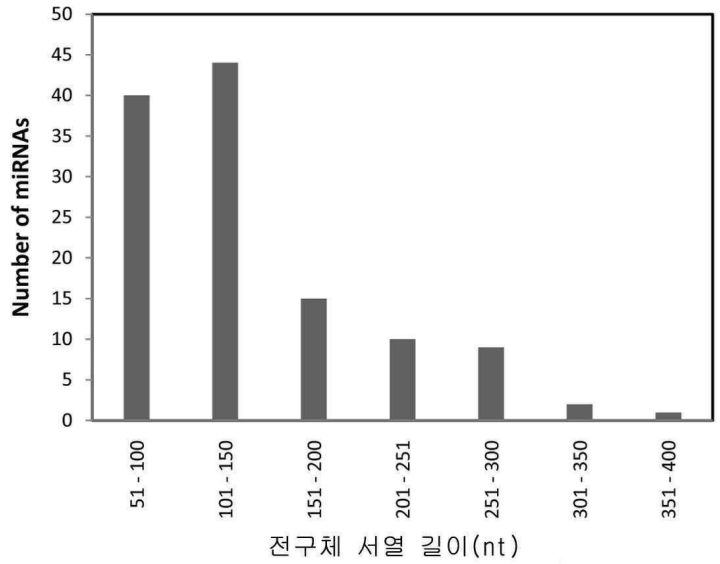
도면3


Number of miRNAs
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
17
18
19
20
21
22
성숙 miRNA 서열 길이(nt)

도면4


>BrMiR 156c
>BrMiR 162a
>BrMiR 164a
>BrMiR 169c
>BrMiR 171f
>BrMiR 172e
>BrMiR 172f
>BrMiR 390a
>BrMiR 398b
> BrMiR 158
> BrMiR 159a.2
> BrMiR 169f
> BrMiR 413
> BrMiR 2091
> BrMiR 1436

도면5



도면6

```
BrMiR162a          GAAAAACAAAAUUAAAAGCAUGAACAGAUCGAUAAACCUCGUGCAUCCAGCGGUCGCCUCU 100
BrMiR162b          GAAAAACAAAAUUAAAAGCAUGAACAGAUCGAUAAACCUCGUGCAUCCAGCGGUCGCCUCU 100
BrMiR162c          GAAAA-CAAAAUUAAAAGCAUGAACAGAUCGAUAAACCUCGUGCAUCCAGCGGUCGCCUCU 99
BrMiR162d          GAAAAACAAAAUUAAAAGCAUGAACAGAUCGAUAAACCUCGUGCAUCCAGCGGUCGCCUCU 100
BrMiR162e          GAAAAACAAAAUUAAAAGCAUGAACAGAUCGAUAAACCUCGUGCAUCCAGCGGUCGCCUCU 100
BrMiR162f          GAAAAACAAAAUUAAAAGCAUGAACAGAUCGAUAAACCUCGUGCAUCCAGCGGUCGCCUCU 99
Bnp_DY025212       GGAAAAAAAAACUCAAAGCAUGAACAGAUCGAUAAACCUCUGCAUCCAGCGGUCGCCACU 105
Bnp_EV208491       CAAUUUACAUGGCA--AGCAUGAAUCGAUCGAUAAACCUCUGCAUCCAGUGCUUC----- 111
Bol_BH920058       UUGGAAAGAGAUUAAAAGCAUGAACGGAUCGAUAAACCUCUGCAUCCAGC---------- 121
Bol_BH555047       UUGGAAAGAGAUUAAAAGCAUGAACGGAUCGAUAAACCUCUGCAUCCAGC---------- 125
Bol_BZ441369       UUGGAAAGAGAUUAAAAGCAUGAACGGAUCGAUAAACCUCUGCAUCCAGCGG-------- 121
ath-MIR162a        UAAAAAUG----UAAAAGCAUGAAUAGAUCGAUAAACCUCUGCAUCCAGCGUUUGCCUCU 120
ath-MIR162b        UUUGU----UUACAAAAGCAAGAAUCGAUCGAUAAACCUCUGCAUCCAGCGCUGCUUGCU 110
sly-MIR162         UACGCAACAUUACAGCAAAAGGAAUCGGUCGAUAAACCUCUGCAUCCAG---------- 99
vvi-MIR162         UGUGAAAAAA-GCAG-AUCAAGAAUCGGUCGAUAAACCUCUGCAUCCAGCGUUCACUCC- 103
cpa-MIR162a        UGUGAAAAAUCACAG-AACAUGAAUCGAUCGAUAAACCUCUGCAUCCAGCGUU-ACCCC- 109
osa-MIR162a        UGCAGCCAACGACAA-CGCGGGAAUCGAUCGAUAAACCUCUGCAUCCAGUUCUCGCC--- 171
                                   ***  * ********** *********
```

서 열 목 록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> BrMiR 156b, novel miRNA molecules isolated from Brassica rapa

<130> PN13062

<160> 73

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 1

uugacagaag aaagagagca c 21

<210> 2

<211> 20

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 2

ugacagaaga gagugagcac 20

<210> 3

<211> 17

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 3

ugacagaaga uagagag 17

<210> 4

<211> 19

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 4

gacagaacag agugagcac 19

<210> 5

<211> 19

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 5

gacagaauag agugagcac 19

<210> 6

<211> 18

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 6

ugacagaaga gagagagc 18

<210> 7

<211> 18

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 7

ccaaauguag acaaagca 18

<210> 8

<211> 21

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 8

uuuggauuga agggagcucu a 21

<210> 9

<211> 18

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 9

uuggauugaa gggagcuc 18

<210> 10

<211> 18

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 10

uugcaugccc caggagcu 18

<210> 11

<211> 21

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 11

ugccuggcuc ccuguaugcc a 21

<210> 12

<211> 21

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 12

ugccuggcuc ccugcaugcc a 21

<210> 13

<211> 21

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 13

ucgauaaacc ugugcaucca g 21

<210> 14

<211> 21

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 14

uggagaagca gggcacgugc a 21

<210> 15

<211> 21

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 15

ucggaccagg cuucauuccc c 21

<210> 16

<211> 21

<212

> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 16

ucgcuuggug caggucggga a 21

<210> 17

<211> 21

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 17

cagccaagga ugacuugccg a 21

<210> 18

<211> 18

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 18

agccaaggau gacuugcc 18

<210> 19

<211> 20

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 19

agccaagaau gauuugccgg 20

<210> 20

<211> 19

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 20

uagccaagga gacugccua 19

<210> 21

<211> 21

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 21

ugauugagcc gcgccaauau c 21

<210> 22

<211> 21

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 22

uugagccgug ccaauaucac g 21

<210> 23

<211> 20

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 23

gaaucuugau gaugcugcau 20

<210> 24

<211> 19

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 24

gaaucuugau gauguuaca 19

<210> 25

<211> 21

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 25

uuggacugaa gggaacuccc u 21

<210> 26

<211> 18

<212

> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 26

uuggacugaa gggagcuc 18

<210> 27

<211> 21

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 27

aagcucagga gggauagcgc c 21

<210> 28

<211> 20

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 28

uuggcauucu guccaccucc 20

<210> 29

<211> 21

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 29

cugaaguguu ugggggaacu c 21

<210> 30

<211> 21

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 30

cugaaguguu ugggggggacu c 21

<210> 31

<211> 19

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 31

uccacaggcu uucuugaac 19

<210> 32

<211> 20

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 32

uguguucuca ggucaccccu 20

<210> 33

<211> 21

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 33

uaugagagua uuauaaguca c 21

<210> 34

<211> 21

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 34

uaugagagua uuauacguca c 21

<210> 35

<211> 20

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 35

augagaguau uauaacucac 20

<210> 36

<211> 21

<212

> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 36

augcacugcc ucuucccugg c 21

<210> 37

<211> 18

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 37

augcacugcc ucuucccu 18

<210> 38

<211> 18

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 38

cuaguuucac uugcucug 18

<210> 39

<211> 18

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 39

ucauccucau caucaucg 18

<210> 40

<211> 20

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 40

ucaucuucau caucaucguc 20

<210> 41

<211> 20

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 41

aacagagcag aaacagaaca 20

<210> 42

<211> 21

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 42

aacagagcag aaacaaaaca u 21

<210> 43

<211> 20

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 43

uuuuggagau uuguccuuac 20

<210> 44

<211> 19

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 44

ucccuacucc acucauccc 19

<210> 45

<211> 18

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 45

ucucccucaa gguuucca 18

<210> 46

<211> 18

<212

> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 46

ucuaagucuu cuuuugau 18

<210> 47

<211> 20

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 47

aucaguuucu uguucuuuuc 20

<210> 48

<211> 19

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 48

uuuucuuaua cuucuugca 19

<210> 49

<211> 18

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 49

auggucagau cggucauc 18

<210> 50

<211> 18

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 50

ggcucugaua ccaauuga 18

<210> 51

<211> 21

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 51

uggcucugau accaacugau g 21

<210> 52

<211> 20

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 52

uugaacugaa gugcuugaau 20

<210> 53

<211> 19

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 53

gauccggacu aaaacaaag 19

<210> 54

<211> 19

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 54

ugaggagagg gaggaggag 19

<210> 55

<211> 18

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 55

gaggagaggg aggaggag 18

<210> 56

<211> 19

<212

> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 56

uuuugcaugu ugaaggugu 19

<210> 57

<211> 19

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 57

cauuaaggaa cggaaggag 19

<210> 58

<211> 18

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 58

auuaugaaac ggaaggag 18

<210> 59

<211> 19

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 59

agaguaaaau acacuagua 19

<210> 60

<211> 17

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 60

uucuuaaguc aaacuuu 17

<210> 61

<211> 18

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 61

uuaugggacg gaaggagu 18

<210> 62

<211> 17

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 62

caggcucuga uaccaug 17

<210> 63

<211> 17

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 63

uucauuuuua aaauaga 17

<210> 64

<211> 22

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 64

uucauuuuua uaaauagaca uu 22

<210> 65

<211> 19

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 65

agaacuugac acgugacaa 19

<210> 66

<211> 19

<212

> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 66

cuguuaaugg aaaaaguug 19

<210> 67

<211> 18

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 67

cuguugaugg aaaauguu 18

<210> 68

<211> 17

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 68

auugcuuaaa augaaau 17

<210> 69

<211> 19

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 69

uuuauuucuu aaaaugaaa 19

<210> 70

<211> 18

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 70

aacucaaccu uacaaaac 18

<210> 71

<211> 22

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 71

agcucugaua ccauguuaga uu 22

<210> 72

<211> 19

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 72

ugagagaagu gagaagaaa 19

<210> 73

<211> 18

<212> RNA

<213> Brassica rapa

<400> 73

aaccgagccg aagaggag 18