



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0041275
(43) 공개일자 2009년04월28일

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01) C07K 7/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0106897

(22) 출원일자 2007년10월23일

심사청구일자 2007년10월23일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

(72) 발명자

김상훈

서울시 동대문구 회기동 경희대학교 생물학과

신연남

서울 동대문구 회기동 경희대학교 생물학과

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이문섭, 윤여강

전체 청구항 수 : 총 5 항

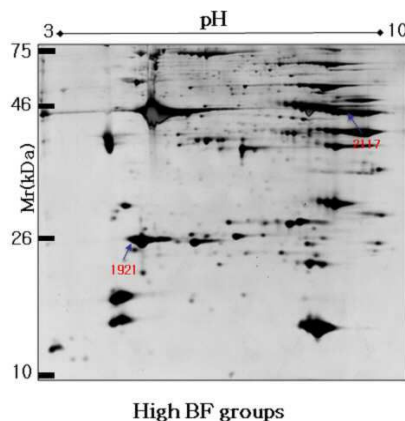
(54) 한우 경제형질 개선을 위한 등지방두께 관련 바이오 마커단백질

(57) 요약

본 발명은 고급육 생산을 위한 등지방두께 등을 포함한 경제형질과 관련된 바이오 마커 단백질과 이들을 이용하여 우수한 경제형질을 지닌 한우를 선발하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 단백질 수준에서 한우의 등지방두께 등을 포함한 경제형질과 관련된 바이오마커 단백질을 프로테옴분석 기술을 이용하여 선발한 후 이를 활용하여 새로운 개념의 고급육 생산기술을 정착시킬 수 있다 또한, 고비용의 표현형 위주의 능력검정작업을 최소화함과 동시에 성장초기나 배아상태에서의 유전적 잠재력과 조기에 측이 가능할 수 있는 저비용의 검정방법으로 대치할 수 있다.

대표도 - 도1a



(72) 발명자

이흥구

서울시 관악구 신림동 산56-1 서울대학교농업생명
과학대학

서강석

충남 천안시 성환읍 어룡리 산9 축산연구소 개량평
가과

윤두학

경기도 수원시 권선구 오목천동 564 축산연구소

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20050301-034-445-009-01-00

부처명 농촌진흥청

연구사업명 바이오그린21사업

연구과제명 한우의 경제능력 개선을 위한 프로테옴 해석 연구

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2007년 01월 01일 ~ 2007년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

등지방두께 관련 육종가 추정치가 낮은 등심조직보다 육종가 추정치가 높은 등심조직에서 단백질 발현이 상대적으로 증가되는 하기 단백질을 포함하는 한우 고급육 선별용 바이오 마커:

서열번호 1, 2, 및 3의 트립신 분해된 펩타이드 서열을 포함하는 약 25-27kDa의 분자량 및 4.5-4.9의 pI를 갖는 미오신 경사슬 1 알칼리(Myosin, light chain 1, alkali; skeletal, fast).

청구항 2

제 1항의 바이오마커 단백질 또는 그 면역원성 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 유효성분으로 포함하는 한우 고급육 선별용 진단제.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 항체는 모노클로날 항체인 것을 특징으로 하는 한우 고급육 선별용 진단제.

청구항 4

한우의 등심조직에서 제 1항의 바이오마커 단백질의 존재를 검출하는 단계를 포함하는 한우의 고급육 선별방법.

청구항 5

제 1항의 바이오마커 단백질 또는 그 면역원성 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 유효성분으로 포함하는 한우 고급육 선별용 진단키트.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 축산물 등급판정에서의 육량등급 판정의 중요한 요소 중 하나인 등지방두께 관련 바이오 마커로 사용될 수 있는 단백질 개발에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 등지방두께 관련 육종가가 낮은 한우 등심조직과 육종가가 높은 한우 등심조직에서 상대적으로 많이 증가되거나 감소되는 바이오 마커 단백질과 이를 이용한 성장조기 산육량을 예측할 있는 진단키트에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 한우는 기후풍토에 대한 적응력은 강하지만, 성장률이 낮고 후구 발달이 빈약하여 고기생산능력이 작은 단점이 있다. 또한 외국산 소고기 수입의 자율화에 따른 국내산 한우의 경쟁력 제고를 위하여 한우 생산을 고급육 생산으로 전환하게 됨에 따라 1992년부터 한우의 개량목표는 산육능력중심에서 육질중심 개량의 방향을 정하고 종모우를 선발하게 되었다. 국내의 축산분야에서는 현재 이러한 연구방향을 이용하여 가축유전자 대량 분석 사업이 진행 중에 있으나, 단백질체에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다.
- <3> 최근 고급육 생산을 위하여 도체형질에 대한 조사가 활발히 진행되면서 생체에서의 도체형질에 대한 판단에 관심이 고조되고 있다. 도체형질에는 도체중, 등지방두께, 배최장근단면적, 근내지방도 및 도체율이 포함된다. 현재 생산효율을 높일 수 있는 도체형질 즉 근내지방교잡도(marbling score)의 개량에 큰 관심을 두고 있지만, 축산물등급판정에서의 육량등급 판정의 객관적 지표인 도체중, 배최장근단면적, 등지방두께도 역시 생산효율을 높일 수 있는 관련 요소이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <4> 따라서, 본 발명의 주된 목적은 한우 고급육 생산을 위한 새로운 바이오 마커 단백질을 제공하는 데 있다.

<5> 본 발명의 다른 목적은 상기 바이오 마커 단백질에 대한 항체 및 이를 이용한 진단키트를 제공하는데 있다.

과제 해결수단

<6> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 등지방두께 관련 육종가 추정치가 낮은 등심조직보다 육종가 추정치가 높은 등심조직에서 단백질 발현이 상대적으로 증가되는 하기 단백질을 포함하는 한우 고급육 선별용 바이오 마커를 제공한다:

<7> 서열번호 1 내지 3의 트립신 분해된 펩타이드 서열을 포함하는 약 25-27kDa의 분자량 및 4.5-4.9의 pI를 갖는 미오신 경사슬 1 알칼리(Myosin, light chain 1, alkali; skeletal, fast).

<8> 본 발명에서, 상기 트립신 분해된 펩타이드란 MS/MS 분석을 위해 트립신으로 분해된 단백질들의 펩타이드를 의미한다. 또한 상기 분자량과 pI는 2차원 전기영동(Two-dimensional electrophoresis) 상에서 확인된 값으로서 일반적으로 허용되는 실험상의 오차범위를 포함한다.

<9> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 등지방두께 관련 육종가 추정치가 높은 등심조직보다 육종가 추정치가 낮은 등심조직에서 단백질 발현이 상대적으로 증가되는 하기 단백질을 포함하는 한우 고급육 선별용 바이오 마커를 제공한다:

<10> 서열번호 5 내지 6의 트립신 분해된 펩타이드 서열을 포함하는 약 42-44kDa의 분자량 및 7.5-7.9의 pI를 갖는 ALDOC 단백질.

<11> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 바이오마커 단백질 또는 그 면역원성 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 유효성분으로 포함하는 한우 고급육 선별용 진단제를 제공한다.

<12> 본 발명의 한우 고급육 선별용 진단제에서, 상기 항체는 폴리클로날 항체일 수도 있으나, 모노클로날 항체인 것이 바람직하다. 폴리클로날 항체는 당업자에 알려진 종래방법에 따라 면역원인 바이오 마커 단백질 또는 그 단편을 외부 숙주에 주사함으로써 제조될 수 있다. 외부 숙주는 마우스, 래트, 양, 토끼와 같은 포유동물을 포함한다. 면역원은 근내, 복강내 또는 피하 주사방법으로 주사되며, 일반적으로 항원성을 증가시키기 위한 보조제(adjuvant)와 함께 투여된다. 외부숙주로부터 정기적으로 혈액을 채취하여 향상된 역가 및 항원에 대한 특이성을 보이는 혈청을 수거하거나 이로부터 항체를 분리, 정제한다.

<13> 모노클로날 항체는 당업자에 알려진 융합에 의한 불멸화된 세포주 생성기술(Koeher and Milstein 1975, Nature, 265:495)에 의해 제조될 수 있다. 그 제조방법은 간단히 설명하면 다음과 같다. 먼저 순수한 단백질을 20 µg을 얻어서 Balb/C 쥐에 면역화를 시키거나 펩타이드를 합성하여 소혈청 알부민과 결합시켜 쥐에 면역화 시킨다. 그 후에 쥐에서 분리된 항원-생산 임파구를 인간 또는 마우스의 미엘로마와 융합하여 불멸화된 하이브리도마를 생성하며, 엘라이저(ELISA) 방법을 사용하여 원하는 모노클로날 항체를 생성하는 하이브리도마 세포만을 선택하여 증식한 후 배양물로부터 모노클로날 항체를 분리, 정제한다.

<14> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 한우의 등심조직에서 상기 바이오마커 단백질의 존재를 검출하는 단계를 포함하는 한우의 고급육 선별방법을 제공한다.

<15> 본 발명의 선별방법에서, 상기 검출 단계는 한우의 등심조직으로부터 2차원 전기영동(2-DE)으로 바이오 마커 단백질의 존재를 직접 검출하거나, 등심조직을 본 발명의 항체와 접촉시켜 항원항체반응을 통해 바이오 마커 단백질의 존재를 간접적으로 확인하는 것을 포함한다. 항원항체반응으로서 현재 널리 알려진 면역분석(immunoassay)법은 효소면역측정법(ELISA, Coated tube), 항체결합 magnetic particle을 이용한 magnetic particle법, 항체결합 latex particle을 이용한 latex particle법 등이 있다.

<16> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 바이오마커 단백질 또는 그 면역원성 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 유효성분으로 포함하는 한우 고급육 선별용 진단키트를 제공한다.

<17> 본 발명의 진단키트는 당업자에 알려진 종래의 제조방법에 의해 제조되며, 전형적으로 동결건조형태의 항체와 버퍼, 안정화제, 불활성 단백질 등을 포함한다. 상기 항체는 방사종(radionuclides), 형광원(fluorescours), 효소(enzymes) 등에 의해 표지화될 수 있다.

<18> 본 발명의 단일클론항체는 immunoassay 키트(ELISA, antibody coated tube test, lateral-flow test, potable biosensor)에 다양하게 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 보다 높은 특이도와 민감도를 나타내는 항체의 개발을 통한 다양한 경제형질 스펙트럼을 갖는 단백질칩 개발에도 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<19> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

<20> 실시예 1. 한우 등심내 단백질 추출

<21> 등급관정부위인 13번째 늑골부위를 Spring-loaded biopsy instrument (Biotech Nitra, Slovak)를 이용하여 biopsy 한 뒤 액체질소에 즉시 냉동시키고 분석 전까지 -80℃에 보관하였다. 도 1에서와 같이 총 146두의 후대검정우의 등심샘플에서 등지방 두께(BF)의 육종가주정치(EBV)의 순위에 따라 총 146개의 한우 등심조직 중에서 상위 20개와 하위 20개를 각기 상위그룹과 하위그룹으로 선정하여 2차원 전기영동을 실시하였다.

<22> 육종가(breeding value, BV)란 다음 세대에 유전적으로 공여 될 수 있는 유전자의 가치 즉 부모로서 어느 개체가 갖고 있는 유전적 가치이다. 또한 이런 육종가의 예측값을 추정육종가(estimated breeding value, EBV)라 한다. 본 발명에서는 아래의 가축개체모형을 이용하여 MTDFREML Package로 육종가를 분석하였다.

$$Y_{ijk} = \mu + YS_i + L_j + D_{ijk} + A_{ijk} + e_{ijk}$$

<24> 여기서, Y: 관측치, μ : 전체 평균, YS: 연도 - 계절효과, L: 출생지역의 효과, D: 도축일령에 대한 co-variate, A: Animal Effects, e: Random Error 이다.

<25> 이렇게 분석된 등지방두께 관련 EBV 수치를 기준으로 총 40두의 후대검정우의 등심샘플에서 등지방두께(BF) 등 육종가주정치(EBV)의 순위에 따라 상위 20개(0.521~0.211)와 하위 20개(-0.088~-0.182)를 각기 고급육과 저급육 그룹으로 선정하여 2차원 전기영동을 실시하였다. 상위그룹 EBV의 평균은 (0.312)이고, 하위그룹 EBV의 평균은 (-0.115)이다 (도 6 참조).

<26> 실시예 2. IEF(1차원 전기영동)과 2-D 전기영동

<27> (1) 1차원 전기영동(First-dimension isoelectric focusing, IEF)

<28> 조직에서 추출한 단백질 100 μ g에 80mM DTT, 0.5% IPG buffer를 넣고, rehydration solution으로 조직과 혈청의 전체 부피가 각각 340 μ l, 250 μ l 되도록 혼합물을 준비하였다. 사용한 rehydration solution의 조성은 다음과 같다: Urea 7M, Thiourea 2.8M, CHAPS 4%, Bromophenol blue 0.002%(w/v). Pharmalyte 3~10은 IPG buffer로 대신 사용하며 solution을 만들 시에는 첨가하지 않았다. 단, IPG buffer는 각 pH에 맞게 샘플을 rehydration solution에 첨가하여 loading시에 바로 첨가하였다. 준비된 mixture를 깨끗한 holder에 loading한 후 IPG strip(조직: pH3~10 and 18cm, serum: pH3~10 and 13cm)을 사용하여 isoelectrofocusing을 다음과 같은 조건으로 실시하였다. 12시간 동안 Rehydration 시킨 후 500V gradient 조건으로 1시간, 이후 8000V gradient로 1시간 전개 후 마지막으로 13시간동안 8000V steady-n-state level을 실시하였다.

<29> (2) 2차원 전기영동(Second-dimension SDS-PAGE)

<30> Isoelectrofocusing을 마친 후 각 strip을 1% DTT(Dithiotheitol)와 2.5% IAA(iodoacetamide)로 각각 15분 동안 equilibration buffer(50mM Tris-HCl, pH8.8, 6M Urea, 30% glycerol, 2% SDS, 0.001% Bromophenol blue)를 사용하여 잘 혼합하면서 반응시켰다. Equilibration 시킨 각 strip을 12.5% SDS-PAGE에 올린 후 agrose sealing solution으로 채운 다음 SDS-PAGE 한 장당 2 Watt로 전개시켰다. 전개시킨 SDS-PAGE를 fixing solution (acetate acid 10%, ethanol 40%)에서 약 30분 정도 고정화시켰다.

<31> 실시예 3. 은(silver) 염색 및 이미지 스캐닝, 분석

<32> 고정화된 gel을 sensitizing solution(30% ethanol, 0.125%(w/v) glutardialdehyde, 0.2%(w/v) sodium thiosulphate, 6.8% sodium acetate)과 30분간 반응시키고 증류수로 세척하였다. 0.25%(w/v) silver nitrate solution으로 다시 20분간 반응시키고 증류수로 세척하였다. 고정화된 gel을 developing solution (2.5%(w/v) sodium carbonate)과 8분간 반응시키고, 마지막으로 stopping solution 1.46%(w/v) EDTA?Na?2H₂O와 반응시켰다. 염색된 gel을 ImageScanner flatbed scanner를 이용하여 scan한 후 각 protein spot을 ImageMaster 2-D melanie software(Amersham Bioscience Inc.)를 사용하여 분석하였다.

<33> 도 3은 등지방 두께(BF) 관련 육종가 추정치(EBV)가 변화된 스팟들의 발현강도(intensity)를 비교한 그래프이다.

실시예 4. 표현형 및 유전능력과 표지단백질간의 연관성 검토

(후보 표지단백질의 발현양과 경제형질간의 상관 분석 및 유의성 검증)

등지방두께(BF) 육종가추정치(EBV)의 순위에 따라 선발한 상위 20두 한우와 하위 20두 한우의 등심을 2차원 전기영동 등 화상의 spot 밀도에 대한 유의성 검증(T-test)을 실시하였고, 또한 SAS 8.12 package를 이용하여 spot의 상대밀도와 각 경제형질간의 상관분석을 실시하였다. 하기 표 1은 등심 단백질에 대한 등지방두께 관련 유의성 검증 결과 및 상관계수를 나타낸다.

[표 1].

Spot No.	CW	EMA	BF
1758	0.452*	ns	ns
1921	ns	ns	0.39989*
1949	-0.419	-0.44988*	-0.374
1996	-0.396	-0.47958*	-0.320
2117	ns	ns	-0.33291*
2193	-0.437	-0.86176**	-0.7903
2246	-0.968	0.97909*	0.36944

도체중(CW), 배최장근단면적(EMA), 등지방두께(BF), 근내지방도(MS)

ns: not significant, **: significant P<0.01, *: significant P<0.05

실시예 5. 질량분석기를 이용한 단백질 동정

이미지 분석을 통하여 단백질 발현 패턴에 차이가 보이는 spot을 선별한 다음, gel에서 해당 spot부분을 blue tip을 이용하여 분리하였다. 분리된 spot들은 30mM potassium ferricyanide와 100mM sodium thiosulfat를 1:1로 섞은 용액에 담귀 destaining 시켰다. destaining 된 spots을 100mM ammonium bicarbonate, pH 7.8 용액과 acetonitrile 용액을 사용하여 전처리 하고 trypsin과 반응시켰다.

In gel tryptic digestion방법으로 처리한 후, 그 추출액을 nano-ESI-Q-TOF mass spectrometer (MS/MS)을 이용하여 분석하였다. 분석된 펩타이드 정보를 가지고 MASCOT search program에서 오차범위를 최소한으로 설정하여 일치되는 단백질을 검색하여 최종적으로 동정하였다. 하기 표 2는 ESI-Q-TOF를 이용해 확인한 등심 후보 표지단백질 목록이다.

[표 2].

Spot No.	Protein Name	NCBI Accession No.	Experimental pI/Mr(kDa)	Sequence coverage(%)	Significance*
1921	Myosin, light chain 1, alkali; skeletal, fast	AAI26717	4.69/26.0	21	High BF group
2117	ALDOC protein	AAI03038	7.69/43.5	11	Low BF group

High BF: 고급육 등지방두께를 표시함.

<48> 상기와 같이 동정된 단백질들의 아미노산 서열은 NCBInr 데이터베이스(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 서치하여 미오신 경사슬 1 알칼리(Myosin, light chain 1, alkali; skeletal, fast)는 서열번호 4, ALDOC 단백질은 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 것을 확인하였다.

산업이용 가능성

<49> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면, 단백질수준에서 한우의 등지방두께 등을 포함한 경제형질과 관련된 바이오마커 단백질을 프로테옴분석 기술을 이용하여 선별한 후 이를 활용하여 새로운 개념의 고급육 생산기술을 정착시킬 수 있다. 또한, 고비용의 표현형 위주의 능력검정작업을 최소화함과 동시에 성장초기나 배아상태에서의 유전적 잠재력과 조기예측이 가능할 수 있는 저비용의 검정방법으로 대체할 수 있다.

도면의 간단한 설명

<50> 도 1은 등지방두께 관련 육종가추정치가 높은 등심와 낮은 한우 등심에서 발현하는 근육단백질을 나타내는 2-D 전기영동이미지이다.

<51> 도 2는 도 1의 화살표 영역의 등지방두께 (BF) 관련 육종가 추정치(EBV)가 높은 등심조직(high BF group)과 낮은 등심조직(low BF group)에서의 스팟을 확대한 것이다.

<52> 도 3은 도 2에서 확인한 스팟들의 발현강도 (intensity)를 비교한 그래프이다.

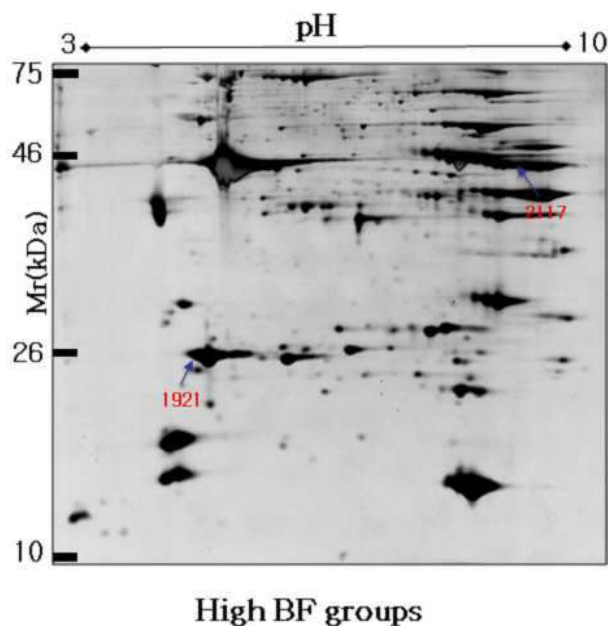
<53> 도 4a는 스팟 1921의 ESI-Q-TOF 질량분석 결과를 MASCOT 서치 프로그램을 이용하여 단백질 동정한 결과이고, 도 4b, 4c, 4d, 4e는 각각 스팟 1921을 트립신으로 분해된 펩타이드들의 MS/MS fragmentation 스펙트럼이다. 이중 도 4b는 서열번호 1, 도 4d는 서열번호 2, 도 4e는 서열번호 3이다.

<54> 도 5a는 스팟 2117의 ESI-Q-TOF 질량분석 결과를 MASCOT 서치 프로그램을 이용하여 단백질 동정한 결과이고, 도 5b, 5c, 5d는 각각 스팟 2117을 트립신으로 분해된 펩타이드들의 MS/MS fragmentation 스펙트럼이다. 이중 도 5b는 서열번호 5, 도 5d는 서열번호 6이다.

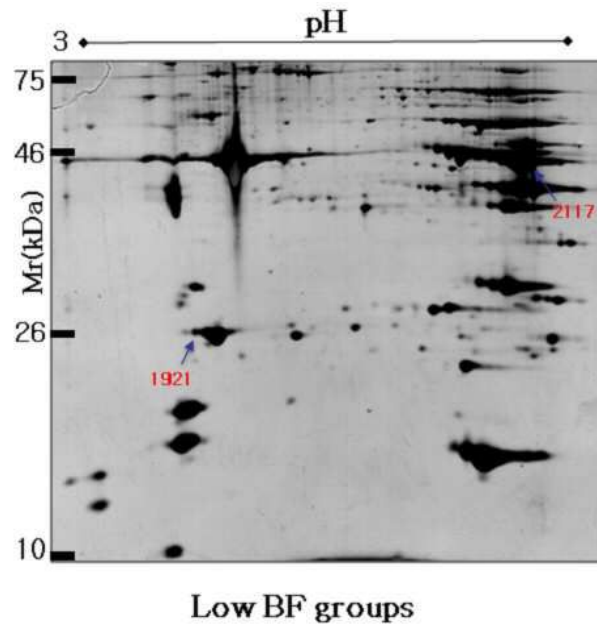
<55> 도 6은 등지방두께 관련 EBV 수치를 기준으로 총 40두의 후대검정우의 각각 고급육과 저급육 그룹으로 선정한 결과이다.

도면

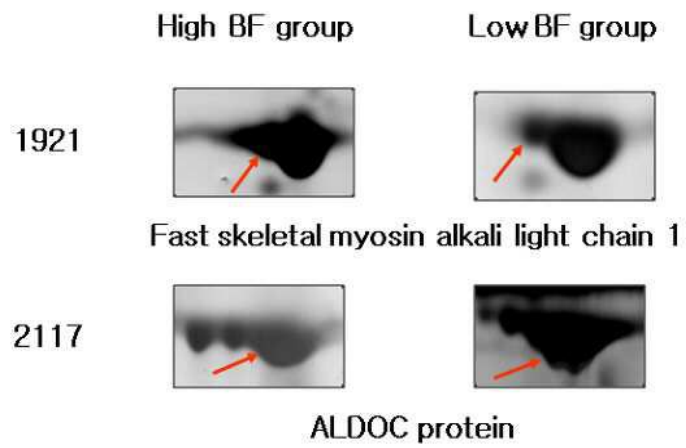
도면1a



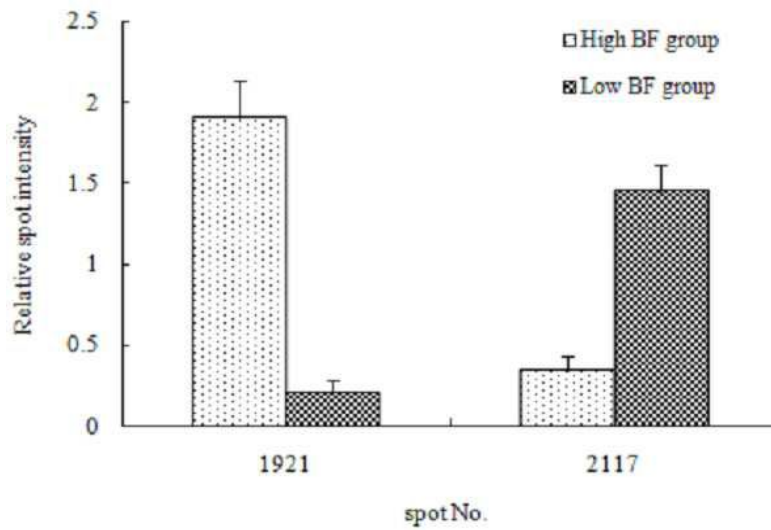
도면1b



도면2



도면3



도면4a

Match to: gi|117306554 Score: 173
 Unknown (protein for MGC:155238) [Bos taurus]
 Found in search of C:\Y00\06ms197_1921.pk1

Nominal mass (M_r): 21033; Calculated pI value: 4.96
 NCBI BLAST search of [gi|117306554](#) against nr
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Bos taurus](#)
 Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:
[gi|143954546](#) from [Bos taurus](#)
[gi|117306554](#) from [Bos taurus](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
 Variable modifications: Oxidation (M)
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Sequence Coverage: 21%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MAPKKDVKKP AAAAAAPAPAP APAPAPAPAP PKEEKIDLSA IKIEFSK**QQQ**
 51 **DEFKEAFLLF** DRITGECKITL SQVGDVLRAL GINPINAQVK KVLGNPSNEE
 101 MNAKKIEFEQ FLFMLQAISN NKDQGTIEDF VEGLRV**FDKE** QNGTVMGAEL
 151 **RHVLATLGEK** MKEEEVEALM AGQEDSNGCI NYEAFVKHIM SN

Show predicted peptides also

Sort Peptides By ☒ Residue Number ☐ Increasing Mass ☐ Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss Sequence
48 - 62	638.9792	1913.9158	1912.9319	0.9839	1 K.QQDEFKEAFLLFDR.T (Ions score 52)
55 - 62	505.7719	1009.5292	1009.5232	0.0060	0 K.EAFLLFDR.T (Ions score 42)
68 - 78	600.8470	1199.6794	1199.6873	-0.0079	0 K.ITLSQVGDVLR.A (Ions score 68)
68 - 78	600.8498	1199.6850	1199.6873	-0.0023	0 K.ITLSQVGDVLR.A (Ions score 68)
136 - 151	575.2781	1722.8125	1721.8406	0.9719	1 R.VFDKEGNGTVMGAELR.H (Ions score 11)
136 - 151	580.6096	1738.8070	1737.8355	0.9715	1 R.VFDKEGNGTVMGAELR.H Oxidation (M) (Ions score 12)

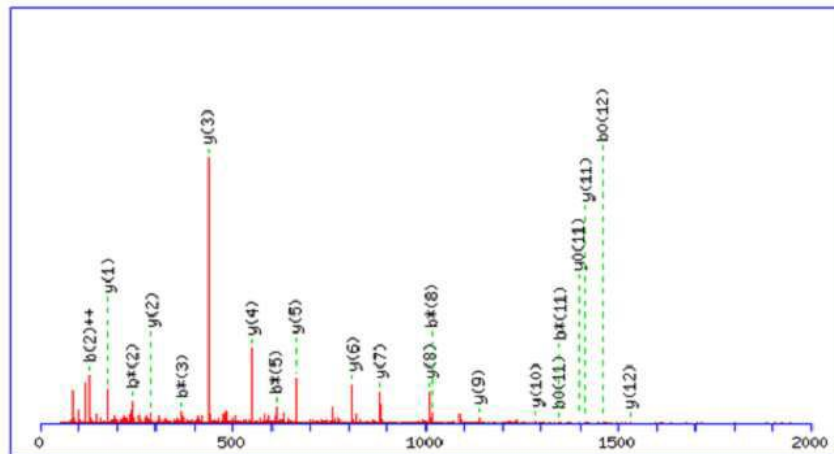
도면4b

MS/MS Fragmentation of **QQQDEFKEAFLLFDR**
Found in **gi|117306554**, Unknown (protein for MGC:155238) [Bos taurus]

Match to Query 6: 1913.915772 from(638.979200,3+) intensity(1087.3193)
Data file C:\YOO\06ms197_1921.pkl

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, to Da



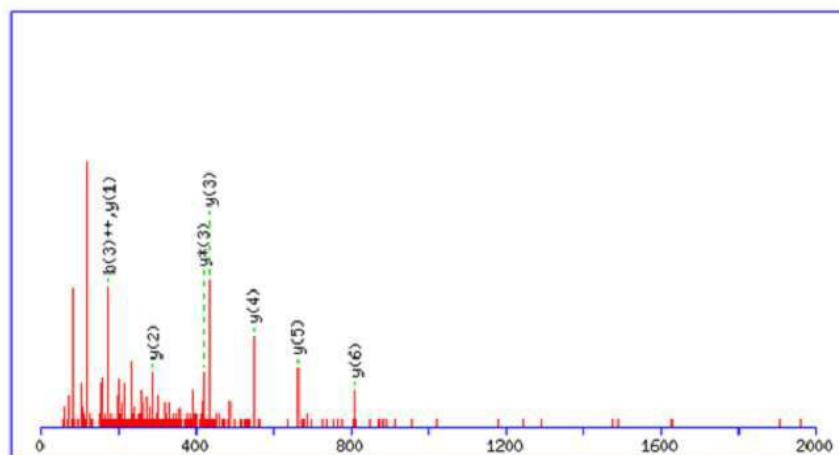
도면4c

MS/MS Fragmentation of **EAFLLFDR**
Found in **gi|117306554**, Unknown (protein for MGC:155238) [Bos taurus]

Match to Query 1: 1009.529248 from(505.771900,2+) intensity(412.3079)
Data file C:\YOO\06ms197_1921.pkl

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

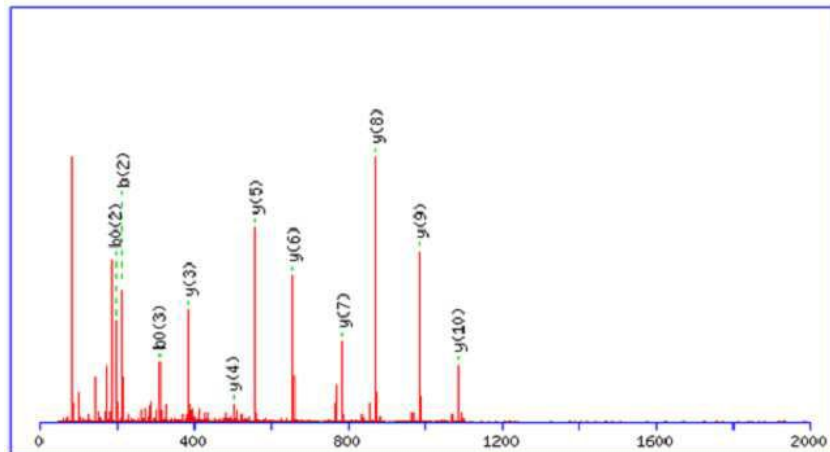
Or, to Da



도면4d

MS/MS Fragmentation of **ITLSQVGDVLR**
 Found in **gi117306554**, Unknown (protein for MGC:155238) [Bos taurus]
 Match to Query 2: 1199.679448 from(600.847000,2+) intensity(6528.6709)
 Data file C:\YOO\06ms197_1921.pkl

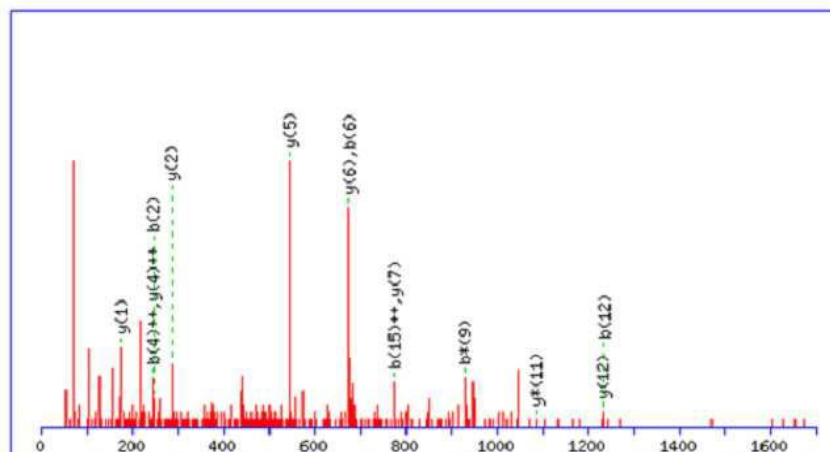
Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point
 Or, to Da



도면4e

MS/MS Fragmentation of **VFDKEGNGTVMGAELR**
 Found in **gi117306554**, Unknown (protein for MGC:155238) [Bos taurus]
 Match to Query 4: 1722.812472 from(575.278100,3+) intensity(1020.7277)
 Data file C:\YOO\06ms197_1921.pkl

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point
 Or, to Da



도면5a

Match to: gi|73587385 Score: 86
 ALDOC protein [Bos taurus]
 Found in search of C:\Y00\06ms197_2117.pkl

Nominal mass (M_r): 43536; Calculated pI value: 7.69
 NCBI BLAST search of [gi|73587385](#) against nr
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Bos taurus](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
 Variable modifications: Oxidation (M)
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Sequence Coverage: 11%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 RSRGWNRSR GSERELFLWL RSYLAADRTV TMPHSYPALS AEQKKEISDI
51 ALRIVAPGKG ILAAGESVGS MAKRLSQIGV ENTEENRRLY RQVLFSADDR
101 VKKCIIGGVIF FHETLYQKDD NGVFFVRIIQ DKGIVVGIVK VDKGVVPLAGT
151 DGETTTQGLD GLSERCAQYK KDGADFARWR CVLKISERTP SALAIENAN
201 VLARYASICQ QNGIVPIVEP EILPDGDHDL KRCQVVTKEV LAADVRLSD
251 HHVYLEGILL KPMNVTPGHA CAIKYSPEEI AMATVTALRR TVPFAVPGVT
301 FLGGQSEEE ASLNINAINR CPLPRPWALT FSYGRALQAS ALNANRGQD
351 NAGAATEEFI KRAEVNGLAA QGKYEGSGED GGAAVQSLYI ANHAY
  
```

Show predicted peptides also

Sort Peptides By ☒ Residue Number ☐ Increasing Mass ☐ Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
140 - 165	872.4274	2614.2604	2614.3085	-0.0481	1	K.VDKGVVPLAGTDGETTTQGLDGLSER.C (Ions score 40)
143 - 165	758.3345	2272.0417	2272.1182	-0.0765	0	K.GVVPLAGTDGETTTQGLDGLSER.C (Ions score 27)
185 - 204	713.6760	2138.0062	2137.1854	0.8207	1	K.ISERTPSALAIENANVLAR.Y (Ions score 19)

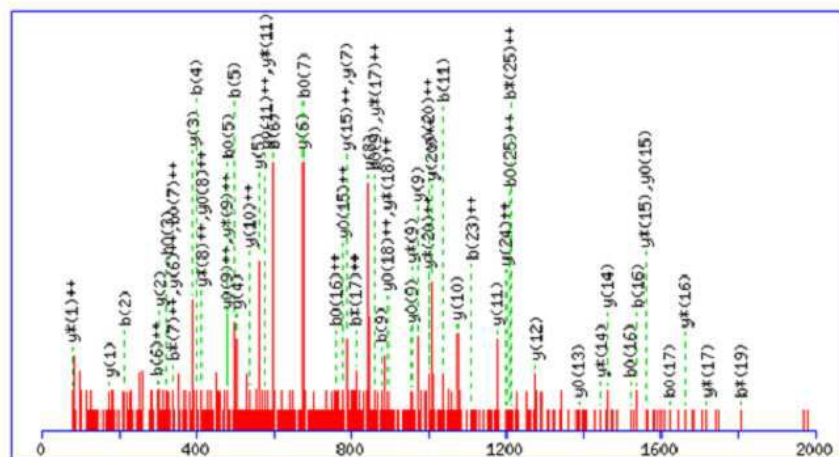
도면5b

MS/MS Fragmentation of **VDKGVVPLAGTDGETTTQGLDGLSER**
 Found in [gi|73587385](#), ALDOC protein [Bos taurus]

Match to Query 9: 2614.260372 from(872.427400,3+) intensity(1404.9098)
 Data file C:\Y00\06ms197_2117.pkl

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, Plot from to Da

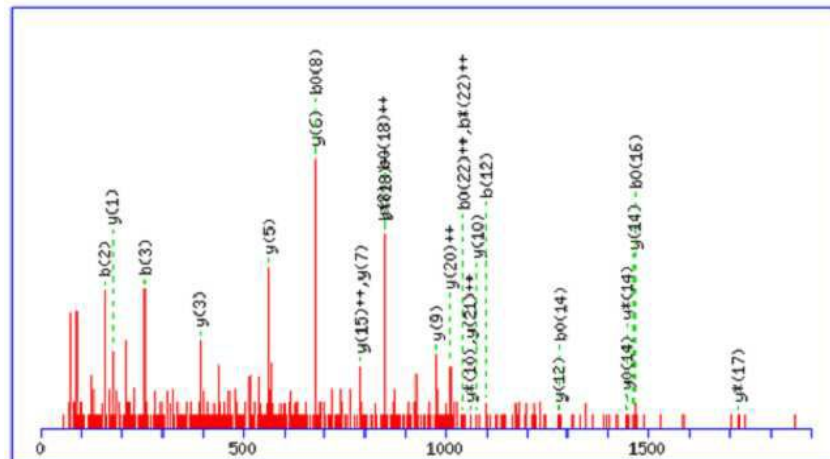


도면5c

MS/MS Fragmentation of **GVVPLAGTDGETTTQGLDGLSER**
Found in **gi|73587385**, ALDOC protein [Bos taurus]

Match to Query 8: 2272.041672 from(758.354500,3+) intensity(1292.7356)
Data file C:\YOO\06ms197_2117.pkl

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point
Or, to Da

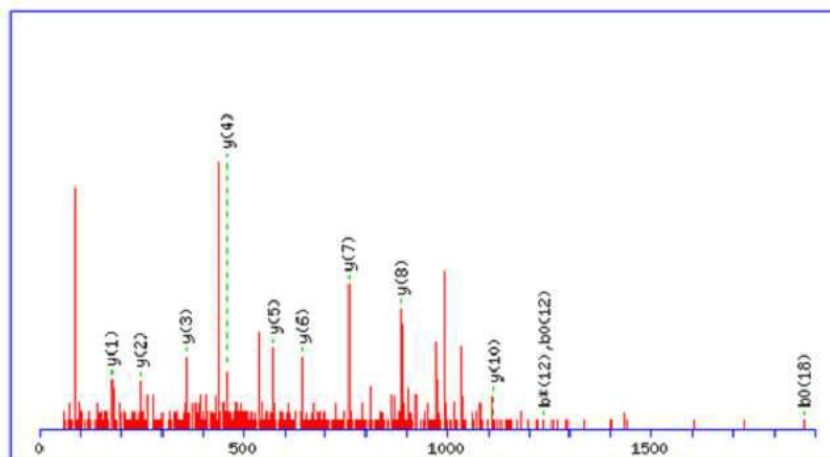


도면5d

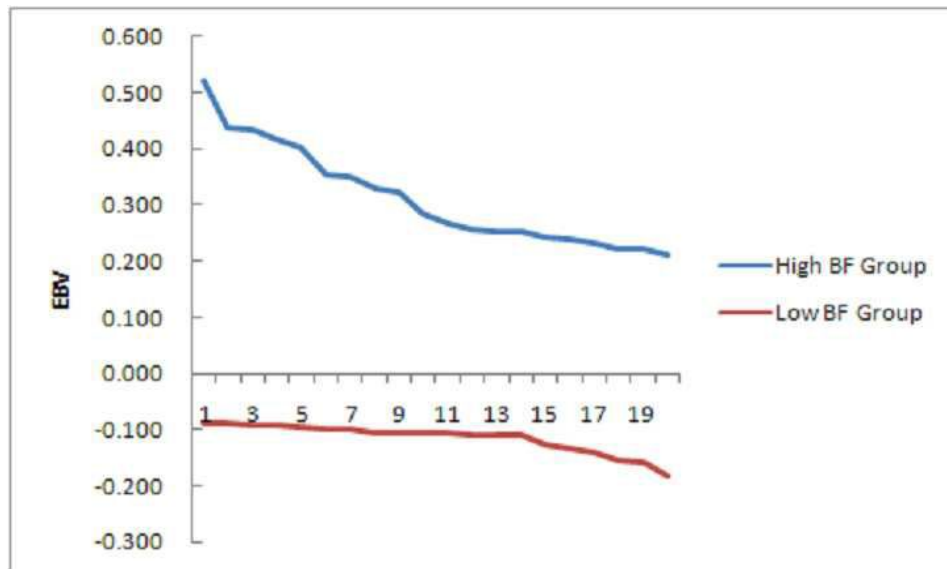
MS/MS Fragmentation of **ISERTPSALAILNANVLAR**
Found in **gi|73587385**, ALDOC protein [Bos taurus]

Match to Query 7: 2138.006172 from(713.676000,3+) intensity(1264.4703)
Data file C:\YOO\06ms197_2117.pkl

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point
Or, to Da



도면6



서열 목록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation of KyungHee University
 <120> Protein Marker Related with the BF for Improving economic traits of Hanwoo

<160> 7

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 1
 Gln Gln Gln Asp Glu Phe Lys Glu Ala Phe Leu Leu Phe Asp Arg
 1 5 10 15

<210> 2
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 2
 Ile Thr Leu Ser Gln Val Gly Asp Val Leu Arg
 1 5 10

<210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 3
 Val Phe Asp Lys Glu Gly Asn Gly Thr Val Met Gly Ala Glu Leu Arg
 1 5 10 15

<210> 4
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 4
 Met Ala Pro Lys Lys Asp Val Lys Lys Pro Ala Ala Ala Ala Pro
 1 5 10 15

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Pro Lys
 20 25 30

Glu Glu Lys Ile Asp Leu Ser Ala Ile Lys Ile Glu Phe Ser Lys Gln
 35 40 45

Gln Gln Asp Glu Phe Lys Glu Ala Phe Leu Leu Phe Asp Arg Thr Gly
 50 55 60

Glu Cys Lys Ile Thr Leu Ser Gln Val Gly Asp Val Leu Arg Ala Leu
 65 70 75 80

Gly Thr Asn Pro Thr Asn Ala Glu Val Lys Lys Val Leu Gly Asn Pro
 85 90 95

Ser Asn Glu Glu Met Asn Ala Lys Lys Ile Glu Phe Glu Gln Phe Leu
 100 105 110

Pro Met Leu Gln Ala Ile Ser Asn Asn Lys Asp Gln Gly Thr Tyr Glu
 115 120 125

Asp Phe Val Glu Gly Leu Arg Val Phe Asp Lys Glu Gly Asn Gly Thr

130

135

140

Val Met Gly Ala Glu Leu Arg His Val Leu Ala Thr Leu Gly Glu Lys
145 150 155 160

Met Lys Glu Glu Glu Val Glu Ala Leu Met Ala Gly Gln Glu Asp Ser
165 170 175

Asn Gly Cys Ile Asn Tyr Glu Ala Phe Val Lys His Ile Met Ser Asn
180 185 190

<210> 5
<211> 26
<212> PRT
<213> Bos taurus

<400> 5
Val Asp Lys Gly Val Val Pro Leu Ala Gly Thr Asp Gly Glu Thr Thr
1 5 10 15

Thr Gln Gly Leu Asp Gly Leu Ser Glu Arg
20 25

<210> 6
<211> 20
<212> PRT
<213> Bos taurus

<400> 6
Ile Ser Glu Arg Thr Pro Ser Ala Leu Ala Ile Leu Glu Asn Ala Asn
1 5 10 15

Val Leu Ala Arg
20

<210> 7
<211> 395
<212> PRT
<213> Bos taurus

<400> 7

Arg Ser Arg Gly Trp Asn Arg Ser Cys Arg Gly Ser Glu Arg Glu Leu
 1 5 10 15
 Phe Leu Trp Leu Arg Ser Tyr Leu Ala Ala Asp Arg Thr Val Thr Met
 20 25 30
 Pro His Ser Tyr Pro Ala Leu Ser Ala Glu Gln Lys Lys Glu Leu Ser
 35 40 45
 Asp Ile Ala Leu Arg Ile Val Ala Pro Gly Lys Gly Ile Leu Ala Ala
 50 55 60
 Asp Glu Ser Val Gly Ser Met Ala Lys Arg Leu Ser Gln Ile Gly Val
 65 70 75 80
 Glu Asn Thr Glu Glu Asn Arg Arg Leu Tyr Arg Gln Val Leu Phe Ser
 85 90 95
 Ala Asp Asp Arg Val Lys Lys Cys Ile Gly Gly Val Ile Phe Phe His
 100 105 110
 Glu Thr Leu Tyr Gln Lys Asp Asp Asn Gly Val Pro Phe Val Arg Thr
 115 120 125
 Ile Gln Asp Lys Gly Ile Val Val Gly Ile Lys Val Asp Lys Gly Val
 130 135 140
 Val Pro Leu Ala Gly Thr Asp Gly Glu Thr Thr Thr Gln Gly Leu Asp
 145 150 155 160
 Gly Leu Ser Glu Arg Cys Ala Gln Tyr Lys Lys Asp Gly Ala Asp Phe
 165 170 175
 Ala Lys Trp Arg Cys Val Leu Lys Ile Ser Glu Arg Thr Pro Ser Ala
 180 185 190
 Leu Ala Ile Leu Glu Asn Ala Asn Val Leu Ala Arg Tyr Ala Ser Ile
 195 200 205
 Cys Gln Gln Asn Gly Ile Val Pro Ile Val Glu Pro Glu Ile Leu Pro
 210 215 220
 Asp Gly Asp His Asp Leu Lys Arg Cys Gln Tyr Val Thr Glu Lys Val
 225 230 235 240

Leu Ala Ala Val Tyr Lys Ala Leu Ser Asp His His Val Tyr Leu Glu
245 250 255

Gly Thr Leu Leu Lys Pro Asn Met Val Thr Pro Gly His Ala Cys Ala
260 265 270

Ile Lys Tyr Ser Pro Glu Glu Ile Ala Met Ala Thr Val Thr Ala Leu
275 280 285

Arg Arg Thr Val Pro Pro Ala Val Pro Gly Val Thr Phe Leu Ser Gly
290 295 300

Gly Gln Ser Glu Glu Glu Ala Ser Leu Asn Leu Asn Ala Ile Asn Arg
305 310 315 320

Cys Pro Leu Pro Arg Pro Trp Ala Leu Thr Phe Ser Tyr Gly Arg Ala
325 330 335

Leu Gln Ala Ser Ala Leu Asn Ala Trp Arg Gly Gln Gln Asp Asn Ala
340 345 350

Gly Ala Ala Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Ala Glu Val Asn Gly Leu
355 360 365

Ala Ala Gln Gly Lys Tyr Glu Gly Ser Gly Glu Asp Gly Gly Ala Ala
370 375 380

Val Gln Ser Leu Tyr Ile Ala Asn His Ala Tyr
385 390 395