

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2009-0096820 (43) 공개일자 2009년09월15일
(51) Int. Cl. <i>C12N 15/52</i> (2006.01) <i>C12N 15/29</i> (2006.01) <i>C12N 15/10</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2008-0021877 (22) 출원일자 2008년03월10일 심사청구일자 2008년03월10일	(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내 (72) 발명자 박영두 경기 용인시 수지구 성북동 성동마을 수지자이1차 아파트 108동702호 이기호 부산 동래구 온천1동 153-8 SK 허브스카이 102동 2206호 (74) 대리인 이덕록	

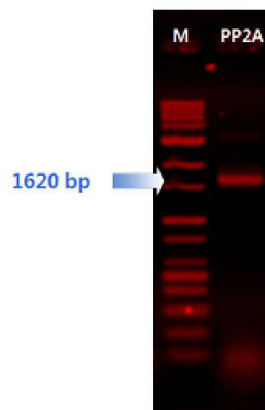
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 배추의 자가불화합성에 관여하는 단백질 포스파타제 2에이 효소의 비 레귤러터리 서브유닛을 코딩하는 유전자

(57) 요약

본 발명은 배추로부터 분리해 낸 자가불화합성에 관여하는 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit) 유전자에 관한 것으로, 이를 이용하여 안티센스(anti-sence vector) 및 RNA 간섭(RNA interference) 벡터를 만들어 식물 형질전환시, 배추의 자가불화합성을 타파하여 자가 화합 배추를 육성할 수 있으며, 이는 1대 잡종을 유지하기 위한 모본 보존 종자 증식에 경제적으로 유용한 배추를 제공하는 효과가 있다.

대표도 - 도1a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20070301034037

부처명 농촌진흥청

연구사업명 바이오그린 21사업

연구과제명 배추 구조유전체 기반을 이용한 기능유전체 및 실용화 연구

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 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit)의 전체 유전자를 분리하는 단계를 포함하는, 배추(*Brassica raps* ssp. *pekinensis*)의 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit) 유전자를 코딩하는 유전자를 분리하는 방법.

청구항 2

서열번호 3의 염기서열을 갖는, 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit)을 코딩하는 유전자.

청구항 3

서열번호 4의 염기서열을 갖는, 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit)을 코딩하는 아미노산.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)로부터 분리된 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit)을 코딩하는 유전자에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 십자화과(*Brassica*) 식물에 포함되는 배추는 유전적인 다양성을 확보하기 위하여 자식(selfing)을 막는 수단으로, 화분을 인식 및 선별하여 동종의 화분으로부터 자기 개체 유래의 수정시 주두(stigma)의 표면에서 화분의 성장하는 것을 막아 수정을 막는 유전 형질인 자가불화합성(self-incompatibility)을 가지고 있다.
- <3> 배추 속의 주두에 존재하는 당단백질(glycoproteins)에 관한 연구는 1978년 Nishio와 Hinata로부터 S 복대립 유전자(S alleles)에 의해 시작되었으며, 이후 SLG(S-linked glycoprotein), SRK(S-receptor kinase)가 확인되었다. 특히 이들은 세린/트레오닌 단백질 키나아제(serine/threonine protein kinase)와 트랜스멤브레인 도메인(transmembrane domain)과 상동성(homology)이 있으며, 이들은 S 아미노 말단 도메인(S amino terminal domain)과 키나아제 도메인(kinase domain)으로 구분된다.
- <4> 단백질 포스파타제(protein phosphatase, PP)은 특정 단백질의 키나아제(kinase) 및 포스파타제(phosphatase)의 활성화와 연관되어있으며, 이들의 특정 단백질의 인산화 정도가 자가불화합성과 관련이 있는 것으로 보고되었다. 진핵세포(Eukaryotes)에서는 특정 단백질인 세린/트레오닌 단백질 키나아제(serine/threonine protein kinase)가 type 1, 2A, 2B, 2C(PP1, PP2A, PP2B, PP2C)로 분류되었다. 특히 PP1과 PP2A의 활성화는 직접적인 OA(Okadaic acid) 처리에 의해 PP1과 PP2A의 기질이 모두 인산화(phosphorylation)되어 선택적 억제제 역할을 한다는 것이 보고된 바 있다.
- <5> 이와 같은 PP1, PP2A 및 PP2C의 활성화는 유채, 콩, 밀, 당근 등에서도 보고되었으며, 특히 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)에서 OA에 의한 단백질 포스파타제 1, 2A(protein phosphatase 1, 2A)의 억제가 배추 본연의 자가불화합성을 타파하여 이것이 상관관계가 있음을 보고한 바 있다. 즉, 단백질 포스파타제(protein phosphatase)는 자가불화합성의 신호 전달 역할을 하며, SRK(S-receptor kinase)가 길항적 효과를 한다. 그래서 단백질 포스파타제(protein phosphatase)를 억제하면 SRK 기질의 인산화 정도가 증가되어 자가불화합성 반

음이 복구되려 하는데, 이것에 의해 SRK가 더 활성화되어 결국 자가화합성이 된다는 것이다.

- <6> PP2A는 십자화과(*Brassica*)의 자가불화합성 이외에도 여러 식물의 세포 대사 과정 조절 및 신호 전달에 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 시금치에서는 당 대사과정 및 질산염(Nitrate) 축적 과정을 조절하고, CAM(crassulacean acid metabolism) 식물에서는 낮 시간 동안 포스포놀피루베이트 카르복실라제(phosphoenolpyruvate carboxylase)의 반응을 억제시켜 불필요한 PEP 탄산화(carboxylation) 및 탈탄산화(decarboxylation) 반응을 막아주는 역할이 보고되어 있다. 또한 담배에서는 에틸렌 발생 신호 전달을 하며, 콩 및 토마토에서는 해충에 대한 반응과 연관이 있으며, 밀에서는 광에 의한 조절을 하고, 고구마에서는 당 축적 유전자와 상관이 있음이 보고되었다.
- <7> PP2A(protein phosphatase 2A)의 활성 소단위(subunit)는 A와 B로 구성되어 있으며, 특히 세포 성장 및 발달에 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있는 B 소단위는 54, 55, 72 킬로달톤(kDa)이 있는 것으로 보고되었다.
- <8> 배추는 김치의 주재료로서 국이나 찜 등에도 이용되는 한국의 4대 채소 가운데 하나이다. 또한 외국으로도 많은 종자를 수출하고 있어 그 산업적 경제성이 우수한 작물이다. 그러나 배추는 자가불화합성 때문에, 수출되는 1대 잡종 종자를 유지하기 위해서는 모본을 유지하기 위한 CO₂ 처리 및 뇌수분을 해 주어야 한다. 이것은 농가에 막대한 경비 및 노력이 소요된다. 그러나 십자화과(*Brassica*) 및 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 자가불화합성 타파에 관련 있는 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit)을 코딩(coding)하는 유전자에 관해서는 보고된 바 없다.
- <9> 이에 본 발명자들은 배추 유래의 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit)을 코딩하는 유전자를 규명하고, 이를 이용하여 자가화합성 배추를 제공함으로써 경제적으로 유용한 배추 품종 육성을 도모하고자 한다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <10> 따라서 본 발명의 목적은 한국의 4대 채소 가운데 하나인 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)로부터 자가불화합성(self-incompatibility)과 관련된 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit)을 코딩하는 유전자를 분리하여 그 염기서열을 제공하는 것이다.
- <11> 또한 본 발명의 다른 목적은, 배추의 단백질 포스파타제 2 에이 효소의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛을 코딩하는 유전자를 크로닝 할 수 있는 프라이머 및 이를 이용하여 배추로부터 단백질 포스파타제 2 에이 효소의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛을 분리하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- <12> 본 발명은 서열번호 3의 염기서열을 갖는, 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit)을 코딩하는 유전자를 제공한다.
- <13> 본 발명은 또한 서열번호 4의 염기서열을 갖는, 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit)을 코딩하는 아미노산을 제공한다.
- <14> 또한 본 발명은 상기 유전자를 크로닝 할 수 있는 프라이머 및 이를 이용하여 배추로부터 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit)을 분리하는 방법을 제공한다.
- <15> 본 발명에서는 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)로부터 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit)을 코딩하는 유전자를 분리하기 위해, 우선 프라이머를 작성하고, 상기 프라이머를 이용하여 RT-PCR 과정을 거쳐 배추로부터 배추의 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit)을 코딩하는 전체 유전자의 염기서열을 밝혔다.
- <16> 본 발명은, 기존에 발표되어 있는 채소작물의 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55

킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit) 염기서열들의 상동성을 기초로, 배추의 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit) 유전자를 클로닝할 수 있는 프라이머를 작성하는 단계; 및 상기 프라이머를 이용한 RT-PCR 방법으로 배추로부터 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit)의 유전자 단편과 전체 유전자를 얻는 단계로 이루어진다.

- <17> 본 발명에 사용된 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)는 기내의 무균상태에서 키운 것에서 샘플을 채취하여 RNA 분리에 사용하였다. 본 발명의 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit)의 유전자를 분리하는 과정은 다음과 같다.
- <18> 첫째, 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit) 유전자 조사는 하기와 같이 수행하였다.
- <19> (1) NCBI GenBank를 통해 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit) 유전자의 시퀀스를 수집한다.
- <20> (2) 수집된 유전자 시퀀스 중 채소작물에 속하는 작물들을 우선 대상으로 하여 코딩 지역만을 분리한 뒤 유전자 코딩 지역만을 정렬(alignment)한다.
- <21> (3) 정렬(alignment)한 결과 중 상동성 빈도가 높은 곳을 택하여 프라이머를 작성한다. 상기와 같이 작성된 프라이머 세트는 프라이머 1과 2에 해당한다.
- <22> 둘째, 배추로부터 RNA의 분리는 GibcoBRL회사에서 제공된 트리졸(Trizol) 시약을 사용하여 하기와 같이 수행하였다.
- <23> (1) 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 잎을 액체질소를 이용하여 파쇄 한다.
- <24> (2) 1ml 트리졸(Trizol) 용액을 첨가하고 잘 섞은 후 5분 동안 상온에 둔다.
- <25> (3) 그것에 200 μ l의 클로로포름(chloroform)을 넣고 섞은 다음 다시 4℃에서 13,000rpm으로 10분 동안 원심분리한 뒤 그 혼합액의 상등액을 새 튜브로 옮긴다.
- <26> (4) 이소프로페놀 (isopropanol)을 500 μ l를 넣고 13,000rpm으로 15분간 원심 분리하여 침전시킨다.
- <27> (5) 그 후, 이소프로페놀을 제거하고 침전물을 75% 에탄올로 세척한 다음, 에탄올이 없도록 잘 건조시킨 후 DEPC 처리된 멸균 증류수에 녹여 사용한다.
- <28> 셋째, E.Coli DH5 α 의 형질전환은 하기와 같이 수행하였다.
- <29> (1) 대장균 DH5 α 를 LB 50ml에 접종시켜 37℃에서 OD570= 0.375~0.400이 되도록 배양한다.
- <30> (2) 균주배양액을 3000rpm에서 10분간 원심분리하고 얻어진 침전물은 0.1M CaCl₂ 용액으로 풀어준 후 30분간 얼음에 둔다.
- <31> (3) 3000rpm에서 7분간 원심분리한 후 0.1M CaCl₂에 침전물을 녹인다.
- <32> (4) 재조합 플라스미드를 함께 섞어 얼음에 30분간 두었다가 42℃에서 90초간 열 충격을 준다.
- <33> (5) 10분간 얼음에 두었다가 LB 배지 700 μ l를 첨가하여 37℃에서 1시간 진탕배양한다.
- <34> (6) 배양액을 12000rpm으로 수초간 원심분리한 후 100 μ l만 남기고 상등액을 제거하였으며 그 상등액으로 침전물을 녹인다.
- <35> (7) 엠페실린(Ampicillin) (50mg/L), X-gal (200mg/L in N-N dimethylformamide) IPTG (200mg/L)가 첨가된 고체 LB 배지에 전개하여 37℃에서 12시간 배양한다.
- <36> (8) 고체배지에서 저항성을 보이며 흰색의 콜로니를 형성하는 형질 전환된 것을 선발하여 배양한다.
- <37> (9) 재조합 플라스미드 DNA를 분리, 정제하여 PCR과 제한 효소처리로 벡터 내 유전자 삽입여부를 확인한다.
- <38> 넷째, 플라스미드 DNA의 분리는 하기와 같이 수행하였다.
- <39> (1) 항생제가 첨가된 LB배지 3ml에 콜로니를 감염시킨 후 37℃에서 12시간 배양한다.

- <40> (2) 콜로니가 진탕배양된 배양액을 4℃에서 12,000rpm으로 10분간 원심분리한다.
- <41> (3) 용액 I(200μl/ml)을 첨가하여 보텍스(vortex)를 수초간 실행한다.
- <42> (4) 용액 II(200μl/ml)를 첨가하여 조심스럽게 섞은 후 실온에서 5분간 방치한다.
- <43> (5) 용액 III(200μl/ml)를 첨가하여 잘 섞은 후 얼음에서 10분간 둔 뒤 12000rpm, 4℃에서 10분간 원심분리 한다.
- <44> (6) 이에서 얻어진 상등액을 취하여 1/10양의 NaOAc를 첨가한 후 2.5배의 100% 에탄올을 첨가하여 -20℃에서 2 시간 침전시킨 후 원심 분리하여 침전물을 70% 에탄올로 세척한 후 멸균 증류수에 녹인 후 사용한다.
- <45> 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 프로테인 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로 달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit)을 코딩하는 유전자를 클로닝 할 수 있는 프라이머 는 프라이머 1과 2로 나타내었다.
- <46> 또한 상기 프라이머를 이용하여 얻어진 배추의 프로테인 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55 킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit)의 유전자를 코딩하는 유전자의 전체 염기서열 은 서열번호 3으로 나타내었으며, 아미노산 서열은 서열번호 4로 나타내었다.

효 과

- <47> 본 발명은 배추로부터 분리해 낸 자가불화합성에 관여하는 프로테인 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit) 유전자의 분리에 관한 것으로, 이를 이용하여 안티센스(anti-sence vector) 및 RNA 간섭(RNA interference) 벡터를 만들어 식물 형질 전환시, 배추의 자가불화합성을 타파하여 자가 화합 배추를 육성 할 수 있으며, 이는 1대 잡종을 유자하기 위한 모본 보존 종자 증식에 경제적으로 유용한 배추를 제공하는 효과가 있어, 식물육종산업상 매우 유용한 발명이라 할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <48> 이하에서는, 본 발명의 구성을 실시예를 들어 더욱 상세히 설명하지만 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니다.
- <49> **실시예 1: 프로테인 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit)의 유전자 효소를 분리하기 위한 프라이머의 작성**
- <50> 프로테인 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit) 유전자의 공통된 부분을 찾기 위하여 기존에 발표되어 있는 작물별 프로테인 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit)의 유 전자를 "National Center for Biotechnology Information(NCBI) Genbank"에서 검색하였다.
- <51> 유전자의 전체 염기서열을 수집하기 위해 엔트레즈 프로그램(Entrez program)을 사용하였다. 검색방법으로는 유전자명을 프로테인 포스파타제 2 에이 효소 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(protein phosphatase 2A 55 kDa B regulatory subunit)을 검색어로 선정하였다.
- <52> 수집된 프로테인 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit) 유전자 가운데, 같은 십자화과 식물인 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 염기서열 을 선발, 염기서열의 상동성을 많이 보이는 부분을 BLAST program으로 찾은 뒤 그 부분을 중심으로 프라이머를 제작하였다. 작성된 프라이머는 하기 표 1과 같다.

표 1

프라이머	프라이머
PP2A F (서열번호 1)	5'-GTT TGT CGA ATC TGG GAA T-3'
PP2A R (서열번호 2)	5'-TTA AGC ATA GTA CAT GTA CAA GCT ATT-3'

- <54> 실시예 2: 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit) 유전자의 분리
- <55> 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit) 유전자의 분리는 확보된 RNA를 주형으로 oligo dT 프라이머(primer)와 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용, cDNA를 합성한 뒤 작성한 프라이머로 PCR하여 분리하였다.
- <56> cDNA합성 프로그램 조건은 1 μ g의 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 마이크로그램을 사용, 작성한 프라이머와 태크 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.
- <57> 각각의 프라이머들로 증폭된 단편들은 그 각각의 염기서열을 분석하기 위해 PCR 산물용 벡터 pGEM-T easy vector에 클로닝하고 삽입된 자리에 근접한 T7, SP6 프라이머를 이용하여 염기서열을 분석하였다.
- <58> 실시예 3: 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit) 유전자의 전체의 확인
- <59> 염기서열 분석용 pGEM-T 이지 벡터(easy vector) 내부에 크로닝 된 PCR 단편의 염기서열 분석은 GenBank BLAST 프로그램을 사용하여 이루어졌다. 그 결과 PP2A F(서열번호 1)와 PP2A R(서열번호 2) 프라이머로 증폭된 1620bp 산물의 염기서열과 아미노산 서열을 분석한 결과, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 및 알팔파(*Medicago sativaa*) 식물의 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit) 유전자와 상동성을 보였으며, 특히 애기장대의 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit) 유전자와는 83%의 높은 상동성을 보였다.
- <60> 즉, RNA를 대상으로 PP2A F와 PP2A R 프라이머를 이용해 RT-PCR을 수행한 결과 배추의 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit) 유전자의 전체 유전자가 증폭된다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 NCBI Conserved Domain program을 이용하여 분리한 유전자에 세린/트레오닌 단백질 포스파타제 2A 레귤러터리 서브유닛 도메인(serine/threonine protein 2A, regulatory subunit domain)이 있는 것을 확인하였으며 E-value가 7e-124로 그 정확도가 높음을 확인하였다.
- <61> 확인된 염기 서열을 바탕으로 시작 코돈(codon)과 종료 코돈을 결정한 후, 그것이 배추로부터 분리된 전체 단백질 포스파타제 2 에이 효소(protein phosphatase 2A)의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛(55 kDa B regulatory subunit) 유전자로 결정, 서열번호 3에 그 염기서열을 제시하고 서열번호 4에 아미노산 서열을 제시하였다.
- 도면의 간단한 설명**
- <62> 도 1a는 각 PP2A F와 PP2A R을 사용한 RT-PCR에 의해 배추로부터 증폭된 단백질 포스파타제 2 에이 효소의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛을 코딩하는 유전자의 단편을 전기영동한 사진이다.
- <63> 도 1b는 각 PP2A F와 PP2A R을 사용한 RT-PCR에 의해 배추로부터 증폭된 단백질 포스파타제 2 에이 효소의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛을 코딩하는 유전자를 pGEM-T easy vector에 넣은 후 정확한 삽입을 확인하기 위해 EcoRI를 처리하여 확인한 사진이다.
- <64> 도 1c는 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 단백질 포스파타제 2 에이 효소의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛을 코딩하는 유전자의 시퀀스를 GenBank BlastX program을 사용하여 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 및 알팔파(*Medicago sativaa*) 시퀀스간에 상동성 비교 결과를 나타낸 도이다.
- <65> 도 1d는 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 단백질 포스파타제 2 에이 효소의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛을 코딩하는 유전자의 시퀀스를 GenBank BlastX program을 사용하여 알팔파(*Medicago sativaa*) 시퀀스간에 상동성 비교 결과를 나타낸 도이다.
- <66> 도 2a는 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 단백질 포스파타제 2 에이 효소의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛을 코딩하는 유전자의 염기서열 및 아미노산 시퀀스 결과를 나타낸 도이다.

<67>

도 2b는 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 프로테인 포스파타제 2 에이 효소의 55킬로달톤 비 레귤러터리 서브유닛을 코딩하는 유전자를 NCBI Conserved Domain program을 이용하여 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도면

도면1a



도면1b



도면1c

```
> [ref|NP_974003.1|] [UG] ATB ALPHA (protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B
alpha isoform); nucleotide binding [Arabidopsis thaliana]
gb|AA050878.1|AC025294.1 [G] 55 kDa B regulatory subunit of phosphatase 2A [Arabidopsis thaliana]
Length=512

GENE ID: 391594 ATB ALPHA | ATB ALPHA (protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory
subunit B alpha isoform); nucleotide binding [Arabidopsis thaliana]
(10 or fewer PubMed links)

Score = 840 bits (2171), Expect = 0.0
Identities = 491/515 (95%), Positives = 494/515 (96%), Gaps = 24/515 (4%)
Frame = +2

Query 107 MNGDDKEIVAAHSVDPSPLEWRFQVFGERSAGEEVQEVVDVIAIEFDHSGDHLATGDRG 286
Sbjct 1 MNGDDE-VVAAADPFLPLEWRFQVFGERSAGEEVQEVVDIISAIETDHSGLHLATGDRG 59

Query 287 GRVVLFRSHVNRSSGGARRDLKOTDHLRHEEFYKTEFQSHDPEFDYLSLEIEEKIN 466
Sbjct 60 GRVVLFR+ NSSG RR+LE+ D+PLRHEEFYKTEFQSHDPEFDYLSLEIEEKIN
GRVVLFRITDINSSG-TRELEADYFLRHEEFYKTEFQSHDPEFDYLSLEIEEKIN 118

Query 467 NIKWCQTANGALFLLSTINDKTIKWKVQDKIKHVCVNSDPKFP---GAVASSGMPT-- 631
Sbjct 119 NIKWCQTANGALFLLSTINDKTIKWKVQDKIKHVCVNSDPKFP---GAVASSGMPT-- 179

Query 632 -ACLNGGVPEA-----ISSLRFLPLVTSHESSPVACRRVYSHADYHINS 766
Sbjct 179 N9CLVNGGVSEVNN3LNDDESLEAGGISSLRFLPLVTSHESSPVACRRVYSHADYHINS 239

Query 767 ISNNSDGETFISADDLAINLNWLEISNQSFNIVDVKPEFMDLSEVITSAEFHTHCNML 946
Sbjct 239 ISNNSDGETFISADDLAINLNWLEISNQSFNIVDVKPEFMDLSEVITSAEFHTHCNML 299

Query 947 AYSSSKSGSIRLIDLRQALCDHSHKLFEEFPAAGSR3SFFTEIIASVDIKFAKEGRYLLS 1126
Sbjct 299 AYSSSKSGSIRLIDLRQALCDHSHKLFEEFPAAGSR3SFFTEIIASVDIKFAKEGRYLLS 358

Query 1127 RDVMTLKLWDINDMDSGPVSTFQVHEYLKPKLCDLYENDSIFDKFECCISGNGLRAATGSY 1306
Sbjct 359 RDVMTLKLWDINDMDSGPVATFQVHEYLKPKLCDLYENDSIFDKFECCISGNGLRAATGSY 418

Query 1307 SYNMFVFGVSPGSTESATLEASRN-pmxxhvpvpspsrLGSIRVVGSGSESAGGVDS 1488
Sbjct 419 SYNMFVFGVAPGSTETATLEASRNPMRRHVPIPSRPSALSSITRVVSRGSESP-GVDGN 477

Query 1488 SNALDYTKLLHLAWHPNENSIAACAGNSLYMYA 1588
Sbjct 478 TNALDYTKLLHLAWHPNENSIACAANSLYMYA 512
```

도면1d

```
> [gb|AA025595.1|AF196285.1 Ser/Thr specific protein phosphatase 2A B regulatory subunit
alpha isoform [Medicago sativa subsp. x varia]
Length=515

Score = 728 bits (1878), Expect = 0.0
Identities = 381/518 (73%), Positives = 437/518 (84%), Gaps = 27/518 (5%)
Frame = +2

Query 107 MNGDDKEIVAAHSVDPSPLEWRFQVFGERSAGEEVQEVVDVIAIEFDHSGDHLATGDRG 286
Sbjct 1 MNG DE +VA +P PLEW+FSQVFGER+AGEEVQEVVD+ISAIEFD 8GDHLATGDRG
MNGGDEVVVAPE-EVQGLEWRFQVFGERAAGEEVQEVVDIISAIIEFDHSGDHLATGDRG 59

Query 287 GRVVLFRSHVNRSSGGARRDLKOTDHLRHEEFYKTEFQSHDPEFDYLSLEIEEKI 466
Sbjct 60 GRVVLFR+ ** G+R DLE D+ +RHEEFYKTEFQSH+PEFDYLSLEIEEKI
GRVVLFRITDSNDQHS-SRSDLERHDVSVNRHPEFRVTEFQSHPEFDYLSLEIEEKI 118

Query 464 NIKWCQTANGALFLLSTINDKTIKWKVQDKIKHVCVNSDPKFP---GAVASSGMPTA 634
Sbjct 119 NIKWCQTANGA+LLSTINDKTIKWKVQDKIKHVCVNSDPKFP---GAVASSGMPTA 178

Query 632 C---LNGGV-----PEATISLRFLPLVTSHESSPVACRRVYSHADYHI 760
Sbjct 179 SRPHLANGGPSDKSYSTLNDTSFPQGLPSLKLPSVVSRETSLLACRRVYSHADYHI 239

Query 761 NSISNNSDGETFISADDLAINLNWLEISNQSFNIVDVKPEFMDLSEVITSAEFHTHCN 940
Sbjct 239 NSISNNSDGETFISADDLAINLNWLEISNQSFNIVDVKPEFMDLSEVITSAEFHTHCN 299

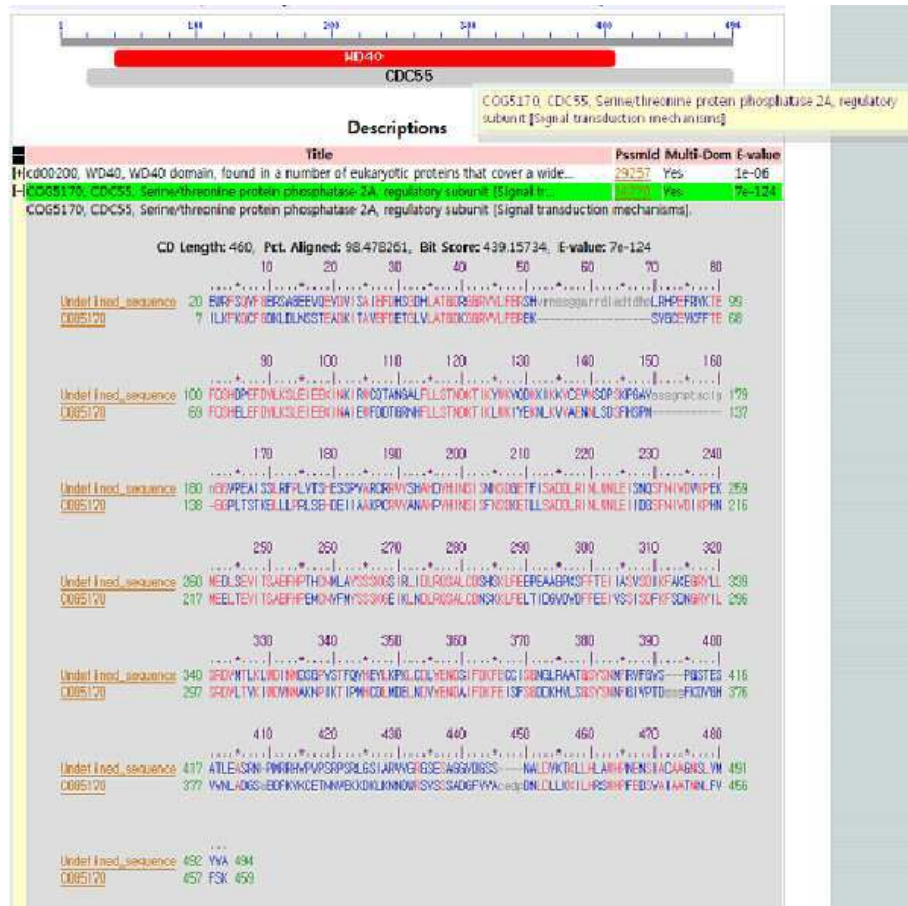
Query 941 MLAYSSSKSGSIRLIDLRQALCDHSHKLFEEFPAAGSR3SFFTEIIASVDIKFAKEGRYL 1120
Sbjct 299 TLAYSSSKSGSIRLVDLRQALCDHSHKLFEEFPAAGSR3SFFTEIIASVDIKFAKEGRYL 358

Query 1121 LSRDVTMLKLWDINDMDSGPVSTFQVHEYLKPKLCDLYENDSIFDKFECCISGNGLRAATG 1300
Sbjct 359 LSRDVTMLKLWDINDMDSGPV+T+VHE+L+P+LCDLYENDSIFDKFECC+SG+G R +TG
LSRDVTMLKLWDINDMDSGPVATRVHEHLRPLCLDLYENDSIFDKFECCISGDSRVSTG 418

Query 1301 SYNMFVFGVSPGSTESATLEASRNpmxxhvpvpspsrLGSIRVVGSGSESAGGV 1474
Sbjct 419 SYNMFVFGVAPGSTETATLEASRNPMRRHVPIPSRPSALSSITRVVSRGSESP-SV 477

Query 1478 DGSNALDYTKLLHLAWHPNENSIAACAGNSLYMYA 1588
Sbjct 478 DANGNSFDFTTKLLHLAWHPNENSIACAANSLYMYA 515
```


도면2b



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation of KyungHee University
- <120> A gene for coding B regulatory subunit of protein phosphatase 2A coding gene involved in self-incompatibility of Brassica ssp. pekinensis
- <160> 2
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 1593
- <212> DNA
- <213> Brassica campestris ssp. pekinensis

<400> 1
TGTGGTTCGA ATCTGGAAT CATCTCAGAC TCTCTCTCC TCTCCTTC CTGAACTCA

ATCGTAATTG ATTTTCTAG CCGCCCTGA TCGTCGGAGA GAGGGGATGA ACGGTGACGA	120
TGAGGAGATC GTCGCAGCTT CGGTAGATCC ATCTCTGCCT CTGGAATGGA GATTCTCTCA	180
GGTCTTCGGT GAACGCAGCG CTGGTGAAGA AGTTCAAGAA GTTGATGTGA TTTCAGCAAT	240
CGAGTTTGAT CATTCCGGCG ACCATCTTGC TACTGGGGAC CGTGGAGGAC GTGTTGTTCT	300
TTTCGAGAGG AGCCATGTCA GAAACAGCAG TGGAGGAGCT AGAAGGGATC TTGAAGACAC	360
TGATCACCCA CTGAGGCATC CGGAGTTTCG TTATAAAACA GAGTTTCAGA GTCATGACCC	420
TGAGTTTGAT TATCTCAAGA GTTTGGAGAT AGAGGAGAAG ATAAACAAAA TTAGATGGTG	480
TCAAACAGCC AATGGCGCTC TTTTCTCCT GTCGACAAAC GATAAAACCA TCAAGTATTG	540
GAAGGTCAA GACAAGAAGA TCAAGAAAGT TTGTGAAGTA AATTCAGATC CTCAAAACC	600
TGGAGCGGTC GCAAGCTCTG GCAATCCAAC CGCTTGCCTT GGGAACGGAG GAGTACCTGA	660
AGCCATCTCA TCGCTGCGGT TCCCACTGGT AACTAGCCAT GAGTCGAGCC CTGTGGCTAG	720
ATGTGAAGA GTCTATTCTC ATGCTCATGA CTATCACATC AATCCATCT CAAATAATAG	780
TGACGGAGAA ACATTTATTT CGGCTGATGA TTTGCGAATA AATCTTTGGA ATCTGGAGAT	840
TAGCAATCAA AGTTTCAATA TTGTTGATGT TAAGCCTGAG AAAATGGAAG ATCTATCTGA	900
GGTTATCACA TCAGCAGAGT TTCATCCTAC ACATTGCAAT ATGTTAGCTT ATAGCAGTTC	960
CAAAGGCTCA ATTCGCCTGA TTGATCTGCG CCAATCAGCT TTATGTGACT CACATTCCAA	1020
ATTGTTTGAG GAACCAGAGG CAGCAGGTCC TAAGTCGTTT TTTACTGAGA TAATTGCTTC	1080
AGTGTGAGAC ATCAAATTTG CAAAAGAGGG AAGATATCTC CTTAGCCGTG ACTACATGAC	1140
ACTCAAGTTA TGGGACATCA ACATGGATTC AGGTCCGGTG TCAACTTTCC AGGTTTCATGA	1200
GTATCTGAAA CCGAAGCTCT GTGATTTATA TGAAAATGAT TCTATCTTTG ACAAGTTCGA	1260

GTGTTGTATA AGTGGAATG GATTGCGAGC AGCTACAGGT TCTTACAGCA ATATGTTCCG 1320

TGTGTTTGGT GTTCCCCGG GAAGTACTGA GTCTGCAACC TTAGAAGCAA GCAGAAATCC 1380

TATGAGGAGA CATGTCCCAG TTCCCTCGAG GCCATCCAGA CTAGGCAGTA TAGCGCGTGT 1440

TGTAGGTAGA GGATCAGAGA GTGCAGGAGG AGTCGATGGG AGTAGCAATG CTCTTGATTA 1500

CAAAACAAAG TTGCTGCATC TTGCTTGCCA TCCAAATGAG AACTCTATTG CTGTGCCGC 1560

TGGAATAGC TTGTACATGT ACTATGCTTA AAA 1593

<210> 2
 <211> 494
 <212> PRT
 <213> Brassica rapa ssp. pekinensis

<400> 2
 Met Asn Gly Asp Asp Glu Glu Ile Val Ala Ala Ser Val Asp Pro Ser
 1 5 10 15

Leu Pro Leu Glu Trp Arg Phe Ser Gln Val Phe Gly Glu Arg Ser Ala
 20 25 30

Gly Glu Glu Val Gln Glu Val Asp Val Ile Ser Ala Ile Glu Phe Asp
 35 40 45

His Ser Gly Asp His Leu Ala Thr Gly Asp Arg Gly Gly Arg Val Val
 50 55 60

Leu Phe Glu Arg Ser His Val Arg Asn Ser Ser Gly Gly Ala Arg Arg
 65 70 75 80

Asp Leu Glu Asp Thr Asp His Pro Leu Arg His Pro Glu Phe Arg Tyr
 85 90 95

Lys Thr Glu Phe Gln Ser His Asp Pro Glu Phe Asp Tyr Leu Lys Ser
 100 105 110

Leu Glu Ile Glu Glu Lys Ile Asn Lys Ile Arg Trp Cys Gln Thr Ala

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

Met Asp Ser Gly Pro Val Ser Thr Phe Gln Val His Glu Tyr Leu Lys
355 360 365

Pro Lys Leu Cys Asp Leu Tyr Glu Asn Asp Ser Ile Phe Asp Lys Phe
370 375 380

Glu Cys Cys Ile Ser Gly Asn Gly Leu Arg Ala Ala Thr Gly Ser Tyr
385 390 395 400

Ser Asn Met Phe Arg Val Phe Gly Val Ser Pro Gly Ser Thr Glu Ser
405 410 415

Ala Thr Leu Glu Ala Ser Arg Asn Pro Met Arg Arg His Val Pro Val
420 425 430

Pro Ser Arg Pro Ser Arg Leu Gly Ser Ile Ala Arg Val Val Gly Arg
435 440 445

Gly Ser Glu Ser Ala Gly Gly Val Asp Gly Ser Ser Asn Ala Leu Asp
450 455 460

Tyr Lys Thr Lys Leu Leu His Leu Ala Trp His Pro Asn Glu Asn Ser
465 470 475 480

Ile Ala Cys Ala Ala Gly Asn Ser Leu Tyr Met Tyr Tyr Ala
485 490