



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0006485  
(43) 공개일자 2022년01월17일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/82 (2006.01) C12N 15/10 (2017.01)  
C12N 15/63 (2006.01) C12N 9/22 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C12N 15/8218 (2013.01)  
C12N 15/102 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-0089814  
(22) 출원일자 2021년07월08일  
심사청구일자 2021년07월08일
- (30) 우선권주장  
1020200084306 2020년07월08일 대한민국(KR)

- (71) 출원인  
한국생명공학연구원  
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
경상국립대학교산학협력단  
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
- (72) 발명자  
김재연  
경상남도 진주시 진주역로73번길 33, 104동 1401호(가좌동, 센트럴헬가)
- 부반티엔  
경상남도 진주시 진주대로 501(가좌동)  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
최규환

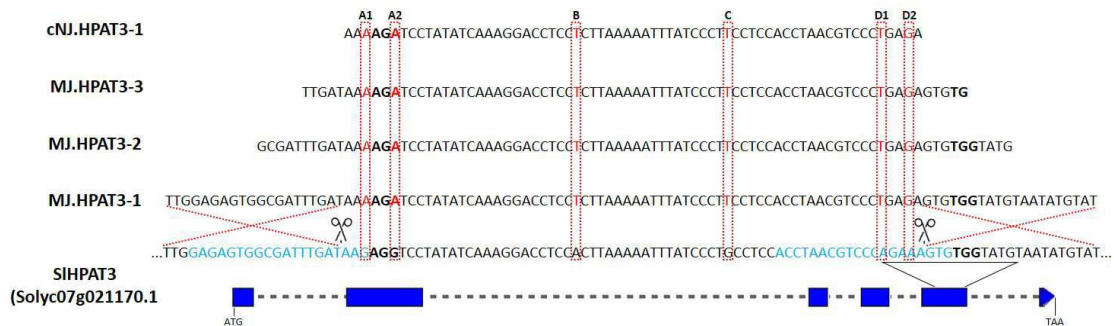
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 미세상동성 기반 말단 결합을 통한 유전자 교정에 이용되는 공여자 핵산 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 미세상동성 기반 말단 결합을 통한 유전자 교정에 이용되는 공여자 핵산 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따른 공여자 핵산을 이용하면 표적 유전자의 위치 및 염기 수에 제한 없이 정밀한 유전자 편집이 가능하므로, 신육종 작물의 개발 뿐만 아니라 SNP의 도입이나 제거 및 짧은 아미노산 치환을 통한 단백질 엔지니어링 분야에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**C12N 15/63** (2013.01)

**C12N 9/22** (2013.01)

**C12N 2310/20** (2017.05)

(72) 발명자

**송영중**

경상남도 진주시 진주대로 501(가좌동)

**트란티밀**

경상남도 진주시 진주대로 501(가좌동)

**김지혜**

경상남도 진주시 진주대로 501(가좌동)

**성연우**

경상남도 진주시 진주대로 501(가좌동)

**다스스왈티**

경상남도 진주시 진주대로 501(가좌동)

**도안 티 하이 드영**

경상남도 진주시 진주대로 501(가좌동)

**정재철**

대전광역시 유성구 과학로 125

**김차영**

대전광역시 유성구 과학로 125

**임가현**

대전광역시 유성구 과학로 125

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395067909  
 과제번호 PJ014784012021  
 부처명 농촌진흥청  
 과제관리(전문)기관명 농촌진흥청  
 연구사업명 차세대농작물신육종기술개발  
 연구과제명 유전자 특위적인 무작위 돌연변이 차세대 유전자교정 신기술 개발  
 기 여 율 15/100  
 과제수행기관명 경상대학교  
 연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711131364  
 과제번호 2020M3A9I4038352  
 부처명 과학기술정보통신부  
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단  
 연구사업명 바이오·의료기술개발  
 연구과제명 유전자교정 도구 전달 효율증진 및 상동성수선(HDR) 기반 범용성 식물 유전체교정

활용 원천기술 개발

기 여 율 37.5/100  
 과제수행기관명 경상대학교  
 연구기간 2020.06.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345331349  
 과제번호 2020R1A6A1A03044344  
 부처명 교육부  
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단  
 연구사업명 이공학학술연구기반구축  
 연구과제명 식물생명공학연구소  
 기 여 율 7.5/100  
 과제수행기관명 경상대학교  
 연구기간 2020.06.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345331759  
 과제번호 2020R1I1A1A01072130  
 부처명 교육부  
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단  
 연구사업명 이공학학술연구기반구축  
 연구과제명 유전자가위 기반 SHyPRP1 domain 삭제를 통한 다중스트레스 저항성 토마토 개발  
 기 여 율 7.5/100  
 과제수행기관명 경상대학교  
 연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711137640  
 과제번호 2021R1A5A8029490  
 부처명 과학기술정보통신부

---

|                    |                                                  |
|--------------------|--------------------------------------------------|
| 과제관리(전문)기관명        | 한국연구재단                                           |
| 연구사업명              | 집단연구지원                                           |
| 연구과제명              | 항노화 바이오소재 세포공장 지역혁신연구센터                          |
| 기 여 율              | 7.5/100                                          |
| 과제수행기관명            | 경상국립대학교                                          |
| 연구기간               | 2021.06.01 ~ 2022.02.28                          |
| 이 발명을 지원한 국가연구개발사업 |                                                  |
| 과제고유번호             | 1711119754                                       |
| 과제번호               | 2020M3A9I4038354                                 |
| 부처명                | 과학기술정보통신부                                        |
| 과제관리(전문)기관명        | 한국연구재단                                           |
| 연구사업명              | 바이오·의료기술개발                                       |
| 연구과제명              | 작물 원형질체기반 나노소자-유전자가위 전달시스템을 이용한 HDR/PE-GE 기술 및 작 |
| 물개발                |                                                  |
| 기 여 율              | 25/100                                           |
| 과제수행기관명            | 한국생명공학연구원                                        |
| 연구기간               | 2021.03.01 ~ 2021.12.31                          |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

미세상동성-기반 말단 결합(microhomology-mediated end joining, MMEJ)을 통한 유전자 교정에 이용되는 공여자(donor) 핵산으로서, 5'-말단 표적 부위 미세상동성 서열, 교체하고자 하는 목적 유전자 서열 및 3'-말단 표적 부위 미세상동성 서열을 포함하며, 상기 5'-말단 및/또는 3'-말단 표적 부위 미세상동성 서열에는 변경된 PAM(Protospacer adjacent motif) 서열 또는 변경된 gRNA 씨드 서열(seed sequence)을 포함하는 것을 특징으로 하는, 공여자(donor) 핵산.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 5'-말단 또는 3'-말단 표적 부위 미세상동성 서열은 하나 이상의 변형된 염기(Base)를 포함하는 것을 특징으로 하는, 공여자(donor) 핵산.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 염기(Base)의 변형은 메틸화(methylation), 할로젠화(halogenation), 아세틸화(acetylation), 인산화(phosphorylation), 포스포로티오에이트 연결(phosphorothioate linkage), LNA(locked nucleic acid), MS(2'-O-methyl phosphorothioate) 또는 MSP(2'-O-methyl plus 3'thiopACE)인 것을 특징으로 하는, 공여자(donor) 핵산.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 5'-말단 또는 3'-말단 표적 부위 미세상동성 서열은 각각 5개 이상 24개 이하의 올리고뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는, 공여자(donor) 핵산.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 변경된 PAM(Protospacer adjacent motif) 서열은 5'-nHG-3', 5'-nGH-3', 5'-nHH-3', 5'-nH-3', 5'-nY-3', 5'-nHRR-3', 5'-DCn-3', 5'-CDn-3', 5'-DDn-3', 5'-Dn-3', 5'-Rn-3' 또는 5'-YYDn-3'을 포함하며, 여기서 n은 염기 A, G, T 또는 C이고, H는 염기 A, C 또는 T이고, D는 염기 A, G 또는 T이고, Y는 염기 C 또는 T이고, R은 염기 A 또는 G인 것; 또는 PAM 서열의 변경을 원하지 않는 경우 Cas 단백질에 의한 공여자 핵산의 절단을 방지하기 위해 PAM 서열로부터 13 뉴클레오티드 이내의 gRNA 씨드 서열(seed sequence)에서 1개 이상의 SNP가 추가된 것을 특징으로 하는, 공여자(donor) 핵산.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 공여자(donor) 핵산이 작동 가능하게 연결된, 벡터.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 바이러스 벡터 또는 PCR 앰플리콘인 것을 특징으로 하는, 벡터.

#### 청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 공여자(donor) 핵산, CRISPR/Cas 단백질 및 가이드 RNA를 포함하는, 유전자 가위(CRISPR/Cas) 시스템.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 CRISPR/Cas 단백질은 SpCas9, xCas9, SpG Cas9, NG Cas9, SpRY SpCas9 또는 SaCas9인 것을 특징으로 하는, 유전자가위(CRISPR/Cas) 시스템.

#### 청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 공여자(donor) 핵산을 이용하여 세포 내의 표적 유전자를 상기 공여자 핵산 내의 표적 유전자 절편으로 교체하는 단계를 포함하는, 유전자 편집 방법.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 상기 세포는 박테리아, 효모, 식물 세포 또는 동물 세포인 것을 특징으로 하는, 유전자 편집 방법.

#### 청구항 12

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 공여자(donor) 핵산을 포함하는, 유전자 편집용 조성물.

#### 청구항 13

제12항에 있어서, 상기 조성물은 CRISPR/Cas 단백질 및 가이드 RNA를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 유전자 편집용 조성물.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 미세상동성 기반 말단 결합을 통한 유전자 교정에 이용되는 공여자(Donor) 핵산에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 미세상동성 서열, 변경된 PAM 서열 및 목적 유전자 절편을 포함하는 공여자(Donor) 핵산 및 이를 포함하는 유전자가위 시스템, 상기 공여자 핵산 및 유전자가위 시스템을 이용한 유전자 편집 방법과 이를 위한 조성물에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0003] 비상동 말단 결합(canonical non-homologous end-joining, cNHEJ) 및 미세상동성 기반 말단 결합(microhomology-mediated end joining, MMEJ) 경로는 CRISPR/Cas9 기반의 정밀 유전체 편집에 관여한다고 알려져 있다. cNHEJ는 상동성을 가지는 서열을 주형으로 이용하는 것이 아니라 절단된 DNA 말단이 DNA-PKcs(DNA dependent protein kinase)와 Ku 단백질의 복합체에 의하여 그대로 연결되는 경로인 반면, MMEJ 경로는 미세상동성(microhomology) 서열을 주형으로 이용하여 절단된 DNA 말단이 Ku 단백질 비의존적으로 연결되는 경로이다. 최근, 유전자의 삽입 또는 대체를 위하여 cNHEJ 경로 및 상동 재조합(homologous recombination, HR)을 이용하는 방법에 관한 연구가 보고된 바 있다. 그러나, cNHEJ 경로에 의한 방법은 DNA의 양 말단에서 error-prone repair(주로 indel 변이 추가)가 일어나는 것이 주된 경로로 이러한 indel로 인해 정밀한 유전자 삽입 및 대체의 확률이 매우 낮다는 단점이 있으며, 상동 재조합에 의한 방법은 고등식물에서 매우 낮은 확률로 작동한다는 단점이 있다. 따라서, 본 발명은 식물세포에서 MMEJ 경로에 의한 방법으로 정밀한 DNA의 절편 삽입 또는 대체를 유도하고, 높은 편집 효율을 위한 최적의 조건을 확립하고자 하였다.

[0004] 또한, 두 개의 가이드 RNA 및 Cas9 단백질을 사용하여 원하는 표적 부위를 절단하고, 교정하고자 하는 부위의 양 말단과 미세상동성 서열을 가지는 공여자 핵산을 주입함으로써, 원하는 서열을 가지는 DNA 절편으로 대체하는 정밀 편집 방법을 개발하고자 하였다.

[0005] 한편, 한국등록특허 제2207728호에는 '올리고뉴클레오타이드 매개 유전자 보수를 사용한 표적화된 유전자 변형의 효율을 증가시키기 위한 방법 및 조성물'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제2002443호에는 '식물체에서 상동 재조합 기반의 유전자 편집 효율을 증가시키는 방법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 '미세상동성 기반 말단 결합을 통한 유전자 교정에 이용되는 공여자 핵산 및 이의 용도'에 대해서는 기재된 바가 없다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 식물체에서 정밀한 유전자 편집 효율을 증가시키기 위해서, 미세상동성 서열 및 변경된 PAM 서열을 포함하는 공여자 핵산을 디자인하였고, 이를 이용하여 유전자 편집 효율을 분석한 결과, 미세상동성 서열을 포함하지 않는 공여자 핵산을 이용했을 때보다 편집 효율이 증가하는 것을 확인하였으며, 상기 미세상동성 서열을 포함하는 공여자 핵산의 처리 농도, 길이 또는 NHEJ 저해제 처리에 따라 편집 효율이 달라질 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

### 과제의 해결 수단

- [0009] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 미세상동성-기반 말단 결합(microhomology-mediated end joining, MMEJ)을 통한 유전자 교정에 이용되는 공여자(donor) 핵산으로서, 5'-말단 표적 부위 미세상동성 서열, 교체하고자 하는 목적 유전자 서열 및 3'-말단 표적 부위 미세상동성 서열을 포함하며, 상기 5'-말단 및/또는 3'-말단 표적 부위 미세상동성 서열에는 변경된 PAM(Protospacer adjacent motif) 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 공여자(donor) 핵산을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 공여자(donor) 핵산이 작동가능하게 연결된, 벡터를 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 공여자(donor) 핵산, CRISPR/Cas 단백질 및 가이드 RNA를 포함하는, 유전자가위(CRISPR/Cas) 시스템을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 공여자(donor) 핵산을 이용하여 표적 유전자를 상기 공여자 핵산 내의 목적 유전자 절편으로 교체하는 단계를 포함하는, 유전자 편집 방법을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 공여자(donor) 핵산을 포함하는, 유전자 편집용 조성물을 제공한다.

### 발명의 효과

- [0015] 본 발명에 따른 미세상동성 기반 말단 결합을 통한 유전자 교정에 이용되는 공여자 핵산을 이용하면 표적 유전자의 위치 및 염기 수에 제한 없이 정밀한 유전자 편집이 가능하므로, 신육종 작물의 개발 뿐만 아니라 SNP의 도입이나 제거 및 짧은 아미노산 치환을 통한 단백질 엔지니어링 분야에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

### 도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 토마토 유래의 *SIHPAT3* 유전자에서 6개(A1, A2, B, C, D1, D2)의 SNP를 포함하는 cNHEJ 기반 유전체 교정을 위한 공여자 핵산(cNJ.HPAT3-1) 및 MMEJ 기반 유전체 교정을 위한 공여자 핵산(MJ.HPAT3-1, MJ.HPAT3-2 및 MJ.HPAT3-3)의 서열을 보여주는 그림이다. *SIHPAT3* 유전자 서열에서 하늘색 서열은 가이드 RNA를 의미하고, 진하게 표시된 서열은 PAM 서열을 의미한다.
- 도 2는 공여자 핵산의 처리 농도에 따른 편집 빈도를 분석한 결과이다.
- 도 3은 공여자 핵산의 길이에 따른 편집 효율을 분석한 결과이다.
- 도 4는 양배추 유래의 *BoTT1*, *BoOr* 및 *BoALS1* 유전자에서 MMEJ 기반 유전체 교정을 위한 공여자 핵산(MJ.BoTT1, MJ.BoOr 및 MJ.BoALS1)의 서열을 보여주는 그림이다. *BoTT1*, *BoOr* 및 *BoALS1* 유전자 서열에서 하늘색 서열은 가이드 RNA를 의미하고, 진하게 표시된 서열은 PAM 서열을 의미하며, 빨간색 점선 박스는 단일 아미노산 치환을 위한 염기 서열을 의미한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 미세상동성-기반 말단 결합(microhomology-mediated end joining, MMEJ)을 통한 유전자 교정에 이용되는 공여자(donor) 핵산으로서, 5'-말단 표적 부위 미세상동성 서열, 교체하고자 하는 목적 유전자 서열 및 3'-말단 표적 부위 미세상동성 서열을 포함하며, 상기 5'-말단 및/또는 3'-말단 표적 부위 미세상동성 서열에는 변경된 PAM(Protospacer adjacent motif) 서열을 포함하는 것을

특징으로 하는, 공여자(donor) 핵산을 제공한다.

- [0019] 본 명세서에서 용어 "유전체/유전자 교정(genome/gene editing)"은, 인간 세포를 비롯한 동·식물세포의 유전체 염기서열에 표적지향형 변이를 도입할 수 있는 기술로서, DNA 절단에 의한 하나 이상의 핵산 분자의 결실(deletion), 삽입(insertion), 치환(substitution), 교체(replacement) 등에 의하여 특정 유전자를 녹-아웃(knock-out) 또는 녹-인(knock-in)하거나, 단백질을 생성하지 않는 비-코딩(non-coding) DNA 서열에도 변이를 도입할 수 있는 기술을 말한다.
- [0020] 본 발명의 목적상 상기 유전체 교정은 특히 엔도뉴클레아제(endonuclease) 예컨대, Cas9(CRISPR associated protein 9) 단백질 및 가이드 RNA를 이용하여 식물체에 변이를 도입하는 것일 수 있다. 또한, 용어 '유전자 교정'은 '유전자 편집'과 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0021] 또한, 용어 "표적 유전자"는 본 발명을 통해 교정하고자 하는 식물체의 유전체 내에 있는 일부 DNA를 의미하며, 그 유전자의 종류에 제한되지 않으며, 코딩 영역 및 비-코딩 영역을 모두 포함할 수 있다. 당업자는 그 표적에 따라, 제조하고자 하는 유전체 교정 식물체에 대하여 원하는 변이에 따라 상기 표적 유전자를 선별할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 공여자(donor) 핵산에 있어서, 상기 5'-말단 또는 3'-말단 표적 부위 미세상동성 서열은 하나 이상의 변형된 염기(Base)를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0024] 상기 염기(Base)의 변형은 메틸화(methylation), 할로젠화(halogenation), 아세틸화(acetylation), 인산화(phosphorylation), 포스포로티오에이트 연결(phosphorothioate linkage), LNA(locked nucleic acid), MS(2'-O-methyl phosphorothioate) 또는 MSP(2'-O-methyl plus 3'thioPACE)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 또한, 본 발명의 공여자 핵산에 있어서, 상기 5'-말단 또는 3'-말단 표적 부위 미세상동성 서열은 바람직하게는 각각 5개 이상 24개 이하의 올리고뉴클레오티드일 수 있고, 더욱 바람직하게는 각각 5개 이상 20개 이하의 올리고뉴클레오티드일 수 있고, 더더욱 바람직하게는 각각 11개 이상 20개 이하의 올리고뉴클레오티드일 수 있으며, 가장 바람직하게는 각각 20개의 올리고뉴클레오티드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 또한, 본 발명의 공여자 핵산에 있어서, 상기 변경된 PAM 서열은 5'-nHG-3', 5'-nGH-3, 5'-nH-3', 5'-nY-3', 5'-nHRR-3', 5'-DCn-3', 5'-CDn-3', 5'-Dn-3', 5'-Rn-3' 또는 5'-YYDn-3'을 포함하며, 여기서 n은 염기 A, G, T 또는 C이고, H는 염기 A, C 또는 T이고, D는 염기 A, G 또는 T이고, Y는 염기 C 또는 T이고, R은 염기 A 또는 G인 것일 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명의 공여자 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥인 것일 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명은 상기 공여자(donor) 핵산이 작동 가능하게 연결된, 벡터 또는 리보뉴클레오타단백질(Ribonucleoprotein, RNP)을 제공한다.
- [0030] 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 바이러스 벡터 또는 PCR 앰플리콘일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 또한, 본 발명은 상기 공여자(donor) 핵산, CRISPR/Cas 단백질 및 가이드 RNA를 포함하는, 유전자가위(CRISPR/Cas) 시스템을 제공한다.
- [0033] 본 명세서에서 용어 "가이드 RNA(guide RNA)"는 짧은 단일 가닥의 RNA로, 표적 유전자를 암호화하는 염기서열 중 표적 DNA에 특이적인 RNA를 포함하며, 표적 DNA 염기서열과 전부 또는 일부가 상보적으로 결합하여 해당 표적 DNA 염기서열로 엔도뉴클레아제 단백질을 이끄는 역할을 하는 리보핵산을 의미한다. 상기 가이드 RNA는 두 개의 RNA, 즉, crRNA(CRISPR RNA) 및 tracrRNA(trans-activating crRNA)를 구성 요소로 포함하는 이중 RNA(dual RNA); 또는 표적 유전자 내 염기서열과 전부 또는 일부 상보적인 서열을 포함하는 제1 부위 및 엔도뉴클레아제(특히, RNA-가이드 뉴클레아제)와 상호작용하는 서열을 포함하는 제2 부위를 포함하는 단일 사슬 가이드 RNA(single guide RNA, sgRNA) 형태를 말하나, 엔도뉴클레아제가 표적 염기서열에서 활성을 가질 수 있는 형태라면 제한없이 본 발명의 범위에 포함될 수 있으며, 함께 사용된 엔도뉴클레아제의 종류 또는 엔도뉴클레아제의 유래 미생물 등을 고려하여 당업계의 공지된 기술에 따라 제조하여 사용할 수 있다.
- [0034] 또한, 상기 가이드 RNA는 플라스미드 주형으로부터 전사된(transcribed) 것, 생체외(*in vitro*)에서 전사된 것

(예컨대, 올리고뉴클레오타이드 이중가닥) 또는 합성한 가이드 RNA 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0035] 또한, 본 발명에 따른 유전자가위(CRISPR/Cas) 시스템에 있어서, 상기 Cas 단백질은 바람직하게는 Cas9 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0036] 또한, 상기 Cas9 단백질은 스트렙토코커스 피요제네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래의 Cas9 단백질, 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*) 또는 스트렙토코커스 아우레우스(*Streptococcus aureus*) 유래의 Cas9 단백질, 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*) 유래의 Cas9 단백질, 파스투렐라 물토시다(*Pasteurella multocida*) 유래의 Cas9 단백질, 프란시셀라 노비시다(*Francisella novicida*) 유래의 Cas9 단백질 등으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. Cas9 단백질 또는 이의 유전자 정보는 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 GenBank와 같은 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있다.
- [0037] Cas9 단백질은 RNA-guided DNA 엔도뉴클레아제 효소로, 이중 가닥 DNA 절단(double stranded DNA break)을 유도한다. Cas9 단백질이 정확하게 표적 DNA의 염기서열에 결합하여 DNA 가닥을 잘라내기 위해서는 PAM(Protospacer Adjacent Motif)이라 알려진 3개의 염기로 이루어진 짧은 염기서열이 표적 DNA의 염기서열 옆에 존재해야 하며, Cas9 단백질은 PAM 서열(NGG)로부터 3번째와 4번째 염기쌍 사이를 추정하여 절단한다.
- [0038] 본 발명의 일 구현 예에 따른 유전자가위(CRISPR/Cas) 시스템에 있어서, 상기 Cas 단백질은 SpCas9, xCas9, SpG Cas9, NG Cas9, SpRY SpCas9 또는 SaCas9일 수 있다.
- [0039] 본 발명에 따른 유전자 가위 시스템에서 SpCas9을 이용할 경우, 공여자 핵산(5'-xxxxxxxxnnnnHGnnnnnn\*...nnnnnnnnDnnnnnyyyyyyy-3', 5'-xxxxxxxxnnnnGHnnnnnn\*...nnnnnnnnCDnnnnnyyyyyyy-3' 또는 5'-xxxxxxxxnnnnHHnnnnnn\*...nnnnnnnnDDnnnnnyyyyyyy-3')은 양 말단에 표적 부위 미세상동성 서열(xxxxxxx 또는 yyyyyyy), 표적 유전자의 교체하고자 하는 목적 유전자 절편 서열(\*...\*) 및 변경된 PAM 서열(nHG, nGH, nHH, DCn, CDn 또는 DDn)을 포함할 수 있다. PAM 서열의 변경을 원하지 않는 경우 Cas 단백질에 의한 공여자 핵산의 절단을 방지하기 위해 PAM 서열로부터 13 뉴클레오타이드 이내의 gRNA 씨드 서열(seed sequence)에서 1개 이상의 SNP를 추가할 수 있다. 상기 H는 염기 A, C 또는 T를 의미하고, 상기 D는 염기 A, G 또는 T를 의미하며, 상기 n은 염기 A, G, C 또는 T를 의미한다.
- [0040] 또한, 본 발명에 따른 유전자 가위 시스템에서 xCas9, SpG Cas9 또는 NG Cas9을 이용할 경우, 공여자 핵산(5'-xxxxxxxxnnnnHnnnnnn\*...nnnnnnnnDnnnnnyyyyyyy-3')은 양 말단에 표적 부위 미세상동성 서열(xxxxxxx 또는 yyyyyyy), 표적 유전자의 교체하고자 하는 목적 유전자 절편 서열(\*...\*) 및 변경된 PAM 서열(nH 또는 Dn)을 포함할 수 있다. PAM 서열의 변경을 원하지 않는 경우 Cas 단백질에 의한 공여자 핵산의 절단을 방지하기 위해 PAM 서열로부터 13 뉴클레오타이드 이내의 gRNA 씨드 서열(seed sequence)에서 1개 이상의 SNP를 추가할 수 있다. 상기 H는 염기 A, C 또는 T를 의미하고, 상기 D는 염기 A, G 또는 T를 의미하며, 상기 n은 염기 A, G, C 또는 T를 의미한다.
- [0041] 본 발명에 따른 유전자 가위 시스템에서 SpRY SpCas9을 이용할 경우, SpRY SpCas9는 nRn PAM 서열뿐만 아니라 더 약한 정도로 nYn을 인식함으로 PAM을 nYn으로 유지하고 PAM으로부터 13 뉴클레오타이드 이내의 gRNA 씨드 서열(seed sequence)에서 1개 이상의 SNP를 추가할 수 있다. 공여자 핵산(5'-xxxxxxxx###nYnnnnnn\*...nnnnnnRn###nyyyyyyy-3')은 양 말단에 표적 부위 미세상동성 서열(xxxxxxx 또는 yyyyyyy), 표적 유전자의 교체하고자 하는 목적 유전자 절편 서열(\*...\*) 및 변경된 PAM 서열(nY 또는 Rn) 및 1-3개의 변경된 gRNA 씨드 서열(###)을 포함할 수 있다. 상기 Y는 염기 C 또는 T를 의미하고, 상기 R은 염기 A 또는 G를 의미하며, 상기 n은 염기 A, G, C 또는 T를 의미한다.
- [0042] 본 발명에 따른 유전자 가위 시스템에서 SaCas9을 이용할 경우, 공여자 핵산(5'-xxxxxxxxnnnnHRRnnnn\*...nnnnnYYDnnnnnyyyyyyy-3')은 양 말단에 표적 부위 미세상동성 서열(xxxxxxx 또는 yyyyyyy), 표적 유전자의 교체하고자 하는 목적 유전자 절편 서열(\*...\*) 및 변경된 PAM 서열(nHRR 또는 YYDn)을 포함할 수 있다. PAM 서열의 변경을 원하지 않는 경우 Cas 단백질에 의한 공여자의 절단을 방지하기 위해 PAM으로부터 13 뉴클레오타이드 이내의 gRNA 씨드 서열(seed sequence)에서 1개 이상의 SNP를 추가할 수 있다. 상기 H는 염기 A, C 또는 T를 의미하고, 상기 R은 염기 A 또는 G를 의미하고, Y는 염기 C 또는 T를 의미하고, 상기 D는 염기 A, G 또는 T를 의미하며, 상기 n은 염기 A, G, C 또는 T를 의미한다.
- [0044] 또한, 본 발명은 상기 공여자(donor) 핵산을 이용하여 표적 유전자를 상기 공여자 핵산 내의 목적 유전자 절편

으로 교체하는 단계를 포함하는, 유전자 편집 방법을 제공한다.

- [0045] 본 발명에서 사용된 유전자 편집 방법은 교정하고자 하는 특정 유전자의 특정 서열과 동일한 서열을 가지는 미세상동성(microhomology)을 이용한 MMEJ(microhomology-mediated end joining) 기반 유전자 편집 방법이다.
- [0046] 본 발명에 따른 공여자 핵산을 이용한 MMEJ 기반 유전자 편집 방법을 이용하면 비상동 말단 결합(canonical non-homologous end-joining, cNHEJ) 기반 유전자 편집 방법을 이용했을 때보다 편집 효율이 증가하는 것이 특징이며, 공여자 핵산의 처리 농도, 길이 및 NHEJ 저해제 처리에 따라 편집 효율이 달라질 수 있다.
- [0047] 또한, 본 발명에 따른 유전자 편집 방법은 박테리아, 효모, 식물 세포 또는 동물 세포에서 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 식물 세포에서 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0048] 본 발명에 따른 유전자 편집 방법에 있어서, 공여자 핵산, 가이드 RNA 및 Cas 단백질을 식물 세포로 도입하는 것은, 공여자 핵산을 암호화하는 DNA, 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA를 암호화하는 DNA 및 Cas 단백질을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 재조합 벡터; 또는 공여자 핵산, 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA와 Cas 단백질의 복합체(ribonucleoprotein);를 이용하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명에 따른 유전자 편집 방법에 있어서, 가이드 RNA와 Cas 단백질의 복합체를 식물 세포에 형질도입하는 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens *et al.*, 1982, Nature 296:72-74; Negrutiu *et al.*, 1987, Plant Mol. Biol. 8:363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito *et al.*, 1985, Bio/Technol. 3:1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway *et al.*, 1986, Mol. Gen. Genet. 202:179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein *et al.*, 1987, Nature 327:70), 아그로박테리움 튜메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) 또는 아그로박테리움 리조젠(*Agrobacterium rhizogens*)에 의해 매개된 유전자 전이에서(비완전성) 박테리아에 의한 감염 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다.
- [0051] 또한, 상기 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA를 암호화하는 DNA 및 Cas 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터를 식물 세포에 도입하는 것은 형질전환 방법을 의미한다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 재조합 벡터를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다.
- [0052] 본 발명에 따른 유전자 편집 방법에 있어서, 표적 염기 서열에 특이적인 가이드 RNA 및 Cas 단백질이 도입되는 "식물 세포"는 어떤 식물 세포도 된다. 식물 세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양 기관 또는 전체 식물이다. "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 떡잎, 하배축, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다. 식물 조직은 인 플란타(in planta)이거나 기관 배양, 조직 배양 또는 세포 배양 상태일 수 있다.
- [0053] 본 발명의 제조방법에 있어서, 유전체가 교정된 식물 세포로부터 유전체가 교정된 식물을 재분화하는 방법은 당 업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다. 유전체가 교정된 식물세포는 전식물로 재분화되어야 한다. 캘러스 또는 원형질체 배양으로부터 성숙한 식물의 재분화를 위한 기술은 수많은 여러 가지 중에 대해서 당업계에 주지되어 있다(Handbook of Plant Cell Culture, 1-5권, 1983-1989 Momillan, N.Y.).
- [0055] 또한, 본 발명은 공여자(donor) 핵산을 포함하는, 유전자 편집용 조성물을 제공한다.
- [0056] 본 발명에 따른 유전자 편집용 조성물은 CRISPR/Cas 단백질 및 가이드 RNA를 더 포함할 수 있으며, 상기 Cas 단백질 및 가이드 RNA는 리보핵산-단백질(ribonucleoprotein) 복합체를 형성하여 RNA 유전자 가위(RNA-Guided Engineered Nuclease, RGEN)로 작동할 수 있다.
- [0057] 본 발명에 따른 유전자 편집용 조성물에서, 상기 CRISPR/Cas 단백질 및 가이드 RNA는 전술한 바와 같다.
- [0059] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0061] 재료 및 방법

[0062] 1. 식물 재료 및 원형질체 분리

[0063] 토마토(*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) 또는 양배추(*Brassica oleracea*)의 종자를 70%(v/v) 에탄올로 멸균한 후, 멸균수로 5회 세척하고 0.4 mg/ℓ 티아민 HCl, 100 mg/ℓ 미오-이노시톨, 30 g/ℓ 수크로스 및 8 g/ℓ 젤라이트, pH 5.7가 첨가된 1/2 MS(Murashige and Skoog) 배지에 치상하여 16시간 명/8시간 암의 광주기, 25℃ (토마토) 또는 23℃(양배추)의 온도 조건으로 배양하였다.

[0064] 원형질체(protoplast) 분리를 위해, 4일령의 토마토 또는 7일령의 양배추 자엽(cotyledon)을 0.5%(v/v) 셀룰라아제, 0.5%(v/v) 펙티나아제, 1%(v/v) 비스코자임, 3 mM MES(2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, pH 5.8) 버퍼 및 9%(w/v) 만니톨이 첨가된 CPW(cell and protoplast washing) 용액에 15분 동안 진공 침투(vacuum infiltration)를 유도한 후, 50 rpm, 25℃ 조건으로 2~4시간 동안 배양하였다. 이후, 8겹 거즈를 이용하여 여과하고 100 g에서 5분 동안 원심분리한 후, 21% 수크로스 밀도 구배 방법을 이용하여 원형질체를 분리하고 W5(2 mM MES pH 5.8, 154 mM NaCl, 125 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl) 용액에 수거하였다. 수거된 원형질체는 W5 용액으로 3회 세척하고 MMG(4 mM MES pH 5.7, 0.4 M 만니톨, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) 용액에 재현탁하고 헤모사이토미터(hemocytometer)를 이용하여 농도를 측정하였다.

[0066] 2. 공여자(donor) 핵산 및 가이드 RNA(gRNA) 준비

[0067] 토마토 식물체에서 신초 분열조직의 형성에 관여하는 당전이효소 유전자인 *SIHPAT3*(*Solanum lycopersicum* Hydroxyproline O-arabinosyltransferase 3)를 표적으로 하는 유전자 교정을 실시하기 위해서 Sol Genomics network database로부터 *SIHPAT3*(Solyc07g021170.1) 유전자 서열을 얻었다. 이후, CRISPR-P 2.0 프로그램을 이용하여 가이드 RNA(guide RNA, gRNA)를 디자인하고(표 1), GeneArt Precision gRNA Synthesis Kit(Invitrogen)를 이용하여 가이드 RNA를 합성하였다. cNHEJ 경로를 위한 공여자 핵산(cNJ.HPAT3-1) 및 MMEJ 경로를 위한 공여자 핵산(MJ.HPAT3-1, MJ.HPAT3-2 및 MJ.HPAT3-3)을 하기 표 1의 프라이머를 이용한 PCR을 통해 준비하였다. cNJ.HPAT3-1의 5'-말단은 포스포다이에스터(phosphodiester) 결합을 가지도록 제조하였다. PCR 증폭산물은 안정성을 증가시키기 위하여 5' 말단에 인산화된 포스포로티오에이트(phosphorothioate)로 변형시켰다.

[0069] 또한, 양배추 식물체의 *thermo-tolerance 1*(TT1), *orange*(Or) 및 *acetolactate synthase 1*(ALS1) 유전자를 표적으로 하는 유전자 교정을 실시하기 위해서 NCBI로부터 *BoTT1*(Bo2g095110), *BoOr*(Bo9g014710) 및 *BoALS1*(Bo1g076910) 유전자 서열을 얻었다. 이후, CRISPR-P 2.0 프로그램을 이용하여 가이드 RNA를 디자인하고(표 1), GeneArt Precision gRNA Synthesis Kit(Invitrogen)를 이용하여 가이드 RNA를 합성하였다. MMEJ 경로를 위한 공여자 핵산(MJ.BoTT1, MJ.BoOr 및 MJ.BoALS1)을 하기 표 1의 프라이머를 이용한 PCR을 통해 준비하였다. 공여자 핵산의 농도는 Nanodrop2000 분광광도계(Thermofisher, USA)를 이용하여 측정하였다.

## 표 1

[0072] 공여자 핵산 및 가이드 RNA 서열

| 용도 | 명칭 | 염기서열(5'-3') | 서열번호 |
|----|----|-------------|------|
|----|----|-------------|------|

|                       |               |                                                                                                                    |    |
|-----------------------|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 공여자 핵산<br>제조용<br>프라이머 | cNJ .HPAT-F1  | AAAAGATCCTATATCAAAGGACCTCCTCTTAAAAATTTATCCCT                                                                       | 1  |
|                       | cNJ .HPAT-R1  | TCTCAGGGACGTTAGGTGGAGGAAGGGATAAATTTTAAAGAGGAGG                                                                     | 2  |
|                       | MJ .HPAT-F1   | TTGGAGAGTGGCGATTTGATAAAAGATCCTATATCAAAGGACCTCCTCTTAA<br>AAATTTATCCCT                                               | 3  |
|                       | MJ .HPAT-R1   | ATACATATTACATACCACACTCTCAGGGACGTTAGGTGGAGGAAGGGATAAA<br>TTTTTAAGAGGAGG                                             | 4  |
|                       | MJ .HPAT-F2   | GCGATTTGATAAAAGATCCTATATCAAAGGACCTCCTCTTAAAAATTTATCC<br>CT                                                         | 5  |
|                       | MJ .HPAT-R2   | CATACCACACTCTCAGGGACGTTAGGTGGAGGAAGGGATAAATTTTAAAGAG<br>GAGG                                                       | 6  |
|                       | MJ .HPAT-F3   | TTGATAAAAGATCCTATATCAAAGGACCTCCTCTTAAAAATTTATCCCT                                                                  | 7  |
|                       | MJ .HPAT-R3   | CACACTCTCAGGGACGTTAGGTGGAGGAAGGGATAAATTTTAAAGAGGAGG                                                                | 8  |
|                       | MJ .BoTT1-F1  | TCCGAGTTCTTGTGCGGAAGAGCAGAAAGCAGGCTGAGCAATACCTCC                                                                   | 9  |
|                       | MJ .BoTT1-R1  | TATTTAAGATTACTTTGTACAGATGGAGGTATTGCTCAGCCTGCTTTC                                                                   | 10 |
|                       | MJ .BoOr-F1   | CATAGAAGGACCTGAAACAGTTCAAGACTTTGCCAAAATGCAATTACAAGAG<br>ATCAAGACA                                                  | 11 |
|                       | MJ .BoOr-R1   | TGTGCAAGAAGATCTTGTTCGGTGACTTCTAATGTTGTCTTGAATCTCTTG<br>TAATTGCATT                                                  | 12 |
|                       | MJ .BoALS1-F1 | TCCTCTTGTGCGCCATTACAGGTCAAGTCTCTCGCCGGATGATCGGTACTGAC                                                              | 13 |
|                       | MJ .BoALS1-R1 | CTCAACGATTGGTGTCTCTTGAAGCGCTCAGTACCGATCATCCGCGGAGAG                                                                | 14 |
| 공여자 핵산                | cNJ .HPAT3-1  | AAAAGATCCTATATCAAAGGACCTCCTCTTAAAAATTTATCCCTTCTCCAC<br>CTAACGTCCCTGAGA                                             | 15 |
|                       | MJ .HPAT3-1   | TTGGAGAGTGGCGATTTGATAAAAGATCCTATATCAAAGGACCTCCTCTTAA<br>AAATTTATCCCTTCTCCACCTAACGTCCCTGAGAGTGTGGTATGTAATATG<br>TAT | 16 |
|                       | MJ .HPAT3-2   | GCGATTTGATAAAAGATCCTATATCAAAGGACCTCCTCTTAAAAATTTATCC<br>CTTCTCCACCTAACGTCCCTGAGAGTGTGGTATG                         | 17 |
|                       | MJ .HPAT3-3   | TTGATAAAAGATCCTATATCAAAGGACCTCCTCTTAAAAATTTATCCCTTCC<br>TCCACCTAACGTCCCTGAGAGTGTG                                  | 18 |
|                       | MJ .BoTT1     | TCCGAGTTCTTGTGCGGAAGAGCAGAAAGCAGGCTGAGCAATACCTCCATCT<br>GTACAAAGTAATCTTAAATA                                       | 19 |
|                       | MJ .BoOr      | CATAGAAGGACCTGAAACAGTTCAAGACTTTGCCAAAATGCAATTACAAGAG<br>ATCAAGACAACATTAGAAGTCACCGAAACAAGATCTTCTTGACA               | 20 |
|                       | MJ .BoALS1    | TCCTCTTGTGCGCCATTACAGGTCAAGTCTCTCGCCGGATGATCGGTACTGAC<br>GCTTTTCAAGAGACACCAATCGTTGAG                               | 21 |
| 가이드 RNA               | gR1 .HPAT3    | GAGAGTGGCGATTTGATAAG                                                                                               | 22 |
|                       | gR2 .HPAT3    | ACCTAACGTCCCAGAAAGTG                                                                                               | 23 |
|                       | gR1 .BoTT1    | GAGTTCTTGTGCGGAAGAGT                                                                                               | 24 |
|                       | gR2 .BoTT1    | TTAAGATTACTTTGTACAAG                                                                                               | 25 |
|                       | gR1 .BoOr     | AGAAGGACCTGAAACAGTAC                                                                                               | 26 |
|                       | gR2 .BoOr     | GCAAGAAGATCTTGTTCGA                                                                                                | 27 |
|                       | gR1 .BoALS1   | TCTTGTGCGCCATTACAGGAC                                                                                              | 28 |
|                       | gR2 .BoALS1   | AACGATTGGTGTCTCTTGGA                                                                                               | 29 |

### [0074] 3. PEG-매개 형질전환

[0075]  $2 \times 10^5$  ml의 토마토 또는 양배추 원형질체에 20  $\mu$ g SpCas9 단백질(ToolGen, Inc. South Korea), 10  $\mu$ g 가이드 RNA 및 300 pmol 공여자 핵산을 포함한 PBS 버퍼를 넣고 25℃에서 10분 동안 반응시켰다. 이후, RNP(ribonucleoprotein) 복합체를 첨가하여 잘 섞어주고 PEG(polyethylene glycol) 용액(40%(w/v) PEG4000, 0.2 M mannitol, 0.1 M  $\text{CaCl}_2$ )을 첨가하고 잘 섞어준 후, 실온에서 10분 동안 반응시켰다. W5 용액으로 세척하고, 100 g에서 5분 동안 원심분리한 후, 상층액을 제거하고, W5 용액을 첨가하여 25℃, 암조건으로 48시간 동안 반응시켰다.

### [0077] 4. 염기서열 분석

[0078] 형질전환된 원형질체로부터 CTAB(Cetyl trimethylammonium bromide) 방법을 이용하여 게놈 DNA를 추출하고 3

번의 PCR을 수행하여 miniseq sequencing service(MiniSeq™ System, USA) 분석을 위한 샘플을 준비한 후, 표적 부위에 대한 딥 시퀀싱(deep sequencing) 분석을 수행하였다. miniseq 샘플 준비를 위한 첫 번째 및 두 번째 PCR은 하기 표 2와 같은 프라이머를 이용하여 수행하였고, 세 번째 PCR은 제조사에서 제공하는 프라이머를 이용하여 수행하였으며, 시퀀싱 결과는 Cas-Analyzer tool을 이용하여 편집 효율을 분석하였다.

표 2

[0080]

miniseq 샘플 준비를 위한 PCR에 사용한 프라이머

| 용도        | 명칭        | 염기서열(5'-3')                                                        | 서열번호 |
|-----------|-----------|--------------------------------------------------------------------|------|
| 첫 번째 PCR용 | HPAT3-F1  | GATATTGTAGGTGCTTTGCATGG                                            | 30   |
|           | HPAT3-R1  | CAACAATTTTACTGATACGAGTAAAT                                         | 31   |
|           | BoTT1-F1  | GCTCCTTTGCTCACTTAGATCA                                             | 32   |
|           | BoTT1-R1  | GCAAATGTGTATTGAAGTGAATTATGATC                                      | 33   |
|           | BoOr-F1   | GTTCGTAATAGAGTGTGGTGGT                                             | 34   |
|           | BoOr-R1   | AGAGGATAATCCCAGCAATGAG                                             | 35   |
|           | BoALS1-F1 | CCCTCTACCCATTTCCAGATTC                                             | 36   |
|           | BoALS1-R1 | CTATGCTCCACAGCGTAGTTAG                                             | 37   |
| 두 번째 PCR용 | HPAT3-F2  | ACACTCTTTCCCTACACGCGCTCTCCGATCTGTTCAGAGTGAGC<br>TTGCTTACGGAA       | 38   |
|           | HPAT3-R2  | GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACCATGCTTATTG<br>AAGATTTATGGAGAG | 39   |
|           | BoTT1-F2  | ACACTCTTTCCCTACACGCGCTCTCCGATCTGCTTCTCTGTAGTG<br>GTATGGGCCC        | 40   |
|           | BoTT1-R2  | GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACAATACTCCAAG<br>AAAAGTAGATGAG   | 41   |
|           | BoOr-F2   | ACACTCTTTCCCTACACGCGCTCTCCGATCTGATTATTTTGGT<br>GCAGCTTTTGTATC      | 42   |
|           | BoOr-R2   | GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCACTTTAAGAAA<br>GTAAACCTCTTCC   | 43   |
|           | BoALS1-F2 | ACACTCTTTCCCTACACGCGCTCTCCGATCTGTTAGCAGACGCGA<br>TGCTTGACA         | 44   |
|           | BoALS1-R2 | GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTATGTCATCAA<br>CATCCATCACCAA   | 45   |

[0082]

실시예 1. cNHEJ 기반 및 MMEJ 기반 유전체 교정 방법의 편집 효율 분석

[0083]

cNHEJ(canonical non-homologous end-joining) 기반 유전체 교정은 미세상동성 말단을 가지지 않은 공여자 핵산을 이용하는 방법이고, MMEJ(microhomology-mediated end joining) 기반 유전자 교정은 미세상동성 말단을 가지는 공여자 핵산을 이용하는 방법이다. 본 발명에서는 토마토 유래의 *SIHPAT3* 유전자에서 6개(A1, A2, B, C, D1, D2)의 SNP(single nucleotide polymorphisms)를 포함하는 cNHEJ 기반 유전체 교정을 위한 공여자 핵산(cNJ.HPAT3-1) 및 MMEJ 기반 유전체 교정을 위한 공여자 핵산(MJ.HPAT3-1, MJ.HPAT3-2 및 MJ.HPAT3-3)을 제조하였다. MJ.HPAT3-1, MJ.HPAT3-2 및 MJ.HPAT3-3는 표적으로 하는 *SIHPAT3* 유전자의 양쪽 PAM 부위의 상류(upstream) 3번째 염기 서열부터 각각 5개, 10개 및 20개의 미세상동성 서열을 가지도록 디자인함으로써, 표적으로 하는 유전자에서 특정 부위의 DNA 절편이 공여자 핵산 서열로 대체되도록 하였다(도 1).

[0084]

또한, 토마토 원형질체에 SpCas9 단백질, 가이드 RNA(gR1.HPAT3, gR2.HPAT3) 및 공여자 핵산을 주입한 후, 편집 효율을 분석한 결과, SpCas9 단백질 및 가이드 RNA만 주입한 경우, 표적하는 유전체 교정이 일어나지 않은 반면, SpCas9 단백질, 가이드 RNA 및 공여자 핵산을 모두 주입한 경우, 표적하는 유전체 교정이 일어나는 것을 확인하였다. 특히, cNJ.HPAT3-1를 공여자 핵산으로 주입했을 때보다, MJ.HPAT3-1를 공여자 핵산으로 주입했을 때의 편집 효율이 높은 것을 확인하였다(표 3).

표 3

[0085]

공여자 핵산에 따른 편집 효율

| 그룹 | SpCas9 | gR1.HPAT3 | gR2.HPAT3 | DNA donor   | total reads | edited reads | editing efficiency(%) |
|----|--------|-----------|-----------|-------------|-------------|--------------|-----------------------|
| 1  | -      | -         | -         | -           | 121368      | 0            | 0                     |
| 2  | +      | +         | -         | -           | 110285      | 0            | 0                     |
| 3  | +      | -         | +         | -           | 105799      | 0            | 0                     |
| 4  | +      | +         | +         | -           | 117136      | 0            | 0                     |
| 5  | +      | +         | +         | cNJ.HPAT3-1 | 93054       | 76           | 0.08                  |
| 6  | +      | +         | +         | MJ.HPAT3-1  | 99885       | 2438         | 2.44                  |

[0086]

상기 결과를 통해, cNHEJ 기반보다 MMEJ 기반 유전체 교정 방법의 편집 효율이 약 30배 이상 높은 것을 알 수 있었다.

[0088]

## 실시예 2. cNHEJ 기반 및 MMEJ 기반 유전체 교정 방법의 편집 빈도 분석

[0089]

cNJ.HPAT3-1 공여자 핵산에 의해 교정된 산물의 각 SNP(A1, A2, B, C, D1, D2) 위치별 편집 빈도를 분석하였다. 그 결과, 총 edited reads 중 94.74%가 B-C 위치의 SNP에서 교정이 일어난 reads인 것을 확인하였다. 또한, 양쪽 말단의 SNP(A1-A2, D1-D2)에서 교정이 일어난 reads는 확인되지 않았으며, 이는 공여자 핵산의 말단이 유전체 교정에 이용되기 전에 알 수 없는 경로에 의해 손상된 것으로 예측된다(표 4).

[0090]

반면, MJ.HPAT3-1 공여자 핵산에 의해 교정된 산물의 각 SNP(A1, A2, B, C, D1, D2) 위치별 편집 빈도를 분석한 결과, 총 edited reads 중에서 9.72% 만이 표적으로 하는 모든 SNP(A1-A2-B-C-D1-D2)에서 교정이 일어난 것을 확인하였다. 또한, B 및 C 위치의 SNP를 포함하는 reads는 총 edited reads 중에서 33.01%로 나타난 것을 확인하였다. 양쪽 말단의 SNP(A1-A2, D1-D2)에서 교정이 일어난 reads는 66.98%로 나타나는 것을 확인함으로써, CRISPR/Cas9 시스템에 의한 recurrent cleavage가 발생하지 않은 것을 알 수 있었다(표 4).

[0091]

또한, cNJ.HPAT3-1 공여자 핵산에 의한 B 및 C 위치의 SNP를 포함하는 reads는 94.74%인 반면, MJ.HPAT3-1 공여자 핵산에 의한 B 및 C 위치의 SNP를 포함하는 reads는 6.93%인 것으로 보아, cNHEJ 기반 유전체 교정 방법은 ODM(oligonucleotide directed mutagenesis)이 관여하는 것으로 예측된다.

## 표 4

[0092]

공여자 핵산에 따른 편집 빈도

| edited SNPs     | DNA Donor              |                      |                        |                      |
|-----------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
|                 | cNJ.HPAT3-1            |                      | MJ.HPAT3-1             |                      |
|                 | Number of edited reads | editing frequency(%) | Number of edited reads | editing frequency(%) |
| A1-A2-B-C-D1-D2 | 0                      | 0                    | 237                    | 9.72                 |
| A1-A2           | 0                      | 0                    | 872                    | 35.77                |
| A1-A2-B-C       | 0                      | 0                    | 150                    | 6.15                 |
| B-C             | 72                     | 94.74                | 169                    | 6.93                 |
| B-C-D1-D2       | 4                      | 5.26                 | 249                    | 10.21                |
| D1-D2           | 0                      | 0                    | 761                    | 31.21                |
| edited reads    | 76                     | 100                  | 2438                   | 100                  |
| total reads     | 93054                  | -                    | 99885                  | -                    |

[0093]

상기 결과를 통해, cNHEJ 기반보다 MMEJ 기반 유전체 교정 방법의 각 SNP 위치별 편집 빈도가 보다 다양하게 나타나는 것을 알 수 있었다.

[0095]

## 실시예 3. 공여자 핵산의 처리 농도에 따른 편집 빈도 분석

[0096]

유전체 교정의 주형(template)인 공여자 핵산을 50, 100, 200 및 300 pmol의 농도로 각각 처리한 후, 유전자 편집 빈도를 분석하였다. 그 결과, cNJ.HPAT3-1 공여자 핵산의 처리 농도가 증가할수록 편집 빈도는 유사한 수준

으로 나타난 반면, MJ.HPAT3-1 공여자 핵산의 처리 농도가 증가할수록 모든 SNP(A1-A2-B-C-D1-D2)에서 편집이 일어난 정밀 편집 빈도도 증가하는 것을 확인하였다(도 2).

#### 실시예 4. 공여자 핵산의 길이에 따른 편집 효율 분석

미세상동성 서열의 길이가 20 bp인 MJ.HPAT3-1 공여자 핵산, 미세상동성 서열의 길이가 10 bp인 MJ.HPAT3-2 공여자 핵산 및 미세상동성 서열의 길이가 5 bp인 MJ.HPAT3-3 공여자 핵산을 각각 처리한 후, 유전자 편집 효율을 분석하였다. 그 결과, 미세상동성 서열의 길이가 증가할수록 표적으로 하는 총 편집 효율, 모든 SNP(A1-A2-B-C-D1-D2)에서 편집이 일어난 정밀 편집 효율, B, C 위치의 SNP에서 일어난 편집 효율 및 양쪽 말단(A1-A2, D1-D2) SNP에서 일어난 편집 효율이 모두 증가하는 것을 확인하였다(도 3).

상기 결과를 바탕으로, 미세상동성 서열의 길이가 20 bp인 공여자 핵산을 이용하였을 때, 편집 효율이 가장 높은 것을 알 수 있었다.

#### 실시예 5. NHEJ 저해제 처리에 따른 편집 효율 분석

동물 시스템에서 NHEJ 경로에서 작동하는 DNA-PKcs(DNA dependent protein kinase) 활성을 저해하는 화합물질인 Nu7441를 0.5, 1 및 2  $\mu$ M의 농도로 각각 처리한 후, 유전자 편집 효율을 분석하였다. 그 결과, Nu7441의 처리에 의해 유전자 편집 효율이 증가하는 것을 확인하였다. 특히, 미세상동성 서열을 가지지 않는 cNJ.HPAT3-1 공여자 핵산을 이용한 편집 효율은 Nu7441을 처리하지 않았을 때보다 2  $\mu$ M의 Nu7441을 처리하였을 때 약 1.88 배 증가하는 것을 확인하였다(표 5).

표 5

Nu7441 처리에 따른 편집 효율 분석

| No. | Donor       | Nu7441 ( $\mu$ M) | Total reads | Overall editing efficiency (%) | Precise editing efficiency (%) | Only B and C editing efficiency (%) | One-sided editing efficiency (%) | gR1.HPAT3 indel rate (%) | gR2. HPAT3 indel rate (%) |
|-----|-------------|-------------------|-------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1   | cNJ.HPAT3-1 | 0.0               | 72024       | 0.84                           | 0.00                           | 0.84                                | 0.00                             | 0.01                     | 0.01                      |
| 2   |             | 0.5               | 69595       | 0.84                           | 0.00                           | 0.84                                | 0.00                             | 0.01                     | 0.01                      |
| 3   |             | 1.0               | 69595       | 1.32                           | 0.00                           | 1.32                                | 0.00                             | 0.02                     | 0.02                      |
| 4   |             | 2.0               | 62798       | 1.58                           | 0.00                           | 1.58                                | 0.00                             | 0.20                     | 0.19                      |
| 5   | MJ.HPAT3-1  | 0.0               | 18363       | 13.16                          | 2.44                           | 2.54                                | 5.73                             | 1.08                     | 1.03                      |
| 6   |             | 1.0               | 27496       | 24.61                          | 3.80                           | 5.09                                | 11.91                            | 3.32                     | 3.54                      |
| 7   | MJ.HPAT3-2  | 0.0               | 56735       | 2.72                           | 0.14                           | 0.55                                | 1.90                             | 0.97                     | 0.95                      |
| 8   |             | 1.0               | 47518       | 24.35                          | 3.34                           | 5.24                                | 12.44                            | 1.19                     | 1.13                      |
| 9   |             | 2.0               | 77234       | 16.17                          | 1.50                           | 3.01                                | 10.15                            | 0.72                     | 0.74                      |
| 10  | MJ.HPAT3-3  | 0.0               | 72885       | 3.37                           | 0.10                           | 1.00                                | 2.18                             | 0.16                     | 0.14                      |
| 11  |             | 1.0               | 77561       | 8.11                           | 0.26                           | 2.68                                | 4.91                             | 0.33                     | 0.25                      |
| 12  |             | 2.0               | 61072       | 9.70                           | 0.41                           | 2.94                                | 5.94                             | 0.38                     | 0.31                      |

상기 결과를 통해, cNJ.HPAT3-1 공여자 핵산에 의한 유전자 편집은 NHEJ 경로에 의한 것이 아니라, Nu7441에 의해 활성화되는 다른 경로에 의해 이루어진다는 것을 알 수 있었다. 또한, MJ.HPAT3-1 공여자 핵산에 의한 유전자 편집은 1  $\mu$ M의 Nu7441 처리에 의해 편집 효율이 증가할 수 있음을 알 수 있었다.

#### 실시예 6. MMEJ 기반 유전체 교정 방법의 편집 효율 검증

본 발명에 따른 MMEJ 기반 유전체 교정 방법을 이용하여 양배추 식물체의 *thermo-tolerance 1*(TT1), *orange*(Or) 및 *acetolactate synthase 1*(ALS1) 유전자를 교정함으로써 각각 내열성, 카로티노이드 축적 및 제초제 내성의 형질을 얻는 식물체를 제조하고자 하였다. MMEJ 기반 유전체 교정을 위한 공여자 핵산(MJ.BoTT1, MJ.BoOr 및 MJ.BoALS1)을 제조하여 단일 아미노산 치환을 유도하였고, 표적으로 하는 *BoTT1*, *BoOr* 및 *BoALS1* 유전자의 양쪽 PAM 부위의 상류(upstream) 3번째 염기 서열부터 20개의 미세상동성 서열을 가지도록 디자인함으로써, 표적으로 하는 유전자에서 특정 부위의 DNA 절편이 공여자 핵산 서열로 대체되도록 하였다. *BoTT1* 유전자의 CGC(Arg) 염기 서열을 CAT(His)로 대체되도록 하였고, *BoOr* 유전자의 CGT(Arg) 염기 서열을 CAC(His)로 대체되도록 하였으며, *BoALS1* 유전자의 CCT(Pro) 염기 서열을 TCT(Ser)로 대체되도록 하였다(도 4).

[0109] 양배추 원형질체에 SpCas9 단백질을, 가이드 RNA(표 1) 및 공여자 핵산을 주입한 후, 편집 효율을 분석한 결과, *BoTT1*, *BoOr* 및 *BoALS1* 유전자를 표적으로 하는 편집 효율이 각각 약 7.27%, 약 3.94% 및 약 2.51%로 나타나는 것을 확인함으로써(표 6), 본 발명에 따른 공여자 핵산을 이용한 유전체 교정 방법이 토마토 뿐만 아니라, 양배추 식물체에서도 정상적으로 작동하는 것을 알 수 있었다.

표 6

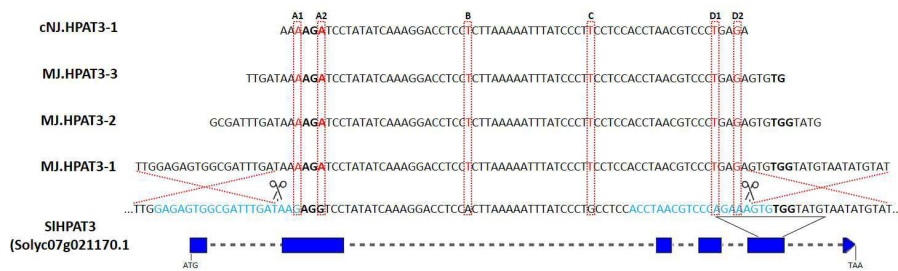
양배추에서의 MMEJ 기반 유전체 교정 방법에 의한 편집 효율

| No. | Locus  | Total reads | Precise editing efficiency (%) | Targeted editing efficiency (%) | gRNA1 indel rate (%) | gRNA2 indel rate (%) |
|-----|--------|-------------|--------------------------------|---------------------------------|----------------------|----------------------|
| 1   | BoTT1  | 16905       | 1.71 ± 0.48                    | 7.27 ± 4.46                     | 4.83 ± 1.27          | 2.39 ± 1.20          |
| 2   | BoOr   | 68028       | 1.56 ± 0.65                    | 3.94 ± 0.14                     | 24.37 ± 1.99         | 16.76 ± 6.12         |
| 3   | BoALS1 | 90366       | 0.73 ± 0.35                    | 2.51 ± 1.19                     | 1.13 ± 0.40          | 10.61 ± 5.11         |

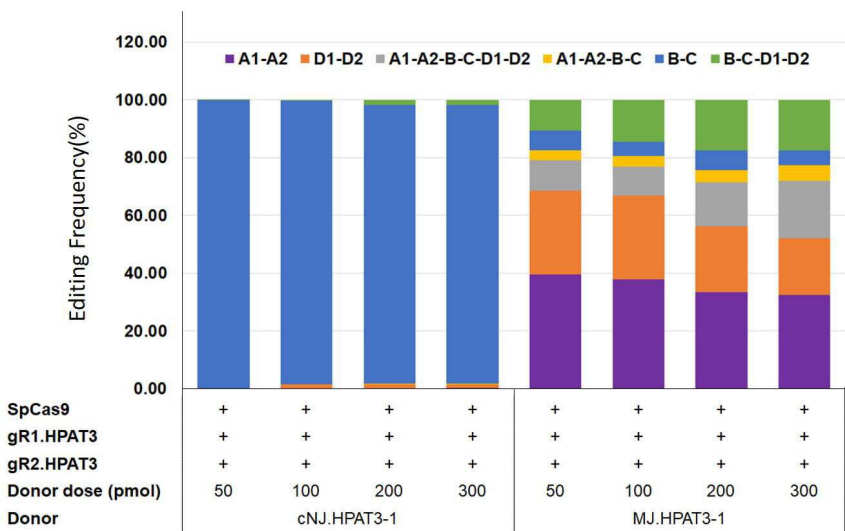
[0110]

도면

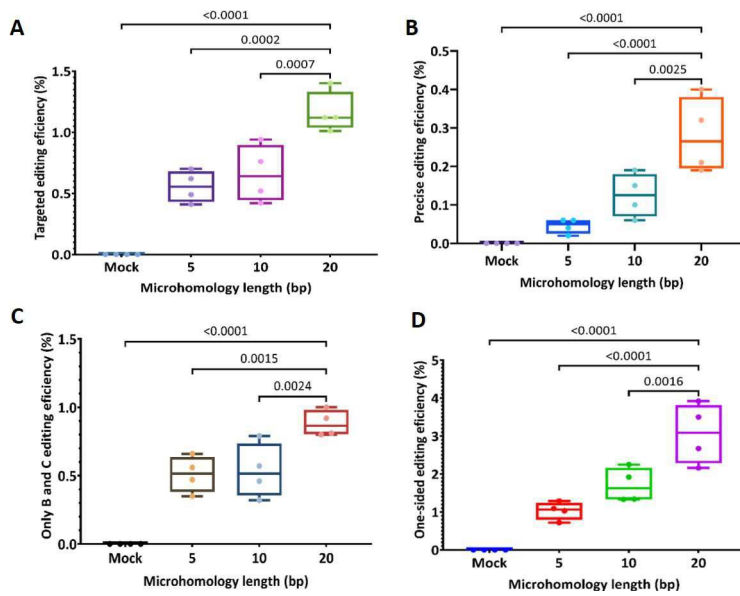
도면1



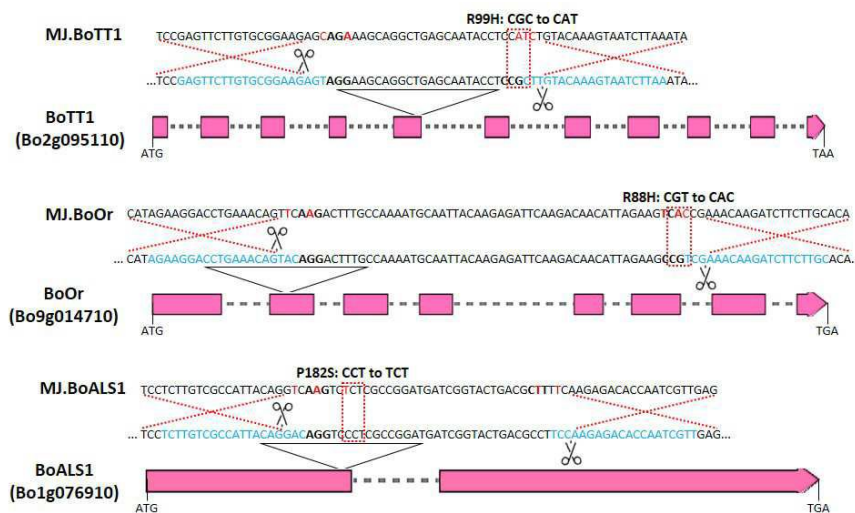
도면2



도면3



도면4



## 서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Donor nucleic acid for gene editing via microhomology mediated end joining and uses thereof
- <130> PN21216
- <160> 45
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 44
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> primer cNJ.HPAT-F1

<400> 1

aaaagatcct atatcaaagg acctcctctt aaaaatttat ccct 44

<210> 2

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer cNJ.HPAT-R1

<400> 2

tctcaggac gttaggtgga ggaaggata aatttttaag aggagg 46

<210> 3

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer MJ.HPAT-F1

<400> 3

ttggagagtg gcgatttgat aaaagatcct atatcaaagg acctcctctt aaaaatttat 60

ccct 64

<210> 4

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer MJ.HPAT-R1

<

<400> 4

atacatatta cataccacac tctcaggac gttaggtgga ggaaggata aatttttaag 60

aggagg 66

<210> 5

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer MJ.HPAT-F2

<400> 5

gcgatttgat aaaagatcct atatcaaagg acctcctctt aaaaatttat ccct 54

<210> 6  
 <211> 56  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer MJ.HPAT-R2  
 <400> 6  
 cataccacac ttcaggac gttagggtgga ggaaggata aatttttaag aggagg 56

<210> 7  
 <211> 49  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer MJ.HPAT-F3  
 <400> 7  
 ttgataaaag atcctatatac aaaggacctc ctcttaaaaa tttatccct 49

<210> 8  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer MJ.HPAT-R3  
 <400> 8  
 cacactctca gggacgttag gtggaggaag ggataaatTT ttaagaggag g 51

<210> 9  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer MJ.BoTT1-F1  
 <400> 9  
 tccgagttct tgtgcggaag agcagaaagc aggctgagca atacctcc 48

<210> 10  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer MJ.BoTT1-R1

<400> 10  
tatttaagat tactttgtac agatggaggt attgctcagc ctgctttc 48

<210> 11  
<211> 62  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> primer MJ.BoOr-F1  
<400> 11  
catagaagga cctgaaacag ttcaagactt tgccaaaatg caattacaag agattcaaga 60  
ca 62

<210> 12  
<211> 62  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> primer MJ.BoOr-R1  
<400> 12  
tgtgcaagaa gatcttgitt cggtgacttc taatgttgtc ttgaatctct tgtaattgca 60  
tt 62

<210> 13  
<211> 52  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> primer MJ.BoALS1-F1  
<400> 13  
tcctcttgtc gccattacag gtcaagtctc tcgccgatg atcggtactg ac 52

<210> 14  
<211> 52  
<212>  
> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> primer MJ.BoALS1-R1  
<400> 14  
ctcaacgatt ggtgtctctt gaaaagcgtc agtaccgatc atccggcgag ag 52  
<210> 15

<211> 67  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> donor nucleic acid cNJ.HPAT3-1  
 <400> 15  
 aaaagatcct atatcaaagg acctcctctt aaaaatttat cccttcctcc acctaacgtc 60  
 cctgaga 67  
 <210> 16  
 <211> 107  
 <212> DNA  
 <213>  
 Artificial Sequence  
 <220><223> donor nucleic acid MJ.HPAT3-1  
 <400> 16  
 ttggagagtgc gcgatttgat aaaagatcct atatcaaagg acctcctctt aaaaatttat 60  
 cccttcctcc acctaacgtc cctgagagtgc tggatatgtaa tatgtat 107  
 <210> 17  
 <211> 87  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> donor nucleic acid MJ.HPAT3-2  
 <400> 17  
 gcgatttgat aaaagatcct atatcaaagg acctcctctt aaaaatttat cccttcctcc 60  
 acctaacgtc cctgagagtgc tggatatg 87  
 <210> 18  
 <211> 77  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> donor nucleic acid MJ.HPAT3-3  
 <400> 18  
 ttgataaaag atcctatatc aaaggacctc ctcttaaaaa tttatccctt cctccaccta 60  
 acgtccctga gagtgtg 77  
 <210> 19  
 <211> 72

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> donor nucleic acid MJ.BoTT1  
 <400> 19  
 tccgagttct tgtgcggaag agcagaaagc aggctgagca atacctccat ctgtacaaag 60  
 taatcttaaa ta 72

<210> 20  
 <211> 98  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> donor nucleic acid MJ.BoOr  
 <400> 20  
 catagaagga cctgaaacag ttcaagactt tgccaaaatg caattacaag agattcaaga 60  
 caacattaga agtcaccgaa acaagatctt ctgcaca 98

<210> 21  
 <211> 79  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> donor nucleic acid MJ.BoALS1  
 <400> 21  
 tcctcttgtc gccattacag gtcaagtctc tcgccgatg atcggtactg acgcttttca 60  
 agagacacca atcggttgag 79

<210> 22  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> guide RNA gR1.HPAT3  
 <400> 22  
 gagagtggcg atttgataag 20

<210> 23  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> guide RNA gR2.HPAT3

<400> 23

acctaacgtc ccagaaagtg

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> guide RNA gR1.BoTT1

<400> 24

gagttcttgt gcggaagagt

20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> guide RNA gR2.BoTT1

<400> 25

ttaagattac tttgtacaag

20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> guide RNA gR1.BoOr

<400> 26

agaaggacct gaaacagtac

20

<210> 27

<

211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> guide RNA gR2.BoOr

<400> 27

gcaagaagat cttgtttcga

20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> guide RNA gR1.BoALS1

<400> 28

tcttgtcgcc attacaggac 20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> guide RNA gR2.BoALS1

<400> 29

aacgattggt gtctcttgga 20

<210> 30

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer HPAT3-F1

<400> 30

gatattgtag gttgctttgc atgg 24

<210> 31

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer HPAT3-R1

<400> 31

caacaatddd agtgatacga gtaaat 26

<210> 32

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer BoTT1-F1

<400> 32

gctcctttgc tcacttagat ca 22

<210> 33  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer BoTT1-R1  
 <400> 33  
 gcaaattgtg tattgaagtg aattatgatc 30  
 <210> 34  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer BoOr-F1  
 <400> 34  
 gttcgtataa gattgtggtg gt 22  
  
 <210> 35  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer BoOr-R1  
 <400> 35  
 agaggataat cccagcaatg ag 22  
 <210> 36  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer BoALS1-F1  
 <400> 36  
 ccctctaccc atttcagat tc 22  
 <210> 37  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer BoALS1-R1

|                                                                   |                     |    |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------|----|
| <400>                                                             | 37                  |    |
| ctatgctcca cagcgtagtt ag                                          |                     | 22 |
| <210>                                                             | 38                  |    |
| <211>                                                             | 59                  |    |
| <212>                                                             | DNA                 |    |
| <213>                                                             | Artificial Sequence |    |
| <220><223>                                                        | primer HPAT3-F2     |    |
| <400>                                                             | 38                  |    |
| acactctttc cctacacgac gctcttccga tcttgttcag agtgagcttg cttacggaa  |                     | 59 |
| <210>                                                             | 39                  |    |
| <211>                                                             | 62                  |    |
| <212>                                                             | DNA                 |    |
| <213>                                                             | Artificial Sequence |    |
| <220><223>                                                        | primer HPAT3-R2     |    |
| <400>                                                             | 39                  |    |
| gtgactggag ttcagacgtg tgctcttccg atctaccatg cttattgaag atttatggag |                     | 60 |
| ag                                                                |                     | 62 |
| <210>                                                             | 40                  |    |
| <211>                                                             | 57                  |    |
| <212>                                                             | DNA                 |    |
| <213>                                                             | Artificial Sequence |    |
| <220><223>                                                        | primer BoTT1-F2     |    |
| <400>                                                             | 40                  |    |
| acactctttc cctacacgac gctcttccga tctgtcttc tgtagtggtg tgggccc     |                     | 57 |
| <210>                                                             | 41                  |    |
| <211>                                                             | 60                  |    |
| <212>                                                             | DNA                 |    |
| <213>                                                             | Artificial Sequence |    |
| <220><223>                                                        | primer BoTT1-R2     |    |
| <400>                                                             | 41                  |    |
| gtgactggag ttcagacgtg tgctcttccg atctacaata ctccaagaaa agtagatgag |                     | 60 |
|                                                                   |                     | 60 |
| <210>                                                             | 42                  |    |

<211> 61  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer BoOr-F2

<400> 42

acactctttc cctacacgac gctcttccga tcttgattat ttttggtgca gcttttgtat 60  
 c 61

<210> 43

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer BoOr-R2

<400> 43

gtgactggag ttacagcgtg tgctcttccg atctccactt taagaaagta aacctcttcc 60  
 60

<210

> 44

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer BoALS1-F2

<400> 44

acactctttc cctacacgac gctcttccga tctgttagca gacgcgatgc ttgaca 56

<210> 45

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer BoALS1-R2

<400> 45

gtgactggag ttacagcgtg tgctcttccg atctggtagt tcatcaacat ccatcaccaa 60  
 60