(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0178279
(43) 공개일자 2024년12월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *A01H 1/02* (2006.01)
A01H 6/20 (2018.01) *C12N 15/82* (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A01H 1/023 (2021.01)
(21) 출원번호 10-2023-0079636
(22) 출원일자 2023년06월21일
심사청구일자 2023년06월21일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
박영두
경기도 용인시 수지구 성복2로 220, 305동 1404호 (성복동, 버들치마을 성복 힐스테이트 3차)
신윤희
인천광역시 남동구 소래역로 93, 902동 104호 (논현동, 냇마을 신영지웰)
윤혜정
경기도 수원시 영통구 청명남로50번길 13-11, 301호 (영통동, 영통원룸아트)
(74) 대리인
특허법인지담

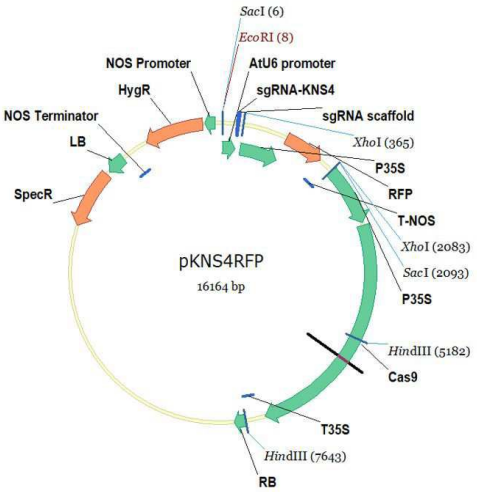
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **웅성불임 형질을 가지는 배추 육성을 위한 KNS4 유전자 교정용 벡터 및 이의 적용 방법**

(57) 요 약

본 발명은 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 웅성불임과 관련된 배추 내 *KNS4* 유전자를 교정하는 식물 형질전환용 바이너리 벡터 pKNS4RFP 및 이를 이용한 형질전환 식물체의 제조 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 형질전환 식물체는 웅성불임의 표현형을 보여 식물체의 교잡 육종에 이용함에 있어 매우 경제적이고 안정적으로 1대 교잡종을 생산할 수 있음으로써, 농작물의 생산성 향상을 위해 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도8



(52) CPC특허분류
A01H 6/204 (2022.05)
C12N 15/8205 (2013.01)
C12N 15/8289 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711155551
과제번호	2021M3E5E6025387
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오위해평가원팀리노베이션사업
연구과제명	CRISPR/Cas9 매개 벼 및 배추 F1 Non-GM 교잡종 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간	2021.04.01 ~ 2023.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 이루어진 염기서열에 상보적인 서열을 포함하는 배추 내 *KNS4* 유전자 교정용 가이드 RNA.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 가이드 RNA 염기서열은 배추(*Brassica rapa*) 유래의 것인, 가이드 RNA.

청구항 3

서열번호 4로 이루어진 염기서열을 포함하는 배추 내 *KNS4* 유전자 교정용 가이드 RNA 카세트.

청구항 4

서열번호 5로 이루어진 염기서열을 포함하는 배추 내 *KNS4* 유전자 교정용 식물 형질전환 벡터.

청구항 5

서열번호 5의 염기서열로 이루어진 식물 형질전환 벡터를 식물체에 형질전환시켜 *KNS4* 유전자의 표적서열에 DNA 삽입/결실(Indel)을 유발하는 단계를 포함하는 형질전환 식물체의 제조 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 또는 수수를 포함하는 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 또는 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩 또는 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 또는 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 또는 튤립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 또는 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 제조 방법.

청구항 7

제 5 항에 있어서,

상기 형질전환은 아크로박테리움(*Agrobacterium*)으로 수행되는 것인, 제조 방법.

청구항 8

제 5 항에 있어서,

상기 형질전환 식물체는 웅성불임인 것인, 제조 방법.

청구항 9

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 제조 방법으로 제조된 형질전환 식물체.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 웅성불임과 관련된 배추 내 *KNS4* 유전자를 교정하는 식물 형질전환용 바이너리 벡터 pKNS4RFP 및 이를 이용한 형질전환 식물체의 제조 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 유전자 교정(gene editing)은 원하는 염기서열을 인식하여 절단하도록 만들어지는 인공제한효소로 동물 또는 식물 세포 내에서 정확히 원하는 유전체 염기서열을 정확히 절단하여 기존의 기술들에 비해 높은 효율로 유전체 상의 유전정보를 교정하는 분자도구이다. 실제로 유전자 교정 방법은 2002년 초파리에서 유전자 knock-out을 위해 사용된 이래 기존의 기술로 정확한 유전자 knock-out이 매우 비효율적이거나 불가능하였던 다양한 동물뿐만 아니라, 애기장대, 담배, 벼, 옥수수 등의 식물에서 매우 효율적인 유전정보 조작을 성공적으로 유도할 수 있음이 증명되었다. 최근에는 이러한 유전자 교정이 성공적으로 이루어지기 위해서 목적 유전자를 특이적으로 목적하는 효율이 높으면서, 비특이적인 지역을 변화시키지 않는 벡터가 요구되고 있다.

[0004] 식물은 세포벽을 가지고 있어 동물 세포를 대상으로 한 유전자 교정 방법의 적용에 한계가 나타나고 있고, 세포 배양이나 개체로의 유전자 전달이 동물보다 어려우며, 식물 세포벽을 제거한 원형질체를 이용한 방법도 충격 등의 안정성에 매우 취약하기 때문에 상대적으로 긴 시간 및 노력이 요구되고 있다. 이에 지난 수년간 유전자 교정을 활용해온 Dow Agrosciences와 최근 기술을 도입한 Syngenta와 같은 세계적 농생명과학 기업에 의해 주도되고 있다. 특히, 유전자 교정을 이용하여 유전정보가 편집된 식물은 기존의 유전자 변형 식물과의 차별성으로 인해 앞으로 유전자 교정의 활용을 통한 개량 식물/작물이 산업적으로 큰 가치를 보일 것으로 예상된다. 따라서 유전자 교정의 효율적인 적용을 위한 연구 시스템 구축이 시급하다.

[0005] 배추, 양배추, 유채 등이 속하는 배추속(*Brassica*) 작물은 세계 넓은 지역에 걸쳐 재배되고 있다. 이 중에서 배추는 주요 채소 작물 중의 하나로 육종과 신품종 개발이 꾸준히 진행되고 있다. 배추는 타식성 작물로 높은 자가불화합성을 가지고 있다. 배추 1대 교잡종 육성 시, 우수한 조합능력을 가진 양친을 반복적인 교배를 통하여 고정시킨 후 자가불화합성을 이용하여 교잡하는 방법을 이용해왔다. 이 때, 양친의 생산과정에서 자가불화합성이 안정적으로 유지되었는지 식별이 필요하며 이에 과다한 양친유지 비용이 요구된다는 문제점이 있다. 또한 양친의 고정을 위해 자식을 반복하는 과정에서 나타나는 자식 열세 현상, 그리고 1대 교잡종 채종 과정에서 종자의 순도의 하락, 더 나아가 1대 교잡종 품종의 무단 복제 및 유통에 의한 피해도 발생되고 있다. 이에 안정적으로 1대 교잡종을 생산할 수 있는 웅성불임을 이용한 배추 품종 육성 방법 개발의 필요성이 대두되었다. 따라서, 웅성불임 형질을 가지는 배추를 육성한다면, 배추의 교잡 육종에 있어 매우 경제적이고 안정된 방법이 될 것으로 기대된다.

[0006] 이에 본 발명자들은 배추의 웅성불임에 관여하는 *KNS4* 유전자를 교정하는 식물형질전환용 바이너리 벡터(pKNS4RFP) 및 이를 이용한 형질전환된 웅성불임의 배추를 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-2090078호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 서열번호 1로 이루어진 염기서열에 상보적인 서열을 포함하는 배추 내 *KNS4* 유전자 교정용 가이드 RNA을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 서열번호 4로 이루어진 염기서열을 포함하는 배추 내 *KNS4* 유전자 교정용 가이드 RNA 카세트를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 5로 이루어진 염기서열을 포함하는 배추 내 *KNS4* 유전자 교정용 식물 형질전환 벡터를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 식물 형질전환 벡터를 식물체에 형질전환시켜 *KNS4* 유전자의 표적서열에 DNA 삽입/결실(Indel)을 유발하는 단계를 포함하는 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환 식물체의 제조 방법으로 제조된 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 서열번호 1로 이루어진 염기서열에 상보적인 서열을 포함하는 배추 내 *KNS4* 유전자 교정용 가이드 RNA을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 서열번호 4로 이루어진 염기서열을 포함하는 배추 내 *KNS4* 유전자 교정용 가이드 RNA 카세트를 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 서열번호 5로 이루어진 염기서열을 포함하는 배추 내 *KNS4* 유전자 교정용 식물 형질전환 벡터를 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 식물 형질전환 벡터를 식물체에 형질전환시켜 *KNS4* 유전자의 표적서열에 DNA 삽입/결실(Indel)을 유발하는 단계를 포함하는 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 형질전환 식물체의 제조 방법으로 제조된 형질전환 식물체를 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 배추 내 *KNS4* 유전자를 교정하는 식물 형질전환용 바이너리 벡터를 이용하여 제조된 형질전환 식물체는 웅성불임의 표현형을 보여 식물체의 교잡 육종에 이용함에 있어 매우 경제적이고 안정적으로 1대 교잡종을 생산할 수 있음으로써, 농작물의 생산성 향상을 위해 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 배추 내 *KNS4* 유전자와 유사한 유전자를 검정하기 위해 Brassica Database(http://brassicadb.cn/)를 이용하여 배추 유전자 목록과 Blast 분석한 결과로서, Bra010198은 목적하는 배추 내 *KNS4* 유전자를 나타낸 것이다.

도 2는 배추 내 *KNS4* 유전자의 엑손(exon) 구조, 목적하는 가이드 RNA(gRNA) 위치 및 검정 프라이머 쌍의 위치를 나타낸 모식도이다.

도 3은 KNS4_F와 KNS4_R 프라이머 쌍을 사용한 PCR에 의해 배추 내 *KNS4* 유전자로부터 증폭된 가이드 RNA 서열을 포함하는 영역을 전기영동 한 결과이다 (M: 100 bp size 마커; 및 KNS4: 목적한 가이드 RNA를 포함하는

영역).

도 4는 KNS4_F와 KNS4_R 프라이머 쌍을 사용한 PCR에 의해 배추 내 *KNS4* 유전자로부터 증폭된 가이드 RNA를 포함하는 영역의 서열분석 결과이다 (Query: *KNS4*_Bra010198의 염기서열; Sbjct: 서열분석 결과; 및 적색 상자: 목적한 가이드 RNA).

도 5는 양끝에 *Sac*I 자리를 가지도록 합성된 배추 내 *KNS4* 가이드 RNA, AtU6 프로모터 영역 및 reporter 유전자인 DsRed 형광단백질(RFP)을 식물 형질전환용 바이너리 벡터에 도입하는 전략을 나타낸 모식도이다.

도 6은 식물 형질전환용 바이너리 벡터에 도입하기 위해 *Sac*I 처리 후 전기영동한 결과이다 (M: 1 kb size 마커; Backbone: 목적한 가이드 RNA, AtU6 프로모터 및 DsRed 형광단백질이 도입되는 식물 형질전환용 바이너리 벡터; 및 Target: 목적한 가이드 RNA, AtU6 프로모터 영역 및 DsRed 형광단백질(RFP)이 합성된 클로닝 벡터).

도 7은 제작된 식물 형질전환용 바이너리 벡터 pKNS4RFP에 목적한 가이드 RNA가 정확하게 존재하는지 검정하기 위해, 서열분석 후 비교 검정한 결과이다 (Query; 예측된 pKNS4RFP 벡터의 염기서열; Sbjct: 서열분석 결과; 및 적색 상자: 목적한 가이드 RNA).

도 8은 제작된 식물 형질전환용 바이너리 벡터 pKNS4RFP의 모식도 및 제한효소 위치를 나타낸 것이다.

도 9는 제작된 식물 형질전환용 바이너리 벡터 pKNS4RFP를 아그로박테리움에 형질전환한 후, 검정을 위해 각 플라스미드를 분리한 후 벡터 내부에 존재하는 *EcoR*I 및 *Hind*Ⅲ를 동시에 처리하여 전기영동한 결과이다 (1 kb: 1 kb size 마커; 및 KF: 형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens*의 plasmid DNA에 제한효소를 처리한 결과).

도 10은 배추 내 *KNS4* 유전자를 교정하는 식물 형질전환용 바이너리 벡터 pKNS4RFP를 배추에 형질전환하는 과정을 나타낸 결과이다.

도 11은 식물 형질전환용 바이너리 벡터 pKNS4RFP의 배추 *KNS4* 유전자의 교정 여부를 검정하기 위해, HPT709-F와 HPT709-R 프라이머 쌍을 사용한 PCR 후 전기영동한 결과이다 (P: 형질전환 배추; N; 비형질전환 배추; M: 100 bp size 마커; 및 1~18: 형질전환된 배추의 DNA).

도 12는 식물 형질전환용 바이너리 벡터 pKNS4RFP의 배추 *KNS4* 유전자를 교정 여부를 검정하기 위해, 도 11에서 선발된 7번 개체에 대하여 KNS4_F와 KNS4_R 프라이머 쌍을 사용한 PCR에 의해 배추 *KNS4* 유전자로부터 증폭된 가이드 RNA를 포함하는 영역을 전기영동한 결과이다 (M: 100 bp size 마커; 및 KNS4: 목적한 가이드 RNA를 포함하는 영역).

도 13은 식물 형질전환용 바이너리 벡터 pKNS4RFP에 의해 목적한 배추의 웅성불임에 관여하는 *KNS4* 유전자 내에 염기서열의 삽입(insertion)을 확인한 결과이다.

도 14는 형질전환된 웅성불임 배추의 웅성기관 표현형을 대조군과 비교하기 위해, 각 화기의 형태, I_2-KI 화분 염색(pollen staining) 분석, 1% TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 화분 염색 분석 및 SEM(scanning electron microscopy) 분석을 수행한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0025] 본 발명에 사용되는 용어는 본 발명의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 기술분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 임의로 선정된 용어도 있으며, 이 경우 해당 실시예의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서, 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.

[0026] 본 발명에서 어느 구성요소 또는 어느 단계를 "포함한다"고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소 또는 다른 단계를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소 또는 다른 단계를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0028] 본 발명은 서열번호 1로 이루어진 염기서열에 상보적인 서열을 포함하는 배추 내 *KNS4* 유전자 교정용 가이드 RNA을 제공한다.

[0029] 본 발명의 용어, "*KNS4*(*kaonashi*) 유전자"는 배추과 식물의 웅성불임에 관여하는 유전자로서 화분외벽의 발달을 조절하는 β-1,3-galactosyltransferase 활성을 가진다.

[0030] 본 발명의 용어, "가이드 RNA(gRNA)"는 표적 서열과 혼성화하고, 표적 서열과 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하기에 충분한 표적 폴리뉴클레오티드 서열과의 상보성을 갖는 임의의 폴리뉴클레오티드 서열이다. 본 발명의 가이드 RNA는 목적하는 유전자 편집 재조합 벡터 내에 Cas9 단백질의 RGEN(RNA guided endonuclease) RNP(ribonucleoprotein) 복합체를 이용하여 목적 유전자의 특이적인 교정을 유발하는 염기서열 정보를 의미한다.

[0031] 보다 상세하게는, 상기 가이드 RNA 염기서열은 배추(*Brassica rapa*)에서 유래된 것일 수 있고, 구체적으로 내혼계 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)에서 유래된 것일 수 있다.

[0032] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 먼저 배추 reference gonome을 기초로 구축된 Brassica Database(http://brassicadb.cn/)와 본 발명의 형질전환에 이용된 내혼계 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis* inbred line "CT001")의 pseudo genome data를 바탕으로 해당 유전자의 패밀리가 존재하는지를 BLAST 프로그램을 활용하여 분석하였다. 분석 결과, 목적한 배추 *KNS4* 유전자는 Bra010198로 검색되었다. 이에 따라 유전자 교정을 유기하기 위한 23 bp(20 bp + PAM) 길이를 가지면서 비특이적인 반응을 최소화시키는 가이드 RNA를 작성하기 위해서 배추 *KNS4* 유전자 정보를 CRISPR direct(http://crispr.dbcls.jp/) 프로그램을 이용하여 검색하였다. 분석 결과, 배추 *KNS4* 유전자의 4번째 엑손(exon)에 특이적으로 인식하면서 비특이적 반응이 최소화하는 영역을 확인 후, 해당 영역의 염기서열을 검정하는 한 쌍의 프라이머를 제작하였다.

[0033] 또한, 본 발명은 서열번호 4로 이루어진 염기서열을 포함하는 배추 내 *KNS4* 유전자 교정용 가이드 RNA 카세트를 제공한다.

[0034] 또한, 본 발명은 서열번호 5로 이루어진 염기서열을 포함하는 배추 내 *KNS4* 유전자 교정용 식물 형질전환 벡터를 제공한다.

[0035] 상기 식물 형질전환 벡터는 배추 내 *KNS4* 유전자를 교정하기 위해 특이적으로 인식하는 가이드 RNA가 도입되어 목적 유전자의 발현을 억제하는 것일 수 있다.

[0036] 본 발명의 배추 내 *KNS4* 유전자를 교정하기 위해 특이적으로 인식하는 가이드 RNA를 삽입할 수 있는 벡터로는 복합체를 형성할 엔도뉴클레아제의 종류 또는 그 유래 미생물에 따라서 적절히 선택될 수 있다. 예컨대, 상기 가이드 RNA는 CRISPR RNA(crRNA), trans-activating crRNA(tracrRNA) 및 단일 가닥 가이드 RNA(sgRNA)로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있고, 엔도뉴클레오타이드 종류에 따라 CRISPR RNA(crRNA) 및 trans-activating crRNA(tracrRNA)의 이중가닥 복합체, 또는 단일 가닥 가이드 RNA(sgRNA)이 것이 수 있으며, 상기 sgRNA는 crRNA 및 tracrRNA의 부분을 포함하는 것일 수 있다.

[0037] 본 발명의 용어, "유전자 교정"은 가이드 RNA 및 Cas 단백질의 RGEN(RNA guided endonuclease) RNP(ribonucleoprotein) 복합체를 식물 형질전환 바이너리 벡터에 도입함으로써, 식물 형질전환을 이용한 유전자 교정이 발생하는 것을 의미한다.

[0038] 상기 RGEN(RNA guided endonuclease)는 단일가닥 RNA 또는 이중가닥 RNA와 복합체를 형성하며 RNA에 포함된 유전자 표적부위 표적 서열을 절단하여 유전자 교정 작용을 하는 엔도뉴클레아제를 의미하는 것으로서, 대표적으로 Cas9 단백질(CRISPR associated protein 9) 등과 같은 타입 Ⅱ의 CRISPR/Cas 시스템에 수반되는 엔도뉴클레아제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명의 용어, "식물 형질전환 재조합 벡터 pKNS4RFP"는 배추 내 *KNS4* 유전자를 교정하기 위해 특이적으로 인식하는 가이드 RNA가 도입된 식물 형질전환용 바이너리 벡터를 의미한다 (도 9 참조). 더 자세하게는 목적 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물로, 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함한 통상의 모든 벡터를 포함한다.

[0040] 상기 재조합 벡터는 목적하는 유전자의 발현 억제 또는 유전자의 발현이 증진될 수 있도록, 발현조절 서열과 기능적으로 연결될 수 있다. 예를 들어, 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 또한, 벡터는 선택성 마커를 포함할 수 있으며, 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다. 본 발명의 벡터는 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할

수 있다.

[0041] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 배추 내 *KNS4* 유전자를 교정하기 위해 특이적으로 인식하는 가이드 RNA가 도입된 식물 형질전환 재조합 벡터인 pKNS4RFP를 제작하였다. 구체적으로, 상기 목적 유전자를 억제시킬 수 있는 형질전환용 재조합 벡터는 본 발명자들이 자체적으로 제작한 식물 형질전환용 유전자 교정을 위한 재조합 바이너리 벡터에 상기 배추 *KNS4* 유전자를 교정하기 위해 특이적으로 인식하는 가이드 RNA를 효과적으로 도입하기 위하여, 해당 가이드 RNA 및 애기장대(Arabidopsis) U6 프로모터(AtU6 promoter) 영역까지 염기서열을 인공적으로 합성 및 제한효소 부위를 추가한 369 bp의 단편과, reporter 유전자로 DsRed 형광단백질(RFP)을 포함하는 총 2,093 bp로 이루어진 단편의 도입을 통해 최종적으로 제작하였다.

[0042] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 배추 내 *KNS4* 유전자를 교정하기 위해 특이적으로 인식하는 가이드 RNA가 도입되어 웅성불임 형질을 가지는 배추를 유기하기 위한 식물 형질전환용 재조합 벡터인 pKNS4RFP가 배추 내에서 목적 유전자를 효과적으로 교정할 수 있는지 확인하기 위하여, 배추의 형질전환을 실시하였다. 아울러, 이를 대상으로 배추에 형질전환 후 이를 통해 확보한 개체를 선별하는 단계를 거친 후, 이를 이용하여 상기 서열번호 2 및 3의 프라이머 쌍을 이용한 DNA 증폭 및 염기 서열 분석 방법과 화분 염색(pollen staining) 분석, SEM(scanning electron microscopy) 분석을 이용한 표현형 검정 분석 방법으로 비형질전환체와의 차이를 분석한 결과, 형질전환된 배추에서 목적한 *KNS4* 유전자의 교정이 효과적으로 발생했음을 검정하였다 (실시예 3).

[0043] 상기의 결과를 통해, pKNS4RFP 백터는 배추 형질전환 시에 배추의 *KNS4* 유전자의 교정이 효과적으로 발생하여 배추에 웅성불임 형질을 도입할 수 있음을 확인하였다.

[0044] 또한, 본 발명은 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 식물 형질전환용 벡터를 식물체에 형질전환시켜 *KNS4* 유전자의 표적서열에 DNA 삽입/결실(Indel)을 유발하는 단계를 포함하는 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0045] 본 발명의 용어, "형질전환"은 유전물질인 DNA를 다른 계통의 살아 있는 세포에 주입했을 때, DNA가 그 세포에 들어가 유전형질을 변화시키는 현상으로, 형질변환, 형전환, 또는 형변환이라고도 한다.

[0046] 본 발명의 벡터로 식물체를 "형질전환"하는 것은 당업자에게 공지된 형질전환기술에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로는, 아그로박테리움을 이용한 형질전환방법, 미세사출법(microprojectile bombardment), 전기천공(electroporation), PEG-매개 융합법(PEG-mediated fusion), 미세주입법(microinjection), 리포좀 매개법(liposome-mediated method), 인-플란타 형질전환법(In planta transformation), 진공 침윤법(Vacuum infiltration method), 화아침지법(floral meristem dipping method) 및 아그로박테리아 분사법(Agrobacteria spraying method)으로 이루어진 군에서 선택되는 방법을 이용할 수 있으며, 바람직하게는 아크로박테리움(*Agrobacterium*)을 이용한 형질전환 방법을 이용할 수 있다.

[0047] 본 발명에 있어서, 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 또는 수수를 포함하는 식량작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 또는 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩 또는 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 또는 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 또는 튤립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 또는 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있고, 바람직하게는 배추속 식물인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명에 있어서, 상기 형질전환 식물체는 웅성불임인 것일 수 있다.

[0049] 본 발명에 있어서, 상기 제조 방법은 형질전환된 개체(캘러스 등)를 선별하는 단계를 추가적으로 더 포함하는 것일 수 있다.

[0050] 본 발명의 용어, "개체 선별"은 상기 재조합 벡터를 이용하여 생산된 배추 형질전환체를 대상으로 형질전환 유무를 확인하여 형질전환이 이뤄진 형질전환된 개체를 분리하는 단계로서, 구체적으로는 프라이머 쌍을 이용하여 PCR 검정을 통해 선별 후 염기 서열 분석 방법으로 목적한 *KNS4* 유전자의 교정이 효과적으로 발생했음을 검정하는 것을 의미한다. 또한, 화분 염색 용액을 이용하여 화분의 활력을 비교 분석하는 방법과 SEM(scanning electron microscopy)을 이용하여 수술의 외면과 화분의 형성 여부를 비교 분석하는 방법을 통해 *KNS4* 유전자의 교정이 효과적으로 발생했음을 검정하는 것을 의미한다.

[0051] 또한, 본 발명은 상기 형질전환 식물체의 제조 방법으로 제조된 형질전환 식물체를 제공한다.

[0052] 본 발명의 용어, "식물체"는 성숙한 식물체뿐만 아니라 성숙한 식물로 발육할 있는 식물 세포, 식물 조직 및 식

물의 종자 등을 모두 포함하는 개념이다.

[0054] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0056] **실시예 1. 배추 내 *KNS4* 유전자를 교정하는 가이드 RNA(gRNA) 선정**

[0057] **1.1. 배추 내 *KNS4* 유전자를 교정하는 유효 가이드 RNA 영역 분석**

[0058] 본 발명에서는 유전자 교정을 유기하기 위한 23 bp(20 bp + PAM(NGG, 3bp)) 길이를 가지면서 비특이적인 반응을 최소화하는 가이드 RNA를 제작하기 위해 CRISPRdirect(http://crispr.dbcls.jp/) 프로그램을 이용하여 배추의 웅성불임에 관여하는 유전자 정보를 검색하였다. 해당 결과로부터 효과적인 가이드 RNA를 선정하기 위해, GC 비율이 40~60% 사이이며, poly-T가 없고, 가이드 RNA의 서열의 특이성을 총 길이에서 12 mer까지 줄여도 비특이적인 반응이 일어나지 않는 영역을 선발하였다.

[0059] 그 결과, 서열번호 1의 가이드 RNA 염기서열을 선발한 후 이를 "gRNA-KNS4"으로 명명하였다. 해당 선발된 가이드 RNA는 배추 내 *KNS4* 유전자의 4번 엑손(exon)을 특이적으로 인식하도록 디자인하였다.

[0060] 또한, 본 발명자들은 비특이적인 반응을 최소화하기 위하여 e-value가 e-40 이하로 나타나는 배추 유전자를 선정한 결과, 목적하는 배추 *KNS4* 유전자인 Bra010198이 확인되었다 (도 1). 이에 목적한 가이드 RNA의 정확한 염기서열을 확인하기 위한 한 쌍의 프라이머를 제작하였다 (도 2). 이의 프라이머 쌍의 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0062]

프라이머	염기서열	Amplicon size
KNS4_F(서열번호 2)	5'-CAACACAGCATTCAGCAGC-3'	371 bp
KNS4_R(서열번호 3)	5'-CATTGCTGCTGCTGTTGAG-3'	

[0064] **1.2. 배추 유전체 DNA 분리**

[0065] 본 발명에 사용된 내혼계 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis* inbred line "CT001")는 기내의 무균상태에서 키운 것에서 샘플을 채취하여 gDNA 분리에 사용하였다. 간단히, 배추의 잎을 액체 질소를 이용하여 파쇄하고, 800 ㎕ RICE buffer(1M Tris-HCl, 5M NaCl, 0.5M EDTA, 20% SDS) 용액을 첨가하여 잘 섞어준 후, 30 분 동안 65℃에서 반응시켰다. 이후, 800 ㎕의 PCI 용액을 넣고 섞어준 다음, 20℃에서 13,000 rpm으로 15 분 동안 원심분리하고, 그 상등액을 새 튜브로 옮겼다. 획득한 상등액의 1/10 양의 3M Sodium acetate와 2 배의 100% 에탄올을 첨가하여 -20℃에서 1 시간 동안 재조합 DNA를 침전시킨 후, 원심분리하여 침전물을 얻었다. 70% 에탄올로 침전물을 세척한 다음, 에탄올이 없도록 잘 건조시키고, TE buffer(10 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA)에 녹여 사용하였다.

[0067] **1.3. 선정된 가이드 RNA 염기서열 검정**

[0068] 목적하는 배추 내 *KNS4* 유전자를 교정하는 가이드 RNA의 정확한 염기서열을 검증하기 위해, 상기 확보된 배추 gDNA를 이용하여 KNS4_F와 KNS4_R 프라이머 쌍으로 PCR을 수행하여 분리하였다. 간단히, 분리된 gDNA 1 ㎍에 대하여 KNS4_F와 KNS4_R 프라이머 쌍 및 태그 중합효소(Taq polymerase)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 프로그램은 95℃에서 5분간 초기 변성 시간을 둔 뒤, 95℃에서 30초, 57.3℃에서 30초, 72℃에서 40초로 40회 반복(cycle) 실행하고, 마지막으로 72℃에서 10분간 최종 연장시킨 후, 16℃를 유지하여 전체 반응을 종료하였다.

[0069] 증폭된 PCR 산물은 전기영동을 통해 확인하였으며, 목적한 371 bp로 확인되었다 (도 3). 이후, 증폭된 PCR 산물의 염기서열을 분석하기 위해 염기서열 분석용 벡터 pGEM-T easy vector로 클로닝하여 재조합 벡터를 구축하였

다.

[0071] **1.4. 재조합 벡터를 이용한 대장균(*E. coli*) DH10B의 형질전환**

[0072] 대장균 DH10B를 LB 50㎖에 접종시켜 37℃에서 O.D. 570 = 0.375 ~ 0.400이 되도록 배양한 후, 균주배양액을 3,000 rpm에서 10 분간 원심분리하였고, 얻어진 침전물을 0.1M $CaCl_2$ 용액으로 풀어준 뒤 30분간 얼음에 보관하였다. 그 후, 3,000 rpm에서 7분간 원심분리한 뒤 0.1M $CaCl_2$에 침전물을 녹이고, 상기 실시예 1.3.에서 구축한 재조합 벡터를 함께 섞어 얼음에 30분간 두었다가 42℃에서 90 초간 열 충격을 주었다. 이후, 10 분간 얼음에 방치한 후, LB 배지 700 ㎕를 첨가하여 37℃에서 1 시간 진탕배양하였다. 배양액을 12,000 rpm으로 수 초간 원심분리한 후, 100 ㎕만 남기고, 상등액을 제거하였으며, 남은 상등액으로 침전물을 녹였다. 이후, 앰피실린(ampicillin, 50 mg/ℓ), X-gal(200 mg/ℓ in N-N dimethylformamide) 및 IPTG (200 mg/ℓ)가 첨가된 고체 LB 배지에 녹인 침전물을 전개하고, 37℃에서 12 시간 배양한 후 고체 배지에서 저항성을 보이며 흰색의 콜로니를 형성하는 형질전환 콜로니를 선발하였다.

[0074] **1.5. 재조합 DNA 분리 및 유전자 삽입 여부 조사**

[0075] 항생제가 첨가된 LB 배지 3 ㎖에 상기 선발한 형질전환 콜로니를 접종한 후 37℃에서 12 시간 배양하고, 배양액을 4℃에서 12,000 rpm으로 10 분간 원심분리 하였다. 침전된 균 덩어리에 Solution I(200 ㎕/㎖)을 첨가하여 보텍스(vortex)를 수초 간 수행하여 충분히 풀어준 후, Solution Ⅱ(200 ㎕/㎖)를 첨가하여 조심스럽게 섞어주어 세포막이 완전히 깨어지도록 실온에서 5 분간 방치하였다. 이후 Solution Ⅲ(200 ㎕/㎖)를 첨가하여 잘 섞어주고, 얼음에서 10 분간 방치한 뒤, 12,000 rpm으로 4℃에서 10 분간 원심분리 하여 상등액을 획득하였다. 획득한 상등액의 1/10 양의 NaOAc와 2.5 배의 100% 에탄올을 첨가하여 -20℃에서 2 시간 동안 재조합 DNA를 침전시킨 후, 원심분리하여 침전물을 얻었다. 70% 에탄올로 침전물을 세척한 다음 멸균 증류수에 녹여 사용하였다.

[0076] 목적하는 배추 *KNS4* 유전자의 가이드 RNA의 정확한 염기서열을 검증하기 위해 상기 분리한 재조합 DNA의 염기서열을 ㈜마크로젠에 의뢰하여 서열분석(sequencing)을 수행하였다. 그 결과, 서열분석을 통해 목적한 서열번호 1의 염기서열을 확인하였으며, 본 발명의 가이드 RNA는 다른 유전자를 비특이적으로 인식하지 않음을 확인하였다(도 4).

[0078] **실시예 2. 선발된 배추 내 *KNS4* 유전자를 교정하는 가이드 RNA(gRNA)가 도입된 식물 형질전환용 바이너리 벡터 제작**

[0079] **2.1. 목적 가이드 RNA 카세트(cassette) 구축**

[0080] 선발된 목적 가이드 RNA를 식물형질전환용 바이너리 벡터에 도입하기 위하여 제한효소 인식 서열을 추가한 가이드 RNA 카세트를 구축하였다. 추가한 제한효소 인식 서열은 *Sac*Ⅰ으로, 최종 벡터의 기존 애기장대 U6 프로모터 앞뒤로 1개의 자리를 가지고 있어 용이하게 도입할 수 있다. 정확한 가이드 RNA를 도입하기 위해 ㈜마크로젠에 의뢰하여, 단편의 양끝에 *Sac*Ⅰ인식 서열을 가지고 있으며, 동시에 목적한 가이드 RNA 및 애기장대 U6 프로모터의 염기서열을 가진 DNA 단편과 reporter 유전자인 DsRed 형광단백질(RFP)을 합성하여 최종 바이너리 벡터에 도입하였다.

[0081] 제한 효소 *Sac*Ⅰ인식 서열을 가지면서 목적한 가이드 RNA 및 애기장대 U6 프로모터, DsRed 형광단백질의 염기서열이 합성된 DNA 단편을 최종 식물형질전환용 바이너리 벡터에 도입하는 전략을 나타낸다 (도 5).

[0083] **2.2. 배추 내 *KNS4* 유전자를 교정하는 식물 형질전환용 바이너리 벡터 pKNS4RFP 제작**

[0084] 상기 확보된 제한 효소 *Sac*Ⅰ인식 서열을 가지면서 목적한 가이드 RNA 및 애기장대 U6 프로모터, DsRed 형광단백질의 염기서열을 가진 합성된 DNA 단편을 최종 식물 형질전환용 바이너리 벡터에 도입하기 위해, 각각의 플라스미드를 상기 실시예의 방법으로 분리한 후 제한효소 처리하여 최종 벡터에 도입하였다 (도 6).

[0085] 이후, 정확한 재조합 벡터가 합성되었는지를 검정하기 위해 서열분석(sequencing)을 통해 염기서열을 분석한 후, NCBI Blast 프로그램으로 비교 검정한 결과, 목적한 가이드 RNA가 벡터 내로 정확하게 도입되었음을 확인하

였다 (도 7).

[0086] 최종 완성된 배추 내 *KNS4* 유전자를 교정하는 식물 형질전환용 바이너리 벡터 pKNS4RFP의 모식도 및 제한효소 위치는 도 8에 나타내었다.

[0088] **실시예 3. 배추 내 *KNS4* 유전자를 교정하는 식물 형질전환용 바이너리 벡터 pKNS4RFP를 이용한 형질전환 배추의 제작**

[0089] **3.1. 형질전환 배추의 제작**

[0090] 상기 제작된 식물 형질전환용 바이너리 벡터 pKNS4RFP의 배추 내 *KNS4* 유전자 교정 효율을 분석하기 위해, "아그로박테리움에 의한 효율적인 배추의 형질전환방법 (등록특허 제10-0523758호, 2005.10.31.)"을 이용하여 배추의 형질전환을 실시하였다. 배추에 접종하는 형질전환 매개체로는 식물 형질전환용 벡터 pKNS4RFP를 함유하고 있는 아그로박테리움 투마파시엔(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404/pKNS4RFP를 사용하였다. 정확한 벡터의 도입을 검증하기 위해 완성된 pKNS4RFP 벡터를 아그로박테리움에 형질전환한 후 각 플라스미드를 분리하여 벡터 내부에 존재하는 *EcoR*Ⅰ 및 *Hind*Ⅲ를 동시에 처리하여 전기영동으로 분석하였다.

[0091] 그 결과, 완성된 pKNS4RFP 벡터에 도입된 가이드 RNA 카세트에 존재하는 *EcoR*Ⅰ 인식 서열로 8,529 bp, 5,174 bp 및 2,461 bp로 각각 확인됨으로써, 바이너리 벡터 pKNS4RFP가 아그로박테리움에 형질전환되었음을 확인하였다 (도 9).

[0092] 또한, 상기 형질전환 방법에 의해 제작된 형질전환 배추의 캘러스, 신초, 뿌리가 유기된 것을 확인하였다 (도 10).

[0094] **3.2. 배추 내 *KNS4* 유전자 교정 확인을 위한 서열분석**

[0095] 상기 제작된 pKNS4RFP 벡터의 배추 내 *KNS4* 유전자 교정 여부를 분석하기 위해, 하이그로마이신(hygromycin) 저항성을 가진 형질전환된 배추의 T-DNA에 대하여 HPT709-F(서열번호 6)와 HPT709-R(서열번호 7) 프라이머 쌍을 사용하여 PCR 검정을 수행하였다. 그 결과, 형질전환된 배추는 목적한 T-DNA(709 bp)가 포함됨을 확인되었다 (도 11).

[0096] 이후, 선발된 7번 개체에 대하여 KNS4_F(서열번호 2)와 KNS4_R(서열번호 3) 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행한 후 (도 12), 배추 내 *KNS4* 유전자로부터 증폭된 가이드 RNA를 포함하는 영역을 마크로젠에 의뢰하여 서열분석을 실시하였다. 그 결과, 제작된 pKNS4RFP 벡터에 의해 배추의 웅성불임에 관여하는 *KNS4* 유전자 내에 염기서열의 삽입(insertion)이 확인되었다 (도 13).

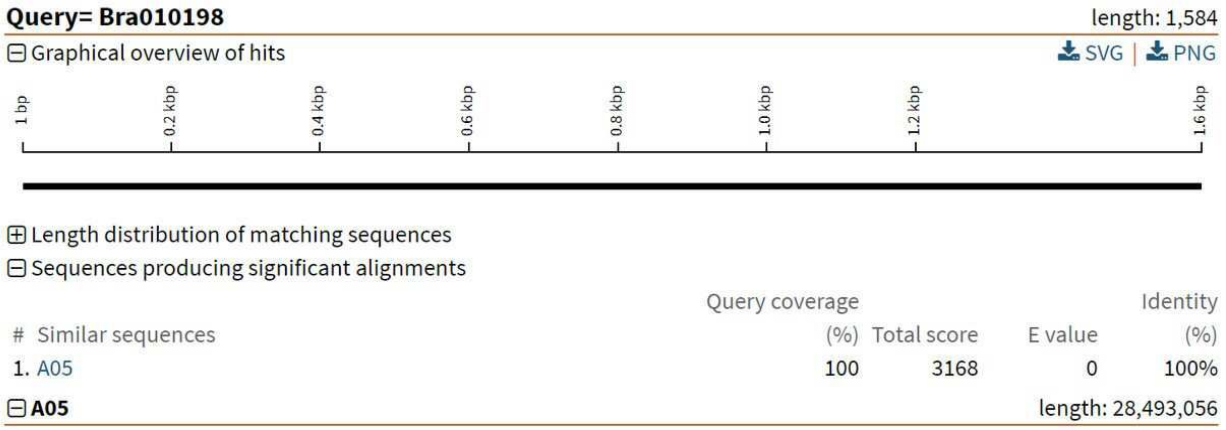
[0097] 다음으로, 배추 내 *KNS4* 유전자를 교정하는 식물 형질전환용 바이너리 벡터 pKNSRFP로 인해 형질전환된 웅성불임 배추의 웅성기관 표현형을 대조군과 비교 분석하였다. 내혼계 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis* inbred line)인 CT001은 대조군으로 사용하였다. 그 결과, 각 화기의 형태, I_2-KI 화분 염색(pollen staining) 분석, 1% TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 화분 염색 분석 및 SEM(scanning electron microscopy) 분석을 통해, 웅성불임의 형질전환 배추가 효과적으로 개발되었음을 확인하였다 (도 14).

[0099] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

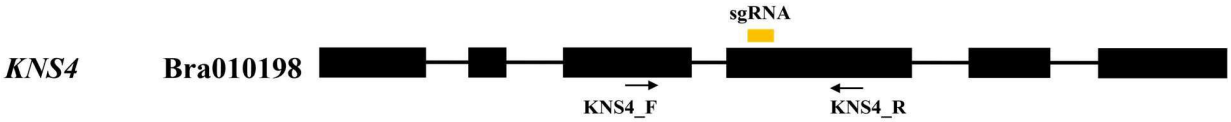
[0100] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

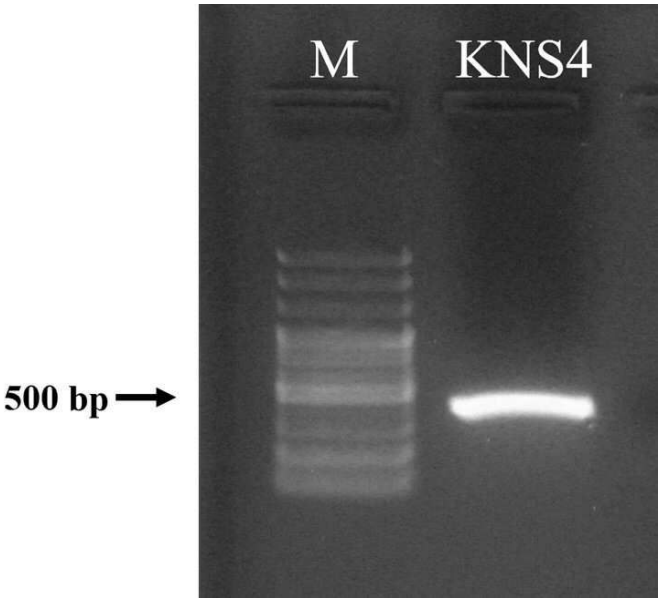
도면1



도면2



도면3



도면4

Query: *KNS4*_Bra010198

Sbjct: *KNS4*_Bra010198_Seq

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
610 bits(330)	2e-179	330/330(100%)	0/330(0%)	Plus/Plus

```
Query  10   ATTCAGCAGCAAGAAAAGACGTGACTCGGTGAGGCAGACATGGATGCCAACAGGAGAAAA  69
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    ATTCAGCAGCAAGAAAAGACGTGACTCGGTGAGGCAGACATGGATGCCAACAGGAGAAAA  60

Query  70   GCTGAAGAAAATCGAGAAAGAGAAAGGGATTGTTGTAAGGTTGTGAAGTAAAGCAAGGAA  129
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61   GCTGAAGAAAATCGAGAAAGAGAAAGGGATTGTTGTAAGGTTGTGAAGTAAAGCAAGGAA  120

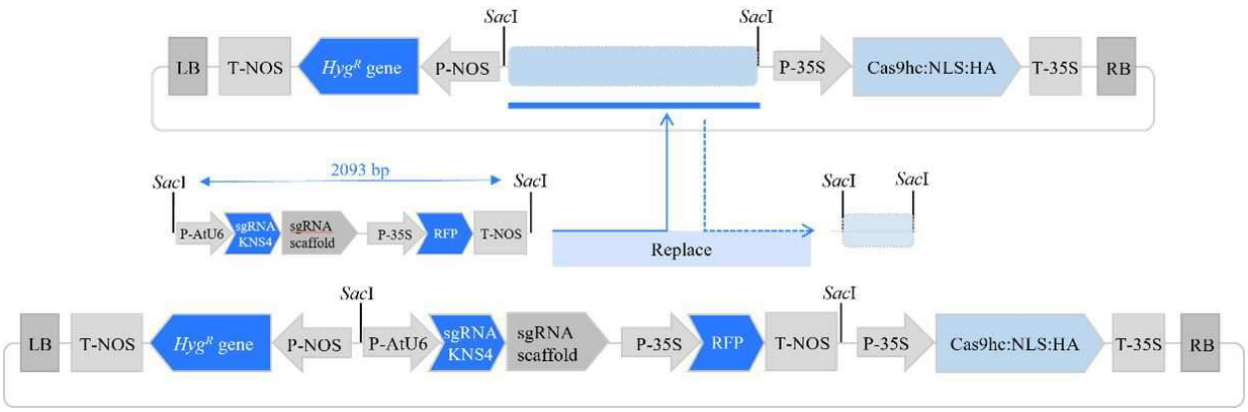
Query  130  AAGACAATAATTATCAAAAAGCGAGTCATCTAAAGTTTGTTGATGTTGTTGTCAGGTTTG  189
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121  AAGACAATAATTATCAAAAAGCGAGTCATCTAAAGTTTGTTGATGTTGTTGTCAGGTTTG  180

Query  190  TGATAGGACACAGTGCAACCCCAGGAGGAGTACTAGACAAAGCCATAGATGAAGAAGATT  249
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181  TGATAGGACACAGTGCAACCCCAGGAGGAGTACTAGACAAAGCCATAGATGAAGAAGATT  240

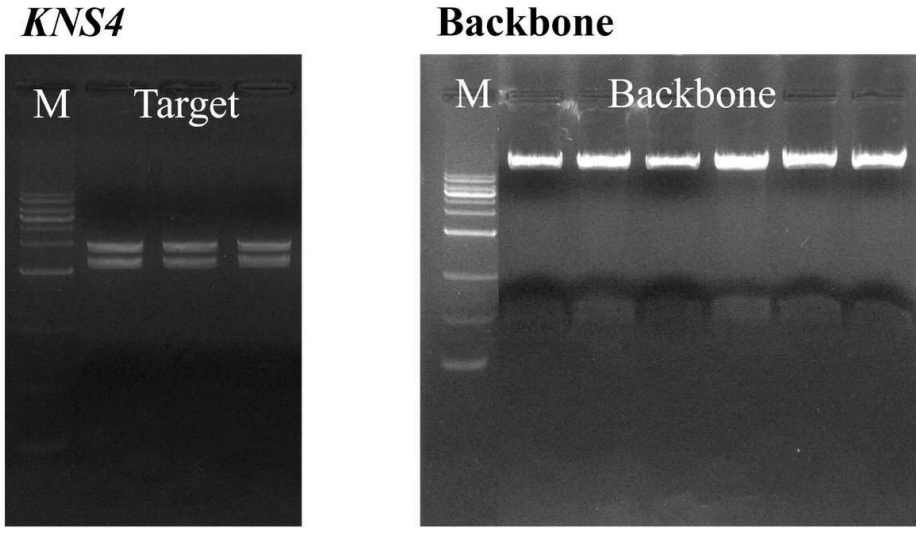
Query  250  TAGAGCATAAAGATTTCTTGAGACTAAAACACATTGAAGGATATCATCAGCTCTCTACAA  309
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241  TAGAGCATAAAGATTTCTTGAGACTAAAACACATTGAAGGATATCATCAGCTCTCTACAA  300

Query  310  AGACAAGACTCTACTTCTCAACAGCAGCAG  339
           |||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301  AGACAAGACTCTACTTCTCAACAGCAGCAG  330
```

도면5



도면6



도면7

Query : pKNS4RFP vector (expected)
Sbjct : pKNS4RFP vector

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1751 bits(948)	0.0	948/948(100%)	0/948(0%)	Plus/Plus

```
Query  1     GAGCTCGAATTCGAATGATTAGGCATCGAACCTTCAAGAATTTGATTGAATAAAACATCT  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  346   GAGCTCGAATTCGAATGATTAGGCATCGAACCTTCAAGAATTTGATTGAATAAAACATCT  405

Query  61    TCATTCTTAAGATATGAAGATAATCTTCAAAAGGCCCCTGGGAATCTGAAAGAAGAGAAG  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  406   TCATTCTTAAGATATGAAGATAATCTTCAAAAGGCCCCTGGGAATCTGAAAGAAGAGAAG  465

Query  121   CAGGCCCATTTATATGGGAAAGAACAATAGTATTTCTTATATAGGCCCATTTAAGTTGAA  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  466   CAGGCCCATTTATATGGGAAAGAACAATAGTATTTCTTATATAGGCCCATTTAAGTTGAA  525

Query  181   AACAATCTTCAAAAGTCCCACATCGCTTAGATAAGAAAACGAAGCTGAGTTTATATACAG  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  526   AACAATCTTCAAAAGTCCCACATCGCTTAGATAAGAAAACGAAGCTGAGTTTATATACAG  585

Query  241   CTAGAGTCGAAGTAGTGATTGGGACACAGTGCAACCCCAGGGTTTTAGAGCTAGAAATAG  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  586   CTAGAGTCGAAGTAGTGATTGGGACACAGTGCAACCCCAGGGTTTTAGAGCTAGAAATAG  645

Query  301   CAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTT  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  646   CAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTT  705

Query  361   TTTCTCGAGATGGTGGAGCACGACACTCTCGTCTACTCCAAGAATATCAAAGATACAGTC  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  706   TTTCTCGAGATGGTGGAGCACGACACTCTCGTCTACTCCAAGAATATCAAAGATACAGTC  765

Query  421   TCAGAAGACCAAAGGGCTATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCGGGAAACCTCCTC  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  766   TCAGAAGACCAAAGGGCTATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCGGGAAACCTCCTC  825

Query  481   GGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTCATCAAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGC  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  826   GGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTCATCAAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGC  885

Query  541   ACCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCTATCGTTCAAGATGCCTCTGCCGAC  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  886   ACCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCTATCGTTCAAGATGCCTCTGCCGAC  945

Query  601   AGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCA  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  946   AGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCA  1005

Query  661   ACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACTCTCGTC  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1006  ACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACTCTCGTC  1065

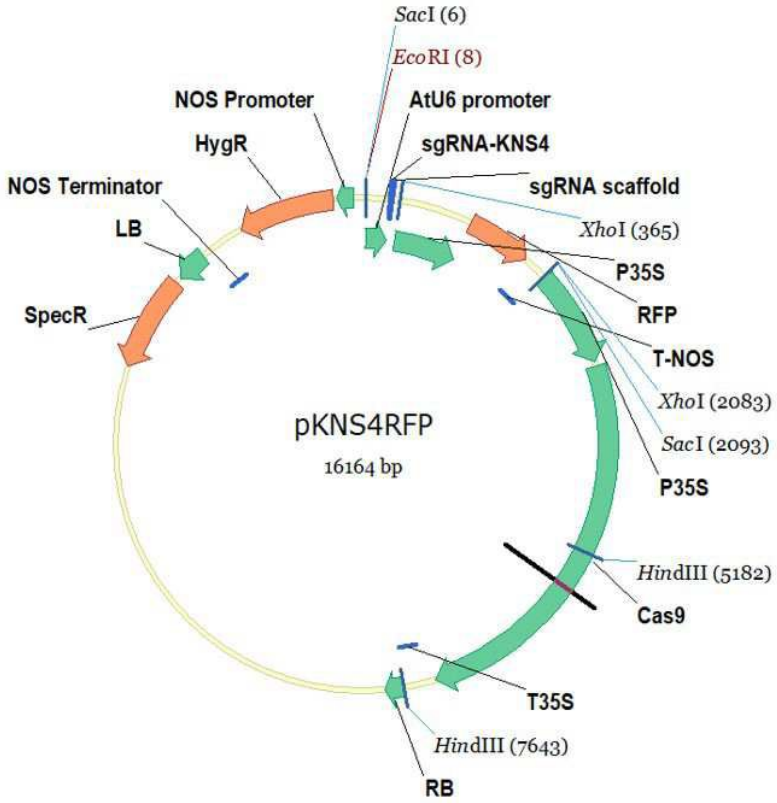
Query  721   TACTCCAAGAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCTATTGAGACTTTTCAA  780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1066  TACTCCAAGAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCTATTGAGACTTTTCAA  1125

Query  781   CAAAGGGTAATATCGGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTCATC  840
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1126  CAAAGGGTAATATCGGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTCATC  1185

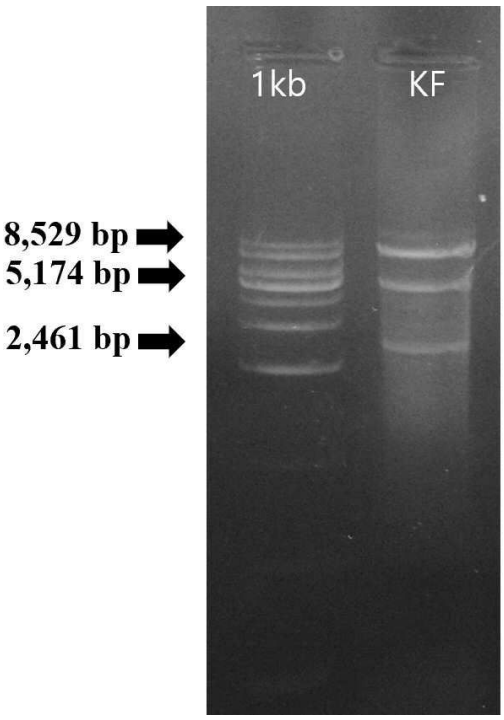
Query  841   AAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGCACCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAG  900
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1186  AAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGCACCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAG  1245

Query  901   GCTATCGTTCAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCC  948
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1246  GCTATCGTTCAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCC  1293
```

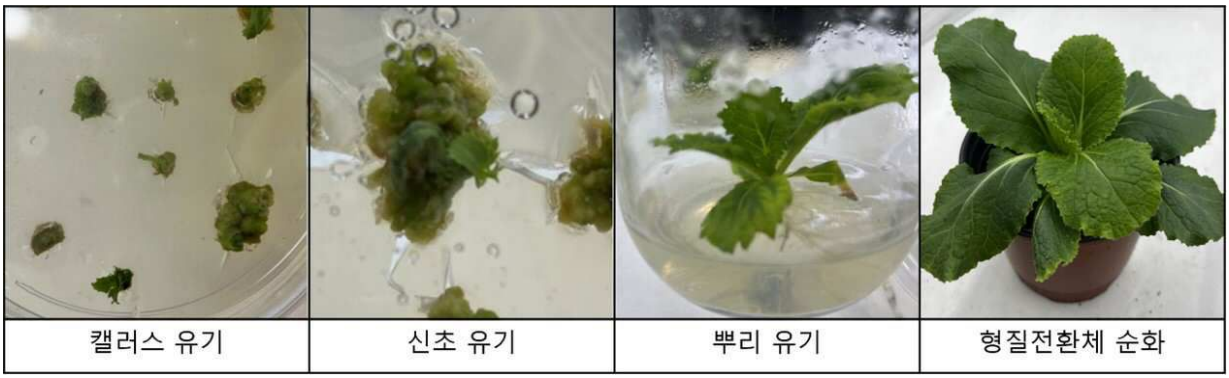
도면8


SacI (6)
EcoRI (8)
NOS Promoter
AtU6 promoter
HygR
sgRNA-KNS4
NOS Terminator
sgRNA scaffold
XhoI (365)
LB
P35S
SpecR
RFP
T-NOS
pKNS4RFP
16164 bp
XhoI (2083)
SacI (2093)
P35S
HindIII (5182)
Cas9
T35S
HindIII (7643)
RB

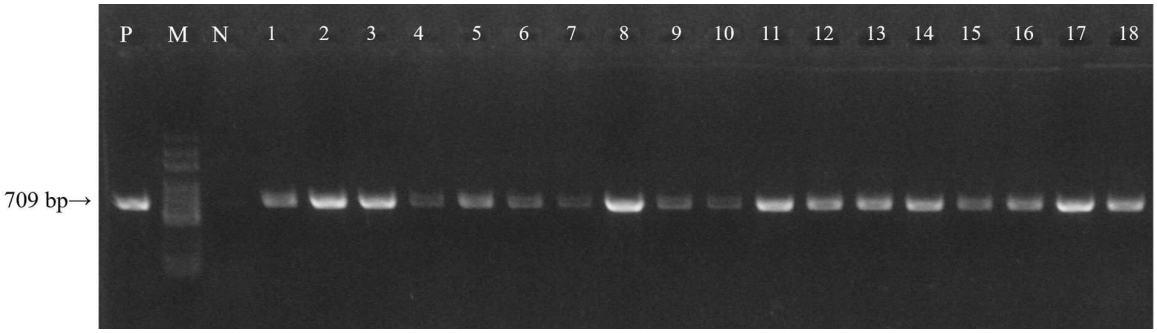
도면9


1kb
KF
8,529 bp
5,174 bp
2,461 bp

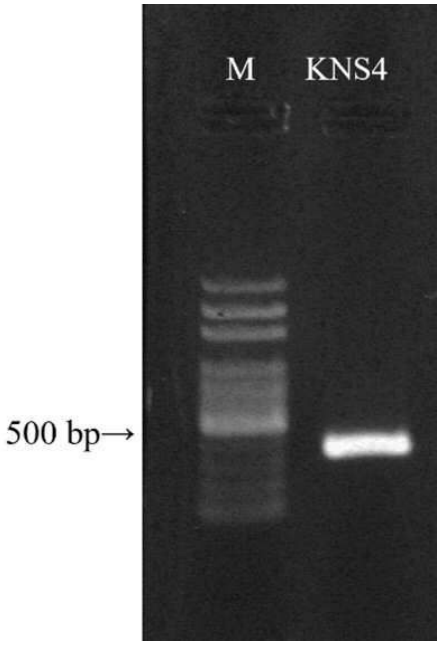
도면10



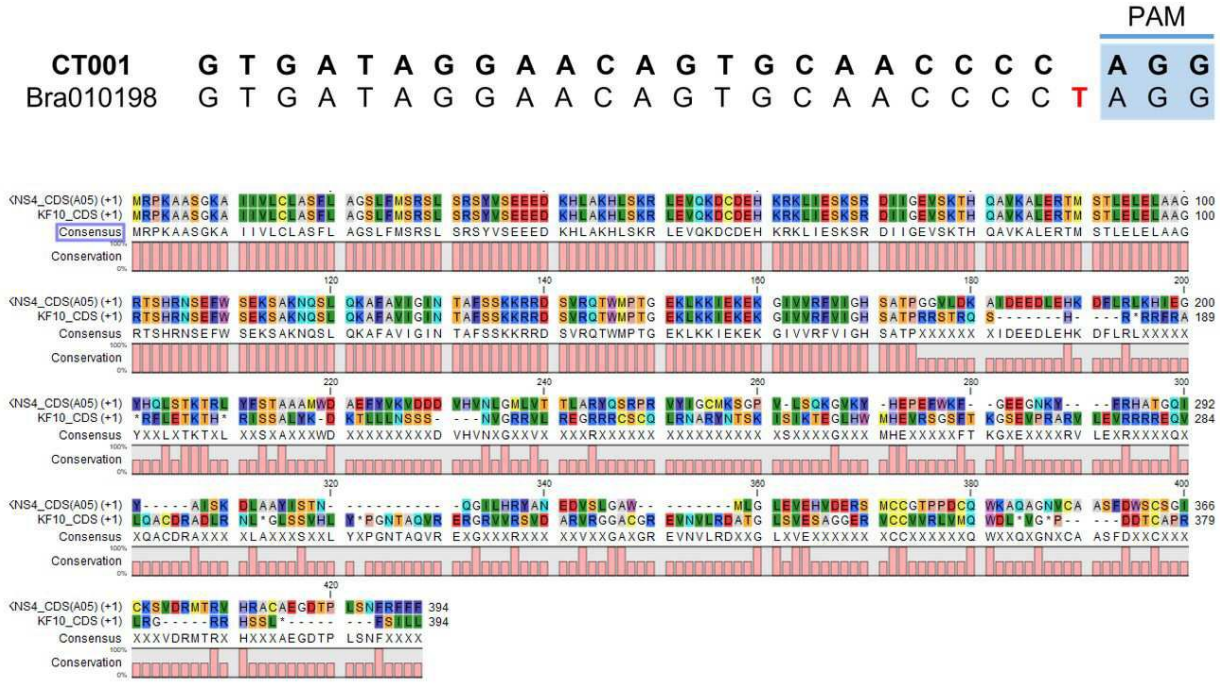
도면11



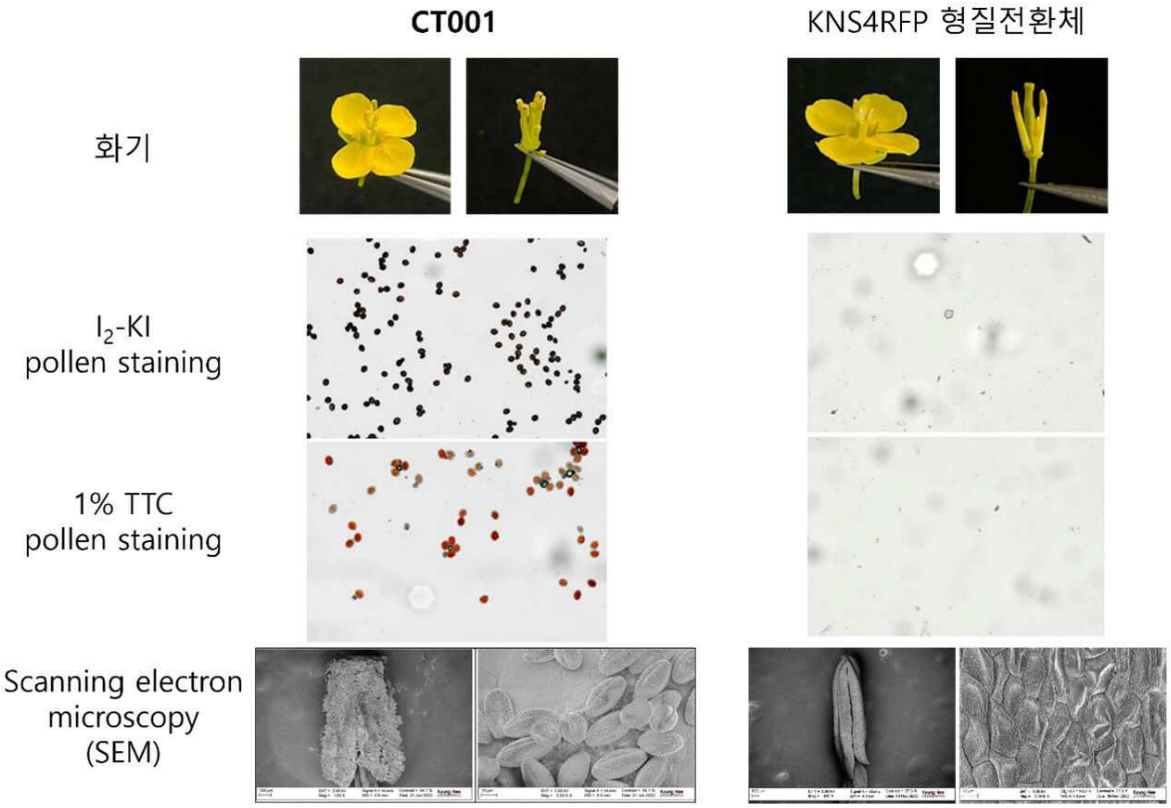
도면12



도면13


PAM
CT001 G T G A T A G G A A C A G T G C A A C C C C A G G
Bra010198 G T G A T A G G A A C A G T G C A A C C C C T A G G
KNS4_CDS(A05) (+1)
KF10_CDS (+1)
Consensus
Conservation

도면14


CT001
KNS4RFP 형질전환체
화기
I2-KI pollen staining
1% TTC pollen staining
Scanning electron microscopy (SEM)

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.