



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0055020
(43) 공개일자 2021년05월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/63 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/10 (2017.01) C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/90 (2006.01) C12N 9/22 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/63 (2013.01)
C07K 14/4747 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-0147401
(22) 출원일자 2020년11월06일
심사청구일자 2020년11월06일
- (30) 우선권주장
1020190141173 2019년11월06일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
- (72) 발명자
성영훈
서울시 강북구 도봉로 47길 26, 401호(미아동, 오
봉예체뜰안)
정연주
인천광역시 부평구 동수로120번길 43, 201동 503
호(부평동, 부평엘에이치2단지)
김경남
울산광역시 울주군 범서읍 평천길 94, 101동 200
7호(천상 청구 그린타운)
- (74) 대리인
특허법인(유한)아이시스

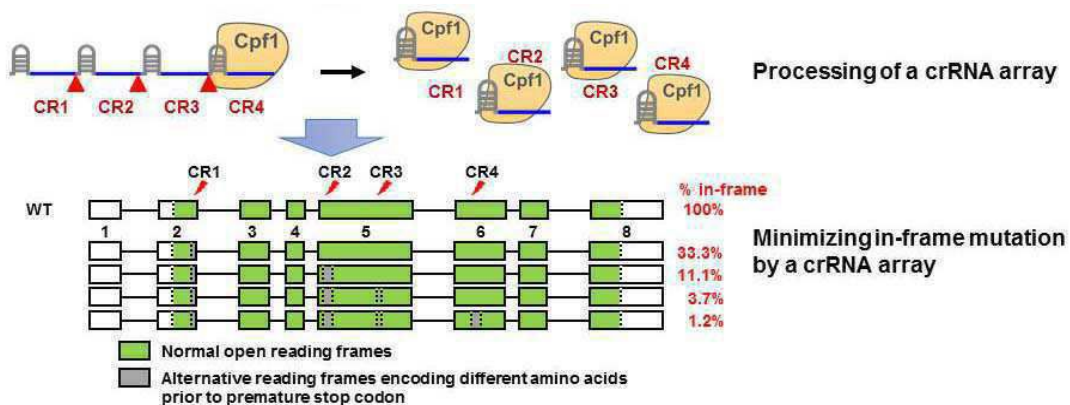
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 crRNA array 및 Cpf1을 포함하는, 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주 제조용 조성물 및 이의
용도

(57) 요약

본 발명은 crRNA array 및 Cpf1을 포함하는, 유전자 녹아웃 세포주 제조용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 프레임 시프트에 의해 각각 독립적으로 조기 종결코돈을 유발할 수 있는 능력이 검증된 다중의 crRNA가 순차적으로 연결된 crRNA array 및 Cpf1을 포함하는 유전자 녹아웃 세포주 제조용 조성물 및 (뒷면에 계속)

대표도 - 도2b



상기 조성물을 이용하여 단일 클론세포 배양과정을 거치지 않고 유전자 녹아웃 세포주를 제조하는 방법에 관한 것이다.

본 발명자들은 후순위에 위치하는 crRNA이 작동하여, 상기 선순위에 위치한 crRNA에 의한 조기 종결코돈을 보전하면서도 인-프레임 돌연변이에 의한 잔류 단백질 발현을 효과적으로 감소시키는 조기 종결코돈을 추가로 생성시키는 후순위 crRNA를 연속적으로 적용시키는 방법을 적용하여 단백질 발현을 최소화함으로써 유전자 녹아웃 동질 유전자형 세포주를 만들 수 있음을 최초로 규명하였는 바, 상기를 이용하면 단일 클론세포 배양과정을 거치지 않고 단일 유전자 녹아웃 효율이 매우 높은 녹아웃 세포주를 제조할 수 있어 본 발명에 따른 조성물, 이를 사용하는 유전자 녹아웃 세포주의 제조방법 및 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주는 유전자의 기능 및 유전병의 연구, 유전병 치료 기전 규명 또는 치료제 개발에 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

(52) CPC특허분류

C12N 15/102 (2013.01)

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 15/907 (2013.01)

C12N 9/22 (2013.01)

C12N 2310/20 (2017.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711070249
과제번호	2017M3A9C4065958
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명	자가포식 기반 천연물 신약후보 스크리닝을 통한 간암 표적항암제 내성 극복 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	울산대학교
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711084403
과제번호	2018R1A2B6002192
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	CRISPR-Cpf1 Knockin 마우스 제작을 통한 새로운 질환모델마우스 확립 전략에 관한 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	울산대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

순차적으로 작동하여 조기 종결코돈 (premature stop codon)을 유발하는 다중의 crRNA를 포함하는 crRNA array 및 Cpf1을 포함하는, 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주 제조용 조성물로서,

상기 crRNA array는 후순위의 crRNA가 선순위의 crRNA의 인-프레임 돌연변이 (in-frame mutation)에 의한 잔류 단백질 발현을 효과적으로 감소시키는 조기 종결코돈을 추가로 생성시키는 것을 특징으로 하는, 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주 제조용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 crRNA array는 4개의 crRNA를 포함하는 것을 특징으로 하는, 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주 제조용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 유전자는 단일 유전자인 것을 특징으로 하는, 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주 제조용 조성물.

청구항 4

조기 종결코돈을 유발하는 다중의 crRNA를 포함하는, 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주 제조용 벡터.

청구항 5

제4항에 따른 벡터 또는 RNA; 및

Cpf1 mRNA, Cpf1 재조합 단백질 또는 Cpf1을 발현하는 벡터를 세포주에 도입하는 단계를 포함하는, 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 유전자는 단일 유전자인 것을 특징으로 하는, 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주의 제조방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 방법은 단일 클론세포 배양과정을 거치지 않는 것을 특징으로 하는, 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주의 제조방법.

청구항 8

제5항의 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주의 제조방법으로 제조된, 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 crRNA array 및 Cpf1을 포함하는, 유전자 녹아웃 세포주 제조용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 각각 독립적으로 조기 종결코돈 (premature stop codon)을 유발할 수 있는 다중의 crRNA를 포함하는 crRNA array 및 Cpf1을 포함하는 유전자 녹아웃 세포 제조용 조성물 및 상기 조성물을 이용하여 단일 클론세포 배양과정을 거치지 않고 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 동일한 유전적 배경을 바탕으로 하되, 단일 유전자에 대해 유전형 (genotype)이 다른 세포주를 동질유전자형 세포주 (isogenic cell line)라고 한다. 동질유전자형 세포주는 유전자 녹아웃의 표현형을 세포 수준에서 연구하는 데에 중요한 재료로써 사용되지만 이를 제작하기 위한 기존의 방법은 세포 내에서 상동 재조합 (homologous recombination)을 일으켜 유전자 녹아웃을 유발할 수 밖에 없었고, 또한 이를 위해서는 타겟팅 벡터 (targeting vector)가 필요하며, 상기 벡터는 일반적으로 5~10 kb에 이르는 상동 암 (homology arm)과 양성 선별 (positive selection) 및 음성 선별 (negative selection)을 수행하기 위한 발현 카세트 (expression cassette)를 포함해야만 한다. 더욱이, 상동 재조합 자체도 매우 낮은 효율로 일어나기 때문에 유전자가 제대로 녹아웃된 동질유전자형 세포주를 구축하기 위해서는 상당한 노력이 필요하였다.

[0003] 한편 상기 녹아웃 세포주 제조방법에 대안적으로 CRISPR-Cas9 시스템을 이용할 수 있는데, 상기 시스템은 HNH와 RuvC라는 nuclease motif를 가지고 있는 Cas9 단백질을 포함하고, Cas9과 결합하여 표적 DNA 서열을 인식할 수 있도록 하는 CRISPR RNA (crRNA) 및 crRNA와 상호작용하는 transactivating crRNA (tracrRNA)로 구성되며, 평활 말단의 이중 가닥 절단 (blunt-ended double-strand break; DSB)을 유발한다고 보고되어 있다.

[0004] 상기 Cas9 nucleoprotein complex가 표적 DNA를 인식하기 위해서는 표적 DNA 상에 protospacer-adjacent motif (PAM)라고 하는 특정 염기서열이 존재해야 하며, 상기과 같이 유발된 DSB는 대부분 세포 내에 존재하는 비상동 말단연결 (Non-homologous End-Joining, NHEJ) 활성을 통해 수선되는데, 비상동말단연결은 error-prone mechanism으로 수선되는 도중에 삽입 (insertion) 및 결실 (deletion)이 빈번하게 일어나고, 이를 통해 단백질 암호화 서열에 조기 종결코돈 (premature stop codon)을 발생시키는 프레임시프트 돌연변이 (frameshift mutation)가 발생하게 되는 것이다. 그러나 세포주가 조기 종결코돈이 생성되었으며 인-프레임 돌연변이 (in-frame mutation)가 없는 세포주인지 여부를 확인하기 위해서는 클론을 얻어서 유전형 (genotype)을 확인해야만 하는 번거로움이 있었다. 또한 유전자 녹아웃이 확인되었다라도 대부분의 암세포주 (cancer cell line)가 나타내는 다양성(clonal variation)으로 인해 그 표현형이 다양하게 나타날 수 있어 다수의 유전자 녹아웃 클론들을 대상으로 실험을 진행해야만 유전형 (genotype)에 의한 표현형을 검증할 수 있다.

[0005] 이에, 클론세포를 배양하는 번거로움 없이 유전자 녹아웃 세포주의 제조가 가능한 새로운 방법에 대한 필요성이 크며, 다양한 박테리아에서 유래된 Cpf1 중 일부가 세포주에서 DSB를 유발하는 것이 발견되었고 (Cell. 2015 Oct 22;163(3):759-71.), 이를 이용한 단일유전자 녹아웃 세포주의 제조방법에 관한 다양한 연구가 진행되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 Cpf1의 pre-crRNA 프로세싱 활성을 이용하면 여러 개의 crRNA가 연결된 하나의 crRNA를 발현시키더라도 여러 개의 유전자를 동시에 공략할 수 있다는 것을 참조하여 (Nat Biotechnol. 2017 Jan;35(1):31-34), 이를 하나의 유전자가 녹아웃된 세포주를 만드는 데에 적용하기 위해 예의 연구한 결과, 선순위에 위치하는 crRNA에 의해 유발된 비상동말단연결에 의해 만들어진 3n+1과 3n+2의 조기 종결코돈보다 다운스트림의 염기서열을 공략하면서 후순위에 위치하는 crRNA를 이용하여, 상기 선순위에 위치한 crRNA에 의한 조기 종결코돈을 보전

하면서도 인-프레임 돌연변이 ($3n \pm 3$)에 대해서는 추가적으로 $3n+1$ 과 $3n+2$ 돌연변이에 의한 조기 종결코돈을 유도하는 전략을 다중의 다운스트림 crRNA로 연속적으로 적용하여 유전자의 기능 연구에 충분한 수준의 유전자 녹아웃 세포주를 만들 수 있음을 최초로 규명하였는 바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

- [0007] 이에, 본 발명은 순차적으로 작동하여 조기 종결코돈 (premature stop codon)을 유발하는 다중의 crRNA를 포함하는 crRNA array 및 Cpf1을 포함하는, 유전자 녹아웃 세포주 제조용 조성물로서, 상기 crRNA array는 후순위의 crRNA가 선순위의 crRNA의 인-프레임 돌연변이 (in-frame mutation)에 의한 잔류 단백질 발현을 효과적으로 감소시키는 조기 종결코돈을 추가로 생성시키는 것을 특징으로 하는, 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주 제조용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0008] 또한 본 발명은 조기 종결코돈을 유발하는 다중의 crRNA를 포함하는, 유전자 녹아웃 세포주 제조용 벡터를 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.
- [0009] 또한 본 발명은 상기 벡터 또는 RNA; 및
- [0010] Cpf1 mRNA, Cpf1 재조합 단백질 또는 Cpf1을 발현하는 벡터를 세포주에 도입하는 단계를 포함하는, 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주의 제조방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [0011] 또한 본 발명은 상기 유전자 녹아웃 세포주의 제조방법으로 제조된 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [0013] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 유전자의 염기서열 중에서도 실제로 단백질을 암호화하는 염기서열 (coding sequence, cds)의 분석을 통해서, 선행되는 crRNA에 의해 유도되는 조기 종결코돈을 보존하면서, 그 조기 종결코돈 보다 후순위에서 인-프레임 돌연변이 (in-frame mutation)를 공략하여 새로운 조기 종결코돈들을 유발할 것으로 예상되는 crRNA들을 디자인하였고, 그 각각의 crRNA의 비상동말단연결 (Non-homologous End-Joining, NHEJ) 활성을 해당 세포주에서 독립적으로 테스트하여 효과적으로 조기 종결코돈 (premature stop codon)을 유발할 수 있을 것으로 예상되는 crRNA들을 선발하였다.
- [0015] 이에, 본 발명은 상기 정보를 바탕으로 제조된 다중의 고효율 crRNA를 포함하는 crRNA array 및 Cpf1을 포함하는, 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주 제조용 조성물로서, 상기 crRNA array는 후순위의 crRNA가 선순위의 crRNA의 인-프레임 돌연변이 (in-frame mutation)에 의한 잔류 단백질 발현을 추가적인 조기 종결코돈의 생성을 통해 효과적으로 감소시키는 것을 특징으로 하는, 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주 제조용 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 일 구현예로, 상기 crRNA array는 4개의 crRNA를 포함하는 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 다른 구현예로, 상기의 대상 유전자는 단일 유전자인 것일 수 있다.
- [0018] 또한 본 발명은 유전자의 염기서열 중에서도 실제로 단백질을 암호화하는 염기서열 (coding sequence, cds)의 분석을 통해서, 선행되는 crRNA에 의해 유도되는 조기 종결코돈을 보존하면서, 그 조기 종결코돈 보다 후순위에서 인-프레임 돌연변이 (in-frame mutation)를 공략하여 새로운 조기 종결코돈들을 유발할 것으로 예상되는 crRNA들에 대한 정보를 제공하는 것일 수 있다.
- [0019] 또한 본 발명은 디자인된 각각의 crRNA가 특정 세포주에서 나타내는 비상동말단연결 (Non-homologous End-Joining, NHEJ) 활성에 대한 정보를 제공하는 것일 수 있다.
- [0020] 또한 본 발명은 조기 종결코돈을 유발하는 다중의 crRNA를 포함하는, 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주 제조용 벡터를 제공한다.
- [0021] 또한 본 발명은 상기 다중의 crRNA를 포함하는 벡터 또는 RNA; 및
- [0022] Cpf1 mRNA, Cpf1 재조합 단백질 또는 Cpf1을 발현하는 벡터를 세포에 도입하는 단계를 포함하는, 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주의 제조방법을 제공한다.

- [0023] 본 발명의 일 구현예로, 상기의 대상 유전자는 단일 유전자인 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 방법은 단일 클론세포 배양과정을 거치지 않는 것일 수 있다.
- [0025] 또한 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주를 제공한다.

발명의 효과

- [0026] 본 발명자들은 선순위에 위치하는 crRNA에 의해 유발된 비상동말단연결에 의해 만들어진 3n+1과 3n+2의 조기 종결코돈보다 다운 스트림의 염기서열을 공략하는, 후순위에 위치하는 crRNA이 작동하여, 상기 선순위에 위치하는 crRNA에 의한 조기 종결코돈을 보전하면서도 인-프레임 돌연변이에 의한 잔류 단백질 발현을 효과적으로 감소시키는 추가적인 조기 종결코돈이 생성되도록 하는 유전자 녹아웃 세포주를 만들 수 있음을 최초로 규명하였는 바, 상기를 이용하면 단일 클론세포 배양과정을 거치지 않고 단일 유전자 녹아웃 효율이 매우 높은 녹아웃 세포주를 제조할 수 있어 본 발명에 따른 조성물, 이를 사용하는 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주의 제조방법 및 이에 의해 제조된 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주는 유전자의 기능 및 유전병의 연구, 유전병 치료 기전 규명 또는 치료제 개발에 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 조기 종결코돈의 생성을 최대화하기 위한 crRNA 선별 방법으로서, 서로 다른 프레임시프트 (frameshift) 돌연변이를 일으키는, crRNA를 순차적으로 적용한 경우 인-프레임 돌연변이의 확률이 줄어드는 것을 모식적으로 나타낸 것이다.

도 2는 crRNA array를 생산하는 과정을 나타낸 것으로서, 도 2a는 crRNA를 선별하되, 이 때 프레임시프트 돌연변이에 의한 조기 종결코돈의 생성을 고려하여 crRNA를 선별하고, 조기 종결코돈을 공유할 수 있는 복수의 crRNA들을 선택한 후, 대상 세포주에서 각각의 crRNA가 나타내는 비상동말단연결 (Non-homologous End-Joining, NHEJ) 활성을 조사하는 과정을 모식적으로 나타낸 것이고, 도 2b는 도 2a의 과정을 통해서 선별된 crRNA를 정보를 이용해 생산된 crRNA array가 발현되는 렌티바이러스 벡터 (Lentivirus vector)를 이용하여 세포주 내에서 각각의 crRNA가 비상동말단연결 (Non-homologous End-Joining, NHEJ) 활성을 나타냈을 때 인-프레임 돌연변이 (in-frame mutation)에 의한 잔류 단백질 발현이 최소화 될 수 있음을 보이게 될 수 있음을 보여주는 것이다.

도 3은 인간 ATG5 유전자에 특이적인 crRNA array의 개발에 관한 것으로서, 도 3a는 먼저 인간 ATG5에 대해서 선택된 6개의 crRNA에 대해서 Cpf1 (AsCpf1)과 단일 crRNA를 발현하는 렌티바이러스 벡터에 클로닝하고 간암세포주인 SNU475 세포에 감염시킨 후, 각각의 crRNA에 의해 유도되는 비상동말단연결 활성을 측정한 결과를 나타낸 것이고, 도 3b는 도 3a의 결과로부터 비상동말단연결 활성이 확인된 4개의 crRNA를 암호화하는 ATG5 유전자 특이적 crRNA array의 합성전략을 나타낸 것이며, 도 3c는 상기 crRNA array가 클로닝된 렌티바이러스 벡터를 SNU475 세포에 감염시킨 후, 각 crRNA 별로 T7E1 assay를 수행하여 비상동말단연결 활성을 측정한 결과이다. 단, 2개의 crRNA의 표적 염기서열이 근접해 있을 때에는 함께 그 비상동말단연결 활성을 조사한 결과를 제시한다.

도 4는 인간 Becn1 유전자에 특이적인 crRNA array의 개발에 관한 것으로서, 도 4a는 Cpf1과 그 crRNA를 이용하여 단일 crRNA에 의해 유도되는 비상동말단연결 활성을 측정한 T7E1 assays 결과를 나타낸 것이고, 도 4b는 도 4a에서 비상동말단연결 활성이 확인된 4개의 crRNA를 암호화하는 Becn1 유전자 특이적인 crRNA array의 합성전략을 나타낸 것이며, 도 4c는 상기 crRNA array를 SNU475 세포에 감염시킨 후, 각 표적 서열 별로 T7E1 assay를 수행한 결과를 나타낸 것이다. 이때, CR15와 CR17의 target sequence가 인접하여 이들의 비상동말단연결 활성은 동시에 확인하였다.

도 5는 인간 EI24 유전자에 특이적인 crRNA array의 개발에 관한 것으로서, 도 5a는 Cpf1과 그 crRNA를 이용하여 단일 crRNA에 의해 유도되는 비상동말단연결 활성을 열 변성 (heat denaturation) 후 상온에서 reannealing시켜 서로 다른 비상동말단연결이 일어난 DNA 간에 heteroduplex가 형성된 PCR 산물을 사용해 측정한 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 결과를 나타낸 것이고, 도 5b는 도 5a에서 비상동말단연결 활성이 확인된 4개의 crRNA를 암호화하는 EI24 유전자 특이적인 crRNA array의 합성전략을 나타낸 것이며, 도 5c는 상기 crRNA array를 SNU475 세포에 감염시킨 후, 각 표적 서열 별로 T7E1 assay를 수행한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 EI24, ATG5 및 Becn1에 대한 crRNA array를 발현시킨 후, 각각의 단백질 발현 수준을 parental SNU475 세포 (Pa)와 pY108 empty vector를 감염시킨 세포 (EV)와 비교하여, crRNA에 의한 유전자 녹아웃 여부를 웨스턴 블롯을 통해 검증한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 Hep3B 세포에서 crRNA array에 의한 ATG5 유전자 녹아웃 효율을 분석한 결과로서, SNU475 세포에서 사용했던 것과 동일한 ATG5 특이적인 crRNA array (CR1, CR2, CR4, CR6)를 사용한 경우 T7E1 assay를 통해 각각의 crRNA에 의해 유도되는 비상동말단연결 활성을 측정한 결과이다.

도 8은 Hep3B에서 인간 Becn1 유전자에 특이적인 crRNA array를 개발하고 이의 녹아웃 효율을 분석한 결과로서, 도 8a는 T7E1 assay를 통한 비상동말단연결 활성 측정을 통해 Hep3B 세포에서의 단일 crRNA의 활성을 테스트한 결과이고, 도 8b는 Hep3B 세포에서 Becn1 유전자 특이적인 crRNA array의 합성전략을 나타낸 것이며, 도 8c는 SNU475에서 사용했던 CR11 대신 CR12를 사용하여 제작된 crRNA array의 Hep3B 세포 내 비상동말단연결 활성을 측정한 결과이다.

도 9는 Hep3B에서 인간 EI24 유전자에 특이적인 crRNA array를 개발하고 이의 녹아웃 효율을 분석한 결과로서, 도 9a는 T7E1 assay를 통한 비상동말단연결 활성 측정을 통해 Hep3B 세포에서의 단일 crRNA의 활성을 테스트한 결과이고, 도 9b는 Hep3B 세포에서 EI24 유전자 특이적인 crRNA array의 합성전략을 나타낸 것이며, 도 9c는 SNU475에서 사용했던 CR2, CR7 및 CR10 대신 CR1, CR8 및 CR9를 사용하여 제작된 crRNA array의 Hep3B 세포 내 비상동말단연결 활성을 측정한 결과이다.

도 10은 Hep3B에서 웨스턴 블롯 분석을 통해 유전자 녹아웃 효과를 검증한 결과로서, ATG5, Becn1 및 EI24에 대한 crRNA array를 발현시킨 후, 각각의 단백질 발현 수준을 parental Hep3B 세포 (Pa)와 pY108 empty vector를 감염시킨 세포 (EV)와 비교한 결과이다.

도 11은 인간 일차 BJ 세포에서 crRNA array 작동을 검증한 결과로서, 도 11a는 SNU475 세포에 특이적인 ATG5, Becn1 및 EI24 각각에 대한 crRNA array를 BJ 세포에서 발현시킨 후 세포 내 비상동말단연결 활성을 측정한 결과이고, 도 11b는 웨스턴 블롯 분석을 통해 상기 각 단백질 발현 수준을 parental BJ 세포 (Pa)와 pY108 empty vector를 감염시킨 세포 (EV)와 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0029] 본 발명자들은 Cpf1의 pre-crRNA 프로세싱 활성을 이용하면 여러 개의 crRNA가 연결된 하나의 crRNA를 발현시키더라도 여러 개의 유전자를 동시에 공략할 수 있다는 것을 참조하여, 이를 하나의 유전자가 녹아웃된 동질유전자형 세포주를 만드는 데에 적용하기 위해 예의 연구한 결과, 선순위에 위치하는 crRNA에 의해 유발된 비상동말단연결에 의해 만들어진 3n+1과 3n+2의 조기 종결코돈보다 다운스트림의 염기서열을 공략하면서 후순위에 위치하는 crRNA를 이용하여, 상기 선순위에 위치한 crRNA에 의한 조기 종결코돈을 보전하면서도 인-프레임 돌연변이에 대해서 추가적으로 조기 종결코돈을 유도하는 전략을 다중의 다운스트림 crRNA로 연속적으로 적용하여 유전자의 기능 연구에 충분한 수준의 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주를 만들 수 있음을 최초로 규명하였는 바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0030] 이에, 본 발명은 조기 종결코돈 (premature stop codon)을 유발하는 다중의 crRNA를 포함하는 crRNA array 및 Cpf1을 포함하는, 유전자 녹아웃 세포주 제조용 조성물로서, 상기 crRNA array는 후순위의 crRNA가 선순위의 crRNA의 인-프레임 돌연변이 (in-frame mutation)에 의한 잔류 단백질 발현을 효과적으로 감소시키는 조기 종결코돈을 추가로 생성시키는 것을 특징으로 하는, 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주 제조용 조성물을 제공한다.

[0031] 본 발명에 있어서, “녹아웃 (knock-out)”은 표적 유전자의 기능 상실을 유발하는 유전자 서열 상의 변형을 의미하는데, 바람직하게는 이로써 표적 유전자 발현이 탐지 가능하지 않거나 무의미한 수준이 되는 것이다. “녹아웃”에는 예를 들어, 표적 유전자 변형을 증진시키는 물질에 해당 동물을 노출시키거나, 표적 유전자 부위에서 재조합을 증진시키는 효소를 도입시키거나 또는 출생 후에 표적 유전자 변형을 지시하는 기타 방법 시, 표적 유전자의 변형이 일어날 수 있는 조건적 녹아웃이 포함된다.

[0032] 본 발명에 있어서, “조기 종결코돈 (premature stop codon)”은 유전자의 판독 프레임에서 종결코돈이 암호화된 위치가 아닌데 돌연변이 등에 의해 상기 위치에 종결코돈이 발생하게 되는 것을 말하며, 예컨대 프레임시프트 돌연변이 (Frameshift Mutation)에 의해 생성될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0033] 본 발명에 있어서, “crRNA (CRISPR RNA)”는 CRISPR-Cas 시스템의 구성요소로서 박테리아 및 고세균에서 침입하는 파지 또는 플라스미드를 표적하는 적응성 RNA-매개 방어 시스템과 관련이 있다. 박테리아 및 고세균은 침입한 바이러스 또는 플라스미드 DNA-유래의 스페이스 (target sequence)를 CRISPR 유전자 좌위 내로 통합시켜 보유하고 있다가, 다음에 동일한 침입이 발생할 때에, 상기 정보를 방어에 사용한다.
- [0034] crRNA는 CRISPR 유전자 좌위에서 각각의 박테리아 및 고세균 특이적이며 반복적으로 나타나는 염기서열 (direct repeat)과 이전에 침입한 바이러스 또는 플라스미드 DNA-유래인 염기서열 (spacer)이 연결되어 하나의 단위로 구성되고, 이렇게 구성된 crRNA는 tandem repeat 형태로 모여서 존재하며, 연결되어 하나의 RNA (pre-crRNA)로 발현된다.
- [0035] 본 발명에 있어서, “crRNA (CRISPR RNA) array”는 다중의 crRNA가 연속적으로 연결되어 발현되는 것을 의미한다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 상기 crRNA array는 바람직하게는 3개 이상의 crRNA를 포함하는 것일 수 있고 더욱 바람직하게는 4개의 crRNA를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명에 있어서, “Cpf1”은 CRISPR/Cas 시스템의 한 종류이고, Cas9과 같이 single subunit effector module로 작동하지만 기능적으로 약간의 차이가 있는데, Cas9가 유전자를 잘라내기 위해서는 tracrRNA를 필요로 하는데 반해 Cpf1은 tracrRNA를 필요하지 않는다. Cas9의 경우 구아닌 (Guanine) / 시토신 (cytosine)이 많은 염기서열을 PAM (protospacer-adjacent motif)으로 사용하는 반면, Cpf1은 티민 (Thymine) / 아데닌 (Adenine)이 많은 염기서열을 PAM으로 사용한다. 또한 Cpf1은 유전자를 잘라낼 때 4~5개 뉴클레오티드 오버행 (overhang)을 발생시킨다는 특징을 가지고 있다.
- [0038] 본 발명에서, 상기 crRNA 중에서 후순위에 위치한 crRNA는 선순위에 위치하는 crRNA에 의해 유발된 비상동말단 연결 (Non-homologous End-Joining, NHEJ)의 위치보다 다운스트림의 염기서열을 표적하여, 상기 선순위에 위치하는 crRNA에 의한 유발된 조기 종결코돈 (premature stop codon)을 보전하면서 인-프레임 돌연변이 (in-frame mutation)에 대해서는 추가로 조기 종결코돈을 유도함으로써 잔류 단백질 발현을 효과적으로 감소시키는 것일 수 있다.
- [0039] 또한 상기 대상 유전자는 단일 유전자인 것일 수 있으며, 상기 단일 유전자는 ATG5, Becn1 및 EI24으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것일 수 있으나 유전자의 종류는 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명에 있어서, “프레임시프트 돌연변이 (Frameshift Mutation)”는 프레임 에러 또는 리딩 프레임 시프트라고도 지칭되며, DNA 서열에서 3으로 나누어 떨어지지 않는 뉴클레오티드의 삽입 또는 결실에 의해 발생하는 유전자 돌연변이이다. 코돈의 삼중항 (triplet) 특성 때문에 상기의 삽입 또는 결실은 판독 프레임을 변경시켜 원래와 완전히 다른 번역을 초래할 수 있으며, 결실 또는 삽입의 순서가 빠를수록 돌연변이로부터 발현되는 단백질이 원래 유전자가 암호화하는 단백질에 비해 더 많이 달라진다고 알려져 있다. 프레임 시프트 돌연변이는 염기서열에서 만난 본래의 종결코돈 (“UAA”, “UGA” 또는 “UAG”) 앞에 새로운 종결코돈을 유발시켜 비정상적으로 짧거나, 또는 종결코돈이 새로이 생성되지 않을 경우라도 그 생산되는 단백질에서 비정상적인 부분이 매우 길 수 있으며, 대부분 기능적이지 않다.
- [0041] 본 발명자들은 실시예를 통해 세 가지 유전자에 대한 녹아웃 세포주를 제작하여, 본 발명에 따른 조성물이 단일 클론 제작 없이 단일 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주의 제작에 사용이 가능함을 규명하였다.
- [0042] 본 발명의 실시예에서는, ATG5에 대한 녹아웃 동질유전자형 세포주를 제작하기 위해 비교적 높은 비상동말단 연결 활성 (NHEJ activity)이 나타난 crRNA 4개를 선발하여 동일한 벡터를 이용해서 crRNA array를 조립하고, 상기 crRNA array를 렌티바이러스로 만들어 SNU475 세포주에 감염시킨 후 각 표적 서열 별로 T7E1 또는 PAGE assay를 진행했고, ATG5에서는 crRNA가 작동할지라도 발현되는 wild-type (WT) sequence가 남아있기는 하나 상당한 수준의 비상동말단연결이 일어났음을 확인하였으며, 유전형 (genotype)의 변화가 실제 단백질 수준에서의 변화와 직결되는지를 알아보기 위해서 각 단백질에 특이적인 항체를 사용해서 웨스턴 블롯을 수행하여 ATG5 crRNA array가 처리된 경우, ATG5 단백질이 거의 검출되지 않은 것을 확인하였다 (실시예 2-1 참조).
- [0043] 본 발명의 다른 실시예에서는, Becn1에 대한 녹아웃 동질유전자형 세포주를 제작하기 위해 비교적 높은 활성이 나타난 crRNA를 4개 선발하여 동일한 벡터를 이용해서 crRNA array를 조립하고, 상기 crRNA array를 lentivirus로 만들어 SNU475 세포주에 감염한 후 각 표적 서열 별로 T7E1 assay를 진행했고, Becn1에서는 crRNA가 작동할 지라도 발현되는 wild-type (WT) sequence가 남아 있기는 하나 상당한 수준의 비상동말단연결이

일어났음을 확인하였으며, 유전형 (genotype)의 변화가 실제 단백질 수준에서의 변화와 직결되는지를 알아보기 위해서 각 단백질에 특이적인 항체를 사용해서 웨스턴 블롯을 수행하여 Becn1 crRNA array가 처리된 경우, Becn1 단백질이 매우 낮은 수준으로 검출되는 것을 확인하였다 (실시예 2-2 참조).

[0044] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 EI24에 대한 녹아웃 세포주를 제작하기 위해 비교적 높은 활성이 나타난 crRNA를 4개를 골라서 동일한 vector를 이용해서 crRNA array를 조립하고, 상기 crRNA array를 lentivirus로 만들어 SNU475 세포주에 감염한 후 각 표적 서열 별로 T7E1 assay를 진행했고, EI24에서는 crRNA가 작동할 지라도 발현되는 wild-type (WT) sequence가 남아 있기는 하나 상당한 수준의 비상동말단연결이 일어났음을 확인하였으며, 유전형 (genotype)의 변화가 실제 단백질 수준에서의 변화와 직결되는지를 알아보기 위해서 각 단백질에 특이적인 항체를 사용해서 웨스턴 블롯을 수행하여 EI24 crRNA array가 처리된 경우, EI24 단백질이 매우 낮은 수준으로 검출되는 것을 확인하였다 (실시예 2-3 참조).

[0045] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 SNU475 세포에서 ATG5, Becn1 및 EI24 유전자 각각에 특이적인 것으로 선발된 crRNA를 Hep3B 세포주에 적용하여 SNU475 이외의 다른 세포에서도 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주의 제조가 가능한지 여부를 조사하였다. 그 결과, ATG5의 경우에는 Hep3B 세포주에서도 동일한 crRNA array를 통해 매우 효율적으로 ATG5 유전자의 녹아웃이 유도됨을 확인하였다. 이에 반해, Becn1과 EI24의 경우 SNU475에서 사용했던 crRNA array를 이용한 경우에는 만족할 만한 결과가 얻어지지 않아 Hep3B에서 T7E1 assay를 통한 비상동말단연결 활성 측정을 통해 새롭게 단일 crRNA들을 테스트했다. 그 결과, Becn1의 경우에는 SNU475에서 사용했던 CR11 대신 CR12를 적용하여 제조된 crRNA array가 높은 활성을 나타내었고, EI24의 경우에는 SNU475에서 높은 활성을 나타내던 CR2, CR7 및 CR10 대신, CR1, CR8 및 CR9를 적용하여 제조된 crRNA array가 높은 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 나아가 deep sequencing 및 웨스턴 블롯을 실시하여 Hep3B 세포에서 선발된 crRNA array에 의한 유전자 녹아웃 효과를 확인하였다 (실시예 3 참조).

[0046] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 본 발명에 따른 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주 확립 기술은 클론 세포의 분리 단계를 배제할 수 있는바, 암세포 유래 세포주와 같이 불멸화된 세포가 아닌 정상조직 유래 일차세포에서도 녹아웃 세포주의 확립이 가능한지 여부를 검증하였다. 이를 위해, 인간 일차 섬유아세포인 BJ 세포에 SNU475에서 사용했던 ATG5, Becn1 및 EI24에 대한 crRNA array를 적용한 결과, ATG5와 EI24에 대해서는 매우 높은 비상동말단연결이 유발되었고, Becn1의 경우에는 상대적으로 약한 활성이 나타남을 확인하였다. 또한 이러한 결과와 일치하게 단백질 수준을 측정한 결과에서도 ATG5와 EI24 단백질은 거의 관찰되지 않았으나, Becn1은 단백질 수준이 낮아지기는 했으나, 상당량의 Becn1이 남아 있는 것을 알 수 있었다 (실시예 4 참조).

[0047] 상기의 결과들은 각 유전자의 crRNA array가 SNU475 및 Hep3B를 포함하는 암세포뿐만 아니라 정상 조직 유래 일차세포에도 잘 작동하여 효과적으로 상응하는 각 단일 유전자가 녹아웃된 일차세포를 유도했음을 확인한 것으로서, 본 발명에 따른 조성물을 이용하면, 단일 클론세포 배양과정을 거치지 않고도 원하는 유전자의 녹아웃 동질유전자형 세포주를 다양한 세포에서 제조할 수 있음을 시사한다.

[0048] 이에, 본 발명은 조기 종결코돈을 유발하는 다중의 crRNA를 포함하는, 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주 제조용 벡터를 제공한다.

[0049] 또한 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 벡터 또는 RNA; 및 Cpf1 mRNA, Cpf1 재조합 단백질 또는 Cpf1을 발현하는 벡터를 세포주에 도입하는 단계를 포함하는, 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주의 제조방법을 제공한다.

[0050] 상기 crRNA 및 Cpf1 발현벡터는 당업계에 통상적으로 알려진 방법에 의해 목적 세포주 내로 주입될 수 있다. 예를 들어, 미세주입법 (microinjection), 전기천공법 (electroporation), 리포좀-매개 전이방법 및 바이러스 (레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노부속바이러스 등)-매개 전이방법을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0051] 본 발명에서 상기 유전자는 단일 유전자인 것일 수 있고, 상기 단일 유전자는 ATG5, Becn1 및 EI24으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것일 수 있으나 유전자의 종류는 이에 제한되는 것은 아니며, 상기 방법은 단일 클론세포 배양과정을 거치지 않는 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0052] 또한 본 발명은 전술한 바와 같이 상기 제조방법에 의해 제조된 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주를 제공한다.

[0053] 상기 유전자 녹아웃 세포주의 모세포는 다양한 특성의 조직에서 유래되는 세포들을 모두 포함할 수 있으며, 예컨대 암조직 또는 정상 조직에서 유래한 세포를 모두 포함할 수 있고, 바람직하게는 SNU475, Hep3B 또는 일차

섭유아세포일 수 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니다.

[0055] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0057] [실시예]

[0058] **실시예 1. 실험 준비 및 실험 방법**

[0059] **1-1. crRNA 클로닝 (cloning) 및 분석**

[0060] crRNA 분석은 web-based software를 사용해서 수행되었다 (benchling.com). Genomic DNA sequence는 Genebank를 통해 획득한 후, Snapgene software (GSL Biotech LLC)를 사용해서 분석하였다. 각각의 crRNA에 대한 정보는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0061]

Target gene	crRNA name	Position	Strand	Sequence	PAM	Specificity Score	서열번호
ATG5	ATG5-E2-CR1	9,721	-1	CCACAATCAATGTACTTACA	TTTG	47.2120767	1
	ATG5-E4-CR2	46,024	1	CAGAAAAAGACCTTCTGCAC	TTTC	47.5823641	2
	ATG5-E4-CR3	46,067	-1	AAGCATCAGCTTCTTCATA	TTTA	45.8210183	3
	ATG5-E4-CR4	46,135	-1	CAATCCCATCCAGAGTTGCT	TTTG	48.8049857	4
	ATG5-E6-CR5	77,585	1	TATCATTACAGACAGATTG	TTTA	45.9890571	5
	ATG5-E6-CR6	77,669	-1	AAATGTTATTTCTACCTGA	TTTA	43.4200818	6
Becn1	Becn1-Ex2-CR11	9,480	1	CACGGCCTCAGGGATGGAAG	TTTC	48.8690132	7
	Becn1-Ex2-CR12	9,586	1	AAGATCCTGGACCGTGTCAC	TTTC	49.8272856	8
	Becn1-Ex7-CR13	14,951	1	GCAGACGCTGTTTGGAGATC	TTTG	97.8029914	9
	Becn1-Ex7-CR14	14,965	1	GAGATCTTAGAGCAAATGAA	TTTG	84.8499002	10
	Becn1-Ex8-CR15	17,302	-1	AATTCAGTATTCTCTCTG	TTTA	76.6095376	11
	Becn1-Ex8-CR16	17,345	-1	AACACTCTTCAGCTCATCAT	TTTC	92.259698	12
	Becn1-Ex8-CR17	17,444	1	ATGCAACCTTCCACATCTGG	TTTA	94.3446589	13

EI24	EI24-ex2-CR1	125,572,536	1	GTGGTGAAGAGATGGCTGAC	TTTG	62.1326572	14
	EI24-ex3-CR2	125,575,277	1	TATAGGAATCAAAGACTCC	TTTC	91.112129	15
	EI24-ex3-CR3	125,575,304	-1	CTGGATTCGAGCATCTAGCT	TTTG	65.5834079	16
	EI24-ex4-CR4	125,576,271	1	CAGTGAGCCACGTATTGTTA	TTTC	96.0479678	17
	EI24-ex4-CR5	125,576,302	1	CAGTGTGTGCTTGAATGG	TTTC	61.803034	18
	EI24-ex6-CR6	125,578,141	1	CTCTTTCTTAGGTGACCCAT	TTTC	92.3860781	19
	EI24-ex6-CR7	125,578,148	1	TTAGGTGACCCATCACTACA	TTTC	96.3414665	20
	EI24-ex6-CR8	125,578,180	1	GTCGTGGCTGGAATTCTTCC	TTTG	64.7972393	21
	EI24-ex7-CR9	125,578,958	1	TCTGTACAGGATATAGCTG	TTTC	93.4369992	22
	EI24-ex7-CR10	125,578,990	1	AGGTATCAGGGAGGAAGCCT	TTTG	64.1555408	23

[0063] 각각의 crRNA에 의한 비상동말단연결 활성 (NHEJ activity)을 평가하기 위해서, 클로닝에 필요한 올리고머 (oligomer)를 (주)마크로젠에서 합성하였고, 이는 하기의 표 2에 나타내었으며, 합성된 oligomer는 annealing 후에 pY108 (Addgene #84739)의 BsmBI site에 cloning하였고, (주)마크로젠의 sequencing service를 통해 검증하였다.

표 2

Target gene	crRNA name	Orientation	Sequence	서열번호
ATG5	ATG5-E2-CR1	F	agatCCACAATCAATGTA CT TACA	24
		R	aaaaTGTAAGTACATTGATTGTGG	25
	ATG5-E4-CR2	F	agatCAGAAAAAGACCTTCTGCAC	26
		R	aaaaGTGCAGAAGGCTTTTCTG	27
	ATG5-E4-CR3	F	agatAAGCATCAGCTTCTTCATA	28
		R	aaaaTATGAAAGAAGCTGATGCTT	29
	ATG5-E4-CR4	F	agatCAATCCCATCCAGAGTTGCT	30
		R	aaaaAGCAACTCTGGATGGGATTG	31
	ATG5-E5-CR5	F	agatTATCATTACAGACAGATTTG	32
		R	aaaaCAAATCTGTCTGTAATGATA	33
	ATG5-E5-CR6	F	agatAAATGTTATTTCTACCTGA	34
		R	aaaaTCAGGTAGGAAATAACATTT	35
Becn1	Becn1-Ex2-CR11	F	agatCACGGCCTCAGGGATGGAAG	36
		R	aaaaCTTCCATCCCTGAGGCCGTG	37
	Becn1-Ex2-CR12	F	agatAAGATCCTGGACCGTGTAC	38
		R	aaaaGTGACACGGTCCAGGATCTT	39
	Becn1-Ex7-CR13	F	agatGCAGACGCTGTTGGAGATC	40
		R	aaaaGATCTCCAACAGCGTCTGC	41
	Becn1-Ex7-CR14	F	agatGAGATCTTAGAGCAAATGAA	42
		R	aaaaTTCATTTGCTCTAAGATCTC	43
	Becn1-Ex8-CR15	F	agatAATTCAGTGTATTCTCTCTG	44
		R	aaaaCAGAGAGAATACAGTGAATT	45
	Becn1-Ex8-CR16	F	agatAACACTCTTCAGCTCATCAT	46
		R	aaaaATGATGAGCTGAAGAGTGTT	47
	Becn1-Ex9-CR17	F	agatATGCAACCTTCCACATCTGG	48
		R	aaaaCCAGATGTGGAAGGTTGCAT	49

EI24	EI24-Ex2-CR1	F	agatGTGGTGAAGAGATGGCTGAC	50
		R	aaaaGTCAGCCATCTCTTACCAC	51
	EI24-Ex3-CR2	F	agatTATAGGGAATCAAAGACTCC	52
		R	aaaaGGAGTCTTTGATTCCCTATA	53
	EI24-Ex3-CR3	F	agatCTGGATTTCGAGCATCTAGCT	54
		R	aaaaAGCTAGATGCTCGAATCCAG	55
	EI24-Ex4-CR4	F	agatCAGTGAGCCACGTATTGTTA	56
		R	aaaaTAACAATACGTGGCTCACTG	57
	EI24-Ex4-CR5	F	agatCAGTGTGTGCTTGGAAATGG	58
		R	aaaaCCATTCCAAGCACAACTG	59
	EI24-Ex6-CR6	F	agatCTCTTTCTTAGGTGACCCAT	60
		R	aaaaATGGGTCACCTAAGAAAGAG	61
	EI24-Ex6-CR7	F	agatTTAGGTGACCCATCACTACA	62
		R	aaaaTGTAGTGTGGGTACCTAA	63
	EI24-Ex6-CR8	F	agatGTCGTGGCTGGAATCTTCC	64
		R	aaaaGGAAGAATTCCAGCCACGAC	65
	EI24-Ex7-CR9	F	agatTCTGTTACAGGATATAGCTG	66
		R	aaaaCAGCTATATCTGTAAACAGA	67
	EI24-Ex7-CR10	F	agatAGGTATCAGGGAGGAAGCCT	68
		R	aaaaAGGCTTCTCCCTGATACCT	69

[0066] crRNA array를 발현하는 벡터를 제작하기 위해서 후술할 실시예 2에 기재한 방법에 따라서 상기 표 2의 올리고머를 (주)마크로젠에서 주문 생산한 후 Xiong et al. (Biotechnol Adv. 2008 Mar-Apr;26(2):121-34)의 기준에 보고한 대로 클로닝하였다.

[0067] Lentivirus particle은 pY108 empty vector (EV), pY108-single crRNA 또는 pY108-crRNA array를 psPAX2 (Addgene #12260) 및 pMD2.G (Addgene #12259)와 함께 Lipofectamine Plus Reagent (ThermoFisher Scientific)를 사용하였으며, 제작사의 매뉴얼에 따라서 293TA 세포로 감염시켜서 제작하였다. SNU475 세포에 4 µg/ml polybrene (Sigma)와 함께 lentivirus를 24시간 동안 배양하여 감염시켰다. 이 후 lentivirus를 제거하고 2 µg/ml puromycin (Sigma)으로 non-infected SNU475 세포가 모두 제거될 때까지 배양하였다.

[0068] 확립된 cell culture에서 genomic DNA 샘플을 준비하여 하기 표 3에 나타낸 PCR primer pair를 사용하여 각 crRNA의 target region을 증폭하였다. 상기 PCR product를 기준에 알려진 보고대로 heteroduplex를 형성시킨 후, Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)에 직접 전개하여 mobility shift되거나(Sci Rep. 2014 Sep 19;4:6420.), T7 Endonuclease I (T7E1; NEB)를 처리한 후 agarose gel에서 전개하였을 때, 잘리는지 여부를 동정하였다.

표 3

Target gene	Oligomer name	Sequence	서열목록
ATG5	ATG5 CR-array-R1	TCTTTTCTGatctacaagagtagaaattTGTAAGTACATTGATTGTGGatctagagacgtat	70
	ATG5 CR-array-R2	GGATGGGATTGatctacaagagtagaaattGTGCAGAAG	71
	ATG5 CR-array-R3	agaCGTCTCaaaaaTCAGGTAGGAAATAACATTTatctacaagagtagaaattAGCAACTCT	72
	ATG5 CR-Bridge-F1	CAGAAAAAGACCTTCTGCAC	73
	ATG5 CR-Bridge-F2	CAATCCCATCCAGAGTTGCT	74
	PCR-F	atacgtctctagatCCACAATCAATGTACTTACA	75
	PCR-R	agaCGTCTCaaaaaTCAGGTAGGAAATAACATTT	76

Becn1	Becn1 CR-array-R1	CAGCGTCTGCatctacaagagtagaaattCTTCCATCCCTGAGGCCGTGatc tagagacgtat	77
	Becn1 CR-array-R2	TACAGTGAATTatctacaagagtagaaattGATCTCCAAA	78
	Becn1 CR-array-R3	agaCGTCTCaaaaaCCAGATGTGGAAGGTTGCATatctacaagagtagaaat tCAGAGAGAA	79
	Becn1 CR-Bridge-F1	agatGCAGACGCTGTTTGGAGATC	80
	Becn1 CR-Bridge-F2	agatAATTCACGTATTCTCTCTG	81
	PCR-Becn1-F	atacgtctctagatCACGGCCTCAGGGATGGAAG	82
	PCR-Becn1-R	agaCGTCTCaaaaaCCAGATGTGGAAGGTTGCAT	83
EI24	EI24 CR-array-R1	TGGCTCACTGatctacaagagtagaaattGGAGTCTTTGATTCCCTATAatc tagagacgtat	84
	EI24 CR-array-R2	GGGTCACCTAAatctacaagagtagaaattTAACAATACG	85
	EI24 CR-array-R3	agaCGTCTCaaaaaAGGCTTCTCCCTGATACCTatctacaagagtagaaat tGTAGTGAT	86
	EI24 CR-Bridge-F1	agatCAGTGAGCCACGTATTGTTA	87
	EI24 CR-Bridge-F2	agatTAGGTGACCCATCACTACA	88
	PCR-EI24-F	atacgtctctagatTATAGGGAATCAAAGACTCC	89
	PCR-EI24-R	agaCGTCTCaaaaaAGGCTTCTCCCTGATACCT	90

[0071] 또한, 하기 실시예 3의 Hep3B 세포에서 Becn1 및 EI24 유전자에 효과적 활성을 나타낸 crRNA 조립을 위해 이용된 올리고머들에 대한 정보는 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

[0072]

Target gene	Oligomer name	Sequence	서열번호
Becn1	Becn1 CR-array2-R1	CAGCGTCTGCatctacaagagtagaaattGTGACACGGTCCAGGATCTTa tctagagacgtat	91
	Becn1 CR-array-R2	TACAGTGAATTatctacaagagtagaaattGATCTCCAAA	78
	Becn1 CR-array-R3	agaCGTCTCaaaaaCCAGATGTGGAAGGTTGCATatctacaagagtagaa attCAGAGAGAA	79
	Becn1 CR-Bridge-F1	agatGCAGACGCTGTTTGGAGATC	80
	Becn1 CR-Bridge-F2	agatAATTCACGTATTCTCTCTG	81
	PCR-Becn1-F2	atacgtctctagatAAGATCCTGGACCGTGTAC	92
	PCR-Becn1-R	agaCGTCTCaaaaaCCAGATGTGGAAGGTTGCAT	83
EI24	EI24-CR-array3-R1	GTGGCTCACTGatctacaagagtagaaattGTCAGCCATCTCTTACCAC atctagagacgtat	93
	EI24-CR-array4-R2	CCAGCCACGACatctacaagagtagaaattTAACAATAC	94
	Ei24 CR-array-R3	agaCGTCTCaaaaaCAGCTATATCCTGTAACAGAatctacaagagtagaa attGGAAGAATT	95
	EI24 CR-Bridge-F1	agatCAGTGAGCCACGTATTGTTA	87
	Ei24 CR-Bridge-F2	GTCGTGGCTGGAATTCTTCC	96
	EI24-PCR-F3	atacgtctctagatGTGGTGAAGAGATGGCTGAC	97
	Ei24-PCR-R	agaCGTCTCaaaaaCAGCTATATCCTGTAACAGA	98

[0074] 1-2. Western blot analysis

[0075] SDS-sample 준비와 웨스턴 블롯 분석 (Western blot analysis)은 다음의 항체들을 사용해서 기존에 보고한 대로 수행하였다 (J Biol Chem. 2013 Oct 25;288(43):31261-7): Atg5 (Cell Signaling #12994), Becn 1(Cell Signaling #3495), Ei24 (Atlas antibodies #HPA047165), β -actin (novusbio #NB600-501).

[0077] 실시예 2. 본 발명에 따른 crRNA array의 제작 및 녹아웃 효율 검증

[0078] 본 발명에서는 4개의 crRNA를 연결한 crRNA array를 제작하였다.

- [0079] 상기의 crRNA array를 제작하는 과정은 도 2a에 나타낸 바와 같이, 한 유전자 안에서 crRNA 표적 서열 (target sequence)을 검색하여 서로 배타적인 프레임시프트 돌연변이 (frameshift mutation)를 유발하여, 5' crRNA에 의해서 생성된 조기 종결코돈을 3' crRNA가 파괴하는 조건을 가능한 한 피할 수 있도록 crRNA를 선택하였다. 상기 과정을 통해 동일하게 선행 crRNA에 의해 생긴 in-frame mutation에 추가로 조기 종결코돈을 유발하는 과정을 3번 반복할 수 있도록 4개 group으로 crRNA를 분류하였다. 각 group 당 1 내지 2개의 crRNA를 골라 각각의 발현벡터를 lentivirus로 제작한 후, 목적되는 세포주에서 비상동말단연결 활성 (NHEJ activity)을 측정하였다 (single crRNA test). 높은 활성이 나타나지 않는 경우 group 안의 다른 crRNA를 다시 골라서 비상동말단연결 활성을 측정하였다.
- [0081] **2-1. ATG5 유전자에 대한 녹아웃 세포 제작**
- [0082] 상기 4개의 group에서 crRNA 선별이 완성되면, 도 2b에서 나타낸 바와 같이 각각의 crRNA를 조립하여 하나의 crRNA array를 완성하고, 이는 세포 내에서 발현된 후 Cpf1에 의해 프로세싱 (processing) 되어 각각의 crRNA로 나뉘어 Cpf1과 결합하였다 (processing of a crRNA array).
- [0083] 이론적으로는 상기의 crRNA들은 동시에 작용하여, 세포 집단 안에서 in-frame mutation의 빈도 (frequency)는 5% 미만으로 떨어지게 될 것이다 (minimizing in-frame mutation by a crRNA array).
- [0084] 상기의 과정을 증명하기 위해, 본 실시예에서는 human hepatocellular carcinoma (HCC) 세포주인 SNU475에서 autophagy related 5 (ATG5) 유전자의 녹아웃을 시도하였다.
- [0085] 먼저 각 유전자 당 7 내지 10개의 Cpf1 표적 서열을 선택해서 Acidaminococcus sp. BV3L6로부터 유래된 Cpf1 (AsCpf1)와 그 crRNA를 발현하는 lentiviral vector (pY108)에 클로닝을 진행하였으며, 이때 사용된 올리고머는 표 1을 참조하였다.
- [0086] 클로닝 완료 후, 상기 lentivirus를 SNU475 cell에 감염하여 crRNA에 의해 유도되는 비상동말단연결 활성 (NHEJ activity)을 측정하였고, 그 결과 도 3a에 나타낸 바와 같다.
- [0087] 그 다음으로, 도 3b에서 나타낸 바와 같이 상기에서 비교적 높은 활성이 나타난 crRNA를 4개 (CR1, CR2, CR4, CR6) 골라서 동일한 벡터를 이용해서 crRNA array를 조립하였다.
- [0088] 상기 crRNA array를 lentivirus로 만들어 SNU475 세포주에 감염한 후 각 표적 서열 별로 T7E1 assay를 진행했고, 각각의 crRNA에 의한 비상동말단연결 활성 (NHEJ activity)을 확인하였다. 그 결과는 도 3c에 나타낸 바와 같다.
- [0089] 그 다음으로, 실제 돌연변이 서열을 조사하기 위해 deep sequencing을 수행하였다.
- [0090] 그 결과 표 5에서 나타낸 바와 같이, crRNA가 작동할 지라도 wild-type (WT) sequence가 발현되기는 하나 상당한 수준의 비상동말단연결이 일어났음을 확인하였다.

표 5

[0091]

Target gene	crRNA name	Total reads	WT (%)	In-del (%)	Possible in-frame (%)
ATG5	ATG5-E2-CR1	5,936	174 (2.9)	5,762 (97.1)	7.6
	ATG5-E2-CR2	10,752	4,144 (38.5)	6,608 (61.5)	
	ATG5-E2-CR4	30,752	6,676 (21.7)	24,076 (78.3)	
	ATG5-E2-CR6	17,635	9,110 (51.7)	8,525 (48.3)	

- [0093] 각 crRNA 별로 동정된 insertion 및 deletion (in-del) mutation의 비율을 바탕으로 계산한 결과, ATG5 유전자에서는 7.6%의 in-frame mutation이 최종적으로 남아 있을 것으로 예상되었다. ATG5 유전자의 경우 CR4에 의한 3n+2 mutant에서 조기 종결코돈이 출현하기 이전 서열에 CR6가 작용하게 되며, 그에 따른 in-frame mutant의 비율 변화도 상기 표 5에 반영하였다.
- [0094] 마지막으로 이러한 유전형 (genotype)의 변화가 실제 단백질 수준에서의 변화와 직결되는지를 알아보기 위해서

각 단백질에 특이적인 항체를 사용해서 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

[0095] 그 결과 도 6에서 나타내는 바와 같이, ATG5 crRNA array가 처리된 경우, ATG5 단백질이 거의 검출되지 않은 것을 확인하였다.

[0096] 상기의 결과는 ATG5 crRNA array가 예상대로 SNU475 HCC 세포주에서 잘 작동하여 효과적으로 유전자 녹아웃 세포를 유도했음을 확인한 것이다.

[0098] 2-2. Becn1 유전자에 대한 녹아웃 세포 제작

[0099] 상기 4개의 group에서 crRNA 선별이 완성되면, 도 2에서 나타낸 바와 같이, 각각의 crRNA를 조립하여 하나의 crRNA array를 완성하고, 이는 세포 내에서 발현된 후 Cpf1에 의해 프로세싱 (processing) 되어 각각의 crRNA로 나뉘어 Cpf1과 결합하였다 (processing of a crRNA array).

[0100] 이론적으로는 상기의 crRNA들의 동시적으로 작용하여, 세포 집단 안에서 in-frame mutation의 빈도 (frequency)는 5% 미만으로 떨어지게 될 것이다 (minimizing in-frame mutation by a crRNA array).

[0101] 상기의 과정을 증명하기 위해 본 실시예에서는 human hepatocellular carcinoma (HCC) 세포 주인 SNU475에서 beclin 1 (Becn1) 유전자의 녹아웃을 시도하였다.

[0102] 먼저 각 유전자 당 7 내지 10개의 Cpf1 표적 서열 (target sequence)을 선택해서 *Acidaminococcus sp.* BV3L6로부터 유래된 Cpf1 (AsCpf1)과 그 crRNA를 발현하는 lentiviral vector에 클로닝을 진행하였으며, 이때 사용된 올리고머는 표 1을 참조하였다.

[0103] 클로닝 완료 후, 상기 lentivirus를 SNU475 세포에 감염하여 crRNA에 의해 유도되는 비상동말단연결 활성을 측정하였고, 그 결과 도 4a에 나타낸 바와 같다.

[0104] 그 다음으로, 도 4b에서 나타낸 바와 같이 상기에서 비교적 높은 활성이 나타난 crRNA 4개 (CR11, CR13, CR15, CR17)를 골라서 동일한 벡터를 이용해서 crRNA array를 조립하였다.

[0105] 상기 crRNA array를 lentivirus로 만들어 SNU475 세포주에 감염한 후 각 표적 서열 (target sequence) 별로 T7E1 assay를 진행했고, 각각의 crRNA에 의한 비상동말단연결 활성을 확인하였다. 그 결과는 도 4c에 나타낸 바와 같다.

[0106] 그 다음으로, 실제 돌연변이 서열을 조사하기 위해 deep sequencing을 수행하였다.

[0107] 그 결과 표 6에서 나타낸 바와 같이, crRNA가 작동할 지라도 wild-type (WT) sequence가 발현되기는 하나 상당한 수준의 비상동말단연결이 일어났음을 확인하였다.

표 6

[0108]

Target gene	crRNA name	Total reads	WT (%)	In-del (%)	Possible in-frame (%)
Becn1	Becn1-Ex2-CR11	33,174	1281 (3.9)	31,893(96.1)	19.0
	Becn1-Ex7-CR13	43,450	29,306 (67.4)	14,144(32.6)	
	Becn1-Ex8-CR15	31,158	22,491 (72.2)	8,667(27.8)	
	Becn1-Ex8-CR17	30,868	22,869 (74.1)	7,999(25.9)	

[0110] 각 crRNA 별로 동정된 insertion 및 deletion (in-del) mutation의 비율을 바탕으로 계산한 결과, Becn1 유전자에서는 19.0%의 in-frame mutation이 최종적으로 남아 있을 것으로 예상되었다.

[0111] 마지막으로 이러한 유전형 (genotype)의 변화가 실제 단백질 수준에서의 변화와 직결되는지를 알아보기 위해서 각 단백질에 특이적인 항체를 사용해서 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

[0112] 그 결과 도 6에서 나타내는 바와 같이, Becn1 crRNA array가 처리된 샘플에서는 각 단백질로부터 시그널이 검출되기는 했으나, 상당히 감소한 것을 확인하였다.

[0113] 상기의 결과는 Becn1 crRNA array가 예상대로 SNU475 HCC 세포 주에서 잘 작동하여 효과적으로 유전자 녹아웃 세포를 유도했음을 확인한 것이다.

[0115] 2-3. EI24 유전자에 대한 녹아웃 세포 제작

[0116] 상기 4개의 group에서 crRNA 선별이 완성되면, 도 2에서 나타낸 바와 같이, 각각의 crRNA를 조립하여 하나의 crRNA array를 완성하고, 이는 세포 내에서 발현된 후 Cpf1에 의해 프로세싱 되어 각각의 crRNA로 나뉘어 Cpf1과 결합하였다 (processing of a crRNA array).

[0117] 이론적으로는 상기의 crRNA들의 동시에 작용하여, 세포 집단 안에서 in-frame mutation의 frequency는 5% 미만으로 떨어지게 될 것이다 (minimizing in-frame mutation by a crRNA array).

[0118] 상기의 과정을 증명하기 위해 본 실시예에서는 human hepatocellular carcinoma (HCC) 세포주인 SNU475에서 EI24 autophagy associated transmembrane protein (EI24) 유전자의 녹아웃을 시도하였다.

[0119] 먼저 각 유전자 당 7 내지 10개의 Cpf1 표적 서열 (target sequence)을 선택해서 *Acidaminococcus sp.* BV3L6로부터 유래된 Cpf1 (AsCpf1)과 그 crRNA를 발현하는 lentiviral vector에 클로닝을 진행하였으며, 이때 사용된 올리고머는 표 1을 참조하였다.

[0120] 클로닝 완료 후, 상기 lentivirus를 SNU475 세포에 감염하여 crRNA에 의해 유도되는 비상동말단연결 활성을 측정하였고, 그 결과 도 5a에 나타낸 바와 같다.

[0121] 그 다음으로, 도 5b에서 나타낸 바와 같이 상기에서 비교적 높은 활성이 나타난 crRNA 4개 (CR2, CR4, CR7, CR10)를 골라서 동일한 벡터를 이용해서 crRNA array를 조립하였다.

[0122] 상기 crRNA array를 lentivirus로 만들어 SNU475 세포주에 감염한 후 각 표적 서열 (target sequence) 별로 T7E1 assay를 진행했고, 각각의 crRNA에 의한 비상동말단연결 활성을 확인하였다. 그 결과는 도 5c에 나타낸 바와 같다.

[0123] 그 다음으로, 실제 돌연변이 서열을 조사하기 위해 deep sequencing을 수행하였다.

[0124] 그 결과 표 7에서 나타낸 바와 같이, crRNA가 작동할 지라도 wild-type (WT) sequence가 발현되기는 하나 상당한 수준의 비상동말단연결이 일어났음을 확인하였다.

표 7

Target gene	crRNA name	Total reads	WT (%)	In-del (%)	Possible in-frame (%)
EI24	EI24-ex3-CR2	34,110	7,952 (23.3)	26,158(76.7)	15.6
	EI24-ex4-CR4	35,795	16,266 (45.4)	19,529(54.6)	
	EI24-ex6-CR7	37,914	19,615 (51.7)	18,299(48.3)	
	EI24-ex7-CR10	28,642	17,478 (61.0)	11,164(39.0)	

[0127] 각 crRNA 별로 동정된 insertion 및 deletion (in-del) mutation의 비율을 바탕으로 계산한 결과, EI24 유전자에서는 15.6%의 in-frame mutation이 최종적으로 남아 있을 것으로 예상되었다.

[0128] 마지막으로 이러한 유전형 (genotype)의 변화가 실제 단백질 수준에서의 변화와 직결되는지를 알아보기 위해서 각 단백질에 특이적인 항체를 사용해서 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

[0129] 그 결과 도 6에서 나타내는 바와 같이, EI24 crRNA array가 처리된 샘플에서는 각 단백질로부터 시그널이 검출되기는 했으나, 상당히 감소한 것을 확인하였다.

[0130] 상기의 결과는 EI24 crRNA array가 예상대로 SNU475 HCC 세포주에서 잘 작동하여 효과적으로 유전자 녹아웃 세포를 유도했음을 확인한 것이다.

[0132] **실시예 3. Hep3B 세포주에서 녹아아웃 세포 제작 및 효율 검증**

- [0133] 본 발명자들은 상기 실시예 2의 결과를 기반으로, 또 다른 간암세포주인 Hep3B 세포에서 crRNA array를 통한 유전자 녹아아웃 효율을 검증하고자 하였다. 이를 위해 상기 실시예 2-1 내지 2-3에서 이용한 ATG5, Becn1 및 EI24 유전자 각각에 특이적인 crRNA array를 적용하여 실험을 진행하고자 하였다.
- [0134] 구체적으로, 먼저 Hep3B 세포에서 ATG5 유전자의 녹아아웃을 유도하기 위하여 상기 실시예 2-1 및 표 5에 개시된 crRNA (CR1, CR2, CR4, CR6)를 동일한 벡터를 이용해 crRNA array를 조립한 다음, 이를 lentivirus로 만들어 Hep3B 세포에 감염시킨 후 각각의 crRNA에 의한 비상동말단연결 활성을 확인하였다.
- [0135] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 상기 crRNA array는 Hep3B 세포주에서도 매우 효율적으로 ATG5 유전자의 녹아아웃을 유도할 수 있음을 확인하였다.
- [0136] 다음으로, Hep3B 세포에서 Becn1 유전자의 녹아아웃을 유도하기 위하여 상기 실시예 2-2의 Becn1 녹아아웃에 이용한 crRNA (CR11, CR13, CR15, CR17)를 골라서 동일한 벡터를 이용하여 crRNA array를 조립하고, 상기와 동일한 방법으로 Hep3B에 감염시킨 후 유전자 녹아아웃을 시도하였다.
- [0137] 그 결과, 상기 ATG5 유전자에서와는 달리 Hep3B 세포에서는 상기 crRNA array를 이용한 경우 Becn1과 EI24의 녹아아웃이 효율적으로 이루어지지 않은 것으로 나타났다. 이에, 본 발명자들은 Hep3B 세포에서 Becn1 유전자의 효율적인 녹아아웃을 위해 새롭게 single crRNA들을 테스트하였고, 그 결과를 도 8a에 나타내었다.
- [0138] 다음으로, 도 8b에 나타난 바와 같이 상기에서 비교적 높은 활성이 나타난 crRNA 즉, CR11 대신 CR12를 이용하여 crRNA 4개 (CR12, CR13, CR15, CR17)를 골라서 동일한 벡터를 이용해 crRNA array를 조립한 후, 상기와 동일한 방법으로 lentivirus를 이용해 Hep3B 세포에 감염시킨 후 비상동말단연결 활성을 확인하였다.
- [0139] 그 결과, 도 8c에서 볼 수 있는 바와 같이 Hep3B 세포에서는 Becn1 유전자에 대하여 CR12, CR13, CR15, CR17의 비상동말단연결 활성이 높게 나타나는 것을 확인하였다.
- [0140] 마지막으로, Hep3B 세포에서 효과적으로 EI24 유전자의 녹아아웃을 유도하는 crRNA array 조합을 알아보기 위하여, 실시예 2-3 및 도 5a에 개시된 CR1~CR10을 이용해 single crRNA 테스트를 진행하였다. 그 결과, 도 9a의 결과를 통해 동일한 crRNA가 서로 다른 세포주에서 다양한 활성을 나타낸다는 사실을 더욱 확실히 확인할 수 있었다. 구체적으로 SNU475 세포에서 높은 활성을 나타냈던 CR2, CR7 및 CR10 대신에 Hep3B 세포에서는 CR1, CR8 및 CR9의 활성이 더 높은 것을 알 수 있었다. 따라서 도 9b에서 볼 수 있는 바와 같이 CR1, CR4, CR8 및 CR9를 이용해 crRNA array를 조립하고 이의 활성을 분석하였다.
- [0141] 그 결과, 도 9b에 나타난 바와 같이 상기 crRNA array가 효율적으로 EI24 유전자의 녹아아웃을 달성할 수 있음을 확인하였다.
- [0142] 나아가, 본 발명자들은 실제 돌연변이 서열을 조사하기 위해 deep sequencing을 수행하였다.
- [0143] 그 결과, 하기 표 8에 나타난 바와 같이 crRNA가 작동할 지라도 wild-type (WT) sequence가 발현되기는 하나 하기 각 유전자에서 상당한 수준의 비상동말단연결이 일어났음을 확인하였다.
- [0144] 각 crRNA 별로 동정된 insertion 및 deletion (in-del) mutation의 비율을 바탕으로 계산한 결과, ATG5 유전자에서는 16.5%, Becn1 유전자에서는 24.8%의 In-frame mutation이 최종적으로 남아 있을 것으로 예상되었으며, EI24 유전자에서는 in-frame mutation이 남아있지 않을 것으로 예상되었다.

표 8

[0145]

Target gene	crRNA name	Total reads	WT (%)	In-del (%)	In-frame (%)
ATG5	ATG5-E2-CR1	8,180	709 (8.7)	7,471 (91.3)	16.5
	ATG5-E2-CR2	15,430	5,557 (36.0)	9,873 (64.0)	
	ATG5-E2-CR4	10,267	7,286 (71.0)	2,981 (29.0)	
	ATG5-E2-CR6	65,233	56,678 (86.9)	8,555 (13.1)	
Becn1	Becn1-Ex2-CR12	11,928	2,042 (17.1)	9,886 (82.9)	24.8
	Becn1-Ex7-CR13	19,588	19,318 (98.6)	270 (1.4)	
	Becn1-Ex8-CR15	9,892	6,420 (64.9)	3,472 (35.1)	
	Becn1-Ex8-CR17	19,751	11,757 (59.5)	7,994 (40.5)	

EI24	EI24-ex3-CR1	4,675	10 (0.2)	4,665 (99.8)	0.0
	EI24-ex4-CR4	17,783	10,946 (61.6)	6,837 (38.4)	
	EI24-ex6-CR8	7,273	1,405 (17.9)	5,868 (82.1)	
	EI24-ex7-CR9	10,644	3,391 (31.9)	7,253 (68.1)	

[0147] 또한, 이러한 유전형의 변화가 실제 단백질 수준에서의 변화와 직결되는지 알아보기 위해 각 단백질에 특이적인 항체를 이용해 웨스턴 블롯을 실시하였다.

[0148] 그 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이 ATG5, Becn1 및 EI24 유전자에 특이적인 crRNA array가 각각 처리된 경우 단백질이 거의 발현되지 않은 것을 확인하였다. 이러한 결과는 상기 각 유전자에 대한 crRNA array가 Hep3B 세포에서 잘 작동하여 효과적으로 유전자 녹아웃 세포를 유도했음을 의미하는 것이다.

[0150] 실시예 4. 정상 조직 유래 일차세포주(primary cell)에서 녹아웃 세포 제작 및 효율 검증

[0151] 상기 실시예 2 및 3에서 이용한 SNU475와 Hep3B는 암세포에서 유래된 불멸화된 세포주로, 생명현상 및 신약개발 등에 있어서 정상세포에서 일어나는 현상을 온전하게 대변하지 못하는 단점이 있다. 정상세포에서의 연구를 위해서 일반적으로 정상 인체조직에서 유래한 일차세포(primary cell)들을 사용하게 되는데, 이러한 세포들은 계대배양이 지속됨에 따라 일정한 수의 세포분열 후에는 복제 노화(replicative senescence)가 일어나 더 이상 증식하지 않게 된다. 이러한 현상은 클론세포 분리 기술을 기반으로 하는 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포의 확립을 불가능하게 한다. 그러나 이러한 부분에 있어서 crRNA array를 이용한 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포 확립 기술은 클론세포 배양 단계를 배제함으로써 일차세포를 이용한 유전자 녹아웃 세포의 확립을 가능하게 할 것으로 여겨진다.

[0152] 이에, 본 발명자들은 이를 확인하기 위하여 SNU475에서 사용했던 ATG5, Becn1 및 EI24에 대한 crRNA array를 인간 일차 섬유아세포(human primary fibroblast)인 BJ 세포에 적용하고 각 유전자에서 각각의 crRNA에 의한 비상동말단연결 활성을 확인하였다.

[0153] 그 결과, 도 11a에 나타낸 바와 같이 ATG5와 EI24에 대해서는 매우 높은 indel mutation이 일어난 것으로 나타났다, Becn1의 경우에는 상대적으로 약한 활성이 관찰되었다.

[0154] 마지막으로, 실제 ATG5, Becn1 및 EI24 단백질의 발현수준을 알아보기 위해 각 단백질에 특이적인 항체를 이용해 웨스턴 블롯을 실시하였다.

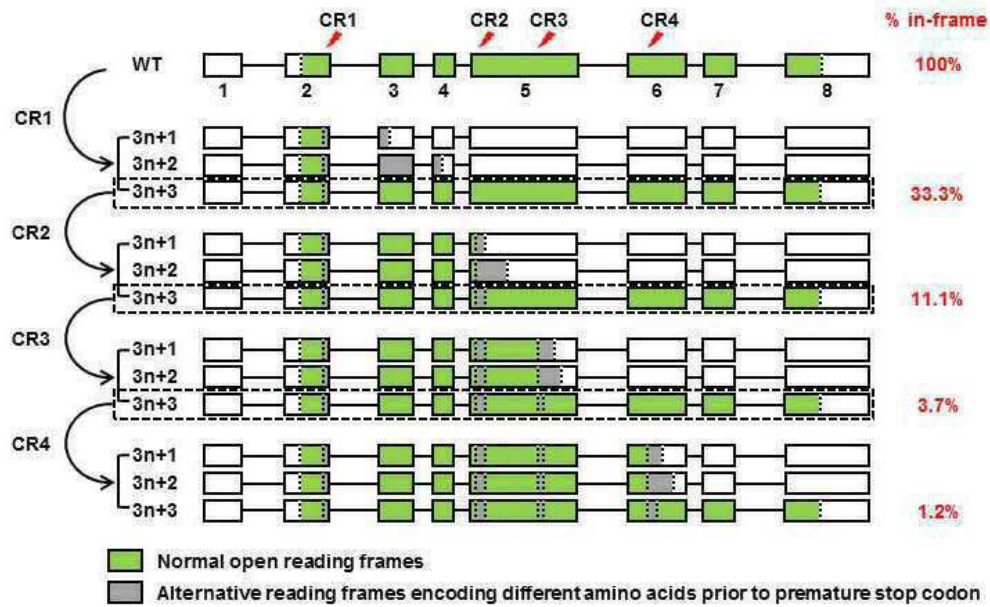
[0155] 그 결과, 도 11b에서 볼 수 있는 바와 같이 도 11a의 결과가 단백질 수준에서도 증명되어, ATG5와 EI24 단백질은 거의 발현되지 않은 것을 확인하였다. 단, Becn1의 경우에는 단백질 수준이 다소 낮아지기는 했으나, 상당량의 Becn1이 남아 있는 것을 확인하였다. 이에, BJ 세포에서 보다 효율적으로 작동하는 Becn1 특이적인 crRNA array를 개발하기 위해서는 single crRNA 테스트가 선행되어야 될 것으로 보인다.

[0156] 종합적으로, 상기 BJ 세포에서의 결과는 crRNA array의 적용이 유전자 녹아웃 동질유전자형 세포주의 확립을 가능하게 한다는 것을 증명하며, 인간뿐만 아니라, 마우스를 포함한 기타 동물에서 유래한 다양한 종류의 일차세포에 적용 가능할 것으로 예상된다.

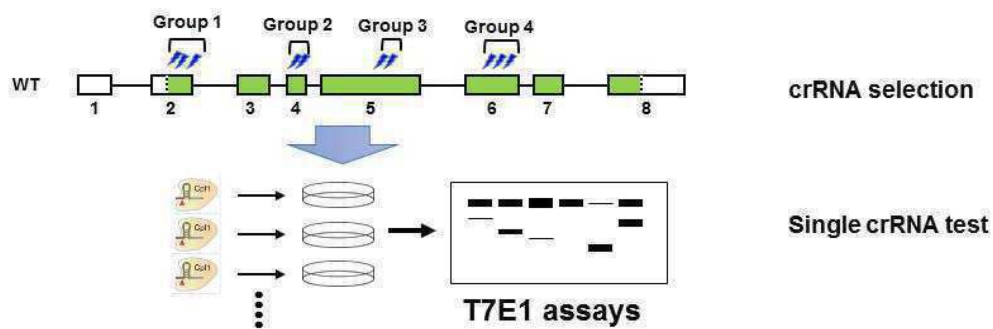
[0158] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해되어야 한다.

도면

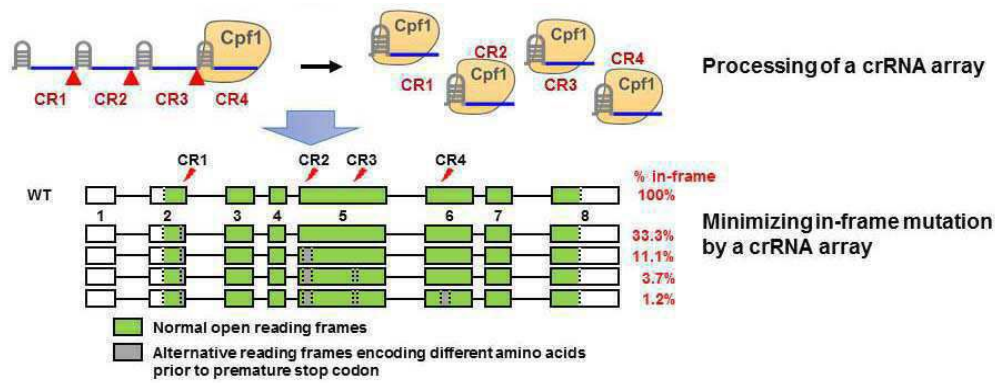
도면1



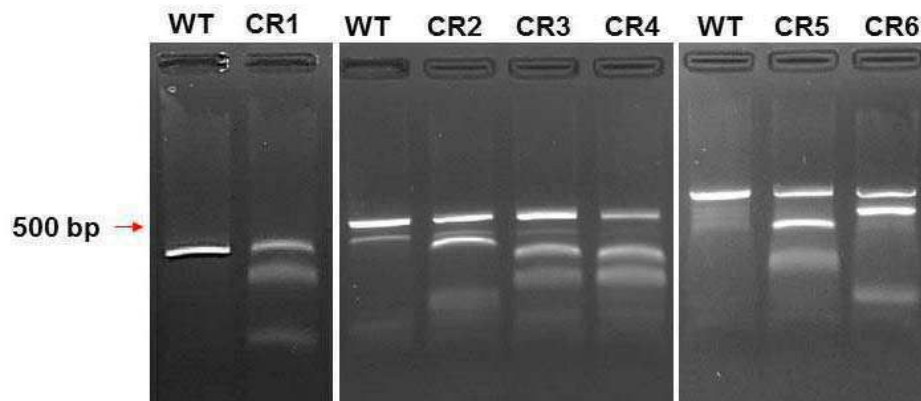
도면2a



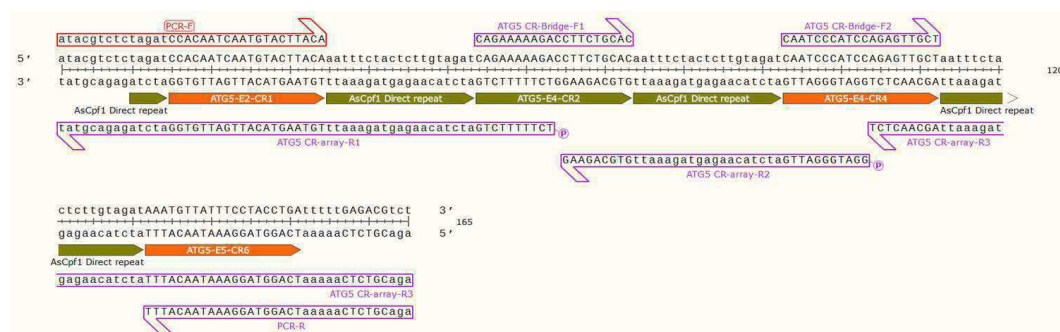
도면2b



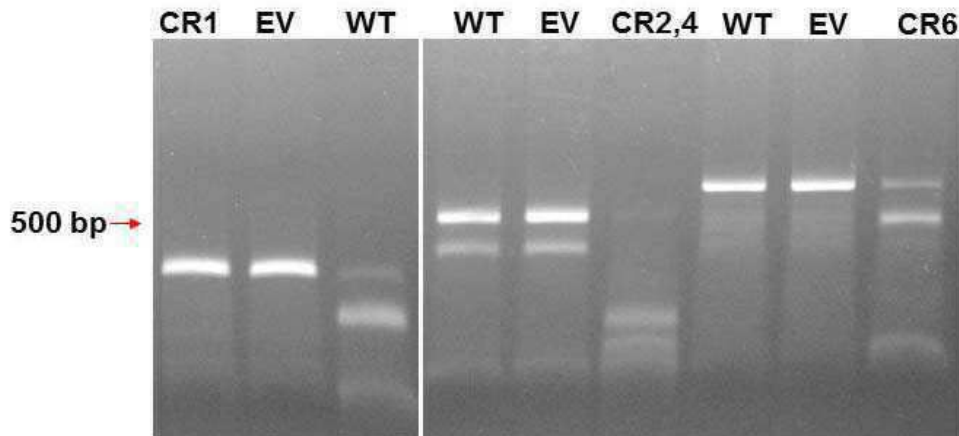
도면3a



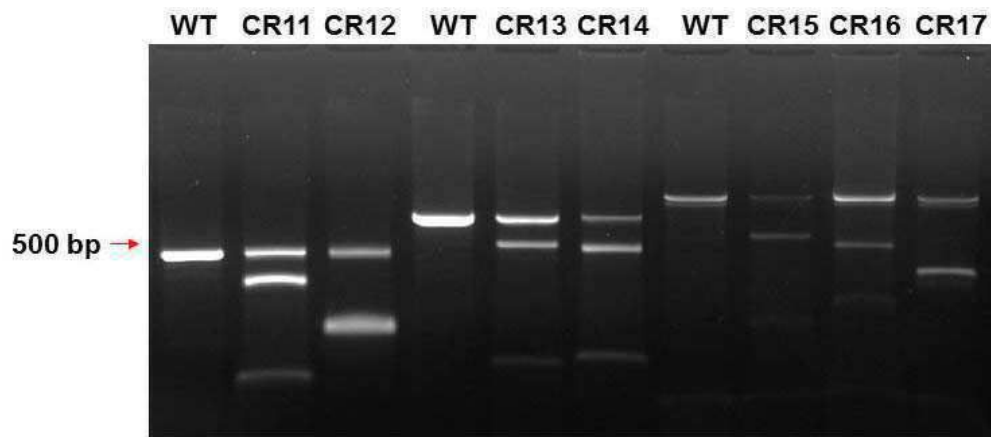
도면3b



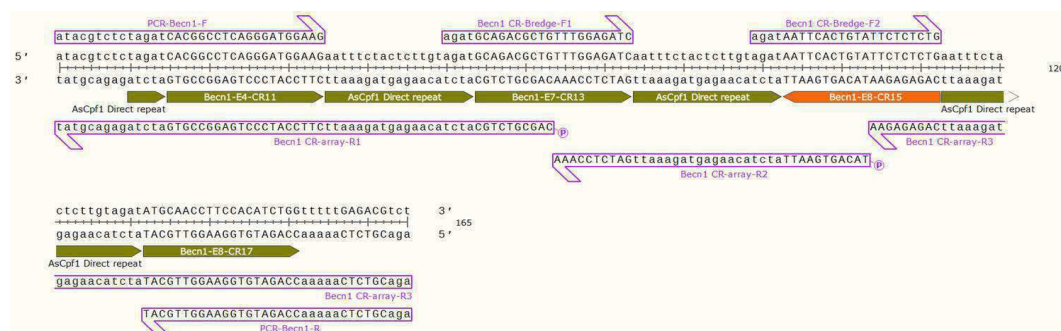
도면3c



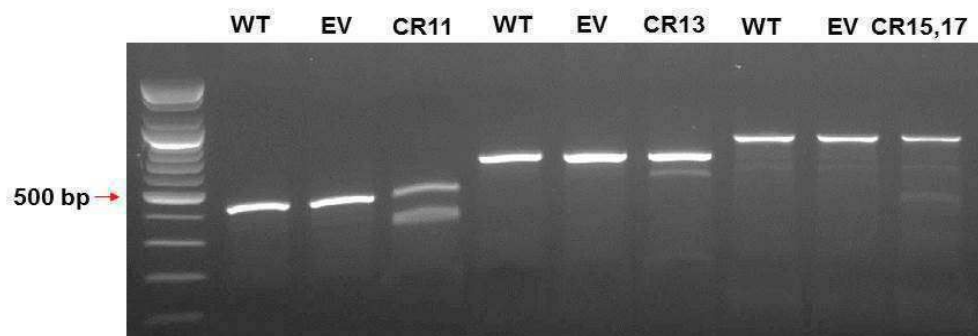
도면4a



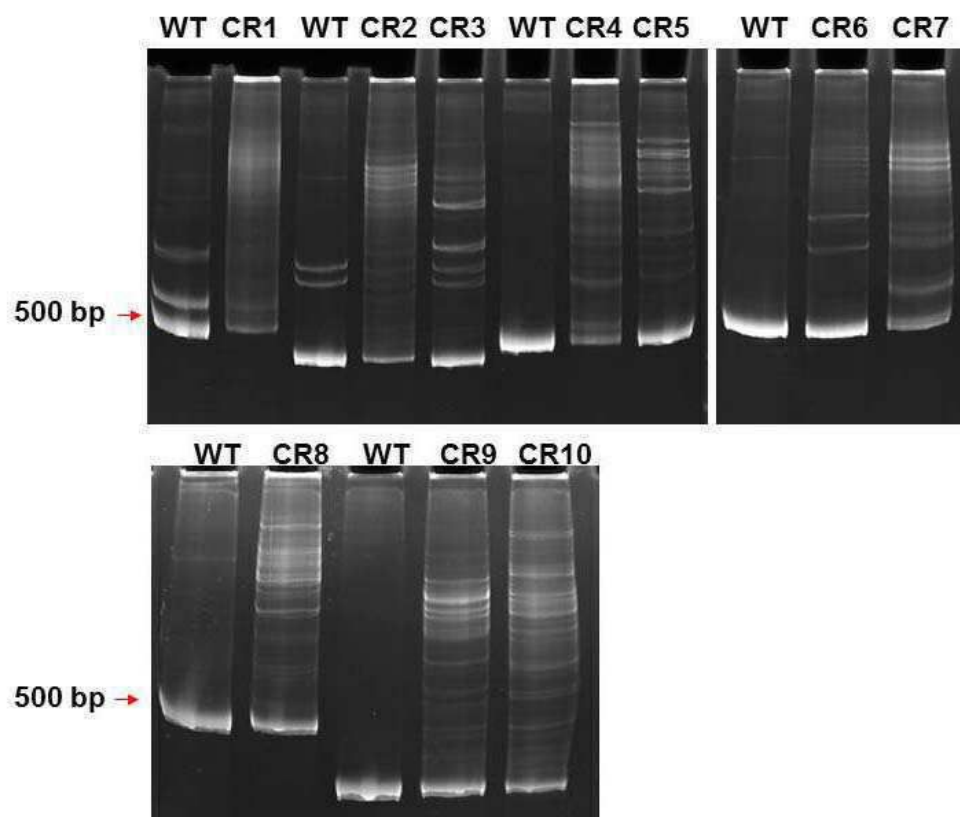
도면4b



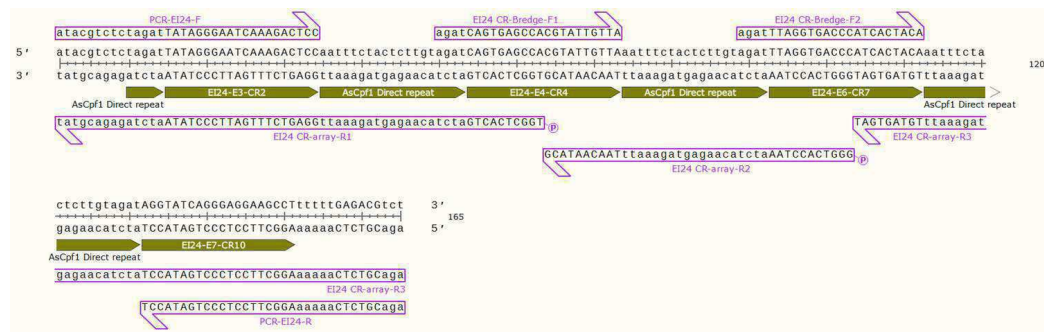
도면4c



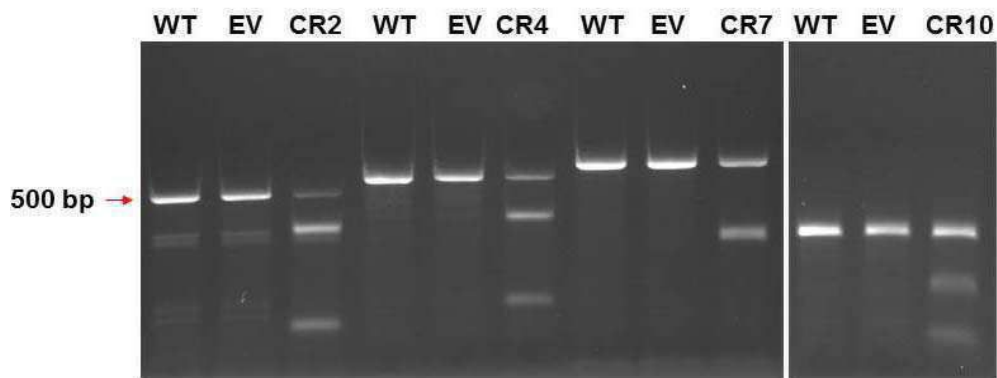
도면5a



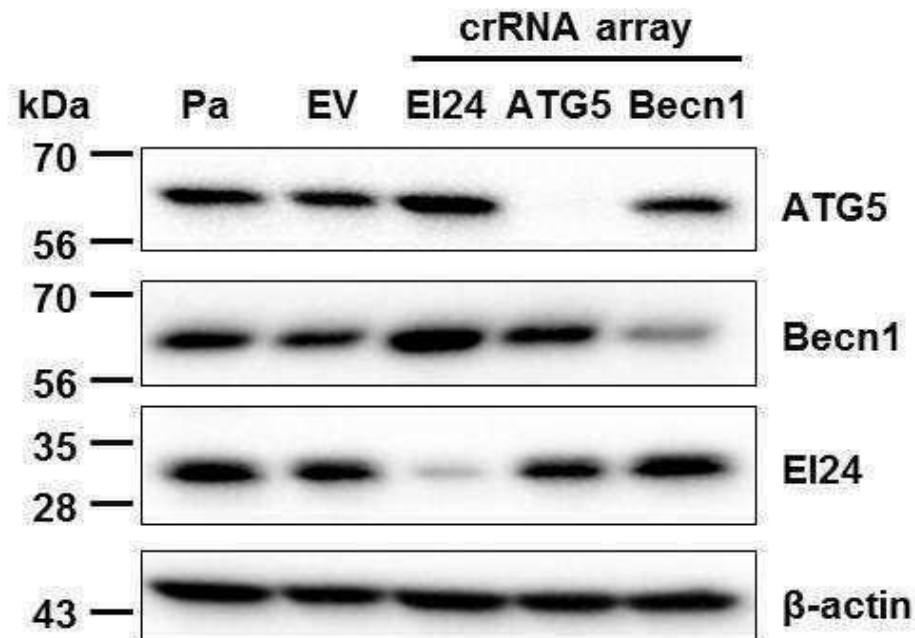
도면5b



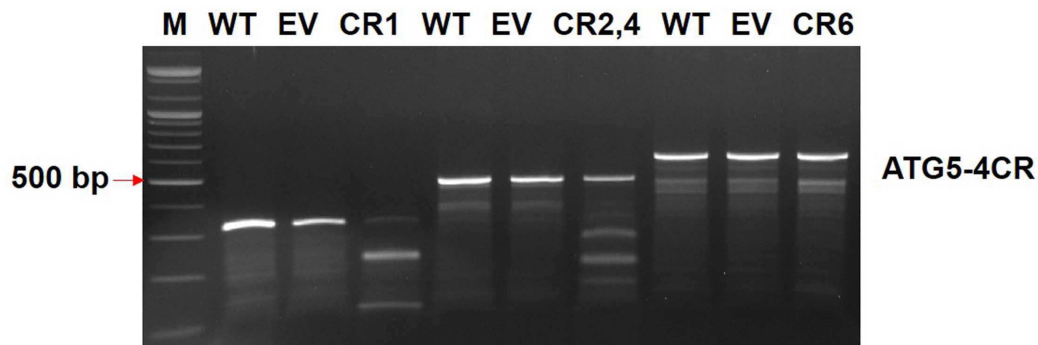
도면5c



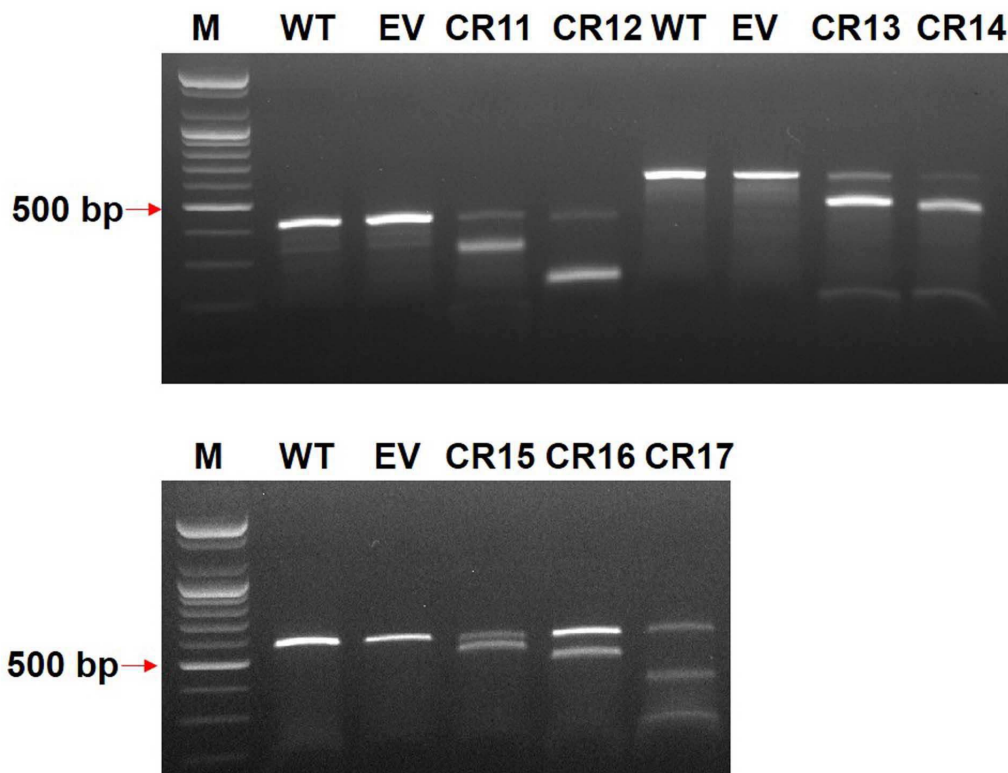
도면6



도면7



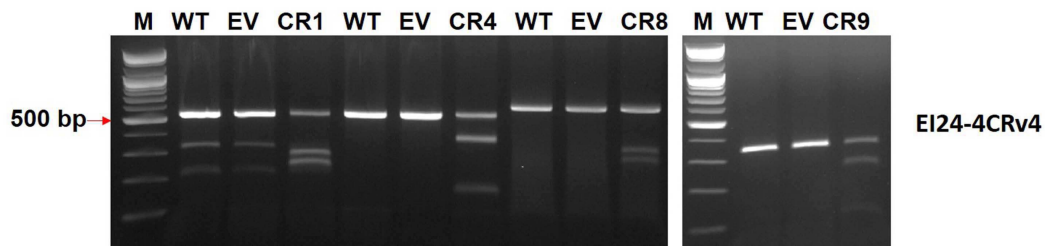
도면8a



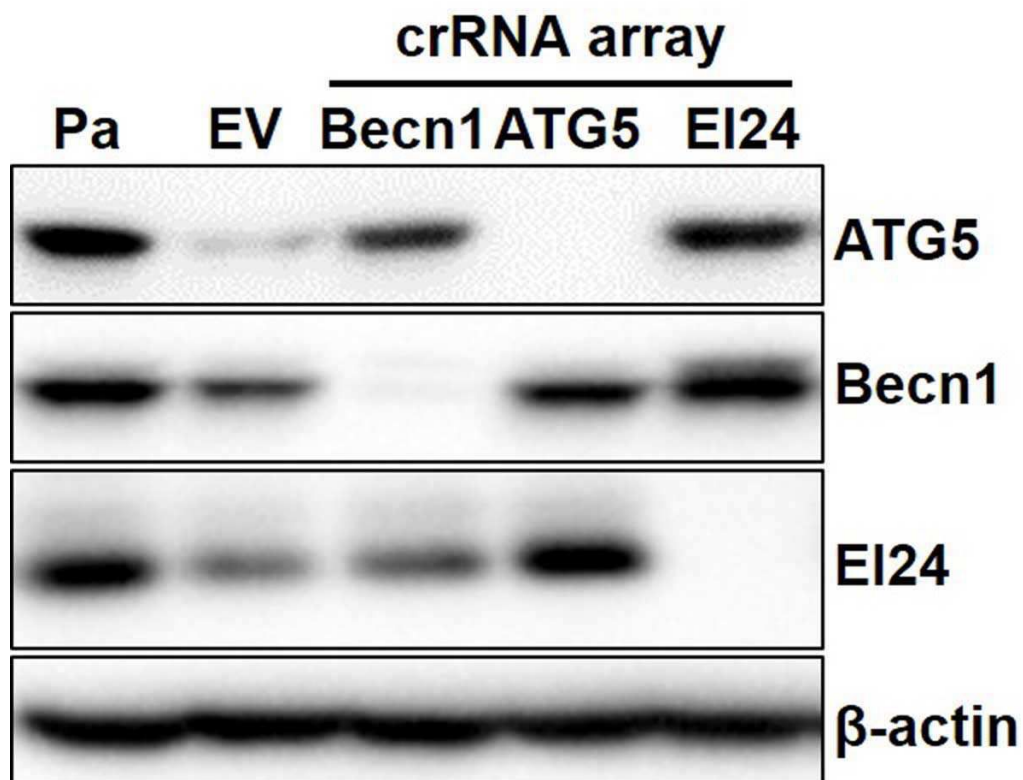
도면8b



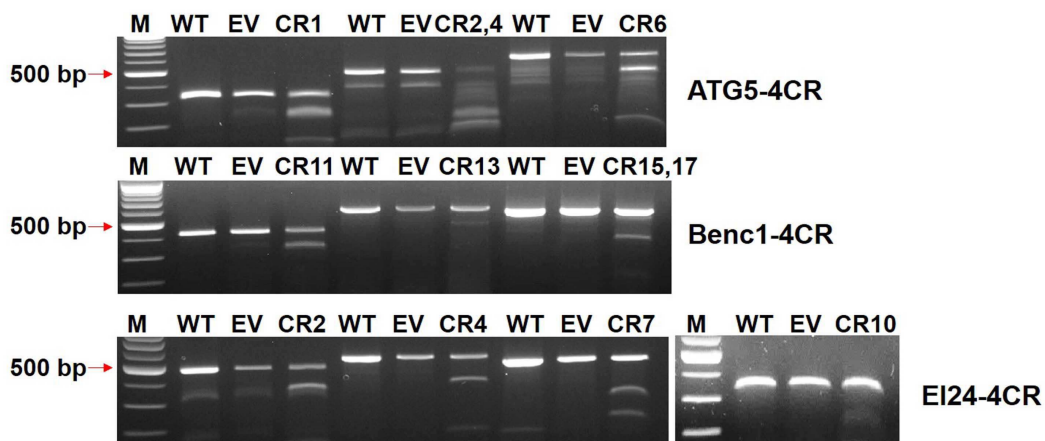
도면9c



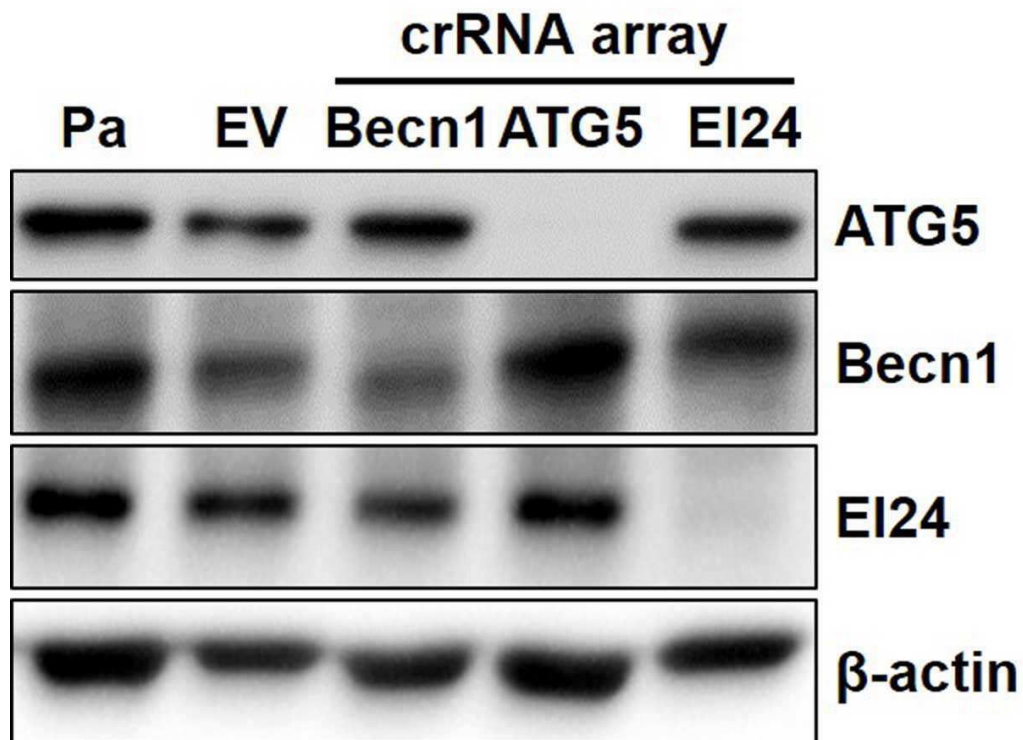
도면10



도면11a



도면11b



서열 목록

<110> THE ASAN FOUNDATION
University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

<120> Composition for manufacturing gene knock-out isogenic cell line
comprising crRNA array and Cpf1 and use thereof

<130> PD19-139-P1

<150> KR 10-2019-0141173

<151> 2019-11-06

<160> 98

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ATG5-E2-CR1

<400> 1

ccacaatcaa tgtacttaca

20

<210> 2

<211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ATG5-E4-CR2
 <400> 2
 cagaaaaaga ccttctgcac 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ATG5-E4-CR3
 <400> 3
 aagcatcagc ttctttcata 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ATG5-E4-CR4
 <400> 4
 caatcccatc cagagttgct 20
 <210> 5
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ATG5-E6-CR5
 <400> 5
 tatcattaca gacagatttg 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ATG5-E6-CR6
 <400> 6
 aaatgttatt tcctacctga 20

<210> 7
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Becn1-Ex2-CR11
 <400> 7
 cacggcctca gggatggaag 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Becn1-Ex2-CR12
 <400> 8
 aagatcctgg accgtgtcac 20

<210> 9
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Becn1-Ex7-CR13
 <400> 9
 gcagacgctg tttggagatc 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Becn1-Ex7-CR14
 <400> 10
 gagatcttag agcaaatgaa 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Becn1-Ex8-CR15

<400>	11	
aattcactgt attctctctg		20
<210>	12	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Becn1-Ex8-CR16	
<400>	12	
aacactcttc agctcatcat		20
<210>	13	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Becn1-Ex8-CR17	
<400>	13	
atgcaacctt ccacatctgg		20
<210>	14	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	EI24-ex2-CR1	
<400>	14	
gtggtgaaga gatggctgac		20
<210>	15	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	EI24-ex3-CR2	
<400>	15	
tataggaat caaagactcc		20
<210>	16	
<211>	20	
<212>	RNA	

<213> Artificial Sequence
 <220><223> EI24-ex3-CR3
 <400> 16
 ctggattcga gcatctagct 20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EI24-ex4-CR4
 <400> 17
 cagttagcca cgtattgtta 20
 <210> 18
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EI24-ex4-CR5
 <400> 18
 cagtgttgtg cttggaatgg 20

 <210> 19
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EI24-ex6-CR6
 <400> 19
 ctctttctta ggtgacccat 20
 <210> 20
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EI24-ex6-CR7
 <400> 20
 ttaggtgacc catcactaca 20
 <210> 21
 <211> 20

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EI24-ex6-CR8
 <400> 21
 gtcgtggctg gaattcttcc 20

<210> 22
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EI24-ex7-CR9
 <400> 22
 tctgttacag gatatagctg 20

<210> 23
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EI24-ex7-CR10
 <400> 23
 aggtatcagg gaggaagcct 20

<210> 24
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ATG5-E2-CR1_F
 <400> 24
 agatccacaa tcaatgtact taca 24

<210> 25
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ATG5-E2-CR1_R
 <400> 25
 aaaatgtaag tacattgatt gtgg 24

<210> 26
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ATG5-E4-CR2_F
 <400> 26
 agatcagaaa aagaccttct gcac 24
 <210> 27
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ATG5-E4-CR2_R
 <400> 27
 aaaagtgcag aaggtctttt tctg 24

 <210> 28
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ATG5-E4-CR3_F
 <400> 28
 agataagcat cagcttcttt cata 24
 <210> 29
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ATG5-E4-CR3_R
 <400> 29
 aaaatatgaa agaagctgat gctt 24
 <210> 30
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ATG5-E4-CR4_F
 <400> 30

agatcaatcc catccagagt tgct	24
<210> 31	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ATG5-E4-CR4_R	
<400> 31	
aaaaagcaac tctggatggg attg	24
<210> 32	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ATG5-E5-CR5_F	
<400> 32	
agattatcat tacagacaga ttg	24
<210> 33	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ATG5-E5-CR5_R	
<400> 33	
aaaacaaatc tgtctgtaat gata	24
<210> 34	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ATG5-E5-CR6_F	
<400> 34	
agataaatgt tatttcctac ctga	24
<210> 35	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> ATG5-E5-CR6_R

<400> 35

aaaatcaggt aggaataac attt

24

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Becn1-Ex2-CR11_F

<400> 36

agatcacggc ctcaggatg gaag

24

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Becn1-Ex2-CR11_R

<400> 37

aaaacttcca tccctgagc cgtg

24

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Becn1-Ex2-CR12_F

<400> 38

agataagatc ctggaccgtg tcac

24

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Becn1-Ex2-CR12_R

<400> 39

aaaagtgaca cgtccagga tctt

24

<210> 40

<211> 24

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Becn1-Ex7-CR13_R
 <400> 40
 agatgcagac gctgtttgga gatc 24
 <210> 41
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Becn1-Ex7-CR13_R
 <400> 41
 aaaagatctc caaacagcgt ctgc 24

 <210> 42
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Becn1-Ex7-CR14_F
 <400> 42
 agatgagatc ttagagcaaa tgaa 24
 <210> 43
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Becn1-Ex7-CR14_R
 <400> 43
 aaaattcatt tgctctaaga tctc 24
 <210> 44
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Becn1-Ex8-CR15_F
 <400> 44

 agataattca ctgtattctc tctg 24

<210> 45
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Becn1-Ex8-CR15_R
 <400> 45
 aaaacagaga gaatacagtg aatt 24
 <210> 46
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Becn1-Ex8-CR16_F
 <400> 46
 agataacact cttcagctca tcat 24
 <210> 47
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Becn1-Ex8-CR16_R
 <400> 47
 aaaaatgatg agctgaagag tggt 24
 <210> 48
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Becn1-Ex9-CR17_F
 <400> 48
 agatatgcaa ccttcacat ctgg 24
 <210> 49
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Becn1-Ex9-CR17_R
 <400> 49

aaaaccagat gtggaaggtt gcat

24

<210> 50

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EI24-Ex2-CR1_F

<400> 50

agatgtggtg aagagatggc tgac

24

<210> 51

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EI24-Ex2-CR1_R

<400> 51

aaaagtcagc catctcttca ccac

24

<210> 52

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EI24-Ex3-CR2_F

<400> 52

agattatagg gaatcaaaga ctcc

24

<210> 53

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EI24-Ex3-CR2_R

<400> 53

aaaaggagtc ttgtattccc tata

24

<210> 54

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EI24-Ex3-CR3_F

<400> 54

agatctggat tcgagcatct agct

24

<210> 55

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EI24-Ex3-CR3_R

<400> 55

aaaaagctag atgctcgaat ccag

24

<210> 56

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EI24-Ex4-CR4_F

<400> 56

agatcagtga gccacgtatt gtta

24

<210> 57

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EI24-Ex4-CR4_R

<400> 57

aaaataacaa tacgtggctc actg

24

<210> 58

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EI24-Ex4-CR5_F

<400> 58

agatcagtgt tgtgcttgga atgg

24

<210> 59

<211> 24

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EI24-Ex4-CR5_R
 <400> 59
 aaaaccattc caagcacaac actg 24
 <210> 60
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EI24-Ex6-CR6_F
 <400> 60

 agatctcttt cttagtgac ccat 24
 <210> 61
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EI24-Ex6-CR6_R
 <400> 61
 aaaaatgggt cacctaagaa agag 24
 <210> 62
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EI24-Ex6-CR7_F
 <400> 62
 agatttaggt gacccatcac taca 24
 <210> 63
 <211> 24
 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EI24-Ex6-CR7_R
 <400> 63
 aaaatgtagt gatgggtcac ctaa 24

<210> 64
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EI24-Ex6-CR8_F
 <400> 64
 agatgtcgtg gctggaattc ttcc 24
 <210> 65
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EI24-Ex6-CR8_R
 <400> 65
 aaaaggaaga attccagcca cgac 24

 <210> 66
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EI24-Ex7-CR9_F
 <400> 66
 agattctgtt acaggatata gctg 24
 <210> 67
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EI24-Ex7-CR9_R
 <400> 67
 aaaacagcta tatcctgtaa caga 24
 <210> 68
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> EI24-Ex7-CR10_F

<400>	68	
agataggtat caggaggaa gcct		24
<210>	69	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	EI24-Ex7-CR10_R	
<400>	69	
aaaaaggctt cctccctgat acct		24
<210>	70	
<211>	63	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ATG5 CR-array-R1	
<400>	70	
tctttttctg atctacaaga gtagaaattt gtaagtacat tgattgtgga tctagagacg		60
tat		63
<210>	71	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ATG5 CR-array-R2	
<400>	71	
ggatgggatt gatctacaag agtagaaatt gtcagaag		39
<210>	72	
<211>	62	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ATG5 CR-array-R3	
<400>	72	
agacgtctca aaaatcaggt aggaaataac atttatctac aagagtagaa attagcaact		60
ct		62
<210>	73	

<211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> ATG5 CR-Bridge-F1
 <400> 73
 cagaaaaaga ccttctgcac 20

<210> 74
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ATG5 CR-Bridge-F2
 <400> 74
 caatcccatc cagagttgct 20

<210> 75
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR-F
 <400> 75
 atacgtctct agatccacaa tcaatgtact taca 34

<210> 76
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR-R
 <400> 76
 agacgtctca aaaatcaggt aggaaataac attt 34

<210> 77
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Becn1 CR-array-R1
 <400> 77

cagcgtctgc atctacaaga gtagaaaatt ttccatccct gaggccgtga tctagagacg 60
tat 63
<210> 78
<211> 40
<212> DNA
<
213> Artificial Sequence
<220><223> Becn1 CR-array-R2
<400> 78
tacagtgaat tatctacaag agtagaaatt gatctccaaa 40
<210> 79
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Becn1 CR-array-R3
<400> 79
agacgtctca aaaaccagat gtggaaggtt gcatacttac aagagtagaa attcagagag 60
aa 62
<210> 80
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220
><223> Becn1 CR-Bridge-F1
<400> 80
agatgcagac gctgtttgga gatc 24
<210> 81
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Becn1 CR-Bridge-F2
<400> 81
agataattca ctgtattctc tctg 24
<210> 82
<211> 34

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR-Becn1-F	
<400>	82	
atacgtctct agatcacggc ctcagggatg gaag		34
<210>	83	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR-Becn1-R	
<400>	83	
agacgtctca aaaaccagat gtggaagggtt gcat		34
<210>	84	
<211>	63	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	EI24 CR-array-R1	
<400>	84	
tggctcactg atctacaaga gtagaaattg gagtctttga ttcctataa tctagagacg		60
tat		63
<210>	85	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	EI24 CR-array-R2	
<400>	85	
gggtcaccta aatctacaag agtagaaatt taacaatag		40
<210>	86	
<211>	62	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	EI24 CR-array-R3	
<400>	86	

agacgtctca aaaaaggctt cctccctgat acctatctac aagagtagaa attttagtg 60

at 62

<210> 87

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> EI24 CR-Bredge-F1

<400> 87

agatcagtga gccacgtatt gtta 24

<210> 88

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EI24 CR-Bredge-F2

<400> 88

agatttaggt gacccatcac taca 24

<210> 89

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR-EI24-F

<400> 89

atacgtctct agattatagg gaatcaaaga ctcc 34

<210> 90

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR-EI24-R

<400> 90

agacgtctca aaaaaggctt cctccctgat acct 34

<210> 91

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Becn1 CR-array2-R1

<400> 91

cagcgtctgc atctacaaga gtagaaattg tgacacggtc caggatctta tctagagacg 60

tat 63

<210> 92

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR-Becn1-F2

<400> 92

atacgtctct agataagatc ctggaccgtg tcac 34

<210> 93

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EI24-CR-array3-R1

<400> 93

giggctcact gatctacaag agtagaaatt gtcagccatc tcttcaccac atctagagac 60

gtat 64

<210> 94

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> EI24-CR-array4-R2

<400> 94

ccagccacga catctacaag agtagaaatt taacaatac 39

<210> 95

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ei24 CR-array-R3

<400> 95

agacgtctca aaaacagcta tatcctgtaa cagaatctac aagagtagaa attggaagaa	60
tt	62
<210> 96	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Ei24 CR-Bridge-F2	
<400>	
96	
gtcgtggctg gaattcttcc	20
<210> 97	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> EI24-PCR-F3	
<400> 97	
atacgtctct agatgtgggtg aagagatggc tgac	34
<210> 98	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Ei24-PCR-R	
<400> 98	
agacgtctca aaaacagcta tatcctgtaa caga	34