

(52) CPC특허분류

C12N 9/22 (2013.01)
A01K 2217/206 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/0387 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016-649
 부처명 서울아산병원
 연구관리전문기관 아산생명과학연구원
 연구사업명 아산생명과학연구원 인프라구축 정책사업
 연구과제명 면역부전마우스 모델 구축
 기 여 율 75/100
 주관기관 아산생명과학연구원
 연구기간 2015.05.01 ~ 2017.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A1009962
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 이공분야기초연구사업-일반연구자지원사업
 연구과제명 유전자가위(탈렌)를 이용한 이중 유전자 결손 마우스모델 제작기법 개발 및 그 적용에 관
 한 연구
 기 여 율 10/100
 주관기관 울산대학교 산학협력단
 연구기간 2013.06.01 ~ 2015.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A1A1A05001483
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 연구재단
 연구사업명 이공분야기초연구사업-신진연구자지원사업(후속연구)
 연구과제명 유전자가위를 이용한 질환동물모델 개발 및 유전자 치료법 연구
 기 여 율 10/100
 주관기관 울산대학교 산학협력단
 연구기간 2015.05.01 ~ 2018.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014M3A9D5A01073836
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 원천기술개발사업
 연구과제명 유전자변형 마우스의 방사선에 대한 면역 표현형 분석 기반 연구
 기 여 율 5/100
 주관기관 서울아산병원
 연구기간 2014.12.26 ~ 2023.11.19

명세서

청구범위

청구항 1

CRISPR-Cpf1 유전자 가위를 이용하는 것을 특징으로 하는, Prkdc (protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide) 결손 면역부전 동물모델 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 방법은

- (i) crRNA 및 Cpf1 mRNA를 생성하는 단계;
- (ii) 동물모델 배아 내로 crRNA 및 Cpf1 mRNA를 주입하는 단계; 및
- (iii) 배아를 대리모에 이식하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 Prkdc 결손 면역부전 동물모델 제조방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 동물은 포유동물인 것을 특징으로 하는 Prkdc 결손 면역부전 동물모델 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 포유동물은 설치류인 것을 특징으로 하는 Prkdc 결손 면역부전 동물모델 제조방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 Cpf1 유전자는 아시다미노코커스(*Acidaminococcus sp.*) 또는 라크노스피라세 박테리움(*Lachnospiraceae bacterium*) 유래의 Cpf1 이종상동성(orthologues) 유전자인 것을 특징으로 하는 Prkdc 결손 면역부전 동물모델 제조방법.

청구항 6

제2항에 있어서, (ii) 단계의 주입은 전핵(pronuclear) 단계 배아의 세포질 내로 crRNA 및 Cpf1 mRNA를 주입하는 것을 특징으로 하는 Prkdc 결손 면역부전 동물모델 제조방법.

청구항 7

제2항에 있어서, (ii) 단계는 미세주입법(microinjection)에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는 Prkdc 결손 면역부전 동물모델 제조방법.

청구항 8

제1항 내지 제4항의 방법 중 어느 하나의 방법으로 제조된, Prkdc 결손 형질전환 면역 부전 동물모델.

청구항 9

제8항에 있어서, Prkdc 결손 형질전환 면역 부전 동물모델은 서열번호 113 내지 160의 DNA 서열 중 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 동물모델.

청구항 10

제8항의 Prkdc 결손 형질전환 면역 부전 동물모델을 이용하여 면역부전 질환의 치료제를 스크리닝하는 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 유전자 결손 동물모델에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 Cpf1 유전자가위를 이용한 유전자 변형 동물모델 제작방법 개발 및 이를 활용한 Prkdc 유전자 결손 동물모델, 예를 들어 Prkdc 유전자의 결핍으로 유발되는 형질전환 면역 부전 마우스 및 이의 제조방법, 및 이용에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 유전체 교정(Genome Editing)이란 생명체의 유전정보를 자유롭게 교정하는 기술이다.

[0003] 생명과학분야의 진보와 유전체 서열 분석 기술의 발전을 통해 우리는 다양한 유전정보에 대해 폭넓게 이해할 수 있게 되었다. 예를 들어 동식물의 번식, 질병과 성장, 다양한 인간 유전질환을 일으키는 유전자 변이, 바이오연료의 생산 등을 위한 유전자에 대한 이해는 이미 확보된 상황이지만 이를 직접적으로 활용하여 생명체를 개선하고, 인간 질병을 치료하는 수준에까지 이르기 위해서는 그 이상의 기술 진보가 필수적이다.

[0004] 유전체 교정 기술은 인간을 포함하여 동물, 식물, 미생물의 유전정보를 변화시켜 그 활용범위를 획기적으로 확장시킬 수 있다. 유전자가위는 원하는 유전정보를 정확히 자를 수 있도록 설계되어 만들어지는 분자 도구로 유전체 교정 기술에서 핵심역할을 하고 있다. 유전자 서열분석 분야를 한 차원 발전시켰던 차세대시퀀싱(Next generation sequencing) 기술과 같이, 유전자가위는 유전정보 활용의 속도와 그 범위를 확장시키고 새로운 산업 분야를 창출해 내는 핵심 기술이 되고 있다

[0005] 지금까지 개발된 유전자 가위는 그 순서에 따라 3세대로 나눌 수 있다. 1세대 유전자 가위는 ZFN(Zinc Finger Nuclease), 2세대 유전자 가위는 TALEN(Transcription Activator-Like Effector Nuclease), 가장 최근에 연구된 CRISPR(크리스퍼, Clustered regularly interspaced short palindromic repeat)-Cas(CRISPR-associated)9은 3세대 유전자 가위다

[0006] CRISPRs (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)는 유전자 서열이 밝혀진 박테리아의 대략 40% 및 유전자 서열이 밝혀진 고세균의 90%의 유전체에서 발견되는 여러 짧은 직접 반복을 포함하는 좌위이다.

[0007] 플라스미드 및 파지 등의 외인성 유전적 요소에 저항성을 부여한다는 점에서, CRISPR는 원핵 면역 시스템으로서 기능한다. CRISPR 시스템은 획득 면역의 한 형태를 제공한다. 스페이서(spacers)라고 불리는 외인성 DNA의 짧은 부분은 CRISPR 반복 사이의 게놈에 편입되고, 과거 노출을 기억하는 역할을 한다. 그때 CRISPR 스페이서는 진행 유기체에서 RNAi와 유사한 방식으로 외인성 유전적 요소를 인지하고 묵살(silence)하는데 사용된다.

[0008] Type II CRISPR/Cas 시스템에서 필수적인 단백질 요소인 Cas9은, CRISPR RNA (crRNA) 및 trans-activating crRNA(tracrRNA)로 명명된 두 개의 RNA와 복합체를 형성했을 때, 활성 엔도뉴클레아제(endonuclease)를 형성하고, 그렇게 함으로써 파지 또는 플라스미드의 침입에서 외부 유전적 요소를 묵살하여 숙주 세포를 보호한다. crRNA는 전달에 외부 침입자로부터 점유되었던 숙주 유전체의 CRISPR 요소로부터 전사된다.

[0009] 최근, Jinek et al.(1)은 crRNA 및 tracrRNA에서 필수적인 부분의 융합에 의해 생산된 단일 사슬 키메라 RNA(chimeric RNA)가 Cas9/RNA 복합체에서 두 개의 RNA를 대체할 수 있어서 기능 엔도뉴클레아제를 형성한다는 것을 입증하였다. 뉴클레오타이드 결합 CRISPR-Cas 단백질의 위치 특이성(site specificity)은 디자인 및 합성하기에 더 까다로울 수 있는 DNA-결합 단백질 대신 RNA 분자에 의해 통제되기 때문에, CRISPR/Cas 시스템은 징크 핑거 (zinc finger) 및 전사 활성화자-유사 반응기 DNA-결합 단백질 (transcription activator-like effector DNA binding protein)에 이점을 제공한다.

[0010] 그러나, 엔도뉴클레아제에 의한 유전자 교정위치가 crRNA가 인식하는 부위라는 점 등을 감안하면 CRISPR/Cas 시스템을 이용한 유전자 변형 동물을 제작에는 여전히 몇몇 제한 조건이 존재한다.

[0011] 이에, 본 발명자들은 상기 Cas9 단백질이 아닌, 새로운 유전자가위 Cpf1을 이용함으로써 보다 간단한 방법으로 유전자 변형 동물을 제작하고, Prkdc 유전자의 결핍으로 유발되는 형질전환 면역 부전 마우스를 효과적으로 제조할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0012] (비특허문헌 0001) 1. Sung, Y.H. et al. Nat. Biotechnol. 31, 23-24 (2013).
- (비특허문헌 0002) 2. Sung, Y.H. et al. Genome Res. 24, 125-131 (2014).
- (비특허문헌 0003) 3. Zetsche, B. et al. Cell 163, 759-771 (2015).
- (비특허문헌 0004) 4. Hsu, P.D., Lander, E.S. & Zhang, F. Cell 157, 1262-1278 (2014).
- (비특허문헌 0005) 5. Zhu, X. et al. Sci. Rep. 4, 6420 (2014).
- (비특허문헌 0006) 6. Panda, S.K. et al. Genetics 195, 703-713 (2013).
- (비특허문헌 0007) 7. Chiang, Y.J. et al. PLoS One 7, e49305 (2012).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명의 목적은 새로운 유전자 가위 Cpf1을 사용한 유전자 변형동물 제작방법 및 유전자 Prkdc (protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide) 결손 면역부전 동물모델 제조방법을 제공하는데 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법으로 제작된 Prkdc 유전자의 결핍으로 유발되는 형질전환 면역 부전 동물모델 및 이의 이용 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 과제를 해결하기 위해서, 본 발명은 CRISPR-Cpf1 유전자 가위를 이용하는 것을 특징으로 하는, Prkdc (protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide) 결손 면역부전 동물모델 제조방법 및 이에 따라 제조된 Prkdc 유전자변형으로 유발되는 형질전환 면역 부전 동물모델을 제공한다.
- [0016] 일 구체예로서, CRISPR-Cpf1 유전자 가위를 이용하는 것을 특징으로 하는, Prkdc (protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide) 결손 면역부전 동물모델 제조방법은 하기와 같은 단계를 포함할 수 있다:
- [0017] (i) crRNA 및 Cpf1 mRNA를 생성하는 단계
- [0018] (ii) 동물 배아내로 crRNA 및 Cpf1 mRNA를 주입하는 단계
- [0019] (iii) 배아를 대리모에 이식하는 단계
- [0020] 이 때, 상기 동물은 포유동물일 수 있고, 바람직하게는 설치류를 사용할 수 있다. 예를 들어, 마우스, 랫드 등을 사용할 수 있다.
- [0021] 상기, crRNA는 서열번호 1 내지 9의 프라이머를 이용하여, 생성할 수 있다.
- [0022] 또한, 상기 Cpf1 유전자는 공지된 16개 패밀리 중 임의의 것을 사용할 수 있고, 구체적인 예로서, 아시다미노코커스(*Acidaminococcus sp.*) 또는 라크노스피라세 박테리움(*Lachnospiraceae bacterium*) 유래의 Cpf1 이종상동성(orthologues) 유전자를 사용할 수 있다.
- [0023] 또한, 상기 (ii) 단계의 crRNA 및 Cpf1 mRNA 주입은 전핵(pronuclear)이 보이는 단계 배아의 세포질 내로 수행될 수 있다. 이 때, 미세주입법(microinjection)에 의해 이루어질 수 있다. 또한, crRNA 50 내지 200 ng/ml, Cpf1 mRNA 10 내지 100 ng/ml을 주입할 수 있다.
- [0024] 또한, (iii) 배아 이식 단계의 상기 crRNAs 및 Cpf1 mRNA가 주입된 수정란은 37℃ 인큐베이터에서 2~24시간 배양되어 1-세포기 또는 2-세포기 상태로 대리모에 이식될 수 있다.
- [0025] 다른 구체예로서, 본 발명은 CRISPR-Cpf1 유전자 가위를 이용하여 제조된, Prkdc 결손 형질전환 면역 부전 동물모델을 제공한다.
- [0026] 바람직한 예로는 상기 동물은 설치류를 사용하고 본 발명의 일 실시예에서는 마우스를 이용하였다.
- [0027] 또 다른 바람직한 예로는 Prkdc 결손 형질전환 면역 부전 동물모델은 서열번호 113 내지 160의 DNA 서열 중 어느 하나 이상의 서열을 포함할 수 있다.

[0028] 또 다른 구체예로서, 본 발명은 Prkdc 결손 형질전환 면역 부전 동물모델을 이용하여 세포치료제 안정성 평가 및 면역치료, 항암제를 포함한 다양한 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0029] 이와 같이, 본 발명은 Cpf1 유전자자위를 이용한 유전자 결손 동물모델 제조, Prkdc 유전자 결손 동물모델 제조 방법 및 이에 의해 생산한 형질전환 면역부전(면역결핍) 동물모델과 이의 적용과 관련한 다양한 이용을 모두 포함한다.

발명의 효과

[0030] 본 발명의 면역부전 또는 면역결핍 동물모델 제조방법은 종래 공지의 방법과 비교하여 간단하고 용이한 장점이 있고, 효과에 있어서도 배아에서 형질전환 효율이 매우 우수하다. 따라서, 인간화 동물 (humanized animal)을 이용한 다양한 실험에 본 발명의 동물모델이 유용하게 사용될 수 있을 것이다. 나아가, 향후 유전체 교정 (Genome Editing) 기술 분야에 있어서 시장 적용 시 상용화 가능성 및 시장 성장성이 매우 높은 장점도 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 Cpf1-매개 Trp53 돌연변이 마우스 생성을 위한 타겟 서열(A), PAGE-기반 게놈타이핑 분석(B), 및 Trp53의 변이된 DNA 서열을 나타낸 것이다.

도 2는 마우스 Trp53 좌위에 대한 In vivo AsCpf1 활성의 전기영동 분석 결과이다.(붉은색 숫자는 돌연변이 과운더를 나타냄)

도 3은 마우스 Trp53 좌위에 대한 In vivo LbCpf1 활성의 전기영동 분석 결과이다.(붉은색 숫자는 돌연변이 과운더를 나타냄).

도 4는 AsCpf1를 이용한 Trp53 유전자 타겟팅에 의한 PAGE-기반 게놈타이핑 분석 결과이다.

도 5는 도 4에서 확인한 F₀ 마우스의 DNA 서열이다.

도 6은 LbCpf1를 이용한 Trp53 유전자 타겟팅에 의한 PAGE-기반 게놈타이핑 분석 결과이다.

도 7은 AsCpf1 및 LbCpf1를 이용하여 Prkdc 돌연변이 마우스 생성을 위한 타겟 서열(A), PAGE-기반 게놈타이핑 분석(B, D) 결과이다.

도 8은 도 7에서 확인한 돌연변이 마우스의 Prkdc의 변이된 DNA 서열을 나타낸 것이다.

도 9는 LbCpf1를 이용하여 Trp53 및 Prkdc 좌위에서 동시적 유전자 타겟팅을 보여주는 PAGE-기반 게놈타이핑 분석 결과이다.

도 10은 비장, 흉선 및 간 조직에서 LbCpf1로 생성된 X-선 조사된 F₀ #13 에서의 Trp53 단백질의 비검출 결과를 보여주는 것이다.

도 11은 Cpf1 타겟팅 Trp53 유전자의 오프-타겟(Off-target) 분석결과이다.

도 12는 Cpf1 타겟팅 Prkdc 유전자의 오프-타겟(Off-target) 분석결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 발명에서 사용되는 용어에 대한 정의는 이하와 같다.

[0033] "질환 모델 동물"이란 사람의 질병과 아주 유사한 형태의 질병을 가진 동물을 말한다. 사람의 질병 연구에 있어 질환 모델 동물이 의미를 갖는 것은 사람과 동물들 간의 생리적 또는 유전적인 유사성에 의한다. 질병 연구에 있어 생체의학 질환모델동물은 질병의 다양한 원인과 발병과정 및 진단에 대한 연구용 재료를 제공해주고, 질환 모델 동물의 연구를 통해 질병에 관련된 유전자들을 알아내고, 유전자들 간의 상호작용을 이해할 수 있게 하고, 개발된 신약후보물질의 실제 효능 및 독성 검사를 통해 실용화 가능성의 여부를 판단하는 기초 자료를 얻을 수 있다.

[0034] "녹아웃(knock-out)"은 표적 유전자의 기능 저하를 가져다 주는 유전자 서열 상의 변형을 의미하는데, 바람직하게는 이로써 표적 유전자 발현이 탐지 가능하지 않거나 무의미하다. Prkdc 유전자의 녹아웃은 Prkdc 유전자의 기능이 실질적으로 저하되어 발현이 탐지될 수 없거나 또는 무의미한 수준으로만 존재하는 것을 의미한다. "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 방법시, 표적 유전자의 변형이 일어날 수 있는 조건적 녹아웃이 또한 포함된다.

[0035] "유전자"는 단백질 코딩 또는 전사시에 또는 다른 유전자 발현의 조절시에 기능적 역할을 갖는 임의의 핵산 서열 또는 그의 일부를 의미한다. 유전자는 기능적 단백질을 코딩하는 모든 핵산 또는 단백질을 코딩 또는 발현하는 핵산의 일부만으로 이루어질 수 있다. 핵산 서열은 엑손, 인트론, 개시 또는 종료 영역, 프로모터 서열, 다른 조절 서열 또는 유전자에 인접한 특유한 서열 내에 유전자 이상을 포함할 수 있다.

[0036] "코딩 영역" 또는 "코딩 서열"은, 통상적인 염기쌍과 코돈 용법 관계에 따라, 발현이 요구되는 특정 유전자 생성물 또는 그의 단편을 코딩하는 핵산 서열, 그의 상보체, 또는 이들의 일부분을 지칭한다. 코딩 서열은 성숙 mRNA를 제공하기 위해 세포의 생화학 기구에 의해 함께 연결되는 게놈 DNA 또는 미성숙 1차 RNA 전사체에서의 엑손을 포함한다. 안티센스(antisense) 가닥은 상기 핵산의 상보체이고, 코딩 서열은 이들로부터 추정될 수 있다. 코딩 서열은, 적절한 길이의 전사체가 생성되고 적절한 리딩 프레임에서 번역되어 목적하는 기능 생성물이 생성되도록, 전사 조절 요소 및 번역 개시 및 종결 코돈과의 관계에 놓인다

[0037] "폴리뉴클레오티드(polynucleotide)" 또는 "핵산(nucleic acid)"이라는 용어는 리보뉴클레오티드 뿐만 아니라 디옥시리보뉴클레오티드 등 온갖 길이의 뉴클레오티드 중합체를 의미한다. 이 용어는 분자의 1차적 구조만을 의미하고, 따라서 이중 또는 단일 사슬의 DNA 또는 RNA를 의미한다. 이것은 또한 변형의 알려진 유형, 예를 들어 당해 분야에서 알려진 표지(label), 메틸화, "caps", 유사체의 하나 혹은 그 이상의 자연 발생의 뉴클레오티드 치환, 탈결합(예: methyl phosphonate, phosphotriester, phosphoamidate, carbamate, 등)과 결합(예:phosphorothioate, phosphorodithioate, 등), 단백질(예: 뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 펩티드(signal peptide), poly-Llysine, 등) 등의 부속물을 포함하는 것, 삽입물(예: 아크리딘, Psolalen, 등)을 가지는 것, 킬레이트(예: 금속원소, 방사성 금속원소, 붕소, 산화 금속원소, 등)를 가지는 것, 알킬화합물을 가지는 것, 변형된 결합(예: alpha anomeric 핵산, 등)을 가지는 것, 또한 폴리뉴클레오티드의 비변형을 포함한 뉴클레오티드 간 변형을 의미한다. 일반적으로, 본 발명에 의해 제공되는 핵산 부분은 지놈(genome)의 파편과 짧은 올리고뉴클레오티드 결합자 또는 일련의 올리고뉴클레오티드, 미생물 또는 바이러스 오페론(operon)이나 진핵세포 유전자로부터 유도된 조절인자(regulatory element)를 포함하는 재조합 전사 단위로 발현될 수 있는 합성 핵산을 제공하는 특유의 뉴클레오티드들로 구성될 것이다.

[0038] "정상 발현"은 야생형 동물 또는 세포주에 존재하는 발현 수준으로서 정의된다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같은 마우스 또는 세포주는, 이러한 마우스 또는 세포주가 야생형 동물 또는 세포주에 존재하는 것과 비교할 때 보다 낮은 수준(이의 총 부재 포함)의 Trp53, Prkdc를 발현하는 경우에 "정상 발현에 결함이 있는" 것으로 간주된다. 당해 분야에 공지된 각종 기술을 사용하여, 소정의 단백질의 발현 수준을 정량화할 수 있다. 이러한 기술에는 면역학적 기술, 예를 들면, ELISA, RIA, 웨스턴 블롯 또는 유동 세포계수법/FACS, 또는 정량적 분석 기술, 예를 들면, 분광법 또는 크로마토그래피 방법(HPLC, FPLC, 친화 또는 발화 크로마토그래피 포함)이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

[0039] "기능적 등가물"이라는 용어는 예를 들어, 기준(reference) 서열로부터 하나 또는 그 이상의 치환, 결실 또는 부가, 기준(reference) 서열과 실험(subject) 서열 사이의 다양한 기능적 비유사성을 낳지 않는 실제 효과(net effect) 등 변화된 돌연변이 서열의 뉴클레오티드와 핵산서열 모두를 의미한다. 통상적으로, 그런 실질적 등가물인 서열은 단지 약 35%(즉, 실질적으로 증가적인 서열에서의 각 잔기 치환, 부가 및 결실의 숫자는 상응하는 기준 서열과 비교하고 실질적으로 증가적인 서열에서의 나머지 전체 숫자로 나누었을 때 약 0.35 또는 그 이하이다) 정도로 본 명세서에 나열된 것에서부터 다양하다. 그런 서열은 나열된 서열과 65%의 서열 동일성을 갖는다. 본 발명에 따른 실질적 등가물인, 예를 들어 돌연변이, 아미노산 서열은 나열된 아미노산 서열과 바람직하게는 최소한 80%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 최소한 90%의 서열 동일성을 갖는다. 실질적 등가물인 본 발명의 뉴클레오티드 서열은 예를 들어, 유전자 암호의 중복(redundancy) 또는 축퇴(degeneracy)를 고려할 때, 더 낮은 백분율의 서열 동일성을 가질 수 있다. 바람직하게는, 뉴클레오티드 서열은 최소한 약 65%의 동일성, 보다 바람직하게는 최소한 약 75%의 동일성, 가장 바람직하게는 약 95%의 동일성을 가져야 한다. 본 발명의 목적을 위해서는, 실질적으로 증가적인 생물학적 활성과 실질적으로 증가적인 합성 특징을 가지는 서열들은 실질적 등가물로 취급된다. 등가물을 결정하기 위해, 성숙 서열(예를 들어, 위(spurious) 종결코돈(stop codon)을 제조하는 돌연변이를 통한)의 절단(truncation)은 무시되어야 한다.

[0040] "항체"라는 용어는 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 적어도 2개의 무손상 항체로부터 형성된 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 원하는 생물학적 활성을 나타내

는 한, 항체 단편을 포함한다.

- [0041] "프라이머"는 올리고뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 핵산쇄(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 중합제의 존재, 그리고 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용할 수 있다. 바람직하게는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드이며 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.
- [0042] "형질전환"은 세포의 유전적 특성의 변화를 나타내고, 세포가 변형되어 새로운 DNA 또는 RNA를 함유할 때 세포는 형질전환된다. 예를 들어, 세포는 형질감염, 형질도입, 또는 기타 기술을 통하여 새로운 유전 물질을 도입함으로써 이의 천연 상태에서부터 유전적으로 변형되는 경우 형질전환된다. 형질감염 또는 형질도입후, 형질전환 DNA는 세포의 염색체 내로 생리학적으로 통합됨으로써 세포의 것과 재결합될 수 있거나, 또는 복제 없이 에피솜 요소로서 일시적으로 유지될 수 있거나, 또는 플라스미드로서 독립적으로 복제될 수 있다.
- [0043] "포유류"는 인간, 가축 및 농장 동물, 및 동물원 동물, 사냥 동물, 또는 애완동물, 가령 개, 말, 고양이, 소, 랫트, 마우스, 비-인간 영장류(가령, 원숭이, 유인원) 등을 포함하여, 포유류로 분류된 임의의 동물을 나타낸다.
- [0044] "설치류" 및 "설치류들"은 계통발생적 순서 설치목(Rodentia)의 모든 구성원을 나타내며 그것으로부터 유래되는 후세의 모든 세대의 임의의 및 모든 자손을 포함한다.
- [0045] 본 명세서에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본 발명의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다.
- [0046] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다.
- [0047] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0048] **[면역부전 동물모델]**
- [0049] 본 발명은 면역부전 또는 면역결핍 동물모델 및 이의 제조방법에 관한 내용을 포함한다.
- [0050] "면역 결핍 동물"이란, 질환이 발병될 수 있도록 면역시스템을 구성하는 일부 구성요소를 유전자 수준에서 인위적으로 손상시켜서 정상적인 면역시스템이 구현되지 않도록 조작하여 제조된 동물모델을 의미한다.
- [0051] 상기 면역결핍 동물로는, 바람직하게는 면역결핍 포유동물을 사용할 수 있고, 보다 바람직하게는 면역결핍되도록 조작된 마우스, 랫트, 햄스터, 기니아피그 등의 면역결핍 설치류가 될 수 있으며, 가장 바람직하게는 누드 마우스, NOD(non-obese diabetic) 마우스, SCID(Severe combined immunodeficiency) 마우스, NOD-SCID 마우스, NOG(NOD/SCID Il2rg^{-/-}) 마우스 등이 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [0052] 본 발명의 일 태양은, Prkdc 유전자의 결핍으로 유발되는 면역 부전 동물모델에 관한 것이다. 구체적 예로서, Prkdc 유전자의 결핍으로 유발되는 형질전환 면역 부전 마우스 모델에 관한 것이다.
- [0053] Prkdc (protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide)는 DNA-PKcs (DNA dependent protein-kinase catalytic subunit)라고도 하며, 동물 유래의 모든 경우를 포함한다.
- [0054] 야생형(wild type)의 Prkdc를 포함하며, 기능적 등가물인 이상, 이들의 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의한 Prkdc 변이체를 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 "Prkdc" 단백질 또는 Prkdc 폴리펩티드란 폴리펩티드 단편, 이의 화학적으로 변형된 유도체 뿐만 아니라 그것의 핵산 및 또는 아미노산 서열 변이체를 포함한다.
- [0055] 상기 Prkdc (DNA-PKcs)는 이중쇄 DNA 손상(double strand DNA break)의 복구와 V(D)J 유전자의 재조합에 중요한 역할을 한다.
- [0056] 이중쇄 DNA 손상은 DNA가 방사능 등으로 인한 손상시 발생하는데, 손상 부위에 DNA 의존 단백질 키나아제가 결합하면 Trp53에 의한 세포자멸사를 억제하고 아울러 연결효소(ligase) 등의 여러 DNA 복구인자들이 참여할 때까

지는 비동종 재조합 (non-homologous recombination)의 기능을 하게 된다. V(D)J 재조합 과정은 정상적인 생체 내 나타나는 이중쇄 DNA 손상의 일종인데, 이는 B세포의 항체나 T세포의 수용체의 형성에 필수적인 과정이다. 즉 항체와 수용체를 형성하는 과정에서 variable (V), diversity (D), 그리고 joining (J)의 유전자 재조합이 일어나는데 이러한 이중쇄 DNA 손상이 필연적임에도 불구하고 p53의 작용에 의해 세포자멸사가 일어날 수 있으므로, V(D)J 재조합 과정 중 세포자멸사가 발생하지 않기 위해서는 DNA 의존 단백질 키나아제의 작용이 필수적이다. 이처럼 DNA 의존 단백질 키나아제는 DNA 복구 기능과 V(D)J 재조합으로 인한 항체와 T세포 수용체 형성에 중요한 역할을 하므로 DNA 의존 단백질 키나아제가 소실되거나 손상 받을 경우 심한 면역장애가 발생한다.

[0057] 대표적으로 DNA-PKcs가 소실된 중증 복합면역결핍(severe combined immune deficiency: SCID)이나, 이러한 DNA-PKcs (Prkdc) 유전자가 소실된 knock-out의 경우는 면역 기능이 심하게 소실되고 말단 회장부에 Peyer's patch가 감소한다. DNA-PKcs가 소실된 경우는 B세포와 T세포의 발달을 모두 억제함으로써 전체적인 면역 기능의 저하를 가져오게 된다.

[0058] 그러므로, Prkdc 유전자 결손 동물모델은 면역부전 또는 면역결핍 동물모델로 활용될 수 있다.

[유전자 가위 시스템]

[0060] 다른 구체예로서, 본 발명은 면역부전 또는 면역결핍 동물모델의 제조방법에 관한 것이다. 바람직하게는 상기 Prkdc 유전자 결손 동물모델의 제조방법에 관한 것이다. 특히, 유전자 가위 기술을 이용하여 목적하는 유전자 결손 동물모델을 제작한다.

[0061] 상기 유전자 가위 기술은 원하는 DNA 서열을 인식하여 자르는 기술이므로 유전자의 기능을 없애는 녹아웃(knock out) 연구 수단으로 주로 사용된다.

[0062] 유전자의 기능을 연구하는 도구로서의 유전자 가위 기술은 DNA 염기서열에 변이를 도입하여 유전자 코드 (genetic code) 자체를 바꾸는 것으로 RNAi(RNA interference)를 이용해 RNA를 표적으로 하는 knock down과는 다르다. RNAi 기술에서 사용되는 miRNA, siRNA 또는 shRNA는 전사된 mRNA와 결합하여 분해하거나 번역을 저해함으로써 유전자 발현량을 감소시킨다. 반면, 유전자 가위 기술은 DNA 염기 서열에 직접적인 변이를 도입하여 녹아웃 시키는 기술로 녹다운(knock down)으로는 보기 어려웠던 부분까지도 확인할 수 있다. 그리고 RNAi 기술은 RNA가 전사되는 부분(Coding DNA Sequences;CDS)에 대해서만 적용이 가능하지만, 유전자 가위 기술은 표적 가능한 영역에 대한 제약이 적기 때문에 CDS 이외의 부분에 대한 연구에도 사용할 수 있다.

[0063] CRISPR-Cas 유전자 가위 기술은 인간이나 동식물 등 다양한 개체의 유전자에 변이를 도입할 수 있고, 이를 통해 유전자의 기능을 밝히는 연구 방법으로 사용되고 있다.

[0064] 상기 CRISPR/Cas 시스템은 특정 서열을 표적화하기 위해 맞춤형 단백질의 생성을 필요로 하지 않고, 오히려, 단일의 Cas 효소가 짧은 RNA 분자에 의해 프로그램화되어, 특정 DNA 표적을 인식할 수 있다. 게놈 시퀀싱 (sequencing) 기법 및 분석 방법의 레퍼토리에 CRISPR-Cas 시스템을 추가하면, 방법을 상당히 단순화시킬 수 있으며, 다양한 생물학적 기능 및 질병과 연관된 유전적 요인을 분류하고 발견하는 능력을 가속화시킬 수 있다.

[0065] 본 발명은 특히, 상기 Cas 단백질이 아닌, Cpf1 유전자가위를 사용하는 것을 특징으로 한다.

[0066] 상기 Cpf1 단백질은 Type CRISPR 시스템에 속하는 단백질로 tracrRNA가 없이 crRNA로만 작동한다는 특징을 갖고 있고, 비교적 짧은 crRNA 하나로 작동할 수 있기 때문에 RNA 제작에 있어서 더 용이한 측면이 있다.

[0067] 그리고 Cas9과 달리 5'-TTN-3'을 PAM으로 갖기 때문에, Cas9는 구아닌(guanine)과 시토신(cytosine)이 포함된 PAM을 필요로 하는 반면, Cpf1은 두 개의 티민(thymine)이 붙어 있는 PAM을 선호하여, 티민(T)이 많은 서열을 표적으로 유전자 가위를 제작할 수 있게 하여 유전자 가위의 선택의 폭을 넓혀 줄 수 있다.

[0068] 또한, Cpf1이 필요로 하는 RNA의 길이는 Cas9의 절반 밖에 안되기 때문에 유전자편집 복합체(gene-editing complex)의 합성작업을 용이하게 한다.

[0069] 또한, Cas9는 DNA 이중사슬을 단칼에 잘라 밋밋한 단면(blunt end)을 남기는 반면, Cpf1은 계단식으로 절단하므로 들쭉날쭉한 말단(jagged end)을 남기기 때문에 DNA 양끝에 이중나선의 한 가닥이 노출되고, 이 노출된 부분에는 이 DNA의 상보적 서열의 다른 DNA가 쉽게 결합될 수 있다.

[0070] 상기 Cpf1은 16개의 패밀리 단백질로 구성되어 있고, 바람직한 예로서, Acidaminococcus 및 Lachnospiraceae가 사용하는 두 가지 단백질이 인간 세포의 유전체를 효과적으로 편집한다. Cpf1 유전자는 아시다미노코커스 (Acidaminococcus sp.) 또는 라크노스피라세 박테리움(Lachnospiraceae bacterium) 유래의 Cpf1 이중상동성

(orthologues) 유전자를 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 *Acidaminococcus* sp. BV3L6 (AsCpf1) 및 *Lachnospiraceae* bacterium N D2006 (LbCpf1) 유래 Cpf1 오쏘로그(orthologues)를 이용하였다.

[0071] 본 발명은 CRISPR 시스템의 요소들 1개 이상을 사용하는 방법을 포함한다.

[0072] 본 발명의 CRISPR/Cpf1 복합체는 표적 폴리뉴클레오티드를 변형하기 위한 효과적인 수단을 제공한다. 본 발명의 CRISPR/Cpf1 복합체는 다수의 세포 유형들에 있어서 표적 폴리뉴클레오티드를 변형(예를 들어, 결실, 삽입, 전좌, 불활성화, 활성화)하는 것을 비롯하여 다 각도로 사용되고 있다. 일 양태에서, 세포는 진핵 세포다. 일 양태에서, 세포는 원핵세포다. 그러므로 본 발명의 CRISPR/Cpf1 복합체는, 예를 들어 유전자 또는 게놈 편집, 유전자 요법, 약물 발견, 약물 스크리닝, 질병 진단 및 예후를 비롯한 분야에서 광범위하게 사용되고 있다.

[0073] 본 발명의 면역부전 또는 면역결핍 동물모델, 예를 들어, *Prkdc* 유전자 결손 동물모델은 crRNA와 Cpf1 mRNA를 혼합하여 주입시키는, 예를 들어, 수정란의 세포질에 주입시키는 간단한 방법으로 제작될 수 있다.

[0074] 본 발명은 클래스 2의 단일 RNA-가이드 엔도뉴클라아제인 다양한 Cpf1 오쏘로그(orthologues)을 이용하여 특정 유전자를 녹아웃(knockout)시킨 마우스를 제조하는 방법에 있어서, 상기 특정 유전자는, 예를 들어, 마우스 *Prkdc*(protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide) 유전자 및/또는 마우스 형질전환 관련 단백질 53 (transformation related protein 53, Trp53) 유전자이고, 타겟 DNA 서열을 선별하여 녹아웃 마우스를 제조하는 방법을 제공한다.

[0075] [제조방법 예시]

[0076] 일 예로서, 본 발명의 *Prkdc* 유전자 결손 마우스의 제조방법은 다음과 같은 단계를 거쳐 실시될 수 있다.

[0077] (i) crRNAs 및 Cpf1 mRNAs의 생성

[0078] 본 발명에 사용되는 Cpf1은 당업계에 공지된 방법에 의해 제조될 수 있으며, 예를 들어 Addgene과 같은 기탁업체 또는 툴젠 등과 같은 유전자가위 공급업체에 의해 제작될 수 있다.

[0079] 본 발명에 사용되는 Cpf1은 마우스에 주입하기 위해 mRNA로 제조된다. 상기 Cpf1 mRNA는 Cpf1을 코딩하는 뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 선형화한 다음, 시험관내(in vitro) 전사 과정을 거쳐 제조될 수 있다.

[0080] 예를 들어, mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra kit (Ambion) 및 MEGAShortscript T7 kit (Ambion)를 각각 이용하여 in vitro 합성할 수 있다.

[0081] (ii) 마우스 배아 내로의 주입

[0082] 상기 crRNAs 및 Cpf1 mRNA는 당업계에 통상적으로 알려진 방법에 의해 마우스 배아 내로 주입될 수 있다.

[0083] 예를 들어, 미세주입법(microinjection), 전기천공법(electroporation), 리포좀-매개 전이방법(Wong, 등, 1980) 및 레트로바이러스-매개 전이방법(Chen, H.Y., et al., (1990), J. Reprod. Fert. 41:173-182; Kopchick, J.J. et al., (1991) Methods for the introduction of recombinant DNA into chicken embryos. In Transgenic Animals, ed. N.L. First & F.P. Haseltine, pp.275-293, Boston; Butterworth-Heinemann; Lee, M.-R. and Shuman, R. (1990) Proc. 4th World Congr. Genet. Appl. Livestock Prod. 16, 107-110)을 포함한다.

[0084] 구체적인 예로서, 주입을 위한 수정란은, 암컷 마우스(3~4 주령)를 5 IU 임신말 혈청성 성선 자극 호르몬(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG, Sigma)의 복강 내 (intra-peritoneal) 주입 및 48시간 간격으로 5 IU 인간 융모성 고나도트로핀 (human chorionic gonadotropin, hCG, Sigma) 주입에 의해 과배란을 유도한 후, 당일 수컷 마우스와 수정을 하도록 유도하고, 수정 후 6-14시간에 난관에서 1-세포기 수정란을 채취하여 얻을 수 있다.

[0085] 수정 후 미세주입기를 이용하여 마우스 1세포기 수정란의 세포질(Cytoplasm)에, 예를 들어, crRNA 100 ng/ml 및 Cpf1 mRNA 50 ng/ml를 전핵(pronuclear) 단계 배아의 세포질 내로 함께 주입할 수 있다.

[0086] (iii) 배아 이식

[0087] 상기 crRNAs 및 Cpf1 mRNA가 주입된 수정란은 37℃ 인큐베이터에서 2~24시간 배양되어 1-세포기 또는 2-세포기 상태로 대리모에 이식될 수 있다.

[0088] 상기 수정란은 당업계에 공지된 방법에 따라 배양될 수 있다.

- [0089] 적절한 배지는 동물 세포 및 특히, 포유동물 세포의 배양을 위해 개발되거나, 또는 동물 세포 성장에 필요한 적절한 성분, 예컨대 동화성 탄소, 질소 및/또는 미량 영양소와 함께 실험실 내에서 제조될 수 있는 임의의 이용 가능한 배지를 사용할 수 있다.
- [0090] 상기 배지는 동물 배아 성장에 적절한 임의의 기본 배지, 비제한적인 예로서, 일반적으로 배양에 이용되는 기본 배지로는 M2, M16, m-RECM, KSOM (Modification of medium SOM), HTF (Human Tubal Fluid), MEM(Minimal Essential Medium), DMEM(Dulbecco modified Eagle Medium), RPMI(Roswell Park Memorial Institute Medium), K-SFM(Keratinocyte Serum Free Medium)이 있으며, 이 외에도 당해 업계에서 이용되는 배지라면 제한없이 사용할 수 있다. 바람직하게는, M2 (SIGMA), M16 (SIGMA), m-RECM (COSMOBIO), KSOM (COSMOBIO), HTF (Irvine Scientific), -MEM 배지(GIBCO), K-SFM 배지, DMEM배지(Welgene), MCDB 131배지(Welgene), IMEM배지(GIBCO), DMEM/F12 배지, PCM 배지, M199/F12(mixture)(GIBCO), 및 MSC 확장배지(Chemicon)로 구성된 군에서 선택될 수 있다.
- [0091] 이러한 기본 배지에, 탄소, 질소 및 미량 영양소의 동화성 공급원, 비제한적인 예로서, 혈청 공급원, 성장 인자, 아미노산, 항생제, 비타민, 환원제, 및/또는 당 공급원이 첨가될 수 있다.
- [0092] 당업계에서 통상의 지식을 가진 자가 가장 적합한 배지를 선택 또는 조합하여 공지의 방법으로 적절히 배양할 수 있음은 자명할 것이다. 또한, 이 분야의 통상의 지식에 기초하여 적합한 배양 환경, 시간, 온도 등의 조건을 조절하면서 배양할 수 있음은 자명하다.
- [0093] 상기와 같은 본 발명 방법은 실험동물에게 있어 목적하는 유전자의 삽입-결실(Indels) 돌연변이를 유도한다.
- [0094] 예를 들어, Prkdc 유전자 결손을 유도함으로써, Prkdc 유전자의 결핍으로 유발되는 형질전환 면역 부전 마우스를 제공할 수 있게 한다.
- [0095] 본 발명의 일 구체예들에 의해 제작한 형질전환된 면역부전 녹아웃 마우스는, 제조방법에 대해서 기존의 방법 대비 쉽고 간단한 방법으로 배아에서 형질전환이 잘 될 뿐만 아니라, 유전형 및 표현형 또한 기존 마우스 모델과 상이하다. 일 실시예에서 서열번호 113 내지 160의 변이 DNA 서열중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0096] 한편, 본 발명의 방법은 단계 (iii)에서 생산된 마우스에서 돌연변이 발생을 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 확인은 게놈타이핑(genotyping), 서열분석 등에 의해 이뤄질 수 있으나, 그 외 당업계에 알려진 방법들로도 확인될 수 있다.
- [0097] 유전자 가위(engineered nuclease)에 의한 돌연변이는 불일치-민감성 T7 엔도뉴클레아제 I (T7E1) 또는 Surveyor 뉴클레아제 어레이, RFLP, 형광 PCR 산물의 모세관 전기영동, 디데옥시 시퀀싱(Dideoxy sequencing) 및 딥 시퀀싱(deep sequencing)을 포함한 다양한 방법에 의해 탐지될 수 있다.
- [0098] 또한, 본 발명의 방법은 Cpf1 유전자가위의 오프-타겟(오작동, Off target)의 예측, 확인 및 제어 단계를 더 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0099] CRISPR-Cpf1 유전자 가위에서 crRNA와 Cpf1 mRNA는 표적 DNA와 상보적으로 결합하여 자르는 위치를 지정한다. 이때, 표적 DNA와 유사한 염기서열을 갖는 다른 위치도 자르는 오프-타겟(off-target)이 일어날 수 있고, 이를 줄이는 것이 중요하다. 표적 DNA와 유사한 서열이 실제로 CRISPR-Cpf1 유전자 가위에 의해 잘리는지 확인하는 것 또한 중요하다. In vitro 또는 in vivo에서 유전자 가위가 작동했을 때 잘린 부분을 확인하는 방법을 이용하여, 예를 들어, 잠재적인 오프-타겟 위치를 Cas-OFFinder를 이용하여 선별하여, CRISPR-Cpf1 유전자 가위의 안전성을 확인할 수 있다.
- [0100] 다양한 질환을 치료하는 목적으로 CRISPR-Cpf1 유전자 가위 기술을 사용할 때, 제작한 유전자 가위가 오프-타겟을 일으킬 수 있는지를 확인함으로써 안전성이 더욱 보장된 치료 방법으로 응용 가능할 수 있다.
- [0101] **[녹아웃 동물모델의 용도]**
- [0102] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 방법으로 제작한 면역부전 또는 면역결핍 동물모델의 이용방법에 관한 것이다. 구체예로서, Prkdc 유전자 결손 동물모델의 이용방법에 관한 것이다.
- [0103] 일반적으로, 녹아웃 동물모델은 유전자 또는 억제된 유전자에 따라서 다양한 용도를 가진다. 예를 들어, 유전자 또는 억제된 유전자가 면역억제 또는 염증을 수반하는 것으로 간주되는 단백질을 인코딩하는 경우, 포유류는 면역조절에 유용한 약물, 즉, 이들 활성도를 증진하거나 또는 저해하는 약물에 대하여 스크리닝하는 데에 이용될

수 있다.

- [0104] 본 발명의 전체적인 Prkdc 유전자 결손 마우스는 B세포와 T세포의 발달 억제에 따른 전체적인 면역 기능의 저하로 인한 다양한 질환의 치료를 위한 잠재적인 약물을 스크리닝하는 데에 이용될 수 있다. 유용한 약물에 대한 스크리닝은 마우스에게 용량 범위에 걸쳐 후보약물을 투여하는 단계, 및 평가되는 질환에서 약물의 효과(들)에 대해 다양한 시점에서 분석시험하는 단계를 포함한다.
- [0105] 추가적으로, 본 발명의 Cpf1 유전자가위를 이용한 유전자 결손 동물모델은 특정한 유전자, 예를 들어 Prkdc 유전자 돌연변이의 효과를 연구하는 데에 유용할 수 있다. 본 발명의 Prkdc 녹아웃 마우스 및 이의 자손의 구체에는 발현될 수 있는 추가적인 전이유전자 및/또는 그들이 함유할 수도 있는 녹아웃 구조체에 따라서 또한 다양한 용도를 가질 것이다.
- [0106] 유용한 약물에 대한 스크리닝은 포유류에서 질병을 먼저 유도하는 단계, 또는 질병의 모델을 유도하는 단계, 및 이후 포유류에게 용량 범위에 걸쳐 후보 약물을 투여하는 단계, 그리고 평가되는 질병 또는 질환에서 약물의 효과(들)에 대해 다양한 시점에서 분석시험하는 단계를 포함한다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 약물은 질병 또는 질병 모델의 유도에 노출시키기 앞서 또는 상기 노출과 동시에 투여될 수 있다. 기타 구체예에서, 발명적 전체적인 Prkdc 녹아웃 마우스는 예를 들어 온-타겟/ 오프-타겟 효과를 구별하기 위한 약물 연구 및 개발을 위해 추가로 유용하다.
- [0107] 질병 또는 질환을 치료하는 데에 있어 이용하기 위한 약물을 스크리닝하는 것과 더불어, 본 발명의 동물모델은 질병 또는 질환을 예방하거나 또는 치유하는 것을 목표로 한 치료 섭생(therapeutic regimen)을 설계하는 것에 있어 유용할 수 있다.
- [0108] 예를 들어, 포유류는 질병 또는 질환의 개시에 앞서, 또는 개시와 동시에, 또는 개시 후에 특정한 식이요법, 정기적인 운동, 방사선 치료, 및/또는 하나 이상의 화합물 또는 물질의 조합으로 치료될 수 있다. 이러한 전반적인 치료 또는 섭생이 질병 또는 질환과 싸우는 데에 있어 화합물 단독으로 치료하는 것보다 더욱 효과적일 수 있다. 추가적으로, 혈액 압력, 체온, 체중, 맥박, 행동, 털가죽의 외형 (주름진(ruffled) 털)등과 같은 기준이 평가될 수 있다.
- [0109] 본 발명의 전체적인 Prkdc 녹아웃 마우스는 하나 이상의 세포주를 발생시키는 데에 또한 이용될 수 있다. 이러한 세포주는 예를 들어, 특정한 조직 또는 기관 상에서 녹아웃의 효과(들)를 평가하는 것, 및 조직내 Prkdc의 활성화 수준에 영향을 줄 수 있는 화합물을 스크리닝하는 것에 관해 많은 용도를 가진다. 이러한 화합물은 치료제로서 이용될 수 있다.
- [0110] 이러한 세포주의 생성은 통상의 기술자에게 공지된, 다양한 방법을 이용하여 성취될 수 있다. 실제 배양 조건은 배양될 조직 및 세포 유형에 의존할 것이다. 상이한 농도의 대량 및 미량 영양소, 성장 인자, 혈청 등을 함유한 다양한 배지는 과도한 실험 없이 세포 상에서 검사되어 세포의 성장 및 증식을 위한 최적 조건을 결정할 수 있다. 유사하게도, 기타 배양 조건, 가령 세포 밀도, 배지 온도, 및 인큐베이터내 이산화탄소 농도가 또한 쉽게 평가되고 최적화될 수 있고, 그리고 이 과정에 영향을 주는 화합물을 식별할 수 있다.
- [0111] 평가 대상이 되는 약제는 어떠한 투여 경로의 약제도 스크리닝할 수 있으며 특별히 제한되지 않는다. 비경구적 및 경구적으로 투여되는 약제도 스크리닝할 수 있다. 약제의 투여량은 약제의 성질, 투여 대상의 종류, 연령이나 체중 등의 조건을 기초로 종합적으로 판단하여, 최적의 양을 적절하게 결정해야 하며 특별히 한정되지 않는다. 투여 시기나 투여 회수 등의 투여 조건은 약제의 성질, 시험 및 평가 목적 등에 따라 적절하게 최적이 되도록 설정하면 되며 특별히 제한되지 않는다.
- [0112] 또한, 이러한 방법을 이용하여 약제 효과를 수치화하여 정량적으로 파악할 수 있다. 통상 피험 약제 투여 종료 후에 뇌경색 부위의 부피를 측정하고 비교하는 방법을 이용하여 약제 효과를 정량화할 수 있다.
- [0113] 이처럼, 본 발명은 Cpf1 유전자가위를 이용한 Prkdc 유전자 결손 동물모델 제조방법 및 이에 의해 생산한 형질 전환 면역부전(면역결핍) 동물모델과 이의 이용에 관한 다양한 이용을 모두 포함한다.
- [0114] 면역부전질환은 면역부전증후군(immuno deficiency syndrome)일 수 있고, 상기 면역부전증후군은 디 조지 증후군(Di George's syndrome), 무감마글로불린혈증, 중증복합면역부전증, 스위스형 저감마 글로불린혈증, 혈관확장성 운동실조증, 만성림프구백혈병, 다발성골수종, 호지킨병, 영양실조증을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0115] [실시예]

[0116] 실시예

[0117] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0118] 실험 준비

[0119] 1. crRNAs 및 Cpf1 mRNAs의 생성

[0120] 마우스 게놈 DNA 서열을 분석하고 타겟 서열을 웹 툴, Benchling (<https://benchling.com/>)를 이용하여 선별하였다. crRNA의 in vitro 전사를 위한 주형을 다음 표에 기재한 올리고머를 이용하여 준비하였다. (Zetsche et al. 2015).

[0121] [표 1]

Primers	Sequence (5' to 3')
T7 top strand primer	GAAATTAATACGACTCACTATAGGG (서열번호 1)
Anti-T7-AsTrp53_1	GCATCTTATCCGGGTGGAAGATCTACAAGAGTAGAAATTACCTATAGTGAGTC GTATTAATTTC (서열번호 2)
Anti-T7-LbTrp53_1	GCATCTTATCCGGGTGGAAGATCTACACTTAGTAGAAATTACCTATAGTGAGTC GTATTAATTTC (서열번호 3)
Anti-T7-AsTrp53_2	AGGTACCACCACGCTGTGGCATCTACAAGAGTAGAAATTACCTATAGTGAGTC GTATTAATTTC (서열번호 4)
Anti-T7-LbTrp53_2	AGGTACCACCACGCTGTGGCATCTACACTTAGTAGAAATTACCTATAGTGAGT CGTATTAATTTC (서열번호 5)
Anti-T7-AsPrkdc_1	TGATTGTAGAGAAGAAGCCCATCTACAAGAGTAGAAATTACCTATAGTGAGTC GTATTAATTTC (서열번호 6)
Anti-T7-LbPrkdc_1	TGATTGTAGAGAAGAAGCCCATCTACACTTAGTAGAAATTACCTATAGTGAGT CGTATTAATTTC (서열번호 7)
Anti-T7-AsPrkdc_2	TTCTGGTCAATTTTCTCTAAATCTACAAGAGTAGAAATTACCTATAGTGAGTCG TATTAATTTC (서열번호 8)
Anti-T7-LbPrkdc_2	TTCTGGTCAATTTTCTCTAAATCTACACTTAGTAGAAATTACCTATAGTGAGTC GTATTAATTTC (서열번호 9)

[0122]

[0123] pcDNA3.1-hLbCpf1 (for LbCpf1 mRNA; addgene #69988) 및 pcDNA3.1-hAsCpf1 (for AsCpf1 mRNA; addgene #69982)을 Addgene (<http://www.addgene.org/>)으로부터 수득하고, EcoRI (NewEngland Biolabs)를 이용하여 선형화하였다.

- [0124] Cpf1 mRNAs 및 crRNAs를 mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra kit (Ambion) 및 MEGAshortscript T7 kit (Ambion)를 각각 이용하여 in vitro 합성하였다(Sung et al. 2014).
- [0125] **2. 마우스 배아의 마이크로주입(Microinjection)**
- [0126] 모든 동물 실험은 한국 식품 의약품 안전처(MFDS, Ministry of Food and Drug Safety) 가이드라인에 따라 수행하였다.
- [0127] 서울아산병원 아산생명과학연구원(Asan Institute for Life Sciences, Asan Medical Center) IACUC (Institutional Animal Care and Use Committees)이 프로토콜을 검토하고 승인하였다(Permit Number: 2015-03-092). 모든 마우스를 서울아산병원 질환중심동물자원센터의 무특이 병원체 시설(specific pathogen-free facility)에서 유지시켰다.
- [0128] 돌연변이 마우스 생성을 위해, C57BL/6J (B6) 및 NOD/ShiLtJ (NOD) 마우스를 배아 공여자로서 Jackson laboratory로부터 구입하고, 대리모(foster mother)로서 OrientBio로부터 ICR 마우스를 구입하였다.
- [0129] 암컷 마우스(3~4 주령)를 5 IU 임신말 혈청성 성선 자극 호르몬 (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG, Sigma)의 복강 내 (intra-peritoneal) 주입 및 48시간 간격으로 5 IU 인간 융모성 고나도트로핀 (human chorionic gonadotropin, hCG, Sigma) 주입에 의해 과배란시켰다. 상기 과배란된 암컷 마우스를 B6 및 NOD stud 수컷들과 교배시키고 수정된 배아를 난관으로부터 수집하였다.
- [0130] 정상적으로, 각 crRNA 100 ng/ml 및 Cpf1 mRNA 50 ng/ml를 전핵(pronuclear) 단계 배아의 세포질 내로 함께 주입하였다. 수정란의 마이크로주입 및 가임신(pseudopregnant) 대리모의 난관 내로 트랜스퍼를 실행하였다(Sung et al. 2013).
- [0131] Trp53 및 Prkdc 유전자를 4 crRNAs (2 crRNAs/gene)를 이용하여 동시에 타겟팅함에 있어서, 각 crRNA의 농도만이 50 ng/ml까지 감소하였다.
- [0132] **3. 게놈타이핑(Genotyping) 및 서열 분석**
- [0133] 타겟팅된 Trp53 또는 Prkdc 대립형질로 F₀ 마우스를 스크리닝하기 위해, 게놈 DNA 샘플을 꼬리 생검으로부터 준비하였다. PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)-기반 게놈타이핑 분석을 수행하였다 (Sci Rep, 2014).
- [0134] 간단히 말하면, Cpf1-crRNA 타겟 부위를 둘러싼 게놈 영역을 PCR-증폭하고, 용해하고(melted), 다시 어닐링하여, PAGE에 의해 분해되는 헤테로듀플렉스 DNA를 형성하였다.
- [0135] Trp53 유전자에 대하여, 일차 PCR 반응을 올리고머 5'-cgccatggccatctacaaga-3' (서열번호 10) 및 5'-tcagcgtctctattttccgc-3' (서열번호 11)를 이용하여 수행하고, 이어서 nested PCR 반응을 5'-tcagcgtctctattttccgc-3' (서열번호 12) 및 5'-gaggcaaacgggttgctaga-3' (서열번호 13)를 이용하여 수행하여, 야생형 마우스에서 486-bp 및 235-bp DNA 프래그먼트를 증폭시켰다.
- [0136] Prkdc 유전자에 대해서, 다음의 프라이머들을 사용하여 일차 및 연속적인 nested PCR 반응을 수행하였다: 5'-ccggaagtcgcttagcattga-3' (서열번호 14) 및 5'-tgaagttggcagaagtgagttt-3' (서열번호 15) (409 bp) 그리고 5'-ttctatcttctctttgttgaggt-3' (서열번호 16) 및 5'-gaggcaaacgggttgctaga-3' (서열번호 17) (199 bp).
- [0137] 시퀀싱을 위해, 돌연변이 마우스의 PCR 산물들을 T-Blunt PCR Cloning Kit (SolGent Co., Ltd. Korea)를 이용하여 클로닝하고, 돌연변이들을 10~15 콜로니/파운더의 Sanger 시퀀싱 분석법으로 확인하였다(Macrogen, Inc., Seoul, Korea).
- [0138] 선택적으로, Trp53 유전자의 타겟 영역을 5'-gctccgatgggtgatggtaag-3' (서열번호 18) 및 5'-tagcactcaggagggtgagg-3' (서열번호 19)을 이용하여 PCR-증폭시키고, 아산 생명과학센터의 게놈 코어 실험실에서 상기 PCR 산물들을 이러한 PCR 프라이머들을 이용하여 양 방향에서 직접적으로 시퀀싱하였다.
- [0139] **4. 웨스턴 블랏 분석**
- [0140] X-Rad 320 irradiator (Precision XRay, CT, USA)를 이용하여 10 Gy X-ray을 마우스에 조사하였다. X선 조사 후 3시간 쯤, 비장, 흉선 및 간 조직을 회수하였다.
- [0141] 조직들의 용해물을 준비하고, Trp53 (FL-393) 및 b-actin (C4) (Santa Cruz, CA)에 특이적인 항체들을 이용하여 면역블랏 분석을 수행하였다.

5. 오프-타겟(Off-target) 분석 및 타겟화된 딥 시퀀싱(targeted deep sequencing)

[0143]

잠재적인 오프-타겟 위치를 Cas-OFFinder (<http://www.rgenome.net/casoffinder>)를 이용하여 선별하였다. 온-타겟(on-target) 및 잠재적 오프-타겟(off-target) 위치를 PCR에 의해 증폭시키고 라이브러리 구축을 위해 사용하였다.

[0144]

오프 타겟 분석을 위한 PCR에 사용된 프라이머들은 다음과 같다:

[0145]

[丑 2]

Target	Off-target No.	1st F	1st R	bp	2nd F	2nd R	bp
Prkdc #1	On-target	GAGATGCTGTGGGG AGGG	TGGCTTTATAGGTTG CTCTGAA	764	CCGCAATGGCAATTC CT	AGCAATGAGGCGAAA TGAAT	393
	OFF-1	GTGATGCTGTGGGG GAGAG	GTGATGCTGTGGGG TACCA	729	AGCAATGAGGCGAAA GCA	AGCAATGAGGCGAAA GGG	394
	OFF-2	GGTATGCTGTGGGG CTCAGTTG	GGTATGCTGTGGGG TGTGGCA	700	TGGTACTGTGTGGGG GGAG	GGTATGCTGTGGGG TGC	445
	OFF-3	TGGTACTGTGTGGG GATTCA	AGCAATGAGGCGAAA ACCA	781	TGGTACTGTGTGGG GG	AGCAATGAGGCGAAA AGGCA	38
	OFF-4	AGCAATGAGGCGAAA CGACA	CGCAATGAGGCGAAA CAGA	696	CGCAATGAGGCGAAA GC	CGCAATGAGGCGAAA GAA	37
	OFF-5	AGCAATGAGGCGAAA TGTAA	TGTGTGTGTGTGTGT ATGG	650	AGCAATGAGGCGAAA CA	CTGTGTGTGTGTGTGT AGA	336
	OFF-6	CTGTGTGTGTGTGT CTGGG	TACTGTGTGTGTGTGT CTGG	612	AGCAATGAGGCGAAA CG	TGTGTGTGTGTGTGT TACGGT	397
	OFF-7	AGCAATGAGGCGAAA CTGTT	TGTGTGTGTGTGTGT GTGT	730	GTGTGTGTGTGTGTGT TACCA	GTGTGTGTGTGTGTGT GGG	364
	OFF-8	TGTGTGTGTGTGTGT TGTAA	TGTGTGTGTGTGTGT CTGAGA	709	GTGTGTGTGTGTGTGT GGG	GTGTGTGTGTGTGTGT GAG	450
	OFF-9	GTGTGTGTGTGTGT TGTAA	GTGTGTGTGTGTGTGT AGGCTT	678	AGCAATGAGGCGAAA CA	GTGTGTGTGTGTGTGT TGA	397
Prkdc #2	OFF-10	AGCAATGAGGCGAAA TGTGT	GTGTGTGTGTGTGTGT CTGTGG	787	GTGTGTGTGTGTGTGT GTGA	GTGTGTGTGTGTGTGT GGG	367
	ON-target	TGTGTGTGTGTGTGT TGTAGGG	TGTGTGTGTGTGTGTGT CTGTGAA	697	GTGTGTGTGTGTGTGT GG	GTGTGTGTGTGTGTGT TGG	364
	OFF-1	GTGTGTGTGTGTGTGT GTGA	GTGTGTGTGTGTGTGT AGGCTT	409	GTGTGTGTGTGTGTGT AG	GTGTGTGTGTGTGTGT GGCT	422
	OFF-2	GTGTGTGTGTGTGTGT ATGGA	GTGTGTGTGTGTGTGT AGGA	440	GTGTGTGTGTGTGTGT GC	GTGTGTGTGTGTGTGT TAT	441
	OFF-3	GTGTGTGTGTGTGTGT CAGCT	GTGTGTGTGTGTGTGT CAG	672	GTGTGTGTGTGTGTGT AG	GTGTGTGTGTGTGTGT TGTGA	434
	OFF-4	GTGTGTGTGTGTGTGT AGAGG	TGTGTGTGTGTGTGTGT GGG	690	GTGTGTGTGTGTGTGT AT	GTGTGTGTGTGTGTGT TTC	445
	OFF-5	GTGTGTGTGTGTGTGT AGGTT	GTGTGTGTGTGTGTGT CTGTGA	692	GTGTGTGTGTGTGTGT GGGA	GTGTGTGTGTGTGTGT ACA	394
	OFF-6	GTGTGTGTGTGTGTGT TGTGTAG	GTGTGTGTGTGTGTGT CTGTGG	696	GTGTGTGTGTGTGTGT AGGA	GTGTGTGTGTGTGTGT GGGG	396
	OFF-7	TGTGTGTGTGTGTGTGT GTATGGA	TGTGTGTGTGTGTGTGT TATGGA	699	TGTGTGTGTGTGTGTGT GGCTT	GTGTGTGTGTGTGTGT TTC	395
	OFF-8	GTGTGTGTGTGTGTGT CAAGA	TGTGTGTGTGTGTGTGT CTGTGG	680	GTGTGTGTGTGTGTGT AA	GTGTGTGTGTGTGTGT TGTGT	445
	OFF-9	GTGTGTGTGTGTGTGT TACATGG	GTGTGTGTGTGTGTGT GTGG	695	GTGTGTGTGTGTGTGT TTACA	GTGTGTGTGTGTGTGT AAG	400
Prkdc #2	OFF-10	TGTGTGTGTGTGTGTGT AGGA	GTGTGTGTGTGTGTGT CA	659	GTGTGTGTGTGTGTGT TTTGG	GTGTGTGTGTGTGTGT AGT	29
	OFF-11	GTGTGTGTGTGTGTGT CTGAA	TGTGTGTGTGTGTGTGT ACTGTT	682	GTGTGTGTGTGTGTGT CT	GTGTGTGTGTGTGTGT TTTGG	420
	OFF-12	TGTGTGTGTGTGTGTGT CAGTT	GTGTGTGTGTGTGTGT AGAGG	660	GTGTGTGTGTGTGTGT AA	GTGTGTGTGTGTGTGT CGAGT	377
	OFF-13	GTGTGTGTGTGTGTGT ATACAGT	TGTGTGTGTGTGTGTGT GTTT	671	GTGTGTGTGTGTGTGT AG	GTGTGTGTGTGTGTGT GCT	329
	OFF-14	TGTGTGTGTGTGTGTGT AGAGG	TGTGTGTGTGTGTGTGT CTGA	678	TGTGTGTGTGTGTGTGT TG	TGTGTGTGTGTGTGTGT GTC	367
	OFF-15	TGTGTGTGTGTGTGTGT TGTGTGG	GTGTGTGTGTGTGTGT AGGTT	672	GTGTGTGTGTGTGTGT TTGGA	GTGTGTGTGTGTGTGT TAGT	442
	OFF-16	GTGTGTGTGTGTGTGT ATATGAG	GTGTGTGTGTGTGTGT CTGG	680	GTGTGTGTGTGTGTGT GGGTT	GTGTGTGTGTGTGTGT TGA	419
	OFF-17	GTGTGTGTGTGTGTGT AGCAGG	TGTGTGTGTGTGTGTGT AGGC	681	GTGTGTGTGTGTGTGT AGG	TGTGTGTGTGTGTGTGT GGTT	300
	OFF-18	TGTGTGTGTGTGTGTGT CTGGA	GTGTGTGTGTGTGTGT CAATAGT	672	TGTGTGTGTGTGTGTGT GA	GTGTGTGTGTGTGTGT GCA	392
	OFF-19	TGTGTGTGTGTGTGTGT AGGGG	TGTGTGTGTGTGTGTGT CACA	620	GTGTGTGTGTGTGTGT ATGT	GTGTGTGTGTGTGTGT CAG	415
	OFF-20	TGTGTGTGTGTGTGTGT AGAGG	GTGTGTGTGTGTGTGT GCAI	700	GTGTGTGTGTGTGTGT TG	GTGTGTGTGTGTGTGT CAE	398
	OFF-21	TGTGTGTGTGTGTGTGT ATGTT	GTGTGTGTGTGTGTGTGT GGGA	646	GTGTGTGTGTGTGTGTGT TGTG	GTGTGTGTGTGTGTGTGT GGGT	439

Target	OFF-target No.	1st F	1st R	bp	2nd F	2nd R	bp
Trp53 #1	On-target	TAGTTCCGCACTTGG ACACC	GGGCCCACACTTGGT TAG	692	CCATGGCATCTACAGA AGTC	GGTTAGCTAGACTCAG GAG	386
	OFF-1	AGTGAAGGCGCTCA GTGTT	GTGAGATCAGGGCAG GGAC	714	ACTCTCGTCCCTCAAT AGC	GATAGGTGGGCGTTTA TGC	377
	OFF-2	GCTAGACAAATAGG CAGCA	TTCCTGAAAGTGAAG TCAGACT	671	GGAAACATGAGCTCACT CTGT	CGTTATTGGAGGCTGT TTT	388
	OFF-3	GCTTCCTTGTITTC AAGCA	TGCTGGCCAGTTTG TTTT	698	GTTCATCTCTCTCTAC CC	GTCCTCTTAACTGT GAC	355
	OFF-4	CTGGGGAAGCAGGG AAGCA	CAGAAGAGAAAGCTG AGCAG	700	AGGAAGAGGGTGGAAAG TG	TATGGCTGACTCTCTG GAG	388
	OFF-5	TCCATGAAGAGAGG AGGGTC	CCCTAGTCAAGTCTAT TAGCACA	698	GATGAAGCTGATCTTAC TGGCT	ACATTGAAGAGCTGGT TGGC	379
	OFF-6	TAAAGGTGGGGGAG AATA	TATTTGGGTACAGGC TGA	679	CCCTTCCCGTGTCTACA GT	ACAGAGAGAAAAAAT GGTC	393
	OFF-7	AGAGAGCAATCCAA CAGGC	CGACCCCTAGTTGAGT TTCC	661	ACTCTTACGTGACAGGT AG	CCAAACCTCTGAACCA CCT	381
	OFF-8	GGCCAGAGAGAGGT TAAGTGT	CCCTAGGGCATCTTAG ACACT	700	AGCAGCTCACAAGTGT CT	GGAGACATCTGTAAC TAAGCA	386
	OFF-9	AACCAAGCCAGGC AAGCA	GATGGCTTCCITCAGC CAGA	661	TCTAAGCAGAGGGGGC AC	TGTTTGGTCTTATGT GTGC	378
	OFF-10	ATGCAAGGCGCTGTA TTTGG	AGGCTCTGTGATGAG CATTC	698	GCAGGCATCCATCGAAA A	GTTGGCGATCTGTTTC CTA	400
Trp53 #2	On-target	AGCTCGGTCTCTCT CCCTT	GTGCTCGCTAAGTCA CTAC	776	TGCTCGATGGTATGTT AA	CTGTAAAGTAGACCT GGGC	364
	OFF-1	CCCGCTCATCTTTTG TCCCT	AGCTCCGGAACATCT CAAA	786	GTGTGAGTCAGGCGCAC C	GGCACAACAGAACT CAA	397
	OFF-2	TCTGTGCTCAAGTG CTTCA	GCTTGGCATAGAGTG GATGG	665	GAGATGAGGGGAGGGAG CC	TGATAGCAGAGAGAG GGG	383
	OFF-3	GTCTTGAAGTCTCA GGCCCT	AGCAGTTCCAGTACT GTCAA	725	TCTCTGTGTAAGTCTGG CT	ATGCAAGCTCTCTTAG CCA	378
	OFF-4	AGCCAGAGGATAGG AGAGG	TGACACAATTCTCTG TTTCACT	690	ACAGGAAGTGGAGGCTA CC	GGTGAATTGATTGCTG CCA	444
	OFF-5	AGGCTGAGTTCAAG TGATT	GGGCACTACTAGTTC CTCA	691	CTCTGTCTCTCTCTCC CA	GACTGGGCTTCAATCG TGA	417
	OFF-6	CTCTCATATTCCGCT GTCCG	AGTCAGGGTGGAGAA GTGC	651	CGAATCCACAGATTCA C	TTGATGGCTGGAGTGT ACT	383
	OFF-7	CAGATTCAACGCAAT CTCCCA	TGTCAGGTTCATACA TTTGGT	627	GCATCTCCCATCAAAAT CCCA	GGCTTTATGCTGGGTC TTCA	414
	OFF-8	ACCAAGTAGAAGGC AGCACA	CCCTGCAATTTGAA GAATG	696	GGCAGCATTGTCCCTATT GT	GCACATGACACTCCAT TCA	419
	OFF-9	AGCTCAAGCTCTGTC ACCTGT	TGTGAGAACCAACT CGGG	688	CTCATCTTGAATCTCCCA CCA	CATGACAGGTTCCAG TGG	394
	OFF-10	GCCCTCCAGGAAA GTC	TGGCTCTGGTGGAAA GC	700	GTCTCTGCTGATGTTTG ACC	CGTCACTCATTGAGTC AAGG	400

[0147]

[0148]

동일 양의 PCR 앰플리콘을 혼합하여 (주)마크로젠(한국)에서 Illumina Miseq를 이용하여 페어드-엔드 리스 시퀀싱(paired-end read sequencing)을 실시하였다. Cpf1 분할 위치(cleavage site) 주변에 위치한 삽입-결실 변이(Indels)를 Cpf-유도된 돌연변이 유발로 간주하였다.

[0149]

실시예 1 : 돌연변이 비율 확인

[0150]

마우스 중 Acidaminococcus sp. BV3L6 (AsCpf1) 및 Lachnospiraceae bacterium N D2006 (LbCpf1) 유래 Cpf1 이종상동성(orthologues) 유전자 타겟팅 잠재능을 알아보기 위해, 마우스 형질전환 관련 단백질53 (transformation related protein 53, Trp53)의 엑손 7 상에서 2개의 타겟 DNA 서열을 선별하였다 (도 1a, 타겟 #1 서열번호 20; 타겟 #2 서열번호 21로 명명함).

[0151]

각 Cpf1 mRNA 및 동족(cognate) crRNA를 C57BL/6J 마우스 유래 전핵(pronuclear) 단계 마우스 배아의 세포질에 마이크로주입(미세주입)하였고, 이러한 배아들을 대리모(foster mother)의 난관 내로 옮겼다. 배아 이동 후 12~14 일 발달시킨 배아로부터 게놈 DNA 샘플을 이용하여 상기 돌연변이 비율을 조사하였다.

[0152]

마이크로주입 후 AsCpf1 및 LbCpf1는 즉시 독성을 나타내지는 않았지만, 회복된 배아 퍼센테이지는 타겟 #2에서 보다 타겟 #1에서 가변적이었다 (표 3).

[0153] [표 3]

<i>Trp53</i> -targeting crRNAs	<i>Cpf1</i> mRNA	Injected zygotes	Survived /transferred (%)*	E12.5~E14.5 embryos (%) [†]	Newborns (%) [†]	Mutants (%) ^{††}
#1	<i>AsCpf1</i>	55	55 (100)	16 (20.1)	-	12 (75.0)
	<i>LbCpf1</i>	56	56 (100)	13 (23.2)	-	1 (7.7)
#2	<i>AsCpf1</i>	59	59 (100)	7 (11.9)	-	3 (42.9)
	<i>LbCpf1</i>	62	62 (100)	23 (37.1)	-	11 (47.8)
#1 + #2	<i>AsCpf1</i>	60	59 (98.3)	-	24 (40.7)	19 (79.2)
	<i>LbCpf1</i>	63	63 (100)	-	18 (28.6)	13 (72.2)

Percentages were calculated using the number in each column as the numerator and *the number of injected eggs, [†]transferred embryos, or ^{††}newborns as the denominator.

[0154]

[0155] PAGE-기반 계놈타이핑 접근법이 변이 배아의 스크리닝에 유용하고(Zhu et al. 2014), *Cpf1* 및 이들 동족(cognate) crRNAs가 마우스 배아에서 돌연변이를 유도할 수 있음을 밝혔다(도 2 및 도 3).

[0156] 가장 높은 돌연변이율(75%)이 타겟 1에 대해 *AsCpf1* mRNA 및 crRNA로 마이크로주입된 배아에서 관찰되었다. *LbCpf1* 또한 target #2에 대하여 crRNA로 높은 수준의 변이를 유도하였다(47.8%; 표 3).

[0157] 이러한 결과들은 마우스 배아에서 두 *Cpf1* 이종상동성 유전자에 의해 유도되는 돌연변이 비율은 변이형 마우스를 생산하기에 충분히 높음을 보여주었다.

[0158] 실시예 2 : 유전자 녹아웃 마우스 생산

[0159] *Trp53* 유전자 녹아웃 마우스를 생산하기 위해, 타겟 #1 및 #2에 대한 두 crRNA를 동시에 수정관 내로 동종 *Cpf1* mRNA와 함께 마이크로 주입하고, 살아있는 마우스를 생산하였다.

[0160] 배아에서의 결과와 유사하게, 두 *Cpf1* 이종상동성 유전자는 급성 독성을 나타내지 않았지만, *AsCpf1* (40.7%)는 *LbCpf1* (28.6%, 표 3)보다 더 높은 출생률(birth rate)을 보였다.

[0161] 유전자 가위(engineered nuclease) mRNAs의 마이크로-주입을 위해 상대적으로 민감한 C57BL/6J 마우스로부터 수정란을 획득하였기 때문에(Panda et al. 2013), 이러한 출생률은 C57BL/6J 마우스에서 유전자 타겟용으로 적합함을 시사한다.

[0162] *AsCpf1* mRNA의 마이크로-주입으로부터 59 마리의 신생 마우스 중 24 돌연변이 마우스 (79.2%)를 획득하였다(도 4 및 표 3). 유사하게, *LbCpf1* mRNA-주입된 배아들로부터의 72.2% 산생 마우스는 돌연 변이 파운더(mutant founder)로 확인되었다(18 돌연변이/63 산생 마우스; 도 1b, 도 6a 및 표 3)

[0163] 본 발명자들은 또한 NOD/ShiLtJ 마우스에서 *Prkdc*(protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide) 유전자를 타겟팅하였다(도 7 및 표 4). *Prkdc* 유전자의 두 타겟서열을 각각 서열번호 22 및 서열번호 23로 명명하였다(도 7A).

[표 4]

<i>Prkdc</i> -targeting crRNAs	<i>Cpf1</i> mRNA	Injected zygotes	Survived /transferred (%)*	Newborns (%) [†]	Mutants (%) ^{††}
#1 + #2	<i>AsCpf1</i>	56	56 (100)	11 (19.6)	2 (18.2)
	<i>LbCpf1</i>	46	45 (97.8)	33 (73.3)	24 (72.7)

Percentages were calculated using the number in each column as the numerator and *the number of injected eggs, [†]transferred embryos, or ^{††}newborns as the denominator.

LbCpf1 mRNA를 사용할 때, 출생률이 73.3%까지 도달하였고 (45 마이크로주입된 배아들 중에서 33 산생 마우스), 돌연변이율은 Trp53 유전자 타겟팅에서 관찰되는 것과 비슷하였다 (도 7d 및 표 4).

그러나, AsCpf1 mRNA를 적용하였을 때, 출생률 및 돌연변이율 모두는 LbCpf1 mRNA로 *Prkdc* 유전자 타겟팅에서 관찰되는 것보다 상당히 낮았다(도 7b 및 표 4).

높은 돌연변이율에 기반하여, 본 발명자들은 LbCpf1 mRNA를 이용하여 Trp53 및 *Prkdc* 유전자를 동시에 타겟팅하였다.

비록 각 crRNAs의 감소된 양 때문에 각 유전자들의 돌연변이율도 감소하지만, 42.9 %의 배아들은 두 유전자에서 돌연변이를 보유하고 있었다 (35 산생 배아 중 15; 도 9 및 표 5).

[표 5]

crRNAs	Injected zygotes	Survived /transferred (%)*	E12.5~E14.5 embryos (%) [†]	Mutants (%) ^{††}		
				<i>Trp53</i>	<i>Prkdc</i>	<i>Trp53; Prkdc</i>
crRNAs targeting <i>Trp53</i> (#1 + #2) and <i>Prkdc</i> (#1 + #2)	80	80 (100)	35 (43.8)	20 (57.1)	20 (57.1)	15 (42.9)

Percentages were calculated using the number in each column as the numerator and the number of *injected eggs, [†]transferred embryos, or ^{††}isolated embryos as the denominator.

이와 같이, Cpf1 오쏘로그를 이용하는 유전자 타겟팅은 유전자 녹아웃 마우스 생산을 위한 유용한 도구이다.

실시예 2 : 시퀀싱 분석

Sanger 시퀀싱 분석은 Cpf1-매개 Trp53 유전자 및 *Prkdc* 유전자 타겟팅이 정상적으로 삽입-결실(indels)을 유도하는 것을 보여주었다(도 1d, 도 5(서열번호 24 내지 111) 및 도 8(서열번호 112 내지 160)).

두 가지의 AsCpf1- 및 LbCpf1-생성된 돌연변이에서, 모자이크 현상(mosaicism)이 자주 관찰되었다(AsCpf1에 대해 19 파운더 중 11, 57.9%; 13 파운더 중 6, 46.2%). AsCpf1는 LbCpf1의 경우와 비교해도 AsCpf1에 대해 5 또는 6 대립형질(alleles)로 더 복잡한 모자이크 현상을 유도하였다(7/19, 36.8%), (1/13, 7.7%).

상기 현상은 Cpf1 단백질-crRNA 복합체가 마우스 배아의 첫 분할(the first cleavage) 보다 더 늦게 유지되고 AsCpf1 단백질-crRNA 복합체는 LbCpf1 단백질-crRNA 복합체보다 최대한 더 안정함을 가리킨다. 특히, 상당한 수의 돌연변이 파운더는 야생형(wild-type, WT) 대립형질 없이 오직 돌연변이 대립형질을 가진다 (5/19 for AsCpf1, 26.3%; 4/13 for LbCpf1, 30.8%).

실시예 3 : 조직에 따른 Trp53 단백질의 발현

기능적으로 Trp53 유전자 타겟팅을 알아보기 위해, Trp53 단백질의 수준을 비장(spleen), 흉선 및 간 조직에서

야생형 및 WT 대립형질 없는 파운더 마우스로부터 비교하였다 (도 10).

[0179] Trp53 단백질은 정상 조건에서는 불안정하였지만 IR (ionizing irradiation)를 포함하는 다양한 유전적독성 스트레스(genotoxic stresses)에 의해 안정화되었다 (Chiang et al. 2012).

[0180] 일관하여, 정상적 조건에서 검출되는 Trp53 단백질-특이적 시그널은 WT 조직에서 IR에 의해 현저하게 증가하였지만, LbCpf1로 생산되는 비-돌연변이 대립형질(-94/-98/-14/-15+1)을 가지는 파운더 마우스 #13의 경우에는 그러하지 않았다(도 10). 이러한 돌연변이 파운더는 Trp53 단백질이 결핍되었음을 확인하였다.

[0181] **실시예 4 : 오프-타겟(off-target) 돌연변이 분석**

[0182] Cpf1 오쏘로그의 안정성을 알아보기 위해, 본 발명자들은 Cpf1-생성된 오프-타겟(off-target) 돌연변이가 파운더 마우스에 존재하는지 여부를 조사하였다. 마우스 게놈에서 Trp53 유전자의 타겟 서열과 높은 상동성을 가지는, 가능한 오프-타겟 위치를 찾았다(표 6).

[0183] [표 6]

Target	OFF-target No.	DNA	Chr.	Position	Direction	Mismatches (bp)
Prkdc #1	On-target	TTTAGGGCTTCTCTCTACAATCA	chr16	15648868	-	0
	OFF-1	TTTCcGcCTTCTCTCTACAATgA	chr3	94646313	-	3
	OFF-2	TTTGGGCTTCTTCTATATAGTCA	chrX	96581003	-	3
	OFF-3	TTTTCcGCTTCTCTCTCTtAAATtA	chr8	29824129	+	4
	OFF-4	TTTGGGGCTTCTTCTAAACAAcCc	chr8	31090337	+	4
	OFF-5	TTTTCcGCTTCTTCTCTAATgTCA	chr8	52051804	-	4
	OFF-6	TTTAGGGCTTCTTgTCTAAGAcCA	chr7	143892623	-	4
	OFF-7	TTTGGGGCTTCTTgTCTACcTgA	chr1	16714672	-	4
	OFF-8	TTTCaGGCTTCTTCTCTAAttAA	chr10	113997894	+	4
	OFF-9	TTTtAGGCTTCTTCTCTAAAGAcA	chr14	77415012	+	4
	OFF-10	TTTGGGGCTTCTcTCTTgCcAttA	chr14	96496933	+	4
Prkdc #2	ON-target	TTTCTTAGAGAAAATTGACCAGAA	chr16	15648904	+	0
	OFF-1	TTTTTTAGAGAAAATTGAAtAGAA	chr18	72465290	-	2
	OFF-2	TTTTTAaAGAAAATTGACCCAGAA	chr19	44985247	+	2
	OFF-3	TTTCTTAGAcAAAATTGACCCAGAA	chr8	62412061	-	3
	OFF-4	TTTAATAGAAATAAATTcACCCAGAA	chr8	129029841	-	3
	OFF-5	TTTCTTAGAGAAAATTGtCCRGcA	chr12	92316752	+	3
	OFF-6	TTTTTTAaAGAAAATTGACCCAcAA	chr3	80049047	+	3
	OFF-7	TTTATTAGAcAAAATTGACCCAcAc	chr4	66424059	-	3
	OFF-8	TTTTTTAGAGAAAtAaTGACaAGAA	chr4	83906467	+	3
	OFF-9	TTTCTcAGAGAcACTTGACCCAGAA	chr16	17528106	-	3
	OFF-10	TTTCTTAGAGAcAATTGAAtAGAA	chr10	10646996	+	3
	OFF-11	TTTTTTAaAGAAAATTGtCCAGAA	chr10	38499625	+	3
	OFF-12	TTTTTTAaAGAAAATTGCCCACAA	chr10	57278969	-	3
	OFF-13	TTTTTTAaAaAAAATTGAaCAGAA	chr10	70903557	+	3
	OFF-14	TTTCTTgtAGAAAATTGAaCAGAA	chr6	12944880	-	3
	OFF-15	TTTCTTcAGAGAAATTaAcAGAA	chr14	36301844	-	3
	OFF-16	TTTATTAGAcAAAATTcCCAGAA	chr9	39103979	-	3
	OFF-17	TTTCTTcAGAGAAAATTGAcAGAc	chrX	40828166	+	3
	OFF-18	TTTTTTcAGAGAAATcAACCCAGAA	chrX	108614541	-	3
	OFF-19	TTTTTCaAGAAAATTGACCCAGAA	chrX	162440339	+	3
	OFF-20	TTTTTTgAGAGAAAATTGACAcAaAA	chr18	13628628	-	3
	OFF-21	TTTATTAGAcAAgATTcACCCAGAA	chr18	54137748	+	3

[0184]

Target	OFF-target No.	DNA	Chr.	Position	Direction	Mismatches (bp)
Trp53 #1	On-target	TTTCCTTCCACCCGGATAAGATGC	chr11	69588617	-	0
	OFF-1	TTTCCTTCCACCCGcGATAAGATGC	chr17	54420207	-	1
	OFF-2	TTTCCTTCCcctCaGGATAAGATGC	chr16	57437974	+	3
	OFF-3	TTTCCTTCCACCCatGATAtGATGC	chr9	96123344	+	3
	OFF-4	TTTTtTTCCcCCCGGATAAGATta	chr4	48002910	-	4
	OFF-5	TTTTCTTCCACCCcGtTAAGtTGA	chr10	86228631	+	4
	OFF-6	TTTCCTTCCACCCcGATAAaAaGg	chr6	49321116	+	4
	OFF-7	TTTCCTTCCcCCCGGAgAAGgaGC	chr14	75433035	-	4
	OFF-8	TTTTCTTCCACtgGGATAAGAAaGa	chr14	121751844	+	4
	OFF-9	TTTCCTTCCACCCcGctTAGAGgGC	chrX	140047478	-	4
	OFF-10	TTTTCTTCCACCCcGAaAtGtTGC	chr11	89735128	-	4
Trp53 #2	On-target	TTTGGCCACAGCGTGGTGGTACCT	chr11	69588675	+	0
	OFF-1	TTTGGCCACAGctGTGGTGGTACCT	chr17	54420265	+	1
	OFF-2	TTTgCCcCAGaGtGGTGGTACCT	chr11	33814412	+	3
	OFF-3	TTTAGCCAGAgGgTGGTGGctCCT	chr8	106139295	+	4
	OFF-4	TTTAGCCACAatGTaGTGGTAaCT	chr4	50008260	+	4
	OFF-5	TTTGGCCAGAGaGTGGTGGTcCaT	chr4	134498885	-	4
	OFF-6	TTTAGCCACtGCGaGGTGGggCCT	chr1	34459725	-	4
	OFF-7	TTTGGCCACAcagTGGTGGcACgT	chr19	35598416	+	4
	OFF-8	TTTGGcCtCAGctGTGGTGGTACCo	chr10	67277919	-	4
	OFF-9	TTTAGCCACtGctATGGTGGTACCa	chr6	99579418	-	4
	OFF-10	TTTTGGCCACAGCGaGGTGAcCtT	chr18	12467360	+	4

[0185]

[0186] sCpf1 및 LbCpf1로 각각 생성된, 게놈 DNA 샘플의 5 돌연변이 파운더로 오프-타겟 위치를 딥-시퀀싱(deep sequencing)에 의해 분석하였다 그러나, 타겟 #1 및 #2에 대한 crRNA로 2-bp ~ 4-bp 미스매치를 포함하는 17 오프-타겟 위치에서 유의미한 오프-타겟 효과가 검출되었다

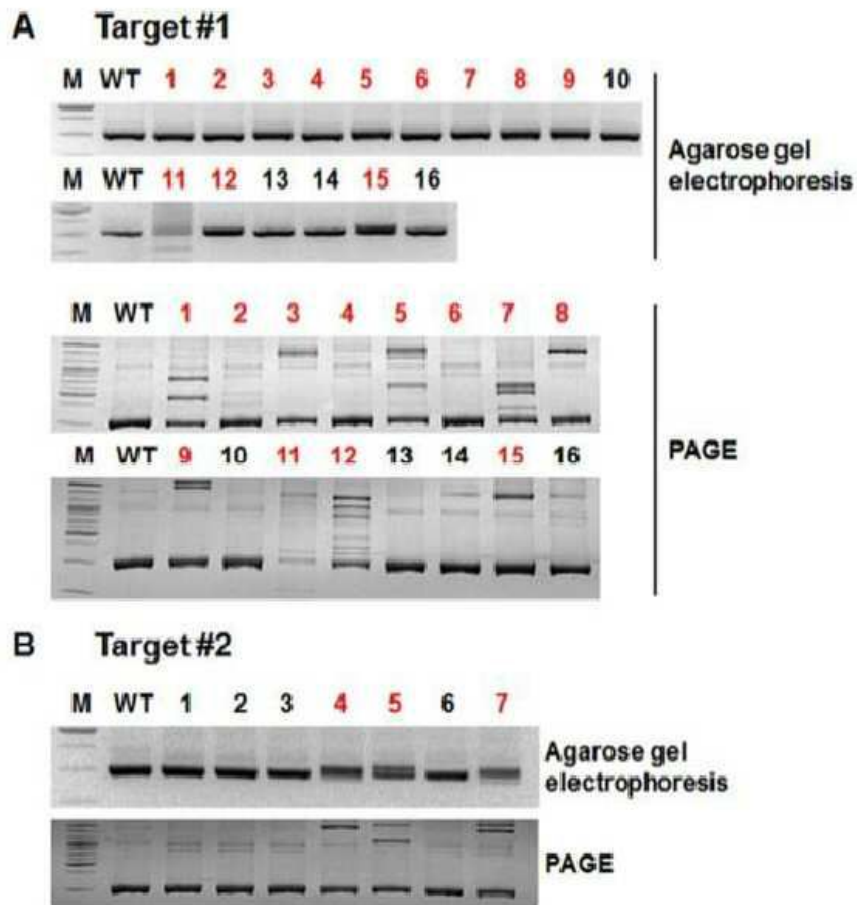
[0187] 타겟 #1에 대한 crRNA로의 1-bp 미스매치를 가지는 하나의 오프-타겟 위치가 두 Cpf1 오쏘로그에 의해 18.6% 및 16.3%의 빈도에서 돌연변이 되었다(도 11).

[0188] 또한 Prkdc 유전자의 두 타겟 서열에 대한 2- 내지 4-bp 미스매치로 24 오프-타겟 위치는 임의의 유의미한 오프-타겟 돌연변이를 나타내지는 않았다(도 12).

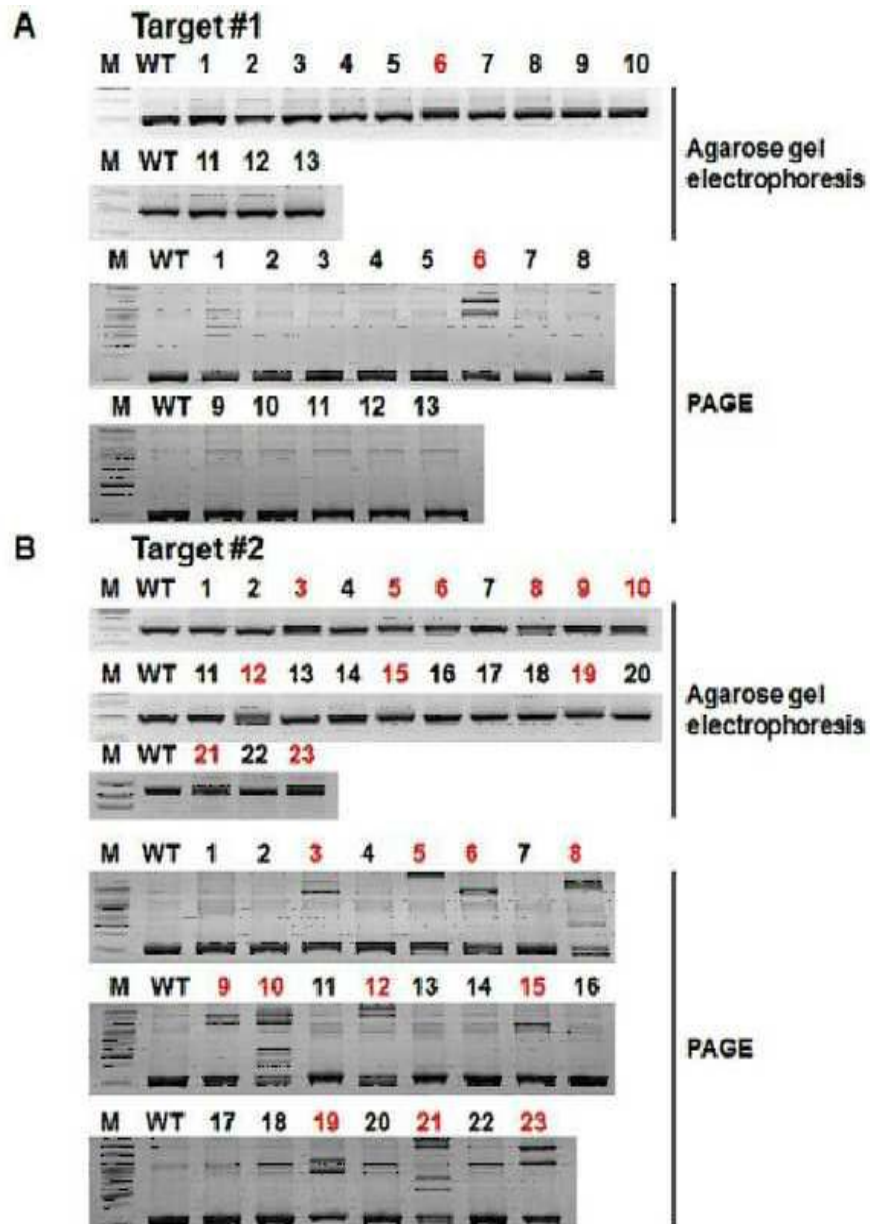
[0189] 이는 AsCpf1- 및 LbCpf1-crRNA 복합체 모두 Cas9-sgRNA 복합체와 유사한 최소의 오프-타겟 영향(off-target effect)를 나타내고, 이는 표적단백질의 타겟 서열을 주의깊게 선별함으로써 오프-타겟 영향을 유의미하게 피할 수 있음을 시사한다.

[0190] 이러한 결과들을 통해, Cpf1-매개 유전자 타겟팅은 녹아웃 마우스를생산하는데 효율적인 방법임을 입증하였다. Cas9의 경우와 구별되는 Cpf1의 특성에 기초하여, Cpf1는 유용한 마우스 모델 구축에 더 많은 기회를 제공할 것이다.

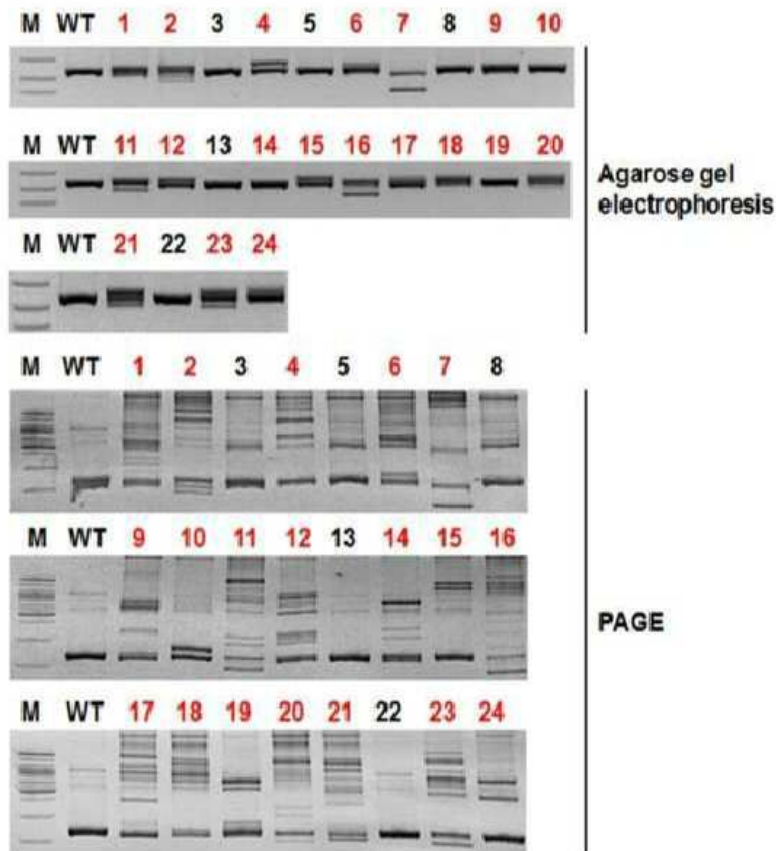
도면2



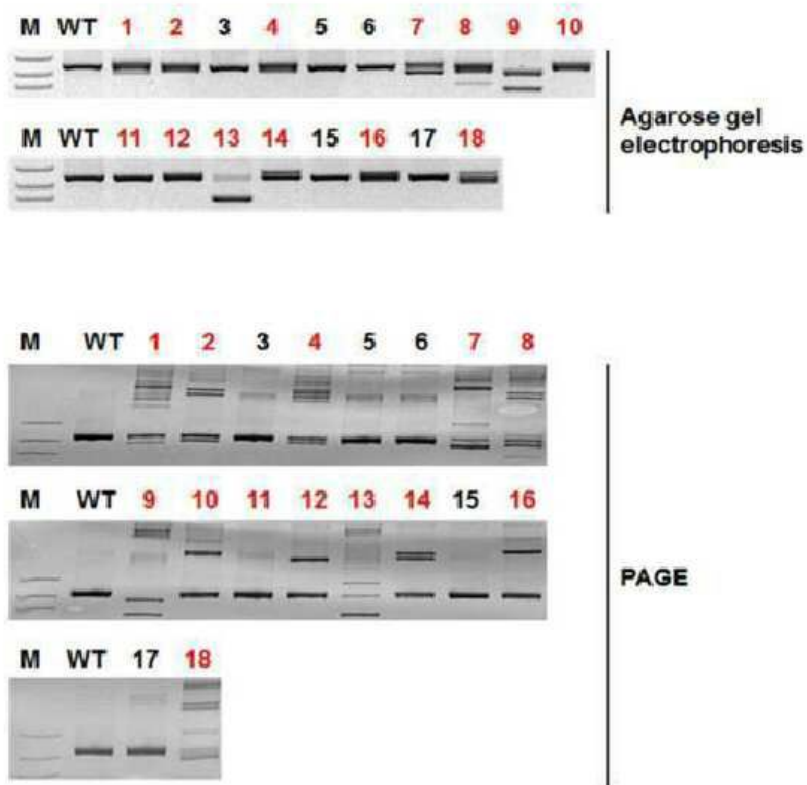
도면3



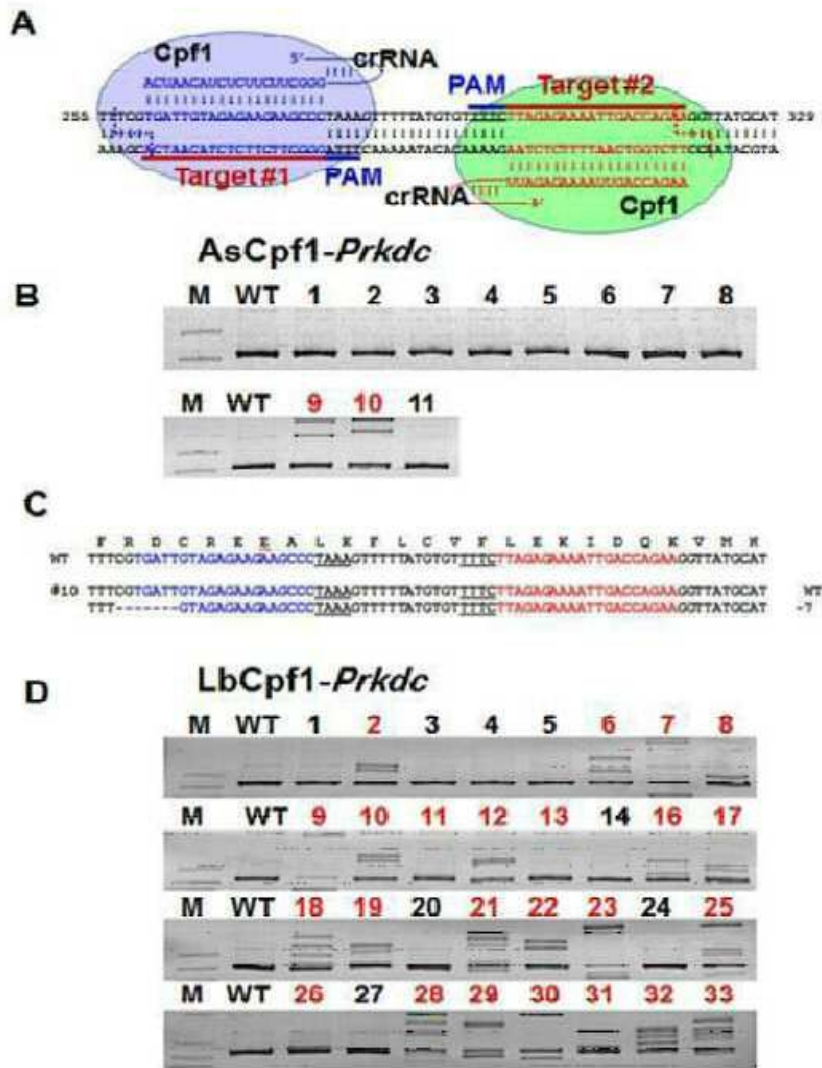
도면4



도면6



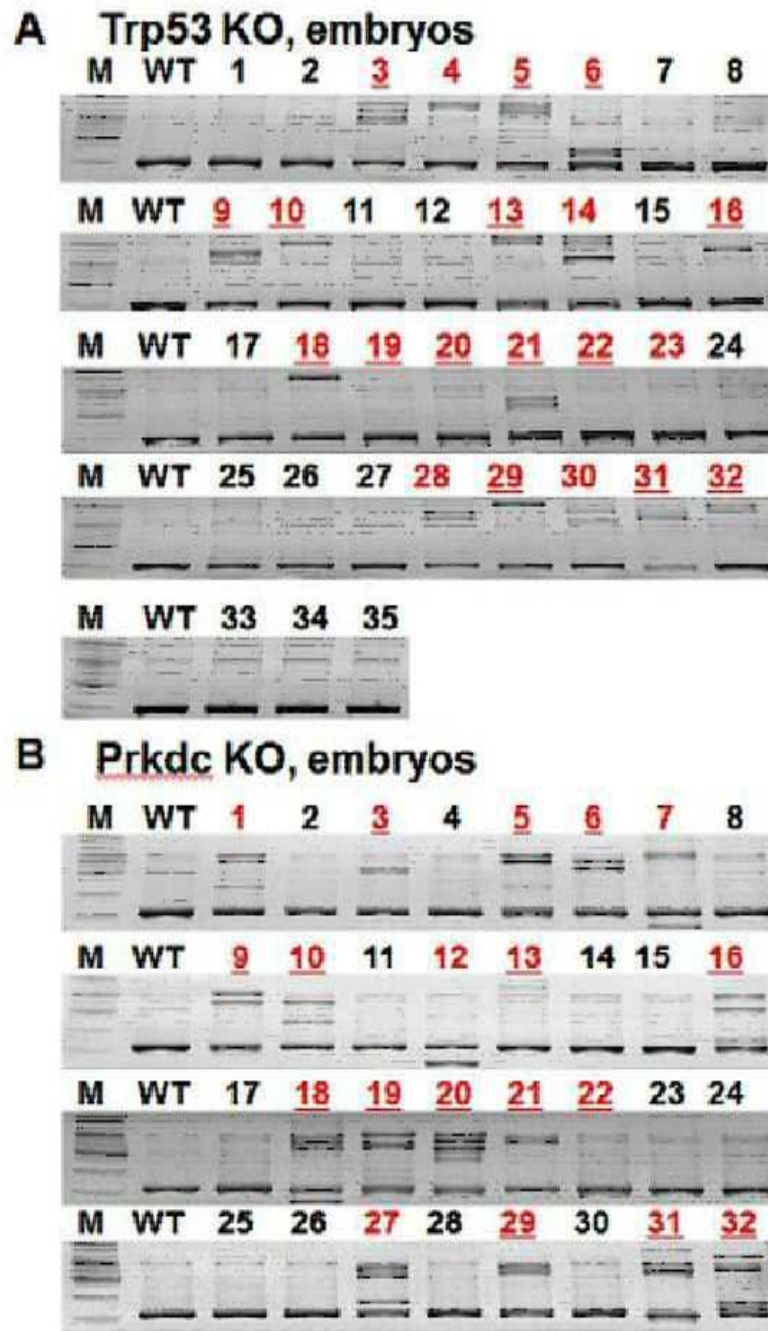
도면7



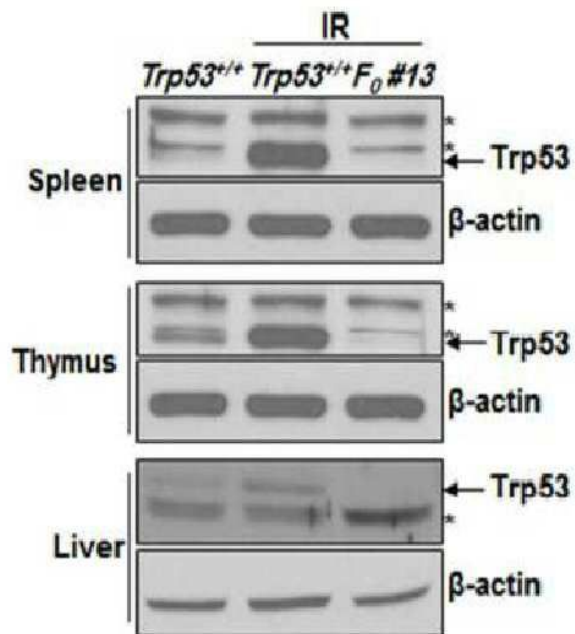
도면8

	F R D C R E E A L K F L C V F L E K I D Q K V H R	
WT	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	
#2	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	WT
	TTTCGTGATT -TA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	-1
	TTTCGTGATT -TA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG A+g s-----ATG	-11+3
#6	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	WT
	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA ---TTAT GCAT	-3
#7	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	WT
	TTTCGT-----GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TT-----TTAT GCAT	-40
	-----GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TT-----	-53
#8	TTTCGTG---GTAGAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	-3
	TTTCGTGAT-GTAGAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	-1
#9	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	WT
	-----	-71+9
#10	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	WT
	TTTCGTGAT-GTAGAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TT-----ATGCAT	-12
#12	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	WT
	TTTCGTG---TA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	-4
#13	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	WT
	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG AC-AGA AGG TAT GCAT	-8
#16	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	WT
	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AG- -GTAT GCAT	-3
#17	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	WT
	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG AC-AGA AGG TAT GCAT	-1
#18	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	WT
	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AG- -GTAT GCAT	-3
	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AG- -TTAT GCAT	-4
#19	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	WT
	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AG- -GTAT GCAT	-3
	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA- -TAT GCAT	-4
#21	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	WT
	-----AGAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG AC- -AGA AGG TAT GCAT	-17
	-----AGAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ag- - -AGGTTATGC	-22+2
#22	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	WT
	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TT-----ATGCAT	-12
#23	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	WT
	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC-----	-32
	-----GTAGAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA-----TGCAT	-40
#25	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	WT
	TTTCGT---TGTAGAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	-3
	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TT-----	-37
#26	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	WT
	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG -ATGCAT	-1
#28	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	WT
	TTTCGTGATT GTAG-----AAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	-5
#29	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	WT
	-----AGAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG AC-AGA AGG TAT GCAT	-15
#30	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	WT
	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA-----	-29
#31	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AGA AGG TAT GCAT	WT
	TTTCGTGATT GTA GAGAAAGAAGC CCT AAA GTT TTTA TGT GTT TTC TTA GAGAAAA TTG ACC AG- -GTAT GCAT	-3

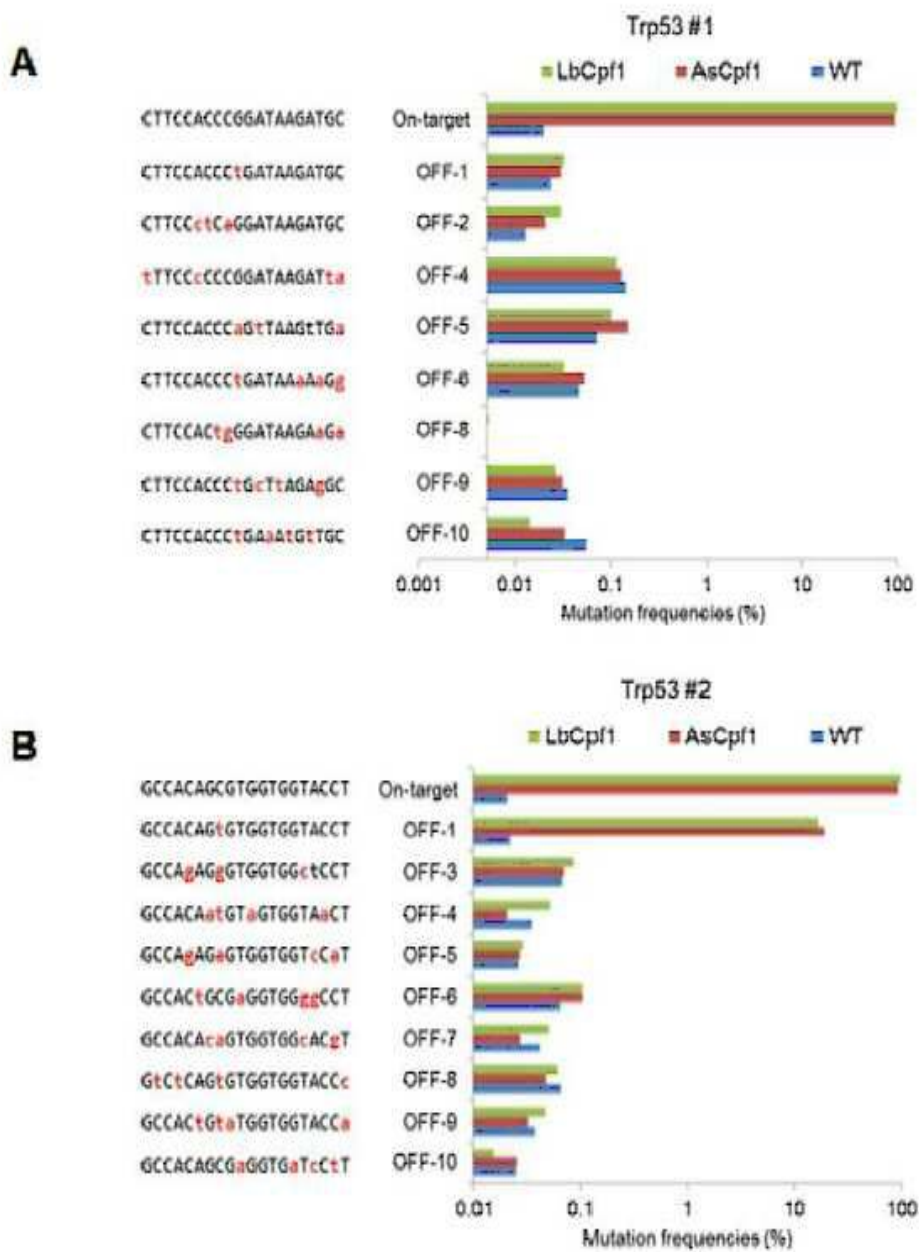
도면9



도면10

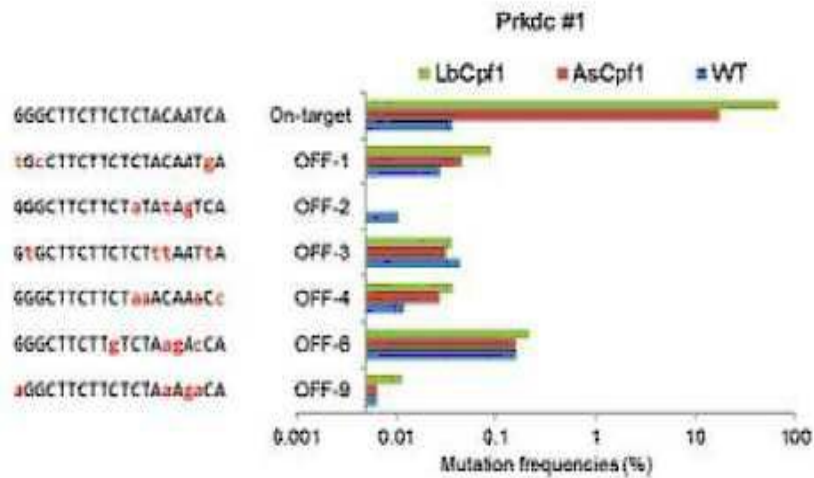


도면11

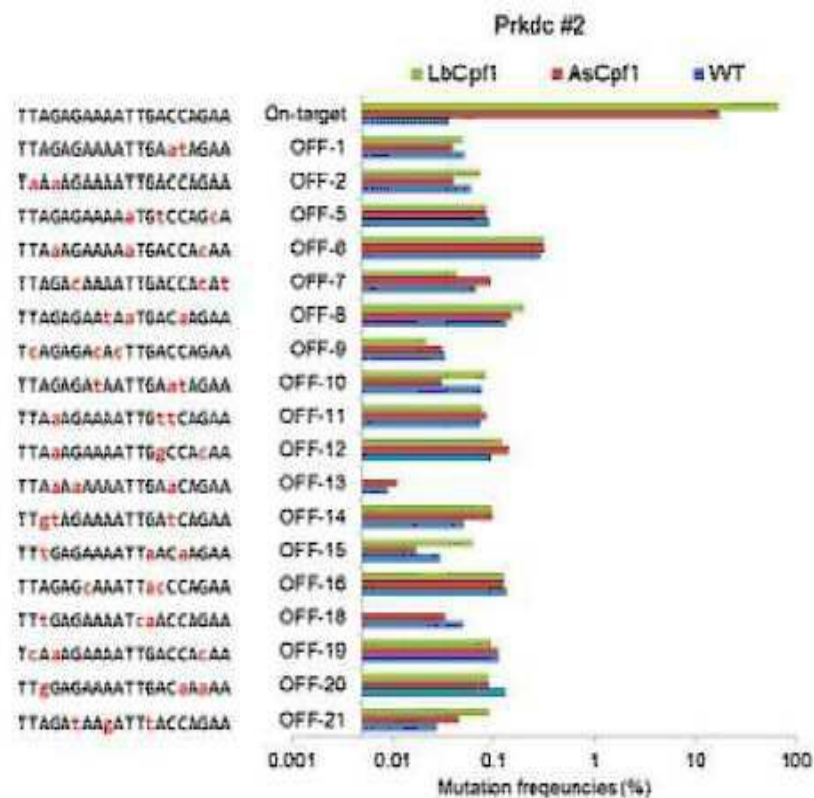


도면12

A



B



서열 목록

<110> Ulsan university industry cooperation

Asan foundation

<120> A knockout Animal Model by Cpf1-mediated gene targeting and the Preparation Method thereof

<130> P-3

<160> 160

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer for crRNA preparation, T7 top strand primer

<400> 1

gaaattaata cgactcacta taggg 25

<210> 2

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer for crRNA preparation, anti-T7-AsTrp53_1

<400> 2

gcatcttattc cgggtggaag atctacaaga gtagaaatta ccctatagtg agtcgtatta 60

atttc 65

<210> 3

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer for crRNA preparation, anti-T7-LbTrp53_1

<400> 3

gcatcttattc cgggtggaag atctacactt agtagaaatt accctatagt gagtcgtatt 60

aatttc 66

<210> 4

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer for crRNA preparation, anti-T7-AsTrp53_2

<400> 4

aggtaccacc acgctgtggc atctacaaga gtagaaatta ccctatagtg agtcgtatta 60

atttc 65

<210> 5

<211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer for crRNA preparation, anti-T7-LbTrp53_2
 <400> 5
 aggtaccacc acgctgtggc atctacactt agtagaaatt accctatagt gagtcgtatt 60

 aatttc 66
 <210> 6
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer for crRNA preparation, anti-T7-AsPrkdc_1
 <400> 6
 tgattgtaga gaagaagccc atctacaaga gtagaaatta ccctatagtg agtcgtatta 60
 atttc 65
 <210> 7
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer for crRNA preparation, anti-T7-LbPrkdc_1

 <400> 7
 tgattgtaga gaagaagccc atctacactt agtagaaatt accctatagt gagtcgtatt 60
 aatttc 66
 <210> 8
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer for crRNA preparation, anti-T7-AsPrkdc_2
 <400> 8
 ttctgggtcaa ttttctctaa atctacaaga gtagaaatta ccctatagtg agtcgtatta 60
 atttc 65
 <210> 9
 <211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer for crRNA preparation, anti-T7-LbPrkdc_2

<400> 9

ttctgggtcaa ttttctctaa atctacactt agtagaaatt accctatagt gagtcgtatt 60

aatttc 66

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primary primer for Trp53

<400> 10

cgccatggcc atctacaaga 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primary primer for Trp53

<400> 11

tcagcgtctc tatttccgc 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nested PCR primer for Trp53

<400> 12

tcagcgtctc tatttccgc 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nested PCR primer for Trp53

<400> 13

gaggcaaacg ggttgctaga

20

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nested PCR primer for prkdc

<400> 14

ccggaagtcg cttagcattg a

21

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nested PCR primer for prkdc

<400> 15

tgaagttggc agaagtgagt tt

22

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nested PCR primer for prkdc

<400> 16

ttctatcttc ctctttgttg gagt

24

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nested PCR primer for prkdc

<400> 17

gaggcaaacg ggttgctaga

20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer for Trp53

<400> 18

gctccgatgg tgatggtaag 20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer for Trp53

<400> 19

tagcactcag gagggtgagg 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Trp53 Target#1 sequence

<400> 20

cgtagaatag gcccaccttc 20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Trp53 Target#2 sequence

<400> 21

gccacagcgt ggtggtacct 20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Prkdc Target#1 sequence

<400> 22

actaacatct cttcttcggg 20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Prkdc Target#2 sequence
 <400> 23
 ttagacaaaa ttgaccagaa 20
 <210> 24
 <211> 105

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Trp53 targeting region wt sequences
 <400> 24
 cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgtatc ccgagtatct ggaagacagg 60
 cagacttttc gccacagcgt ggtggtacct tatgagccac ccgag 105
 <210> 25
 <211> 105

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Fo#1Trp53 allele 1(mutant)
 <400> 25
 cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgtatc ccgagtatct ggaagacagg 60
 cagacttttc gccacagcgt ggtggtacct tatgagccac ccgag 105

<210> 26
 <211> 67
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Fo#1Trp53 allele 2(mutant)
 <400> 26
 cctccgggtg gaaggaaatt tgtatcccga gtatctggaa gacaggcaga cttttcgcca 60
 cccgaga 67
 <210> 27
 <211> 67
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Fo#1Trp53 allele 3(mutant)

<400> 27

cctcccggtt ggaaggaaat ttgtatcccg agtatctgga agacaggcag acttttcgcc 60

acccgag 67

<210> 28

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fo#1Trp53 allele 4(mutant)

<400> 28

cctcccggtt ggaaggaaat ttgtatcccg agtatctgga agacaggcag acttttcgcc 60

acagcgtggt ggtatgagcc acccgag 87

<210> 29

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fo#1Trp53 allele 5(mutant)

<400> 29

cctccgggtg gaaggaaatt tgtatcccg gtatctggaa gacaggcaga cttttcgcca 60

cagcgtggtg gtaccttatg agccaccga g 91

<210> 30

<211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fo#1Trp53 allele 6(mutant)

<400> 30

cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgtatc ccgagtatct ggaagacagg 60

cagacttttc gccacagcgt ggtttgccac ccgag 95

<210> 31

<211> 105

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fo#2 Trp53 allele 1(mutant)

<400> 31
 cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgatc ccgagtatct ggaagacagg 60
 cagacttttc gccacagcgt ggtggtacct tatgagccac ccgag 105

<210> 32
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Fo#2 Trp53 allele 2(mutant)
 <400> 32
 cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgatc ccgagtatct ggaagacagg 60
 cagacttttc gccacagcga g 81

<210> 33
 <211> 105
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#4 Trp53 allele 1 sequences(mutant)
 <400> 33
 cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgatc ccgagtatct ggaagacagg 60
 cagacttttc gccacagcgt ggtggtacct tatgagccac ccgag 105

<210> 34
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#4 Trp53 allele 2 sequences(mutant)
 <400> 34
 cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgatc ccgagtatct ggaagacagg 60
 cagacttttc gccacccgag 80

<210> 35
 <211> 86
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#4 Trp53 allele 3 sequences(mutant)
 <400> 35

cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgtatc ccgagtatct ggaagacagg 60

cagacttttc gccacagcca cccgag 86

<210> 36

<211> 105

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#7 Trp53 allele 1 sequences(mutant)

<400> 36

cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgtatc ccgagtatct ggaagacagg 60

cagacttttc gccacagcgt ggtggtacct tatgagccac ccgag 105

<210> 37

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#7 Trp53 allele 2 sequences(mutant)

<400>

37

cctcccagtg gaaggaaatt tgtatcccga gtatctggaa gacaggcaga cttttcgcca 60

cagccaccg ag 72

<210> 38

<211> 102

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#7 Trp53 allele 3 sequences(mutant)

<400> 38

cctccccatc ttatccgggt ggaaggaaat ttgtatcccg agtatctgga agacaggcag 60

acttttcgcc acagcgtggt ggtaccttat gagccaccg ag 102

<210> 39

<211> 78

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> F0#8 Trp53 allele 1 sequences(mutant)

<400> 39

cctccccatc ttatccgggt ggaaggaaat ttgtatcccg agtatctgga agacaggcag 60
acttttcgcc acagcgag 78

<210> 40
<211> 99
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> F0#8 Trp53 allele 2 sequences(mutant)
<400> 40

cctccccctc ttccgggtgg aaggaaattt gtatcccgag tatctggaag acaggcagac 60
ttttcgccac agcgtggtgt accttatgag ccacccgag 99

<210> 41
<211> 101
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> F0#8 Trp53 allele 3 sequences(mutant)
<400> 41

cctccccatc ttatccgggt ggaaggaaat ttgtatcccg agtatctgga agacaggcag 60
acttttcgcc acagcgtggt gtaccttatg agccaccga g 101

<210> 42
<211> 105
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Trp53 targeting region wt sequence(figure 5)
<400> 42

cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgtatc ccgagtatct ggaagacagg 60

cagacttttc gccacagcgt ggtggtacct tatgagccac ccgag 105

<210> 43
<211> 105
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> F0#1 Trp53 allele 1 sequence(figure 5)
<400> 43

cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgtatc ccgagtatct ggaagacagg 60

cagacttttc gccacagcgt ggtggtacct tatgagccac ccgag 105

<210> 44

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#1 Trp53 allele 2 sequence(figure 5)

<400>

> 44

cctcctccgg gtggaaggaa atttgatcc cgagtatctg gaagacaggc agacttttcg 60

ccacagcgaa aagccaccc 79

<210> 45

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#1 Trp53 allele 3 sequence(figure 5)

<400> 45

cctccccaga tccgggtgga aggaaatttg tatcccgagt atctggaaga caggcagact 60

tttcgccaca gcgtggtggt accttatgag ccacccgag 99

<210> 46

<211> 89

<212> DNA

<

213> Artificial Sequence

<220><223> F0#1 Trp53 allele 4 sequence(figure 5)

<400> 46

tccgggtgga aggaaatttg tatcccgagt atctggaaga caggcagact tttcgccaca 60

gcgtggtggt accttatgag ccacccgag 89

<210> 47

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#1 Trp53 allele 5 sequence(figure 5)

<400> 47

cctcccatcc ggggtggaagg aaatttgat cccgagtatc tggaagacag gcagactttt 60

cgccacagcg tgggtgtacc ttatgagcca cccgag	96
<210> 48	
<211> 105	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> F0#2 Trp53 allele 1 sequence(figure 5)	
<400> 48	
cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgtatc ccgagtatct ggaagacagg	60
cagacttttc gccacagcgt ggtggtacct tatgagccac ccgag	105
<210> 49	
<211> 55	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> F0#2 Trp53 allele 2 sequence(figure 5)	
<400> 49	
cctccctttg tatcccgagt atctggaaga caggcagact tttcgccaca gcgtg	55
<210> 50	
<211> 75	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> F0#2 Trp53 allele 3 sequence(figure 5)	
<400> 50	
ccgggtggaa ggaaatttgt atcccgagta tctggaagac aggcagactt ttcgccacag	60
cgtgagccac ccgag	75
<210> 51	
<211> 105	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> F0#4 Trp53 allele 1 sequence(figure 5)	
<400> 51	
cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgtatc ccgagtatct ggaagacagg	60
cagacttttc gccacagcgt ggtggtacct tatgagccac ccgag	105

<210> 52
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#4 Trp53 allele 2 sequence(figure 5)
 <400> 52
 cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgtatc ccgagtatct ggaagacagg 60
 cagacttttc gccacagcgt ggtggtacga gccacccgag 100
 <210> 53
 <211> 105
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#6 Trp53 allele 1 sequence(figure 5)
 <400>
 > 53
 cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgtatc ccgagtatct ggaagacagg 60
 cagacttttc gccacagcgt ggtggtacct tatgagccac ccgag 105
 <210> 54
 <211> 93
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#6 Trp53 allele 2 sequence(figure 5)
 <400> 54
 cctatccggg tggaaggaaa ttgtatccc gagtatctgg aagacaggca gacttttcgc 60
 cacagcgtgg tggtagctta tgagccacc gag 93
 <210> 55
 <211> 91
 <212> DNA
 <
 213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#6 Trp53 allele 3 sequence(figure 5)
 <400> 55
 cctccgggtg gaaggaaatt tgtatcccga gtatctggaa gacaggcaga cttttcgcca 60
 cagcgtggtg gtaccttatg agccaccga g 91
 <210> 56

<211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#7 Trp53 allele 1 sequence(figure 5)
 <400> 56
 cctccgggag ccacccg 17
 <210> 57
 <211> 91
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#7 Trp53 allele 2 sequence(figure 5)
 <400> 57
 tatccgggtg gaaggaaatt tgtatcccga gtatctggaa gacaggcaga cttttcgcca 60
 cagcgtggtg gtaccttatg agccaccga g 91
 <210> 58
 <211> 105
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#9 Trp53 allele 1 sequence(figure 5)
 <400> 58
 cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgtatc ccgagtatct ggaagacagg 60
 cagacttttc gccacagcgt ggtggtacct tatgagccac ccgag 105
 <210> 59
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#9 Trp53 allele 2 sequence(figure 5)
 <400> 59
 cctccccatc ttatccgggt ggaaggaaat ttgtatcccg agtatctgga agacaggcag 60
 acttttcgcc acagcgtggt ggtaccttat gagccaccg ag 102
 <210> 60
 <211> 91
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#9 Trp53 allele 3 sequence(figure 5)

<400> 60

cctccgggtg gaaggaaatt tgtatcccga gtatctggaa gacaggcaga cttttcgcca 60

cagcgtggtg gtaccttatg agccaccga g 91

<210> 61

<211> 105

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#10 Trp53 allele 1 sequence(figure 5)

<400> 61

cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgtatc ccgagtatct ggaagacagg 60

cagacttttc gccacagcgt ggtggtacct tatgagccac ccgag 105

<210> 62

<211> 103

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#10 Trp53 allele 2 sequence(figure 5)

<400> 62

cctccccaat ctatccggg tggaaggaaa ttgtatccc gagtatctgg aagacaggca 60

gacttttcgc cacagcgtgg tgggtacctt tgagccacc gag 103

<210> 63

<211> 105

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#11 Trp53 allele 1 sequence(figure 5)

<400> 63

cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgtatc ccgagtatct ggaagacagg 60

cagacttttc gccacagcgt ggtggtacct tatgagccac ccgag 105

<210> 64

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#11 Trp53 allele 2 sequence(figure 5)

<400> 64

cctcccaggc ctttctttcc ggggtggaagg aaatttgtat cccgagtatc tggaagacag 60

gcagactttt cgccacagcg tgggtgtacc ttatgagcc 99

<210> 65

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#11 Trp53 allele 3 sequence(figure 5)

<400> 65

tccgggtgga aggaaatttg tatcccgagt atctggaaga caggcagact ttctgccaca 60

gcgag 65

<210> 66

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#11 Trp53 allele 4 sequence(figure 5)

<400> 66

ccgggtggaa ggaaatttgg atcccgagta tctggaagac aggcagactt ttctgccacag 60

ccacccgag 69

<210> 67

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#11 Trp53 allele 5 sequence(figure 5)

<400> 67

cctcccaggc ctttctttcc ggggtggaagg aaatttgtat cccgagtatc tggaagacag 60

gcagactttt cgccacagcg 80

<210> 68

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#11 Trp53 allele 6 sequence(figure 5)

<400> 68

tccgggtgga aggaaatttg tatcccgagt atctggaaga caggcagact ttctgccaca 60

gcgtggtggt accttatgag ccacccgag 89

<210> 69

<211> 105

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#12 Trp53 allele 1 sequence(figure 5)

<

400> 69

cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgatc cagagtatct ggaagacagg 60

cagacttttc gccacagcgt ggtggtacct tatgagccac ccgag 105

<210> 70

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#12 Trp53 allele 2 sequence(figure 5)

<400> 70

cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgatc cagagtatct ggaagacagg 60

cagacttttc gccacagcgt ggtagccacc cgag 94

<210> 71

<211> 102

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#12 Trp53 allele 3 sequence(figure 5)

<400> 71

cctccccatc ttatccgggt ggaaggaaat ttgtatccg agtatctgga agacaggcag 60

acttttcgcc acagcgtggt ggtaccttat gagccaccg ag 102

<210> 72

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#12 Trp53 allele 4 sequence(figure 5)

<400> 72
 cctccccagc ttatccgggt ggaaggaaat ttgtatcccg agtatctgga agacaggcag 60
 acttttcgcc acagcgtggt agccacccga g 91

<210> 73
 <211> 83
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#12 Trp53 allele 5 sequence(figure 5)
 <400> 73
 cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgtatc ccgagtatct ggaagacagg 60
 cagacttttc gccacagcgt ggt 83

<210> 74
 <211> 105
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#14 Trp53 allele 1 sequence(figure 5)
 <400> 74
 cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgtatc ccgagtatct ggaagacagg 60

cagacttttc gccacagcgt ggtggtacct tatgagccac ccgag 105
 <210> 75
 <211> 91
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> F0#14 Trp53 allele 2 sequence(figure 5)
 <400> 75
 cctccgggtg gaaggaaatt tgtatcccga gtatctggaa gacaggcaga cttttcgcca 60
 cagcgtggtg gtaccttatg agccacccga g 91

<210> 76
 <211> 105
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#15 Trp53 allele 1 sequence(figure 5)

<

400> 76
cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgtatc ccgagtatct ggaagacagg 60
cagacttttc gccacagcgt ggtggtacct tatgagccac ccgag 105
<210> 77
<211> 90
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> F0#15 Trp53 allele 2 sequence(figure 5)
<400> 77
cctcccccta tccgggtgga aggaaatttg tatcccaggt atctggaaga caggcagact 60
tttcgccaca gcgtggtttg agccaccgga 90
<210> 78
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> F0#16 Trp53 allele 1 sequence(figure 5)
<400> 78
cctcttccgg gtggaaggaa atttgtatcc cgagtatctg gaagacaggc agacttttcg 60
ccacagcgtg gtggtacctt atgagccacc cga 93
<210> 79
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> F0#16 Trp53 allele 2 sequence(figure 5)
<400> 79
ccgggtggaa ggaaatttgt atcccagta tctggaagac aggcagactt ttcgccacc 60
gag 63
<210> 80
<211> 88
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> F0#16 Trp53 allele 3 sequence(figure 5)
<400> 80

ccgggtggaa ggaaatttgt atcccgagta tctggaagac aggcagactt ttcgccacag 60
 cgtggtggta cttatgagc cacccgag 88
 <210> 81
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#16 Trp53 allele 4 sequence(figure 5)
 <400> 81
 ccgggtggaa ggaaatttgt atcccgagta tctggaagac aggcagactt ttcgccacag 60
 ccacccgag 69
 <210> 82
 <211> 86
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#16 Trp53 allele 5 sequence(figure 5)
 <400> 82
 cctccccagc cgggtggaag gaaatttgta tcccgagtat ctggaagaca ggcagacttt 60
 tcgccacagc gtgggagcca cccgag 86
 <210> 83
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#16 Trp53 allele 6 sequence(figure 5)
 <400>
 > 83
 cctctccggg tggaaggaaa ttgtatccc gattatctgg aagacaggca gacttttcgc 60
 cacagccacc cgag 74
 <210> 84
 <211> 91
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#17 Trp53 allele 1 sequence(figure 5)
 <400> 84
 cctccgggtg gaaggaaatt tgtatcccga gtatctggaa gacaggcaga cttttcgcca 60

cagcgtggtg gtaccttatg agccacccga g 91

<210> 85

<211> 97

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#17 Trp53 allele 2 sequence(figure 5)

<400> 85

cctccccca gcatcttata cgggtggaag gaaatttgta tcccgagtat ctggaagaca 60

ggcagacttt tcgccacagc gtggtgtgag ccacccg 97

<210> 86

<211> 105

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#18 Trp53 allele 1 sequence(figure 5)

<400> 86

cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgatc ccgagtatct ggaagacagg 60

cagacttttc gccacagcgt ggtggtacct tatgagccac ccgag 105

<210> 87

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#18 Trp53 allele 2 sequence(figure 5)

<400> 87

cctccgggtg gaaggaaatt tgtatcccga gtatctggaa gacaggcaga cttttcgcca 60

cagcgtggtg gtaccttatg agccacccga g 91

<210> 88

<211> 86

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#18 Trp53 allele 3 sequence(figure 5)

<400> 88

cctccgggtg gaaggaaatt tgtatcccga gtatctggaa gacaggcaga cttttcgcca 60

cagcgtggtg gtatgagcca cccgag 86

<210> 89

<211> 86

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#18 Trp53 allele 4 sequence(figure 5)

<400> 89

cctccctcct ccgggtggaa ggaaatttgt atcccgagta tctggaagac aggcagactt 60

ttcgccacag cgtggtggag ccaccc 86

<210> 90

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#18 Trp53 allele 5 sequence(figure 5)

<400>

> 90

cctccctcct ccgggtggaa ggaaatttgt atcccgagta tctggaagac aggcagactt 60

ttcgccacag cgtggtggta ccgagccacc c 91

<210> 91

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#18 Trp53 allele 6 sequence(figure 5)

<400> 91

cctccctat ccgggtggaa ggaaatttgt atcccgagta tctggaagac aggcagactt 60

ttcgccacag cgtggtggta ccgagccacc cgag 94

<210> 92

<211> 105

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#19 Trp53 allele 1 sequence(figure 5)

<400> 92

cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgtatc ccgagtatct ggaagacagg 60

cagacttttc gccacagcgt ggtgttacct tatgagccac ccgag 105

<210> 93
 <211> 92
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#19 Trp53 allele 2 sequence(figure 5)
 <400> 93
 cctcccaggg tggaaggaaa ttgtatccc gattatctgg aagacaggca gacttttcgc 60
 cacagcgtgg tggtagctta tgagccacc ga 92

<210> 94
 <211> 91
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#19 Trp53 allele 3 sequence(figure 5)
 <400> 94
 cctccgggtg gaaggaaatt tgtatcccga gtatctggaa gacaggcaga cttttcgcca 60
 cagcgtggtg gtaccttatg agccaccga g 91

<210> 95
 <211> 99
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#20 Trp53 allele 1 sequence(figure 5)
 <400> 95
 cctcccctta tccgggtgga aggaaatttg tatcccgagt atctggaaga caggcagact 60
 ttctgccaca gcgtggtggt accttatgag ccaccgag 99

<210> 96
 <211> 94
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#20 Trp53 allele 2 sequence(figure 5)
 <400> 96
 cctcccctta tccgggtgga aggaaatttg tatcccgagt atctggaaga caggcagact 60
 ttctgccaca gcgtggtggt atgagccacc cgag 94

<210> 97

<211> 94
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#20 Trp53 allele 3 sequence(figure 5)
 <400>
 > 97
 cctccccctta tccgggtgga aggaaatttg tatcccgagt atctggaaga caggcagact 60
 ttctgccaca gcgtgggtggt acgagccacc cgag 94
 <210> 98
 <211> 88
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#20 Trp53 allele 4 sequence(figure 5)
 <400> 98
 ccgggtggaa ggaaatttgt atcccgagta tctggaagac aggcagactt ttcgccacag 60
 cgtgggtgta ccttatgagc cacccgag 88
 <210> 99
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#20 Trp53 allele 5 sequence(figure 5)
 <400> 99
 cctcccggtt ggaaggaaat ttgtatcccg agtatctgga agacaggcag acttttcgcc 60
 acagcgag 68
 <210> 100
 <211> 89
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#21 Trp53 allele 1 sequence(figure 5)
 <400> 100
 tcctccgggt ggaaggaaat ttgtatcccg agtatctgga agacaggcag acttttcgcc 60
 acagcgtggt ggtaccttat gagccaccc 89
 <210> 101

<211> 77
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#21 Trp53 allele 2 sequence(figure 5)
 <400> 101
 cctccatctt atccgggtgg aaggaaattt gtatcccgag tatctggaag acaggcagac 60
 ttttcgccac agccact 77
 <210> 102
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#21 Trp53 allele 3 sequence(figure 5)
 <400> 102
 tcctccgggt ggaaggaaat ttgtatcccg agtatctgga agacaggcag acttttcgcc 60
 acagccact 69
 <210> 103
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#21 Trp53 allele 4 sequence(figure 5)
 <400> 103
 cctccccatc ttatccgggt ggaaggaaat ttgtatcccg agtatctgga agacaggcag 60
 acttttcgcc acagcgtggt ttaccttatg agccacccga 100
 <210> 104
 <211> 95
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0#21 Trp53 allele 5 sequence(figure 5)
 <400> 104
 cctccccatc ttatccgggt ggaaggaaat ttgtatcccg agtatctgga agacaggcag 60
 acttttcgcc acagcgtggt ggtgagccac ccgag 95
 <210> 105
 <211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#21 Trp53 allele 6 sequence(figure 5)

<400> 105

cctccccagc ttatccgggt ggaaggaaat ttgtatccg agtatctgga agacaggcag 60

acttttcgcc acagcgtggt ttacattatg agccaccga 100

<210> 106

<211> 105

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#23 Trp53 allele 1 sequence(figure 5)

<400> 106

cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgtatc ccgagtatct ggaagacagg 60

cagacttttc gccacagcgt ggtggtacct tatgagccac ccgag 105

<210> 107

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#23 Trp53 allele 2 sequence(figure 5)

<400> 107

tatcccgagt atctggaaga caggcagact ttctgccaca gcgtggtggt accttatgag 60

ccacccgag 69

<210> 108

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#23 Trp53 allele 3 sequence(figure 5)

<400> 108

cctcccagtg gaaggaaatt tgtatccga gtatctggaa gacaggcaga cttttcgcca 60

cagcgtggtg gtacattatg agccaccga 90

<210> 109

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#23 Trp53 allele 4 sequence(figure 5)

<400> 109

cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgtatc ccgagtatct ggaagacagg 60

cagacttttc gccacagcgt ggtgtctgag ccaccc 96

<210> 110

<211> 105

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#24 Trp53 allele 1 sequence(figure 5)

<400> 110

cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgtatc ccgagtatct ggaagacagg 60

cagacttttc gccacagcgt ggtggtacct tatgagccac ccgag 105

<210> 111

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0#24 Trp53 allele 2 sequence(figure 5)

<400> 111

cctccccagc atcttatccg ggtggaagga aatttgtatc ccgagtatct ggaagacagg 60

cagacttttc gccacagctt atgagccacc cgag 94

<210> 112

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Prkdc targeting region wt sequences

<400> 112

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60

cagaaggtta tgcatt 75

<210> 113

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #2 Prkdc allele 1 sequences(mutant)

<400> 113

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60

cagaaggtta tgcatt 75

<210> 114

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #2 Prkdc allele 2 sequences(mutant)

<400> 114

tttcgtgatt tagagaagaa gccctaaagt ttttatgtgt tttcttagag aaaattgacc 60

agaaggttat gcat 74

<210> 115

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #2 Prkdc allele 3 sequences(mutant)

<400> 115

tttcgtgatt tagagaagaa gccctaaagt ttttatgtgt tttcttagag aaaattgatg 60

gatg 64

<210> 116

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #6 Prkdc allele 1 sequences(mutant)

<400> 116

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60

cagaaggtta tgcatt 75

<210> 117

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #6 Prkdc allele 2 sequences(mutant)

<400> 117

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60

cagattatgc at 72

<210> 118

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #7 Prkdc allele 1 sequences(mutant)

<

400> 118

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60

cagaaggtta tgcatt 75

<210> 119

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #7 Prkdc allele 2 sequences(mutant)

<400> 119

tttcgtttat gcat 14

<210> 120

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #7 Prkdc allele 3 sequences(mutant)

<400> 120

gagaagaagc cctaaagttt ttatgtgttt tctt 34

<210> 121

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #8 Prkdc allele 1 sequences(mutant)

<400> 121

tttcgtgga gagaagaagc cctaaagttt ttatgtgttt tcttagagaa aattgaccag 60

aaggttatgc at	72
<210> 122	
<211> 74	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> F0 #8 Prkdc allele 2 sequences(mutant)	
<400> 122	
tttcgtgatg tagagaagaa gccctaaagt ttttatgtgt tttcttagag aaaattgacc	60
agaaggttat gcat	74
<210> 123	
<211> 75	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> F0 #9 Prkdc allele 1 sequences(mutant)	
<400> 123	
tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac	60
cagaaggtta tgcatt	75
<210> 124	
<211> 5	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> F0 #9 Prkdc allele 2 sequences(mutant)	
<400> 124	
tatac	5
<210> 125	
<211> 75	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> F0 #10 Prkdc allele 1 sequences(mutant)	
<400> 125	
tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac	60
cagaaggtta tgcatt	75
<210> 126	

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #10 Prkdc allele 2 sequences(mutant)

<400> 126

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattatg 60

cat 63

<210> 127

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #12 Prkdc allele 1 sequences(mutant)

<400> 127

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60

cagaaggtta tgcatt 75

<210> 128

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #12 Prkdc allele 2 sequences(mutant)

<400> 128

tttcgtgtag agaagaagcc ctaaagtttt tatgtgtttt cttagagaaa atgaccaga 60

aggttatgca t 71

<210> 129

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #13 Prkdc allele 1 sequences(mutant)

<400> 129

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60

cagaaggtta tgcatt 75

<210> 130

<211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0 #13 Prkdc allele 2 sequences(mutant)
 <400> 130
 ttctgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60
 agaaggttat gcat 74
 <210> 131
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0 #16 Prkdc allele 1 sequences(mutant)
 <400> 131
 ttctgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60
 cagaaggtta tgcatt 75
 <210> 132
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0 #16 Prkdc allele 2 sequences(mutant)
 <400> 132
 ttctgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60
 caggttatgc at 72
 <210> 133
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F0 #17 Prkdc allele 1 sequences(mutant)
 <400> 133
 ttctgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60
 cagaaggtta tgcatt 75
 <210> 134
 <211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #17 Prkdc allele 2 sequences(mutant)

<400> 134

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60

agaaggttat gcat 74

<210> 135

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #18 Prkdc allele 1 sequences(mutant)

<400> 135

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60

cagaaggtta tgcatt 75

<210> 136

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #18 Prkdc allele 2 sequences(mutant)

<400> 136

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60

cagttatgca t 71

<210> 137

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #19 Prkdc allele 1 sequences(mutant)

<400> 137

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60

cagaaggtta tgcatt 75

<210> 138

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #19 Prkdc allele 2 sequences(mutant)

<400> 138

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60

caggttatgc at 72

<210> 139

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #19 Prkdc allele 3 sequences(mutant)

<400> 139

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60

cagatatgca t 71

<210> 140

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #21 Prkdc allele 1 sequences(mutant)

<400> 140

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60

cagaaggtta tgc at 75

<210> 141

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #21 Prkdc allele 2 sequences(mutant)

<400> 141

agaagaagcc ctaaagtttt tatgtgtttt cttagagaaa attgacaagg ttatgcat 58

<210> 142

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #21 Prkdc allele 3 sequences(mutant)

<400> 142

agaagaagcc ctaaagtttt tatgtgtttt cttagagaaa attggcaagg ttatgc 56

<210> 143

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #22 Prkdc allele 1 sequences(mutant)

<400> 143

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60

cagaaggtta tgcatt 75

<210> 144

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #22 Prkdc allele 2 sequences(mutant)

<400> 144

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattatg 60

cat 63

<210> 145

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #23 Prkdc allele 1 sequences(mutant)

<400> 145

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60

cagaaggtta tgcatt 75

<210> 146

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #23 Prkdc allele 2 sequences(mutant)

<400> 146

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg tttt	44
<210> 147	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> F0 #23 Prkdc allele 3 sequences(mutant)	
<400> 147	
gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttatg cat	43
<210> 148	
<211> 75	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> F0 #25 Prkdc allele 1 sequences(mutant)	
<400> 148	
tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac	60
cagaaggtta tgcatt	75
<210> 149	
<211> 72	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> F0 #25 Prkdc allele 2 sequences(mutant)	
<400> 149	
tttcgttgta gagaagaagc cctaaagttt ttatgtgttt tcttagagaa aattgaccag	60
aaggttatgc at	72
<210> 150	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> F0 #25 Prkdc allele 3 sequences(mutant)	
<400> 150	
tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttctt	47
<210> 151	
<211> 75	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #26 Prkdc allele 1 sequences(mutant)

<400> 151

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60

cagaaggtta tgcatt 75

<210> 152

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #26 Prkdc allele 2 sequences(mutant)

<400> 152

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60

cagaaggatat gcat 74

<210> 153

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #28 Prkdc allele 1 sequences(mutant)

<400> 153

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60

cagaaggtta tgcatt 75

<210> 154

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #28 Prkdc allele 2 sequences(mutant)

<400> 154

tttcgtgatt gttagagccc taaagttttt atgtgttttc ttagagaaaa ttgaccagaa 60

ggttatgcat 70

<210> 155

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #29 Prkdc allele 1 sequences(mutant)

<400> 155

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60

cagaaggtta tgcatt 75

<210> 156

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #29 Prkdc allele 2 sequences(mutant)

<400> 156

agaagaagcc ctaaagtttt tatgtgtttt cttagagaaa attgacagaa ggttatgcat 60

60

<210> 157

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #30 Prkdc allele 1 sequences(mutant)

<400> 157

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60

cagaaggtta tgcatt 75

<210> 158

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #30 Prkdc allele 2 sequences(mutant)

<400> 158

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttctta 48

<210> 159

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #31 Prkdc allele 1 sequences(mutant)

<400> 159

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60

cagaaggtta tgca 74

<210> 160

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F0 #31 Prkdc allele 2 sequences(mutant)

<400> 160

tttcgtgatt gtagagaaga agccctaaag tttttatgtg ttttcttaga gaaaattgac 60

caggttatgc at 72