(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0040116
(43) 공개일자 2018년04월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/63 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)
C12N 15/82 (2006.01) *C12N 9/22* (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/63 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0131554
(22) 출원일자 2017년10월11일
심사청구일자 2017년10월11일
(30) 우선권주장
1020160131495 2016년10월11일 대한민국(KR)

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
조성경
서울특별시 서대문구 연희로 38-20 연희대우아파트 106동 1303호
유시인
대구광역시 동구 팔공로 27길 25-3
이병하
서울특별시 마포구 성암로 91, 103동 705호 (중동, 현대아파트)
(74) 대리인
윤대웅, 공병욱

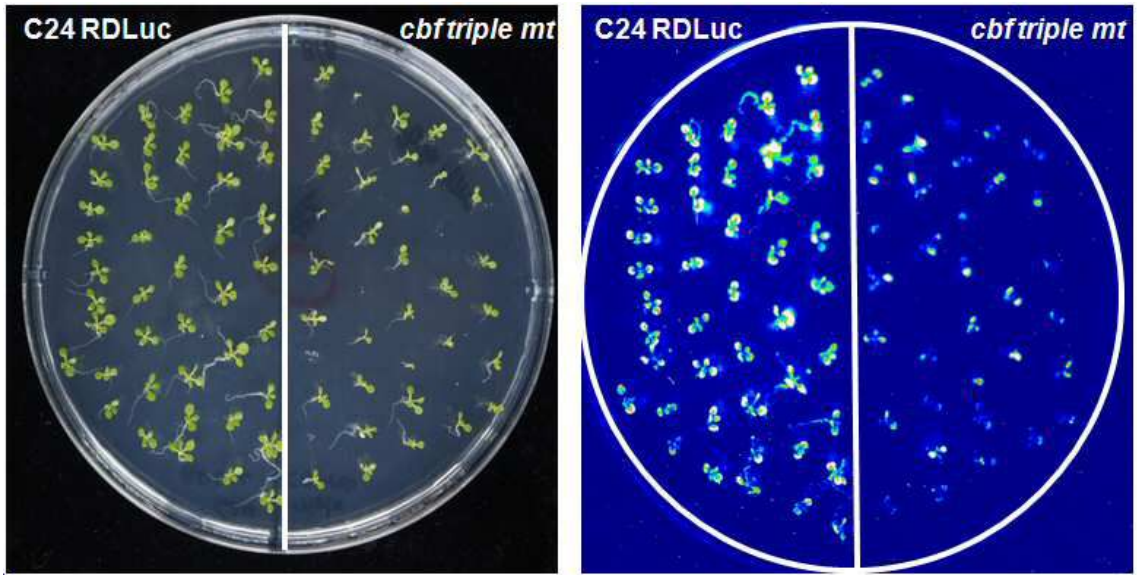
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **저온 스트레스 저항성 유전자의 스크리닝 방법**

(57) 요 약

본 발명은 저온 스트레스 저항성 유전자의 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 리포터 유전자를 도입한 CBF1, CBF2 및 CBF3의 삼중 돌연변이체를 이용한 저온 스트레스 저항성 유전자의 스크리닝 방법에 관한 것으로, 본 발명의 스크리닝 방법을 이용하면 CBF 독립적인 저온 스트레스 신호전달 돌연변이체를 선별할 수 있으므로 CBF 독립적인 저온 스트레스 저항성 유전자를 스크리닝할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류
C12N 15/8273 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
C12Q 1/6895 (2013.01)
C12Q 2549/113 (2013.01)
C12Q 2600/13 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ011006
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 국립농업과학원
연구사업명 생명공학 실용화 기술 공동연구-차세대바이오그린 21 농생물게놈활용연구사업
연구과제명 Small RNA 매개 환경스트레스 저항성 기작 연구를 통한 배추과 작물의 농업적 개선 기반 구축 연구
기 여 율 50/100
주관기관 서강대학교
연구기간 2015.01.15 ~ 2017.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014R1A1A2058769
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 일반연구자지원사업-기본연구지원사업
연구과제명 식물 저온신호전달 네트워크의 확장
기 여 율 50/100
주관기관 서강대학교
연구기간 2014.11.01 ~ 2017.04.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 저온 스트레스 저항성 유전자의 스크리닝 방법:

CBF1, CBF2 및 CBF3 삼중 돌연변이체를 제조하는 돌연변이 제조 단계;

상기 삼중 돌연변이체 중 저온 스트레스 저항성 특성을 나타내는 개체를 선별하는 개체 선별 단계; 및

선별된 개체로부터 높은 활성을 나타내는 유전자를 스크리닝하는 유전자 스크리닝 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 돌연변이 제조 단계는,

서열번호 4의 염기서열로 이루어진 핵산 서열;

Cas9 단백질을 코딩하는 핵산 서열; 및

서열번호 5의 염기서열로 이루어진 핵산 서열;

을 식물에 도입하는 단계를 포함하는 것인, 저온 스트레스 저항성 유전자의 스크리닝 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 돌연변이 제조 단계는,

저온 스트레스 반응성 프로모터를 코딩하는 핵산 서열 및 상기 프로모터에 작동가능하도록 연결된 리포터 유전자를 코딩하는 핵산 서열을 식물에 도입하는 리포터 유전자 도입 단계를 추가적으로 포함하는 것인, 저온 스트레스 저항성 유전자의 스크리닝 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 유전자 스크리닝 단계는,

리포터 유전자의 발현량이 증가한 개체로부터 유전자를 스크리닝하는 것인, 저온 스트레스 저항성 유전자의 스크리닝 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 리포터 유전자는 발광단백질 또는 형광단백질을 발현하는 것인, 저온 스트레스 저항성 유전자의 스크리닝 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 CBF1, CBF2 및 CBF3은 애기장대(Arabidopsis)로부터 유래한 것인, 저온 스트레스 저항성 유전자의 스크리닝 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 삼중 돌연변이체는,

서열번호 1의 267 내지 642번째 염기가 결실된 a 서열;

서열번호 3의 1 내지 310 번째 염기가 결실된 b 서열; 및

서열번호 2의 246 내지 309번째 염기가 결실된 c 서열;

을 포함하고,

상기 a 서열과 b 서열은 직접 연결된 것인,

저온 스트레스 저항성 유전자의 스크리닝 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 삼중 돌연변이체는,

서열번호 1의 267 내지 642번째 염기가 결실된 a 서열;

서열번호 3의 1 내지 310 번째 염기가 결실된 b 서열; 및

서열번호 2의 246 내지 309번째 염기가 결실된 c 서열;

을 포함하고,

상기 a 서열과 b 서열 사이에 서열번호 16으로 표시되는 핵산 서열이 삽입된 것인,

저온 스트레스 저항성 유전자의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 저온 스트레스 저항성 조절 유전자의 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 리포터 유전자를 도입한 CBF1, CBF2 및 CBF3의 삼중 돌연변이체를 이용하여 저온 환경에서 높은 활성을 나타내는 유전자를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 저온 스트레스는 식물의 발달 및 생식에 부정적인 영향을 미치는 주요 비생물적 스트레스(abiotic stress)이다. 그러나 식물은 얼어 죽지 않을 정도로 춥지 않은 온도에 노출되었을 때의 추운 온도를 견디기 위한 메카니즘을 발달시켜왔고, 이를 저온 순화라고 한다. 저온 순화 동안에는 식물이 저온 스트레스를 견딜 수 있도록 분자적으로 조정하는 식물의 저온 저항성 유전자(cold responsive, COR)의 발현이 증가한다.

[0003] COR 유전자 발현의 주요한 신호 경로는 CBF(C-repeat/DRE-Binding Factor) 신호 경로이다. CBF 유전자는 유전자 발현을 촉진하는 전사인자로, 에틸린 반응성 유전자 조절 전사 인자(ethylene-responsive element-binding factor, ERF)와 꽃기관 발달 전사 인자인 AP2(APETALA 2) 단백질에서 발견되는 보존된 DNA-결합 도메인을 가지고 있다.

[0004] 애기장대(Arabidopsis)는 4개의 CBF 유전자를 가지고 있다. 이 중 CBF1, CBF2, CBF3은 저온에 의해 유도되는 것이나, 건조 및 고염도(high-salinity) 스트레스에 의해서는 유도되지 않는다. 반면에, CBF4 유전자의 발현은 가뭄 스트레스에 의해 발현이 증가하지만, 저온 조건에서는 그렇지 않다. 따라서, CBF1, CBF2, CBF3 (이하 3개 유전자를 총괄해서 부를 시 CBF)만이 저온 스트레스 저항 유전자 조절에 관여한다.

[0005] CBF 유전자는 저온 스트레스 초기에 발현되어 많은 COR 유전자의 발현을 조절한다. 저온 스트레스하에서 CBF 유전자의 중심적인 역할은, 저온 스트레스 저항성의 증가를 보이는 CBF 과발현 식물 및 저온 스트레스 저항성의 감소를 보이는 안티센스 구조를 이용하는 CBF 결실 식물로 인하여 입증된다. 그러나 저온 스트레스하에서 작동하는 CBF-독립적 신호 경로가 존재하고 저온 관련 CBF 유전자의 전체 결실 돌연변이체가 없어 상기 경로는 완전히 연구되지 못했다.

[0006] CBF1, CBF2 및 CBF3 유전자는 각각 약 700 염기쌍의 작은 엑손을 가지며, 애기장대의 4번째 염색체상에 7.5k 염기쌍 내에서 가깝게 정렬되어 존재한다. 나란히 배열된 이 작은 유전자들의 위치 때문에 단일 식물 내에서의 다중 돌연변이체를 유전적 교배로 확보하기 어렵다. 최근 개발된 유전자 편집 기술인 CRISPR/Cas(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated) 시스템의 이용에 의하여, CBF 유전자들은 개별적으로 표적이 되어 CBF 부위의 전체 결실 및 CBF 다중 돌연변이체 확보도 가능하게 되었다.

[0007] CRISPR/Cas 시스템은 표적 유전정보의 편집을 위한 새로운 기술이다. CRISPR/Cas 시스템은 외래 핵산으로부터 자신을 방어하기 위한 원핵생물(prokaryotes)의 적응면역체계로 처음 연구되었다. 이전의 다른 TALEN(transcription activator-like effector nuclease) 및 징크 핑거 뉴클레아제(zinc finger nucleases,

ZFN)와 같은 방법들은 유전정보의 변형을 발생시킬 수 있으나, CRISPR/Cas 시스템은 연구자들에게 있어 더욱 강력하고 쉽게 유전자 편집을 가능하게 한다.

[0008] CRISPR/Cas 시스템은 정교한 설계 또는 DNA-결합 단백질의 집합을 필요로 하지 않고 핵산을 합성하여 변형시키기 위한 벡터 DNA를 생성할 수 있다. 합성된 핵산은 작은 가이드 RNA(small guide RNA; sgRNA)가 되고, 단일 엔도뉴클레아제인 Cas9를 표적 사이트로 가이드한다. 엔도뉴클레이즈 Cas9이 이중가닥 브레이크를 형성하면, 상동 재조합(homologous recombination, HR) 또는 NHEJ(error-prone non-homologous end) 메카니즘에 의해 복원될 수 있다.

[0009] NHEJ 메카니즘은 식물의 주요 이중가닥 복원 경로로 알려져 있다. NHEJ는 DNA 수선 과정 중 불완전한 수선을 종종 할 수 있는데, 이 때문에 CRISPR/Cas에 의해 표적된 부위에 돌연변이를 야기할 수 있다. 또한, 복수 표적부위를 사용하면 해당 DNA 부위가 결실이 일어나는 돌연변이를 기대할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 저온 스트레스 반응성 프로모터에 연결된 루시퍼레이즈(luciferase) 리포터 유전자를 가지고 있는 식물체에 저온 스트레스 저항성 유전자 전사인자인 CBF1, CBF2 및 CBF3이 결실된 돌연변이체를 제작하였고, 이를 이용하여 저온 스트레스 반응성 루시퍼레이즈 리포터 유전자로, CBF 독립적인 저온 신호의 변화 시 이를 시각화 할 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0011] 따라서 본 발명의 목적은, CBF1, CBF2 및 CBF3 삼중 돌연변이체를 제조하는 돌연변이 제조 단계; 상기 돌연변이체 중 저온 스트레스 저항성 특성을 나타내는 개체를 선별하는 개체 선별 단계; 및 선별한 개체로부터 높은 활성을 나타내는 유전자를 스크리닝하는 유전자 스크리닝 단계;를 포함하는 저온 스트레스 저항성 유전자의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 저온 스트레스 저항성 유전자의 스크리닝 방법에 관한 것으로서, CBF1, CBF2 및 CBF3 삼중 돌연변이체를 제조하는 돌연변이 제조 단계; 상기 삼중 돌연변이체 중 저온 스트레스 저항성 특성을 나타내는 개체를 선별하는 개체 선별 단계; 및 선별한 개체로부터 높은 활성을 나타내는 유전자를 스크리닝하는 유전자 스크리닝 단계;를 포함한다.

[0013] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0014] 본 발명의 일 양태는 다음의 단계를 포함하는 저온 스트레스 저항성 유전자의 스크리닝 방법이다:

[0015] CBF1, CBF2 및 CBF3 삼중 돌연변이체를 제조하는 돌연변이 제조 단계;

[0016] 상기 삼중 돌연변이체 중 저온 스트레스 저항성 특성을 나타내는 개체를 선별하는 개체 선별 단계; 및

[0017] 선별된 개체로부터 높은 활성을 나타내는 유전자를 스크리닝하는 유전자 스크리닝 단계.

[0018] 본 명세서상의 용어 "저온"은 식물의 생육이 저하되는 온도 조건을 의미하고, 0 내지 4℃일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0019] 본 명세서상의 용어 "저온 스트레스 저항성 유전자"는 저온 조건 하에서 식물의 생육이 저하되는 것을 억제함으로써 식물이 높은 생존율을 나타낼 수 있도록 작용하는 유전자를 의미한다.

[0020] 저온 스트레스 저항성 유전자는 본 발명의 명세서에 기재된 CBF1, CBF2 및 CBF3일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 상기 돌연변이 제조 단계는,

[0022] CBF1 및 CBF2 단백질을 코딩하는 핵산 서열에 특이적인 가이드 RNA(small guide RNA; sgRNA)를 코딩하는, 서열번호 4로 표시되는 핵산 서열;

[0023] Cas9 단백질을 코딩하는 핵산 서열; 및

[0024] CBF2 및 CBF3 단백질을 코딩하는 핵산 서열에 특이적인 sgRNA를 코딩하는 서열번호 5로 표시되는 핵산 서열;

[0025] 을 식물에 도입하는 단계일 수 있다.

[0026] 상기 돌연변이 제조 단계에서, 서열번호 4로 표시되는 핵산 서열, Cas9 단백질을 코딩하는 핵산 서열, 서열번호 5로 표시되는 핵산 서열은 재조합 벡터(vector)에 포함되어 식물에 도입되는 것일 수 있다.

[0027] 본 명세서상의 용어 "벡터"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파아지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함한다. 상기 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예를 들면, λgt4λB, λ-Charon, λ△z1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예를 들면, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0028] 상기 재조합 벡터는, 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.

[0029] 상기 재조합 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 사용되는 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예를 들어, pL^{λ} 프로모터, CMV 프로모터, *trp* 프로모터, *lac* 프로모터, *tac* 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 벡터에 포함되는 진핵 세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 *tk* 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

[0030] 본 발명의 일 예에서, 재조합 벡터를 숙주세포에 삽입함으로써 형질전환체를 만들 수 있으며, 상기 형질전환체는 상기 재조합 벡터를 적절한 숙주 세포에 도입시킴으로써 얻어진 것일 수 있다.

[0031] 상기 숙주세포는 상기 발현벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 또는 발현시킬 수 있는 세포로서 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있다.

[0032] 본 발명에서 사용된 숙주세포로는 대장균, 효모, 동물세포, 식물세포, 또는 곤충세포 등을 포함할 수 있으며, 원핵세포로는, 예를 들어, E. coli JM109, E. coli BL21, E. coli RR1, E. coli LE392, E. coli B, E. coli X 1776, E. coli W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 츄린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있으며, 진핵 세포에 형질 전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 효모(Saccharomyce cerevisiae), 곤충 세포, 식물 세포 및 동물 세포, 예를 들어, Sp2/0, CHO(Chinese hamster ovary) K1, CHO DG44, PER.C6, W138, BHK, COS7, 293, HepG2, Huh7, 3T3, RIN, MDCK 세포주 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 이를 포함하는 재조합 벡터의 숙주 세포 내로의 운반(도입)은, 당업계에 널리 알려진 운반 방법을 사용할 수 있다. 상기 운반 방법은 예를 들어, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, $CaCl_2$ 방법 또는 전기 천공 방법 등을 사용할 수 있고, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포좀매개 형질감염법 및 유전자 밤바드먼트 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.

[0034] 상기 형질 전환된 숙주 세포를 선별하는 방법은 선택 표지에 의해 발현되는 표현형을 이용하여, 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 용이하게 실시할 수 있다. 예를 들어, 상기 선택 표지가 특정 항생제 내성 유전자인 경우에는, 상기 항생제가 함유된 배지에서 형질전환체를 배양함으로써 형질전환체를 용이하게 선별할 수 있다.

[0035] 상기 재조합 벡터는 아그로박테리움(Agrobacterium) 바이너리 벡터일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 본 명세서상의 용어 "바이너리 벡터"는 Ti(tumor inducible) 플라스미드에서 이동에 필요한 부분인 LB(left border)와 RB(right border)를 가지는 플라스미드와 타겟 뉴클레오타이드를 옮기는데 필요한 유전자를 가진 플

라스미드를 두 개로 나누어 놓은 벡터를 말한다.

[0037] 본 발명의 재조합 벡터를 아그로박테리움에 도입하는 방법은 당업자에게 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있으며, 입자 충격법(particle bombardment), 전기천공법(electroporation), 형질감염법(transfection), 리튬 아세테이트법(lithium acetate method) 및 열충격법(heat shock)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법을 이용하여 수행할 수 있다.

[0038] 상기 돌연변이 제조 단계는,

[0039] 저온 스트레스 반응성 프로모터를 코딩하는 핵산 서열 및 상기 프로모터에 작동가능하도록 연결된 리포터 유전자를 코딩하는 핵산 서열을 식물에 도입하는 리포터 유전자 도입 단계를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.

[0040] 본 명세서상의 용어 "작동가능하도록 연결된"은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 발현을 조절하게 된다.

[0041] 상기 식물은 애기장대(Arabidopsis thaliana)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 상기 식물을 형질전환시키기 위하여 외래성 폴리뉴클레오티드를 플라스미드나 바이러스 등과 같은 벡터 등의 운반체에 삽입할 수 있고, 아그로박테리움 박테리아를 매개체로 사용할 수 있으며, 직접 외래성 폴리뉴클레오티드를 식물 세포내로 도입시켜 식물을 형질전환시킬 수 있다. 예를 들어, 아그로박테리움 박테리아를 매개체로 사용하는 화아침지법을 이용하여 도입시킬 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0043] 상기 아그로박테리움 박테리아는 아그로박테리움 투메페이시언스(Agrobacterium tumefaciens)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 본 명세서상의 용어 “식물”은 성숙한 식물뿐만 아니라 성숙한 식물로 발육할 있는 식물 세포, 식물 조직 및 식물의 종자 등을 모두 포함하는 의미로서 사용된다.

[0045] 상기 유전자 스크리닝 단계는, 리포터 유전자의 발현량이 증가한 개체로부터 유전자를 스크리닝하는 것일 수 있다.

[0046] 상기 저온 스트레스 반응성 프로모터는 RD29A 프로모터일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0047] 상기 리포터 유전자는 발광단백질 또는 형광단백질을 발현하는 것일 수 있다.

[0048] 상기 발광단백질은 루시퍼레이즈(luciferase)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0049] 상기 형광단백질은 녹색 형광단백질(GFP, Green Fluorescent Protein), 황색 형광단백질(YFP, Yellow Fluorescent Protein), 청록 형광단백질(CFP, Cyan Fluorescent Protein), 주황 형광단백질(OFP, Orange Fluorescent Protein) 및 붉은 형광단백질(RFP, Red Fluorescent Protein)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0050] 상기 CBF1, CBF2 및/또는 CBF3은 애기장대(Arabidopsis)로부터 유래한 것일 수 있다.

[0051] 상기 CBF1, CBF2 및 CBF3 삼중 돌연변이체는 CBF1의 일부 결실; CBF2의 일부 결실; 및 CBF3의 일부 또는 전체 결실에 의해 제조될 수 있다.

[0052] 본 발명의 스크리닝 방법에 있어서, CBF1, CBF2 및/또는 CBF3 유전자에서 결실이 발생한 세포 또는 유기체에서는 저온 스트레스 저항성 특성이 감소하고, 이에 저온 신호에 반응하는 프로모터에 연결된 리포터 유전자의 발현이 감소할 것으로 예측할 수 있다.

[0053] 따라서 추가적인 임의의 돌연변이를 제조함으로써, CBF 유전자 결실로 인해 감소된 리포터 유전자의 발현이 증가하여 저온 스트레스 저항성 유전자의 발현이 증가함을 나타내는 돌연변이 개체가 있을 경우, 최종적으로 이를 선별하면 CBF 독립적으로 저온 스트레스 저항성 유전자 발현을 조절하여 저온 스트레스 저항성에 관여하는 유전자를 스크리닝할 수 있다.

[0054] CBF 유전자는 애기장대 4번 염색체에 CBF2-CBF3-CBF1 순으로, 단백질 암호화는 역방향으로 배열되어있다. 따라서, 단백질 암호화 방향으로 CBF를 배열하면, 5'-CBF1-CBF3-CBF2-3'로 배열할 수 있다.

[0055] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 삼중 돌연변이체는,

[0056] 서열번호 1의 267 내지 642번째 염기가 결실된 a 서열;

[0057] 서열번호 3의 1 내지 310 번째 염기가 결실된 b 서열; 및

[0058] 서열번호 2의 246 내지 309번째 염기가 결실된 c 서열;

[0059] 을 포함하고,

[0060] 상기 a 서열과 b 서열은 직접 연결된 것일 수 있다.

[0061] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 삼중 돌연변이체는,

[0062] 서열번호 1의 267 내지 642번째 염기가 결실된 a 서열;

[0063] 서열번호 3의 1 내지 310 번째 염기가 결실된 b 서열; 및

[0064] 서열번호 2의 246 내지 309번째 염기가 결실된 c 서열;

[0065] 을 포함하고,

[0066] 상기 a 서열과 b 서열 사이에 서열번호 16으로 표시되는 핵산 서열이 삽입된 것일 수 있다.

발명의 효과

[0067] 본 발명은 저온 스트레스 저항성 유전자의 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 상기 스크리닝 방법을 이용하면 CBF 유전자 독립적인 저온 스트레스 신호전달 돌연변이체를 선별할 수 있으므로, 선별된 저온 스트레스 신호전달 돌연변이체를 이용하여 CBF 독립적인 저온 스트레스 저항성 유전자를 스크리닝할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0068] 도 1a는 CBF1, CBF2 및 CBF3의 sgRNA 설계를 위해 CBF1 및 CBF2 코딩 시퀀스(CDS)를 정렬 프로그램 coffee-T 및 clustal-W을 이용하여 나타낸 그림이다.

도 1b는 CBF1, CBF2 및 CBF3의 sgRNA 설계를 위해 CBF2 및 CBF3 코딩 시퀀스(CDS)를 정렬 프로그램 coffee-T 및 clustal-W을 이용하여 나타낸 그림이다.

도 1c는 애기장대 유전체 4번째 염색체상의 sgRNA 표적 위치를 나타낸 모식도이다.

도 1d는 sgRNA12의 가능한 비표적 시퀀스를 CRISPR-P 프로그램으로 분석한 결과이다.

도 1e는 sgRNA23의 가능한 비표적 시퀀스를 CRISPR-P 프로그램으로 분석한 결과이다.

도 2a는 이중 sgRNA-Cas9 컨스트럭트의 조합을 위해 단일 sgRNA 및 Cas9 컨스트럭트의 구축을 나타낸 모식도이다.

도 2b는 이중 sgRNA 및 Cas9 컨스트럭트를 위한 sgRNA의 PCR 증폭을 나타낸 모식도이다.

도 2c는 이중 sgRNA 및 Cas9 컨스트럭트의 구축을 나타낸 모식도이다.

도 2d는 식물 발현 벡터 pCAMBIA1300으로의 sgRNA 및 Cas9 컨스트럭트 서브클로닝을 나타낸 모식도이다.

도 3a는 CBF를 표적하는 이중 sgRNA-Cas9 컨스트럭트를 PCR을 통해 확인한 결과이다.

도 3b는 CBF를 표적하는 이중 sgRNA-Cas9 컨스트럭트에 대한 제한 효소로의 절단을 PCR을 통해 확인한 결과이다.

도 3c는 CBF를 표적하는 이중 sgRNA-Cas9 컨스트럭트로부터 시퀀싱을 통해 sgRNA 삽입 시퀀스를 확인한 결과이다.

도 4는 형질전환된 T1 개체군 중에서의 하이그로마이신-저항성 T1 식물체를 나타내는 사진이다.

도 5a는 하이그로마이신-저항성 T1 식물에서의 sgRNA-Cas9 컨스트럭트를 확인하기 위한 sgRNA12의 PCR 결과이다.

도 5b는 하이그로마이신-저항성 T1 식물에서의 sgRNA-Cas9 컨스트럭트를 확인하기 위한 Cas9의 PCR 결과이다.

도 5c는 하이그로마이신-저항성 T1 식물에서의 sgRNA-Cas9 컨스트럭트를 확인하기 위한 sgRNA23의 PCR

결과이다.

도 5d는 하이그로마이신-저항성 T1 식물에서의 sgRNA-Cas9 컨스트럭트를 확인하기 위한 프라이머를 정렬한 모식도이다.

도 6a는 CRISPR/Cas 시스템에 의해 제작된 동형접합체(Homozygotic) cbf 삼중 돌연변이의 확인에 이용된 CBF 삼중 돌연변이체 C24RDLUC T2 #50-35의 PCR 확인을 나타낸 모식도이다. (첫째 줄은 C24RDLUC T2 #50-35의 CBF1 sgRNA12 및 CBF3 sgRNA23 사이에서의 결실, 둘째 줄은 C24RDLUC T2 #50-35의 CBF1 5' UTR 지역, 셋째 줄은 C24RDLUC T2 #50-35의 65 염기쌍이 결실된 CBF2 sgRNA12 및 CBF2 sgRNA23 사이의 결실, 마지막 줄은 분리되어 C24RDLUC T2 #50-35에 제시되지 않는 Cas9)

도 6b는 C24RDLUC T2 #50-35의 결실을 확인한 시퀀싱 결과이다.

도 6c는 C24RDLUC T2 #50-35의 결실 발생을 나타낸 모식도이다.

도 7은 C24RDLUC T2 #50-35를 저온에서 배양하였을 때 야생형과 대비하여 루시퍼레이즈의 발현 정도를 비교한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0069] 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.

[0071] **실시예 1. CBF1, CBF2 및 CBF3에 대한 sgRNA의 선택**

[0072] CBF 유전자는 서로 유사한 DNA 시퀀스와 기능을 가지고 있다. CBF 유전자의 삼중 돌연변이 및 가능하다면 이중 및 단일 돌연변이도 생성하기 위해서, 가능하면 많은 위치(site)를 표적으로 하는 sgRNA를 필요로 하였다.

[0073] 다중 표적 sgRNA의 선택을 위해서 CBF1, CBF2 및 CBF3의 정렬에 다중 정렬(alignment) 소프트웨어인 coffee-T 및 clustal W를 이용하였다. sgRNA의 표적 시퀀스는 회문성의 인접 모티프(Palindromic Adjacent Motif, PAM) 시퀀스(5'-NGG-3') 직전의 19개 염기서열이다. PAM 시퀀스는 sgRNA에 부분적으로 포함되지 않는다. 상기 CBF1, CBF2 및 CBF3를 코딩하는 핵산 서열은 하기 표 1과 같다.

표 1

[0074]

서열 번호	명칭	서열(5'-3')
1	CBF1	ATGAACTCATTTTCAGCTTTTTCTGAAATGTTTGGCTCCGATTACGAGCCTCAAGGCGGAGATTATTGTCCGACGTTGGCCACGAGTT GTCCGAAGAAACCGGCGGGCCGTAAGAAGTTTCGTGAGACTCGTCACCCAATTTACAGAGGAGTTCGTCAAAGAAACTCCGGTAAGTG GGTTTCTGAAGTGAGAGAGCCAAACAAGAAAACCAGGATTTGGCTCGGGACTTTCCAAACCGCTGAGATGGCAGCTCGTGCTCACGAC GTCGCTGCATTAGCCCTCCGTGGCCGATCAGCATGTCTCAACTTCGCTGACTCGGCTTGGCGGCTACGAATCCCGGAGTCAACATGCG CCAAGGATATCCAAAAAGCGGCTGCTGAAGCGGCGTTGGCTTTTCAAGATGAGACGTGTGATACGACGACCACGAATCATGGCCTGGA CATGGAGGAGACGATGGTGGAAGCTATTTATACACCGGAACAGAGCGAAGGTGCGTTTTATATGGATGAGGAGACAATGTTTGGGATG CCGACTTTGTTGGATAATATGGCTGAAGGCATGCTTTTACCGCCGCCGTCTGTTCAATGGAATCATAATTATGACGGCGAAGGAGATG GTGACGTGTCGCTTTGGAGTTACTAA
2	CBF2	ATGAACTCATTTTCTGCCTTTTCTGAAATGTTTGGCTCCGATTACGAGTCTCCGGTTTCCTCAGGCGGTGATTACAGTCCGAAGCTTG CCACGAGCTGCCCCAAGAAACCAGCGGGAAGGAAGAAGTTTCGTGAGACTCGTCACCCAATTTACAGAGGAGTTCGTCAAAGAAACTC CGGTAAGTGGGTGTGTGAGTTGAGAGAGCCAAACAAGAAAACGAGGATTTGGCTCGGGACTTTCCAAACCGCTGAGATGGCAGCTCGT GCTCACGACGTCGCCGCCATAGCTCTCCGTGGCAGATCTGCCTGTCTCAATTTCGCTGACTCGGCTTGGCGGCTACGAATCCCGGAAT CAACCTGTGCCAAGGAAATCCAAAAGGCGGCGGCTGAAGCCGCGTTGAATTTTCAAGATGAGATGTGTCATATGACGACGGATGCTCA TGGTCTTGACATGGAGGAGACCTTGGTGGAGGCTATTTATACGCCGGAACAGAGCCAAGATGCGTTTTATATGGATGAAGAGGCGATG TTGGGGATGTCTAGTTTGTTGGATAACATGGCCGAAGGGATGCTTTTACCGTCGCCGTCGGTTCAATGGAACTATAATTTTGATGTCG AGGGAGATGATGACGTGTCCTTATGGAGCTATTAA
3	CBF3	ATGAACTCATTTTCTGCTTTTTCTGAAATGTTTGGCTCCGATTACGAGTCTTCGGTTTCCTCAGGCGGTGATTATATTCCGACGCTTG CGAGCAGCTGCCCCAAGAAACCGGCGGGTCGTAAGAAGTTTCGTGAGACTCGTCACCCAATATACAGAGGAGTTCGTCGGAGAAACTC CGGTAAGTGGGTTTGTGAGGTTAGAGAACCAAACAAGAAAACAAGGATTTGGCTCGGAACATTTCAAACCGCTGAGATGGCAGCTCGA GCTCACGACGTTGCCGCTTTAGCCCTTCGTGGCCGATCAGCCTGTCTCAATTTCGCTGACTCGGCTTGGAGACTCCGAATCCCGGAAT CAACTTGCGCTAAGGACATCCAAAAGGCGGCGGCTGAAGCTGCGTTGGCGTTTCAGGATGAGATGTGTGATGCGACGACGGATCATGG CTTCGACATGGAGGAGACGTTGGTGGAGGCTATTTACACGGCGGAACAGAGCGAAAATGCGTTTTATATGCACGATGAGGCGATGTTT GAGATGCCGAGTTTGTTGGCTAATATGGCAGAAGGGATGCTTTTGCCGCTTCCGTCCGTACAGTGGAATCATAATCATGAAGTCGACG GCGATGATGACGACGTATCGTTATGGAGTTATTAA

[0076] 도 1a 및 1b와 같이, 다중 부위를 표적으로 하기 위해 CBF1, CBF2 및 CBF2, CBF3에서 PAM 시퀀스 및 sgRNA 시퀀스가 같은 두 시퀀스를 선택하였다. 박스는 선택된 sgRNA12 시퀀스를 보여주고 *은 CBF1 및 CBF2 사이의 동일한 시퀀스를 나타낸다.

[0077] 도 1c와 같이, 두 개의 sgRNA는 CBF1 및 CBF2를 표적하는 것을 서열번호 4로 표시되는 핵산 서열로 코딩되는 sgRNA12, CBF2 및 CBF3을 표적하는 것을 서열번호 5로 표시되는 핵산 서열로 코딩되는 sgRNA23으로 지칭하였다. 모든 세 CBF 유전자의 시퀀스는 또한 같은 정렬 프로그램을 이용하여 분석하였으나, 모든 코딩 시퀀스 지역(coding sequence, CDS)에서 세 CBF 유전자를 표적 가능한 sgRNA 위치는 존재하지 않았다.

표 2

[0078]

서열번호	명칭	서열(5'-3')
4	CBF1 및 CBF2를 표적하는 sgRNA12	AGCTGCCATCTCAGCGGTT
5	CBF2 및 CBF3를 표적하는 sgRNA23	GAGTCAGCGAAATTGAGAC

[0080] 상기 컨스트럭트가 애기장대 C24RDLUC의 생태형에서 이용될 것이기 때문에, SNP(single nucleotide polymorphism)의 지역을 배제하기 위하여 상기 생태형에서의 CBF 지역을 조사하였다. 가능한 비표적(off-target) 위치를 찾기 위하여, sgRNA12 및 sgRNA23을 온라인 프로그램인 CRISPR-P로 분석하였다. 비표적 위치는 sgRNA를 선택하기 위한 간섭 전위(interference potential)에 따라 기록되었다.

[0081] 도 1d와 같이, sgRNA12는 CBF1과 CBF2가 주요 표적이다. 다른 두 가능한 비표적 시퀀스는 유의미하게 낮은 지수(score)를 가졌고, 이는 비표적 포텐셜(potential)이 낮음을 나타낸다.

[0082] 도 1e와 같이, sgRNA23은 CBF2, CBF3가 주요 표적이다. 이는 또한 다른 가능한 비표적 시퀀스가 유의미하게 낮은 지수를 가짐을 보여준다.

[0084] **실시예 2. 이중 sgRNA로의 CRISPR/Cas9 시스템 구축**

[0085] CRISPR/Cas 시스템은 RNA 및 엔도뉴클레이즈(endonuclease) 단백질 복합체에 의해 돌연변이를 표적하고 생성하는 기능으로써 유용한 도구이다. 단일 포인트 돌연변이(single point mutation) 생성을 위하여 Cas9 시퀀스 및 단일 sgRNA를 포함하는 컨스트럭트를 이용하였다. 모든 세 CBF 유전자를 표적하기 위하여 상기 형질전환을 위한 컨스트럭트는 두 개의 sgRNA를 필요로 한다.

[0086] 단일 sgRNA-Cas9 플라스미드의 컨스트럭트는 올리고머 이량체의 인산화(phosphorylating) 및 어닐링(annealing)에 의해 제조되었다. 상기 어닐링된 올리고머 쌍은 절단된 psgR-Cas9-At 벡터(Mao, Yanfei, et al. "Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants." Molecular plant 6.6 (2013): 2008.)에 연결될 것이다.

[0087] 구체적으로, 정방향 올리고머(oligomer)(10 uM/ul), 역방향 올리고머(10 uM/ul), T4 연결효소(ligase) 버퍼 및 T4 폴리뉴클레오타이드 인산화효소(10 units/ul)(NEB, New England Biolab, USA)의 혼합물을 제조하였다. 상기 혼합물은 아래 파라미터를 이용하는 유전자증폭기(thermocycler)에서 어닐링하였다: 37℃ 30분, 95℃ 5분, 그리고 0.2℃/s로 25℃까지 감소시켰다. 이후 어닐링된 올리고머는 증류수로 200배로 희석되었다.

[0088] 정방향 올리고머 및 역방향 올리고머는 sgRNA 코딩 핵산 서열의 상류에 표 3과 같이 서열을 추가하여 제조하였다.

표 3

[0089]

서열번호	명칭	서열(5'-3')
6	정방향 올리고머 제조를 위한 추가 서열 (sgRNA 코딩 핵산 서열의 상류)	GATTG

7	역방향 올리고머 제조를 위한 추가 서열 (sgRNA 코딩 핵산 서열의 상류)	AAAC

[0091] 도 2a와 같이, sgRNA 백본 벡터인 psgR-Cas9-At는 Cas9 시퀀스를 sgRNA를 위한 키머릭(chimeric) RNA와 포함하였다. 단일 sgRNA 및 Cas9 컨스트럭트를 생성하기 위하여, psgR-Cas9-At는 제한 효소 BbsI 로 절단하였고 정방향 및 역방향으로 이루어진 sgRNA 올리고머 이량체(dimer)를 연결하였다. sgRNA 올리고머 이량체는 Bbs1 절단부위의 돌출과 일치하는 돌출(overhang)을 가지므로, 이음매 없이 연결되었다.

[0092] 구체적으로, psgR-Cas9-At 벡터는 BbsI(10 units/ul)(NEB, New England Biolab, USA)으로 절단되었다. 반응을 보조하기 위한 절단 혼합액에 소혈청알부민(Bovine Serum Albumin, BSA) 1%(v/v)를 추가하였다. 37℃에서 배양한 지 2시간 후, CIAP(Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)(10 units/ul)(NEB, New England Biolab, USA)를 추가하고 다시 37℃에서 한 시간 동안 배양하였다. 절단의 확인은 젤 전기영동에 의해 수행한 후 젤 추출 키트(Gel extraction kit, Cosmogenetech)로 회수하였다. 회수한 벡터는 페놀/클로로포름 방법으로 농축하였다.

[0093] 각각 CBF1, CBF2를 표적하는 sgRNA12 및 CBF2, CBF3을 표적하는 sgRNA23은 모두 단일 sgRNA 및 Cas9 컨스트럭트의 생성에 삽입된다. 이중 sgRNA 및 Cas9 컨스트럭트의 생성에서, 단일 sgRNA 컨스트럭트의 PCR(polymerase chain reaction)은 키메릭 RNA 백본 다운스트림에 대한 sgRNA의 애기장대 U6 프로모터 업스트림 범위의 sgRNA 지역에서 수행되었다. 도 2b와 같이 PCR 산물의 앞에 KpnI 효소 위치를, 뒤에 EcoRI 효소 위치를 더하여 PCR이 수행되었다.

[0094] 도 2c와 같이 생성된 sgRNA23 부위 및 단일 sgRNA12 Cas9 컨스트럭트의 PCR 산물을 KpnI 및 EcoRI으로 절단한 후, sgRNA12, Cas9 및 sgRNA23을 정렬하고 둘을 연결하여 이중 sgRNA 및 Cas9 컨스트럭트를 생성하였다.

[0095] 도 2d와 같이 sgRNA 및 Cas9 컨스트럭트는 제한 효소 HindIII 및 EcoRI로 절단하여 동일한 제한 효소로 절단된 바이너리 벡터인 pCAMBIA1300(CAMBIA)에 삽입하였다. pCAMBA 1300의 EcoRI 및 HindIII(10 units/ul)(NEB, New England Biolab, USA)로의 절단도 상기 psgR-Cas9-At 벡터의 절단과 같은 프로세스로 수행하였다. 바이너리 벡터에서 이중 sgRNA 및 Cas9 컨스트럭트의 생성 이후, 상기 벡터는 식물의 형질전환에 이용되었다.

[0096] 구체적으로, 희석된 올리고머 이량체는 BbsI로 절단된 psgR-Cas9-At와 연결하였다. 절단된 벡터 및 올리고머 이량체의 비율은 1:3 ~ 1:5였다. 상기 연결은 T4 DNA 연결효소(400 units/ul)(NEB, New England Biolab, USA)로 16℃에서 하룻밤 동안 수행하였다. 절단된 psgR-Cas9-At 절편과 절단된 pCAMBIA1300도 동일하게 수행하였다. 연결된 플라스미드는 대장균 DH5α 세포를 이용하여 30분 동안 얼음에 넣고, 30초 동안 42℃에서 열충격(heat shock)을 가하여 형질전환(transformation)하였다. 얼음 위에서 2분 경과 후, 클린벤치(clean bench)에서 혼합물에 LB 1 ml을 추가하여 37℃에서 진탕배양기로 45분 동안 배양하였다. 전기영동법으로 아그로박테리움 투메파시엔스(Agrobacterium tumefaciens) GV1301에 바이너리 벡터(binary vector)를 보완하여 연결한 형질전환을 완성하였다.

[0098] **실시예 3. 식물 형질전환을 위한 컨스트럭트의 확인**

[0099] 컨스트럭트의 생성을 각 단계(stage)에서 다양한 방법으로 확인하였다. 첫째로, 단일 sgRNA 및 Cas9 컨스트럭트에서 sgRNA12 및 sgRNA23의 삽입을 확인하기 위해 프라이머 중 하나가 sgRNA의 시퀀스로 이루어진 프라이머 세트를 이용하는 PCR을 이용하였다.

[0100] 이중 sgRNA-Cas9 플라스미드를 생성하기 위해서, 두 개의 단일 sgRNA-CAS9 플라스미드를 분리하여 생성하였다. PCR에 의한 sgRNA23-Cas9 플라스미드로부터의 sgRNA23 모듈(module) 증폭에는 하기 표 4의 프라이머 쌍을 이용하였다:

표 4

[0101]

서열번호	명칭	서열(5'-3')
8	sgR_U6_Kpn1-F	gccggtacccattcggagtttttgtat
9	sgR_end_EcoR1-R	tatgaattcgccatttgtctgcagaattg

[0103] 상기 PCR 산물은 1%(v/v) 젤 전기영동을 수행하여 젤 추출 키트로 회수하였다. sgRNA12-Cas9 벡터의 Kpn1 및 EcoR1로의 절단은 상기 기재된 바와 같이 수행되었다. 회수된 PCR 산물로의 연결은 이중 sgRNA-Cas9 컨스트럭트를 생성하기 위해 수행되었다.

[0104] 이후 이중 sgRNA 및 Cas9 컨스트럭트를 위하여, sgRNA23의 삽입을 확인하기 위해 두 번째 sgRNA의 삽입 위치를 덮는 프라이머 세트를 이용하였다. 삽입 없이 상기 PCR 산물은 500 bp의 크기를, 삽입되었다면 상기 PCR 산물은 1 kbp의 크기를 나타낼 것이라고 예측하였다. 다른 확인 프로세스는 Cas9 시퀀스에 결합하는 프라이머 세트를 이용하여 수행하였다. 이후 제한 효소 HindIII 및 EcoRI를 이용하여 컨스트럭트를 확인하였다.

[0105] 도 3a에서 확인할 수 있듯이, psgR-Cas9-At 컨스트럭트를 이 제한 효소들로 절단하면 두 개의 밴드가 보이는데, 하나는 이중 sgRNA 및 Cas9 카세트로 구성된 6.1 kbp 밴드이고, 다른 하나는 sgRNA 및 Cas9 카세트 없이 컨스트럭트 백본인 2.6 kbp 밴드이다.

[0106] 도 3b에서 확인할 수 있듯이, 이중 sgRNA 및 Cas9 컨스트럭트를 포함하는 pCAMBIA1300는 동일한 제한 효소로 절단되어 이중 sgRNA 및 Cas9 카세트인 동일한 6.1 kbp 및 8.9 kbp인 pCAMBIA1300 벡터를 나타낸다.

[0107] 도 3c와 같이 PCR 확인 이후 제한 효소 절단을 수행하여, 상기 컨스트럭트에서 sgRNA 삽입 시퀀스의 최종 확인을 위해 시퀀스 분석을 수행하였다.

[0108] 확인 이후 컨스트럭트는 화아침지법을 통한 식물 형질전환을 위해 아그로박테리움 투메파시엔스 GV3101 균주로 이동되었다.

[0110] **실시예 4. 도입 유전자를 포함하는 T1 유식물체의 식별**

[0111] 컨스트럭트의 식물 형질전환 이후, 형질전환된 식물로부터의 종자를 T1 종자로 지칭하였다.

[0112] 애기장대 종자는 표백 용액(0.01%(v/v) Tween 20 용액)으로 5분 동안 소독하고 고압살균한 물로 6 내지 8분 동안 헹구었다. 상기 종자는 MS 플레이트에 일회용 플라스틱 운반 파이펫(pipette)으로 파종하였다. 파종 후, 플레이트는 적어도 22℃로 운반하기 2일 전 성장의 동시성을 위해 파라필름으로 봉하여 4℃에서 보관하였고 발아 및 성장을 위하여 계속적인 조명 및 70%의 상대습도를 공급하였다.

[0113] 상기 컨스트럭트는 선별을 위해 하이그로마이신 저항성 단백질을 포함하였으므로 T1 식물은 스크리닝을 위해 하이그로마이신 B를 포함하는 MS 배치(MS batch)에서 처음 수행되어 10일 동안 성장하였다.

[0114] MS 배지는 기본배지(pH는 10M KOH로 5.7 내지 5.8로 조절함), 0.3%(v/v) 겔라이트(gelrite)(G1101, Duchefa, NL) 및 2%(v/v) 자당(sucrose)으로 제작하였다. 고압살균 이후, 상기 배지는 소독된 일회용 플라스틱 페트리접시(150mm X 20mm, SPL 10150)에 투입하였다. 선별 배지를 준비하기 위하여서는, 마지막에 하이그로마이신(hygromycin) B를 기본 MS 배지에 25 mg/L 농도로 추가하였다.

[0115] 구체적으로, 애기장대(Arabidopsis thaliana) C24RDLUC는 화아침지법(floral dipping)으로 아그로박테리움 투메파시엔스 GV1301 균주를 통해 sgRNA12와 sgRNA23을 포함하는 CBF12-CBF23 CRISPR-Cas 컨스트럭트에 의하여 형질전환되었다. C24RDLUC은 애기장대 C24 생태형(Ishitani, Manabu, et al. "Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in Arabidopsis: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways." The Plant Cell 9.11 (1997): 1935-1949.)에 스트레스 반응성 유전자 RD29A의 프로모터에 의해 발현이 유도되는 루시퍼레이즈(luciferase) 리포터 유전자를 가지고 있는 식물체이다. 아그로박테리움 펠릿을 이용하기 위한 화아침지법을 수행하기 위해 자당 용액(0.05%(v/v) Silwet L-77을 포함하는 5%(v/v) 자당)을 준비하였다. T1 종자는 T0 식물(화아침지법이 실시된 식물체)로부터 수집하였고 T1 종자는 하이그로마이신 25 ug/mL을 포함하는 MS 플레이트에 배양하여 형질전환체를 선별하였다.

[0116] 도 4에서 확인할 수 있듯이, 빨간 화살표는 하이그로마이신에 대하여 저항성을 가짐으로써 비-형질전환체에 비하여 더 크게 자라는 형질전환체 식물을 나타낸다. 선별된 형질전환된 T1 식물은 토양으로 이동시키고 식물체에서 CTAB(Cetyltrimethylammonium Bromide) 방법으로 DNA를 추출하였다.

[0117] 도 5a 내지 5c와 같이 sgRNA12, sgRNA23 및 Cas9의 PCR을 컨스트럭트 요소의 확인에 이용된 동일한 프라이머로

수행하여 컨스트럭트의 형질전환을 확인하였다. 추출된 DNA는 도 5d와 같은 3개의 서로 다른 프라이머 쌍과 함께 유전형 분석에 이용하였다. 프라이머 쌍은 하기 표 5와 같다.

표 5

[0118]

서열번호	명칭	서열(5'-3')
10	doublesgRNA-F (A 정방향)	gatcgacctgtctcagctgg
11	CBF12-sgR1-R (A 역방향)	aaacaaccgctgagatggcagctc
12	Cas9-F (B 정방향)	cccaagaggaacagcgataag
13	Cas9-R (B 역방향)	tggatccttacttttttctttttgcctggc
14	pCAM1300intC-F (C 정방향)	attaatgcagctggcacgac
15	pCAM1300intC-R (C 역방향)	ggcctcttcgctattacgc

[0120] 하기 표 6에 기재된 검출 비율(%)과 같이, 하이그로마이신을 통해 선별된 식물일지라도, 도입 유전자 각 요소의 검출이 각 식물체마다 다양하게 나타났다.

표 6

[0121]

Accession	sgRNA12	Cas9	sgRNA23	sgRNA12 and Cas9	Cas9 and sgRNA23	sgRNA12 and sgRNA23	sgRNA12, Cas9 and sgRNA23
C24RDLUC	84.00	84.00	94.00	72.00	80.00	82.00	62.00 (33/50)*

[0123] 표 6의 *표는 [sgRNA12, Cas9 및 sgRNA23 모두가 검출된 식물의 수/전체 실험에 사용된 식물의 수]로 나타낸 값이다.

[0124] 어떤 개체는 세 요소의 부분적인 검출을 나타내어 불완전한 형질전환을 짐작할 수 있었다. 다른 조합에서의 요소의 검출 비율에 있어서, sgRNA12 및 sgR23 검출이 나타내는 비율은 전체 세 요소의 검출 비율과 가장 유사하다. 이는 sgRNA 및 Cas9 카세트의 정렬 여부와, sgRNA12, Cas9 및 sgRNA23의 순서와 연관이 있다.

[0126] **실시예 5. T1 식물에서의 대규모 결실 발생**

[0127] CRISPR/Cas 시스템은 표적 지역 및 sgRNA의 시퀀스에 의존적으로 다른 비율로 작동한다. sgRNA12 및 sgRNA23이 작동하는지를 측정하기 위해서, PCR 산물의 크기 분석을 수행하였다. 한 프라이머가 CBF1의 5' UTR 지역에 나란하고 다른 프라이머가 CBF2의 3' UTR 지역에 나란한 프라이머 세트를 이용하여 1.5분의 연장 시간만을 부여하여 PCR을 수행하였다.

[0128] 도 5a에서 확인할 수 있듯이, 대규모 결실 없이는 상기 프라이머들은 정방향 및 역방향 프라이머 사이의 긴 거리 때문에 밴드를 생성할 수 없었다. CBF1로부터 CBF2까지의 대규모 결실 돌연변이가 존재하려면, 프라이머는 그 사이의 시퀀스를 증폭시키기 위해 충분히 가까워져야 한다. 위와 같이 예상하는 이유는 T1 식물이 돌연변이의 키메라 분포를 보여주고, 어떤 T1 식물은 CBF1으로부터 CBF2까지의 범위에서 대규모 결실 돌연변이를 포함하는 적은 세포를 포함하기 때문이다.

[0129] 도 5b에서 확인할 수 있듯이, 보통의 PCR에 의해서는 적고 희미한 밴드만을 관찰할 수 있다.

[0130] 그러므로 1/1000 희석에 의한 PCR 산물로 네스티드 PCR을 수행하였다. 네스티드 PCR을 통해 희미한 밴드는 비-특이적 밴드임을 확실히 할 수 있고 또한 PCR 산물의 증폭은 충분히 보일 수 있을 것으로 예상되었다.

[0131] 도 5c에서 확인할 수 있듯이, 네스티드 PCR의 결과에서는 앞서 선명한 밴드를 나타냈던 샘플에서 밴드가 나타나지 않는 경우도 발생하였다. 대규모 결실을 보여주는 T1 식물은 sgRNA12, Cas9 및 sgRNA23이 검출된 식물이고, 온전한 컨스트럭트가 발생시킨 형질전환 유전자를 내재하고 있다.

[0132] 표 7의 *표는 [sgRNA12, Cas9 및 sgRNA23 모두가 검출된 식물의 수/전체 실험에 사용된 식물의 수]로 나타낸 값이고, a는 [대규모 결실이 검출된 식물의 수/sgRNA12, Cas9 및 sgRNA23 모두가 검출된 식물의 수]로 나타낸 값이다.

표 7

[0133]

Accession	sgRNA12, Cas9 and sgRNA23	Large deletion mutation
C24RDLUC	62.00 (33/50)*	84.85 (28/33)a

[0135] **실시예 6. T2 식물에서의 대규모 결실 비율**

[0136] T1 식물로부터 얻은 종자는, T2 종자이며, PCR을 이용하여 스크리닝하였다. 높은 스크리닝 효율을 위해, CBF1으로부터 CBF2까지의 범위에서 대규모 결실을 나타내는 동형(homozygous)의 돌연변이 식물을 찾기 위한 PCR 분석을 이용하였다.

[0137] 표 8은 C24RDLUC에서의 T1세대에서 대규모 결실 유무에 따른 그 후속 T2세대에서의 대규모 결실 비율을 나타낸다.

표 8

[0138]

C24RDLUC T1 #	large deletion detected in 0 T1	T2		
		number of plants showing large deletion	number of plants examined	% of large deletion detection
3	Y	10	24	41.67
5	N	0	21	0.00
11	N	1	24	4.17
12	N	0	12	0.00
13	N	0	2	0.00
14	Y	8	15	53.33
15	Y	11	24	45.83
16	Y	0	24	0.00
19	N	0	11	0.00
20	Y	9	24	37.50
21	Y	10	24	41.67
24	Y	3	24	12.50
25	Y	0	2	0.00
29	N	8	17	47.06
30	N	1	24	4.17
31	Y	0	13	0.00
33	N	0	24	0.00
34	Y	16	24	66.67
37	Y	0	20	0.00
38	N	1	17	5.88
41	Y	0	9	0
42	Y	16	46	34.78
47	N	2	22	9.09
48	N	0	24	0.00
49	Y	1	5	20.00
50	Y	78	89	92.13
51	Y	2	11	18.18

[0140] 일부는 대규모 결실이 검출된 T1 식물의 경우에도 T2에서 대규모 결실이 없거나, 그 반대의 경우도 있으나, 일

반적으로 C24RDLUC T2 식물에서의 대규모 결실의 높은 검출 비율을 얻기 위해서는, 대규모 결실을 보인 T1 식물로부터의 T2 식물을 스크리닝하는 것이 가능성이 높았다.

[0142] **실시예 7. T2 세대에서의 대규모 결실 동형접합체(homozygote) 돌연변이**

[0143] PCR 분석은 식물이 대규모 결실 돌연변이를 가지는지를 측정할 수 있을 뿐 접합자구조(zygosity)를 측정할 수는 없다(동형접합체인지, 이형접합체(heterozygote)인지 또는 키메라인지). 그러므로 돌연변이를 찾기 위해 세 프라이머로 스크리닝을 또한 수행하여 식물의 접합자구조를 측정하였다. 세 프라이머는 CBF1의 5' UTR 및 CBF2의 3' UTR에 나란한 둘 및 CBF1 sgRNA12 지역 이후의 시퀀스에 나란한 다른 하나이다.

[0144] 상기 프라이머들을 이용하여 1분의 연장 시간만을 부여한 PCR 산물은 세 가지 양상을 나타냈다. 대규모 결실 돌연변이는 존재하지 않았고, 야생형 밴드만 나타났으며, CBF1의 5' UTR 및 sgRNA12 지역의 두 프라이머는 300 bp의 밴드를 생산하였다.

[0145] 대규모 결실 돌연변이가 있었다면, CBF1의 5' UTR 및 CBF2의 3' UTR의 프라이머는 sgRNA23 또는 sgRNA12 위치에서 발생한 절단에 의존적으로 각각 약 680 또는 740 bp의 프라이머를 생산할 것이다. 만약 식물이 이종 또는 키메라 접합자구조라면 PCR은 다중 밴드를 증폭할 것이다.

[0146] 이러한 원리를 이용하여 PCR 산물이 야생형 밴드 없이 CBF1 및 CBF2 사이에서 대규모 결실을 나타냄을 보인 C24RDLUC T2 #50-1을 찾을 수 있었다. 그러나 몇 번의 초과적인 PCR 이후 C24RDLUC #50-1는 하나의 대규모 결실 돌연변이가 CBF1 sgRNA12부터 CBF2 sgRNA23까지이고 다른 대립형질(allele)은 CBF1 sgRNA12로부터 CBF3 sgRNA23까지의 결실을 가짐에 따라 CBF2 지역 이내 결실의 이중 대립형질 돌연변이체(biallelic mutant)임을 알 수 있었다.

[0147] 어떤 자매종 식물은 양쪽 대립형질(allele)에 동일한 돌연변이를 갖는 순종(homo) 돌연변이체를 포함할 것이라는 예상으로 C24RDLUC #50-1의 더 많은 자매종 스크리닝을 수행하였다. 식물 유전체에 남아있는 Cas9는 예측 불가능한 다중 생성 효과를 일으킬 수 있기 때문에, 동형접합체 식물에서 또한 Cas9 시퀀스가 유전적으로 제거되어야 한다.

[0148] 도 6a에서 확인할 수 있듯이, 자매종 중에서 #50-35가 상기 설명된 #50-1의 두 번째 대립형질의 순종 돌연변이체를 가지고 있었다. CBF1 5' UTR 및 CBF3 3' UTR, CBF1 지역, CBF2 지역 및 Cas9 시퀀스에 나란한 프라이머로 PCR 확인을 수행하였다. 각 증폭된 밴드들은 순종 돌연변이체일 것으로 예상되었다.

[0149] 도 6b에서 확인할 수 있듯이, PCR 산물을 이용한 시퀀싱에 의해 C24RDLUC #50-35가 CBF1 sgRNA12 및 CBF3 sgRNA23의 범위에서 3633 bp 결실 및 프레임시프트 돌연변이(frameshift mutation) 및 CBF2 지역의 sgRNA12 및 sgRNA23 사이에 다른 65 bp 결실을 생성하기 위한 틈에 AP2 도메인의 중간을 삭제하고 이른(premature) 종결 코돈을 만드는 서열번호 16으로 표시되는 11 bp 삽입(필러(filler) DNA)을 포함하는 것을 확인하였다. 이를 도 6c와 같이 도식화하였다.

표 9

[0150]

서열번호	명칭	서열(5'-3')
16	결실 부위에 삽입된 11 bp	TTGCGCTAATT

[0152] **실시예 8. 삼중 돌연변이체의 발광(luminescence) 발현 확인**

[0153] C24RDLUC CBF1, CBF2, CBF3의 삼중 돌연변이체 #50-35에서 얻은 종자를 배지(MS 배지, pH 5.8, 0.3%(v/v) 겔라이트(gelrite) 및 2%(v/v) 자당(sucrose))에 대조군인 야생형 C24RDLUC 종자와 함께 심었다. 22℃, 24시간 빛 조건에서 10일간 키워 유식물체를 얻은 후, 이들 유식물체를 0℃에서 24시간 저온 스트레스 처리하였다.

[0154] 상기 유식물체에 루시퍼레이즈(luciferase)의 기질인 루시페린(luciferin)을 뿌린 후 발광 정도를 비교하였다. 이 발광은 스트레스 반응성 유전자 RD29A 프로모터에 의해 조절되어 리포터 유전자인 루시퍼레이즈 발현이 유도되었을 때 발생한다.

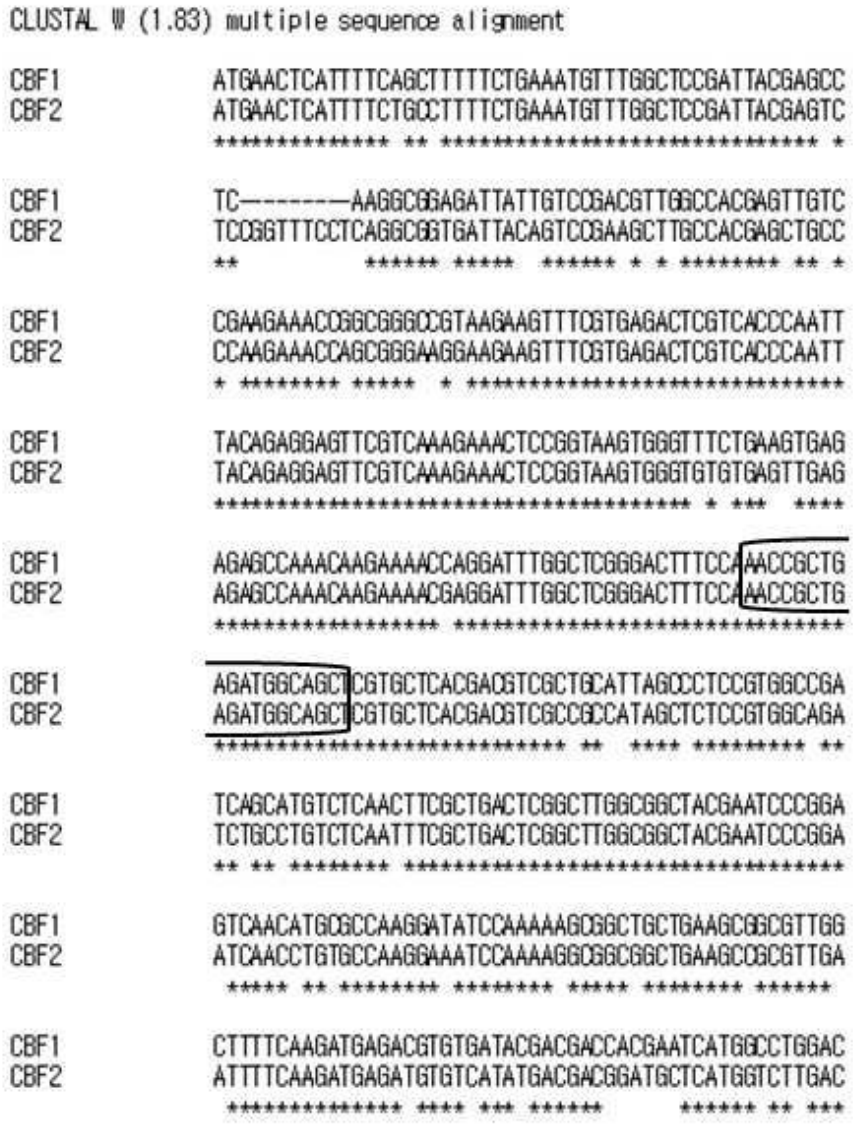
[0155] 도 7에서 확인할 수 있듯이, 발광 정도를 비교한 결과, 전반적으로 C24RDLUC #50-35에서 야생형보다 그 발광이

감소하였다.

[0156] 따라서, CBF 삼중돌연변이체는 CBF1, CBF2, CBF3 삼중 결실에 의해서 RD29A 프로모터에 의한 루시퍼레이즈 발현이 유도되지 않았음을 알 수 있었다.

도면

도면1a



도면1b

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

CBF2            ATGAACTCATTTTCTGCCTTTTCTGAAATGTTTGGCTCCGATTACGAGTC
CBF3            ATGAACTCATTTTCTGCTTTTTCTGAAATGTTTGGCTCCGATTACGAGTC
                ********************************************************

CBF2            TCCGGTTTCCTCAGGCGGTGATTACAGTCCGAAGCTTGCCACGAGCTGCC
CBF3            TTCGGTTTCCTCAGGCGGTGATTATATTCCGACGCTTGCGAGCAGCTGCC
                * ********************** * ***** ****** *  *******

CBF2            CCAAGAAACCAGCGGGAAGGAAGAAGTTTCGTGAGACTCGTCACCCAATT
CBF3            CCAAGAAACCGGCGGGTCGTAAGAAGTTTCGTGAGACTCGTCACCCAATA
                ********** *****  * ****************************

CBF2            TACAGAGGAGTTCGTCAAAGAAACTCCGGTAAGTGGGTGTGTGAGTTGAG
CBF3            TACAGAGGAGTTCGTCGGAGAAACTCCGGTAAGTGGGTTTGTGAGGTTAG
                ***************  ******************** ****** * **

CBF2            AGAGCCAAACAAGAAAACGAGGATTTGGCTCGGGACTTTCCAAACCGCTG
CBF3            AGAACCAAACAAGAAAACAAGGATTTGGCTCGGAACATTTCAAACCGCTG
                *** ************** ************** ** ** **********

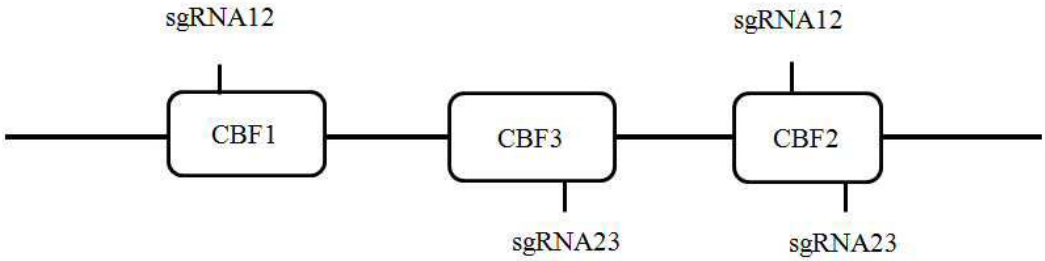
CBF2            AGATGGCAGCTCGTGCTCACGACGTCGCCGCCATAGCTCTCCGTGGCAGA
CBF3            AGATGGCAGCTCGAGCTCACGACGTTGCCGCTTTAGCCCTTCGTGGCCGA
                ************* ********** *****  **** ** ****** **

CBF2            TCTGCCTGTCTCAATTTCGCTGACTCGGCTTGGCGGCTACGAATCCCGGA
CBF3            TCAGCCTGTCTCAATTTCGCTGACTCGGCTTGGAGACTCCGAATCCCGGA
                ** ****************************** * ** ************

CBF2            ATCAACCTGTGCCAAGGAAATCCAAAAGGCGGCGGCTGAAGCCGCGTTGA
CBF3            ATCAACTTGCGCTAAGGACATCCAAAAGGCGGCGGCTGAAGCTGCGTTGG
                ****** ** ** ***** ********************** ******

CBF2            ATTTTCAAGATGAGATGTGTCATATGACGACGGATGCTCATGGTCTTGAC
CBF3            CGTTTCAGGATGAGATGTGTGATGCGACGACGGA---TCATGGCTTCGAC
                  ***** ************ **  *********   ******  * ***
```

도면1c



도면1d

sgRNA12

postion: 4:+13015847 CBF2

guide sequence: GAGCTGCCATCTCAGCGGTTTGG

number of offtarget sites: 3

top 20 genome-wide off-target sites

Sequence	Score	MMs	Locus	Gene	
GAGCTGCCATCTCAGCGGTTTGG	100.0	0MMs	4:+13022327	AT4G25490	CBF1
GAGCAGCCATGTCAGGGGCTTGG	0.0	4MMs	3:-5957587	AT3G17410	
GCGCTGCCATCTCCGCCGTGGGG	0.0	4MMs	2:-11015156	AT2G25820	

도면1e

sgRNA23

postion: 4:+13015782 CBF2

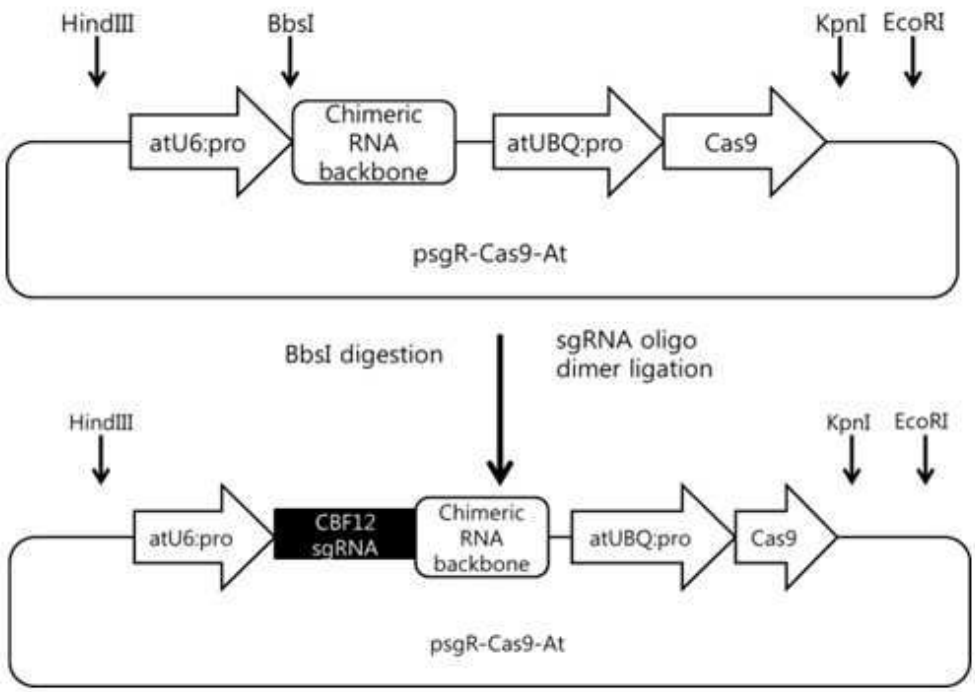
guide sequence: CGAGTCAGCGAAATTGAGACAGG

number of offtarget sites: 4

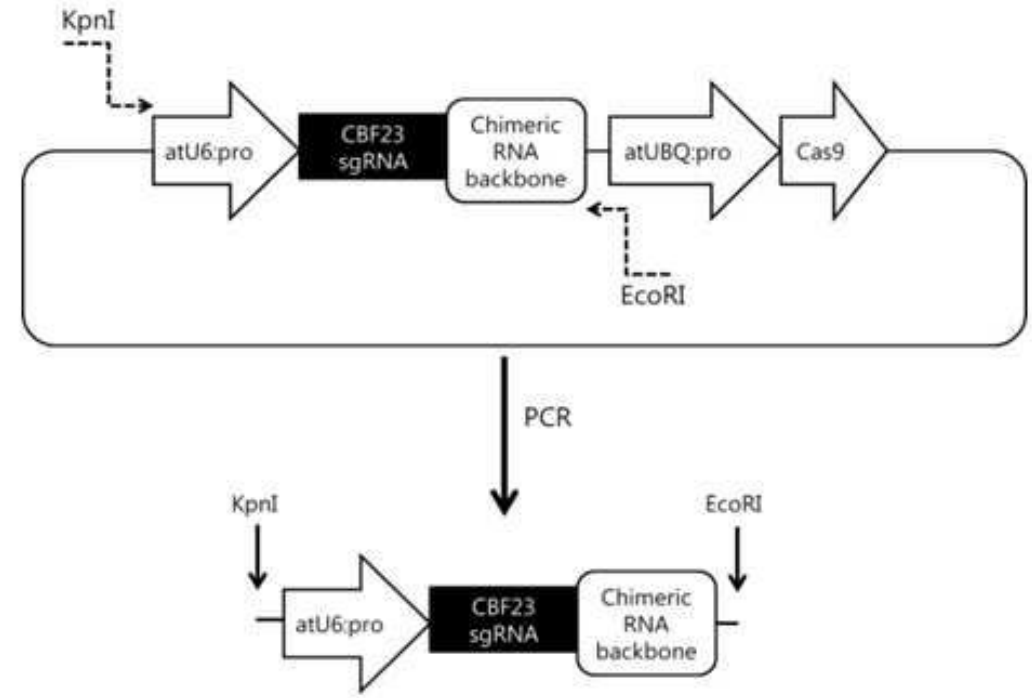
top 20 genome-wide off-target sites

Sequence	Score	MMs	Locus	Gene	
CGAGTCAGCGAAATTGAGACAGG	100.0	0MMs	4:+13018694	AT4G25480	CBF3
AGAATCAGCGAAATTGAGACAAG	5.7	2MMs	5:+21117469	AT5G51990	CBF4
CGTTTCAGCGAAATTGATAAGGG	0.1	4MMs	2:+19572968	AT2G47790	
CGAGACTGAGAAATTTAGACGGG	0.1	4MMs	3:+1397375		

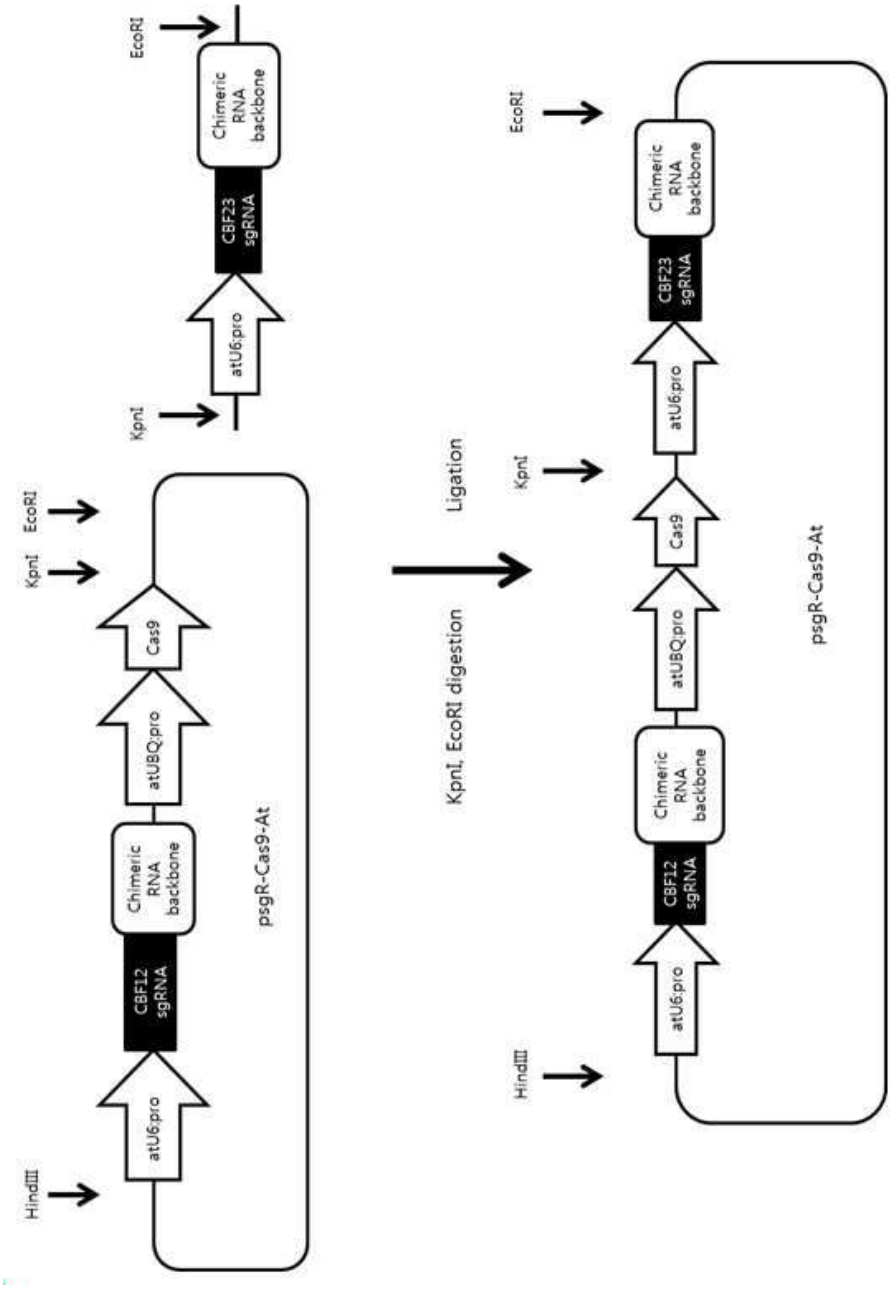
도면2a



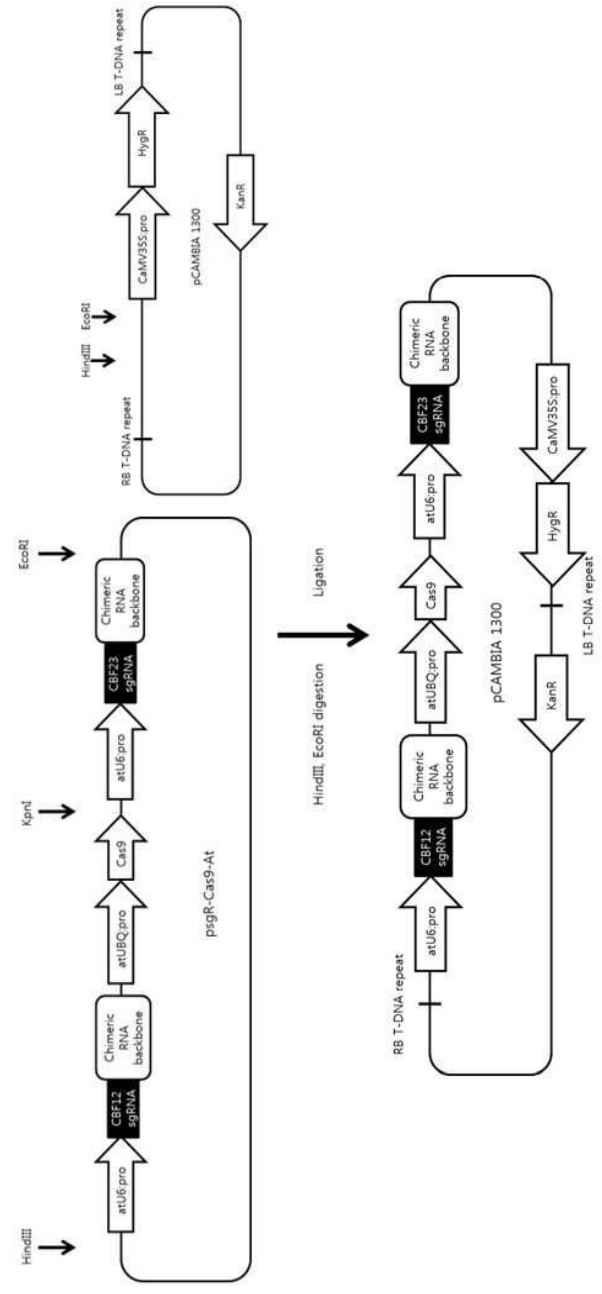
도면2b


KpnI
atU6:pro
CBF23 sgRNA
Chimeric RNA backbone
atUBQ:pro
Cas9
EcoRI
PCR
KpnI
EcoRI
atU6:pro
CBF23 sgRNA
Chimeric RNA backbone

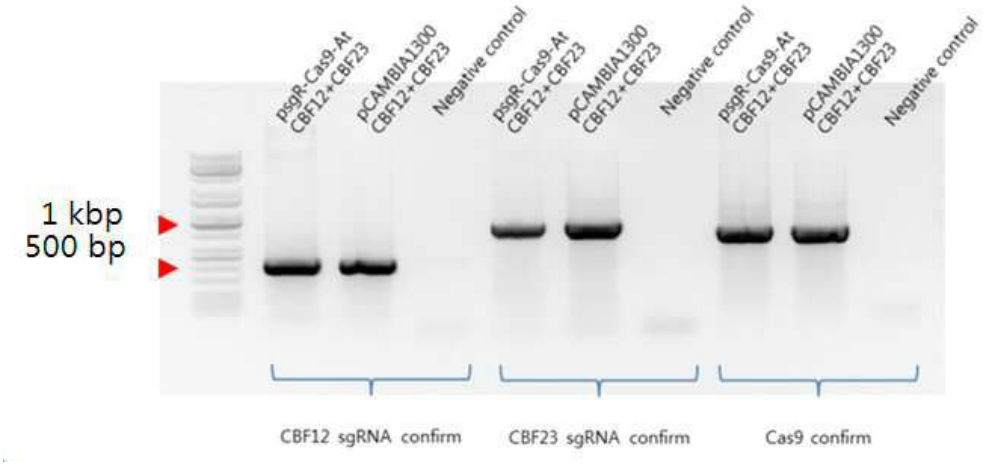
도면2c


EcoRI
Chimeric RNA backbone
CBF23 sgRNA
atU6:pro
KpnI
EcoRI
KpnI
Cas9
atUBQ:pro
Chimeric RNA backbone
CBF12 sgRNA
atU6:pro
HindIII
psgR-Cas9-At
Ligation
KpnI, EcoRI digestion
EcoRI
Chimeric RNA backbone
CBF23 sgRNA
atU6:pro
KpnI
Cas9
atUBQ:pro
Chimeric RNA backbone
CBF12 sgRNA
atU6:pro
HindIII
psgR-Cas9-At

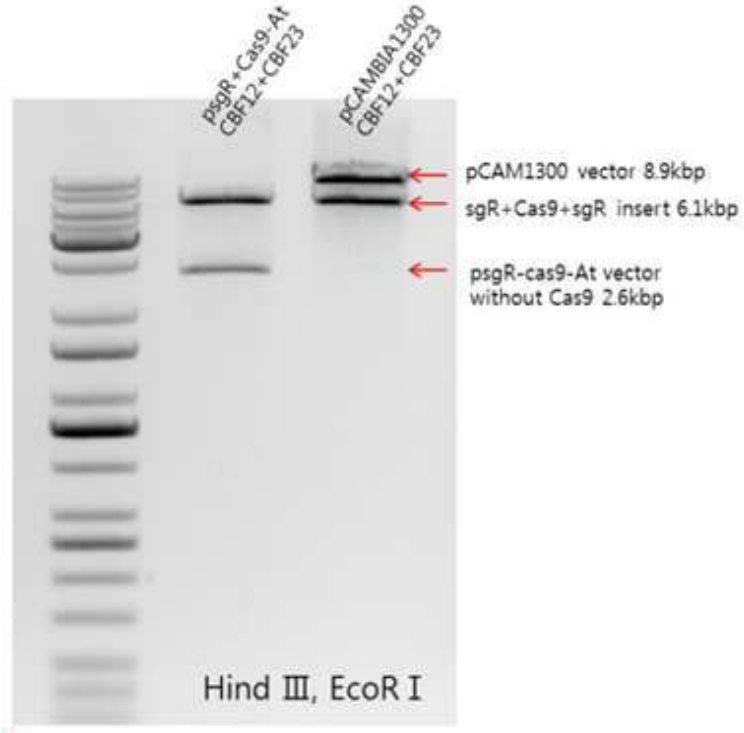
도면2d


HindIII
EcoRI
KpnI
atU6.pro
CBF12 sgRNA
Chimeric RNA backbone
atUBQ.pro
Cas9
atU6.pro
CBF23 sgRNA
Chimeric RNA backbone
psgR-Cas9-At
HindIII, EcoRI digestion
Ligation
RB T-DNA repeat
HindIII
EcoRI
CaMV35S.pro
HygR
LB T-DNA repeat
pCAMBIA 1300
KanR

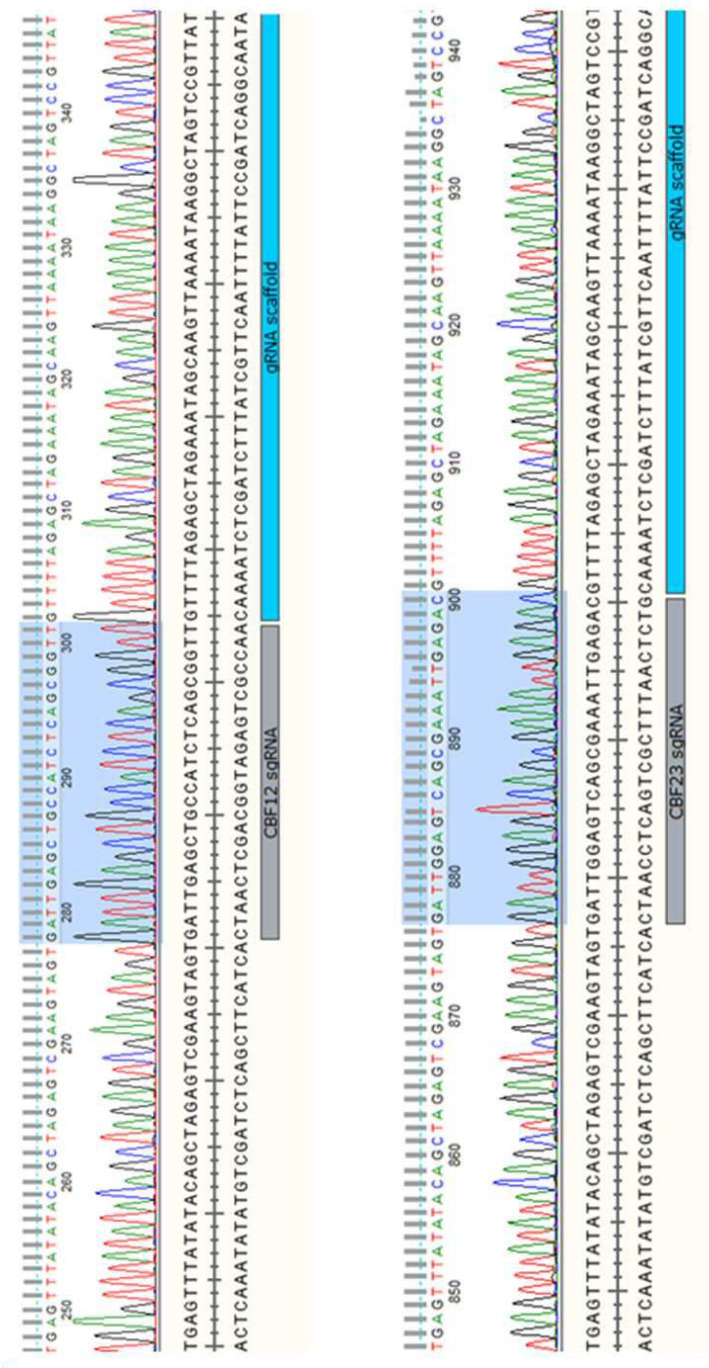
도면3a


psgR-Cas9-At CBF12+CBF23
pCAMBIA1300 CBF12+CBF23
Negative control
psgR-Cas9-At CBF12+CBF23
pCAMBIA1300 CBF12+CBF23
Negative control
psgR-Cas9-At CBF12+CBF23
pCAMBIA1300 CBF12+CBF23
Negative control
1 kbp
500 bp
CBF12 sgRNA confirm
CBF23 sgRNA confirm
Cas9 confirm

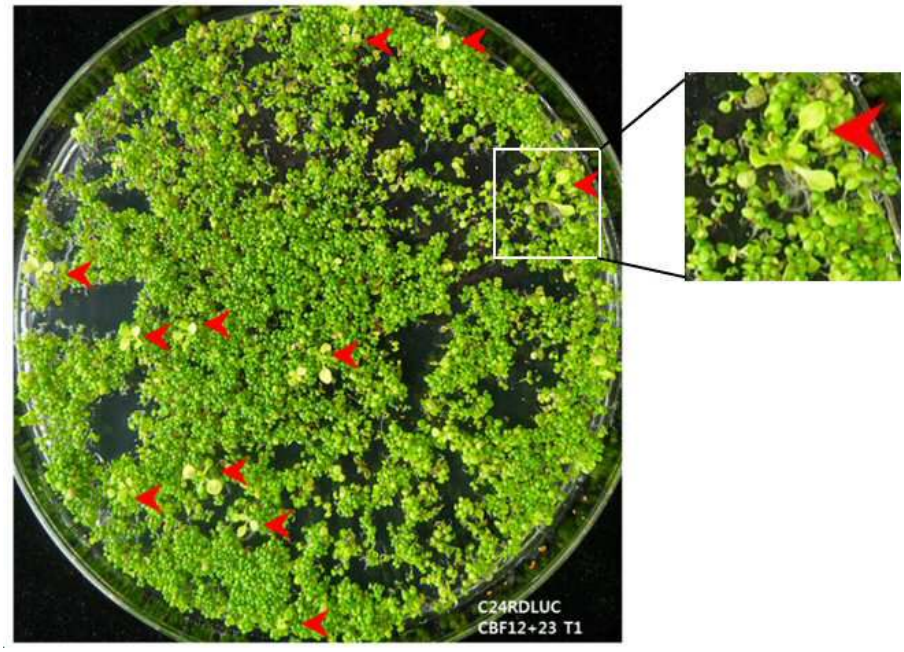
도면3b


psgR+Cas9-At CBF12+CBF23
pCAMBIA1300 CBF12+CBF23
pCAM1300 vector 8.9kbp
sgR+Cas9+sgR insert 6.1kbp
psgR-cas9-At vector without Cas9 2.6kbp
Hind Ⅲ, EcoR I

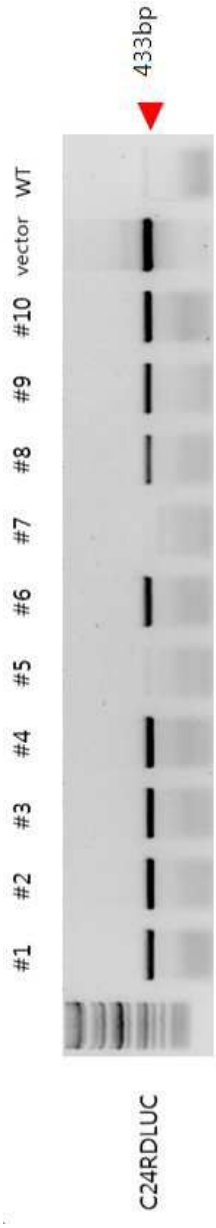
도면3c



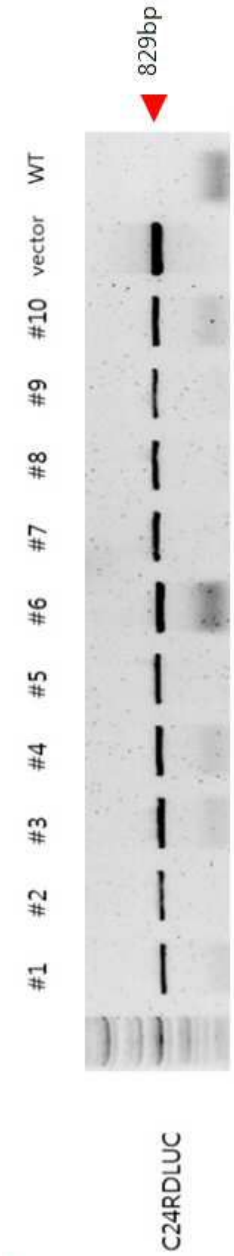
도면4



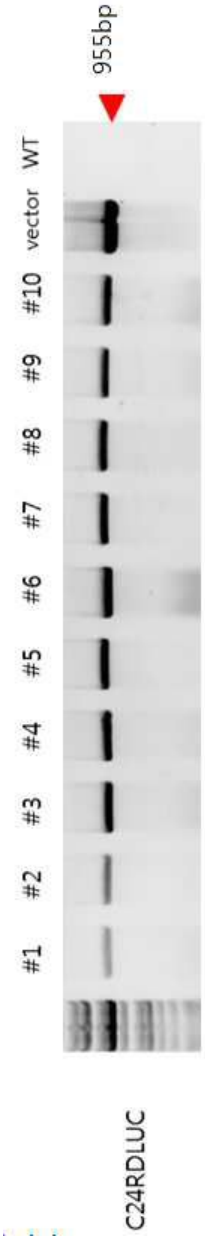
도면5a



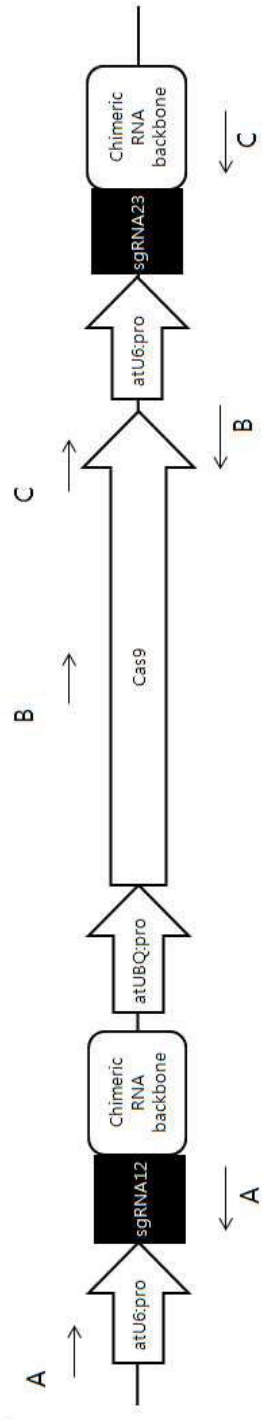
도면5b



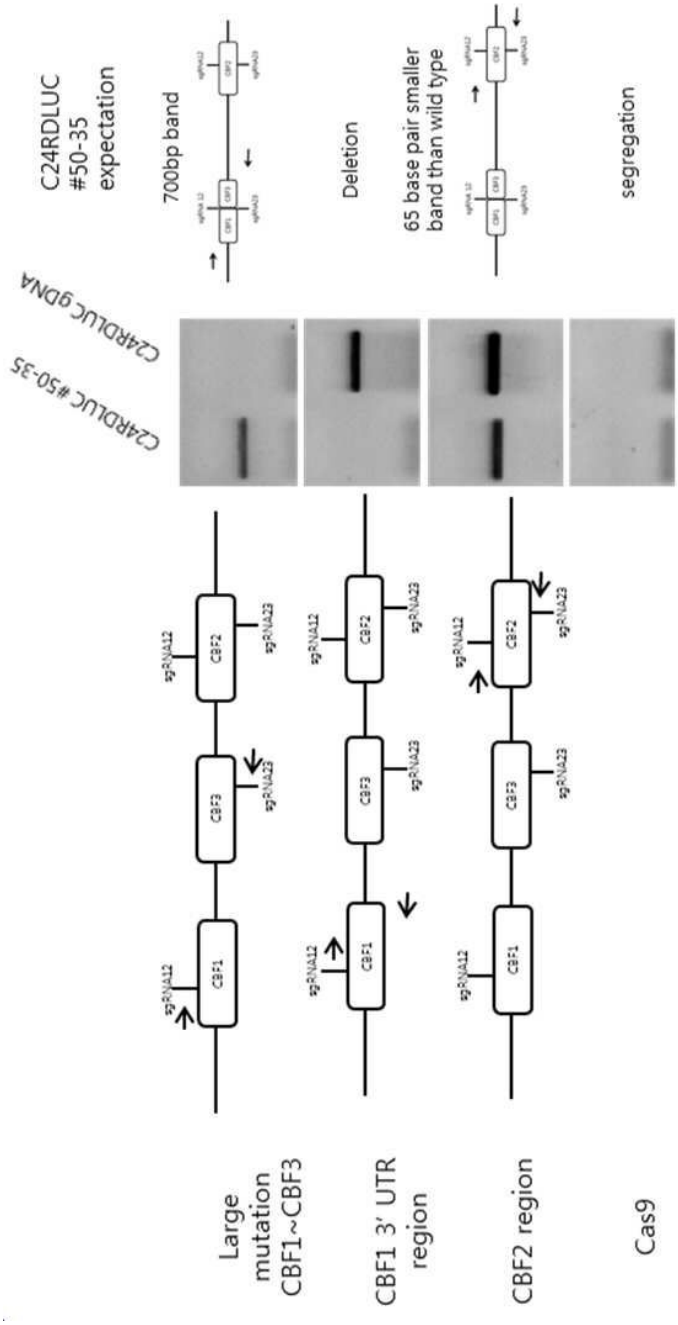
도면5c



도면5d


A
atU6:pro
sgRNA12
Chimeric RNA backbone
A
atUBQ:pro
B
Cas9
B
C
atU6:pro
sgRNA23
Chimeric RNA backbone
C

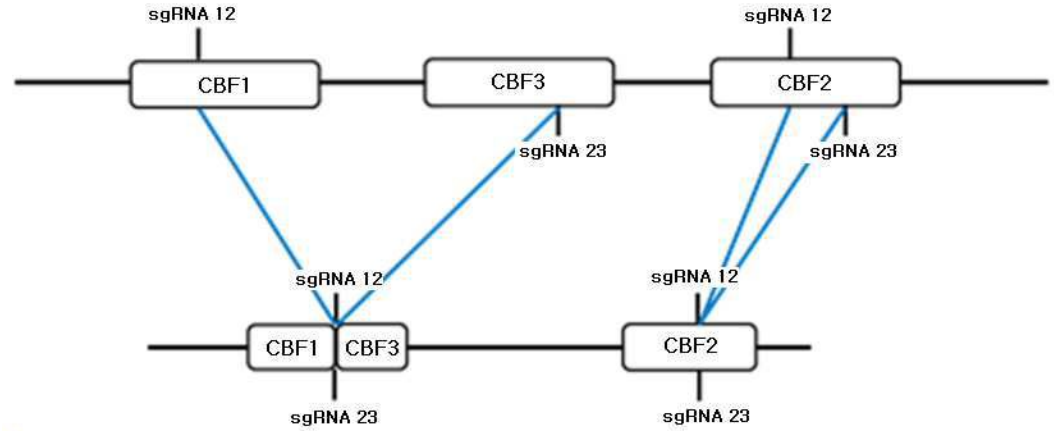
도면6a


C24RDLUC #50-35 expectation
700bp band
Deletion
65 base pair smaller band than wild type
segregation
C24RDLUC #50-35
C24RDLUC gDNA
Large mutation CBF1~CBF3
CBF1 3' UTR region
CBF2 region
Cas9

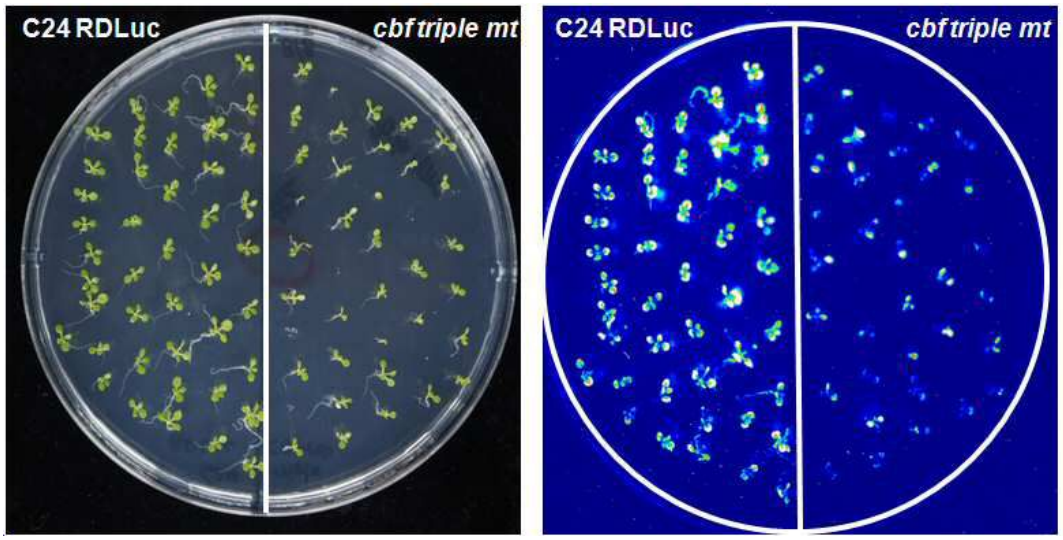
도면6b

Wild Type
CBF1 sgRNA12
CBF3 sgRNA23
GGCTCGGGACTTTCCAAACGGCTGAGATGGCAGCTCGTGCTCA----//----GGCCGATCAGCCTGTCTCAATTTCGCTGACTCGGCTTG
GGCTCGGGACTTTCCAAAC----------11 base pair insertion ----------TCAATTTCGCTGACTCGGCTTG
C24RDLUC #50-35
Wild type
CBF2 sgRNA12
CBF2 sgRNA23
CGAGGATTTGGCTCGGGACTTTCCAAACCGCTGAGATGGCAGCTCGTGTGC----//--AGATCTGCCTGTCTCAATTTCGCTGACTCGGCTTG
CGAGGATTTGGCTCGGGACTTTCCAAAC----------TCAATTTCGCTGACTCGGCTTG
C24RDLUC #50-35

도면6c



도면7



서 열 목 록

<110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University

<120> Screening method for genes of cold stress resistance

<130> PN160315P

<150> KR 16/131,495

<151> 2016-10-11

<160> 16

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 642

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

atgaactcat tttcagcttt ttctgaaatg tttggctccg attacgagcc tcaaggcgga 60

gattattgtc cgacgttggc cacgagttgt ccgaagaaac cggcgggccg taagaagttt 120

cgtgagactc gtcacccaat ttacagagga gttcgtcaaa gaaactccgg taagtgggtt 180

tctgaagtga gagagccaaa caagaaaacc aggatttggc tcgggacttt ccaaaccgct 240

gagatggcag ctcgtgctca cgacgtcgct gcattagccc tccgtggccg atcagcatgt 300

ctcaacttcg ctgactcggc ttggcggcta cgaatcccgg agtcaacatg cgccaaggat 360

atccaaaaag cggctgctga agcggcgttg gcttttcaag atgagacgtg tgatacgacg 420

accacgaatc atggcctgga catggaggag acgatggtgg aagctattta tacaccggaa 480

cagagcgaag gtgcgtttta tatggatgag gagacaatgt ttgggatgcc gactttgttg 540

gataatatgg ctgaaggcat gcttttaccg ccgccgtctg ttcaatggaa tcataattat 600

gacggcgaag gagatggtga cgtgtcgctt tggagttact aa 642

<210> 2

<211> 651

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

atgaactcat tttctgcctt ttctgaaatg tttggctccg attacgagtc tccggtttcc 60

tcaggcggtg attacagtcc gaagcttgcc acgagctgcc ccaagaaacc agcgggaagg 120

aagaagtttc gtgagactcg tcacccaatt tacagaggag ttcgtcaaag aaactccggt 180

aagtgggtgt gtgagttgag agagccaaac aagaaaacga ggatttggct cgggactttc 240

caaaccgctg agatggcagc tcgtgctcac gacgtcgccg ccatagctct ccgtggcaga 300

tctgcctgtc tcaatttcgc tgactcggct tggcggctac gaatcccgga atcaacctgt 360

gccaaggaaa tccaaaaggc ggcggctgaa gccgcgttga attttcaaga tgagatgtgt 420

catatgacga cggatgctca tggtcttgac atggaggaga ccttggtgga ggctatttat 480

acgccggaac agagccaaga tgcgttttat atggatgaag aggcgatgtt ggggatgtct 540

agtttgttgg ataacatggc cgaagggatg cttttaccgt cgccgtcggt tcaatggaac 600

tataattttg atgtcgaggg agatgatgac gtgtccttat ggagctatta a 651

<210> 3

<211> 651

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 3

atgaactcat tttctgcttt ttctgaaatg tttggctccg attacgagtc ttcggtttcc 60

tcaggcggtg attatattcc gacgcttgcg agcagctgcc ccaagaaacc ggcgggtcgt 120

aagaagtttc gtgagactcg tcacccaata tacagaggag ttcgtcggag aaactccggt 180

aagtgggttt gtgaggttag agaaccaaac aagaaaacaa ggatttggct cggaacattt 240

caaaccgctg agatggcagc tcgagctcac gacgttgccg ctttagccct tcgtggccga 300

tcagcctgtc tcaatttcgc tgactcggct tggagactcc gaatcccgga atcaacttgc 360

gctaaggaca tccaaaaggc ggcggctgaa gctgcgttgg cgtttcagga tgagatgtgt 420

gatgcgacga cggatcatgg cttcgacatg gaggagacgt tggtggaggc tatttacacg 480

gcggaacaga gcgaaaatgc gttttatatg cacgatgagg cgatgtttga gatgccgagt 540

ttgttggcta atatggcaga agggatgctt ttgccgcttc cgtccgtaca gtggaatcat 600

aatcatgaag tcgacggcga tgatgacgac gtatcgttat ggagttatta a 651

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequences

<400> 4

agctgccatc tcagcggtt 19

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequences

<400> 5

gagtcagcga aattgagac 19

<210> 6

<211> 5

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequences

<400> 6

gattg 5

<210> 7

<211> 4

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequences

<400> 7

aaac 4

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequences

<400> 8

gccggtaccc attcggagtt tttgtat 27

<210> 9

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequences

<400> 9

tatgaattcg ccatttgtct gcagaattg 29

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequences

<400> 10

gatcgacctg tctcagctgg 20

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequences

<400> 11

aaacaaccgc tgagatggca gctc 24

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequences

<400> 12

cccaagagga acagcgataa g 21

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequences

<400> 13

tggatcctta ctttttcttt tttgcctggc 30

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequences

<400> 14

attaatgcag ctggcacgac 20

<210> 15

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequences

<400> 15

ggcctcttcg ctattacgc 19

<210> 16

<211> 11

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Unknown Sequences

<400> 16

ttgcgctaat t 11