



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0014337
(43) 공개일자 2023년01월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01H 1/00 (2006.01) A01H 1/06 (2006.01)
A01H 4/00 (2006.01) A01H 5/10 (2018.01)
A01H 6/82 (2018.01) C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01H 1/1245 (2021.01)
A01H 1/06 (2021.01)

(21) 출원번호 10-2021-0095574

(22) 출원일자 2021년07월21일

심사청구일자 2021년07월21일

(71) 출원인

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

김상희

경상남도 진주시 진주대로 501, 27동 320호(가좌동)

손건희

경상남도 진주시 소호로19번길 11, 108동 801호(충무공동, 진주혁신도시 중흥에스-클래스 더프라임)

김재연

경상남도 진주시 진주역로73번길 33, 104동 1401호(가좌동, 센트럴웰가)

(74) 대리인

최규환

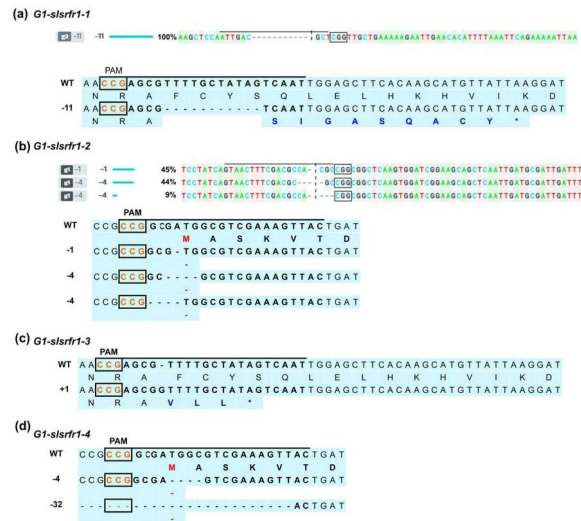
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 유전자 교정을 이용한 병 저항성이 조절된 토마토 식물체의 제조방법 및 상기 제조방법에 의해 제조된 토마토 식물체

(57) 요약

본 발명은 유전자 교정을 이용한 병 저항성이 조절된 토마토 식물체의 제조방법 및 상기 제조방법에 의해 제조된 토마토 식물체에 관한 것으로, 보다 상세하게는 토마토 유래 식물면역조절인자 *SRFR1* (*SUPPRESSOR OF rps4-RLD1*) 유전자를 CRISPR/Cas 시스템을 이용하여 교정한 기생영양(biotrophic) 및/또는 사물기생성 병원균에 대한 저항성이 조절된 토마토 식물체에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A01H 4/00 (2013.01)
A01H 5/10 (2022.05)
A01H 6/825 (2022.05)
C07K 14/415 (2013.01)
C12N 15/8282 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395067635
과제번호	PJ01575601
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	바이오그린연계농생명혁신기술개발(R&D)
연구과제명	면역 억제인자의 엔지니어링을 통한 병저항성 작물 개발
기 여 율	6/10
과제수행기관명	경상대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395067656
과제번호	PJ01483601
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	차세대농작물신육종기술개발(R&D)
연구과제명	신육종기술 활용 병저항성 및 내건성 육종소재 개발
기 여 율	3/10
과제수행기관명	경상대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395054510
과제번호	PJ01344901
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21사업
연구과제명	식물 면역반응 조절기작의 이해와 이를 이용한 작물 병저항성 엔지니어링
기 여 율	1/10
과제수행기관명	경상대학교
연구기간	2018.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

토마토 유래 *SRFR1* (*Solanum lycopersicum* SUPPRESSOR OF *rps4*-*RLD1*; *SISRFR1*) 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA(guide RNA)를 암호화하는 DNA 및 엔도뉴클레아제(endonuclease) 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제조합 벡터; 또는 *SISRFR1* 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA와 엔도뉴클레아제 단백질의 복합체(ribonucleoprotein);를 유효성분으로 함유하는, 토마토 식물체의 병 저항성을 조절하기 위한 유전체 교정용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 *SISRFR1* 유전자의 표적 염기서열은 서열번호 4 또는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

(a) 토마토 유래 *SRFR1* (*Solanum lycopersicum* SUPPRESSOR OF *rps4*-*RLD1*; *SISRFR1*) 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA(guide RNA) 및 엔도뉴클레아제(endonuclease) 단백질을 토마토 식물세포에 도입하여 유전체를 교정하는 단계; 및

(b) 상기 유전체가 교정된 토마토 식물세포로부터 토마토 식물체를 재분화하는 단계;를 포함하는, 병 저항성이 조절된 유전체 교정 토마토 식물체의 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 (a) 단계의 가이드 RNA 및 엔도뉴클레아제 단백질을 토마토 식물세포에 도입하는 것은, *SISRFR1* 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA를 암호화하는 DNA 및 엔도뉴클레아제 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 제조합 벡터; 또는 *SISRFR1* 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA와 엔도뉴클레아제 단백질의 복합체(ribonucleoprotein);를 이용하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 *SISRFR1* 유전자의 표적 염기서열은 서열번호 4 또는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 병 저항성은 야생형에 비해 기생영양(biotrophic) 병원균에 의한 식물병에 대한 저항성을 증가시키거나, 사물기생성(necrotrophic) 병원균에 의한 식물병에 대한 저항성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 7

제3항 내지 제6항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 병 저항성이 조절된 유전체 교정 토마토 식물체.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 유전체 교정 토마토 식물체는 야생형에 비해 기생영양(biotrophic) 병원균에 의한 식물병에 대한 저항성이 증가되거나, 사물기생성(necrotrophic) 병원균에 의한 식물병에 대한 저항성이 감소되는 것을 특징으로 하는 유전체 교정 토마토 식물체.

청구항 9

제7항에 따른 토마토 식물체의 유전체가 교정된 종자.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유전자 교정을 이용한 병 저항성이 조절된 토마토 식물체의 제조방법 및 상기 제조방법에 의해 제조된 토마토 식물체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 애기장대 *SRFR1* (*SUPPRESSOR OF rps4-RLD 1*) 유전자는 *RPS4* (*Ribosomal protein S4*) 유전자에 과오 돌연변이 (missense mutation)를 가지고 있는 야생형 RLD 애기장대를 이용한 억제제 스크리닝(suppressor screening)을 통해서 발견되었다. 애기장대에서 *SRFR1*의 돌연변이는 이펙터인 *avrRPS4* 또는 *hopAI*을 발현하는 슈도모나스 시린개 pv. 토마토 (*Pto*) DC3000 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pto*) DC3000)에 대해, 각각 상응되는 *R* 유전자인 *RPS4* 및 *RPS6*가 돌연변이되었을 때 저항성을 증가시켰다. 열성 형질의 *srfr1* 돌연변이체는 야생형 RLD처럼 *Pto* DC3000에 유사한 감수성을 보이므로 *SRFR1*은 ETI에서 음성조절자로 확인되었다. *SRFR1*은 면역조절자인 EDS1 (Enhanced disease susceptibility 1)과 TNL 종류의 저항성 단백질인 *RPS4*, *RPS6*, *SNC1* (suppressor of *npr1-1*, constitutive 1)과 같은 단백질과 복합체를 형성하는 어댑터 단백질로써 기능을 한다. *SRFR1*은 전사억제조절자로 알려져 있는 사카로미세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) *Ssn6* 단백질과 염기서열이 유사한 TPR (tetratricopeptide repeat) 도메인을 가지고 있다. 그리고 애기장대 *srfr1* 돌연변이체에서 면역관련유전자의 발현이 증가되는 것이 확인되었다. 게다가, *SRFR1* 단백질은 면역 샤페론인 *SGT1b* (Suppressor of G2 allele of *SKP1* homolog B)와 TCP 패밀리의 전사조절인자들과 상호작용한다. 이러한 결과들은 *SRFR1* 단백질이 ETI 관련 전사면역반응을 음성으로 조절하는 어댑터 단백질로써의 역할을 뒷받침한다.

[0003] 우수한 형질의 식물체를 개발하기 위해 EMS (ethyl methane sulfonate) 또는 감마선 처리 등을 이용하여 자연적 돌연변이를 유도하거나 우수한 양친을 교배하는 전통적 육종방법이 주로 이용되어져 왔으나, 이 방법의 경우 원하는 목표 형질만 바꾸는데 어려움이 있어, 최근에는 목표 형질만 대입하기 위해 TALENs, ZFNs, CRISPR/Cas9 등을 이용한 신육종 방법이 적용되고 있다. 그러나 TALENs 또는 ZFNs의 경우 인공적인 뉴클레아제 설계 및 제작에 많은 시간과 비용이 소요되고, 다수의 유전자를 편집하기 어려운 단점을 가진다. 그러나 CRISPR/Cas9 시스템은 매우 높은 표적 특이성을 가지고 있고 메틸화된 DNA도 표적으로 인지할 수 있기 때문에 매우 다양한 유전자에 적용할 수 있으며 멘델의 유전법칙에 따라 자손에게 전달되어 형질의 세대고정이 가능하다는 장점이 있다. 또한, Cas9 단백질과 sgRNA (single guide RNA)만을 필요로 하기 때문에 위의 두 방법에 비해 적은 비용으로 목표 형질의 도입이 가능하다는 장점이 있어 최근 동물 및 식물 등에서 널리 적용되어지고 있는 신육종 기술이다.

[0004] 한편, 한국등록특허 제2264215호에는 '유전자 교정을 이용한 아스코르브산 함량이 증가된 토마토 식물체의 제조방법 및 상기 제조방법에 의해 제조된 토마토 식물체'가 개시되어 있고, 한국공개특허 제2019-0043841호에는 '식물체에서 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 *LeMADS-RIN* 유전자 편집에 의해 에틸렌 생산을 감소시키는 방법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 유전자 교정을 이용한 병 저항성이 조절된 토마토 식물체의 제조방법 및 상기 제조방법에 의해 제조된 토마토 식물체에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 토마토 *SRFR1* 게놈 DNA의 두 영역을 표적으로 하는 sgRNA와 CRISPR/Cas9을 이용하여 토마토 *SRFR1* 돌연변이체(*slsrfr1*)를 제조하였고, 상기 돌연변이체에서 살리실산 신호전달에 관여하는 병원체 관련(pathogen-related, PR) 유전자의 발현이 증가하는 것을 확인하였으며, 상기 돌연변이체가 비교정 토마토 식물체에 비해 *Pto* DC3000에 대한 저항성이 증진되었음을 확인하였다. 하지만 사물기생성(necrotrophic) 곰팡이인 푸사리움 옥시스포럼 f. sp. 라이코페르시씨(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)에 대한 저항성은 비교정 토마토 식물체에 비해 감소되었음을 확인할 수 있었다. 이를 통해, *SRFR1*이 토마토 식물체에서 기생영양(biotrophic) 병원균과 사물기생성 병원균에 대한 저항성을 조절하는 데 관여함을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 토마토 유래 *SRFR1* (*Solanum lycopersicum* *SUPPRESSOR OF rps4-RLD1*;

SISRFR1) 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA(guide RNA)를 암호화하는 DNA 및 엔도뉴클레아제(endonuclease) 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터; 또는 *SISRFR1* 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA와 엔도뉴클레아제 단백질의 복합체(ribonucleoprotein);를 유효성분으로 함유하는, 토마토 식물체의 병 저항성을 조절하기 위한 유전체 교정용 조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 (a) 토마토 유래 *SRFR1* (*Solanum lycopersicum* SUPPRESSOR OF *rps4-RDL1*; *SISRFR1*) 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA 및 엔도뉴클레아제 단백질을 토마토 식물세포에 도입하여 유전체를 교정하는 단계; 및 (b) 상기 유전체가 교정된 토마토 식물세포로부터 토마토 식물체를 재분화하는 단계;를 포함하는, 병 저항성이 조절된 유전체 교정 토마토 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 병 저항성이 조절된 유전체 교정 토마토 식물체 및 이의 유전체가 교정된 종자를 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에서 제시한 *SISRFR1* 유전자 편집을 통한 돌연변이 유도는 병 저항성이 조절된 토마토 식물체를 개발하는데 유용하게 이용할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 방법은 자연적 변이와 구별할 수 없는 변이를 유도하므로, 안전성과 환경 유해성 여부를 평가하기 위해 막대한 비용과 시간이 소모되는 GMO(Genetically Modified Organism) 작물과 달리 비용과 시간을 절약할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1a는 토마토 *SRFR1*의 게놈 구조 및 gRNA 표적 위치(Target 1, 2)를 보여주고, 도 1b는 gRNA의 표적 서열이고, 도 1c는 p*SISRFR*-GE 컨스트럭트의 T-DNA 모식도이며, 도 1d는 *SISRFR1 sgRNA1*- 및 *sgRNA2*-유도 G1 돌연변이체의 CAPS 분석 결과로, 하얀색 화살표는 동형접합 돌연변이체를 나타낸다.

도 2는 토마토 G0 식물체에서 표적 부위를 분석한 결과이다. 수직 점선은 각 sgRNA에 대해 SpCas9에 의한 절단 부위를 나타낸다.

도 3은 토마토 G1 식물체에서 표적 부위의 유전체 교정 양상을 분석한 결과이다.

도 4는 토마토 *SRFR1* 돌연변이체(*sIsrfr1*)의 생장모습이며(a), 상기 돌연변이체에서 식물방어기작에 관여하는 유전자의 발현 정도를 qRT-PCR을 통해서 확인한 결과(b)이다. *; $P < 0.01$.

도 5는 G1 세대 *sIsrfr1* 식물체의 기생영양(biotrophic) 병원균인 슈도모나스 시린개 pv. 토마토 DC3000 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)에 대한 반응을 보여주는 것으로, (a)는 접종 5일 후의 앞에서 나타난 병증을 보여주는 사진이고, (b)는 균수를 측정한 결과이다. *; $P < 0.01$.

도 6은 G1 세대 *sIsrfr1* 식물체의 사물기생 병원균인 푸사리움 옥시스포럼 f. sp. 라이코페르시씨(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)에 대한 반응을 보여주는 것으로, (a)는 접종 3일 후의 앞 사진이고, (b)는 트립판 블루 염색 이미지이며, (c)는 병변 부위의 직경을 측정한 결과이다. *; $P < 0.01$.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 토마토 유래 *SRFR1* (*Solanum lycopersicum* SUPPRESSOR OF *rps4-RDL1*; *SISRFR1*) 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA(guide RNA)를 암호화하는 DNA 및 엔도뉴클레아제(endonuclease) 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터; 또는 *SISRFR1* 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA와 엔도뉴클레아제 단백질의 복합체(ribonucleoprotein);를 유효성분으로 함유하는, 토마토 식물체의 병 저항성을 조절하기 위한 유전체 교정용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명에 따른 유전체 교정용 조성물에 있어서, 상기 식물병은 기생영양(biotrophic) 병원균에 의한 식물병 또는 사물기생(necrotrophic) 병원균에 의한 식물병일 수 있고, 상기 기생영양(biotrophic) 병원균은 바람직하게는 슈도모나스 시린개 pv. 토마토 (*Pto*) DC3000 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pto*) DC3000)일 수 있으며, 상기 사물기생(necrotrophic) 병원균은 바람직하게는 푸사리움 옥시스포럼 f. sp. 라이코페르시씨(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0013] 본 명세서에서 용어 "유전체/유전자 교정(genome/gene editing)"은, 인간 세포를 비롯한 동·식물 세포의 유전체 염기서열에 표적지향형 변이를 도입할 수 있는 기술로서, DNA 절단에 의한 하나 이상의 핵산 분자의 결실

(deletion), 삽입(insertion), 치환(substitutions) 등에 의하여 특정 유전자를 녹-아웃(knock-out) 또는 녹-인(knock-in)하거나, 단백질을 생성하지 않는 비-코딩(non-coding) DNA 서열에도 변이를 도입할 수 있는 기술을 말한다. 본 발명의 목적상 상기 유전체 교정은 특히 엔도뉴클레아제(endonuclease) 예컨대, Cas9 (CRISPR associated protein 9) 단백질을 및 가이드 RNA를 이용하여 식물체에 변이를 도입하는 것일 수 있다. 또한, '유전자 교정'은 '유전자 편집'과 혼용되어 사용될 수 있다.

[0014] 또한, 용어 "표적 유전자"는 본 발명을 통해 교정하고자 하는 식물체의 유전체 내에 있는 일부 DNA를 의미하며, 그 유전자의 종류에 제한되지 않으며, 코딩 영역 및 비-코딩 영역을 모두 포함할 수 있다. 당업자는 그 목적에 따라, 제조하고자 하는 유전체 교정 식물체에 대하여 원하는 변이에 따라 상기 표적 유전자를 선별할 수 있다.

[0015] 본 발명의 일 구현 예에 따른 조성물에 있어서, 상기 토마토 유래 *SISRFR1* (*Solanum lycopersicum* SUPPRESSOR OF *rps4-RLD1*) 유전자는 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 SISRFR1 단백질을 암호화하는 것으로, 바람직하게는 *SISRFR1*의 게놈 DNA는 서열번호 1로 표시되는 염기서열일 수 있고, *SISRFR1*의 cDNA는 서열번호 2로 표시되는 염기서열일 수 있다.

[0016] 또한, 용어 "가이드 RNA(guide RNA)"는 짧은 단일 가닥의 RNA로, 표적 유전자를 암호화하는 염기서열 중 표적 DNA에 특이적인 RNA를 의미하며, 표적 DNA 염기서열과 전부 또는 일부가 상보적으로 결합하여 해당 표적 DNA 염기서열로 엔도뉴클레아제 단백질을 이끄는 역할을 하는 리보핵산을 의미한다. 상기 가이드 RNA는 두 개의 RNA, 즉, crRNA (CRISPR RNA) 및 tracrRNA (trans-activating crRNA)를 구성 요소로 포함하는 이중 RNA (dual RNA); 또는 표적 유전자 내 염기서열과 전부 또는 일부 상보적인 서열을 포함하는 제1 부위 및 엔도뉴클레아제(특히, RNA-가이드 뉴클레아제)와 상호작용하는 서열을 포함하는 제2 부위를 포함하는 단일 사슬 가이드 RNA(single guide RNA, sgRNA) 형태를 말하나, 엔도뉴클레아제가 표적 염기서열에서 활성을 가질 수 있는 형태라면 제한없이 본 발명의 범위에 포함될 수 있으며, 함께 사용된 엔도뉴클레아제의 종류 또는 엔도뉴클레아제의 유래 미생물 등을 고려하여 당업계의 공지된 기술에 따라 제조하여 사용할 수 있다.

[0017] 또한, 상기 가이드 RNA는 플라스미드 주형으로부터 전사된 것, 생체 외(*in vitro*)에서 전사된(transcribed) 것(예컨대, 올리고뉴클레오타이드 이중가닥) 또는 합성한 가이드 RNA 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0018] 본 발명의 일 구현 예에 따른 조성물에 있어서, 상기 *SISRFR1* 유전자의 표적 염기서열은 서열번호 4 또는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0019] 또한, 본 발명에 따른 유전체 교정용 조성물에 있어서, 상기 엔도뉴클레아제 단백질은 Cas9, Cpf1 (also known as Cas12a), TALEN (Transcription activator-like effector nuclease), ZFN (Zinc Finger Nuclease) 또는 이의 기능적 유사체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 RNA-가이드 뉴클레아제인 Cas9 또는 Cpf1 등일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 Cas9 단백질을 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 또한, 상기 Cas9 단백질은 스트렙토코커스 피요제네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래의 Cas9 단백질, 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 써모필러스(*S. thermophilus*) 또는 스트렙토코커스 아우레우스(*S. aureus*) 유래의 Cas9 단백질, 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*) 유래의 Cas9 단백질, 파스투렐라 물토시다(*Pasteurella multocida*) 유래의 Cas9 단백질, 프란시셀라 노비시다(*Francisella novicida*) 유래의 Cas9 단백질 등으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. Cas9 단백질 또는 이의 유전자 정보는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 GenBank와 같은 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있다. 상기 Cas9 유전자 정보는 공지된 서열을 그대로 사용할 수도 있고, 형질도입되는 대상(유기체)의 코돈에 최적화된 서열을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] Cas9 단백질은 RNA-guided DNA 엔도뉴클레아제 효소로, 이중 가닥 DNA 절단(double stranded DNA break)을 유도한다. Cas9 단백질이 정확하게 표적 염기서열에 결합하여 DNA 가닥을 잘라내기 위해서는 PAM (Protospacer Adjacent Motif)이라 알려진 3개의 염기로 이루어진 짧은 염기서열이 표적 염기서열 옆에 존재해야 하며, Cas9 단백질은 PAM 서열(NGG)로부터 3번째와 4번째 염기쌍 사이를 추정하여 절단한다.

[0022] 본 발명에 따른 유전체 교정용 조성물에 있어서, 상기 가이드 RNA와 엔도뉴클레아제 단백질은 리보핵산-단백질(ribonucleoprotein) 복합체를 형성하여 RNA 유전자 가위(RNA-Guided Engineered Nuclease, RGEN)로 작동할 수 있다.

[0023] 본 발명에 따른 유전체 교정용 조성물에 있어서, 사용된 CRISPR/Cas9 시스템은 교정하고자 하는 특정 유전자의 특정위치에 이중나선 절단을 도입하여 DNA 수선 과정에서 유도되는 불완전 수선에 의한 삽입-결실(insertion-

deletion, InDel) 돌연변이를 유도시키는 NHEJ(non-homologous end joining) 기작에 의한 유전자 교정 방법이다.

[0024] 본 발명은 또한,

[0025] (a) 토마토 유래 *SRFR1* (*Solanum lycopersicum* SUPPRESSOR OF *rps4*-*RLD1*; *SISRFR1*) 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA(guide RNA) 및 엔도뉴클레아제(endonuclease) 단백질을 토마토 식물세포에 도입하여 유전체를 교정하는 단계; 및

[0026] (b) 상기 유전체가 교정된 토마토 식물세포로부터 토마토 식물체를 재분화하는 단계;를 포함하는, 병 저항성이 조절된 유전체 교정 토마토 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0027] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 (a) 단계의 가이드 RNA 및 엔도뉴클레아제 단백질을 토마토 식물세포에 도입하는 것은, *SISRFR1* 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA를 암호화하는 DNA 및 엔도뉴클레아제 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터; 또는 *SISRFR1* 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA와 엔도뉴클레아제 단백질의 복합체(ribonucleoprotein);를 이용하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 본 발명의 일 구현 예에 따른 제조방법에 있어서, 상기 *SISRFR1* 유전자의 표적 염기서열은 서열번호 4 또는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 상기 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA를 암호화하는 DNA 및 엔도뉴클레아제 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 도입하는 것은 형질전환 방법을 의미한다. 식물 종의 형질전환은 이제 는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 재조합 벡터를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다.

[0030] 본 발명의 일 구현 예에 따른 제조방법에 있어서, 상기 재조합 벡터가 식물 세포에 형질전환되면, DNA 결합 및 절단 활성이 있는 엔도뉴클레아제 단백질과 상기 엔도뉴클레아제 단백질에 결합되며 표적 서열로 엔도뉴클레아제 단백질을 이끄는 sgRNA가 함께 발현되게 된다.

[0031] 또한, 본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 가이드 RNA와 엔도뉴클레아제 단백질의 복합체를 식물세포에 형질도입하는 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens et al., 1982, Nature 296:72-74; Negrutiu et al., 1987, Plant Mol. Biol. 8:363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito et al., 1985, Bio/Technol. 3:1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202:179-185), 각종 식물 요소의(DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein et al., 1987, Nature 327:70), 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 매개된 유전자 전이에서(비완전성) 박테리아에 의한 감염 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다.

[0032] 본 명세서에서 용어 "재조합"은 세포가 이중의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이중의 펩티드 또는 이중의 핵산에 의해 코딩된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0033] 또한, 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용 가능한 프로모터, 인핸서, 종결 신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.

[0034] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA 및 엔도뉴클레아제 단백질이 도입되는 "식물세포"는 어떤 식물세포도 된다. 식물세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양 기관 또는 전체 식물이다. "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃가루, 소포자, 난세포, 종자 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다. 식물 조직은 인 플란타(in planta)이거나 기관 배양, 조직 배양 또는 세포 배양 상태 일 수 있다.

- [0035] 본 발명의 제조방법에 있어서, 유전체가 교정된 식물세포로부터 유전체가 교정된 식물을 재분화하는 방법은 당 업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다. 유전체가 교정된 식물세포는 전식물로 재분화되어야 한다. 캘러스 또는 원형질체 배양으로부터 성숙한 식물의 재분화를 위한 기술은 수많은 여러 가지 중에 대해서 당업계에 주지되어 있다(Handbook of Plant Cell Culture, 1-5권, 1983-1989 Momillan, N.Y.).
- [0036] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조된 병 저항성이 조절된 유전체 교정 토마토 식물체 및 이의 유전체가 교정된 종자를 제공한다.
- [0037] 본 발명에 따른 병 저항성이 조절된 유전체 교정 토마토 식물체는 *SISRFR1* (*Solanum lycopersicum* *SUPPRESSOR OF rps4-RLD1*) 유전자를 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 교정한 것으로, 토마토 유래 *SISRFR1* 유전자가 녹-아웃되어, 유전체를 교정하지 않은 토마토 식물체에 비해 병 저항성이 조절된 형질을 가지는 유전체 교정 토마토 식물체이다. 상기 유전체 교정 토마토 식물체는 아생형에 비해 기생영양(biotrophic) 병원균에 의한 식물병에 대한 저항성이 증가되고, 사물기생성(necrotrophic) 병원균에 의한 식물병에 대한 저항성이 감소된 것을 특징으로 한다.
- [0039] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] **재료 및 방법**
- [0042] **1. 토마토 형질 전환을 위한 벡터 구축**
- [0043] CRIPSR-P v2.0 프로그램 (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>)을 이용하여 *SISRFR1*의 N-말단 부위에서 SpCas9-gRNA 복합체의 타겟부위를 조사하였다. 그리고 유전체 교정을 일으킬 수 있는 수치인 on-score, gRNA의 2차 구조, 타겟 부위의 GC 뉴클레오티드 함량 및 off-target 서열을 고려하여 두 개의 gRNA를 선정하였다. 두 개의 gRNA는 애기장대 U6 프로모터 (originated from Addgene #46968), scaffold RNA와 poly T를 프라이머 이합체화반응(dimerization) 방법을 통해 서로 연결하였고, 상기 gRNA 전체는 Golden Gate 클로닝 시스템을 통해서 레벨1 플라스미드인 pICH47751 및 pICH47761에 각각 클로닝 하였다. 만들어진 각 gRNA 모듈은 식물 선별마커 (Addgene #51144), SpCas9 (Addgene #49771), 링커 (Addgene #48019)와 함께 Golden Gate 클로닝 시스템을 통해서 pAGM4723 내부로 클로닝하여 컨스트럭트를 제조하였으며, 상기 컨스트럭트를 pSISRFR1-GE로 명명하였다.
- [0045] **2. 아그로박테리움을 이용한 토마토 형질전환 및 CRISPR/Cas9으로 유전체 교정이 일어난 식물체 선별**
- [0046] 토마토 형질전환 및 식물체 선별은 이전 연구를 참고하여 수행하였다 (Plant Cell Rep. 2021 Jun;40(6):999-1011). 토마토 품종 M82 (*Solanum lycopersicum* cv. M82)를 25℃, 16시간 명/8시간 암조건에서 1/2 MSO 배지 (2.2g MS salts + B5, 20g sucrose, 0.5g MES (pH=5.7), 7.5g agar for 1L)에 7일동안 키운 후 칼을 이용하여 자엽(cotyledon) 외식편들을 만들어 PREMC 배지(2.2g MS salts + B5, 30g maltose, 0.1g Ascorbic acid, 1.952g MES, 0.2mg IAA (pH=5.5), 7.5g agar for 1L; 상기 혼합물을 멸균한 후, 1.0mg Zeatin trans-isomer, 1mℓ Putrescine(1mM), acetosyringone(AS) 100 μM 첨가) 위에 올려 25℃ 암조건에서 하루동안 보관한다. pSISRFR1-GE 플라스미드는 전기천공법을 통해 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 (MP90)으로 형질전환시켰다. 28℃에서 18시간동안 배양한 pSISRFR1-GE를 보유한 아그로박테리움 3mℓ을 30 mℓ의 LB 배지(50mg · L⁻¹ kanamycin 및 10mg · L⁻¹ gentamicin 포함)로 옮겨 OD₆₀₀ 값이 0.8~1 정도될 때까지 배양 하였다. 아그로박테리움을 3,000rpm으로 15분동안 원심분리하고 펠렛은 200 μM 아세토시린곤(acetosyringone, #D134406, Sigma, USA)을 함유한 30mℓ의 ABM-MS [1.106g K₂HPO₄, 0.565g KH₂PO₄, 0.748g NH₄NO₃, 0.0745g KCl, 0.154g MgSO₄, 0.0075g CaCl₂, 0.0015g FeSO₄, 20g glucose, 1.952g MES, 1.1g MS salts + B5, 2.5g sucrose (pH 5.5) for 1L]에 현탁시켰다. 현탁액을 한시간동안 28℃에서 배양하고 토마토 자엽(cotyledon) 외식편을 아그로박테리움과 20분동안 공동배양하여 토마토를 형질전환시켰다. 토마토 자엽 외식편을 200 μM 아세토시린곤을 함유하고 있는 ABM-MS에 옮겨 25℃ 암조건에서 2일동안 배양하였다. 외식편에 붙은 아그로박테리움은 500mg · L⁻¹ 티멘틴(timentin) 용액에 2분간 저어서 세척하였다. 외식편에 남아있는 물은 와트만(Whatman) 페이퍼를 이

용하여 완전히 없애주고, 선별배지[SEL4-70; 4.4g MS salts + B5, 30g maltose, 0.05mg IAA, 0.976g MES, 0.5mg zeatin ribose trans-isomer, 70mg kanamycin, 300mg timentin, 1mM putrescine (pH 5.7), 8g agar for 1L]에 올려놓고 캘러스를 유도하며 완전한 줄기가 나오기까지 2주마다 캘러스를 새 선별배지(SEL4-70)에 옮겨주었다. 줄기가 나온 외식편은 뿌리유도배지[RIM; 2.2g MS salts + B5, 20g sucrose, 0.1mg NAA, 0.3mg IBA, 300mg Timentin (pH 5.7), 8g agar for 1L]에 옮기고 뿌리가 유도될 때까지 배양하였다. 건강한 식물체는 25℃, 16시간 명/8시간 암조건에서 키운다.

3. 토마토에서 게노믹 DNA 분리

게노믹(genomic) DNA 분리는 Pater 등(Plant Biotechnol. J. (2009) 7:821-835)을 참고하여 수행하였다. 콜크 보러(cork borer) 5호를 이용하여 G0와 G1세대 토마토 식물체에서 두 장의 잎 조각을 튜브에 넣고 액체질소에 올려 구슬을 이용하여 mixer mill (#MM301, Retsch, Germany)에서 1분동안 분쇄하였다. 상기 분말에 300 μ l의 2X CTAB extraction buffer (0.1M Tris, 2% CTAB, 1.4M NaCl, and 20mM EDTA)를 넣고 65℃에서 20분간 반응시켰다. 튜브에 300 μ l 클로로포름을 추가로 넣어주고 강하게 섞어준 다음 14,000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상등액 200 μ l를 취하여 새 튜브로 옮기고 200 μ l의 이소프로판올을 상등액에 넣어 섞고 상온에서 2분간 반응시켰다. 그 후, 14,000rpm으로 5분간 원심분리한 후 1ml의 70% 에탄올을 이용하여 펠렛을 씻어주었다. 14,000rpm으로 1분간 원심분리하여 DNA 펠렛을 회수하고, 상기 펠렛을 상온에서 10분간 건조시키고 50 μ l의 삼차증류수를 넣어 녹였다. 이 중 2 μ l의 게노믹 DNA를 이용하여 25 μ l 부피의 PCR 반응에 사용하였다.

4. 시퀀싱을 통한 유전체교정 분석

G0이나 G1 세대 토마토에서 *SISRFR1* 타겟부위를 PCR을 통해서 증폭시키고 시퀀싱을 수행하였다. 상기 결과를 ICE (Inference of CRISPR Edits, <https://ice.synthego.com/#/>) 분석을 통해서 G0이나 G1 세대 토마토에서 Indel 돌연변이가 얼마나 일어났는지 확인하였다. G1 세대 토마토에서 좀 더 명확한 결과를 확인하기 위해서는 Miseq 시퀀싱을 수행하여 Cas-Analyzer 프로그램 (<http://www.rgenome.net/>)으로 분석하였다. *SISRFR1-F1/SISRFR1-R2* 프라이머 세트를 이용하여 945bp 크기의 PCR 단편을 증폭하고 유전자 특이적 염기서열과 어댑터(adaptor) 프라이머 일부 서열을 공유하는 프라이머(MiSeq-1-F2/MiSeq-1-R2 and MiSeq-2-F2/MiSeq-2-R2)를 이용하여 2차 PCR 을 통해 155bp 와 150bp 크기의 DNA 단편을 증폭하였다. MiSeq sequencing service (MiniSeqTM System, Illumina, USA)에서 제공하는 dual Index adapter (D501~D508과 D701~D712의 조합) 프라이머를 이용하여 3차 PCR 단편을 증폭하여 Miseq 시퀀싱을 통해 Indel 돌연변이 정도를 분석하였다.

5. Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) 연구

G1 세대 유전자변형 토마토에서 동형(homozygous) 식물체를 찾기 위해서 유전자의 다형성(polymorphism)을 이용한 CAPS 분석을 수행하였다. *SISRFR1-sgRNA1*과 *SISRFR1-sgRNA2*에서 일어난 돌연변이 양상을 구별하기 위해서 *SISRFR1-F1/SISRFR1-Bcc-R2*와 *SISRFR1-F1/SISRFR1-R2*를 이용하여 DNA 단편을 증폭하였다. 이 DNA에 *BccI*과 *BcgI*을 각각 처리하고 37℃에서 3-4시간 반응시켰다. 이후 상기 혼합물을 아가로스 겔에 로딩하여 전기영동을 수행하고 G1 세대의 유전형(genotype)을 선별하였다.

6. 박테리아와 곰팡이 병원균에 의한 발병 분석

슈도모나스 시린게 pv. 토마토 DC3000 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, 이하 *Pto* DC3000)에 의한 발병 분석은 이전의 연구를 따라 수행하였다(Scalschi, L. et al., PLoS One 2014, 9:e106429). 슈도모나스 배지에서 자란 pVSP61 공백터(empty vector)가 들어있는 *Pto* DC3000을 2×10^8 CFU/ml로 희석하고 6주된 토마토 식물의 세 번째 또는 네 번째 잎에 상기 희석액을 30초동안 처리한 후 높은 습도를 유지하기 위해서 플라스틱백으로 감싸서 5일동안 유지하였다. 슈도모나스균이 처리된 식물에서 콜크보더 5호를 이용하여 두 장의 잎 조각을 10 mM 염화마그네슘 용액에 넣어 분쇄한 후 단계희석하여 슈도모나스 배지에 도말한 뒤 30℃에서 배양시키며 자라난 박테리아 수를 관찰하였다.

푸사리움 옥시스포럼 f. sp. 라이코페르시씨(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, 이하 FOL)에 의한 발병

분석은 이전의 연구(Kostov, K. *et al.*, Biotechnol. Biotechnol. Equip. 2009, 23:1121-1125.)를 따라 수행하였다. 30℃ 암조건의 potato dextrose (#254920, BD Difco, USA)에서 FOL을 배양한 후, 25℃ 16시간 명/8시간 암조건에서 5일동안 키위 실험에 사용하였다. 콜크보더 1호를 사용하여 배지에서 자란 곰팡이를 플러그를 만들어 6주된 토마토 잎 위에 얹고, 25℃, 16시간 명/8시간 암조건에서 3-8일동안 두었다.

7. Trypan Blue 염색

곰팡이가 감염된 토마토 잎 조각을 트립판 블루(trypan blue) 용액 (1:1:1=85%(w/v) lactic acid:phenol (pH 8.0):glycerol(≥ 99%), 10mg/ml trypan blue)에 1시간동안 담가두었다. 염색된 잎을 99% 에탄올에 하루 담귀 색소를 제거하였다. 형광현미경을 이용하여 곰팡이 균사의 발달정도를 시각화하였다.

8. RNA 분리와 cDNA 합성

G1 세대 *sIsrfr1* 돌연변이체에서 콜크보더 5호를 이용하여 잎 조각 3장을 뚫어 2ml의 튜브에 넣고 액체질소에 얼린다음 mixer mill을 이용하여 분쇄하였다. RiboEx (#301-001, GeneAll, Korea) 프로토콜을 따라 50μl 총 RNA를 분리하고 TURBO DNA-free kit (#AM1907, Invitrogen, USA)를 사용하여 총 RNA로부터 섞여있는 genomic DNA를 제거하였다. SuperiorScripTM III cDNA synthesis kit (#EZ405S, Enzynomics, SouthKorea)를 이용하여 cDNA를 합성한 다음 그 중에서 1μl를 qRT-PCR 반응에 사용하였다.

9. qRT-PCR을 통하여 유전자 발현 분석

확인하고자 하는 유전자의 프라이머와 QuantiNova SYBR® Green PCR Kit (#208054, Qiagen, Germantown, USA)를 이용하여 CFX384 system (BioRad, Hercules, USA) 기계에서 95℃ 2분, 40 cycle (95℃ 5초, 60℃ 15초) 조건으로 DNA를 증폭하였다. *SIACT*와 *SIGAPH*를 이용하여 상대적인 유전자 발현정도를 분석하였다.

표 1

본 발명에 사용한 프라이머 정보

No.	Name	Sequence (5'-3')	Purpose
1	SISRFR1-F1	CGGTCAATAAAACACGTGTC (서열번호 6)	Genotyping
2	SISRFR1-R2	GAGCTTCATCCTACTCCTCG (서열번호 7)	Genotyping
3	SISRFR1Bcl-R	GGAACAGTGAAAAACGTAAC (서열번호 8)	Genotyping
4	SISRFR1-MiSeq-1-F2	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAATCGCATCAATTGAGCTGC (서열번호 9)	MiSeq
5	SISRFR1-MiSeq-1-R2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGACGCAAGTTTGAGCAAG (서열번호 10)	MiSeq
6	SISRFR1-MiSeq-2-F2	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTGGACATTATGAATGAAGTATTAA (서열번호 11)	MiSeq
7	SISRFR1-MiSeq-2-R2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAGGATCGAGCTGAAGTGCC (서열번호 12)	MiSeq
8	crU6C9-F1	CAGTCGGTCTCAGGAGTGATCAAAAGTCCCACATCGATCAGGTGATATATAGCAGCTTAGTTA (서열번호 13)	SgRNA construction
9	crU6C9-R1	CAGTCGGTCTCACAATCGCTATGTCGACTCTATCATATATAAACTAAGCTGCTATATACACC (서열번호 14)	SgRNA construction
10	9gR-SISRFR1-g5-F1	CAGTCGGTCTCAATTGGTAACCTTCGACGCCATCGCGTTTATAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAAC (서열번호 15)	SgRNA construction
11	9gR-R1	CAGTCGGTCTCAAGCGAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTT (서열번호 16)	SgRNA construction
12	9gR-SISRFR1-g10-F1	CAGTCGGTCTCAATTGGATTGACTATAGCAAAACGCTGTTTATAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAAC (서열번호 17)	SgRNA construction
13	SIPR1-qRT-F	GCCATATTTCACTCTTGTGAG (서열번호 18)	qRT-PCR
14	SIPR1-qRT-R	TAGTCTGGCCTCTCGGACA (서열번호 19)	qRT-PCR
15	SIPR2-qRT-F	TCCAGGTAGAGACAGTGGTAAA (서열번호 20)	qRT-PCR
16	SIPR2-qRT-R	CTGGTTTCTTTGGTGTTCCTGC (서열번호 21)	qRT-PCR
17	SIPR5-qRT-F	GCAACAAGTGTCCATACACC (서열번호 22)	qRT-PCR
18	SIPR5-qRT-R	AGACTCCACCACAATCACC (서열번호 23)	qRT-PCR
19	TomloxD-qRT-F	GACAAGCAATAGCAGGAGTG (서열번호 24)	qRT-PCR
20	TomloxD-qRT-R	TAAGTGTGCCAACATCAGAC (서열번호 25)	qRT-PCR
21	SIAct-qRT-F	GAAATAGCATAAGATGGCAGACG (서열번호 26)	qRT-PCR
22	SIAct-qRT-R	ATACCCACCATCACACAGTAT (서열번호 27)	qRT-PCR
23	SiGAPDH-qRT-F	CTGCTCTCTCAGTAGCCAACAC (서열번호 28)	qRT-PCR
24	SiGAPDH-qRT-R	CTTCCTCCAATAGCAGAGGTTT (서열번호 29)	qRT-PCR

[0069]

[0071]

10. 단백질 면역 블랏 분석

[0072]

콜크보더 5호를 이용하여 토마토 잎 조각 2개를 튜브에 넣고 50 μ l의 8M 우레아(urea)를 튜브에 넣어 막자를 이용하여 분쇄하였다. 12,000rpm으로 10분간 두 번 원심분리하여 상층액을 12%의 폴리아크릴아미드 겔에 로딩하였다. 단백질 면역 블랏 분석은 α -PR1 antibody (1:10,000 dilution, #AS10 687, Agrisera, SWEDEN) 또는 α -Actin antibody (1:10,000 dilution, #AS13 2640, Agrisera)를 이용하여 수행하였으며, Clarity Western ECL Substrate (#1705061, Bio-Rad, USA)와 SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (#34094, Thermo Scientific, USA)을 이용하여 시각화하였다.

[0074]

실시예 1. 표적 선발 및 *SISRFR1* 교정을 위한 벡터 구축

[0075]

*SRFR1*는 애기장대에서 단일 카피 유전자로, 애기장대 *SRFR1*는 주로 단백질-단백질 상호작용에 관여하는 11개의 TPR (tetratricopeptide repeat) 도메인으로 구성되어 있다. 토마토 프로테오믹스에 주석을 달기 위해 블라스트(Blast) 알고리즘을 사용하였고, 애기장대 *SRFR1*와 65%의 유사성을 가지는 Solyc02g09280 (*SISRFR1*)을 확인하였다. 애기장대 *SRFR1*과 서열 정렬을 통해 *SISRFR1*이 1,055개의 아미노산으로 이루어진 단백질을 암호화하며, 두 개의 TPR 도메인이 N-말단에 위치하고, 9개의 TPR 도메인이 중앙에 위치함을 알 수 있었다.

[0076]

본 발명자는 *SISRFR1*의 기능을 분석하기 위해, CRISPR/Cas 시스템을 이용하여 돌연변이체를 제조하였다. 표준

조건에 기반하여 sgRNA를 디자인하였고, *SISRFR1*의 ORF (open reading frame)의 5' 말단쪽 위치를 교정을 위한 자리로 선정하였다(표 2).

표 2

SISRFR1 교정을 위한 gRNA 표적 위치

Name	gRNA	Target position on genome	Number of off-targets (<4 MMs)
sgRNA1 (Target 1)	GTAACCTTCGACGCCATCGC (서열번호 4)	5' UTR and CDS	1
sgRNA2 (Target 2)	ATTGACTATAGCAAAACGCT (서열번호 5)	CDS	3

실시예 2. CRISPR/Cas9에 의해 생성된 *SISRFR1* 대립유전자 분석

G0 세대에서, 37개 식물체가 형질전환된 자엽으로부터 채분화되었다. 생성된 식물체로부터 분리한 게놈 DNA를 통해 잠재적인 게놈 교정 이벤트를 입증하였다. 표적 DNA 부위를 유전자 특이적 프라이머를 통해 증폭하고 아가로스 겔에 로딩하여 비교한 결과, 비교정 식물체 M82와 증폭산물의 크기가 유사하게 확인되어 표적 영역에서 큰 결실은 일어나지 않았음을 알 수 있었다. 또한, 증폭된 부위를 ICE (Inference of CRISPR Edits) 프로그램을 사용하여 분석한 결과, 14개의 G0 식물체에서 InDel 변이가 확인되어, CRISPR/Cas9 매개 교정 효율은 37.84%임을 알 수 있었다(도 2). 특히, 서열번호 4의 sgRNA (Target 1) 표적 부위가 서열번호 5의 sgRNA (Target 2) 표적 부위에 비해 InDel 돌연변이가 많이 발생하였음을 알 수 있었다.

모든 InDel 변이는 절단 위치에서 발생하였다. SRFR1-sgRNA1 표적 자리에서는 1 bp 삽입(G0-5, G0-6, G0-7, G0-8, 및 G0-9) 및 3 bp 결실(G0-10 및 G0-11)이 주로 관찰되었으며, 다섯 개의 독립적인 이벤트(G0-5 to 9)에서 유사한 교정 패턴을 나타냈다. ICE-기반 decomposition 분석에서 나타난 혼재된 피크는 G0 세대에서 이형접합의(heterozygous) *slsrfr1* 돌연변이체의 존재를 확인시켜 주었다. 그래서, 3개의 G0 계통(G0-1, G0-2, G0-3)을 동형접합의 식물체를 획득하기 위해 다음 세대(G1)로 진전시켜 분석하였다. G1 세대 식물체로부터 분리한 DNA를 사용하여 PCR 반응을 수행하고, CAPS 분석을 진행하여 동형접합의 G1 식물체를 확인하였다(도 1d).

또한, CAPS 분석을 통해 동형접합으로 확인된 G1 식물체 모두를 대상으로 Deep sequencing 또는 Sanger sequencing 분석을 수행하였다. 그 결과, 2종의 monoallelic 동형접합체 (11 bp 결실 in TPR domain, *slsrfr1-1*; 및 1 bp 삽입 in TPR domain, *slsrfr1-3*), 1종의 multiallelic 동형접합체 (1, 4, 및 4 bp 결실, *slsrfr1-2*), 1종의 biallelic 동형접합체 (22 bp 결실 및 4 bp 결실 removing the start codon, *slsrfr1-4*)를 포함하는 4 유형의 대립유전자를 가진 G1 식물체가 생산되었음을 알 수 있었다(도 3). TPR 도메인의 1 bp 또는 11 bp 결실은 조기 종결코돈을 생성하였다. 또한, *slsrfr1-2* 및 *slsrfr1-4*의 돌연변이는 개시 코돈에서 확인되었다. 또한, 정제된 PCR 앰플리콘의 Sanger sequencing 분석을 통해 모든 대상에서 off-target site가 확인되지 않았음을 알 수 있었다.

실시예 3. *slsrfr1* 돌연변이 식물체의 형태 및 방어 마커 유전자 발현 분석

slsrfr1 G1 세대 식물체는 야생형 M82 식물체와 비교하여 약한 성장 감소가 확인되었으나, 심각한 왜화는 나타나지 않았다(도 4a). 또한, 야생형 M82 식물체와 비교하여 식물방어기작에 관여하는 유전자인 *SIPR1* (*Solyc09g007010.1*), *SIPR2* (*Solyc01g008620.2*), *SIPR5* (*Solyc08g080640*), 및 *TomloxD* (*Solyc03g122340.2*) 유전자의 발현 수준이 증가되어 있음을 확인할 수 있었고(도 4b), 이 결과는 CRISPR/Cas9 매개 *SISRFR1*의 돌연변이는 살리실산 의존 방어 유전자의 발현 수준을 상향 조절하고 자스몬산 신호 마커 유전자(*TomloxD*)의 발현도 유도함을 의미하였다.

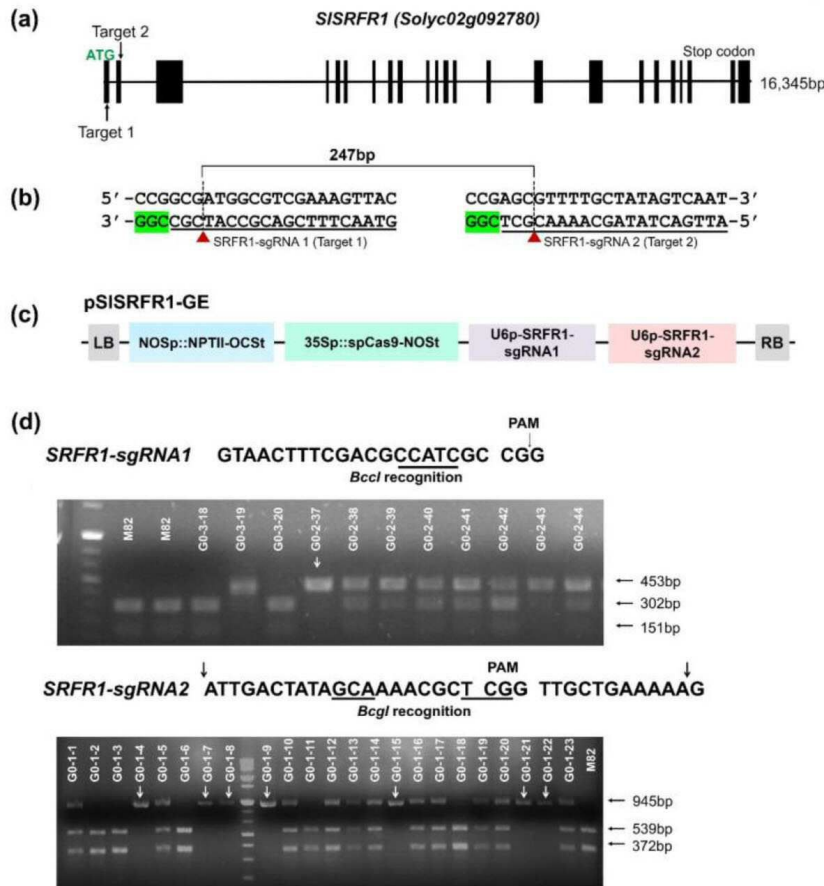
실시예 4. *slsrfr1* 돌연변이 식물체의 병 저항성 분석

애기장대 *srfr1* 돌연변이체는 식물방어기작에 관여하는 유전자들이 항시적으로 상향 조절되었으나 병독성의 *Pto*

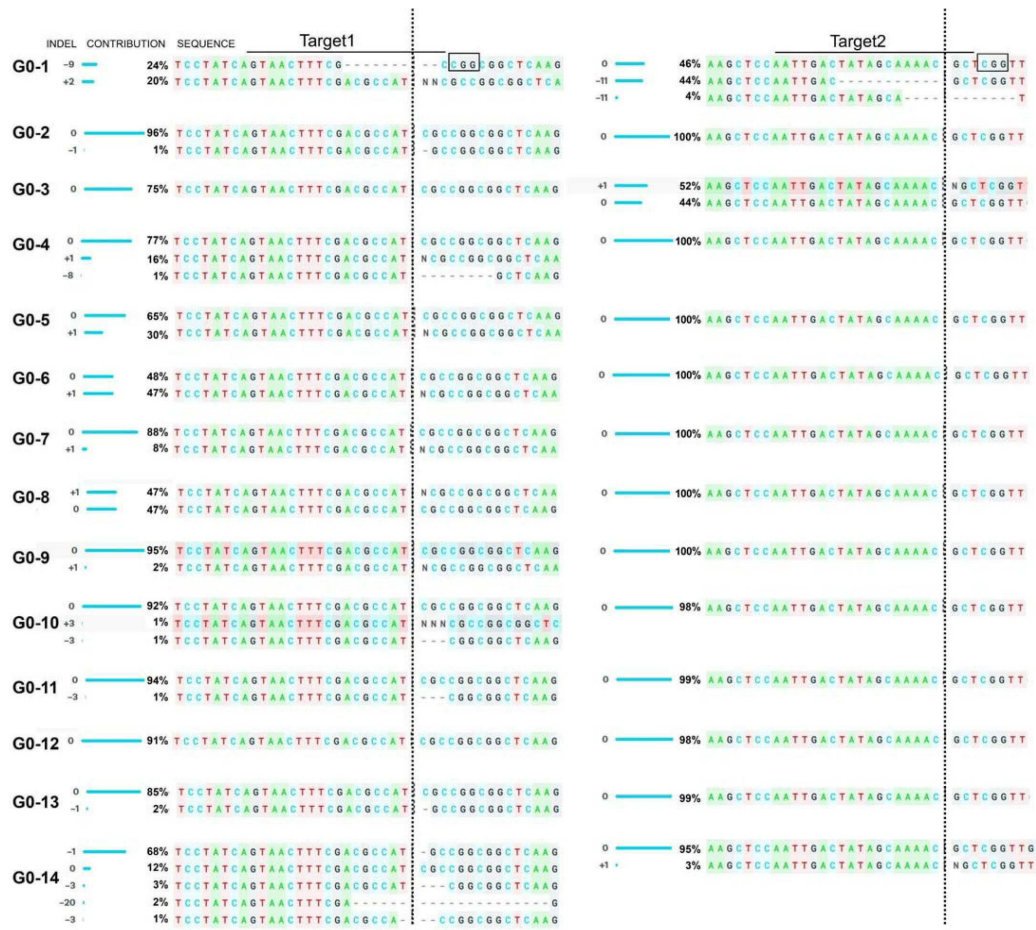
DC3000에 대한 증진된 저항성이 없는 것으로 보고되었으나(Kim, S.H. et al., Plant Signal Behav. 2009, 4:149-150), 6주령의 *slsrfr1* G1 세대 식물체는 야생형 M82 식물체에 비해 *Pto* DC3000에 대한 저항성이 증진되었음을 알 수 있었다(도 5). 반면, 사물기생 병원균인 푸사리움 옥시스포럼 f. sp. 라이코페르시씨(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)에 대해서는 애기장대에서와 같이 *slsrfr1* G1 세대 식물체가 야생형 M82 식물체에 비해 감수성이 더욱 증가되었음을 확인할 수 있었다(도 6).

도면

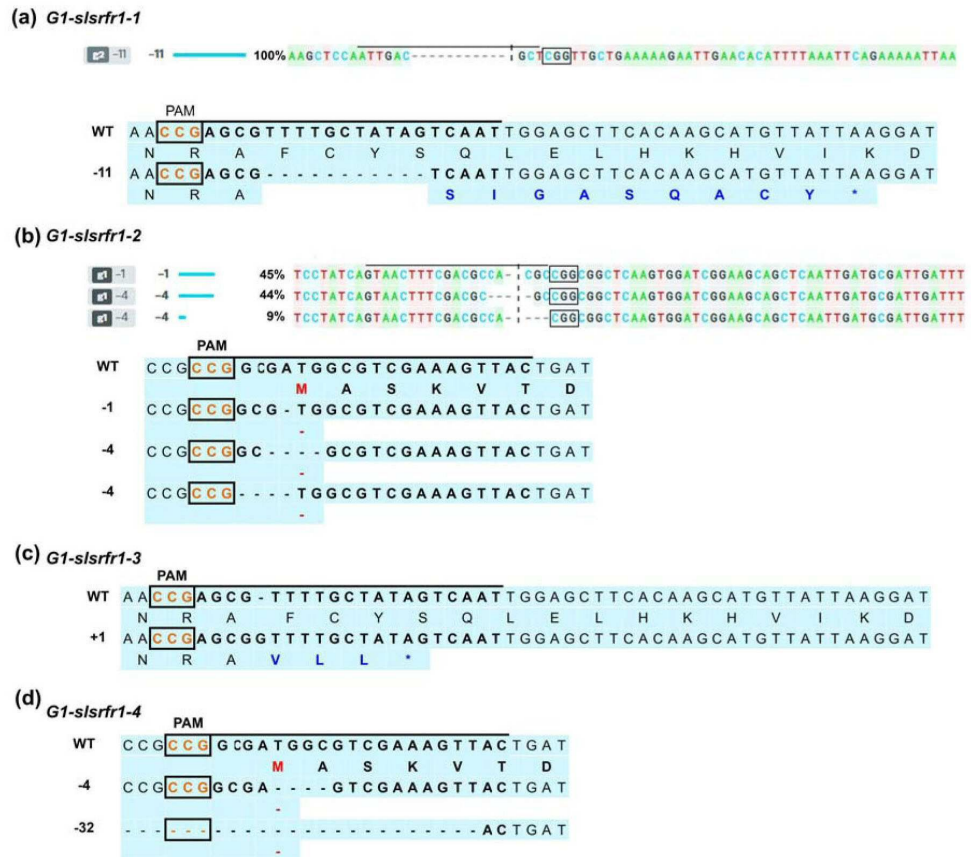
도면1



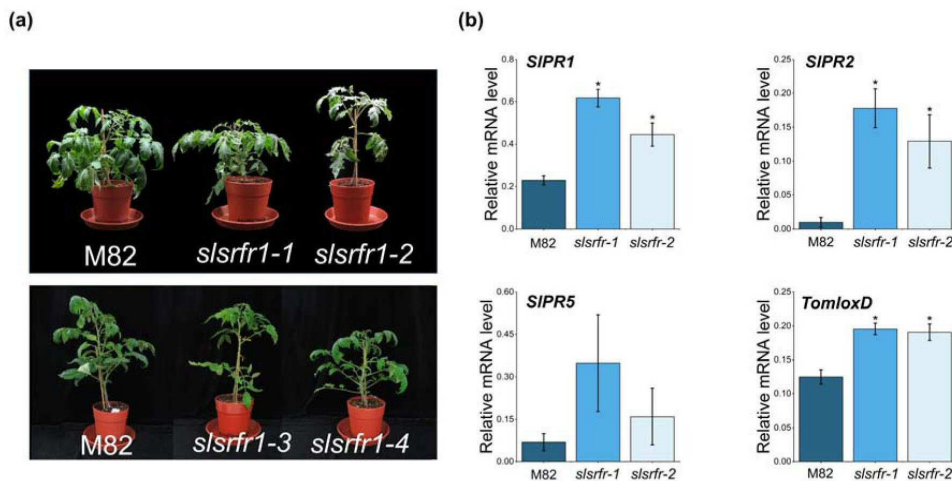
도면2



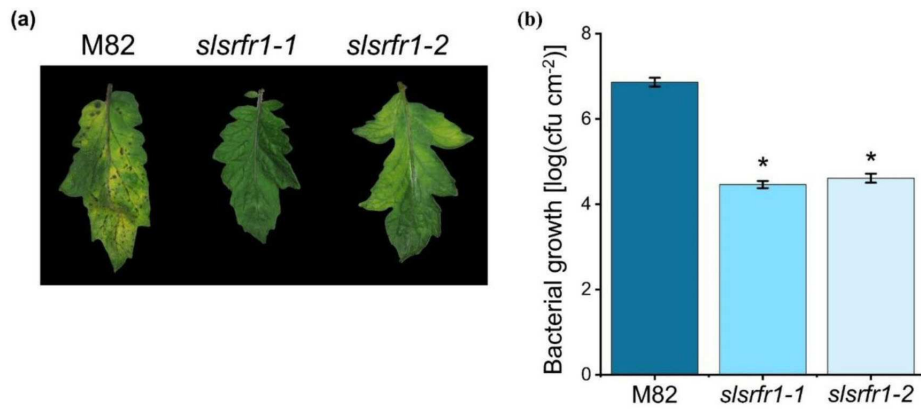
도면3



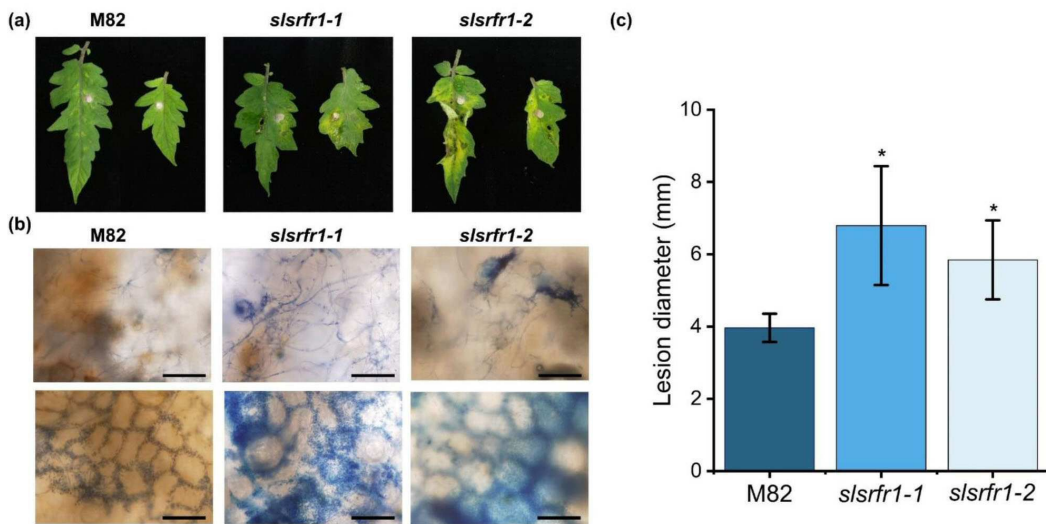
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Method for producing tomato plant having controlled
disease-resistance using gene editing and tomato plant produced
by the same method
- <130> PN21203
- <160> 29
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 16345
- <212> DNA
- <213> Unknown
- <220><223> *Solanum lycopersicum*
- <400> 1

atggcgctga aagtactga taggattgaa ctagctaagc tttgtagctc taaggagtgg	60
tcgaaagcaa ttcgaattct cgattctctt cttgctcaaa cttgcgtcat tcaagatc	120
tggtccgta cgttttcac tgttccatct tttccctgt ttgtatatag gtttttgac	180
atztatgaat gaactgatta atttttctga atttaaatg tgttcaattc ttttcagca	240
accgagcgtt ttgtatatgt caattggagc ttcacaagca tgttattaag gattgtgata	300
aggcacttca gctcgatcct aagcttcttc aagcttatat attcaaaggt tcttttcatt	360
ttctccttgc atttccagct aactgttttt accgtgtata agaaatgcga aagagaattt	420
agaagttttc aattgcattt ggaatgtcaa ttttgaatgt ggatgtgttg tggtcaggca	480
tcctaataccc tataggcctg tgaagtcac tgggatactc taaatttaca attttagggt	540
tcttgttcaa atttagggtga ttggctataa ttgagtaaat ttttctggtt ttggacaaac	600
atgaaccatt ggtaatttcg aggagtagga tgaagctctt gtaaagctag tgaactgttg	660
cacctctcgg ttgatgtcct acaatttacg actattgtca agtatgcgc aaaataaggg	720
ttagctttaa atgaattgtg tatgtgagaa gccattttaa gcttgataaa ggtcatattg	780
gacttgcttt ctgtatccta tagtggctct atattatatt tttgaaatga cttttaactt	840
taaaataaac tatgttttgt tgggtataa agggaaggga tggaaaataa aggagggcat	900
aagatggttg aattctatgc tcgcggggta cagtagaggg tttgaccata ttgtgtctat	960
tgtaagtac cttttctcta aaaggctatt tccacggcat gaacgtgtga cctccttgta	1020
tcattgcaac aactccgac agataaaaag atcaaataca tttttgtctc ttgtgtgtaa	1080
catagccctt gaaataatga tataagaatt tgaattaaca atattcttgt gtggatactg	1140
tggattttcc ctagatgtgg ttatagttaa tgctgcagaa atttcaatat tcttaaagct	1200
ttacaaactg gatttttgag tttgaagcat tatgtaacaa agttacttga tacttgttgc	1260
ttaggacgtg cattatctgc tcttggtgaa aaagaggaag ctcttctagt ttgggagcaa	1320
gggtatgaac atgcagttca tcagtcgca gacttaagc aactgttaga gcttgaagag	1380
ctgtcaaaa ttgcaaagca gaacaccgca gttggcagca acaatcattc ggtgcagtca	1440
tctggccctg agtccaacac tggacctcct ctttctacca aatctggtga aacttgtgat	1500
attagtaagg cctcagatag ggaacttaaa acatgcagca gtgggatgtt ggaaagctct	1560
gagaaatcaa agaatagtc tgttttaca aattcctcaa gtaataattc caaaaagcat	1620
aagaagattg agtctgaatc aaaggaattg catgagagac aagcaaataa aaccaacaac	1680
aattgcaaaa aattgggtta tccatctctg gtttgagtg agttaagtga tatatctgaa	1740
gacagtagga aatcatctgc agtaactagt gaatcaagtg aacagtcaga accaaatgag	1800

ttgcaggaaa ttctcagtc gttgaataat aaatgtgatg ttcgcgttga attgagtgat	1860
gaaggcaaga gaaacaaaa attttgtgtt accagggtca acaaaaccaa gtccattaac	1920
gttgatttcc gattatcaag gggaatagca caggtagact gcctatcctg tgatattaca	1980
atgaagacag gaagaattag tccatctatt gatatttctt gttagtgcgg ttgatcatta	2040
atatgctatt cttctttatt gaaatacaaa taacaatata ttgttaactt caaatatatg	2100
ccaaagatca acttcatgtc tcaatttgtg agattatctt cttctcaaatt aagtagagaa	2160
atgaattttt tcttgatata tctgctaggt actgggatac catgctcatg catagcagga	2220
aaggccttct actgcagtct tcatgtcttt tctgttcact ttgcttattt cagttgtaat	2280
ttggtgatta cactccactt ttaattttgt gaacttaact ggaagattct gcataatgtc	2340
aaagcttggg tcaactaagc tctattatta gaattcattt tcttcagtta ctagatttgt	2400
atctctaact cttatgtgtt aaatttatgg agttagtatc atttttgcag tgtgcttgac	2460
tgcatgtttt gctttgttta aacttaagat gtcaaaatag gtttgtgatt gccagtcatt	2520
ctttctctct ctagtctcac atatccgcac tatagtgaca ttaaaacaaa aaagaagaag	2580
agaatttagc ttgattattt cttcaatcta gtaggggtga ttttctttcc tacgccccct	2640
aagctgcggt ggacagaggt attcggatatt tgcaccgata ggaggattta gataccact	2700
agactacttg agatgcctgt aggttgggtcc tgacaccatt gttattcaaa agaattgatg	2760
taaattgaca atctagctct gtgtgcata tttttcgtca aacacaagat gtgaaacaat	2820
aagtagtgct gcttgatgtg gttgagatca tggatatctt gcttgcaatt gatctgacta	2880
tcacgtctcg ttgcttactt cttcaagaga ttagattatc atgatttaaa atgttgtgtt	2940
tctaaattgg atcattttatc tggggaactt cttgccatt ttacattaga atatccaaaa	3000
cttgatgtg tatgctgtcg taatgcagta gtagttgtct ccaaaatccc ttgatgtagg	3060
taggatgcag attatgacat ttcacaagga gcctggagag actggttaat cactctaaca	3120
accaattaga tgatgtgtca tgcaattgtg aaatacttga gtttgccagc aattcttcta	3180
tattgatcca gaccttctag agatatccat ccaaaactag tcttgacact tggatccata	3240
gaggtatcaa taagtttgca atctagtata ccttgtttct tccaatatat caggtggata	3300
cttcccttag gccttatgat attggacgtg caaacttgat ggtaggatg tattttatgt	3360
ttctacaagt gcctagtctt aaaatgactg gtgttgata ataccttgaa gcctataagg	3420
ttgtaaggaa acagagtaaa acagatcaaa ctatgcttaa tgagactgct taagaccata	3480
aattatcggc cttgtcgaaa cgctacttta aactcttctt agttgatgtc taactgatga	3540
ctgatgaagg aactagtga gcgtgggtcg catagaaatg gaaagaccag cacatgcaat	3600
tttagttgct aagagagagt atcaaccatt gccatatatc tgaatgtatt tgttgacaat	3660

tgattgagct ttgagacaat tataaccatc ttgattataa atactcaatg aaatccaact	3720
gtagttttat tctgtggag gatctatctc tgaagtgccca ctgttttttg ttgtcaggca	3780
tctccttaga tatgcatgca attggtttta ccagtctaag atattgaatt tgtgcataat	3840
ttgtaatgca agcatgatat aaatgtgaaa aacaatgtga aacacctact ggattagtgt	3900
gtagacgatt tgctcaaagc tgtcttcagt agaaccaaag aagagaagaa aattgttgga	3960
gaactgtcat aggggaagta agtttgtatc acaaaaaaac aaggatgaga atcgtgaaaa	4020
atgttttagtt tgctattccc tcaaggtaat gaagttttaa tagtgtttac atatgatata	4080
atataggaag attgaatttc ccgattaat atttgttggg agcggaaaagg gggatgcgag	4140
tctgagatgg ttcggatatg taaagaggag atgcacatat gttccagtga agagggtgta	4200
gcgagtttgt ctatggtgga tctgaggaga ggtagggtga ggttgaagaa gtattgtgta	4260
gaaatgatta gttgaacatt gtctcgctgt cathtagtag gggcatgatg atagtttgga	4320
acaaattact tgttggctgt ctttctttt ccatattagt attattgtta ttactcttct	4380
attatattat tctccgattt ttattagtac atattttttc ctttgcttta attatcgtag	4440
tattgtttgt tgttgttact gttcttttct ccattatttc cgacatgaat tcttcacaac	4500
tgtatctcct tticaaacct gctttgaatg ctttacttga gccgagggtc tatcggaac	4560
aaccactcta ccttcacaag gcaggcacca ccttcccaa acctacttgt gggattacac	4620
cggatatgtt attgttatgt gatattccct gatctctat acatatttcc ttatctaagt	4680
ccttaattac aaaaatttct taacaagatc aatcatctct gagataataa atacaattcg	4740
aaatattaag gtaaatccaa atatttttat cttgcaacaa tagtttccct tttttcttt	4800
tttcttaaac aagaaatatt tttaactttg taagttgagc agcaacgcca tttttagtga	4860
aaattgtgct taagtatgtt ggatggaaac tagcaaagcg aacacatgac ttaccgaaa	4920
gccaagtgtc tccgactcta tactttcagt gtgcacccg tgttgacacg ccatgggtgt	4980
gggattcgta cccggtatgg tcaaccagtt ttggatactc tgaacaaatt cgaggagaa	5040
attctggaca ggttcaatga tttttgtaat caaaacaaaa ctaatgtgat ttgaagaaaa	5100
tggaatgcct tgtatatata aatttcattt gtcacccct ttccttttat ctccttccaa	5160
gattctctc ttgatcaaat attttctct caacttttcc gcataataac tcataatttt	5220
aggttttata actctattag tagatatttt gaattatctt tcggcgaatc cccacatccg	5280
ttccataca tggatcttta tctctgaatc ttaaaattta tatcatagag gatccgacct	5340
ctagatccgc acctgcattg ggcacctgta cccgagtctg agcaacttaa cccgaaagaa	5400
gtttcaaaag agattgcacc cattcgggtga tttagtggat gtaattaacc aggacttgag	5460
ttaaactatt tctttctatt cccatgtctt gactagcgat attcagttcc ttttcgtaag	5520

tatatatttg taggtaatta tattttttcc tcgatcttcc agttacgaca ctatttaatc	5580
atgtattcat cgtatttaat tgagaaatat ggtcaacgag gaatcatcta gccggtcttg	5640
acttgcttgg ttttgaggcg tagtaatagt tgttattact cgtcatcctg tacaaacata	5700
gaagcgtaaa acaataatit tgggtgatttc aggttaatga aggaaaatat agtaatgctg	5760
tatccatctt tgaccagggt agcatttagc ttaccactct tcgatatttt actagttttg	5820
tttgctagat gtgccttgtg ctttattttg ccttttttca tgtttgaatg gattaaacgg	5880
aggacttgtg tgtggcatgc tgaacttact tacggagctt cttctcttct atctataata	5940
acacagatac tagaacaaga tccaacgtac ccggaggcac ttatcgcccg gggaacagcg	6000
ttggcatttc aaagagaact tgatgcagct atttctgatt ttacaaaggt ttgcattgat	6060
ttggccattt aagtaaccaat tgaggtaata cttcaacccc tgttgtaaat atttaccacc	6120
tgcttttcag gccatacaat caaatccatc tgcctggagag gcctggaaac gcagagggca	6180
agcccgctgt gctttagggt aatctgttga ggtataaaat tcgtatttgt ctatttattg	6240
agctatcttt tggtttttgt cttcagggtt tttctttctg ctatatttat tttttttcaa	6300
agtcaacttt caatgatctc ttctgtggat gtgatgtgca gtgtaaatga tgtggaatta	6360
ctgaatttta tcacttgtgc tatcagattt tgaaacccaa tttttcgta atagcaatca	6420
gactccagtt agaccactag ggatattatc aagaggcact tggttatttt ccttcagatt	6480
gtggtagctt acagagttaa tgatggaaga tgaatgtct ttggatgttc taactaaggc	6540
ttgagctata tcacaactta tgagcatctt cccgtgaaag ttaaattcta aaatggaatc	6600
aggagcataa cattattcag ctgcatcctt ttgatcatgg gagtttcttg gtagtctaag	6660
tctaaaacat aattttaaca ttctgatgag ttagtttttag tttgttttg ctccgattat	6720
cccatggaga gtgatattag ttacatttaa acgcttttta cttcttaaaa atgttggttt	6780
cacagtaaaa gtagtatgat tgatatttgt gacttggtat atctaaacaa aatgatttta	6840
caccaggcaa ttacagactt gaccaaagcg ttggaatttg agccagactc tgccgatata	6900
ttacatgaaa gaggtgacga gactgaactc ttccatttac tatgaacaat tggatttatg	6960
ctgttaaagt agatagacat aaatagcaaa acatacatit tatgacagat agcttttgtg	7020
catgtaattt gaaactaagg ttcactttca tctttacaac actgagatta tttattgagg	7080
cccataggtg gtttcatctt gtaactattt tgcaataaat gacctctagc ggaatattcc	7140
ataatttctt gagatttcag aaaagatcat ttgattggac aaagtgtgtt caatciaacc	7200
tgggagtcac taactctcct taattagtgc aggaattgtc aattttaagt ttaaagattt	7260

caaaggtgct gttgaagacc tctctacatg tgtaaagtcc gataaggata ataaatctgc	7320
glatacatat ttggtgagtc tatgaccttg agtctaccaa ttgttgtaga atgagctaag	7380
aatgtttatc cgcaaaagtt tgagaaattt ttgtttggaa aaatactgat ataatgctgg	7440
tcgaaaaaaa ttiggaaaaat tatcaggggtt tggcggttata ctctctagga gaatatagga	7500
aggctgagga ggcacataag aaagcaatcc aaattgaaag gaatttcctc gaggcttggg	7560
ctcatctagc acaggtatct ctgaatatat ggtgaatact cttaatgcta tttttcctgc	7620
caagtgggat cccaatactt ctattggtag tgctgatgat atagagtttc ttgatgatga	7680
agttgccttt tgacttcgag aattttctta taccaagttc ttgtttttgt ttgtctcttt	7740
tttcaccggt atctggaact caaggttgag gtaaatatat acttctgcat gcaagttaag	7800
aaattcaaga ataaggattt aaatggcaag tagacattct attgcttaac cagtgatgaa	7860
gagcctaact ctctgttate agatatttg tgagcggtca tcttctgggg tgcaatgcac	7920
atgtattgta atagcttttg ccttgttgca ttttcagata aggtctcctg attagctggt	7980
agatgttatt aatttacatc atcaaatgg atgtttatgg aatatctatt gccataagtt	8040
taaaattcct aagactcagg agctgctcta acctagtctt tgattggttg agtttcttca	8100
cttatattaa atgtggcaaa acaatgagat ctctttgaag atattttttt aatgatgtat	8160
ttgattattg aagaatcttt atctttggtg cagttttatc aagacctagc aaactcagag	8220
aaggccttgg aatgccttca tcagattttg caaatagatg ggaggtgatt actgaggatc	8280
tcaatattta catctttttc accgataaat atctaattc gagtatttga atggtgaagt	8340
ataaaaccta tcttcaaata ggaatataac tgataatcca tctctatct accctttttc	8400
gttgaaggt acgcgaaagc atatcacctg cgcgggctgc tacttcatgg aatgggagag	8460
catagtaca tatttctgaa aaattttgct gtcttgagtc tcccctttct ctcttttttg	8520
tcaaattttc tatgtataat cctcttttaa cgaaaaatgt agcaggcctt aactgcctat	8580
atatgctgtt acaggaatgc tataaaagat ttatcaatgg ggttggctat tgatagcgca	8640
aacattgaat gcttgatct acgagcttct tgctatcatg ctattggatt atataaagaa	8700
gcagtatggg cattttcaaa ctctctctt gtgacttttg agtatctta aatattttaa	8760
ggtggtgtc tccaatttca gattattgat tctgaattta tgctgtaggt gaaggactat	8820
gatgtgctt tagatcttga attagattct atggaaaagt ttgtgcttca atgcttggcg	8880
ttctatcagg taaataagta tatgccagat ttccgtccat cgagctggtt caatgttatg	8940
cctctactaa gtattgtttt cttttgtgtt gcactatttt ctttttgctt tctaagtttt	9000
ggcattttct aactgtttagc ttttaccttg ctggaatggt tctcgattct caagtggaca	9060
actcatactt caaattttag atttgtcatt tcgggttggt agccatttta gtagttgcaa	9120

ttttacattt acitaaagta gtagtcaaaa atttagcaat tttacatttt cccacaaatt	9180
gtccaaacat tggctaaatt tctgaccatc tttttgttcc gtttaagccac tgttgacag	9240
tttgggtcga agtggccgat ggtaacaaa gccaagcttg gcttggttta agcttgatta	9300
tgattgcgtt taggtgtccc gcataattca acctagcaca aatgtcccta ccaaaagctc	9360
gagttgacag atgctagctt gtgagcccag ttaagttggc agtgttcttt tcaactaacc	9420
attacacatc cggtaaaata agattttgct acccggatca tttaatagtc ctatggaaac	9480
tcttttcatt ctagtttgtt gctcctctc cttcctcatt cttgtgaaca gccttctgct	9540
tcctgcctgt gacaatacag gtgcagccat tatcatgaga caccaattga tctctctatc	9600
tctgttattt ttgtccaat ttctatttca gtttgaatag cttatgtttt gcttttcaat	9660
atttttccct tgcagaaaga aattgcatta tacactgcat caaagatgaa cagcgaattt	9720
tcttggtttg atattgatgg agatatgat ccccttttca aggtaatgtc taaaaagaga	9780
atataattgct tggttatttt ttgatacact cattaaaaac aacacggaat attctggtag	9840
cctctgtacc gcctctttct gagagaattg ggaaaaggaa tgaagtttga agttatagca	9900
aaaagtacta tctggtggga attacgcaga actttgaagg ttagcagaga atttgagaa	9960
tgaatgaagt ttaaagaaat aaggcctcac tgattcaatt tgaattcgat tataagctta	10020
cctgaagaat ttgacctga aatcactaca actctgtcaa agtaattgga cattttacca	10080
tatcttttaa catgctcata ctctattatg tagagttatc ccttttaggc ttcaaacct	10140
tcttttagagc ccccatcatt tcttaaccc ccactaaatg gttggaaagt gatctcttct	10200
caaccaatag tctcataaga ttgctacaac agtttcattg ctcaattact ttatcatgag	10260
tagagtggca atggatacaa ggactatcta gaaacgtaaa ggttgctttc actgagttgc	10320
tgctgcagac attgcttgca ctttaagtat gtgctttatt tggatcatat gttccttcat	10380
agttagtgtt caatgttctt ttgctgatcc atgtcgaatg ggtgtgcgga gtctggaaaa	10440
tactaaacgt tctgaaaaag tcacaggtac ccatatggat aggacaaagt tactggttcc	10500
agttaggtag ataatcaatg aaggtacaac atgcatatac cagtgatagt tttctggaat	10560
gatgtgtagt ctccagttca taaacctaac agtgctttta tcacttttat gcacctggag	10620
gggccagggt gataccttta caaagtgaac tgcattggga aaacctttga tttcaaatga	10680
tggtttcttg acagataatg gggatcattt cattaatatt aggggctaata atcagtttt	10740
tgtaaatctc ggatctaaag tggtagatac ctctatgaag tgaactgtca tctgaaaagt	10800
gcttttggtg gcagtgaatt tcttatctca aagttattat ttccattgac ttcgtgttct	10860
tatacttctg tctcaattcc tacttttttt tcccttctgt tctcaggagt attggtgcaa	10920
aaggctgcac ccaaaaaatg ttgtcgaaaa ggtctacagg caacctcctt taaaagaatc	10980

tttgaaaaag gggaagcaaa gaaagcaaga atttactttc accaagcaaa aaactgccct	11040
tctacaggct gcagattcta tcggtagaaa tatccagtat cattgtccag gtttcttgca	11100
taataggcgc caggtaattc taaaaagagt taaatattaa gtttaactttg ttcttttctaa	11160
aaaaaccag agctccacat tttccttgag aaacctgata gtgatttcct gttgccttat	11220
tagatgcctt tttatgcttt gctttcacat ttctctaat atagacaatg agaatttga	11280
aggaaaagaa tatgaaaatg ttaccagaac cttttgtttg cattagtgc cttgtaattg	11340
agggatttga actgatatgc cgattataag agaaagtct tgtacaagaa tgttaccttt	11400
attttcacac tcaacgtttc ctctccagct ttctgtgtac acactccttg ttttccatca	11460
atagttagtt actttccatg aaatataaaa attaaggaat tcatctcaa ttaggttate	11520
ggaaaaaaa gaagagaatc catctgtcaa cagaagattt tcaactattg tggactagtg	11580
ttctatcttc tcttagcaca gaaagtgaga tttggatctt aaagacaata acaacaaacc	11640
cagcgaatc tcactacatg ggctctgggg atcttaagga ctgttttagca ttttatattc	11700
cacaattatg aatgataact ttctacacac actgttaaata aagattgagg tgactgccaa	11760
gtgccaaggc tacatttcta gtgaaaatgt ctaaaatgaa tagcatgcaa ctaataataa	11820
tacttataga tgtgaataat gatgttagac taagaatgcc aagttttgat ggtcatctag	11880
tgcaaaaagg gttggcgtct ttagttttgt ggagacactt ataggaagca gttgtctttc	11940
gcccttcagc ctctaattct gtaatatgia tgttgtggag caatttccga tgttaactgt	12000
gatgctcttt gtagttattt cgttgagtta gtttgtgcaa tggttgtaa cagtagtatt	12060
agatttgtgc ctttctaact tgtgttgctt tttcatgac aaaatttctc ttttcttate	12120
tagtgaagag gatctattgt tcgtagtgta tctcttagac cttatcatga cattcttttc	12180
tttttgcaat ttaaagatga tataatatct ttattacaga tagtggattc ataaattatt	12240
gttatgtact aatatgtgc tctttagcta caaacatgct tgccacaatg tttttattct	12300
ttcacccaaa tctgagaatt attttgcaat tatcagcacc gcatggcagg attagctgct	12360
attgagatag cacaaaaagt ctcaaaagct tggcgtgcct tacaagctga atggagaaac	12420
tcaactaaag gcacagggaag gtctgggaag agactcagga gaagggaata actaaattct	12480
attagtttaa acagagggtg agctgggtgt agcactagca gttcctccga cacatctact	12540
tcatacagtt tgattgatga taggtcaact ggacgttcca tgatgtcatg gaaccacttg	12600
tattcattgg ctgtcaaatg gagacaaata tctgaacat gtgatccagt ggtgtggatt	12660
aacaagctaa ggtactccac ctgctattaa ttactgaag tttagttagt tattaaagtt	12720

cattgaaatc atacttgggtc tcagcattct aacaaatata tactacattt tgctaaagtc	12780
attccgattt gaattgagta cacaatgata tttttttctt ttatttttga taaagagctc	12840
ttattttctta atatcaacaa tgatattctc ttagtacata aagataataa gaatcactat	12900
cttcaccaca agcatgaaaa aaacctctct tcaatttgct taacttgctc cgtttgatcc	12960
tttagttcta tggagttatt tcccagcttc tgtgttggtg tacttcactc tcatttggag	13020
cactcacgaa aagaaggatt ctagcatgta tgacttttga agtttgggtg aagatcttgg	13080
aggactaaag acctatttca ctttggctcg tctaagaaac taagactaaa atcattaatt	13140
cgtattttacg ccgggataac tagatatacc acactactta ccacgtcgac gagattctag	13200
tgtatgaagt gagcccccta aaaagtcgta gagaaattca agaaaaaca cctgtcatgc	13260
gaatcaaata tccatacact tacccaatta tctaagcagt gagagcatta tgcgcaagtc	13320
taaacacatt agtaataatt tgataaaaagg agaacaataa atccaactaa atccataatc	13380
glatcattaa ttccacgata accaaatacc ctctgcccaa aatacgaccg tgaagcatct	13440
aatagagtta atgagttcag ctatcaggca tggaaatccc aagaaagaag atatatgcta	13500
taaaatagat agagctgaaa caacggcctc cactaaaggt ctttagcttt actataatga	13560
agataatgat tctaattgtc cgctttggct ttactttttg atgagaattc ttgtttttt	13620
gcatagttag gaatttaata ctggttttgg gtctcacacc cctctgttc tcggtcaagc	13680
caaagtgtgt cgctaccatc ccaattttca gaggtaagag ctttacctt ctgataagcg	13740
caaatgtatt tttttactat tatttttttg tgtaacatgg atactgcaa tgatactgat	13800
gctatgattg accttttgag ctcatcacag gatgtgtaaa ttgatgtac ctttgtaaat	13860
aactttacaa cagcttgcgt ctggccatga ataaaaattc ctttttaaca gtcaaaaggc	13920
ataacctttc ttatttgtat tagctctttc tcaaggctct tattgtctgt caatgttcag	13980
aaccttgact gttgccaagg ctgttatcaa ggagaataaa tcagtgtgca acaaggaaga	14040
caagataatt gatctttctg aacaacagaa gttgcaagaa gtgagtttgt ttgcttatga	14100
cctaaattca tcttttgac tgttttgcct tttcacagt gtatagtttt tggttgttga	14160
taattathtt tctggttcat gtcaaaatac ctactttata gcatttccca tgacaataaa	14220
agcgtcaaat tgagaaatct ttattaggct gattttatat tggtcacatt tcttccttag	14280
atgttaactg atggctctct gaaatcaaac taggtgtcca cttgctagga ttaatacttc	14340
agtgccatac ctttttttt ctgggtggtaa tcaacacctg aactgtactt tgcagataat	14400
ggctgcagaa tccagctcag atctttacag agttgttggt caagactttt ggttggccac	14460
ctggtgtaac agtacggcac ttgaagggtta atttttata tttagtctc tttatactgt	14520
ataacagtat gttactcttg aatattatct ctcatcgggg tcttttttct aattttccct	14580

cctttcttat tgccatgac ggaagcgtct tgaaggaaca aggatcactg ttgtgaaaat	14640
gtagaacacc atttaacctt attggaattc aaccttttgt gtgtgtggaa aggagggtga	14700
cttgagtaaa atatacctta aactagatct gatTTTTctt attcctgtca acttttgttg	14760
ttccttccag gggtagatt ggttacgact ttgcaattag aacaccttgc acacctgcta	14820
gatgggatga ctttgatgtg gagatgacat cagcctggga ggtatcctct tgatttatta	14880
ctagaagcc attttctact ccatgacata gtttttggat atttgaaagc aatattacat	14940
caatgtaaaa cagtaacaca aaaattcttt agtggctgtt ttgtaggctg tattaggtag	15000
aataatgcta gtactaaatt ttagtacaat gtttggtttt aaatctcacc tatgtactac	15060
taataccagt attacttata caccctatit aatacgattc ttatgcatag taaacctagg	15120
cattaactat atcagtacca ttctatact cataatcata caccctattc agtagtactc	15180
ttgataattc aatgcatgic agattgctag ttttagtaca acaaaccaaa caatcaataa	15240
gaaatgatgt cagcataaaa attcctgtia ctagtcttca aaccaaacag ccccttatag	15300
tacagttttt catggtttat tcatcttggt cctgctcgga gatgatcagt taagtcttat	15360
aataagccta tattagtcag ctggggagtc tgttcatcag actattctct cacttttaaa	15420
aagagatttt gctaagcact gaaacaagca gaagtaatga accttttctt gtctgaacat	15480
agaagtaagc attatgcctg agatgatctg ggtttttgtt cggtatgac tttctgaaat	15540
gatttggcat atattttcta ctggaacctg ttgtagacc tactattttg tttctaactg	15600
aagctttatc tataccatt aatttcctat tgttgcttgc ttctgtttgt gtagctcct	15660
ttttttccct cctttctctt ttttatttgt tcttgagaca cacatatatt ttctgtttgg	15720
tacttaata atagtgttct aattaagtta actaactagt gcccgaaggt tggcccgac	15780
accacgtca tcacacacac aaaaaaaga gtaactaag ttgagactta aatgatagt	15840
ttctagttag accaagttga acacaaaact gttatgcagg ctctttgtgc tgcgtactgt	15900
ggtgataatt atgggtcaac agattttgat gtgcttgaaa atgtgagaga tgcaatctta	15960
aggatgacat attactggta agatatatta acttctatit ggttgatcac aagggaagcg	16020
tatggttctc ttttaattgt ctgataattt ttgcaggtat aatttcatgc cgctttccag	16080
aggaactgct gttgttgggt tcatagtttt gcttggatta ctgctcgctg ctaatatgga	16140
gttcacagga agcattccaa aaggctgca ggtggattgg gaagccatcc tggagtttga	16200
ctcgagtcc ttigtatatt ctgtaaagaa atggtttgac ccatctctca aagtcagcac	16260
atcgtggaaa agctaccag atgtcacgtc aacatttgag acgactggat cagttgttgc	16320
tgctctgagc acctattcag actaa	16345

<211> 3168

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Solanum lycopersicum

<400> 2

atggcgtcga aagttactga taggattgaa ctagctaagc tttgtagctc taaggagtgg 60

tcgaaagcaa ttcgaattct cgattctctt cttgctcaaa cttgcgtcat tcaagatata 120

tgcaaccgag cgttttgcta tagtcaattg gagcttcaca agcatgttat taaggattgt 180

gataaggcac ttcagctcga tcctaagctt cttcaagctt atatattcaa aggacgtgca 240

ttatctgctc ttggtaagaa agaggaagct cttctagttt gggagcaagg gtatgaacat 300

gcagttcatc agtccgcaga cttaaagcaa ctgttagagc ttgaagagct gctcaaaatt 360

gcaaagcaga acaccgcagt tggcagcaac aatcattcgg tgcagtcatac tggccctgag 420

tccaacactg gacctcctct ttctacaaa tctggtgaaa cttgtgatata tagtaaggcc 480

tcagataggg aacttaaaac atgcagcagt gggatgttgg aaagctctga gaaatcaaag 540

aatagctctg ttttcaaaa ttctcaagt aataattcca aaaagcataa gaagattgag 600

tctgaatcaa aggaattgca tgagagacaa gcaataaaaa ccaacaacaa ttgcaaaaaa 660

ttgggttata catctctggt ttgcagtgag ttaagtata tatctgaaga cagtaggaaa 720

tcattctcag taactagtga atcaagtga cagtcagaac caaatgagtt gcaggaaatt 780

ctcagtcagt tgaataataa atgtgatgtt cgcgttgaat tgagtgatga aggcaagaga 840

aacaaaaaat tttgtgttac cagggtcaac aaaaccaagt ccattaacgt tgatttccga 900

ttatcaaggg gaatagcaca ggtaaatgaa ggaaaatata gtaatgctgt atccatcttt 960

gaccagatac tagaacaaga tccaacgtac ccggaggcac ttatcggcgg gggaacagcg 1020

ttggcatttc aaagagaact tgatgcagct atttctgatt ttacaaaggc catacaatca 1080

aatccatctg ctggagaggc ctggaacgc agagggaag cccgtgctgc tttaggtgaa 1140

tctgttgagg caattacaga cttgacaaa gcgttggaat ttgagccaga ctctgccgat 1200

atattacatg aaagaggaat tgtcaatttt aagtttaaag atttcaaagg tgctgttgaa 1260

gacctctcta catgtgtaaa gtccgataag gataataaat ctgcgtatac atatttgggt 1320

ttggcgttat acitcttagg agaatatagg aaggctgagg aggacataa gaaagcaatc 1380

caaattgaaa ggaatttcct cgaggcttgg gctcatctag cacagtttta tcaagaccta 1440

gcaaactcag agaaggcctt ggaatgcctt catcagatit tgcaaataga tgggaggtag 1500

gcgaaagcat atcacctgcg cgggctgcta cttcatggaa tgggagagca taggaatgct 1560

ataaaagatt tatcaatggg gttggctatt gatagcgcaa acattgaatg cttgtatcta	1620
cgagcttctt gctatcatgc tattggatta tataaagaag cagtgaagga ctatgatgct	1680
gcttttagatc ttgaattaga ttctatggaa aagtttgtgc ttcaatgctt ggcgttctat	1740
cagaaagaaa ttgcattata cactgcatca aagatgaaca gcgaattttc ttggtttgat	1800
attgatggag atatcgatcc ccttttcaag gagtattggt gcaaaaggct gcacccaaaa	1860
aatgtttgcg aaaaggctca caggcaacct cctttaaaag aatctttgaa aaaggggaag	1920
caaagaaagc aagaatttac ttccaccaag caaaaaactg cccttctaca ggctgcagat	1980
tctatcgga gaaatatcca gtatcattgt ccaggtttct tgcataatag gcgccagcac	2040
cgcatggcag gattagctgc tattgagata gcacaaaaag tctcaaaagc ttggcgtgcc	2100
ttacaagctg aatggagaaa ctcaactaaa ggcacaggga agtctgggaa gagactcagg	2160
agaagggaaa aactaaattc tattagttaa aacagagggtg gagctggttg tagcactagc	2220
agttcctccg acacatctac ttcatcacgt ttgattgatg ataggccaac tggacgttcc	2280
atgatgtcat ggaaccactt gtattcattg gctgtcaaat ggagacaaat atctgaacca	2340
tgtgatccag tgggtgtgga taacaagcta agtgaggaat ttaatactgg ttttgggtct	2400
cacaccctc ttgttctcgg tcaagccaaa gtgtgtcgt accatcccaa ttttcagaga	2460
accttgactg ttccaaggc tgttatcaag gagaataaat cagtgtgcaa caaggaagac	2520
aagataattg atctttctga acaacagaag ttgcaagaaa taatggctgc agaattcagc	2580
tcagatcttt acagagtgtg tggtaagac ttttggttgg ccacctggtg taacagtacg	2640
gcacttgaag ggaagcgtct tgaaggaaca aggatcactg ttgtgaaaat gggtagatt	2700
ggttacgact ttgcaattag aacaccttgc acacctgcta gatgggatga ctttgatgtg	2760
gagatgacat cagcctggga ggctctttgt gctgcgtact gtggtgataa ttatgggtca	2820
acagattttg atgtgcttga aaatgtgaga gatgcaatct taaggatgac atattactgg	2880
tataatttca tgccgctttc cagaggaact gctgttgttg gggtcatagt ttgcttga	2940
ttactgctcg ctgctaatat ggagttcaca ggaagcattc caaaaggtct gcaggtggat	3000
tggaagcca tcctggagtt tgactcgagt tccttttag attctgtaa gaaatggttg	3060
taccatctc tcaaagtcag cacatcgtgg aaaagctacc cagatgtcac gtcaacattt	3120
gagacgactg gatcagttgt tgctgctctg agcacctatt cagactaa	3168
<210> 3	
<211> 1055	
<212> PRT	
<213> Unknown	

<220><223> Solanum lycopersicum

<400> 3

Met Ala Ser Lys Val Thr Asp Arg Ile Glu Leu Ala Lys Leu Cys Ser

1 5 10 15

Ser Lys Glu Trp Ser Lys Ala Ile Arg Ile Leu Asp Ser Leu Leu Ala

20 25 30

Gln Thr Cys Val Ile Gln Asp Ile Cys Asn Arg Ala Phe Cys Tyr Ser

35 40 45

Gln Leu Glu Leu His Lys His Val Ile Lys Asp Cys Asp Lys Ala Leu

50 55 60

Gln Leu Asp Pro Lys Leu Leu Gln Ala Tyr Ile Phe Lys Gly Arg Ala

65 70 75 80

Leu Ser Ala Leu Gly Lys Lys Glu Glu Ala Leu Leu Val Trp Glu Gln

85 90 95

Gly Tyr Glu His Ala Val His Gln Ser Ala Asp Leu Lys Gln Leu Leu

100 105 110

Glu Leu Glu Glu Leu Leu Lys Ile Ala Lys Gln Asn Thr Ala Val Gly

115 120 125

Ser Asn Asn His Ser Val Gln Ser Ser Gly Pro Glu Ser Asn Thr Gly

130 135 140

Pro Pro Leu Ser Thr Lys Ser Gly Glu Thr Cys Asp Ile Ser Lys Ala

145 150 155 160

Ser Asp Arg Glu Leu Lys Thr Cys Ser Ser Gly Met Leu Glu Ser Ser

165 170 175

Glu Lys Ser Lys Asn Ser Ser Val Leu Gln Asn Ser Ser Ser Asn Asn

180 185 190

Ser Lys Lys His Lys Lys Ile Glu Ser Glu Ser Lys Glu Leu His Glu

195 200 205

Arg Gln Ala Asn Lys Thr Asn Asn Asn Cys Lys Lys Leu Gly Tyr Pro

210 215 220

Ser Leu Val Cys Ser Glu Leu Ser Asp Ile Ser Glu Asp Ser Arg Lys

225 230 235 240
 Ser Ser Ala Val Thr Ser Glu Ser Ser Glu Gln Ser Glu Pro Asn Glu
 245 250 255
 Leu Gln Glu Ile Leu Ser Gln Leu Asn Asn Lys Cys Asp Val Arg Val
 260 265 270
 Glu Leu Ser Asp Glu Gly Lys Arg Asn Lys Lys Phe Cys Val Thr Arg
 275 280 285
 Val Asn Lys Thr Lys Ser Ile Asn Val Asp Phe Arg Leu Ser Arg Gly
 290 295 300
 Ile Ala Gln Val Asn Glu Gly Lys Tyr Ser Asn Ala Val Ser Ile Phe

 305 310 315 320
 Asp Gln Ile Leu Glu Gln Asp Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Leu Ile Gly
 325 330 335
 Arg Gly Thr Ala Leu Ala Phe Gln Arg Glu Leu Asp Ala Ala Ile Ser
 340 345 350
 Asp Phe Thr Lys Ala Ile Gln Ser Asn Pro Ser Ala Gly Glu Ala Trp
 355 360 365
 Lys Arg Arg Gly Gln Ala Arg Ala Ala Leu Gly Glu Ser Val Glu Ala
 370 375 380

 Ile Thr Asp Leu Thr Lys Ala Leu Glu Phe Glu Pro Asp Ser Ala Asp
 385 390 395 400
 Ile Leu His Glu Arg Gly Ile Val Asn Phe Lys Phe Lys Asp Phe Lys
 405 410 415
 Gly Ala Val Glu Asp Leu Ser Thr Cys Val Lys Ser Asp Lys Asp Asn
 420 425 430
 Lys Ser Ala Tyr Thr Tyr Leu Gly Leu Ala Leu Tyr Ser Leu Gly Glu
 435 440 445
 Tyr Arg Lys Ala Glu Glu Ala His Lys Lys Ala Ile Gln Ile Glu Arg

 450 455 460
 Asn Phe Leu Glu Ala Trp Ala His Leu Ala Gln Phe Tyr Gln Asp Leu
 465 470 475 480

Ala Asn Ser Glu Lys Ala Leu Glu Cys Leu His Gln Ile Leu Gln Ile
485 490 495

Asp Gly Arg Tyr Ala Lys Ala Tyr His Leu Arg Gly Leu Leu Leu His
500 505 510

Gly Met Gly Glu His Arg Asn Ala Ile Lys Asp Leu Ser Met Gly Leu
515 520 525

Ala Ile Asp Ser Ala Asn Ile Glu Cys Leu Tyr Leu Arg Ala Ser Cys
530 535 540

Tyr His Ala Ile Gly Leu Tyr Lys Glu Ala Val Lys Asp Tyr Asp Ala
545 550 555 560

Ala Leu Asp Leu Glu Leu Asp Ser Met Glu Lys Phe Val Leu Gln Cys
565 570 575

Leu Ala Phe Tyr Gln Lys Glu Ile Ala Leu Tyr Thr Ala Ser Lys Met
580 585 590

Asn Ser Glu Phe Ser Trp Phe Asp Ile Asp Gly Asp Ile Asp Pro Leu
595 600 605

Phe Lys Glu Tyr Trp Cys Lys Arg Leu His Pro Lys Asn Val Cys Glu
610 615 620

Lys Val Tyr Arg Gln Pro Pro Leu Lys Glu Ser Leu Lys Lys Gly Lys
625 630 635 640

Gln Arg Lys Gln Glu Phe Thr Phe Thr Lys Gln Lys Thr Ala Leu Leu
645 650 655

Gln Ala Ala Asp Ser Ile Gly Arg Asn Ile Gln Tyr His Cys Pro Gly
660 665 670

Phe Leu His Asn Arg Arg Gln His Arg Met Ala Gly Leu Ala Ala Ile
675 680 685

Glu Ile Ala Gln Lys Val Ser Lys Ala Trp Arg Ala Leu Gln Ala Glu
690 695 700

Trp Arg Asn Ser Thr Lys Gly Thr Gly Lys Ser Gly Lys Arg Leu Arg
705 710 715 720

Arg Arg Glu Lys Leu Asn Ser Ile Ser Leu Asn Arg Gly Gly Ala Gly
725 730 735

Cys Ser Thr Ser Ser Ser Ser Asp Thr Ser Thr Ser Tyr Ser Leu Ile

740 745 750
 Asp Asp Arg Ser Thr Gly Arg Ser Met Met Ser Trp Asn His Leu Tyr
 755 760 765
 Ser Leu Ala Val Lys Trp Arg Gln Ile Ser Glu Pro Cys Asp Pro Val
 770 775 780
 Val Trp Ile Asn Lys Leu Ser Glu Glu Phe Asn Thr Gly Phe Gly Ser
 785 790 795 800
 His Thr Pro Leu Val Leu Gly Gln Ala Lys Val Val Arg Tyr His Pro
 805 810 815

Asn Phe Gln Arg Thr Leu Thr Val Ala Lys Ala Val Ile Lys Glu Asn
 820 825 830
 Lys Ser Val Cys Asn Lys Glu Asp Lys Ile Ile Asp Leu Ser Glu Gln
 835 840 845
 Gln Lys Leu Gln Glu Ile Met Ala Ala Glu Ser Ser Ser Asp Leu Tyr
 850 855 860
 Arg Val Val Gly Gln Asp Phe Trp Leu Ala Thr Trp Cys Asn Ser Thr
 865 870 875 880
 Ala Leu Glu Gly Lys Arg Leu Glu Gly Thr Arg Ile Thr Val Val Lys

885 890 895
 Met Gly Glu Ile Gly Tyr Asp Phe Ala Ile Arg Thr Pro Cys Thr Pro
 900 905 910
 Ala Arg Trp Asp Asp Phe Asp Val Glu Met Thr Ser Ala Trp Glu Ala
 915 920 925
 Leu Cys Ala Ala Tyr Cys Gly Asp Asn Tyr Gly Ser Thr Asp Phe Asp
 930 935 940
 Val Leu Glu Asn Val Arg Asp Ala Ile Leu Arg Met Thr Tyr Tyr Trp
 945 950 955 960

Tyr Asn Phe Met Pro Leu Ser Arg Gly Thr Ala Val Val Gly Phe Ile
 965 970 975
 Val Leu Leu Gly Leu Leu Leu Ala Ala Asn Met Glu Phe Thr Gly Ser

980 985 990
 Ile Pro Lys Gly Leu Gln Val Asp Trp Glu Ala Ile Leu Glu Phe Asp
 995 1000 1005
 Ser Ser Ser Phe Val Asp Ser Val Lys Lys Trp Leu Tyr Pro Ser Leu
 1010 1015 1020
 Lys Val Ser Thr Ser Trp Lys Ser Tyr Pro Asp Val Thr Ser Thr Phe

1025 1030 1035 1040
 Glu Thr Thr Gly Ser Val Val Ala Ala Leu Ser Thr Tyr Ser Asp

1045 1050 1055

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gRNA1

<400> 4

gtaactttcg acgccatcgc 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gRNA2

<400> 5

attgactata gcaaaacgct 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

cggtaataa aacacgtgtc 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

gagcttcac cctactcctcg

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

ggaacagtga aaaacgtaac

20

<210> 9

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

acactctttc cctacacgac gctcttccga tctaatacgca tcaattgagc tgc

53

<210> 10

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

gtgactggag ttcagacgtg tgctcttccg atctatgacg caagtttgag caag

54

<210> 11

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

acactctttc cctacacgac gctcttccga tctttggaca tttatgaatg aactgattaa

60

60

<210>	12	
<211>	54	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	12	
	gtgactggag ttcagacgtg tgctcttccg atcttaggat cgagctgaag tgcc	54
<210>	13	
<211>	64	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	13	
	cagtcggtct caggagtgat caaaagtccc acatcgatca ggtgatatat agcagcttag	60
	ttta	64
<210>	14	
<211>	64	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	14	
	gagtcggtct cacaatcgct atgtcgactc tatcattata taaactaagc tgctatatat	60
	cacc	64
<210>	15	
<211>	86	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	15	
	cagtcggtct caattggtaa ctttcgacgc catcgcggtt tagagctaga aatagcaagt	60
	taaaataagg ctagtcggtt atcaac	86
<210>	16	
<211>	74	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

cagtcggtct caagcgaaaa aaagcaccga ctcggtgccca ctttttcaag ttgataacgg 60

actagcctta tttt 74

<210> 17

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 17

cagtcggtct caattggatt gactatagca aaacgctgtt ttagagctag aaatagcaag 60

ttaaaataag gctagtcggt tatcaac 87

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 18

gccatatttc actcttgta g 21

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 19

tagtctggcc tctcggaca 19

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 20

tccaggtaga gacagtggta aa	22
<210> 21	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 21	
ctggtttctt tgggttcct gc	22
<210> 22	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 22	
gcaacaactg tccatacacc	20
<210> 23	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 23	
agactccacc acaatcacc	19
<210> 24	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 24	
gacaagcaat agcaggagtg	20
<210> 25	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> primer
 <400> 25
 taagtgtgcc aacatcagac 20
 <210> 26
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 26
 gaaatagcat aagatggcag acg 23
 <210> 27
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 27
 ataccaccca tcacaccagt at 22
 <210> 28
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 28
 ctgctctctc agtagccaac ac 22
 <210> 29
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 29
 ctctctccaa tagcagaggt tt 22