(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0123462
(43) 공개일자 2024년08월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *A01H 6/66* (2018.01)
C12N 15/82 (2006.01) *C12N 9/22* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/1137 (2013.01)
A01H 1/10 (2024.01)
(21) 출원번호 10-2023-0015689
(22) 출원일자 2023년02월06일
심사청구일자 2023년02월06일

(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
동아대학교 산학협력단
부산광역시 사하구 낙동대로550번길 37, 동아대학교 내 (하단동)
(72) 발명자
김현욱
경기도 남양주시 별내5로 81, 3107동 802호(별내동, 남양주 별내 스위첸 아파트)
황성빈
서울특별시 송파구 송파대로28길 27, 송파성원상떼빌 102동 910호(가락동, 송파성원쌍떼빌)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인리채

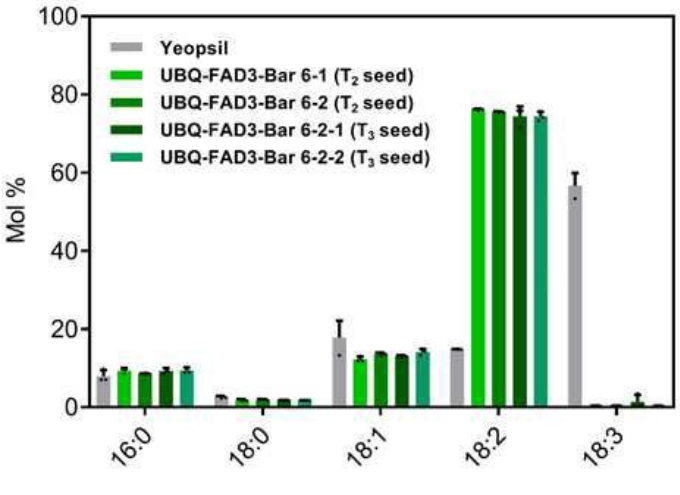
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **가이드 RNA 및 이를 이용한 들깨 오일에서 지방산 조성 조절 방법**

(57) 요 약

본 발명은 들깨의 FAD3 유전자를 표적하는 gRNA 및 이를 이용한 들깨 오일에서 지방산 조성을 조절하는 방법에 관한 것으로, 들깨에서 FAD3 유전자를 넉아웃시킬 수 있어 보다 확실하게 알파-리놀렌산 함량은 줄이고 리놀레산 함량을 증가시킬 수 있다. 또한 본 발명은 FAD3 유전자 변이를 포함하는 알파-리놀렌산 함량이 감소한 들깨에 관한 것으로, 알파-리놀렌산이 감소되어 있어 들깨 오일의 산패를 방지할 수 있다.

대 표 도 - 도10



(52) CPC특허분류
A01H 6/66 (2022.05)
C12N 15/8247 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)

(72) 발명자
박민음
서울특별시 광진구 능동로36길 34-5, 302호(능동, 능동다가구주택)

허재복
부산광역시 사하구 하신번영로 400, 105동 804호(하단동, 하단동에스케이뷰아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1545024872
과제번호 319107044SB010
부처명 농림축산식품부
과제관리(전문)기관명 농림식품기술기획평가원
연구사업명 농생명산업기술개발
연구과제명 생명공학기술을 활용한 고기능성 들깨 개발
기 여 율 50/100
과제수행기관명 세종대학교산학협력단
연구기간 2022.02.20 ~ 2023.02.19
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711164043
과제번호 2020R1A2C2008175
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 종자 지방산 대사를 조절하는 전사인자 발굴을 통한 오일 작물에서 기능성 지방산 생산 증진 연구
기 여 율 25/100
과제수행기관명 세종대학교산학협력단
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395072147
과제번호 PJ016520012022
부처명 농촌진흥청
과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
연구사업명 차세대농작물신육종기술개발사업
연구과제명 유전자교정 형질개선 엽채류 육종소재 개발 및 시장 경쟁력 확보(1주관)
기 여 율 25/100
과제수행기관명 동아대학교 산학협력단
연구기간 2022.01.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 또는 2의 서열로 이루어진 가이드 RNA.

청구항 2

청구항 1의 가이드 RNA(gRNA)가 삽입된 CRISPR-Cas9 재조합 벡터를 들깨에 도입하여 FAD3 유전자를 넉아웃(knock-out)시키는 단계를 포함하는, 들깨 오일에서 지방산 조성을 조절하는 방법.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 지방산 조성 조절은 18:3 지방산(알파-리놀렌산) 함량을 감소시키고, 18:2 지방산(리놀레산) 함량을 증가시키는 것인, 들깨 오일에서 지방산 조성을 조절하는 방법.

청구항 4

야생형 들깨의 유전체와 비교하여 FAD3 유전자의 염기서열 중 서열번호 7의 서열 중 644~795번째 염기서열 또는 서열번호 8의 서열 중 649~800번째 염기서열 내에

(i) 657~661번째 염기 중 하나의 염기로부터 145 내지 150개의 연속된 염기의 결실(deletion);

(ii) 650~658번째 염기 중 하나의 염기 또는 790~795번째 염기 중 하나의 염기로부터 2 내지 6개의 연속된 염기의 결실;

(iii) 664~665번째 위치 또는 792~793번째 위치에 A 또는 T 염기의 삽입(insertion); 및

(iv) 649~681번째 염기서열의 서열번호 12의 서열로 이루어진 염기서열로의 치환(substitution)

으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 변이를 포함하는, 알파-리놀렌산 함량이 감소한 들깨.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 가이드 RNA 및 이를 이용한 들깨 오일에서 지방산 조성을 조절하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 불포화지방산은 한 분자 속에 하나 이상의 이중결합을 가지는 사슬 모양 화합물로 동식물 속에 널리 분포하며, 일반적으로 탄소수 12 내지 20개 정도의 짝수 개로 구성되어 있다. 지방산 분자가 단 하나의 이중결합을 갖고 있으면 단일불포화지방산이라고 하며, 두 개 이상의 이중결합을 갖고 있으면 다가 불포화지방산(다중불포화지방산)이라고 부른다. 불포화지방산은 이중결합 바로 다음의 수소 원자가 결합된 형태에 따라 시스 형(cis configuration)과 트랜스 형(trans configuration)으로 나뉜다. 시스 형은 인접한 수소 원자가 이중결합과 같은 방향에 있는 것을 말하며, 트랜스 형은 다음 2개의 수소 원자가 이중결합과 반대의 방향으로 결합한 것을 말한다. 지방산 사슬에서 이중결합이 형성되면 수소 원자가 제거되어야 하는데, 이 때문에 포화지방산에서 '포화'라는 용어는 수소 원자가 포화하였다는 것을 의미한다. 세포 내 대사에서 수소-탄소 결합은 에너지 생산을

위해 결합이 깨지거나 산화된다. 따라서 불포화지방산은 같은 크기의 포화지방산에 비해 에너지를 더 적게 함유한다. 또한, 불포화지방산은 더 낮은 녹는점이 있어서 세포막의 유동성을 증가시키는 작용도 하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 들깨 오일에는 16:0, 18:0, 18:1, 18:2(리놀레산), 18:3(알파-리놀렌산) 지방산이 존재한다. 알파-리놀렌산은 심혈관계 질환, 암, 염증 등의 질병 예방 효과가 있다고 알려져 있지만 이의 함량이 많으면 산패가 되기 쉬워 상온에서 오래 가지 못해 저장이 어려운 단점이 있다. 이에 산패를 방지하기 위해 들깨에서 알파-리놀렌산의 합성을 억제할 수 있는 방안이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 10-1570725호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 FATTY ACID DESATURASE 3 (FAD3) 유전자를 표적하는 가이드 RNA(gRNA)를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 본 발명은 상기 gRNA를 사용하여 들깨에서 FAD3를 넉아웃시켜 들깨 오일에서 지방산 조성을 조절하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 FAD3 유전자에 변이가 일어나 알파-리놀렌산 함량이 감소한 들깨를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 1. 서열번호 1 또는 2의 서열로 이루어진 가이드 RNA.

[0012] 2. 위 1의 가이드 RNA(gRNA)가 삽입된 CRISPR-Cas9 재조합 벡터를 들깨에 도입하여 FAD3 유전자를 넉아웃(knock-out)시키는 단계를 포함하는, 들깨 오일에서 지방산 조성을 조절하는 방법.

[0013] 3. 위 2에 있어서, 상기 지방산 조성 조절은 18:3 지방산(알파-리놀렌산) 함량을 감소시키고, 18:2 지방산(리놀레산) 함량을 증가시키는 것인, 들깨 오일에서 지방산 조성을 조절하는 방법.

[0014] 4. 야생형 들깨의 유전체와 비교하여 FAD3 유전자의 염기서열 중 서열번호 7의 서열 중 644~795번째 염기서열 또는 서열번호 8의 서열 중 649~800번째 염기서열 내에

[0015] (i) 657~661번째 염기 중 하나의 염기로부터 145 내지 150개의 연속된 염기의 결실(deletion);

[0016] (ii) 650~658번째 염기 중 하나의 염기 또는 790~795번째 염기 중 하나의 염기로부터 2 내지 6개의 연속된 염기의 결실;

[0017] (iii) 664~665번째 위치 또는 792~793번째 위치에 A 또는 T 염기의 삽입(insertion); 및

[0018] (iv) 649~681번째 염기서열의 서열번호 12의 서열로 이루어진 염기서열로의 치환(substitution)

[0019] 으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 변이를 포함하는, 알파-리놀렌산 함량이 감소한 들깨.

발명의 효과

[0021] 본 발명 gRNA 및 본 발명의 방법으로 들깨에서 FAD3 유전자를 완전히 넉아웃시킬 수 있어 보다 효과적으로 들깨에서 알파-리놀렌산을 감소시키면서 리놀레산 함량을 증가시킬 수 있다.

[0022] 본 발명 들깨는 알파-리놀렌산 함량이 감소되어 있어 쉽게 산패 또는 변질되지 않는 들깨 오일을 생산할 수 있다.

[0023] 본 발명의 들깨로부터 생산된 들깨 오일은 쉽게 산패 또는 변질되지 않으며, 저장성이 증대될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1 내지 5는 들깨에서 FAD3 유전자를 넉아웃시키기 위해 제작된 CRISPR-Cas9 재조합 벡터를 도식화한 것이다.

도 6은 들깨 FAD3 유전자를 타겟하기 위해 클로닝한 CRISPR 벡터맵을 도식화한 것이다.

도 7은 들깨 FAD3 유전자인 FAD3a 와 FAD3b 구조와 gRNA가 타겟하는 위치를 나타낸 것이다.

도 8은 들깨 형질전환체에서 FAD3a의 생거 시퀀싱 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 들깨 형질전환체에서 FAD3b의 생거 시퀀싱 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 들깨 형질전환체와 엽실의 종자 지방산 함량을 분석한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0028] 본 발명은 서열번호 1 또는 2의 서열로 이루어진 가이드 RNA에 관한 것이다.

[0029] 본 발명의 "가이드 RNA(guide RNA, gRNA)"란 RNA의 한 종류로, 인간이나 동식물의 특정 유전자를 교정하는 유전자 교정(genome editing)에서 교정하려는 DNA를 인식하여 찾아내려는 RNA를 의미한다.

[0030] 유전자 교정 기술로는 유전자 가위(engineered nuclease)가 있으며, 유전자 가위의 한 종류로 CRISPR-Cas9이 있다.

[0031] 본 발명에서 "CRISPR-Cas9"이란 미생물의 면역체계로 알려진 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 시스템을 이용해 원하는 유전자 염기서열을 절단하도록 고안된 것으로서, 고정적 구성요소로서 Cas9 단백질을 포함하고, 가변적 구성요소로서 타겟 유전자에 특이적인 가이드 RNA를 포함한다. 이때 가이드 RNA는 20bp 내외 길이의 타겟 유전자 부위와 서열의 3`쪽에 PAM 서열(5`-NGG-3`)이 존재해야 한다. 가이드 RNA가 타겟 유전자를 인식하면 가이드 RNA에 Cas9 단백질이 결합하여 뉴클라아제로 작용하여 타겟 유전자 부위 중 PAM 서열로부터 상위 3-4bp 사이를 절단함으로써 DNA 이중가닥 손상(DNA double strand break, DSB)을 유발한다. 이중가닥 손상으로 인해 염기서열의 교정이 발생할 수 있다.

[0032] 상기 가이드 RNA는 들깨 유래 FAD3 유전자의 특정서열을 표적으로 한다. 들깨는 4배체 식물로, FAD3 유전자가 두 카피 존재하며, 상기 가이드 RNA는 두 카피의 들깨 FAD3 유전자(FAD3a(pfrFAD3a) 및 FAD3b(pfrFAD3b) 유전자)를 모두 표적할 수 있다.

[0033] 상기 FAD3 유전자는 서열번호 7 또는 8의 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0034] 상기 FAD3 유전자의 특정서열은 상기 FAD3 유전자의 프로모터, 엑손 또는 인트론일 수 있으며, 구체적으로는 엑손일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 상기 FAD3 유전자의 특정서열은 서열번호 7로 이루어진 서열 중 644~795번째 염기서열 또는 서열번호 8로 이루어진 서열 중 649~800번째 염기서열일 수 있다. 상기 FAD3 유전자의 특정서열은 PAM 서열을 포함할 수 있으며, 상기 FAD3 유전자의 특정서열 위치의 바로 뒤에 PAM 서열이 존재할 수 있다.

[0036] 상기 FAD3 유전자는 소포체 막에 저장지질을 구성하며 18:2 지방산(리놀레산)을 18:3(알파-리놀렌산)으로 합성하는 과정에 관여하는 유전자로, 이 유전자의 발현 조절을 통해 리놀레산과 알파-리놀레산 함량을 증가시키거나 감소시킬 수 있다.

[0038] 또한 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 서열로 이루어진 가이드 RNA(gRNA)가 삽입된 CRISPR-Cas9 재조합

벡터를 들깨에 도입하여 FAD3 유전자를 넉아웃(knock-out)시키는 단계를 포함하는, 들깨 오일에서 지방산 조성을 조절하는 방법에 관한 것이다.

[0039] 상기 CRISPR-Cas9 재조합 벡터에는 서열번호 1의 서열로 이루어진 가이드 RNA 및 서열번호 2의 서열로 이루어진 가이드 RNA가 같이 삽입될 수 있다.

[0040] 상기 CRISPR-Cas9 재조합 벡터는 목적하는 유전자가 넉아웃될 수 있도록, Cas9과 가이드 RNA의 발현에 필요한 발현조절 서열이 기능적으로 연결될 수 있다. 예를 들어, 상기 벡터에는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서, 터미네이터 등의 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호서열 또는 리더 서열을 포함할 수 있으며, 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 또한, 상기 벡터는 선택성 마커(예컨대, 식물 선발 항생제 및 제초제 저항성 마커, 형광선발마커, 세균 저항성 선발 마커 등)를 포함할 수 있으며, 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다.

[0041] 상기 벡터는 아그로박테리아 벡터, 식물 바이러스성 벡터 또는 비바이러스성 벡터일 수 있다. 식물 바이러스성 벡터는 예를 들어, Alternanthera mosaic virus (AltMV), cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV), Bean yellow dwarf virus (BeYDV), Wheat dwarf virus (WDV), Cabbage leaf curl virus (CaLCuV), Tobacco rattle virus (TRV) 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 비바이러스성 벡터는 예를 들어, 플라스미드 또는 리포좀일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0042] 상기 CRISPR-Cas9 재조합 벡터에 포함될 수 있는 프로모터는 가이드 RNA의 발현에 관여하는 프로모터, Cas9 단백질의 발현에 관여하는 프로모터를 다 포함하며, 이러한 프로모터로 당업계에서 통상적으로 사용되는 프로모터라면 제한 없이 사용될 수 있다.

[0043] 가이드 RNA의 발현에 관여하는 프로모터는 예를 들어, U6 프로모터, H1 프로모터 등의 RNA 폴리머레이즈 Ⅲ(Pol Ⅲ) 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0044] Cas9 단백질의 발현에 관여하는 프로모터는 예를 들어, UBQ, 액틴, CaMV(Cauliflower Mosaic Virus) 35S, EC1.2 (egg cell-specific gene), RPS5A, NOS 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. UBQ 프로모터의 경우, 애기장대 UBQ 프로모터(UBQ3, UBQ10, UBQ11 등), 들깨 UBQ 프로모터(UBQ4 등), 파슬리 UBQ 프로모터(UBQ4-2), 옥수수 UBQ (UBQ1)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0045] 상기 CRISPR-Cas9 재조합 벡터는 당업계에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당업계에서 통상적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.

[0046] 상기 CRISPR-Cas9 재조합 벡터를 들깨에 도입하는 것은 당업계에 공지된 형질전환기술에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 아그로박테리움을 이용한 형질전환방법, 미세사출법(microprojectile bombardment), 일렉트로포레이션(electroporation), PEG-매개 융합법(PEG-mediated fusion), 미세주입법(microinjection), 리포좀 매개법(liposome-mediated method), 인-플란타 형질전환법(In planta transformation), 진공 침윤법(Vacuum infiltration method), 화아침지법(floral meristem dipping method) 또는 아그로박테리아 분사법(Agrobacteria spraying method)을 이용할 수 있으나, 이제 제한되는 것은 아니다.

[0047] 상기 CRISPR-Cas9 재조합 벡터를 들깨에 도입하여 들깨의 FAD3 유전자를 넉아웃시킬 수 있으며, 이로 인해 상기 재조합 벡터가 도입된 들깨 및 이 들깨에서 얻어진 들깨 오일에서 지방산의 조성을 조절할 수 있다.

[0048] 상기 지방산의 조성을 조절하는 것은 불포화지방산의 조성을 조절하는 것일 수 있고, 구체적으로는 다중불포화지방산의 조성을 조절하는 것일 수 있다. 더 구체적으로는 18:3 지방산(알파-리놀렌산) 함량을 감소시키고, 18:2 지방산(리놀레산) 함량을 증가시키는 것일 수 있다.

[0050] 또한, 본 발명은 알파-리놀렌산 함량이 감소한 들깨에 관한 것이다.

[0051] 본 발명의 알파-리놀렌산 함량이 감소한 들깨는 야생형 들깨의 유전체와 비교하여 FAD3 유전자의 염기서열 중 서열번호 7의 서열 중 644~795번째 염기서열 또는 서열번호 8의 서열 중 649~800번째 염기서열 내에 (i) 657~661번째 염기 중 하나의 염기로부터 145 내지 150개의 연속된 염기의 결실(deletion); (ii) 650~658번째 염기 중 하나의 염기 또는 790~795번째 염기 중 하나의 염기로부터 2 내지 6개의 연속된 염기의 결실; (iii) 664~665번째 위치 또는 792~793번째 위치에 A 또는 T 염기의 삽입(insertion); 및 (iv) 649~681번째 염기서열의 서열번호 12의 서열로 이루어진 염기서열로의 치환(substitution)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의

변이를 포함할 수 있다.

[0052] 상기 변이는 자연적 또는 인위적으로 발생한 것일 수 있다.

[0053] 상기 변이가 인위적으로 발생한 경우, 본 발명의 가이드 RNA를 사용한 형질전환 또는 본 발명의 방법으로 인해 발생한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0054] 본 발명의 알파-리놀렌산 함량이 감소한 들깨는 서열번호 7의 서열 중 644~795번째 염기서열 및 서열번호 8의 서열 중 649~800번째 염기서열에 동시에 변이가 존재할 수 있다.

[0055] 각 염기서열에서의 변이는 구체적으로 서열번호 7의 서열 중 644~795번째 염기서열로 이루어진 FAD3 유전자 표적서열에서의 (i) 변이, 서열번호 7의 서열 중 644~795번째 염기서열로 이루어진 FAD3 유전자 표적서열에서의 (ii) 및 (iii) 변이, 서열번호 8의 서열 중 649~800번째 염기서열로 이루어진 FAD3 유전자 표적서열에서의 (ii) 및 (iv) 변이 또는 서열번호 8의 서열 중 649~800번째 염기서열로 이루어진 FAD3 유전자 표적서열에서의 (ii) 및 (iii) 변이일 수 있다.

[0056] 이러한 변이로 인해 들깨에서 FAD3 유전자가 넉아웃될 수 있고, 이에 따라 들깨에서 알파-리놀렌산 함량은 감소하고 리놀레산 함량은 증가할 수 있다.

[0057] 본 발명의 알파-리놀렌산 함량이 감소한 들깨에서 생산되는 들깨 오일은 감소된 알파-리놀렌산 함량, 증가된 리놀레산 함량을 가질 수 있다.

[0058] 상기 들깨 및 이로부터 생산되는 들깨 오일은 알파-리놀렌산 함량이 감소되어 있어 쉽게 산패 또는 변질되지 않을 수 있고, 저장성이 증대될 수 있다.

[0060] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0062] **실시예 1. 들깨의 FAD3 유전자를 넉아웃시킬 수 있는 gRNA 탐색**

[0063] **1. gRNA 디자인 및 형질전환체 제작**

[0064] 들깨에서 알파 리놀렌산 합성에 관련된 FAD3 유전자를 CRISPR-Cas9 시스템을 이용해 넉아웃시켜 알파 리놀렌산 함량은 줄이고 리놀레산 함량은 증가시키고자 이에 적합한 gRNA를 탐색하였다.

[0065] 들깨는 4배체로 FAD3 유전자가 2개(pfrFAD3a(서열번호 7), pfrFAD3b(서열번호 8); 이하에서는 FAD3a, FAD3b라고도 표기함) 존재하여 이 2개의 FAD3 유전자를 모두 타겟할 수 있는 가이드 RNA(guide RNA; gRNA)를 디자인하였다. 총 3 세트의 gRNA를 디자인했고, 각 gRNA 세트마다 표적하는 FAD3 유전자의 서열 위치를 달리하였다. 타겟 위치, 형질전환을 위한 CRISPR 벡터에 사용되는 gRNA와 마커들은 표 1에 나타내었다. 각 벡터당 2개의 gRNA를 클로닝하여 1번~6번 벡터를 만들어 들깨 형질전환에 사용하였다(도 1 내지 6).

표 1

[0066]

	벡터 이름	gRNA 시퀀스	서열번호	타겟 위치(bp)	식물 선발 마커	세균 선발 마커
1	pHEE401E-pfrUBQ4-FAD3	TTCTTGTACCGTATCATGGA	1	644~800	Hygromycin	Kanamycin
		AAACCATGGACATGTCGAGA	2			
2	pHEE401E-pfrUBQ4-FAD3-1	TTCTTCACCCAGCAATGCGC	3	163~295	Hygromycin	Kanamycin
		GCCGGTTTACTGGATTGCTC	4			
3	pHEE401E-pfrUBQ4-mDsRed-FAD3-1	TTCTTCACCCAGCAATGCGC	3	163~295	DsRed	Kanamycin
		GCCGGTTTACTGGATTGCTC	4			
4	pHEE401E-pfrUBQ4-FAD3-2	GGTTTAAACAAATCGCTGTA	5	1,196~1,298	Hygromycin	Kanamycin
		CAATGGTGGAGGCATAGAGG	6			
5	pHEE401E-pfrUBQ4-mDsRed-FAD3-2	GGTTTAAACAAATCGCTGTA	5	1,196~1,298	DsRed	Kanamycin
		CAATGGTGGAGGCATAGAGG	6			
6	pHEE401E-UBQ-FAD3-Bar	TTCTTGTACCGTATCATGGA	1	644~800	Basta	Kanamycin
		AAACCATGGACATGTCGAGA	2			

[0068] 형질전환체 제작은 다음과 같이 수행되었다.

[0069] 들깨 엽실 종자를 LD 조건(16시간 광/8시간 암, 22℃)에서 MS 배지(1x MS, 0.8% 수크로스 및 0.8% agar, pH 5.7)에 파종하였다. 7~10일령 식물체의 떡잎과 배축을 0.8 ~ 1 cm 크기로 잘라 아그로박테리움 현탁액에 30분간 침지시켰다. 그런 다음 샘플을 멸균된 여과지에 놓고 수분을 제거하고 공동 배양 배지(1% MS 배지, 3% 수크로스, 3 mg/L 6-벤질아미노퓨린 (BA), 0.1 mg/L α-나프탈렌아세트산 (NAA), 1 mM 아세토시린곤, 0.4% Gelrite)에서 25℃, 암조건에서 배양하였다. 3일 후 외식체를 액상 MS 배지로 3회 세척하고 멸균된 여과지에 올려 수분을 제거한 후 새싹유도배지(1% MS 배지, 3% 수크로스, 3 mg/L BA, 0.1 mg/L NAA, 500 mg/ L 카르베니실린, 1.2 mg/L phosphinothricin (PPT), 0.4% Gelrite)를 첨가하여 배양하였다. 6~10주 후 떡잎에서 새싹이 재생되고 유합조직 절편에서 하배축을 잘라내어 새싹신장배지(1% MS 배지, 3% 수크로스, 3 mg/L BA, 500 mg/L 카르베니실린, 1.2 mg/L PPT, 0.4% Gelrite)에 얹고, 그런 다음 뿌리유도배지(1% MS 배지, 3% 수크로스, 0.4% Gelrite)에 넣어 뿌리를 유도하였다. 이후 형질전환 식물체를 화분에 옮기고 온실에서 키운 후 종자를 수확하여 형질전환 들깨 종자를 얻었다.

[0070] 상기 방법으로 1번부터 6번까지의 벡터를 사용해 들깨를 형질전환시킬 수 있는지 확인해본 결과, 1번부터 5번의 경우 형질전환체를 얻지 못하였지만, 6번 벡터로부터 형질전환체를 두 종류 얻을 수 있었고, 이 두 종류의 형질전환체에서 들깨 FAD3 유전자가 넉아웃(knock-out)된 것을 확인하였다.

[0072] **2. 들깨 FAD3 유전자 넉아웃(knock-out)된 형질전환체에서의 유전자 변이 확인**

[0073] 상기에서 확인한 6번 벡터를 사용하여 제작한 두 종류의 들깨 FAD3 유전자 넉아웃 형질전환체에서 FAD3 유전자의 변이 여부를 확인하고자 하였다. 형질전환체를 각각 6-1번 라인과 6-2번 라인으로 지칭하였다.

[0074] 상기 6번 벡터에는 서열번호 1 및 2의 gRNA, U6 프로모터 및 유비퀴틴 프로모터(Cas9 프로모터)가 사용되었고(도 6), 상기 gRNA는 2개의 gRNA 중 서열번호 1의 gRNA는 pfrFAD3의 2번째 엑손(타겟 1번 부위), 서열번호 2의 gRNA는 3번째 엑손(타겟 2번 부위)을 타겟하여 2개의 gRNA가 제대로 작동할 시 132bp가 결실되게끔 디자인하였다. 서열번호 1 및 2의 gRNA가 FAD3(FAD3a, FAD3b)에서 타겟한 좀 더 구체적인 위치는 FAD3a(서열번호 7)에서 644~795번째 염기서열, FAD3b(서열번호 8)에서 649~800번째 염기서열이었다(도 7).

[0076] 들깨 형질전환 식물체에서 유전자 삽입을 확인하기 위해 전체 게놈 DNA를 추출하였다. 구체적으로, CTAB(cetyltrimethylammonium bromide) 방법을 사용한 DNA 추출은 비-형질전환(NT) 및 형질전환체 식물의 잎 샘플로 수행되었다. 각 샘플을 2 ml 멸균 반응 튜브로 옮기고 1 ml의 CTAB 추출 완충액(20 g·L-1 CTAB, 1.4 M NaCl, 0.1 M Tris/HCl, 200 mM EDTA) 및 1.4 M b-머캅토에탄올을 첨가하였다. 혼합물을 볼텍싱하고 65℃에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음 용액을 12,000 X g에서 10분 동안 원심분리하였다. 상층액을 새로운 2 ml 멸균 반응 튜브로 옮겼다. 10 μl의 RNase A(10 mg·ml-1)를 첨가하고 혼합물을 37℃에서 60분 동안 배양하였다. 혼합물을 클로로포름:이소아밀 알코올(24:1) 800 ml로 추출하고 12,000 X g에서 10분 동안 원심분리하였다. 상층을 새로운 반응관으로 옮기고 이 단계를 반복하였다. 이소프로판올(0.6 부피)을 상부에 첨가하였다; 혼합물을 혼합하고 -20℃에서 30분 동안 배양하였다. 인큐베이션 후 혼합물을 실온에서 10분 동안 원심분리하고 상층액을 버렸다. 펠릿을 70% 에탄올 1 ml로 세척하고 12,000 X g에서 5분 동안 원심분리하였다. 상층액을 버리고, 펠릿을 37℃에서 30분 동안 건조시켰다. 그런 다음, 건조된 펠릿을 30 μl의 탈이온수에 녹이고 -20℃에서 보관하였다.

[0077] 상기 방법으로 추출한 DNA와 FAD3a와 FAD3b를 구분할 수 있고, gRNA가 타겟하는 부분을 포함할 수 있도록 디자인한 프라이머 및 Takara ex taq(폴리머레이즈)를 사용하여 PCR을 진행하였다. 사용한 프라이머 서열은 표 2에 나타내었다.

표 2

[0078]

	정방향 (5`-3`)	역방향 (5`-3`)
FAD3a	ATGGCCGTTTCTTCCGGTG (서열번호 9)	TTCTCAGGCAACTGCAATAAT (서열번호 10)
FAD3b		CAGGCAACTGCAGAGGGAA (서열번호 11)

[0080] PCR 생성물은 PCR purification kit(코스모진텍)를 이용해 정제 과정을 거친 후 생거 시퀀싱을 통해 형질전환체의 PfrFAD3a와 PfrFAD3b에 어떠한 돌연변이가 생겼는지 확인하였다.

[0081] PfrFAD3a의 생거 시퀀싱 결과, 6-1번 라인에서는 타겟 1번 부위의 658번째 C 염기서열 뒤쪽에서 147bp의 결실(deletion)이 일어났고, 6-2번 라인의 타겟 1번 부위에서는 654번째 G 염기서열 뒤쪽에서 5bp(TATCA)의 결실, 타겟 2번 부위에서는 792번째 G 염기서열 뒤쪽에서 1bp(A)의 삽입(insertion)이 일어났다(도 8).

[0082] PfrFAD3b의 생거 시퀀싱 결과, 6-1번 라인에서는 타겟 1번 부위가 649번째 T 염기서열부터 681번째 염기서열까지 기존 시퀀스와는 전혀 다른 시퀀스인 서열번호 12의 서열(CGTGGTGGGAGTTTTTCGGACAATACCACGCT)로 바뀌었고(1bp는 결실됨), 타겟 2번 부위에서는 793번째 T 염기서열 뒤쪽으로 4bp(GTCG)가 결실이 일어났다. 6-2번 라인의 경우 타겟 1번에서는 664번째 A 염기서열 뒤쪽으로 1bp(T)의 삽입, 타겟 2번에서는 793번째 T 염기서열 뒤쪽으로 4bp(GTCG)가 결실된 것을 확인하였다(도 9).

[0084] **실시예 2. 들깨 FAD3 유전자 돌연변이가 종자 지방산 조성에 미치는 영향**

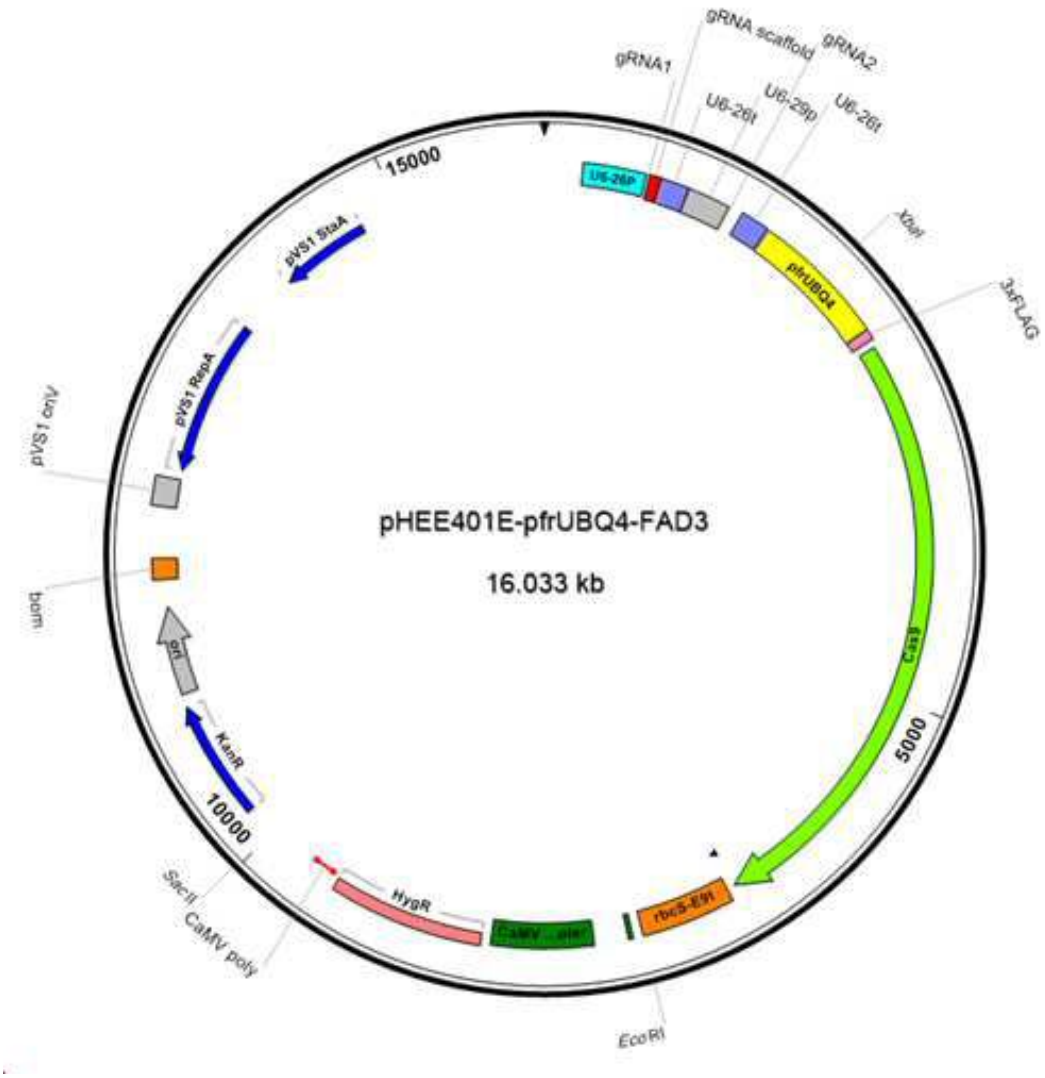
[0085] PfrFAD3a와 PfrFADb의 돌연변이가 종자 지방산 조성에 어떠한 영향을 끼쳤는지 보기 위해 각 라인의 들깨 종자 1개를 총 3반복으로 진행하였다.

[0086] 대조군(엽실), 실시예 1에서의 6-1번 라인, 6-2번 라인의 들깨 종자를 screw tube에 1개씩 각각 담고 실험 준비를 진행하였다. 각 tube에 톨루엔 500 μl와 15:0 Standard가 들어있고, 메탄올로 희석한 5% 황산을 500 μl씩 넣었다. 그 후 85℃ water bath에서 2시간 동안 반응을 시켰고, 20분마다 샘플을 흔들어 주었다. 2시간 동안 반응을 시키고 나면 흄후드에서 샘플을 어느정도 식힌 후에 0.9% NaCl 1 ml, Hexane 1 ml을 넣고 흔들어준 다음, 3000 rpm에서 2분간 원심분리기를 돌렸다. 그 다음에 지방산이 있는 상층액을 떠내어 6 ml tube에 옮겨주었다. 그리고 질소를 이용해 purge를 시켜 지방산만 침전시키고 나머지는 다 날린 후에 200 μl Hexane을 넣고 녹여서 가스 크로마토그래피(GC)를 분석하기 위한 바이알에 넣어주었다. 이 바이알을 GC-2030 autosampler에 배치시켜 놓고 GC 분석을 진행하였다. GC 기계의 칼럼은 DB-23 column(30 m X 0.25 mm, 0.25-μm film, Agilent)을 사용하였고, GC 오븐의 온도는 190℃에서 230℃까지 분당 6℃씩 증가하게 설정하였다.

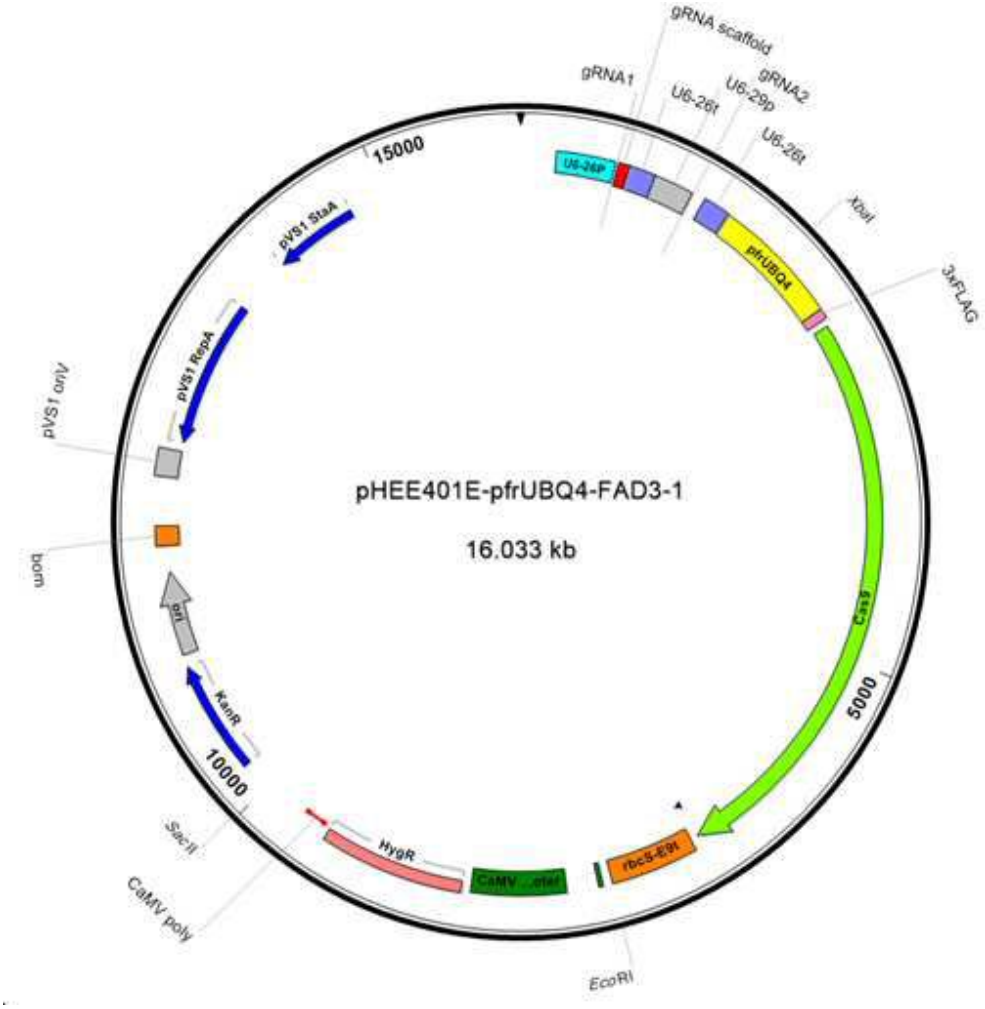
[0087] 종자 지방산 분석 결과, 엽실의 18:3(알파 리놀렌산) 함량이 56.7%였던 것이 6-1번 라인과 6-2번 라인에서 0.3%까지 크게 감소하였다. 18:2(리놀레산) 함량은 엽실에서 14.8%였던 것이 6-1번 라인과 6-2번 라인에서는 75.6%~76.2%로 크게 증진하였다. 18:1 함량 역시 엽실에서 17.9% 였던 것이 6-1번 라인과 6-2번 라인에서 12.3%~13.6%로 약간 감소하였다. 6-2번 라인의 다음세대인 T3 종자 (6-2-1번, 6-2-2번 라인)의 종자 지방산 분석 결과 18:1 함량은 13.0%~14.1%, 18:2 함량은 74.4%~74.5%, 18:3 함량은 0.3%~1.4% 정도로 T2 종자와 비슷한 함량을 보였다. 종자 지방산 그래프를 통해 실시예 1에서 제조한 6번 벡터가 성공적으로 PfrFAD3a와 PfrFAD3b를 타겟하여 돌연변이를 만들어 18:3 함량을 크게 감소시키고 그에 따라 18:2 지방산을 크게 증진시킨 것을 알 수 있었다(도 10).

도면

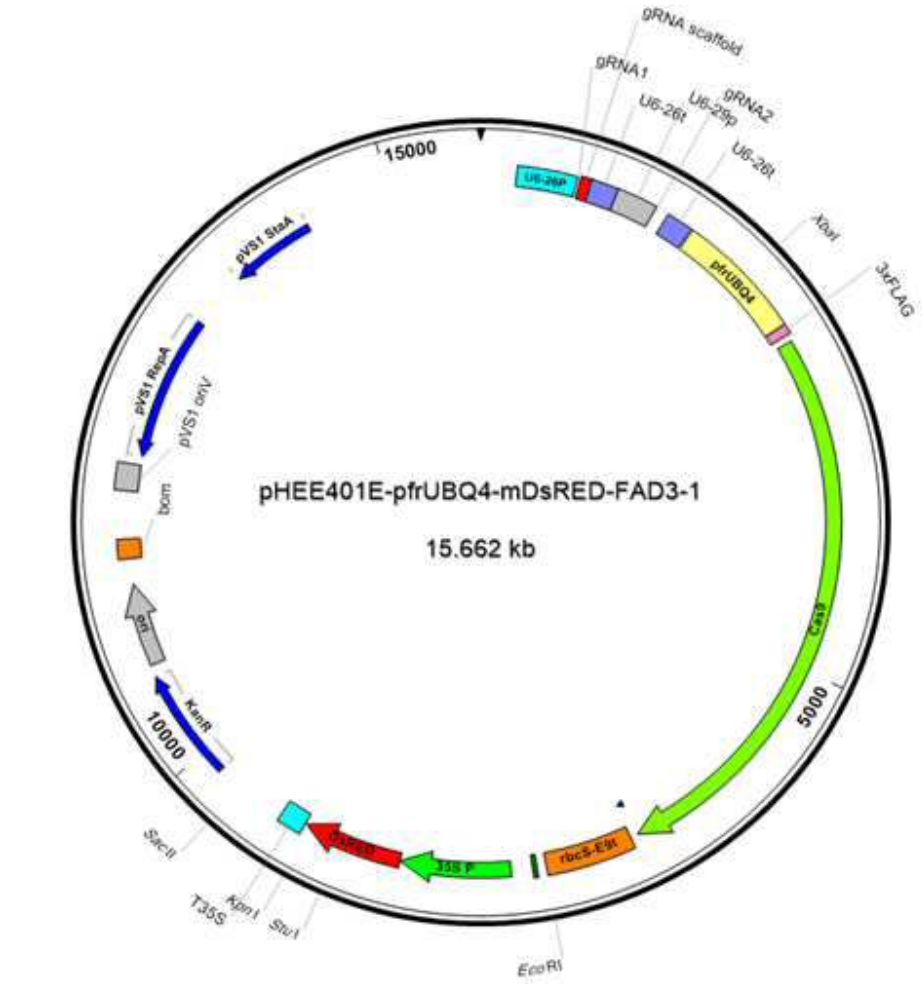
도면1


gRNA1
gRNA scaffold
gRNA2
U6-26t
U6-29p
U6-26t
U6-26P
15000
pVS1 StaA
pVS1 RepA
pVS1 oriV
bom
ori
KanR
10000
SacII
CaMV poly
HygR
rbcS-E9t
5000
Cas9
XbaI
pfrUBQ4
3xFLAG
EcoRI
pHEE401E-pfrUBQ4-FAD3
16.033 kb

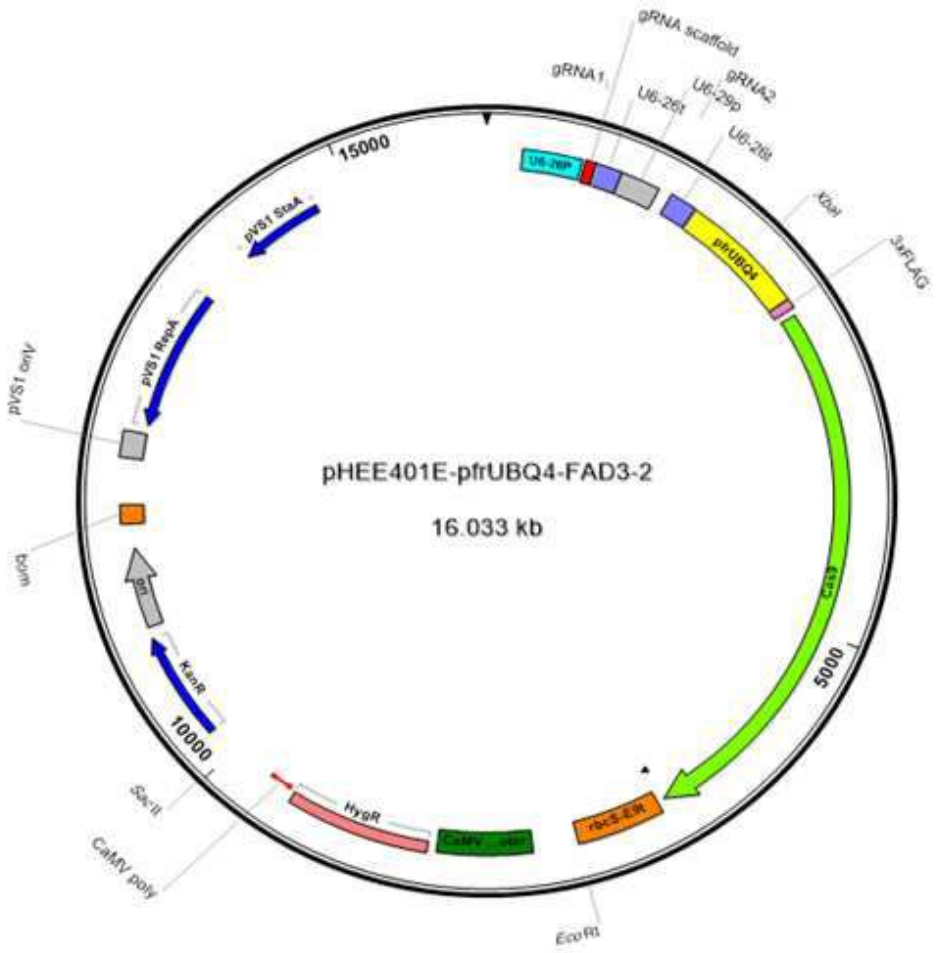
도면2


gRNA scaffold
gRNA1
U6-26t
U6-29p
gRNA2
U6-26t
U6-34p
XbaI
3xFLAG
pfrUBQ4
Cas9
5000
rbcS-E9t
EcoRI
HygR
CaMV poly
SacII
10000
KanR
ori
bom
pVS1 oriV
pVS1 RepA
pVS1 StaA
15000
pHEE401E-pfrUBQ4-FAD3-1
16.033 kb

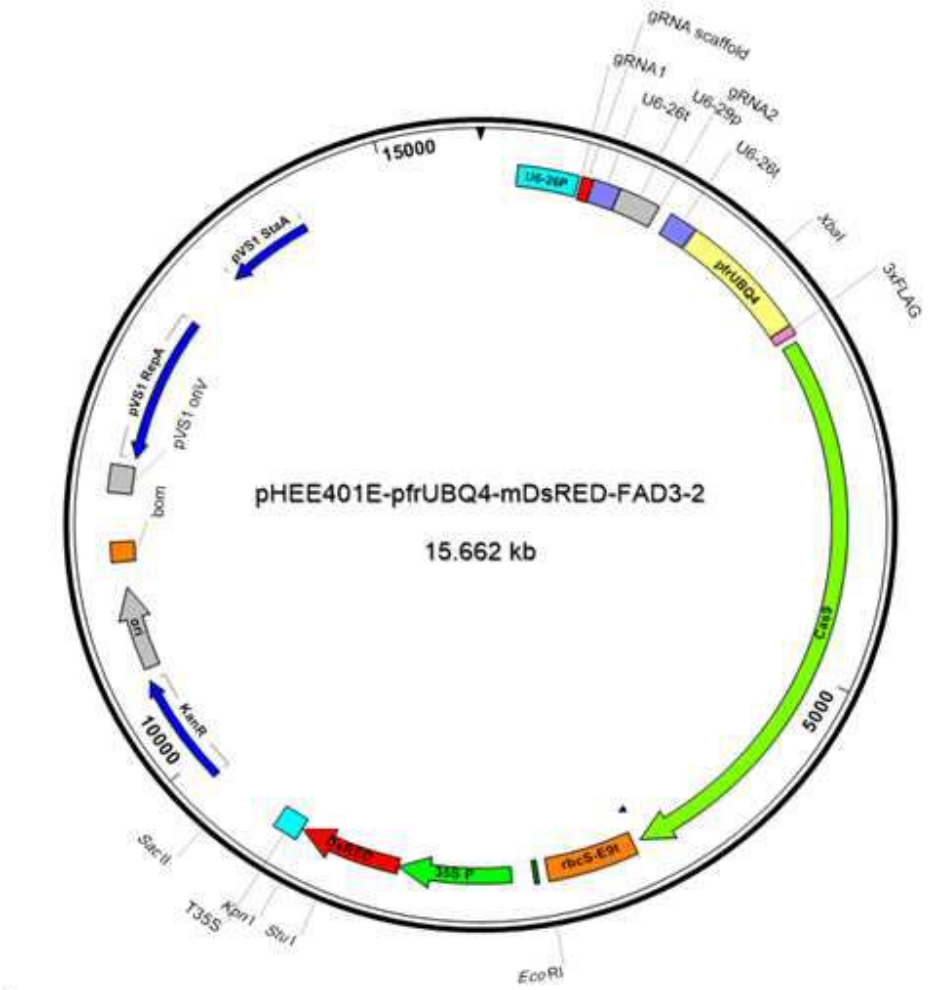
도면3


gRNA scaffold
gRNA1
U6-26t
U6-29p
gRNA2
U6-26t
XbaI
3xFLAG
15000
U6-26P
pVS1 StaA
pfrUBQ4
pVS1 RepA
pVS1 oriV
pHEE401E-pfrUBQ4-mDsRED-FAD3-1
15.662 kb
bom
Cas9
5000
pfr
KanR
10000
rbcS-E9t
35S P
SacII
T35S
KpnI
StuI
EcoRI

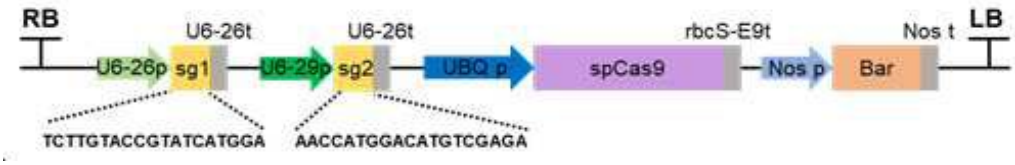
도면4


gRNA scaffold
gRNA1
gRNA2
U6-26t
U6-29p
U6-26p
XbaI
3xFLAG
15000
pVS1 StaA
pVS1 RepA
AvrII
pHEE401E-pfrUBQ4-FAD3-2
16.033 kb
bom
KanR
5000
10000
SacII
HygR
CaMV poly
EcoRI

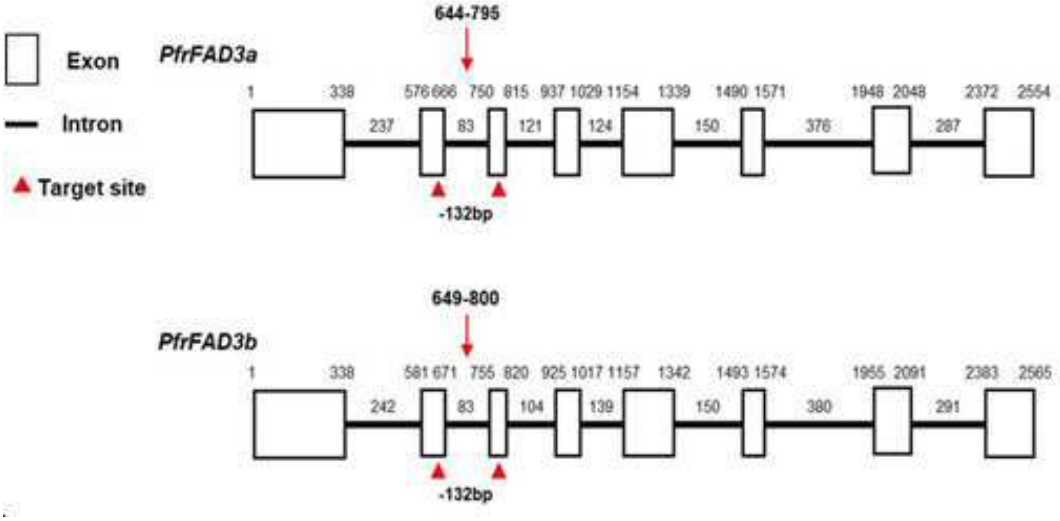
도면5


gRNA scaffold
gRNA1
U6-26t
U6-29p
gRNA2
U6-26t
15000
U6-26P
XbaI
3xFLAG
pVS1 StaA
pVS1 RepA
pVS1 oriV
pHEE401E-pfrUBQ4-mDsRED-FAD3-2
15.662 kb
bom
ori
KanR
10000
5000
Cas9
rbcS-E9t
T35S
SacII
T35S
KpnI
StuI
EcoRI

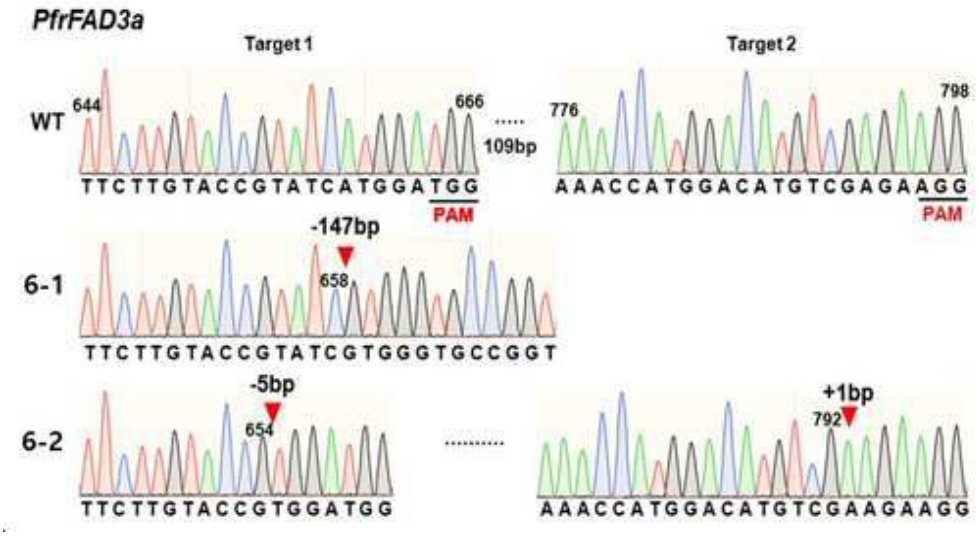
도면6


RB
U6-26t
U6-26t
rbcS-E9t
Nos t
LB
U6-26p
sg1
U6-29p
sg2
UBQ p
spCas9
Nos p
Bar
TCTTGTACCGTATCATGGA
AACCATGGACATGTCGAGA

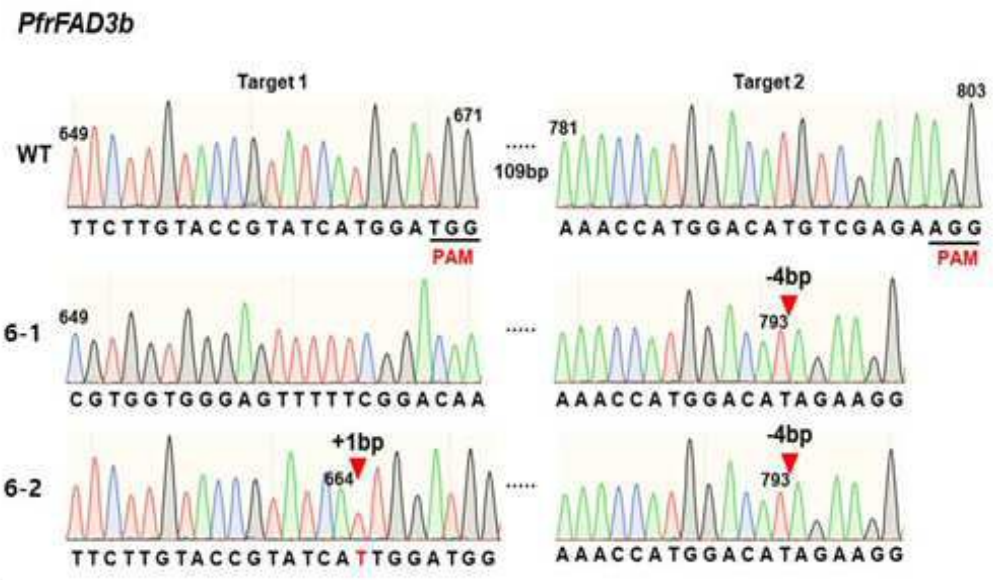
도면7


Exon
Intron
Target site
PfrFAD3a
644-795
1 338 576 666 750 815 937 1029 1154 1339 1490 1571 1948 2048 2372 2554
237 83 121 124 150 376 287
-132bp
PfrFAD3b
649-800
1 338 581 671 755 820 925 1017 1157 1342 1493 1574 1955 2091 2383 2565
242 83 104 139 150 380 291
-132bp

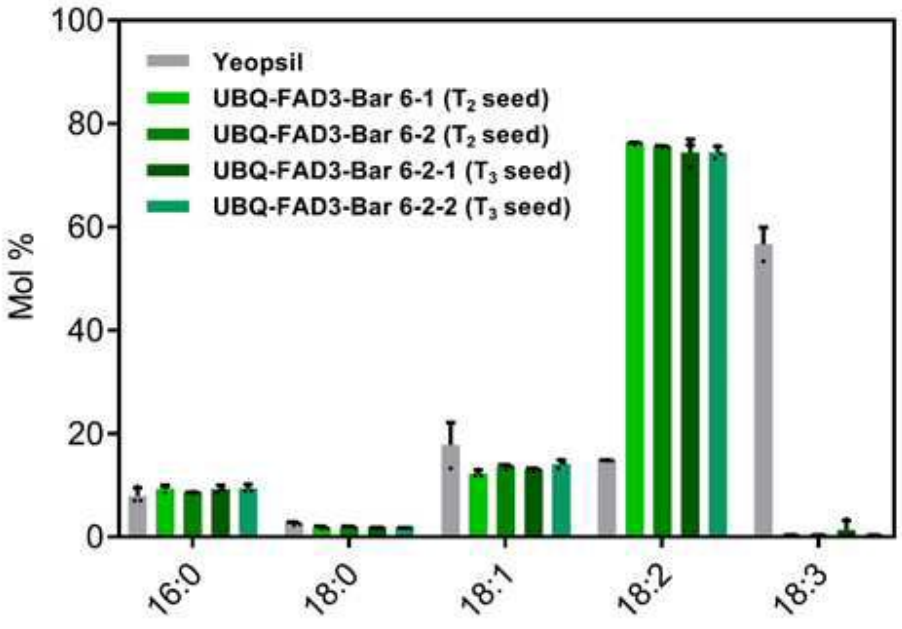
도면8


PfrFAD3a
Target 1
Target 2
WT
644
666
109bp
TTCTTGTACCGTATCATGGATGG
PAM
776
798
AAACCATGGACATGTCGAGAAGG
PAM
6-1
-147bp
658
TTCTTGTACCGTATCGTGGGTGCCGGT
6-2
-5bp
654
TTCTTGTACCGTGGATGG
+1bp
792
AAACCATGGACATGTCGAAGAAGG

도면9


PfrFAD3b
Target 1
Target 2
WT
649
671
109bp
781
803
TTCTTGTACCGTATCATGGATGG
PAM
AAACCATGGACATGTCGAGAAGG
PAM
6-1
649
-4bp
793
CGTGGTGGGAGTTTTTCGGACAA
AAACCATGGACATAGAAGG
6-2
+1bp
664
-4bp
793
TTCTTGTACCGTATCATTGGATGG
AAACCATGGACATAGAAGG

도면10


Yeopsil
UBQ-FAD3-Bar 6-1 (T2 seed)
UBQ-FAD3-Bar 6-2 (T2 seed)
UBQ-FAD3-Bar 6-2-1 (T3 seed)
UBQ-FAD3-Bar 6-2-2 (T3 seed)
Mol %
100
80
60
40
20
0
16:0
18:0
18:1
18:2
18:3

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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