(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년03월17일
(11) 등록번호 10-2090078
(24) 등록일자 2020년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *C12N 15/10* (2017.01)
C12N 15/82 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 15/102 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0127450
(22) 출원일자 2019년10월15일
심사청구일자 2019년10월15일
(30) 우선권주장
1020180144991 2018년11월22일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR101724933 B1
WO2017207589A1
논문(Journal of Integrative Plant Biology)
논문(한국원예학회 학술발표요지)

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
박영두
경기도 용인시 수지구 성복2로 220, 305동 1404호(성복동, 버들치마을 성복 힐스테이트 3차)
이기호
경기도 수원시 영통구 청명로 61,301호(영통동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 **배추의 내건성 관련 유전자 교정용 식물형질전환 벡터 및 이의 적용 방법**

(57) 요 약

본 발명은 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 내건성 관련 유전자를 교정 방법으로 부여하기 위해, 배추 내건성 조절과 밀접한 관련이 있는 *BrDST71*(*Brassica rapa* Drought Stress Tolerance 71)을 코딩하는 유전자를 교정하는 식물형질전환용 바이너리 벡터에 관한 것으로, 배추 내 *BrDST71* 유전자의 교정으로 발현을 억제하여 내건성을 증진시킬 수 있으며, 배추 속(Brassica) 작물은 건조 환경에 의한 피해에 민감하며, 이로 인한 생육장애로 수확량이 감소되어 농가와 소비자에게 막대한 피해를 줄 수 있기 때문에, 해당 형질전환체는 배추 육종 시 내건성 형질 도입을 위한 주요 교배 계통으로 활용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도10

(52) CPC특허분류
C12N 15/8205 (2013.01)
C12N 15/8273 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)

(72) 발명자
박지수
경기도 수원시 영통구 센트럴타운로 76, 6111동 2702호(이의동, e편한세상 광교)

최유리
경기도 수원시 영통구 덕영대로 1462-14, 114동 1503호(망포동, 힐스테이트 영통 아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ01365201
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농업생명공학연구단
연구사업명 차세대바이오그린21
연구과제명 미래 대비 농업 애로 사항 해결용 유용 생명공학 배추육종 소재 개발 및 분자생물학적 분석
기 여 율 1/1
주관기관 경희대학교(산학협력단)
연구기간 2018.02.01 ~ 2020.12.31
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 이루어진 염기서열에 상보적인 서열을 포함하는 배추 내 BrDST71(Brassica rapa Drought Stress Tolerance 71) 유전자를 교정하는 가이드 RNA.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 가이드 RNA 염기서열은 배추(*Brassica rapa*) 유래의 것인 배추 내 BrDST71 유전자를 교정하는 가이드 RNA.

청구항 3

서열번호 4로 이루어진 염기서열을 포함하는 배추 내 *BrDST71* 유전자를 교정하는 가이드 RNA 카세트.

청구항 4

서열번호 5로 이루어진 염기서열을 포함하는 배추 내 *BrDST71* 유전자를 교정하는 식물형질전환 벡터.

청구항 5

1) 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 가이드 RNA를 제작하는 단계;

2) 상기 단계 1)에서 제작한 가이드 RNA를 포함하는 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 가이드 RNA 카세트를 제작하는 단계;

3) 상기 단계 2)에서 제작한 가이드 RNA 카세트를 포함하는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 식물형질전환 벡터를 제작하는 단계; 및

4) 상기 단계 3)에서 제작한 식물형질전환 벡터를 아그로박테리움을 이용하여 배추에 형질전환시켜 *BrDST71* 유전자의 표적서열에 DNA 결실(deletion)을 유발하는 단계를 포함하는 내건성이 증진된 형질전환 배추를 제조하는 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

제 5항의 제조방법에 의해 제조된 내건성이 증진된 형질전환 배추.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 내건성을 조절하는 유전자를 교정하는 식물형질전환용 바이너리 벡터 및 이를 이용한 식물형질전환에서 목적 유전자 교정 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식물체의 생장은 건조 스트레스에 매우 큰 영향을 받는다. 그러므로 식물체들은 생존을 위해 건조 스트레스에 적응해야 한다. 건조 스트레스는 식물 잎의 세포 내 기공의 폐쇄에 관여하는 앱시스산 호르몬(abscisic acid, ABA)의 분비를 촉진하는데, 현재 ABA-responsive element binding protein 1(AREB1)/ABA-responsiveelement(ABRE)-binding factor 2(ABF2), dehydration-responsive element(DRE)-binding protein 2A(DREB2A), receptor-like kinase 1(RPK1), SNF1-relatedprotein kinase 2C(SRK2C), calcium-dependent

protein kinases(CDPKs) CPK3과CPK6 등이 중요한 시그널로 작용됨이 밝혀져 있다.

[0003] 건조 스트레스는 식물체 내에서 다양한 생화학적·생리적 반응을 유발한다.예를 들어, 건조 스트레스 발생 시 식물들은 제각각 당류(sucrose, trehalose,sorbitol 등), 당알콜(mannitol 등), 아미노산류(proline 등), 아민류(glycinebetaine, polyamine류 등)들을 축적하며, 이들 대사물질들은 식물체가 건조 스트레스에 내성을 지니는데 도움을 줄 수 있는 삼투질(osmolyte), 항산화물질(antioxidant), 스캐빈저(scavenger)로써 작용하는 것으로 밝혀져 있다.

[0004] 그러나 많은 식물은 건조 스트레스에 내성을 가질 수 있는 특수 대사물질들을 합성하는 능력이 부족하여 생장 및 생존의 위협을 받고 있다. 건조 스트레스관련 대사기작 내 물질들에 관계된 유전자들을 이용한 유전공학 연구는 건조 스트레스 저항성 형질전환 식물체들을 개발하는데 있어 매우 유용한 방법이며, 유전공학 기법으로 개발된 많은 형질전환 식물들이 건조 스트레스에 대한 내성이 증진되었다고 알려져 있다. 그리고 지금까지 다양한 작물에서 다양한 저항성 유전자들이 발견되고 있으며 그 발현 네트워크에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다.

[0005] 유전자 교정(gene editing)은 원하는 염기서열을 인식하여 절단하도록 만들어지는 인공제한효소로 동물 또는 식물 세포내에서 정확히 원하는 유전체 염기서열을 정확히 절단하여 기존의 기술들에 비해 높은 효율로 유전체 상의 유전정보를 교정하는 분자도구이다. 실제로 유전자 교정 방법은 2002년 초파리에서 유전자 knock-out을 위해 사용된 이래 기존의 기술로 정확한 유전자 녹아웃이 매우 비효율적이거나 불가능하였던 다양한 동물뿐만 아니라, 애기장대, 담배, 벼, 옥수수 등의 식물에서 매우 효율적인 유전정보 조작을 성공적으로 유도할 수 있음이 증명되었다.

[0006] 그러나 최근에는 이러한 유전자 교정이 성공적으로 이루어지기 위해서 목적 유전자를 특이적으로 목적하는 효율이 높으면서, 비특이적인 지역을 변화시키지 않는 벡터가 요구되고 있다.

[0007] 또한, 식물은 세포벽을 가지고 있어 동물 세포를 대상으로 한 유전자 교정 방법의 적용에 한계가 나타나고 있다. 특히 식물의 경우 세포배양이나 개체로의 유전자 전달이 동물보다 어려우며, 식물 세포벽을 제거한 원형질체를 이용한 방법도 충격 등의 안정성에 매우 취약하기 때문에 상대적으로 긴 시간 및 노력이 요구되고 있다. 이에 지난 수년간 유전자 교정을 활용해온 Dow Agrosciences와 최근 기술을 도입한 Syngenta와 같은 세계적 농생명과학 기업에 의해 주도되고 있다. 특히 유전자 교정을 이용하여 유전정보 편집된 식물은 기존의 유전자 변형 식물과의 차별성으로 인해 앞으로 유전자 교정의 활용을 통한 개량 식물/작물이 산업적으로 큰 가치를 보일 것으로 예상된다. 따라서 유전자 교정의 효율적인 식물적용을 위한 연구 시스템 구축이 시급하다.

[0008] 한편, 배추는 김치의 주재료로서 한국의 4대 채소 가운데 하나이며 배추 속(Brassica)에 포함되어 있다. 배추 속(Brassica)에는 유채, 겨자 등 산업적 경제성이 우수한 작물이 포함되어 있어 외국에서도 중요한 작물이다. 배추 속(Brassica) 작물은 건조 환경에 의한 피해에 민감하며, 이로 인한 생육장애로 수확량이 감소되어 농가와 소비자에게 막대한 피해를 줄 수 있으므로 배추의 내건성을 증진하는 유전자를 이용하여 형질전환 배추를 개발하는 연구가 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) (0001) 국내 등록 특허 KR10-1724933

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 배추의 내건성 관련 *BrDST71*(*Brassica rapa* Drought Stress Tolerance 71) 유전자를 교정하기 위해 특이적으로 인식하는 가이드 RNA(guide RNA, gRNA)의 염기서열을 제공하기 위한 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 작성된 특이적인 가이드 RNA가 도입되어 효과적으로 목적 유전자 교정을 유발하는 식물형질전환용 재조합 벡터를 제공하기 위한 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 벡터를 제조하는 단계, 상기 벡터를 아그로박테리움을 이용하여 식물체에 형질전환하는 단계, 및 상기 형질전환체를 선별하는 단계를 포함하는 형질전환 식물체 제조방법을 제공하는

데 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 서열번호 1의 배추의 내건성 관련 *BrDST71*(*Brassica rapa* Drought Stress Tolerance 71) 유전자를 교정하기 위해 특이적으로 인식하는 가이드 RNA(guide RNA, gRNA)의 상보적인 염기서열을 제공한다. 일반적으로, 가이드 RNA는 표적 서열과 혼성화하고, 표적 서열과 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하기에 충분한, 표적 폴리뉴클레오티드 서열과의 상보성을 갖는 임의의 폴리뉴클레오티드 서열이다.

[0014] 본 발명에서 용어 "배추의 내건성 관련 *BrDST71*(*Brassica rapa* Drought Stress Tolerance 71) 유전자를 교정하기 위해 특이적으로 인식하는 가이드 RNA"는, 목적하는 유전자 편집 재조합 벡터 내에 Cas9 단백질의 RGEN(RNA guided endonuclease) RNP(ribonucleoprotein) 복합체를 이용하여 목적 유전자의 특이적인 교정을 유발하는 염기서열 정보를 의미한다. 보다 상세하게, 상기 염기 서열은 배추(*Brassica rapa*)에서 유래되었고, 구체적으로는 내혼계 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)에서 유래되었다.

[0015] 본 발명의 일 실시 예에 따르면, 먼저 유전자 교정을 유기하기 위한 23 bp(20 bp + PAM) 길이를 가지면서 비특이적인 반응을 최소화시키는 가이드 RNA를 작성하기 위해서 배추의 내건성 관련 *BrDST71* 유전자(특허 등록 제 10-1724933호) 정보를 CRISPR direct(http://crispr.dbcls.jp/) 프로그램을 이용하여 검색하였다. 분석 결과 배추의 내건성 관련 *BrDST71* 유전자의 첫 번째 엑손(exon)에 특이적으로 인식하면서 비특이적 반응이 최소화하는 영역을 확인 후, 해당 지역의 염기서열을 검정하는 한 쌍의 프라이머를 제작하였다.

[0016] 또한, *BrDST71* 유전자와 유사한 유전자를 검정하기 위해 Brassica Database(http://brassicadb.org)를 이용하여 분석한 결과, 목적한 *BrDST71* 유전자(Br016127) 이외에 염기 서열이 유사한 유전자 Bra003918 정보를 획득 수 있었다. 그러나 본 발명에서 배추 형질전환에 사용한 내혼계 배추(*Brassica rapa*ssp. *pekinensis*inbred line "CT001")의 제놈 정보를 바탕으로 분석한 결과에서는 목적한 *BrDST71* 유전자는 단독으로 존재하는 것으로 확인되었다.

[0017] 이에 상기 목적 유전자만 특이적으로 인식하고 나머지 유전자는 인식하지 않도록 가이드 RNA 영역을 제한하여 분석 및 선발하였다. 이후, 내혼계 배추(*Brassica rapa*ssp. *pekinensis*inbred line "CT001")에서 DNA를 분리하였으며, 상기 확보된 DNA를 주형으로 실시예 1에서 얻은 프라이머를 이용하여 253 bp의 PCR 산물을 얻었으며, 이를 염기서열 분석용 벡터 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 재조합 벡터를 구축하였다. 이후, 삽입된 253 bp의 PCR 산물의 유전자 서열을 분석하기 위하여, 삽입된 자리에 근접한 T7 및 SP6 프라이머를 이용하여 염기서열을 조사하였으며, 염기서열 분석은 GenBank BLAST program(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)을 사용하여 분석하였다. 확인된 염기서열을 바탕으로 목적하는 가이드 RNA의 정확한 염기서열을 검정 후, *BrDST71*유전자를 교정하기 위해 특이적으로 인식하는 가이드 RNA로 확인하였으며, "gRNA-DT1"으로 명명하였다.

[0018] 상기 본 발명의 배추 내 *BrDST71* 유전자를 교정하기 위해 특이적으로 인식하는 가이드 RNA를 삽입할 수 있는 벡터로는 복합체를 형성할 엔도뉴클레아제의 종류 및/또는 그 유래 미생물에 따라서 적절히 선택될 수 있다. 예컨대, 상기 가이드 RNA는 CRISPR RNA(crRNA), trans-activating crRNA(tracrRNA), 및 단일 가닥 가이드 RNA(gRNA)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 엔도뉴클레오타이드 종류에 따라서, CRISPR RNA(crRNA) 및 trans-activating crRNA(tracrRNA)의 이중가닥 복합체, 또는단일 가닥 가이드 RNA(gRNA)일 수 있다. 상기 sgRNA는 crRNA 및 tracrRNA의 부분을 포함할 수 있다. 또한 상기 가이드 RNA는 대장균 유래 플라스미드(pBR322, pBR325, pUC118, pUC119, pET30a, pET30c 및 pGEX-GST), 바실러스 서브틸러스 유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5), 효모 유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50) 및 Ti 플라스미드 등을 사용할 수 있고, 레트로바이러스, 아데노바이러스 또는 백시니아바이러스와 같은 동물 바이러스, 배큘로바이러스와 같은 곤충 바이러스 및 식물 바이러스가 사용될 수 있으며, pPZP, pGA 및 pCAMBIA 계열과 같은 바이너리 벡터를 사용할 수 있다. 당업자라면 본 발명의 *BrDST71* 유전자를 교정하기 위해 특이적으로 인식하는 가이드 RNA을 도입시키는데 Cas9 단배질 종류 및/또는 적합한 벡터를 선택할 수 있으며, 본 발명에서는 상기 유전자를 숙주 세포내로 도입할 수 있는 벡터라면 어떠한 벡터라도 모두 사용할 수 있다.

[0019] 본 발명의 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 *BrDST71* 유전자를 교정하기 위해 특이적으로 인식하는 가이드 RNA 도입되어 목적 유전자의 발현을 억제시켜 배추의 내건성을 증진할 수 있는 서열번호 4의 식물형질전환용 재조합 벡터인 pDST71-Tra1을 제공한다.

[0020] 본 발명에서 용어 "유전자 교정 방법"은 가이드 RNA 및 Cas 단백질의 RGEN(RNA guided endonuclease)

RNP(ribonucleoprotein) 복합체를 식물형질전환용 바이너리 벡터에 도입하여, 식물 형질전환을 이용한 유전자 교정이 발생하는 것을 특징으로 한다.

[0021] 상기 RNA 가이드 엔도뉴클레아제(RGEN)는 단일가닥 RNA 또는 이중가닥 RNA와 복합체를 형성하며 RNA에 포함된 유전자 표적부위 타겟팅 서열을 절단하여 유전자 교정 작용을 하는 엔도뉴클레아제를 의미하는 것으로, 대표적으로 Cas9 단백질(CRISPR associated protein 9) 등과 같은 타입 Ⅱ의 CRISPR/Cas 시스템에 수반되는 엔도뉴클레아제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명에서 용어 "식물형질전환용 재조합 벡터 pDST71-Tra1"은 상기 배추 내 *BrDST71* 유전자를 교정하기 위해 특이적으로 인식하는 가이드 RNA가 도입된 식물형질전환용 바이너리 벡터를 의미한다. 더 자세하게는 목적 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 제작물로, 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함한 통상의 모든 벡터를 포함한다.

[0023] 상기 재조합 벡터는 목적하는 유전자의 발현 억제 또는 유전자의 발현이 증진될 수 있도록, 발현조절 서열과 기능적으로 연결될 수 있다. 예를 들어, 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 또한, 벡터는 선택성 마커를 포함할 수 있으며, 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다. 본 발명의 벡터는 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 실험예에 따르면, 상기 배추 내 *BrDST71* 유전자를 교정하기 위해 특이적으로 인식하는 가이드 RNA가 도입된 식물형질전환용 재조합 벡터인 pDST71-Tra1을 제작하였다. 구체적으로, 상기 목적 유전자를 억제시킬 수 있는 형질전환용 재조합 벡터는, 발명자들이 자체적으로 제작한 식물형질전환용 유전자 교정을 위한 재조합 바이너리 벡터에 상기 배추 내 *BrDST71* 유전자를 교정하기 위해 특이적으로 인식하는 가이드 RNA를 효과적으로 도입하기 위하여, 해당 가이드 RNA 및 애기장대(Arabidopsis) U6 프로모터(AtU6 promoter) 지역까지 염기서열을 인공적으로 합성 및 제한효소 사이트를 추가하여 총 363 bp의 단편을 도입으로 최종 제작하였다(실시예 2).

[0025] 또한, 본 발명의 일 실험예에 따르면, 상기 배추 내 *BrDST71* 유전자를 교정하기 위해 특이적으로 인식하는 가이드 RNA가 도입되어 배추 내건성을 증진할 수 있는 식물형질전환용 재조합 벡터인 pDST71-Tra1이 배추 내에서 목적 유전자를 효과적으로 교정할 수 있는지 확인하기 위하여, 배추 형질전환을 실시하였다. 아울러, 이를 대상으로 배추에 형질전환 후 이를 통해 확보한 캘러스를 선별하는 단계를 거친 후, 이를 이용하여 상기 서열번호 2 및 3을 이용한 DNA 증폭 및 고해상도 해리 곡선 분석(high resolution melting analysis, HRM) 방법으로 비형질전환체와의 차이를 분석한 결과, 형질전환 된 배추 모두 목적한 *BrDST71* 유전자의 교정이 효과적으로 발생했음을 검정할 수 있었다(실시예 3).

[0026] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 단계에서 전술한 프라이머 서열을 이용한 DNA 증폭은 당 업계에서 공지된 임의의 방법을 사용할 수 있으나, 정확한 HRM 분석을 위해서는 DNA 이중나선구조 사이에 무작위적으로 삽입되는 'SYBR green' 대신, 'LCGreen' 또는 'EvaGreen' 등과 같이 일정하게 삽입되는 형광염색 물질을 연쇄중합반응에 이용하는 것이 바람직하다. 통상은 생명공학 회사에서 제작 및 판매하는 일반적인 PCR 또는 응용된 PCR 키트를 이용할 수 있다. 그러한 HRM 분석용 키트로는 아래의 실시예에 사용된 Qiagne 사, 또는 Applied Biosystems사, Bioline 사가 판매하는 키트 등을 들 수 있다.

[0027] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 단계에서 전술한 DNA 증폭 산물의 분석은 HRM 분석 방법을 이용한 증폭된 산물의 해리 곡선 모양(melting graph) 분석은 3반복 이상의 반복 실험 결과를 수집하여 통계처리하는 것이 바람직하다. 계통 분석 데이터 선발하는 단계에서 해리 곡선 모양 분석은 온도 증가에 따른 형광값의 변화를 수집하여, 아래의 실시예에서 사용된 중위수검증법(Mood's Median Test)을 10,000번의 마르코프 연쇄 몬테카를로 방법(Monte Carlo simulations)으로 정확도를 확보하여 각 비형질전환체 및 형질전환된 식물 세포 간의 유전자 교정 여부를 분석할 수 있으나, 해당 방법으로 제한되지 않는다.

[0028] 상기의 결과를 통해, pDST71-Tra1 벡터는 배추 형질전환 시에 배추의 *BrDST71* 유전자의 교정이 효과적으로 발생하여 내건성을 증진시킬 수 있음을 확인 할 수 있었다.

[0029] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체를 제공한다.

[0030] 본 발명에서 용어 "재조합 벡터" 및 "식물체"는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0031] 본 발명에서 용어 "형질전환"은, 유전물질인 DNA를 다른 계통의 살아 있는 세포에 주입했을 때, DNA가 그 세포에 들어가 유전형질(遺傳形質)을 변화시키는 현상으로, 형질변환, 형전환, 또는 형변환 이라고도 한다.

[0032] 본 발명에서 상기 벡터로 식물체를 "형질전환"하는 것은 당업자에게 공지된 형질전환기술에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로는, 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), 및 아그로박테리아 분사법(Agrobacteria spraying method)을 이용할 수 있으며, 더 구체적으로는 아그로박테리움을 이용한 형질전환방법을 이용할 수 있다.

[0033] 본 발명에서 용어 "식물체"는, 성숙한 식물체 뿐만 아니라 성숙한 식물로 발육할 있는 식물 세포, 식물 조직 및 식물의 종자 등을 모두 포함하는 의미로서 이해된다.

[0034] 본 발명에서 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 또는 수수를 포함하는 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 또는 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩 또는 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 또는 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 또는 튤립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 또는 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나이며, 구체적으로는 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩 또는 유채를 포함하는 특용작물류이며, 더욱 구체적으로는 담배 또는 배추이나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 재조합 벡터를 제조하는 단계, 상기 벡터를 아그로박테리움을 이용하여 식물체에 형질전환하는 단계, 및 상기 형질전환 켈러스를 선별하는 단계를 포함하는 형질전환 식물체 제조방법을 제공한다.

[0036] 상기 용어 "재조합 벡터", 및 "식물체", 및 "형질전환"은 상기에서 설명한 바와 같다.

[0037] 본 발명에서 용어 "켈러스를 선별하는 단계"는, 상기 재조합 벡터를 이용하여 생산된 배추 형질전환 켈러스들을 대상으로 형질전환 유무를 확인하여 형질전환이 이뤄진 형질전환 켈러스를 분리하는 단계로, 구체적으로는 프라이머 쌍을 이용하여 PCR 검정을 통해 선별 후 고해상도 해리 곡선 분석(high resolution melting analysis, HRM) 방법으로 목적한 *BrDST71* 유전자의 교정이 효과적으로 발생했음을 검정하는 것을 의미한다.

발명의 효과

[0038] 본 발명은 배추 내건성 조절과 밀접한 관련이 있는 *BrDST71*(*Brassica rapa* Drought Stress Tolerance 71)을 코딩하는 유전자를 교정하는 식물형질전환용 바이너리 벡터에 관한 것으로, 배추 내 *BrDST71* 유전자의 교정으로 발현을 억제하여 내건성을 증진시키는 것을 확인하였으므로 건조환경에서 배추 속 작물의 피해를 막을 수 있으며, 배추 육종 시 내건성 형질 도입을 위한 주요 교배 계통으로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 배추 DST71 유전자와 유사한 유전자를 검정하기 위해 공개된 데이터베이스를 이용하여 분석한 결과이다.

1A는 Brassica Database(http://brassicadb.org)를 이용하여 지부 배추의 표준 유전체 유전자 목록과 Blast 분석한 결과이다. Bra016127은 목적하는 배추 DST71유전자를 나타내고, Bra003918은 배추 DSR71 유전자와 유사성이 높은 유전자로 분석된 것을 나타낸다.

1B는 본 발명에 사용된 내혼계 배추 "CT001"의 pseudo genome을 이용하여 NCBI BlastN 프로그램으로 분석된 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 *BrDST71* 유전자의 엑손(exon) 구조 및 목적하는 가이드 RNA(gRNA) 위치, 검정 프라이머 위치를 나타낸 모식도이다.

도 3은 각 DST71-s-F와 DST71-s-R 프라이머 쌍을 사용한 PCR에 의해 배추 DST71 유전자로부터 증폭된 가이드 RNA를 포함하는 영역을 전기영동 한 사진이다. M은 100 bp size 마커를 의미하며, Target은 목적한 가이드 RNA를 포함하는 영역을 나타낸다.

도 4는 각 DST71-s-F와 DST71-s-R 프라이머 쌍을 사용한 PCR에 의해 배추 DST71 유전자로부터 증폭된 가이드 RNA를 포함하는 영역을 시퀀싱(sequencing) 방법으로 염기서열을 확인한 결과이다. 상기 도에서 밑줄은 프라이어의 위치를 나타내고, 적색 상자는 목적한 가이드 RNA를 나타낸다. Query는 PCR로 증폭된 염기서열 분석 결과이며, Sbjct는 예측되는 *BrDST71* 유전자 증폭 산물의 염기서열이다.

도 5는 양끝에 *Sac*Ⅰ 자리를 가지도록 합성된 *BrDST71* 가이드 RNA 및 AtU6 프로모터 영역을 식물형질전환용 바이너리 벡터에 도입하는 전략을 나타낸 모식도이다.

도 6은 양끝에 *Sac*Ⅰ 자리를 가지도록 합성된 *BrDST71* 가이드 RNA 및 AtU6 프로모터 영역을 식물형질전환용 바이너리 벡터에 도입하기 위해 *Sac*Ⅰ 처리 후 전기영동 한 사진이다. M은 100 bp size 마커를 의미하며, Backbone은 목적한 가이드 RNA및 AtU6 프로모터가 도입되는 식물 형질전환용 바이너리 벡터를 나타내며, Target은 목적한 가이드 RNA및 AtU6 프로모터가 합성된 클로닝 벡터를 나타낸다.

도 7은 최종 완성된 pDST71-Tra1 벡터에 목적한 가이드 RNA가 정확하게 존재하는지 검정하기 위해, 염기서열 분석 후 비교 검정한 결과이다. Query는 염기서열 분석 결과이며, Sbjct는 예측되는 pDST71-Tra1 벡터 염기서열이다. 적색 상자는 목적한 가이드 RNA를 나타낸다.

도 8은 최종 완성된 배추 내 *BrDST71* 유전자를 교정하는 식물형질전환용 바이너리 벡터 pDST71-Tra1의 모식도 및 제한 효소 위치를 나타낸 그림이다.

도 9는 최종 완성된 pDST71-Tra1 벡터를 아그로박테리움에 형질전환 후 검정을 위해, 각 플라스미드를 분리 후 벡터 내부에 존재하는 *Eco*RⅠ 및 *Hin*dⅢ를 동시에 처리하여 전기영동으로 분석한 결과이다. M은 1 kb size 마커를 의미하며, *E.coli*는 *Escherichia coli* plasmid DNA를 제한효소 처리한 결과를 나타내고, Agro는 형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens* plasmid DNA를 제한효소 처리한 결과를 나타낸다.

도 10은 배추 내 *BrDST71* 유전자를 교정하는 식물형질전환용 바이너리 벡터 pDST71-Tra1를 배추에 형질전환하는 과정을 나타내는 사진이다.

도 11은 식물형질전환용 바이너리 벡터 pDST71-Tra1의 배추 내 *BrDST71* 유전자를 교정 여부를 검정하기 위해, DST71-s-F와 DST71-s-R 프라이머 쌍을 사용한 PCR 후 전기영동 한 결과이다. N은 비형질전환 배추를 나타내고, M은 100 bp size 마커를 의미하며, 1~4는 형질전환 된 배추 캘러스 DNA를 나타낸다.

도 12는 식물형질전환용 바이너리 벡터 pDST71-Tra1의 배추 내부에 제대로 삽입되었는지 확인하기 위해, 벡터 내부의 하이그로마이신(Hygromycin) 부분을 타겟팅하는 HPT 709-F, HPT 709-R 프라이머 쌍과 Cas9 단백질 부분을 타겟팅하는 Cas-F, Cas-R 프라이머 쌍을 사용한 PCR 후 전기영동 한 결과이다. N은 비형질전환 배추를 나타내며, M은 1Kb size 마커를 의미하며, 1은 형질전환 된 배추 캘러스 DNA를 나타내며, 2~3은 형질전환 된 배추 식물체 DNA를 나타낸다.

도 13은 식물형질전환용 바이너리 벡터 pDST71-Tra1의 배추 내 *BrDST71* 유전자를 교정 여부를 검정하기 위해, 각 DST71-s-F와 DST71-s-R 프라이머 쌍을 사용한 PCR 증폭 산물을 HRM을 이용한 해리 곡선 모양 분석을 나타낸 것이다. IB는 비형질전환체를 나타내며, 1~5는 형질전환이 된 것으로 선발된 캘러스 DNA 번호를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 배추과 및 배추의 내건성 관련 *BrDST71*(*Brassica rapa* Drought Stress Tolerance 71) 유전자는 국내 특허 등록이 되었으며(제10-1724933호,), 해당 유전자의 발현이 억제되었을 시에 식물체의 내건성이 증진되었다는 연구결과가 보고되었다(Park et al., 2018, Drought tolerance induction in transgenic tobacco through RNA interference of BrDST71, a droughtresponsive gene from Chinese cabbage. Hort. Environ. Biotechnol.59:749-757). 그러나 해당 유전자를 교정하는 식물형질전환용 바이너리 벡터 및 이를 이용한 유전자 교정 방법에 관해서는 보고된 바 없다.

[0041] 이에, 본 발명자들 서열번호 1로 이루어진 염기서열에 상보적인 서열을 포함하는 배추의 내건성 관련 *BrDST71*(*Brassica rapa* Drought Stress Tolerance 71) 유전자를 교정하기 위해 특이적으로 인식하는 가이드 RNA(guide RNA, gRNA)를 선발하였으며, 이를 이용하여 서열번호 5와 같이 작성된 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens*)을 이용하는 식물형질전환용 재조합 바이너리 벡터를 pDST71-Tra1 벡터로 명명하였다. 본 재조합 벡터를 이용한 배추 형질전환으로 목적 유전자의 유전자 교정이 효과적으로 일어나는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0043] 이하 본 발명을 하기 예에 의해 상세히 설명한다. 다만, 하기 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 하기 예에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0045] **실시예 1. 배추 내 *BrDST71* 유전자를 교정하는 가이드 RNA(gRNA) 선정**

[0046] **1-1. 배추 내 *BrDST71* 유전자를 교정하는 유효 가이드 RNA 영역 분석**

[0047] 본 실시예에서 유전자 교정을 유기하기 위한 23 bp(20 bp + PAM(AGG, 3bp)) 길이를 가지면서 비특이적인 반응을 최소화시키는 가이드 RNA를 작성하기 위해서, 배추의 내건성 관련 *BrDST71* 유전자 정보를 CRISPR direct(http://crispr.dbcls.jp/) 프로그램을 이용하여 검색하였다. 해당 결과에서 효과적인 가이드 RNA를 선정하기 위해, 본 발명자들은 GC 비율이 40~60% 사이이며, poly-T가 없고, 가이드 RNA의 서열의 특이성을 총 길이에서 12 mer까지 줄여도 비특이적인 반응이 일어나지 않는 영역을 선발하였다.

[0048] 그 결과, 서열번호 1의 가이드 RNA 염기서열을 선발 후 "gRNA-DT1"으로 명명하였다. 해당 선발된 가이드 RNA는 *BrDST71* 유전자의 첫 번째 엑손(exon)을 특이적으로 인식하도록 디자인하였다.

[0049] 상기 *BrDST71* 유전자와 유사한 유전자가 존재할 경우 비특이적인 반응이 발생할 수 있기 때문에, Brassica Database(http://brassicadb.org)의 Blast 프로그램을 이용하여 조사하였다(도 1A). 본 발명자들은 비특이적인 반응을 최소화하기 위하여 e-value가 e-40 이하로 나타나는 배추 유전자를 선정하였으며, 그 결과 목적하는 *BrDST71* 유전자인 Bra016127과 유사한 유전자로 Bra003918이 확인되었다. 그러나 본 실시예에서 사용되는 내혼계 배추 "CT001"의 pseudo genome을 이용하여 NCBI BlastN 프로그램으로 분석된 결과에서는 크로모좀 7번(A07)에서만 *BrDST71* 염기서열이 검색되었으며, 다른 부분에서는 유사한 유전자를 검색할 수 없었다. 이에 목적한 가이드 RNA의 정확한 염기서열을 확인하기 위한 한 쌍의 프라이머를 제작하였고, 그 서열을 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0051]

프라이머	염기서열
DST71-s-F (서열번호 2)	5'-TATCCAGACGTGTCCTCACTT-3'
DST71-s-R (서열번호 3)	5'-CAGTCATGGAAATGTATGCG -3'

[0053] **1-2. 배추유전체 DNA 분리**

[0054] 본 발명에 사용된 내혼계 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis* inbred line "CT001")는 기내의 무균상태에서 키운 것에서 샘플을 채취하여 gDNA 분리에 사용하였다. 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 잎을 액체 질소를 이용하여 파쇄하고, 800 ㎕ 2× CTAB buffer(0.1M Tris-HCl, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, 1% 2-ME, 2% PVP, 1% Sodium bisulfite) 용액을 첨가하여 잘 섞어준 후, 30분 동안 65℃에서 반응하였다. 800㎕의 PCI 용액을 넣고 섞어준 다음, 4℃에서 13,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하고, 그 상등액을 새 튜브로 옮겼다. 획득한 상등액의 1/10 양의 NaOAc와 2.5배의 100% 에탄올을 첨가하여 -20℃에서 2시간 동안 재조합 DNA를 침전시킨 후, 원심분리하여 침전물을 얻었다. 70% 에탄올로 침전물을 세척한 다음, 에탄올이 없도록 잘 건조시키고, TE 버퍼(10 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA)에 녹여 사용하였다.

[0056] **1-3. 목적 가이드 RNA 염기 서열 검정**

[0057] 목적하는 *BrDST71* 유전자의 가이드 RNA의 정확한 염기서열을 검증하기 위해, 상기 확보된 배추 gDNA를 이용하여 상기 DST71-s-F와 DST71-s-R 프라이머 쌍으로 PCR을 수행하여 분리하였다.

[0058] 구체적으로, 분리된 gDNA 1㎍을 사용하여 상기 DST71-s-F와 DST71-s-R 프라이머 쌍과 태그 중합효소(*Taq* polymerase)로 PCR 하였다. PCR 프로그램은 95℃에서 5분간 초기 변성 시간을 둔 뒤 95℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 1분으로 40회 반복(cycle) 실행하고 마지막으로 72℃에서 10분간 최종 연장시킨 후, 16℃를 유지하여 전체 반응을 종료하였다.

[0059] 그 결과, DST71-s-F와 DST71-s-R 프라이머 쌍을 사용한 PCR에 의해 배추 *BrDST71* 유전자로부터 증폭된 가이드 RNA를 포함하는 영역을 전기영동한 사진에서 목적한 253bp에 해당하는 PCR 산물을 확인하였다(도 3).

[0060] 이후, DST71-s-F와 DST71-s-R 프라이머 쌍으로 증폭된 단편의 염기서열을 분석하기 위해 염기서열 분석용 벡터 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 재조합 벡터를 구축하였다.

[0062] **1-4. 재조합 벡터를 이용한 *E. coli* DH10β의 형질전환**

[0063] 대장균 DH10β를 LB 50㎖에 접종시켜 37℃에서 OD570 = 0.375 ~ 0.400이 되도록 배양한 후, 균주배양액을 3,000rpm에서 10분간 원심분리 하였고, 얻어진 침전물을 0.1M $CaCl_2$ 용액으로 풀어준 뒤 30분간 얼음에 보관하였다. 그 후, 3,000rpm에서 7분간 원심분리한 뒤 0.1M $CaCl_2$에 침전물을 녹이고, 상기 실시예 1-3의 재조합 벡터를 함께 섞어 얼음에 30분간 두었다가 42℃에서 90초간 열 충격을 주었다. 이 후, 10분간 얼음에 방치한 후, LB 배지 700㎕를 첨가하여 37℃에서 1시간 진탕배양 하였다. 배양액을 12,000rpm으로 수 초간 원심분리한 후, 100㎕만 남기고, 상등액을 제거하였으며, 남은 상등액으로 침전물을 녹였다. 이후 앰피실린(ampicillin, 50 mg/ℓ), X-gal(200 mg/ℓ in N-N dimethylformamide) 및 IPTG (200 mg/ℓ)가 첨가된 고체 LB 배지에 녹인 침전물을 전개하고, 37℃에서 12시간 배양한 후 고체 배지에서 저항성을 보이며 흰색의 콜로니를 형성하는 형질전환 콜로니를 선발하였다.

[0065] **1-5. 재조합 DNA 분리 및 유전자 삽입 여부 조사**

[0066] 항생제가 첨가된 LB 배지 3㎖에 상기 선발한 형질전환 콜로니를 접종한 후 37℃에서 12시간 배양하고, 배양액을 4℃에서 12,000rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 침전된 균 덩어리에 Solution Ⅰ(200㎕/㎖)을 첨가하여 보텍스(vortex)를 수초 간 수행하여 충분히 풀어준 후, Solution Ⅱ(200㎕/㎖)를 첨가하여 조심스럽게 섞어주어 세포막이 완전히 깨어지도록 실온에서 5분간 방치하였다. 이후 Solution Ⅲ(200 ㎕/㎖)를 첨가하여 잘 섞어주고, 얼음에서 10분간 방치한 뒤, 12,000rpm으로 4℃에서 10분간 원심분리 하여 상등액을 획득하였다. 획득한 상등액의 1/10 양의 NaOAc와 2.5배의 100% 에탄올을 첨가하여 -20℃에서 2시간 동안 재조합 DNA를 침전시킨 후, 원심분리하여 침전물을 얻었다. 70% 에탄올로 침전물을 세척한 다음 멸균 증류수에 녹여 사용하였다.

[0067] 목적하는 배추 내 *BrDST71* 유전자의 가이드 RNA의 정확한 염기서열을 검증하기 위해 상기 분리한 재조합 DNA의 염기서열을 ㈜마크로젠에 의뢰하여 시퀀싱(sequencing)으로 분석하고, 예측한 *BrDST71* 유전자와 NCBI의 Blast 프로그램으로 비교 분석하였다.

[0068] 그 결과, 목적한 서열번호 1의 염기서열을 확인하였다(도 4).

[0070] **실시예 2. 선발된 배추 내 *BrDST71* 유전자를 교정하는 가이드 RNA(gRNA)가 도입된 식물형질전환용 바이너리 벡터 제작**

[0071] **2-1. 목적 가이드 RNA 카세트(cassette) 구축**

[0072] 선발된 목적 가이드 RNA를 식물형질전환용 바이너리 벡터에 도입하기 위하여 제한효소 인식 서열을 추가한 가이드 RNA 카세트를 구축하였다. 추가한 제한효소 인식 서열은 *Sac*Ⅰ으로 최종 벡터의 기존 애기장대 U6 프로모터 앞 뒤로 1개의 자리를 가지고 있어 용이하게 도입할 수 있다. 정확한 가이드 RNA를 도입하기 위해 ㈜마크로젠에 의뢰하여, 단편의 양끝에 *Sac*Ⅰ인식 서열을 가지고 있으며, 동시에 목적한 가이드 RNA 및 애기장대 U6 프로모터의 염기서열을 가진 DNA 단편을 합성하여 최종 바이너리 벡터에 도입하였다(서열번호 4). 제한 효소 *Sac*Ⅰ인식 서열을 가지면서 목적한 가이드 RNA 및 애기장대 U6 프로모터의 염기서열을 가진 합성된 DNA 단편을 최종 식물형질전환용 바이너리 벡터에 도입하는 전략을 나타낸다(도 5).

[0074] **2-2. 식물 형질전환용 배추 내 *BrDST71* 유전자 교정 바이너리 벡터 pDST71-Tra1 제작**

[0075] 상기 확보된 제한 효소 *Sac*Ⅰ인식 서열을 가지면서 목적한 가이드 RNA 및 애기장대 U6 프로모터의 염기서열을 가진 합성된 DNA 단편을 최종 식물형질전환용 바이너리 벡터에 도입하기 위해 각각의 플라스미드를 상기 실시예 1-5의 방법으로 분리 후 제한효소 처리하여, 최종 벡터에 도입하였다(도 6). 이후 정확한 재조합 벡터가 합성되었는지를 검정하기 위해 시퀀싱(sequencing)으로 염기서열 분석 후 NCBI Blast 프로그램(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)으로 비교 검정 하였다.

[0076] 그 결과, 목적한 가이드 RNA가 정확하게 도입되었음을 확인하였다(도 7).

[0077] 또한, 최종 완성된 배추 내 *BrDST71* 유전자를 교정하는 식물형질전환용 바이너리 벡터 pDST71-Tra1의 모식도 및 제한 효소 위치를 나타낸 그림이며, 서열번호 5는 최종 완성된 pDST71-Tra1의 전체 염기 서열을 GenBank 형식으로 나타내었다(도 8).

[0079] **실시예 3. 식물 형질전환용 *BrDST71* 유전자 교정 바이너리 벡터 pDST71-Tra1를 이용한 형질전환 배추의 제작 및 확인**

[0080] **3-1. 형질전환 배추의 제작**

[0081] 상기 작성된 식물형질전환용 바이너리 벡터 pDST71-Tra1의 배추 내 *BrDST71* 유전자 교정 효율을 분석하기 위해 "아그로박테리움에 의한 효율적인 배추의 형질전환방법(특허 등록 제0523758호, 2005.10.31.)"을 이용하여 형질전환 배추를 제작하였다.

[0082] 구체적으로, 배추에 접종하는 형질전환 매개체로는 식물형질전환용 벡터 pDST71-Tra1을 함유하고 있는 아그로박테리움 투마파시엔(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404/pDST71-Tra1를 사용하였다. 정확한 벡터의 도입을 검증하기 위해 완성된 pDST71-Tra1 벡터를 Agrobacterium에 형질전환 후 검정을 위해, 각 플라스미드를 분리 후 벡터 내부에 존재하는 *Eco*R Ⅰ 및 *Hin*dⅢ를 동시에 처리하여 전기영동으로 분석하였다.

[0083] 그 결과, 완성된 pPR55-Tra1 벡터에 도입된 가이드 RNA 카세트에 존재하는 *Eco*R Ⅰ 인식 서열로 8,880 bp, 3,099 bp, 2,461 bp로 각각 검증되어, 정확한 벡터가 아그로박테리움에 형질전환 되었음을 확인하였다(도 9).

[0084] 또한, 상기 배추형질전환 방법에 의해 캘러스, 신초, 뿌리가 유기 및 순화된 형질전환 배추를 확인하였다(도 10).

[0086] **3-2. 배추 내pDST71-Tra1 벡터삽입 유무 분석을 위한PCR 검정**

[0087] 형질전환된 배추의 비형질전환체 대비 형질전환의 유무 검정을 위하여 형질전환된 식물체의 T-DNA 지역을 PCR 증폭 검정하였다.위해, 상기 확보된 형질전환배추 gDNA를 이용하여 상기 HPT 709-F, HPT 709-R (서열번호 4 및 서열번호 5), 와 Cas-F, Cas-R (서열번호 6 및 서열번호 7) 프라이머 쌍으로 PCR을 수행하여 분리하였다.

[0088] 구체적으로, 분리된 gDNA 1㎍을 사용하여 상기 HPT 709-F, HPT 709-R, 와 Cas-F, Cas-R 프라이머 쌍과 태그 중합효소(Taq polymerase)로 PCR 하였다. PCR 프로그램은 95℃에서5분간 초기 변성 시간을 둔 뒤 95℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 1분으로40회 반복(cycle) 실행하고 마지막으로 72℃에서 10분간 최종 연장시킨 후, 16℃를 유지하여 전체 반응을 종료하였다.

[0089] 그 결과, HPT 709-F, HPT 709-R, 와 Cas-F, Cas-R 프라이머 쌍을 사용한 PCR에 의해 식물형질전환용 바이너리 벡터 pDST71-Tra1 유전자로부터 증폭된 영역을 전기영동한 사진에서 목적한 709bp, 460bp 에 해당하는 PCR 산물을 확인하였다(도 12).

[0092] **3-3. 배추 내 *BrDST71* 유전자 교정 효율 분석을 위한 HRM 실시**

[0093] 상기 완성된 pDST71-Tra1 벡터의 배추 내 *BrDST71* 유전자 교정 효율을 분석하기 위해, 형질전환 되어 하이그로마이신(hygromycin) 저항성을 가진 배추 캘러스를 상기 실시예 1-2 및 1-3의 방법으로 DNA를 분리 후 PCR 검정하였다.

[0094] DST71-s-F와 DST71-s-R 프라이머 쌍을 사용한 PCR 후 전기영동 한 결과로, 형질전환된 캘러스에서 목적한 *BrDST71* 유전자 지역을 증폭한 결과이다(도 11).

[0095] 이후 명확한 분석을 위해 분리된 각각의 배추 형질전환체 캘러스 DNA를 이용하여 HRM 분석을 실시했다. HRM 분석은 RotorGene 6000(Corbett Life Science, Cambridge, UK)을 사용하여 수행했다. HRM 증폭은 'EvaGreen' 형광물질이 포함된 Type-it HRM kit(Qiagen)를 사용하여, 상기 실시예 1-1에서 선발된 DST71-s-F와 DST71-s-R 프라이머 쌍 0.75uM, 분리된 양파 유전체 DNA 10 ng에 Type-it HRM 혼합액을 1×로 섞어 총 10 ul의 반응액으로 각 계통간 3 반복 이상 분석을 실시했다. HRM 증폭 프로그램은 과정은 RotorGene 6000을 이용하여 95℃에서 5분간 초기 변성 시간을 둔 뒤 95℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 1분으로 40회 반복(cycle) 실행하고 마지막으로 95℃에서 30초간 변성 시간을 제공한 후, 65℃에서 95℃까지 0.1℃씩 올리면서 각 온도에서 2초간 유지하는 동안 형광을 측정하여 해리 곡선을 그렸고, RotorGene 자체 분석 프로그램을 사용하여 해리 곡선 모양 비교 분석 및 해리 온도를 분석하였다. 유사성 분석은 온도 증가에 따른 형광값의 변화를 수집하여, 중위수검증법(Mood's Median Test)을 10,000번의 마르코프 연쇄 몬테카를로 방법(Monte Carlo simulations)으로 정확도를 확보하여 비교 분석하였다.

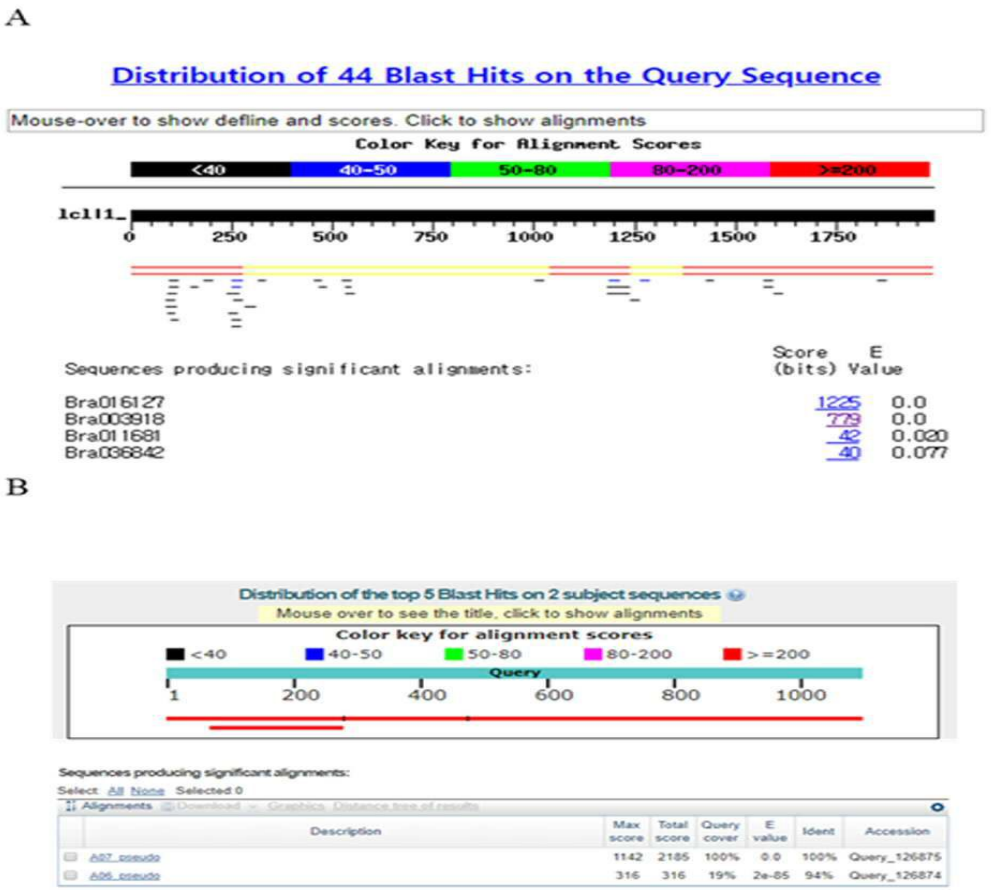
[0096] 그 결과, 비형질전환체 대비 형질전환된 캘러스 DNA는 동등성이 모두 0%로 비형질전환체 대비 매우 큰 차이를 나타내었다(도 13).

[0097] 이는 개발된 pDST71-Tra1벡터에 의해 목적한 배추 내 *BrDST71* 유전자가 교정되어 염기서열의 결실(deletion)이 발생해 해리 온도의 큰 차이를 유발한 것으로 판단된다. 이에 따라 개발된 pDST71-Tra1 벡터에 의해 목적한 배

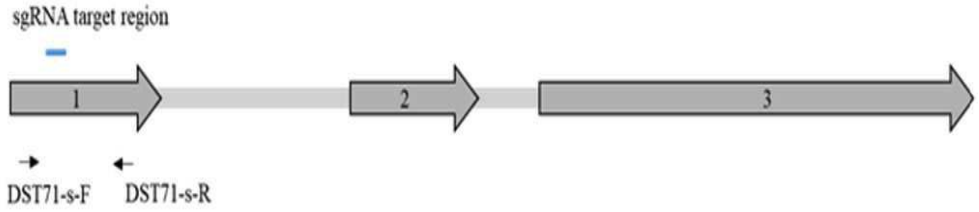
추 내건성 조절 관련 *BrDST71* 유전자 교정이 매우 효과적으로 확인되었다.

도면

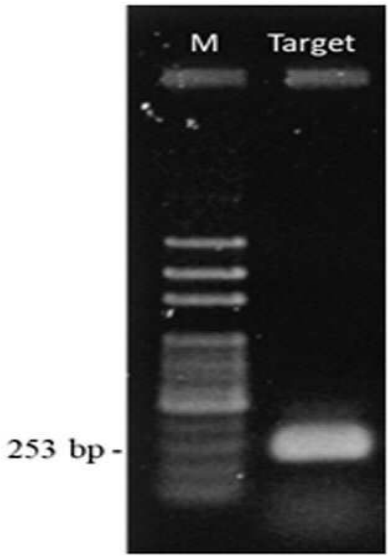
도면1



도면2



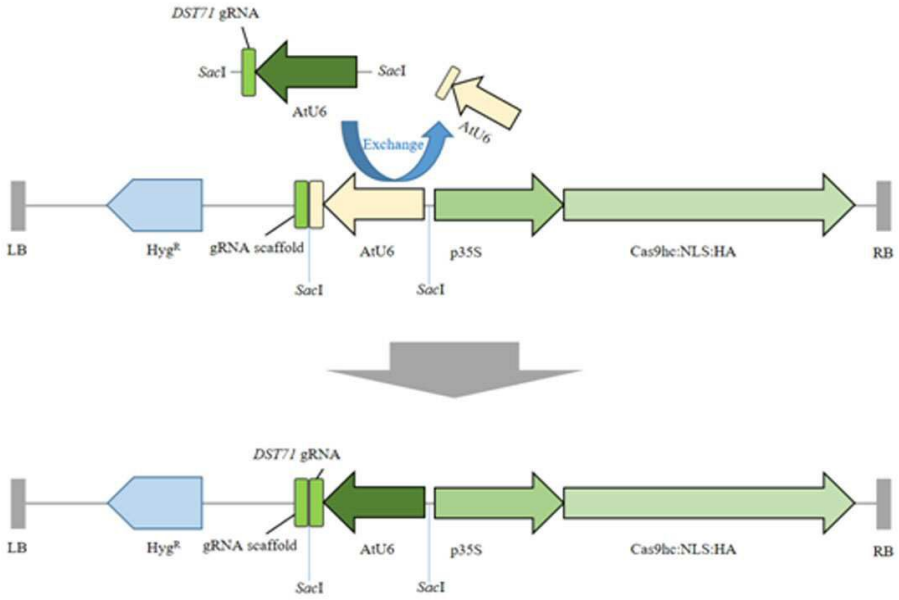
도면3



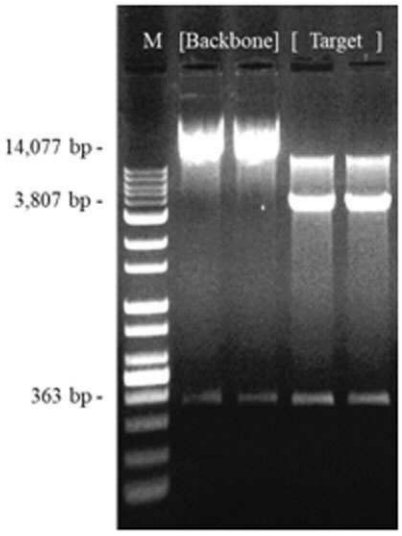
도면4

```
Score          Expect        Identities          Gaps          Strand
457 bits(506)  1e-133        253/253(100%)       0/253(0%)     Plus/Plus

Query  1    TATCCAGACGTGTCCTCACTTTTCTGATATTGATCTCGTTACTGGCGGTGGCAATGAACC  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    TATCCAGACGTGTCCTCACTTTTCTGATATTGATCTCGTTACTGGCGGTGGCAATGAACC  60

Query  61   TTCTGTCCACGGTAGAGGCACAGAACAAGAAGAAGCCGAGGAGAGATGTTCCTCTAGTGA  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61   TTCTGTCCACGGTAGAGGCACAGAACAAGAAGAAGCCGAGGAGAGATGTTCCTCTAGTGA  120

Query  121  AAGGTCTCTCATGGAGCTTTTACCAGAAAGCATGTCCAAAAGTGGAAAGCATCATCAGGA  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121  AAGGTCTCTCATGGAGCTTTTACCAGAAAGCATGTCCAAAAGTGGAAAGCATCATCAGGA  180

Query  181  AAGAGCTCAAGAAAGTCTTCAAGAGAGACATTGGTTTAGCCGCAGCCATCCTTCGCATAC  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181  AAGAGCTCAAGAAAGTCTTCAAGAGAGACATTGGTTTAGCCGCAGCCATCCTTCGCATAC  240

Query  241  ATTTCCATGACTG  253
            |||||||||||||
Sbjct  241  ATTTCCATGACTG  253
```

도면5


DST71 gRNA
SacI
SacI
AtU6
Exchange
AtU6
LB
Hyg^R
gRNA scaffold
AtU6
p35S
Cas9hc:NLS:HA
RB
SacI
SacI
DST71 gRNA
LB
Hyg^R
gRNA scaffold
AtU6
p35S
Cas9hc:NLS:HA
RB
SacI
SacI

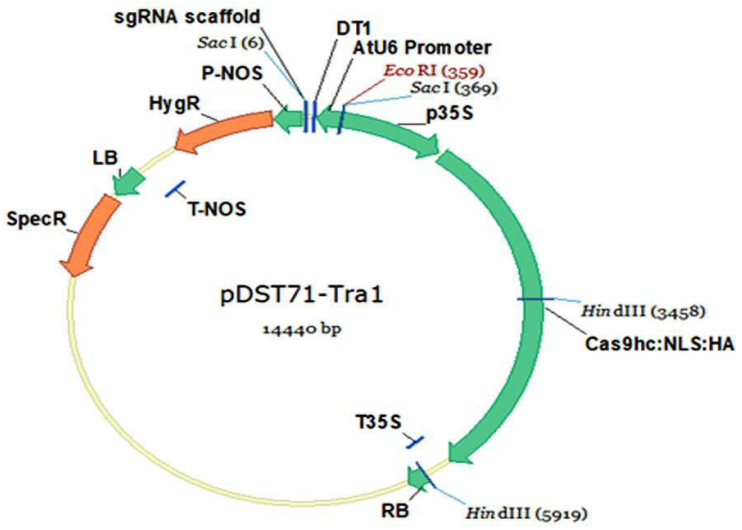
도면6


M
[Backbone]
[Target]
14,077 bp
3,807 bp
363 bp

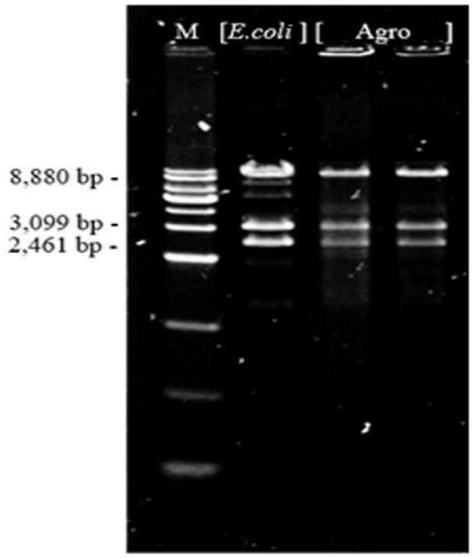
도면7

```
Score            Expect   Identities      Gaps            Strand
1310 bits(709)   0.0      748/766(98%)    5/766(0%)       Plus/Plus

Query  405  GAGCTCAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTAT  464
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    GAGCTCAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTAT  60

Query  465  TTCAACTTGCTATGCTGTTTCCAGCATAGCTCTGAAACCTAGTGAAAGGTCTCTCATGCA  524
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61   TTCAACTTGCTATGCTGTTTCCAGCATAGCTCTGAAACCTAGTGAAAGGTCTCTCATGCA  120

Query  525  ATCACTACTTCGACTCTAGCTGTATATAAACTCAGCTTCGTTTTCTTATCTAAGCGATGT  584
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121  ATCACTACTTCGACTCTAGCTGTATATAAACTCAGCTTCGTTTTCTTATCTAAGCGATGT  180

Query  585  GGGACTTTTGAAGATTGTTTTCAACTTAAATGGGCCTATATAAGAAATACTATTGTTCTT  644
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181  GGGACTTTTGAAGATTGTTTTCAACTTAAATGGGCCTATATAAGAAATACTATTGTTCTT  240

Query  645  TCCCATATAAATGGGCCTGCTTCTCTTCTTTCAGATTCCCAGGGGCCTTTTGAAGATTAT  704
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241  TCCCATATAAATGGGCCTGCTTCTCTTCTTTCAGATTCCCAGGGGCCTTTTGAAGATTAT  300

Query  705  CTTCATATCTTAAGAATGAAGATGTTTTATTCAATCAAATTCTTGAAGGTTCGATGCCTA  764
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301  CTTCATATCTTAAGAATGAAGATGTTTTATTCAATCAAATTCTTGAAGGTTCGATGCCTA  360

Query  765  ATCATTCGAATTCGAGCTCTCCCATATGGTCGACTAGAGCCAAGCTGATCTCCTTTGCCC  824
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361  ATCATTCGAATTCGAGCTCTCCCATATGGTCGACTAGAGCCAAGCTGATCTCCTTTGCCC  420

Query  825  CGGAGATCACCATGGACGACTTTCTCTATCTCTACGATCTAGGAAGAAAGTTCGACGGAG  884
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421  CGGAGATCACCATGGACGACTTTCTCTATCTCTACGATCTAGGAAGAAAGTTCGACGGAG  480

Query  885  AAGGTGACGATACCATGTTCACCACCGATAATGAGAAGATTAGCCTCTTCAATTTCAGAG  944
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  481  AAGGTGACGATACCATGTTCACCACCGATAATGAGAAGATTAGCCTCTTCAATTTCAGAA  540

Query  945  AGAATGCTGACCCACAGATGGTTAGAGAGGCCTACGCGGCAGGTCTCATCAAGACGATCT  1004
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  541  AGAATGCTGACCCACAGATGGTTAGAGAGGCCTACGCGGCAGGTCTCATCAAGACGATCT  600
```

도면8

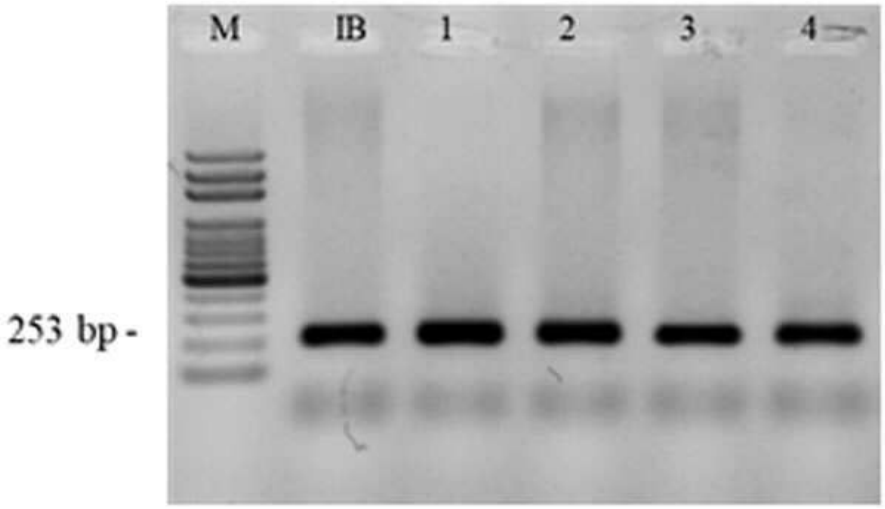


도면9

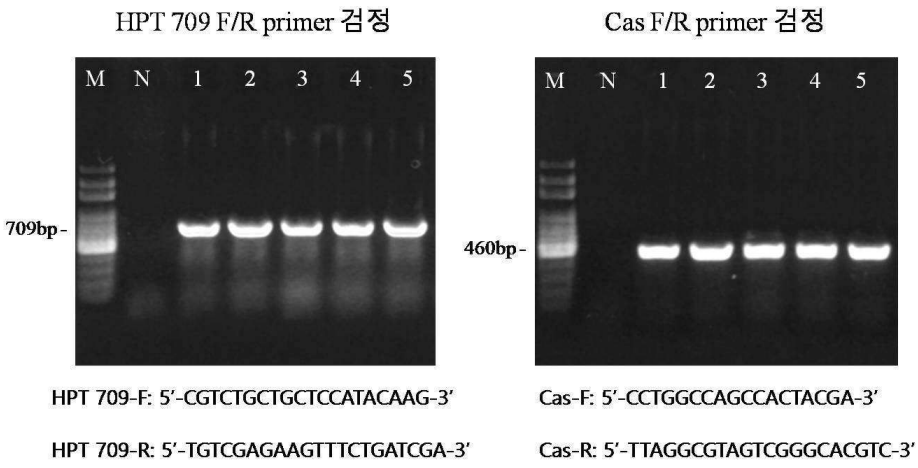


도면10

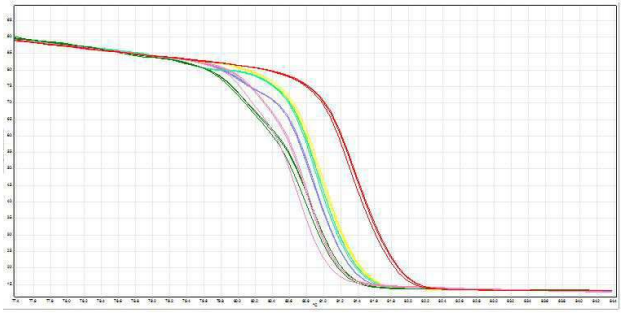
도면11


M
IB
1
2
3
4
253 bp -

도면12


HPT 709 F/R primer 검정
M N 1 2 3 4 5
709bp -
HPT 709-F: 5'-CGTCTGCTGCTCCATACAAG-3'
HPT 709-R: 5'-TGTCGAGAAGTTTCTGATCGA-3'
Cas F/R primer 검정
M N 1 2 3 4 5
460bp -
Cas-F: 5'-CCTGGCCAGCCACTACGA-3'
Cas-R: 5'-TTAGGCGTAGTCGGGCACGTC-3'

도면13



Color	Name	Genotype	Confidence %
	DT1-1	Variation	0.02±0.00
	DT1-2	Variation	0.20±0.02
	DT1-3	Variation	0.54±0.08
	DT1-4	Variation	0.00±0.00
	DT1-5	Variation	0.00±0.00
	CT001	IB	98.63±0.00

서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Method of Plant Transformation Vector for Gene Editing of Implicated with Drought Stress Tolerance and Their Applications

<130> PN1811-452

<160> 9

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> An effective guide RNA region for editing the BrDST71 gene

<400> 1

gaaccttctg tccacggtag agg 23

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DST71-s-F

<400> 2

tatccagacg tgtcctcact t 21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DST71-s-R

<400> 3

cagtcatgga aatgtatgcg 20

<210> 4

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> An effective guide to editing the BrDST71 gene RNA cassettes

<400> 4

gagctcgaat tcgaatgatt aggcatcgaa ccttcaagaa tttgattgaa taaaacatct 60

tcattcttaa gatatgaaga taatcttcaa aaggcccctg ggaatctgaa agaagagaag 120

caggcccatt tatatgggaa agaacaatag tatttcttat ataggcccat ttaagttgaa 180

aacaatcttc aaaagtccca catcgcttag ataagaaaac gaagctgagt ttatatacag 240

ctagagtcga agtagtgatt ggaaccttct gtccacggta ggttttagag ctagaaatag 300

caagttaaaa taaggctagt ccgttatcaa cttgaaaaag tggcaccgag tcggtgcttt 360

tttgagctc 369

<210> 5

<211> 14440

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Plant transformation vector sequences that correct BrDST71 gene in Chinese cabbage

<400> 5

gagctcaaaa aagcaccgac tcggtgccac tttttcaagt tgataacgga ctagccttat 60

tttaacttgc tatttctagc tctaaaacct accgtggaca gaaggttcca atcactactt 120

cgactctagc tgtatataaa ctcagcttcg ttttcttatc taagcgatgt gggacttttg 180

aagattgttt tcaacttaaa tgggcctata taagaaatac tattgttctt tcccatataa 240

atgggcctgc ttctcttctt tcagattccc aggggccttt tgaagattat cttcatatct 300

taagaatgaa gatgttttat tcaatcaaat tcttgaaggt tcgatgccta atcattcgaa 360

ttcgagctct cccatatggt cgactagagc caagctgatc tcctttgccc cggagatcac 420

catggacgac tttctctatc tctacgatct aggaagaaag ttcgacggag aaggtgacga 480

taccatgttc accaccgata atgagaagat tagcctcttc aatttcagaa agaatgctga 540

cccacagatg gttagagagg cctacgcggc aggtctcatc aagacgatct acccgagtaa 600

taatctccag gagatcaaat accttcccaa gaaggttaaa gatgcagtca aaagattcag 660

gactaactgc atcaagaaca cagagaaaga tatatttctc aagatcagaa gtactattcc 720

agtatggacg attcaaggct tgcttcataa accaaggcaa gtaatagaga ttggagtctc 780

taagaaagta gttcctactg aatcaaaggc catggagtca aaaattcaga tcgaggatct 840

aacagaactc gccgtgaaga ctggcgaaca gttcatacag agtcttttac gactcaatga 900

caagaagaaa atcttcgtca acatggtgga gcacgacact ctcgtctact ccaagaatat 960

caaagataca gtctcagaag accaaagggc tattgagact tttcaacaaa gggtaatatc 1020

gggaaacctc ctcggattcc attgcccagc tatctgtcac ttcatcaaaa ggacagtaga 1080

aaaggaaggt ggcacctaca aatgccatca ttgcgataaa ggaaaggcta tcgttcaaga 1140

tgcccctgcc gacagtggtc ccaaagatgg acccccaccc acgaggagca tcgtggaaaa 1200

agaagacgtt ccaaccacgt cttcaaagca agtggattga tgtgatatct ccactgacgt 1260

aagggatgac gcacaatccc actatccttc gcaagaccct tcctctatat aaggaagttc 1320

atttcatttg gagaggactc cggtattttt acaacaatta ccacaacaaa acaaacaaca 1380

aacaacatta caatttacta ttctagtcga cctgcaggcg gccgcactag tgatatcaca 1440

agtttgtaca aaaaagcagg cttcatggac aagaagtaca gcatcggcct ggacatcggt 1500

accaacagcg tgggctgggc cgtgatcacc gacgagtaca aggtgcccag caagaagttc 1560

aaggtgctgg gcaacaccga ccgccacagc atcaagaaga acctgatcgg cgccctgctg 1620

ttcgacagcg gcgagaccgc cgaggccacc cgcctgaagc gcaccgcccg ccgccgctac 1680

acccgccgca agaaccgcat ctgctacctg caggagatct tcagcaacga gatggccaag 1740

gtggacgaca gcttcttcca ccgcctggag gagagcttcc tggtggagga ggacaagaag 1800

cacgagcgcc accccatctt cggcaacatc gtggacgagg tggcctacca cgagaagtac 1860

cccaccatct accatctgcg caagaagctg gtggacagca ccgacaaggc cgacctgcgc 1920

ctgatctacc tggccctggc ccacatgatc aagttccgcg gccacttcct gatcgagggc 1980

gacctgaacc ccgacaacag cgacgtggac aagctgttca tccagctggt gcagacctac 2040

aaccagctgt tcgaggagaa ccccatcaac gccagcggcg tggacgccaa ggccatcctg 2100

agcgcccgcc tgagcaagag ccgccgcctg gagaacctga tcgcccagct gcccggcgag 2160

aagaagaacg gcctgttcgg caacctgatc gccctgagcc tgggcctgac ccccaacttc 2220

aagagcaact tcgacctggc cgaggacgcc aagctgcagc tgagcaagga cacctacgac 2280

gacgacctgg acaacctgct ggcccagatc ggcgaccagt acgccgacct gttcctggcc 2340

gccaagaacc tgagcgacgc catcctgctg agcgacatcc tgcgcgtgaa caccgagatc 2400

accaaggccc ccctgagcgc cagcatgatc aagcgctacg acgagcacca ccaggacctg 2460

accctgctga aggccctggt gcgccagcag ctgcccgaga agtacaagga gatcttcttc 2520

gaccagagca agaacggcta cgccggctac atcgacggcg gcgccagcca ggaggagttc 2580

tacaagttca tcaagcccat cctggagaag atggacggca ccgaggagct gctggtgaag 2640

ctgaaccgcg aggacctgct gcgcaagcag cgcaccttcg acaacggcag catcccccac 2700

cagatccacc tgggcgagct gcacgccatc ctgcgccgcc aggaggactt ctacccctttc 2760

ctgaaggaca accgcgagaa gatcgagaag atcctgacct tccgcatccc ctactacgtg 2820

ggcccccctgg cccgcggcaa cagccgcttc gcctggatga cccgcaagag cgaggagacc 2880

atcaccccct ggaacttcga ggaggtggtg gacaagggcg ccagcgccca gagcttcatc 2940

gagcgcatga ccaacttcga caagaacctg cccaacgaga aggtgctgcc caagcacagc 3000

ctgctgtacg agtacttcac cgtgtacaac gagctgacca aggtgaagta cgtgaccgag 3060

ggcatgcgca agcccgcctt cctgagcggc gagcagaaga aggccatcgt ggacctgctg 3120

ttcaagacca accgcaaggt gaccgtgaag cagctgaagg aggactactt caagaagatc 3180

gagtgcttcg acagcgtgga gatcagcggc gtggaggacc gcttcaacgc cagcctgggc 3240

acctaccacg acctgctgaa gatcatcaag gacaaggact tcctggacaa cgaggagaac 3300

gaggacatcc tggaggacat cgtgctgacc ctgaccctgt tcgaggaccg cgagatgatc 3360

gaggagcgcc tgaagaccta cgcccacctg ttcgacgaca aggtgatgaa gcagctgaag 3420

cgccgccgct acaccggctg gggccgcctg agccgcaagc ttatcaacgg catccgcgac 3480

aagcagagcg gcaagaccat cctggacttc ctgaagagcg acggcttcgc caaccgcaac 3540

ttcatgcagc tgatccacga cgacagcctg accttcaagg aggacatcca gaaggcccag 3600

gtgagcggcc agggcgacag cctgcacgag cacatcgcca acctggccgg cagccccgcc 3660

atcaagaagg gcatcctgca gaccgtgaag gtggtggacg agctggtgaa ggtgatgggc 3720

cgccacaagc ccgagaacat cgtgatcgag atggcccgcg agaaccagac cacccagaag 3780

ggccagaaga acagccgcga gcgcatgaag cgcatcgagg agggcatcaa ggagctgggc 3840

agccagatcc tgaaggagca ccccgtggag aacacccagc tgcagaacga gaagctgtac 3900

ctgtactacc tgcagaacgg ccgcgacatg tacgtggacc aggagctgga catcaaccgc 3960

ctgagcgact acgacgtgga ccacatcgtg ccccagagct tcctgaagga cgacagcatc 4020

gacaacaagg tgctgacccg cagcgacaag aaccgcggca agagcgacaa cgtgcccagc 4080
gaggaggtgg tgaagaagat gaagaactac tggcgccagc tgctgaacgc caagctgatc 4140
acccagcgca agttcgacaa cctgaccaag gccgagcgcg gcggcctgag cgagctggac 4200
aaggccggct tcatcaagcg ccagctggtg gagacccgcc agatcaccaa gcacgtggcc 4260
cagatcctgg acagccgcat gaacaccaag tacgacgaga acgacaagct gatccgcgag 4320
gtgaaggtga tcaccctgaa gagcaagctg gtgagcgact tccgcaagga cttccagttc 4380
tacaaggtgc gcgagatcaa caactaccac cacgcccacg acgcctacct gaacgccgtg 4440

gtgggcaccg ccctgatcaa gaagtacccc aagctggaga gcgagttcgt gtacggcgac 4500
tacaaggtgt acgacgtgcg caagatgatc gccaagagcg agcaggagat cggcaaggcc 4560
accgccaagt acttcttcta cagcaacatc atgaacttct tcaagaccga gatcaccctg 4620
gccaacggcg agatccgcaa gcgccccctg atcgagacca acggcgagac cggcgagatc 4680
gtgtgggaca agggccgcga cttcgccacc gtgcgcaagg tgctgagcat gccccaggtg 4740
aacatcgtga agaagaccga ggtgcagacc ggcggcttca gcaaggagag catcctgccc 4800
aagcgcaaca gcgacaagct gatcgcccgc aagaaggact gggaccccaa gaagtacggc 4860

ggcttcgaca gccccaccgt ggcctacagc gtgctggtgg tggccaaggt ggagaagggc 4920
aagagcaaga agctgaagag cgtgaaggag ctgctgggca tcaccatcat ggagcgcagc 4980
agcttcgaga agaaccccat cgacttcctg gaggccaagg gctacaagga ggtgaagaag 5040
gacctgatca tcaagctgcc caagtacagc ctgttcgagc tggagaacgg ccgcaagcgc 5100
atgctggcca gcgccggcga gctgcagaag ggcaacgagc tggccctgcc cagcaagtac 5160
gtgaacttcc tgtacctggc cagccactac gagaagctga agggcagccc cgaggacaac 5220
gagcagaagc agctgttcgt ggagcagcac aagcactacc tggacgagat catcgagcag 5280

atcagcgagt tcagcaagcg cgtgatcctg gccgacgcca acctggacaa ggtgctgagc 5340
gcctacaaca agcaccgcga caagcccatc cgcgagcagg ccgagaacat catccacctg 5400
ttcaccctga ccaacctggg cgcccccgcc gccttcaagt acttcgacac caccatcgac 5460
cgcaagcgct acaccagcac caaggaggtg ctggacgcca ccctgatcca ccagagcatc 5520
accggtctgt acgagacccg catcgacctg agccagctgg gcggcgacgg cggctccgga 5580
cctccaaaga aaaagagaaa agtatacccc tacgacgtgc ccgactacgc ctaacaccca 5640
gctttcttgt acaaagtggt gatatcccgc ggccatgcta gagtccgcaa aaatcaccag 5700

tctctctcta caaatctatc tctctctatt tttctccaga ataatgtgtg agtagttccc 5760

agataaggga attagggttc ttatagggtt tcgctcatgt gttgagcata taagaaaccc 5820

ttagtatgta tttgtatttg taaaatactt ctatcaataa aatttctaat tcctaaaacc 5880

aaaatccagt gacctgcagg catgcgacgt cgggcccaag cttagcttga gcttggatca 5940

gattgtcgtt tcccgccttc agtttaaact atcagtgttt gacaggatat attggcgggt 6000

aaacctaaga gaaaagagcg tttattagaa taatcggata tttaaaaggg cgtgaaaagg 6060

tttatccgtt cgtccatttg tatgtgcatg ccaaccacag ggttcccctc gggatcaaag 6120

tactttaaag tactttaaag tactttaaag tactttgatc caacccctcc gctgctatag 6180

tgcagtcggc ttctgacgtt cagtgcagcc gtcttctgaa aacgacatgt cgcacaagtc 6240

ctaagttacg cgacaggctg ccgccctgcc cttttcctgg cgttttcttg tcgcgtgttt 6300

tagtcgcata aagtagaata cttgcgacta gaaccggaga cattacgcca tgaacaagag 6360

cgccgccgct ggcctgctgg gctatgcccg cgtcagcacc gacgaccagg acttgaccaa 6420

ccaacgggcc gaactgcacg cggccggctg caccaagctg ttttccgaga agatcaccgg 6480

caccaggcgc gaccgcccgg agctggccag gatgcttgac cacctacgcc ctggcgacgt 6540

tgtgacagtg accaggctag accgcctggc ccgcagcacc cgcgacctac tggacattgc 6600

cgagcgcatc caggaggccg gcgcgggcct gcgtagcctg gcagagccgt gggccgacac 6660

caccacgccg gccggccgca tggtgttgac cgtgttcgcc ggcattgccg agttcgagcg 6720

ttccctaatc atcgaccgca cccggagcgg gcgcgaggcc gccaaggccc gaggcgtgaa 6780

gtttggcccc cgccctaccc tcaccccggc acagatcgcg cacgcccgcg agctgatcga 6840

ccaggaaggc cgcaccgtga aagaggcggc tgcactgctt ggcgtgcatc gctcgaccct 6900

gtaccgcgca cttgagcgca gcgaggaagt gacgcccacc gaggccaggc ggcgcggtgc 6960

cttccgtgag gacgcattga ccgaggccga cgccctggcg gccgccgaga atgaacgcca 7020

agaggaacaa gcatgaaacc gcaccaggac ggccaggacg aaccgttttt cattaccgaa 7080

gagatcgagg cggagatgat cgcggccggg tacgtgttcg agccgcccgc gcacgtctca 7140

accgtgcggc tgcatgaaat cctggccggt ttgtctgatg ccaagctggc ggcctggccg 7200

gccagcttgg ccgctgaaga aaccgagcgc cgccgtctaa aaaggtgatg tgtatttgag 7260

taaaacagct tgcgtcatgc ggtcgctgcg tatatgatgc gatgagtaaa taaacaaata 7320

cgcaagggga acgcatgaag gttatcgctg tacttaacca gaaaggcggg tcaggcaaga 7380

cgaccatcgc aacccatcta gcccgcgccc tgcaactcgc cggggccgat gttctgttag 7440

tcgattccga tccccagggc agtgcccgcg attgggcggc cgtgcgggaa gatcaaccgc 7500

taaccgttgt cggcatcgac cgcccgacga ttgaccgcga cgtgaaggcc atcggccggc 7560

gcgacttcgt agtgatcgac ggagcgcccc aggcggcgga cttggctgtg tccgcgatca 7620

aggcagccga cttcgtgctg attccggtgc agccaagccc ttacgacata tgggccaccg 7680

ccgacctggt ggagctggtt aagcagcgca ttgaggtcac ggatggaagg ctacaagcgg 7740

cctttgtcgt gtcgcgggcg atcaaaggca cgcgcatcgg cggtgaggtt gccgaggcgc 7800

tggccgggta cgagctgccc attcttgagt cccgtatcac gcagcgcgtg agctacccag 7860

gcactgccgc cgccggcaca accgttcttg aatcagaacc cgagggcgac gctgcccgcg 7920

aggtccaggc gctggccgct gaaattaaat caaaactcat ttgagttaat gaggtaaaga 7980

gaaaatgagc aaaagcacaa acacgctaag tgccggccgt ccgagcgcac gcagcagcaa 8040

ggctgcaacg ttggccagcc tggcagacac gccagccatg aagcgggtca actttcagtt 8100

gccggcggag gatcacacca agctgaagat gtacgcggta cgccaaggca agaccattac 8160

cgagctgcta tctgaataca tcgcgcagct accagagtaa atgagcaaat gaataaatga 8220

gtagatgaat tttagcggct aaaggaggcg gcatggaaaa tcaagaacaa ccaggcaccg 8280

acgccgtgga atgccccatg tgtggaggaa cgggcggttg gccaggcgta agcggctggg 8340

ttgtctgccg gccctgcaat ggcactggaa cccccaagcc cgaggaatcg gcgtgagcgg 8400

tcgcaaacca tccggcccgg tacaaatcgg cgcggcgctg ggtgatgacc tggtggagaa 8460

gttgaaggcc gcgcaggccg cccagcggca acgcatcgag gcagaagcac gccccggtga 8520

atcgtggcaa gcggccgctg atcgaatccg caaagaatcc cggcaaccgc cggcagccgg 8580

tgcgccgtcg attaggaagc cgcccaaggg cgacgagcaa ccagattttt tcgttccgat 8640

gctctatgac gtgggcaccc gcgatagtcg cagcatcatg gacgtggccg ttttccgtct 8700

gtcgaagcgt gaccgacgag ctggcgaggt gatccgctac gagcttccag acgggcacgt 8760

agaggtttcc gcagggccgg ccggcatggc cagtgtgtgg gattacgacc tggtactgat 8820

ggcggtttcc catctaaccg aatccatgaa ccgataccgg gaagggaagg gagacaagcc 8880

cggccgcgtg ttccgtccac acgttgcgga cgtactcaag ttctgccggc gagccgatgg 8940

cggaaagcag aaagacgacc tggtagaaac ctgcattcgg ttaaacacca cgcacgttgc 9000

catgcagcgt acgaagaagg ccaagaacgg ccgcctggtg acggtatccg agggtgaagc 9060

cttgattagc cgctacaaga tcgtaaagag cgaaaccggg cggccggagt acatcgagat 9120

cgagctagct gattggatgt accgcgagat cacagaaggc aagaacccgg acgtgctgac 9180

ggttcacccc gattactttt tgatcgatcc cggcatcggc cgttttctct accgcctggc 9240

acgccgcgcc gcaggcaagg cagaagccag atggttgttc aagacgatct acgaacgcag 9300

tggcagcgcc ggagagttca agaagttctg tttcaccgtg cgcaagctga tcgggtcaaa 9360

tgacctgccg gagtacgatt tgaaggagga ggcggggcag gctggcccga tcctagtcat 9420

gcgctaccgc aacctgatcg agggcgaagc atccgccggt tcctaatgta cggagcagat 9480

gctagggcaa attgccctag caggggaaaa aggtcgaaaa ggtctctttc ctgtggatag 9540
cacgtacatt gggaacccaa agccgtacat tgggaaccgg aacccgtaca ttgggaaccc 9600
aaagccgtac attgggaacc ggtcacacat gtaagtgact gatataaaag agaaaaaagg 9660
cgatttttcc gcctaaaact ctttaaaact tattaaaact cttaaaaccc gcctggcctg 9720
tgcataactg tctggccagc gcacagccga agagctgcaa aaagcgccta cccttcggtc 9780
gctgcgctcc ctacgccccg ccgcttcgcg tcggcctatc gcggccgctg gccgctcaaa 9840
aatggctggc ctacggccag gcaatctacc agggcgcgga caagccgcgc cgtcgccact 9900

cgaccgccgg cgcccacatc aaggcaccct gcctcgcgcg tttcggtgat gacggtgaaa 9960
acctctgaca catgcagctc ccggagacgg tcacagcttg tctgtaagcg gatgccggga 10020
gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttggcgg gtgtcggggc gcagccatga 10080
cccagtcacg tagcgatagc ggagtgtata ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat 10140
tgtactgaga gtgcaccata tgcggtgtga aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata 10200
ccgcatcagg cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct 10260
gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga 10320

taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc 10380
cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg ccccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg 10440
ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttcccccctgg 10500
aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt 10560
tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggt 10620
gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg 10680
cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caacccggta agacacgact tatcgccact 10740

ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt 10800
cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggta tctgcgctct 10860
gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac 10920
cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc 10980
tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg 11040
ttaagggatt ttggtcatgc atgatatatc tcccaatttg tgtagggctt attatgcacg 11100
cttaaaaata ataaaagcag acttgacctg atagtttggc tgtgagcaat tatgtgctta 11160

gtgcatctaa cgcttgagtt aagccgcgcc gcgaagcggc gtcggcttga acgaatttct 11220

agctagacat tatttgccga ctaccttggt gatctcgcct ttcacgtagt ggacaaattc 11280

ttccaactga tctgcgcgcg aggccaagcg atcttcttct tgtccaagat aagcctgtct 11340

agcttcaagt atgacgggct gatactgggc cggcaggcgc tccattgccc agtcggcagc 11400

gacatccttc ggcgcgattt tgccggttac tgcgctgtac caaatgcggg acaacgtaag 11460

cactacattt cgctcatcgc cagcccagtc gggcggcgag ttccatagcg ttaaggtttc 11520

atttagcgcc tcaaatagat cctgttcagg aaccggatca aagagttcct ccgccgctgg 11580

acctaccaag gcaacgctat gttctcttgc ttttgtcagc aagatagcca gatcaatgtc 11640

gatcgtggct ggctcgaaga tacctgcaag aatgtcattg cgctgccatt ctccaaattg 11700

cagttcgcgc ttagctggat aacgccacgg aatgatgtcg tcgtgcacaa caatggtgac 11760

ttctacagcg cggagaatct cgctctctcc aggggaagcc gaagtttcca aaaggtcgtt 11820

gatcaaagct cgccgcgttg tttcatcaag ccttacggtc accgtaacca gcaaatcaat 11880

atcactgtgt ggcttcaggc cgccatccac tgcggagccg tacaaatgta cggccagcaa 11940

cgtcggttcg agatggcgct cgatgacgcc aactacctct gatagttgag tcgatacttc 12000

ggcgatcacc gcttccccca tgatgtttaa ctttgtttta gggcgactgc cctgctgcgt 12060

aacatcgttg ctgctccata acatcaaaca tcgacccacg gcgtaacgcg cttgctgctt 12120

ggatgcccga ggcatagact gtaccccaaa aaaacagtca taacaagcca tgaaaaccgc 12180

cactgcgccg ttaccaccgc tgcgttcggt caaggttctg gaccagttgc gtgagcgcat 12240

acgctacttg cattacagct tacgaaccga acaggcttat gtccactggg ttcgtgcccg 12300

aattgatcac aggcagcaac gctctgtcat cgttacaatc aacatgctac cctccgcgag 12360

atcatccgtg tttcaaaccc ggcagcttag ttgccgttct tccgaatagc atcggtaaca 12420

tgagcaaagt ctgccgcctt acaacggctc tcccgctgac gccgtcccgg actgatgggc 12480

tgcctgtatc gagtggtgat tttgtgccga gctgccggtc ggggagctgt tggctggctg 12540

gtggcaggat atattgtggt gtaaacaaat tgacgcttag acaacttaat aacacattgc 12600

ggacgttttt aatgtactga attaacgccg aattgaatta tcagcttgca tgccggtcga 12660

tctagtaaca tagatgacac cgcgcgcgat aatttatcct agtttgcgcg ctatattttg 12720

ttttctatcg cgtattaaat gtataattgc gggactctaa tcataaaaac ccatctcata 12780

aataacgtca tgcattacat gttaattatt acatgcttaa cgtaattcaa cagaaattat 12840

atgataatca tcgcaagacc ggcaacagga ttcaatctta agaaacttta ttgccaaatg 12900

tttgaacgat ctgcttgact ctagggaatt aattcctgaa tcactgcgac cggccctccc 12960

gcgacccagc cgagcgagct tagcgaactg tggacgagaa ctgtgccacc aagcgtaagg 13020

ccgttctctc gcatttgcct tgctaggctc gcgcgagttg ctggctgagg cgttctcgaa 13080

atcagctctt gttcggtcgg catctactct attcctttgc cctcggacga gtgctggggc 13140

gtcggtttcc actatcggcg agtacttcta cacagccatc ggtccagacg gccgcgcttc 13200

tgcgggcgat ttgtgtacgc ccgacagtcc cggctccgga tcggacgatt gcgtcgcatc 13260

gaccctgcgc ccaagctgca tcatcgaaat tgccgtcaac caagctctga tagagttggt 13320

caagaccaat gcggagcata tacgcccgga gccttggcga tcctgcaagc tccggatgcc 13380

tccgctcgaa gtagcgcgtc tgctgctcca tacaagccaa ccacggcctc cagaagaaga 13440

tgttggcgac ctcgtattgg gaatccccga acatcgcctc gctccagtca atgaccgctg 13500

ttatgcggcc attgtccgtc aggacattgt tggagccgaa atccgcgtgc acgaggtgcc 13560

ggacttcggg gcagtcctcg gcccaaagca tcagctcatc gagagcctgc gcgacggacg 13620

cactgacggt gtcgtccatc acagtttgcc agtgatacac atggggatca gcaatcgcgc 13680

atatgaaatc acgccatgta gtgtattgac cgattccttg cggtccgaat gggccgaacc 13740

cgctcgtctg gctaagatcg gccgcagcga tagcatccat agcctccgcg accggctgaa 13800

gaacagcggg cagttcggtt tcaggcaggt cttgcaacgt gacaccctgt gcacggcggg 13860

agatgcaata ggtcaggctc tcgctgaact ccccaatgtc aagcacttcc ggaatcggga 13920

gcgcggccga tgcaaagtgc cgataaacat aacgatcttt gtagaaacca tcggcgcagc 13980

tatttacccg caggacatat ccacgccctc ctacatcgaa gctgaaagca cgagattctt 14040

cgccctccga gagctgcatc aggtcggaga cgctgtcgaa cttttcgatc agaaacttct 14100

cgacagacgt cgcggtgagt tcaggctttt tcataggggg gattcgagtt gagagtgaat 14160

atgagactct aattggatac cgaggggaat ttatggaacg tcagtggagc atttttgaca 14220

agaaatattt gctagctgat agtgacctta ggcgactttt gaacgcgcaa taatggtttc 14280

tgacgtatgt gcttagctca ttaaactcca gaaacccgcg gctcagtggc tccttcaacg 14340

ttgcggttct gtcagttcca aacgtaaaac ggcttgtccc gcgtcatcgg cgggggtcat 14400

aacgtgactc ccttaattct ccgctcatga tcgataattc 14440

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> HPT 709 primer F

<400> 6

cgtctgctgc tccatacaag 20

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> HPT 709 primer R

<400> 7

tgtcgagaag tttctgatcg a 21

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Cas primer F

<400> 8

cctggccagc cactacga 18

<

210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Cas primer R

<400> 9

ttaggcgtag tcgggcacgt c 21