



- (51) 국제특허분류:
C12N 15/63 (2006.01) C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/66 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/003020
- (22) 국제출원일: 2016년 3월 25일 (25.03.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0042130 2015년 3월 26일 (26.03.2015) KR
- (71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 김용삼 (KIM, Yong Sam); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 전성국 (JEON, Seong Kook); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 고정현 (KO, Jeong Heon); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 최규환 (CHOI, Kyu Whan); 35209 대전시 서구 한밭대로 745, 12층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

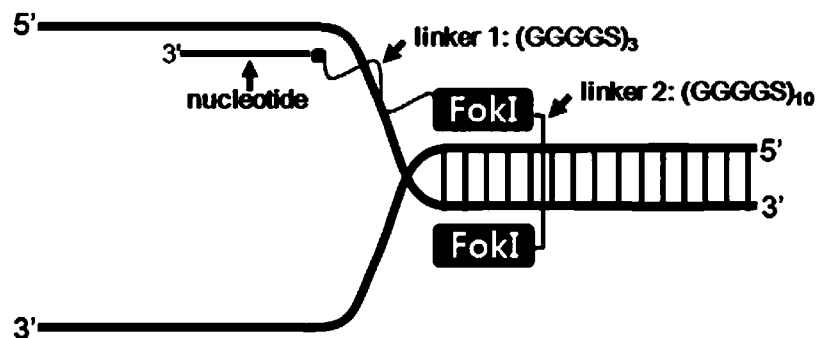
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: COMPOSITION FOR SPECIFICALLY EDITING TARGET GENE IN CELLS USING TARGET GENE-SPECIFIC NUCLEIC ACID PROBE AND FOKI RESTRICTION ENZYME DIMER, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭 : 표적 유전자 특이적 핵산 프로브 및 FokI 제한효소 이량체를 이용하여 세포 내에서 표적 유전자를 특이적으로 편집하기 위한 조성물 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention provides a composition for target gene-specific edition and a method for specifically editing a target gene in cells using the composition for target gene-specific edition, wherein the composition contains: as active ingredients, (a) a target gene recognition probe comprising a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of a target gene and a protein-binding material linked to the complementary nucleotide sequence; and (b) an expression vector inserted such that a gene coding a dimer, in which two FokI restriction enzymes are linked to each other, and a gene coding a protein binding to the protein-binding material are expressed while being linked to each other.

(57) 요약서: 본 발명은 (a) 표적 유전자의 염기서열과 상보적인 염기서열 및 상기 상보적인 염기서열에 연결된 단백질 결합 물질을 포함하는 표적 유전자 인식 프로브; 및 (b) 두 개의 FokI 제한효소가 서로 연결된 이량체를 코딩하는 유전자 및 상기 단백질 결합 물질과 결합하는 단백질을 코딩하는 유전자가 서로 연결된 채 발현될 수 있도록 삽입된 발현 벡터;를 유효성분으로 함유하는 표적 유전자 특이적 편집용 조성물 및 상기 표적 유전자 특이적 편집용 조성물을 이용하여 세포 내에서 표적 유전자를 특이적으로 편집하는 방법을 제공한다.



명세서

발명의 명칭: 표적 유전자 특이적 핵산 프로브 및 FokI 제한효소 이량체를 이용하여 세포 내에서 표적 유전자를 특이적으로 편집하기 위한 조성물 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 표적 유전자 특이적 핵산 프로브 및 *FokI* 제한효소 이량체를 이용하여 세포 내에서 표적 유전자를 특이적으로 편집하기 위한 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 (a) 표적 유전자의 염기서열과 상보적인 염기서열 및 상기 상보적인 염기서열에 연결된 단백질 결합 물질을 포함하는 표적 유전자 인식 프로브; 및 (b) 두 개의 *FokI* 제한효소가 서로 연결된 이량체를 코딩하는 유전자 및 상기 단백질 결합 물질과 결합하는 단백질을 코딩하는 유전자가 서로 연결된 채 발현될 수 있도록 삽입된 발현 벡터;를 유효성분으로 함유하는 표적 유전자 특이적 편집용 조성물을 이용하여 세포 내에서 표적 유전자를 특이적으로 편집하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 생체 계놈 내에서 특정 유전자 염기서열만을 대상으로 삭제나 교정, 삽입을 유도하는 유전자 편집 기술은 요즘 세계적으로 큰 관심을 불러일으키고 있다. 그 이유는 과거의 유전 공학 기술 내에서 유전자 재조합 기술이 초점이었다면, 현재는 세포 내 계놈을 조작함으로써 유전자의 기능을 밝히고, 더 나아가서 유전 질환의 치료에 초점을 맞추고 있기 때문이다. 유전자 편집 기술은 기존의 유전자 재조합 기술과 비교했을 때, 생체 계놈 내 엄청난 크기의 유전자 염기서열 중 특정 유전자를 제거하는 정확성과 효율성을 보이기 때문에 현재 세계적으로 큰 주목을 받고 있다.
- [3] 가장 최초에 개발된 유전자 편집 기술은 징크핑거 뉴클라아제(Zinc-Finger Nuclease, ZFN) 방법이다. 이 기술은 표적 유전자 서열과 결합이 가능한 단백질과 *FokI* 제한효소를 결합시킨 형태인데, 이 표적 유전자 결합 영역의 조합 효율이 낮고 시간이 많이 걸리는 단점을 가지고 있다.
- [4] 그 다음에 개발된 기술이 탈렌(Transcription Activator-Like Effector Nucleases, TALEN) 방법인데 식물체를 감염시키는 잔토모나스(*Xanthomonas*) 속 세균에서 처음으로 발견된 전사 인자를 이용한 기술이다. 이 기술은 DNA 표적 결합 영역의 조합에 시간이 많이 걸리는 점과 표적 유전자 서열이 반드시 티민(thymine)으로 시작해야 한다는 점, 표적 유전자 서열 중 시토신이 메틸화(methylation)되어 있으면 결합력이 감소되는 점, 생체 계놈 내 유사 표적 서열에서 활성을 띠는 부작용(off-target effect) 등의 단점을 가지고 있다.
- [5] 그리고 가장 최근에는 크리스퍼/카스9(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9, CRISPR/Cas9) 방법이 개발되었는데, 1987년 최초로

대장균에서 크리스퍼가 보고된 이후, 활발한 연구 결과로 인해 이것은 세균 내부에 외부의 바이러스가 침입했을 때 이에 대항하는 획득성 면역 체계라는 사실이 규명되었다. 이 기술은 앞서 설명한 2가지 유전자 편집 기술들보다 효율도 높고 합성 가격도 많이 저렴한 편이다. 그러나 표적 유전자 서열에 반드시 아데닌/구아닌/시토신/티민-구아닌-구아닌(A/G/C/T-G-G, NGG, PAM 서열)이 반복되어야 결합이 가능하다는 점과 생체 게놈 내 유사 표적 유전자 서열에서 활성을 띠는 부작용 등의 단점을 가지고 있다.

[6] 현존하는 유전자 편집 기술들은 지금까지도 활발히 연구가 진행되고 있는데 각각의 단점들을 지니고 있다. 그래서 이러한 단점들을 해결할 수 있는 보편적인 만능 유전자 편집 기술의 등장이 절실한 상황이다.

[7] 한편, 한국공개특허 제2011-0101175호에서는 '징크 핑거 뉴클레아제를 이용한 랫트의 유전체 편집'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2012-0101532호에서는 'T A L 이펙터-매개된 DNA 변형'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2014-0115335호에서는 '변형 캐스케이드 리보핵단백질 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 표적 유전자 특이적 핵산 프로브 및 *FokI* 제한효소 이량체를 이용하여 세포 내에서 표적 유전자를 특이적으로 편집하는 방법 및 이의 용도에 대해서는 밝혀진 바가 전혀 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자 및 표적 유전자의 상보적인 염기서열 인식 핵산 프로브에 포함되어 있는 EDTA와 결합하는 단백질인 다수의 히스티딘 발현 서열이 삽입된 발현 벡터를 제조한 후, 상기 벡터와 EDTA가 결합된 표적 유전자 특이적 프로브 및 2가 전이금속이온을 세포 내로 도입하였다. 그 결과, 세포 내에서 전이금속의 존재 하에 표적 유전자의 염기서열 인식 물질인 프로브와 이에 포함되는 EDTA와 결합하는 단백질인 히스티딘간의 배위결합으로 *FokI* 제한효소와 표적 유전자 특이적 프로브가 결합되는 것을 확인하였다. 또한, 상기 EDTA 대신 바이오틴이 결합된 표적 유전자 특이적 프로브와 바이오틴과 결합하는 단백질인 스트렙타아비딘 발현 서열이 삽입된 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자 발현 벡터를 세포 내로 도입한 결과, 표적 유전자의 염기서열 인식 물질인 프로브와 이에 포함되는 바이오틴과 결합하는 단백질인 스트렙타아비딘의 결합으로 *FokI* 제한효소와 표적 유전자 특이적 프로브가 결합되는 것을 확인하였다. 본 발명에서는 상기와 같이 세포 내에서 결합되는 표적 유전자 특이적 프로브와 *FokI* 제한효소 이량체를 이용하여 외생적 녹색형광단백질 발현 유전자의 특이적 녹-아웃(knock-out), 내생적 인간 LGALS3BP(렉틴 갈락토스-결합가용성결합단백질3) 유전자의 특이적 녹-아웃(knock-out) 및 내생적 쥐 면역 글로불린 G1(Immunoglobulin G1, IgG1)

유전자를 대상으로 하는 특이적 킥-인(knock-in) 등 세포 내에서 표적 유전자 특이적인 유전자 조작이 잘 이루어지는 것을 확인하였다.

- [9] 이를 통해, 본 발명에서는 현재까지 개발되어 온 유전자 조작 기술과는 달리, 표적 유전자 특이적 프로브의 설정에 있어서, 게놈 내 유전자 결합 영역의 조합이 필요 없고, 생체 게놈 내 표적 인식 서열의 제한이 전혀 없어 게놈 내 표적 유전자 서열 중 시토신이 메틸화(methylation)되어 있어도 아무 상관없이 결합력과 절단력이 유지되며, 게놈 내 유사 표적 유전자 서열에서도 활성을 띄는 부작용(off-target effect)을 전혀 보이지 않는다는 점을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [10] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 (a) 표적 유전자의 염기서열과 상보적인 염기서열 및 상기 상보적인 염기서열에 연결된 단백질 결합 물질을 포함하는 표적 유전자 인식 프로브; 및 (b) 두 개의 *FokI* 제한효소가 서로 연결된 이량체를 코딩하는 유전자 및 상기 단백질 결합 물질과 결합하는 단백질을 코딩하는 유전자가 서로 연결된 채 발현될 수 있도록 삽입된 발현 벡터;를 유효성분으로 함유하는 표적 유전자 특이적 편집용 조성물을 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은
- [12] (a) *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자 및 표적 유전자의 염기서열과 상보적인 염기서열에 연결된 단백질 결합 물질과 결합하는 단백질을 코딩 유전자가 삽입된 발현 벡터를 제조하는 단계;
- [13] (b) 상기 (a) 단계의 발현 벡터 및 표적 유전자의 염기서열과 상보적인 염기서열 및 상기 상보적인 염기서열에 연결된 단백질 결합 물질을 포함하는 표적 유전자 인식 프로브를 세포 내로 도입하는 단계; 및
- [14] (c) 상기 (b) 단계의 세포 내로 도입되어 발현된 *FokI* 제한효소 이량체와 표적 유전자 인식 프로브의 결합을 유도하는 단계를 포함하는 세포 내에서 표적 유전자를 특이적으로 편집하는 방법을 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 표적 유전자의 염기서열과 상보적인 염기서열 및 상기 상보적인 염기서열에 연결된 단백질 결합 물질을 포함하는 표적 유전자 인식 프로브; 및 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자 및 상기 단백질 결합 물질과 결합하는 단백질을 코딩하는 유전자가 삽입된 발현 벡터;를 유효성분으로 함유하는 표적 유전자 특이적 편집용 키트를 제공한다.

발명의 효과

- [16] 본 발명은 현재까지 개발되어 온 다른 유전자 조작 기술보다 표적 유전자 특이적 프로브의 설정에 있어서, 게놈 내 유전자 결합 영역의 조합이 필요 없고, 생체 게놈 내 표적 인식 서열의 제한이 전혀 없을 뿐만 아니라, 게놈 내 표적 유전자 서열 중 시토신이 메틸화(methylation)되어 있어도 아무 상관없이 결합력과 절단력이 유지되며, 게놈 내 유사 표적 유전자 서열에서도 활성을 띄는

부작용(off-target effect)을 전혀 보이지 않으므로, 보다 효과적으로 표적 유전자의 편집을 수행할 수 있다.

- [17] 특히, 본원 발명은 세포 내 유전자의 편집 대상 위치를 인식하기 위한 구성으로 핵산 프로브를 이용하므로, 본원 발명의 경우 핵산 프로브의 서열을 그에 맞게 설계함으로써 유전자 내의 그 어떤 위치라도 특이적으로 인식하고 접근하도록 할 수 있고, 그 결과 편집 위치를 선정함에 어떠한 제약도 없다는 점에서, 크리스퍼/카스9 편집 기술에 비해 보편성(universality)을 가진다.

- [18] 또한, *FokI* 제한효소의 두 개를 링커로 서로 연결하여 이량체의 형태로 구성하고, 이러한 이량체를 위와 같은 프로브와 결합할 수 있도록 함으로써, 하나의 프로브만으로도 DNA 이중 가닥 절단에 필요한 *FokI* 제한효소 단량체 두 개를 모두 편집 위치에 배치시킬 수 있다는 점에서, 크리스퍼/카스9 편집 기술에 비해 단순성(simplicity)을 가지며, 아울러, 본원 발명의 조성물에 포함된 발현 벡터에는 *FokI* 제한효소 2개와 링커 정도만(약 2~3kbp)을 클로닝되면 가능하므로, 추후 본원 발명의 조성물을 전달(delivery)하기 위해 AAV(Adeno-Associate virus) 등을 이용하는 경우에도 페이로드(payload)가 과중하지 않다는 점에서, 크리스퍼/카스9 편집 기술에 비해 효율성(efficiency)을 가진다.

- [19] 따라서, 본 발명은 유전자 조작을 이용하는 의학, 약학, 생명공학 등의 생명 과학 연구에서 매우 유용한 방법이며, 유전자 치료법과 생명공학의 발전에 크게 이바지할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [20] 도 1은 표적 유전자 특이적 핵산 프로브와 다수의 히스티딘 발현 서열을 포함한 *FokI* 제한효소 이량체의 결합 방법을 나타낸 것이다.

- [21] 도 2는 다수의 히스티딘 발현 서열을 포함한 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자를 DNA 벡터 내에 삽입시켜 차후 단백질로 발현했을 때, 이디티에이-C2(EDTA-C₂) 화합물과의 서로 간 배위 결합을 통해 연결하는 구조를 나타낸 것이다.

- [22] 도 3은 EDTA가 결합된 표적 유전자 특이적 핵산 프로브와 다수의 히스티딘 발현 서열을 포함한 *FokI* 제한효소 이량체 발현 단백질이 결합된 구조를 나타낸다. C-타입은 *FokI* 제한효소 이량체의 카복실기(-COOH) 말단에 핵사 히스티딘 서열, 핵 위치화 신호(nuclear localization signal, NLS) 서열, 락토제 결정기(myc epitope) 서열이 존재하는 것을 지칭하고, N-타입은 *FokI* 제한효소 이량체의 아미노기(-NH₂) 말단에 핵사 히스티딘 서열, 핵 위치화 신호(nuclear localization signal, NLS) 서열, 락토제 결정기(myc epitope) 서열이 존재하는 것을 지칭한다. 단백질의 구조와 운동성, 프로브와의 결합 가능성을 고려해서 2가지 형태를 제작했다.

- [23] 도 4는 바이오틴이 결합된 표적 유전자 특이적 핵산 프로브와

스트렙트아비딘이 결합된 *FokI* 제한효소 이량체 발현 단백질을 나타낸다. C-타입은 *FokI* 제한효소 이량체의 카복실기(-COOH) 말단에 스트렙트아비딘 유전자, 핵 위치화 신호(nuclear localization signal, NLS) 서열, myc 항원 결정기(myc epitope) 서열이 존재하는 것을 지칭하고, N-타입은 *FokI* 제한효소 이량체의 아미노기(-NH₂) 말단에 스트렙트아비딘 유전자, 핵 위치화 신호(nuclear localization signal, NLS) 서열, myc 항원 결정기(myc epitope) 서열이 존재하는 것을 지칭한다. 단백질의 구조와 운동성, 프로브와의 결합 가능성을 고려해서 2가지 형태를 제작했다.

- [24] 도 5는 녹색 형광 단백질 발현 유전자에 대한 프라이머 조합에 따라 생성된 4종의 PCR 산물을 나타낸다. 중합 효소 연쇄 반응 시 100bp와 70bp 길이의 산물이 형성되게 프라이머를 제작하였다. 중합 효소 연쇄 반응 후 형성된 산물을 95°C에서 변성시키고 즉시 급냉시키면 최종적으로 4가지 형태(P1, P2, P3, P4)의 DNA가 남게 된다.
- [25] 도 6은 녹색 형광 단백질 발현 유전자에 대한 프라이머 조합에 따라 생성된 4종의 PCR 산물을 각각 아가로스 젤 상에서 전개시킨 결과이다. 레인 1, F1+R 프라이머; 레인 2, 어닐링한 직후; 레인 3, 어닐링한 후 4시간째; 레인 4, F2+R 프라이머 조합
- [26] 도 7은 다수의 히스티딘 발현 서열을 포함한 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자를 대장균에서 발현시켜 획득한 용해물을 일반 DNA 벡터와 반응시킨 후 절편화된 DNA 산물을 확인함으로써 *FokI* 제한효소 이량체의 활성을 확인한 결과이다. 레인 1, 버퍼; 레인 2, Mock 추출물; 레인 3, *FokI* 제한효소 추출물
- [27] 도 8은 *FokI* 제한효소 이량체의 표적 특이적인 활성을 확인한 결과이다. 프로브(probe) 1, 2는 녹색 형광 단백질 발현 유전자의 개시 코돈부터 3'방향으로 디옥시리보핵산 염기 26개와 이것과 상보적인 서열을 가지는 염기 26개를 각각 합성하고 말단부에 이디티에이-C2(EDTA-C₂)를 결합시킨 것이다. 상단의 젤 사진의 레인 1, 2, 3, 4 및 5는 표에 나타낸 Reagents 1, 2, 3, 4 및 5를 각각 나타낸다. (+, 첨가; -, 무첨가)
- [28] 도 9는 외생적 녹색 형광 단백질 발현 유전자의 특이적 녹-아웃(knock-out) 실험 결과를 나타낸다. Treat는 이디티에이-C2(EDTA-C₂)가 결합된 프로브와 유전자 편집 벡터를 세포주에 형질도입시킨 경우로써 유전자 편집 기능이 있고, Control은 유전자 편집 벡터만을 세포주에 형질도입시킨 경우로써 유전자 편집 기능이 없다. C-타입은 *FokI* 제한효소 이량체의 카복실기(-COOH) 말단에 헥사 히스티딘 서열이 결합된 벡터를 세포주에 형질도입시킨 경우이고 N-type은 *FokI* 제한효소 이량체의 아미노기(-NH₂) 말단에 헥사 히스티딘 서열이 결합된 벡터를 세포주에 형질도입시킨 경우이다. TALEN은 탈렌(Transcription Activator-Like Effector Nucleases) 플라스미드 벡터를 세포주에 형질도입시킨 경우이다.
- [29] 도 10은 도 9에 대한 결과물 중에서 C-유형의 *FokI* 제한효소 유전자 발현 벡터와 프로브, 탈렌(TALEN)을 각각 형질 도입시킨 세포를 형광 현미경으로

관찰한 결과이다.

- [30] 도 11은 내생적 렉틴 갈락토스-결합 가용성 3 결합 단백질 유전자(Lectin, GALactoside-binding, Soluble, 3 Binding Protein, LGALS3BP) 엑손 3번 특이적인 핵산 프로브 위치를 나타낸다.
- [31] 도 12는 *FokI* 다수의 히스티딘 발현 서열을 포함한 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자가 삽입된 DNA 벡터 5 μ g, 니켈(Ni²⁺) 50 mM, 내생적 렉틴 갈락토스-결합 가용성결합단백질3 유전자 특이적 DNA 프로브 1 μ M, 3 μ M을 인간 대장암 세포주인 에이치티-29(HT-29)에 동시에 도입시킨 결과이다. T7 제한효소 1(T7 endonuclease 1, T7E1)은 완전히 상보적으로 결합되지 않고(mismatch) 와블(wobble)이 형성된 이중결합 DNA를 절단하는 제한효소로서 지놈 DNA 상의 염기서열 삽입이나 결실을 확인할 때 이용되는 효소이다.
- [32] 도 13은 내생적 인간 LGALS3BP 유전자 조작(gene edition) 여부를 확인하기 위해 LGALS3BP 유전자용 양방향 프라이머를 제작해서 중합 효소 연쇄 반응을 실시한 결과이다. (FP1+RP1 프라이머; FP2+RP1 프라이머; gDNA, 게놈 DNA) 사용한 프라이머 서열은 FP1이 5'-tacaagctcagcaggggaga-3'(서열번호 1)이고, RP1은 5'-ttcgtcttaggggatttggc-3'(서열번호 2), FP2는 5'-agatcttctacagaggccag-3'(서열번호 3)이다.
- [33] 도 14는 도 13에서 PCR을 통해서 증폭된 산물 중 2개를 선별하여 DNA 벡터에 결합시켜 염기서열 분석용 프라이머를 이용해서 염기서열을 분석한 결과를 나타낸다.
- [34] 도 15는 야생형(WT) HT-29 세포(WT)와 형질 도입시킨 HT-29 세포(23, 56)의 LGALS3BP 유전자의 발현 강도를 단백질 면역 흡착 검침법(protein immunoblot, western blot)을 통해서 확인한 결과이다. IB(immunoblot), LGALS3BP; IB(immunoblot), Gal-3.
- [35] 도 16은 인간 LGALS3BP 유전자 엑손 3번 내에서 선정된 디옥시리보핵산 탐침자 4종의 위치(A)와 서열(B)을 표시한 모식도로 모두 디옥시리보핵산 염기 20개로 구성되어 있고 5' 방향에 바이오틴을 결합시킨 형태이다. 또한, 인간 상기 탐침자를 이용하여 인간 LGALS3BP 유전자 엑손 3번을 표적으로 한 특이적 편집 실험 결과(C)를 나타낸다.
- [36] 도 17은 내생적 쥐 면역 글로불린 G1(Immunoglobulin G1, IgG1) 유전자의 당질화 서열을 포함하는 엑손 부분의 치환에 필요한 공여자 DNA 벡터의 제조를 나타낸다.
- [37] 도 18은 다수의 히스티딘 발현 서열을 포함한 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자가 삽입된 DNA 벡터 5 μ g, 니켈(Ni²⁺), 각각 0mM, 5mM, 50mM, DNA 프로브 3 μ M, 도 17에 나타낸 공여자 DNA 벡터 5 μ g을 쥐 엔아이에이치-3T3(NIH-3T3) 세포에 도입시킨 결과이다. 사용한 프라이머 서열은 knock-in-F가 5'-gcagcaccaaggtggacaag-3'(서열번호 4)이고, knock-in-R은 5'-gtgctgggtgtggcagtga-3'(서열번호 5)이다. No T.F은 N-type *FokI* 제한효소

이량체의 유전자 플라스미드 벡터만을 세포주에 형질도입시킨 결과이고, px458은 카스9(Cas9) 유전자 플라스미드 벡터를 세포주에 형질도입시킨 결과인데, 이 두 경우에는 표적 유전자 인식 기능이 존재하지 않아서 유전자 편집이 불가능하다. CRISPR는 카스9(Cas9) 유전자 플라스미드 벡터와 단일 가닥 안내자(single-guide) RNA 전사 플라스미드 벡터를 동시에 세포주에 형질도입시킨 경우로써, 표적 유전자 인식 기능이 존재해서 유전자 편집이 가능하다. FokI은 *FokI* 제한효소 이량체 유전자와 이디티에이-C2 DNA 프로브, 니켈(Ni·So4)을 동시에 세포주에 형질도입시킨 경우로써, 표적 유전자 인식 기능이 존재해서 유전자 편집이 가능하다. T7 제한효소 1(T7 endonuclease 1, T7E1)은 mismatch 이중결합 DNA를 절단하는 제한효소로써, 지노믹 DNA 내 염기서열의 삽입이나 결실 여부를 확인하기 위해서 사용했다.

- [38] 도 19는 게놈 내 표적 유전자 염기서열에 존재하지 않았던 *SacI* 제한효소 인식 서열이 공여자 DNA 벡터를 통해서 잘 삽입되었는지를 확인한 결과이다. 사용한 프라이머 서열은 knock-in-F가 5'-gcagcaccaaggtggacaag-3'(서열번호 6)이고, knock-in-R이 5'-gtgctgggtgtggcagtgtga-3'(서열번호 7)이다. No T.F은 N-type *FokI* 제한효소 이량체의 유전자 플라스미드 벡터만을 세포주에 형질도입시킨 결과이고, Donor DNA는 공여자 유전자 플라스미드 벡터를 세포주에 형질도입시킨 경우로써, 표적 유전자 인식 기능이 존재하지 않아서 유전자 편집이 불가능하다. px458은 카스9(Cas9) 유전자 플라스미드 벡터를 세포주에 형질도입시킨 결과인데, 이 두 경우에는 표적 유전자 인식 기능이 존재하지 않아서 유전자 편집이 불가능하다. CRISPR는 카스9(Cas9) 유전자 플라스미드 벡터와 단일 가닥 안내자(single-guide) RNA 전사 플라스미드 벡터를 동시에 세포주에 형질도입시킨 경우로써, 표적 유전자 인식 기능이 존재해서 유전자 편집이 가능하다. TALEN은 탈렌(Transcription Activator-Like Effector Nucleases) 유전자 플라스미드 벡터를 세포주에 형질도입시킨 경우로써, 표적 유전자 인식 기능이 존재해서 유전자 편집이 가능하다. FokI은 *FokI* 제한효소 이량체 유전자와 이디티에이-C2 DNA 프로브, 니켈(Ni·So4)을 동시에 세포주에 형질도입시킨 경우로써, 표적 유전자 인식 기능이 존재해서 유전자 편집이 가능하다.

- [39] 도 20은 본 발명을 통해 유전자 조작된 쥐의 내생적 쥐 면역 글로불린 G1(Immunoglobulin G1, IgG1) 유전자 특이적 녹-인(knock-in)을 시퀀싱을 통해 확인한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [40] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 표적 유전자의 염기서열과 상보적인 염기서열 및 상기 상보적인 염기서열에 연결된 단백질 결합 물질을 포함하는 표적 유전자 인식 프로브; 및 (b) 두 개의 *FokI* 제한효소가 서로 연결된 이량체를 코딩하는 유전자 및 상기 단백질 결합 물질과 결합하는 단백질을

코딩하는 유전자가 서로 연결된 채 발현될 수 있도록 삽입된 발현 벡터;를 유효성분으로 함유하는 표적 유전자 특이적 편집용 조성물을 제공한다.

- [41] 일반적으로, 생체 내 유전 물질인 DNA는 복제되는 과정을 거치는데, 이것은 원본 DNA를 주형으로 삼아 새로운 두 개의 DNA로 만드는 과정이며, DNA 중합효소 복합체가 이 역할을 수행한다. DNA 복제가 발생하는 곳을 복제분기점 (Replication Fork)이라고 부르며, 이곳은 일시적으로 이중나선 가닥이 단일나선으로 노출하는 순간이 존재하게 된다. 이때 본 발명에서 제시한 표적 유전자 인식 프로브가 표적 유전자에 결합되게 되면, 바이오틴이나 EDTA를 매개로 FokI 이량체가 결합하여 복제분기점을 벗어난 이중나선가닥 부분의 절단을 유도하게 된다.
- [42] 생체 세포 내에서는 이 DNA 복제 과정상 오류나, 자외선, 방사선 같은 환경적 요인 때문에 DNA 손상이 일어날 수 있으며, 이를 복구하기 위해 두 가지 방법을 동원한다. 첫번째, 비동형성 말단 접합이라는 방법은 자체적인 수선 오류가 발생하기 쉬워서 뉴클레오타이드 상 염기서열의 결실이나 삽입이 잘 일어나서 이를 유전 공학 연구 분야에 적용했을 때, 게놈 상 특정 유전자 기능 제거에 이용할 수 있다. 두번째, 동형 직접적 수선이라는 방법은 뉴클레오타이드 상 염기서열의 결실이나 삽입 없이 수선이 가능한 방법으로 유전 공학 연구 분야에 적용했을 때, 실제 게놈 상에 존재하는 특정 염기서열을 공여자 DNA 벡터에 삽입시키고 그 한가운데에 게놈 내에 삽입시키려는 염기서열을 추가적으로 삽입시켜 세포 내에 도입시키면, 게놈 내에 원래 존재하지 않던 특정 외래 유전자를 삽입시키는데 이용할 수 있다.
- [43] 본 발명에 따른 표적 유전자 인식 프로브 및 FokI 제한효소 이량체를 생체 내에 주입시키면 첫번째, 세포의 핵막 내 게놈 상에서 DNA 복제가 진행 중인 뉴클레오타이드 부분에 핵산 프로브 및 FokI 제한효소 이량체가 접근하게 된다. 두번째, 핵산 프로브가 자신의 염기서열과 상보적인 염기서열에 가서 결합하게 된다. 세번째, 이 프로브의 말단에 결합된 메탈 킬레이트제(metal chelating agent) 또는 바이오틴이 FokI 제한효소 이량체 말단의 히스티딘 또는 테트라벨런트 스트렙트아비딘(tetravalent streptavidin) 또는 모노벨런트 스트렙트아비딘(monovalent streptavidin)과 결합하게 된다. 네번째, FokI 제한효소 이량체가 DNA 뉴클레오타이드 두 가닥에 각각 결합해서 두 가닥을 모두 절단시킨다. 다섯번째, 생체 세포 내에서는 변형이 이루어진 염기서열 또는 이와 가까운 염기서열에 DNA를 수선하기 위한 여러 분자들이 결합하고, 이들은 여기에 또다른 분자들이 붙어 복합체를 이루도록 유도함으로써 실질적인 수선 과정이 이루어질 수 있게 한다. 여섯번째, 이 DNA 수선 작업 결과 수선 오류가 발생하고, 뉴클레오타이드 상 염기서열의 결실이나 삽입이 일어나서 원래 형태의 DNA와 다른 형태의 DNA가 형성되게 된다. 그러면서 특정 유전자 내 염기서열의 틀이동 (frame shift) 현상이 발생하고, 정지 코돈이 형성되면 유전자가 정상적인 아미노산을 합성하지 못하고, 그 결과 특정 유전자의 기능이

제거될 수 있다. 그리고, 세포 내에 핵산 프로브 및 *FokI* 제한효소 이량체 외에 공여자 DNA 벡터(실제 게놈 상에 존재하는 특정 염기서열을 공여자 DNA 벡터에 삽입시키고 그 한가운데에 게놈 내에 삽입시키려는 염기서열을 추가적으로 삽입)를 같이 도입시키면 공여자 DNA에 있는 유전자서열로 원하는 서열을 교정할 수 있게 된다.

[44] 본 발명의 일 구현 예에 따른 조성물에서, 상기 (a)의 단백질 결합 물질은 금속 킬레이트제(metal chelating agent) 또는 바이오틴일 수 있고, 바람직한 금속 킬레이트제는 이디티에이(EDTA)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[45] 본 발명의 일 구현 예에 따른 조성물에서, 상기 (b)의 단백질 결합 물질과 결합하는 단백질은 다수의 히스티딘, 테트라벨런트 스트렙트아비딘(tetravalent streptavidin) 또는 모노벨런트 스트렙트아비딘(monovalent streptavidin)일 수 있고, 상기 다수의 히스티딘은 바람직하게는 헥사 히스티딘일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[46] 본 발명에서, 표적 유전자의 염기서열 인식 물질로 EDTA를 이용할 경우, 표적 유전자의 염기서열 인식 물질과 결합하는 단백질은 헥사 히스티딘이며, 표적 유전자의 염기서열 인식 물질로 바이오틴을 이용할 경우, 표적 유전자의 염기서열 인식 물질과 결합하는 단백질은 테트라벨런트 스트렙트아비딘(tetravalent streptavidin) 또는 모노벨런트 스트렙트아비딘(monovalent streptavidin)일 수 있다.

[47] 본 발명의 일 구현 예에 따른 조성물에서, 표적 유전자의 염기서열 인식 물질과 연결된 단백질 결합 물질로 EDTA를 이용할 경우 전이금속을 추가로 포함할 수 있으며, 상기 전이금속은 Ni^{2+} , Co^{2+} 또는 Zn^{2+} 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[48] 본 발명에서, 프로브는 표적 염기서열과 상보적인 서열을 가진 디옥시리보핵산(DeoxyriboNucleic Acid, DNA) 또는 리보핵산(RiboNucleic Acid, RNA) 염기 10~100개, 바람직하게는 10~50개, 더 바람직하게는 10~30개를 사용할 수 있다.

[49] 본 발명의 일 구현 예에 따른 조성물에서, 상기 (b)의 발현 벡터는 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자, 연결체(linker), 표적 유전자의 염기서열과 상보적인 염기서열에 연결된 단백질 결합 물질과 결합하는 단백질 코딩 유전자 및 핵 위치 신호(nuclear localization signal, NLS) 서열이 작동가능하게 연결된 것일 수 있다.

[50] 본 발명의 일 구현 예에 따른 조성물에서, 상기 연결체는 벡터 내에 유전자가 코딩하고 있는 단백질들이 세포 내에서 발현되었을 때, 유연한 운동성을 가질 수 있는 기능을 부여하고자 하므로, 이러한 기능을 부여할 수 있는 연결체로는 어느 것이나 가능하다. 바람직하게는, 상기 연결체는 1개부터 10개까지의 글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린 연결체((GGGGS)₁₋₁₀)일 수 있고, 가장 바람직하게는 *FokI* 제한효소 이량체 유전자 사이에 10개의

글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린 연결체((GGGGS)₁₀)를 삽입하고, *FokI* 제한효소 단량체와 핵 위치 신호(NLS) 서열 사이에는 3개의 글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린 연결체((GGGGS)₃)를 삽입할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [51] 본 발명의 일 구현 예에 따른 조성물에서, 상기 발현 벡터는 5'→3' 방향으로 표적 유전자의 염기서열과 상보적인 염기서열에 연결된 단백질 결합 물질과 결합하는 단백질 코딩 유전자, 핵 위치 신호(NLS) 서열, 3개의 글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린 연결체((GGGGS)₃), *FokI* 제한효소 유전자, 10개의 글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린 연결체((GGGGS)₁₀) 및 *FokI* 제한효소 유전자가 작동가능하게 연결되거나; 또는 5'→3' 방향으로 *FokI* 제한효소 유전자, 10개의 글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린 연결체((GGGGS)₁₀), *FokI* 제한효소 유전자, 3개의 글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린 연결체((GGGGS)₃), 핵 위치 신호(NLS) 서열 및 표적 유전자의 염기서열과 상보적인 염기서열에 연결된 단백질 결합 물질과 결합하는 단백질 코딩 유전자가 작동가능하게 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [52] 본 발명에서 "작동가능하게 연결된"은 유전 구조체로 혼입되어 발현 제어 서열이 관심이 있는 코딩 서열의 발현을 효과적으로 제어하는 것을 의미한다. RNA 중합효소가 RNA (mRNA이더라도)로 코딩 서열을 전사할 수 있고, 이어서 코딩 서열에 의해 코딩된 단백질로 번역될 수 있는 경우, 코딩 서열은 "작동가능하게 연결되고", 세포 내의 발현 제어 서열의 "조절 하에" 있게 된다. 따라서, 조절 영역은 변형된 표적 핵산을 발현하도록 요망되는 동물 세포, 동물, 또는 동물 조직에서의 전사를 조정하거나, 예를 들어 조절하거나, 용이하게 하거나, 또는 진행시킬 수 있다.
- [53] 본 발명의 일 구현 예에 따른 조성물은 핵 위치 신호(NLS) 서열과 3개의 글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린 연결체((GGGGS)₃) 사이에 믹 항원 결정기(myc epitope) 서열을 추가로 포함할 수 있다. 상기 믹 항원 결정기(myc epitope) 서열의 추가는 세포 내 단백질 발현 여부를 단백질 면역 흡착 검침법(protein immunoblot, western blot)을 통해 확인할 때 이용될 수 있다.
- [54] 본 발명의 일 구현 예에 따른 조성물에서, 상기 유전자 편집 또는 조작은 유전자 결실, 유전자 삽입, 유전자 교정 또는 염색체 재배열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 유전자 삽입은 세포 내에 본 발명의 표적 유전자 특이적 조작(gene edition)용 조성물과 공여 DNA 벡터를 같이 형질도입하면 세포 내에서는 공여 DNA 벡터의 상동염기서열들을 인식해 상동 재조합이 유도되어, 상동 염기서열 사이에 삽입시켜 원하는 유전자가 염색체 안의 표적 위치에 정확히 삽입될 수 있다.
- [55] 또한, 본 발명은
- [56] (a) *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자 및 표적 유전자의 염기서열과 상보적인

염기서열에 연결된 단백질 결합 물질과 결합하는 단백질 코딩 유전자가 삽입된 발현 벡터를 제조하는 단계;

- [57] (b) 상기 (a) 단계의 발현 벡터 및 표적 유전자의 염기서열과 상보적인 염기서열 및 상기 상보적인 염기서열에 연결된 단백질 결합 물질을 포함하는 표적 유전자 인식 프로브를 세포 내로 도입하는 단계; 및
- [58] (c) 상기 (b) 단계의 세포 내로 도입되어 발현된 *FokI* 제한효소 이량체와 표적 유전자 인식 프로브의 결합을 유도하는 단계를 포함하는 세포 내에서 표적 유전자를 특이적으로 편집하는 방법을 제공한다.
- [59] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 (b) 단계의 프로브에 포함된 단백질 결합 물질은 금속 킬레이트제(metal chelating agent) 또는 바이오틴일 수 있고, 바람직한 금속 킬레이트제는 이디티에이(EDTA)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [60] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 (a) 단계의 표적 유전자의 염기서열과 상보적인 염기서열에 연결된 단백질 결합 물질과 결합하는 단백질은 다수의 히스티딘, 테트라벨런트 스트렙타아비딘(tetravalent streptavidin) 또는 모노벨런트 스트렙타아비딘(monovalent streptavidin)일 수 있고, 상기 다수의 히스티딘은 바람직하게는 헥사 히스티딘일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [61] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 (a) 단계의 발현 벡터는 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자, 연결체(linker), 표적 유전자의 염기서열과 상보적인 염기서열에 연결된 단백질 결합 물질과 결합하는 단백질 코딩 유전자 및 핵 위치 신호(nuclear localization signal, NLS) 유전자가 작동가능하게 연결된 것일 수 있다.
- [62] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 연결체는 3개의 글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린 연결체((GGGGS)₃) 또는 10개의 글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린 연결체((GGGGS)₁₀)인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [63] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 발현 벡터는 5'→3' 방향으로 표적 유전자의 염기서열과 상보적인 염기서열에 연결된 단백질 결합 물질과 결합하는 단백질 코딩 유전자, 핵 위치 신호(NLS) 서열, 3개의 글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린 연결체((GGGGS)₃), *FokI* 제한효소 유전자, 10개의 글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린 연결체((GGGGS)₁₀) 및 *FokI* 제한효소 유전자가 작동가능하게 연결되거나; 또는 5'→3' 방향으로 *FokI* 제한효소 유전자, 10개의 글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린 연결체((GGGGS)₁₀), *FokI* 제한효소 유전자, 3개의 글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린 연결체((GGGGS)₃), 핵 위치 신호(NLS) 서열 및 표적 유전자의 염기서열과 상보적인 염기서열에 연결된 단백질 결합 물질과 결합하는 단백질 코딩 유전자가 작동가능하게 연결된 것일

수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [64] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법은 핵 위치 신호(NLS) 서열과 3개의 글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린 연결체((GGGGS)₃) 사이에 믹 항원 결정기(myc epitope) 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [65] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 유전자 편집 또는 조작은 유전자 결실, 유전자 삽입, 유전자 교정 또는 염색체 재배열인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [66] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 (b) 단계의 세포 내로의 도입은 리포솜 전달 방법 또는 전기충격법(electroporation)인 것일 수 있고, 바람직하게는 전기충격법일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [67] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 (b) 단계에서 발현 벡터 및 표적 유전자 인식 프로브의 세포 내로의 도입은 발현 벡터와 표적 유전자 인식 프로브를 동시에 도입할 수도 있고, 발현 벡터를 먼저 세포 내로 도입 후에 표적 유전자 인식 프로브를 도입할 수도 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [68] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 (c) 단계의 세포 내로 도입되어 발현된 *FokI* 제한효소와 표적 유전자 인식 프로브의 결합 유도는 상기 (b) 단계에서 전이금속을 추가로 세포 내로 도입하여 세포 내에서 전이금속의 존재하에 표적 유전자의 염기서열 인식 물질인 EDTA와 EDTA와 결합하는 단백질인 히스티딘의 배위결합으로 *FokI* 제한효소와 표적 유전자 인식 프로브의 결합을 유도할 수 있다. 상기 전이금속은 Ni²⁺, Co²⁺ 또는 Zn²⁺ 등일 수 있고, 바람직하게는 Ni²⁺일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [69] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 세포는 동물 세포, 식물 세포 또는 미생물 세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [70] 또한, 본 발명은 표적 유전자의 염기서열과 상보적인 염기서열 및 상기 상보적인 염기서열에 연결된 단백질 결합 물질을 포함하는 표적 유전자 인식 프로브; 및 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자 및 상기 단백질 결합 물질과 결합하는 단백질을 코딩하는 유전자가 삽입된 발현 벡터;를 유효성분으로 함유하는 표적 유전자 특이적 편집용 키트를 제공한다.
- [71] 본 발명의 '표적 유전자 인식 프로브'는 명세서 전반에 걸쳐 기재된 '표적 유전자 특이적 핵산 프로브' 또는 '핵산 프로브'와 동일한 의미로 혼용되었다.
- [72]
- [73] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [74]
- [75] 재료 및 방법
- [76] 핵산 프로브와 *FokI* 제한효소 이량체의 제조 및 이들의 결합 확인
- [77] 본 발명자들은 새로운 형태의 만능형 유전자 편집 기술을 개발했으며, 이것은 표적 유전자 서열과 상보적인 서열을 가진 디옥시리보핵산(Deoxyribo Nucleic

Acid, DNA) 또는 리보핵산(Ribo Nucleic Acid, RNA) 염기 26개를 합성하여 표적 유전자 인식 물질로 사용함으로써, 생물체 내 특정 염기서열을 매우 특이적으로 인식할 수 있다.

[78] 5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGXT-3'(서열번호 8), X=EDTA-C2-dT

[79] *FokI* 제한효소 발현 유전자 2개는 pMLM-290과 pMLM-292 플라스미드 벡터 DNA 1 μ l(50ng), 정방향 프라이머 1 μ l, 역방향 프라이머 1 μ l, 증류수 17 μ l, PCR primix를 혼합하여 95°C에서 5분을 반응시키고, 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초를 총 30회 반응시킨 후, 72°C에서 7분을 반응시키는 중합효소 연쇄반응을 실시하여 획득하였다.

[80] *FokI*-290 정방향 프라이머 :

5'-TTGGATCCCAACTAGTCAAAAGTGAA-3'(서열번호 9)

[81] *FokI*-290 역방향 프라이머 :

5'-TTGAGCTCGTTTATCTCGCCGTTATT-3'(서열번호 10)

[82] *FokI*-292 정방향 프라이머 :

5'-TTGTCGACCCCAACTAGTCAAAAGTGAAGT-3'(서열번호 11)

[83] *FokI*-292 역방향 프라이머 :

5'-TTCTCGAGCCTTAAAAGTTTATCTCGCCGT-3'(서열번호 12)

[84] 중합효소 연쇄반응이 완료된 산물은 1.5% 아가로스 겔에서 100 볼트로 전개시켜 절단한 후, 그 중에서 DNA만 추출하였다. *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자 Fok1-290 DNA, *BamHI*, *SacI* 제한효소를 혼합하여 37°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 다수의 히스티딘 서열을 보유한 pET-28a(+) 플라스미드 벡터 DNA, *BamHI*, *SacI* 제한효소를 혼합하여 37°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 제한효소 반응이 완료된 산물은 1.5% 아가로스 겔에서 100 볼트로 전개시켜 절단한 후, 그 중에서 DNA만 추출하였다. 각각의 DNA와 10x라이게이스 버퍼, T4 DNA 라이게이스를 혼합시켜 16°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 획득된 산물은 DH5 α 대장균 균주에 형질전환시키고 LB 아가 플레이트에 배양시켰다. 획득된 형질전환 균집들은 LB 배지에 주입시켜 37°C에서 250rpm으로 16시간 동안 배양시켰다. 획득된 산물에서 플라스미드 벡터 DNA를 추출한 다음 염기서열 분석용 프라이머를 이용해서 염기서열을 분석했다.

[85] T7 : 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'(서열번호 13)

[86] *FokI* 제한효소 발현 유전자 Fok1-292 DNA, *Sall*, *NotI* 제한효소를 혼합하여 37°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 다수의 히스티딘 서열을 보유한 pET-28a(+) 플라스미드 벡터 DNA, *Sall*, *NotI* 제한효소를 혼합하여 37°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 제한효소 반응이 완료된 산물은 1.5% 아가로스 겔에서 100 볼트로 전개시켜 절단한 후, 그 중에서 DNA만 추출하였다. 각각의 DNA와 10x라이게이스 버퍼, T4 DNA 라이게이스를 혼합시켜 16°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 획득된 산물은 DH5 α 대장균 균주에 형질전환시키고 LB 아가 플레이트에 배양시켰다. 획득된 형질전환 균집들은 LB 배지에 주입시켜

37°C에서 250rpm으로 16시간 동안 배양시켰다. 획득된 산물에서 플라스미드 벡터 DNA를 추출한 다음 염기서열 분석용 프라이머를 이용해서 염기서열을 분석했다.

- [87] T7 ter : 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCG-3'(서열번호 14)
- [88] pET-28a(+) 플라스미드 벡터 내의 다수의 히스티딘 서열과 *FokI* 제한효소 발현 유전자 *FokI*-290 사이에 *NheI*, *BamHI* 제한효소를 이용해서 글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린 연결체(GGGGS linker) 3개를 삽입하고, *FokI* 제한효소 발현 유전자 *FokI*-290과 *FokI*-292 사이에 *SacI*, *Sall* 제한효소를 이용해서 글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린 연결체(GGGGS linker) 3개를 삽입시켰다(도 1).
- [89] 디옥시리보핵산 또는 리보핵산 염기 26개의 마지막 염기는 디옥시-티민(deoxy-thymine) 또는 디옥시-우라실(deoxy-uracil)로 합성하고, 이 부위에 이디티에이-C2(EDTA-C2) 화합물을 결합시켰다(도 2). 다수의 히스티딘 서열과 *FokI* 제한효소 발현 유전자 2개, 글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린 연결체(GGGGS linker) 2개가 포함된 pET-28a(+) 플라스미드 벡터 DNA 1 μ l(50ng), 정방향 프라이머 1 μ l, 역방향 프라이머 1 μ l, 증류수 17 μ l, PCR 프리믹스를 혼합하여 95°C에서 5분을 반응시키고, 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분을 총 30회 반응시킨 후, 72°C에서 7분을 반응시키는 중합효소 연쇄반응을 실시하여 획득하였다.
- [90] C-his *FokI* 정방향 프라이머 : 5'-ttgggtaccatgggcagcagccat-3'(서열번호 15)
- [91] C-his *FokI* 역방향 프라이머 : 5'- ttgggcccttaaaagtttatctcgccgtta-3' (서열번호 16)
- [92] 중합효소 연쇄반응이 완료된 산물은 1.2% 아가로스 젤에서 100 볼트로 전개시켜 절단한 후, 그 중에서 DNA만 추출하고 *KpnI*, *Apal* 제한효소를 혼합하여 37°C에서 16시간 동안 반응시켰다. pcDNA3.1 hygro(+) 플라스미드 벡터 DNA, *KpnI*, *Apal* 제한효소를 혼합하여 37°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 절단 반응이 완료된 산물들은 1.2% 아가로스 젤에서 100 볼트로 전개시켜 절단한 후, 그 중에서 DNA만 추출하였다. 각각의 DNA와 10x라이게이스 버퍼, T4 DNA 라이게이스를 혼합시켜 16°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 획득된 산물은 DH5 α 대장균 균주에 형질전환시키고 LB 아가 플레이트에 배양시켰다. 획득된 형질전환 균집들은 LB 배지에 주입시켜 37°C에서 250rpm으로 16시간 동안 배양시켰다. 획득된 산물에서 플라스미드 벡터 DNA를 추출한 다음 염기서열 분석용 프라이머를 이용해서 염기서열을 분석했다.
- [93] T7 : 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'(서열번호 17)
- [94] BGH-R : 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'(서열번호 18)
- [95] 획득한 플라스미드 벡터 DNA를 *NheI*, *BamHI* 제한효소를 이용하여 핵 위치화 신호(nuclear localization signal, NLS) 서열과 믹 항원 결정기(myc epitope) 서열을 삽입시켰다(도 3).
- [96] 핵 위치 신호(NLS) : 5'-CCAAAGAAAAAGAGAAAGGTT-3'(서열번호 19)

[97] 믹 항원 결정기 서열:

5'-GAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG-3'(서열번호 20)

[98] 획득한 플라스미드 벡터 DNA를 *XhoI* 제한효소를 이용하여 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자와 테트라벨런트 스트렙트아비딘(tetravalent streptavidin) 또는 모노벨런트 스트렙트아비딘(monovalent streptavidin)을 플라스미드 벡터 내에 삽입시켰다. 그리고 핵 위치화 신호(nuclear localization signal, NLS) 서열과 믹 항원 결정기(myc epitope) 서열을 같이 삽입시켰다(도 4).

[99]

[100] 핵산 프로브와 *FokI* 제한효소 이량체의 생체 외 결합 확인

[101] 녹색 형광 단백질 발현 유전자의 개시 코돈부터 3' 방향으로 100개까지의 염기와 이와 상보적인 서열을 가지는 염기를 각각 합성한 다음, 중합 효소 연쇄 반응 시 100bp와 70bp 길이의 산물이 형성되게끔 프라이머를 제작하였다.

[102] 100bp 프라이머:

[103] 5'-ATGGTGAGCAAGGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTG
GTCGAGCTGGACGGCGACG

[104] TAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGG-3'(서열번호 21)

[105] 70bp 프라이머:

[106] 5'-GGAGCGGCCTGTGCGACTTGAACACCGGCAAATGCAGCGGCAGGTCGA
GCTGGTCCTACCCGTGGTGG

[107] GG-3'(서열번호 22)

[108] 100bp와 70bp 길이의 DNA 각각 1 μ g, 정방향 프라이머 2개 각각 1 μ l, 역방향 프라이머 1 μ l, 증류수 17 μ l, PCR primix를 혼합하여 95°C에서 5분을 반응시키고, 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초를 총 30회 반응시킨 후, 72°C에서 7분을 반응시키는 중합효소 연쇄반응을 실시하였다.

[109] F1 : 5'-ATGGTGAGCAAGGGGCGAGGA-3'(서열번호 23)

[110] F2 : 5'-GGGGTGGTGCCCATCCTGG-3'(서열번호 24)

[111] R1 : 5'-CCTCGCCGGACACGCTGAA-3'(서열번호 25)

[112] 중합 효소 연쇄 반응 후 형성된 산물을 95°C에서 5분간 반응시키고 즉시 196°C에 반응시키면 최종적으로 4가지 형태의 DNA가 남게 된다(도 5). 이렇게 얻어진 중합 효소 연쇄 반응 직후의 100bp DNA, 70bp DNA, 그리고 이형 접합체를 형성시킨 직후의 DNA와 37°C에서 4시간 동안 반응시킨 DNA를 각각 아가로스 젤 상에서 100 볼트로 전개시켰다(도 6). *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자와 다수의 히스티딘 발현 서열을 pET-28a(+) 플라스미드 벡터 내에 삽입시킨 후, 외래 유전자가 삽입되지 않은 대장균 발현 플라스미드 벡터와 함께 BL21(DE3) 대장균 균주에 각각 형질전환시켰다. 획득된 대장균 군집(colony)을 배지에 주입시켜 37°C에서 250rpm으로 16시간 동안 배양시켰다. 자외선 분광 광도계를 이용해서 흡광도 600nm에서 광학 밀도가 0.4~0.6에 도달했을 때, 0.1mM 농도의 IPTG를 주입시키고, 18°C에서 180rpm으로 18시간 동안

증식시켰다. 증식된 대장균을 13,000rpm으로 15분 동안 4°C에서 원심분리시키고 상층액은 제거하였다. 남은 침전물에 10초간 동작 5초간 정지를 총 20분간 반복하면서 초음파를 가해서 분쇄를 실시했고, 13,000rpm으로 15분 동안 4°C에서 원심분리시킨 후, 상층액은 제거하였다. 원심분리를 실시한 다음, 침전물은 제거하고 용해물을 획득했다. 이 산물들을 일반 플라스미드 벡터와 함께 37°C에서 250rpm으로 14시간 동안 반응시킨 후 아가로스 젤 전개를 실시하였다(도 7). *FokI* 제한효소 이량체의 표적 특이적인 활성을 확인하기 위해서 녹색 형광 단백질 발현 유전자의 개시 코돈부터 3' 방향으로 디옥시리보핵산 염기 26개와 이것과 상보적인 서열을 가지는 염기 26개를 각각 합성하고 말단부에 이디티에이-C2(EDTA-C2)를 결합시켰다. *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자와 다수의 히스티딘 서열을 대장균 발현 플라스미드 벡터를 형질전환시켜 획득한 용해물을 히스트레프 HP 칼럼에 주입시켜 이미다졸 농도 구배를 이용하여 AKTA 퓨리파이어로 정제하였고, 획득한 산물을 다시 모노 Q 칼럼에 주입시켜 이온 간 전하 차이를 이용하여 AKTA 퓨리파이어로 정제하였다. 획득된 단백질과 녹색 형광 단백질 발현 유전자 프로브 2종류, Ni^{2+} , EDTA를 각각 다른 주입 조건으로 선행 실험에서 얻은 4가지 형태(도 5 참조)의 DNA와 37°C에서 14시간 동안 반응시켰다. 그리고 아가로스 젤 전개를 실시하였다(도 8).

[113]

[114] 외생적 녹색 형광 단백질 발현 유전자의 특이적 녹-아웃(knock-out) 분석

[115] 녹색 형광 단백질 발현 유전자의 개시 코돈부터 디옥시리보핵산 염기와 리보핵산 염기 26개를 합성하고, 이것들과 상보적인 염기서열을 가지는 26개를 또한 합성했다.

[116] 5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGXT-3'(서열번호 26), X=EDTA-C2-dT

[117] 5'-AXCAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCAT-3'(서열번호 27), X=EDTA-C2-dT

[118] 이 핵산 프로브의 말단부에 이디티에이-C2를 각각 결합시켰다. 그리고 인간 대장암 세포주인 더블유아이디알(WiDr)에 녹색 형광 단백질 발현 유전자를 도입시킨 다음, 형광 현미경으로 형광 강도를 관찰하면서 강도가 강한 세포들을 선별하는 작업을 반복했다. 녹색 형광 단백질이 항상 발현될 수 있는 세포를 최종 선별한 다음, 이 세포들에 녹색 형광 단백질 발현 유전자의 프로브 300pM과 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자, 다수의 히스티딘 서열이 삽입된 플라스미드 벡터 5 μ g, 니켈(Ni^{2+}) 500mM을 동시에 도입시켰다. 대조군(control)으로써 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자, 다수의 히스티딘 서열이 삽입된 플라스미드 벡터 5 μ g만을 따로 세포에 도입시켰다. 또한 유전자 플라스미드 벡터를 먼저 세포 내에 도입시키고 24시간 후에 녹색 형광 단백질 유전자 프로브를 도입시키기도 했다. 탈렌(TALEN) 방법과의 비교 실험을 위해서 녹색 형광 단백질 발현 유전자의 개시 코돈부터 26개의 염기서열과 더 3' 방향으로 12개 염기서열만큼 더 진행된 시점부터 26개의 염기서열을 선정해서 전사 활성화 유사 인자(TALE)

결합 영역을 각각 조합해서 pCS2TAL3-DD 플라스미드 벡터와 pCS2TAL3-RR 플라스미드 벡터에 삽입한 다음, 2개 벡터를 각각 5 μ g씩 동시에 세포 내에도입했다. 세포 내 도입 방법은 리포솜 전달 방법 중 하나인 리포펙타민 2000(lipofectamine 2000)을 이용하는 방법과 전기 충격법(electroporation)을 1,250 볼트로 1,000분의 20초 시간 동안 충격 부여 2회 조건으로 각각 이용했다. 형질 도입 96시간 후 세포를 각각 분리한 다음, 흐름 세포 분석 방법(flow cytometry)을 구동시키는 FACS aria를 이용해서 형질 도입 세포 전체 중, 10,000개 세포의 형광 강도를 측정한 후 그래프 상의 곡선으로 산출시켰다(도 9). C-유형의 *FokI* 제한효소 유전자 플라스미드 벡터와 프로브, 탈렌(TALEN)을 각각 형질 도입시킨 세포를 형광 현미경으로 관찰하였다(도 10).

[119]

[120] 내생적 인간 LGALS3BP(렉틴 갈락토스-결합가용성결합결합단백질3) 유전자의 특이적 녹-아웃(knock-out) 분석

[121] 내생적 렉틴 갈락토스-결합가용성결합결합단백질3 유전자(Lectin, GALac-toside-binding, Soluble, 3 Binding Protein, LGALS3BP) 엑손 3번의 디옥시리보핵산 염기서열과 상보적인 염기 26개를 합성하고, 이 디옥시리보핵산 프로브의 말단부에 이디티에이-C2를 결합시켰다(도 11). 그리고 *FokI* 제한효소 이량체 유전자와 다수의 히스티딘 서열을 삽입된 pcDNA3.1 hygro(+) 플라스미드 벡터 5 μ g, 니켈(Ni²⁺) 50mM, DNA 프로브 1 μ M을 인간 대장암 세포주인 에이치티-29(HT-29)에 동시에 도입시켰다. 또한 *FokI* 제한효소 이량체 유전자와 다수의 히스티딘 서열이 삽입된 플라스미드 벡터 5 μ g, 니켈(Ni²⁺) 50mM, DNA 프로브 3 μ M도 인간 대장암 세포주인 에이치티-29(HT-29)에 동시에 도입시켰다. 세포 내 도입 방법은 리포솜 전달 방법 중 하나인 리포펙타민 2000(lipofectamine 2000)을 이용하는 방법과 전기 충격법(electroporation)을 1,600 볼트로 1,000분의 10초 시간 동안 충격 부여 3회 조건으로 각각 이용했다. 형질 도입 96시간 후 세포를 각각 전기 충격법(electroporation)을 이용했다. 형질 도입 48시간 후 지노믹 DNA를 정제하고, LGALS3BP 유전자용 양방향 프라이머를 이용하여 중합 효소 연쇄 반응을 실시했다.

[122] 지노믹 DNA 100ng, 정방향 프라이머 1 μ l, 역방향 프라이머 1 μ l, 증류수 9.5 μ l, Pfu polymerase primix 12.5 μ l를 혼합하여 95°C에서 5분을 반응시키고, 95°C에서 30초, 54°C에서 40초, 72°C에서 1분을 총 30회 반응시킨 후, 72°C에서 7분을 반응시키는 중합효소 연쇄반응을 실시하였다.

[123] FP1 : 5'-tacaagctcagcaggggaga-3' (서열번호 28)

[124] R1 : 5'-ttcgtcttaggggattgcc-3' (서열번호 29)

[125] FP2 : 5'-agatcttctacagaggccag-3'(서열번호 30)

[126] 획득된 중합효소 연쇄반응 산물은 95°C에서 5분을 반응시키고, 1분에 1°C씩 온도를 감소시키는 반응을 91회 동안 실시하였다. 획득된 산물 12 μ l, 제한효소

10x버퍼 2 μ l, T7 제한효소 1x버퍼 0.5 μ l, 증류수 5.5 μ l를 혼합시켜 37°C에서 20분간 반응시키고 12% 폴리아크릴 아마이드 겔에 70 볼트로 전개시켰다(도 12). 중합 효소 연쇄 반응을 통해서 증폭된 산물 중 2개를 선별하여 1.5% 아가로스 겔 상에서 100 볼트로 전개시켜 절단한 후, 그 중에서 DNA만 추출하였다. 추출된 DNA 산물 6.5 μ l, 6x라이게이스 버퍼 1.5 μ l, 피탑 블런트 V2 벡터 DNA 1 μ l를 혼합하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 획득된 산물은 DH5 α 대장균 균주에 형질전환시키고 LB 아가 플레이트에 배양시켰다. 획득된 형질전환 균집들은 LB 배지에 주입시켜 37°C에서 250rpm으로 16시간 동안 배양시켰다. 획득된 산물에서 플라스미드 벡터 DNA를 추출한 다음 염기서열 분석용 프라이머를 이용해서 염기서열을 분석했다(도 14).

[127] M13F(-20) : 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'(서열번호 31)

[128] M13R(-20) : 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'(서열번호 32)

[129] 배양 중인 야생형 에이치티-29 세포와 형질 도입시킨 에이치티-29 세포를 트립신-이디티에이를 이용해서 배양 접시에서 분리시킨 후, NP40(Nonidet-P40) 버퍼로 용해시키고, 2초간 동작 1초간 정지를 총 30초 간 반복하면서 초음파를 가해서 분쇄를 실시했다. 13,000rpm으로 15분 동안 4°C에서 원심분리시키고 상층액만 분리해서 브래드포드 정량법(Bradford assay)을 이용해서 정량하였다. 동일한 농도의 용해물을 각각, 5x버퍼, PBS(Phosphate-Buffered Saline)와 혼합시키고 95°C에서 5분간 반응시킨 후 12% 폴리아크릴 아마이드 겔에 전개시켰다.

[130] PVDF(PolyVinylidene DiFluoride) 막에 100 볼트로 2시간 동안 이동시키고, 스킵 밀크가 5%로 주입된 TBST(Tris-Buffered Saline+Tween20 0.1%) 용액과 혼합시켜 실온에서 2시간 동안 교반하면서 블로킹했다. 1차 항체인 anti-LGALS3BP를 스킵 밀크가 5%로 주입된 TBST(Tris-Buffered Saline+Tween20 0.1%) 용액과 1:1,000 비율로 혼합시키고 PVDF 막을 주입시켜 4°C에서 16시간 동안 교반시켰다. TBST로 10분간 3회 교반 세척을 실시하고, 2차 항체인 anti-mIgG-HRP(mouse Immunoglobulin G-Horse Radish Peroxidase)를 스킵 밀크가 5%로 주입된 TBST(Tris-Buffered Saline+Tween20 0.1%) 용액과 1:2,000 비율로 혼합시키고 PVDF 막을 주입시켜 실온 에서 1시간 동안 교반시켰다. TBST로 10분간 6회 교반 세척을 실시하고 발색 용액을 PVDF 막과 혼합시켜 엑스레이 필름에 노출시켜서 현상기로 인화시켰다(도 15).

[131]

[132] 내생적 쥐 면역 글로불린 G1(Immunoglobulin G1, IgG1) 유전자를 대상으로 하는 녹-인(knock-in) 분석

[133] 쥐에서 항체를 합성시키는데 관여하는 면역 글로불린 G1의 유전자의 당질화 서열을 포함하는 엑손 부분 중 치환시킬 pUC19 공여자 플라스미드 벡터를 제작하였다. 이 플라스미드 벡터 내에 원래 유전자의 당질화 서열에 존재하지 않는 *SacI* 제한효소 인식 서열을 삽입시켰고, 염기서열을 치환시킬 부위에 맞게

DNA 프로브를 합성하고 이디티에이-C2를 결합시켰다(도 17). 그리고 *FokI* 제한효소 이량체 유전자와 다수의 히스티딘 서열이 삽입된 플라스미드 벡터 5 μ g, 니켈(Ni²⁺) 각각 0mM, 5mM, 50mM, DNA 프로브 3 μ M, 공여자 플라스미드 벡터 5 μ g를 쥐 엔아이에이치-3T3(NIH-3T3) 세포에 도입시켰다. 또한 치환 부위에 맞게 탈렌(TALEN) 방법을 이용한 pCS2TAL3-DD와 pCS2TAL3-RR 플라스미드 벡터 2개도 제작하여, 공여자 플라스미드 벡터와 함께 각각 5 μ g씩 쥐 엔아이에이치-3T3(NIH-3T3) 세포에 도입시켰다. 그리고 크리스퍼/카스9 방법을 이용하기 위해 치환 부위에 부합되는 디옥시리보핵산 염기 26개를 제작하여 pSpCas9-GFP 플라스미드 벡터에 삽입시킨 후, 공여자 플라스미드 벡터와 함께 각각 5 μ g씩 쥐 엔아이에이치-3T3(NIH-3T3) 세포에 도입시켰다. 세포 내 도입 방법은 리포솜 전달 방법 중 하나인 리포펙타민 2000(lipofectamine 2000)을 이용하는 방법과 전기 충격법(electroporation)을 1,350 볼트로 1,000분의 20초 시간 동안 충격 부여 2회 조건으로 각각 이용했다. 형질 도입 48시간 후 지노믹 DNA를 정제하였다. 지노믹 DNA 100ng, 정방향 프라이머 1 μ l, 역방향 프라이머 1 μ l, 증류수 9.5 μ l, Pfu polymerase primix 12.5 μ l를 혼합하여 95°C에서 5분을 반응시키고, 95°C에서 20초, 60°C에서 40초, 72°C에서 1분을 총 30회 반응시킨 후, 72°C에서 7분을 반응시키는 중합효소 연쇄반응을 실시하였다.

[134] Knock in-정방향 프라이머 : 5'-GCAGCACCAAAGTGGACAAG-3'(서열번호 33)

[135] Knock in-역방향 프라이머 : 5'-GTGCTGGGTGTGGCAGTGTA-3'(서열번호 34)

[136] 획득된 중합효소 연쇄반응 산물은 95°C에서 5분을 반응시키고, 1분에 1°C씩 온도를 감소시키는 반응을 91회 동안 실시하였다. 획득된 산물 12 μ l, 제한효소 10x버퍼 2 μ l, T7 제한효소 1x버퍼 0.5 μ l, 증류수 5.5 μ l를 혼합시켜 37°C에서 20분간 반응시키고 12% 폴리아크릴 아마이드 겔에 70 볼트로 전개시켰다(도 18).

[137] 그리고 원래 게놈 내 표적 유전자 염기서열에 존재하지 않았던 *SacI* 제한 효소 인식 서열이 공여자 플라스미드 벡터를 통해서 잘 삽입되었는지를 확인하고자, 최종적으로 게놈 내 표적 유전자 부위를 포함할 수 있도록 증폭용 프라이머를 합성해서 중합 효소 연쇄 반응을 실시했다(도 19).

[138] Knock in-정방향 프라이머 : 5'-GCAGCACCAAAGTGGACAAG-3'(서열번호 35)

[139] Knock in-역방향 프라이머 : 5'-GTGCTGGGTGTGGCAGTGTA-3'(서열번호 36)

[140] 추출된 DNA 산물 6.5 μ l, 6x라이게이스 버퍼 1.5 μ l, 피탐 블런트 V2 벡터DNA 1 μ l를 혼합하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 획득된 산물은 DH5 α 대장균 균주에 형질전환시키고 LB 아가 플레이트에 배양시켰다. 획득된 형질전환 균집들은 LB 배지에 주입시켜 37°C에서 250rpm으로 16시간 동안 배양시켰다. 획득된 산물에서 플라스미드 벡터 DNA를 추출한 다음 염기서열 분석용 프라이머를 이용해서 염기서열을 분석했다(도 20).

[141] M13F(-20) : 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'(서열번호 37)

[142] M13R(-20) : 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'(서열번호 38)

[143]

[144] 실시예 1. 핵산 프로브와 *FokI* 제한효소 이량체의 결합 확인

[145] 본 발명자들은 새로운 형태의 만능형 유전자 편집 기술을 개발했으며, 이것은 표적 유전자 서열과 상보적인 서열을 가진 디옥시리보핵산(Deoxyribo Nucleic Acid, DNA) 또는 리보핵산(Ribo Nucleic Acid, RNA) 염기 26개를 합성하여 표적 유전자 인식 물질로 사용함으로써, 생물체 내 특정 염기서열을 매우 특이적으로 인식할 수 있다. 다수의 히스티딘 발현 서열을 포함한 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자를 DNA 벡터 내에 삽입시켜 차후 단백질로 발현됐을 때, 이디티에이-C2 화합물과의 서로 간 배위 결합을 통해 연결시킬 수 있게 만들었다. *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자 사이에는 글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린 연결체(GGGGS linker) 10개를 삽입하고, *FokI* 제한효소 단량체와 다수의 히스티딘 발현 유전자 사이에는 글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린 연결체(GGGGS linker) 3개를 삽입하여 차후에 생체 내에서 단백질로 발현됐을 때, 유연한 운동성을 가질 수 있게 만들었다(도 1).

[146] 그래서 실제로 이 만능형 유전자 편집 기술을 세포주에 적용시키기 위해 디옥시리보핵산 또는 리보핵산 염기 26개의 마지막 염기는 디옥시-티민(deoxy-thymine) 또는 디옥시-우라실(deoxy-uracil)로 합성하고, 이 부위에 이디티에이-C2(EDTA-C2) 화합물을 결합시켰다. 다수의 히스티딘 발현 서열을 포함한 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자를 DNA 벡터 내에 삽입시켜 차후 단백질로 발현됐을 때, 이디티에이-C2 화합물과의 서로 간 배위 결합을 통해 연결시킬 수 있게 만들었다(도 2).

[147] 그리고 핵 위치화 신호(nuclear localization signal, NLS) 유전자를 삽입시켜 생체 세포 내 유전자 발현 벡터를 주입했을 시 단백질로 발현된 후 세포핵 내에 상주하여 게놈에 결합될 수 있게 했다. 또한, 락토미신 결합기(myc epitope) 서열을 같이 삽입시켜 차후 생체 세포 내 단백질 발현 여부를 단백질 면역 흡착 검침법(protein immunoblot, western blot)을 통해 확인할 수 있게 했다(도 3). 단백질의 구조와 운동성, 프로브와의 결합 가능성을 고려해서 2가지 형태인 C-type인 경우와 N-type인 경우를 제작했다.

[148] 또한, 디옥시리보핵산 또는 리보핵산 염기 20개의 마지막 염기에 바이오틴(biotin)을 결합시켜 표적 염기서열 인식 물질로 사용함으로써, 생물체 내 유전체 특정 염기서열을 매우 특이적으로 인식할 수 있다. 그리고 징크핑거 뉴클레아제와 탈렌 기술이 생체 내 유전자 인식 물질을 단백질로 사용함으로써 발생하는 활성 감소 문제를 해결할 수 있다. 테트라벨런트 스트렙트아비딘(tetravalent streptavidin) 또는 모노벨런트 스트렙트아비딘(monovalent streptavidin) 발현 유전자를 포함한 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자를 DNA 벡터 내에 삽입시켜 차후 단백질로 발현됐을 때, 바이오틴과의 서로 간 결합을 통해 연결시킬 수 있게 만들었다. 그리고 핵 위치 신호(nuclear localization signal, NLS) 서열을 삽입시켜 생체 세포 내 유전자 발현

백터를 주입했을 시 단백질로 발현된 후 세포핵 내에 상주하여 게놈에 결합될 수 있게 했다. 또한, 락토마이신 결정기(myf epitope) 서열을 같이 삽입시켜 차후 생체 세포 내 단백질 발현 여부를 단백질 면역 흡착 검침법(protein immunoblot, western blot)을 통해 확인할 수 있게 했다(도 4).

[149]

[150] 실시예 2. 핵산 프로브와 *FokI* 제한효소 이량체의 생체 외 결합 확인

[151] 녹색 형광 단백질 발현 유전자의 개시 코돈부터 3'방향으로 100개까지의 염기와 이와 상보적인 서열을 가지는 염기를 각각 합성한 다음, 중합 효소 연쇄 반응 시 100bp와 70bp 길이의 산물이 형성되게끔 프라이머를 제작하였다. 중합 효소 연쇄 반응 후 형성된 산물을 95°C에서 변성시키고 즉시 급냉시키면 최종적으로 4가지 형태의 DNA가 남게 된다(도 5). 이렇게 얻어진 중합 효소 연쇄 반응 직후의 100bp DNA, 70bp DNA, 그리고 이형 접합체를 형성시킨 직후의 DNA와 37°C에서 4시간 동안 반응시킨 DNA를 각각 아가로스 젤 상에서 전개시켰다. 그 결과 이 2종류의 DNA 모두 이형 접합체를 형성시킨 DNA가 100bp DNA와 70bp DNA 사이에 정확하게 전개되는 것을 확인할 수 있었다(도 6).

[152] 그리고 다수의 히스티딘 발현 서열을 포함한 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자를 대장균 발현 DNA 벡터 내에 삽입시킨 후, 외래 유전자가 삽입되지 않은 대장균 발현 DNA 벡터와 함께 BL21(DE3) 전능성 대장균 세포 내에 각각 형질전환시켰다. 그렇게 해서 획득된 대장균 콜로니(colony)를 액체 배지에 주입시켜 37°C에서 증식시켰다. 흡광도 600nm에서 광학 밀도가 0.4~0.6에 도달했을 때, 0.1mM 농도의 IPTG를 주입시키고, 18°C에서 18시간 동안 증식시켰다. 그렇게 증식된 대장균에 초음파를 가하면서 분쇄를 실시했고 용해물을 획득했다. 이 산물들을 일반 DNA 벡터와 함께 37°C에서 14시간 동안 반응시킨 후 아가로스 젤 전개를 실시한 결과, 일반 제한효소 버퍼와 대장균 발현 DNA 벡터를 형질전환시켜서 획득한 용해물을 일반 DNA 벡터와 반응시킨 산물에서는 절단 DNA가 확인되지 않았다. 반면 다수의 히스티딘 발현 서열을 포함한 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자를 대장균 발현 DNA 벡터를 형질전환시켜서 획득한 용해물을 일반 DNA 벡터와 반응시킨 산물에서는 절편화된 DNA가 확인되어 *FokI* 제한효소 이량체의 활성을 확인할 수 있었다(도 7).

[153] 또한, *FokI* 제한효소 이량체의 표적 특이적인 활성을 확인하기 위해서 녹색 형광 단백질 발현 유전자의 개시 코돈부터 3'방향으로 디옥시리보핵산 염기 26개와 이것과 상보적인 서열을 가지는 염기 26개를 각각 합성하고 말단부에 이디티에이-C2(EDTA-C2)를 결합시켰다. 그리고 다수의 히스티딘 발현 서열을 포함한 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자를 대장균 발현 DNA 벡터를 형질전환시켜서 획득한 용해물을 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)와 이온 교환 크로마토그래피(ion-exchange chromatography)를

거쳐 정제를 실시했다. 이렇게 획득한 단백질과 녹색 형광 단백질 발현 유전자 프로브 2종류, Ni^{2+} , EDTA를 각각 다른 주입 조건으로 선행 실험에서 얻은 4가지 형태(도 5 참조)의 DNA와 37°C에서 14시간 동안 반응시켰다. 아가로스 젤 전개를 실시한 결과, *FokI* 단백질과 Ni^{2+} , 프로브 2를 같이 반응시킨 DNA의 경우에 표적 DNA 부분(P2, P3)이 절단되어서 밴드가 희미해진 것을 관찰할 수 있었다. 또한 *FokI* 단백질과 Ni^{2+} , EDTA, 프로브 2종류를 모두 주입시켜 반응시킨 경우에는 전체 DNA 밴드를 모두 절편화시키는 것을 확인했다. 이로써 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자의 표적 특이적인 활성을 확인할 수 있었다(도 8).

[154]

[155] 실시예 3. 외생적 녹색 형광 단백질 발현 유전자의 특이적 녹-아웃(knock-out) 분석

[156] 녹색 형광 단백질 발현 유전자의 개시 코돈부터 디옥시리보핵산 염기와 리보핵산 염기 18개, 26개, 28개를 각각 합성하고, 이것들과 상보적인 염기서열을 가지는 18개, 26개, 28개를 또한 합성했다. 그리고 이 핵산 프로브의 말단부에 이디티에이-C2를 각각 결합시켰다. 다수의 히스티딘 발현 서열을 포함한 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자를 DNA 벡터 내에 삽입시켜 차후 단백질로 발현됐을 때, 프로브의 말단부에 결합되어 있는 이디티에이-C2 화합물과의 배위 결합을 통해 연결시킬 수 있게 만들었다. 그리고 인간 대장암 세포주인 더블유아이디알(WiDr)에 녹색 형광 단백질 발현 유전자를 도입시킨 다음, 형광 현미경으로 형광 강도를 관찰하면서 강도가 강한 세포들을 선별하는 작업을 반복했다. 그럼으로써 녹색 형광 단백질이 항시 발현될 수 있는 세포를 최종 선별한 다음, 이 세포들에 녹색 형광 단백질 발현 유전자의 프로브 300pM과 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자, 다수의 히스티딘 발현 유전자가 삽입된 발현 벡터 5 μg , 니켈(Ni^{2+}) 500mM을 동시에 도입시켰다. 이때 니켈은 세포 내에서 이디티에이-C2와 결합하는 역할을 한다. 또한 유전자 발현 벡터를 먼저 세포 내에 도입시키고 24시간 후에 녹색 형광 단백질 유전자 프로브를 도입시키기도 했다. 그리고 탈렌(TALEN) 방법과의 비교 실험을 위해서 녹색 형광 단백질 발현 유전자의 개시 코돈부터 20개의 염기서열과 더 3'방향으로 12개 염기서열만큼 더 진행된 시점부터 20개의 염기서열을 선정해서 전사 활성화 유사 인자(TALE) 결합 영역을 각각 조합해서 DNA 벡터에 삽입한 다음 왼쪽과 오른쪽 벡터를 각각 5 μg 씩 동시에 세포 내에 도입했다. 세포 내 도입 방법은 리포솜 전달 방법 중 하나인 리포펙타민 2000(lipofectamine 2000)을 이용하는 방법과 전기 충격법(electroporation)을 각각 이용했다. 형질 도입 96시간 후 세포를 각각 분리한 다음, 흐름 세포 분석 방법(flow cytometry)을 이용해서 형질 도입 세포 전체 중, 일만 개 세포의 형광 강도를 측정한 후 그래프 상의 곡선으로 산출시켰다. 그 결과 C-유형의 *FokI* 제한효소 유전자 발현 벡터와 프로브를 세포 내 도입한 결과는 녹색 형광 발현율이 19% 감소했고, N-유형의 *FokI* 제한효소 유전자 발현 벡터와 프로브를 세포 내 도입한 결과는 녹색 형광 발현율이 5%

감소했다. 그리고 탈렌(TALEN) 방법을 이용한 결과 역시 녹색 형광 발현율이 5% 감소했다(도 9). C-유형의 *FokI* 제한효소 유전자 발현 벡터와 프로브, 탈렌(TALEN)을 각각 형질 도입시킨 세포를 형광 현미경으로 관찰한 결과, 각각 형광 발현이 사라진 세포들을 다수 관찰할 수 있었다(도 10).

[157]

[158] 실시예 4. 내생적 인간 LGALS3BP(렉틴 갈락토스-결합가용성결합단백질3) 유전자의 특이적 녹-아웃(knock-out) 분석

[159] 내생적 렉틴 갈락토스-결합가용성결합단백질3 유전자(Lectin, GALac-toside-binding, Soluble, 3 Binding Protein, LGALS3BP) 엑손 3번의 디옥시리보핵산 염기서열과 상보적인 염기 20개를 합성하고, 이 디옥시리보핵산 프로브의 말단부에 이디티에이-C2를 결합시켰다. 다수의 히스티딘 발현 서열을 포함한 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자를 DNA 벡터 내에 삽입시켜 차후 단백질로 발현됐을 때, 프로브의 말단부에 결합되어 있는 이디티에이-C2 화합물과의 배위 결합을 통해 연결시킬 수 있게 만들었다(도 11).

[160] 그리고 다수의 히스티딘 발현 서열을 포함한 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자가 삽입된 DNA 벡터 5 μ g, 니켈(Ni²⁺) 50mM, DNA 프로브 1 μ M을 인간 대장암 세포주인 에이치티-29(HT-29)에 동시에 도입시켰다. 또한 *FokI* 제한효소 이량체 유전자와 다수의 히스티딘 발현 유전자가 삽입된 DNA 벡터 5 μ g, 니켈(Ni²⁺) 50mM, DNA 프로브 3 μ M도 인간 대장암 세포주인 에이치티-29(HT-29)에 동시에 도입시켰다. 세포 내 도입 방법은 리포솜 전달 방법 중 하나인 리포펙타민 2000(lipofectamine 2000)을 이용하는 방법과 전기 충격법(electroporation)을 각각 이용했다. 형질 도입 48시간 후 지노믹 DNA를 정제하고 LGALS3BP 유전자용 양방향 프라이머를 이용하여 중합 효소 연쇄 반응을 실시했다. 그리고 이형 접합 DNA 형태를 만들고 T7 제한효소 1와 반응시켜 폴리아크릴 아마이드 젤에 전개시켰다. 그 결과 다수의 히스티딘 발현 서열을 포함한 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자가 삽입된 DNA 벡터 5 μ g, 니켈(Ni²⁺) 50mM, DNA 프로브 3 μ M을 동시에 세포 내에 도입시킨 결과에서 절단된 유전자 증폭 산물을 확인했다(도 12).

[161] LGALS3BP 유전자용 양방향 프라이머를 제작해서 중합 효소 연쇄 반응을 실시한 결과, 게놈 내 삽입된 유전자 증폭 산물을 확인했다. 예상 절단 DNA 부위에 LGALS3BP 유전자용 양방향 프라이머를 제작하여 중합 효소 연쇄 반응을 실시한 결과, 다수의 증폭되지 않은 산물을 또한 확인했다(도 13).

[162] 중합 효소 연쇄 반응을 통해서 증폭된 산물 중 2개를 선별하여 DNA 벡터에 결합시켜 염기서열 분석용 프라이머를 이용해서 염기서열을 분석했다. 에이치티-29 세포 내 LGALS3BP 유전자의 대립 유전자(allele)는 총 3개가 존재하는데, 그 3개의 대립 유전자가 모두 특정 염기서열의 결실과 삽입이 이루어진 것을 확인했다(도 14).

[163] 그리고 단백질 면역 흡착 검침법(protein immunoblot, western blot)을 통해서

야생형 에이치티-29 세포와 형질 도입시킨 에이치티-29 세포의 LGALS3BP 유전자의 발현 강도를 확인했는데 야생형 세포는 발현 강도가 강한 반면, 형질 도입된 세포는 전혀 발현이 관찰되지 않은 것을 확인했다. 이로써 특이적인 유전자의 녹-아웃(knock-out)이 잘 이루어진 것을 알 수 있었다(도 15).

- [164] 또한, 내생적 렉틴 갈락토스-결합가용성결합단백질3 유전자(Lectin, GALac-toside-binding, Soluble, 3 Binding Protein, LGALS3BP) 엑손 3번의 디옥시리보핵산 염기서열과 상보적인 염기 20개를 합성하고, 이 디옥시리보핵산 프로브의 말단부에 바이오틴(Biotin)을 결합시켰다. 스트렙트아비딘(streptavidin) 발현 서열을 포함한 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자를 DNA 벡터 내에 삽입시켜 차후 단백질로 발현됐을 때, 프로브의 말단부에 결합되어 있는 바이오틴과의 결합을 통해 연결시킬 수 있게 만들었다(도 4).
- [165] 인간 HT-29 세포 내에 LGALS3BP 유전자 엑손 3번의 디옥시리보핵산 탐침자 4종 각각과, *FokI* 제한 절단 효소 이량체 발현 유전자와 N-타입 모노벤투린 스트렙트아비딘 발현 유전자가 삽입된 플라스미드 벡터를 형질도입시킨 후 도출된 게놈 상 염기서열의 결실, 삽입을 확인한 결과, 바이오틴이 결합된 디옥시리보핵산 탐침자 4종 모두에서 일정 길이의 결실 또는 삽입이 이뤄진 것을 알 수 있었다.
- [166] 인간 LGALS3BP의 엑손 3번의 특이적 핵산 프로브 및 *FokI* 제한효소 이량체를 생체 내에 주입시키면 상기한 바와 같이 DNA의 이중절단이 유도되고 이를 복구하는 과정에서 복구 에러가 발생하여 다양한 형태의 유전자결손이나 첨가현상이 발생하게 된다. 도 16의 (C)는 다양한 형태의 결손(Δ 로 표기)과 첨가(+로 표기)가 나타난 것을 보여주고 있다. 만약 3의 배수(예: 27염기 결손)로 결손이나 첨가가 일어난 경우 유전자의 기능은 보존될 수 있지만, 그렇지 않은 경우는 유전자의 틀이동(frame shift)이 유도되어 유전자 적중(gene targeting)의 결과를 낳게 된다. 이로써 바이오틴-스트렙트아비딘 간 결합을 이용한 유전자 편집기술이 생체 내에서 제대로 작동되는 것을 확인할 수 있었다(도 16).
- [167]
- [168] 실시예 5. 내생적 쥐 면역 글로불린 G1(Immunoglobulin G1, IgG1) 유전자를 대상으로 하는 녹-인(knock-in) 분석
- [169] 쥐에서 항체를 합성시키는데 관여하는 면역 글로불린 G1의 유전자의 당질화 서열을 포함하는 엑손 부분 중 치환시킬 공여자 DNA 벡터를 제작하였다. 이 벡터 내에 원래 유전자의 당질화 서열에 존재하지 않는 *SacI* 제한효소 인식 서열을 삽입시켰고, 이 벡터가 정상적으로 생체 게놈 내에 삽입되면 면역 글로불린 G1에서 정상적으로 당질화가 일어나지 않게 된다. 염기서열을 치환시킬 부위에 맞게 DNA 프로브를 합성하고 이디티에이-C2를 결합시켰다(도 17).
- [170] 다수의 히스티딘 발현 서열을 포함한 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자를

DNA 벡터 내에 삽입시켜 차후 단백질로 발현됐을 때, 프로브의 말단부에 결합되어 있는 이디티에이-C2 화합물과의 배위 결합을 통해 연결시킬 수 있게 만들었다. 그리고 다수의 히스티딘 발현 서열을 포함한 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자가 삽입된 DNA 벡터 5 μ g, 니켈(Ni²⁺) 각각 0mM, 5mM, 50mM, DNA 프로브 3 μ M, 공여자 DNA 벡터 5 μ g를 쥐 엔아이에이치-3T3(NIH-3T3) 세포에 도입시켰다. 또한 치환 부위에 맞게 탈렌(TALEN) 방법을 이용한 DNA 벡터 2쌍도 제작하여, 공여자 DNA 벡터와 함께 각각 5 μ g씩 쥐 엔아이에이치-3T3(NIH-3T3) 세포에 도입시켰다. 그리고 크리스퍼/카스9 방법을 이용하기 위해 치환 부위에 부합되는 디옥시리보핵산 염기 20개를 제작하여 카스9 DNA 벡터에 삽입시킨 후, 공여자 DNA 벡터와 함께 각각 5 μ g씩 쥐 엔아이에이치-3T3(NIH-3T3) 세포에 도입시켰다. 세포 내 도입 방법은 리포솜 전달 방법 중 하나인 리포펙타민 2000(lipofectamine 2000)을 이용하는 방법과 전기 충격법(electroporation)을 각각 이용했다. 형질 도입 48시간 후 지노믹 DNA를 정제하고 쥐 면역 글로불린 G1(Immunoglobulin G1, IgG1) 유전자용 양방향 프라이머를 이용하여 증합 효소 연쇄 반응을 실시했다. 그리고 이형 접합 DNA 형태를 만들고 T7 제한효소 1와 반응시켜 폴리 아크릴 아마이드 젤에 전개시켰다. T7 제한효소 1(T7 endonuclease 1, T7E1)은 완전히 상보적으로 결합되지 않고(mismatch) 와블(wobble)이 형성된 이중결합 DNA를 절단하는 제한효소로서 지노믹 DNA 상의 염기서열 삽입이나 결실을 확인할 때 이용되는 효소이다.

- [171] 그 결과 각각의 절단된 유전자 증폭 산물을 확인했다(도 18). 그리고 원래 게놈 내 표적 유전자 염기서열에 존재하지 않았던 *SacI* 제한효소 인식 서열이 공여자 DNA 벡터를 통해서 잘 삽입되었는지를 확인한 결과, 각각의 절단된 유전자 증폭 산물을 확인했다(도 19). 최종적으로 게놈 내 표적 유전자 부위를 포함할 수 있도록 증폭용 프라이머를 합성해서 증합 효소 연쇄 반응을 실시했다. 증폭된 산물 3개를 벡터 DNA에 결합시켜 염기서열 분석용 프라이머를 이용해서 염기서열을 분석했다. 그 결과 증폭된 산물 3개 모두에서 *SacI* 제한효소 인식 서열이 삽입된 것을 확인했고, 이로써 특이적인 유전자의 녹인(knock-in)이 잘 이루어진 것을 알 수 있었다(도 20).

청구범위

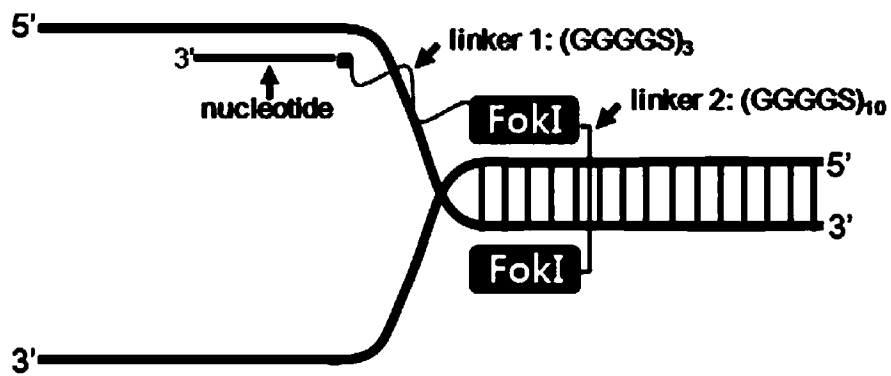
- [청구항 1] (a) 표적 유전자의 염기서열과 상보적인 염기서열 및 상기 상보적인 염기서열에 연결된 단백질 결합 물질을 포함하는 표적 유전자 인식 프로브; 및
(b) 두 개의 *FokI* 제한효소가 서로 연결된 이량체를 코딩하는 유전자 및 상기 단백질 결합 물질과 결합하는 단백질을 코딩하는 유전자가 서로 연결된 채 발현될 수 있도록 삽입된 발현 벡터;를 유효성분으로 함유하는 표적 유전자 특이적 편집용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 (a)의 단백질 결합 물질은 금속 킬레이트제(metal chelating agent) 또는 바이오틴인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 금속 킬레이트제는 이디티에이(EDTA)인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 전이금속을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 전이금속은 Ni^{2+} , Co^{2+} 또는 Zn^{2+} 인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 (b)의 단백질 결합 물질과 결합하는 단백질은 다수의 히스티딘, 테트라벨런트 스트렙트아비딘(tetravalent streptavidin) 또는 모노벨런트 스트렙트아비딘(monovalent streptavidin)인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 (b)의 발현 벡터는 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자, 연결체(linker), 표적 유전자의 염기서열과 상보적인 염기서열에 연결된 단백질 결합 물질과 결합하는 단백질 코딩 유전자 및 핵 위치 신호(nuclear localization signal, NLS) 유전자가 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 연결체는 1개부터 10개까지의 글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린 연결체((GGGGS)₁₋₁₀)인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 발현 벡터는 5'→3' 방향으로 표적 유전자의 염기서열과 상보적인 염기서열에 연결된 단백질 결합 물질과 결합하는 단백질 코딩 유전자, 핵 위치 신호(NLS) 서열, 3개의 글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린 연결체((GGGGS)₃), *FokI* 제한효소 유전자, 10개의 글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린 연결체((GGGGS)₁₀) 및 *FokI* 제한효소 유전자가 작동가능하게 연결되거나; 또는 5'→3' 방향으로 *FokI* 제한효소 유전자, 10개의 글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린 연결체((GGGGS)₁₀), *FokI* 제한효소 유전자, 3개의 글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린

연결체((GGGGS)₃), 핵 위치 신호(NLS) 서열 및 표적 유전자의 염기서열과 상보적인 염기서열에 연결된 단백질 결합 물질과 결합하는 단백질 코딩 유전자가 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 조성물.

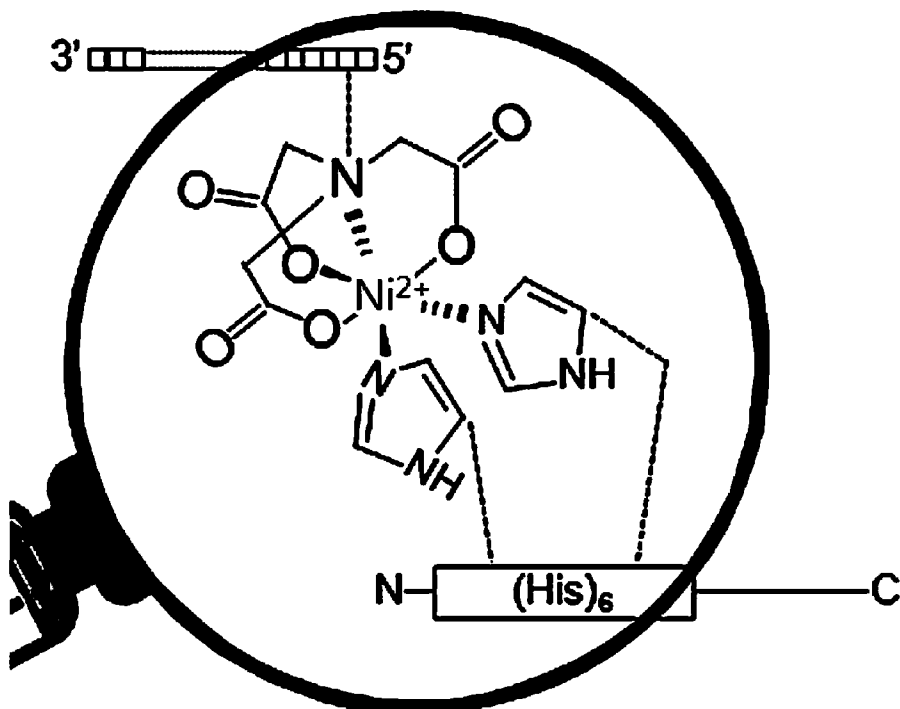
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 핵 위치 신호(NLS) 서열과 3개의 글라이신-글라이신-글라이신-글라이신-세린 연결체((GGGGS)₃) 사이에 myc 항원 결정기(myc epitope) 서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 유전자 특이적 편집은 유전자 결실, 유전자 삽입, 유전자 교정 또는 염색체 재배열인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 12] (a) *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자 및 표적 유전자의 염기서열과 상보적인 염기서열에 연결된 단백질 결합 물질과 결합하는 단백질 코딩 유전자가 삽입된 발현 벡터를 제조하는 단계;
(b) 상기 (a) 단계의 발현 벡터 및 표적 유전자의 염기서열과 상보적인 염기서열 및 상기 상보적인 염기서열에 연결된 단백질 결합 물질을 포함하는 표적 유전자 인식 프로브를 세포 내로 도입하는 단계; 및
(c) 상기 (b) 단계의 세포 내로 도입되어 발현된 *FokI* 제한효소 이량체와 표적 유전자 인식 프로브의 결합을 유도하는 단계를 포함하는 세포 내에서 표적 유전자를 특이적으로 편집하는 방법.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 (b) 단계의 프로브에 포함된 단백질 결합 물질은 금속 킬레이트제(metal chelating agent) 또는 바이오틴인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 금속 킬레이트제는 이디티에이(EDTA)인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 15] 제12항에 있어서, 상기 (a) 단계의 표적 유전자의 염기서열과 상보적인 염기서열에 연결된 단백질 결합 물질과 결합하는 단백질은 다수의 히스티딘, 테트라벨런트 스트렙타아비딘(tetravalent streptavidin) 또는 모노벨런트 스트렙타아비딘(monovalent streptavidin)인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 16] 제12항에 있어서, 상기 (a) 단계의 발현 벡터는 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자, 연결체(linker), 표적 유전자의 염기서열과 상보적인 염기서열에 연결된 단백질 결합 물질과 결합하는 단백질 코딩 유전자 및 핵 위치 신호(nuclear localization signal, NLS) 서열이 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 17] 제12항에 있어서, 상기 (b) 단계의 세포 내로의 도입은 리포솜 전달 방법 또는 전기충격법(electroporation)인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 18] 제12항에 있어서, 상기 세포는 동물 세포, 식물 세포 또는 미생물 세포인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 19] 표적 유전자의 염기서열과 상보적인 염기서열 및 상기 상보적인

염기서열에 연결된 단백질 결합 물질을 포함하는 표적 유전자 인식 프로브; 및 *FokI* 제한효소 이량체 발현 유전자 및 상기 단백질 결합 물질과 결합하는 단백질을 코딩하는 유전자가 삽입된 발현 벡터;를 유효성분으로 함유하는 표적 유전자 특이적 편집용 키트.

[51]

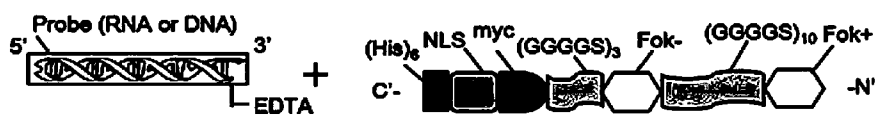


[도2]

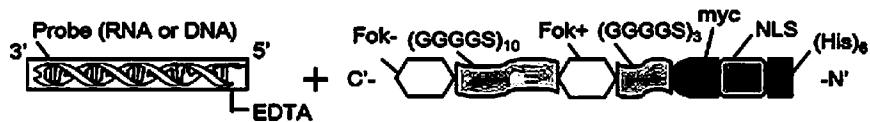


[도3]

C-type

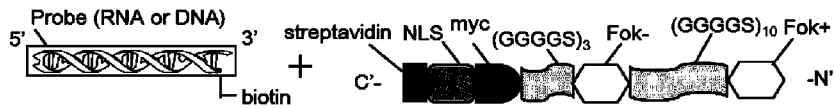


N-type

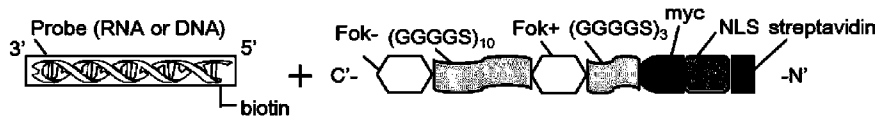


[도4]

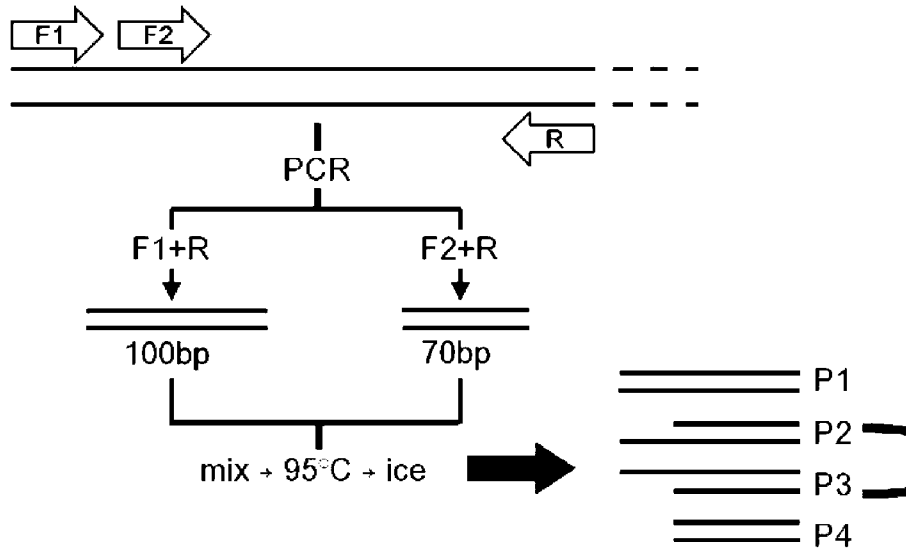
C-type



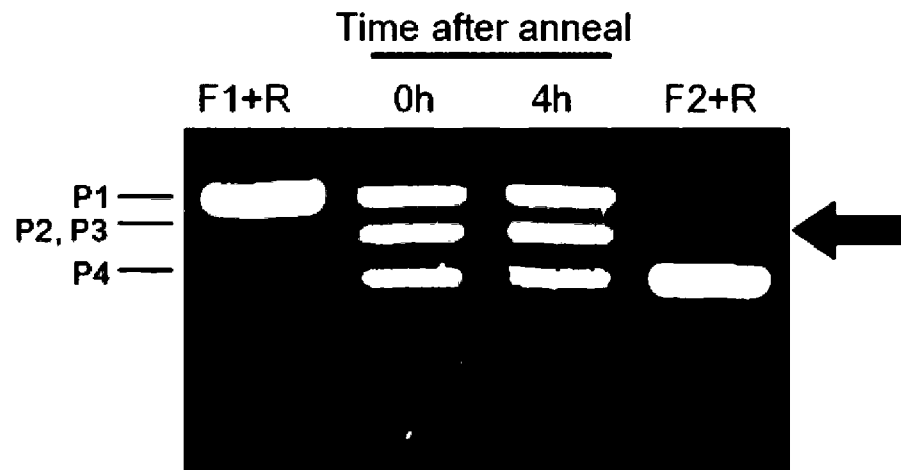
N-type



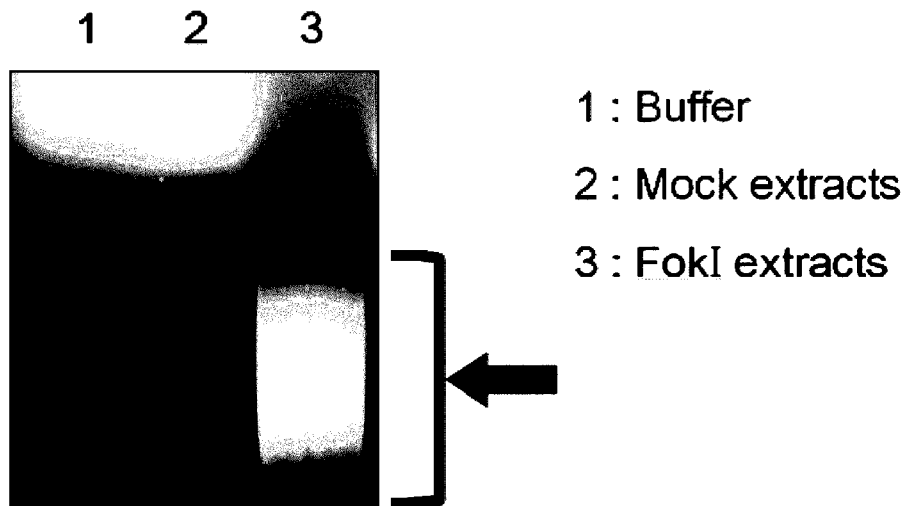
[도5]



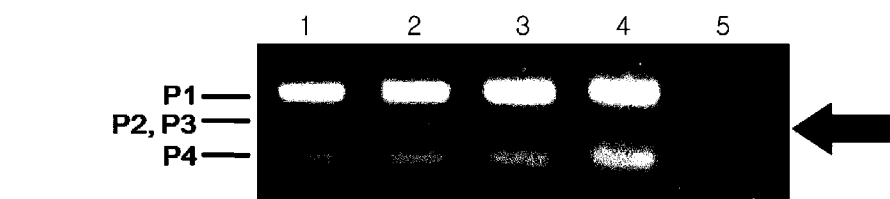
[도6]



[도7]

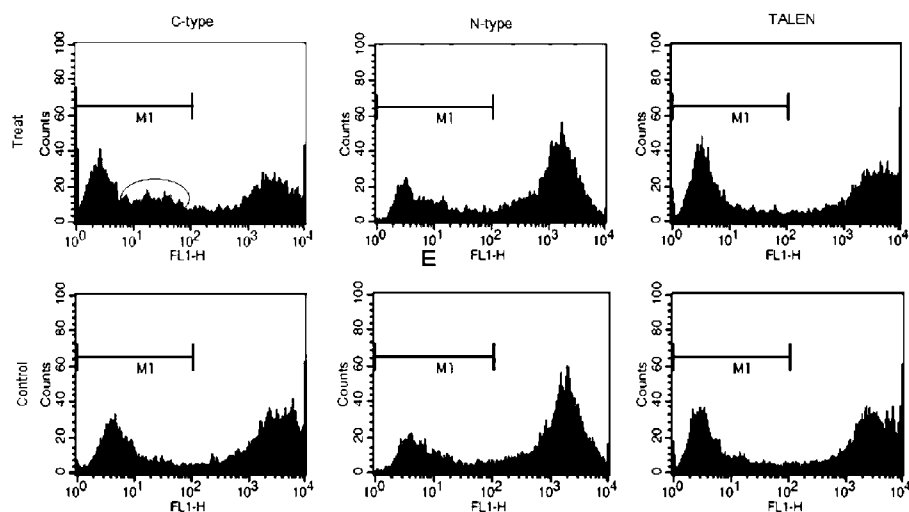


[도8]

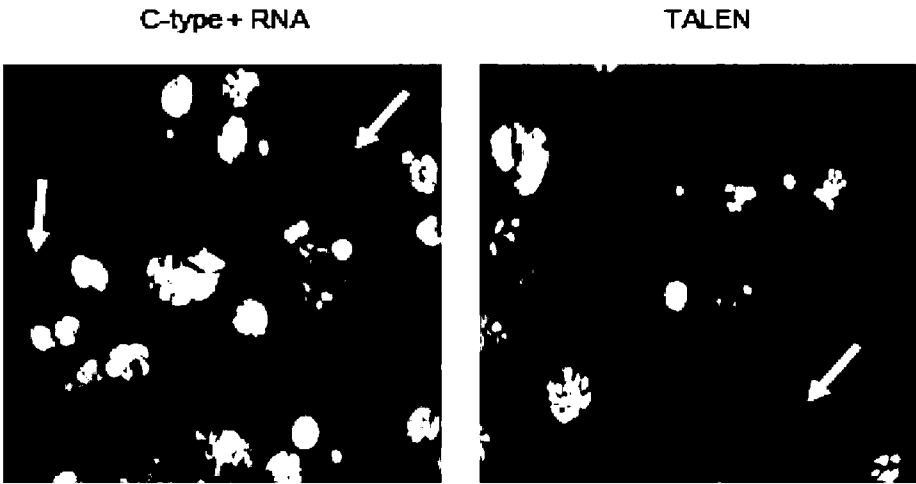


Reagents	1	2	3	4	5
<u>FokI</u>	-	-	+	+	+
Ni ²⁺	+	+	+	+	+
Probe 1	-	-	+	-	+
Probe 2	-	-	-	+	+
EDTA	-	+	-	-	+

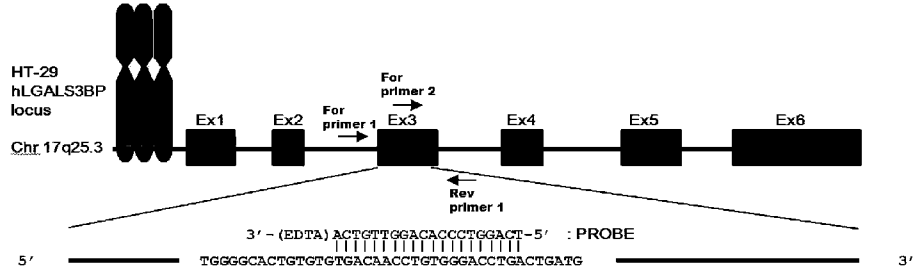
[도9]



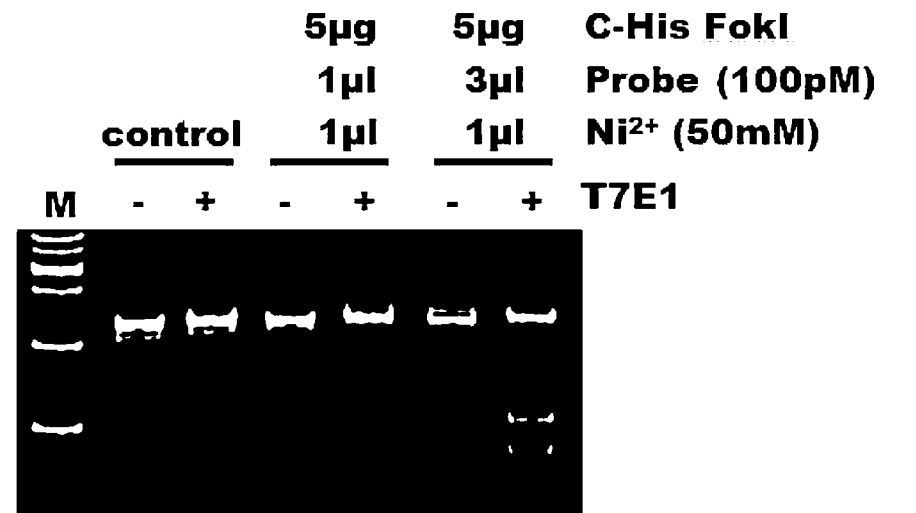
[도10]



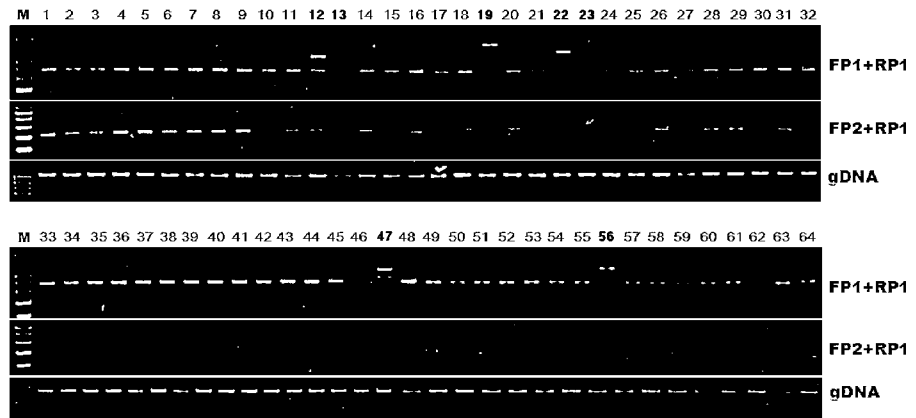
[도11]



[도12]



[도13]

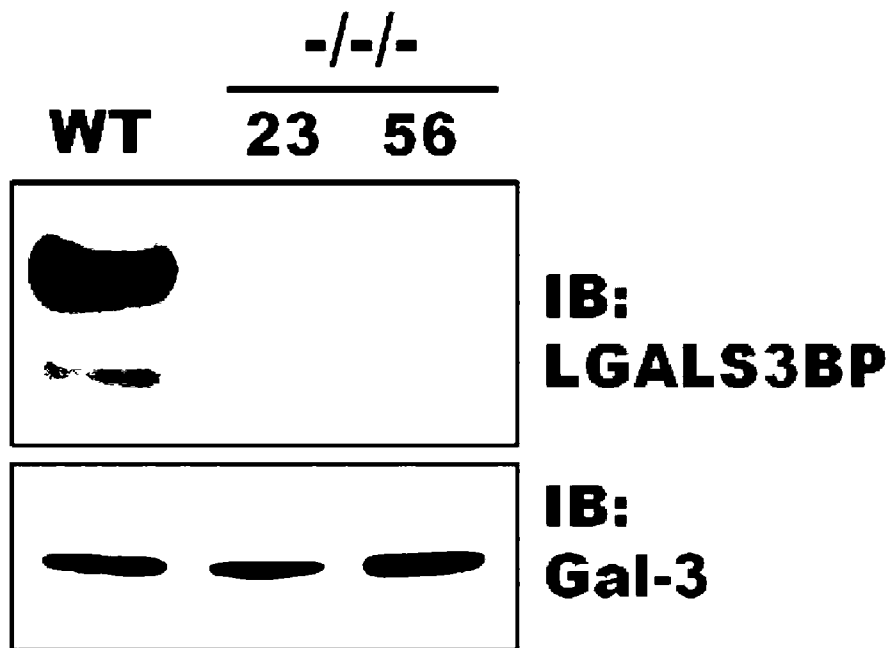


[도14]

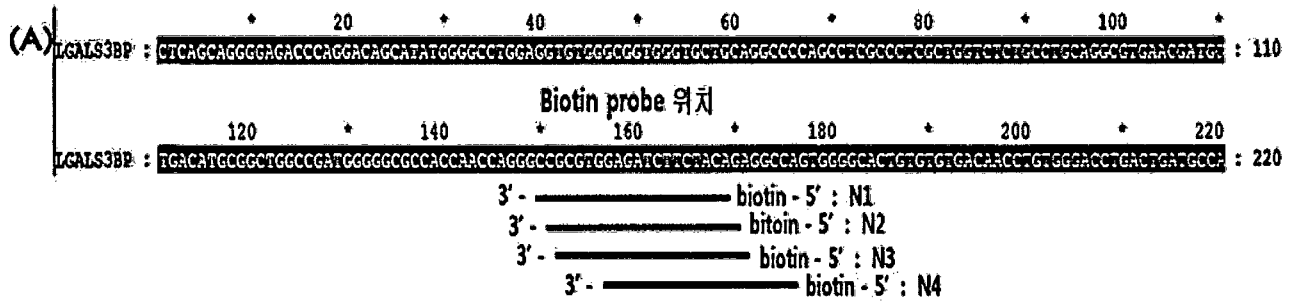
#23 cggcaccacaccaggccgcgtggagatctttcta gaggccagtggggcactgtgtgtgaca (-13)
 ----- (-337+246=-91)
 ----- (-338+527=+189)

#56 cggcaccacaccaggccgcgtggagatctttcta cagagggccagtggggcactgtgtgtgaca (+192)
 ▲
cggcaccacaccaggccgcgtggagatctttctaacagagggccagtggggcactgtgtgtgaca (+1)
 ----- (-339+915=+576)

[도15]



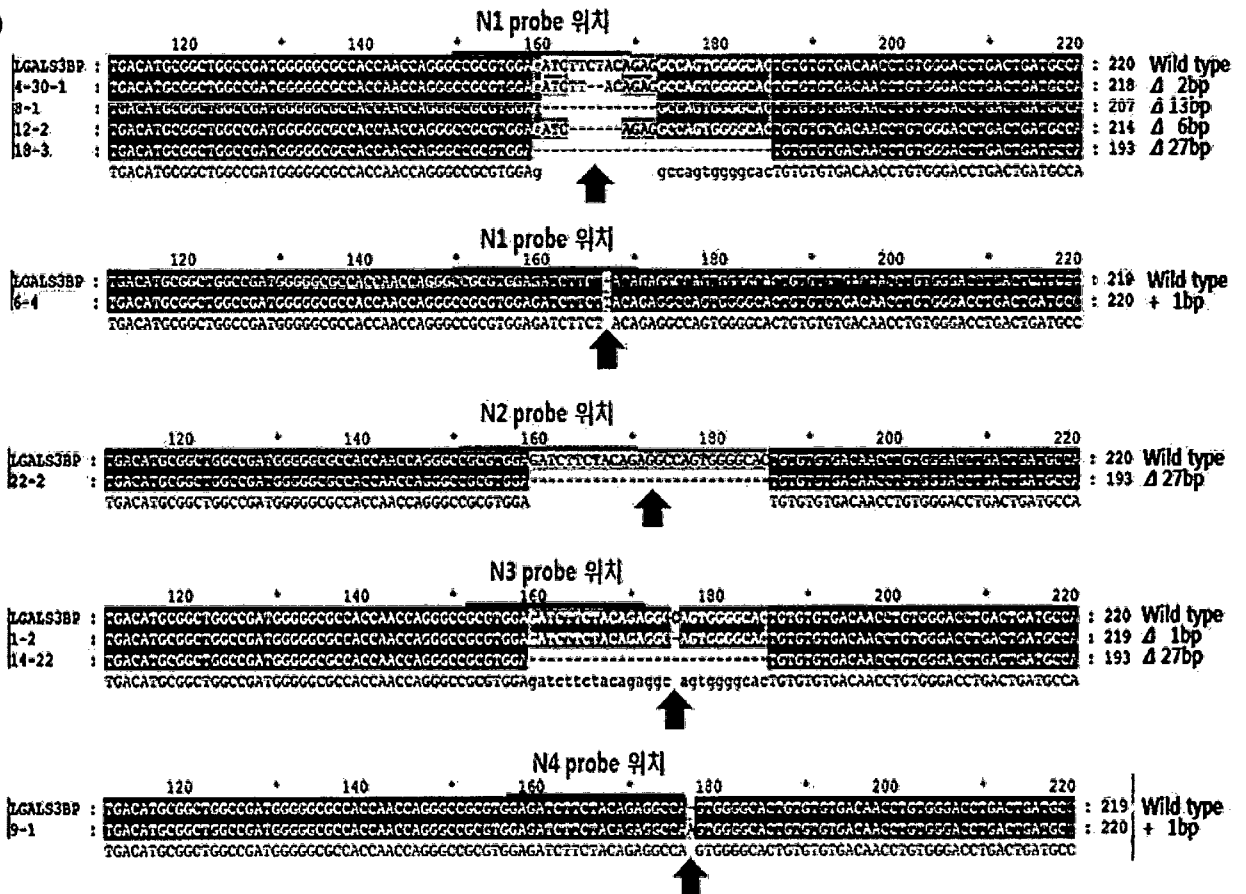
[도 16]



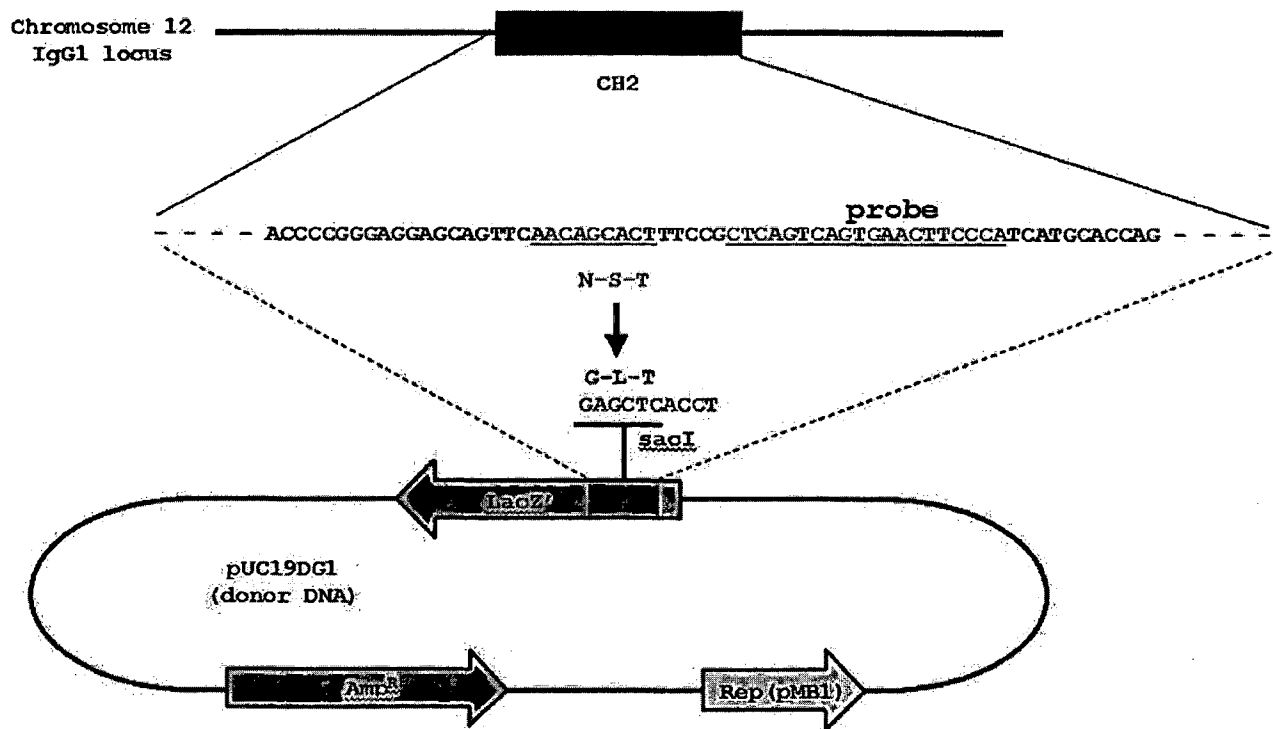
(B)

No.	DNA probe sequence (서열번호)
N1	5' - biotin + TGT AGA AGA TCT CCA CGC GG - 3'(39)
N2	5' - biotin + CTG TAG AAG ATC TCC ACG CG - 3'(40)
N3	5' - biotin + TCT GTA GAA GAT CTC CAC GC - 3'(41)
N4	5' - biotin + TGG CCT CTG TAG AAG ATC TC - 3'(42)

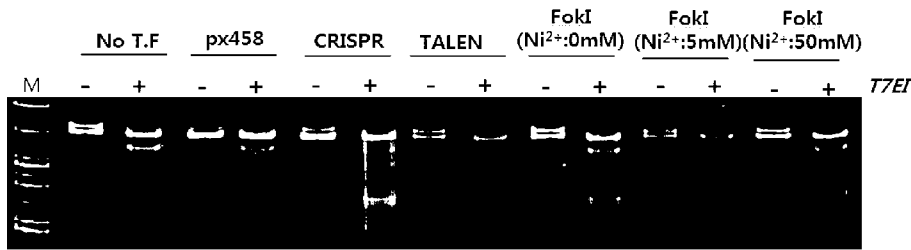
(C)



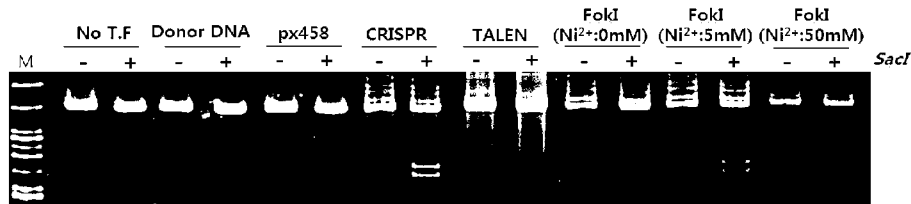
[도 17]



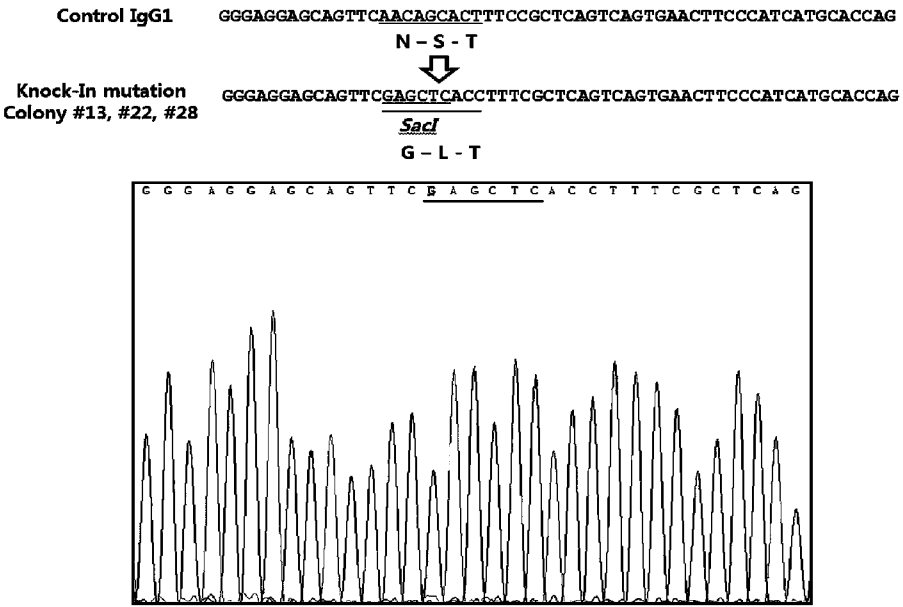
[도18]



[도19]



[도20]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/003020**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 15/63(2006.01)i, C12N 15/66(2006.01)i, C12N 15/10(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/63; C07K 19/00; C12N 5/071; C07K 14/195; C12N 15/11; C12N 15/62; C12N 15/85; C12N 15/66; C12N 15/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: FoxI, restriction enzyme, polymer, vector, genome editing

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TSAL, Shengdar Q. et al., "Dimeric CRISPR RNA-guided FokI Nucleases for Highly Specific Genome Editing", Nature Biotechnology, 25 April 2014, vol. 32, no. 6, pages 569-576 See the entire document.	1-19
A	JEON, Seong Kook et al., "Cleavage of Double-Stranded DNA by Engineered FokI Endonuclease", ACGG 2012 Conference, 2013, p. 113 See abstract.	1-19
A	CN 104357440 A (ZHONGSHAN UNIVERSITY) 18 February 2015 See claims 1-3.	1-19
A	WO 2015-021426 A1 (SAGE LABS, INC.) 12 February 2015 See claims 1, 3 and 5.	1-19
A	US 2013-0196373 A1 (SANGAMO BIOSCIENCES, INC.) 01 August 2013 See claim 1.	1-19



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 JULY 2016 (28.07.2016)

Date of mailing of the international search report

29 JULY 2016 (29.07.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/003020

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
CN 104357440 A	18/02/2015	NONE	
WO 2015-021426 A1	12/02/2015	US 2015-044772 A1	12/02/2015
US 2013-0196373 A1	01/08/2013	AU 2014-340213 A1	29/05/2014
		CA 2854819 A1	23/05/2013
		EP 2780460 A1	24/09/2014
		EP 2780460 A4	26/08/2015
		HK 1200871 A1	14/08/2015
		JP 2015-501637 A	19/01/2015
		WO 2013-074999 A1	23/05/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/63(2006.01)i, C12N 15/66(2006.01)i, C12N 15/10(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/63; C07K 19/00; C12N 5/071; C07K 14/195; C12N 15/11; C12N 15/62; C12N 15/85; C12N 15/66; C12N 15/10

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: FokI, 제한효소, 이량체, 벡터, 유전자 편집

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	TSAL, SHENGDAI Q. 등, 'Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing', Nature Biotechnology, 2014.04.25, 32권, 6호, 페이지 569-576 문서 전체 참조.	1-19
A	JEON, SEONG KOOK 등, 'Cleavage of double-stranded DNA by engineered FokI endonuclease', ACGG 2012 Conference, 2013, p. 113 초록 참조.	1-19
A	CN 104357440 A (ZHONGSHAN UNIVERSITY) 2015.02.18 청구항 1-3 참조.	1-19
A	WO 2015-021426 A1 (SAGE LABS, INC.) 2015.02.12 청구항 1, 3 및 5 참조.	1-19
A	US 2013-0196373 A1 (SANGAMO BIOSCIENCES, INC.) 2013.08.01 청구항 1 참조.	1-19

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 07월 28일 (28.07.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 07월 29일 (29.07.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



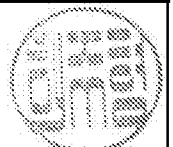
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 104357440 A	2015/02/18	없음	
WO 2015-021426 A1	2015/02/12	US 2015-044772 A1	2015/02/12
US 2013-0196373 A1	2013/08/01	AU 2014-340213 A1	2014/05/29
		CA 2854819 A1	2013/05/23
		EP 2780460 A1	2014/09/24
		EP 2780460 A4	2015/08/26
		HK 1200871 A1	2015/08/14
		JP 2015-501637 A	2015/01/19
		WO 2013-074999 A1	2013/05/23