



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0124652
(43) 공개일자 2022년09월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/63 (2006.01) C12N 15/10 (2017.01)
C12N 15/113 (2010.01) C12N 9/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/63 (2013.01)
C12N 15/102 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0027564
(22) 출원일자 2022년03월03일
심사청구일자 2022년03월03일
(30) 우선권주장
1020210028176 2021년03월03일 대한민국(KR)

(71) 출원인
중앙대학교 산학협력단
서울특별시 동작구 흑석로 84 (흑석동)
(72) 발명자
이상준
경기도 안성시 대덕면 서동대로 4726 시스템생명
공학과
이호중
경기도 안성시 대덕면 서동대로 4726 시스템생명
공학과
김현주
경기도 안성시 대덕면 서동대로 4726 시스템생명
공학과
(74) 대리인
김순용

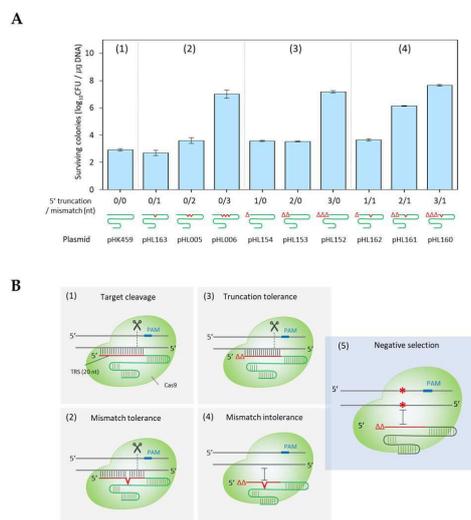
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 유전체 단일염기 편집 방법 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 CRISPR/Cas9 시스템을 기반으로 한 유전체 편집 방법 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드-유도 돌연변이 및 5' -절단(truncated) sgRNA를 이용한 CRISPR 시스템은 표적 DNA에 유의적인 유전체 편집 효과를 달성하는 바, 본 발명의 CRISPR 시스템은 유전자 가위를 이용한 유전자 교정용 조성물, 유전체 수준의 스크리닝, 암을 비롯한 다양한 질병의 치료제, 질병 진단 또는 이미징용 조성물 개발, 형질전환동식물 개발 등의 폭넓은 분야에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 9/22 (2013.01)

C12N 2310/20 (2017.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711132370
과제번호	2021R1A2C1013606
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	병원성 미생물 제어를 위한 CRISPR 기반 박테리오파지 개발
기여율	1/2
과제수행기관명	중앙대학교 산학협력단
연구기간	2021.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395069499
과제번호	PJ015001032021
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	농축산물생산현장의안전관리기술개발(R&D)
연구과제명	농식품에 오염된 시가독소 생산 대장균의 분자진단법 확립과 파지기반 제어법 개발(3공동)
기여율	1/2
과제수행기관명	중앙대학교 산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

표적 DNA에 상보적으로 결합하는 공여 핵산 분자 및 가이드 RNA(guide RNA, gRNA)를 포함하는 CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein 9) 시스템 기반 유전체 편집 방법으로서,

상기 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA의 5'-말단으로부터 1개 내지 3개의 뉴클레오타이드를 결실시키는 단계를 포함하는, CRISPR/Cas9 시스템 기반 유전체 편집 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 가이드 RNA는, 상기 표적 DNA에 상보적인 17 내지 19개의 연속적 뉴클레오타이드로 이루어진 영역을 포함하게 되는 것을 특징으로 하는,

CRISPR/Cas9 시스템 기반 유전체 편집 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 가이드 RNA는 표적 DNA와 혼성화하는 crRNA(CRISPR RNA) 및 tracrRNA (transactivating crRNA)를 포함하는 이중 RNA (dualRNA), 또는 상기 crRNA 및 tracrRNA의 부분을 포함하고 표적 DNA와 혼성화하는 단일-사슬 가이드 RNA (sgRNA)인 것을 특징으로 하는,

CRISPR/Cas9 시스템 기반 유전체 편집 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 표적 DNA는 상기 crRNA 또는 sgRNA와 상보적인 서열의 뉴클레오타이드 및 프로토스페이스어-인접 모티프 (protospacer-adjacent motif, PAM)를 포함하는 것을 특징으로 하는,

CRISPR/Cas9 시스템 기반 유전체 편집 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 공여 핵산 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태인 것을 특징으로 하는,

CRISPR/Cas9 시스템 기반 유전체 편집 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 공여 핵산 분자는 표적 DNA 상에 변형을 유발하는 것을 특징으로 하는, CRISPR/Cas9 시스템 기반 유전체 편집 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 변형은 하나 이상의 뉴클레오타이드의 치환, 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실, 녹아웃(knockout), 녹인(knockin), 내인성 핵산 서열의 상동, 이종상동성(endogenous) 또는 이종 핵산 서열로의 치환, 또는 이의 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는,

CRISPR/Cas9 시스템 기반 유전체 편집 방법.

청구항 8

표적 DNA에 상보적으로 결합하는 공여 핵산 분자 및 가이드 RNA를 포함하는 CRISPR/Cas9 시스템 기반 유전체 편집용 조성물로서,

상기 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA는 이의 5'-말단으로부터 1개 내지 3개의 뉴클레오타이드가 결실된 것을 특징으로 하는

CRISPR/Cas9 시스템 기반 유전체 편집용 조성물.

청구항 9

표적 DNA에 상보적으로 결합하는, 공여 핵산 분자 및 가이드 RNA를 포함하는 CRISPR/Cas9 시스템 기반의 유전체 편집 효율 증가 방법으로서,

상기 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA의 5'-말단으로부터 1개 내지 3개의 뉴클레오타이드를 결실시키는 단계를 포함하는, CRISPR/Cas9 시스템 기반 유전체 편집 효율 증가 방법.

청구항 10

다음 단계를 포함하는, CRISPR/Cas9 시스템 기반의 표적 DNA가 편집된 대상체의 제조 방법:

- (a) 표적 DNA에 상보적으로 결합하고, 표적 DNA 상에 변형을 유발하는 공여 핵산 분자를 제작하는 단계;
- (b) 상기 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA의 5'-말단으로부터 1개 내지 3개의 뉴클레오타이드가 결실된 가이드 RNA를 제작하는 단계;
- (c) 상기 (a) 단계의 공여 핵산 분자 및 상기 (b) 단계의 가이드 RNA를, 편집시키고자 하는 대상체에 주입시켜 대상체의 표적 DNA를 편집하는 단계.

청구항 11

제10항의 표적 DNA가 편집된 대상체의 제조 방법에 의해 제조된, 표적 DNA가 편집된 대상체.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 CRISPR/Cas9 시스템의 불일치 불허용(mismatch intolerance)을 기반으로 한 유전체의 단일염기 편집

[0001]

방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR-associated) 시스템은 박테리오파지 등의 외래 DNA에 감염된 후 생존한 미생물이 감염되었을 시 DNA 서열의 일부를 잘라내어 자신의 유전체에 저장해두었다 비슷한 서열의 외래 DNA에 재감염 되었을 때 그를 인식하고 이중가닥 절단을 유발하여 자신을 보호하는 미생물의 적응 면역 체계이다. CRISPR/Cas 시스템은 끊임없이 돌연변이를 통하여 진화하는 박테리오파지에 대응하는 면역체계로 진화하면서 표적 DNA 서열과 sgRNA의 표적 인식 서열이 완전히 일치하지 않더라도 표적 DNA에 이중 가닥 절단을 유발하는 미스매치 허용(mismatch tolerance)를 가지게 되었고, 이로 인해 유전체의 복잡성(complexity)이 높은 진핵 시스템(eukaryotic system)에서는 원치 않은 부위를 표적으로 인식하여 이중가닥 절단이 일어나는 off-target effect가 문제로 작용하였다.
- [0004] CRISPR/Cas 시스템은 표적 DNA를 인식하는 가이드 RNA와, 가이드 RNA를 매개로 표적에 근접하여 이중가닥 절단을 일으키는 뉴클레아제(nuclease) 활성을 가진 Cas 단백질로 기능이 모듈화되어 있다. CRISPR/Cas 시스템이 표적 부위에 이중 가닥 절단을 유발하기 위해서는 sgRNA와 표적 DNA 간의 base pairing이 선행되어야 하므로 유전체 편집 도구로써 CRISPR/Cas 시스템이 활용되기 위해서는 sgRNA의 디자인이 가장 중요한 부분이다. 유전체 편집 도구로써 CRISPR/Cas 시스템의 최우선 과제는 표적 DNA에 대한 특이성을 높이는 것이고, 이를 위해 sgRNA의 디자인을 최적화하는 것이 가장 손쉬운 방법으로 생각되고 있다.
- [0005] 많은 CRISPR/Cas 시스템들이 미생물뿐 아니라 진핵생물의 유전체 편집에도 널리 이용되고 있기 때문에 다른 부위에는 이중가닥 절단이 일어나지 않으면서 표적 부위에만 이중 가닥 절단을 유발하는 정확성이 중요하므로, CRISPR/Cas 시스템의 불일치 허용을 줄이기 위해 표적 DNA에 대한 CRISPR/Cas 시스템의 특이성을 높이는 등의 연구가 진행되어 왔다.
- [0006] 그러나, 대부분이 NHEJ에 의한 무작위 돌연변이 도입을 기반으로 하여 정교함이 다소 떨어지는 문제가 존재한다.
- [0007] 따라서, 종래 유전체 편집 방법의 정교함을 보완하고, 디자인이 간단하며 범용적으로 사용가능하여 미생물을 포함한 목적 대상의 유전체를 자유자재로 용이하고 효율적으로 편집할 수 있는 CRISPR/Cas9 유전자자위의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) US 2020/0071730 A1
(특허문헌 0002) 대한민국 10-2020-0177636

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) Fu YF, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK. 2014. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. Nat Biotechnol 32: 279-284.
- (비특허문헌 0002) Kim H, Lee WJ, Oh Y, Kang SH, Hur JK, Lee H, Song W, Lim KS, Park YH, Song BS et al. 2020. Enhancement of target specificity of CRISPR-Cas12a by using a chimeric DNA-RNA guide. Nucleic Acids Res 48: 8601-8616.
- (비특허문헌 0003) Li P, Kleinstiver BP, Leon MY, Prew MS, Navarro-Gomez D, Greenwald SH, Pierce EA, Joung JK, Liu Q. 2018. Allele-Specific CRISPR-Cas9 Genome Editing of the Single-Base P23H Mutation for Rhodopsin-Associated Dominant Retinitis Pigmentosa. CRISPR J 1: 55-64.
- (비특허문헌 0004) Park HM, Liu H, Wu J, Chong A, Mackley V, Fellmann C, Rao A, Jiang F, Chu H,

Murthy N et al. 2018. Extension of the crRNA enhances Cpf1 gene editing in vitro and in vivo. Nat Commun 9: 3313.

(비특허문헌 0005) Zhang X, Xu L, Fan R, Gao Q, Song Y, Lyu X, Ren J, Song Y. 2018. Genetic editing and interrogation with Cpf1 and caged truncated pre-tRNA-like crRNA in mammalian cells. Cell Discov 4: 36.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 상술한 상황 하에서, 본 발명자들은 CRISPR/Cas9 시스템을 기반으로 하여 목적 대상의 유전체를 단일 염기 수준으로 정교하게 편집할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 이에, 본 발명자들은, 표적 DNA의 5'-말단의 뉴클레오타이드를 결실시킨 5'-절단(truncated) sgRNA를 포함하는 CRISPR/Cas9 시스템에, 표적 DNA에서 단일 염기 불일치를 가지는 염기 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드로 위치 유도 돌연변이를 도입하였고, 그 결과, 상기 표적 DNA와 상동성을 갖는 상기 가이드 5'-절단(truncated) sgRNA에서 5'-말단의 2 개 뉴클레오타이드가 결실(제거)되면 CRISPR/Cas9 시스템이 단일염기 불일치를 구분하는 불일치 불허용 (mismatch intolerance)를 보여 이를 이용한 대장균 유전체의 단일 염기 편집(교정) 효율과 정확도가 크게 향상되었음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하였다.
- [0012] 따라서, 본 발명의 일 목적은 CRISPR/Cas9 시스템 기반 유전체 편집 방법을 제공하는 데 있다.
- [0013] 또한, 본 발명의 다른 목적은 CRISPR/Cas9 시스템 기반 유전체 편집용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0014] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 CRISPR/Cas9 시스템 기반의 유전체 편집 효율 증가 방법을 제공하는 데 있다.
- [0015] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 CRISPR/Cas9 시스템 기반의 표적 DNA가 편집된 대상체의 제조 방법을 제공하는 데 있다.
- [0016] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 CRISPR/Cas9 시스템 기반의 표적 DNA가 편집된 대상체의 제조 방법에 의해 제조된, 표적 DNA가 편집된 대상체를 제공하는 데 있다.
- [0018] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0020] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0021] 또한, 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시 예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0022] 본 명세서에서 사용되는 용어 "핵산 서열", "뉴클레오타이드 서열" 및 "폴리뉴클레오타이드 서열"은, 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드, 및 이의 단편 또는 일부, 및 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있는 게놈 또는 합성 기원의 DNA 또는 RNA를 의미하고, 센스 또는 안티센스 가닥을 나타낸다.

- [0024] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0026] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 표적 DNA에 상보적으로 결합하는 공여 핵산 분자 및 가이드 RNA(guide RNA, gRNA)를 포함하는 CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein 9) 시스템 기반 유전체 편집 방법을 제공하며, 상기 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA의 5'-말단으로부터 1개 내지 3개의 뉴클레오타이드를 결실시키는 단계를 포함한다.
- [0027] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "편집한다", "편집하는" 또는 "편집된"은 특정 게놈 표적을 선택적으로 결실 시키거나, 외부로부터 공급된 DNA 주형을 사용하여 새로운 특정 서열을 포함시킴으로써 폴리뉴클레오타이드의 핵산 서열(예를 들면, 야생형 천연 생성 핵산 서열 또는 돌연변이된 천연 생성 서열)을 변경시키는 방법을 의미한다. 이러한 특정 게놈 표적은 염색체 영역, 미토콘드리아 DNA, 유전자, 프로모터, 오픈 리딩 프레임 또는 임의의 핵산 서열을 포함하나, 이들로 한정되지 않을 수 있다.
- [0028] 본 명세서에서 용어 "유전체 교정(genome editing)"은, 특별한 언급이 없는 한, 표적 DNA의 표적 부위에서의 Cas9 절단에 의한 핵산 분자의 결실, 삽입, 치환 등에 의하여 유전자 기능을 편집, 회복, 수정, 상실 및/또는 변경시키는 것을 의미한다.
- [0029] 본원에서 사용된 용어 "결실시킨다", "결실된", "결실시키는" 또는 "결실"은 하나 이상의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기가 부재(제거)하거나 부재하게 되는, 각각 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열에서의 변화로서 정의될 수 있다.
- [0030] 바람직하게는, 본 발명에서 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA의 5'-말단으로부터 1개 내지 3개의 뉴클레오타이드가 결실된(5'-절단(truncated)) 가이드 RNA는, 상기 표적 DNA에 상보적인 17 내지 19개의 연속적 뉴클레오타이드로 이루어진 영역을 포함하게 되며, 이러한 절단된 가이드 RNA가 오히려 CRISPR 시스템의 편집 효과를 향상시키는 것을 특징으로 한다.
- [0031] 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 한, 결실된 뉴클레오타이드의 수는 제한되지 않으나, 바람직하게는, 결실된 뉴클레오타이드의 수는 1 내지 10개, 보다 바람직하게는 1 내지 5개, 보다 더욱 바람직하게는 1 내지 3개, 보다 더욱 더 바람직하게는 1 내지 2개, 가장 바람직하게는 2개이다.
- [0032] 또한, 가이드 RNA 상의 결실된 뉴클레오타이드는 연속적 또는 불연속적으로 위치할 수 있다.
- [0033] 본 발명에 따르면, 본 발명의 가이드 RNA, 즉, 5'-절단(truncated) 가이드 RNA 상의 결실되는 뉴클레오타이드의 위치는, 가이드 RNA 상의 5'-말단으로부터 1 개 내지 3개의 뉴클레오타이드가 이격된 바로 근접한 부위에 위치할 수 있다.
- [0034] 본 명세서에서 5'-절단(truncated) 가이드 RNA 상의 결실된 뉴클레오타이드 위치를 언급하면서 사용되는 용어 "바로 근접한(immediately adjacent)"은, 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA 상의 5'-말단 방향으로 인접(juxtaposition)한, 즉, 1 개 뉴클레오타이드만큼 이격된 부위에 위치하는 것을 의미한다.
- [0035] 용어 "가이드 RNA"는 표적 DNA에 특이적인 RNA로, Cas 단백질과 복합체를 형성할 수 있고, Cas 단백질을 표적 DNA에 가져오는 RNA를 말한다.
- [0036] 상기 가이드 RNA는 표적 DNA와 혼성화하는 crRNA(CRISPR RNA) 및 tracrRNA (transactivating crRNA)를 포함하는 이중 RNA (dualRNA), 또는 상기 crRNA 및 tracrRNA의 부분을 포함하고 표적 DNA와 혼성화하는 단일-사슬 가이드 RNA (sgRNA)일 수 있고, 본 발명의 일 실시예에서 상기 가이드 RNA는 sgRNA이다.
- [0037] 상기 가이드 RNA가 crRNA 및 tracrRNA의 필수적인 부분 및 표적과 상보적인 부분을 포함한다면, 어떠한 가이드 RNA라도 본 발명에 사용될 수 있다.
- [0038] 상기 crRNA는 표적 DNA와 혼성화될 수 있다.
- [0039] 가이드 RNA는 RNA의 형태 또는 가이드 RNA를 암호화하는 DNA의 형태로 세포 또는 유기체에 전달될 수 있다. 또한, 가이드 RNA는 분리된 RNA의 형태, 바이러스 벡터에 포함되어 있는 RNA, 또는 벡터에 암호화되어있는 형태일 수도 있다. 바람직하게, 상기 벡터는 바이러스 벡터, 플라스미드 벡터, 또는 아그로박테리움 (agrobacterium) 벡터일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0040] 본 발명에서 CRISPR/Cas9 시스템 기반 유전체 편집을 언급하면서 사용되는 용어 "5'-절단(truncated) 가이드 RNA"는 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA의 5'-말단으로부터 1개 내지 3개의 뉴클레오타이드가 결실된 crRNA를 포함하는 sgRNA로서, 본 명세서에서 5'-truncated sgRNA와 혼용하여 사용된다.
- [0041] 본 발명에서 CRISPR/Cas9 시스템 기반 유전체 편집을 언급하면서 사용되는 용어 "공여 핵산 분자" 또는 "공여체 핵산 서열"은 표적 DNA에 삽입하고자 하는 목적의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 천연의 또는 변형된 폴리뉴클레오타이드, RNA-DNA 키메라, 또는 DNA 단편, 또는 PCR 증폭된 ssDNA 또는 dsDNA 단편 또는 이의 유사체를 지칭한다.
- [0042] 이러한 공여 핵산 분자는 표적 DNA 상에 변형을 유발하여 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 한, 임의의 형태, 예컨대, 단일-가닥 및 2중-가닥 형태를 포함할 수 있다.
- [0043] 상기 표적 DNA 상의 변형은 임의의 목적 위치에서의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 치환, 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실, 녹아웃(knockout), 녹인(knockin), 내인성 핵산 서열의 상동, 이종상동성(endogenous) 또는 이종 핵산 서열로의 치환, 또는 이의 조합을 포함할 수 있다.
- [0044] 본 발명에서, 바람직하게는, 상기 표적 DNA 상의 변형은 야생형 DNA 서열에서 하나 이상의 뉴클레오타이드의 치환에 의해 점 돌연변이가 도입(유도)된 것이고, 이러한 점 돌연변이의 도입은 예컨대, 올리고뉴클레오타이드에 의한 것이다.
- [0045] 본 명세서에서 사용된 용어 "혼성화(hybridization)"는 상보적인 단일 가닥 핵산들이 이중-가닥 핵산을 형성하는 것을 의미한다. 혼성화는 2 개의 핵산 가닥 간의 상보성이 완전할 경우(perfect match) 일어나거나 또는 일부 미스매치(mismatch) 염기가 존재하여도 일어날 수 있다.
- [0046] 본원에서 사용된, 용어 "Cas 단백질"은 CRISPR/Cas 시스템에서 필수적인 단백질 요소를 의미하고, CRISPR RNA (crRNA) 및 트랜스-활성화 crRNA (trans-activating crRNA, tracrRNA)로 불리는 두 RNA와 복합체를 형성할 때, 활성 엔도뉴클레아제 또는 니카아제 (nickase)를 형성한다.
- [0047] Cas 유전자 및 단백질의 정보는 국립생명공학정보센터 (national center for biotechnology information, NCBI)의 GenBank에서 구할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. Cas 단백질을 암호화하는 CRISPR-연관 (CRISPR-associated, cas) 유전자는 종종 CRISPR-반복 스페이스 배열(CRISPR repeat-spacer array)과 관련된다. CRISPR-Cas 시스템은 두 개의 class와 여섯 개의 type이 존재하며, 이들 중에서, Cas9 단백질 및 crRNA 및 tracrRNA를 수반하는 type Ⅰ 시스템이 대표적으로 잘 알려져 있다.
- [0048] 상기 표적 DNA는 상기 crRNA 또는 sgRNA와 상보적인 서열의 뉴클레오타이드 및 프로토스페이스-인접 모티프 (protospacer-adjacent motif, PAM)를 포함한다.
- [0049] 상기 올리고뉴클레오타이드는 표적 DNA의 프로토스페이스-인접 모티프(protospacer-adjacent motif, PAM)를 포함한다.
- [0050] 상기 PAM은 5'-NGG-3' 트리뉴클레오타이드 (trinucleotide)이다.
- [0051] 종래 기술인 돌연변이 유발 올리고뉴클레오타이드를 세포에 삽입하면, DNA를 복제하는 과정에서 낮은 수율로 돌연변이가 도입될 뿐이었다. 종래 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하는 경우에도 CRISPR/Cas9의 불일치 허용으로 인해 단일 염기 점 돌연변이를 도입하는데 어려움이 있었다.
- [0052] 이에, 상술한 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명자들은 표적 DNA의 5'-말단의 뉴클레오타이드를 결실시킨 5'-절단(truncated) sgRNA를 포함하는 CRISPR/Cas9 시스템에, 표적 DNA에서 단일 염기 불일치를 가지는 염기 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드로 위치 유도 돌연변이를 도입하였다.
- [0053] 그 결과, 상기 표적 DNA와 상동성을 갖는 상기 가이드 5'-절단(truncated) sgRNA에서 5'-말단의 2 개 뉴클레오타이드가 결실되면 CRISPR/Cas9 시스템이 단일염기 불일치를 구분하는 불일치 불허용 (mismatch intolerance)를 보여 이를 이용한 유전체의 단일 염기 편집(교정) 효율 및 정확도가 크게 향상되는 효과를 달성함을 규명하였다.
- [0054] 따라서, 본 발명의 방법은 단일 염기 돌연변이를 도입하여 목적 대상체의 유전체를 효과적으로 단일 염기 단위로 정교하게 편집할 수 있음을 입증한다.

- [0056] 또한, 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 표적 DNA에 상보적으로 결합하는 공여 핵산 분자 및 가이드 RNA를 포함하는 CRISPR/Cas9 시스템 기반 유전체 편집용 조성물을 제공하며, 상기 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA는 이의 5'-말단으로부터 1개 내지 3개의 뉴클레오타이드가 결실된 것이다.
- [0057] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 CRISPR-Cas9 시스템에서 표적 유전자를 인식하나 선택된 표적 DNA 서열보다 1개 내지 3개의 뉴클레오타이드가 결실된 가이드 RNA를 발현할 수 있는 구조물을 포함하며, 가이드 RNA 및 공여 DNA(예컨대, 올리고뉴클레오타이드)가 동시에 세포 내로 전달되고, Cas9 단백질에 의한 표적 DNA의 절단 시 공여 DNA를 통해 표적 DNA 대신 돌연변이 서열을 포함하는 공여 DNA가 유전체 내에 포함되어 표적 DNA의 치환 돌연변이 효율을 높일 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [0058] 본 발명의 조성물은 상술한 본 발명의 방법을 이용하므로, 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재 생략한다.
- [0060] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 표적 DNA에 상보적으로 결합하는, 공여 핵산 분자 및 가이드 RNA를 포함하는 CRISPR/Cas9 시스템 기반의 유전체 편집 효율 증가 방법을 제공하며, 상기 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA의 5'-말단으로부터 1개 내지 3개의 뉴클레오타이드를 결실시키는 단계를 포함한다.
- [0061] 본 발명의 방법은 상술한 방법을 이용하므로, 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재 생략한다.
- [0063] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는, CRISPR/Cas9 시스템 기반의 표적 DNA가 편집된 대상체의 제조 방법을 제공한다:
- [0064] (a) 표적 DNA에 상보적으로 결합하고, 표적 DNA 상에 변형을 유발하는 공여 핵산 분자를 제작하는 단계;
- [0065] (b) 상기 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA의 5'-말단으로부터 1개 내지 3개의 뉴클레오타이드가 결실된 가이드 RNA를 제작하는 단계;
- [0066] (c) 상기 (a) 단계의 공여 핵산 분자 및 상기 (b) 단계의 가이드 RNA를, 편집시키고자 하는 대상체에 주입시켜 대상체의 표적 DNA를 편집하는 단계.
- [0067] 또한, 본 발명의 상기 CRISPR/Cas9 시스템은 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 한, 당업계에 공지된 임의의 선별마커를 이용할 수 있다.
- [0068] 본 발명의 대상체는, 본 발명의 방법을 적용할 수 있는 한, 제한되지 않으나, 바람직하게는 플라스미드, 바이러스, 원핵 세포, 분리된 진핵 세포 또는 인간을 제외한 진핵 유기체일 수 있다.
- [0069] 상기 진핵 세포는 효모, 곰팡이, 식물, 곤충, 양서류, 포유동물 등의 세포일 수 있고, 예를 들어, 당업계에서 일반적으로 사용되는 인 비트로에서 배양된 세포, 이식된 세포, 일차 세포 배양, 인 비보 세포, 인간을 포함하는 포유 동물의 세포일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0070] 상기 Cas9 단백질을 암호화하는 핵산 또는 Cas9 단백질은 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 한, 임의의 것도 이용할 수 있으나, 바람직하게는 스트렙토코커스 속 (genus *Streptococcus*)으로부터 유래한 것이다.
- [0072] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 표적 DNA가 편집된 대상체의 제조 방법에 의해 제조된, 표적 DNA가 편집된 대상체를 제공한다.
- [0073] 본 발명은 목적 대상의 유전체를 단일 염기 단위로 편집, 수선하는 방법에 관한 것으로서, 목표 유전자에 변이가 일어난 목적 대상, 예컨대, 미생물 균주들의 유전체를 올바르게 수선하거나, 코돈의 변화 등을 유발함으로써 유용 물질 등의 생산능을 최적화시킨 균주를 제작하는 방법을 제공하는 효과가 있다.

발명의 효과

[0075] 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드-유도 돌연변이 및 5' -절단(truncated) sgRNA를 이용한 CRISPR 시스템은 표적 DNA에 유의적인 유전체 편집 효과를 달성하였으므로, 본 발명의 CRISPR 시스템은 유전자 가위를 이용한 유전자 교정용 조성물, 유전체 수준의 스크리닝, 암을 비롯한 다양한 질병의 치료제, 질병 진단 또는 이미징용 조성물 개발, 형질전환동식물 개발 등의 폭넓은 분야에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0077] 도 1은 다양한 길이의 불일치 또는 5' -말단 결실 가이드 RNA를 이용한 CRISPR/Cas9의 음성선택 후 콜로니 생성 단위 (Colony Forming Unit)를 그래프로 나타낸 것(도 1A)과 상기 (1) 내지 (4) 실험군 제조에 대한 불일치 불허용 (mismatch intolerance) 개념도(도 1B)를 나타낸 것이다.

도 2는 불일치 불허용을 이용한 5' -절단(truncated) sgRNA/Cas9 음성 선택을 통해 *galk*, *xyIB* 유전자 별 단일 염기 편집 효율 (Editing efficiency) 확인 실험 방법(도 2A) 및 이에 따른 결과를 콜로니 생성 단위 (Colony Forming Unit) 그래프(도 2B)로 나타낸 것이다.

도 3은 5' -절단(truncated) sgRNA를 이용한 CRISPR/Cas9의 단일 염기 편집 능력을 검증하기 위해 *galk*(도 3A), *xyIB*(도 3B) 유전자 내 다양한 위치에서의 염기 편집 효율을 그래프로 나타낸 것이다.

도 4A 및 4B는 5' -절단(truncated) sgRNA/Cas9를 이용한 음성 선택에서 sgRNA 5'말단 제거 뉴클레오타이드 길이 차이에 따른 단일 또는 이중 염기 삽입/제거 효율 및 유전자가위의 작동 여부 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 5는 CRISPR/Cas9-NG에서 5' -절단(truncated) sgRNA에 의한 음성 선택으로 *galk*, *xyIB* 유전자 별 단일 염기 편집 효율 (Editing efficiency) 및 콜로니 생성 단위 (Colony Forming Unit)를 그래프로 나타낸 것(도 5A) 및 실험군의 모식도(도 5B)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0078] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0080] 실시예 1. CRISPR/Cas9에서 5' -절단(truncated) sgRNA의 불일치 불허용 검증

[0081] 본 발명자들은 PCT/KR2021/004155에서 발명된 HK1059 (*cas9* 유전자가 유전체에 삽입되어 있는 돌연변이 대장균 균주, *E. coli* MG1655 *araBAD::P_{BAD}-cas9-KmR*) 균주와 올리고뉴클레오타이드에 의한 재조합을 돕기 위한 람다-레드 베타 발현 플라스미드 pHK463과 sgRNA 플라스미드를 이용한 CRISPR/Cas9 시스템을 기반으로 하기 실시예에 사용하였다.

[0082] HK1059 균주를 LB 고체배지에 도말 후 자라난 단일 콜로니를 LB 액체배지 200 ml에 접종하여 37°C에서 OD_{600nm}가 0.4가 될 때까지 배양하고, 3500 rpm에서 20분 동안 원심분리 후 40 ml의 10% 글리세롤로 세척하는 과정을 두 번 거쳐 electrocompetent cell로 제조하였다.

[0083] 표적 DNA와 상동성을 갖는 sgRNA 내에 1~3개의 불일치 서열, 1~3개의 5' - 말단 뉴클레오타이드 결실, 1개의 불일치와 동시에 1~3개의 5' -말단 뉴클레오타이드 결실을 도입한 가이드 RNA를 발현하는 플라스미드를 HK1059에 ml⁻¹ 농도로 첨가된 LB 고체배지에 도말하였다. CRISPR/Cas9 시스템이 정상적으로 작동한 경우 LB 고체배지에서 형성되는 콜로니의 숫자가 감소하게 되는데, 이를 바탕으로 불일치 또는 5' -말단 뉴클레오타이드가 결실된 sgRNA 플라스미드에 의한 CRISPR/Cas9의 작동 여부를 간접적으로 확인하였다.

[0084] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이 sgRNA 내에 표적 DNA와 1~2개 불일치 서열, 1~2개의 5' -말단 뉴클레오타이드 결실, 1개 불일치와 동시에 1개 5' -말단 뉴클레오타이드 결실이 존재하는 경우에만 CRISPR/Cas9 시스템이 작동하였으나, 3개 이상의 불일치 또는 5' -말단 뉴클레오타이드 결실이 존재하는 경우, 1개 불일치와 동시에 2

개 이상의 5' -말단 뉴클레오타이드 결실이 존재하는 경우에는 생존 콜로니 수가 증가하는 것을 확인하였다.

[0085] 이에, 본 발명자들은 이러한 CRISPR/Cas9의 불일치 불허용을 역이용하여 유전체를 단일 염기 수준으로 정교하게 편집하는 CRISPR/Cas9 시스템을 확립하였다. 보다 구체적으로, 본 발명자들은, 먼저, 가이드 RNA에, 상기 가이드 RNA가 상보적으로 결합하는 타겟 유전자 서열의 5' -말단으로부터 뉴클레오타이드가 제거되도록 가이드 RNA를 설계하였다. 이에 따라, 유전자 가위의 타겟 DNA 서열에 올리고뉴클레오타이드에 의해 돌연변이가 도입된 경우, 불일치 불허용으로 단일 염기가 편집된 서열을 유전자 가위가 타겟 서열로 인식하지 못해 세포가 생존할 수 있는 반면, 돌연변이가 유발되지 않은 타겟은 유전자 가위의 불일치 허용에 의해 이중가닥의 DNA가 절단되고 세포가 생존하지 못해 (음성선택, Negative selection), 목적 유전체를 단일 염기 수준으로 효과적으로 편집할 수 있을 뿐만 아니라, 선별할 수 있다.

[0087] **실시예 2. 음성선택을 통한 5' -절단(truncated) sgRNA의 단일 염기 편집 가능 여부 확인**

[0088] 본 발명자들은, 음성선택을 통한 5'-절단(truncated) sgRNA의 단일 염기 편집 가능 여부 확인하기 위하여, 도 2A에 나타난 바와 같이 실험을 설계하였다.

[0089] 간략하게는 다음과 같다: 상기 실시예 1의 HK1059 균주에 올리고뉴클레오타이드에 의한 재조합을 돕기 위한 람다-레드 베타 발현 플라스미드 pHK463을 삽입하여 도말 후 형성된 단일 콜로니를 LB 액체배지 200 ml에 접종하여 30°C에서 OD_{600nm}가 0.4가 될 때까지 배양하고, L-arabinose를 1 mM 농도로 첨가해 3시간 추가로 배양하여 람다-레드 베타 단백질과 Cas9 단백질을 과발현시켰다. 이후 3500 rpm에서 20분 동안 원심분리 후 40 ml의 10% glycerol로 세척하는 과정을 두 번 거쳐 electrocompetent cell로 제조하였다.

[0090] 돌연변이 유발 올리고뉴클레오타이드들은 *galK* 유전자(NCBI accession no. 945358)의 504번 염기 또는 510번 염기에, *xy1B* 유전자(NCBI accession no. 948133)의 643번 염기와 652번 염기에 1개의 단일 염기가 치환되도록 제작되었다. 가이드 RNA를 발현하는 플라스미드와 올리고뉴클레오타이드를 HK1059에 전기 천공으로 삽입한 후 갈락토오스를 5 g/L로 첨가한 맥콘키(MacConkey plate) 선택 배지에 도말한 후 37°C에서 배양하였다.

[0091] 올리고뉴클레오타이드에 의해 *galK* 또는 *xy1B* 유전자에 돌연변이가 도입된 경우 각 유전자가 정상적으로 발현되지 않아 갈락토오스 또는 자일로오스의 대사가 불가능하고, 그 결과로 맥콘키 선택배지에서 흰색 콜로니를 형성한다. 반대로 돌연변이가 일어나지 않아 갈락토오스 또는 자일로오스의 대사가 이루어지면 대사산물에 의해 맥콘키 배지의 pH가 6.8 이하로 낮아져 적색 콜로니를 형성한다. 고체배지에서 형성된 콜로니의 색도 별 비율 [흰색 콜로니/(흰색 콜로니 + 적색 콜로니)]로 CRISPR/Cas9 시스템의 편집 효율을 계산하였다.

[0092] 그 결과, 도 2B에 나타난 바와 같이, sgRNA에서 5' -말단 뉴클레오타이드 결실 개수가 2개까지 증가함에 따라 편집 효율이 최대로 증가하였으며, *galK* 유전자의 504번 단일 염기 편집은 80%, 510번 단일염기 편집은 83%, *xy1B* 유전자의 643번 단일 염기 편집은 82%, 652번 단일염기 편집은 60%의 편집 효율로 도입되었다. 그러나 sgRNA에서 5' -말단 뉴클레오타이드 결실 개수가 3개 이상인 경우 CRISPR/Cas9 시스템이 정상적으로 작동하지 않아 생존 콜로니 수가 10⁸ CFU/ μ gDNA 수준으로 크게 증가하였다.

[0094] **실시예 3. 무작위 후보군 서열분석을 통한 5' -절단(truncated) sgRNA의 단일 염기 편집 효율 검증**

[0095] 본 발명자들은, 5' -절단(truncated) sgRNA가 *galK*의 504번, 510번 또는 *xy1B*의 643번, 652번 염기의 편집외에도 다양한 염기를 편집하는데 효과적으로 작용할 수 있는지 확인하기 위해, Cas9의 표적 DNA 서열 (N₂₀) 내 다양한 위치에 단일 점 돌연변이를 자기 자신을 제외한 각각 다른 세 개의 염기로 치환하도록 올리고뉴클레오타이드를 제작하였다(A→G/T/C, T→G/A/C, G→A/T/C, 또는 C→G/A/T).

[0096] 간략하게는 다음과 같다: 표적 한 부위 당 표적 서열과 일치하는 가이드 RNA 및 점 돌연변이 위치를 기준으로 오른쪽에 불일치 서열을 갖는 각각 다른 세 개의 가이드 RNA를 발현하는 플라스미드와 점 돌연변이 유발 올리고뉴클레오타이드를 HK1059에 전기 천공으로 삽입한 후 (표적 10개 또는 8개 X 점 돌연변이 유발 올리고뉴클레오타이드 3개 = 30 또는 24 전기 천공) LB 배지에 도말한 후 37°C에서 배양하였으며, 형성된 콜로니 중 무작위로 네 개를 선정하여 생어 염기 서열 분석을 통해 돌연변이의 도입 여부를 확인하였다.

[0097] 그 결과, 도 3A에 나타난 바와 같이, *galK*에서는 30 가지의 가능한 점 돌연변이 경우 중 (표적 10개 X 점 돌연

변이 유발 올리고뉴클레오타이드 3개) 63% (19/30)의 점 돌연변이가 성공적으로 유도되었다. 또한, 도 3B에 나타난 바와 같이, *xy1B*에서는 24 가지의 가능한 점 돌연변이 경우 중 (표적 8개 X 점 돌연변이 유발 올리고뉴클레오타이드 3개) 62% (15/24)의 점 돌연변이가 성공적으로 유도되었다.

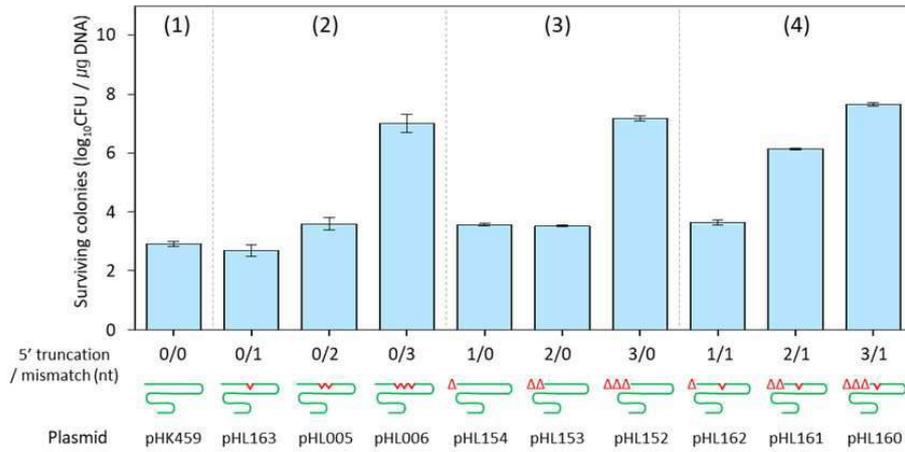
- [0098] 한편, 점 돌연변이는 염기쌍 하나의 변이가 생겨서 서열이 바뀌는 현상을 말하는 데 Transition 및 Transversion이 있다. Transition은 Py 염기는 Py 염기로, Pu 염기는 Pu 염기로 바뀌는 현상이며, Transversion은 Py 염기가 Pu 염기로, 또는 Pu 염기가 Py 염기로 바뀌는 현상이다(Py = pyrimidine = C 또는 T, Pu = purine = G 또는 A).
- [0099] 돌연변이 도입에 성공한 *galK*의 19개 전기천공과 *xy1B*의 15개 전기천공 (/192개 전기 천공) 결과를 이러한 돌연변이 유형 (64 Transition + 128 Transversion)에 따라 결과를 나누었을 때, Transition이 각각 50% (5/10), 50% (4/8), Transversion이 각각 70% (14/20), 68% (11/16)로 Transversion이 더 우세하게 나타났다.
- [0100] 이는, 본 발명의 5' -절단(truncated) sgRNA가 나타내는 CRISPR/Cas9의 불일치 불허용을 역이용하는 것이 점 돌연변이 유발 효율을 높일 수 있는 최적의 조건임을 입증한다.
- [0101] **실시예 4. CRISPR/Cas9 5' -절단(truncated) sgRNA를 이용한 single 뉴클레오타이드 insertion/deletion 효율 확인**
- [0102] 본 발명자들은, 5' -절단(truncated) sgRNA이 단일염기 편집 효율 향상뿐 아니라 단일 뉴클레오타이드의 삽입 또는 결실에도 적용되어 frameshift 변이 교정 등에 활용될 수 있는지 확인하였다.
- [0103] 간략하게는 다음과 같다: *galK* 유전자의 504번 또는 510번 염기가 결실되거나 504번 또는 510번 위치에 단일 뉴클레오타이드의 삽입이 일어나면 *galK* 유전자의 frame shift가 일어나 600번대 염기에서 stop codon이 만들어지고 premature translation termination으로 이어져 GalK 단백질이 정상적으로 합성되지 않는다. 단일 뉴클레오타이드의 결실 또는 삽입이 일어난 균주는 갈락토오스 대사를 정상적으로 할 수 없어 맥콘키 배지에서 흰색 콜로니를 형성한다. 따라서 맥콘키 배지에서 형성된 콜로니의 색도 변화로 단일 뉴클레오타이드의 결실 또는 삽입 효율을 가늠할 수 있다.
- [0104] PAM 서열로부터 5'-방향으로 이격된 위치인 *galK* 유전자의 504번 또는 504~505번 뉴클레오타이드를 결실시키거나, 504번 위치에 Cytosine을 삽입 또는 504~505번 위치에 Cytosine과 Thymine을 삽입하는 올리고뉴클레오타이드와 sgRNA의 5'말단에 0~3개 뉴클레오타이드의 결실이 존재하는 sgRNA 발현 플라스미드를 삽입하여 맥콘키 배지에서 형성되는 콜로니의 색도변화를 관찰하였다.
- [0105] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 5'-말단 뉴클레오타이드가 결실되지 않거나 1개 뉴클레오타이드만 결실된 경우 모두에서 8% 이하의 편집효율을 보였다. 반면 sgRNA의 5' -말단에서 2개 뉴클레오타이드가 결실된 경우, 504번 뉴클레오타이드 결실 효율은 74%, 504번 위치에 단일 뉴클레오타이드 삽입 효율은 78%로 나타났으며(도 4A), 504번~505번 뉴클레오타이드 결실 효율은 48%, 504번~505번 위치에 2개 뉴클레오타이드 삽입 효율은 47%로 나타나 모든 경우에서 sgRNA 5'말단의 2개 뉴클레오타이드가 결실되었을 때 가장 높은 편집 효율을 보였다 (도 4B).
- [0106] sgRNA에서 5'-말단의 결실 뉴클레오타이드가 3개 이상인 경우 뉴클레오타이드의 결실 또는 삽입 위치에 관계없이 CFU가 $10^7/\mu\text{gDNA}$ 이상으로 상승하였는데, 이러한 결과는 실시예 1, 2에서와 동일한 경향을 나타낸 것으로, CRISPR/Cas9 시스템에서 5' -절단(truncated) sgRNA를 이용할 때는 2개 뉴클레오타이드의 결실이 단일염기의 편집, 삽입 또는 결실 모두에 가장 효과적임을 보여준다.
- [0108] **실시예 5. CRISPR/Cas9-NG에서 5' -절단(truncated) sgRNA의 단일 염기 편집 가능 여부 확인**
- [0109] 본 발명자들은 *cas9-NG* 유전자가 유전체에 삽입되어 있는 돌연변이 대장균 균주 HK1159(*E. coli* MG1655 *araBAD::P_{BAD}-cas9-NG-KmR*)를 람다-레드 재조합 (lambda-red recombineering)을 통해 제작하였다. 마찬가지로 올리고뉴클레오타이드에 의한 재조합을 돕기 위한 람다-레드 베타 발현 플라스미드 pHK463을 삽입하여 도말 후 형성된 단일 콜로니를 LB 액체배지 200 ml에 접종하여 30°C에서 OD_{600nm}가 0.4가 될 때까지 배양하고, L-arabinose를 1 mM 농도로 첨가해 3시간 추가로 배양하여 람다-레드 베타 단백질과 Cas9 단백질을 과발현시켰다. 이후 3500 rpm에서 20분 동안 원심분리 후 40 ml의 10% glycerol로 세척하는 과정을 두 번 거쳐 electrocompetent cell로 제조하였다.

- [0110] 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 HK1159 균주에 올리고뉴클레오타이드에 의해 *galK* 또는 *xy1B* 유전자에 돌연변이가 도입된 경우, 도 5에 나타낸 바와 같이, CRISPR/Cas9-NG에서는 sgRNA에서 5' -말단 뉴클레오타이드 결실 개수가 3개까지 증가함에 따라 편집 효율이 최대로 증가하였으며, *galK* 유전자의 504번 단일 염기 편집은 85%, 510번 단일염기 편집은 78%, *xy1B* 유전자의 643번 단일 염기 편집은 74%, 652번 단일염기 편집은 66%의 편집 효율로 도입되었으며, 5' -말단 뉴클레오타이드 결실 개수가 3개일 때 생존한 콜로니의 수가 10^6 CFU/ μ gDNA 수준으로 소폭 상승하였다. 서로 다른 5' -말단 뉴클레오타이드 제거 수와 생존 콜로니 수의 차이는 Cas9과 Cas9-NG가 단백질 구조적인 차이로 인해 세포 내에서 서로 다른 메커니즘으로 작용하는 것으로 생각된다. sgRNA에서 5' -말단 뉴클레오타이드 결실 개수가 4개 이상인 경우에는 CRISPR/Cas9-NG 시스템이 정상적으로 작동하지 않아 생존 콜로니 수가 Cas9에서와 같이 10^8 CFU/ μ gDNA 수준으로 크게 증가하였다.
- [0112] 따라서, 본 발명은 종래 CRISPR/Cas9 시스템에 비해 간단한 디자인 방법으로 점 돌연변이 도입 효율이 항상 뿐 아니라, Cas9과 Cas9-NG 모두에서 작용하는 실제 단일 염기 단위의 정교한 유전자 편집 효과를 달성한 바, 목표 유전자에 변이(예컨대, 점 돌연변이)가 일어난 미생물 균주들의 유전체를 올바르게 수선하거나, 또는 코돈의 변화 등을 유발함으로써 물질 생산에 최적화된 코돈과 대사경로를 가지게 하여, 유용 물질의 생산능을 최적화시킨 균주의 제작 등에 다양하게 활용될 수 있어, 유용 산물 생산과 관련된 산업적 활용에 매우 유용하다.
- [0114] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

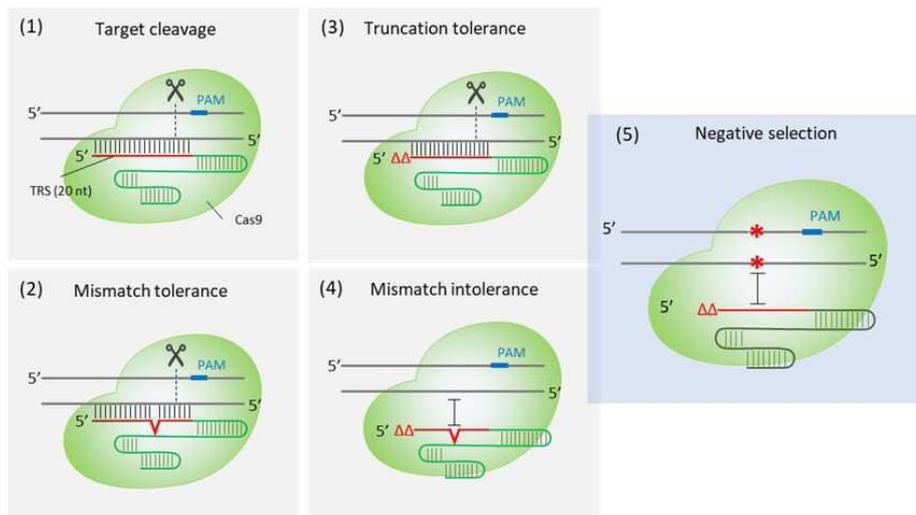
도면

도면1

A

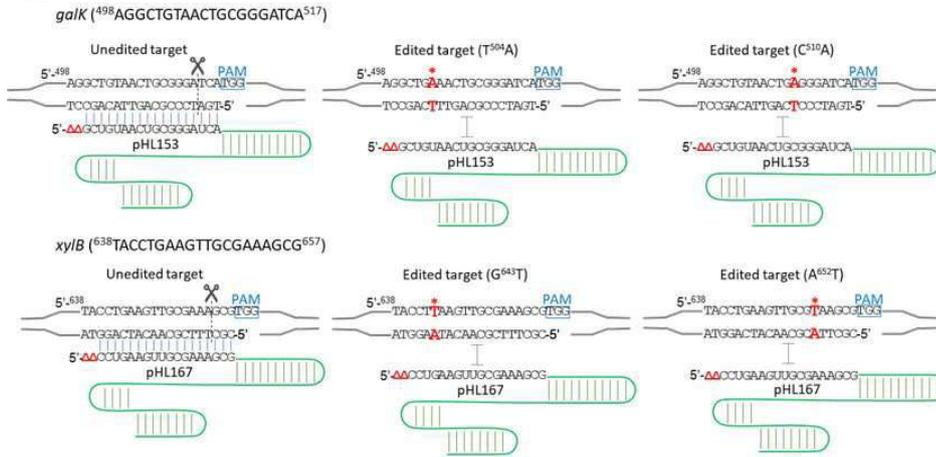


B

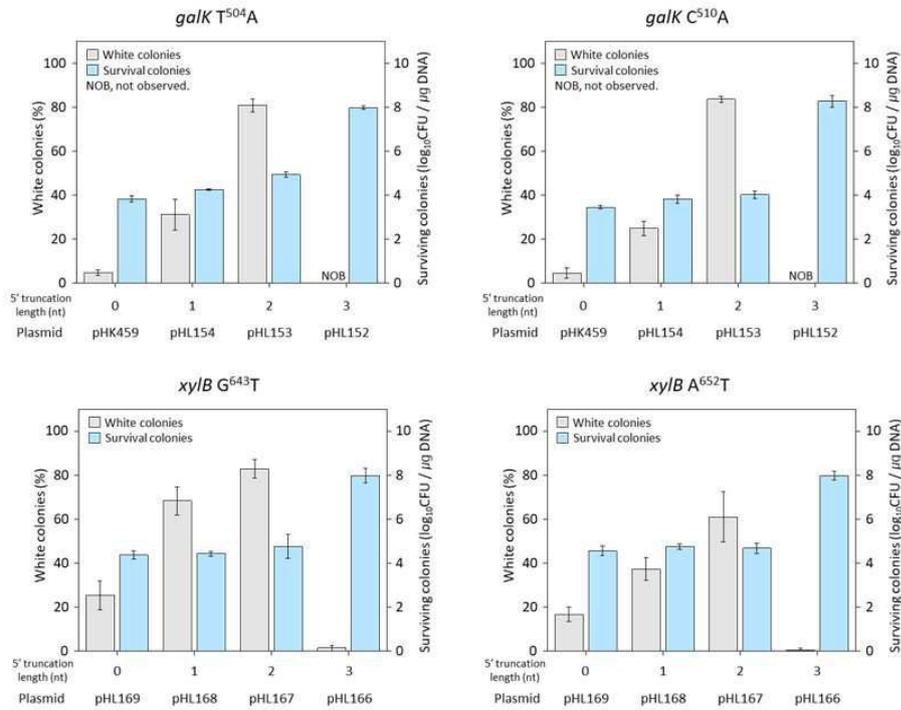


도면2

A

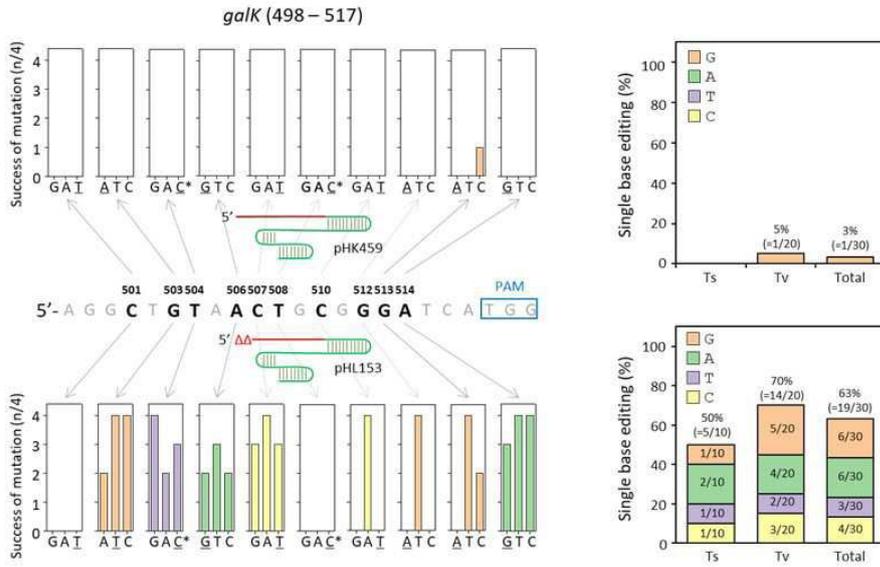


B

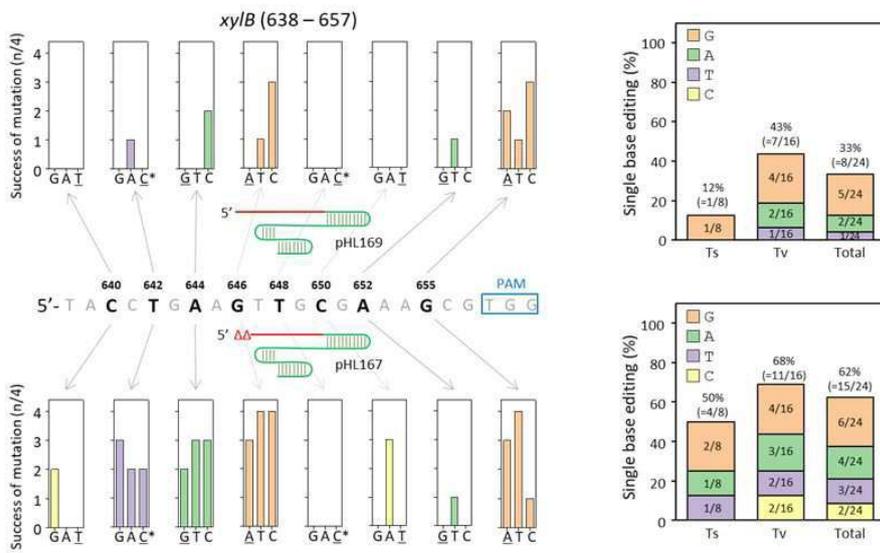


도면3

A

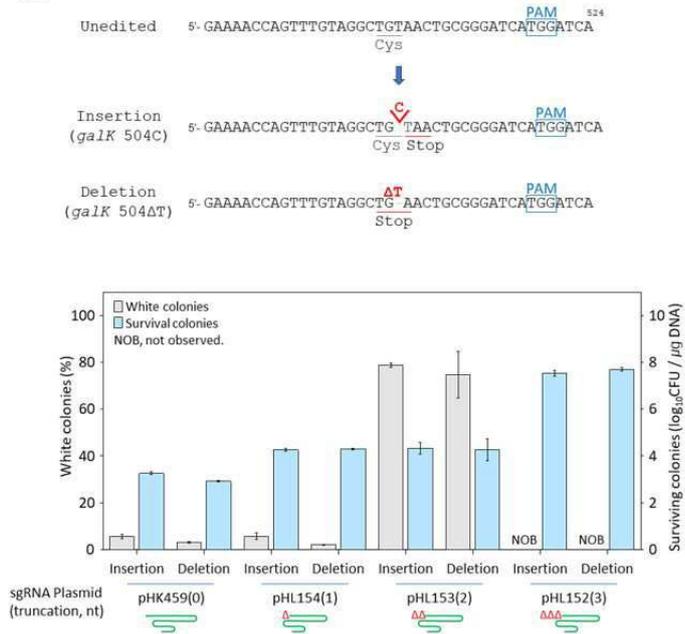


B

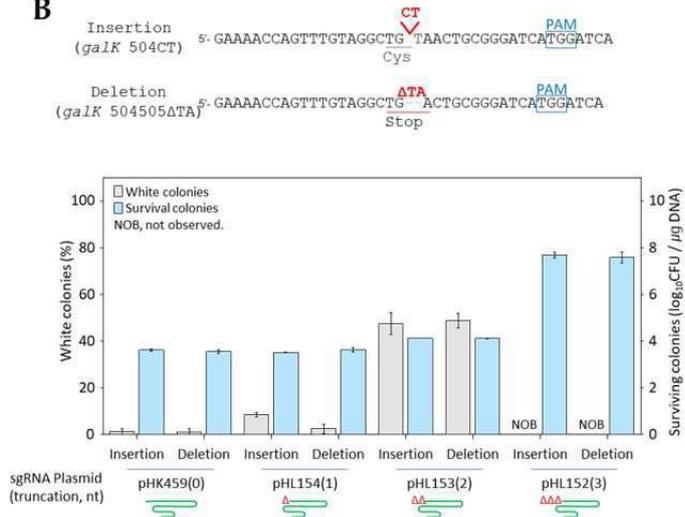


도면4

A

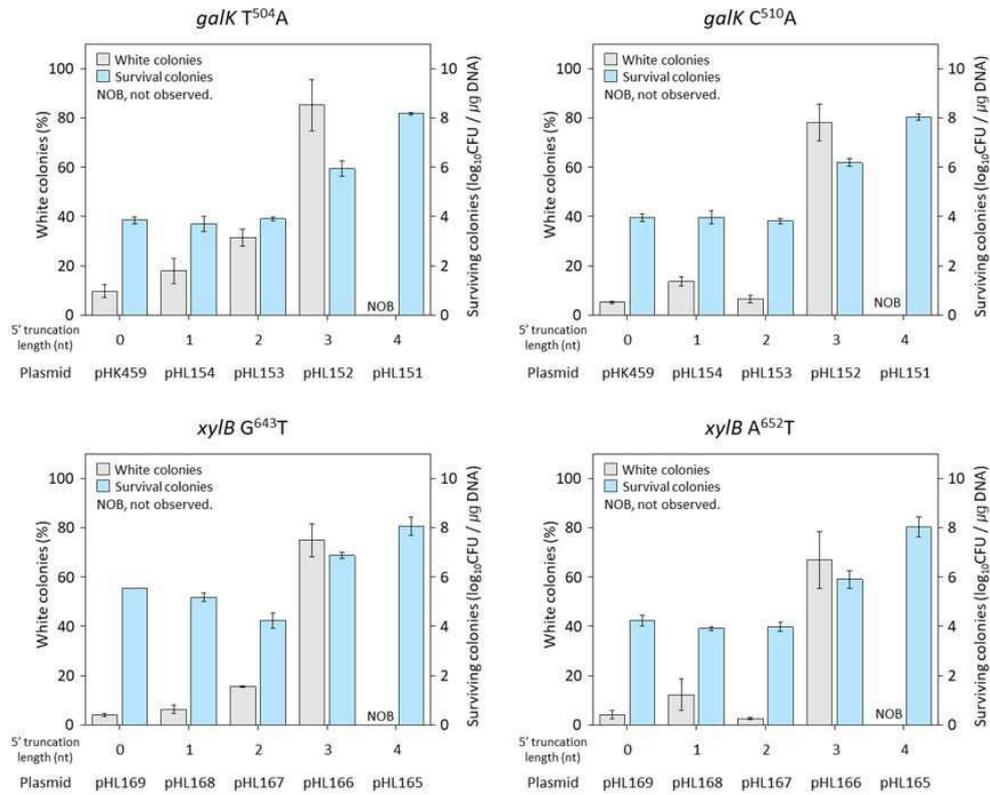


B



도면5

A



B

