



등록특허 10-2774954



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월27일

(11) 등록번호 10-2774954

(24) 등록일자 2025년02월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/82 (2006.01) *A01H 5/10* (2018.01)

C07K 14/415 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)

C12N 9/22 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/8247 (2013.01)

A01H 1/06 (2021.01)

(21) 출원번호 10-2021-0129368

(22) 출원일자 2021년09월30일

심사청구일자 2021년09월30일

(65) 공개번호 10-2023-0046412

(43) 공개일자 2023년04월06일

(56) 선행기술조사문헌

CN110982838 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

세종대학교산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

(72) 발명자

김현욱

서울특별시 중랑구 용마산로129가길 41, 102동 901호(신내동, 영풍마드레빌)

이혜지

서울특별시 노원구 동일로184길 35, 나동 201호(공릉동, 주인맨션)

(74) 대리인

특허법인리체

전체 청구항 수 : 총 8 항

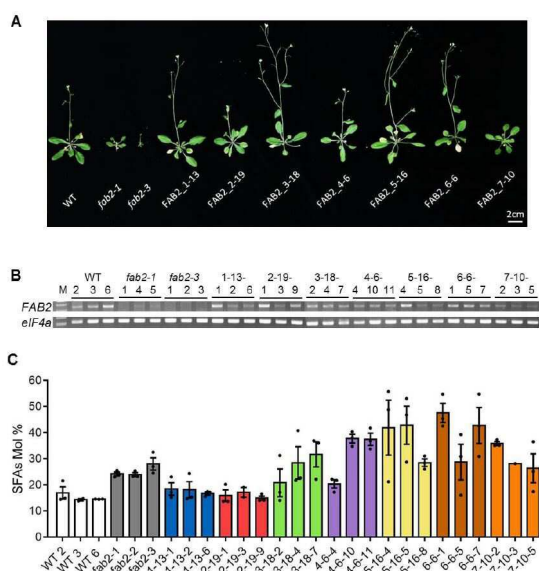
심사관 : 박정웅

(54) 발명의 명칭 종자 내 포화지방산 함량 증가용 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 식물 생장에 악영향 없이 종자 특이적으로 종자 내 포화지방산 함량을 증가시킬 수 있는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명의 조성물 및 방법으로 종자 내 포화지방산 함량을 증가시키되 식물 생장에 미치는 악영향을 최소화할 수 있어 식물유지 사업 분야에 이용될 수 있다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

A01H 5/10 (2022.05)
C07K 14/415 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395067436
과제번호	PJ015714012021
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	바이오그린연계농생명혁신기술개발(R&D)
연구과제명	유전자 제어 기술을 활용한 지방산 고생산 플랫폼 개발(1주관)
기 여 율	1/2
과제수행기관명	세종대학교 산학협력단
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711109928
과제번호	2020R1A2C2008175
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	종자 지방산 대사를 조절하는 전사인자 발굴을 통한 오일 작물에서 기능성 지방산
생산 증진 연구	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	세종대학교 산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

종자 특이적 발현 올레오신 1 프로모터; 이와 작동가능하게 연결된 Cas13a 유전자; 및 서열번호 1의 서열에 대응되는 FAB2(Fatty acid biosynthesis 2) RNA를 표적으로 하는 gRNA;를 포함하는 벡터를 포함하는,

상기 서열번호 1에서 31 내지 43번째, 70 내지 81번째, 579 내지 590 번째, 592 내지 603번째, 598 내지 609번째, 1008 내지 1019번째, 또는 1026 내지 1037번째 위치에 대응되는 위치 중 적어도 하나를 절단하는 종자 내 포화지방산 함량 증가용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 gRNA는 서열번호 2 내지 8 중 적어도 하나의 서열로 이루어진 것인 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 포화지방산은 팔미트산 (C16:0), 스테아르산 (C18:0) 및 아라키드산 (C20:0)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 종자는 깨, 참깨, 들깨, 땅콩, 콩, 유채, 아마, 아주까리, 야자나무, 올리브, 동백, 잇꽃, 삼, 아마, 오동, 해바라기, 올리브, 낙화생, 동백, 피마자, 평지, 개암나무, 붉은 유칼립투스, 벼, 레스캐넬라, 피마자 또는 옥수수 식물체의 종자인 조성물.

청구항 6

FAB2(Fatty acid biosynthesis 2) 단백질을 발현하는 식물체를 종자 특이적 발현 올레오신 1 프로모터; 이와 작동가능하게 연결된 Cas13a 유전자; 및 서열번호 1의 서열에 대응되는 FAB2(Fatty acid biosynthesis 2) RNA를 표적으로 하는 gRNA;를 포함하는 벡터로 형질전환하여

상기 식물체의 FAB2(Fatty acid biosynthesis 2) RNA에서 서열번호 1에서 31 내지 43번째, 70 내지 81번째, 579 내지 590 번째, 592 내지 603번째, 598 내지 609번째, 1008 내지 1019번째, 또는 1026 내지 1037번째 위치에 대응되는 위치 중 적어도 하나를 절단하는 단계를 포함하는 종자 내 포화지방산 함량을 증가시키는 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

청구항 6에 있어서, 상기 gRNA는 서열번호 2 내지 8 중 적어도 하나의 서열로 이루어진 것인 방법.

청구항 9

청구항 6에 있어서, 상기 포화지방산은 팔미트산 (C16:0), 스테아르산 (C18:0) 및 아라키드산 (C20:0)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 10

청구항 6에 있어서, 상기 종자는 깨, 참깨, 들깨, 땅콩, 콩, 유채, 아마, 아주까리, 야자나무, 올리브, 동백, 잇꽃, 삼, 아마, 오동, 해바라기, 올리브, 낙화생, 동백, 피마자, 평지, 개암나무, 붉은 유칼립투스, 벼, 레스 퀴렐라, 피마자 또는 옥수수 식물체의 종자인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 종자 내 포화지방산 함량 증가용 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 식물 종자 오일의 지방산은 다양한 산업원료로 사용되고, 지방산의 탄소사슬 길이, 이중결합의 수, 및 화학기의 차이에 따라 산업적 용도가 상이하어, 유전공학을 통한 식물 종자에서 특정 지방산의 함량이 증가된 오일작물 개발이 이루어지고 있다.

[0004] 이와 관련하여 FAB2 (Fatty acid biosynthesis 2)는 엽록체에서 지방산 합성 효소에 의해 합성된 18:0-ACP를 18:1-ACP로 불포화하는 효소로서, 포화지방산에서 불포화지방산으로 전환되는 교차점에서 역할을 하는 효소이기 때문에, *FAB2* 유전자는 하우스키핑(housekeeping) 유전자로 다양한 식물종에서 단백질 서열이 높은 수준의 상동성을 갖고 보존되어 있다.

[0005] 종래 *FAB2* 유전자의 기능을 억제하여 포화지방산이 증가된 종자를 얻으려는 시도가 있었다. 상기 *FAB2* 유전자를 녹다운(knock-down)하여 돌연변이 시키면 종자 오일에서 포화지방산의 함량이 증진됨이 확인되었으나, 잎의 엽록체 및 표피세포에서도 포화지방산의 함량이 증진되어 식물생장에 악영향을 미치는 문제가 있었다.

[0006] 이에, 식물의 생장에 악영향 없이 종자 특이적으로 종자 내 포화지방산 함량을 증가시킬 수 있는 기술의 필요성이 대두되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2018-0008885호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 식물 생장에 악영향 없이 종자 특이적으로 종자 내 포화지방산 함량을 증가시킬 수 있는 조성물 및 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 1. 종자 특이적 발현 프로모터; 이와 작동가능하게 연결된 Cas13a 유전자; 및 FAB2 (Fatty acid biosynthesis

2) RNA를 표적으로 하는 gRNA를 포함하는 벡터를 포함하고,

- [0012] 서열번호 1의 서열에 대응되는 FAB2(Fatty acid biosynthesis 2) RNA에서 서열번호 1에서 31 내지 43번째, 70 내지 81번째, 579 내지 590 번째, 592 내지 603번째, 598 내지 609번째, 1008 내지 1019번째, 또는 1026 내지 1037번째 위치에 대응되는 위치 중 적어도 하나를 절단하는, 종자 내 포화지방산 함량 증가용 조성물.
- [0013] 2. 위 1에 있어서, 상기 종자 특이적 발현 프로모터는 올레오신 1인 조성물.
- [0014] 3. 위 1에 있어서, 상기 gRNA는 서열번호 2 내지 8 중 적어도 하나의 서열로 이루어진 것인 조성물.
- [0015] 4. 위 1에 있어서, 상기 포화지방산은 팔미트산 (C16:0), 스테아르산 (C18:0) 및 아라키드산 (C20:0)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.
- [0016] 5. 위 1에 있어서, 상기 종자는 깨, 참깨, 들깨, 땅콩, 콩, 유채, 아마, 아주까리, 야자나무, 올리브, 동백, 잇꽃, 삼, 아마, 오동, 해바라기, 올리브, 낙화생, 동백, 피마자, 평지, 개암나무, 붉은 유칼립투스, 벼, 레스케텔라, 피마자 또는 옥수수 식물체의 종자인 조성물.
- [0017] 6. FAB2(Fatty acid biosynthesis 2) 단백질을 발현하는 식물체를 종자 특이적 발현 프로모터; 이와 작동가능하게 연결된 Cas13a 유전자; 및 FAB2(Fatty acid biosynthesis 2) RNA를 표적으로 하는 gRNA를 포함하는 벡터로 형질전환하여
- [0018] 상기 식물체의 FAB2(Fatty acid biosynthesis 2) RNA에서 서열번호 1에서 31 내지 43번째, 70 내지 81번째, 579 내지 590 번째, 592 내지 603번째, 598 내지 609번째, 1008 내지 1019번째, 또는 1026 내지 1037번째 위치에 대응되는 위치 중 적어도 하나를 절단하는 단계를 포함하는, 종자 내 포화지방산 함량을 증가시키는 방법.
- [0019] 7. 위 6에 있어서, 상기 종자 특이적 발현 프로모터는 올레오신 1인 방법.
- [0020] 8. 위 6에 있어서, 상기 gRNA는 서열번호 2 내지 8 중 적어도 하나의 서열로 이루어진 것인 방법.
- [0021] 9. 위 6에 있어서, 상기 포화지방산은 팔미트산 (C16:0), 스테아르산 (C18:0) 및 아라키드산 (C20:0)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.
- [0022] 10. 위 6에 있어서, 상기 종자는 깨, 참깨, 들깨, 땅콩, 콩, 유채, 아마, 아주까리, 야자나무, 올리브, 동백, 잇꽃, 삼, 아마, 오동, 해바라기, 올리브, 낙화생, 동백, 피마자, 평지, 개암나무, 붉은 유칼립투스, 벼, 레스케텔라, 피마자 또는 옥수수 식물체의 종자인 방법.

발명의 효과

- [0024] 본 발명은 식물 성장에 악영향 없이 종자 내 포화지방산 함량을 증가시킬 수 있고, 이는 식물유지 사업 분야에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 애기장대에서 지방산 기반 지질의 합성 및 대사에 관한 개략도를 나타낸 것이다.
- 도 2는 CRISPR/Cas13a RNA의 억제 메커니즘을 나타낸 것이다.
- 도 3은 애기장대 fab2 돌연변이 대립유전자(*fab2-1*, *fab2-2* 및 *fab2-3*) 분리 및 성장 표현형을 나타낸 것이다.
- 도 4는 야생형 및 *fab2* T-DNA 돌연변이의 지방산 조성 및 종자 표현형 분석을 나타낸 것이다.
- 도 5는 7종의 Cas13a gRNA의 FAB2 RNA 2차 구조 및 표적 위치를 나타낸 것이다.
- 도 6은 Cas13a-FAB2 T1 형질전환 식물의 형질전환 유전자 분석을 나타낸 것이다.
- 도 7은 FAB2_Cas13a T1 형질전환체 7종의 종자 포화지방산(16:0+18:0+20:0) 함량 분포를 나타낸 것이다.
- 도 8은 Cas13a_FAB2 T1 형질전환주 7종 중 종자 포화지방산 함량이 가장 높은 3종의 영양생장 표현형을 나타낸 것이다.
- 도 9는 Cas13a-FAB2 형질전환 T2 세대 분석을 나타낸 것이다.
- 도 10은 Cas13a-FAB2 형질전환체 T3 종자 발아율 및 종자 특성을 나타낸 것이다.

도 11은 Cas13a-FAB2_7 형질전환체 T2 세대 분석을 나타낸 것이다.

도 12는 애기장대와 다른 식물 간의 FAB2 효소 단백질의 아미노산 서열 비교를 나타낸 것이다. At: *Arabidopsis thaliana* (애기장대), Ah: *Arachis hypogaea* (땅콩), Bn: *Brassica napus* (유채), Bo: *Brassica oleracea* (양배추), Br: *Brassica rapa* (배추), Cs: *Camelina sativa* (양구슬냉이), Gm: *Glycine max* (대두), Jc: *Jatropha curcas* (자트로파), Nb: *Nicotiana glauca* (담배), Os: *Oryza sativa* (벼), Rc: *Ricinus communis* (피마자), Ta: *Triticum aestivum* (밀), Tc: *Theobroma cacao* (카카오), Xs: *Xanthoceras sorbifolium* (기름모과나무), Zm: *Zea mays* (옥수수).

도 13은 애기장대와 다른 식물 간의 FAB2 mRNA 억제를 위해 7종 sgRNA 염기서열을 비교를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0029] 본 발명은 종자 내 포화지방산 함량 증가용 조성물에 관한 것이다.
- [0030] 본 발명의 조성물은 종자 특이적 발현 프로모터; 이와 작동가능하게 연결된 Cas13a 유전자; 및 FAB2(Fatty acid biosynthesis 2) RNA를 표적으로 하는 gRNA;를 포함하는 벡터를 포함하고,
- [0031] 서열번호 1의 서열에 대응되는 FAB2(Fatty acid biosynthesis 2) RNA에서 서열번호 1에서 31 내지 43번째, 70 내지 81번째, 579 내지 590 번째, 592 내지 603번째, 598 내지 609번째, 1008 내지 1019번째, 또는 1026 내지 1037번째 위치에 대응되는 위치 중 적어도 하나를 절단한다.
- [0032] 대상 식물 종에 무관하게, FAB2 mRNA에서 서열번호 1의 상기 위치에 대응되는 위치가 절단되면 식물 생장에 악영향 없이 종자 내 포화지방산 함량이 증가될 수 있다.
- [0033] “프로모터(promoter)”란, 일반적으로 전사를 개시하는 지점을 포함하는 암호화 부위의 상류 쪽에 위치하는 유전자 부위로, 흔히 유전자 발현을 조절하는 TATA 박스, CAAT 박스 부위, 외부 자극에 반응하여 유전자 발현에 영향을 주는 부위 및 위치와 방향에 상관없이 거의 모든 유전자의 발현을 촉진하는 인핸서 등으로 이루어져 있다. 또한, 이러한 프로모터 중에는 모든 조직에서 상시적으로 발현을 유도하는 프로모터 및 시간 또는 조직 특이적으로 발현을 유도하는 프로모터가 있다.
- [0034] 본 발명에 따른 프로모터는 종자에서 특이적으로 발현하는 프로모터이고, 예를 들면, 올레오신 1일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] “gRNA”는 가이드 RNA라고도 하며, 이에 의하여 표적 부위가 특정될 수 있다. gRNA는 표적 서열에 상보적 결합이 가능하며 Cas13a 단백질과 결합할 수 있어, Cas13a 단백질을 표적 RNA 내의 특정 위치에 표적화하는 것을 돕는다. gRNA는 단일 사슬 가이드 RNA (sgRNA)일 수 있다.
- [0036] gRNA는 본 발명의 표적 RNA인 FAB2 mRNA로부터 당해 공지된 방법에 의해 제작될 수 있다. 예를 들면, RNAi를 이용하거나 염기 간의 결합력이 낮은 두 부분을 기점으로 PFS (protospacer flanking site)를 고려하여 제작될 수 있다.
- [0037] 다수 식물 종이 FAB2를 발현할 수 있으나, 식물 종이 달라지면 FAB2의 서열 또는 길이가 달라질 수 있으므로, 특정 종 유래 FAB2 mRNA의 특정 위치 숫자가 다른 종에서는 달라질 수 있다. 종자 내 포화지방산을 증진시키고자 하는 식물체의 FAB2 mRNA 서열에서 상기 위치에 대응되는 위치를 타겟팅 할 수 있도록 당업계 공지된 방법에 의해 gRNA를 적절히 제작할 수 있다. 일 실시예에 따르면, gRNA는 서열번호 1의 FAB2 mRNA로부터 제작될 수 있고, 서열번호 2 내지 8 중 적어도 하나의 서열로 이루어질 수 있다.
- [0038] 일 실시예에 따르면, gRNA는 서열번호 1의 FAB2 mRNA 내의 특정 위치, 예를 들면 19 내지 46, 57 내지 84, 566 내지 593, 579 내지 606, 585 내지 612, 995 내지 1022, 또는 1013 내지 1040 뉴클레오타이드를 표적으로 할 수 있다.
- [0039] “뉴클레오타이드”는 RNA 분자 또는 이들의 유사체를 지칭할 수 있고, 비제한적으로 예를 들면 전령 RNA 또는 합성 RNA를 포함할 수 있다.
- [0040] “작동가능하게 연결”된다는 것은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 의미한다.

- [0041] 일 실시예에 따르면, sgRNA는 U6-26 프로모터와 작동가능하게 연결될 수 있고, CRISPR/Cas13a를 발현하는 Cas13a 유전자는 종자 특이적 발현 프로모터와 작동가능하게 연결될 수 있다. 그에 따라, CRISPR/Cas13a를 종자 특이적 발현 프로모터 조절 하에 종자 특이적으로 발현시킬 수 있다.
- [0042] “CRISPR/Cas 시스템”이란 CRISPR/Cas 단백질 및 gRNA를 포함하는 복합체를 지칭하며, CRISPR/Cas13a는 RNA를 표적으로 하는 유전자 편집기술 중 하나이다. 특히, CRISPR/Cas13a는 식물에서 조직특이적으로 RNA 발현을 억제할 수 있다.
- [0043] CRISPR/Cas13a는 crRNA에 있는 짧은 헤어핀 구조인 DR (Direct Repeat)을 인식함으로써 gRNA와 복합체를 형성한다. 이후, 표적화 특이성을 높이는 PFS (Protospacer Flanking Site)를 인식하여 표적 RNA에 결합하고, 표적 RNA 위치상 5'에서 표적이 된 뉴클레오타이드 부위로부터 13 내지 24의 뉴클레오타이드에서 절단이 일어난다. 상기 표적 위치로부터 13 내지 24의 뉴클레오타이드 부위 내라면 그 위치의 제한 없이 절단이 일어날 수 있다.
- [0044] 예를 들어, FAB2 mRNA에서 서열번호 1의 19 내지 46의 뉴클레오타이드를 표적으로 하는 경우 31 내지 43번째, 57 내지 84의 뉴클레오타이드를 표적으로 하는 경우 70 내지 81번째, 566 내지 593의 뉴클레오타이드를 표적으로 하는 경우 579 내지 590 번째, 579 내지 606의 뉴클레오타이드를 표적으로 하는 경우 592 내지 603번째, 585 내지 612의 뉴클레오타이드를 표적으로 하는 경우 598 내지 609번째, 995 내지 1022의 뉴클레오타이드를 표적으로 하는 경우 1008 내지 1019번째, 1013 내지 1040의 뉴클레오타이드를 표적으로 하는 경우 1026 내지 1037번째 뉴클레오타이드 중 적어도 어느 하나에서 절단이 일어날 수 있다. 상기 표적 위치로부터 13 내지 24의 뉴클레오타이드 부위 내라면 그 위치의 제한 없이 절단이 일어날 수 있다.
- [0045] 식물체에서 FAB2 유전자를 단순히 녹아웃(knock-out) 시키는 경우에는 식물체 잎 및 종자 내의 포화지방산 함량이 증가하는 동시에 성장 결함의 문제가 발생하게 된다.
- [0046] 따라서, 본 발명에 따라 종자에서 특이적으로 발현하는 프로모터와 CRISPR/Cas13a를 이용하여 조직 특이적으로 FAB2 RNA를 절단할 필요가 있다. 이에 따라 식물체의 생장에 대한 문제를 일으키지 않으면서 동시에 종자 내 포화지방산 함량을 증가시킬 수 있다.
- [0047] “벡터”는 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있도록 제조된 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다. 본 발명에서 사용될 수 있는 벡터는 예컨대 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터 같은 바이러스 벡터 등을 포함한다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 등과 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함할 수 있으며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다.
- [0048] 본 발명 조성물에서 벡터는 종자 특이적 발현 프로모터; 이와 작동가능하게 연결된 Cas13a 유전자; 및 FAB2(Fatty acid biosynthesis 2) RNA를 표적으로 하는 gRNA를 포함한다.
- [0049] 상기 벡터를 당해 기술분야에 공지된 방법을 이용하여 식물 세포내로 도입할 수 있다. 상기 본 발명에 따른 벡터를 식물 세포내로 도입하는 방법으로는, 제한 없이 당해 공지된 방법이 사용할 수 있다. 예를 들어, 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법, 원형질체의 전기천공법, 식물 요소로의 현미주사법, 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법, 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질 전환에 의한 아그로박테리움 투머파시엔스 매개된 유전자 전이에서 바이러스에 의한 감염 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다.
- [0050] 서열번호 1은 본 발명의 실시예에서 사용된 모델 식물인 애기장대(Arabidopsis)의 전장 FAB2 RNA 서열을 나타낸 것이다.
- [0051] 상기 FAB2 RNA로부터 발현된 FAB2 단백질은 식물체에서 포화지방산을 불포화지방산으로 전환하는데 관여한다.
- [0052] “지방산”은 1개의 카복시기(-COOH)를 가지는 탄화수소 사슬을 의미한다. 자연 상태의 지방산은 대부분 4 내지 36개 정도의 짝수 개 탄소를 가지며, 지방산은 사슬의 포화(또는 탄소-탄소 이중결합) 여부에 따라 포화 또는 불포화 지방산으로 나눌 수 있다.
- [0053] “포화 지방산”은 단일결합으로 이루어진 지방산을 의미하며, “불포화 지방산”은 하나 이상의 탄소간 이중결합을 포함하는 지방산을 의미한다. 불포화 지방산은 탄소-탄소 이중결합이 시작하는 위치에 따라 오메가-3 지방산, 오메가-6 지방산, 오메가-7 지방산, 오메가-9 지방산으로 분류될 수 있으며, 예를 들면 오메가-9 지방산은 탄소 사슬 끝에서 아홉 번째 탄소에서부터 이중결합이 시작되는 불포화 지방산을 의미한다.

- [0054] 식물성 기름에서 포화지방산은 팔미트산(16:0), 스테아르산(18:0) 및 아라키드산 (C20:0)을 포함할 수 있고, 불포화 지방산은 올레인산(18:1^{Δ9}), 리놀레산(18:2^{Δ9,12}) 및 리놀렌산(18:3^{Δ9,12,15})이 포함될 수 있다.
- [0055] “대응되는 서열”이란 두 서열을 배열(alignment)하였을 때 그 서열이 서로 대응되는 서열을 의미하며, “대응되는 위치”는 상기 서열을 대응되는 서열과 배열하였을 때 대응되는 위치를 의미한다.
- [0056] 다수 식물 종이 FAB2를 발현할 수 있으나, 식물 종이 달라지면 FAB2의 서열 또는 길이가 달라질 수 있으므로, 특정 종 유래 FAB2 mRNA의 특정 위치 숫자가 다른 종에서는 달라질 수 있다. 이에, 서로 다른 FAB2 mRNA 서열을 배열하여, 그 대응 여부, 그 대응되는 위치를 확인할 수 있다.
- [0057] 예를 들면, 본 발명의 도 12a 내지 12d에서와 같이 상기 애기장대의 FAB2 단백질 서열을 여러 식물 종의 것들과 배열하여 대응하는 위치를 확인할 수 있다. 상기 FAB2 단백질 서열이 식물 종 사이에서 서열의 보존성이 높은 서열임을 확인할 수 있다.
- [0058] 본 발명에서 포화지방산 함량을 증가시킬 수 있는 종자는 FAB2 단백질을 발현하는 유료작물 (oil crops)의 종자일 수 있다. 예를 들면, 깨, 참깨, 들깨, 땅콩, 콩, 유채, 아마, 아주까리, 야자나무, 올리브, 동백, 잇꽃, 삼, 아마, 오동, 해바라기, 올리브, 낙화생, 동백, 피마자, 평지, 개암나무, 붉은 유칼립투스, 벼, 레스퀘렐라, 피마자 또는 옥수수 식물체의 종자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0059] 일 실시예에 따르면, 상기 종자 식물체에서 CRISPR/Cas13a를 종자 특이적 발현 프로모터 조절 하에 종자 특이적으로 발현시킬 수 있고, 서열번호 1의 서열에 대응되는 FAB2 RNA에서 서열번호 1에서 31 내지 43번째, 70 내지 81번째, 579 내지 590 번째, 592 내지 603번째, 598 내지 609번째, 1008 내지 1019번째, 또는 1026 내지 1037 번째 위치에 대응되는 위치 중 적어도 하나의 뉴클레오타이드에서 CRISPR/Cas13a으로 절단이 일어나 종자 특이적으로 FAB2의 mRNA 발현을 억제할 수 있다.
- [0061] 또한, 본 발명은 종자 내 포화지방산 함량을 증가시키는 방법에 관한 것이다.
- [0062] 본 발명의 종자 내 포화지방산 함량을 증가시키는 방법은 FAB2(Fatty acid biosynthesis 2) 단백질을 발현하는 식물체를 종자 특이적 발현 프로모터; 이와 작동가능하게 연결된 Cas13a 유전자; 및 FAB2(Fatty acid biosynthesis 2) RNA를 표적으로 하는 gRNA;를 포함하는 벡터로 형질전환하여,
- [0063] 상기 식물체의 FAB2(Fatty acid biosynthesis 2) RNA에서 서열번호 1에서 31 내지 43번째, 70 내지 81번째, 579 내지 590 번째, 592 내지 603번째, 598 내지 609번째, 1008 내지 1019번째, 또는 1026 내지 1037번째 위치에 대응되는 위치 중 적어도 하나를 절단하는 단계를 포함한다.
- [0064] 종자 특이적 발현 프로모터, gRNA, Cas13a 유전자, 벡터 및 식물체의 종자에 관한 설명은 전술한 바와 같다.
- [0065] “형질 전환”은 원래의 세포가 가지고 있던 것과 다른 종류의 유전자가 포함된 DNA 사슬 조각, 플라스미드 같은 벡터가 침투되어 원래 세포에 존재하던 DNA와 결합하여 유전형질을 변화시키는 것을 말한다.
- [0066] 식물의 형질 전환에 이용되는 “식물 세포”는 특별히 제한되지 않으며, 식물 세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양 기관 또는 전체 식물의 세포일 수 있고, 상기 조직은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들어 뿌리, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체 (protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다. 식물 조직은 인 플란타(in planta)이거나 기관 배양, 조직배양 또는 세포 배양 상태일 수 있다.
- [0067] 형질 전환은, 재조합 벡터를 이용하여 식물체의 세포를 형질전환하고, 상기 형질 전환된 식물체 세포로부터 형질 전환 식물체 세포를 재분화하는 단계를 포함할 수 있다. 형질 전환 식물체 세포로부터 형질 전환 식물체 세포를 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다.
- [0069] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.
- [0071] **실시예**
- [0072] **1. 재료 및 방법**
- [0073] **(1) 식물재료 및 성장 조건**
- [0074] 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)는 Col-0를 야생형 (wild type)으로 사용하였다. FAB2 T-DNA 삽입 돌연변이는

TAIR (The Arabidopsis Information Resource)를 통해 *fab2-1* (Salk_039852), *fab2-2* (SAIL_209_D07) 및 *fab2-3* (Salk_036854) 총 3개의 라인을 분양 받아 호모 돌연변이를 선발하였다. 야생형, 돌연변이체 및 형질전환체의 종자 발아를 위해 종자를 70% EtOH와 0.5% NaOCl을 이용하여 소독을 하였고 멸균수로 10번 세척을 하였다. 세척한 후 4℃ 암 상태에서 3일 동안 stratification 한 후 1% sucrose, 0.5% MS (Murashige and Skoog) agar 배지에 두었다. 치상된 종자는 $100 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ 16h/8h 빛/암 조건으로 23℃의 생장상 (growth chamber)에서 배양시켰다. 10일 배양된 유묘를 흙으로 이식하여 상기와 동일한 조건에서 생장시켰다.

[0076] (2) T-DNA 삽입 호모 돌연변이 선발

T-DNA 삽입 호모돌연변이체는 야생형과 T-DNA가 삽입된 *fab2* 돌연변이 개체의 rosette 잎에서 분리한 게놈 DNA를 대상으로 T-DNA border 영역과 T-DNA 삽입을 가운데 두고 FAB2 유전자 특이 LP 와 RP 프라이머를 이용하여 PCR하였다. 그 결과를 토대로 PCR DNA 단편의 크기 차이 분석을 통해 선발하였다. T-DNA 삽입 호모 돌연변이 선발용 프라이머는 T-DNA Primer design site (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>)를 이용하여 디자인 하여 제작하였다 (표 1).

[0079] (3) gRNA 디자인

FAB2 mRNA를 표적하는 guide RNA를 디자인하기 위해서 두 가지 방법을 사용하였다. 첫번째는 RNAs webserver (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAs/RNAs.cgi>)를 이용하여 RNA fold을 기반으로 mRNA target site accessibility를 계산하여 gRNA를 디자인하였다. 두번째로는 RNA fold webserver (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>)를 활용하여 centroid secondary structure를 예측하였다. 예측된 구조를 확인하여 주위 뉴클레오타이드와의 결합력이 높은 헤어핀 구조를 제외한 부분을 선택하였다. gRNA의 길이가 20 뉴클레오타이드 이상이어야 cleavage activity가 있으므로 28 mer로 디자인하였다. 벡터와의 결합을 위해 모든 gRNA에 AarI 제한효소 site도 삽입하였다 (표 1).

[0082] (4) 벡터 제작

Oleoin promoter: LwaCas13a-NosT세트와 Nos Promoter: hygromycin resistance gene-NosT 세트, 및 U6-26 promoter 하위에 gRNA를 삽입할 수 있는 pJY297 벡터에 FAB2 gRNA들을 제작하여 삽입하였다. gRNA 앞뒤로 AarI site를 추가하여 정방향(forward) 프라이머와 역방향(reverse) 프라이머를 제작하여 어닐링한 후 AarI으로 벡터를 cutting한 부위에 gRNA를 삽입하였다. Cutting한 벡터와 sgRNA를 T4 DNA 연결효소로 접합시켜 대장균에 형질전환(transformation) 하였다. 카나마이신(Kanamycin)에 저항성 콜로니를 대상으로 gRNA가 벡터에 클로닝 되었는지 확인을 위해 U6-26 프로모터 서열을 인식하는 정방향 프라이머와 gRNA를 인식하는 역방향 프라이머 (표 1)를 이용해 colony PCR을 진행하였다. 예상되는 PCR 밴드가 확인된 콜로니를 배양하여 플라스미드 DNA를 분리하여 생어 염기서열 분석(Sanger DNA sequencing)으로 gRNA가 올바르게 클로닝된 7종의 pCas13a-FAB2 벡터를 선발하였다.

[0085] (5) 형질전환체 식물 제작, 선발 및 분석

pCas13a-FAB2 벡터를 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101에 freezing-thawing 방법으로 형질전환 하였다. pCas13a-FAB2 벡터가 도입된 GV3101 세포용액에 애기장대의 꽃을 담겨서 감염시켜 pCas13a-FAB2가 들어 있는 T-DNA를 게놈에 삽입시켰다. 감염시킨 T0 식물체로부터 T1 세대를 종자를 수확하였다. T1 종자들을 25mg L^{-1} hygromycin B와 100mg L^{-1} carbenicillin 항생제가 포함된 MS 배지에서 14일 정도 기른 후 저항성을 보이는 개체를 선발하였다. 선발된 T1 형질전환체를 흙으로 이식하여 재배한 후 잎에서 벡터의 형질전환과 지방산 분석 및 T2 종자에서 지방산 분석을 수행하였다. pCas13a-FAB2 유전자가 애기장대 게놈에 삽입된 형질전환체임을 확인하였다. genomic DNA는 rosette 잎에서 200mM Tris-Cl(pH 8.0), 25mM EDTA, 250mM NaCl, 0.5% SDS 용액을 이용하여 분리하였다. 분리한 genomic DNA에 *Cas13a* 유전자를 인식하는 프라이머 (표 1)를 사용하여 PCR을 진행하여 형질전환체를 확인하였다.

[0088] (6) RT-PCR 분석

애기장대 잎으로부터 total RNA는 invitrogen사의 Trizol Reagent을 사용하여 추천 방법에 따라 분리하였다. 분리한 RNA용액에 DNase I을 처리한 후 total RNA를 회수하였다. 발달 종자로부터 total RNA 분리는 water-saturated acidic phenol를 이용한 방법을 사용하여 분리하였다 먼저 곱게 간 조직에 추출 용액 (0.4 M LiCl, 0.2 M Tris-HCl pH:8, 25mM EDTA, 1% SDS) 550 μL 과 클로로포름 550 μL 를 넣은 후 강하게 섞어준다. 14000 rpm에 3분간 원심분리 하여 상층액을 새로운 튜브로 옮긴다. 거기에 500 μL water-saturated acidic phenol과 200 μL

클로로포름을 더하여 섞은 뒤 3분간 원심분리 한다. 다시 상층액을 새로운 튜브에 옮겨 200 μ L 클로로포름을 넣어 섞어 3분간 원심분리 하여 나온 상층액과 상층액 1/3 양의 8M LiCl을 혼합하여 -20℃에서 한시간동안 침전시킨 뒤 14,000rpm, 4℃ 조건으로 30분간 원심분리 한다. 그렇게 나온 펠렛에 26 μ L DEPC-water와 3 μ L 10X DNase I buffer와 1 μ L DNase I을 넣어 37℃에서 30분간 반응시켜준다. 반응이 끝나면 470 μ L DEPC-water, 7 μ L 3M NaAc pH:5.2와 250 μ L 에탄올을 넣고 잘 섞은 뒤 14,000rpm, 4℃ 조건으로 10분간 원심분리 한다. 상층액을 새로운 튜브로 옮기고 43 μ L 3M NaAc pH: 5.2와 750 μ L 에탄올을 넣어 섞어서 -20℃에서 한시간동안 침전시킨 뒤 14,000rpm, 4℃ 조건으로 20분간 원심분리 한다. 나온 펠렛을 70% 에탄올로 씻은 후 말려서 20 μ L DEPC-water에 희석하였다 (Onate-Sanchez and Vicente-Carbajosa, 2008).

[0090] cDNA는 NEX cDNA 합성 키트와 Takara cDNA 합성 키트를 이용하여 각 추천 방법에 따라 total RNA로부터 합성하였다. RT-PCR은 NEX사의 e-Taq을 사용하였다. 애기장대 eIf4a 유전자를 대조구로 PCR 확인 및 상대 기준으로 하여 발현 분석을 진행하였다. *FAB2* 발현확인을 위한 프라이머 서열은 *FAB2*의 CDS를 증폭하는 염기서열을 포함하였다 (표 1).

[0092] (7) 지방산 분석

[0093] 약 20 mg의 rosette 잎과 20-30개의 종자로부터 지방산을 분리하여 분석하였다. 각 시료를 유리 튜브에 넣고 500ml toluene과 500ml internal standard (15:0-TAG)가 들은 H₂SO₄을 넣어주었다. 85℃water bath에서 2시간 정도를 끓인 다음 10분 정도 식히고 1ml 0.9% NaCl 용액을 넣어 주었다. n-hexane을 넣고 바로 섞은 후 원심분리하여 fatty acid methyl ester (FAME)가 포함된 용액층을 분리하였다. FAME 층을 따내어 새로운 튜브로 옮긴 후 질소 가스를 이용하여 purge 침전시켰다. 침전된 지질을 200 μ L n-hexane으로 FAME를 녹인 후 gas chromatography 분석을 진행하였다. 추출된 FAME은 GC-2030 (Shimadzu)를 이용하여 분석을 진행하였고 DB-23 column (30m x 0.25mm, 0.25um film, Agilent)를 이용하였다. GC 오븐의 온도는 190℃에서 230℃까지 분당 3℃씩 높여서 분석하였다.

[0095] (8) 종자 저항성 개체, 발아율, 크기 및 무게 분석

[0096] 형질전환체 종자 중 도입 항생제 유전자 저항성을 가진 개체를 확인하기 위해 대조구인 야생형과 분석할 형질전환체 라인의 종자를 세척한 후 4℃ 암 상태에서 3일동안 stratification 한 후 25mg L⁻¹ hygromycin, 1% sucrose, 0.5% MS (Murashige and Skoog) agar 배지에 각각 종자 44개씩 치상하여 2주간 100 μ mol-2s-1 16h/8h 빛/암 조건으로 23℃의 생장상에서 배양시킨 뒤 개수하였다.

[0097] 발아율 분석을 위해 대조구인 야생형, T-DNA 삽입 호모 돌연변이체인 *fab2-1*, *fab2-2* 및 *fab2-3*과 분석할 라인의 종자들을 70% EtOH와 0.5% NaOCl을 이용하여 소독을 하였고 멸균수로 10번 세척을 하였다. 종자를 세척한 후 4℃ 암 상태에서 3일동안 stratification 한 후 1% sucrose, 0.5% MS (Murashige and Skoog) agar 배지에 각각 종자 50개씩 치상하여 총 3반복을 수행하였다. 치상한 종자는 100 μ mol-2s-1 16h/8h 빛/암 조건으로 23℃의 생장상에서 배양시키며 12시간 간격으로 발아여부를 확인하였다.

[0098] 종자의 크기는 무작위적으로 같은 라인의 종자 20개씩 3반복 수행하여 SMZ745T (Nikon) 현미경으로 길이를 알 수 있는 자와 같이 사진을 찍었다. 상기 사진은 image J 프로그램을 이용하여 종자의 가로와 세로를 측정하였으며 두 값을 곱하여 비교하였다. 종자의 무게는 백립중을 기준으로, 5반복 수행하였다.

[표 1] 프라이머 목록

T-DNA homozygous mutant selection		
<i>fab2-1</i>	LP	GTCGGAAGTGCTTCTTCTGTG (서열번호 9)
	RP	ATAAGAATGGGCCATCCTCTG (서열번호 10)
<i>fab2-2</i>	LP	AACAGACATTGAGGAAAGCTTC (서열번호 11)
	RP	CTTTTCGATCTGCCTCATGTC (서열번호 12)
<i>fab2-3</i>	LP	TGAAGAAACCATTACGCCAC (서열번호 13)
	RP	GAATCTTGGGTCCTTCTTGG (서열번호 14)
LBb1.3	genotyping	ATTTTGGCGATTTTCGGAAC (서열번호 15)
LB2	genotyping	GCTTCCTATTATATCTTCCCAAATTACCAATACA (서열번호 16)
Gene expression analysis		
Cas13a	F	ACAGCGTGCTGTATCTGAAG (서열번호 17)
	R	ACACGTATTTCTCTTCGCCC (서열번호 18)
RT-FAB2	F	ATGGCTCTAAAGTTTAACCT (서열번호 19)
	R	TTAGAGCTGCACTTCTCTGT (서열번호 20)
RT-eIF4a	F	CGTGGTTTCAAGGACCAGAT (서열번호 21)
	R	ATTGATCGCAACACCCTTTCT (서열번호 22)
sgRNA construction		
sgRNA1	F	AAACATTTGTAAGGCTGAGATGCCACCAAAGG (서열번호 23)
	R	AAAACCTTTGGTGGCATCTCAGCCTTACAAAT (서열번호 24)
sgRNA2	F	AAACTCTGAAAGAAGGAGTTGGCGGACGAGTC (서열번호 25)
	R	AAAAGACTCGTCCGCCAACTCCTTCTTTCAGA (서열번호 26)
sgRNA3	F	AAACACACGACCAGACAAGTAAAGGTATTTAT (서열번호 27)
	R	AAAAATAAATACCTTTACTTGTCTGGTCGTGT (서열번호 28)
sgRNA4	F	AAACCTGCCTCATGTCAACACGACCAGACAAG (서열번호 29)
	R	AAAACCTTGCTGGTCGTGTGACATGAGGCAG (서열번호 30)
sgRNA5	F	AAACTTCGATCTGCCTCATGTCAACACGACCA (서열번호 31)
	R	AAAATGGTCGTGTTGACATGAGGCAGATCGAA (서열번호 32)
sgRNA6	F	AAACAACCTCAAGAATGTCTGCATAGTCTTTGG (서열번호 33)
	R	AAAACCAAAGACTATGCAGACATTCTTGAGTT (서열번호 34)
sgRNA7	F	AAACTTCCACCTACCAACCAGAACTCAAGAA (서열번호 35)
	R	AAAATTCTTGAGTTTCTGGTTGGTAGGTGGAA (서열번호 36)
U6-26P	F	AACCTTCAAGAATTTGATTGAATA (서열번호 37)

[0101]

[0103] 2. 결과

[0104] (1) *fab2* T-DNA 삽입 돌연변이 선발

[0105]

TAIR로부터 분양 받은 *fab2* 유전자 영역에 T-DNA 삽입된 Salk_039852, SAIL_209_D07 및 Salk_036854 라인에 대해 분석하였다. T-DNA 삽입 돌연변이를 확보한 결과 각 라인별 FAB2 유전자내 T-DNA 삽입 위치가 달랐다. Salk_039852은 인트론 1에, SAIL_209_D07은 엑손 2에, Salk_036854은 엑손 3에 T-DNA가 삽입되어 있었다. 삽입 위치를 5' 쪽으로부터 순서에 따라 *fab2-1*, *fab2-2* 및 *fab2-3* 돌연변이체로 명명하였다 (도 3A). 각 라인에 맞는 LP와 RP 프라이머를 제작하였고 라인에 따른 각 T-DNA에 맞는 BP를 디자인하여 유전형 분석(genotyping)을 진행하였다 (표 1). 각각 30개체씩 genotyping을 진행하였으며 Salk 라인인 *fab2-1*과 *fab2-3*은 LBb1.3을 BP로 사용하였으며 SAIL 라인인 *fab2-2*는 LB2를 BP로 사용하였다. 분석 결과 BP+RP PCR 단편의 크기가 예상하였던 500bp에서 800bp에서 확인되었으며 LP+RP PCR 단편은 확인되지 않았기 때문에 T-DNA 삽입 호모 돌연변이체임을 확인할 수 있었다 (도 3B).

[0106]

확인된 T-DNA 삽입 호모 돌연변이의 앞에서 분리한 RNA를 이용하여 RT-PCR을 진행하였다. 발현의 정도는 하우스 키핑 유전자(housekeeping gene)인 eIF4a를 기준하였다. 비교한 결과 인트론에 T-DNA가 있는 *fab2-1*은 FAB2 유전자가 야생형에 비해 약하게 발현하는 것을 확인하였고 엑손에 T-DNA가 있는 *fab2-2* 및 *fab2-3* 라인은 FAB2 유전자가 발현하지 않았다 (도 3C). 이 결과를 토대로 *fab2* 돌연변이개체를 선별하여 생장 표현형을 관찰하였다.

치상 후 5주차에 관찰한 결과 야생형 대비 *fab2* 돌연변이체 모든 종류라인에서 생장에 문제가 생김을 알 수 있었다. 세 라인 모두 rosette 잎의 크기가 작으며 슈트 (shoot)가 올라오는 시기가 늦어졌고 실리크 (silique)의 크기도 작아졌다 (도 3D). 세 라인 중 T-DNA 가 인트론에 삽입되어 스플라이싱(splicing)이 일어날 경우에 해당 하는 *FAB2*가 약한 발현을 보인 *fab2-1* 라인이 어느정도 야생형과 비슷하게 생장을 보였다.

[0108] (2) *fab2* 돌연변이 지방산 조성 및 종자 형태 분석

fab2-1, *fab2-2* 및 *fab2-3* 돌연변이체에 대한 식물의 잎 지방산과 종자 지방산 분석을 진행하였다 (표 2 및 표 3). 지방산 분석의 정확성을 위해 *fab2* 돌연변이를 세대 진전 후 호모 돌연변이체 라인임을 genotyping으로 확인 후 진행하였다. 야생형 잎에서 16:0이 20%정도 존재하였다면 *fab2-1*은 약 27%, *fab2-2*는 약 28%, *fab2-3*은 약 30%로 증가하였다. 18:0은 야생형에서 약 5%이며 *fab2* 돌연변이 순서대로 각각 약 26%, 27% 및 31%로 큰 증가를 보였다 (도 4A). 종자에서는 야생형과 *fab2* 돌연변이 간에 16:0 경우 유의적 변화 차이는 없으나 18:0은 야생형에서 약 3%인 반면 *fab2-1*, *fab2-2* 및 *fab2-3* 약 10%까지 크게 증가하였다. 또한 20:0은 야생형에서 2%인 반면 *fab2-1*, *fab2-2* 및 *fab2-3* 약 6%까지 증가한 것을 확인하였다 (도 4B).

야생형 대비 *fab2* 돌연변이체로부터 수확한 종자의 크기와 형태를 관찰하였을 때 *fab2-2*와 *fab2-3*의 종자들 중 발달이 제대로 되지 않은 종자가 있음을 확인하였다 (도 4C). 종자의 크기는 야생형과 비교하였을 때 *fab2-1*과 *fab2-2*가 유의적으로 증가하였고 종자 무게는 *fab2-1*과 *fab2-2*가 유의적으로 증가하였다 (도 4D 및 도 4E).

[표 2] T-DNA 돌연변이 잎의 지방산 조성

Fatty acid ^a (%)	WT				<i>fab2-1</i>				<i>fab2-2</i>				<i>fab2-3</i>			
	1 ^b	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
16:0	17.1	16.9	21.6	24.5	18.8	32.1	29.6	28.5	24.5	30.8	31.2	28.8	27.5	29.9	29.6	34.9
16:1	2.4	1.7	3.4	2.7	0.8	0.3	0.6	0.3	0.7	0.6	0.4	0.4	0.5	0.9	0.8	0.5
16:2	3.7	2.8	4.6	4.9	2.2	2.2	2.1	2.8	2.1	1.1	1.4	1.6	2.7	1.9	0.4	0.5
16:3	12.3	12.7	12.8	11.9	8.8	5.8	4.0	4.8	7.1	2.8	2.6	3.8	3.8	4.1	5.5	0.4
18:0	5.1	5.1	2.4	5.3	20.9	26.0	26.8	30.8	18.8	31.7	31.8	27.5	18.9	27.9	33.6	44.4
18:1	2.7	3.3	2.1	2.3	4.8	9.0	7.0	8.8	9.7	14.2	9.2	7.9	9.2	12.7	16.7	
18:2	13.8	11.4	11.5	14.4	11.5	5.6	5.6	4.7	8.0	4.7	5.6	5.2	7.6	6.3	4.1	1.3
18:3	42.9	46.0	41.6	34.0	32.2	19.0	24.4	19.1	31.9	18.6	12.8	23.5	31.1	19.8	13.4	1.4
SFAs ^c	22.2	22.0	24.0	29.8	39.8	58.1	56.3	59.4	43.3	62.5	63.0	56.2	46.4	57.9	63.2	79.2

^a average % of fatty acid (n=4)

^b number indicates independent plant

^c Saturated fatty acids are sum of 16:0+18:0

[표 3] T-DNA 돌연변이 종자의 지방산 조성

Fatty acid ^a (%)	WT			<i>fab2-1</i>			<i>fab2-2</i>			<i>fab2-3</i>		
	1 ^b	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
16:0	9.8	9.6	9.7	9.0	8.8	8.5	8.9	7.8	9.0	8.8	9.4	10.3
18:0	3.1	3.4	3.0	9.8	9.9	8.8	9.6	10.6	9.7	11.3	11.8	10.9
18:1	12.1	14.5	12.5	12.7	11.9	12.5	16.8	10.2	16.0	10.4	10.3	10.3
18:2	33.2	33.6	34.6	27.5	28.0	29.6	29.6	28.7	30.1	28.3	26.8	29.1
18:3	20.0	17.8	19.6	18.8	18.4	18.9	16.2	18.7	15.9	17.7	18.5	18.3
20:0	2.2	2.0	2.3	5.5	5.9	5.6	4.9	7.3	4.9	7.1	6.7	6.0
20:1	15.4	15.6	14.7	14.0	14.2	13.2	12.1	13.7	12.4	13.6	13.6	12.2
20:2	2.1	1.8	2.0	1.4	1.5	1.5	1.0	1.6	1.1	1.6	1.6	1.5
22:1	2.2	1.9	1.7	1.4	1.3	1.4	0.8	1.4	1.0	1.3	1.4	1.4
SFAs ^c	15.1	15.0	14.9	24.2	24.6	22.8	23.4	25.7	23.6	27.2	27.8	27.2

^a average % of fatty acid (n=3)

^b number indicates independent plant

^c Saturated fatty acids are sum of 16:0+18:0+20:0

[0118] (3) *FAB2* mRNA 표적 gRNA 제작 및 종자 특이적 Cas13a 발현 벡터제작

*FAB2*의 mRNA를 억제하기 위해 Cas13a가 *FAB2*를 인식하여 작동할 수 있도록 gRNA를 두 가지 프로그램을 이용하여 선택하였다. 첫번째는 RNAi를 이용하여 mRNA를 억제하는 프로그램을 사용하여 표적 RNA의 5' 부분 쪽에 위치한 guide RNA 1과 2를 디자인하였다. sgRNA 1은 *FAB2* 유전자의 뉴클레오타이드 19에서 46까지를 표적하고 sgRNA 2는 57에서 84까지를 표적한다 (도 5A, 5B 및 5C). 두번째로 RNA *FAB2*의 2차구조를 열역학 ensemble의 자유에너지를 기반으로 centroid secondary structure를 예측하였다 (도 5A). 염기 간의 결합력이 낮은 두 부분을 기점으로 protospacer flanking site (PFS)를 고려하여 5개의 guide RNA를 제작하였다. sgRNA3은 566에서 593, sgRNA4는 579에서 606, sgRNA5는 585에서 612, sgRNA6은 995에서 1,022, sgRNA7은 1,013에서 1,040 뉴클레오타이드까지를 표적으로 한다 (도 5B 및 도 5C).

상기 제작한 7종의 *FAB2* mRNA 표적 gRNA를 종자에서만 특이적으로 작동할 수 있도록 종자에서 강한 발현을 보이는 올레오신 1 (*OLE1*) 유전자의 프로모터 하에 Cas13a가 발현되도록 하였다. 각각의 sgRNA는 U6-26 프로모터 조

절하에 발현되었다 (도 5D).

[0122] (4) FAB2-Cas13a T1 형질전환체 선발

[0123] 7종의 Cas13a-FAB2 벡터를 각각 5포트, 포트당 7개체의 애기장대를 키워 *Agrobacterium*를 개화시기에 접종하여 T1 종자를 수확하였다. 각 벡터마다 0.06g의 종자를 hygromycin이 첨가된 배지에서 저항성 T1 식물체를 선발하였다. Cas13a-FAB2 벡터가 형질전환되어 hygromycin 저항성을 보이는 형질전환체는 Cas13a-FAB2_1은 31개체, Cas13a-FAB2_2는 19개체, Cas13a-FAB2_3는 19개체, Cas13a-FAB2_4는 20개체, Cas13a-FAB2_5는 21개체, Cas13a-FAB2_6는 17개체 및 Cas13a-FAB2_7은 29개체를 각각 얻었다. 7종의 벡터에서 총 156 개체의 형질전환체를 확보하였다. 이들 개체의 앞에서 genomic DNA를 분리하여 *Cas13a* 유전자 서열을 인식하는 프라이머를 이용하여 PCR 하여 형질전환체에 Cas13a가 genome에 삽입되었음을 확인하였다 (도 6). Cas13a-FAB2_1 라인 중 19번 개체를 제외한 총 155 개체가 형질전환체임을 확인하였다.

[0125] (5) FAB2-Cas13a T1 형질전환체로부터 수확한 T2 종자 지방산 분석

[0126] 7종의 Cas13a-FAB2 벡터 T1 형질전환체에서 종자를 수확하여 지방산을 분석하였다 (표 4 내지 표 6). FAB2 gRNA에 의해 *FAB2*가 종자발달과정에서 발현이 억제되어 포화지방산의 함량이 증진되었는지를 조사하였다. 종자의 포화지방산 함량은 16:0+18:0+20:0에 해당하는 3종류의 포화지방산의 합으로 계산하였다. Cas13a-FAB2_1은 29개체, Cas13a-FAB2_2는 17개체, Cas13a-FAB2_3는 15개체, Cas13a-FAB2_4는 17개체, Cas13a-FAB2_5는 16개체, Cas13a-FAB2_6는 13개체 및 Cas13a-FAB2_7은 27개체에 대한 종자를 분석한 결과 포화지방산 (saturated fatty acids: SFAs)이 야생형 경우 약 15%인 것과 비교하였을 때 15%-50%까지 다양하게 큰 폭으로 변화하여 증진된 것을 7종의 gRNA 도입에서 관찰할 수 있었다 (도 7). Cas13a-FAB2_7라인에서는 포화지방산이 최대 58.3%까지 증가하였다. 이 결과는 7종의 FAB2의 모든 gRNA가 종자에서 발현되는 FAB2 mRNA 억제하고 있음을 보여주었다 (도 7).

[0127] Cas13a-FAB2의 7개 gRNA 형질전환 T1 라인들 중에 각 gRNA별 종자에서 포화지방산이 크게 증가한 대표 개체 3개의 표현형을 관찰하였다. Cas13a-FAB2_1라인은 13, 27, 17번 개체, Cas13a-FAB2_2는 19, 8, 11번 개체, Cas13a-FAB2_3은 18, 1, 10번 개체, Cas13a-FAB2_4는 6, 4, 2번 개체, Cas13a-FAB2_5는 16, 1, 15번 개체, Cas13a-FAB2_6은 6, 5, 4번 개체 및 Cas13a-FAB2_7은 10, 15, 1번 T1 개체들의 생장 표현형을 살펴보았을 때 포화지방산의 비율이 높았던 *fab2* T-DNA 돌연변이체들과는 달리 잎의 크기나 잎의 모양이 야생형과의 생장 차이가 거의 없었다 (도 8).

[표 4] 7개의 Cas13a-FAB2 T1 라인으로부터의 T2 종자의 지방산 조성(1)

Fatty acid		WT		Cas13a-FAB2_1																													
		1 ^a	2	3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	17	18	20	21	22	23	24	25	26	27	28	30	31	32
16:0		8.8	9.6	8.7	10.3	9.4	8.9	9.3	8.8	8.8	8.5	8.6	9.1	9.3	8.9	9.7	18.1	14.2	10.9	16.7	11.8	14.4	12.8	10.4	10.2	9.8	14.6	14.4	18.9	16.2	16.4	8.9	8.7
18:0		3.0	3.6	3.4	4.1	3.9	3.8	3.6	3.8	3.6	4.0	4.2	4.4	4.2	4.0	4.4	20.1	9.7	6.3	17.9	8.1	14.3	9.2	5.7	5.8	4.8	11.5	12.5	17.9	15.4	16.9	3.6	4.0
18:1		16.8	14.9	17.2	12.8	13.3	17.0	15.4	14.9	15.6	17.7	15.8	15.1	15.4	19.0	16.6	16.5	17.3	17.2	17.5	18.8	15.5	16.6	15.3	16.5	15.8	16.1	17.0	18.9	17.3	16.0	16.9	
18:2		31.8	33.4	31.2	32.2	32.4	30.7	30.8	31.7	30.4	30.8	31.4	31.3	28.1	29.8	19.3	29.9	29.3	20.3	27.3	22.9	27.2	31.2	27.0	30.1	25.1	23.7	21.1	21.6	22.3	31.6	30.6	
18:3		17.3	18.7	16.8	19.0	18.1	17.0	17.8	16.8	17.2	15.8	17.2	15.8	17.2	15.5	16.6	11.1	15.7	15.3	12.2	15.0	11.8	15.4	14.0	18.8	16.4	15.0	15.9	11.3	11.0	11.6	17.3	16.2
20:0		2.0	1.9	2.0	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.2	2.1	2.3	2.3	1.9	2.2	1.8	1.9	1.9	1.6	1.9	1.7	1.8	2.3	2.2	2.1	1.9	1.5	1.5	1.8	2.1	2.2	
20:1		17.4	14.9	17.7	16.0	17.0	17.6	17.6	18.3	18.9	18.6	18.5	17.4	17.7	19.1	17.0	11.4	12.6	16.4	12.1	15.9	14.1	15.4	16.5	17.5	17.3	13.6	13.3	10.5	13.3	11.7	17.3	18.4
20:2		1.6	1.6	1.5	1.8	1.7	1.4	1.6	1.7	1.6	1.7	1.6	1.4	1.5	1.8	1.4	1.3	1.0	1.2	1.0	1.3	1.4	1.5	1.4	1.2	1.1	0.8	0.9	1.0	1.6	1.5		
22:1		1.3	1.4	1.5	1.7	1.7	1.5	1.6	1.9	1.7	1.6	1.8	1.6	1.7	1.5	1.0	1.5	1.3	0.9	1.2	1.1	1.4	1.7	1.8	1.6	1.4	1.2	0.9	1.1	1.1	1.6	1.5	
SFAs ^b		13.8	15.1	14.1	16.5	15.7	14.9	15.2	14.7	14.7	14.5	14.3	15.4	15.7	15.2	17.1	30.9	25.8	19.2	36.3	21.8	30.4	23.9	18.5	18.1	16.8	28.0	28.7	38.4	33.1	35.0	14.6	14.9

Fatty acid		Cas13a-FAB2_2																											
		1	2	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19											
16:0		11.1	9.8	10.6	13.3	10.6	9.3	20.4	9.1	19.5	14.6	14.6	11.8	14.9	16.2	14.2	12.5	20.8											
18:0		6.7	5.1	6.1	7.8	6.6	4.5	20.7	3.0	21.2	13.1	11.2	8.0	12.7	15.6	10.6	8.6	22.2											
18:1		19.8	18.2	20.3	15.0	18.6	18.1	16.8	16.3	16.5	14.8	16.9	17.6	17.0	19.8	16.3	18.5	17.0											
18:2		28.4	30.0	28.5	30.4	29.9	30.5	20.4	34.2	20.1	26.5	25.4	27.9	24.0	23.0	26.9	27.9	18.0											
18:3		14.0	15.1	14.2	16.0	13.6	15.1	10.0	16.2	10.1	13.6	14.1	14.9	13.8	8.5	14.0	12.9	9.6											
20:1		18.1	19.7	19.7	19.1	18.5	2.0	1.5	2.0	1.5	2.0	1.8	1.9	1.7	1.5	1.8	1.8	1.4											
20:2		15.9	17.1	16.1	13.0	16.1	17.7	8.6	16.0	9.5	13.0	13.5	13.4	13.5	13.1	13.8	15.5	9.4											
22:1		1.2	1.4	1.1	1.3	1.5	0.8	1.6	0.9	1.3	1.2	1.3	1.1	1.2	1.3	1.2	1.3	1.0											
22:2		1.2	1.4	1.4	1.4	1.5	1.6	0.7	1.5	0.7	1.2	1.1	1.2	1.2	1.0	1.2	1.1	0.7											
SFAs		19.6	16.8	18.4	23.0	19.1	15.6	42.6	14.1	42.2	29.7	27.7	21.7	29.4	33.3	26.6	29.9	44.4											

Fatty acid		Cas13a-FAB2_3																											
		1	2	3	4	7	8	9	10	11	12	15	16	17	18	19													
16:0		19.2	8.8	9.6	10.1	13.1	14.2	13.4	14.2	12.1	9.6	9.7	8.7	10.4	18.9	12.9													
18:0		19.5	4.0	4.8	6.6	10.2	11.2	10.5	12.0	8.0	4.8	4.9	3.5	5.2	20.5	9.8													
18:1		17.0	17.5	16.8	18.9	16.7	16.1	15.6	16.2	14.8	15.6	15.1	14.5	13.0	18.7	17.8													
18:2		18.9	30.6	30.5	27.0	28.5	24.7	25.9	23.7	27.9	30.2	30.2	30.5	31.5	16.9	26.8													
18:3		10.8	16.2	16.6	14.6	14.2	15.4	14.9	14.4	15.8	16.7	17.4	18.0	17.0	10.2	12.8													
20:1		1.6	2.1	2.1	1.9	2.0	1.9	2.0	2.0	2.1	2.3	2.3	2.3	2.6	1.6	2.0													
20:2		1.1	1.5	1.5	1.3	1.3	1.5	1.3	1.5	1.4	1.7	1.6	1.8	1.7	1.0	1.2													
22:1		1.0	1.4	1.5	1.4	1.2	1.2	1.1	1.2	1.1	1.4	1.4	1.5	1.7	1.4	0.9	1.1												
SFAs		40.3	14.9	16.5	18.5	25.3	27.2	26.0	28.3	22.2	16.7	16.9	14.3	18.1	41.1	24.7													

^a number indicates independent plant
^b Saturated fatty acids are sum of 16:0+18:0+20:0
Red number indicate top three SFAs in each line

[0130]

[0132] [표 5] 7개의 Cas13a-FAB2 T1 라인으로부터의 T2 종자의 지방산 조성(2)

Fatty acid	Cas13a-FAB2_4																		
(%)	2 ^a	3	4	5	6	7	8	9	10	12	13	14	16	17	18	19	20		
16:0	13.2	12.2	19.6	12.1	23.2	8.4	8.2	8.5	12.0	9.5	8.9	9.0	8.6	9.4	8.1	8.6	8.3		
18:0	11.1	9.3	20.2	7.8	26.6	3.2	3.1	3.4	6.9	4.2	3.9	3.6	3.1	3.8	3.3	3.2	3.1		
18:1	19.3	18.6	17.9	15.4	17.3	18.8	18.1	20.2	15.5	16.9	17.9	16.3	17.7	16.0	20.9	17.7	19.5		
18:2	25.0	27.4	18.9	29.3	14.3	30.6	30.8	29.8	29.9	30.8	31.5	32.4	32.2	32.7	30.4	31.2	30.9		
18:3	12.0	13.7	9.6	15.4	7.7	15.9	16.7	16.0	16.3	16.8	15.3	16.5	16.2	16.4	14.5	16.5	14.9		
20:0	1.7	1.9	1.7	2.3	1.4	2.1	2.1	1.9	2.1	2.2	2.4	2.3	2.1	2.2	2.1	2.2	1.9		
20:1	15.2	14.5	10.3	15.2	8.0	18.1	17.8	17.5	14.4	16.6	17.4	16.7	17.1	16.4	18.0	17.7	18.4		
20:2	1.1	1.2	1.1	1.4	0.8	1.4	1.5	1.3	1.5	1.4	1.4	1.5	1.5	1.6	1.4	1.6	1.5		
22:1	1.4	1.3	0.9	1.3	0.7	1.6	1.6	1.4	1.4	1.4	1.4	1.6	1.5	1.4	1.4	1.4	1.5		
SFAs ^b	26.0	23.3	41.4	22.2	51.2	13.6	13.5	13.7	21.0	16.0	15.1	14.9	13.7	15.4	13.5	14.0	13.4		

Fatty acid (%)	Cas13a-FAB2_5																
	1	3	4	6	7	8	9	11	13	14	15	16	18	19	20	21	
16:0	16.3	9.2	10.6	9.0	9.9	10.0	8.8	9.3	9.0	11.2	16.1	16.9	11.5	9.7	9.3	8.8	
18:0	14.9	4.1	5.6	4.4	4.9	5.3	4.0	4.0	3.9	7.7	14.5	17.2	7.2	4.6	4.3	3.7	
18:1	18.0	17.9	17.6	20.1	19.0	18.5	20.8	18.4	19.0	18.9	17.3	19.0	17.7	17.8	18.3	19.2	
18:2	23.1	30.2	29.1	29.5	30.1	30.2	30.5	31.8	29.3	27.8	23.0	20.4	28.6	30.5	30.4	31.1	
18:3	11.4	16.4	16.7	14.8	15.2	14.4	15.9	14.8	16.4	14.3	12.7	10.8	15.0	15.8	15.5	15.2	
20:0	1.8	2.1	2.1	2.1	1.9	2.1	1.8	2.1	2.0	2.0	1.9	1.6	2.1	2.2	2.0	2.1	
20:1	12.3	17.3	15.8	17.3	16.4	16.9	15.9	17.1	17.5	15.7	12.4	12.5	15.4	16.6	17.4	17.3	
20:2	1.0	1.4	1.2	1.3	1.2	1.3	1.1	1.4	1.3	1.2	1.2	0.8	1.2	1.4	1.5	1.4	
22:1	1.0	1.4	1.2	1.4	1.4	1.3	1.1	1.2	1.5	1.2	0.9	0.9	1.2	1.4	1.4	1.2	
SFAs	33.0	15.4	18.3	15.6	16.7	17.4	14.6	15.3	14.9	20.9	32.4	35.7	20.9	16.6	15.7	14.6	

Fatty acid (%)	Cas13a-FAB2_6													
	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	15	17	
16:0	10.1	11.3	12.8	12.7	16.8	10.6	12.2	10.7	9.5	9.5	8.0	9.1	10.0	
18:0	5.0	6.4	8.6	9.6	16.4	6.1	7.7	5.9	4.5	3.9	3.0	3.6	4.5	
18:1	16.1	18.0	17.9	16.5	18.2	17.2	15.7	17.8	17.9	15.5	19.7	18.2	17.2	
18:2	30.6	30.6	29.0	27.2	22.6	29.8	32.2	30.6	31.0	33.5	30.6	31.3	35.0	
18:3	16.4	14.2	13.6	15.4	10.1	15.0	14.8	14.6	15.6	16.5	15.2	15.7	15.0	
20:0	2.0	2.1	1.9	2.1	1.7	2.1	2.3	2.1	2.0	2.4	2.0	2.0	2.2	
20:1	16.8	15.0	13.7	14.1	12.3	16.4	12.6	15.5	16.8	15.6	18.5	17.4	13.5	
20:2	1.6	1.2	1.1	1.1	0.9	1.3	1.2	1.3	1.4	1.5	1.5	1.4	1.4	
22:1	1.4	1.3	1.3	1.4	1.1	1.5	1.3	1.5	1.4	1.6	1.5	1.4	1.2	
SFAs	17.1	19.7	23.4	24.4	34.8	18.8	22.2	18.7	16.0	15.8	13.0	14.6	16.8	

^a number indicates independent plant

^b Saturated fatty acids are sum of 16:0+18:0+20:0

Red number indicate top three SFAs in each line

[0133]

[0136] [표 6] 7개의 Cas13a-FAB2 T1 라인으로부터의 T2 종자의 지방산 조성(3)

Fatty acid (%)	Cas13a-FAB2_7																											
	1 ^a	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14	15	16	17	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
160	13.2	13.0	8.9	8.3	9.0	8.9	8.9	11.5	26.3	9.6	8.8	8.9	8.7	19.5	9.3	8.8	9.1	10.8	14.0	10.4	8.9	8.7	8.5	9.1	9.3	9.5	9.0	9.0
180	11.5	11.3	3.2	3.5	3.3	3.2	3.0	7.3	30.8	4.0	3.5	3.9	3.5	20.7	3.1	3.3	4.0	6.2	10.2	5.7	3.9	3.7	3.2	3.9	3.6	4.4	3.5	3.5
181	19.1	20.7	18.1	18.3	17.2	17.6	18.2	17.8	19.5	16.3	18.8	18.5	18.6	18.8	18.0	17.6	18.6	17.6	18.7	19.0	21.1	20.3	19.0	18.7	16.9	18.5	18.3	18.3
182	25.9	24.8	32.9	31.7	32.1	32.7	33.9	29.7	10.8	30.3	31.4	31.5	30.7	17.9	32.0	32.6	31.1	30.4	26.4	30.1	31.1	30.3	31.3	31.0	32.8	30.8	32.7	32.7
183	12.5	11.7	14.9	15.4	16.1	16.0	14.5	13.7	5.2	18.2	15.6	15.4	15.8	9.2	15.7	15.7	15.3	14.9	12.4	14.5	13.7	15.2	15.1	15.1	15.5	16.0	15.2	15.2
200	1.8	1.9	2.2	2.3	2.2	2.2	2.0	2.2	1.2	2.3	2.1	2.1	2.1	1.6	2.3	2.2	2.1	1.9	2.1	2.1	1.9	2.1	2.0	2.3	2.1	2.2	2.1	2.2
201	13.9	14.4	16.9	17.6	16.9	16.3	16.6	15.1	5.3	16.4	17.0	16.8	17.6	10.4	16.9	16.7	16.9	15.3	13.9	15.6	16.5	17.3	17.8	17.2	16.8	16.1	16.2	16.2
202	1.0	0.9	1.4	1.5	1.5	1.5	1.5	1.2	0.6	1.5	1.4	1.5	1.4	0.9	1.4	1.6	1.4	1.3	1.4	1.3	1.3	1.3	1.5	1.4	1.5	1.3	1.5	1.5
221	1.0	1.2	1.5	1.5	1.7	1.6	1.5	1.4	0.3	1.3	1.3	1.5	1.5	0.8	1.3	1.5	1.4	1.5	1.2	1.3	1.4	1.3	1.5	1.5	1.4	1.3	1.5	1.5
SFAs ^b	26.5	26.2	14.3	14.1	14.6	14.3	14.0	21.0	58.3	15.9	14.5	14.9	14.3	41.9	14.7	14.3	15.2	19.1	26.1	18.2	14.9	14.3	13.8	15.1	15.3	16.0	14.6	14.6
^a number indices independent plant																												
^b Saturated fatty acids are sum of 16:0+18:0+20:0																												
bold number indicate top three SFAs in each line																												

^a number indicates independent plant

^b Saturated fatty acids are sum of 160+180+200

Red number indicate top three SFAs in each line

[0137]

[0139]

(6) 7종의 FAB2-Cas13a 대표라인의 T2 세대 분석

[0140]

T1세대의 7종의 FAB2-Cas13a T1세대에서 T2 종자에서 포화지방산의 함량이 가장 높은 1라인을 각각 T2 후대세대에서 분석하였다. Cas13a-FAB2_1-13, Cas13a-FAB2_2-19, Cas13a-FAB2_3-18, Cas13a-FAB2_4-6, Cas13a-FAB2_5-16, Cas13a-FAB2_6-6, Cas13a-FAB2_7-10에 해당하는 T2 개체에 대한 생장 표현형 (도 9A)과 라인 마다 3개체의 T2로부터 수확한 T3 종자 지방산을 분석하였다 (도 9C).

[0141]

T2 세대에서 형질전환 유전자가 고정을 라인을 확인하기 위해 각 라인의 종자를 hygromycin 배지에서 생육하여 저항성 개체의 비율을 확인하였다. 확인한 결과 44개체 기준 저항성을 가지는 개체가 야생형은 0개체, Cas13a-FAB2_1-13 라인은 31개체, Cas13a-FAB2_2-19 라인은 41개체, Cas13a-FAB2_4-6 라인은 38개체, Cas13a-FAB2_5-16 라인은 27개체, Cas13a-FAB2_6-6 라인은 43개체, Cas13a-FAB2_7-10 라인은 28개체가 확인되었다. Cas13a-FAB2_3-18라인은 18개체 기준 10개체가 저항성을 가졌다. T2 세대에서 *Cas13a* 유전자를 이용하여 형질전환체임을 확인한 결과와 함께 비교하였다. 비교한 결과 Cas13a-FAB2_2-19라인만 형질전환 유전자가 homozygote로 확인되었다 (표 7). Cas13a-FAB2 각 라인별 T2 세대에서의 표현형을 야생형과 *fab2* T-DNA 돌연변이체와 비교하여 분석하였다. T2 세대 형질전환체들의 표현형 역시 *fab2* 돌연변이체 식물체보다 야생형에 더 가까운 것을 확인할 수 있었다. 이는 *FAB2* knock-down 된 *fab2* T-DNA 돌연변이 식물체에서 발생하였던 식물 생장에 나타났던 문제들이 나타나지 않는다는 것을 확인할 수 있다 (도 9A). 또한 앞에서의 *fab2-1*과 *fab2-3* 돌연변이체에서는 *FAB2* 발

현이 없으나 Cas13a-FAB2 형질전환체의 앞에서는 *FAB2*가 발현하는 것을 확인할 수 있었다 (도 9B). 이는 처음 설계했던 대로 올레오신 1 프로모터를 이용하여 Cas13a가 종자 특이적 발현을 하고 있음을 제시하는 결과이다.

[0143] [표 7] Cas13a-FAB2 형질전환주의 T2 세대 분리

Lines	Hyg ⁺ ^b	Hyg ⁻	Observed ratio	Expected ratio	Expected copy	Cas13a gene detection ^c
WT	0	44	0:44			
Cas13a-FAB2_1-13 ^a	31	13	2.4:1	3:1	1	11/12
Cas13a-FAB2_2-19	41	3	13.6:1	15:1	2	11/11
Cas13a-FAB2_3-18	10	8	1.2:1	3:1	?	10/11
Cas13a-FAB2_4-6	38	6	6.3:1		multi	10/11
Cas13a-FAB2_5-16	27	16	1.6:1	3:1	1	8/11
Cas13a-FAB2_6-6	43	1	43:1		multi	10/12
Cas13a-FAB2_7-10	28	16	1.8:1	3:1	1	6/10

^a representative T2 line

^b Hyg⁺=hygromycin resistant, Hyg⁻=hygromycin susceptible

^c Cas13 gene detection by PCR in Hyg⁺ plant,
numerator=Cas13a detected plant number,
denominator=total analysed Hyg⁺ plant

[0144]

[0146]

Cas13a-FAB2 T2 형질전환체 7개의 라인당 3개체에서 수확한 T3 종자의 지방산을 분석하였다 (표 8). 분석한 지방산 중 포화지방산의 함량을 비교하였다. Cas13a-FAB2_1-13과 Cas13a-FAB2_2-19라인은 T3 종자에서 야생형과 비슷한 수준으로 포화지방산 함량이 하락하였고 Cas13a-FAB2_3-18, Cas13a-FAB2_4-6, Cas13a-FAB2_5-16, Cas13a-FAB2_6-6과 Cas13a-FAB2_7-10 라인은 야생형보다 높고 대부분 *fab2* T-DNA 돌연변이체 보다 더 높은 포화지방산 비율을 T3 종자에서 가지는 것을 확인하였다 (도 9C).

[0147]

포화지방산 함량의 증가가 생장 이외에 종자의 발아와 종자의 형태에 영향을 주는지를 Cas13a-FAB2 형질전환체에 대해 조사하였다. 발아율을 12시간 간격으로 확인한 결과 Cas13a-FAB2 T3 종자의 발아율은 야생형과 비슷하였으며 발아하는 시간대도 비슷하였다 (도 10A). 종자 무게를 비교해본 결과 백립중 기준 Cas13a-FAB2_6-6-1은 야생형에 비해 줄어들었고 Cas13a-FAB2_4-6-4, Cas13a-FAB2_4-6-10, Cas13a-FAB2_5-16-5, Cas13a-FAB2_6-6-7 라인은 *fab2-1*과 비슷하게 유의적인 차이를 보였다 (도 10B). 종자 크기를 비교한 결과 Cas13a-FAB2_3-18-7, Cas13a-FAB2_4-6-4, Cas13a-FAB2_4-6-10, Cas13a-FAB2_6-6-7라인이 야생형에 비해 유의적으로 커짐을 확인하였다 (도 10C).

[표 8] 7개의 Cas13a-FAB2 T2 식물의 T3 종자의 지방산 조성

Fatty acid ^a	WT1			WT2			WT3			<i>fab2-1</i>			<i>fab2-2</i>			<i>fab2-3</i>			1-13-1 ^b			1-13-2			1-13-6		
(%)	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1 ^c	2	3	1	2	3	1	2	3
16:0	11.8	8.8	8.9	8.5	9.0	8.7	8.9	8.7	8.7	8.9	8.7	10.7	8.9	7.7	8.9	12.5	9.8	8.7	9.2	10.0	12.2	8.7	12.6	8.9	9.9	9.7	9.0
18:0	8.0	4.0	3.4	3.2	3.7	3.5	3.3	3.4	9.7	9.8	12.5	9.5	10.5	9.6	14.4	10.9	9.3	3.8	4.8	8.7	4.0	9.9	4.2	5.0	4.6	3.8	
18:1	20.0	20.2	17.6	17.4	16.9	18.0	17.1	16.4	12.6	11.8	12.9	16.7	10.1	15.9	12.9	10.9	11.8	15.6	15.0	15.6	19.9	19.0	19.6	14.6	14.4	14.6	
18:2	27.4	30.5	33.7	31.3	30.9	31.0	31.9	31.9	27.3	27.7	25.1	29.3	28.4	29.9	24.6	27.2	28.6	31.1	30.7	27.1	29.9	24.5	29.6	30.7	32.8	31.9	
18:3	13.6	14.8	15.6	16.9	17.2	16.7	17.6	16.8	18.6	18.3	16.6	16.1	18.5	15.8	16.0	20.1	18.0	17.3	17.1	16.3	15.9	15.6	16.1	17.2	16.2	17.1	
20:0	1.7	1.9	2.2	2.0	2.0	2.3	2.2	2.4	5.4	5.9	5.6	4.9	7.2	4.9	5.6	6.3	6.4	2.1	2.4	2.1	2.1	1.8	2.2	2.6	2.8	2.7	
20:1	15.3	17.0	15.9	17.6	17.1	16.8	16.3	17.2	13.8	14.1	13.3	12.0	13.6	12.3	11.9	12.4	14.3	17.5	17.0	15.3	17.1	14.3	16.8	16.9	17.2	17.6	
22:0	1.2	1.2	1.4	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.4	1.5	1.3	1.0	1.6	1.0	1.2	1.3	1.5	1.7	1.5	1.4	1.4	1.1	1.2	1.6	1.7	1.7	
22:1	1.1	1.5	1.3	1.5	1.7	1.5	1.3	1.7	1.4	1.3	1.2	0.8	1.4	1.0	1.0	1.1	1.4	1.6	1.6	1.4	1.3	1.2	1.4	1.6	1.6	1.6	
SFAs ^d	21.5	14.8	14.4	13.8	14.7	14.5	14.4	14.5	24.0	24.4	28.8	23.3	25.4	23.4	32.5	27.0	24.5	15.2	17.1	23.0	14.7	24.3	15.3	17.4	17.1	15.5	

Fatty acid	2-19-1			2-19-3			2-19-9			3-18-2			3-18-4			3-18-7			4-6-4			4-6-10			4-6-11		
(%)	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
16:0	8.5	8.5	11.1	9.3	10.6	9.5	8.5	8.6	8.5	9.8	15.6	11.9	18.8	11.6	17.0	17.7	11.6	11.6	9.7	11.4	18.0	19.3	16.9	16.5	19.8	17.7	17.7
18:0	3.1	3.1	7.1	3.7	6.3	4.9	3.4	3.4	3.4	5.2	13.9	9.0	20.4	8.2	17.4	17.7	8.6	9.1	5.6	8.5	18.2	19.4	15.9	15.4	20.4	17.4	17.4
18:1	17.1	17.6	18.0	14.6	15.7	16.4	16.6	16.8	18.8	18.3	19.1	20.7	19.2	20.0	19.3	18.2	18.9	17.6	19.7	20.0	17.9	18.1	19.0	16.8	17.5	17.1	17.1
18:2	30.7	30.5	27.1	30.3	28.2	28.6	30.2	29.6	30.2	29.4	22.4	25.1	18.0	25.4	20.0	20.2	26.5	20.9	27.1	24.9	20.6	20.0	22.1	23.9	19.6	22.5	22.5
18:3	17.1	16.7	15.4	18.5	17.2	17.3	17.7	17.7	16.5	16.2	12.3	13.9	9.6	15.3	10.9	10.9	14.4	26.1	16.8	15.0	11.0	10.5	11.0	12.5	10.0	12.0	12.0
20:0	2.1	2.1	1.9	2.3	2.2	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	3.8	1.9	1.6	1.9	1.6	1.6	1.9	1.4	1.8	1.8	1.8	1.7	1.9	1.7	1.6	1.6	
20:1	18.3	18.5	16.8	18.1	17.0	18.0	18.4	18.7	17.5	16.2	12.8	15.3	10.8	15.2	12.0	11.8	15.6	11.4	16.6	16.0	10.7	9.5	11.2	11.0	9.3	9.9	9.9
22:0	1.6	1.5	1.2	1.7	1.5	1.6	1.6	1.5	1.5	1.4	1.0	1.0	0.9	1.1	1.0	1.0	1.2	0.9	1.2	1.1	0.8	0.8	1.0	1.1	1.0	0.9	0.9
22:1	1.5	1.4	1.4	1.6	1.5	1.6	1.5	1.5	1.5	1.4	1.1	1.2	0.9	1.3	0.8	1.0	1.3	0.9	1.4	1.3	1.0	0.7	1.0	1.0	0.8	0.9	0.9
SFAs	13.7	13.7	20.2	15.3	19.0	16.5	14.0	14.1	14.0	17.1	33.2	22.7	40.8	23.7	36.0	36.9	22.1	22.1	17.2	21.7	38.0	40.4	34.7	33.7	41.8	36.8	36.8

Fatty acid	5-16-4			5-16-5			5-16-8			6-6-1			6-6-5			6-6-7			7-10-2			7-10-3			7-10-5		
(%)	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
16:0	22.7	12.8	25.2	14.7	21.9	23.6	13.1	15.4	14.3	20.3	21.5	25.4	15.4	9.4	18.9	15.1	19.9	25.0	17.7	18.2	17.0	14.7	17.9	10.5	13.5	13.5	13.5
18:0	24.5	6.1	29.1	12.3	23.6	27.9	10.7	13.7	12.3	20.2	22.2	27.5	13.9	4.6	18.9	14.2	21.2	28.6	15.7	17.4	16.2	11.6	16.9	5.0	9.9	9.9	9.9
18:1	16.4	14.0	16.4	19.6	18.1	17.6	16.2	17.1	17.8	15.7	16.3	16.4	21.2	20.6	20.3	18.2	18.6	18.4	17.0	16.8	16.6	16.4	17.1	15.6	16.3	16.3	16.3
18:2	18.0	33.6	14.3	23.7	16.7	15.2	26.4	23.5	23.9	20.8	19.2	14.9	21.9	28.5	18.6	23.9	18.7	12.9	20.9	20.6	21.6	25.9	22.3	32.2	28.7	28.7	28.7
18:3	8.7	16.2	6.7	12.3	8.4	6.7	14.5	12.8	14.2	10.0	9.3	6.9	11.3	15.5	9.6	11.9	9.1	6.2	13.0	12.0	12.6	13.8	11.7	15.9	13.8	13.8	13.8
20:0	1.6	2.2	1.4	1.7	1.4	1.5	2.2	1.9	1.8	2.0	1.7	1.8	1.5	1.9	1.5	1.7	1.4	1.2	1.7	1.8	1.8	1.9	1.7	1.9	1.6	1.6	1.6
20:1	7.0	12.3	5.8	13.4	8.6	6.6	14.2	13.5	13.6	9.1	8.2	6.0	13.0	17.1	10.6	13.0	9.7	6.7	11.9	11.2	12.2	13.3	10.5	16.1	13.5	13.5	13.5
22:0	0.5	1.5	0.6	1.2	0.8	0.5	1.4	1.1	1.1	0.9	0.9	0.7	0.9	1.1	0.9	1.1	0.8	0.7	1.0	1.1	1.1	1.2	1.0	1.6	1.3	1.3	1.3
22:1	0.6	1.2	0.5	1.1	0.6	0.5	1.4	1.0	1.0	1.0	0.7	0.5	0.8	1.1	0.7	1.0	0.7	0.4	1.2	1.0	1.1	1.3	1.0	1.3	1.3	1.3	1.3
SFAs ^d	48.8	21.2	55.7	28.7	46.8	53.0	26.0	31.0	28.4	42.5	45.4	54.7	30.8	16.0	39.3	30.9	42.5	54.8	35.1	37.3	35.0	28.1	36.5	17.4	25.1	25.1	25.1

^a average % of fatty acid (n=3)
^b each of cas13a_FAB2 line: x-y-z, x=T1, y=T2, z=T3 generation
^c number indicates independent plant. Three independent plants were analyzed
^d Saturated fatty acids are sum of 16:0+18:0+20:0

[0150]

[0152]

[0153]

(7) Cas13a-FAB2_7 계통에서 다양한 범위의 포화지방산을 갖는 라인의 T2 세대 분석

같은 gRNA를 사용했지만 라인간에 다른 포화지방산 비율을 가진 개체들에 대해 후대를 진전시켜 실험을 진행하였다. Cas13a-FAB2_7 라인 중 포화지방산 비율이 높은 순서대로 7-10, 7-15, 7-1, 7-8, 7-6 총 5개의 라인을 골라 세대진전을 하였다 (도 11A). 이전과 마찬가지로 hygromycin 배지를 이용하여 저항성 개체를 확인하는 실험을 진행하였다. 저항성을 가지는 개체는 44개체 기준 야생형은 0, Cas13a-FAB2_7-10 라인은 31개체, Cas13a-FAB2_7-15 라인은 41개체, Cas13a-FAB2_7-8 라인은 42개체, Cas13a-FAB2_7-6 라인은 32개체로 확인되었다. Cas13a-FAB2_7-1라인은 16개체 기준 16개체가 저항성을 가지는 것으로 확인되었다 (표 9). T2 plant의 잎 genomic DNA에서 *Cas13a* 유전자를 이용하여 형질전환체임을 확인한 PCR 결과와 비교하여 분석하였을 때 Cas13a-FAB2_7-15, Cas13a-FAB2_7-1 및 Cas13a-FAB2_7-8 라인은 homozygote로 예상된다 (표 9, 도 11B). 이 식물체들을 이용하여 잎 지방산 분석을 진행하였다 (표 10). 야생형과 *fab2* T-DNA 삽입 돌연변이체와 비교하였을 때 포화지방산의 비율이 야생형과 비슷하거나 야생형보다 높거나 *fab2* T-DNA 돌연변이체 보다는 낮은 것을 확인하였다 (도 11C). 또한 잎에서의 *fab2-3* 돌연변이체에서는 FAB2 발현이 없으나 Cas13a-FAB2_7 계통의 모든 형질전환체의 잎에서는 FAB2가 발현하는 것을 확인할 수 있었다 (도 11D). 이는 Cas13a-FAB2의 다른 라인들과 같이 처음 설계했던 대로 올레오신 1 프로모터를 이용하여 Cas13a가 종자 특이적 발현을 하고 있음을 제시하는 결과이다.

[0154]

Cas13a-FAB2_7 T2 형질전환체 5 라인에서 수확한 T3 종자의 지방산을 분석하였다 (표 11 및 표 12). 분석한 지방산 중 포화지방산의 합산을 비교하였다. 대부분의 T3 종자에서 야생형보다 높은 종자 지방산 비율을 가지는 것으로 확인되었으며 *fab2* T-DNA 삽입 돌연변이체와 비슷한 포화지방산 비율을 보이는 라인은 Cas13a-FAB2_7-

10-7, Cas13a-FAB2_7-15-6, Cas13a-FAB2_7-15-7, Cas13a-FAB2_7-15-8, Cas13a-FAB2_7-1-1, Cas13a-FAB2_7-1-6, Cas13a-FAB2_7-8-7, Cas13a-FAB2_7-6-1 총 8개체이다. 앞 지방산과 비교해보았을 때 Cas13a-FAB2_7-1-1이 앞은 야생형과 유사하고 종자에서의 가장 높은 포화지방산을 가지는 것을 확인하였다 (도 11E).

[0156]

[표 9] Cas13a-FAB2_7 형질전환 라인의 T2 세대 분리

Lines	Hyg ⁺ ^b	Hyg ⁻	Observed ratio	Expected ratio	Expected copy	Cas13a gene detection ^c
WT	0	44	0:44			
Cas13a-FAB2_7-10 ^a	31	13	2.4:1	3:1	1	5/7
Cas13a-FAB2_7-15	41	3	13.6:1	15:1	2	8/8
Cas13a-FAB2_7-1	16	0			multi	7/8
Cas13a-FAB2_7-8	41	3	13.6:1	15:1	2	8/8
Cas13a-FAB2_7-6	33	11	3:1		1	6/8

^a representative T2 line

^b Hyg⁺=hygromycin resistant, Hyg⁻=hygromycin susceptible

^c Cas13 gene detection by PCR in Hyg⁺ plant,

numerator=Cas13a detected plant number, denominator=total analysed Hyg⁺ plant

[0157]

[표 10] Cas13a-FAB2_7 라인으로부터의 T2 식물의 지방산 조성

Fatty acid (%)	WT				fab2-3				7-10 ^a				7-15								7-1							
	1 ^b	2	3	4	1	2	3	4	2	3	6	7	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	5	6	7	8	
16:0	15.2	16.0	17.3	16.8	27.2	29.9			17.0	15.4	18.3	20.1	21.3	20.7	23.4	21.8	25.1	18.7	24.7	25.5	14.8	20.8	18.6	18.9	20.8	22.6	13.3	
16:1	2.2	3.0	2.7	2.8	1.6	2.0			1.2	1.6	1.2	1.0	0.9	1.4	1.3	1.1	1.3	0.8	1.5	1.1	1.1	1.9	2.0	2.3	1.9	1.7	1.2	
16:2	4.5	3.7	3.9	4.0	0.9	2.0			2.6	4.3	2.2	2.5	2.3	3.8	3.1	3.6	2.8	3.0	2.6	2.6	2.5	3.2	4.0	3.7	3.6	3.5	2.4	
16:3	14.3	14.1	12.9	12.8	3.3	7.1			10.2	14.8	7.8	7.8	6.4	11.0	8.6	11.3	8.5	9.0	8.0	7.1	8.4	12.4	11.5	12.0	11.6	10.9	8.0	
18:0	1.3	1.3	1.3	1.0	15.7	17.1			7.6	1.1	11.9	13.9	17.4	9.8	15.8	12.3	19.2	10.3	19.7	20.8	1.4	1.0	1.5	1.0	3.2	12.1	2.5	
18:1	2.2	2.5	2.5	1.5	2.1	3.8			6.0	2.8	8.7	8.7	10.4	6.1	7.8	7.0	10.5	10.8	9.4	13.0	6.2	1.7	5.6	3.0	3.8	5.7	10.0	
18:2	14.5	13.9	14.7	12.2	15.6	13.7			10.9	15.4	11.6	15.5	10.3	12.7	10.0	13.0	10.0	13.3	10.1	11.2	29.6	15.4	19.5	15.6	17.2	11.6	14.7	
18:3	45.8	45.5	44.6	48.8	33.5	24.3			44.6	44.7	38.1	30.6	31.0	34.5	30.1	29.9	22.5	34.0	23.9	18.8	36.1	43.6	37.2	43.5	38.0	32.0	47.9	
SFAs ^c	16.5	17.4	18.7	17.8	42.9	47.1			24.6	16.4	30.2	34.0	38.8	30.5	39.2	34.1	44.4	29.0	44.4	46.2	16.2	21.7	20.2	19.8	23.9	34.6	15.8	

Fatty acid (%)	7-8								7-6							
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	3	5	6	7	8		
16:0	15.2	16.0	17.3	16.8	27.2	29.9	17.0	15.4	18.3	20.1	21.3	20.7	23.4	21.8		
16:1	2.2	3.0	2.7	2.8	1.6	2.0	1.2	1.6	1.2	1.0	0.9	1.4	1.3	1.1		
16:2	4.5	3.7	3.9	4.0	0.9	2.0	2.6	4.3	2.2	2.5	2.3	3.8	3.1	3.6		
16:3	14.3	14.1	12.9	12.8	3.3	7.1	10.2	14.8	7.8	7.8	6.4	11.0	8.6	11.3		
18:0	1.3	1.3	1.3	1.0	15.7	17.1	7.6	1.1	11.9	13.9	17.4	9.8	15.8	12.3		
18:1	2.2	2.5	2.5	1.5	2.1	3.8	6.0	2.8	8.7	8.7	10.4	6.1	7.8	7.0		
18:2	14.5	13.9	14.7	12.2	15.6	13.7	10.9	15.4	11.6	15.5	10.3	12.7	10.0	13.0		
18:3	45.8	45.5	44.6	48.8	33.5	24.3	44.6	44.7	38.1	30.6	31.0	34.5	30.1	29.9		
SFAs	16.5	17.4	18.7	17.8	42.9	47.1	24.6	16.4	30.2	34.0	38.8	30.5	39.2	34.1		

^a each of cas13a_FAB27 line: x-y, x=T1, y=T2 generation
^b number indicates independent plant
^c Saturated fatty acids are sum of 16:0+18:0+20:0

[표 11] 7개의 Cas13a-FAB2_7 T2 식물로부터의 T3 종자의 지방산 조성(1)

Fatty acid ^a (%)	WT1			WT2			WT4			fab2-1			fab2-2			fab2-3			7-10-2 ^b			7-10-3			7-10-4			7-10-7		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
160	9.6	8.5	11.7	11.0	10.8	9.8	10.9	10.9	10.3	10.2	11.0	12.0	13.6	13.7	12.7	12.9	15.1	14.6	15.5	15.4	12.1	16.6	12.1	14.6	14.0	12.3	11.7	11.4	20.1	16.6
180	4.7	3.5	8.1	6.7	6.4	5.1	6.9	6.5	5.3	12.0	11.9	13.3	15.4	15.3	17.8	17.8	17.4	13.1	11.6	7.4	14.2	7.6	11.8	10.9	8.6	7.3	7.1	22.1	14.9	
181	16.3	16.5	16.7	17.8	18.5	17.3	17.2	17.0	16.3	12.0	10.9	11.7	11.0	11.2	12.3	13.1	15.1	15.2	15.9	16.4	14.9	15.3	15.4	16.1	15.1	15.1	15.5	16.2	16.0	
182	31.6	32.2	29.1	29.7	29.5	31.1	29.2	30.0	31.2	23.9	24.9	23.5	24.6	24.4	24.7	24.6	24.1	24.6	27.6	31.2	24.1	30.1	26.8	27.6	28.4	30.3	28.8	18.9	23.8	
183	15.9	16.7	14.8	14.7	14.5	15.7	15.1	15.1	15.8	18.7	18.9	17.8	17.0	17.0	15.4	15.2	14.9	14.4	13.6	14.1	15.1	12.6	15.9	14.2	14.5	16.8	15.8	16.4	9.3	12.8
200	2.0	2.0	2.0	1.9	1.8	1.9	1.9	1.9	2.1	5.3	4.9	5.0	5.4	5.7	5.6	4.6	5.4	1.7	2.0	2.1	1.8	2.1	2.0	1.9	1.8	2.2	2.1	1.8	2.1	
201	16.6	17.0	14.5	15.4	15.8	16.3	15.8	15.6	16.0	15.2	14.5	13.7	10.5	10.3	11.2	11.5	9.1	10.6	11.1	11.4	13.5	11.7	14.1	12.6	12.8	13.3	14.7	15.5	9.8	11.7
202	1.6	1.9	1.5	1.4	1.5	1.6	1.4	1.5	1.6	1.5	1.7	1.5	1.4	1.5	1.3	1.3	0.9	1.2	1.3	1.3	1.2	1.3	1.4	1.4	1.6	1.6	0.9	1.2		
221	1.8	1.7	1.5	1.2	1.3	1.5	1.4	1.5	1.3	1.4	1.3	1.2	1.4	1.2	1.2	0.9	1.3	1.1	1.4	1.3	1.6	1.4	1.5	1.4	1.4	1.6	0.8	1.0		
SFAs ^d	16.3	14.0	21.8	19.5	19.0	16.8	19.8	19.3	17.7	27.4	27.7	30.4	34.4	34.4	34.0	33.3	37.5	37.4	30.4	29.1	21.6	32.6	21.8	28.3	26.8	22.6	21.2	20.6	44.1	33.6

Fatty acid (%)	7-15-1			7-15-2			7-15-3			7-15-4			7-15-5			7-15-6			7-15-7			7-15-8		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
160	12.5	10.9	11.5	13.4	15.5	14.7	12.7	13.8	14.5	12.5	11.8	13.3	13.5	11.5	15.5	17.7	16.4	20.7	17.0	18.3	15.0	17.6	16.8	13.4
180	9.9	6.7	7.2	9.3	13.2	12.0	9.5	11.0	12.5	8.6	7.9	10.0	14.5	7.8	13.9	16.9	15.2	22.5	15.2	17.9	13.0	17.2	15.1	9.5
181	15.8	15.1	15.0	15.8	16.2	17.5	17.2	17.1	16.9	15.9	15.7	16.0	16.6	16.4	17.4	16.8	16.2	16.1	16.2	15.7	17.2	16.9	15.6	14.6
182	27.7	29.7	28.9	27.9	25.0	25.2	27.5	26.0	25.4	27.5	28.2	25.9	24.0	28.4	23.8	22.3	23.9	18.6	24.5	22.7	24.4	23.3	25.0	29.8
183	14.6	16.1	16.7	15.1	13.7	13.6	14.0	13.9	13.5	15.8	16.1	15.7	12.5	15.4	12.6	11.1	11.8	9.4	11.2	10.1	11.4	10.2	11.9	13.7
200	2.1	2.3	2.3	1.8	1.7	1.7	1.8	1.9	1.8	2.0	2.1	1.8	2.0	2.1	1.8	1.6	1.9	1.5	1.8	1.8	2.1	2.0	1.8	2.3
201	14.5	15.8	15.0	13.9	12.3	12.9	14.3	13.5	12.9	14.7	15.1	14.2	12.5	15.2	12.5	10.9	12.0	9.3	11.5	10.6	14.1	10.6	11.4	13.8
202	1.5	1.7	1.6	1.4	1.3	1.2	1.6	1.5	1.2	1.5	1.5	1.5	1.3	1.5	1.4	1.5	1.3	1.0	1.2	1.4	1.3	1.0	1.2	1.5
221	1.3	1.8	1.7	1.4	1.2	1.4	1.3	1.2	1.5	1.3	1.3	1.3	1.3	1.7	1.0	1.2	1.3	1.0	1.4	1.4	1.7	1.2	1.1	1.5
SFAs	24.4	19.9	21.0	24.6	30.4	28.4	24.1	26.7	28.9	23.0	21.8	25.4	31.8	21.4	31.2	36.2	33.5	44.7	34.0	38.0	30.0	36.8	33.7	25.2

Fatty acid (%)	7-1-1			7-1-2			7-1-3			7-1-5			7-1-6			7-1-7			7-1-8		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
160	19.0	16.4	16.4	16.3	14.0	14.2	12.4	12.9	17.0	12.5	12.1	14.2	17.1	16.5	13.6	13.7	13.9	15.5	12.4	14.7	13.2
180	17.7	12.7	12.1	14.6	10.4	10.7	8.3	7.8	15.9	8.4	8.0	11.5	16.2	15.0	9.9	10.8	10.2	14.2	8.4	11.8	9.0
181	15.0	14.3	14.9	18.3	17.1	18.3	15.1	14.5	15.7	16.2	15.8	16.9	16.4	15.9	15.3	15.1	14.5	15.2	16.6	17.3	17.6
182	26.1	31.7	30.8	24.3	26.6	25.8	29.1	31.9	23.4	30.0	30.1	26.9	23.9	25.3	29.7	27.5	27.4	24.8	30.0	26.3	28.6
183	9.4	10.9	11.2	12.1	13.6	13.2	15.3	14.6	11.8	14.0	14.3	12.8	11.3	11.7	13.5	15.1	15.4	13.3	14.3	12.8	13.7
200	2.0	2.2	2.2	1.8	2.1	1.8	2.2	2.0	2.0	2.1	2.0	1.9	1.8	2.1	2.1	2.2	2.0	1.9	2.1	1.9	
201	8.6	9.5	9.8	10.7	11.9	13.5	14.9	13.3	11.7	13.9	14.7	13.2	10.8	11.4	13.0	13.3	12.2	13.8	12.5	13.3	
202	1.1	1.3	1.3	0.8	1.2	1.3	1.4	1.4	1.4	1.5	1.5	1.3	1.3	1.5	1.3	1.5	1.4	1.2	1.4	1.2	1.3
221	1.2	1.1	1.3	1.1	1.2	1.4	1.1	1.4	1.1	1.4	1.4	1.3	1.0	1.1	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.3	1.3
SFAs	38.7	31.2	30.7	32.6	26.5	26.7	22.9	22.9	34.9	23.9	22.2	27.7	35.3	33.4	25.6	26.6	26.4	31.7	22.6	28.6	24.2

^a average % of fatty acid (n=3)^b each of cas13a_FAB2 line: x-y-z, x=T1, y=T2, z=T3 generation^c rubber indices independent plant. Three independent plants were analyzed^d Saturated fatty acids are sum of 16:0+18:0+20:0

[0165] [표 12] 7종의 Cas13a-FAB2_7 T2 식물로부터의 T3 종자의 지방산 조성(2)

Fatty acid ^a (%)	7-8-1 ^b			7-8-2			7-8-3			7-8-4			7-8-5			7-8-6			7-8-7			7-8-8		
	1 ^c	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
16:0	10.5	12.4	17.3	15.3	11.7	12.2	13.0	13.9	14.6	14.1	12.3	12.8	12.5	12.4	11.5	12.4	13.3	17.1	17.0	15.5	22.2	15.3	12.4	16.6
18:0	6.6	9.8	16.5	12.5	7.2	8.5	9.6	11.0	11.7	11.1	9.0	9.9	9.5	8.2	7.0	7.4	10.3	15.6	14.6	13.6	22.8	14.1	8.4	16.3
18:1	16.9	16.7	17.1	16.2	15.4	15.7	16.1	15.9	15.5	15.7	15.6	15.7	17.1	16.2	16.3	14.1	15.3	15.7	14.9	14.7	16.1	18.2	17.8	17.6
18:2	29.6	28.3	23.1	26.3	31.3	29.6	27.7	28.0	27.1	25.9	27.5	26.5	27.4	28.9	29.8	32.5	29.6	25.3	28.0	25.6	19.7	23.4	27.8	21.6
18:3	15.3	13.7	11.2	13.1	15.4	15.0	15.2	13.7	13.4	15.0	15.5	16.8	14.3	15.0	15.6	14.6	13.5	11.5	11.3	13.1	8.5	12.5	14.9	11.9
20:0	2.1	2.0	1.8	1.9	2.2	2.0	2.1	2.0	2.2	2.2	2.3	2.2	2.3	2.2	2.3	2.2	1.9	1.9	2.2	1.7	1.9	1.9	1.9	1.9
20:1	15.7	14.3	10.9	12.1	13.9	14.1	13.6	12.8	12.8	13.4	14.8	13.4	14.3	14.7	13.3	12.8	10.5	9.9	12.3	7.4	12.3	14.4	11.7	
20:2	1.6	1.5	1.0	1.3	1.5	1.4	1.5	1.4	1.5	1.3	1.5	1.4	1.5	1.5	1.5	1.7	1.5	1.2	1.3	1.5	0.7	1.1	1.2	1.3
22:1	1.8	1.3	1.1	1.2	1.5	1.4	1.3	1.4	1.3	1.4	1.5	1.3	1.4	1.4	1.4	1.6	1.3	1.1	1.1	1.7	0.8	1.1	1.1	1.1
SFAs ^d	19.2	24.2	35.6	29.7	21.0	22.8	24.7	26.8	28.5	27.3	23.6	25.0	24.1	22.7	20.7	22.1	25.8	34.6	33.6	31.2	46.8	31.3	22.7	34.8

Fatty acid (%)	7-6-1			7-6-3			7-6-5			7-6-7			7-6-8		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
16:0	19.1	13.9	16.7	15.0	12.8	13.6	15.5	13.9	10.9	13.9	14.1	11.4	11.6	14.0	10.2
18:0	18.3	10.2	14.7	12.9	9.8	10.6	13.3	10.5	6.2	11.4	11.4	7.4	8.2	11.7	6.9
18:1	16.4	16.0	16.3	16.8	17.2	16.6	15.9	15.7	15.0	17.3	17.2	17.4	18.2	18.0	17.8
18:2	22.6	28.1	24.9	25.5	27.6	26.9	25.8	28.0	31.4	27.2	27.0	30.3	28.5	25.9	29.4
18:3	10.1	14.6	12.2	12.9	14.0	13.6	12.8	13.6	15.6	12.4	12.5	13.8	13.4	12.1	15.3
20:0	1.6	1.8	1.7	1.8	1.8	1.9	1.9	1.9	2.2	1.9	1.8	2.0	2.0	1.8	1.9
20:1	9.8	12.6	10.9	12.8	14.1	13.9	12.4	13.4	15.2	13.3	13.1	14.7	15.5	13.8	15.7
20:2	1.2	1.4	1.1	1.2	1.3	1.3	1.4	1.4	1.7	1.4	1.3	1.3	1.2	1.5	1.3
22:1	1.1	1.3	1.2	1.3	1.5	1.3	1.5	1.7	1.3	1.5	1.5	1.3	1.5	1.2	1.4
SFAs ^d	38.9	26.0	33.2	29.7	24.5	26.1	30.6	26.4	19.4	27.1	27.4	20.9	21.8	27.5	19.1

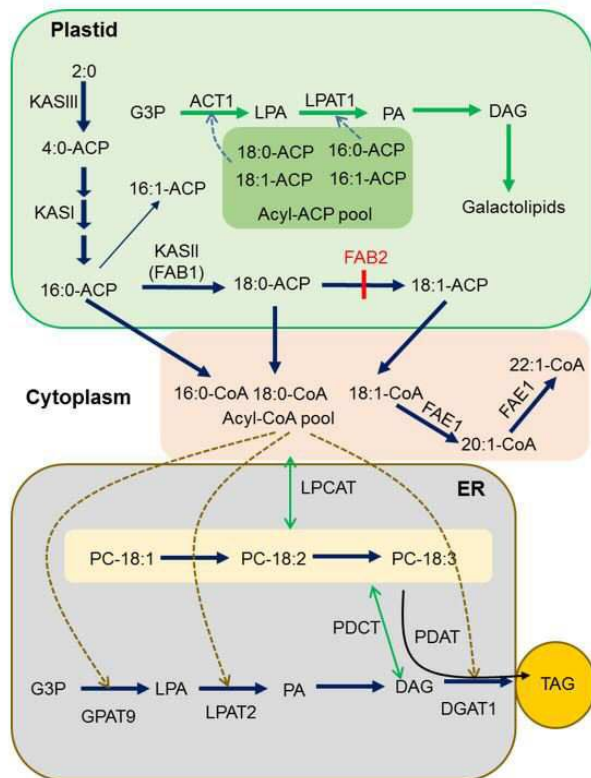
Fatty acid (%)	7-6-1			7-6-3			7-6-5			7-6-7			7-6-8		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
16:0	19.1	13.9	16.7	15.0	12.8	13.6	15.5	13.9	10.9	13.9	14.1	11.4	11.6	14.0	10.2
18:0	18.3	10.2	14.7	12.9	9.8	10.6	13.3	10.5	6.2	11.4	11.4	7.4	8.2	11.7	6.9
18:1	16.4	16.0	16.3	16.8	17.2	16.6	15.9	15.7	15.0	17.3	17.2	17.4	18.2	18.0	17.8
18:2	22.6	28.1	24.9	25.5	27.6	26.9	25.8	28.0	31.4	27.2	27.0	30.3	28.5	25.9	29.4
18:3	10.1	14.6	12.2	12.9	14.0	13.6	12.8	13.6	15.6	12.4	12.5	13.8	13.4	12.1	15.3
20:0	1.6	1.8	1.7	1.8	1.8	1.9	1.9	1.9	2.2	1.9	1.8	2.0	2.0	1.8	1.9
20:1	9.8	12.6	10.9	12.8	14.1	13.9	12.4	13.4	15.2	13.3	13.1	14.7	15.5	13.8	15.7
20:2	1.2	1.4	1.1	1.2	1.3	1.3	1.3	1.4	1.7	1.4	1.3	1.3	1.2	1.5	1.3
22:1	1.1	1.3	1.3	1.2	1.3	1.5	1.3	1.5	1.7	1.3	1.5	1.5	1.3	1.2	1.4
SFAs	38.9	26.0	33.2	29.7	24.5	26.1	30.6	26.4	19.4	27.1	27.4	20.9	21.8	27.5	19.1

^a average % of fatty acid (n=3)
^b each of cas13a_FAB2 line: x=y-z, x=F1, y=F2, z=F3 generation
^c number indices independent plant. Three independent plants were analyzed
^d Saturated fatty acids are sum of 16:0+18:0+20:0

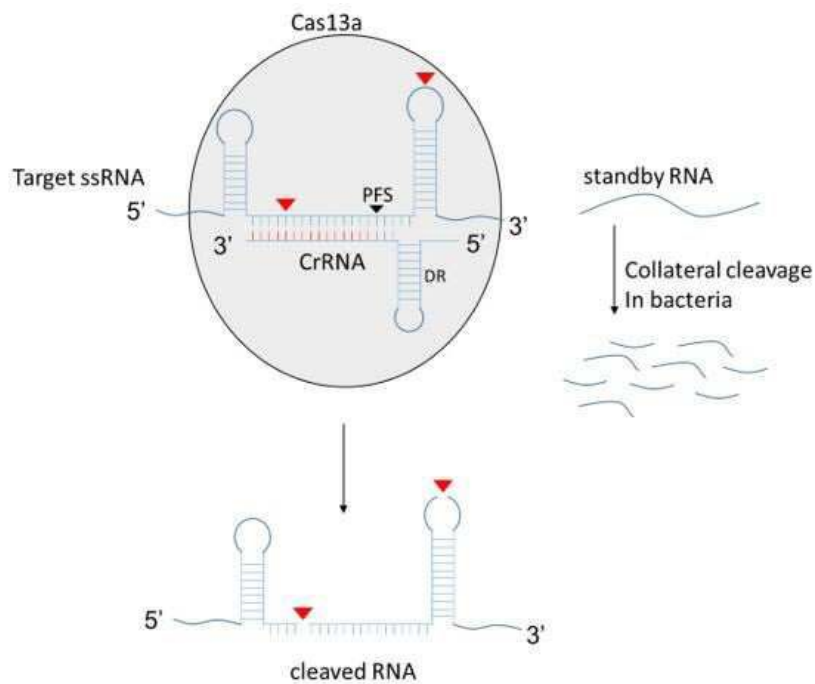
[0166]

도면

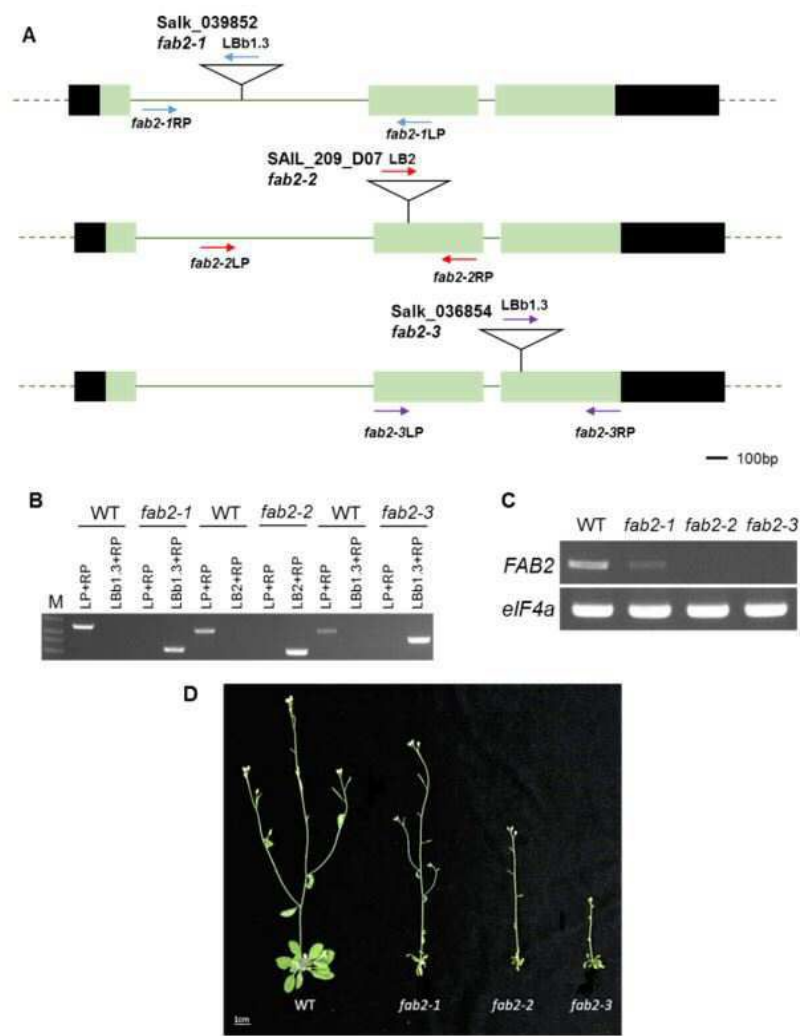
도면1



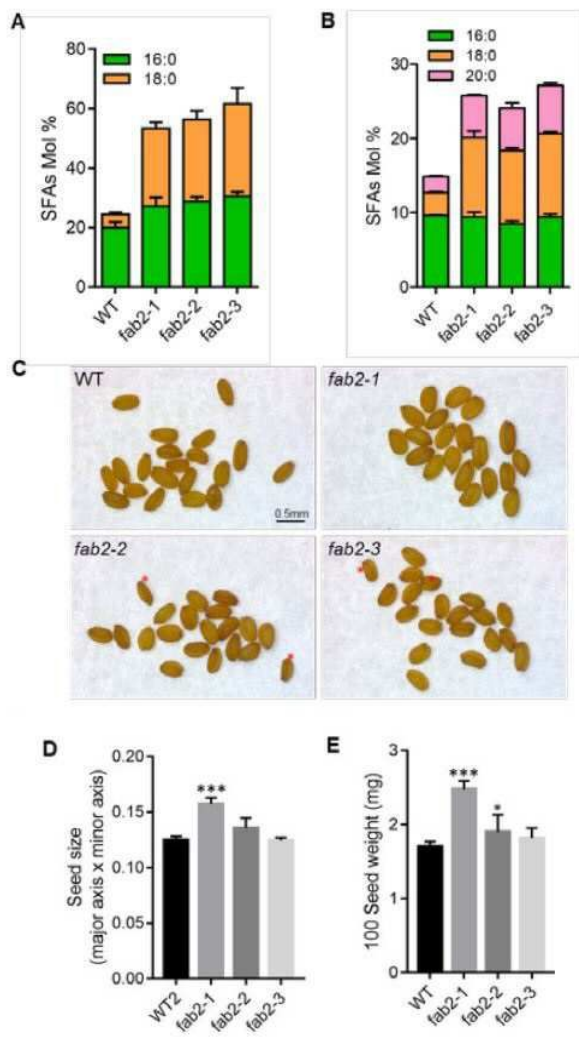
도면2



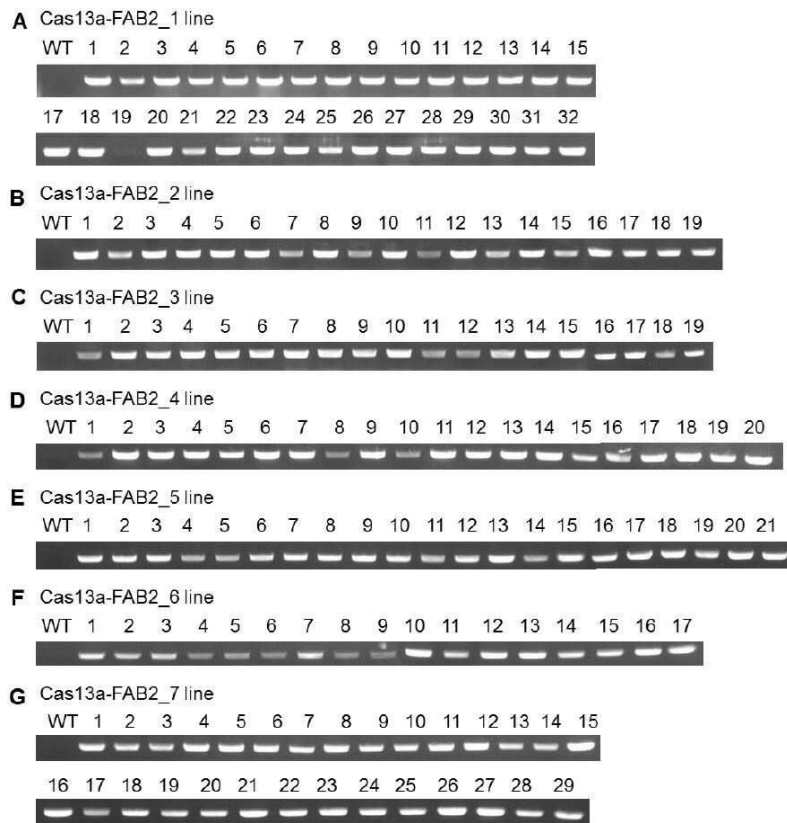
도면3



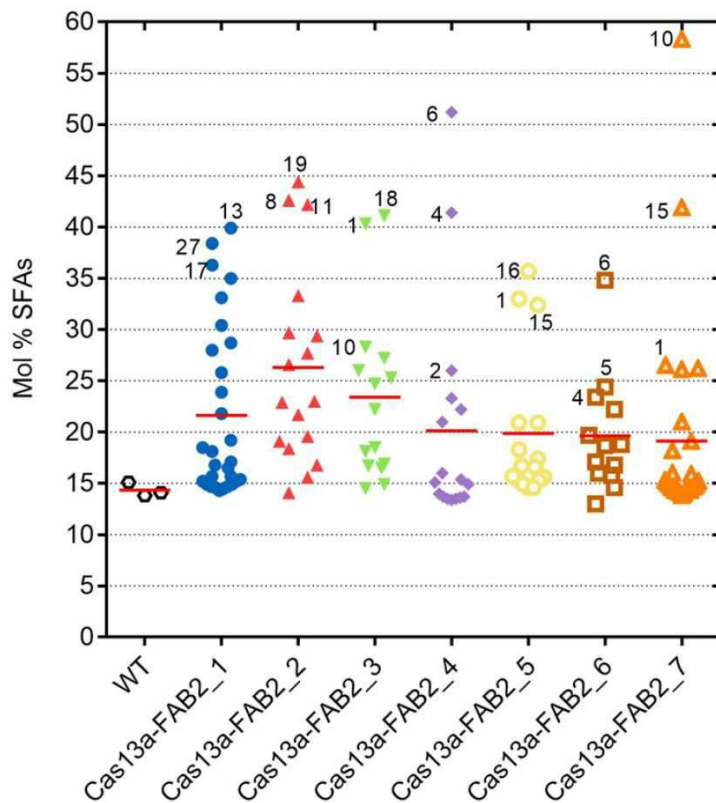
도면4



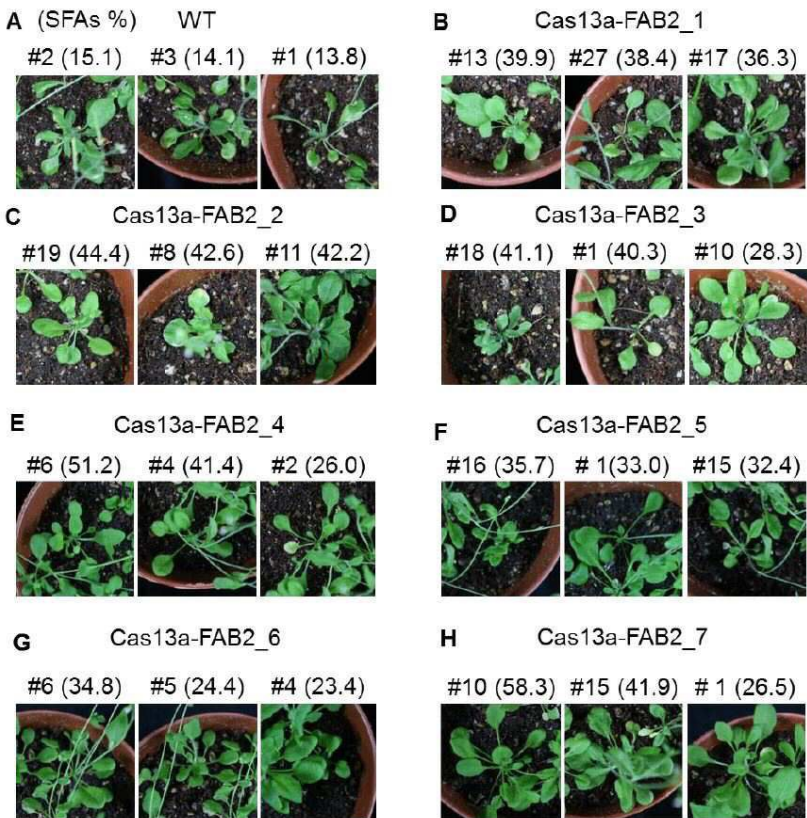
도면6



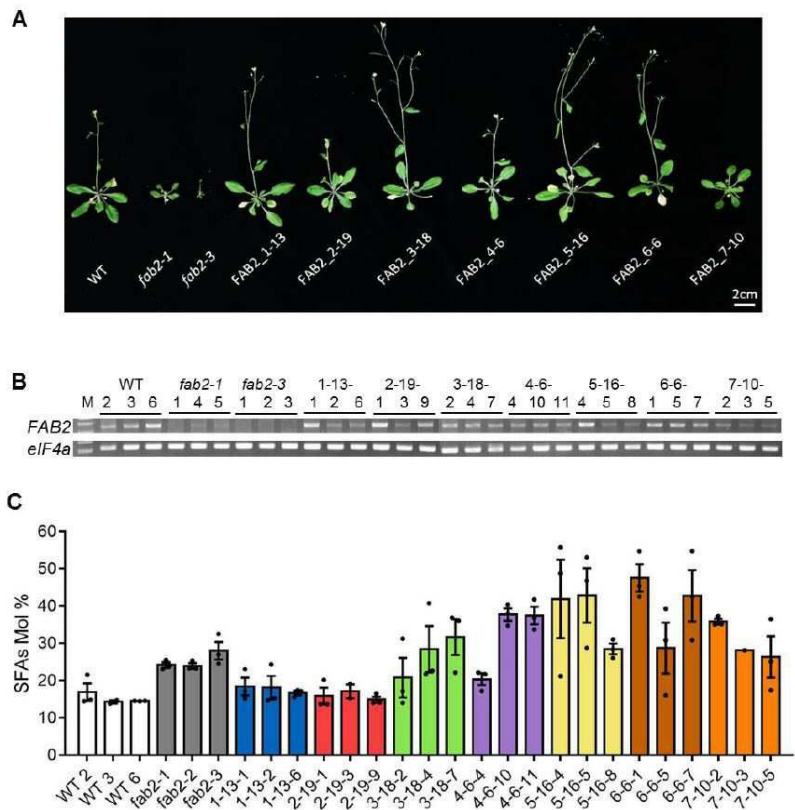
도면7



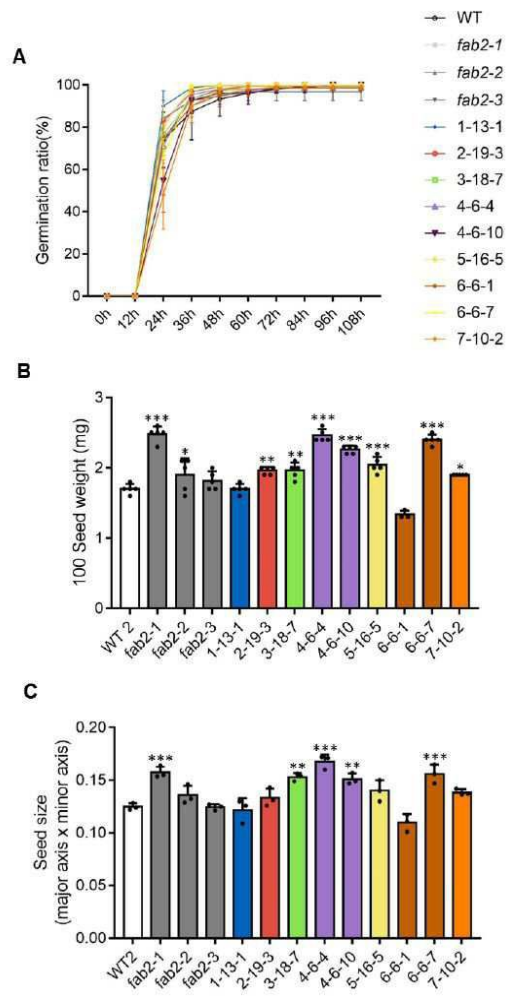
도면8



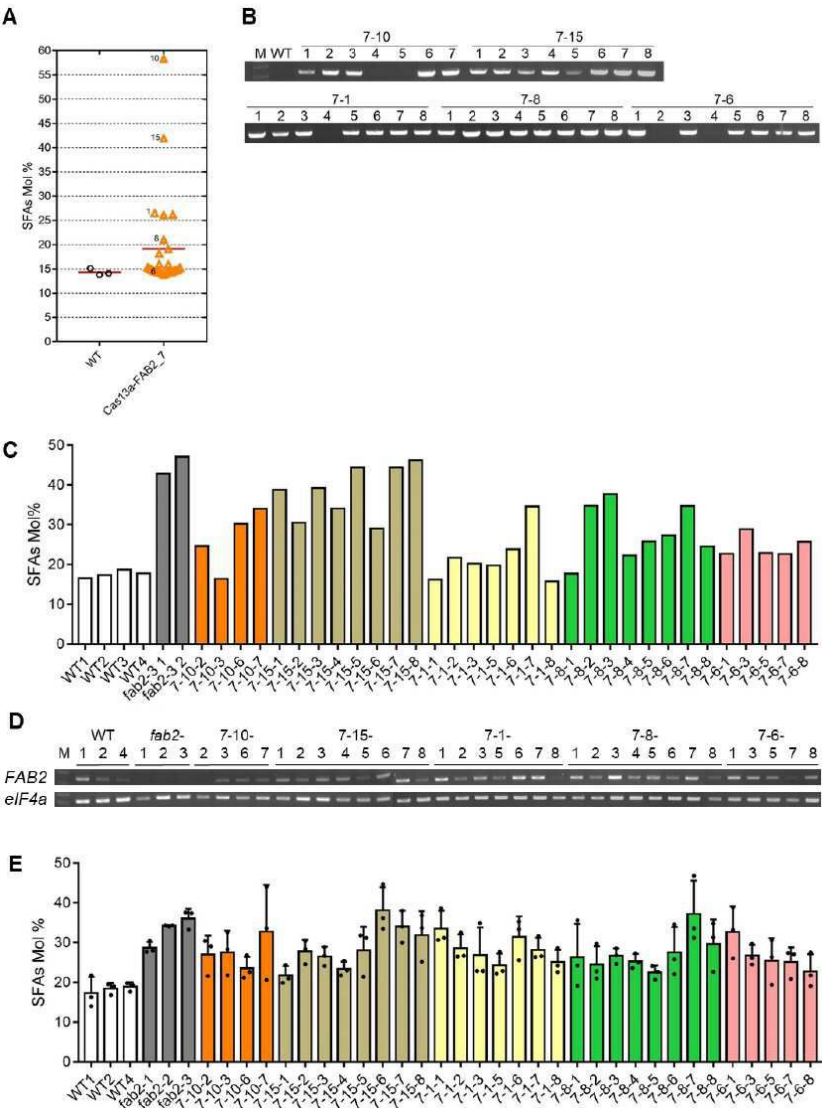
도면9



도면10



도면11



도면12a

Amino acid sequence alignment

	sgRNA1										sgRNA2										
AtFAB2	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	107
AtFAB2A	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	112
AtFAB2B	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	111
BnFAB2A	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	105
BnFAB2B	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	104
BnFAB2C	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	105
BnFAB2D	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	107
BnFAB2A	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	105
BnFAB2B	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	105
BnFAB2C	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	104
BnFAB2D	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	107
CsFAB2A	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	107
CsFAB2B	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	107
CsFAB2C	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	107
CsFAB2D	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	97
GmFAB2A	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	97
GmFAB2B	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	102
JcFAB2A	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	102
JcFAB2B	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	101
NbFAB2A	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	102
NbFAB2B	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	101
NbFAB2C	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	106
NbFAB2D	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	102
RcFAB2	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	102
TafAB2A	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	98
TafAB2B	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	98
TcfAB2	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	102
XsFAB2	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	103
ZmFAB2A	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	102
ZmFAB2B	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA	98

도면 12b

[illegible]

도면 12c

[illegible]

도면12d

AtFAB2	:	SGEGNKACDYLCGLSPRIKRRLDERACPRARKGPK----	IPFSWIHOREVCI	:	401
AhFAB2A	:	SGEGFKACDYVCGLPFRIRRLLEERACGRAKESPR----	IKFSWIHOREVCI	:	406
AhFAB2B	:	SGEGRKACDYVCGLPFRIRRLLEERACGRAKESPR----	IKFSWIHOREVCI	:	405
BnFAB2A	:	SGEGNKACDYLCGLTFRIRRLDERACPRARKGPK----	VPFSWIHOREVCI	:	399
BnFAB2B	:	SGEGNKACDYLCGLTFRIRRLDERACPRARKGPK----	VPFSWIHOREVCI	:	398
BnFAB2C	:	SGEGNKACDYLCGLTFRIRRLDERACPRARKGPK----	IPFSWIHOREVCI	:	399
BnFAB2D	:	SGEGNKACDYLCGLTFRIRRLDERACPRARKGPK----	IPFSWIHOREVCI	:	401
BoFAB2A	:	SGEGNKACDYLCGLTFRIRRLDERACPRARKGPK----	VPFSWIHOREVCI	:	399
BoFAB2B	:	SGEGNKACDYLCGLTFRIRRLDERACPRARKGPK----	IPFSWIHOREVCI	:	399
BrFAB2A	:	SGEGNKACDYLCGLTFRIRRLDERACPRARKGPK----	VPFSWIHOREVCI	:	398
BrFAB2B	:	SGEGNKACDYLCGLTFRIRRLDERACPRARKGPK----	IPFSWIHOREVCI	:	401
CsFAB2A	:	SGEGNKACDYLCGLSPRIKRRLDERACPRARKGPK----	IPFSWIHOREVCI	:	401
CsFAB2B	:	SGEGNKACDYLCGLSPRIKRRLDERACPRARKGPK----	IPFSWIHOREVCI	:	401
CsFAB2C	:	SGEGNKACDYLCGLSPRIKRRLDERACPRARKGPK----	IPFSWIHOREVCI	:	401
GmFAB2A	:	SGEGRKACDYVCGLPFRIRRLLEERACGRKESST----	IKFSWIHOREVLI	:	391
GmFAB2B	:	SGEGRKACDYVCGLPFRIRRLLEERACGRKESST----	IKFSWIHOREVLI	:	391
JcFAB2A	:	SAEGCKACDYVCGLPFRIRRLLEERACGRAKEGPT----	IPFSWIHOREVKI	:	396
JcFAB2B	:	SAEGCKACDYVCGLPFRIRRLLEERACGRAKEGPT----	IPFSWIHOREVKI	:	396
NbFAB2A	:	SGEGRKACDYVCGLPFRIRRLLEERACGRAKOGPI----	MPFSWIHOREVKI	:	395
NbFAB2B	:	SGCGRKACDYVCGLPFRIRRLLEERACGRAKOGPI----	MPFSWIHOREVKI	:	395
OsFAB2	:	SSEGKACDYLCGLTAAIRIRRLDERACSRARKAGT----	LPFSWVYGREVCI	:	400
RcFAB2	:	SAEGCKACDYVCGLPFRIRRLLEERACGRAKAAPT----	MPFSWIHOREVKI	:	396
TaFAB2A	:	SGEGHKACDYLCGLTAGRIKRLDERACSRKQAGK----	MPFSWVYGREVCI	:	392
TaFAB2B	:	SGEGRRSCDYVCTLATFRIRRLDERACPRAKOGPV----	VPFSWVYGRKVOI	:	392
TcFAB2	:	SALGRKACDYVCGLPFRIRRLLEERACGRAKCAPS----	IPFSWIHOREVKI	:	396
XsFAB2	:	SGEGRKACDYVCGLPFRIRRLLEERACGRAKOGPI----	LPFSWIHOREVCI	:	397
ZmFAB2A	:	SGEGNKACDYLCGLTASRIIRRLLEERACSRARKAGT----	LPFSWVYGRIVCI	:	396
ZmFAB2B	:	SGEGNKACDYLCGLTASRIIRRLLEERACSRARKAGT----	LPFSWVYGREVCI	:	392

도면13

mRNA sequence alignment

sgRNA1

AlFAB2	CCTTTGCTGGCATCTCAGCCTTACAAAT
BoFAB2	AACCTTTGGCATCTCAGCCTTACAACT
BrFAB2	---CCTTTGGCATCTCAGCCTTACAACT
GmFAB2	---CCTTTGGCATCTCAGCCTTACAACT
OeFAB2	---GAACTCAACCTTCAATCCCAAAAT
RcFAB2	---CCTTTCCCTTCTCAACCCCAAAAGT
OsFAB2	GGCCCAACGACGTTCACGCTCCCTCAC
ZmFAB2	---GTCCTCCCTCT

sgRNA2

AlFAB2	GACTCGTTCGCCCAACTCCTTDTTTCAGA
BoFAB2	GGCTCGTTCGCCCAACTCTTACTTTTCAGA
BrFAB2	GGCTCGTTCGCCCAACTCTTACTTTTCAGA
GmFAB2	CTCCCTCGGCCCAACTCCCACTCTTCAGA
OeFAB2	TGCTCTTCCCACTTGTGTCTCAGCCACGA
RcFAB2	CCCTCTTCCCACTTGTGTCTCAGCCACGA
OsFAB2	GGCCCTCGGCCCAACTCCCACTCTTCAGA
ZmFAB2	CCCTCGGCCCAACTCCCACTCTTCAGA

sgRNA3

AlFAB2	ATAAATACCTTTACCTGTCTSGTCTGTGT
BoFAB2	ATAAGTATCTTTACCTGTCTSGTCTGTGT
BrFAB2	ATAAGTATCTTTACCTGTCTSGTCTGTGT
GmFAB2	ACAAATATCTTTACCTGTCTSGTCTGTGT
OeFAB2	ACAAATATCTCTTATCTCTGTCTGTGTGT
RcFAB2	ATAAGTATCTCTTATCTCTGTCTGTGTGT
OsFAB2	ACAAATATCTCTTATCTCTGTCTGTGTGT
ZmFAB2	ATAAGTATCTCTTATCTCTGTCTGTGTGT

sgRNA4

AlFAB2	CTTGCTCTGCTGCTGTTGACATGAGGCAG
BoFAB2	CTTGCTCTGCTGCTGTTGACATGAGGCAG
BrFAB2	CTTGCTCTGCTGCTGTTGACATGAGGCAG
GmFAB2	CTTGCTCTGCTGCTGTTGACATGAGGCAG
OeFAB2	TCTGCTCTGCTGCTGTTGACATGAGGCAG
RcFAB2	CTTGCTCTGCTGCTGTTGACATGAGGCAG
OsFAB2	CTTGCTCTGCTGCTGTTGACATGAGGCAG
ZmFAB2	CTTGCTCTGCTGCTGTTGACATGAGGCAG

sgRNA5

AlFAB2	TGCTCGTGTGTGACATGAGGCAGATTGAA
BoFAB2	TGCTCGTGTGTGACATGAGGCAGATTGAA
BrFAB2	TGCTCGTGTGTGACATGAGGCAGATTGAA
GmFAB2	TGCTCGTGTGTGACATGAGGCAGATTGAA
OeFAB2	TGCTCGTGTGTGACATGAGGCAGATTGAA
RcFAB2	TGCTCGTGTGTGACATGAGGCAGATTGAA
OsFAB2	TGCTCGTGTGTGACATGAGGCAGATTGAA
ZmFAB2	TGCTCGTGTGTGACATGAGGCAGATTGAA

sgRNA6

AlFAB2	CCAAAGACATATGAGACATTCTTGAGTT
BoFAB2	CTAAAGACATATGAGACATTCTTGAGTT
BrFAB2	CTAAAGACATATGAGACATTCTTGAGTT
GmFAB2	CTAAAGACATATGAGACATTCTTGAGTT
OeFAB2	CTAAAGACATATGAGACATTCTTGAGTT
RcFAB2	CTAAAGACATATGAGACATTCTTGAGTT
OsFAB2	CTAAAGACATATGAGACATTCTTGAGTT
ZmFAB2	CTAAAGACATATGAGACATTCTTGAGTT

sgRNA7

AlFAB2	TTCTTGAGTTTCTGCTTCTGCTGCTGAA
BoFAB2	TTCTTGAGTTTCTGCTTCTGCTGCTGAA
BrFAB2	TTCTTGAGTTTCTGCTTCTGCTGCTGAA
GmFAB2	TTCTTGAGTTTCTGCTTCTGCTGCTGAA
OeFAB2	TTCTTGAGTTTCTGCTTCTGCTGCTGAA
RcFAB2	TTCTTGAGTTTCTGCTTCTGCTGCTGAA
OsFAB2	TTCTTGAGTTTCTGCTTCTGCTGCTGAA
ZmFAB2	TTCTTGAGTTTCTGCTTCTGCTGCTGAA

서열목록

- <110> SEJONG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION
- <120> COMPOSITION AND METHOD FOR INCREASING THE CONTENT OF SATURATED FATTY ACIDS IN SEEDS
- <130> 21P07015
- <160> 37
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1

<211> 1206

<212> RNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

auggcucuaa aguuuaaccc uuugguggca ucucagccuu acaaaauccc uuccucgacu 60

cguccgcaa cuccuucuuu cagaucuccc aaguuccucu gccucgcuuc uucuuuccg 120

gcucucagcu ccggcccaa gucaguugag aguuugaaga aaccauuuac gccaccagg 180

gaagugcaug uucaagucuu gcacuccaug ccaccucaa agaucgagau cuucaaauacu 240

auggaaaacu gggccgagga gaaccuucug auucaccuca aggaugugga gaagucuugg 300

caacccagg auuuuugcc ugaccugca ucagaugggu uugaagauca gguaagagag 360

uuaagagaga ggguagaga gcuccugau gauuacuuug uuguuuuggu gggggacaug 420

aucacagaag aagcacuucc gaccuauca acuauguuga acacuugga uggaguuagg 480

gaugaaacag gugcuagucc uacuucagg gcuaauugga ccagagcuug gacugcagaa 540

gaaaaccgac auggcgaucu ucugaauaaa uaccuuuacu ugucuggucg uguugacaug 600

aggcagaucg aaaagaccu ucaguacuug auuggaucug gaauuggaucc gcggacagag 660

aauaacccu accuuggcuu caucuauacg ucauuccaag aaagagcgac auucaucucu 720

cacggaaaca cagcccgcca agccaaagag cacggggaca ucaaacuagc ccaaaauagu 780

ggcacaauag cugcagacga gaagcgucan gaaacagcau acaccaagau aguugaaaag 840

cucuugaga ugauccuga ugguacuguc auggcuuuug cagacaugau gagaaagaaa 900

aucucaaugc cugcucacuu gauguaugau gggcgcaacg acaaccucu ugacaacuuc 960

ucuuccgugg cucagagcu cgguguuuac accgcaaag acuaugcaga cauucuugag 1020

uuucugguug guagguggaa aauccaggac uuaaccgggc uuucagguga aggaaacaaa 1080

gcacaagacu auuuauagcg guuggcucca aggaucaaga gauuggauga gagagcucaa 1140

gcaagagcca agaaaggacc caagauuccu uucaguugga uacacgacag agaagugcag 1200

cucuaa 1206

<210> 2

<211> 28

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FAB2 targeted gRNA

<400> 2

ccuuuggugg caucucagcc uuacaaau	28
<210> 3	
<211> 28	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> FAB2 targeted gRNA	
<400> 3	
gacucguccg ccaacuccuu cuuucaga	28
<210> 4	
<211> 28	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> FAB2 targeted gRNA	
<400> 4	
auaaaauaccu uuacuugucu ggucgugu	28
<210> 5	
<211> 28	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> FAB2 targeted gRNA	
<400>	
5	
cuugucuggu cguguugaca ugaggcag	28
<210> 6	
<211> 28	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> FAB2 targeted gRNA	
<400> 6	
uggucguguu gacaugaggc agaucgaa	28
<210> 7	
<211> 28	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> FAB2 targeted gRNA
 <400> 7
 ccaaagacua ugcagacauu cuugaguu 28
 <210> 8
 <211> 28

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FAB2 targeted gRNA
 <400> 8
 uucuugaguu ucugguuggu agguggaa 28
 <210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> fab2-1_primer_LP
 <400> 9
 gtcggaagtg cttcttctgt g 21
 <210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> fab2-1_primer_RP
 <400> 10
 ataagaatgg gccatcctct g 21

<210> 11
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> fab2-2_primer_LP
 <400> 11
 aacagacatt gaggaagct tc 22
 <210> 12
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> fab2-2_primer_RP
 <400> 12
 cttttcgatc tgcctcatgt c 21
 <210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> fab2-3_primer_LP
 <400> 13

 tgaagaaacc atttacgcca c 21
 <210> 14
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> fab2-3_primer_RP
 <400> 14
 gaatcttggg tcctttcttg g 21
 <210> 15
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LBbl.3_genotyping
 <400> 15
 attttccga tttcggaac 19
 <210> 16
 <211> 34
 <212>
 DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LB2_genotyping
 <400> 16
 gcttcctatt atatcttccc aaattaccaa taca 34

<210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cas13a_primer_F
 <400> 17
 acagcgtgct gtatctgaag 20
 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cas13a_primer_R
 <400> 18
 acacgtattt ctcttcgccc 20

 <210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RT-FAB2_primer_F
 <400> 19
 atggctctaa agtttaaccc t 21
 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RT-FAB2_primer_R
 <400> 20
 ttagagctgc acttctctgt 20
 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RT-eIF4a_primer_F
 <400>

21	
cgtggtttca aggaccagat	20
<210> 22	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> RT-eIF4a_primer_R	
<400> 22	
attgatcgca acaccctttc t	21
<210> 23	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> sgRNA1_primer_F	
<400> 23	
aaacatttgt aaggctgaga tgccaccaaa gg	32
<210> 24	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> sgRNA1_primer_R	
<400> 24	
aaaacctttg gtggcatctc agccttacia at	32
<210> 25	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> sgRNA2_primer_F	
<400> 25	
aaactctgaa agaaggagtt ggcggacgag tc	32
<210> 26	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> sgRNA2_primer_R
 <400> 26
 aaaagactcg tccgccaact ctttctttca ga 32

<210> 27
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sgRNA3_primer_F
 <400> 27
 aaacacacga ccagacaagt aaaggtatatt at 32

<210> 28
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sgRNA3_primer_R
 <400> 28
 aaaaataaat acctttactt gtctggtcgt gt 32

<210> 29
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sgRNA4_primer_F
 <400> 29
 aaacctgcct catgtcaaca cgaccagaca ag 32

<210> 30
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sgRNA4_primer_R
 <400> 30
 aaaacttgtc tggtcgtgtt gacatgaggc ag 32

<210> 31
 <211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sgRNA5_primer_F

<400> 31

aaacttcgat ctgcctcatg tcaacacgac ca 32

<210> 32

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sgRNA5_primer_R

<400> 32

aaaatggtcg tgttgacatg aggcagatcg aa 32

<210> 33

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sgRNA6_primer_F

<400> 33

aaacaactca agaatgtctg catagtcttt gg 32

<210> 34

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sgRNA6_primer_R

<400> 34

aaaaccaag actatgcaga cattcttgag tt 32

<210> 35

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sgRNA7_primer_F

<400> 35

aaacttcac ctaccaacca gaaactcaag aa 32

<210> 36
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sgRNA7_primer_R
 <400> 36
 aaaattcttg agtttctggt tggtagggtg aa 32
 <210> 37
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> U6-26P_primer_F
 <400> 37

 aaccttcaag aatttgattg aata 24