



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112689678 B
(45) 授权公告日 2023. 04. 07

(21) 申请号 201980059729.7
(22) 申请日 2019.09.10
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112689678 A
(43) 申请公布日 2021.04.20
(30) 优先权数据
10-2018-0108026 2018.09.11 KR
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.03.11
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2019/011677 2019.09.10
(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/055084 KO 2020.03.19
(73) 专利权人 庆尚大学校产学协力团
地址 韩国庆尚南道
(72) 发明人 金在演 吴天万 金知谐 郑世正
金贤晶 朴序振 米尔蒂·川
韦鲁·斯万卡雅尼 成演瑀
杜安蒂海登
迪比亚吉奥蒂·普拉马尼克
马哈德夫·拉胡尔·雪莱 孙建熙
(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002
专利代理师 刘翠娥 李青

(51) Int.Cl.
C12N 15/82 (2006.01)
(56) 对比文件
CN 108486145 A, 2018.09.04
CN 108486145 A, 2018.09.04
CN 108018306 A, 2018.05.11
CN 108018306 A, 2018.05.11
Tomáš Čermák, 等. High-frequency,
precise modification of the tomato
genome.《Genome Biol》.2015, 第6卷(第16期),
1-14.
Tomáš Čermák, 等. High-frequency,
precise modification of the tomato
genome.《Genome Biol》.2015, 第6卷(第16期),
1-14.
Nicholas J. Baltes, 等. DNA Replicons
for Plant Genome Engineering.《The Plant
Cell》.2014, 第26卷151-163.
Florian Hahn等. Homology-Directed
Repair of a Defective Glabrous Gene in
Arabidopsis With Cas9-Based Gene
Targeting.《Front Plant Sci》.2018, 第9卷(第
424期), 1-13. (续)

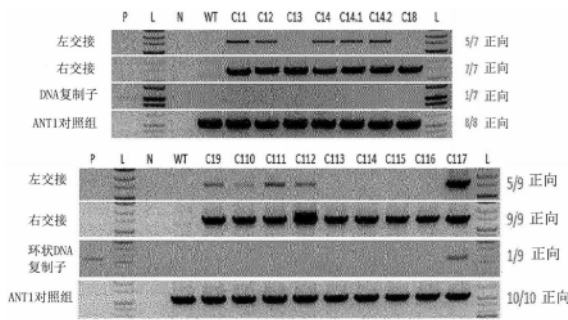
审查员 徐丹

权利要求书1页 说明书11页
序列表7页 附图3页

(54) 发明名称
用于在植物体的基因组中无需插入复制子
即可编辑基因组的基于病毒的复制子及其用途
(57) 摘要

本发明在Ti质粒的左边界(left border, LB)与右边界(right border, RB)序列之间包含基于双生病毒(geminivirus)的复制子(replicon)的用于在T₀代植物体的基因组内无需插入复制子即可编辑基因组的重组载体以及包括通过在上述重组载体中插入外源基因来转化植物细胞的步骤的在T₀代植物体的基因组内

无需插入复制子即可编辑基因组的方法。



[转续页]

CN 112689678 B

[接上页]

(56) 对比文件

- Florian Hahn等.Homology-Directed
Repair of a Defective Glabrous Gene in
Arabidopsis With Cas9-Based Gene
Targeting.《Front Plant Sci》.2018,第9卷(第
424期),1-13.
- Shepherd,D.N,等.EU152256.1.《GENBANK》
.2008,1.
- Hahn,F.,等.MG760357.1.《GenBank》.2018,
1.

1. 一种重组载体,用于在 T_0 代植物体的基因组内无需插入复制子即可编辑基因组,其特征在于,在Ti质粒的左边界与右边界序列之间包含基于豆黄矮病毒的复制子,

所述复制子由长基因间区;Rep/RepA蛋白编码序列;短基因间区;CaMV 35S终止子;Cpf1编码序列;具有AtUBQ内含子的CaMV 35S启动子;U6-双向导RNA;用于编辑基因组的模板DNA部位、NOS启动子、NPT II 编码序列、OCS (章鱼碱合酶) 终止子、CaMV 35S启动子、用于编辑基因组的模板DNA部位;以及长基因间区依次连接而成。

2. 一种在 T_0 代植物体的基因组内无需插入复制子即可编辑基因组的方法,其特征在于,包括通过在权利要求1所述的重组载体的用于编辑基因组的模板DNA部位中插入外源基因来转化植物细胞的步骤。

3. 一种组合物,用于在 T_0 代植物体的基因组内无需插入复制子即可编辑基因组,其特征在于,包含权利要求1所述的重组载体作为有效成分。

用于在植物体的基因组中无需插入复制子即可编辑基因组的 基于病毒的复制子及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及用于在植物体的基因组中无需插入复制子即可编辑基因组的基于病毒的复制子及其用途。

背景技术

[0002] 植物体的基因剪刀技术作为一种尖端的新育种技术,是一种在最终产物中去除如基因/基因组编辑中所使用的基因剪刀等所有外部基因并改变内部基因组的碱基序列的技术。主要通过基于农杆菌 (*Agrobacterium*) 的转化来使CRISPR相关蛋白9 (CRISPR associated protein 9, Cas9) 等的基因组 (genome) 编辑工具表达,此时, T_0 代或 T_1 代中,将T-DNA插入至植物体的基因组进行基因编辑。此后,在 T_1 代或 T_2 代中,通过遗传性分离选择未插入T-DNA的基因组编辑植物。

[0003] 在植物基因组的编辑中,本发明是为了从 T_0 代中选择的事件中不包含复制子而使用基于病毒的复制子 (replicon) 来使复制子不插入植物体的基因组中且完成基因组编辑后从细胞中去除的技术。此技术中所使用的复制子为基于豆黄矮病毒 (Bean Yellow Dwarf virus) 的复制子 (双子叶植物用) 和基于玉米条纹病毒 (Maize Streak virus) 的复制子 (单子叶植物用)。使用本发明的复制子具有在营养生殖 (vegetative reproduction) 作物而非有性生殖 (种子繁殖) 中可有效编辑基因组的优点。通常,在 T_1 代中,对于有性生殖作物,可使用通过孟德尔分离定律来去除基因剪刀的方式,但是对于营养生殖作物,不可能去除基因剪刀,然而,若利用本发明的复制子,则在营养生殖作物中可有效编辑基因组。另外,若通过使用本复制子载体系统来确保在 T_0 代中立即发生基因组编辑但未插入外部基因的事件,则可使新育种的进行速度比从现有 T_1 或 T_2 代中获得这种事件的速度快。此外,由于在完全没有外部基因插入植物体基因组的状态下,由临时表达的基因剪刀进行基因编辑,因此,在进程方面上也可以视为非转基因 (Non-GMO) 方式的使用不同于现有基因剪刀技术,可有效通过规制。

[0004] 另一方面,韩国公开专利第2017-0081268号公开了一种“基因组编辑用核酸构建体”,其关于植物细胞及其基因编辑用途,该植物细胞包含用于编码单向导RNA (sgRNA) 的核酸序列构建体,上述单向导RNA介导对烟草脆裂病毒 (TRV) 序列和靶基因组的靶序列具有序列特异性的切割;以及关于其的基因编辑用途的“基因组编辑用核酸构建体”,但在其中并没有记载本发明的用于在植物体的基因组中无需插入复制子即可编辑基因组的基于病毒的复制子及其用途。

发明内容

[0005] 技术问题

[0006] 本发明根据如上所述的要求而提出,本发明人利用基于双生病毒的复制子在植物体中进行基因组编辑,结果,确认了在 T_0 事件的植物体中发生基因组编辑但复制子未插入

植物体的基因组内,从而完成了本发明。

[0007] 解决问题的方案

[0008] 为了解决上述问题,本发明提供在Ti质粒的左边界(left border,LB)与右边界(right border,RB)序列之间包含基于双生病毒(geminivirus)的复制子(replicon)的用于在 T_0 代植物体的基因组内无需插入复制子即可编辑基因组的重组载体。

[0009] 并且,本发明提供在 T_0 代植物体的基因组内无需插入复制子即可编辑基因组的方法,包括:通过在上述重组载体中插入外源基因来转化植物细胞的步骤。

[0010] 并且,本发明提供包含上述重组载体作为有效成分的用于在 T_0 代植物体的基因组内无需插入复制子即可编辑基因组的组合物。

[0011] 发明的效果

[0012] 本发明为在植物基因组编辑中通过使用植物体质粒形态的基于病毒的复制子的系统来使本发明中所使用的复制子未插入于植物体的基因组中而在 T_0 代中消失,从而可缩短育种过程,并在植物基因组中未发生外部基因的插入的非转基因方式的技术。

附图说明

[0013] 图1为基于豆黄矮病毒(BeYDV)的pLSL.R.Ly载体(Golden Gate2级载体)的载体图谱。

[0014] 图2为pLSL.R.Ly载体的T-DNA的示意图及示出LIR-Rep/RepA-SIR的碱基序列的图。

[0015] 图3为基于玉米条纹病毒的(MSV)的复制子(pMSV0)的示意图。当内含子(intron)不操作时,Rep/RepA编码DNA部分的RepA被编码为短ORF,当内含子被切除而后部分被操作为外显子时,Rep蛋白被生成为长ORF。蛋白编码ORF由反向(reverse)序列表示。

[0016] 图4为确认使用pLSL.R.Ly载体试图编辑基因组的番茄 T_0 植物体是否编辑基因组(是否同源重组)以及复制子是否存在的结果。

[0017] 图5为pContorol 2.6(8161.1)的载体图谱。

[0018] 图6为从pContorol 2.6(8161.1)载体中释放的复制子的图谱。

具体实施方式

[0019] 为了实现本发明的目的,本发明提供在Ti质粒的左边界(left border,LB)与右边界(right border,RB)序列之间包含基于双生病毒(geminivirus)的复制子(replicon)的用于在 T_0 代植物体的基因组内无需插入复制子即可编辑基因组的重组载体。

[0020] 术语“重组”是指细胞复制异源核酸或者表达上述核酸或者表达由肽、异源肽或异源核酸加密的蛋白。重组细胞可以将在上述细胞的天然形态中未发现的基因或基因片段表达为正义或反义形态中的一种。并且,重组细胞还可以表达在天然状态的细胞中发现的基因,但是,上述基因是经过修饰的通过由人工方式重新引入细胞内的。

[0021] 术语“载体”是在将(多个)DNA片段、基因分子可传递到细胞内时所使用的。载体可以在宿主细胞中使DNA独立地复制并再生。术语“传递体”通常与“载体”互换使用。术语“表达载体”是指包含表达目的编码序列以及在特定宿主生物中可操作连接的编码序列所必需的合适基因序列的重组载体。重组载体是指细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺

乳动物细胞病毒载体或其他载体。通常,可以使用任何质粒和载体,只要可以在宿主内复制和稳定化。

[0022] 根据本发明一实例的重组载体,上述双生病毒可以为豆黄矮病毒(Bean Yellow Dwarf virus,BeYDV)或玉米条纹病毒(Maize Streak virus,MSV),但并不限于此。上述豆黄矮病毒为了制备双子叶植物用复制子而使用,玉米条纹病毒为了制备单子叶植物用复制子而使用。

[0023] 根据本发明的重组载体,上述复制子可以由长基因间区(long intergenic region,LIR)、启动子、Rep/RepA蛋白编码序列、终止子、短基因间区(short intergenic region,SIR)、能够插入要表达的外源基因的多克隆位点(multiple cloning site,MCS)、短基因间区以及长基因间区依次连接而成,但并不限于此。

[0024] 病毒的长基因间区(long intergenic region,LIR)具有与复制起点及启动子相同的功能,短基因间区(short intergenic region,SIR)具有与终止子相同的功能。

[0025] 通常,复制子的尺寸越小,复制数量越多,并且随着模板(template)的复制数量的增加,同源重组的可能性增加,因此可以考虑多种因子来调整复制子的结构。

[0026] 根据本发明一实例的重组载体,上述复制子可以由基于豆黄矮病毒的序列1的碱基序列组成的复制子或由基于玉米条纹病毒的序列2的碱基序列组成的复制子,但并不限于此。

[0027] 术语“复制子(replicon)”是指自主控制的复制单元,其中,复制单元为连续的DNA分子,复制起始于分子内的特定部位中依次进行并结束。质粒、病毒的DNA及细菌的染色体全部为一个复制单元。

[0028] Baltes等(2014,植物细胞26(1):151-163)表明了使用诱导现有的双链断裂(double strand break,DSB)的锌指核酸酶(Zinc Finger Nuclease,ZFN)和基于双生病毒的病毒复制子扩增同源重组(homologous recombination,HR)模板,从而使烟草植物中的同源重组效率显著提高。包含锌指核酸酶和同源重组模板的双生病毒复制子装载在T-DNA上,通过农杆菌注入到烟草中,然后通过滚环式复制制作环状复制子,并且表达锌指核酸酶,在有缺陷的GUS靶基因中诱导双链断裂,此时,由复制子中所装载的同源重组模板生成同源重组。

[0029] 在本发明的复制子中,上述多克隆位点可以由限制酶BsmBI、AarI或BpiI组成,但并不限于此。上述限制酶BsmBI、AarI或BpiI是用于Golden Gate克隆的IIs型限制酶。

[0030] 可通过同源重组(homologous recombination)机制进行利用基于病毒的复制子的基因组编辑。

[0031] 根据本发明的上述多克隆位点中,可以克隆用于基因组编辑的模板DNA序列或者可以克隆用于基因组编辑的模板DNA序列;选自由CRISPR相关蛋白9(CRISPR associated protein 9,Cas9)、来自Prevotella和Francisella 1的CRISPR(CRISPR from Prevotella and Francisella 1,Cpf1)、转录激活因子样效应物核酸酶(Transcription activator-like effector nuclease,TALEN)、锌指核酸酶(Zinc Finger Nuclease,ZFN)或其功能类似物组成的组中的一个以上的核酸酶编码序列;以及能够将上述核酸酶诱导至待编辑的靶基因组位点的向导RNA等,但并不限于此。

[0032] 本发明人根据Cas9或Cpf1的差异比较了同源重组效率,结果,确认了Cpf1具有比

Cas9更高的同源重组事件效率。

[0033] 本发明还提供在 T_0 代植物体的基因组内无需插入复制子即可编辑基因组的方法，包括：通过在本发明的重组载体中插入外源基因来转化植物细胞的步骤。

[0034] 本发明的重组载体与上述相同，发生基因组编辑的 T_0 事件中，从细胞中去除复制子，从而可在营养生殖作物而非有性生殖中也可以有效编辑基因组。

[0035] 根据本发明一实例的上述复制子可以由序列1或序列2的碱基序列组成，但并不限于此。

[0036] 本发明还提供包含本发明的重组载体作为有效成分的用于在 T_0 代植物体的基因组内无需插入复制子即可编辑基因组的组合物。本发明的组合物包含重组载体作为有效成分，该重组载体包含本身不会插入植物体的基因组内并可编辑靶基因的基于病毒的复制子，因此，在 T_0 代植物体的基因组内无需插入复制子即可发生所需的基因编辑。

[0037] 以下，通过实施例详细说明本发明。然而，以下实施例仅用于例示本发明，本发明的内容不限于以下实施例。

[0038] 材料及方法

[0039] 1. 实验材料

[0040] 本发明中所使用的材料如表1所示。

[0041] 表1. 本发明中所使用的实验材料、试剂及工具

[0042]

名称	来源
植物体	
番茄品种 (Tomato variety Cultivar) <i>Hongkwang</i>	韩国本地企业
细菌	
大肠杆菌 10-beta (<i>Escherichia coli</i> 10-beta)	恩益碧 (NEB), 美国
根癌农杆菌 GV3101 : : pMP90 (<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101: :pMP90)	庆尚大学, 韩国
DNA 载体	
pTC147	阿德基因 (Addgene), 美国
pTC217	阿德基因, 美国
pContorol 2.6 (8161.1)	实验室拥有载体
Golden Gate 试剂盒 (Golden Gate tool kit)	阿德基因, 美国
MoClo 试剂盒 (MoClo Tool kit)	阿德基因, 美国
试剂	
三磷酸脱氧核糖核苷酸 (dNTPs)	赛默飞世尔科技 (ThermoFisher Scientific), 美国
Phusion <i>Taq</i> DNA 聚合酶 (polymerase)	赛默飞世尔科技, 美国
<i>Pfu</i> DNA 聚合酶	赛默飞世尔科技, 美国
T4 DNA 连接酶 (ligase)	恩益碧, 美国
限制酶 (Restriction enzymes) (<i>Bpi</i> I、 <i>Bsa</i> I 及其他)	恩益碧, 美国
T7E1 核酸内切酶 (endonuclease)	恩益碧, 美国

[0043]	植物激素 (Plant hormone) ; 乙酰丁香酮 (Acetosyringone) ; 烃 (Hydrocarbon) ; β -D 葡糖苷酸 (β -D Glucuronide, X-Gluc) ; 植物组织培养用化学品 (Chemicals for plant tissue culture) ; MS 盐和维生素 (MS salts and vitamins) ; MS 盐和维生素 B5 (MS salts and B5 vitamins) 、植物琼脂 (PhytoAgar) 、麦芽糖 (Maltose) 。	西格玛 (Sigma), 美国 ; DUCHEFA Biochemie B.V., 荷兰
	水	使用密理博系统处理 (Treated with Millipore system)
	试剂盒	
	CloneJET™ PCR 克隆	赛默飞世尔科技, 美国
	质粒 DNA 分离试剂盒 (Plasmid DNA isolation kit) (小型和中型 (mini and midi))	BIOFACT , 韩国 ; Qiagen, 德国
	总基因组 DNA 分离试剂盒 (Total genomic DNA isolation kit) (小量制备 (mini preps))	Qiagen, 德国

[0044] 2. 克隆

[0045] 2.1. 利用PCR的DNA片段扩增

[0046] 根据制造商的协议, 利用Phusion Taq聚合酶(高保真 (high fidelity)), 混合了特异性引物(最终浓度为0.4 μ M)、dNTPs(最终浓度为0.2mM)及模板(10~20ng的基因组DNA或0.1~0.5ng/reaction的纯化的DNA)进行PCR反应。PCR反应中使用了不含DNase、RNase及蛋白酶(protease)的水, 其电导率小于2 μ S/cm。通过装载在0.8%的琼脂糖凝胶来确认PCR产物, 并且使用QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) 将预期大小的条带部分的凝胶切除并纯化。使用Nanodrop2.0 (赛默飞世尔科技 (ThermoFisher Scientific)) 来测量PCR产物的浓度。

[0047] 2.2. 构建Golden Gate酶切-连接 (digestion-ligation)

[0048] 如表2所示, 设定用于Golden Gate组装的酶切 (digestion) 以及连接 (ligation) 的条件。

[0049] 表2. 酶切-连接条件

[0050]

要素	需要量 (fmol)	1 ×
10×T4 DNA 缓冲液 (buffer)		1.5
插入	20	x
载体 (Vector)	13	y
T4 DNA 连接酶		0.5
<i>Bsa</i> I 或 <i>Bpi</i> I 或 <i>Bsm</i> BI		0.5
H ₂ O		最多 15
合计 (Total)		15 (μL)

[0051] 利用*Bsa*I或*Bpi*I的基因扩增反应程序如表3所示,利用*Bsm*BI的基因扩增反应程序如表4所示。

[0052] 表3. 扩增反应条件 (*Bsa*I或*Bpi*I)

[0053]

步骤	温 度 (°C)	时间 (分 钟)	反 复 次数	说明
1	37	15	1	预 消 化 (Pre-digestion)
2	37	2	25-40	酶切-连接
	16	5		
3	37	5	1	消 化 后 (Post-digestion)
4	50	5	1	消化后
5	80	5	1	变性(Denaturation)

[0054] 表4. 扩增反应条件 (*Bsm*BI)

[0055]

步骤	温度 (°C)	时间(分钟)	反复 次数	说明
1	42	15	1	预消化
2	42	2	25-40	酶切-连接

[0056]

	16	5		
3	42	5	1	消化后
4	50	5	1	消化后
5	80	5	1	变性

[0057] 2.3. 大肠杆菌转化

[0058] 将酶切-连接混合物转化为10⁸菌株的大肠杆菌后,将转化的大肠杆菌和15 μ L的XGAL (5-溴-4-氯-3-吲哚基- β -D-吡喃半乳糖苷 (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside), 20mg/mL) 涂抹在含有125mg/L的羧苄青霉素 (Carbenicillin) 或氨苄西林的左边界固体培养基上,培养过夜,鉴定出阳性白色菌落。

[0059] 为了确认构建体在菌落内的比例,将每个构建体的白色菌落接种在含有50mg/L的链霉素的左边界液体培养基 (0级克隆确认用)、含有125mg/L的羧苄青霉素的左边界液体培养基 (1级克隆确认用) 或含有50mg/L的卡那霉素的左边界液体培养基 (2级或3级克隆确认用) 中并进行培养,然后分离质粒并用适当的限制酶处理。将包含显示预期大小的切割大小的质粒的菌落分类为每个阳性克隆。

[0060] 2.4. 排序

[0061] 委托Solgent (韩国) 对每个构建体的两个阳性克隆进行排序分析。分析排序结果后执行克隆步骤。

[0062] 3. 制作基于豆黄矮病毒 (Bean Yellow Mosaic Virus, BeYDV) 的复制子受体载体

[0063] 在LIR-SIR-LIR内,为了制作包含具有调整为表达的Rep/RepA的豆黄矮病毒复制子的2级载体 (能够使用Golden Gate 2级受体作为载体),将BpiI克隆位点 (TGCC..GGGA) 插入LIR-SIR与LIR之间。通过从pLSLR载体克隆来使用LIR和SIR。

[0064] 对于pLSL载体的克隆反应,该载体包含在SIR-LIR之间具有BsaI克隆位点的LIR-SIR-LIR,使用BpiI依次组装以下DNA片段以生成附着末端,并使用T4 DNA连接酶连接:

[0065] a) PCR产物 (PCR product): BpiI (TGCC) -LIR-SIR- (TGCC) BsaI. (GCAA) BpiI

[0066] b) PCR产物: BpiI (GCAA) .BsaI (GGGA) -LIR-BpiI (ACTA)

[0067] c) pICH41744末端连接载体 (pICH41744 end linker vector): BpiI (ACTA) -L3E- (GGGA) BpiI

[0068] d) 2级受体 (Level 2acceptor): pAGM4673或pAGM4723 (TGCC..GGGA)。

[0069] 此后,为了克隆在LIR-SIR之间包含多克隆位点 (multicloning site, MCS) 的pLSL.MCS1,将以下DNA片段整合 (integration) 并连接到pLSL载体的MCS1位点:

[0070] a) 由AscI和BstXI切割的pLSL。

[0071] b) MCS1 (混合MCSf1和MCSr1并进行退火)。

[0072] 此后,将以下DNA片段连接以制作载体 (pLSL.Ly), 其中将番茄红素表达盒作为克隆标记引入pLSL.MCS1中。

[0073] a) 由BpiI切割的pLSL.MCS1。

[0074] b) 由BpiI切割的pAGM4723及分离的番茄红素片段。

[0075] 此后,将以下DNA片段连接到复制子内以克隆pLSL.R.Ly载体,其中在LIR的调整下,克隆了Rep/RepA编码序列。

[0076] a) 由BsaI切割pLSL.Ly。

[0077] b) 由RRA-F4/RRA-R4引物生成的Rep/RepA PCR产物。

[0078] 在如上所述的方法制备的pLSL.R.Ly载体 (图1和图2) 中,去除与番茄红素生产相关的基因 (Ly), 并通过Golden Gate组装方式 (命名为8161.1) 克隆包含crRNA、35S-Cpf1、供体模板 (donnor template) 等的构建体,用于以后的实验。

[0079] 4. 番茄转化

[0080] 利用含有本发明构建体的农杆菌转化在生物体外 (In vitro) 培养的番茄 Hongkwang 品种的子叶 (cotyledon) 外植体。简而言之, 在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 的温度、16 小时 (明) / 8 小时 (暗) 的光周期条件下, 在 $1/2 \times \text{MS0}$ 培养基 (2.2g 的 MS 盐 (MS salts) + B5、20g 的蔗糖 (sucrose)、0.5g 的 MES (pH=5.7)、7.5g 的琼脂 (1L)) 中, 将 Hongkwang 品种的灭菌种子培养 7 天后, 回收幼苗, 将子叶切割成 0.2~0.3cm 的大小, 然后将各个切片 (外植体) 置于含有 PREMC 培养基 (2.2g 的 MS 盐 + B5、30g 的麦芽糖 (maltose)、0.1g 的抗坏血酸 (Ascorbic acid)、1.952g 的 MES, 0.2mg 的 IAA (pH=5.5)、7.5g 的琼脂 (1L); 将上述混合物灭菌后, 添加 1.0mg 的玉米素反式异构体、1mL 的腐胺 (Putrescine) (1mM)、100 μM 的乙酰丁香酮 (acetosyringone, AS)) 的平板培养基上进行 1 小时的预处理。刺穿经预处理的外植体以形成小孔后, 使用含有本发明的构建体的根癌农杆菌 GV3101::pMP90 菌株, 在常温下反应 20 分钟进行转化。在 30°C 的温度下, 在含有适当抗生素的 LB 培养基中搅拌并培养将用于转化的农杆菌 GV3101::pMP90 菌株过夜, 然后, 通过离心分离从 OD_{600} 值为 0.6~0.8 水平的培养液中回收细胞。该细胞沉淀物悬浮在含有 200 μM 的 AS 的 ABM-MS 液体培养基后, 用于番茄外植体的转化。

[0081] 用农杆菌转化的番茄外植体转移到共培养基 (ABM-MS 培养基, 8g/L 的琼脂, 200 μM 的 AS) 中, 并在 25°C 的温度下培养 2 天。之后, 将外植体转移到非选择性培养基 (NSEL) 中并培养 5 天, 然后转移到选择性培养基 (SEL5) 中进行培养。在选择性培养基中, 以 10 天为间隔执行转化的外植体的传代培养, 直至达到最佳的再生效率。当芽长到足够长 (1.5~3.0cm) 时, 将其转移到生根培养基中以诱导再生为完整的植物体。从生根培养基中生长的完整植物体转移到蛭石中并固化, 直到转移至温度为 $26 \pm 2^\circ\text{C}$ 、光周期为 16 小时 (明) / 8 小时 (暗) 的温室中的土壤中。

[0082] 表 5. 用于培养番茄外植体的培养基组成

[0083]	AMB (1L)	MS (1L)	ABM-MS	NSEL (1L)	SEL5 (1L)
--------	-------------	------------	--------	--------------	-----------

[0084]	K_2HPO_4 : 2.212g KH_2PO_4 : 1.130g NH_4NO_3 : 1.496g KCl : 0.149g $MgSO_4$: 0.308g $CaCl_2$: 0.015g $FeSO_4$: 0.003g 葡萄糖: 20g MES : 3.904g pH=5.5	MS 盐+ 维生素 B5 : 2.2g 蔗糖: 5g pH=5.5	以 1 : 1 的比例混 合 ABM 和 MS; 半 固 体 ABM-MS 中, 加入 8g/L 的琼 脂。 然后, 向 高压灭菌 器 中 加 入: 玉米素反 式 异 构 体 : 1.0mg/L IAA : 0.2mg/L 腐 胺 (1mM) : 1ml AS (200 μ M)	MS 盐+维 生素 B5: 4.4g MES : 0.976g 麦芽糖: 30g IAA : 0.2mg pH=5.7 琼脂: 8g 然后, 向 高压灭菌 器 中 加 入: 玉米素反 式 异 构 体: 2.0mg 泰 门 汀 (Timent in) : 300mg 腐 胺 (1mM): 1ml	MS 盐+维 生素 B5: 4.4 g MES : 0.976g 麦 芽 糖 : 30g IAA: 0.5mg pH=5.7 琼脂: 8g 然后, 向高 压 灭 菌 器 中 加 入: 玉 米 素 反 式 异 构 体: 2.0mg 卡那霉素: 80mg 泰 门 汀 : 300mg 腐 胺 (1mM) : 1ml

[0085] 5. T_0 番茄转化体的分析

[0086] 收集番茄转化体的叶子, 并根据制造商的协议使用DNeasy Plant mini kit (Qiagen) 提取总基因组DNA。使用提取的gDNA作为模板, 利用对复制子的左交接 (Left junction) 或右交接 (Right junction) 具有特异性的引物, 通过PCR分析来评价 T_0 植物体中是否存在同源重组事件, 并且通过环状DNA的存在与否, 确认了 T_0 事件植物体内是否存在复制子。肌动蛋白基因用作内参基因, 通过Sanger法对PCR产物进行序列分析, 以确认通过复制子交接和同源重组交换的序列。

[0087] 表6. 用于确认是否存在复制子的同源重组事件以及是否存在复制子的PCR分析中使用的引物信息

[0088]

靶	引物	序列信息 (5'→3')	副产物大小
左交接	UPANT 1-F1	TGCGATGATCTAC GGTAACAAA (序列 4)	1485bp
	NPTII- R1	GCGTGCAATCCAT CTTGTTTC (序列 5)	
右交接	ZY010F	ACGTAAGGGATG ACGCACA (序列 6)	1380bp
	TC140R	TACCACCGGTCCA TTCCCTA (序列 7)	
ANT1 对照组	TC140F	GGAAAATGGCAT CTTGTTCCC (序列 8)	1056bp
	TC140F	TACCACCGGTCCA TTCCCTA (序列 7)	
复制子	GR-F1	TTGAGATGAGCA CTTGGGATAG (序列 9)	557bp
	pCf.AN T1-R4	ACCTCAACGACG CAAGTATT (序列 10)	

[0089] 实施例1. 确认 T_0 番茄转化体的复制子是否存在

[0090] 利用本发明的基于病毒的复制子转化番茄植物体的结果, 在所分析的所有16个 T_0 番茄植物体中都鉴定出右交接的PCR扩增产物, 从而证实了16个植物体中都发生了同源重组, 在10个植物体中鉴定出左交接的PCR扩增产物, 可以看出在10个植物体中发生了完整的同源重组。有趣的是, 在16个植物体中只在2个植物体(C11及C117)中鉴定出环状DNA, 则表明在其余14个植物体中, 用于转化的复制子未插入于 T_0 事件植物体的基因组内(图4)。即, 可以推断出, 使用本发明的复制子, 即使不在有性生殖(种子繁殖), 而在营养生殖作物中也可以有效编辑基因组。

<110> 庆尚大学校产学协力团

<120> 用于在植物体的基因组中无需插入复制子即可编辑基因组的基于病毒的复制子及其用途

<130> KHP212110318.9

<160> 10

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1610

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pLSL.R.Ly T-DNA

<400> 1

[0001] gagggtcgta cgaataattc gtatccaacg gaaataacctg atacaatata cgctccatca 60
aataccatca catcgtatat gcttttatag tgtgaacacc tttaacccta gtgggcggga 120
aattttctac tttaaactcg gaccgctcgt gctaaagcac tcgcgataag gggggggccac 180
gccggaata ttaaattcgg cgtgggcccc ccctgtcgc aaagacttcg tctttaagta 240
aattccacgt cattttccac tatctattaa aatgacaaaa ataccctgc ctccatgcct 300
ccacgccggt tataagatag agtttgaggc aaccctcgg agtcacaaca actcccaaaa 360
tgccttctgc tagtaagaac ttcagactcc aatctaaata tgtttcctt acctatccca 420
agtgctcatc tcaaagagat gatttattcc agtttctctg ggagaaactc acaccttttc 480
ttattttctt ccttggtgtt gcttctgagc ttcatcaaga tggcactacc cactatcatg 540
ctcttctcca gcttgataaa aaaccttgta ttagggatcc ttctttttc gattttgaag 600
gaaatcacc taatatccag ccagctagaa actctaaaca agtccttgat tacatatcaa 660
aggacggaga tattaaaacc agaggagatt tccgagatca taaggtttct cctcgcaaat 720

	ctgacgcacg atggagaact attatccaga ctgcaacgct taaggaggaa tatcttgaca	780
	tgatcaagga agaattccct catgaatggg caacaaagct tcaatggctg gaatattcag	840
	ccaacaaatt attccctcca caacctgaac cgtatgtgtc gcccttcaca gaatcagatc	900
	ttcgtgcc cgaagatcta cactctgga gggaaacca tctataccat gtaagcatag	960
	acgcttatac ttacatacat cctgtctcat accaacaagc tcaatctgac ctggaatgga	1020
	tggccgattt aacaaggaca atggaaggaa tggaatccga caccagcc tctacatctg	1080
	cggaccaact cgtaccggaa agaccacctg ggctagaagt ctcggacgac acaactattg	1140
	gaacggtacc atcgatttca ccaactacga tgaacacgcc acctataata tcatcgacga	1200
	catccccttc aagttcgtcc cattgtggaa gcaattaata ggttgccagt ctgatttcac	1260
	tgtcaaccct aaatatggaa aaaagaagaa aataaaagggt gggatccctt ctataattct	1320
	ttgcaatcct gacgaggact ggatgttatc aatgacaagt caacagaagg attactttaa	1380
[0002]	agataattgc gtcaccact acatgtgtga cggggagact tttttgctc gggaatcgtc	1440
	gagtcactga ggcaacgtgc ctctctcat acgagtttat cttaaagtat tattttttt	1500
	ggggtgttg ttttggatt gtctttttt gttatttcg tgtgttatgt aacatatgta	1560
	atttctatct acttgcaaa tgaaatatat tcataaaata atcattttat	1610
	<210> 2	
	<211> 2250	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> pMSV0 T-DNA	
	<400> 2	
	ggtctcatgc cggcgcgtgc ctgtcttcg tcgactagtc tagaagacaa gggaagcttt	60
	agccgacgac ggaggttgag gctgagggat ggagactgg gagctcaaa ctctatagta	120

	tacctgtgcg ccttcgaaat ccgccgctcc ctgtcttat agtggttgatg aatgggccgg	180
	accgggtcgg cccagcagga aaagaaggcg cgcactaata ttaccgcgcc ttcttttct	240
	gcgagggccc ggtagggccc gagcgattg atgtaaagct tggctctgct ttgtatgatt	300
	tatctaaagc agccattct aaagaaaccg gtcccgggca ctataaattg cctaacaagt	360
	gcgattcatt ctgaataaaa actcccgttt tattatatct gatgaatgct gaaagcttac	420
	attaatatgt cgtgcgatgg cacgaaaaa cacacgcaat caatacaggg gggtagtagg	480
	cgggcggcta aggggtggtgc tcggcgggca gaacatcgaa aaatgcctga gacgccagt	540
	ccttaggcag gtgcgagtac gctcgacacc tgcggtaggg atccacgtct cagggatgaa	600
	taaaaactcc cgttttatta tatctgatga atgctgaaag ctacattaa tatgtcgtgc	660
	gatggcacga aaaaacacac gcaatcaata caggggggta gtaggcgggc ggctaagggt	720
	ggtgctcggc gggcagaaca tcgaaaaatc aagatctatc tgaatgtact gcctccgtag	780
[0003]	gaggcagctc agggggagaa taccatttct cccccggcga cataatgtaa atgacgcagt	840
	ttgcctcgaa atactccagc tgcctggag tcatttctt catcaatct tcatccgagt	900
	tggcgaggat tattgtaggc ttagacttct tctgcacctt cttcttcta ccatacttg	960
	ggtttacaat gaaatccctc tgacagccaa ctaactgtt ccaacaagga cagaatttaa	1020
	acgggatatc atctacgatg ttgtagattg cgtcctcgtt gtatgaggac caatcaacat	1080
	tattttgcca gtaattatga acccctaggc ttctggcca agtagatttt cctgttcttg	1140
	ttgggccgac gatgtagagg ctctgcttc ttgatcttc atctgatgac tggatacatt	1200
	atccatccat tggaggtcag aaattgcac ctcgagggta taacaggtag gttgaaggag	1260
	catgtaagct tcgggactaa cctggaagat gtaggctgg agccaatcat tgattgactc	1320
	attacaaagt aaatcagggtg aggattgcgg atgaggattg gtgaactctt cctgaatctc	1380
	aggaaaaagc ttatttgag agtattcaaa atactgcaat ttgtggacc aatcataggg	1440
	aagctcttc tggatcatgg agaggctac ttcttgga gtagagtgtg aaataatgtc	1500

tcgcattatt tcacttttgg aaggcttttt ttcttaact tctgaatcag atttcctag 1560
gaagggggac ttctaggaa tgaaagtacc tctctcaaac atagccagag gttccttgag 1620
gatgtaatcc ctacacctgt ttactgactt ggcactctga atgtttgggt gaaaccatt 1680
aatatcaaag aaccttgagt ccgatattct taccggcttc tctgttgaa gcaatgcatg 1740
taaagtcaaa cttccatctt tatgtgctc tcgggcacat agaatgtact tgggaatcca 1800
acgaacaacg agctcccaga tcacttgaca ggcgatttca ggattttctg gacactttgg 1860
ataggtgagg aacgtgttag cgttccggtg tgagaactga cggttggatg aggaggaggc 1920
catgtttgag ccgacgacgg aggttgaggc tgagggatgg cagactggga gtcctaaact 1980
ctatagtata cctgtgcgcc ttcgaaatcc gccgctccct tgtcttatag tggttgtgaa 2040
tgggccggac cgggtcggcc cagcaggaaa agaaggcgcg cactaatatt accgcgcctt 2100
cttttctgc gagggcccgg tagggcccga gcgatttgat gtaaagcttg gtcctgcttt 2160
[0004] gtatgattta tctaaagcag ccattctaa agaaaccggt cccgggcact ataaattgcc 2220
taacaagtgc gattcattcg ggatgagacc 2250

<210> 3
<211> 1091
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 经修饰的Rep/RepA

<400> 3
atgccttctg ctagtaagaa cttcagactc caatctaaat atgttttct tacctatccc 60
aagtgtcat ctcaaagaga tgattattc cagtttctt gggagaaact cacaccttt 120
cttattttct tccttgggtg tgcttctgag cttcatcaag atggcactac ccactatcat 180
gctcttctcc agcttgataa aaaaccttgt attagggatc cttcttttt cgattttgaa 240

	ggaaatcacc ctaatatcca gccagctaga aactctaaac aagtccttga ttacatatca	300
	aaggacggag atattaaaac cagaggagat ttccgagatc ataagggttc tctcgc aaa	360
	tctgacgcac gatggagaac tattatccag actgcaacgt ctaaggagga atatcttgac	420
	atgatcaagg aagaattccc tcatgaatgg gcaacaaagc ttcaatggct ggaatattca	480
	gccaacaaat tattccctcc acaacctgaa ccgtatgtgt cgcccttcac agaatcagat	540
	cttcgctgcc acgaagatct acactcctgg agggaaaccc atctatacca tgtaagcata	600
	gacgcttata cttacatata tctgtgtca taccaacaag ctcaatctga cttgaatgg	660
	atggccgatt taacaaggac aatggaagga atggaatccg acaccccagc ctctacatct	720
	gcggaccaac tcgtaccgga aagaccacct gggctagaag tctcggacga cacaactatt	780
	ggaacggtac catcgatttc accaactacg atgaacacgc cacctataat atcatcgacg	840
[0005]	acatcccctt caagttcgtc ccattgtgga agcaattaat aggttgccag tctgatttca	900
	ctgtcaaccc taaatatgga aaaaagaaga aaataaaagg tgggatccct tctataattc	960
	tttgcaatcc tgacgaggac tggatgttat caatgacaag tcaacagaag gattacttta	1020
	aagataattg cgtcacccac tacatgtgtg acggggagac ttttttgct cgggaatcgt	1080
	cgagtcactg a	1091
	<210> 4	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 4	
	tgcgatgatc tacggtaaca aa	22

	<210>	5	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	5	
		gcgtgcaatc catcttggtc	20
	<210>	6	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
[0006]	<400>	6	
		acgtaaggga tgacgcaca	19
	<210>	7	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	7	
		taccaccggt ccattcccta	20
	<210>	8	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		

<223> 引物

<400> 8

ggaaaatggc atctgttcc c

21

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

[0007]

<400> 9

ttgagatgag cacttgggat ag

22

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 10

acctcaacga cgcaagtatt

20

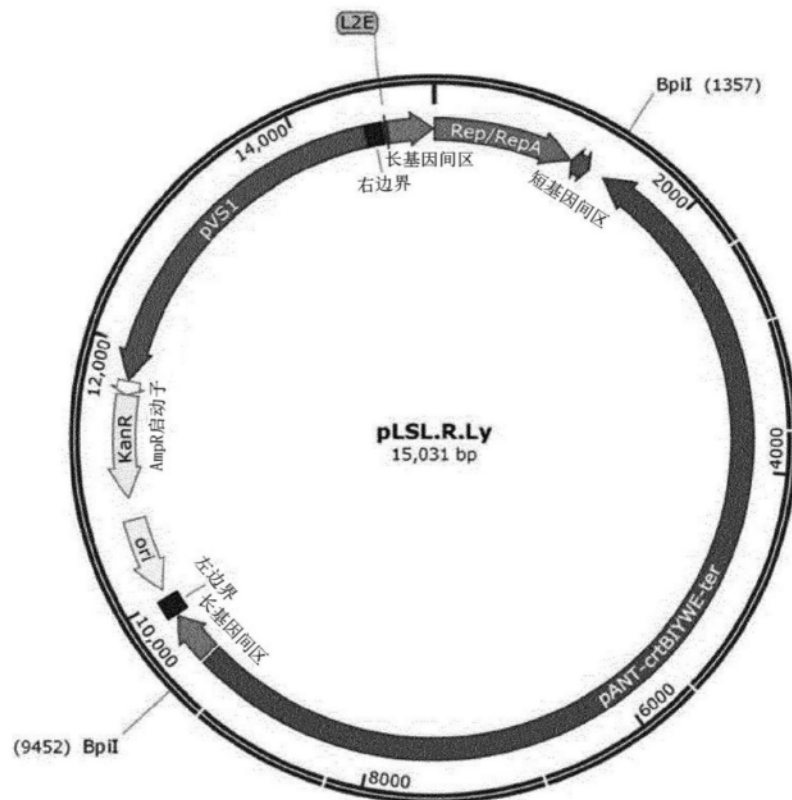


图1

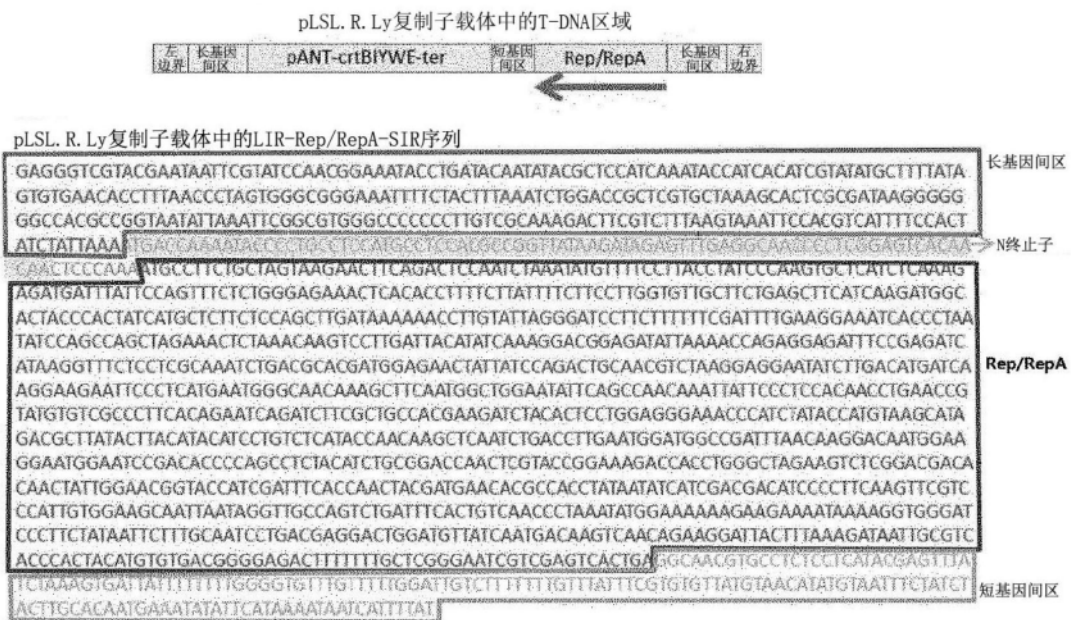


图2

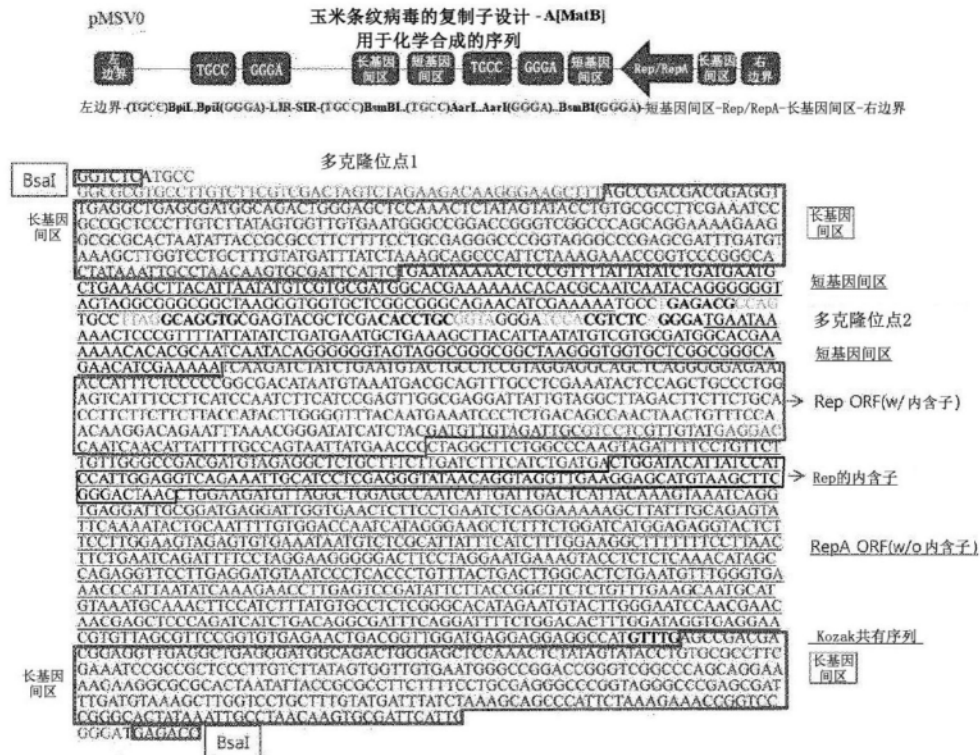


图3

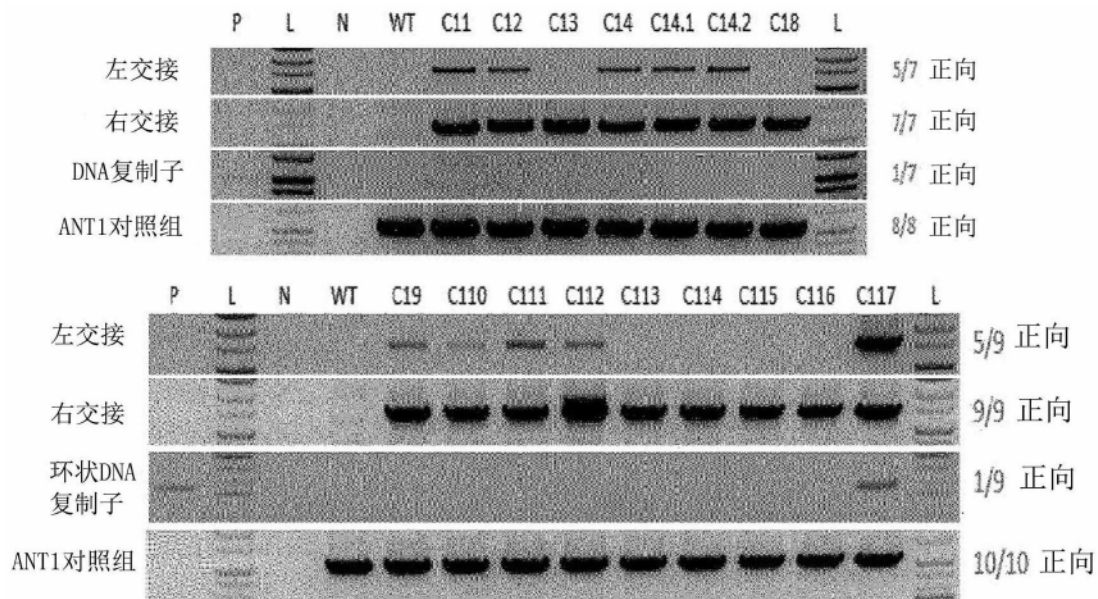


图4

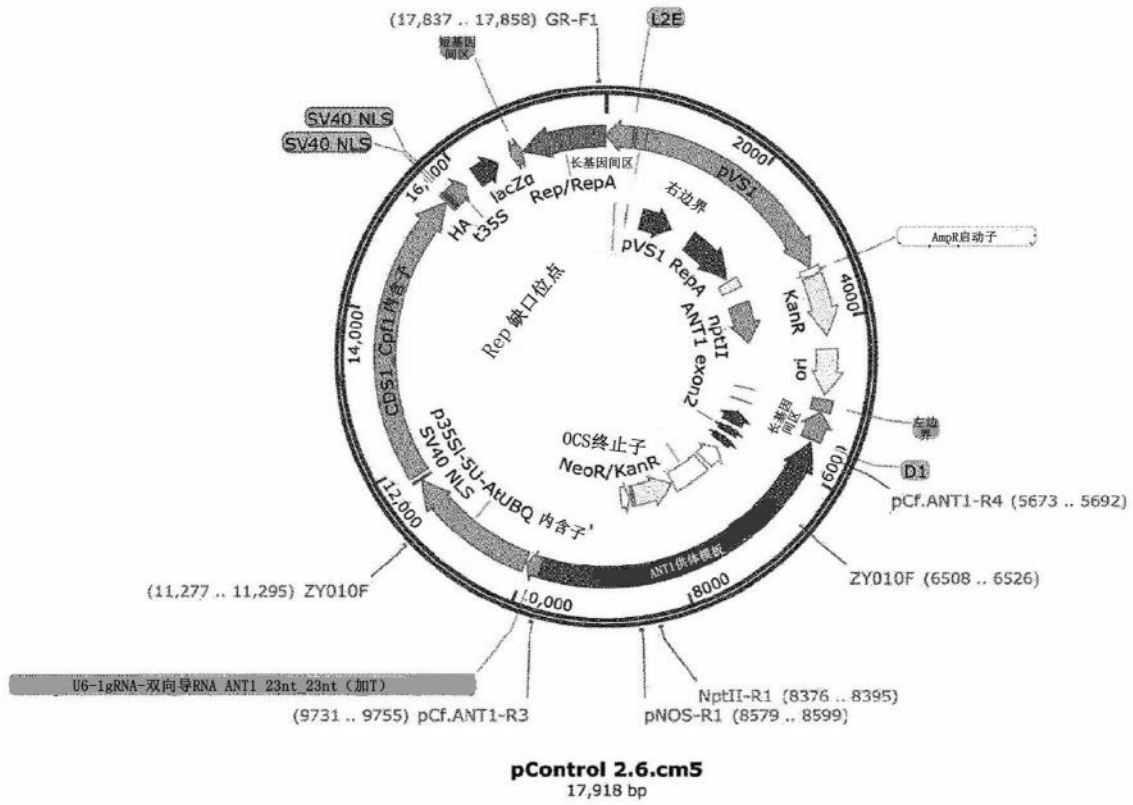


图5

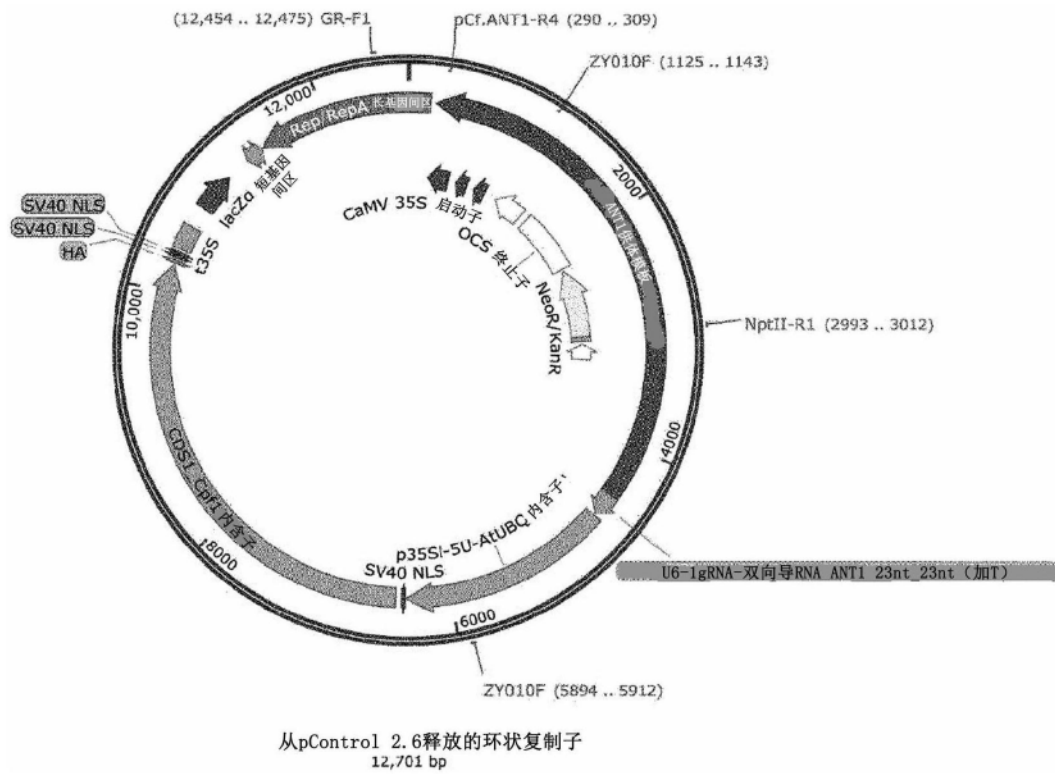


图6