



등록특허 10-2074744



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년02월07일

(11) 등록번호 10-2074744

(24) 등록일자 2020년02월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/82 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/8203 (2013.01)

C12N 2750/12041 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0108026

(22) 출원일자 2018년09월11일

심사청구일자 2018년09월11일

(56) 선행기술조사문헌

Tomas Cermak 등. Genome Biology. Vol. 16, No. 232, 페이지 1-14 (2015.11.06.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

김재연

경상남도 진주시 새평거로 75, 406동 804호

부반티엔

경상남도 진주시 진주대로 501

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

전체 청구항 수 : 총 3 항

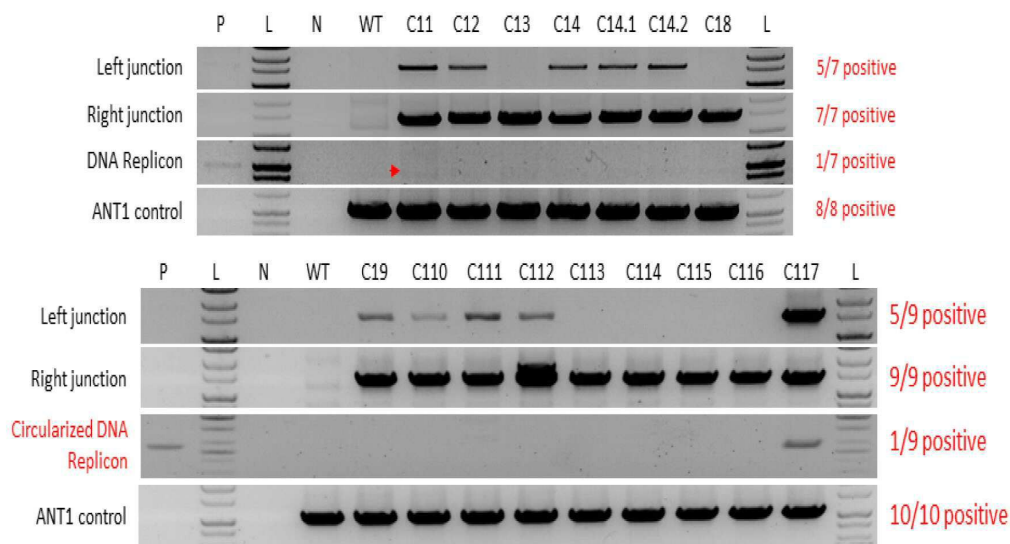
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 식물체의 게놈에 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하기 위한 바이러스 기반의 레플리콘 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 Ti 플라스미드의 LB(left border) 및 RB(right border) 서열 사이에 게미니바이러스(geminivirus) 기반 레플리콘(replicon)을 포함하는 T0 세대 식물체에서 게놈 내 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하기 위한 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터에 외래 유전자를 삽입하여 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는 T0 세대 식물체에서 게놈 내 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

김지혜

경상남도 진주시 진주대로 501

정세정

경상남도 진주시 진주대로 501

김현정

경상남도 진주시 진주대로 501

박서진

경상남도 진주시 진주대로 501

트란티필

경상남도 진주시 진주대로 501

시반 칼리아니 벨루

경상남도 진주시 진주대로 501

성연우

경상남도 진주시 진주대로 501

도안 티 하이 드영

경상남도 진주시 진주대로 501, 27동 306호

디브야조티 프라마니크

경상남도 진주시 진주대로 501, 27동 306호

라홀 마하데브 쉐케

경상남도 진주시 진주대로 501, 27동 306호

손건희

경상남도 진주시 진주대로 501, 27동 306호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711059928 (세부과제번호 2015R1A2A1A10053576)

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(미래부)

연구과제명 칼로스 매개 원형질연락사 개폐조절 분자신호전달 연구

기 여 율 1/10

주관기관 경상대학교

연구기간 2017.11.01 ~ 2018.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395054998 (세부과제번호 PJ013226012018)

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21(R&D)

연구과제명 유전자 가위 고도화 기술개발

기 여 율 2/10

주관기관 경상대학교

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711065968 (세부과제번호 2017R1A4A1015515)

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 집단연구지원(R&D)

연구과제명 상동성재조합기반 식물유전체교정 원천기술 개발

기 여 율 7/10

주관기관 경상대학교

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

Ti 플라스미드의 LB(left border) 및 RB(right border) 서열 사이에 BeYDV(Bean Yellow Dwarf virus) 기반 레플리콘(replicon)을 포함하는, T0 세대 식물체에서 게놈 내 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하기 위한 재조합 벡터로서,

상기 레플리콘은 LIR(long intergenic region); Rep/RepA 단백질 코딩서열; SIR(short intergenic region); CaMV 35S 터미네이터; Cpf1 코딩 서열; AtUBQ 인트론을 갖는 CaMV 35S 프로모터; U6-double gRNAs; 유전체 교정을 위한 주형 DNA 부위, NPTII 코딩서열, OCS(octopine synthase) 터미네이터, CaMV 35S 프로모터, 유전체 교정을 위한 주형 DNA 부위; 및 LIR;이 순차적으로 연결된 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항의 재조합 벡터의 유전체 교정을 위한 주형 DNA 부위에 외래 유전자를 삽입하여 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는 T0 세대 식물체에서 게놈 내 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하는 방법.

청구항 7

제1항의 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는 T0 세대 식물체에서 게놈 내 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하기 위한 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식물체의 게놈에 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하기 위한 바이러스 기반의 레플리콘 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 식물체를 대상으로 하는 유전자가위 기술은 첨단 신육종 기술로서, 최종 산물에 유전자/게놈 교정에 사용된 유전자/가위 등의 외부 유전자가 모두 제거되고 내부 게놈 염기서열에 변화를 일으키는 기술이다. Cas9(CRISPR associated protein 9) 등의 게놈(유전체) 편집 부품을 주로 아그로박테리움(Agrobacterium) 기반 형질전환을 통해 발현시키는데 이 경우 T0 또는 T1 세대에서 식물체의 게놈에 T-DNA가 삽입되어 유전자 교정을 일으킨다. 이후 T1 또는 T2 세대에서 유전적인 분리를 통해 T-DNA가 삽입되지 않은 유전체 교정 식물이 선택된다.

[0003] 본 발명은 식물 유전체를 교정함에 있어서, 바이러스 기반의 레플리콘(replicon)을 사용하여 레플리콘이 식물체의 유전체에 삽입되지 않고 유전체 교정을 한 후 세포에서 제거되어 T0 세대에서 선발된 이벤트에서 이미 레플

리콘을 포함하지 않게 하는 기술이다. 이 기술에 사용된 레플리콘은 Bean Yellow Dwarf virus 기반의 레플리콘(쌍떡잎 식물용)과 Maize Streak virus 기반의 레플리콘(외떡잎 식물용)이 사용되었다. 본 발명의 레플리콘을 사용하면 유성생식(종자번식)이 아닌 영양생식(vegetative reproduction) 작물에서 효과적으로 유전체 교정이 가능한 장점이 있다. 일반적으로 T1 세대에서 멘델의 분리법칙을 통해 유전자가위를 제거하는 방식은 유성생식 작물의 경우에 활용가능하나 영양생식 작물의 경우에 유전자가위를 제거하는 것이 불가능하나, 본 발명의 레플리콘을 이용하면 영양생식 작물에서 효과적으로 유전체 교정이 가능할 것이다. 또한 본 리플리콘 벡터시스템을 사용하여 T0 세대에서 바로 유전체 교정이 일어났으나 외부 유전자가 삽입되지 않은 이벤트를 확보하면, 기존 T1 또는 T2에서 이런 이벤트를 얻는 것보다 빠르게 신육종이 진행될 수 있다. 또한 식물체의 게놈에 외부 유전자가 전혀 삽입되지 않은 상태에서 일시적으로 발현하는 유전자가위에 의해 유전자 교정이 일어남으로 프로세스 상태에서도 기존 유전자가위 기술과 다르게 Non-GMO 방식을 사용한다고 볼 수 있어 규제 통과에 효과적일 것이다.

[0004] 한편, 한국공개특허 제2017-0081268호에는 담배 얼룩 바이러스(TRV) 서열과 대상 게놈의 타겟 서열에 서열 특이적인 절단을 매개하는 단일한 가이드 RNA(sgRNA)를 코딩하는 핵산 서열 구조체를 포함하는 식물세포 및 이의 유전자 편집 용도에 관한 '게놈 편집용 핵산 구조체'가 개시되어 있으나, 본 발명의 식물체의 게놈에 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하기 위한 바이러스 기반의 레플리콘 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 게미니바이러스 기반의 레플리콘을 이용하여 식물체에 유전체 교정을 수행한 결과, T0 이벤트 식물체에서 유전체의 교정은 일어났으나, 레플리콘이 식물체 게놈 내에 전혀 삽입되지 않았음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 Ti 플라스미드의 LB(left border) 및 RB(right border) 서열 사이에 게미니바이러스(geminivirus) 기반 레플리콘(replicon)을 포함하는 T0 세대 식물체에서 게놈 내 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하기 위한 재조합 벡터를 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터에 외래 유전자를 삽입하여 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는 T0 세대 식물체에서 게놈 내 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하는 방법을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는 T0 세대 식물체에서 게놈 내 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하기 위한 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명은 식물 유전체를 교정함에 있어 식물체 플라스미드 형태인 바이러스 기반 레플리콘을 사용하는 시스템으로 본 발명에 사용된 레플리콘은 식물체의 유전체에 삽입되지 않고 T0 세대에서 사라짐으로써 육종 과정을 짧게 할 수 있고, 식물 유전체에 외부 유전자의 삽입이 일어나지 않는 non-GMO 방식의 기술이다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 Bean Yellow Dwarf virus(BeYDV) 기반 pLSL.R.Ly 벡터(Golden Gate Level 2 vector)의 벡터 맵이다.

도 2는 pLSL.R.Ly 벡터의 T-DNA 모식도와 LIR-REp/REpA-SIR 염기서열을 보여주는 도면이다.

도 3은 Maize Streak virus(MSV) 기반의 레플리콘(pMSV0)의 모식도와 염기서열을 보여주는 도면이다.

도 4는 pLSL.R.Ly 벡터를 사용하여 유전체 교정을 시도한 토마토 T0 식물체의 유전체 교정 여부(상동재조합 여부)와 레플리콘의 존재 여부를 확인한 결과이다.

도 5는 pContorol 2.6(8161.1)의 벡터 맵이다.

도 6은 pContorol 2.6(8161.1) 벡터로부터 빠져나온 레플리콘의 맵이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Ti 플라스미드의 LB(left border) 및 RB(right border) 서열 사이에 게미니바이러스(geminivirus) 기반 레플리콘(replicon)을 포함하는 T0 세대 식물체에서 게놈 내 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하기 위한 재조합 벡터를 제공한다.
- [0012] 용어 "재조합"은 세포가 이중의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 캡티드, 이중의 캡티드 또는 이중의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 것을 의미한다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.
- [0013] 용어 "벡터"는 DNA 단편(들), 유전자 분자를 세포 내로 전달할 수 있는 수단을 지칭할 때 사용된다. 벡터는 숙주세포에서 독립적으로 DNA를 복제시키고, 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 유전자 서열을 포함하는 재조합 벡터를 의미한다. 재조합 벡터는 세균 플라스미드, 파아지, 효모 플라스미드, 식물 세포 바이러스, 포유동물 세포 바이러스 벡터, 또는 다른 벡터를 의미한다. 대체로, 임의의 플라스미드 및 벡터는 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 벡터에 있어서, 상기 게미니바이러스는 BeYDV(Bean Yellow Dwarf virus) 또는 MSV(Maize Streak virus)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 BeYDV는 쌍떡잎 식물용 레플리콘 제작을 위해 사용된 것이며, MSV는 외떡잎 식물용 레플리콘 제작을 위해 사용된 것이다.
- [0015] 본 발명에 따른 재조합 벡터에서, 상기 레플리콘은 LIR(long intergenic region); 프로모터; Rep/RepA 단백질 코딩 서열; 터미네이터; SIR(short intergenic region); 발현시키고자 하는 외래 유전자를 삽입할 수 있는 MCS(multiple cloning site); SIR; 및 LIR이 순차적으로 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0016] 바이러스의 LIR(long intergenic region)은 복제원점 및 프로모터와 같은 기능을 가지고 있고, SIR(short intergenic region)은 터미네이터와 같은 기능을 가지고 있다.
- [0017] 일반적으로 레플리콘의 크기가 작으면 카피 수가 많아지고, 상동재조합의 확률은 주형(template)의 카피 수가 많아질수록 확률이 증가하므로, 다양한 인자들을 고려하여 레플리콘의 구성을 조절할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 벡터에 있어서, 상기 레플리콘은 BeYDV 기반 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 레플리콘 또는 MSV 기반 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 레플리콘일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 용어 "레플리콘(replicon)"은 자율적 제어를 하는 복제단위를 의미하는 것으로, 복제단위는 연속된 DNA 분자로, 복제는 분자 내의 특정부위에서 개시하여 축차적으로 진행하여 종결한다. 플라스미드, 바이러스의 DNA 및 세균의 염색체는 모두가 1개의 복제단위이다.
- [0020] Baltes 등(2014, Plant Cell 26(1):151-163)은 기존에 DSB(double strand break)를 유도하는 ZFN(Zinc Finger Nuclease)과 게미니바이러스 기반의 바이러스 레플리콘을 사용하여 HR(homologous recombination) 주형을 증폭 시킴으로써 담배 식물에서 HR 효율이 획기적으로 증가함을 보여주었다. ZFN과 HR 주형을 포함하는 게미니바이러스 레플리콘은 T-DNA에 탑재되었고 아그로박테리움을 통해 담배에 주입된 후, 롤링 서클 복제를 통해 원형의 레플리콘을 만들고 ZFN을 발현시켜 결합있는 GUS 표적 유전자에 DSB를 유도하면 레플리콘에 탑재된 HR 주형에 의해 HR이 일어나게 되는 것이다.
- [0021] 본 발명의 레플리콘에서, 상기 MCS는 제한효소 *BsmBI*, *AarI* 또는 *BpiI*로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 제한효소 *BsmBI*, *AarI* 또는 *BpiI*는 골든 게이트 클로닝을 위한 타입 IIs 제한효소이다.
- [0022] 바이러스 기반의 레플리콘을 이용한 유전체 교정은 상동재조합(homologous recombination) 기전을 통해 유전체의 교정이 가능할 수 있다.
- [0023] 본 발명에 따른 상기 MCS에는 유전체 교정을 위한 주형 DNA 서열을 클로닝할 수 있고, 또는 유전체 교정을 위한 주형 DNA 서열; Cas9(CRISPR associated protein 9), Cpf1(CRISPR from *Prevotella* and *Francisella* 1), TALEN(Transcription activator-like effector nuclease), ZFN(Zinc Finger Nuclease) 또는 이의 기능적 유사체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 핵산가수분해효소 코딩 서열; 및 상기 핵산가수분해효소를 편집하고자 하는 표적 게놈 자리로 유도할 수 있는 가이드 RNA 등을 클로닝할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0024] 본 발명자는 Cas9 또는 Cpf1의 차이에 따른 상동재조합 효율을 비교한 결과, Cpf1이 Cas9 보다 상동재조합 이벤트 효율이 높음을 확인하였다.
- [0025] 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 벡터에 외래 유전자를 삽입하여 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는 T0 세대 식물체에서 게놈 내 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하는 방법을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 재조합 벡터는 전술한 것과 같으며, 유전체 교정이 일어난 T0 이벤트에서 레플리콘이 세포로부터 제거되어, 유성생식이 아닌 영양생식 작물에서도 효과적으로 유전체 교정이 가능함을 알 수 있었다.
- [0027] 본 발명의 일 구현 예에 따른 상기 레플리콘은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는 T0 세대 식물체에서 게놈 내 레플리콘의 삽입 없이 유전체를 교정하기 위한 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은, 그 자체는 식물체의 게놈 내로 삽입되지 않으면서 표적하는 유전자의 교정 이벤트가 가능한 바이러스 기반의 레플리콘을 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하고 있어, T0 세대 식물체에서 레플리콘의 게놈 내 삽입 없이 원하는 유전자의 교정만 일어나게 된다.
- [0029] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] **재료 및 방법**
- [0031] **1. 실험 재료**
- [0032] 본 발명에 사용된 재료는 하기 표 1과 같다.

표 1

[0033] 본 발명에 사용된 실험 재료, 시약 및 도구

명칭	출처
식물체	
Tomato variety Cultivar <i>Hongkwang</i>	지역 회사
박테리아	
<i>Escherichia coli</i> 10-beta	NEB, 미국
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101::pMP90	경상대학교, 한국
DNA 벡터	
pTC147	Addgene, 미국
pTC217	Addgene, 미국
pCantorol 2.6(8161.1)	실험실 보유 벡터
Golden Gate too kit	Addgene, 미국
MoClo Tool kit	Addgene, 미국
시약	
dNTPs	ThermoFisher Scientific, 미국
Phusion <i>Taq</i> DNA polymerase	ThermoFisher Scientific, 미국
<i>Pfu</i> DNA polymerase	ThermoFisher Scientific, 미국
T4 DNA ligase	NEB, 미국
Restriction enzymes(<i>Bpi</i> I, <i>Bsa</i> I and others)	NEB, 미국
T7E1 endonuclease	NEB, 미국
Plant hormones; Acetosyringone; Hydrocarbon; β -D Glucuronide (X-Gluc); Chemicals for plant tissue culture; MS salts and vitamins; MS salts and B5 vitamins, PhytoAgar, Maltose.	Sigma, 미국; DUCHEFA Biochemie B.V., 네덜란드
물	Treated with Millipore system
키트	
CloneJET™ PCR cloning	ThermoFisher Scientific, 미국
Plasmid DNA isolation kit (mini and midi)	BIOFACT, 한국; Qiagen, 독일
Total genomic DNA isolation kit (mini preps)	Qiagen, 독일

2. 클로닝

2.1 PCR을 이용한 DNA 단편 증폭

제조사에 따라 Phusion Taq 중합효소(high fidelity)를 이용하여, 특이적 프라이머(최종 농도 0.4 μM), dNTPs(최종 농도 0.2mM) 및 주형(게노믹 DNA의 10~20ng, 또는 정제된 DNA의 0.1~0.5ng/reaction)을 혼합하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응에 사용된 물은 전기전도도가 2 μS/cm 보다 작으면서, DNase, RNase 및 protease가 없는 것을 사용하였다. PCR 산물은 0.8% 아가로스 겔에 로딩하여 확인하였으며, 예상되는 크기의 밴드 부분의 겔을 절제하여 QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen)을 사용하여 정제하였다. PCR 산물의 농도는 Nanodrop 2.0(ThermoFisher Scientific)을 사용하여 측정하였다.

2.2 골든 게이트 digestion-ligation 셋업

골든 게이트 어셈블리를 위한 효소 처리(digestion) 및 라이게이션(ligation)의 조건은 하기 표 2와 같이 설정하였다.

표 2

Digestion-Ligation 조건

요소	필요량 (fmol)	1×
10×T4 DNA buffer		1.5
insert	20	x
Vector	13	y
T4 DNA ligase		0.5
<i>Bsa</i> I or <i>Bpi</i> I or <i>Bsm</i> BI		0.5
H ₂ O		up to 15
Total		15 (μl)

*Bsa*I 또는 *Bpi*I를 이용한 경우의 유전자증폭 반응 프로그램은 하기 표 3과 같으며, *Bsm*BI를 이용한 경우의 유전자증폭 반응 프로그램은 표 4와 같다.

표 3

증폭 반응 조건(*Bsa*I 또는 *Bpi*I)

단계	온도(℃)	시간(분)	반복 횟수	설명
1	37	15	1	Pre-digestion
2	37	2	25-40	Digestion-ligation
	16	5		
3	37	5	1	Post-digestion
4	50	5	1	Post-digestion
5	80	5	1	Denaturation

표 4

증폭 반응 조건(*Bsm*BI)

단계	온도(℃)	시간(분)	반복 횟수	설명
1	42	15	1	Pre-digestion
2	42	2	25-40	Digestion-ligation
	16	5		
3	42	5	1	Post-digestion
4	50	5	1	Post-digestion
5	80	5	1	Denaturation

2.3 대장균 형질전환

- [0044] Digestion-ligation 혼합물을 대장균 10 β 균주로 형질전환한 후, 형질전환된 대장균과 XGAL(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside, 20mg/ml) 15 μ l를 125mg/L의 카르베니실린(Carbenicillin) 또는 암피실린을 포함하는 LB 고체배지에 도말하고, 하룻밤 배양한 후 양성의 하얀색 콜로니를 확인하였다.
- [0045] 콜로니 내 컨스트럭트의 비율을 확인하기 위해, 각 컨스트럭트 별로 하얀색 콜로니를 50mg/L의 스트렙토마이신을 포함하는 LB 액체배지(레벨 0 클로닝 확인용), 125mg/L의 카르베니실린을 포함하는 LB 액체배지(레벨 1 클로닝 확인용) 또는 50mg/L의 카나마이신을 포함하는 LB 액체배지(레벨 2 또는 3 클로닝 확인용)에 접종하여 배양한 후, 플라스미드를 분리하여 적절한 제한효소로 처리하였다. 예상되는 크기의 절단된 크기를 보이는 플라스미드를 포함하는 콜로니들을 각각의 양성 클론으로 분류하였다.
- [0046] 2.4 시퀀싱
- [0047] 각 컨스트럭트 당 2개의 양성 클론을 솔젠트(한국)에 의뢰하여 시퀀싱 분석 하였다. 시퀀싱 결과를 분석하고 차후 클로닝 단계를 수행하였다.
- [0048] **3. BeYDV(Bean Yellow Mosaic Virus) 기반의 레플리콘 수용체 벡터 제작**
- [0049] LIR-SIR-LIR 내에, 발현되도록 조정된 Rep/RepA를 가진 BeYDV 레플리콘을 포함하는 레벨 2 벡터를 제작하기 위해서(골든 게이트 레벨 2 수용체로 벡터를 사용할 수 있도록), *BpiI* 클로닝 자리(TGCC..GGGA)를 LIR-SIR와 LIR 사이에 삽입하였다. LIR과 SIR은 pLSLR 벡터로부터 클로닝하여 사용하였다.
- [0050] SIR-LIR 사이에 *BsaI* 클로닝 자리를 가진 LIR-SIR-LIR을 포함하는 벡터인 pLSL의 클로닝 반응을 위해, 하기의 DNA 단편을, 부착말단의 생성을 위해 *BpiI*를 사용하여 순차적으로 어셈블하였고, T4 DNA 리가제를 사용하여 연결시켰다:
- [0051] a) PCR product: *BpiI*(TGCC)-LIR-SIR-(TGCC) *BsaI*..(GCAA)*BpiI*
- [0052] b) PCR product: *BpiI*(GCAA)..*BsaI*(GGGA)-LIR-*BpiI*(ACTA)
- [0053] c) pICH41744 end linker vector: *BpiI*(ACTA)-L3E-(GGGA)*BpiI*
- [0054] d) Level 2 acceptor: pAGM4673 or pAGM4723 (TGCC..GGGA).
- [0055] 그 후, LIR-SIR 사이에 MCS(multicloning site)를 포함하는 pLSL.MCS1의 클로닝을 위해, 하기의 DNA 단편을 pLSL 벡터의 MCS1 자리에 인테그레이션(integration)시켜 연결시켰다:
- [0056] a) *AscI* 및 *BstXI*에 의해 절단된 pLSL.
- [0057] b) MCS1(MCSf1 및 MCSr1을 혼합하고 어닐링).
- [0058] 그 후, pLSL.MCS1에 클로닝 마커로서 라이코펜 발현 카세트를 도입한 벡터(pLSL.Ly)를 제작하기 위해 하기의 DNA 단편을 연결시켰다:
- [0059] a) *BpiI*에 의해 절단된 pLSL.MCS1.
- [0060] b) *BpiI*에 의해 절단된 pAGM4723 및 분리된 라이코펜 단편.
- [0061] 그 후, LIR의 조절 하에 Rep/RepA 코딩 서열이 클로닝된 pLSL.R.Ly 벡터의 클로닝을 위해 하기의 DNA 단편을 레플리콘 내에 연결시켰다:
- [0062] a) *BsaI*에 의해 절단된 pLSL.Ly.
- [0063] b) RRA-F4/RRA-R4 프라이머에 의해 생성된 Rep/RepA PCR 산물.
- [0064] 상기와 같이 제조한 pLSL.R.Ly 벡터(도 1 및 도 2)에서 라이코펜 생산에 관련된 유전자(Ly)가 제거되고 crRNA, 35S-Cpf1, donor template 등을 포함하는 컨스트럭트를 골든 게이트 어셈블리 방식을 통해 클로닝하여(8161.1 명명), 추후 실험에 사용하였다.
- [0065] **4. 토마토 형질전환**
- [0066] *In vitro* 조건에서 배양시킨 토마토 홍광 품종 유래의 자엽(cotyledon) 외식편을 본 발명의 컨스트럭트를 포함하고 있는 아그로박테리움을 이용하여 형질전환시켰다. 간단하게, 홍광 품종의 멸균된 종자를 1/2x MSO 배지(2.2g MS salts + B5, 20g sucrose, 0.5g MES (pH=5.7), 7.5g agar for 1L)에서 25 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 16시간 명/8시간 암

의 광주기 조건에서 7일간 배양한 후 유묘를 회수하여 자엽 잎을 0.2~0.3cm 크기로 절단한 다음, 각 단편(외식편)을 PREMC 배지(2.2g MS salts + B5, 30g maltose, 0.1g Ascorbic acid, 1.952g MES, 0.2mg IAA (pH=5.5), 7.5g agar for 1L; 상기 혼합물을 멸균한 후, 1.0mg Zeatin trans-isomer, 1ml Putrescine(1mM), acetosyringone(AS) 100 μ M 첨가)를 포함하는 평판배지에 1시간 동안 올려 전처리시켰다. 전처리된 외식편을 작은 구멍이 나도록 찌른 후 본 발명의 컨스트럭트를 포함하고 있는 아그로박테리움 튜메파시엔스 GV3101::pMP90 균주를 사용하여 상온에서 20분간 반응시켜 형질전환시켰다. 형질전환에 사용된 아그로박테리움 GV3101::pMP90 균주는 적절한 항생제를 포함하는 LB 배지, 30℃에서 교반시키며 하룻밤 일차 배양시킨 후, OD₆₀₀ 값이 0.6~0.8 수준인 배양액으로부터 원심분리를 통해 세포를 회수하였다. 세포 펠렛은 200 μ M의 AS를 포함하는 ABM-MS 액체배지로 현탁시킨 후, 토마토 외식편 형질전환에 사용되었다.

[0067] 아그로박테리움으로 형질전환시킨 토마토 외식편은 공배양 배지(ABM-MS 배지, 8g/L agar, 200 μ M AS)로 옮겨 25℃에서 2일간 배양시켰다. 그 후, 외식편을 비-선별 배지(NSEL)로 옮겨 5일간 배양시킨 후, 선별 배지(SEL5)로 옮겨 배양시켰다. 선별 배지에서 형질전환시킨 외식편의 계대배양은 최적의 재생 효율에 이를때까지 10일 간격으로 수행되었다. 신토가 충분한 길이(1.5~3.0cm)에 이르면, 발근배지로 옮겨 온전한 식물체로 재생되도록 유도하였다. 발근배지로부터 성장한 온전한 식물체를 버미큘라이트 포트에 옮겨 26±2℃의 온도 및 16시간 명/8시간 암의 광주기를 가진 비닐하우스 내의 토양으로 옮겨지기 전까지 경화시켰다.

표 5

[0068] 토마토 외식편 배양에 사용된 배지 조성

AMB (for 1L)	MS (for 1L)	ABM-MS	NSEL (for 1L)	SEL5 (for 1L)
K ₂ HPO ₄ : 2.212 g KH ₂ PO ₄ : 1.130 g NH ₄ NO ₃ : 1.496 g KCl: 0.149 g MgSO ₄ : 0.308 g CaCl ₂ : 0.015 g FeSO ₄ : 0.003 g Glucose: 20 g MES: 3.904 g pH=5.5	MS salts + B5 vitamins: 2.2 g Sucrose: 5 g pH=5.5	Mix ABM and MS as 1:1 ratio. For semisolid ABM-MS, add 8g/L of agar. Autoclave then add: Zeatin trans-isomer: 1.0 mg/L IAA: 0.2 mg/L putrescine (1mM): 1ml AS (200 μ M)	MS salts + B5 vitamins: 4.4 g MES: 0.976 g Maltose: 30 g IAA: 0.2 mg pH = 5.7 Agar: 8 g Autoclave then add: Zeatin trans-isomer: 2.0 mg Timentin: 300 mg Putrescine (1mM): 1ml	MS salts + B5 vitamins: 4.4 g MES: 0.976 g Maltose: 30 g IAA: 0.5 mg pH = 5.7 Agar: 8 g Autoclave then add: Zeatin trans-isomer: 2.0 mg Kanamycin: 80 mg Timentin: 300 mg Putrescine (1mM): 1ml

[0069] 5. T0 토마토 형질전환체의 분석

[0070] 토마토 형질전환체의 잎을 채집하여, 제조사의 프로토콜에 따라 DNeasy Plant mini kit(Qiagen)를 사용하여 총 게놈 DNA를 추출하였다. T0 식물체에서 상동재조합 이벤트의 여부는 추출한 gDNA를 주형으로 사용하여 레플리콘의 left 또는 right junction에 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR 분석으로 평가하였으며, 환형 DNA의 존재 여부를 통해 레플리콘의 T0 이벤트 식물체 내의 존재 유무를 확인하였다. *Actin* 유전자는 내부 참조 유전자로 사용되었으며, 레플리콘 junction과 상동재조합을 통해 교환된 서열의 확인을 위해 PCR 산물은 생거법으로 서열 분석하였다.

표 6

[0071] 레플리콘에 의한 상동재조합 이벤트 유무 및 레플리콘 존재 확인을 위한 PCR 분석에 사용된 프라이머 정보

표적	프라이머	서열정보(5'→3')	부산물 크기
Left junction	UPANT1-F1	TGCGATGATCTACGGTAACAAA (서열번호 4)	1485 bp
	NPTII-R1	GCGTGCAATCCATCTTGTTTC (서열번호 5)	
Right junction	ZY010F	ACGTAAGGGATGACGCACA (서열번호 6)	1380 bp
	TC140R	TACCACCGGTCCATTCCCTA (서열번호 7)	
ANT1 control	TC140F	GGAAATGGCATCTTGTTCCC (서열번호 8)	1056 bp

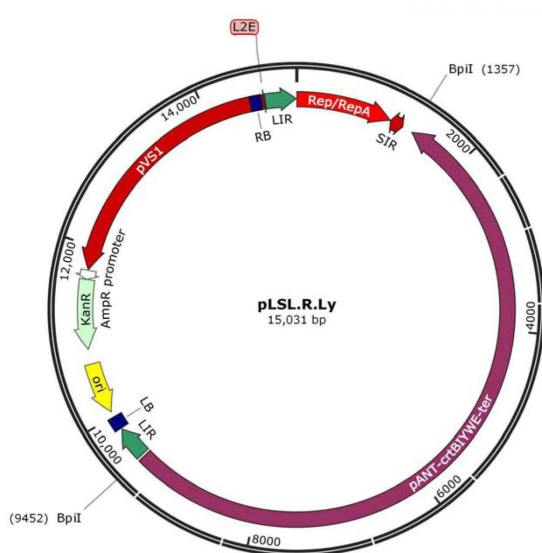
Replicon	TC140R	TACCACCGGTCCATTCCCTA (서열번호 7)	557 bp
	GR-F1	TTGAGATGAGCACTTGGGATAG (서열번호 9)	
	pCf.ANT1-R4	ACCTCAACGACGCAAGTATT (서열번호 10)	

[0072] 실시예 1. T0 토마토 형질전환체의 레플리콘 존재 여부 확인

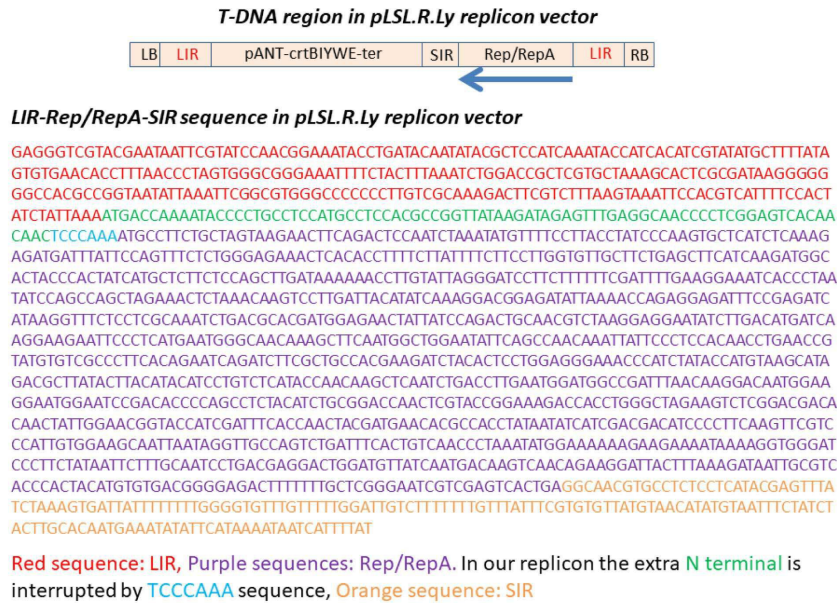
[0073] 본 발명에 따른 바이러스 기반 레플리콘을 이용한 토마토 식물체의 형질전환 결과, 분석된 T0 토마토 식물체 16개 모두에서 right junction에 대한 PCR 증폭 산물이 확인되어, 16개의 식물체 모두 상동재조합이 일어났음을 확인할 수 있었으며, 10개의 식물체에서는 left junction에 대한 PCR 증폭 산물도 확인되어, 10개의 식물체는 완전한 상동재조합이 일어났음을 알 수 있었다. 흥미롭게도, 16개 식물체 중 단 2개의 식물체(C11 및 C117)에서만 환형 DNA가 확인되어, 나머지 14개의 식물체는 형질전환에 사용된 레플리콘이 T0 이벤트 식물체의 게놈 내에 삽입되지 않았음을 알 수 있었다(도 4). 즉, 본 발명의 레플리콘을 사용하면 유성생식(종자번식)이 아닌 영양생식 작물에서도 효과적으로 유전체 편집이 가능할 수 있음을 유추할 수 있었다.

도면

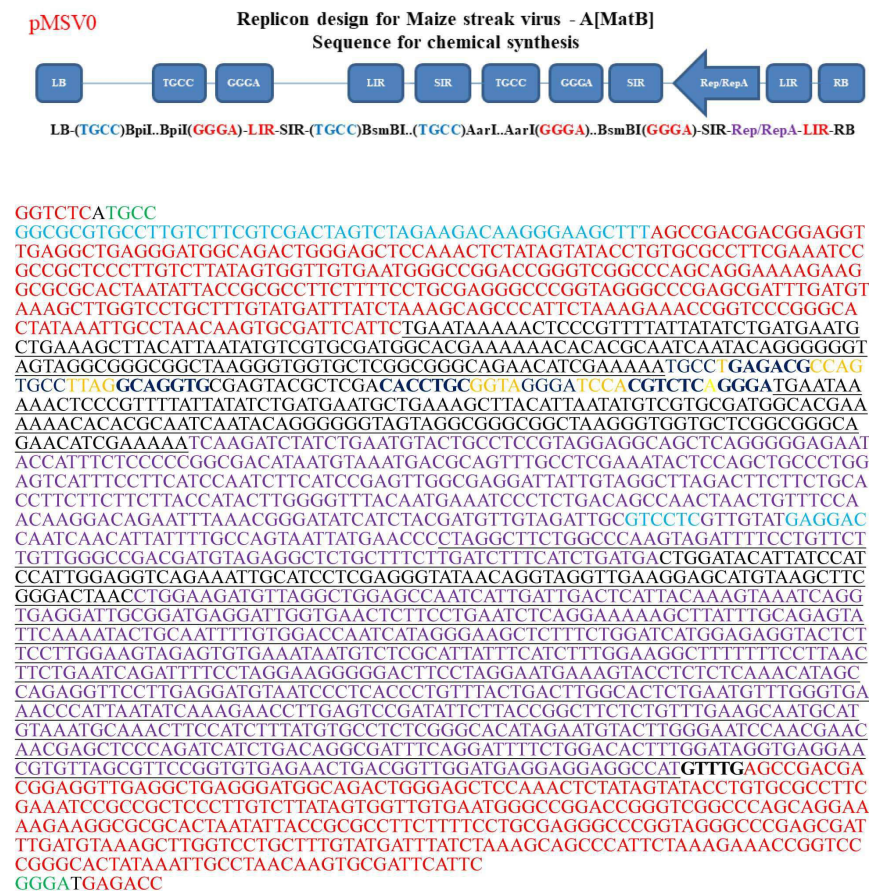
도면1



도면2

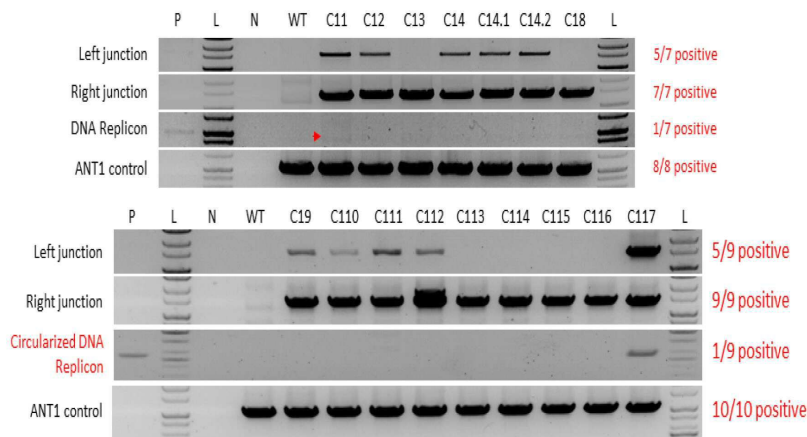


도면3

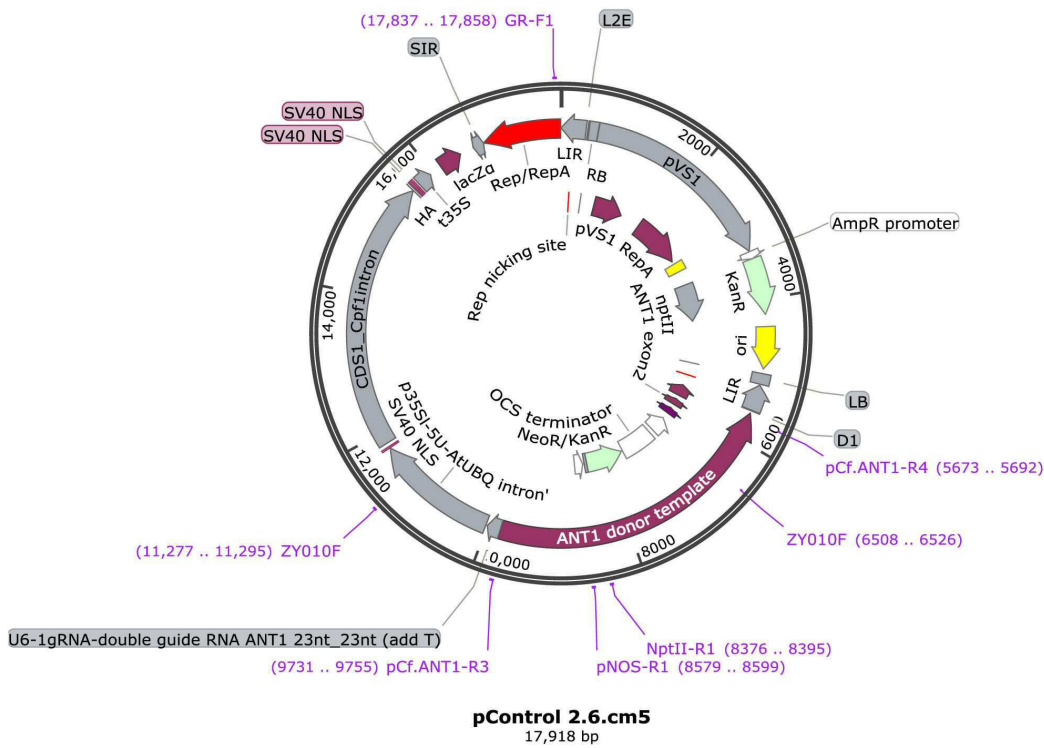


Red font, LIR; Black font, SIR; Purple font, Rep/RepA;
 Light blue font: Multi-cloning site 1 (Level 2 golden gate cloning site with BpiI)
 Orange font: Multi-cloning site 2 (Level 2 golden gate cloning site with BsmBI)

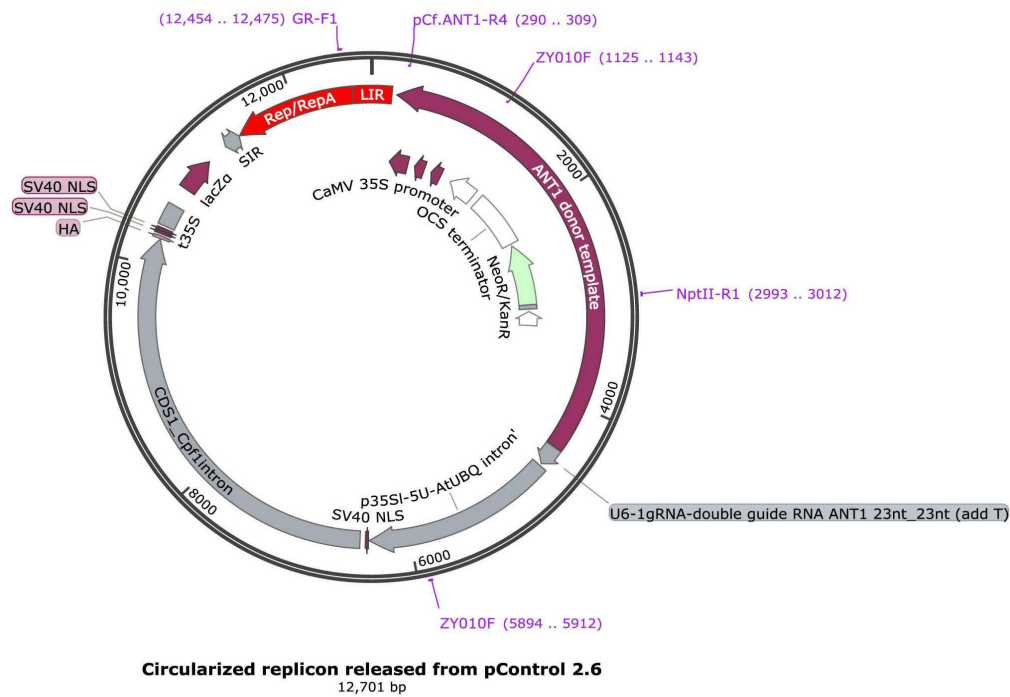
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Virus-based replicon for plant genome editing without inserting replicon into plant genome and uses thereof
- <130> PN18171
- <160> 11
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 1610
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> pLSL.R.Ly T-DNA
- <400> 1

gagggtcgta cgaataattc gatatcaacg gaaatacttg atacaatata cgctccatca	60
aataccatca catcgtatat gcttttatag tgtgaacacc tttaacccta gtgggcggga	120
aattttctac tttaaactcg gaccgctcgt gctaaagcac tcgcgataag ggggggccac	180
gccggttaata ttaaattcgg cgtgggcccc cccttgctgc aaagacttcg tctttaagta	240
aattccacgt cattttccac tatctattaa aatgacaaaa ataccctgc ctccatgcct	300
ccacgccgt tataagatag agtttgaggc aaccctcgg agtcacaaca actccaaaa	360

tgcccttctgc tagtaagaac ttcagactcc aatctaaata tgttttctt acctatccca	420
agtgtctcgc tcaaagagat gatttattcc agtttctctg ggagaaactc acaccttttc	480
ttattttctt ccttggtgtt gcttctgagc ttcacaaaga tggcactacc cactatcatg	540
ctcttctcca gcttgataaa aaaccttgta ttagggatcc ttttttttc gattttgaag	600
gaaatcaccc taatatccag ccagctagaa actctaaaca agtccttgat tacatatcaa	660
aggacggaga tattaaaacc agaggagatt tccgagatca taaggtttct cctcgcaaat	720
ctgacgcacg atggagaact attatccaga ctgcaacgtc taaggaggaa tatcttgaca	780
tgatcaagga agaattccct catgaatggg caacaaagct tcaatggctg gaatattcag	840
ccaacaaatt attccctcca caacctgaac cgtatgtgtc gcccttcaca gaatcagatc	900
ttcgtgcca cgaagatcta cactcctgga gggaaccca tctataccat gtaagcatag	960
acgcttatac ttacatacat cctgtctcat accaacaagc tcaatctgac cttgaatgga	1020
tggccgattt aacaaggaca atggaaggaa tggaatccga caccacagcc tctacatctg	1080
cggaccaact cgtaccggaa agaccacctg ggctagaagt ctccgacgac acaactattg	1140
gaacgttacc atcgatttca ccaactacga tgaacacgcc acctataata tcatcgacga	1200
catcccttc aagttcgtcc cattgtggaa gcaattaata ggttgccagt ctgatttcac	1260
tgtcaacctt aaatatggaa aaaagaagaa aataaaagggt gggatccctt ctataattct	1320
ttgcaatcct gacgaggact ggatgttatt aatgacaagt caacagaagg attactttaa	1380
agataattgc gtcaccact acatgtgtga cggggagact tttttgctc gggaatcgtc	1440
gagtcactga ggcaacgtgc ctctcctcat acgagtttat ctaaagtgat ttttttttt	1500
ggggtgtttg tttttgatt gtcttttttt gtttatttcg tgtgttatgt aacatatgta	1560
atttctatct acttgacaaa tgaaatatat tcataaaata atcattttat	1610
<210> 2	
<211> 2250	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> pMSV0 T-DNA	
<400> 2	
gggtctcatgc cggcgcgtgc cttgtcttcg tcgactagtc tagaagacaa gggaagcttt	60
agccgacgac ggaggttgag gctgagggat ggcagactgg gagctccaaa ctctatagta	120
tacctgtgcg ccttcgaaat ccgccgctcc cttgtcttat agtggttgtg aatgggccgg	180
accgggtcgg cccagcagga aaagaaggcg cgcactaata ttaccgcgcc ttttttctt	240

gcgagggccc ggiagggccc gagcgatttg atgtaaagct tggtcctgct ttgtatgatt	300
tatctaaagc agcccatctt aaagaaaccg gtccccggca ctataaattg cctaacaagt	360
gcgattcatt ctgaataaaa actcccgttt tattatatct gatgaatgct gaaagcttac	420
attaatatgt cgtgcgatgg cacgaaaaaa cacacgcaat caatacaggg gggtagtagg	480
cgggcggcta aggggtgtgc tcggcgggca gaacatcgaa aaatgcctga gacgccagt	540
ccttaggcag gtgcgagtac gctcgacacc tgcggtaggg atccacgtct cagggatgaa	600
taaaaactcc cgttttatta tatctgatga atgctgaaag cttacattaa tatgtcgtgc	660
gatggcacga aaaaacacac gcaatcaata caggggggta gtaggcgggc ggctaagggt	720
ggtgctcggc gggcagaaca tcgaaaaatc aagatctatc tgaatgtact gcctccgtag	780
gaggcagctc agggggagaa taccatttct cccccggcga cataatgtaa atgacgcagt	840
ttgcctcgaa atactccagc tgccttgag tcatttctt catccaatct tcatccgagt	900
tggcgaggat tattgtaggc ttagacttct tctgcacctt cttcttctta ccatacttg	960
ggtttacaat gaaatccctc tgacagccaa ctaactgttt ccaacaagga cagaatttaa	1020
acgggatata atctacgat ttgtagattg cgtcctcgtt gtatgaggac caatcaacat	1080
tattttgcca gtaattatga acccctaggc ttctggccca agtagatttt cctgttcttg	1140
ttgggccgac gatgtagagg ctctgctttc ttgatctttc atctgatgac tggatacatt	1200
atccatccat tggaggtcag aaattgcac ctcgagggta taacaggtag gttgaaggag	1260
catgtaagct tcgggactaa cctggaagat gttaggctgg agccaatcat tgattgactc	1320
attacaaagt aaatcagggtg aggattgcgg atgaggattg gtgaactctt cctgaatctc	1380
aggaaaaagc ttatttgcag agtattcaaa atactgcaat tttgtggacc aatcataggg	1440
aagctctttc tggatcatgg agaggtactc ttcccttgaa gtagagtgtg aaataatgtc	1500
tcgcattatt tcatctttgg aagcttttt ttcccttaact tctgaatcag attttcctag	1560
gaagggggac ttccctaggaa tgaaagtacc tctctcaaac atagccagag gttccttgag	1620
gatgtaatcc ctacacctgt ttaactgactt ggcaactctga atgtttgggt gaaaccatt	1680
aatatcaaag aaccttgagt ccgatattct taccggttc tctgtttgaa gcaatgcatg	1740
taaatgcaaa ctccatctt tatgtgcctc tcgggcacat agaatgtact tgggaatcca	1800
acgaacaacg agctccaga tcatctgaca ggcgatttca ggattttctg gacactttgg	1860
ataggtaggg aacgtgttag cgttccggtg tgagaactga cggttgatg aggaggaggc	1920
catgtttgag ccgacgacgg aggttgaggc tgagggatgg cagactggga gtcctaaact	1980
ctatagtata cctgtgcgcc ttcgaaatcc gccgtccct tgtcttatag tggttgtgaa	2040
tgggccggac cgggtcggcc cagcaggaaa agaaggcgcg cactaatatt accgcgcctt	2100

cttttcctgc gagggcccgg tagggcccg gcgatttgat gtaaagcttg gtcctgcttt 2160
glatgattta tctaaagcag cccattctaa agaaaccggg cccgggcact ataaattgcc 2220

taacaagtgc gattcattcg ggatgagacc 2250

<210> 3
<211> 1091
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> modified Rep/RepA
<400> 3

atgccttctg ctagtaagaa cttcagactc caatctaaat atgttttcct tacctatccc 60
aagtgtcat ctcaaagaga tgatttattc cagttttctt gggagaaaact cacacctttt 120
cttattttct tccttgggtg tgcttctgag cttcatcaag atggcactac ccactatcat 180
gctcttctcc agcttgataa aaaaccttgi attagggatc cttctttttt cgattttgaa 240

ggaaatcacc ctaatatcca gccagctaga aactctaaac aagtccttga ttacatatca 300
aaggacggag atattaaaac cagaggagat ttccgagatc ataagggttc tcctcgcaaa 360
tctgacgcac gatggagaac tattatccag actgcaacgt ctaaggagga atatcttgac 420
atgatcaagg aagaattccc tcatgaatgg gcaacaaagc ttcaatggct ggaatatcca 480
gccaacaaat tattccctcc acaacctgaa ccgtatgtgt cgcccttcac agaatcagat 540
cttcgtgcc acgaagatct acactcctgg agggaaaccc atctatacca tgtaagcata 600
gacgcttata cttacatata tcctgtctca taccaacaag ctcaatctga ccttgaatgg 660

atggccgatt taacaaggac aatggaagga atggaatccg acaccccagc ctctacatct 720
gcggaccaac tcgtaccgga aagaccacct gggctagaag tctcgacga cacaactatt 780
ggaacggtac catcgatttc accaactacg atgaacacgc cacctataat atcatcgacg 840
acatcccctt caagttcgtc ccattgtgga agcaattaat aggttgccag tctgatttca 900
ctgtcaacce taaatatgga aaaaagaaga aaataaaagg tgggatccct tctataattc 960
tttgcaatcc tgacgaggac tggatgttat caatgacaag tcaacagaag gattacttta 1020
aagataattg cgtcaccacac tacatgtgtg acggggagac tttttttgct cgggaatcgt 1080

cgagtcactg a 1091

<210> 4
<211> 22
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 4
 tgcgatgac tacgtaaca aa 22
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 5
 gcgtgcaatc catctgttc 20
 <210> 6
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 6
 acgtaaggga tgacgcaca 19
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 7
 taccaccgt ccattccta 20
 <210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 ggaaaatggc atctgttc c 21
 <210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

taccaccggt ccattcccta 20

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

ttgagatgag cacttgggat ag 22

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

acctcaacga cgcaagtatt 20