



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0112552
(43) 공개일자 2023년07월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) A01H 1/00 (2006.01)
C12N 15/10 (2017.01) C12N 15/113 (2010.01)
C12N 9/22 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/8216 (2013.01)
A01H 1/104 (2021.01)
- (21) 출원번호 10-2023-0007321
(22) 출원일자 2023년01월18일
심사청구일자 2023년01월18일
- (30) 우선권주장
1020220008019 2022년01월19일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
- (72) 발명자
김현욱
서울특별시 중랑구 용마산로129가길 41, 102동 901호(신내동, 영풍마드레빌)
김원녕
서울특별시 광진구 면목로 7, 302호(군자동)
정영수
부산광역시 사하구 제석로 171, 202동 1203호(당리동, 당리동2차 동원베네스트아파트)
- (74) 대리인
특허법인리채

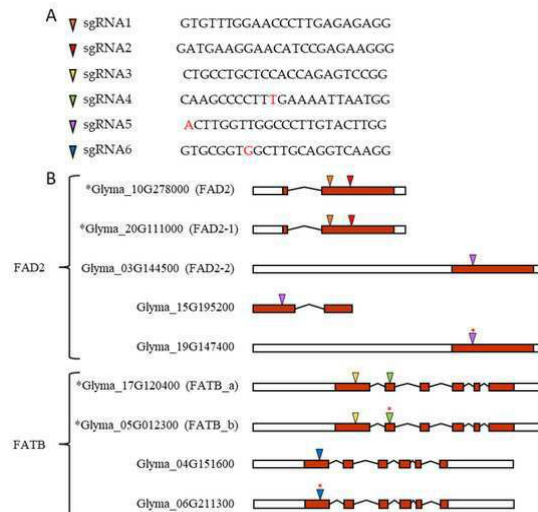
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 지방산 함량이 변형된 종자를 생성하는 대두 형질전환체 제조용 재조합 벡터

(57) 요약

본 발명은 다중 유전자 편집 벡터 및 이를 이용한 종자의 지방산 조성이 변화된 형질전환 대두를 제조하기 위한 조성물, 제조 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명을 통해 대두의 FAD2 및 FATB 유전자의 여러 부위에 동시에 유전자 변형을 일으킴으로써 올레산 함량은 증가하고 포화지방산 함량은 감소한 종자를 생성하는 대두 형질변환체를 제조할 수 있다.

대표도 - 도11



(52) CPC특허분류

C12N 15/102 (2013.01)

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 15/8247 (2013.01)

C12N 9/22 (2013.01)

C12N 2310/20 (2017.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395067740
과제번호	PJ015324012021
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	차세대농작물신육종기술개발(R&D)
연구과제명	대사조절을 통한 유용소재 생산용 유전자교정 작물 개발(1주관)
기 여 율	1/10
과제수행기관명	세종대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395072257
과제번호	PJ015714012022
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	바이오그린연계농생명혁신기술개발
연구과제명	유전자 제어 기술을 활용한 지방산 고생산 플랫폼 개발(1주관)
기 여 율	1/10
과제수행기관명	세종대학교
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711109806
과제번호	2020R1A2C2010057
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	농생명산업활용을 위한 콩캘러스 특이적 신규 프로모터 발굴 및 유용유전자 도입 세
포 계통 생산	
기 여 율	4/10
과제수행기관명	동아대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395072190
과제번호	PJ016533012022
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	차세대농작물신육종기술개발사업
연구과제명	유용소재 및 농업형질 개선 유전자교정 콩 개발 및 시장경쟁력 확보(1주관)
기 여 율	4/10
과제수행기관명	세종대학교
연구기간	2022.01.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 4의 서열로 이루어진 gRNA(guide RNA)를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 서열번호 5 및 6의 서열로 이루어진 gRNA를 더 포함하는 재조합 벡터.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 벡터는 Cas9(CRISPR associated protein 9) 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 4

청구항 1 또는 2의 벡터; 및 Cas9(CRISPR associated protein 9) 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는, 올레산 함량이 증가하고 포화지방산 함량이 감소된 종자를 생성하는 형질전환 대두(*Glycine max*) 제조용 조성물.

청구항 5

청구항 1 또는 2의 벡터로 대두(*Glycine max*)를 형질전환하는 단계를 포함하는,

올레산 함량이 증가하고 포화지방산 함량이 감소된 종자를 생성하는 형질전환 대두 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 올레산 함량이 증가하고 불포화지방산 함량이 감소한 종자를 생성하는 대두 형질전환체 제조용 벡터, 조성물 및 제조 방법에 관한 것으로, 식물유지 사업 분야에서 이용될 수 있다.

배경 기술

[0002] 식물 종자 오일은 지방산 종류에 따라 다양한 용도로 사용되고 있으며 전세계적으로 식물 종자 오일의 수요 역시 증가하는 추세이다.

[0003] 한편 식물 종자 오일에서 식용유의 경우 고온에서 사용하면 다중불포화지방산이 트랜스지방산으로 바뀌기 때문에 건강에 좋지 않은 문제점이 있으며, 또한 포화지방산은 인체에 해로워 높은 포화지방산의 함량도 식용오일로 서 불리한 점에 해당한다. 관련하여 종래 대두 종자의 지방산 조성 변화에 대한 연구는 고온으로 인한 트랜스지방산 생성에 집중하여 올레산 함량을 증가시키는 데 중점을 두고 있다.

[0004] 이에 본 발명에서는 높은 올레산 함유량과 더불어 포화지방산의 함량은 줄어든 종자 갖는 형질전환 대두를 제조하고자 예의 노력한 결과,

[0005] 다중 sgRNA가 삽입된 유전자 편집 벡터를 이용하여 대두의 FAD2(Fatty Acid Desaturase 2) 및 FATB(Fatty Acyl-ACP Thioesterase B) 유전자 패밀리의 여러 위치를 동시에 변형함으로써 성공적으로 종자의 지방산 함량이 변화된 형질전환체를 얻어 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국특허 제2117110호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 올레산이 증가하고 포화지방산은 감소한 종자를 생성하는 형질전환 대두 제조용 벡터, 조성물 및 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0008] 1. 서열번호 1 내지 4의 서열로 이루어진 gRNA(guide RNA)를 포함하는 재조합 벡터.
- [0009] 2. 위 1에 있어서, 서열번호 5 및 6의 서열로 이루어진 gRNA를 더 포함하는 재조합 벡터.
- [0010] 3. 위 1 또는 2에 있어서, 상기 벡터는 Cas9(CRISPR associated protein 9) 유전자를 포함하는 재조합 벡터.
- [0011] 4. 위 1 또는 2의 벡터; 및 Cas9(CRISPR associated protein 9) 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는, 올레산 함량이 증가하고 포화지방산 함량이 감소된 종자를 생성하는 형질전환 대두(*Glycine max*) 제조용 조성물.
- [0012] 5. 위 1 또는 2의 벡터로 대두(*Glycine max*)를 형질전환하는 단계를 포함하는, 올레산 함량이 증가하고 포화지방산 함량이 감소된 종자를 생성하는 형질전환 대두 제조방법.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 벡터, 조성물 및 방법을 이용하여 FAD2 및 FATB의 다중 유전자를 동시에 변형시킴으로써 올레산 함량이 증가하고 포화지방산 함량은 감소한 종자를 생성하는 대두 형질전환체를 제조할 수 있으며, 상기 변형은 DNA 수준에서 이루어지므로 유전자 교정이 가능하여 기술 안정성이 높다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 식물 TAG 생합성의 도식적 경로 및 올레산을 증가시키고 포화 지방산을 감소시키는 전략을 도식화한 것이다. X: FAD2 및 FATB 녹아웃, 화살표: 예상 지방산 흐름, 화살표 두께 및 형태는 흐름의 양을 나타낸다. G3P: 글리세롤-3-포스페이트, LPA: 리소포스파티드산, PA: 포스파티드산, DAG: 디아실글리세롤, TAG: 트리아실글리세롤.
- 도 2는 pHEE401E 결찰을 위한 각 삽입물의 개략도 구조를 나타낸 것이다.
- 도 3은 pHEE401E 및 MCS 서열의 벡터 맵을 나타낸 것이다. U6-26 프로모터 영역은 시안색 음영, 스펙티노마이신 내성 시퀀스는 파란색 배경과 흰색 문자로, sgRNA 스캐폴드는 녹색 배경으로 각각 표시되었다.
- 도 4는 pCBC-DT1T2 및 MCS 서열의 벡터 맵을 나타낸 것이다. sgRNA 영역은 노란색 배경으로, sgRNA 스캐폴드 영역은 녹색 음영으로, U6-26 터미네이터 영역은 회색 배경으로, U6-29 프로모터는 시안색 음영으로 각각 표시되었다.
- 도 5는 pHEE401E_UBQ_Bar 벡터를 사용하여 주문된 삽입 중합체 및 최종 제품에 대한 단계적 결찰을 나타낸 것이다.
- 도 6은 pBatC_tRNA 및 MCS 서열의 벡터 맵을 나타낸 것이다. tRNA 영역은 노란색 배경으로, AarI 인식 사이트는 시안색 배경으로, sgRNA 백본은 회색 배경으로 각각 표시되었다.
- 도 7은 pTV00 및 MCS 시퀀스의 벡터 맵을 나타낸 것이다. sgRNA 백본은 회색 배경으로, tRNA 영역은 노란색 배경으로 각각 표시되었다.
- 도 8은 pBatC_tRNA 벡터 기반 multi-sgRNA 인서트 구성을 도식적으로 나타낸 것이다.

도 9는 자가 결찰 벡터 형질전환체의 스크리닝 개략도를 나타낸 것이다.

도 10a는 pHEE401_4sg의 도식적인 벡터 구조를 나타낸 것이다. U6-26P; U6-프로모터, U6-26t; U6-26 터미네이터, UBQ10 P; 유비퀴틴 10 프로모터, Nos P; Nos 프로모터.

도 10b는 pBatC_4sg의 도식적인 벡터 구조를 나타낸 것이다. U6-26P; U6-프로모터, Nos P; Nos 프로모터, Nos T; Nos 터미네이터.

도 10c는 pBatC_6sg의 도식적인 벡터 구조를 나타낸 것이다. U6-26P; U6-프로모터, Nos P; Nos 프로모터, Nos T; Nos 터미네이터.

도 11은 대두의 FAD2 및 FATB 후보 유전자와 sgRNA 서열 및 표적 위치를 나타낸 것이다.

도 12는 PCR 또는 결찰 생성물의 겔 사진을 나타낸 것이다. (A) 삽입 단편의 PCR 산물. 각 조각 번호는 순차적인 순서를 나타낸다. 1: DT1 및 DT2 프라이머 세트 사용 단편, 2: DT3 프라이머 세트 사용 단편, 3: DT4 프라이머 세트 사용 단편. (B) 골든 게이트 반응의 산물. + 삽입 단편의 결찰을 나타낸다. (C) pHEE401E 벡터 콜로니 PCR의 산물. 예상 밴드로 표시된 노란색 별표는 예상 결과이다.

도 13은 PCR 또는 결찰 산물의 겔 사진을 나타낸 것이다. (A) pBatC_4sg 구성을 위한 삽입 단편 PCR의 산물. 각 조각 번호는 순차적인 순서를 나타낸다. 1: 'g1g2' 프라이머 세트 사용 단편, 2: 'g2g3' 프라이머 세트 사용 단편, 3: 'g3g4' 프라이머 세트 사용 단편. (B) pBatC_6sg 구성을 위한 삽입 단편 PCR의 산물. 각 조각 번호는 순차적인 순서를 나타낸다. 1: 'g1g2' 프라이머 세트 사용 단편, 2: 'g2g3' 프라이머 세트 사용 단편, 3: 'g3g4' 프라이머 세트 사용 단편, 4: 'g4g5' 프라이머 세트 사용 단편, 5: 'g5g6' 프라이머 세트 사용 단편. (C) 골든 게이트 반응에 의한 결찰된 삽입 단편의 산물. (D) pBatC_4sg 및 pBatC_6sg의 결찰된 삽입 PCR의 산물. (E) pBatC_4sg, 6sg 콜로니 PCR의 산물. 예상 밴드로 표시된 노란색 별표는 예상 결과이다.

도 14는 pHEE401E_4sg-10 형질전환체에서 FAD2 및 FAD2-1의 표적 서열을 정렬하여 나타낸 것이다. 빨간색 점선은 예상 절단 부위를 나타낸다.

도 15는 pHEE401E_4sg T0 형질전환체에서의 FAD2, FATB 유전자 시퀀싱 결과를 나타낸 것이다.

도 16는 pBatC_4sg-1 T0 형질전환체에서의 FAD2, FATB 유전자 시퀀싱 결과를 나타낸 것이다.

도 17은 pBatC_6sg-11 T0 형질전환체에서의 FAD2, FATB 유전자 시퀀싱 결과를 나타낸 것이다.

도 18은 본 발명의 다중유전자 편집 벡터를 이용하여 FAD2, FATB의 유전자서열이 바뀐 T1 형질전환체의 지방산 함량을 나타낸 그래프이다.

도 19a 내지 19m은 형질전환체 각 pHEE401E_4sg-1, pBatC_4sg-1, pBatC_6sg-11의 FAD2 및 FATB 다중 복제 유전자들의 시퀀싱 결과를 나타낸 것이다.

도 20은 pHEE401E_4sg 형질전환체 T2 세대 41개 라인으로부터 수확한 T3 종자의 올레산(18:1)과 포화지방산(SFA=16:0+18:0) 함량을 그래프로 나타낸 것이다.

도 21a는 pHEE401E_4sg 1-5 #4 라인 indel 유형과 야생형 유전자 서열을 얼라인한 결과이다.

도 21b는 pBatC_4sg 10-4 #14 라인 indel 유형과 야생형 유전자 서열을 얼라인한 결과이다.

도 21c-d는 pBatC_6sg 4 #2 라인 indel 유형과 야생형 유전자 서열을 얼라인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 서열번호 1 내지 4의 서열로 이루어진 gRNA(guide RNA)를 포함하는 재조합 벡터에 관한 것이다.

또한, 상기 벡터는 서열번호 5 및 6의 서열로 이루어진 gRNA를 더 포함할 수 있다.

상기 "gRNA(guide RNA)"란 RNA 유전자가위(RNA-guided engineered nuclease, RGEN)의 DNA 특이성을 결정하는 작은 RNA 분자를 의미한다. 가이드 RNA는 세포내에서 유전자가위 단백질(Cas9)과 결합하여 RNA 유전자가위를 형성할 수 있다.

- [0020] 예를 들면 유전자 가위 단백질(Cas9)과 가이드 RNA로 구성되어 있는 제3세대 유전자가위가 있다. 이는 미생물의 면역체제로 알려진 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 시스템을 이용해, 타겟하는 유전자 염기서열을 절단하도록 설계된 인공제한효소로 인간 및 동식물 유전자 교정에 사용될 수 있다. gRNA가 타겟하는 부위에서는, DNA의 이중 가닥 파손(DSB)이 유발된 후, 상동 재조합(HR) 또는 비상동 말단 연결(NHEJ)과 같은 DNA 복구 시스템이 유도되어 근본적으로 원래의 염기 서열을 재형성하거나 삭제될 수 있다. 즉 CRISPR/Cas9 설계에서는 올바른 gRNA를 설정하는 것이 중요하다.
- [0021] 본 발명에서 상기 서열번호 1 내지 6의 서열로 이루어진 각 gRNA는 대두(*Glycine max*)에서 FAD2 또는 FATB 각각의 유전자 패밀리와 특정 부위를 타겟할 수 있다.
- [0022] 상기 FAD2(Fatty Acid Desaturase 2)는 소포체에서 18:1~18:2 지방산을 촉매하는 효소이며, 상기 FATB(Fatty Acyl-ACP Thioesterase B)는 아실 운반 단백질(ACP)을 분리하고 이를 16:0-ACP 및 18:0-ACP에서 16:0 및 18:0 유리 지방산으로 전환시키는 티오에스테라제 활성을 갖는 색소체 위치 효소이다.
- [0023] 따라서, FAD2의 녹아아웃은 리놀레산(18:2) 합성을 차단하고 올레산(18:1)의 축적을 유발할 수 있고, FATB의 녹아아웃은 티오에스테라제의 비활성화를 유발하고 대두 종자에 포화 지방산이 축적되는 것을 방지한다. 도 1에서는 이러한 상기 효소들의 작용 기전을 도식화하여 나타내었다.
- [0024] 정리하면, 본 발명에서는 올레산이 증가하고 포화 지방산 함량은 감소된 종자를 생성하는, 바이오디젤 및 인체 건강에 유용한 대두를 제조하기 위해서, 대두 게놈에 다중 복제 유전자로 존재하는 FAD2 및 FATB를 녹아아웃시키고자 하였다.
- [0025] 도 11에서 본 발명의 상기 gRNA의 각 타겟 부위를 도식화하여 나타내었으며, 도면 상의 sgRNA1(서열번호 1) 및 sgRNA2(서열번호 2)는 FAD2 및 FAD2-1을 표적으로 하고, sgRNA5(서열번호 5)는 나머지 FAD2 상동 유전자를 표적으로 한다. 또한, sgRNA3(서열번호 3) 및 sgRNA4(서열번호 4)는 FATB_a 및 FAT_b를 표적으로 하며, sgRNA6(서열번호 6)은 나머지 FATB 상동 유전자를 표적으로 한다.
- [0026] CRISPR 시스템은 예를 들면 고정적 구성요소로서 Cas9 단백질을 포함하고, 가변적 구성요소로서 타겟 유전자에 특이적인 가이드 RNA를 포함할 수 있으며, 이들은 본 발명과 같이 벡터 형태로 대상 세포에 도입될 수 있다.
- [0027] 즉, 상기 벡터는 상기 서열번호 1 내지 4, 또는 1 내지 6의 서열로 이루어진 gRNA 외 Cas9 유전자를 포함할 수 있다.
- [0028] 또는 상기 벡터는 Cas9 유전자를 포함하는 벡터와 함께 사용될 수 있으며, 이 경우 본 발명은 상기 벡터 및 Cas9 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는, 올레산 함량이 증가하고 포화지방산 함량이 감소된 종자를 생성하는 형질전환 대두제조용 조성물에 관한 것을 포함한다.
- [0029] 상기 "벡터"는 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 아테노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아테노-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 신호서열 또는 리더 서열을 포함할 수 있으며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다.
- [0030] 본 발명과 같이 다중 gRNA 벡터를 구성하기 위한 방법 중 하나로, 예를 들면 골든 게이트 어셈블리(Golden Gate Assembly) 방법을 이용할 수 있다.
- [0031] 골든 게이트 어셈블리는 Type IIS 제한 효소와 T4 DNA 리가아제를 사용하여 여러 DNA 단편을 동시에 방향성 있게 단일 조각으로 조립할 수 있도록 하는 분자 클로닝 방법을 의미한다. IIS 유형 효소에는 예를 들면 BsaI, BsmBI 및 BbsI가 있다.
- [0032] 골든 게이트 어셈블리는 서브클로닝 벡터에 결합된 삽입 단편을 생성하는 것으로 시작되며, 삽입물은 주형 벡터 PCR 또는 올리고뉴클레오타이드 어닐링에 의해 생성될 수 있다. 다음 단계는 gRNA 단편을 골든 게이트 어셈블리에 사용할 수 있도록 하는 서브클로닝이다. 마지막으로 서브클로닝 벡터의 DNA 염기서열 검증 후 골든 게이트 어셈블리를 위해 Cas9 벡터와 서브클로닝 벡터를 혼합한다. 상기 방법은 골든 게이트 어셈블리를 위해 한 쌍의 서브클로닝 및 CRISPR/Cas9 벡터가 필요하다.
- [0033] 일반적인 CRISPR/Cas9 벡터만 있는 경우, IIS 유형 제한 효소를 사용하여 다중 sgRNA를 클로닝하기 위하여 본

발명 실시예의 프로토콜을 따를 수 있으며, 해당 프로토콜은 서브클로닝 단계가 필요하지 않다. 여기에서는 sgRNA 또는 폴리시스트론 tRNA-gRNA당 하나의 프로모터를 사용하여 두 개의 서로 다른 벡터를 구성하는 두 가지 전략을 사용한다. pHEE401E 벡터는 결찰을 위한 유형 IIS 제한 효소 인식 부위를 가지고 있으며, 다른 하나는 폴리시스트론 tRNA-gRNA 발현 시스템을 사용하고 두 개의 AarI 유형 IIS 제한 효소 부위를 갖는 pBatC-tRNA 벡터이다. 원래 이 두 벡터는 두 개의 gRNA를 운반할 수 있으나, 수정된 프라이머 세트 및 결찰 전략을 사용하면 pHEE401E 벡터는 4개의 gRNA를 전달할 수 있고 pBatC-tRNA 벡터는 4 내지 6개의 gRNA를 전달할 수 있다.

[0034] 상기 벡터는 하나 이상의 선택 마커를 포함하는 것일 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질주입된 세포를 비형질주입 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자에 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate), 글루포시네이트암모늄(glufosinate ammonium) 또는 포스포노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 본 발명의 벡터에서, 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다.

[0036] 상기 "재조합 벡터"는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미하는 용어이며, 진핵세포에서 이용 가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.

[0037] 본 발명 실시예에서는 상기 벡터에 의한 대두 형질전환체의 일 예로 각 pHEE401E_4sg-1, pBatC_4sg-1, pBatC_6sg-11의 올레산 및 포화지방산 함량 변화를 분석하였다. 그 결과 각 형질전환체 종자의 올레산 함량이 최대 84.5%, 포화지방산 함량이 최소 11%로, 일반적으로 대두 종자의 올레산 함량이 약 22%, 포화지방산 함량이 약 15%인 것과 비교하여 올레산 함량이 증가하고 포화지방산 함량이 감소한 종자를 갖는 대두 형질전환체가 제조되었음을 확인할 수 있다.

[0038] 나아가 도 19a내지 19m에서는 상기 형질전환체의 FAD2 및 FATB 유전자의 타겟 부위에 대한 시퀀싱 결과를 나타내었으며, 이를 통해 목적인 FAD2 및 FATB 패밀리의 유전자의 다중 부위에서 유전자 변형이 일어났음을 확인할 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명은 상기 서열번호 1 내지 4의 서열로 이루어진 gRNA를 포함하는 재조합 벡터; 또는 상기 벡터에 서열번호 5 및 6의 서열로 이루어진 gRNA를 더 포함하는 벡터로 대두(*Glycine max*)를 형질전환하는 단계를 포함하는, 올레산 함량이 증가하고 포화지방산 함량이 감소된 종자를 생성하는 형질전환 대두 제조방법에 관한 것이다.

[0041] 상기 재조합 벡터는 Cas9 유전자를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0042] 상기 벡터의 작동 원리 및 제작 방법에 대하여는 전술한 바와 같으므로 중복을 피하기 위하여 그 기재 생략한다.

[0043] 상기 "형질전환(transformation)"이란 외부로부터 주어진 유전물질을 포함하는 재조합 벡터에 의해 개체 또는 세포의 형질이 유전적으로 변화하는 것을 의미한다.

[0044] 상기 본 발명에 따른 벡터를 대두 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-코딩된) 입자 충격법, 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투머파시엔스 매개된 유전자 전이에서 바이러스에 의한 감염 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다.

[0046] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 보다 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0048] **실시예**

[0049] 본 실험에서는 pHEE401E 및 pBatC의 두 가지 주요 벡터가 사용되었다. 상기 벡터는 현지 연구원이나 Addgene(<https://www.addgene.org>, 2021년 11월 21일 ACCESS)과 같은 비영리 조직을 통해 얻을 수 있다. pHEE401E 벡터의 각 삽입물은 sgRNA1로 시작하는 최상위 삽입물을 제외하고 스캐폴드, 업스트림 sgRNA2의 터미네이터, 자체 sgRNA3용 프로모터 및 sgRNA3으로 구성된다(도 2). 이 패턴은 sgRNA3 및 sgRNA4에도 적용된다. 결찰 부위는 분해 후 인서트 사이에 동일한 접착성 말단을 가지며, 이는 의도한 인서트 중합체를 얻기 위해 단계적 결찰(ligation)이 중요함을 나타낸다.

[0050] pBatC 벡터는 pHEE401E 벡터보다 삽입이 더 간단하다. 두 sgRNA 사이에는 스캐폴드와 tRNA만 있으며, sgRNA의 중간에 있는 ligation 부위는 절단 후 서로 다른 접착성 말단을 생성할 수 있어, 정렬된 삽입 중합체의 동시 결찰이 가능함을 의미한다.

[0052] **실험 재료 및 장비**

[0053] **1. pHEE401E_UBQ_Bar_4sgRNA 클로닝**

[0054] **1.1. 실험 재료**

[0055] pHEE401E_UBQ_Bar 벡터는 pHEE401E 벡터의 Cas9 발현을 위한 egg-specific 프로모터를 UBQ10 프로모터로, 하이그로마이신 내성 유전자를 식물 형질전환 선택을 위한 bar 유전자로 교체한 버전(도 3)(상기 벡터는 세종대학교 분자생물학과 박민음 제공).

[0056] pCBC_DT1T2 (도 4) (서강대학교 생명과학과 서미충 교수 제공).

[0057] KOD-plus-(TOYOBO, Osaka, Japan; Cat. No. KOD-201 200U).

[0058] The QIAquick PCR Purification Kit (Cat. No. 28104).

[0059] The QIAquick Gel Extraction Kit (Cat. No. 28704).

[0060] T4 DNA ligase (TaKaRa, Kusatsu, Japan; Cat. No. 2011A).

[0061] 10X T4 DNA ligase buffer (TaKaRa, Japan; Cat. No. 2011A).

[0062] AarI restriction enzyme (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA; Cat. No. ER1581)

[0063] BbsI restriction enzyme (NEB, Ipswich, MA, USA; Cat. No. R0539S).

[0064] BsaI-HFv2 restriction enzyme (NEB, Ipswich, MA, USA.; Cat. No. R3733S)

[0066] **1.2. 실험 장비**

[0067] TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Touch (TaKaRa, Japan; Cat. No. TP350).

[0068] Mupid-exU (Advanced, Nomi, Japan; Cat. No. AD140).

[0070] **1.3. 프라이머 설계**

[0071] pHEE401E-UBQ_Bar 벡터 클로닝에서 pCBC_DT1T2 벡터를 삽입 템플릿으로 사용했다. 템플릿은 sgRNA, 스캐폴드, 터미네이터, 프로모터 및 두 번째 sgRNA로 구성되었다. 프로모터는 벡터의 다중 클로닝 부위(MCS)의 업스트림에, 스캐폴드와 터미네이터는 벡터의 MCS의 다운스트림에 있다. pCBC_DT1T2에서 증폭된 삽입물을 pHEE401E-UBQ_Bar의 MCS에 클로닝하면 두 세트의 promoter-sgRNA-scaffold-terminator가 제작된다.

[0072] sgRNA 스캐폴드로 시작하는 삽입물은 정방향 프라이머의 어닐링 위치를 조정하여 만들 수 있다. 이 scaffold-starting 삽입물은 원래 pHEE401E-UBQ_Bar 삽입물의 다운스트림에 부착되어 순차적 프로모터-sgRNA-스캐폴드-종결자 세트를 형성할 수 있다(도 5). 이론적으로 이 조합은 각 sgRNA의 PCR 길이, 벡터 크기 및 실제 발현 비율과 같은 제한 요소를 충족할 때까지 지속적으로 확장될 수 있다.

[0074] 프라이머를 설계하기 위해서는 다음과 같은 일반 서열이 필요하다.

[0075] [표 1]

[0076] pHEE401E_UBQ_Bar 인서트에 대한 프라이머 및 서열 정보

Insert name	Sequence	
DT1-BsF	ATATATGGTCTCGATT(--sg1--GTT	서열번호 7
DT1-F	T(--sg1--)GTTTGTAGAGCTAGAAATAGC	서열번호 8
DT2-R	AAC(--sg2--)AATCTCTTAGTCGACTCTAC	서열번호 9
DT2-BbR	ATTATTGAAGACNNAAC(--sg2--AA	서열번호 10
DTsc_BbF	ATATATGAAGACNNGTTTGTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA	서열번호 11
DT3-R	AAC(--sg3--)AATCTCTTAGTCGACTCTAC	서열번호 12
DT3-AaR	ATTATTCACTGCNNNNAAC(--sg3--AA	서열번호 13
DTsc-AaF	ATATATCACCTGCNNNGTTTGTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA	서열번호 14
DT4-R	AAC(--sg4--)AATCTCTTAGTCGACTCTAC	서열번호 15
DT4-BsR	ATTATTGGTCTCGAAAC(--sg4--AA	서열번호 16

[0077]

[0078] 프라이머는 제한효소 인식 부위와 절단 부위 사이의 간격을 조절하기 위한 서열을 가지고 있다. 본 명세서에서 프라이머 'DT'는 template plasmid의 stand-in이며, 다음 번호는 프라이머에 어떤 sgRNA가 포함되어 있는지를 나타낸다. sgRNA 스캐폴드는 'sc'로 약칭된다. 정방향 및 역방향 프라이머는 대문자 F와 R로 표시되며 필요한 제한 효소는 BsaI의 경우 Bs, BbsI의 경우 Bb, AarI의 경우 Aa로 표시된다. 상기 표의 밑줄은 제한효소 인식 부위를 나타낸다.

[0080] 2. pBatC_4sgRNA, pBatC_6sgRNA 클로닝

[0081] 2.1. 실험 재료

[0082] pBatC_tRNA (도 6) (한국 대전 IBS 게놈 공학 센터 김상규 박사 제공).

[0083] pTV00 (도 7) (한국 대전 IBS 게놈 공학 센터 김상규 박사 제공).

[0084] KOD-plus- (TOYOBO, Japan; Cat. No. KOD-201 200U).

[0085] The QIAquick PCR Purification Kit (Cat. No. 28104).

[0086] T4 DNA ligase (TaKaRa, Japan; Cat. No. 2011A).

[0087] 10X T4 DNA ligase buffer (TaKaRa, Japan; Cat. No. 2011A).

[0088] AarI restriction enzyme (Thermo Fisher, MA, USA; Cat. No. ER1581).

[0089] BbsI restriction enzyme (NEB, MA, USA; Cat. No. R0539S).

[0091] 2.2. 실험 장비

[0092] TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Touch (TaKaRa, Japan; Cat. No. TP350).

[0093] Mupid-exU (Advanced, Japan; Cat. No. AD140).

[0095] 2.3. 프라이머 설계

[0096] 뚜렷한 오버행 서열이 없는 pHEE401E_UBQ_Bar 프라이머와 달리 pBatC 프라이머는 sgRNA를 2개로 나누어 4개의 서로 다른 염기쌍 오버행을 생성할 수 있다. 분할 지점은 중간 4개 염기 쌍에 있어야 하지만 4개 염기 쌍의 영역은 sgRNA 사이에 동일한 오버행 서열 생성을 피하기 위해 측면으로 이동할 수 있다. 이러한 프라이머는 단일 가닥과 원하는 4개의 염기쌍 돌출부를 노출시키기 위해 DNA 이중 가닥을 분해하는 유형 IIS 제한 효소 부위를 포함해야 한다. 하나의 삽입 단편은 순서대로 상류 sgRNA, sgRNA 스캐폴드, tRNA의 절반 및 하류 sgRNA의 절반

으로 구성되었다(도 8).

[0097] 첫 번째 삽입 단편은 대부분의 업스트림 sgRNA가 손상되지 않고 마지막 삽입 단편은 대부분의 다운스트림 sgRNA가 손상되지 않아야 한다. 유형 IIS 제한 효소의 독특한 점착성 말단 및 비가역적 반응 특성으로 인해 삽입 중 합체의 동시 조립을 위해 다중 삽입물의 골든 게이트 클로닝이 가능하다. 또한, 템플릿과 프라이머가 완전히 접촉할 수 있도록 맨 처음과 마지막 시퀀스의 프라이머 결합 공간을 보존하기 위해 두 말단 삽입체에 위치한 제한 효소 인식 부위는 삽입체 사이에 위치하는 제한효소 인식 부위와 달라야 한다. 본 실험에서 BbsI와 AarI는 각각 말단 제한 효소와 inter-insert 제한 효소로 사용되었다. 프라이머를 설계하기 위해서는 다음과 같은 일반 서열이 필요하다.

[0098] [표 2]

[0099] pBatC_4sg 인서트에 대한 프라이머 및 서열 정보

Insert Name	Sequence	
Bb_g1g2_F1	(--sg1--)GTTTATAGAGCTAGAA	서열번호 17
Bb_g1g2_F2	ATGAAGACNNTGCA(--sg1--)	서열번호 18
Aa_g1g2_R	ATCACCTGCNNNN(--half of sg2, 5' moiety--)TGCACCAGCCGGGAA	서열번호 19
Aa_g2g3_F	ATCACCTGCNNNN(--half of sg2, 3' moiety--)GTTTATAGAGCTAGAAATAGC	서열번호 20
Aa_g2g3_R	ATCACCTGCNNNN(--half of sg3, 5' moiety--)TGCACCAGCCGGGAATCGAA	서열번호 21
Aa_g3g4_F	ATCACCTGCNNNN(--half of sg3, 3' moiety--)GTTTATAGAGCTAGAA	서열번호 22
Bb_g3g4_R1	(--sg4--)TGCACCAGCCGGGAATCGAA	서열번호 23
Bb_g3g4_R2	ATGAAGACNNAAC(--sg4--)	서열번호 24

[0100]

[0101] [표 3]

[0102] pBatC_6sg 인서트에 대한 프라이머 및 서열 정보

Insert Name	Sequence	
Aa_g3g4_F	ATCACCTGCNNNN(--half of sg3, 5' moiety --)GTTTATAGAGCTAGAA	서열번호 25
Aa_g3g4_R	ATCACCTGCNNNN(--half of sg4, 5' moiety --)TGCACCAGCCGGGAATCGAA	서열번호 26
Aa_g4g5_F	ATCACCTGCNNNN(--half of sg4, 5' moiety --)GTTTATAGAGCTAGAA	서열번호 27
Aa_g4g5_R	ATCACCTGCNNNN(--half of sg5, 5' moiety --)TGCACCAGCCGGGAATCGAA	서열번호 28
Aa_g5g6_F	ATCACCTGCNNNN(--half of sg2, 5' moiety --)GTTTATAGAGCTAGAA	서열번호 29
Bb_g5g6_R1	(--sg6--)TGCACCAGCCGGGAA	서열번호 30
Bb_g5g6_R2	ATGAAGACNNAAC(--sg6--)	서열번호 31

[0103]

[0104] 본 명세서의 프라이머 이름에서 'Bb'와 'Aa'는 프라이머에서 각각 BbsI 및 AarI에 대한 제한 효소 인식 서열을 나타낸다. 약어 'g1g2' 또는 'g2g3'은 프라이머에 포함된 sgRNA의 수를 나타낸다. 예를 들어, sgRNA1과 sgRNA2로 산물을 생성하는 프라이머 세트로 프라이머 이름 중간에 'g1g2'가 있다. 가장 첫 번째와 마지막 삽입물은 프라이머의 긴 서열 때문에 BbsI 인식 부위를 부착하기 위해 두 번째 PCR이 필요하다. 숫자 1과 2는 각각 첫 번째 및 두 번째 PCR을 나타낸다. 상기 표의 밑줄은 제한효소 인식 부위를 나타낸다.

[0106] pBatC_6sg 벡터 구성의 경우 프라이머 세트 'g1g2' 및 'g2g3'은 pBatC_4sg 프라이머와 동일하다. 공식적으로 pBatC_4sg에서 말단 삽입 단편으로 지정된 'g3g4' 프라이머 세트는 중앙 삽입 단편으로 수정된다. 프라이머 명명 약어는 pBatC_4sg와 동일하다.

[0108] 실험 과정

[0109] 1. pHEE401E_4sg

[0110] 1. 다음 조건에서 PCR을 수행한다.

[0111] [표 4]

[0112] 첫 번째 삽입물의 PCR 구성 요소 및 온도 조건

Item	Conc.	Amount	Temp.	Time	Cycle
pCBC_DT1T2		(5ng)	94°C	2 min	1
*DT1-BsF1	20 μM	1 μl	94°C	15 sec	
*DT1-F1	1 μM	1 μl	60°C	20 sec	30
*DT2-R1	1 μM	1 μl	68°C	20 sec	
*DT2-BbR1	20 μM	1 μl	68°C	2.5 min	1
10X KOD Buffer		5 μl	4°C	Hold	1
dNTP	2 mM	4 μl			
MgSO ₄	25 mM	3 μl			
KOD -Plus-	1U/μl	1 μl			
Distilled Water		to 50 μl			

[0113]

[0114] *두 번째 및 세 번째 인서트 조각은 프라이머로 대체해야 한다. 이때 DTsc-BbR과 DTsc-AaR의 농도는 21 μM이었다.

[0115] 2. 전기 영동으로 밴드 크기(약 600bp)를 확인한다. 단단한 밴드가 있는 경우 PCR 정제 키트를 사용하여 각 PCR 산물을 정제한다. 최대 농도에 대한 최소 용출량을 사용한다.

[0116] 3. 다음 조건에서 골든 게이트 반응을 사용하여 Ligate Insert 1 및 Insert 2를 삽입한다.

[0117] [표 5]

[0118] 골든 게이트 반응 성분 및 온도 조건

Item	Conc.	Amount	Temp.	Time
Insert 1		(300 ng)	37°C	5 h
Insert 2		(300 ng)	50°C	5 min
10X T4 ligase Buffer		1.5 μl	80°C	10 min
BbsI	10U/μl	1 μl	8°C	Hold
T4 Ligase	350U/μl	1 μl		
Distilled Water		to 15 μl		

[0119]

[0120] 4. 1 μL을 로딩하여 전기영동을 사용하여 결찰 산물의 크기를 확인한다. 결과는 의도하지 않은 결찰과 첫 번째 삽입물의 잔여물로 인해 다중 밴드가 될 수 있다. 그러나 1200bp 크기가 가장 우세하고 단단한 밴드로 표시되는 경우 다음 단계로 진행한다.

[0121] 5. 다음 조건에서 첫 번째 산물을 세 번째 인서트로 연결한다.

[0122] [표 6]

[0123] 골든 게이트 반응 성분 및 온도 조건

Item	Conc.	Amount	Temp.	Time
First golden gate product		7 μl	37°C	5 h
Insert 3		(300 ng)	50°C	5 min
*50X oligonucleotide	0.5μM	0.5 μl	80°C	10 min
10X T4 Ligase Buffer		2.5 μl	8°C	Hold
AarI	2U/μl	1 μl		
T4 Ligase	350U/μl	1 μl		
Distilled Water		to 25 μl		

[0124]

[0125] *50X AarI oligo는 효율성을 위해 추가되어야 한다.

6. 최종 골든 게이트 산물에 대한 젤 추출을 수행한다. 결과는 3개의 다중 밴드와 번짐이 있을 수 있지만 1800bp 크기가 밴드를 나타내는 경우 이 1800bp 밴드에 대한 젤 추출을 진행한다. 최종 용출량은 다음 단계에서 필요한 DNA 질량을 고려하여 조정해야 한다.

7. 다음 조건에서 삽입 중합체와 pHEE401E 벡터를 연결한다.

[표 7]

골든 게이트 반응 성분 및 온도 조건

Item	Conc.	Amount	Temp.	Time
Insert polymer		(200 ng)	37°C	5 h
pHEE401E vector		(100 ng)	50°C	5 min
10X T4 Ligase Buffer		1.5 µl	80°C	10 min
<i>Bsa</i> I	20U/µl	1 µl	8°C	Hold
T4 Ligase	350U/µl	1 µl		
Distilled Water		to 15 µl		

8. 결찰된 벡터로 대장균을 변형하고 카나마이신 LB 플레이트에 펼친다.

9. 자체 결찰 벡터 형질전환체를 스크리닝하기 위해 새로운 카나마이신 LB 플레이트 및 스펙티노마이신 LB 플레이트에 잘 자란 콜로니를 접종한다. 카나마이신에서 생존하고 스펙티노마이신에서 죽는 콜로니가 관심 콜로니이다(도 9).

10. 다음 조건에서 콜로니 PCR을 진행한다.

[표 8]

첫 번째 삽입물의 PCR 구성 요소 및 온도 조건

Item	Conc.	Amount	Temp.	Time	Cycle
Colony		(5 ng)	95°C	5 min	1
*U6-26P_F	10 µM	1 µl	95°C	30 sec	
**UBQ10_R	10 µM	1 µl	55°C	30 sec	30
10X Buffer		2 µl	72°C	***2.5kb	
dNTP	2.5mM	1.6 µl	72°C	5 min	1
DNA polymerase	5U/µl	0.1 µl	8°C	Hold	1
Distilled Water		to 20 µl			

*U6-26P_F sequence: AACCTTCAAGAATTGATTGAATA

**UBQ10_R sequence: CGTGTATTGAGCGTTGTTTA

***Use different elongation times based on the DNA-polymerase performance.

11. 젤 전기영동을 이용하여 PCR 산물을 확인한다. 결과적으로 4개의 다중 밴드가 나타날 수 있지만 2.5kb 크기가 다른 밴드에 비해 가장 지배적인 밴드를 보일 경우 DNA 시퀀싱을 위한 플라스미드 추출을 진행한다.

12. 모든 sgRNA 서열이 DNA 시퀀싱 결과에 표시되는지 확인한다.

2. pBatC_4sg, 6sg

1. 다음 조건에서 PCR을 진행한다.

[표 9]

[0143] 첫 번째 삽입물의 PCR 구성 요소 및 온도 조건

Item	Conc.	Amount	Temp.	Time	Cycle
pTV00		(5 ng)	94°C	2 min	1
*Bb_g1g2_F1	10 μM	2 μl	94°C	15 sec	30
*Bb_g1g2_F2	1 μM	1 μl	60°C	20 sec	
*Aa_g1g2_R	10 μM	2.5 μl	68°C	20 sec	
10X KOD Buffer		5 μl	68°C	2.5 min	1
dNTP	2mM	4 μl	4°C	Hold	1
MgSO4	25mM	3 μl			
KOD -Plus-	1U/μl	1 μl			
Distilled Water		to 50 μl			

[0144]

[0145] * 터미널 인서트 프라이머 전용 3-프라이머 PCR.

[0146] pBatC_4sg의 경우 g1g2 및 g3g4 세트가 말단 삽입 프라이머이다. pBatC_6sg의 경우 g1g2 및 g4g6 세트가 말단 삽입 프라이머이다. 동일한 방향을 가진 두 개의 프라이머가 있는 경우 외부 및 내부 프라이머 양은 각각 2 μl 및 1 μl이어야 한다. 솔로 프라이머의 반대 방향의 양은 2.5 μl였다. 중간 삽입 프라이머(10 μM)는 양방향으로 2 μl이어야 한다.

[0149] 2. 다음 조건에서 골든 게이트 반응을 진행한다.

[0150] [표 10]

[0151] 골든 게이트 반응 및 온도 조건의 구성 요소

Item	Conc.	Amount	Temp.	Time	Cycle
*Inserts		(100ng)	37°C	5 min	40
**50X oligonucleotide	0.5μM	0.3 μl	20°C	10 min	
10X T4 Ligase Buffer		1.5 μl	20°C	1 hour	1
<i>AarI</i>	2U/μl	0.5 μl	65°C	20 min	1
T4 Ligase	350U/μl	1 μl	8°C	Hold	1
Distilled Water		to 15 μl			

*Every insert.

**Must be added owing to efficiency.

[0152]

[0153] 3. 겔 전기영동을 이용하여 골든 게이트 산물을 확인한다. 결과는 의도하지 않은 ligation 또는 잔류 삽입(하나의 삽입 크기는 200bp)으로 인해 여러 밴드를 표시할 수 있지만 pBatC_4sg에 600bp 밴드 또는 pBatC_6sg에 1000bp 밴드가 있는 경우 다음 단계로 진행한다.

[0154] 4. 골든 게이트 산물을 골든 게이트 템플릿(GG 템플릿)으로 10배 희석하고 다음 조건에서 PCR을 수행한다.

[0155] [표 11]

[0156] PCR 및 온도 조건의 구성 요소

Item	Conc.	Amount	Temp.	Time	Cycle
GG template	1/10 diluted	1 μ l	94°C	2 min	1
Aa_g1g2_F2	10 μ M	2 μ l	94°C	15 sec	
*Reverse primer	10 μ M	2 μ l	60°C	20 sec	40
10X KOD Buffer		5 μ l	68°C	**1 min/kb	
dNTP	2mM	4 μ l	68°C	5 min	1
MgSO4	25mM	3 μ l	4°C	Hold	1
KOD -Plus-	1U/ μ l	1 μ l			
Distilled Water		to 50 μ l			
*pBatC_4sg reverse primer: Aa_g3g4_R2					
*pBatC_6sg reverse primer: Aa_g5g6_R2					
**4sg time: 40 sec; 6sg time: 1 min 10 sec					

[0157]

[0158] 5. 다음 조건에서 직접 PCR 산물을 절단한다.

[0159] [표 12]

[0160] 인서트 폴리머 절단 및 온도 조건의 구성 요소

Item	Conc.	Amount	Temp.	Time
PCR product	-*	20~25 μ l	37°C	2 h
10X <i>BbsI</i> Buffer		5 μ l	65°C	20 min
<i>BbsI</i>	10U/ μ l	1 μ l	8°C	Hold
Distilled Water		to 50 μ l		

[0161]

[0162] 6. *BbsI* 절단 인서트 폴리머를 정제한다. 최대 농도에 대한 최소 용출량을 사용한다.

[0163] 7. 다음 조건에서 정제된 삽입 중합체를 pBatC_tRNA 벡터와 연결한다.

[0164] [표 13]

[0165] 골든 게이트 반응 성분 및 온도 조건

Item	Conc.	Amount	Temp.	Time	Cycle
Insert polymer		(200 ng)	37°C	5 min	40
pBatC_tRNA		(100 ng)	20°C	10 min	
50X oligonucleotide	0.5 μ M	0.3 μ l	20°C	1 h	1
10X T4 Ligase Buffer		1.5 μ l	65°C	10 min	1
<i>AarI</i>	1U/ μ l	1 μ l	8°C	Hold	1
T4 Ligase	350U/ μ l	1 μ l			
Distilled Water		to 15 μ l			

[0166]

[0167] 8. 열 충격 방법을 사용하여 대장균을 변형한다. 스펙티노마이신 LB 플레이트에 형질전환된 박테리아를 퍼뜨린다.

[0168] 9. 다음과 같은 조건에서 콜로니 PCR로 형질전환체 콜로니를 확인한다.

[0169] [표 14]

[0170] PCR 구성 요소 및 온도 조건

Item	Conc.	Amount	Temp.	Time	Cycle
Colony		(5 ng)	95°C	5 min	1
U6-26P_F	10 μ M	1 μ l	95°C	30 sec	
*NosP_Rev	10 μ M	1 μ l	55°C	30 sec	30
10X Buffer		2 μ l	72°C	**see footer	
dNTP	2.5mM	1.6 μ l	72°C	5 min	1
DNA polymerase	5U/ μ l	0.1 μ l	8°C	Hold	1
Distilled Water		to 20 μ l			

*NosP_Rev sequence: AAGTCGCCTAAGGTCACCT

**pBatC_4sg, expected PCR band size: 1159 bp

**pBatC_6sg, expected PCR band size: 1513 bp

** Use different elongation times based on the DNA-polymerase performance.

[0171]

[0172] 10. 겔 전기영동을 이용하여 PCR 산물을 확인한다. 결과가 smear 또는 다중 밴드로 나타날 수 있지만 pBatC_4sg의 1.1kb 밴드와 pBatC_6sg의 1.5kb 밴드가 다른 밴드에 비해 가장 지배적인 밴드인 경우 DNA 시퀀싱을 위한 플라스미드 추출을 진행한다.

[0173] 11. 모든 sgRNA 서열이 DNA 시퀀싱 결과에 존재하는지 확인한다.

[0175] 위 모든 단계가 성공하면 DNA 시퀀싱 결과에 지정된 모든 sgRNA 서열이 포함되어야 한다(도 10a 내지 10c).

[0177] 실험 결과

[0178] 1. 식물에서 다중 sgRNA 적용: 대두에서 FAD2 및 FATB의 다중 유전자 편집

[0179] sgRNA를 설계하기 위해 앞서 대두의 다중 복제 특성을 고려하여 상동 FAD2 및 FATB 유전자를 조사했다. 데이터베이스 검색과 BLAST를 통해 총 7개의 FAD2와 4개의 FATB가 확인되었다. 또한, 여러 FAD2 및 FATB 유전자 중 주요 및 부 발현 유전자의 결정을 위해 유전자 발현 데이터를 조사하여 유사 유전자를 in silico로 녹아웃 및 제거하였다. 잘못된 데이터를 필터링한 후 5개의 FAD2와 4개의 FATB가 남았고 RGEN Tools Cas-Designer를 사용하여 sgRNA를 설계했다. 6개의 sgRNA가 다중 FAD2 및 FATB 표적을 위해 설계되었다. sgRNA1 및 sgRNA2는 FAD2 및 FAD2-1을 표적으로 하는 반면, sgRNA5는 나머지 FAD2 상동 유전자를 표적으로 한다. sgRNA3 및 sgRNA4는 FATB_a 및 FAT_b를 표적으로 하는 반면 sgRNA6은 나머지 FATB 상동 유전자를 표적으로 한다(도 11). 이 프로토콜에 따라 sgRNA1-4에 해당하는 4개의 sgRNA를 pHEE401E 및 pBatC-tRNA에 클로닝하여 각각 pHEE401E_4sg 및 pBatC_4sg를 제조했다. 그런 다음, sgRNA1-6에 해당하는 6개의 sgRNA를 pBatC-tRNA 벡터에 클로닝하여 pBatC_6sg를 구성하였다.

[0181] 1.1. pHEE401E_4g의 구성

[0182] 각 삽입 단편에 대한 최초의 PCR은 다음 프라이머로 수행되었다.

[0183] [표 15]

[0184] pHEE401E_4sg 구성을 위한 프라이머 및 서열 목록

Insert name	Sequence	
DT1-BsF	ATATATGGTCTCGATTGTGTTTGGAACCCCTTGAGAGGTT	서열번호 32
DT1-F	TGTGTTTGGAACCCCTTGAGAGGTTTATAGAGCTAGAAATAGC	서열번호 33
DT2-R	AACCTCTCGGATGTTCTTCATCAATCTCTTAGTCGACTCTAC	서열번호 34
DT2-BbR	ATTATTGAAGACATAAACTTCTCGGATGTTCTTCATCAA	서열번호 35
DTsc_BbF	ATATATGAAGACATGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA	서열번호 36
DT3-R	AACGACTCTGGTGGAGCAGGCACAATCTCTTAGTCGACTCTAC	서열번호 37
DT3-AaR	ATTATTACCTGCATATAAAACGACTCTGGTGGAGCAGGCACAA	서열번호 38
DTsc-AaF	ATATATCACCTGCATATGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA	서열번호 39
DT4-R	AACCTAATTTTCAAAGGGGCTTCAATCTCTTAGTCGACTCTAC	서열번호 40
DT4-BsR	ATTATTGGTCTCGAAACCTAATTTTCAAAGGGGCTTCAA	서열번호 41

[0185]

[0186] 표 4에 나열된 조건으로 PCR 후 3 μ L PCR 산물을 겔 전기영동으로 검사했다(도 12의 A). PCR 밴드는 원하는 크기(~600bp)에서 두껍고 투명하여 유형 IIS 제한 효소와 단계적으로 결찰할 수 있었다.

[0187] 프로토콜 섹션에서 언급했듯이 첫 번째 및 두 번째 단편은 BbsI 효소 매개 골든 게이트 반응과 연결되었다. 첫 번째 결찰 후 AarI 효소 매개 골든 게이트 반응으로 두 번째 결찰을 수행했다. 각 반응 산물의 3 μ L 샘플을 겔 전기영동으로 검사했다(도 12의 B). 골든 게이트 반응의 밴드 크기를 기반으로 각 단계는 예상 길이(약 1.2kb 및 1.8kb)를 보여 다음 단계로 이어졌다.

[0188] 겔에서 적당한 크기의 밴드를 추출하였다. pHEE401E 벡터 클로닝, E. coli 형질전환 및 선택은 공식 프로토콜 장(pHEE401E 벡터 절차, 단계 7-8)에 설명된 대로 수행되었다. 표 7에 나열된 조건을 사용하여 콜로니 PCR을 수행하고, 산물을 겔 전기영동으로 검사하였다(도 13의 C). 다중 밴드에도 불구하고 예상 밴드(약 2.4kb)도 다른 밴드에 비해 상대적으로 우세한 것으로 나타났다. 이러한 추정되는 양성 콜로니에서 클로닝된 pHEE401E_4sg 벡터를 추출하고 최종 검증을 위해 시퀀싱했다. 시퀀싱은 또한 4개의 sgRNA 서열이 성공적으로 통합되었음을 보여 준다.

[0189] pHEE401E_4sg의 구축이 완료된 후, 아그로박테리움과 캘러스 공동 배양에 의해 Glycine max로 옮겼다.

[0191] 1.2. pBatC_4sg 및 pBatC_6sg의 구성

[0192] 각 삽입 단편에 대한 최초의 PCR은 다음 프라이머로 수행되었다.

[0193] [표 16]

[0194] pBatC_4sg 삽입 단편에 대한 프라이머 목록

Insert Name	Sequence	
Bb_g1g2_F1	GTGTTTGGAACCCCTTGAGAGGTTTATAGAGCTAGAA	서열번호 42
Bb_g1g2_F2	ATGAAGACNNTGCAGTGTGTTGGAACCCCTTGAGAG	서열번호 43
Aa_g1g2_R	ATCACCTGCATATTGTT*CTTCATCTGCACCAGCCGGGAA	서열번호 44
Aa_g2g3_F	ATCACCTGCATATAACA*TCCGAGAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	서열번호 45
Aa_g2g3_R	ATCACCTGCATATTGGA*GCAGGCAGTGCACCAGCCGGGAATCGAA	서열번호 46
Aa_g3g4_F	ATCACCTGCATATTC*CCAGAGTCGTTTTAGAGCTAGAA	서열번호 47
Bb_g3g4_R1	TAAATTTTCAAAGGGGCTGTGACCAGCCGGGAATCGAA	서열번호 48
Bb_g3g4_R2	ATGAAGACATAAACTTAATTTTCAAAGGGGCTTG	서열번호 49

[0195] Sticky ends that generated by type IIS restriction enzyme are indicated with red text

[0196] [표 17]

[0197] pBatC_6sg 삽입 단편에 대한 추가 프라이머 목록

Insert Name	Sequence	
**Aa_g3g4_F	ATCACCTGCATATTCCA*CCAGAGTCGTTTTAGAGCTAGAA	서열번호 50
**Aa_g3g4_R	ATCACCTGCATATTCAA*AGGGGCTTGTGCACCAGCCGGGAATCGAA	서열번호 51
Aa_g4g5_F	ATCACCTGCATATTGA*AAATTAAGTTTTAGAGCTAGAA	서열번호 52
Aa_g4g5_R	ATCACCTGCATATAGCC*ACCGCACTGCACCAGCCGGGAATCGAA	서열번호 53
Aa_g5g6_F	ATCACCTGCATATGGCT*TGCAGGTCGTTTTAGAGCTAGAA	서열번호 54
Bb_g5g6_R1	AGTACAAGGGCCAACCAAGTTGCACCAGCCGGGAA	서열번호 55
Bb_g5g6_R2	ATGAAGACATAAACAGTACAAGGGCCAACCAAGT	서열번호 56

* Sticky ends that generated by type IIS restriction enzyme are indicated with red text
 ** The Primer that use alternatively from pBatC_4sg 'g3g4' primer set.

[0198]

[0199] 표 8에 나열된 조건으로 PCR 후 3 μ L PCR 산물을 겔 전기영동으로 검사했다(도 13의 A 및 B). PCR 밴드는 원하는 크기(~200bp)에서 두껍고 투명하여 유형 IIS 제한 효소와 동시 골든 게이트 절찰이 가능했다.

[0200] 모든 삽입 단편은 AarI 매개 골든 게이트 반응과 동시에 절찰되었으며(표 9), 3 μ L의 절찰 산물은 공식 프로토콜(pBatC_4sg, 6sg 절차, 2-3단계)에 설명된 대로 겔 전기영동으로 검사되었다(도 13의 C).

[0201] pBatC_4sg insert와 pBatC_6sg insert(각각 ~550bp 및 ~1kb)의 예상 band size를 확인한 후, 표 10에 나열된 조건에서 PCR을 수행하였다. 마지막으로 겔 전기영동을 이용하여 3 μ L의 PCR 산물을 검사했다(도 13의 D).

[0202] 다중의 smear 밴드가 나타났음에도 불구하고, 각 삽입 크기는 상대적으로 두껍고 밝은 밴드를 보여 BbsI 제한 효소 처리 및 PCR 정제의 처리를 허용했다(pBatC_4sg, 6sg 구성 절차, 단계 5-7). 정제 후, 각각의 삽입물을 골든 게이트 반응을 사용하여 pBatC_tRNA 벡터에 클로닝하고 E. coli로 옮겼다. 양성 콜로니의 스크리닝은 항생제 LB 한천 플레이트 및 콜로니 PCR(pBatC_4sg, 6sg 구성 절차, 8-10단계)을 사용하여 수행되었다(도 13의 E).

[0203] 다중 밴드에도 불구하고 예상 밴드(pBatC_4sg의 경우 약 1.1kb, pBatC_6sg의 경우 1.5kb)도 다른 밴드에 비해 상대적으로 우세했다. 이러한 추정되는 양성 콜로니에서 클로닝된 pBatC_4sg 및 pBatC_6sg 벡터를 추출하고 최종 검증을 위해 시퀀싱했다. 시퀀싱은 또한 4개 및 6개의 sgRNA 서열이 성공적으로 통합되었음을 보여주었다. pBatC_4sg 및 pBatC_6sg의 구축이 완료되었고, Agrobacterium과 캘러스 공동 배양에 의해 Glycine max로 옮겨졌다.

[0205] 2. FAD2 및 FATB 다중 표적 유전자의 심층 시퀀싱 분석

[0206] 총 16개의 개체가 pHEE401E_4sg 형질전환 식물에서 샘플링되었다. 또한, 27 및 29개의 개체가 각각 pBatC_4sg 및 pBatC_6sg 형질전환 식물에서 샘플링되고 조사되었다. 샘플링된 트랜스제닉 T0 세대 대두 잎으로 CTAB 용액을 사용하여 게놈 DNA(gDNA)를 추출했다. 추출된 gDNA는 각 sgRNA 표적 부위에 대한 라이브러리 구축을 위한 템플릿으로 사용되었다. 딥 시퀀싱 플랫폼은 pair-end 방법을 사용하는 Illumina MiSeq였다. 페어 엔드 FASTQ 파일은 FASTQ-JOIN 프로그램(<https://github.com/ExpressionAnalysis/ea-utils>, 2021년 11월 21일 액세스)을 사용하여 병합되었으며 각 sgRNA 대상 사이트의 indel 비율은 CRIS.py에서 조사했다.

[0207] 각 유전자에 대한 sgRNA 표적 부위는 도 11에 나와 있으며, pHEE401E_4sg, pBatC_4sg 및 pBatC_6sg의 T0 형질전환 식물에서 각 유전자의 indel 비율은 각각 표 18 내지 20에 나와 있다. 표 21은 각 벡터에 대한 형질전환체의 대표적인 계통인 pHEE401E_4sg-10, pBatC_4sg-1 및 pBatC_6sg-5에 대한 표적 유전자의 두 위치에서의 indel 비율을 요약한 것이다. 각 형질전환체에 대해 indel 비율은 표적 부위에 따라 100%에서 0.1%까지 다양했다. 3개의 벡터에 의해 형질전환된 T0 세대의 모든 개체에 대한 모든 표적 유전자에 대한 평균 indel 비율은 pHEE401E_4sg의 경우 44.2%, pBatC_4sg의 경우 26%, pBatC_6sg의 경우 22%였다. 이 결과는 pHEE401E_4sg가 가장 높은 삽입결실 효과를 가짐을 시사한다. FATB_a 유전자를 제외하고 다중 표적 유전자에 대한 sgRNA의 효율에는 유의한 차이가 없었다. 이 사이트는 완벽한 염기쌍 일치율을 갖는 sgRNA4의 표적이 되었지만 sgRNA4와 하나의 염기쌍 불일치가 있는 FATB_b 두 번째 표적 사이트보다 낮은 indel 비율을 보였다. 이에 대한 정확한 이유는 아직 알려지지 않았지만 FATB_a 두 번째 표적 부위는 sgRNA4로 접근하기 어렵다고 가정할 수 있다.

[0208] 각 벡터 형질전환체의 인텔 위치와 인텔 유형 백분율을 확인하기 위해 CRISPResso2 웹 도구를 사용하여 FASTQ 결과 파일을 조사했다. 그러나 이 도구는 FAD2 및 FAD2-1과 같은 상동 유전자를 염기쌍 대체 돌연변이로 간주한다. 따라서 각 대상 사이트의 총 indel 비율은 CRIS.py와 다른 값을 보여준다(표 18 내지 20). 즉, CRISPResso2는 완벽하게 일치하는 참조 시퀀스만 indel로 계산한다. 예를 들어, pHEE401E_4sg-10 형질전환체의

경우 CRIS.py를 사용한 FAD2 첫 번째 표적 부위의 indel 비율은 66.4%로 더 높은 indel 비율 값을 갖는 반면, CRISPResso2를 사용한 indel 비율은 23.12%(도 14)로 더 낮은 값을 가진다. 또한, CRISPResso2 분석을 통해 FAD2와 FAD2-1의 두 번째 표적 부위에서 sgRNA1과 sgRNA2 표적 부위 사이의 큰 결실의 29.13%를 확인하였다. 이 연구에서는 T0 세대에서 다양한 삽입결실이 확인되었다. 이러한 복잡한 indel은 생성이 진행됨에 따라 개별 라인당 하나의 주요 indel로 고정될 것으로 예상된다.

[표 18]

pHEE401E 벡터 T0 형질전환체 각각의 Indel 비율

No.	Target genes	FAD2		FAD2-1		FATB_a		FATB_b	
	Sample name	1st site	2nd site	1st site	2nd site	1st site	2nd site	1st site	2nd site
1	pHEE401E_4sg-1	29.8	83.2	59.3	89.9	65.7	10.6	64.5	28.6
2	pHEE401E_4sg-2	18.6	46.8	16.8	17.1	18.7	2.9	15.8	23.5
3	pHEE401E_4sg-3	61.5	35.3	81.8	9.9	14.1	2.4	10.6	17.2
4	pHEE401E_4sg-4	70.3	39.4	18.1	23.6	15.5	0.1	12.1	2.1
5	pHEE401E_4sg-5	16.7	48.2	0.3	8.4	22.1	0.8	26.6	28.1
6	pHEE401E_4sg-6	100	99.8	99.9	99.9	96.9	1.9	98.3	79.1
7	pHEE401E_4sg-7	22	73.3	35.4	19.8	34.4	0.8	32	25.7
8	pHEE401E_4sg-8	29.1	56.4	33.5	25.7	34.5	2	36.9	29.6
9	pHEE401E_4sg-9	82.3	59.3	87.8	0.6	20.2	0.3	30	37.2
10	pHEE401E_4sg-10	66.4	91.9	5.4	0.4	74	5.6	71.4	44.6
11	pHEE401E_4sg-11	100	100	99.9	99.7	79.3	3.3	87.5	69.7
12	pHEE401E_4sg-12	71.8	87.3	51.8	51.7	73.4	6.6	66.2	57
13	pHEE401E_4sg-13	30.3	58.8	0.1	0.5	18.4	0.3	23.3	0.6
14	pHEE401E_4sg-14	73.5	87.4	76	75.5	0.2	0.3	0.4	2.6
15	pHEE401E_4sg-15	70.1	82.3	72.6	71.1	42.7	16.6	65.9	77.7
16	pHEE401E_4sg-16	99.2	100	99.9	99.6	79.9	2.9	86.9	47.1

[표 19]

pBatC 벡터 T0 형질전환체 각각의 Indel 비율

No.	Target genes	FAD2		FAD2-1		FATB_a		FATB_b	
	Sample name	1st site	2nd site	1st site	2nd site	1st site	2nd site	1st site	2nd site
1	pBatC_4sg-1	54	76.6	67.4	77.1	55.7	0.9	53.8	76.5
2	pBatC_4sg-2	18.5	19.3	31.4	17.9	9.9	0.8	6.4	4
3	pBatC_4sg-3	21	17.4	11.5	16.2	10.9	0.5	7.7	8.9
4	pBatC_4sg-4	38	12.9	23.5	16.1	3.7	0.4	0.4	0.3
5	pBatC_4sg-5	7.9	0.1	0.2	0.1	4	0.1	0.6	1.1
6	pBatC_4sg-6	5.4	21.6	13.4	46.8	4.8	0.1	0.9	0.9
7	pBatC_4sg-7	89.3	2.1	12.4	2.9	5	0.1	1	2.1
8	pBatC_4sg-8	38	75.6	34	59.8	10.4	1.5	7	15.5
9	pBatC_4sg-9	-	47.6	58.1	55.6	11.6	1.9	8.6	16.3
10	pBatC_4sg-10	59.3	31.9	67.3	73	49.4	2.8	47.6	81.8
11	pBatC_4sg-11	53.7	68	34.6	69.9	7.8	0.8	7.2	23.1
12	pBatC_4sg-12	0.3	62.4	2	17.5	15	0.4	7.5	0.4
13	pBatC_4sg-13	99.9	72	45.8	99.1	0.5	0.3	0.5	0.4
14	pBatC_4sg-14	52.7	75.7	45.1	46.2	18.4	2.1	16.8	33.6
15	pBatC_4sg-15	28.2	61.9	18.2	25.8	18.5	1.1	23.5	9.5
16	pBatC_4sg-16	78.1	67.5	68	63.4	40.9	1.1	30.5	39
17	pBatC_4sg-17	2.4	76.9	3.6	4.8	32.3	0.2	30.9	0.8
18	pBatC_4sg-18	100	99.7	75.6	63.5	2	0.3	10.7	69.5
19	pBatC_4sg-19	56.9	85.7	76.7	74.7	12.6	1.7	9.8	14.8
20	pBatC_4sg-20	18.9	43.5	4.7	16.9	0.8	0.4	1	1.1
21	pBatC_4sg-21	0.7	34	0.4	0.3	0.4	0.4	0.6	1.4
22	pBatC_4sg-22	6.9	47.7	0.4	20.6	0.5	0.6	7.9	0.3
23	pBatC_4sg-23	41.1	70.4	33.5	-	36.2	1.3	33	16.4
24	pBatC_4sg-24	0.5	50.8	26.8	44.8	28.9	2.6	30.6	20.4
25	pBatC_4sg-25	61.9	74	38.2	55.8	36.4	1.9	32.2	18.1
26	pBatC_4sg-26	-	-	-	-	-	-	-	-
27	pBatC_4sg-27	0.7	50.5	0.5	39.5	0.7	0.5	0.7	0.4

[표 20]

[0216] pBatC_6sg 벡터 T0 형질전환체 각각의 Indel 비율

No.	Target genes	FAD2-2		15G195200	19G147400	FAD2		FAD2-1		FATB a		FATB b		04G151600	06G211300
	Sample name					1st site	2nd site	1st site	2nd site	1st site	2nd site	1st site	2nd site		
1	pBArc_6sg-1	7.2	2.7	2.8	1	6.7	0.2	15.4	4.2	0.3	0.5	0.2	49.1	53.9	
2	pBArc_6sg-2	14.4	7	18.4	16.5	20.8	13.6	22.3	8	0.2	4.3	4.3	47.1	60.1	
3	pBArc_6sg-3	7.1	2.8	4.1	1.1	4.3	0.3	0.8	4	0.3	0.3	0.2	61.6	45.6	
4	pBArc_6sg-4	52.7	30.5	77.5	37.8	74.6	48.5	71	17.7	0.4	14.2	2.6	13.5	89.3	
5	pBArc_6sg-5	56.5	25.7	80.1	71.8	69	45.6	60	23.5	0.2	20.3	3.1	41.4	59.1	
6	pBArc_6sg-6	17.5	16.6	17.3	9.5	25.3	1.7	21	4.3	0.3	0.5	0.2	42.1	58.4	
7	pBArc_6sg-7	0.4	2.1	0.3	0.8	32.3	0.3	10.7	4.5	0.8	0.3	38.9	39.8	65	
8	pBArc_6sg-8	49.7	19.1	57.5	26.2	29.2	23.7	36.6	8.7	0.2	4.8	0.8	46.5	56.9	
9	pBArc_6sg-9	47.5	6.2	51	24	69.4	16.5	58.6	11.9	0.4	8.2	1.5	46.2	58.8	
10	pBArc_6sg-10	16	4.1	41.4	12.2	50.4	5.9	24.6	12.2	0.4	8.8	2.6	44.4	60.8	
11	pBArc_6sg-11	26.3	4.8	28.4	11.3	46.4	10.3	19.9	18.8	0.3	15.6	3.6	41.6	62.9	
12	pBArc_6sg-12	7	3.4	24.1	10.9	45.9	2.4	15.4	12	0.2	7.8	1.6	0.9	100	
13	pBArc_6sg-14	6.2	3	10	10.6	47.3	5.6	13.9	12.3	0.1	9.1	2.3	0.9	100	
14	pBArc_6sg-15	25.4	4.4	11.3	9	46.9	2.9	10.2	12.7	0.3	9.1	2.5	46.9	59.8	
15	pBArc_6sg-16	10.7	4.9	22	10.5	53.4	19.5	27.6	15.2	0.3	11.9	4.8	48	57.6	
16	pBArc_6sg-17	13.3	4.8	21.3	9.2	54.7	20.9	28.2	15.6	0.1	12.1	4.4	37.9	67	
17	pBArc_6sg-18	2.4	2.6	10.9	6.3	44.7	6.4	10.4	9.7	0.3	6.1	1.7	39.4	62.4	
18	pBArc_6sg-19	15.7	3.6	23.2	8.6	60.4	8.9	41.3	12.1	0.2	8.6	1.6	39.5	64.2	
19	pBArc_6sg-20	21.9	4.6	45.9	9.6	51.7	10.2	19.4	11.3	0.3	7.3	1.9	46.1	57.1	
20	pBArc_6sg-21	15.1	3.3	30.9	10	53.3	3	33.2	13.4	0.2	10.2	1.2	48.3	54.3	
21	pBArc_6sg-22	12	4.9	61.4	8.6	48.8	13	17.8	12.2	0.3	8.4	2.3	30.6	71.3	
22	pBArc_6sg-23	43.4	6.6	59	19.5	64.5	22.1	51.2	9.7	0.2	5.8	2.8	39.5	63.4	
23	pBArc_6sg-24	35.4	8.9	64.9	16.2	73.8	36.1	70.6	12.4	0.5	8.2	2.7	37	64.3	
24	pBArc_6sg-25	38.5	6.6	54.1	16.8	73.1	29.9	70.9	19.7	0.9	16.1	6.4	42.4	60.5	
25	pBArc_6sg-26	11.1	3.6	14	7.4	40.2	2.8	16.9	6.1	0.2	2.5	1.4	42.3	62.1	
26	pBArc_6sg-27	7.4	4	21.9	12.4	47.4	18.3	23.6	14	0.3	11	5.3	43.1	59.7	
27	pBArc_6sg-28	9.9	4.9	21.2	15	49.2	21.2	21.2	13.5	0.5	9.9	2.6	41.4	62.4	
28	pBArc_6sg-29	17.2	4.1	6.3	5.3	67.1	0.7	55.5	5.8	0.1	2.3	0.2	43	60.6	
29	pBArc_6sg-30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
30	pBArc_6sg-31	7.7	3.4	34.1	6.1	54.6	4.8	26.2	4.9	0.4	3.6	2.5	0.9	0.5	
31	pBArc_6sg-32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

[0217]

[0218] [표 21]

Target genes	FAD2-2		15G195200		19G147400		FAD2		FAD2-1		FATB_a		FATB_b		04G151600		06G211300	
	1st site	2nd site	1st site	2nd site	1st site	2nd site	1st site	2nd site	1st site	2nd site	1st site	2nd site	1st site	2nd site	1st site	2nd site	1st site	2nd site
pHEE401E_4sg-10	-	-	-	66.4	91.9	5.4	0.4	74	5.6	71.4	44.6	-	-	-	-	-	-	-
pBatC_4sg-1	-	-	-	54	76.6	67.4	77.1	55.7	0.9	53.8	76.5	-	-	-	-	-	-	-
pBatC_6sg-5	56.5	25.7	80.1	71.8	69	45.6	60	23.5	0.2	20.3	3.1	41.4	59.1	-	-	-	-	-

- indicates no indel detected.

Ratio unit: percent (%)

[0219]

[0220] 이후, pHEE401E_4sg, pBatC_4sg 및 pBatC_6sg 형질전환체 T0 세대를 진전시켜 얻은 T1과 T2 세대를 얻어 이에 대한 FAD2와 FATB 다중 유전자의 돌연변이 indel 분석을 실시하였다. pHEE401E_4sg 벡터에 의한 형질전환된 총 24개의 T1세대와 41개의 T2 세대 식물에서 DNA가 샘플링 되었다. pBatC_4sg 벡터에 의해 형질전환된 총 62개의 T2 세대 식물에서 DNA가 샘플링 되었다. pBatC_6sg 형질전환 식물은 총 22개의 T1 와 9개의 T2세대 식물에서 DNA 샘플링 되었다. 샘플링된 DNA들을 대상으로 타겟 유전자인 FAD2와 FATB 유전자들에 대한 indel을 조사함과 동시에 각 형질전환체들이 세대가 진전되면서 최초로 삽입된 Cas9과 PPT 유전자가 존재하는지 PCR 분석을 통해 Cas9과 PPT 유전자 유무에 대한 genotyping을 진행하였다. 샘플링된 형질전환체 대두 잎으로 CTAB 용액을 사용하여 게놈 DNA(gDNA)를 추출했다. 추출된 gDNA는 각 sgRNA 표적 부위에 대한 라이브러리 구축을 위한 템플릿으로 사용되었다. 딥 시퀀싱 플랫폼은 pair-end 방법을 사용하는 Illumina Miniseq하였다. 페어엔드 FASTQ 파일은 FASTQ-JOIN 프로그램(<https://github.com/ExpressionAnalysis/ea-utils>, 2021년 11월 21일 액세스)을 사용하여 병합되었으며 각 sgRNA 대상 사이트의 indel 비율은 CRIS.py에서 조사했다.

[0221] 각 유전자에 대한 sgRNA 표적 부위는 도 11에 나와 있으며, pHEE401E_4sg, pBatC_4sg 및 pBatC_6sg의 T1 및 T2 형질전환 식물에서 각 유전자의 indel 비율은 하기 표 22 내지 25에 나타내었다. indel 비율은 0-100 %로 표시되며, 높은 비율일수록 타겟유전자의 돌연변이 indel이 고정되었음을 나타낸다. SFA (16:0+18:0)는 포화지방산 함량을, oleic acid는 올레산 함량을 표시한 것이다.

[0222] [표 22]

[0223] pHEE401E_4sg 벡터 T1 형질전환체 각각의 Indel 비율

No	T1 lines	Genotyping		FAD2 (10G278000)		FAD2-1 (20G111000)		FATB_a (05G012300)		FATB_b (17G120400)		Average(n=10)	
		Cas9	Bar	1st site	2nd site	1st site	2nd site	1st site	2nd site	1st site	2nd site	SFA	Oleic acid
1	pHEE401E_4sg5 #1	X	X	89.3	98.6	0.3	12.4	0.6	43.4	0.2	-	16.01	21.40
2	pHEE401E_4sg5 #2	X	X	-	96.7	0.3	1.4	0.5	5.1	0.4	-	15.93	20.55
3	pHEE401E_4sg5 #3	X	O	76.1	87	0.2	2.9	0.4	8.2	0.3	0	16.07	20.41
4	pHEE401E_4sg5 #4	X	X	-	100	0.4	6.3	0.3	3.4	0.6	-	15.77	20.48
5	pHEE401E_4sg5 #5	X	X	99.3	86	4.6	99.8	22.8	100	1.6	-	17.17	21.52
6	pHEE401E_4sg5 #6	X	X	82.6	86.9	0.4	2.6	0.5	13.8	3.2	0.4	16.19	20.01
7	pHEE401E_4sg5 #7	X	X	57	88.4	0.2	5.2	0.6	10.7	0.5	-	17.44	21.88
8	pHEE401E_4sg5 #8	X	X	41.5	75.4	0.2	0.7	0.3	2.4	0.3	0.4	16.63	27.97
9	pHEE401E_4sg5 #9	X	X	0.3	6	0.2	89.8	18.5	26.9	0.5	0	17.16	21.03
10	pHEE401E_4sg5 #10	X	X	0.3	11.2	0.2	95.4	0.6	0.9	0.5	0	17.56	21.04
11	pHEE401E_4sg5 #11	X	X	0.4	2.2	0.8	96.7	18.4	99.7	0.8	-	16.75	20.96
12	pHEE401E_4sg5 #12	X	O	0.3	8.7	0.2	76.9	5.1	96.6	0.6	-	15.77	20.48
13	pHEE401E_4sg5 #13	X	X	91	69	32.8	45.4	3.6	6.5	15.3	0	16.56	21.55
14	pHEE401E_4sg5 #14	X	X	-	77.2	32.6	80.2	1.9	98.1	0.5	-	17.29	20.74
15	pHEE401E_4sg5 #15	X	X	0.4	62.5	2.9	82	1	48.4	0.4	-	16.33	21.44
16	pHEE401E_4sg5 #16	X	X	95	80.8	90.7	99.8	2.4	98.3	1.3	-	16.19	20.01
17	pHEE401E_4sg5 #17	X	X	0.2	52.2	0.9	99.9	2.1	-	0.5	0.7	17.42	22.17
18	pHEE401E_4sg5 #18	X	O	0.3	2.6	0.2	99.7	1.1	80.1	0.5	0.5	17.26	20.81
19	pHEE401E_4sg5 #19	X	X	0.4	3.4	0.2	99.1	1.2	96.8	0	0.4	16.01	22.10
20	pHEE401E_4sg5 #20	X	O	0.5	2	0.5	99.8	1.1	40.6	0.3	1.7	16.04	21.90
21	pHEE401E_4sg5 #21	X	X	0.3	9.8	1.5	85.4	0.7	90.8	0.5	1.5	15.66	20.74
22	pHEE401E_4sg5 #22	X	X	0.2	1.4	0.2	99.8	3.2	100	0	0.6	15.66	20.74
23	pHEE401E_4sg5 #23	X	X	0.1	0.9	0.4	99.8	1.4	99.5	0.5	0.7	15.78	22.85
24	pHEE401E_4sg5 #24	X	X	0.8	73.4	0.2	45.2	1.2	68.8	1.3	-	16.48	22.18
25	WT #1	X	X	0.1	1.3	5.9	0.9	1.2	0.7	0.3	0.5	15.12	20.27
26	WT #2	X	X	0.3	1.9	8	1	1.3	0.8	0.3	0.2	16.71	20.76

[0224]

[0225] [표 23]

[0226] pHEE401E_4sg 벡터 T2 형질전환체 각각의 Indel 비율

No	T2 lines	Genotyping		FAD2 (10G278000)		FAD2-1 (20G111000)		FATB_a (05G012300)		FATB_b (17G120400)		Average(n=10)	
		Cas9	Bar	1st site	2nd site	1st site	2nd site	1st site	2nd site	1st site	2nd site	SFA	Oleic acid
1	pHEE401E_4sg1-3 #1	X	X	100	99.8	99.6	100	95.5	8	25.5	17	10.88	83.04
2	pHEE401E_4sg1-3 #2	X	X	100	99.9	99.9	100	95.9	51.5	99.4	98.8	8.93	83.82
3	pHEE401E_4sg1-3 #3	X	X	100	99.9	99.9	100	99	0.4	90.6	79.8	10.03	84.64
4	pHEE401E_4sg1-4 #1	X	X	100	100	99.5	100	100	1.1	100	100	10.29	81.70
5	pHEE401E_4sg1-4 #2	X	X	99.9	99.9	100	100	99.3	1.4	91.8	96.1	11.90	78.16
6	pHEE401E_4sg1-5 #1	X	X	100	100	100	99.8	98.6	0.9	99.9	99.9	9.35	83.57
7	pHEE401E_4sg1-5 #2	X	X	99.7	97	9.1	83.8	96.6	0	97.3	93.8	10.33	81.89
8	pHEE401E_4sg1-5 #3	X	X	85.3	99.2	98.2	81.5	40.6	7.1	0.9	1.2	10.72	81.34
9	pHEE401E_4sg1-5 #4	X	X	100	99.9	100	100	99.8	3.5	99	96.3	7.95	85.22
10	pHEE401E_4sg1-5 #5	X	X	-	92.9	99.6	99.4	99.7	45.8	97	100	8.58	84.12
11	pHEE401E_4sg3-1 #1	X	X	100	86.5	99	70.2	-	-	97.9	-	11.14	77.50
12	pHEE401E_4sg3-1 #2	X	X	95.2	3.9	99.7	17	30.4	6.9	0.5	3.9	12.11	66.51
13	pHEE401E_4sg3-1 #3	X	X	-	66.7	99.1	1.5	28.9	1.4	2.6	0	10.31	83.04
14	pHEE401E_4sg3-1 #4	X	X	100	2.5	99.7	0.7	38.7	9.7	0.6	0.8	11.53	73.48
15	pHEE401E_4sg3-1 #5	X	X	-	82.6	100	71.4	-	-	-	-	13.76	76.34
16	pHEE401E_4sg3-1 #6	X	X	-	-	100	-	97.3	25.5	1	-	11.60	74.14
17	pHEE401E_4sg3-1 #7	X	X	100	38.2	99.9	0.9	98.2	36.7	0.7	0.6	10.48	76.62
18	pHEE401E_4sg3-1 #8	X	X	-	5.8	99.8	7.1	-	-	8.9	4.2	13.76	79.74
19	pHEE401E_4sg3-1 #9	X	X	100	2.6	99.8	1.1	7	0.3	78	91.1	9.60	84.84
20	pHEE401E_4sg3-1 #10	X	X	100	2.6	99.8	2.1	2.7	0.4	0.5	0.5	11.84	68.33
21	pHEE401E_4sg3-1 #11	X	X	100	3.1	99.8	1.2	11.8	0.6	0.7	0.8	12.26	66.85
22	pHEE401E_4sg3-1 #12	O	X	100	1.9	99.8	0.9	0.7	0.6	0.5	0.5	-	-
23	pHEE401E_4sg3-1 #13	O	O	100	3.1	99.8	1.3	0.9	0.1	0.8	0.3	13.17	73.92
24	pHEE401E_4sg3-3 #1	O	X	100	3.1	100	1.3	0.8	0.7	0.3	0.4	11.07	75.59
25	pHEE401E_4sg3-3 #2	O	O	99.8	4.1	100	1.1	1.7	0.5	0.9	0.6	10.88	76.18
26	pHEE401E_4sg3-3 #3	X	X	99.8	2.1	100	1.4	0.4	0.4	0.4	0.4	10.63	78.25
27	pHEE401E_4sg3-3 #4	X	X	99.9	1.6	100	1.2	15.3	3.4	0.6	0.7	13.37	62.01
28	pHEE401E_4sg3-3 #5	X	X	100	1.9	100	1.2	0.8	0.4	0.6	0.8	12.05	59.35
29	pHEE401E_4sg3-3 #6	O	O	99.9	1.8	100	1.5	0.7	0.5	0.8	0.7	12.40	64.78
30	pHEE401E_4sg3-3 #7	X	O	99.8	2.2	100	1.5	32.3	0.5	0.6	0.7	11.12	78.18
31	pHEE401E_4sg3-3 #8	O	O	100	1.3	100	0.7	0.8	0.4	0.4	0.5	12.29	68.62
32	pHEE401E_4sg3-3 #9	X	X	99.8	1.5	100	1.1	0.9	0.7	0.5	0.6	11.82	69.67
33	pHEE401E_4sg3-3 #10	O	O	99.8	2.9	100	1.8	0.4	0.7	0.3	0.6	12.05	72.02
34	pHEE401E_4sg3-3 #11	X	O	85.3	64.8	100	1.7	0.3	16.1	0.5	-	13.65	60.72
35	pHEE401E_4sg3-3 #12	X	X	96.2	77.6	100	0.7	0.5	3.7	0.4	0	11.40	73.28
36	pHEE401E_4sg3-3 #13	X	O	99.5	98.5	100	1.6	0.4	0.8	0.3	-	13.14	68.35
37	pHEE401E_4sg3-3 #14	X	X	99.4	97.2	100	7.4	0.3	0.7	0.4	3.7	14.15	47.25
38	pHEE401E_4sg3-3 #15	O	O	90.2	61	100	1.2	0.3	24.1	0.4	3.8	11.49	77.14
39	pHEE401E_4sg3-3 #16	X	X	95.9	95	100	3.8	0.5	29.8	0.4	0	12.10	62.76
40	pHEE401E_4sg3-4 #1	X	X	52.5	71.2	100	1.4	0.4	10.5	0.3	-	14.05	44.36
41	pHEE401E_4sg3-4 #2	O	X	85.9	96.9	100	1.4	0.4	8.6	0.3	1.4	16.07	20.41
42	WT #1	X	X	0.1	1.3	5.9	0.9	1.2	0.7	0.3	0.5	15.12	20.27
43	WT #2	X	X	0.3	1.9	8	1	1.3	0.8	0.3	0.2	16.71	20.76

[0227]

[0228] [표 24a]

[0229] pBA1C_4sg 벡터 T2 형질전환체 각각의 Indel 비율

No	T1 lines	Genotyping		FAD2 (10G278000)		FAD2-1 (20G111000)		FATB a (05G012300)		FATB b (17G120400)		Average (n=10)	
		Cas9	Bar	1st site	2nd site	1st site	2nd site	1st site	2nd site	1st site	2nd site	SFA	Oleic acid
1	pBA1C_4sg 1-2#1	X	O	0.6	100	99.6	99.6	0.4	0.7	0.4	100	10.27	82.68
2	pBA1C_4sg 1-2#2	X	O	-	100	99.4	100	0.6	1.4	0.3	99.8	11.20	82.09
3	pBA1C_4sg 1-3#1	X	O	-	99.9	60.1	100	99.2	1	61.3	96.7	13.47	51.07
4	pBA1C_4sg 1-3#2	X	O	-	99.9	55	98.4	99.5	0.8	0.2	99.9	13.08	52.57
5	pBA1C_4sg 1-3#3	O	O	-	98.3	100	100	100	0.9	100	99.9	9.75	81.76
6	pBA1C_4sg 1-3#4	O	O	-	90.2	100	99.8	99	3.3	20.4	99.9	9.76	82.06
7	pBA1C_4sg 1-3#5	O	O	100	91.5	100	100	99.9	2.7	74.7	99.9	9.89	84.29
8	pBA1C_4sg 1-3#6	O	O	-	91.9	81.7	99.9	99.8	4.6	69	99.9	10.01	83.72
9	pBA1C_4sg 1-3#7	O	O	-	93.8	100	100	99.8	5.7	67.5	99.9	10.58	82.84
10	pBA1C_4sg 1-3#8	O	O	-	97.2	82.6	100	81.9	19.4	49.6	84.6	10.76	81.99
11	pBA1C_4sg 1-3#9	O	O	-	98.8	99.5	100	99.2	1.7	65.8	99.9	10.17	83.97
12	pBA1C_4sg 1-3#10	X	O	-	98.7	99.5	100	99.6	1.2	100	100	12.41	61.37
13	pBA1C_4sg 1-3#11	O	O	-	99.3	87.2	100	97.4	4.5	21.3	100	11.22	71.47
14	pBA1C_4sg 1-3#12	X	O	58.3	99.7	57	99.9	97.6	1.2	4.6	99.9	14.67	26.68
15	pBA1C_4sg 1-3#13	O	O	-	99.7	99	99.6	99.1	3.1	61.2	98.9	10.84	71.51
16	pBA1C_4sg 1-3#14	O	O	-	99.9	99.7	100	98.7	6.6	13.6	100	11.01	69.47
17	pBA1C_4sg 1-3#15	O	O	0	100	90.9	3.1	17	26.8	3.2	3.1	10.27	79.32
18	pBA1C_4sg 1-3#16	O	O	-	100	93	99.6	99.9	0.7	99.9	100	10.43	84.18
19	pBA1C_4sg 1-3#17	O	O	-	100	100	99.4	100	19.4	100	99.9	10.14	84.15
20	pBA1C_4sg 1-3#18	O	O	-	82	82	99.2	99.4	1.8	60.6	100	9.90	84.67
21	pBA1C_4sg 1-3#19	O	O	-	100	100	99.8	98.4	3.8	38.9	100	9.91	84.68
22	pBA1C_4sg 1-3#20	O	O	-	100	100	99.5	99.6	4.9	27.3	100	9.43	82.69
23	pBA1C_4sg 8-2#1	O	O	-	100	0.2	55.4	0.6	0.7	0.4	0.7	-	-
24	pBA1C_4sg 8-2#2	O	O	-	99.9	0.5	2.7	0.8	0	0	0.8	16.61	31.91
25	pBA1C_4sg 8-2#3	O	O	-	100	0.5	52.4	0.7	0.5	0.8	0.7	14.58	45.47
26	pBA1C_4sg 8-2#4	O	O	96.4	99.5	0.3	61.7	1.7	0	0.4	2	13.54	56.55
27	pBA1C_4sg 8-3#1	O	O	100	100	6	91.4	1.2	0.9	1.2	10.2	10.87	74.45
28	pBA1C_4sg 8-3#2	O	O	98.6	100	12.8	100	1.9	2.5	3.1	33.5	11.43	82.13
29	pBA1C_4sg 8-3#3	O	O	100	100	78	75.8	2	0.7	0.7	28.4	11.46	80.36
30	pBA1C_4sg 10-1#1	X	O	94.2	83.8	94.5	50	0.8	0.6	92.3	100	10.33	84.67
31	pBA1C_4sg 10-1#2	X	O	96.8	66.3	82.9	43.7	0.4	1.3	1.7	99.9	9.55	84.75

[0230]

[0231]

[표 24b]

32	pBA1C_4sg 10-1#3	X	X	94.3	54.6	94	11.2	0.6	0.9	0.3	100	10.10	83.36
33	pBA1C_4sg 10-1#4	X	O	100	80.5	88.2	87.7	2.5	0.6	0	100	10.54	82.82
34	pBA1C_4sg 10-1#5	X	X	0.3	24.5	14	49.1	32.8	43.1	2.5	100	-	-
35	pBA1C_4sg 10-1#6	X	O	0.3	47.4	38.6	23.2	32.3	20.7	1	100	10.45	83.49
36	pBA1C_4sg 10-1#7	X	O	0.5	86.2	57.9	99.2	0.6	1	0.4	100	10.86	82.60
37	pBA1C_4sg 10-1#8	X	O	0.3	50.9	46.3	81.7	0.9	0.7	0.4	100	9.95	82.82
38	pBA1C_4sg 10-1#9	X	O	0.5	14.6	97.5	97.1	0.5	0.6	0.4	100	9.79	84.94
39	pBA1C_4sg 10-1#10	X	O	0.3	60.5	94.2	99.7	2.1	0.3	0.8	100	10.63	83.02
40	pBA1C_4sg 10-1#11	X	O	0.1	20.8	34.4	97	0.3	0.7	0.4	99.5	10.72	82.38
41	pBA1C_4sg 10-1#12	X	O	0.4	22.6	69.2	99.1	0.6	0.3	0.7	99.9	10.45	84.59
42	pBA1C_4sg 10-1#13	X	O	0.3	28	23.2	99.4	0.7	0.6	0.4	99.9	10.47	84.37
43	pBA1C_4sg 10-1#14	X	O	28.3	50.1	77	99.3	1.2	0.6	6.9	99.8	9.99	81.49
44	pBA1C_4sg 10-1#15	X	O	0.2	22.2	14.5	99	1.2	0.6	7.3	100	10.48	82.56
45	pBA1C_4sg 10-1#16	X	O	0.6	36	34.5	99.3	2.5	0.6	3.2	100	11.12	82.13
46	pBA1C_4sg 10-1#17	X	O	45.4	33.4	2.5	44.9	0.9	1	0.4	100	9.57	83.61
47	pBA1C_4sg 10-1#18	X	O	0.4	21.1	1.4	99.3	64.4	0.4	0.8	6.6	-	-
48	pBA1C_4sg 10-4#1	X	O	6.1	83.8	3.6	99.7	65.1	0.6	23.4	100	9.65	84.31
49	pBA1C_4sg 10-4#2	X	O	8.4	99.4	99.4	99.1	51.6	0.6	1.3	16.3	9.73	84.12
50	pBA1C_4sg 10-4#3	X	O	52.3	97	99.7	99.9	0.4	0.9	1.8	100	11.68	82.69
51	pBA1C_4sg 10-4#4	X	O	3	85.3	99.8	100	2	0.4	0.4	30.8	9.59	86.20
52	pBA1C_4sg 10-4#5	X	X	0.2	22.6	92.6	99.2	0.4	0.5	0.3	1.3	11.76	82.81
53	pBA1C_4sg 10-4#6	X	X	3	28.8	99.6	99.8	64.9	0.3	11.9	100	9.94	82.99
54	pBA1C_4sg 10-4#7	X	O	3.3	82.8	99.5	99.9	59.7	0.7	8.4	100	10.68	82.89
55	pBA1C_4sg 10-4#8	X	O	2.4	42.3	99.6	99.9	0.6	1	0.3	100	11.07	83.16
56	pBA1C_4sg 10-4#9	X	O	9.7	53.1	99.8	99.8	65.3	0.4	1.5	99.9	12.02	81.03
57	pBA1C_4sg 10-4#10	X	O	5.7	100	99.5	100	63.2	0.8	26.7	100	10.71	81.34
58	pBA1C_4sg 10-4#11	X	O	3.3	89.9	99.6	100	63.8	0.6	18.7	100	9.84	84.72
59	pBA1C_4sg 10-4#12	X	O	1.6	79.4	99.8	99.9	63.1	0.7	1.5	99.9	9.75	83.08
60	pBA1C_4sg 10-4#13	X	O	5.4	22.1	3.1	97.4	0.9	0.5	0.4	100	11.60	81.38
61	pBA1C_4sg 10-4#14	X	O	26.3	11.3	82.6	77.4	8.7	0.4	0.8	100	9.96	86.46
62	pBA1C_4sg 10-4#15	X	X	42.1	39.6	99.6	99.9	61.8	0.8	1	100	12.20	81.76
63	WT #1	X	X	0.1	1.3	5.9	0.9	1.2	0.7	0.3	0.5	15.12	20.27
64	WT #2	X	X	0.3	1.9	8	1	1.3	0.8	0.3	0.2	16.71	20.76

[0232]

[0233]

[표 25]

[0234] pBAtC_6sg 벡터 T1 형질전환체 각각의 Indel 비율

No	T1 lines	Genotyping		FAD2-2 (03G144500)	15G195200	19G147400	FAD2 (10G278000)		FAD2-1 (20G111000)		FATB_a (05G012300)		FATB_b (17G120400)		04G151600	06G211300	Average(n=10)	
		Csq9	Ibar				1st site	2nd site	1st site	2nd site	1st site	2nd site	1st site	2nd site			FA	Oleic acid
1	pBAtC_6sg#1	X	O	92.5	6.6	5.9	2.7	99.2	15.3	11.1	1.2	0.6	0.6	0.5	4	3.7	13.09	89.94
2	pBAtC_6sg#2	O	O	97.9	41.8	94.3	64.6	99.3	75.1	99.1	53.5	2.7	47.9	34.7	4.8	4.6	9.75	88.36
3	pBAtC_6sg#3	O	O	97.1	35.4	38	64.6	99.6	56.4	97.5	31.1	1.6	34.7	19.3	4.8	4.8	10.27	87.46
4	pBAtC_6sg#4	O	O	84.7	30.6	64.4	32.2	18.7	19.3	29.5	4.9	0.8	2.5	1	2.9	4.7	-	-
5	pBAtC_6sg#5	O	O	81.2	22	61.2	20.7	17.2	15	22.2	3.6	0.3	5.4	1.3	3.8	6.1	-	-
6	pBAtC_6sg#6	O	O	93	36.4	90	62.3	95.5	61.2	92.3	45.4	3.6	48	37.2	6.3	8.3	12.52	59.32
7	pBAtC_6sg#7	O	O	88.2	29.9	76.6	37.9	59.4	41.4	64.2	9.1	0.9	6.6	3	7.9	9.9	-	-
8	pBAtC_6sg#8	X	X	44	4.3	54.8	4.2	1.8	20.2	1.7	2	0.7	0.4	0.8	7.4	6.9	16.20	20.98
9	pBAtC_6sg#9	X	X	0.2	0.3	0.3	0.9	2.4	3.7	1.9	0.6	0.6	0.4	0.5	5.9	7	16.04	20.22
10	pBAtC_6sg#10	X	O	0.2	0.2	0.4	6.2	2.9	34.3	2.9	4.2	1.1	0.3	0.5	4.2	6.5	16.61	20.74
11	pBAtC_6sg#11	O	O	85.2	39.9	80.4	56.3	77.9	49.7	87.1	17.1	1	14.2	5	3.2	10.7	-	-
12	pBAtC_6sg#12	O	O	61.9	20.7	36.6	11	11.9	11.8	18	3.1	0.6	2.5	0.8	4.5	8.6	11.74	71.87
13	pBAtC_6sg#13	X	X	0.3	0.1	0.3	1.4	1.6	5.4	1.2	0.9	0.8	0.3	0.4	2.5	4.6	10.56	84.86
14	pBAtC_6sg#14	O	O	87.4	26.7	90.3	59.2	94	61.1	90.6	28.5	2.9	42.1	17.3	6.1	6.6	17.25	25.93
15	pBAtC_6sg#15	X	O	0.4	0.3	0.2	7.3	2.7	46.4	2.1	4.3	0.7	0.5	0.5	3.5	4.1	12.38	67.10
16	pBAtC_6sg#16	O	O	89.6	24.5	84.6	31.9	51.3	33	56.5	6.6	0.7	6.8	2.5	2.9	4	-	-
17	pBAtC_6sg#17	O	O	85.7	23.2	65.6	58.9	89.1	70.4	71.5	31.5	1.9	30.7	23.8	5.5	5.1	12.26	60.94
18	pBAtC_6sg#18	X	X	0.3	0.2	0.2	1.3	3.2	8	3.7	0.9	0.4	0.4	0.4	3.1	4.7	16.03	22.56
19	pBAtC_6sg#19	X	X	0.3	0.2	0.1	5.7	1.4	37.3	1.3	2.3	0.6	0.5	0.6	2.7	4.5	16.77	19.56
20	pBAtC_6sg#20	O	O	87.3	35.6	75.1	33.6	62.4	45.5	54.9	8.8	0.8	7	3.2	3.1	4.9	17.55	20.71
21	pBAtC_6sg#21	X	O	95.6	3.9	96.3	0.7	57.9	5.9	1.1	0.6	0.5	0.4	0.3	2.8	4.6	16.45	25.11
22	pBAtC_6sg#22	O	O	96.4	48	99	62.2	87.7	81.7	58.5	9.8	0.4	6.3	2.4	3.5	6.7	-	-
23	WT#1	X	X	0.1	0.4	0.2	0.1	1.3	5.9	0.9	1.2	0.7	0.3	0.5	3.4	4.7	15.12	20.27
24	WT#2	X	X	0.4	0.2	0.3	0.3	1.9	8	1	1.3	0.8	0.3	0.2	3.4	5.4	16.71	20.76

[0235]

[0236] pHEE401E_4sg, pBAtC_4sg 및 pBAtC_6sg 벡터에 의한 형질전환체 모두에서 T1, T2 세대를 지나며 각 유전자들의 삽입결실 비율은 0%이나 100%에 수렴하는 값으로 나타났으며 이는 T0세대에서 편집되었던 부위와 그 유형이 하나의 편집유형으로 고정되었음을 뜻한다.

[0237]

추가적으로, 벡터 별로 타겟 유전자의 삽입결실 위치와 유형을 확인하기 위해 CRIP.py를 통해 나온 결과 중 각 read의 서열정보를 담고 있는 txt 파일을 분석하고 각 서열을 야생형 서열과 align하여 비교하였다(도 21a-d). 그 결과 0%에 가깝게 고정된 야생형 유형을 제외하고 모든 삽입결실 유형과 위치는 각 벡터에 포함되어있는 sgRNA에 의해 의도된 대로 일어난 것으로 보인다.

[0239]

3. 형질전환체 종자의 지방산 함량 분석

[0240]

각각의 T0 형질전환체에서 샘플링한 것으로부터 gDNA를 추출하였다. 이후 gDNA를 바탕으로 도 11에서 각 sgRNA가 타겟하는 부위에 대하여 각각의 Library를 제작하기 위하여 Nested PCR을 진행하였다. 모든 형질전환체에 대한 Library 제작이 완료되고 Illumina의 Miseq을 이용하여 pair-end FASTQ file을 결과로 얻었다. 해당 File은 fastq-join과 CRIS.py라는 deep sequence indel 분석 프로그램을 사용했으며 개체별 차이가 있지만 타겟한 모든 부위에 indel이 발생했음을 알 수 있었다. 추가적으로 Indel이 원래 의도한 sgRNA로 인해 발생했는지 조사하기 위하여 해당 부위의 indel 유형을 align했으며 이를 통해 indel이 sgRNA의 cleavage window 내에서 일어났고, 따라서 sgRNA가 indel을 일으켰음을 확인했다. 지방산 함량 조사를 위한 Gas Chromatography는 종자의 유지를 위해서 종자 전체를 사용하지 않고 일부만 잘라내어 실험에 사용하였다.

[0242]

상기 표 22-25에서, T1과 T2 세대로부터 수확한 T2와 T3 종자의 지방산 함량을 라인당 10개 (n=10)의 독립적인 종자의 지방산을 Gas Chromatography 분석하여 그 평균을 표시하였다.

[0244]

3.1.1. pHEE401E_4sg T0 형질전환체

[0245]

pHEE401E_4sg의 T0 형질전환체의 경우 임의로 선택한 10개 종자에서 최소 78.3%, 최대 83.3%의 올레산 함량을 보였고 포화지방산은 팔미트산, 스테아르산을 합쳐서 최소 11.0%, 최대 15.3% 함량을 보였다.

[0246]

[표 26]

[0247]

pHEE401E_4sg-1 형질전환체 10개 종자의 올레산 및 포화지방산 함량 변화

pHEE401E_4sg-1											
	WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
16:0	12.9	6.3	6.7	8.8	8.0	6.3	5.6	6.5	7.3	8.7	7.6
18:0	5.0	4.7	5.2	4.5	5.9	4.7	4.9	4.4	5.5	6.6	5.0
18:1	19.8	82.5	81.8	80.1	80.2	83.3	82.9	83.4	81.5	78.3	81.0
18:2	51.4	2.1	1.8	2.3	1.7	1.6	1.5	1.8	1.5	1.8	1.9
18:3	10.9	4.4	4.5	4.4	4.2	4.0	5.0	3.9	4.1	4.6	4.6
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

[0248]

[0250] 3.1.2. pHEE401E_4sg T2 형질전환체

[0251] pHEE401E_4sg T2 세대라인 41 개체로부터 T3 종자를 수확 후 라인당 단일종자 10개씩 지방산 분석을 수행하였다. 그 결과 41개 모든 라인의 종자에서 올레산이 증진했고 포화지방산이 감소했다(도 20, 표 23). FAD2, FAD2-1, FATB_a, FATB_b 4개 유전자 모두가 편집된 라인인 pHEE401E_4sg 1-5 #5 (도 20의 #9) 라인은 올레산 (18:1)이 평균 85.22%까지 증진되었으며 포화지방산 (16:0+18:0)이 7.95%로 감소되었다. 이 결과는 올레산 (18:1)이 야생형 (WT) (20%) 대비 85%까지 증진, 포화지방산인 16:0과 18:0이 WT (16%) 대비 7.9%까지 감소한 효과이다.

[0253] 3.1.3. pHEE401E_4sg 1-5, T2 우수계통 종자 지방산 분석 및 타겟 유전자 indel 모양 분석

[0254] pHEE401E_4sg T2 세대 라인 중 올레산이 가장 높은 라인을 선발하고, 해당 라인의 indel 유형을 파악하기 위하여 해당 라인의 NGS 결과 파일을 분석하여 FAD2, FAD2-1, FATB_a, FATB_b 유전자의 야생형 서열과 align하였다 (도 21a). 야생형 쿼리의 경우 18:1의 함량과 포화지방산 함량 (16:0+18:0)이 10개 종자 평균 각각 20.8%, 16.7%의 수치를 보인 반면 지방산이 가장 우수했던 라인은 pHEE401E_4sg 1-5 #4 라인으로 18:1의 함량과 포화지방산 함량 (16:0+18:0)이 10개 종자 평균 각각 85.2%, 8.0%의 수치를 보였다 (표 27).

[0255] [표 27]

[0256] pHEE401E_4sg 1-5 #4 형질전환체 10개 종자의 올레산(18:1) 및 포화지방산(16:0+18:0) 함량을 야생형 (WT)과 비교

WT											Average (N=10)
FA (%)											
16:0	12.6	12.4	12.6	13.5	13.5	12.6	12.5	12.5	12.9	12.8	12.8
18:0	3.5	3.5	3.5	4.3	4.3	4.7	3.7	4.3	4.1	3.4	3.9
18:1	19.5	24.5	21.8	22.0	21.5	20.3	21.2	18.7	18.1	20.0	20.8
18:2	50.7	48.7	51.5	48.5	48.7	51.6	53.1	54.7	51.8	53.1	51.2
18:3	13.8	11.0	10.6	11.6	12.0	10.9	9.5	9.8	13.1	10.7	11.3
SFA (16:0+18:0)	16.0	15.9	16.1	17.8	17.8	17.2	16.3	16.8	16.9	16.2	16.7
PUFA (18:2+18:3)	64.5	59.6	62.1	60.2	60.7	62.4	62.5	64.5	65.0	63.8	62.5

pHEE401E_4sg 1-5 #4											Average (N=10)
FA (%)											
16:0	5.1	5.2	5.0	5.0	5.0	5.2	5.8	5.1	5.2	6.5	5.3
18:0	2.4	2.6	2.6	2.6	2.5	2.5	2.8	3.0	2.5	2.7	2.6
18:1	85.2	85.8	85.9	86.5	86.1	84.9	82.0	87.0	84.5	84.3	85.2
18:2	2.2	2.1	2.2	1.8	1.9	2.6	3.1	1.4	2.5	2.1	2.2
18:3	5.1	4.3	4.3	4.1	4.4	4.8	6.3	3.5	5.3	4.4	4.6
SFA (16:0+18:0)	7.5	7.9	7.6	7.7	7.5	7.7	8.7	8.1	7.7	9.2	8.0
PUFA (18:2+18:3)	7.3	6.4	6.5	5.9	6.3	7.4	9.3	4.9	7.7	6.5	6.8

[0257]

[0258] 해당 라인의 indel유형과 야생형 유전자 서열간 align한 결과 각 유전자에서 발생한 indel은 벡터에 삽입된 sgRNA에 의해 발생한 것으로 보인다(도 21a).

[0260] 3.2.1. pBAtC_4sg-1 T0 형질전환체

[0261] pBAtC_4sg의 1번 형질전환체의 경우 임의로 선택한 10개 종자에서 최소 29.3%, 최대 82.6%의 올레산 함량을 보였고 포화지방산은 팔미트산, 스테아르산을 합쳐서 최소 11.2%, 최대 23.7% 함량을 보였다.

[0262] [표 28]

[0263] pBatC_4sg-1 형질전환체 10개 종자의 올레산 및 포화지방산 함량 변화

pBatC_4sg-1										
WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
16:0	12.9	7.0	7.5	7.6	7.8	11.8	8.2	8.6	12.2	8.2
18:0	5.0	4.2	3.8	4.5	4.4	4.7	4.1	4.9	5.5	4.7
18:1	19.8	82.6	74.6	81.8	75.3	29.3	72.2	72.0	79.5	68.8
18:2	51.4	1.9	7.5	2.2	6.2	44.1	8.8	7.4	2.3	3.4
18:3	10.9	4.2	6.6	3.9	6.4	10.1	6.7	7.2	4.2	4.1
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

[0264]

[0266] 3.2.2. pBatC_4sg, T2 우수계통 형질전환체 종자 지방산 분석 및 타겟 유전자 indel 모양 분석

[0267] pBatC_4sg T2 세대 라인 중 올레산이 가장 높은 라인을 선발하고, 해당 라인의 indel 유형을 파악하기 위하여 해당 라인의 NGS 결과 파일을 분석하여 FAD2, FAD2-1, FATB_a, FATB_b 유전자의 야생형 서열과 align하였다 (도 21b). 야생형 콩의 경우 18:1의 함량과 포화지방산 함량 (16:0+18:0)이 10개 종자 평균 각각 20.8%, 16.7%의 수치를 보인 반면 지방산이 가장 우수했던 라인은 pBatC_4sg 10-4 #14 라인으로 올레산 (18:1)의 함량과 포화지방산 함량 (16:0+18:0)이 10개 종자 평균 각각 86.5%, 10%의 수치를 보였다 (표 29).

[0268] [표 29]

[0269] pBatC_4sg 10-4 #14 형질전환체 10개 종자의 올레산(18:1) 및 포화지방산(16:0+18:0)함량을 야생형 (WT)과 비교

WT											Average (N=10)
FA (%)											
16:0	12.6	12.4	12.6	13.5	13.5	12.6	12.5	12.5	12.9	12.8	12.8
18:0	3.5	3.5	3.5	4.3	4.3	4.7	3.7	4.3	4.1	3.4	3.9
18:1	19.5	24.5	21.8	22.0	21.5	20.3	21.2	18.7	18.1	20.0	20.8
18:2	50.7	48.7	51.5	48.5	48.7	51.6	53.1	54.7	51.8	53.1	51.2
18:3	13.8	11.0	10.6	11.6	12.0	10.9	9.5	9.8	13.1	10.7	11.3
SFA (16:0+18:0)	16.0	15.9	16.1	17.8	17.8	17.2	16.3	16.8	16.9	16.2	16.7
PUFA (18:2+18:3)	64.5	59.6	62.1	60.2	60.7	62.4	62.5	64.5	65.0	63.8	62.5

pBatC_4sg 10-4 #14											Average (N=10)
FA (%)											
16:0	7.4	6.2	6.4	6.4	6.6	7.2	6.9	6.7	7.1	7.1	6.8
18:0	3.1	3.7	3.0	2.9	3.0	3.2	3.1	3.3	3.2	3.2	3.2
18:1	86.5	88.0	84.2	85.2	85.3	87.2	84.5	87.8	87.9	87.9	86.5
18:2	0.7	0.4	1.9	1.8	1.4	0.5	1.8	0.4	0.3	0.4	1.0
18:3	2.2	1.7	4.5	3.8	3.7	1.8	3.7	1.8	1.4	1.5	2.6
SFA (16:0+18:0)	10.5	9.9	9.4	9.2	9.6	10.4	10.0	10.0	10.3	10.3	10.0
PUFA (18:2+18:3)	3.0	2.1	6.4	5.6	5.1	2.4	5.5	2.2	1.8	1.8	3.6

[0270]

[0271] 해당 라인의 indel유형과 야생형 유전자 서열간 align한 결과 각 유전자에서 발생한 indel은 벡터에 삽입된 sgRNA에 의해 발생한 것으로 보인다(도 21b).

[0273] 3.3.1. pBatC_6sg-11 T0 형질전환체

[0274] pBatC_6sg의 11번 형질전환체의 경우 임의로 선택한 10개 종자에서 최소 14.6%, 최대 84.5%의 올레산 함량을 보였고 포화지방산은 팔미트산, 스테아르산을 합쳐서 최소 11.6%, 최대 20.5% 함량을 보였다.

[0275] [표 30]

[0276] pBatC_6sg-11 형질전환체 10개 종자의 올레산 및 포화지방산 함량 변화

pBatC_6sg-11										
WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
16:0	12.9	7.5	7.5	13.8	8.2	14.9	7.6	8.8	13.6	9.1
18:0	5.0	4.1	4.8	6.7	5.7	6.8	5.7	6.1	6.6	5.5
18:1	19.8	81.7	84.3	15.1	83.2	24.3	84.5	81.8	14.6	80.8
18:2	51.4	3.0	1.2	51.3	0.9	44.7	0.5	0.9	52.2	1.1
18:3	10.9	3.8	2.2	13.1	2.1	9.3	1.8	2.4	13.0	2.2
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

[0277]

[0279] 3.2.2. pBatC_6sg, T1 우수계통 형질전환체 종자 지방산 분석 및 타겟 유전자 indel 모양 분석

[0280] pBatC_6sg T1 세대 라인중 올레산이 가장 높은 라인을 선발하고, 해당 라인의 indel 유형을 파악하기 위하여 해당 라인의 NGS 결과 파일을 분석하여 FAD2-2, 15G195200, 19G147400, FAD2, FAD2-1, FATB_a, FATB_b, 04G151600, 06G211300 유전자의 야생형 서열과 align하였다 (도 21c-d). 야생형 콩의 경우 18:1의 함량과 포화 지방산 함량 (16:0+18:0)이 10개 종자 평균 각각 20.8%, 16.7%의 수치를 보인 반면 지방산이 가장 우수했던 라인은 pBatC_6sg 4 #2 라인으로 18:1의 함량과 포화지방산 함량 (16:0+18:0)이 10개 종자 평균 각각 88.4%, 9.7%의 수치를 보였다 (표 31).

[0281] [표 31]

[0282] pBatC_6sg 4 #2 형질전환체 10개 종자의 올레산(18:1) 및 포화지방산(16:0+18:0)함량을 야생형 (WT)과 비교

FA (%)	WT										Average (N=10)
16:0	12.6	12.4	12.6	13.5	13.5	12.6	12.5	12.5	12.9	12.8	12.8
18:0	3.5	3.5	3.5	4.3	4.3	4.7	3.7	4.3	4.1	3.4	3.9
18:1	19.5	24.5	21.8	22.0	21.5	20.3	21.2	18.7	18.1	20.0	20.8
18:2	50.7	48.7	51.5	48.5	48.7	51.6	53.1	54.7	51.8	53.1	51.2
18:3	13.8	11.0	10.6	11.6	12.0	10.9	9.5	9.8	13.1	10.7	11.3
SFA (16:0+18:0)	16.0	15.9	16.1	17.8	17.8	17.2	16.3	16.8	16.9	16.2	16.7
PUFA (18:2+18:3)	64.5	59.6	62.1	60.2	60.7	62.4	62.5	64.5	65.0	63.8	62.5

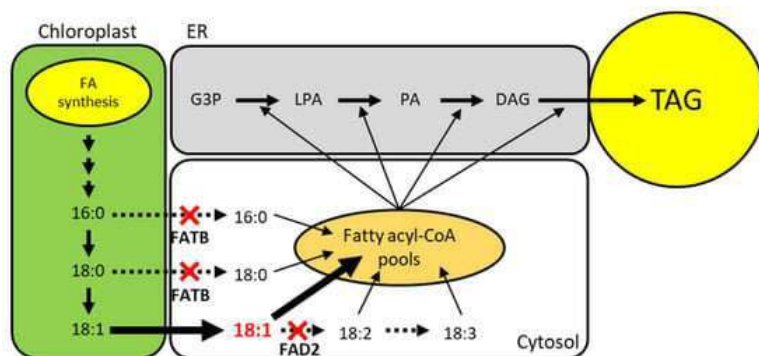
FA (%)	pBatC_6sg 4 #2										Average (N=10)
16:0	6.4	7.4	7.0	6.3	6.5	6.5	6.5	7.0	6.4	6.8	6.7
18:0	3.4	3.2	3.0	2.9	2.8	3.0	3.0	2.9	3.4	3.1	3.1
18:1	89.3	85.3	88.8	89.5	87.3	89.3	89.3	89.2	86.6	89.0	88.4
18:2	0.0	0.8	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0	0.2
18:3	1.0	3.4	1.2	1.2	2.8	1.3	1.1	0.9	2.9	1.1	1.7
SFA (16:0+18:0)	9.8	10.5	10.0	9.3	9.3	9.4	9.6	9.9	9.7	9.9	9.7
PUFA (18:2+18:3)	1.0	4.2	1.2	1.2	3.4	1.3	1.1	0.9	3.7	1.1	1.9

[0283]

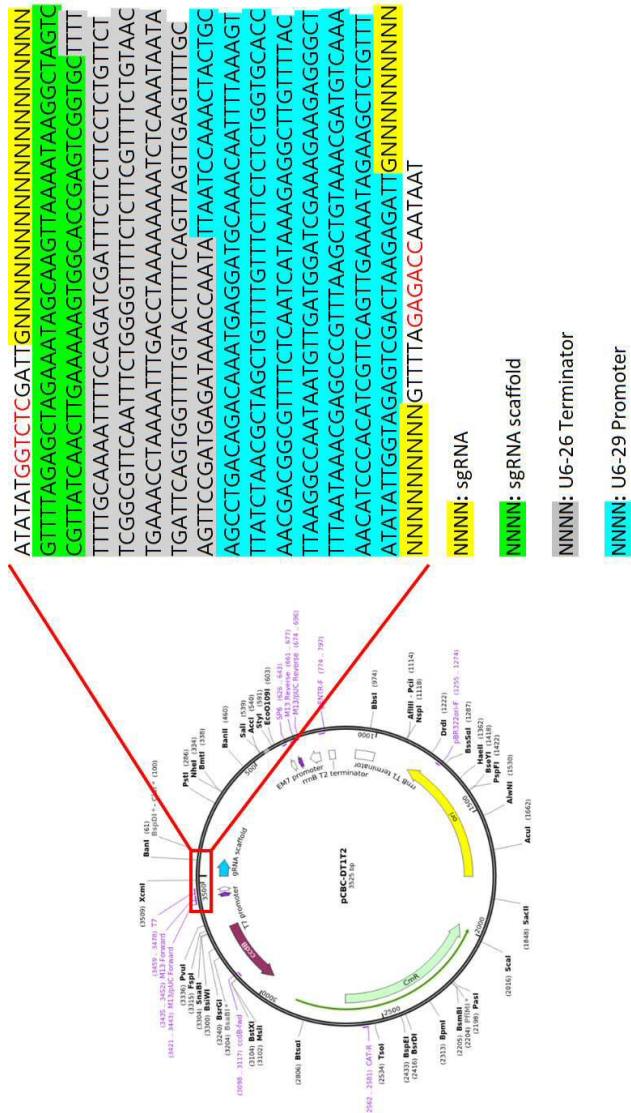
[0284] 해당 라인의 indel유형과 야생형 유전자 서열간 align한 결과 각 유전자에서 발생한 indel은 벡터에 삽입된 sgRNA에 의해 발생한 것으로 보인다(도 21c-d).

도면

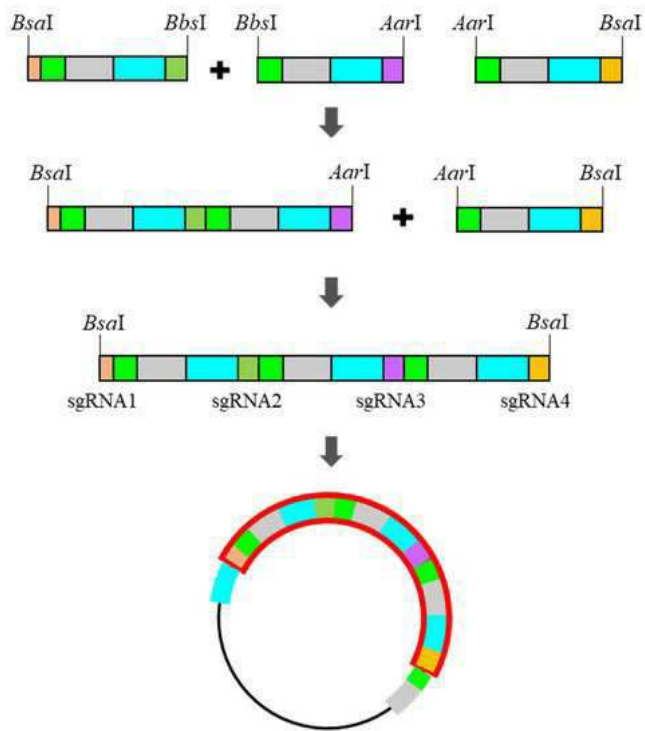
도면1



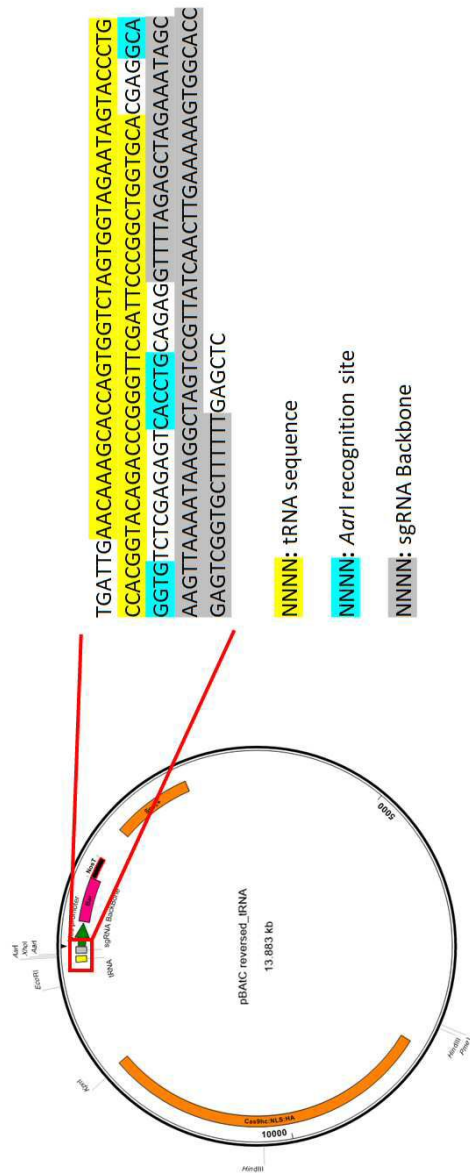
도면4



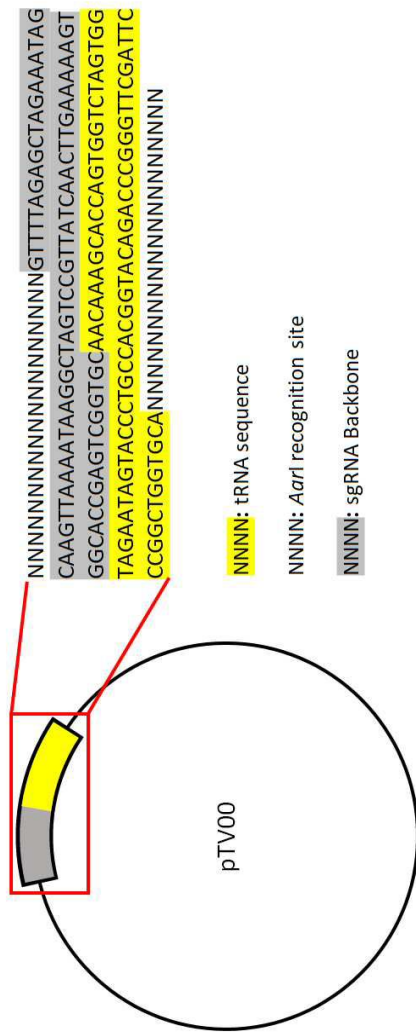
도면5



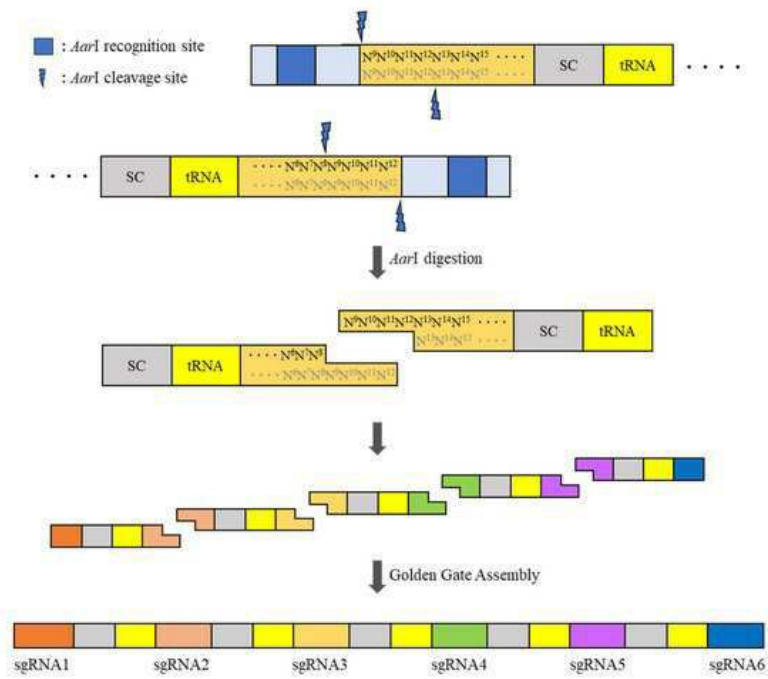
도면6



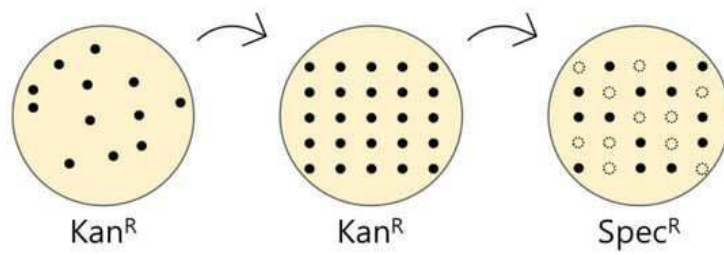
도면7



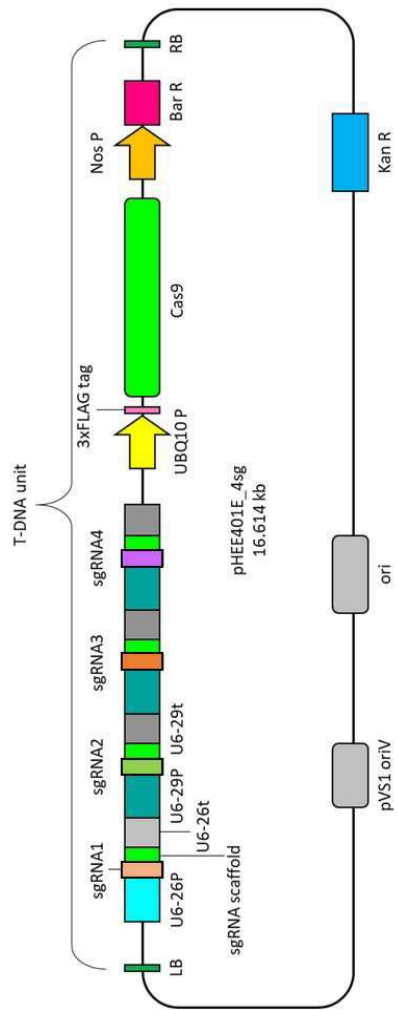
도면8



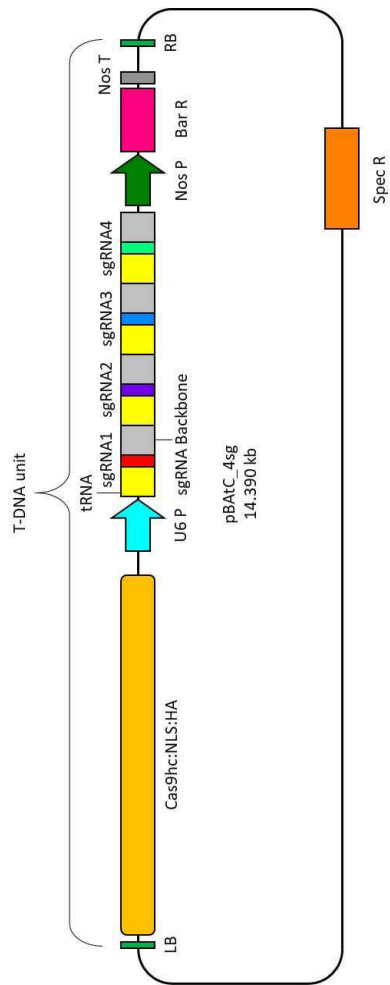
도면9



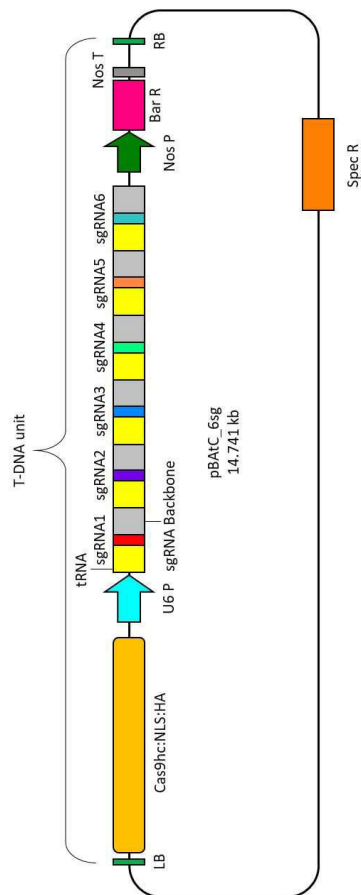
도면10a



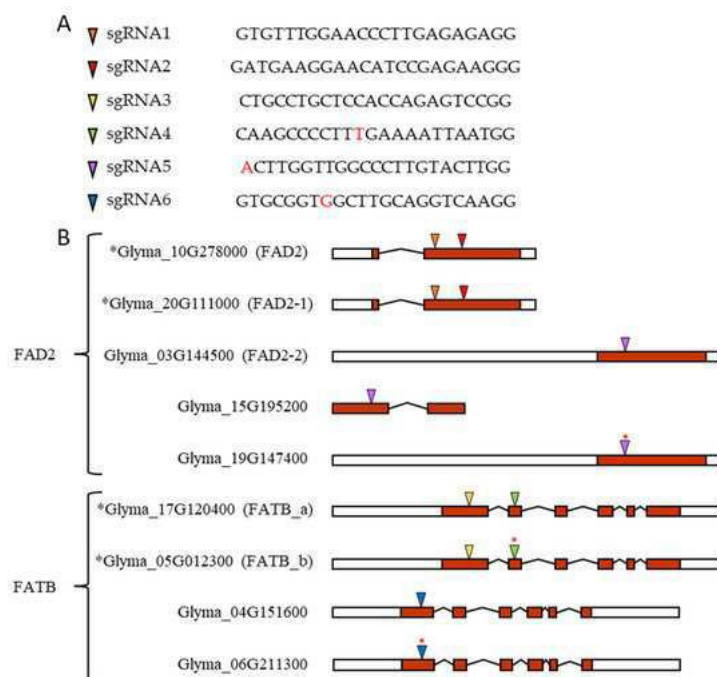
도면10b



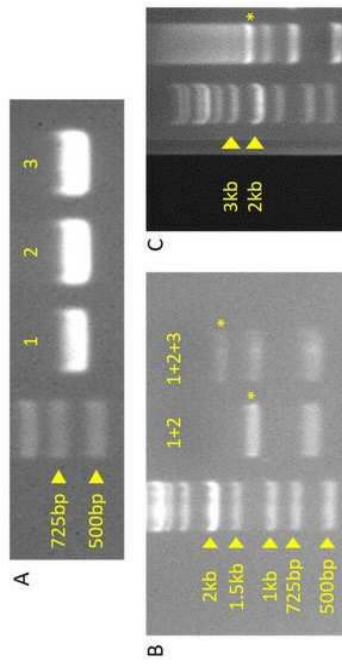
도면10c



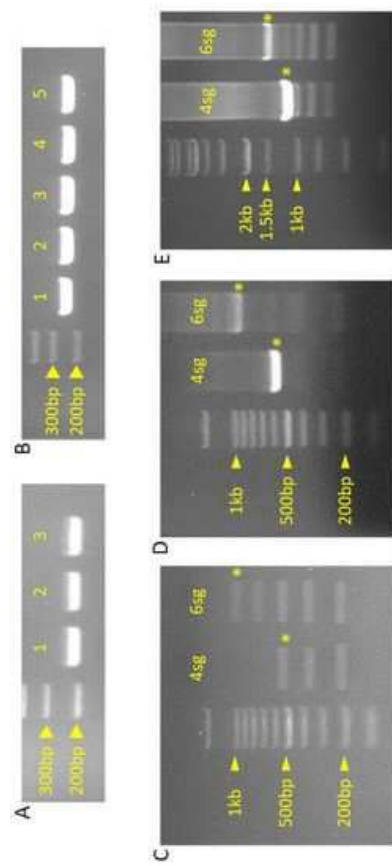
도면11



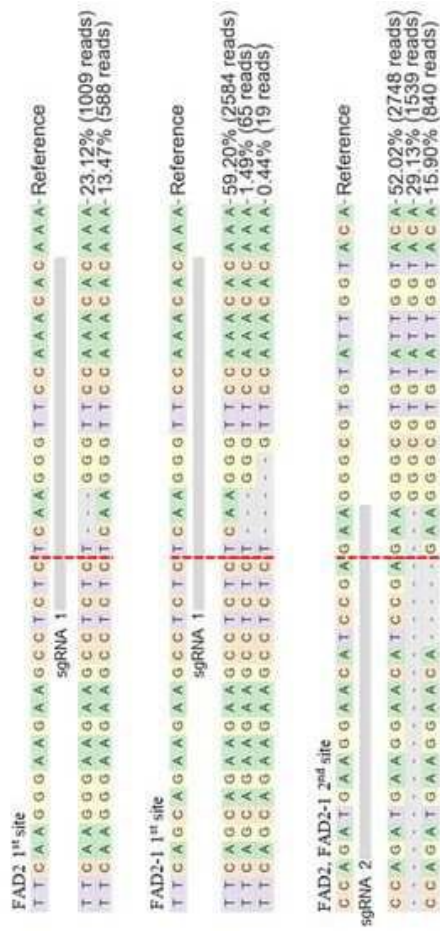
도면12



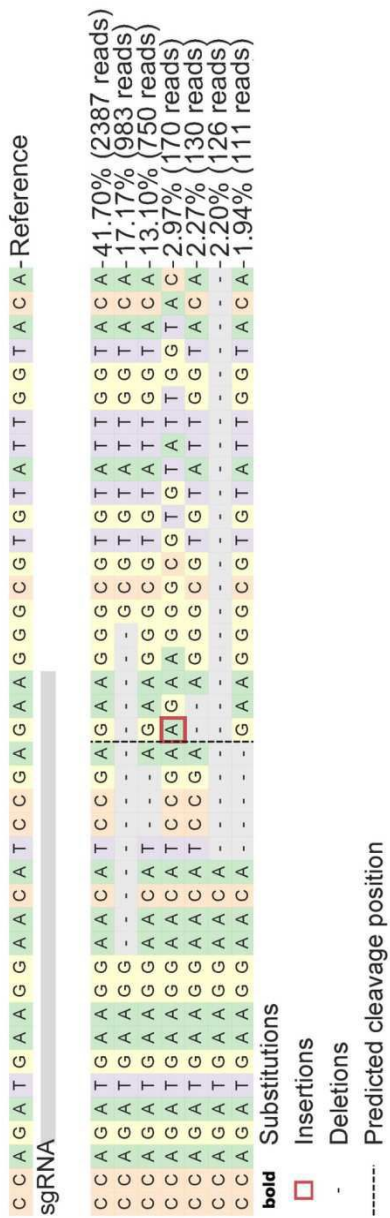
도면13



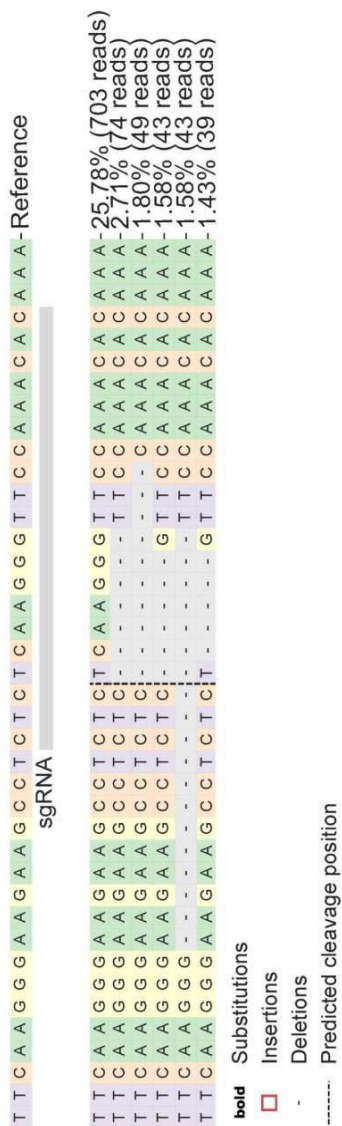
도면14



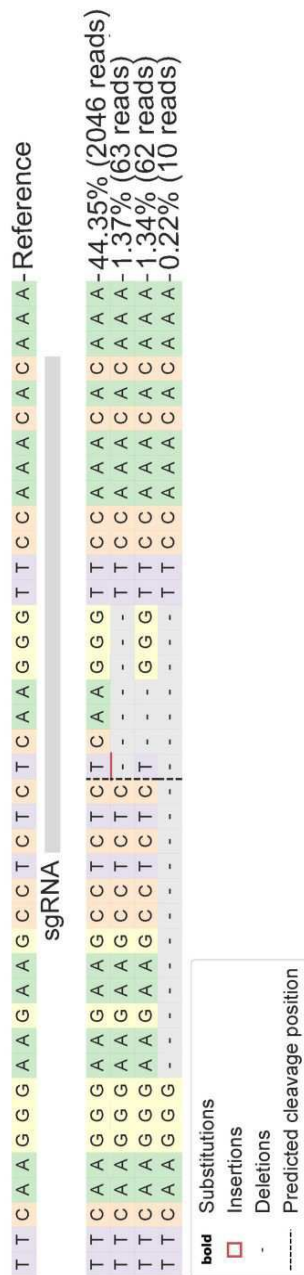
도면15



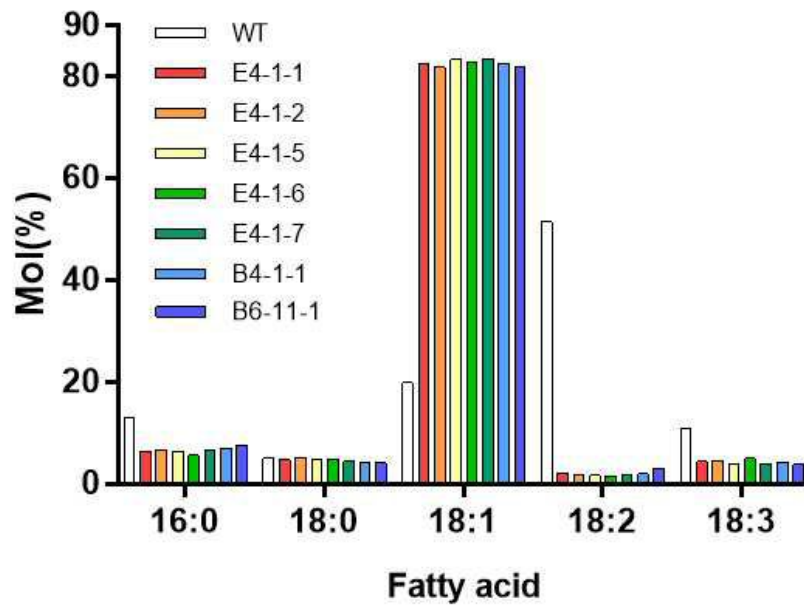
도면16



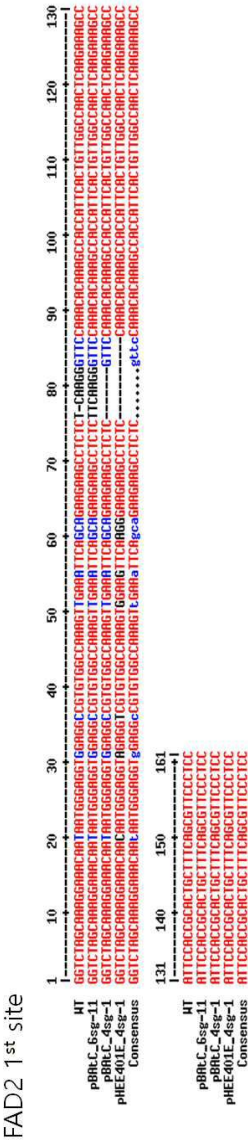
도면17



도면18

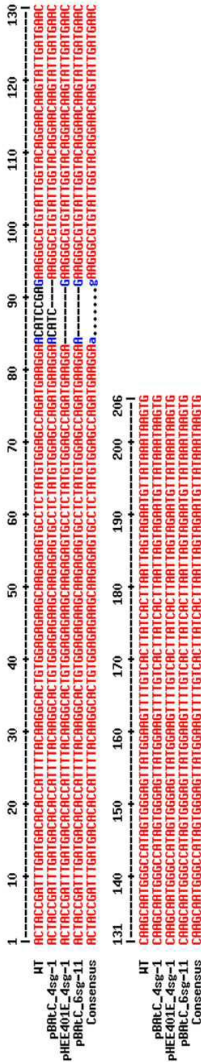


도면19a

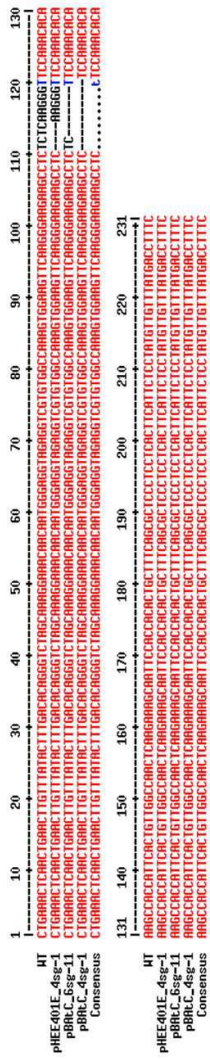


도면19b

FAD2 2nd site



도면 19c

FAD2-1 1st site

도면 19e

FAD2-2

1.3 1.2 1.1 1.0 0.9 0.8 0.7 0.6 0.5 0.4 0.3 0.2 0.1 0

 1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130

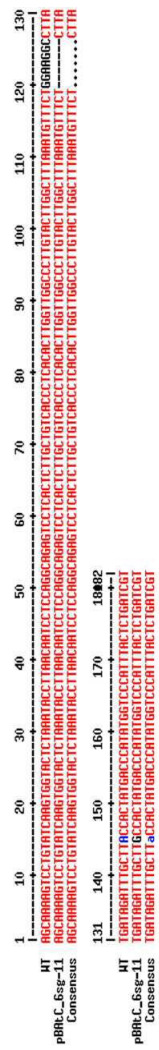
 AAGTCTGTATCAATGAGTGTACTTAAATACCTTAAACATCTCCGAGACCTCTACCTTCTGTCCACCTCAGACCTTGGTGGGCTTGGTGGCTTGGCTTGAAGGCTTATGATA

 Consensus

 AAGTCTGTATCAATGAGTGTACTTAAATACCTTAAACATCTCCGAGACCTCTACCTTCTGTCCACCTCAGACCTTGGTGGGCTTGGTGGCTTGGCTTGAAGGCTTATGATA

도면 19f

FAD2 GLYMA_15G195200



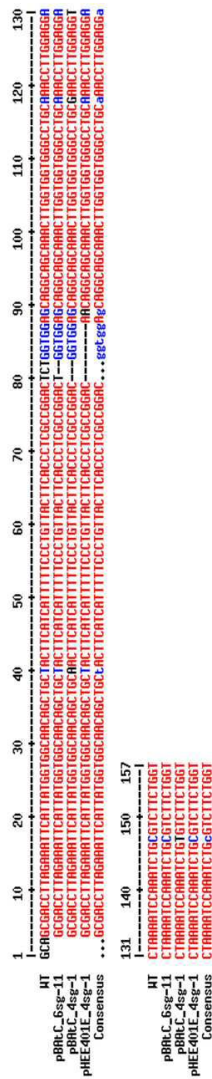
도면 19g

FAD2 19G147400



도면 19h

FATB_a 1st site

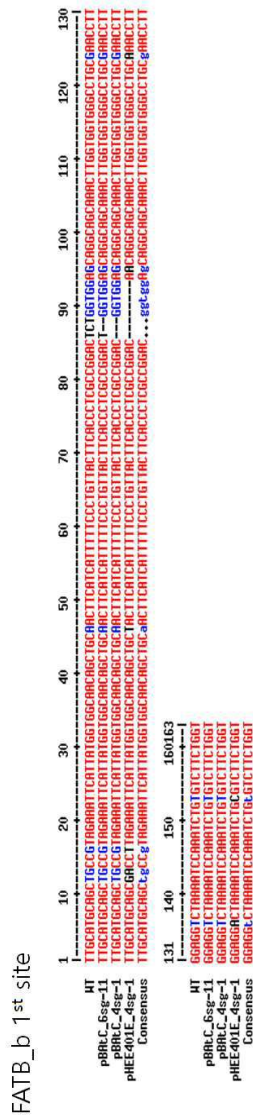


도면 19i

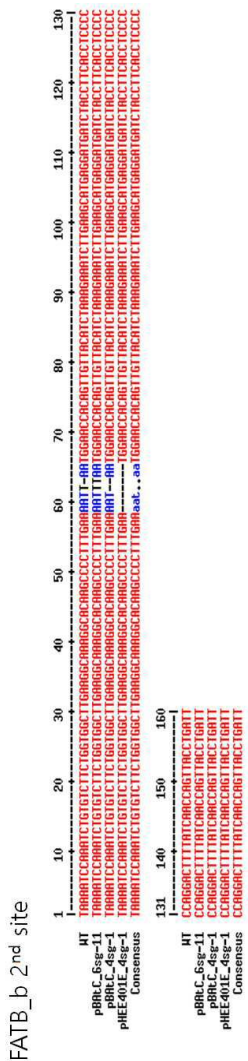
FATB_a 2nd site

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
 HT
 GAGGAC TAAATTC CCAATCT CGCTCTT CTGATGG TTTGAGG CCGAG CCCC TCAGAAAT TATGAGG CACAC AGT GTTACAT TAA GAAAGGCT TCAAGCAT GATGATG ATCTTGGC
 pBR-C₆sg-11
 GAGGAC TAAATTC CCAATCT CGCTCTT CTGATGG TTTGAGG CCGAG CCCC TCAGAAAT TATGAGG CACAC AGT GTTACAT TAA GAAAGGCT TCAAGCAT GATGATG ATCTTGGC
 pBR-C₄sg-1
 GAGGAC TAAATTC CCAATCT CGCTCTT CTGATGG TTTGAGG CCGAG CCCC TCAGAAAT TATGAGG CACAC AGT GTTACAT TAA GAAAGGCT TCAAGCAT GATGATG ATCTTGGC
 pHEE-401E₄sg-1
 GAGGAC TAAATTC CCAATCT CGCTCTT CTGATGG TTTGAGG CCGAG CCCC TCAGAAAT TATGAGG CACAC AGT GTTACAT TAA GAAAGGCT TCAAGCAT GATGATG ATCTTGGC
 Consensus
 GAGGAC TAAATTC CCAATCT CGCTCTT CTGATGG TTTGAGG CCGAG CCCC TCAGAAAT TATGAGG CACAC AGT GTTACAT TAA GAAAGGCT TCAAGCAT GATGATG ATCTTGGC
 131 140 150 161
 HT
 TCCCTCC CAGAAC TTTTATTC CAGCCAG GTTGCCT
 pBR-C₆sg-11
 TCCCTCC CAGAAC TTTTATTC CAGCCAG GTTGCCT
 pBR-C₄sg-1
 TCCCTCC CAGAAC TTTTATTC CAGCCAG GTTGCCT
 pHEE-401E₄sg-1
 TCCCTCC CAGAAC TTTTATTC CAGCCAG GTTGCCT
 Consensus
 TCCCTCC CAGAAC TTTTATTC CAGCCAG GTTGCCT

도면19j



도면19k



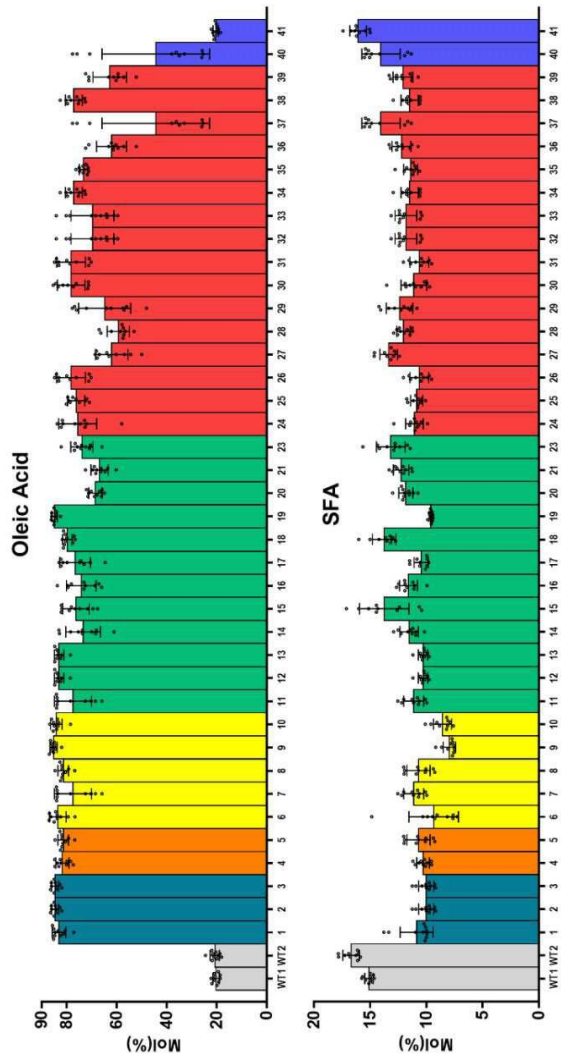
도면 191

FATB GLYMA_04G151600

pRR_C_Easy
 Consensus

pRR_C_Easy+
 Consensus

도면20



도면21a

<pHEE401E_4sg 1-5 #4>

FAD2 (10G278000)	WT	AGGGAAGAGCCCTCTCTCAAGGGTTCCAAACACA(AAAGCCACCA	998bp	Target1 PAM sgRNA1	Target2 sgRNA2 PAM	Deletion bases (bp)
	Indel	AGGGAAGAGCCCTC-----TTCCAAACACAAAGCCACCA			TGTGGAGCCAGATGAAGGAACATCCGAGATGGCGTGTATTGG	-19
FAD2-1 (20G111000)	WT	GCAGAGAGAGCCCTCTCTCAAGGGTTCCAAACACA(AAAGCCACCA	998bp	Target3 PAM sgRNA1	Target4 sgRNA2 PAM	Deletion bases (bp)
	Indel	GCAGAGAGAG-----54bpAGCC			TGTGGAGCCAGATGAAGGAACATCCGAGATGGCGTGTATTGG	-62
FATB_a (05G012300)	WT	TTCACCCCTCCCGGACTCTGTGGAGCAGGCA(GAAACTTTGGT	59bp	Target5 PAM sgRNA3	Target6 sgRNA4 PAM	Deletion bases (bp)
	Indel	TTCACCCCTCGCCGGAC-----AAGCAGGCAAGCAAACTTTGGT			GGCAAAGGCGCAAGCCCTTCGAAAAATTATGGAAACACAGTT	-8
FATB_b (17G120400)	WT	TTCACCCCTCCCGGACTCTGTGGAGCAGGCA(GAAACTTTGGT		Target7 PAM sgRNA3	Target8 sgRNA4 PAM	Deletion bases (bp)
	Indel	TTCACCCCTCGCCGGAC-----GGAGCAGGCAAGCAAACTTTGGT			GGCAAAGGCGCAAGCCCTTCGAAAAATTATGGAAACACAGTT	-8

도면21b

<pBatC_4sg 10-4 #14>

FAD2 (10G278000)	WT	AGGGAAGAAGCCTCTCTCAAGGGTTCCAAACAACAAGCCACCA	998bp	Target1 PAM sgRNA1	Target2 sgRNA2 PAM	Deletion bases (bp)
	Indel	AGGGAAGAAGCCTC-----AAGGGTTCCAAACAACAAGCCACCA			TGTGGAGCCGAGATGAAGGAACATCCGAGAGCGCGTGTATTGG	-4
FAD2-1 (20G111000)	WT	GCAGAAGAAGCCTCTCTCAAGGGTTCCAAACAACAAGCCACCA	998bp	Target3 PAM sgRNA1	Target4 sgRNA2 PAM	Deletion bases (bp)
	Indel	GCAGAAGAAGCCTCTC-----GTTCCAAACAACAAGCCACCA			TGTGGAGCCGAGATGAAGGAACATCCGAGAGCGCGTGTATTGG	-8
FATB_a (05G012300)	WT	TTCACCCCTCCCGGACTCTGTGGAGCAGGCACAAAACCTTGGT	59bp	Target5 PAM sgRNA3	Target6 sgRNA4 PAM	Deletion bases (bp)
	Indel	TTCACCCCTCCCGGACTCTGTGGAGCAGGCACAAAACCTTGGT			GGCAAAAGGCGCAAGCCCTTCGAAAAATTAATGGAAACACAGTT	-0
FATB_b (17G120400)	WT	TTCACCCCTCCCGGACTCTGTGGAGCAGGCACAAAACCTTGGT		Target7 PAM sgRNA3	Target8 sgRNA4 PAM	Deletion bases (bp)
	Indel	TTCACCCCTCCCGGACTCTGTGGAGCAGGCACAAAACCTTGGT			GGCAAAAGGCGCAAGCCCTTCGAAAAATTAATGGAAACACAGTT	-15

도면21d

		Target5	59bp	Target6	Deletion bases (bp)
		PAM sgRNA3		PAM sgRNA4	
WT		TTCACCCCTCGCCGACTCTCTGGTGGAGCAGCAGCAAAACTTTGGT		GGCAAGGCGAAGCCCTTCGAAAATTATGGCAACACAGTT	
FATB_a (05G012300)					
Indel		TTCACCCCTGGCGGATCTGTGGAGCAGCAGCAAACTTTGGT		GGCAAGGCGCAGCCCTTCGAAAATAATGGAACACAGTT	-0
Indel_2		TTCACCCCTGGCGGAT--GGTGGAGCAGCAGCAAACTTTGGT		GGCAAGGCGCAGCCCTTCGAAAATAATGGAACACAGTT	-2
		Target7		Target8	
		PAM sgRNA3		PAM sgRNA4	
WT		TTCACCCCTCGCCGACTCTCTGGTGGAGCAGCAGCAAACTTTGGT		GGCAAGGCGAAGCCCTTCGAAAATTATGGCAACACAGTT	
FATB_b (17G120400)					
Indel		TTCACCCCTGGCGGATCTGTGGAGCAGCAGCAAACTTTGGT		GGCAAGGCGCAGCCCTTCGAAAATAATGGAACACAGTT	-0
Indel_2		TTCACCCCTGGCGGAT--GGTGGAGCAGCAGCAAACTTTGGT		GGCAAGGCGCAGCCCTTCGAAAATAATGGAACACAGTT	-2
		Target12		Deletion bases (bp)	
		PAM sgRNA6			
WT		TCAACAGAAACAAGTTTGTGGTGGCTTCAGGTCAGC		GGCAAGGCGCAGCCCTTCG	
04G151600					
Indel		TCAACAGAAACAAGTTTGTGGTGGCTTCAGGTCAGCAGCAAGCCCTTCG			-0
		Target13		Deletion bases (bp)	
		PAM sgRNA6			
WT		TCAACAGAAACAAGTTTGTGGTGGCTTCAGGTCAGC		GGCAAGGCGCAGCCCTTCG	
06G211300					
Indel		TCAACAGAAACAAGTTTGTGGTGGCTTCAGGTCAGCAGCAAGCCCTTCG			-0

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.