



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0076425
(43) 공개일자 2025년05월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) C12N 15/10 (2017.01)
C12N 15/113 (2010.01) C12N 9/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8205 (2013.01)
C12N 15/102 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0167196
(22) 출원일자 2024년11월21일
심사청구일자 2024년11월21일
(30) 우선권주장
1020230161962 2023년11월21일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
주식회사놀라바이오
경상남도 진주시 진주대로 501, 27동 305 (가좌동)
(72) 발명자
김재연
경상남도 진주시 진주역로73번길 33, 104동 1401호 (가좌동, 센트럴웰가)
부디엔반
경상남도 진주시 내동로348번길 10, 110동 1102호 (가좌동, 가좌그린빌주공아파트)
(74) 대리인
최규환

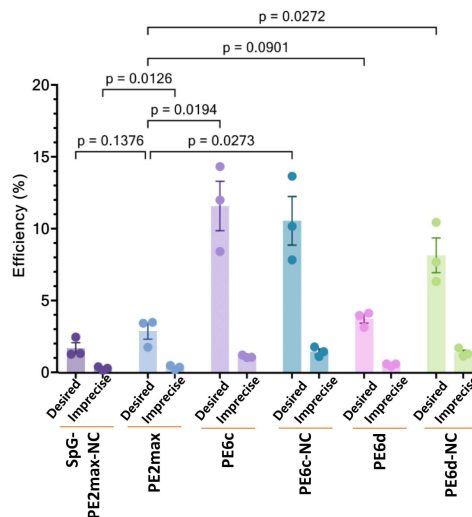
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 식물체에서 프라임 에디팅 효율을 증가시키는 방법

(57) 요약

본 발명은 식물체에서 프라임 에디팅 효율을 증가시키는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 U6 composite 프로모터에 의해 조절되는 프라임 에디팅 가이드 RNA (prime editing guide RNA, pegRNA) 발현 카세트; 및 프라임 에디터(Prime Editor) 발현 카세트;를 포함하는 바이러스 기반 레플리콘(replicon);을 포함하는, 교정 효율이 증가된 식물체 프라임 에디팅용 재조합 벡터 및 이의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도29



(52) CPC특허분류

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 9/22 (2025.05)

C12N 2310/20 (2025.05)

(72) 발명자

우엔티으언

경상남도 진주시 내동로348번길 10, 116동 1102호
(가좌동, 가좌그린빌주공아파트)

김지혜

경상남도 밀양시 내일중앙길 26-9 (내일동)

우웬호아이투

경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교 가좌캠퍼스 10동 416호 (가좌동)

송영중

경상남도 진주시 천수로298번길 10, 903호 (신안동, 대화리네르빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711174911
 과제번호 2022-주문연구창업-공공-SB1-01
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 (재단)과학기술일자리진흥원
 연구사업명 연구산업육성
 연구과제명 식물유전자교정기반 주문연구 서비스 및 BM 개발
 과제수행기관명 (주)놀라바이오
 연구기간 2022.04.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711181092
 과제번호 2021R1A5A8029490
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 집단연구지원
 연구과제명 향노화 바이오소재 세포공장 지역혁신연구센터
 과제수행기관명 경상국립대학교
 연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711182138
 과제번호 2022R1A2C3010331
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
 연구과제명 세포간 이동 유전자가위 활용 in planta 유전자교정
 과제수행기관명 경상국립대학교
 연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395075476
 과제번호 PJ016867022022
 부처명 농촌진흥청
 과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
 연구사업명 차세대농작물신육종기술개발사업
 연구과제명 유전자와 특이적인 유전자교정 기술 개발(2공동)
 과제수행기관명 경상국립대학교 산학협력단
 연구기간 2022.04.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711183464
 과제번호 2020M3A9I4038352
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 바이오의료기술개발
 연구과제명 유전자교정 도구 전달 효율증진 및 상동성수선(HDR) 기반 범용성 식물 유전체교정

활용 원천기술 개발

과제수행기관명 경상국립대학교
 연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345366491
 과제번호 2020R1A6A1A03044344
 부처명 교육부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 이공학학술연구기반구축
 연구과제명 식물생명공학연구소
 과제수행기관명 경상국립대학교
 연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

U6 composite 프로모터에 의해 조절되는 프라임 에디팅 가이드 RNA (prime editing guide RNA, pegRNA) 발현 카세트; 및 프라임 에디터(Prime Editor) 발현 카세트;를 포함하는 바이러스 기반 레플리콘(replicon);을 포함하는, 교정 효율이 증가된 식물체 프라임 에디팅용 재조합 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 바이러스는 Bean Yellow Dwarf virus (BeYDV), Maize Streak virus (MSV), Tobacco mosaic virus (TMV), Cauliflower mosaic virus (CaMV), Tobacco ringspot virus (TRSV), Tobacco etch virus (TEV), Potato spindle tuber viroid (PSTVd), Cucumber mosaic virus (CMV), Papaya ringspot virus (PRSV), Tobacco streak virus (TSV), Pea enation mosaic virus (PEMV), Potato virus X (PVX), Potato virus Y (PVY), Potato leafroll virus (PLRV), Cowpea mosaic virus (CPMV), Bean common mosaic virus (BCMV), Beet curly top virus (BCTV), Alfalfa mosaic virus (AMV), Tomato spotted wilt virus (TSWV), Beet yellows virus (BYV), Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV), Turnip yellow mosaic virus (TYMV), Tobacco vein mottling virus (TVMV), Soybean mosaic virus (SMV), Rice tungro bacilliform virus (RTBV), Rice stripe virus (RSV), Rice dwarf virus (RDV), Maize streak virus (MSV), Maize chlorotic mottle virus (MCMV), Maize dwarf mosaic virus (MDMV), Maize chlorotic dwarf virus (MCDV), Barley stripe mosaic virus (BSMV), Wheat streak mosaic virus (WSMV), Wheat dwarf virus (WDV) 또는 Wheat streak mosaic virus (WSMV)인 것을 특징으로 하는, 교정 효율이 증가된 식물체 프라임 에디팅용 재조합 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 U6 composite 프로모터는 서열번호 10의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 교정 효율이 증가된 식물체 프라임 에디팅용 재조합 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 프라임 에디터 발현 카세트는 CaMV 35S 프로모터와 EURb7 터미네이터에 의해 발현이 조절되는 것을 특징으로 하는 교정 효율이 증가된 식물체 프라임 에디팅용 재조합 벡터.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 프라임 에디터는 니카아제(nickase) Cas9 (CRISPR associated protein 9) 단백질, MMLV (Moloney murine leukemia virus) 역전사효소 및 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 단백질의 융합 단백질 1; 니카아제 Cas9 단백질 및 Tf1 Retrotransposon 역전사효소 단백질의 융합 단백질 2; 또는 니카아제 Cas9 단백질, Tf1 Retrotransposon 역전사효소 및 뉴클레오캡시드 단백질의 융합 단백질 3;인 것을 특징으로 하는, 교정 효율이 증가된 식물체 프라임 에디팅용 재조합 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 융합 단백질 1은 서열번호 255의 염기서열에 의해 코딩되는 것이고, 융합 단백질 2는 서열번호 260 또는 서열번호 264의 염기서열에 의해 코딩되는 것이고, 융합 단백질 3은 서열번호 261 또는 서열번호 265의 염기서열에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는, 교정 효율이 증가된 식물체 프라임 에디팅용 재조합 벡터.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 레플리콘은 선택 마커 발현 카세트를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 교정 효율이 증가된 식물체 프라임 에디팅용 재조합 벡터.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는, 식물체의 프라임 에디팅 효율 증진 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 형질전환은 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 또는 EHA105 superagro ver.2의 유전적 배경을 가진 균주 매개인 것을 특징으로 하는, 식물체의 프라임 에디팅 효율 증진 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 형질전환은 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 균주 매개 형질전환이며, 아그로박테리움 튜메파시엔스와 공배양 후 식물 조직을 30~35℃의 온도로 처리하는 것을 특징으로 하는, 식물체의 프라임 에디팅 효율 증진 방법.

청구항 11

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는, 식물체의 프라임 에디팅 교정 효율 증진용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식물체에서 프라임 에디팅(Prime Editing)의 효율을 증가시키기 위한 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 프라임 에디팅(Prime Editing, 프라임 편집)은 2019년 Anzalone 등(Nature 2019, 576, 149-157)에 의해 처음 설명된 CRISPR-Cas9 도구로서, 프라임 에디팅은 이중가닥 절단(double strand break, DSB)을 유도하지 않으며 모든 유형의 점 돌연변이, 삽입 및 삭제를 정확하게 교정할 수 있어, 인간 병원성 유전적 변이의 약 89%를 복구할 수 있는 잠재력이 있는 것으로 보고되었다.

[0003] 프라임 편집 기술에는 두 가지 주요 구성 요소가 필요한데, 첫 번째는 니카아제(nickase) Cas9 (nCas9)에 융합된 역전사 효소(reverse transcriptase)로 구성된 프라임 에디터(prime editor, PE) 단백질이고, 두 번째는 표적 위치로 PE를 가이드하고 원하는 교정을 위한 주형으로서 기능하는 프라임 에디터 가이드 RNA (prime editing guide RNA, pegRNA)이다. pegRNA는 역전사 효소의 도킹 사이트 역할을 하는 PBS (primer binding site)와 원하는 교정 정보를 포함하는 RTT (reverse transcription template)로 구성되어 있다.

[0004] Anzalone 등에 의한 PE의 첫 보고 후 다양한 유기체에서 PE의 개선과 적용이 보고되었다. 처음 PE 구성 요소의 모든 것이 최근에는 변형되고 새로운 특성이 추가되어 프라임 에디팅의 효율 향상을 가져왔다. 그러나, 식물체에서 PE 적용은 상이한 loci 및 식물 종(species) 간의 불일치를 나타냈고, 특히, 쌍자엽(dicot) 식물에서 프라임 에디팅의 효율을 개선하기 위해 여전히 많은 노력이 요구되고 있다.

[0005] 이에 본 발명에서는 식물체 특히, 쌍자엽 식물체에서 프라임 에디팅의 효율을 향상시키기 위한 방법을 제공하고 자 한다.

[0006] 한편, 한국공개특허 제2022-0112698호에는 '교정 효율이 개선된 프라임에디팅용 조성물'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2023-0075420호에는 'HIV 역전사효소 및 Cas9 또는 이의 변이체를 이용한 프라임 에디팅'이 개시되어 있으나, 본 발명의 '식물체에서 프라임 에디팅 효율을 증가시키는 방법'에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 식물체에서 프라임 에디팅의 효율(efficiency)을 증가시키기 위해 다양한 프라임 에디터(Prime Editor) 구성 단백질의 조합, 상기 프라임 에디터 구성 단백질 및/또는 pegRNA의 전사 조절 인자(프로모터, 터

미네이터)의 종류, 전달 시스템 등 다양한 조건을 실험하고 최적화된 조합을 제시하여 식물체에서 프라임 에디팅 효율을 증가시킬 수 있는 방법을 제공하고자 하였다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 U6 composite 프로모터에 의해 조절되는 프라임 에디팅 가이드 RNA (prime editing guide RNA, pegRNA) 발현 카세트; 및 프라임 에디터(Prime Editor) 발현 카세트;를 포함하는 바이러스 기반 레플리콘(replicon);을 포함하는, 교정 효율이 증가된 식물체 프라임 에디팅용 재조합 벡터를 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는, 식물체의 프라임 에디팅 효율 증진 방법을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는, 식물체의 프라임 에디팅 교정 효율 증진용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0011] 본 발명에 따른 방법을 사용하면 식물체, 특히 쌍자엽 식물체에서 프라임 에디팅의 효율을 향상시킬 수 있으므로, 본 발명의 방법은 정밀 유전자 편집 기술 기반 신종 품종 육종 분야에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 본 발명에서 사용된 프라임 에디터(PE) 발현 카세트의 모식도이다. p35S: CaMV 35S promoter, nCas9max: mutant SpCas9(R221K, N394K, D840A), nCas9: mutant SpCas9(D840A), MMLV-RT: mutant MMLV reverse transcriptase(D200N, T306K, W313F, T330P, L603W), MMLV-RT-△RnaseH: RNaseH domain truncated mutant MMLV reverse transcriptase(D200N, T306K, W313F, T330P, L603W), MHL1dn: truncated MLH1 D754-756 lacking endonuclease domain, NC: viral nucleocapsid protein, EURb7: EU + Rb7 dual terminator, MCP-MMLV-RT: MS2 coat protein fused MMLV-RT (MCP was cloned from pREDIT-MCP-RecT, MMLV RT is a tobacco codon-optimized MMLV RT from the PE2).

도 2 및 도 3은 본 발명의 실시 예에서 사용된 프라임 에디팅용 재조합 벡터의 모식도로, 도 2는 U6-26 core 프로모터에 의해 pegRNA의 발현이 조절되는 벡터이고, 도 3은 U6 composite 프로모터에 의해 pegRNA의 발현이 조절되는 벡터이다. Supp.gRNA는 *ALS1* 프라임 편집을 위한 pegRNA의 근접 위치에 결합하여 프라임 에디팅 반응을 보조하는 gRNA를 의미하는 것으로 서열번호 258의 염기서열로 이루어져 있으며, pegR1.6-MS2는 서열번호 257의 염기서열로 이루어져 있으며, pegR1.8은 Cas9 gRNA scaffold 서열(서열번호 258의 염기서열에서 92번째부터 177번째 염기에 해당)의 양 말단에 gRNA 및 RTT+PBS의 염기서열(표 1)이 연결되어 이루어져 있다.

도 4는 도 2 및 도 3의 재조합 벡터를 이용한 프라임 에디팅의 교정 효율 분석 결과이다. *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.0002$, ****: $p < 0.0001$.

도 5는 재분화된 식물체에서 의도된 프라임 에디팅의 빈도 및 효율을 분석한 결과이다. 그래프에서 y축 수치는 형질전환체(도 2 또는 도 3의 벡터로 형질전환된 떡잎 절편체로부터 재분화된 식물체 즉, PEO 이벤트를 의미)에서 표적 위치의 Sanger 시퀀싱에 의해 분석된 프라임 편집의 빈도(%)를 의미하고, 각 플랏의 상단에 표시된 수치는 식물 단계에서 의도된 프라임 편집의 효율을 의미하는 것으로, 의도된 프라임 편집을 수반하는 형질전환체의 수를 분석된 총 형질전환체 수로 나누어 계산하였다.

도 6은 일부 PEO 이벤트 식물체에서 레플리콘과 T-DNA의 존재 여부를 확인한 PCR 결과이다.

도 7은 아그로박테리움 균주에 따른 프라임 에디팅 효율 비교를 위해 사용된 재조합 벡터의 모식도이다.

도 8은 아그로박테리움 균주에 따른 프라임 에디팅 효율 분석 결과이다. *: $p < 0.05$.

도 9는 아그로박테리움 균주에 따른 프라임 에디팅 실험에서 재분화된 식물체에서 의도된 프라임 에디팅의 빈도 및 효율을 분석한 결과이다.

도 10은 T-DNA 또는 레플리콘 기반 재조합 벡터에 따른 프라임 에디팅 효율 비교를 위해 사용된 재조합 벡터의 모식도이다. pEL2B-3: Golden Gate endlinker (position 3).

도 11은 T-DNA 또는 레플리콘 기반 재조합 벡터에 따른 프라임 에디팅 효율 분석 결과이다. ****: $p < 0.0002$,

****: $p < 0.0001$.

도 12는 프라임 에디팅 수행 온도 조건에 따른 프라임 에디팅 효율 비교를 위해 사용된 재조합 벡터의 모식도이다.

도 13은 프라임 에디팅 수행 온도 조건에 따른 프라임 에디팅 효율 분석 결과이다. **: $p < 0.0021$, ***: $p < 0.0002$, ****: $p < 0.0001$.

도 14는 프라임 에디팅 수행 온도 조건에 따른 프라임 에디팅 실험에서 재분화된 식물체에서 의도된 프라임 에디팅의 빈도 및 효율을 분석한 결과이다.

도 15는 다양한 위치 및 자리에 대한 프라임 에디팅 효율 비교를 위해 사용된 재조합 벡터의 모식도이다. npegRNA는 tRNA(Gly)-표적 유전자의 gRNA-altered (F+E) SpCas9 gRNA scaffold-표적 유전자의 RTT-tevopreQ1-HDV 서열로 이루어진 것으로, 서열번호 259의 염기서열로 이루어져 있다.

도 16은 토마토 식물체의 다양한 표적 위치 및 자리에 대한 프라임 에디팅 효율 분석 결과이다.

도 17은 다른 터미네이터를 포함하는 프라임 에디터 발현 카세트의 모식도이다.

도 18은 프라임 에디터 발현 카세트의 터미네이터 종류에 따른 프라임 에디팅 효율 비교를 위해 사용된 재조합 벡터의 모식도이다.

도 19는 프라임 에디터 발현 카세트의 터미네이터 종류에 따른 프라임 에디팅 효율 분석 결과이다.

도 20은 다른 프로모터를 포함하는 프라임 에디터 발현 카세트의 모식도이다.

도 21은 프라임 에디터 발현 카세트의 프로모터 종류에 따른 프라임 에디팅 효율 비교를 위해 사용된 재조합 벡터의 모식도이다.

도 22는 프라임 에디터 발현 카세트의 프로모터 종류에 따른 프라임 에디팅 효율 분석 결과이다.

도 23은 RNA 샤페론 단백질의 유무, 종류 및 배열 순서가 상이한 프라임 에디터의 모식도이다.

도 24는 RNA 샤페론 단백질의 유무, 종류 및 배열 순서에 따른 프라임 에디팅 효율 비교를 위해 사용된 재조합 벡터의 모식도이다.

도 25는 RNA 샤페론 단백질의 유무, 종류 및 배열 순서에 따른 프라임 에디팅 효율 분석 결과이다.

도 26은 도 25의 결과에서 표적 위치의 편집 유형을 분석한 결과이다.

도 27은 PE2max와 다른 니카아제(nickase) Cas9 및/또는 역전사 효소를 포함하는 프라임 에디터 발현 카세트 PE6의 모식도이다. PE6c, PE6c-NC, PE6d, PE6d-NC, PE6ec, PE6ec-NC, PE6fc, PE6fc-NC, PE6gc 및 PE6gc-NC 프라임 에디터의 코딩 서열은 순차적으로 서열번호 260 내지 269의 염기서열로 이루어져 있다. nCas9max: mutant SpCas9(R221K, N394K, D840A), SpG-nCas9max: mutant SpCas9(R221K, N394K, H840A, D1135L, S1136W, G1218K, E1219Q, R1335Q, T1337R), evoTf1-RT: mutant Tf1 Retrotransposon reverse transcriptase(P70T, G72V, S87G, M102I, K106R, K118R, I128V, L158Q, F269L, A363V, K413E, S492N, S188K, I260L, S297Q, R288Q).

도 28은 PE6 프라임 에디터 발현 카세트의 종류에 따른 프라임 에디팅 효율 비교를 위해 사용된 재조합 벡터의 모식도이다.

도 29는 PE6 프라임 에디터 발현 카세트의 종류에 따른 프라임 에디팅 효율 분석 결과이다. PE2max가 비교대조군으로 사용되었다.

도 30은 PE2max-NC 프라임 에디터 및 PE6c 프라임 에디터의 프라임 에디팅 효율을 비교한 결과이다.

도 31은 PE6c 프라임 에디터의 증진된 에디팅 효율을 검증하기 위해 사용된 6종의 토마토 유전자를 표적으로 하는 재조합 벡터의 모식도이다.

도 32는 6종의 토마토 유전자를 표적으로 하는 PE6c 프라임 에디터의 프라임 에디팅 효율을 분석한 것으로, PE2max가 비교대조군으로 사용되었다.

도 33은 *SIHKT1;2* 유전자를 표적으로 하는, 다양한 PE6 프라임 에디터 발현 카세트를 포함하는 재조합 벡터의 모식도이다.

도 34는 다양한 PE 프라임 에디터를 이용한 *SIHKT1;2* 유전자 표적 프라임 에디팅 효율 분석 결과다.

도 35는 PE6c, PE6c-NC 또는 PE6ec-NC 프라임 에디터 발현 카세트를 포함하는 *SIOR*, *SICAB13* 및 *SICENH3(sub)* 유전자 표적 재조합 벡터의 모식도이다.

도 36은 3종의 토마토 유전자에 대한 PE6c, PE6c-NC 및 PE6ec-NC 프라임 에디터의 프라임 에디팅 효율을 분석한 것으로, PE2max가 비교대조군으로 사용되었다.

도 37은 애기장대 식물체를 대상으로 *AtPDS3* 유전자를 표적으로 하는 PE2max-NC, PE6c 또는 PE6c-NC 프라임 에디터의 에디팅 효율 분석 결과로, 사용된 재조합 벡터의 모식도와 프라임 에디팅 효율 분석 그래프이다.

도 38은 애기장대 식물체를 대상으로 *AtCENH3*, *AtOR* 및 *AtALS* 유전자를 표적으로 하는 PE2max-NC 또는 PE6c-NC 프라임 에디터의 에디팅 효율 분석 결과로, 사용된 재조합 벡터의 모식도와 프라임 에디팅 효율 분석 표이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 U6 composite 프로모터에 의해 조절되는 프라임 에디팅 가이드 RNA (prime editing guide RNA, pegRNA) 발현 카세트; 및 프라임 에디터(Prime Editor) 발현 카세트;를 포함하는 바이러스 기반 레플리콘(replicon);을 포함하는, 교정 효율이 증가된 식물체 프라임 에디팅용 재조합 벡터를 제공한다.
- [0014] 프라임 에디터(prime editor)는 CRISPR/Cas9에 기반을 둔 유전자가위 시스템의 일종으로, DNA 이중가닥 절단 없이 한 가닥의 DNA만 절단하여 유전자 변화를 도입할 수 있다. 상기 프라임 에디터는 Cas 니카아제(nickase)-역전사 효소(reverse transcriptase, RT) 융합 단백질 및 프라임에디팅 가이드 RNA (pegRNA)를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 프라임 에디팅의 효율을 향상시키기 위해 추가적인 도메인 또는 단백질이 상기 융합 단백질에 추가로 포함될 수 있다.
- [0015] 본 발명에서 용어 "pegRNA"는 표적 서열을 인식하는 가이드 서열(guide sequence 또는 spacer sequence), tracrRNA (trans-activating crisper RNA) 스캐폴드 서열, 역전사 개시에 필요한 프라이머 결합 부위(primer binding site, PBS) 및 원하는 유전적 변화를 포함하는 역전사 주형(reverse transcription template, RTT)을 포함한다. 또한, 상기 pegRNA는 pegRNA의 안정성을 향상시킬 수 있는 tevopreQ1 융합과 같은 변형된 형태도 포함될 수 있다.
- [0016] 상기 pegRNA에서 가이드 서열은 표적 부위를 지정하는 가이드 RNA 내의 서열을 지칭하며, 표적 서열과 전부 또는 일부 상보적인 서열을 포함한다. 상기 가이드 서열은 표적 DNA 서열과 혼성화하고, 표적 DNA 서열로의 유전자 편집 복합체의 서열-특이적 결합을 유도하기에 충분한, 표적 폴리뉴클레오티드 서열과의 상보성을 갖는 임의의 폴리뉴클레오티드 서열이다.
- [0017] 본 발명에 따른 재조합 벡터에 있어서, 상기 U6 composite 프로모터는 서열번호 10의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명에서 용어 "레플리콘(replicon)"은 자율적 제어를 하는 복제단위를 의미하는 것으로, 복제단위는 연속된 DNA 분자로, 복제는 분자 내의 특정 부위에서 개시하여 순차적으로 진행하여 종결한다. 플라스미드, 바이러스의 DNA 및 세균의 염색체는 모두가 1개의 복제단위이다.
- [0019] 본 발명에 따른 재조합 벡터에 있어서, 상기 바이러스 기반 레플리콘은 이에 한정되지 않으나, Bean Yellow Dwarf virus (BeYDV), Maize Streak virus (MSV), Tobacco mosaic virus (TMV), Cauliflower mosaic virus (CaMV), Tobacco ringspot virus (TRSV), Tobacco etch virus (TEV), Potato spindle tuber viroid (PSTVd), Cucumber mosaic virus (CMV), Papaya ringspot virus (PRSV), Tobacco streak virus (TSV), Pea enation mosaic virus (PEMV), Potato virus X (PVX), Potato virus Y (PVY), Potato leafroll virus (PLRV), Cowpea mosaic virus (CPMV), Bean common mosaic virus (BCMV), Beet curly top virus (BCTV), Alfalfa mosaic virus (AMV), Tomato spotted wilt virus (TSWV), Beet yellows virus (BYV), Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV), Turnip yellow mosaic virus (TYMV), Tobacco vein mottling virus (TVMV), Soybean mosaic virus (SMV), Rice tungro bacilliform virus (RTBV), Rice stripe virus (RSV), Rice dwarf virus (RDV), Maize streak virus (MSV), Maize chlorotic mottle virus (MCMV), Maize dwarf mosaic virus (MDMV), Maize chlorotic dwarf virus (MCDV), Barley stripe mosaic virus (BSMV), Wheat streak mosaic virus (WSMV), Wheat dwarf virus (WDV) 또는 Wheat streak mosaic virus (WSMV) 기반의 레플리콘일 수 있고, 바람직하게는

BeYDV 또는 MSV 등의 게미니바이러스(geminivirus) 기반 레플리콘일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0020] 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. 바이러스의 LIR은 복제원점 및 프로모터와 같은 기능을 가지고 있고, SIR은 터미네이터와 같은 기능을 가지고 있다. 상기 바이러스 기반의 레플리콘 벡터는 본 발명자의 이전 결과(한국등록특허 제2074744호)를 참고할 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 바이러스 기반 레플리콘은 T-DNA에 탑재되었고, 아그로박테리움을 통해 식물체에 주입된 후, 롤링 서클 복제를 통해 원형의 레플리콘을 만들고 탑재된 재조합 서열을 발현시키게 된다.
- [0022] 본 발명에 따른 재조합 벡터에 있어서, 상기 레플리콘은 프라임 에디터(Prime Editor) 발현 카세트 및 선택 마커 발현 카세트를 추가로 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 벡터에 있어서, 상기 프라임 에디터는 니카아제(nickase) Cas9 (CRISPR associated protein 9) 단백질, MMLV (Moloney murine leukemia virus) 역전사효소 및 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 단백질의 융합 단백질 1; 니카아제 Cas9 단백질 및 Tf1 Retrotransposon 역전사효소 단백질의 융합 단백질 2; 또는 니카아제 Cas9 단백질, Tf1 Retrotransposon 역전사효소 및 뉴클레오캡시드 단백질의 융합 단백질 3;일 수 있으며, 상기 융합 단백질 1은 서열번호 255의 염기서열에 의해 코딩되는 것일 수 있고, 상기 융합 단백질 2는 서열번호 260 또는 서열번호 264의 염기서열에 의해 코딩되는 것일 수 있으며, 상기 융합 단백질 3은 서열번호 261 또는 서열번호 265의 염기서열에 의해 코딩되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0024] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 서열번호 255의 염기서열에 의해 코딩되는 프라임 에디터는 PE2max-NC이고, 상기 서열번호 260의 염기서열에 의해 코딩되는 프라임 에디터는 PE6c이고, 상기 서열번호 264의 염기서열에 의해 코딩되는 프라임 에디터는 PE6ec이고, 상기 서열번호 261의 염기서열에 의해 코딩되는 프라임 에디터는 PE6c-NC이고, 상기 서열번호 265의 염기서열에 의해 코딩되는 프라임 에디터는 PE6ec-NC이다(도 23 및 도 27 참고).
- [0025] 또한, 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 PE2max-NC, PE6c 및 PE6c-NC 프라임 에디터의 니카아제 Cas9 단백질은 R221K, N394K 및 D840A 돌연변이를 가지는 SpCas9 (*Streptococcus pyogenes* Cas9)일 수 있고, 상기 PE6ec 및 PE6ec-NC 프라임 에디터의 니카아제 Cas9 단백질은 K775R, H840A 및 K918A 돌연변이를 가지는 SpCas9일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, R221K, N394K, H840A, D1135L, S1136W, G1218K, E1219Q, R1335Q 및 T1337R 돌연변이를 가지는 니카아제 Cas9 단백질(SpG-nCas9max, 서열번호 278의 염기서열로 암호화)도 사용될 수 있다.
- [0026] 또한, 상기 PE2max-NC 프라임 에디터의 MMLV 역전사효소는 D200N, T306K, W313F, T330P 및 L603W 돌연변이를 가지는 것일 수 있으며, 상기 PE6c, PE6ec, PE6c-NC 및 PE6ec-NC 프라임 에디터의 Tf1 Retrotransposon 역전사효소는 P70T, G72V, S87G, M102I, K106R, K118R, I128V, L158Q, F269L, A363V, K413E, S492N, S188K, I260L, S297Q 및 R288Q 돌연변이를 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0027] 본 발명의 일 구현 예에 따른 프라임 에디터 발현 카세트는 CaMV 35S 프로모터와 EURb7 터미네이터(EU + Rb7 dual terminator)에 의해 발현이 조절되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 본 발명에 따른 상기 프라임 에디터는 다른 요소들의 조합으로 이루어진 프라임 에디터보다 식물체에서 프라임 에디팅의 효율이 우수한 것이 특징이다.
- [0029] 또한, 본 발명에 따른 재조합 벡터에 있어서, 상기 선택마커는 벡터가 도입되어 형질전환된 세포를 선별하기 위한 것으로서, 약물 내성, 영양 요구성, 세포독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서는 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하므로 형질전환된 세포가 선별 가능하다.
- [0030] 본 발명에서 용어 "재조합"은 세포가 이중의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이중의 펩티드 또는 이중의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 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 것으로써 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.
- [0031] 또한, 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시

키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다.

- [0032] 본 발명에서 용어 "발현 카세트(expression cassette)"는 하나 이상의 유전자 및 이들의 발현을 조절하는 서열, 예를 들어 다양한 cis-작용 전사 조절 요소들의 임의의 조합을 포함하는 핵산 서열을 의미한다. 본 발명의 발현 카세트는 하기의 세 가지 주요한 요소를 포함한다: i) 프로모터; ii) 상기 프로모터에 작동가능하게 연결되고 상기 발현 카세트가 세포 내로 도입되는 경우 상기 프로모터에 의해 그 전사가 지시되는 것인 "코딩 폴리뉴클레오티드(coding polynucleotide)" 또는 "코딩 서열(coding sequence)(코딩 유전자라고도 함)"로 지칭될 수 있는 제2 폴리뉴클레오티드; 및 iii) 전사의 종료를 지시하고 상기 제2 폴리뉴클레오티드의 바로 하류에 위치하는 종결자(terminator) 폴리뉴클레오티드(전사종결인자라고도 함).
- [0033] 본 발명에 있어서, "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "항시성(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 항시성 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 항시성 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.
- [0034] 본 발명에서 상기 프로모터는 형질전환에 적합한 프로모터들로서, 바람직하게는 CaMV 35S 프로모터, U6-26 core 프로모터, U6 composite 프로모터, 액틴 프로모터, 유비퀴틴 프로모터, pEMU 프로모터, MAS 프로모터 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 본 발명에서, 터미네이터는 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 EURb7 (EU + Rb7 double terminator), t3T (EU + 35S + Rb7 triple terminator), 노팔린 합성효소(nopaline synthase, NOS) 터미네이터, 베타-아밀라아제 RAmY1 A 터미네이터, 파세올린(phaseolin) 터미네이터, 아그로박테리움 튜메파시엔스의 옥토파인 합성효소(octopine synthase) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는, 식물체의 프라임 에디팅 효율 증진 방법을 제공한다.
- [0037] 본 발명에 따른 식물체의 프라임 에디팅 효율 증진 방법에 있어서, 상기 재조합 벡터는 전술한 것과 같다.
- [0038] 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및 (또는) 조직 배양기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 중에 대해 일반적이다. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코딩된) 입자충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다.
- [0039] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에 있어서, 상기 형질전환은 아그로박테리움 튜메파시엔스 EHA105 또는 EHA105 superagro ver.2의 유전적 배경을 가진 균주 매개일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0040] 상기 형질전환은 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 균주 매개 형질전환이며, 아그로박테리움 튜메파시엔스와 공배양 후 식물 조직을 30~35℃의 온도로 처리할 수 있으며, 바람직하게는 30~32℃로 처리할 수 있으며, 더 바람직하게는 31℃로 처리할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0041] 식물의 형질전환에 이용되는 "식물세포"는 어떤 식물세포도 된다. 식물세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양기관 또는 전체 식물이다. "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다. 식물 조직은 인 플란타(in planta)이거나 기관 배양, 조직배양 또는 세포 배양 상태일 수 있다.
- [0042] 본 발명의 방법에 있어서, 형질전환된 식물세포는 전식물로 재분화되어야 한다. 상기 형질전환된 식물세포로부

터 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다. 캘러스 또는 원형질체 배양으로부터 성숙한 식물의 재분화를 위한 기술은 수많은 여러 가지 중에 대해서 당업계에 주지되어 있다.

[0043] 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는, 식물체의 프라임 에디팅 교정 효율 증진용 조성물을 제공한다.

[0044] 본 발명에 따른 조성물에 있어서, 상기 재조합 벡터는 전술한 것과 같다. 본 발명의 조성물은 식물체의 표적 부위에서 프라임 에디팅의 효율을 증진시키는 것이 특징이다.

[0046] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0048] 실험방법

[0049] 1. PE 단백질 요소들의 조합 및 플라스미드 구축

[0050] 본 발명에서 사용된 PE 단백질의 생산을 위해 플라스미드 pCMV-PEmax-P2A-hMLH1dn (Addgene #174828)으로부터 PE2max와 PE4max, ePEmax1의 nCas9(H840A), ePEmax2, ePEmax3의 nCas9와 eRT를 클로닝하였다. PPE-NC-v1의 nCas9는 nCas9-PPE 플라스미드(Addgene #140445)로부터 클로닝하였고, NC 및 RT는 pH-ePPE 플라스미드(Addgene #183097)로부터 클로닝하였다. pH-ePPE 플라스미드로부터 ePPE를 클로닝하였고, pH-ePPE 플라스미드로부터 ePEmax1, ePEmax2, ePEmax3 및 PE2max-NC에서 사용된 NC 서열을 클로닝하였다.

[0051] 기본 PE 발현 카세트의 경우 CaMV 35S 프로모터(p35S) (Addgene #50267)와 EU + Rb7 이중 터미네이터(EURB7) (Diamos and Mason, 2018, Plant Biotechnol J. 16:1971-1982)를 사용하여 전사를 제어하였다. 프로모터의 영향을 평가한 실험의 경우 EU + 35S + Rb7 삼중 터미네이터 (t3T)와 함께 여러 프로모터 (p35S, 이중 CaMV 35S 프로모터(p2x35S) (Addgene #50269) 및 토마토 EF1 α (PSLEF1 α) (Niu et al., Plant Biotechnol J. 2023, 21:5-7)를 사용하였다. PE 효율성에 대한 터미네이터 영향을 평가하기 위해 p35S를 여러 터미네이터 (t35S, tNOS, EURB7, t3T)와 결합하였다.

[0052] 수정된 epegRNA는 변경된 SpCas9 스캐폴드에서 epegRNA의 스캐폴드에 기본 변경사항을 도입하여 설계되었다 (Nelson et al., Nat Biotechnol. 2022, 40:402-410). pegRNA의 전사를 구동하기 위해 U6-26 코어 프로모터 (pU6-26 core) 또는 U6 composite 프로모터(Jiang et al., Genome Biol. 2020, 21:257)를 사용하였다. 편집된 부위/loci, gRNA 및 RTT 정보는 표 1에 자세히 나와있다. pegRNA는 PCR로 증폭되어 발현 카세트에 클로닝된 후 골든 게이트 어셈블리에 의해 바이너리 벡터로 결합되었다.

[0053] T-DNA 기반 PE 도구의 경우 선택 마커(NPTII, Addgene #51144), PE 단백질 및 pegRNA의 발현 카세트를 pAGM4723 플라스미드(Addgene #48015)에 클로닝하였고, 게미니바이러스 복제 시스템을 사용한 경우 앞서 보고한 pLSL.R.Ly 벡터에 발현 카세트를 클로닝하였다(Vu et al., Plant Biotechnol J. 2020, 18:2133-2143). 모든 바이오 부품[pNOS::NptII::tOCS (from pICSL11024, Addgene Plasmid #51144), PE2max(서열번호 1), PE4max(서열번호 2), PPE-NC-v1(서열번호 3), ePPE(서열번호 4), ePEmax1(서열번호 5), ePEmax2(서열번호 6), PE2max-NC(서열번호 255), ePEmax3(서열번호 256), 35S promoter(서열번호 7), U6-26 core promoter(서열번호 8), U6 composite promoter(서열번호 9), EU + Rb7 double terminator (EURb7; 서열번호 10), EU + 35S + Rb7 triple terminator (t3T; 서열번호 11)]은 Moclo(Weber et al., 2011, PLoS One. 6(2):e16765) 레벨 0 플라스미드로 길들여지고(domesticated) PE 단백질 조합 및 바이너리 벡터로 조립되었다.

표 1

The selected target sites/loci, gRNA, and RTT information

Gene/allele name	Accession no.	Targeted change	paired pegRNA	gRNA (5'-3')	RTT + PBS (5'-3')
SIALSI	SolyCD30M4330	P186S: +1 C to T; +3 A to T	Forward	CTATTACAGGTCAAGTGC	CAATCATCTCTCTa ga CACTTGACTT (서열번호 26)
		P186S: +4 T to A; +6 G to A	Reverse	TCAGTACCAATCATCTCTCT	GTGCTACACAGGTCAAGTCT ing AGGATGATGG (서열번호 27)
SIOR	SolyCD3093830	R95H: +1 AAG to CAT	-	GAGATAATATAGAGATAGG (서열번호 14)	AAATCTTGTTCT rag ACTTCTAATATTAAT (서열번호 28)
		G50E: +3 A to T; +5 GG to AA	Forward	AAAGAAAGGTTACAGGCCA (서열번호 15)	GAAGTGCACCT gntt a gg CCCTGTACGC (서열번호 29)
SICENH3	SolyCD16095650	G50del+T51Del: +4 GACACg del	-	AAAGAAAGGTTACAGGCCA (서열번호 15)	TCGAAGTGGC (C) GTGCTTGGCTGTACGC (서열번호 30)
		G50E: +1 CC to TT; +4 C to A	Reverse	TCTGGAAGTGCACACTGTCC (서열번호 16)	GGCTTACAGGCT gaa ACAGTGGCA (서열번호 31)
SICAB13	SolyCD76063600	AAATTGTGA insertion: +4 AAATTGTGA _{ins}	-	ATTGTGCAGAAACTTAGTG (서열번호 17)	AAATTAATGGACT TC CAATTTCAGTAAGTTCTTGC (서열번호 32)
SHKT1,2	SolyCD76014680	N217D: +10 A to G; +19 A to G; +21 T to C	-	ATCATCATGTTTTCATTGT (서열번호 18)	TATCAACCTTTGG g CTGTGGTTT GTTACCTACCAATGAACAATG (서열번호 33)
SIEPSP51	SolyCD16091190	T178I and P182S: +9 CA to TC; +20 C to T; +22 G to T	Forward	CAACTATCTCTGGAAATGC (서열번호 19)	TGCTGCTGTCA gag ATCGCAT g ATTCCTGCAATTCGAAGGAAT (서열번호 34)
		T178I and P182S: +4 C to A; +6 G to A; +16 TG to GA	Reverse	ACAGTAACTGCTGCTGCA (서열번호 20)	GAATATGCAAG atg GCATGCGT ttt TGACAGCAGCA (서열번호 35)
WUSCHEL, HOMEBOX 9/compound inflorescence (s)	SolyCD26077390	G69D (s-classic): +4 A to T; +6 GC to AT	-	CTTGAAAGCAATCTTTAATTC (서열번호 21)	GTGGATTCC cc CA ta CGAATTAAAGATTGCT (서열번호 36)
Jointless-2/SIMBP21	SolyCD126038510	Premature Q108stop: +1 C to T; +3 A to G; +5 G to T	-	AGCTCTCTCAACGTTCTCA (서열번호 22)	TCCTAATATCTTAC a CT a GAAGGTTGAA (서열번호 37)
		E140stop: +1 GAATGGCTTC del	-	TAGAGAAAGATGCTCTCGAA (서열번호 23)	AAAGATGATGGATT (G) GAAGGCCAT del JAGGAGCATAC (서열번호 38)
SIDMR6-1	SolyCD3080190	-	-	GTTCACACGGAAGTAAAMAC (서열번호 24)	GGAAACGAC a CT a CG a TTTACTTCGG (서열번호 39)
ALC (alobacea)	FJ404469	V106D: +2 A to T; +4 C to T; +7 C to T	-	AGAAAAACAGATGCTGGAA (서열번호 25)	TTTAATACCCMA AC(C) AG del JAAAGCTGAT CA T a CA g CTCTGG (서열번호 40)
PROCTRA D/DELA D allele	SolyCD116011260	AA6del (DELAAG to DELVAG): +2 A to T; +19 CTG del	-	-	-

표 2

Primers for cloning the PE protein parts

Seq. ID No.	Primer	Sequence (5'-3')	Length (nt)	PCR template
41	PEmax-F1	CAGTCGAAGACAAAATGaaacggacagccgacggaag	37	pCMV-PEmax-P2A-hMLH1dn
42	PEmax-Rev1	CATACGAAGACAAatcttcaatgttcaggggtcttcg	39	
43	PEmax-Fwd1	CAGTCGAAGACAAagatgagatagactgcatgaaacaagc	41	
44	PE2max-R1	CATACGAAGACAAAAGCttagtcagcttcactctcttagcgg	43	
45	PEmax-F1	CAGTCGAAGACAAAATGaaacggacagccgacggaag	37	
46	PEmax-Rev1	CATACGAAGACAAatcttcaatgttcaggggtcttcg	39	
47	PEmax-Fwd1	CAGTCGAAGACAAagatgagatagactgcatgaaacaagc	41	
48	PE4max-Rev2	CATACGAAGACAAAttgatcacctcgccggcgg	34	
49	PE4max-Fwd2	CAGTCGAAGACAAcaAagacctgccaatgcaataaagga	39	
50	PE4max-R1	CATACGAAGACAAAAGCttacaccttcttctcttcgggctgccgaaacattataaaggctcgggcagc	72	
51	PEmax-F1	CAGTCGAAGACAAAATGaaacggacagccgacggaag	37	nCas9-PPE
52	nCas9max-R2	CATACGAAGACAACGAaccacgcctcgaattcagagccgtcgg	45	
53	nC9PPE-F1	CAGTCGAAGACAAaatgcctaagaaaaagagaaaaagtgacaagaagtactcgatcggcctc	62	pH-ePPE
54	nC9PPE-Rev3	CAGTCGAAGACAAtcactgtgcatggagagaacc	36	
55	nC9PPE-Fwd3	CAGTCGAAGACAAtgaaatctcgtcaaaaagacagaggt	39	
56	nC9PPE-Rev4	CAGTCGAAGACAAtatctccacgcgctgttga	34	
57	nC9PPE-Fwd4	CAGTCGAAGACAAtatctccacgcgctgttga	33	nCas9-PPE
58	ePPE-R1	CAGTCGAAGACAAAAGCtcacaccttcttctcttcgggctgccgcccgtga	57	
59	nC9PPE-F1	CAGTCGAAGACAAaatgcctaagaaaaagagaaaaagtgacaagaagtactcgatcggcctc	62	pH-ePPE
60	nC9PPE-Rev3	CAGTCGAAGACAAtcactgtgcatggagagaacc	36	
61	nC9PPE-Fwd3	CAGTCGAAGACAAtgaaatctcgtcaaaaagacagaggt	39	
62	ePPE-R2	CATACGAAGACAACGAacaaaggaggatgtttgtgccttg	42	
63	PPE-F1	CAGTCGAAGACAATTCGccaaagaagaagcggaaggtggagctcagcgga gga	53	
64	nC9PPE-Rev4	CAGTCGAAGACAAtatctccacgcgctgttga	34	
65	nC9PPE-Fwd4	CAGTCGAAGACAAtatctccacgcgctgttga	33	
66	ePPE-R1	CAGTCGAAGACAAAAGCtcacaccttcttctcttcgggctgccgcccgtga	57	
67	eNCRT-F1	CAGTCGAAGACAATTCGgccacagtggtgtccggccaa	38	
68	nC9PPE-Rev4	CAGTCGAAGACAAtatctccacgcgctgttga	34	PE2max
69	nC9PPE-Fwd4	CAGTCGAAGACAAtatctccacgcgctgttga	33	
70	ePPE-R1	CAGTCGAAGACAAAAGCtcacaccttcttctcttcgggctgccgcccgtga	57	ePPE
71	PEmax-F1	CAGTCGAAGACAAAATGaaacggacagccgacggaag	37	
72	PEmax-Rev2	CATACGAAGACAAtggcgtccagcttcactcttagcgg	40	PE2max
73	NC-Fwd1	CAGTCGAAGACAAGccacagtggtgtccggccaa	34	
74	NC-R1	CATACGAAGACAAAAGCtaaaaggaggatgtttgtgccttg	43	ePPE
75	PEmax-F1	CAGTCGAAGACAAAATGaaacggacagccgacggaag	37	
76	PEmax-Rev3	CATACGAAGACAAtggcgtctcgaattcagagccgtcg	33	ePPE
77	NC-Fwd1	CAGTCGAAGACAAGccacagtggtgtccggccaa	38	
78	NC-Rev2	CAGTCGAAGACAAGggtaggcctagatcctc	33	PE2max
79	PEmax-Fwd2	CAGTCGAAGACAaccctgaacattgaagatgagatag	38	
80	ePE2max-Rev1	CATACGAAGACAacagacaggggctgacgtcaggt	37	
81	ePE2max-Fwd1	CAGTCGAAGACAAtctggcggctcaaaaagaaccg	35	
82	PE2max-R1	CATACGAAGACAAAAGCTTAGTCCAGTCTCACTCTTATAGCGG	43	pSIEF1α-ABE8e-nCas9-NG
83	pSIEF1a-F1	CAGTCGAAGACAAGGAGGATTAGTTTGTCAAATAGTAGATTTC	43	
84	pSIEF1a-Rev1	CATACGAAGACAAGAACTCTAAATTAATTTTACTCTTT	39	
85	pSIEF1a-Fwd1	CAGTCGAAGACAAGTTCTACTGcCTTCAAATTTCTATTT	39	
86	pSIEF1a-Rev2	CATACGAAGACAATCATCTAGTAAACAACCTGAAAAAC	39	
87	pSIEF1a-Fwd2	CAGTCGAAGACAATGATTTTCACTGTCTcCTTGTTAGAT	39	
88	pSIEF1a-R2	CATACGAAGACAACATTCTTGAGACACTAAGAACTGCAT	40	

[0055]

표 3

Primers for cloning pegRNAs

Seq. ID No.	Primer	Sequence (5'-3')	Length (nt)	For cloning
89	npegR-ALS1-F1	CAGTCGAAGACAATGCACTATTACAGGTCAAGTGCCA	37	ALS1 gRNA, forward
90	npegR-ALS1-R1	CAGTCGAAGACAAAACTGGCACTTGACCTGTAATAG	37	
91	2gRNA-ALS1-F1	CAGTCGAAGACAATGCACTAACCCTAGGCGTTTCCGTTTAAGA GCTATGCTGGAACAGC	62	ALS1 supporting gRNA
92	2gRNA-ALS1-	CAGTCGAAGACAACGCGGCACCGACTCGGTGCGACTT	37	
93	PBR1-ALS1-F1	CAGTCGAAGACAAGTGCCAATCATCTCTAGACACTTGA	40	ALS1 RTT, forward
94	PBR1-ALS1-R1	CAGTCGAAGACAACGCGAGGTCAAGTGCTTAGGAGGATGA	40	
95	ncrU6C1-F2	CAGTCGGTCTCAGGAGAAGTTGAAAAAATCTTCAAAAGTCCCA	44	the ALS1 pegRNA expression cassette using nU6-26 core
96	HDV-7T-R2	CAGTCGGTCTCAAGCGAAAAAAGTCCCATTGCGCATGCC	41	
97	npegR-OR-F1	CAGTCGAAGACAATGCAGAGATAATATTAGAAGTAGG	37	OR gRNA
98	npegR-OR-R1	CAGTCGAAGACAAAAACCTACTTCTAATATTATCTC	37	
99	PBR1-OR-F1	CAGTCGAAGACAAGTGCAATATCTTGTCTatgACTTCTAATAT	45	OR RTT
100	PBR1-OR-R1	CAGTCGAAGACAACGCGATAATATTAGAAGTcatAGGAACAAGAT	45	
101	npegR-CENH3-	CAGTCGAAGACAATGCAAAAAAGCGTTACAGGCCA	37	CENH3 gRNA, forward
102	npegR-CENH3-	CAGTCGAAGACAAAACTGGCCTGTAACGTTCTTTT	37	
103	PBR1-CENH3-	CAGTCGAAGACAAGTGCGAAGTGCCACTGTTtCaGGCCTGTA	42	CENH3 RTT
104	PBR1-CENH3-	CAGTCGAAGACAACGCGGCGTTACAGGCCGtaACAGTGGCA	42	
105	PBR2-CENH3-	CAGTCGAAGACAAGTGCTCGAAGTGCCACTGGCCTGTAAC	40	CENH3 RTT del
106	PBR2-CENH3-	CAGTCGAAGACAACGCGGCGTTACAGGCCAGTGGCACTTC	40	
107	npegR-CAB13-	CAGTCGAAGACAATGCAATTGTGCAAGAACTTAGTG	37	CAB13 gRNA
108	npegR-CAB13-	CAGTCGAAGACAAAAACCACTAAGTTTCTTGCACAAT	37	
109	PBR1-CAB13-F1	CAGTCGAAGACAAGTGCAATTAATTGGACCTCACAATTTTCACTAA GT	48	CAB13 RTT
110	PBR1-CAB13-R1	CAGTCGAAGACAACGCGGCAAGAACTTAGTGAAAATTGTGAGG TCCA	48	
111	npegR-HKT12-	CAGTCGAAGACAATGCAATCATCATGTTTTTCATTTGT	37	HKT12 gRNA
112	npegR-HKT12-	CAGTCGAAGACAAAAACACAAATGAAAACATGATGAT	37	
113	PBR1-HKT12-F1	CAGTCGAAGACAAGTGCTATCAACTTTTGCAgAcTGTGGTTTcTAC CTAC	51	HKT12 RTT
114	PBR1-HKT12-R1	CAGTCGAAGACAACGCGCATGTTTTTCATTTGTAGGTAaGAAACCA CAgTcT	51	
115	npegR-EPSPS1-	CAGTCGAAGACAATGCACAACCTATTCCTTGAAATGC	37	EPSPS1 gRNA, forward
116	npegR-EPSPS1-	CAGTCGAAGACAAAAACGCATTCCAAGGAATAGTTG	37	
117	PBR1-EPSPS1-F1	CAGTCGAAGACAAGTGCTGCTGCTGTCaAagaACGCATTGCgaTTC CTGC	50	EPSPS1 RTT, forward pegRNA
118	PBR1-EPSPS1-R1	CAGTCGAAGACAACGCGTTCCTTGAAATGCAGGAAtcGCAATGC GTtct	50	
119	npegR-WH9-F1	CAGTCGAAGACAATGCACTTGAAGCAATCTTTAATTC	37	WH9 gRNA
120	npegR-WH9-	CAGTCGAAGACAAAAACGAATTAAAGATTGCTTCAAG	37	
121	PBR1-WH9-F1	CAGTCGAAGACAAGTGCGTGATTCCACATatCaGAATTAAAGAT	45	WH9 RTT
122	PBR1-WH9-R1	CAGTCGAAGACAACGCGAGCAATCTTTAATTCTGatATGGTGAAT	45	
123	npegR-MBP21-	CAGTCGAAGACAATGCAAGCTCCTTCAACGTTCTCAA	37	MBP21 gRNA
124	npegR-MBP21-	CAGTCGAAGACAAAACTTGAGAACGTTGAAGGAGCT	37	
125	PBR1-MBP21-	CAGTCGAAGACAAGTGCTCACTAATATCTTACaTcTaAGAACGT	44	MBP21 RTT
126	PBR1-MBP21-	CAGTCGAAGACAACGCGTTCAACGTTCTtAgAtGTAAGATATTAG	45	
127	npegR-DMR6-	CAGTCGAAGACAATGCATAGAGAAGTATGCTCCTGAA	37	DMR6 gRNA
128	npegR-DMR6-	CAGTCGAAGACAAAACTTCAGGAGCATACTTCTCTA	37	
129	PBR1-DMR6-F1	CAGTCGAAGACAAGTGCAAGATGATGGATTAAGGAGCATAC	41	DMR6 RTT
130	PBR1-DMR6-	CAGTCGAAGACAACGCGGTATGCTCCTTAATCCATCATCT	40	
131	npegR-ALC-F1	CAGTCGAAGACAATGCAGTTCACCGGAAGTAAAAAC	37	ALC gRNA

[0056]

표 4

Primers for cloning pegRNAs

Seq. ID No.	Primer	Sequence (5'-3')	Length (nt)	For cloning
132	npegR-ALC-R1	CAGTCGAAGACAAAAACGTTTTTACTTCCGGTGGAAC	37	ALC gRNA
133	PBR1-ALC-F1	CAGTCGAAGACAAGTGCggaaccgacaaAccAgAttttacttc	43	ALC RTT
134	PBR1-ALC-R1	CAGTCGAAGACAACGCGcgggaagtaaaaTcTggTttgtcggtt	43	
135	npegR-PRD-F1	CAGTCGAAGACAATGCAAGAAAAACAGATGCTGGAA	37	PRD gRNA
136	npegR-PRD-R1	CAGTCGAAGACAAAACTTCCAGCATCTGGTTTTTCT	37	
137	PBR1-PRD-F1	CAGTCGAAGACAAGTGCTTTATAACCCAAAACTAAAGCTCATCC ATaCC	50	PRD RTT
138	PBR1-PRD-R1	CAGTCGAAGACAACGCGCCAGATGCTGGtATGGATGAGCTTTTAG TTTTG	50	
139	ALS1-Pr1r-F1	CAGTCGAAGACAATGCATCAGTACCAATCATCCTCCT	37	ALS1 gRNA,
140	ALS1-Pr1r-R1	CAGTCGAAGACAAAAACAGGAGGATGATTGGTACTGA	37	reverse
141	rPBR1-ALS1-F1	CAGTCGAAGACAAGTGCTACAGGTCAAGTgtcTAGGAGGATG	42	ALS1 RTT,
142	rPBR1-ALS1-R1	CAGTCGAAGACAACGCGCCAATCATCTCCTTaGaCACTTGACC	43	reverse
143	pegR-CENH3r-	CAGTCGAAGACAATGCATCTCGAAGTGCCACTGTCCC	37	CENH3 gRNA,
144	pegR-CENH3r-	CAGTCGAAGACAAAAACGGGACAGTGGCACTTCGAGA	37	reverse
145	PBR1-CENH3r-	CAGTCGAAGACAAGTGCGCGTTACAGGCCtGaaACAGTGGCA	42	CENH3 RTT,
146	PBR1-CENH3r-	CAGTCGAAGACAACGCGTGCCACTGTtCaGGCCTGTAACGC	42	reverse
147	pegR-EPSPS1-F1	CAGTCGAAGACAATGCAACAGTAAGTCTGCTGTCAA	37	EPSPS1 gRNA,
148	pegR-EPSPS1-R1	CAGTCGAAGACAAAACTTGACAGCAGCAGTACTGT	37	reverse
149	PBR1-EPSPS1r-	CAGTCGAAGACAAGTGCGAAATGCAGGAAtcGCAATGCGTtctTTG	47	EPSPS1 RTT,
150	PBR1-EPSPS1r-R1	CAGTCGAAGACAACGCGTGCTGTGTCaAgaACGCATTGCaTTC C	47	reverse
151	npegR-RPS23-F1	CAGTCGAAGACAATGCACATTTACGAATAGCAGAATT	37	RPS23 gRNA,
152	npegR-RPS23-R1	CAGTCGAAGACAAAAACAATTCTGTATTCTGTAATG	37	reverse
153	PBR1-RPS23-F1	CAGTCGAAGACAAGTGCGTATTGAGGCTAgACAGCctAAcTCTG	44	RPS23 RTT,
154	PBR1-RPS23-R1	CAGTCGAAGACAACGCGGAATAGCAGAgTTaGGCTGTcTAGCCT	44	reverse

[0057]

[0059] 2. 아그로박테리움 매개 토마토 형질전환 및 프라임 에디팅 효율 분석

[0060]

토마토의 아그로박테리움 매개 변환은 Vu 등에 의해 설명된 대로 수행되었다. 본 발명에서는 GV3101::pMP90, EHA105 및 EHA105 기반 슈퍼아그로 버전 2(Nonaka et al., 2019, Front Plant Sci. 10:1204) 아그로박테리움 투메파시엔스 균주를 사용하였다. 토마토 식물체의 7일령 떡잎을 절개하고 형질전환에 이용하였다. PE 플라스미드를 함유하는 아그로박테리움은 배양하여 원심분리로 수확한 후 100 μ M 아세트시링론을 보충한 ABM-MS 용액 (Vu et al., 2020)에 재현탁하여 OD_{600nm}이 0.8이 되도록 준비하였다. 아그로박테리아는 형질전환 전 28℃에서 1 시간 동안 배양함으로써 활성화되었다. 아그로박테리아와 떡잎을 혼합하여 실온에서 20분 동안 배양한 후, 형질 전환된 식물을 세척 전 2일 동안 공배양하여 선별 배지 상에 옮겼다. 샘플을 31℃에서 5일 동안 배양한 후 28℃에서 5일 동안 배양한 후 나머지 단계에서 25℃ 배양 조건을 적용하였다. 재분화된 신초를 80 mg/L 카나마이신이 포함된 배지에서 선별하고 토양으로 옮기기 전에 발근을 유도하였다. 이어 경화된(hardened) 식물을 PE 효율 평가에 사용하였다. 온도 처리 실험을 위해, 공배양 후, 절편체(explant)를 다른 온도에서 5일 동안 배양한 후 28℃에서 5일 동안 배양한 후 후기 단계에서 25℃ 배양 조건으로 옮겼다.

[0061]

PE 효율을 평가하기 위해, 형질전환 후 16일(dpt)에 시료를 채취하여 표적 딥 시퀀싱(Targeted deep sequencing)을 실시하였으며, 모든 식물 생장 단계에서 형질전환체의 잎을 채취하여 PCR과 Sanger 시퀀싱을 이용하여 PE 대립 유전자를 스크리닝 하였다.

[0063]

3. Targeted deep sequencing

[0064]

게노믹 DNA (gDNA)는 CTAB 방법을 이용하여 떡잎 또는 식물체의 잎에서 추출하였다. 분석에는 MiniSeq 시퀀싱 서비스(MiniSeq™ System, Illumina, USA)를 이용하였다. MiniSeq 시료는 표 5 및 표 6에 기재된 프라이머를 활용한 3번의 PCR을 통해 제조하였다. 세 번째 PCR은 제조사가 제공한 프라이머로 진행하여 시료 ID를 할당하였다. 이어서 MiniSeq 원시(raw) 데이터 FASTQ 파일은 표 7 및 표 8에 기재된 파라미터로 Cas-Analyzer (Park et al., 2016, Bioinformatics 33:286-288) 및 CRISPResso2 (Clement et al., 2019, Nat Biotechnol. 37:224-

226) 도구를 이용하여 분석하였다.

표 5

Primer for targeted deep sequencing and Sanger sequencing analysis

Seq.No.	Primer	Sequence (5'-3')	Length (nt)	PCR order	Targeted site/locus	Note
155	ALS-F1	CCTCACCATCTCCATGTTTCTC	23	1st PCR	ALS1	For targeted deep sequencing and Sanger sequencing
156	ALS-R1	GTCTCAGCTCCTCACTTGATTG	20			
157	ALS-F2	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGCTA CAAATCTTGTAAGTGGTCTTG	53	2nd PCR		For targeted deep sequencing
158	ALS-R2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCT GCTTCGAATAGATCTCGTTACCTC	66			
159	ORPE-F1	ATGCGAATCGTAGAAATGGAATTAG	25	1st PCR	OR	For targeted deep sequencing and Sanger sequencing
160	ORPE-R1	ACTCGTTTCTTCGGTCCTTAAT	22			
161	ORPE-F2	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTAGG ACCTGAGACAGTAGA	51	2nd PCR		For targeted deep sequencing
162	ORPE-R2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTAG ACATCACAGTAATAAATACGA	57			
163	CENH3-F1	CCCTAATTGGTGATGTTGTACC	23	1st PCR	CENH3	For targeted deep sequencing and Sanger sequencing
164	CENH3-R1	CACTGATAGCCCTCTCACTTT	21			
165	CENH3-F2	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCTAT ATGATGGGAGAATATATGTG	57	2nd PCR		For targeted deep sequencing
166	CENH3-R2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTAA GTCTGATGAAAGGAGCAGCTG	57			
167	CAB13PE-F1	CTTTGGTGCGCATGAGTCTAA	21	1st PCR	CAB13	For targeted deep sequencing and Sanger sequencing
168	CAB13PE-R1	ACGGTCAGGTCCATACCACA	20			
169	CAB13-F2.2	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTAAAT GGGGCCCTCCAGATATT	55	2nd PCR		For targeted deep sequencing
170	CAB13-R2.2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTCT AACAACTGTGGCTGAGCTAC	56			
171	HKPE-F1	ACAAAGATTATGAGCTAGGGAATGT	25	1st PCR	HKT1;2	For targeted deep sequencing and Sanger sequencing
172	HKPE-R1	CCTTCAGAATTCACCTCCAATGA	23			
173	HKPE-F2	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCGC CAAACAAATCCTTGACC	53	2nd PCR		For targeted deep sequencing
174	HKPE-R2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTTG AGGGATAAGAATGAGAAGAAGAC	59			
175	EPPE-F1	TGAGTTACTTACAACCTTGTCCT	23	1st PCR	EPSPS1	For targeted deep sequencing and Sanger sequencing
176	EPPE-R1	GTAATTATCACCAGGGCAACTATTATC	28			
177	EPPE-F2	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGGC AGTTTCTGTCGGTAA	52	2nd PCR		For targeted deep sequencing
178	EPPE-R2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTAA ACAAATGGCACGAAGAAGG	55			
179	WH9-F1	GGAGTCTATATAAGAAGTGTGTTAGGG	25	1st PCR	WH9	For targeted deep sequencing and Sanger sequencing
180	WH9-R1	TCATTAAGAAGAAGTCCAGAAGAAGA	22			
181	WH9-F2	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCAG AGCCAAAGCCTCGAT	51	2nd PCR		For targeted deep sequencing
182	WH9-R2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTAG CATCACCTACTTGACCATATT	57			

[0065]

표 6

Primer for targeted deep sequencing and Sanger sequencing analysis

Seq.No.	Primer	Sequence (5'-3')	Length (nt)	PCR order	Targeted site/locus	Note	
183	MBP21-F1	CCGGTTAGTGATACTCAGGTATTG	25	1st PCR	MBP21	For targeted deep sequencing and Sanger sequencing	
184	MBP21 -R1	TGACTGCTTCCTAAGATGCTAAA	23				
185	MBP21-F2	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTCG ACGTTTTCTCTTCAACAGAT	53	2nd PCR			For targeted deep sequencing
186	MBP21-R2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT CACTTATTA AAAACTTATGTAATCTAAC	59				
187	DMR-F1	CTTTCAGGTTCTTATCGTTGGATTG	25	1st PCR	DMR6	For targeted deep sequencing and Sanger sequencing	
188	DMR-R1	AGGTTAGCTAGGTAGATTAGGTAGT	25				
189	DMR-F2	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGGA GACAGTTCATAATTGGAGAGATTAT	61	2nd PCR			For targeted deep sequencing
190	DMR-R2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT TTGAAGTATGACTCAGATAGCA	57				
191	ALC-F1	AAGTAGTGGACAAACATAAAGTAGTGG	27	1st PCR	ALC	For targeted deep sequencing and Sanger sequencing	
192	ALC-R1	AATAATCTATGTGCAACCTCTTTCGG	26				
193	ALC-F2	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTATAT CCTAACGGGGCGCAGGGCCAAT	58	2nd PCR			For targeted deep sequencing
194	ALC-R2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT GCATGATCCAATTAGTTTTACCCCT	61				
195	PRD-F1	GTGAATATTATTGCTGGCCTGTT	23	1st PCR	PRD	For targeted deep sequencing and Sanger sequencing	
196	PRD-R1	CAACTAGTACAACAGGTCTCGT	22				
197	PRD-F2	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGGT GCTGTTTCTTCAGGGAA	53	2nd PCR			For targeted deep sequencing
198	PRD-R2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT TAGCCATCTCAAGCTGTTCAAG	57				
199	RPS23.1-F1	GACTCTAACTAATCTGTGGTGGTT	24	1st PCR	RPS23.1	For targeted deep sequencing and Sanger sequencing	
200	RPS23.1-R1	GAAACGAACCTCCGGGAATATCT	22				
201	RPS23.1-F2	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTGCTTACA TATCTTAAAAACATCTAT	60	2nd PCR			For targeted deep sequencing
202	RPS23.1-R2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCAATCT TTTTCCCATCTTGTATGAG	60				
203	RPS23.2-F1	TGAGAGAGCATACACAAGCATAG	23	1st PCR	RPS23.2	For targeted deep sequencing and Sanger sequencing	
204	RPS23.2-R1	TGAGAAGCAAGATGGTGTTAGG	22				
205	RPS23.2-F2	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGGTTTTGG CCCTTGCAATTAAC	56	2nd PCR			For targeted deep sequencing
206	RPS23.2-R2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGAACG AATGCAGCAATCTTCTTC	58				
207	RPS23.3-F1	CTACAGTTCTAGGTGTGCACTAAT	24	1st PCR	RPS23.3	For targeted deep sequencing and Sanger sequencing	
208	RPS23.3-R1	CGACCAAATCCAGCAATCAAC	21				
209	RPS23.3-F2	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTCAAGTC ATGCAGAATTAACAC	57	2nd PCR			For targeted deep sequencing
210	RPS23.3-R2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGCAGC AATCTCTTCCCATTTTTG	59				

[0066]

표 7

Sequence information used for RGEN and CRISPResso2 analysis of targeted deep sequencing data			
Template	Reference sequence	Donor (RGEN)	CRISPResso2 3' extension
AL51	GCTACAAATCTGTAGTGGTCTTGGGGATGCTTTAGATAGTATTCGGATGTG CTATTACAGGTCAAGTCCCAAGGAGGATGATTTGGTACTGATGCGTTCCAGGAAACG CCTATTGTGAGGTAAACGAGATCTATTACGAAGCA (서열번호 211)	AGGTCAAGTGTGAGGAGGATG ATTG (서열번호 212)	CAATCATCTCTCTAGaCACTTGACCT (서열번호 213)
OR	AGGACCTGAGACAGTAGAGGACTTCGTAATAATGGAGTTGCGAGGAAATTCGAGAT AATATTAGAAAGTAGAGGAACCAAGATATTTTTCATATGAGGAGGCTGTGTGTTTTT TTTTCTCTCTCAAAATTCGATTTATTACTGTGATGTCCTA (서열번호 214)	aTATATTAGAAAGTcaTAgGAAC AAGATATT (서열번호 215)	AATATCTTGTCTaTgaCTTCTAATATTAT (서열번호 216)
CENH3	TTTCAGCTTCAGTGCAGAAAGCCAAACCAAAAGAGCGTTACAGGCGCAGGGACAT GGCACTTCGAGAAATCAGACACTTTTCAGAGAAGCGTGGGATCTTATTTCGAATAA GAAGATCCACGCTCTGTAAGAGTCTGATTTCTCGAAGTGCACACTGTCCTGGCC TGTACGCTCTTTTGTGTTTGGCTCTGCACTGAAGCTGAAA (서열번호 217)	GCGTTACAGGCCGtaaacAGTg GCACTTC (서열번호 218) GCGTTACAGGCCAGTGGCACTT CGA (서열번호 219)	TCGTATTCTCGAAGTGCACAGTTCaagGCTGTa ACGCTTCTTTG/CAAAAGAAGCGTTACAGGCGCTg aaACAGTGGCACTTCGAGAAATCAGA (서열번호 220)
CAB13	TAAATGGGGCCCTTCAGATATTTTTTCCAACAGTTATTCTTATATATAGTATATAA ATTGTGCAAGAACTTAGTGAAGTCCCAATTAATAAAGAGAATAATTAAGCAATAGA GAAATGGCAGCAACAGGTAGCTTCAGGCACAGTTGTTAGAG (서열번호 222)	GCAAGAAACTTAgTGAaAATTG TGAGGTCCaATTAAIT (서열번호 223)	ACTTCGAGAAATCAGA (서열번호 221)
HKT1.2	CTTGAGGATTAAGATGAGAAGAGACTGGAATTTTCTTGAAATATCATATGTTTTT CATTGTAGGTAAAAAACCACAATTTGCCAAAGTTGATACTGTGTGTAATAGTAA GGCAGTTTCTGTGTAATAAGTCTGGAAGAAATCTCACTATCTCTTGAAAT AAAGTATGTAAATTAAGGCCCTTTTGGTCAGGATTTTGTGGCG (서열번호 225)	TATCAACTTTTTCagAgCTGTGT TTCCTTGAaATGCAGGAATgC TTCCTGCAATTCGATATGAT G (서열번호 226)	ACCACAGTATCAACTTTTGCagACTGTGTGTTCTTA CCTACAAATGAaAACATG (서열번호 227)
EPSP51	GCAGAACACAGCAATGCGTCCGTTCGACAGCAGCAGTACTGTAGCTGGAAGACATT CAAGGTCTTCAATCGTCTCTTCTGTCGATTTGTTTAAAGATTGAAGACCTTG AATGCTCTCAAGCTACAGTACTGCTGTCTCAAGGAGCGCATTTGCTGTTCGAT TTCCAGGAATAGTTGGATTTTCTCTCAGACTTT (서열번호 228)	TTCTTGAaATGCAGGAATgC AATGCGTTCttTGAAGCAGCA (서열번호 229)	TACAGTAACTGCTGCTGTCAaagaACGATTGCGga TTCTGCAATTTCCAAAGGAATA/TATTCCTTGGAaAT GCAGGAATGCAATGCGTTCttTGAAGCAGCACT TACTGTa (서열번호 230)
WH9	CTAAGGCAATAGTTGGATTTTCTCTCAGACTTT (서열번호 228) CAGAGCCAAAGCCTCGATGGAATCTCAGACCTGAGCAAAATTTGTACTTTGAAGC AATCTTAAATTCAGGATGTGGAATCCACCAAGGAGGATGAATAAAGAAATCCGAG CTAACTTGAAGAAATATGTCGAAGTAGTGAATCTAT (서열번호 231)	AGCAATCTTTAAATTCgaATGTG GAATCCAC (서열번호 232)	GTGGATTCAACCAATaCagaATTAaAGATTGCT (서열번호 233)
MP21	TCTGACGTTTTTCTCTTCAACAGATGAAGTACATAGATGAGGCTAAAGC TAGAGTTGAGCTCTTCAACGCTTCAAGGTACGAATTTAGTGAATTAAGT AATTTAGTTAGATTTACATAAGTTTTTAATAGTGA (서열번호 234)	TTCACGTTTCTAGaGTAAAGAT ATTAGTGA (서열번호 235)	TCACTAAATATCTaCTaGaaAGCTTGAa (서열번호 236)

표 8

Sequence information used for RGEN and CRISPResso2 analysis of targeted deep sequencing data			
Template	Reference sequence	Donor (RGEN)	CRISPResso2 3' extension
DMR	GGAGACAGTTCATTAATGGAGAGATTATGTCAGCTTCATTTGTTATCCCTCAGAGAA GTAATGCTCTGAATGGCTCTCTATCATCTTCATTTGAGTAAACACCATTAATTAA TGTTAATTAATCTTCTTATTAATTAATATACATTCGTAAGTCACTCAATCA(서열번 호 237)	CCTTAGAGAGATATGCTCTT AATCCATCATCTTTCAAGTA(서 열번호 238)	TACCTGAAAGATGATGGATTAAAGAGCATCTTC TCTAGAGG/AAAGATGATGATTAAAGAGCATAC(서 열번호 239)
ALC	TTTGGTGGTTACCGCGTAAAAACGAGCGCTTTTACCCCAACCTTTGTGTG CACCAGAGTAAAAACCGGCTGTGCGTTCGGAAGCTTCATTAACCCGATGTT GCAGCCCG(서열번호 240)	GGAACCGACCAACCGATTTTA CTTCCG (서열번호 241)	GAAGGCTACCGGAACCGACAACCAAGATTTTACT TCCGGTGAACACA (서열번호 242)
PRD	AAATAGAGATTGGGAAGAGATGAAGAAAGAAACCAAGATGCTGGATGGATGAG CTTTAGCTGTTTGGGTTATAAAGTGAAGTGTCTGATATGGCGGATGTTGCTCA AAA (서열번호 243)	TTTAAATTTTGGGTTATAAA (서 열번호 244)	CTTCACTTTATAACCCAAACTTAAAGCTCATCA TACCAGCATCTGTTTCTTCT (서열번호 245)
RP523.1	TGTGTTGCAGAGGATTAAGGCTAAACAGCCAAATTCGCTATTCGTAATGTC AGGGTCAACTCATCAAGATGGGAAGGATTCG/ATGAGTTGAACCTTAGCACA TTTACGAATAGCAGAAATTTGGCTGTTAGCTCAATACCTCTGCAACACATATTAG CAACTTACAGCTAGTATCAAT (서열번호 246)	TTGCAGAGGATTAAGGCTAGA ATGTGC (서열번호 247)	GTATTGAGGCTAGACAGCCCAACTCTGCTATTTC (서 열번호 248)
RP523.2	GTATTGAGGCTAAGCAGCCCAATTCGCTATTCGTAATGTCAGGTTCAATTGA TCAAAAATGGGAAGAGATTCGCTCAATTCGTC/CAATTTGATCAATTAACCC TAGCACATTTACGAATAGCAGAAATTTGGCTGCTAGCTCAATACCTCTGCAAAAAT CTTCGAATCTCTTTGATG (서열번호 249)	TTGCAGAGGATTAAGGCTAGA CAAGCCCAACTCTGCTATTCGTA ATGTGCT (서열번호 250)	GTATTGAGGCTAGACAGCCCAACTCTGCTATTTC (서 열번호 251)
RP523.3	TTGTCAGAGGATTAAGGCTAAGCAGCCGAATTCGCTCAATTCGTAATGTCAGG GTTCAACTCATCAAAAATGGGAAGGATTCGTC/ATGAGTTGAACCTTAGCACA ATTACGAATGGCAGAAATTTGGCTGCTAGCTCAATACCTCTGCAACCAATTTCA GCAAGTTTGAACATTAGAGCCAA (서열번호 252)	TGTTTGTGCAGAGGATTAAGG CTAGACAGCCCAACTCTGCTATT GTAATGTCAGGTT (서열 번호 253)	GTATTGAGGCTAGACAGCCCAACTCTGCTATTTC (서 열번호 254)

[0068]

[0070]

[0071]

4. PE 대립 유전자를 포함하는 형질전환체의 확인

경화 단계 후 생존한 형질전환체에 대해 PE 대립 유전자 선별을 실시하였다. 각 식물체의 세 가지 다른 잎 조각을 수집하고 조합하여 CTAB 방법을 사용하여 gDNA를 분리하였다. PCR 반응은 표적 부위 옆에 있는 DNA 서열을 증폭하기 위해 사용되었으며 PCR 생성물은 Sanger 시퀀싱 방법에 의해 시퀀싱되었다. 결과적인 시퀀싱 크로마토그램은 PE 대립 유전자를 운반하는 잠재적인 이벤트를 선별하기 위해 ICE Synthgo 도구에 의해 분석되었다. 일부 대표적인 PE 이벤트는 표적 딥 시퀀싱에 의해 후속적으로 검증되었다.

[0073]

5. PE 이벤트 내의 T-DNA 및 레플리콘 존재 유무 평가

[0074]

T-DNA와 레플리콘의 유무를 평가하기 위해 PE 식물의 gDNA를 T-DNA의 오른쪽 경계(RB)에 명시된 프라이머 쌍과 레플리콘의 원형화된 형태를 사용하여 PCR 반응의 템플릿으로 사용하였다. 레플리콘 프라이머는 벡터로부터 방

출되도록 구성된 원형화된 DNA만 증폭할 수 있는 방식으로 설계되었다(Vu et al., 2020). PCR 생성물은 1% 아가로스 겔에서 전개되었으며, T-DNA와 레플리콘에 각각 해당하는 크기의 PCR 밴드의 확인을 통해 T-DNA와 레플리콘의 존재 유무를 판단하였다.

6. 표적이탈(off-target) 분석

pegRNA의 gRNA 시퀀스는 gRNA 시퀀스와 일치하지 않는 부분이 4개 미만인 토마토 게놈 데이터베이스 *Solanum lycopersicum*(SL2.4) 내의 잠재적 off-target 부위를 검색하기 위해 Cas-OFinder 도구를 사용하였다. 확인된 잠재적 off-target 부위를 가진 pegRNA로 변환된 16-dpt (day post transformation) 떡잎 절편체는 표 5 및 표 6에 나열된 프라이머를 사용하여 표적 딥 시퀀싱에 의해 분석되었다.

7. 데이터 분석

모든 실험은 최소 3배수로 수행되었다. 편집 결과, 해당 통계 분석 및 산점도는 MS Excel과 GraphPad Prism 9.0 소프트웨어를 사용하여 처리되었다. 수정되지 않은 Fisher's LSD 테스트를 사용하여 다중 비교를 실행하였다.

실시예 1. 프라이밍 에디터 구성 단백질 조합 및 pegRNA 전사 조절 프로모터의 종류에 따른 교정 효율 분석

본 발명자는 토마토 *ALSI* 유전자를 표적으로 하는 다양한 프라이밍 에디터용 재조합 벡터(도 2 및 도 3)를 구축한 뒤, 이들 각각을 아그로박테리움을 매개로 하여 토마토 홍광 품종의 떡잎에 형질전환하였다. 그 후, 표적 부위의 NGS 분석을 통해 염기 교정 여부를 분석하였다.

그 결과, 도 4에 개시된 바와 같이 U6-26 core 프로모터에 의해 pegRNA의 발현이 조절되는 벡터보다 U6 composite 프로모터에 의해 pegRNA의 전사가 조절되는 벡터로 프라이밍 에디팅을 수행한 실험군에서 교정 효율이 현저히 우수한 것을 확인할 수 있었으며, 이 중 특히 PE2max, PE2Max + Supp.gRNA와 ePEmax2의 프라이밍 에디터를 사용한 실험군에서 의도된 염기 교정이 가장 많이 일어난 것을 알 수 있었다.

토마토 *ALSI* 유전자가 교정된 캘러스로부터 식물체를 재분화한 뒤 재분화된 식물체에서 의도된 프라이밍 편집의 여부를 재확인하였다. 그 결과, 캘러스에서 확인된 프라이밍 에디팅의 효율과 유사하게 PE2max, PE2Max + Supp.gRNA와 ePEmax2의 프라이밍 에디터를 사용한 교정체에서 우수한 빈도와 효율을 확인할 수 있었다(도 5). 또한, 재분화된 식물체의 게놈 DNA를 추출하여 T-DNA와 레플리콘의 존재 유무를 PCR 분석을 통해 일부 PEO 이벤트 식물체에서 T-DNA와 레플리콘이 확인되지 않는 것을 확인할 수 있었다(도 6).

실시예 2. 형질전환 매개 균주 strain에 따른 프라이밍 에디팅 효율 분석

본 발명자는 아그로박테리움 균주 strain에 따른 프라이밍 에디팅 효율을 분석하기 위해 PE2max, PE2max + Supp.gRNA 또는 PE4max를 이용한 재조합 벡터를 구축한 후(도 7), 이들 각각을 아그로박테리움 EHA105 superagro ver.2 (EHA105sv2), GV3101::pMP90 또는 EHA105 균주에 형질전환한 뒤 프라이밍 에디팅 효율을 분석하였다.

캘러스 단계에서 NGS 분석을 통한 프라이밍 에디팅의 효율을 비교한 결과, 도 8에 개시된 바와 같이 EHA105sv2 및 EHA105 균주를 사용한 경우의 교정 효율이 GV3101::pMP90 균주를 사용한 경우보다 각각 1.27~1.43배, 1.2~1.55배 우수한 것을 확인할 수 있었다. 재분화 식물체에서 프라이밍 에디팅의 빈도와 효율을 비교한 결과에서도 EHA105sv2 및 EHA105 균주 사용의 경우가 GV3101::pMP90 균주를 사용한 경우보다 각각 0.92~4.33배, 1.34~3.17배 우수한 것을 확인할 수 있었다(도 9).

실시예 3. 프라이밍 에디터 도구의 전달 방법에 따른 프라이밍 에디팅 효율 분석

본 발명자는 프라이밍 에디터 도구의 전달 방식 즉, T-DNA 또는 게미니바이러스 기반 레플리콘에 따른 프라이밍 에디팅 효율을 비교하였다. 동일한 구성 요소들을 각각 T-DNA 또는 레플리콘 기반 재조합 벡터에 클로닝한 뒤(도 10), 이들을 아그로박테리움 EHA105sv2 균주를 통해 토마토 식물체에 형질전환한 뒤 프라이밍 에디팅 효율을 분석

하였다.

[0093] 켈러스 단계에서 NGS 분석을 통한 프라임 에디팅의 효율을 비교한 결과, 도 11에 개시된 바와 같이 케미니바이러스 기반 레플리콘 시스템을 이용한 경우가 T-DNA 벡터를 이용한 조건보다 6.55~7.79배 높은 프라임 에디팅 효율을 나타내었다.

[0095] 실시예 4. 프라임 에디팅 수행 온도 조건에 따른 프라임 에디팅 효율 분석

[0096] 본 실시예에서는 아그로박테리움과 공배양 후 5일 내 식물조직의 처리 온도(25, 28, 31 및 34℃)에 따른 프라임 에디팅 효율을 평가하였다. 간단하게, PE2max 또는 ePEmax2 프라임 에디터를 포함하는 레플리콘 기반 재조합 벡터(도 12)를 사용하여 아그로박테리움 EHA105sv2 균주를 통해 토마토 식물체에 형질전환한 뒤 프라임 에디팅 효율을 분석하였다.

[0097] 분석 결과, 켈러스 단계에서는 처리 온도와 비례하게 프라임 에디팅 효율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 13). 또한, 재분화 식물체에서 프라임 에디팅의 빈도와 효율을 분석한 결과, PE2max 프라임 에디팅 식물체는 31℃의 수행 조건이, ePEmax2 프라임 에디팅 식물체는 31℃와 34℃의 수행 조건에서 프라임 에디팅 빈도가 가장 높은 것을 확인할 수 있었다(도 14). 따라서, 프라임 에디팅의 효율 및 식물체의 재분화를 고려하여 31℃의 온도 조건이 적합함을 알 수 있었다.

[0099] 실시예 5. 다양한 표적 유전자에 대한 프라임 에디팅 효율 비교

[0100] 본 발명자는 토마토의 다양한 표적 유전자 위치에 대해 프라임 편집을 수행하고, 표적 유전자간 프라임 에디팅 효율을 비교하였다. 본 실시예에 사용된 레플리콘 기반 벡터의 모식도는 도 15와 같으며, 아그로박테리움 EHA105sv2 균주를 통해 토마토 식물체에 형질전환한 뒤 프라임 에디팅 효율을 분석하였다.

[0101] 분석 결과, 도 16에 개시된 바와 같이 각기 다른 표적 유전자에서 프라임 에디팅 효율에 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 총 11개의 유전자 중 7개의 표적 유전자에서 2% 이상의 편집 효율을 보여주었으며, 4개의 유전자에서는 1% 미만의 편집 효율이 확인되었고, *DMR6* 유전자의 경우 프라임 편집이 일어나지 않은 것을 알 수 있었다. 상기 결과를 통해 토마토 식물체의 다양한 위치 및 자리에 대해서 프라임 에디팅이 적용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0103] 실시예 6. 프라임 에디터 발현 카세트의 터미네이터 종류에 따른 효율 비교

[0104] 프라임 에디터 단백질의 발현 카세트 내에 포함되는 터미네이터의 종류에 따른 프라임 에디팅 효율 차이를 분석하고자, 도 17과 같은 프라임 에디터 단백질 발현 카세트를 디자인하고, 도 18과 같은 레플리콘 기반 재조합 벡터를 구축한 후 아그로박테리움 EHA105sv2 균주를 통해 토마토 식물체에 형질전환한 뒤 프라임 에디팅 효율을 분석하였다.

[0105] 분석 결과, t35S가 가장 낮은 효율을 보여주었으나, 터미네이터의 종류에 따른 유의적인 차이는 확인되지 않았다(도 19).

[0107] 실시예 7. 프라임 에디터 발현 카세트의 프로모터 종류에 따른 효율 비교

[0108] 본 실험에서는 프라임 에디터 단백질의 전사를 조절하는 프로모터의 종류에 따른 프라임 에디팅 효율 차이를 분석하고자, 도 20과 같은 프라임 에디터 단백질 발현 카세트를 디자인하고, 도 21과 같은 레플리콘 기반 재조합 벡터를 구축한 후 아그로박테리움 EHA105sv2 균주를 통해 토마토 식물체에 형질전환한 뒤 프라임 에디팅 효율을 분석하였다.

[0109] 분석 결과, pSIEF1가 가장 낮은 효율을 보여주었으나, 프로모터의 종류에 따른 유의적인 차이는 확인되지 않았다(도 22).

[0111] 실시예 8. RNA 사폐론에 따른 프라임 에디팅 효율 비교

- [0112] 본 실험에서는 프라임 에디터 구조 내 RNA 샤페론 단백질의 유무, 종류 또는 배열 순서에 따른 프라임 에디팅 효율 차이를 분석하였다. 상기 실시예 1을 통해 프라임 에디팅 효율이 우수하였던 PE2max를 기본 구조로 하여, NC (nucleocapsid) 또는 L1ORF1p를 프라임 에디터에 추가하거나, 이들의 프라임 에디터 내 배열 순서에 변화를 주어 재조합 벡터를 구축하였다(도 23 및 도 24).
- [0113] 제조한 재조합 벡터를 아그로박테리움 EHA105sv2 균주를 통해 토마토 식물체에 형질전환한 뒤 프라임 에디팅 효율을 분석한 결과, 전체 에디팅 효율은 PE2max-NC의 프라임 에디터를 사용한 실험군에서 가장 높게 확인되었다(도 25). 또한 의도된 프라임 에디팅의 효율도 PE2max-NC의 프라임 에디터를 사용한 실험군에서 가장 높게 확인되었다(도 26).
- [0114] 이상의 결과를 통해 nCas9max-MMLV RT-NC (nucleocapsid)가 융합된 프라임 에디터를 사용할 때 식물체에서 프라임 에디팅의 효율을 현저히 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다.
- [0116] **실시예 9. 프라임 에디터 구성 단백질 변경에 따른 교정 효율 분석**
- [0117] 본 실험에서는 PE2max 또는 PE2max-NC의 프라임 에디터에서 사용되었던 니카아제 Cas9 단백질 또는/및 MMLV 역전사효소를 변경한 신규한 프라임 에디터 발현 카세트(도 27), 상기 발현 카세트를 포함하는 *SICAB13* 유전자를 표적으로 하는 재조합 벡터를 구축한 후(도 28), 제조한 재조합 벡터를 아그로박테리움 EHA105sv2 균주를 통해 토마토 식물체에 형질전환한 뒤 프라임 에디팅 효율을 분석하였다. 분석 결과, PE6c와 PE6c-NC의 프라임 에디터를 사용한 실험군에서 PE2max의 프라임 에디터를 사용한 실험군보다 높은 에디팅 효율이 확인되었다(도 29). 또한, PE6d의 프라임 에디터를 사용한 실험군보다 PE6d-NC의 프라임 에디터를 사용한 실험군에서 에디팅 효율이 증가되는 것이 관찰되었다.
- [0118] 상기 실시예 8에서 PE2max의 프라임 에디터보다 높은 에디팅 효율을 보였던 PE2max-NC의 프라임 에디터와 PE6c의 프라임 에디터의 에디팅 효율을 비교한 결과, 도 30에 개시된 것과 같이 PE6c의 프라임 에디터를 사용한 실험군에서 보다 높은, 특히 의도된 프라임 에디팅 효율이 증가됨이 확인되었다.
- [0119] 본 발명자는 PE6c 프라임 에디터의 증진된 프라임 에디팅 효율을 검증하기 위해 *SICAB13* 유전자 외 다른 토마토 유전자를 표적으로 하는 재조합 벡터를 제조한 뒤(도 31) 프라임 에디팅 효율을 분석하였고, PE2max 프라임 에디터를 비교대조군으로 사용하였다. 분석 결과, 도 32에 개시된 바와 같이 테스트한 6종의 유전자 모두에 대해 PE6c 프라임 에디터가 PE2max 프라임 에디터보다 높은 프라임 에디팅 효율을 보여주었으며, *SIHKT1;2* 유전자의 경우 8.9배나 높은 수준으로 확인되었다.
- [0120] *SIHKT1;2* 유전자를 표적으로 하여 다양한 PE6 프라임 에디터 발현 카세트(도 27 참고)를 포함하는 재조합 벡터를 구축한 뒤(도 33), 프라임 에디팅 효율을 분석한 결과, PE6c-NC 및 PE6ec-NC 프라임 에디터가 PE6c 프라임 에디터보다 약 1.5% 높은 프라임 에디팅 효율을 나타내는 것으로 확인되었다(도 34).
- [0121] 본 발명자는 PE6c, PE6c-NC 및 PE6ec-NC 프라임 에디터 발현 카세트를 포함하는 *SIOR*, *SICAB13* 및 *SICENH3(sub)* 유전자 표적 재조합 벡터(도 35)를 구축한 뒤 프라임 에디팅 효율을 분석한 결과, 상기 3종의 PE6 프라임 에디터는 PE2max 프라임 에디터보다 높은 프라임 에디팅 효율을 나타내었고, *SICENH3(sub)* 유전자를 제외하고 PE6c 프라임 에디터가 가장 높은 효율을 보여주었으며, *SICAB13* 유전자에 대한 PE6c 프라임 에디터의 프라임 에디팅 효율은 14.68%에 달하는 것으로 확인되었다(도 36).
- [0123] **실시예 10. 애기장대 대상 프라임 에디터의 교정 효율 분석**
- [0124] 본 실험은 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 식물체를 대상으로, PE2max-NC, PE6c 또는 PE6c-NC 프라임 에디터의 에디팅 효율을 분석하였다. 표적 유전자는 *AtPDS3*로 하였으며, 상기 실시예들과 같이 구축한 재조합 벡터를 아그로박테리움 EHA105sv2 균주를 통해 식물체에 형질전환하였다.

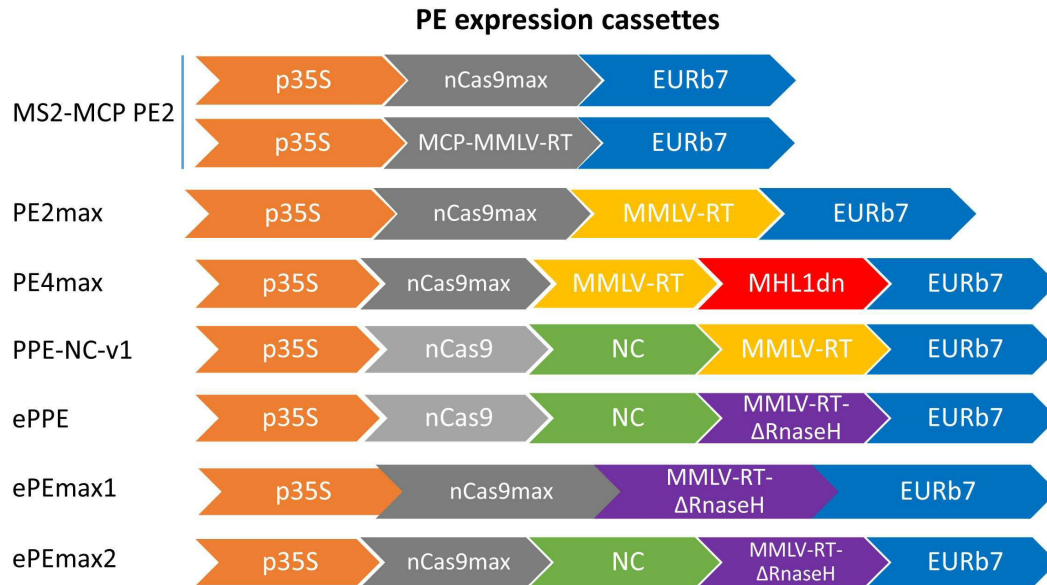
표 9

The selected target sites/loci, gRNA, and RTT information for <i>Arabidopsis</i>				
No.	Gene/allele name	Accession no.	Targeted change	gRNA (5'-3') RTT (5'-3')
1	<i>AtALS</i>	AT3G48560	P1975: +3 A to T; +5+6 GG to AA	CTGTACCACTATACGACGA (서열번호 270) TCACAGGACAAAGTTCGCTGATGATTC (서열번호 271)
2	<i>AtOR</i>	AT5G61570	R90H: +3+4 TC to AT; +6 G to A	GCAAGAGGACTTGTTCGT (서열번호 272) AGATACTTCGAGTCGCGAAACAAGATCT (서열번호 273)
3	<i>AtCENH3</i>	AT1G01370	G83T84 del.: +5 GGACC del	AAAAGAGCGTTACAGGCGCA (서열번호 274) TCTCTTTAGAGCACTGGCCCTGATCGAT (서열번호 275)
4	<i>AtPDS3</i>	AT4G14210	M38IOP: +2 AATG to TTGA	ATCTGGAGGTGTGGAACTAA (서열번호 276) TAAAGCTATGTCCTcaaaAGTTCACAACC (서열번호 277)

- [0125]
- [0126] 분석 결과, *AtPDS3* 유전자에 대한 프라임 에디팅 효율은 PE6c 프라임 에디터에 비해 PE2max-NC와 PE6c-NC 프라임 에디터에서 높게 확인되었고, PE2max-NC와 PE6c-NC 프라임 에디터는 유사한 수준으로 나타났다(도 37).
- [0127] 본 발명자는 PE2max-NC와 PE6c-NC 프라임 에디터를 이용하여 *AtCENH3*, *AtOR* 및 *AtALS* 유전자를 표적으로 프라임 에디팅 효율을 추가로 분석한 결과, *AtALS*와 *AtCENH3* *AtALS* 유전자에서 PE6c-NC 프라임 에디터의 높은 프라임 에디팅 효율을 확인할 수 있었다(도 38).
- [0128] 상기 결과를 통해, PE2max-NC, PE6c, PE6c-NC, PE6ec 또는 PE6ec-NC 프라임 에디터가 쌍자엽 식물체에서 프라임 에디팅 효율을 높이는데 유용하게 이용될 수 있을 것으로 유추되었다.

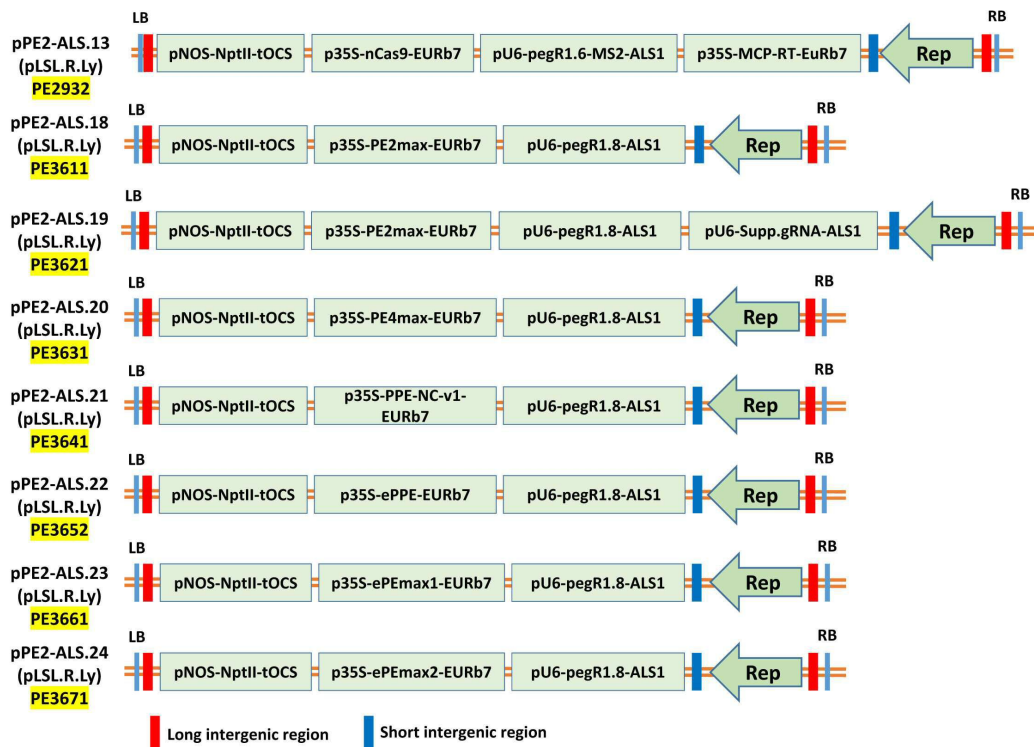
도면

도면1



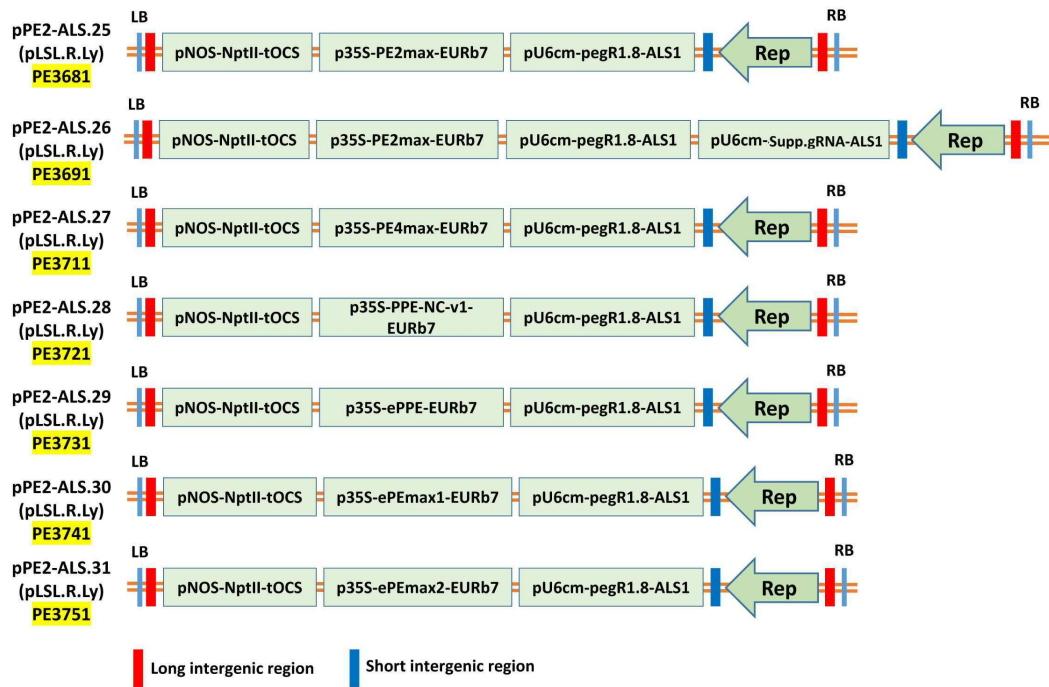
도면2

Map of binary vectors with U6-26 core promoter used in the experiment

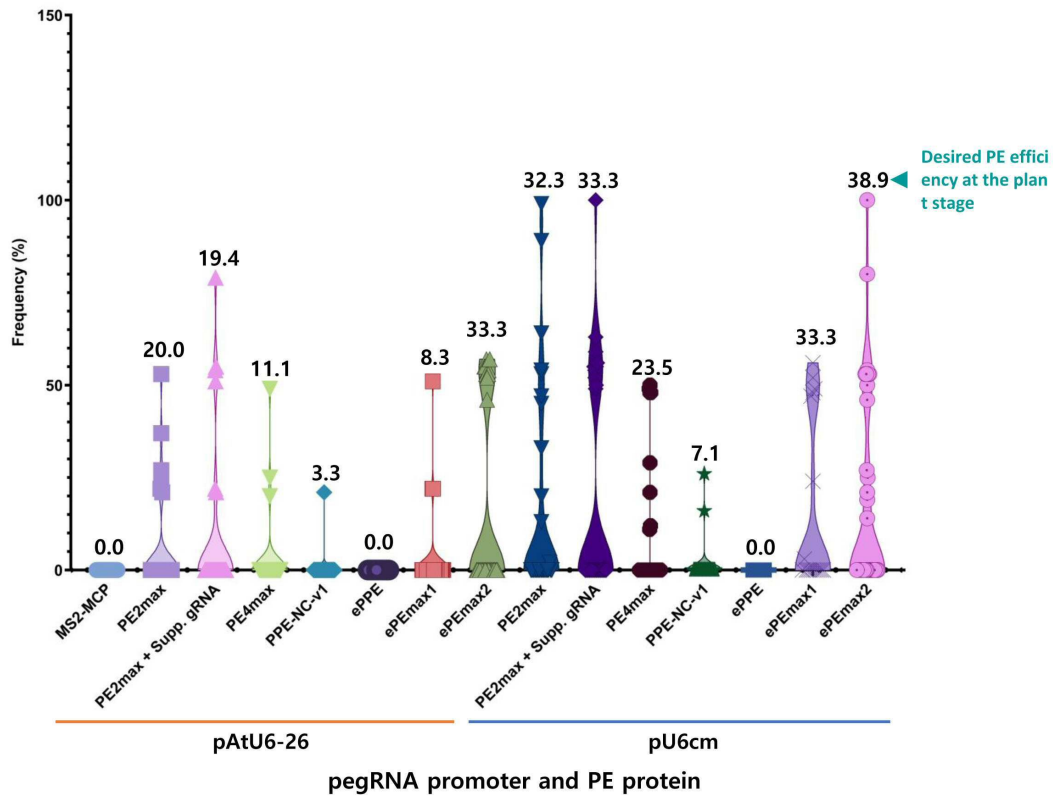


도면3

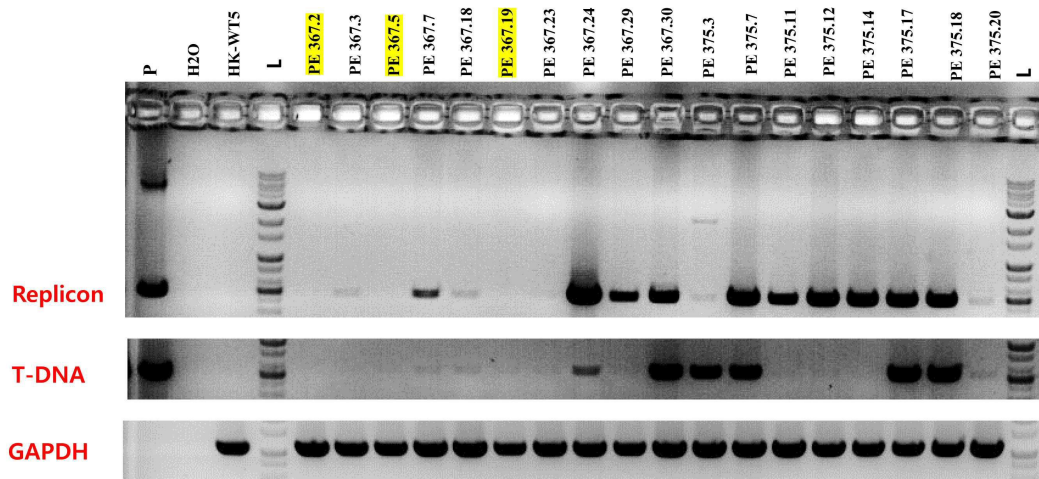
Map of binary vectors with U6cm promoter used in the experiment



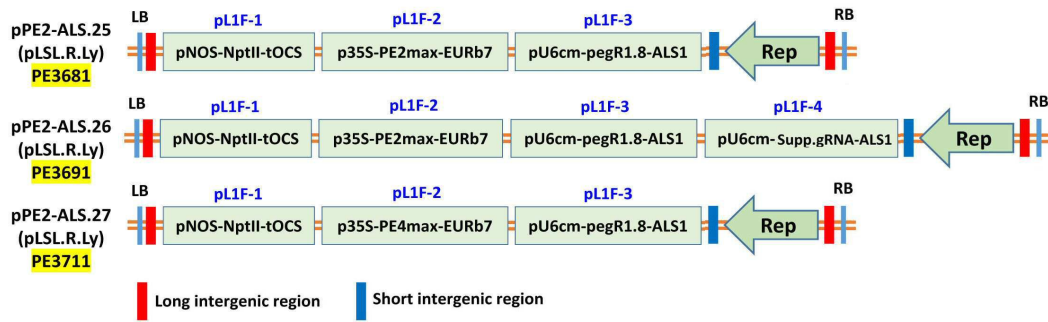
도면5



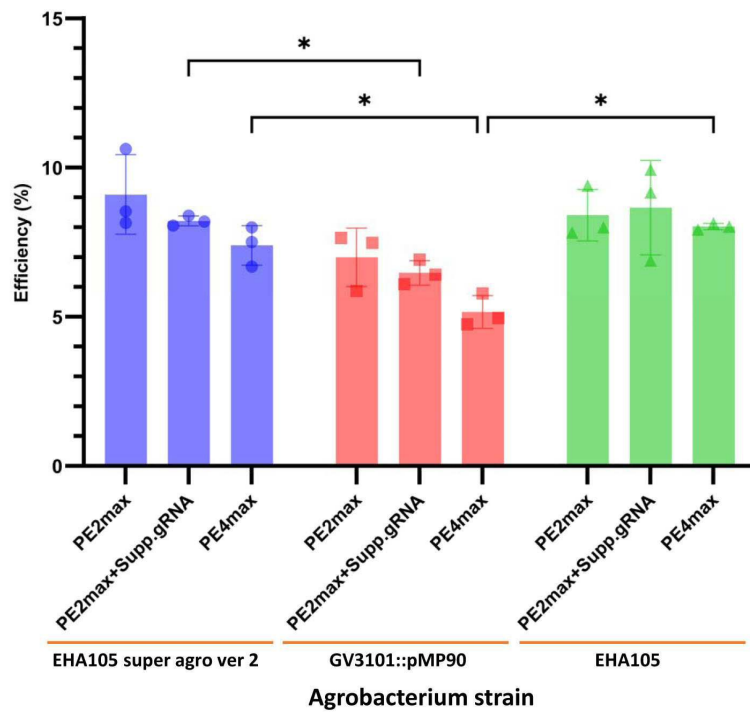
도면6



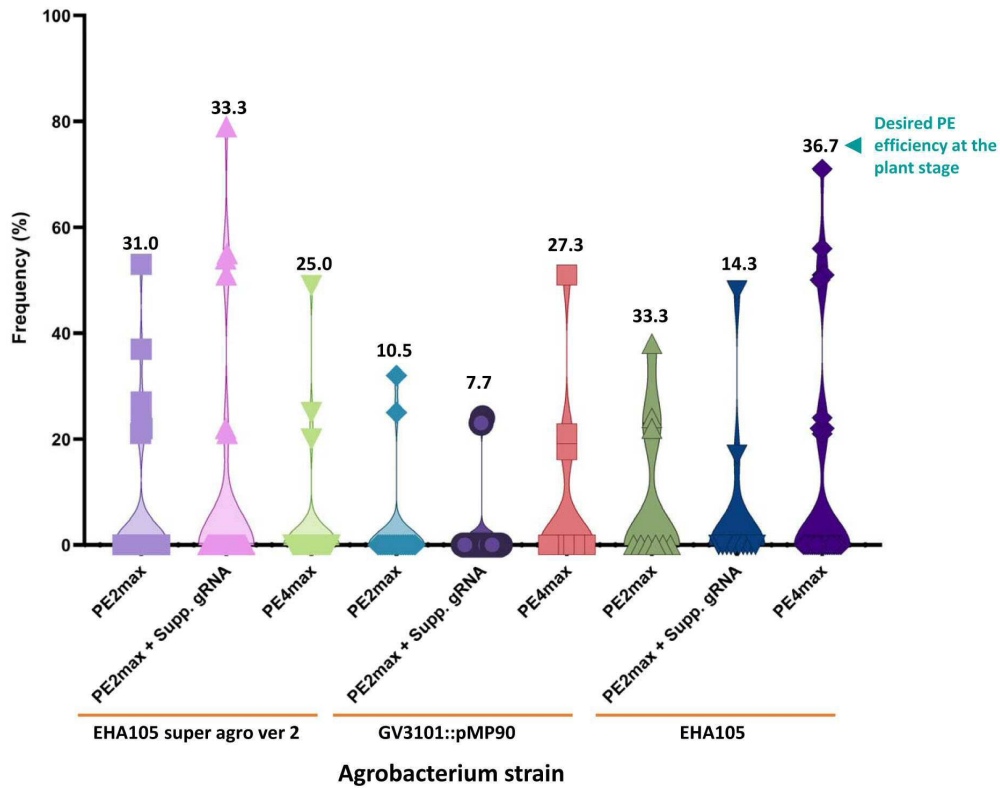
도면7



도면8

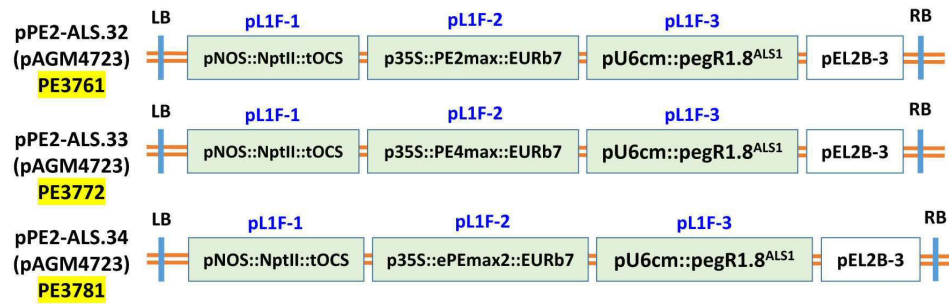


도면9

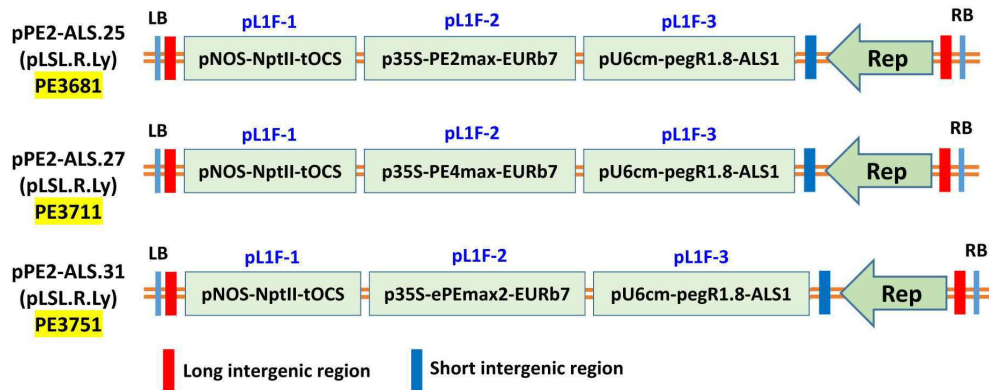


도면10

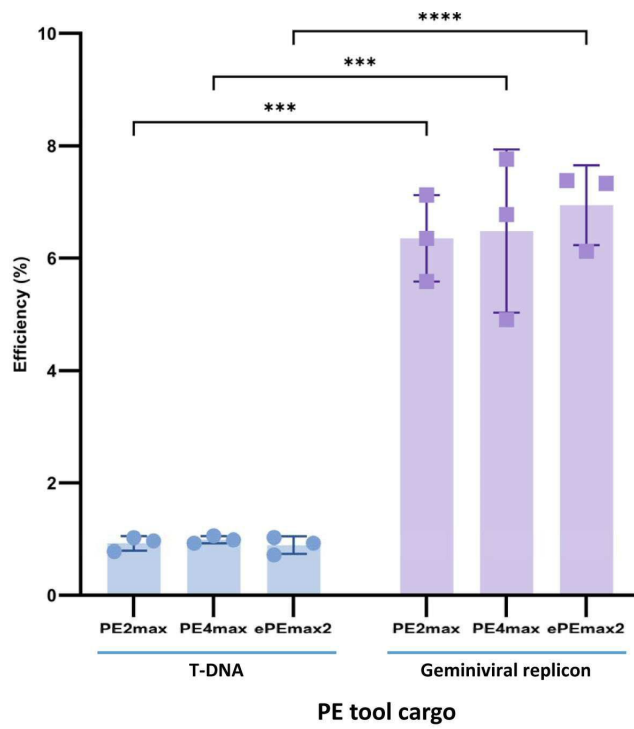
➤ T-DNA-based PE tools.



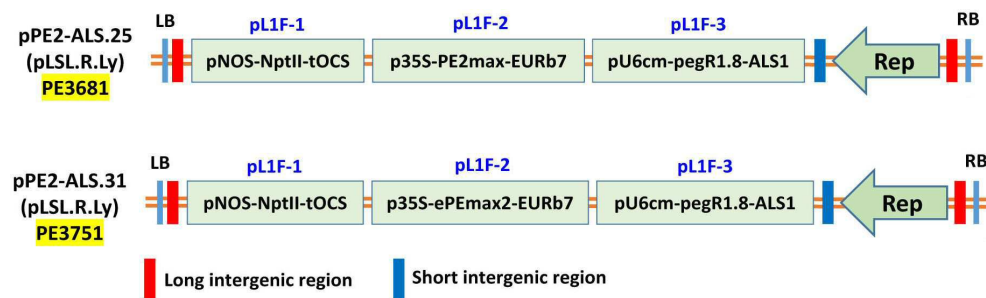
➤ Replicon-based PE tools.



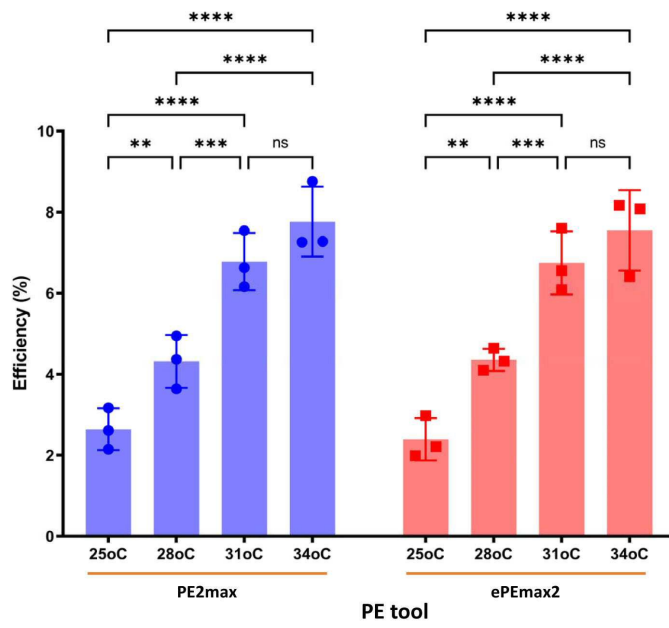
도면11



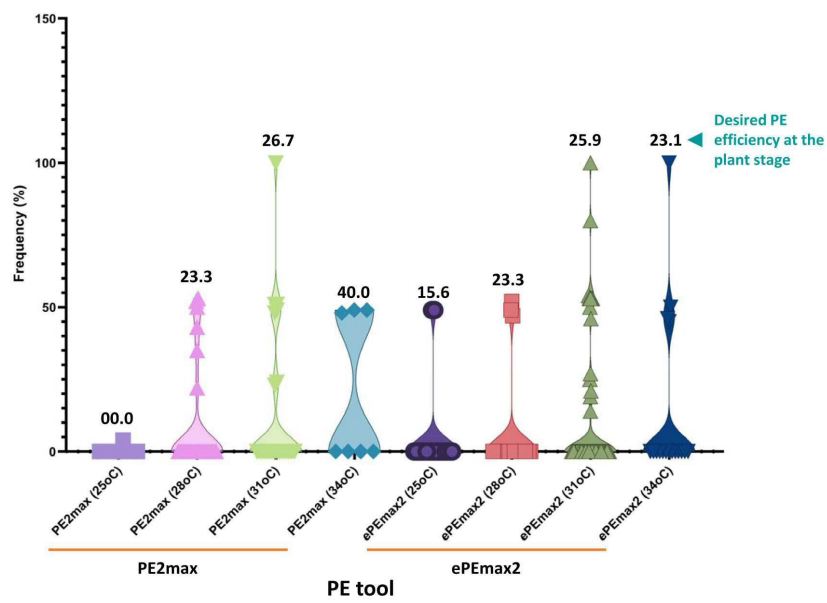
도면12



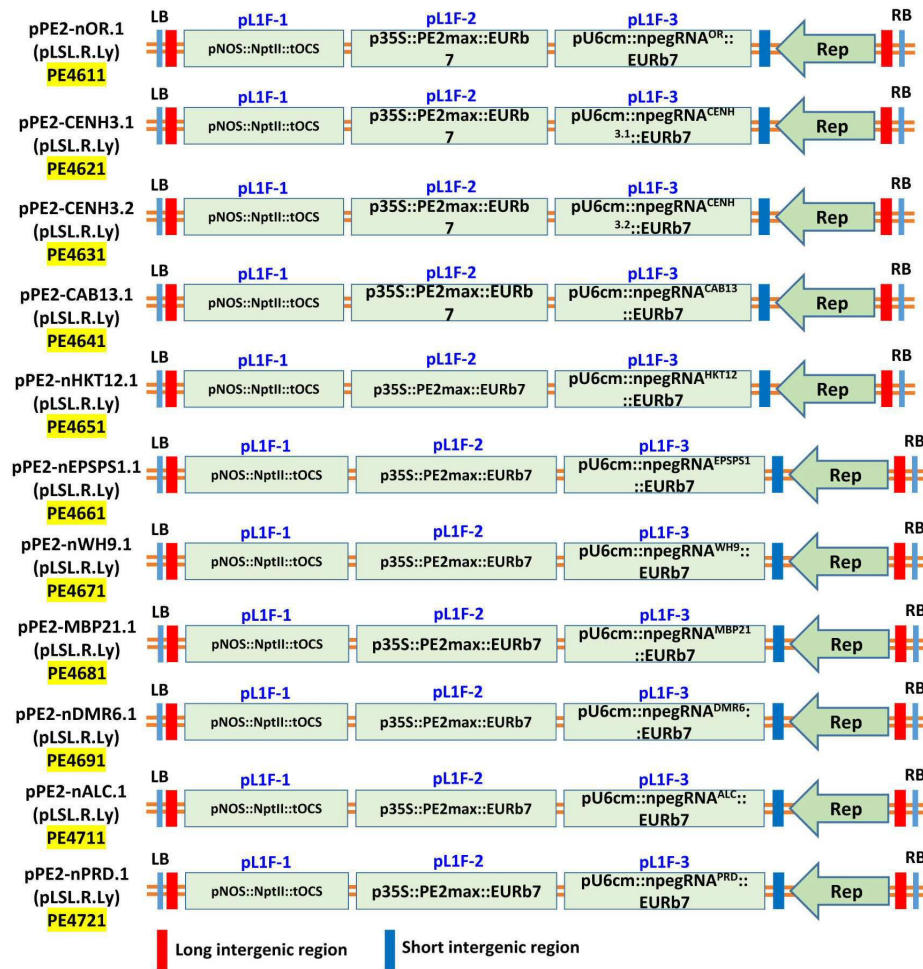
도면13



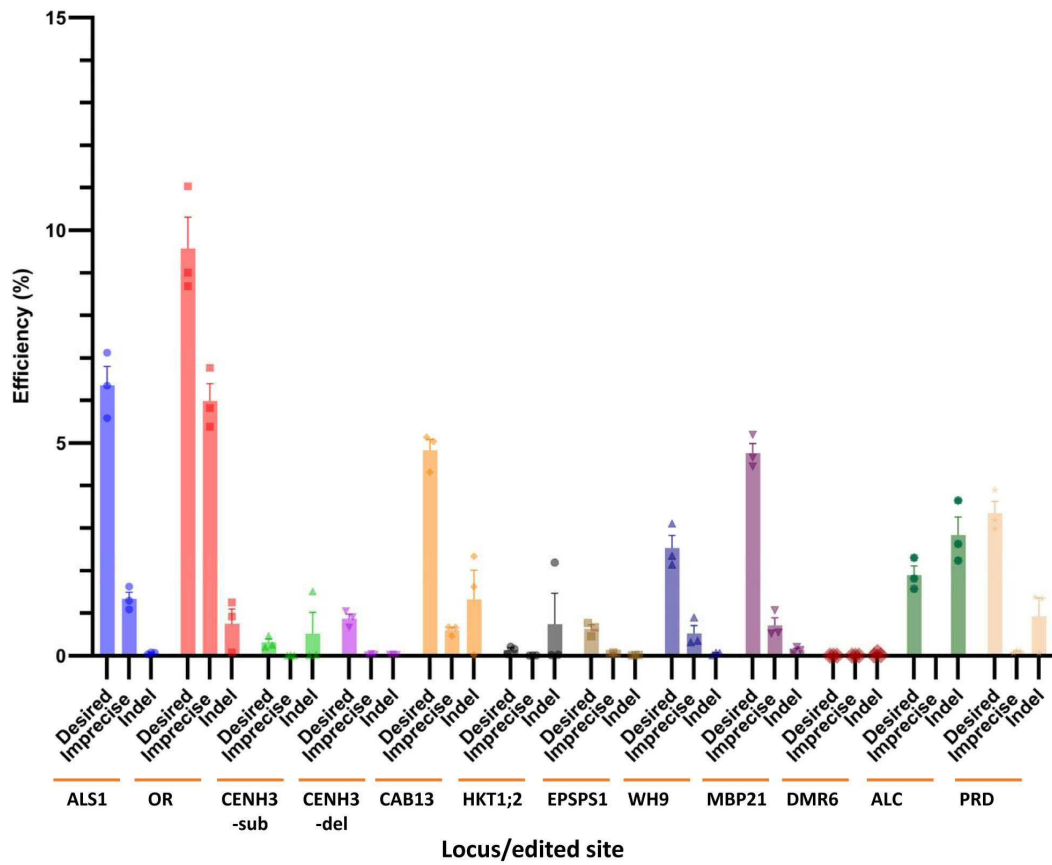
도면14



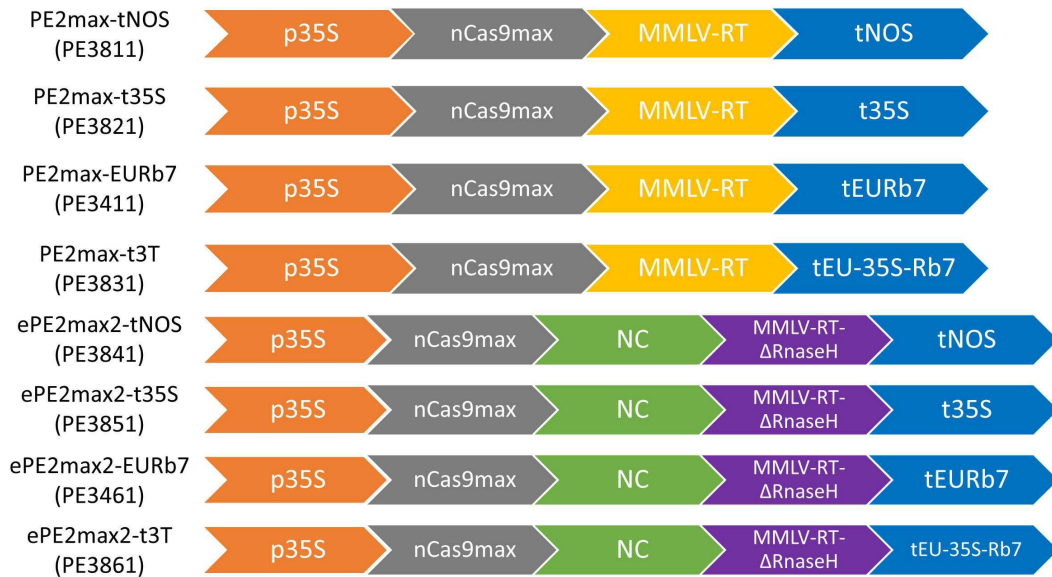
도면15



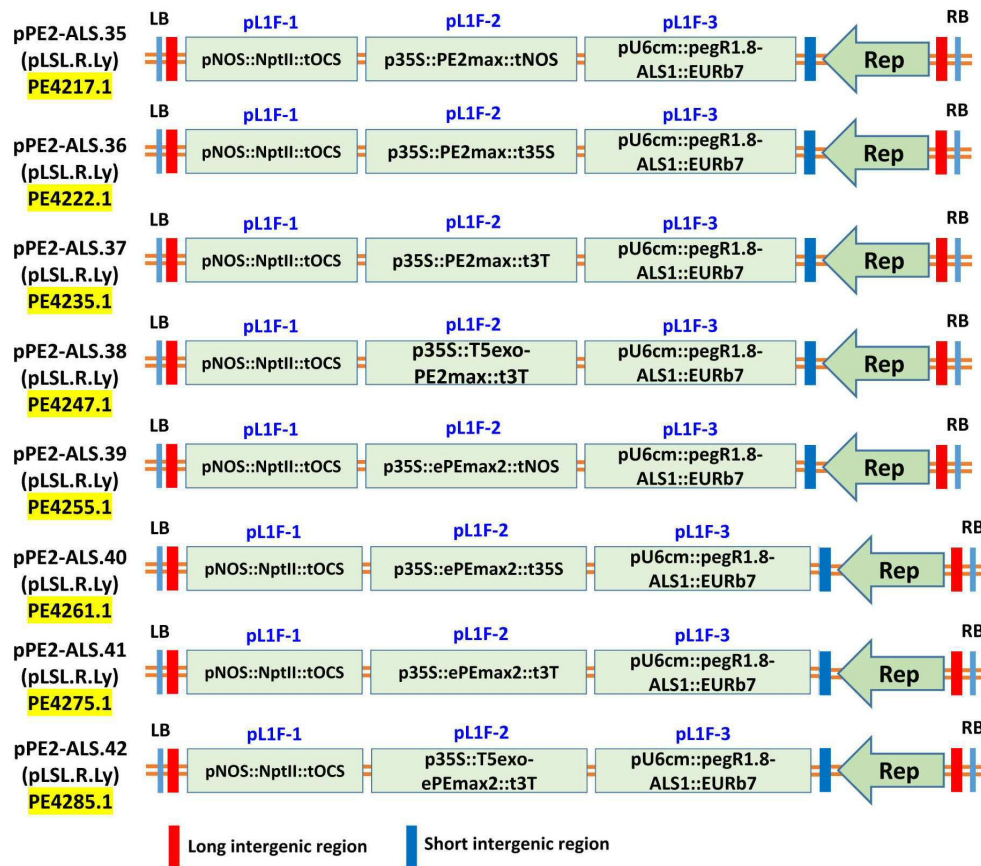
도면16



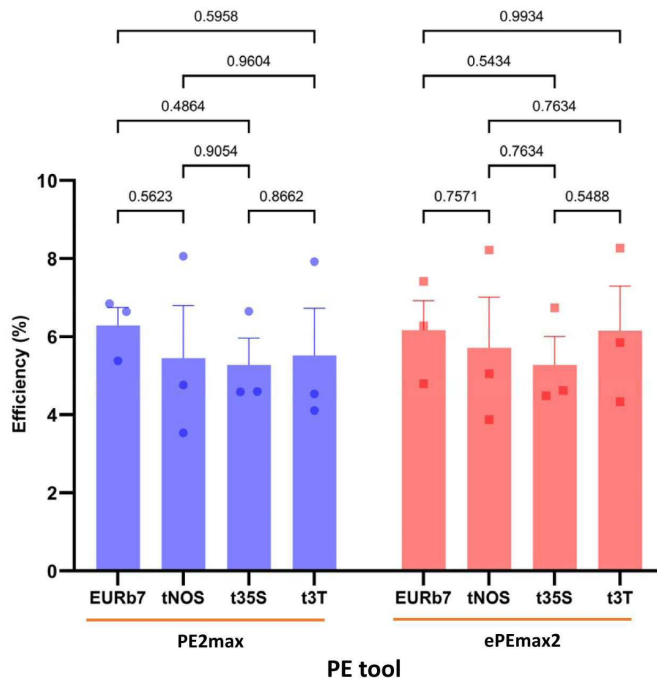
도면17



도면18



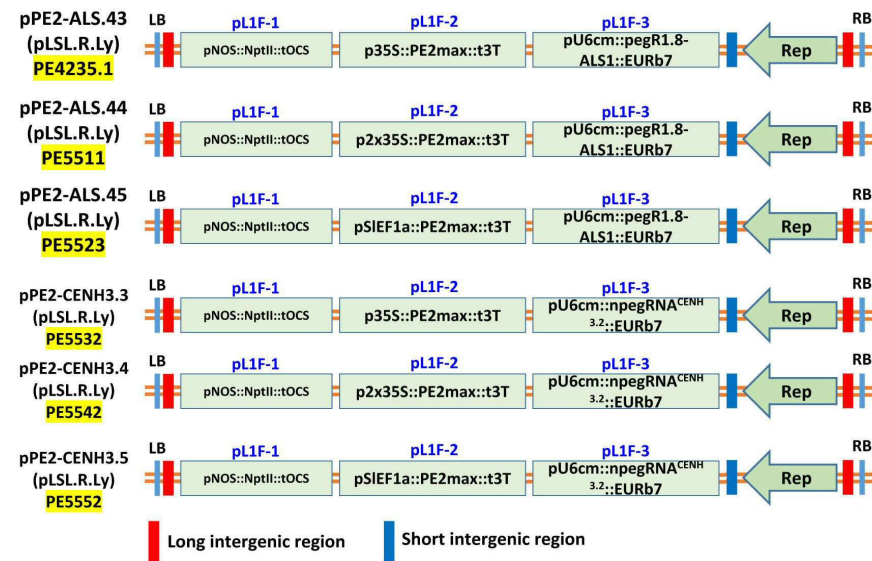
도면19



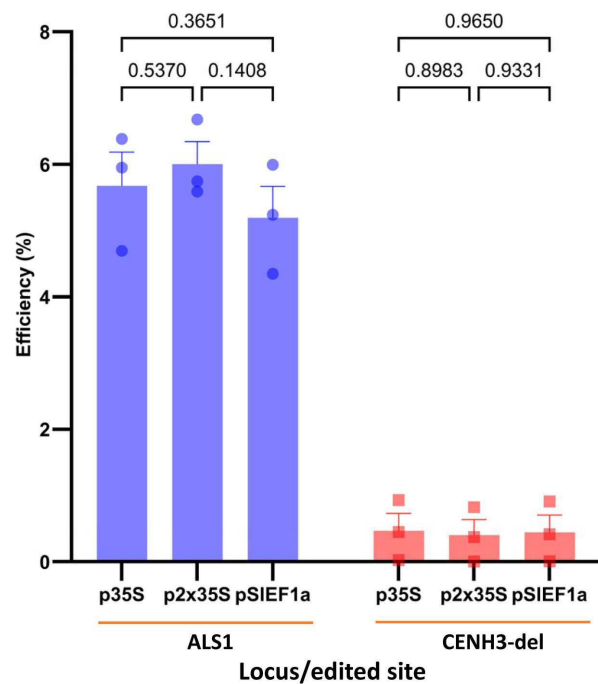
도면20



도면21

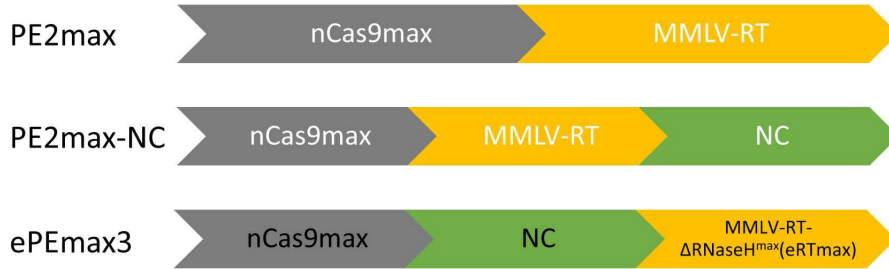


도면22



도면23

PEmax-NC (all the RT bioparts are from PE2max)

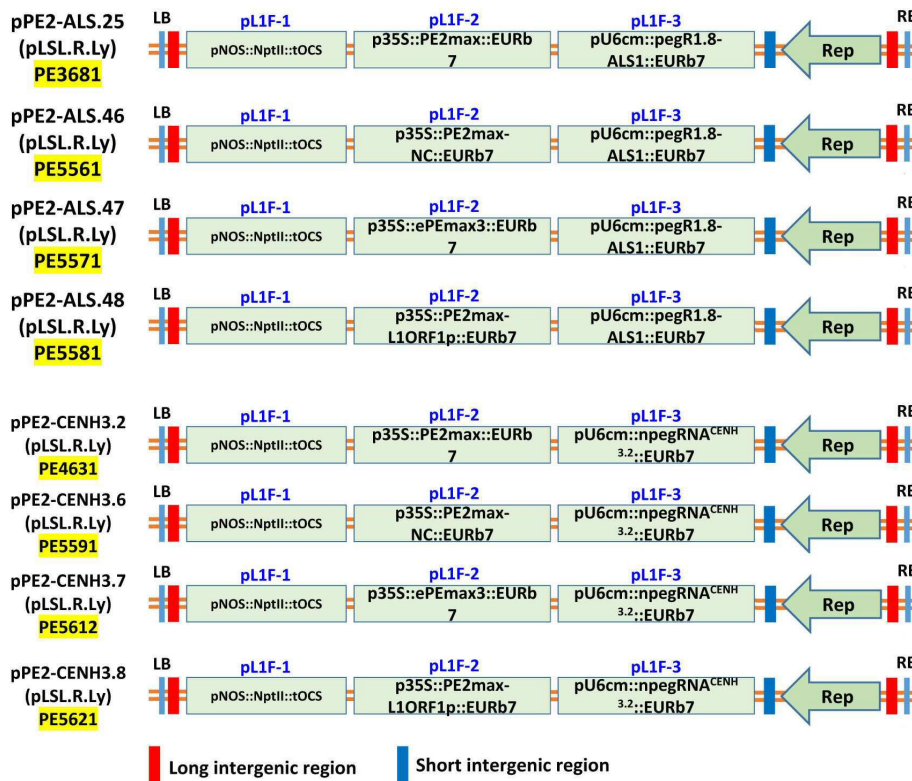


PEmax-L1ORF1p (all the RT bioparts are from PE2max)

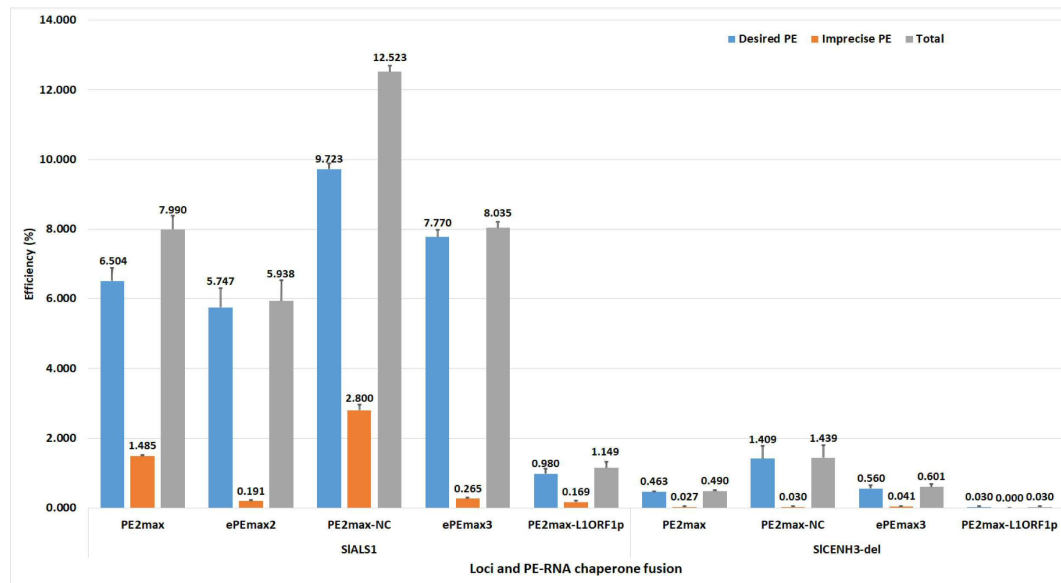


도면24

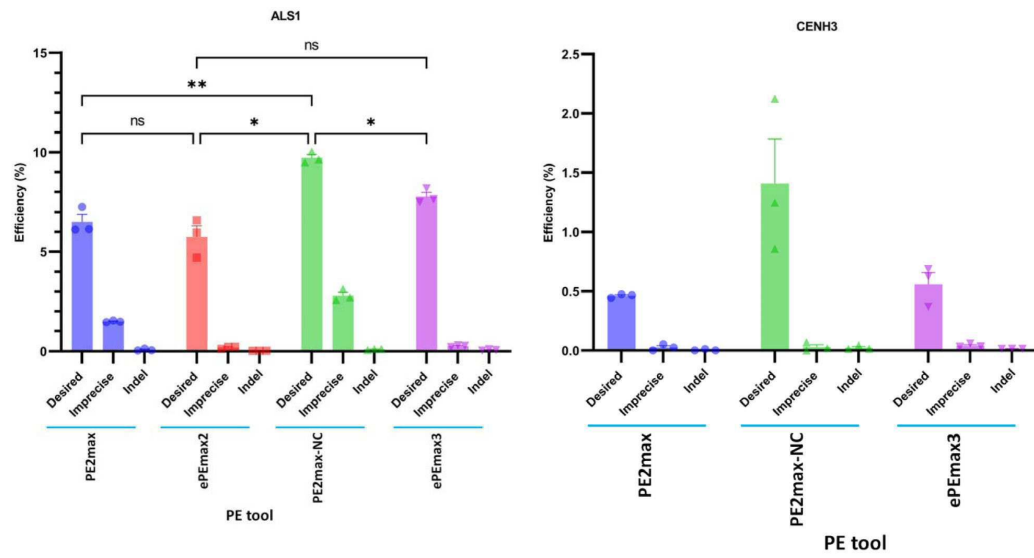
Map of binary vectors used in the experiment



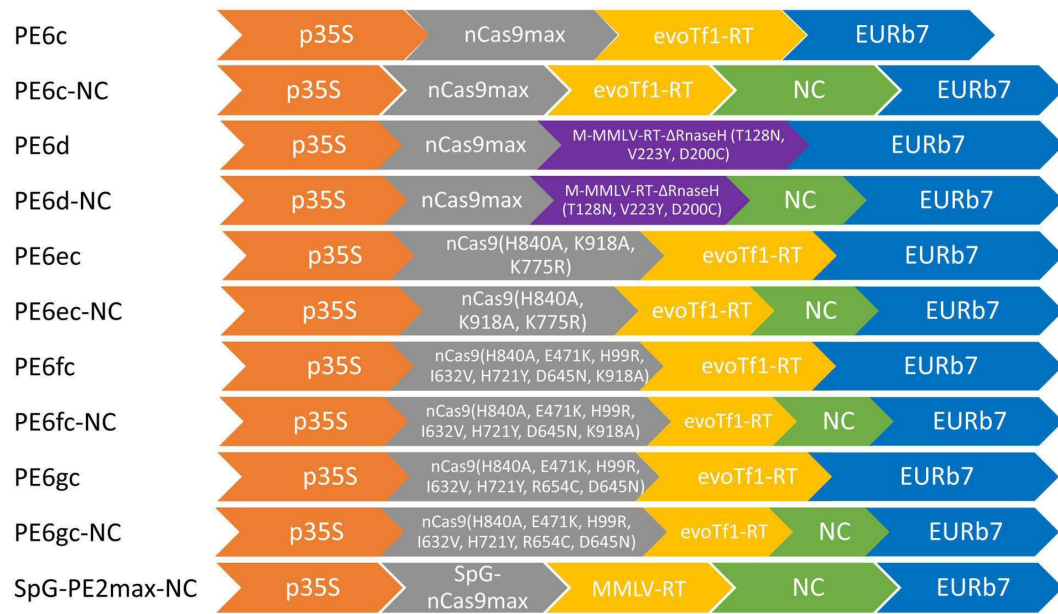
도면25



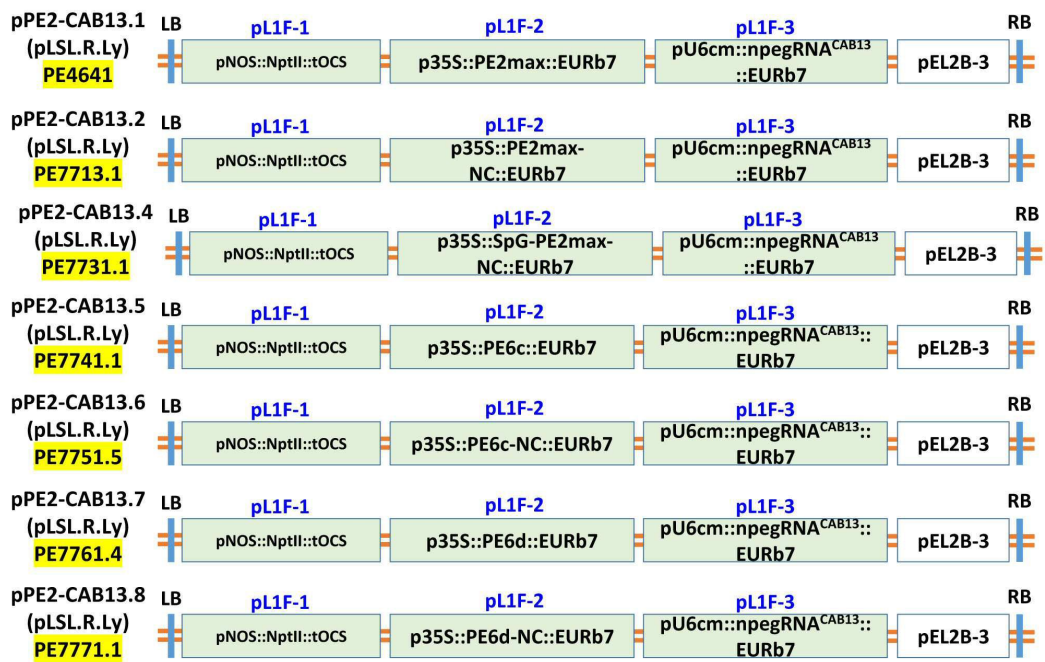
도면26



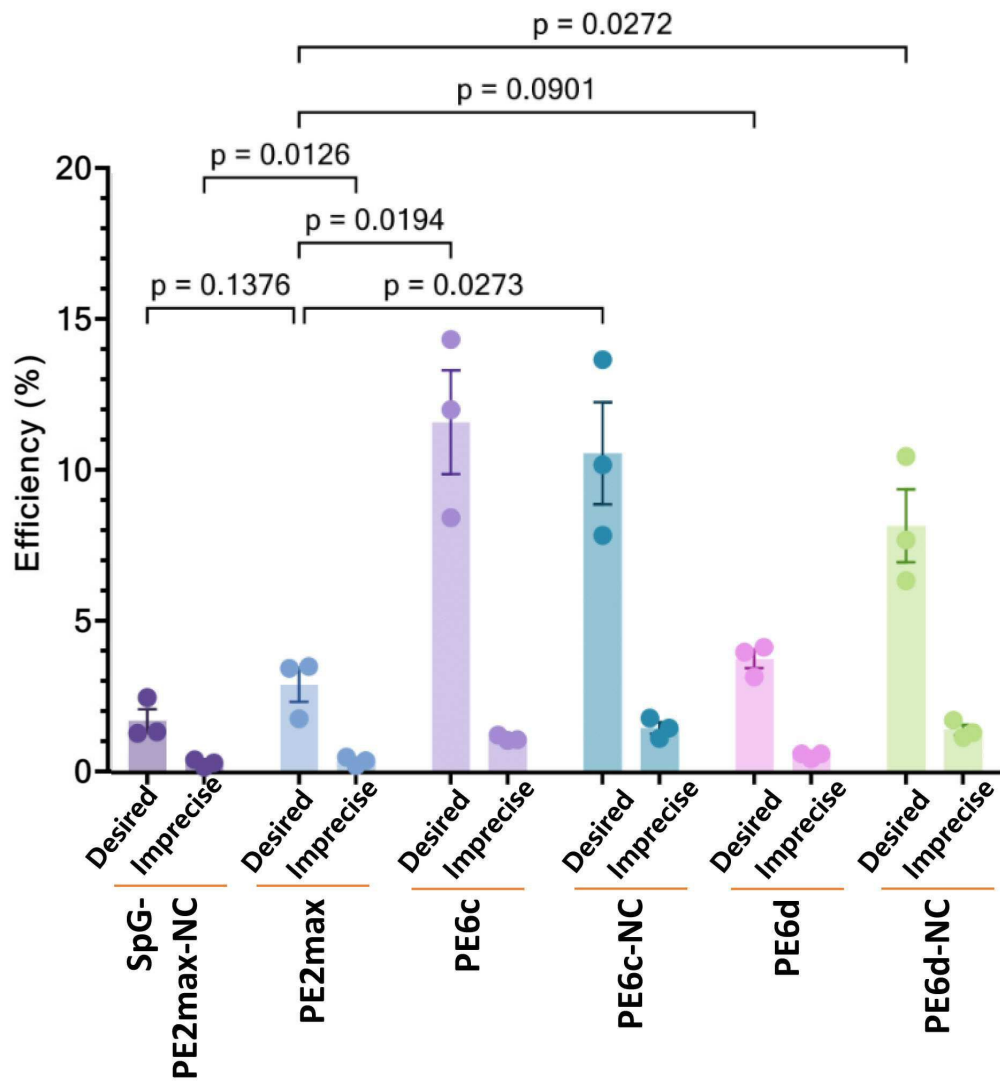
도면27



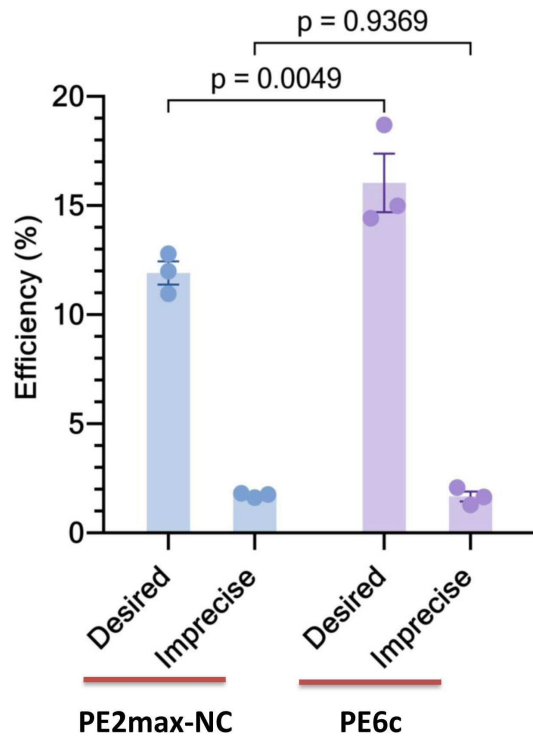
도면28



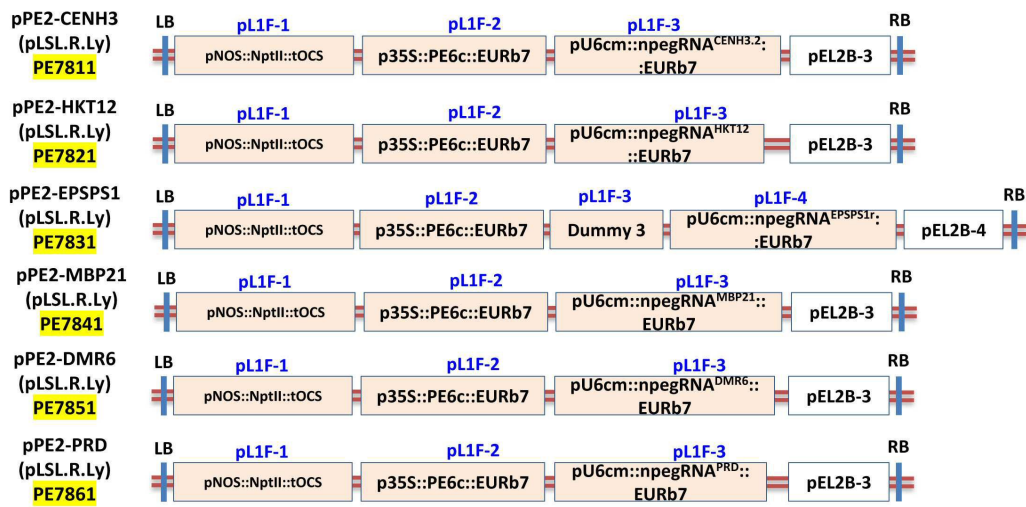
도면29



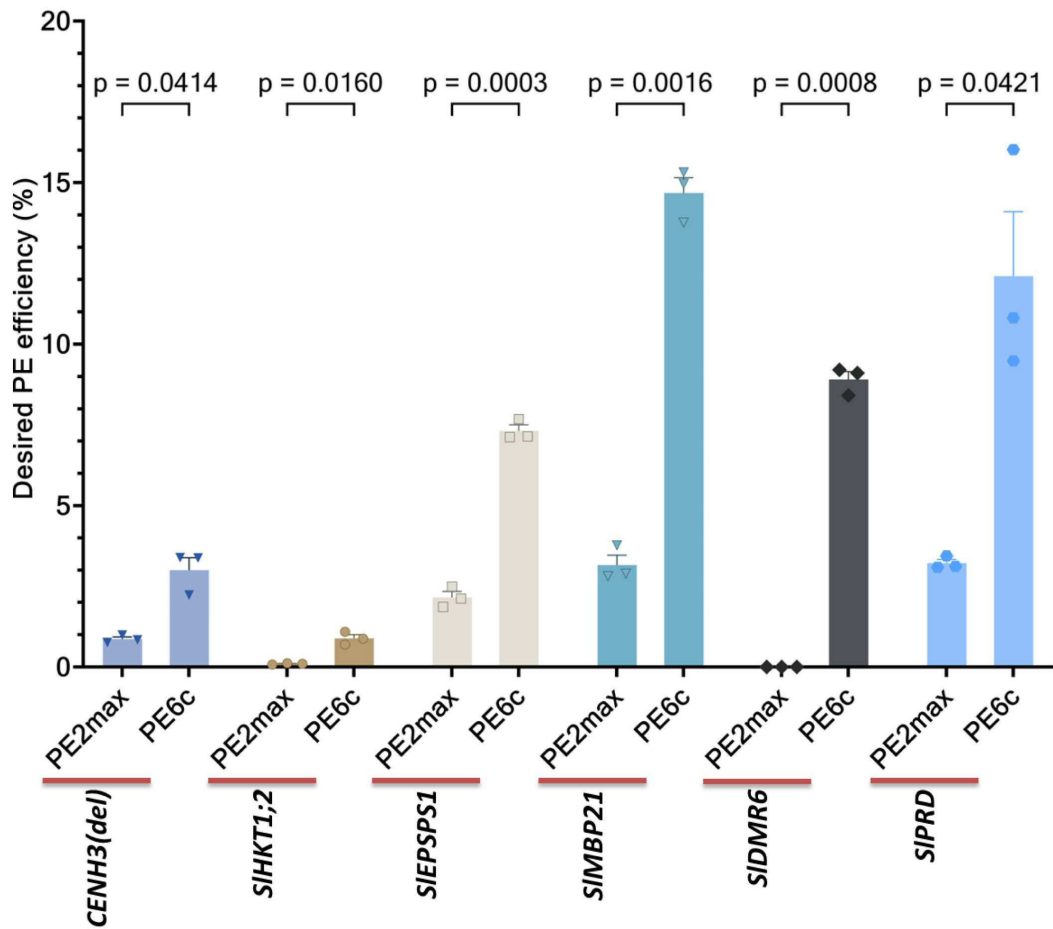
도면30



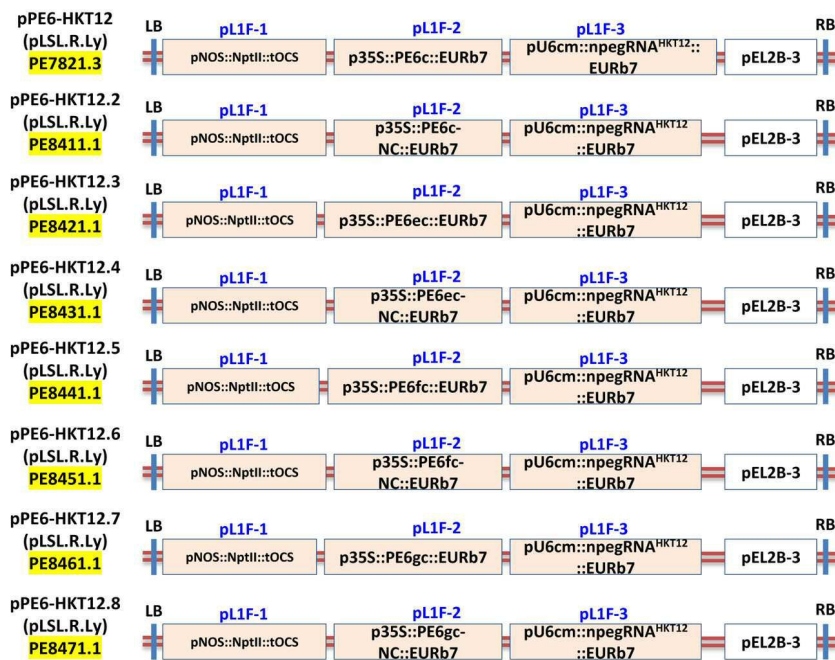
도면31



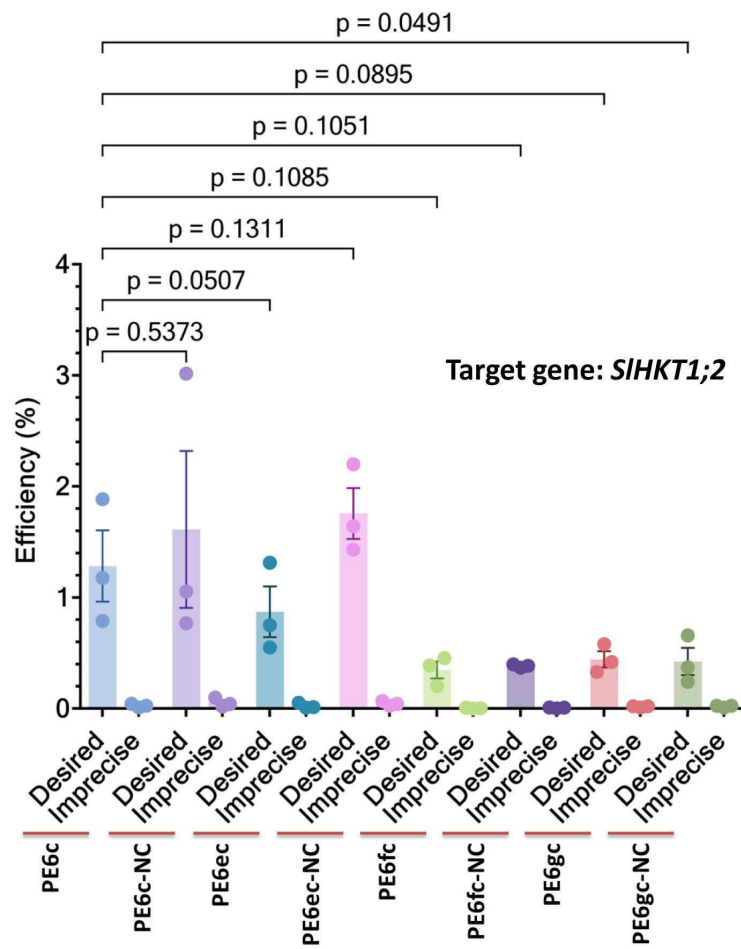
도면32



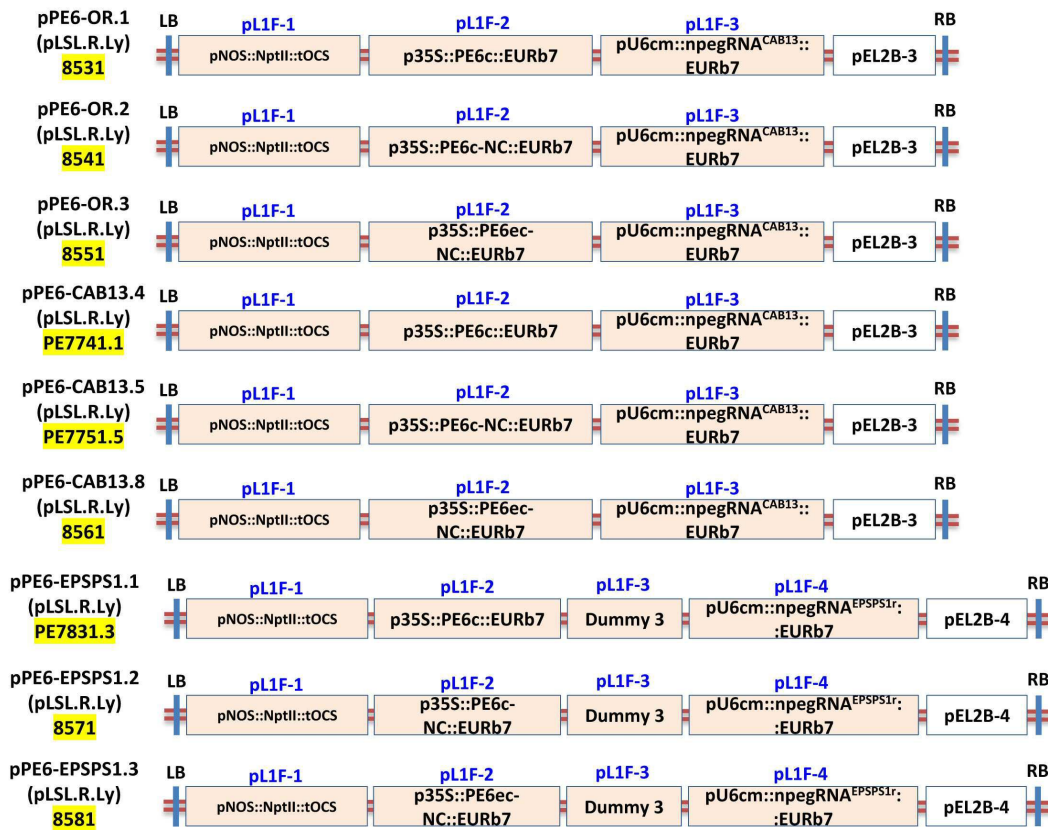
도면33



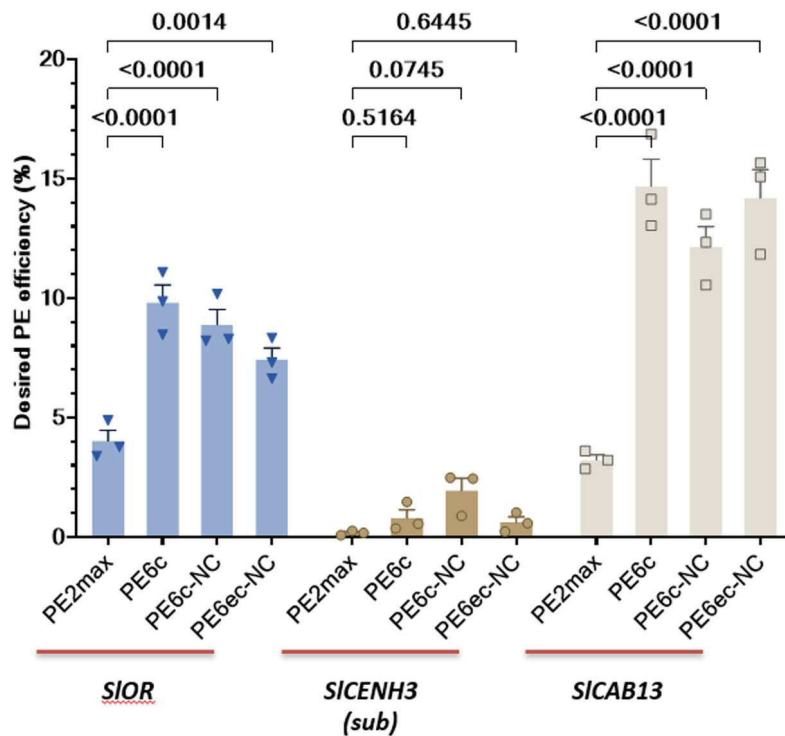
도면34



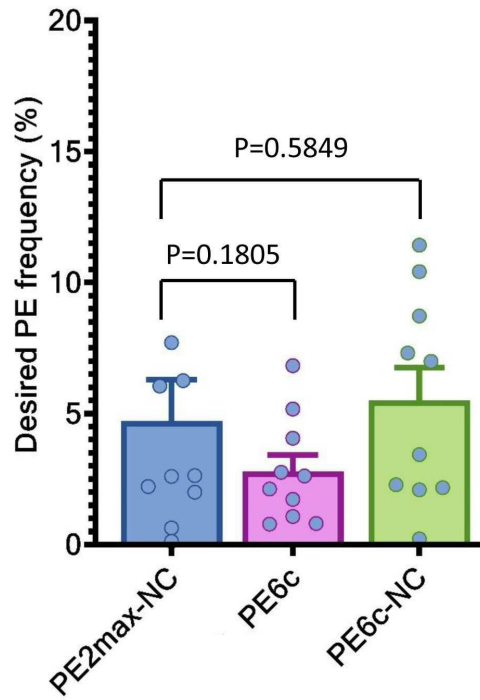
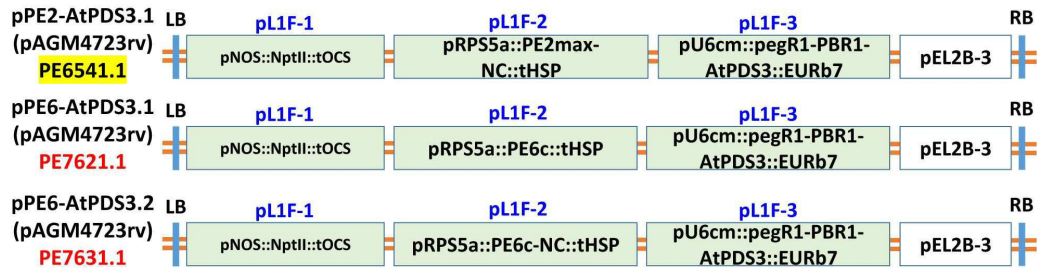
도면35



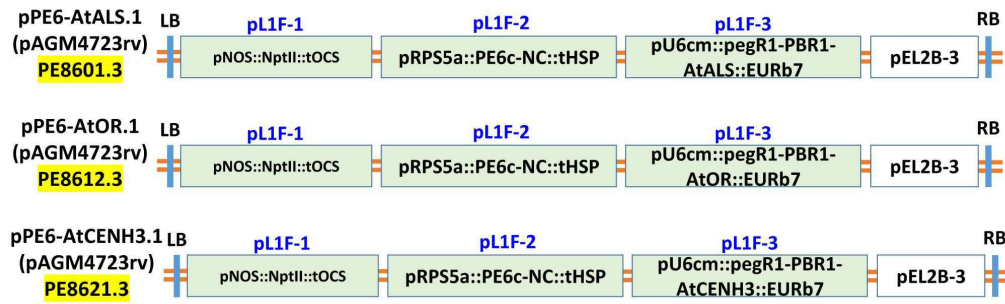
도면36



도면37



도면38



PE efficiency at active sites in *Arabidopsis*

Target	PE2max-NC	PE6c-NC	Fold change
<i>AtALS</i>	0.56 %	5.57 %	9.9
<i>AtOR</i>	0.32 %	0.56 %	1.8
<i>AtCENH3</i>	0.09 %	1.12 %	11.8
<i>AtPDS3</i>	4.02 %	5.24 %	1.3

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.