

CRISPR/Cas9기술로 벼의 유사분열인자활성화단백질 키나제유전자 *OsMPK5*를 표적특이적으로 결실시키기 위한 운반체의 제작

김철갑, 허명식

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《오늘 세포공학, 유전자공학과 같은 첨단과학기술이 빠른 속도로 발전하고있는 조건에서 이러한 과학기술의 성과를 농업과학연구사업에 적용하면 종자문제를 해결하는데서 비약을 일으킬수 있습니다.》(《김정일선집》 증보판 제22권 166페이지)

현재 생명과학분야에서 첨단기술인 게놈편집기술이 개발되어 식물의 육종분야에 도입되면서 커다란 전환이 일어나고있다.[2, 3] 오늘 벼농사에서는 벼열병이 수확고를 떨구는 주요병의 하나로서 그것에 대한 저항성을 가진 벼를 육종하는것은 현실적으로 매우 중요한 문제로 나서고있다.[6, 7] MAP키나제유전자의 하나인 *OsMPK5*는 벼에서 스트레스에 의하여 유도되는 유사분열인자활성화단백질키나제를 암호화한다. *OsMPK5*는 벼에서 방어응답의 음성 조절인자이므로 이 유전자가 기능결실되면 벼의 병저항성이 높아진다.[2, 6, 7]

우리는 CRISPR/Cas9기술로 벼품종 《평양 53》호에서 *OsMPK5*를 표적특이적으로 결실시키기 위한 2중sgRNA발현운반체를 tRNA가공계[2]와 Golden Gate법[4]을 리용하여 만들었다.

재료와 방법

운반체로는 식물의 CRISPR/Cas9발현운반체인 pYLCRISPR/Cas9_{P_{ubi}}-H[3]를, 숙주로는 *Escherichia coli* Top10을 리용하였다. 《평양 53》호의 *OsMPK5*를 결실시키기 위한 sgRNA는 선행연구[2, 6]에 제시된 배열을 리용하였으며 tRNA^{Gly}의 배열은 선행연구[2]에 준하여 설계하였다. 또한 Golden Gate법으로 조립하기 위한 프라이머들과 반응조건들은 선행연구[1]에 준하여 설계하고 반응을 진행하였다. 기타 모든 재조합DNA실험은 선행연구[5]에 준하여 진행하였으며 해당한 프라이머배열과 DNA단편배열은 전문기관에 의뢰하여 합성하였다.

결과 및 논의

1) *OsSWEET14*에 대한 sgRNA배열의 설계

OsMPK5(*Os03g0285800*)는 *Oryza sativa japonica*의 게놈에서 3번 염색체에 놓여있는 MAPK를 암호화하는 유전자로서 생물성 및 비생물성신호전달경로에 참가한다.[2, 6] 우리는 이 유전자를 CRISPR/Cas9법으로 일정한 DNA단편을 결실시키는 방식으로 변이시키기로 하였으므로 2개의 gRNA를 리용하기로 하였다.

*OsMPK5*에 대한 2개의 gRNA배열의 설계 우리 나라의 주요재배벼품종인 《평양 53》호의

*OsMPK5*의 주변배열을 결정하였는데 선행연구[2, 6]에서 리용된 2개의 gRNA에 해당하는 배열들이 일치하였으므로 그것을 그대로 리용하기로 하였다. 우리가 리용한 2개의 gRNA배열은 다음과 같다.

gRNA1: 5'-AGATGTCGTAGAGCAGGTACCCGG-3'

여기서 사선체로 표기한 부분이 제한효소 *KpnI*의 인식배열이고 밑선을 친 부분은 PAM배열이다.

gRNA2: 5'-TGTACATCGCCACGGAGCTCATGG-3'

여기서 사선체로 표기한 부분이 제한효소 *SacI*의 인식배열이고 밑선을 친 부분은 PAM배열이다.

*OsMPK5*에 대한 2중sgRNA발현카세트의 설계 *OsMPK5*를 표적특이적으로 결실시키는데 필요한 두 sgRNA를 식물의 tRNA가공계를 리용하여 발현시키기 위한 sgRNA발현카세트의 구조는 선행연구[1]에 준하여 벼의 U3프로모터+tRNA^{Gly}+gRNA1+sgRNA폴릭+tRNA^{Gly}+gRNA2+sgRNA폴릭+U3터미네터로 이루어지도록 설계하였다. 이 sgRNA발현카세트를 U3프로모터+tRNA^{Gly}로 된 DNA배열과 sgRNA폴릭+tRNA^{Gly}로 된 DNA배열, sgRNA폴릭+U3터미네터로 된 DNA배열을 리용하여 Golden Gate법으로 조립하기 위한 프라이머조의 배열은 다음과 같다.

F1: 5'-TTCAGAGGTCTCTCTCGACTAGTATGGA-3'

R1: 5'-AgggTCTCCTACgACATCTTgCACCAgCCgggAAT-3'

F2: 5'-TgggTCTCTCgTAGAgCAGgTACgTTTTAgAgCTAgAAATAgCAAgT-3'

R2: 5'-AAggTCTCTgCgATgTAGTgCACCAgCCgggAAT-3'

F3: 5'-AAggTCTCTCgCCACggAgCTCAgTTTTAgAgCTAgAAATAgCAAgT-3'

R3: 5'-AGCGTGGGTCTCGACCGCA-3'

2) 필요한 개별적DNA단편들의 PCR합성과 2중sgRNA발현카세트의 조립

sgRNA발현카세트의 조립에 필요한 개별적인 DNA단편들의 PCR합성 위에서 설계한 F1과 R1프라이머를 리용하여 첫번째 DNA단편 즉 벼의 U3프라이머+tRNA^{Gly}+gRNA1의 절반부분으로 된 DNA단편을 U3프로모터+tRNA^{Gly}로 된 DNA배열을 주형으로 PCR를 리용하여 합성하였는데 그 결과는 그림 1과 같다.

그림 1의 2번주로에서 보는바와 같이 목적하는 첫번째 DNA단편의 크기는 559bp로서 해당하는 위치에서 단일띠로 나타났다. 따라서 목적하는 벼의 U3프라이머+tRNA^{Gly}+gRNA1의 절반부분으로 된 DNA단편이 정확히 합성되었다는것을 알 수 있다.

다음 sgRNA폴릭+tRNA^{Gly}로 된 DNA배열을 주형으로 하고 F2와 R2프라이머를 리용하여 목적하는 두번째

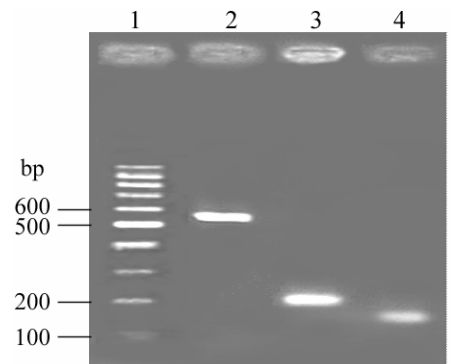


그림 1. 개별적인 DNA단편들에 대한 PCR산물의 아가로스겔 전기영동상

1-분자크기표식자(100bp), 2-벼의 U3프로모터+tRNA^{Gly}+gRNA1의 절반부분으로 된 DNA단편을 PCR로 합성한 아가로스겔전기영동상, 3-벼의 gRNA1절반부분+tRNA^{Gly}+sgRNA폴릭+gRNA2의 절반부분으로 된 DNA단편을 PCR로 합성한 아가로스겔전기영동상, 4-gRNA2절반부분+sgRNA폴릭+U3터미네터로 된 DNA단편을 PCR로 합성한 아가로스겔전기영동상

째 DNA단편 즉 gRNA1절반부분+sgRNA골격+tRNA^{Gly}+gRNA2절반부분으로 된 DNA단편을 PCR로 합성한 결과는 그림 1의 3과 같다.

그림에서 보는바와 같이 목적하는 두번째 DNA단편의 크기는 195bp로서 해당한 위치에서 나타났다. 따라서 목적하는 195bp크기의 gRNA1절반부분+sgRNA골격+tRNA^{Gly}+gRNA2절반부분으로 된 DNA단편이 정확히 합성되었다는것을 알수 있다.

다음 sgRNA골격+U3터미네이터로 된 DNA배열을 주형으로 하고 F3과 R3프라이머를 리용하여 목적하는 세번째 DNA단편 즉 gRNA2절반부분+sgRNA골격+U3터미네이터로 된 DNA단편을 PCR로 합성한 결과는 그림 1의 4와 같다.

그림에서 보는바와 같이 세번째 DNA단편의 크기는 148bp로서 해당한 위치에서 나타났으므로 목적하는 DNA단편이 정확히 합성되었다는것을 알수 있다.

Golden Gate법에 의한 2중sgRNA발현카세트의 조립 우에서 합성한 3개의 DNA단편을 Golden Gate법으로 하나로 연결하여 벼의 *OsMPK5*를 표적특이적으로 결실시키기 위한 2중sgRNA발현카세트를 제작하였다. 해당 반응조건에서 3개의 DNA단편들을 1개의 에펜도프관에 넣고 제한효소 *Bsa*I와 T7 DNA폴리메라제를 리용하여 11h동안 반응시키고 해당 프라이머로 PCR증폭한 결과는 그림 2와 같다.

그림 2에서 보는바와 같이 우에서 개별적으로 PCR증폭하여 얻은 3개의 DNA단편들이 하나로 연결되어 860bp의 DNA단편이 PCR증폭에 의하여 얻어졌다. 따라서 3개의 DNA단편들이 Golden Gate법에 의하여 정확히 연결되어 *OsMPK5*를 표적특이적으로 결실시키기 위한 2중sgRNA발현카세트가 조립되었다는것을 알수 있다.

3) pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H운반체으로의 *OsMPK5*에 대한 2중sgRNA발현카세트의 클론화

우에서 얻은 *OsMPK5*에 대한 2중sgRNA발현카세트의 860bp의 DNA단편을 벼의 CRISPR/Cas9운반체인 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H플라스미드에 Golden Gate법으로 연결하고 *E. coli* Top10에 형질전환시킨 다음 100g/mL의 카나미핀이 들어있는 LB배지에서 형질전환체들을 선발하였다. 다음 얻어진 형질전환체들에서 재조합플라스미드를 분리하고 PCR와 제한효소분해로 그 정확성을 확인하였다.

먼저 재조합플라스미드를 주형으로 하고 선행연구[2]에 제시된 SP-L과 SP-R프라이머로 PCR를 진행하고 제한효소 *Sac*I로 분해하였다.(그림 3)

그림 3에서 보는바와 같이 SP-L과 SP-R프라이머로 PCR를 진행하였을 때 978bp크기의 예상단편이 나타났다. 다음 gRNA발현카세트에 특이적인 프라이머(FP: 5'-ATGGAATCGGCAGCAAAGGACG-3', RP: 5'-CATCCACTCCAAGCTCTTGAAA-3')로 PCR를 진행하였을 때 그림 4에서와 같이 대조플라스미드에는 없는 816bp크기의 DNA단편이 생겨났다. 따라서 벼의 CRISPR/Cas9운반체인 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H에 *OsMPK5*를 표적특이적으로 결실시키기 위한 2중sgRNA발현카세트가 정확히 삽입되었다는것을 알수 있다. 이렇게 제작된 재조합플라스미드 pYLCRISPR/Cas9-MPK5:2sgRNAs의 물리적지도는 그림 5와 같다.

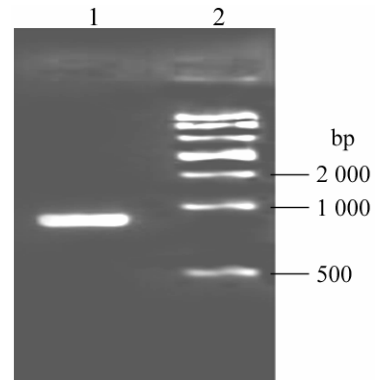


그림 2. 2개의 DNA단편을 Golden Gate법으로 연결하고 PCR로 증폭한 산물의 아가로스겔전기영동상
1-PCR산물, 2-분자크기 표식자(1kb)

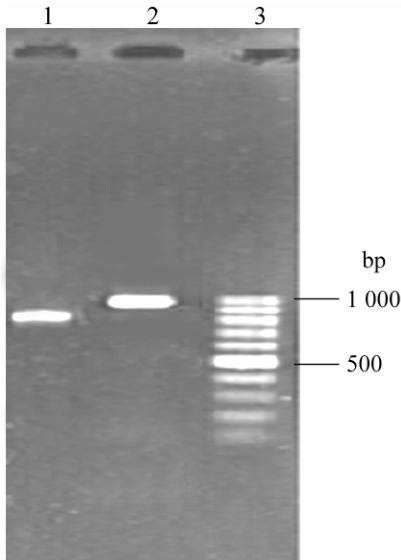


그림 3. SP-L과 SP-R 프라이머를 리용한 PCR산물의 아가로스겔 전기영동상

1-출발플라스미드에 대한 PCR산물,
2-재조합플라스미드에 대한 PCR산물,
3-분자크기표식자(100bp)

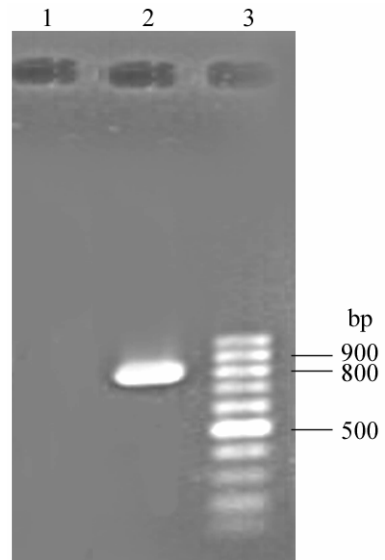


그림 4. sgRNA 발현 카세트에 특이적인 프라이머를 리용한 PCR산물의 아가로스겔 전기영동상

1-출발플라스미드에 대한 PCR산물,
2-재조합플라스미드에 대한 PCR산물,
3-분자크기표식자(100bp)

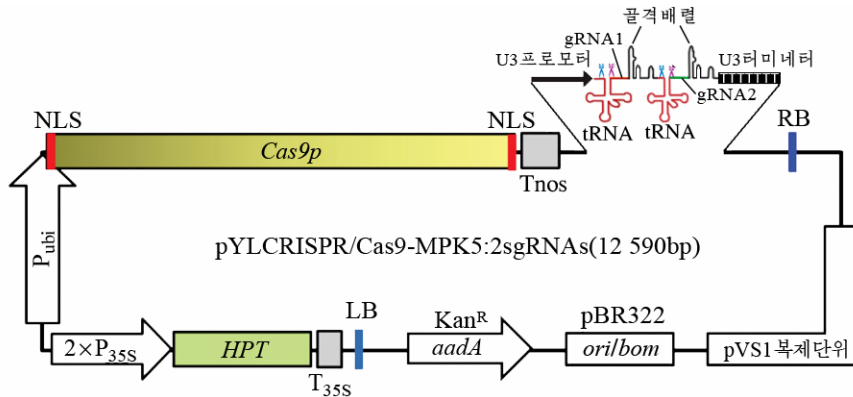


그림 5. 플라스미드 pYLCRISPR/Cas9-MPK5:2sgRNAs의 물리적 지도

맺 는 말

우리 나라의 재배벼품종인 《평양 53》호의 *OsMPK5*의 주변령역을 배렬결정하고 그 부분의 DNA단편을 표적특이적으로 결실시키는데 필요한 2개의 sgRNA를 tRNA가공계와 벼의 U3프로모터-터미네터를 리용하여 조립하기 위한 프라이머들과 sgRNA발현카세트를 설계하고 Golden Gate법으로 조립하였다.

*OsMPK5*를 표적특이적으로 결실시키기 위한 2중sgRNA발현카세트를 식물의 CRISPR/Cas9 운반체인 pYLCRISPR/Cas9_{P_{ubi}}-H에 Golden Gate법으로 클론화하고 그 정확성을 확인하였다.

참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보 생명과학, 64, 2, 71, 주체107(2018).
- [2] K. Xie et al.; PNAS, 112, 11, 3570, 2015.
- [3] X. Ma et al.; Mol. Plant, 8, 1274, 2015.
- [4] C. Engler et al.; PLoS ONE, 3, 11: e3647.DOI:10.1371/journal.pone.0003647, 2008.
- [5] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 105~122, 2001.
- [6] K. Xie et al.; Mol. Plant, 6, 1975, 2013.
- [7] K. Xie et al.; Plant Cell, DOI: 10.1105/tpc.114.126441, 2014.

주체108(2019)년 4월 5일 원고접수

Construction of a Plasmid Vector for Targeted Deletion of Rice Mitogen-Activated Protein Kinase Gene, *OsMPK5*, by CRISPR/Cas9 System

Kim Chol Gap, Ho Myong Sik

Recent advances in genome editing technologies based on the CRISPR/Cas9 system are driving innovative application from basic biology to plant biotechnology. Here we report the construction of a plasmid vector for targeting *OsMPK5* by CRISPR/Cas9 system. We sequenced appropriate region of *OsMPK5* from our countries' cultivars "Pyongyang No. 53", designed some primers for assembling *OsMPK5*-targeted dual sgRNAs-expressing cassette based on the tRNA processing system and rice U3 promoter-terminator, followed by obtaining three DNA fragments using step-by-step PCRs with them, and brought them together using Golden Gate method. This *OsMPK5*-targeted dual sgRNA-expressing cassette was cloned into rice CRISPR/Cas9 vector, pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H using Golden Gate method and was given their entity.

Key words: CRISPR/Cas9, rice, "Pyongyang No. 53", *OsMPK5*, tRNA processing system, Golden Gate method, rice blast