

CRISPR/Cas9계로 벼의 리상초형유전자 *OsIPA1*을 표적특이적으로 변이시키기 위한 운반체의 제작

석원희, 김순의, 허명식

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《종자연구에 현대과학기술의 성과를 적극 받아들여야 합니다. 오늘 세포공학, 유전자 공학과 같은 첨단과학기술이 빠른 속도로 발전하고있는 조건에서 이러한 과학기술의 성과를 농업과학연구사업에 적용하면 종자문제를 해결하는데서 비약을 일으킬수 있습니다. 농업부문의 과학연구기관들에서는 첨단과학기술을 받아들여 육종사업에서 전환을 일으키도록 하여야 합니다.》(《김정일선집》 증보판 제22권 165~166페이지)

최근 CRISPR/Cas9계에 기초한 게놈편집기술이 발전하면서 기초생물학분야로부터 식물 생물공학에 이르기까지 그것이 급속히 응용되고있다.[2, 3]

세계적으로 이미 벼에서 리상초형유전자(*OsIPA1*)에 있는 *OsmiR156*의 표적부위가 특이적으로 변이되면 벼가 리상적인 초형을 가지고 대가 강해지고 굵어지면서 잘 넘어지지 않게 된다는것이 알려졌다.[6-8]

이로부터 우리는 CRISPR/Cas9기술로 우리 나라의 주요재배벼품종 《평양 53》호에서 *OsIPA1*을 표적특이적으로 편집하기 위한 sgRNA발현운반체를 tRNA가공계[2]와 Golden Gate 법[4]을 리용하여 만들었다.

재료와 방법

형질전환숙주로는 *Escherichia coli* Top10을, 클론화운반체로는 식물의 대표적인 CRISPR/Cas9발현운반체인 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H[3] 리용하였다. 《평양 53》호의 *OsIPA1*을 편집하기 위한 sgRNA는 선행연구[8]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. 유전자재조합실험은 선행연구[5]에 준하여 진행하였는데 TIAN pure Midi플라스미드분리정제키트(《TIANGEN》), SanPrep PCR 산물정제키트(《Sangon》), KOD-Plus-Neo pol키트(《TOYOBO》), T7 DNA리가제(《Promega》) 등을 리용하였다. 해당한 프라이머배열과 DNA단편배열은 전문기관에 의뢰하여 합성하였다.

결과 및 논의

1) *OsIPA1*에 대한 gRNA배열과 프라이머의 설계

OsIPA1(일명 *OsSPL14*, *Os08g0509600*로도 표시)은 *Oryza sativa japonica*의 게놈에서 8번 염색체에 놓여있으며 3개의 엑손으로 된 유전자로서 mRNA의 길이는 4 156bp이고 CDS길이는 1 254bp이며 418개의 아미노산으로 된 전사활성화인자를 암호화한다.

*OsIPA1*에 대한 gRNA배열의 설계 먼저 《평양 53》호의 *OsIPA1*의 *OsmiR156*표적부위와 그 주변배열을 PCR로 증폭하고(그림 1) 배열을 결정하였다.

그림 1에서 보는바와 같이 증폭산물의 길이는 900bp 정도로서 해당한 위치에서 단일띠로 나타났다. 그리고 이 증폭산물의 1차 구조(832bp)와 벼게놈자료의 배열을 비교한 결과 상동성이 100%였으므로 선행연구[8]에서 리용된 gRNA배열을 그대로 리용하기로 하였다. 우리가 리용한 gRNA의 배열은 다음과 같다.

gRNA: 5'-AGCACAGCTCGAGTCGGTGGCGG-3'

여기서 사선으로 표기한 배열은 제한효소 *XhoI*의 인식배열이고 밑선을 친 배열은 PAM배열이다.

*OsIPA1*에 대한 sgRNA발현카세트조립용 프라이머의 설계 *OsIPA1*을 표적특이적으로 파괴하는데 필요한 sgRNA를 식물의 tRNA가 공계를 리용하여 발현시키기 위한 sgRNA발현카세트의 구조는 선행연구[1]에 준하여 벼U3프로모터+벼tRNA^{Gly}+gRNA+sgRNA골격배열+벼U3터미네터로 설계하였다. 이 sgRNA발현카세트를 U3프로모터+tRNA^{Gly}로 된 DNA배열과 sgRNA골격+U3터미네터로 된 DNA배열을 리용하여 Golden Gate법으로 조립하기 위한 프라이머조의 배열은 다음과 같다.

F1: 5'-TTCAGAGGTCTCTCTCGACTAGTATGGA-3'

R1: 5'-TAGGTCTCCGAGCTGTGCTTGCACCGCCGGAAT-3'

F2: 5'-TAGGTCTCAGCTCGAGTCGGTGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT-3'

R2: 5'-AGCGTGGGTCTCGACCGCA-3'

2) 필요한 개별적DNA단편들의 PCR합성과 sgRNA발현카세트의 조립

sgRNA발현카세트의 조립에 필요한 개별적인 DNA단편들의 합성 위에서 설계한 F1과 R1 프라이머를 리용하여 첫번째 DNA단편 즉 벼U3프로모터+tRNA^{Gly}+gRNA의 절반부분으로 된 DNA단편을 벼U3프로모터+tRNA^{Gly}로 된 DNA배열을 주형으로 PCR로 합성하였다.(그림 2)

그림 2에서 보는바와 같이 목적하는 첫번째 DNA단편의 크기는 559bp로서 해당한 위치에서 단일띠로 나타났다. 따라서 목적하는 벼U3프로모터+tRNA^{Gly}+gRNA의 절반부분으로 된 DNA단편이 정확히 합성되었다는것을 알수 있다.

다음 우리는 sgRNA골격+벼U3터미네터로 된 DNA배열을 주형으로 하고 F2와 R2프라이머를 리용하여 목적하는 두번째 DNA단편 즉 gRNA절반부분+sgRNA골격+벼U3터미네터로 된 DNA단편을 PCR로 합성하였다.(그림 3)

그림 3에서 보는바와 같이 목적하는 두번째 DNA단편의 크기는 150bp로서 해당한 위치에서 나타났다. 따라서 목적하는 150bp 크기의 gRNA절반부분+sgRNA골격+벼U3터미네터로 된 DNA단편이 정확히 합성되었다는것을 알수 있다.

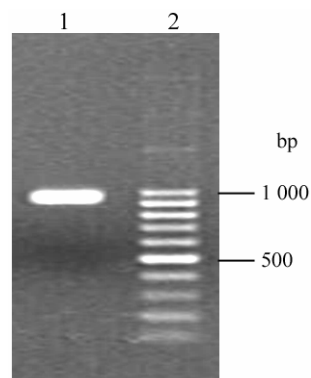


그림 1. 《평양 53》호의 *OsIPA1*의 *OsmiR156*표적부위와 그 주변배열의 증폭산물
1-PCR산물, 2-100bp DNA 분자크기표식자

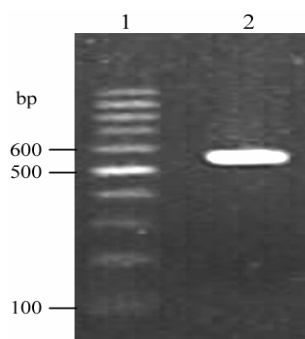


그림 2. 벼의 U3프로모터+tRNA^{Gly}+gRNA의 절반부분으로 된 DNA단편을 PCR로 합성한 아가로스겔 전기영동상
1-100bp DNA분자크기표식자, 2-PCR산물

Golden Gate법에 의한 sgRNA발현카세트의 조립 우에서 합성한 2개의 DNA단편을 Golden Gate법으로 하나로 연결하여 벼의 *OsIPAI*를 표적특이적으로 파괴하기 위한 sgRNA발현카세트를 제작하였다. 해당 반응조건에서 2개의 DNA단편들을 1개의 에펜도프관에 넣고 제한효소 *BsaI*과 T7 DNA폴리메라제를 리용하여 8h동안(37°C 5min→25°C 10min 25회 순환→25°C 1h→50°C 30min→80°C 20min) 반응시키고 해당 프라이머로 PCR증폭하였다.(그림 4)

정방향프라이머: 5'-TTCAGAGGTCTCTCTCGACTAGTATGGA-3',

역방향프라이머: 5'-AGCGTGGGTCTCGACCGCA-3'

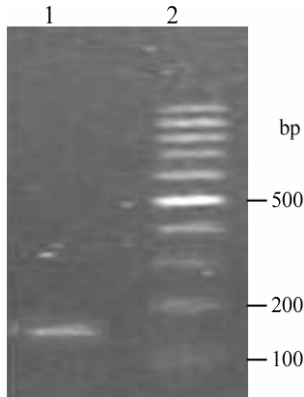


그림 3. gRNA절반부분 + sgRNA
골격 + U3터미네이터로 된 DNA
단편을 PCR법으로 합성한
아가로즈겔전기영동상
1-PCR산물, 2-100bp DNA
분자크기표식자

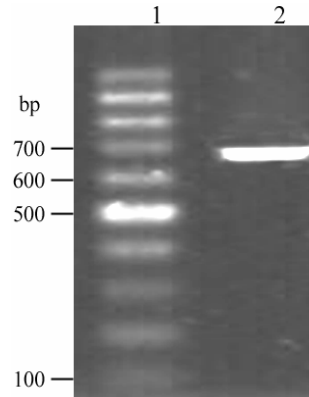


그림 4. 2개의 DNA단편을
Golden Gate법으로 연결
하고 PCR로 증폭한 산물의
아가로즈겔전기영동상
1-100bp DNA분자크기
표식자, 2-PCR산물

그림 4에서 보는바와 같이 2개의 DNA단편들이 하나로 연결되었으며 PCR에 의하여 증폭된 687bp의 DNA 단편이 단일띠로 얻어졌다. 따라서 2개의 DNA단편들이 Golden Gate법에 의하여 정확히 연결되어 *OsIPAI*를 표적특이적으로 변이시키기 위한 sgRNA발현카세트가 조립되었다는것을 알수 있다.

3) *OsIPAI*에 대한 sgRNA발현카세트의 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H운반체로의 클론화

우에서 얻은 *OsIPAI*에 대한 sgRNA발현카세트를 식물의 CRISPR/Cas9운반체인 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H플라즈미드에 Golden Gate법으로 연결하고 *E. coli* Top10에 형질전환시킨 다음 50μg/mL의 카나미신이 들어있는 LB 배지에서 형질전환체들을 선발하였다. 다음 얻어진 형질전환체들에서 재조합플라즈미드를 분리하고 PCR와 제한효소분해로 그 정확성을 확인하였다.(그림 5, 6)

먼저 재조합플라즈미드를 주형으로 하고 sgRNA

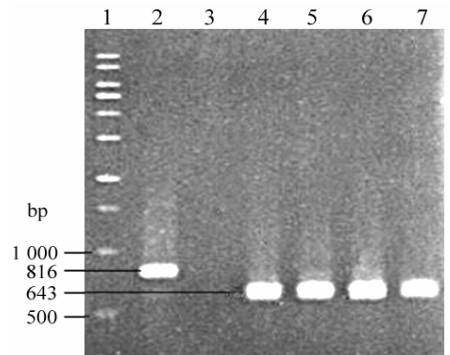


그림 5. *E. coli* Top10의 형질전환체에서
분리한 플라즈미드에 대한 PCR산물의
아가로즈겔전기영동상
1-1kb DNA분자크기표식자, 2-pYLCRISPR/
Cas9-TGW6-2sgRNA에 대한 PCR산물,
3-pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H에 대한
PCR산물, 4-7은 재조합플라
즈미드에 대한 PCR산물

발현카세트에 특이적인 프라이머(U3-FP: 5'-ATGGAATCGGCAGCAAAGGACG-3', U3-RP: 5'-CATCCACTCCAAGCTCTTGAAA-3')로 PCR를 진행하였다.(그림 5)

그림 5에서 보는바와 같이 재조합플라스미드를 주형으로 PCR를 진행하였을 때에는 643bp크기의 예상단편이, pYLCRISPR/Cas9-TGW6-2sgRNA[1]를 주형으로 하였을 때에는 816bp의 단편이 나타났으며 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H를 주형으로 하였을 때에는 증폭산물이 생기지 않았다.

다음 재조합플라스미드를 주형으로 하고 선행연구[2]에 제시된 SP-L과 SP-R프라이머로 PCR를 진행하고 제한효소 *Xho*I로 분해하였다.(그림 6)

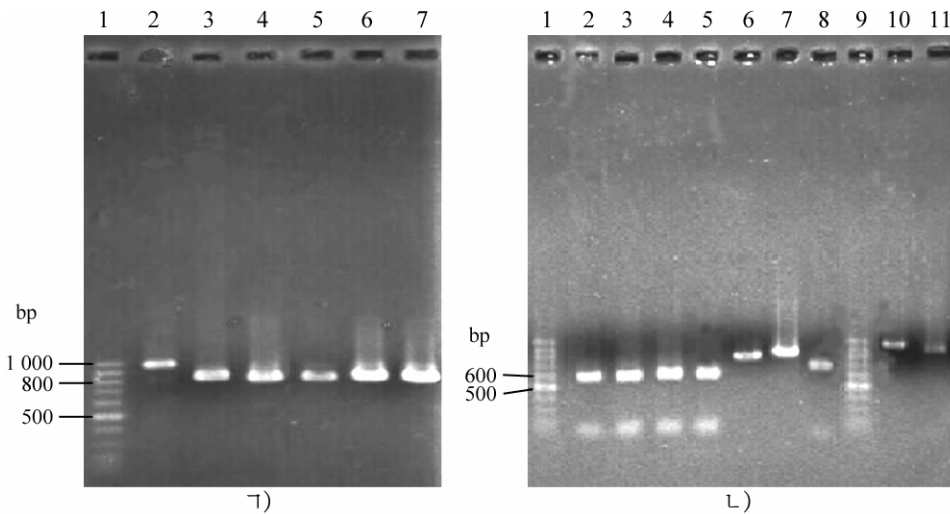


그림 6. SP-L와 SP-R프라이머를 리용한 PCR산물과 그것을 제한효소 *Xho*I로 처리한 단편들의 아가로스겔전기영동상

7) SP-L와 SP-R프라이머를 리용한 재조합플라스미드들에 대한 PCR산물의 아가로스겔전기영동상: 1-100bp DNA분자크기표식자, 2-pYLCRISPR/Cas9-TGW6-2sgRNA에 대한 PCR산물, 3-pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H에 대한 PCR산물, 4-7은 재조합플라스미드에 대한 PCR산물; L) PCR산물을 제한효소 *Xho*I로 처리한 단편들의 아가로스겔전기영동상, 1-100bp DNA분자크기표식자, 2-5는 재조합플라스미드에 대한 PCR산물을 *Xho*I로 처리한것, 6-제한효소로 처리하지 않은 재조합플라스미드에 대한 PCR산물, 7-제한효소로 처리하지 않은 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H에 대한 PCR산물, 8-pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H에 대한 PCR산물을 *Xho*I로 처리한것, 9-100bp DNA분자크기표식자, 10-pYLCRISPR/Cas9-TGW6-2sgRNA에 대한 PCR산물, 11-pYLCRISPR/Cas9-TGW6-2sgRNA에 대한 PCR산물을 *Xho*I로 처리한것

그림 6에서 보는바와 같이 SP-L과 SP-R프라이머로 PCR를 진행하였을 때 805bp 크기의 예상단편이 나타났으며 원래 gRNA속에 인식배열을 가지고있는 제한효소 *Xho*I로 절단하였을 때 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H의 경우(이 운반체속에 있는 *ccdB*유전자속에 *Xho*I절단부위가 있다.)와 다른 단편이 생겨났다. 따라서 식물의 CRISPR/Cas9운반체인 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H에 *OsIPA1*을 표적특이적으로 파괴하기 위한 sgRNA발현카세트가 정확히 삽입되었다는것을 알수 있다.

맺는 말

1) 우리 나라 벼재배품종인 《평양 53》호의 *OsIPA1* 영역을 배열결정하고 그것을 표적특이적으로 변이시키는데 필요한 sgRNA를 tRNA가공계와 벼의 U3프로모터-터미네터를 리용하여 조립하기 위한 프라이머들과 sgRNA발현카세트를 설계하고 Golden Gate법으로 조립하였다.

2) *OsIPA1*에 대한 sgRNA발현카세트를 식물의 CRISPR/Cas9운반체인 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H에 Golden Gate법으로 클론화하고 그 정확성을 확인하였다.

참고 문헌

- [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] Y. Jiao et al.; Nature Genetics, 42, 6, 541, 2010.
- [7] Z. Lu et al.; The Plant Cell, 25, 3743, 2013.
- [8] M. Li et al.; Front. Plant Sci., 7, 377, DOI: 10.3389/fpls.2016.00377, 2016.

주체107(2018)년 10월 5일 원고접수

Construction of a Plasmid Vector for Targeted Mutation of Rice-Ideal Plant Architecture Gene, *OsIPA1* by CRISPR/Cas9 System

Sok Won Hui, Kim Sun Ui and Ho Myong Sik

The recent advances in genome editing technologies based on the CRISPR/Cas9 system are driving an innovative application from basic biology to plant biotechnology. Here we report the construction of a plasmid vector for targeting *OsIPA1* by CRISPR/Cas9 system.

We sequenced the appropriate region of *OsIPA1* from our countries' cultivar "Pyongyang No. 53", designed some primers for assembling *OsIPA1*-targeted sgRNA-expressing cassette based on the tRNA processing system and rice U3 promoter-terminator, followed by obtaining two DNA fragments using step-by-step PCRs with them, and brought them together using Golden Gate method. This *OsIPA1*-targeted 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", *OsIPA1*, tRNA processing system, Golden Gate method, ideal plant architecture