

CRISPR/Cas9기술로 벼의 천알질량관련유전자 *OsTGW6*속에 질산염수송체유전자 *OsNRT2.3b*를 표적특이적으로 삽입시키기 위한 운반체의 제작

한금성, 유웅주, 허명식

경애하는 최고령도자 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《정보기술, 나노기술, 생물공학을 비롯한 핵심기초기술과 새 재료기술, 새 에너지기기술, 우주기술, 핵기술과 같은 중심적이고 견인력이 강한 과학기술분야를 주타격방향으로 정하고 힘을 집중하여야 합니다.》

CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9에 기초한 게놈편집기술은 오늘 생명과학에서 최첨단기술로서 이미 새로운 벼품종의 육종에 널리 도입되어 적지 않은 성과들이 이룩되였다.[5, 7, 9] 여러개의 gRNA를 동시에 발현시켜 게놈편집효율을 높이고 벼의 천알질량관련유전자(*OsTGW6*)를 파괴할 때 벼의 수확고가 높아졌다는 연구결과가 발표[3, 10]되였다.

우리는 이 기술을 리용하여 벼의 천알질량관련유전자(*OsTGW6*)를 파괴하면서 그속에 벼의 질산염수송체유전자 *OsNRT2.3b*를 표적특이적으로 삽입시키고 과잉발현시키기 위하여 Golden Gate법으로 *OsTGW6*에 대한 2개의 한오리안내RNA(sgRNA)가 발현되며 35S프로모터(P_{35S})와 T_{nos}사이에서 *OsNRT2.3b*가 놓이고 그 양쪽에 *OsTGW6*의 상동팔을 각각 가진 운반체를 제작하였다.

재료와 방법

운반체로는 벼의 CRISPR/Cas9발현운반체인 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H를, 숙주로는 *Escherichia coli* Top10을 리용하였다.

《평양 53》호의 *OsNRT2.3b*를 클론화하기 위한 nested PCR의 프라이머와 2개의 엑손을 클론화하기 위한 프라이머는 *Oryza sativa* 조선형벼의 게놈배열자료에 기초하여 설계하였다. 그리고 *OsNRT2.3b*를 발현시키기 위한 프로모터(P_{35S})와 터미네이터(T_{nos})는 식물발현운반체 pCambia1301를 주형으로 PCR로 증폭하여 리용하였다. 그리고 상동재조합에 의하여 *OsTGW6*속에 표적특이적으로 삽입시키기 위한 오른쪽 상동팔과 왼쪽 상동팔은 *Oryza sativa* 조선형벼의 게놈배열자료와 GenBank AB513135의 자료에 기초하여 *OsTGW6*에 대한 2개의 sgRNA배열의 양쪽 400bp배열을 그에 해당하는 프라이머로 먼저 nested PCR를 진행하고 다음 양쪽 팔을 각각 PCR로 증폭하여 클론화하였다. 이렇게 얻어진 오른쪽 상동팔과 P_{35S}, *OsNRT2.3b*의 엑손 1과 엑손 2, T_{nos}, 왼쪽 상동팔에는 모두 Golden Gate법으로 연결하기 위한 제한효소 *BsaI*의 인식배열이 들어있도록 프라이머들을 설계하고 리용하였다.

모든 프라이머들을 전문기관에 의뢰하여 합성하였다. 그리고 모든 PCR반응과 플라스미드들의 분리정제와 형질전환, Golden Gate반응은 선행방법[1, 2, 6]에 따라 진행하였다.

결과 및 논의

1) *OsNRT2.3b*를 클론화하기 위한 nested PCR

*OsNRT2.3*은 1번 염색체에 놓여있으며 길이가 서로 다른 전사산물로서 *OsNRT2.3a* (AK109776)와 *OsNRT2.3b*(AK072215)가 생긴다. *OsNRT2.3*은 2개의 엑손과 1개의 인트론으로 되어있는데 이것이 하나의 CDS로 발현되면 *OsNRT2.3a*(516개 아미노산)가 생기고 잘라 잇기에 의하여 인트론이 떨어져나가면 2개의 엑손만으로 된 *OsNRT2.3b*(486개의 아미노산)가 생긴다. *OsNRT2.3b*는 질산염수송체로서 그 유전자는 끝판 속에서 발현되면서 pH수감모티프가 세포질쪽에 놓여 식물체전반의 pH항상성을 보장하고 질산염의 흡수와 수송을 촉진하여 벼의 수확고에 큰 영향을 미친다.[8]

*OsNRT2.3b*의 엑손 1과 2를 클론화하기 위하여 먼저 nested PCR로 이 유전자를 통채로 PCR증폭하였다. 클론화를 위하여 *Oryza sativa* 조선형벼의 게놈배열자료에 기초하여 프라이머를 다음과 같이 설계하였다.

FP: 5'-GAGCCGCGCTTTCCGCTAT-3'

RP: 5'-CTGTTCCCAGCGAATCAACGACT-3'

《평양 53》호의 게놈DNA를 CTAB법으로 분리정제하고 위의 프라이머로 nested PCR를 진행한 결과 *OsNRT2.3*을 포함한 PCR산물의 크기는 2 026bp로서 예상위치에서 단일띠로 나타났다.(그림 1) 그러므로 우리가 목적하는 *OsNRT2.3*을 포함하는 PCR산물이 정확히 얻어졌다는것을 알수 있다.

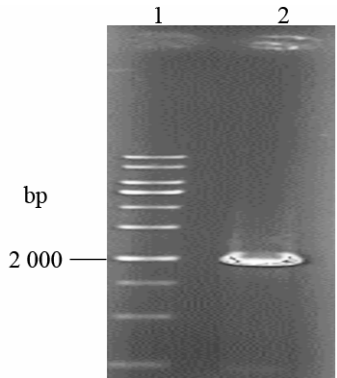


그림 1. 《평양 53》호벼에서 게놈DNA를 분리하고 nested PCR한 아가로스겔전기영동상 1-분자크기표식자(DNA Ladder 1000), 2-《평양 53》호의 게놈DNA에 대한 nested PCR산물

2) *OsNRT2.3*의 엑손 1과 엑손 2의 클론화

*OsNRT2.3*에 대한 nested PCR산물로부터 그속에 있는 인트론을 제외하고 2개의 엑손으로만 된 CDS를 만들기 위하여 *OsNRT2.3*의 엑손 1과 엑손 2를 각각 클론화하기로 하였다.

*OsNRT2.3*의 엑손 1과 엑손 2를 클론화하기 위한 프라이머를 *Oryza sativa* 조선형벼의 게놈배열자료에 기초하여 다음과 같이 설계하였다.

엑손 1

FP: 5'-AGCggtcttcCTTGCTACCACGTGTTG-3'

RP: 5'-GCggtcttcGCGCGAACGTGGACA-3'

엑손 2

FP: 5'-GTggtcttcGCGCGTGTTCG-3'

RP: 5'-GTggtcttcATTGCGACCTTATTGTCC-3'

*OsNRT2.3*의 nested PCR산물을 주형으로 한 *OsNRT2.3*의 엑손 1과 엑손 2에 대한 PCR산물의 아가로스겔전기영동상은 그림 2와 같다.

그림 2에서 보는바와 같이 위의 프라이머들을 리용하여 *OsNRT2.3*의 nested PCR산물을 주형으로 PCR를 진행한 결과 크기가 232bp인 *OsNRT2.3b*의 엑손 1에 해당하는 띠와 크기가 1 318bp인 *OsNRT2.3b*의 엑손 2에 해당하는 띠가 정확히 얻어졌다.

3) P_{35S}와 T_{nos}의 PCR클론화

*OsNRT2.3b*를 잘 알려진 P_{35S}와 T_{nos}를 리용하여 과잉발현시키기 위하여 그것에 해당하는 DNA배열을 식물발현운반체인 pCAMBIA1301로부터 PCR법으로 얻기로 하였다. 먼저 플라스미드 pCAMBIA1301의 배열자료에 기초하여 프라이머를 다음과 같이 설계하였다.

P_{35S}에 해당하는 프라이머

FP: 5'-TCggtctcttAGAATCCCGCCTTCAGTTTAGC-3'

RP: 5'-TAggtctcttCAAGAGTCCCCCGTGTT-3'

T_{nos}에 해당하는 프라이머

FP: 5'-AAggtctctgGCAATAAAGTTTCTTAAGAT-3'

RP: 5'-AAggtctctcaAGGTTTAATTCCCGATCTAGTA-3'

다음 이 프라이머들을 리용하여 플라스미드 pCAMBIA1301의 DNA를 주형으로 PCR를 진행하였을 때 목적하는 579bp의 P_{35S}와 267bp의 T_{nos}의 DNA배열이 정확히 증폭되었다.(그림 3)

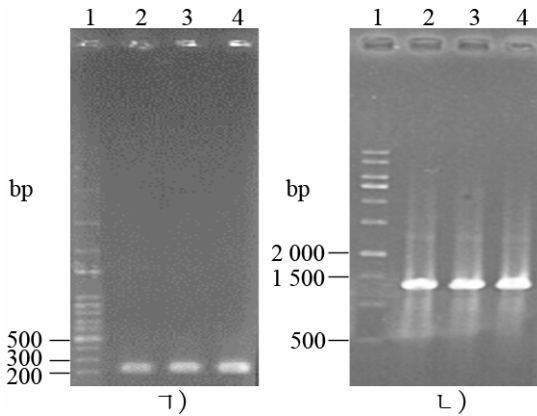


그림 2. *OsNRT2.3*의 nested PCR산물을 주형으로 한 *OsNRT2.3*의 엑손 1과 엑손 2에 대한 PCR산물의 아가로스겔전기영동상

ㄱ) 엑손 1에 대한 PCR산물: 1-분자크기표식자 (DNA Ladder 100), 2-4는 엑손 1의 PCR산물;
ㄴ) 엑손 2에 대한 PCR산물, 1-분자크기표식자 (DNA Ladder 1000), 2-4는 엑손 2의 PCR산물

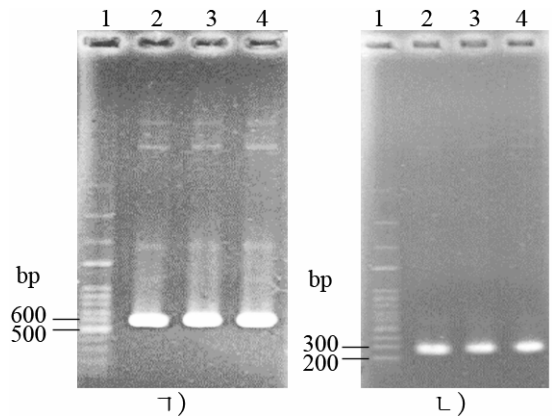


그림 3. P_{35S}와 T_{nos}배열에 대한 PCR산물의 아가로스겔전기영동상

ㄱ) P_{35S}배열에 대한 PCR산물: 1-DNA표식자 (DNA Ladder 100), 2-4는 P_{35S}배열에 대한 PCR산물; ㄴ) T_{nos}배열에 대한 PCR산물: 1-DNA표식자 (DNA Ladder 100), 2-4는 T_{nos}배열에 대한 PCR산물

4) *OsNRT2.3b*를 *OsTGW6*속에 삽입하기 위한 오른쪽 상동팔과 왼쪽 상동팔에 해당하는 DNA단편의 PCR클론화

CRISPR/Cas9기술에서는 게놈의 목적하는 부위에 DSB를 도입하면 재조합률이 비약적으로 높아지는데 상동단편이 있으면 상동재조합에 의하여 상동단편이 그 부위에 치환되어 목적하는 DNA단편이 정확히 표적특이적으로 삽입된다. 우리는 *OsNRT2.3b*를 *OsTGW6*속에 표적특이적으로 삽입시키기 위하여 *OsTGW6*을 파괴하기 위한 sgRNA1과 sgRNA2에 대하여 양쪽으로 각각 400bp의 상동팔DNA단편을 클론화하기로 하였다. 먼저 *OsTGW6*를 nested PCR로 증폭하기 위한 프라이머를 설계하고 PCR를 진행하였다.(그림 4)

FP: 5'-CAAACCTGGTTATTGAGCCTGTGC-3'

RP: 5'-TGGGTCGCCATCGGTTC-3'

그림 4에서 보는바와 같이 4 219bp의 *OsTGW6*를 포함하는 DNA단편이 정확히 얻어졌다. 다음 이 DNA단편을 주형으로 하여 오른쪽 상동팔과 왼쪽 상동팔을 PCR증폭하기 위한 프라이머를 다음과 같이 설계하고 PCR를 진행하였다.(그림 5)

오른쪽 상동팔을 얻어내기 위한 프라이머

FP: 5'-AGggtctc**g**ACCTCGGCGGATCACTG-3'

RP: 5'-GATCGTTGGTAGTTCATGCTGCTGTCG-3'

왼쪽 상동팔을 얻어내기 위한 프라이머

FP: 5'-AACAGTCCATTATCATCTGGCCTGTCA-3'

RP: 5'-TCggtctc**c**TTCTCATGGCTGTAGCCTGTAG-3'

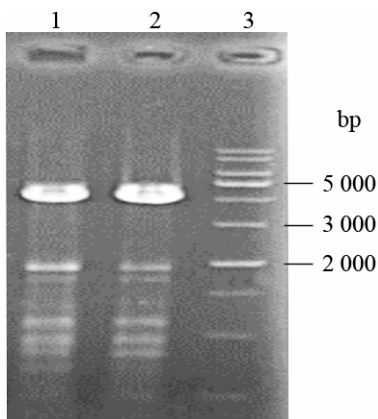


그림 4. *OsTGW6*에 대한 nested PCR산물의 아가로스겔 전기영동상
1, 2는 각각 nested PCR산물,
3-DNA크기표식자(DNA Ladder 1000)

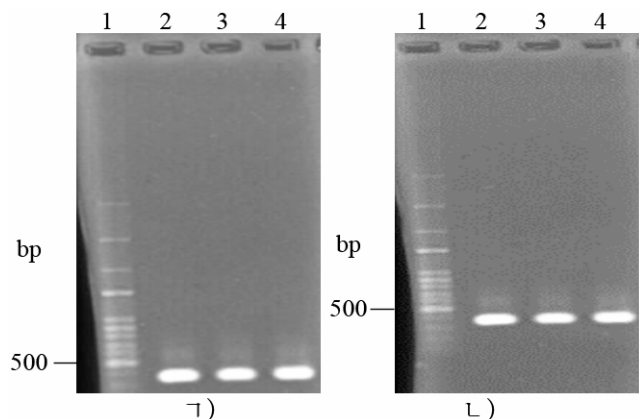


그림 5. *OsTGW6*에서 왼쪽 상동팔과 오른쪽 상동팔을 얻어내기 위한 PCR산물의 아가로스겔 전기영동상
ㄱ) 왼쪽 상동팔의 DNA단편에 대한 PCR산물: 1-DNA크기 표식자(DNA Ladder 100), 2-4는 PCR산물; ㄴ) 오른쪽 상동팔의 DNA단편에 대한 PCR산물: 1-DNA크기표식자 (DNA Ladder 100), 2-4는 PCR산물

그림 5에서 보는바와 같이 위에서 설계한 프라이머들을 리용하고 nested PCR산물을 주형으로 하여 PCR를 진행하였을 때 362bp의 왼쪽 상동팔과 429bp의 오른쪽 상동팔에 해당하는 DNA단편이 정확히 증폭되었다.

5) *OsNRT2.3b*삽입-발현카세트의 제작

위에서 합성된 *OsTGW6*에 대한 오른쪽 상동팔과 P_{35S} , *OsNRT2.3b*의 엑손 1과 엑손 2, T_{nos} , 왼쪽 상동팔에 해당하는 DNA단편들을 Golden Gate법으로 하나로 연결하여 *OsNRT2.3b*삽입-과잉발현카세트를 만들기로 하였다. 매 DNA단편들에 대한 프라이머들을 설계할 때 Golden Gate법으로 연결하기 위한 제한효소 *Bsa*I의 제한효소인식부위를 고려하였으므로 이 6개의 DNA단편들을 Golden Gate법으로 연결하고 프라이머

FP: 5'-AGggtctc**g**ACCTCGGCGGATCACTG-3'

RP: 5'-TCggtctc**c**TTCTCATGGCTGTAGCCTGTAG-3'

를 리용하여 PCR증폭을 진행하였다.(그림 6)

그림 6에서 보는바와 같이 6개의 DNA단편들이 모두 하나로 합쳐져 결국 3 083bp의 DNA 단편이 정확히 자기 위치에서 나타났다. 따라서 목적하는 *OsTGW6*에 대한 오른쪽 상동팔 +*P*_{35S}+*OsNRT2.3* 엑손 1+엑손 2+*T*_{nos}+왼쪽 상동팔로 된 하나의 DNA단편 즉 *OsNRT2.3b*삽입-발현카세트가 만들어졌다는것을 알수 있다.

6) *OsTGW6*에 대한 2중sgRNA발현카세트와 *OsNRT2.3b*삽입-발현카세트의 연결

《평양 53》호의 *OsNRT2.3b*를 *OsTGW6*속에 제놈편집기술로 표적특이적으로 삽입시켜 과잉발현시키기 위하여 2중sgRNA발현카세트[1]와 *OsNRT2.3b*삽입-발현카세트를 Golden Gate법으로 연결하고 해당하는 프라이머로 PCR를 진행하였다.(그림 7)

연결산물을 얻기 위해 리용한 프라이머는 다음과 같다.

FP: 5'-TGTAACACGACGGCCAGT-3'

RP: 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'

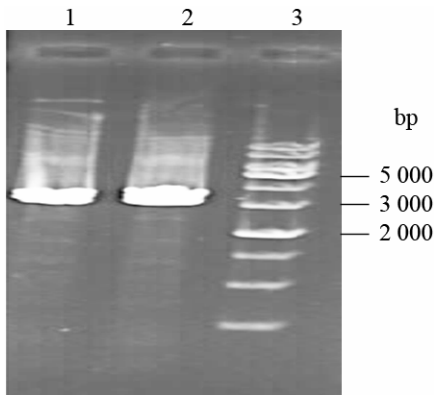


그림 6. *OsTGW6*왼쪽 상동팔+*P*_{35S}+
+*OsNRT2.3*엑손 1+엑손 2+*T*_{nos}+
+*OsTGW6*오른쪽 상동팔로 된
*OsNRT2.3b*삽입-발현카세트에
대한 PCR산물의 아가로스겔
전기영동상

1, 2는 각각 *OsNRT2.3b*삽입-발현카세트에
대한 PCR산물, 3-DNA크기표식자
(DNA Ladder 1000)

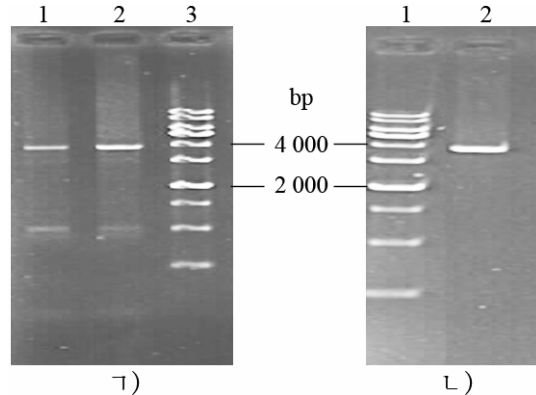


그림 7. Golden Gate법으로 연결된 2중sgRNA
발현카세트와 *OsNRT2.3b*삽입-발현카세트에
대한 PCR산물과 겔분취단편의 아가로스겔
전기영동상

1) PCR산물: 1, 2는 PCR산물, 3-DNA크기표식자
(DNA Ladder 1000); 2) 아가로스겔분취단편:

1-DNA크기표식자(DNA Ladder 1000),

2-겔분취단편

그림 7에서 보는바와 같이 2중sgRNA발현카세트와 *OsNRT2.3b*삽입-발현카세트를 Golden Gate법으로 연결하고 PCR를 진행하였을 때 3 918bp의 예상띠가 자기 위치에 정확히 나타났다.(그림 7의 1)) 한편 PCR과정에 일부 부산물띠들이 나타났으므로 목적하는 단편만을 아가로스겔분취하여 전기영동하였을 때 정확히 자기의 띠가 나타났다.(그림 7의 2))

7) 2중sgRNA발현카세트+*OsNRT2.3b*삽입-발현카세트의 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H운반체 에로의 클론화

최종적으로 식물의 CRISPR운반체인 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H에 *OsTGW6*에 대한 2중sgRNA 발현카세트와 *OsNRT2.3b*삽입-발현카세트를 클론화하였다. 그것을 위하여 먼저 우의 3 918bp의 배렬을 우의 프라이머로 PCR증폭하고 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H의 플라스미드DNA와 함께 Golden Gate반응을 진행한 다음 *E. coli* Top10에 형질전환시켜 형질전환체들을 얻었다. 얻

어진 이 형질전환체들에 대하여 선행연구[4]에 제시된 SP-L1과 SP-R프라이머로 균무지PCR를 진행하고 양성균무지들로부터 플라스미드를 분리하여 다시 PCR를 진행한 다음 목적하는 재조합플라스미드를 가진 균무지들을 선발하였다.(그림 8)

재조합플라스미드를 가진 균무지선발에 리용한 프라이머는 다음과 같다.

SP-L1: 5'-GCGGTGTCATCTATGTTACTAG-3'

SP-R: 5'-CGACATAGATGCAATAACTTCG-3'

그림 8에서 보는바와 같이 형질전환체에서 분리한 플라스미드를 주형으로 하고 우의 프라이머를 리용하여 PCR를 진행한 결과 4 054bp의 예상띠가 정확한 위치에 나타났다.

이렇게 만든 *OsTGW6*에 대한 2중sgRNA발현카세트와 *OsNRT2.3b*삽입-발현카세트가 클론화된 재조합플라스미드를 pYLCRISPR/Cas9-TGW6:2sgRNAs-NRT2.3b라고 하였으며 그것의 물리적지도는 그림 9와 같다.

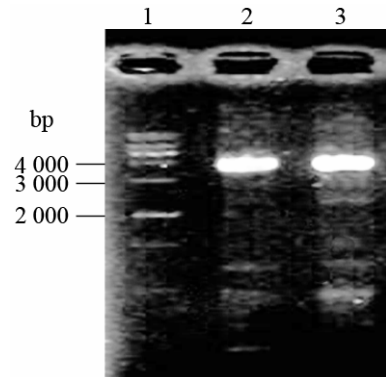


그림 8. 형질전환체확인을 위한 PCR산물의 전기영동상

1-DNA크기표식자(DNA Ladder 1000), 2-균무지PCR결과, 3-형질전환체로부터 분리한 플라스미드를 주형으로 진행한 PCR산물

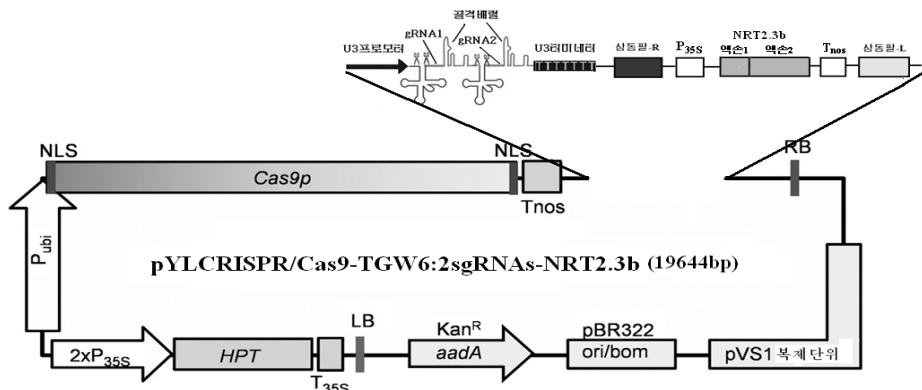


그림 9. 재조합플라스미드 pYLCRISPR/Cas9-TGW6:2sgRNAs-NRT2.3b의 물리적지도

맺는 말

1) 우리 나라의 벼품종 《평양 53》호로부터 nested PCR로 *OsNRT2.3*을 얻은 다음 PCR로 엑손 1과 엑손 2에 해당하는 DNA단편을 얻어냈다.

2) 우리 나라의 벼품종 《평양 53》호로부터 nested PCR로 *OsTGW6*을 얻은 다음 PCR로 왼쪽 상동팔과 오른쪽 상동팔에 해당하는 DNA단편을 얻어냈다.

3) pCambia1301로부터 PCR로 P_{35S}와 T_{nos}를 얻어냈다.

4) 위에서 얻은 6개의 단편들을 Golden Gate법으로 하나로 연결하고 PCR를 진행하여 *OsNRT2.3b*삽입-과잉발현카세트를 얻어냈다.

5) *OsTGW6*에 대한 2중sgRNA발현카세트와 *OsNRT2.3b*삽입-발현카세트가 연결된 3 918bp의 단편을 식물운반체인 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H에 Golden Gate법으로 클론화하였다.

참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보 생명과학, 64, 2, 71, 주체107(2018).
- [2] C. Engler et al.; PLoS ONE, 3, 11, 2008.
- [3] K. Xie et al.; PNAS, 112, 11, 3570, 2015.
- [4] X. Ma et al.; Mol. Plant, 8, 1274, 2015.
- [5] R. Xu et al.; J. Genetics and Genomics, 43, 529, 2016.
- [6] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 201~387, 2001
- [7] A. V. Wright et al.; Cell, 164, 29, 2016.
- [8] X. Fan et al.; PNAS, 113, 26, 7118, 2016.
- [9] H. Puchta et al.; Current Opinion in Plant Biology, 36, 1, 2017.
- [10] 王加峰 等; 作物学报, 42, 1160, 2016.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

Construction of a Plasmid Vector for Targeted Homology-Dependent Knock-in of Nitrate Transporter Gene, *OsNRT2.3b* into Thousand Grain Weight Gene, *OsTGW6* by CRISPR/Cas9 System

Han Kum Song, Yu Ung Ju and Ho Myong Sik

We report the construction of a plasmid vector for homology-dependent knock-in of nitrate transporter gene, *OsNRT2.3b* into thousand grain weight gene, *OsTGW6* by CRISPR/Cas9 system. We sequenced the appropriate regions of *OsNRT2.3* and *OsTGW6* from elite cultivar, “Pyongyang No. 53”, and obtained DNA fragments of exon 1 and exon 2 from *OsNRT2.3b*, and left homology arm and right homology arm from *OsTGW6* with nested PCR, followed by cloning CaMV 35S promoter(P_{35S}) and terminator, T_{nos} from plasmid pCAMBIA1301 by PCR. And then above six DNA fragments of left homology arm from *OsTGW6*, P_{35S}, exon 1 and exon 2 from *OsNRT2.3b*, T_{nos}, and right homology arm from *OsTGW6* were assembled by using Golden Gate method, giving rise to *NRT2.3b* knockin-overexpressing cassette, which was linked to *OsTGW6*-targeted dual single guide RNAs(sgRNAs)-expressing cassette based on the tRNA processing system and rice U3 promoter-terminator using Golden Gate method, that was cloned into crop CRISPR/Cas9 vector, pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H and was given their entity.

Key words: CRISPR/Cas9, rice, “Pyongyang No. 53”, *OsTGW6*, *OsNRT2.3b*, homology-dependent knock-in, Golden Gate method