

## 애기장대에서 CRISPR/Cas9기술을 리용한 자스몬산 합성유전자(*AtOPR3*)갑작변이체의 선발과 염성회복특성

송은철, 박학성

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《정보기술, 나노기술, 생물공학은 현시대 과학기술발전의 핵심기초기술입니다. 최신과학기술의 급격한 발전과 사회경제생활에서의 과학기술적변혁들은 다 정보기술과 나노기술, 생물공학의 발전에 기초하여 이루어지고있습니다.》(《김정일선집》 증보판 제22권 20~21페이지)

최근 게놈편집기술인 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9(CRISPR associated nuclease 9)기술[1, 3-5]이 개발되어 생명과학분야에서 많은 성과들이 이룩되고있다.

애기장대의 자스몬산합성단계에서 중요한 역할을 하는 *AtOPR3*은 꽃기관발육에 관계하는 유전자이며 이 유전자가 기능결실된 갑작변이체는 리놀렌산이나 자스몬산처리에 의하여 염성이 회복된다.[2]

우리는 CRISPR/Cas9기술을 리용하여 애기장대에서 식물호르몬인 자스몬산합성유전자(*AtOPR3*)를 갑작변이시켜 목적하는 갑작변이체를 선발하기 위한 연구를 하였다.

### 재료와 방법

#### 1) 연구재료

애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 생태형 Columbia를 리용하였다.

#### 2) 연구방법

애기장대키우기 종자를 70% 에틸알콜에서 30~60s동안 소독하고 무균수로 2회 세척한 후 0.5%의 Tween 20이 포함되어있는 2% 차아염소산나트륨용액에서 5min동안 처리하였다. 다음 무균수로 4~5회 세척하고 4℃에서 4일동안 봄맞이처리를 진행하였다. 애기장대는 하루에 빛조건과 어둡조건을 각각 16, 8h 보장하면서 생장실(비침도 14 000lx, 습도 80%)에서 키웠다.

유전자전이를 위한 아그로박테리움의 활성화 유전자갑작변이를 위한 발현운반체 Cas9/gRNA를 가진 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens* LB4404)[1]을 활성화한 후에 단클론을 선발하여 10mL의 무균LB액체배지(리팜피진 75mg/L, 카나미진 100mg/L 포함)에 접종하고 항온조(28℃)에서 진탕배양(250r/min)하였다. 얻어진 균배양액의 1~2%를 200mL의 LB 배양액에 접종하고 다시 항온조(28℃)에서 OD<sub>600</sub>이 1.8로 될 때까지 진탕배양(250r/min)

하였다. 4℃에서 원심분리(3 000r/min, 15min)한 다음 상청액을 버리고 OD<sub>600</sub>이 0.8로 될 때까지 아그로박테리움을 현탁하였다.

애기장대에서 꽃침종법에 의한 유전자전이방법 애기장대에서 이미 꽃이 피었거나 당일 꽃핀 꽃차례들은 제거하고 활성화한 아그로박테리움으로 감염시켰다. 활성화한 아그로박테리움균을 500mL들이 비커에 넣고 식물체를 꺼꾸로 세워 균액에 잠근 다음 2~3min동안 가볍게 흔들어주었다. 식물체를 검은 천으로 덮어 어둡조건에서 2일동안 공배양하였다. 공배양후 정상적인 방법으로 물을 주고 식물체를 키웠다. 3~5주동안 계속 자래워 종자를 수집하였다. 종자를 원심분리관안에 넣고 4℃에서 건조시켜 보관하였다.

T1에서의 선발과 형질관찰 수확한 T0종자(T1)를 소독하고 4℃에서 2일동안 봄맞이처리하였다. 다음 0.8%의 아가로즈, 15μg/mL의 하이그로미딘이 포함된 1/2MS배지에 옮겨 선발하였다. 선발한 개체들을 생장실에서 키우면서 형질들을 관찰하였다.

선발한 개체에서 PCR와 변이검사 꽃기관관찰과 꽃가루염색방법으로 수성불염성을 확인한 전이개체들의 잎에서 DNA를 분리하여 *AtOPR3*의 엑손2와 엑손4에서 설계한 첫번째 DNA 단편(First DNA Fragment: FDF)과 두번째 DNA단편(Nested DNA Fragment: NDF)[1]을 PCR 증폭하였다. 대조와 전이선발계통들에서 증폭단편의 염기배열들을 상동성검색하여 갑작변이계통들에서의 변이배열들을 검사하였다.

T1전이식물그루의 염성회복실험 전이식물체가 꽃핀 후에 수성불염성을 확인한 다음 이미 꽃핀 개체들이 있는 가지를 잘라버리고 다시 나온 가지에서 성숙되지 않은 꽃망울을 50μmol/L의 메틸자스몬산용액에 1min동안 잠그었다. 1~2일후에 전이식물체에서 꽃가루집의 성숙정도와 꽃가루의 발아상태, 수꽃술의 성장상태를 관찰하였다.

## 결과 및 논의

### 1) T1에서 전이개체들의 형질특성

애기장대에서 꽃침종법으로 목적하는 유전자를 도입한 T0으로부터 얻은 종자를 봄맞이처리하고 계통별로 15μg/mL의 하이그로미딘이 포함된 1/2MS선발배지에서 선발하였다. 선발개체들을 개별포트에 옮겨 정상적으로 키우면서 꽃피는 시기에 꽃기관과 꽃가루를 관찰하는 방법으로 수성불염성을 확인하였다.

수성불염개체들은 꽃망울시기에는 꽃형질에서 대조개체와 차이가 없었다. 그러나 꽃피는 시기에 대조개체에서는 수꽃술이 급격히 자라면서 꽃가루집이 정상적으로 터져 꽃가루가 날렸지만 수성불염개체들에서는 꽃가루집은 일정하게 성숙된것처럼 보였지만 수꽃술이 자라지 못하고 꽃가루집이 터지지 못하여 수정을 하지 못하였으며 결국 수성불염성으로 나타났다.

### 2) 선발한 전이개체들에서의 변이검사

수성불염성이 확인된 개체들의 잎에서 DNA를 분리하여 *AtOPR3*의 엑손2와 엑손4에서 설계한 FDF와 NDF를 PCR증폭하였다.

대조와 선발한 전이계통들에서 FDF와 NDF의 PCR증폭단편의 염기배열들을 조립하여 정확한 염기배열을 결정하고 매 전이계통에서 *AtOPR3*의 증폭단편염기배열상동성검색으로 갑작변이계통들에서 변이검사를 진행하였다.(그림 1)

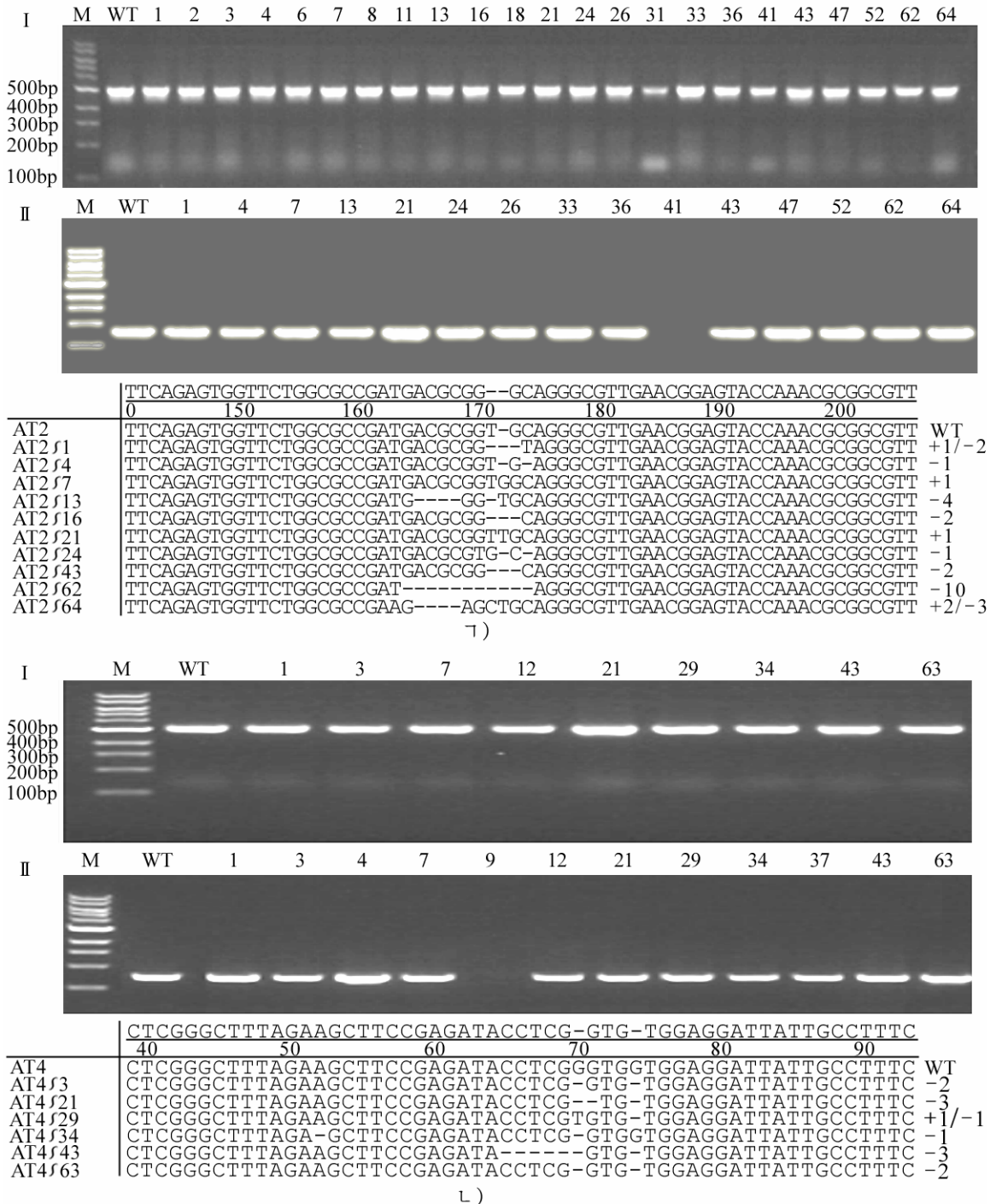


그림 1. 갑작변이계통들에서 변이검사결과

7) 엑손2, 4) 엑손4; I-FDF, II-NDF

변이검사결과에 기초하여 변이개체수와 일염기차이개체수를 갈라보았다. T1에서 전이률과 갑작변이비율은 표와 같다.

표에서 보는바와 같이 선발한 전이계통들에서 gRNA위치에 따라 수성불염개체가 나

표. T1에서 전이률과 갑작변이비율

gRNA위치	T1개체수/개	선발개체수/개 (비율/%)	수성불염개체수/개 (전이률/%)	갑작변이개체수/개 (비율/%)	일염기차이개체수/개 (비율/%)
엑손2	167	34(20.4)	24(14.37)	10(5.99)	2(1.2)
엑손4	123	21(17.1)	10(8.13)	6(4.88)	1(0.8)

타난 전이률은 엑손2위치에서는 14.37%, 엑손4에서는 8.13%였다. 변이개체비율과 일염기차이개체비율도 gRNA위치에 따라 다른데 엑손2에서는 각각 5.99, 1.2%였고 엑손4에서는 각각 4.88, 0.8%였다.

T1에서 엑손위치에 따르는 불염개체수, 갑작변이개체수와 일염기차이개체수를 그림 2에 보여주었다.

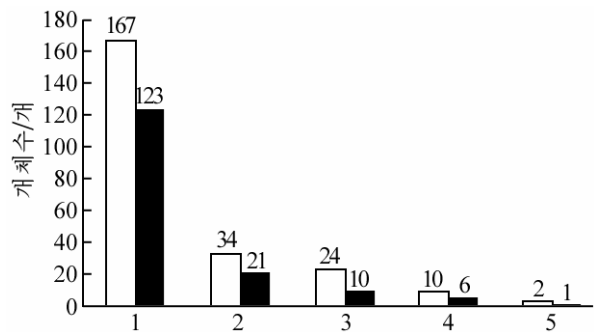


그림 2. T1에서 엑손위치에 따르는 불염개체수, 갑작변이개체수와 일염기차이개체수

□-엑손2, ■-엑손4; 1-T1총개체수, 2-선발개체수, 3-불염개체수, 4-갑작변이개체수, 5-일염기차이개체수

### 3) T1전이식물그루의 염성회복

T1에서 수성불염성을 확인한 개체들에서 이미 꽃핀 가지들을 잘라버리고 새로 나온 가지의 성숙되지 않은 꽃망울에 메틸자스몬산을 처리하였다. 처리후 1~2일후에 전이식물체에서 꽃가루집의 성숙정도와 꽃가루의 발아상태, 수꽃술의 성장상태를 관찰하였다.

대조개체는 정상으로 염성을 가지며 수성불염갑작변이체는 본래는 수성불염성이던것이 메틸자스몬산처리후 염성이 회복되면서 꼬투리가 생겼다. 꽃피기11단계에서 대조개체와 수성불염갑작변이체는 모두 꽃발생과정이 같았다. 꽃피기13단계에서 보면 대조개체는 수꽃술이 정상으로 발육하고 꽃가루집과 꽃가루가 정상으로 되어 염성을 가졌다. 메틸자스몬산을 처리하지 않은 개체는 수꽃술이 정상으로 발육하지 못하고 꽃가루집이 터지지 못하였으며 꽃가루가 성숙되지 못하여 염성을 가지지 못하였지만 메틸자스몬산을 처리한 개체는 꽃가루집이 터지고 꽃가루가 정상성숙하여 염성을 회복하였으며 꼬투리가 생겼다.

애기장대에서 자스몬산합성단계에서 중요한 역할을 하는 *AtOPR3*은 꽃기관발육에 참가하는 유전자이며 T-DNA삽입법이나 RNA간섭법으로 이 유전자를 결실시킨 갑작변이체는 리놀렌산이나 자스몬산처리에 의하여 염성이 회복된다[2]는것이 알려져있다.

우리가 애기장대에서 CRISPR/Cas9기술을 리용하여 자스몬산합성유전자(*AtOPR3*)를 갑작변이시켜 얻은 수성불염계통은 우에서 론의한 수성갑작변이체들과 마찬가지로 자스몬산처리에 의하여 염성이 회복되었다.

## 맺 는 말

선발한 전이계통들에서 gRNA위치에 따라 수성불염개체가 나타난 전이률은 엑손2에서는 14.37%, 엑손4에서는 8.13%이다.

갑작변이개체비율과 일염기차이개체비율이 엑손2에서는 각각 5.99, 1.2%이고 엑손4에서는 각각 4.88, 0.8%이다.

## 참 고 문 헌

- [1] 박학성 등; 생물학, 3, 21, 주체106(2017).
- [2] S. Ishiguro et al.; Plant Cell, 13, 2191, 2001.
- [3] E. W. Chehab et al.; Plant Physiology, 156, 770, 2011.
- [4] Tomoyuki Tani et al.; Planta, 227, 517, 2008.
- [5] C. Wasternack et al.; Annals of Botany, 111, 1021, 2013.

주체106(2017)년 7월 5일 원고접수

### **Selection of Jasmonate Synthesis Gene (*AtOPR3*) Mutant and Restoration of Sterility in *Arabidopsis thaliana* using CRISPR/Cas9 System**

*Song Un Chol, Pak Hak Song*

We introduced mutation on jasmonate synthesis gene (*AtOPR3*) in *Arabidopsis thaliana* using CRISPR/Cas9 system, and selected target mutants. In the result, the proportions of mutant and 1bp mutant were 5.9 and 1.2% respectively in exon2, and they were 4.9 and 0.8% in exon4.

Key words: CRISPR/Cas9, *AtOPR3*, sterility, *Arabidopsis thaliana*, jasmonate