

CRISPR/Cas9법으로 벼의 천알질량관련유전자 *OsTGW6*을 표적특이적으로 변이시키기 위한 운반체의 제작

윤금미, 유용주, 김순의, 어동주, 허명식

경애하는 최고령도자 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《자연과학부문에서는 식량문제, 에너지문제를 비롯하여 인민경제발전과 국방력강화에서 절박하게 나서는 과학기술적문제들을 푸는데 적극 이바지하며 기초과학과 첨단과학기술부문에서 세계적인 경쟁력을 가진 연구성과들을 내놓아야 합니다.》

오늘 세계적으로 생명과학분야에서 최신기술인 게놈편집기술이 개발되어 생명과학의 기초분야와 응용분야에서는 커다란 전환이 일어나고있다.[6] 세계적으로 이미 벼에서 천알질량관련유전자(*OsTGW6*)가 기능결실되면 천알질량이 5~8% 높아진다는것이 알려져있다.[7]

우리는 CRISPR/Cas9기술로 벼품종 《평양 53》호에서 *OsTGW6*을 파괴하기 위한 2중sgRNA 발현운반체를 tRNA가공계[2]와 Golden Gate법[1]을 리용하여 만들기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

운반체로는 벼의 CRISPR/Cas9발현운반체인 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H[3]를, 숙주로는 *Escherichia coli* Top10을 리용하였다. 《평양 53》호의 *OsTGW6*을 편집하기 위한 gRNA들은 선행연구[7]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 프라이머와 DNA단편은 전문기관에 의뢰하여 합성하였다.

결과 및 논의

1) *OsTGW6*에 대한 2중sgRNA발현카세트조립을 위한 설계

*OsTGW6*은 *Oryza sativa japonica*의 게놈에서 6번 염색체에 놓여있으며 1개의 엑손으로 된 유전자로서 그 CDS길이는 1 050bp이며 350개의 아미노산으로 된 폴리펩티드를 암호화한다.

*OsTGW6*에 대한 2개의 gRNA배열의 설계 우리는 우리 나라의 주요재배벼품종인 《평양 53》호의 *OsTGW6*의 해당한 영역을 배열결정하였는데 선행연구[7]에서 리용된 gRNA1과 gRNA3에 해당한 배열(그림 1)이 꼭 같았으므로 그것을 그대로 리용하기로 하였다. 우리가 리용한 gRNA1과 gRNA2의 배열은 다음과 같다.

gRNA1: 5'-GGCTACAGCC**ATG**AGAAGCACGG-3', -10~+10bp부위

gRNA2: 5'-AGCCAGCATCTGGACCTCGGCGG-3', +136~155bp부위

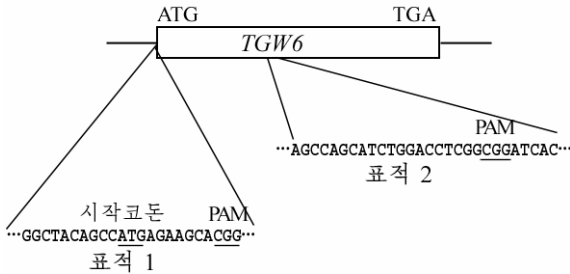


그림 1. *OsTGW6*의 구조와 두 sgRNA배열[7]

5'-ATGGAATCGGCAGCAAAGGACGCGTTGACATTGTAGGACTATATTGCTCTAATAAAGGAAGGAATCTTTTAAACATACGAACAGATCACTTAAAGTTCTTCTGAAGCAACTTAAAGTTATCAGGCATGCATGGATCTTGGAGGAATCAGATGTGCAGTCAGGGACCATAGCACAAGACAGGCGTCTTCTACTGGTGCTACCAGCAAATGCTGGAAGCCGGGAACACTGGGTACGTTGGAACCACGTGTGATGTGAAGGAGTAAGATAAACTGTAGGAGAAAAGCATTTTCGTAGTGGGCCATGAAGCCTTTCAGGACATGTATTGCAGTATGGGCCCGGCCATTACGCAATTGGACGACAACAAAGACTAGTATTAGTACCACCTCGGC TATCCACATAGATCAAAGCTGGTTTAAAAAGAGTTGTGCAGATGATCCGTGGC-3'(440bp)

벼의 U3터미네이터배열은 선행연구[4]에 준하여 다음과 같이 설계하였다.

5'-TTTTTTTTTTTCAAGAGCTTGGAGTGGATGGTTG-3'

벼의 tRNA^{Gly}의 배열은 선행연구[2]에 준하여 다음과 같이 설계하였다.

5'-AACAAAGCACCAAGTGGTCTAGTGGTAGAATAGTACCCTGCCACGGTACAGACCCGGGTTTCGATTCCCGGCTGGTGCA-3'(77bp)

벼의 sgRNA의 골격배열의 설계 벼에서 sgRNA를 발현시키기 위하여 우리가 선택한 sgRNA 골격배열을 선행연구[2]에 준하여 다음과 같이 설계하였다.

5'-GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAAC TTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCA-3'(76bp)

sgRNA발현카세트의 설계 *OsTGW6*을 표적특이적으로 파괴하는데 필요한 2개의 sgRNA를 식물의 tRNA가공계를 리용하여 발현시키기 위한 2중sgRNA발현카세트의 구조는 그림 2와 같다.

그림 2에서 보는바와 같이 *OsTGW6*을 파괴하기 위한 2중sgRNA발현카세트는 벼의 U3프로모터와 벼의 tRNA^{Gly}, gRNA1, sgRNA골격배열, gRNA2, sgRNA골격배열, U3터미네이터가 하나로 연결된것이다. 여기

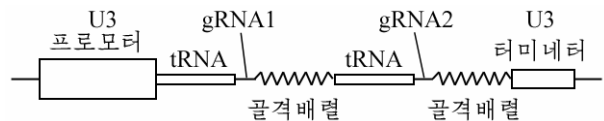


그림 2. 2중sgRNA발현카세트의 구조

서 tRNA배열과 sgRNA골격배열은 모두 같은 배열이며 차이나는것은 gRNA배열뿐이다. 따라서 2중sgRNA발현카세트를 Golden Gate법으로 조립하기 위하여 3조의 프라이머배열을 그림 3에 준하여 설계하였다. 우선 U3프로모터+tRNA^{Gly}로 된 DNA배열을 설계하여 하나로 합성하고 sgRNA골격+tRNA^{Gly}로 된 DNA배열을 설계하여 또 하나로 합성하였으며 sgRNA골격+U3터미네이터로 된 DNA배열을 또 하나로 합성하였다. 이 세가지 DNA배열이면 여러개의 sgRNA가 동시에 발현되는 임의의 다중sgRNA발현카세트를 해당한 gRNA에 준하여 필요한 프라이머조만 설계하여 PCR로 증폭하고 Golden Gate법[1]으로 한번에 하나로 조립할수

있다.

*OsTGW6*을 2개의 gRNA를 리용하여 표적특이적으로 결실변이시키기 위하여 그림 3에서와 같이 매 gRNA의 가운데 부분에서 R1과 F2, R2와 F3의 프라이머 배열이 서로 중복되게 하고 Golden Gate 법의 기본효소인 IIS형제한효소 *BsaI*의 인식배열 5'-GGTCTC-3'와 매 프라이머의 5'쪽에 붙여지도록 설계하였다. F1과

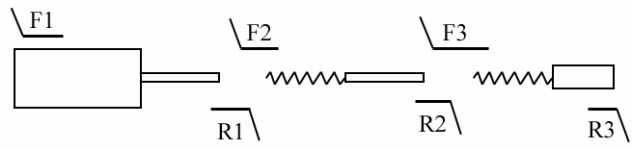


그림 3. 2중sgRNA발현카세트설계에서 하나로 합성된 DNA단편과 그것들을 Golden Gate법으로 하나로 연결하기 위한 프라이머의 설계도식
그림에서 사선으로 꺾인 부분은 IIS형제한효소 *BsaI*의 인식배열에 해당하는 부분임

R3의 프라이머배열에도 제한효소 *BsaI*의 인식배열이 놓이게 한것은 이 2중sgRNA발현카세트가 식물의 CRISPR/Cas9운반체인 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H에 역시 Golden Gate법으로 클론화 되도록 운반체가 만들어졌기때문이다. 이렇게 설계된 프라이머들의 배열은 다음과 같다.

F1: 5'-TTCAGAGGTCTCTCTCGACTAGTATGGA-3'

R1: 5'-at-GGTCTC-CATGGCTGTAGCC-TGCACCAGCCGGAAT-3'

F2: 5'-ta-GGTCTC-GCCATGAGAAGCA-GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT-3'

R2: 5'-at-GGTCTC-CCAGATGCTGGCT-TGCACCAGCCGGAAT-3'

F3: 5'-ta-GGTCTC-ATCTGGACCTCGG-GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT-3'

R3: 5'-AGCGTGGGTCTCGACCGCA-3'

2) 필요한 개별적DNA단편들의 PCR합성과 2중sgRNA발현카세트의 조립

2중sgRNA발현카세트의 조립에 필요한 개별적인 DNA단편들의 PCR합성 위에서 설계한 F1과 R1프라이머를 리용하여 그림 3의 첫번째 DNA단편 즉 벼의 U3프로모터+tRNA^{Gly}+gRNA1절반부분으로 된 DNA단편을 U3프로모터+tRNA^{Gly}로 된 DNA배열을 주형으로 PCR로 합성하였는데 그 결과는 그림 4와 같다.

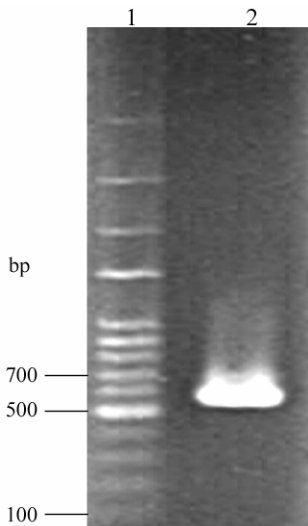


그림 4. 벼의 U3프로모터+tRNA^{Gly}+gRNA1의 절반부분으로 된 DNA단편을 PCR로 합성한 아가로즈젤

전기영동상

1-분자량표식자,

2-PCR산물

그림 4에서 보는바와 같이 우리가 목적하는 첫번째 DNA단편의 크기는 559bp로서 해당한 위치에서 단일띠로 나타났다. 따라서 우리가 목적하는 벼의 U3프로모터+tRNA^{Gly}+gRNA1절반부분으로 된 DNA단편이 정확히 합성되었다는것을 알수 있다.

다음 우리는 sgRNA골격+tRNA^{Gly}로 된 DNA배열을 주형으로 하고 F2와 R2프라이머를 리용하여 목적하는 두번째 DNA단편 즉 gRNA1절반부분+sgRNA골격+tRNA^{Gly}+gRNA2절반부분으로 된 DNA단편을 PCR로 합성하였는데 그 결과는 그림 5와 같다.

그림 5에서 보는바와 같이 목적하는 DNA단편의 길이는 195bp로서 해당한 위치에 단일띠로 나타났다. 따라서 우리가 목적하는 gRNA1절반부분+sgRNA골격+tRNA^{Gly}+gRNA2절반부분으로 된 195bp크기의 DNA단편이 정확히 합성되었다는것을 알수 있다.

다음 우리는 목적하는 세번째 DNA단편 즉 gRNA2절반부분+sgRNA골격+U3터미네터로 된 DNA단편을 sgRNA골격+U3터미네터로 된 DNA배열을 주형으로 하고 F3과 R3프라이머를 리용하

여 PCR로 합성하였는데 그 결과는 그림 6과 같다.

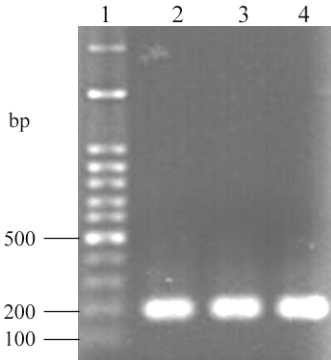


그림 5. gRNA1절반부분+sgRNA 골격+
tRNA^{Gly}+gRNA2절반부분으로 된
DNA단편을 PCR법으로 합성한
아가로즈겔전기영동상
1-분자량표식자, 2-4는 PCR산물

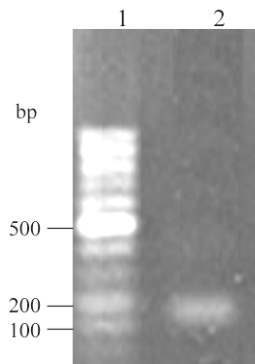


그림 6. gRNA2절반부분+sgRNA 골격+
U3터미네이터로 된 DNA단편을 PCR법
으로 합성한 아가로즈겔전기영동상
1-분자량표식자, 2-PCR산물

그림 6에서 보는바와 같이 우리가 목적하는 세번째 DNA단편의 크기는 148bp로서 해당 위치에서 나타났다. 따라서 우리가 목적하는 150bp크기의 gRNA2절반부분+sgRNA 골격+U3터미네이터로 된 DNA단편이 정확히 합성되었다는것을 알수 있다.

Golden Gate법에 의한 2중sgRNA발현카세트의 조립 우에서 합성한 3개의 DNA단편을 Golden Gate법으로 한번에 하나로 연결하여 벼의 *OsTGW6*유전자를 파괴하기 위한 2중sgRNA발현카세트를 제작하였다. 해당 반응조건에서 3개의 DNA단편들을 1개의 에펜도프관에 넣고 제한효소 *BsaI*와 T7 DNA폴리메라제를 리용하여 12h동안 반응시키고 해당 프라이머로 PCR증폭한 결과는 그림 7과 같다.

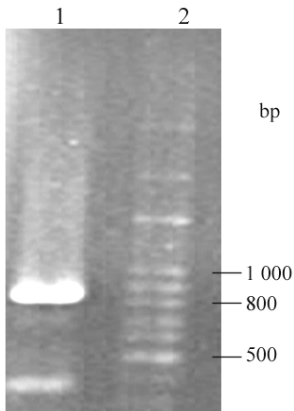


그림 7. 3개의 DNA단편을
Golden Gate법으로 연결
하고 PCR로 증폭한
산물의 아가로즈겔
전기영동상
1-PCR산물, 2-분자량
표식자

그림 7에서 보는바와 같이 우에서 개별적으로 PCR증폭하여 얻은 3개의 DNA단편들이 하나로 연결되어 860bp의 DNA단편이 PCR증폭에 의하여 얻어졌다. 따라서 3개의 DNA단편들이 Golden Gate법에 의하여 정확히 자기의 순서대로 연결되어 *OsTGW6*을 표적 특이적으로 결실시키기 위한 2중sgRNA발현카세트가 조립되었다는것을 알수 있다. 이 PCR증폭산물에 일부 비특이적인 띠들이 있으므로 목적하는 860bp증폭산물만을 아가로즈겔분취하여 다음반응에 리용하였다.

3) pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H운반체으로의 *OsTGW6*에 대한 2중sgRNA발현카세트의 클론화

우에서 얻은 *OsTGW6*유전자에 대한 2중sgRNA발현카세트의 겔분취한 860bp의 DNA단편을 벼의 CRISPR/Cas9운반체인 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H플라스미드에 Golden Gate법으로 연결하고 *E. coli* Top10에 형질전환시킨 다음 100μg/mL의 카나미핀이 들어있는 LB배지에서 형질전환체를 선발하였다. 얻어진 형질전환체에서 재조합플라스미드를 분리하고 확인한 전기영동상은 그림 8과 같다.

그림 8의 ㄱ)에서 보는바와 같이 재조합플라스미드는 대조플라스미드와 크기가 비슷하다. 그것은 플라스미드 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H에 Golden Gate법으로 외래DNA단편을 클론화할 때 원래 거기에 있던 689bp의 *ccdB*가 떨어져나가면서 그 자리에 외래DNA가 들어가기때문이다. 한편 그림 3의 F2와 R2프라이머를 리용하여 재조합플라스미드에 대하여 PCR를 진행하였을 때 대조플라스미드에서는 증폭산물이 생기지 않고 재조합플라스미드들에 대하여서만 195bp의 증폭산물이 생겼다. 한편 2중sgRNA발현카세트가 *ccdB*자리에 삽입될 때 본래의 운반체에는 없던 제한효소 *Pma*I의 인식배열이 생겨난다. 따라서 우리는 이 특성을 리용하여 실제로 재조합플라스미드에 제한효소 *Pma*I의 배열이 생겨났는가를 확인하였다. (그림 9)

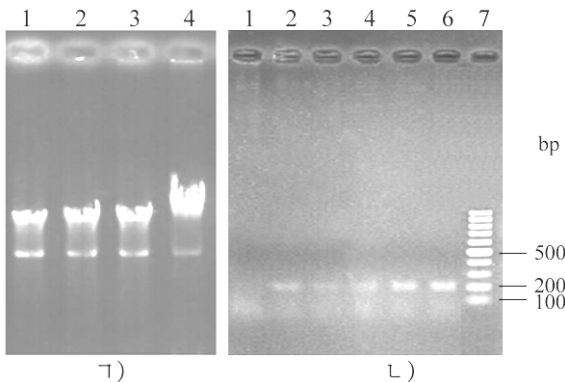


그림 8. *E. coli* Top10의 형질전환체에서 분리한 플라스미드와 PCR산물의 아가로스겔전기영동상
ㄱ) 형질전환체에서 분리된 플라스미드: 1-3은 재조합 플라스미드, 4-대조플라스미드; ㄴ) 그림 3의 F2와 R2프라이머를 리용하여 재조합플라스미드들을 PCR로 증폭한 산물의 아가로스겔전기영동상: 1-대조플라스미드의 PCR반응산물, 2-6은 재조합플라스미드에 대한 PCR반응산물, 7-분자량표식자

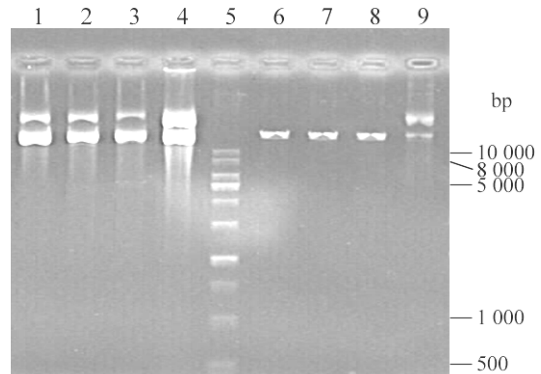


그림 9. 제한효소 *Pma*I에 의하여 절단된 재조합플라스미드의 아가로스겔 전기영동상
1-3은 재조합플라스미드들, 4-출발플라스미드, 5-분자량표식자, 6-8은 제한효소 *Pma*I로 절단한 재조합플라스미드들, 9-출발 플라스미드를 제한효소 *Pma*I로 처리한것

그림 9에서 보는바와 같이 제한효소 *Pma*I로 처리하였을 때 재조합플라스미드는 1개의 띠로 나타났지만 출발플라스미드는 분해되지 않았다. 따라서 벼의 CRISPR/Cas9운반체인 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H에 *OsTGW6*을 표적특이적으로 파괴하기 위한 2중sgRNA발현카세트가 정확히 삽입되었다는것을 알수 있다. 이렇게 제작된 재조합플라스미드 pYLCRISPR/Cas9-tgw6-2sgRNA의 물리적지도는 그림 10과 같다.

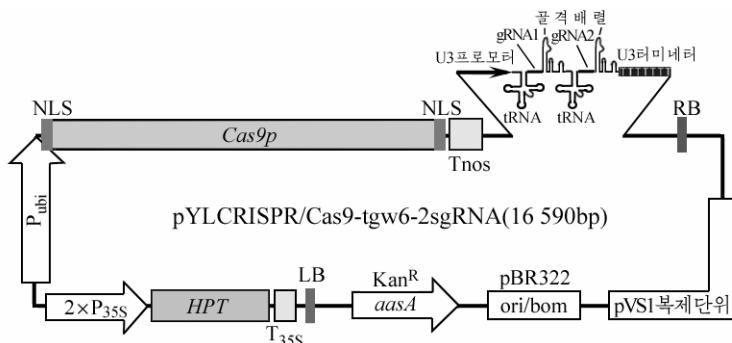


그림 10. 플라스미드 pYLCRISPR/Cas9-tgw6-2sgRNA의 물리적지도

맺는 말

우리 나라의 재배벼품종인 《평양 53호》의 *OsTGW6* 영역을 배렬결정하고 그것을 파괴하는데 필요한 2개의 gRNA를 tRNA가공계와 벼의 U3프로모터-터미네터를 리용하여 조립하기 위한 프라이머들과 2중sgRNA발현카세트를 설계하고 Golden Gate법으로 조립하였다.

*OsTGW6*에 대한 2중sgRNA발현카세트를 식물의 CRISPR/Cas9운반체인 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H에 Golden Gate법으로 클론화하고 그 정확성을 확인하였다.

참고 문헌

- [1] C. Engler et al.; PLoS ONE, 3, 11, 2008.
- [2] K. Xie et al.; PNAS, 112, 11, 3570, 2015.
- [3] X. Ma et al.; Mol. Plant, 8, 1274, 2015.
- [4] R. Xu et al.; J. Genetics and Genomics, 43, 529, 2016.
- [5] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 106~122, 2001.
- [6] A. V. Wright et al.; Cell, 164, 29, 2016.
- [7] 王加峰 等; 作物学报, 42, 1160, 2016.

주체107(2018)년 1월 5일 원고접수

Construction of a Plasmid Vector for Targeting Rice Thousand Grain Weight Gene, *OsTGW6* by CRISPR/Cas9 System

Yun Kum Mi, Yu Ung Ju, Kim Sun Ui, O Tong Ju and Ho Myong Sik

The 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 *OsTGW6* by CRISPR/Cas9 system. We sequenced the appropriate region of *OsTGW6* from our country's cultivar "Pyongyang No. 53", designed some primers for assembling *OsTGW6*-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 *OsTGW6*-targeted dual sgRNAs-expressing cassette was cloned into rice CRISPR/Cas9 vector, pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H using Golden Gate method and their entity was given.

Key words: CRISPR/Cas9, rice, "Pyongyang No. 53", *OsTGW6*, tRNA processing system, Golden Gate method