

CRISPR/Cas9기술로 벼의 피토펬놀포화효소유전자 (*OsPDS*)를 표적특이적으로 파괴하기 위한 운반체의 제작

윤금미, 정예진, 김일룡, 김순의, 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 최첨단기술인 게놈편집기술이 개발되어 생명과학의 기초분야와 식물의 육종분야에서는 커다란 전환이 일어나고있다.[2, 3] 세계적으로 이미 벼에서 여러가지 유전자들이 CRISPR/Cas9기술에 의하여 편집되고 그 유전자들에 대한 분자생물학적리해와 응용에서는 큰 전진이 이룩되고있다. 벼의 피토펬놀포화효소(PDS)의 유전자가 파괴되면 벼잎이 백색화되고 왜소화되므로 벼에서 유전자조작의 기초연구에 널리 리용되고있다.[2, 6-8]

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

재료와 방법

운반체로는 벼의 CRISPR/Cas9발현운반체인 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H[3]를, 숙주로는 *Escherichia coli* Top10을 리용하였다. 《평양 53》호의 *OsPDS*를 편집하기 위한 gRNA는 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. 기타 모든 재조합DNA실험은 선행방법[5]에 준하여 진행하였으며 해당한 프라이머배열과 DNA단편배열은 전문기관에 의뢰하여 합성하였다.

결과 및 논의

1) *OsPDS*에 대한 gRNA배열의 설계

OsPDS(Os03g0184000)는 *Oryza sativa japonica*의 게놈에서 3번 염색체에 놓여있으며 14개의 엑손으로 된 유전자[2]로서 그것이 기능결실되면 백색화되고 왜소화되므로 유전자과 피실험에서 표적유전자로 흔히 리용된다.

*OsPDS*에 대한 gRNA배열의 설계 우리는 우리 나라의 주요재배벼품종인 《평양 53》호의 *OsPDS*의 주변배열을 결정하였는데 선행연구[8]에서 리용된 gRNA에 해당한 배열과 일치하였으므로 그것을 그대로 리용하기로 하였다. 우리가 리용한 gRNA의 배열은 다음과 같다.

gRNA: 5'-GTTGGTCTTTGCTCCTGCAGAGG-3'

여기서 사선으로 표기한 부분이 제한효소 *Pst*I의 인식배열이고 밑선을 친 부분은 PAM배열이다.

*OsPDS*에 대한 sgRNA발현카세트의 설계 *OsPDS*을 표적특이적으로 파괴하는데 필요한 gRNA를 식물의 tRNA가공계를 리용하여 발현시키기 위한 sgRNA발현카세트의 구조는 선행연구자료[1]에 준하여 벼의 U3프로모터+벼tRNA^{Gly}+gRNA+sgRNA골격배열+U3터미네터로 설계하였다. 이 sgRNA발현카세트를 U3프로모터+tRNA^{Gly}로 된 DNA배열과 sgRNA골격+U3터미네터로 된 DNA배열을 리용하여 Golden Gate법으로 조립하기 위한 프라이머의 배열은 다음과 같다.

F1: 5'-TTCAGAGGTCTCTCTCGACTAGTATGGA-3'

R1: 5'-atGGTCTCAGCAAAGACCAACTGCACCAGCCGGAAT-3'

F2: 5'-taGGTCTCTTTGCTCCTGCAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT-3'

R2: 5'-AGCGTGGGTCTCGACCGCA-3'

2) 필요한 개별적DNA단편들의 PCR합성과 sgRNA발현카세트의 조립

sgRNA발현카세트의 조립에 필요한 개별적인 DNA단편들의 PCR합성 위에서 설계한 F1과 R1 프라이머를 리용하여 첫번째 DNA단편 즉 벼의 U3프로모터+tRNA^{Gly}+gRNA의 절반부분으로 된 DNA단편을 U3프로모터+tRNA^{Gly}로 된 DNA배열을 주형으로 PCR로 합성하였다.(그림 1)

그림 1에서 보는바와 같이 목적하는 첫번째 DNA단편의 크기는 559bp로서 해당한 위치에서 단일띠로 나타났다. 따라서 목적하는 벼의 U3프라이머+tRNA^{Gly}+gRNA의 절반부분으로 된 DNA단편이 정확히 합성되었다는것을 알수 있다.

다음 우리는 목적하는 두번째 DNA단편 즉 gRNA절반부분+sgRNA골격+U3터미네터로 된 DNA단편을 sgRNA골격+U3터미네터로 된 DNA배열을 주형으로 하고 F2와 R2프라이머를 리용하여 PCR로 합성하였다.(그림 2)

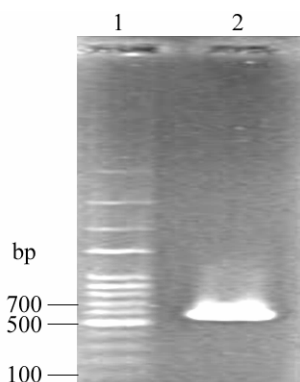


그림 1. 벼의 U3프로모터+tRNA^{Gly}+gRNA의 절반부분으로 된 DNA 단편을 PCR로 합성한 아가로스 겔 전기영동상
1-100bp분자량표식자,
2-PCR산물

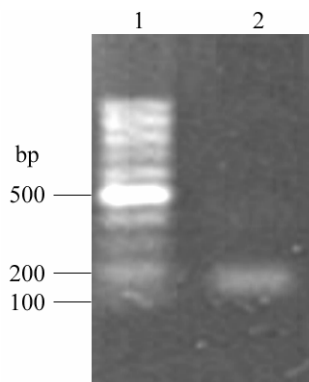


그림 2. gRNA절반부분+sgRNA골격+U3터미네터로 된 DNA단편을 PCR로 합성한 아가로스겔 전기영동상
1-100bp분자량표식자,
2-PCR산물

그림 2에서 보는바와 같이 목적하는 두번째 DNA단편의 크기는 148bp로서 해당한 위치에서 나타났다. 따라서 목적하는 148bp크기의 gRNA절반부분+sgRNA플렉+U3터미네이터로 된 DNA단편이 정확히 합성되었다는것을 알수 있다.

Golden Gate법에 의한 sgRNA발현카세트의 조립 우에서 합성한 2개의 DNA단편을 Golden Gate법으로 하나로 연결하여 벼의 *OsPDS*를 표적특이적으로 파괴하기 위한 sgRNA발현카세트를 제작하였다. 해당 반응조건에서 2개의 DNA단편들을 1개의 에펜도프관에 넣고 제한효소 *BsaI*과 T7 DNA폴리메라제를 리용하여 12h동안 반응시키고 해당 프라이머로 PCR증폭하였다.(그림 3)

그림 3에서 보는바와 같이 우에서 개별적으로 PCR증폭하여 얻은 2개의 DNA단편들이 하나로 연결되어 685bp의 DNA단편이 PCR증폭에 의하여 얻어졌다. 따라서 2개의 DNA단편들이 Golden Gate법에 의하여 정확히 연결되어 *OsPDS*를 표적특이적으로 변이시키기 위한 sgRNA발현카세트가 조립되었다는것을 알수 있다.

3) pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H운반체으로의 *OsPDS*에 대한 sgRNA 발현카세트의 클론화

우에서 얻은 *OsPDS*에 대한 sgRNA발현카세트의 겔분취한 685bp의 DNA단편을 벼의

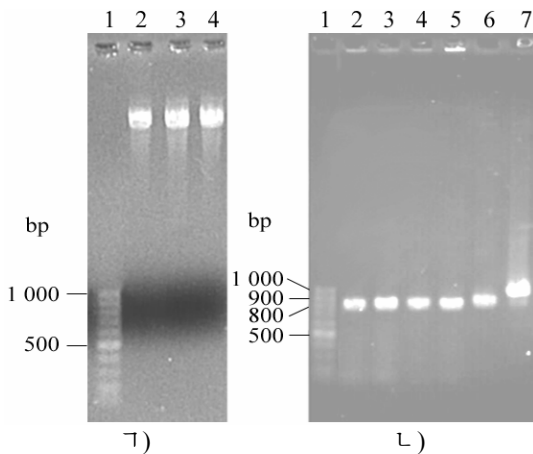


그림 4. *E. coli* Top10의 형질전환체에서 분리한 플라스미드와 PCR산물의 아가로스겔전기영동상

T) 형질전환체에서 분리된 플라스미드: 1-분자량표식자, 2-대조플라스미드, 3, 4는 재조합플라스미드,
L) SP-L과 SP-R프라이머를 리용하여 재조합플라스미드들을 PCR로 증폭한 산물의 아가로스겔전기영동상: 1-100bp분자량표식자, 2-5는 재조합플라스미드에 대한 PCR산물, 6-출발플라스미드에 대한 PCR산물, 7-양성플라스미드(TGW6)에 대한 PCR산물

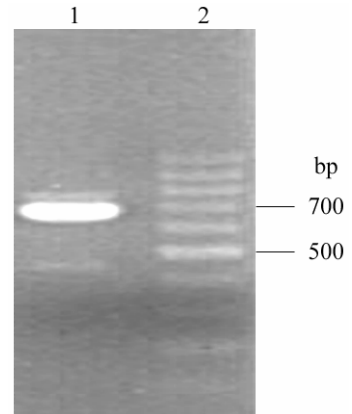


그림 3. 2개의 DNA단편을 Golden Gate법으로 연결하고 PCR로 증폭한 산물의 아가로스겔전기영동상
1-PCR산물, 2-100bp 분자량표식자

CRISPR/Cas9운반체인 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H플라스미드에 Golden Gate법으로 연결하고 *E. coli* Top10에 형질전환시킨 다음 100μg/mL의 카나미친이 들어있는 LB배지에서 형질전환체들을 선발하였다. 다음 얻어진 형질전환체들에서 재조합플라스미드를 분리하고 PCR와 제한효소분해로 그 정확성을 확인하였다.

먼저 재조합플라스미드를 주형으로 하고 선행연구[3]에 제시된 SP-L과 SP-R프라이머로 PCR를 진행하였다.(그림 4)

그림 4에서 보는바와 같이 SP-L과 SP-R프라이머로 PCR를 진행하였을 때 805bp크기의 예상단편이 나타났으며 원래 gRNA속에 인식배열을 가지고있는 제한효소 *PstI*로 절단하였을 때 대조플라스미드와는 달리 분해된 DNA단편이 생겨났다.(그림 5)

다음 sgRNA발현카세트에 특이적인 프라이머 U3-FP: 5'-ATGGAATCGGCAGCAAAGGACG-3' U3-RP: 5'-CATCCACTCCAAGCTCTTGA-3'로 PCR를 진행하였을 때 그림 6에서와 같이 대

조플라스미드에는 없는 643bp크기의 DNA단편이 생겨났다. 따라서 벼의 CRISPR/Cas9운반체인 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H에 *OsPDS*를 표적특이적으로 파괴하기 위한 sgRNA발현카세트가 정확히 삽입되었다는것을 알수 있다. 이렇게 제작된 재조합플라스미드 pYLCRISPR/Cas9-PDS-sgRNA의 물리적지도는 그림 7과 같다.

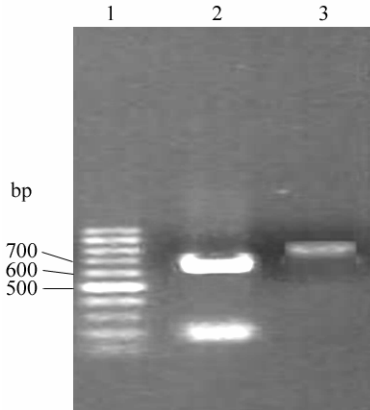


그림 5. 재조합플라스미드에 대한 PCR산물을 제한효소 *Pst*I로 처리한 아가로스겔전기영동상

1-100bp분자량표식자, 2-재조합플라스미드의 PCR산물을 제한효소 *Pst*I로 처리한것, 3-출발 플라스미드의 PCR산물을 제한효소 *Pst*I로 처리한것

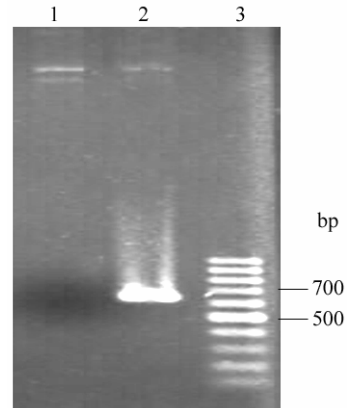


그림 6. U3-FP, U3-RP프라이머를 리용하여 PCR한 재조합플라스미드의 아가로스겔전기영동상

1-출발플라스미드에 대한 PCR산물, 2-재조합플라스미드에 대한 PCR산물, 3-100bp 분자량표식자

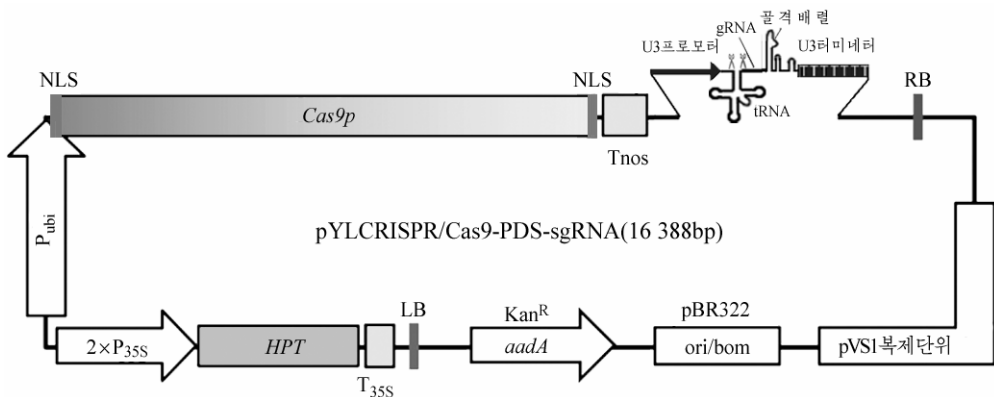


그림 7. 플라스미드 pYLCRISPR/Cas9-PDS-sgRNA의 물리적지도

맺는 말

우리 나라의 재배벼품종인 《평양 53》호의 *OsPDS*영역을 배렬결정하고 그것을 표적특이적으로 변이시키는데 필요한 sgRNA를 tRNA가공계와 벼의 U3프로모터-터미네터를 리용하여 발현시키기 위한 프라이머들과 sgRNA발현카세트를 설계하고 Golden Gate법으로 조립하였다.

*OsPDS*에 대한 sgRNA발현카세트를 식물의 CRISPR/Cas9운반체인 pYLCRISPR/Cas9P_{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 2008. doi:10.1371/ journal.pone.0003647.
- [5] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 105~122, 2001.
- [6] Q. Shan et al.; Nature Protocol, **9**, 10, 2395, 2014.
- [7] Q. Shan et al.; Nature Biotech., **31**, 8, 686, 2013.
- [8] G. Qin et al.; Cell Res., **17**, 471. 2007.

주체107(2018)년 7월 5일 원고접수

Construction of a Plasmid Vector for Targeted Mutation of Rice Phytoene Desaturase Gene, *OsPDS* by CRISPR/Cas9 System

Yun Kum Mi, Jong Ye Jin, Kim Il Ryong, Kim Sun Ui 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 on the construction of a plasmid vector for targeting rice phytoene desaturase gene, *OsPDS* by CRISPR/Cas9 system. We sequenced an appropriate region of *OsPDS* from our countries cultivars “Pyongyang No. 53”, designed some primers for assembling *OsPDS*-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 *OsPDS*-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”, *OsPDS*, tRNA processing system, Golden Gate method