

벼에서 CRISPR/Cas9 활용 고빈도 유전자 편집 방법

정유진 · 배상수 · 이금주 · 서필준 · 조용구 · 강권규

A novel method for high-frequency genome editing in rice, using the CRISPR/Cas9 system

Yu Jin Jung · Sangsu Bae · Geung-Joo Lee · Pil Joon Seo · Yong-Gu Cho · Kwon Kyoo Kang

Received: 26 March 2017 / Revised: 27 March 2017 / Accepted: 27 March 2017

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract The CRISPR/Cas9 is a core technology that can result in a paradigm for breeding new varieties. This study describes in detail the sgRNA design, vector construction, and the development of a transgenic plant and its molecular analysis, and demonstrates how gene editing technology through the CRISPR/Cas9 system can be applied easily and accurately. CRISPR/Cas9 facilitates targeted gene editing through RNA-guided DNA cleavage, followed by cellular DNA repair mechanisms that introduce sequence changes at the site of cleavage. It also allows the generation of heritable-targeted gene mutations and corrections. Here, we present

detailed procedures involved in the CRISPR/Cas9 system to acquire faster, easier and more cost-efficient gene edited transgenic rice. The protocol described here establishes the strategies and steps for the selection of targets, design of sgRNA, vector construction, and analysis of the transgenic lines. The same principles can be used to customize the versatile CRISPR/Cas9 system, for application to other plant species.

Keywords CRISPR/Cas9, Gene editing, sgRNA design, transgenic rice, null plant

Y. J. Jung · K. K. Kang (✉)
국립한경대학교 원예생명과학과
(Department of Horticultural Life Science, Hankyong National University, Ansong 17579, Korea)
국립한경대학교 유전공학연구소
(Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University, Ansong 17579, Korea)
e-mail: kykang@hknu.ac.kr, yuyu1216@hknu.ac.kr

S. Bae
한양대학교 화학과
(Department of Chemistry, Hanyang University, Seoul 04763, Korea)

G.-J. Lee
충남대학교 원예학과
(Department of Horticulture, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea)

P. J. Seo
성균관대학교 생명과학과
(Department of Biological Sciences, Sungkyunkwan University, Suwon 16419, Korea)

Y.-G. Cho
충북대학교 식물자원학과
(Department of Crop Science, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea)

서 언

최근 다양한 생물 중에서 목적하는 유전자를 개량하는 기술로 “게놈편집”이 주목 받고 있다. 특히 인공제한효소를 이용한 게놈편집은 광범위한 생물 중에서 표적유전자 파괴 (Knock-out) 및 외래유전자의 부가(knock-in)가 가능하게 되면서부터 차세대 유전자 개량기술로 주목을 받고 있다 (Subburaj et al. 2016). 식물에서는 애기장대에 있어서 Zinc Finger Nuclease (ZFN)라고 불리는 Zinc Finger를 모티브로 사용함으로써 DNA 인식영역과 DNA를 절단하는 nuclease가 융합한 인공 nuclease를 사용한다고 보고되었다(Durai et al. 2005). 이 효소는 게놈상의 표적유전자를 특이적으로 절단하고, 오차 없는 DNA 수복체인 비상동조환수복(NHEJ)을 이용하여 절단부위 주변의 염기를 결실 및 치환하여 표적 유전자를 개량하는 방법으로 보고되었다(Shukla et al. 2009; Townsend et al. 2009; Chen et al. 2014). 표적배열 특이적으로 융합하는 ZFN은 구축과정이 복잡하고, 기능적인 ZFN의 디자인을 하기가 매우 어려운 결점을 가지고 있다. 그러나, 식

물 병원세균 *Xanthomonas*에서 발견한 DNA 인식 system을 이용하면서부터 ZFN의 DNA 인식영역이 개량된 인공 nuclease (transcription activator-like effector nuclease, TALEN)가 개발되어 ZFN 보다 표적배열 선택의 자유도가 높아졌다. TALEN 기술의 이용에 따라 식물에서 벼, 동물에서는 제브라피쉬 및 쥐, 배양세포에서는 ES 세포 및 iPS 세포에서 게놈편집이 순차적으로 보고 되었다(Li et al. 2012; Shan et al. 2015; Sander et al. 2011; Flemer et al. 2015). 세계적으로 주목 받고 있는 새로운 기술로 모델 생물이 아닌 생물에도 적용 가능한 TALEN system을 보고하였다(Li et al. 2012; Shan et al. 2015). 최근 들어 세균 획득 면역반응 system (CRISPR/Cas9(clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR-associated protein 9)은 염기서열 특이적 핵산분해효소로서 작용할 수 있는 일종의 맞춤형 유전자 가위이다. CRISPR/Cas9 활용을 통해 특정 염기서열을 인지하고 그 부위의 이중나선을 절단함으로써 유전체 상 위치 특이적 돌연변이 유도, 유전자 삽입, 대체 등을 포함한 다양한 염기서열 특이적 유전체 편집이 가능하다(Endo et al. 2016; Wang et al. 2016; Zhou et al. 2015; Jiang et al. 2013). 지금까지 많은 생물에서 CRISPR/Cas9를 이용하여 유전자 편집에 대한 보고는 되었으나 일반적인 연구실에서 적용 및 응용하기가 아직 부족한 실정이다. 본 논문에서는 CRISPR/Cas9을 이용하여 유전자 편집 기술을 기존에 알려진 방법보다 쉽고 정확하게 실험 할 수 있도록 sgRNA 디자인, 벡터 구축, 형질전환체 분석 및 육성 등을 자세히 기술하고자 한다.

재료 및 방법

RGEN (RNA-guided engineered nuclease)의 선정

유전자 편집을 위해 목표로 하는 유전자의 sgRNA (single guide RNA)는 CRISPR RGEN tools (<http://www.rgenome.net/>)을 이용하여 디자인하였다 (Park et al. 2015). RGEN 디자인 프로그램은 먼저 선정된 작물의 게놈에서 목표하는 유전자 염기서열 중 CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9) 시스템이 인식하는 부위인 PAM (Proto-Spacer Adjacent Motif) 5'-NGG-3' 서열을 선정 한 후, PAM으로부터 시작하여 역으로 20bp의 sgRNA를 제작하도록 고안되어 있다. 프로그램 사용방법은 사이트 접속 후 Cas-Designer로 들어가서 원하는 PAM type을 선정할 수 있으며, 본 연구에서는 SpCas9 from *Streptococcus pyogenes*: 5'-NGG-3' 을 선정하였다. 그 다음은 target genome을 선정하고, 유전자 전체 CDS 중에서 앞쪽부터 50% 정도 되는 서열을 한번에 1,000 bp 이내로 target sequence에 넣은 후 submit를 클릭한다. 분석에 의해 얻어진 sgRNA들 중에서는 mis-match 1, 2에서 off-target이 제거된 list 1-0-0으로 나온

것과, 30%~70% 사이의 GC 함량으로 구성되고, out-of-frame score가 높은 것 순으로 선정하는 것이 바람직하다. 이 score는 indel이 일어났을 때 frame-shift가 일어날 가능성을 예측하여 기록한 것으로 높을 수록 염기에 변이가 일어날 가능성이 높다고 볼 수 있다. 이렇게 선정된 sgRNA들은 한번 더 Cas-OFFinder로 들어가서 넣은 후 mis-match 설정을 3~4개로 하여 off-target들을 찾아내어 list 1-0-0을 골라낸다. Off-target이 많으면 원하지 않는 변이가 생길 가능성이 높으므로 신중히 선택하는 것이 좋다. 최종 선정된 sgRNA들 중에서 한 유전자당 4~5개를 선정하여 사용한다.

디자인된 RGEN의 합성

선정된 sgRNA들은 PAM서열을 제외한 20개의 염기를 이용하여 target-up: 5'-ggcaGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'과 target-down: 5'-aaacNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'의 올리고를 디자인 한다. 이때 연속적인 N은 선정된 sgRNA 각각의 염기들을 의미하며, 앞뒤의 소문자로 구성된 어댑터는 삽입될 벡터의 OsU3 프로모터 영역과 오버행을 갖는 염기들이다. 다른 프로모터에 의해 작동되는 sgRNA의 경우, 어댑터 순서는 다를 수 있으며, *AarI*이나 *BbsI* 등과 다른 유형의 제한효소는 사용이 어려울 수 있으나, 본 연구에서 사용한 pPZP-3'PinII-Bar-Cas9-Os의 *AarI* 제한효소 사이트는 sgRNA-Cas9 벡터에 원활하게 cloning이 가능하다(Kim et al. 2016). sgRNA를 선정하면, 각각의 20-mer 올리고를 합성한 후, target-up과 target-down을 100 pmoles로 맞추어 준비하고 T4 ligase buffer 5 ul와 target-up oligo 5 ul, target-down oligo 5 ul, DW 35 ul를 넣어 총 볼륨을 50 ul로 하여 37°C 30분, 94°C 5분 처리 후에 28초마다 1°C씩 온도를 낮추어 30분간 수형 후, 온도가 30°C가 되면 다음에 10°C에서 10분 처리하여 double strand sgRNA 단편을 만들어 Ti-plasmid 벡터 구축 시 insert로 사용한다.

Ti-plasmid 벡터내 Cas9 유전자 구축

식물 형질전환에 사용할 pPZP-3'PinII-Bar 벡터를 이용하여 *HindIII/SmaI*으로 소화하고, 이곳에 *HindIII*, *BamHI*, *SnaBI*, *SacI*, *XbaI*, *NruI*, *AstII*, *PstI*, *SmaI* 등의 multiple cloning site를 합성하여 cloning 하였다. 먼저, 식물 형질전환용 운반체는 pPZP-3'PinII-Bar 벡터를 모벡터로 사용하여 Cas9이 CaMV 35S 프로모터에 의해 제어되며, sgRNA는 OsU3 프로모터에 의하여 작동되도록 연결하여 제작하였다. 형질전환된 캘러스 및 식물체의 선발을 위해서는 CaMV 35S 프로모터에 의해 제어되는 Bar 유전자를 이용하였다. 첫 번째로는 pPZP-3'PinII-Bar 벡터의 *HindIII/BamHI* 자리에 p35S와 연결하였다. 두 번째로는 구축된 첫 번째 벡터를 *BamHI/SacI*으로 자른 후 Cas9과 연결하였다. 세 번째로는 OsU3프로모터에

sgRNA를 연결하기 위한 *AarI* site 및 *XhoI* site를 넣어 주었다.

이와 같이 벡터의 기본 틀 (pPZP-Cas9)이 완성되면 *AarI* 제한효소를 사용하여 RGEN을 붙이는 과정이 필요하다. pPZP-Cas9 벡터 플라스미드 DNA를 2 ug 준비하고, *AarI* (Thermo Scientific Inc. USA) 제한효소 2 ul (4 unit), 10 x *AarI* buffer 5 ul, Oligonucleotide 1 ul와 DW를 첨가하여 총 볼륨을 50 ul로 맞추고 후 37°C에서 3시간 처리한다. 그 후 합성하여 상보적 사슬로 만들어 놓은 target-up과 target-down의 RGEN을 *AarI* 처리가 진행된 벡터와 연결한다. 벡터는 최소 10 ng으로 준비하고, RGEN 2 ul, T4 ligase 0.5 ul, T4 ligase buffer 1 ul를 첨가한 뒤 DW로 총 볼륨을 10 ul에 맞추고 16°C에서 3시간 처리하고, 효소 및 버퍼의 불활성화를 위하여 65°C에서 10분간 처리한 후 DH5a competent cell에 형질전환 하였다. 형질전환 방법은 heat shock법으로 positive colony를 2-3개 선발하여 LB spectinomycin 50 mg/L를 포함한 액체배지에 배양한다. sgRNA 도입 여부를 알기 위해 배양액 1 ul를 이용하여 PCR분석 후, *XhoI*으로 소화하여 절단 여부를 전기영동에 의해 확인하였다. PCR 프라이머는 Fw: 5'-CAGCTTGGCTCTAGTCGACC-3', Rv: 5'-CGGTGCCACTTTTTCAAGTT-3'를 이용하여 95°C에서 5분간 pre-denaturation 시킨 후, 94°C에서 40초간 denaturation, 55°C에서 40초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 과정을 35 cycles로 진행하였으며, 마지막으로 72°C에서 5분간 extension을 실시하여 분석하였다. 성공된 벡터는 약 509 bp에서 1개의 밴드 확인이 가능하며, 434 bp와 86 bp의 2개 밴드가 보여진다면 RGEN의 삽입이 이루어지지 않은 것으로 판단하였다. 최종 확인된 PCR 산물은 염기배열 분석에 의해 최종 확인한 후, *Agrobacterium tumefaciens* EHA105에 형질전환하였다.

형질전환 벼 육성 및 도입확인

형질전환 벼 육성을 위하여 동진 벼 종자를 2 mg/L 2,4-D가 포함된 N6 액체배지에 침종하여 30°C 암상태에서 24시간 동안 발아시켜, 배 부분이 부풀어 오르기 시작한 종자를 15 mL의 *Agrobacterium* 현탁액이 담겨있는 튜브에 담가 약 20 분간 접종한 다음 멸균한 필터페이퍼 위에 종자를 올려놓아 여분의 *Agrobacterium*을 제거하였다. *Agrobacterium*을 접종한 종자를 1 mM dithiothreitol (DTT), 3 mg/L silver nitrate (AgNO₃), 0.5% gelrite가 포함된 2N6-AS 배지 위에 필터페이퍼를 놓고 치상하여 25°C 암조건에서 3일간 공동 배양하였고, 그 후 배지 성분의 영향력을 높이기 위해 필터페이퍼를 제거한 배지에 치상하여 25°C 암조건에서 4일간 공동 배양하였다(Lee et al. 2011; Jung et al. 2014). 그 후 재분화 배지로 2주 마다 계대배양하여 형질전환체를 선발하였다. 유전자가 도입된 형질전환체는 Bar를 선발 마커로 하여 100개의 캘러스 중에서 총 45개의 형질전환 식물체를 얻어 높은 효

율을 보였다. 형질전환실험에서 얻어진 재분화 식물체를 대상으로 벼 계층 상에서 pPZP-Cas9-RGEN 벡터의 도입을 확인하기 위해 재분화된 잎으로부터 genomic DNA를 분리하여 도입유전자를 Bar 및 nos terminator 특이 증폭용 primer set를 이용하여 PCR 분석을 수행하였다. 이때 사용한 프라이머는 forward: 5'-CGTCAACCACTACATCGAGA-3', reverse: 5'-TTGCGCGCTATATTTTGTGTTT-3'로 제작하여 95°C에서 5분간 pre-denaturation 시킨 후, 94°C에서 30초간 denaturation, 58°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 과정을 30 cycles로 수행하였으며, 마지막으로 72°C에서 5분간 extension을 실시하여 분석하였다.

NGS 분석을 통한 변이체 확인

앞서 제작한 pPZP-Cas9-RGEN 벡터들 중에서 유전자당 선발된 5개의 RGEN 중 가장 효율이 높은 RGEN이 삽입된 벡터를 선발하여 보다 안정적이고 많은 변이체를 확보하고자 RGEN별로 3개의 튜브를 준비하여 감염한지 1주된 벼 캘러스 4개씩을 한 튜브에 모아서 (주)나노헬릭스사의 kit를 사용하여 DNA를 추출한 후에 한양대학교 화학과로 의뢰하여 next generation sequencing (NGS) 분석을 수행하였다(Park et al. 2017).

Taq-Man PCR 분석을 통한 single copy 선발

형질전환 각 세대에서 single copy로 도입된 개체를 효율적으로 선발하기 위해 TaqMan PCR에 의해 유전자를 증폭하였다. TaqMan probe real-time PCR을 위하여 2 × Brilliant II QPCR Master Mix (Roche, Switzerland) 10 ul, dH₂O 5.5 ul, 10 pmol sense primer 0.5 ul, 10 pmol antisense primer 0.5 ul, 10 pmol probe 0.5 ul, 추출한 DNA template 3 ul로 total 20 ul를 PCR tube에 넣은 후, 혼합액을 thermal cycler (7500 Real Time PCR system, Applied Biosystems)에서 증폭하였으며 음성 대조군으로 멸균증류수와 형질전환시에 사용한 동진에서 추출한 DNA를 이용하였고, 양성 대조군으로 이미 검증된 형질전환체 T₂ homo 계통과 T₂ hetero 계통의 DNA를 이용하였다. TaqMan probe PCR 반응 조건은 95°C에서 10분간 pre-denaturation 시킨 후, 95°C에서 20초 denaturation, 56°C에서 1분 annealing을 40회 반복 실시하였고, annealing 반응 중에 Quencher로부터 분리된 fluorescein FAM이 활성화 될 때마다 fluorescence를 탐지하고 처음 탐지된 cycle 수(ct)는 amplification plots로 표현하였다. TaqMan probe real-time PCR 검사로 복제된 증폭 산물은 nos terminator의 특이적인 labeling한 probe primer를 이용하여 분석되었다.

결과 및 고찰

sgRNA 디자인 및 CRISPR-Cas9 벡터 구축

CRISPR/Cas9은 크게 표적하는 염기서열을 인식하는 single chain guide RNA (sgRNA)와 핵산분해효소인 Cas9 단백질로 구성되어 있다. sgRNA는 표적염기서열과 상보적인 20개의 guide sequence 포함한다. 본 실험에서는 타겟 유전자 하나를 교정하기 위해 CRISPR RGEN tools 프로그램을 이용하여 해당 유전자의 특정부위에서 sgRNA를 5개 디자인하여 합성한 이후에 어셈블리 과정을 거친 후, *AarI* 제한효소를 이용하여 OsU3프로모터 뒤에 부착하였다(Fig. 1A). sgRNA가 표적 유전자의 특정 위치를 인식하여 결합하면 sgRNA 3'영역의 PAM을 인식하여 DNA를 잘라줄 수 있는 효소인 Cas9은 35S 프로모터에 의해 조절되도록 벡터를 구축하였다(Fig. 1A). 이렇게 구축된 벡터를 DH5α에 형질전환한 후, 배양하여 colony PCR분석하였다. Primer로는 OsU3 프로모터 영역

을 포함한 509 bp가 되도록 구축하였으며, sgRNA의 정상적인 삽입여부는 PCR 산물을 *XhoI* site 존재에 의해 확인하였다(Fig. 1B). 구축한 벡터의 90% 이상은 sgRNA가 잘 삽입되어 single 밴드로 나타났으나, 약 10%는 434 bp와 86 bp의 두 밴드를 보였다(Fig. 1B). PCR분석/*XhoI* 결과 sgRNA가 잘 도입되었다고 하는 PCR 산물은 염기배열을 조사하여 확인하였다(Fig. 1B). 본 실험에서 구축한 CRISPR-Cas9 system은 기존의 벡터보다 구축하기 용이하고 경제적이며 아주 정확하게 만들 수 있다고 생각된다.

구축한 CRISPR/Cas9 벡터의 효용성 평가

목적 유전자로부터 sgRNA를 4개씩 디자인하여 각각Ti-plasmid 벡터에 구축하고 이를 *Agrobacterium* 법을 이용하여 비종자 유래 callus에 감염시켜 형질전환 시켰다(Fig. 2A). sgRNA에 의한 유전자 편집 여부를 확인하기 위해서 감염 후 1주된 bulk callus 집단을 만들어 total DNA를 추출한 후 NGS 분석

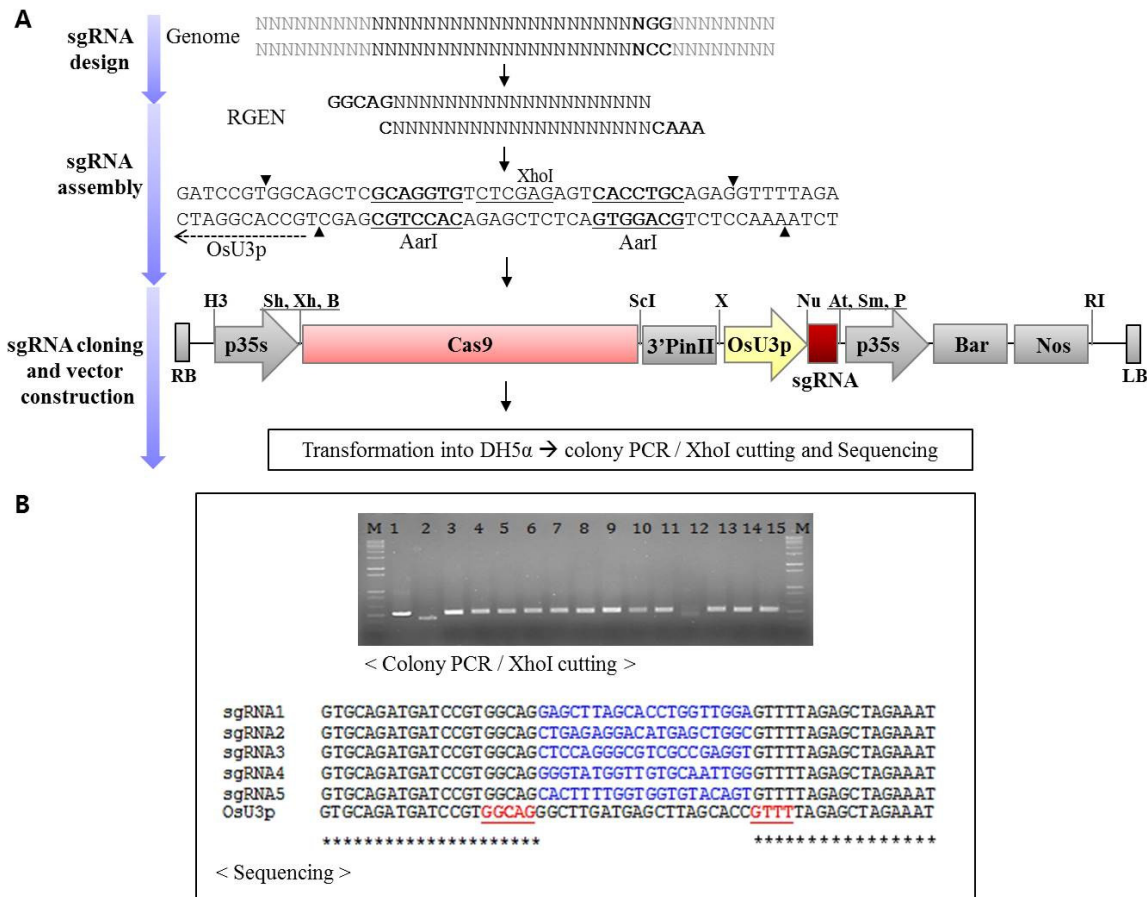


Fig. 1 Flowchart for the construction of sgRNA/Cas9 expression vectors. (A) Each essential step is depicted in the figure, including sgRNA design, assembly of sgRNA-Cas9 into an expression vector, cloning of a sgRNA module, quick evaluation of the sgRNA activity by NGS, and construction of a sgRNA/Cas9 expression vector. (B) PCR amplification of transferred genes (sgRNA) in Ti-plasmid vector (pZP-3'PinII-Bar). Amplified products were subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis. Lane M, DNA ladder; Lane 1, positive control; Lane 2, negative control; Lane 3-15, each sgRNA module and sequences analysis of sgRNA region in constructed Ti-plasmid vector

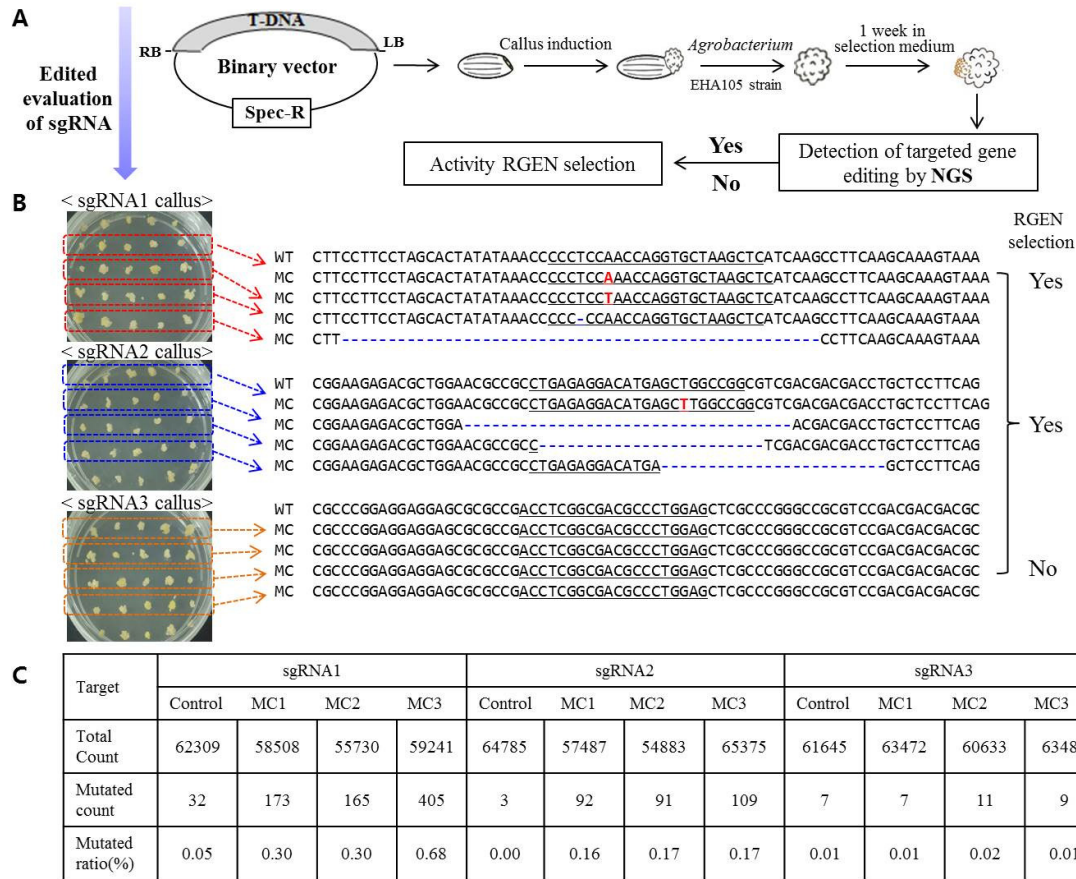


Fig. 2 Workflow for screening stably inherited gene-modified mutants in rice callus. (A) The customized CRISPR/Cas9 expression vector is used for rice transformation using the *Agrobacterium*-mediated method. (B) Sequencing assay. Sequencing data of PCR products from infected bulk callus showing the target region. WT, wild type; MC, mutated callus. (C) Mutated rate analysis by NGS technology with infected bulk callus

을 수행하였다. NGS의 염기배열 54,883-65,375bp를 읽어, 변이율을 조사한 결과 sgRNA 종류에 따라 비율이 다르게 나타났다(Fig. 2. B and C). sgRNA1 및 sgRNA2의 경우 염기 첨가, 결실 등이 많이 일어났으나, sgRNA3의 경우 변이가 전혀 나타나지 않았다. 따라서 callus 단계에서 변이를 보이지 않은 것은 더 이상 형질전환실험을 진행하지 않았으며, 변이가 보인 sgRNA는 형질전환실험을 계속하였다. 왜 sgRNA에 따라 유전자편집 차이가 보이는데 대해서는 아직 잘 알려지지 않았으며, 다만 sgRNA가 발현하는 과정에서 이상이 생겨, Cas9 효소를 특이적인 염기서열에 이동시켜주지 못해서 변이가 일어나지 않는 것으로 생각하고 있다.

선발한 sgRNA의 형질전환체 육성

NGS 분석으로 변이 효율이 높다고 판단된 sgRNA 삽입 벡터를 선발하여 벼 형질전환을 수행하였다(Fig. 3A). 본 실험에서 벼 형질전환 실험은 감염 후 48일에 재분화 식물을 얻어 순화과정을 거쳐 토양에 옮겨 생육하였다(Fig. 3B). sgRNA 종류별 형질전환체는 최소 30개체부터 최대 65개체

를 얻었다. 따라서 본 연구에 사용한 형질전환 방법은 Toki et al. (2006)이 발표한 방법을 개량하여 사용한 것으로 단기간에 아주 정확하게 재분화 할 수 있는 것으로 판단된다.

형질전환체의 T-DNA 도입 확인 및 single copy 선발

sgRNA 벡터별로 육성한 재분화 식물은 순화 후, pot에 이식하여 생장시켰다(Fig. 4A). 형질전환 여부를 알기 위해 T0세대의 재분화 식물은 개체별로 Total DNA를 추출하여 genomic PCR 분석을 수행하였다(Fig. 4B). 그 결과 재분화하여 순화 후, 토양에 옮겨 심은 식물체의 99%는 형질전환체임을 확인하였다. 이들 형질전환체를 이용하여 single copy 여부를 알기 위해 TaqMan PCR 분석을 실시하였다(Fig. 4C). 총 3개의 유전자 도입 형질전환체들 중 sgRNA1에서는 8개체, sgRNA2에서는 9개체, sgRNA3에서는 6개체의 single copy를 확인하여 T1 종자를 채종하였다. 이상의 결과로부터 재분화된 식물체의 T-DNA 도입 여부를 genomic PCR 및 TaqMan PCR 방법으로 분석하면 쉽고 빠르게 single copy가 삽입된 형질전환체 선발이 가능하다고 생각된다.

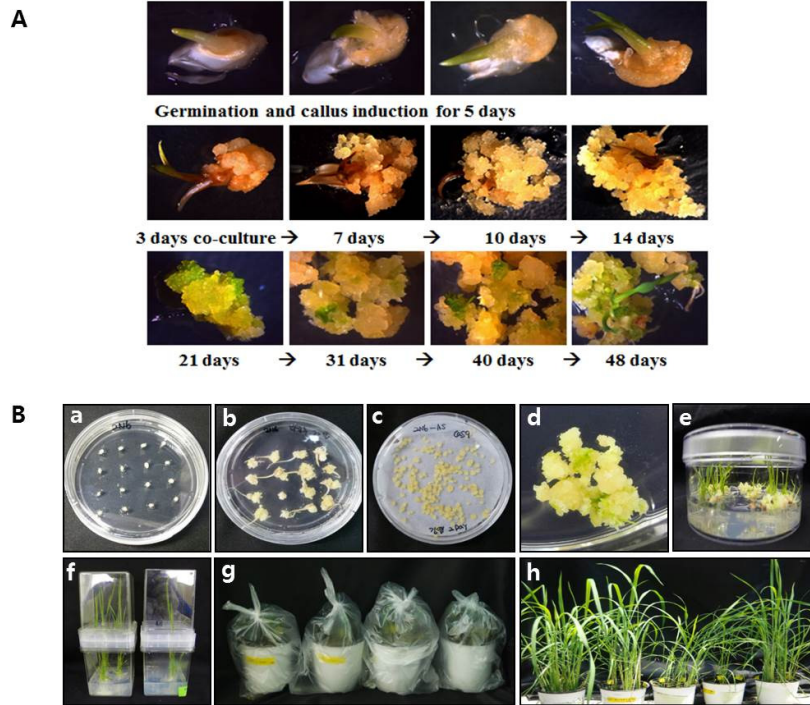


Fig. 3 Dongjinbyeo (*Oryza sativa* L.) plants transformed with pPZP-3'PinII-Bar vector containing CRISPR/Cas9::sgRNA gene. (A) Modification of Toki's method. (B) a~c, callus formation; d~e, multi-shoot differentiation; f, regenerated plants in rooting medium; g~h, acclimation in soil

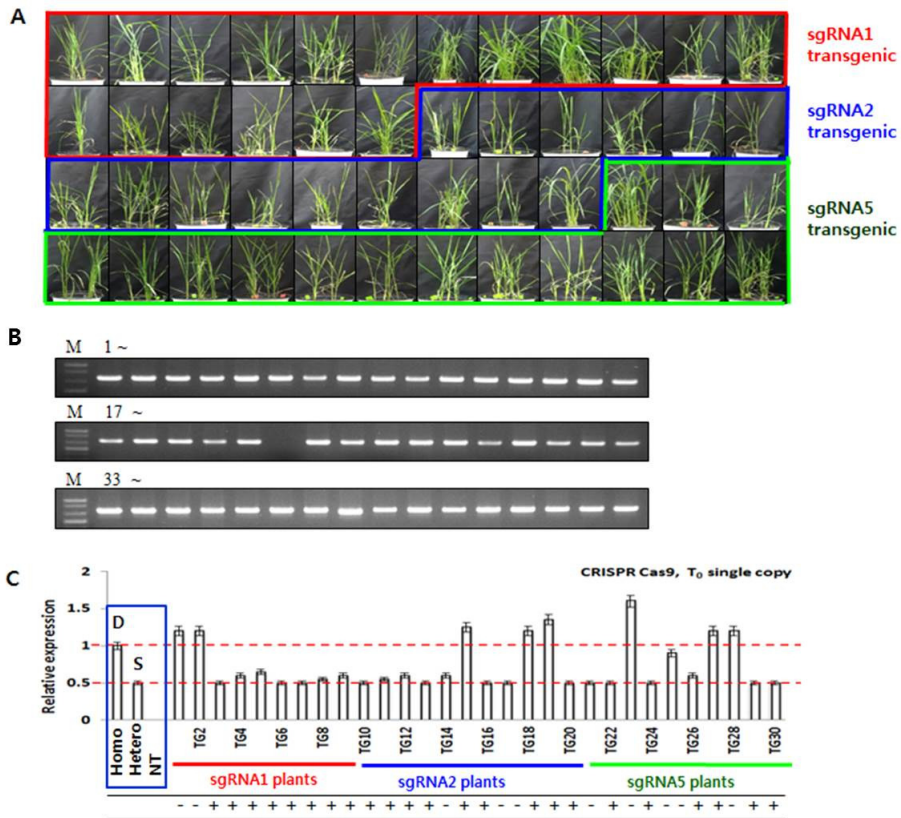


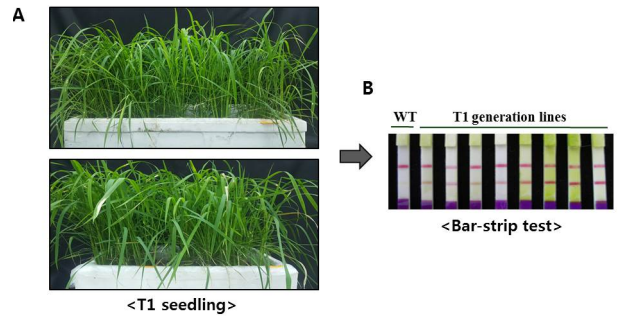
Fig. 4 Methods for detecting sgRNA/Cas9-mediated DNA modifications. (A) Phenotype of transgenic plants with the newly introduced sgRNA1, sgRNA2 and sgRNA5. (B) PCR analysis of bar and nos terminator region. (C) Selection of transgenic single copy plants using TaqMan PCR analysis. Lane 1, T₂ Homo; Lane 2, T₂ Hetero; Lane 3, Negative control and sgRNA/1, 2 and 5 transgenic lines. Each level is generated from the DNA template of independent T₁ transgenic lines. (Target gene probe, 3'NOS; Reference probe, Tubulin1)

T1 세대에서 Null 형질전환체 선발

T0 세대에서 23개의 형질전환체는 single copy로 도입되어 있었으며, 유전자별 평균 7.3개를 보였으며, 이들 식물체로부터 T1종자를 계통별로 150립 이상 채종하였다. 그 다음에 T1 종자를 계통별로 30립씩 육묘상에 파종하여 생육시켰다 (Fig. 5A). 발아 후 28일된 유묘를 이용하여 T-DNA 삽입 여부를 Bar-strip을 사용하여 조사하였다(Fig. 5B). 조사한 계통의 대부분에서 T-DNA 가 호모 및 헤테로로 삽입된 개체들은 χ^2 -test에 의해 평가한 결과 저항성과 감수성 비율이 3:1로 분리되었다(Fig. 5C). 이러한 결과는 Taq-Man PCR 결과가 아주 정확하게 single copy 도입개체를 선발하여 Mendel 법칙에 의해 잘 분리됨을 알 수 있었다. 따라서 본 실험의 목적에 맞게 T-DNA 가 삽입 되지 않은 T1 식물체 중 생육 및 표현형 등을 고려하여 null 식물체(CRISPR/Cas9 벡터 제외 개체)로 선정하여 유전자 편집 여부를 확인하고, 다음 세대를 육성하였다.

선발 Null 식물체의 표적유전자 편집여부 확인 및 표현형

선발한 T-DNA가 삽입되지 않고 유전자 편집만 된 null 식물체는 pot에 생육시켜 표현형의 변이를 살펴보았다(Fig. 6A). 그 결과 시각적으로 두드러진 표현형의 변이는 아직 발견할 수 없었다. 따라서 목적하는 유전자에 국한되어 편집되었기 때문이라고 생각된다. sgRNA별 null 식물체를 4개씩 선정하여 sgRNA 부분이 포함되도록 primer를 제작하고 이를 이용하여 PCR 증폭을 수행하여 염기서열을 조사한 결과는 Fig. 6B와 같다. 각 sgRNA 영역의 PAM 영역에서 3번째부터 1 bp 결실 및 부가 변이체, 22 bp 결실 변이체 및 최대 35 bp 결실 변이체로 나타났다. 따라서, 본 연구에서는 정밀 유전



T1 generation	Result of Bar-strip test		χ^2 - test
	No. of resistant	No. of susceptible	
sgRNA1 line	24	6	0.40
sgRNA2 line	25	5	1.14
sgRNA3 line	23	7	0.04
sgRNA4 line	21	9	0.40

Fig. 5 Selection strategy for null segregant plants in T1 generation. (A) T1 transgenic lines. (B) Bar-strip test with wild type and T1 generation. Analysis of the sample extract for the presence of transgenic rice. The test strips 5 minutes after inserting the strip. At the least, the control line should always develop approximately 1 cm above the bottom sample pad. A red line appearing below the control line is the test line, and indicates a positive result for PAT protein. If the test strip displays 2 red lines, the test is considered complete, and the sample is positive for the transgenic trait. (C) χ^2 -test for resistant and susceptible strains, estimated with the bar-strip test

자 편집 기술인 CRISPR/Cas9 system 을 이용하여 보다 빠르고 쉽고 경제적으로 유전자가 편집된 개체를 확보할 수 있었다. 본 실험에서 확립된 system은 상업용 식물 계통육성에 이용 가능하여 육종적 가치가 매우 클 것으로 사료된다.

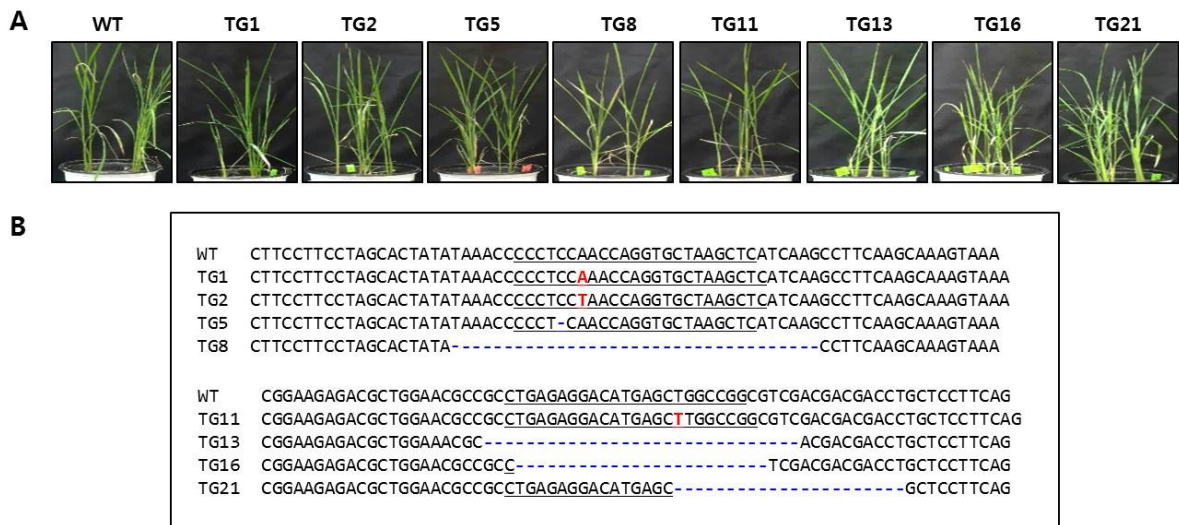


Fig. 6 Genome editing in rice transgenic plants. (A) Phenotype of the gene edited plants. (B) Targeted next-generation sequencing (NGS) analysis of selected TG1, TG2, TG5 and TG8 for sgRNA1, TG11, TG13, TG16 and TG21, for assessing sgRNA2. The indel sequences of target locus are ranked with the read numbers with insertion and deletion

적 요

CRISPR/Cas9 기술은 생명공학을 활용한 신종 작물육성에 있어 패러다임 변혁을 가져다 줄 핵심 기반기술이다. 본 연구에서는 CRISPR/Cas9를 이용하여 유전자편집기술을 기존에 알려진 방법보다 쉽고 정확하게 실험 할 수 있도록 sgRNA 디자인, 벡터구축, 형질전환체 육성 및 분석 등을 자세히 기술하였다. sgRNA는 <http://www.rgenome.net/> 사이트에서 NGG 영역을 중심으로 하여 target-up: 5'-ggcaGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'과 target-down: 5'-aacNNNNNNNNNNNNNNNNNNNC-3'의 올리고를 디자인하였다. 식물 형질전환용 벡터는 pPZP-Cas9-RGEN을 기본으로 하였으며, sgRNA의 프로모터는 OsU3를 이용하여 pPZP::35S::Cas9::PinII-OsU3::sgRNA::Bar-Gen 순으로 구축하였다. 형질전환체의 육성은 단기형질전환 *Agrobacterium* 법을 사용하였으며 재분화 식물체를 얻는데 48일 정도 소요되었다. 형질전환체 유무는 genomic PCR 분석으로 single copy 선발은 TaqMan PCR 로 분석하였다. 정밀유전자편집 식물체는 T1 세대에서 T-DNA 삽입되지 않은 식물체를 Bar-strip에 의해 선발하였다. 선발된 식물체의 sgRNA 영역의 염기배열 조사에 의해 유전자 편집 식물체를 육성하였다. 따라서 본 연구에서 CRISPR/Cas9 system에 의한 정밀유전자편집 기술을 이용하여 보다 빠르고 쉽고 경제적으로 유전자가 편집된 개체를 확보할 수 있었다. 본 실험에서 확립된 system은 상업용 식물 계통육성에 이용 가능하여 육종적 가치가 매우 클 것으로 사료된다.

사 사

본 성과물은 농촌진흥청 연구사업(세부과제명: 벼 미색관련 유전자의 표적 돌연변이체 육성 및 이용, 세부과제번호: PJ01119202)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

Chen W, Qian Y, Wu X, Sun Y, Wu X, Cheng X (2014) Inhibiting replication of begomoviruses using artificial zinc finger nucleases that target viral-conserved nucleotide motif. *Virus Genes* 48:494-501

Durai S, Mani M, Kandavelou K, Wu J, Porteus MH, Chandrasegaran S (2005) Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 18:5978-5990

Endo M, Mikami M, Toki S (2016) Biallelic gene targeting in rice. *Plant Physiol* 170:667-677

Flemr M, Bühler M (2015) Single-Step Generation of Conditional Knockout Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell Reports* 12:

709-716

Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP (2013) Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res* 41:e188

Jung YJ, Nou IS, Kang KK (2014) Overexpression of Oshsp16.9 gene encoding small heat shock protein enhances tolerance to abiotic stresses in rice. *Plant Breed Biotech* 2(4):370-379

Kim H, Kim S-T, Ryu J, Choi MK, Kweon J, Kang B-C, Ahn H-M, Bae S, Kim J, Kim J-S, Kim S-G (2016) A simple, flexible and high-throughput cloning system for plant genome editing via CRISPR-Cas system. *J Integr Plant Biol* 58(8):705-712

Lee HJ, Abdula SE, Jee MG, Jang DW, Cho YG (2011) High efficiency and Rapid *Agrobacterium*-mediated genetic transformation method using germinating rice seeds. *J Plant Biotechnol* 38:251-257

Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B (2012) High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotechnol* 30:390-392

Park J, Bae S, Kim J-S (2015) Cas-Designer: a web-based tool for choice of CRISPR-Cas9 target sites. *Bioinformatics* 31(24):4014-4016

Park J, Lim K, Kim J-S, Bae S (2017) Cas-Analyzer: an online tool for assessing genome editing results using NGS data. *Bioinformatics* 33(2):286-288

Sander JD, Cade L, Khayter C, Reyon D, Peterson RT, Joung JK, Yeh JRJ (2011) Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nat Biotechnol* 29:697-698

Shan Q, Zhang Y, Chen K, Zhang K, Gao C (2015) Creation of fragrant rice by targeted knockout of the OsBADH2 gene using TALEN technology. *Plant Biotechnol J* 13:791-800

Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, DeKolver RC, Moehle EA, Worden SE, Mitchell JC, Arnold NL, Gopalan S et al. (2009) Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* 459:437-441

Subburaj S, Tu L, Jin Y-T, Bae S, Seo PJ, Jung YJ, Lee G-J (2016) Targeted Genome Editing, an Alternative Tool for Trait Improvement in Horticultural Crops. *Hortic Environ Biotechnol* 57(6):531-543

Toki S, Hara N, Ono K, Onodera H, Tagiri A, Oka S, Tanaka H (2006) Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *Plant J* 47:969-976

Townsend JA, Wright DA, Winfrey RJ, Fu F, Maeder ML, Joung JK, Voytas DF (2009) High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature* 459:442-445

Wang F, Wang C, Liu P, Lei C, Hao W, Gao Y, Liu YG, Zhao K (2016) Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922. *PLoS ONE* 11:e0154027

Zhou X, Jacobs TB, Xue LJ, Harding SC, Tsai CJ (2015) Exploiting SNPs for biallelic CRISPR mutations in the outcrossing woody perennial *Populus* reveals 4-coumarate:CoA ligase specificity and redundancy. *New Phytol* 208:298-301