Bovine β-casein 유전체 위치에 따른 single guide RNA의 효율 검증

김승연*, 김가연*, 유형주*, 김세은*, 강만종*
*전남대학교 동물공학과
e-mail:mjkang@jnu.ac.kr

Validation of single guide RNA targeting on the loci of bovine β-casein genome

Seung-Yeon Kim*, Ga-Yeon Kim*, Hyeong-Ju Yoo*, Se-Eun Kim*, Man-Jong Kang*
*Dept. of Animal Science and Biotechnology, Chonam National University

요 약

특정 유전자 위치에 정확하게 외래 유전자를 도입하기 위한 방법으로 유전자적중법에 대한 많은 연구들이 보고되고 있으며 최근에는 유전자 가위가 개발되어 고전적인 방법에 비해 유전자 적중 효율 및 정확도를 높일 수 있게 되었다. 유전자 가위로는 zinc-finger nucleases(ZFNs), transcription activator-like effector nucleases(TALENs)와 clustered regularly interspaced short palindromic repeat(CRISPR)/Cas 시스템이 보고되어 있으며 그 중에서도 CRISPR/Cas9 시스템이 가장 최근에 개발되어 많이 이용되고 있다. CRISPR/Cas9 시스템은 특정 서열을 정확히 인식하도록 디자인된 single guide RNA(sgRNA)와 DNA를 절단하는 Cas9 nuclease로 이루어져 있다. 그러나 sgRNA가 인식하는 유전자의 서열 위치에 따라 CRISPR/Cas9 시스템의 활성이 다른 것으로 보고되고 있다. 따라서 본 연구에서는 소 β-casein 유전자의 위치에 외래유전자를 knock-in하는데 필요한 CRISPR/Cas9 시스템을 구축하기 위하여 소 β-casein 유전자 위치에서 효율적으로 기능하는 sgRNA를 개발하였다. 그 결과 소 β-casein 유전자의 엑손 또는 인트론을 특이적으로 인식하는 8개의 sgRNA를 합성하여 활성을 비교한 결과 2개의 sgRNA에서 특이적으로 소 β-casein 유전자를 절단할 수 있음을 확인하였다. 따라서 이러한 sgRNA를 이용한 CRISPR/Cas9 시스템을 활용하여 소 β-casein 유전자의 위치에 외래유전자를 knock-in하는데 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

(Key words :Bovine β-casein gene, CRISPR/Cas9 system, Gene targeting, Single guide RNA)

1. 서론

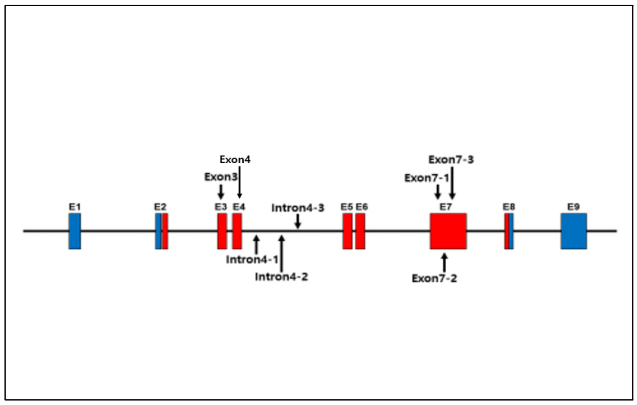
유전자 편집 기술에 대한 많은 연구가 진행되어 오면서 유전자 편집을 통해 살아있는 세포의 유전체 내에서 유전자를 knock-out 또는 knock-in하여 세포 내 특정 유전자의 편집이 활발히 진행되고 있다(1). 최근 이러한 유전자 편집에는 유전자 가위를 이용하고 있으며 유전자 가위는 zinc-finger nucleases(ZFNs), transcription activator-like effector nucleases(TALENs)와 clustered regularly interspaced short palindromic repeat(CRISPR)/Cas 시스템이 보고되어 있다(2). 그 중에서도 CRISPR/Cas 시스템은 ZFNs나 TALENs에 비해 더 쉽고 간편한 대안으로써 최근에 보고되고 있으며 knock-in 형질전환 동물의 생산에도 활발하게 이용되고 있다(3, 4). CRISPR/Cas9 시스템이 작동하기 위해서는 특정 서열을 정확히 인식하도록 디자인된 sgRNA와 DNA를 절단하는 역할을 하는 Cas9 nuclease라는 단백질이 필요한 것으로 보고되고 있다(5). CRISPR/Cas9 시스템의 활성은 먼저, 특정 서열로 이루어진 sgRNA가 상보적인 염기쌍을 찾아 결합하게 되면 나머지 한 가닥의 DNA에 있는 NGG 서열로 이루어진 protospacer adjacent motif(PAM) 부위를 Cas9 nuclease가 인식하여 double-strand break(DSB)를 일으키는 것으로 알려져 있다(2, 6). 유전자 편집을 하기 위하여 특정 표적 DNA를 정확히 절단하기 위해 sgRNA의 선별이 중요하며 이 때 sgRNA가 인식하는 유전자의 특정 서열 위치에 따라 CRISPR/Cas9 시스템의 활성이 차이가 있는 것으로 보고되고 있다(7). 따라서 본 연구에서는 소 β-casein 유전자 위치에 외래 유전자를 knock-in하기 위하여 sgRNA들을 제작하고 그것들의 활성을 비교 검증함으로써 효율적인 유전자 편집을 위한 sgRNA를 개발하였다.

2. 결과 및 고찰

2.1 소 β-casein 유전자를 인식하는 sgRNA의 디자인

소 β-casein 유전자의 특정 위치에 따른 sgRNA의 효율을 확인하기 위해 엑손3, 엑손4, 인트론4 그리고 엑손7 위치를 인식하는 sgRNA들을 그림 1에 나타낸

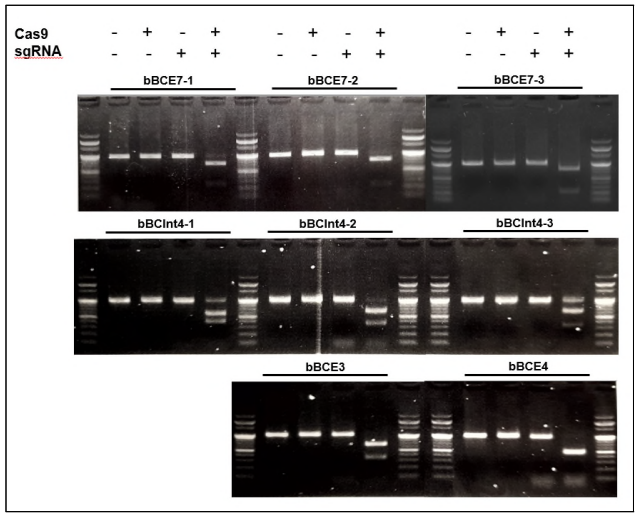
바와 같이 각각 1개, 1개, 3개, 3개씩 디자인하여 제작하였다.



[그림 1] Bovine β-casein 유전자 위치를 인식하는 sgRNA 디자인

2.2 In vitro assay를 통한 sgRNA 활성 검증

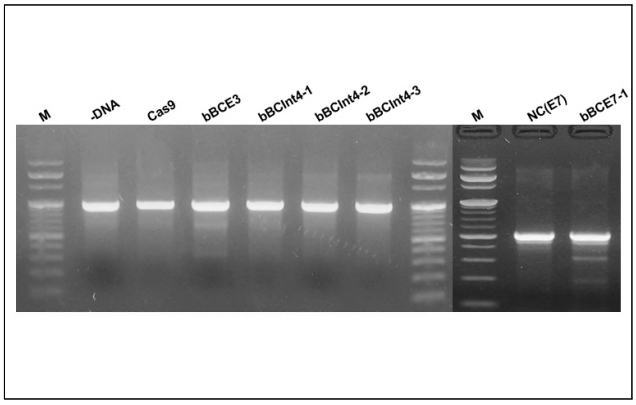
그림 1에서 제작한 sgRNA의 활성을 검증하기 위하여 우선, 절단 부위를 포함하는 부분을 PCR 증폭한 다음 Cas9 단백질과 각각의 sgRNA를 첨가해 in vitro assay를 실시하였다. 그 결과 그림 2에 제시한 바와 같이 8개 모두에서 부분적 또는 완전한 indel이 일어남을 확인하였다. 이러한 결과는 in vitro에서는 유전체의 위치에 관계없이 sgRNA가 활성을 띤다는 것을 나타내며 특히 인트론보다는 엑손을 인식하는 경우에 그 효율이 비교적 우수하다는 것을 알 수 있었다.



[그림 2] Bovine β-casein 엑손3, 엑손4, 인트론4, 그리고 엑손7 위치를 인식하는 sgRNA의 in vitro 활성 검증

2.3 In vivo assay를 통한 sgRNA 활성 검증

제작한 sgRNA들이 in vivo에서도 활성을 띠는지 검증하기 위하여 우선, pGuide-it-ZsGreen1 벡터에 각 sgRNA들을 클로닝 하여 MAC-T 세포에 도입하였다. 그 다음 절단 부위를 포함하는 부분을 PCR 증폭하여 T7 endonuclease I assay를 통하여 활성을 검증하였다. 그 결과, 엑손3와 엑손7을 인식하는 bovine β-casein 엑손3 sgRNA와 bovine β-casein 엑손7-1 sgRNA에서 활성을 보여 in vivo에서도 기능함을 확인할 수 있었다(그림 3). 이러한 결과는 in vitro assay에서와 마찬가지로 인트론보다는 엑손을 인식하는 sgRNA를 이용하는 것이 효과적임을 나타낸다.



[그림 3] T7 endonuclease I을 이용한 bovine β-casein 엑손3, 인트론4, 그리고 엑손7 위치를 인식하는 sgRNA의 in vivo 활성 검증 (M ;marker, NC ;negative control)

위의 결과들을 종합해봤을 때 in vitro에서는 제작한 sgRNA 모두에서 활성을 나타냈지만 이것을 in vivo에 도입했을 땐 인트론보다는 엑손에서의 sgRNA 활성이 좋음을 알 수 있었다. 또한 엑손3와 엑손7-1을 타겟으로 하는 sgRNA의 경우, T7 endonuclease I assay를 실시했을 때의 indel 효율이 다른 위치를 인식하는 sgRNA보다 더 높은 활성을 나타내었다. 따라서 본 연구를 통해 검증한 효율이 좋은 sgRNA를 이용한다면, 소 β-casein 엑손3와 7 위치에 효율적인 유전자 편집이 가능할 것으로 생각된다.

3. 사사

이 성과는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2019R1F1A1061424).

참고문헌

[1] Xiao-Hui Zhang, “Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering”, Nucleic Acids, Volume 4, pp. 264, Oct, 2015.

[2] Natasa Savic, “Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing, Elsevier, Volume 168, pp.15-21, Feb, 2016.

[3] Yaling Zhang, “Chapter Eight - CRISPR/Cas9-Based Genome Editing in Plants”, Elsevier, Volume 149, pp.133-150, May, 2017.

[4] Keiichiro Suzuki, “In vivo genome editing via CRISPR/Ca9 mediated homology independent targeted integration”, Nature, Volume 540, pp.144-149, Nov, 2016.

[5] Woong Y Hwang, “Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system”, Nature Biotechnology, Volume 31, pp.227-229, Mar, 2013.

[6] F. Ann Ran, “Double Nicking by RNA-Guided CRISPR

Cas9 for Enhanved Genome Editing Specificity", Cell, Volume 154, Issue 6, pp.1380-1389, September, 2013.

[7] Josh Tycko, "Methods for Optimizing CRISPR-Cas9 Genome Editing Specificity", Molecular Cell, Volume 63, pp.355-370, Aug, 2016.