

Research Article



CrossMark

Open Access

후숙 조절 유전자 Pectate lyase와 Phytoene Synthase 편집용 CRISPR-Cas9 sgRNA의 유전자 편집 효율 측정

박효선, 양소희, 김의연, 구연종*

전남대학교 농화학과

Evaluation of sgRNAs Targeting Pectate Lyase and Phytoene Synthase for Delaying Tomato Fruit Ripening

Hyosun Park, So Hee Yang, Euyeon Kim and Yeonjong Koo* (Department of Agricultural Chemistry, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea)

Received: 31 August 2021/ Revised: 17 September 2021/ Accepted: 18 September 2021

Copyright © 2021 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID

Yeonjong Koo

<https://orcid.org/0000-0002-0147-1758>

Abstract

BACKGROUND: Tomato genome editing using CRISPR-Cas9 is being actively conducted in recent days, and lots of plant researches have been aiming to develop high valued crops by editing target genes without inserting foreign genes. Many researchers have been involved in the manipulation of the crop ripening process because fruit ripening is an important fruit phenotype for increasing fruit shelf life, taste, and texture of crops. This paper intends to evaluate target sgRNA to edit the two ripening-related genes encoding pectate lyase (*PL*) and phytoene synthase (*Psy*) with the CRISPR-Cas9 system.

METHODS AND RESULTS: The CRISPR-Cas9 expression vector was cloned to target the *PL* (Solyc03g111690), *Psy1* (Solyc03g031860), and *Psy2* (Solyc02g081330) genes, which are the ripening genes of tomatoes. Tomatoes injected with *Agrobacterium* containing the CRISPR-Cas9 expression vector were further cultured for 5 days and used to check gene editing efficiency. As a result of the target gene sequence analysis by the next generation sequencing method, gene editing efficiency was calculated, and the efficient target location was selected for the

PL and *Psy* genes.

CONCLUSION: Therefore, this study was aimed to establish target sgRNA data that could have higher efficiency of the CRISPR-Cas9 system to obtain the delayed ripening phenotype of tomato. The developed method and sgRNA information is expected to be utilized in the development of various crops to manage its ripening processes.

Key words: CRISPR-Cas9, Fruit Ripening, sgRNA Efficiency, Tomato

서론

과일의 후숙과정은 맛, 품질, 색상 등의 특성을 결정하는 작물의 발달과정 중 하나일 뿐만 아니라 이후 유통과정 중 운송, 저장 및 유통기한 등 과일의 가치에 영향을 미치는 상업적으로도 중요한 과정이다. 따라서 후숙 조절을 통해 맛과 품질이 좋은 유통기한이 긴 농산물 품종개발 및 시장공급을 위한 육종 및 수확 후 기술 개발이 활발히 진행되고 있다.

토마토(*Solanum lycopersicum*)의 후숙과정은 조직의 변화로 인해 질감, 색상, 당도의 변화를 초래한다[1]. 세포벽은 셀룰로스, 헤미셀룰로스, 펙틴 및 구조 단백질을 포함한 미세섬유 및 다당류 등의 복잡한 구조로 이루어져 있으며 이들의 합성과 분해를 조절하는 polygalacturonase (PG), pectinesterase, galactanase, xyloglucan endo-transglycosylase

*Corresponding author: Yeonjong Koo
Phone: +82-62-530-2133; Fax: +82-62-530-2139;
E-mail: yeonjong@jnu.ac.kr

및 pectate lyase (PL) 등의 유전자를 통해 후숙을 유도하는 메커니즘이 잘 알려져 있다[2]. 과일 후숙의 유전적 및 분자적 기초는 다당류가 많은 세포벽 구조 및 팽창, 하이드록실라디칼(OH)의 영향을 포함한 수많은 요인에 의해 결정된다[3,4,5]. 토마토의 열매는 주황색부터 붉은색으로 여러 종류가 있다. 이러한 색깔의 합성은 리코펜에 의해 결정되는데 리코펜 합성의 첫 단계는 식물의 15-cis-isomer를 형성하기 위한 geranylgeranyl diphosphate 두 분자의 응축이다. 이러한 반응을 하기 위해서는 효소인 phytoene synthase (Psy)에 의해 촉매된다[6].

게놈의 편집은 유전자 기능 분석 및 작물 개선을 위한 중요한 도구 중 하나이다. 최근 CRISPR-Cas9 시스템을 활용하는 3세대 유전자 교정 방법은 zinc-finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like nucleases (TALENs) 과 같은 다른 유전자 교정 방법보다 저렴한 비용, 짧은 작물 개발시간으로 인해 강력한 유전자 편집 도구로서 각광받고 있다. CRISPR-Cas9 시스템은 총 3가지 유형(I, II 및 III)으로 분류가 된다. 그 중 타입 II는 단일 Cas9 단백질을 사용해 표적 DNA/RNA의 분열을 유도시켜 유전자를 편집한다. CRISPR RNA (crRNA)는 성숙된 crRNA를 형성하기 위해 small trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA)로 혼성화시킨다. 성숙한 crRNA는 Cas9와 결합하여 기능성 복합체를 형성한다. 형성된 복합체는 RNA/DNA 염기 페어링에 의해 5'-NGG-3' 인 Protospacer-adjacent motif (PAM) 부근에서 짧은 서열을 인식하면 Cas9 단백질은 표적 DNA를 갈라놓는다. 완성된 crRNA는 단일 합성 가이드 RNA (sgRNA)로 대체될 수 있다. 따라서 sgRNA 및 Cas9 단백질을 통해 간단하고 효율적으로 게놈 편집을 할 수 있다[7].

지금까지 토마토에서 CRISPR-Cas9 시스템에 의한 후숙 관련 유전자의 억제에는 후숙과정에 영향을 주는 수준은 미미하다[8]. 하지만 최근 연구에서 후숙 조절 유전자의 억제로 효율적으로 후숙과정을 조절하는 돌연변이 작물이 개발되고 있다. 토마토 과일 후숙과정에서 PL과 같은 펙틴 분해 효소 유전자의 역할이 최근 CRISPR-Cas9 매개 표적 돌연변이 제작으로 밝혀지고 있으며, 동시에 CRISPR-Cas9을 활용한 PL 유전자 발현을 억제 토마토 생식으로 과일 숙성이 현저히 늦춰진 상품 개발이 진행되고 있다. 또한, CRISPR-Cas9 시스템을 *Psy1* 유전자의 돌연변이 생성이 토마토의 색깔을 조절하는데 효율적임을 증명한 이전 연구가 있다[9].

CRISPR-Cas9 시스템의 효율은 sgRNA 구조, 표적의 GC 함량, 표적 주변의 크로마틴 구조 등의 요소들과 오프타겟에 대한 친화성 등에 의해 빈번히 영향을 받는다[10]. 하지만 이러한 요소들의 영향을 받는 이유에 대해서는 구체적으로 알려져 있지 않다. 그럼에도 불구하고 이 시스템을 이용하는 이유는 CRISPR-Cas9의 시스템이 전통 육종 방법 대비 원하는 유전자에 대한 특이적 돌연변이체를 유도한다는 장점과 염기의 삽입과 결실을 통한 최종 돌연변이체가 자연 돌연변이체와 동일하다는 점이다. 본 연구에서는 토마토의 후숙을 조절하기 위해 CRISPR-Cas9 시스템에 적용할 수 있는 높은 편

집 효율의 sgRNA를 *Agrobacterium*을 이용한 떡잎 transient 발현을 통해 선발하여 다양한 상업용 토마토에 적용할 수 있는 정보를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

토마토 재배 조건

원예용상토(상토2호, 부농, 대한민국)를 토마토(*S. lycopersicum* cv. Micro-Tom) 종자의 발아를 위해 사용하였다. 배양 조건으로 심어진 토마토 종자는 4°C에서 5일간 저온처리를 거친 후 25°C에서 12 hr/12 hr 광주기 조건에서 배양했다.

sgRNA 선별 및 Vector construction

토마토 pectate lyase (PL), phytoene synthase (Psy) 유전자의 전신 coding sequence (CDS)는 Sol Genomics Network database에서 얻었으며 이들 유전자를 표적으로 하는 single guide RNA (sgRNA)는 CRISPR-P v2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn>)에서 선발하였다. 선발된 sgRNA 클로닝을 위한 20 mer의 상보적인 DNA 올리고는 마크로젠(대한민국)에 의뢰해 제작했다. 제작된 상보적 올리고를 annealing하기 위해 각각 100 pmole의 올리고를 총 25 µL 볼륨에서 95°C 10분 처리 후 10초에 2°C씩 37°C까지 온도를 낮춰 double strand sgRNA로 만들었다. Double strand sgRNA는 제한효소 *Esp8I*으로 자른 pYPQ141A 벡터(Addgene plasmid ID 69290)에 cloning했다[11]. 이후 pYPQ141A 벡터에 sgRNA가 도입됨을 확인하고 Cas9이 포함된 pYPQ154 벡터, 그리고 pMDC32 벡터와 함께 LR clonase (11791019, Thermo Scientific Inc. USA)를 이용해 재조합 했다. 재조합이 확인된 벡터는 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101에 electroporation 방법으로 형질전환했다.

Transient assay

형질전환 된 *Agrobacterium*은 28°C에서 5 mL Luria-Bertani broth (LB broth)배지에 16 h동안 증배양을 진행하였고 5 mL LB broth에 계대배양 후 A_{600nm} 값이 0.9가 되었을 때 접종균으로 사용했다. 완성된 *Agrobacterium* 배양균은 1 mL를 취해 6,000 rpm에서 1분간 원심분리 하고, 침전물을 미리 준비된 완충액(1/2 MS medium, 1% sucrose, 1 µM IAA, 10 µM zeatin, 200 µM acetosyringone)에 재현탁 하였다. 이 후 28°C에서 한 시간동안 순화배양 하였다. 완성된 *Agrobacterium* 접종액은 1 mL 마이크로주사기의 끝을 이용하여 약 12일 된 토마토 떡잎에 50 µL를 주입했다. 주입된 토마토의 떡잎은 5일 후 CRISPR-Cas9 유전자 교정 확인에 사용되었다.

CRISPR-Cas9 유전자 교정 효율 확인

CRISPR-Cas9 유전자 교정 확인 및 교정 효율 확인을 위해 5일간 배양된 토마토 떡잎을 취하여 액체질소를 이용해 동결했다. 동결된 떡잎은 Edwards et al. (2013)에 기술된

추출용액을 이용해 토마토 genomic DNA를 추출하였다 [12]. 동결된 잎은 TissueLyser II (QIAGEN)에서 21 rpm으로 1분간 파쇄한 뒤 Edwards buffer [0.5% SDS, 200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA (pH 8.0)]에 파쇄된 잎을 현탁하고 SDS를 1%가 되도록 첨가한 후 65°C에서 5분간 반응했다. 이후 1 M potassium acetate 조건에서 단백질과 세포파편들을 침전하였고 13,000 rpm에서 원심분리 후 얻은 상등액을 300 mM NaOAc, 50% isopropyl alcohol 조건에서 genomic DNA를 침전시켰다. 침전된 genomic DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 건조시켜 3차 증류수에 genomic DNA를 녹여 추출을 완료하고 이를 PCR 반응에 이용했다.

완성된 genomic DNA시료는 목표 유전자의 편집 Target 부위를 포함하여 0.5-1kb 크기로 증폭시키는 1차 PCR을 진행했다. 증폭되어진 1차 PCR 산물은 10배 희석하여 편집부위를 포함하는 150-200 bp 위치를 2차 증폭하였다. 최종 3차 PCR은 Index primer를 사용하여 증폭한 뒤 Next Generation Sequencing (NGS) 방법으로 염기서열을 분석하였다(바이

오코어센터, 한국). 분석된 염기서열 정보는 CRISPR RGEN Tools (<http://www.rgenome.net>)의 Cas-analyzer를 통해 교정 염기서열 및 교정 효율을 확인하였다. 사용한 primer의 정보는 Table 1에 기재하였다.

통계처리 방법

sgRNA 효율 측정은 유전자별로 최소 6회 반복으로 조사하여 측정되었다. 결과는 상자수염 그래프 형식으로 나타냈다.

결과 및 고찰

CRISPR-Cas9 발현 벡터를 구성하기 위한 target guide RNA 선발

본 연구에서 토마토의 후숙 유전자인 pectate lyase (*PL*), phytoene synthase (*Psy*) 유전자들의 locus name은 각각 Solyc03g111690, Solyc03g031860, 그리고 Solyc02g081330이다. *PL* 유전자의 경우 Solyc03g111690 유전자를 이용하여 두 가지 target guide RNA 위치를 CRISPR-P v2.0 프로

Table 1. List of primers used for amplifying sgRNA target region

Target gene	Primer		Sequence
<i>SIPL-1</i>	1st primer	Forward	AAGGAGTTCATTCGTATTTAAAATA
		Reverse	ATGCTATGGTGC GGAGCAGTCCAT
	2nd primer	Forward	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCCGAAATCCAATC GACGATTGTT
		Reverse	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGCGTACACATAG CGGGTGGTCCG
<i>SIPL-2</i>	1st primer	Forward	TATGCTATTGGTGGAAAGTGCTGAT
		Reverse	ACAACCCTAAACTTCTTGTCCTT
	2nd primer	Forward	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTATGTAGGTTACAAA GCACGAGGAT
		Reverse	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCAACGAGAACCC TTTTACAGTT
<i>Psy 1-1</i>	1st primer	Forward	ACTTGAGGTC ACTATAGGAGCTCA
		Reverse	CATATGTGTTTGTGCGCGTAACTG
	2nd primer	Forward	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTCTTGCTCAGAATG TCTGTTGCC
		Reverse	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCGTTCTCCAGATG GAGTAGCCAAA
<i>Psy 1-2</i>	1st primer	Forward	ACTTGAGGTC ACTATAGGAGCTCA
		Reverse	CATATGTGTTTGTGCGCGTAACTG
	2nd primer	Forward	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCAAGTTTCATGGAAT CAGTCCGGG
		Reverse	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATTCCCCGGAATA GGTATATCCGG
<i>Psy 2</i>	1st primer	Forward	GGGGTGAGTTGAGTAATTGGCTTT
		Reverse	TGCATACTCTGCACATACTTCGCC
	2nd primer	Forward	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGGGTATCTACTAGG CTGAGGTGA
		Reverse	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTCCTTTCCACA TCGAATTCCT

그램을 참고하여 선정하였다(Fig. 1a). 선택된 guide RNA는 GC함량을 65%, 45%를 가지고 있었으며 두번째 exon과 네번째 exon에 위치하였다. 유사하게 *Psy*의 경우 Solyc03g031860, Solyc02g081330 두 가지 유전자에 대해 sgRNA를 디자인 하였는데, Solyc03g031860의 경우 두 가지 target guide RNA를 선발하였고 각각의 sgRNA의 GC함량은 40%, 50%이며 두 가지 target guide RNA 모두 첫번째 exon에 위치 하였다(Fig. 1b). Solyc02g081330을 타겟으로 하는 한 가지 target guide RNA는 50%의 GC함량을 가지며 첫번째 exon의 위치를 표적으로 하였다(Fig. 1c).

CRISPR-Cas9 발현 벡터와 Target guide RNA 클로닝

본 연구에서는 토마토의 후숙 유전자인 *PL*, *Psy* 유전자를 타겟으로 하는 CRISPR-Cas9 시스템 형질전환을 위해 Fig. 2와 같은 유전자 발현 벡터를 제작하였다[11]. CRISPR-Cas9 발현을 위한 식물용 destination 벡터로는 pMDC32를 사용 하였다. pMDC32 벡터는 2반복 35S 프로모터에 의해 Cas9 이 발현되고, AtU6 프로모터에 의하여 guide RNA가 발현 조절된다(Fig. 2).

sgRNA의 목표 유전자 편집 효율 측정

각 sgRNA의 목표 유전자별 편집 효율 측정은 *Agrobacterium* 을 토마토 떡잎에 주입하여 transient 발현을 실시해 분석하였다. 각 sgRNA의 표적 부위를 포함하는 프라이머를 이용하여 목표 유전자를 증폭하고, 증폭된 단편을 Next Generation Sequencing (NGS)방법으로 분석하였다. 보다 정확한 분석을 위하여 6번 이상의 반복 연구를 수행하였다. 결과로 SIPL-2 sgRNA의 경우 0.01~0.02%의 효율을 보여주었으며 이는 NGS 방법의 오도 가능성인 약 0.1% 보다 낮은, sgRNA의 편집 효율로 유의하지 않은 값을 나타냈다. 반면 SIPL-1의 경우 0.1~1.29%의 *PL* 유전자 교정 효율이 나타났다. sgRNA의 편집 효율 분포를 나타내는 상자수염의 1사분위수(Q1)는 전체 분석값의 25%, 중앙선은 분석값의 50%, 3사분위수(Q3)는 분석값의 75%를 나타낸다. 따라서 이 세가지 분석값을 통해 만들어진 상자는 전체 분석값의 절반이 시각화된 그림이다. 결과로 보아 SIPL-1은 Q1-Q3까지의 사분위수 범위를 벗어난 1.29%의 특이점을 가지고 있지만 SIPL-2에 비교하여 만들어진 상자의 모양은 sgRNA 편집 효율이 높음을 알 수 있다 (Fig 3a). 두 가지 유전자 효율에 차이가 나는 이유는 SIPL-1이 SIPL-2

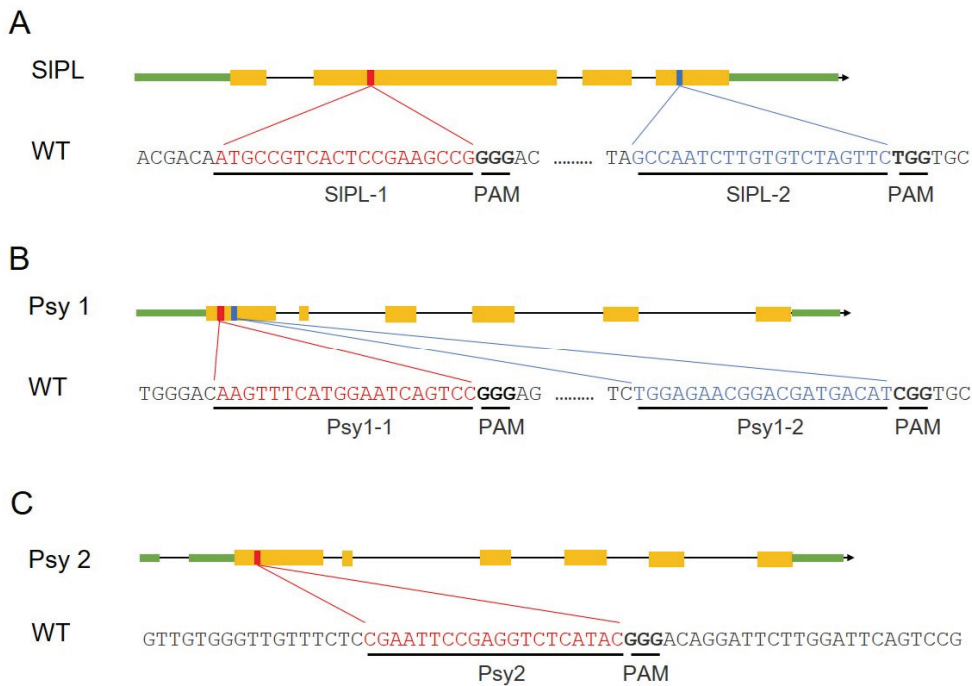


Fig. 1. Sequence and target location of sgRNAs to edit ripening genes. The gene structure of tomato *PL* gene and the target location of sgRNAs SIPL-1, and SIPL-2 (A), the gene structure of *Psy1* gene and the target location of sgRNAs Psy1-1 and Psy1-2 (B), and the gene structure of *Psy2* gene and the target location of sgRNA Psy2.

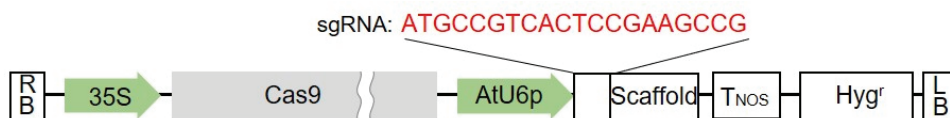


Fig. 2. Schematic description of CRISPR-Cas9 vector construction for editing Tomato target genes. The representative sgRNA sequence for editing *PL* gene is indicated.

보다 높은 GC 함량을 가지고 있으며[13] CRISPR-Cas9 복합체가 유전자를 편집하는데 있어 잘 접근할 수 있는 target 위치임을 시사한다. 따라서 SIPL 유전자에 대한 두 가지 sgRNA, SIPL-1과 SIPL-2의 큰 유전자 교정 효율의 차이는 일차적으로 sgRNA 자체의 높은 GC 함량에 의한 것으로 예측되며 SIPL-1과 SIPL-2 target 위치가 충분히 멀다는 점을 고려했을 때 SIPL-2 위치에서는 Cas9 시스템이 접근하기 어려워 낮은 교정효율을 나타낼 수 있다는 해석을 배제할 수 없다.

*Psy*의 결과값은 *Psy* 1-1, *Psy* 1-2, *Psy* 2 각각 0.01~0.1%, 0.01~0.16%, 0.01~0.15%의 효율을 보여주었다. 상자수염의 경우 세 가지 sgRNA 모두 비슷한 중간값과 평균값을 보여주었지만 SIPL-1에 비해 비교적 낮은 편집 효율이 나타났다 (Fig. 3b). *Psy1*, *Psy2*에서 세가지 target sgRNA 모두 비슷한 결과값을 나타냄을 알 수 있었고 NGS 분석의 오류값인 0.1%에 근접하는 효율을 나타내어 두 가지 *Psy1*을 표적으로 하는 sgRNA 모두 CRISPR-Cas9를 이용한 유전자 편집에 적합하지 않은 유전자임을 알 수 있다. 이전 연구에 의하면 *Psy1*의 경우 돌연변이 발생률이 낮았으며 sgRNA디자인 또는 후성 유전학에 의하여 낮은 돌연변이 발생률이 보인다는

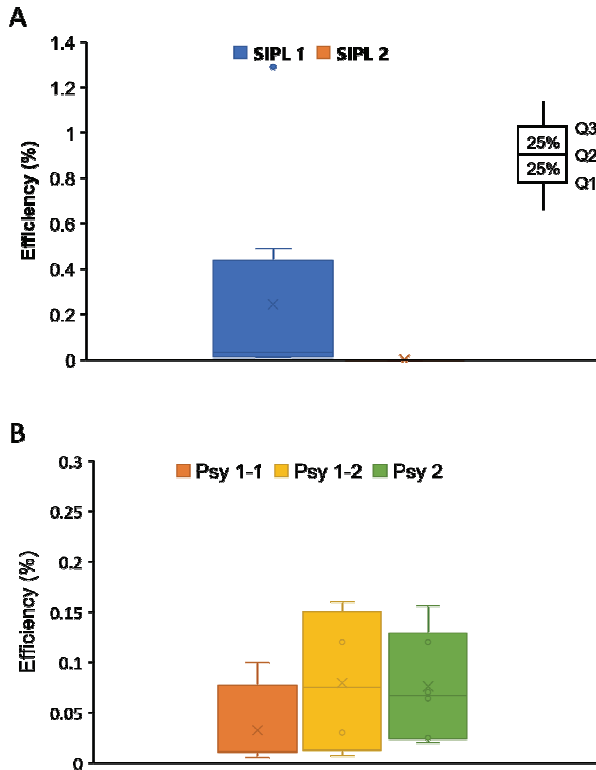


Fig. 3. Box plot showing distribution of mean sgRNA efficiencies. (A) The editing efficiency of sgRNAs SIPL-1, and SIPL-2. (B) The editing efficiency of sgRNA *Psy*1-1, *Psy* 1-2, and *Psy* 2. The box lines indicate Q1 (25%), Q2 (median, 50%), and Q3 (75%), respectively as shown in (A) inset. The mean values are indicated in x mark inside the box. The upper and lower whiskers indicate the maximum and minimum values, respectively, obtained in each experiment.

연구결과가 있다[14]. 본 연구의 결과는 앞선 연구결과와 일치하는 면이 있다.

CRISPR RGEN Tools을 통해 분석된 목표 유전자 편집 결과를 염기서열 비교를 통해 분석하였다(Fig. 4). 결과로 보았을 때 대체적으로 표적 돌연변이가 PAM 서열의 3-4 bp upstream에서 발생하는 것으로 관찰되었다(Fig. 4a, 4b). 관찰된 돌연변이의 모형은 예상했던 대로 CRISPR-Cas9 시스템의 이전에 관찰된 돌연변이 패턴으로 구성된 염기의 삽입 및 삭제 (In/Del)를 포함하였다[15,16].

A

Gene name	Target sequence	#Read	Effc.
SIPL 1	ATGCCGTCACCTCCGAAGCCG	158502	
	ATGCCGTCACCTCCGAA-CCG	2033	
	ATGCCGTCACCTCCGAA-CCG	15	
	ATGCCGTCACCTCCGAAGCC-	6	1.29%
	ATGCCGTCACCTCCGAAGCCG	62101	
	ATGCCGTCACCTCCGAA-CCG	131	
	ATGCCGTCACCTCCGA-CCG	108	
	ATGCCGTCACCTCCGAAGCC-	18	
	ATGCCGTCACCTCCG-AGCCG	2	
	ATG-CGTCACCTCCGAAGCCG	3	0.42%
	ATGCCGTCACCTCCGAAGCCG	106395	
	ATGCCGTCACCTCCGAA-CCG	235	
	ATGCCGTC-CCG	18	
	ATGCCGTCACCTCCGAAG-CG	5	
	ATGCCGTCACCTCCGAA-CCG	3	
	ATGCCGTCACCTCCGAAGCC-	2	
	ATGCCGTCACCTCCG-AGCCG	2	
ATGCCGTCACCTCC-AAGCCG	2	0.25%	

B

Gene name	Target sequence	#Read	Effc.
Psy1-2	TGGAGAACGGACGATGACAT	96814	
	TGGAGAACGGACGAT-CAT	34	
	TGGAGAACGGAC-CCAT	31	
	TGGAGAACGGAC-TCATCAT	22	
	TGGAGAACGGACGATG-CAT	22	
	TGGAGAACGGAC-CCGACAT	19	
	TGGAGAAC-GACGATGACAT	4	
	TGG-CAACGGACGATGACAT	3	
	T-GAGAACGGACGATGACAT	3	
	TGGAGAACGGACGAT-CCAT	2	
	TGGAGAACGGACGATGAACAT	14	0.16%
	CGAATTCGAGGTCTCATA	62988	
	CGAATTCGAGG-ATAC	11	
	CGAAICCGAGGI-AIAC	8	
CGAATTCGAGGT-TAC	6		
CGAATTCC-CCAT	5		
CGAATTCGAGGTCTCA-AC	4		
CGAATTCGA-ATAC	2		
CGAATTCGAGGTCT-TAC	2		
CGAATTCGAGGTCTCAATAC	4	0.16%	

Fig. 4. The edited gene sequence analyzed from NGS. The edited sequences by SIPL-1 (A) and by *Psy*1-2 or *Psy*2 (B) are indicated. The PAM sequence is on the 3'-end (right side of sequence). The total read is indicated on the first row of each sequence patterns and the calculated editing efficiency is indicated in the last row of the sequence lists.

Fig. 3과 Fig. 4의 결과를 종합했을 때 *PL* 유전자의 경우 SIPL-1 sgRNA가 가장 적합한 sgRNA임을 알 수 있고 *Psy* 유전자의 경우 높은 교정 효율을 나타내진 않지만 편집된 유전자 염기서열을 고려했을 때 CRISPR-Cas9 시스템이 작동하고 있다는 것이 명확하여 제시된 세 가지 sgRNA를 모두 사용 가능함을 알 수 있다. 당근(*Daucus carota*)에서 CRISPR-Cas9 시스템에 의한 carotenoid 생합성 억제실험을 한 연구결과에서는 callus에서 *Psy2*가 아닌 *Psy1*이 carotenoid 생합성에 더 중요하다는 결론이 있었다[14]. 따라서 제시된 두 가지의 *Psy1-1*, *Psy1-2* 중에 효율 측면에서 약간의 우위에 있는 *Psy1-2*를 최적 sgRNA로 제시하고자 한다.

CRISPR-Cas9시스템의 경우 2012년에 등장한 새로운 유전자 편집 시스템으로 토마토 이외의 많은 작물들의 경우 유전자 편집 효율을 증진시키기 위한 여러 연구결과가 존재한다. 이전에 연구된 결과로 보아 유전자 편집 효율은 Cas9 단백질을 구동하는 다양한 프로모터의 선택, 코돈 최적화, 이중 sgRNA의 활용 등 다양한 편집 효율성 향상을 위한 노력을 통해 개선되어 왔다[1]. 또한, 특정 표적 sgRNA가 식물에서 얼마나 효율적인지 비효율적인지는 불명확하기 때문에 형질 전환을 실시하기 전 가능성 있는 sgRNA 유전자 효율을 빠르게 분석하는 방법은 추후에 CRISPR-Cas9시스템 기능적 연구를 위해 필수적이다[17,18]. 본 논문에서는 토마토 떡잎에 transient 발현을 통해 sgRNA의 효율을 성공적으로 측정할 수 있다는 점을 실험적으로 보여주었고 동시에 후속 조절을 위한 CRISPR-Cas9용 sgRNA를 제안하였다.

결과적으로 토마토 과실의 유통기한과 색상 등을 조절하는 후속 조절 유전자를 CRISPR-Cas9시스템을 이용하여 편집하였을 때, sgRNA들은 각각 상이한 유전자 편집 효율을 보여주었으며 유의미한 결과값을 가지는 SIPL-1의 경우 작물 형질전환에 있어 효율적으로 이용가치가 높은 target guide RNA임을 알 수 있었다. *Psy*의 경우 전체 관독값의 약 0.1%인 NGS 방법의 오도 가능성과 비슷하기는 하지만 편집된 염기서열 분석을 통해 *Psy1-2*와 *Psy2* sgRNA가 유전자 편집에 사용될 수 있음을 확인하였다.

Note

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

This work was supported by the Cooperative Research Program for Agriculture Science and Technology Development (Project No. PJ01477601) funded by Rural Development Administration.

References

1. Wang R, da Rocha Tavano EC, Lammers M, Martinelli

- AP, Angenent GC, de Maagd RA (2019) Re-evaluation of transcription factor function in tomato fruit development and ripening with CRISPR/Cas9-mutagenesis. *Scientific Reports*, 9(1), 1696.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-38170-6>.
2. Seymour GB, Østergaard L, Chapman NH, Knapp S, Martin C (2013) Fruit development and ripening. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 219-241.
<https://doi.org/10.1111/nph.16724>.
3. Martin LB, Rose JK (2014) There's more than one way to skin a fruit: Formation and functions of fruit cuticles. *Journal of Experimental Botany*, 65(16), 4639-4651.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru301>.
4. Keegstra K (2010) Plant cell walls. *Plant Physiology*, 154(2), 483-486. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161240>.
5. Wang D, Samsulrizal NH, Yan C, Allcock NS, Craigon J, Blanco-Ulate B, Ortega-Salazar I, Marcus SE, Bagheri HM et al. (2019) Characterization of CRISPR mutants targeting genes modulating pectin degradation in ripening tomato. *Plant Physiology*, 179(2), 544-557.
<https://doi.org/10.1104/pp.18.01187>.
6. Giorio G, Stigliani AL, D'Ambrosio C (2008) Phytoene synthase genes in tomato (*Solanumlycopersicum* L.) new data on the structures, the deduced amino acid sequences and the expression patterns. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 275(3), 527-535.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06219.x>.
7. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281-2308.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>.
8. Uluisik S, Chapman NH, Smith R, Poole M, Adams G, Gillis RB, Besong TMD, Sheldon J, Stieglmeier S et al. (2016) Genetic improvement of tomato by targeted control of fruit softening. *Nature Biotechnology*, 34(9), 950-952. <https://doi.org/10.1038/nbt.3602>.
9. D'Ambrosio C, Stigliani AL, Giorio G (2018) CRISPR/Cas9 editing of carotenoid genes in tomato. *Transgenic Research*, 27(4), 367-378.
<https://doi.org/10.1007/s11248-018-0079-9>.
10. Jung YJ, Bae SS, Lee GJ, Seo PJ, Cho YG, Kang KK (2017) A novel method for high-frequency genome editing in rice, using the CRISPR/Cas9 system. *Journal of Plant Biotechnology*, 44(1), 89-96.
<https://doi.org/10.5010/JPB.2017.44.1.089>.
11. Lowder LG, Zhang D, Baltus NJ, Paul III J W, Tang X, Zheng X, Voytas DF, Hsieh TF, Zhang Y et al. (2015) A CRISPR/Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation. *Plant*

- Physiology, 169(2), 971-985.
<https://doi.org/10.1104/pp.15.00636>.
12. Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, 19(6), 1349. <https://doi.org/10.1093/nar/19.6.1349>.
 13. Ren F, Ren C, Zhang Z, Duan W, Lecourieux D, Li S, & Liang Z (2019) Efficiency optimization of CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in grape. *Frontiers in Plant Science*, 10, 612.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00612>.
 14. Oleszkiewicz T, Klimek-Chodacka M, Kruczek M, Godel-Jędrychowska K, Sala K, Milewska-Hendel A, Zubko M, Kurczynska E, Qi Y et al. (2021) Inhibition of carotenoid biosynthesis by CRISPR/Cas9 triggers cell wall remodelling in carrot. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6516.
<https://doi.org/10.3390/ijms22126516>.
 15. Dahan-Meir T, Filler-Hayut S, Melamed-Bessudo C, Bocobza S, Czosnek H, Aharoni A, Levy AA (2018) Efficient in planta gene targeting in tomato using geminiviral replicons and the CRISPR/Cas9 system. *Plant Journal*, 95(1), 5-16.
<https://doi.org/10.1111/tpj.13932>.
 16. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339(6121), 823-826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>.
 17. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W et al. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823.
<https://doi.org/10.1126/science.1231143>.
 18. Xie K, Yang Y (2013) RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Molecular Plant*, 6(6), 1975-1983. <https://doi.org/10.1093/mp/sst119>.