Korean Journal of Environmental Agriculture

Korean J Environ Agric. 2021;40(3):186-193. Korean
Published online 2021 September 30. https://doi.org/10.5338/KJEA.2021.40.3.22

Online ISSN: 2233-4173
Print ISSN: 1225-3537

Research Article

Open Access

# *Agrobacterium*을 이용한 토마토 떡잎에서 CRISPR-Cas9 시스템의 임시발현 시 토마토 떡잎 발달 단계에 따른 유전자교정 효율 변화

김의연, 양소희, 박효선, 구연종*

전남대학교 농화학과

## Observation of Gene Edition by the Transient Expression of CRISPR-Cas9 System During the Development of Tomato Cotyledon

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

Received: 28 August 2021/ Revised: 16 September 2021/ Accepted: 23 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:** Before generating transgenic plant using the CRISPR-Cas9 system, the efficiency test of sgRNAs is recommended to reduce the time and effort for plant transformation and regeneration process. The efficiency of the sgRNA can be measured through the transient expression of sgRNA and Cas9 gene in tomato cotyledon; however, we found that the calculated efficiency showed a large variation. It is necessary to increase the precision of the experiment to obtain reliable sgRNA efficiency data from transient expression.

**METHODS AND RESULTS:** The cotyledon of 11th, 15th, 19th, and 23rd-day-old tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) were used for expressing CRISPR-Cas9 transiently. The agrobacterium harboring sgRNA for targeting ALS2 gene of tomato was injected through the stomata of leaf adaxial side and the genomic DNA was extracted in 5 days after injection. The target gene edition was identified by amplifying DNA fragment of target region and analyzing with Illumina sequencing method. The target gene editing efficiency was calculated by counting base deletion and insertion events from total target sequence read.

**CONCLUSION:** The CRISPR-Cas9 editing efficiency varied with tomato cotyledon age. The highest efficiency was observed at the 19-day-old cotyledons. Both the median and mean were the highest at this stage and the sample variability was also minimized. We found that the transgene of CRISPR-Cas9 system was strongly correlated with plant leaf development and suggested the optimum cotyledon leaf age for *Agrobacterium*-mediated transfection in tomato.

**Key words:** CRISPR-Cas9, Genome Editing Efficiency, Tomato Transformation, Transient Expression

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

## 서 론

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9(CRISPR-associated nuclease 9)은 돌연변이 유발 및 생물학적 표현형 변화, 기능 유전학 등에 활용 가능한 genome editing 기술로서 다양한 분야에서 활용하고 있다[1,2]. Zinc Finger Nucleases (ZFNs) 과 Transcription activator-like effector nucleases (TALENs) 과 같은 1, 2세대 유전자 교정기술과는 달리 CRISPR-Cas9는 목표 유전자에 결합하는 guide RNA (또는 single guide RNA, sgRNA)와 DNA endonuclease인 Cas9 단백질이

결합된 형태로 구성되며, 절단된 서열은 non-homologous end joining (NHEJ) 또는 homology-directed repair (HDR)에 의해서 복구된다[3]. NHEJ는 잘려진 두개의 이중 가닥을 다시 붙여줄 때 염기 서열의 삽입이나 결실을 일으키는 반면, HDR은 잘려진 이중 가닥 부위에 공여 DNA를 함께 도입해 절단된 부위를 복구하는 방식이다[3]. CRISPR-Cas9의 위와 같은 기술을 이용하여 유전자 교정을 통해 작물의 생산성을 높이거나, 화학농약에 대해 저항성을 갖는 작물을 얻어 지속 가능한 농업을 시행할 수 있으며[4] 특히, 외래 유전자가 아닌 내부 유전자 돌연변이로 식품안전성에 대한 소비자의 우려를 낮출 수 있다는 장점도 가지고 있어 종자개발에 활용될 가능성이 높다[5].

현재 CRISPR-Cas9 시스템을 활용하여 형질 전환 식물체를 만들기위해 많은 연구들이 시행되고 있으며, 형질전환 된 작물을 상품화한 사례도 있다. 버섯에서 갈변을 유발하는 유전자인 polyphenol oxidase(PPO)를 표적으로 CRISPR-Cas9를 이용해 PPO 유전자가 제거된 버섯이 만들어져 상품화되었다[6]. 또한 옥수수의 경우 두 개의 DSB 자리 사이의 waxy 유전자를 CRISPR-Cas9을 이용해 제거한 식물체를 얻어 상업용 옥수수를 더 빠르게 수확할 수 있게 만들었다[7]. 그 외에도 토마토, 밀, 벼, 오이 등 다양한 작물들에 도입한 연구결과가 발표되어 있다. 토마토에서 3개의 sgRNA로 구성된 CRISPR-Cas9 시스템을 활용하여 LeMADSRIN 유전자를 교정하여 에틸렌 함량이 더 낮은 계통을 개발했다[8]. 밀에서는 수확량 손실을 일으키는 wheat dwarf virus(WDV)에 대한 내성을 가지는 항바이러스 밀 생산을 목표로 CRISPR 유전자 교정을 통해 바이러스 접종 시 바이러스 DNA가 발견되지 않는 항바이러스 밀을 개발했다[9]. Chlorsulfuron과 bispyribac sodium을 포함한 중요한 제초제의 주요 표적인 ALS1 유전자의 염기 서열을 변형하여 쌀에서 제초제에 내성이 있는 것을 확인했다[10]. 또한 오이의 유전자를 교정하여 Zucchini yellow mosaic virus와 ipomovirus, Papaya ringspot mosaic virus에 대한 내성을 갖는 오이를 생산했다[11].

CRISPR-Cas9를 이용한 유전자교정은 전적으로 target guide RNA의 염기서열에 의해 결정되므로, 교정이 이뤄진 형질전환 식물을 얻기 위해서는 특이성이 확보된 sgRNA를 설계하는 것이 중요하다[12]. sgRNA의 경우 서열의 길이가 20개로 짧기 때문에 만들기 쉽다는 장점이 있지만 게놈 내에 유사서열이 존재할 확률이 크다. 유사서열이 있을 경우 원하는 부위 외에 다른 유전자 부위에서 유전자 교정이 일어나고 따라서 원하는 유전자의 형질을 얻을 수 없다. 유사서열에 대한 sgRNA의 교정 효율은 여러 논문에서 논의되어 선발된 sgRNA에 대한 off-target 효율을 미리 예측할 수 있는 시스템이 제공되고 있다[13,14,15]. 한편 아직까지 sgRNA에 따라 유전자 교정효율이 변화하는 이유는 정확히 알려져 있지 않다[16]. 다만 sgRNA 내에 GC 비율에 따라 sgRNA 자체의 효율이 변화할 수 있으며 크로마틴 구조에 따라 sgRNA의 효율이 변화한다는 보고가 있다[15]. 교정 효율성을 높이기 위해 sgRNA를 설계하거나 선발하는 방법, 교정 특이성을 높일 수 있는 Cas9 단백질 개발하는 등의 방법이 계속 시도되고 있다[12].

한편, sgRNA 발현양을 조절하여 교정 효율을 높이기 위한 다양한 연구들이 시도되고 있다. 종 특이적 프로모터를 적용해 sgRNA의 발현양을 높이는 방법들로 옥수수에서 교정 효율을 높이는 동시에 mosaicism을 줄이기 위해 감수 분열 특이적 프로모터인 *dmc1* 유전자의 프로모터를 선택해 고효율의 유전자 편집을 확인하거나[17], 애기장대와 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*)의 경우 애기장대 *UBQ10* 프로모터를 이용해 애기장대와 메디카고에서 각각 95%, 70%까지 교정 효율을 향상한 예가 있다[18]. 또한 포도나무 유전자 교정 효율을 높이기 위해 *VvU3* (*Vitis vinifera* L.)/ *VvU6* 프로모터와 *UBQ* 프로모터를 이용해 sgRNA와 Cas9의 발현율을 증가시키기도 했다[19].

일반적으로 작물 형질전환은 많은 시간과 노력이 투입되는 과정으로, CRISPR-Cas9 시스템을 적용함에 있어 sgRNA의 효율을 미리 알고 선발하는 것은 형질전환체 생성 작업의 효율성을 크게 높일 수 있다. 작물의 떡잎과 Agrobacterium을 이용한 transient expression 방법은 형질전환 이전에 sgRNA의 효율성을 확인할 수 있는 방법인데 복잡한 유전자 전달과정 및 유전자 발현과정, 그리고 떡잎의 생리적 상태에 따라 유전자교정 효율이 매우 다르게 나타나는 문제점을 보였다. 이 논문에서는 ALS2 유전자를 타겟으로 하는 sgRNA의 효율을 떡잎의 연령에 따라 측정하여 비교함으로써 디자인 한 sgRNA의 정확한 유전자교정 효율 도출을 위한 방법을 제시하였다.

## 재료 및 방법

### 토마토 재배 조건

토마토(*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom)를 발아시키기 위해 원예용상토(부농, 대한민국)에 토마토 종자를 파종했다. 토마토 종자 발아를 위해 4℃에서 5일간 저온 처리 하고 25°C에서 12 hr/12 hr 광주기, 95 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$의 광도에서 배양했다.

### Vector construction

sgRNA는 CRISPR-P v2.0 (http://crispr.hzau.edu.cn)을 이용하여 20-mer의 상보적인 DNA 올리고를 디자인했다 (Table 1). 100 pmole 상보적 올리고는 총 볼륨 25 μl에서 95℃ 10분 처리 후 10초에 2℃씩 37℃까지 온도를 낮춰 double strand sgRNA로 만들었다. Annealing된 sgRNA는 제한효소 *Esp3*I으로 자른 pYPQ141A 벡터 (Addgene plasmid ID 69290)에 cloning했다. sgRNA가 도입된 pYPQ141A 벡터는 Cas9이 포함된 pYPQ154 벡터, 그리고 pMDC32 벡터와 함께 LR clonase(cat#11791019, Thermo Scientific Inc. 미국)를 이용해 재조합 했다. 재조합이 확인된 벡터는 *Agrobacterium tumefaciens* gv3101에 electroporation 방법으로 형질전환 했다.

Table 1. The primer sequence used for amplifying sgRNA target region of ALS2 gene

| Primers | | Sequence |
|---|---|---|
| ALS2-P | forward | CTATTACAGGTCAAGTGCCA |
| | reverse | TGGCACTTGACCTGTAATAG |
| 1st primer | forward | CCCATAACGACGTTTCTGAACCTG |
| | reverse | CCCTCCAATATGGAATTCAAACCC |
| 2nd primer | forward | ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGGTGTTTGCATTGCTACCTCTGGT |
| | reverse | GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTTCACGAACAACCCTAGGAATA |
| 3rd primer | forward | kaist index forward primer |
| | reverse | kaist index reverse primer |

### 토마토 떡잎을 이용한 transient assay

CRISPR-Cas9 발현 벡터를 포함한 Agrobacterium을 바늘을 제거한 주사기를 이용해 토마토 떡잎에 주입했다. 주입용 Agrobacterium은 28℃에서 rifampicin, kanamycin, gentamicin 항생제가 포함된 LB broth 5 mL에 하루 동안 1차 배양한 뒤, rifampicin, kanamycin, gentamicin이 포함된 LB broth 5 mL에 $A_{600nm}$ 값이 0.9가 될 때까지 2차 배양했다. 토마토 떡잎으로 주사하기 위해 배양된 Agrobacterium 1 mL를 6,000rpm 에서 1분 동안 원심분리 하고 침전된 Agrobacterium을 완충용액 (1/2 MS medium, 1% sucrose, 1 $\mu$M IAA, 10 $\mu$M zeatin, 200 $\mu$M acetosyringone)에 재현탁 후 28℃, 1시간 30분 동안 순화배양 했다. 1 mL 주사기(cat#26G, KOVAX, 대한민국)를 이용하여 토마토 떡잎 전체에 용액이 퍼질 때까지 약 30 $\mu$L ~ 50 $\mu$L를 주입했다. Agrobacterium을 주입한 토마토는 이후 5일간 추가 배양하고 유전자교정 효율 확인에 사용했다.

### Genomic DNA 추출 및 유전자교정 효율 확인

Agrobacterium 주입 후 5일간 배양된 떡잎을 취하여 액체질소를 이용해 동결한다. TissueLyser II(QIAGEN)를 이용해 떡잎을 완전히 파쇄한 뒤 [20]에 기술된 추출용액을 이용해 토마토 genomic DNA를 추출하였다. 파쇄한 토마토 시료를 Edwards buffer (0.5% SDS, 200mM Tris-HCl (pH 7.5), 250mM NaCl, 25mM EDTA (pH 8.0))에 현탁하고 SDS를 1%가 되도록 첨가한 후 65℃에서 5분간 반응했다. 이후 1 M potassium acetate 조건에서 단백질과 세포파편들을 침전했다. 이후 13,000 rpm에서 원심분리 후 상등액을 취하고 300 mM NaOAc, 50% Isopropyl Alcohol 조건에서 genomic DNA를 침전했다. Genomic DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 3차 증류수에 genomic DNA를 녹여 PCR 반응에 사용했다.

### PCR 산물 염기서열 분석방법

토마토 떡잎에서 추출한 genomic DNA 시료는 표적 유전자의 sgRNA 부분을 포함하는 0.5~1 kbp 위치를 1차 PCR을 실시했다. 증폭된 PCR 산물은 1/10으로 희석하여 sgRNA를 포함하는 150~200 bp 위치를 2차 PCR 했다. 최종 index sequence 삽입을 위한 3차 PCR을 index primer를 사용하여 실시했다. 각 PCR 프라이머는 Table 1에 표시하였다. PCR 반응 산물은 next generation sequencing 방법으로 염기서열을 분석하고(바이오코어센터, 한국) 염기서열 정보는 CRISPR RGEN Tools (http://www.rgenome.net)의 Cas-Analyzer 프로그램을 통해 타겟 유전자 교정효율을 계산했다. 유전자 교정은 치환의 경우는 제외하고 염기가 삭제되거나 삽입된 경우만을 교정 효율 계산에 산입했다.

### RNA 추출과 sgRNA 발현양 확인

RNA 추출은 Qiagen (Hilden, Germany)사의 RNeasy plant mini kit에서 제공하는 방법에 따라 진행했다. 추출된 RNA는 scaffold reverse primer 5′-ACCGACTCGGTGCCACTTTT-3′와 actin reverse primer 5′-ACCACTGAGCACAATGTTACCG-3′를 이용해 reverse transcription 반응 (SuperScript™ III, ThermoFisher, 미국)으로 1st strand를 합성하고 ALS sgRNA forward primer 5′-GATTGCTATTACAGGTCAAGTGCCA-3′과 actin forward primer 5′-TTGCCTATGTGGCTCTTGACTA-3′를 포함해 PCR 반응을 실시했다. 증폭된 ALS2-P sgRNA와 Cas9 유전자는 전기영동을 통해 발현양을 비교하였고 ImageJ 프로그램을 이용해 발현강도를 정량하였다.

### 통계처리 방법

sgRNA 효율 측정은 토마토 연령별로 4회에 걸쳐 6반복으로 조사하여 총 24회 이상의 시료에서 측정되었다. 결과는 상자수염 그래프 형식으로 나타냈다.

## 결과 및 고찰

### sgRNA 디자인 및 벡터 재조합

토마토 떡잎을 이용한 transient assay를 수행하기 위해 표적으로 활용할 sgRNA를 디자인 및 합성했다. 토마토에서 sgRNA와 Cas9 발현을 위한 벡터 재조합은 Lowder et al[21]의 방법에 따라 시행했다. 완성된 벡터는 Cas9 유전자를 35S 프로모터로, sgRNA와 scaffold를 Arabidopsis

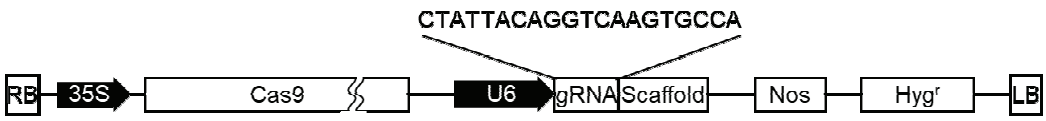


Fig. 1. Construction map for targeted mutagenesis of ALS2 gene.

U6 프로모터로 전사 촉진한다(Fig. 1). 표적 유전자는 ALS2 유전자로 CRISPR-P v2.0를 통한 검색과 떡잎을 활용한 sgRNA 효율 측정에서 높은 효율이 검증된 ALS2-P sgRNA (CTATTACAGGTCAAGTGCCA)를 사용하였다.

### 토마토 떡잎의 생장 관찰

CRISPR-Cas9 시스템의 토마토 떡잎에서 transient 발현을 수행하기 위해 먼저 날짜 별 토마토 떡잎의 길이 성장을 측정하였다(Fig. 2). 파종한 후 11, 15, 19, 그리고 23일 지난 토마토의 떡잎은 각각 0.9, 1.9, 2.5, 그리고 2.6의 평균 길이를 나타냈다(Fig. 2A). 떡잎 길이 측정 결과를 토대로 토마토 떡잎은 파종 후 19일 이후에는 잎의 길이 성장이 느려지는 것으로 보아 파종 후 19일에 토마토 떡잎이 완전한 확장에 이르는 것으로 판단했다. 이후 떡잎은 노화 단계로 진입하는 것으로 보인다. True leaf인 1st/2nd 잎은 파종 후 평균 14일 정도에서 1 mm 크기 이하의 primordia 잎 상태로 발달이 시작됨을 관찰하였고 23일에 떡잎과 비슷한 크기까지 성장을 이뤘다.

### 토마토 생육 주기에 따른 sgRNA 효율 변화 측정

파종 후 11일부터 4일 간격으로 실시한 결과 19일 된 떡잎에서 sgRNA 교정 효율이 평균값(상자 내 x 표시)과 중간값(상자 내 가로선) 모두에서 일정하고 높은 결과를 보였다 (Fig. 3). 19일 떡잎에서 교정효율은 11일 잎에 비해 평균값 기준 약 5배 높았다. 23일 잎에서는 11일 잎에 비해 약 2배 높게 나타나 19일 잎에 비해서는 낮은 값을 나타냈다. 15일 잎은 11일 잎과 비슷한 평균값을 나타냈다. 기대할 수 있는 유전자교정 효율의 최대값을 예측하기 위하여 각 잎에서 최대값을 비교하였다. 평균값과 마찬가지로 19일, 23일, 15일, 11일 순으로 높게 나타난 것을 알 수 있다. 19일 떡잎에서 교정효율의 최대값은 5.8%로 나타나 일반적으로 토마토 떡잎에서 기대하는 교정효율인 1%를 크게 뛰어넘는 값을 보였다. 이는 실험에 사용된 ALS2 유전자에 대한 CRISPR/Ca9 복합체의 접근성이 뛰어나며 디자인된 sgRNA 또한 높은 효율을 나타내기 때문으로 생각된다. 특히 23일의 경우 최대값이 19일과 크게 차이가 나지 않지만, 사분위 범위(interquartile range, IQR)가 19일에 비해 긴 것으로 나타나 효율은 높지만 변이가 크다는 것을 확인했다. 19일 잎에서 sgRNA 교정 효율의 최대값은 11일과 15일 잎과 비교 시 약 3.2배, 3.1배 높게 나타났다. 이와 같은 실험 결과로 미뤄보아 19일 이전과 이후의 떡잎은 Fig. 2에서 보듯 성장이 완료되고 광합성 등 대사활동이 활발한 시기로 35S 프로모터의 활성 증가와 이에

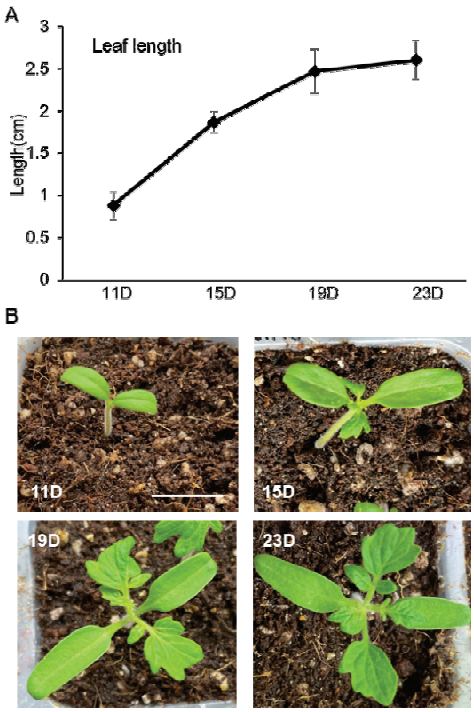


Fig. 2. Leaf length changes during the tomato cotyledon growth. A. Cotyledon length was measured at four different day points. B. Pictures representing growth status at indicated day points. The white bar indicates 2 cm of length.

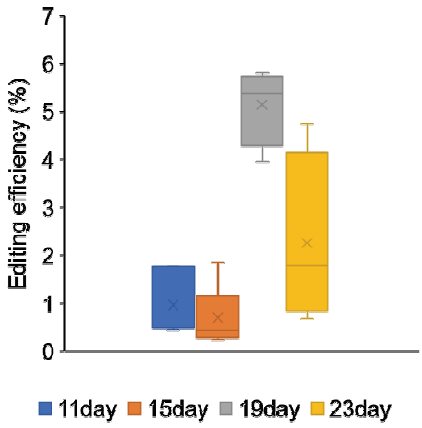


Fig. 3. Change of sgRNA efficiency during the cotyledon growth. The lower, middle and upper lines of the box graph indicate 25%, 50%, and 75% of sample groups, respectively. The average is indicated as x mark in the box. The highest and lowest value showed as upper and lower whiskers.

따른 CRISPR-Cas9 복합체 증가에 의해 교정 효율이 증가한 것으로 예상된다. 하지만 21일 이후의 떡잎은 성장을 끝내고 노화에 접어드는 시기로 이 때의 떡잎에서는 sgRNA의 효율에 큰 변이가 발생한다.

CRISPR RGEN Tools을 통해 분석된 target guide RNA의 교정 event를 나타냈다(Table 2). 생육 주기별로 sgRNA 교정 효율이 가장 높게 나타난 잎에서 발견된 event들을 표시하였다. 모든 주기의 토마토에서 PAM sequence의 5′쪽 3 ~ 7번째 자리를 중심으로 염기 삭제와 삽입이 이뤄진 것으로 보아 CRISPR-Cas9에 의한 교정이 이뤄졌음을 확인할 수 있다. 또한 효율이 높은 19일 떡잎에서는 예상할 수 있는 모든 종류의 deletion event를 확인할 수 있고, 19일 떡잎에서 CRISPR-Cas9 시스템의 높은 교정효율을 다시한번 확인할 수 있었다.

Table 2. In/Del pattern analyzed from NGS

| | 11D | #read | | 15D | #read |
|---|---|---|---|---|---|
| | CTATTACAGGTCAAGTGCCA | 64102 | | CTATTACAGGTCAAGTGCCA | 55733 |
| Del | CTATTACAGGTCAA---CCA | 700 | Ins | CTATTACAGGTCAAGTGACCA | 93 |
| | CTATTACAGGTCAAGT-CCA | 427 | | CTATTACAGGTCAAGTGTCCA | 58 |
| | CTATTACAGGTC-AGTGCCA | 4 | | CTATTACAGGTCAAGTGGCCA | 38 |
| | CTATTACAGGTCAA---CCA | 3 | | CTATTACAGGTCAAGTGCCCA | 25 |
| | CTATT-CAGGTCAAGTGCCA | 2 | | CTATTACAGGTCAAGTGTATTCCA | 4 |
| | others | 6 | | CTATTACAGGTCAAGTGGTATTCCA | 3 |
| | | | | CTATTACAGGTCAAGTGAACCA | 2 |
| | | | | CTATTACAGGTCAAGTGTACCA | 2 |
| | | | | CTATTACAGGTCAAGTGTGCCA | 2 |
| | | | Del | CTATTACAGGTCAAGT-CCA | 193 |
| | | | | CTATTACAGGTCAA---CCA | 144 |
| | | | | CTATTACAGGTCA----CCA | 124 |
| | | | | CTATTACAGGTC-----CCA | 69 |
| | | | | CTATTACAGGTCAA--GCCA | 32 |
| | | | | CTATTACAGGT------CCA | 31 |
| | | | | CTATTACAGGTCA--TGCCA | 29 |
| | | | | CTATTACAGGT-------CA | 14 |
| | | | | CTATTACAGGTCAAGTG-CA | 13 |
| | | | | CTATTACAGGTCAAGTG--- | 11 |
| | | | | CTATTACAGGTCA---TCCA | 10 |
| | | | | CTAT----------CCA | 9 |
| | | | | others | 128 |

| | 19D | #read | | 23D | #read |
|---|---|---|---|---|---|
| | CTATTACAGGTCAAGTGCCA | 66660 | | CTATTACAGGTCAAGTGCCA | 51952 |
| Ins | CTATTACAGGTCAAGTGACCA | 283 | Ins | CTATTACAGGTCAAGTGTCCA | 171 |
| | CTATTACAGGTCAAGTGTCCA | 203 | | CTATTACAGGTCAAGTGACCA | 163 |
| | CTATTACAGGTCAAGTGGCCA | 110 | | CTATTACAGGTCAAGTGGCCA | 149 |
| | CTATTACAGGTCAAGTGCCCA | 57 | | CTATTACAGGTCAAGTGCCCA | 57 |
| | CTATTACAGGTCAAGTGAATGTACCA | 14 | Del | CTATTACAGGTCAA---CCA | 453 |
| | others | 19 | | CTATTACAGGTCA----CCA | 370 |
| Del | CTATTACAGGTCAAGT-CCA | 779 | | CTATTACAGGTCAAGT-CCA | 362 |
| | CTATTACAGGTCA----CCA | 587 | | CTATTACAGGTC-----CCA | 174 |
| | CTATTACAGGTCAA---CCA | 436 | | CTATTACAGGTCAA--GCCA | 110 |
| | CTATTACAGGTC-----CCA | 268 | | CTATTACAGGT------CCA | 88 |
| | CTATTACAGGT------CCA | 146 | | CTATTACAGGT-------CA | 41 |
| | CTATTACAGGTCAA--GCCA | 133 | | CTATTACAGGTCA--TGCCA | 39 |
| | CTATTACAGGT-------CA | 62 | | CTATTACAG-------GCCA | 27 |
| | CTATTACA--------GCCA | 52 | | CTATTACAGGTCAAGTG-CA | 26 |
| | CTATTACAGGTCA--TGCCA | 47 | | others | 239 |
| | CTATTACAGGTCAAGTG-CA | 46 | | | |
| | CTATTACAGGTCA-----CA | 35 | | | |
| | CTATTACAG-------GCCA | 30 | | | |
| | CTATTACAGGTC---TGCCA | 27 | | | |
| | others | 288 | | | |

### 토마토 떡잎 생육주기에 따른 CRISPR-Cas9 교정효율 변화에 대한 고찰

CRISPR-Cas9 교정효율이 높은 변이를 나타내는 것은 Agrobacterium으로부터 transgene의 복잡한 유전자 전달과정 및 transgene의 토마토 유전체로의 삽입과 발현과정, 그리고 떡잎의 생리적 상태에 따라 유전자교정 효율이 매우 다르게 나타날 수 있는 다양한 이유를 생각해 볼 수 있다. 토마토 유전체로 transgene이 전달되어 삽입되고 이후 Cas9 유전자와 sgRNA가 발현되기까지의 효율성은 Cas9과 sgRNA의 전사체 발현양을 측정함으로써 예측해 볼 수 있다. 이를 위해 앞선 ALS2 유전자교정 효율 측정에 사용된 시료와 같은 시료에서 RNA를 추출하여 Cas9, sgRNA 발현양을 측정하여 서로 비교하였다(Fig. 4). 실험 결과 19일 떡잎에서 sgRNA는 모든 잎에서 비슷한 발현양을 나타냈으나 Cas9의 경우 19일과 23일에서 상대적으로 높아진 발현양을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 떡잎을 이용한 transient 발현에서 CRISPR-Cas9의 효율성이 떡잎의 생장에 따른 Cas9 전사체의 발현양, 다시 말해서 35S 프로모터의 활성 증가로 크게 향상된 것을 의미한다.

토마토 떡잎의 생육 기간에 따른 토마토 형질전환의 차이를 보기 위한 실험들이 과거 진행되었다. Rai group에서는 토마토에 사용된 Agrobacterium 균주와 상관없이 모두 오래된 잎보다는 어린 잎에서 더 쉽게 형질전환이 일어나는 결과를 보였다[22]. 또한 Mazumdar group에서도 발생 후 3 ~ 9일의 토마토 떡잎으로 실험한 결과 형질전환 효율이 연령간 상당한 차이를 보였으며, 3일부터 점차 증가하다 6일 떡잎에서 최대치에 이르렀고 이후 점차 감소했다[23]. Van group에서는 7일 이하, 1주, 그리고 2주가 지난 3종의 떡잎으로 형질전환 효율을 측정한 결과 나이가 어릴 수록 캘러스를 형성하는 비율이나 그에 따라 싹을 유도하는 캘러스의 수, 캘러스당 평균 새싹 수가 유의하게 증가하는 결과를 보였다[24]. 이러한 결과들은 성장이 완료된 잎 보다 어린 잎에서 탈분화와 재분화가 더 잘 일어나며 이는 형질전환 시 캘러스 생성과 캘러스로부터 새싹이 생성되는 과정을 더 용이하게 한다[25]. 또한 어린 잎은 더 많은 대사와 발달이 일어날 가능성이 있으며, 이에 따라 형질전환시 필요한 식물 호르몬 등이 어린잎에서 더 높은 수준을 유지한다[24]. 따라서 일반적으로 형질전환은 Agrobacterium에 의한 T-DNA 전달과 캘러스 생성 이후 재분화 과정까지 완성된 형질전환 과정의 효율이 측정되므로 어린 떡잎을 사용하여 식물의 탈분화 재분화의 효율을 높이는 것이 전체 형질과정 효율을 증대시킬 수 있을 것으로 생각된다. 하지만 본 실험에서는 탈분화와 재분화 과정이 없는 T-DNA의 전달과정만을 측정하는 방법으로 실험결과 완전히 성장한 떡잎에서 더 높은 효율을 나타내는, 앞선 어린 떡잎에서 형질전환 효율이 증대되는 결과들과 상이한 결과를 얻었다. 이는 담배를 이용한 transient 발현 등 몇몇 실험에서 참고될 수 있는 결과이며 특히 CRISPR-Cas9 시스템을 이용한 sgRNA 효율을 측정하는 방법에 참고될 중요한 결과이다.

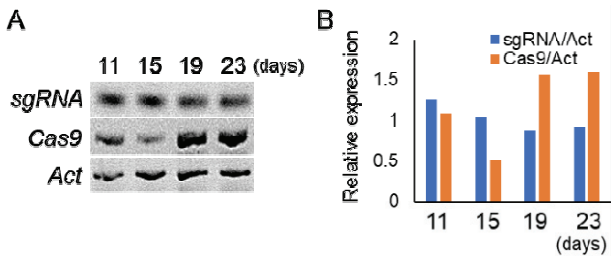


Fig. 4. sgRNA and Cas9 transcript expression during the tomato cotyledon growth. A. The expression level of sgRNA and Cas9 after Agrobacterium-mediated transient expression was visualized with reverse transcription and PCR amplification. B. The expression level of sgRNA and Cas9 is quantified from image. Actin gene expression level was used as a reference for comparison.

CRISPR-Cas9을 이용한 작물 육종 방법은 육종 연한과 정밀도를 획기적으로 높일 수 있는 방법이다. 하지만 작물 형질전환을 위해서 가장 많이 활용되고 있는 Agrobacterium 매개 형질전환 및 재분화 방법은 Agrobacterium을 이용한 T-DNA 전달과정 이후 조직배양을 통한 탈분화와 재분화 과정을 수 달에 걸쳐 진행한다. 또한 원하는 형질전환체를 얻기 위해 수 십 개의 재분화 식물체를 유기시키는데 이렇듯 식물의 형질전환 과정은 시간과 노력이 많이 소모되는 과정이다. 여기에서 CRISPR-Cas9 시스템을 이용한 유전자교정은 Cas9 시스템 전달뿐만 아니라 전달된 Cas9 시스템이 제대로 작동하여 목표 유전자를 교정하는 과정이 추가적으로 필요하고 목표 유전자의 교정 효율은 sgRNA의 효율이 절대적이다. 따라서 Cas9을 이용한 식물 유전자교정에서 sgRNA의 효율을 미리 점검하는 것은 형질전환 기한을 단축시키고 노력을 절감할 수 있는 방법이 된다. 본 실험에서 나타난 토마토 떡잎을 활용한 sgRNA 효율 검정법은 19일 이후의 떡잎을 활용함으로써 sgRNA가 목표 유전자 교정을 위한 최대의 효율을 나타내는 환경에서 선발된 sgRNA를 검정할 수 있음을 보여준다. 하지만 19일 이후의 잎에서도 11일과 15일 잎과 비교해서 중앙값 50% 변이폭이 획기적으로 개선되지 않은 것, 전체 변동폭이 여전히 1% 수준에 이르는 것으로 보아 Agrobacterium을 이용한 transient 발현 실험의 정확도 개선을 위한 실험환경 개선이 여전히 필요해 보인다.

## 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. Bassett AR, Tibbit C, Ponting CP, Liu JL (2013) Highly efficient targeted mutagenesis of Drosophila with the CRISPR/Cas9 system. Cell Reports, 4(1), 220-228. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.020.
2. Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell, 157(6), 1262-1278.
3. Sander JD, Joung JK (2014) CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. Nature Biotechnology, 32(4), 347-355. https://doi.org/10.1038/nbt.2842.
4. Eş I, Gavahian M, Marti-Quijal FJ, Lorenzo JM, Khaneghah A M, Tsatsanis C, Kampranis SC, Barba FJ (2019) The application of the CRISPR-Cas9 genome editing machinery in food and agricultural science: Current status, future perspectives, and associated challenges. Biotechnology Advances, 37(3), 410-421. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.006.
5. Park SR, Park JH, Lim SH, Lee JY, Kim BG (2019) Current status of new plant breeding technologies crop development. Korean Journal of Breeding Science, 51(3), 161-174. https://doi.org/10.9787/KJBS.2019.51.3.161.
6. Waltz, E. (2016). Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. Nature News, 532(7599), 293. https://doi.org/10.1038/nature.2016.19754.
7. Gao H, Gadlage MJ, Lafitte HR, Lenderts B, Yang M, Schroder M, Farrel J, Snopek K, Peterson D et al. (2020) Superior field performance of waxy corn engineered using CRISPR–Cas9. Nature Biotechnology, 38, 579-581. https://doi.org/10.1038/s41587-020-0444-0.
8. Jung YJ, Lee GJ, Bae SS, Kang KK (2018) Reduced ethylene production in tomato fruits upon CRSPR/Cas9-mediated LeMADS-RIN mutagenesis. Horticultural Science and Technology, 36(3), 396-405. https://doi.org/10.12972/kjhst.20180039.
9. Kis A, Hamar É, Tholt G, Bán R, Havelda Z (2019) Creating highly efficient resistance against wheat dwarf virus in barley by employing CRISPR/Cas9 system. Plant Biotechnology Journal, 17(6), 1004-1006. https://doi.org/10.1111/pbi.13077.
10. Sun Y, Zhang X, Wu C, He Y, Ma Y, Hou H, Guo X, Du W, Zhao Y et al. (2016). Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. Molecular Plant, 9(4), 628-631. https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.01.001.
11. Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, Leibman D, Klap C, Pearlsman M, Sherman A, Arazi T, Gal-On A (2016) Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. Molecular Plant Pathology, 17(7), 1140-1153. https://doi.org/10.1111/mpp.12375.
12. Cho SW, Kim S, Kim Y, Kweon J, Kim HS, Bae S, Kim JS (2014) Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. Genome Research, 24(1), 132-141. https://doi.org/10.1101/gr.162339.113.
13. Jeong CY, Hong JW, Yu JH, Kim SB, Kang SK, Kim SW, Kim NS, Kim KY, Park JW (2020). Importance of guide-RNA design using big data in insect molecular breeding research. The Journal of the Korea Institute of Electronic Communication Sciences, 45(8), 1447-1451. https://doi.org/10.7840/kics.2020.45.8.1447.
14. Doudna JA, Charpentier E (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science, 346 (6213), 1258096. https://doi.org/10.1126/science.1258096.
15. Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK (2014) Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. Nature Biotechnology, 32(3), 279-284. https://doi.org/10.1038/nbt.2808.
16. Jung YJ, Bae SS, Lee GJ, Seo PJ, Cho YG, Kang KK (2017) A novel method for high-frequenvy 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.
17. Feng C, Su H, Bai H, Wang R, Liu Y, Guo X, Liu C, Zhang J, Yuan J et al. (2018) High-efficiency genome editing using a dmc1 promoter-controlled CRISPR/Cas9 system in maize. Plant Biotechnology Journal, 16(11), 1848-1857. https://doi.org/10.1111/pbi.12920.
18. Wolabu TW, Park JJ, Chen M., Cong L, Ge Y, Jiang Q, Debnath S, Li G, Wen J et al. (2020) Improving the genome editing efficiency of CRISPR/Cas9 in Arabidopsis and Medicago truncatula. Planta, 252(2), 1-14. https://doi.org/10.1007/s00425-020-03415-0.
19. Ren C, Liu Y, Guo Y, Duan W, Fan P, Li S, Liang Z (2021) Optimizing the CRISPR/Cas9 system for genome editing in grape by using grape promoters. Horticulture Research, 8(1), 1-12. https://doi.org/10.1038/s41438-021-00489-z.
20. 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.
21. Lowder LG, Zhang D, Baltes NJ, Paul III JW, 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.

22. Davis ME, Lineberger RD, Miller AR (1991) Effects of tomato cultivar, leaf age, and bacterial strain on transformation by Agrobacterium tumefaciens. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 24(2), 115-121. https://doi.org/10.1007/BF00039739.
23. Rai GK, Rai NP, Kumar S, Yadav A, Rathaur S, Singh M (2012) Effects of explant age, germination medium, pre-culture parameters, inoculation medium, pH, washing medium, and selection regime on Agrobacterium-mediated transformation of tomato. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 48(5), 565-578. https://doi.org/10.1007/s11627-012-9442-3.
24. Mazumdar P, Basu A, Paul A, Mahanta C, Sahoo L (2010) Age and orientation of the cotyledonary leaf explants determine the efficiency of de novo plant regeneration and Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation in Jatropha curcas L. South African Journal of Botany, 76(2), 337-344. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.01.001.
25. van Wordragen MF, Dons HJ (1992) Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of recalcitrant crops. Plant Molecular Biology Reporter, 10(1), 12-36. https://doi.org/10.1007/BF02669262.