

Application of the CRISPR/Cas System for Point-of-care Diagnosis of Cattle Disease

Wonhee Lee¹ and Yoonseok Lee^{1,2*}

¹Department of Biotechnology, College of Agriculture & Life Science, Hankyung National University, 327, Jungang-ro, Anseong-si, Gyeonggi-do 17579, Korea

²Center for Genetic Information, Hankyung National University, 327, Jungang-ro, Anseong-si, Gyeonggi-do 17579, Korea

Received March 8, 2020 / Revised March 26, 2020 / Accepted March 27, 2020

Recently, cattle epidemic diseases are caused by a pathogen such as a virus or bacterium. Such diseases can spread through various pathways, such as feed intake, respiration, and contact between livestock. Diagnosis based on the ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) and PCR (Polymerase chain reaction) methods has limitations because these traditional diagnostic methods are time consuming assays that require multiple steps and dedicated equipment. In this review, we propose the use of the CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) Cas system based on DNA and RNA levels for early point-of-care diagnosis in cattle. In the CRISPR/Cas system, Cas effectors are classified into two classes and six subtypes. The Cas effectors included in class 2 are typically Cas9 in type II, Cas12 in type V (Cas12a and Cas12b) and Cas13 in type VI (Cas13a and Cas13b). The CRISPR/Cas system uses reporter molecules that are attached to the ssDNA strands. When the Cas enzyme cuts the ssDNA, these reporters either fluoresce or change color, indicating the presence of a specific disease marker. There are several steps in the development of a CRISPR/Cas system. The first is to select the Cas enzyme depending on DNA or RNA from pathogens (viruses or bacteria). Based on that, the next step is to integrate the optimal amplification, transducing method, and signal reporter. The CRISPR/Cas system is a powerful diagnostic tool using a gene-editing method, which is faster, better, and cheaper than traditional methods. This system could be used for early diagnosis of epidemic cattle diseases and help to control their spread.

Key words : Biosensor, cattle, CRISPR/Cas system, disease, point-of-care diagnostic

서 론

대가축의 전염성 질병은 영양 혹은 환경요인이 충족되었음에도 불구하고 바이러스 혹은 세균등과 같은 병원체들이 포함된 사료 섭취와 감염된 가축 간의 신체접촉 혹은 호흡 등 다양한 경로를 통해 전파되어 발생되어진다. 바이러스에 의한 감염은 바이러스 외에도 존재하는 캡시드 단백질과 숙주세포 표면상의 수용체가 결합하여 세포내로 유입되고 이는 세포내 DNA 복제 시스템으로 유전물질을 복제한 후 확산(shedding)과정을 통해 방출된다[36]. 세균에 의한 감염의 경우 병원체가 점막 또는 상처부위로 침투하여 증식하는 과정에서 독소를 생성하고 이는 관련 면역반응을 억제함으로써 질병을 유발시킨다[25, 33].

최근, 국내에서 발병되는 대가축의 질병을 살펴보면, 주로 구제역, 우결핵, 브루셀라병, 요네병 등이 발병되고 있다. 2019년 농림축산검역본부의 통계자료에 의하면 우결핵은 10%, 브루셀라병은 10.5%, 요네병은 38.5%로 발병률이 보고되었다. 바이러스성 질병인 구제역의 경우 구제역바이러스(Foot and mouth disease virus)에 감염된 개체의 분비물 등이 직접적으로 가축에 접촉됨으로써 전파되며 사망률은 높지 않지만 가축의 생산성을 감소시킨다[4]. 세균성 질병인 우결핵은 우형 결핵균(*Mycobacterium bovis*)에 감염되며 가축의 호흡, 소변, 대변 및 고름을 통해 병원균이 배출되고 가축 간의 접촉으로 인해 전염된다[29]. 그리고 브루셀라는 브루셀라균(*Brucella abortus*)에 의해 감염되는 질병으로 가축의 상처부위로 병원균이 침투되거나 이들 병원균으로 오염된 사료를 가축이 섭취함으로써 감염된다. 브루셀라균은 감염된 가축의 태반, 체액, 우유 등과 같은 분비물을 통해 병원균이 방출되며 이들 병원균이 신체에 접촉됨으로써 감염된다[16]. 또한, 요네병은 요네병균(*Mycobacterium paratuberculosis*)에 의해 감염되는 질병으로 이들 병원균은 위장관과 장간 막 림프절에서 증식한 후 가축의 배설물 혹은 우유를 통해 방출되고 이들 병원균이 신체에 접촉됨으로써 감염된다[10]. 이와 같이 병원성 바이러스

*Corresponding author

Tel : +82-31-670-5332, Fax : +82-31-670-5339

E-mail : yoonseok95@hknu.ac.kr

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.

혹은 세균에 의해 발생하는 전염성 질병은 가축의 건강을 위협하고 이들의 생산성을 감소시킨다. 따라서, 이러한 질병들의 병원체를 현장에서의 조기 진단 진단은 질병의 통제 관리를 위한 중요한 단계이다[10].

앞서 언급된 4가지 주요 질병들을 유발시키는 병원체를 진단하기 위해 면역크로마토그래피법, 효소면역법(ELISA), PCR (Polymerase chain reaction) 기반 진단법들이 일반적으로 사용되고 있다. 면역크로마토그래피법은 항원-항체 반응을 이용하여 병원체를 정량적으로 분석할 수 있는 방법으로 분석스트립을 플라스틱 케이스에 장착하여 분석스트립 상 검체 패드에 병원체를 분주하게 되면 병원체의 감지 여부를 확인할 수 있다[8]. 효소면역법은 항체에 효소를 결합시켜 병원체의 양을 측정하는 방법으로 이들을 세부적으로 분리하면 Direct ELISA, Sandwich ELISA, Competition ELISA가 있다. 특히, Sandwich ELISA는 에피토프(epitope)가 다른 2종의 항체를 이용하여 샘플 내의 특정 병원체를 측정하는 방법이다[14]. 하지만 항원-항체반응을 기반으로 한 진단법에는 정확도, 특이성, 안정성 부분에 대해 단점들이 있다. 면역크로마토그래피법의 경우 항원과 항체간 결합 특이성이 떨어져 진단의 정확도와 재현성이 낮아질 수 있다. 또한 액상 시약의 경우 보관기간이 정해져 있어 물질이 오염되는 등 안정성에 문제가 있다[8]. ELISA 기반 키트의 경우 여러 단계의 분석과정에 있어 분석 소요시간이 길며 측정 샘플이 특정 항원이 아닌 다른 물질과 교차반응을 하여 진단의 재현성과 항원-항체간 결합 특이성이 떨어진다[14]. 이 외 PCR과 RT-PCR (Real time-PCR) 진단법이 사용되어지고 있다. 하지만 정교한 도구와 기술을 기반으로 주로 연구실에서 분석됨에 따라 현장에서 분석하기에는 어려움이 있다[35]. 또한, 분석 소요 시간이 길고 중소형 장비가 필요하기에 현장 사용에는 제한적이다. 따라서, 병원체를 현장에서 진단하기 위해서는 병원체 감지에 대한 결합 특이성, 민감도, 정확성과 안정성이 높으면서 현장에서 간편히 사용될 수 있는 바이오센싱 시스템의 개발이 시급하다[21]. 따라서, 본 논문에서는 현장에서 직접적으로 가축 병원체를 탐지 및 진단할 수 있는 DNA와 RNA 기반 CRISPR/Cas 시스템을 소개하고 이를 대가축형 현장 진단 바이오센서 개발에 대한 활용과 전략을 수립하고자 한다.

본 론

CRISPR/Cas 시스템의 구조와 메커니즘

크리스퍼(CRISPR, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)는 박테리아 및 고세균과 같은 원핵생물의 유전체에서 발견되는 DNA 염기서열로서 원핵생물에 침입한 병원체를 제거하는 후천성 면역반응과 관련된 DNA 단편들이다[5]. CRISPR 영역은 세가지 주요 구성으로 이루어져 있으며 이들은 leader 서열, repeat-spacer 서열, Cas 유전자로

구분된다. CRISPR-Cas 시스템의 면역 기작은 이전에 감염된 박테리오파지의 DNA 단편들을 repeat-spacer 서열에 각인된 후 동일한 병원체의 DNA가 유입되었을 때 이들을 제거하는 기작으로 박테리오파지가 침입하면 CRISPR 영역에서 pre-CRISPR RNA로 전사될 뿐만 아니라 동시에 Cas 효소들이 생성된다. 그리고 이들은 복합체를 형성하여 세포 안으로 침입한 박테리오파지 DNA 염기서열을 절단하게 된다. CRISPR-Cas 시스템에서 가장 중요한 요소인 Cas 효소들은 두가지 클래스로 분류되며 클래스 1은 Cas 효소를 복합체 형태로 사용하고 클래스 2는 단일 Cas 효소로 사용되어진다. 최근 Li 등 (2019)은 클래스 2에 해당하는 Cas9, Cas13, Cas12 인자들이 유전자 편집뿐만 아니라 바이오센싱 플랫폼으로써 활용될 수 있는 가능성이 높음을 보고하였다[21].

CRISPR/Cas 시스템의 종류와 특징

현재까지 보고된 CRISPR/Cas 시스템 기반 바이오센서들은 Cas 효소에 따라 세가지로 분류되며 Cas9, Cas12와 Cas13에 대한 특징을 Table 1에 나타내었다. Table 1에서와 같이 Cas9은 fM 감도에서 aM 감도까지 감지할 수 있으며 이들의 DNA 염기서열의 절단범위는 한 개의 nucleotide를 절단할 수 있다. 또한 colorimetric과 fluorescent 방법을 통해 3시간 미만으로 표적 DNA와 RNA를 감지할 수 있다[21, 38]. Cas13은 제 6형 Cas 효소 유형에 속하며 RNA 절단 효소와 2개의 HEPN (Higher Eukaryotes and Prokaryotes Nucleotide-binding) 부위를 포함한다. Abudayyeh 등(2016)의 연구결과에 의하면, Cas13-crRNA 복합체는 표적 RNA에 결합하면서 활성화되어 다른 단일 가닥 RNA를 절단하는 'collateral cleavage' 활성을 갖는다고 보고되었고 이 활성화에 대한 탐구가 계속되어지고 있다[1, 31]. 특히, Cas13과 관련된 Cas 효소들은 Cas13a와 Cas13b가 있으며 Cas13a는 RNA knockdown에 대한 활성을 가지며 Cas13b는 포유동물 세포에서 RNA knockdown 뿐만 아니라 유전자 편집이 가능하다는 차이점이 있다. CRISPR/Cas 시스템에서 Cas13a는 aM 감도로 colorimetric과 fluorescent 방법을 통해 최대 5시간 미만으로 DNA와 RNA 모두 감지할 수 있다. Cas13b는 zM 수준에서도 감지가 가능하며 Cas13a의 aM 감도는 Cas13b 감도보다 높은 수준임을 알 수 있었다. 또한, colorimetric과 fluorescent 방법을 통해 3시간 미만으로 표적 DNA와 RNA를 모두 감지할 수 있다. 마지막으로 Cas12 효소는 Cas13 효소와 마찬가지로 collateral cleavage 활성을 갖는다. 이는 DNA와 trans-cleave collateral 단일 가닥 DNA를 표적으로 하여 절단할 수 있지만 collateral cleavage는 단일 가닥 DNA에 대해서만 활성화되어 이에 대한 리포터가 필요하다[6, 7, 17-20, 22, 37]. 이 효소는 Cas12a와 Cas12b가 존재하며 이들의 큰 차이점은 표적 DNA를 절단할 수 있는 HNH (Histidine and asparagine residues) 부위의 존재 여부이다. CRISPR/Cas 시스템에서 Cas12a는 aM의 감도로 감지

Table 1. Characteristics of CRISPR/Cas system

Type classification	System name	Effector	Signal amplification	Sensitivity ¹	Specificity (nt)	Readout ²	Time	Target type	Ref.
Cas9	NASBACC	Cas9	NASBA	fM	1	C	~3 hr	RNA	[28]
	CAS-EXPAR	Cas9	EXPAR	aM	1	F	<1 hr	DNA/RNA	[13]
Cas13	SHERLOCK	Cas13a	RPA	aM	1	F	2-5 hr	DNA/RNA	[12]
	SHERLOCKv2	Cas13b Cas13a	RPA	zM	1	F, C	0.5-3 hr	DNA/RNA	[11]
	HUDSON +SHERLOCK	Cas13a	RPA	aM	1	F, C	<2 hr	DNA/RNA	[23]
	HOLMES	Cas12a	PCR; RT-PCR	aM	1	F	~1 hr	DNA/RNA	[7, 20]
Cas12	DETECTR	Cas12a	RPA	aM	6	F	~2 hr	DNA	[37]
	HOLMESv2	Cas12b	LAMP;	aM	1	F	~1 hr	DNA/RNA	[18]

¹zM, 10^{-21} M or zeptomole/l; aM, 10^{-18} M or attomole/l; fM, 10^{-15} M or femtomole/l;

²C, Colorimetric; F, Fluorescent;

할 수 있을 뿐만 아니라 다른 효소들의 절단범위와 다르게 6개의 nucleotide를 제거할 수 있는 범위를 가지고 있다. 또한, fluorescent 방법을 통해 2시간 이내로 표적 DNA를 감지할 수 있다. Cas12b 효소는 aM의 감도로 감지할 수 있으며 fluorescent 방법을 통해 1시간 이내로 DNA와 RNA 모두 감지할 수 있다[9, 21].

CRISPR/Cas 시스템의 분석방법

CRISPR/Cas 시스템을 활용한 분석방법은 증폭과정(amplification), 변환(transducing)과 신호 발생(signal reporting) 단계로 구분된다. 증폭과정(Amplification)에서는 PCR, RT-PCR (Reverse transcription-PCR), RPA (Recombinase polymerase amplification)와 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 등의 기술로 표적 DNA 또는 RNA를 증폭시키고 변환(Transducing) 단계에서는 Cas9, Cas13과 Cas12 효소들이 guide RNA와 결합하여 표적서열을 인식하고 절단한다. 마지막 단계로서 신호 발생(Signal reporting)은 형광물질을 활용한 fluorescent 방법이나 colorimetric, bioluminescent 방법들을 통해 Cas 효소들에 의한 병원체 감지 여부를 확인한다 [21]. 따라서, 현재까지 Cas 효소의 종류에 따라 개발된 CRISPR/Cas 시스템을 통한 분석방법들에 대해 소개하고자 한다.

Cas9 효소 기반 CRISPR/Cas 시스템

Cas9을 기반으로 개발된 CRISPR/Cas 시스템은 NASBACC (NASBA-CRISPR cleavage)와 CAS-EXPAR (CRISPR/Cas9 triggered isothermal exponential amplification)이 있다. Pardee 등(2016)은 Zika 바이러스의 유전자형 분석을 위해 Cas9 효소와 NASBA (Nucleic acid sequence based amplification) 기술이 융합된 NABACC 시스템을 개발하였다. NASBACC 분석방법은 RNA 서열을 증폭하여 감지하는 기술로서 표적

RNA를 역전사(reverse transcription)를 통해 cDNA로 전변하여 colorimetric reporting 방법으로 병원체를 감지하는 시스템이다. 이 시스템의 핵심적인 감지는 toehold switch이며 이는 switch RNA 구조에 대한 riboregulator로 신호 발생(signal reporting)하는 시스템이다. Switch RNA 구조는 toehold 서열, RBS (Ribosome Binding Site), start codon과 리포터 유전자(reporter gene) 서열로 구성되어 있으며 RNA가 상보적인 RNA 서열과 결합할 때 형성되는 헤어핀 구조를 활용한다. Toehold 서열에 상보적으로 표적 RNA가 결합하면 헤어핀 구조가 풀림으로써 RBS에 리보솜이 결합하고 리포터 유전자가 번역된다[34]. Pardee 등(2016)은 toehold switch 시스템을 활성화하기 위해 발광 단백질을 암호화하는 리포터 유전자인 LacZ 서열을 활용하였고 아메리칸 Zika의 SNP를 포함하는 PAM (Protospacer adjacent motif) 서열로 단일 가닥 가이드 RNA를 설계함으로써 Cas9 효소가 아메리칸 Zika의 증폭산물에 대해 절단이 가능하도록 하였다. 절단으로 인해 toehold switch 시스템은 활성화 되지 않아 LacZ에 의한 colorimetric 반응이 나타나지 않는다[28]. 또한, 최근 Huang 등(2018)은 짧은 단일 가닥의 표적서열을 증폭시킬 수 있는 EXPAR (Exponential isothermal amplification reaction) 기술을 통해 1시간 이내에 단일 염기에 대한 특이성과 aM 감도로 표적 DNA를 감지할 수 있는 CAS-EXPAR 기술을 개발하였다. 이 기술은 먼저 변환 과정(transducing)으로 표적을 인식 및 절단한 후에 표적서열을 증폭하여 fluorescent reporting으로 병원체 감지를 확인한다. 변환과정(Transducing)에서 Cas9에 의해 표적 단일 가닥 DNA가 절단된 후 이들이 설계한 PAMmer를 프라이머로 사용하고 형광물질인 SYBR Green I을 추가하여 EXPAR을 통해 형광신호(Fluorescent signal)가 나타나는 표적 DNA가 증폭되었음을 확인할 수 있다[13].

Cas13 효소 기반 CRISPR/Cas 시스템

Cas13 효소를 기반으로 개발된 CRISPR/Cas 시스템은 대표적으로 SHERLOCK (specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking)과 SHERLOCK v2가 있으며 이들이 가지는 문제점을 개선한 HUDSON-SHERLOCK 기술이 있다. SHERLOCK은 Gootenberg 등(2017)이 Cas13a 효소의 'collateral cleavage'로 개발한 시스템으로 증폭과정(amplification) RPA 또는 RT-RPA (Reverse transcription-RPA) 기술로 핵산을 증폭한 후 T7 전사를 통해 표적이 되는 DNA와 RNA를 모두 감지한다. 이 후 변환과정(transducing)에서 collateral cleavage 활성에 의해 단일 가닥 RNA가 절단되고 fluorescent 또는 colorimetric reporting을 통해 병원체의 감지 여부를 확인할 수 있다. SHERLOCK v2 시스템은 SHERLOCK과 분석 방법은 동일하지만 리포터 RNA에 보조유형 CRISPR인자인 Csm6를 결합하여 병원체를 감지할 수 있는 수준을 3.5배 증가시켰다. 그리고 HUDSON-SHERLOCK 시스템은 샘플에서 직접 바이러스 DNA를 추출할 수 있는 허드슨(HUDSON, Heating Unextracted Diagnostic Sample to Obliterate Nucleases) 방법을 SHERLOCK에 결합한 기술로써 분석 소요시간을 5시간에서 2시간 미만으로 단축하였다[3, 11, 12, 21, 24].

Cas12 효소 기반 CRISPR/Cas 시스템

Cas12 효소는 trans-cleavage 활성을 갖는 것으로 RNA를 표적으로 하는 Cas13 효소와는 달리 DNA를 표적으로 하며

주변에 존재하는 단일 가닥 DNA를 무작위적으로 절단한다[6, 19, 30, 37]. 이러한 Cas12 효소를 기반으로 개발된 CRISPR/Cas 시스템은 HOLMES, DETECTR와 HOLMESv2가 있다. 홈즈(HOLMES, one HOur Low-cost Multipurpose highly Efficient System)는 trans-cleavage를 통해 개발된 핵산 검출 기술이며, 이는 PCR 또는 RT-PCR를 통해 표적 DNA를 증폭시켜 Cas12a-gRNA-표적 DNA 복합체 형태로 만들어진 후 trans-cleavage를 활성화하여 fluorescent reporting을 통해 병원체를 감지할 수 있다. 이와 유사한 디텍터(DETECTR, DNA Endonuclease-TargEted CRISPR Trans Reporter)는 형광신호(fluorescent signal)을 통해 병원체의 핵산을 감지할 수 있는 시스템이지만 증폭과정(amplification)에서 RPA 방식을 활용함으로써 HOLMES 시스템보다 현장에서 손쉽게 사용이 가능하다[19]. 최근 Li 등(2018)은 Cas12b 효소를 사용하여 HOLMES 시스템의 문제점을 개선한 HOLMES v2를 개발하였다[18]. HOLMES v2 시스템의 특징은 LAMP법을 활용하여 표적 DNA에 대한 정량적인 분석이 가능한 핵산 검출 시스템이다 [18].

CRISPR/Cas 기반 바이오센서 개발전략

현장에서 대가축의 질병을 조기 진단하는 바이오센서를 개발하기 위해서 가축들의 전염 매개체에서 DNA와 RNA를 추출하는 방식, Cas 효소들과 분석 방식을 적절하게 선정하는

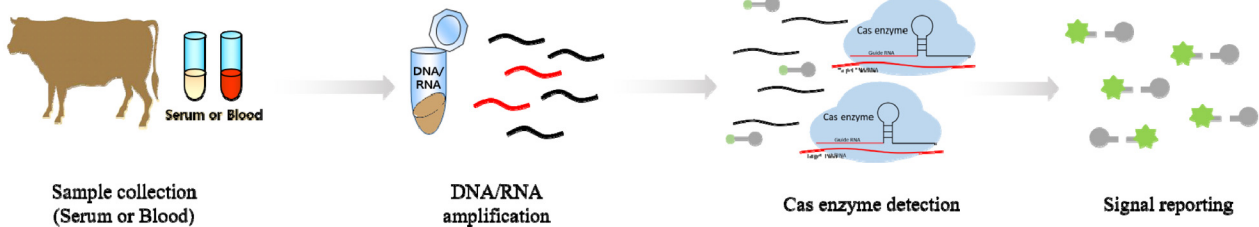


Fig. 1. Schematic of CRISPR/Cas system in livestock.

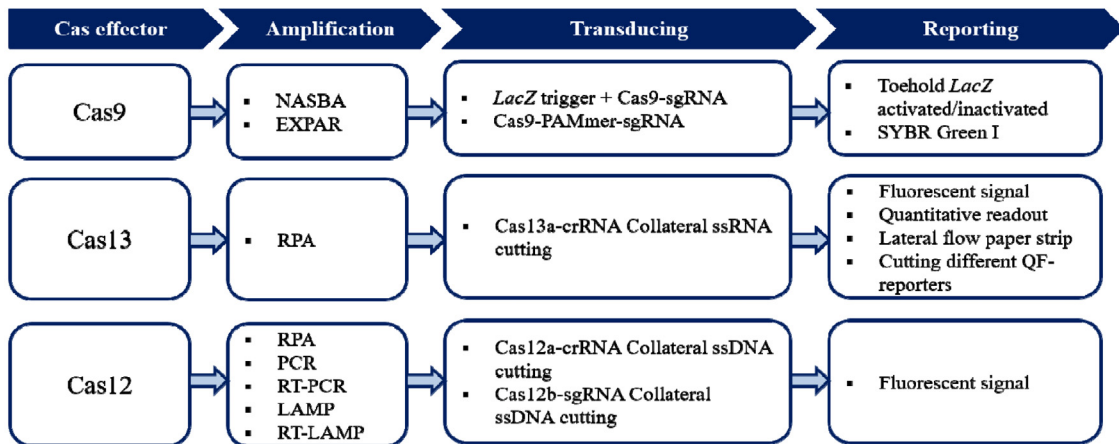


Fig. 2. Strategies for CRISPR/Cas effector based biosensing system development.

것이 중요하다. 앞서 언급된 CRISPR/Cas 시스템들은 표적 핵산의 증폭과 병원체 검출을 하기 위해서 샘플로부터 DNA와 RNA를 추출하거나 정제하는 전처리 과정이 필요하다. 가축들의 전염 매개체는 소변, 분변, 우유, 타액 등으로 다양하며 이들의 DNA와 RNA는 주로 추출 키트를 사용하여 추출할 수 있다. 하지만 추출 키트의 사용은 원심분리가 필요하여 연구실에서 사용 가능한 제한이 있어 현장에서의 적용에 대한 한계가 있다[26]. 가장 간편한 방법으로는 열처리가 있으며 이를 이용한 HUDSON은 Myhrvold 등(2018)의 연구를 통해 타액 및 소변 샘플에서 효과를 입증하였다[24]. 이는 DNA와 RNA의 추출과정 없이 RPA를 통해 증폭될 수 있으며 RPA는 간편한 장비를 사용하여 실온에서 증폭이 가능하기 때문에 현장에서 가축들의 샘플로부터 병원체를 감지하는데 활용될 수 있다[2]. RPA를 적용할 수 있는 Cas 효소는 Cas13과 Cas12가 있다. Cas13 효소는 RNA를 표적으로 하고 Cas12 효소는 DNA를 표적으로 하지만 증폭을 통해 표적의 유형이 전변될 수 있어 DNA와 RNA 모두 검출이 가능하다. Cas12 효소는 RPA 이외에 LAMP 또한 적용될 수 있다. LAMP는 핵산증폭기기(Thermal cycler) 없이 60-65°C의 온도조건을 충족시키면 증폭반응이 진행되는 방법으로 이 또한 현장에서 병원체를 감지하기 위한 증폭방법으로 활용될 수 있다[21]. 다음으로 Cas 효소가 표적 핵산을 인식하고 절단할 수 있도록 변환과정(transducing)에서 필요한 guide RNA (gRNA)는 설계에 따라 Cas효소를 원하는 유전자 위치에 표적화 하는데 영향을 미친다. gRNA와 표적 DNA간의 서열차이는 Cas효소의 활성을 감소시킬 수 있어 gRNA를 설계하기 전 표적 DNA의 서열을 정확히 확인하여야 한다. 표적 DNA 서열 내 모든 PAM서열(NGG)을 식별하고 PAM서열의 위치를 기준으로 gRNA를 설계할 수 있다. 설계된 gRNA와 Cas효소가 세포에서 함께 발현될 때, gRNA-Cas복합체는 표적 내에 존재하는 PAM서열 앞에 위치하게 된다[15]. gRNA-Cas 복합체는 표적 서열을 절단함으로써 PAM서열 이후의 이중 가닥을 분리하고 Cas효소가 gRNA에 결합되지 않으면 표적 핵산을 절단할 수 없는 기작을 통해 CRISPR-Cas 시스템의 특이성을 제공할 수 있다[15, 27]. 현재까지 개발된 CRISPR/Cas 바이오센싱 시스템은 형광신호(fluorescent signal)와 colorimetric reporting을 통해 병원체의 감지여부를 확인할 수 있다. 이는 휴대용 형광 판독기에 의해 판독될 수 있으며 대표적으로 종이기반 스트립(LAF, Lateral flow strip paper)이 활용될 수 있다. LAF는 Cas13 효소의 신호발생(signal reporting)에서 사용 가능하고 이는 가축의 병원체 감지를 하기 위한 POC진단이 가능함을 알 수 있다[21].

결론 및 향후 연구방향

대가축의 전염성 질병들은 현장에서 조기 진단하여 개체 격리와 같은 통제 관리가 필수적이다. 기존 사용되고 있는 진

단키트들은 현장에서 사용하기에 용이하지 않으며 극소량의 감도에서 진단이 제한적인 단점을 가지고 있다. 따라서, 현장에서 극소량의 감도와 진단의 편이성을 고려하여 DNA와 RNA 수준에서 진단할 수 있는 CRISPR/Cas 시스템은 최적의 시스템이라 할 수 있다. 최근 발견된 CRISPR/Cas 효소들은 2개 클래스와 6가지 하위유형으로 분류되었다[17, 32]. 이들 Cas 효소들은 대표적으로 제 2형에 Cas9, 제 5형에 Cas12a와 Cas12b, 제 6형에 Cas13a와 Cas13b가 있다[22, 23, 32]. 현재까지 개발된 CRISPR/Cas 시스템들은 간단한 시각 신호로 표적에 대한 정량 및 다중 감지가 가능하고 특히, 극소량 수준의 초고감도에서도 표적만을 진단할 수 있으며 2시간 이내에 진단 결과를 얻을 수 있다. 하지만 초고감도 DNA 혹은 RNA를 진단하기 위해 최적의 신호 증폭 방법과 결합되어야 하고 표적 DNA 혹은 RNA를 진단에 적합하도록 DNA를 RNA로, RNA를 DNA로 전변해야 하는 단점이 있다. 따라서, 현장에서 대가축의 전염성 질병을 조기에 진단할 수 있는 CRISPR/Cas 바이오센서를 개발하는데 있어 병원체 유형(DNA 혹은 RNA)을 고려하여 최적의 Cas 효소를 선정하여야 하고 이에 따른 적절한 신호 증폭 방법이 결합되어야 한다.

감사의 글

본 성과물은(논문, 산업재산권, 품종보호권 등)은 농촌진흥청 연구사업(세부 과제 번호 : PJ013322)의 지원으로 이루어진 것임.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Joung, J., Slaymaker, I. M., Cox, D. B., Shmakov, S., Makarova, K. S., Semenova, E., Minakhin, L., Severinov, K., Regev, A., Lander, E. S., Koonin, E. V. and Zhang, F. 2016. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science* **353**, aaf5573.
2. Abd, E. I., Wahed, A., El-Deeb, A., El-Tholoth, M., Abd El Kader, H., Ahmed, A., Hassan, S., Hoffmann, B., Haas, B., Shalaby, M. A., Hufert, F. T. and Weidmann, M. 2013. A portable reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. *PLoS One* **8**, e71642.
3. Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Essletzbichler, P., Han, S., Joung, J., Belanto, J. J., Verdine, V., Cox, D. B. T., Kellner, M. J., Regev, A., Lander, E. S., Voytas, D. F., Ting, A. Y. and Zhang, F. 2017. RNA targeting with CRISPR-Cas13.

- Nature* **550**, 280-284.
4. Arzt, J., Juleff, N., Zhang, Z. and Rodriguez, L. L. 2011. The pathogenesis of foot and mouth disease I: Viral pathways in cattle. *Transbound. Emerg. Dis.* **58**, 291-304
 5. Barrangou, R. 2015. The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond. *Curr. Opin. Immunol.* **32**, 36-41.
 6. Chen, J. S, Ma, E., Harrington, L. B., Da Costa, M., Tian, X., Palefsky, J. M. and Doudna, J. A. 2018. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science* **360**, 436-439.
 7. Cheng, Q. X. 2017. An application of a Cas protein, and a method and kit for detecting a target nucleic acid molecule. CN107488710A.
 8. Choi, H. G., Hong, S. Y., Hwang, H. Y. and Lee, H. K. 2013. Freeze-drying conjugate-construct for point-of-care testing immunochromatography, a kit for immunoassay using the same, and a method for analysis using the kit. WO2013180533A1.
 9. East-Seletsky, A., O'Connell, M. R., Knight, S. C., Burstein, D., Cate, J. H., Tjian, R. and Doudna, J. A. 2016. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. *Nature* **538**, 270-273.
 10. Garvey, M. 2018. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis: A possible causative agent in human morbidity and risk to public health safety. *Open. Vet. J.* **8**, 172-181.
 11. Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Kellner, M. J., Joung, J., Collins, J. J. and Zhang, F. 2018. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science* **360**, 439-444.
 12. Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Lee, J. W., Essletzbichler, P., Dy, A. J., Joung, J., Verdine, V., Donghia, N., Daringer, N. M., Freije, C. A., Myhrvold, C., Bhattacharyya, R. P., Livny, J., Regev, A., Koonin, E. V., Hung, D. T., Sabeti, P. C., Collins, J. J. and Zhang, F. 2017. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science* **356**, 438-442.
 13. Huang, M., Zhou, X., Wang, H. and Xing, D. 2018. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9 triggered isothermal amplification for site-specific nucleic acid detection. *Anal. Chem.* **90**, 2193-2200.
 14. Jeon, J. H. and Rhie, G. E. 2017. Recent advancements in diagnostic ELISA kits and immunosensors. *PHWR* **10**, 1100-1103.
 15. Karvelis, T., Gasiunas, G. and Siksnys, V. 2017. Methods for decoding Cas9 protospacer adjacent motif (PAM) sequences: a brief overview. *Methods* **121-122**, 3-8.
 16. Khan, M. Z. and Zahoor, M. 2018. An overview of brucellosis in cattle and humans, and its serological and molecular diagnosis in control strategies. *Trop. Med. Infect. Dis.* **3**, 65.
 17. Koonin, E. V., Makarova, K. S. and Zhang, F. 2017. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **37**, 67-78.
 18. Li, L., Li, S. and Wang, J. 2018. CRISPR-Cas12b-assisted nucleic acid detection platform. *bioRxiv* 1-12.
 19. Li, S. Y., Cheng, Q. X., Liu, J. K., Nie, X. Q., Zhao, G. P. and Wang, J. 2018. CRISPR-Cas12a has both cis- and trans-cleavage activities on single-stranded DNA. *Cell* **28**, 491-493.
 20. Li, S. Y., Cheng, Q. X., Wang, J. M., Li, X. Y., Zhang, Z. L., Gao, S., Cao, R. B., Zhao, G. P. and Wang, J. 2018. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection. *Cell* **4**, 20.
 21. Li, Y., Li, S., Wang, J. and Liu, G. 2019. CRISPR/Cas systems towards next-generation biosensing. *Cell* **37**, 730-743.
 22. Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., Barrangou, R., Brouns, S. J., Charpentier, E., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J., Terns, R. M., Terns, M. P., White, M. F., Yakunin, A. F., Garrett, R. A., van der Oost, J., Backofen, R. and Koonin, E. V. 2015. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 722-736.
 23. Makarova, K. S., Zhang, F. and Koonin, E. V. 2017. SnapShot: class 2 CRISPR-Cas systems. *Cell* **168**, 328.
 24. Myhrvold, C., Freije, C. A., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Metsky, H. C., Durbin, A. F., Kellner, M. J., Tan, A. L., Paul, L. M., Parham, L. A., Garcia, K. F., Barnes, K. G., Chak, B., Mondini, A., Nogueira, M. L., Isern, S., Michael, S. F., Lorenzana, I., Yozwiak, N. L., MacInnis, B. L., Bosch, I., Gehrke, L., Zhang, F. and Sabeti, P. C. 2018. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science* **360**, 444-448.
 25. Negut, I., Grumezescu, V. and Grumezescu, A. M. 2018. Treatment strategies for infected wounds. *Molecules* **23**, 2392.
 26. Ng, H. H., Ang, H. C., Hoe, S. Y., Lim, M. L., Tai, H. E., Soh, R. C. H. and Syn, C. K. 2018. Simple DNA extraction of urine samples : Effects of storage temperature and storage time. *Forsciint. Sci. Int.* **287**, 36-39.
 27. Oliveros, J. C., Franch, M., Daniel, T. M., David, S. L., Montoliu, L., Cubas, P. and Pazos, F. 2016. Breaking-Cas-interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ENSEMBL genomes. *Nucleic Acids Res.* **44**, 267-271.
 28. Pardee, K., Green, A. A., Takahashi, M. K., Braff, D., Lambert, G., Lee, J. W., Ferrante, T., Ma, D., Donghia, N., Fan, M., Daringer, N. M., Bosch, I., Dudley, D. M., O'Connor, D. H., Lee, G. and Collins, J. J. 2016. Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components. *Cell* **165**, 1255-1266.
 29. Phillips, C. J., Foster, C. R., Morris, P. A. and Teverson, R. 2001. The transmission of Mycobacterium bovis infection to cattle. *Res. Vet. Sci.* **74**, 1-15.
 30. Qiu, X. Y., Zhu, L. Y., Zhu, C. S., Ma, J. X., Hou, T., Wu, X. M., Xie, S. S., Min, L., Tan, D. A., Zhang, D. Y. and Zhu, L. 2018. Highly effective and low-cost microRNA detection with CRISPR-Cas9. *ACS. Synth. Biol.* **7**, 807-813.
 31. Shmakov, S., Abudayyeh, O. O., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Gootenberg, J. S., Semenova, E., Minakhin, L., Joung, J., Konermann, S., Severinov, K., Zhang, F. and Koonin, E. V. 2015. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems. *Mol. Cell* **60**, 385-397.

32. Shmakov, S., Smargon, A., Scott, D., Cox, D., Pyzocha, N., Yan, W., Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Severinov, K., Zhang, F. and Koonin, E. V. 2017. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 169-182.
33. Timoney, J. F., Gillespie, J. H., Scott, F. W. and Barlough, J. E. 1988. Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals, p280-285, 8th ed.
34. To, A. C., Chu, D. H., Wang, A. R., Li, F. C., Chiu, A. W., Gao, D. Y., Choi, C. H. J., Kong, S. K., Chan, T. F., Chan, K. M. and Yip, K. Y. 2018. A comprehensive web tool for toehold switch design. *Bioinformatics* **34**, 2862-2864.
35. Vidic, J., Manzano, M., Chang, C. M. and Nicole, J. R. 2017. Advanced biosensors for detection of pathogens related to livestock and poultry. *Vet. Res.* **48**, 11.
36. Willey, J. M., Sherwood, L. M. and Woolverton, C. J. 2011. Prescott's MICROBIOLOGY, p99-103, 8th ed.
37. Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P., Volz, S. E., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., Koonin, E. V. and Zhang, F. 2015. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* **163**, 759-771.
38. Zhang, F., Wen, Y. and Guo, X. 2014. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum. Mol. Genet.* **23**, R40-46.
39. Zhang, Y., Qian, L., Wei, W., Wang, Y., Wang, B., Lin, P., Liu, W., Xu, L., Li, X., Liu, D., Cheng, S., Li, J., Ye, Y., Li, H., Zhang, X., Dong, Y., Zhao, X., Liu, C., Zhang, H. M., Ouyang, Q. and Lou, C. 2017. Paired design of dCas9 as a systematic platform for the detection of featured nucleic acid sequences in pathogenic strains. *ACS. Synth. Biol.* **6**, 211-216.

초록 : 현장에서 가축질병을 진단하기 위한 CRISPR/Cas 시스템의 활용

이원희¹ · 이윤석^{1,2*}

(¹국립한경대학교 농업생명과학대학 생명공학과, ²국립한경대학교 유전정보연구소)

최근, 국내에서 발생하는 대가축의 질병은 바이러스 혹은 세균 등과 같은 병원체가 사료 섭취, 가축 간의 신체 접촉, 호흡 등 다양한 경로를 통해 전파되어 발병되는 전염성 질병이다. 전염성 질병은 가축의 건강을 위협하고 생산성을 감소시키기 때문에 현장에서 조기 진단하여 개체 격리와 같은 통제 관리가 필수적이다. 기존 사용되고 있는 진단 키트들은 현장에서 사용하기에 용이하지 않으며 극소량의 감도에서 진단이 제한적인 단점을 가지고 있다. 그러므로, 현장에서 극소량의 감도와 진단의 편이성을 고려하여 DNA와 RNA 수준에서 진단할 수 있는 CRISPR/Cas 시스템은 최적의 시스템이라 할 수 있다. 본 연구논문에서는 대가축의 전염성 질병들을 현장에서 조기 진단함에 있어 CRISPR/Cas 시스템의 활용전략에 대해 소개하고자 한다. 최근 발견된 CRISPR/Cas 효소들은 2개의 클래스와 6가지 하위유형으로 분류되었다. 이 중에서 클래스 2에 포함되는 Cas 효소들은 대표적으로 제 2형에 Cas9, 제 5형에 Cas12a와 Cas12b, 제 6형에 Cas13a와 Cas13b가 있다. 현재까지 개발된 CRISPR/Cas 시스템들은 간단한 시각 신호를 통해 표적에 대한 정량 및 다중 감지가 가능하고 특히, 극소량 수준의 초고감도에서도 표적만을 진단할 수 있으며 단시간 이내에 진단 결과를 얻을 수 있다. 하지만 초고감도 DNA 혹은 RNA를 진단하기 위해 최적의 신호 증폭 방법과 결합되어야 하고 표적 DNA 혹은 RNA를 진단에 적합하도록 DNA를 RNA로, RNA를 DNA로 전변해야 하는 단점이 있다. 따라서, 현장에서 대가축의 전염성 질병을 조기에 진단할 수 있는 CRISPR/Cas 바이오센서를 개발하는데 있어 가축의 전염 매개체로부터 추출되는 병원체 유형(DNA 혹은 RNA)을 고려하여 최적의 Cas 효소를 선정하여야 하고 이에 따른 적절한 신호 증폭 방법이 결합되어야 한다. 따라서, CRISPR/Cas 시스템은 유전자 편집 방법을 사용하는 빠르고 효율적인 진단 도구이며 이 시스템은 소의 전염병을 조기에 진단하고 감염 확산방지에 도움될 수 있을 것으로 판단 되어진다.