

CRISPR/Cas9 System을 활용한 배스의 불임 유도에 대한 연구^{1a}

박승철² · 김종현³ · 이윤정^{4*}

A Study on the Induction of Infertility of Largemouth Bass (*Micropterus salmoides*) by CRISPR/Cas9 System^{1a}

Seung-Chul Park², Jong Hyun Kim³, Yoon Jeong Lee^{4*}

요약

배스(*Micropterus salmoides*)는 수생태계에서 최상위단계에 위치하는 생태계교란 어종으로 심각한 담수생태계의 불균형을 초래하고 있다. 배스의 퇴치 및 관리를 위한 다양한 시도를 하고 있지만 효과적인 방안은 없는 상황이므로 배스의 고유한 특성에 기반한 개체군 감소의 효율성을 극대화할 수 있는 방식을 모색하였다. 본 연구에서는 배스의 Transcriptom 분석으로 Unigene contigs는 182,887개, 그리고 정자-난자 인식 단백질인 IZUMO1과 Zona pellucida sperm-binding protein의 유전자에서 CRISPR/Cas9 system을 적용할 최종 Target sequence는 12종을 산출하였다. 각 Target sequence를 인식할 수 있는 12종의 sgRNA를 합성한 후 후속 연구에 사용할 12종의 Cas9-sgRNA ribonucleoprotein (RNP) complex를 제작하였다. 본 연구에서는 차세대염기서열 분석법으로 정자-난자 인식 단백질을 암호화하는 유전자를 탐색하였고, CRISPR/Cas9 system으로 유전자를 편집하여 번식행동은 하지만 수정란을 형성하지 못하는 생식세포를 생산하는 불임개체를 유도하기 위한 조성물 개발 과정을 확립하였다. 그리고 배스와 동일한 수계에 있는 고유 생물종의 서식에는 영향을 미치지 않는 생태계교란종 관리 방안으로서의 유용성을 검증하기 위한 후속 연구의 귀중한 기초 자료를 확보하는데 기여했다고 판단된다.

주요어: 수생태계, 생태계교란종, 생식, 차세대염기서열 분석, 유전자 편집

ABSTRACT

A largemouth bass (*Micropterus salmoides*) is an ecosystem disturbance fish species at the highest rank in the aquatic ecosystem, causing a serious imbalance in freshwater ecosystems. Although various attempts have been made to eradicate and control largemouth bass, no effective measures were found. Therefore, it is

1 접수 2021년 7월 30일, 수정 (1차: 2021년 9월 29일), 게재확정 2021년 9월 30일

Received 30 July 2021; Revised (1st: 29 September 2021); Accepted 30 September 2021

2 국립공원연구원 책임연구원 National Park Research Institute. 171 Dangu-ro, Wonju-si, Gangwon-do, 26441, Korea (bong82@knps.or.kr)

3 주식회사 엔에이피 대표 Nature And People Co., Ltd. 69-5 Dalgubeol-daero 652-gil, Suseong-gu, Daegu, 42281, Korea (new-jonghyun@hanmail.net)

4 주식회사 엔에이피 부장 Nature And People Co., Ltd. 69-5 Dalgubeol-daero 652-gil, Suseong-gu, Daegu, 42281, Korea (yjlee-7447@hanmail.net)

a 본 연구는 2020년도 국립공원공단 국립공원연구원 생태계교란종 및 외래생물관리 연구사업의 연구비 지원으로 수행하였음

* 교신저자 Corresponding author: yjlee-7447@hanmail.net

necessary to find an approach to maximize the effective population reduction based on the unique characteristics of largemouth bass. This study used the transcriptome analysis to derive 182,887 unigene contigs and select 12 types of final target sequences for applying the CRISPR/Cas9 system in the genes of IZUMO1 and Zona pellucida sperm-binding protein, which are proteins involved in sperm-egg recognition. After synthesizing 12 types of sgRNA capable of recognizing each target sequence, 12 types of Cas9-sgRNA ribonucleoprotein (RNP) complexes to be used in subsequent studies were prepared. This study searched the protein-coding gene of sperm-egg through the Next Generation Sequencing (NGS) and edited genes through the CRISPR/Cas9 system to induce infertile individuals that produced reproductive cells but could not form fertilized eggs. Through such a series of processes, it successfully established a composition development process for largemouth bass. It is judged that this study contributed to securing the valuable basic data for follow-up studies to verify its effect for the management of ecological disturbances without affecting the habitat of other endemic species in the same water system with the largemouth bass.

KEY WORDS: AQUATIC ECOSYSTEM, ECOSYSTEM DISTURBANCE SPECIES, REPRODUCTION, NEXT GENERATION SEQUENCING, GENE EDITING

서 론

배스(*Micropterus salmoides*)는 농어목(Perciformes), 검정우럭과(Centrarchidae), 검정우럭속(*Micropterus*)에 속하는 어류로서 원산지는 미국 남동부(플로리다, 미시시피강 유역)와 미네소타, 위스콘신, 다코타 등 오대호 유역으로 매우 광범위하게 분포하고 있다(Kim, 1997; Nelson, 2006). 우리나라는 1970년대에 수산청에서 미국의 양어장으로부터 3~4cm 치어 500마리를 어족 자원조성을 통한 단백질 공급을 목적으로 도입하였고, 양어에 성공하여 팔당호를 포함한 북한강수계의 조종천과 강원도 철원군 민통선 내에 위치한 토교 저수지에 방류하였다(NIER, 1995). 그러나 국내에서는 식용으로 선호하지 않아 식량자원으로서의 가치가 하락하여 양식업자들의 양어 포기, 홍수에 의한 양식장의 범람 등으로 인해 큰 강과 저수지로 방류되어 확산되기 시작하였고, 1990년대 여가 활동이 증가한 이후 일부 낚시인들에 의한 전국의 저수지 또는 낚시터로의 인위적인 유입으로 급속하게 확산되어 제주도를 비롯한 우리나라의 전 지역에 널리 분포하고 있다. 배스는 먹이사슬에서 수생태계의 최상위단계에 위치하며 생태계교란 어종으로서 우리나라의 토착어류를 비롯한 다양한 수중생물들을 포식하며 이로 인해 담수생태계의 불균형을 초래하고 있다. 우리나라는 1998년 2월 환경부 자연환경보전법 제2조(정의) 18항에 “생태계위해외래동식물” 중 생태계교란 어류로 지정하여 배스의 퇴치 및 관리를 위한 다양한 시도를 하고 있지만 많은 인력과 예산 투입에도 불구하고 효율적인 퇴치 방안

모색 및 검증이 미진한 상황으로 담수생태계에 미치는 악영향은 점차 심각해지고 있는 실정이다(NPRI, 2020; KNPS, 2020).

배스의 생태·생식적 특성에 대한 연구 내용을 기반으로 한 다양한 퇴치방법에는 낚시, 투망, 정치망, 자망, 족대, 펌핑, 작살, 전기충격, 인공산란장, 천적 등이 있다. 그러나 대부분이 상당한 시간, 경비, 설비 그리고 인력이 필요한 방식이거나 수계 내 다른 어종도 함께 영향을 받는 방식이기 때문에 실제적인 시행의 결과와 현실적인 효과의 검증은 미흡한 상황이다(ME, 2012). 이 중 인공산란장법은 배스의 생식 습성을 이용하여 산란을 유도한 후 수정란을 제거하는 번식 차단방식으로 수계 내 타 서식 종에 영향을 끼치지 않고 상당수의 개체를 한꺼번에 포획할 수 있는 효과를 가지고 있다(ME, 2010; NFRDI, 2011). 그러나 인공산란장 이외에 다른 산란장소가 있는 경우에는 포획 효과가 낮다는 단점이 있다(ME, 2012). 이러한 인공산란장법의 장점은 활용하고 단점은 보완하여 배스의 고유한 생식적 특성에 기반한 개체군 감소의 효율성을 극대화할 수 있는 방식의 모색이 요구된다.

동물의 생식세포는 서로 다른 종 간의 수정을 방지하도록 종 특이적인 정자와 난자의 인식 부위를 가지고 있다(Raj et al., 2017). 성게(*Arbacia punctulata*)의 경우, 정자 머리 표면에 있는 침체돌기의 빈딘 단백질은 종 특이성을 갖는 단백질로서 난자 난황막의 빈딘 수용체와 결합하고 이후 정자와 난자의 세포막이 융합한 뒤 정자의 핵이 난자의 세포질로 삽입된다(Foltz and Lennarz, 1992). 어류의 경우,

수컷의 방정 행동으로 물 속에 뿌려진 정자는 편모운동으로 난자로 이동한 후, 각 생식세포 표면에 있는 종 특이적 인식 부위의 결합에 의해 동 종간의 수정이 이루어진다(Hirohashi *et al.*, 2008; Miwa, 2015). Zebrafish의 경우, 정자 표면의 단백질은 난자의 바운서(Bouncer)와 종 특이적 결합을 한다(Herberg *et al.*, 2018; Lehmann, 2018). 포유동물인 설치류의 경우, 정자 표면의 Izumo는 난자 표면의 수용체인 Zuno에 의해 인식되어 수정 과정이 완결된다(Avella *et al.*, 2014; Bianchi *et al.*, 2014; Bianchi and Wright, 2015). 그러므로 동종이라 할지라도 종 특이적인 정자와 난자의 결합 부위를 인식하지 못하는 생식세포를 생산하는 개체는 수정 현상을 나타내지 못하므로 불임 개체라고 할 수 있다.

최근 인간에게 특정 질환을 매개하는 해충의 방제에 대한 연구동향을 보면, 방사선 또는 유전자 편집기술로 해충의 불임을 유도함으로써 번식을 차단하는 방법을 개발하여 인류의 건강에 악영향을 미치는 생물종 퇴치 방법의 유용성을 입증하고 있다(Kyrou *et al.*, 2018; Zheng *et al.*, 2019). 유전자 편집기술(Gene Editing)이란, 질병을 일으키는 DNA를 잘라 없애거나 또는 필요한 DNA를 추가하는 유전자의 수정을 통해 질병을 치료하는 기술이고 특히 유전자의 특정 부분을 정교하게 잘라내는 기술을 유전자가위라고 한다. 현재 유전자 편집기술 중 가장 각광받고 있는 CRISPR/Cas9(Clustered

Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)은 바이러스의 침입에 저항하기 위한 세균의 면역시스템으로서 화농성 연쇄상구균(*Streptococcus pyogenes*)의 CRISPR II 시스템이 가장 많이 알려져 있고 제3세대 유전자 가위로 개발되어 활용되고 있다(Gantz *et al.*, 2015; Hashimoto and Takemoto, 2015; Elasmwad *et al.*, 2018; Trionnaire *et al.*, 2019).

본 연구에서는 배스의 종 특이적 정자-난자 인식 단백질을 암호화하는 유전자를 탐색한 후 CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 유전자 편집을 통해 수정 과정에 필수적인 종 특이적 인식부위가 발현되지 않도록 유도하는 불임 유도 조성물의 개발과정을 확립하였다. 그리고 생태교란어종과 동일한 수생태계에 속해 있는 고유종 및 토착종의 서식에는 영향을 미치지 않는 효율적인 생태계교란종 관리 방안으로서의 유용성을 검증하기 위한 연구의 기초 자료를 확보하고자 하였다.

연구방법

전체적인 불임 개체 유도 과정 중 불임유도 조성물의 개발과정을 중심으로 나열하여 기술하였다. 불임 개체 및 불임유도 조성물의 개발과정은 Flow chart로 도식화하였다 (Figure 1).

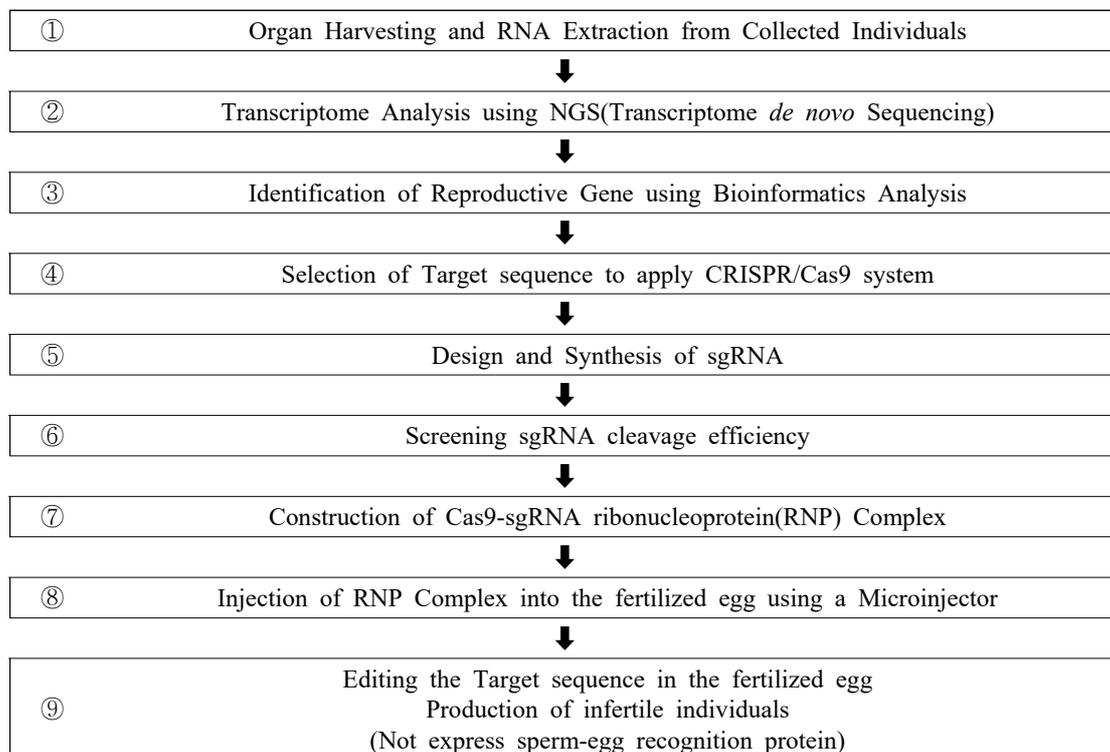


Figure 1. Flow Chart for the Development Process of infertile individuals (①~⑨) and infertility inducing composition (①~⑦).

1. 채집 장소

본 연구에 사용된 배스는 2020년 6월, 대구광역시 수성구 옥수동 망월지에서 포획하였다.

2. 배스의 뇌와 생식소(정소, 난소) 적출 및 RNA 추출

실험군은 B1-1(Female, 뇌), B1-2(Female, 난소), B2-1(Male, 뇌), B2-2(Male, 정소)로 나누고 멸균된 기구를 이용하여 뇌와 생식소를 신속하게 적출하였다. 적출한 기관들을 1ml의 Trizol reagent에서 분쇄하고, 200 μ l의 Chloroform을 첨가한 뒤 15초 동안 섞고 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 11,000g으로 원심분리한 후 상층액을 취하였다. 상층액에 500 μ l의 isopropanol을 첨가하여 섞은 후 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 11,000g으로 원심분리하여 상층액을 제거하고 침전물을 건조시킨 다음, 건조된 침전물에 100 μ l의 nuclease-free water를 넣어 녹인 후 RNA를 획득하였다. 추출한 RNA의 Quality는 Micro-Spectrophotometer (ALLSHENG, China)를 이용하여 분석하였다.

3. NGS를 이용한 전사체 분석 및 생식 유전자 탐색

Transcriptome *de novo* Sequencing을 진행하기 전, 추출된 RNA로 Original sample QC를 수행하여 분석 과정에 사용할 샘플로 B1-2(Female, 난소), B2-1(Male, 뇌) 2종을 선정하였다. Illumina TruSeq Stranded mRNA LT sample Prep Kit를 이용하여 cDNA library를 구축한 후 Library QC를 수행하고 NovaSeq 6000 system을 활용한 NGS방법으로 paired-end

염기서열을 획득하였다(Macrogen. Inc., Korea). Trimmomatic program을 이용하여 산출된 Raw data에서 adapter 서열, 낮은 quality의 read를 제거한 Trimming data를 획득하였다. Trinity 프로그램을 이용하여 각 샘플로부터 획득한 약 100 million sequencing reads로 *de novo* assembly를 진행하여 Contig들을 확보한 후 TGICL을 이용하여 assembly와 clustering을 수행하여 Unigene contig들을 획득하였다. NCBI BLAST의 BLASTN과 DIAMOND software의 BLASTX (E-value cut-off of 1.0E-5)을 이용하여 획득한 Unigene들을 Annotation 하였고, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), NCBI Nucleotide (NT), Pfam, Gene ontology (GO), NCBI non-redundant Protein (NR), UniProt 그리고 EggNOG의 총 7종의 데이터베이스를 이용하여 관련 유전자별 기능을 확인하였다. 획득한 데이터 중에서 정자-난자 인식 단백질과 관련한 키워드 ‘Sperm’, ‘Zona Pellucida’, ‘IZUMO’, ‘Acrosome’을 포함하는 Contig들을 선별하여 CRISPR/Cas9 시스템을 적용할 Target sequence를 탐색하였다(Martyniuk *et al.*, 2013; Vicens *et al.*, 2014; Klangnarak *et al.*, 2018).

4. CRISPR/Cas9 system을 적용할 Target Sequence 선정

프로그램 Geneious Prime (version 11.0.4+11)을 이용하여 각 Contig를 구성하는 염기서열에서 CRISPR/Cas9 시스템을 적용했을 때 편집 가능한 서열(Target sequence) 즉, Cas9 nuclease가 인식하는 부위인 PAM (5'-NGG-3')을 가진 20bp의 염기서열을 후보 서열(Target sequence)로 선정하였다. 배스의 Genomic DNA에서 동일한 서열의 존재 여부와 Target sequence 내 intron 삽입에 의한 CRISPR/Cas9

Table 1. Primer sets to identify candidate target sequence

Target seq. Name	Primer F.	Primer R.
T1	GACAGACCTCTACATGCTTTGG	ACCAACACCAGCAACATCTC
T2	GTTCTAGCAGGAAGTTAAGGG	TATCTGGCTGGTCTCTCTGTAG
T3	TACAGAGAGACCAGCCAGATAC	CAGAAGGAGAGGGACAGATGTA
T4	TCATCCGTGATGGATTGTGTC	GGAGTAGTGGTACTCTGGTCTT
T5	CTTCCATGGCATCGTCTACTG	TGACAGGTCGGTGAATTTGG
T6	GGAACGTATCGCTGCTCTTT	CCAGGACAACCTGTAATGCCTAC
T7	CCAGTCATCGCCGTGTTTA	CTCCCTGTCTTTAGAGTGTGTG
	TGCCTCATGGAAACAACACTACTC	GTCTCCATCACACCGTGTTT
T8	CATGTTCACTACTCGCAGATGT	TGTGTGTTTAAGTGGGTGTGT
T9	GCGTGACACCCCCTTAAA	TTCGGGATTGATTGGATGGC
	CATAACAAAGCGTGACACACC	AATCCGGGAGATTTACCTCATC
T10	CCCTGAATGGAGCGATGG	GACTAAACATTCAAAGAAACCCTGA
T11	GGAAGTGGGAGCATGAAGAA	ACTGAGCTGGATATTGTAGACATC
T12	TGTCGGTGATGAGGAAATGAAG	GCTTGAGCACATCTCAAGAGTA

Table 2. Primer sets to identify candidate target sequence (continuous)

Target seq. Name	Primer F.	Primer R.
T13	CACGGCTCAGATGGTTTACT	CCAAACAGGTCAGCTTTGATAAC
T14	CAGACTTGCTGGAGATCGTTAT	AGGCCACAGGAGAGTATATGA
T15	TCGTTGTTGGATTAGTGGACTG	GCAGCTTGGGTAGACATGAA
T16	GTTCTTCGCTCCTGCCTAC	CACACAGCTGCTCACAAATAC
T17	GTCAGAGTTGGGTATCACATGG	CATTTACTGGCACAGCATTACG
T18	TCAGGACACAGGATGACAAAC	TTGGATTCAGCCACCTTACC
T19	TGGCCAAACCCACCATAA	GCAGTCCCATCTCGTCTTT
T20	CCAGTGGAGAGGTGGAATAAC	AGCAGTTGTGTTTGACAGTTTAG
T21	TGGACCCTAACGGCACAG	CAGTTGATTTACATCAGATAAACAGGGA
T22	TCTGAGGTCTAATTGGCAGTAAAG	CTAGGCAGGTTGAGTATGAAGTG
T23	TGAACACACTTCATACTCAACCT	GAGCACACCTGACAGACAAT
T24	TGGAAGTCCTGAGATGTTCAA	CACGGGAGTTGGAAGTCTAAA
T25	GGTGTCTTTGTGTCTGTGT	TCATCCTTGTGATGCCATTGTA
T26	GAACAGTCAGTGTGGTGAT	GTTGCGACAACATTGACATACA
T27	AGCTGAAAGCTACCTCTGAAAT	TGACTGTAATCTTGTCTACTTGCT

system 적용 불가능 여부를 확인하기 위해 각 후보 서열 (Target sequence)을 기준으로 Primers (Table 1, 2)를 디자인, 제작한 후 PCR을 수행하여 최종 Target sequence를 선정하였다. 최종 Target sequence를 선정하기 위한 배스의 Genomic DNA 분석 과정은 다음과 같다. 실험군은 B1 (Female), B2 (male)로 나누고 멸균된 기구를 이용하여 지느러미를 신속하게 적출한 후 DNeasy blood and tissue kit (Qiagen, USA)를 이용하여 DNA를 추출하였다. PCR 반응은 DNA 1 μ l(50ng/ μ l), 10X buffer 5 μ l, 10mM dNTP 1 μ l, primer 각각 2 μ l(10pmol/ μ l), DNA Taq polymerase (solgent, Korea) 0.25 μ l, 증류수를 첨가하여 최종 50 μ l 용량으로 수행하였다. PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 initial denaturation한 다음 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 62 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 90초를 1 cycle로 하여 30회 반복한 후, 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 final extension하고 8 $^{\circ}$ C에 보관하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

5. sgRNA 디자인 및 합성

최종 선정된 Target sequence에 유전자 편집기술을 적용할 수 있도록 sgRNA를 디자인하고 합성하였다. sgRNA 합성을 위해 Guide-it sgRNA In Vitro Transcription kit (Takarabio, USA)을 이용하였다. sgRNA 합성에 필요한 Template 제작 방법은 다음과 같다. Template 제작용 Forward primers는 Table 3에 나타내었다. Guide-it Scaffold Template 1 μ l, Forward primer 0.5 μ l(10pmol/ μ l), PrimeSTAR Max Premix 12.5 μ l, 증류수를 첨가하여 최종 25 μ l 용량으

로 반응하였다. 반응조건은 98 $^{\circ}$ C에서 10초, 68 $^{\circ}$ C에서 10초를 1 cycle로 하여 33회 반복하였고, 반응산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. sgRNA 합성 방법은 다음과 같다. sgRNA PCR template 5 μ l, Guide-it *In Vitro* Transcription Buffer 7 μ l, Guide-it T7 Polymerase Mix 3 μ l, RNase Free Water 5 μ l를 혼합하여 최종 20 μ l 용량으로 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 반응하였다. 이어 Recombinant DNase I (RNase-Free) 2 μ l를 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 반응하여 sgRNA를 합성하였다. 합성한 sgRNA의 Purify를 위해 Guide-it IVT RNA Clean-Up kit (Takarabio, USA)을 이용하였고 Purify 과정은 다음과 같다. 합성한 sgRNA 22 μ l, IVT Binding Buffer 30 μ l, isopropanol 130 μ l, RNase Free Water 78 μ l를 혼합한 후 IVT RNA Clean-Up Spin Column을 이용하여 30초간 11,000g으로 원심분리하였다. 이어 Wash Buffer 600 μ l로 2회 Washing하고 RNase Free Water 20 μ l로 1분간 Incubation한 후 1분간 11,000g으로 원심분리하여 sgRNA를 획득하였다. 획득한 sgRNA는 Micro-Spectrophotometer (ALLSHENG, China)를 이용하여 정량하였다.

6. sgRNA 효율성 Screening

합성한 sgRNA가 정상적으로 작동하여 Target sequence를 인식할 수 있는지에 대해 배스의 Genomic DNA와 Guide-it sgRNA Screening kit (Takarabio, USA)를 이용하여 확인하였다. Screening 방법은 다음과 같다. 먼저 Target sequence가 포함된 amplicon을 증폭하기 위해 PCR을 수행

Table 3. Forward primers to create the DNA template for sgRNA

Target seq. Name	Primer Sequence (5'→3')	size(bp)
T2	CCTCTAATACGACTCACTATAGGAGTCCTCTCTGCTCCCACTGGTTTAAGAGCTATGC	58
T3	CCTCTAATACGACTCACTATAGGAAAATCTTAGAGAAACACTGTTTAAGAGCTATGC	57
T5	CCTCTAATACGACTCACTATAGGCAGCTGCATGTGGATGAACAGTTTAAGAGCTATGC	58
T6	CCTCTAATACGACTCACTATAGGACTCTGCCCTCCCTGCCTCAGTTTAAGAGCTATGC	58
T8	CCTCTAATACGACTCACTATAGGAGGATTGCCGATGTGAACTAGTTTAAGAGCTATGC	58
T9	CCTCTAATACGACTCACTATAGGCACGATCACTGATCTGACCCGTTTAAGAGCTATGC	58
T10	CCTCTAATACGACTCACTATAGGAATCCCGAATAATCCCTGTGTTTAAGAGCTATGC	58
T11	CCTCTAATACGACTCACTATAGGCAGGGCAGATTTGAATGTGTTTAAGAGCTATGC	56
T12	CCTCTAATACGACTCACTATAGGTCCAGCTCAGTTAGAATCACGTTTAAGAGCTATGC	58
T13	CCTCTAATACGACTCACTATAGGCCTCAAATACACTGTGCAGTTTAAGAGCTATGC	58
T14	CCTCTAATACGACTCACTATAGGATGTTGATGAGATACGCCTGTTTAAGAGCTATGC	57
T15	CCTCTAATACGACTCACTATAGGCCTCCTCATATACTCTCCTGGTTTAAGAGCTATGC	58
T16	CCTCTAATACGACTCACTATAGGAGCTCTAACGTGTTTACTTGTGTTTAAGAGCTATGC	58
T18	CCTCTAATACGACTCACTATAGGTGATGCAGAGGCACCAAATAGTTTAAGAGCTATGC	58
T20	CCTCTAATACGACTCACTATAGGTGCTGCATCTCTAGAAAGTGTTTAAGAGCTATGC	58
T21	CCTCTAATACGACTCACTATAGGTTTGCTTTCTGAGGTCTAATGTTTAAGAGCTATGC	58
T22	CCTCTAATACGACTCACTATAGGTTCAAGTTTTCACTTAAATGTTTAAGAGCTATGC	57
T23	CCTCTAATACGACTCACTATAGGACCATTATGCTTTAAAGTTAGTTTAAGAGCTATGC	58
T24	CCTCTAATACGACTCACTATAGGTTTTGAGGCAGTGAAAAATGGTTTAAGAGCTATGC	58
T25	CCTCTAATACGACTCACTATAGGTGCGGACTCCTCCATGATGTTTAAGAGCTATGC	58
T26	CCTCTAATACGACTCACTATAGGTGAAAGCTACCTCTGAAATGGTTTAAGAGCTATGC	58

하였다. DNA 2 μ l, 2X Terra PCR Direct Buffer 25 μ l, primer 각각 1.5 μ l(10pmol/ μ l) (Table 1, 2), Terra PCR Direct Polymerase Mix (1.25 U/ μ l) 1 μ l, RNase Free Water 19 μ l를 혼합하여 최종 50 μ l 용량으로 반응하였다. PCR 조건은 98 $^{\circ}$ C에서 2분간 initial denaturation한 다음 9 $^{\circ}$ C에서 10초, 60 $^{\circ}$ C에서 15초, 68 $^{\circ}$ C에서 90초를 1 cycle로 하여 35회 반복한 후, 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. 합성된 sgRNA가 Target sequence를 인식할 수 있는지는 Cas9에 의한 Target sequence의 절단 여부로 하였다. Target-specific sgRNA (50ng/ μ l) 1 μ l와 Guide-it Recombinant Cas9 Nuclease (500ng/ μ l) 0.5 μ l를 혼합하여 5분간 37 $^{\circ}$ C에서 반응하였다. 이어서 상기 PCR 산물 5 μ l, 15X Cas9 Reaction Buffer 1 μ l, 15X BSA 1 μ l, 상기 Cas9/sgRNA mix 1.5 μ l, RNase Free Water 6.5 μ l를 혼합하여 최종 15 μ l 용량으로 37 $^{\circ}$ C에서 1시간, 80 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. 전기영동 결과 DNA 밴드가 cleaved fragment 2개로 나타나는 경우는 합성한 sgRNA가 Target sequence를 제대로 인식하여 유전자 편집이 성공적으로 실행되었다고 판단하였다.

7. Cas9-sgRNA ribonucleoprotein(RNP) complex 제작

Target sequence를 인식하고 절단하는 Cas9-sgRNA ribonucleoprotein (RNP) complex를 제작하기 위해 Guide-it Recombinant Cas9 kit (Takarabio, USA)를 이용하였다. 효율성이 검증된 sgRNA 0.45 μ l(1 μ g/ μ l), Guide-it Recombinant Cas9 0.75 μ l(3 μ g/ μ l), Resuspension Buffer 6.3 μ l를 섞어 최종 7.5 μ l의 용량으로 5분간 37 $^{\circ}$ C에서 반응하여 배스의 수정란에 Microinjector로 주입할 Cas9-sgRNA ribonucleoprotein (RNP) complex를 제작한 다음 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

결 과

1. NGS를 이용한 전사체 분석 및 생식 유전자 탐색

배스의 RNA 서열분석 결과, 총 242,418,292개의 reads (B1-2는 129,816,500 reads, B2-1는 112,601,792 reads)와 24,484,247,492 bp (B1-2는 13,111,466,500 bp, B2-1는 11,372,780,992 bp)의 Raw data를 확보하였다(Table 4).

Table 4. Raw data stats

Index	Sample	Total reads	Total read bases	GC (%)
1	B1-2	129,816,500	13,111,466,500	51.20
2	B2-1	112,601,792	11,372,780,992	48.46

Table 5. Trimming data stats

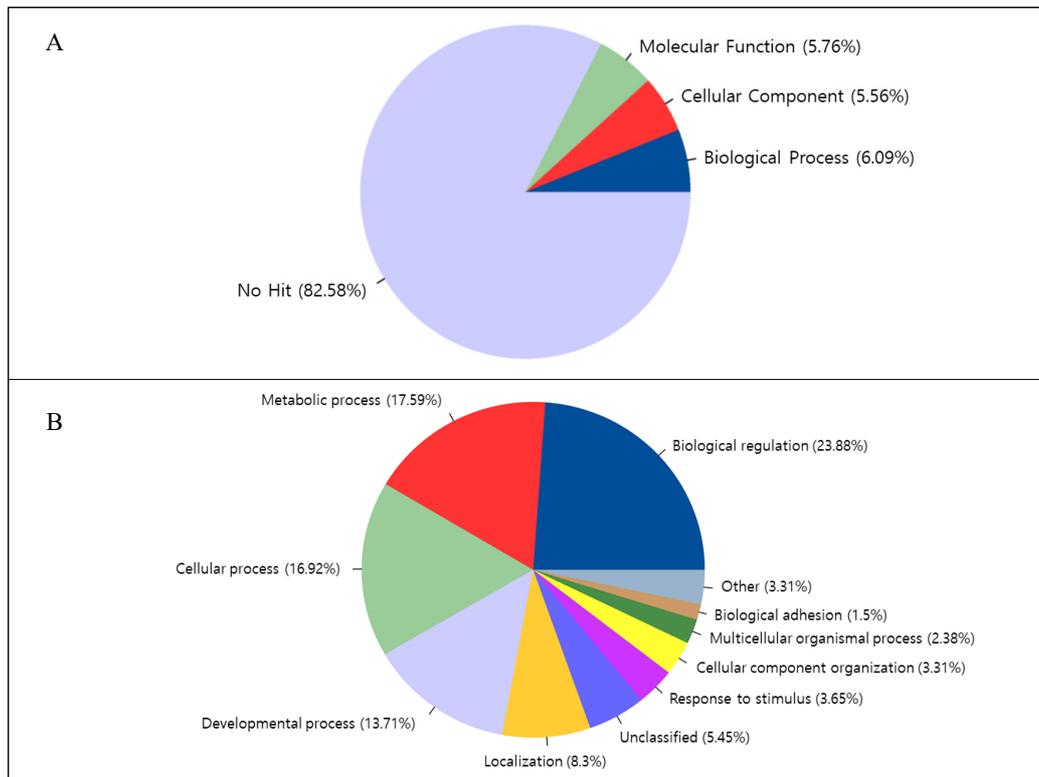
Index	Sample	Total reads	Total read bases	GC (%)
1	B1-2	128,492,724	12,854,708,436	51.20
2	B2-1	111,543,694	11,206,616,993	48.46

Table 6. Contig data stats

	# of genes	# of transcripts	Total assembled bases(bp)	GC(%)
Trinity <i>de novo</i> assembly	189,512	243,117	235,627,133	45.39
TGICL clustering	182,887	182,887	132,127,994	44.02

Low quality 서열 및 adaptor 서열의 trimming을 통해 240,036,418개의 reads (B1-2는 128,492,724 reads, B2-1는 111,543,694 reads)와 24,061,325,429 bp (B1-2는 12,854,708,436 bp, B2-1는 11,206,616,993 bp)의 Trimming data를 확보하였다(Table 5). Trinity를 이용한 *de novo* assembly 결과 Total

trinity transcripts는 243,117개(235,627,133 bp), Total trinity 유전자는 189,512개를 확인하였고, TGICL을 이용한 clustering 결과 182,887개(132,127,994 bp)의 Unigene Contig를 확인하였다(Table 6). Gene ontology (GO) 분석으로 획득한 contig들의 Annotation 결과는 기능별 즉, biological



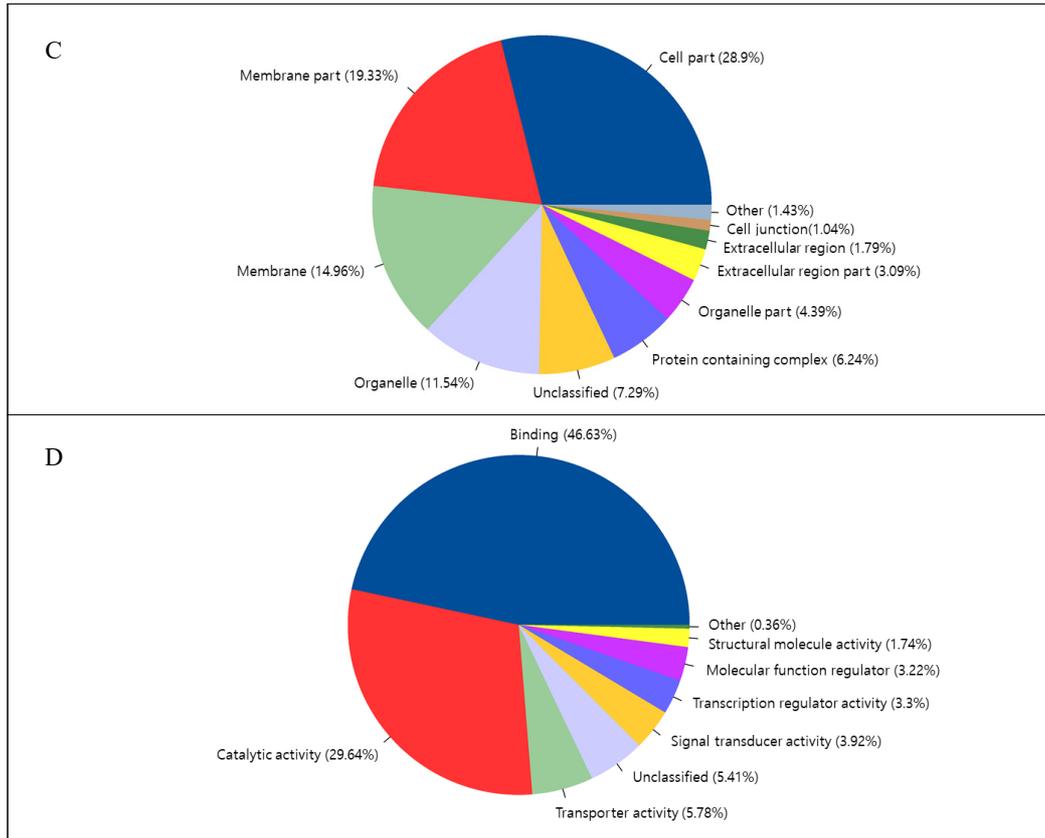


Figure 2. Gene Ontology (GO) analysis. (A) Categorization of GO terms, (B) Biological process terms, (C) Cellular component terms, (D) Molecular function terms. All of the differentially expressed genes were classified based on GO analysis. Each category is labeled with different colors, and the numbers refer to ratio of these categories to the all dataset.

processes, cellular components, molecular function으로 나누어 Figure 2에 나타내었다. Unigene Contig (이하 Contig) 정보를 활용하여 정자-난자 인식단백질과 관련한 키워드 ‘Sperm’, ‘Zona Pellucida’, ‘IZUMO’, ‘Acrosome’ 으로 검색하여 1차 선별한 결과, 발현 단백질은 10종, 단백질과 관련된 Contig는 122개가 산출되었고 1차 선별한 Contig 정보는 Table 7에 나타내었다. 1차 선별정보를 대상으로 7종의 데이터베이스에서 모두 검색되는 Contig들, 동시에 Blast 참조 유전자 서열과의 유사도가 80% 이상 되는 Contig들을 2차 선별한 결과, 단백질은 2종, 단백질과 관련된 Contig는 4종이 산출되었다. IZUMO1 단백질의 경우에는 3개의 Contig 그리고 Zona pellucida sperm-binding protein의 경우에는 1개의 Contig가 산출되었고 2차 선별한 Contig 정보는 Table 8에 나타내었다.

2. CRISPR/Cas9 system을 적용할 Target Sequence 선정

각 Contig를 구성하는 염기서열에서 CRISPR/Cas9 시스템을 적용했을 때 편집 가능한 서열(Target sequence) 즉, Cas9 nuclease가 인식하는 부위인 PAM (5'-NGG-3')을 가진 20bp의 염기서열을 후보 서열(Candidate Target sequence)이라 하고 선정된 결과는 Figure 3, 4, 5, 6에 표시하였다. 후보 서열은 IZUMO1의 C69849_g1_i1은 7개(Figure 3), C82233_g1_i1은 3개(Figure 4), C183992_g1_i1은 2개(Figure 5), 그리고 Zona pellucida sperm-binding protein의 C63950_g1_i1은 15개(Figure 6-1, 6-2)로, 총 27개의 후보 서열을 선정하였다. 배스 DNA에서 동일한 서열의 존재 여부, Target sequence 내 intron 삽입으로 인한 CRISPR/Cas9 system 적용 불가능 여부를 확인하기 위해 각 후보 서열을 기준으로 Primer를 디자인, 제작하여 PCR을 수행한 후 최종 Target sequence를 선정하였고, 결과는 Table 9에 나타내었다. 최종 Target sequence는 IZUMO1의 C69849_g1_i1은 4개, C82233

Table 7. 1st selected Contig information

	Protein	Function	Number of ontigs
1	Zona pellucida sperm-binding protein	• Extracellular matrix surrounding oocyte • Sperm binding receptor	23
2	Spermatogenesis-associated protein	• Control of fertility	63
3	Motile sperm domain-containing protein	• Membrnae contact site formation • facilitation of egg maturation • Oocyte migration to fertilization site	5
4	Sperm-associated antigen	• Spermatogenesis • Fertilization associated GTP binding and GTPase activity	7
5	IZUMO1	• Sperm-specific protein • Sperm-egg plasma membrane bindingand fusion	3
6	Round spermatid basic protein	• Sperm maturation	6
7	Sperm-tail PG-rich repeat-containing protein	• Early development of the zygote	2
8	Sperm acrosome membrane-associated protein	• Normal sperm morphology • Sperm surface membrane protein • Sperm-egg plasma membrane adhesionand fusion	4
9	Acrosomal vesicle	• Sperm surface membrane protein • sperm-egg plasma membrane adhesionand fusion	2
10	Sperm flagellum	• Sperm motility	7

Table 8. 2nd selected Contig information

Protein	Contig No.	Annotation on GO	
IZUMO1	C69849_g1_i1 (1,357 bp)	BP	• cellular process • reproductive process • cellular component organization or biogenesis
	C82233_g1_i1 (531 bp)	CC	• membrane • organelle part • cell part
	C183992_g1_i1 (324 bp)	MF	• binding
Zona pellucida sperm-binding protein	C63950_g1_i1 (2,850 bp)	BP	• cellular process • reproductive process • biological process
		CC	• extracellular region part
		MF	• binding

* GO terms : biological process (BP), cellular component (CC), molecular function (MF)

_g1_i1은 3개, C183992_g1_i1은 2개, 그리고 Zona pellucida sperm-binding protein의 C63950_g1_i1은 12개로, 총 21개의 최종 Target sequence를 선정하였다.

3. sgRNA 디자인 및 합성

최종 선정된 Target sequence에 유전자 편집기술을 적용하는데 필수적인 sgRNA를 합성하기 위해 Target sequence별

해당 primer를 사용하여 sgRNA 합성용 template를 제작한 결과, 전기영동 Gel상에서 약 130bp의 DNA band로 관찰되었다(Figure 7). Guide-it sgRNA In Vitro Transcription kit (Takarabio, USA)와 Guide-it IVT RNA Clean-Up kit (Takarabio, USA)를 이용하여 합성한 sgRNA의 합성량은 Table 10에 나타내었다.

```

> lzumo c69849_g1_i1
TTGAAGTGTACCTATGATAAAAATGACAGACCTCTACATGCTTTGGTGAACGTGGGGTGAACAG
TGACAGTACTGTTGCAGTTTGTGGCAGAATCTGACTGGTarget1 CAGGCTGGCACATGAACAAAATTG
CAAACTGTTCCAGAACATACTACAGAGAACCTGCTCTGACAGAGGAGCAAAAGTGACTCATCCTA
GTTCCCTAGCAGGAAGTTAAGGGTACCGAGGGGAGATGTTGCTGGTGTGGTGTCCCTGCTTTGCT
GTGTCCCTGCTGCCAAGGCCTGTTTGCAGTGTGACCTCAGGGTCAGGCTCCTACATGAGGACTTA
GTCCTCTCTGCTCCCACTGTGGTarget2 ACAACCAGATTGAATTGAAAAAGATTTGTGACCATGCCTA
TGTGACCTACAGAGAGACCAGCCAGATACGAAAGGGAGTCATTGATCCCACCACTCTGTACAGA
GCCACAACCTGAGTACCAGAGTGAATTTGACCGCTTCTTAAAACCAAGGACACTGGATCTGTAAC
ATTGAAGCCATTGAGTACATGGAGAAGGGCAGGGAAAACTTTAGAGAAACACTTGGTarget3 ACACA
TTCATCCGTGATGGATTGTGTCCCAACAAGTGTGGGCTTTTAAAACAGAGAGTAATGGATTGCAT
CTCTTGCCACTACAAGATATACATCTGTCCCTCTCCTTCTGGCCAACAGGATTGCGGTGAGTATCC
AGTGCAGGTarget4 CTGAGGAGGGAGGCCAGGCAGTGTGAACTGTTTCTTCCATGGCATCGTCTA
CTGTTGGGAAGACCAGAGTACCACTACTCCTGGGCCCTGGTGTGCCAGAAACGGAAAAGCTGA
CTGAGAGCAACTTCAAAGCCTTGGTAGTGACAGACGACTCATCTGTGGTCTTAAATCAGCTGCAT
GTGGATGAACAAGGTarget5 AACGTATCGCTGCTCTTTGCAGGACGAAAATGGAACCGTCTTCTACC
GAGTCACTTTCTGCTCGCTGTCAACCCTTTGCCTGTCCAAATTCACCGACCTGTATCACTCTGC
CCTCCCTGCCTCATGGTarget6 AAACAATACTCACCTTTTCTACCTACTGAGGAGGGCCTGCTGATG
CCAGTCATCGCCGTGTTTACTGCTCTGAGTCTGGCAGCCTGCGTAGGCATTACAGTTGCTCCTGGG
GTGAGAGACAATTTATTATAAATCAGAGGTarget7 AGAGCTGTGAACAAGCCGAGAAGAAAGAGGAA
GGAGGAAAACACACACAAAACACGGTGTGATGGAGACACTGCGCACAGTAAACACACACTCTA
AAGACAGGGAGGTTTTACTCATTTAGGTTGGACATTTCTCTGTGGCTAAATAAATTTCCAAGC
ACAAAGTGCCAAGTCAT

```

Figure 3. Candidate Target Sequence indicated in C69849_g1_i1 gene Sequence (1,357 bp). Yellow color for Candidate Target Sequence, Orange color for PAM (5'-NGG-3') region and Superscript for No. of Target sequence is Indicated.

```

> lzumo c82233_g1_i1
TTTCATGTAAGTGTGAAAACATGTTCACTACTCGCAGATGTGGCTCTGCGAAGCGTATAATGTGTT
TAGATGTTTTTGAATATATTGATTAACCTAAAACAAAACATAAAAACCTTAAGGATTGCCGATGT
GAACTATGGTarget8 TGATGAAAACACAGAGATCTCACTCATAAAAAGAAAGTTTGTGGTGAACATA
ACAAAGCGTGACACACCCCACTTAAACACACACAAAATCCCCAGAAAGCACTCACTTTCCATAG
CATTAAAGCACCAGCTTGCCTTAAACACGATCACTGATCTGACCCTGGTarget9 CAGGGACACGTTCC
CCCTGAATGGAGCGATGGCATGGTCACGTGGGTGTTTATGAGAGGAATCAGGGATGAGGTAAT
CTCCCGGATTACAGTTTTTTTTCAGAGATTAACAGCCCCAGCCATCCAATCAATCCCGAATAATCCC
CTGTTGGTarget10 AGGAGGAGGGAGACAGGAGGGGTAAAAGATAGCAGCAGATGTTTTCATCAGG
GTTTCTTTGAATGTTTAGTCA

```

Figure 4. Candidate Target Sequence indicated in C82233_g1_i1 gene Sequence (531 bp). Yellow color for Candidate Target Sequence, Orange color for PAM (5'-NGG-3') region and Superscript for No. of Target sequence is Indicated.

```

> lzumo c183992_g1_i1
AGGGTGAGAAGGGAAGTGGGAGCATGAAGAAAGTGGAGTCAGAGGTTTGTGAGTGGGAGACATTT
GCGGCAGGGCAGATTTGAATGTCCGTarget11 TGATGAGGAAATGAAGACAAAGACGTGAGATTAC
ACCTTAACTATCCCACACCGCACATAAAGTATAATTTCTGTGTGTAACCTGAGTGTCCCTGTATCC
AGGGGTGGAAAGATGTCTACAATATCCAGCTCAGTTAGAATCACTGGTarget12 TGTGTTGACTTAAAT
ATTACAAATGCAGAATTGAAAATACTCACATAAAAATGCAAAAAAAGACTACTCTTGAGATGTG
CTCAAAGCCCC

```

Figure 5. Candidate Target Sequence indicated in C183992_g1_i1 gene Sequence (324 bp). Yellow color for Candidate Target Sequence, Orange color for PAM (5'-NGG-3') region and Superscript for No. of Target sequence is Indicated.

```

> Zona pellucida c63950_g1_i1
CCACGGCTCAGATGGTTTACTGCCTAGTGGGTCAGATGGGACCTTTTGCAGTCTGAACTGGGTT
GCTGTTTTGAGTGGCATTTCATGGAGACCTTGTATTTTGGGTTTATGTCTAGTTGGACTCTTGTT
GCCAGGGATCTGCCTCAGGCCATCTTTTGCATTTCCACACAAACGTACAGACAACATGATTCCT
TTCTAAGGGCTCCCTTCACGGGGCACTCCAAATACACTGTGCATGGTarget13GCACCAAAAGGCTC
CAGCTGAGGAACGAGAGCAGGTGAACACTGTCAGAGTACCTGCCACCCAGACTTGCTGGAGA
TCGTTATCAAAGCTGACCTGTTTGGAGTCGGACTCCTGTTGATGTTGATGAGATACGCCCTCGGTarget14
AGTGAAGCCCGATGAGTTCTGTAGAGCTGCAGCATCTTCAGAAGATGAGTACAAGATCGTT
GTTGGATTAGTGGACTGCGGGACCAAACTGGATGGATGAATCCGTTCTGGCCTACACAACC
TCCTCATATACTCTCCTGTGGTarget15CCTCCCCAGGTGGGGTGACTCGAATGGATGAGGCTGTAAT
TCCAATTGAGTGTATTACAAAAGGAAATACAATTTGTCTAGTTCTTCGCTCCTGCCTACCTGGAT
CCCCTTCATGTCTACCCAAGCTGCAGTGGAAACCTTGGAGTTAACTTGAGAATTATGACAAATG
ACTGGCAGTATAAAAGAAGCTCTAACGTGTTTACTTCGGTarget16GGATCTCATCGGCCTCGAAGC
CTCTGTCAGAGTTGGGTATCACATGGGGCTCAGAGTATTTGTGAGCAGCTGTGTGGCCACACTT
GACCCAGACATAAACTCTGTTCCAGATATGTCTTCATTGAAAACGGGTGCTTGGTarget17TTGACT
CCATGGTTCCAGGTTCAAAGTCTCACTACTTAGTCAGGACACAGGATGACAACTCCACTTGATG
ATTGATGCCTTTAAATTTACATAATGAGGACAGAGCAGAGCTCTACATCACATGTCAACTGAATGC
TGTGCCAGTAATGATGCAGAGGCACCAATAAGGTarget18CGTGCACCTTTTGTCAATGATAGATG
GAGATCGGCAGATGGTAACGACTACTTATGCCAGTATTGTACAAATCAAAATATAGGTGGCCAA
ACCCACCATAAGCCCAGCAGCTCTGGCAAGTTTGGTAAGGTGGCTGAATCCAAACCTTCTGGG
AGAGCGGACTGAAGCGCAATGAAGTGTGGCATCAGGAGGCAAGACTGGGTCCAATGCTGGTCT
TGCCAGGTarget19TAAACAGAAGACTGAGCATCTACCTGTAGAAGAGCTTCTCCCGTTCCCAATA
AAAGCAGCAGACCTGCACTGTATGGCAGCCAGTGGAGAGGTGGAATAACTTTACAGAAAAGACG
AGATGGGACTGCTTCCACCTACACCAGACCAGGTGGCTGAGACGTTTTCTTCTGAACAGAAAGA
TGTCAAAAGTAAACGGATCTAAAAGATGAAGATGCAGAAAGTGAAGTTGCTGCATCTCTAGAA
AGGTTGGTarget20GTCCTGAGTTGACTTGAAGCGATAGAGGCAGCACTGGACCCTAACGGCAC
AGCAGCCCTCAGTGATGTCATCCCACGGCTCAGTTTACGATGGATGTGACTAACTGTCAAAC
ACAAGTCTACAGAATCTGACCTTTCAGCTGCAAATGACCCAAGAGTGAATGAACAATAAAA
ATAGTTTGCCTTCTGAGGTCTAATTGGTarget21

```

Figure 6-1. Candidate Target Sequence indicated in C63950_g1_i1 gene Sequence (2,850 bp). Yellow color for Candidate Target Sequence, Orange color for PAM (5'-NGG-3') region and Superscript for No. of Target sequence is Indicated.

```

> Zona pellucida c63950_g1_i1 (continuous)
CAGTAAAGTCTGATGTTGCACAGGTTTTTTTTTTTTTTTTTCCCTGTTTATCTGATGTAATCAAC
TGAAACTTTAAATGCCACTCTAAAATTAACCTTTGGAGAAAGCAAATGTTTGCATTTATGAGC
CACTGACTTTTTATTTGAATGTCTTTGTTTTAAGTTCAAGTTTTCACTTAAATTGGTarget22CAATCTC
TAGTATGCATCCTGTCTTTCCAGTGTGAACACACTTCATACTCAACCTGCCTAGAATTGGTAATT
ATGTGGGACACAACAGTCATCACTACTATGGAAAATAAATAACAAGCGTTTGCATGAAAAAT
GGTTCTATGGCTTAAAGCATGTGCACTGAGTAACAGTAAAATGTAATAAACTTGTCTGCTGTTT
CCACTACTGGGAATGTACATTAGTGAACCATTATGCTTAAAGTTATGGTarget23AAGTCCTGAG
ATGTTCAAAATGTTGACTCTCATACTAAATGTGCATTGTCTGTCAGGTGTGCTCACAATCTCCTG
AATGATTTTTGAGGCAGTGAAAAATGAGGTarget24AAGGCCAGATTGCAAAGACTAAGTGAATGCA
AATAGACGGTGTCTTTGTGCTGTGTTTCAGTAGATTTAAAGCTAGTTTAGCAGATGGGACTGTT
TAGACTTCCAACCTCCCGTGTGTATTGCGGACTCCTCCATGATTGTGGTarget25TGAAGGCTGGCGGT
ACAACAACGGATGTTACTCCTAGAGAGCTTTACTTGGGAGAAGCAGAACAGTCAGTGCTGGTGA
TGCTGACTGCTAGTTACAATGGCATCACAAGGATGACATGCTGTAGTTTCGTGTTTCTGCCTCTC
TAAAAGTCTGCCTTCTCACTCAAGCTGATGACAGATTTATATCATGCCAGCTGAAAGCTACCT
CTGAAATGTGGTarget26AGCAGCAGTCCCATCAACAAGGTCTTCAATTATGTACATTCAAGATGGTarget27
GAAAATGTGGATGGGGGAGATGATGTATGTCAATGTTGTCGCAACACTTAGAAAGATGAGAC
AAATCTGAGACGTCTGATCCCTGAAGATACCATGGCATGTGACACCGTAACCCCTTGATTTTCCC
CAGCAAGTAGACAAGATTACAGTCATAAACAGTGC

```

Figure 6-2. Candidate Target Sequence indicated in C63950_g1_i1 gene Sequence (2,850 bp). Yellow color for Candidate Target Sequence, Orange color for PAM (5'-NGG-3') region and Superscript for No. of Target sequence is Indicated.

Table 9. Target sequences for application of CRISPR/Cas9 system

Protein	Contig No.	Target No.	Target Sequence (5'→3')
IZUMO1	C69849_g1_i1 (1,357 bp)	2	AGTCCTCTCTGCTCCCACTG
		3	GAAAATCTTAGAGAAACACT
		5	CAGCTGCATGTGGATGAACA
		6	ACTCTGCCCTCCCTGCCTCA
	C82233_g1_i1 (531 bp)	8	AGGATTGCCGATGTGAACTA
		9	CACGATCACTGATCTGACCC
		10	AATCCCGAATAATCCCTGT
	C183992_g1_i1 (324 bp)	11	GGCAGGGCAGATTGAATGT
		12	TCCAGCTCAGTTAGAATCAC
		13	CACTCCAAATACACTGTGCA
		14	GATGTTGATGAGATACGCCT
		15	CCTCCTCATATACTCTCCTG
16		AGCTCTAACGTGTTTTACTT	
Zona pellucida sperm-binding protein	C63950_g1_i1 (2,850 bp)	18	TGATGCAGAGGCACCAAATA
		20	TGCTGCATCTCTAGAAAGGT
		21	TTTGCTTTCTGAGGTCTAAT
		22	GTTCAAGTTTTCACTTAAAT
		23	ACCATTATGCTTTAAAGTTA
		24	TTTTGAGGCAGTGAAAAATG
		25	TGCGGACTCCTCCATGATTG
		26	TGAAAGCTACCTCTGAAATG

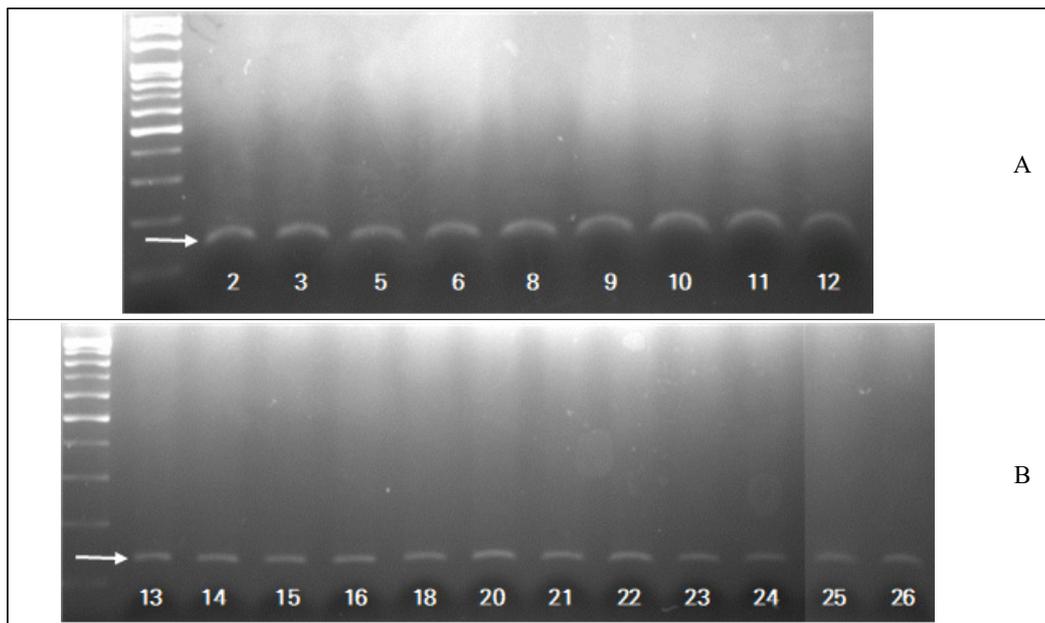


Figure 7. Gel electrophoresis of the sgRNA Templates (arrow: 130 bp band). (A) Lane1: 100 bp DNA marker, Lanes 2 to 9: sgRNA Templates for each target sequence No. 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, (B) Lane1: Marker, Lanes 2 to 12: sgRNA Templates for each target sequence No. 13, 14, 15, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26.

Table 10. Synthesis of sgRNA

Protein	Contig No.	Target No.	Synthetic amount (ng/ μ l)
IZUMO1	C69849_g1_i1 (1,357 bp)	2	833.15
		3	766.32
		5	825.95
		6	715.55
	C82233_g1_i1 (531 bp)	8	1004.30
		9	841.43
		10	902.29
	C183992_g1_i1 (324 bp)	11	914.12
		12	601.95
	Zona pellucida sperm-binding protein	C63950_g1_i1 (2,850 bp)	13
14			866.14
15			789.30
16			1027.20
18			828.77
20			653.07
21			364.87
22			364.79
23			729.56
24			323.55
25			666.42
26			827.10

4. sgRNA 효율성 Screening

제작한 sgRNA가 Target sequence를 인식할 수 있는지 확인하기 위해 Target sequence 절단 여부를 Agarose 전기영동 방법으로 실험한 Target별 sgRNA Screening 결과는 다음과 같다(Figure 8, 9, 10, 11). IZUMO1 (C69849_1_i1)의 경우, Target 3과 5를 인식하는 sgRNA가 정상적으로 작동하여 sequence의 절단 현상이 나타났고, Target 2와 6을 인식하는 sgRNA는 정상적으로 작동하지 않아 sequence의 절단 현상이 나타나지 않았다(Figure 8). IZUMO1 (C82233_g1_i1)의 경우, Target 8, 9, 10을 인식하는 sgRNA가 정상적으로 작동하여 sequence의 절단 현상이 나타났다. Target 8과 10에서는 Uncleaved fragment가 절단된 것은 확인되었으나 cleaved fragments 2개 중 1개는 200bp 이하이기 때문에 전기영동 결과인 gel band의 육안 식별이 안 되는 것으로 추정되었다(Figure 9). IZUMO1 (C183992_g1_i1)의 경우, Target 11과 12를 인식하는 sgRNA가 정상적으로 작동하여 sequence의 절단 현상이 나타났다. Target 11과 12에서는 Uncleaved fragment가 절단된 것은 확인되었

으나 cleaved fragments 2개 중 1개는 200 bp 이하이기 때문에 전기영동 결과인 gel band의 육안 식별이 되지 않는 것으로 추정되었다(Figure 10). Zona pellucida sperm-binding protein (C63950_g1_i1)의 경우, 모든 Target 13, 14, 15, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26을 인식하는 sgRNA가 정상적으로 작동하여 sequence가 절단된 것을 확인하였다. Target sequence 23, 24, 25에서는 Uncleaved fragment가 절단된 것은 확인하였으나 cleaved fragments 2개 중 크기가 작은 cleaved fragment는 구분이 되지만 크기가 큰 cleaved fragment는 Uncleaved fragment와 육안 구분이 되지 않았다(Figure 11-1, 11-2, 11-3). sgRNA 효율성 Screening 결과에서 정상 작동하는 sgRNA는 IZUMO1 (C69849_g1_i1)의 경우에는 Target sequence 3과 5, IZUMO1 (C82233_g1_i1)의 경우에는 Target sequence 9, Zona pellucida sperm-binding protein (C63950_g1_i1)의 경우에는 Target sequence 13, 14, 15, 16, 18, 20, 21, 22, 26으로 확인되었다.

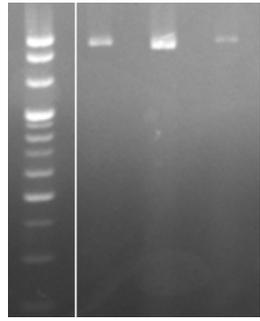
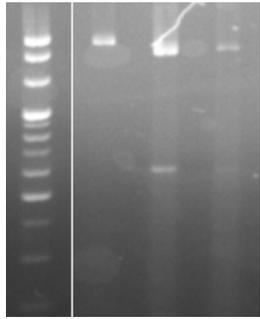
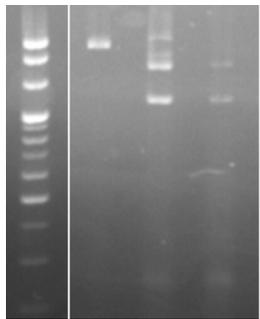
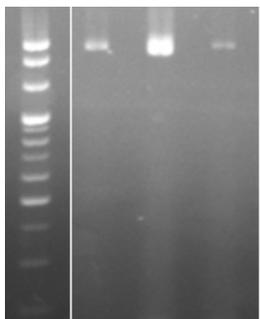
Protein	Contig No.	Target No.	Result of sgRNA screening
IZUMO1	C69849_g1_i1 (1,357 bp)	2	 ← Uf
		3	 ← Uf ← Cf
		5	 ← Uf ← Cf
		6	 ← Uf

Figure 8. sgRNA Screening Result by Target sequence of IZUMO1 (C69849_g1_i1)

* Lane1: Marker, Lane2 : Uncleaved fragment, Lane3: B1 Cleaved fragments, Lane4: B2 Cleaved fragments.
 → Uf: Uncleaved fragment, → Cf: Cleaved fragments

Protein	Contig No.	Target No.	Result of sgRNA screening
IZUMO1	C82233_g1_i1 (531 bp)	8	
		9	
		10	

Figure 9. sgRNA Screening Result by Target sequence of IZUMO1 (C82233_g1_i1)

* Lane1: 100bp DNA Marker, Lane2 : Uncleaved fragment, Lane3: B1 Cleaved fragments, Lane4: B2 Cleaved fragments.
 → Uf: Uncleaved fragment, → Cf: Cleaved fragments

Protein	Contig No.	Target No.	Result of sgRNA screening
IZUMO1	C183992_g1_i1 (324 bp)	11	

Protein	Contig No.	Target No.	Result of sgRNA screening
		12	

Figure 10. sgRNA Screening Result by Target sequence of IZUMO1 (C183992_g1_i1)

* Lane1: 100bp DNA Marker, Lane2 : Uncleaved fragment, Lane3: B1 Cleaved fragments, Lane4: B2 Cleaved fragments.

→ Uf: Uncleaved fragment, → Cf: Cleaved fragments

Protein	Contig No.	Target No.	Result of sgRNA screening
Zona pellucida sperm-binding protein	C63950_g1_i1 (2,850 bp)	13	
		14	
		15	

Protein	Contig No.	Target No.	Result of sgRNA screening
		16	

Figure 11-1. sgRNA Screening Result by Target sequence of Zona pellucida sperm-binding protein(C63950_g1_i1)
 * Lane1: 100bp DNA Marker, Lane2 : Uncleaved fragment, Lane3: B1 Cleaved fragments, Lane4: B2 Cleaved fragments.
 → Uf: Uncleaved fragment, → Cf: Cleaved fragments

Protein	Contig No.	Target No.	Result of sgRNA screening
Zona pellucida sperm-binding protein	C63950_g1_i1 (2,850 bp)	18	
		20	
		21	

Protein	Contig No.	Target No.	Result of sgRNA screening
		22	

Figure 11-2. sgRNA Screening Result by Target sequence of Zona pellucida sperm-binding protein(C63950_g1_i1)
 * Lane1: 100bp DNA Marker, Lane2 : Uncleaved fragment, Lane3: B1 Cleaved fragments, Lane4: B2 Cleaved fragments.
 → Uf: Uncleaved fragment, → Cf: Cleaved fragments

Protein	Contig No.	Target No.	Result of sgRNA screening
Zona pellucida sperm-binding protein	C63950_g1_i1 (2,850 bp)	23	
		24	
		25	

Protein	Contig No.	Target No.	Result of sgRNA screening
		26	

Figure 11-3. sgRNA Screening Result by Target sequence of Zona pellucida sperm-binding protein (C63950_g1_i1)
 * Lane1: 100bp DNA Marker, Lane2 : Uncleaved fragment, Lane3: B1 Cleaved fragments, Lane4: B2 Cleaved fragments.
 → Uf: Uncleaved fragment, → Cf: Cleaved fragments

5. Cas9-sgRNA ribonucleoprotein(RNP) complex 제작

sgRNA 효율성 Screening 결과 cleaved fragments 2개 중 1개라도 육안 구분이 안 되는 경우는 Cas9-sgRNA ribonucleoprotein (RNP) complex 제작에 사용하지 않고 Target sequence 절단이 명확하게 확인되는 sgRNA 12종을 이용하여 Cas9-sgRNA ribonucleoprotein (RNP) complex 를 제작하였다.

고 찰

최근까지 생태교란어종인 배스(*Micropterus salmoides*)의 생태 및 생식적 특성에 기반하고 있는 다양한 관리 방법, 즉 낚시법, 투망법, 정치망법, 자망법, 죽대법, 펌핑법, 작살법, 전기충격법, 인공 산란장법, 천적법 등이 제시되고 있으나 실제적인 시행의 결과와 효과의 검증은 미흡한 상황이라 할 수 있다.

2014년과 2020년에 국립공원연구원에서는 소백산국립공원의 금계저수지, 속리산국립공원의 삼가저수지, 내장산국립공원의 내장저수지의 어류상을 조사하여 블루길과 배스에 의한 한국 고유종의 개체수 영향과 제거 방식의 효율성을 분석하였다. 2014년과 비교하면 2020년 조사에서 금계저수지의 경우, 배스가 가장 높은 비율로 서식하고, 블루길의 새로운 서식이 확인되었고, 과거에 출현했었던 붕어(*Carassius auratus*), 돌고기(*Pungtungia herzi*), 자가사리(*Liobagrus mediadiposalis*), 얼룩동사리(*Odontobutis interrupta*), 갈문망둑(*Rhinogobius giurinus*)은 출현하지 않았고, 참갈겨니(*Zacco koreanus*)와 피라미(*Zacco platypus*), 메기(*Silurus asotus*), 밀어(*Rhinogobius brunneus*) 등은 급격하게 감소한 것으로 나타났다. 삼가저수지의 경우, 배스가 급격하게 증가

하였고, 과거에 출현했었던 빙어(*Hypomesus nipponensis*), 가물치(*Channa argus*)가 출현하지 않았고, 참물개(*Squalidus chankaensis tsuchigae*), 피라미, 밀어 등은 급격하게 감소한 것으로 나타났다. 내장저수지의 경우, 배스가 처음으로 확인되었고, 과거에 출현했었던 잉어(*Cyprinus carpio*), 납자루(*Acheilognathus lanceolata*), 흰줄납줄개(*Rhodeus ocellatus*), 왜매치(*Abbottina springeri*), 참붕어(*Pseudorasbora parva*), 점줄종개(*Cobitis lutheri*), 메기, 빙어, 대륙송사리(*Oryzias sinensis*), 갈문망둑, 가물치(*Channa argus*) 등 12종이 출현하지 않았다. 국립공원연구원은 이 연구 결과로 2020년에 소형 어류의 개체수 급감이나 소멸은 생태계교란 생물로 지정된 포식성이 강한 육식성 어종인 배스에 의한 것으로 추정하였고, 블루길과 배스의 출현 개체수를 산정, 비교했을 때 현재 제거방식의 효율성에 대하여 재고할 필요가 있다고 보고하였다(NPRI, 2014; NPRI, 2020).

확산방지 및 관리를 위한 기술적인 대처 방안 중 인공 산란장법은 배스의 생식 습성을 이용하여 산란을 유도한 후 수정란을 제거하는 번식 차단방식으로서 다른 방식에 비해 수백 개에서 1만개에 이르는 상당수의 개체를 한 번에 포획, 제거할 수 있는 유일한 방법이지만 인공 산란장을 설치하더라도 그 외의 산란장소가 있는 경우에는 알의 포획 효과가 낮다는 단점을 갖고 있다(ME, 2012). 본 연구의 내용은 인공 산란장법이 수정란 상태에 있는 상당수의 개체를 한꺼번에 포획, 제거할 수 있는 효과를 가진다는 장점과 적절한 산란장소가 있는 경우 포획, 제거 효과가 낮다는 단점에서 착안하였다. 상당한 시간, 경비, 인력을 필요로 하는 성체 배스의 포획, 제거 방식 보다는 수정란 상태에서 다수의 개체를 한꺼번에 포획하는 방식이 효율적이지만 단점을 보완하여 수정란 포획 방식보다는 수정 이전의 상태에서 번식을 차단하는 방식이 훨씬 더 효율적일 것이라고 판단하

고 번식행동은 하지만 수정란은 형성하지 못하는 불임개체의 유도 방법을 모색하였다.

최근에는 유전자 편집기술의 발전과 더불어 CRISPR/Cas9 system을 질환매개 해충의 방제에 이용하여 곤충 매개질환의 전파 차단에 활용하기도 한다. Kyrou *et al.*(2018)의 연구에서는 말라리아를 일으키는 원충을 매개하는 얼룩날개모기(*Anopheles gambiae*)를 대상으로, 생식 능력을 부여하는 특정 유전물질을 유전자 가위로 잘라 유전자를 편집하여 모기의 불임을 유도하고 불임 모기와와 세대별 교미를 통해 모기를 박멸시켜 실험에 사용된 ‘모기 가계’가 모두 멸종하는 것을 확인하였다. Zheng *et al.*(2019)의 연구에서는 소두증을 유발하는 지카바이러스를 매개하는 이집트 숲모기(*Aedes aegypti*)를 대상으로, 모기 수컷에 방사선을 조사하여 불임을 유도한 후 무정자 모기로 번식이 불가능하게 하였고, 유전자 조작 기술로 유충이 자라지 않는 유전자를 수컷에 삽입하여 교미 후 알에서 태어난 유충이 성충으로 자라지 못하고 죽도록 만들어 번식을 차단하는 방법으로 누적 모기 퇴치율 82%를 달성하였다. 이러한 두 연구는 인간에게 질환을 유발하는 병원체를 매개하는 곤충의 불임개체를 이용하거나 유전자 조작 기술로 번식을 차단함으로써 인류의 건강에 악영향을 미치는 생물종 퇴치 방법의 유용성을 입증한 사례라고 할 수 있다.

본 연구에서 가장 먼저 수행한 실험은 유전자 편집을 위한 생식세포의 표적 유전자 선별 즉, 종 특이적 정자-난자 인식 단백질을 암호화하는 유전자의 탐색이었다. 생식세포 유전자 편집에 앞서 표적 유전자 선별과정에 필수적인 배스의 유전자 정보 즉, whole genome sequencing(WGS) 자료가 전무했기 때문에 본 실험에서는 Transcriptome *de novo* Sequencing (RNAseq.)을 수행하여 배스의 Transcript 정보를 획득하였다 (Fu and He, 2012; Zhao *et al.*, 2018). 배스의 Transcriptome 분석 결과, 각 샘플별 약 100million sequencing reads를 *de novo assembly*하여 전체 trinity transcript는 243,117개를, 전체 trinity 유전자는 189,512개를 얻었고, 전체 Unigene contigs는 182,887개 확인하였다. 7종의 데이터베이스를 참고하여 이미 알려진 단백질과 sequence 유사성을 조사한 blastX 분석 결과, 63,662개(34.81%) 유전자가 annotation되어 정자-난자 인식단백질을 발현하는 유전자를 탐색하기에 충분한 데이터베이스를 구축하였다고 판단된다. 획득한 배스의 Transcript 정보로부터 유전자를 탐색할 때에는 정자-난자 인식단백질을 발현하는 유전자의 서열 정보에 집중할 수 있도록 편집 대상 단백질의 종류를 최소로 제한하였다. 정자-난자 인식단백질과 관련한 키워드 ‘Sperm’, ‘Zona Pellucida’, ‘IZUMO’, ‘Acrosome’ 으로 검색하여 Contig들을 1차 선별하고, 7종의 데이터베이스에서 모두 검색되면서 Blast 참조 유전자 서열과의 유사도가 80% 이상 되는 contig들을 2차

선별한 결과, 단백질은 2종, 단백질과 관련된 contig는 4개가 산출되었다. IZUMO1 단백질의 경우 3개의 contig, Zona pellucida sperm-binding protein의 경우 1개의 contig가 산출되었다. 선별된 각 contig별로 PAM (5'-NGG-3')을 가진 20bp의 염기서열을 탐색한 결과 총 27개의 후보 서열이 선정되었고, 배스의 genomic DNA 내 존재여부와 인트론 삽입 여부를 확인한 결과로 총 21개 최종 Target sequence가 선정되어 유전자 편집의 높은 성공률이 보장되었다고 판단된다. 최종 선정된 Target sequence에 유전자 편집기술을 적용할 수 있도록 sgRNA를 제작하고, 제작된 sgRNA의 효율성을 검증한 결과 IZUMO1의 C69849_g1_i1은 Target 3, 5, C82233_g1_i1은 Target 9, 그리고 Zona pellucida sperm-binding protein의 C63950_g1_i1은 Target 13, 14, 15, 16, 18, 20, 21, 22, 26, 총 12개 sequence가 도출되었다. Target sequence의 절단이 확인된 sgRNA 사용은 유전자 편집 성공률을 상당히 높은 수준에 까지 이르게 할 것이라고 기대한다. Target sequence 절단이 명확하게 확인되는 sgRNA 12종을 이용하여 Cas9-sgRNA ribonucleoprotein (RNP) complex를 제작하였고, 제작한 RNP complex는 후속 연구에 활용할 계획이다.

후속 연구 내용은 다음과 같다. 배스의 산란 시기에 수컷의 정자와 암컷의 난자를 채취한 후 수정을 유도하고 수정된 수정란에 microinjector로 RNP를 주입함으로써 종 특이적인 정자 또는 난자 인식 단백질의 암호화된 염기서열 (Target sequence)을 편집한다(Elaswad *et al.*, 2018). 유전자 편집으로 번식행동은 하지만 수정란을 형성하지 못하는 생식세포를 생산하는 불임개체를 유도한다. 불임이 유도된 개체를 이용하여 개체군 감소의 효과는 메조코스(mesocosm) 방식(Graney *et al.*, 1994)을 활용한 실험실적 검증을 거친 다음 저수지별 현장 검증으로 확인할 계획이다.

자연계에 유입된 생태계교란어종을 멸종단계까지 박멸한다는 것은 사실상 불가능하므로 일정 수준 이하로 밀도를 감소시키면 토종 어류들의 경쟁력이 상대적으로 증가하여 생태계가 자연스럽게 균형을 이룰 수 있으므로 본 연구는 현실적으로 매우 유용한 생태교란어종 관리방안 수립에 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

본 연구에서는 배스의 종 특이적 정자-난자 인식 단백질을 암호화하는 유전자를 탐색하였고, CRISPR/Cas9 시스템을 활용하여 수정 과정에 필수적인 종 특이적 인식부위를 유전자 편집을 통해 발현되지 않도록 유도하는 불임유도 조성물의 개발 과정을 확립하였다. 그리고 배스와 동일한 수생태계에 속해 있는 고유 생물종의 서식에는 영향을 미치지 않는 효율적인 생태교란종 관리 방안으로서의 유용성을 검증하기 위한 후속 연구의 귀중한 기초 자료를 확보하는데 기여했다고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 국립공원공단 국립공원연구원 「생태계교란 어종 관리방안 연구」의 일환으로 수행되었습니다. 도움을 주신 모든 분께 감사드립니다.

REFERENCES

- Avella, M.A., B. Baibakov and J. Dean(2014) A single domain of the ZP2 zona pellucida protein mediates gamete recognition in mice and humans. *Journal of Cell Biology* 205(6): 801-9.
- Bianchi, E. and G.J. Wright(2015) Cross-species fertilization the hamster egg receptor, Juno, binds the human sperm ligand, Izumo1. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 370(1661): 20140101.
- Bianchi, E., B. Doe, D. Goulding and G.J. Wright(2014) Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* 508(7497): 483-7.
- Elaswad, A., K. Khalil, D. Cline, P.P. McCaw, W. Chen, M. Michel, R. Cone and R. Dunham(2018) Microinjection of CRISPR/Cas9 Protein into Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*, Embryos for Gene Editing. *Journal of Visualized Experiments* 20(131):56275.
- Foltz, K.R. and W.J. Lennarz(1992) Identification of the sea urchin egg receptor for sperm using an antiserum raised against a fragment of its extracellular domain. *Journal of Cell Biology* 116(3): 647-58.
- Fu, B. and S. He(2012) Transcriptome Analysis of Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by Paired-End RNA Sequencing. *DNA Research* 19: 131-142.
- Gantz, V.M., N. Jasinskiene, O. Tatarenkova, A. Fazekas, V.M. Macias, E. Bier and A.A. James(2015) Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(49): E6736-43.
- Graney, R.L., J.H. Kennedy and J.H. Rodgers(1994) Aquatic mesocosm studies in ecological risk assessment. Lewis Publishers, pp.69-176.
- Hashimoto, M. and T. Takemoto(2015) Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing. *Scientific Reports* 5: 11315.
- Herberg, S., K.R. Gert, A. Schleiffer and A. Pauli(2018) The Ly6uPAR protein Bouncer is necessary and sufficient for species-specific fertilization. *Science* 361(6406): 1029-1033.
- Hirohashi, N., N. Kamei, H. Kubo, H. Sawada, M. Matsumoto and M. Hoshi(2008) Egg and sperm recognition systems during fertilization. *Development, Growth & Differentiation* 50(Suppl 1): S221-S238.
- Kim, I.S.(1997) Illustrated encyclopedia of fauna & flora of Korea. Vol. 37. Freshwater fishes. Ministry of Education, Seoul, Korea, 629pp. (in Korean)
- Klangnarak, W., T. Fukuyo, M.D. Rezanujjaman, M. Seki, S. Sugano, Y. Suzuki and T. Tokumoto(2018) Candidate gene identification of ovulation-inducing genes by RNA sequencing with an in vivo assay in zebrafish. *Plos One* 13(5): e0196544.
- KNPS(Korea National Park Service)(2020) 2020 National Park basic statistics. Korea National Park Service, Wonju, Korea, 31pp. (in Korean)
- Kyrou, K., A.M. Hammond, R. Galizi, N. Kranjc, A. Burt, A.K. Beaghton, T. Nolan and A. Crisanti(2018) A CRISPR-Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Nature Biotechnology* 36(11): 1062-1066.
- Lehmann, R.(2018) Matchmaking molecule for egg and sperm. *Science* 361(6406): 974-975.
- Martyniuk, C.J., M.S. Prucha, N.J. Doperalski, P. Antczak, K.J. Kroll, F. Falciani, D.S. Barber and N.D. Denslow(2013) Gene expression networks underlying ovarian development in wild largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Plos One* 8(3): e59093.
- ME(Ministry of Environment)(2010) A study on the effective removal plan of invasive species using artificial spawning bed. Ministry of Environment, Sejong, Korea, 104pp. (in Korean)
- ME(Ministry of Environment)(2012) Standardization of technology and method for restoration of Han river ecosystem. Ministry of Environment, Sejong, Korea, pp.20-29. (in Korean)
- Miwa, N.(2015) Protein-Carbohydrate Interaction between Sperm and the the Egg-Coating Envelope and Its Regulation by Dicalcin, a *Xenopus laevis* Zona Pellucida Protein-Associated Protein. *Molecules* 20(5): 9468-86.
- Nelson, J.S.(2006) *Fishes of the world*(4th ed.). John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 601pp.
- NFRDI(National Fisheries Research & Development Institute) (2011) A effect research of artificial spawning bed in inland water, 2010. National Fisheries Research & Development Institute, Gapyeong, Korea, 116pp. (in Korean)
- NIER(National Institute of Environmental Research)(1995) Survey for ecological impact by naturalized organisms (I). National Institute of Biological Resources, Incheon, Korea, pp.1-215. (in Korean)
- NPRI(National Park Research Institute)(2014) A study on the management of specific foreign species. National Park Research Institute, Wonju, Korea, 140pp. (in Korean)
- NPRI(National Park Research Institute)(2020) A study on the

- management of invasion fishes. National Park Research Institute, Wonju, Korea, 64pp. (in Korean)
- Raj, I., H.S.A. Hosseini, E. Dioguardi, K. Nishimura, L. Han, A. Villa, D.D. Sanctis and L. Jovine(2017) Structural basis of egg coat-sperm recognition at fertilization. *Cell* 169(7): 1315-1326.
- Trionnaire, G.L., S. Tanguy, S. Hudaverdian, F. Gleonnec, G. Richard, B. Cayrol, B. Monsion, E. Pichon, M. Deshoux, C. Webster, M. Uzest, A. Herpin and D. Tagu(2019) An integrated protocol for targeted mutagenesis with CRISPR-Cas9 system in the pea aphid. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 110: 34-44.
- Vicens, A., L. Lüke and E.R.S. Roldan(2014) Proteins Involved in Motility and Sperm-Egg Interaction Evolve More Rapidly in Mouse Spermatozoa. *Plos One* 9(3): e91302.
- Zhao, C., P. Wang and L. Qiu(2018) RNA-Seq-based transcriptome analysis of reproduction and growth related genes in *Lateolabrax japonicus* ovaries at four different ages. *Molecular Biology Reports* 45: 2213-2225.
- Zheng, X., D. Zhang, Y. Li, C. Yang, Y. Wu, X. Liang, Y. Liang, X. Pan, L. Hu, Q. Sun, X. Wang, Y. Wei, J. Zhu, W. Qian, Z. Yan, A.G. Parker, J.R. Gilles, K. Bourtzis, J. Bouyer, M. Tang, B. Zheng, J. Yu, J. Liu, J. Zhuang, Z. Hu, M. Zhang, J.T. Gong, X.Y. Hong, Z. Zhang, L. Lin, Q. Liu, Z. Hu, Z. Wu, L.A. Baton, A.A. Hoffmann and Z. Xi(2019) Incompatible and sterile insect techniques combined eliminate mosquitoes. *Nature* 572(7767): 56-61.