

감자 특이 Internal Control DNA 증폭용 Primer와 이를 이용한 유전자 변형 감자의 경쟁적 이중 PCR 검정법

서효원* · 이정운 · 조현묵 · 김승열
농촌진흥청 고령지농업시험장

Primer for the Potato Specific Internal Control DNA and Screening Method for the Genetically Modified Potatoes by Competitive Duplex-PCR

SEO, Hyo Won* · YI, Jung Yoon · CHO, Hyun Mook · KIM, Sung Yeul

Highland Crop Research Division, National Highland Agricultural Experiment Station, RDA, Pyongchang 232-955, Korea

ABSTRACT We report the new method for the screening of genetically modified potato by competitive duplex-PCR using the potato specific single oligomer primer for the internal control and CaMV 35S promoter or NOS terminator specific primers. The single oligomer primer (rAGU4A) amplify the potato specific internal control band from the homozygous potato genomic DNA in the RAPD profiles of all analyzed potato varieties. The 530 bp internal control DNA was amplified independently to CaMV 35S promoter or NOS terminator DNA and identified as repetitive or microsatellite DNA of potato (AF541972). With this new technique, the transgenic potatoes which were transformed with vectors contained the different foreign genes are analyzed. In case of the commercialized transgenic potato varieties, 'New Leafs', those two genetic factors are used for promoter and terminator respectively. So, this new PCR technique should be a promising method of cost effective and accurate screening for the commercialized GM potatoes on market.

Key words : Duplex-PCR, GMO screening, internal control, potato

서 론

유전자 변형 농산물의 안전성에 대해 국제적으로 논란이 제기되고 있음에도 불구하고 2001년도 유전자 변형작물의 재배 면적은 세계적으로 5천만 ha를 넘어섰다 (James 2002). 유전자 변형 감자는 콩과 옥수수에 비해 재배 면적이 적고 (Hall 2002), 국내 수입 가능성이 상대적으로 낮은 것으로 판단된다. 그러나 1996년 미국에서 'New Leaf' 품종 감자가 상용화된 바 있고, 감자의 주요 수입국들이 미국, 호주 등 유전자 변형 농산물의 주요 재배국들임을 감안해 볼 때 (James 2002), 국내로의 유전자 전환 감자의 수입 가능성도 배제할 수 없다.

최근 유전자 변형 농산물의 유해성 여부와는 별도로 유통과정에 유전자 변형 여부를 상품에 표기하고 소비자로 하여금 구매여부를 판단하게 하는 단계에 이르게 되었다. 또한 2000년 생명공학안전성의정서 (Biosafety Protocol)가 채택되어 조만간 발효될 것으로 전망되고 있어 유전자 변형 감자의 검정 기술은 향후 농산물 교역과정에도 필요한 기술로 개발될 필요가 있다. 특히 EU, 일본, 호주 등의 경우 GMO 여부표시를 의무화하고 있으며 (Grunst and Kephart 2001), 2002년도부터 우리나라에서도 감자를 포함한 주요작물들의 유전자 변형 농산물 표시제를 시행하고 있다. 유전자 변형 작물의 판별은 도입된 유전자의 발현으로 생성된 단백질을 검정하는 방법 (Elliott et al. 1999)과 도입된 외래 DNA를 직접 검출하는 방법 (Brunnert et al. 2001; Tao et al. 2001; Vickers et al. 1996; Wurz et al. 1999) 등이 개발되어 있다. 그러나 단백질은 가공

*Corresponding author Tel 033-330-7815 Fax 033-330-7715
E-mail shwonkw@rda.go.kr

과정에서 쉽게 변성이 될 수 있고, 항체의 사용에 따른 불리한 점을 가지고 있어 가공된 식품을 대상으로 한 방법으로는 이용이 곤란하다는 단점을 가지고 있다 (Chiueh et al. 2002; Meyer 1999). 따라서 최근에는 GMO screening에 PCR을 이용한 방법, 특히 multiplex-PCR을 이용한 방법들이 개발되어 보편적으로 이용되고 있다 (Hübner et al. 1999; Mannerlöf and Tenning 1997; Tao et al. 2001).

유전자변형 작물을 multiplex-PCR로 검정하기 위해서는 몇 가지 조건이 충족되어야 한다. 우선 유전자 변형 식물체에 도입된 유전자를 증폭할 수 있는 특이 primer가 필요하다. 현재까지 개발되어 이용되고 있는 식물체 형질전환용 운반체의 대부분은 기본적으로 유사한 구조를 가지고 있으며 (Hübner et al. 1999), 공통적인 유전인자로 정상적인 유전자 발현을 위해 필요한 프로모터와 터미네이터를 비롯해 항생제 내성 선발 마커 등의 염기서열 부분을 증폭할 수 있는 primer들을 이용할 수 있다. 가장 보편적으로 포함되는 유전인자는 CaMV 35S 프로모터와 NOS 터미네이터로 현재까지 상품화된 대부분의 유전자 변형 콩과 옥수수를 비롯해 최근 상품화된 'New Leaf' 품종의 감자들도 동일한 유전인자들을 포함하고 있다 (Hübner et al. 1999; Meyer 1999). 또한 PCR 수행이 정상적으로 이루어졌다는 것을 증명하기 위해 유전자 변형 식물과 그렇지 않은 식물에서 분리한 모든 DNA에서 공통적으로 증폭되는 PCR 산물, 즉 internal control을 증폭할 수 있는 primer가 필요하다 (Meyer 1999; Wurz et al. 1999). 이러한 PCR 산물을 얻기 위해서 콩의 경우 lectin 유전자 (Wurz et al. 1999), 옥수수의 경우 zein 유전자 (Meyer 1999)에 특이적인 primer를 많이 이용하고 있다. 감자의 경우 아직 감자 특이적인 internal control을 증폭할 수 있는 primer가 보고된 문헌은 확인되지 않고 있다.

본 연구는 유전자 변형 감자의 screening에 이용할 수 있는 internal control로서 감자 특이적인 control DNA를 탐색하고, 이를 이용한 새로운 이중 PCR 방법을 개발하기 위해 수행되었다.

재료 및 방법

식물재료

분석을 위해 이용한 유전자 전환 감자는 서로 다른 유전자

를 이용해 농촌진흥청 고령지농업시험장에서 개발되어 있는 3품종 4계통의 감자를 이용하였다 (Table 1). 또한 유전자 전환되지 않은 감자 품종들은 농촌진흥청 고령지농업시험장에서 유전자원으로 유지중인 품종들을 이용하였다. 모든 재료는 온실내에서 생육중인 감자의 어린잎을 재료로 이용하였다.

감자 total DNA의 분리

감자잎으로부터 total DNA 분리는 Teresa 등 (1995)이 이용한 방법을 다소 변형하여 수행하였다. 어린 감자 잎으로부터 0.1 g 정도의 조직을 취하여 1.5 mL micro centrifuge tube에 넣고 -80°C로 유지되는 초저온냉동고에서 동결시킨 다음 일회용 tissue grinder로 조직을 파쇄하였다. 이후 0.7 mL의 감자 DNA 추출용 완충용액 [DNA extraction buffer (0.35 M sorbitol, 0.1 M Tris base, 5 mM EDTA (pH 7.5) : nuclei lysis buffer (0.2 M Tris base, 50 mM EDTA, 2 M NaCl, 2% (w/v) CTAB : 5% (w/v) sarkosyl = 2.5 : 2.5 : 1)]을 가하여 잘 섞은 다음 65°C 수조에서 30~120분간 반응시켰다. 이후 0.7 mL의 chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1)을 채워 vortex한 다음 10,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액의 투명한 부분을 회수하여 2/3배의 isopropanol을 가하여 침전된 DNA를 회수하였다. 회수된 DNA는 RNase를 처리하고 정량한 뒤 농도를 200 ng/ μ L로 맞춘 후 PCR 반응의 template로 이용하였다.

PCR용 primer

경쟁적 이중 PCR을 통한 유전자변형 감자의 검정에 이용한 PCR primer로 CaMV 35S 프로모터 특이밴드 증폭용으로는 Lipp 등 (1999)이 제안한 sequence인 sense, 5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3'; anti-sense, 5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'를 이용했다. NOS 터미네이터 증폭용 primer는 Spoth와 Strauss (1999)가 이용한 것으로 sense, 5'-GAATCCTGTTGCCGGTCTTG-3'; anti-sense, 5'-TTATCCTAGTTTGC GCGCTA-3'을 이용하였다. PCR 반응의 internal control 밴드 증폭을 위한 primer는 arbitrary primed (AP)-PCR을 이용해서 고안하였다. AP-PCR용 primer를 합성하기 위한 기본 primer는 SRILS UniPrimer Kit I (Seoulin Scientific, Korea)에 포함된 URP primer들을 이용하였다. 감자의 품종 구분용으로 이용할 수 있는 URP primer를 선별하는 과정에서 실험에 사용한 모든 품종의 감자에서 동일한 크기의 증폭

Table 1. Potato varieties and vectors for transformation used in this study.

Variety	Origin	Vector	Promoter /Terminator	Reference
Dejima	Japan	pGA3b-2	CaMV 35S/ NOS	Seo et al, 2001
Irish Cobbler	USA	pMYE1	CaMV 35S/ NOS	Yi et al, 1998
Superior	USA	pLRCP-1	CaMV 35S/ NOS	Seo, 2001
Superior	USA	pGA3b-2	CaMV 35S/ NOS	Seo et al, 2001

산물을 생성하는 primer를 확인하여 3' 쪽에 특이적 염기서열을 부가하는 방법으로 합성하였다. 또한 유전자 변형 감자의 PCR 판별에 이용할 수 있는 특이 primer들과 Tm 값을 맞추고, primer들 간의 중합체 형성 및 hairpin 구조를 이룰 수 있는 가능성을 줄이기 위해 특이성에 영향을 주지 않는 범위에서 5' 쪽 염기를 제거하는 방법으로 primer를 합성하였다.

PCR

PCR 반응은 최종부피 20 μ L로 맞춘 반응액에 1.0 unit *Taq* polymerase, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 mM dNTPs, 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 40 mM KCl, 100 pmole primer 및 200 ng의 감자 DNA가 포함된 반응액으로 수행하였다. 증폭반응은 Perkin Elmer Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer, USA)를 이용하였다. 감자특이 DNA 밴드를 증폭할 수 있는 primer를 고안하기 위한 random primers는 URP primer를 이용하였다 (Korean Patent No. 97-016981, Seolin, Seoul, Korea). PCR 증폭을 위한 조건은 94°C로 5분간 전변성을 시킨 후 94°C로 20초 (denaturation), 54°C로 40초 (annealing), 72°C로 1분 (extension)의 조건으로 45회 증폭시켰다. 최종 증폭 후 72°C로 7분간 반응하여 증폭을 종료하고 1.5% (w/v) 아가로스 겔 상에서 5.0 V/cm로 40분간 전기영동하여 EtBr 염색 후 UV trans-illuminator로 관찰하고 촬영하였다.

결과 및 고찰

Internal control DNA 증폭용 primer

감자의 DNA에 특이적인 PCR control 증폭용 primer를 탐색하기 위해 AP-PCR을 이용한 RAPD 분석과정에서 증폭되는 감자 특이적 DNA band를 이용하였다. URP primer (Kang et al. 2002)를 이용해 감자의 품종구분을 위한 AP-PCR 산물 중 URP 4 (5'-AGGACTCGATAACAGGCTCC-3')를 이용한 PCR 산물의 전기영동 결과 재료로 이용한 12품종 모두에서 homozygous한 여러 DNA 밴드를 확인하였다 (Figure 1). 이 밴드들 중에 약 530 bp 크기의 target DNA 밴드를 특이적으로 증폭할 수 있는 primer를 합성하기 위해 최초 이용한 primer의 3' 말단에 adenine (A), guanine (G), cytosine (C), thymine (T)이 각각 첨가된 primer들을 합성하여 다양한 품종의 감자 DNA를 이용해 AP-PCR을 수행하였다 (Figure 2). 이 중 adenine (Figure 2B)과 cytosine (Figure 2D)이 첨가된 primer를 이용했을 경우 크기가 서로 다른 특이적 DNA 밴드가 증폭되었으나 이후 유전자 전환된 감자들을 이용한 PCR 결과 cytosine이 부가된 경우 일정범위의 annealing 온도구배 (53~58°C)에서 PCR 산물의 재현성이 낮아지는 것을 확인하였다. 그러나 adenine이 부가된 primer의 경우 동일한

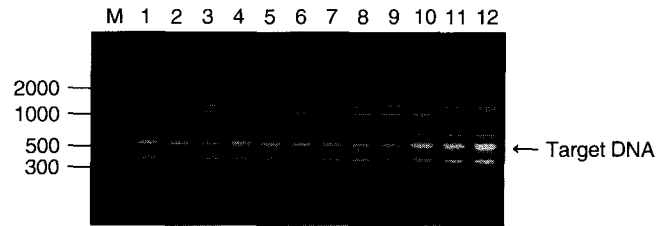


Figure 1. RAPD profile of 12 potato varieties generated by a primer URP4. M, PCR marker; 1, Superior; 2, Dejima; 3, Irish Cobbler; 4, Atlantic; 5, Jopung; 6, Namsuh; 7, Jasim; 8, Desiree; 9, Spunta; 10, Russet Burbank; 11, Snowden; 12, Kennebec.

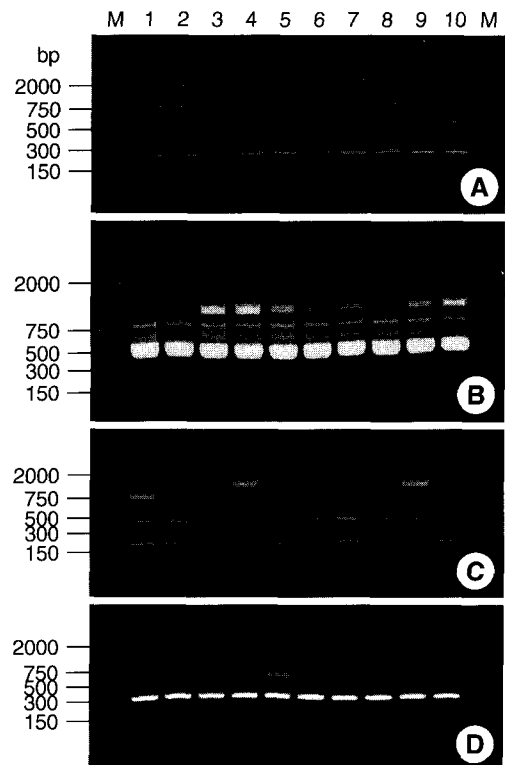


Figure 2. PCR amplified DNA from different potato varieties. All DNAs have been amplified with different specific primers. (A) 5'-AGGACTCGATAACAGGGTCCG-3', (B) 5'-AGGACTCGATAACAGGGTCCA-3', (C) 5'-AGGACTCGATAACAGGGTCC-3', (D) 5'-AGGACTCGATAACAGGGTCCC-3'. M, PCR marker; 1, Superior; 2, Dejima; 3, Irish Cobbler; 4, Atlantic; 5, Shepody; 6, Desiree; 7, Spunta; 8, Russet Burbank; 9, Snowden; 10, Kennebec.

annealing 온도구배에서 수행한 PCR 결과가 비교적 높은 재현성을 갖는 것을 확인하였다. 이 primer를 이용할 경우 한 종의 primer만을 이용해도 감자 특이적인 DNA를 증폭할 수 있었는데, 이러한 점은 여러 종류의 primer들을 이용해야 하는 경쟁적 PCR 수행과정에 primer 들간의 중합체 형성이나 비특이적 증폭산물의 생성 가능성을 낮출 수 있을 것으로 판단되었다. 이 primer가 현재 상품화된 대부분의 형질전환 감자 품종들에 포함된 유전인자인 CaMV 35S promoter와 NOS 터미네이터를 증폭하기 위한 primer들과 동일한 조건에서 독

립적으로 해당 DNA 산물을 증폭하는지를 확인하기 위해 이중 PCR을 수행해 보았으나 primer들 간의 상호 간섭효과로 의심되는 결과를 얻었다 (결과 미제시). 이러한 현상은 합성된 primer의 hairpin 구조형성이나 중합체 형성을 통해 나타나는 것으로 판단되었다. 경쟁적 이중 PCR 수행을 위해 이용되는 primer들 간의 dimer 형성 가능성을 줄이기 위해 특이성에 영향을 주지 않는 범위에서 일부 염기를 변화시키는 경우도 보고된 바 있다 (Tao et al. 2001). 따라서 합성된 primer에서 특이성에 영향을 적게 주면서 hairpin 구조나 중합체 형성 가능성을 줄이기 위해 5' 말단의 염기 adenine과 guanine을 제거한 primer (rAGU4A)를 (5'-GACTCGATAACAGGC TCCA-3') 합성하였다. 이 후 유전자 변형 감자 DNA를 이용한 경쟁적 이중 PCR을 수행한 결과 CaMV 35S 프로모터 혹은 NOS 터미네이터에 특이적인 primer들과 서로 독립적으로 목표 DNA가 증폭되는 것을 확인하였다 (Figure 3).

PCR을 통한 GMO 판별과정에서 internal control DNA의 증폭 과정은 결과의 신뢰성 확보에 필수적인 과정이다 (Meyer 1999; Wurz et al. 1999). 이는 운반체 특이 유전자만을 증폭하여 검정하는 방법은 작물에 대한 특이성과 정확한 PCR 수행 여부를 판단할 수 없어 결과에 대한 신뢰도가 낮아지게 되기 때문이다. 현재까지 개발되어 있는 GMO 판별 기술은 대부분 콩과 옥수수를 대상으로 하고 있으며, 콩의 경우 lectin (Wurz et al. 1999), 옥수수의 경우 zein 단백질 유전자를 증폭할 수 있는 primer를 internal control용 primer로 이용하는 경우가 많다 (Meyer 1999). 감자의 경우 알려진 대부분의 유전자들이 토마토 등의 근연작물과 유전자 염기서열의 유사성이 매우 높으므로 (Bonierbale et al. 1991) 감자 특이적인 유전자를 찾아 internal control로 이용하는 것은 어려울 것으로 판단되었다. 최근 작물 genome 상에 존재하는 특이적 microsatellite 부분을 이용하거나 (Tozzini et al. 2000) 식물별로 특이적인 염기서열 부위 (Anonymous 2002)를 GMO 판별과정의 internal control 증폭용으로 이용하는 경우가 보고된 바 있다.

본 연구 결과는 특정 작물의 GMO 여부 판별을 위해 수행되는 경쟁적 이중 PCR에 필요한 internal control DNA로 작물 고유의 유전자에 특이적 primer를 찾기 곤란할 경우 효율

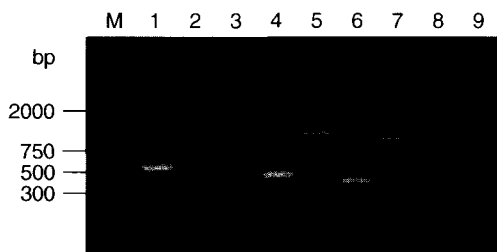


Figure 3. DNA profile of different plant species generated by primer rAGU4A. M, PCR marker; 1, potato; 2, maize; 3, soybean; 4, Chinese cabbage; 5, red pepper; 6, rice; 7, tobacco; 8, tomato; 9, black nightshade.

적인 방법으로 이용할 수 있을 것으로 판단된다. 본 연구에서는 벼의 repetitive DNA 부위에서 고안되어 다양한 생물체의 유전적 다형성 확인에 이용하는 URP primer (Kang et al. 2002)를 최초 arbitrary primer (AP)로 이용하였다. 이들 primer는 AP-PCR을 통한 작물 고유의 DNA sequence를 찾는 데 보다 유리할 것으로 판단되는데, 이는 20 mer 길이의 URP primer가 갖는 높은 annealing 온도와 결과의 재현성이 일반적 RAPD용 primer들 보다 높기 때문이다.

개발된 primer의 감자 특이성

Internal control DNA 증폭을 위해 제작된 single primer를 이용하여 증폭된 DNA 밴드의 염기서열 (KS108446, AF541972)은 BLAST를 이용한 검색결과 유사성이 높은 sequence를 가진 유전자가 검색되지 않았다. 또한 분석된 염기서열은 TC 염기서열의 빈도가 높은 repetitive sequence를 포함하는 intron 혹은 microsatellite 부위에 해당하는 것으로 판단되었다. 합성한 primer가 감자 DNA에 특이적인 밴드를 생성하는지를 확인하기 위해 감자 이외에 옥수수, 콩, 배추, 고추, 벼, 담배, 토마토 등 국내에서 형질전환 연구재료로 사용 빈도가 높은 작물들과 우리나라의 밭 잡초 중 감자와 동일속(屬)인 까마중 (*Solanum nigrum*)에서 추출한 DNA를 이용하여 AP-PCR을 수행하여 사용한 primer의 감자특이성 여부를 확인하였다. 이용한 모든 종의 DNA에서 서로 다른 크기로 증폭되는 amplicon을 확인할 수 있었으며, 특히 배추와 벼의 경우 감자의 경우와 유사한 약 530 bp 크기의 minor band를 확인할 수 있었다 (Figure 3). 그러나 이러한 DNA 증폭 산물을 해당 작물에 특이적인 주요 band로 구분하기는 곤란한 것으로 판단되었다. 또한 감자에서 나타나는 약 1 kb 전후의 증폭 산물은 이 후 형질전환 감자 특이적인 CaMV 35S 프로

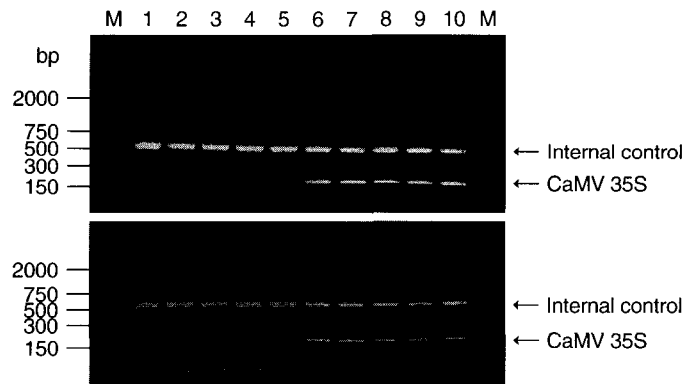


Figure 4. Competitive duplex-PCR amplification of DNAs from transgenic and non-transgenic potatoes. M, PCR marker; 1, Atlantic; 2, Shepody; 3, Russet Burbank; 4, Superior; 5, Dejima; 6-7, Superior transformed by pLRCP-1; 8, Irish Cobbler transformed by pMYE1; 9, Superior transformed by pGA3b-2; 10, Dejima transformed by pGA3b-2.

모터나 NOS 터미네이터 증폭용 primer와의 경쟁적 이중 PCR 과정에서 별다른 영향을 주지 않았다 (Figure 4).

GMO 판별을 위한 이중 PCR

형질전환된 감자와 형질전환에 이용한 것과 같은 품종의 감자 잎에서 분리한 DNA를 주형으로 합성된 primer와 CaMV 35S 프로모터 혹은 NOS 터미네이터 특이 primer를 이용해 경쟁적 이중 PCR을 수행한 결과 GMO 특이 DNA와 internal control DNA가 각각 독립적으로 증폭되었음을 확인할 수 있었다 (Figure 4). CaMV 35S 프로모터와 NOS 터미네이터는 'New Leaf' 품종의 개발에 이용된 형질전환용 운반체들에 공통적으로 포함된 genetic factor들이므로 본 실험과 동일한 방법으로 'New Leaf' 품종 등의 GMO 여부 판별에 적용이 가능할 것으로 판단된다. 현재 상품화되어 있는 'New Leaf' 품종들은 'Superior', 'Atlantic', 'Shepody' 및 'Russet Burbank' 등의 품종을 이용한 것이다. 이들 품종에서의 internal control DNA의 증폭 여부를 확인하기 위해 각각의 품종에서 분리한 DNA를 이용하여 PCR을 수행해 본 결과 동일한 크기의 DNA 밴드를 확인할 수 있었는데 (Figure 4), 동일한 양의 DNA를 이용한 PCR 결과에서 유전자 전환 여부와 상관없이 거의 같은 양의 DNA가 증폭된다는 사실은 해당 밴드가 internal control로 이용하기 충분한 것임을 의미한다. 또한 이중 PCR을 이용한 기존의 GMO 콩과 옥수수 검정기술 (Hübner et al. 1999; Wurz et al. 1999)에는 GMO 특이 DNA 증폭용 primer 한 쌍과 해당 작물의 internal control DNA 증폭을 위한 한 쌍의 primer 등 4개의 primer를 이용했던 반면, 본 연구에서는 한 쌍의 GMO 특이 primer와 한 종의 감자특이 primer를 이용하였다. Internal control용 primer로 한 종의 primer만을 사용할 경우 비특이적인 DNA 밴드가 증폭될 가능성이 줄어들 뿐만 아니라 실험에 소요되는 비용을 줄일 수 있는 장점도 있다. 따라서 이 기술은 감자의 GMO 여부 판별에 보다 경제적이고 효율적인 방법으로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

적 요

현재 유전자 변형 작물의 검정에는 CaMV 35S 프로모터 혹은 NOS 터미네이터 등과 같이 형질전환에 널리 이용하는 유전인자를 검출하기 위한 PCR 기술이 널리 이용되고 있다. 본 연구에서는 유전자변형 감자를 검정하기 위한 새로운 기술로서 감자특이 internal control과 CaMV 35S 프로모터 혹은 NOS 터미네이터에 특이적인 프라이머를 이용한 경쟁적 이중 PCR 방법을 개발하였다. 감자 유전자의 RAPD 결과 이용한 모든 품종에서 약 530 bp인 homozygous DNA 밴드를 증폭하는 특이 primer (rAGU4A)를 찾아 감자특이 internal control

증폭용으로 이용하였다. 이 프라이머에 의해 증폭되는 DNA는 TC 염기의 반복 빈도가 높은 repetitive 혹은 microsatellite DNA (AF541972)로 판단되었다. 이와 같은 단일 프라이머 internal control 증폭용으로 이용한 경쟁적 이중 PCR은 비특이적 PCR 산물을 줄일 수 있고, 기존 방법들에 비해 경제적이다. 현재 상품화되어 있는 유전자 변형 감자품종인 'New Leaf'의 경우도 형질전환에 이용한 유전인자로 CaMV 35S 프로모터와 NOS 터미네이터가 모두 이용되었으므로 이 기술을 이용할 경우 현재까지 상품화된 유전자 변형감자들의 효율적인 검정 기술로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

인용문헌

- Anonymous (2002) <http://www.bats.ch/about/projekte.htm>
- Bonierbale MW, Plaisted RL, Tanksley SD (1991) Application of restriction fragment length polymorphisms and genetic mapping to potato breeding. *In* : International Potato Center, Molecular Methods for Potato Improvement. Report of the Planning Conference on "Application of Molecular Techniques to Potato Germplasm Enhancement". CIP, Peru, PP. 149-157
- Brunnert HJ, Spener F, Borchers T (2001) PCR-ELISA for the CaMV-35S promoter as a screening method for genetically modified Roundup Ready soybeans. *Eur Food Res Technol* **213**: 366-371
- Chiu LC, Chen YL, Daniel TCS (2002) Study on the detection method of six varieties of genetically modified maize and processed foods. *J Food Drug Anal* **10**:25-33
- Elliott AR, Campbe JA, Dugdale B, Brettel RSI, Grof CPL (1999) Green-fluorescent protein facilitates rapid in vivo detection of genetically transformed plant cells. *Plant Cell Rep* **18**:707-714
- Hall TC (2002) Current status of GMO: development and perspective. *In* : International symposium on agrobiotechnology for 21st century, RDA, Suwon Korea, PP.79-102
- Hübner P, Studer E, Lüthy J (1999) Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organism in food. *Food Control* **10**:353-358
- Grunst T, Kephart D (2001) Wizard Magnetic DNA purification system for food: Part II. Semi-automated DNA isolation and analysis of GMO foods. *Pomega Note* **76**:19-22
- James C (2002) Global hectareage of GM crops in 2001. *Crop Biotech Brief Vol. II No. 1*
- Kang HW, Park DS, Go SJ, Eun MY (2002) Fingerprinting of diverse genomes using PCR with Universal Rice Primers generated from repetitive sequence of Korean Weed Rice. *Mol Cells* **13**:281-287
- Lipp M, Brodmann P, Puetsch K, Pauwels J, Anklam E (1999). IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybeans and maize in dried powder. *J AOAC Int* **82**:

923-928

- Mannerlöf M, Tenning P** (1996) Screening of transgenic plant by multiplex PCR. *Plant Mol Biol Rep* **15**:38-45
- Meyer R** (1999) Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control* **10**: 391-399
- Seo HW** (2001) Genetic engineering of virus resistant potatoes and development of nucleic acid diagnostic methods using coat protein gene of Potato leafroll virus. PhD thesis, Konkuk University, Seoul. pp. 51-81
- Seo HW, Yi JY, Cho HM, Cho JH, Park YE** (2001) Development of maturity controllable transgenic potato with GA 3beta-hydroxylase. *In* : Annual Research Report of National Highland Agricultural Experiment Station, RDA, Korea. pp. 342-345
- Spoth B, Strauss E** (1999) Screening for genetically modified organisms in food using Promegas Wizard Resin. *Promega Notes* **73**:23-25
- Tao Z, Cai XF, Yang SL, Gong Y** (2001) Detection of exogenous genes in genetically modified with multiplex polymerase chain reaction. *Plant Mol Biol Rep* **19**:289-298
- Teresa MF, Julapark C, Tanksley SD** (1995) Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol Biol Rep* **13**: 207-209
- Tozzini AC, Martinez MC, Lucca, MF, Rovere CV, Distefano AJ, del Vas M, Hopp HE** (2000) Semi-quantitative detection of genetically modified grains based on CaMV 35S promoter amplification. *Electric Journal of Biotechnology* **3**:149-153
- Vickers JE, Graham GC, Henry RJ** (1996) A protocol for the screening of putatively transformed plant for bar, the selectable marker gene, using the polymerase chain reaction. *Plant Mol Biol Rep* **14**:363-368
- Wurz, A, Bluth A, Zeltz P, Pfeifer C, Willmund R** (1999) Quantitative analysis of genetically modified organism (GMO) on processed food by PCR-based methods. *Food Control* **10**:385-389
- Yi JY, Lee SW, Park KW** (1998) Introduction of Shiva gene into tobacco and potato using tissue-specific tomato PAL promoter. *Korean J. Plant Tissue Culture* **25**:109-113

(접수일자 2002년 11월 7일)