

비타민 E 강화 유전자변형 들깨에 대한 정성 PCR 분석법

김재환 · 안지혜 · 송희성 · 김경환¹ · 김동현² · 김해영*

경희대학교 생명공학원, ¹농촌진흥청 농업생명공학연구원 세포유전과,
²농촌진흥청 농업생명공학연구원 생물안전성과

Qualitative PCR Detection of vitamin E-enriched GM Perilla

Jae-Hwan Kim, Ji-Hye Ahn, Hee-Sung Song, Kyung-Hwan Kim¹, Dong-Hern Kim² and Hae-Yeong Kim*

Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University, Suwon 446-701, Korea

¹Division of Cell and Genetics, National Institute of Agricultural Biotechnology, Suwon 441-100, Korea

²Division of Biosafety, National Institute of Agricultural Biotechnology, Suwon 441-100, Korea

Received May 29, 2006; Accepted July 4, 2006

For the development of a qualitative PCR detection method for genetically modified perilla (*Perilla frutescens*), perilla species-specific gene, KAS-I (Beta-ketoacyl-ACP synthase I), was selected and validated as suitable for the use as an endogenous reference gene in perilla. Primer specificity was first tested by the means of qualitative PCR analysis. The primer pair Pfru3-F/R amplifying the perilla endogenous gene, KAS-I, gave rise to an amplicon 95 bp. No amplified product was observed when DNA samples from 15 different plants were used as templates. Qualitative PCR detection method was assayed with vitamin E-enriched GM Perilla developed in Korea. For the qualitative PCR detection method, the construct-specific detection primer pairs were constructed. The primer pair TMTO-F/R amplifying the junction region of TMT (γ -tocopherol methyltransferase) gene and OCS (Octopine synthase) terminator introduced in GM perilla gave rise to an amplicon 148 bp.

Key words: GM Perilla, γ -tocopherol methyltransferase, β -ketoacyl-ACP synthase I, PCR

서 론

전세계 유전자변형 작물 재배 면적은 농업생명공학 국제서비스(ISAAA; international Service for the Acquisition of Agri-biotech Application) 2005년 말 통계에 따르면 21개국에서 9,100만 ha로 2004년 17개국 8,100만 ha보다 11% 증가하였으며, 1996년 이후 매년 2자리 수 이상의 증가율을 보이고 있으며, 10년 동안 50배가 증가하였다 또한, 개발이 완료되어 상품화가 허가된 GM작물은 18개 작물 78개 품종으로 옥수수, 유채, 콩, 토마토, 면화, 감자 등이 보고되어 있다¹⁾.

우리나라에서도 농촌진흥청을 중심으로 기업 및 대학 연구소에서 제초제와 병, 각종 재해에 대한 저항성을 높이거나 기능을 강화한 벼, 토마토, 감자, 콩, 고추, 배추, 들깨 등 18개 작물을 대상으로 다수의 유전자변형 작물들을 개발 중에 있으며 이중 일부는 최종 개발 단계에 있는 것으로 알려져 있다. 특히, 유전자 변형 들깨의 경우, 농촌진흥청 농업생명공학연구원과 작물시험

장은 생명공학기술을 이용하여 들깨의 형질전환방법을 확립하고, 유용한 유전자를 들깨에 도입함으로써 기능성 들깨 2종류를 육성하였다. 토코페롤합성유전자(γ -tocopherol methyltransferase; TMT)를 분리하여 들깨 종자에 형질 전환하여 대량 발현시킴으로써 감마토코페롤을 알파토코페롤로 전환시켜 알파토코페롤 고함유 들깨를 개발하였다^{2,4)}. TMT는 토코페롤 생합성 대사의 마지막 단계인 감마 토코페롤을 알파 토코페롤로 변환하는데 관여하는 효소이다⁵⁾. 2003년 농림부 보고에 따르면 들깨의 재배 면적이 2.9만 ha이고 종실 생산량은 22.4 M/T으로 참깨 다음으로 많이 생산되는 특용작물로서 들깨유는 식용 및 산업용으로 사용되며 깨끗은 연간 1,000억 원 이상이 거래되는 작물이다. 따라서 국내에서 개발된 기능성 유전자변형 들깨도 이용 가치가 높을 것으로 기대되며 상업화될 가능성이 높은 작물 중의 하나이다.

본 연구에서는 최초로 국내에서 개발된 제초제에 내성을 갖고 비타민 E가 강화된 유전자변형 들깨에 대한 정성 PCR분석법을 개발하였다. 먼저 유전자변형 들깨의 정성 PCR분석법을 개발하기 위해 들깨의 내재유전자를 선별하였다. Beta-ketoacyl-ACP synthase I(KAS-I; AF026148)는 들깨의 genome내에 single copy로 존재하는 것으로 알려져 있으며 이러한 유전자의

*Corresponding author
Phone: 82-31-201-2660; Fax: 82-31-204-8116
E-mail: hykim@khu.ac.kr

염기서열을 기초로 95 bp의 PCR 산물을 확인할 수 있는 특이적인 primer 쌍을 제작하였다^{6,7}). 비타민 E가 강화된 유전자변형 들깨의 경우 TMT유전자와 OCS(Octopine synthase) terminator의 연결부위를 증폭할 수 있는 primer 쌍을 제작하여 본 연구에 이용하였다. 이와 같은 두 쌍의 primers를 이용하여 duplex PCR을 실시하였으며 유전자변형 들깨를 판단할 수 있는 PCR 조건을 확립하였으며⁸), 이러한 조건에서의 LOD(Limit of Detection) 값을 측정하였다.

재료 및 방법

재료. 유전자변형 들깨는 농촌진흥청 농업생명공학연구원 생물안전성과로부터 분양 받아 이용하였으며, 유전자변형이 되지 않은 들깨를 포함한 감자, 메밀, 콩, 배추, 오이, 고추, 쌀, 녹두, 해바라기, 보리, 밀, 팥, 옥수수, 카놀라, 면화 등 16개 작물들을 농업생명공학연구원 유전자원과로부터 분양 받거나 국내 시장에서 구입하여 본 연구에 이용하였다.

Primer 제작. 들깨의 내재 유전자인 KAS-I유전자의 염기서열을 기초로 하여 특이적인 primer 쌍을 제작하여 95 bp의 PCR 산물을 얻을 수 있도록 제작하였다. 유전자변형 들깨에 삽입된 TMT유전자와 OCS terminator를 증폭시켜 148 bp의 PCR 산물을 얻을 수 있도록 특이적인 primer 쌍을 제작하였다(Fig. 1). 이들 primer 쌍에 대한 각각의 염기서열은 Table 1에서 보는 바와 같다.

DNA 추출. 유전자변형 들깨, 유전자변형이 되지 않은 들깨, 그리고 다른 15종의 작물들은 모두 1g씩의 시료를 준비하여 막자 사발에 넣고 액체질소를 가하여 분말 형태로 만들어 DNeasy Plant Maxi kit(Qiagen, USA)을 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 UV-visible spectrophotometer UV-1700(Shimadzu, Japan)를 이용하여 260 nm와 280 nm에서 정량하였으며 260 nm/280 nm가 1.8~2.0 사이인 것을 이용하였다.

PCR 조건. PCR 반응 용액은 한 시료 당 25 μ l로 만들어 사용하였다. 반응 용액은 2.5 μ l의 10 \times PCR buffer(Applied Biosystems, USA), 2 μ l의 dNTP (2.5 mM each, Applied Biosystems), 1.5 μ l의 1.5 mM MgCl₂(Applied Biosystems), duplex PCR의 경우 10 μ M의 Pfru3-F/R와 4 μ M의 TMT-O/F/

R, 들깨 내재유전자의 특이성 확인을 위한 단일 PCR의 경우 10 μ M의 TMT-O/F/R만을 사용하였다. 모든 조건은 50 ng의 template DNA가 포함되도록 하였고 반응은 thermocycler PC808(ASTECC, Japan)를 이용하여 수행하였다⁹). PCR 조건으로 첫 cycle에서 95°C에서 5분간 수행하였고 나머지 cycle에서는 95°C에서 30초, 63°C에서 30초, 72°C에서 30초간 40 cycle을 수행하였으며, 마지막 단계로 72°C에서 8분간 수행한 후, 4°C에서 PCR산물을 보관하였다. PCR 산물은 3% agarose gel상에서 전기영동을 수행하였다.

PCR 산물의 염기서열분석. 유전자변형 들깨에 특이적인 primer 쌍을 이용하여 증폭된 PCR 산물들은 Automated DNA Sequencer ABI 3700(Applied Biosystems)을 이용하여 두 번 반복하여 염기서열을 분석하였다.

결과 및 고찰

들깨의 내재 유전자(KAS-I)에 대한 특이성 확인. 들깨(*Perilla frutescens*)를 포함하여 감자(*Solanum tuberosum*), 메밀(*Fagopyrum esculentum*), 콩(*Glycine max* L.), 배추(*Brassica campestris* subsp. *napus* var. *pekinensis*), 오이(*Cucumis sativus*), 고추(*Capsicum annuum* L.), 쌀(*Oryza sativa*), 녹두(*Phaseolus radiatus*), 해바라기(*Helianthus annuus*), 보리(*Hordeum vulgare* var. *hexastichon*), 밀(*Triticum aestivum* L.), 팥(*Phaseolus angularis*), 옥수수(*Zea mays* L.), 유채(*Brassica campestris*), 그리고 면화(*Gossypium* spp.)까지 16종의 작물로부터 분리된 genomic DNA를 template로 하고 들깨의 내재 유전자에 특이적인 primer(Pfru3-F/R) 쌍을 이용하여 PCR을 수행한 결과 들깨에서만 PCR 산물을 얻었고, 다른 작물에서는 PCR 산물이 검출되지 않았다(Fig. 2). 따라서 본 연구에서 제작한 primer 쌍이 유전자변형 들깨의 정성 PCR 분석에 있어서 내재 유전자에 대한 특이적인 primer로 적용할 수 있음을 확인하였다.

비타민 E 강화 유전자변형 들깨에 대한 Duplex PCR. 국내에서 개발된 유전자변형 들깨는 TMT 유전자를 삽입하여 비타민 E 성분을 강화하고 *Streptomyces hygroscopicus* 유래의 bar 유전자를 삽입하여 제초제 내성을 갖도록 개발된 것이다. 또한 OCS terminator가 삽입되어 있어서 본 연구에서는 유전자변형 들깨의 분석을 위해 TMT 유전자와 OCS terminator 부위에서 각각 forward/reverse primer 쌍을 제작하였다. 이러한 primer 쌍과 들깨의 내재 유전자를 특이적으로 증폭시킬 수 있는 primer(Pfru3-F/R) 쌍을 이용하여 duplex PCR을 실시하였다(Fig. 3).

유전자변형 들깨를 검출할 수 있는 특이적인 primer(TMT-O/F/R) 쌍은 본 연구에서 제시한 PCR 조건에서 148 bp의 PCR 산물을 얻었다. 이러한 PCR 산물은 DNA sequencer 기기의 염기서열 분석을 통해서 각각의 염기서열을 확인하였다(Fig. 4).

Duplex PCR의 민감도 측정. 100% 유전자변형 들깨의 genomic DNA 50 ng부터 0.0005 ng를 template로 하여 duplex PCR를 실시하여 민감도를 측정하였다(Fig. 5). 내재유전자를 증폭시켜 95 bp의 PCR 산물을 얻을 수 있는 primer 쌍과 유전자변형 들깨에 삽입된 외래유전자를 증폭시켜 148 bp의 PCR 산



Fig. 1. Schematic diagram of PCR strategy for qualitative detection of GM *Perilla*.

Table 1. Sequences of primers used in this study

Primer name	Sequences (5'-3')	Target	Amplicon size (bp)
Pfru3-F	AGCTTCGATTCGCCACGCT	Endogenous gene (KAS-I)	95
Pfru3-R	GGAGCGGTGGGGTTTGAGAA		
TMT-O-F	GGTGATGCCATTGATGATCG	TMT / T-OCS	148
TMT-O-R	GGCGTCTCGCATATCTCATT		

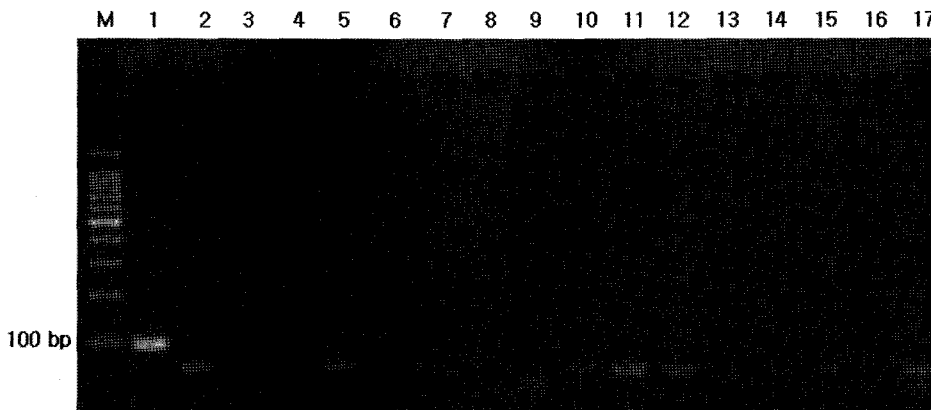


Fig. 2. Specificity analysis of the primer pair Pfru3-F/R. M: Marker (100 bp DNA Ladder) 1: perilla, 2: potato, 3: buckwheat, 4: soybean, 5: Chinese cabbage, 6: cucumber, 7: red pepper, 8: rice, 9: mung bean, 10: sun flower, 11: barley, 12: wheat, 13: red bean, 14: maize, 15: canola, 16: cotton, 17: no template.

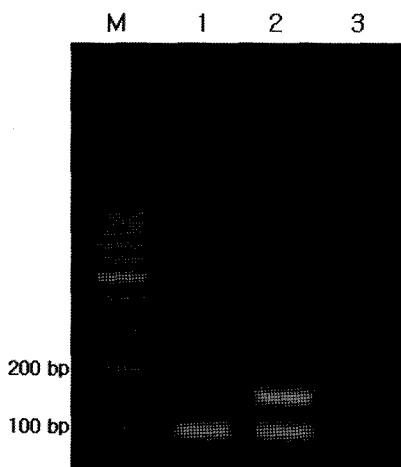


Fig. 3. PCR analysis of non-GM and GM perilla. M: Marker (100 bp DNA Ladder), 1: non-GM Perilla (95 bp), 2: GM Perilla (148 bp), 3: no template.

물을 얻을 수 있는 primer 쌍을 이용하여 하나의 tube에서 % 별 유전자변형 들개의 genomic DNA를 증폭시킨 결과 0.5 ng 까지 정확한 PCR 산물이 확인되었다. 이와 같이 본 연구에서 사용한 primer 쌍의 특이성과 민감도를 확인함으로써 유전자변형 들개의 PCR 정성분석법을 확립하였다. 특히, 본 연구에서는 들개 genome내에 단일 카피로 존재하는 내재유전자 KAS-I을 선별하였고 이것을 다른 작물들과 구별하여 특이적으로 증폭시

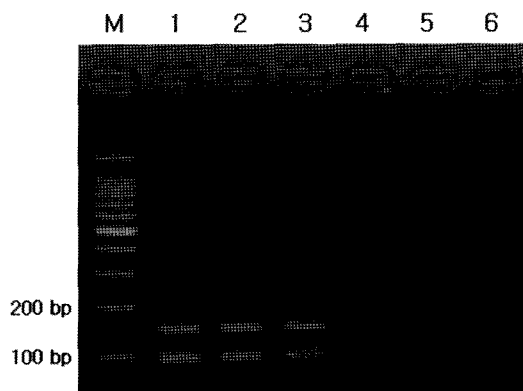


Fig. 5. Sensitivity of qualitative PCR. M: Marker (100 bp DNA Ladder), 1-6: 50, 5, 0.5, 0.05, 0.005 and 0.0005 ng of 100% GM Perilla.

킬 수 있는 primer를 개발하였으며, 유전자변형 들개에 삽입된 외래유전자의 염기서열을 확인함으로써 앞으로 유전자변형 들개의 정량분석법의 개발에 활용이 가능할 것으로 기대한다.

초 록

국내에서 개발된 비타민 E 강화 유전자변형 들개의 정성 PCR 분석법의 개발을 위해 들개의 내재 유전자로서 KAS-I (Beta-ketoacyl-ACP synthase I)를 선별하였고, 이러한 내재유전

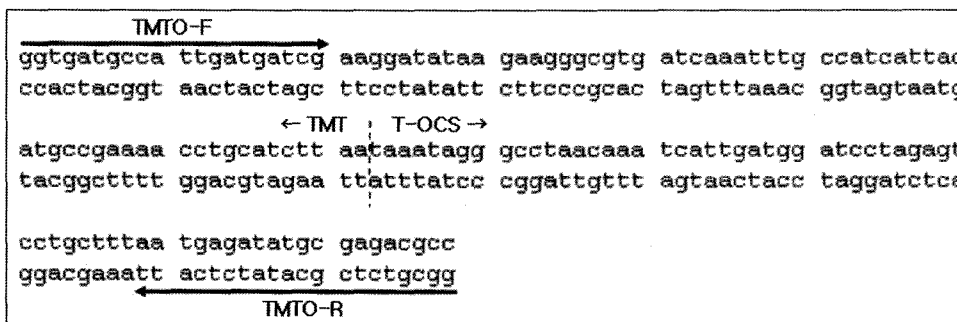


Fig. 4. The results of sequencing for PCR products amplified from GM Perilla with TMTO-F/R.

자를 특이적으로 증폭시킬 수 있는 Primer(Pfru3-F/R)쌍을 이용한 PCR에서 95 bp의 PCR 증폭 산물을 얻었으며, 들깨를 포함한 16개 작물에 대해 PCR을 수행한 결과에서 들깨만이 특이적으로 증폭되는 것을 확인하였다. 또한, 비타민 E 강화 유전자변형 들깨에 삽입된 TMT(γ -tocopherol methyltransferase) 유전자와 OCS(Octopine synthase) terminator 연결 부위를 증폭시켜 148 bp의 PCR 산물을 얻을 수 있는 primer(TMTO-F/R)를 제작하였으며, 이러한 두 쌍의 primer를 이용하여 국내 개발된 비타민 E 강화 유전자변형 들깨의 PCR 정성 분석법을 확립하였다.

Key words: GM *Perilla*, γ -tocopherol methyltransferase, β -ketoacyl-ACP synthase I, PCR

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21 지원사업으로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. James, C. (2005) Executive Summary of Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2005. *ISAAA Briefs* No. 34. ISAAA: Ithaca, NY.
2. Kim, K. H., Hwang, S. K., Kim, D. H., Lee, J. Y. and Hwang, Y. S. (2002) Molecular cloning and characterization of γ -tocopherol methyltransferase cDNA from *Perilla frutescens*. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **45(4)**, 203-206.
3. Shigeoka, S., Ishiko, H., Nakano, Y. and Mitsunaga, T. (1992) Isolation and properties of gamma-tocopherol methyltransferase in *Euglena gracilis*. *Biochim Biophys. Acta* **1128**, 220-226.
4. Kim, K. H., Lee, Y. H., Kim, D. H., Park, Y. H., Lee, J. Y., Hwang, Y. S. and Kim, Y. H. (2004) Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Perilla frutescens*. *Plant Cell Rep.* **23**, 386-390.
5. Erin, A. N., Skrypin, V. V. and Kagan, V. E. (1985) Formation of alpha-tocopherol complexes with fatty acids Nature of complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **815**, 209-214.
6. Hwang, S. K. and Kim, Y. M. (2000) A simple and reliable method for preparation of cross-contamination free plant genomic DNA for PCR-based detection of transgenes. *J. Biochem. Mol. Biol.* **33(6)**, 537-546.
7. Hwang, S. K. and Hwang, Y. S. (2000) Molecular cloning and functional expression of *Perilla frutescens* 3-ketoacyl-[acyl carrier protein] synthase III. *Mol. Cells* **10**, 375-381.
8. Kim, S. K., Kim, K. H. and Hwang, Y. S. (2000) Molecular cloning and expression analysis of 3-Ketoacyl-ACP synthases in the immature seeds of *Perilla frutescens*. *Mol. Cells* **10(5)**, 533-539.
9. Kim, J. H., Song, H. S., Jee, S. M., Ryu, T. H., Kim, D. H. and Kim, H. Y. (2005) Qualitative PCR detection of GM rices (Milyang 204 and Iksan 483) developed in Korea. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **48(4)**, 335-338.