

# 환경위해성 평가를 위한 해충저항성 배추의 분자생물학적 특성 검정 및 계통 특이 마커 개발

임선형\*, 김나영, 이시명, 우희종, 신공식, 진용문, 조현석\*  
농업생명공학연구원 생물안전성과

## Molecular Characterization and Event-Specific Marker Development of Insect Resistant Chinese Cabbage for Environmental Risk Assessment

Sun-Hyung Lim\*, Na-Young Kim, Si-Myung Lee, Hee-Jong Woo, Kong-Sik Shin,  
Yong-Moon Jin, and Hyun-Suk Cho\*

*Biosafety Division, National Institute of Agricultural Biotechnology, RDA, Suwon 441-707, Korea*

**ABSTRACT** Commercialization of genetically modified (GM) plants will be required the assessment of risks associated with the release of GM plants that should include a detailed risk assessment of their impacts in human health and the environment. Prior to GM plant release, applicants should provide the information on GM crops for approval. We carried out this study to provide the molecular data for risk assessment of the GM Chinese cabbage plants with insect-resistance gene, modified *CryIAC*, which we obtained by *Agrobacterium*-transformation. From the molecular analysis with GM Chinese cabbage, we confirmed the transgene copy number and stability, the expression of the transgene, and integration region sequences between the transgene and the Chinese cabbage genome. Based on the unique integration DNA sequences, we designed specific primer set to detect GM Chinese cabbage and set up the GM cabbage detection method by qualitative PCR analysis. Qualitative analysis with GM Chinese cabbage progenies analysis was revealed the same as the result of herbicide treatment. Our results provided the molecular data for risk assessment analysis of GM Chinese cabbage and demonstrated that the primer set proposed could be useful to detect GM Chinese cabbage.

### 서 론

형질전환기술의 발달로 콩, 옥수수, 목화, 유채 등 수 종의 주요 작물들이 제초제, 해충, 병 저항성을 지니도록 개발

되어 상업화 되고있다. 2006년 보고에 따르면 유전자변형 작물은 22개국에서 재배되며, 유전자변형 작물의 식품 및 사료로의 수출입 승인국은 51개국에 이르고 있다. 재배면적은 1억 ha에 이르고 있고, 매년 그 면적이 증가되는 추세이며, 시장규모는 전체 종자시장의 21%인 61억 5천만 불에 이르고 있다 (James 2006).

국내에서도 경제적으로 중요한 작물인 벼, 감자, 배추 등

\*Corresponding author Tel 031-299-1163 Fax 031-299-1772  
E-mail: limsh2@rda.go.kr

과 그외 여러 작물에서 형질전환 연구가 수행되고 있으나 아직까지 실용화단계에는 이르지 못하고 있다 (Lee 2003, Woo et al. 2006). 현재까지 국내에서 다양한 형질전환 작물의 개발에는 많은 노력과 투자가 이루어졌으나 상업화를 위한 안정성 및 환경위해성 평가 연구는 미비한 실정이다.

형질전환 작물은 유전자변형 농산물의 환경위해성 평가 심사지침에 따라 실험을 수행하여야 상업화될 수 있다. 형질전환 작물을 상업화하기 위해서 심사지침중 별표2에 관한 내용을 수행하여야 한다 (농림부 2002). 분자생물학적 검정 내용인 별표 2의 8항의 내용은 유전자변형 식물의 도입유전자의 확인, 도입유전자의 위치 및 주변서열, 도입유전자의 복제수, 도입유전자의 세대간 안정적 유전 및 발현결과와 도입유전자의 검출 및 발현의 확인에 사용된 방법 등을 명시하도록 요구하고 있다. 또한 유전자변형 농산물과 식품에 대한 검정법 확립과 동시에 실제 유전자변형 농산물 및 식품의 표시에 적용 가능한 검사법이 요구되고 있다. 국내뿐만 아니라 국제적으로 유전자변형농산물 및 식품에 대한 검사법의 개발 및 표준화 연구가 활발히 이뤄지고 있다. 국제적으로는 현재 DNA를 바탕으로 한 정성분석법은 PCR을 이용하여 4가지의 범주내에서 이뤄지고 있다. 첫째, screening method로 유전자변형 작물을 개발할 때 사용되는 35S 프로모터나 Nos 터미네이터등을 이용하여 유전자변형 농산물의 혼입여부를 확인 (Hardegger et al. 1999, Matsuoka et al. 2002, Cankar et al. 2005) 하는 것과, 둘째, gene specific method로 목적유전자를 이용하여 유전자변형 농산물을 동정 (Vaitilingom et al. 1999, James et al. 2003) 하는 것, 셋째, construct specific method는 도입된 목적유전자의 프라이머와 주변의 터미네이터와 프로모터의 프라이머를 이용하여 유전자변형 농산물을 동정 (Hupfer et al. 1998, Zimmermann et al. 1998, Kim et al. 2002, Matsuoka et al. 2001, Rho et al. 2004) 하는 것이 있다. 마지막으로 event specific method는 T-DNA가 삽입된 식물체놈내의 인접서열과 운반체내의 염기서열을 바탕으로 프라이머를 작성하여 유전자변형 농산물을 동정 (Berdal et al. 2001, Hernández et al. 2003, Rønning et al. 2003, Windels et al. 2003, Nielsen et al. 2004, Collonnier et al. 2005, Taverniers et al. 2005, Yang et al. 2005, Yang et al. 2007)하는 것이다. 이들 방법들 중에서 비교적 안정적으로 유전자변형 농산물을 동정하는 event specific method가 많이 연구 개발되고 있다. 또한 서로 다른 유전자가 들어간 개체들을 교배하여 얻은 gene stacking개체에서도 이들 event specific

방법을 이용한다면 어떤 유전자를 지닌 개체들이 교배되었는지를 확인할 수도 있다. 또한 이들 event specific 프라이머는 유전자변형 농산물의 지적재산권을 확보하기 위한 마커와 유전자변형 농산물의 유전자 이동성 등을 확인하는 방법으로 이용할 수 있다.

따라서 본 실험에서는 환경위해성 평가를 위한 분자생물학적 기초자료를 생산하고 개발된 해충저항성 배추의 검정에 대한 지적 재산권을 확보하고자 실험을 수행하였다. 해충저항성 유전자를 배추에 도입하고, 유전자의 도입 및 발현을 확인하였으며, 도입유전자의 삽입 위치를 확인하고 이를 이용한 형질전환 배추 특이 마커를 개발하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

배추 (*Brassica rapa*) 종자는 동부한농(주)의 순계계통인 '노완'을 사용하였다. 배추종자를 70% (v/v) 에탄올에서 2분간 표면살균한 다음, 2.5% (v/v) sodium hypochlorite 용액에서 10분간 살균하고 멸균수로 3회 세척하였다. 살균된 종자는 MS 기본배지 (Murashige and Skoog 1962)에 파종하여 26°C, 암배양하고, 파종후 5일된 배추식물체의 하배축을 실험재료로 사용하였다.

### 유전자

해충저항성 배추 형질전환체를 육성하기 위해 사용된 벡터인 416은 pCAMBIA3301을 backbone으로 하여 dual 35S 프로모터와 식물에서 발현이 잘 되도록 염기서열을 변형한 해충저항성 유전자인 *CryIAC* 유전자와 35S 프로모터와 사과로부터 분리된 개화유전자인 *MdMADS*를 역방향으로 삽입한 뒤 선발마커로는 *bar* 유전자를 사용하였다. *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 도입한 것을 동부한농(주)으로부터 분양받아 사용하였다.

### 배추 형질전환

형질전환된 *A. tumefaciens* LBA4404를 YEP (Km<sup>R</sup>) 액체배지에 접종하여 48시간 동안 진탕배양하였다. *Agrobacterium* 배양액에 배추 하배축을 20분간 감염시킨 다음, 1 mg/L NAA, 1 mg/L BA, 10 g/L sucrose, 8 g/L agar가 첨가된 MS배지에서 2일간 공동배양하였다. 형질전환된 재분화 식물체를

얻기 위하여 1 mg/L NAA, 1 mg/L BA, 300 mg/L carbenicillin, 3 mg/L phosphinotricine (PPT), 10 g/L sucrose, 8 g/L agar가 첨가된 MS배지에서 배양한 다음, 3주마다 계대배양 하였다. 재분화된 신허는 300 mg/L carbenicillin, 3 mg/L PPT, 10 g/L sucrose, 8 g/L agar가 첨가된 MS배지로 옮겨 발근을 유도하였다. 발근된 개체는 순화 후 화분으로 이식하여 온실에서 생육하였다.

형질전환체의 검정

Genomic DNA는 Kim (2002)의 방법을 이용하여 추출하였고, 20 µg DNA를 제한효소 *EcoRI*과 *HindIII* 처리하여 0.8% agarose gel에 전기영동한 다음, capillary transfer 방법 (Southern 1975)으로 nylon membrane에 전이시켰다. Membrane은 0.5 M sodium phosphate buffer(pH 7.2), 7% SDS, 1% BSA, 1 mM EDTA, 0.1 mg/ml denatured salmon sperm DNA가 첨가된 용액에서 3시간 (65°C)동안 prehybridization 한 다음, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP로 표지된 *CryIAc* DNA를 첨가하여 12시간 hybridization하였다. Membrane은 2 X SSC, 0.1% SDS 용액 (65°C)에서 20분, 1 X SSC, 0.1% SDS용액 (65°C)에서 20분 세척한 후 Bio-imaging analyzer (BAS-2000; Fuji Photo Film, Japan)로 분석하였다.

형질전환이 확인된 배추식물체 잎으로부터 Trizol (Invitrogen co.)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 분리된 total RNA 20 µg을 1% formaldehyde agarose gel에 전기영동한 다음, capillary

transfer 방법으로 nylon membrane에 전이시켰다. Hybridization 반응과 membrane의 세척은 Southern 분석과 동일한 방법으로 수행하였다.

인접서열 분석 및 특이 프라이머 제작

유전자도입 및 발현이 확인된 배추식물체로부터 genomic DNA를 분리하여 genome walker (Invitrogen co.)를 이용하여 인접서열을 확인하였다. 제조사가 제공한 방법들을 이용하여 T-DNA삽입된 인접부위를 증폭하였다. Genome walker의 방법에 따라 bar F1 프라이머 (5'-CTTCAGCCTGCCGGTACCGCCCGTCCGGTCTGCCCCG-3')와 AP1 프라이머 (5'-GT AATACGACTCACTATAGGGC-3')를 이용하여 1st PCR을 수행하였고, 이를 희석하여 bar F2 프라이머(5'-GGGTTTCT ATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGC-3')와 AP2 프라이머 (5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3')를 이용하여 2nd PCR을 수행하였다. 증폭된 PCR산물은 1% agarose gel에 전기영동한 후, Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen)를 사용하여 정제한 후, pGEM-T easy 벡터 (Promega)에 삽입하여 양방향의 염기서열을 확인하였다. 확인된 염기서열을 NCBI BLAST 분석을 이용하여 유사성 분석을 수행하였다.

증폭된 산물의 염기서열을 바탕으로 계통 특이 프라이머를 제작하였다 (Table 1). 프라이머의 특이성을 확인하기 위하여 Perkin-Elmer사의 9600 Geneamp PCR system을 이용하

Table 1. Primer used in this study and expected amplicon length

Combination	Primer Name	Nucleotide sequences (5'-3')	Amplicon length (bp)
A	Bar-F1	CTTCAGCCTGCCGGTACCGCCCGTCCGGTCTGCCCCG	556
	416-R1	GGGGTTTAATATCTAAATATTTTCATGAAGC	
B	Bar-F1	CTTCAGCCTGCCGGTACCGCCCGTCCGGTCTGCCCCG	646
	416-R2	CCGATTATCGAGTCAGCTTAATCACCTTTGGGCCAC	
C	Bar-F1	CTTCAGCCTGCCGGTACCGCCCGTCCGGTCTGCCCCG	755
	416-R3	CGTTGGATGTCCACATGCGCCTCACGTGATCTCGC	
D	Bar-F2	GGGTTTCTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGC	454
	416-R1	GGGGTTTAATATCTAAATATTTTCATGAAGC	
E	Bar-F2	GGGTTTCTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGC	544
	416-R2	CCGATTATCGAGTCAGCTTAATCACCTTTGGGCCAC	
F	Bar-F2	GGGTTTCTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGC	653
	416-R3	CGTTGGATGTCCACATGCGCCTCACGTGATCTCGC	
G	Bar-F3	CTAAAATCCAGATCCCCGAATTAATTCGGCG	347
	416-R1	GGGGTTTAATATCTAAATATTTTCATGAAGC	
H	Bar-F3	CTAAAATCCAGATCCCCGAATTAATTCGGCG	437
	416-R2	CCGATTATCGAGTCAGCTTAATCACCTTTGGGCCAC	
I	Bar-F3	CTAAAATCCAGATCCCCGAATTAATTCGGCG	546
	416-R3	CGTTGGATGTCCACATGCGCCTCACGTGATCTCGC	

여94°C에서 3분간 변성시킨 후, 95°C에서 45초, 60°C에서 45초, 72°C에서 1분 30초의 단계로 30 회 반복하여 실시하고, 72°C에서 5분간 최종 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel에 전기영동하여 밴드를 확인하였다.

**결과 및 고찰**

**배추 형질전환**

배추의 하배축에 *Agrobacterium* 현탁액을 접종한 후, 2일간 공동배양을 실시하고, PPT가 첨가된 배지에서 형질전환체를 선발하였다. 형질전환이 일어나지 않은 세포는 암모니아 축적으로 세포내 인산화과정이 저해됨으로 괴사현상이 나타나고, 형질전환이 일어난 세포의 경우에는 phosphinothricin acetyltransferase 효소가 발현되어 살아남았다. 살아남은 개체를 PPT가 첨가된 배지에서 2-3주마다 계대배양하였고, 뿌리유도 후 화분에 심어서 온실에서 순화시켰다. 순화후 배추개체에 0.3% Basta용액을 처리하여 형질전환 배추를 확보하였다. 살아남은 배추식물체는 416-1, 416-2, 416-3으로 명명하였다.

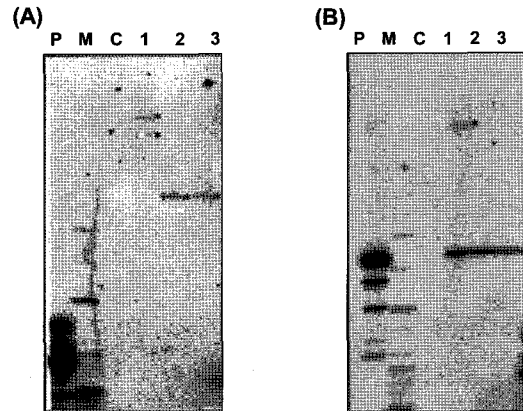
**형질전환 배추의 분자생물학적 검정 및 후대검정**

재분화된 배추식물체의 해충저항성 유전자 도입여부를 확인하기 위해서, 제초제 처리시 살아남은 배추잎과 형질전환시키지 않은 대조구 배추 잎으로부터 genomic DNA를 추출하여 *CryIAc*의 DNA 단편을 probe로 이용하여 Southern 분석을 수행하였다. 대조구에서는 band가 검출되지 않았으나 (Figure 1의 lane C), 형질전환 배추식물체에서는 band가 검출되어 배추식물체의 genome내로 *CryIAc* 유전자가 도입되었음을 확인하였다 (Figure 1). Southern 분석결과 형질전환 배추식물체중에서 416-1번 개체의 경우 2 copy의 유전자가 도입된 것을 확인하였고, 416-2, 416-3번 개체는 1 copy의 유전자가 도입된 것을 확인하였다. 또한 여러 차례의 반복실험과 다른 종류의 제한효소의 처리에서도 416-2와 416-3번 개체는 동일한 결과를 얻었다. 이것은 416-2와 416-3번 개체가 기원이 같은 캘러스로부터 유래한 형질전환체일수도 있음을 의미한다. 보다 정확한 정보를 얻기 위해서 이들로부터

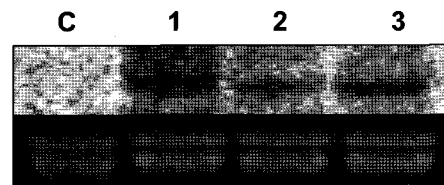
T-DNA 삽입부위의 인접서열을 증폭하여 분석하였다.

유전자 도입이 확인된 형질전환 배추식물체에서 total RNA를 분리하여 *CryIAc*의 DNA 단편을 probe로 이용하여 Northern 분석을 실시한 결과, PPT배지와 Basta처리에 살아남은 개체들에서 모두 유전자 발현이 확인되었다 (Figure 2). 형질전환 식물체에서는 *CryIAc* 유전자가 발현되고 있으나 형질전환시키지 않은 대조구에서는 발현이 확인되지 않았다.

유전자 도입 및 발현이 확인된 416-2와 416-3식물체를 자가수정하여 후대검정을 실시하였다. 형질전환시 사용된 식물발현용 운반체는 T-DNA내에 pNos::Bar를 지니고 있어서 제초제 Basta를 처리하여 분리비를 검정할 수 있다. Southern 분석시 1 copy가 삽입된 것으로 나타난 416-2와 416-3번 식



**Figure 1.** Southern blot analysis of transgenic Chinese cabbage plants (T<sub>0</sub>). Genomic DNA was digested with *Eco*RI (A) and *Hind*III (B) hybridized with *CryIAc* gene. C: wild type plant, P: positive control, lane 1: 416-1, 2: 416-2, 3: 416-3. Asterisks indicated the *CryIAc* band.



**Figure 2.** Northern blot analysis of *CryIAc* mRNA levels from putative transgenic cabbage plants and wild type plants. Twenty microgram total RNA was loaded per lane and separated on an agarose gel. Ethidium bromide-stained total RNA bands are shown as loading control. C: wild type plant, lane 1: 416-1, 2: 416-2, 3: 416-3.

**Table 2.** Segregation of bud-pollinated Chinese cabbage (T<sub>1</sub> generation) with by Basta (0.3% v/v) spraying on leaf tissue

T <sub>0</sub> plant line	T <sub>1</sub> segregation ratio (Herb <sup>S</sup> :Herb <sup>S</sup> )	Expected segregation ratio	P-value
416-2	45:14	3:1	0.82
416-3	43:13	3:1	0.76

물체는 제초제 처리후 분석결과 제초제 저항성: 제초제 민감성 = 3:1로 나타나 1 copy의 유전자가 삽입되어 유전됨을 확인할 수 있었다. Southern 및 Northern 분석과 후대종자의 분리비 분석을 통하여 형질전환 배추식물체는 도입된 *CryIAC* 유전자의 안정적인 삽입, 발현 및 유전을 확인하였다.

인접서열분석 및 특이프라이머를 이용한 PCR 조건 확립

Southern 분석을 통해 유전자의 삽입이 확인된 개체 중에서 1 copy가 들어간 416-2와 416-3을 이용하여 배추 genome 내의 T-DNA 삽입부위의 인접서열을 분석하고자 genome walker의 방법에 따라 1st PCR을 수행하였고, 이를 바탕으로 2nd PCR을 수행하였다 (Figure 3). 416-2와 416-3의 genomic DNA 중에서 *DraI*과 *StuI*로 처리한 경우에만 인접서열이 증폭되었다. 증폭된 PCR산물을 pGEM-T easy vector에 cloning 하여 염기서열을 분석하였다 (Figure 4). 그 결과, 416-2와 416-3개체에서 증폭된 산물은 서로 동일한 염기서열을 지닌 것으로 확인되었고, 이들 개체들은 동일한 캘러스 유래의

형질전환체임을 확인할 수 있었다. 분석된 염기서열은 Blast 검색을 실시한 결과 운반체내의 T-DNA이외의 염기는 삽입되지 않음이 확인되어서, 운반체내의 T-DNA만이 배추게놈 내로 삽입됨을 확인하였다. T-DNA의 인접서열과 배추 genome의 유사성 분석을 수행한 결과, 배추 genome의 유사성 있는 염기서열은 확인되지 않았으나, 앞으로 배추 genome의 염기서열 분석이 완료되면 이들 T-DNA가 몇 번 염색체 내로 삽입된 것을 확인할 수 있으리라 생각된다.

형질전환 배추의 계통 특이적인 마커를 개발하고자, 도입 유전자의 벡터내의 염기서열과 genome내의 T-DNA 삽입부위의 염기서열을 바탕으로 프라이머를 제작하였고, 이들 프라이머 조합별로 증폭되는 산물의 예상크기는 표 1에 나타내었다. 프라이머 조합의 마커 특이성을 확인하고자 416-1, 416-3개체들을 대상으로 PCR을 수행하였다 (Figure 5). 그 결과 A, B, C, F조합에서 416-3 개체에서만 특이적으로 증폭되었으나 나머지 조합에서는 416-1 개체에서도 증폭된 산물을 얻게 되어 이들은 계통 특이 프라이머로 적합하지 않다고 판단하였다. 일반적으로 PCR분석시 프라이머의 게놈내의 유사성 또는 프라이머의 낮은 annealing 온도 때문에 비특이적으로 증폭되었다는 보고들이 있다 (Malhortra et al. 1998, James et al. 2003). 따라서 계통 특이적인 프라이머를 개발하기 위해서는 높은 annealing 온도조건에서도 안정적인 특이적으로 증폭되는 프라이머의 개발이 요구된다.

계통 특이프라이머를 이용한 적정 PCR 조건을 수립하고자, 416-1과 416-3 개체로부터 DNA를 분리하여 DNA 농도, 프라이머 농도, annealing 온도별 PCR조건을 수립하였다. DNA농도별 PCR 조건을 확인하고자 프라이머 조합 B를 이용하여 분석을 수행하였다. DNA농도를 10, 25, 50, 100, 250, 500 ng으로 하고, 프라이머는 200 μM로 하여 PCR을 수행한 결과, DNA농도가 10 ng일 경우에는 밴드가 희미하게 증폭되었으나, 25 ng 이상의 농도에서는 모두 밴드의 증폭을 확인할 수 있었다 (Figure 6A). 기존의 연구결과에서도 DNA

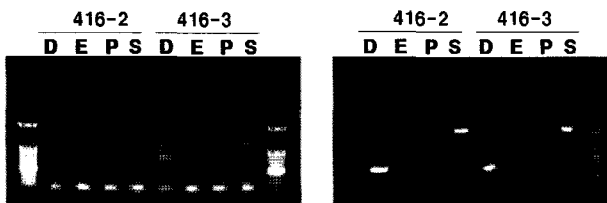


Figure 3. Representative gels from primary PCR reaction (A) and secondary PCR reaction (B) for transgenic Chinese cabbage 416-2 and 416-3 line flanking region. The genomic DNAs from 416-2 and 416-3 were restricted with *DraI* (D), *EcoRV* (E), *PvuII* (P), and *StuI* (S) to a total digestion, ligated to genome walking adapter of Universal Genome Walking Kit (Clontech, USA), to create different libraries, and used as template for PCR. (A) panel represents the primary PCR reaction results using barF1 and AP1 primers. (B) panel represents the secondary PCR reaction results using barF2 and AP2 primers.

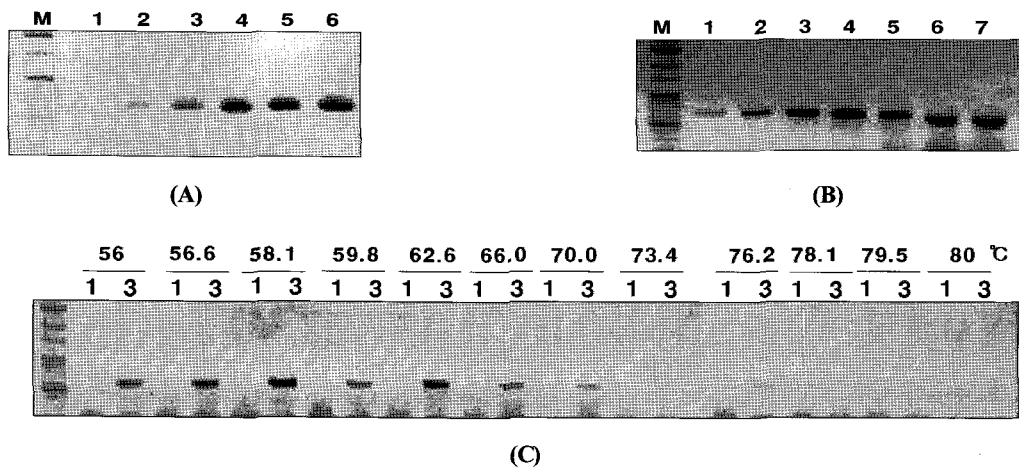
```

ataaagaacccttagtatgtatttggatattgtaaaatacttctatcaataaaatttct 60
aattcctaaaccaaaatccagtaactaaaatccagatccccgaattaattcggcgtaa 120
tcagtcacattaaaacgtccgcaatgtgttattaagttgtctaaagcgtcaattTGTTA 180
CAGCCAAATATATCTCTGCTCTAAACTAATTTTGTAAACCTTATGCCRAAAAACCTAACAA 240
ATCTTACAAATGGTCAGATTATTC TAAGCAGAGCCGAACCAATGATTAAC TAATTAGCTT 300
TTAGTTAAAGTTATACATATATCAATTTACCAATAAATACCTACCTATTACAATTAGTTAAAT 360
CTTCCATAAACCAAAAATTCACAGAAAATAATGCTTCATGAANAATTTAGATATTAACCC 420
ATAAGAAAACAAAATTTCAATAACAAAGAGTTATTAATAAAGCCTTTTTGTGTTTGTGGCC 480
CAAAGGTGATTAAGCTGACTCGATAATCGGTTTAAATAACAATTAAGGTTTACTTTTGA 540
TTTGGTTCGGTTTATTTTCTATAATCTATTTCGAGATCACGTGAGGCATGTTGGACAT 600
CCACGAAATGGCCAAATCGCTTTTACCAGCCC 632
    
```

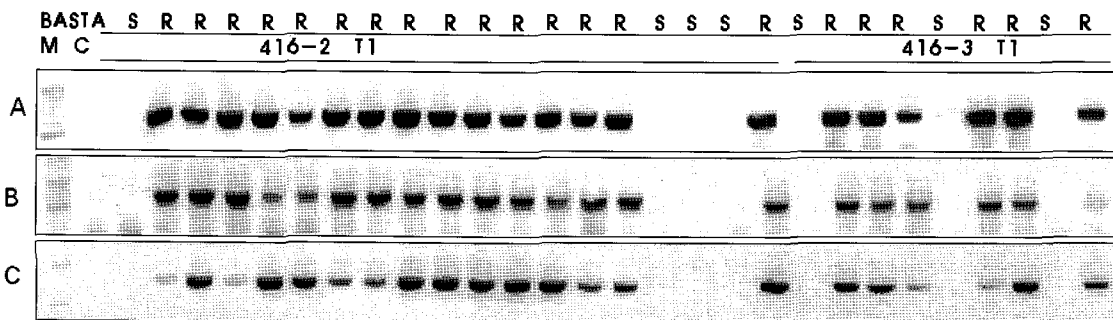
Figure 4. Nucleotide sequences between the Chinese cabbage genome and the integrated T-DNA. Capital letters represents the flanking genomic sequences and lower case letters show the partial of bar gene. Underlined letters show the left border of T-DNA.



Figure 5. Agarose gel electrophoresis of PCR product amplified with nine combinations of event-specific primers. 1: DNA from transgenic Chinese cabbage line 416-1 and 3: DNA from transgenic Chinese cabbage line 416-3. A-H represents the specific pairs, which amplified the T-DNA integration region.



**Figure 6.** Effect of DNA, primer concentration and annealing temperature on event-specific PCR reaction. (A) Effect of template concentrations on PCR. DNA was taken at different concentration (10~500 ng), (B) Effect of primer concentrations on PCR. Primers were used different concentration (25~1,600  $\mu$ M) for PCR reaction, (C) Effect of annealing temperature on PCR. The numbers above the lanes show the annealing temperatures.



**Figure 7.** PCR amplification of the event-specific fragments of progenies from 416-2 and 416-3 plants. A, B, and C represent the specific primer set combination. R and S mean herbicide resistance and herbicide-susceptible, respectively.

농도에 따라 형질전환 작물의 PCR 결과가 다르게 나타남이 보고되었다 (James et al. 2003). 적정 프라이머의 농도조건을 알아보려고 DNA를 100 ng으로 하고, 프라이머 조합 B의 농도를 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1,600  $\mu$ M로 하여 PCR을 수행하였다 (Figure 6B). 그 결과 프라이머의 농도가 800  $\mu$ M 이상이 될 경우 밴드가 두꺼워짐을 확인할 수 있었다. 따라서 계통특이 프라이머를 이용하여 PCR을 수행할 때 DNA농도는 25 - 250 ng으로 사용하고, 프라이머는 25 - 400  $\mu$ M 농도를 이용하는 것이 적합함을 알 수 있었다.

계통 특이 프라이머를 이용하여 PCR 검정을 수행할 때 적정 annealing 온도를 결정하기 위해서 416-1과 416-3의 DNA를 100 ng, 프라이머 농도를 200  $\mu$ M로 하여 gradient PCR을 수행하였다 (Figure 6C). 그 결과 56°C~72°C까지 416-3에서만 특이적으로 증폭됨을 확인할 수 있었다. 낮은 온도인 56°C에서도 416-1에서는 증폭이 이루어지지 않고 416-3에서만

특이적으로 증폭이 이루어져서 낮은 온도에서도 계통특이 개체를 선발하는데 사용될 수 있으리라 판단된다. 위의 결과로 계통특이 PCR을 수행할 경우, DNA농도는 25 - 250 ng, 프라이머는 25 - 400  $\mu$ M, annealing 온도 60°C - 65°C로 하는 것이 적당하리라 판단된다.

#### 계통 특이 마커를 이용한 해충저항성 배추의 후대검정

위에서 선발된 조합을 이용하여 해충저항성 배추를 자가 수정하여 얻은 후대를 가지고 PCR 분석을 수행하였다. 분석 조건은 본 실험에서 확립된 조건을 이용하여 수행하였다. 416-2와 416-3의 자가수정하여 얻은 후대의 잎으로부터 DNA를 추출하여 계통 특이 마커를 이용하여 PCR을 수행한 결과는 Figure 7과 같다. 제초제 처리 후 저항성을 나타내는 개체들은 계통특이 프라이머를 이용하여 PCR 분석 결과에서도 모두 밴드가 증폭되어 이들의 연구결과는 서로 일치되

었다. 따라서 계통 특이 프라이머를 이용하여 PCR 분석을 수행한다면 후대에서 신속하고 정확하게 형질전환체를 판별할 수 있으리라 판단된다.

이상의 결과로 형질전환 배추의 환경위해성 평가를 위한 유전자변형 식물의 도입유전자의 확인, 도입유전자의 복제수, 도입유전자의 게놈내 삽입 위치 및 주변 염기서열들을 확인하였고, 이를 이용한 형질전환 배추에 특이적인 프라이머 조합을 개발하였다. 앞으로 형질전환 배추를 자가수정하여 도입유전자의 후대 안전성 및 마커의 후대 적용가능성등을 확인하고 개발된 계통 특이 프라이머의 정성분석법을 개발하는 실험을 수행하고자 한다.

## 적 요

유전자변형 작물의 상업화를 위해서는 유전자변형 작물이 식품으로서의 안전성과 환경에 미치는 영향에 관한 평가가 이루어져야한다. 이를 위해 개발자는 유전자변형 작물의 방출이전에 유전자변형 작물 개발에 관한 정보를 제출해야만 한다. 본 연구는 유전자변형 작물의 환경위해성 평가를 위한 분자생물학적 자료를 제공하고자 수행하였다. 아그로박테리움 형질전환법을 통하여 해충저항성 *CryIIAc* 유전자가 도입된 배추 형질전환체를 획득한 후, 분자생물학적인 분석을 통하여 유전자의 copy수, 안정성, 식물체내에서의 발현을 확인하였고, T-DNA의 배추게놈내의 인접서열을 분석하였다. T-DNA의 게놈내 삽입 인접서열을 바탕으로 유전자변형 배추를 동정할 수 있는 프라이머를 제작하였고, 이를 이용한 검정방법을 수립하였다. 계통 특이 프라이머를 이용한 해충저항성 배추 후대의 PCR 분석결과와 제초제 처리결과가 서로 일치하였다. 본 연구 결과로 환경위해성 평가를 위한 해충저항성 배추의 분자생물학적인 자료를 획득하였으며, 개발된 프라이머는 해충저항성 배추의 검출을 위하여 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 GM작물 실용화연구비 (05-5-24-5-2)와 바이오그린21사업 (05-5-21-20-1)에 의해 지원되었습니다.

## 인용문헌

농림부 (2002) 유전자변형농산물의 환경위해성 평가지침. 농림부

고시 제2002-02호

- Berdal KG, Holst-Jensen A (2001) Roundup ready soybean event specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analysis. *Eur Food Res Technol* 213: 432-438
- Cankar K, Ravnikar M, Zel J, Gruden K, Toplak N (2005) Real-time polymerase chain reaction detection of cauliflower mosaic virus to complement the 35S screening assay for genetically modified organisms. *J AOAC Int* 88: 814-822
- Collonnier C, Schattner A, Berthier G, Boyer F, Coue-Philippe G, Diolez A, Duplan MN, Fernandez S, Kebdani N, Kobilinsky A, Romaniuk M, De Beuckeleer M, De Loose M, Windels P, Bertheau Y (2005) Characterization and event specific-detection by quantitative real-time PCR of T25 maize insert. *J AOAC Int* 88: 536-546
- Hardegger M, Brodmann P, Herrmann A (1999) Quantitative detection of the 35S promoter and the NOS terminator using quantitative competitive PCR. *Eur Food Res Technol* 209: 83-87
- Hernández M, Pla M, Esteve T, Prat S, Puigdomenech P, Ferrando A (2003) A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize YieldGard® based on the 3'-transgene integration sequence. *Transgenic Res* 12: 179-189
- Hupfer C, Hotzel H, Sachse K, Engel KH (1998) Detection of the genetically modification in heat products of Bt maize by polymerase chain reaction. *Z Lebensm Unters Forsch* 206: 203-207
- James C (2006) Global status of commercialized biotech/GM crops in 2006. ISAAA Briefs No.35-2006
- James D, Schmidt AM, Wall E, Green M, Marshi S (2003) Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean, and canola by multiplex PCR analysis. *J Agri Food Chem* 51: 5829-5834
- James D, Schmidt AM, Wall E, Green M, Masri S (2003) Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean, and canola by multiplex PCR analysis. *J Agric Food Chem* 51: 5829-5834
- Kim JS (2002) Composite of a linkage map of *Brassica rapa* (ssp. *pekinensis*) using EST clones and comparative genome study to *Arabidopsis thaliana*. PhD thesis, Kyunghee University, Suwon, Republic of Korea
- Kim YM, Sohn SH, Jeong SI, Yoon MS, Kim TS, Park YH (2002) Detection methods for genetically modified soybeans. *J Korean Soc Agri Chem Biotechnol* 45: 185-189
- Lee SW (2003) Current research status on the development of genetically modified plants in Korea. *Kor J Plant Biotech* 30: 1-6
- Malhotra K, Foltz L, Mahoney WC, Schueler PA (1998) Interaction and effect of annealing temperature on primers

- used in differential display RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 26: 854-856
- Matsuoka T, Kuribara H, Akiyama H, Miura H, Goda Y, Kusakabe Y, Isshiki K, Toyoda M, Hino A (2001) A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize. *J Food Hyg Soc Japan* 42: 24-32
- Matsuoka T, Kuribara H, Takubo K, Akiyama H, Miura H, Goda Y, Kusakabe Y, Isshiki K, Toyoda M, Hino A (2002) Detection of recombinant DNA segments introduced to genetically modified maize (*Zea mays*). *J Agric Food Chem* 50: 2100-2109
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Nielsen CR, Berdal KG, Holst-Jensen A (2004) Characterisation of the 5'-integration site and development of an event-specific real-time PCR assay for NK603 maize from a low starting copy number. *Eur Food Res Technol* 219: 421-427
- Rho JK, Lee T, Jung SI, Kim TS, Park YH, Kim YM (2004) Qualitative and quantitative PCR methods for detection of three lines of genetically modified potatoes. *J Agric Food Chem* 52: 3269-3274
- Rønning SB, Vaitilingom M, Berdal KG, Holst-Jensen A (2003) Event specific real-time quantitative PCR for genetically modified Bt11 maize (*Zea mays*). *Eur Food Res Technol* 216: 347-354
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments. *J Mol Biol* 98: 503-517
- Taverniers I, Windels P, Vaitilingom M, Milcamps A, Van Bockstaele E, Van Den Eede G, De Loose M (2005) Event-specific plasmid standards and real-time PCR methods for transgenic Bt11, Bt176, and GA21 Maize and transgenic GT73 canola. *J Agric Food Chem* 53: 3041-3052
- Vaitilingom M, Pijnenburg H, Gendre F, Brignon P (1999) Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and RoundupReady soybean in some representative foods. *J Agric Food Chem* 47: 5261-5266.
- Windels P, Bertrand S, Depicker A, Moens W, Van Bockstaele E, De Loose M. (2003). Qualitative and event-specific PCR real-time detection methods for StarLink maize. *Eur Food Res Technol* 216: 259-263.
- Woo HJ, Lim SH, Lee KJ, Won SY, Kim TS, Cho HS, Jin YM. (2006) Current development status on the genetically modified crops in Korea. *Korean J Intl Agri* 18: 221-229
- Yang L, Pan A, Zhang K, Yin C, Qian B, Chen J, Huang C, Zhang D (2005) Qualitative and quantitative PCR methods for event specific detection of genetically modified cotton MON1445 and MON531. *Transgenic Res* 14: 817-831
- Yang R, Xu W, Luo Y, Guo F, Lu Y, Huang K (2007) Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of roundup ready event GT73 based on the 3'-integration junction. *Plant Cell Rep* 43: 250-257
- Zimmermann A, Liniger M, Luthy J, Pauli U (1998) A sensitive detection method for genetically modified MaisGard™ corn using a nested PCR-system. *Lebensm-Wissu Technol* 31: 664-667

(접수일자 2007년 10월 18일, 수리일자 2007년 11월 26일)