

혹명나방저항성 GM 벼의 분자생물학적 특성 및 특이 마커를 이용한 검정

신공식^{1*} · 이시명¹ · 임선형¹ · 우희종¹ · 조현석¹ · 이경렬¹ · 이명철² · 권순종¹ · 서석철¹
¹농촌진흥청 국립농업과학원, ²농촌진흥청 첨단농업과

Molecular biological characteristics and analysis using the specific markers of leaf folder-resistant GM rice

Kong-Sik Shin^{1*} · Si-Myung Lee¹ · Sun-Hyung Lim¹ · Hee-Jong Woo¹ · Hyun-Suk Cho¹ · Kyeong-Ryeol Lee¹ ·
Myung-Chul Lee² · Soon-Jong Kweon¹ · Seok-Cheol Suh¹

¹National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea

²High-Tech Agriculture Division, RDA, Suwon 441-707, Korea

Abstract In recent years, several genetically modified (GM) crops have been developed worldwide through the recombinant DNA technology and commercialized by various agricultural biotechnological companies. Commercialization of GM crops will be required the assesment of risks associated with the release of GM crops. In advance of the commercial release of GM crops, developer should submit the several information on GM crops for approval. In this study, we carried out to provide the molecular data for the risk assesment of GM rice containing insect-resistant gene, modified *CryIAC* (*CryIAC1*). Through the molecular analysis with *CryIAC1* induced GM rice, we confirmed the steady integration and expression of transgene, the transgene copy number, the adjacent region sequences of inserted gene into rice genome, and the transgene stability in progenies. For the qualitative PCR detection methods, specific primer pairs were designed on the basis of integration sequences, and construct- and event-specific detection markers were developed for leaf folder-resistant rice, Cr7-1 line. From these results, we demonstrated that the molecular data and the PCR detection methods of leaf folder-resistant GM rice could be acceptable to conduct the biosafety and environment risk assesment.

서 론

생명공학기술의 발전으로 식량증산, 영양개선, 기능성 강화, 치료용 물질생산 등의 목적을 위하여 유전자재조합 농작물이 개발되고 있고, 전 세계적으로 유전자변형 (genetically modified, GM) 작물의 재배면적이 2007년 기준 23국에서 1억1,430만 헥타르 (2억 8,240만 에이커)로 상업화 이후 67배 이상 증가하여 누적 재배면적이 6억9,000만 헥타르에 달한다고 농업생명공학 국제서비스 (International Service for the Acquisition of Agribiotech Application, ISAAA)는 보고하였다 (James 2007). 유전자변형 작물의 상업화는 1994년 미국의 칼젠 (Calgene)사에서 보존성을 향상시킨 토마토를 개발하여 상품화 한 이후, 2006년 기준으로 개발이 완료되어 상품화가 허가된 GM 작물은 옥수수, 유채, 콩, 토마토, 면화, 감자 등 18개 작

물 78개 품종이 있다 (James 2006; Kim et al. 2006). 국내에서도 경제적으로 중요한 작물인 벼, 토마토, 감자, 콩, 고추, 배추, 들깨 등 여러 작물을 대상으로 다양한 유전자를 이용한 형질전환 작물이 개발되고 있으나 아직까지 실용화 단계에는 이르지 못하고 있다 (Kim et al. 2006; Woo et al. 2006). 또한 GM 작물의 상업화를 위해서는 환경위해성 및 안정성 평가가 요구되고 있으나 이에 대한 연구는 극히 미흡한 실정이다. 국외의 경우는 유전자변형 작물을 생산하는 생명공학회사들을 주축으로 유전자변형 농산물 및 식품에 대한 검정법 개발 연구가 활발히 진행되고 있다.

한편 국내의 형질전환작물의 실용화를 위해서는 농림수산식품부에서 법으로 고시하고 있는 ‘유전자변형농산물의 환경위해성 평가심사 지침 (농림부고시 2002-2호)’에 따라 유전자변형 식물의 도입유전자의 확인, 도입유전자의 위치 및 주변서열, 도입유전자의 복제수, 도입유전자의 세대간 안정적 유전 및 발현, 도입유전자의 검출 및 발현 확인에 이용된 방법 등을 명시하도록 하고 있고, 유전자변형 농산물에 대한 검정법 및 표시에 적용 가능한 검사법이

*Corresponding author Tel 031-299-1128 Fax 031-299-1122

E-mail: kongsiks@rda.go.kr

요구되고 있다. 유전자변형 작물의 검사법 중 도입유전자의 확인을 위해서 DNA를 이용한 방법이 지금까지 가장 보편적으로 이용되고 있는 검출법으로 정성적인 방법과 정량적인 PCR 분석방법이 있다. DNA를 이용한 유전자변형 작물의 PCR 검출법에는 구체적으로 screening, gene-specific, construct-specific 및 event-specific PCR 검출법 등을 들 수 있다 (Matsuoka et al. 2002; Rho et al. 2004; Lee et al. 2006; Pan et al. 2006). Screening PCR법은 유전자변형 작물의 개발 시 현재까지 보편적으로 이용되고 있는 35S 프로모터나 Nos 터미네이터 등을 검지하여 유전자변형체의 유무를 확인하게 되고, gene-specific 및 construct-specific PCR법은 도입된 목적유전자의 특정 부분을 증폭시켜 검지하는 PCR 방법이다. Gene-specific 및 construct-specific 방법은 변형된 유전자 및 구조가 각기의 유전자변형체에 이용됐을 때, 또는 일정치 않은 카피수를 가질 때 잘못된 양성반응을 나타낼 수 있고, 더욱이 이들 방법은 같은 구조의 유전자 운반벡터로 유전자를 삽입하기 때문에 얻어진 유전자변형체의 계통 간의 구별이 어렵다는 단점을 가지고 있다 (Taverniers et al. 2005; Pan et al. 2006). 이러한 단점을 해결하기 위해서 최근에는 event-specific PCR 방법이 이용되고 있다. Event-specific 방법은 T-DNA가 삽입된 식물계놈 내의 인접서열과 운반체 내의 염기서열을 바탕으로 특이 프라이머를 작성하여 유전자변형 작물을 동정하는 방법으로 식물체내 삽입된 인접서열의 분석 및 도입유전자의 카피수의 확인이 선행되어야 한다. 또한 이들 방법은 서로 다른 유전자를 갖고 있는 두 유전자변형 개체를 교배하여 얻어진 stack gene 작물의 동정에 이용할 수 있으며, 특히 교배에 사용된 유전자변형 작물의 모본 계통을 파악할 수 있는 장점이 있다 (Lim et al. 2007). Event-specific 방법을 이용한 GM 작물의 검출로 RRS 콩, Bt11 옥수수, NK603 옥수수 및 Mon531 면화 등에 대하여 검정법이 개발되어 보고되었고 (Berdal and Holst-Jensen 2001; Huang and Pan 2005; Taverniers et al. 2005; Pan et al. 2006), 국내에서는 Lim 등 (2007)이 국내개발 GM 배추에 대하여 계통특이 마커를 개발하여 보고한 바 있다.

금후 국내개발 GM 작물의 상업화를 위해서는 환경위해성 평가의 심사 자료를 마련해야 하며, 이에는 분자생물학적 특성 확인 및 검출 방법 개발은 필수요소라 할 수 있다. 따라서 본 연구는 미생물로부터 유래한 해충저항성 Bt 유전자의 주요 살충성 염기서열을 작물에 적합하도록 조절한 modified *CryIac* 유전자 (*CryIac*)로 형질전환한 벼에 대하여 생물검정의 결과, 흑명나방 유충에 특이적으로 높은 살충력이 확인되어서, 이 흑명나방저항성 GM 벼의 실용화를 목적으로 GMO 환경위해성 평가를 위한 분자생물학적 기초자료를 마련하고자 유전자변형 생물의 도입유전자, 도입유전자의 복제수, 도입유전자의 계놈 내 삽입위치 및 인접서열 등을 확인하였다. 또한 이들 유전정보를 이용하여 선발 event 계통에 대한 검정 특이 마커를 개발하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에 이용한 GM 벼 Cr7-1 계통은 농촌진흥청에서 토양미생물로부터 유래한 Bt 유전자를 작물에 적합하도록 살충성 염기의 일부분을 변형시킨 유전자, *CryIacI*를 벼에 형질전환하여 해충저항성 벼로 개발한 것으로 non-GM 벼 (낙동벼)와 같이 *Oryzae sativa* L., *Japonica* 종이다. 실험에 이용한 대조작물로는 콩, 배추, 감자, 고추, 상추, 참외, 들깨, 토마토, 완두, 피망, 고구마 등을, 벼 대조구로는 간척벼, 계화벼, 그루벼, 금남벼, 금오벼, 금호1호, 금호2호, 낙동벼, 남감벼, 남원벼, 남천벼, 남평벼, 내풍벼, 농안벼, 다산벼, 대립1호, 대산벼, 대안벼, 대야벼, 대진벼, 대청벼, 동안벼, 동진벼, 동해벼, 둔내벼, 만금벼, 봉광벼, 삼백벼, 상산벼, 상주벼, 상주찰벼, 삼천벼, 서안벼, 서진벼, 소백벼, 신선찰벼, 신운봉벼, 장안벼, 조령벼, 주안벼, 중화벼, 진부벼, 진부올벼, 진부찰벼, 진미벼, 청명벼, 추청벼, 아랑향찰, 안산벼, 안중벼, 양조벼, 영남벼, 영해벼, 오대벼, 오봉벼, 운봉벼, 운장벼, 일미벼, 화남벼, 화동벼, 화서벼, 화선찰벼, 화성벼, 화신벼, 화영벼, 화중벼, 향남벼, 향미1호, 향미2호, 탐진벼, 팔공벼 등 71개 품종을 이용하였다. 또한, Cr7-1과 같은 유전자 운반체로 형질전환하여 얻은 계통들을 대조하였고, 자체개발한 GM 작물로 벼, 콩, 고추, 감자, 배추, 들깨 등을 PCR 검출 대조구로 사용하였다.

분자생물학적 검정

DNA 추출 및 Southern blot 분석 : 식물체의 genomic DNA는 각 시료 1 g씩을 취하여 막자사발에 넣고 액체질소를 가하여 분말화한 후 DNeasy Plant kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, USA)를 이용하여 260/280 nm 값이 1.8~2.0 사이인 추출액을 각 실험에 이용하였다.

유전자변형 식물체의 도입유전자 특성 확인을 위해서 Southern blot을 수행하였으며, 방법은 추출한 genomic DNA 5 µg를 제한효소 *PstI*과 *ClalI*으로 각각 달리 처리하여 절단하고 1% agarose gel 상에서 전기영동 한 다음 denaturation 과정을 수행하였다. 이 후 nylon membrane (Hybond-N+, Amersham, Uppsala, Sweden)에 겔의 DNA를 전이시키고, Membrane의 DNA 단편들을 UV-crosslink (1200×µJ/cm²)로 고정된 후 hybridization buffer (0.5 M Na₂PO₄ pH 7.2, 1% BSA, 7% SDS, 1 mM EDTA, 10 mg/mL salmon sperm testicle DNA)로 1시간 동안 pre-hybridization하였다. Hybridization은 Random primer DNA labeling kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)를 이용하여 미리 형질전환 벼를 *PstI*으로 절단하여 준비한 2.1kb의 m*CryIac* 단편 DNA를 프로브로하고 ³²P로 labeling하여, 65°C에서 16~18시간 동안 hybridization 하였다. Membrane은 washing solution (1st solution, 2X SSC, 0.1% SDS; 2nd solution, 1X SSC, 0.1% SDS; 3rd solution, 0.2% SSC, 0.1% SDS)으로 처리하고 X-ray 필름 (Super RX, Fuji, Tokyo, Japan)에 감광하여 형질전환체의 도입유전자 특성을 확인하였다.

면역학적 방법을 이용한 유전자 발현 확인 : 도입유전자의 단백

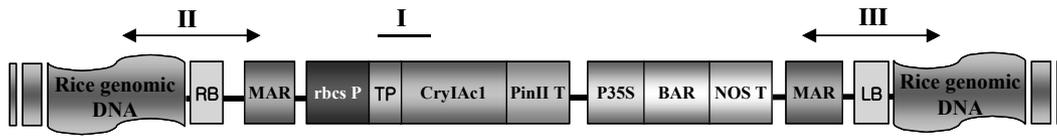


Figure 1. Schematic diagram of PCR strategy for the detection of leaf folder resistant GM rice. I: construct-specific primer region, II and III: event-specific primer regions of right and left border

Table 1 Sequences of primers used for the event and construct-specific detection in this study

| No. | Primer name | Sequences (5'-3') | Target gene | Amplicon size (bp) |
|-----|-------------|----------------------------|--------------------|--------------------|
| I | TPCry-5' | 5'-CTTCGGCAACGTCAGCAAT-3' | TP/CryIAc1 | 258 |
| | TPCry-3' | 5'-GATGGACCAAAGATACCCAG-3' | | |
| II | Mrs-5' | 5'-TTCTGAGCACGCATAGGAAG-3' | RB-franking region | 341 |
| | MrRB-3' | 5'-TGTCATGCCCTGTTATGCTG-3' | | |
| III | Mrs-5' | 5'-TTCTGAGCACGCATAGGAAG-3' | LB-franking region | 236 |
| | MrLB-3' | 5'-TTTGCCCTACCATCTGAAGG-3' | | |

질 발현 확인을 위하여 immunostrip 검정 (lateral flow strip test)을 실시하였다. 각 시료를 마쇄하고 추출액을 넣어 단백질을 추출한 후, *bar* 도입유전자에 대해서는 Trait LL Test Strip (Strategic Diagnostics Inc., Newark, USA)을, *CryIAc1* 도입유전자에 대해서는 Cry1Ab-1Ac ImmunoStrip Test (Agdia, Elkhart, USA)을 이용하여 제조사가 제공한 방법에 따라 immunostrip 검정을 수행하였다.

인접서열 분석 : 선발계통에 대한 genomic DNA 상의 도입 T-DNA의 인접서열을 확인하고자 Kim (2005b)의 방법에 따라 두 단계로 실시하였다. 먼저, genomic DNA를 *HincII*로 절단하고, 이후 AD1 (5'-TAATACGACTCACTATAGCAATTAACCTCACTAAAGGGA-3')와 AD2 (5'-TCCCTTAG-3')으로 구성된 adaptor를 ligation하였다. 두 번째 단계로, adaptor에 대한 A1 (5'-TAATACGACTCACTATAG-3') 및 A2 (5'-GACTCACTATAGCAATTAAC-3')의 특이 프라이머를 제작하고, T-DNA의 right border에 대해서 RB1 (5'-GAAGGAGCCACTCAGCAAGC-3') 및 RB2 (5'-GGACAAGCCGTTTACGTTTG-3')를, left border에 대해서는 LB1 (5'-ATAAGGCTGTGTGTCCTTG-3') 및 LB2 (5'-ACTGAATTCGAGCTCCTGAC-3')의 primer를 제작하여 단계별로 PCR를 수행하였다. 이후 증폭된 PCR산물은 1% agarose gel에 전기영동하고 Gel Extraction kit (Qiagen)를 이용하여 정제 후, pGEM-T easy vector (Promega, Madison, USA)에 삽입하여 염기서열을 확인하였다. 확인된 염기서열은 NCBI BLAST 분석을 이용하여 동일성 분석을 수행하였다.

특이 프라이머 제작 및 PCR 검정 : 식물 발현벡터의 유전정보 및 T-DNA의 인접서열을 바탕으로 해충저항성 GM 벼의 선발계통에 대한 검정 특이 프라이머를 제작하였다 (Figure 1; Table 1). 제작한 프라이머는 그 특이성을 확인하고자 온도, 프라이머 농도 및 DNA의 농도에 따른 영향을 조사하였고, 프라이머의 검정 정확성을 확인하기 위하여 각종 작물별, 계통별 및 세대별 등 다양한 확인 실험을 수행하였다.

기본적인 PCR 반응은 한 시료 당 총 25 μ L로 하여, 2.5 μ L의

10 \times PCR buffer (Ampliqon, Herlev, Denmark) 2 μ L의 dNTP (2.5 mM each, Ampliqon), 1.5 μ L의 1.5 mM MgCl₂ (Ampliqon), 각각 10 μ M의 forward와 reverse primer, Taq DNA polymerase는 TEMPase Hot Start DNA polymerase (Ampliqon)를 1.25 unit 첨가하고, 20 ng의 template DNA가 포함되도록 조성하여 수행하였다. PCR반응 조건은 Dyad Peltier Thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, USA)를 이용하여, 95 $^{\circ}$ C에서 15분간 실시하고, 95 $^{\circ}$ C에서 20초, 60 $^{\circ}$ C에서 40초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 35cycle로 하였으며, 마지막 단계로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 수행하였다. 증폭된 PCR산물은 2% agarose gel 상에서 전기영동 하여 UV로 확인하였다.

결과 및 고찰

해충저항성 GM 벼의 분자생물학적 특성 확인

농촌진흥청은 최근 미생물로부터 유래한 해충저항성 Bt 유전자를 전체 염기 중 살충성을 나타내는 주요 염기서열을 작물에 적합하도록 변형시킨 *CryIAc1* 유전자를 이용하여 해충저항성 벼를 개발하였고, 생물검정 결과 특히 흑명나방 유충에 대하여 우수한 살충력을 나타냄으로써 흑명나방저항성 벼라 명명하였으며 품종화 및 실용화를 위한 안전성 평가가 진행 중에 있다. 국내의 안전성 평가 현황을 보면 농촌진흥청에서 국내개발 된 제초제저항성 벼, 고추, 배추, 감자 및 잔디와 해충저항성 벼 등 7종에 대하여 안전성 평가를 실시하고 있다 (KBCH 2008). 따라서 본 실험은 생육에 있어서 비형질전환체와 차이를 보이지 않고 높은 해충저항성을 나타낸 event Cr7-1 계통을 이용하여 GMO 환경위해성 평가 심사를 위한 분자생물학적 분석 자료를 생산하고자 실시하였다. Genomic DNA 상에 도입유전자의 안정적인 유지 및 발현 확인을 위해서, 먼저 선발계통 Cr7-1 및 형질전환 시키지 않은 낙동벼의 잎으로부터 genomic DNA를 추출하고 *CryIAc1*의 DNA 단편을 probe로 하여 Southern

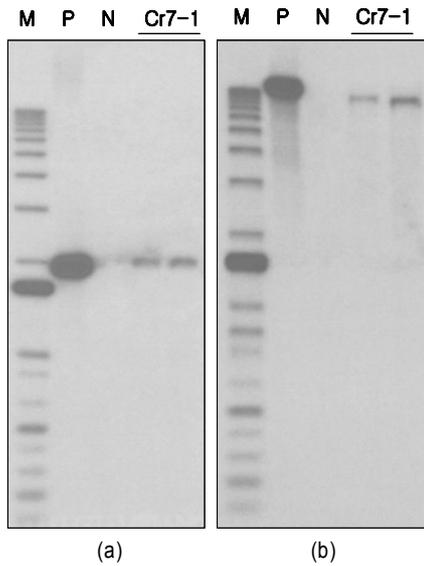


Figure 2. Southern blot analysis of leaf folder resistant GM rice. Genomic DNA was digested with *Pst*I for the two-cut site (A) and *Clal* for the one-cut site (B) followed by hybridization to *CryI*Ac1. M: 1kb DNA ladder, P: positive control, N: wild type plant, Cr7-1: event lines of leaf folder resistant GM rice

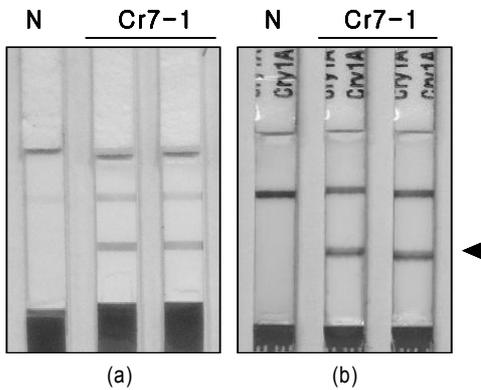


Figure 3. Confirmation of gene expression for leaf folder resistant GM rice by using immunostrip. (A) immunostrip tests for the bar detection, (B) immunostrip tests for the *CryI*Ac1 detection. N: wild type nagdongbyeo, Cr7-1: leaf folder resistant event lines. Arrow indicated the positive bands on bar and *CryI*Ac expression

blot 분석을 수행하였다. 제한효소 *Pst*I과 *Clal*을 각각 달리 처리하고 식물체 내 유전자의 삽입과 도입유전자의 복제수를 blotting으로 형성된 반응밴드로 확인하였다. 제한효소 *Pst*I을 이용하여 *CryI*Ac1 유전자 부분만을 도출시키고, 생성된 밴드를 확인한 결과, 선발 Cr7-1계통은 대조구와 비교하여 확연한 양성반응을 나타내어 목표 유전자가 genome 상에 안정적으로 삽입되었음을 확인할 수 있었다 (Figure 2A). 또한 T-DNA 상의 한 부위를 *Clal*로 절단하여 선발 계통에 대한 도입유전자의 복제수를 분석한 결과 1 copy의 유전자가 삽입되어 있는 것을 확인하였다 (Figure 2B). 같은 유전자 운반 벡터로 형질전환 한 다른 계통에 대해서도 copy수를 확인한 결과

1~3개의 형태를 나타냈는데 (data not shown), 이는 형질전환 상황에 따라 genome 상에 외래유전자가 다양하게 삽입되어지고 있음을 의미한다. *Agrobacterium*으로 식물형질전환 하는 경우 1~3개의 다양한 copy수를 보인다고하며, 일반적으로 copy 수가 많을수록 그 발현양이 높다고 알려져 있으나 정비례하는 것은 아니고, 단일 copy일수록 후대에 유전자의 안정적 유지에 유리하다고 한다 (Lee et al. 1997; Youm et al. 2002). 본 실험의 Cr7-1 계통의 경우에도 단일 copy로 삽입되어 있는 것이 확인되었고, 오히려 높은 copy수를 갖는 개체를 보다 유전적으로 안정된 상태를 유지하는 것으로 파악되었다.

면역학적 방법으로 흑명나방저항성 GM 벼, Cr7-1의 단백질 발현을 확인하고자 항체가 표지되어 있는 시판 immunostrip을 이용하여 lateral flow strip test (LFST)를 수행하였다. Event Cr7-1에 대해서는 bar와 *CryI*Ac1으로부터 뚜렷한 단백질 발현 밴드를 확인할 수 있었으나, 대조구의 경우 어떠한 밴드도 나타내지 않았다 (Figure 3). LFST를 통해서 Cr7-1 계통은 도입유전자에 의한 단백질 발현이 이루어짐이 입증되었고, 시판되고 있는 bar와 *CryI*Ab-1Ac의 immunostrip으로 검출 가능한 것으로 판명되었다.

인접서열 분석

Southern blot 분석으로부터 event 계통, Cr7-1이 1 copy의 유전자가 삽입되어있음을 확인하였으며, 이에 따라 도입유전자의 분자생물학적 특성 분석을 위해서 T-DNA 삽입부위의 인접서열을 Kim (2005b)의 방법에 따라 단계적으로 수행하였다. 먼저, 추출한 gDNA를 제한효소 *Hinc*II로 처리하여 1st PCR을 수행하였고, 이를 바탕으로 2nd PCR을 수행하여 agarose gel 전기영동으로 T-DNA의 right border (RB) 및 left border (LB) 부위의 증폭된 밴드를 확인하였다 (Figure 4A). 증폭된 RB와 LB의 PCR산물은 pGEM-T easy vector에 cloning하여 염기서열을 분석하고, 이들 염기서열에 대하여 NCBI blast 검색을 실시하여 확인한 인접서열을 Figure 4에 나타내었다. 검색 결과 운반체 내의 T-DNA 이외의 염기는 확인되지 않아서, T-DNA만이 벼 genome에 삽입되었음을 알 수 있었다. 또한 T-DNA의 인접서열에 대한 벼 genome의 유사성 분석 및 삽입위치를 확인한 결과, 유사성 있는 염기서열은 확인되지 않았으며, T-DNA의 삽입부위는 벼 genome 제1염색체 내의 9,296,530번 염기서열 부위로 삽입되어 있음을 확인할 수 있었다.

GMO 검출에 있어서 35S 프로모터 및 *Nos* 터미네이터 등을 대상으로 하는 일반적인 screening 검정방법은 자연 상의 바이러스 등에 의한 오염 또는 감염으로 잘못된 양성 반응을 나타낼 수 있고, gene-specific 및 construct-specific 방법은 변형된 유전자와 운반체로 많은 유전자변형체의 생산에 이용되고 있기 때문에 잘못된 반응을 야기할 수 있으며, 또한 동일한 운반체로 삽입되었을 때 다른 유전자변형체 간 구분이 어렵다는 점이 잘 알려져 있다 (Huang and Pan 2005; Taverniers et al. 2005; Pan et al. 2006). 반면 도입유전자의 작물 genome 내 삽입부위의 인접서열을 알고 있다면 계통

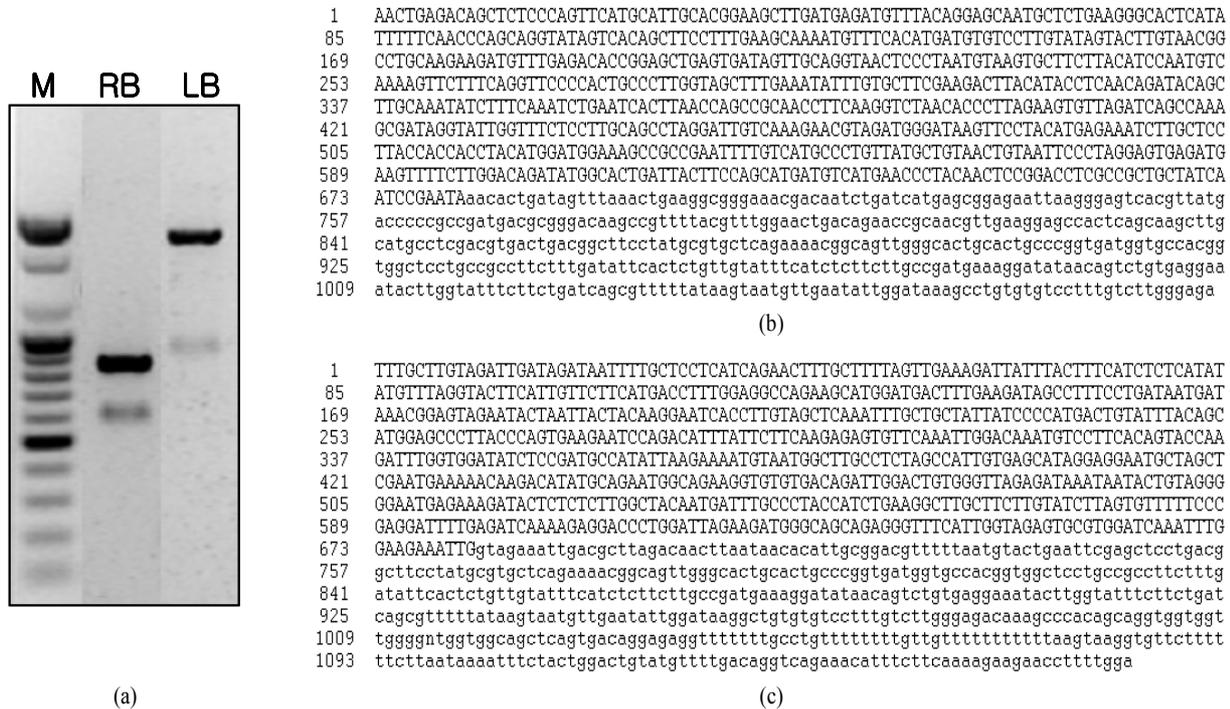


Figure 4. Secondary PCR products (A) and junction sequences of T-DNA (B: right border; C: left border) for the transgenic GM rice Cr7-1 line flanking region. The genomic DNA was digested with *HincII*, ligated to genome walking adapter to create different libraries, and used as template for PCR. M: 1kb DNA ladder, RB: right border, LB: left border. Capital letters represents the flanking genomic sequences and lower case letters show the inner part of each border of T-DNA

특이 (event-specific) 마커를 작성하여 유전자변형 작물의 더욱 세밀한 검출 및 동정에 이용할 수 있다.

특이 프라이머를 이용한 PCR 조건 확립

흑명나방저항성 GM 벼의 특이적인 마커를 개발하고자, 상기 분석으로 확인된 도입유전자의 벡터 내의 염기서열과 벼 genome 내의 T-DNA 삽입부위의 염기서열을 바탕으로 계통특이 (event-specific) 프라이머를, 또한 T-DNA 내의 목적유전자의 염기서열을 바탕으로 구조특이 (construct-specific) 프라이머 쌍을 제작하였다 (Table 1). Table 1에 나타난 프라이머 쌍은 GM 벼에 대한 예비 PCR 실험을 통해서 비특이적으로 증폭되는 PCR 산물을 생산하지 않는 프라이머 쌍들을 최종적으로 선발한 것이다. 일반적으로 프라이머의 특성에 따라 genome 상에 유사성 염기의 존재 및 낮은 프라이머의 annealing 온도에 의해 비특이적인 증폭 산물을 나타낼 수 있기 때문에 최적의 PCR 분석을 위해서는 안정적이고 특이적으로 증폭 반응을 나타낼 수 있는 프라이머 쌍의 개발이 제시되고 있다 (Malhotra et al. 1998; James et al. 2003; Lim et al. 2007). 선발된 구조 및 계통 특이 프라이머에 대한 최적 PCR 조건을 파악하고자 DNA 농도, annealing 온도 및 프라이머 농도를 달리하여 PCR 반응을 수행하였다. 먼저 Cr7-1의 DNA 농도를 10~200 ng의 범위에서 단계별로 조절하고, 20 μM의 프라이머 농도로 하여 PCR를 실시한 결과, 구조 특이 프라이머 (TPCry-5/3), RB를 바탕으로 한 계통특이 프라이머

(Mrs-5'/MrRB-3') 및 LB의 계통특이 프라이머 (Mrs-5'/MrLB-3')에 대하여 각각 258bp, 341bp 및 236bp에서 특이적인 PCR 증폭 산물을 얻었다 (Figure 5). DNA 농도에 대한 밴드 감도를 확인해 보면, 1 ng 농도에서도 특이적인 밴드를 확인할 수 있었고, 10 ng 농도부터 확연한 밴드를 형성하여 최대 농도인 200 ng까지 증폭 밴드를 확인할 수 있었다. 그러나 밴드의 강도 면에서 10 ng 농도 이상에서는 큰 차이를 나타내지 않아 최적의 농도로 10 ng에서 100 ng의 농도 범위가 적절할 것으로 파악되었다 (Figure 5A). 이의 결과로 본 구조 및 계통 특이 프라이머는 낮은 DNA 농도에서도 특이적인 검정이 가능할 것으로 생각된다. Lim 등 (2007)은 프라이머에 대한 DNA 농도별 실험에서 25 ng 이상의 농도부터 확연한 밴드를 확인할 수 있었다고 했는데, 이는 프라이머의 특성, 중합효소의 활성 및 annealing 온도 등 여러 요인에 의해 반응이 좌우 될 수 있기 때문으로 여겨진다. 앞서 DNA 농도 범위가 확인되어, 적정 프라이머 농도를 결정하기 위해서 DNA 농도를 20 ng으로 하고 프라이머 농도를 5~100 μM 범위에서 각각 달리하여 PCR을 수행한 결과, 10 μM 농도 이상에서 뚜렷한 증폭 산물의 형성을 나타내어 Cr7-1에 대한 구조 및 계통 특이 프라이머의 검정을 위한 최적 사용 농도로 10~50 μM 범위가 적당한 것으로 확인되었다 (Figure 5B). 이어 적정 annealing 농도를 파악하기 위해서 55.0~75.0°C 범위에서 각각 달리하여 PCR을 실시한 결과, 높게는 65.0°C 까지 확인 가능한 것으로 나타났으며, 56.5~61.0°C 범위가 3종의 프라이머 쌍 모두에 대하여 가장 적절한 온도 조건으로 확인되었다 (Figure 5C). 이상의

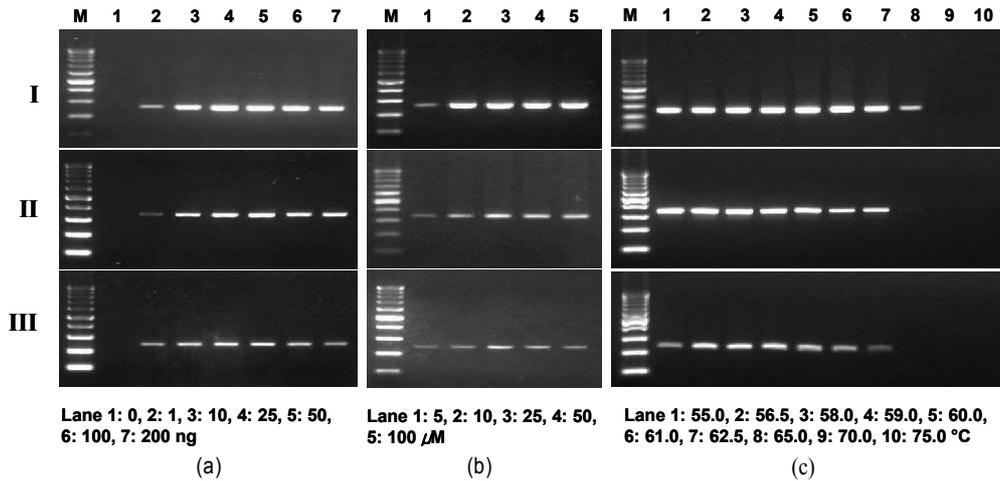


Figure 5. Effect of DNA concentration, primer concentration and annealing temperature on event-specific and construct-specific PCR reaction. (A) Effect of different template DNA concentration (1~200 ng) on PCR, (B) Effect of different primer concentration (5~100 μM) on PCR, (C) Effect of different annealing temperature (55~75 °C). M: 100bp DNA ladder. I, II and III represent the specific primer set for a PCR amplification of leaf folder resistant GM rice

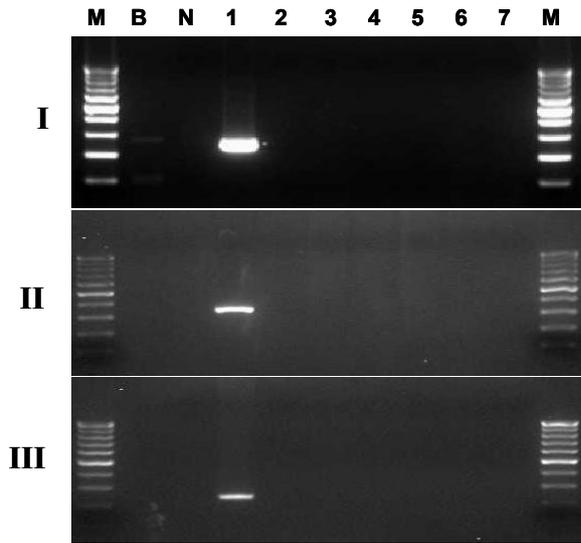


Figure 6. Confirmation of the specific primer set on the different GM crops. M: 100bp DNA ladder, B: no template control, N: wild type nagdongbyeo, lane 1: Cr7-1 event line, lane 2: GM rice, 3: GM soybean, 4: GM paprika, 5: GM potato, 6: GM chinese cabbage, 7: GM perilla. These GM crops were developed in Korea. I, II and III represent the specific primer set for the leaf folder resistant GM rice

결과를 종합해 보면 흑명나방저항성 GM 벼, Cr7-1의 검증을 위해 개발된 구조 및 계통특이 프라이머 쌍의 최적 PCR조건은 10~100 ng의 DNA 농도 범위로 사용하고, 프라이머는 10~50 μM 농도로, 56.0~61.0°C의 annealing 온도 범위가 가장 적절한 반응조건인 것으로 확인되었으며, 이들 프라이머 쌍은 넓은 범위의 PCR반응 조건에서 적용 가능하리라 보여진다.

특이 마커를 이용한 GM 작물 및 non-GM 작물에 대한 확인

상기 PCR조건 실험을 통하여 특이적 반응이 확인된 프라이머 쌍들이 다양한 non-GM 작물 및 GM 작물에 대하여 비특이적인 증폭산물의 형성을 나타내는지 확인하였다. GM 작물에 대한 확인을 위하여 먼저 자체개발 된 각종 GM 작물로서 벼, 콩, 고추, 감자, 배추, 들깨 등을 이용하여 PCR반응을 실시하였다. 그 결과, Figure 6에 나타낸 바와 같이 Cr7-1 계통의 특이적인 반응밴드 이외에 다른 GM 작물에서는 어떠한 특이적인 밴드도 형성치 않음을 확인할 수 있었으며, 다른 GM 작물과 혼합되어 있어도 Cr7-1의 확인이 가능하다고 보여진다.

벼 품종에 있어서 개발 특이 프라이머와 genome 상에 유사 염기 서열의 존재로 비특이적인 반응을 나타낼 수 있기 때문에 국내의 71개 벼 품종으로부터 gDNA를 추출하여 PCR 반응을 수행하였다. Figure 7에서 보는 바와 같이 event Cr7-1 계통은 뚜렷한 특이적인 반응산물을 형성한 반면, 71개 non-GM 벼 품종에서는 구조 및 계통특이 프라이머에 대하여 어떠한 반응밴드도 확인할 수 없었다. 이는 국내의 벼 품종들이 개발된 프라이머 쌍과 비특이적으로 반응할 수 있는 여타 염기서열도 가지고 있지 않다는 것을 보여주고 있으며, Cr7-1이 여러 벼 품종과 혼재되어 있을 때 이들 특이 마커를 이용한다면 쉽게 구분할 수 있을 것으로 본다. 본 연구에서는 또한 non-GM 작물에 대하여 반응산물의 생산 여부를 확인하였으며, 상기 GM 작물에서 확인된 것처럼 non-GM 작물에서도 특이적인 반응밴드를 형성하지 않는 것으로 나타났다 (Figure 8). 이상과 같이 Cr7-1 계통의 검정용 특이 마커를 다양한 작물 및 벼 품종에 적용하여 확인해본 결과, PCR반응에 의해 증폭될 수 있는 작물 genome 상의 어떠한 유사 염기서열도 존재하지 않음이 확인되었으며, 이는 PCR반응에 의해 증폭된 특이적인 산물에 대하여 신뢰할 수 있을 것으로 생각된다.

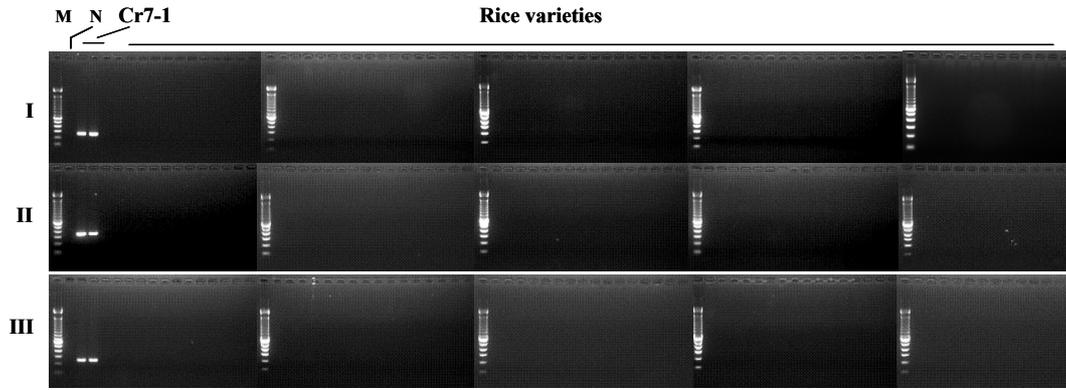


Figure 7. PCR amplification of the event-specific and construct-specific primers on the several non-GM rice varieties. M: 100bp DNA ladder, N: wild type nagdongbyeo, Cr7-1: leaf folder resistant event lines. The 71 varieties of cultivated non-GM rice were shown in material and methods. I, II and III represent the specific primer set for the leaf folder resistant GM rice

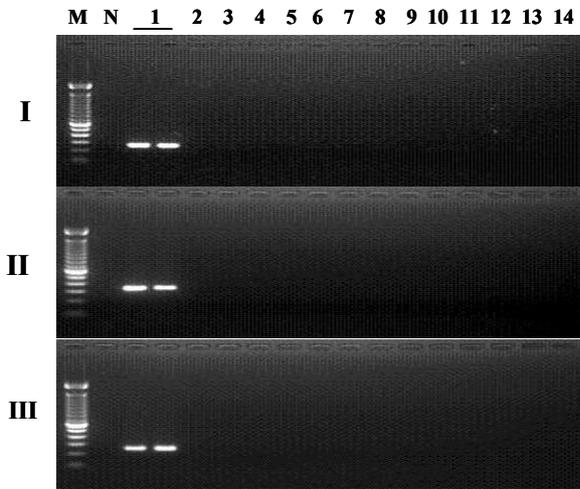


Figure 8. PCR amplification of the event-specific and construct-specific primers on the various non-GM crops. M: 100bp DNA ladder, N: wild type nagdongbyeo, lane 1: Cr7-1 event lines, lane 2: nagdongbyeo, 3: hwayoungbyeo, 4: chinese cabbage, 5: papper, 6: potato, 7: lettuce, 8: soybean, 9: perilla, 10: tomato, 11: musk melon, 12: pea, 13: pimento, 14: sweet potato. I, II and III represent the specific primer set for the leaf folder resistant GM rice

특이 마커를 이용한 GM 벼의 후대 및 계통 간 검정

식물 형질전환을 수행할 때 일반적으로 동일한 식물벡터를 이용하여 많은 개체를 얻게 되며, 이 개체들은 genome 상에 각기 다른 위치에 외부유전자가 삽입되기 때문에 서로 다른 개체로 각각의 계통을 이루게 된다. 반면 이들 계통들은 같은 목표유전자를 포함하고 있어 T-DNA 상의 유전자에 대한 검출 마커를 이용하게 되면 계통 간의 구별이 어려워 동일 계통으로 잘못 확인될 수 있다. Genome 상의 도입유전자의 인접서열을 바탕으로 한 계통특이 마커를 구성함으로써 이러한 문제점들을 해결할 수 있게 되었다 (Pan et al. 2006).

흑명나방저항성 GM 벼 검출을 위해 개발된 특이 마커를 이용하여 event 계통과 동일한 운반벡터로 형질전환 된 여러 해충저항성 GM 벼 계통에 대하여 PCR분석을 수행하였고, 또한 Cr7-1의 후대 계통에 대하여 동일하게 검출이 가능한지를 앞서 확립된 PCR 조건을 토대로 반응을 수행하였다. 흑명나방저항성 벼도 event Cr7-1 이외에 Cr103, Cr127 및 HCr3~8 등 동일 운반체를 갖는 여러 형질전환 계통이 생산되었으며, 이들 계통으로부터 event 계통을 구별 가능하지 특이 마커를 이용하여 정성 PCR을 수행하고 증폭된 밴드를 확인하였다 (Figure 9). T-DNA 상의 유전자를 바탕으로 조성된 TPCry-5'/3' (I)로 증폭한 경우 Figure 9A에서 보는 바와 같이 모든 *CryIAc1* GM 벼 계통에서 동일하게 검출됨을 확인할 수 있었다. 반면 두 종의 계통특이 마커, Mrs-5'/MrRB-3' (II)과 Mrs-5'/MrLB-3' (III)의 경우에 있어서는 Cr7-1 계통에 대해서만 특이적인 PCR반응 산물이 형성됨을 확인할 수 있었다. 이는 동일 유전자를 포함하는 다른 계통에 대해서도 계통특이 마커를 사용하게 되면 쉽게 확인 가능한 것을 보여주고 있다. Event Cr7-1의 T1~T5 세대 까지 전개된 후대세대의 gDNA를 추출하여 특이 마커로 PCR을 수행하고 그 결과를 Figure 9B에 나타내었다. 후대세대에 대한 PCR 분석 결과, 모든 세대에서 동일한 특이적인 PCR 증폭밴드를 확인할 수 있었고, 후대세대가 지속적으로 전개되더라도 도입유전자의 안정성에 변화가 일어나지 않는 것으로 분석되었다. 따라서 이들 계통특이 마커를 이용하여 PCR분석을 수행한다면 Cr7-1의 후대 계통에서도 신속하고 정확하게 event 계통임을 판별할 수 있을 것으로 파악되고, 흑명나방저항성 GM 벼, Cr7-1의 안전성 평가 시 효율적인 분석 마커로 이용 가능하리라 생각된다.

특이 마커를 이용한 검출법 개발은 GMO 환경위해성 평가 심사를 위해서 매우 중요한 사안이며, 국외적으로 상업화된 GM 작물의 대표적인 정성분석으로 RRS 콩 (Berdal and Holst-Jensen 2001) 과 MON810, Bt11, NK603, MON863 및 Starlink 옥수수 (Hernandez et al. 2003; Windels et al. 2003; Taverniers et al. 2005; Huang and Pan 2004; Pan et al. 2006) 등에서 수행되어졌고, 국내에서는 상업화 GM 작물은 아니지만 국내개발 벼 (Kim et al. 2005a), 들깨 (Kim

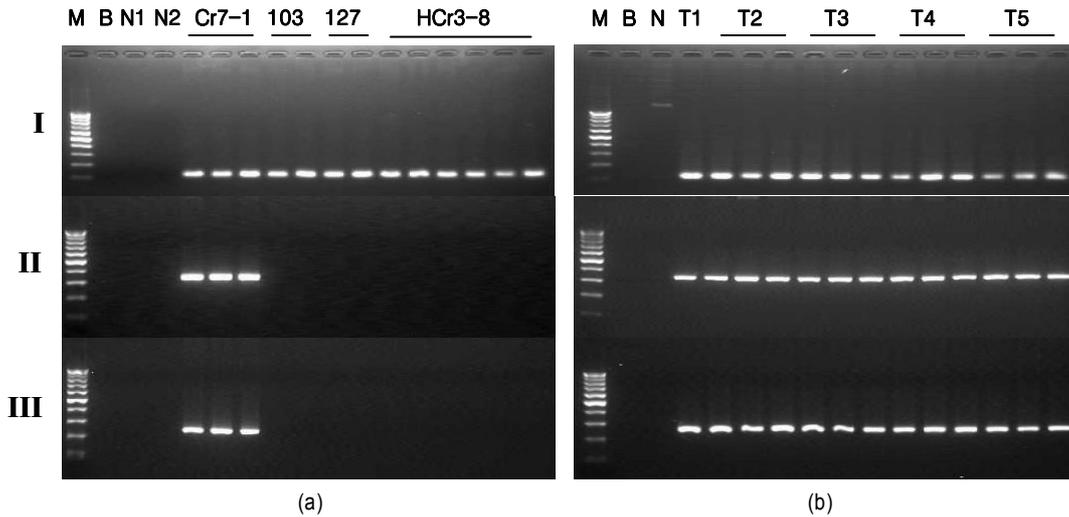


Figure 9. PCR amplification of the event-specific and construct-specific primers on the various insect-resistant rice lines (A) and generations of Cr7-1 event line (B). M: 100bp DNA ladder, B: no template control, N: wild type nagdongbyeo, N2: wild type hwayoungbyeo, Cr7-1: leaf folder resistant event lines, 103 and 127: leaf folder resistant lines of nagdongbyeo, HCr3-8: leaf folder resistant lines of hwayoungbyeo. T1~T5 indicate the post-generations of Cr7-1 event line. I, II and III represent the specific primer set for the leaf folder resistant GM rice

et al. 2006), 배추 (Lim et al. 2007) 등에서 특이 마커를 이용한 정성 분석을 수행한 보고가 있다.

이상의 결과에서 농촌진흥청은 토양미생물로부터 유래한 Bt 유전자를 벼 작물에 삽입시켜 해충저항성 GM 벼 (*CryIaC1*)를 개발하였으며, 환경친화적이고 해충관리의 유용성을 갖는 GM 작물로서 실용화하기 위해 안전성 평가를 추진 중에 있다. 이에 따라 GM 작물의 환경위해성 평가 심사를 위하여 흑명나방저항성 GM 벼의 도입유전자의 확인, 도입유전자의 복제수, 도입유전자의 계통 내 삽입 위치 및 주변 염기서열들을 확인하였으며, 이를 바탕으로 한 형질전환 벼에 특이적 검출이 가능한 프라이머 쌍을 개발하였다. 개발 특이 마커에 대해서 PCR 반응 조건을 검토한 결과 넓은 범위에서 적용이 가능한 것으로 나타났고, 벼를 비롯한 여러 작물에 유사성 염기서열을 갖지 않아 비특이적이 반응산물을 생산하지 않는 것으로 확인 되었다. 앞으로 형질전환 벼의 후세대 계통에 대한 안전성 및 마커의 적용가능성 등을 지속적으로 확인하고 개발된 계통특이 마커를 이용한 정성적 분석법 개발의 실험을 수행하고자 한다.

해 상업화가 이루어지고 있다. 유전자변형 작물의 상업화를 위해서는 인간에 대한 안전성과 환경에 미치는 영향에 관한 평가가 요구되고 있기 때문에 유전자변형 작물의 상업적 방출에 앞서 개발자는 유전자변형 작물에 대한 많은 환경위해성 평가 자료를 심사 받아야 한다. 본 연구는 국내에서 개발된 해충저항성 GM 벼 (*CryIaC1*)에 대한 안전성 평가 자료를 제공하기 위해서 실험을 수행하였다. *CryIaC1* GM 벼에 대한 분자생물학적 분석을 통해서 도입유전자의 식물체내 안정적 삽입과 발현이 이루어지고 있음을 확인 할 수 있었고, 도입유전자의 copy수를 확인하였다. 또한 T-DNA의 벼 계통내의 삽입된 위치와 인접서열을 분석하였으며, 이의 정보를 바탕으로 구조 및 계통특이 프라이머를 제작하였다. 이들 개발된 특이 마커를 이용하여 PCR 반응을 수행하여 흑명나방저항성 GM 벼에 대한 계통 특이적 검정방법을 수립하였다. 이상의 결과로부터 흑명나방저항성 GM 벼의 분자생물학적 분석 자료와 계통 특이적 PCR 검출 방법은 GM 작물의 생물안전성 및 환경위해성 평가를 위해 적용될 수 있음을 확인하였다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 일몰형과제(07-5-12-5-5)와 21세기프론티어연구개발사업 중 작물유전체기능연구사업(과제번호 CG2211)에 의해 지원되었습니다.

적 요

최근 생명공학 기술의 발달로 세계적으로 많은 유전자변형 (GM) 작물이 개발되고 있고, 여러 세계적인 농업생명공학 회사들에 의

인용문헌

- Berdal KG, Holst-Jensen A (2001) Roundup ready soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the paractical detection and quantification limits in GMO analyses. *Eur food Res Technol* 213:432-438
- Hernandez 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 Research* 12:179-189
- Huang HY, Pan TM (2004) Detection of genetically modified maize methods. *J Agric Food Chem* 52:3264-3268

- Huang CC, Pan TM (2005) Event-specific real-time detection and quantification of genetically modified Roundup Ready Soybean. *J Agric Food Chem* 53:3833-3839
- James C (2006) Global status of commercialized biotech/GM crops in 2006. ISAAA Briefs No. 35-2006
- James C (2007) Global status of commercialized biotech/GM crops: 2007. ISAAA Briefs No. 37-2007
- 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
- KBCH (2008) 2008 Biosafety white paper. Ministry of Knowledge Economy Korea Biosafety Clearing House, pp 320-450
- Kim JH, Ahn JH, Song HS, Kim KH, Kim DH, Kim HY (2006) Qualitative PCR detection of vitamin E-enriched GM perilla. *J Korean Soc. Appl Biol Chem* 49:192-195
- Kim JH, Song HS, Jee SM, Ryu TH, Kim DH, Kim HY (2005a) Qualitative PCR detection of GM rices (Milyang 204 and Iksan 483) developed in Korea. *J Korean Soc. Appl Biol Chem* 48:335-338
- Kim YS (2005b) Genetic characterization of TPSP/CBF3 transgenes hybrid in rice. Ph. D. thesis. Konkuk University, Seoul
- Lee JM, Ryou CS, Kwon MS (1997) Generation of transgenic plant (*Nicotiana tabacum* var. Petit Havana SR1) harboring *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein gene, cryIIA. *Korean J. Plant Tissue Culture* 24:305-311
- Lee SH, Kong SH, Park YH, Min DM, Kim YM (2006) Quantitative analysis of two genetically modified maize lines by real-time PCR. *J Microbiol Biotechnol* 16:205-211
- Lim SH, Kim NY, Lee SM, Woo HJ, Shin KS, Jin YM, Cho HS (2007) Molecular characterization and Event-specific marker Development of insect Resistant chinese cabbage for environmental risk assessment. *J Plant Biotechnol* 34:347-354
- 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
- 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
- Pan A, Yang L, Xu S, Yin C, Zhang K, Wang Z, Zhang D (2006) Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of MON 863 maize based upon the 3'-transgene integration sequence. *J Cereal Sci* 43:250-257
- 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
- Taverniers I, Windels P, Vaitilingom M, Milcamps A, Van Brckstaele E, Van Den Eede G, Ee Loose M (2005) Event-specific plasmid standard and real-time PCR methods for transgenic Bt11, Bt176, and GA21 maize and transgenic GT73 canola. *J Agric Food Chem* 53:3041-3052
- Windels P, Bertrand S, Depicker A, Moens W, Bockstaele E, 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
- Youm JW, Jeon JH, Jung JY, Lee BC, Kang WJ, Kim MS, Kim CJ, Joung H, Kim HS (2002) Introduction of VP6 gene into potato plant by *Agrobacterium*-mediated transformation and analysis of VP6 expression in transgenic potatoes. *Korean J. Plant Biotechnology* 29:93-98

(접수일자 2008년 12월 3일, 수리일자 2009년 6월 29일)