

유전자변형(GM)대두의 CaMV 35S promoter 정성검출방법

박연경, 이수민, 최형기, 유경희
 산업자원부 기술표준원 생물환경과
 전화 (02) 509-7257, FAX (02) 507-1922

특정 DNA의 정성적인 분석은 특정 DNA 단편이 검출되었는지를 확인하기 위해 수행된다. 본 실험에서는 유전자변형(GM)대두로부터 추출한 핵산을 분석한 후 Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S promoter를 이용하여 정성 PCR로 검출하였다. 정성 PCR 방법은 프라이머를 이용하여 특정 DNA 부위를 특이적으로 반복 합성하여 시험관내에서 특정 DNA 단편을 증폭시킨 후 전기영동으로 증폭된 DNA를 확인하는 방법이다. 프라이머는 증폭할 부분을 잡는 짧은 올리고뉴클레오티드로 본 실험에서 사용한 CaMV 35S promoter는 많은 유전자변형식물에 존재하기 때문에 시료가 유전적으로 변형되었는지를 스크린 할 수 있으며 대두의 내재성유전자 lectin은 대두에서 파생된 산물로부터 DNA의 품질을 평가하고 GMO 분석을 위해 DNA의 양이 충분한지를 확인할 수 있다. 그리고 각각 PCR 반응 때마다 DNA를 함유하지 않은 음성대조군, 비변형유전자 DNA를 함유한 양성대조군(IRMM-410의 표준물질로써 0% Roundup Ready™ soya)⁷⁾, 검출하고자하는 변형유전자 DNA를 함유한 양성대조군(IRMM-410의 표준물질로써 5% Roundup Ready™ soya)⁷⁾을 준비하여 시료와 함께 비교해서 분석하였다. 본 실험에서 사용한 PCR에 의한 유전자변형대두의 정성검출방법은 EU에서 제시한 프라이머를 사용하는 방법^{1),2)}과 Nippon gene사의 프라이머를 사용하는 방법^{3),5),6)}으로 나눌 수 있다. EU에서 제시한 프라이머^{1),2)}는 프로토콜에 나와 있는 시퀀스에 따라 프라이머를 디자인하여 사용하였고 Nippon Gene사의 프라이머^{3),5),6)}는 Nippon gene에서 생산하는 프라이머를 구입하여 사용하였다. 두 방법 모두 PCR 반응 시 필요한 시약인 Taq DNA polymerase, PCR완충용액, dNTPs, MgCl₂는 TaKaRa Taq™(Mg²⁺ free buffer)⁴⁾을 사용하였다.

EU에서 제시한 프라이머를 사용하는 방법으로 대두의 내재유전자 lectin를 검출하는 방법¹⁾은 PCR을 하고자 하는 시료 수에 맞춰 사용하는 튜브의 수를 정하고 이에 따른 전체 사용량을 정해서 표1의 액량과 비교하여 적당한 배율이 되도록 시료 DNA를 뺀 각 액을 혼합 조정하여 각 PCR 반응 때마다 시료 DNA를 첨가하지 않은 음성대조군과 IRMM의 표준물질에서 추출한 DNA를 첨가한 양성대조군(IRMM-410의 표준

물질로써 0%, 5% Roundup Ready™ soya)⁷⁾을 동시에 PCR 증폭시켰다. PCR 전용 200 μ l 튜브에 시료 DNA를 넣지 않은 PCR 반응액을 24 μ l씩 분주한 다음 음성대조군, 시료에서 추출한 시료 DNA, IRMM 표준물질에서 추출한 양성대조군(IRMM-410의 표준물질로써 0%, 5% Roundup Ready™ soya)⁷⁾을 각각 1 μ l씩 첨가하였다. 모든 용액을 첨가한 후 5분간 원심분리하여 잘 혼합하고 PCR을 실시하였다. EU에서 제시한 lectin gene 프라이머¹⁾를 이용할 경우 반응조건은 95°C에서 10분간 방치하여 최초의 변성이 일어나게 한 후 95°C에서 30초간 변성시키고 60°C에서 30초간 냉각하여 유전자를 다시 결합시키며 72°C에서 60초간 증폭반응이 일어나도록 하는 것을 1회로 하여 35회 반응시키고 35회 이상 반응이 이루어진 후 72°C로 3분간 연장을 한 후 4°C에서 보존하도록 설정하였다.

EU에서 제시한 프라이머를 사용한 방법으로 재조합유전자 CaMV 35S promoter를 검출하는 방법²⁾은 PCR을 하고자 하는 시료 수에 맞춰 사용하는 튜브의 수를 정하고 이에 따른 전체 사용량을 정해서 표1의 액량과 비교하여 적당한 배율이 되도록 시료 DNA를 뺀 각 액을 혼합 조정하여 각 PCR 반응 때마다 시료 DNA를 첨가하지 않은 음성대조군과 IRMM의 표준물질에서 추출한 DNA를 첨가한 양성대조군(IRMM-410의 표준물질로써 0%, 5% Roundup Ready™ soya)⁷⁾을 동시에 PCR 증폭시켰다. PCR 전용 200 μ l 튜브에 시료 DNA를 넣지 않은 PCR 반응액을 24 μ l씩 분주한 다음 음성대조군, 시료에서 추출한 시료 DNA, IRMM 표준물질에서 추출한 양성대조군(IRMM-410의 표준물질로써 0%, 5% Roundup Ready™ soya)⁷⁾을 각각 1 μ l씩 첨가하였다. 모든 용액을 첨가한 후 5분간 원심분리하여 잘 혼합하고 PCR을 실시하였다. EU에서 제시한 CaMV 35S promoter 프라이머²⁾를 이용할 경우 반응조건은 95°C에서 10분간 방치하여 최초의 변성이 일어나게 한 후 94°C에서 20초간 변성시키고 54°C에서 40초간 냉각하여 유전자를 다시 결합시키며 72°C에서 60초간 증폭반응이 일어나도록 하는 것을 1회로 하여 40회 반응시키고 40회 이상 반응이 이루어진 후 72°C로 3분간 연장을 한 후 4°C에서 보존하도록 설정하였다.

다음은 nippon gene사에서 생산하는 프라이머를 사용하여 대두의 내재유전자 lectin을 검출하는 방법^{3,5)}으로 PCR 반응액의 일반적인 조성은 표 2와 같다. PCR을 하고자 하는 시료 수에 맞춰 사용하는 튜브의 수를 정하고 이에 따른 전체 사용량을 정하였다. 표2의 액량과 비교하여 적당한 배율이 되도록 시료 DNA를 뺀 각 액을 혼합 조정하였다. 각 PCR 반응 때마다 시료 DNA를 첨가하지 않은 음성대조군과 IRMM의 표준물질에서 추출한 DNA를 첨가한 양성대조군(IRMM-410의 표준물질로써 0%, 5%

Roundup Ready™ soya)⁷⁾을 동시에 PCR증폭시켰다. PCR 전용 200 μ l 튜브에 시료 DNA를 넣지 않은 PCR 반응액을 24 μ l씩 분주한 다음 음성대조군, 시료에서 추출한 시료 DNA, IRMM 표준물질에서 추출한 양성대조군(IRMM-410의 표준물질로써 0%, 5% Roundup Ready™ soya)⁷⁾을 각각 1 μ l씩 첨가하였다. 모든 용액을 첨가한 후 5분간 원심분리하여 잘 혼합하고 PCR을 실시하였다. Nippon Gene에서 생산하는 lectin gene 프라이머^{3),5)}를 이용할 경우 반응조건은 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 방치하여 최초의 변성이 일어나게 한 후 95 $^{\circ}$ C에서 30초간 변성시키고 60 $^{\circ}$ C에서 30초간 냉각하여 유전자를 다시 결합시키며 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 증폭반응이 일어나도록 하는 것을 1회로 하여 40회 반응시키고 40회 이상 반응이 이루어진 후 72 $^{\circ}$ C로 7분간 연장을 한 후 4 $^{\circ}$ C에서 보존하도록 설정하였다.

nippon gene사에서 생산하는 프라이머를 사용하여 재조합유전자 CaMV 35S promoter^{3),6)}를 검출하는 방법은 PCR을 하고자 하는 시료 수에 맞춰 사용하는 튜브의 수를 정하고 이에 따른 전체 사용량을 정해서 표2의 액량과 비교하여 적당한 배율이 되도록 시료 DNA를 뺀 각 액을 혼합 조정하였다. 각 PCR 반응 때마다 시료 DNA를 첨가하지 않은 음성대조군과 IRMM의 표준물질에서 추출한 DNA를 첨가한 양성대조군(IRMM-410의 표준물질로써 0%, 5% Roundup Ready™ soya)⁷⁾을 동시에 PCR증폭시켰다. PCR 전용 200 μ l 튜브에 시료 DNA를 넣지 않은 PCR 반응액을 24 μ l씩 분주한 다음 음성대조군, 추출한 시료 DNA, IRMM 표준물질에서 추출한 양성대조군(IRMM-410의 표준물질로써 0%, 5% Roundup Ready™ soya)⁷⁾을 각각 1 μ l씩 첨가하였다. 모든 용액을 첨가한 후 5분간 원심분리하여 잘 혼합하고 PCR을 실시하였다. Nippon Gene에서 생산하는 CaMV 35S promoter 프라이머^{3),6)}를 이용할 경우 반응조건은 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 방치하여 최초의 변성이 일어나게 한 후 95 $^{\circ}$ C에서 30초간 변성시키고 60 $^{\circ}$ C에서 30초간 냉각하여 유전자를 다시 결합시키며 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 증폭반응이 일어나도록 하는 것을 1회로 하여 40회 반응시키고 40회 이상 반응이 이루어진 후 72 $^{\circ}$ C로 7분간 연장을 한 후 4 $^{\circ}$ C에서 보존하도록 설정하였다.

이렇게 모든 PCR 반응이 끝나면 겔 조제용 틀을 준비하고 2% 아가로스를 전자렌지를 이용하여 녹인 다음 아가로스가 식어서 굳기 전에 100ml당 1 μ l의 EtBr(10mg/ml)을 넣어 잘 섞어준 다음 겔 조제용 틀에 붓고 홈을 끼워 30분에서 1시간 정도 방치하였다. 겔이 충분히 굳어 불투명하게 되면 홈을 빼고 겔을 전기영동조안에 설치한 후 겔의 윗면이 잠길 정도로 1 \times TAE완충용액을 채웠다. PCR증폭 반응액 25 μ l에 10 \times 전기영동겔 loading buffer 3 μ l 넣어 잘 혼합한 후 겔의 홈에 10 μ l씩 주입하고 100V 전압으로 전기 영동하였다. bromophenol blue가 겔의 1/2 가량 진행하면 전기영동을

멈추고 겔을 꺼내 UV 조사기에 올려놓고 자외선을 쬐어 목적하는 DNA 밴드가 얻어졌는지를 확인한 후 폴라로이드카메라로 촬영하였다. 이때 DNA marker는 ϕ X174 RF DNA(form I)—Hae III digest^(8),9),10)를 사용하였다.

EU에서 제시한 내재유전자 lectin과 nippon gene사에서 생산하는 내재유전자 lectin은 118bp인 밴드를 얻을 수 있었다. 이것은 추출한 시료 DNA에 대두 DNA가 있다는 뜻으로 분석할 수 있다. 그리고 EU에서 제시한 재조합유전자 CaMV 35S promoter와 nippon gene사에서 제시한 재조합유전자 CaMV 35S promoter도 각 프라이머에서의 35S promoter의 증폭크기인 195bp와 101bp의 밴드가 각각 나타났다.

표 1. EU에서 제시한 프라이머를 위한 PCR 반응액 조제

성분	최종농도		stock용액 농도		1회 용량(μ l)	
	lectin	35S	lectin	35S	lectin	35S
시료 DNA	50ng/ μ l (200ng/ μ l)	50ng/ μ l (200ng/ μ l)	50ng/ μ l (200ng/ μ l)	50ng/ μ l (200ng/ μ l)	1	1
평균중류수					15.9	15.9
PCR완충용액(without MgCl ₂)	1 \times	1 \times	10 \times	10 \times	2.5	2.5
MgCl ₂	1.5mmol/l	1.5mmol/l	25mmol/l	25mmol/l	1.5	1.5
dNTPs	0.8mmol/l	0.8mmol/l	10mmol/l	10mmol/l	2	2
프라이머 5'	0.2 μ mol/l	0.2 μ mol/l	5 μ mol/l	5 μ mol/l	1	1
프라이머 3'	0.2 μ mol/l	0.2 μ mol/l	5 μ mol/l	5 μ mol/l	1	1
Taq DNA Polymerase	0.5IU	0.5IU	5IU/ μ l	5IU/ μ l	0.1	0.1
전체량					25	25

표 2. nippon gene사에서 생산하는 프라이머를 위한 PCR 반응액 조제

성분	최종농도		stock용액 농도		1회 용량(μ l)	
	lectin	35S	lectin	35S	lectin	35S
시료 DNA	50ng/ μ l (200ng/ μ l)	50ng/ μ l (200ng/ μ l)	50ng/ μ l (200ng/ μ l)	50ng/ μ l (200ng/ μ l)	1	1
평균중류수					17.375	16.875
PCR완충용액(without MgCl ₂)	1 \times	1 \times	10 \times	10 \times	2.5	2.5
MgCl ₂	1.5mmol/l	1.5mmol/l	25mmol/l	25mmol/l	1.5	1.5
dNTPs	0.2mmol/l	0.2mmol/l	2.5mmol/l	2.5mmol/l	2	2
프라이머 5'	0.5 μ mol/l	0.5 μ mol/l	50 μ mol/l	25 μ mol/l	0.25	0.5
프라이머 3'	0.5 μ mol/l	0.5 μ mol/l	50 μ mol/l	25 μ mol/l	0.25	0.5
Taq DNA Polymerase	0.625IU	0.625IU	5IU/ μ l	5IU/ μ l	0.125	0.125
전체량					25	25 μ l

※시료 DNA 200ng/tube에서 실험을 수행하였음.

gacgctattg tgacctctc gggaaagta caactcaata aggtgacga aaacggcacc ccaaaacctt cgtctctgg 1260

gcccctc tactccaccc
 tgc cca ^③tcc ^①acat ttgggacaaa gaaaccggta gcgttgccag cttgccgct 1330

aaaaaggc ttgcagatgg
 tcttcaact tcaccttcta tggccctga ^② c ac ^④ gc ttgccctc 1390

tttctgcac caattgacac taagccacaa acacatgcag gttatctgg tctttcaac 1450

그림 1. Soybean lectin gene sequences (GenBank[®] accession-No. K00821)

- ① = EU에서 제시한 Soybean lectin gene Forward primer
- ② = EU에서 제시한 Soybean lectin gene Reverse primer
- ③ = Nippon gene사에서 생산하는 Soybean lectin gene Forward primer
- ④ = Nippon gene사에서 생산하는 Soybean lectin gene Reverse primer

tcaacaaagg gtaatatccg gaaacctct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt tatttgaag atagtggaaa 7180

aggaagtg g ctctacaaa tgccatca ^⑤tt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg cctctgccga 7250

cagtgtccc aaagatggac cccccaccac gaggagcatc gtggaaaaag aagacgttcc aaccagctct tcaaagcaag 7330

tgg attgatg tgatatctcc actgacgt ^⑥aa ggga^⑥ tgacgc acaatcccac tatc cttcgc aagaccttc 7400

ctctatata^⑦ a ggaagttcat ttcatttgga gaggg acacgc tgaatcacc agtctctctc tacaaatcta 7470

tctctctcta taataatgtg tgagtagttc ccagataagg gaattagggt tctataggg ttctctcat gtttgagca 7550

그림 2. CaMV 35S promoter sequences (GenBank[®] accession-No. V00141)

- ⑤ = EU에서 제시한 CaMV 35S promoter Forward primer
- ⑥ = EU에서 제시한 CaMV 35S promoter Reverse primer
- ⑦ = Nippon gene사에서 생산하는 CaMV 35S promoter Forward primer
- ⑧ = Nippon gene사에서 생산하는 CaMV 35S promoter Reverse primer

표 3. 정성 PCR용 프라이머 결합온도 및 검출유전자의 판별크기

프라이머	결합온도	크기	비고
lectin 5' / 3'	60℃	118bp	EU
	60℃	118bp	Nippon gene
35S promoter 5' / 3'	54℃	195bp	EU
	60℃	101bp	Nippon gene

- EU = EU에서 제시한 프라이머

- Nippon gene = Nippon gene사에서 생산하는 프라이머

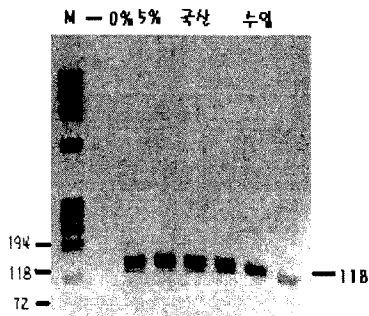


그림 3. EU에서 제시한 lectin 프라이머

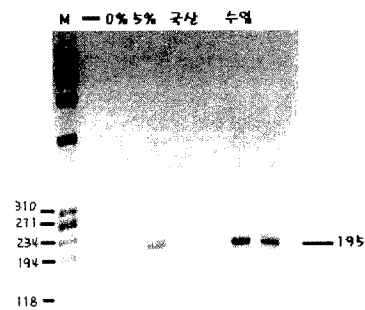


그림 4. EU에서 제시한 P35S 프라이머

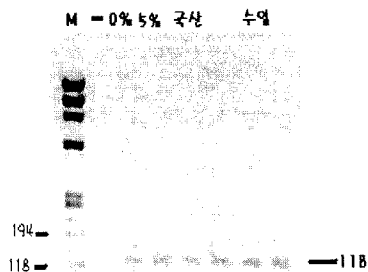


그림 5. Nippon gene사에서 생산하는 lectin 프라이머

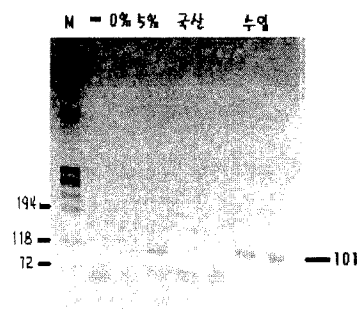


그림 6. Nippon gene사에서 생산하는 P35S 프라이머

참고문헌

- 1) prEN ISO 21569 (2002) Foodstuffs-Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products-Qualitative nucleic acid based methods Annex A.1.1 Target taxon specific methods p11-15
- 2) prEN ISO 21569 (2002) Foodstuffs-Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products-Qualitative nucleic acid based methods Annex B.1.1 Screening method for the detection of genetically modified plant DNA (CaMV 35S promoter) p28-31
- 3) 식품의약품안전청, 유전자재조합식품 검사법 지침(2001), 4.정성 PCR법, p7-12
- 4) TaKaRa bio catalog (2002), TaKaRa Taq™(Mg²⁺ free buffer), Cat.no. R001AM B-92
- 5) Nippon Gene co., LTD, GM Soybean(RRS) Detection Le1-n02 Oligonucleotide, code no.314-04953
- 6) Nippon Gene co., LTD, GMO Detection P35S-1 Oligonucleotide, code no.313-05523
- 7) Fluka catalog (2001/2002), Soya Bean Powder SB set, certified Reference Material IRMM 410 R, Cat.no. 89305, p1337
- 8) invitrogen catalog (2002), ØX174 RF DNA(form I), Cat.no. 25260-027 p295
- 9) New England Biolabs catalog (2000), HaeIII, Cat.no. R0108S, p39
- 10) New England Biolabs catalog (2000), ØX174 RF DNA(form I)-HaeIII Digest, Cat.no. N3026S, p117