

PCR을 이용한 glyphosate 저항성 콩의 검출법에 관한 연구

김현중 · 박선희² · 김혜영^{1*}

경희대학교 생명과학부 및 ¹식물대사 연구센터, ²식품의약품안전청 식품미생물과

Study for Detection of Glyphosate Tolerant Soybean Using PCR

Hyun-Joong Kim, Sun-Hee Park² and Hae-Yeong Kim^{1*}

Institute of Life Science and ¹Plant Metabolism Research Center, Kyung Hee University

²Division of Food Microbiology, Korea Food and Drug Administration

A method using PCR was developed for the monitoring of glyphosate tolerant soybean (GTS) produced by the DNA recombination technique. We designed 3 pairs of specific oligonucleotide primers based on the gene sequences inserted in soybean and in lectin and ferritin genes as internal standards. Template DNAs were isolated from soybeans by the modified hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) method and used for PCR with different primer sets. PCR, used with specific primer sets for GTS detection, showed the amplified DNA fragments with GTS template DNA but no product showed with non-GTS template. PCR amplified products were confirmed by DNA sequencing and were detected for up to 0.05% of GTS template DNA.

Key words: PCR, glyphosate tolerant soybean, Genetically modified Food

서 론

생명공학기술의 발달로 농작물 등에서 제초제에 대한 저항성, 질병에 대한 저항성, 해충에 대한 저항성, 저장성 및 영양학적으로 향상된 특성을 갖는 유전자재조합생물체(genetically modified organism, GMO)를 개발하고, 실용화하는 단계까지 이르렀다^(1,2). 유전자재조합 농작물은 인류가 직면한 인구 폭발, 제한된 천연자원, 자연 파괴로 인한 경작면적의 축소, 예측하지 못한 자연 재해 등의 여러 식량문제들의 해결책으로서 농업분야에서 많은 발전을 이룩할 것으로 기대되고 있다⁽³⁻⁶⁾. 그러나, 한편으로는 인체에 대한 안전성과 재배과정에서의 생태계에 미치는 영향 등이 우려되면서 안전성 논란이 국제적으로 제기되고 있다.

현재까지 국제적으로 생산, 유통되어지고 있는 유전자재조합 농산물은 대두와 옥수수 등 약 40여 가지인 것으로 알려지고 있다⁽¹⁾. 대표적인 것이 미국 Monsanto 사가 개발한 제초제(glyphosate)내성 콩(상품명: Round-up ready soybean)으로, 콩 그 자체로서 뿐만 아니라 두부, 두유, 콩기름, 된장, 스펙류 등의 가공식품형태로 광범위하게 소비되고 있다. 유

전자재조합식품의 이용확대와 소비자의 관심의 증대에 따라 각국이 표시제도를 마련하고 있으며 유전자재조합식품의 표시의 타당성확인이나 시중유통현황을 알기 위한 시험법의 확립은 유전자재조합식품분야에서 또 하나의 중요한 문제가 되고 있다.

이러한 검사법과 관련하여 유전자재조합기술에 의해 개발된 콩의 모니터링에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, Lipp 등^(7,8)은 35S promoter 유전자와 NOS terminator 유전자를 근거로 PCR을 수행하여 그 정성분석에 관한 연구를 보고하였다. Duiji 등⁽⁹⁾은 PCR과 western blotting analysis의 결과를 비교 분석하였으며, Shirai 등⁽⁶⁾은 콩 잎에서 DNA를 추출, PCR을 수행한 결과를 보고하고 있다. 이러한 결과들은 각기 다른 조건에서 PCR을 수행한 후, 전기영동 gel 상에서의 산물을 확인하는 정성적인 방법을 이용하였다. 한편, 정량적인 GMO의 분석에 관한 연구로는 Wurz 등⁽¹⁰⁾이 Taqman 기술에 근거한 PCR 방법을 이용하여 정량적인 GMO의 검색을 보고하고 있으며 Hubner 등⁽¹¹⁾은 정량적인 competitive PCR을 수행하여 정량적인 GMO 검색을 보고하고 있으나 이들 방법은 그 실험 방법이 복잡하고 비용이 많이 드는 단점을 가지고 있어, 앞으로 계속해서 늘어나는 GMO의 수를 고려하였을 때 현실적인 적용이 문제가 될 수 있는 단점을 가지고 있다.

현재 국내에서도 원료농산물 및 가공식품에 대한 표시제가 실시되고 있으며, 유전자재조합을 기술을 이용해 개발된 콩을 이용하여 두부, 콩기름, 두유 등의 가공식품들이 있는

*Corresponding author : Hae-Yeong Kim, Institute of Life Science and Plant Metabolism Research Center, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea
Tel: 82-31-201-2660
Fax: 82-31-201-2157
E-mail: hykim@khu.ac.kr

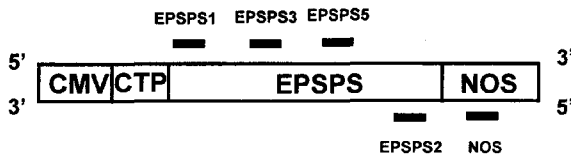


Fig. 1. Schematic diagram of designed PCR primers.

CMV: Cauliflower mosaic virus 35S promoter(CaMV 35S) sequence, CTP: Chloroplast transit peptide(CTP) sequence of *Petunia hybrida*, EPSPS: *Agrobacterium tumefaciens* EPSPS gene, NOS: *Agrobacterium tumefaciens* nopaline synthase terminator(NOS) gene

것으로 추정되나, 아직까지 구분 할 수 있는 실험방법의 확립 및 정량의 실험방법이 확립되어있지 않은 상태이다.

그러므로, 본 실험에서는 식품 가공산업에 많이 활용되는 농산물중의 하나인 콩의 유전자재조합기술 사용 여부를 PCR을 이용하여 모니터링 하는 방법을 확립하기 위하여 Monsanto 회사에서 제조된 GTS를 표준물질로 이용하여, 삽입된 유전자와 대조구 유전자들을 기본으로 하여 PCR 검출법에 의해 이용할 수 있는 여러 종류의 oligonucleotide primer를 제작하여 검출 가능한 primer들을 개발하였고, PCR을 이용하여 검출 한계를 연구하였다.

재료 및 방법

재료

PCR을 통한 glyphosate tolerant soybean(GTS)와 non-GTS의 검출법에 사용한 콩은 식품의약품안전청이 Monsanto사에서 제공받은 각각 Glyphosate Tolerant Soybean과 Wild-Type Soybean⁽¹²⁾[*Glycine max* (L.) Merr.]을 실험의 시료로 이용하였다.

Primer의 제작

GTS 검출을 위한 primer들은 Fig. 1과 같다. GTS에 인위적으로 삽입되어진 glyphosate(N-phosphonomethylglycine)에 강한 저항성을 갖는 *Agrobacterium tumefaciens* CP4의 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase(EPSPS) gene, Nopaline synthase(NOS) terminator gene, 및 cauliflower mosaic virus의 35S promoter(CaMV 35S) gene을 근거로 5개의 primer들을 gene bank를 통하여 제작하였다^(12,13). 대조구 유전자를 확인하는 primer로는 콩에 존재하고 있는 lectin gene⁽¹⁴⁾과 ferritin gene⁽¹⁵⁾에 대해 primer들을 제작하였고, 이들 각각에 대한 유전자 배열은 Table 1에 나타내었다.

DNA의 추출

콩에서 DNA의 추출은 기존에 보고된 Hexadecyl-trimethylammonium-bromide(CTAB) 방법⁽¹⁶⁾과 Qiagen 사의 DNeasy Plant Mini kit를 이용하였다. 사용된 시료는 GTS과 non-GTS 각각 10 g를 12시간 물에 불린 후, 각 시료가 오염되지 않게 마쇄하여 0.1 g 씩 3개의 tube로 나누어 각각 DNA 추출에 이용하였다. 추출된 DNA들은 UV-spectrophotometer(220S, Hitachi, Japan)를 이용하여 260 nm에서 정량하여 사용하였다. 한편 추출한 DNA는 0.5%의 agarose gel상에서 30 V로 100분

Table 1. Sequence of designed primers

primer name	primer sequences
EPSPS 1	5'-CAACCGCCCGCAAATCTCTG-3'
EPSPS 2	5'-GGTTTTCCGACACGAGGCCCA-3'
EPSPS 3	5'-TTTGGCGCCAACCTTACCGTCG-3'
EPSPS 5	5'-GAAGACCGCGCGCTTCGAT-3'
NOS	5'-ATCGCAAGACCGGCAACAGG-3'
Lectin 1	5'-GTTACAACCTCAATAAGGTTGACG-3'
Lectin 2	5'-CGGAACTCTTGGGATCCACCAA-3'
Ferritin 1	5'-GGCTCTTGCTCCTTCCAAAGT-3'
Ferritin 2	5'-CGAGCCAGCGAGACTTGGGGAGC-3'

동안 전기영동하여 추출된 DNA의 상태를 확인을 하였으며, marker로는 λ -Hind III(Gibco-BRL, USA)를 사용하였다.

PCR 조건

PCR을 위한 반응용액은 한 시료 당 25 μ L씩 3개를 준비하여 사용하였다. 반응용액 조성은 10 \times PCR buffer 2.5 μ L (TaKaRa, Japan), sense primer 1 μ L(10 pM/ μ L), antisense primer 1 μ L(10 pM/ μ L), dNTP 0.5 μ L(10 pM/ μ L, Gibco-BRL, USA), Taq DNA polymerase(TaKaRa, Japan) 1 unit (0.2 μ L), template DNA는 농도에 따라 1 μ L 부피로 희석하여 thermocycler(MJ Research, USA)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건으로 첫 cycle에서 3분간 94 $^{\circ}$ C에서 수행을 한 후, 94 $^{\circ}$ C에서 45초, 65 $^{\circ}$ C에서 45초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 30초씩 40 cycle을 수행하였으며, 마지막 단계로 72 $^{\circ}$ C에서 8분간 수행한 후, 4 $^{\circ}$ C에서 PCR 산물을 보존하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel상에서 전기영동 후, Image analysis system(Bioneer, Korea)을 사용⁽¹⁷⁾하여 산물의 크기 및 양을 확인하였다.

PCR 산물의 DNA 염기서열 비교

PCR 산물의 DNA 염기서열을 확인하기 위해 agarose gel에서 PCR 산물을 Gel extraction kit(Qiagen, USA)를 이용하여 추출한 후, DNA sequencing에 이용하였다. DNA 염기배열은 ABI PRISM 377 model(Perkin Elmer, USA)을 사용하여 염기서열을 결정하였다. Cyclic sequencing 반응의 조성으로는 추출된 PCR 산물 10 ng, primer 3 pM, Dye terminator kit 용액 1 μ L, 1 \times PCR buffer 2 μ L을 사용하였으며, 온도 조건으로는 96 $^{\circ}$ C에서 10초간 반응시킨 뒤에 96 $^{\circ}$ C에서 10초, 56 $^{\circ}$ C에서 5초, 60 $^{\circ}$ C에서 25초의 조건으로 25 cycle을 수행하였으며 마지막 반응은 60 $^{\circ}$ C에서 4분간 수행하였다. Cyclic sequencing이 종료되면 3 M Sodium acetate(pH 5.7) 1 μ L, 95% ethanol 12.5 μ L을 첨가한 뒤 -20 $^{\circ}$ C에서 10분간 정치한 뒤 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전하여 건조시킨 뒤 loading buffer(Blue Dextran/EDTA) 2 μ L을 첨가하여 DNA를 녹인 후 5분간 변성시켜 automatic sequencer로서 염기서열을 결정하였다.

결과 및 고찰

Genomic DNA의 추출

추출한 DNA를 0.5%의 agarose gel에서 30 V로 100분간

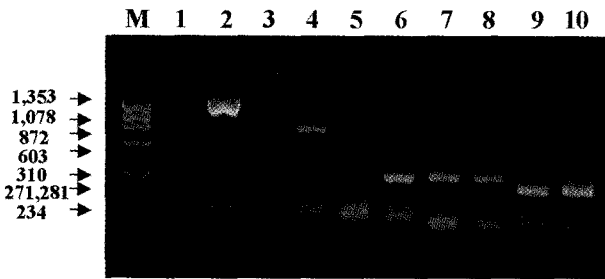


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products with GTS and Non-GTS using various primers.

Lane M: marker(Φ X174RF DNA/*Hae* III), Lane 1: Non-GTS using EPSPS1-NOS primer, Lane 2: GTS using EPSPS1-NOS primer, Lane 3: Non-GTS using EPSPS3-NOS primer, Lane 4: GTS using EPSPS3-NOS primer, Lane 5: Non-GTS using EPSPS5-EPSPS2 primer, Lane 6: GvS using EPSPS5-EPSPS2 primer, Lane 7: Non-GTS using Lectin primer, Lane 8: GTS using Lectin primer, Lane 9: Non-GTS using Ferritin primer, Lane 10: GTS using Ferritin primer

PCR product	: GAAGACCGCG CGCCTTCGAT GATCGACGAA TATCCGATTC	40
EPSPS gene	: GAAGACCGCG CGCCTTCGAT GATCGACGAA TATCCGATTC	40
PCR product	: TCGCTGTCCG CGCCGCCTTC GCGGAAGGGG CCACCGTGAT	80
EPSPS gene	: TCGCTGTCCG CGCCGCCTTC GCGGAAGGGG CCACCGTGAT	80
PCR product	: GAACGGTCTG GAAGAACTCC GCGTCAAGGA AAGCGACCGC	120
EPSPS gene	: GAACGGTCTG GAAGAACTCC GCGTCAAGGA AAGCGACCGC	120
PCR product	: CTCTCGGCCG TCGCCAATGG CCTCAAGCTC AATGGCGTGG	160
EPSPS gene	: CTCTCGGCCG TCGCCAATGG CCTCAAGCTC AATGGCGTGG	160
PCR product	: ATTGCGATGA GGGCGAGACG TCGCTCGTCC TCGGTGGCCG	200
EPSPS gene	: ATTGCGATGA GGGCGAGACG TCGCTCGTCC TCGGTGGCCG	200
PCR product	: CCCTGACGGC AAGGGGCTCG GCAACGCCTC GGGCGCGGCC	240
EPSPS gene	: CCCTGACGGC AAGGGGCTCG GCAACGCCTC GGGCGCGGCC	240
PCR product	: GTGCGCACCC ATCTCGATCA CCGCATGCC ATGAGCTTCC	280
EPSPS gene	: GTGCGCACCC ATCTCGATCA CCGCATGCC ATGAGCTTCC	280
PCR product	: TCGTCATGGG CCTCGTGTCC GAAAACC	307
EPSPS gene	: TCGTCATGGG CCTCGTGTCC GAAAACC	307

Fig. 3. Sequence comparison between EPSPS gene and PCR product.

Sequence used is from *Agrobacterium tumefaciens* EPSPS gene.⁽¹³⁾

전기영동한 결과 GTS 시료와 non-GTS 시료에서 유사하게 DNA들이 고르게 존재하는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 DNA 분포들은 일반적으로 시료에서 genomic DNA들을 추출했을 때와 같은 패턴을 보였다. Qiagen kit로 추출한 DNA는 CTAB 방법을 이용한 것보다 DNA 추출 수율에서 3분의 1 정도로 낮았다. 본 실험에서는 대부분 CTAB 방법을 통하여 추출한 DNA를 template DNA로 사용하여 PCR을 수행하였다.

Primer를 이용한 PCR 산물 분석

GTS 검색을 위하여 제작한 EPSPS1, EPSPS2, EPSPS3, EPSPS5, NOS primer들을 이용하여 3개의 PCR 산물을 얻을 수 있도록 PCR을 수행하였으며 internal standard로 원래 콩에 존재하는 lectin gene과 ferritin gene을 기초로 하여 제작된 primer set를 사용하여 PCR을 수행하여 Figure 2와 같은 결과를 나타내었다. 검색용 primer sets의 결과로는 예상한 결과와 같이 GTS 시료에서만 각각 약 1.4 kbp, 0.8 kbp, 0.3

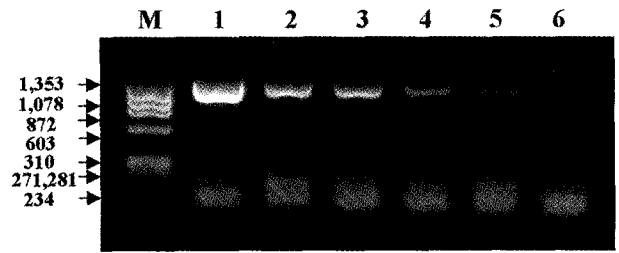


Fig. 4. PCR sensitivity for template DNA containing a various percent of GTS.

M: marker 250 ng(Φ X174RF DNA/*Hae* III), Lane 1: 2% GTS, Lane 2: 1% GTS, Lane 3: 0.5% GTS, Lane 4: 0.1% GTS, Lane 5: 0.05% GTS, Lane 6: 0% GTS

kbp의 PCR 산물을 확인할 수 있었으며 non-GTS 시료의 경우에는 어떠한 PCR 산물도 생성되지 않았다. 그러므로, 본 실험에서 사용한 검색용 primer들은 유전자 재조합된 GTS에 특이적으로 반응함을 관찰할 수 있었으며 GTS의 검출이 PCR을 통하여 가능함을 입증하였다. 한편 대조구 유전자 확인 primer의 경우에는 GTS와 non-GTS 시료 모두에서 lectin primer의 경우에는 313 bp, ferritin primer의 경우에는 242 bp 크기의 PCR 산물들을 확인할 수 있었다. 또한, 제작한 primer의 특이성을 확인하기 위하여 EPSPS 유전자를 근거로 만들었던 EPSPS5-EPSPS2 primer set의 PCR 산물의 DNA 염기서열분석을 수행하였다. PCR 산물의 크기는 300 bp 정도의 크기를 보였으며, 염기서열 분석의 결과는 Figure 3에 나타내었다. 보고된 EPSPS 유전자⁽¹³⁾를 PCR 산물의 염기서열과 비교하여 일치하는 결과를 보였다.

GTS 혼합비율에 따른 PCR 검출 한도

GTS 혼합비율을 조절하여 GTS와 반응하는 PCR의 검출한도를 측정하였다. 액체 질소로 냉각시킨 뒤 곱게 마쇄한 GTS와 non-GTS를 섞어서 각각 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, 0%의 GTS를 함유하는 콩 가루를 조제하여 이를 시료로 DNA를 추출하였으며, 추출한 template DNA를 EPSPS1-NOS primer와 각각 400 ng씩 PCR을 수행하여 전기영동을 하였다. Figure 4와 같이 EPSPS1-NOS primer는 각각의 DNA와 정량적으로 반응하여 PCR 산물의 intensity가 GTS %에 비례하여 줄어드는 것을 확인하였으며, 0.05% GTS를 포함하는 DNA까지 최소 검출한도로 측정되었다. PCR 조건은 다르지만, Lipp등⁽⁸⁾은 GTS 분말이 각각 2, 0.5, 0.1, 0%가 섞여 있는 시료를 이용하여 PCR을 수행하여 0.1%까지 검출 가능한 보고와 유사한 결과를 보이고 있다.

이상의 GTS 검출방법으로부터 원료 콩에 포함된 GTS 검출조건 및 검출한도에 연구를 수행하였고, 이를 토대로 열처리 및 발효를 통하여 제조된 가공식품의 GTS 검출조건 및 측정한도에 대한 연구도 진행 중이다.

요 약

본 연구는 유전자재조합 기술에 의해 개발된 glyphosate에 내성을 가지고 있는 콩(GTS)의 모니터링을 위하여 PCR을 이용한 검출 방법에 대한 실험을 수행하였다. Glyphosate에

내성이 있는 콩에 삽입된 유전자와 표준대조 유전자인 lectin 과 ferritin 유전자를 근거로 제작된 primer와 CTAB 방법으로 추출된 콩의 DNA를 template로 이용하여 PCR을 수행하였다. GTS의 검출을 위한 제작된 primer들은 GTS와 특이적으로 반응하여 증폭된 PCR 산물을 생성하였으나, non-GTS와는 PCR 산물을 생성하지 못했다. 증폭된 염기서열 분석을 통하여 GTS에 특이적인 것을 확인하였으며, 약 0.05%가 포함되어 있는 GTS까지 검출이 가능함을 보였다.

감사의 글

이 연구는 식품의약품안전청 국립독성연구소의 용역연구과제로 수행되었으며 연구비 지원에 깊은 감사를 드립니다.

문헌

1. Chui, W.S. The safety of food developed by gene manipulation. *J. Food Hyg. Safety* 14: 216-225 (1999)
2. Padgett, S.R., Della-Cioppa, G., Shah, D.M., Fraley, R.T. and Kishore, G.M. Cell culture and somatic cell genetics of plants, vol. 6: Selective herbicide tolerance through protein engineering. pp 441-476. Academic Press, New York (1989)
3. Dunwell, J.M. Novel food products from genetically modified crop plants: methods and future prospects. *Int. J. Food Sci. Technol* 33: 205-213 (1998)
4. Dunwell, J.M. Transgenic crops: the next generation, or an example of 2020 vision. *Ann. Bot* 84: 269-277 (1999)
5. Gasser, C.S. and Fraley, R.T. Genetically engineering plants for crop improvement. *Science* 244: 1293-1299 (1989)
6. Shirai, N., Ozawa, S., Hashimoto, W., Utsumi, S., and Murata-Safety, K. Safety assessment of genetically engineered food : detection and monitoring of glyphosate-tolerant soybeans. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 1461-1464 (1998)
7. Lipp, M., Anklam, E., Brodmann, P., Pietsch, K. and Pauwels, J. Result of an interlaboratory assessment of a screening method of genetically modified organisms in soy beans and maize. *Food Control* 10: 379-383 (1999)
8. Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J. and Anklam, E. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy bean and maize in dried powder. *J. AOAC Int.* 82: 923-928 (1999)
9. Duijn, G., Biert, R., Peppelman, H. and Hessing, M. Detection methods for genetically modified crops. *Food Control* 10: 375-378 (1999)
10. Wurz, A., Bluth, A., Zeltz, P., Pfeifer, C. and Willmund, R. Quantitative analysis of genetically modified organisms (GMO) in processed food by PCR-based methods. *Food Control* 10: 385-389 (1999)
11. Hubner, P., Studer, E. and Luthy, J. Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organisms in food. *Food Control* 10: 353-358 (1999)
12. Padgett, S.R., Kolacz, K.H., Delannay, X., Re, D.B., Lavallee, B.J., Tinius, C.N., Rhodes, W.K., Otero, Y.I. and Barry, G.F. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop. Sci.* 35: 1451-1461 (1995)
13. Barry, G.F., Kishore, G.M., Padgett, S.R. and Stallings, W.C. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvyl-3-phosphate. U.S. Patent 5,633,435 (1997)
14. Proudhon, D., Wei, J., Briat, J. and Theil, E.C. Ferritin gene organization: differences between plants and animal suggest possible kingdom-specific selective constraints. *J. Mol. Evol.* 42: 325-336 (1996)
15. Vodkin, L.O., Rhodes, P.R. and Goldberg, R.B. Ca lectin gene insertion has the structural features of a transposable element. *Cell* 34: 1023-1031 (1983)
16. Meyer, R. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control* 10: 391-399 (1999)
17. Kim, T.W., Min, S.G., Choi, D.H., Jo, J.S. and Kim, H.Y. Rapid Identification of *Lactobacillus plantarum* in kimchi using polymerase chain reaction. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 881-884 (2000)

(2001년 2월 9일 접수)