



Roundup Ready Soybean의 정량 검출에서 SYBR Green I을 이용하는 Real-Time PCR 조건의 분석

백인순 · 정순천 · 이규화 · 윤원기 · 박상규¹ · 김창기 · 김환목

한국생명공학연구원 바이오평가센터 LMO평가연구실, ¹아주대학교 자연과학대학 자연과학부

Real-Time Quantitative PCR with SYBR Green I for Living Modified Roundup Ready Soybean

In-Soon Pack, Soon-Chun Jeong, Kyu Hwa Lee, Won Kee Yoon, Sangkyu Park¹,
Chang-Gi Kim and Hwan Mook Kim

LMO Evaluation Laboratory, Bio-Evaluation Center,
Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-806

¹Division of Natural Sciences, College of Natural Sciences, Ajou University,
San 5 Woncheon-dong, Yeongtong-gu, Suwon 443-749, Korea

Received August 31, 2005; Accepted September 12, 2005

ABSTRACT. Concerns on the safety of living modified (LM) crops have led to mandatory-labeling legislation of LM crops in many countries including Korea. An real-time PCR method for quantification of LM Roundup Ready soybean (RRS) with the double-stranded DNA intercalating dye, SYBR Green I, is described. Pairs of primers that specifically PCR-amplify the targeted 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) and *le1* gene sequences were selected by means of analysis of melting-curve plot of PCR products. Then, the specificity and general performance of the selected primer pairs were further increased by selecting optimum primer concentration by means of serial analyses of combination of different concentrations of each primer in the selected primer pairs. Using 1, 2, and 5% RRS test samples and applying the real-time PCR with SYBR Green I, mean values deviated from true values by 5.5 to 25%. The precision of the real-time PCR with SYBR Green I was comparable with that of the real-time PCR with TaqMan chemistry, which is widely used for the quantification of LM crops today. The results suggest that the real-time PCR with SYBR Green I, which does not require the high-cost dye labelling step for the initial primer or probe design, could be an alternative method for the quantification of LM Crops.

Keywords: EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase), Living modified crops, Roundup Ready soybean, SYBR Green I, Real-time polymerase chain reaction.

서 론

지난 10여년 동안 내충성, 내병성, 제초제저항성 등의 생산량을 증가시키거나 노동력을 감소시키는 목적으로 상

업화된 유전자변형작물(Living Modified Crops, LMC)의 재배는 꾸준히 증가하여 왔다(Nap *et al.*, 2003). 현재 가장 일반적으로 재배되는 LMC는 옥수수, 케놀라, 및 콩이며, 특히 제초제저항성 Roundup Ready soybean(RRS)가 주류를 이루는 LM 콩의 재배 면적은 2003년 전체 LM 작물 재배 면적의 61% 정도를 차지하였다(한국생명공학연구원, 2003; Nap *et al.*, 2003). 그러나 LMC는 전통적인 육종 방법과 달리 유연관계가 먼 동물·식물·미생물의 유전자를 작물에 인위적으로 도입하였기 때문에, LMC의 광범위한 재배 및 소비는 이들 작물의 잠재적인

Correspondence to: Hwan Mook Kim, LMO Evaluation Laboratory, Bio-Evaluation Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-806, Korea
E-mail: hwanmook@kribb.re.kr

Abbreviations: EPSPS, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase; LM, Living modified; PCR, polymerase chain reaction; RRS, Roundup Ready soybean.

환경 및 인체위해성에 대한 논란을 불러 일으켜왔다. 이러한 위해성에 대한 논란은 소비자의 알 권리를 보장하는 차원에서 LMC의 식품 및 사료료의 의도적 또는 비의도적 혼입에 대한 표시제의 시행을 유도하였다. 유럽연합국은 0.9% 이상의 LMC를 포함하는 식품의 표시를 의무화하였고(Auer *et al.*, 2003), 노르웨이와 스위스는 각각 2%와 1% 이상에 대해 표시를 의무화하였다(Ahmed *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 1999). 우리나라에서도 2001년부터 LMC를 3% 이상 포함하는 27개 식품에 대한 표시제를 의무화하였다(농림부고시, 2000; 식품의약품안전청고시, 2001). 따라서 식품에 첨가된 LMC의 포함여부를 검출하는 정성 및 정량적 방법의 개발은 필수적이다.

LMC의 혼입 여부를 검출하기 위한 방법은 크게 두 가지로 구분되는데, 유전자변형에 의해 만들어진 단백질을 항체를 사용하여 분석하는 방법과 도입유전자나 표지유전자의 DNA를 증폭하여 정성·정량 분석하는 방법이 있다(Anklam *et al.*, 2002; Pack *et al.*, 2004; Yun *et al.*, 2004). 현재 LMC의 정량분석을 위하여 널리 사용되는 DNA 기초 방법은 실시간 PCR(real-time PCR)이다. 실시간 PCR 방법은 PCR의 매 사이클마다 형광염료의 형광값을 측정하고, 사이클 대비 형광값에 대한 그래프의 지수 증식기(exponential phase) 범위 내에서 분석하는 방법이다. 상기에서 얻은 그래프를 회기 분석하여 표준시료의 Ct(threshold cycle) 값에 대한 표준곡선을 구한 후 미지시료의 Ct값을 대입하여 LMC의 혼입률을 측정할 수 있다. DNA-결합 형광물질(DNA-binding fluorophore)의 종류로는 SYBR Green I, ethidium bromide, rhodamine 등을 들 수 있다(Higuchi *et al.*, 1992, 1993; Wittwer *et al.*, 1997). 현재까지 표적 DNA의 정량을 목적으로 개발된 실시간 PCR 방법은 TaqMan probe 방법, Molecular beacon 방법, hybridization probe 방법, Ampliflour™ 보편적 증폭 및 검출 시스템, SYBR Green I 염료를 사용하는 방법 등이 있다. TaqMan probe 방법은 5' nuclease activity를 이용하여 PCR이 진행됨에 따라 5' 말단의 reporter 형광 염료가 quencher 염료로부터 분리되면서 발생시키는 고유의 형광 값을 읽는 방법이다(Holland *et al.*, 1991). Molecular beacon 방법은 루프(loop) 부분이 표적에 특이적인 염기 서열이고 양쪽 끝의 서로 상보적인 염기서열을 통하여 헤어핀 구조를 이루는 probe가 PCR 과정에 따라 표적에 결합하면 양쪽 끝의 염료가 분리되면서 형광을 발산하는 원리를 이용한다(Kramer *et al.*, 1996). Hybridization probe 방법은 upstream oligo probe의 3' 말단에 donor 염료가 결합되어 있고, 근접한 염기서열에 대한 downstream oligo probe의 5' 말단에 acceptor 염료가 결합되어 있어서 PCR 과정에 따라 표

적에 두 probe가 모두 결합하면 두 염료가 가까워지면서 형광을 발산하는 원리를 이용한다(Livak *et al.*, 1995). Ampliflour™ 보편적 증폭 및 검출 시스템은 유전자 특이적 oligonucleotides에 부착된 Z 모양의 염기서열에 universal 헤어핀 primer(Uniprimer™)가 부착하여 PCR 증폭산물에 결합하면 형광을 발하는 원리를 이용한다(Nazarenko *et al.*, 1997). SYBR Green I 염료를 사용하는 방법은 통상적인 PCR에서와 같이 한 쌍의 primer를 사용하여 PCR을 진행하여 PCR 산물인 DNA의 이중나선에 염료가 특이적으로 삽입(intercalating)되어 형광을 발하는 SYBR Green I 염료의 특성을 이용한다(Morrison *et al.*, 1998).

위와 같은 형광염료를 사용한 실시간 PCR 방법은 근래에 LMC의 혼입률 분석에 활발히 응용되고 있으며(Cankar *et al.*, 2005), 현재 LMC 혼입률 정량에 가장 널리 사용되는 방법은 TaqMan probe 방법이다. SYBR Green I을 이용하는 방법은 TaqMan 법에 비해 형광 표지된 oligonucleotide probe를 고안할 필요가 없고 SYBR Green I 염료가 저렴하다는 장점이 있다. 그러나 SYBR Green I을 이용하는 방법은 한 종류의 PCR 산물만 증폭되는 조건이어야 하고, 통상적인 PCR에서 발생하는 primer dimer와 같은 비특이적 산물의 형성이 일어나지 않는 민감한 조건을 요구한다. 이러한 한계점 때문에 Terry *et al.* (2002)은 SYBR Green I 방법이 RRS의 정량에 적합하지 않다고 제안한 바 있다. 한편, Hernández *et al.* (2003)은 본 방법이 LMC의 정량을 위해서는 한층 최적화되어야 할 면이 있으나, 다양한 LMC의 동정 목적으로 값싸고 고속으로 사용될 수 있음을 주장하였다. 결론적으로, SYBR Green I의 성공적인 적용을 위해서는 특이적인 PCR 산물만 증폭하고 비특이적 산물을 형성하지 않는 primer쌍을 고안하고 비특이적 산물이 형성되지 않는 적합한 PCR 조건을 찾는 것이 매우 중요하다.

본 연구는 현재 전 세계적으로 가장 널리 재배되는 LM콩인 RRS를 재료로 사용하여 RRS의 혼입률을 정량하기 위한 SYBR Green I을 사용한 정량 실시간 PCR 방법의 확립을 위한 조건에 대하여 기술하고 있다. RRS 콩은 전 세계에서 가장 많이 판매되는 라운드업(Roundup) 제초제의 핵심성분을 이루는 글리포세이트(glyphosate)에 내성을 가지는 *Agrobacterium* sp, strain CP4에서 분리한 EPSPS[5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase] 유전자를 도입한 콩이다. EPSPS 효소는 방향족 아미노산의 전구물질인 chorismate를 합성하는 시킴산(shikimic acid) 대사과정의 관여하는데, 식물의 정상적인 EPSPS 효소는 글리포세이트에 의해 작용이 억제된다. RRS의 혼입률을 SYBR Green I을 이용하는 실시간 PCR방법으로 정량하기 위하여, 도입유전자 EPSPS 및 콩 특이 lectin

내재양성대조 유전자 *le1*에 대해 특이적인 PCR primer를 제작하였다. 각 primer 조합의 정량에 적합한 반응 조건을 찾기 위하여 melting curve 분석을 통하여 일차적으로 primer 쌍을 선발하였고, primer 농도구배를 주어 정량에 적합한 선발된 primer쌍의 농도 조합을 결정하였다. 본 연구에서 개발한 SYBR Green I을 이용한 실시간 PCR은 RRS의 혼입률을 TaqMan 법에 상응하는 수준으로 정량하는 결과를 생산하였다.

재료 및 방법

실험재료

LM 콩 HS2906은 Growmark사(Bloomington, IL, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 음성대조군으로는 non-LM 콩인 Williams82 품종을 사용하였다. HS2906은 미국 Monsanto 사(St. Louis, MO, USA)에서 개발한 GM 콩 event 인 Roundup Ready™ Soybean(RRS)에서 유래한 품종으로 도입유전자는 *Agrobacterium tumefaciens* CP-4로부터 유래된 제초제 저항성 유전자 *EPSPS*가 cauliflower mosaic virus(CaMV)의 35S promoter와 *Agrobacterium tumefaciens*의 nopaline synthase (NOS) 유전자의 terminator에 의해 발현되도록 도입되어 있다. Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)에서 공급하는 표준물질(certified reference materials, CRM)은 Joint Research Centre사(European Commission, Brussels, Belgium)로부터 구입하였으며,

LM 표준 plasmid molecule(reference plasmid molecule, RPM)은 Nippon Gene 사(NipponGene Co., Tokyo, Japan)에서 구입하였다.

DNA 추출

LM 및 non-LM 콩의 DNA는 CTAB 방법에 의해 추출하였다(Doyle and Doyle, 1990). 추출한 DNA는 A260/A280의 값이 1.7에서 2.0까지 범위내의 DNA만을 사용하였다.

Primer 제작

Primer는 RRS 콩에 도입된 *EPSPS* 유전자 염기서열과 내재유전자 *le1* 유전자 염기서열에 기초하여 GC함량, annealing 온도 등을 고려하여 도입유전자의 증폭을 위한 primer를 제작하거나, 기존에 발표된 primer를 사용하였다(Table 1). NTC(no template control) 및 0% 샘플에서 primer dimer와 같은 비특이적 산물이 일어나지 않는 조건에서 제작한 primer 쌍들은 oligonucleotide 합성회사(Bioneer, Daejeon)에 의뢰하여 합성하였다. TaqMan probe는 Nippon Gene사(NipponGene Co., Tokyo, Japan)에서 구입하였다. Probe의 5' 말단에는 형광탐지염료 6-carboxyfluorescein (FAM)이 표지되어있고, 3' 말단에는 형광억제염료 6-carboxytetramethyl-rhodamine (TAMRA)가 표지되어있다 (Table 1).

SYBR Green I을 이용한 실시간 PCR

시료를 조제하기 전에 실시간 PCR 기기[iCycler (Bio-

Table 1. List of primers and TaqMan probes for quantitative real-time PCR of Roundup Ready soybean

Method	Target gene	Primers	Orientation	Sequence (5'-3')	References	
SYBR Green I	<i>EPSPS</i> ^a	RRS1	Forward	AGTGGCTACAGCCCTGCATGC	This study	
		RRS2	Forward	ACTAGTGGCTACAGCCTG	This study	
		RRS3	Reverse	GGAATGCGGACGGTTCGGG	This study	
		RRS4	Reverse	CGGGAATGCGGACGGTT	This study	
		gcgRRS1	Forward	GCGAGTGGCTACAGCCTGCATGC	This study	
		gcgRRS2	Forward	GCGATCAGTGGCTACAGCCTG	This study	
		RRS27	Forward	ACAGCCTGCATGCTTCAC	This study	
		RRS91	Reverse	GAAAGGCCAGAGGATTTG	This study	
		sltmf3a	Forward	GCAAATCCTCTGGCCTTTCC	Hernández <i>et al.</i> , 2003	
		sltm2a	Reverse	CTTGCCCGTATTGATGACGTC	Hernández <i>et al.</i> , 2003	
		<i>Le1</i>	Lectin1	Forward	TGTGTCAGGGGCATAGAAGG	This study
			Lectin2	Reverse	ACCCCATCCACATTCACATTTGGG	This study
			sltm1	Forward	AACCGGTAGCGTTGCCAG	Hernández <i>et al.</i> , 2003
			sltm2	Reverse	AGCCCATCTGCAAGCCTTT	Hernández <i>et al.</i> , 2003
TaqMan	<i>EPSPS</i> ^a	RRS-Taq	Probe	(FAM)-CGCAACCGCCCGCAAATCC-(TAMRA)	Kuribara <i>et al.</i> , 2002	
		RRS01-5'	Forward	CCTTAGGATTTTCAGCATCAGTGG	Kuribara <i>et al.</i> , 2002	
		RRS01-3'	Reverse	GACTTGTCCGCGGGAATG	Kuribara <i>et al.</i> , 2002	
	<i>Le1</i>	Le1-Taq	Probe	(FAM)-AGCTTCGCCGCTTCCCTCAACTTCAC-(TAMRA)	Kuribara <i>et al.</i> , 2002	
		Le1n02-5'	Forward	GCCCTCTACTCCACCCCA	Kuribara <i>et al.</i> , 2002	
		Le1n02-3'	Reverse	GCCCATCTGCAAGCCTTTT	Kuribara <i>et al.</i> , 2002	

^a5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase.

Rad) 또는 ABI7900 (Applied Biosystems)]를 켜놓은 후, 분석시료 1개당 3반복 실험을 위하여 4반복 분량의 마스터 믹스(master mix)를 아래 조성에 해당하도록 만들었다. 분석시료 DNA의 부피를 제외한 PCR을 위한 1차 마스터 믹스를 4-well에 해당하는 만큼 1.5 ml 튜브로 분주한 후, 200 ng의 분석시료 DNA를 넣어 잘 섞은 다음에 25 μ l씩 3 well에 분주하였다. 이 때 primer는 forward와 reverse primer를 함께 넣어주었다. Primer의 최적 농도를 찾는 스크리닝에는 forward primer 50 nM, 300 nM, 900 nM과 reverse primer 50 nM, 300 nM, 900 nM의 모든 조합을 시도하였다. 표준시료를 분석하기 위하여 분석시료 DNA 대신 표준시료를 넣었으며, NTC well에는 증류수를 넣어주었다. 결과적으로 PCR 반응의 조성은 14.5 μ l primer, 1.0 μ l SYBR Green I(Sigma, USA), 1.5 unit Taq polymerase(Invitrogen, USA), 2.5 μ l 완충용액, 0.5 μ l dNTP(10 mM), 5.0 μ l 분석시료 genomic DNA (50 ng, 농도 10 ng/ μ l) 또는 적당량의 RPM DNA 이었고, 전체 부피는 25.0 μ l이었다. 모든 시료는 녹인 후 얼음 위에 보관하도록 하고 분주가 끝나면 광학 커버 시트로 플레이트를 덮은 후 전용 롤러로 완전히 밀폐하였다. Well 바닥에 기포가 생기지 않도록 plate 용 원심분리기를 이용하여 1000 rpm에서 원심분리를 실시하였다. 컴퓨터의 분석 프로그램에 각 well 정보를 입력한 후, 95°C 10분 반응 후, 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 30초의 40 사이클로 PCR을 수행하면서 사이클마다 신장기에 형광 값을 읽었으며, 55°C부터 95°C까지 0.5°C씩 올리면서 용해 곡선(melting curve)을 그렸다. PCR 반응이 끝나면 분석 프로그램으로 분석한 후 LMC 함량을 계산하였다.

TaqMan probe 방법을 이용한 실시간 PCR

TaqMan probe 방법은 RRS의 정량에 관한 문헌(Hird *et al.*, 2003; Kuribara *et al.*, 2002)을 바탕으로 하였다. 간단히 설명하면, PCR 조성은 0.5 μ M forward primer, 0.5 μ M reverse primer, 0.2 μ M TaqMan probe(2.5 μ M), 25 μ l 10 mM Tris HCl(pH 8.3), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2.5 mM deoxynucleotide triphosphates, 0.625 U AmpliTaq Gold, 0.25 U AmpErase UNG 를 포함하는 20 μ l PCR 마스터 믹스(Taqman Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems)에 5.0 μ l 분석시료 DNA 50 ng(10 ng/ μ l)를 넣어 주었고, NTC well에는 증류수를 넣어주었으며, 전체 부피는 25 μ l이었다. EPSPS와 *le1*의 primer와 probe 정보는 Table 1에 나열된 바와 같다. 컴퓨터의 분석 프로그램에 각 well 정보를 입력한 후, 50°C에서 2분, 95°C 10분 반응 후, 95°C에서 15초, 60°C에

서 60초의 40 사이클로 PCR을 수행하면서 사이클마다 신장기에 형광 값을 읽었다. 60°C부터 95°C까지 0.5°C씩 올리면서 용해 곡선(melting curve)을 그렸으며, PCR 반응이 끝나면 분석 프로그램으로 분석한 후 LMC 함량을 계산하였다.

결 과

용해 곡선 분석에 의한 SYBR Green I 법에 적합한 primer의 선택

SYBR Green I을 이용하여 정량 실시간 PCR 분석을 수행하기 위해서는 RRS에 도입된 유전자를 특이적으로 증폭시키는 primer와 콩에 존재하는 내재유전자를 특이적으로 증폭시키는 primer의 개발이 중요하다. 그러나 SYBR Green I법은 primer dimer와 같은 비특이적 산물도 PCR 사이클이 증가함에 따라 검출되기 때문에, PCR primer의 염기조성을 변화시키거나 여러 다른 부위의 sequence를 포함하는 PCR primer를 고안하였다(Table 1). 고안된 primer 쌍의 비특이적 산물의 PCR 증폭 여부는 실시간 PCR 산물의 용해 곡선(melting curve)을 이용하여 확인하였다. EPSPS 유전자에 기초하여 제작된 primer (Table 1)에서 조합한 9개의 primer 쌍(RRS1+RRS3, RRS1+RRS4, RRS2+RRS3, gcgRRS1+RRS3, gcgRRS1+RRS4, gcgRRS2+RRS3, gcgRRS2+RRS4, RRS27+RRS91 및 sltmf3a+sltm2a)의 비특이적인 증폭의 생성 여부와 template DNA가 없는 NTC의 경우에 primer dimer가 형성 여부를 조사하였다. 주요 산물의 peak 이외에 여타 산물의 peak가 감지되지 않은 용해 곡선을 생산하는 primer 쌍은 primer dimer와 같은 비특이적인 산물을 생성하지 않는 것으로 판단되어 정량에 적합한 primer 쌍으로 선발되었다. 본 9개의 primer 쌍 중에서 RRS1+RRS3(Fig. 1A & B), RRS1+RRS4, RRS27+RRS91 및 sltmf3a+sltm2a, gcgRRS1+RRS3은 SYBR Green I를 위한 정량분석에 적합하였던 반면, primer 쌍 gcgRRS1+RRS4 (Fig. 1C & D), RRS2+RRS3, gcgRRS2+RRS3, gcgRRS2+RRS4는 분석에 적합하지 않았다. 또한 콩 내재유전자 *le1*의 증폭을 위한 primer 조합 Lectin1+Lectin2 및 sltm1+sltm2는 비특이적인 산물이 검출되지 않았기 때문에 분석에 적합한 조합으로 결정되었다.

Primer 농도 차이에 의한 SYBR Green I법에 적합한 primer 조합의 선택

도입유전자와 내재유전자의 증폭에 적합한 primer 조합을 찾기 위하여 forward primer 50 nM, 300 nM, 900 nM과 reverse primer 50 nM, 300 nM, 900 nM의 모든

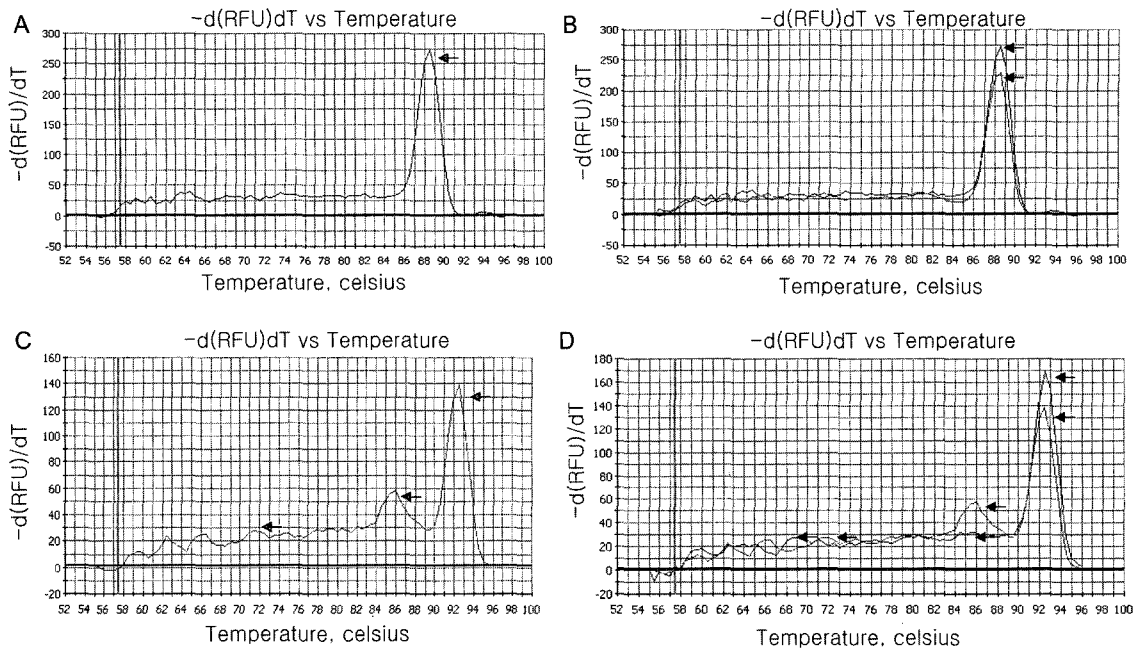


Fig. 1. Representative melting curves of products amplified from reference plasmid molecules (RPM) by real-time PCR with SYBR Green I. A : A curve of PCR products amplified by the RRS1 and RRS3 primer pair which was determined to be suitable for quantitative real-time PCR with SYBR Green I. B : Curves of PCR products amplified by the RRS1 and RRS3 primer pair from two different concentrations of RPMs. C : A curve of PCR products amplified by the gcgRRS1 and RRS4 primer pair which was determined to be unsuitable for quantitative real-time PCR with SYBR Green I. D : Curves of PCR products amplified by the gcgRRS1 and RRS4 primer pair from two different concentrations of RPMs. In the abscissa axis is represented the temperature in Celsius degrees and in the ordinate axis the derivate of the fluorescence. The peaks visualized by arrow indicate the melting points of the respective amplicons.

primer 농도 조합으로 PCR을 수행하였다. 본 분석을 통해 같은 primer 조합이라 하더라도 농도 조합이 달라짐에 따라 primer dimer와 같은 비특이적 산물의 검출여부가 달라지며, 다른 조건의 영향없이 혼입물에 따른 Ct 값의 차이가 큰 조건을 찾을 수 있었다. RRS1과 RRS3 primer 조합은 각각의 농도가 50 nM과 300 nM인 경우와 50 nM과 50 nM에서 2% RRS에서 기대되는 특이 산물만 증폭되었고 NTC에서 PCR 산물이 감지되지 않았고 background가 깨끗하기 때문에 정량에 적합한 것으로 판단되었고(Fig. 2A), 50 nM과 300 nM의 농도 조합이 Ct 값이 작기 때문에 정량에 보다 더 적합한 것으로 판단되었다. 하지만, RRS1과 RRS3 primer 조합에서 각각의 농도가 50 nM과 900 nM인 경우와 300 nM과 300 nM을 사용하였을 경우에는 2% RRS에서 비특이적 산물이 증폭되었고 NTC에서 PCR 산물이 감지되어 정량에 부적합한 것으로 간주되었다(Fig. 2B). 그 결과 EPSPS 도입유전자의 검출을 위한 primer 조합 RRS1과 RRS3의 경우 각각 50 nM과 300 nM, RRS1과 RRS4의 경우 각각 300 nM과 50 nM, RRS27과 RRS91의 경우 각각 300 nM과 50 nM, sltmf3a과 sltm2a의 경우 각각 900 nM과 50 nM

이 분석에 적합한 농도로 결정되었다. 또한 내재유전자 *le1*의 검출을 위한 primer Lectin1과 Lectin2의 경우 각각 50 nM과 50 nM, sltm1과 sltm2의 경우 각각 300 nM과 300 nM의 primer 농도 조합이 정량분석에 적합하게 작동하였다.

표준물질 Plasmid DNA를 사용한 LMC 미지시료의 정량 분석

스크리닝을 통하여 선정된 SYBR Green I을 사용한 실시간 정량 PCR에 적합한 EPSPS 유전자 특이적 primer 조합 중에서 가장 정량에 적합한 것으로 간주된 RRS1과 RRS3 조합과 RRS1과 RRS4 조합을 콩 내재양성대조 유전자 *le1* 특이적 primer 조합 Lectin1과 Lectin2를 이용하여 RRS의 혼입률을 정량하였다. RPM을 사용하여 작성한 calibration curve의 회기값은 0.995이었다. 미지시료로는 IRMM에서 공급하는 표준물질 RRS CRM을 사용하였다. 본 실험에서 '혼입률'이란 분석 시료(미지 시료)의 전체 양에서 유전자 변형 작물이 차지하는 양의 비율을 의미하는 것으로, 분석시료의 전체 양에서 EPSPS 유전자 도입된 콩이 차지하는 양의 비율을 의미하고, 백분율(%)

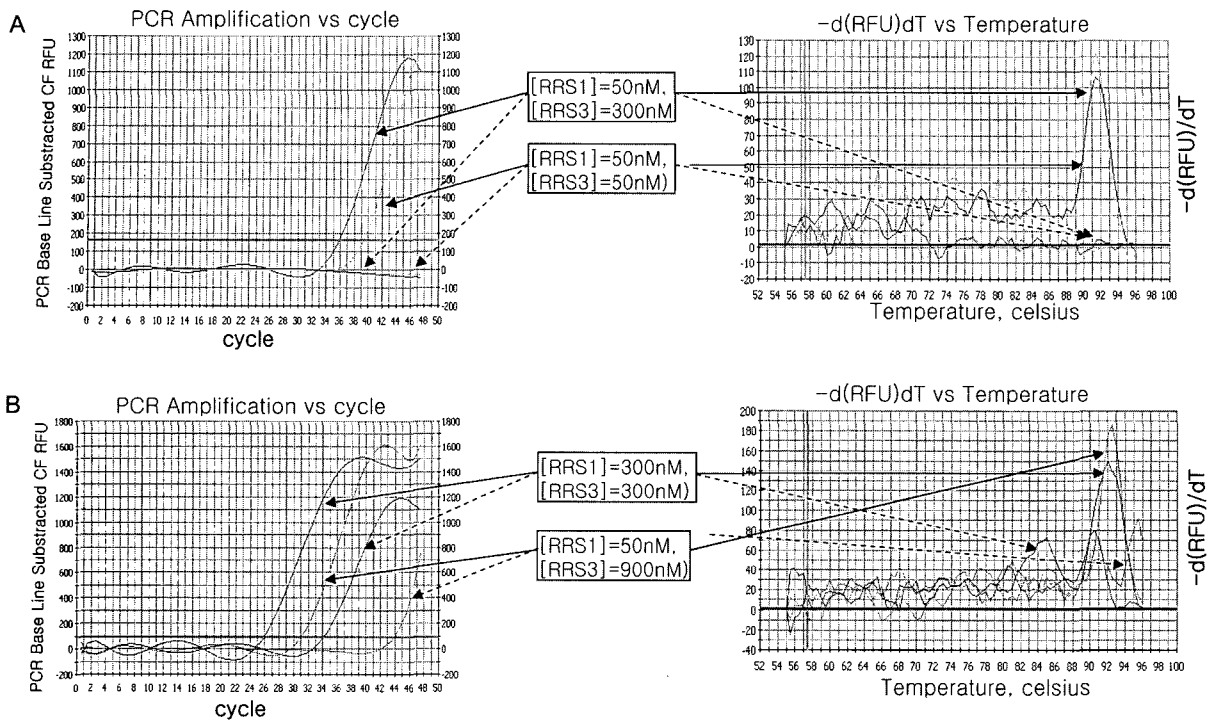


Fig. 2. Amplification and melting curves obtained by real-time PCR with SYBR Green I by using four combinations of different concentrations of each primer in the RRS1 and RRS3 primer pair for detection of 2% Roundup Ready soybean (RRS). A : Concentration combinations suitable for quantitative real-time PCR with SYBR Green I. B : Concentration combinations unsuitable for quantitative real-time PCR with SYBR Green I. 2% RRS curves are indicated by straight arrow lines and no-template control curves by dotted arrow lines.

Table 2. Quantitative estimates of Roundup Ready soybean (RRS) content in certified reference materials (CRMs) by using SYBR Green I method and TaqMan method. The calibration was based on copy number of reference plasmid molecules

CRM ^a	SYBR Green I (RRS1/RRS3)		SYBR Green I (RRS1/RRS4)		TaqMan	
	% RRS	Error (%)	% RRS	Error (%)	% RRS	Error (%)
1	0.93	7.0	1.10	10.0	1.27	27.0
2	1.89	5.5	1.50	25.0	2.43	21.5
5	4.08	18.4	3.80	24.0	4.74	5.2

^aPercentage of RRS in the CRM according to the supplier.

로 나타내었다. 이러한 방법을 통하여 RRS1과 RRS3과 Lectin1과 Lectin2를 이용하여 CRM 1, 2 및 5% RRS 시료를 분석하여, CRM 1, 2, 및 5% RRS에서 각각 0.93, 1.89 및 4.08%로 평균값(반복수 = 3)을 얻었으며, 각각 7, 5.5 및 18.4의 오차를 보였다(Table 2). 한편, RRS1과 RRS4과 Lectin1과 Lectin2를 이용하여 CRM 1, 2 및 5% RRS 시료를 분석하여 CRM 1, 2, 5% RRS는 각각 1.1, 1.5 및 3.8%로 평균값(반복수 = 3)을 얻었으며, 각각 10, 25 및 24%의 오차를 보였다(Table 2).

또한, 기존에 사용되던 방식인 TaqMan probe 방법 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA; Holland *et al.*, 1991; Kuribara *et al.*, 2002)과 SYBR Green I 방법을 비교하기 위하여 동일한 시료 조건에서 TaqMan probe 방법으로 같은 실험을 하였다. CRM 1, 2 및 5% RRS에서 각각 1.27, 2.43 및 4.74%의 평균값(반복수 = 3)을 얻었으며, 각각 27, 21.5 및 5.2%의 오차를 나타내었다(Table 2).

고찰

본 연구는 LM 콩 RRS의 도입유전자 *EPSPS* 유전자 특이적 primer 조합과 콩 특이 lectin 유전자 *le1*에 대해 특이적 primer 조합으로 SYBR Green I을 이용하는 실시간 PCR을 수행하여 RRS의 혼입률을 정량 분석하는 조건을 확립하여, RRS의 혼입률 정량 분석을 위한 kit를 제조한 결과를 보고하고 있다. 이론적으로 비특이적 산물이 생성되지 않는 온도와 구조의 조합을 갖는 oligonucleotide 쌍을 제작하는 것에 첨가하여, SYBR Green I을 이용한 실시간 PCR에 적합한 primer 쌍의 선별은 일차적으로 용해 곡선 분석에 의해 선별되었고, 선별된 primer 쌍 내

각 primer의 최적 농도를 이차적으로 선발하는 과정을 거쳤다.

LMC의 정량을 위해 PCR 산물을 특이성 있게 모니터링하는 다양한 실시간 PCR 방법이 제안되었고, TaqMan probe 방법이 현재 가장 널리 개발되어 사용되고 있다(예, Canker *et al.*, 2005; Kuribara *et al.*, 2002; Terry *et al.*, 2002; Vaitilingom *et al.*, 1999). 하지만 TaqMan법은 염료의 probe 부착으로 인한 고비용과 primer와 probe의 작용을 방지하는 전제하에 세 개의 oligonucleotide를 고안하는 어려움으로 인하여, 특정 LM 작물의 특이성 있는 검출 kit를 제작하는 데는 상당한 비용과 시간을 소요하는 것으로 간주되고 있다. TaqMan 법의 문제점에 대한 대안으로 PCR 용액에 염료를 첨가하여 실시간 PCR산물을 정량적으로 검출할 수 있는 SYBR Green I을 이용하는 방법이 작은 양으로 발현하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 것과 같은 경우에 적용될 수 있음이 조심스럽게 일찌기 제안되었다(Morrison *et al.*, 1998). 하지만, 당시에는 본 연구에서 사용한 실시간 PCR 기기와 같이 고성능으로 PCR 산물을 실시간으로 모니터링 할 뿐만 아니라 최종 PCR 산물을 즉시 용해 곡선으로 분석하여 비특이적 산물이 생성되었는지를 신속히 확인할 수 있는 기기가 없었기 때문에, SYBR Green I을 이용하는 방법이 TaqMan 방법에 필적할 정도로 PCR 산물을 정량하는 것으로 간주되지 않았다. 나아가, 본 SYBR Green I 방법이 LMC의 정량에 적용된 예는 정량에 부적합하다고 제안한 것(Terry *et al.*, 2002)을 제외하고는 성공적인 적용이 현재까지 보고된 바 없다.

RRS 표준 시료를 미지시료로 사용하여 SYBR Green I 방법을 통해 얻은 정량값의 오차 범위(5.5에서 25%)는 동일한 시료를 사용한 TaqMan probe방법으로 얻은 정량값의 오차의 범위(5.2에서 27%)와 유사하였다. 이 결과는 본 연구에서 개발한 SYBR Green I을 사용한 실시간 정량 PCR이 기존에 LMC의 정량분석을 위해 사용되어왔던 TaqMan probe 이용 실시간 PCR 방법에 상응하는 정확성을 가짐을 제안한다. 본 연구에서 얻은 CRM의 정량값에 대한 오차 범위는 기존에 CRM 미지시료를 TaqMan probe를 사용한 실시간 PCR로 정량한 연구와 비슷하지만(예, Berdal and Holst-Jensen, 2001; Kuribara *et al.*, 2002), 우리나라의 비의도적 혼입률 허용치인 3% 미지시료의 분석에 정확하고 광범히 적용되기 위해서는 오차범위를 현저히 줄이는 노력이 있어야 할 것이다.

결론적으로 본 연구는 PCR 산물의 실시간 모니터링과 비특이적 PCR 산물을 즉시 감지할 수 있는 용해 곡선 분석법을 사용하여 정량에 적합한 primer 쌍을 선발함에 의해 개발한 SYBR Green I 형광염료를 사용한 실시간 정

량 PCR에 의해 RRS의 혼입률을 정량하는 방법이 현재 널리 사용되는 TaqMan probe를 사용한 실시간 PCR의 대체 방법으로 사용될 수 있는 가능성을 제시하였다. 또한, 본 연구의 결과는 RRS 뿐만 아니라 다양한 LMC의 정량에 SYBR Green I을 이용하는 방법을 이용하기 위하여 적합한 primer 조합을 스크리닝할 필요가 있음을 제안하고 있다.

국문요약

유전자 변형(LM) 작물의 안전에 대한 우려는 우리나라를 비롯한 많은 나라들로 하여금 LM 식품의 의무적 표시제를 도입하게 하였다. LM 콩 Roundup Ready의 정량을 위해 DNA 이중나선에 삽입하는 형광염료인 SYBR Green I을 사용한 real-time PCR 방법을 개발하였다. EPSPS5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase 유전자에 특이적인 PCR이 진행되는 primer 쌍과 콩 특이 lectin 유전자 *le1* 특이적 primer 쌍을 PCR 산물의 melting-curve plot의 분석으로 선발한 후, 각 primer의 농도 조합의 분석으로 적합한 최적 primer 농도를 결정하여 이들 primer 쌍의 특이성과 전반적인 성능을 증가시켰다. 1, 2, 및 5%의 RRS 시험 시료를 본 개발된 방법으로 분석한 결과는 평균 정량값은 실제값에 대해 10에 25%의 오차를 나타내었다. SYBR Green I을 사용한 real time PCR의 정확성은 TaqMan probe 방법에 필적할 정도의 정확성을 보여주었다. 이러한 결과는 primer나 probe의 제작을 위한 고비용 형광염료 labelling 단계를 요구하지 않는 본 SYBR Green I 이용 real-time PCR 방법은 LM 작물의 정량을 위한 하나의 대안이 될 수 있음을 제시하였다.

감사의 말씀

이 연구는 과학기술부 시행 생명공학안전성평가기술개발사업, 과학기술부 21C 프런티어 작물유전체 기능연구사업, 바이오그린 21사업, 및 한국생명공학연구원의 기관 고유사업의 연구비 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사하는 바입니다.

참고문헌

- 농림부 (2000): 유전자변형농산물표시요령, 농림부고시 제2000-31호.
- 식품의약품안전청 (2001): 유전자재조합식품등의 표시기준, 식품의약품안전청 고시 제2001-43호.
- 한국생명공학연구원 바이오안전성정보센터 (2003): 2003 바이오

- 안전성백서, 한국생명공학연구원, 대전, pp. 420.
- Auer, C.A. (2003): Tracking genes from seed to supermarket: techniques and trends. *Trends Plant Sci.*, **8**, 591-597.
- Ahmed, F.E. (2002): Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends Biotechnol.*, **20**, 215-223.
- Anklam, E., Gadani, F., Heinze, P., Pijnenburg, H. and Van Den Eede, G. (2002): Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *Eur. Food Res. Technol.*, **214**, 3-26.
- Berdal, K.G. and 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 analyses. *Eur. Food Res. Technol.*, **213**, 432-438.
- Cankar, K., Ravnikar, M., Zel, J., Gruden, K. and 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.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1990): Isolation of DNA from small amounts of plant tissue. *BRL Focus*, **12**, 13-15.
- Hernández, M., Rodríguez-Lazaro, D., Esteve, T., Prat, S. and Pla, M. (2003): Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. *Anal. Biochem.*, **323**, 164-170.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S. and Griffith, R. (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, **10**, 413-417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. (1993): Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, **11**, 1026-1030.
- Hird, H., Powell, J., Johnson, M.L. and Oehlschlager, S. (2003): Determination of percentage of Roundup Ready soya in soya flour using real-time polymerase chain reaction: interlaboratory study. *J. AOAC Int.*, **86**, 66-71.
- Holland P.M., Abramson, R.D., Watson, R. and Gelfand, D.H. (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' → 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, **88**, 7276-7280.
- Kramer, J.A. and Krawetz, S.A. (1996): Analysis of transgenes by polymerase chain reaction: Establishing and maintaining the PRM1 → PRM2 → TNP2 line. *Anal. Biochem.*, **235**, 110-111.
- Kuribara, H., Shindo, Y., Matsuoka, T., Takubo, K., Futo, S., Aoki, N., Hirao, T., Akiyama, H., Goda, Y., Toyoda, M. and Hino, A. (2002): Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean. *J. AOAC Int.*, **85**, 1077-1089.
- Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W. and Deetz, K. (1995): Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.*, **4**, 357-362.
- Meyer, R. (1999): Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control*, **10**, 391-399.
- Morrison, T.B., Weis, J.J. and Wittwer, C.T. (1998): Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, **24**, 954-958, 960, 962.
- Nap, J.P., Metz, P.L., Escaler, M. and Conner, A.J. (2003): The release of genetically modified crops into the environment. Part I. Overview of current status and regulations. *Plant J.*, **33**, 1-18.
- Nazarenko, I.A., Bhatnagar, S.K. and Hohman, R.J. (1997): A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2516-2521.
- Pack, I.S., Jeong, S.C., Yoon, W.K., Park, S.K., Youk, E.S. and Kim, H.M. (2004): Effect of heat, pressure, and acid treatments on DNA and protein stability in GM soybean. *Kor. J. Food Sci.*, **36**, 677-682.
- Terry, C.F., Shanahan, D.J., Ballam, L.D., Harris, N., McDowell, D.G. and Parkes, H.C. (2002): Real-time detection of genetically modified soya using Lightcycler and ABI 7700 platforms with TaqMan, Scorpion, and SYBR Green I chemistries. *J. AOAC Int.*, **85**, 938-944.
- Vaitilingom, M., Pijnenburg, H., Gendre, F. and Brignon, P. (1999): Real-time quantitative PCR detection of genetically modified Maximizer maize and Roundup Ready soybean in some representative foods. *Agric Food Chem.*, **47**, 5261-5266.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A. and Rasmussen, R.P. (1997): Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, **22**, 130-131, 134-138.
- Yun, S.O., Jeong, S.C., Yoon, W.K., Park, S.K., Moon, J.S., Lee, J.H. and Kim, H.M. (2004): Performance evaluation of PCR kits for detecting genetically modified crop ingredients. *J. Toxicol. Pub. Health*, **20**, 101-108.