

국내에서 개발된 GM 쌀 (밀양 204호, 익산 483호)에 대한 정성 PCR 분석법 개발

김재환 · 송희성 · 지삼미 · 류태훈¹ · 김동훈¹ · 김해영*

경희대학교 생명공학원, ¹농촌진흥청 농업생명공학연구원 생물안전성과

Qualitative PCR Detection of GM rices (Milyang 204 and Iksan 483) developed in Korea

Jae-Hwan Kim, Hee-Sung Song, Sang-Mi Jee, Tae-Hun Ryu¹, Dong-Hern Kim¹ and Hae-Yeong Kim*

Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea

¹Division of Biosafety, National Institute of Agricultural Biotechnology, Suwon 441-100, Korea

Received November 2, 2005; Accepted November 25, 2005

For the development of qualitative PCR detection method of genetically modified rice (*Oryza sativa* L.), rice species specific gene, *SAMDC1* (S-adenosylmethionine decarboxylase), was selected and validated as suitable for use as an endogenous reference gene in rice. The primer pair OsSAMDC1-5'/3' with 110 bp amplicon was used for amplification of the rice endogenous gene, *SAMDC1* and no amplified product was observed from 19 different plants as templates. Qualitative PCR method was assayed with 2 different GM rices (Milyang 204 and Iksan 483) developed in Korea. For the qualitative PCRs, the construct-specific detection primer pairs were constructed. Os204-5'/OsNOS-3' amplifying the junction region of GUS gene and NOS terminator introduced in Milyang 204 gave rise to an amplicon 172 bp; also, Os483-5'/OsNOS-3' amplifying the junction region of *Bar* gene and NOS terminator introduced in Iksan 483 gave rise to an amplicon 161 bp.

Key words: GM Rice, Milyang 204, Iksan 483, *SAMDC1*, PCR

서 론

1994년 미국의 칼젠(Calgene)사에서 개발한 보존성이 향상된 토마토가 상품화되어 시판된 이후, 전세계적으로 콩, 옥수수, 면화, 카놀라 등 상품화된 유전자변형 농작물들이 2004년 말 현재 16개 작물, 약 80여종에 달하며 개발이 완료되어 각 나라별로 환경위해성 및 인체안전성 평가를 받은 후 시판되고 있다¹⁾. 우리나라의 경우 국내에서 개발되어 GM 작물로서 상품화된 것은 없으나, 국내 주요 농산물을 중심으로 농촌진흥청 산하의 연구기관, 대학 및 산업체 등에서 제초제내성 및 해충저항성 등을 갖는 GM 작물들의 개발이 활발하게 이루어지고 있으며, 일부 작물들에 대해 환경위해성에 대한 평가가 진행 중이며 머지않아 상업화가 가능할 것으로 예상된다. 특히, 쌀의 경우 미국, 일본, 중국, 인도, 우리나라에서 GM 쌀에 대한 개발²⁻⁶⁾이 활발히 이루어지고 있으나, 아직까지 전 세계적으로 상업화 채택된 GM 쌀은 없는 것으로 보고되고 있다. 그러나, 2005년 그린피

스(Greenpeace; 국제환경보호단체)에서는 중국에 후베이성 지역 내에 종자회사, 농가, 기타 여러 시장 등에서 판매되고 있는 쌀을 수거하여 시험 분석한 결과, 해충저항성 유전자가 삽입된 GM 쌀이 검출되었다고 보고된 바 있는 만큼 GM 쌀의 상업화⁷⁾는 곧 이루어질 것으로 예상된다. 이에 따라 국내에서도 개발된 제초제 저항성을 갖는 GM 쌀(밀양204호, 익산 483호)에 대한 상업화도 곧 이루어질 것이며, 이들의 모니터링을 위한 정성, 정량 분석법이 필수적이다. 현재까지 GM 콩, 옥수수, 감자 등에 대해 PCR을 이용한 분석 방법⁸⁻¹⁰⁾이 보고되었으나, GM 쌀에 대한 정성 PCR 분석법에 대한 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 두 종의 GM 쌀의 분석을 위해 쌀의 특이적인 내재 유전자를 선별하고, 제초제 저항성인 밀양204호, 익산 483호 품종에 삽입된 특이적인 유전자를 이용하여 정성 PCR 분석법을 개발하고자 한다.

재료 및 방법

재료. GM 쌀(밀양204호, 익산 483호)과 non-GM 쌀(동진벼)은 *Oryza sativa* L., *Japonica* 종으로써 농촌진흥청 농업생명공학연구원 생물안전성과로부터 분양받아 이용하였으며, 콩, 옥

*Corresponding author

Phone: 82-31-201-2660; Fax: 82-31-204-8116

E-mail: hykim@khu.ac.kr

Table 1. Sequences of primers used in this study

Primer name	Sequences(5'-3')	Target	Amplicon size
OsSAMDC1-5'	GGATGCTAAGAAAGCTGAGG	SAMDC1	110 bp
OsSAMDC1-3'	CCATCTCAGGGATGATTTCAGA	SAMDC1	
Os204-5'	ACGCTGGACTGGCATGAACT	GUS	172 bp
OsNos-3'	AAGACCGCAACAGGATTCA	T-nos	
Os483-5'	GGGAACCTCATCGAACTCAAC	Bar	161 bp
OsNos-3'	AAGACCGCAACAGGATTCA	T-nos	

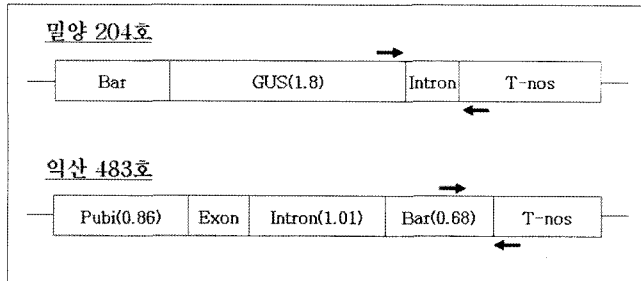


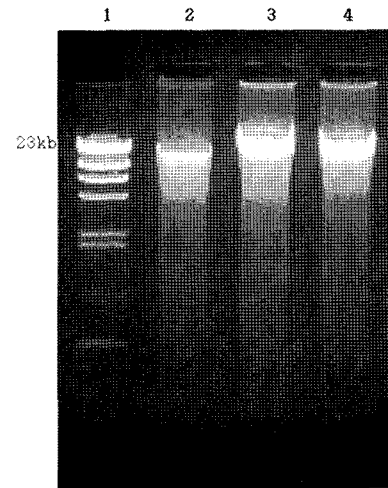
Fig. 1. Construct-specific primer pair of 'Milyang 204' and 'Iksan 483'.

수수, 밀, 면화, 유채, 고추, 비타민, 무순, 상추, 적근대, 파, 딸기, 돌미나리, 해바라기, 깻잎, 시금치, 돌나물, 파슬리, 쑥갓 등 19개 작물들을 농업생명공학연구원 유전자원과로부터 분양 받거나 국내 시장에서 구입하여 본 연구에 이용하였다.

Primer 제작. 쌀의 내재 유전자인 *SAMDC1*(S-adenosylmethionine decarboxylase) 유전자¹¹⁾의 염기서열을 기초로 하여 110 bp의 PCR 산물을 얻을 수 있도록 특이적인 primer 쌍을 제작하였다. 밀양 204호는 삽입된 GUS 유전자¹²⁾와 NOS terminator를 증폭시켜 172 bp의 PCR 산물을 얻을 수 있도록 특이적인 primer 쌍을 제작하였고, 익산 483은 삽입된 *bar* 유전자와 NOS terminator를 증폭시켜 161 bp의 PCR 산물을 얻을 수 있도록 특이적인 primer 쌍을 제작하였다(Fig. 1).

DNA 추출. GM 쌀, non-GM 쌀, 그리고 다른 19종의 작물들은 모두 1g씩의 시료를 준비하여 막자사발에 넣고 액체질소를 가하여 분말형태로 만들어 DNeasy Plant Maxi kit(Qiagen, USA)을 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 UV-visible spectrophotometer UV-1700(Shimadzu, Japan)를 이용하여 260 nm와 280 nm에서 정량 하였으며 260 nm/280 nm가 1.8-2.0 사이인 것을 이용하였다. 추출된 DNA는 0.8%의 agarose gel상에서 100 volt로 15분 동안 전기영동을 수행하여 확인하였으며, 표준 분자량의 마커로는 *λ*HindIII을 사용하였다(Fig. 2).

PCR 조건. PCR 반응 용액은 한 시료 당 25 μ 로 만들어 사용하였다. 반응 용액은 1.5 mM MgCl₂를 포함하는 10 \times PCR buffer(TaKaRa, Japan) 2.5 μ , 10 μ M의 forward primer, 10 μ M의 reverse primer, 2 μ dNTP(2.5 mM each, TaKaRa, Japan) 그리고 50 ng의 template DNA가 포함되도록 하였고, 반응은 thermocycler PC808(ASTECC, Japan)를 이용하여 수행하였다. PCR 조건으로 첫 cycle에서 95°C에서 5분간 수행하였고 나머지 cycle에서는 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초간 40 cycle을 수행하였으며, 마지막 단계로 72°C에서 8분간

Fig. 2. Genomic DNA of GM rice and non-GM rice. 1: Marker (*λ*HindIII marker), 2: non-GM rice, 3: GM rice (Milyang 204), 4: GM rice (Iksan 483).

수행한 후, 4°C에서 PCR 산물을 보관하였다. PCR 산물은 3% agarose gel상에서 전기영동을 수행하였다.

PCR 산물의 염기서열분석. 밀양 204호와 익산 483호에 각각 특이적인 primer 쌍을 이용하여 증폭된 PCR 산물들은 Automated DNA Sequencer ABI 3700(Applied Biosystems, USA)을 이용하여 두 번 반복하여 염기서열을 분석하였다.

결과 및 고찰

쌀의 내재 유전자(SAMDC1)에 대한 특이성 확인. 쌀(*Oryza sativa* L.)을 포함하여 비타민(*Hippophae rhamnoides*), 무순(*Raphanus sativus*), 상치(*Lactuca scariola* L. var. *sativa* Bisch), 적근대(*Beta vulgaris* L. var. *flavescens* DC.), 파(*Allium fistulosum* L.), 딸기(*Fragaria Ananassa* Duchesne), 콩(*Glycine max* L.), 고추(*Capsicum annuum* L.), 돌미나리(*Oenanthe javanica*(Blume)DC.), 해바라기(*Helianthus annuus*), 밀(*Triticum aestivum* L.), 깻잎(*Perilla Frutescens*), 시금치(*Spinacia oleracea* L.), 돌나물(*Sedum sarmentosum* Bunge), 파슬리(*Petroselinum crispum*), 쑥갓(*Chrysanthemum coronarium* L.), 옥수수(*Zea mays* L.), 면화(*Gossypium* spp.), 그리고 유채(*Brassica campestris*)까지 20종의 작물로부터 분리된 genomic DNA를 template로 하고 쌀의 내재 유전자에 특이적인 primer (OsSAMDC1-5'/3')쌍을 이용하여 PCR 결과 쌀에서만 PCR 산물을 얻었다(Fig. 3). 따라서 본 연구에서 제작한 primer쌍이 GM 쌀의 정성 PCR 분석에 있어서 내재 유전자에 대한 특이적인 primer로 적용할 수 있음을 확인하였다.

밀양 204호와 익산 483호에 대한 Duplex PCR. 국내에서 개발된 밀양 204호와 익산 483호는 *Streptomyces hygroscopicus* 유래의 PAT(Phosphinotricin acetyl transferase)⁶⁾를 암호화하는 *bar* 유전자가 삽입되어 있어 제초제의 주성분인 PPT(Phosphinotricin)를 아세틸화하여 제초제내성을 갖도록 개발된 것이다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 밀양 204호는 *bar* 유전자와 NOS terminator가 삽입되어 있고, 익산 483호는 *bar* 유전자와 NOS terminator

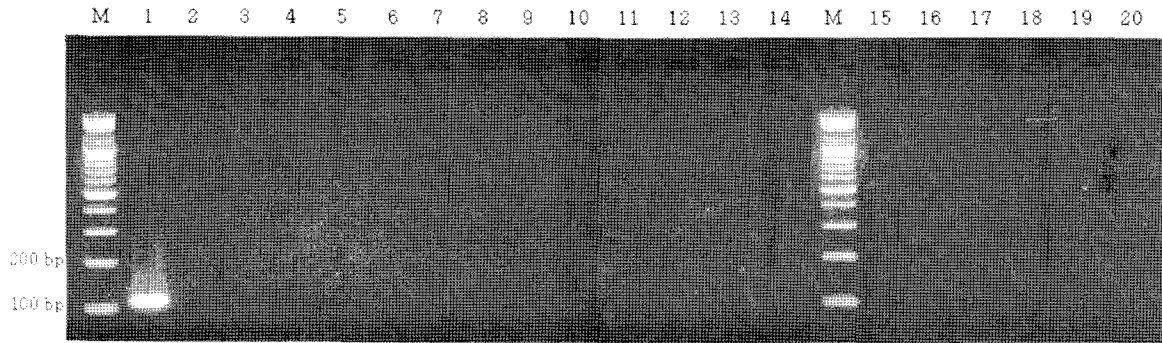


Fig. 3. PCR products amplified from genomic DNAs of 20 different plants. M: Marker (100 bp DNA ladder), 1-20: Rice, Vitamin, Radish, Lettuce, red rhubarb chard, Green Onion, Strawberry, Soybean, Pepper, Wild parsley, Sunflower, Wheat, Sesame leaf, Spinach, Sedum, Parsley, Crown daisy, Corn, Cotton, Canola.

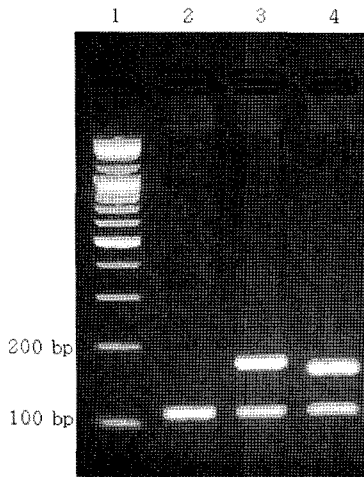


Fig. 4. PCR analysis of non-GM rice and GM rice (Milyang 204 and Iksan 483). 1: Marker (100 bp DNA ladder), 2: non-GM rice (110 bp), 3: GM rice (Milyang 204; 172 bp), 4: GM rice (Iksan 483; 161 bp)

그리고 *GUS* 유전자가 삽입되어 있다. 따라서 본 연구에서는 밀양 204호의 분석을 위해 *GUS* 유전자와 *NOS* terminator 부위에서 각각 forward/reverse primer 쌍을 제작하였고, 익산 483호의 분석을 위해 *bar* 유전자와 *NOS* terminator 부위에서 forward/reverse primer 쌍을 제작하였다. 이러한 각각의 primer 쌍과 쌀의 내재 유전자를 특이적으로 증폭시킬 수 있는 primer(OsSAMC1-5'/3')쌍을 이용하여 duplex PCR을 실시하였다(Fig. 4).

밀양 204호를 검출할 수 있는 특이적인 primer(Os204-5'/OsNos-3')쌍은 본 연구에서 제시한 PCR 조건에서 172 bp의 PCR 산물을 얻었고, 익산 483호를 검출할 수 있는 특이적인 primer(Os483-5'/OsNos-3')쌍은 동일한 조건에서 161 bp의 PCR 산물을 얻었다. 이러한 각각의 PCR 산물들은 DNA sequencer 기기의 염기서열 분석을 통해서 각각의 염기서열을 확인하였다.

오늘날 농업생명공학 기술은 생산성의 향상, 환경 보전, 식품의 안전성 및 품질 향상에 기여함은 물론 농업의 경쟁력을 높일 수 있는 유일한 대안으로 인식되고 있다¹³⁾. 유전자 변형 농산물의 개발은 미국, 캐나다 등의 선진국이 주도하고 있지만 우리나라의 기술도 선진국과 격차가 그다지 크지 않아 앞으로 유망산업으로 각광받을 전망이다. 특히, 우리나라를 비롯하여 동

남아시아 지역의 여러 나라들의 주요 농산물 중에 하나인 쌀은 재배 면적이나 생산량 및 소비량에 있어서 가장 우위에 있다. 따라서 국내에서도 GM 쌀(밀양 204호, 익산 483호)의 개발을 이미 10년 전부터 시작해 오고 있으며, 국내 상업화를 목적으로 한 최초 GM 작물인 만금 삽입유전자의 이동성, 재배 기간 중에 우점 토착미생물의 변화 양상, 시험포장내 무척추동물의 다양성에 미치는 영향, 생산성 및 영양성분 비교 등의 포괄적인 환경위해성 평가가 진행 중에 있다. 따라서 이러한 GM 쌀의 예기치 못한 개발 중의 관리 소홀로 인한 주변 지역의 방출 또는 앞으로 상업화에 따른 GM 쌀에 대한 관리 체계 확립을 위한 검정법 마련의 필요성에 따라 본 연구를 수행하였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21 지원사업으로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

초 록

국내에서 개발된 GM 쌀인 밀양 204호, 익산 483호의 정성 PCR 분석법의 개발을 위해 쌀의 내재 유전자로써 *SAMDC1* (S-adenosylmethionine decarboxylase)에 특이적인 primer (OsSAMDC1-5'/3')쌍을 제작하여 쌀을 포함한 20개 작물에 대해 PCR을 수행하여 쌀에 특이적으로 증폭되는 것을 확인하였다. 또한, 밀양 204호에 삽입된 *GUS* 유전자와 *NOS* terminator 연결 부위를 증폭시켜 172 bp의 PCR 산물을 얻을 수 있는 primer(Os204-5'/OsNOS-3')와 익산 483호에 삽입된 *bar* 유전자와 *NOS* terminator 연결 부위를 증폭시켜 161 bp의 PCR 산물을 얻을 수 있는 primer(Os483-5'/OsNOS-3')를 이용하여 국내 개발된 GM 쌀인 밀양 204호, 익산 483호의 PCR 정성 분석법을 확립하였다.

Key words: GM 쌀, 밀양 204호, 익산 483호, *SAMDC1*, PCR

참고문헌

1. Clive, J. (2004) Preview: Global status of commercialized

- biotech/GM crops. *ISAAA briefs No. 32*, ISAAA: Ithaca, NY.
2. Huang, J. K., Hu, R., Rozelle, S. and Pray, C. (2005) Insect-resistant GM rice in farmers' fields: Assessing productivity and health effects in China. *Science* **308**, 688-690.
 3. High, S. M., Cohen, M. B., Shu, Q. Y. and Altosaar, I. (2004) Achieving successful deployment of *Bt* rice. *Trends in Plant Sci.* **9**, 286-292.
 4. Oard, J. H., Linscombe, S. D., Braverman, M. P., Jodari, F., Blouin, D. C., Leech, M., Kohli, A., Vain, P., Cooley, J. C. and Christou, P. (1996) Development, field evaluation and agronomic performance of transgenic herbicide resistant rice. *Mol. Breed* **2**, 359-368.
 5. Wu, G., Cui, H., Ye, G., Xia, Y., Sardana, R., Cheng, X., Li, Y., Altosaar, I. and Shu, Q. (2002) Inheritance and expression of the cry1Ab gene in *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) transgenic rice. *Theor. Appl. Genet.* **104**, 727-734.
 6. Won, Y. J., Yi, G. H., Cho, J. H., Ko, J. M., Park, H. M., Han, C. D., Yang, S. J., Kim, S. C. and Nam, M. H. (2004) Establishment of a new breeding scheme for rapid release of variety using *bar* gene transformed rice. *Korean J. Plant Biotechnol.* **31**, 7-11.
 7. Zi, X. (2005) GM rice forges ahead in China amid concerns over illegal planting. *Nat. Biotechnol.* **23**, 637.
 8. Kim, H. J., Park, S. H. and Kim, H. Y. (2001) Study for detection of glyphosate tolerant soybean using PCR. *Korean J. Food Sci. Technol.* **33**, 521-524.
 9. Hur, M. S., Kim, J. H., Park, S. H., Woo, G. J. and Kim, H. Y. (2003) Detection of Genetically Modified Maize Safety-approved in Korea using PCR. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**, 1033-1038.
 10. Lee, S. H., Park, Y. H., Kim, J. K., Park, K. W. and Kim, Y. M. (2004) Qualitative PCR Method for Detection of Genetically Modified Maize Lines NK603 and TC1507. *Agric. Chem. Biotechnol.* **47**, 185-188.
 11. Li, J. Y. and Chen, S. Y. (2000) Differential accumulation of the S-adenosylmethionine decarboxylase transcript in rice seedlings in response to salt and drought stresses. *Theor. Appl. Genet.* **100**, 782-788.
 12. McElroy, D., Blowers, A. D., Jenes, B. and Wu, R. (1991) Construction of expression vectors based on the rice actin 1. 5' region for use in monocot transformation. *Mol. Gen. Genet.* **231**, 150-160.
 13. Uzogara, S. G. (2000) The impact of genetic modification of human foods in the 21st century. *Biotechnol. Adv.* **18**, 179-206.