

## 국내개발 stack gene GM 벼(LS28×Cry1Ac)에 대한 정성 PCR 분석

신공식<sup>1\*</sup> · 박종현<sup>1</sup> · 이진형<sup>1</sup> · 이시명<sup>1</sup> · 우희중<sup>1</sup> · 임선형<sup>1</sup> · 김해영<sup>2</sup> · 서석철<sup>1</sup> · 권순종<sup>1</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원, <sup>2</sup>경희대학교 생명공학원

## Qualitative PCR Detection of Stack Gene GM Rice (LS28×Cry1Ac) Developed in Korea

Kong-Sik Shin<sup>1\*</sup>, Jong-Hyun Park<sup>1</sup>, Jin-Hyoung Lee<sup>1</sup>, Si-Myung Lee<sup>1</sup>, Hee-Jong Woo<sup>1</sup>, Sun-Hyung Lim<sup>1</sup>, Hae-Yeong Kim<sup>2</sup>, Seok-Cheol Suh<sup>1</sup>, and Soon-Jong Kweon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea

Received January 5, 2009; Accepted February 11, 2009

For the development of qualitative PCR detection method of genetically modified (GM) rice, rice species-specific gene, *OsCc-1* (rice cytochrome c gene), was selected as suitable for use as an endogenous gene in rice. The primer pair *OsCytC-5'/3'* with 111 bp amplicon was used for PCR amplification of the rice endogenous gene, *OsCc-1* and no amplified product was observed from 8 different crops as templates. Qualitative PCR method was carried out with stack traits of LS28×Cry1Ac GM rice developed in Korea. For the qualitative PCRs, some primer pairs were designed with a construct-specific and event-specific type based on T-DNA and junction sequences of T-DNA in GM rice. *ActCK-5'/3'* amplifying between actin promoter and *OsCK1* gene introduced in LS28 gave rise to an amplicon 306 bp; also, *CrLB-5'/3'* from *Cry1Ac1* and *CKRB-5'/3'* amplifying the junction region of T-DNA and genome sequence from LS28 as event-specific primers gave rise to an amplicon 142 bp and 91 bp, respectively. These primer pairs for the detection of event-specific targets not produced PCR amplicons on non-GM rice and various crops in contrast to event lines. Therefore, in this study we verified that event-specific primers were effective to specifically detect stack trait lines and demonstrated that this method presented could be provided with the detection-method data for risk assessment analysis of GM rice to be commercialized.

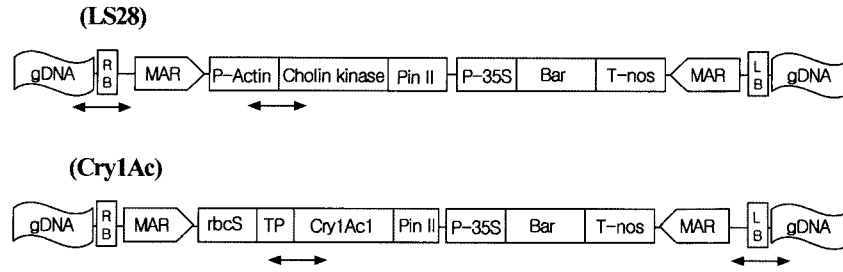
**Key words:** event-specific primer, GM rice, qualitative PCR, stack traits

### 서 론

최초 유전자변형(genetically modified, GM) 작물의 상업화로써 1994년 미국의 칼젠(Calgene)사가 개발한 보존성이 향상된 토마토의 시판 이후, 10년이 경과한 지금 전세계 GM 작물의 재배면적은 2007년 기준 1억1,430만 헥타르에 달하여 96년 대비 67배가 증가하였다고 농업생명공학 국제서비스(International Service for the Acquisition of Agribiotech Application, ISAAA)는 보고하고 있다[James, 2007]. 상업화된 GM 작물도 2006년 기준 21개 작물 107개 이벤트로 총 51개국에서 승인된 상태이

다[James, 2006]. 기존의 생물공학 작물은 제초제저항성, 해충 저항성 등의 단일형질(single trait)을 갖는 GM 작물이 주로 재배되었으나, 최근에는 한 품종에 2-3개의 형질이 결합되어 다양한 이익을 제공하고 있는 후대교배종(stacked traits) GM 작물의 재배가 빠르게 증가하고 있다[Akiyama 등, 2005; 2008]. 미국에서 후대교배종 GM 작물은 2007년 현재 옥수수 63%, 면화 78%에 달하여 전체 GM 작물의 37%를 차지하고 있으며, 생산성과 관련하여 농민들의 욕구를 충족시켜 중요한 미래의 성장추세로서 점점 더 많은 국가들이 후대교배종을 채택할 것으로 전망하고 있고[James, 2007], 우리나라의 후대교배종 GM 작물에 대한 위해성심사 승인 현황을 보면 2008년 3월 기준 총 57개 유전자변형 품목 중 20개 품목으로 35%를 차지하고 있다[KBCH, 2008]. 이와 같이 두 가지 이상의 농업적 형질을 포함함으로써 재배 시 예측하지 못한 피해로부터 위험부담을 줄일 수 있기 때문에 세계적으로 후대교배종 GM 작물의 개발이

\*Corresponding author  
Phone: +82-31-299-1128; Fax: +82-31-299-1122  
E-mail: kongsiks@rda.go.kr



**Fig. 1. Schematic representation of the T-DNA structures of LS28 and CryIAc1 rice.** Arrows indicate the location of primers designed for the detection of stack trait.

증가하고 있는 추세지만 국내의 경우 이러한 복합형질 품목의 개발은 전무한 실정이다.

한편 우리나라의 경우 국내에서 개발되어 GM 작물로서 상업화된 것은 아직 없으나, 국내 주요 작물을 이용하여 농촌진흥청, 대학 및 산업체 등에서 제초제 및 해충저항성을 갖는 GM 작물의 개발이 활발하게 이루어지고 있고, 일부 작물은 환경위해성에 대한 평가가 진행 중으로 머지않아 상업화가 가능할 것으로 예상하고 있다[Kim 등, 2006]. 또한 현대교배종 GM 작물도 농촌진흥청에서 벼를 이용하여 연구 개발하고 있으며, 그 대표적인 복합형질로 스트레스 및 해충저항성을 동시에 갖는 LS28×CryIAc1 GM 벼의 교배가 완료되었고, 현재 육성평가 단계에 있어 곧 실용화를 예측해 볼 수 있다.

GM 작물의 상업화를 위해서는 환경위해성 및 인체안정성 평가가 요구되고 있으며, 국내에서는 법으로 고시하고 있는 ‘유전자변형농산물의 환경위해성 평가심사 지침(농림부고시 2002-2호)’에 따라 상업화를 수행하여야 한다. 심사지침종 별표 2의 8항의 내용에는 도입유전자에 대한 분자생물학적 분석, 도입유전자의 검출 및 발현의 확인, 유전자변형 농산물에 대한 검정 방법 등을 명시하도록 하고 있다. 또한 GM 작물의 환경위해성 평가심사는 사례별(case-by-case)로 다루어지고 있으며, 심사에 제출되는 각 품목에 대해서 해당 자료가 마련되어야 하기 때문에 각각의 GM 작물에 대한 검정방법 확립은 중요한 사안이고, 검정법 개발은 GMO의 비의도적 환경방출에 따른 안전성 확보를 위한 사후모니터링 기술의 적용에 필수적이라 할 수 있다[Rho 등, 2004; Kim 등, 2005; Lim 등, 2007]. GMO (genetically modified organism)의 주요 검정방법으로는 도입유전자의 DNA를 검출하는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)이 국제 표준분석법으로 추천되고 있으며, 정성 분석법으로 도입된 T-DNA 내의 유전자를 검출하는 screening, gene specific 및 construct specific method와 T-DNA가 삽입된 게놈내의 인접서열과 운반체의 염기서열을 바탕으로 특이 마커를 작성하여 분석하는 event-specific method을 들 수 있다[Matsuoka 등, 2002; Min 등, 2004; taverniers 등, 2005; Pan 등, 2006; Lim 등, 2007]. 이러한 분석방법을 이용하여 상업화된 GM 작물에 대하여 각각의 PCR 검정방법을 정립하고[Matsuoka 등, 2002; Min 등, 2004; Lee 등, 2006; Marmiroli 등, 2008], 환경방출에 따른 모니터링, 농산물 및 가공식품에 대한 혼입유무의 판별 등 GMO 검정방법으로 활용되고 있다.

따라서 본 연구는 각각의 단일형질을 갖는 GM 벼를 교배하여 개발된 LS28×CryIAc1 GM 벼의 실용화를 위한 검정방법의

마련을 위하여 도입유전자 및 삽입부위의 인접서열을 바탕으로 특이 마커를 제작하고, 이를 이용하여 정성 PCR 검출법을 개발하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**재료.** 현대교배종 GM 벼(LS28×CryIAc1)는 *OsCKI* (cholin kinase) 유전자를 갖는 LS28 GM 벼(event LS30-32-20-1)를 모본으로 하고 흑명나방저항성 GM 벼(event Cr7-1-9-1)를 부분으로 교배(Fig. 1)하여 농촌진흥청 농업생명자원부에서 개발한 벼로 non-GM 벼(낙동벼)와 같이 *Oryzae sativa* L. *Japonica* 종으로 본 실험에 이용하였으며, 옥수수, 콩, 배추, 감자, 고추, 상추, 토마토 등의 작물을 대조구로 이용하였다.

**DNA 추출.** GM 벼, non-GM 벼 및 7종의 작물에 대하여 genomic DNA를 추출하기 위해서 모든 시료 1g씩을 막자사발에 넣고 액체질소를 가하여 분말화한 후 DNeasy Plant Kit (Quiagen, USA)을 이용하여 추출하였다. 추출한 DNA는 NanoDrop Spectrophotometer ND-1000(NanoDrop Technologies Inc. Wilmington)를 이용하여 농도를 측정하고, 260/280 nm 값이 1.8-2.0 사이인 DNA액을 실험에 이용하였다.

**면역학적 방법을 이용한 단백질 발현 확인.** 도입유전자의 단백질 발현 확인을 위하여 immunostrip 검정(lateral flow strip test, LFST)을 실시하였다. 각 시료를 마쇄하고 추출액을 넣어 단백질을 추출한 후, *bar* 도입유전자에 대해서는 Trait LL Test Strip(Strategic Diagnostics Inc. Newark)을, *CryIAc1* 도입유전자에 대해서는 *CryIAb-1Ac* ImmunoStrip Test(Agdia, Indiana)을 이용하여 제조사가 제공한 방법에 따라 LFST를 수행하였다.

**특이 Primer 제작 및 PCR 검정.** 벼의 내재유전자인 *OsCc-1*(rice cytochrome c gene)[Kemmerer 등, 1991] 유전자의 염기서열을 바탕으로 111 bp의 PCR 증폭 산물을 얻을 수 있도록 특이적인 primer 쌍을 제작하였으며, LS28×CryIAc1 GM 벼 계통의 검출을 위해서 LS28에 대하여 Actin promoter와 *OsCKI* 유전자를 증폭시킬 수 있도록 구조특이(construct-specific) primer 쌍과 T-DNA와 gDNA의 도입유전자 삽입부위의 인접서열을 바탕으로 계통특이(event-specific) primer 쌍을 각각 306 bp와 91 bp의 PCR 산물이 형성 되도록 제작하였다. 또한 *CryIAc1* 도입형질에 대하여 *TP* 유전자와 *CryIAc1* 유전자 사이의 증폭을 위한 구조특이 primer 쌍을, T-DNA의 left border(LB) 인접서열을 바탕으로 141 bp의 PCR 산물이 형성 되도록 계통특이 primer 쌍을 제작하였다(Fig. 1, Table 1).

Table 1. Sequences of primer pairs used in this study

Source	Primer name	Sequence (5'-3')	Target gene	Amplicon size (bp)
CryIAC1 rice	TPCry-5'* TPCry-3'*	CTTCGGCAACGTCAGCAAT GATGGACCAAAGATACCCCAGA	TP/CryIAC1	258
	CrLB-5' CrLB-3'	TGGATTAGAAGATGGGCAGCA CGTCAGGAGCTCGAAATTCAGTA	LB flanking region	142
LS28 rice	LSCK-5' LSCK-3'	CACGCAAGGACACTATCTGCA GTTTTTCAGTCGGTCCCAAATG	Cholin kinase	134
	ActCK-5' ActCK-3'	CCCTCAGCATTGTTTCATCGGTAGT ACCTGGTACACCTCGTTGGTCAT	Actin/OsCK1	306
	CKRB-5' CKRB-3'	TGACTCCCTTAATTCTCCGCTC AAATAGATGGTGAAAGCCTTGGAC	RB flanking region	91
Rice	OsCytC-5' OsCytC-3'	TAGATCTCGGAGGAGCTAAT CCGTCTCCACATCAAGCAGA	cytochrome c (reference)	111

\*This primer pair was already used for PCR detection of leaf folder-resistant GM rice.

기본적인 PCR 반응은 한 시료 당 총 25  $\mu$ L로 하여, 2.5  $\mu$ L의 10×PCR buffer(Ampliqon, Copenhagen), 2  $\mu$ L의 dNTP (2.5 mM each, Ampliqon), 1.5  $\mu$ L의 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Ampliqon), 각각 10  $\mu$ M의 forward와 reverse primer, Taq DNA polymerase는 TEMPase Hot Start DNA polymerase (Ampliqon)를 1.25 unit 첨가하고, 20 ng의 template DNA가 포함 되도록 조정하여 수행하였다. PCR 반응 조건은 Dyad Peltier Thermal cycler (Bio-Rad, Hercules)를 이용하여, 95°C에서 15분간 pre-denaturation 과정을 수행하고, 95°C에서 20초, 60°C에서 40초, 72°C에서 1분간 1cycle로 수행하여 총 35 cycle을 실시한 후, 72°C에서 5분간 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 2% agarose gel에 전기영동하고 UV 램프로 확인하였다.

**PCR 증폭 산물의 염기서열 분석.** LS28×CryIAC1 GM 벼 계통에 대한 각각의 특이적인 primer 쌍을 이용하여 증폭된 PCR 산물은 agarose gel에 전기영동하고, Gel Extraction kit(Qiagen, Hilden)를 이용하여 정제한 후, pGEM-T easy vector(Promega, Madison)에 삽입하여 염기서열을 확인하였다. 확인된 염기서열은 NCBI BLAST 분석을 통해서 동일성 분석을 수행하였다.

## 결과 및 고찰

**Lateral flow strip을 이용한 단백질 발현 확인.** 면역학적 방법으로 후대교배종 GM 벼(LS28×CryIAC1)의 단백질 발현을 확인하고자 항체가 표지되어 있는 시판 immunostrip을 이용하여 lateral flow strip test(LFST)를 수행하였다. 본 연구의 후대교배종은 환경스트레스에 저항성이 있는 *OsCKI* 유전자를 내포한 LS28 GM 벼를 모본으로 하고 해충저항성의 *CryIAC1* GM 벼를 부분으로 교배했기 때문에 *CryIAb-1Ac* strip을 이용하면 교배에 의한 발현 유무를 쉽게 확인할 수 있고, 또한 기본적으로 *bar* 유전자를 포함하므로 *bar* strip을 이용하여 단백질 발현을 확인할 수 있었다(Fig. 2). Fig. 2에 나타낸 바와 같이 교배계통 및 *CryIAC1* GM 벼에 대하여 *CryIAC* 유전자에 의한 단백질 발현을 뚜렷하게 확인할 수 있었으며, 이와 대조적으로 모본인 LS28 벼에 있어서는 어떠한 밴드도 나타내지 않았다. 반면 *bar*

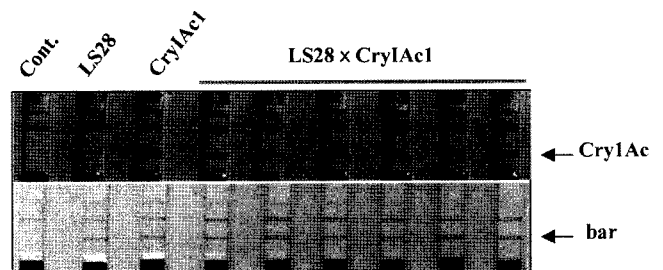


Fig. 2. Lateral flow strip test on the stack gene rices by using the bar and the *CryIAC* immunostrip. Lane Cont., non-transformed nagdongbyeon; lane LS28, single trait rice transformed with *OsCKI* gene; lane *CryIAC1*, single trait rice transformed with *CryIAC1* gene; lane LS28×*CryIAC1*, stack trait lines combined with LS28 and *CryIAC1* GM rice.

에 대한 LFST는 LS28 벼를 포함한 모든 GM 벼에서 확연한 밴드를 나타내어 도입유전자의 단백질 발현이 교배가 된 상태에서도 안정적으로 이루어지고 있음이 확인되었다. LFST를 통해서 LS28 GM 벼와 *CryIAC1* GM 벼가 정상적으로 교배되었고, 두개의 도입유전자가 안정적으로 발현하고 있음이 판명되었으며, 시판 *bar* 및 *CryIAb-1Ac*의 immunostrip으로 GMO 유무의 판단이 가능한 것으로 나타났다.

**작물 및 교배계통에 대한 특이 primer의 확인.** LS28×*CryIAC1* GM 벼를 특이적으로 검출하기 위하여 교배 모·부분의 GM 벼의 유전정보(Fig. 1)를 바탕으로 구조특이(construct-specific) 및 계통특이(event-specific) primer 쌍을 제작하였다(Table 1). 기본적으로, 제작 primer 쌍들에 있어서 벼의 내재유전자인 *OsCc-1* 유전자로부터 111 bp의 PCR 증폭 산물을 얻을 수 있도록 하였으며, LS28에 대하여 Actin promoter와 *OsCKI* 유전자 사이를 증폭시켜 306 bp의 PCR 산물을 형성하도록 구조특이 primer 쌍을, T-DNA와 계놈상의 도입유전자 삽입부위의 인접서열을 바탕으로 91 bp 증폭 산물의 계통특이 primer 쌍을 제작하였다. 또한 *CryIAC1* 벼에 대하여 258 bp의 구조특이 primer 쌍과 LB의 인접서열을 바탕으로 141 bp의 PCR 산물이 형성되도록 계통특이 primer 쌍을 제작하여 정성 PCR 반응을

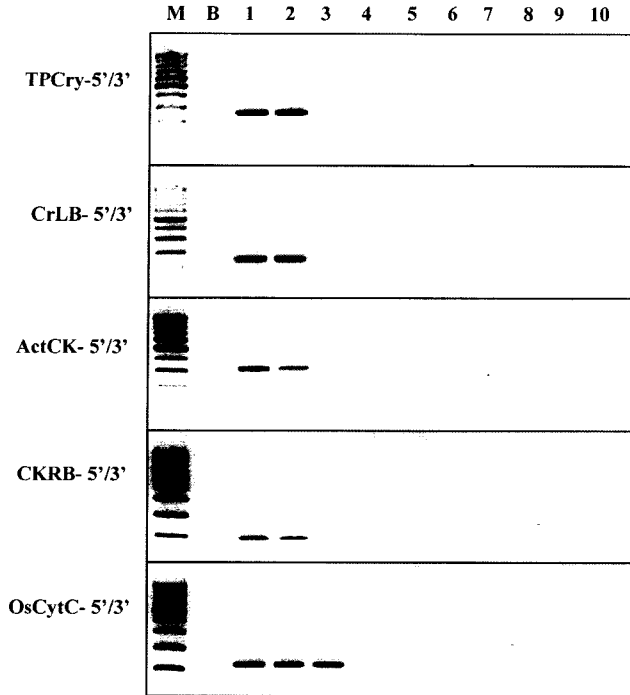


Fig. 3. Specificity of the detection primer pairs designed for the qualitative PCR. Lane M, 100 bp DNA ladder; lane B, non-sample blank; lane 1 and 2, LS28×CryIAc1 rices; lane 3, nagdongbyeo; lane 4, corn; lane 5, soybean; lane 6, chinees cabbage; lane 7, potato; lane 8, paper; lane 9, lettuce; lane 10, tomato.

수행하였다. 먼저, 벼(*Oryza sativa* L.)를 포함한 옥수수(*Zea mays* L.), 콩(*Glycine max* L.), 배추(*Brassica campestris* L.), 감자(*Solanum tuberosum* L.), 고추(*Capsicum annuum* L.), 상추(*Lactuca scariola* L.) 및 토마토(*Lycopersicon esculentum* Mill.) 등 총 8개 작물에 대하여 각종 특이 primer 쌍을 이용한 PCR 반응의 수행 결과, 구조 및 계통특이 primer 쌍들(TPCry-5'/3'; ActCK-5'/3'; CrLB-5'/3'; CKRB-5'/3')은 후대교배종인 LS28×CryIAc1 GM 벼에 있어서만 특이적으로 PCR 증폭 산물을 형성하는 것으로 나타났다(Fig. 3). 한편, 벼의 내재유전자에 특이적인 primer 쌍(OsCytC-5'/3')을 이용한 PCR 분석에 있어서 각종 작물들은 어떠한 반응도 보이지 않았으므로 이들 벼 특이 primer를 GM 벼의 PCR 분석시 다른 작물들과 구분하기 위해 적용 가능성이 확인되었다. 교배계통들에 대한 정성 PCR 분석을 위하여 LS28 및 CryIAc1의 단일형질 GM 벼를 포함해서 이들의 후대교배종, LS28×CryIAc1 계통들에 대하여 PCR 반응을 수행한 결과, TPCry-5'/3' 및 CrLB-5'/3'는 CryIAc1과 후대교배종 계통들에 대해서, ActCK-5'/3' 및 CKRB-5'/3'는 LS28과 후대교배종 계통들에 대하여 특이적인 PCR 증폭 산물을 나타내었다(Fig. 4). 또한, *OsCKI* 유전자에 대한 LSCK-5'/3' primer 쌍은 LS28 GM 벼에 대해서 134 bp의 PCR 증폭 산물을 형성하여 LS28 GM 벼로부터 기인함을 확인하였다.

GM 작물이 상업화되어 전세계적으로 재배되고 있고, 최근에는 2-3개의 복합적인 형질을 갖도록 유용유전자를 집적하여 농업적 형질을 증가시킨 후대교배종(stack traits) GM 작물이 개발되어 재배관리 측면에서 다양한 이익을 제공하고 있어, 그의

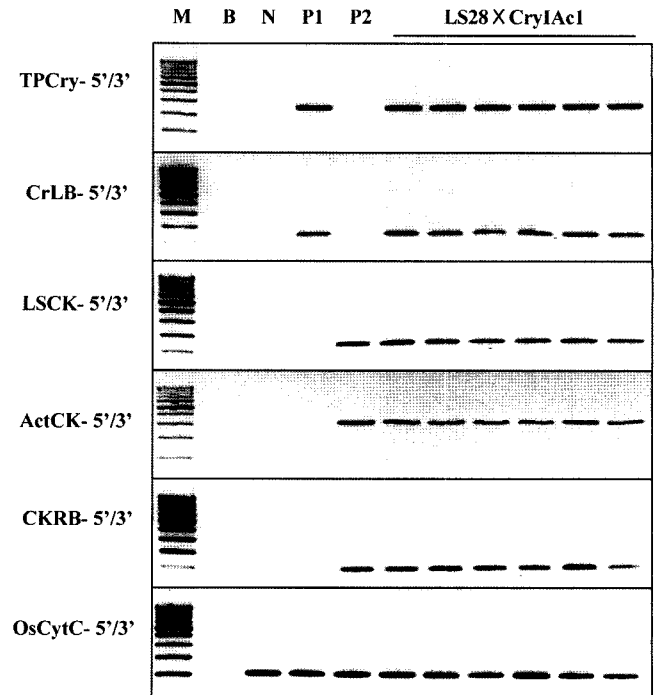


Fig. 4. Specificity test of the primer pairs designed for the qualitative PCR of LS28×CryIAc1 GM rice. Lane M, 100 bp DNA ladder; lane B, non-sample blank; lane N, nagdongbyeo negative control; lane P1, CryIAc1 GM rice; lane P2, LS28 GM rice; lane LS28×CryIAc1, stack trait lines.

재배가 크게 증가하고 있다[James, 2007]. 한편, 복합형질을 갖는 후대교배종 GM 작물은 단일형질의 경우보다 복합적 형질에 대한 정확한 검출 및 파생계통의 모본을 파악하기에 어려운 문제점이 있다[Akiyama 등, 2005]. GM 작물의 환경방출 및 유통관리에 있어서 안전성 확보와 사후모니터링을 위해서는 교배계통뿐만 아니라 모본에 대해서도 확인이 가능해야 한다. 기존의 screening, 유전자 특이(gene-specific), 구조특이(construct-specific) primer 등을 이용한 PCR 분석법의 경우 도입유전자에 대해서는 검출이 가능하지만[Matsuoka 등, 2002; Marmiroli 등, 2008], 교배에 이용된 모본과 동일 유전자로 형질전환된 계통들로부터 후대교배종을 정확히 구분하기가 불가능하다. 최근 GMO 검정에 이용되고 있는 PCR 분석방법으로 식물체놈내의 도입유전자 삽입부위의 인접서열과 운반체내의 염기서열을 바탕으로 작성한 계통특이(event-specific) primer가 유용하게 이용되고 있는데[Taverniers 등, 2005; Pan 등, 2006], 특이 primer의 제작을 위해서는 먼저 특정 계통의 도입유전자가 삽입된 부위의 염기서열 분석이 선행되어야 한다. 각 계통은 형질전환시 도입유전자가 식물체놈내의 각기 다른 부위로 삽입되어 서로 상이한 인접 염기서열을 갖기 때문에 특정 염기서열에 기인한 검출 마커는 해당 계통을 쉽게 구분할 수 있게 되었고, 후대교배종에 대한 모본 파악이 용이하게 되었다[Lim 등, 2007]. 따라서 본 실험에서는 후대교배종의 검정방법 검토와 LS28×CryIAc1 GM 벼의 검정법 마련을 위해서 각 형질의 모본 계통의 인접서열을 바탕으로 제작된 계통특이 primer 쌍(CrLB-5'/3'; CKRB-5'/3')을 이용하여 정성 PCR 분석을 수행하였고, 후대 교

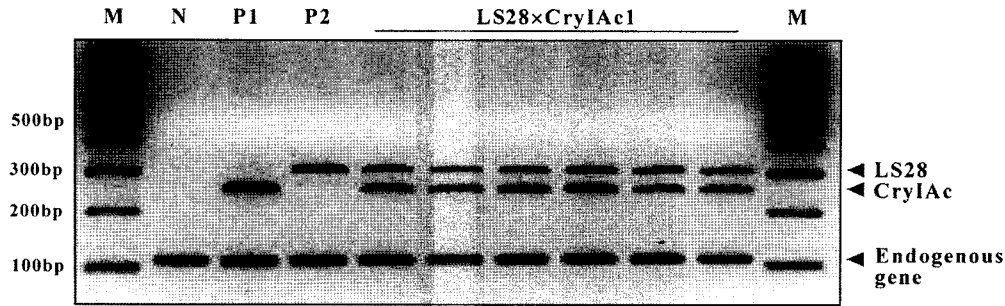


Fig. 5. Multiplex PCR products amplified from *stack* gene GM rice. Lane M, 100 bp DNA ladder; lane N, nagdongbyeo negative control; lane P1, CryIAc1 GM rice; lane P2, LS28 GM rice; lane LS28×CryIAc1, *stack* trait lines.

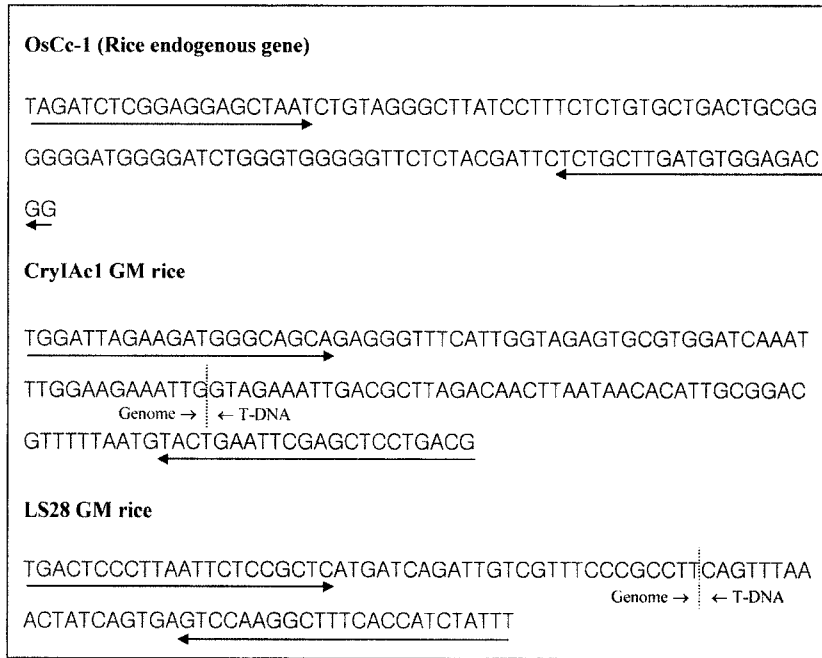


Fig. 6. Sequencing results of the event-specific PCR Products. *OsCc-1* (rice endogenous gene); LB-flanking region of CryIAc1 rice; RB-flanking region of LS28 rice.

배계통들에 대하여 특이적으로 검출 분석이 가능한 것으로 나타나, 향후 실용화 되었을 때 이들 계통의 검정을 위한 특이 마커로 적용할 수 있음을 시사하였다.

**LS28×CryIAc1 GM 벼에 대한 multiplex PCR.** 국내에서 개발된 후대교배종(LS28×CryIAc1) GM벼는 각각의 단일형질로부터 유래한 두개의 T-DNA, LS28과 CryIAc1 부위를 포함하고 있으므로, 본 실험에서는 정성 PCR 반응에서 도입유전자의 특이적 검출이 확인된 구조특이 primer 쌍(TPCry-5/3'; ActCK-5/3')과 벼에 특이적인 primer 쌍(OsCytC-5/3')을 이용하여 복합적 형질을 효율적으로 파악할 수 있는 multiplex PCR 반응을 실시하였다(Fig. 5). 각각의 primer 쌍들을 하나의 혼합액으로 하여 PCR 반응을 수행하였고, 그 결과 각 primer 쌍으로부터 예상된 크기인 306, 258 및 111 bp에 정확한 PCR 증폭 산물이 형성되어 두 도입유전자를 동시에 검출할 수 있음을 확인하였다. GMO 검정에 있어서 질적인 PCR 반응을 수행하여 하나 이상의 GMO를 동시에 감지할 수 있다는 것은 신속하고 효과적인 방법이라 생각된다. Peano 등[2005]은 RRS 콩을 포함해서 MON810, Bt176, Bt11 및 GA21을 대상으로 *Lectin*과

*Zein*을 대조 내재유전자로 사용하여 한 혼합액에서 동시에 최대 7개까지 목표유전자를 증폭시킬 수 있는 multiplex PCR 결과를 얻었고, 이들 방법이 손상된 DNA의 경우에서도 양질의 PCR 증폭이 가능한 결과를 얻었다고 하였다. 또한 최근에는 *adh1* 내재유전자를 포함해서 MON810, Bt11, NK603 및 GA21 GM 옥수수에 대하여 PCR 증폭 산물에 HEX, FAM 및 TET 등의 각기 다른 형광물질이 표지될 수 있도록 특이 primer를 제작하고 capillary gel electrophoresis(CGE)을 통해서 PCR 산물의 크기 및 형광색에 따라 분석할 수 있는 PCR-CGE 방법이 수행되어, 크기가 매우 유사한 PCR 증폭 산물도 형광색에 따라 정확한 구분이 가능한 multiplex PCR 검출법도 보고되었다[Nada 등, 2006]. 이와 같이 multiplex PCR 접근법은 상이한 여러 유전자를 동시에 검출할 수 있는 신속하고 유용한 방법이라 할 수 있다. 반면 이들 분석법으로 후대교배종 GM 작물을 정확하게 판별하기는 어려우나, 효과적으로 다중 유전자의 파악이 가능하기 때문에 후대교배종 작물의 신속한 확인을 위한 검정방법으로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다. LS28×CryIAc1 계통에 대해서도 각기 다른 두개의 형질에

대하여 특이적 primer 쌍을 작성하여 multiplex PCR 반응을 수행하였고, 복합형질을 갖은 LS28×CryIAc1 GM 벼의 각각의 유전자를 동시에 효과적으로 검출할 수 있었다. 또한 oligomer의 혼재에 의해 발생할 수 있는 PCR dimer 밴드도 형성하지 않는 것으로 나타났다.

본 실험의 PCR 반응을 통해서 확인된 각 특이 primer에 의한 PCR 증폭 산물이 목표유전자와 일치하는지 확인하기 위하여 PCR 산물에 대하여 DNA 염기서열 분석을 수행하고, NCBI blast를 통해서 동일성 확인을 실시하였다(Fig. 6). 벼에 특이적인 primer(CsCytC-5'/3')로부터 111 bp의 PCR 산물, CryIAc1 벼의 인접서열을 바탕으로 한 CrLB-5'/3'로부터 141 bp 및 LS28 벼의 인접서열을 바탕으로 한 CKRB-5'/3'로부터 91 bp의 PCR 산물의 염기서열 분석결과 본래의 GM 벼의 유전자들과 동일성을 갖는 것으로 분석되었다.

오늘날 농업생명공학 기술의 발달로 미국, 캐나다 등의 선진국을 중심으로 GM 농작물의 개발이 활발히 이루어지고 있고, 최근에는 브라질, 아르헨티나의 남미 국가뿐만 아니라 중국, 인도, 필리핀 등 전 세계적으로 그 재배가 급속히 증가하고 있다 [James, 2007; Marmiroli 등, 2008]. 우리나라도 이 분야의 연구와 기술개발의 노력으로 선진국과 격차가 그다지 크지 않은 것으로 파악되고 있어, 머지않아 국내개발된 몇몇 GM 작물들은 실용화될 것으로 전망하고 있다 [Kim 등, 2005; 2006]. 또한 각기 다른 형질을 집적하여 새로운 복합형질을 갖는 후대교배종이 상업화 GM 옥수수 등을 주축으로 개발되어, 높은 생산성의 효과로 농민들의 욕구에 부합되고 있어 최근 그 재배가 성장추세에 있다 [Akiyama 등, 2005; Jmaes, 2007; Akiyama 등, 2008]. 국내에서도 농업적 형질을 높일 수 있도록 스트레스저항성 및 해충저항성 형질을 갖는 GM 벼의 교배를 통해서 복합저항성 GM 벼(LS28×CryIAc1)를 개발하였다. GM 작물의 상업화를 위해서는 이에 앞서 환경위해성 평가 및 안전성 평가를 진행하여야 하고, GM 농산물의 이력추적, 비의도적 환경방출에 따른 모니터링, 농산물 및 가공식품에 대한 혼입 판별 등 안전성 확보 차원에서 도입유전자에 대한 검정방법의 정립이 법으로 고시되어 요구되고 있다. 본 연구는 현재까지 국내에서 후대교배종 GM 작물의 PCR 검정 분석법이 보고된 바 없기 때문에 이의 검정방법 검토와 국내개발된 LS28×CryIAc1 GM 벼의 실용화를 위한 검정법 마련을 위하여 도입 T-DNA에 대한 구조특이 primer 및 T-DNA가 삽입된 식물체내의 인접서열과 운반체의 염기서열을 바탕으로 event 계통에 대해서 특이적으로 검정이 가능한 계통특이 primer를 제작하여 PCR 반응을 실시하고, LS28×CryIAc1 GM 벼를 검출할 수 있는 정성 PCR 검정방법을 마련하였다. 계통특이 마커의 이용은 도입유전자의 계통내의 삽입된 부분의 인접서열을 먼저 분석하고, 확인된 염기서열을 바탕으로 특이 primer를 작성하기 때문에 같은 유전자로 형질전환된 계통들과 혼재해 있어도 해당 event 계통에 대해서 선택적으로 검출할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 따라서 LS28×CryIAc1 GM 벼 계통에 대하여 특이적인 염기서열을 바탕으로 작성된 특이 마커의 이용은 이들 후대교배종 벼가 실용화 되었을 때 GMO의 구분 및 안전한 유통관리를 위한 검정방법으로 활용 가능할 것으로 기대한다.

## 초 록

후대교배종 GM 벼의 정성 PCR 검정방법을 개발하기 위하여, 벼의 내재유전자로써 *OsCc-1*(rice cytochrome c gene)을 선 발하여 *OsCytC-5'/3'*의 primer 쌍을 제작하고, 벼를 포함한 서로 다른 8개 작물에 대하여 PCR을 수행한 결과 벼에 특이적으로 증폭되는 111 bp의 반응 산물을 확인하였다. 국내 개발된 LS28×CryIAc1 GM 벼의 검정 분석으로 정성 PCR 반응을 수행하였다. 정성 PCR을 위하여 GM 벼에 도입된 T-DNA 및 계통상의 도입유전자 삽입부위의 인접서열을 바탕으로 구조 및 계통 특이적인 검정 primer 쌍을 제작하였다. ActCK-5'/3' primer 쌍을 이용하여 LS28의 T-DNA 내의 actin 프로모터와 *OsCK1* 유전자 사이를 증폭시켜 306 bp의 PCR 반응 산물을 얻을 수 있었으며, 또한 계통특이 primer 쌍인 CryIAc1 GM 벼 유래의 CrLB-5'/3' 및 LS28 GM 벼 유래의 CKRB-5'/3'를 이용한 PCR 반응으로 각각 142 bp와 91 bp의 도입유전자의 인접서열 부위의 특이적인 증폭 산물을 확인할 수 있었다. 계통 특이적 검정을 위한 이들 개발 primer 쌍들은 event 계통과 대조적으로 non-GM 벼와 다양한 작물에 대하여 어떠한 특이적인 PCR 증폭 산물을 형성하지 않았다. 따라서 본 연구에서 계통 특이 primer를 이용하여 후대교배종 GM 벼 계통, LS28×CryIAc1을 특이적으로 검출할 수 있음을 확인하였고, 제시된 방법이 GM 벼의 실용화를 위한 위해성평가의 검정방법 자료로 제공될 수 있음을 확인하였다.

**Key words:** 계통특이 primer, 유전자변형 벼, 후대교배종, 정성 PCR

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업 기획과제(20080401034032)와 21세기프론티어연구개발사업 중 작물유전체기능연구사업(CG2211)에 의해 지원되었습니다.

## 참고문헌

- Akiyama H, Sakata K, Kondo K, Tanaka A, Liu MS, Oguchi T, Furui S, Kitta K, Hino A, and Teshima R (2008) Individual detection of genetically modified maize varieties in non-identity-preserved maize samples. *J Agric Food Chem* **56**, 1977-1983.
- Akiyama H, Watanabe T, Wakabayashi K, Nakade S, Yasui S, Sakata K, Chiba R, Spiegelhalter F, Hino A, and Maitani T (2005) Qualitative detection system for maize sample containing combined-trait genetically modified maize. *Anal Chem* **77**, 7421-7428.
- 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.
- KBCH (2008) 2008 Biosafety white paper. pp. 320-450. Ministry of Knowledge Economy Korea Biosafety Clearing House.

- Kemmerer EC, Lei M, and Wu R (1991) Isolation and molecular evolutionary analysis of a cytochrome c gene from *Oryza sativa* (rice). *Mol Biol Evol* **8**, 212-226.
- Kim JH, Ahn JH, Song HS, Kim KH, Kim DH, and 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, and Kim HY (2005) Qualitative PCR detection of GM rices (Milyang 204 and Iksan 483) developed in Korea. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **48**, 335-338.
- Lee SH, Kong SH, Park YH, Min DM, and 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, and 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.
- Marmiroli N, Maestri E, Gulli M, Malcevschi A, Peano C, Bordini R, and De Bellis G (2008) Methods for detection of GMOs in food and feed. *Anal Bioanal Chem* **392**, 369-384.
- Matsuoka T, Kuribara H, Takubo K, Akiyama H, Miura H, Goda Y, Kusakabe Y, Isshiki K, Toyoda M, and Hino A (2002) Detection of recombinant DNA segments introduced to genetically modified maize (*Zea mays*). *J Agric Food Chem* **50**, 2100-2109.
- Min DM, Kim MY, Jung SI, Heo MS, Kim JK, and Kim HY (2004) Quantitative analysis of genetically modified soybean in processed foods using real-time PCR. *Korean J Food Sci Technol* **36**, 723-727.
- Nada A, Coll A, La Paz JL, Esteve T, and Pla M (2006) A new PCR-CGE (size and color) method for simultaneous detection of genetically modified maize events. *Electrophoresis* **27**, 3879-3888.
- Pan A, Yang L, Xu S, Yin C, Zhang K, Wang Z, and Zhang D (2006) Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of MON863 maize based upon the 3'-transgene integration sequence. *J Cereal Sci* **43**, 250-257.
- Peano C, Bordini R, Gulli M, Mezzelani A, Samson MC, De Bellis G, and Marmiroli N (2005) Multiplex polymerase chain reaction and ligation detection reaction/universal array technology for the traceability of genetically modified organism in foods. *Anal Biochem* **346**, 90-100.
- Rho JK, Lee T, Jung SI, Kim TS, Park YH, and 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, and 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.