

우리나라 미승인 유전자변형 장미의 duplex PCR검출법

김재환 · 박영두 · 김해영*

경희대학교 생명자원과학연구원

Detection Method for Unapproved Genetically Modified Rose Plants in Korea Using Duplex Polymerase Chain Reaction

Jae-Hwan Kim, Young-Doo Park, and Hae-Yeong Kim*

Institute of Life Science & Resources, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Korea

Abstract. A duplex PCR method was developed to detect a transformation vector pSPB130 used in the development of a genetically modified (GM) rose plant. To detect a GM rose plant, the anthocyanin synthase (*ANS*) was used as an endogenous reference gene of rose in PCR detection. The primer pair RHANS-KF/KR producing 107 bp amplicon was used to amplify the *ANS* gene and no amplified product was observed in any of the 9 different plants used as a template. The primer pair GMRH-KF/KR was designed to amplify the junction sequence between 35S promoter and flavonoid 3',5'-hydroxylase (*F3'5'H*) gene in pSPB130. The detection limit of the duplex PCR method is approximately 0.5%. This result indicates that this duplex PCR method could be useful for monitoring unauthorized GM rose in Korea.

Additional key words: flavonoid 3',5'-hydroxylase, pSPB130, primer, transformation vector

서 언

2010년 3월까지 AGBIOS GM database(<http://www.agbios.com>)에 따르면 전 세계적으로 22종의 유전자변형 작물에서 144개의 이벤트가 개발된 것으로 보고되고 있으며, 이들을 승인한 국가들도 25개국에 이른다(James, 2010). 우리나라의 경우 한국바이오안전성정보센터(<http://www.biosafety.or.kr>)에서 보고한 우리나라 유전자변형 작물 위해성 심사 승인 현황을 살펴 보면 2010년 3월 기준으로 콩, 옥수수, 면화, 카놀라, 감자, 사탕무, 알팔파에 대해서 사료용 54건, 식품용 66건이 승인된 것으로 나타났다.

우리나라에서는 식품의약품안전청에서 인체안전성 심사를 진행하고 있으며, 농촌진흥청에서 환경위해성 심사기준을 마련하여 여러 유전자변형 작물을 식품 또는 사료의 용도로 수입을 승인하고 있다(Korea Food & Drug Administration, 2007; Kim 등, 2010). 최근에는 농촌진흥청을 통해 화훼작물로는 처음으로 유전자변형 카네이션 4종에 대해서 심사를 진행하였으나, 제출자료 미비로 심사가 취소된 바 있다. 따

라서 현재 우리나라에서 승인된 유전자변형 화훼작물은 없으며 앞으로 보다 다양한 유전자변형 화훼작물에 대한 심사가 진행될 것으로 생각되며 이에 따른 화훼작물류의 혼입에 대한 관리제도가 필요한 실정이다.

화훼시장에서 가장 많은 판매량을 기록하고 있는 품목은 절화류로서 꽃을 잘라 판매를 목적으로 재배하는 장미, 국화, 백합, 카네이션 등이 있다. 특히, 장미(*Rosa hybrida*)의 경우 2010년 1월에 보고된 농림수산식품부(<http://www.mifaff.go.kr>)의 2009년 농림수산식품통계연보의 2008년 기준으로 우리나라 절화류 전체 재배면적인 2267.5ha의 약 1/4인 578.8ha, 전체 생산액 약 3,548억의 36.6%인 1,300억 정도를 차지하고 있는 가장 중요한 화훼작물이다(Ministry Agr. & For., 2009; Yu 등, 2006).

우리나라에서는 현재까지 유전자변형 화훼작물로서 수입이 승인된 품종이 없으나 꾸준히 화훼류가 수입되고 있는 실정이므로 이에 대한 검역 강화가 필요할 것으로 생각된다. 대표적인 유전자변형 화훼작물로는 오스트레일리아의 플로리진(Florigene)사에서 개발한 유전자변형 카네이션(Moondust,

*Corresponding author: hykim@khu.ac.kr

※ Received 21 April 2010; Accepted 8 May 2010. 본 연구는 2010년도 경희대학교 연구박사 지원사업에 의한 결과임(KHU-20100441).

Moonshadow, Moonlite, Moonvista, Moonqua 등)과 일본의 산토리(Suntory)사에서 개발한 유전자변형 장미가 있다 (Tanaka, 2006; Katsumoto, 2007). 우리나라에서는 김 등 (2010)에 의해 유전자변형 카네이션에 대한 검사법 개발이 보고된 바 있으나 아직까지 유전자변형 장미에 대한 검사법이 마련되어 있지 않아 미승인 유전자변형작물의 관리차원에서 이에 대한 연구가 시급하다.

일본 산토리사에서 최초로 개발된 유전자변형 장미는 플라보노이드 생합성 경로를 변화시킨 것으로써 팬지(*Viola × wittrockiana*)꽃으로부터 델피니딘(delphinidin)이라는 안토시아닌(anthocyanin) 계열의 색소합성에 관여하는 flavonoid 3',5'-hydroxylase(*F3'5'H*) 유전자를 장미에 삽입하여 전통적인 육종법으로 만들 수 없었던 파란 화색을 갖도록 한 것이다(Katsumoto, 2007). 그러나 델피니딘의 생성으로 완전한 파란 화색을 갖는 장미가 만들어 진 것이 아니라 보라색에 가까운 장미가 개발되고 있다. 이것은 세포의 pH, 다른 색소의 존재 등 여러 가지 환경 요인에 따라 순수한 파란색을 만들지 못하고 보라색, 자주색 등의 화색을 나타나는 것이다.

본 연구에서는 이러한 유전자변형 장미를 간단하게 검출할 수 있는 duplex PCR 분석법을 개발하였다. 현재 산토리사에서 유전자변형 장미 개발에 사용하고 있는 형질전환 벡터(pSPB130)에 삽입된 유전정보를 기초로 하여 제작한 한 쌍의 primer와 장미 내재유전자인 anthocyanin synthase (*ANS*) 유전자에 특이적인 한 쌍의 primer를 개발하였다. 이러한 두 쌍의 primer를 이용하여 한 번의 PCR로 간편하고 신속하게 유전자변형 장미를 확인할 수 있도록 하였다. 본 연구에서 개발한 유전자변형 장미 검사법은 수입 절화 장미에 대한 검역, 우리나라에 유통중인 장미 종자에 대한 유전자변형 장미 모니터링 등에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

재료 및 방법

공시재료

유전자변형 장미는 일본 산토리사에서 개발한 것을 사용하였고, 유전자변형이 되지 않은 일반 장미(*Rosa hybrida*), 카네

이션(*Dianthus caryophyllus* L.), 해바라기(*Helianthus annuus*), 국화(*Chrysanthemum morifolium*), 백합(*Lilium longiflorum*), 카라(*Zantedeschia aethiopicum*), 담배(*Nicotiana tabacum*), 호박(*Cucurbita pepo*), 및 치코리(*Cichorium intybus*)는 우리나라 화훼시장 또는 식품유통매장에서 구입하여 실험 재료로 사용하였다. 유전자변형 카네이션 1종은 국립식물검역원으로부터 분양 받았고, 유전자변형 콩 2종(RRS, A2704-12)과 유전자변형 옥수수 8종(MON810, MON863, NK603, GA21, Bt11, T25, TC1507, DAS59122-7)은 미국유지화학회(AOCS, USA)와 Simga-Aldrich(USA)사로부터 구입하여 본 연구에 이용하였다.

DNA 추출

유전자변형 장미를 포함한 실험에 사용된 모든 식물체는 모두 1g씩 시료를 준비하여 막자 사발에 넣고 액체질소를 가하여 분말 형태로 만들어 DNeasy Plant Maxi kit(Qiagen, USA)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 genomic DNA는 UV-visible spectrophotometer(Shimadzu, Japan)를 이용하여 260nm와 280nm에서 정량하여 260/280nm 비율이 1.8 이상인 DNA 만을 사용하였다.

Primer 제작

장미의 내재유전자인 *Rosa hybrida* anthocyanin synthase (*ANS*, GenBank no. AB239791) 유전자의 염기서열을 기초로 하여 특이적인 한 쌍의 primer를 제작하여 107bp의 PCR 산물을 얻을 수 있도록 하였다. 또한 산토리사에서 유전자변형 장미 개발을 위해 제작한 pSPB130 형질전환용 벡터에 삽입된 유전정보를 기초로 하여 특이적인 한 쌍의 primer를 제작하였다(Table 1). 모든 primer는 Primer Designer Program, version 3.0(Scientific and Educational Software)을 이용하여 제작되었다.

PCR 조건

PCR 반응 용액은 한 시료당 25μL로 만들어 사용하였다. 반응 조성은 2.5μL의 10 × PCR buffer(Applied Biosystems,

Table 1. Oligonucleotides used in this study

Primer name	Sequence(5'-3')	Target	Amplicon size (bp)
RHANS-KF	GCGAGTACGCCAAGGAACTG	<i>ANS</i> ^z	107
RHANS-KR	GAGTCCACCGACCTCCTTCT		
GMRH-KF	CCACTATCCTTCGCAAGACC	P-35S/F3'5'H	310
GMRH-KR	GCATGATCGGACCATACTTC		

^zanthocyanin synthase

USA), 2 μ L의 dNTPs(2.5 mM each, Applied Biosystems), 1.5 μ L의 1.5mM MgCl₂(Applied Biosystems), 50ng의 template DNA가 포함되도록 하였고, 반응은 thermocycler PC808 (ASTECH, Japan)을 이용하여 수행하였다. PCR 반응 조건은

첫 cycle에서 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 수행하였고, 다음 cycle로 94 $^{\circ}$ C 30초, 59 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초를 40회 반복 수행한 후 마지막 단계에서 72 $^{\circ}$ C 8분간 수행한 후, 4 $^{\circ}$ C에서 PCR 산물을 보관하였다. PCR 산물은 2% agarose gel 전기영동과 Agilent 2100 bioanalyzer와 DNA 1000 LabChip kit(Agilent Technologies, USA)를 이용하여 분석되었다.

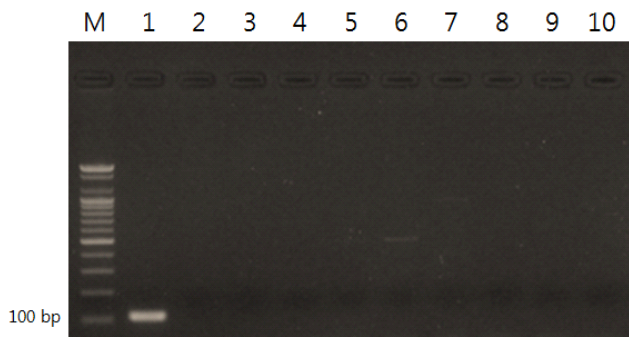


Fig. 1. Specificity analysis of the primer pair RHANS-KF/KR for rose endogenous gene. Lane M: marker (100 bp DNA Ladder); lanes 1-9: rose, carnation, chrysanthemum, lily, kara, sunflower, chicory, tobacco, and squash; lane 10: no template.

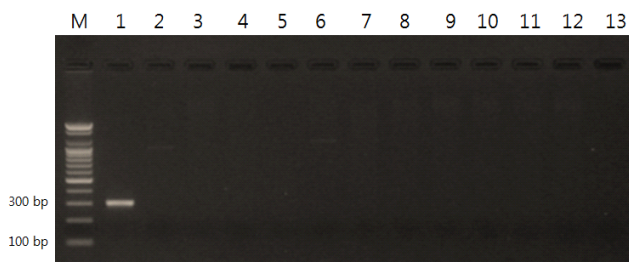


Fig. 2. Specificity analysis of the primer pair GMRH-KF/KR. Lane M: marker (100 bp DNA Ladder); lane 1: GM rose; lane 2: GM carnation; lanes 3-4: GM soybean RRS and A2704-12; lanes 5-12: GM maize MON810, MON863, NK603, GA21, Bt11, T25, TC1507, and DAS59122-7; lane 13: no template.

PCR 산물의 염기서열 분석

각 식물들에서 추출된 genomic DNA를 template로 각각의 primer 쌍을 이용하여 PCR 반응을 수행한 후, 증폭된 PCR 산물은 T-easy vector(Promega, USA)에 cloning 한 후 Automated DNA Sequencer ABI 3700(Applied Biosystems)을 이용하여 양방향 두 번 반복하여 염기서열을 분석하여 결과물로 이용하였다.

결과 및 고찰

Primer 쌍의 제작 및 특이성 확인

장미를 포함하여 카네이션, 국화, 백합, 카라, 해바라기, 치코리, 담배, 호박까지 9종의 다른 식물체로부터 분리된 genomic DNA를 template로 하여 장미의 내재 유전자(*AMS*)의 염기서열을 기초로 제작한 한 쌍의 primer(RHANS-KF/KR)를 이용하여 PCR를 수행한 결과 장미에서만 특이적인 PCR 산물을 얻었다(Fig. 1).

산토리사에서 개발한 유전자변형 장미는 플라보노이드 생합성 경로를 개변한 것으로 이러한 목적을 위해 삽입된 35S promoter와 *Viola × wittrockiana* flavonoid 3', 5'-hydroxylase (*F3'5'H*) 유전자 사이를 증폭시킬 수 있는 한 쌍의 primer

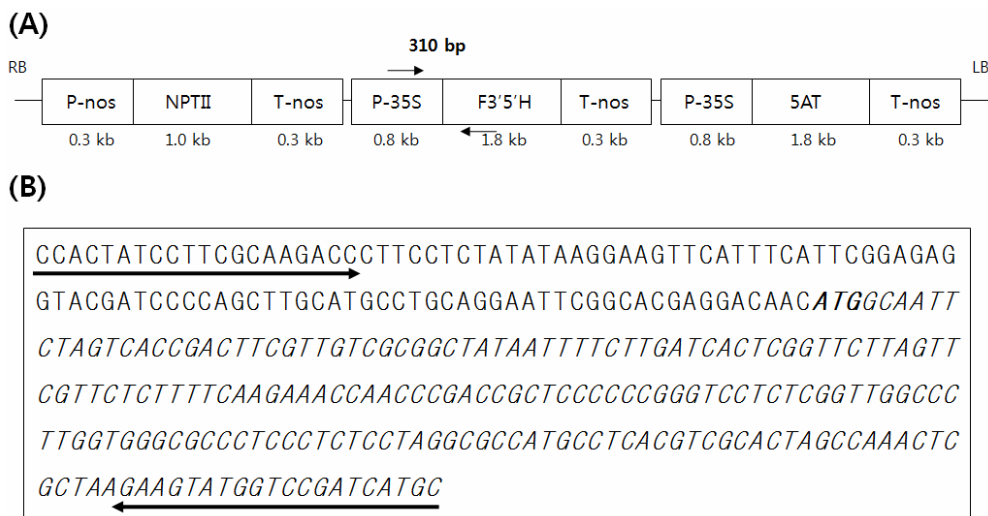


Fig. 3. (A) Schematic diagram of the genetic elements of transformation vector pSPB130 in GM rose plant, (B) The target sequences between P-35S and F3'5'H amplified with GMRH-KF/KR primers. Arrows indicate PCR primers and the italic letters indicate the F3'5'H gene, ATG is the start codon.

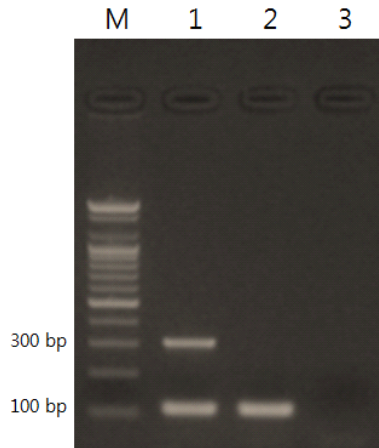


Fig. 4. Duplex PCR results of GM and non-GM rose plants. Lane M: marker (100 bp DNA Ladder); lane 1; GM rose; lane 2: non-GM rose; lane 3: no template.

(GMRH-KF/KR)를 제작하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 GMRH-KF/KR primer 쌍을 이용하여 12종의 유전자변형 작물(장미 1종, 카네이션 1종, 콩 2종, 옥수수 8종)에 대하여 PCR을 실시한 결과 유전자변형 장미에서만 310bp의 PCR 산물을 얻었다. 이러한 PCR 산물의 염기서열 분석을 통해서 35S promoter와 *F3'5'H* 유전자 사이가 정확히 증폭된 것을 확인하였다(Fig. 3).

따라서 본 연구에서 제작한 장미 내재 유전자 확인을 위한 primer쌍(RHANS-KF/KR)과 유전자변형 장미에 특이적인 primer쌍(GMRH-KF/KR)이 유전자변형 장미 분석을 위해 적용될 수 있음을 확인하였다.

유전자변형 장미에 대한 duplex PCR 분석

본 연구에서는 형질전환 벡터 pSPB130을 포함하는 유전

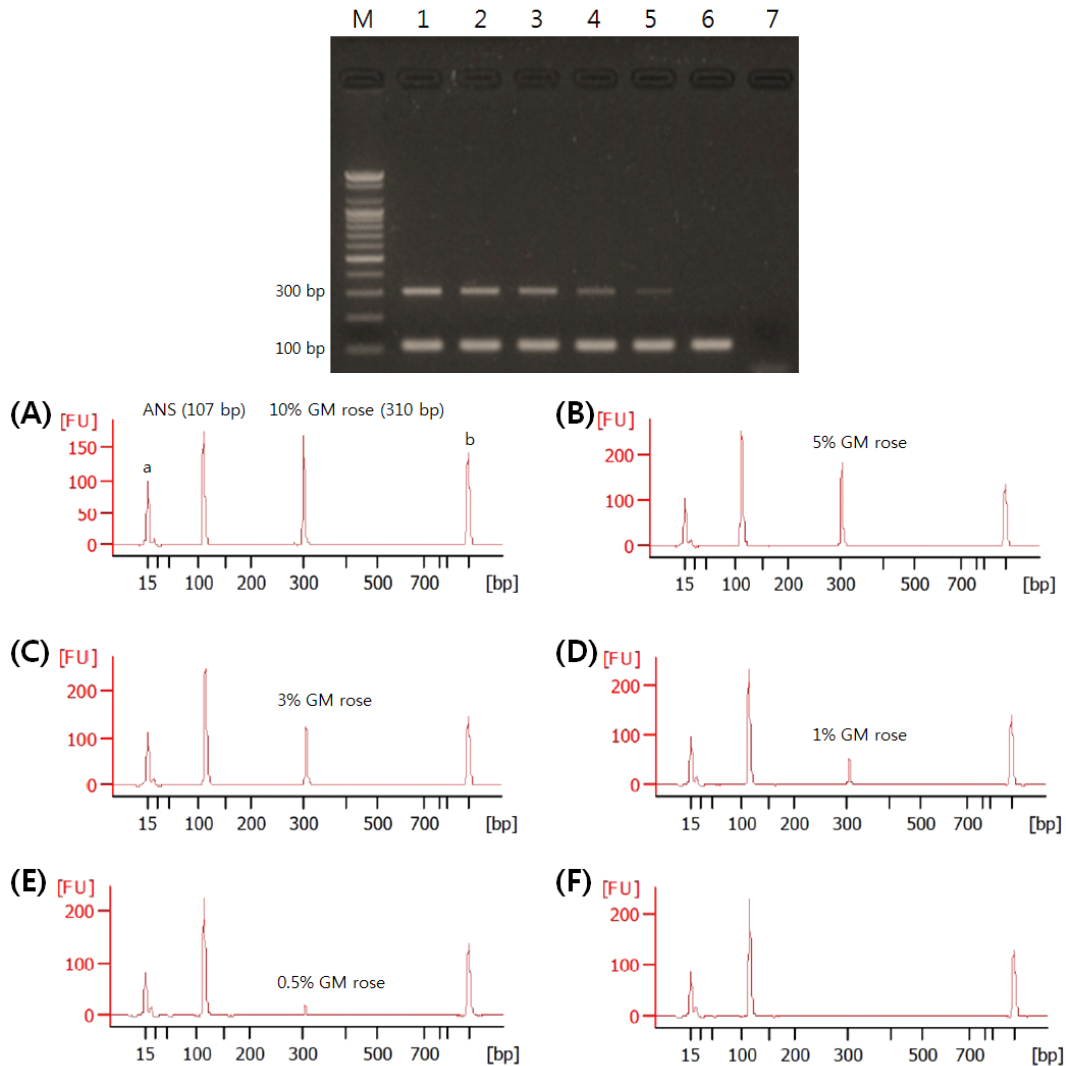


Fig. 5. Sensitivity analysis of the duplex PCR. Lane M: marker (100 bp DNA Ladder); lanes 1-6: 10, 5, 3, 1, 0.5, and 0.1% of GM rose containing pSPB130; lane 7: non-GM rose; (A)-(F): Peaks produced by the two PCR products when analyzed with the Agilent 2100 bioanalyzer and DNA 1000 LabChip kit. The reference materials containing 10, 5, 3, 1, 0.5, and 0.1% of the GM rose were prepared by mixing GM DNA from GM rose with non-GM DNA from the control rose in order to determine the LOD value of the duplex PCR. FU: fluorescence, a and b: alignment marker.

자변형 장미에 특이적인 primer 쌍과 장미의 내재유전자를 확인 할 수 있는 primer쌍을 동시에 이용하여 한 번의 PCR 반응으로 유전자변형 장미를 확인 할 수 있는 duplex PCR 분석법을 개발하였다. Duplex PCR 결과 Fig. 4와 같이 유전자변형 장미에서는 내재유전자와 외래유전자가 모두 증폭되었으며, 일반 장미에서는 내재유전자만이 확인되었다.

현재까지 많은 나라에서 여러 연구자들이 PCR 기법을 이용하여 콩을 비롯한 옥수수, 카놀라, 면화, 호박 등 다양한 유전자변형 작물에 대해 검사법을 보고하였다(Kim 등, 2008, 2009; Li 등, 2009; Oguchi 등, 2009). 지금까지 보고된 PCR 검사법은 각국의 실정에 따라 유전자변형작물의 표시제 기준에 맞춰 비의도적 혼입허용치(유럽연합 0.9%, 일본 5%, 한국 3%)를 확인할 수 있는 범위까지 검출이 가능하도록 개발되었다(European Commission, 2003; Matsuoka, 2001; Ministry of Agr. & For., 2000). 본 연구에서 개발한 유전자변형 장미의 duplex PCR 검사법의 검정한계치를 확인하기 위하여 10, 5, 3, 1, 0.5, 0.1% 유전자변형 장미 표준시료를 준비하여 각각 50ng의 농도로 PCR을 실시한 결과 Fig. 5와 같이 검정한계치가 0.5%인 것으로 확인되었다. 이러한 검정한계치는 정확성을 위해 agarose gel 전기영동과 Agilent 2100 bioanalyzer와 DNA 1000 LabChip kit(USA)을 함께 사용하여 분석되었다.

본 연구에서 개발한 유전자변형 장미의 검사법은 현재 일본에서 개발한 형질전환 벡터 pSPB130을 포함하는 유전자변형 장미 분석에만 적용이 가능하다. 따라서 앞으로 추가적인 유전자변형 장미가 개발될 가능성이 있으며, 이들 유전자에 따라 지속적인 연구 및 검사법 개발이 필요할 것이다.

일본에서 유전자변형 장미가 개발되어 승인됨에 따라 우리나라를 포함한 이러한 장미를 수입할 가능성이 있는 대부분의 나라는 이것을 분석할 수 있는 검사법 및 체계적인 관리방안이 마련되어야 할 것으로 생각한다. 더 나아가 우리나라에서는 식용 또는 사료용으로 사용되는 콩, 옥수수, 카놀라, 면화 등에 대한 검사법이 개발되었을 뿐 장미를 포함한 카네이션, 호박, 토마토 등의 우리나라에서 승인되지 않은 미승인 유전자변형 작물에 대한 검사법 개발이 필요할 것으로 생각된다.

초 록

유전자변형 장미 개발에 이용된 형질전환 벡터 pSPB130을 검출할 수 있는 duplex PCR이 개발되었다. 유전자변형 장미를 검출하기 위해 anthocyanin synthase(ANS)가 장미 내재유전자로 PCR 검사법에 이용하였다. 107bp의 PCR 산물

을 얻을 수 있는 RHANS-KF/KR primer가 ANS 유전자를 증폭시키는데 이용되었고, 이것을 이용하여 9개의 다른 식물에 대해서 PCR한 결과 장미에서만 특이적인 증폭산물이 확인되었다. GMRH-KF/KR primer가 형질전환 벡터 pSPB130에 삽입된 35S promoter와 flavonoid 3',5'-hydroxylase(*F3'5'H*) 사이의 염기서열을 확인할 수 있도록 제작되었다. 본 연구에서 개발된 duplex PCR의 검정한계치는 약 0.5%이며, 이러한 duplex PCR이 우리나라 미승인 유전자변형 장미를 모니터링 하는데 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

추가 주요어 : flavonoid 3',5'-hydroxylase, pSPB130, 프라이머, 형질전환 벡터

인용문헌

- European Commission. 2003. "Commission Regulation (EC) No. 1830/2003 of September 22, 2003, Concerning the traceability and labeling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC" Off. J. Eur. Commun. No. L 268:24-28.
- James, C. 2010. Global status of commercialized transgenic crops. ISAAA Briefs No. 41.
- Kim, H.Y., J.H. Kim, and M.H. Oh. 2010. Regulation and detection methods for genetically modified foods in Korea. Pure Appl. Chem. 82:129-137.
- Kim, J.H., S.A. Kim, Y.J. Seo, W.Y. Lee, S.H. Park, and H.Y. Kim. 2008. Multiplex PCR detection of the MON1445, MON15985, MON88913, and LLcotton25 varieties of GM cotton. Food Sci. Biotechnol. 17:829-832.
- Kim, J.H., S.H. Park, and H.Y. Kim. 2009. Multiplex PCR detection of four events of GM maize (Event 3272, LY038, MIR162, and MON88017). J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem. 52:105-107.
- Kim, J.H., J.E. Lee, S.J. Yoo, Y.D. Park, and H.Y. Kim. 2010. Detection method for genetically modified carnation plants using multiplex polymerase chain reaction. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 28: 275-280.
- Katsumoto, Y., M. Fukuchi-Mizutani, Y. Fukui, F. Brugliera, T.A. Holton, M. Karan, N. Nakamura, K. Yonekura-Sakakibara, J. Togami, A. Pigeaire, G.Q. Tao, N.S. Nehra, C.Y. Lu, B.K. Dyson, S. Tsuda, T. Ashikari, T. Kusumi, J.G. Mason, and Y. Tanaka. 2007. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. Plant Cell Physiol. 48:1589-1600.
- Korea Food & Drug Administration. 2007. Guidelines for the Safety Evaluation Notification 2007-60.
- Li, X., L. Yang, J. Zhang, S. Wang, K. Shen, L. Pan, and D. Zhang. 2009. Simplex and duplex polymerase chain reaction analysis of *Herculex RW* (59122) maize based on one reference molecule including separated fragments of 5' integration site and endogenous gene. J. AOAC Int. 92:1472-1483.
- Matsuoka, T. 2001. GMO labeling and detection methods in Japan.

- In: APEC-JIRCAS Joint Symposium and Workshop on Agricultural Biotechnology. September 6, Amari Watergate Hotel, Bangkok, Thailand. JIRCAS, Japan.
- Ministry of Agr. & For. 2000. Guidelines for labeling of genetically modified agricultural products. Notification No. 31.
- Ministry of Agr. & For. 2009. Flower production in Korea. p. 1-190.
- Oguchi, T., M. Onishi, Y. Minegishi, Y. Kurosawa, M. Kasahara, H. Akiyama, R. Teshima, S. Futo, S. Furui, A. Hino, and K. Kitta. 2009. Development of quantitative duplex real-time PCR method for screening analysis of genetically modified maize. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 50:117-125.
- Tanaka, Y. 2006. Flower colour and cytochromes P450. *Phytochem. Rev.* 5:283-291.
- Tanaka, Y., Y. Katsumoto, F. Brugliera, and J. Mason. 2005. Genetic engineering in floriculture. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 80:1-24.