

상업용 유전자 변형작물 이벤트 선발을 위한 도입유전자 확인, 발현 및 세대간 안정성 평가 : 오이모자이크바이러스 저항성 GM 고추

강승원¹ · 한밝음² · 이태호² · 김은지² · 이궁표^{2*}

¹중앙대학교 생명환경연구원, ²중앙대학교 생명자원공학부 식물시스템과학전공

Identification of Introduced Gene and Its Expression and Gene Stability Assessment for Event Selection of Genetically Modified Plant toward Approval: *Cucumber Mosaic Virus* Resistant Hot Pepper

Seung Won Kang¹, Bal-Kum Han², Tae-Ho Lee², Eun-Ji Kim², and Gung Pyo Lee^{2*}

¹BET Institute, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea

²Department of Integrative Plant Science, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea

Abstract. For the development of genetically modified plants, it is important to verify various factors which potentially affect the risk assessment as well as to establish an experimental program to produce scientific and reliable data. However, it is a time and cost consuming process to develop GM plants as well as to prepare scientific and convincing data for government's approval. Therefore, using the transgenic hot pepper tolerant to a new CMV pathotype, we attempted to suggest few methodological procedures, such as probe saturation for southern blot analysis and RT-PCR and ELISA for expression analysis, for identification and stability evaluation of inserted gene in genetically modified plant which are required for submission for approval. Ten partially overlapped probes covering full length of inserted gene were produced. We could identify that the inserted gene was stacked as a single copy as well as no partial element existed. Also, we could identify the stability of the inserted gene stacked in hot pepper using probe saturation. In the expression analysis with RT-PCR and ELISA, we also could provide the stable expression of transcript and proteins in leaves and placenta and pericarp of fruits of the CMV-resistant hot pepper.

Additional key words: ELISA, hybridization, probe, reverse transcription polymerase chain reaction, southern blotting

서 언

유전자변형작물의 2010년 재배면적은 1억4천8백만헥타르, 1996년에 170만ha에 비해 87배가 증가하여 누적재배면적은 2010을 기준으로 10억ha를 넘어서고 있다(James, 2010). 현재 식품, 사료 및 가공(FFP: Food, Feed, and Processing)용으로 국내에 승인되어 수입되고 있는 유전자변형작물은 72종으로 미국, 일본, 캐나다, 멕시코, 호주에 이어 6번째를 차지하고 있는 상황이다(ISAAA, 2011).

우리나라는 2000년에 바이오 안전성 의정서 서명을 마치고,

2001년 3월에 '유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률(LMO법률)'을 제정 및 공포하였고, 이후 LMO법률의 시행령, 시행규칙의 완료, 통합고시 제정 등의 제도적 기반을 마련하여 2008년부터 시행되었다. 국내에서도 우수한 형질이 도입된 다양한 유전자변형작물이 개발되었지만, 재배를 포함한 상용화 승인까지는 아직 이루어지지 않고 있다. 승인을 위한 심사자료 제출은 바이오안전성 의정서를 바탕으로 과학적인 타당성을 가지면서 투명한 방법에 의해 수행되어야 함을 전제로 하는데(SCBD, 2000), 세부 내용은 국가별로 조금씩 다르게 규정되고 있다.

*Corresponding author: gplee@cau.ac.kr

※ Received 2 January 2012; Revised 31 January 2012; Accepted 31 January 2012. 본 연구는 2011년 농촌진흥청이 지원한 LMO환경위해성 평가기관 기술보고서 과제의 일부로 수행되었음.

국내에서 유전자변형 생물체의 위해성평가 자료를 제출하기 위한 항목은 크게 1) 일반적 사항, 2) 생물학적 특성, 3) 유전자변형 과정, 4) 변형산물의 평가, 5) 기타 등으로 구분할 수 있다(NAAS, 2005). 일반적 사항으로 개발의 목적, 유용성 및 용도에 관한 정보, 생물학적 특성에는 숙주 및 숙주가 속한 생물종, 외래 DNA 공여 생물체에 관한 정보, 유전자변형 과정에는 운반체, 도입유전자, 유전자변형 식물의 육성 방법, 특성, 및 분자생물학적 검정에 관한 정보, 변형산물의 평가에는 모의적 환경(격리포장) 시험 실적, 유전자변형 식물의 위해성 평가에 관한 정보, 기타에는 해외의 인가 및 이용 상황, 모니터링 시행계획 및 방법, 유전자 변형 식물의 불활성화 방법, 불의의 사고 등에 대한 긴급 시 처리 방법 등에 관한 정보 등의 자료를 제시하여 작성해야 한다. 또한, 개발자들이 환경위해성 평가를 수행하는데 있어 평가의 원활한 수행을 돕기 위하여 국립농업과학원으로부터 유전자 변형 작물의 환경위해성 평가 자료의 생산을 위한 가이드라인이 제시된 바 있다(NAAS, 2005, 2006).

한편, 개발자 입장에서는 유전자변형 식물을 개발한 후 환경위해성 평가를 수행하여 심사자료를 작성하기 위해 많은 시간과 비용이 소요되며, 논문과 대등한 질적 수준의 결과를 필요로 하기 때문에, 자료 생산을 위해 보다 과학적이고, 신뢰도가 높은 방법 및 기술을 모색하는 것이 요구된다(Zhong, 2001). 그러나, 심사 자료의 제시를 위하여 구체적인 사례를 활용한 가이드라인은 아직 없으며, 특히 이벤트의 도입유전자 및 분자생물학적 검정방법에서 요구되는 도입유전자 확인, 발현, 세대간 안정성 평가 부분은 대부분 개발 초기단계의 연구논문으로는 부족할 수 있어, 평가와 관련된 자료를 추가로 생산해야 하는 경우가 발생할 수 있다. 특히, 상업용 이벤트로서의 심사를 받기 위해서는 개발 초기단계에서부터 평가를 염두에 둔 자료생산이 없으면, 평가를 위한 실험결과 도출시 부적합성이 발견될 경우, 전체 개발을 다시 진행할 수도 있게 된다.

따라서, 형질전환 작물을 개발하고 상업화하기 위해서는 가이드 라인에서 제시하는 평가 자료의 생산과 더불어 지속적이고 안정적인 유전자 발현을 나타내는 이벤트를 선발하는 것이 중요하며, 여기에는 개발 초기단계에서부터 전체 평가를 가능할 수 있는 실제 개발사례를 포함하는 가이드라인이 필수적이라 할 수 있다. 이런 점을 고려하여, 본 연구에서는 오이모자이크바이러스(*Cucumber mosaic virus*: CMV) 저항성 유전자변형(genetically modified: GM) 고추(Lee et al., 2009)에 대한 평가분석 연구 사례를 통해 유전자변형작물의 환경위해성 평가를 수행하는데 있어 도입유전자 확인을 위한 평가서 작성을 위해 요구되는 서던 분석(southern

blot analysis)을 위한 탐침 포화(probe saturation), 도입유전자의 발현 해석을 위한 RT-PCR, ELISA 실험에 관한 사례를 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

시험 재료

본 사례연구를 위하여 CMV저항성 GM고추(계통명: H15, T₄ 세대), 형질전환 모본인 P2377 계통, 그리고 H15와 비유전자변형 계통과의 교잡후대인 F₁(DEY × H15)을 이용하였다. 대상 고추 유품들은 (주)농우바이오(여주, 대한민국)에서 공급받아 안성시 보개면 불현리에 위치한 중앙대학교 안성캠퍼스의 LMO 격리포장에 정식하였다. 재식거리는 75cm로 각 20주, 보식주로 6주를 정식하였다. 이중 10개체를 임의 선택하여 PCR검정으로 확인된 개체들을 대상으로 각 4반복으로 DNA, RNA, 단백질을 추출하여 사용하였다.

서던분석을 위한 탐침 포화 및 제조

형질전환에 이용된 플라스미드 벡터와 벡터의 염기서열을 (주)농우바이오에서 제공 받아, 벡터 지도를 제작하고, 유전정보를 바탕으로 선발 마커, 목적 유전자 등의 유전인자 및 도입유전자 서열 전체를 포함하는 탐침용 프라이머를 제작하였다. 탐침 조제는 PCR DIG Probe Synthesis Kit(Roche Applied Science, Germany)을 이용하였으며, 1ng의 형질전환 벡터를 주형으로 하였다(Lee et al., 2009). 제조사의 설명서에 준하여 최종 농도가 200μM dNTP(70μM DIG-11-UDP), 0.2μM의 프라이머, 2.6unit의 enzyme mix(3.5U·μL⁻¹), 1xPCR 버퍼(10 × conc. 1.5mM MgCl₂ 포함)가 되도록 혼합한 다음, 최종 반응 부피 50μL가 되도록 PCR급의 H₂O를 첨가하였다. PCR은 95°C에서 2분간 초기변성, 95°C에서 30초, 탐침의 조건에 따라 55-57°C에서 30초, 72°C에서 40초간 30회 증폭을 반복한 후, 72°C에서 7분간 추가로 신장 하였다. 5μL의 증폭산물을 이용하여 1.0% 아가로스 겔에 전기영동하여, 탐침 제작 여부를 확인하였다.

DNA 추출 및 서던 분석

DNA는 포장에 정식한 고추의 3분지 이상의 신엽 1.5g을 채취하여 Lee et al.(2011)의 방법을 변형하여 추출하였다. 시료는 액체질소로 냉각시킨 후 Automill(Tokken Inc., Japan)로 마쇄하여 18mL의 추출 버퍼 첨가 후 65°C에서 30분간 처리하였다. 동량의 CI(chloroform:isoamylalcohol = 24:1, v/v)로 분리 후 원심분리하여 상등액을 다시 동량의 PCI(phenol: chloroform:isoamylalcohol = 25:24:1, v/v/v)

처리 후 한번 더 CI 처리를 하였다. 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20°C에서 침전을 촉진시키고 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 회수한 침전물은 70% 에탄올로 세척한 다음 건조시켜 1.2mL의 1 × Tris-EDTA(TE) 버퍼 첨가 후 RNase를 처리하였다. RNase를 처리한 DNA는 1/10부피의 3M NaOAc와 2.5배의 99% 에탄올을 첨가하여 재침전시킨 후 원심분리 하여 침전물을 회수하였다. 70% 에탄올로 세척한 다음에 건조하여 600μL의 1 × TE 버퍼에 녹인 후 분광광도계(DU 700, Beckman Instruments, USA)로 순도확인 및 정량하였다. Genomic DNA(gDNA) 30μg을 37°C에서 하룻밤 동안 *NdeI* 및 *NdeI/EcoRI*으로 절단한 후 0.8% 아가로스 겔에서 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gDNA를 nylon membrane(Nylon Membrane positively charged, Roche Applied Science, Germany)으로 transfer한 후, 상기 PCR로 조제한 탐침의 혼성화, 세척, 검출 과정은 제조사의 설명서(Roche Applied Science, 2008)에 준하여 실시하였다. 인위적으로 의도한 목적유전자와의 혼성화 여부를 확인하기 위해 $2.7 \times 10^9 \text{bp} \cdot \text{C}^{-1}$ 의 고추 haploid 게놈 크기를 기준으로 정량한 0.03ng의 형질전환 벡터를 혼합하였다(Yoo et al., 2003). GM 고추에 도입된 유전자의 세대간 유전적 안정성 확인을 위하여 H15, F1, P2377의 gDNA를 *NdeI*으로 절단하여 서던 분석을 실시하였다. 추가적인 양성 대조구로 형질전환용 플라스미드 0.3ng을 *EcoRI*으로 절단하였다. 10개의 탐침 중 CMVP0-CP와 NPTII 프로모터 부위를 대상으로 혼성화 하였고, 아가로스 겔을 이용한 분리 및 서던 분석은 상기와 동일한 방법으로 실시하였다.

RT-PCR 및 ELISA를 이용한 도입유전자의 발현 해석

H15, P2377, 및 F1의 부위별로 잎, 과실, 과피, 태좌로 나누고, 과실은 성숙단계 별로 녹과와 적과로 나누어 액체질소로 동결시킨 후 100mg의 시료를 2.0mL 용량의 원심튜브에 넣고, Automill(Tokken Inc., Japan)을 이용하여 마쇄하였다. 마쇄한 시료에 400μL의 RNA 추출 버퍼(Tris-Cl pH 8.0, 10% SDS, 0.5 M EDTA, 0.01% β-mercaptoethanol)를 첨가한 후 섞어 주었다. DNase I을 첨가하여 37°C에서 30분간 배양하고, 400μL의 PCI를 혼합하여 잘 섞은 후 4°C에서 10분간 12,000rpm으로 원심분리하였다. 상등액을 새 튜브에 옮긴 후 상기의 PCI 처리를 2회 반복하였다. 100μL의 상등액을 새 튜브에 옮긴 후 200μL의 99.5% 에탄올과 30μL의 7.5M NH₄OAc를 첨가하여 -20°C에서 20분간 정지한 다음 4°C, 12,000rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후 500μL의 70% 에탄올을 넣고 4°C, 12,000rpm으로 1분간 원심분리하고 상등액을 제거하였다. 진공 원심분리기

를 이용하여 2분간 건조시킨 후 D.W. 50μL와 0.5μL의 RNase inhibitor(NEB, USA)를 넣어 RNA를 녹여주었으며, 사용하기 전까지 -20°C에서 보관하였다. PrimeScript™ RT-PCR kit(TaKaRa, Japan)을 이용하여 1μg의 total RNA를 주형으로 cDNA를 합성한 후 RT-PCR을 실시하였다. cDNA합성 및 RT-PCR 조건은 제품 설명서에 준하였다. 선발마커로 사용한 kanamycin 저항성 유전자 및 외피단백질 유전자의 발현을 확인하기 위해 각 유전자에 대한 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행하였고, 모든 시료의 안정성을 확인하기 위한 양성대조구로 고추의 18S ribosomal RNA(forward primer: 5'-GACTGTGAAACTGCGAATGG-3', reverse primer: 5'-TAAGTTTCAGCCTTGCGACC-3')를 증폭하였다. RT-PCR은 94°C에서 5분간 초기변성, 94°C 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 60초의 증폭반응을 40회 반복하였다. 증폭산물은 1% 아가로스 겔에 전기영동하여 발현을 확인하였다.

도입유전자 내에서 발현하는 목적유전자인 외피단백질과 선발마커로 이용한 kanamycin 저항성 유전자의 단백질(NPTII)을 ELISA 기법을 이용하여 검출하였다. 외피단백질은 CMV serogroup II ELISA: Reagent set(SRA44800/500, Agdia, USA), kanamycin 저항성 단백질은 neomycin phosphotransferase II ELISA: Complete Kit(PSP 73000/0480, Agdia, USA)를 이용하였다. 분석을 위한 시료 준비, 면역반응 및 발색반응 유도는 제품 설명서에 준하여 Triple Antibody Sandwich(TAS) 기법을 이용하였다. 발색반응을 한 시료는 효소면역반응 측정기(Spectramax190, Molecular Device, USA)를 이용하였으며, 외피단백질은 405nm, NPTII 단백질은 450nm에서 흡광도를 측정하였다. NPTII 단백질의 정량은 양성대조구를 기준으로 환산하여 표기하였고, 외피단백질은 펩타이드 다클론 항체를 이용하여 획득한 표준 방정식(단백질(μg·g⁻¹) = 303.03 × O.D. + 32.939, R² = 0.9849)을 통해 정량하였다. RT-PCR 및 ELISA 분석은 3반복으로 3회씩 반복하여 재현성을 확인하였다.

결 과

탐침 포화 및 서던 분석

서던 분석에 사용할 탐침제작을 위하여, 본 이벤트의 형질 전환시 사용한 벡터의 전장 염기서열을 바탕으로 프라이머를 설계하였고(Table 1), 도입유전자 내에 존재하는 kanamycin 저항성 유전자, CaMV35S×2 프로모터, 외피 단백질, CAM35S 프로모터 등과 도입유전자의 intervening 서열을 포함한 전체 염기서열에 대한 integrity확인이 가능한 탐침 10가지를 (Fig. 1) DIG-labeling PCR 방법으로 제작하였다.

Table 1. Primer sequences used to synthesize probes for southern blot analysis.

Probe name ^z		Sequences (5' → 3')	T _m (°C)	Probe size (bp)
NPTII	Fwd	ATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGT	69.0	799
	Rev	TCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGCGCATAGAAG	65.5	
CAMV35S×2	Fwd	ATTGGCTAGAGCAGCTTGCCA	58.6	800
	Rev	AGACTGGTGATTTTCAGCGTGTCTT	59.9	
CMVP0-CP	Fwd	ATGGACAAATCTGAATCAACCAGTGC	61.1	657
	Rev	TCAGACTGGGAGCACTCCAGATGT	60.8	
CAMV35S	Fwd	ATGGAGTCAAAGATTCAAATAGAGG	53.9	524
	Rev	ACTGGTTGATTCAGATTTGTCCA	54.8	
pcFNY1	Fwd	ATTCGACCACCAAGCGAAAC	56.2	734
	Rev	TGGCAGGATATATTGTGGTGTAA	53.6	
pcFNY2	Fwd	AGCAAGTGGATTGATGTGATAAC	52.3	573
	Rev	TAGCCGGATCAAGCGTATGCA	60.0	
pcFNY3	Fwd	ATGTAATGCATGACGTTATTTATGA	52.4	1154
	Rev	AGACTGGTGATTTTCAGCGTGTCTT	59.9	
pcFNY4	Fwd	ACGGGGGACTCTAGAATGGA	54.6	795
	Rev	ACATGCTTAACGTAATTCAACAGA	52.5	
pcFNY5	Fwd	TGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTA	52.4	572
	Rev	ATTCCGTGACTGAATCAGGTAG	58.6	
pcFNY6	Fwd	TAAACGCTCTTTTCTTTAGGTTTA	58.6	883
	Rev	TAGGAGCCACCTTCCTTTCCATA	53.5	

^zPrimer sets for NPTII and CMVP0-CP were also used to analyze for expression by RT-PCR.

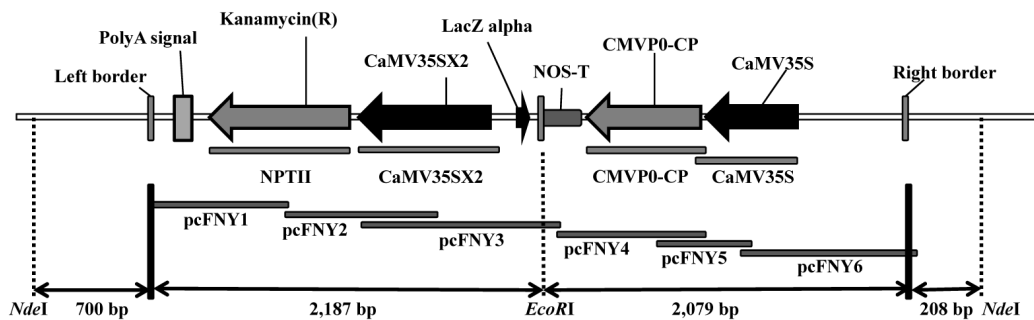


Fig. 1. Schematic diagram of the inserted DNA and probe location for southern blot analysis. The T-DNA map was drawn based on Lee et al. (2009) and Seo et al. (2009). Each probe is marked as a gray-color bar with probe label. Probe size and primer sets for probe amplification are described in Table 1. Location of two restriction enzymes, *EcoRI* and *NdeI*, which were used for southern blot analysis and approximate size are described.

서던 분석을 위한 gDNA의 제한효소 자리는 도입유전자에 인접한 고추 계놈의 염기 서열정보를 바탕으로(Seo et al., 2009), 도입유전자 내부를 절단하지 않는 제한효소인 *NdeI* 과 도입유전자 내부에 하나의 제한효소 절단 구역을 갖는 *EcoRI*과의 조합을 통한 이중절단(*NdeI/EcoRI*)을 선택하였다. 서던분석 결과, *NdeI* 단독 절단의 경우는 예상대로 10개

의 모든 탐침에서 목적하는 크기인 약 5,200bp의 단편으로, 단일신호가 검출되었다(Fig. 2A-J). *NdeI/EcoRI*으로 절단하는 경우는 약 2,887와 2,287bp의 두 단편에 대한 혼성화 결과를 보여주었다. 서던 분석에서 2,887bp 절편에 결합할 것으로 예상한 탐침은 목표 유전자부위 특이적인 NPTII 및 CaMV35S×2와, pcFNY1, pcFNY2, pcFNY3이며, 이때 NPTII

와 pcFNY1(Figs. 2A and 2E)는 단일신호가 검출되었고, CaMV35S×2 프로모터에 특이적으로 결합할 수 있는 탐침들인 CaMV35S×2, pcFNY2, pcFNY3(Figs. 2B, 2F, and 2G)는 예상된 위치에서 두 단편 모두에서 결합한 결과가 나타났다. 한편, 서던 분석으로 2,287bp의 절편에 결합할 것으로 예상된 탐침들은 CMVP0-CP와 CaMV35S, pcFNY4, pcFNY5, pcFNY6이며, CMVP0-CP, pcFNY4와 pcFNY6(Figs. 2C, 2H, and 2J)는 단일신호가 검출되었고, CaMV35S와 pcFNY5(Figs. 2C and 2I)는 각 단편에 해당하는 두 개의 신호가 검출되어 gDNA의 각 단편에 존재하는 CaMV35S 프로모터와의 상동성으로 인한 결합이 존재함을 시사하였다. 음성 대조군으로 사용한 형질전환체의 모본인 P2377에서는 10개의 모든 탐침에서 신호가 검출되지 않았다. 이는 H15의 도입유전자의 유전요소들이 고추에서 유래하지 않기 때문이다. 유전자 변형 고추의 도입유전자에 대해 포화한 탐침들의 의도된 표적에 대한 혼성 여부를 증명하기 위하여 P2377과 벡터의 각 DNA를 *EcoRI*로 절단한 후 1:1의 계능비율로 혼합하여 양성 대조군으로 사용하였다(Fig. 2). 도입유전자를 포함하는 벡터를 *EcoRI*로 절단하여 서던 분석시 검출

되는 예상 크기는 10,606bp로 모든 탐침에서 동일한 위치에서 신호가 검출되었다.

H15에 존재하는 도입유전자의 세대간 안정성을 평가하기 위하여 H15 및 F₁에서 추출한 동량의 gDNA를 이용하여 서던 분석을 실시하였고, 서던 분석은 제시한 분석방법으로 5회 이상 반복적인 결과를 얻었으며, 그 대표결과를 제시하였다(Fig. 3). P2377을 음성대조군으로 사용하였고, 형질전환 벡터를 양성대조군으로 이용하였다. 각 gDNA를 *NdeI*로 절단하였으며, 형질전환 고추에서 도입유전자의 좌우 경계구역 외부에 *NdeI* 절단 부위가 존재하므로 서던 상에서 단일 밴드로 약 5,200bp에서 신호가 검출되도록 하여, H15 및 F₁에서 도입유전자의 밴드를 확증하였다. 혼성화를 통한 밴드 검출을 위해 탐침은 CMVP0-CP와 NPTII(Table 1)를 이용하였다. 양성 대조군인 플라스미드 벡터를 하나의 절단 부위를 가지는 *EcoRI*로 절단한 뒤 탐침이 목적 유전자와의 혼성화에 사용될 수 있음을 확인하였다. 또한, 이형접합체인 F₁에서 검출된 신호가 H15 및 플라스미드 벡터에 비해 상대적으로 낮게 나타났다.

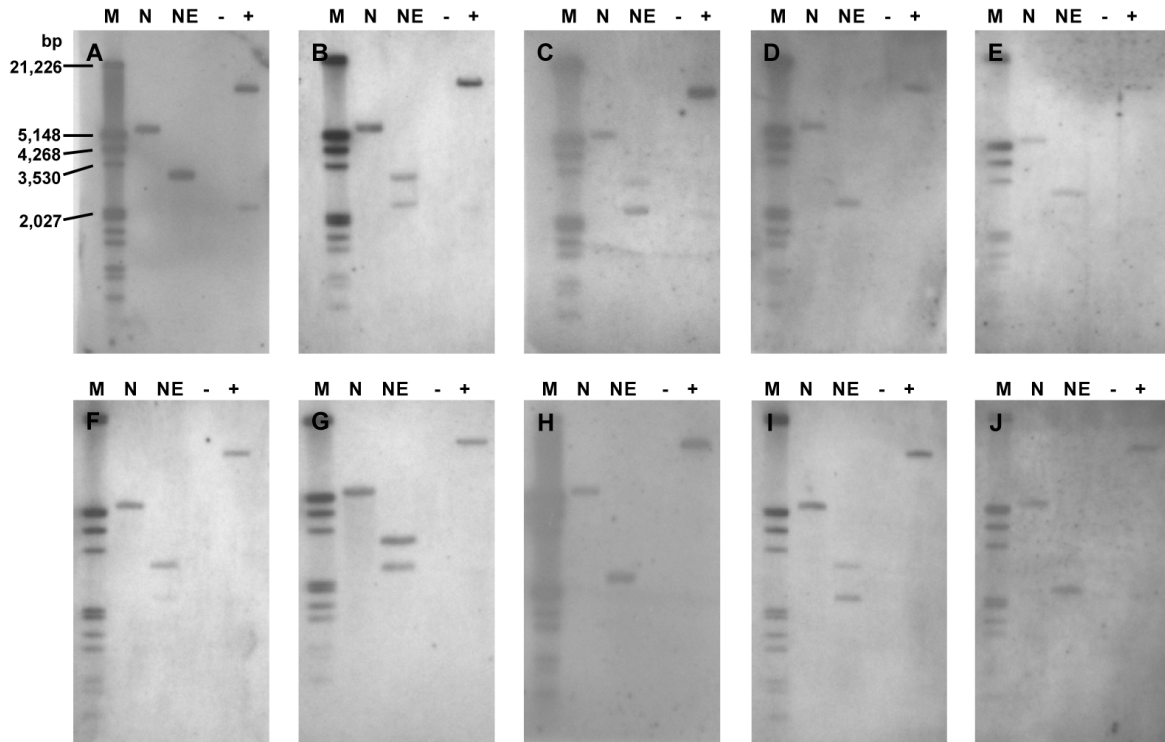


Fig. 2. Southern blot analysis of the inserted DNA in H15 using various probes. Each genomic DNA was extracted and digested with *NdeI* only or *NdeI/EcoRI*. Digested DNA was separated in 0.8% agarose gel, transferred onto positively charged nylon membrane, and hybridized with DIG-labeled probe. M: DNA Molecular Weight Marker III, DIG-labeled marker (Roche, Germany), N: single digestion with *NdeI*, NE: double digestion with *NdeI* and *EcoRI*, -: negative control (P2377), +: P2377 spiked with plasmid vector (1:1 genomic equivalent). A: NPTII probe, B: CAMV35S×2 probe, C: CAMV35S probe, D: CMVP0-CP probe, E: pcFNY1 probe, F: pcFNY2 probe, G: pcFNY3 probe, H: pcFNY4 probe, I: pcFNY5 probe, and J: pcFNY6 probe.

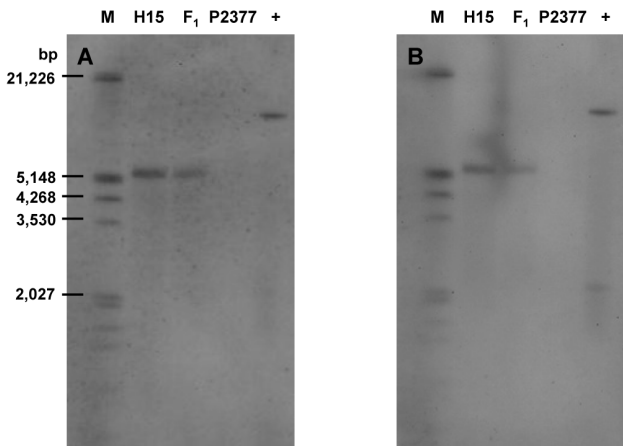


Fig. 3. Representation of southern blot analysis for identification of the inserted gene stability in F_1 hybrid (DEY \times H15 T_4) using CMVP0-CP (A) and NPTII probe (B). Plant gDNAs were digested with *NdeI*, whereas the plasmid vector was digested with *EcoRI* for linearization. Digested DNA was separated in 0.8% agarose gel, transferred onto positively charged nylon membrane, and hybridized with DIG-labeled probe. M: DNA Molecular Weight Marker III, DIG-labeled marker (Roche, Germany), H15: CMV resistant T_4 transgenic line, F_1 : F_1 hybrid between DEY (non-transgenic) and T_4 generation of H15, P2377: non-transgenic line, +: plasmid vector.

H15 및 F_1 교잡종에 존재하는 외피단백질 및 NPTII의 전사산물 및 단백질 검출

H15의 잎과 과실에서 도입유전자의 발현을 검출하기 위하여 RT-PCR 및 ELISA를 이용하였다. 가식부인 과실은 성숙전·후를 비교하기 위하여 녹과와 적과로 구분하였으며, 각 성숙시기의 과실을 태좌와 과피로 나누어 조직에 따른 발현여부와 발현량을 확인하였다. 또한 도입유전자의 세대 간 안정성 확인을 위해 제작된 F_1 교잡종을 이용하여 도입

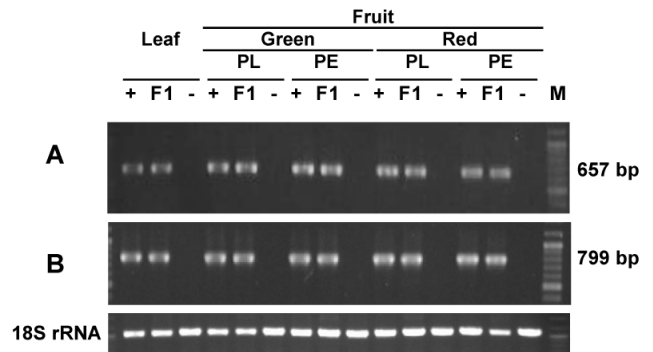


Fig. 4. Detection of CMVP0-CP (A) and Kanamycin (B) transcripts using RT-PCR. 18S ribosomal RNA was used as an endogenous control. PL: Placenta, PE: Pericarp. Fruits were collected at green and red ripening stage and analyzed by dividing the harvested fruits into placenta and pericarp. +: H15 (GM), F_1 : hybrid line between GM and Non-GM, -: non-GM, M: molecular marker.

유전자의 발현을 확인하였다. RT-PCR 결과, 유전자 변형 작물인 H15 및 F_1 교잡종에 대하여 잎과 과실 발달 시기 및 과실의 부위에 따라 CMV 외피 단백질(675bp) 및 kanamycin 저항성 유전자의 전사(799bp)가 안정적으로 이루어지는 것을 확인하였다(Fig. 4). H15 및 F_1 교잡종의 잎, 녹과 및 적과, 각 과실의 과피와 태좌 부위에서 외피 단백질 및 kanamycin 저항성 유전자의 변역산물인 단백질을 검출하기 위해 ELISA 기법을 이용하였다. 외피 단백질은 잎을 포함한 모든 시료에서 단백질이 발현하는 것으로 나타났다(Fig. 5A). H15와 F_1 의 잎에서 발현되는 외피 단백질은 각각 2.63 ± 0.33 과 $1.75 \pm 0.05 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 로 나타났다. 녹과의 태좌에서는 1.20 ± 0.04 와 $1.14 \pm 0.02 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 과피에서는 1.58 ± 0.03 과 1.34

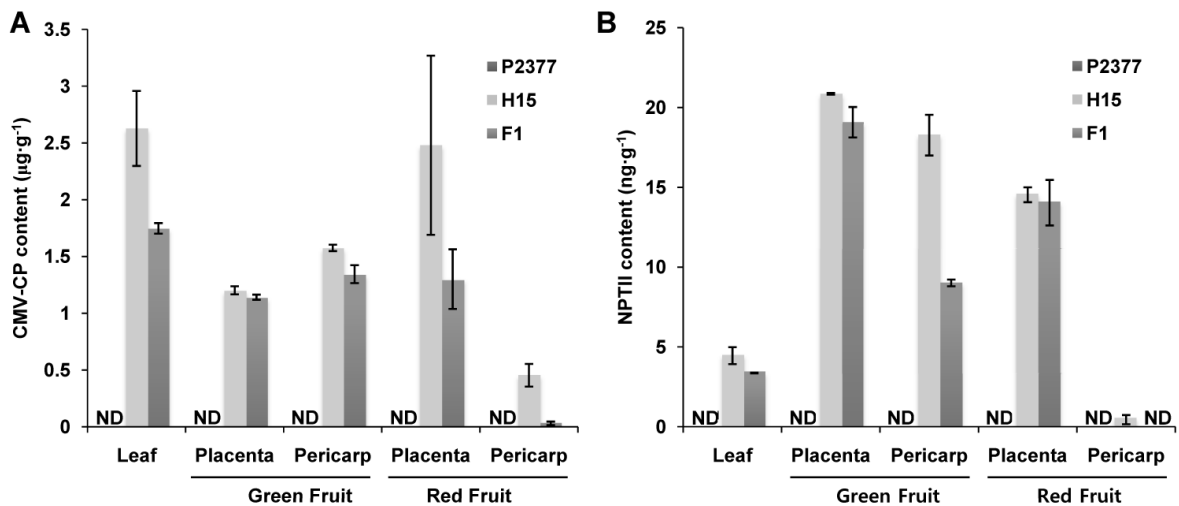


Fig. 5. Detection of CMVP0-CP (A) and NPTII proteins (B) from fruits of GM and F_1 hybrid using ELISA. Fruits were collected at green and red ripening stage and analyzed by dividing the harvested fruits into placenta and pericarp. ND: not detected. Bar on the graph means standard error ($n = 3$).

$\pm 0.08\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 적과의 태좌에서는 2.48 ± 0.79 와 $1.30 \pm 0.26\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 과피에서는 0.45 ± 0.099 와 $0.03 \pm 0.015\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 로 나타났다. Kanamycin 저항성 단백질의 경우 녹과의 과피 부위를 제외한 잎, 녹과의 태좌, 적과의 태좌 부위에서 H15와 F₁ 간에 단백질 양의 차이가 나타나지 않았다(Fig. 5B). H15와 F₁의 잎에서 발현되는 NPTII 단백질은 각 0.892 ± 0.106 과 $0.673 \pm 0.003\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 로 나타났다. 녹과의 태좌에서는 4.171 ± 0.011 과 $3.816 \pm 0.190\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$, 과피에서는 3.654 ± 0.255 와 $1.802 \pm 0.042\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$, 적과의 태좌에서는 2.907 ± 0.094 와 $2.808 \pm 0.285\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 로 나타났다. H15 적과의 과피에서는 $0.089 \pm 0.057\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 이었으나, F₁ 적과의 과피에서는 검출이 되지 않았다.

고 찰

유전자 변형 생물체에 대한 목적유전자의 안정적 도입 여부는 PCR을 통한 확인 또는 서던 분석을 통해 입증된다. NAAS(2005)의 가이드 라인에 따르면 PCR 기법을 이용한 분석시에는 증폭을 위한 프라이머 염기서열과 증폭조건에 대한 서술, 서던 분석시 혼성을 위한 탐침 제조시 사용한 프라이머 염기서열과 제조과정에 대한 서술을 최소요건으로 제시하고 있다. 유전자변형작물에 도입되는 T-DNA의 유전 인자들은 목적유전자, 선발마커(항생제, 제초제 저항성 등), 전사 개시점인 프로모터, 종료를 위한 터미네이터 등이다. 그러나 아그로박테리움의 T-DNA가 삽입되는 과정에서 식물 게놈 상의 서열이 삽입에 영향을 미치는 것으로 알려져 있고(Brunaud et al., 2002; Tzfira et al., 2004), 형질전환 방법에 따라 복제수의 양상이 다르게 나타나는 경우도 있기 때문에(De Buck et al., 2009), 보다 명확한 해석을 위해서는 도입유전자 내의 유전인자를 포함하는 전체 서열을 확인하는 것이 중요하다. 하지만, 여전히 전체 게놈 수준에서 도입 유전자 외에 존재할 수 있는 조각의 유무와 위치를 일일이 확인하는 것은 염기서열분석법의 획기적 발전에도 불구하고 여전히 매우 힘든 과정으로 판단된다.

본 연구에서는 고추에 도입된 외래유전자가 단일사본으로 존재함을 입증하기 위하여 서던 분석시 탐침포화 방법을 이용하였는데, 각 탐침의 크기는 524-1,154bp의 범위로(Table 1)하여, 도입유전자 전체를 중복하여 포괄할 수 있도록 설계하였다(Fig. 1). 또한, 도입유전자에는 제한효소 자리가 없는 NdeI과 두 종류의 CaMV35S 프로모터 부위를 사이에 두고 절단하는 EcoRI를 조합하여 절단하는 방법으로 두 단편으로 서던 분석에서 검출신호가 가시화될 수 있도록 하였다. 이때, CaMV35S 프로모터와 혼성화시 결합하지 않는 탐침

은 단일밴드로 나타났으나(Figs. 2A, 2D, 2E, and 2H), 부분적으로 CaMV35S 및 CaMV35S×2 프로모터와 상동성을 갖는 탐침들은 두 개의 신호가 검출되었다(Figs. 2B, 2C, 2F, 2G, and 2I). 한편, CaMV35S 프로모터영역의 일부와 right border 영역을 혼성화하는 pcFNY6 탐침은 단일 밴드로 검출되었다(Fig. 2J). CaMV35S×2 프로모터는 781bp, CaMV35S 프로모터는 524bp로, 두 프로모터 간의 염기서열이 완전히 일치하지 않으며, CaMV35S 프로모터 염기서열에 기초한 pcFNY6 탐침은 883bp로 3' 영역의 32.5%인 287bp만이 CaMV35S 프로모터와 혼성화가 이루어지는 영역이고, 나머지 596bp는 CaMV35S 프로모터 외부로부터 right border 까지의 intervening 서열에 혼성화가 이루어지기 때문에, 서던 분석시 혼성화가 이루어지는 단계에서 상동성이 상대적으로 낮은 CaMV35S×2 프로모터 영역과 경쟁적으로 혼성화가 이루어졌기 때문인 것으로 생각된다. 또한, 형질전환 과정에서 사용된 벡터의 전체 염기서열을 바탕으로 T-DNA의 도입부위 이외의 벡터 염기서열의 삽입이 없었음을 서던 분석을 통하여 확인하였고, 형질전환 과정에서 목적 유전자의 도입 외에 비의도적인 염기서열 삽입이 없었음을 알 수 있었다(자료 미제시). 종합적으로, H15의 LMO 환경위해성 평가에서 분자생물분야에서 요구하는 도입유전자의 확인사항에서 탐침포화(pcFNY1-6)를 통하여 단일사본으로 존재함과 기타 도입유전자 조각이 존재하지 않음을 충족시킬 수 있었다.

단백질 발현에 대한 분석은 정성적인 방법으로 western blot 분석법을, 정량적인 방법으로는 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 방법을 이용하며, 항체에 대한 정보 제시가 최소한의 요구조건으로 명시되어 있다. 본 연구에서는 개발자가 개발 시 주로 제시하는 도입유전자에 의하여 발현되는 단백질의 western blot 분석을 통한 정성적인 자료(Lee et al., 2009) 이외에, 발현이 예상되는 CMV 외피단백질과 NPTII 단백질이 비유전자변형계통(P₁: DEY)와 유전자변형 계통(P₂: H15) 및 이들의 교잡후대식물체(F₁: DEY × H15)에서 부위별(잎, 과실), 발현 시기별(잎, 녹과, 적과), 그리고 가식 부위인 과실의 조직부위별(태좌, 과피)로 발현량을 정량하여 제시하였다. 전체적으로 이형접합 세대인 F₁에서는 유전자가 도입된 동형접합 부분인 H15보다 상대적으로 단백질 발현량이 동등하거나 낮았으며, 이는 비유전자변형계통(DEY)과의 교잡후대에서 도입유전자의 초우성 혹은 상위작용에 의한 목적단백질의 과다발현은 이루어지지 않았음을 의미한다. 또한 유전자투입효과(gene dosage effect)의 측면에서, 도입유전자가 이형접합상태보다 동형접합상태에서 발현수준이 높다는 기존의 연구(Beaujean et al., 1998; James et

al., 2002; Richards et al., 2003; Tang et al., 2003)와 일치한다. 한편, 적과의 과피에서는 CMV 외피단백질과 NPTII 단백질이 검출이 되지 않거나 소량으로 검출되었다. 고추 과실의 성숙이 진행될수록 캡사이신 등과 같은 주요 대사산물의 변화, 색소 증가와 같은 생리적 변화 등이 야기되고, 광호흡, 산화·환원 등의 대사과정에 관련된 주요 단백질 함량 및 활성 감소 등이 일어나며, 노화에 따른 산화적 스트레스가 발생하여 단백질의 변성 등이 일어나기 때문에 도입유전자에 의해 생성되는 단백질도 과실의 성숙 및 노화에 따른 영향을 받았기 때문인 것으로 생각된다(Mateos, 2003; Nez et al., 2003). 결과적으로, 본 논문에서는 GM 작물의 승인에 요구되는 도입유전자의 부위별, 시기별 단백질 발현량을 제시할 수 있었고, T4 세대 및 후대 교잡세대에서의 발현량 변화를 통하여 녹과까지의 안정적 발현을 확인할 수 있었다. 또한, 상용 단백질의 검정법을 사용할 경우에는 제품에 대한 원리와 제품번호의 표기가 원칙으로 활성 측정을 위해 다른 방법이 사용되었을 경우 재현 실험을 수행할 수 있는 수준의 방법론을 기술하여야 하는 조건을 충족하였다.

형질전환작물의 승인 과정은 전통적인 육종방법에 의해 형질이 개선된 작물에 비할 수 없이 강력한 법적 규제를 받으며, 형질전환기법에 의해 우수한 형질을 획득한 이벤트가 상업적 재배를 위한 승인을 획득해야 하는 구조를 가지고 있다(Jaffe, 2002). LMO 개발부터 위해성 평가, 및 승인까지의 각 과정은 하의상달식 형태로 전 단계에서 획득한 LMO에 대한 평가 결과는 다음 단계의 평가과정에 영향을 미치게 되며, 검증된 결과는 다시 전 단계에 영향을 미칠 수 있다(Brandenberg et al., 2011; Züghart et al., 2008). 따라서 상업화 목적을 갖는 GM 작물 개발자 입장에서는 개발 초기부터 향후 위해성 평가에 영향을 미치게 될 요인들을 미리 파악해야 하며, 신청 이벤트 선별시 평가에서 중요시 되는 항목과 요청받을 수 있는 실험결과 수준에 대한 높은 이해도가 요구된다.

본 연구에서 제시한 CMV 저항성 GM 고추의 도입유전자의 확인 및 발현의 안정성에 관련한 위해성평가 자료 생산의 구체적 사례들은, 향후 다양하게 GM 작물을 개발하고자 하는 개발자 및 상용화를 위한 심사청구자에게 중요한 지침으로 활용될 것을 기대한다.

초 록

형질전환 작물 개발시, 위해성 평가에 영향을 미치게 될 요인들을 파악하고, 이에 대한 과학적 근거의 마련을 위한 실험 자료 생산계획의 확립과 실험을 진행하는 것이 매우

중요하다. 또한 유전자변형작물을 개발한 후 정부의 승인을 위한 과학적이고 신뢰할 만한 자료를 축적하기 위해서는 오랜 기간과 많은 자본이 투입된다. 이에 따라, 본 연구에서는 CMV 저항성 유전자변형 고추에 대한 평가분석 연구를 통해 유전자변형작물의 환경위해성 평가를 수행하는데 있어 도입유전자 확인을 위한 평가서 작성을 위해 요구되는 서던 분석을 위한 탐침 포화, 도입유전자의 발현 해석을 위한 RT-PCR, ELISA 실험에 관한 사례를 제시하고자 하였다. 서던 분석을 위해 삽입 유전자 전체 서열의 확인이 가능한 10개의 부분적으로 겹치는 탐침을 제작하였다. 서던 분석 결과, 고추에 도입된 외래유전자가 단일사본으로 존재하여, 게놈전체에서 도입된 위치 이외에 상동성을 갖는 다른 조각 부위가 없음을 확인하였으며, 도입유전자 전체의 안정성을 확실히 입증할 수 있었다. 그와 더불어, 역전사 중합효소 연쇄반응 및 효소면역법 실험을 통하여, CMV 저항성 고추의 잎, 과실 등과 같은 주요 기관에서의 삽입 유전자에 대한 안정적인 발현을 확인 할 수 있었다.

추가 주요어 : 효소면역법, 혼성화, 탐침자, 역전사 중합효소 연쇄 반응, 서던 분석

인용문헌

- Beaujean, A., R.S. Sangwan, M. Hodges, B.S. Sangwan-Norreel. 1998. Effect of ploidy and homozygosity on transgene expression in primary tobacco transformants and their androgenetic progenies. *Mol. Gen. Genet.* 260:362-371.
- Brandenberg, O., A. Sensi, K. Ghosh, and A. Sonnino. 2011. Biosafety resource handbook: Test and post-release monitoring of genetically modified organisms (GMOs). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Brunaud, V., S. Balzergue, B. Dubreucq, S. Aubourg, F. Samson, S. Chauvin, N. Bechtold, C. Cruaud, R. DeRose, G. Pelletier, L. Lepiniec, M. Caboche, and A. Lecharny. 2002. T-DNA integration into the *Arabidopsis* genome depends on sequences of pre-insertion sites. *EMBO reports* 3:1152-1157.
- De Buck, S., N. Podevin, J. Nolf, A. Jacobs, and A. Depicker. 2009. The T-DNA integration pattern in *Arabidopsis* transformants is highly determined by the transformed target cell. *Plant J.* 60:134-135.
- International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). 2011. GM Approval Database. <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase>.
- Jaffe, G.A. 2002. A consumer perspective on regulating agricultural biotechnology. Center for Science in the Public Interest, Washington DC, USA.
- James, C. 2010. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2010. ISAAA, SEAsia Center, Metro Manila, Philippines.
- James, V.A., C. Avart, B. Worland, J.W. Snape, P. Vain. 2002. The relationship between homozygous and hemizygous transgene

- expression levels over generations in populations of transgenic rice plants. *Theor. Appl. Genet.* 104:553-561.
- Lee, S.N., S.H. Choi, K.B. Ryu, H.H. Kim, and K.H. Ryu. 2011. Molecular and cytogenetic assessment of transgenic hot peppers resistant to *Cucumber Mosaic Virus*. *Hort. Environ. Biotechnol.* 52:211-217.
- Lee, Y.H., M. Jung, S.H. Shin, J.H. Lee, S.H. Choi, N.H. Her, J.H. Lee, K.H. Ryu, K.Y. Paek, and C.H. Harn. 2009. Transgenic peppers that are highly tolerant to a new CMV pathotype. *Plant Cell Rep.* 28:223-232.
- Mateos, R.M., A.M. León, L.M. Sandalio, M. Gómez, L.A. del Río, and J.M. Palma. 2003. Peroxisomes from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.): Purification, characterisation and antioxidant activity. *J. Plant Physiol.* 160:1507-1516.
- National Academy of Agricultural Science (NAAS). 2005. Guideline for environmental risk assessment of genetically modified crops: A general consideration. NAAS, Suwon, Korea.
- National Academy of Agricultural Science (NAAS). 2006. Guideline for environmental risk assessment of genetically modified crops: Herbicide tolerance. NAAS, Suwon, Korea.
- Nez, A.J., F. Romojaro, J.M.G. Mez, M.R. Lanos, and F. Sevilla. 2003. Antioxidant systems and their relationship with the response of pepper fruits to storage at 20°C. *J. Agr. Food Chem.* 51:6293-6299.
- Richards, H.A., M.D. Halfhill, R.J. Millwood, C.N. Stewart. 2003. Quantitative GFP Fluorescence as an indicator of recombinant protein synthesis in transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 22: 117-121.
- Roche Applied Science. 2008. DIG application manual for *filter hybridization*. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany.
- Secretariat of the Convention on Biological Diversity (SCBD). 2000. Cartagena protocol on biosafety to the convention on biological diversity: Text and annexes. The Secretariat of the Convention on Biological Diversity World Trade Centre, Montreal, Quebec, Canada.
- Seo, S.G., J.S. Kim, S.B. Jeon, M.R. Shin, S.W. Kang, G.P. Lee, J.S. Hong, C.H. Harn, K.H. Ryu, T.S. Park, and S.H. Kim. 2009. Characterization, detection and identification of transgenic chili pepper harboring coat protein gene that enhances resistance to cucumber mosaic virus. *J. Plant Biotechnol.* 36:384-391.
- Tang, J., R. Scarth, B. Fristensky. 2003. Effects of genomic position and copy number of Acyl-ACP thioesterase transgenes on the level of the target fatty acids in *Brassica napus* L. *Mol. Breed.* 12:71-81.
- Tzfira, T., J. Li, B. Lacroix, and V. Citovsky. 2004. Agrobacterium T-DNA integration: Molecules and models. *Trends in Genetics* 20:375-383.
- Yoo, E.Y., S. Kim, Y.H. Kim, C.J. Lee, and B.D. Kim. 2003. Construction of a deep coverage BAC library from *Capsicum annuum*, 'CM334'. *Theor. Appl. Genet.* 107:540-543.
- Zhong, G.Y. 2001. Genetic issues and pitfalls in transgenic plant breeding. *Euphytica* 118:137-144.
- Züghart, W., A. Benzler, F. Berhorn, U. Sukopp, and F. Graef. 2008. Determining indicators, methods and sites for monitoring potential adverse effects of genetically modified plants to the environment: the legal and conceptual framework for implementation. *Euphytica* 164:845-852.