

Duplex PCR을 이용한 국내 미승인 유전자변형 감자(EH92-527-1)의 검사법 개발

유명렬 · 김재환 · 예미지¹ · 김해영*

경희대학교 생명자원과학연구원 및 식품생명공학과, ¹농림수산검역검사본부 식물검역부 위험관리과

Development of Detection Method of Unapproved Genetically Modified Potato (EH92-527-1) in Korea using Duplex Polymerase Chain Reaction

Myung-Ryul Yoo, Jae-Hwan Kim, Mi-Chi Yea¹, and Hae-Yeong Kim*

Institute of Life Sciences and Resources and Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University

¹Department of plant Quarantine, Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency

Abstract A duplex polymerase chain reaction (PCR) method was developed to detect unapproved genetically modified (GM) potato (EH92-527-1) in Korea. The *UDP-glucose pyrophosphorylase (UGP)* gene was selected as an endogenous reference gene for potato and used to validate the specificity for 14 different crops. The primer pair EH92-F/R was designed to amplify the junction sequence between the genome and transgenic region introduced in GM potato. Its specificity was also validated using several different GM events. The detection limit of the duplex PCR method is approximately 0.05%. This duplex PCR method could be useful for monitoring cultivation of unauthorized GM potato in Korea.

Keywords: EH92-527-1, genetically modified potato, duplex PCR, *UDP-glucose pyrophosphorylase*

서 론

International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) 보고서에 따르면 2011년까지 전세계적으로 25종의 작물에 대해 총 196개의 genetically modified (GM) event가 한 개 이상의 국가에서 식품 또는 사료의 용도로 승인되었다(1). 우리나라에서는 식품의약품안전처와 농촌진흥청에서 각각 genetically modified organism (GMO)에 대한 인체안전성 및 환경위해성 심사기준을 마련하여 여러 유전자변형 작물들을 식품 및 사료의 용도로 승인하고 있고, 2012년 11월 기준으로 7개 작물 (콩, 옥수수, 면화, 카놀라, 감자, 사탕무, 알팔파)로부터 82개의 event가 식품의 용도로 승인되었고, 84개의 event가 사료의 용도로 승인되어 있다(2).

2011년까지 전세계적으로 개발된 GM 감자는 9종이며 우리나라에서 식품의약품안전처로부터 식품의 용도로 승인된 GM 감자는 4종으로 다음과 같다(2). 모두 몬산토사(주)에서 개발한 것으로 콜로라도 감자벌레(Colorado Potato Beetle, CPB)와 감자 잎말이(Leafroll) 바이러스에 저항성을 갖는 NewLeaf Plus (RBMT21-129, RBMT21-350, RBMT22-82), 콜로라도 감자벌레와 감자 바

이러스 Y (Potato Virus Y, PVY)에 저항성을 갖도록 한 NewLeaf Y (RBMT15-101, SEMT15-02, SEMT15-15), 콜로라도 감자벌레에 저항성을 갖는 SPBT02-05와 RBBT06이 있으나(3), 현재는 상업적 재배가 완전히 중단된 상태이다.

한국농촌경제연구원의 보고에 따르면 한국의 2011년 감자 재배면적은 약 23,900 ha으로, 생산량은 약 65만 6천 톤으로 추정되었다(4). 우리나라에서 생산된 감자는 국내수급이 부족하여 2007년 6만7천톤 수입 이후 지속적으로 증가세를 보였으며, 2010년 수입한 감자의 양은 8만 233톤으로 전체 생산량의 약 13.7%에 달한다. 이에 따라 수입 감자에 대한 GMO 여부에 대한 검역 강화가 필요할 것으로 생각된다.

현재 상업적으로 판매되고 있는 유전자변형 감자는 BASF사에서 각 1996년에 개발된 EH92-527-1과 2007년에 개발된 BPS-A1020-5가 알려져 있다. 이러한 유전자변형 감자는 *Solanum tuberosum*으로부터 유래한 *antisense granule-bound starch synthase (GBSS)* 유전자를 포함한 것으로 gene silencing mechanism을 통해 amylose 합성을 억제하고 전분입자에 amylopectin 함량을 증가시킨 것으로 전분과 그의 부산물 등이 식품산업과 제지산업 등에 활용될 것으로 기대한다(5).

GMO의 검정방법 중에서 가장 대표적인 것은 증합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)으로 많은 연구자들이 다양한 GMO event를 대상으로 이러한 방법을 적용한 결과가 보고되고 있다(6-10). 일반적으로 GMO에 삽입된 T-DNA 영역과 genome의 연결부위(flanking region)를 target으로 하는 event-specific PCR법이 그 특이성 때문에 많이 이용되고 있다(11-13).

Rho 등(14)은 PCR법을 이용하여 3종의 유전자변형감자(NewLeaf, NewLeaf Plus, NewLeaf Y)에 대한 정성, 정량 분석법

*Corresponding author: Hae-Yeong Kim, Institute of Life Sciences and Resources and Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin, Gyeonggi 446-701, Korea
Tel: 82-31-201-2660
Fax: 82-31-204-8116
E-mail: hykim@khu.ac.kr
Received December 3, 2012
accepted January 2, 2013

을 보고한 바 있고, Watanabe 등(15)은 3종의 유전자변형감자 (RBMT 15-101, SEMT 15-02, SEMT 15-15) 분석을 위한 event-specific PCR법을 보고하였다. 특히, 유전자변형감자 EH92-527-1 event의 경우 real-time PCR을 이용한 정량적 검정방법이 보고되어 있다(16,17).

본 연구에서는 유전자변형감자 EH92-527-1 event를 대상으로 event-specific primer를 이용하여 screening 단계에서 활용할 수 있는 정성 PCR 방법을 개발하였다. 개발된 duplex PCR 방법으로 시중에 유통 중인 수입 감자와 이를 포함한 가공식품의 분석에 적용하여 유전자변형감자 EH92-527-1의 혼입 여부를 모니터링 하였다.

재료 및 방법

실험재료

BASF사에서 개발한 유전자변형 감자(EH92-527-1)의 표준시료는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사에서 구입하였다. 대조구로 사용한 유전자변형 콩(RRS, MON89788, A2704-12), 유전자변형 옥수수(TC1507, MON810, MON89034, Event 3272, Bt11, MON863, Bt176), 유전자변형 카놀라(GT73, T45), 유전자변형 면화(MON1445, MON15985)는 American Oil Chemists' Society (AOCS, Urbana, IL, USA)와 Sigma-Aldrich사로부터 구입하였다. 고추, 토마토, 가지, 콩, 옥수수, 카놀라, 면화, 아마, 쌀, 밀, 보리, 녹두, 배추, 무를 비롯하여 국내산 감자 1종, 미국산 감자 1종, 감자스프 1종, 감자칩 1종, 감자를 포함한 레토르트 카레 2종을 국내 대형마트와 재래시장으로부터 구입하여 본 연구에 사용하였다.

DNA 추출

유전자변형 감자를 포함한 모든 시료는 약 1g씩 막자사발을 이용하여 액체질소를 넣고 분말형태로 만들어 cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)법을 이용하여 genomic DNA를 추출하였다(10). 1g의 분말시료에 CTAB용액 10 mL (1.5% CTAB, 5 M NaCl, 100 mM EDTA, 75 mM Tris-HCl (pH 8.0))을 첨가한 후 65°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 반응액 700 µL를 phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) 800 µL와 교반기(vortex mixer)로 잘 섞은 뒤 12,000×g로 실온에서 15분간 원심분리하고, 상층액을 새로운 튜브로 옮겨 chloroform: isoamylalcohol (24:1) 800 µL를 가하여 섞은 후 12,000×g로 실온에서 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 새로운 튜브에 옮겨 500 µL isopropanol을 가하여 혼합 후 12,000×g로 10분간 원심분리하였다. 이후 상층액은 버리고 침전물에 500 µL의 70% ethanol을 가하여 12,000×g에서 1분간 원심분리하고 ethanol 제거 후에 침전물을 건조시켜 50 µL의 멸균수로 녹였다. 모든 시료의 genomic DNA는 UV-visible spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan)을 이용하여 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 260/280 nm의 값이 1.8 이상인 것을 사용하였다.

Table 1. Oligonucleotides used in this study

Primer name	Sequence (5'-3')	Target	Amplicon size (bp)
UGPase-KF3	AGGAGGTGCGAGGTAATGGT	UGP	113
UGPase-KR3	CCTCGGTGATGTGAAGCATA		
EH92-F	GGAGTCATAAGCTCAAACATCCAC	GM potato EH92-527-1	234
EH92-R	CGTTGCGGTTCTGTCAGTTCCA		

*UGP, UDP-glucose pyrophosphorylase.

Primer제작

감자의 내재유전자인 *UDP-glucose pyrophosphorylase (UGP*, GenBank Accession no. U20345) 유전자의 염기서열을 기초로 하여 113 bp의 PCR 산물을 얻을 수 있도록 UGPase-KF3/KR3 primer 쌍을 제작하였고, BASF Plant Science사(18)에서 보고된 유전자변형 감자 EH92-527-1 event의 5'-flanking region의 염기서열을 기초로 하여 event-specific primer (EH92-F/R) 쌍을 제작하였다(Table 1). 모든 primer는 Primer Designer Program, Version 3.0 (Scientific and Educational Software, Cary, NC, USA)를 이용하여 제작하였다.

PCR조건

PCR 반응 용액은 한 시료당 25 µL로 하여 0.5 unit의 Gold Taq polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 2.5 µL의 10× PCR buffer (Applied Biosystems), 2 µL의 dNTPs (2.5 mM, Applied Biosystems), 1.5 µL의 1.5 mM MgCl₂ (Applied Biosystems), 50 ng의 template DNA, 52 nM의 UGPase-KF3/KR3 primers, 800 nM의 EH92-F/R primers가 포함되도록 하였다. PCR 반응은 thermocycler G02 (ASTEC, Fukuoka, Japan)을 이용하여 수행하였다. PCR 반응 조건은 94°C에서 5분간 수행 후, 다음 단계에서 94°C 30초, 62°C 30초, 72°C 30초간 35 cycles를 수행한 후 마지막 단계에서 72°C 5분간 반응시킨 뒤 4°C에서 PCR 산물을 보관하였다. PCR 산물은 2% Agarose gel 상에서 100 V로 전기영동하여 확인하였다.

PCR 산물의 염기서열 분석

각각의 내재유전자와 외재유전자에 특이적인 primer 쌍을 이용하여 얻은 PCR 산물은 Qiaquick PCR purification kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 이용하여 정제한 뒤, pGEM T easy vector system (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 cloning 한 후에 Automated DNA Sequencer ABI 3700 (Applied Biosystems)을 이용하여 양방향 두 번 반복하여 염기서열을 확인하였다. 읽혀진 염기서열은 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 프로그램을 이용하여 기존의 내재, 외재 유전자와 염기서열상 일치 하는지 확인하였다.

결과 및 고찰

Primer 쌍의 제작 및 특이성 확인

감자의 내재 유전자(*UGP*)에 대한 primer (UGPase-KF3/KR3) 쌍의 특이성을 확인하기 위하여 감자, 가지, 고추 등의 가지과 작물과 쌀, 밀, 보리 등 전체 14종의 다른 식물체로부터 추출한 genomic DNA를 template로 하여 PCR을 실시하였다. Figure 1에서 보는 바와 같이 감자에 대해서만 특이적인 증폭산물이 확인되었다. 유전자변형 감자 EH92-527-1을 검출하기 위해 제작된 EH92-F/R primer 쌍의 특이성을 확인하기 위하여 유전자변형 콩,



Fig. 1. Specificity analysis of the primer pair UGPase-KF3/KR3 for potato endogenous gene, *UDP-Glucose Pyrophosphorylase (UGP)*. Lane M: 100 bp DNA Ladder (Bioneer, Korea), lanes 1-15: potato, pepper, tomato, eggplant, soybean, maize, canola, cotton, flax, rice, wheat, barley, mung beans, Chinese cabbage, and radish, Lane 16: no template

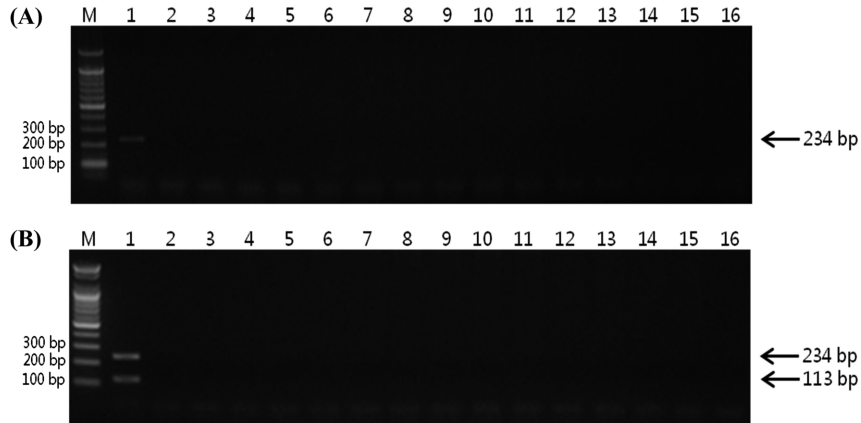


Fig. 2. Specificity analysis of the primer pair EH92-F/R (A) and the duplex PCR (B) for GM potato EH92-527-1. Lane M: 100 bp DNA Ladder, lane 1: EH92-527-1 positive control, lanes 2-4: GM soybean RRS, MON89788, and A2704-12, lanes 5-11: GM maize TC1507, MON810, MON89034, Event 3272, Bt11, MON863, and Bt176, lanes 12-13: GM canola GT73 and T45, lanes 14-15: GM cotton MON1445 and MON15985, lane 16: no template

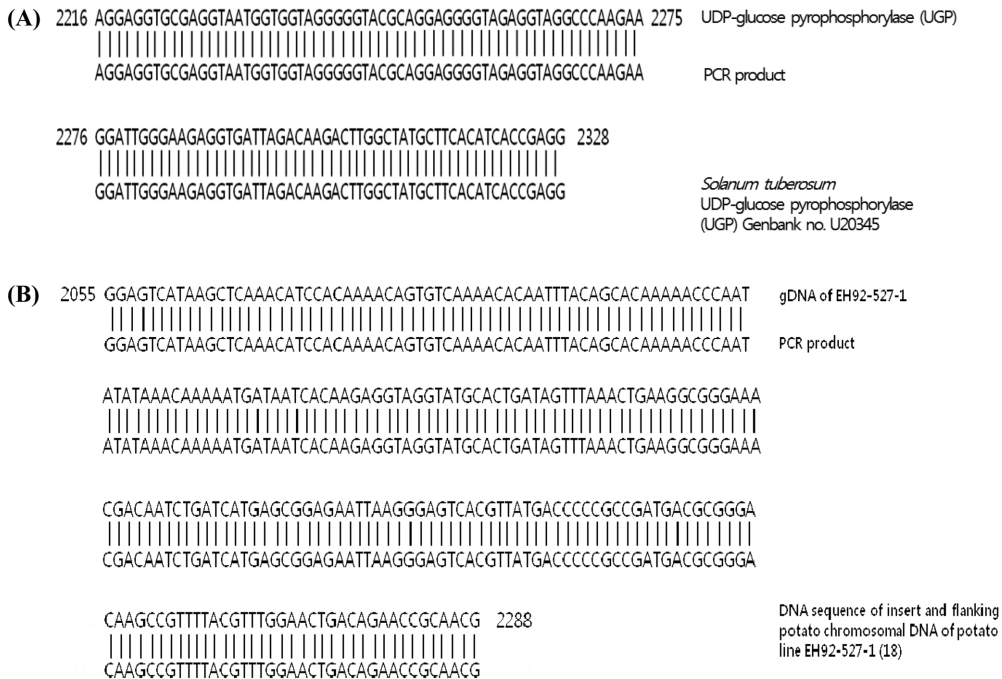


Fig. 3. Alignment of nucleotide sequence of endogenous gene (UGP, U20345) and PCR product generated with UGPase-KF3/KR3 primer pair (A), genomic DNA of EH92-527-1 and PCR product generated with EH92-F/R primer pair (B).

옥수수, 카놀라, 면화로부터 14개의 event를 대상으로 PCR을 실시한 결과 유전자변형 감자 EH92-527-1에 대해서만 PCR산물이 확인되었다(Fig. 2). 얻은 PCR 산물의 염기서열을 분석한 결과 내

재 유전자와 외래 유전자 PCR 산물 모두 target과 100% 일치함을 확인하였으며, 제작된 primer쌍의 특이성을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

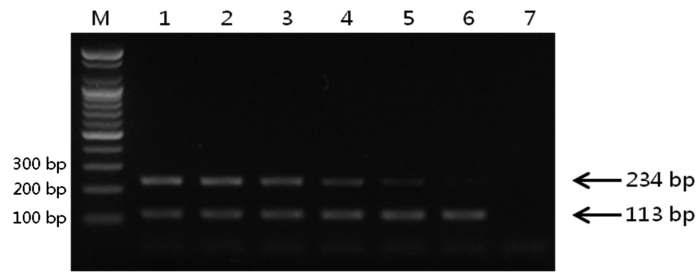


Fig. 4. Sensitivity analysis of the duplex PCR for GM potato. Lane M: 100 bp DNA Ladder, lanes 1-6: 5, 3, 1, 0.5, 0.1, and 0.05% mixture of GM potato EH92-527-1, lane 7: no template

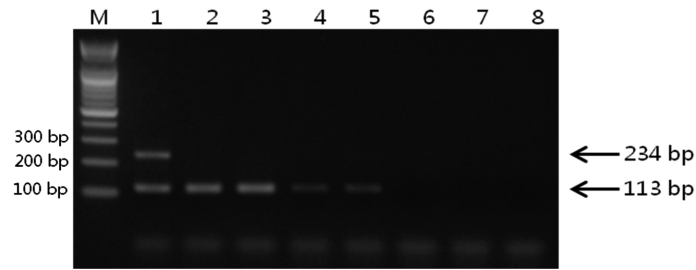


Fig. 5. Detection of GM potato in food samples using duplex PCR. Lane M: 100 bp DNA Ladder, lane 1: positive control, lane 2: fresh potato (Korea), lane 3: fresh potato (USA), lane 4: potato soup, lane 5: potato chip, lanes 6-7: cooked potato from retort curry, lane 8: no template

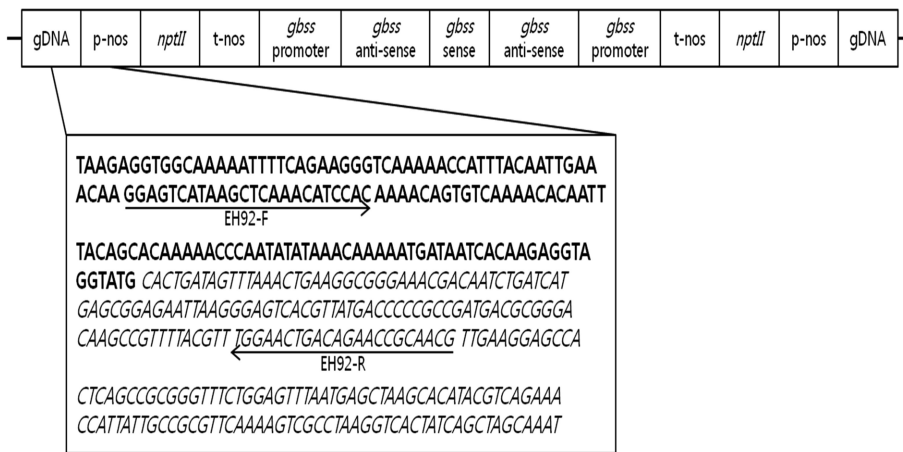


Fig. 6. Schematic diagram of PCR primers designed for GM potato EH92-527-1 event and the junction sequences between genome and transgenic region (T-DNA). Potato genome shown in bold and T-DNA region in italic.

유전자변형 감자 EH92-527-1 검출을 위한 duplex PCR 검사법 및 가공식품의 분석

감자의 내재유전자를 확인하기 위한 primer 쌍과 유전자변형 감자 EH92-527-1에 대한 event-specific primer 쌍을 동시에 이용하여 한 번의 PCR반응으로 유전자변형 감자 EH92-527-1을 구별할 수 있는 duplex PCR 검사법을 개발하였다. 이러한 duplex PCR 검사법을 이용하여 유전자변형 콩, 옥수수, 카놀라, 면화로부터 14개의 event를 대상으로 validation을 실시한 결과 유전자변형 감자 EH92-527-1에 대해서만 특이적인 PCR 산물이 확인되었다(Fig. 4). 또한, 검정한계치를 확인하기 위해서 100% EH92-527-1 event 감자의 DNA와 non-GM 감자의 DNA를 혼합하여 각각 5, 3, 1, 0.5, 0.1, 0.05%(w/w)의 농도를 갖는 표준시료를 준비하였고, 결과적으로 본 연구에서 개발한 유전자변형 감자의 duplex PCR 분석법은 검정한계치가 0.05%인 것으로 확인되었다(Fig. 5). 이와 같이 유전자변형감자 EH92-527-1에 대한 개발된 duplex

PCR 검사법을 이용하여 우리나라에서 구입한 국내산 감자 1종, 미국산 감자 1종, 감자스프 1종, 감자칩 1종, 감자를 포함한 레토르트 카레 2종 등 시료 6종 대한 분석을 실시하였고 모두 음성반응으로 확인되어(Fig. 6) 본 실험결과를 통해 유전자변형감자 EH92-527-1은 국내에 수입되는 감자 및 감자가공품에 포함되지 않은 것으로 판단된다.

유전자변형감자 EH92-527-1은 EU에서 2010년에 승인되어 현재 독일, 스웨덴, 체코 등에서 실제로 재배되고 있으나 우리나라에서는 아직까지 미승인 품목으로써 본 연구에서 개발한 duplex PCR 검사법을 이용하여 미승인 GM 감자 EH92-527-1에 대한 모니터링이 가능할 것으로 판단된다.

요 약

우리나라에서 미승인 품목인 유전자변형 감자 EH92-527-1을

검출하기 위한 duplex PCR 검사법이 개발되었다. 감자의 내재유전자로 *UDP-glucose pyrophosphorylase (UGP)*가 선별되었고, 14개 다른 작물을 이용하여 특이성이 확인되었다. 유전자변형 감자에 삽입된 T-DNA 영역과 감자 게놈 사이의 연결 부위를 증폭하도록 프라이머 EH92-F/R 쌍이 제작되었고, 몇 개의 다른 유전자변형 작물을 이용하여 특이성이 확인되었다. 서론에서 언급한 바와 같이 BASF사에서 각 개발된 유전자변형 감자 EH92-527-1과 BPS-A1020-5가 GBSS 유전자를 동일하게 포함하고 있으나 본 연구에서 개발한 검사법은 event-specific primers를 이용하였기 때문에 유전자변형 감자 EH92-527-1에만 특이성을 나타낸다. 이와 같이 개발된 duplex PCR 검사법의 검정한계치는 약 0.05%이다. 이러한 duplex PCR 검사법이 우리나라에 미승인 유전자변형 감자의 모니터링에 유용하게 사용될 것으로 판단한다.

감사의 글

본 연구는 2012년 농림수산검역검사본부 용역과제(201208005)로 수행되었으며 연구비 지원에 감사 드립니다.

문헌

- International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). GM Approval Database. Available from: <http://www.isaaa.org>. Accessed Nov. 30, 2012.
- Korea Biosafety Clearing House. Status of risk assessment of GMO in Korea. Available from: <http://www.biosafety.or.kr>. Accessed Nov. 30, 2012.
- Center for Environmental Risk Assessment (CERA), ILSI Research Foundation. GM Crop Database. Available from: <http://www.cera-gmc.org>. Accessed Nov. 30, 2012.
- KREI. Outlook of the Agricultural Economy. Korea Rural Economic Institute, Seoul, Korea. pp. 82-84 (2011)
- EFSA. Opinion of the scientific panel on genetically modified organisms on a request from the commission related to the notification (reference C/SE/96/3501) for the placing on the market of genetically modified potato EH92-527-1 with altered starch composition, for cultivation and production of starch, under part C of directive 2001/18/EC from BASF Plant Science. The EFSA Journal 323: 1-20 (2006)
- Kim JH, Ahn JH, Song HS, Kim KH, Kim DH, Kim HY. Qualitative PCR detection of vitamin E-enriched GM perilla. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 49: 192-195 (2006)
- Oguchi T, Onishi M, Chikagawa Y, Minegishi Y, Kodama T, Akiyama H, Ohno Y, Futo S, Hino A, Furui S, Kitta K. Development of event-specific quantitation method for GA21 maize, which is a GM event without CaMV35S promoter. J Food Hyg. Soc. Jpn. 49: 16-22 (2008)
- Yang L, Xu S, Pan A, Yin C, Zhang K, Wang Z, Zhou Z, Zhang D. Event specific qualitative and quantitative polymerase chain reaction detection of genetically modified MON863 maize based on the 5'-transgene integration sequence. J. Agric. Food Chem. 53: 9313-9318 (2005)
- Holck A, Vaitilingom M, Didierjean L, Rudi K. 5'-Nuclease PCR for quantitative event-specific detection of the genetically modified Mon810 MaisGard maize. Eur. Food Res. Technol. 214: 449-453 (2002)
- Kim SA, Lee MK, Yoo SJ, Kim JH, Lee H, Park KS, Jeong J, Kim HY. Detection of GM papaya event 55-1 in fresh and processed papaya using duplex PCR. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 53: 237-242 (2010)
- Mano J, Furui S, Takashima K, Koiwa T, Futo S, Minegishi Y, Akiyama H, Teshima R, Kurashima T, Takabatake R, Kitta K. Development and validation of event-specific quantitative PCR method for genetically modified maize MIR604. J. Food Hyg. Soc. Jpn. 53: 166-171 (2012)
- Li X, Pan L, Li J, Zhang Q, Zhang S, Lv R, Yang L. Establishment and application of event-specific polymerase chain reaction methods for two genetically modified soybean events, A2704-12 and A5547-127. J. Agric. Food Chem. 59: 13188-13194 (2011)
- Taverniers I, Windels P, Vaitilingom M, Milcamps A, Van Bockstaele E, Van den Eede G, De Loose M. Event-specific plasmid standards and real-time PCR methods for transgenic Bt11, Bt176, and GA21 maize and transgenic GT73 canola. J. Agric. Food Chem. 53: 3041-3052 (2005)
- Rho JK, Lee T, Jung SI, Kim TS, Park YH, Kim YM. Qualitative and quantitative PCR methods for detection of three lines of genetically modified potatoes. J. Agric. Food Chem. 52: 3269-3274 (2004)
- Watanabe T, Kuribara H, Mishima T, Kikuchi H, Kodama T, Futo S, Kasama K, Toyota A, Nouno M, Saita A, Takahashi K, Hino A, Akiyama H, Maitani T, Kubo M. New qualitative detection method of genetically modified potatoes. Biol. Pharm. Bull. 27: 1333-1339 (2004)
- Broothaerts W, Corbisier P, Emons H, Emterborg H, Linsinger TPJ, Trapmann S. Development of a certified reference material for genetically modified potato with altered starch composition. J. Agric. Food Chem. 55: 4728-4734 (2007)
- BASF Plant Science GmbH. Event-specific method for the quantification of amylopectin potato event EH92-527-1 using real-time PCR, Ludwigshafen, Germany. pp. 1-12 (2009)
- Hofvander P. Structure and DNA sequence of insert and flanking genomic region of potato event EH92-527-1. BASF Plant Science GmbH, Ludwigshafen, Germany. pp. 1-60 (2005)