

신규 수입 승인 6개 유전자변형작물의 검출기법 개발

설민아 · 조범호 · 최원균 · 신수영 · 엄순재 · 김일룡 · 송해룡 · 이종로

Development of detection methods for six approved LM crops in Korea

Min-A Seol · Beom-Ho Jo · Wonkyun Choi · Su Young Shin · Soon-Jae Eum · Il Ryong Kim · Hae-Ryong Song · Jung Ro Lee

Received: 5 January 2017 / Revised: 8 February 2017 / Accepted: 8 February 2017
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Living modified crops are genetically modified living organisms and are widely used in biotechnical research and desired goods. As the reliance on LM products, concerns about safety of LMOs have been continuously increased in South Korea. We established the detection methods for unintentional released LMOs in environmental conditions. To detect six LM event genes of 1 canola, 1 maize and 4 soybeans, PCR conditions were based upon consideration of the Joint Research Centre information. Genomic DNAs were isolated from LM samples and PCR analysis were performed using each event-specific primer pair. Event-specific genes of all events were efficiently recognized by our methods. To investigate the insertion site of LM genes in each genome, we verified PCR product sequence by DNA sequencing. These results suggest that the LM event-specific gene amplification can be efficiently developed. In addition, our detection method is fit for monitoring and post-management of LM crops in the environment.

Keywords Living modified organism (LMO), Monitoring, Detection method, Polymerase chain reaction (PCR)

M. A. Seol · W. K. Choi · S. Y. Shin · S. J. Eum · I. R. Kim · H. R. Song · J. R. Lee (✉)
국립생태원 생태연구본부 생태보전연구실
(Division of Ecological Conservation, National Institute of Ecology (NIE), Seocheon 33657, Korea)
e-mail: leejr73@nie.re.kr

B.-H. Jo
충남테크노파크 바이오센터 생물산업팀
(Bio-industrial Team, Bio Center, Chungnam Techno Park, Yesan, 32415, Korea)

서론

유전자변형생물체(LMO)란 인위적으로 유전자를 재조합하거나 유전자를 구성하는 핵산을 세포 또는 세포 내 소기관으로 직접 주입하는 기술, 또는 분류학에 의한 과(科)의 범위를 넘는 세포융합기술을 이용하여 새롭게 조합된 유전물질을 포함하고 있는 생물체를 말한다(유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률 제2조). 현대생명공학기술은 유전자변형농작물이나 유전자변형식품뿐만 아니라, 동물과 미생물 분야에서도 널리 활용되고 있다. 일반적으로 유전자 재조합 기술이 이용되고 있는 것은 LMO 작물 분야이다. 2015년 기준으로 전 세계 28개국에서 유전자변형작물이 재배되었고, 그 면적은 대한민국 면적의 약 18배 정도인 1억 7,970만 ha에 이른다. 1990년대에는 해충저항성, 제초제내성, 바이러스 내성 등 형질 작물의 생산성을 높이기 위한 유전자변형작물(콩, 옥수수, 면화, 캐놀라)이 재배되었으며, 점차 무름방지, 갈변방지(사과), 발암물질 제거(감자), 영양성분 강화(비타민 A 강화 쌀), 천연물질(약품) 생산 등의 여러 가지 특성을 가진 작물이 개발되고 있으며, 육류 품질 향상 및 의약품 장기 생산 등에 활용할 수 있도록 GM (Genetically modified) 동물의 개발에도 큰 진척을 보이고 있다. GM 염소에서 생성된 의약품이 상용화 돼있고, 빠르게 자라는 GM 연어와 GM 닭에서 생산되는 난치병 치료를 위한 의약품이 FDA의 승인을 받았으며, 그 밖에도 장기이식을 위한 GM 동물 연구가 진행되고 있다. 또한, 대량생산이 용이한 미생물에서는 산업용 효소, 식품첨가물, 농약, 오염정화용 미생물, 의약품 단백질 등을 생산하여 각종 산업 분야에 활용하고 있다.

초기 GM 작물(콩, 옥수수, 면화, 캐놀라)은 미국과 같이 대규모 농업을 하고 있는 산업국에서 잡초 제어와 해충 방제 효과를 목적으로 개발되었고, 향상된 생산성으로 농업 경제 성장 및 식량 확보 효과를 거두었다. 그러나, 아메리카 대륙에 비해 아시아와 아프리카 지역은 소규모 경작이 이

루어지고 있으며 기후 변화에 따라 농업 환경이 열악하다. 따라서 개발도상국들은 안정적인 식량 확보와 농업 발전을 위해 산업국과 다국적 기업으로부터 GM 품종을 도입하였고, 생산성 향상과 경제적인 혜택을 경험하게 되었다. 2006년부터 필리핀은 GM 옥수수를 재배하였고 황금쌀에 대한 시험 재배가 이루어지고 있으며, 인도는 전세계에서 가장 많은 면적에서 GM 면화를 재배하여 수출하고 있다. 일부 아프리카 국가들은 GMO가 혼합된 식량 원조를 거부하고 있지만, 남아프리카공화국은 GM 작물을 도입하여 옥수수, 면화, 콩 등을 재배하여 부족한 식량난을 해결하고 있다. GM 작물을 도입 후 식량 확보에 긍정적인 효과를 경험한 개발도상국들은 점차 자국 내 농업 환경에 맞는, 가뭄과 염분 등 환경스트레스 내성, 영양성분 강화, 농업환경 개선(물이용효율, 질소효율 등)에 이용할 수 있는 맞춤형 GM 작물을 개발하고 있다. 또한, 바나나, 완두, 카사바, 가지, 파파야, 사탕수수, 토마토 등 실생활에 유용한 식품으로 이용될 수 있는 작물을 개발하고 있다(ISAAA 2015).

현재 우리나라는 상업적으로 LMO를 재배하고 있지는 않지만, 곡물자급률이 낮아 식품과 사료용으로 유전자변형 옥수수, 콩, 면화를 수입하고 있다(MAFRA 2015). 그리고 전세계적으로 다양한 GM 작물 개발이 이루어지고 있는 상황에서 우리나라 또한 2000년대 초반부터 활발하게 GM 작물을 연구하고 있다. 개발 중인 GM 작물은 해충저항성 벼(흑명나방 방제), 황금쌀(비타민 A 보강), 시력개선 및 노화방지용 컬러쌀, 가뭄저항성 벼를 포함하여 총 13작물 58종이다. 주요 대상 작물은 벼, 콩, 배추, 고추, 감자, 고구마, 화훼류 등이며, 해충저항성, 불량환경 내성 등 생산성 보존과 농약 및 노동력 절감형, 품질 고급화 특성을 갖도록 연구하고 있다.

2008년부터 국내 식품용 및 농업용으로 수입된 LMO는 해마다 증가하여 2015년 약 23.6억 달러 규모의 총 1,024만 톤이 수입되었다. 전체 수입 작물 중 식용으로는 215만 톤(21%)이 수입되었으며, 그 외 농업용으로 809만 톤(79%)이 수입되었다. 가장 많이 수입된 작물은 옥수수로 전체 수입량의 88%를 차지하는 905만 톤이 수입되었으며, 다음으로 10%를 차지하는 콩 103만 톤, 면실 16만 톤(1.6%), 그리고 소량의 캐놀라가 수입되었다. 또한, LMO법 시행(2008년 1월1일) 이후 2016년 7월 현재 국내에는 147개의 LMO가 식용(food), 사료용(feed), 가공용(processing)으로 승인되어 수입되고 있다(KBCH 2015). 하지만, 부족한 식량 문제의 해결, 바이오 연료를 이용한 대체 에너지 마련 및 불치병 치료 방법으로서의 LMO의 개발과 이용에 대한 호의적인 견해와 달리, 한편으로는 위험성에 대한 논의가 계속되고 있다. LMO가 자연생태계나 인체 및 동물에게 미치는 잠재적인 위험성은 비의도적인 환경방출에 의한 GM 식물의 자생, Bt 유전자 이용시 비표적 곤충류 피해, 유전자 이동으로 인한 잡초화, 잡초 및 해충의 내성 증가 등에 관한 것이다(Agrios 2001). 예로는 2004년 일본의 이바라키현 카시마항 하역장

주변에서 자생하는 GM유채 발견, 2005년 몬산토에서 개발한 LMO 옥수수(MON863)를 먹인 쥐에서 나타난 혈액 이상 및 장기 크기 논란과, 제초제 내성 옥수수 NK603의 만성독성에 대한 논쟁이 대표적이다(Seralini et al. 2012). 따라서 LMO를 안전하고 효과적으로 이용하기 위해서는 잠재적인 위험성에 대한 평가가 뒷받침 되어야 한다. 우리나라는 비의도적 위해성에 대한 안전성 심사를 통해 LMO를 수입하지만 여전히 불안함이 존재하며, 인천 항구에서부터 운송로를 따라 운송 회사, 사료 제조 공장 주변에서 GM 콩과 옥수수가 발견된 사례 등 국내에서 자연환경에 LMO가 발견된 사례가 보고되고 있다(Lee et al. 2009; Park et al. 2010; Han et al. 2014; Han et al. 2015).

국내 수입·유통중인 LMO의 비의도적 환경유출 현황 및 사후관리를 위해 환경부는 2009년부터 매년 전국 6개 권역에서 LMO가 수입되는 항만에서부터 운송로를 따라 사료 공장이나 축산농가, 또는 지역 축제지까지 자연생태계의 유출 가능성을 모니터링 하고 있다. 운송로를 따라 유출된 낙곡이나, 도로 주변에서 자생하고 있는 콩, 옥수수, 면화, 캐놀라 등을 LMO 의심작물로 채집하여 LMO 여부를 분석하고 있다. 2009년(159지역)부터 2015년(787지역)까지 해마다 모니터링 지역수가 증가하고 있으며, 결과적으로 LMO로 판별되는 의심 시료 수도 증가하고 있다(Lee et al. 2015c).

따라서, 확산된 LMO가 유발할 수 있는 생태계 교란, 파괴로부터 자연환경을 보호하고 LMO를 안전하게 이용하기 위해 자연생태계 위해성 평가 및 안전관리가 필요하다. 먼저, 매년 증가하고 있는 자연환경에 비의도적으로 유출된 LM 의심시료를 분석하기 위해서 LMO 여부를 판별할 수 있는 빠르고 명확한 검출법 개발이 선행되어야 한다. 환경부와 국립생태원에서는 효율적인 모니터링 조사 및 사후관리를 위해 2011~2014년까지 총 5작물 40개 LM이벤트(콩 10개, 옥수수 16개, 면화 8개, 캐놀라 5개, 사탕무 1개)의 단일검출기법을 확립하였고(Lee et al. 2015a), 2013년 옥수수 15개, 2014년 17개 LM 이벤트(콩 6, 면화 6, 캐놀라 5)의 동시검출기법을 개발하였다(Lee et al. 2015b). 지속적으로 신규로 승인 및 유통되는 LMO가 늘어나고 있어 수입된 신규 LMO의 명료한 판별을 위한 유전자변형 작물의 특이적인 검출기법을 구축해야 할 필요성이 있다.

2015년 국립생태원에서 국내 수입이 승인되어 유통되고 있는 LM 작물 중 6개 이벤트를 선정하고 LMO를 판별할 수 있는 검출기법 개발을 수행한 결과를 참고하여 본 연구논문은 작성하였다(Choi et al. 2015). 본 연구 결과 확립된 LMO 검출기법은 국내 수입·승인된 LMO의 90%를 검출 가능하게 할 수 있으며, 보다 많은 의심시료를 빠른 시간 내 효과적으로 판별 가능한 동시검출기법 개발 연구의 기초가 될 것이다. 따라서, 본 연구 결과 확립된 검출기법은 비의도적으로 혼입된 LMO에 의한 자연생태계 위해성 평가 및 안전관리를 위한 과학적인 판별 기법을 제공할 것이다.

재료 및 방법

표준시료로부터 genomic DNA 정제

유전자변형 작물의 특이적인 검출기법 개발에 필요한 LM 콩(MON87708, MON87769, DAS-68416-4, DAS-44406-6)과 LM 옥수수(DAS-40278-9), LM 캐놀라(MON88302) 및 비변형 표준시료를 표준물질 및 측정연구소(Institute for Reference Materials and Measurements, IRMM)와 미국유지화학협회(American Oil Chemists' Society (AOCS, Urbana, IL, USA))로부터 구입하였으며 본 연구에 사용한 표준시료는 분말상태(MON87708, MON87769, DAS-68416-4, DAS-44406-6, DAS-40278-9)와 종자상태(MON88302)로만 판매한다(Table 1). 구입 후 종자상태(MON88302) 표준시료는 막자사발을 이용하여 분말상태로 만든 후 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. Genomic DNA는 전기영동과 Nano-drop (Thermo fisher scientific, Waltham, USA)을 이용하여 순도가 높은 것을 사용하였다.

각 작물의 내재유전자 및 이벤트 특이적 Primer 제작

각 콩, 옥수수, 캐놀라의 내재유전자 primer는 NCBI GenBank 유전체 염기서열을 바탕으로 *Lectin 1 (Le1)*, GenBank accession no. K00821), *Alcohol Dehydrogenase1 (Adh1)*, GenBank accession no. AF123535) 및 *Cruciferin A (CruA)*, GenBank accession no. X14555)의 primer를 제작하였다(Seol et al. 2015). 6개 LM 작물에 도입된 목적 유전자를 검출하기 위한 특이적 primer는 유럽위원회 공동연구센터(Joint Research Centre-European Commission, JRC-EC)와 LM 환경 위해성센터(Center for Environmental Risk Assessment, CERA)에서 LMO 이벤트의 도입유전자 특성과 primer 서열 정보 등을 참고하여 제작하였다(Table 2) (JRC 2015).

이벤트 특이적 PCR 반응 및 민감도 분석

Non-LM은 비변형 표준시료로써, LM 표준시료인 LM의 대조구로 사용하였으며, 매 회 50 ng/μl의 genomic DNA를 2X

Table 1 List of six LM events

Crop	Event name	Provider	Type
Soybean	MON87708	AOCS	Powder (10 g)
	DAS-68416-4	IRMM	Powder (1 g)
	DAS-44406-6	IRMM	Powder (1 g)
	MON87769	AOCS	Powder (10 g)
Maize	DAS-40278-9	IRMM	Powder (1 g)
Canola	MON88302	AOCS	Seed (100 g)

Table 2 Oligonucleotide primers used to detect six LM events

Primer name	Sequence(5'-3')	Target	Amplicon size (bp)
Letin 1-F	CACCTTTCTCGCACCAATTGACA	<i>Le1</i> (Soybean endogenous)	105
Letin 1-R	TCAAACCTCAACAGCGACGAC		
Alcohol Dehydrogenase1-F	CGTCGTTCCCATCTCTTCCTCC	<i>Adh1</i> (Maize endogenous)	135
Alcohol Dehydrogenase1-R	CCACTCCGAGACCCTCAGTC		
CruciferinA-F	GGCCAGGGTTTCCGTGAT	<i>CruA</i> (Canola endogenous)	101
CruciferinA-R	CCGTCGTTGTAGAACCATTGG		
MON87708-F	TCATACTCATTGCTGATCCATGTAG	MON87708	91
MON87708-R	AGAACAAATTAACGAAAAGACAGAACG		
DAS-68416-4-F	GTACATTA AAAACGTCGCAATGTGT	DAS-68416-4	130
DAS-68416-4-R	GTTTAAGAATTAGTCTTACAGTTTATTGTTAG		
DAS-44406-6-F	TTATTGTTCTTGTGTTTCCTCTTTAGG	DAS-44406-6	99
DAS-44406-6-R	CCTCAATTGCGAGCTTTCTAATTT		
MON87769-F	CATACTCATTGCTGATCCATGTAGATT	MON87769	87
MON87769-R	GCAAGTTGCTCGTGAAGTTTTG		
DAS-40278-9-F	CACGAACCATGAGTTACAATC	DAS-40278-9	98
DAS-40278-9-R	TGGTTCATTGTATTCTGGCTTTG		
MON88302-F	TCCTTGAACCTTATTTTATAGTGACA	MON88302	101
MON88302-R	TCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCA		

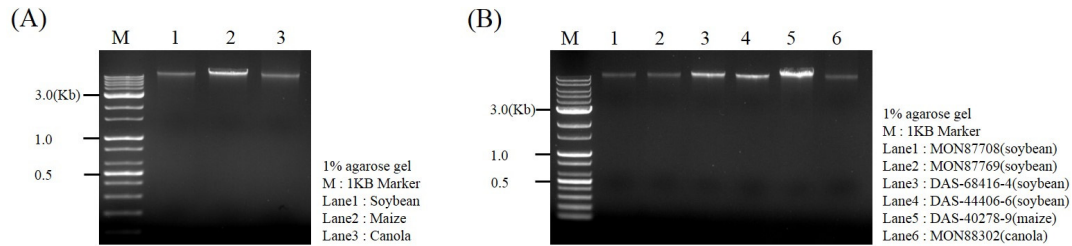


Fig. 1 Genomic DNA isolation from NON-LM and LM. (A) Genomic DNAs of NON-LM crops were displayed by 1% agarose gel electrophoresis (Lane M; 1Kb DNA Ladder, Lane 1; Soybean, Lane 2; Maize, Lane 3; Canola). (B) Genomic DNAs of six LM events were displayed by 1% agarose gel electrophoresis (Lane M; 1Kb DNA Ladder, Lane 1; LM soybean MON87708, Lane 2; LM soybean MON87769, Lane 3; LM soybean DAS-68416-4, Lane 4; LM soybean DAS-44406-6, Lane 5; LM Maize DAS-40278-9, Lane 6; LM Canola MON88302).

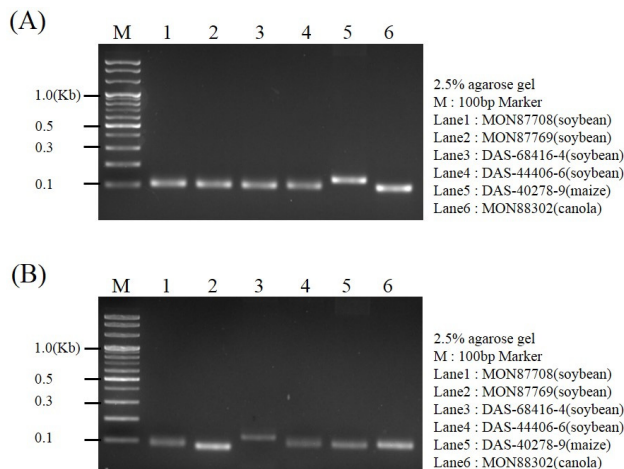


Fig. 2 Amplification for endogenous and event-specific genes in six LM crops. (A) Endogenous genes (soybean *Le1*, maize *Adh1* and canola *CruA*) of six LM events were detected by 2.5% agarose gel electrophoresis. (B) Event-specific PCR products of six LM events were detected by 2.5% agarose gel electrophoresis. (Lane M; 100 bp DNA Ladder, Lane 1; LM soybean MON87708, Lane 2; LM soybean MON87769, Lane 3; LM soybean DAS-68416-4, Lane 4; LM soybean DAS-44406-6, Lane 5; LM Maize DAS-40278-9, Lane 6; LM Canola MON88302).

EF-Taq PCR Pre-Mix (Solgent, Daejeon, Korea)를 사용하여 이벤트 검출 PCR 반응을 수행하였다(Proplex PCR system, Applied Biosystems, Waltham, USA). 확립된 각 6개 작물에 대한 검출기법을 통해 LM 이벤트가 검출될 수 있는 최저 농도를 확인하기 위하여 민감도 분석 실험을 수행하였다. 유전자 변형 작물의 검출 최고 농도는 50 ng/μl를 기준으로 하였고 순차적 희석을 통해 검출최저 농도를 확인하였다. PCR은 95°C에서 5분, 95°C 15초, 60°C 20초간 40 cycle 수행한 뒤, PCR 생성물과 Biofact사의 100 bp Plus DNA Ladder 4 μl (150 ng/μl)를 agarose gel에 전기영동으로 결과를 확인하였다.

LMO 검출반응 후 생성물의 염기서열 정보 분석

검출기법 PCR 반응 후, 이벤트 특이적인 primer에 의해 증폭된 산물인지 증명하기 위하여 염기서열 분석을 수행하였

다. 먼저, 6개 LM 작물의 PCR 생산물을 PCR Purification system으로 정제(Biofact, Daejeon, Korea)한 후, T-blunt PCR Cloning system (Solgent, Daejeon, Korea)을 이용하여 cloning하였고, 도입 유전자와 주변 염기서열을 비교 분석하였다.

자체적인 최적검출 기법확립

각 6개 이벤트의 특이적인 primer 염기서열을 blast하여 식물 유전체 염기서열을 검색하였고, 정확한 도입유전자의 삽입위치와 증폭 효율이 높은 검출기법 확립을 위하여 여러 조합의 primer를 제작하였다. JRC로부터 수집한 기존의 primer와 새로 제작한 primer를 이용하여 이벤트 검출 PCR을 수행하였고, 자체적인 최적의 검출 기법을 확립하였다.

결과 및 고찰

LMO 도입유전자 검출기법 확립 및 민감도 분석

6개 유전자변형(LM) 표준시료와 비변형(NON-LM) 콩, 옥수수 및 캐놀라 표준시료로부터 genomic DNA를 정제하여 (Fig. 1), 도입유전자 검출 PCR을 수행하였다. 먼저, 각 작물 고유의 내재유전자 검출 PCR 및 이벤트 특이적 도입유전자를 검출 가능한지 PCR을 통해 확인하였다. PCR 실험을 통해 6개 LM 이벤트에서 각 작물의 내재유전자(*Le1*, *Adh1*, *CruA*)와 이벤트 특이적 도입유전자가 검출되는 것을 확인하였다(Fig. 2). 이어, 6개 LM과 NON-LM의 표준시료에서 내재유전자와 이벤트 특이적 primer를 이용하여 검출반응 실험을 진행하였다(Savini et al. 2013b; Mazzara et al. 2012; Savini et al. 2014; Savini et al. 2015; Savini et al. 2012; Savini et al. 2013a).

제초제저항성 LM 콩 MON87708(*CS-dmo* 유전자 삽입), DAS-68416-4 (*pat*, *aad-12* 유전자 삽입)와 DAS-44406-6 (*mEPSPS*, *pat*, *aad-12* 유전자 삽입) 및 기능성강화 LM 콩 MON87769 (*CS-Pjd6D*, *CS-NcFad3* 삽입) 4개 LM 이벤트를 대상으로 검

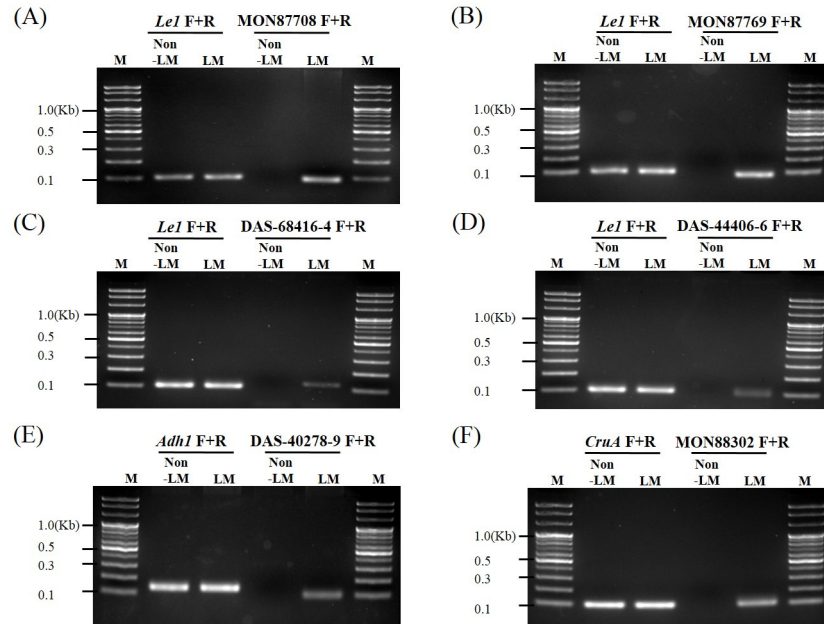


Fig. 3 Establishment of PCR amplification for LMO events. PCR analysis were performed by using the endogenous *Lectin 1 (Le1)* and event-specific gene primers. PCR products of MON87708 (A), MON87769 (B), DAS-68416-4 (C) and DAS-44406-6 (D) were displayed. (E) PCR analysis were performed by using the endogenous *Alcohol Dehydrogenase 1 (Adh1)* and DAS-40278-9 event-specific gene primers. (F) PCR analysis were performed by using the endogenous *Cruciferin A (CruA)* and MON88302 event-specific gene primers. PCR products were electrophoresed on a 2.5% agarose gel.

출기법을 확립하고자 하였다. 그 결과, 모든 NON-LM 및 LM 이벤트 표준시료에서 콩 고유의 내재유전자가 검출되었으며, 각 이벤트 특이적 primer는 LM 표준시료에서만 증폭되어 4개의 LM 콩에 대한 검출기법을 확립하였다(Fig. 3A-D). 또한, 제초제저항성 LM 옥수수 DAS-40278-9 (*aad-1* 유전자 삽입)와 LM 캐놀라 MON88302 (*cp4 epsps* 유전자 삽입) PCR 반응 결과, 유전자변형 옥수수와 캐놀라에 대해서만 특이적으로 도입유전자가 검출되는 것을 확인하였다 (Fig. 3E and F).

LMO 검출기법은 자연환경에 혼입된 LMO 의심시료를 과학적인 방법을 이용하여 LMO 여부를 분명하게 판단하여 제거하기 위해 구축하였다. 그러나, 자연생태계에 비의도적으로 유출된 콩, 옥수수의 낙곡이나 자생하고 있는 식물체의 모양, 크기 및 시든 정도에 따라, 검출 반응 PCR에 필요한 양만큼의 genomic DNA 분리가 불가능하거나 순도가 낮아 LM 여부를 판단하기 위한 PCR을 수행하기 힘든 경우가 있다. 따라서 다수의 문헌 자료를 참고하여 6개 LM 표준시료에서 정제한 genomic DNA 농도 조건을 달리하여 검출 가능한 가장 낮은 농도를 확인하기 위한 검출 한계 PCR을 수행하였다(Kim and Kim 2009a; Kim et al. 2008; Kim et al. 2015; Kim et al. 2009b; Lee et al. 2007; Min et al. 2004; Moon et al. 2012; Wu et al. 2009; Yoo et al. 2013). 각 LM 콩, 옥수수, 캐놀라의 genomic DNA는 50 ng/μl을 최고 농도로 사용하였으며, 이어서 차례대로 D.W로 희석한 낮은 농도의 genomic DNA로 검출 반응시 사용한 PCR 실험 방법과 동일한 방법

으로 검출 한계 농도를 확인하였다. 본 검출법은 자연환경 모니터링을 통해 채집된 LM 의심시료를 판별하기 위해 개발된 분석법이다. 본 데이터는 표준시료를 이용하여 수행하였으나, 환경에 비의도적으로 유출된 의심개체의 명확한 LMO 여부를 판단할 수 있는 최저 검출 농도를 확인하고자 민감도 분석 실험을 수행하였고, 실제 의심시료의 LM 유전자의 PCR 생성물을 정확하게 확인할 수 있는 농도를 검출 최저 농도로 결정하였다. 검출 최저 농도 분석 결과, LM 콩 MON87708, MON87769 이벤트는 0.05 ng/μl, DAS-68416-4 이벤트는 6.25 ng/μl, DAS-44406-6 이벤트는 0.19 ng/μl 농도까지 검출되었다. 또한, LM 옥수수 DAS-40278-9 이벤트는 3.12 ng/μl, LM 캐놀라 MON88302 이벤트는 0.025 ng/μl 농도까지 검출되었다. 판매되는 각각의 표준시료 중 LM 시료가 가장 많이 혼합된 표준시료를 선정하여 검출법을 개발하기 위해 사용하였다. MON87708, MON87769 및 MON88302는 LM작물이 100% 혼합된 표준시료이고, DAS-68416-4, DAS-44406-6, DAS-40278-9는 LM 작물이 10%가 혼합된 표준시료이다. 그 결과, 검출이 가능한 최저농도 확인 실험에서도 각 LM 작물 검출반응 결과와 유사하게 LM 작물이 10% 혼합된 DAS-68416-4(검출한계 최저농도: 6.25 ng/μl), DAS-44406-6(검출한계 최저농도: 0.19 ng/μl), DAS-40278-9(검출한계 최저농도: 3.12 ng/μl) 이벤트에 비해, LM 작물이 100% 혼합된 MON87708(검출한계 최저농도: 0.05 ng/μl), MON87769(검출한계 최저농도: 0.05 ng/μl) 및 MON88302(검출한계 최저농도: 0.025 ng/μl) 이벤트에서는 낮은 농도에서

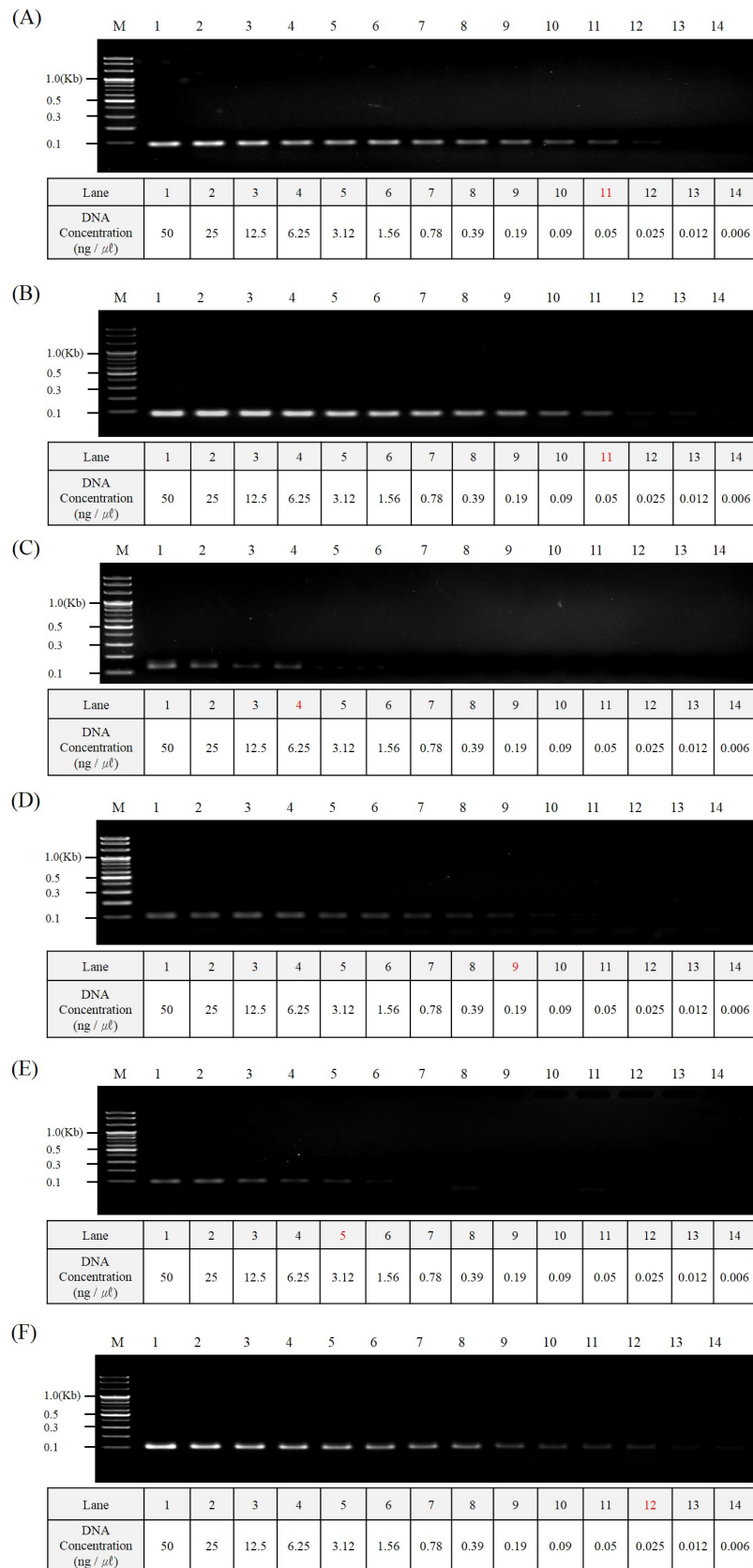


Fig. 4 Concentration-dependent DNA amplification of event-specific genes. PCR products of MON87708 (A), MON87769 (B), DAS-68416-4 (C), DAS-44406-6 (D), DAS-40278-9 (E) and MON88302 (F) were electrophoresed on a 2.5% agarose gel. (Lane M; 100bp DNA Ladder, Lane 1-14; 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19, 0.09, 0.05, 0.025, 0.012, 0.006 ng/ μl LM crops).

Table 3 Sequencing results of six LM events

Crop	Event name	Sequence(5'-3')
Soybean	MON87708	<u>TCATACTCATTGCTGATCCATGTAGATTTCCCGGACTTTAGCTCAAATGCATGTATTTA</u> <u>TTAGCGTTCTGTCTTTTCGTTAATTTGTTCT</u>
	DAS-68416-4	<u>GTACATTA AAAACGTC CGCAATGTGTTATTAAGTTGTCTAAGCGTCAATATTTTAATTCT</u> <u>TAACAATCAATATTTTAATTCTTAAACTTTATTAATCTAACAATAAACTGTAAGA ACTA</u> <u>ATTCTTAAAC</u>
	DAS-44406-6	<u>TTATTGTTCTTGTGTTTCTCTTTAGGAACTTACATGTAAACGGTAAGGTCATCATGGA</u> <u>GGTCCGAATAGTTTGAAATTAGAAAGCTCGCAATTGAGG</u>
	MON87769	<u>CATACTCATTGCTGATCCATGTAGATTTCCCGGACATGAAGCCATTTACAATTGACCATC</u> <u>ATACTCAA AACTTCACGAGCAACTTGC</u>
Maize	DAS-40278-9	<u>CACGAACCATTGAGTTACAATCAACAGCACCGTACCTTGAAGCGGAATACAATGAAGGT</u> <u>TAGCTACGATTTACAGCAAAGCCAGAATACAATGAACCA</u>
Canola	MON88302	<u>TCCTTGAACCTTATTTTATAGTGCACAAAACCTTTTAGTCATCATGTTGTACCACTTCAA</u> <u>ACACTGATAGTTTAAACTGAAGGCGGGAAACGACAATCTGA</u>

*Under bars denote event-specific primer sequences for detection of six LMOs.

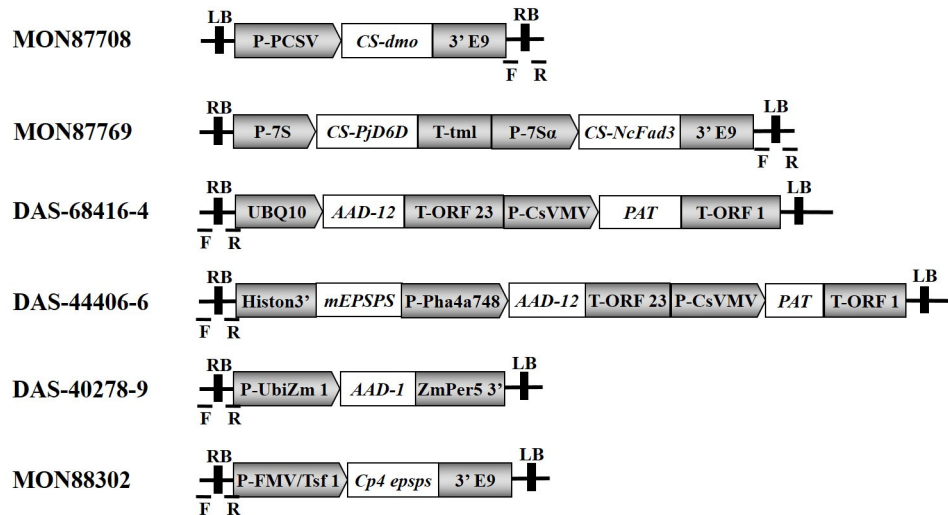


Fig. 5 Schematic representations of event-specific genetic elements of six LM crops. Location and direction of primers are indicated by F and R. All primer pairs were designed with nucleotide sequences of the DNA flanking region and the inserted DNA cassette. (LB; left border, RB; right border, ; promoter, ; encoding gene, 3' terminator).

도 LM 특이적인 도입유전자가 검출되었다. 이러한 결과는 표준시료에 포함된 LMO 혼합 비율이 검출 최저 농도에 영향을 준다는 것을 나타내며, 모니터링 시 발견된 LM 의심시료를 분석할 때 기초 데이터로 활용될 것이다. 각 6개 작물에 대한 검출한계 최저 농도를 각각 정리하였다(Fig. 4).

각 이벤트 별 도입유전자 구조 및 주변염기서열 분석

각 이벤트 별 도입유전자가 삽입된 위치와 검출기법의 정확성을 확인하기 위하여 PCR 산물을 이용한 염기서열을 분석하고 alignment를 수행하였다. Bioedit program을 이용하여 검출 반응 후 PCR 생성물이 LM 특이적 primer에 의해 증폭된 산물인지 확인하였다. 또한, GMO Detection Method Database (GMDD)와 BIOSAFETY SCANNER Website로부터 수집한

정보를 토대로 각 이벤트 별 프로모터, 도입유전자, 종결인자의 구조를 파악할 수 있었다. Table 3에서 보듯이, 6개 이벤트 모두 LMO를 검출할 수 있도록, 각 작물의 고유 유전자와 LM 특이적 도입유전자의 염기서열에서 LM 특이적인 이벤트 검출 primer가 설계되었음을 확인할 수 있었고, 기존에 수집된 LMO 유전정보와 일치하였다(Table 3, Fig. 5).

신규 최적 검출기법 확립

PCR 증폭의 효율성은 여러 가지 실험 조건에 따라 변하는데, 본 연구에서 자체적으로 확립한 각 이벤트 별 특이적 증폭 실험에서도 표준시료의 함량, primer 결합 부위와 반응산물의 크기 등에 따라 PCR 증폭 효율의 차이를 확인하였다. 기존에 수집된 정보를 바탕으로 확립한 검출 조건에서

Table 4 New oligonucleotide primers for detection of LM events

Target event name		Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
MON87708	R1	CCTAGCTATAGTTTTGTCCAC	123
	R2	CCGTCCGCAAGTGAATAATATACAG	200
	R3	GGTAATAGATGCACCGTAGG	246
	R4	AGAAGACGTGCACTACGTGA	325
MON87769	F1	TAACGCTGCGGACATCTACATTTTTGA	163
	F2	GGACGTGAATGTAGACACGTCGAA	287
	F3	CATGCATCAATCGACCGTACCGCGGCCG	366
DAS-68416-4	R1	GAAGTTGCTAACATATTTCAATGG	242
	R2	CCCTCACATAAAGTAAATG	300
	R3	GAGTATCAGTGGCAGAAAGAG	375
	R4	CACACTTATGTGTCGAGGCCA	429
DAS-44406-6	F1	GAAGGGTGGGGCCTGACATAGTAGC	229
	F2	GATATGTGGGTCATTGGCCACATGA	272
	F3	GTCCTATAAAAAACACATCTGAATAC	371
DAS-40278-9	F1	TCTCTAAGCGGCCCAAACCTTG	153
	F2	CAGGAGACCTCGCTTGTAACC	215
	F3	GTCCAGAGGGTACCCCATCATT	277
	F4	TAGGAGACATATGATCCTCATG	333
MON88302	F1	GATCCTCCTCAAGTTGTACAGTCTTGAAGAG	196
	F2	GTCTTTGCTTTTGGCTCTACTTTTGCG	304
	F3	CGCGTCTAGAAGTTGTGGATAAGATTGAATC	407

는 이벤트 특이적 PCR 생성물의 크기가 100 bp 이하로 검출되는 이벤트들이 존재하는데, 이것은 향후 다수의 모니터링 의심 시료를 분석할 때 생성물 크기가 비슷한 내재유전자와 구별하기에 혼란을 줄 수 있다. 따라서 내재유전자의 생성물 크기와 명확하게 구분되며 PCR 증폭 효율이 높은 새로운 primer를 구축하는 실험을 수행하였다. 먼저, 6개 이벤트 검출시 사용된 primer sequence를 바탕으로 blast하여 식물 유전체 염기서열을 검색하였다. MON87769(콩), DAS-44406-6(콩), DAS-40278-9(옥수수) 및 MON88302(캐놀라) 이벤트의 검출에 사용된 정방향 primer와 MON87708(콩), DAS-68416-4(콩) 이벤트 검출에 사용된 역방향 primer는 각 식물 유전체 염기서열의 일부분에 일치하였고, 최적의 검출기법 확립을 위하여 다수의 새로운 primer를 (주)마크로젠에 의뢰하여 제작하였다(Table 4). 새롭게 제작한 primer의 작동 여부를 확인하기 위하여, 본 연구의 검출기법 확립에 사용한 JRC primer와 짝을 이루어 이벤트 검출 PCR을 수행하였다. 그 결과, MON87708 이벤트는 새롭게 제작한 R1/R3 primer, MON87769 이벤트는 F1/F2/F3 primer, DAS-68416-4 이벤트는 R1/R3/F4 primer를 사용할 경우 JRC primer 조합보다 증폭효율이 많이 향상되는 결과를 확인하였다. DAS-44406-6 이벤트는 F1/F3 primer, DAS-40278-9 이벤트는 F1/F2/F4 primer, MON88302 이벤트는 F1/F2/F3 primer가 결합 및 중합하여 검출되는 것을 확인하였고, 새롭게 제작한 primer를 사용할 경우 증폭효율이 많이 향상되는 효과를 보였다. 특히, LM 작물

이 10%가 혼합된 DAS-68416-4, DAS-44406-6, DAS-40278-9 이벤트에서는 새로운 primer를 이용하여 PCR 반응을 수행하였을 때 기존 JRC primer 조합보다 높은 농도의 PCR 산물을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

이러한 결과들로부터 검출 반응 시 높은 효율의 primer 결합을 선택하는 것이 중요하며, 확립된 6개 이벤트의 새로운 검출기법은 국립생태원 자체적인 검출기법으로 예상치 못하게 자연생태계에 발견된 LM 의심시료 분석 및 모니터링 조사 연구 등에 적극 활용할 것이다.

적 요

일반적으로 유전자를 재조합하는 생명공학기술이 널리 이용되고 있는 것은 유전자변형 작물 분야이다. LM 제품에 대한 의존도가 높아짐에 따라 한국에서는 LMO의 안전성에 대한 우려가 지속적으로 증가하고 있다. 따라서, 우리는 자연환경 내 비의도적으로 방출된 LMO를 판별할 수 있는 검출기법을 확립하였다. JRC 정보를 토대로 6개 LM 이벤트(캐놀라 1, 옥수수 1, 콩 4개)의 유전자를 검출할 수 있는 PCR 조건을 확립하였다. 각 LM 시료에서 genomic DNA를 분리하였고, 이벤트 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR 실험을 수행하였다. 또한 자체적으로 확립된 검출법에 의해 모든 LMO의 이벤트 특이적 유전자가 검출되었다. LM 유전자

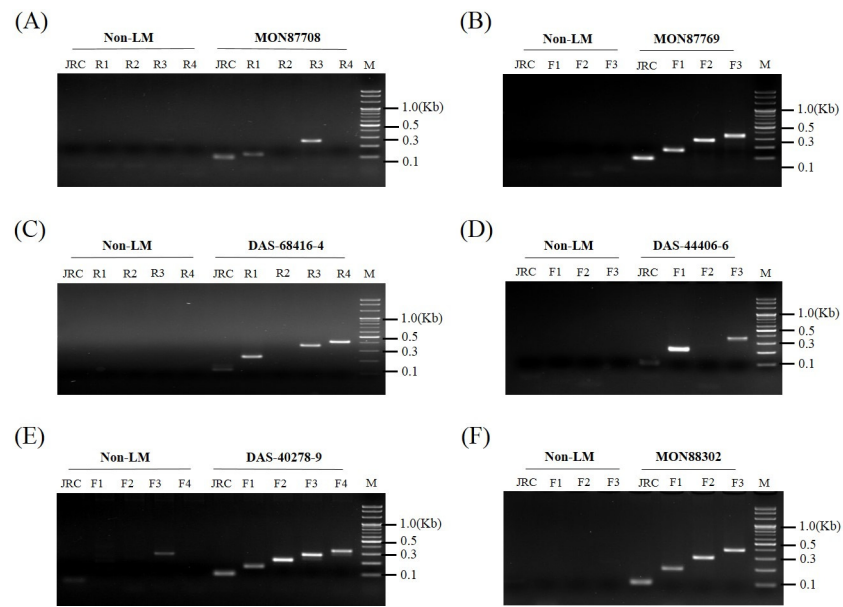


Fig. 6 Amplification of event-specific genes using newly designed primers of six LM events. PCR products of MON87708 (A), MON87769 (B), DAS-68416-4 (C), DAS-44406-6 (D), DAS-40278-9 (E) and MON88302 (C) were electrophoresed on a 2.5% agarose gel (Lane M; 100bp DNA Ladder, Lane 1; JRC primer, Lane 2~5; new primer).

의 삽입 위치를 분석하기 위해 PCR 생성물을 이용하여 염기서열을 분석하였다. 이 결과는 LM 이벤트의 특이적인 유전자를 효율적으로 검출할 수 있음을 나타낸다. 게다가 본 연구결과 확립된 검출기법은 자연환경 내 LM 작물의 모니터링 및 사후 관리에 활용될 것이다.

사 사

본 연구는 2015년 국립생태원 생태보전연구실의 연구과제 (NIE-2015-06)로 수행되었다.

References

- Agbios (2001) Essential Biosafety. Vol. 1 No. 1 Merckville, Canada
- Choi WK, Seol MA, Lee JR, Jo BH, Moon JC, Shin SY, Eum SJ, Kim IR, Kim JM, Song HR (NIE) (2015) Establishment of detection methods for LMO
- Han SM, Kim DY, Md RU, Hwang KS, Lee BK, Kim CG, Park KW (2014) Appearance/Instance of genetically modified maize at grain receiving harbors and along transportation routes in Korea. *Weed Turf. Sci* 3:221-224
- Han SM, Oh TK, Md RU, Shinogi Y, Lee BK, Kim CG, Park KW (2015) Monitoring the occurrence of genetically modified maize in Korea: A 3-year observations. *J Fac Agriculture*, 60(2):285-290
- European Commission, Joint Research Centre (JRC). Available from: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu>
- International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). GM Approval Database. Available from: <http://www.isaaa.org>. Accessed 2015
- Korea Biosafety Clearing House(KBCH). Status of risk assessment of GMO in Korea. Available from: <http://www.biosafety.or.kr>. Accessed 2015
- Kim JH, Kim HY (2009a) Event-specific detection methods for genetically modified maize MIR604 using real-time PCR. *Food Sci. Biotechnol.* 18(5):1118-1123
- Kim JH, Kim SA, Seo YJ, Lee WY, Park SH, Kim HY (2008) Multiplex PCR detection of the MON1445, MON15985, MON88913, and LLcotton25 Varieties of GM cotton. *Food Sci. Biotechnol.* 17(4):829-832
- Kim JH, Park SB, Roh HJ, Park SH, Shin MK, Moon GI, Hong JH, Kim HY (2015) A simplified and accurate detection of the genetically modified wheat MON71800 with one calibrator plasmid. *Food Chem.* 176:1-6
- Kim JH, Seo YJ, Sun SH, Kim HY. Multiplex PCR detection of 4 events of genetically modified soybeans(RRS, A2704-12, DP356043-5, and MON89788) (2009b) *Food Sci. Biotechnol.* 18(3):694-699
- Lee BK, Kim CG, Park JY, Park KW, Kim HJ, Yi H, Jeong SC, Yoon WK, Kim HM (2009) Monitoring the occurrence of genetically modified soybean and maize in cultivated fields and along the transportation routes of Incheon Port in South Korea. *Food con.* 250-254
- Lee JR, Shin SY, Choi WK, Moon JC, Jo BH, Seol MA, Eum SJ, Kim IR, Kim JM, Song HR (NIE) (2015c) Study on environmental monitoring and post-management of LMO (VII)
- Lee JR, Choi WK, Moon JC, Jo BH, Shin SY, Seol MA, Eum SJ, Kim IR, Song HR, Kim JM (NIE) (2015a) LMO detection methods. ISBN 979-11-86197-24-0

- Lee JR, Jo BH, Choi WK, Moon JC, Shin SY, Eum SJ, Seol MA, Kim IR, Kim JM, Song HR (NIE) (2015b) Development of multiplex-PCR for simultaneous detection of LMOs (III)
- Lee SH, Kim JK, Yi BY. Detection methods for biotech cotton mon15985 and mon88913 by PCR (2007) *J. Agric Food Chem.* 55:3351-3357
- Ministry of agriculture food and rural affairs. Self-sufficiency rate of grain in Korea. Available from: <http://www.mafra.go.kr>. Accessed 2015
- Mazzara M, Charles Delobel C, Pinski G, Savini C, Van den Eede G (2012) Event-specific Method for the Quantification of Soybean MON87769 Using Real-time PCR. Validation Report and Validated Method. EUR 25487 EN.2012. JRC74371
- Min DM, Kim MY, Jung SI, Heo MS, Kim JK, Kim HY (2004) Quantitative analysis of genetically modified soybean in processed foods using real-time PCR. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36(5): 723-727
- Moon GS, Shin WS. Establishment of quantitative analysis method for genetically modified maize using a reference plasmid and novel primers (2012) *Prev Nutr Food Sci.* 17:274-279
- Park KW, Lee BK, Kim CG, Kim DY, Park JY, Ko EM, Jeong SC, Yoon WK, Kim HM (2010) Monitoring of occurrence of genetically modified maize at a grain receiving port and along transportation routes in the Republic Korea. *Food Con.* 456-461
- Savini, C. Event-specific Method for the Quantification of Oilseed Rape MON88302 Using Real-time PCR -Validation Report and Validated Method (2013a) JRC86264
- Savini C, Bogni A, Foti N, Mazzara M, Kreysa J. Event-specific Method for the Quantification of Maize DAS-40278-9 Real-time PCR - Validation Report and Validated Method (2012) EUR 25585 EN
- Savini C, Mazzara M, Munaro B, Kreysa J. Event-specific Method for the Quantification of Soybean MON87708 Using Real-time PCR - Validation Report and Validated Method (2013b) EUR 25982 EN. JRC81896
- Savini C, Sacco MG, Mazzara M, Kreysa J. Event-specific Method for the Quantification of Soybean DAS-68416-4 Using Real-time PCR - Validation Report and Validated Method (2014) EUR 26706 EN. JRC 89867
- Savini C, Sacco MG, Mazzara M, Kreysa J. Event-specific Method for the Quantification of Soybean DAS-44406-6 Using Real-time PCR - Validation Report and Validated Method (2015) JRC 95249
- Seralini GE, Clair E, Mesnage R, Gress S, Defarge N, Malatesta M, Hennezuin D, Joel Spiroux de Vendomois (2012) Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Food and Chemical Toxicology* 50:4221-4231
- Seol MA, Lee JR, Choi WK, Jo BH, Moon JC, Shin SY, Eum SJ, Kim IR, Song HR (2015) Establishment of detection methods for approved LMO in Korea. *J Plant Biotechnol.* 42:196-203
- Wu G, Wu YH, Xiao L, Lu CM. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of genetically modified rapeseed topas 19/2 (2009) *Food Chem.* 112:232-238
- Yoo MR, Kim JH, Yea MC, Kim HY (2013) Development of detection method of unapproved genetically modified potato (EH92-527-1) in Korea using duplex polymerase chain reaction. *Korean J. Food Sci.* 45(2):156-160