

Development of a Kit for Diagnosing AtCYP78A7 Protein in Abiotic-tolerant Transgenic Rice Overexpressing AtCYP78A7

Kyong-Hee Nam¹, Jung-Ho Park², In-Soon Pack², Ho Bang Kim³ and Chang-Gi Kim^{2*}

¹Division of Ecological Conservation, National Institute of Ecology, Seoecheon 33657, Korea

²Bio-Evaluation Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Cheongju 28116, Korea

³Life Sciences Research Institute, Biomedic Co., Ltd., Bucheon 14548, Korea

Received February 26, 2018 / Revised May 10, 2018 / Accepted July 5, 2018

Quantitative determination of the protein expression levels is one of the most important parts in assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. Overexpression of AtCYP78A7, a gene encoding cytochrome P450 protein, has been reported to improve tolerance to abiotic stress, such as drought and salt stress, in transgenic rice (*Oryza sativa* L.). In the present study, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for diagnosing AtCYP78A7 protein including AtCYP78A7-specific monoclonal antibody was developed. GST-AtCYP78A7 recombinant protein was induced and purified by affinity column. Four monoclonal antibodies (mAb 6A7, mAb 4C2, mAb 11H6, and mAb 7E8) against recombinant protein were also produced and biotinylated with avidin-HRP. After pairing test using GST-AtCYP78A7 protein and lysate of rice samples, mAb 4C2 and mAb 7E8 were selected as a capture antibody and a detecting antibody, respectively, for ELISA kit. Product test using rice samples indicated that percentages of detected protein in total protein were greater than 0.1% in AtCYP78A7-overexpressing transgenic rice (Line 10B-5 and 18A-4), whereas those in negative control non-transgenic rice (Ilpum and Hwayoung) were less than 0.1%. The ELISA kit developed in this study can be useful for the rapid detection and safety assessment of transgenic rice overexpressing AtCYP78A7.

Key words : ELISA, genetically modified crop, monoclonal antibody, safety assessment

서 론

유전자변형(Genetically Modified, GM) 농산물의 상업화가 급진전되면서 유럽을 중심으로 이의 안전성에 대한 우려가 증가되고 있으며, 안전성 기준 또한 점차 강화되고 있다. 특히, 우리나라는 많은 곡물을 미국, 브라질, 아르헨티나로부터 수입하고 있으며, 2016년 기준 GM 옥수수를 858만 톤, GM 콩은 98만 톤을 수입했다[8]. 소비자들의 GM 농산물에 대한 우려가 높아지자 정부는 2001년 3월부터 GM 농산물 구분 표시제를 시행하고 있으며, 또한 2002년 9월부터 바이오안전성의정서가 국제적으로 발효됨에 따라 국내에서 수입 및 유통되고 있는 GM 농산물에 대하여 안전성 심사에 의하여 승인된 농산물과 미승인 농산물의 판별이 요구되고 있다. 따라서 GM 농산물에 대한 수요의 급증과 더불어 유전자 변형 여부에 대한 확인 및 분석이 요구되는 현시점에 비추어 볼 때, GM 농산물에 대

한 신뢰성 있고 효율적인 검사방법의 개발은 무엇보다 중요하다고 할 수 있다.

현재 주로 사용하고 있는 GM 농산물의 검사는 GM 작물에 도입된 유전자에 의해 생산되는 단백질을 특이적으로 인지하는 항체를 이용하여 진단하는 효소면역학적(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 방법과 삽입된 유전자를 판별하는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 방법을 이용하고 있다[1, 2]. 특히 ELISA 분석은 GM 작물에 도입된 새로운 단백질의 발현정도를 가장 신속하고 간편하게 파악하는 방법으로 인체 노출도 검정 및 환경 모니터링 연구에 유용하게 활용되고 있다[4, 15].

한편, 시토크롬 P450은 식물체에서 스테로이드, 테르페노이드, 플라보노이드, 알카로이드, 페닐프로파노이드, 글루코시노레이트 등을 포함하는 이차대사산물의 생합성과 독성물질의 분해 및 무독화 경로에 관여한다[16]. 시토크롬 P450 효소의 유전자는 식물체의 생장과 발달을 비롯하여 다양한 생물학적 혹은 비생물학적 스트레스 반응에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[20]. 시토크롬 P450 CYP78A 유전자 서브패밀리(subfamilies)의 일종인 CYP78A9의 과발현은 애기장대에서 열매의 모양과 크기의 변화를 유도하였다[5]. 팔레눔시스에서는 CYP78A2를 과발현시켰을때 꽃잎에서 안토시아닌 함량이 증가되었다[15]. 우리나라에서는 벼에서 애기장대 유래 AtCYP

*Corresponding author

Tel : +82-43-240-6543, Fax : +82-43-240-6549

E-mail : cgkim@kribb.re.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

78A7 유전자의 과발현이 수분 스트레스에 대한 저항성을 높이고, 종자의 크기를 증가시키는 것으로 보고되었다[17].

벼에서 AtCYP78A7 유전자의 과발현은 수분 스트레스 환경에 노출되었을 때 종자 영양성분의 변화와 생장시기에 따라 출수기의 줄기와 등숙기의 종자에서 대사체의 변화를 유도하였다[10, 12, 13]. 이 GM 벼에서 발현되는 신규단백질의 아미노산 서열 상동성 비교 및 마우스를 이용한 단회투여 독성시험에서 AtCYP78A7 단백질의 잠재적 알레르기성과 독성이 없음이 확인되기도 했다[11].

본 연구는 시토크롬 P450을 암호화하는 AtCYP78A7 유전자를 과발현하는 환경스트레스 내성 GM 작물의 검출 및 위해성 평가에 유용하게 사용하고자 AtCYP78A7 특이적 단클론 항체(monoclonal antibody, mAb)를 포함하는 AtCYP78A7 단백질 진단 키트를 개발하기 위하여 수행하였으며, 키트의 검출 성능은 AtCYP78A7 과발현 벼 2 계통(10B-5, 18A-4)과 그 모본인 화영벼, 그리고 일반 재배품종인 일품벼를 이용하여 검증하였다.

재료 및 방법

AtCYP78A7 재조합 단백질 제조

AtCYP78A7 재조합 단백질은 Nam 등(2018)과 동일한 방법으로 제조하였다. 즉 AtCYP78A7 DNA를 pGEX-4T-1 벡터와 접합하여 pGEX-4T-1-AtCYP78A7을 합성한 다음 클로닝된 플라스미드를 대장균 BL-21 (DE3) RIPL에 도입시켰다. pGEX-4T-1-AtCYP78A7이 도입된 대장균 600 nm에서 0.6의 Optical Density (OD) value를 얻을 때까지 액체배지에 배양한 후 1 mM Isopropyl-β-d-thiogalactopyranoside (IPTG)로 5시간 동안 37°C에서 배양함으로써 GST-AtCYP78A7 단백질의 과발현을 유도하였다. 발현이 확인된 세포는 초음파로 파쇄하고 GST affinity column을 사용해 GST-AtCYP78A7 단백질을 분리 정제한 후 12% SDS-PAGE로 분리하여 Coomassie blue 염색으로 그 크기를 확인하였다.

AtCYP78A7 재조합 단백질에 대한 단클론 항체의 생산

재조합한 GST-AtCYP78A7 단백질을 항원으로 사용하여 항체를 생산하였다. 항원을 마우스(BALB/c)에 보조항원(adjuvant, Sigma)과 혼합하여 주사하고 마우스의 혈액을 채취하여 항체 생성여부를 ELISA 방법으로 확인하였다. 2회 면역 후 항체의 역가(1:5,000)가 적정하게 증가하여 면역된 마우스에서 비장을 떼어내어 B 림프구를 분리한 다음, 배양한 골수종 세포(sp2/0)와 융합시켰다. 융합된 세포를 히포잔틴(hypoxanthin), 아미노프테린(aminopterin) 및 티미딘(thymidine)이 첨가되어 있는 HAT 배지에서 배양한 후 골수종과 B 림프구만이 융합된 융합세포(hybridoma)를 선택적으로 선발하여 배양하였다. 얻어진 융합세포 중에서 항원과 반응하는 항체를

생산하는 세포를 ELISA 방법을 이용하여 확인하였다. 이때 ELISA 양성반응인 세포를 한계희석법(limiting dilution method)을 이용하여 양성세포와 음성세포를 분리하는 과정(cloning)을 반복한 후 항원에 반응하는 항체를 생산하는 단일클론 세포(hybridoma)를 생산하였다.

ELISA 키트 제작

분리 정제된 단일클론 항체를 이용하여 비오틴화(biotinylation) 및 페어링 테스트(pairing test)를 한 후 포획항체(capture antibody)와 검출항체(detector antibody)를 선정하였으며, GST-AtCYP78A7 정제 단백질을 기준(standard)으로 일품벼, 화영벼, AtCYP78A7 과발현 벼(10B-5, 18A-4)의 용해물(lysate)을 검출 항원으로 사용하여 product test를 진행하였다.

페어링 테스트의 경우 항원으로는 정제된 GST-AtCYP78A7 단백질을 0.1 µg/ml과 0.5 µg/ml의 농도로 사용하였고, pAb #1, pAb #2, mAb 6A7, mAb 4C2, mAb 11H6, mAb 7E8을 포획항체로, biotylation 된 pAb #1, pAb #2, mAb 6A7, mAb 4C2, mAb 11H6, mAb 7E8을 검출항체로 사용하여 조합을 선정하였다. 그 후 AtCYP78A7 과발현 벼 2 계통(10B-5, 18A-4), 화영벼 및 일품벼의 용해물을 PBS 상태로 버퍼 교환하여 항원으로 사용하고, mAb 6A7, mAb 4C2, mAb 11H6를 포획항체로 biotylation 된 pAb #2, mAb 7E8을 검출항체로 사용하여 최적 조합을 선정하였다.

Product test는 GST-AtCYP78A7 정제 단백질을 standard로 사용하고 일품벼, 화영벼, AtCYP78A7 과발현 벼(10B-5, 18A-4)의 용해물을 검출항원으로 PBS 상태로 버퍼 교환하여 사용하였으며, 포획항체는 1:200으로 희석한 mAb 4C2, 검출항체는 1:400으로 희석한 biotylation 된 mAb 7E8을 사용하였다. 측정된 OD 값을 기준으로 4 파라미터 피트(four-parameter fit) 방식을 이용하여 기준곡선과 농도를 계산한 후, 각 측정값을 총 단백질에서의 비율로 환산하여 각 시료의 용해물에 존재하는 검출 단백질 양을 확인하였다.

결과 및 고찰

AtCYP78A7 재조합 단백질에 대한 단클론 항체의 생산

재조합한 GST-AtCYP78A7 단백질을 이용하여 마우스 면역 실험을 실시한 후 혈청을 분리하여 ELISA 테스트를 수행한 결과, 항체 역가는 1:10,000 정도이며 GST 대조군 단백질과의 교차반응은 매우 약한 것으로 관찰되었다(Fig. 1).

융합을 진행한 후 융합된 세포들이 GST-AtCYP78A7 단백질에 반응하는 항체를 분비하는지 확인하기 위하여 ELISA 테스트를 실시하였고, 그 결과 GST-AtCYP78A7 단백질과 반응하는 19개의 클론을 확인하였다(Table 1).

6개의 양성 클론을 대상으로 면역침강(Immunoprecipita-

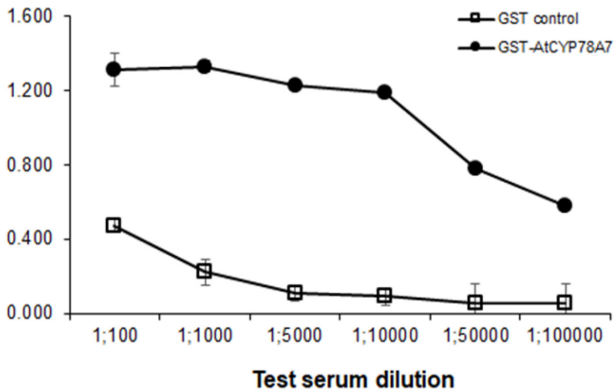


Fig. 1. Specificity of the polyclonal GST-AtCYP78A7 antibody (Ab) from bleeding serum as ELISA test. Data are means ($n=4$) \pm standard deviations.

Table 1. Results of preliminary immunoreactivity studies from hybridomas (OD 450 values)

Clone No.	GST-AtCYP78A7
2E11	1.595
4C2	0.423
6A7	1.326
6A9	0.376
6B2	1.751
6B10	1.874
6C6	1.469
6D10	1.007
6E1	0.319
7B3	0.844
7E8	1.524
8A1	2.081
8B11	0.848
8B12	2.504
9A10	0.255
9G2	1.028
9G5	0.280
11E1	2.202
11H6	1.502

Table 2. ELISA test of selected monoclonal antibodies to evaluate antigen-antibody interaction (OD 450 values)

Clone No.	OD
4C2	1.331
6A7	0.973
7E8	1.847
11H6	1.468

Table 3. Isotyping of the selected monoclonal antibodies (OD 450 values)

	4C2	6A7	7E8	11H6
IgG1	0.074	0.848	0.066	0.074
IgG2a	0.800	0.158	0.182	0.203
IgG2b	0.062	0.069	1.041	0.986
IgG3	0.063	0.114	0.147	0.158
IgGM	0.056	0.164	0.216	0.209
IgGA	0.056	0.054	0.061	0.069

tion, IP) 분석을 수행한 후 12% SDS-PAGE에 로딩하여 웨스턴 블롯팅(Western blotting)으로 확인한 결과, 화영벼의 용해물에서는 나타나지 않았던 2개의 밴드가 50 kDa 주위에 관찰되었고, 그 중 위에 위치하는 밴드가 control과 사이즈가 같아 목적 밴드(target band)로 생각되며, AtCYP78A7 과발현 벼인 18A-4의 용해물에서는 4개의 클론(#4C2, #6A7, #7E8, #11H6)에서 IP 반응이 확인되었다(Fig. 2).

IP 반응이 있는 4개의 클론(#4C2, #6A7, #7E8, #11H6)에 대한 클로닝을 진행한 후 ELISA를 진행하여 ELISA 결과가 양성인 well 중에서 세포수가 가장 적거나 하나만 있는 well을 선별하여 클로닝을 진행하였으며 세포가 들어있는 모든 well에서 ELISA 결과가 양성일 때 단일클론이 완성된 것으로 보고 클로닝을 종료하였다.

재조합한 GST-AtCYP78A7 단백질을 항원으로 사용하여 4종의 단클론 항체를 개발하였으며, 개발된 항체의 항원과의 반응을 간접적 ELISA로 확인하였다(Table 2). 또한 각 클론에 대한 Immunoglobulin 이소타입(isotype)을 확인한 결과 항

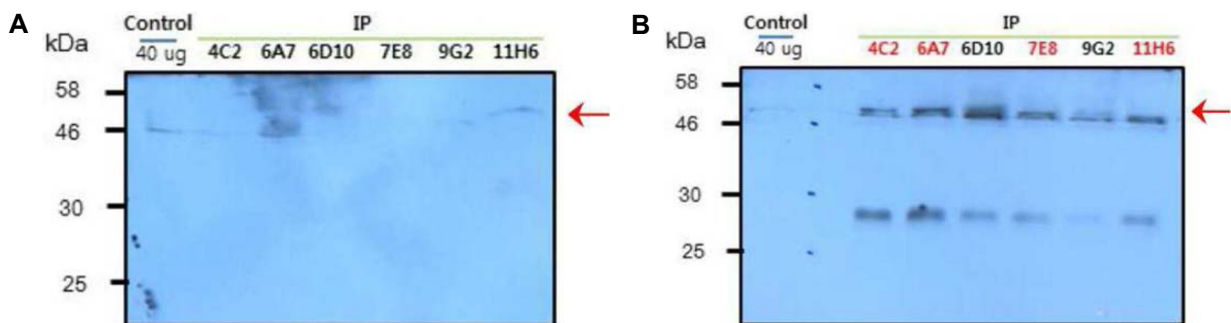


Fig. 2. Immunoprecipitation test for selected monoclonal antibodies. Western blot analysis of rice (A) 'Hwayoung' and (B) '18A-4' lysate expressing AtCYP78A7 protein with selected monoclonal antibodies, 4C2, 6A7, 6D10, 7E8, 9G2 and 11H6. The names of the finally selected monoclonal antibodies are in red. Red arrows show AtCYP78A7.

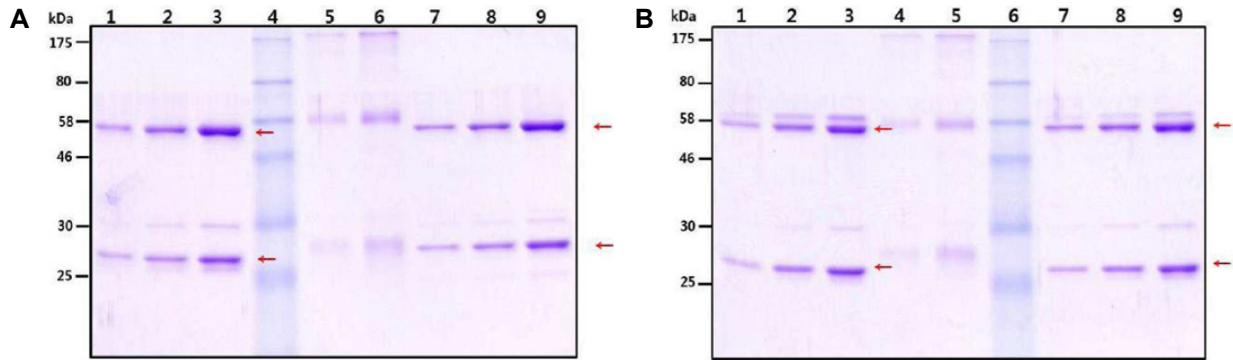


Fig. 3. Anti-AtCYP78A7 monoclonal antibody purification. (A) SDS-PAGE analysis for purified anti-AtCYP78A7 #4C2 and #6A7. Lanes 1-3, 0.5, 1, 2 μ g #4C2 added, respectively; lane 4, protein ladder; lanes 5-6, 0.5, 1 μ g BGG added, respectively; lanes 7-9, 0.5, 1, 2 μ g #6A7 added, respectively. (B) SDS-PAGE analysis for purified anti-AtCYP78A7 #7E8 and #11H6. Lanes 1-3, 0.5, 1, 2 μ g #7E8 added, respectively; lanes 4-5, 0.5, 1 μ g BGG added, respectively; lane 6, protein ladder; lanes 7-9, 0.5, 1, 2 μ g #11H6 added, respectively. Arrows show 50 and 25 kDa immunoglobulin chains.

-AtCYP78A7 #4C2, #6A7, #7E8, #11H6는 각각 IgG2a, IgG1, IgG2b, IgG2b 이었다(Table 3).

마우스 복수(Mouse Ascites)를 각 10 ml씩 IgG 정제하여 12% SDS-PAGE로 확인한 결과, 항체 크기는 50 kDa, 25 kDa 이었으며, 항-AtCYP78A7 #4C2, #6A7, #7E8, #11H6의 농도는 각각 5.8, 3.4, 4.5, 4.0 mg/ml이었다(Fig. 3).

ELISA 키트 제작

정제된 각각의 항체 4 mg을 이용하여 비오틴 접합(biotin conjugation)을 시킨 후, Avidin-HRP로 binding을 확인한 결과 AtCYP78A7 mAb 6A7, mAb 4C2, mAb 11H6, mAb 7E8 항체에 비오틴이 접합되었음을 확인하였다(Table 4).

GST-AtCYP78A7 (0.1 μ g/ml)을 항원으로 이용한 페어링 테스트 결과 Table 5에서 이탤릭체로 표시된 항체 7쌍을 사용하는 것이 좋은 결과를 보였으며, 그 중에서도 포획항체 mAb 6A7, mAb 4C2, mAb 11H6과 검출항체 pAb #2-biotin, mAb

7E8-biotin이 좋은 결과를 보였다. 또한 비 시료(일품벼, 화영벼, 10B-5, 18A-4)의 용해물에 대한 실험 결과, 포획항체로는 mAb 6A7과 4C2가 mAb 11H6를 사용하는 것보다 항원 특이성이 높으며, 검출항체로는 Ab 7E8-biotin이 pAb #2-biotin 보다 항원 특이성이 높은 것을 확인하였다(Table 6). 결과적으로 검출항체로는 mAb 7E8, 포획항체로는 biotylation된 mAb 4C2가 가장 좋은 조합으로 선정되었다.

Product test 결과 음성 대조구인 일품벼의 용해물은 측정치가 낮아 확연히 구분되나, 화영벼의 용해물은 일정비율로 검출되는 단백질이 있는 것으로 확인되었다(Fig. 4). 그러나 양성 대조구인 AtCYP78A7 과발현 벼 2계통(10B-5, 18A-4)에 비해서는 낮은 비율로 검출되었다. 전체 단백질 대비 측정된 단백질의 비율은 일품벼의 경우 측정치가 0.008% 이하로 나왔으며, 화영벼는 0.05~0.06%의 비율로 검출되었다. 반면 AtCYP78A7 과발현 벼 2계통(10B-5, 18A-4)는 0.12~0.21%의 비율로 검출되었다. 이상의 결과로 일품벼와 화영벼는 검출 단백질

Table 4. Results of immunoreactivity studies using biotin-labelled monoclonal antibodies with Avidin-HRP

	mAb 4C2	4C2-Biotin	mAb 6A7	6A7-Biotin	mAb 7E8	7E8-Biotin	mAb 11H6	11H6-Biotin
200 ng	0.038	2.696	0.039	2.746	0.035	2.709	0.037	2.647
100 ng	0.036	2.688	0.034	2.713	0.034	2.670	0.034	2.670
50 ng	0.041	2.671	0.035	2.676	0.033	2.624	0.037	2.674

Table 5. Results of pairing test of finally selected monoclonal antibodies with GST-AtCYP78A7 (0.1 μ g/ml) as antigen

		Capture Ab					
		pAb #1	pAb #2	mAb 6A7	mAb 4C2	mAb 11H6	mAb 7E8
Detector Ab	pAb #1-Biotin	0.113	1.007	1.103	1.030	1.106	1.014
	pAb #2-Biotin	0.139	1.829	1.958	1.852	1.882	1.746
	mAb 6A7-Biotin	0.213	1.632	1.721	1.614	1.726	1.505
	mAb 4C2-Biotin	0.111	1.499	1.614	1.502	1.471	1.416
	mAb 11H6-Biotin	0.366	1.839	1.927	1.852	1.786	1.731
	mAb 7E8-Biotin	0.778	2.038	2.070	1.966	1.986	1.914

Table 6. Results of pairing test of selected monoclonal antibodies with rice (Ilpum, Hwayoung, 10B-5, and 18A-4) lysates as antigen

Capture Ab	mAb 4C2		mAb 6A7		mAb 11H6	
	pAb #2 -Biotin	mAb 7E8 -Biotin	pAb #2 -Biotin	mAb 7E8 -Biotin	pAb #2 -Biotin	mAb 7E8 -Biotin
Ag	1.604 ^a	0.664 ^a	1.869 ^a	0.959 ^a	1.863 ^a	1.211 ^a
	0.408 ^b	0.677 ^b	0.542 ^b	0.899 ^b	0.740 ^b	0.845 ^b
	0.857 ^c	0.989 ^c	1.022 ^c	1.138 ^c	1.079 ^c	1.040 ^c
	1.135 ^d	1.252 ^d	1.196 ^d	1.456 ^d	0.928 ^d	1.188 ^d

^aIlpum, ^bHwayoung, ^c10B-5, ^d18A-4.

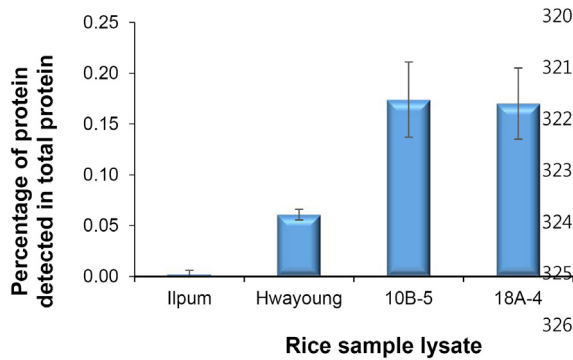


Fig. 4. Percentage of protein detected in each rice lysate from ELISA tests. Data are means ($n=5$) \pm standard deviations.

비율이 0.1% 미만으로 음성, AtCYP78A7 과발현 벼 2계통 (10B-5, 18A-4)는 0.1% 이상으로 양성으로 확인되었다.

본 연구는 시토크롬 P450 CYP78A 유전자의 서브패밀리의 일종인 애기장대 유래의 AtCYP78A7을 과발현하는 형질전환 식물체로부터 AtCYP78A7 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론 항체의 제조와 그 항체를 AtCYP78A7 단백질과 접촉시켜 항원-항체 복합체 형성을 검출함으로써 AtCYP78A7 단백질을 면역학적으로 검출하는 방법을 개발하는 것을 목적으로 하였다. 새롭게 개발된 GM 작물이 식품으로 승인받기 위해서는 안전성 평가를 거쳐야 하며, 그 중 도입 유전자 산물인 재조합 단백질은 잠재적인 알레르기성 및 독성 평가와 함께 발현 정도에 대한 분석이 요구되고 있다. 도입 단백질의 발현 분석은 일반적으로 ELISA 분석법을 통해 정량분석이 수행되며, Western blot과 Immuno-strip 등을 통해 정성분석이 수행되고 있다[3, 14, 19]. 특히 단백질의 발현량은 환경조건에 따라 다를 수 있기 때문에 단백질의 정량분석을 위한 시료는 복수년차 및 복수지역에서 재배된 GM 작물을 대상으로 하며, 발현부위 및 발현시기와 관련하여 식물체의 다양한 부위에서 생장시기별로 준비한다[7, 18]. 따라서 단시간에 많은 양의 시료를 동시에 분석할 수 있는 ELISA 방법은 단백질의 발현량 분석에서 가장 흔히 사용되고 있는 방법이다. ELISA 방법은 특정 단백질을 인식하는 다클론 혹은 단일클론 항체를 이용하는데, 단일클론 항체는 항원-항체 결합을 이용하는 진단 및 분석학적 분석법의 선택성과 특이성을 개선시키고, 하이브리도마 배양

에 의해 합성되기 때문에 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않는 장점이 있다[9].

본 연구에서는 AtCYP78A7 단백질에 특이적으로 결합하는 4개의 단일클론 항체(mAb 6A7, mAb 4C2, mAb 11H6, mAb 7E8)를 생산하였고, 비오틴화 및 페어링 테스트를 통해 선발된 포획항체 mAb 4C2와 검출항체 mAb 7E8-biotin의 조합으로 ELISA 키트를 개발하였다. 개발된 ELISA 키트를 이용한 벼 시료의 분석 결과 AtCYP78A7 과발현 벼는 전체 단백질 대비 AtCYP78A7 단백질의 비율이 0.1% 이상인 양성으로, 일품벼와 화영벼는 0.1% 미만인 음성으로 나타나 키트를 이용한 AtCYP78A7 단백질의 검출이 가능하였으며, 본 키트는 향후 AtCYP78A7을 과발현하는 형질전환 작물을 대상으로 하는 환경 모니터링 또는 인체 위해성 평가에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 KRIBB 기관고유사업, 과학기술정보통신부 중견 연구자 지원사업(과제번호: 20110028162), 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업(과제번호: PJ01368601)의 연구비지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

References

- Ahmed, F. E. 2002. Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends Biotech.* **20**, 215-223.
- Anklam, E., Gadani, F., Heinze, P., Pijnenburg, H. and Eede, G. V. D. 2002. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *Eur. Food Res. Technol.* **214**, 3-26.
- Chhapekar, S., Raghavendrarao, S., Pavan, G., Ramakrishna, C., Singh, V. K., Phanindra, M. L. V., Dhandapani, G., Sreevathsa, R. and Kumar, P. A. 2015. Transgenic rice expressing a codon-modified synthetic CP4-EPSPS confers tolerance to broad-spectrum herbicide, glyphosate. *Plant Cell Rep.* **34**, 721-731.
- Head, G., Brown, C. R., Groth, M. E. and Duan, J. J. 2001. Cry1Ab protein levels in phytophagous insects feeding on transgenic corn: implications for secondary exposure risk

- assessment. *Entomol. Exp. Appl.* **99**, 37-45.
5. Ito, T. and Meyerowitz, E. M. 2000. Overexpression of a gene encoding a cytochrome P450, *CYP78A9*, induced large and seedless fruit in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 1541-1550.
 6. Kim, H. B. and Choi, S. B. 2012. Cytochrome P450 gene for increasing seed size or water stress resistance of plant. US Patent 8153862 B2.
 7. Kim, H. J., Lee, S. M., Kim, J. K., Ryu, T. H., Suh, S. C., and Cho, H. S. 2010. Expression of PAT and NPTII proteins during the developmental stages of a genetically modified pepper developed in Korea. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 10906-10910.
 8. Korea Biosafety Clearing House. 2017. Biosafety White Paper 2017. Korea Biosafety Clearing House, Daejeon.
 9. Marx, U., Embleton, M. J., Fischer, R., Gruber, F. P., Hansson, U., Heuer, J., de Leeuw, W. A., Logtenberg, T., Merz, W., Portetelle, D., Romette, J. and Straughan, D. W. 1997. Monoclonal antibody production. The report and recommendations of ECVAM workshop 23. *ATLA* **25**, 121-137.
 10. Nam, K. H., Kim, D. Y., Shin, H. J., Nam, K. J., An, J. H., Pack, I. S., Park, J. H., Jeong, S. C., Kim, H. B. and Kim, C. G. 2014. Drought stress-induced compositional changes in tolerant transgenic rice and its wild type. *Food Chem.* **153**, 145-150.
 11. Nam, K. H., Kim, D. Y., Shin, H. J., Pack, I. S., Park, J. H., Yoon, W. K., Kim, H. B. and Kim, C. G. 2018. Safety assessment of AtCYP78A7 protein expressed in genetically modified rice tolerant to abiotic stress. *Kor. J. Agric. Sci.* **45**, 248-257.
 12. Nam, K. H., Shin, H. J., Pack, I. S., Park, J. H., Kim, H. B. and Kim, C. G. 2015. Growth stage-based metabolite profiling of drought-tolerant transgenic rice under well-watered and deficit conditions. *Plant Omics J.* **8**, 587-594.
 13. Nam, K. H., Shin, H. J., Pack, I. S., Park, J. H., Kim, H. B. and Kim, C. G. 2016. Metabolomic changes in grains of well-watered and drought-stressed transgenic rice. *J. Sci. Food Agri.* **96**, 807-814.
 14. Rahnama, H., Nikmard, M., Abolhasani, M., Osfoori, R., Sanjarian, F. and Habashi, A. A. 2017. Immune analysis of *cry1Ab*-genetically modified potato by in-silico analysis and animal model. *Food Sci. Biotechnol.* **26**, 1437-1445.
 15. Rui, Y. K., Yi, G. X., Zhao, J., Wang, B. M., Li, Z. H., Zhai, Z. X., He, Z. P. and Li, Q. X. 2005. Changes of Bt toxin in the rhizosphere of transgenic Bt cotton and its influence on soil functional bacteria. *World J. Microb. Biot.* **21**, 1279-1284.
 16. Schuler, M. A. 1996. Plant cytochrome P450 monooxygenases. *Crit. Rev. Plant Sci.* **15**, 235-284.
 17. Su, V. and Hsu, B. D. 2010. Transient expression of the Cytochrome p450 CYP78A2 enhances anthocyanin production in flowers. *Plant Mol. Biol. Rep.* **28**, 302-308.
 18. Wan, P., Zhang, Y., Wu, K. and Huang, M. 2005. Seasonal expression profiles of insecticidal protein and control efficacy against *Helicoverpa armigera* for Bt cotton in the Yangtze River Valley of China. *J. Econ. Entomol.* **98**, 195-201.
 19. Wang, Y., Ke, K., Li, Y., Han, L., Liu, Y., Hua, H. and Peng, Y. 2016. Comparison of three transgenic Bt rice lines for insecticidal protein expression and resistance against a target pest, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Sci.* **23**, 78-87.
 20. Xu, J., Wang, X. Y. and Guo, W. Z. 2015. The cytochrome P450 superfamily: Key players in plant development and defense. *J. Integr. Agr.* **14**, 1673-1686.

초록 : AtCYP78A7 과발현 환경스트레스 내성 형질전환 벼의 단백질 진단 키트 개발

남경희¹ · 박정호² · 백인순² · 김호방³ · 김창기^{2*}

(¹국립생태원 생태보전연구실, ²한국생명공학연구원 바이오평가센터, ³(주)바이오메디 생명과학연구소)

본 연구는 시토크롬 P450 단백질을 암호화하는 애기장대 유래의 AtCYP78A7을 과발현하는 형질전환 식물체로부터 AtCYP78A7 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론 항체의 제조와 그 항체를 AtCYP78A7 단백질과 접촉시켜 항원-항체 복합체 형성을 검출함으로써 AtCYP78A7 단백질을 효소면역학적(ELISA) 방법으로 검출하는 진단 키트를 개발하기 위하여 수행하였다. 재조합한 GST-AtCYP78A7 단백질을 항원으로 사용하여 단일클론 항체를 분리하는 융합세포주를 제조한 후 비오틴화 및 페어링 테스트를 통해 포획항체와 검출항체를 선정하였으며, GST-AtCYP78A7 정제 단백질을 기준으로 일품벼, 화영벼, AtCYP78A7 과발현 벼(10B-5, 18A-4)의 용해물을 검출 항원으로 사용하여 product test를 진행하였다. 그 결과 AtCYP78A7 단백질에 특이적으로 결합하는 4개의 단일클론 항체(mAb 6A7, mAb 4C2, mAb 11H6, mAb 7E8)를 생산하였고, 포획항체 mAb 4C2와 검출항체 mAb 7E8-biotin의 조합으로 ELISA 키트를 개발하였다. 개발된 ELISA 키트를 이용한 벼 시료의 분석 결과 AtCYP78A7 과발현 벼는 전체 단백질 대비 AtCYP78A7 단백질의 비율이 0.1% 이상인 양성으로, 일품벼와 화영벼는 0.1% 미만인 음성으로 나타나 키트를 이용한 AtCYP78A7 단백질의 검출이 가능하였으며, 따라서 본 키트는 향후 AtCYP78A7을 과발현하는 형질전환 작물을 대상으로 하는 환경 모니터링 또는 인체 위해성 평가에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.