

## CP4 EPSPS 검출을 위한 단클론 항체 생산

윤아미, 김일룡, 최원균\*

국립생태원 생태안전연구소

## Monoclonal antibody production for CP4 EPSPS detection assays

A-Mi Yoon, Il Ryong Kim and Wonkyun Choi\*

Division of Ecological Safety, National Institute of Ecology (NIE), Seocheon 33657, Republic of Korea

### \*Corresponding author

Wonkyun Choi  
Tel. 041-950-5822  
E-mail. wonkyun@nie.re.kr

**Received:** 26 October 2021

**Revised:** 11 November 2021

**Revision accepted:** 16 November 2021

**Abstract:** In this study, we described the production of an antibody to living modified organisms (LMOs) containing the gene encoding for 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) from *Agrobacterium tumefaciens* strain CP4 EPSPS provides resistance to the herbicide glyphosate (N-(phosphonomethyl) glycine). These LMOs were approved and have recently been used in the feed, food production, and processing industries in South Korea. Highly efficient monoclonal antibody (mAb) production is crucial for developing assays that enable the proper detection and quantification of the CP4 EPSPS protein in LMOs. This study describes the purification and characterization of recombinant CP4 EPSPS protein in *E. coli* BL21 (DE3) based on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. The production of mAbs was undertaken based on the standard operating procedure of Abclon, Inc. (South Korea), and the purity of the mAbs was assessed using SDS-PAGE. The following five mAb clones were produced: 2F2, 4B9, 6C11, 10A9, and 10G9. To verify the efficiency and specificity of the five developed mAbs, we performed Western blotting analysis using the LM (living modified) cotton crude extracts. All mAbs could detect the CP4 EPSPS protein in the LM cotton traits MON1445 and MON88913 with high specificity, but not in any other LM cottons or non-LM cottons. These data indicate that these five mAbs to CP4 EPSPS could be successfully used for the further development of antibody-based detection methods to target CP4 EPSPS protein in LMOs.

**Keywords:** Living Modified Organisms, LMO, CP4 EPSPS, monoclonal antibody production

## 서 론

*Agrobacterium* sp. strain CP4 유래 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (CP4 EPSPS) 유전자는 글리포세이

트 제초제에 저항성을 부여하는 특성을 활용하여 지난 25년간 유전자변형생물체 (Living modified organism, LMO) 개발에 활용되어져 왔다. CP4 EPSPS 단백질과 EPSPS 계열 단백질이 발현되는 국내 승인된 LM 작물에서 최소 30

개 이상의 단일 및 후대교배종에 이르고 있으며 주요 재배국 및 수입국에서 생산 및 이용 승인을 얻어 전 세계적으로 유통 중에 있다(Center for Environmental Risk Assessment 2011). EPSPS 유전자 및 시킵산 회로는 포유류를 제외하고 식물, 박테리아, 곰팡이 등 다양한 생물종에 존재하며 식물의 EPSPS 단백질은 엽록체나 색소체에 분포한다(della-Cioppa *et al.* 1986). 최근 *Escherichia coli* 유래 EPSPS 돌연변이 유전자가 LM 작물 개발에 활용 중이다(Funke *et al.* 2009).

2008년 1월 UN 생물다양성협약 바이오안전성의정서 국내 이행 법인 ‘유전자변형생물체 국가 간 이동 등에 관한 법률’이 시행된 이래, 국내 식품용 및 사료용 LM 작물은 연간 약 1천 2백만 톤 이상이 수입되고 있으며 유통 과정에서 비의도적 환경 유출이 지속적으로 발생하고 있어 국내 생물다양성의 위협요인으로 작용하고 있다(NIE 2020a; KBCH 2021). ‘LMO 자연환경 모니터링 및 사후관리 연구’에 따르면 전국 900지점을 조사한 결과 총 508개의 의심 개체를 수집하였으며 77개의 환경 유출 LMO 중 LM 면화가 44건으로 가장 높은 비율을 차지하고 있다(NIE 2020a). LM 면화는 최근 축산농가에서 사료용으로 많이 사용한 결과 국내 유통경로 및 축산농가 주변으로 LM 면화 종자의 유출이 늘어나고 이에 따라 국내 환경 내 자생하는 LM 면화 또한 증가한 결과로 예상된다.

최근 PCR 기반의 LMO 검출기술은 digital PCR 기술을 적용한 분자진단 및 정량분석법이 개발되고 있지만 장비 및 시약 등 높은 분석 비용으로 폭넓은 사용은 제한적이다(Morisset *et al.* 2013). 국내 LMO 검출기술 개발은 식품 및 농업용 LMO의 정성분석을 목적으로 하는 PCR 기반의 DNA 검출법이 대부분을 차지한다. LMO의 상품 단위인 이벤트 한 건을 특이적으로 검출하는 단일검출법과 여러 종류의 이벤트를 단회 PCR 분석으로 검출할 수 있는 동시 검출법의 개발은 환경 유출된 LMO 의심시료를 분석할 수 있는 필수적인 시험방법이다(NIE 2020b). PCR 검출기술은 정확한 이벤트 검정이 가능한 분석법이지만 숙련된 연구 인력이 장비를 갖춘 실험실에서 분석해야 하는 단점이 있어 현장에서 LMO 여부를 쉽게 판별하는 데 제한적이다(Eum *et al.* 2019). 따라서 이러한 문제점을 극복하기 위한 방법으로 항체 기반의 Lateral flow assay가 최근 민·관 LMO 현장조사에서 1차적인 LMO 여부를 판별하는 데 사용되고 있다.

국내 LMO 도입단백질의 항체를 이용한 단백질 기반 검출법 개발은 아직 초기단계에 머물러 있다. 간접경합 효소면역측정법(competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay, ciELISA) 개발을 위해 3종의 CP4 EPSPS 단클론 항체를 개발한 바 있다(Kwak *et al.* 2003). 또한 국외 연구진에 의해 CP4 EPSPS 단클론 항체가 개발되어 특성 연구 및 sandwich ELISA, electrochemical immunosensor 개발에 활용된 바 있다(Li *et al.* 2013; Zeng *et al.* 2021). 본 연구에서는 단백질 기반 LMO 검출기술 개발을 위한 연구로 국내 승인 LMO 내에 가장 많은 빈도로 도입된 제초제저항성 유전자인 CP4 EPSPS 단백질에 CTP2 서열이 추가된 실제 LMO 내에서 발현되는 단백질의 항체를 확보하여, 향후 LMO 현장조사에서 활용될 간이면역 검사키트 개발을 위한 기초 소재로 활용 가능성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. Antigen preparation

재조합 CP4 EPSPS 단백질 발현을 위하여 미국 국립생물공학정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)에서 *Agrobacterium tumefaciens* strain CP4 유래 글리포세이트(*N*-phosphonomethyl-glycine) 제초제 저항성 CP4 EPSPS 단백질에 엽록체 전달 펩타이드(chloroplast transit peptide 2, CTP2)가 결합된 실제 LM 작물에 삽입된 단백질 서열(ARW80140.1)을 확보한 후 (주)바이오팩트에 의뢰하여 유전자 합성 및 pET28a vector 클로닝을 진행하였다. 재조합 단백질 대량발현은 *E. coli* BL21 (DE3)에 pET28a CTP2::CP4 EPSPS 플라스미드를 형질전환 후 Kanamycin 항생제 배지에서 선별하였다. 형질전환된 *E. coli*를 37°C 100 mL LB 배지에서 흡광도(OD<sub>600</sub>)가 0.6이 될 때까지 배양 후 IPTG 최종 농도가 0.3 mM이 되도록 첨가하여 30°C에서 3시간 추가 배양하였다. 단백질 정제는 NIE (2020b) 방법에 따라 진행하였으며 정제 후 SDS-PAGE gel에 전기영동 후 Coomassie brilliant blue R250 (Bio-Rad, USA) 염색으로 단백질 상태를 확인하였다. 정제한 CP4 EPSPS 단백질의 동정을 위하여 (주)제노마인에 의뢰하여 Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) 분석을 수행하였다.

## 2. Immunization of mice

본 연구에서는 대장균에서 정제한 CP4 EPSPS 단백질을 단클론 항체 제작을 위한 항원으로 사용하였으며 (주)엡클론에 의뢰하여 항체 제작을 진행하였다. 항원은 adjuvant와 1:1 비율로 혼합하여 20 µg씩 6~8주 된 4마리의 BALB/c 마우스(암컷)에 2주 간격으로 6주간 주사하였다. 면역유도 전과 면역 1주일 후에 각각의 마우스로부터 혈청을 채취하여 ELISA 분석에 사용하였다. ELISA 결과를 바탕으로 최종 주사 여부를 결정하였으며 최종 면역 유도 3일 후 마우스의 비장을 채취하였다. 본 연구의 모든 동물실험은 (주)엡클론 동물실험윤리위원회 승인을 받아 지침에 따라 수행하였다.

## 3. Hybridoma production

Fusion 1주일 전에 10% fetal bovine serum (FBS)에 혼탕시킨 SP2/0 myeloma cell을 배양하였다. 채취한 spleen 세포는 SP2/0 myeloma cell과 PEG 1500 (Sigma, USA) 용액에 넣어 hybridoma를 제작하였다. 융합된 세포를 hypoxanthin, aminopterin, thymidine이 첨가되어 있는 HAT 배지에서 배양하여 myeloma와 B 림프구가 융합된 hybridoma 세포를 선택적으로 선별하여 배양하였다. 선별된 hybridoma cell은 단계희석법(serial dilution method)을 이용하여 양성세포와 음성세포를 분리하였다. ELISA 항체 스크리닝을 통해 positive clone을 확보하고 이중 LM 카놀라 GT73 추출액을 이용하여 Western blotting하여 역가가 높은 클론을 선별하였으며, 각각의 최종 세포 배양액을 이용하여 isotype을 확인하였다.

## 4. Antibody purification

CP4 EPSPS 단백질 항체 5종(2F2, 4B9, 6C11, 10A9, 10G9)에 대한 단클론 항체 정제를 위하여 10주령 BALB/c 마우스에 pristane을 주사하고 hybridoma cell을 배양하여 마우스 복강에 IP로 주사하였다. 1~2주 후 ascites가 생성되면 복강에서 ascites를 10 mL 채취 후 filtering하였다. Protein A resin에 천천히 상등액을 흘려 결합 후 1xPBS로 세척한다. 0.1 M Glycine buffer (pH 3.0)로 항체를 용출한 후 pH 8.8 Tris 버퍼로 중성화하였다. 정제된 항체는 Bradford protein assay로 정량 후 SDS-PAGE를 통해 항체 상태를 확인하였다. 정제된 항체는 사용 전까지 소분하여 -20°C에 보관하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. CP4 EPSPS 항원 클로닝

국내 식품 및 사료용으로 수입이 승인된 LMO 단일이벤트 현황을 이용하여 가장 높은 빈도로 삽입된 LMO 단백질을 조사하였다. 그 결과 2020년 12월 기준으로 국내 승인된 주요 LM 작물(옥수수, 콩, 면화, 카놀라, 알팔파, 사탕무) 69개 이벤트에서 CP4 EPSPS 단백질이 가장 많은 17개 이벤트에서 발견되며 그 뒤를 PAT (16개)와 BAR (10개) 단백질이 차지하였다. 1980년대 초기부터 사용된 비선택성 제초제인 글리포세이트는 방향족 아미노산 생합성 경로인 시킴산 회로의 핵심 효소인 EPSPS를 억제하여 식물체를 사멸에 이르게 하며 이 같은 특성을 활용한 제초제 저항성 LM 작물이 개발되었다(Padgett *et al.* 1995). 실제 주요 수출국에서 재배되고 국내 수입되는 형태인 후대교배종을 고려하면 국내 유통 중인 LMO 이벤트에는 더 높은 비율로 CP4 EPSPS 단백질이 함유되어 있을 것으로 추정된다. 이러한 CP4 EPSPS 단백질의 항체 확보는 later flow assay나 ELISA kit 개발을 위해 필수적이며 고효율의 항체를 활용한 단백질 기반 검출기술 개발은 PCR 기반의 유전자 검출기술과 함께 현장에서 즉시 활용할 수 있는 장점을 갖는다. NCBI에서 확보한 CP4 EPSPS 아미노산 서열을 이용하여 530개 아미노산으로 발현되도록 유전자를 합성하고 pET28a vector에 클로닝하여 대장균에서 재조합 단백질을 대량 정제하였다.

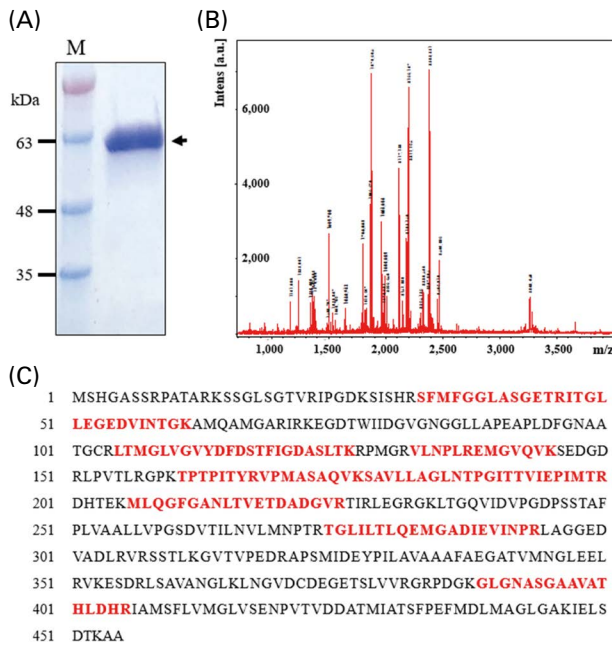
### 2. 항원단백질 발현, 정제 및 서열분석

단클론 항체 제작을 위하여 6개 히스티딘 표지단백질이 융합된 CP4 EPSPS 재조합 단백질을 대량으로 정제하였다(Renz *et al.* 2009). CP4 EPSPS 단백질의 크기는 약 55.67 kDa이며 히스티딘 표지단백질과 벡터 시퀀스 일부가 추가되어 약 60 kDa 크기로 정제되었다. 정제된 단백질은 SDS-PAGE gel에 전기영동 한 결과 약 60 kDa 크기의 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 1A). MALDI-TOF MS는 펩타이드 질량 지문법(PMF)과 함께 단백질 및 펩타이드 동정에 많이 활용되고 있다(Webster *et al.* 2012). 정제된 재조합 단백질의 동정을 위하여 겔 전기영동 후 Coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad, USA)으로 염색된 CP4 EPSPS 밴드를 절취하여 MALDI-TOF MS와 PMF 분석을 통해 단백질의 펩타이드 조각의 개수와 질량을 분석하여 해당 단백질이 실

제 CP4 EPSPS 단백질인지 확인하였다. NCBI에서 확보한 아미노산 서열을 이용하여 alignment한 결과 분석된 펩타이드 조각과 CP4 EPSPS 아미노산 서열이 7개 부위에서 일치하였다(Fig. 1B).

### 3. CP4 EPSPS 마우스 단클론 항체 제작

CP4 EPSPS 단클론 항체는 hybridoma 제작 후 단계희석



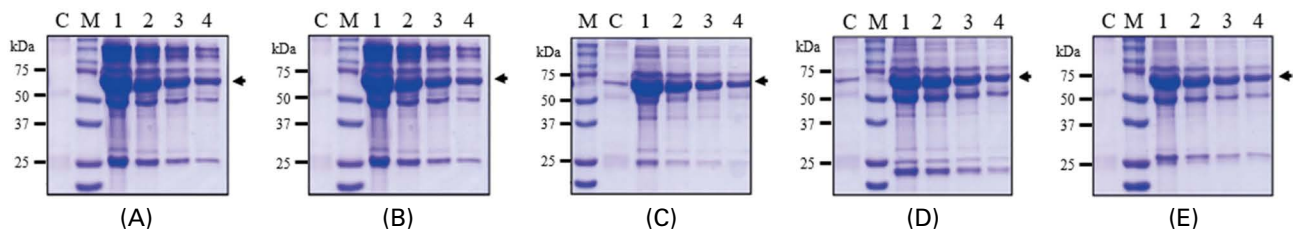
**Fig. 1.** Expression and identification of recombinant HIS-fused CTP2::CP4 EPSPS proteins. (A) Purification and CP4 EPSPS. Lane M: markers; lane 1: CTP2::CP4 EPSPS recombinant protein of pET28a-CTP2::CP4 EPSPS in *E. coli* BL21 (DE3). Arrow indicates purified CTP2::CP4 EPSPS. (B) Peptide mass fingerprint (PMF) by MALDI-TOF mass spectrometric analysis of CTP2::CP4 EPSPS. Numbers above the peaks indicate the average mass of the MH<sup>+</sup> ion (*m/z*). (C) The digested peptide fragments of CTP2::CP4 EPSPS identified by mass spectrometry are denoted by red letters.

법으로 3회 클로닝하여 최종 5종의 단클론 항체(2F2, 4B9, 6C11, 10A9, 10G9)을 선별하였다(Fig. 2). 1차 스크리닝에서 ELISA법을 이용하여 33개의 클론을 확보하여 WB를 통해 LMO 내에서 발현되는 CP4 EPSPS 단백질을 강하게 검출하는 5개 클론을 2차 스크리닝하였다(Table 1). 5종의 항체 클론에서 대량 정제 및 농축한 CP4 EPSPS 단클론 항체는 최종 농도를 확인한 결과 2F2 클론은 0.253 mg mL<sup>-1</sup>로 가장 낮은 농도를 보였으며 10A9 클론은 5.054 mg mL<sup>-1</sup>로 가장 높은 농도를 보였다(Table 2). 각각의 CP4 EPSPS 단클론 항체는 추가 항체 분자 역가 분석 및 특성 연구에 활

**Table 1.** ELISA test results of the first CP4 EPSPS fusion

Clone No.	O.D		Clone No.	O.D	
	CP4 EPSPS (Ag)	HIS control		CP4 EPSPS (Ag)	HIS control
<b>2A6</b>	1.553	0.066	<b>10A3</b>	1.550	0.045
2B12	0.355	0.052	<b>10A9</b>	2.024	0.048
<b>2F2</b>	1.650	0.048	<b>10D3</b>	2.231	0.053
2G6	0.449	0.048	10D9	0.488	0.054
<b>3A8</b>	1.649	0.050	<b>10E1</b>	1.294	0.049
<b>4B3</b>	1.637	0.073	<b>10G9</b>	1.997	0.046
<b>4B9</b>	0.734	0.047	<b>11A6</b>	1.171	0.044
<b>4H7</b>	2.038	0.051	11B1	0.477	0.053
5B12	0.414	0.006	<b>11F4</b>	1.354	0.057
<b>5C7</b>	0.895	0.047	<b>12C6</b>	1.758	0.069
<b>6B7</b>	0.680	0.047	12D10	0.347	0.452
<b>6C11</b>	2.206	0.046	<b>12H1</b>	1.652	0.050
6E1	0.411	0.048	<b>13E11</b>	1.171	0.048
<b>7A8</b>	1.595	0.120	13G11	0.289	0.046
7A10	0.175	0.048	15H9	0.490	0.046
<b>8D5</b>	1.646	0.056	Negative	0.058	0.048
<b>8G11</b>	1.370	0.087	Positive	2.252	1.780
<b>9G5</b>	1.801	0.045			

\*Bold number represents positive clone of CP4 EPSPS



**Fig. 2.** Analysis of purified CP4 EPSPS monoclonal antibodies (A-E). SDS-PAGE analysis of the purified CP4 EPSPS 2F2 (A), 4B9 (B), 6C11 (C), 10A9 (D), and 10G9 antibodies (E). Lane M: marker, lane C: bovine gamma globulin (BGG), lane 1: CP4 EPSPS ascites 1  $\mu$ L, lane 2: CP4 EPSPS ascites 0.5  $\mu$ L, lane 3: CP4 EPSPS ascites 0.25  $\mu$ L, and lane 4: CP4 EPSPS ascites 0.125  $\mu$ L. Arrow indicates heavy-chain antibody.

용되기 충분한 농도임을 알 수 있었다. 또한 고농도의 단클론 항체는 간이면역 검사키트 개발 시 최적의 항체 페어링을 위해 필수적으로 본 연구에서 제작된 항체의 농도는 향후 간이면역 검사키트 개발에 이용될 것이다. 정제된 각각의 항체에서 isotype screening을 통해 isotype을 분석한 결과 2F2, 4B9 클론은 IgG1/kappa type이며 6C11, 10A9, 10G9은 IgG2b/kappa type임을 확인하였다(Table 3). 항체 중쇄의 isotype은 크게 2종류로 나뉘며 각각은 분자량과 분자특성에서 차이를 보이며 세포 표면의 서로 다른 Fc 수용체와 결합한다(Apiratmateekul *et al.* 2009). 본 연구에서 개발한 5종의 CP4 EPSPS 단클론 항체의 중쇄는 모두 IgG type으로 IgM type은 확인되지 않았으며 이 결과를 바탕으로 항체 정제 시 affinity chromatography에 적합한 컬럼을 protein G 컬럼을 이용하여 항체 정제를 진행하였다(Nelson *et al.* 2000). 또한 마우스의 경우 성숙한 B cell의 5~10%만 lambda isotype으로 주로 kappa isotype의 특징을 보이는데 본 연구에서도 모든 단클론의 중쇄는 kappa isotype임을 확인하였다(Edholm *et al.* 2011).

**Table 2.** Final concentration and amount of CP4 EPSPS monoclonal antibody

Clone No.	Concentration (mg mL <sup>-1</sup> )	Amount (mg)
2F2	0.253	1.265
4B9	3.504	17.52
6C11	0.880	4.40
10A9	5.054	25.27
10G9	2.795	13.975

**Table 3.** Isotype screening of the CP4 EPSPS monoclonal antibody

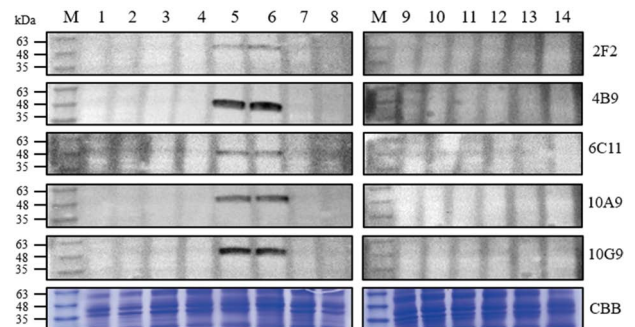
Isotype	Clone No.				
	2F2	4B9	6C11	10A9	10G9
IgG1	<b>1.548</b>	<b>1.513</b>	0.072	0.055	0.056
IgG2a	0.079	0.052	0.069	0.058	0.052
IgG2b	0.097	0.060	<b>2.258</b>	<b>1.976</b>	<b>1.802</b>
IgG3	0.055	0.050	0.072	0.049	0.056
IgA	0.044	0.048	0.048	0.047	0.047
IgM	0.067	0.068	0.069	0.059	0.052
Kappa	<b>0.531</b>	<b>0.459</b>	<b>0.756</b>	<b>0.454</b>	<b>0.456</b>
Lambda	0.050	0.049	0.067	0.047	0.048

\*Bold number represents isotype of CP4 EPSPS monoclonal antibody

#### 4. CP4 EPSPS 단클론 항체의 면역반응 검증

고농도로 정제된 CP4 EPSPS 항체가 실제 LMO 시료에서도 특이적으로 항원 항체 반응을 하는지 검증하기 위하여 LM 면화 14종(비변형 면화 5종, LM 면화 9종)에서 추출한 총 단백질을 이용하여 western blot 실험을 수행한 결과 CP4 EPSPS가 발현되는 LM 면화 이벤트인 MON1445와 MON88913에서 5종의 항체 모두 약 60 kDa 크기에서 band가 관찰되었다(Fig. 3). 그 외 다른 비변형 면화와 LM 면화 이벤트에서는 특이적인 band가 관찰되지 않아 특이적인 검출이 가능한 항체임을 알 수 있었다.

1996년 LM 면화가 재배된 이래 지난 26년간 19개국 이상의 국가에서 재배되고 있으며 2018년 기준 전 세계 면화 재배면적의 약 76% 이상을 LM 면화가 차지하고 있다(Balasubramani *et al.* 2021). 국내 수입되는 LM 면화에 도입된 외래유전자를 분석한 결과 14종의 단일이벤트 중 3종을 제외하고 모두 제초제저항성 유전자가 삽입되어 있다. 이처럼 제초제저항성 유전자에 대한 항체 확보는 단백질 기반 LM 면화 검출법 개발에 중요한 요소이며 CP4 EPSPS 외에도 PAT, BAR, AAD 등의 다른 제초제저항성 단백질 항체 확보도 중요하다. LM 면화 MON1445에서 CP4 EPSPS 단백질의 발현 양상에 대한 연구 결과에 따르면 종자에서는 0.047~0.117  $\mu\text{g mg}^{-1}$ 이 발현되고 잎 조직에서는



**Fig. 3.** Western blot analysis of mouse monoclonal antibodies to CP4 EPSPS using LM cotton crude extract. The right panels indicate each monoclonal antibody clone number. Lane M, protein size marker; 1, non-LM (AOCS 0804-A2); 2, MON88701 (AOCS 0113-A2); 3, MON531 (AOCS 0804-C2); 4, MON15985 (AOCS, 0804-D2); 5, MON1445 (AOCS 0804-B2); 6, MON88913 (AOCS, 0906-D2); 7, non-LM (IRMM, ERM-BF429a); 8, T304-40 (IRMM, ERM-BF429c); 9, non-LM (IRMM, ERM-B428a); 10, GHB119 (IRMM, ERM-B428c); 11, non-LM (IRMM, ERM-BF422a); 12, 281/3006 (IRMM, ERM-BF422b); 13, non-LM (AOCS, 1012-C2); and 14, COT102 (AOCS, 1012-A). CBB represents Coomassie brilliant blue staining of SDS-PAGE gel for loading control.

0.019~0.084  $\mu\text{g mg}^{-1}$ 이 발현됨을 알 수 있었다(Nida *et al.* 1996). MON1445 표준물질(AOCS 0804-B2, seed powder)도 이번 연구에서 5종의 항체 모두 검출이 가능하였으며 향후 LMO 현장조사에서 수집되는 면화 조직 시료를 이용한 분석에서도 항체 검출 한계 분석이 필요할 것으로 사료된다(Lane 5 in Fig. 3). 또한 LM 콩에서 발현되는 CP4 EPSPS 단백질 연구 결과에 따르면 74개의 서로 다른 조건에서 평균 124  $\mu\text{g g}^{-1}$  dw의 단백질 발현이 확인되어 LMO 모니터링에서 발견되는 의심 시료를 분석하는 데 충분한 양의 CP4 EPSPS가 면화 및 콩에 발현되고 있음을 알 수 있었다(Chinnadurai *et al.* 2018).

본 연구에서는 국내 승인된 69종의 LM 작물 내 도입된 단백질을 조사하였으며 그중 제초제저항성 단백질을 CP4 EPSPS 단백질 항체를 개발하였다. 국내 환경에 유출된 LMO는 유전자 전이 등 생태계교란의 잠재적 위협으로 '유전자변형생물체 국가간 이동 등에 관한 법률'에 따라 사후관리 중에 있다. LMO 현장조사 시 조사원이 쉽게 LMO 여부를 판별할 수 있는 기본적인 검사법으로 간이면역 검사키트가 활용되고 있지만 대부분 수입에 의존하고 있어 국산화 노력이 필요하다. 본 연구에서는 고효율의 CP4 EPSPS 항체 5종을 개발하였으며 향후 LMO 모니터링 의심시료 현장 분석을 위한 항체 기반 LMO 검출기술 개발에 활용될 것이다. 또한 다양한 LMO 도입단백질 항체 확보를 통해 검사키트 상용화 및 고도화 노력이 향후 요구된다.

## 적 요

*Agrobacterium tumefaciens* strain CP4 유래 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) 유전자를 포함하는 유전자변형생물체(Living modified organism, LMO)가 개발되었다. 이 같은 LMO는 국내 승인되어 사료용, 식품용, 가공용으로 이용 중이다. 간이면역 검사키트 개발을 위해서는 고효율의 단백질 항체 개발이 필수적이다. 본 연구에서는 대장균 BL21 (DE3)에서 재조합 CP4 EPSPS 단백질을 정제하였으며 SDS-PAGE와 MALDI-TOF MS 분석으로 단백질 특성을 분석하였다. 단백질 항체 제작은(주)엡클론의 SOP 매뉴얼에 따라 진행하였다. 본 연구 결과 5개의 단백질 항체 클론(2F2, 4B9, 6C11, 10A9, 10G9)를 확보하였다. 5종의 단백질 항체의 효율과 특이도 검정을 위

해서 LM 면화 추출액을 이용한 western blotting 분석을 실시하였다. 모든 단백질 항체는 CP4 EPSPS를 함유하는 MON1445와 MON88913을 특이적으로 검출하였으며 비변형 면화 및 타종의 LM 면화에서는 검출되지 않았다. 이러한 결과들을 바탕으로 CP4 EPSPS 단백질 항체는 LMO에 함유된 CP4 EPSPS 단백질을 타겟으로 항체 기반 검출법 개발에 활용될 것으로 사료된다.

## 사 사

본 연구는 환경부 재원으로 NIE-법정연구-2021-06 지원을 받아 수행하였습니다.

## REFERENCES

- Apiratmateekul N, P Phunpae and W Kasinrer. 2009. A modified hybridoma technique for production of monoclonal antibodies having desired isotypes. *Cytotechnology* 60:45-51.
- Balasubramani G, KP Raghavendra, J Das, R Kumar, HB Santosh, J Amudha, S Kranthi and KR Kranthi. 2021. Critical evaluation of GM cotton. pp. 351-410. In: *Cotton Precision Breeding* (Rahman M, Y Zafar and T Zhang eds.). Springer. Cham, Germany.
- Center for Environmental Risk Assessment and ILSI Research Foundation. 2011. A review of the environmental safety of the CP4 EPSPS protein. *Environ. Biosafety Res.* 10:5-25.
- Chinnadurai P, D Stojšin, K Liu, GE Frierdich, KC Glenn, T Geng, A Schapaugh, K Huang, AE Deffenbaugh, ZL Liu and LA Burzio. 2018. Variability of CP4 EPSPS expression in genetically engineered soybean (*Glycine max* L. Merrill). *Transgenic Res.* 27:511-524.
- Della-Cioppa G, SC Bauer, BK Klein, DM Shah, RT Fraley and GM Kishore. 1986. Translocation of the precursor of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate into chloroplasts of higher plants in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:6873-6877.
- Edholm ES, M Wilson and E Bengten. 2011. Immunoglobulin light (IgL) chains in ectothermic vertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* 35:906-915.
- Funke T, Y Yang, H Han, M Healy-Fried, S Olesen, A Becker and E Schönbrunn. 2009. Structural basis of glyphosate resistance resulting from the double mutation Thr<sup>97</sup> → Ile and Pro<sup>101</sup> → Ser in 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 284:9854-9860.
- KBCH. 2021. Korea Biosafety Clearing House. Korea Research

- Institute of Bioscience and Biotechnology. Daejeon, Korea. Retrieved from <http://biosafety.or.kr/> (accessed on 1 Oct 2021).
- Kwak BY, SH Ko, CW Park, DY Son and DH Shon. 2003. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for glyphosate-tolerant soybeans. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35:366–372.
- Li Z, HYu, Y Hu, S Shi, Y Liu, Y Duan, X Li, Y Wang and Q Li. 2013. Preparation and analysis on biological characteristics of monoclonal antibodies against CP4-EPSPS for sandwich ELISA. *Biotechnol. Bull.* 4:206–209.
- Morisset D, D Štebih, M Milavec, K Gruden and J Žel. 2013. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR. *PLoS One* 8:e62583.
- Nelson PN, GM Reynolds, EE Waldron, E Ward, K Giannopoulos and PG Murray. 2000. Monoclonal antibodies. *Mol. Pathol.* 53:111–117.
- Nida DL, KH Kolacz, RE Buehler, WR Deaton, WR Schuler, TA Armstrong, ML Taylor, CC Ebert, GJ Rogan, SR Padgett and RL Fuchs. 1996. Glyphosate-tolerant cotton: Genetic characterization and protein expression. *J. Agric. Food Chem.* 44:1960–1966.
- NIE. 2020a. Study on Environmental Monitoring and Post-management of LMO. National Institute of Ecology. Seocheon, Korea.
- NIE. 2020b. Establishment of Detection Method for LMO. National Institute of Ecology. Seocheon, Korea.
- Padgett SR, KH Kolacz, X Delannay, DB Re, BJ LaVallee, CN Tinius, WK Rhodes, YI Otero, GF Barry, DA Eichholtz, VM Peschke, DL Nida, NB Taylor and GM Kishore. 1995. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci.* 35:1451–1461.
- Renz B, JK Davies, D Carling, H Watkins and C Redwood. 2009. Determination of AMP-activated protein kinase phosphorylation sites in recombinant protein expressed using the pET28a vector: A cautionary tale. *Protein Expr. Purif.* 66:181–184.
- Sharon E, J Juye and M Jack. 2019. The effects of acculturative stress, intergenerational conflict, and negative mood regulation expectancies of the mental health of Korean immigrants. *Asian J. Fam. Ther.* 3:1–27.
- Webster J and D Oxley. 2012. Protein identification by MALDI-TOF mass spectrometry. pp. 227–240. In: *Chemical Genomics and Proteomics* (Zanders ED, ed.). Springer, London.
- Zeng H, Q Yang, H Liu, G Wu, W Jiang, X Liu, J Wang and X Tang. 2021. A sensitive immunosensor based on graphene-PAMAM composites for rapid detection of the CP4-EPSPS protein in genetically modified crops. *Food Chem.* 361: 129901.