

**해양한국발전프로그램(KSGP)연구개발사업
연구 보고서**

**유전자변형 해양생물체 검색기술 개발
(Detection of living modified marine organism)**

2004. 5. 21.

군산대학교 SG연구사업단

해 양 수 산 부

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “유전자변형 해양생물체 검색기술 개발”과제의 보고서로 제출합니다.

2004. 5. 21.

주관연구기관명 : 군산대학교

주관연구책임자 : 최 상 훈

연 구 원 : 최 민 순

연 구 원 : 채 준 석

최종(단계)보고서 초록

과제관리번호		해당단계 연구기간	2003,5,22- 2004,5,21	단계 구분	(해당단계)/(총단계)
연구사업명	※ 지원대상 분야 기제(2003년도 해양한국발전프로그램<KSGP>지원과제				
연구과제명	수입예상 유전자변형 해양생물체 검색기술 개발				
연구책임자	최 상훈	해당단계 참여연구원수	총 : 9 명 내부 : 5 명 외부 : 4 명	해당단계 연구비	정부: 448,00 천원 대학: 천원 계: 448,00 천원
연구기관명 및 소속부서명	군산대학교 해양과학대학		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국 연구기관명 :		
위 탁 연 구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	47
<p>수입예상 유전자변형 해양생물체 검색기술 개발을 위하여 PCR 법과 실시간 TaqMan PCR 법을 이용하여 유전자변형 잉어, 틸라피아, 송사리 그리고 은연어 검출법을 개발하였다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 유전자변형 잉어를 검출하기 위한 PCR primer와 probe는 RSV-F/R과 RSV-P를 제작하였으며, 양성대조로 pGEM-Teasy/RSV 벡터를 개발하였다. 유전자변형 틸라피아를 검출하기 위한 PCR primer와 probe는 AFP-F/R과 AFP-P를 제작하였으며, pGEM-Teasy/AFP 벡터를 개발하였다. 유전자변형 송사리를 검출하기 위한 PCR primer와 probe는 MetA-F/R과 MetA-P를 제작하였으며, 양성대조로 pGEM-Teasy/MetA 벡터를 개발하였다. 유전자변형 은연어를 검출하기 위한 PCR primer와 probe는 MtB-F/R과 MtB-P를 제작하였으며, 양성대조로 pGEM-Teasy/MtB 벡터를 개발하였다. 2. 내재유전자의 검출을 위한 PCR primer와 probe는 잉어는 CCβ-act-F/-R과 CCβ-act-P, 틸라피아는 ONβ-act-F/-R과 ONβ-act-P, 송사리는 OLβ-act-F/-R과 OLβ-act-P를 제작하였으며, 은연어는 CScyt-F/-R과 CScyt-P를 제작하였다. 3. 내재유전자의 검출을 위한 양성대조로 pGEM-Teasy/CCβ-act, pGEM-Teasy/ONβ-act, OLβ-act 그리고 pGEM-Teasy/CScyt 벡터를 개발하였다. 4. 목표유전자와 내재유전자 단편이 모두 삽입된 pGEM-Teasy/RSV-CCβ-act, pGEM-Teasy/AFP-ONβ-act, pGEM-Teasy/MetA-OLβ-act 그리고 pGEM-Teasy/MtB-CScyt 벡터를 개발하였다. 5. 이들 primer set와 probe를 이용하여 정성검사를 할 수 있는 PCR 조건과 실시간 TaqMan PCR 법을 확립하였다. 두 검사법의 민감도를 비교하여 보았을 시 일반 PCR 법 보다 실시간 TaqMan PCR 법이 약 1,000배 정도의 민감도가 높은 것으로 나타났다. 6. 이상의 결과로 보아 본 연구에서 개발한 유전자변형 해양생물체 검색기술을 실용화 할 수 있을 것으로 본다. 					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	유전자변형 해양생물체, 잉어, 틸라피아, 송사리, 은연어			
	영 어	Living modified organism, Common carp, Tilapia, Medaka, Coho salmon			

요 약 문

I. 제 목

수입예상 유전자변형 해양생물체 검색기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

수산물의 안정성 증대와 평가기술 개발 일환과 유전자 재조합 어류(genetically modified fish; GM fish)의 경우 유해성 논란이 있으나 아직 정확히 입증 된 바가 없다. 그러나 소비자의 불신과 거부반응으로 인해 대책이 요구되고 있으며, 자연계에 방출되었을 시 예기치 못한 환경의 파괴에 대한 안전성 문제의 해결을 위하여 ‘생명공학안전성 의정서(Cartagena Protocol on Biosafety)’가 몬트리올에서 2002년 1월에 채택되어 유전자변형생물체의 ‘국가간 이동등에 관한 법률’(2001. 3)을 제정하게 되었다. 이 법률의 발효에 대비하여 어류의 유전자 변형생물체(living modified organism; LMO) 검출법을 개발하는데 본 연구의 목적이 있으며, 수산물품질관리법시행령 제19조 및 제20조의 규정에 의하여 유전자변형수산물의 표시대상 품목 및 표시요령의 제정에 따라 유전자변형수산물(Living modified fish; LM fish)의 시료검정을 원활히 수행하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

유전자변형수산물에 있어서는 아직 그 검정법이 확립되지 않았으며, 공식적인 국제 표준화된 방법이 개발되어 있지 않다. 따라서 우선적으로 유전자변형 수산물의 표시대상 품목 및 표시요령의 제2조(표시대상품목) 영 제19조의 규정에 의한 유전자변형수산물을 표시하여야 한다. 따라서 현재 개발 중인 잉어(영명: Common carp, 학명: *Cyprinus carpio*), 틸라피아(영명: Tilapia, 학명: *Oreochromis niloticus*), 송사리(영명: Medaka, 학명: *Oryzias latipes*) 그리고 은연어(영명: Coho salmon, 학명: *Oncorhynchus kisutch*)를 대상으로 PCR 및 실시간(real-time) 정량 TaqMan PCR법을 이용한 검출 방법을 연구하였다.

본 연구에서 재료 및 방법으로서 시료, 시료의 전처리, 유전자 추출 및 정제, DNA 순도 및 농도확인, 정성검사, 정량검사 그리고 유전자변형 해양생물체 검출을 위한 사전 준비에 대하여 연구하였으며, 연구결과로서 유전자 변형한 잉어, 틸라피아, 송사리 그리고 은연어를 검출하기위한 PCR 법과 real-time TaqMan PCR 법 그리고 유전자변형생물체 검출을 위한 모델시스템에 관하여 연구하였다.

IV. 연구개발결과

수입예상 유전자변형 해양생물체 검색기술 개발을 위하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)법과 실시간 TaqMan PCR법을 이용하여 유전자변형 잉어(영명:

Common carp, 학명: *Cyprinus carpio*), 틸라피아(영명: Tilapia, 학명: *Oreochromis niloticus*), 송사리(영명: Medaka, 학명: *Oryzias latipes*) 그리고 은연어(영명: Coho salmon, 학명: *Oncorhynchus kisutch*) 검출법을 개발하였다.

유전자변형 잉어를 검출하기 위한 PCR primer와 probe는 RSV-F/R과 RSV-P를 제작하였으며, 양성대조로 pGEM-Teasy/RSV 벡터를 개발하였다. 유전자변형 틸라피어를 검출하기 위한 PCR primer와 probe는 AFP-P/R과 AFP-P를 제작하였으며, pGEM-Teasy/AFP 벡터를 개발하였다. 유전자변형 송사리를 검출하기 위한 PCR primer와 probe는 MetA-F/R과 MetA-P를 제작하였으며, 양성대조로 pGEM-Teasy/MetA 벡터를 개발하였다. 유전자변형 은연어를 검출하기 위한 PCR primer와 probe는 MtB-F/R과 MtB-P를 제작하였으며, 양성대조로 pGEM-Teasy/MetA 벡터를 개발하였다.

내재유전자의 검출을 위한 PCR primer와 probe는 잉어는 $CC\beta$ -act-F/-R과 $CC\beta$ -act-P, 틸라피어는 $ON\beta$ -act-F/-R과 $ON\beta$ -act-P, 송사리는 $OL\beta$ -act-F/-R과 $OL\beta$ -act-P, 은연어는 CScyt-F/-R과 CScyt-P를 제작하였다.

내재유전자의 검출을 위한 양성대조로 pGEM-Teasy/ $CC\beta$ -act, pGEM-Teasy/ $ON\beta$ -act, pGEM-Teasy/ $OL\beta$ -act 그리고 pGEM-Teasy/CScyt 벡터를 개발하였다.

또한 목표유전자와 내재유전자 단편이 모두 삽입된 pGEM-Teasy/RSV- $CC\beta$ -act, pGEM-Teasy/AFP- $ON\beta$ -act, pGEM-Teasy/MetA- $OL\beta$ -act 그리고 pGEM-Teasy/MtB-CScyt 벡터를 개발하였다.

이들 primer set와 probe를 이용하여 정성검사를 할 수 있는 PCR 조건과 real-time TaqMan PCR 법을 확립하였다. 두 검사법의 민감도를 비교하여 보았을 시 일반 PCR 법 보다 real-time TaqMan PCR 법이 약 1,000배 정도의 민감도가 높은 것으로 나타났다. 이상의 결과로 보아 본 연구에서 개발한 유전자변형 해양생물체 검색기술을 실용화 할 수 있을 것으로 본다.

V. 연구개발결과의 활용계획

유전자변형 해양생물체의 국가간의 이동시 검역 또는 해양생물체가 포함된 식품 등에서 유전자변형 해양생물체가 포함이 되어 있는지에 관한 여부를 판정 할 때 본 연구에서 개발한 방법을 활용할 계획이다.

VI. 기대효과

현재 유전자변형 해양생물체가 공식적으로 유통이 되고 있지 않으므로 양성대조를 구할 수 없어 어려움이 있었으나 양성대조로 사용할 수 있는 클론을 제작하였으며, PCR 법으로 유전자변형 생물체를 검출 할 수 있는 모델과 유전자변형 잉어, 틸라피아, 송사리 그리고 은연어에 대하여 검색할 수 있는 방법으로 이용할 수 있을 것으로 기대한다.

S U M M A R Y

Detection of living modified marine organism

A conventional PCR and real-time TaqMan PCR with TaqMan system-based assay for the identification of living modified (LM) Common carp (*Cyprinus carpio*), Tilapia (*Oreochromis niloticus*), Medaka (*Oryzias latipes*) and Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) carrying antifreeze protein or growth hormone transgenes were developed.

A pair of PCR primer and probe, RSV-F/R and RSV-P were designed, and pGEM-Teasy/RSV vector as positive control was constructed for detection of living modified (LM) Common carp. A pair of PCR primer and probe, AFP-P/R and AFP-P were designed, and pGEM-Teasy/AFP vector as positive control was constructed for detection of LM Tilapia. A pair of PCR primer and probe, MetA-F/R and MetA-P were designed, and pGEM-Teasy/MetA vector as positive control was constructed for detection of LM Medaka. A pair of PCR primer and probe, MtB-F/R and MtB-P were designed, and pGEM-Teasy/MtB vector as positive control was constructed for detection of LM Coho salmon. Four pair of PCR primers and probes, CC β -act-F/-R and CC β -act-P for Common carp, ON β -act-F/-R and ON β -act-P for Tilapia, OL β -act-F/-R and OL β -act-P for Medaka, and CScyt-F/-R and CScyt-P for Coho Salmon were designed from endogenous gene.

For detection of endogenous gene from Common Carp, Tilapia, Medaka and Coho salmon, pGEM-Teasy/CC β -act, pGEM-Teasy/ON β -act pGEM-Teasy/OL β -act vectors and pGEM-Teasy/CScyt vectors as positive control were constructed, respectively. A target and endogenous genes were inserted a vector for using positive control, pGEM-Teasy/RSV-CC β -act for Common carp, pGEM-Teasy/AFP-ON β -act for Tilapia, pGEM-Teasy/MetA-OL β -act for Medaka and pGEM-Teasy/MtB-CScyt for Coho salmon.

Conventional and real-time TaqMan PCR methods were optimized for detection of LM Common carp, Tilapia, Medaka and Coho salmon. The real-time TaqMan PCR method has 1,000 times better sensitivity than conventional PCR.

The application of a qualitative and a quantitative method of analysis to detect transgenic DNAs in LM fishes is tried. The use of the ABI Prism 7700 sequence detection system allowed the determination of the amplified product accumulation through a fluorogenic probe. The methods of analyses proved to be very sensitive and specific in regard to the Common carp, Tilapia, Medaka and Coho salmon checked. It is necessary to determine the LM fishes in order to assess whether living modified marine organisms were deliberately added, or whether they were caused by contamination.

C O N T E N T S

I. Outline of research project	1
II. Present states of research in domestic and foreign countries	2
III. Contents of research and results	3
1. Materials and methods	3
A. Samples	3
a. Selection of samples	3
b. Information of samples	3
c. Store of samples	3
d Examination of samples	3
e. Storage and discard	3
B. Preparation of samples	4
a. Equipments	4
b. Washing and grinding of samples	4
c. Volume of samples for test	4
C. DNA extraction and purification	4
a. Equipments	4
b. Solutions	4
D. Purity and concentration of DNA	5
a. Equipments	5
b. Using electrophoresis	5
c. Using spectrophotometer	6
E. Qualitative analysis	7
a. Equipments	7
b. Solutions	7
c. Methods	8

d. Managements of results	8
F. Quantitative analysis	8
a. Equipments	9
b. Solutions	9
c. Methods	9
d. Managements of results	9
G. Preparation for detection of LMO	10
a. Analyses of nucleotide sequences	10
b. Design of PCR primers and probe for amplification of target gene fragment from LMO	11
c. Design of PCR primers and probe for amplification of endogenous gene fragment from LMO	13
d. Cloning of target gene	15
2. Results	25
A. Common carp	25
B. Tilapia	28
C. Medaka	31
D. Coho salmon	31
E. Model system for detection of living modified marin organism	34
3. Discussion	38
4. Conclusion	39
IV. Achievement of goal and contribution of related fields	41
V. Application plan of research results	42
VI. Scientific information of foreign countries in the research period	43
VII. References	44

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	1
제 2 장 국내외 연구개발 현황	2
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	3
제 1 절 재료 및 방법	3
1. 시료	3
가. 시료 선택	3
나. 시료 접수	3
다. 시료 보관	3
라. 시료 검정	3
마. 시료 보관 및 폐기	3
2. 시료의 전처리	4
가. 기기 장비	4
나. 시료의 세정 및 분쇄	4
다. 분석용 시료 채취 및 사용량	4
3. 유전자 추출 및 정제	4
가. 기기 및 장비	4
나. 시약 및 완충용액	4
4. DNA 순도 및 농도 확인	5
가. 기기 및 장비	5
나. 전기영동 이용법	5
다. 분광광도계 이용법	6
5. 정성검사	7
가. 기기 및 장비	7
나. 시약 및 준비물	7
다. 실험방법	8
라. 검정결과의 판정 및 처리	8
6. 정량검사	8

가. 기기 및 장비	9
나. 시약 및 준비물	9
다. 실험방법	9
라. 검정결과의 판정 및 처리	9
7. 유전자변형 해양생물체 검출을 위한 사전준비	10
가. 염기서열분석	10
나. 유전자변형 해양생물체 검출을 위한 목표유전자의 PCR primer set 및 probe 설계	11
다. 해양생물체 내재유전자의 증폭을 위한 PCR primer set 및 probe 설계	14
라. 목표 유전자 클로닝	17
제 2 절 연구결과	29
1. 잉어	29
2. 틸라피아	28
3. 송사리	31
4. 은연어	31
5. 유전자변형생물체 검출을 위한 모델시스템	34
제 3 절 고찰	38
제 4 절 결론	39
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	41
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	42
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	43
제 7 장 참고문헌	44

제 1 장 연구개발과제의 개요

수산물의 안정성 증대와 평가기술 개발 일환과 유전자 재조합 어류(genetically modified fish; GM fish)의 경우 유해성 논란이 있으나 아직 정확히 입증된 바가 없다. 그러나 소비자의 불신과 거부반응으로 인해 대책이 요구되고 있으며, 자연계에 방출되었을 시 예기치 못한 환경의 파괴에 대한 안전성 문제의 해결을 위하여 '생명공학안전성 의정서(Cartagena Protocol on Biosafety)'가 몬트리올에서 2002년 1월에 채택되어 유전자변형생물체의 '국가간 이동등에 관한 법률'(2001. 3)을 제정하게 되었다. 이 법률의 발효에 대비하여 어류의 유전자 변형생물체(living modified organism; LMO) 검출법을 개발하는데 본 연구의 목적이 있으며, 수산물품질관리법시행령 제19조 및 제20조의 규정에 의하여 유전자변형수산물의 표시대상 품목 및 표시요령의 제정에 따라 유전자변형수산물(Living modified fish; LM fish)의 시료검정을 원활히 수행하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

최근에 유전자변형생물체의 검정방법으로는 유전자증폭방법(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 생물체에 도입된 유전자를 확인하는 방법과 항원항체반응법을 이용한 생물체에 도입된 유전자에 의해 발현되는 단백질을 확인하는 방법 등을 들 수 있다. 현재 유전자 변형농산물에 대한 검정으로서 PCR 키트와 단백질검출 키트 등이 개발되어 이용되고 있으나, 아직 국제적으로 표준화가 되어 있지는 않지만 실제적으로 많은 국가에서 PCR을 이용한 유전자분석방법과 항원항체반응을 이용한 단백질분석방법을 채택하여 유전자변형농산물 또는 유전자변형농산물이 함유된 식품 등에 있어서 정성 및 정량검사에 활용하고 있다.

유전자변형수산물에 있어서는 아직 그 검정법이 확립되지 않았으며, 공식적인 국제 표준화된 방법이 개발되어 있지 않다. 따라서 우선적으로 유전자변형 수산물의 표시대상 품목 및 표시요령의 제2조(표시대상품목) 영 제19조의 규정에 의한 유전자변형수산물은 표시를 하여야 한다. 따라서 현재 개발 중인 잉어(영명: Common carp, 학명: *Cyprinus carpio*), 틸라피아(영명: Tilapia, 학명: *Oreochromis niloticus*), 송사리(영명: Medaka, 학명: *Oryzias latipes*) 그리고 은연어(영명: Coho salmon, 학명: *Oncorhynchus kisutch*) 를 대상으로 PCR 및 실시간(real-time) 정량 TaqMan PCR법을 이용한 검출 방법을 연구하였다.

본 연구에서는 시료의 전처리, 유전자 추출 및 정제, DNA 순도 및 농도확인, 정성 및 정량 검사 그리고 LMO fish 검출을 위한 사전 준비에 대하여 기술하였으며, 연구결과로서 유전자 변형 잉어, 틸라피아, 송사리 그리고 은연어를 검출하기위한 PCR 법과 real-time TaqMan PCR 법 그리고 유전자변형어체 검출을 위한 모델시스템에 관하여 설명하였다.

제 2 장 국내외 연구개발 현황

현재 수산생물에 대한 유전자변형 생물체로는 미국을 비롯한 8개국에서 5개 어종(연어, 무지개 송어, 틸라피아, 잉어, 메다카)이 개발 중에 있으며(Rancourt *et al.*, 1987; Rancourt *et al.*, 1990; Bayer *et al.*, 1992; Du *et al.*, 1992; Hew *et al.*, 1992; Ozato *et al.*, 1992; Sato *et al.*, 1992; Chan *et al.*, 1993; Hanley *et al.*, 1998; Hew *et al.*, 1999; Rahman *et al.*, 1997; Rahman *et al.*, 1998; Rahman *et al.*, 2001; Masri *et al.*, 2002; Hartmut *et al.*, 2002; Tiina *et al.*, 1999; Maclean *et al.*, 2002; Aleksei *et al.*, 1999; Stevens *et al.*, 1999; Elwood *et al.*, 1999; Tsukasa *et al.*, 1999; Nathan *et al.*, 2002), 우리나라에서는 미꾸라지와 잉어를 개발 하였다(김 등, 1995; 김 등, 1999; 김 등, 2000; 김 등, 2000; 김 등, 2001; 김 등, 2002). 그러나 아직까지 식품으로는 상업적으로 유통은 되지 않고 있으나 앞으로 LMO 수산생물체가 국내 유통뿐만이 아니라 국가간에 이동이 있을 것으로 전망되고 있다. 따라서 앞으로 국내 및 국외에서 점차 유전자 재조합 어류의 개발과 상품화에 따른 국내수입 및 수출 과정 중 유전자 변형 유무 판별이 요구될 것으로 기대되며, LMO 어류의 인체 위해성이 불분명한 현시점에서 수입 어류에 대한 안전성 확보에 문제점이 노출될 것으로 보고 있다. 또한 우리나라의 어류 양식시 수입종에 의존하는 비율이 높아짐에 따라 국내에서 양식한 어류의 LMO 검증의 필요성 부각되고 있으며, 유전자변형 어류의 인체 또는 환경 위해성 논란이 대두되고 있고, 소비자들은 알고 먹을 권리의 주장이 높아지고 있어 국내 유통에 대비한 검색 기술의 개발이 필요하였다.

현재 GM 농산물에 있어서는 단백질 및 변형유전자검출법이 개발되어 사용되고 있으나 유전자변형 해양생물체의 검출법은 극히 일부에서 시도 되고 있는 상황이다. 캐나다에서 2002년도에 유전자변형 은연어(Coho salmon)의 검출을 위한 일반 PCR 법에 관하여 보고된 바가 있으며(Masri *et al.*, 2002), 기타의 유전자변형 해양생물체의 검색을 위한 실시간 TaqMan PCR 법은 채 등(2003)이 유전자변형 대서양연어를 상대로 검출법을 보고한 바 있다. 따라서 본 연구에서 잉어, 틸라피아, 송사리 그리고 은연어에 대해 LM 해양생물체인지에 대한 conventional PCR 및 실시간 TaqMan PCR 검색법을 개발하였다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 재료 및 방법

1. 시료

가. 시료 선택

- (1) 시판 또는 수출입 수산물 또는 수산물이 혼입된 식품으로부터 유전자변형수산물인지의 여부를 확인하기 위한 검정의뢰용 시료는 무작위 표본추출하고, 추출한 시료는 냉동 또는 냉장 상태로 실험실로 운반한다.
- (2) 시료를 수집시에는 튜브 또는 지퍼팩을 이용하여 오염되지 않도록 해야 하며, 반드시 시료 채취일시 및 채취자 성명, 소유자 성명, 상호 및 주소, 수산물의 이름, 원산지 또는 수입국 등을 기록하여야 한다.

나. 시료 접수

- (1) 시료 선택과 수송이 적절하다고 판단된 시료는 시료접수 및 검정 대장에 다음과 같은 항목을 기록한다. 접수번호, 접수일자, 의뢰기관, 수산물 품목, 시료번호, 시료 채집시의 기록지(시험검사 의뢰서)를 첨부하여 보관하여야 한다.

다. 시료 보관

검정의뢰용 시료는 검정용 시료와 보관용 시료로 구분하여 동일한 시료번호를 부여하여 시험에 이용하고, 보관용은 냉동 보관 또는 70 %의 알콜용액에 넣어 실온에서 보관한다.

라. 시료 검정

시료의 검정은 시료의 전처리, 정성검사 또는 정량검사 및 결과해석 과정 순으로 분석하며, 세부 사항은 다음에 기술하였다.

마. 시료 보관 및 폐기

- (1) 접수된 검정용 시료 중 검사용 시료는 시료의 전처리 과정에 따라 처리하고, 남은 시료는 검정결과 통보서 발급일로부터 한 달간 -20°C 이하의 냉동고 또는 70%의 알콜용액에 넣어 실온에서 보관한다.
- (2) 보관용 시료는 시료 번호를 기록한 표지로 봉인한 후, -20°C 이하의 시료보관 냉동

고에 검정결과 통보서 발급일로부터 6개월간 보관한다.

(3) 보관이 경과한 시료는 폐기처분한다.

2. 시료의 전처리

가. 기기 및 장비

분쇄기(mill), 저울(balance), 냉동고(freezer), 피펫세트 등

나. 시료의 세정 및 분쇄

검정용 시료는 멸균증류수로 2 또는 3회 세정을 실시하고 킴와이프스 등으로 물기를 제거한 후 실험에 사용할 적당한 부위(근육)로부터 20g의 조직을 적출하여 분쇄기에 넣어 미세하게 분쇄한다.

다. 분석용 시료 채취 및 사용량

분쇄된 시료로부터 분석용 시료는 100 mg씩 2점을 채취하여 각각 멸균된 1.5 ml 튜브에 옮긴다.

3. 유전자 추출 및 정제

유전자 추출 방법에는 다양한 방법이 있으나 유전자변형수산물의 검정을 위한 가장 간단하면서 정확한 상품화된 DNA 추출 키트를 이용한 방법을 사용하는 것이 표준화하는데 쉬울 것으로 생각하며, 자동화기기를 이용하면 더욱 편리하고 한번에 다량의 시료를 처리 할 수 있으며, 실험자에 대한 오차를 줄일 수 있어서 가장 표준화된 방법으로 정확한 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대한다.

가. 기기 및 장비

미량원심분리기(microcentrifuge), 고압증기멸균기(autoclave), 항온수조(water bath), 무균작업대(clean banch), 피펫세트 등

나. 시약 및 완충용액

(1) Silicagel membrane 법

(가) Silicagel membrane 이용 DNA 추출 Kit : Qiagen사의 DNeasy tissue kit 이용

(나) 그 외에 TE buffer(10 mM Tris-HCl(pH8.0), 1 mM EDTA, Isopropanol, 70% Ethanol, 멸균 증류수 등

(2) CTAB(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide)법

(가) 완충용액

① DNA 추출용액(extraction buffer)

증류수 500 ml에 Sorbitol 63.75g, Tris-base 12.1g, EDTA-Na₂ 1.68 g을 넣고 완전히 용해한 후 증류수로 1ℓ가 되도록 맞춘 후 고압멸균하여 사용한다.

② Nuclei lysis buffer

20 g의 CTAB을 200 ml의 증류수에 완전히 용해한 후 200 ml의 1M Tris(pH8.0), 200 ml의 0.25M EDTA, 400 ml의 5M NaCl을 넣은 후 고압멸균하여 사용한다.

③ Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol = 25 : 24 : 1(V/V) 혼합용액을 사용한다.

④ Chloroform : Isoamyl alcohol = 24 : 1(V/V) 혼합용액을 사용한다.

⑤ 70% 에탄올

⑥ 멸균증류수 : 정제한 2, 3차 증류수를 121℃에서 20분간 고압멸균하여 사용한다.

4. DNA 순도 및 농도 확인

변형유전자 검색을 위한 PCR 법은 DNA의 순도와 농도에 따라 그 결과는 매우 다르게 나타날 수 있다. 추출하는 방법과 과정 및 사용되는 시약 그리고 개발된 키트들이 매우 다양하며 또한 실험자의 숙련도에 따라 추출된 DNA의 순도와 농도는 많은 차이를 나타낸다. 따라서 첫째 DNA의 순도가 깨끗한 것을 사용하여야 실험의 결과에 대한 신뢰도가 있으며, 둘째 정확한 양의 DNA를 사용하여야 실험결과에 대한 해석에 있어서 일관된 결과를 얻을 수 있다. 따라서 추출된 DNA에 대한 순도 및 농도는 반드시 측정하여 그에 알맞은 순도가 높은 DNA와 적당한 용량의 DNA를 실험에 사용하여야 한다. 추출된 DNA의 순도 및 농도의 확인 방법으로는 아가로스 겔을 이용한 전기영동법과 자외선을 이용한 분광광도계법을 사용하고 있다.

가. 기기 및 장비

전기영동장치(electrophoresis system), UV/VIS 분광광도계(spectrophotometer), 전자렌지(microwave), 겔 이미지 영상장치(Gel documentation system)

나. 전기영동 이용법

(1) 시약 및 완충용액

(가) TAE buffer(50배 농축용액)

Tris base 242 g, Glacial acetic acid 57.1 ml, 0.5M EDTA(pH8.0) 100ml를 넣고 완전히 용해한 후 증류수로 1ℓ를 맞춘다. 전기영동시 1×TAE로 희석하여 이용한다.

(나) 전기영동 겔 loading buffer(6배 농축용)

최종농도가 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 15% Ficoll이 되도록 혼합한다.

(다) Ethidium bromide 농축액 : 10 mg/ml로 갈색병 또는 차광 보관한다.

(라) 2% agarose gel

Agarose 2 g을 1×TAE buffer 100 ml에 넣고 전자렌지로 가열하여 녹인 다음 60℃ 정도가 되면 겔 트레이에 부어 굳힌다.

(2) 분석방법

(가) PCR로부터 얻어진 DNA 10 μl에 전기영동용 loading buffer 1 μl를 혼합하여 1% agarose gel 에 loading 한 후 150 volt 전압으로 20~40분 동안 전기영동을 실시한다.

(나) Gel loading dye의 BPB(Bromophenol Blue)가 gel의 2/3 정도까지 진행되면 전기영동을 멈추고 UV 조사기(transilluminator) 위에 겔을 올려 CCD(또는 폴라로이드) 카메라 등으로 촬영하고 화상데이터로 보존한다.

다. 분광광도계 이용법

(1) 기기 및 장치

UV/VIS 분광광도계(spectrophotometer) 또는 GenQuant Pro, UV cell

(2) 분석방법

(가) 원액 DNA를 멸균증류수로 적당히 희석하여 260 nm에서의 흡광도(O.D.)를 측정한다.

(나) 분광광도계를 이용하여 230 nm, 260 nm, 280 nm에서의 흡광도를 측정하여, 260/280 nm에서의 흡광도 비율이 1.8이고 260/230 nm에서의 흡광도 비율이 2이면 가장 이상적인 순도이나 실제적으로 양자의 비율이 1.5이상이면 PCR 분석에 이용 가능하다.

(다) 260 nm에서의 흡광도가 1일 때의 DNA 농도는 50 ng/μl이므로 추출한 DNA의 농도계산은 아래와 같다.

$$* \text{DNA 농도}(\text{ng}/\mu\text{l}) = 260 \text{ nm에서의 흡광도} \times 50 \times \text{희석배수}$$

(라) 원액 DNA를 PCR분석에 적당한 농도인 20 ng/μl가 되도록 멸균증류수로 희석하여 PCR용 DNA로 사용하며 -20℃ 이하에서 보관한다.

(마) 원액 DNA의 농도가 PCR에 필요한 농도보다 낮을 경우에는 원액 DNA를 그대로 이용한다.

5. 정성검사

중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)법을 이용한 정성검사법으로서 유전자변형수산물의 도입된 유전자의 단편을 프라이머를 이용하여 증폭시킨 후 아가로스 겔 전기영동을 실시하여 증폭된 유전자 단편의 유무를 확인하는 방법이다.

가. 기기 및 장비

전기영동장치(electrophoresis system), 전자렌지(microwave), 젤 이미지 영상장치(Gel documentation system)

나. 시약 및 준비물

(1) PCR buffer(10×PreMix)

2.5 mM dNTPs, 20 mM Tris-HCl(pH 9.0), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 25 mM MgCl₂

(2) Taq DNA Polymerase

시판되는 Taq DNA Polymerase (5 U/μl)를 사용한다.

(3) Primer

자체 제작된 primer를 사용하며, 농도는 100 ng/μl를 사용한다.

(4) TAE Buffer(50배 농축용)

Tris base 242 g, Glacial acetic acid 57.1 ml, 0.5M EDTA(pH8.0) 100 ml를 넣고 완전히 용해한 후 증류수로 1 ℓ를 맞춘다. 전기영동시 1×TAE로 희석하여 이용한다.

(5) 전기영동 겔 loading buffer(6배 농축용)

최종농도가 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 15%

Ficoll이 되도록 혼합한다.

(6) Ethidium bromide 농축액 : 10 mg/ml로 갈색병 또는 차광보관

(7) 2% agarose gel

Agarose 2 g을 1×TAE buffer 100 ml에 넣고 전자렌지로 가열하여 녹인 후 ethidium bromide 농축액 2 μ l 첨가하여 혼합한 후, 60°C이하로 식은 뒤 젤 트레이에 부어 굳힌다.

다. 실험방법

(1) PCR 혼합용액(master mix) 조제

1.5 ml 튜브를 준비하여 시료 1점에 대한 반응용액을 20 μ l기준(template DNA 추가량 포함)으로 PCR분석 시료수 및 대조구 수에 대한 master mix를 조제한다. PCR 전용 튜브에 PCR 혼합액(master mix)을 분주한 다음, 검사시료로부터 추출한 template DNA를 넣어 최종 20 μ l가 되도록 한다.

(2) PCR 증폭

PCR 반응은 95°C에서 10분간의 DNA 변성(denaturation) 반응 후, 95°C에서 30초, 각 primer의 annealing 온도에서 1분, 72°C에서 30초의 일련의 반응을 35~40 cycle 반복한다. 이어 72°C에서 7분간의 중합반응을 추가한 후 4°C로 냉각하여 반응을 종료한다.

라. 검정결과의 판정 및 처리

(1) 전기영동에 의한 PCR 결과 확인

PCR 산물 10 μ l에 loading buffer 2 μ l를 넣어 혼합한 후, 2% agarose gel의 well에 주입하여 150 볼트 전압으로 30분 동안 전기영동한 후, Gel loading dye의 BPB(Bromophenol Blue)가 gel의 2/3 정도 진행되면 전기영동을 멈추고, gel document system 위에 겔을 올려놓고 CCD(또는 폴라로이드) 카메라 등으로 촬영하고, DNA 분자량 마커와 비교하여 목적하는 크기의 DNA 밴드가 생성되었는지 확인한다.

(2) 결과 통보

유전자변형 해양생물체 검사에 대한 양성 인지 음성인지를 판정한 후 검사결과서를 작성하여 통보하고, 결과서에는 어느 목표유전자를 검사하였는지와 내재유전자의 검사결과 및 사진들을 첨부하여 보관한다.

6. 정량검사

유전자변형수산물의 유통과정에 있어서는 정량적 검사의 의미는 중요하지 않지만 유전자변형수산물이 가공식품 등에 혼입되었을 경우 LMO 표시제에 있어서는 몇 퍼센트의 LMO가 포함되어 있는지에 대해 알고자 할 때 중요한 검정법이다. 이러한 정량검사의 방법으로는 실시간 TaqMan PCR 법을 이용한 도입된 유전자를 확인하는 방법으로서 내재유전자를 비교로 정량적으로 검출할 수 있는 방법이다.

가. 기기 및 장비

Real-Time PCR 기기(ABI PRISM 7700 SDS), 원심분리기 등

나. 시약 및 준비물

- (1) TaqManTM Universal PCR Master Mix : Applied Biosystems(#4304437)
- (2) Primer/Probe Mix : 자체 제작된 Primer, Probe로서 농도는 Primer, Probe 각각 100uM이다.
- (3) 기타 : 반응용 tube(Applied Biosystems # N801-0933) 와 cap(Applied Biosystems # N801-0935)

다. 실험방법

- (1) TaqManTM Universal PCR Master Mix와 각 primer/probe mix를 1.25 : 1의 비율로 반응용액(master mix)를 조제하고, 3초간 vortex한 후 spin down 한 후, 각 well당 반응용액은 25 μ l(template로 사용될 DNA 포함)로 한다. 각 well의 바닥에 기포가 생기지 않도록 주의한다. 만약 기포가 well의 바닥에 있으면, 분석치가 부정확하게 된다.
- (2) 시약을 조제하기 전에 분석기기(ABI PRISMTM 7700)의 전원을 켜고 기기 control 용 Macintosh computer의 전원을 넣은 후, 기기 본체에 시료를 넣고 Thermal cycler condition의 반응조건 50 $^{\circ}$ C 2분, 95 $^{\circ}$ C 10분, 95 $^{\circ}$ C 30초, 각 샘플의 annealing 반응온도 55 $^{\circ}$ C 1분 20초에서 40 cycle를 확인한 후 기기를 작동시킨다.

라. 검정결과의 판정 및 처리

반응이 끝난 후 화면상에서 각 well의 증폭상태를 확인하여 음성과 양성을 판정한다.

Amplification plot의 threshold cycle calculation에서 Ct값이 plasmid DNA로 copy 수를 계산하여 standard serial dilution한 것과 비교를 하여 어떻게 증폭이 되었는지 확인하여 값을 결정하고, 결과서를 작성하며, 정성방법과 같이 결과서를 보관한다.

7. 유전자변형 해양생물체 검출을 위한 사전 준비

가. 염기서열분석

다양한 종류의 유전자 변형 어류에 대한 변형유전자 탐색을 위하여 최근의 발표논문들을 근거로 유전자변형 수산생물체에 이용한 목표유전자는 National Center for Biotechnology Information(NCBI)에서 제공되는 Blast (<http://www.ncbi/BLAST/>)를 통하여 유사염기서열을 추출한 후 MultAlin program(<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin.html>)을 이용하여 분석하였으며(Corpet, 1988), 분석한 데이터를 사용하여 특정부위로부터 Primer ExpressTM program(Applied Biosystem, USA)을 사용하여 PCR primer와 probe를 설계하였다(표 1).

(1) 잉어(common carp)

유전자변형 잉어(common carp, *Cyprinus carpio*)를 개발하기 위하여 삽입된 유전자는 RSV(Rous Sarcoma virus) 유전자(GenBank accession number M83236)를 이용하였다(Zhang PJ, *et al.*, 1990). 따라서 RSV 유전자 중에서 PCR 산물의 염기서열이 총 153 bp가 되도록 PCR primer와 probe를 설계하였다.

(2) 틸라피아(Tilapia)

유전자변형 Tilapia(*Oreochromis niloticus*)는 Ocean pout (*Macezoarces americanus*) anti-freeze protein(AFP) 유전자 (GenBank accession number S65567)을 이용하였다(Azizur Rahman, *et al.* 1998). 따라서 AFP 유전자로부터 PCR 산물의 총염기서열이 113 bp가 되도록 PCR primer와 probe를 설계하였다.

(3) 송사리(medaka)

송사리(medaka, *Oryzias latipes*)를 검출하기 위한 목표유전자는 Rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) metallothionein(MT)¹⁾ A promoter 유전자 (GenBank accession number X80181)에서 PCR 산물의 총 염기서열이 156 bp가 되도록 PCR primer와 probe를 설계하였다(Olsson, P. E., *et al.*, 1995).

(4) 은연어(coho salmon)

1) Metallothionein (MT)

MT는 박테리아에서 고등동물에 이르기까지 폭넓게 분포하는 작은 단백질이다. MT는 약 60여개의 아미노산으로 구성된 작은 단백질로서 그 1/3이 시스테인 잔기이며 8개의 리신 잔기를 지니고 있다. MT는 보통 7개의 금속 원자를 결합하고 있다. 높은 금속 함량, 특이한 생무기화학적 구조, 반응속도론적 불안정성, 신속한 금속전달기능 등에서 다른 금속단백질과는 다른 성질을 나타낸다. 1957년 발견 이래로 아직까지 정확한 기능은 알려지지 않고 있다. 흔히 금속독성에 대한 방어, 항산화제 기능, 세포내 금속 농도 유지와 전이 등이 기능으로 추정되고 있다.

은연어(coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*)를 검출하기 위한 목표유전자는 Rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) metallothionein(MT)²⁾ B promoter gene (GenBank accession number M22487)을 사용하였다(Masri S, *et al.* 2002). 따라서 MtB promoter 유전자로부터 PCR 산물의 총염기서열이 133 bp가 되도록 PCR primer와 probe를 설계하였다

나. 유전자변형 해양생물체 검출을 위한 목표유전자의 PCR primer set 및 probe 설계

유전자변형 해양생물체인 잉어, 송사리, 은연어 및 틸라피아의 PCR 검출을 위하여 표 2와 같이 PCR primer 및 probe를 설계하였다. 잉어는 RSV 유전자를 목표유전자로 하였으며, 틸라피아는 AFP 유전자를 목표유전자로 하였으며, 송사리는 MetA 유전자를 목표유전자로 하였고, 은연어는 MtB 유전자를 목표유전자로 하였다(표 1).

2) Metallothionein (MT)

MT는 박테리아에서 고등동물에 이르기까지 폭넓게 분포하는 작은 단백질이다. MT는 약 60여개의 아미노산으로 구성된 작은 단백질로서 그 1/3이 시스테인 잔기이며 8개의 리신 잔기를 지니고 있다. MT는 보통 7개의 금속 원자를 결합하고 있다. 높은 금속 함량, 특이한 생무기화학적 구조, 반응속도론적 불안정성, 신속한 금속전달기능 등에서 다른 금속단백질과는 다른 성질을 나타낸다. 1957년 발견 이래로 아직까지 정확한 기능은 알려지지 않고 있다. 흔히 금속독성에 대한 방어, 항산화제 기능, 세포내 금속 농도 유지와 전이 등이 기능으로 추정되고 있다.

표 1. 유전자변형 수산생물체의 벡터, 목표유전자, 내재유전자 및 양성대조 벡터 종류

항 목	잉어 (Common carp)	틸라피아 (Tilapia)	송사리 (Medaka)	은연어 (Coho salmon)
사용벡터	pRSV-RTGHcDNA	opAFPcsGH	pCAT	onMTGH
목표유전자	RSV (153 bp)	AFP (113 bp)	MetA (159 bp)	MtB (133 bp)
내재유전자	β -act (180 bp)	β -act (170 bp)	β -act (180 bp)	cyt (170 bp)
목표유전자 양성대조 벡터	pGEM-Teasy/RSV	pGEM-Teasy/AFP	pGEM-Teasy/MetA	pGEM-Teasy/MtB
내재유전자 양성대조 벡터	pGEM-Teasy/CC β -act	pGEM-Teasy/ON β -act	pGEM-Teasy/OL β -act	pGEM-Teasy/CScyt
목표 및 내재 유전자 공통벡터	pGEM-Teasy/RSV -CC β -act	pGEM-Teasy/AFP- ON β -act	pGEM-Teasy/MetA -OL β -act	pGEM-Teasy/MtB -CScyt

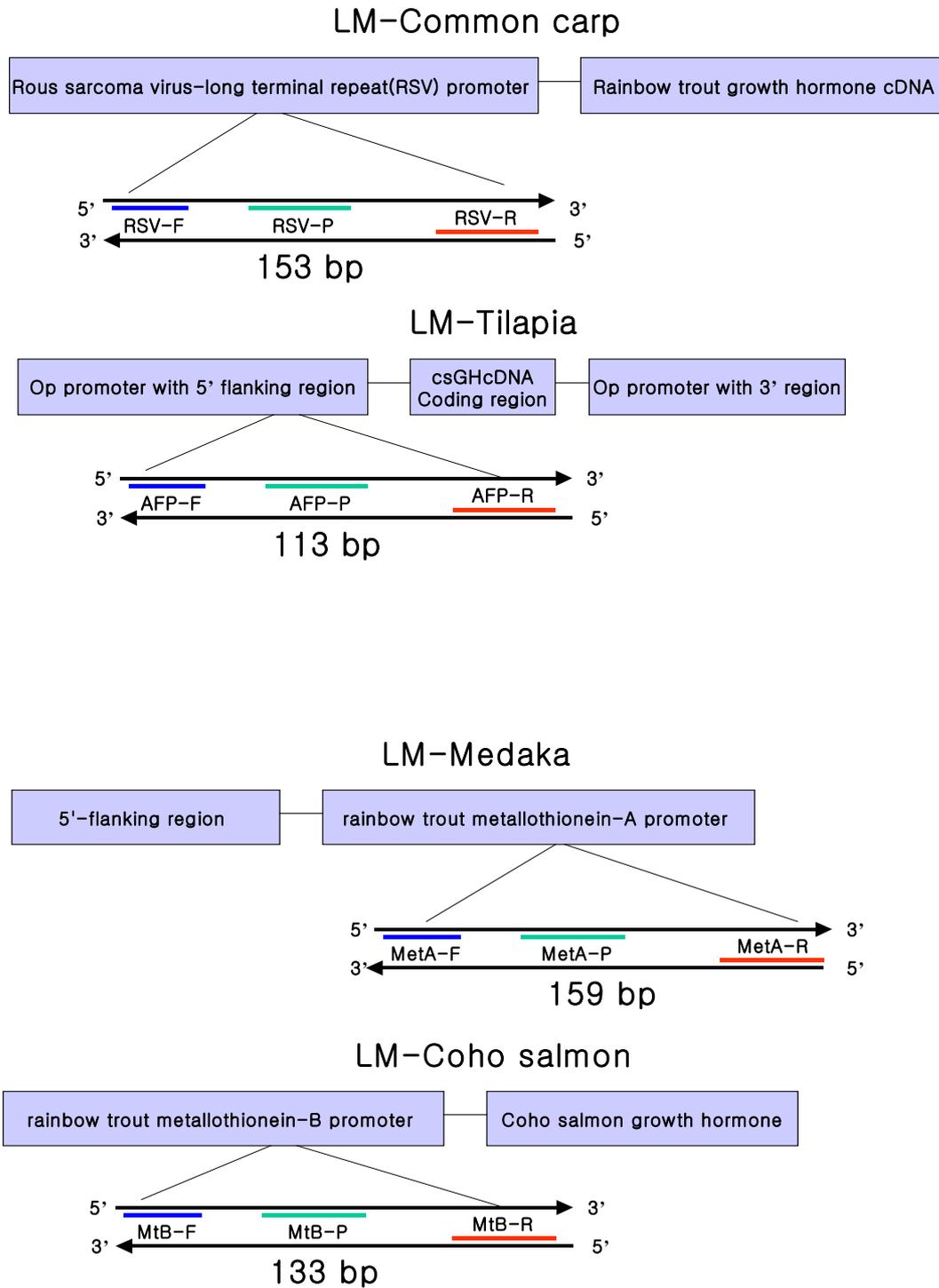


그림 1. 유전자변형 잉어, 틸라피아, 송사리 그리고 은연어에 삽입된 변형유전자 모식도 및 목표유전자의 증폭을 위한 PCR primer set 및 probe 설계 부위. LM: living modified.

표 2. 유전자변형 해양생물체 검출을 위한 목표유전자의 PCR primer set 및 probe

Species of fish	Name of PCR primer and probe	Size of PCR primer and probe	Tm (°C)	Target gene
Common carp	RSV-F	22	58	RSV (153 bp)
	RSV-R	20	59	
	RSV-P	29	68	
Tilapia	AFP-F	20	57	AFP (113 bp)
	AFP-R	20	56	
	AFP-P	30	67	
Medaka	MetA-F	21	56	MetA (159 bp)
	MetA-R	20	56	
	MetA-P	30	69	
Coho salmon	MtB-F	22	57	MtB (133 bp)
	MtB-R	20	59	
	MtB-P	27	69	

다. 해양생물체의 내재유전자의 증폭을 위한 PCR primer set 및 probe 설계

유전자변형 해양생물체의 PCR 검출시 해양생물체가 원래 가지고 있는 내재유전자를 같이 증폭함으로써 PCR 실험이 잘 되었는지 확인 할 수 있으며, 또한 가공식품으로 만들어졌을 시 유전자가 파괴되었는지 아닌지를 확인하기 위한 방법 그리고 정량검사를 하기 위한 하나의 방법으로서 내재유전자의 확인이 필수적이다. 따라서 각각에 대한 또는 공통으로 가지고 있는 내재유전자를 증폭하기 위한 PCR primer 및 probe는 표 3과 같이 설계하였다.

은연어의 내재유전자는 각각의 cytochrome(cyt)³⁾ 유전자로부터 설계하였으며(Wolf, *et al*, 2000), 또한 잉어, 틸라피아, 송사리가 공통으로 가지고 있는 β -actin 유전자로부터 PCR primer와 probe를 설계하였다(Liu *et al*, 1990 ; Hwang *et al*, 2003 ; Takagi *et al*, 1994)

3) Cytochrome (cyt)

색소단백질에 속하며, 이 색소가 호기성 생물에 널리 존재하며 세포호흡에 관여하는 것을 발견하고 '세포색소'라는 뜻의 시토크롬으로 명명하였다. 일반적인 동식물의 세포·세균·곰팡이·효모 등에 널리 존재한다. 처음에 존재하지 않는 것으로 생각되던 절대혐기성 세균의 일부에서도 발견되었다. 보통 1개의 세포에는 몇 종의 시토크롬이 미토콘드리아, 그 밖의 대형입자와 결합되어 있고, 그것들이 협력하여 세포호흡의 촉매로서 작용한다.

표 3. 해양생물체의 내재유전자의 증폭을 위한 PCR primer set 및 probe

Species of fish	Name of PCR primer and probe	Size of PCR primer and probe	T _m (°C)	Target gene
Common carp	CC β -act-F	20	58	β -act (180 bp)
	CC β -act-R	21	59	
	CC β -act-P	26	68	
Tilapia	ON β -act-F	20	58	β -act (170 bp)
	ON β -act-R	20	58	
	ON β -act-P	28	70	
Medaka	OL β -act-F	20	57	β -act (180 bp)
	OL β -act-R	20	58	
	OL β -act-P	25	66	
Coho salmon	CScyt-F	23	57	Cyt (170 bp)
	CScyt-R	25	57	
	CScyt-P	28	68	

라. 목표유전자 클로닝

(1) 유전자 변형 잉어(Common carp) 검출을 위한 RSV 유전자 클로닝

유전자변형 잉어의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위하여 목표유전자인 RSV 유전자 단편을 pGEM-Teasy vector에 재조합하여 pGEM-Teasy /RSV 벡터를 제조하였다(그림 2).

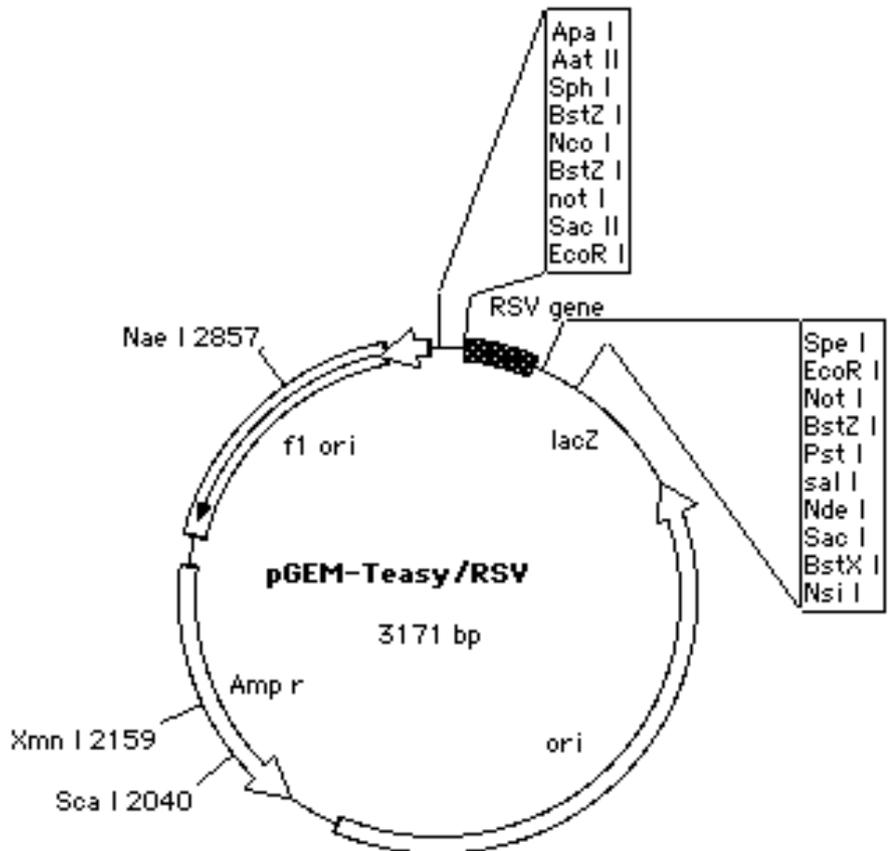


그림 2. 유전자변형 잉어의 PCR 검출을 위한 대조로 사용하기 위하여 RSV 유전자 단편을 pGEM-T easy vector에 재조합한 pGEM-Teasy/RSV 벡터모식도.

(2) 유전자변형 틸라피아(Tilapia) 검출을 위한 AFP 유전자 클로닝

유전자변형 Tilapia의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위하여 목표유전자인 AFP 유전자 단편을 pGEM-Teasy vector에 재조합하여 pGEM-Teasy /AFP 벡터를 재조합 하였다(그림 3).

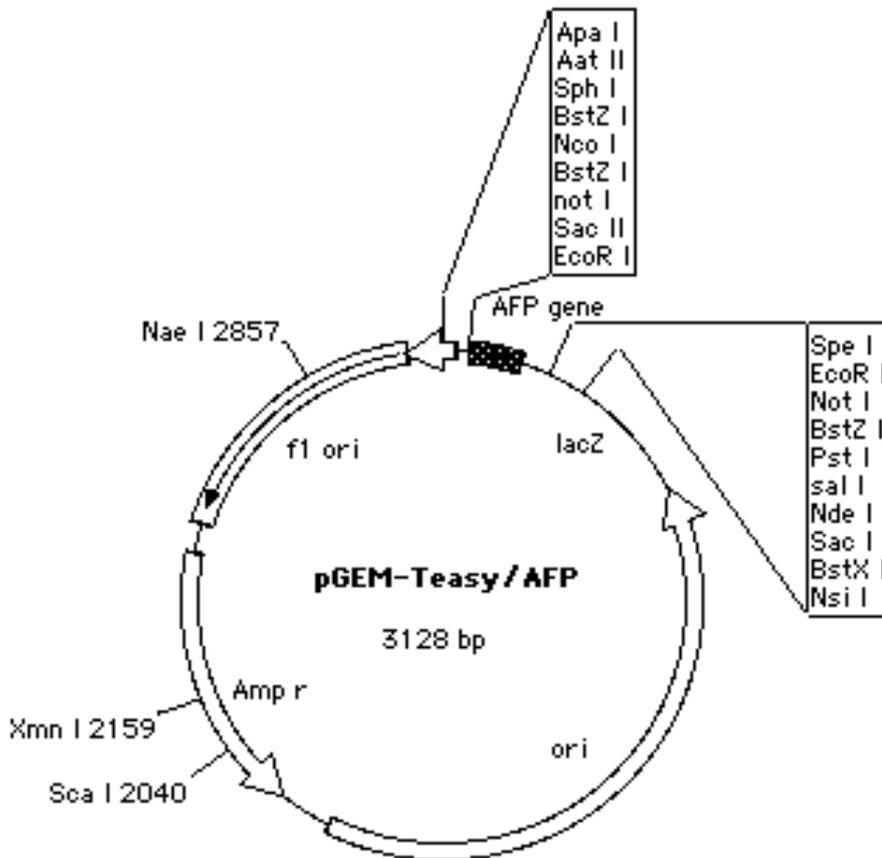


그림 3. 유전자변형 Tilapia의 PCR 검출을 위한 대조로 사용하기 위하여 AFP 유전자 단편을 pGEM-Teasy vector에 재조합하여 pGEM-Teasy /AFP 벡터를 제조한 모식도.

(3) 유전자변형 송사리(Medaka) 검출을 위한 MetA 유전자 클로닝

유전자변형 송사리의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위하여 목표유전자인 Met 유전자 단편을 pGEM-Teasy vector에 재조합하여 pGEM-Teasy /MetA 벡터를 제조 하였다(그림 4).

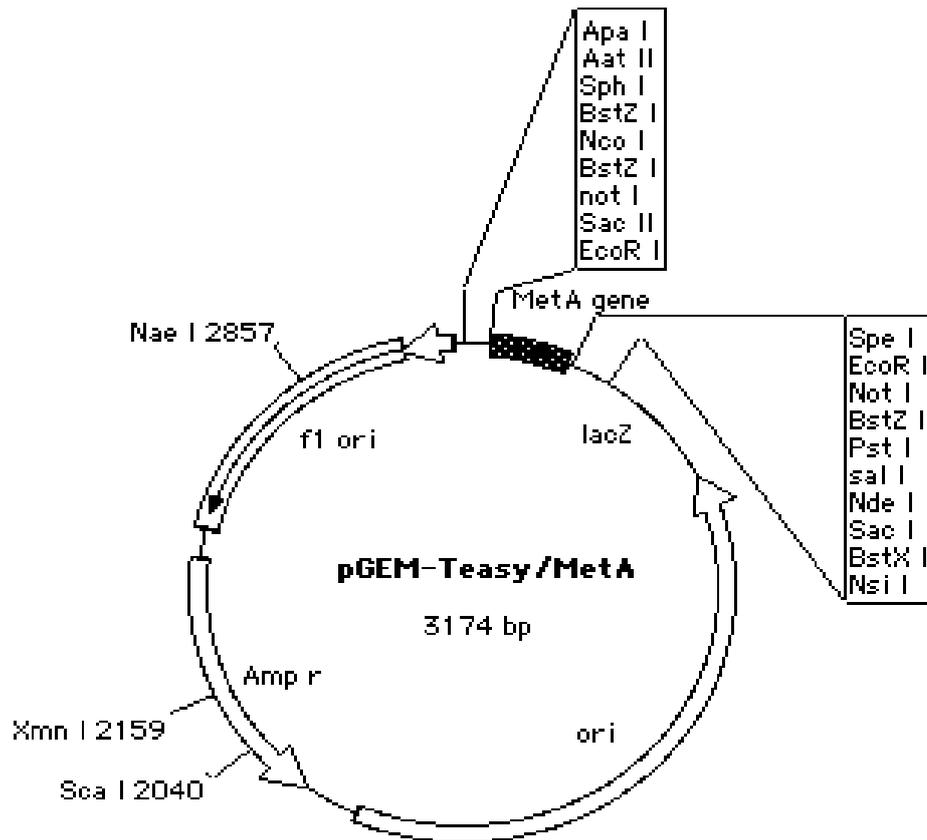


그림 4. 유전자변형 송사리의 PCR 검출을 위한 대조로 사용하기 위하여 met 유전자 단편을 pGEM-T easy vector에 재조합하여 pGEM-Teasy /MetA 벡터를 제조한 모식도.

(4) 유전자변형 은연어(Coho salmon) 검출을 위한 MtB 유전자 클로닝

유전자변형 은연어의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위하여 목표유전자인 MT 유전자 단편을 pGEM-Teasy vector에 재조합하여 pGEM-Teasy /MtB 벡터를 제조 하였다(그림 5).

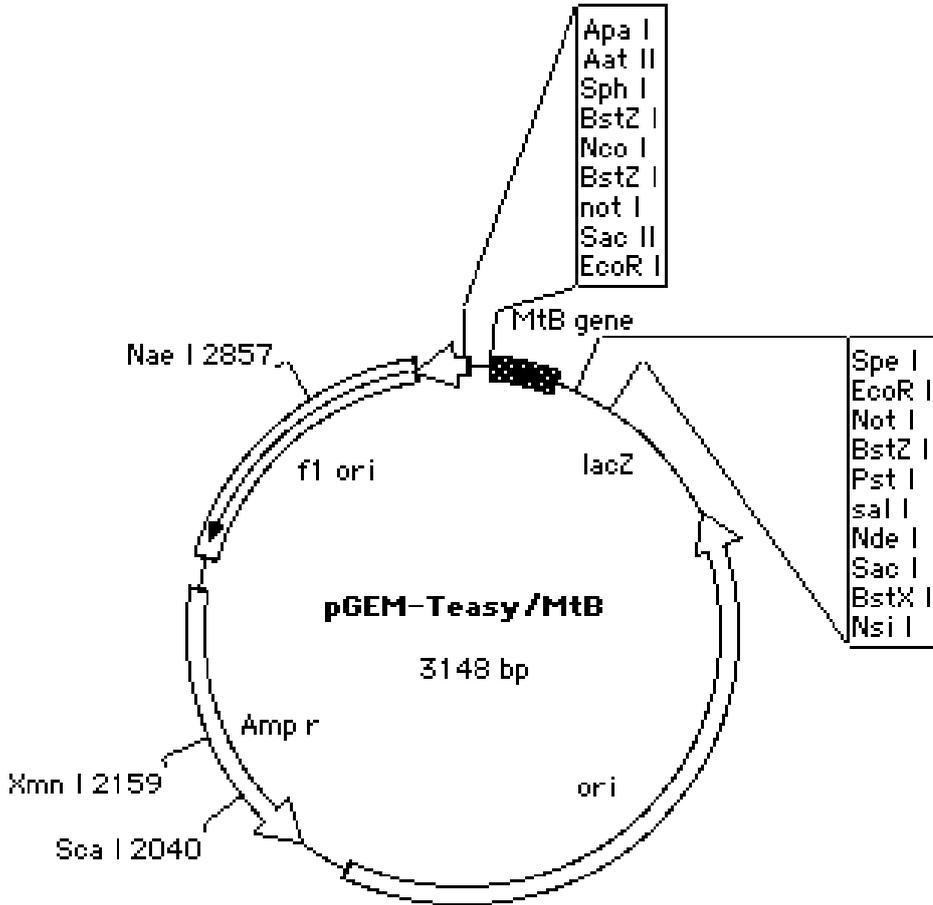


그림 5. 유전자변형 은연어의 PCR 검출을 위한 대조로 사용하기 위하여 MtB 유전자 단편을 pGEM-T easy vector에 재조합하여 pGEM-Teasy /MtB를 제조한 모식도.

(5) 잉어의 내재유전자 검출을 위한 β -act 유전자 클로닝

유전자변형 잉어의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위하여 내재유전자(common carp b-actin; CC β -act) 단편을 제조함하여 pGEM-Teasy /CC β -act 벡터를 제조하였다(그림 6).

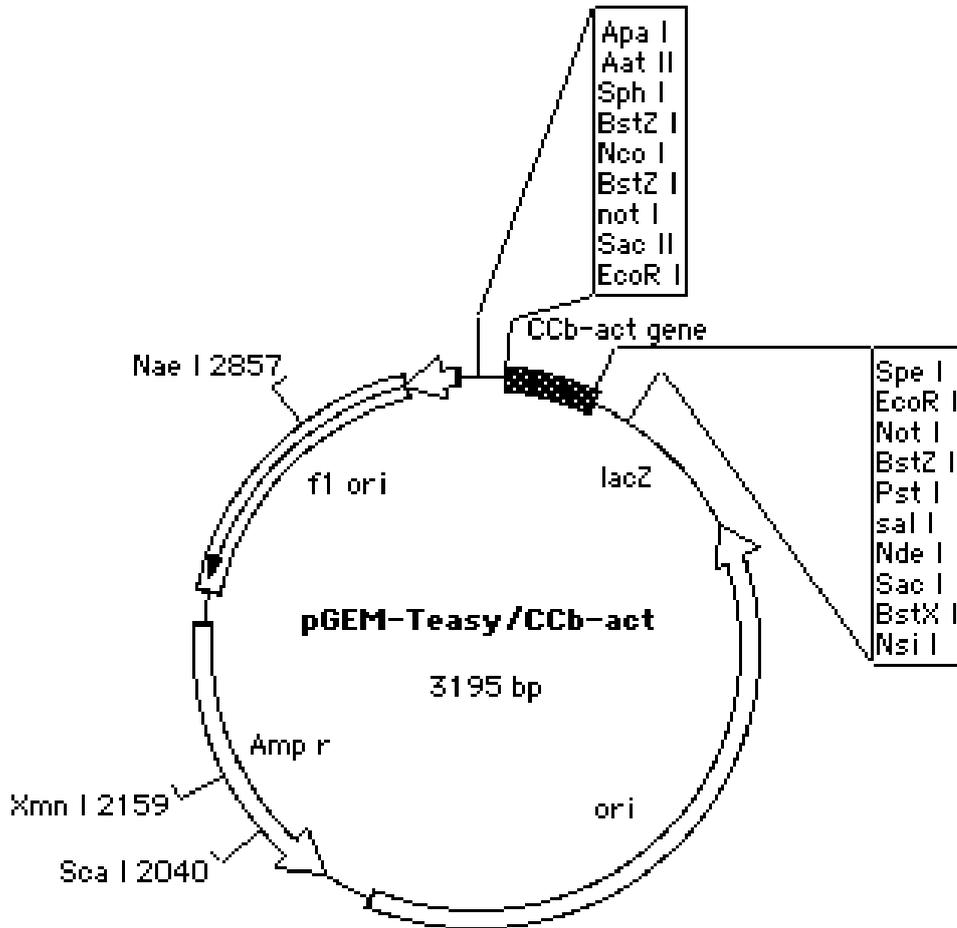


그림 6 유전자변형 잉어의 PCR 검출을 위한 대조로 사용하기 위하여 내재유전자인 β -act 유전자 단편을 pGEM-Teasy vector에 재조합하여 pGEM-Teasy/CC β -act 벡터를 제조한 모식도.

(6) 틸라피아의 내재유전자 검출을 위한 β -act 유전자 클로닝

유전자변형 틸라피아의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위하여 내재유전자(Tilapia b-actin; ON β -act) 단편을 제조함하여 pGEM-Teasy/ON β -act 벡터를 제조하였다(그림 7).

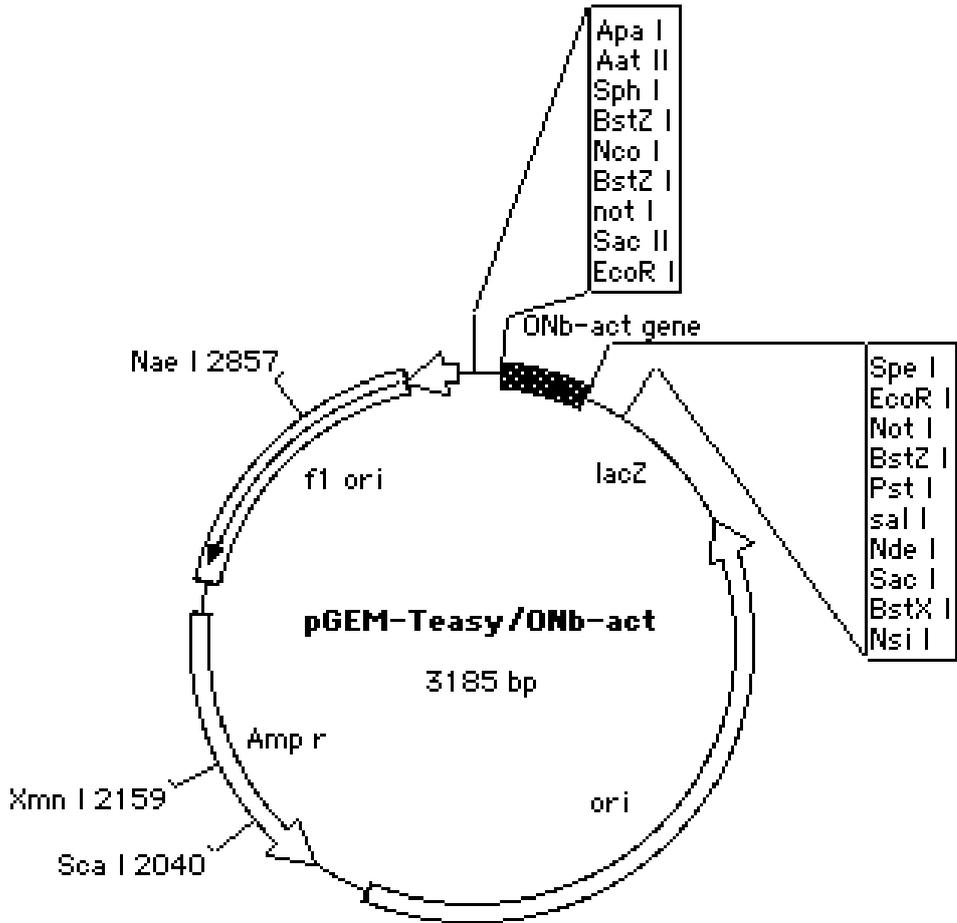


그림 7. 유전자변형 틸라피아의 PCR 검출을 위한 대조로 사용하기 위하여 내재유전자인 β -act 유전자 단편을 pGEM-Teasy vector에 재조합하여 pGEM-Teasy/ON β -act 벡터를 제조한 모식도.

(7) 송사리의 내재유전자 검출을 위한 β -act 유전자 클로닝

유전자변형 송사리의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위하여 내재유전자 (Medaka β -act) 단편을 pGEM-Teasy vector에 재조합하여 pGEM-Teasy/OL β -act 벡터를 제조하였다(그림 8).

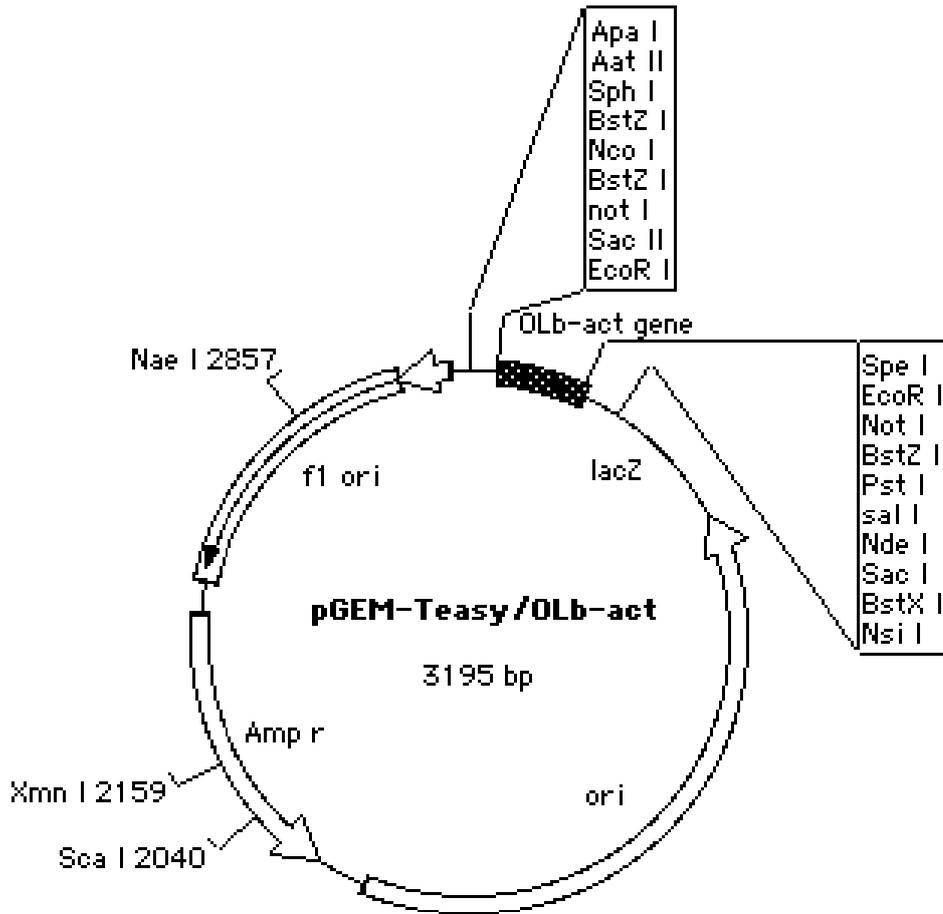


그림 8. 유전자변형 틸라피아의 PCR 검출을 위한 대조로 사용하기 위하여 내재유전자인 β -act 유전자 단편을 pGEM-Teasy vector에 재조합하여 pGEM-Teasy/OL β -act 벡터를 제조한 모식도.

(8) 은연어의 내재유전자 검출을 위한 *cyt* 유전자 클로닝

유전자변형 은연어의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위하여 내재유전자 (Coho salmon-*cyt*) 단편을 pGEM-Teasy vector에 재조합하여 pGEM-Teasy/CScyt 벡터를 제조하였다(그림 9).

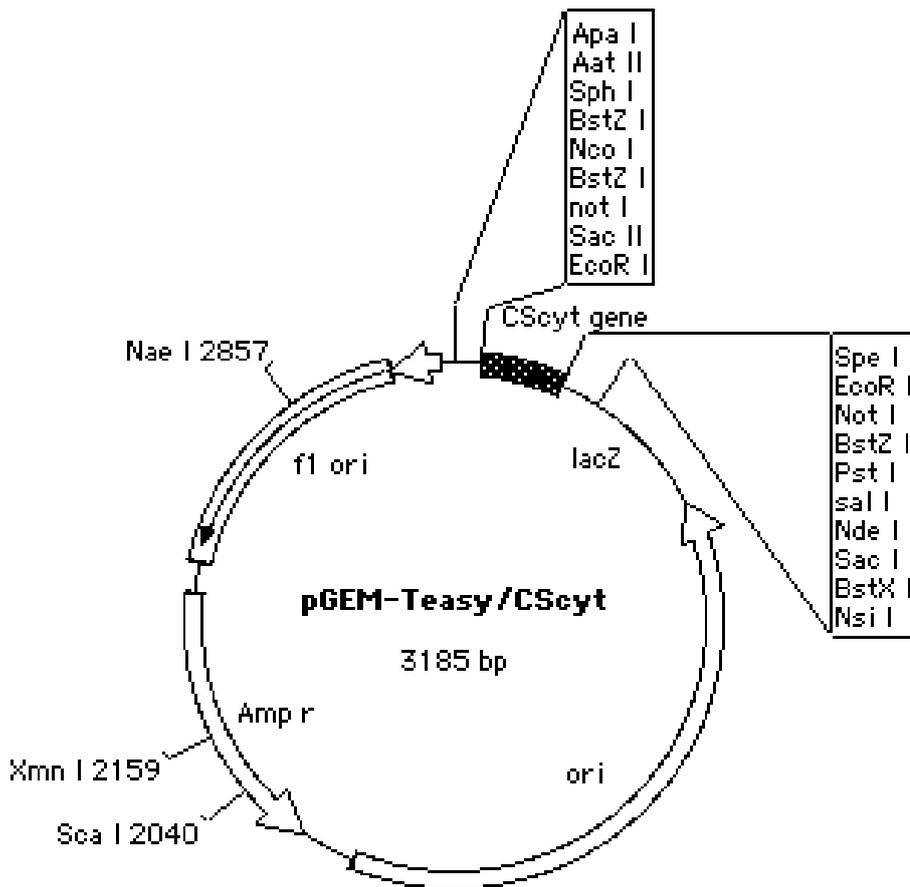


그림 9. 유전자변형 은연어의 PCR 검출을 위한 대조로 사용하기 위하여 은연어의 내재유전자인 *cyt* 유전자 단편을 pGEM-Teasy vector에 재조합하여 pGEM-Teasy/CScyt 벡터를 제조한 모식도.

(9) RSV와 β -act 유전자의 복합클로닝

유전자변형 잉어의 PCR 검출시 목표유전자인 RSV의 양성대조와 내재유전자 β -act 단편을 pGEM-Teasy vector에 복합으로 재조합하여 pGEM-Teasy/RSV-CC β -act 벡터를 제조하였다(그림 10).

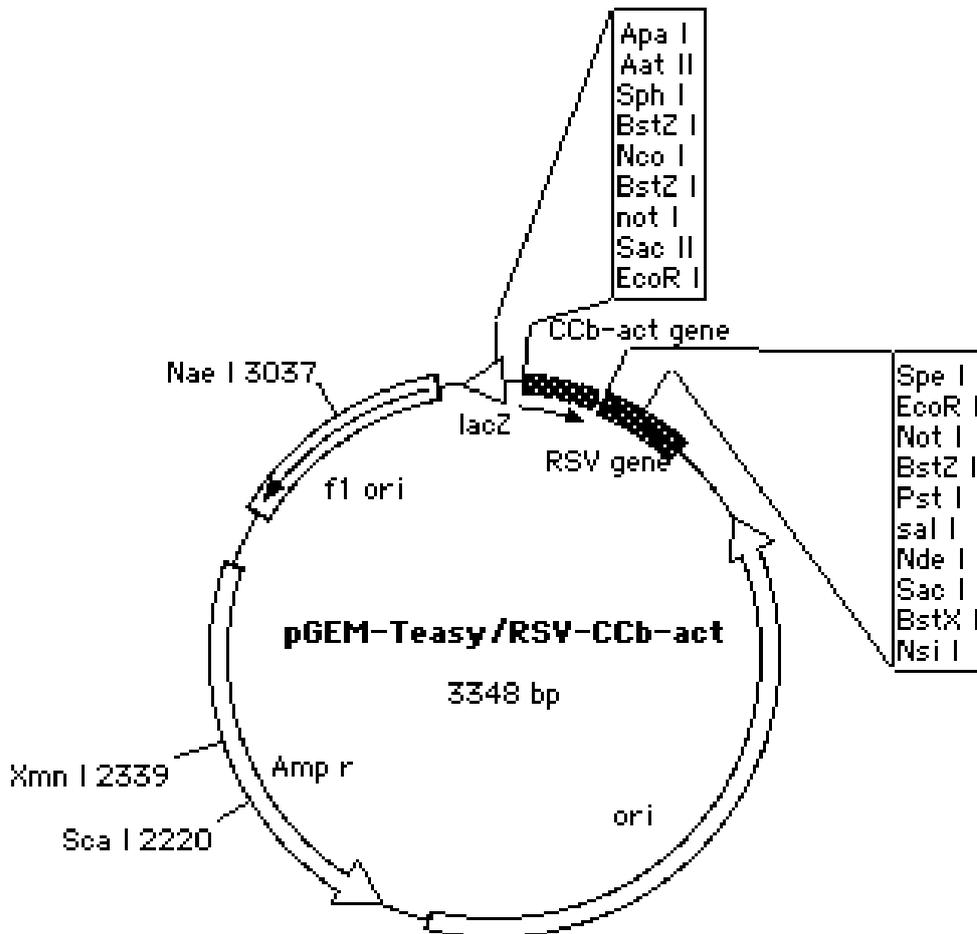


그림 10. 유전자변형 잉어의 PCR 검출을 위한 대조로 사용하기 위하여 RSV 유전자 단편과 내재유전자인 β -act 유전자 단편을 pGEM-Teasy vector에 복합으로 재조합하여 pGEM-Teasy/RSV-CC β -act 벡터를 제조한 모식도.

(9) AFP와 β -act 유전자의 복합 클로닝

유전자변형 털라피아의 PCR 검출시 목표유전자인 AFP의 양성대조와 내재유전자 β -act 단편을 pGEM-Teasy vector에 복합으로 재조합하여 pGEM-Teasy/AFP-ON β -act 벡터를 제조하였다(그림 11).

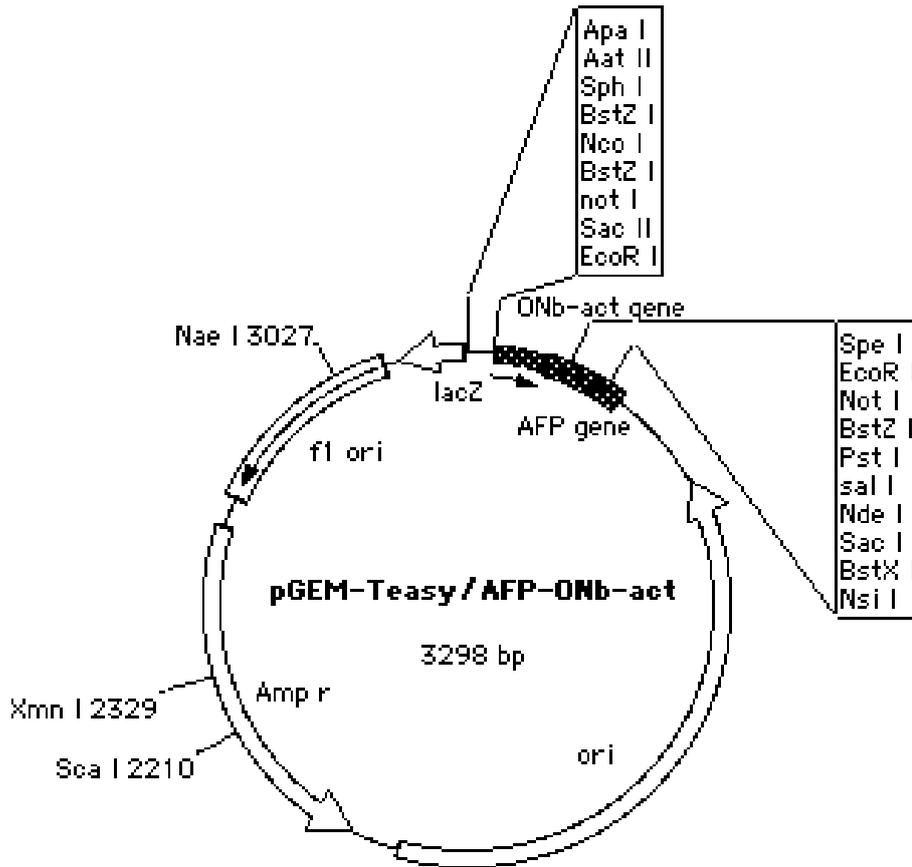


그림 11. 유전자변형 털라피아의 PCR 검출을 위한 대조로 사용하기 위하여 AFP 유전자 단편과 내재유전자인 β -act 유전자 단편을 pGEM-Teasy vector에 복합으로 재조합하여 pGEM-Teasy/AFP-ON β -act 벡터를 제조한 모식도.

(10) MetA와 β -act 유전자의 복합클로닝

유전자변형 송사리의 PCR 검출시 목표유전자인 MetA의 양성대조와 내재유전자 β -act 단편을 pGEM-Teasy vector에 재조합하여 pGEM-Teasy /MetA-OL β -act 벡터를 제조하였다(그림 12).

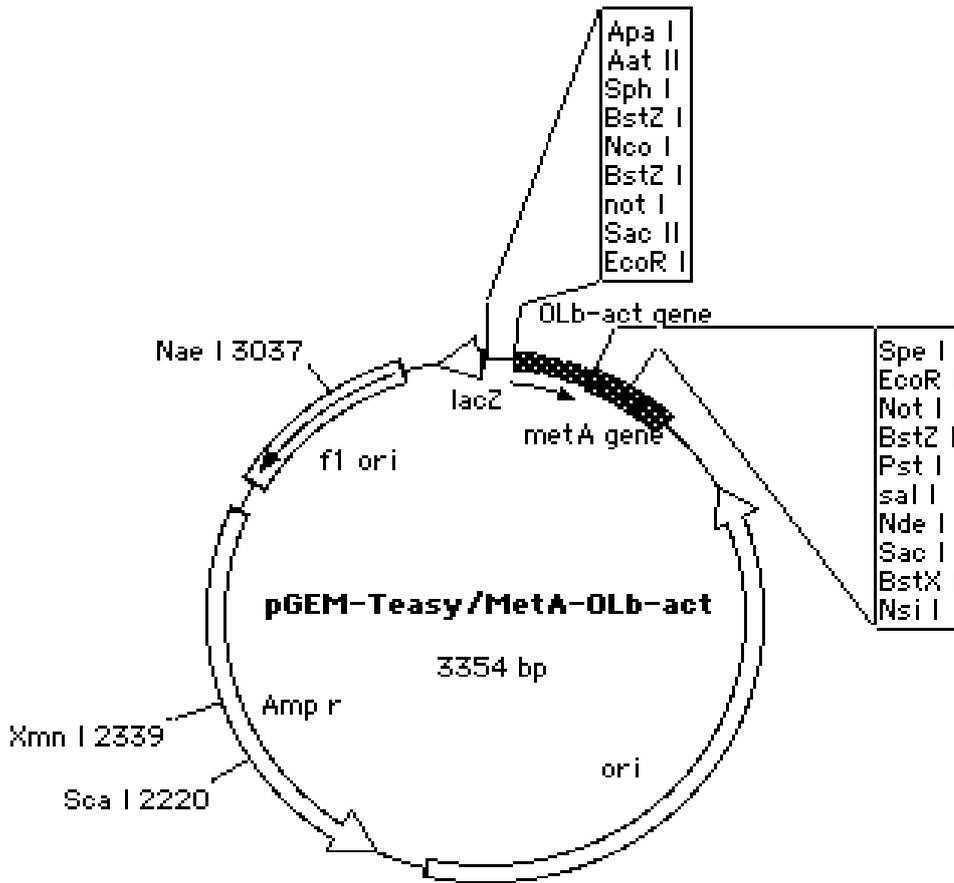


그림 12. 유전자변형 송사리의 PCR 검출을 위한 대조로 사용하기 위하여 MetA 유전자 단편과 내재유전자인 β -act 유전자 단편을 pGEM-Teasy vector에 재조합하여 pGEM-Teasy/MetA-OL β -act 벡터를 제조한 모식도.

(11) MtB와 cyt 유전자의 복합클로닝

유전자변형 은연어의 PCR 검출시 목표유전자인 MtB의 양성대조와 내재유전자 cyt 단편을 pGEM-Teasy vector에 재조합하여 pGEM-Teasy /MtB-CScyt 벡터를 제조하였다(그림 13).

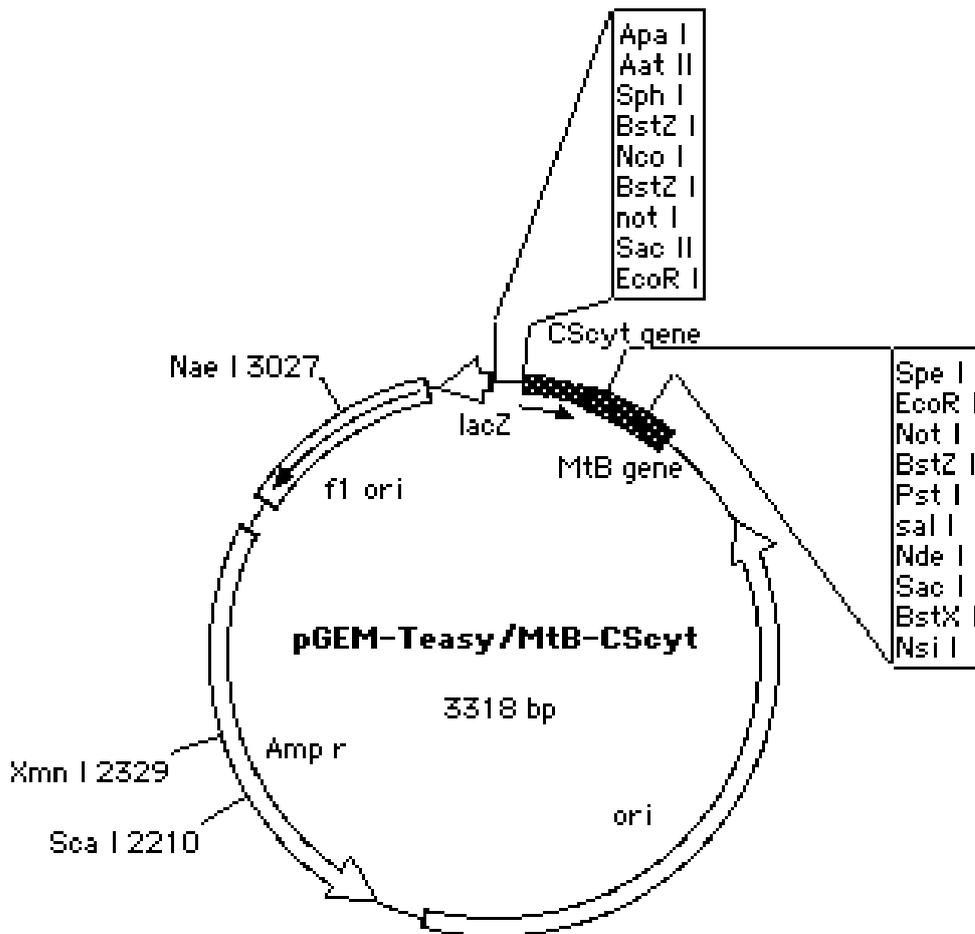


그림 13. 유전자변형 은연어의 PCR 검출을 위한 대조로 사용하기 위하여 MtB 유전자 단편과 내재유전자인 cyt 유전자 단편을 pGEM-Teasy vector에 재조합하여 pGEM-Teasy/MtB-CScyt 벡터를 제조한 모식도.

제 2 절. 연구결과

1. 잉어(Common carp)

가. 정성검사 결과

유전자변형 잉어의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위한 RSV 유전자 단편을 클로닝 한 후 플라스미드 DNA를 추출하여 민감도를 보기위한 PCR 결과는 그림 12와 같다. PCR primer는 RSV-F/-R을 사용하였으며, 플라스미드 DNA의 copy 수를 계산하여 10배 연속 희석하여 PCR 한 결과 10^8 부터 10^4 copy까지 153 bp의 증폭된 유전자 단편을 확인 할 수 있었다(그림 14).

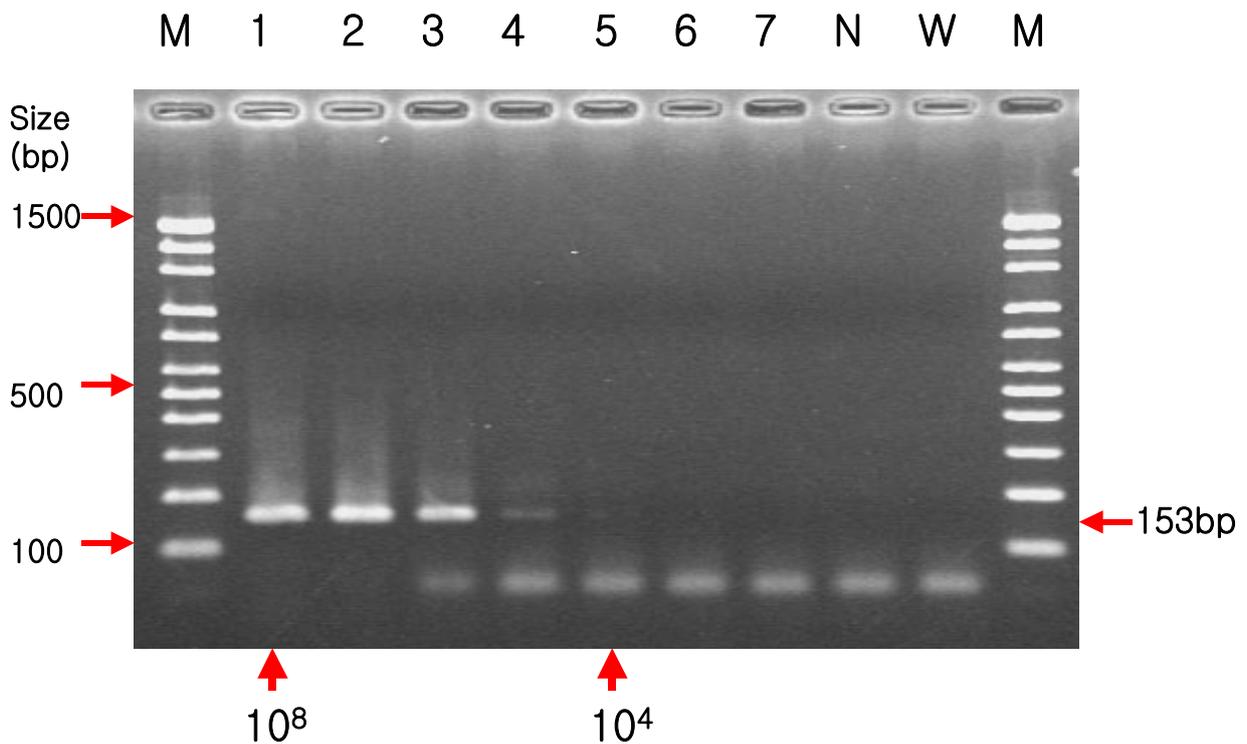


그림 14. 유전자변형 잉어의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위한 RSV 유전자 단편을 클로닝 한 후 플라스미드 DNA를 추출하여 민감도를 보기위한 PCR 결과. PCR primer는 RSV-F/-R을 사용하였으며, template DNA로 사용한 플라스미드 DNA는 copy 수를 계산하여 10배 연속 희석하여 사용하였음. Lane M, DNA size marker(100 bp DNA ladder); Lane 1-8, 10^8 부터 10^1 copy; Lane N, 음성대조; Lane W, 증류수.

나. 정량검사 결과

유전자변형 잉어의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위한 RSV 유전자 단편을 클로닝 한 후 플라스미드 DNA를 추출하여 copy 수에 따른 반응을 알아보기 위한 real-time TaqMan PCR은 정성검사에 사용한 PCR primer는 RSV-F/-R과 같은 것을 사용하였으며, probe로는 RSV-P를 사용하였다. 플라스미드 DNA의 copy 수를 계산하여 10배 연속 희석하여 PCR 한 결과 10^8 부터 10^1 copy까지 증폭된 반응을 보였다(그림 15). PCR 반응은 총 40 cycle을 실시하였으며, 10^8 copy에서는 16 cycle에서부터 형광색소를 감지하여 증폭되는 것을 확인 할 수 있었고, 10^1 에서는 36 cycle에서부터 증폭을 확인 할 수 있었다.

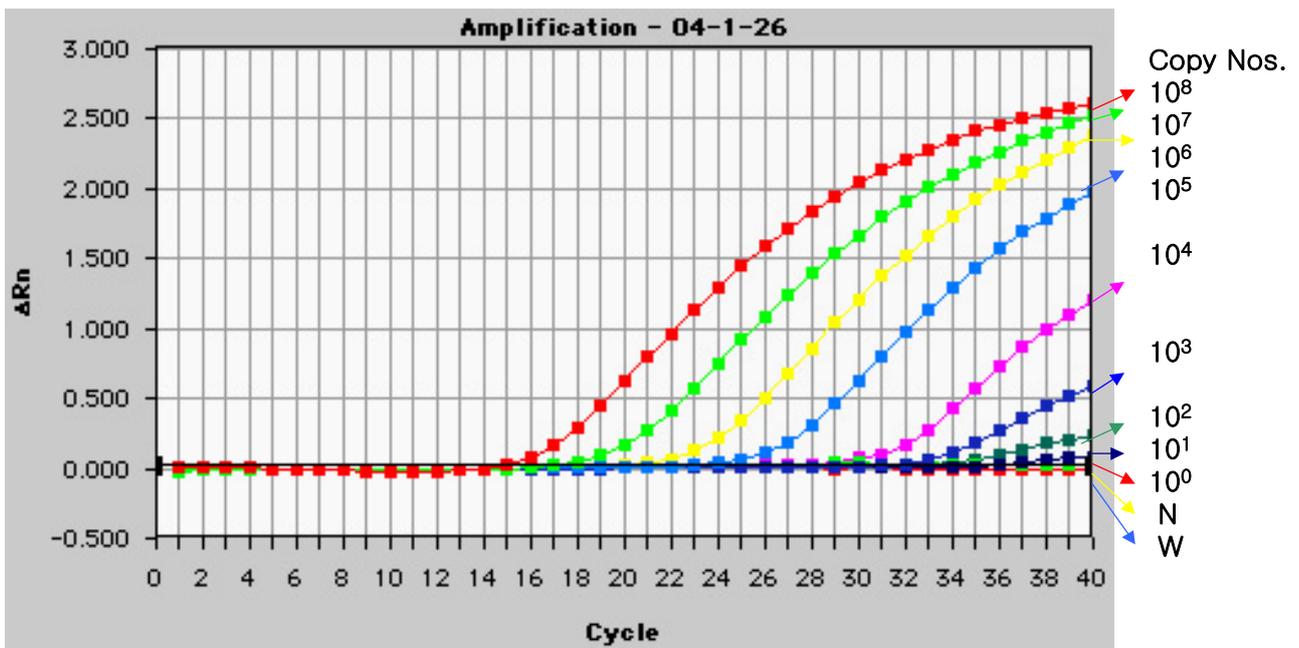


그림 15. 유전자변형 잉어의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위한 RSV 유전자 단편을 클로닝 한 후 플라스미드 DNA를 추출하여 copy 수에 따른 반응을 알아보기 위한 real-time TaqMan PCR 결과. PCR primer는 RSV-F/-R 그리고 probe는 RSV-P를 사용하였으며, template DNA로 사용한 플라스미드 DNA는 copy 수를 계산하여 10배 연속 희석하여 사용하였음. Copy Nos., 10^8 부터 10^1 copy; N, 음성대조; W, 증류수.

다. 내재유전자 검출

유전자변형 잉어의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위한 내재유전자인 $CC\beta$ -act 유전자 단편을 증폭하기 위하여 $CC\beta$ -act-F/-R primer set를 이용하여 PCR 한 결과 180 bp의 위치에서 증폭된 유전자단편을 확인 할 수 있었다(그림 16).

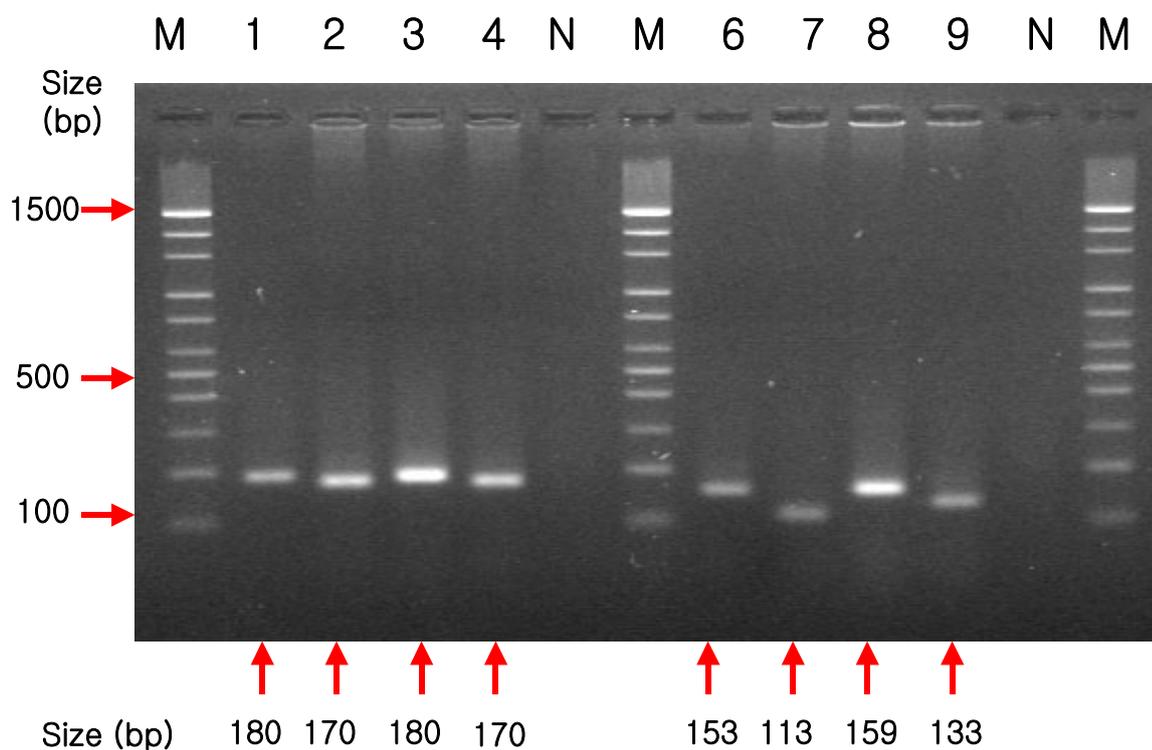


그림 16. 유전자변형 잉어, 틸라피아, 송사리, 은연어의 PCR 검출시 내재유전자의 확인을 위한 β -act, Cyt 유전자 단편을 F/-R primer set를 이용하여 PCR 증폭한 결과. Lane M, DNA size marker(100 bp DNA ladder); Lane 1, 잉어 내재유전자; Lane 2, 틸라피아 내재유전자; Lane 3, 송사리 내재유전자; Lane 4, 은연어 내재유전자; Lane 5, 유전자 변형 잉어; Lane 6, 유전자 변형 틸라피아; Lane 7, 유전자 변형 송사리; Lane 8, 유전자 변형 은연어; Lane N, 음성대조

2. 틸라피아(Tilapia)

가. 정성검사 결과

유전자변형 틸라피아 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위한 AFP 유전자 단편을 클로닝 한 후 플라스미드 DNA를 추출하여 민감도를 보기위한 PCR 결과는 그림 6과 같다. PCR primer는 AFP-F/-R을 사용하였으며, 플라스미드 DNA의 copy 수를 계산하여 10배 연속 희석하여 PCR 한 결과 10^8 부터 10^4 copy까지 113 bp의 증폭된 유전자 단편을 확인 할 수 있었다(그림 17).

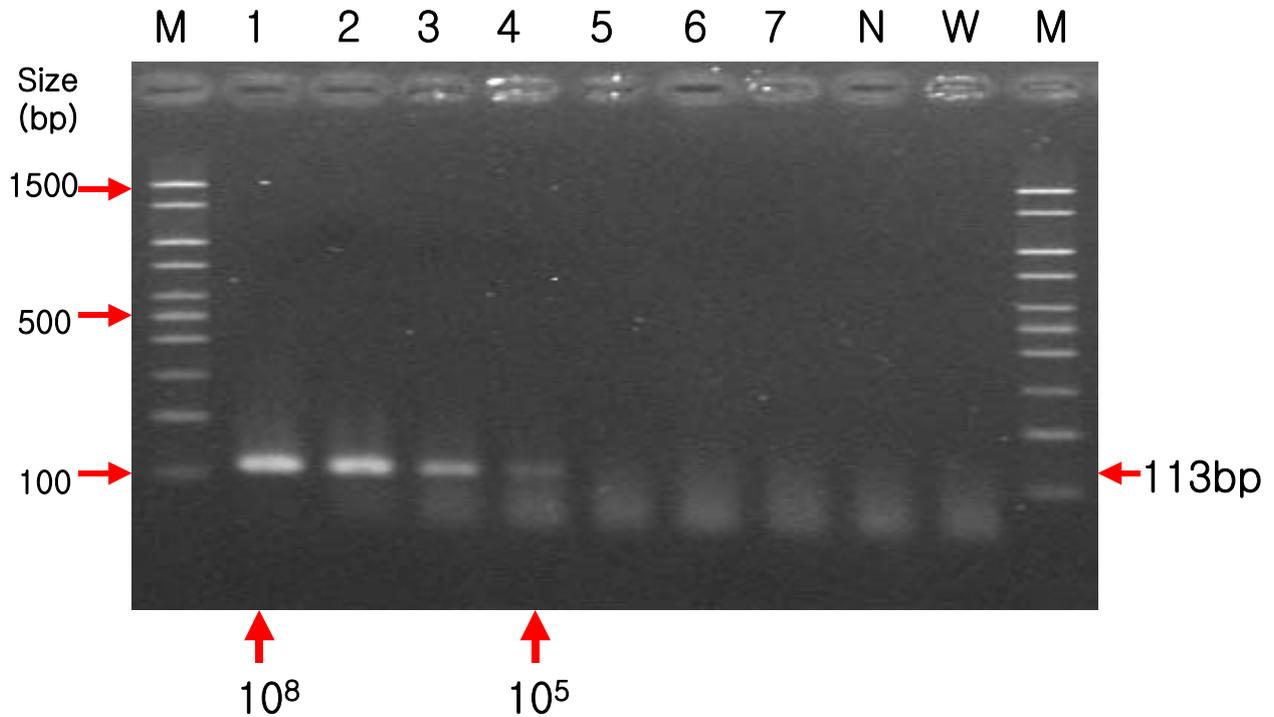


그림 17. 유전자변형 틸라피아의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위한 AFP 유전자 단편을 클로닝 한 후 플라스미드 DNA를 추출하여 민감도를 보기위한 PCR 결과. PCR primer는 AFP-F/-R을 사용하였으며, template DNA로 사용한 플라스미드 DNA는 copy 수를 계산하여 10배 연속 희석하여 사용하였음. Lane M, DNA size marker(100 bp DNA ladder); Lane 1-7, 10^8 부터 10^2 copy; Lane N, 음성대조; Lane W, 증류수.

나. 정량검사 결과

유전자변형 틸라피아의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위한 AFP 유전자 단편을 클로닝 한 후 플라스미드 DNA를 추출하여 copy 수에 따른 반응을 알아보기 위한 real-time TaqMan PCR은 정성검사에 사용한 PCR primer는 Tilapia-F/-R과 같은 것을 사용하였으며, probe로는 AFP-P를 사용하였다. 플라스미드 DNA의 copy 수를 계산하여 10배 연속 희석하여 PCR한 결과 10^8 부터 10^1 copy까지 증폭된 반응을 보였다(그림 18). PCR 반응은 총 40 cycle을 실시하였으며, 10^8 copy에서는 17 cycle에서부터 형광색소를 감지하여 증폭되는 것을 확인 할 수 있었으며, 10^1 에서는 37 cycle에서부터 증폭을 확인 할 수 있었다.

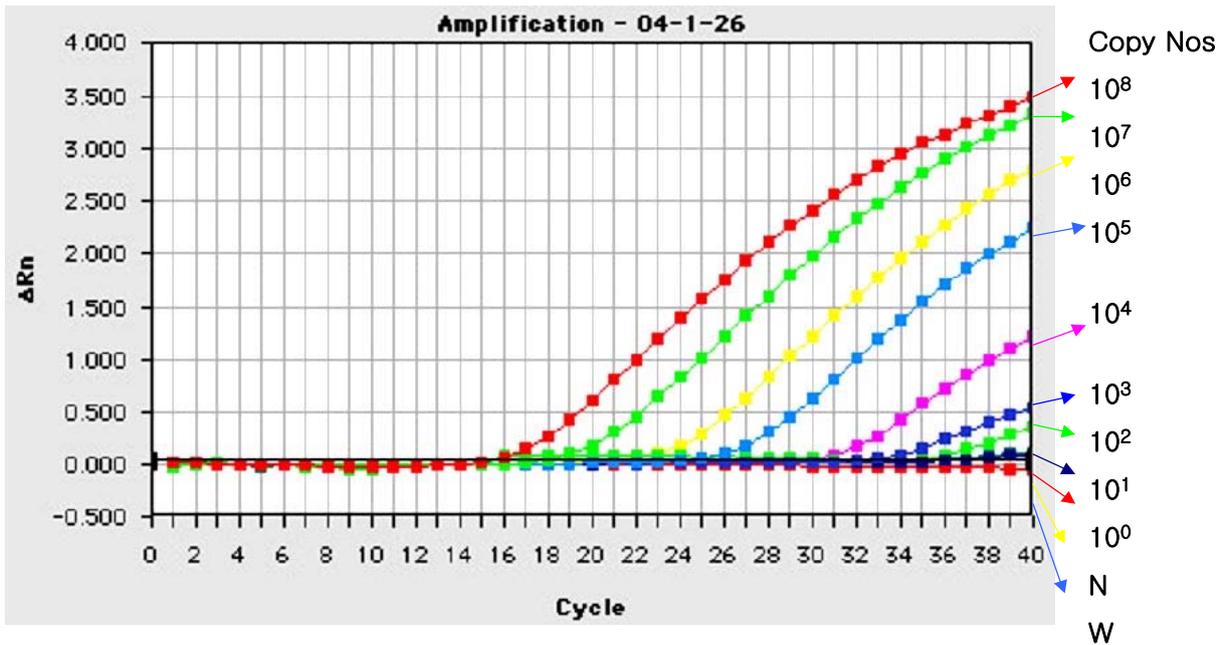


그림 18. 유전자변형 틸라피아의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위한 AFP 유전자 단편을 클로닝 한 후 플라스미드 DNA를 추출하여 copy 수에 따른 반응을 알아보기 위한 real-time TaqMan PCR 결과. PCR primer는 AFP-F/-R 그리고 probe는 AFP-P를 사용하였으며, template DNA로 사용한 플라스미드 DNA는 copy 수를 계산하여 10배 연속 희석하여 사용하였음. Copy Nos., 10^8 부터 10^1 copy; N, 음성대조; W, 증류수.

다. 내재유전자 검출

유전자변형 틸라피아의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위한 내재유전자인 ON β -act 유전자 단편을 증폭하기 위하여 ON β -act-F/-R primer set를 이용하여 PCR한 결과 170 bp의 위치에서 증폭된 유전자단편을 확인 할 수 있었다(그림 19).

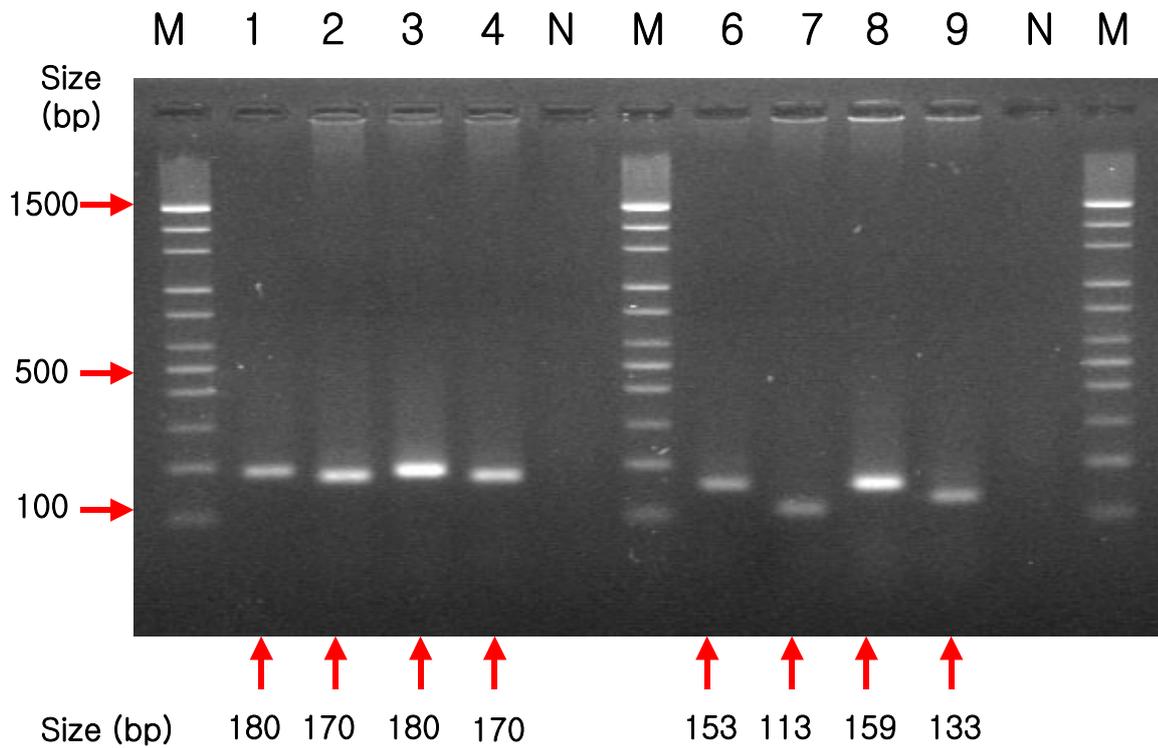


그림 19. 유전자변형 잉어, 틸라피아, 송사리, 은연어의 PCR 검출시 내재유전자의 확인을 위한 β -act, Cyt 유전자 단편을 F/-R primer set를 이용하여 PCR 증폭한 결과. Lane M, DNA size marker(100 bp DNA ladder); Lane 1, 잉어 내재유전자; Lane 2, 틸라피아 내재유전자; Lane 3, 송사리 내재유전자; Lane 4, 은연어 내재유전자; Lane 5, 유전자 변형 잉어; Lane 6, 유전자 변형 틸라피아; Lane 7, 유전자 변형 송사리; Lane 8, 유전자 변형 은연어; Lane N, 음성대조

3. 송사리(Medaka)

가. 정성검사 결과

유전자변형 송사리의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위한 MetA 유전자 단편을 클로닝 한 후 플라스미드 DNA를 추출하여 민감도를 보기위한 PCR 결과는 그림 8과 같다. PCR primer는 MetA-F/-R을 사용하였으며, 플라스미드 DNA의 copy 수를 계산하여 10배 연속 희석하여 PCR 한 결과 10^8 부터 10^5 copy까지 159 bp의 증폭된 유전자 단편을 확인 할 수 있었다(그림 20).

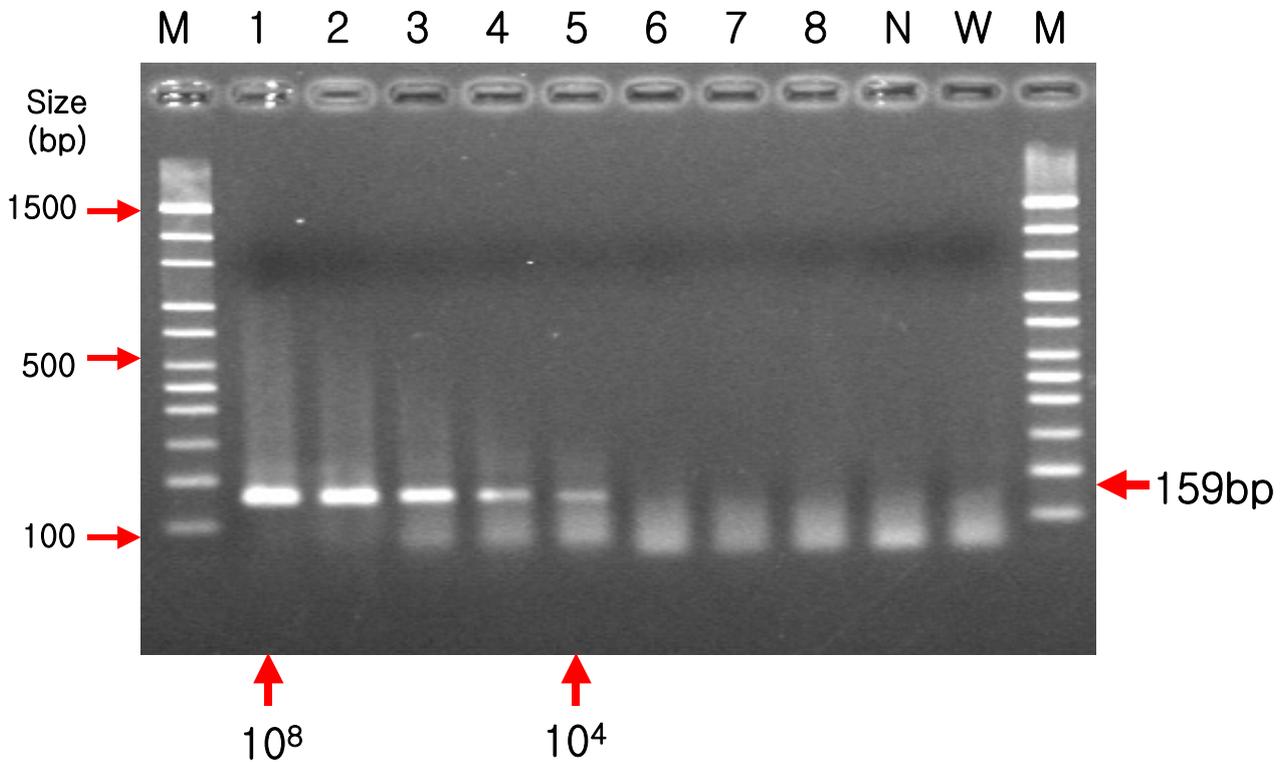


그림 20. 유전자변형 송사리의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위한 MetA 유전자 단편을 클로닝 한 후 플라스미드 DNA를 추출하여 민감도를 보기위한 PCR 결과. PCR primer는 MetA-F/-R을 사용하였으며, template DNA로 사용한 플라스미드 DNA는 copy 수를 계산하여 10배 연속 희석하여 사용하였음. Lane M, DNA size marker(100 bp DNA ladder); Lane 1-7, 10^8 부터 10^1 copy; Lane N, 음성대조; Lane W, 증류수.

나. 정량검사 결과

유전자변형 송사리의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위한 Met 유전자 단편을 클로닝 한 후 플라스미드 DNA를 추출하여 copy 수에 따른 반응을 알아보기 위한 real-time TaqMan PCR은 정성검사에 사용한 PCR primer인 MetA-F/-R과 같은 것을 사용하였으며, probe로는 MetA-P를 사용하였다. 플라스미드 DNA의 copy 수를 계산하여 10배 연속 희석하여 PCR한 결과 10^8 부터 10^1 copy까지 증폭된 반응을 보였다(그림 21). PCR 반응은 총 40 cycle을 실시하였으며, 10^8 copy에서는 18 cycle에서부터 형광색소를 감지하여 증폭되는 것을 확인 할 수 있었으며, 10^1 에서는 34 cycle에서부터 증폭을 확인 할 수 있었다.

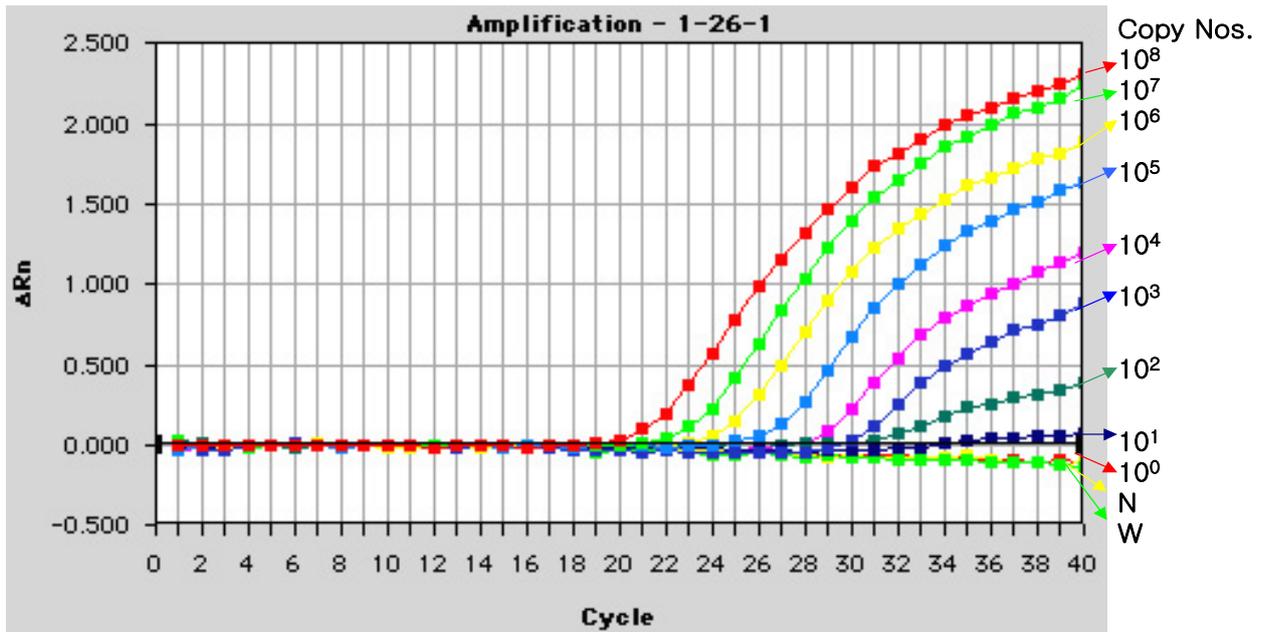


그림 21. 유전자변형 송사리의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위한 MetA 유전자 단편을 클로닝 한 후 플라스미드 DNA를 추출하여 copy 수에 따른 반응을 알아보기 위한 real-time TaqMan PCR 결과. PCR primer는 MetA-F/-R 그리고 probe는 MetA-P를 사용하였으며, template DNA로 사용한 플라스미드 DNA는 copy 수를 계산하여 10배 연속 희석하여 사용하였음. Copy Nos., 10^8 부터 10^0 copy; N, 음성대조; W, 증류수.

다. 내재유전자 검출

유전자변형 송사리의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위한 내재유전자인 OL β -act 유전자 단편을 증폭하기위하여 OL β -act-F/-R primer set를 이용하여 PCR 한 결과 180 bp의 위치에서 증폭된 유전자단편을 확인 할 수 있었다(그림 22).

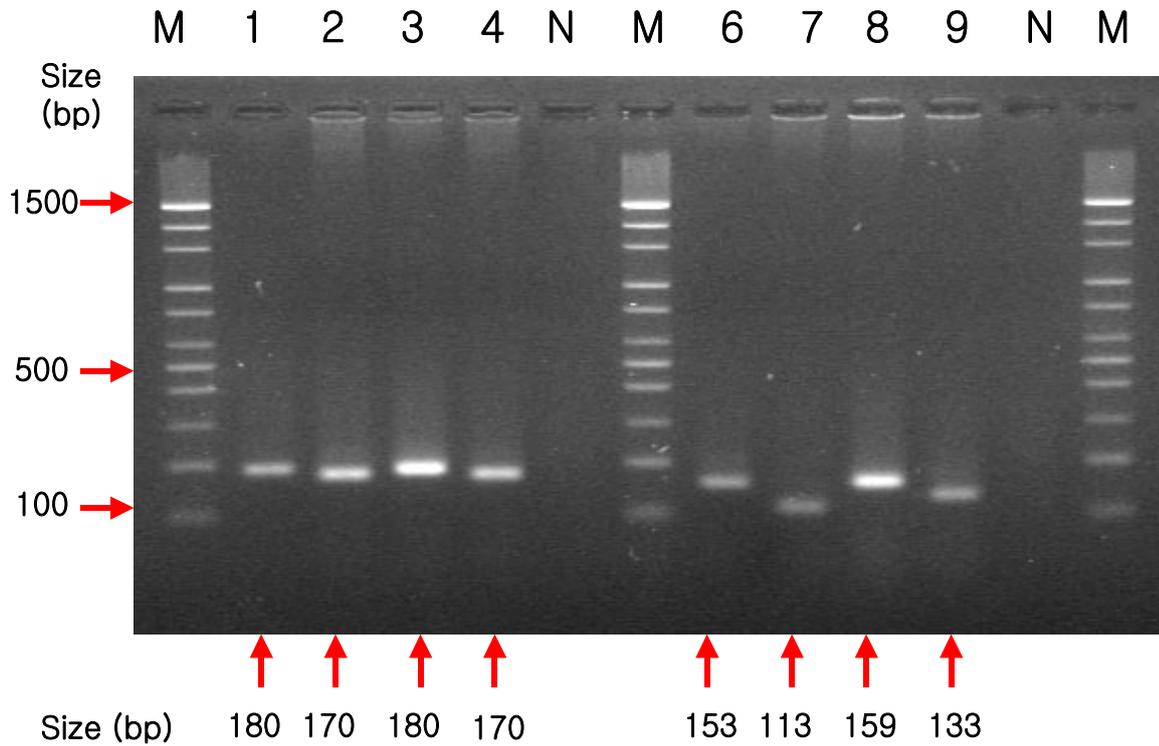


그림 22. 유전자변형 잉어, 틸라피아, 송사리, 은연어의 PCR 검출시 내재유전자의 확인을 위한 β -act, Cyt 유전자 단편을 F/-R primer set를 이용하여 PCR 증폭한 결과. Lane M, DNA size marker(100 bp DNA ladder); Lane 1, 잉어 내재유전자; Lane 2, 틸라피아 내재유전자; Lane 3, 송사리 내재유전자; Lane 4, 은연어 내재유전자; Lane 5, 유전자 변형 잉어; Lane 6, 유전자 변형 틸라피아; Lane 7, 유전자 변형 송사리; Lane 8, 유전자 변형 은연어; Lane N, 음성대조

4. 은연어(Coho salmon)

가. 정성검사 결과

유전자변형 은연어의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위한 MtB 유전자 단편을 클로닝 한 후 플라스미드 DNA를 추출하여 민감도를 보기위한 PCR 결과는 그림 8과 같다. PCR primer는 MtB-F/-R을 사용하였으며, 플라스미드 DNA의 copy 수를 계산하여 10배 연속 희석하여 PCR 한 결과 10^8 부터 10^5 copy까지 156 bp의 증폭된 유전자 단편을 확인 할 수 있었다(그림 23).

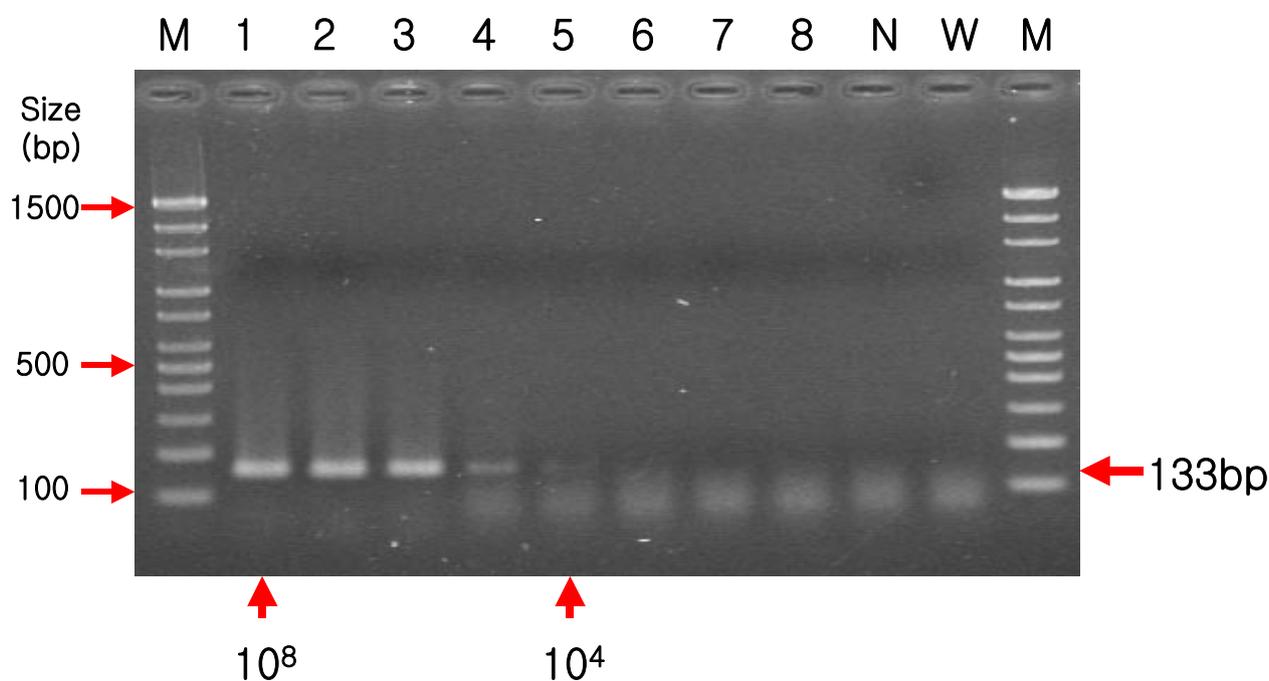


그림 23. 유전자변형 은연어의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위한 MtB 유전자 단편을 클로닝 한 후 플라스미드 DNA를 추출하여 민감도를 보기위한 PCR 결과. PCR primer는 MtB-F/-R을 사용하였으며, template DNA로 사용한 플라스미드 DNA는 copy 수를 계산하여 10배 연속 희석하여 사용하였음. Lane M, DNA size marker(100 bp DNA ladder); Lane 1-7, 10^8 부터 10^1 copy; Lane N, 음성대조; Lane W, 증류수.

나. 정량검사 결과

유전자변형 은연어의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위한 MtB 유전자 단편을 클로닝 한 후 플라스미드 DNA를 추출하여 copy 수에 따른 반응을 알아보기 위한 real-time TaqMan PCR은 정성검사에 사용한 PCR primer인 MtB-F/-R과 같은 것을 사용하였으며, probe로는 MtB-P를 사용하였다. 플라스미드 DNA의 copy 수를 계산하여 10배 연속 희석하여 PCR한 결과 10^8 부터 10^1 copy까지 증폭된 반응을 보였다(그림 24). PCR 반응은 총 40 cycle을 실시하였으며, 10^8 copy에서는 14 cycle에서부터 형광색소를 감지하여 증폭되는 것을 확인 할 수 있었으며, 10^1 에서는 36 cycle에서부터 증폭을 확인 할 수 있었다.

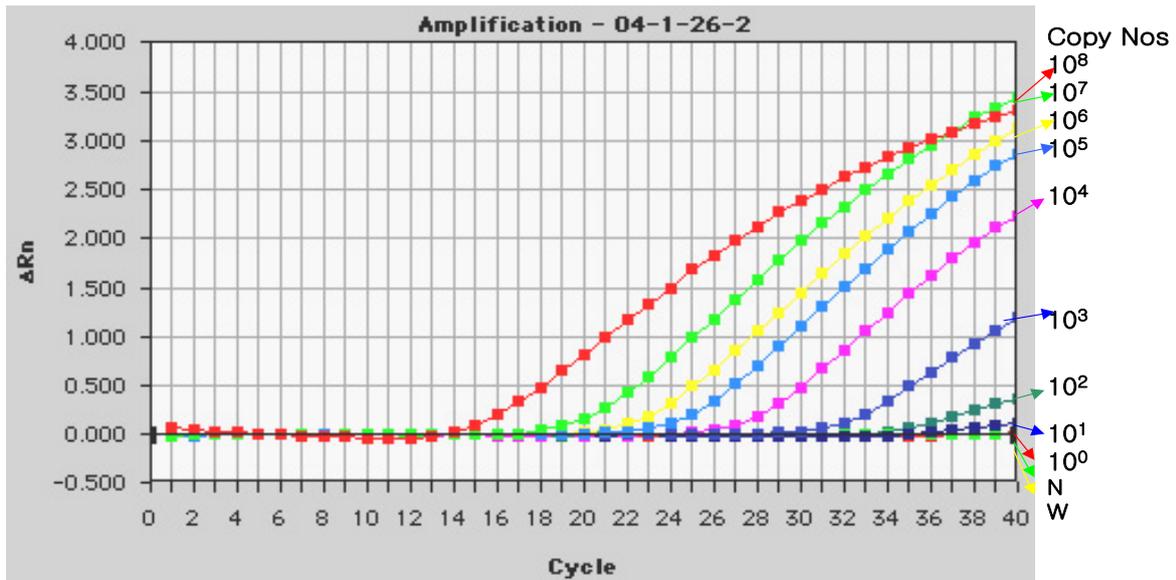


그림 24. 유전자변형 은연어의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위한 MtB 유전자 단편을 클로닝 한 후 플라스미드 DNA를 추출하여 copy 수에 따른 반응을 알아보기 위한 real-time TaqMan PCR 결과. PCR primer는 MtB-F/-R 그리고 probe는 MtB-P를 용하였으며, template DNA로 사용한 플라스미드 DNA는 copy 수를 계산하여 10배 연속 희석하여 사용하였음. Copy Nos., 10^8 부터 10^0 copy; N, 음성대조; W, 증류수.

다. 내재유전자 검출

유전자변형 은연어의 PCR 검출시 양성대조로 사용하기 위한 내재유전자인 MtB-Cyt 유전자 단편을 증폭하기 위하여 MtB-Cyt-F/-R primer set를 이용하여 PCR한 결과 170 bp의 위치에서 증폭된 유전자단편을 확인 할 수 있었다(그림 25).

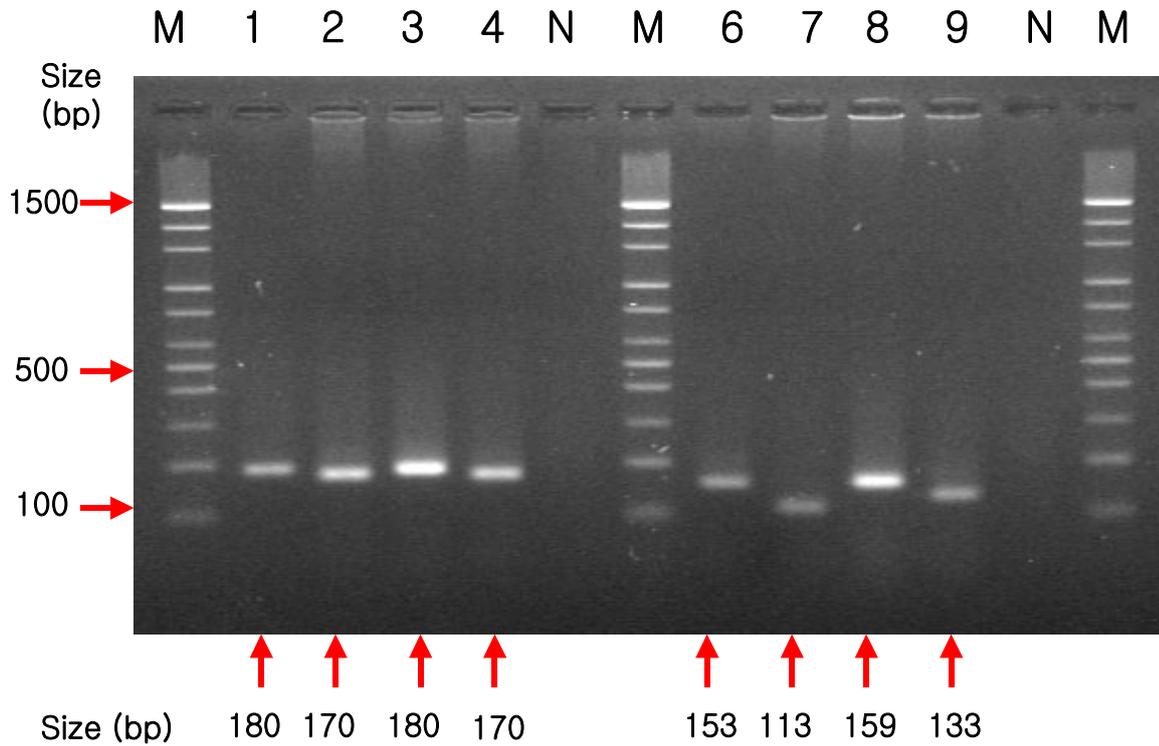


그림 25. 유전자변형 잉어, 틸라피아, 송사리, 은연어의 PCR 검출시 내재유전자의 확인을 위한 β -act, Cyt 유전자 단편을 F/-R primer set를 이용하여 PCR 증폭한 결과. Lane M, DNA size marker(100 bp DNA ladder); Lane 1, 잉어 내재유전자; Lane 2, 틸라피아 내재유전자; Lane 3, 송사리 내재유전자; Lane 4, 은연어 내재유전자; Lane 5, 유전자 변형 잉어; Lane 6, 유전자 변형 틸라피아; Lane 7, 유전자 변형 송사리; Lane 8, 유전자 변형 은연어; Lane N, 음성대조

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

수산물의 안전성 증대와 평가기술 개발의 일환과 유전자 재조합어류의 소비자 불신과 거부 반응 그리고 유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률발효에 대비한 LMO 검출법을 개발하는데 목적이 있었으며, 그 목적에 해당하는 유전자변형 잉어, 틸라피아, 송사리, 은연어 검색법을 개발 하였다.

현재 유전자변형 해양생물체가 공식적으로 정부의 승인을 얻지 못하여 유통이 되고 있지 않으므로 유전자변형 해양 생물체인 연어, 송어 또는 슈퍼미꾸라지를 구할 수 없어 양성대조를 사용하기가 어려웠다. 따라서 목표유전자를 합성하여 벡터에 삽입시킨 후 *E. coli*에 형질 전환시켜 플라스미드 DNA를 추출하여 PCR 검사시 양성대조로 사용하였다. 그러나 내재유전자는 잉어, 틸라피아, 송사리 그리고 은연어로부터 내재유전자인 β -act 와 cyt 유전자단편을 증폭하여 클로닝을 할 수 있었다. LM 해양생물체를 개발한 대부분의 연구자들은 상품화가 되기 전까지 개발한 LM 해양생물체를 유통을 시키지 않기 때문에 검출시스템을 개발하는데 많은 어려움이 있었으나 본 연구의 결과에서처럼 정확한 유전자 정보를 가지고 있다면 목표 유전자를 인공합성하여 클로닝함으로써 PCR 검사시 양성대조를 위해 지속적으로 사용 할 수 있을 것으로 본다. 그러나 현재까지 개발이 되지 않은 다른 종의 해양생물체에 유전자변형을 시키거나 새로운 벡터의 개발과 새로운 목표단백질을 유전자변형 해양생물체에 이용함으로써 검출법은 이에 맞춰 지속적으로 개발을 해야 하는 어려움이 있다. 따라서 해양생물체가 개발되는 데로 그 정보를 빨리 입수하여 그에 맞는 검색기법을 개발해야 될 것으로 본다. 따라서 본 연구의 결과는 해양생물체의 유전자 변형 여부의 검사를 실용화시키는데 많은 도움이 되리라 기대한다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

유전자변형 해양생물체의 국가간의 이동시 검역 또는 해양생물체가 포함된 식품 등에서 유전자변형 해양생물체가 포함이 되어 있는지에 관한 여부를 판정 할 때 본 연구에서 개발한 방법을 활용할 계획이다.

현재까지 무지개송어, 대서양연어, 미꾸라지 외에 은연어(coho salmon), 잉어(common carp), 메다카(medaka), 틸라피아(tilapia), 인도 연어(Labeo rohita), zebra fish 등의 유전자변형 생물체를 개발한 나라들이 있으며, 이 분야의 많은 연구가 진행되고 있다. 따라서 유전자변형 해양생물체의 검색기술의 개발을 위해서는 지속적인 정보의 입수와 데이터베이스를 구축함으로써 빠른 대응을 할 수 있을 것으로 본다.

또한 각종 해양생물체에 대한 내재유전자의 데이터베이스와 종의 구분을 위한 종간의 특이유전자검색법도 필요 할 것으로 생각한다.

본 연구개발한 기술은 유전자변형 해양생물체의 PCR검출 키트를 개발하여 상용화 할 수 있도록 유도하고, 국립수산물품질관리원과 국립수산물품질관리원에 기술을 전수하여 활용하도록 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구진들은 2004년 5월 2-7일 까지 Thailand Phuket 에서 개최된 제 11차 어류의 사료 및 영양 국제 학회("The 11th international international symposium on nutrition a feeding in fish")에 참석하여서 매우 GM작물 첨가사료의 생체내 유입 및 발현에 대한 중요한 정보들을 접할 수가 있었다. 일본의 Dr. Shuichi Satoh 교수(Department of Mrine Biosciences, Tokyo University)는 유전자변형(GM) 콩을 어류 사료에 혼합투여 기간에 따른 외래유전자의 발현인자의 흡수 및 소실등에 대한 연구를 시행한 결과에서 목표유전자(35S promotor 유전자)가 물고기 근육으로 전이 되어 있음을 PCR 방법을 통하여 증명하였다. 또한 노르웨이의 Dr. Monica Sanden(National Institute of Nutrition and Seafood Research, Bergen, Norway)는 GM 사료를 어류에 급여시 세포성 반응이 증가된다는 연구 보고를 하였다. 이러한 일련의 보고들은 유전자 변형 생물체의 안전성/위해성 평가와 관련하여 GM 사료가 물고기에 미치는 영향과 GM사료로 사육된 물고기를 사람이 섭취하였을 시 문제시 될 수 있는 안전성평가 실험의 필요성이 절대적으로 요구되어짐을 예견될 수 있다.

한편, 수산 양식분야는 국제적으로 성장 추세에 있으며, 많은 연구가 이루어지고 있으나 삼면이 바다로 둘러싸인 국내의 현실은 이 분야에 대한 관심 및 투자가 오히려 축소되고 있는 점은 매우 안타까운 현실이다. 더욱이 국제적으로 유전자변형 작물들(대두, 옥수수)을 가축 및 어류의 사료에 이용율이 매년 증가추세에 있다는 점을 감안해 볼때, 사료로 이용되는 유전자변형 작물내에 함유된 이종의 유전자가 어류체내에 들어가 어체의 특이 단백질 발현기작과 GM 사료를 섭취한 어류로부터 GM 유전자 검출 및 발현단백질 검출에 관한 연구뿐만 아니라 더 나아가 LM fish를 사람이 먹었을시 나타날 수 있는 제반 문제점에 관하여 실험동물을 이용한 안전성 평가 실험을 위한 대책수립이 필요하다.

따라서 이러한 연구를 효율적으로 수행되기 위해서는 최근 다양하게 개발되고 있는 LM 어패류에(관상어, 전복)등의 외래유전자 발현인자들의 검출시스템에 대한 지속적인 연구를 통한 데이터베이스 구축과 예비실험을 통한 PCR primer와 probe 등을 확보하고 유전자은행을 구축하여 체계적으로 운영하여서 지속적인 연구사업이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

제 7 장 참고문헌

1. Aleksei Krasnov, Jytki J. Agren, Tiina I. Pitkanen, Hannu Molsa. 1999. Transfer of growth hormone(GH) transgenes into Arctic charr(*Salvelinus alpinus* L.) II. Nutrient partitioning in rapidly growing fish. Genetic Analysis: Biomol. Engin. 15:99-105.
2. Bayer, T.A., Campos-Ortega, J.A. 1992. A transgene containing lacZ is expressed in primary sensory neurons in zebrafish. Develop. 115(2):421-426.
3. Chae, J.S., Wang, H.Y., Choi, M.S. Choi, S.H. Detection of living modified Atlantic salmon using TaqMan PCR amplification. "Agro-Biotech in the New Millennium" 24-29 November, 2002. Biotechnology Havana, Cuba.
4. Chan, W.K. and Devlin, R.H. 1993. polymerase chain reaction amplification and functional characterization of sockeye salmon H3, metallothionein-B and protamine promoters. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 2(5):308-318.
5. Corpet, F. 1998. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucl. Acids Res. 16(22):10881-10890.
6. Du, S.J., Gong, Z.Y., Fletcher, G.L., Shears, M.A., King, M.J., Idler, D.R., Hew, C.L. 1992. Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct. Biotechnol. 10(2):176-181.
7. Elwood Linney, Nancy L. Hardison, Bonnie E. Lonze, Sophia Lyons, and Leo DiNapoli. 1999. Transgene Expression in Zebrafish: A Comparison of Retroviral-Vector and DNA-Injection Approaches. Develop. Biol. 213:207-216.
8. Hanley S, Smith T.J, Muller F, Maclean N, Uzbekova S, Prunet P, Breton B. 1998. Isolation and functional analysis of the histone H3 promoter from atlantic salmon(*Salmo salar* L.). Mol. Mar. Bio. Biotechnol. 7(3):165-172.
9. Hartmut Rehbein, Devlin. R.H, Hermann Ruggeberg. 2002. Detection of a genetic alteration and species identification of coho salmon(*Oncorhynchus kisutch*): a collaborative study. Eur. Food Res. Technol 214:352-355.
10. Hew C, Poon R, Xiong F, Gauthier S, Shears M, King M, Davies P, Fletcher G. 1999. Liver-specific and seasonal expression of transgenic Atlantic salmon harboring the

- winter flounder antifreeze protein gene. *Transgenic Res.* 8:405–414.
11. Hew, C.L., Davies, P.L., Fletcher, G. 1992. Antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1:309–317.
 12. Hurst, CD., Bartlett, SE., Davidson, WS. and Bruce, IJ. 1999. The complete mitochondrial DNA sequence of the Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Gene.* 239(2):237–242.
 13. Hwang,G.L., Rahman,M.A., Razak,S.A., Sohm,F., Farahmand,H., Smith,A., Brooks,C. and Maclean,N. 2003. Isolation and characterization of tilapia beta-actin promoter and comparison of its activity with carp beta-actin promoter. *Biochim. Biophys. Acta* 1625(1): 11–18
 14. Kim, D.S, Y.K. Nam, I.S. Park. 1995. Survival and karyological analysis of reciprocal diploid and triploidy hybrids between mud loach(*Misgurnus mizolepis*) and cyprinid loach(*Misgurnus anguillicaudatus*). *Aquacul.* 135:257–265.
 15. Kim, D.S, Y.K. Nam, C.H. Noh. 1999. Transmission and expression of an integrated reporter construct in three generations of transgenic mud loach(*Misgurnus mizolepis*). *Aquacul.* 172:229–245.
 16. Kim, D.S, Y.K. Nam, Y.S. Cho. 2000. Isogenic transgenic homozygous fish induced by artificial parthenogenesis. *Transgenic Res.* 9:463–469.
 17. Kim, D.S., Y.K. Nam, Y.S. Cho, Y.J. Chang, J.Y. Jo. 2000. Generation of transgenic homozygous line carrying the CAT gene in mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Fisheries Sci.* 66:58–62.
 18. Kim, D.S., Y. K. Nam, J. K. Noh, Y. S. Cho, H. J. Cho, K. N. Cho, C. G. Kim. 2001. Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Transgen. Res.* 10:353–362.
 19. Kim, D.S., Y. K. Nam, Y. S. Cho, H.J. Cho. 2002. Accelerated growth performance and stable germ-line transmission in androgenetically derived homozygous transgenic mud loach, *Misgurnus mizolepis*. *Aquacul.* 209:257–270.
 20. Liu,Z.J., Zhu,Z.Y., Roberg,K., Faras,A., Guise,K., Kapuscinski,A.R. and Hackett,PB. 1990. Isolation and characterization of beta-actin gene of carp (*Cyprinus carpio*). *DNA Seq.* 1(2): 125–136.

21. Masri S, Rast H, Ripley T, James D, Green M, Jia X, Devlin RH. 2002. Detection of genetically modified coho salmon using polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J. Agric. Food Chem.* 50:3161–3164.
22. Maclean.N, M.A. Rahman, F. Sohm, G. Hwang, A. Iyengar, H. Ayad, A. Smith, H. Farahmand. 2002. Transgenic tilapia and the tilapia genome. *Gene* 295:265 –277.
23. Nathan D. Lawson and Brant M. Weinstein. 2002. *In vivo* imaging of embryonic vascular development using transgenic Zebrafish. *Develop. Biol.* 248 :307–318.
24. Noh, JK., Cho, KN., Han, EH., Kim, A., Nam, YK., Kim, DS. and Kim, CG. 2000. Genomic cloning of the mud loach(*Misgurnus mizolepis*) beta-actin gene and usefulness of its regulatory region in fish-specific expression vectors.
25. Olsson, PE., Kling, P., Erkell, L.J. and Kille, P. 1995 Structural and functional analysis of the rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) metallothionein-A gene *Eur. J. Biochem.* 230(1):344–349
26. Ozato K, Wakamatsu Y, Inoue K. 1992. Medaka as a model of transgenic fish. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1(4-5):346–354.
27. Rahman. MA, Arati Iyengar and Norman Maclean. 1997. Co-injection strategy improves integration efficiency of a growth hormone gene construct, resulting in lines of transgenic tilapia(*Oreochromis niloticus*) expressing an exogenous growth hormone gene. *Transgenic Res.* 6:369–378.
28. Rahman. MA, Rohan Mak, hala Ayad, Alan Smith and Norman Maclean. 1998. Expression of a novel piscine growth hormone gene results in growth enhancement in transgenic tilapia(*Oreochromis niloticus*). *Transgenic Res.* 7:357–369.
29. Rahman, M.A, A. Ronyai, B.Z. Engidaw, K.Jauncey, G-L. Hwang, A. Smith, E. Roderick, D. Penman, L. Varadi and N. Maclean. 2001. Growth and nutrition trials on transgenic Nile tilapia containing an exogenous fish growth hormone gene. *J. Fish. Biol.* 59:62–78.
30. Rancourt, D. E., Walker, V.K., Davies, P.L. 1987. flounder antifreeze protein synthesis under heat shock control in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* 7(6):2188–2195.

31. Rancourt, D. E., Walker, V.K., Davies, P.L. 1990. Wolffish antifreeze protein from transgenic *Drosophila*. *Biotechnology* 8(5):453-457.
32. Stevens, E.D, G.N. Wagner, A. Sutterlin. 1999. Gut morphology in growth hormone transgenic Atlantic salmon. *J. Fish Biol* 55:517-526.
33. Takagi, S., Sasado, T., Tamiya, G., Ozato, K., Wakamatsu, Y., Takeshita, A. and Kimura, M. 1994. An efficient expression vector for transgenic medaka construction. *Mol. Marine Biol. Biotechnol.* 3(4): 192-199.
34. Tiina I. Pitkanen, Aleksei Krasnov, Heli Teerijoki, Hannu Molsa. 1999. Transfer of growth hormone(GH) transgenes into Arctic charr(*Salvelinus alpinus* L.) I. Growth response to various GH constructs. *Genetic Analysis: Biomol. Engin.* 14:91-98.
35. Tsukasa Mori, Robert H. Devlin. 1999. Transgene and host growth hormone gene expression in pituitary and nonpituitary tissue of normal and growth hormone transgenic salmon. *Mol. Cell. Endocrinol.* 149:129-139.
36. Sato A, Komura J, Masahito P, Matsukuma S, Aoki K, Ishikawa T. 1992. Firefly luciferase gene transmission and expression in transgenic medaka(*Oryzias latipes*). 1, 318-325. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1:346-354.
37. Wolf C, Burgener M, Huebner P. and Luethy J. 2000. PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: Differentiation of Fish Species. *Lebensmittelwissenschaft und Technology* 33: 144-150
38. Zhang PJ, Hayat M., et al., 1990. Gene transfer, expression and inheritance of pRSV-rainbow trout-GH cDNA in the common carp, *Cyprinus carpid* (Linnaeus). *Mol. Reprod. DEV.* 25(1):3-13.

***국제 학술대회 proceeding 초록**

**The 11th international conference of the association of institutions for tropical veterinary medicine
23-27, August 2004,**

**Detection of living modified Rainbow trout and Super mud loach
by real-time TaqMan PCR**

**Joon-seok Chae^{1*}, Hey-young Wang¹, , Jae-cheol Han¹, Mae-rim Cho¹,
Jin-ho Park¹, Min-soon Choi², Sang-hoon Choi²**

**1College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju, Jeonbuk 561-756, South Korea. 2Department of
Marine Biomedical Science, Kunsan National University, Kunsan, Jeonbuk 573-702, Korea.**

***Corresponding author: jschae@chonbuk.ac.kr**

A conventional PCR and real-time TaqMan PCR for identification of living modified (LM) Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Super mud loach (*Misgurnus mizolepis*) carrying growth hormone transgenes were developed. A pair of PCR primer and probe, ONMT-P/R and ONMT-P (LMrainbow trout) and MLCAT-F/R and MLCAT-P (mud loach) were designed while pGEM-Teasy/onMT and pGEM-Teasy/MLcat vector as positive control were designed for detection of LM rainbow trout and Super mud loach, respectively. Two pairs of PCR primers and probes, RTCYT-F/-R and RTCYT-P (rainbow trout) and MLBACT-F/-R and MLBACT-P (mud loach) were designed targeting endogenous gene while pGEM-Teasy/RTcyt and pGEM-Teasy/ML-act vector, respectively were used as a positive control. Positive control vectors using endogenous gene fragments were constructed in pGEM-Teasy/onMT-act (rainbow trout) and pGEM-Teasy/MLcat--act (mud loach). The qualitative and a quantitative method of analysis to detect transgenic DNAs in salmon fishes were tried. The use of the ABI Prism 7700 sequence detection system allowed determination of the amplified product accumulation through a fluorogenic probe. These methods of analyses were very sensitive and specific. It is necessary to determine the LM fishes in order to assess whether living modified marine organisms were deliberately added, or were resulted due to contamination.

주 의

1. 이 보고서는 해양수산부에서 시행한 “해양한국발전프로그램 (KSGP) 연구개발사업”의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 해양수산부에서 시행한 “해양한국발전프로그램(KSGP)연구개발사업”의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.
4. 이 보고서와 관련된 문의사항은 해양수산부 해양정책과(전화 : 02 - 3148 - 6514)로 하시면 됩니다.