

최 종
연구보고서

유전자 변형 감자의 정성 및 정량법의
개발에 관한 연구

Development of Qualitative and Quantitative Analysis
Method of Genetically Modified Potato

연구 기관
(주)넥스젠

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “유전자 변형 감자의 정성 및 정량법의 개발에 관한 연구” 과제
의 최종보고서로 제출합니다.

2003년 월 일

주관연구기관명: (주)넥스젠

총괄연구책임자: 이 선 교

연 구 원: 김 성 아

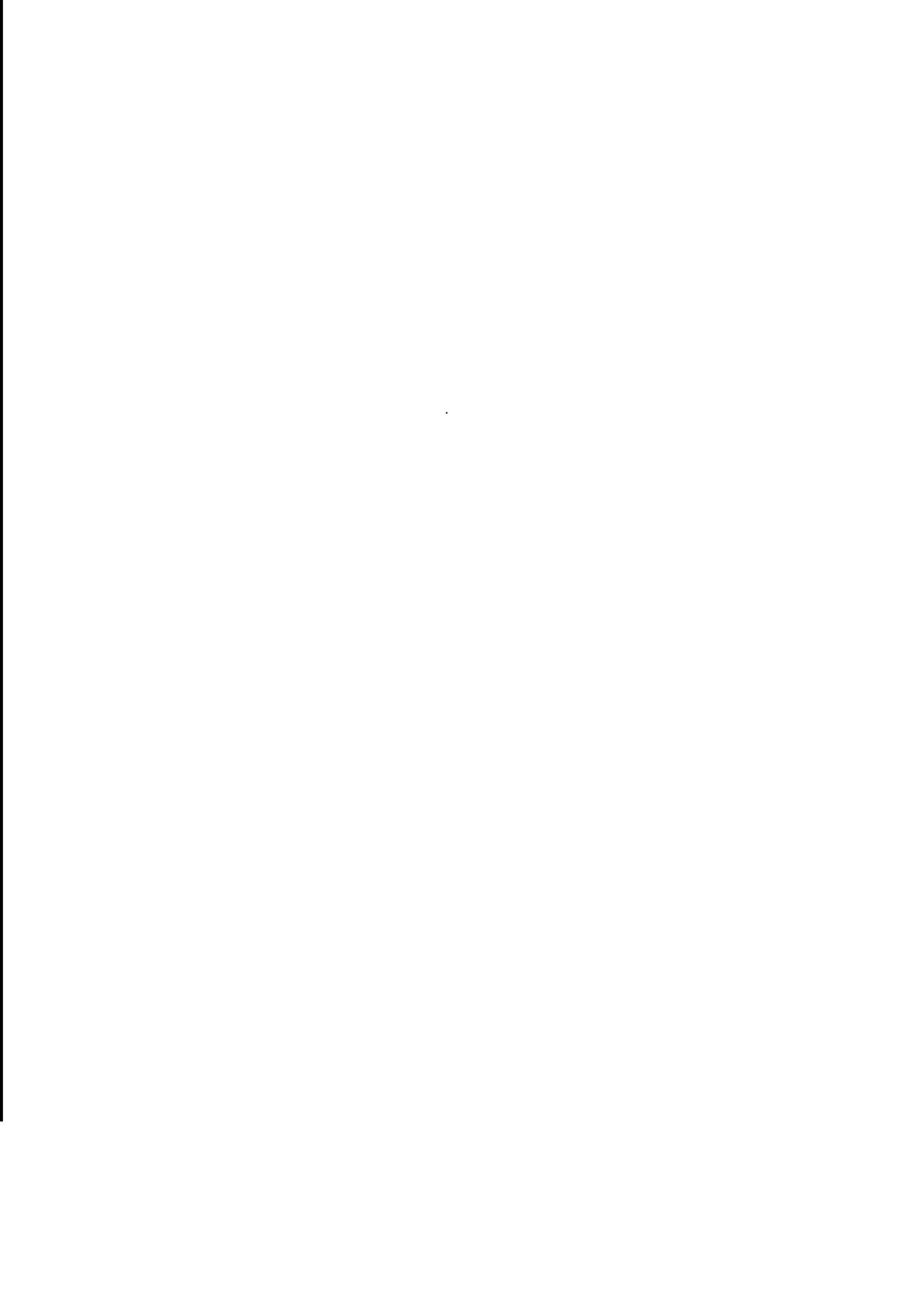
연 구 원: 이 인 희

연 구 원: 심 상 미

연 구 원: 김 은 희

협동연구기관명: 연세대학교

협동연구책임자: 정 건 섭



요 약 문

I. 제 목

유전자 변형 감자의 정성 및 정량법의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

유전자변형 감자에 도입된 외래유전자들의 정성 및 정량분석을 위한 GMO
판별 시스템 개발

III. 연구개발 내용 및 범위

○ 유전자변형 감자의 판별에 필수적인 기술 개발

- 유전자변형 감자 샘플링 방법 및 DNA 고순도 분리와 효율적 회수
방법의 개발
- 유전자변형 감자 분석의 재현성 및 정확도 향상을 위한 분석 방법
정량화

○ 유전자변형 감자의 분석법 개발

- 유전자변형 감자 제작에 사용되는 요소들(프로모터, 항생제 마커,
터미네이터, 유전자 등)을 탐지하기 위한 그 단편들에 특이적인

프라이머 디자인 및 제작

- 제작한 프라이머의 적합성을 PCR 기법으로 조사하여 최적합 프라이머 선발
- 검출 대상 유전자변형 감자의 범위 확장
- 유전자변형 감자 함량의 정량분석을 위한 Real time PCR용 probe 제작
- 유전자변형 감자 및 이를 이용한 식품에 혼입된 GMO 함량의 정량분석 방법 개발

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구과제의 목표이었던 유전자 변형 감자의 샘플링, 감자로부터의 DNA의 분리, 유전자변형감자의 정성법과 정량법이 성공적으로 확립되었으며 현재 당사에서 진행 중인 유전자 변형작물 및 이를 원료로 사용하여 제조된 식품 등의 분석 서비스 업무에 효과적으로 활용되고 있다. 또한 본 과제의 수행 중에 습득한 기술 등으로 국제표준협회(ISO) 인증기관이자 영국 정부연구소인 CSL(Central Service Laboratory)를 통해 실시한 유전자변형 원료 및 가공식품에 대한 정성과 정량검사 링테스트(Ring Test)에서 모두 합격을 하여 본 연구과제를 성공적으로 완료하였음을 보여주었다. 본 과제의 수행으로 습득한 기술을 이용하여 국내에 수입되는 감자 및 이를 사용한 가공식품들의 효과적인 분석을 가능하도록 하였다. 또한 이 기술을 중동, 아시아, 아프리카 등지에 수출하여 외화 획득이 가능할 것으로 사료된다.

SUMMARY

In this study, 1)sampling methods of the genetically modified(GM) potato, 2)efficient DNA isolation procedure for GM potato, 3) optimized quantification and qualification analysis protocol for GM potato were developed successfully. Depend on those protocols, Nexgen GMO Screening Center has been certified by the GMO Ring Test of Central Science Laboratory (CSL, UK; ISO GMO Certifying Organization) for quantification and qualification analysis of GMO detection.

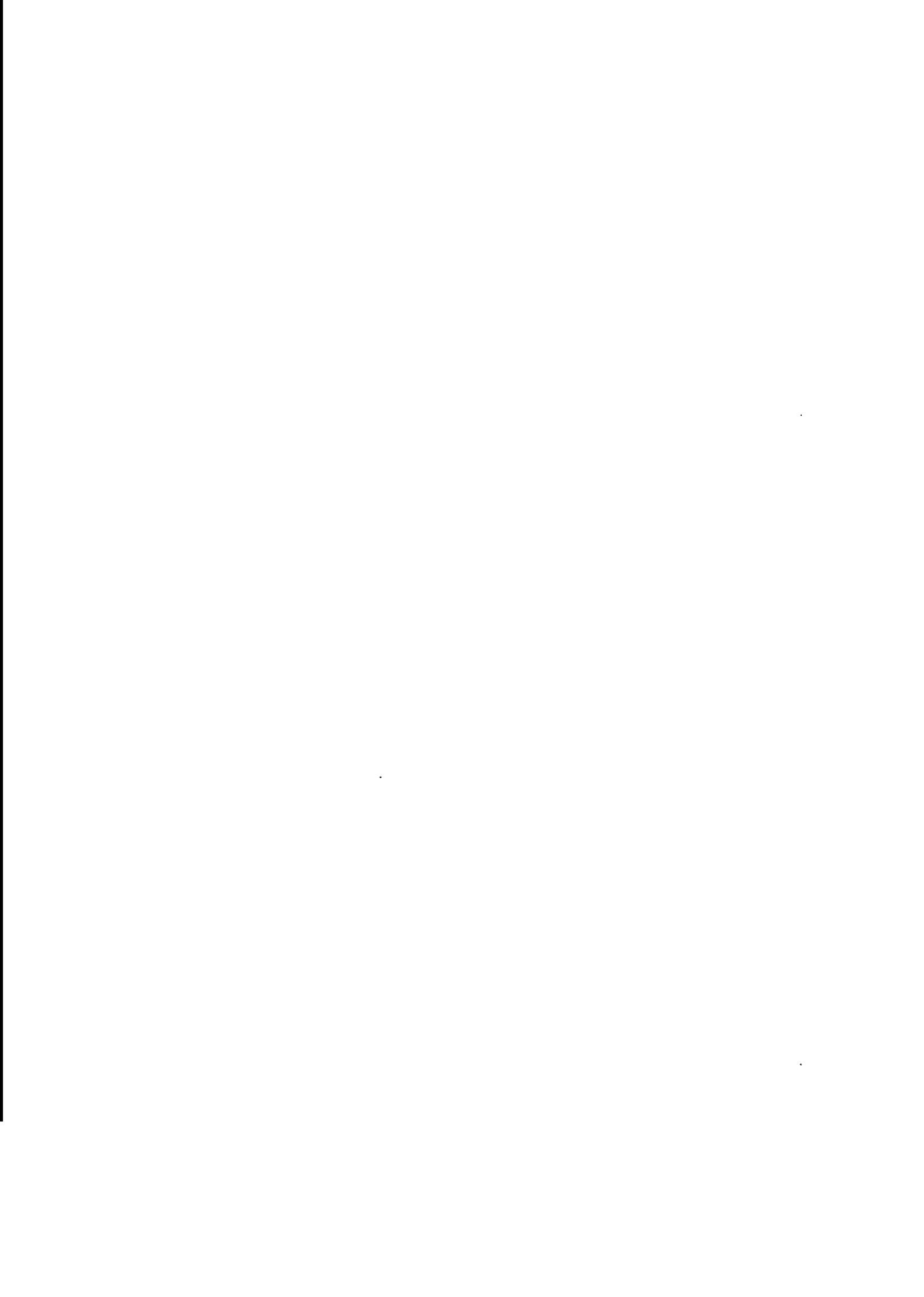
Nexgen GMO Screening Center using certified protocols to detects GMOs from the various samples of crops and of processed foods.

CONTENTS

Chapter I. Summary of the research project-----	7
Section 1. Background and Purpose -----	7
Section 2. Necessity -----	7
1. Necessity of the research project -----	7
2. Technical and functional aspects -----	9
Section 3. Objectives of the research project -----	10
1. 1st year-----	10
2. 2nd year-----	10
Chapter II. Technical status in domestic and foreign fields-----	11
Chapter III. Contents and results-----	13
Section 1. Objective and results of 1st year-----	13
1. Sampling and Genomic DNA isolation from GM potato-----	13
2. Development of specific primers for qualitative analysis-----	18
3. Qualification analysis for GM potato detection-----	27
Section 2. Objective and results of 2nd year-----	29
1. Sampling and Genomic DNA isolation from the processed foods	29
2. Development of foreign gene specific primers for quantitative analysis-----	29
3. Qualification analysis for GM potato detection-----	30
4. Optimization of analysis procedures for reproducibility and accuracy--	30
5. Development of primers for quantitative analysis-----	31
6. Development of fluorescent primers-----	32
7. Establishment of RT-PCR procedures and quantitative analysis-----	34
IV. Accomplishment and contribution to related field-----	36
V. Application of the results-----	38
VI. Foreign technological information obtained-----	39
VII. References-----	41

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요-----	7
제 1 절 연구개발의 목적-----	7
제 2 절 연구개발의 필요성-----	7
1. 개발의 필요성-----	7
2. 용도 및 기능-----	9
제 3 절 개발범위-----	10
1. 1차년도 개발범위-----	10
2. 2차년도 개발범위-----	10
제 2 장 국내외 연구 개발 동향 -----	11
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과-----	13
제 1 절 제 1차 년도 연구개발 -----	13
1. 유전자변형 감자 검출 위한 샘플링 방법 및 DNA의 회수-----	13
2. 도입유전자 특이적 정성 프라이머 선별 및 제작-----	18
3. 정성 PCR 조건 분석-----	27
제2절 제 2차 년도 연구개발-----	29
1. GM 가공식품 정량검사를 위한 샘플링 방법 및 DNA의 회수-----	29
2. 도입유전자 특이적 정량 프라이머 선별 및 제작-----	29
3. 정성 PCR 반응조건 확립 -----	30
4. 정량용 primer 선별 및 제조-----	30
5. 형광물질을 이용한 형광probe의 제작-----	31
6. RT-PCR 반응조건 및 정량법 확립-----	32
7. 재현성 및 정확도의 향상을 위한 분석방법 확립-----	34
제 4.장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도-----	36
제 5 장 연구개발결과의 활용계획-----	38
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보-----	39
제 7 장 참고문헌-----	41



제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

유전자변형 감자에 도입된 외래유전자들의 정성 및 정량분석을 위한 GMO 판별시스템 개발이 목적이다. 이에 대한 기술을 확립하여 국내수요기관에 공급하는 한편 국내독자적으로 개발한 제품을 해외에 수출하여 국내기술에 대한 국제적 인식변화를 도모하고자 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 개발의 필요성

○ GMO (Genetically Modified Organism: 유전자변형생물체)는 유전공학적인 방법을 이용하여 생물체에 외래 유전자를 도입하여 제작한 생물체를 의미한다. 식물의 경우에 있어서 외래유전자가 도입된 GMO는 기존에 존재하지 않던 형질을 나타내게 되거나 기존에 존재하던 형질이 억제되어 발현되지 않는 경우 등이 있을 수 있다.

○ 식물에 외래 유전자를 도입하는 이유는, 주로 병충해로부터 농작물을 보호하기 위한 것이다. 나아가, 신제품 개발기간의 단축, 작물의 수량과 품질의 개선, 고부가가치 물질의 생산(의약품, 비타민, 바이오폴리머 등), 영양학적 품질 개선 등의 이유가 있다. 최근에는 곤충 유충들이나 제초제들에 대한 저항성을 제공하는 유전자를 소지하는 GMO들이 가장 일반적이다. 한편, 식용작물들 중에 가장 많이 재배되고 있는 GMO들은 콩, 옥수수, 유채, 감자 등이 있다.

○ GMO는 1994년부터 상품화되기 시작하여 미국, 캐나다, 아르헨티나 등을 중심으로 재배면적이 급속도로 확산되고 있다. 일례로, 콩의 경우에는 1998년

북미에서 재배되고 있는 콩의 약 1/3이 GMO인 것으로 알려져 있으며 2000년에는 약 75% 수준이 될 것으로 추측되고 있다. 우리나라는 주요곡물을 미국 등으로부터 수입하고 있으므로 다량의 GMO가 non-GMO와 구분없이 수입되고 있으나 정확한 현황조사가 불가능한 실정이다. '98년통계로 국내 GMO 표시대상 수입물량은 콩, 옥수수 등 7백12만톤을 초과하고 있다. 이들 GMO들의 인체·환경에 대한 잠재적 위해성 문제가 계속 논란이 되고 있는 가운데 각국의 소비자단체 및 환경단체들 중심으로 유전자변형작물의 재배금지 및 소비자의 알권리 보장을 위한 표시제 시행 등이 요구되고 있다. 각국 정부는 이와 같은 단체들의 의견을 수렴하여 GMO 표시제를 추진하고 있으며 그 현황은 다음과 같다.

일본의 농림수산성은 '99년 8월 유전자변형 식품의 표시제 최종안을 승인하였고 2000년 4월에 고시, 2001년 4월 시행 예정으로 있으며 EU (유럽연합)는 EU 위원회의 GMO 표시규정에 따라 '99년 9월부터 GMO 식품 표시를 의무화하고 있다. 그리고 국내에서도 GMO가 대상품목에 3% 이상 혼입되어 있을 경우 콩, 콩나물, 옥수수 3개 품목들은 2001년 3월부터 이러한 GMO 작물을 사용한 식품들의 경우에는 2001년 7월부터 시행을 계획하고 있다. 주관기관인 (주) 넥스젠은 생명공학 분야의 원천기술을 보유하고 있는 전문벤처회사로서 국내 최초로 2000년 5월에 콩, 콩나물, 옥수수에 대한 GMO Detection Kit의 개발을 완료하고 제품을 생산, 판매 중이다.

○ 감자(*Solanum tuberosum* L.)는 1년생 가지과 식물로 전분자원으로 중요한 작물이며, 생산량으로 보면 옥수수, 벼, 밀 다음으로 세계 4대 작물에 속한다. 국내에서 감자는 과거에는 주식개념으로만 사용되어 왔으나 오늘날에는 가공용으로도 많이 소비되고 있으며, 알카리성 식품으로 국민소득향상 및 식생활양식의 변화에 따라 수요가 증가되고 있는 추세이다. 식품가공용 감자는 감자 chip(65%), french fried 감자(5%), 감자전분(30%) 등으로 사용되고 있다. 특히 수입 감자가격은 국내산 감자가격의 1/3수준이고, 또한 식품가공적성 등의 이유로 가공용 감자는 대부분이 수입되고 있는 실정이다.

제주농업시험장 발표 자료에 따르면, 1997년도 국내 감자소비량은 국내생산 감자 73만톤과 수입 감자 20만톤을 합하여 93만톤이었으며, 2001년도에는 약 23

만톤 정도를 수입할 것으로 예상하고 있다.

감자의 해외로부터 수입은 호주가 1위이며, 미국, 캐나다 순서이고 이들 3개국에서 대부분 수입이 되고 있는데, 1999년 일본의 식품표시문제간담회의 유전자 변형식품부회의 보고에 의하면 1998년 기준으로 미국산 대두의 27%, 미국산 옥수수의 23-34%, 미국산 감자의 39%를 GMO로 추정하고 있으며, BIO(Biotechnology Industry Organization)자료에 의하면 1998년도 미국과 캐나다의 GM감자 재배면적이 약 24,000ha 정도로 발표하고 있다.

○ 감자에서의 고순도 DNA 추출기술개발과 GMO 감자 검출방법을 확립한 후 국내수요기관에 공급하여 귀중한 외화유출을 방지할 뿐만 아니라 귀중한 국민의 세금을 절약하는 효과를 얻고자 한다. 또한 수출을 추진하는 한편 국내독자적으로 개발한 제품을 해외에 소개하여 국내기술에 대한 국제적 인식변화를 도모하고자 한다.

2. 용도 및 기능

1) 개발 대상기술의 용도

- 유전자변형 감자의 신속·정확한 검출에 이용하기 위한 PCR(DNA 중합효소 연쇄반응)에 의한 GMO의 정성분석용 기술로 감자에 도입된 DNA분석
- 유전자변형 감자가 혼입된 시료 중의 GMO 함량을 분석하기 위하여 형광프로브와 유전자 특이적인 한 쌍의 프라이머를 사용하는 실시간 PCR 기법으로 정량분석용

2) 제품의 기능

- 본 제품은 유전자변형 감자를 검출하기 위하여, GMO 제조시 필수요소들과 특수형질(내충성, 내병성)을 감자에 도입시키기 위하여 사용된 유전자들을 일반적인 PCR 기법과 Real-time PCR 기법으로 검출하여 유전자 변형여부와 혼입 퍼센트를 정량한다.

제 3 절 개발범위

1. 1차년도 개발범위

- 유전자변형 감자로부 검출을 위한 샘플링 방법 및 DNA의 회수
- 도입유전자 특이적 프라이머 선별 및 제작
- 정성 PCR 조건 분석
- 원료 감자의 DNA 분리방법 확립
- GM감자에 도입된 유전자에 특이적 프라이머 확립
- 정성 PCR 반응 조건 분석

2. 2차년도 개발범위

- 유전자변형 감자 및 가공식품으로부터 샘플링 방법 및 DNA의 회수
- 도입유전자 특이적 프라이머 선별 및 제작
- 정성 PCR 반응조건 확립
- 재현성 및 정확도의 향상을 위한 분석방법 확립
- 정량용 primer 선별 및 제조
- 형광물질을 이용한 형광probe의 제작
- RT-PCR 반응조건 및 정량법 확립

제 2 장 국내외 기술개발 동향

○ 정성적 검출

옥수수, 대두, 감자, 유채 등을 중심으로 현재 40 여종의 유전자변형농산물이 전 세계적으로 유통되고 있으며, 식량 자급도가 낮은 우리나라는 주요한 가공식품의 원료 대부분을 수입에 의존하고 있다. 따라서 우리나라는 사전예방원칙과 소비자의 알권리 확보라는 측면에서 2001년 3월 GMO 농산물에 대해 GMO 표시제를 본격적으로 시행하고 있다.

EU는 이미 '99년 9월부터 표시를 의무화하고 있고 일본도 2001년 4월부터 GMO 표시제를 시행할 예정이다. 이에 관련 국가연구기관 및 민간 단체의 소비가 본격적으로 확대될 전망이며, 따라서 GMO 진단키트 및 분석서비스의 잠재시장은 전 세계 곡물시장을 토대로 수 천억 원대로 확대될 것으로 전망하고 있다.

○ 정량적 검출법

정성분석결과 GMO 혼입이 확인된 시료에 대한 2차 검정으로 GMO 혼입량을 확인할 수 있는 검정방법으로 세계 각국에서 개발하고 있으나, 정확한 표준정량곡선을 얻기 위한 표준시료 확보가 무엇보다 중요하며, 농산물의 종류에 따라 유전체의 크기가 달라 이를 보정해야 하는 어려움이 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 국제적인 공인방법을 정하기 위하여 ISO 등에서 현재 이에 대한 표준화 작업을 진행하고 있다. 현재 가장 유력한 방법은 Real Time PCR을 이용하여 TaqMan chemistry에 의하여 PCR 증폭과정 중에 발색되는 형광색소의 양을 실시간 별로 측정하여 정량하는 방법이다. 따라서 본 연구에서도 Real Time PCR을 이용하여 유전자 변형작물을 정량하는 방법을 개발하고자 한다.

현재 GMO 농산물에 대한 detection Kit를 개발 판매하는 국가는 우리나라, 일본, 독일, 독일 등이 주도적이다. 현재까지는 대두, 옥수수 등에 대한 GMO 분석 키트가 개발되어 있으며, 미국 및 캐나다는 GMO 농산물에 대한 분석

서비스만을 하고 있다.

표1. 상품화된 GMO Detection Kit 현황

국가	회사명	상품명
한국	(주)넥스젠	GMO Detective Corn
		GMO Detective Bean
		GMO Detective Bean & Corn
	(주)바이오니아	GMO Detective Potato
		GMO Spectrum Kits (Bean, Corn, Potato 등)
		AccuPower GMO Screening kit
	(주)코젠바이오텍	PowerCheck ^{1M} GMO Screening Kit
일본	Takara	PCR Screening kit for GM Soyben Ver 2.0
독일	GeneScan	GMO-Screen, -Ident, -Quant

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 제 1차 년도 연구개발

1. 유전자변형 감자로부터 유전자 변형 탐지를 위한 샘플링 방법 및 DNA의 회수

가. 방법 및 결과

1) 감자의 샘플링

- 감자 껍질, 감자 싹, 감자 내육

2) 분쇄 및 DNA 추출

- 감자의 껍질, 싹, 내육을 각각 채취하여 시료를 정량 하였다.
- 분쇄방법
시료를 막자사발에 넣고 액체질소를 이용하여 분쇄하였다.
- 추출방법
 - 가) Silica membrane 이용 (Qiagen DNeasy Maxi kit)
 - 나) Magnetic DNA purification system(Promega wizard kit)
 - 다) Silica based resin 이용 (Nexgen DNA EasyPrep kit)

부위별로 채취한 시료를 유발 등을 사용하여 마쇄한 후 Solution I을 5ml를 첨가하여 거품이 생기지 않도록 갈아준 다음, 분쇄액을 원심분리용 튜브에 넣어 55~60℃의 Dry oven에 넣고 30분간 반응 시켰다. 반응 후 13,000rpm으로 실온에서 5분간 원심분리를 한 다음 상등액을 새 튜브에 옮겨서, Solution II를 3ml 첨가하여 잘 섞어준 후, 다시 원

심분리를 실시하였다. 상등액을 새 튜브에 옮긴 후 silica resin을 첨가하여 잘 섞은 후 10분간 반응시킨 뒤 원심분리를 하였다. 상등액을 제거한 pellet에 70% 에탄올을 첨가하여 DNA binding matrix를 2번 세척 후 공기 중에서 matrix를 건조시켰다. 여기에 적당량의 멸균 증류수를 넣어 65°C의 Heat Blok에 5분간 방치한 후 원심 분리하여 상등액인 DNA를 추출하였다.

3) DNA 추출 결과

가) 샘플크기에 따른 검정 한계 및 적절한 샘플크기 조사

감자 시료량을 1g, 2g, 3g, 4g, 5g으로 각각 정량하여 추출한 결과 2g 이상의 시료로부터 DNA를 추출하는 것은 너무 많은 시간과 시약이 소비되었으며, 시료량을 2g으로 정하여 추출하는 것이 가장 적합한 것으로 사료되었다.

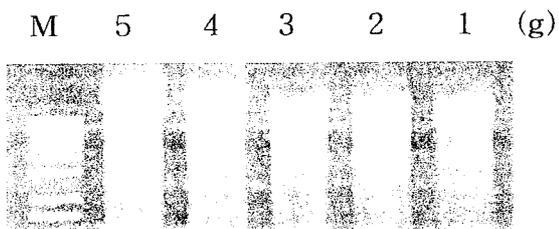


그림 1. 감자 시료량에 따른 DNA 추출

나) 감자의 sampling 부위 결정

감자의 껍질, 싹, 내육을 각각 정량하여 DNA를 추출한 결과, 싹에서의 DNA 추출이 가장 용이하고, DNA 농도가 가장 높았으며, 내육은 주로 전분으로 이루어져 있으므로 껍질 또는 싹 등과 동일한 량의 시료를 취하여 이들로부터 DNA를 추출할 경우 DNA 추출량이 가장 낮았다. 그러나, 신속하게 DNA를 분석해야 하는 상황에서 싹이 발생할 때까지 배양

하는데 많은 시간이 소요됨으로, 대기 시간과 DNA 추출량을 비교하여 검토한 결과 생감자의 경우 껍질을 분석하는 것이 가장 적당한 것으로 밝혀졌다.

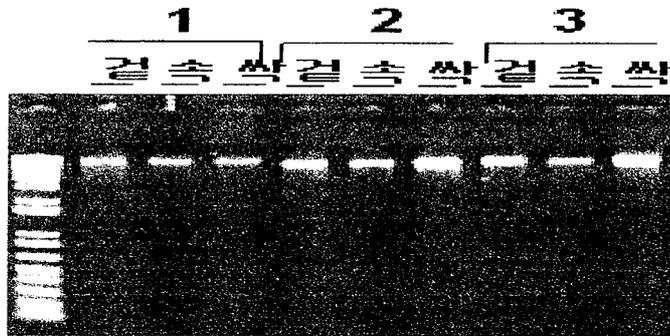


그림 2. 생감자의 껍질, 내육, 싹에서 추출한 DNA
1:넥스젠, 2:Qiagen, 3:Promega

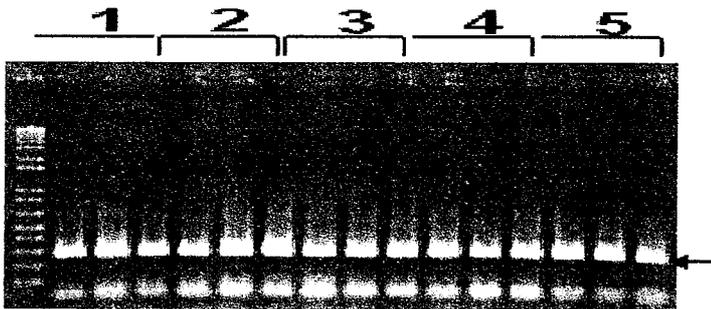


그림 3. 내재 유전자(pss)를 이용한 PCR 증폭 확인
1:생감자, 2:건조감자, 3:Qiagen, 4:Promega, 5:넥스젠

표2. 생감자 시료의 부위별, 분쇄법, 추출법에 따른 DNA 농도 및 순도

시료	추출법	시료량 (g)	O.D. ratio 260/280	DNA 농도 (ng/ul)
싹	Silica resin법	2	1.78	180.5
	Silica membrane 법	2	1.81	115.3
껍질	Silica resin법	2	1.75	92.2
	Silica membrane 법	2	1.64	89.3
내육	Silica resin법	2	1.58	75.2
	Silica membrane 법	2	1.54	67.8

다) 감자 저장 기간에 따른 DNA 추출 정도 비교

감자 sample을 채취하여 검사하기까지는 일정 시간이 소요되게 되며 다양한 운송 환경을 거치게 된다. 특히 조직이 잘려진 경우 검사 전까지 소요되는 운송 시간동안 세포 내의 endonuclease에 의하여 DNA가 분해될 가능성이 예상된다. 이에 대한 영향을 조사하기 위하여 sampling 시점에서 검사 장소까지 운송시기를 대략 3일로 하여 저장온도와 sampling 방법에 따른 DNA 손상정도를 확인하고 이들 sample을 이용하여 GMO 포함 여부 검사가 가능한지를 조사하였다.

감자를 절단하여 샘플을 채취한 경우 감자내 DNA 파손을 막기 위해 보관을 위한 최적 온도 조건을 확인해 보았다. 샘플 채취일부터 검사일까지 기한을 3일로 예상하여 상온, 냉장(4℃), 냉동(-20℃)에서 3일간 보관후 각각의 조건에 있는 sample들로부터 DNA를 추출하여 비교하였다. 비교한 결과 샘플의 두께가 1cm 이상인 경우 상기의 세가지 조건 모두에서

DNA의 분해가 아가로스 젤에서 확인되지 않았다. 위의 결과들에 의하면 감자의 표면으로부터 두께 1cm 이상에서 샘플을 채취하여 냉장조건에서 운송하는 것이 안전하나 상온 운송 시에도 분석에 커다란 영향을 미치지 않는 것으로 밝혀졌다 (그림 4).

라) 감자의 sampling volume 결정

생감자의 경우 그 크기가 커서 적합한 검사대상 집단과 volume을 결정하는 것은 매우 중요한 일이다. 정성이나 정량 모두 정확한 샘플링이 실험의 결과에 큰 영향을 미치며 sampling volume이 클수록 오차가 적다. 그러나 감자의 경우 감자의 부피가 커서 100개 이상의 샘플을 늘리는 경우 샘플운송이나 분석작업에 부적절하다. 그러므로 부피를 줄이기 위한 방법으로 표피가 포함되도록 조각을 내서 감자 100개 이상에서 취해야 한다. 조각의 두께는 1cm-3cm가 적합하다(그림 4, 그림 5).

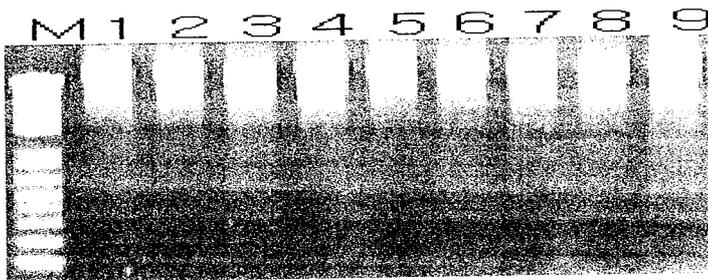


그림 4. 저장 온도별 DNA 추출 결과

1, 2, 3: 상온 3일 저장, 4,5,6: 4°C 3일 저장

7, 8, 9: 냉동 3일 저장

1, 4, 7: 1cm 이상, 2,5,8: 0.5cm, 3,6,9: 내육 1cm 이상

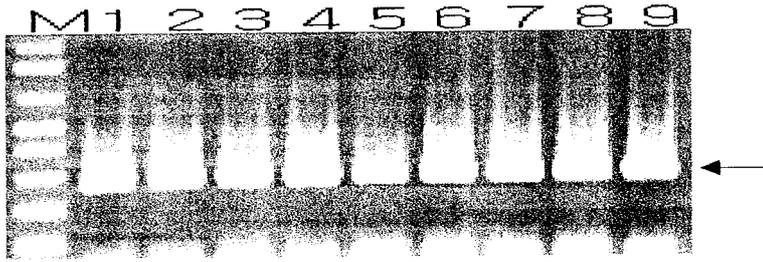


그림 5. PCR을 이용한 순도 확인

2. 도입유전자 특이적 프라이머 선발 및 제작

가. 방법

유전자 변형 감자의 유전자분석을 위하여 캐나다 NRC의 PBI로부터 입수한 cryIII A가 도입된 NewLeaf potato의 genomic DNA를 사용하였다. 유전자 변형 감자의 sample 내 혼입 유무의 판별을 위한 스크리닝 방법으로는 도입유전자의 발현을 위한 유전자조절부위 즉, 프로모터나 터미네이터 부위에 대한 유전자 정보를 (예, 35S promoter, NOS terminator) 참고로 하거나 도입유전자 즉, 해충저항성유전자, 바이러스저항성 유전자 등에 대한 정보를 수집하는 것을 일차적으로 실시한다. 이와 같은 방법으로 확보한 여러 종류의 염기서열 분석하여 유전자변형 감자를 특이적으로 판별할 수 있는 프라이머들을 디자인하여 이들을 조합하여 합성한 후 이들 중에서 정확성과 재현성이 높은 조합을 유전자변형 감자 분석을 위한 프라이머로 선발하였다.

나. 도입유전자 특이적 프라이머 선발 및 제작

1) GM 감자의 품종 및 도입유전자

GM 감자 계통	상품명	도입유전자
Russet Burbant Bt	NewLeaf	<i>CryIIIA</i>
Superior Bt	NewLeaf	<i>CryIIIA</i>
Russet Burbant Bt/Vr	NewLeaf Plus	<i>CryIIIA</i> /PLRV replicase
Shepody	NewLeaf Y	<i>CryIII</i> /PVY-CP

2) 각 계통의 정보

가) Russet Burbank NewLeaf

- (1) Line 명: BT6, BT10, BT12, BT16, BT17, BT18, BT23
- (2) 특성: Colorado potato beetle 저항성
(*Leptinotarsa decemlineata*, Say).
- (3) 삽입방법: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated
plant transformation.
- (4) 목적: 사람 및 가축 식용. Except for line BT6,
- (5) 회사명: Monsanto사

나) Atlantic and Superior NewLeaf

- (1) Line 명: ATBT04-6, ATBT04-27, ATBT04-30, ATBT04-31,
ATBT04-36, SPBT02-5, SPBT02-7
- (2) 특성: Resistance to Colorado potato beetle
(*Leptinotarsa decemlineata*, Say).
- (3) 삽입방법: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated
plant transformation.
- (4) 목적: 사람 및 가축 식용. ATBT04-6, -30 and -36, and line

SPBT02-5만 상용화. Atlantic lines은 단절됨.

(5) 개발회사: Monsanto 사

(6) 삽입 유전자명: *cryIIIa* delta-endotoxin

(*B. thuringiensis* subsp. *Tenebrionis*)

(7) Promoter: double enhanced CaMV 35S or *ats1A* promoter of
Arabidopsis thaliana ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase

(8) Terminator: 3' poly(A) signal from

pea ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase

다) Russet Burbank NewLeaf Plus

(1) Line 명: RBMT21-129, RBMT21-350, RBMT22-082

(2) 특성: Resistance to Colorado potato beetle

(*Leptinotarsa decemlineata*, Say)

Resistance to potato leafroll luteovirus (PLRV).

(3) 삽입방법: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated
plant transformation.

(4) 목적: 사람 및 가축 식용.

(5) 개발회사: Monsanto사

라) NewLeaf Y

(1) Line 명: RBMT15-101, SEMT15-02, SEMT15-15

(2) 특성: Colorado potato beetle 저항성

(*Leptinotarsa decemlineata*, Say).

potato virus Y (PVY) 저항성.

(3) 삽입방법: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated
plant transformation.

(4) 목적: 사람 및 가축 식용.

(5) 회사명: Monsanto사

3) GM감자에 도입된 유전자에 특이적 프라이머 제작

가) 35S 프로모터

- s1-5' & s2-3', s10-5' & s11-3', sp6-5' & d2-3'

나) Tnos

- n10-5' & n11-3', nos01-5' & nos02-3', n05-5' & n06-3'

다) *Bacillus thuringiensis cryIIIA* 유전자

- pot-bt1-5' & pot-bt2-3', po-bt5-5' & po-bt6-3', po-bt7-5' & po-bt8-3'

라) PVY cp

- PY03-5' & PY04-3', PY09-5' & PY10-3', PY15-5' & PY16-3'

마) PLRV cp

- RV01-5' & RV02-3', RV07-5' & RV08-3', RV14-5' & RV15-3'

바) 내재유전자

- pss01-5' & pss02-3', pss11-5' & pss12-3', pss05-5' & pss06-3'

표3. GM감자에 도입된 유전자에 대한 특이적 프라이머 염기 서열

구분	프라이머명	C말단 염기서열	N말단 염기서열
35S 프로모터	s1 & s2	5'-CCG ATG TGA GAC TTT TCA ACA AAG GGT AAT ATC C-3'	5'-CAC ATC AAT CCA CTT GCT TTG AAG ACG TGG TTG-3
	s10 & s11	5'-CCG ACA GTG GTC CCA AAG ATG GAC-3'	5'-ATA TAG AGG AAG GGT CTT GCG AAG G-3'
	sp3 & d2	5'-CTA CAA ATG CCA TCA TTG CG-3'	5'-TAT AGA GGA AGG GTC TTG CG-3'
Tnos	n10 & n11	5'-TTG AAT CCT GTT GCC GGT CT-3'	5'-TTG CGC GCT ATA TTT TGT TTT C-3'
	nos01 & nos02	5'-CAA TTC CCG ATC GTT CAA ACA TTT GGC AAT AAA-3'	5'-GGG GAT CGA TCC CCG ATC TAG TAA CAT AGA TG-3'
	n05 & n06	5'-CAA ACA TTT GGC AAT AAA GTT TCT TAA G-3'	5'-GGC AAT AAA GTT TCT TAA GAT TGA ATC CTG-3'
cryIIIA	pot-bt1 & pot-bt2	5'-CGC AGT TTA CTC AGG CGT CA-3'	5'-GGC-CAG-AAC-ATA-CGG-CA C-TT-3'
	po-bt5 & po-bt6	5'-CGC-CGA-TGG-TTT-CTA-CA A-3'	5'-GGC-GTC-GGT-TTC-CAC-TA T-3'
	pss01 & pss02	5'-GGC CAG AAC ATA CGG CAC TT-3'	5'-GTT-GGT-GGC-TGT-AGC-CC T-TC-3'
PSSI	pss05 & pss06	5'-GCT AGA CAT GCG GAG AAG GT-3'	5'-GCC ATT CGC GAT CAT AAA CA-3'
	pss11 & pss12	5'-TTG CAG AGA CTC GGG AAC CT-3'	5'-TGG CCA AGA GTT TGT GCT GT-3'
	PY03-5' & PY04-3'	5'-CTG TGC CGA GAA TCA AGG CT-3'	5'-GTC GTA TGC CAT CCG CAC T-3'
PVY	PY09-5' & PY10-3'	5'-GCT GGT ACG TCC GGA ACA CAT-3'	5'-CTG TGA TTG AGT TGC CCG AGT-3'
	PY15-5' & PY16-3'	5'-GCC AAC TGT GAT GAA TGG GC-3'	5'-GCC ATG ATT TGC CTA AGG GTT-3'
	RV01-5' & RV02-3'	5'-CCA AGA AGG CGA AGA AGG CA-3'	5'-TCT CGC TTG AGC CTC GTC CT-3'
PLRV	RV07-5' & RV08-3'	5'-GCG CTA ACA GAG TTC AGC CAG-3'	5'-AGT TGC CCA TGA GGT TGT CC-3'
	RV14-5' & &RV15-3'	5'-AGT GGT TAT GGT CAC GGC CC-3'	5'-CGG CCC GAA GGT GAA ACT T-3'

4) 도입유전자 특이적 프라이머 선발

GMO 혼입 유무의 판별을 위한 스크리닝 방법으로 도입유전자의 발현을 위한 유전자조절부위 즉, 프로모터(35S promoter)와 터미네이터 부위에 대한 프라이머(NOS terminator), 그리고 도입유전자 즉, 해충저항성유전자, 바이러스저항성 유전자 등에 대한 특이 프라이머를 사용한다. 이를 위해 각각의 유전자별 DNA 염기서열을 조사하여 각 유전자별로 프라이머를 조합하여 선발하였다.

가) 유전자 조절부위

(1) 35S cauliflower mosaic virus 프로모터

cauliflower mosaic virus의 35S promoter를 기준으로 합성한 primer들 중 primer s1-5 (5'- -3'), s2-3(5'--3') 가 35S promoter를 포함한 GM 작물을 특이적으로 증폭함을 확인하였다 (그림6).



그림 6. 35S promoter primer

선발(s1-5', s2-3')(195bp)

1: no primer, 2: no template

3: Non- GM 감자, 4: GM 감자

5: Non-GM 콩, 6: GM 콩

M: DNA size marker

(2) Nopaline synthase의 터미네이터 *Tnos*

Nos terminator를 가진 GM 작물들에 해당 유전자들이
특이적으로 증폭되는 것을 확인하였다.

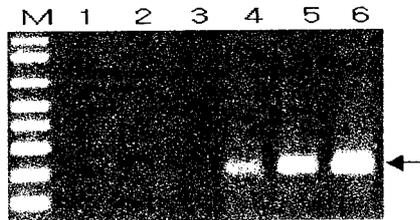


그림7. Nos terminator primer
선발(nos10-5', nos11-3')(172bp)

1: no primer, 2: no template,
3: Non- GM 감자, 4: GM 감자,
5: GM 콩, 6: GM 옥수수,
M: DNA size marker

나) 도입유전자

(1) *Bacillus thuringiensis* cryIII_A 유전자 (BT 세균의 독소유전자)

BT 세균의 독소 cryIII_A유전자를 기준으로 합성한 primer들 중
pot-bt1 (5'-3') & pot-bt2 (5'-3') primer가 BT cryIII_A를 포함한
GM 작물을 특이적으로 증폭함을 확인하였다 (그림 8).

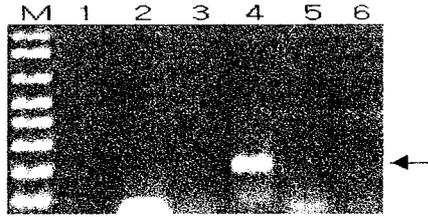


그림 8. CryIII A primer 선발
 (pot-bt01-5', pot-bt02-3')(145bp)
 1: no primer, 2: no template,
 3: Non- GM 감자, 4: GM 감자,
 5: GM 콩, 6: GM 옥수수,
 M: DNA size marker

(2) PVY cp (potato virus Y의 coat protein 유전자)

potato virus Y의 coat protein 유전자를 기준으로 합성한 primer 들 중 primer PY03 (5'-3') & PY04 (5'-3')가 PVY cp를 포함한 GM 작물을 특이적으로 증폭함을 확인하였다 (그림 9).

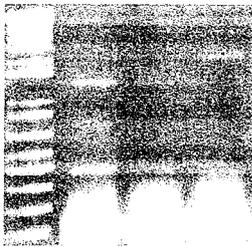


그림 9. PVY primer 선발
 (pot-bt01-5', pot-bt02-3')(179bp)
 1: GM 감자1, 2: GM감자2, 3: PVY standard
 M: DNA size marker

(3) PLRV cp (potato leafroll virus의 coat protein 유전자)

potato leafroll virus의 coat protein 유전자를 기준으로 합성한 primer들 중 primer RV01 (5'-3') & RV02 (5'-3')가 PLRV cp를 포함한 GM 작물을 특이적으로 증폭함을 확인하였다 (그림 10).

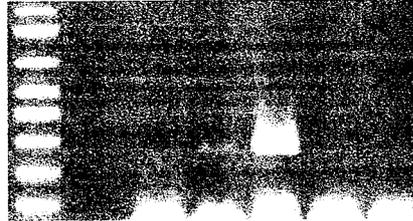


그림 10. PLRV primer 선발

1: No-primer, 2: No-template
3: GM-감자, 4: PLRV standard
5: M: DNA size marker

(4) NPTII(kanamycin 내성 유전자)

형질전환을 실시할 때 사용된 선발마커인 NPTII 유전자를 확인하는 primer를 선발하였다. 그림 4에서 3종의 primer를 볼 때 세 번째 조합인 pt5-5'와 pt6-3' 조합이 가장 진하게 NPTII 유전자를 특이적으로 증폭함을 확인하였다.

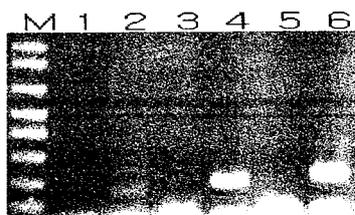


그림 11. NPTII primer 선발

lane 1,2: pt1-5', pt2-3', lane 3,4: pt3-5', pt4-3',
lane 5,6: pt5-5', pt6-3', M: DNA size marker)

다) 내재 유전자

PSSI 유전자(squalene syntase)

추출한 DNA의 순도가 PCR 가능한 정도로 순도가 높은지를 확인하고 감자 DNA가 포함되어있음을 확인하는 primer이다. 선발된 PSS primer는 콩, 옥수수에서는 증폭되지 않고 감자에서 특이적으로 증폭됨이 확인되었다.

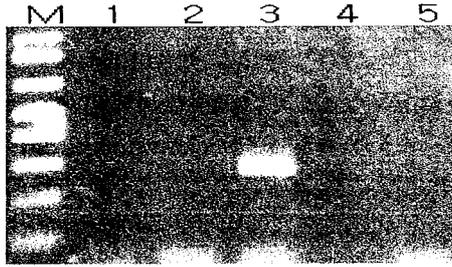


그림 12. PSS primer의 감자 특이성 확인

1:콩, 2:옥수수, 3:감자, 4: no template,
5: no primer)(250bp), M: DNA size marker

3. 정성 PCR 조건 분석

가. 정성 PCR 조건 분석

1) Silica based resin을 이용하여 DNA를 추출한 다음 정량한 DNA를 PCR template로 사용할 수 있도록 10 ng/ μ l로 희석하였다.

2) 정성 PCR 용액

PCR 반응 완충액 (10X), 2.5mM dNTP 혼합물, 각 프라이머는 최종농도가 5 μ M, 증류수(D.D.W.)를 혼합하고, PCR 반응을 시작하기 직전에 상기 PCR 혼합액에 5 μ l의 Taq DNA 폴리머라제를 첨가하고 혼합을 한 다음, 각 PCR 튜브에 상기 PCR 각테일 및 Taq DNA 폴리머라제의

혼합액을 분주한 후, template DNA 50 ng을 첨가하고 신속히 혼합하여 총 25 ul 용액이 되게 하였다 (PCR 반응 완충액(10X)의 조성은 100mM Tris/HCl, 400mM KCl, 15mM MgCl₂, 10mM DTT, 5ug/ml BSA이다).

3) 정성 PCR 조건

PCR은 96℃에서 10분간 Pre-denaturation 과정을 수행하고, 94℃에서 30초간의 Denaturation 과정, Annealing 과정을 55℃-62℃에서 30-60초간 수행하고 난 후에 72℃에서 30초간의 Extension 과정으로 이루어진 사이클을 30회 수행하였다. 그런 후에 72℃에서 10분간의 Final-extension 과정을 수행하였다.

제2절 제 2차 년도 연구개발

1. 유전자변형 가공식품으로부터 샘플링 방법 및 DNA의 회수

감자를 이용한 가공식품의 종류에는 1차 년도에 확립한 원료 감자로부터의 DNA 분리 방법을 가공식품의 경우에는 원료의 전처리 및 조리, 가미, 보존제 첨가 등의 문제로 원료감자에서의 DNA 분리와는 달리 감자를 원료로 이용하는 각종 식품군들의 제조특성에 따른 DNA 분리에 앞서 전처리 등을 필요로 하며 DNA 확보 후에도 DNA의 순도를 높이기 위하여 별도의 방법을 추가로 적용해야 하는 등 복잡한 과정을 필요로 한다. 이를 위하여 1차 년도에 확립한 원료 감자로부터의 DNA 분리 방법을 변형시켜 대표적인 감자 가공식품인 감자스낵(포테이토 칩, 감자튀김, 감자전분함유 가공식품)에 효과적인 새로운 DNA 분리 방법을 확립하였다. 유기용매를 사용하지 않는 방법으로 인하여 고순도의 DNA는 정성 및 정량 검사에 매우 적합하였다.

2. 도입유전자 특이적 프라이머 선별 및 제작

1차 년도에 개발하여 연구 진행 중인 유전자변형 감자에 사용되었던 각종의 프라이머를 사용하여 가공식품에 적용한 결과는 신속·정확한 검출에 용이하였다. 개발되어진 프라이머들 중에서도 PCR에 의한 도입 유전자 판별에는 구조유전자보다는 프로모터 또는 터미네이터에 민감한 반응을 나타내었다. 원료감자를 사용하여 제조된 가공식품의 경우에는 식품제조 중에 가해지는 각종 물리적, 화학적 처리에 의하여 식품 중에 존재하는 genomic DNA들의 파손이 예상되므로 손상 받지 않은 DNA를 주형으로 하여 개발된 원료감자에 사용한 프라이머들을 직접 PCR 반응에 적용하기에 곤란한 시료들의 경우에도 손상된 DNA들을 주형으로 사용 가능하도록 하여 PCR 반응이 정상적으로 작동시키기 위하여 더 작은 PCR 산물을 유도할 수 있는 프라이머를 1차 년도와 같은 절차와 방법에 의하여 선별 제작하였다.

3. 정성 PCR 반응조건 확립

1차년도에 선별한 GM 감자 탐지 primer를 이용하여 직접 유통되는 감자 및 이를 사용한 가공식품에서 분리한 DNA를 주형으로 이용하여 작동 여부를 확인하며 필요에 따라 가공식품의 분석을 위한 PCR 방법을 다양하게 처리하였다. PCR 방법은 프라이머에 관계없이 1차 년도의 방법을 기본으로 하여 실험한 결과가 가장 민감하였다. 다음은 기존의 방법이다. PCR 반응 완충액 (10X) 250 μ l, 2.5mM dNTP 혼합물 200 μ l, 프라이머-1 25 μ l, 프라이머-2 25 μ l, 증류수(D.W.)를 혼합하여 PCR 각테일 2 ml를 준비하였다. 이때, PCR 반응 완충액(10X)의 조성은 100mM Tris/HCl, 400mM KCl, 15mM MgCl₂, 10mM DTT, 5ug/ml BSA이다. PCR 반응을 시작하기 직전에 상기 PCR 각테일 1ml에 5 μ l의 Taq DNA 폴리머라제를 첨가하고 혼합하였다. 그리고 나서, 각 PCR 튜브에 상기 PCR 각테일 및 Taq DNA 폴리머라제의 혼합액을 분주한 후, plant DNA 용액을 첨가하고 신속히 혼합하였다. 그리고 96 $^{\circ}$ C에서 2분간 Pre-denaturation Step을 수행한 후에 94 $^{\circ}$ C에서 1분간의 Denaturation Step, 64 $^{\circ}$ C에서 1분간의 Annealing Step, 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 2분간의 Extension Step로 이루어진 사이클을 30회 수행한다. 그런 후, 72 $^{\circ}$ C에서 10분간의 Final-extension Step을 수행하였다.

4. 정량용 primer 선별 및 제조

PCR 기법에 의하여 GMO 판별시 검출대상이 되고 있는 DNA 서열들은 생물체의 형질전환 및 도입유전자의 발현에 필수적인 것으로, 크게 세 개의 그룹 “유전자 발현조절 서열, 항생제 마커, 유전자”로 나눌 수 있다. GMO 감자 및 가공식품을 스크린하기 위하여, 작물 형질전환 시 필수적인 프로모터들 중에서 일반적으로 가장 많이 사용되고 있는 cauliflower mosaic virus의 35S 프로모터 부위를 검출 및 정량을 하고자 한다. 우선 실제적으로 감자 및 가공식품을 유전자 변형 작물을 만들기 위하여 사용된 35S promoter 부위 염기 서열을 확인하였다. 확보된 염기서열 정보를 이용하여 어닐링 온도가 60 $^{\circ}$ C에서 35S promoter 영역을 인지할 수 있는 primer를 합성하였다. 합

성된 primer는 우선 non-GM 감자와 GM 감자 및 가공식품을 실험군으로 하여 GM 작물 특이적으로 증폭이 이루어지는지를 선별하였다. 선별된 primer쌍은 1 μ M 크기로 합성 후 HPLC 정제를 실시하여 고도로 순수 정제하였다. 35S 프로모터 부위를 PCR로 증폭하기 위해서, 상기 프로모터의 서열로부터 1개의 PCR용 프라이머-1 및 프라이머-2를 제작하였다. 35S promoter 이외에도 GMO 제작 시에 사용되는 주요 요소들 (프로모터, 항생제 마커, 터미네이터, 유전자 등)을 이용하여 이들에 특이적인 프라이머도 제작하였다.

5. 형광물질을 이용한 형광probe의 제작

가. 올리고뉴클레오타이드에 형광물질 및 고체수지를 연결하는 프롤린 링커

(1) 연구 목적

본 연구의 목적은 올리고뉴클레오타이드에 리포터나 퀀처로서의 형광물질과 고체수지를 동시에 연결하는 새로운 링커 제조를 목적으로 한다. 이는 순수한 엔안티오머 구조의 화합물로서 일반적인 라세미체 구조의 링커가 야기하는 정제 및 분석과정을 간편하게 하며 용이하게 올리고뉴클레오타이드에 적용이 가능하다.

(2) 개발기술

프롤린 링커 CPG를 이용한 RT-PCR 프로브의 제작

모든 프로브는 Expedite 8909 DNA/PNA Synthesizer (PerSeptive Biosystems 사)를 이용하여 1 마이크로몰 스케일로 트리틸-온 (trityl-on) 상태로 합성되었다. 3'끝의 TAMRA 퀀처의 도입을 위하여는 TAMRA가 CPG (controlled pore glass)에 부착되어 있는 3'-TAMRA-CPG (1-Dimethoxytrityloxy-3-[O-(N-carboxy-(tetramethyl-rhodamine)-3-aminopropyl)]-propyl-2-O-succinoyl

-long chain alkylamino-CPG, Glen Research사)를 사용하고 5' 위치의 FAM의 도입은 5-fluorescein phosphoramidite([(3',6'-dipivaloyl fluoresceinyl)-6-carboxyamidoethyl]-1-O-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidite, Glen Research)를 사용하였다. 그리고 각 염기는 dA^{bz}, dC^{bz}, dG^{dmf}, T phosphoramidite (ABI)를 사용하였다. 농도 계산을 위한 자연 뉴클레오타이드의 흡광 계수는 다음과 같다: dAMP, 15200: dCMP, 7700: TMP, 8830: dGMP, 11500. FAM, 20958: TAMRA, 31980. 올리고머의 구성은 효소분해 (알칼린 포스파타제 및 스넥 버넘 포스포다이에스테라제) 후 HPLC (Hewlett Packard, ODS hypersil, C-18; 20 mM K₂HPO₄, pH 5.6 (A), MeOH (B), 100 % A to 40% B, 20 min)와 Laser Desorption 질량 분석으로 확인되었다.

6. RT-PCR 반응조건 및 정량법 확립

미지의 시료 및 표준곡선을 위한 표준 시료 1개당 3개의 RT PCR 반응액을 제조하였다. 1개의 RT PCR 반응액 부피는 50 μ l이며 구성은 반응 각테일 39.25 μ l, AmpliTaq GoldTM DNA polymerase (5U/ μ) 0.25 μ l, AmpErase Uracil N-Glycosylase (UNG) (1U/ μ) 0.5 μ l, DNA template 10 μ l (미지의 시료 및 감자 양성 표준시료)로 되어 있다. PCR 반응을 시작하기 직전에 상기 PCR 각테일 39.25 μ l에 0.25 μ l의 AmpliTaq GoldTM DNA polymerase와 0.5 μ l의 AmpErase Uracil N-Glycosylase (UNG)를 첨가하고 혼합하였다. 그리고, 각 PCR 튜브에 상기 PCR 각테일 및 효소 혼합액을 분주한 후, 실시예 1에서 분리된 형질전환되지 않은 재래종 감자, 유전자변형감자, 형질전환된 감자로부터 추출된 양성표준시료 1%, 3%, 5%, 10%, 50% GMO 감자 DNA 용액 10 μ l (각 50ng/ μ l)와, 음성표준시료로서 증류수 및 형질 전환되지 않은 감자 DNA 10 μ l (50ng/ μ l)을 첨가하고 그리고 미지의 시료 DNA 10 μ l (50ng/ μ l)를 신속히 혼합하였다. 그런 후에 50 $^{\circ}$ C에서 2분간 사전-변성 단계(Pre-denaturation Step)을 수행하였다. 그런 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 10분간의 변성 단계(Denaturation Step); 60 $^{\circ}$ C에서 1분간의 어닐링 단계(Annealing

Step)로 이루어진 사이클을 40회 수행하였다. 실시간 PCR은 ABI사의 Prism 7700 혹은 Corbett사의 Rotor Gene 2000기기를 이용하여 수행하였고, PCR 결과의 분석도 상기한 기기내의 프로그램에 의하여 얻었다. 한편, 미지의 유전자 변형식물체의 변형정도를 정량적으로 분석하기 위해서는 표준곡선이 있어야 하는 바, 우선 100% GMO 식물(Russet Burbank NewLeaf, Potato)의 DNA와 100% Non-GMO 식물의 DNA(채래종 감자)를 혼합하여 양성표준시료, 즉 0%, 1%, 3%, 5%, 10%, 50% 양성표준시료를 음성표준시료, 및 미지의 시료와 함께 실시간 PCR 하여 표준시료로서 GMO 함량에 대한 표준곡선을 그리고 미지의 시료의 GMO 함량을 분석하였다(그림 13).

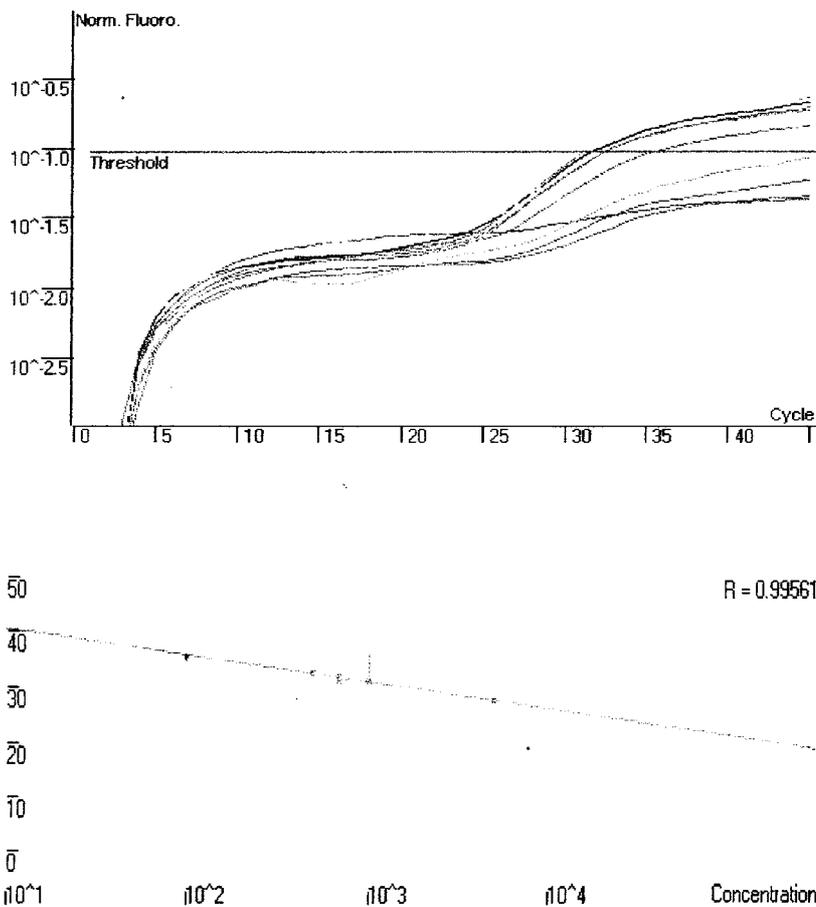


그림 13. 합성한 probe를 이용한 정량 PCR

7. 재현성 및 정확도의 향상을 위한 정량분석 방법 확립

GMO 감별에 이용되는 primer의 경우 일반적인 PCR에 비하여 재현성 및 정확도는 더욱 중요하게 여겨져 왔다. 이를 위하여 선발된 primer와 probe를 이용하여 정량 검사 키트 제작과 더불어 GM 감자, 야생형 감자, 감자를 원료로 사용한 가공식품 등을 이용하여 이미 확보한 primer와 probe의 적합성 (다양한 실시간 PCR 기계를 사용)을 반복 확인함으로써 원료와 가공식품에 동시에 사용할 수 있는 재현성 및 정확도가 우수한 분석방법을 확립하였다.

가. 유전자 변형 정량 키트의 제작

유전자 변형 정량 키트의 구성은 다음과 같다. 1. 반응 각테일 1mL x 8, 2. AmpliTaq Gold™ DNA polymerase 250 Unit (5U/ μ), 3. AmpErase Uracil N-Glycosylase (UNG) 100 Unit (1U/ μ), 4. GM-Potato 1%, 3%, 5%, 10%, 50% Standard Control 각 300 μ L. 반응 각테일의 구성농도는 다음과 같다. PCR 반응 완충액 (1X, 로슈사에서 구입), MgCl₂ (3.5 mM), dATP (200 μ M), dCTP (200 μ M), dGTP (200 μ M), dUTP (400 μ M), 프라이머-1 (300 nM), 프라이머-2 (300 nM), 프로브 (200 nM). 이 때, PCR 반응 완충액(10X)의 조성은 100mM Tris/HCl, 400mM KCl, 15mM MgCl₂, 10mM DTT, 5ug/ml BSA이다.

나. 표준곡선의 도출

실시 예의 방법을 사용하여 대조 음성대조시료로서 비중폭대조시료, 0% GMO 표준시료를 사용하고 표준시료로서는 즉 0%, 1%, 3%, 5%, 10%, 50% GMO 변형시료를 사용하여 RT-PCR을 시행하였다. 여기서 얻어진 표준곡선의 상호관계계수 (Correlation coefficient)는 0.992로서 우수한 결과를 보였다(표 4). 상기의 표준곡선에 기초하여 상기의 미지

시료에 대한 실시간 PCR 결과를 분석하였다. 그림 13에서 알 수 있듯이, 표준시료에 대한 스탠다드 곡선의 유출이 상관계수 0.995로서 이상치인 1에 매우 근접하므로 미지 시료의 GMO 함량을 정확하게 계산한 것으로 예상하였다.

표 4. 실시간 PCR 결과

No.	Name	Type	Given Conc.	Calculated Conc.	CV	Ct	Ct Std. Dev.
1	H ₂ O	NTC		0			
2	1%Potato	Standard	100	104	3.88%	31.91	0.01
3	1%Potato	Standard	100	103	3.11%	31.92	0.01
4	3%Potato	Standard	300	265	11.77%	30.66	0.11
5	3%Potato	Standard	300	301	0.20%	30.49	0.11
6	5%Potato	Standard	500	500	0.00%	29.81	0.03
7	5%Potato	Standard	500	500	0.00%	29.81	0.03
8	10%Potato	Standard	1,000	1,073	7.26%	28.79	0.12
9	10%Potato	Standard	1,000	995	0.47%	28.89	0.12
10	50%Potato	Standard	5,000	4,755	4.90%	26.8	0.09
11	50%Potato	Standard	5,000	5,201	4.03%	26.68	0.09
12	B7	Sample		0			

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구과제의 목표이었던 유전자 변형 감자의 샘플링, 감자로부터의 DNA의 분리, 유전자변형감자의 정성법과 정량법이 성공적으로 확립되었으며 현재 당사에서 진행 중인 유전자 변형작물 및 이를 원료로 사용하여 제조된 식품 등의 분석 서비스 업무에 효과적으로 활용되고 있다. 또한 본 과제의 수행 중에 습득한 기술 등으로 국제표준협회(ISO) 인증기관이자 영국 정부연구소인 CSL(Central Service Laboratory)를 통해 실시한 유전자변형 원료 및 가공식품에 대한 정성과 정량검사 링테스트(Ring Test)에서 모두 합격을 하여 본 연구과제를 성공적으로 완료하였음을 보여주었다.

본과제의 목표였던 GMO 감자 및 이를 사용한 가공식품에서 DNA 고순도 분리 및 효율적 회수 방법의 개발로 감자 뿐만 아니라 다른 분석시료들로부터 DNA를 추출시 유기 용매의 유해성과 컬럼 방식의 단점을 보완하였으며 보다 적은 시약 (고농도의 염용액)으로 짧은 시간 내에 각종 시료로부터 유전자 변형 여부를 판별하기에 충분한 순도의 genomic DNA를 추출하는 방법을 개발하여 타 시료 분석 분야에 있어서도 기여를 하게 되었다. 또한 GMO 함량을 정확하게 정량하기 위해서는 정량 PCR에 적합한 고순도의 DNA 추출이 필수적이다. 이러한 식물이나 제품에서 DNA 추출은 대부분 Qiagen, Promega의 제품을 이용하여 DNA를 추출하고 있다. 본 연구를 통하여 기존에 실험실에서 사용되는 방법들 중에서 사용이 편리하고 고순도의 DNA를 재현성있게 추출할 수 있는 키트를 개발하게 되어 외화 절약의 효과를 기대할 수 있게 되었다.

향후 GMO 표시제가 확대되면 대표적인 GMO 작물의 수출국중의 하나이면서도 국제적으로 전혀 통계가 잡혀있지 않는 중국산 농산물에 대한 검사가 가능할 것이며 이는 우리나라에 대한 중국 농산물의 무분별한 수입을 간접적으로 조절함으로써 국내 농민들을 보호하는 효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

유전자정량 분석방법은 주로 PCR 산물을 정량하여 측정하는데 이는 일반적으로 PCR 실시시 형광물질이 부착된 올리고뉴클레오타이드를 프로브 (probe)로 첨가하여 사용한다. 일반적으로 형광프로브는 template의 상보서열로 구성된 올리고뉴클레오타이드의 양쪽 말단에 형광을 나타내는 Reporter와 일정거리 내에 존재하는 형광물질의 형광을 억제하는 Quencher가 붙어 있다. 현재 이 프로브는 로슈나 ABI사로부터 원하는 올리고뉴클레오타이드의 서열정보를 제공하면서 주문하면 구매가 가능하나 이는 매우 고가이며 또한 주문기간이 장기간 소요되므로 본사에서 제작하는 이 프로브를 사용하여 효율적인 분석이 가능하게 되었다. 또한 이 기술을 타분야에 있어서, 예를 들면 유전자발현 분석을 위한 방법으로 Real-time PCR을 이용한 mRNA의 정량에도 이용할 수 있다. 이러한 프라이머와 프로브를 국내에서 직접 개발 생산함으로써 외화 절약뿐만 아니라 서비스 단가를 낮출 수 있다.

본 연구과제의 목표이었던 유전자 변형 감자의 샘플링, 감자로부터의 DNA의 분리, 유전자변형감자의 정성법과 정량법이 성공적으로 확립되었으며 현재 당사에서 진행 중인 유전자 변형작물 및 이를 원료로 사용하여 제조된 식품 등의 분석 서비스 업무에 효과적으로 활용되고 있다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

GMO 감자에서 DNA 고순도 분리 및 효율적 회수 방법의 개발과 작물로부터 genomic DNA를 추출시 유기 용매의 유해성과 컬럼 방식의 단점을 보완하고 보다 적은 시약 (고농도의 염용액)으로 짧은 시간 내에 각종 작물로부터 유전자 변형 여부를 판별하기에 충분한 순도의 genomic DNA를 추출하는 방법을 개발하여 식물유전공학의 연구에 도움을 주며 본 과제에서 개발한 방법을 키트화하여 제품을 개발하였다.

유전자정량 분석방법은 주로 PCR 산물을 정량하여 측정하는데 이는 일반적으로 PCR 실시시 형광물질이 부착된 올리고뉴클레오타이드를 프로브 (probe)로 첨가하여 사용한다. 일반적으로 형광프로브는 template의 상보서열로 구성된 올리고뉴클레오타이드의 양쪽 말단에 형광을 나타내는 Reporter와 일정거리 내에 존재하는 형광물질의 형광을 억제하는 Quencher가 붙어 있다. 현재 이 프로브는 로슈나 ABI사로부터 원하는 올리고뉴클레오타이드의 서열정보를 제공하면서 주문하면 구매가 가능하나 이는 매우 고가이며 또한 주문기간이 장기간 소요되므로 본사에서 제작하는 이 프로브를 사용하여 효율적인 분석이 가능하게 되었다. 또한 이 기술을 타분야에 있어서, 예를 들면 유전자발현 분석을 위한 방법으로 Real-time PCR을 이용한 mRNA의 정량에도 이용할 수 있다. 이러한 프라이머와 프로브를 국내에서 직접 개발 생산함으로써 외화 절약뿐만 아니라 본 과제의 수행과정에 습득한 노하우를 타 연구분야에 적용하여 국내의 생명공학 관련 분야의 발전에 기여할 수 있게 되었다.

본 연구과제의 목표이었던 유전자 변형 감자의 샘플링, 감자로부터의 DNA의 분리, 유전자변형감자의 정성법과 정량법이 성공적으로 확립되었으며 현재 당사에서 진행 중인 유전자 변형작물 및 이를 원료로 사용하여 제조된 식품 등의 분석 서비스 업무에 효과적으로 활용되고 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

2001년 3월 22일 Monsanto사에서는 더 큰 시장을 개발하기 위하여 농부들에 의한 유전자변형감자의 재배면적의 감소와 감자를 사용하여 가공식품들을 생산하는 회사들의 GMO 거부로 인하여 Bt potato variety인 NewLeaf potato의 판매를 중지할 것이라고 발표하였으나 Monsanto의 대변인인 Ms. Fisher 감자는 중요한 틈새시장이므로 언젠가 다시 판매를 시작할 것이라고 이중적인 태도를 보인 것과 같이 실제로는 다른 감자 품종들의 개발을 계속하고 있는 실정이다.

북미에서는 1999년도 유전자 변형된 NewLeaf potato의 재배가 약 55,000에이커에 달하는 절정을 이루었으며 현재까지 재배가 계속되고 있으며 이를 사용한 가공식품이 계속 생산되고 실정이다. 그 한 예로 2001년 일본에서는 미국에서 생산되어 수입된 스낵류에서 2회에 걸쳐 GM potato가 검출되어 리콜을 요구하는 등의 사건이 계속되고 있다. 현재 우리도 일본과 같이 이러한 문제에 노출되어 있으므로 본 과제의 목표인 유전자 변형 감자의 검출 기술의 개발은 시기 적절한 것이었다.

영국의 국영방송 BBC의 보도에 의하면 인도에서는 식량문제를 해결하기 위한 일환으로 GM potato를 대규모 상업적인 재배가 6개월 이내에 승인 될 것이라고 2003년 6월 발표했으며 인도정부의 유력한 인사인 Department of Biotechnology의 Dr Manju Sharma는 GM potato의 생산으로 수백만 어린이들의 영양결핍 문제를 해결할 것이라는 견해를 피력했다. 이와 같이 선진국 소비자들의 GM 작물 기피현상과는 달리 인도, 아프리카 등에서는 식량문제를 해결하기 위한 방안으로 GM potato의 생산을 적극적으로 추진하고 있으므로 유전자변형 감자의 재배는 식량문제를 지닌 각 국가로 전파되어 유전자 변형 감자는 물론 다른 GM 작물의 재배도 세계적인 추세로 진행될 것으로 예상된다.

다.

중국에서도 2050년도 14억을 초과할 인구들의 식량문제를 해결하기 위하여 GM 감자의 재배에 대하여 적극적이다. 그러므로 세계에서 미국, 캐나다, 아르헨티나에 이어 네 번째로 큰 GM 작물의 생산국인 중국으로부터 GM potato들이 현재 수입되고 있는 많은 중국산 작물들과 함께 국내로 유입될 가능성을 배제할 수 없는 형편이다.

이와 같은 국제 상황으로 GM 감자의 국내 유입에 대한 대책이 시급한 것으로 사료된다.

제 7 장 참고문헌

1. Huang, J., Rozelle, S., Pray, C., and Wang, Q. (2001). Plant biotechnology in the developing world: The case of China (REAP working paper). Davis, CA: University of California-Davis.
2. ACNFP (Advisory Committee on Novel Foods and Processes) (1991) Department of Health Report on health and social subjects No. 38., Guidelines on the assessment of novel foods and processes. London, HMSO.
3. Foreign Agricultural Service. (2002). China, People's Republic of, Food and Agricultural Import Regulations and Standards, Ag GMO Implementation Measures 2002 (GAIN Report). Washington, DC: United States Department of Agriculture.
4. J. Clive (1997) Global status of transgenic crops in 1997. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications.
5. F. T. Fraley, S. G. Rogers, R. B. Horsch, P. R. Sanders, F. S. Flick, S. P. Adams, M. L. Bittner, L. A. Brand, C. L. Fink, F. S. Fry, G. R. Galluppi, S. B. Goldber, N. L. Hoffmann, and S. C. Woo (1983) Expression of bacterial genes in plant cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80, 4803-4807.
6. <http://www.gene.ch/genet/2001/Mar/msg00042.html>,
7. M. B. Hayford, J. I. Medford, N. L. Hoffmann, S. G. Rogers, and H. J. Klee (1988) Development of a plant transformation selection system

based on expression of genes encoding gentamicin acetyltransferases. *Plant Physiol.* 86, 1216-1222.

8. Burton, M., Rigby, D., Young, T., and James, S. (2001). Consumer attitudes to genetically modified organisms in food in the UK. *European Review of Agricultural Economics*, 28, 479-498.
9. J. Hille, F. Verheggen, P. Roelvink, H. Franssen, A. van Kammen, and P. Zabel (1986) Bleomycin resistance : a new dominant selectable marker for plant cell transformation. *Plant Mol. Biol.* 7, 171-176.
10. V. M. Watt, C. J. Ingles, M. S. Urdea, W. J. Rutter. (1985) Homology requirements for recombination in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 82, 4768-4772.
11. <http://news.bbc.co.uk/1/hi/sci/tech/2980338.stm>
12. IFBC (International Food Biotechnology Council) (1990) *Biotechnologies and food: Assuring the safety of foods produced by genetic modification*, Regul. Toxicol. Pharmacol. 12 S1-S196.
13. OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) (1993) *Safety evaluation of foods produced by modern biotechnology: Concepts and principles*, OECD, Paris.
14. World Health Organization (1996) "Biotechnology and Food Safety: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation," ,Geneva, Switzerland.
15. World Health Organization (1997) "Biotechnology and Food Safety, Food and Nutrition paper61, Food and Agriculture Organisation of United

Nations, Rome.

16. M. Lipp, P. Brodmann, K. Pietsch, J. Pauwels, and E. Anklam (1999) IUPAC Collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *J. AOAC Int.* 82(4), 923-928.
17. S. R. Padgett (1993) Glyphosate tolerant soybeans in the U.S. in 1992. Monsanto Technical Report MSL12906.
18. N. Shirai, S. Ozawa, W. Hashimoto, S. Utsumi, and K. Murata (1998) Safety assessment of genetically engineered food. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62(7), 1461-1464.
19. S. R. Padgett, N. B. Taylor, D. L. Nida, M. R. Bailey, J. Macdonald, L. R. Holden, and R. L. Fuchs (1995) The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans. *J. Nutr.* 126, 702-716.
20. Association of Official Analytical Chemists (1990) *Official Methods of Analysis*, 15th ed. AOAC, Arlington, VA.
21. A. M. A. Van Hoef, E. J. Kok, E. Bouw, H. A. Kuiper, and J. Keijer (1998) Development and application of a selective detection method for genetically modified soy and soy-derived products. *Food Addit. Contamint.* 15, 767-774.
22. Population Reference Bureau. (2002). Available on the World Wide Web: <http://www.prb.org>.

23. http://binas.unido.org/binas/news/2001-08_4.html, "Japan P & G recalls Pringles over barred GM potato"
24. <http://www.gene.ch/genet/2001/Mar/msg00058.html>, Monsanto dumps GM potatoes
25. Is China the Market for Genetically Modified Potatoes?
26. Kynda R. Curtis, Jill J. McCluskey, and Thomas I. Wahl ,Washington State University
27. Thornton, M. (2003, June). The rise and fall of NewLeaf potatoes. Paper presented at the National Agricultural Biotechnology Council (NABC) Conference, Seattle, WA.