가뭄저항성벼(CaMsrb2-8)의 환경위해성 평가 : 3세대의 후대안정성 연구

오성덕^{1†} · 이기종^{1†} · 박순기² · 박향미³ · 이시명¹ · 안홍일¹ · 손수인¹ · 조현석¹ · 류태훈^{1*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원, ²경북대학교 응용생명과학부, ³농촌진흥청 식량과학원

Biosafety Assessment for Drought-tolerant Transgenic Rice (CaMsrb2-8) : Progeny Stability Study for Three Generations

Sung-Dug Oh^{1†}, Kijong Lee^{1†}, Soon-Ki Park², Hyang-Mi Park³, Si Myoung Lee¹, Hong-Il Ahn¹,
Soo-In Sohn¹, Hyun Suk Cho¹, and Tae-Hun Ryu^{1*}

¹National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon, 441-707, Korea

²School of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu, 702-701, Korea

³National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Suwon, 441-857, Korea

Abstract : The purpose of this research is a molecular characterization of introduced T-DNA in transgenic rice T4~T6 generation lines (#8) harboring a pepper *MsrB2* gene under the control of stress inducible *Rab21* promoter, as a part of biosafety evaluation for drought-tolerant transgenic rice (CaMsrb2-8). We identified the structure and sequence of transformation vector of T-DNA and analyzed insertion sites, flanking sequences, and generational stability of inserted T-DNA in transgenic rice. The transformation vector was consisted of right border, a drought-tolerant CaMsrb2-8 gene unit (*Rab21 promoter::CaMsrb2::PinII terminator*), a selectable marker herbicide resistance unit (*CaMV 35S promoter::bar::Nos terminator*), and left border in sequential order. We confirmed that T-DNA was introduced at the position of 41,737,284 bp of chromosome No. 1. based on the adaptor-ligation PCR and whole genome sequence database. T-DNAs were stably inherited through the T4 to T6 generations, and also stable expression of *bar* gene from T-DNA was confirmed. It was also confirmed that the backbone DNA of transformation vector containing antibacterial gene (*aadA*) was not present in CaMsrb2-8 rice genome. These results will be filed to biosafety assessment document of CaMsrb2-8 rice.

Keywords : Biosafety, Drought-tolerant, Progeny study

서 언

물 사용량 중 농업으로 인한 소비량은 세계에서 가장 큰 비중을 차지하며, 개발도상국을 포함한 건조지역의 농업용수가 차지하는 비율은 전체 물 소비의 90%를 상향한다. 2025년에 이르면 아프리카 4억 8천만명의 사람들이 물 부족으로 고통 받고, 농지 60만 km²가 파괴될 것으로 예측되고 있다(GLAAS 2012). 우리나라의 연평균 강수량은 약 1,245 mm로 세계 평균(880 mm)보다 많으나 여름 장마철 집중호우로 대부분을 바

다로 흘러 보내고 30% 안팎만 이용되고 있어 물 부족 국가에 속한다. 2012년 전 세계적인 대가뭄으로 인해, 미국은 1,000 여개 이상 지역에서 재난선포를 한 바 있으며 콩, 옥수수 등 곡창지대의 생산성 감소로 애그플레이션까지 유발시켰으며 우리나라도 가뭄으로 인한 큰 피해를 입은 바 있다. 전 세계적으로 물은 점점 부족하게 될 것이며, 농업에서 물 이용 효율을 높이는 것은 매우 중요하다(FAO 2004, UNESCO 2012).

GM작물(Genetically modified crops)개발 연구가 본격적으로 시작된 1980년 이래로 식물생명공학기술에 의한 GM작물은 사료용 및 식품가공용을 중심으로 세계적으로 널리 확산되고 있다. GMO의 인체안전성 및 환경위해성 논란에도 불구하고 전 세계 GM작물 재배면적은 1억 7,030만 헥타르에 달하고 있으며, 28개국에서 1,730만여 명이 GM작물 재배에 중

[†]The first two authors contributed equally to this work

*Corresponding author (E-mail: thryu@korea.kr, Tel: +82-31-299-1141, Fax: +82-31-299-1122)

(Received on May 8, 2013. Revised on June 13, 2013.

Accepted on June 17, 2013.)

사하고 있다(James, 2012).

현재 국내에서도 다양한 유용 GM작물들이 개발되고 있으며, 안전성 평가를 통해 안전성 심사서와 상업화를 위한 단계를 준비 중에 있다. GM작물의 개발은 환경과 재배 단계 안정성을 높이고, 고부가가치의 농산물 수요 확대를 연구와 개발 전수뿐만 아니라 GM작물의 재배 면적이 증가하고 있다. 또한 국내 개발 GM작물의 상업화를 2020년 목표로 하고 있어 GM작물의 환경위해성과 식품안전성 평가는 개발된 더욱 필수 요건이 되고 있다(Lee et al. 2010). 이에 개발된 GM작물이 독성, 알레르기 및 영양 성분 평가 등에 관한 식품안전성 및 환경에 미치는 잠재적 위험성, 즉 도입 유전자들이 표적 및 비표적 생물체로 전이될 가능성과 잡초화, 생태계 교란 등에 대한 환경위해성뿐만 아니라, GM작물에 도입된 유전자의 발현 및 후대안정성 평가에 대한 검증 가이드라인 구축의 필요성이 대두되고 있다(Oh et al. 2012). GM작물들이 세대 진전에 따라 도입유전자의 발현정지, 유전자 변이 등이 나타날 수 있어 GM작물의 상업에 위해서는 세대 진전에 따른 도입 유전자의 후대안정성 평가가 필수적이다(Xia et al. 2009).

물 부족에 대비하여 물자원의 관리와 농업지속성을 위한 체계적 접근과 더불어 생명공학 기술을 이용하여 내건성 작물 개발은 더욱 중요한 시점에 있다. 최근, 몬산토에서 개발된 가뭄저항성 옥수수는 포장시험을 통해 상업화를 눈앞에 두고 있다. 한국에서도 감자 유래 StMYB1 유전자(Im et al. 2012), 대장균 유래 Trehalose 생합성 유전자(Jang et al. 2003), 애기장대의 PUB22, 23 (Cho et al. 2008) 등이 가뭄저항성을 보이는 것으로 보고되었다. 일미버를 모본으로 생명공학기술을 이용하여 개발된 가뭄저항성 벼는 스트레스 유도성 프로모터하에 고추 유래 CaMsrb2 유전자를 도입하여 개발되었으며 유묘기와 성숙기에 강한 건조저항성을 나타낸다. 고추에서 분리한 CaMsrb2 유전자는 엽록체내에서 산화스트레스 조건에서 메티오닌의 산화를 방지하고 활성산소의 제거작용을 통해 엽록체의 손상을 방지함으로써 가뭄 등 스트레스 저항성을 유도한다(Oh et al. 2010).

식물은 광, 가뭄, 염분, 고온 및 병원균 감염 등 여러 환경 스트레스에 노출되어 있고, 여러 비생물학적 및 생물학적 스트레스를 받게 되면 성장, 신진 대사, 그리고 생산성에 중요한 영향을 받는다. 이중 가뭄은 식물의 성장과 생산성에 가장 유해한 영향을 미치는 환경 요소 중에 하나이다(Boyer 1982). 가뭄 스트레스에 의한 피해 중 하나는 미토콘드리아, 엽록체, 그리고 퍼옥시좀에서 생산되는 활성산화소(ROS) 이다(Cruz

de Carvalho 2008). 과도하게 생산된 ROS는 단백질의 구조를 변화시키고 기능을 손상시킨다. 특히 메티오닌(Methionine)은 가장 산화되기 쉬운 아미노산이며, 최근 그 잔기가 항산화 방어 기작의 맨 마지막 단계를 조절하는 중요한 기능이 알려지고 있다. 메티오닌설퍼라이드 그룹의 산화는 알-형태(R-form)와 에스-형태(S-form)의 두가지 형태로 나타나며, 두 개의 다른 단백질인 Methionine sulfoxide reductase (Msr) A와 B에 의해 메티오닌으로 환원된다. Msr A와 B 유전자가 돌연변이 또는 과발현된 효모 연구를 통해 이들 효소가 세포 내 산화적 스트레스에 대한 방어 기능이 보고되어 있고, 고추에서 분리된 CaMsrb2 유전자는 메티오닌 잔기의 산화를 안정적인 환원 상태로 전환시키는 기능을 통하여 식물의 생물 및 비생물적 스트레스에 대한 저항성을 부여하는 유전자이다(Oh et al. 2010).

본 시험에서는 국내 개발된 가뭄저항성벼(CaMsrb2-8)에 대한 후대안정성 분석을 위해서 가뭄저항성벼의 도입 유전자들인 목적유전자(CaMsrb2), 개시인자(Rab21 and 35S), 종결인자(NOS and PinII) 및 선발마커(bar) 유전자에 대한 복수세대의 서던 분석과 목적유전자의 RT-PCR 분석, 생육시기-부위별 PAT 발현 분석을 수행하였다. 본 시험을 통해 국내 개발 GM작물의 안전성 자료 생산뿐만 아니라, 3세대 이상의 복수세대에 대한 GM벼의 후대안정성 평가 가이드라인을 구축하고자 하였다.

재료 및 방법

도입유전자의 인접서열 분석

가뭄저항성벼(CaMsrb2-8)의 게놈 DNA에 도입된 T-DNA의 인접서열을 확인하고자 Ha et al. (2010)의 방법에 따라 두 단계로 실시하였다. 가뭄저항성벼(CaMsrb2-8)의 T4와 T6세대의 게놈 DNA를 Hae III로 절단하고, AD1와 AD2으로 구성된 adaptor를 접합하였다. 두번째 단계로, adaptor에 대한 A1 (5'-TAATACGACTCACTATAG-3')과 A2 (5'-GACTCACTATAGCAATTAAC-3')의 특이 프라이머를 제작하고, T-DNA right border에 대해서 RB1 (5'-GCTTGCTGAGTGGCTCCTTC-3')과 RB2 (5'-CAAACGTAAAACGGCTTGTC-3')를 left border에 대해서는 LB1 (5'-GTCAGGAGCTCGAATTCAGT-3')와 LB2 (5'-CATTAAAAACGTCGCAATG-3')의 프라이머를 제작하여 단계별로 PCR를 수행하였다. 이후 증폭된 PCR산물을 1% agarose gel에 전기영동하고 Gel Extraction Kit (Qiagen, 28704)를 이용하여 정제

후, pGEM T-easy 벡터(Promega, Madison, USA)에 삽입하여 염기서열 정보를 확인하였다. 확인된 염기서열은 NCBI BLAST 분석을 이용하여 동일성 분석을 수행하였다.

게놈 DNA 분리 및 서던 검정

가뭄저항성벼(CaMsrb2-8 T4, T5, T6)와 일미벼 식물체 시료를 각 1 g씩 취하여, 막자 사발에서 액체질소와 함께 분말화한 후 DNeasy Plant kit (Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 게놈 DNA를 분리하였다. NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, DE)을 이용하여 260/280 nm 값이 1.8~2.0 사이인 DNA 추출액을 실험에 이용하였다. 가뭄저항성벼의 도입유전자 확인을 위해서 추출한 게놈 DNA 10 µg를 제한효소 *Hind* III와 *Bsr*BI으로 처리하여 절단하고 1% 한천 겔에서 전기 영동후 변성화 과정을 수행하였다. 이 후 nylon membrane (Hybond-N+, Amersham, Uppsala, Sweden)에 겔의 DNA를 전이시키고, membrane의 DNA 단편들을 UV-crosslink ($1200 \times \mu\text{J}/\text{cm}^2$)로 고정한 후 혼성화 용액(0.5 M Na₂PO₄ pH 7.2, 1% BSA, 7% SDS, 1 mM EDTA, 10 mg/mL salmon sperm testicle DNA)로 1시간 동안 전처리하였다. 혼성화는 Random primer DNA labeling kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)를 이용하였고, 방사선인 α -³²P로 표지하여, 65°C에서 16~18시간 동안 혼성화하였다. 유전자 운반체(T-DNA) 내의 구성 요소들의 유전적 후대안정성 검정을 위한 프로브는 특이적인 프라이머를 이용하여 목적 유전자(*CaMsrb2*), 프로모터(35S, *Rab21*),

종결인자(*NOS*, *PinII*) 및 선발마커(*bar*) 유전자를 PCR로 증폭한 후 정제하여 사용하였다(Table 1). Backbone DNA 유무 검정용 probe는 항생제인 spectinomycin의 *aadA* (SPM) 유전자 부위를 PCR로 증폭한 후 elution 하여 사용하였다(Table 2). 혼성화가 끝난 membrane은 세척액(1st solution, 2X SSC, 0.1% SDS; 2nd solution, 1X SSC, 0.1% SDS; 3rd solution, 0.2X SSC, 0.1% SDS)으로 세척한 후 Bio-imaging analyzer (BAS-2000, Fuji Photo film, Tokyo, Japan)로 분석하였다.

Backbone DNA의 도입 유무 PCR 검정

가뭄저항성벼(CaMsrb2-8)의 게놈 DNA에 유전자 운반체의 T-DNA 이외의 backbone DNA 삽입유무 확인을 위한 유전자 운반체의 유전정보를 바탕으로 가뭄저항성벼의 backbone DNA (pSB11 vector) 확인용 프라이머를 제작하였다(Table 2). 가뭄저항성벼(CaMsrb2-8 T5, T6) 식물체 시료를 각 1 g씩 취하고, 막자 사발에서 액체질소와 함께 분말화한 후 DNeasy Plant kit (Qiagen, CA, USA)을 이용하여 게놈 DNA를 분리하였다. NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc, Wilmington, USA)를 이용하여 260/280 nm 값이 1.8~2.0 사이인 추출액을 실험에 이용하였다. PCR 검정을 위하여 dNTP (10 mM) 4 µl, 10X PCR buffer 4 µl, 프라이머 각 20 µM, f-Taq DNA polymerase 1unit (Solgent, Korea), 주형 DNA로 pSB11-RbMSR 10 ng과 가뭄저항성벼 (T5, T6) DNA 1 µg를 추가한 후 최종 반응 부피를 40 µl로 하였다. PCR 반응은 PTC-100 Thermal cycler (MJ Research,

Table 1. Primers list used for the Drought-tolerant transgenic rice (CaMsrb2-8) Southern blot analysis.

Probe	Primer	Primer sequence	Product Size (bp)
<i>Msrb2</i>	Forward	5'-TTGCGATGGCTACACCAGGCTC-3'	348
	Reverse	5'-GGTTCGGGAACCCCTCACCCCTT-3'	
<i>Bar</i>	Forward	5'-CTGCACCATCGTCAACCACT-3'	505
	Reverse	5'-GGAAATTCGGGGTCATCAGA-3'	
<i>Rab21</i>	Forward	5'-TCTCCCGCCGCGTGCAATAC-3'	391
	Reverse	5'-CTAGCGTGGTCCCGGCATC-3'	
<i>Pin II</i>	Forward	5'-TGGGCATCAAAGTTGTGTGT-3'	593
	Reverse	5'-TTGACAATCCATTCGTTTCT-3'	
<i>NOS</i>	Forward	5'-ATTGAATCCTGTTGCCGGTC-3'	237
	Reverse	5'-AGCTTGATATCGAATTCCCG-3'	
35S	Forward	5'-ACGCAGCAGGTCTCATCAAG-3'	554
	Reverse	5'-ATCGCAATGATGGCATTGTGT-3'	

Table 2. Primers used for the backbone DNA detection PCR analysis.

Probe	Primer	Primer sequence	Product Size (bp)
pSB11 131-1300	Forward	5'-ATTACTCCGGCGGCCTTAGA-3'	1,170
	Reverse	5'-TCGGATAGACCTGCCTGTGC-3'	
pSB11 (SPM) 1304-2092	Forward	5'-CTTCGCGCCGCACCTCAACTG-3'	789
	Reverse	5'-GTAACGCGGGCCGAAACAAACC-3'	
pSB11 2101-3400	Forward	5'-CTGCACCATCGTCAACCACT-3'	1,300
	Reverse	5'-GGAAATTCGGGGTCATCAGA-3'	
pSB11 3501-5100	Forward	5'-GGGACCCGTTGTATCTGGTT-3'	1,600
	Reverse	5'-TCGGATGGGGTTTTATAGGG-3'	
pSB11 5101-6100	Forward	5'-TGGGCATCAAAGTTGTGTGT-3'	1,000
	Reverse	5'-TTGACAATCCATTCGTTTCT-3'	
RAc1	Forward	5'-ATCACTGCCTTGCTCCTAGC-3'	350
	Reverse	5'-GTACTCAGCCTTGCAATCC-3'	

USA)를 이용하여 1 cycle (95℃, 5분), 35 cycle (95℃, 40초 -60℃, 40초 -72℃, 60초), 1 cycle (72℃, 5분)반응을 순차적으로 실시하였다. 증폭된 PCR산물은 1% 한천겔에서 전기영동한 후 UV조사로 확인하였으며 Gel Extraction kit (Qiagen, 28704)를 이용하여 정제하고 pGEM T-easy 벡터(Promega, Madison, USA)에 삽입하여 정확한 염기서열 정보를 확인하였다.

목적유전자의 RT-PCR 검정

가뭄저항성벼(CaMsrb2-8 T4, T5, T6)와 일미벼 식물체 시료를 각 1 g씩을 취하고, 막자 사발에서 액체질소와 함께 분말화한 후 RNeasy Plant mini kit (Qiagen, CA, USA)을 이용하여 RNA를 분리하였다. NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc, Wilmington, USA)를 이용하여 260/230 nm 값이 2.0 이상인 RNA추출액을 실험에 이용하였다. 추출한 total RNA 5 µg를 주형으로, RevertAid™ First strand cDNA synthesis Kit (Fermentas, CA, USA) 이 용하여 총 볼륨 20 µl로 cDNA를 합성하였다. 식물 형질전환용 운반체의 유전정보를 바탕으로 가뭄저항성벼의 *CaMsrb2*와 *bar* 유전자의 발현 확인용 프라이머를 제작하였고(Table 1), 벼 내재 유전자인 *actin*을 검출하기 위하여 RAc1 F (5'-ATCACTGCCTTGCTCCTAGC-3')와 RAc1 R (5'-GTACTCAGCCTTGCAATCC-3')의 primer를 제작하여 cDNA 검정용으로 사용하였다. 합성된 일미벼와 가뭄저항성벼(T5, T6)의 cDNA를 5 µl씩, 양성대조군으로 유전자 운반체인 pSB11-RbMSR 10 ng를 주형DNA로, dNTP (10 mM) 4 µl, 10X PCR

buffer 4 µl, 프라이머 각 20 µM, f-Taq DNA polymerase 1 unit (Solgent, Korea)를 추가한 후 최종 반응 부피를 40 µl로 PCR 검정을 수행하였다. PCR 반응은 PTC-100 Thermal cycler (MJ Research, USA)를 이용하여 1 cycle (95℃, 5분), 35 cycle (95℃, 40초 -55℃, 40초 -72℃, 40초), 1 cycle (72℃, 5분)반응을 순차적으로 실시하였다. 증폭된 PCR산물은 1% agarose gel에서 전기영동한 후 UV조사로 확인하였으며 Gel Extraction kit (Qiagen, 28704)를 이용하여 정제하고 pGEM T-easy 벡터(Promega, Madison, USA)에 삽입하여 정확한 염기서열 정보를 확인하였다.

도입유전자의 단백질 발현 확인

PAT (bar) 유전자의 발현 확인을 위하여 ImmunoStrip 검정 (lateral flow strip test)을 실시하였다. 가뭄저항성벼(CaMsrb2-8 T6)와 일미벼 식물체 시료를 추출액과 함께 마쇄하여 단백질을 추출한 후, *PAT* 유전자의 발현을 Trait LL Test Strip (Strategic Diagnostics Inc, Newark, DE)를 이용하여 ImmunoStrip 검정을 수행하였다(Oh et al. 2012). *PAT* 단백질의 농도를 정량하기 위하여 가뭄저항성벼(CaMsrb2-8 T6)와 일미벼의 잎을 채취하여 시료들을 마쇄한 후 PBST용액과 함께 균질화한 후 저온처리(얼음에서 5분) 및 원심분리(5,000 g, 5분)하여 단백질을 분리, 추출한 후 *PAT/bar* ELISA kits (EnviroLogix LibertyLink, Portland, USA)을 이용하여 ELISA분석을 실시하였다. 모든 시료들은 상온에서 2시간 반응한 후 ELISA reader (Multiskan EX, Thermo Scientific)를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다(Kim et al. 2010).

결과 및 고찰

가뭄저항성벼 도입 유전자의 도입위치 및 주변염기서열 분석

본 시험에 공시한 가뭄저항성벼는 일미벼를 모본으로 엽록체내에서 메티오닌의 산화를 방지하고 활성산소의 제거 기작을 통해 엽록체의 손상을 방지하여 가뭄 등 스트레스 저항성을 유도하는 고추 유래 *CaMsrb2* 유전자와 스트레스 유도성 프로모터(*Rab21* promoter)를 부착하여 개발되었으며(Fig. 1A), 유묘기, 성숙기에 강한 건조저항성을 나타낸다. 벼의 유묘기와 성장기에서 가뭄저항성이 증진된 가뭄저항성벼 복수 세대(CaMsrb2-8 T4 ~ T6)에 대한 도입 유전자들의 후대 유전적 안정성 분석을 실시하였다. 우선, 도입유전자의 분자생물학적 특성 분석은 가뭄저항성벼(CaMsrb2-8 T4, T6)의 T-DNA 삽입부위의 인접서열을 Ha 등(2010)의 방법에 따라 단계적으로 수행하였다. 먼저, 추출한 게놈 DNA를 제한효소 *Hae* III로 처리하여 1st PCR을 수행하였고, 이를 바탕으로 2nd PCR을 수행하여 한천겔 전기영동으로 T-DNA의 right border (RB)와 left border (LB) 부위의 증폭된 밴드를 확인하였다(Fig. 1B). 증폭된 RB와 LB의 PCR 산물은 pGEM T-easy 벡터에 클로

닝하여 염기서열을 분석하고, 이들 염기서열에 대하여 NCBI blast 검색을 실시하여 확인한 인접서열을 Fig. 1C, 1D에 나타내었다. 검색 결과 운반체 내의 T-DNA 이외의 염기는 확인되지 않아서, T-DNA만이 벼의 게놈에 삽입되었음을 알 수 있었다. 또한 T-DNA의 인접서열에 대한 게놈의 유사성 분석과 삽입위치를 확인한 결과, 유사성 있는 염기서열은 확인되지 않았으며, T-DNA의 삽입부위는 도입유전자의 RB 및 LB의 인접염기서열을 Gene Bank (NCBI)에서 *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) 게놈 데이터베이스에 근거하여 BLAST한 결과, RB 쪽의 염기서열은 벼 염색체 1번 중에서 41,737,284 ~ 41,737,585번, LB 쪽은 염색체 1번 중 41,739,704 ~ 41,740,007번 사이의 염기서열과 일치하였다. BLAST 염기서열 분석 결과를 바탕으로 도입유전자의 삽입 위치를 확인한 결과, 벼 염색체 1번 중 41,737,284번과 41,740,007번 사이의 단일 부위에 *CaMsrb2* 도입유전자가 삽입되어 있는 것을 확인하였다. 따라서 가뭄저항성벼의 CaMsrb2-8 T4와 T6의 주변염기서열분석이 서로 일치하는 결과를 나타냈으며, 가뭄저항성벼 CaMsrb2-8 (T6)의 도입유전자가 벼 1번 염색체 내에서 intergenic한 상태로 안정적으로 유지되고 있음을 확인하였다(Table 3).

Fig. 1. T-DNA junction sequences analysis. (A) Schematic representation of the pSB11-RbMSR vector used for rice transformation. pSB11-RbMSR vector contained a recombinant gene, *CaMsrb2*. The remaining construct components had the same configuration, consisting of the rice Responsive to ABA protein 21 promoter (*Rab21*), the 3' region of the potato proteinase inhibitor II gene (*PinII*) and the *Bar* expression cassette containing a 35S promoter/*Bar* coding region/3' region from the nopaline synthase gene (*NOS*). (B) Secondary PCR products and junction sequences of T-DNA (C: right border; D: left border) for the Drought-tolerant transgenic rice (CaMsrb2-8) line flanking region. The genomic DNA was digested with *Hae* III, ligated to genome walking adapter to create identical libraries, and used as template for PCR. The DNA molecular size markers are indicated on the left. RB: right border, LB: left border. Capital letters represents the flanking genomic sequences and lower case letters show the inner part of each border of T-DNA.

Table 3. Junction sequence analysis of T-DNA for the Drought-tolerant transgenic rice (CaMsrB2-8) line flanking region.

Pedigree	Chromosome	Junction sequence	Junction gene & sequence
CaMsrB2-8	1	41737284 ~ 41737585 41739704 ~ 41740007	Os01g0917100
			41741070 ~ 41742342
			Os01g0916800
			41,715,800 ~ 41,731,764

Fig. 2. Genomic Southern blot analyses of Drought-tolerant transgenic rice (CaMsrB2-8). Genomic DNAs from leaf tissues were digested with *Hind* III/*Bsr* B I and hybridized with probe (A) *Rab21*, (B) *CaMsrB2*, (C) *PinII*, (D) *35S*, (E) *Bar*, and (F) *Nos*. The DNA molecular size markers are indicated on the left. PC: binary vector carrying *CaMsrB2* recombinant genes as positive controls, Ilmibyeo: non-transgenic wild type rice as negative controls.

가뭄저항성벼의 도입 유전자 서던 분석

가뭄저항성벼의 도입 유전자(T-DNA)는 산화스트레스 저항성 유전자인 *CaMsrB2*, 개시인자(*35S*, *Rab21*), 종결인자(*NOS*, *PinII*), 및 선발마커(*bar*, *PAT*) 유전자로 구성되어있다(Fig. 1A). 도입 유전자의 후대안정성 분석에 사용된 복수세대의 가뭄저항성벼(CaMsrB2 T4 ~ T6) 시료에서 도입 유전자들인 목적유전자(*CaMsrB2*), 개시인자(*35S*, *Rab21*), 종결인자(*NOS*, *PinII*) 및 선발마커(*bar*) 유전자에 대한 서던 분석을 수행하였다. 가뭄저항성벼 CaMsrB2 T4 ~ T6의 각 세대별 앞에서 게놈 DNA를 분리 추출한 후, 각 10 ug를 *Hind* III와 *Bsr* B I 제한효소로

처리하고 1% 한천겔에서 전기 영동한 후, Nylon membrane에 전이하였다. 양성대조군(PC)으로는 pSB11-RbMSR 500 pg을 사용하였다. 가뭄저항성벼 세대별(CaMsrB2 T4 ~ T6)로 *Rab21* 프로모터(*Bsr* B I 절단)의 경우 음성대조군인 일미벼와 T4에서 T6세대까지 가뭄저항성벼 CaMsrB2-8에서 전체적으로 밴드가 발현되는 양상을 보였으며, 이는 *Rab21* 프로모터가 스트레스 유발에 의해 발현되는 벼 내재 유전자이기 때문인 것으로 사료되었다(Fig. 2A). 가뭄저항성 유전자인 *CaMsrB2* 유전자(*Bsr* B I 절단)를 프로브로 이용하여 서던 분석 결과, 음성 대조군인 일미벼에서 12 kb 위치에서 밴드가 검출되었고,

복수세대의 가뭄저항성벼 CaMsrb2-8 (T5)에서도 일미벼와 동일한 위치인 12 kb와 2.6 kb 위치에서 특이적인 밴드가 하나 더 검출되었다. 벼 내재된 *Msrb2* 유전자의 검출된 밴드 위치에서는 음성대조군인 일미벼와 가뭄저항성벼 CaMsrb2-8 (T4 ~ T6)에서 12 kb에서 동일하게 검출되고, 가뭄저항성벼에 도입된 고추유래 *CaMsrb2* 유전자는 2.6 kb에서 안정적으로 유지를 확인하였다(Fig. 2B). 가뭄저항성벼 각 세대별(CaMsrb2-8 T4 ~ T6)로 35S 프로모터 유전자를 이용하여 서던 분석을 수행한 결과, 한 개의 35S 프로모터(*Hind* III 절단) 유전자가 도입되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 2D). 가뭄저항성벼 T4 ~ T6세대별로 제초제 저항성 선발마커인 *bar* 유전자(*Hind* III 절단)를 probe로 하여 Southern 분석을 수행한 결과, *bar* 유전자는 one-copy의 유전자가 도입되었음을 확인하였다(Fig. 2E). 가뭄저항성벼 각 세대별(CaMsrb2-8 T4 ~ T6)로 도입유전자 터미네이터 *PinII* 및 *NOS* 터미네이터 유전자의 서던 분석(각각 *Hind* III 절단) 결과, 모두 한 카피의 유전자가 도입되었음을 확인하였다(Fig. 2C, 2F). 이는 도입 유전자들인 목적유전자(*CaMsrb2*), 개시인자(35S, *Rab21*), 종결인자(*NOS*, *PinII*) 및 선발마커(*bar*) 유전자들이 본 실험에 사용된 가뭄저항성벼에 one-copy로 도입되었고, 도입 유전자가 T4에서 T6세대까지 안정적으로 발현됨을 확인할 수 있었다.

Backbone DNA의 도입 유무 PCR 검증

가뭄저항성벼 형질전환에 사용된 유전자 운반체의 backbone DNA인 pSB11 벡터에서 Fig. 3A와 같이 서던 프로브 및 PCR 검증용으로 디자인하였으며, 항생제(spectinomycin) 내성 마커 유전자 *aadA*를 포함한 총 5곳 부위를 프로브용 프라이머를 제작하였고(Table 2), 가뭄저항성벼 CaMsrb2 T5, T6의 게놈 DNA를 Table 2의 프라이머 셀을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 결과, 가뭄저항성벼 형질전환에 사용된 pSB11-RbMSR (backbone DNA와 T-DNA)에서는 각각의 부위에 따라 양성대조군(PC)인 backbone DNA에서만 밴드가 검출되었고, 가뭄저항성벼 CaMsrb2 T5, T6에서는 벼 내재 유전자인 액틴 유전자 밴드만 검출되어, Backbone DNA와 *aadA* (*spm*)가 도입되지 않았음을 확인하였다(Fig. 3B). 가뭄저항성벼 CaMsrb2 T4 ~ T6의 각 계통에 대한 항생제 내성 마커 유전자인 *aadA* (*spm*)로 서던 분석 결과, 양성대조군(PC)인 pSB11-RbMSR에서만 밴드가 검출되었고, 가뭄저항성벼의 세대별(CaMsrb2 T4 ~ T6)에서는 *aadA*가 삽입되지 않음을 확인하여 가뭄저항성벼(CaMsrb2 T4 ~ T6)에는 backbone DNA가 삽입되지 않음을 확인하였다(Fig. 3C).

Fig. 3. Backbone DNA PCR and Southern blot analyses of *CaMsrb2* transgenic rice (CaMsrb2-8). (A) Schematic representation of the pSB11 vector used for PCR and Southern blot analyses. (B) Verification of backbone DNA (pSB11) insert using PCR amplification of genomic DNA samples extracted from transgenic leaf tissues. (C) Genomic DNAs from leaf tissues were digested with *Hind* III and hybridized with probe *aadA* (SPM). The DNA molecular size markers are indicated on the left. PC: binary vector carrying *CaMsrb2* recombinant genes as positive controls, Ilmibyco: non-transgenic wild type rice as negative controls.

Fig. 4. RT-PCR analyses of *CaMsrb2* transgenic rice (*CaMsrb2*-8). Two pairs of primers were to detect transcripts expressed in *CaMsrb2* and *bar* gene for *CaMsrb2* transgenic rice T4 ~ T6 generations. The DNA molecular size markers are indicated on the left. PC: binary vector carrying *CaMsrb2* recombinant genes as positive controls, NC: non-transgenic wild type (Ilmiby eo) rice as negative control.

RT-PCR분석에 의한 목적유전자 발현분석

가뭄저항성벼 *CaMsrb2*-8의 세대간 안정적인 유전자의 발현 여부를 확인하고자, GMO 격리 온실에서 재배된 T4세대에서 T6세대까지의 식물체 잎으로부터 RNA를 추출하여 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 분석을 실시하였다. 그 결과 연속되는 세대 간에 동일한 유전자 발현량을 나타냈으며(Fig. 4), 비형질전환 일미벼 대조구는 벼 내재 유전자인 *액틴*에서 밴드가 검출되었고, *bar*와 *CaMsrb2* 유전자는 밴드가 검출되지 않았다. RT-PCR 분석 결과, 가뭄저항성(*CaMsrb2*-8)벼의 세대가 진전되어도 목적유전자의 발현이 안정적으로 일정하게 이루어지고 있음을 확인하였다.

도입유전자 복수세대의 단백질 발현 확인

가뭄저항성벼에서 선발마커로 사용된 제초제 저항성인 PAT 단백질 발현을 검정하기 위하여 항체를 이용한 lateral flow strip test (LFST)분석을 실시하였다. 가뭄저항성벼 *CaMsrb2*-8 T4~T6의 각 세대별로 파종한 후, 유묘기(파종 후 4주), 성장기(파종 후 8주), 출수기(파종 후 12주)와 등숙기(파종 후 16주)의 생육 시기별로 PAT 단백질 확인용 항체가 표지되어 있는 ImmunoStrip을 이용하여 단백질 발현을 분석한 결과, 세대별(T4~T6), 부위별(뿌리, 줄기, 잎), 생육시기(유묘기, 성장기, 출수기, 성형기)별로 *Bar* (PAT protein)가 검출됨을 확인하였고, 대조군인 일미벼에서는 유묘기, 성장기, 출수기, 성형기의 모든 부위(뿌리, 줄기, 잎)에서 *Bar*가 검출되지 않았다(Fig. 5). 또한 가뭄저항성벼에서의 PAT 단백질 발현량을 정

량하기 위해서 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 법을 이용하여 분석한 결과, 가뭄저항성벼 특이적으로 $64.82 \pm 1.40 \mu\text{g/g}$ 수준의 PAT 단백질이 발현되었으며 일미벼에서는 발현되지 않음을 확인하였다(Table 4).

본 실험에서는 가뭄저항성벼(*CaMsrb2*-8)의 도입유전자에 대한 후대안정성 평가를 처음으로 시도하였다. 가뭄저항성벼 *CaMsrb2*-8 T4와 T6의 도입유전자 삽입 위치를 확인한 결과, 벼 1번 염색체 중 41,737,284번과 41,740,007번 사이의 단일 부위에 intergenic한 상태로 *CaMsrb2*-8 도입유전자가 삽입되어 안정적으로 유지되고 있음을 확인하였다. 또한, 도입된 T-DNA의 구성요소들이 3세대 이상의 복수세대에서 one-copy로 안정적으로 유지되고, 형질전환에 사용된 벡터의 backbone DNA는 도입되지 않았음을 확인하였다. 그리고, 선발 마커로 도입된 PAT 단백질의 발현 분석을 통해 가뭄저항성벼 *CaMsrb2*-8 T4에서 *CaMsrb2*-8 T6까지의 복수세대에서 생육시기별, 부위별로 안정적으로 발현되고 있음을 확인하였으며, 목적 유전자인 *CaMsrb2*와 선발 마커인 *bar*가 *CaMsrb2*-8 T4~T6 세대에서 안정적으로 발현됨을 검증하였다.

생명공학에 대한 집중적인 연구로 국내의 대학과 연구소에

Table 4. PAT protein levels in Ilmiby eo and Drought-tolerant transgenic rice (*CaMsrb2*-8).

Sample	PAT Concentration ($\mu\text{g/g}$ fresh weight)
Ilmiby eo	0 (N.D.)
<i>CaMsrb2</i> -8	$64.82 \pm 1.40^{1)}$

¹⁾Values are the average $\pm$ SD of triplicate measures.

Fig. 5. Confirmation of *bar* gene expression for Drought-tolerant transgenic rice (CaMsrB2-8) by using immunostrip. (A) Seedling stage, (B) Tillering stage, (C) Heading stage, (D) Ripening stage; Generation (CaMsrB2-8 T4 ~ T6), Tissue (roots, stems, leaves) type; Ilmibyoo, non-transgenic wild type rice as negative controls.

서는 다양한 기능을 가진 GM벼의 개발이 이루어지고 있으나, 아직까지 국내에서 GM벼의 상업적인 재배는 이루어지지 않고 있다. GM벼의 실용화를 위해서는 유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률에 따라 위해성평가와 심사를 거쳐야 하지만 아직까지 경험이 많지 않아 평가항목에 대한 논란이 개발자 및 연구자들간에 존재한다. 따라서 향후 평가될 GM벼들에 대한 후대안정성 평가에서는 본 실험에서 수행된 것처럼 3세대 이상의 복수세대를 대상으로 도입 유전자의 안정성과 backbone DNA 삽입여부 및 목적 유전자의 단백질 발현 평가가 이루어져야 할 필요가 있다. 이러한 후대 안정성 평가 항목뿐만 아니라 향후, GM벼의 도입 유전자의 특성 검증 방법에 대한 표준 가이드라인을 구축함으로써 보다 과학적이며 체계적인 GM작물의 후대안정성 평가를 수행할 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

가뭄저항성벼의 복수세대에 대한 후대안정성을 서던 블롯과 PCR로 분석한 결과, 가뭄저항성벼의 CaMsrB2-8 T4 ~ T6 세대에서는 도입된 모든 유전자들이 안정적으로 도입되어 있으며, T-DNA 구성요소 이외의 backbone DNA는 가뭄저항성벼에 삽입되지 않았음을 확인하였다. 목적 유전자인 *CaMsrB2*와 제초제 저항성 선발 마커인 *bar*가 가뭄저항성벼의 CaMsrB2-8 T4 ~ T6 세대에서 안정적으로 발현됨을 검증하였다. 제초제 저항성 선발 마커로 도입된 PAT 단백질의 발현 분석 결과에서도 CaMsrB2-8 T4 ~ T6의 3세대에서 생육시기별, 부위별로 안정적으로 발현됨을 입증하였다. 도입유전자의 삽입 위치를 확인한 결과, 가뭄저항성벼 CaMsrB2-8의 도입유전자가 벼 1번 염색체 내에서 intergenic한 상태로 안정적으로 유지되고

있음을 확인하였다. 이상의 분석 기법을 통해 복수세대에서 가
뭄저항성벼의 도입 유전자들이 안정적으로 유지되고 목적 단
백질들이 안정적으로 발현되고 있음을 확인하였다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업(과제번호:
PJ009505012013)의 지원에 의해 이루어진 것임.

인 용 문 헌

1. Boyer JS. 1982. Plant productivity and environment. Science 218: 443-448.
2. Cho SK, Ryu MY, Song C, Kwak JM, Kim WT. 2008. Arabidopsis PUB22 and PUB23 are homologous U-Box E3 ubiquitin ligases that play combinatorial roles in response to drought stress. Plant Cell. 20: 1899-1914.
3. Cruz de Carvalho MH. 2008. Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling. Plant Signal Behav. 3: 156-165.
4. FAO. 2004. Economic valuation of water resources in agriculture. FAO.
5. GLAAS. 2012. UN-water Global Analysis and Assessment of Sanitation and Drinking-Water, WHO.
6. Ha SH, Liang YS., Jung HR, Ahn MJ, Suh SC, Kweon SJ, Kim DH, Kim YM, Kim JK. 2010. Application of Two Bicistronic Systems Involving 2A and IRES Sequences to the Biosynthesis of Carotenoids in Rice Endosperm, Plant Biotechnology Journal. 8: 928-938.
7. Im JS, Cho KS, Cho JH, Park YE, Cheun CG, Kim HJ, Cho HM, Lee JN, Jin YI, Byun MO, Kim DY, Kim MJ. 2012. Growth, quality, and yield characteristics of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) overexpressing StMyb1R-1 under water deficit. Journal of Plant Biotechnology. 39: 154-162.
8. James C. 2012. The global status of commercialized biotech/ GM crops: 2012. ISAAA Briefs 44.
9. Jang IC, Oh SJ, Seo JS, Choi WB, Song SI, Kim CH, Kim YS, Seo HS, Choi YD, Nahm BH, Kim JK. 2003. Expression of a bifunctional fusion of the Escherichia coli genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. Plant Physiol. 131: 516-24.
10. Lee HS, Ryu TH, Jung HY, Park SK, Park GH, Sohn JK, Kim KM. 2010. Characteristics of agronomy to vitamin A strengthening rice at large scale GMO field. Korean J. Breed. Sci. 42: 56-60.
11. Kim HJ, Lee SM, Kim JK, Ryu TH, Suh SC, and Cho HS. 2010. Expression of PAT and NPT II proteins during the developmental stages of a genetically modified pepper developed in Korea J Agric Food Chem 58: 10906-10910.
12. Oh SD, Park SY, Sohn SI, Kim JK, Park JS, Park SK, Cho HY, Ahn BO, Lee KJ. 2012. Evaluation and assessment of biosafety carotenoid-biofortified rice (PAC) : Progeny stability study for four generations, Korean J. Breed. Sci. 44: 579-587.
13. Oh SK, Baek KH, Seong ES, Joung YH, Choi GJ, Park JM, Cho HS, Kim EA, Lee S, Choi D. 2010. CaMsrb2, pepper methionine sulfoxide reductase B2, is a novel defense regulator against oxidative stress and pathogen attack. Plant Physiol. 154: 245-261.
14. UNESCO 2012. Managing Water under Uncertainty and Risk, UN water report 4. 1: 22-69.
15. Xia H, Lu B. R., Su J., Chen R., Rong J., Song Z., Wang F. 2009. Normal expression of insect-resistant transgene in progeny of common wild rice crossed with genetically modified rice: its implication in ecological biosafety assessment. Theor Appl Genet 119: 635-644.