GM벼 OsCK1의 도입유전자 구조분석: Whole Genome Shotgun Sequencing을 이용한 다중 도입된 T-DNA 구조 분석

안흥일 · 이진형 · 천양 · 우희종 · 신공식 · 권순종 · 임명호*

농촌진흥청 국립농업과학원 생물안전성과

Transgene Structure Analysis of Genetically Modified OsCK1 Rice : Whole Genome Shotgun Sequencing as a Tool for Structure Analysis of Multi-Inserted T-DNAs

Hong-il Ahn, Jin-Hyung Lee, Yang Qin, He-Jong Woo, Kong-Sik Shin,

Soon-Jong Kweon, and Myung-Ho Lim*

Biosafety Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea

Abstract : The purpose of this study was to characterize the T-DNAs introduced into the transgenic OsCK rice, as part of a biosafety evaluation. *Choline Kinase (CK)* gene is upregulated in the transgenic OsCK rice. We identified the insertion sites, flanking sequences, structures and sequences of the inserted T-DNAs. Based on the adaptor-ligation PCR, we found that the right border of the T-DNA was inserted at position no. 129971, on BAC clone OSJNBa0014J14 of chromosome 10. The flanking sequences of the left border region of the T-DNA (which was later identified as a region harboring a 1-kb long deleted sequence), could not be identified by various PCR-based trials. However, it was finally identified with whole-genome shotgun sequencing, using an Illumina sequencer. The result indicated that one of the T-DNAs was inserted into the CaMV 35S promoter region, whereas the other T-DNA was introduced at position 128947 on OSJNBa0014J14 clone, with an inverse orientation. During the insertion process, a 1024-bp-long chromosome sequences flanked by the right border of the T-DNA region was deleted. A 370-bp long left border region and 199-bp long right border region corresponding to the matrix attachment region (MAR) sequences of the T-DNA were also deleted. Collectively, these results indicate that whole-genome shotgun sequencing is a useful tool to reveal the detailed sequences and structures of the introduced T-DNAs, especially in the case of multiple T-DNA insertions. The expenses incurred on genome sequencing can be easily compensated by minimizing the time and efforts invested in conventional molecular analyses.

Keywords : GMO, OsCK, T-DNA structure analysis, Whole genome shotgun sequencing, NGS

서 언

1994년 무르지 않는 유전자 변형 토마토인 FLAVR SAVR™ 개발을 시작으로 제초제 저항성을 가진 Roundup Ready™ GM콩과 Starlink™ GM옥수수 등이 개발 되었다(Redenbaugh et al. 1992, Padgett et al. 1995, Orlandi et al. 2002). 이후

전 세계적으로 25개 주요 작물에서 330개의 유전자 변형 품종이 개발되었으며, 2013년 기준 상업화가 승인된 주요 유전자 변형 작물은 옥수수 126개 품종, 면화 49개 품종, 유채 30개 품종, 콩 24개 품종에 이른다('13. ISAAA, <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/>). 특히, 다국적 종자 기업을 중심으로 개발된 제초제 저항성, 해충저항성 등 200여종의 GM작물 농산물이 28개국 170백만ha 면적에 재배되고 있으며, 세계 GM 종자시장 규모는 2012년 기준 150억 달러에 이르고 있다('13, ISAAA). 미국, 중국의 경우 GM벼 상업화를 목적으로 가능한 빠른 시일 내에 허가를 받기위한 GM 벼의

*Corresponding author (E-mail: mlim312@korea.kr, Tel: +82-31-299-1126, Fax: +82-31-299-1122)

(Received on October 29, 2013. Revised on July 29, 2014.
Accepted on August 3, 2014.)

환경위해성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 특히 중국의 경우 농업적 특성상 GM벼와 일반 재배벼가 혼입되어 GM 벼의 유전자가 생태계로 유입될 가능성과 영향에 대한 예측 연구들이 속속 진행되고 있다.

우리나라의 경우, 주요 다국적기업(몬산토, 신젠타, 듀폰 등)을 중심으로 생명공학기술을 이용하여 농업재배형질이 획기적으로 증진된 GM작물이 개발되어 제초제저항성, 병해충 저항성, 내건성, 및 성분개량이 된 GM작물의 상업화를 추진하고 있으며, 본 연구원에서도 기능성물질을 생산하는 GM 벼를 개발하고 있다(Qin 2013). 현재까지 국내 재배용으로 GM 작물의 개발 또는 승인된 예가 없으나 2013년 기준으로 85개 국외 생산 GM작물의 수입승인은 이루어졌다(MFDS 2013). 이들 수입 승인된 품목은 동물사료용 또는 가공식품의 원재료로 이용되고 국내 관련 산업의 사활이 이들 수입 GM 작물의 가격동향과 밀접한 관련이 있을 정도로 의존도가 심각한 상황이다.

최근 생명공학 기술이 발달함에 따라 우리나라에서도 병저항성 유전자를 도입한 다양한 GM작물이 개발되고 있으나, 안전성을 평가할 수 있는 기반이 확립되지 않아 이에 대한 연구가 매우 부족한 실정이다. 소비자 및 환경단체에서도 GM 작물 안전성에 관한 연구를 더욱 강화할 것을 요구하고 있어 체계적이고 지속적인 GM작물 안전관리 평가 및 시스템 확립이 필요하다. 유전자변형 작물이 환경에 영향을 줄 수 있는 잠재적 위해성에 대한 우려는 국제적으로 2000년 바이오안전성의정서가 채택됨으로써 제기되었다. 국내에서 이미 일부 개발단계의 GM작물에 대한 식품안전성 및 환경위해성 평가연구가 진행된 바가 있으나, 아직 GM작물의 실용화에 이르지 못하고 있다.

GM작물의 환경위해성평가는 해당 GM작물의 환경방출시 농업환경의 타 생물체에 미치는 영향, 토종자원에 미치는 영향, non-GM의 동종작물로의 유전자 전이여부, 작물의 농업 특성의 동질성, 및 재배환경에 대한 영향 등에 대한 과학적 근거자료를 제시하여야 한다. 본 연구의 공시재료인 OsCK GM벼(Lee JS et al. 2007, Oh SD et al. 2013)는 벼의 환경위해성평가의 일환으로 환경적 평가뿐만 아니라 벼에 도입된 유전자의 구조적 완결성 분석, 도입된 유전자의 안정적 유전 및 발현을 분석하여 GM 이벤트 적격성 여부를 평가할 필요성이 제기되었다(NAAS 2012).

GM작물의 개발 방법으로 가장 보편적으로 사용되는 *Agrobacterium tumefaciens* mediated 형질전환법, microparticle

bombardment를 이용한 방법, Electroporation 방법 등과 그리고 전통적인 육종방법을 이용한 GM 작물간의 교배 방법이 있다. 이러한 방법들은 형질전환 하고자 하는 유전자의 기주 염색체내에 무작위 적인 형태로 도입이 되어 삽입된 위치와 안정적 유전을 확인해야 하는 검정을 수행하여야 하는데 GM 작물의 분자생물학적 특성평가는 기본적으로 도입유전자의 구조적 완결성 분석과 도입유전자의 안정적 발현 및 유전형상의 검증이 주된 요소이다. 이에 대한 실험방법은 이미 확립되었고 분자생물학적 실험에 널리 이용되는 PCR, cloning, sequencing, Southern blot, Northern blot, Western blot 그리고 인공 교배 후 멘델의 유전법칙을 이용한 유전분석 등의 방법이 이용된다. 삽입된 위치를 확인하기 위한 방법으로는 flanking sequencing 방법이 많이 이용된다(Ahn et al. 2011). 그러나 이와 같은 방법은 단일 T-DNA 염기서열이 하나의 염색체 위에 삽입된 경우를 제외하고는 효과적인 결과를 얻기 힘들다. Southern blot을 통한 copy 수 결정을 마친 경우라 하더라도 다양한 실험적 오류로 인한 multi-copy 유전자의 존재가 가능하기 때문에 flanking sequencing 방법만으로 도입위치 결정하기 어려운 경우가 있다. 하지만 최근 수행되고 있는 분자생물학적 분석방법 중 하나인 차세대 염기서열분석(Next Generation Sequencing, NGS) 기술이 이러한 경우의 해결책으로 대두되고 있다(Mardis 2008). NGS 기술 중 Whole genome shotgun sequencing 방법을 이용함에 있어 단순 도입 부위 비교는 과도한 경비의 지출일수도 있다는 견해가 있지만 이를 통한 많은 정보를 획득함으로써 얻어지는 부수적인 결과도 GM작물의 안전성평가에 있어 보다 정확한 평가를 위한 결과로 활용할 수 있다. 본 실험의 결과에서도 단일 copy의 도입유전자로 평가되었지만 flanking sequencing 방법만으로 도입위치 결정하기 어려웠고 위치 결정 확인 후에 밝혀진 내용이지만 도입된 유전자는 복합적인 위치로 확인되었다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에 이용된 OsCK1벼는 벼 유래의 *OsCK1* 유전자(Lee JS et al. 2007)를 낙동벼에 형질전환 하여 벼내에서 과다 발현시켜 벼흰잎마름병 및 벼도열병에 대한 저항성을 높게 한 GM벼로 농촌진흥청에서 개발한 것이다. 우수 선발계통 LS28-30-32-20-9-7 (Oh SD et al. 2013)을 선정하여 실험

험을 수행하였으며, 형질전환을 위한 모본인 낙동벼를 대조구로 사용하였다.

식물체의 genomic DNA (gDNA) 추출을 위해서 잎 조직 1g씩을 취하여 막자사발에서 액체질소를 넣어 분말화 한 후, DNeasy Plant kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc. USA)를 이용하여 260/280 nm 값이 1.8~2.0 사이인 DNA를 각 실험에 사용하였다.

형질전환벡터 및 T-DNA의 염기서열 분석

형질전환벡터의 경우 구성되어있는 각 유전자의 보고된 염기서열을 참고하여 염기서열 결정에 필요한 primer들을 제작하여 염기서열분석에 이용하였다. GM벼에 도입된 T-DNA의 경우 PCR 산물의 크기가 1 k~1.4 kbp 정도 되도록 primer의 위치를 설정하였고 삽입된 T-DNA의 전체를 포함하도록 제작하였다. 삽입된 T-DNA의 증폭을 위한 PCR 반응조건은 95도 5분 predenaturation를 실시한 후, 95도 30초 denaturation, 65도 30초 annealing, 72도 1분 extension 과정을 30회 반복하였고 72도 5분의 post extension 과정으로 실시하였다. PCR 결과 생성된 다양한 크기의 생성물을 pGEM-T easy vector에 클로닝한 후 염기서열을 결정하였다.

주변염기서열(flanking sequence) 분석

T-DNA의 삽입이 확인된 형질전환 식물체로부터 gDNA를 추출하였고 Adaptor ligation PCR (GreenGene Biotech inc.) 방법으로 인접서열을 확인하기 위하여 제조사가 제공한 방법들을 이용해 T-DNA가 들어간 벼의 gDNA 인접부위를 증폭하였다. 분리된 gDNA를 *HincII*, *HaeIII*, *MspI*, *XceI*, *RsaI* 등의 제한효소를 이용하여 37°C에서 2시간 처리한 후, gDNA의 절편들을 agarose gel에서 전기영동 하여 확인하였다. 절단된 gDNA에 25μM adaptor를 첨가하여 16°C에서 8시간 이상 ligation을 실시하였다. 효소활성을 억제하기 위해서 70°C에서 5분간 변성 처리한 뒤에 이를 template DNA로 F1 primer와 AP1 primer를 이용하여 1차 PCR을 수행하였고, 이를 희석하여 F2 primer와 AP2 primer를 이용하여 2차 PCR을 수행하였다. 1차와 2차 PCR 조건은 94°C에서 3분간 변성시킨 후, 94°C에서 25초, 72°C에서 3분의 단계로 7회 실시하고, 94°C에서 25초, 67°C에서 3분의 단계로 32회 반복하여 실시하고, 67°C에서 5분간 최종 증폭하였다. 증폭된 PCR

산물은 1% agarose gel에 전기영동 한 후, Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen)를 사용하여 정제한 후, pGEM-T easy vector (Promega)에 삽입한 다음 HFF DH5-α *E. coli* competent cell (UBI)에 transfer 하여 양방향의 염기서열을 확인하였다. 확인된 염기서열은 NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 분석을 이용하여 유사성 분석을 수행하였다.

Illumina NGS을 이용한 염기서열분석

GM벼와 대조구 낙동벼의 whole genome sequencing을 위하여 HiSeq2000 (Illumina, USA)을 이용하였다. 분석에 이용된 gDNA 분리, library 제작, quality control, 및 sequencing 실험은 제작사가 제공한 표준 프로토콜(HiSeq® 2000 System User Guide)에 준하여 실시하였다. 방법을 간략히 소개하면 다음과 같다. 분석시료의 gDNA quality 조사는 DNA 추출과정에서 많은 degradation이 생길 수 있으므로 1% agarose gel을 이용한 일반 전기영동을 통하여 육안으로 검사하여 gDNA의 상태를 확인하였다. Shotgun pair-end sequencing library 제작은 순수 분리된 gDNA를 Covaris 기계를 이용하여 500 bp 정도의 크기가 되도록 절단하는 DNA fragmentation을 거쳐서 gel elution한 DNA 절편의 양쪽을 exonuclease activity로 repaired한 후 adapter ligation 수행하였다. PCR enrichment를 통하여 repair한 절편의 양쪽 말단에 약 53에서 68bp 정도의 adapter를 붙여서 sequencing 할 수 있는 준비를 하였다. PCR은 양쪽 adapter primer를 이용하여 DNA 절편을 증폭하였고, sample과 primer의 비율은 enrichment 후에 primer-dimer의 생성을 피하기 위하여 1:10의 비율로 실행하였다. Illumina HiSeq 2000을 이용하여 sequencing 전에 library single DNA 절편을 시료를 올려놓을 수 있는 flow cell에 붙여서 각 단편을 PCR로 증폭하여 주위에 cluster를 만들었다. DNA sequencing은 앞서 만들어진 library를 flow cell에서 PCR을 수행한 후 single base synthesis 방식으로 4가지 oligo의 fluorescence의 색깔을 laser로 detection하는 방식으로 이루어졌다. 이번 실험에서 읽을 수 있는 유용한 염기서열의 길이는 50-100bp 정도이고, DNA sequencer로부터 나오는 image file을 자동으로 fasta data를 얻기까지 과정을 거쳐서 최종 data를 생산하였다. 최종 data의 quality check는 quality score (QC)가 30 이상이 되는 것의 빈도를 확인하고 duplicate sequence 통계를 확인하여 data를 점검하였다. 일반적인 good sequencing quality는 lane별 전체 sequencing

양이 30 Gb 이상이고 그 중 QC30 이상이 70% 이상 혹은 QC20 이상이 85% 이상이면 성공으로 판단하였다.

염기서열 분석 자료를 이용한 형질전환벡터 및 T-DNA의 구조 분석

형질전환벡터의 완전장 염기서열 분석은 GM벼와 대조구 낙동벼의 whole genome sequencing을 결과 생성된 sequence file (fasta file)중 QC를 통과한 염기서열 자료를 대상으로 실시한 denovo assembly 시스템을 이용하여 전장의 염기서열을 확인할 수 있었다. NCBI database에 등록된 벼의 reference genome 서열과 낙동벼, GM벼의 생성된 100 bp 길이의 sequence를 assemble하였고, BLAST 분석을 통하여 T-DNA 서열과 벼의 gDNA 서열에 일치하는 contig를 선별하였다. 그 중 하나가 C5344753번이었으며 이를 낙동벼의 염기서열과 비교하여 염색체 번호를 확인하였다. 도입된 T-DNA만의 contig를 분석하여 1 copy가 아닌 이중으로 삽입된 사실을 확인하였으며 또한 이 분석을 통하여 삽입된 구조를 확인하였다.

결과 및 고찰

형질전환벡터 T-DNA 영역의 완전장 염기서열분석 및 구조 분석

선행연구에서 부분적으로 진행된 형질전환벡터의 완전장 염기서열 분석을 수행하였다. GM벼 형질전환에 이용된 재조합벡터의 완전장 염기서열 분석은 재조합형질전환벡터 분리, 염기서열분석용 primer 제작 및 염기서열분석, Seqman (DNASTAR) 프로그램 이용한 sequence alignment, blast 분석을 통한 vector sequence 및 구조 분석의 순서로 진행된다. 이렇게 분석된 주요조사항목은 개발자가 보고한 vector의 각 유전자 구성을 확인하여 개발자의 결과와 일치 여부를 검증

하게 되며, 이것을 통하여 개발된 GM 작물의 안정성을 확인하는 기초가 된다.

형질전환벡터내 T-DNA의 완전장염기서열을 분석을 위하여 기존에 알려진 구조와 염기서열을 바탕으로 sequencing용 primer를 제작하였고 이들 primer를 이용하여 염기서열분석을 수행하였다. 각 primer의 이름과 서열은 Fig. 2에 나타내었고, 분석결과 생산된 염기서열은 SeqManII 프로그램을 이용하여 연결된 sequence 형태의 contig로 만들었다. 약 8.2 kb의 contig로 연결된 염기서열을 NCBI database를 이용한 BLAST 분석을 수행하였고 이를 바탕으로 식물체에 도입될 유전자의 구조를 확정하였다. Fig. 1에서와 같이 양쪽 border (LB, RB) 상간에 2개의 MAR (matrix attachment region) 염기서열이 서로 마주보는 형태로 위치하고 있으며, 제초제 저항성 유전자 PAT는 *CaMV 35S promoter*에 의하여 발현이 유도되고 *nopaline synthase* 유전자의 terminator에 의하여 발현이 종료되는 구조로 제작되었다. 목표 유전자인 *choline kinase* (OsCK)는 *actin promoter*와 *PinII* terminator에 의하여 발현이 조절되며 left border를 기준으로 역방향으로 배치되었다.

목적 유전자인 *OsCK1* 유전자를 NCBI database를 통한 BLAST 분석을 수행한 결과 벼에 도입된 *choline kinase* 유전자는 원래 개발자가 NCBI에 등록한 유전자 *OsLS28* (GeneBank ID EU847524, Lee JS 2007)와는 2개의 염기가 달랐고 그 결과 2개의 아미노산이 다른 것으로 분석되었다. 실제 아미노산 상동성 100%를 나타내는 유전자는 *Os01g0717000*로 분석되었고 1110 bp 중 1109 bp가 정확히 match하여 99.9% 일치하였다. 결론적으로 두 유전자 *OsLS28*과 *Os01g0717000*은 동일한 *choline kinase* 유전자임이 확실하고, *OsLS28* 유전자 이름 대신 *OsCK* 유전자 이름으로 사용하기로 하였다. Fig. 2에 실제 식물체에 도입되는 Left border와 right border 사이의 8.2 kb 염기서열을 그림으로 나타내었다.

Fig. 1. Structural map of the T-DNA region in transformation vector pSBM-LS28.

A structural map was drawn on the basis of complete DNA sequence data and the blast analysis results corresponding to the T-DNA region of the transformation vector. LB: Left Border, MAR: matrix attachment region, T-NOS: terminator (3'-UTR) of *nopaline synthase* gene, PAT: coding region of phosphinothricin aminotransferase (herbicide BASTA resistance gene), T-PinII: terminator (3' UTR) of *PinII* gene, OsCK: coding region of *choline kinase* (rice), P-Act: promoter (5' UTR) of *actin* gene, RB: right border.

Fig. 2. Complete DNA sequences of the T-DNA regions of the transformation vector pSBM-LS28. T-DNA sequences (approximately 8.2-kb long) with both left and right border sequences were identified. The primers that were used for the sequencing analysis and PCR amplifications were labeled with a primer name (e.g., 5-MAR-fow-3), which was either underlined or not underlined.

도입유전자(T-DNA)의 삽입위치 및 flanking sequence

도입유전자의 삽입위치 및 flanking sequence 분석은 adaptor ligation PCR, tail PCR 등의 방법으로 T-DNA가 숙주 genome에 도입된 위치의 숙주 genome 염기서열을 분석한다. 분석된 도입부분 숙주 genome sequence는 blast 분석을 통하여 숙주의 염색체상의 위치를 확인하고 PCR cloning 및 sequencing을 이용하여 삽입위치를 재확인 한다. 이로써 도입유전자의 intergenic 여부를 판정하고 도입유전자 인근의 벼 내재유전자의 발현변이 여부를 확인하는 것이다.

유전자의 도입위치와 주변염기서열을 분석하기 위하여 adaptor ligation PCR을 수행하였는데, MAR 영역에 위치하

는 제한효소로 GM벼 genomic DNA를 절단한 후 adaptor를 붙였다. 염기서열 분석을 위하여 T-DNA의 양 말단에서 primer를 제작한 후 sequence 분석을 하였다. BLAST 분석한 결과, T-DNA의 right border 인근의 MAR sequence가 벼 genome의 10번 염색체 BAC클론 OSJNBa0014J14의 129971번 염기와 연결되어 있음을 확인하였다. Fig. 3은 T-DNA의 right border 영역의 MAR sequence 일부와 주변의 벼 genome 서열을 나타낸 결과이며 MAR sequence 일부와 right border의 370 bp가 결손 되었음을 확인하였다. 이러한 현상은 다른 벼나 보리 포플러 그리고 옥수수 등에서도 쉽게 찾아볼 수 있다(Kim et al., 2003; Stahl et al., 2002;

```

TGAATACAACAGAGTGAATATCAAAGAAGCGCGGAGGCCACCGTGGCACCATCACCGGGCAGTGCAGTGCCCAACTGCCGTTTCCTGAGCAGGCATA
GGAAGCCGTGAGTACGCTCGAGGCATGCAAGCTTGCTGAGTGGCTCCTTCAACGTTGCGGTTCTGTGAGTTCACAAACGTAACCGGCTGTCCCGCGCTCA
TCGGCGGGGGTCATAACGTGACTCCCTTAATTCTCCGCTCATGATCAGATTGTCTGTTCCCGCCTTCAGTTTAACTATCAGTGAGTCCCAAGGCTTTTCA
CATCTATTTCACACTTGCTTAGCTGTATTTTATATTATGAATATCATGTATTTCATGTTATTTAGCACTTAAGTACATAATTATTACGATGGATCGTTAA
ATGATTATTGCATTGTTGTGAGGGATTATTGGAGTTGGGAGATAGTAAGTGTGTGGGAGGGAGGCAGAACAGAGAGAGTCTAGAGAACAAATGAACGT
TCTCATTTGTGACTTACACATAAGTAGACACATGATTGGCCATATAGTTGGCGGCGC
3- Osf3-1 -5

```

Fig. 3. The flanking sequences at the insertion site of T-DNA right border region on BAC clone OSJNBa0014J14 of chromosome 10. Adaptor ligation PCR revealed the presence of an insertion site on the right border region of the T-DNA at position no. 129970 on OSJNBa0014J14 BAC clone of chromosome 10. Part of the DNA sequence corresponding to the MAR along with 370 bps of right border was deleted during this insertion process. The flanking sequences have been marked with green-colored blocks.

```

>C5344753 27.0
CAATATCAGTTTGAAGAAAACAGGAAACATGTGTAGACTAATGGCATCTTCATTTGGCTGGGCAATGAAATCCTAAATGATAGAGCAAACTGGACAGT
GAAGCAGCAATTGATCATCAACATCAGTTTCTTATGGACGCAAGGCTCTCAACTAAATGCAAGCTCAACAAACAAAAGAAATCAATATCCTCTCAGTTT
TTTTGACATGTACTTCCGTAGTTCCGTATCATACGCTATCTAGCTTGACAAAAATAAGTACATAATTCAATTTACTGAATCTAACATGAAACAGTCAA
TCACCTATCCAGGAACCGACACACAAAAAATCAAGATAGCAGTAAAAAGAATAGTAAAAATTGTTTTTTTACTGGAAGTAGAAATGTTGTTTACCA
TGGTTCCCTCTACAAACTGGAGTAGAGGACCTCGGGTGCTAAAGGATAAATGGGATCTGACAAAGCAAGGTGCTGCGACTACCGCAACTTCGTTGCTAG
TTTGTACTTCTTCTAGTGATGGCAATGGGTCAACAAACAGATGTGATACATATGATACCAAAATGACGTATATAGTATTTCTATTTGACAACATAGT
ATGAGGAAAAACAAACAAATAGAAATTCAGTTGTCAATATAGAACTAGTAGTAATATTTAGTGTCTTGTATGCTGCACATCGATCCATTTAAGGTT
GTTACATAAAGTAATAATGTTCCGGGATACCAAGAGTTTCATGCTGCTCCTCAATCATTTGACCATAAAGTAACTGCTACCGGAGTTAGCG
TGGGTTGTAATGACAAAAATACAATATGGCGACATATCAGGGATGGGGGAGAGGGGATCTGTACCTTTCTGCGAGCGGAGTAGATTGTTGTGCGTGGCGA
CGCTGATCGGTTATTAGTAAATGTGATGGCTAAATATAAAGGAAGGGCATATAATTAATAAACTTAAGTGTAAGTCTAGGCCATATAAATCAAGATA
CGGTCGTGAATGTAGCAGTACTTGTGGTGAGGTAGGGAGCATACCGGACTCAGCGTGGGAAGACGGTGACGTAGACCTGCTGCCCTCTTGGCCGAGGTT
GTTCTGGACTGTAGAATTTGAGTTAGAAATTTGCTACTGTGAACCAAAAAAATTAACCTTTGACTGAAAATGGAAGTCCCTAAGAGTCTCAAATTCCTCAA
TTGGCAGTGAAGATTATACATTATACAAACGCTTGGAGAGCAAAAGAACAGTGACAATTTCTAATATAGAGTCAAGAACAGCAATAACCTTAATGTATCT
ATTAAAAACATATATACAAAAATCAGTAGTAACCTGTGGTGAAAACAACTTTAGAAAAACAACACCCATAGAACCATACCGGGAGAGCCACTATTAC
ATCATCAAATTTGTTATAGTCAATTCAAATGGTGGTGGGAGGGAGGAGGAGGCAATTTGTACCTTTTGAAGATGGCAGTGGGAAGAGGAGGGCTCCCGG
CGAACGGGCACCGCAGTTGACGAAAGGGACCTACGCAAGTGGGCGACAGGCTGGACGACGGCGCTCGCTCCAATGACGGCTGCATGCGGCGAAGGGGATT
CAACGACGGTGGCCATTGTGGGATCAGTGGCGGCGGAGGAGATCGACGAGGCGGGCGTCTGTAGCGACTCTTTCGGGAAAGATCAGAGGAGATCAAT
GAGGTGGGCAACACTGCGACCTTTGCAGGAAATATCGGCGACCTGAAATTCCTCAAACTGAAGTGCTCACTTCTGTGGATGGTTCGCAACAGTAGTTCCTCC
CCTCACTTCGTTTACCAAAAAGGACTGGTCTGCAATCCACCTAAATGAAATGAAACCAATCAGCAAGAGTTAAAGAAAAATAAATACTGGTTACCTCCT
AAATGCAGTATGAGCAATTTATAGAAAAAAAACACCAATTCAGTTGGATGTTTTCACCTTTAATTTTCAATTCAGACACTAACATAATGAGATGGTTTA
AATATTACTACACAAGATGATGTCATATACACAGGTGGCAGCTCAGTGACAGGAGAGGTTTTTTTGCCTGTTTTTTTTG

```

MAR region of the first T-DNA
position no. 128947

Fig. 4. Flanking DNA sequences and insertion sites on the left border region of the T-DNA.

One of the contigs (C5344753) produced by the de novo assembly of the whole genome sequence was BLAST-analyzed. This confirmed that the left border region of the T-DNA was inserted at position no. 128947 on OSJNBa0014J14 BAC clone of chromosome 10. During this process, 199 bps corresponding to the MAR sequence and the entire right border sequence were deleted. The MAR sequence is depicted with a blue box and a bracket.

Kumar and Fladung 2002; Kuraya et al., 2004). 기존의 보고된 단자엽 작물인 옥수수에서도 총 23개의 T-DNA 삽입부위의 LB 인접서열 분석 결과에서도 12개는 LB의 부위가 남아있었으나, 11개의 경우 최대 78 bp절단이 확인되었고 (Kuraya et al., 2004), 벼의 경우 61개의 LB인접부위에서 28개만이 LB의 부위가 남아있었으나, 나머지의 경우 T-DNA의 180 bp까지 절단이 보고되는 경향을 나타냈다(Kim et al., 2003).

T-DNA의 right 영역 삽입위치 확인 후 벼 genome 상의 left border 삽입 예상부위를 확인하기 위하여 다양한 PCR primer를 이용하여 분석하였으나 실패하였다. 그러나 Left 영역의 삽입위치는 이후 실시한 Illumina NGS 시스템을 이용하여 확인할 수 있었는데, 그 중 하나가 C5344753번 이었고 벼 10번 염색체의 예상되는 삽입위치와 일치함을 확인하였다. Whole genome sequence의 assembly 과정을 통하여 생성된 contig sequence를 벼 reference genome과 blast 분석하여 기존의 adaptor ligation 방법으로 확인되지 않은 T-DNA의 left

border 주변부의 삽입위치를 확인할 수 있었다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 T-DNA 중의 MAR sequence가 벼 genome의 128847번째 염기에 삽입되었음을 확인하였고 결론적으로 T-DNA의 left border 영역의 삽입위치는 10번 염색체의 BAC클론 OSJNBa0014J14의 128847번째 염기와 129971번째 염기 사이임을 확인하였다. 이는 벼 genome의 일부(1024 bp)가 T-DNA의 삽입에 의하여 결실되었음을 보여주었고 본 실험에서 adaptor ligation PCR 분석법으로 left border가 분석되지 않은 이유로 판단된다. Fig. 5는 벼 10번 염색체에 T-DNA가 삽입된 모식도이며 실제 벼 10번 염색체의 BAC클론 OSJNBa0014J14의 염기서열을 상세히 나타내고 있으며 T-DNA가 벼 내재유전자 사이에 intergenic(인접하는 두 유전자의 gene 영역 사이에 위치) 형태로 되었고 이로 인한 벼의 다른 내재 유전자는 손상되지 않은 것으로 추정된다.

도입유전자(T-DNA)의 삽입 수, 구조 및 염기서열 분석 결과 GM벼에 도입된 외래유전자의 완전장염기서열분석 및 구

```
128581 CGACTCTTTG CGGGAAGAT CAGAGGAGT CAATGAGGT GGCAACACTG CGACCTTTGC
128641 AGGAAATATC GCGGACCTGA AATTCCCAA CTGA GTGCT CACTTTCTGT GGATGGTGC
128701 AACAGTAGTT CCCCCCTCAC TTCGTTTACC AAAAGGAGT GGTCTGCAAT CCACCTAAAT
128761 GAAATGAAAC CAAATCAGCA AGAGTTAAAG AAAATAAAT ACTGGTTACC TCCTAAATGC
128821 AGTATGAGCA TTTATAGAAA AAAAAACACC ATTCAGTTTG GATGTTTGA CCTTAAATTT
128881 CACAATTCAG ACATAACAT AATGAGATGG TTTAAATATT ACTACACAAG ATGATGTCAT
128941 ATACAG (128947)
```

Gene= "OSJNBa0014J14.26"
Hypothetical protein, AAM18166.1
(128387 ... 128674)

```
128947 tgta caggagacat ggtcaaatgc aaaatcagta gtatctttcg cccaaaattg
129001 aaggcagaag cagaattgga taatgataat tcaaaatttt atgctaacga taattcaaaa
129061 ctttatgcct tcattggatt gactcatagc acatacaaat attatttggc cacaataaag
129121 gtatagtcag ccagataaac aacataagta tgtattattt tttatcttaa acataagtac
129181 gcgtttgatg aaattaatct accctgcaca gtcattgtacc caataaattt atctggtaaa
129241 atcataagca ttacatcgat ccattccatcc atcaaatgca tggaaagaaa aacataataa
129301 ccacaatcct ccaactttaa ttaagagcc caacatcaaa catgatccca tccatccatc
129361 aaatgcattg aaagaaaaaac ataataacca caatcctcca actttaattt aagagcccaa
129421 catcaaacat aaattttcag gttttgctgt tcttttgac ccttcaaat tatgatccaa
129481 ccaattagta tatagtgaac aaaaatagta ctacatgatt cagtgcacac cagcacagag
129541 caagcagcct atcagcctga agaaagcaat agagaacaaa ggtgcttgtt gtgagggtgt
129601 acctaaaatt ggtatgctct gaagatgatc tcgttgacgt tgatgccgat ggcggagggc
129661 ggagaccggt ggaccacgga ggacggagtt ttctccctgg gcgggtggc taagaagatc
129721 agtttgtagg tttttgtagt aagccatttt ttgtttgtga gcattgatat tcccttttgt
129781 catggttgac caactgtata taaaatgaaa ttactacaca cgtaaaagat tgactccatt
129841 tgttagcttc CCAATAAATG GGACCTAAA GGGCGATCGA TCGCCTGGGG ACGGGTTAG
129901 aacagggaca aatcattcag gggtaaatga gcattgatcc agagatgcca tcatgaacaa
129961 taattgatct (129970)
```

T-DNA Insertion Site
(128947 ~ 129970)
1024 bp Deleted : 128947 ~ 129970

```
129971 AGTCCAAAGC TTTCACCATC TATTTCACAC TTGCTTAGCT GTATTTTAT
130021 ATTATGAATA TCATGTATTC ATGTTATTTA GCACCTAAGT ACATAATTAT TACGATGGAT
130081 CGTTAAATGA TTATTGCATT GTTGTGAGGG ATTATTGGAG TTGGGAGATA GTAACGTGTG
130141 GGGAGGGAGG CAGAACAGAA GAGAGTCTTA GAGAACAAAT GAACGTCTC ATTTGTTGAC
130201 TTACACATAA GTAGACACAT GATTGGCCAT ATAGTTGGCG CGCCACAAA CACACTGATT
130261 TTCTAGTTCA CCAATAAATG GGACCTAAA GGGCGATCGA TCGCCTGGGG ACGGGTTAG
130321 CGATCAATCC CCGTCCCTCC TCCCTCCCTC CACCTGGTTT CCTTTTGTG CACCGCATT
130381 CTTTCCCATC TTATGAAAT TATGCAAAAG TTTACACATC TAAAGTTTGA AGACCAAAAG
130441 TTTATATATC GATTTCAAAT TTGAATTTGA ATTCAAATAT TTTTATATA TAGTATTTCT
130501 ATACATCTAA AGTTTATAGA CCTAAAGTTT ATAGACCTTA AGTTTATATA CCGTTTCAA
```

Gene= "OSJNBa0014J14.27"
Unknown protein, AAM18167.1
(140110 ... 141605)

Fig. 5. The actual insertion site and the flanking DNA sequences of OSJNBa0014J14 BAC clone.

The T-DNA was inserted at position no. 128947 on OSJNBa0014J14 BAC clone of chromosome 10. A 1024-bp-long stretch (marked with a red dotted box) of chromosome and the insertion locus is intergenic between *OSJNBa0014J14.27* and *OSJNBa0014J14.26* gene.

조분석은 GM벼에 도입된 외래유전자의 PCR cloning, 염기서열분석용 primer 제작 및 염기서열분석, Seqman 프로그램 이용한 sequence alignment, blast 분석을 통한 T-DNA sequence 및 구조 분석의 과정을 거쳐 수행한다. 주요 조사항목은 도입 유전자의 완결성 및 비의도적 유전자 도입여부 확인하고 외래 도입유전자에 기인한 신규 ORF 형성유무를 확인하는 것이다. 또한, 도입유전자의 복제 수 분석은 유전자프로브 이용한 Southern hybridization, 프로브 signal 분석 및 도입유전

자 복제 수 확인, 정량 PCR 분석을 이용한 도입 유전자 수 검증을 수행한다. 주요 조사항목은 도입유전자의 single copy 여부를 판정하고 복수의 프로브를 이용한 반복 hybridization으로 결과를 검증하는 것이다.

앞에서 언급한 바와 같이 adaptor ligation PCR 방법으로 T-DNA의 right border 주변부가 염색체 10번의 BAC클론 OSJNBa0014J14의 129971번째 염기와 연결됨을 설명(Fig. 3 및 Fig. 5)하였고 whole genome shotgun sequencing으로

Fig. 6. The junction site and the DNA sequences of the two T-DNAs.

Adaptor ligation PCR and sequencing revealed the presence of two T-DNAs. The right border of one of the T-DNAs is connected with the CaMV 35S promoter region of another T-DNA. This confirms the presence of the second T-DNA (as well as its structure) at the junction site. A) PCR product generated by adaptor ligation PCR, B) DNA sequences of PCR product in A) above.

TAAAGTGACAGATAGCTGGGCAATGGAATCCGAGGAGGTTCCGGATATTACCTTTGTTGAAAGTCTCAATTGCCCTTTGGTCTTCTGAGACTGTATC
 TTTGATATTTTGGAGTAGACAAGTGTGTCGTCCTCCACATGTTGACGAAGATTTTCTTCTGTCATTGAGTCGTAAGAGACTCTGTATGAAGTCTCG
 CCAGTCTTTACGGCGAGTCTGTGTAGGTCCTTATTGAACTTTGACTCCATGGCCTTTGATTCAGTGGGAACCTACCTTTTACAGACTCCAACTCTA
 TTACTTGCCTTTGGTTTGTGAAGCAAGCCTTGAAATGTCATCTGGAATAGTACTTCTGATCTTGAGAAATATATCTTTCTCTGTGTTCTTGATGCACTT
 AGTCTTGAATCTTTTACTGTCATCTTAACTTTTGGGAAGGTTATTGATTTCTGGAAGATTATTGCTCGGGTAGATCTGTTGATGAGACTGCTGCG
 TAAGCCTCTCTAACCATTCTGTGGGTTAGCATCTTTCTGAAATGGAAGGCTTAATCTGGGGACCTGCAAGGTCGATTCTAGAAAGATTAGATTCTTCTATA
 GTATTTTTTAAAGTAAACCTTTAACTACGGTTAGGACACTTTTAAAGTTAAATTTAAATTTGAACCTTTAAATTTAAATTTTAAATATAGATAAATATCAATC
 ATCCTGATATGCTTTTGAATAATGAATGAGAAAGATGATTCAATTAAGGCCCATTTTAAATCATGACTAAAATAATATACAGTATAATTTATATATAT
 TTGCTTTTAAAAAAATTTGACAATCCATTCTGTTCTAGCAATAAATTTCTTCAACCACAAATATATTAAAGATAACTACGGCATAGAAACAAAATCTAT
 GAAGAATTTTGTATCTTATATGAAATTTAAAAAACTTCATTGAACATCAAAATAATAATAATATCAAACTCTCAATATTTATATTTCTAGCT
 TCTTGAATTAATTTTACATATTCACGATGTAATAAATTTATTTCTATCTATTTTCTTATATCATGATGTTTTCACATATATCAAGGATAAAA
 GCAATCTATGTAAATATCTCACITTTATTAAGTTTCTATCTGAATTTATGAGAACGTAGATTCTTTTTCACATATCCCCAATAATTAGCAAAACACA
 CCTAGACTAGATTTTGTGTTTGAACCAATTTGATATTAATATATATGATTAAATTTATATGTTATATGAAATTTGGTTAATAAAATGCATCTGGTTTCATC
 AAAGAATTATAAGACAGTGCATTCATTAGGATAAGAAATATGGATGATCTTTTCTTATTCAGATAATTAGTAATTACACATAACACACAACCT
 TGATGCCACATTATAGTGAATTAGCATGTCATGTTGTCATCTTTTATTTTCATACATTAATTAAGTTGGCCAATCCAGAAGATGGACAAGTCTAGGG
 TCACATTGCAGGGTACTCTAGCTAGAGCGCCGCTCTAGAAATTCATGAAGTTAAAGTGTCTTCTTCTGCCAACTACTGCTCGA

Fig. 7. The sequence of the CaMV 35S promoter region displays an intact structure.

The contig generated by the *de novo* assembly of the whole genome sequence displays a complete and intact sequence of the CaMV 35S promoter, which refers the presence of 2nd intact T-DNA. The red arrow head indicates the insertion site of the second T-DNA into the first T-DNA.

Fig. 8. A schematic map of two T-DNAs inserted on GM rice.

This figure illustrates the insertion site of the first T-DNA on the rice chromosome and the junction site of the second T-DNA onto the promoter region of CaMV 35S corresponding to the first T-DNA. The sequence information corresponding to the insertion and junction site is presented in the figure.

Fig. 9. Detailed information pertaining to the sequence near the junction site of the two T-DNAs.

The DNA sequences of the junction site of the two T-DNAs are shown in the above figure. The first T-DNA is directly connected with to the rice chromosome and the second T-DNA is inserted onto the CaMV 35S promoter region of the first T-DNA.

right border 주변부가 의 삽입위치가 128847번째 염기와 연결됨을 증명(Fig. 4 및 Fig. 5)하였다. 주변염기서열 분석결과 또 다른 형태의 T-DNA 삽입구조가 밝혀졌는데 adaptor ligation PCR (Fig. 6-A)을 수행하여 PCR product를 분리하여 sequencing 하여 분석한 결과 MAR 영역과 CaMV 35S promoter가 서로 연결되어 있음을 확인하였다(Fig. 6-B). 이는 두 번째 T-DNA가 첫 번째 T-DNA 중간에 삽입되었음을 증명하는 결과가 되고 PCR sequencing을 수행하여 재확인하여 동일한 결과를 얻었다. 이는 adaptor ligation PCR 분석이 두 개의 T-DNA 존재를 시사하고 있으나 이 분석을 통하여 더 이상의 정보를 얻기는 어려웠다. 그래서 이를 해결하기 위한 방안으로 GM벼의 전체 염기서열 분석을 수행하게 되었다. whole genome sequencing 결과 만들어진 contig 분석에서는 CaMV 35S promoter 영역에서 끊어짐 없이 온전하게 보존된 염기서열(Fig. 7)을 확인하였는데 이는 두 번째 T-DNA의 35S promoter가 완전한 구조임을 증명하고 있다.

이상의 결과를 종합하면 OsCK GM 벼에는 2개의 T-DNA가 도입되었음을 알 수 있고, 첫 번째 T-DNA는 벼 10번 염색체 BAC클론 OSJNBa0014J14의 128947번째 염기와 129970번째 염기에 위치하고 벼 genome 염기 1024 bp가 결실됨을 확인하였다. 이 과정에서 첫 번째 T-DNA left border와 첫 번째 MAR sequence 일부(370 bp)가 결실되었고 right border와 두 번째 MAR 영역 199 bp가 결실되었음을 확인하였다. 두 번째 T-DNA는 right border가 결실된 형태로 첫 번째 T-DNA의 35S promoter 중간에 삽입되었음을 확인하였다. 이의 구체적인 구조를 Fig. 8에 나타내었고 상세한 염기서열을 Fig. 9에 나타내었다.

T-DNA가 삽입된 인접서열에서는 흔히 운반체의 backbone 염기서열이 끼어들어가는 경우가 발생하지만 (Kumar and Fladung 2002; Kim et al., 2003; Huang et al., 2004; Kuraya et al.,

2004; Kim and Lee 2007) 이번 연구에서는 그와는 조금 다른 경우가 확인되었다.

도입유전자(T-DNA)의 연속하는 복수 세대간 안정적 유전 분석

OsCK 형질전환 벼에 도입된 유전자의 연속하는 복수세대 간 안정적 유전현상(stable inheritance)를 확인하기 위하여 삽입부위 주변염기서열과 T-DNA의 교차 삽입부위의 두 영역을 분석하였다. PCR 분석을 수행하였고 T6 세대와 T7세대를 대상으로 서로 다른 3개의 genomic DNA를 분리하여 시료로 이용하였다. Fig. 10의 A)는 genome에 삽입된 T-DNA의 안정적 유전을 확인하기 위하여 분석한 결과인데 T6 세대에서 확인된 삽입부위 구조가 T7세대에서도 유지됨을 확인하였다. Fig. 10의 B)는 두 번째 T-DNA가 첫 번째 T-DNA에 삽입된 부위를 확인하는 PCR 실험이며 T6 세대에서 확인된 삽입구조가 안정적으로 T7 세대에서도 유지됨을 확인하였다. 그러나 앞에서 살펴본 도입유전자의 복잡한 구조를 고려할 때 도입유전자의 연속하는 세대간 안정적 유전은 고려하여야 할 필요성이 있는 것으로 여겨진다.

Illumina NGS을 이용한 염기서열분석의 필요성

GM 작물의 개발에 있어 분자생물학적 검정은 형질전환배터 완전장염기서열분석, 도입유전자(T-DNA)의 구조 분석, 도입유전자의 삽입위치 및 flanking sequence 분석, 도입유전자의 복제 수 분석, 도입유전자(T-DNA)의 연속하는 복수세대 간 안정적 유전분석 등으로 진행된다. 이와 같은 결과는 GM벼의 재로평가를 통한 이벤트의 적격성 여부 평가에 활용하고 분자생물학적 특성평가 결과자료는 안전성심사서 작성에 활용할 수 있다.

Fig. 10. Multi-generational stability analysis of the introduced T-DNAs.

A) A PCR amplification of the right border flanking region of the first T-DNA, B) A PCR amplification of the junction region between the first and the second T-DNA. T6: the sixth generation, T7: the seventh generation. The numbers refer to individual plants used for the analysis.

본 실험에서의 도입유전자에 삽입위치를 확인하기 위한 flanking sequence 분석의 경우 right border 부분의 분석은 이루어 졌으나 left border의 경우는 분석이 어려웠다. 삽입된 T-DNA가 단일 copy의 유전자로 하나의 도입위치에 삽입 되었을 경우에는 flanking sequence의 분석이 보편적으로 잘 이루어 지지만 두 개 이상의 copy 수가 도입되었을 경우는 T-DNA 양쪽 border의 중복된 염기서열로 인한 sequencing 분석에 많은 어려움이 발생한다. flanking sequence 분석을 실시하기 전에 Southern blot과 같은 방법으로 도입 유전자의 copy 수를 확인하여 단일 copy의 식물체를 선발하지만 실험적 오류(주로 probe DNA의 선택)로 copy 수의 확인이 정확하지 않은 경우 flanking sequence의 분석이 난항에 빠지는 경우가 발생하기도 한다.

단일 copy의 식물체로 판단된 식물체를 이용하여 연구했던 결과에서 flanking sequence의 결과를 얻기 힘들었던 본 연구에서도 기존의 방법으로는 결과를 도출하기 힘들었던 상황을 Illumina NGS를 이용하여 보다 많은 염기서열의 정보를 확인하고 정확한 분석이 가능하였다. 단순한 염기서열만을 비교하여 도입된 위치만을 확인하는 연구라면 이러한 분석법은 많은 실험비의 사용으로 효율성이 떨어지지만 도입된 유전자 외의 다른 비의도적 혼입된 유전자나 형질전환용 벡터의 backbone 유전자의 절편들에 비의도적 도입을 확인하는 GM작물의 환경안정성 평가실험과 같은 보다 정밀한 분석을 요구하는 경우 충분한 정보를 얻을 수 있었다.

적 요

GM벼 OsCK는 벼 유래의 *OsCK1* 유전자를 벼에 형질전환 하여 벼흰잎마름병 및 벼도열병에 대한 저항성을 높게 한 벼로 농촌진흥청에서 개발하였다. 형질전환 벡터의 구성은 양쪽 border (LB, RB) 상간에 2개의 MAR 염기서열이 서로 마주보는 형태로 위치하고 있으며, 제초제 저항성 유전자 *PAT*는 *CaMV* 35S promoter에 의하여 발현이 유도되고, 목표 유전자인 *choline kinase* (*OsCK*)는 *actin* promoter에 의하여 발현이 조절되며 left border 기준으로 역방향으로 배치되었다. 도입유전자 확인을 위하여 adaptor ligation PCR을 수행하였는데, MAR 영역에 위치하는 제한효소로 GM벼 genomic DNA를 절단한 후 adaptor를 붙였다. 염기서열 분석을 위하여 T-DNA의 양 말단에서 primer를 제작한 후 sequence 분석을 하였다. 분석한 결과, T-DNA의 right border 인근의

MAR sequence가 벼 genome의 10번 염색체 129971번 염기와 연결되어 있음을 확인하였다.

Left 영역의 삽입위치는 이후 실시한 Illumina NGS 시스템을 이용하여 확인할 수 있었으며, GM 벼에는 2개의 T-DNA가 도입되었음을 알 수 있고, 첫 번째 T-DNA는 벼 10번 염색체 BAC클론 OSJNBa0014J14의 128947번째 염기와 129970번째 염기에 위치하고 벼 genome 염기 1024 bp가 결실됨을 확인하였다. 이 과정에서 첫 번째 T-DNA left border와 첫 번째 MAR sequence 일부(370 bp)가 결실되었고 right border와 두 번째 MAR 영역 199 bp가 결실되었음도 확인하였다. 두 번째 T-DNA는 right border가 결실된 형태로 첫 번째 T-DNA의 35S promoter 중간에 삽입되었음을 확인하였다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ00854502)과 바이오그린 21사업(과제번호: PJ00797803)의 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

1. Ahn HI, Shin KS, Woo HJ, Lee KJ, Kim HS, Park YH, Suh SC, Cho HS, Kweon SJ. 2011. Analysis of right border flanking sequence in transgenic Chinese cabbage harboring integrated T-DNA. J. Plant Biotechnol. 38: 15-21.
2. Huang S, Gilbertson LA, Adams TH, Malloy KP, Reisenbigler EK, Birr DH, Snyder MW, Zang Q, Luethy MH. 2004. Generation of marker-free transgenic maize by regular two-border *Agrobacterium* transformation vectors. Transgenic Res. 13: 451-461.
3. Illumina, Inc. 2013. HiSeq® 2000 System User Guide. Part # 15011190 Rev. R.
4. ISAAA : <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/>
5. James C. 2012. "ISAAA Brief 44, Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012". ISAAA Briefs. Ithaca, New York: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA).
6. Kim JH, Lee S. 2007. Analysis of junction between T-DNA and plant genome in transgenic *Arabidopsis thaliana*. J. Plant Biol. 50: 455-460.

7. Kim KN, Lee JS, Han H, Choi SA, Go SJ, Yoon IS. Isolation and characterization of a novel rice Ca^{2+} -regulated protein kinase gene involved in responses to diverse signals including cold, light, cytokinins, sugars and salts. *Plant Mol. Biol.* 52: 1191-202.
8. Kim SR, Lee J, Jun SH, Park S, Kang HG, Kwon S, Ahn GH. 2003. Transgene structures in T-DNA-inserted rice plants. *Plant Mol. Biol.* 52: 761-773.
9. Kumar S, Fladung M. 2002. Transgene integration in aspen: Structures of integration sites and mechanism of T-DNA integration. *Plant J.* 31: 543-551.
10. Kuraya Y, Ohta S, Fukuda M, Hiei Y, Murai N, Hamada K, Ueki J, Imaseki H, Komari T. 2004. Suppression of transfer of non-T-DNA 'vector backbone' sequences by multiple left border repeats in vectors for transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Breed.* 14: 309-320.
11. Lee JS, Suh SC, Lee YH, Kim YH, Heo SK. 2007. OsCK1 gene from *Oryza sativa*, expression vector comprising the gene, transformants transformed with the vector and production method of the transformants. Korean Patent No. 100682129.
12. Mardis ER. 2008. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu. Rev. Genomics. Hum. Genet.* 9: 387-402.
13. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS). 2013. www.mfds.go.kr.
14. National Academy of Agricultural Science (NAAS). 2012. Guidelines for risk assessment of genetically modified organism (Rice). ISBN 987-89-480-1701-4 93520.
15. NCBI BLAST. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
16. Oh SD, Lee KJ, Park SY, Lee DY, Sohn SI, Kim MY, Ryu TH. 2013. Responses of *Misgurnus anguillicaudatus* and *Cyprinus carpio* fed on disease resistant (OsCK1) rice variety. *Korean J. Environ. Agric.* 32: 231-239.
17. Orlandi PA, Lampel KA, South PK, Assar SK, Carter L, Levy DD. 2002. Analysis of flour and food samples for cry9C from bioengineered corn. *J. Food Prot.* 65: 426-31.
18. Padgett SR, Kolacz KH, Delannay X, Re DB, LaVallee BJ, Tinius CN, Rhodes WK, Otero YI, Barry GF, Eichholtz DA, Peschke VM, Nida DL, Taylor NB, Kishore GM. 1995. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci.* 35: 1451-1461.
19. Qin Y, Kim SM, Ahn HI, Lee JH, Baek SH, Shin KS, Woo HJ, Cho HS, Kweon SJ, Lim MH. 2013. Bioassay for the response of resveratrol transgenic rice lines to bacterial and fungal diseases. *Plant Breed. Biotech.* 1: 253-261.
20. Redenbaugh Keith, Hiatt B, Martineau B, Kramer M, Sheehy R, Sanders R, Houck C, Emlay D. 1992. Safety assessment of genetically engineered fruits and vegetables: A case study of the flavr savr tomato. CRC Press pp.288.
21. Stahl R, Horvath H, van Fleet J, Voetz M, von Wettstein D, Wolf N. 2002. T-DNA integration into the barley genome from single and double cassette vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 2146-2151.