



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

제초제 저항성 형질전환 토마토의
개발 및 특성분석

Development and characterization of transgenic
tomato plants with herbicide tolerance

濟州大學校 大學院

生命工學科

정혜린

2021年 2月

제초제 저항성 형질전환 토마토의 개발 및 특성분석

Development and characterization of transgenic
tomato plants with herbicide tolerance

指導教授 李 孝 淵

정 혜 린

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2021年 2月

정혜린의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____

委 員 _____

委 員 _____

濟州大學校 大學院

2021年 2月

목 차

Abstract 4

제1부. 제초제 저항성 GM 토마토의 개발 및 분석

I. 서론 5

II. 재료 및 방법 7

1. 형질전환 vector 구축 및 *Agrobacterium* 형질전환 7

1) *Agrobacterium tumefaciens* transformation 및 Colony PCR 7

2. 토마토 형질전환 10

1) 식물재료 및 배지 10

2) *A. tumefaciens* 감염액 10

3) *A. tumefaciens* 감염 및 공동배양 10

4) Callus 유도 및 선발 11

5) Shoot 유도 및 선발 11

6) Root 유도 및 선발 11

3. 형질전환체 선발 및 유전자 도입 확인.....13

4. Southern blot.....13

1) DNA 추출.....13

2) Southern blot.....16

5. RT-PCR.....20

1) RNA 추출 및 RNA mixture 제작.....20

2) RT-PCR.....20

6. Western blot.....	23
1) 단백질 발현 및 정제.....	23
2) Western blot.....	26
7. 형질전환 토마토의 형태학적 분석.....	27
8. 형질전환 토마토의 제초제 저항성 확인.....	27
III. 결과 및 고찰	29
1. <i>Agrobacterium</i> 균주의 vector 도입 확인	29
2. 토마토 형질전환	29
3. 형질전환체 선발 및 유전자 도입 검정	32
4. 도입 유전자의 copy 수 검정	32
5. 도입 유전자의 mRNA 발현 확인	32
6. 도입유전자의 단백질 발현 분석.....	36
7. 형질전환 토마토의 형태학적 분석	36
8. 형질전환 토마토의 제초제 저항성 검정	37
IV. 종합 고찰	43
V. 인용문헌	44
제2부. 제초제 저항성 GM 잔디의 특성 분석	
I. 서론	46

II. 재료 및 방법	48
1. 식물재료	48
2. 일반성분 분석	48
3. 아미노산 분석.....	48
4. 아미노산 서열 상동성 분석.....	48
5. PAT 단백질 발현 및 정제.....	49
6. PAT 단백질의 인공위액에서의 안정성평가.....	50
7. PAT 단백질의 glycosylation 여부 평가.....	50
8. PAT 단백질의 단회 경구투여 독성 평가.....	51
1) 단회 경구투여 독성실험 시험물질의 제조.....	51
2) 실험동물의 군분리 및 시험물질 투여.....	51
III. 결과 및 고찰	53
1. 일반성분 및 아미노산 분석	53
2. PAT 단백질의 알레르겐 가능성 평가	56
3. PAT 단백질의 인공위액에서의 안정성평가	60
4. PAT 단백질의 단회 경구투여 독성 평가	62
IV. 종합 고찰	65
V. 인용문헌	66
감사의 글	69

Abstract

본 연구의 제1부에서는 *Agrobacterium*을 매개로 *bar* 유전자를 도입하여 glufosinate 저항성 토마토를 개발하였다. 형질전환체는 strip test를 통하여 1차 선별하였고 목적유전자의 도입 여부는 PCR 분석을 통하여 확인하였다. 유전자 도입이 확인된 개체는 Southern blot을 수행하여 목적유전자의 copy 수를 검정하였다. 그 결과 선별한 식물체 3개체가 모두 single copy임을 확인하였다. Single copy임이 확인된 식물체는 RT-PCR 분석 및 Western blot 분석을 수행하여 목적유전자의 발현을 확인하였다. 그 결과 토마토에 도입된 *bar* 유전자는 단백질 수준까지 발현하고 있음이 확인되었다. 이상과 같이 목적유전자의 도입 및 발현이 확인된 제초제 저항성 토마토는 토양에 순화한 후 야생형 토마토와 형태학적 특성을 비교하여 분석하였다. 또한, 형질전환 토마토 식물체에 glufosinate 제초제인 BASTA를 처리하여 제초제 저항성을 확인하였다. 그 결과 야생형 토마토는 고사하였으나 제초제 저항성 토마토는 BASTA 제초제에 저항성을 나타냈다.

본 연구의 제2부에서는 제초제 저항성 잔디의 안전성을 평가하였다. 본 연구에는 제초제 저항성 잔디에서 발현되는 PAT 단백질의 잠재적인 알레르기 유발 가능성과 급성 경구 독성을 평가하였다. PAT 단백질의 아미노산 서열에 대한 생물 정보학 분석에서는 알려진 알레르겐 또는 독소와의 유사성이 없음이 확인되었다. PAT 단백질은 80개의 아미노산으로 이루어진 절편에 걸쳐 기지의 알레르겐과 35% 이상의 상동성을 보이지 않았으며, 알레르겐 항원결정기를 나타내는 연속된 8개의 아미노산과 일치하는 서열도 확인되지 않았다. PAT 단백질의 독성을 평가하기 위하여 대장균에서 발현시켜 정제한 PAT 단백질을 이용하여 마우스에 대한 독성을 평가하였다. PAT 단백질은 마우스에 4,000mg/kg 체중의 용량으로 공급되었고, 투여 후 7일 동안 사망률, 임상 소견 및 체중 변화를 관찰하고 7일째에 부검을 수행했다. 그 결과 마우스에서 사망개체나 특이적인 임상 증상은 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 PAT 단백질이 잠재적인 알레르겐이나 독소가 아니며 건강에 부정적인 영향을 미치지 않을 것임을 시사한다.

제1부. 제초제 저항성 GM 토마토의 개발 및 분석

I. 서론

우리나라에서 시설재배 되는 작물은 매우 다양하다. 채소부터 과수까지 모든 시설재배 되는 2020년도 작물의 면적은 논과 밭을 합하여 80,611ha이다. 이 중에서 토마토는 5,521ha로 6.84%를 차지한다(통계청, 농업면적조사). 토마토는 남아메리카 서부가 원산지이며 유럽에는 1500년대에 전해졌고, 1800년대에 북미로 전해졌다(Jones et al. 1999). 우리나라에는 1614년에 이수광이 편찬한 지봉유설이라는 책에 ‘남만시’라는 명칭으로 토마토에 대한 기록이 남아있는 것으로 보아 그 이전에 전파되었을 것으로 추측되고 있다.

전 세계에서 재배되는 작물은 살균제를 지속적으로 처리함에도 생산량의 손실이 약 12%로 추정된다. 그렇기에 식물의 질병을 줄이기 위해 다양한 병 저항성 유전자를 이용한 형질전환 식물체의 개발이 생산성을 높일 것으로 기대되고 있다(Lee et al. 2003). 또한 야외에서 작물을 재배할 경우 잡초를 제거하기 위해 제초제를 사용하게 된다. 잡초는 경작지에서 필요한 작물 외에 발생하는 식물이다. 잡초는 다른 재배작물과 비교해서 빠르게 성장하며 종자가 수명이 길고 비연속적으로 발아되는 특성이 있다(Herouet et al. 2005). 제초제 중 glufosinate는 글루탐산합성효소를 저해하여 그 결과 식물체 내에 암모늄이 축적되어 식물을 고사시킨다. *bar* 유전자를 도입하면 glufosinate 제초제에 저항성을 갖게 된다(De Block 1990). 최초의 glufosinate 저항성 작물로 1995년에 캐놀라가 개발되었고, 그 후 1997년 옥수수, 2004년 면화, 2011년 대두 순으로 개발되었다. 쌀, 사탕무, 밀과 같은 다른 작물도 개발되었지만, 현재 농업용으로는 사용되고 있지 않다(Takano and Dayan. 2020). 작물 중 토마토는 외국에서 봄과 여름철에는 야외에서도 재배된다(Afonso 2008). 그렇기에 비선택적 제초제로 잡초를 용이하게 제거할 수 있는 제초제 저항성 토마토를 만들고자 하였다.

본 연구에서는 glufosinate 제초제 저항성 토마토를 개발하였다. 사용된 유전자는 *Streptomyces hygroscopicus* 유래의 bialaphos acetyltransferase 유전자(*bar*)

이다. *bar* 유전자의 발현산물인 phosphinothricin N-acetyltransferase (PAT)는 glufosinate를 불활성화시킨다(Thompson et al. 1987). 개발된 제초제 저항성 토마토는 유전자 도입 및 도입 copy 수를 확인한 다음 mRNA 및 단백질 수준에서의 발현을 확인하였다. 그 후 유리 온실에 순화시킨 후 같은 시기에 순화시킨 야생형 토마토와 비교하여 형태학적 특성을 분석하였다. 또한, 형질전환 토마토의 제초제 저항성은 glufosinate 제초제인 바스타를 처리하여 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 형질전환 vector 구축 및 *Agrobacterium* 형질전환

1) *Agrobacterium tumefaciens* transformation 및 Colony PCR

Glufosinate 저항성 토마토를 개발하기 위해서 사용된 vector는 pCAMBIA3301으로 T-DNA 내부에 *bar* 유전자(bialaphos resistance gene)와 T-DNA 외부에 kanamycin 저항성 유전자를 포함하고 있다(Figure 1). pCAMBIA3301 vector는 freezing-thawing 방법을 이용하여 *A. tumefaciens* GV3301에 transformation 하였다(Table 1). 형질전환된 균주는 kanamycin 50mg/L와 rifampicin 25mg/L을 첨가한 YEP 배지에 도말하였다.

균주 내 vector의 도입을 확인하기 위해 single colony를 4개 선발하여 colony PCR을 수행하였다. colony PCR에는 Takara의 EmeraldAmp GT PCR master mix(2×premix)를 사용하였다. Primer는 *bar* 특이적 primer 세트를 사용하였다. forward primer는 5'-TTTCATATGAGCCCAGAACGACGC-3'를 사용하였고, reverse primer는 5'-TTTCTCGAGGATCTCGGTGACGGG-3'을 사용하였다. PCR은 95°C에서 5분간 pre-denaturation 한 다음 95°C에서 denaturation 30초, 58°C에서 annealing 30초, 72°C에서 extension 30초간 반응시키는 것을 30 cycle 수행하였다. 그 후 72°C에서 post elongation을 7분간 수행하였다. PCR 산물은 1.0% agarose gel(TAE buffer 50mL, agarose 0.5g, EtBr 0.5μl)에서 전기영동 하여 밴드를 확인하였다. 형질전환된 균주는 kanamycin 50mg/L와 rifampicin 25mg/L을 첨가한 YEP 액체배지에서 28°C, 24시간 진탕배양한 후 glycerol 50% 용액과 1:1로 혼합하여 -70°C에 보관하였다.



Figure 1. Diagram of the T-DNA region of the vector pCAMBIA3301.

KanR, Gene for kanamycin resistance; LB, left border; 35S poly-A, CaMV 35S terminator; BAR, bialaphos resistance gene; P35S, CaMV 35S promoter; RB, right border

Table 1. Procedure of *A. tumefaciens* transformation

① <i>Agrobacterium</i> competent cell에 vector DNA 첨가 후 heat shock	② freeze 후 thaw
<ul style="list-style-type: none"> ● <i>Agrobacterium</i> competent cell(100μl)을 얼음 위에서 녹이기 ● vector DNA 5μl 넣기 ● 37°C에서 5분 열처리 	<ul style="list-style-type: none"> ● 액체질소에 2분 ● 37°C에서 5분 열처리
③ ice에 방치 후 recovery	④ 상청 제거 후 YEP배지에 spreading 하여 암배양
<ul style="list-style-type: none"> ● 얼음에 tube를 30분간 두기 ● YEP배지 500μl 첨가 후 28°C에서 1시간동안 200rpm shaking 	<ul style="list-style-type: none"> ● 3,000rpm, 25°C, 5분 원심분리 후 500μl 상청 제거 ● kanamycin 50mg/L, rifampicin 25mg/L 첨가된 YEP agar 배지에 Pipetting 후 spreading ● 28°C에서 2일 암배양

2. 토마토 형질전환

1) 식물재료 및 배지

본 실험에 사용된 토마토의 품종은 Micro Tom이다. 토마토 종자를 70% 에탄올에서 약 1분간 교반한 후 1.5% NaClO 용액으로 30분간 표면 살균을 하였다. 살균한 토마토 종자를 멸균수로 5회 세척 후 5회째 세척액에서 하룻밤 방치하였다. 그 후 멸균한 필터 종이 위에 올려 수분을 제거한 후 종자 파종 배지에 약 20개씩 파종하였다. 파종한 종자는 25°C에서 장일조건(16h light/8h dark)으로 배양하였다. 토마토 형질전환 시 사용한 배지는 MS배지(Murasige and Skoog 1962)를 바탕으로 형질전환 단계에 따라 재료를 첨가하였다(Table 2). 모든 배지는 멸균하기 전에 pH를 5.8로 적정하였고, autoclave를 이용하여 멸균하였다.

2) *A. tumefaciens* 감염액

적합한 항생물질(kanamycin 100ppm, rifampicin 25ppm)이 포함된 LB 액체배지 2mL에 *Agrobacterium cell stock* 20 μ l를 접종하였다. *A. tumefaciens*은 28°C에서 200rpm으로 24시간 진탕배양 하여 균농도가 600nm에서 흡광도가 0.8이 되도록 배양하였다. 그 후 배양액을 3,000rpm으로 5분간 원심분리하였고, 배양 시 넣은 배지와 동량의 감염배지로 재현탁하였다. 그리고 그 현탁액을 감염배지로 20배 희석하여 *A. tumefaciens* 감염액을 제조하였다.

3) *A. tumefaciens* 감염 및 공동배양

7일에서 10일간 명배양하여 발아한 종자의 자엽을 준비하였다. 준비한 자엽을 잎맥에 수직으로 가운데를 잘라서 1개의 자엽에서 2개의 절편을 만들었다. 이때 자엽의 가장 바깥쪽을 약간 자르고 자엽을 이등분하였다. 자엽 절편을 *A. tumefaciens* 감염액에 넣어 10분에서 20분간 감염하였다. 그 후 멸균한 필터 종이 위에 감염한 잎 절편을 올려 과잉 수분을 제거하여 공동배양 배지에 잎의 표면이 배지와 접하도록 하여 치상하였다. 그 후 호일로 petri dish의 빛을 차단하여 2일간 25°C에서 암배양하였다.

4) Callus 유도 및 선발

공동배양한 잎 절편을 잎의 뒷면이 배지와 접하도록 하여 callus 유도 배지에 옮겼고, 25℃에서 장일조건(16h light/8h dark)으로 배양하였다. 2주 후 PPT가 0.1mg/L 첨가된 callus 유도 및 선발 배지에 계대 배양하였다. 자엽 절편에서 callus가 형성되고 그 callus에서 shoot가 보이기 시작하면 shoot 유도 및 선발배지로 옮겨 25℃에서 장일조건으로 배양하였다.

5) Shoot 유도 및 선발

Shoot 유도 및 선발배지에 옮긴 캘러스에서 shoot가 생성되면 자엽을 핀셋을 이용하여 제거하고 새 배지에 옮긴 후 25℃에서 장일조건(16h light/8h dark)으로 배양하였다. 2주마다 계대배양 하였는데 shoot가 1cm에서 2cm 자라면 조심히 잘라내어 root 유도 및 선발배지로 옮겨 25℃에서 장일조건으로 배양하였다.

6) Root 유도 및 선발

Root 유도 및 선발배지로 옮겨 2주 이내에 뿌리가 형성된 개체를 형질전환체 후보로 선발하였다. 그 후 식물체의 성장을 고려하여 100×40mm petri dish에서 root가 유도된 개체를 72×72×100mm incu tissue(SPL)로 옮겨서 배양하였다. 30일 배양한 개체는 증식을 위해 줄기를 2, 3등분으로 절단하여 root 유도 및 선발배지에서 25℃에서 장일조건(16h light/8h dark)으로 배양하였다.

Table 2. Composition of the medium used for transformation of tomato

Medium name	Composition
MS medium	MS salt, myo-inositol 100mg/L, gelrite 3g/L
Infection medium	MS salt, myo-inositol 100mg/L, mercaptoethanol 10 μ M, acetosylingone 100 μ M
Co-cultivation medium	MS salt, myo-inositol 100mg/L, gelrite 3g/L, acetosylingone 40 μ M, zeatin 2mg/L
Callus induction medium	MS salt, myo-inositol 100mg/L, gelrite 3g/L, zeatin 2mg/L, augmentin 250mg/L
Callus selection medium	MS salt, myo-inositol 100mg/L, gelrite 3g/L, zeatin 2mg/L, augmentin 250mg/L, PPT 0.1mg/L
Shoot induction and selection medium	MS salt, myo-inositol 100mg/L, gelrite 3g/L, zeatin 0.5mg/L, augmentin 250mg/L, PPT 0.1mg/L
Root induction and selection medium	MS salt, myo-inositol 100mg/L, gelrite 3g/L, augmentin 250mg/L, PPT 0.1mg/L

3. 형질전환체 선발 및 유전자 도입 확인

형질전환체 선발을 위해 뿌리가 유도된 토마토의 잎을 0.5에서 1cm 크기로 잘라 tube에 넣었다. 그 후 멸균수를 0.4mL 넣어 잎을 grinding 하였다. 그리고 immuno strip test를 통해 형질전환체를 선발하였다. immuno strip test 시 사용한 kit는 ROMER의 Seedchek LL Strip test strips (PAT)를 사용하였다. 이 kit를 사용하면 PAT 단백질이 있는 경우에는 하단에 있는 PAT 항체-색소 복합체에 PAT 단백질이 결합하여 붉은 band 1개가 생성되고, 상단에는 control band 1개가 생성되어 총 2개의 band가 생성된다. PAT 단백질이 없는 경우는 control band만 1개 생성된다.

2개의 band가 생성된 식물은 CTAB법(Murray and Thomson, 1980)을 참고하여 잎에서 genomic DNA를 추출하였다. 야생형 토마토와 비교하기 위해 야생형 토마토의 잎에서도 genomic DNA를 추출하였다. 그 후 유전자 도입을 확인하기 위해 *bar* 특이적 primer 세트를 사용하여 genomic DNA PCR을 수행하였다. forward primer는 5' -GTCTGCACCATCGTCAACCACTA-3' 를 사용하였고, reverse primer는 5' -AAGTCCAGCTGCCAGAAACCCAC-3' 을 사용하였다. PCR은 95°C에서 5분간 pre-denaturation 한 다음 95°C에서 denaturation 30초, 58°C에서 annealing 30초, 72°C에서 extension 30초간 반응시키는 것을 30cycle 수행하였다. 그 후 72°C에서 post elongation을 7분간 수행하였다. PCR 산물은 1.0% agarose gel(TAE buffer 50mL, agarose 0.5g, EtBr 0.5 μ l)에서 전기영동 하여 밴드를 확인하였다.

4. Southern blot

1) DNA 추출

DNA 추출을 위하여 Table 3과 같이 extraction buffer 만들어 65°C에 넣었다. 그다음 액체질소를 사용하여 잎을 분쇄하여 0.1g씩 튜브에 담았다. extraction buffer를 튜브에 800 μ l씩 넣고 vortexing 하였다. 그리고 65°C에 넣어 10분마다

inverting을 3회 수행하였다. 그 후 12,000rpm으로 4℃에서 5분간 원심분리를 하였다. CI solution(chloroform 24 : isoamylalcohol 1)을 만들어서 750 μ l씩 새 튜브에 넣었다. 원심분리 후 CI solution을 담은 튜브에 상청 750 μ l를 넣고 5분간 inverting 하였다. 그다음 12,000rpm으로 4℃에서 20분간 원심분리를 하였다. 그 사이에 새 튜브에 isopropyl alcohol을 800 μ l씩 넣었다. 원심분리 후 상청을 100 μ l씩 5회에 나누어서 isopropyl alcohol을 담은 튜브에 총 500 μ l를 넣어 inverting 후 -20℃에 넣어 20분 동안 정치하였다. 그리고 12,000rpm으로 4℃에서 20분간 원심분리를 하였다. 그 후 상청을 버리고 -20℃에 보관해놓은 에탄올을 500 μ l 넣고 원심분리를 동일하게 반복하였다. 원심분리 후 피펫으로 에탄올을 제거하고 상온에서 15분 건조하였다. 건조 후 SDW 150 μ l 넣어 tapping 하여 녹였다. 그다음 같은 sample을 4개씩 합쳐서 600 μ l를 만들고 RNase(0.4mg/ μ l) 10 μ l를 넣어 37℃에 15분간 처리하였다. RNase 처리 후 CI solution을 600 μ l 넣고 5분간 inverting을 하였다. 그다음 12,000rpm으로 4℃에서 10분간 원심분리를 하였다. 원심분리를 하는 동안 새 2mL 튜브에 4M NaCl을 250 μ l 넣었다. 원심분리 후 상청을 100 μ l씩 5회에 나누어 NaCl을 담은 튜브에 넣고 inverting 하였다. 그다음 -20℃에 보관해놓은 100% 에탄올 1mL을 튜브에 넣고 inverting 하였다. 그 후 12,000rpm으로 4℃에서 10분간 원심분리를 하였다. 원심분리를 마치고 상청을 버린 다음 -20℃에 보관해놓은 70% 에탄올을 1mL 넣고 12000rpm으로 4℃에서 5분간 원심분리를 하였다. 그 후 상청을 제거하고 상온에서 15분간 건조한 다음 SDW 100 μ l로 tapping 하여 녹였다. loading dye 1 μ l, SDW 6 μ l, DNA 3 μ l를 1.0% agarose gel에 넣어 전기영동으로 DNA를 확인하였다. 그 후 260nm로 흡광도를 측정하여 농도를 확인하였다.

Table 3. Composition of DNA extraction buffer

Material	Amount
CTAB (Hexadecyltrimethyl ammonium bromide) 10% solution	3mL
Tris-HCl 1M (pH 8.0) solution	1mL
EDTA 0.25M (pH 8.0) solution	800 μ l
β -mercaptoethanol	20 μ l
NaCl 5M	2.8mL
SDW	2.38mL
Total	10mL

2) Southern blot

Genomic DNA를 20 μ g을 Xba I 을 사용하여 제한효소 처리하였다. 18시간 후 1.0% agarose gel(TBE buffer 320mL, agarose 3.2g, EtBr 5 μ l)에 loading 하였다. 50V로 영동을 시작하다가 60, 80V 순서로 점차 올려서 5시간 영동 하였다. 그 후 밴드가 없는 부분을 UV로 확인하며 잘라내었다. Southern blot에 사용한 solution은 table 4에 정리하였다. 잘라낸 gel을 depurination 하기 위해 0.25M HCl 용액을 넣어 30rpm으로 15분간 처리하였다. 그다음에 Denaturation solution 을 넣어 30분간 교반하였고 Neutralization solution을 넣어 30분간 교반하였다. 마지막으로 20 \times SSC buffer를 넣어 30분간 평형화시켰다. 그 후 20 \times SSC buffer를 이용하여 나일론 membrane에 16시간 transfer 하였다. 그 후 membrane은 80 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 baking 하여 DNA를 고정하였다. Probe는 유전자 도입을 확인할 때와 동일하게 *bar* 특이적 primer 세트를 사용해서 같은 조건으로 PCR을 수행하여 제작하였다(Table 5). Baking 후 membrane은 Hybridization buffer를 50mL 넣어 45 $^{\circ}$ C에서 pre-hybridization을 2시간 하였다. 10% Block solution은 Blocking reagent(Roche)를 증류수에 10% 농도로 제조 후 autoclave로 멸균하여 준비하였다. Hybridization solution은 다음과 같이 제작하였다. probe를 튜브에 45 μ l 넣고 SDW 50 μ l를 넣어 100 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하였다. 즉시 튜브를 얼음에 꽂고 얼음에 꽂힌 상태로 용액을 피펫으로 빼내어 빠르게 Hybridization buffer 50mL에 첨가하여서 Hybridization solution을 제작하였다. Hybridization solution은 65 $^{\circ}$ C에 보관하였다. Membrane을 pre-hybridization 후 Hybridization solution에 넣어 45 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 hybridization 하였다. 그다음 2 \times washing buffer(2 \times SSC containing 0.1% SDS)로 membrane을 실온에서 5분간 2회 washing 하였다. 65 $^{\circ}$ C에 넣어둔 0.1 \times washing buffer(0.1 \times SSC containing 0.1% SDS)로 15분씩 2회 washing 하였다. 마지막으로 Washing buffer(buffer 1 containing 0.3% Tween 20)로 2분간 washing 하였다. 그리고 Buffer 2(blocking solution) 50mL을 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 blocking 하였다. 그리고 Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments(Roche)를 Buffer 2(blocking solution) 50mL에 5 μ l 넣어서 10,000배 희석하여 antibody solution을 준비하였다. antibody

solution을 넣어 37℃에서 30분 반응시켰다. 그 후 antibody solution을 버리고 Washing buffer(buffer 1 containing 0.3% Tween 20)을 넣어 실온에서 15분씩 두 번 50rpm으로 강하게 washing 하였다. 버퍼를 버리고 Buffer 3(detection buffer)를 넣어 5분간 평형화시켰다. 그 후 membrane 표면에 CDP-starTM detection reagent(GE healthcare)를 고르게 뿌리고 5분 후 LAS 4000 기계를 사용하여 signal을 확인하였다.

Table 4. Buffer solution used for Southern blot

Used step	Buffer	Material
Transfer	Denaturation solution	0.5M NaOH 1.5M NaCl
	Neutralization solution	0.5M Tris-HCl(pH 7.5) 1.5M NaCl
	20×SSC buffer (pH 7)	0.3M Sodium citrate 88.2g 3M NaCl 175.3g
Washing	2×washing buffer (2×SSC containing 0.1% SDS)	20x SSC 100mL 10% SDS 10mL SDW 890mL
	0.1×washing buffer (0.1×SSC containing 0.1% SDS)	20x SSC 5mL 10% SDS 10mL SDW 985mL
	Buffer 1 (pH 7.5)	0.15M NaCl 0.1M Maleic acid
	Washing buffer	Buffer 1 (pH 7.5) 300mL Tween 20 900 μ l(0.3%)
Blocking	Buffer 2 (blocking solution)	10% Block solution 10mL Buffer 1 40mL
Hybridization	Hybridization buffer	25× SSC 40mL
		10% Block solution 40mL
		10% N-lauroylsarcosine 2mL
		1M Sodium phosphate 10mL
		10% SDS 4mL
		100% Formamide 100mL
Detection	Buffer 3 (pH 9.5)	0.1M Tris 0.1M NaCl

Table 5. Probe used for Southern blot

Material	Probe	DIG-label probe	Unlabeled control probe
10×PCR buffer		5μl	-
PCR DIG Probe Synthesis Mix		5μl	-
2×Emerald premix		-	10μl
Forward primer		2.5μl	1μl
Reverse primer		2.5μl	1μl
PCR DIG Probe synthesis kit Enzyme mix		1μl	-
SDW		31μl	6μl
Template DNA		3μl	2μl
Total volume		50μl	20μl

5. RT-PCR

1) RNA 추출 및 RNA mixture 제작

RT-PCR을 수행하기 위해서 먼저 RNA를 추출하였다. 토마토 잎 0.1g을 액체 질소를 사용하여 분쇄하여 튜브에 넣었다. 그다음 trizol 1mL을 넣어 1분간 vortexing 하여 얼음에 두었다. chloroform을 200 μ l 넣고 vortexing 후 얼음에 두었다. 12,000rpm으로 4 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 원심분리를 하였다. 새 튜브에 isopropanol 400 μ l를 넣고 원심분리 후 상청을 500 μ l 넣었다. 15분간 얼음에서 배양하였다. 그리고 12,000rpm으로 4 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 원심분리를 하였다. pallet을 확인 후 상청을 버리고 DEPC가 첨가된 70% 에탄올을 넣어 12,000rpm으로 4 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 원심분리를 하여 세척하였다. 상청을 피펫으로 제거한 후 클린벤치에서 10분간 건조하였다. DEPC를 첨가한 멸균수를 40 μ l 넣고 heat block에서 60 $^{\circ}$ C로 5분간 열을 가했다. 그 후 얼음에 넣어두고 농도를 측정하였다. 측정된 농도에 따라 RNA 양이 2 μ g이 되도록 튜브에 넣고 oligo DT(100pM) 1 μ l를 넣은 다음 총 부피가 13.5 μ l가 되도록 DEPC가 첨가된 멸균수를 넣어 RNA mixture를 만들었다.

2) RT-PCR

Table 6에 따라 RT mixture를 만들고 cDNA 합성을 위해 PCR을 수행하였다. PCR 수행조건은 70 $^{\circ}$ C에서 7분간 이차구조를 해리한 다음 4 $^{\circ}$ C에서 고정 30초, 42 $^{\circ}$ C에서 cDNA 합성 60분, 90 $^{\circ}$ C에서 분리를 8분 하였다. 상세한 과정은 다음과 같다. 먼저 RNA mixture를 넣은 튜브를 PCR 기계에 넣어 70 $^{\circ}$ C에 7분간 두었다가 꺼내어 얼음에 3분간 두었다. 기계는 4 $^{\circ}$ C 단계에 도달하면 정지시켰다. 3분 후 튜브에 RT mixture를 첨가하고 3번 피펫팅하였다. 그 후 기계에 튜브를 넣고 기계를 작동시켜서 PCR을 진행하였다. 그 결과 합성된 cDNA 1 μ l와 Table 6에 제시된 시약들을 넣어 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 pre-denaturation 한 다음 95 $^{\circ}$ C에서 denaturation 30초, 58 $^{\circ}$ C에서 annealing 30초,

72°C에서 extension 30초간 반응시키는 것을 25cycle 수행하였다. 이때 사용한 primer 세트는 2종류이다. 첫 번째는 *bar* 유전자의 일부를 증폭하는 primer 세트이고 두 번째는 18S rRNA를 증폭시키는 primer 세트이다. PCR 산물은 1.2% agarose gel(TAE buffer 50mL, agarose 0.6g, ETBr 0.5μl)에서 전기영동 하였다. 사용한 *bar* forward primer는 5'-CTCTACACCCACCTGCTGAA-3'이고, *bar* reverse primer는 GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC-3'이다. 사용한 18S rRNA forward primer는 5'-CCTCCAATGGATCCTCGTTA-3'이고, 사용한 18S rRNA reverse primer는 5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3'이다.

Table 6. RT mixture and RT-PCR

Name	Material	Amount
RT mixture	Reverse transcriptase	1 μ l
	5 \times buffer	5 μ l
	dNTP	5 μ l
	DEPC-SDW	0.5 μ l
	Total	11.5 μ l
RT-PCR	Emerald premix ($\times 2$)	10 μ l
	Forward primer	0.5 μ l
	Reverse primer	0.5 μ l
	cDNA	1 μ l
	SDW	8 μ l
	Total	20 μ l

6. Western blot

1) 단백질 발현 및 정제

Western blot을 위해 항체를 제작하려면 항원인 단백질이 필요하였다. 그래서 *bar gene*을 pET30a vector에 도입하여 대장균 DE3에 cloning 하였다. 이때 사용한 제한효소는 Nde I 과 Xho I 을 사용하였다. *bar gene*이 cloning 된 대장균을 배양하여 단백질을 발현시켰다(Table 7). 단백질 발현 및 정제에 사용한 buffer는 Table 8에 정리하였다. 자세한 과정은 다음과 같다.

PAT 단백질의 발현을 유도하기 위해 LB 액체배지 5mL에 대장균 cell stock 50 μ l, kanamycin 100ppm을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 200rpm으로 overnight 배양하였다. 하룻밤 동안 배양한 것을 kanamycin 100ppm을 첨가한 LB 액체배지 100mL에 1mL씩 넣고, 37 $^{\circ}$ C, 200rpm의 조건에서 2시간 배양하였다. 그 배양액을 28 $^{\circ}$ C에서 30분 배양한 후 IPTG를 1mM이 되도록 첨가하여 5시간 배양하여 PAT 단백질의 발현을 유도하였다. PAT 단백질의 발현이 유도된 배양액을 50mL씩 tube에 분주한 다음 4 $^{\circ}$ C에서 3,000rpm으로 10분간 원심분리를 하였다. 상청을 버리고 resuspension buffer 20mL를 넣어 재현탁하였다. 그런 다음 재현탁 용액에 imidazole을 최종농도 20mM이 되도록 첨가하여 pulse on 10초, pulse off 50초로 5분간 sonication하였다. Sonication을 하는 동안 단백질 정제용 column에 실리콘 tube를 연결하고, column에는 Ni-Sepharose 레진 2mL을 충전하였다. Sonication 산물은 4 $^{\circ}$ C, 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상청을 새 튜브로 옮긴 다음, 정제용 column에 apply 하였다. Apply한 샘플 용액이 레진에 거의 들어간 다음, binding buffer 10mL로 washing하고, washing buffer 10mL로 한 번 더 washing 하였다. 그런 다음 elution buffer 10mL을 넣고 column을 통과한 액체를 1mL씩 tube에 분취하였다. 분취한 각 정제 샘플은 280nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 측정하였다. A280=1일 때 1mg/mL로 계산하였다. 흡광도 측정 후 0.5mg/mL 이상인 용액만 모아 PBS로 3회 투석하여 영인프론티어에 항체 제작을 의뢰하였다.

Table 7. Process of PAT protein expression

① 대장균 배양 (overnight)	② 37°C 2시간 배양	③ 단백질 5시간 발현
<ul style="list-style-type: none"> ● LB배지 5mL ● Kanamycin 100mg/L ● DE3 pET30a <i>bar</i> cell stock 50μl 	<ul style="list-style-type: none"> ● ①번의 대장균 1mL ● LB배지 100mL ● Kanamycin 100mg/L 	<ul style="list-style-type: none"> ● ②번에 IPTG 첨가 ● 28°C에서 배양
④ 원심분리	⑤ 재현탁 후 보관	
<ul style="list-style-type: none"> ● 50mL씩 tube에 넣기 ● 3,000rpm, 4°C 조건하에 30분 원심분리 	<ul style="list-style-type: none"> ● 상청을 버리기 ● Resuspension buffer 20mL 넣어서 재현탁 ● -70°C 보관 	

Table 8. Buffer solution used for protein purification

Buffer	Material	Amount
Resuspension buffer (pH 7.5)	50mM Tris-HCl (pH 8.0)	4mL
	NaCl	10mL
Binding buffer (pH 7.4)	DW	500mL fill up
	Sodium phosphate(20mM)	1.42g
	NaCl(0.5M)	14.61g
	Imidazole(20mM)	0.68g
Washing buffer (pH 7.4)	DW	500mL fill up
	Sodium phosphate(20mM)	1.42g
	NaCl(0.5M)	14.61g
	Imidazole(50mM)	1.70g
Elution buffer (pH 7.4)	DW	200mL fill up
	Sodium phosphate(20mM)	0.56g
	NaCl(0.5M)	5.84g
	Imidazole(500mM)	6.8g
10×PBS buffer	NaCl	80g
	KCl	2.5g
	Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O	28.9g
	KH ₂ PO ₄	2.5g
	pH	7.4

2) Western blot

Running gel과 stacking gel을 순서대로 만들고(Table 9) marker, transgenic plants 3개체의 단백질 추출물 20 μ l, 야생형 토마토의 단백질 추출물 20 μ l를 순서대로 loading하고, 동일한 순서로 mercaptoethanol을 5% 첨가한 샘플들을 loading하였다. 그 다음 250V, 15mA에서 30mA로 올려서 SDS-PAGE를 수행하였다. marker는 Bio-rad의 Precision plus proteinTM all blue standards를 사용하였다. 단백질 추출물은 잎 1g을 액체질소로 분쇄 후 200 μ l PBS를 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 13,000rpm으로 5분간 원심분리를 하여 상청을 사용하였다. SDS-PAGE 후 running gel의 가로와 세로 길이를 측정하였다. 그리고 blotting buffer(Tris 3g/L, glycine 14.4g/L, methanol 20%)에 겔 플레이트에서 분리한 running gel을 넣고 천천히 교반하였다. membrane을 gel 크기에 맞추어 1장을 자르고, 필터페이퍼를 gel 크기에 맞게 6장을 잘랐다. Membrane은 Bio-rad의 Immun-Blot^(R) PVDF membrane for protein blotting을 사용하였다. Membrane을 메탄올에 10초 동안 담근 다음 blotting buffer에 10분간 넣어 두었다. 그런 다음 blotting 장치에 필터페이퍼를 3장씩 핀셋으로 집어 blotting buffer을 적시어 blotting 장치에 세팅하였다. 필터페이퍼 위에 gel을 올리고 그 위에 membrane을 올렸다. 그리고 그다음에 필터페이퍼를 3장씩 blotting buffer에 적셔서 올렸다. 그 후 유리 막대를 이용하여 공기를 제거하고 50mA에서 1시간 동안 blotting하였다. TBS buffer에 tween 20을 0.05%가 되도록 첨가하여 T-TBS buffer를 제조하였다. Blotting 후의 membrane은 blotting 할 때 gel과 접촉한 면이 위로 향하게 한 후 blocking buffer(TBS + 2% non-fat milk)에 넣고 1시간 동안 교반하여 blocking을 수행하였다. 1차 antibody는 Non-fat milk 2%가 첨가된 T-TBS에 PAT antibody를 1,000배 희석하여 준비하였다. Blocking 한 membrane을 T-TBS로 5분씩 3회 세척한 다음 희석한 1차 antibody 용액에 넣어 1시간 동안 교반하였다. 2차 antibody는 Non-fat milk 2%가 첨가된 T-TBS에 Goat Anti-Rabbit IgG-HRP(Bio-Rad)를 1,000배 희석하여 준비하였다. 1차 antibody와 반응시킨 각 membrane을 T-TBS로 5분씩 3회 세척한 다음 희석한 2차 antibody를 넣고 1시간 동안 교반하였다. 항원 단백질의 검출에는 Immun-blot goat anti-rabbit

(H+L)-HRP assay kits(Bio-Rad)을 사용하였다. HRP color development buffer 50mL에 HRP color reagent A 10mL와 HRP color reagent B 300 μ l를 넣어 발색 시약을 만들었다. 2차 항체와 반응시킨 각 membrane을 T-TBS로 5분씩 3회 세척한 다음, TBS로 5분간 1회 세척하였다. 그런 다음 TBS buffer를 버리고 발색 시약을 넣은 다음 교반하여 항원의 검출 양상을 관찰하였다. 이때 발색 시간은 30분이 넘지 않도록 주의하였다.

7. 형질전환 토마토의 형태학적 분석

순화시킨 후 40일이 지난 토마토를 형태학적으로 분석하였다. 종자에서 발아시킨 야생형 토마토와 조직 배양으로 재분화시킨 야생형 토마토, GM 토마토를 비교하여 분석하였다. 이때 비교한 것은 줄기의 정단부까지 측정한 식물의 높이, 주맥에 수평으로 측정한 잎의 길이, 주맥에 수직으로 측정한 잎의 넓이, 꽃의 수를 측정하였다. 본 측정에서 얻은 결과는 평균 \pm 표준편차(mean \pm SD)로 나타내었으며, 통계처리는 SPSS (20.0, Statistical Package for Social Sciences Inc., USA)를 이용하여 일원변량분석(One way ANOVA)을 실시한 후 Duncan's multiple range test로 식물체들 사이의 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

8. 형질전환 토마토의 제초제 저항성 확인

형질전환 토마토의 제초제 저항성을 확인하기 위해 glufosinate 제초제인 바스타를 처리하였다. 사용한 바스타의 glufosinate 함량은 18%이다. glufosinate 함량을 0.05%로 처리하기 위해 바스타 원액을 0.3% 희석하였다. glufosinate 함량을 0.05% 농도로 희석한 제초제 바스타를 분무기로 토마토 식물체의 잎의 윗면과 아랫면, 줄기에 고르게 분사하였다. 제초제 처리 후 3주간 관찰하였다.

Table 9. Buffer solution and Acrylamide gel for SDS-PAGE analysis

Name	Material	Amount
30% Acrylamide stock solution (100mL)	Acrylamide	30g
	Methylene bis acrylamide	0.8g
Buffer A(200mL, pH 8.8)	Tris(0.75M)	18.17g(1M)
	0.2% SDS	0.4g
Buffer B(200mL, pH 6.8)	Tris(0.25M)	6.06g(1M)
	0.2% SDS	0.4g
Buffer C(1L)	Tris	30.3g
	Glycine	144g
	SDS	10g
Buffer D(100mL)	Tris	1.5g
	Glycerol	20g
	SDS	4g
	BPB	0.04g
0.2% CBBR(1.1L)	Methanol	500mL
	Acetic acid	100mL
	Coomassie brilliant blue	2g
Running gel	30% Acrylamide stock solution	3mL
	DW	0.75mL
	Buffer A	3.75mL
	Ammonium persulfate	6.25mg
	TEMED	6.25 μ l
Stacking gel	30% Acrylamide stock solution	375 μ l
	DW	1.5mL
	Buffer B	1.8mL
	Ammonium persulfate	3.75mg
	TEMED	3.75 μ l

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. *Agrobacterium* 균주의 vector 도입 확인

pCAMBIA3301 vector를 *A. tumefaciens* GV3301 competent cell에 transformation 한 다음 kanamycin을 첨가한 YEP 배지에 도말하였다. 그 후 single colony를 4개씩 선택하여 colony PCR을 수행하였다. 그 결과 4개의 single colony가 모두 밴드를 나타냈다(Figure 2). 이와 같이 *bar* 유전자가 있는 vector가 균주 내에 도입된 것을 확인하였다.

2. 토마토 형질전환

토마토 형질전환을 위해서 토마토 종자를 소독하여 배지에 파종한 결과 7일에서 10일 후 종자에서 자엽을 볼 수 있었다. 본엽이 자라기 전의 자엽을 *A. tumefaciens*로 감염시킨 후 3일간 공동배양하였다. 그 후 캘러스 유도 배지에서 캘러스를 2주간 유도하였다. 노란색 캘러스가 있을 자른 면에서 보이기 시작했다. 그 후 캘러스를 PPT가 들어간 배지에서 배양하여 2주간 선발하였다. 2주 후 shoot가 보이기 시작한 캘러스를 shoot 유도 및 선발배지에 옮겨서 배양하였다. shoot가 2cm 자랐을 때 root 유도 및 선발배지로 옮겨서 배양하였고 2주 내 뿌리가 자란 개체를 strip test를 통해 선발하였다. 그 후 일부 식물체는 기내배양을 유지하였고 일부 식물체는 유리 온실에서 순화시켰다(Figure 3).

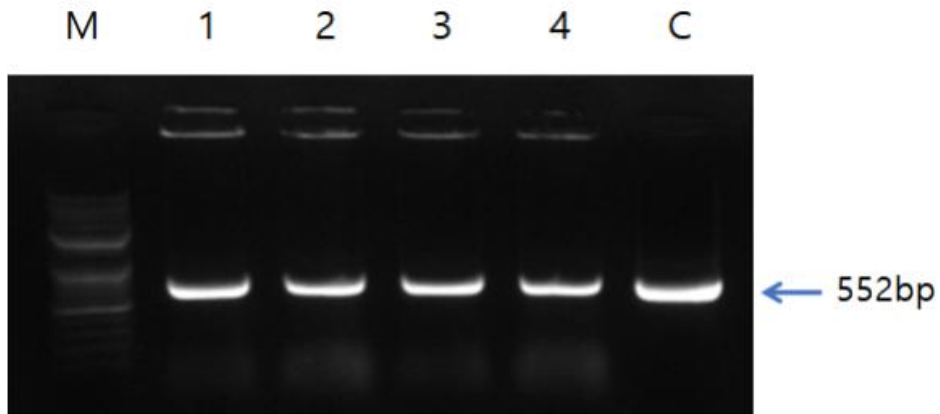


Figure 2. Colony PCR performed on colonies to verify the presence of *bar* gene in *A. tumefaciens*.

M, 100bp size marker; 1-4, *A. tumefaciens* single colony; C, Plasmid DNA of vector pCAMBIA3301

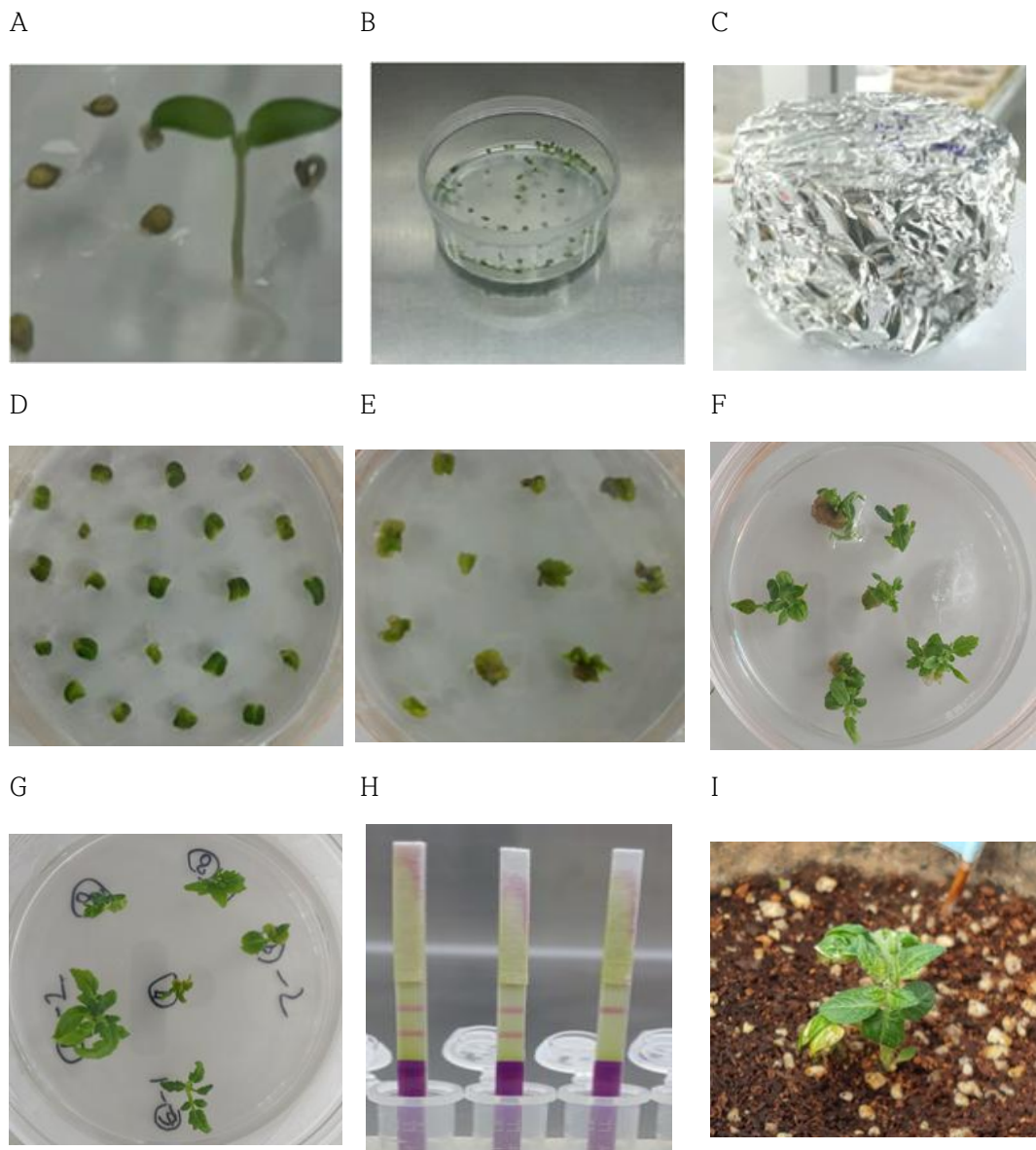


Figure 3. Procedure of *Agrobacterium*-mediated transformation for tomato.

(A) Cotyledon after sowing tomato seeds; (B) Tomato cotyledon infection; (C) Cultivation in dark conditions during co-culture; (D) Callus induction; (E) Callus selection; (F) Shoot induction and selection; (G) Root induction and selection; (H) Immuno strip test; (I) Acclimation after immuno strip test

3. 형질전환체 선발 및 유전자 도입 검정

뿌리 유도 후 2주 내로 뿌리가 형성된 토마토를 immuno strip test로 형질전환 여부를 확인하였다(Figure 4-A). 밴드가 하나 생성된 것은 테스트 용지에는 이상이 없으나 형질전환체가 아니라는 것을 뜻한다. 밴드가 두 개 생성된 것은 그 식물이 형질전환 되었다는 것을 뜻한다. strip test한 개체 중 밴드가 2개인 개체들을 genomic DNA를 추출하여 PCR 하였다. PCR 결과물을 전기영동을 하여 확인한 결과 밴드가 보였다(Figure 4-B). PCR 수행 시 *bar* 특이적 primer 세트를 사용하였기에 *bar* 유전자가 도입되었음을 확인할 수 있었다.

4. 도입 유전자의 copy 수 검정

형질전환으로 유전체에서 도입된 DNA의 copy 수를 확인하기 위해서 Southern blot을 수행하였다. *bar* 유전자는 자르지 않고 T-DNA의 내부를 1회 자르는 제한효소인 Xba I를 사용하여 제한효소 처리하였다. 그 후 전기영동 및 membrane으로 transfer 한 다음 probe를 이용하여 LAS 기계로 detection 하였다. 110분 노출한 결과 strip 선발 토마토가 모두 single copy임을 확인하였다(Figure 5).

5. 도입 유전자의 mRNA 발현 확인

합성된 cDNA 1 μ l와 Table 6에 제시된 시약들을 넣어 PCR은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 pre-denaturation 한 다음 95 $^{\circ}$ C에서 denaturation 30초, 58 $^{\circ}$ C에서 annealing 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 extension 30초간 반응시키는 것을 25cycle 수행하였다. 이때 사용한 primer 세트는 2종류이다. 첫 번째는 *bar* 유전자의 일부를 증폭하는 primer이고 두 번째는 18S rRNA를 증폭시키는 primer이다. 그 결과 18S rRNA primer를 사용하여 RT-PCR 한 경우는 모두 밴드가 보였고, *bar* 유전자 증폭 primer를 사용한 경우는 GM 토마토는 밴드가 보이고, 야생형 토마토는 밴드가 보이지 않았다(Figure 6).

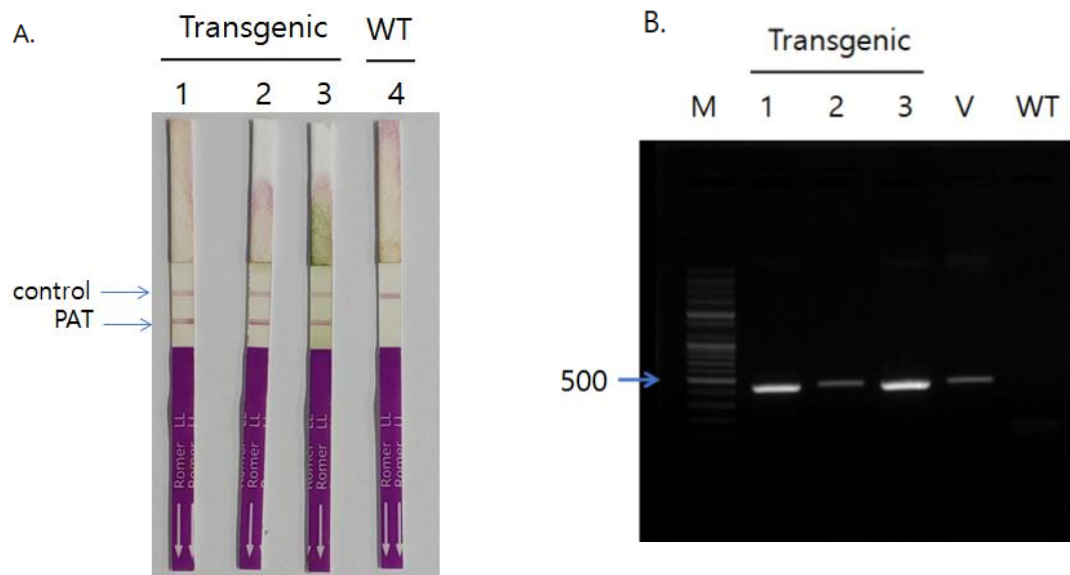


Figure 4. Screening of putative transgenic tomato by immuno strip test and PCR analysis of transgenic tomato plants.

(A) Screening by immuno strip test. 1-3, transgenic tomato; 4, wild type tomato (B) PCR detection of transgenic tomato. 1-3, PCR amplification transgenic tomato genomic DNA; V, PCR amplification plasmid DNA of pCAMBIA3301 vector; WT, PCR amplification wild type tomato genomic DNA

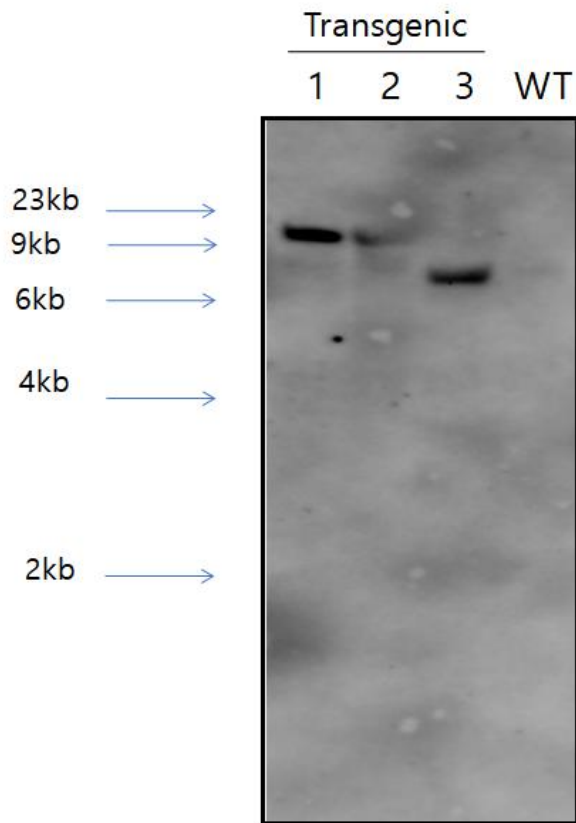


Figure 5. Southern blot analysis of transgenic tomato using *bar* probe.

1-3, Transgenic tomato plants; WT, Wild type tomato plant

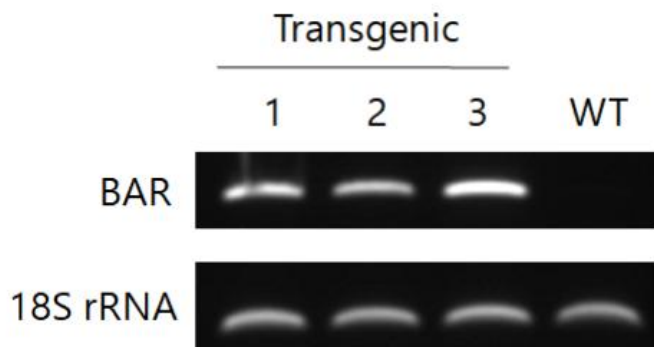


Figure 6. Expression analysis of *bar* gene in transgenic tomato by RT-PCR analysis.

1-3, Single copy GM tomato; WT, Wild type tomato

6. 도입유전자의 단백질 발현 분석

Western blot을 위해 대장균에서 단백질을 정제하여 SDS-PAGE로 단백질을 확인하였다. 그 후 영인프린터에 보내 항체를 제작하였고, 항체를 4°C에서 정제하여 -70°C에 보관하였다. Bio-led의 Immun-blot goat anti-rabbit (H+L)-HRP assay kits를 사용하여 Western blot을 하였다. 1차 항체는 대장균에서 만든 PAT을 항원으로 하는 항체를 토끼에서 만든 것(영인프린터)을 사용하였고, 2차 항체는 토끼의 IgG에 결합하는 goat HRT를 사용하였다. 발색시약에 반응시켜 밴드를 확인하였다(Figure 7). 5% mercaptoethanol를 첨가하여 환원시킨 sample과 그렇지 않은 sample 둘 다 25kDa보다 아래쪽에 밴드를 보였다. 이는 PAT 단백질의 크기와 일치하며, PAT 단백질이 monomer로 발현된다는 것을 뜻한다.

7. 형질전환 토마토의 형태학적 분석

단백질 발현까지 확인한 다음 Southern blot 수행 결과에 따라 독립계통 토마토의 이름을 명명하였다. 같은 크기의 밴드를 나타내는 2개체를 SB1, 다른 크기를 나타내는 1개체를 SB2라고 명명하였다. SB1, SB2 형질전환 토마토를 각각 3개체, 야생형 토마토, 재분화시킨 야생형 토마토를 각각 10개체씩 순화시켰다. 순화시킨 후 40일이 지난 종자에서 발아시킨 야생형 토마토와 재분화시킨 야생형 토마토, GM 토마토를 형태학적으로 비교하였다. 이때 식물의 높이, 잎의 길이, 잎의 넓이, 꽃의 수를 측정하였다. 본 측정에서 얻은 결과는 평균±표준편차(mean±SD)로 나타내었으며(Figure 8), 통계처리는 SPSS (20.0, Statistical Package for Social Sciences Inc., USA)를 이용하여 일원변량분석(One way ANOVA)을 실시한 후 Duncan's multiple range test로 식물체들 사이의 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다(Table 10). 그 결과 SB1 토마토는 식물의 높이의 경우 재분화시킨 야생형 토마토와 유의한 차이가 있었다. 잎의 길이는 야생형 토마토와 유의한 차이가 있었다. 잎의 넓이는 유의한 차이가 없었다. 꽃의 수도 유의한 차이가 없었다. SB2 토마토의 식물체 높이는 재분화시킨 야생형 토마토와 유의한 차이가 있었다. 잎의 길이, 잎의 넓이, 꽃의 수는 모두 유의한 차이가

없었다. SB1과 SB2 토마토는 식물체 높이와 잎의 길이, 꽃의 수 모두 유의한 차이가 있었다. 이는 재분화 과정에서 체세포 변이가 일어난 것이 원인으로 추측된다. 아그로박테리움을 이용하여 형질전환한 토마토를 재분화시킨 경우 24.5%에서 80%까지 4배체가 존재했다는 연구가 있다.(Ellul et. al. 2003) 재분화 과정에서 배수성 이상이 발생한 것이다. 이와 같이 본 연구에서도 배수성 이상이 발생하였을 가능성이 있다. 그리고 높은 배수성은 조직배양에서 재생된 식물에서 흔한 현상이며 polyploidization은 형태학적 변화를 초래할 수 있다고 한다.(Jing et. al. 2016) 본 실험에서 잎의 모양의 경우 야생형 토마토와 재분화 토마토, 형질전환 토마토 모두 차이를 보였다(Figure 9). 야생형 토마토의 경우 잎이 톱니 모양을 보이며 잎의 길이가 넓이보다 긴 모양을 보였다. 반면에 재분화 토마토는 잎이 둥근 모양을 보이며 잎의 길이가 넓이에 비해 덜 긴 모양을 보였다. GM 토마토는 재분화 토마토와 유사한 모양을 보이는 개체도 있었으며, 종자에서 발아시킨 야생형 토마토와 유사한 모양을 보이는 개체도 있었다.

8. 형질전환 토마토의 제초제 저항성 검정

토마토 형질전환체에서의 *bar* 유전자 활성화에 따른 glufosinate 제초제 저항성 여부를 알기 위해 glufosinate 함량을 0.05% 농도로 희석한 제초제 바스타를 분무기로 토마토 식물체의 잎의 윗면과 아랫면, 줄기에 고르게 분사하였다. 그 결과 *bar* gene이 도입된 SB1, SB2 토마토는 2주 후에도 고사하지 않았다. 반면에 야생형 토마토는 2주 후 고사한 것을 볼 수 있었다(Figure 10). 3주 후 관찰한 결과 2주 후 결과와 유사하였다. 제초제 glufosinate는 비선택성 제초제로 대부분의 잡초에 효과가 있으며, 토양 잔류독성이 낮은 특성이 있다. 0.05%로 희석한 glufosinate를 field에서 성장한 잡초에 처리하여 방제효과를 확인한 연구 결과 대부분 잡초들이 0.05%에서 방제가 가능하였다(Ahn et. al 2011). 이는 field에서 제초제 저항성 토마토 재배 시 효과적으로 잡초를 방제할 수 있음을 시사한다.

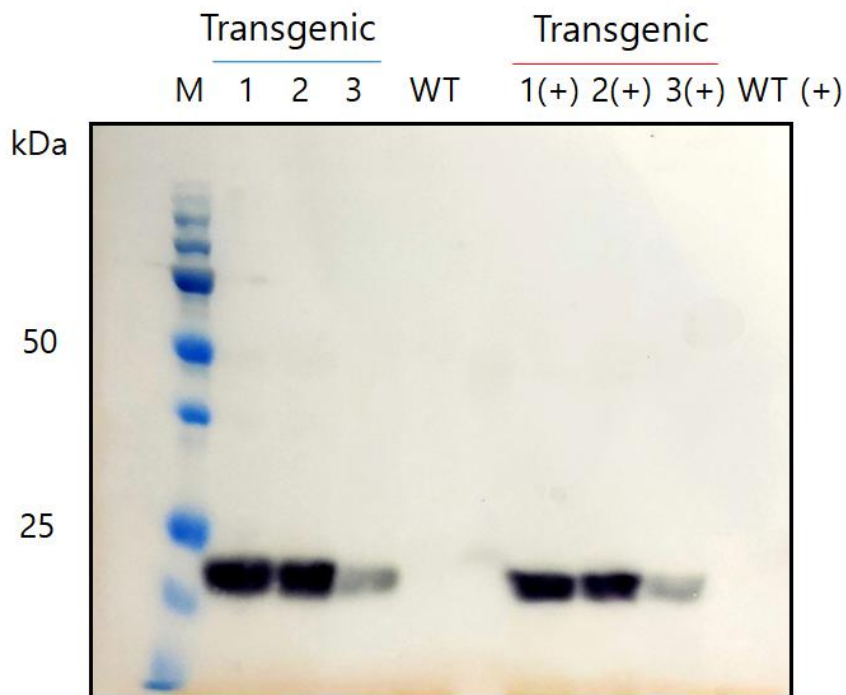


Figure 7. Expression analysis of PAT protein in transgenic tomato by Western blot analysis.

M, Prestained SDS-PAGE standard marker; 1-3, Single copy GM tomato plants; WT, Wild type tomato plant; (+), Mercaptoethanol 5% in same sample

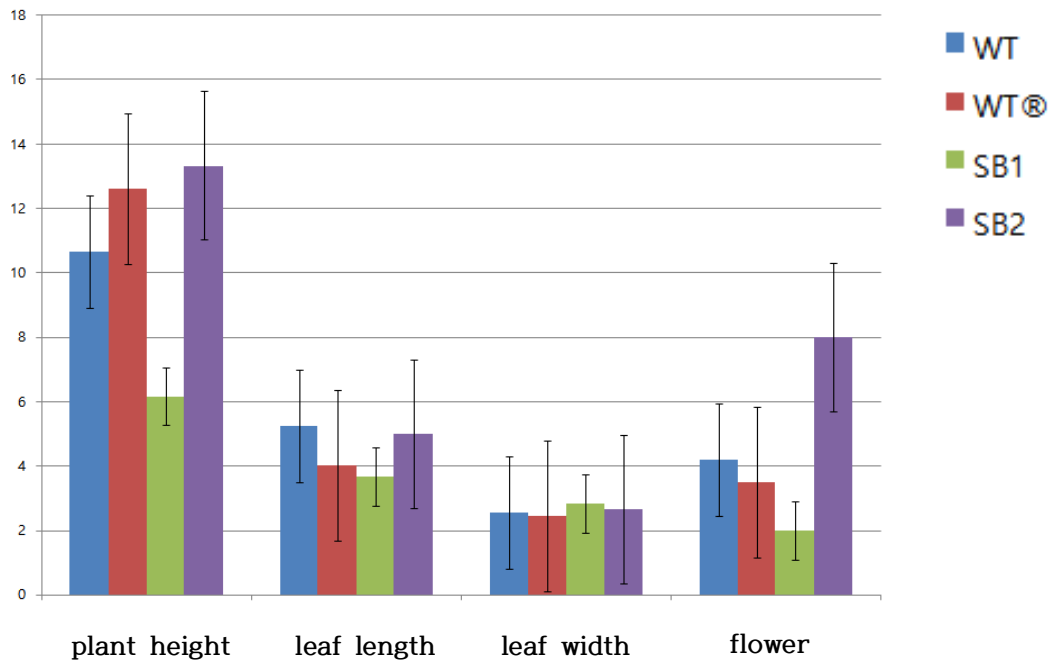


Figure 8. Comparison between GM tomato plants and wild type tomato plants.

Values are mean±SD(WT, WT® n=10; SB1, SB2 n=3).

Blue bar, Wild type tomato; Red bar, Regeneration wild type tomato; Green bar, SB1 GM tomato; Purple bar, SB2 GM tomato

Table 10. Phenotype analysis of transgenic tomato plants with *bar* gene

plants	plant height	leaf length	leaf width	flower
WT	10.65±3.36 ^{ab}	5.24±1.11 ^b	2.55±0.50 ^a	4.20±3.38 ^{ab}
WT®	12.60±4.78 ^b	4.03±0.50 ^{ab}	2.45±0.49 ^a	3.50±3.20 ^{ab}
SB1	6.16±1.60 ^a	3.66±1.50 ^a	2.83±1.44 ^a	2.00±3.40 ^a
SB2	13.33±7.50 ^b	5.00±1.00 ^b	2.66±0.28 ^a	8.00±3.60 ^b

Values are mean±SD(WT, WT® n=10; SB1, SB2 n=3). Means with the different letters are not significantly different among plants by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$

WT, Wild type tomato; WT®, Regeneration wild type tomato; SB1, SB1 GM tomato; SB2, SB2 GM tomato

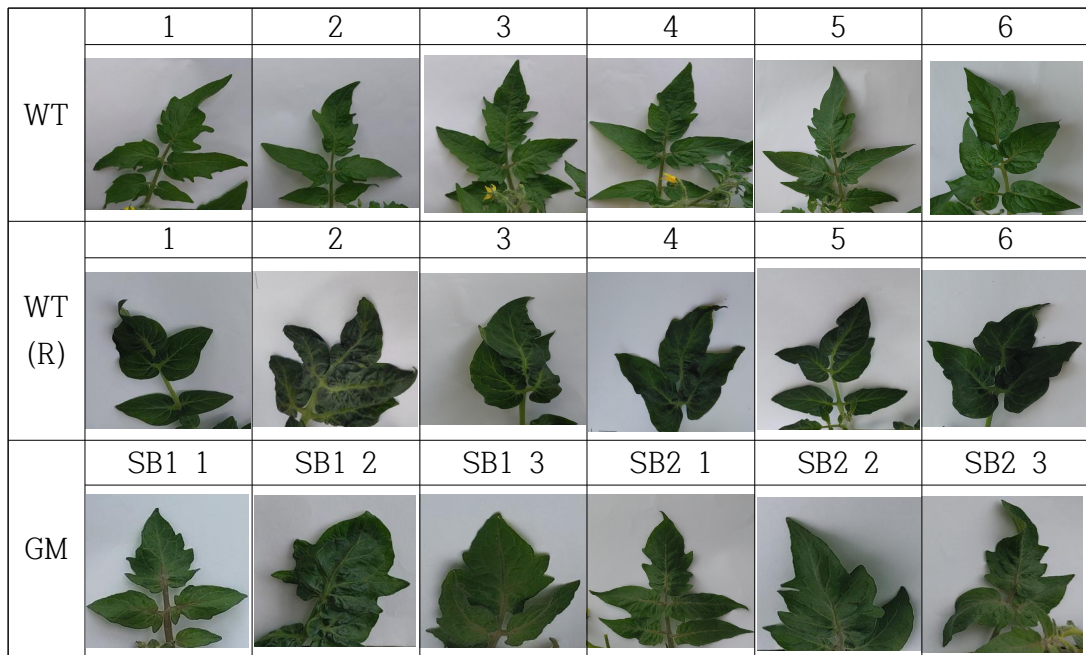


Figure 9. Comparison between GM tomato leaf and wild type tomato leaf.

WT, Wild type tomato; WT(R), Regeneration wild type tomato; GM, Genetically modified tomato; SB1, SB1 GM tomato; SB2, SB2 GM tomato

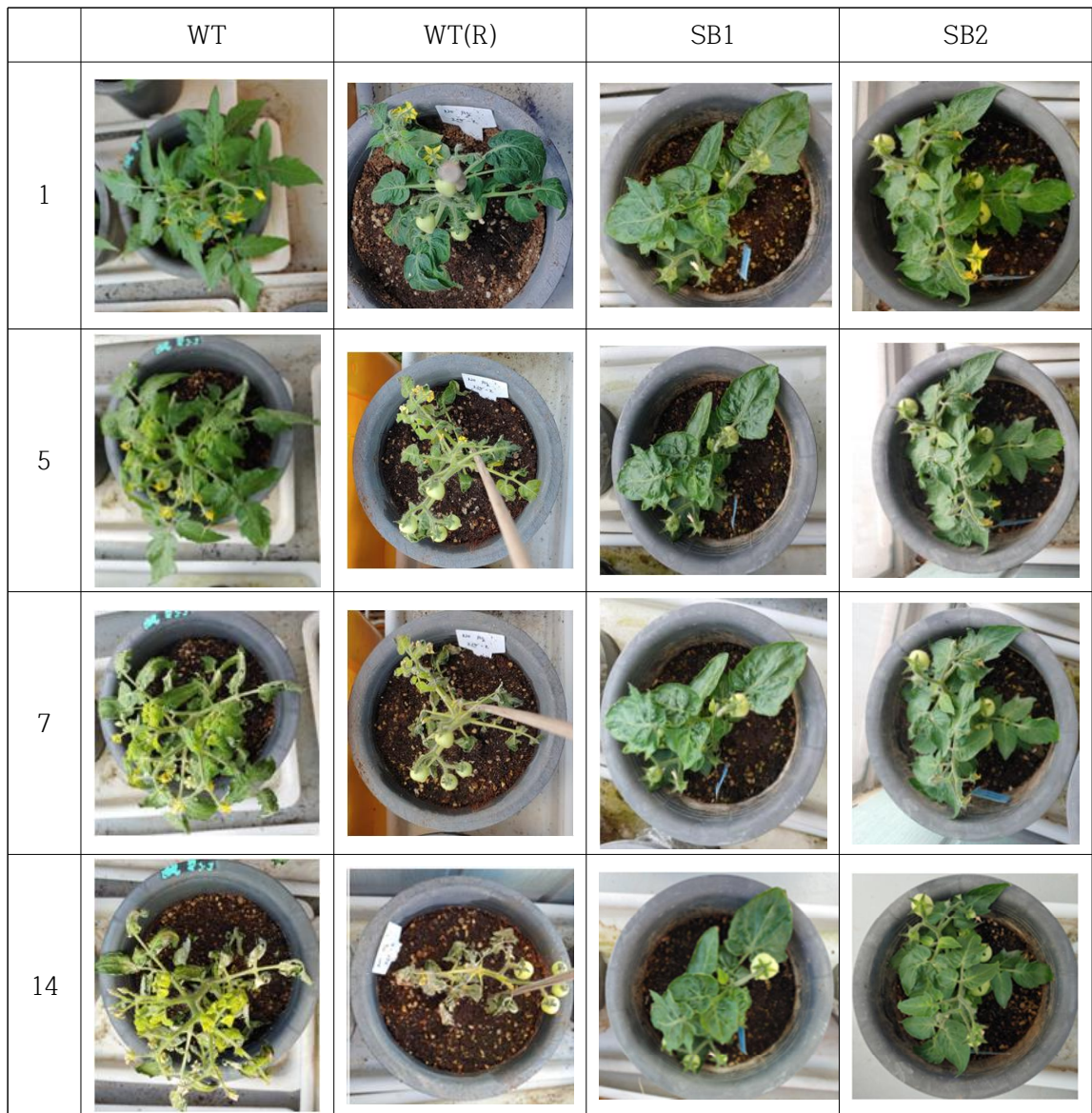


Figure 10. Herbicide resistance of transgenic tomato (0.05% BASTA)

WT, Wild type tomato; WT®, Regeneration wild type tomato; SB1, SB1 GM tomato; SB2, SB2 GM tomato

IV. 종합 고찰

본 연구에서는 아그로박테리움법을 사용하여 *bar* 유전자를 도입하여 제초제 저항성 토마토를 개발하였다. 형질전환 시 PPT는 1mg/L를 사용하여 선발하였다. PPT 선발 후 Immuno strip test를 통해 토마토를 3개체 선발하였다. 그 후 genomic DNA를 추출하여 PCR을 통해 유전자의 도입을 확인하였다. 그리고 유전자 copy 수를 확인하기 위해 Southern blot를 수행하였다. Single copy인 것을 확인한 3개체를 RT-PCR을 통해 mRNA의 발현을 확인하였다. 그 후 PAT 항체를 사용하여 Western blot으로 단백질 발현을 확인하였다. 그 결과 3개체 모두 단백질까지 발현됨을 확인하였다. 그 후 Southern blot 수행 결과에 따라 독립계통 토마토의 이름을 명명하였다. 같은 크기의 밴드를 나타내는 2개체를 SB1, 다른 크기를 나타내는 1개체를 SB2라고 명명한 후 3개체씩 뿌리 유도 배지에 옮긴 후 뿌리가 모두 자랐을 때 유리온실에 순화하였다. 종자에서 발아시킨 야생형 토마토와 캘러스에서 재분화시킨 야생형 토마토를 같은 시기에 뿌리 유도 배지에 배양하여 10개체씩 GM 토마토와 함께 순화하였다. 40일 후 토마토의 줄기 정단 부까지 길이와 잎의 길이를 측정하고, 꽃의 수를 비교하였다. 그 결과 야생형 토마토와 GM 토마토 간의 통계적 유의차가 있었다. 야생형 토마토와 재분화시킨 야생형 토마토 간에도 통계적 유의차가 있었다. 이는 재분화 과정에서 일어난 체세포 변이가 표현형에 영향을 미친 것으로 추측된다. 제초제 바스타 처리 시 제초제에 저항성이 있는 GM 토마토만 살아남았다. 이처럼 형질전환으로 개발된 토마토가 제초제에 저항성이 있다는 것을 검증하였다.

V. 인용 문헌

Afonso MJ (2008) Weed management in solanaceae crops in portugal. Commun Agric Appl Biol Sci 73(4):919-927

Ahn SY, Cho KS, Seo HW, Yi JY, Bae Shin-Cheol, Cho JH, Park YE, Kim JI, Kim HJ, Cho HM (2011) Evaluation of agronomic characteristics, nutritional contents, and insect response of the transgenic potato resistant to glufosinate ammonium. Kor. J. Hort. Sci. Technol 29(3):247-254.

De Block M (1990) Factors influencing the tissue culture and the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid aspen and popular clones. Plant Physiol 93:1110-1106.

Ellul P, Garcia-Sogo B, Pineda B, Ríos G, Roig L, Moreno V (2003) The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is genotype and procedure dependent. Theor Appl Genet 106(2):231-238

Herouet C, Esdaile DJ, Mallyon BA, Debruyne E, Schulz A, Currier T, Hendrickx K, van der Klis R, Rouan D (2005) Safety evaluation of th phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the *pat* and *bar* sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. Regul Toxicol Pharmacol 41: 134-149.

Jing JW, Davis TM, Zhang Q (2016) Perspectives on elevated ploidy in regenerants from plant tissue culture and transformation. RRJBS 5(4):19-21

Jones, J.B (1999) Tomato plant culture: in the field, greenhouse, and home garden. CRC Press LLC.

Lee OS, Lee B, Park N, Koo JC, Kim YH, Prasad D T, Karigar C, Chun HJ, Jeong BR, Kim DH, Nam J, Yun JG, Kwak SS, Cho MJ, Yun DJ (2003) Pn-AMPs, the hevein-like proteins from *Pharbitis nil* confers disease resistance against phytopathogenic fungi in tomato, *Lycopersicum esculentum*. *Phytochemistry* 62: 1073-1079

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-479

Murray MG, Thomson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8:4321 -4325

Takano HK and Dayan FE (2020) Glufosinate-ammonium: a review of the current state of the knowledge. *Pest Manag Sci* 76:3911-3925

Thompson CJ, Movva NR, Tizard R, Cramer R, Davis JE, Lauwereys R, Botterman J (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBOJ* 6:2519-2523

제2부. 제초제 저항성 GM 잔디의 특성 분석

I. 서론

유전자변형(Genetically Modified, GM) 작물은 1996년에 상업용 재배가 시작되었다. GM 작물의 재배면적은 1996년 170만 헥타르에서 점차 증가하여 2017년 1억 9천만 헥타르로 약 112배 증가하였다. GM 작물은 옥수수, 대두, 면화, 카놀라와 같은 4대 작물뿐만 아니라 알팔파, 사탕무, 파파야, 가지, 감자 등 다양한 작물들이 상용화되고 있다. 2017년 현재 67개 국가에서 총 26종류 작물의 GM 이벤트 476개를 대상으로 재배, 식품, 사료 용도로 GM 작물을 채택하고 있다(Cho et al. 2020; ISAAA Brief 53). 2020년 현재까지 국내에서는 재배가 승인된 GM 작물이 없으며 GM 작물의 상업용 재배 또한 이루어지지 않았다.

국내에서도 벼, 콩, 배추, 고추, 국화, 잔디 등의 작물에서 상용화를 위해 GM 작물이 다수 개발되고 있다. 하지만 국내 시민사회의 GM 작물에 대한 인식이 부정적이며 상용화에 필요한 안전성평가 또한 어려우므로 현재 GM 작물 중 극히 적은 수의 작물만이 상용화가 추진되고 있다. 2020년 현재 국내에서 개발된 GM 작물 중 제주대학교에서 개발된 제초제 저항성 GM 들잔디가 유일하게 재배 승인을 위한 안전성심사가 진행되고 있다. 제주대학교에서는 잔디를 관리 할 때 소요되는 비용이 가장 많은 잡초관리를 용이하게 하기 위해 *Streptomyces hygroscopicus* 유래의 *bar* 유전자(Thompson et al. 1987)를 도입한 제초제 저항성 GM 들잔디(JG21) 이벤트를 개발하였고(Toyama et al. 2003), ‘유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률’ 즉 LMO 통합고시 별표 10-1에 따라 각종 환경위해성평가를 재배 승인을 위해 수행하였다(Bae et al. 2008; Kang et al. 2009; Lee et al. 2015a; Lee et al. 2015b; Sun et al. 2010). 제초제 저항성 GM 들잔디 이벤트(JG21)는 화분비산에 의한 비의도적 환경방출 가능성이 낮음을 유전자이동성평가를 통해 확인되었으나 여러 전문가들의 화분비산에 의한 환경방출 가능성 지적에 따라 화분비산에 의한 유전자이동 가능성을 차단하기 위해 꽃대를 제거한 무추대 제초제 저항성 GM 들잔디(JG21-MS1) 이벤트를 개발하였다(Bae et

al. 2009; Kang et al. 2019). 현재 무추대 제초제 저항성 GM 들잔디 이벤트 (JG21-MS1)는 상용화를 위해 재배 승인 심사를 하고 있으며, 지속적으로 각종 안전성평가 연구를 수행하고 있다.

본 연구에서는 *Streptomyces hygroscopicus* 유래의 *bar* 유전자가 도입된 무추대 제초제 저항성 GM 들잔디(JG21-MS1) 이벤트의 안전성평가의 일환으로 GM 들잔디에서 발현되는 단백질을 기지의 알레르겐과의 상동성을 비교하였다. 또한 일반성분 및 아미노산 성분을 모품종과 비교하여 분석하였으며, GM 들잔디에서 발현된 PAT 단백질의 잠재적 알레르기성 및 독성 평가 연구를 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료

본 연구에서는 *Streptomyces hygrosopicus*에서 유래된 *bar* 유전자(Thompson et al. 1987)를 *Agrobacterium tumefaciens*으로 도입하여 개발된 제초제 저항성 GM 잔디(Toyama et al. 2003)에 감마선(^{60}Co)을 조사하여 육성한 GM 들잔디 JG21-MS1 (Bae et al. 2009)과 대조구 식물로서 JG21-MS1의 모품종 들잔디 (*Zoysia japonica* Steud.)를 사용하였다.

2. 일반성분 분석

일반성분을 분석하기 위해 LMO환경위해성평가기관으로 지정된 제주대학교 및 서귀포시 남원 LMO격리포장에서 재배하였다. 잔디 시료는 제주대학교 및 남원의 격리포장에서 재배하고 있는 잔디의 지상부를 7월에서 9월 사이에 채취하였으며, 채취한 잔디는 액체질소를 이용하여 분쇄한 다음 동결건조하여 분석용 시료로 사용하였다. 일반성분 분석은 제주대학교 생명과학기술혁신센터에 의뢰하여 식품공전의 일반시험법에 따라 분석하였다.

3. 아미노산 분석

아미노산 성분을 분석하기 위해 일반성분 분석에 사용한 시료와 동일한 방법으로 잔디 시료를 준비하였고 아미노산 성분 분석은 한국기초과학지원연구원에 의뢰하여 분석하였다. 잔디 분말 약 0.3 g을 6 N HCl로 가수분해가 된 아미노산을 PITC(phenylisothiocyanate)로 유도체화한 다음 아미노산 분석기를 이용하여 분석하였다. 칼럼은 Nova-Pak C₁₈(3.9×300mm, WatersCo., Milford, MA, USA)을 사용하였다(Lee et al., 2013).

4. 아미노산 서열 상동성 분석

제초제 저항성 GM 들잔디에서 발견된 PAT(phosphinothricin acetyltransferase)

단백질의 아미노산 서열과 기존에 알려진 알레르겐과의 아미노산 서열 상동성 분석은 AllergenOnline(<http://www.allergenonline.org>) 프로그램을 이용하여 수행하였다. Codex 지침(2009)과 FAO/WHO (2001)에서 권장하고 있는 방법에 따라 80개 단위의 아미노산 단편이 35% 이상 상동성을 가질 경우를 검색하고, 8개의 연속된 아미노산 서열이 완전히 일치하는 알레르겐의 존재유무를 검색하였다. 또한 NCBI의 BLAST 검색을 통해 제초제 저항성 GM 들잔디에서 발현된 PAT 단백질과 기존 독소의 상동성 여부를 분석하였다.

5. PAT 단백질 발현 및 정제

PAT 단백질의 인공위액에서의 안정성 평가 및 급성 경구투여 독성시험 연구를 수행하기 위해 대장균에서 PAT 단백질의 발현을 유도하고 대량으로 정제하였다. 제초제 저항성 유전자인 *bar* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디(JG21-MS1)에서 genomic DNA를 분리하고 이를 주형으로 PCR을 수행하여 *bar* 유전자를 클로닝한 다음 pET-30a(+) 벡터에 도입하였다. *bar* 유전자를 도입한 발현 벡터는 E. coli BL21(DE3)에 형질전환하고, kanamycin이 100mg/L로 첨가된 LB고체배지에 도말하여 형질전환된 콜로니를 선발한 다음 PAT 단백질의 발현 및 정제에 이용하였다. PAT 단백질의 발현을 유도하기 위해 LB 액체배지 5mL에 대장균 cell stock 50 μ l, kanamycin 100ppm을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 200rpm으로 overnight 배양하였다. 하룻밤 동안 배양한 배양액을 kanamycin 100ppm을 첨가한 LB 액체배지 100mL에 1mL씩 넣고, 37 $^{\circ}$ C, 200rpm의 조건에서 2시간 배양하였다. 그 배양액을 28 $^{\circ}$ C에서 30분 배양한 후 IPTG를 1mM이 되도록 첨가하여 5시간 배양하여 PAT 단백질의 발현을 유도하였다. PAT 단백질의 발현이 유도된 배양액을 50mL씩 tube에 분주한 다음 4 $^{\circ}$ C에서 3,000rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상청을 버리고 resuspension buffer 20mL를 넣어 재현탁하였다. 그런 다음 재현탁 용액에 imidazole을 최종농도 20mM이 되도록 첨가하여 pulse on 10초, pulse off 50초로 5분간 sonication하였다. Sonication을 하는 동안 단백질 정제용 column에 실리콘 tube를 연결하고, column에는 Ni-Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences) 2mL를 충전하였다. Sonication 산물은 4 $^{\circ}$ C, 13,000rpm

에서 10분간 원심분리하여 상청을 새 튜브로 옮긴 다음, 정제용 column에 apply 하였다. Apply 한 샘플 용액이 레진에 거의 들어간 다음, binding buffer 10mL로 washing하고, washing buffer 10mL로 한 번 더 washing 하였다. 그런 다음 Elution buffer 10mL를 넣고 column을 통과한 액체를 1mL씩 tube에 분취하였다. 분취한 각 정제 샘플은 280nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 측정하였다. $A_{280}=1$ 일 때 1mg/mL로 계산하였다. 흡광도 측정 후 0.5mg/mL 이상인 용액만 모아 PBS로 3회 투석하여 영인프론티어에 항체 제작을 의뢰하였으며 인공위액에서의 안정성평가 및 급성 경구투여 독성시험 연구에 사용하였다.

6. PAT 단백질의 인공위액에서의 안정성평가

대장균에서 정제한 PAT 단백질에 펩신을 첨가하지 않은 인공위액(0.084M HCl, 35mM NaCl, pH 1.2)과 펩신을 첨가한 인공위액(0.084M HCl, 35mM NaCl, 0.32% pepsin, pH 1.2)을 각각 처리하고 시간 경과에 따른 PAT 단백질의 안정성을 SDS-PAGE를 통하여 분석하였다. 정제한 PAT 단백질(1mg/mL) 각 300 μ L에 37 $^{\circ}$ C에서 약 5분간 전배양한 펩신을 첨가하지 않은 인공위액과 펩신을 첨가한 인공위액을 각각 300 μ L씩 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시켰다. 각 반응액에서의 샘플은 0, 0.5, 1, 5, 10, 60분에 각각 50 μ L씩 채취하여 반응정지액[0.12M Tris-HCl, 20% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 4% SDS, 0.04% bromophenol blue(pH 6.8) and 0.09M NaOH] 50 μ L를 미리 넣어 둔 1.5mL 튜브에 넣어 잘 혼합한 후 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 다음 각각 20 μ L씩을 SDS-PAGE 분석에 사용하였다. SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질들은 Coomassie Brilliant Blue(CBB)로 염색한 다음 7.5% 아세트산 용액으로 탈색하여 PAT 단백질의 인공위액에서의 안정성을 평가하였다.

7. PAT 단백질의 glycosylation 여부 평가

JG21-MS1 잔디에서 발견된 PAT 단백질이 당화(glycosylation)되지 않았음을 실험적으로 증명하기 위해서 JG21-MS1 잔디에서 PAT 단백질을 정제하여 당단백 염색 실험을 수행하였다. 먼저 GM 잔디에서 PAT 단백질을 정제하기 위해

항체 및 항체칼럼을 제작하였다. PAT 항체(Rabbit polyclonal antibody)는 대장균에서 정제한 PAT 단백질을 항원으로 (주)영인프런티어에 의뢰하여 제작하였고, 정제한 rabbit anti-PAT 항체를 이용하여 항체칼럼을 제작하였다. 항체칼럼은 Pierce사의 Kit (Pierce, product number 44894)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 제작하였고, 이 항체칼럼을 사용하여 GM 잔디로부터 PAT 단백질을 정제하였다. 정제한 PAT 단백질의 생성 후 변이 여부(glycosylation)는 Glycoprotein Staining Kit(Pierce)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 분석하였다.

8. PAT 단백질의 단회 경구투여 독성 평가

1) 단회 경구투여 독성실험 시험물질의 제조

단회 경구투여 독성실험은 대구경북첨단의료산업진흥재단 실험동물센터에 의뢰하여 수행하였다. 본 실험은 “의약품등의 독성시험기준” 식품의약품안전처 고시 제 2015-82호에 근거하여 실시하였다. 또한 본 실험은 동물보호법에 근거한 대구경북첨단의료산업진흥재단 실험동물센터 동물윤리위원회(IACUC)에 의해 승인되었다(승인번호: DGMIF-17092102-00). 경구투여 실험의 부형제로는 PBS 버퍼가 사용되었으며 정제된 PAT 단백질은 투여 하루 전 무게를 측정하여 투여용량에 맞게 부형제에 3시간 정도 용해한 후 3시간 동안 침전 여부를 확인하였고 투여 시작 전까지 2-8℃에 냉장 보관한 뒤 투여 직전 상온에서 차광한 상태로 보관하였다.

2) 실험동물의 균분리 및 실험물질 투여

실험동물로는 6주령 ICR 마우스를 암수 각각 25마리를 입수하여 7일간 순화기간을 가졌으며, 순화기간 종료일에 체중을 측정하고 일반증상을 관찰하였다. 마우스는 입수 후 IVC케이지(391W×199D×130H mm)에 케이지당 5-6마리씩 수용하였고, 실험기간에는 케이지당 5마리로 분류하여 시험을 실시하였다. 사육실 온도는 23±3℃로 유지하였고 상대습도는 55±10%, 환기횟수는 10-20회/시간, 명암주는 12시간/일(07:00~19:00), 조도는 150-300 lux로 유지하였다. 마우스 사료는

(주)우정BSC로부터 공급받아 모니터링 정보를 확인하고 급이기에 고품사료를 넣어 자유 섭취시켰다. 음수의 경우 대구광역시 상수도를 RO수 장치를 통하여 정수한 뒤 자유 섭취시켰다. 실험동물의 군분리는 순화종료일에 평균체중에 가까운 수컷 및 암컷 각각 20마리를 선별하여 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 8군, 군당 5마리로 군분리를 실시하였다. 실험동물 개체별 실험물질 투여액량은 절식 후(투여당일)의 체중을 기준으로 10mg/kg으로 투여하였다. 경구투여용 카테터를 부착한 일회용 주사기(1mL)를 이용하여 위내에 단회 강제 투여하였다. 모든 동물은 투여 전에 음수는 자유 섭취시키면서 약 4시간 이상 절식시켰고, 투여 후 약 4시간 후 사료를 급여하였다. PAT 단백질은 대조군(G1)에는 0mg/kg, 시험물질 저용량군(G2)에는 1,000mg/kg, 시험물질 중용량군(G3)에는 2,000mg/kg, 시험물질 대용량군(G4)에는 4,000mg/kg 용량으로 투여하였다. 모든 동물은 매일 사료 및 음수 섭취, 운동성, 사망률 및 부상 여부 등을 관찰하였다. 시험동물의 관찰은 투여 1일 차에 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간 이후 7일간 매일 1회 증상을 관찰하였다. 모든 동물은 군분리 전 체중을 측정하고 측정된 체중에 따라 군을 나누었으며, 실험물질 투여를 실시한 후에는 1일, 5일 및 7일 차에 체중을 측정하였다. 모든 동물은 실험기간이 종료된 후 CO₂가스를 이용한 안락사를 실시한 후 부검을 통하여 5대장기(심장, 폐, 간, 신장, 비장)의 이상 여부를 육안으로 관찰하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 일반성분 및 아미노산 분석

GM 작물의 상용화를 위한 재배 승인을 받기 위해서는 2008년 1월부터 시행된 ‘유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 한 법률’ 즉, LMO법에 따라 인체위해성 및 환경위해성을 포함한 안전성평가를 수행해야 한다. GM 작물을 식품 용도로 사용할 때는 일반성분, 비타민, 지방산, 무기질 및 아미노산 함량 등을 분석하여 모품종인 non-GM 작물과의 실질적 동등성을 검증할 필요가 있다. 본 연구에 사용한 제초제 저항성 GM 잔디는 식용작물이 아닌 비식용 원예작물이므로 일반성분과 아미노산 함량을 분석하고 대조구인 non-GM 들잔디와 비교하여 실질적 동등성을 평가하였다.

모품종과 JG21-MS1 들잔디의 일반성분 분석 결과를 Table 1에 제시하였다. 채취한 잔디 시료는 동결건조하여 분석에 사용하였고, 분석 결과의 수분함량은 생체시료의 수분함량을 나타내지 않으므로 결과에서 제외하고 모든 결과는 건물 100g당 함량으로 계산하여 제시하였다. 모품종과 JG21-MS1 들잔디의 일반성분 함량을 비교한 결과, 열량, 회분, 탄수화물, 단백질, 조지방, 조섬유 등 분석한 모든 성분에서 유의차를 보이지 않았다(Table 1). 모품종과 JG21-MS1 들잔디의 아미노산 조성비를 분석한 결과, 이들 들잔디 시료에는 asparagine과 glutamine 및 alanine이 각각 10% 이상으로 많이 함유되어 있었고, tryptophan 함량이 낮은 특성을 보였다. JG21-MS1 들잔디의 각 아미노산 조성비를 모품종의 조성비와 비교한 결과, GM 들잔디와 non-GM 들잔디 간의 아미노산 조성에는 차이가 없는 것으로 나타났다(Table 2).

Table 1. Proximate compositions of herbicide-tolerant GM and parental non-GM zoysiagrass

Component	Parental	GM
Calories (kcal/100g)	376.50±3.79 ^a	378.41±5.10 ^a
Crude ash (g/100g)	8.10±0.60 ^a	7.82±0.86 ^a
Carbohydrate (g/100g)	79.83±0.82 ^a	79.07±1.65 ^a
Crude protein (g/100g)	10.28±0.90 ^a	11.16±1.25 ^a
Crude lipid (g/100g)	1.78±0.33 ^a	1.94±0.44 ^a
Crude fiber (g/100g)	31.47±0.50 ^a	29.88±6.47 ^a

Values are mean±SD (n=3) of dry weight basis

Values with the same letters in each row are not significantly different at p<0.05 by t-test

Table 2. Amino acids contents of herbicide-tolerant GM and parental non-GM zoysiagrass

Amino acid (Mol %)	Parental	GM
Cysteine	1.91±0.23 ^a	2.03±0.22 ^a
Asparagine	13.48±4.75 ^a	11.86±1.94 ^a
Glutamine	11.70±0.63 ^a	11.37±1.09 ^a
Serine	6.15±0.63 ^a	5.96±0.55 ^a
Glycine	9.11±0.94 ^a	9.13±0.72 ^a
Histidine	1.66±0.19 ^a	1.59±0.17 ^a
Arginine	4.18±0.24 ^a	4.00±0.19 ^a
Threonine	5.09±0.50 ^a	5.20±0.47 ^a
Alanine	10.41±1.26 ^a	10.77±0.33 ^a
Proline	6.04±0.34 ^a	5.87±0.53 ^a
Tyrosine	1.96±0.30 ^a	2.01±0.08 ^a
Valine	6.49±0.75 ^a	6.52±0.13 ^a
Methionine	1.73±0.10 ^a	1.81±0.14 ^a
Isoleucine	4.31±0.32 ^a	4.71±0.62 ^a
Leucine	8.25±0.70 ^a	8.84±1.36 ^a
Phenylalanine	3.81±0.52 ^a	4.25±0.99 ^a
Tryptophan	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
Lysine	3.73±0.86 ^a	4.11±1.38 ^a

Cysteine, cysteine+cystine; Asparagine, asparagine+aspartic acid; Glutamine, glutamine+glutamic acid

Values are mean±SD (n=3)

Values with the same letters in each row are not significantly different at p<0.05 by t-test

2. PAT 단백질의 알레르겐 가능성 평가

특정단백질의 알레르겐 가능성 연구는 일차적으로 컴퓨터 생물정보 데이터베이스를 이용한 가상실험 (*in silico* study)에 의존한다. 본 조사에서는 많은 연구자에 의해 널리 이용되고 있는 알레르겐 아미노산 서열 상동성 검정 프로그램인 AllergenOnline Database를 이용하여 PAT 단백질의 알레르겐 가능성을 평가하였다. 그 결과 PAT 단백질은 80개의 아미노산으로 이루어진 절편에 걸쳐 기지의 알레르겐과 35% 이상의 상동성을 보이지 않았으며 (Figure 1-A), 알레르겐 항원결정기를 나타내는 연속된 8개의 아미노산과 일치하는 서열도 확인되지 않았다 (Figure 1-B). 따라서 *bar* 유전자의 발현산물인 PAT 단백질은 기지의 알레르겐과 구조적으로 유사성이 없으므로 알레르겐으로 작용할 가능성이 매우 낮을 것으로 판단된다. 이와 같은 PAT 단백질에 대한 안전성평가는 이미 수행된 바 있으며 PAT 단백질이 알레르기를 유발할 가능성은 매우 낮을 것으로 보고되었고(Herouet et al. 2005), 모품종(non-GM) 들잔디와 제초제 저항성 GM 들잔디의 알레르기 접촉피부염을 비교 평가한 첩포시험에서도 PAT 단백질이 발현된 GM 들잔디의 잎 조직은 모품종 들잔디의 잎 조직과 유사한 양성반응을 보였다 (Lee et al. 2015a). 또한, PAT 단백질의 아미노산 서열과 기존 독소 아미노산 서열의 상동성을 검색한 결과 대부분 PAT 단백질과 관련된 phosphinothricin acetyltransferase, acetyltransferase 등의 효소와 아미노산 서열 상동성이 높게 나타났고, 단백독소와의 유의미한 상동성은 검색되지 않았다(data not shown). 이상의 결과는 제초제 저항성 GM 잔디에서 발현된 PAT 단백질은 알레르겐 및 독성물질로 작용할 위험성이 없음을 시사한다.

많은 단백질 알레르겐은 당쇄가 부가되어 있고, 그 당쇄 그룹들이 단백질들의 알레르겐으로 작용할 가능성을 높이는데 기여하고 있다(Jenkins et al. 1996). 대부분의 알레르겐과 연관된 당쇄화(glycosylation)는 폴리펩타이드 체인의 아스파라긴에 N-glycosidic 결합을 한 것이며, N-glycosylation은 폴리펩타이드 체인에 Asparagine-Xaa-Serine/Threonine (Xaa 는 Proline 이외의 아미노산)배열의 아스파라긴 잔기에서 일어난다. 유전자변형 식물에 도입된 *bar* 유전자 유래의 PAT 단백질의 아미노산 배열에서는 잠재적 당화 사이트(glycosylation site)가 없음이 보고된바 있다(Herouet et al. 2005).

본 실험에서는 JG21-MS1 잔디에서 발현한 PAT 단백질이 당화되지 않았음을 실험적으로 증명하기 위해, JG21-MS1 잔디에서 PAT 단백질을 정제하여 당단백 염색 실험을 수행하였다(Figure 2). 그 결과, Positive control로 사용한 Horseradish peroxidase는 5 μ g(좌, 2번 lane) 1 μ g(좌, 3번 lane) 모두에서 염색되어 당단백질임을 확인할 수 있었고, Negative control로 사용한 Soybean trypsin inhibitor(좌, 4-5번 lane)는 염색이 되지 않아 당단백질이 아님을 확인할 수 있었다. JG21-MS1 잔디에서 정제한 PAT 단백질(좌, 8-9번 lane)은 Negative control로 사용한 Soybean trypsin inhibitor에서의 결과와 같이 염색되지 않았다 (Fig. 2). 본 결과로부터 JG21-MS1에서 발현한 PAT 단백질은 glycosylation 되지 않았음을 확인할 수 있었다.

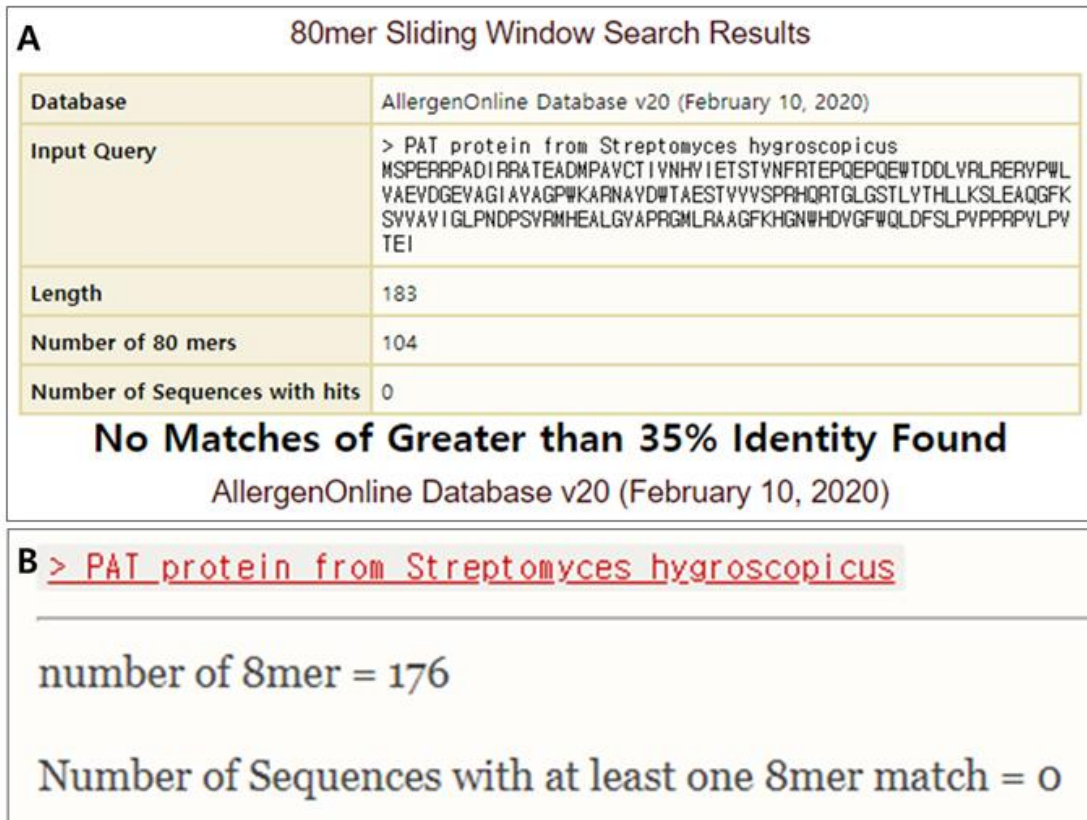


Figure 1. Amino acid sequence identity of PAT protein from Allergen online Database.

(A) 35% identity with known allergens across a length of 80 amino acids; (B) Continuous 8 amino acids identity

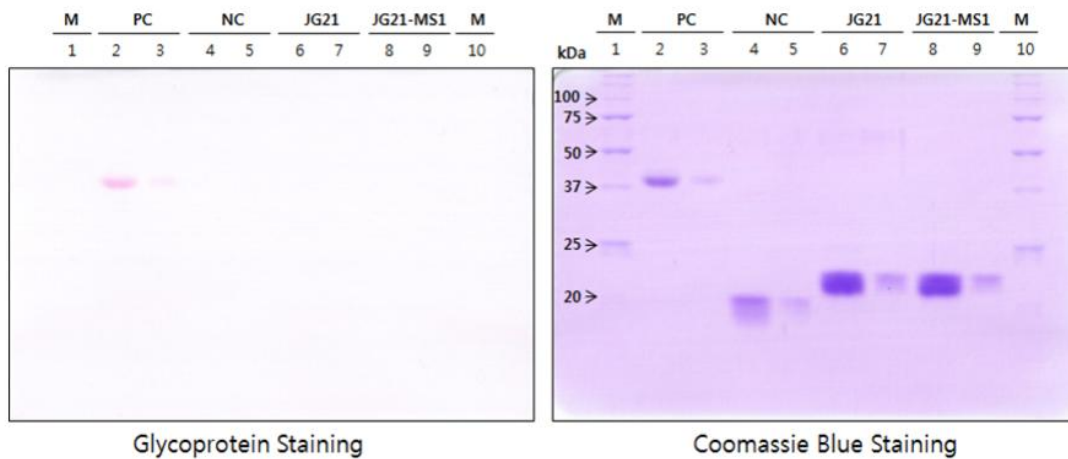


Figure 2. Glycoprotein staining of the protein purified from GM zoysiagrass events.

M, protein size marker. Size of protein standard (kDa) is shown at left (lane 1, lane 10); lane 2-3, Horseradish Peroxidase as positive control (lane 2, 5 μ g; lane 3, 1 μ g); lane 4-5, Soybean trypsin inhibitor as negative control (lane 4, 5 μ g; lane 5, 1 μ g); lane 6-7, Purified PAT protein from JG21 (lane 6, 10 μ g; lane 7, 1 μ g); lane 8-9, Purified PAT protein from JG21-MS1 (lane 8, 10 μ g; lane 9, 1 μ g). After the glycoprotein stain, the gel was stained with Coomassie brilliant blue

3. PAT 단백질의 인공위액에서의 안정성평가

본 실험에서는 JG21-MS1 들잔디에서 발현된 PAT 단백질도 가축이나 사람의 위액에서 빠른 속도로 분해된다는 사실을 실험적으로 검증하였다. 실험 결과, 펩신을 첨가하지 않은 인공위액에서는 처리 후 60분이 경과하여도 PAT 단백질이 분해되지 않은 반면, 펩신을 첨가한 인공위액에서는 처리 후 30초 이내에 PAT 단백질이 분해됨을 확인하였다(Figure 3). 이 결과로부터 JG21-MS1에 도입된 *bar* 유전자의 발현산물인 PAT 단백질은 인공위액에서 안정하지 않고 매우 빠르게 분해됨을 확인할 수 있었다. 소화에 대한 PAT 단백질의 안정성을 평가한 다른 연구에서도 PAT 단백질은 인공위액 및 장액에서 5분 이내에 분해됨이 확인되었고(Herouet et al. 2005), 제초제 저항성 GM 들잔디(JG21) 이벤트에서 발현된 PAT 단백질의 인공위액에서의 분해성 평가에서도 이와 유사한 결과가 보고되었다(Sun et al. 2010). 이상의 결과는 무추대 제초제 저항성 GM 들잔디(JG21-MS1)에서 발현된 PAT 단백질은 인공위액에서 빠르고 완전하게 분해되어 알레르겐으로 작용할 가능성이 낮을 것임을 시사한다.

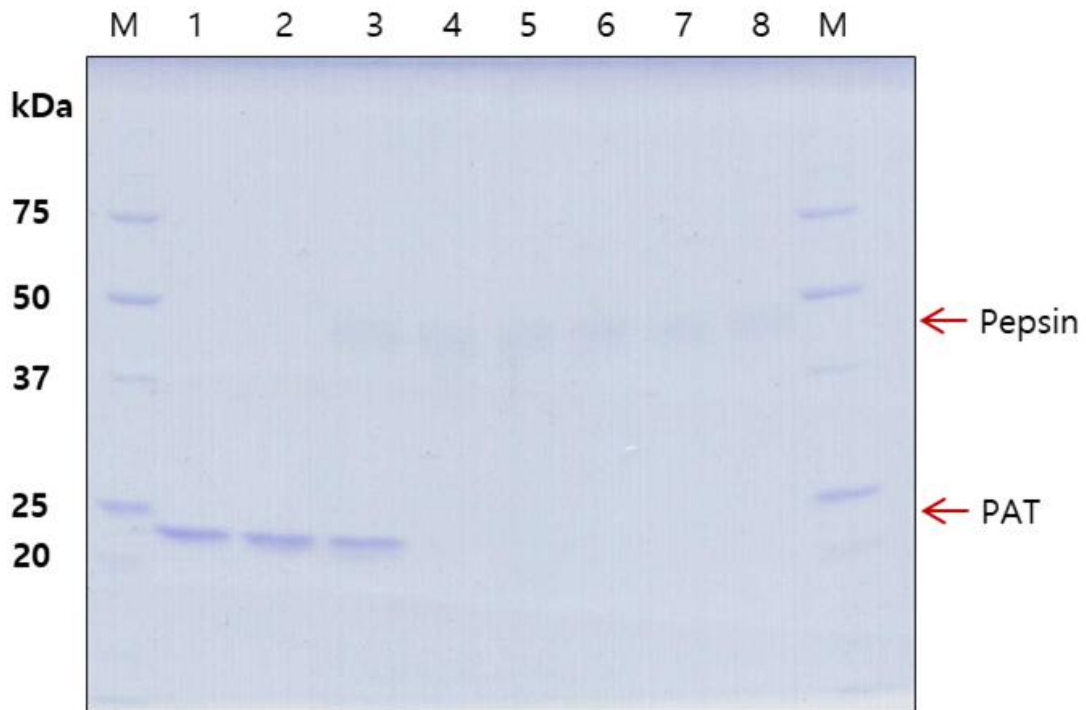


Figure 3. SDS-PAGE analysis of PAT protein after digestion in simulated gastric fluid (SGF).

Purified PAT protein was incubated in SGF without [lanes 1 (0 min) and 2 (60 min)] or with [lanes 3-8 (0, 0.5, 1, 5, 10 or 60 min)] pepsin. M, protein size marker. Size of protein standard (kDa) is shown at left

4. PAT 단백질의 단회 경구투여 독성 평가

본 실험에서는 암수 ICR 마우스를 이용하여 PAT 단백질의 단회 경구투여 시 나타나는 독성반응과 치사량을 조사하기 위하여 실험물질 투여 후 7일간 관찰하였다. 총 4개 그룹의 마우스에 부형제 또는 실험물질을 0, 1,000, 2,000, 4,000mg/kg의 용량으로 단회 경구투여하였고(Table 3), 투여 1일 차에는 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간 증상관찰을 수행하였으며, 7일 차까지의 증상을 관찰하였다.

실험 결과, 시험물질 투여 후 모든 시험구에서 유의적인 체중변화는 관찰되지 않았고(Table 3), 일반증상에서도 이상증상은 관찰되지 않았으며, 대용량군(4,000mg/kg)을 포함한 모든 시험구에서 사망개체는 발생하지 않았다(Table 4). 부검결과에서도 대조군과 비교하였을 때 모든 시험구에서 5대장기의 이상증상은 관찰되지 않았다(data not shown). 본 연구를 통해 PAT 단백질의 마우스에 대한 단회 경구투여는 어떤 독성학적인 변화도 유발하지 않는 것으로 확인되었으며, PAT 단백질의 ICR 마우스에 대한 최소 치사량(minimal lethal dose)은 암수 모두 4000mg/kg을 상회하는 것으로 나타났다. PAT 단백질은 동물모델을 이용한 독성 실험에서 위해성이 없음이 보고되었고, 동물이나 인체에 유해한 어떠한 결과도 발견되지 않았다(EPA 1997; Herouet et al. 2005; Jeong et al. 2004; Lee et al. 2012). 이는 PAT 단백질이 독성물질로 작용할 가능성이 매우 낮음을 시사한다. 따라서 제초제 저항성 GM 들잔디(JG21-MS1) 이벤트에서의 PAT 단백질 발현이 들잔디 식물체의 독성 변화에 미치는 영향은 거의 없을 것으로 사료된다.

Table 3. Body weight changes in male and female ICR mice after single oral administration of PAT protein

Sex	Group (Dose: mg/kg)	Body weights		
		1	3	7
Male	G1 (0)	34.84±1.42 ^a	36.41±1.63 ^a	36.17±1.52 ^a
	G2 (1000)	34.25±2.12 ^a	35.49±2.17 ^a	35.94±2.19 ^a
	G3 (2000)	34.47±0.79 ^a	35.26±0.93 ^a	36.33±0.88 ^a
	G4 (4000)	35.16±1.33 ^a	35.94±1.17 ^a	35.98±1.26 ^a
Female	G1 (0)	29.96±0.86 ^b	29.60±0.93 ^{bc}	30.23±0.90 ^b
	G2 (1000)	29.94±0.62 ^b	30.94±1.22 ^b	30.49±1.24 ^b
	G3 (2000)	27.84±0.70 ^c	28.05±0.87 ^c	28.95±1.11 ^b
	G4 (4000)	29.86±1.30 ^{bc}	29.95±1.53 ^b	30.98±1.84 ^b

Body weights (g/day) are mean±SD (n=5). Means with different letters are significantly different among days and doses by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$

Table 4. Clinical signs and mortality of ICR mice after single oral administration of PAT protein

Sex	Group (Dose: mg/kg)	No. of animals	Clinical signs	Mortality (%)
Male	G1 (0)	5	-	0
	G2 (1000)	5	-	0
	G3 (2000)	5	-	0
	G4 (4000)	5	-	0
Female	G1 (0)	5	-	0
	G2 (1000)	5	-	0
	G3 (2000)	5	-	0
	G4 (4000)	5	-	0

-, No abnormal findings

IV. 종합 고찰

본 연구는 제초제 저항성 GM 들잔디에서 발현된 PAT 단백질의 잠재적인 알레르기성 및 독성을 평가하기 위해 수행되었다. PAT 단백질의 *in silico* 분석에서 PAT 단백질은 알려진 알레르겐 또는 독성 단백질과 유사성을 보이지 않았다. PAT 단백질은 80개의 아미노산으로 이루어진 절편에 걸쳐 기지의 알레르겐과 35% 미만의 아미노산 서열 상동성을 보였고, 기지의 알레르겐과 연속한 8개의 아미노산과 일치하는 서열도 확인되지 않았다. 또한, 제초제 저항성 GM 들잔디에서 발현된 PAT 단백질은 펩신을 첨가한 인공위액에서 매우 빠르게 분해되었으며, GM 들잔디에서 발현된 PAT 단백질은 번역 후 수식(glycosylation)이 일어나지 않았음이 확인되었다. 경구투여 독성 시험에서는 체중 1kg당 4,000mg을 투여한 실험구에서도 PAT 단백질 투여 후 마우스에서 사망이나 독성 영향은 관찰되지 않았다. 이들 결과는 제초제 저항성 GM 들잔디에서 발현된 PAT 단백질이 잠재적 알레르겐이나 독소로 작용할 가능성이 없음을 시사한다.

V. 인용 문헌

Bae TW, Kim J, Song IJ, Song SY, Lim PO, Song PS, Lee HY (2009) Production of unbolting lines through gamma-ray irradiation mutagenesis in genetically modified herbicide-tolerant *Zoysia japonica*. *Breed Sci* 59:103-105

Bae TW, Vanjidorj E, Song SY, Nishiguchi S, Yang SS, Song IJ, Kang TW, Kim JI, Koh YJ, Park SY, Lee J, Lee YE, Ryu KH, Riu KZ, Song PS, Lee HY (2008) Environmental risk assessment of genetically engineered herbicide-tolerant *Zoysia japonica*. *J Environ Qual* 37:207-218

Cho JI, Park SH, Lee GS, Kim SM, Lim SM, Kim YS, Park SC (2020) Current status of GM crop development and commercialization. *Korean J Breed Sci Special Issue*:40-48

Codex Alimentarius Commission (2009) Foods derived from modern biotechnology. 2nd ed. WHO, FAO, Rome, Italy

EPA (1997) Phosphinothricin acetyltransferase and the genetic material necessary for its production in all plants. Exemption from the requirement of a tolerance on all raw agricultural commodities. *Federal Register*. 62: 17717-17720

FAO/WHO (2001) Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy

Hérouet C, Esdaile DJ, Mallyon BA, Debruyne E, Schulz A, Currier T, Hendrickx K, van der Klis RJ, Rouan D (2005) Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the *pat* and *bar* sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regul Toxicol Pharmacol* 41:134-149

ISAAA Brief 53 (2018) Global status of commercialized biotech/GM crops in 2017

Jenkins N, Parekh (RB, James DC (1996) Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry. *Nat Biotechnol* 14:975-981

Jeong MH, You AS, Lee JB, Shin JS, Kim JH, Han JS (2004) Mutagenicity studies of the herbicide-resistance phosphinothricin acetyltransferase (PAT). *Korean J Pestic Sci* 8:22-29

Kang HG, Bae TW, Jeong OC, Sun HJ, Lim PO, Lee HY (2009) Evaluation of viability, shedding pattern, and longevity of pollen from genetically modified (GM) herbicide-tolerant and wild-type zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.). *J Plant Biol* 52:630-634

Kang HG, Sun HJ, Kwon YI, Yang DH, Lee GS, Park KW, Lee HY (2019) Assessment of bolting recovery of an unbolting line produced by gamma-ray irradiation in genetically modified herbicide-tolerant *Zoysia japonica*. *Weed Turf Sci* 8:257-265

Lee J, Sun HJ, Lee HY (2015a) Biohazard surveillance of allergic contact

dermatitis in genetically-modified *Zoysiagrasses* using patch testing. *AARD* 3:134-138

Lee SM, Seo DS, Jeong MH, Sung HJ, Kim JK, Kim HJ, Yeo YS, Cho HS (2012) Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins and herbicide resistant Potato. *J Korean Soc Int Agric* 24:598-608

Lee YE, Lee SH, Ryu GD, Kang HG, Kwon YI, Sun HJ, Lee HY (2015b). Investigation into effects of transgenic glufosinate-resistant *Zoysiagrasses* with herbicide application on bacterial communities under field conditions. *J Plant Biol* 58:303-310

Lee YT, Lee HM, Ahn BO, Cho HS, Suh SC (2013) Nutritional composition of drought-tolerant transgenic rice. *J Korean Soc Food Sci Nut* 42:730-735

Sun HJ, Kang HG, Bae TW, Cho TG, Kim J, Lim PO, Riu KZ, Lee HY (2010) Assessment of phosphinothricin acetyltransferase (PAT) degradation from transgenic zoysiagrass digested with simulated gastric fluid (SGF). *J Plant Biol* 53:113-120

Thompson CJ, Movva NR, Tizard R, Cramer R, Davis JE, Lauwereys R, Botterman J (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBOJ* 6:2519-2523

Toyama K, Bae CH, Kang JG, Lim YP, Adachi T, Riu KZ, Song PS, Lee HY (2003) Production of herbicide-tolerant zoysiagrass by *Agrobacterium*-mediated transformation. *MolCells* 16:19-27

감사의 글

학부생일 때 연구소에 들어와 어느새 석사 학위 졸업을 하게 되었습니다. 연구소에 들어올 계기를 마련해주신 이효연 교수님께 감사드립니다. 많이 부족한 저를 이끌어주신 선현진 교수님과 강홍규 교수님께도 감사의 마음을 전합니다. 저 혼자 힘으로는 여기까지 올 수 없었을 것입니다. 교수님들과 박사님들의 조언이 있었기에 제가 한 걸음씩 앞으로 나아갈 수 있었습니다. 처음 연구소에 들어와 서툴렀던 저에게 하나씩 실험을 가르쳐주신 연구원들과 언니, 오빠들에게도 감사를 전합니다. 졸업을 앞두고 바쁜 저를 옆에서 응원해준 모든 분께도 감사드립니다. 바쁘고 지친 마음에 많은 힘이 되었습니다. 졸업까지 저를 지탱해준 가족들 모두 고맙습니다. 연구소에서 날마다 함께한 선후배 모두에게도 감사의 마음을 전합니다.