pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 33, No. 3, pp. 193~199 (2018)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2018.33.3.193

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

제초제 내성 유전자 변형 옥수수 중 PAT단백질에 특이한 단크론성 항체의 생산과 특성 확인

김솔아 · 이정은 · 심원보[1,2] · 강성조[3] · 정덕화[1]*

경상대학교 응용생명과학부, [1]경상대학교 농화학식품공학과, [2]경상대학교 농업생명과학연구원, [3]㈜매디랩

Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Specific to PAT Protein Expressed in Genetically Modified Herbicide-Resistance Maize

Sol-A Kim, Jeong-Eun Lee, Won-Bo Shim[1,2], Sung-Jo Kang[3], and Duck-Hwa Chung[1]*

Division of Applied Life Science, Graduate School, Gyeongsang National University, Jinju, Korea
[1]Department of Agricultural Chemistry and Food Science & Technology, Gyeongsang National University, Jinju, Korea
[2]Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju, Korea
[3]MADI-LAB, Inc., Jinju, Korea

(Received May 28, 2018/Revised June 2, 2018/Accepted June 5, 2018)

ABSTRACT - In this study, PAT protein of genetically modified maize was prepared from the recombinant *E. coli* strain BL21 (DE3), and mice were immunized with the recombinant PAT protein. After cell fusion and cloning, two hybridoma cells (PATmAb-7 and PATmAb-12) were chosen since the monoclonal antibodies (Mabs) produced by them were confirmed to be specific to PAT protein in the indirect enzyme-linked immunsorbent assay (ELISA) and western blot tests. There were no cross-reactions of either Mabs to other GM proteins or to the extracts of non-GM maize. The ELISA based on the PATmAb-7 can sensitively detect 0.3 ng/g PAT protein in corn. These results indicate that the developed Mabs can be used as bio-receptors in the development of immunosensors and biosensors for the rapid and simple detection of GM corn adulterated in foods.

Key words : GM maize, PAT protein, Hybridoma cell, Monoclonal antibody

'유전자변형생물체' 또는 '유전자변형식품'이라고 불리는 genetically modified organism (GMO)은 생물체의 유전자 중 유용한 유전자를 취하여 그 유전자를 갖고 있지 않은 생물체에 삽입하여 유용한 성질을 나타나게 한 것이다. 이와 같은 유전자재조합기술을 활용하여 재배·육성된 농산물 · 축산물 · 수산물 · 미생물 및 이를 원료로 하여 제조 · 가공한 식품(건강기능식품을 포함) 중 정부가 안전성을 평가하여 입증된 경우에만 식품으로 사용할 수 있으며, 이를 유전자변형식품이라 한다[1,2].

GMO는 미국 몬산토사가 1995년 제초제 저항성 GM 콩을 상품화하면서 대중에게 처음 알려지기 시작하였고, 그 당시 약 120만 ha 정도이던 유전자 재조합 농산물의 재배면적은 1999년 대비 2009년에 약 13배 증가하고 있어 원하지 않더라도 유전자 재조합 농산물을 접할 기회는 점점 증가하고 있는 추세이다. 그 중 제초제 저항성 농작물은 그 생산의 편리성으로 인해 생산성이 향상되어 점차 생산량이 늘어나고 있는 실정이기 때문에 전 세계적으로 GM 농산물의 생산 및 교역이 증대되고 있다. 그러나 전 세계적으로 GM 식품의 잠재적 안전성이 논란되면서 각국의 정부에서는 GMO 안전성 평가 및 표시제를 시행하고 있다[3]. EU에서는 1998년 9월부터, 일본 및 호주에서는 2001년 4월 및 2001년 12월부터 GMO 표시제를 각각 시행해 오고 있다. 우리나라에서도 식품위생법에 따라 2001년 7월부터 안전성 심사가 완료된 GM 콩 및 옥수수 원료를 사용하는 27개 식품 유형에 대하여 GMO 표시제를 시행한 후 2007년 11월에 식품용으로 안전성 심사 및 승인이 완료된 GM농산물 면화, 유채, 사탕무를 추가하였다. 최근에는 "식품 등의 표시기준" 고시에 GMO 표시 의무가 확대되어 GM 식품에 GMO DNA가 남아 있다면 모든 원재료에 GMO 표시를 의무적으로 해야 되며, GMO DNA가 잔류하지 않는 식용유 등에 대해서는 표시를 하지 않아도

*Correspondence to: Duck-Hwa Chung, Department of Agricultural Chemistry and Food Science & Technology, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 52828, Korea
Tel: 82-55-772-1422, Fax: 82-55-772-1909
E-mail: dhchung@gnu.ac.kr

되도록 하고 있다[4].

앞서 언급한 바와 같이 국내외적으로 GMO에 대한 안전성 측면은 여전히 논란이 있지만 전 세계적으로 인구의 증가로 인한 식량소비 증가와 기후변화로 인한 곡물 생산량의 감소로 인해 글로벌 식량 위기가 예상되고 있는 상황에서 GMO는 식량문제를 해결할 수 있는 대안으로 여겨지고 있다[5-8]. 2015년 현재 재배되고 되고 있는 GMO 작물의 재배면적은 콩(9,210만 ha)과 옥수수(5,360만 ha), 면화(2,400만 ha), 카놀라(850만 ha) 순으로 그 중 제초제 내성에 대한 작물의 재배가 9,590만 ha로 가장 높게 보고되고 있으며 GMO 재배국가의 순위는 미국, 브라질, 아르헨티나, 인도, 캐나다 순이다(2015년 GM작물 재배 면적). 우리나라의 경우 식량자급률이 30%에도 미치지 못하는 수준으로 쌀을 제외한 주요 곡물을 미국 등 농산물 수출국으로부터의 수입에 의존하고 있는 상황이며 일본에 이어 세계적으로 손꼽히는 GMO 수입 대국에 해당한다. 따라서 국내 소비자들은 비록 승인 받은 GMO 작물이라고 하더라도 가공식품 중 사용여부에 대한 관심과 안전성 평가를 받지 않은 미심사 GMO 작물이 수입 및 유통 여부 등에 관심이 커지고 있는 상황이다[9-11]. 이러한 GMO의 안전성 논란과 가공식품에서의 표시제 등의 시행으로 인해 다양한 원료와 가공식품에 유전자 변형 농산물의 혼입 여부를 신속하게 확인할 수 있는 분석법 개발에 관한 요구도 증가하고 있는 추세이다.

GMO를 검출하기 위해 주로 사용되는 방법으로는 유전학적 방법과 면역화학적 방법이 이용되고 있는데 주로 GMO 작물 검사에 사용되는 방법으로는 유전학적 방법인 PCR이 국제 표준분석법으로 추천되고 있으며, 상업화된 여러 GMO 작물에 대하여 PCR을 이용한 분석방법이 정립되어 분석법으로 활용되고 있다. 그러나 PCR은 범용성, 비용 및 분석시간 면에서 단점을 가지고 있어 중소규모의 생산현장에서 손쉽게 적용 가능한 현장 검사법의 보급이 필요하다[12-14]. 국외의 경우 PCR법의 단점을 해결하기 위해 다양한 면역분석법을 개발해 오고 있으며, Envirologix사, Romerlabs사, Neogen사 등은 단백질 분석용 ELISA kit나 lateral flow test kit등을 제조하여 판매하고 있다. 이러한 면역학적 분석방법은 현장에서 GMO의 혼입여부를 측정할 수 있는 방법으로 전세계적으로 많은 수요가 있는 것으로 보고하고 있다. 그러나 현재까지는 GM 콩에 대한 연구보고[15-16]는 있었으나, 국내의 기술에 의한 GMO분석용 ELISA kit나 lateral flow test kit 제품은 보고되고 있지 않고 있으며, GM 옥수수에 대한 연구보고는 되고 있지 않은 상황이다.

제초제 phosphinothricin (PPT)는 식물에서 glutamine 합성효소의 활성을 억제하여 세포 내 암모니아의 빠른 축적을 가져와 광호흡(photorespiration)이 중단되어 결국 식물세포를 사멸시키는 것으로 알려져 있다[17]. GM 옥수수에 많이 발현되는 phosphinothricin-N-acetyltransferase (PAT) 단백질은 acetyl coenzyme A가 존재 시 PPT의 자유아민기(free NH2 group)를 아세틸화하여, glutamine 합성효소의 활성을 억제하지 않기 때문에 PPT에 대한 내성을 제공한다. 또 유전자변형식품 승인 현황(2018. 3. 28. 기준)에서 승인된 190 품종 중 옥수수는 83종(단일형질 24종과 후대교배 중 56종 그리고 기타 3종)으로 GMO 작물 중 비율이 높다[18].

따라서 본 연구에서는 제초제 저항성 GM 옥수수에서 발현되는 PAT 단백질을 형질전환 된 대장균으로부터 대량 생산하고, 생산된 PAT 단백질을 항원으로 사용하여 단크론성 항체 개발과 그 특성을 확인하고자 하였다.

Materials and Methods

실험재료 및 기기

GM 옥수수 유전자 확보를 위해 옥수수 3종(DP-004114-3, MON89034 XMON88017, Bt11XMIR604XTC1507X5307XGA21)를 식품의약품안전처로부터 분양 받았다. GM 옥수수에 대한 항원 준비를 위해 *E. coli* strain BL21 (DE3), DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, USA), pET-15b (Novagen, USA), LB broth (Difco, USA), IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside), Ni-NTA resin (Qiagen, USA)을 구입하여 사용하였다. PAT단백질에 대한 단크론성 항체를 개발하기 위해 BALB/c mouse를 효창사이언스(Hyochang Science Inc., Korea)로부터 구입하여 사용하였고, SDS-PAGE과 western blot는 Laemmli[19-20]등의 방법에 준하여 실시하였으며 그 외 필요한 시약 및 재료는 구입하여 사용하였다. 기타 사용된 시약은 50 mM carbonate buffer (pH 9.6), 50 mM phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4), 50 mM phosphate bufferd saline containing 0.05% Tween20 (PBST), 2 M H_2SO_4, 10 mM citrate buffer (pH 4.0), 30% hydrogenperoxide, 0.1 M glycine (pH 4.0), 1 M Tris-HCl (pH 8.0), 1% sodium citrate, 10% NaCl, 2 mM borate buffer (pH 7.2), 1 M Tris-HCl (pH 9.0) 등을 사용하였으며, UV-spectrometer[Shimadzu (Japan)], 역위상차현미경(Olympus, Japan)과 CO_2배양기(Forma Scientific, USA)를 사용하였다. 시료분석과 유전자증폭을 위해 원심분리기(Hanil, Korea), ELISA reader (Bio-Rad, USA), PCR 기기(Bio-Rad, USA)를 사용하였다.

PAT 단백질의 확보

식품의약품안전처로부터 제공받은 GM 옥수수 3종 DP-004114-3, MON89034 XMON88017, Bt11XMIR604XTC1507X5307XGA21으로부터 PAT유전자를 추출하고 PCR과 cloning을 거쳐 PAT 유전자가 삽입된 pET-15b벡터를 전이시킨 형질전환 대장균을 확보하여 PAT 단백질의 생산과

정제를 수행하였다. 형질 전환된 *E. coli* strain BL21 (DE3)를 1 L의 LB broth에 접종하여 37°C에서 약 2시간 배양하고 OD_{600} 값이 0.4 정도가 되면 IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)를 0.5~1 mM 되도록 첨가하여 다시 37°C에서 4시간 추가 배양하여 단백질의 발현을 유도하였다. 배양이 끝난 후 3,500 rpm 에서 15분간 원심분리하여 균체를 회수하였고, 단백질을 분리 정제하기 위하여 native condition법으로 실시하였다. 즉, 균체를 binding buffer (10 mM imidazole, 500 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl) 5 mL에 resuspending한 뒤 이를 ice상에서 sonication 한 후 원심분리 하여 상등액을 회수하였다. 여기에 준비한 Ni-NTA resin (Qiagen, USA) 1.5 mL를 첨가하여 4°C에서 1시간 반응한 후 column에 resin을 충진하였다. 반응물이 다 충진되면 15 mL의 binding buffer와 10 mL washing buffer (60 mM imidazole, 500 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl)로 각각 washing한 후, 5~7 mL의 elution buffer (200 mM imidazole, 500 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl)로 PAT 단백질만을 순수하게 분리하였다. 각각의 tube로부터 일부 채취하여 SDS-PAGE를 수행하여 원하는 단백질이 순수하게 분리되었는지 확인하였고 정제된 단백질은 정량을 한 후 냉동(–20°C) 보관하면서 항원과 코팅항원으로 사용하였다.

단크론성 항체 확보를 위한 hybridoma 세포주 개발

준비된 항원을 complete freund's adjuvant와 1:1(v/v)로 유화시켜 생후 6주된 암컷 BALB/C mouse에 마리당 200 μL씩 복강에 주입하여 1차 면역을 실시하였고, 1차 면역 후 2주 간격으로 동일한 면역원을 incomplete freund's adjuvant와 동량 혼합하여 추가 면역을 2회 실시하였으며, 세포 융합 4일 전에 2배의 면역원만을 복강 내 주사하여 최종 면역 시켰다. 3차 면역 일주일 후 mouse의 꼬리 정맥에서 1 μL의 혈액을 채취하여 간접 효소면역분석법 (indirect enzyme-linked immunosorbent assay; iELISA)으로 항체의 역가를 측정하였다. 그 중 가장 높은 역가를 갖는 mouse로부터 spleen cell을 분리한 후 한국생명공학연구원으로부터 분양 받은 myeloma cell (SP_2)을 사용하여 Kohler and Milstein[21]의 방법으로 세포융합을 실시하였고, Mckearn 등[22]의 무한대 희석법으로 cloning을 실시하여 단일클론의 hybridoma cell을 획득하였다

PAT에 대한 단크론성 항체 생산 및 정제

선택된 hybridoma cell은 대량 배양한 후 mouse 복강에 200 μL를 주입하여 복수액을 생산하였으며, 1주일 후 생산된 복수액을 채취하여 ammonium sulfate 침전법[23]으로 정제한 후, PBS를 이용하여 3일 동안 투석하였다. 친화성 칼럼을 통한 추가정제는 protein G column을 이용하여 정제하였다. 즉, 먼저 PBS buffer 5 mL로 protein G Column을 안정화한 다음 ammonium sulfate 침전법으로 정제된 항체와 PBS를 동량 희석한 후 column에 주입하였다. 불순물을 씻어 주기 위하여 다시 PBS buffer 15 mL을 흘려주고 15 mL의 elution buffer (0.1 M glycine, pH 4.0)로 용출시킨 후 1 mL씩 분획하였다. 분획한 시료는 즉시 1 M Tris-HCl (pH 8.0)로 중화시키고 280 nm에서 흡광도를 확인한 후 PBS로 투석을 실시하였으며, 동결 건조시킨 후 –20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

생산된 PAT 단크론성 항체의 특성 확인

개발된 항체의 교차반응성을 확인하기 위해 정제된 발현 PAT 단백질과 GM 옥수수에서 추출한 단백질(PAT), 유전자 재조합 농작물에서 주로 발현되는 CP4-EPSPS, MEPSPS, 2MEPSPS, PMI, mCry3A, Cry3Bb1, Cry34Ab1, Cry35Ab1 및 Cry2Ab2 단백질 등을 이용하여 western blot 법과 간접효소면역분석법으로 확인하였다. 먼저, western blot은 Towbin 등[24]의 방법에 준하여 실시하였다. SDS-PAGE 후 단백질은 PVDF membrane (Millipore, USA)에 transfer buffer (25 mM tris, 192 mM glycine and 5% methanol)와 전사장치(Bio-Rad)를 이용하여 전사시킨 후 PVDF membrane은 TBST (0.05% Tween 20 in tris-buffered saline buffer)를 이용하여 3회 세척하고 3% skim milk를 이용하여 37°C에서 1시간 blocking 하였다. 이후 blocking 처리된 막은 TBST를 이용하여 3회 세척한 후 hybridoma cell 배양액을 이용하여 37°C에서 1시간 반응시키고 TBST로 4차례 세척 후 희석률 1:6000의 2차 항체인 goat anti-mouse alkaline phosphate conjugate (Bio-Rad)로 37°C에서 1시간 반응시켰다. TBST로 5차례 세척 후, AP conjugate substrate kit (Bio-Rad)를 이용하여 발색시켜 PVDF membrane 상에서 확인하였다. 간접효소면역분석법은 정제된 단백질 및 옥수수 추출액을 96-well microplate (Nunc, Roskildeenmark)에 분주하고 1시간 동안 37°C에서 코팅시킨 후 0.05% Tween 20이 포함된 PBS (PBST, pH 7.4)로 3회 세척하였다. 비 특이적인 반응을 방지하기 위해 1% skim milk로 1시간 동안 37°C에서 blocking 시킨 후 PBST로 4회 세척하였고, 세척된 well에 hybridoma cell 배양액을 100 ul씩 분주하고, 1시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 다시 PBST로 5회 세척하였다. 세척된 well에 2차 항체 goat-anti-mouse IgG-HRP (Sigma Chemical Co.)를 100 μL씩 분주하여 1시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 PBST로 6회 세척하고, 기질용액인 2,2'-azino-di-3-ethyl-benzthiazoline-sulfonate (ABTS, Sigma Chemical Co.)를 각 well에 100 μL씩 첨가하여 37°C에 30분 반응시킨 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Results and Discussion

재조합 PAT 단백질의 생산 및 정제

GM 옥수수 중 PAT 단백질에 대한 단크론성 항체를 개

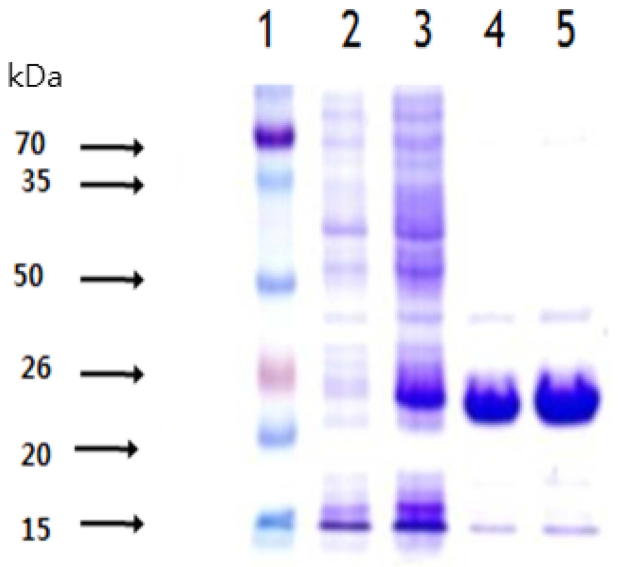

Fig. 1. SDS-PAGE analysis of PAT protein purified by Ni-NTA resin. PAT protein was produced from *E. coli* strain BL21 (DE3) transformed with pET 15b plasmid expressing PAT gene. Lane 1: Marker, lane 2: whole cell lysate before IPTG induction, lane 3: whole cell lysate after IPTG induction, lane 4 and 5: Purified PAT protein.

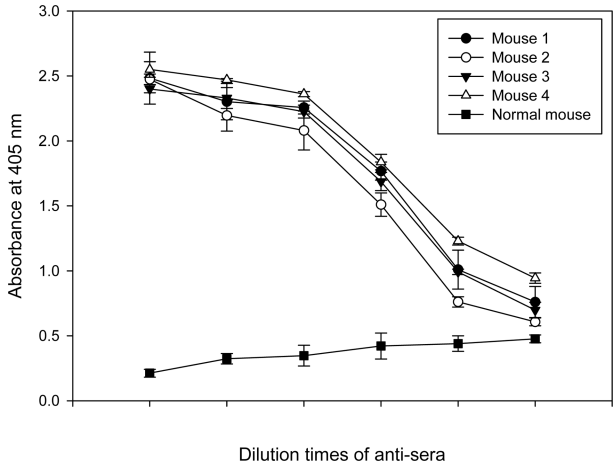

Fig. 2. Titration of antisera from immunized mice with recombinant PAT protein by indirect ELISA.

발하기 위해 형질 전환된 *E. coli* strain BL21 (DE3)을 앞서 설명한 바와 같이 배양 IPTG를 첨가하여 단백질의 발현을 유도하였다. 발현이 유도된 단백질은 Ni-NTA resin을 이용하여 정제를 실시하였고, 정제도를 SDS-PAGE로 확인하였다. 그 결과 Fig. 1에서와 같이 재조합 PAT 단백질을 순수 분리할 수 있었고, column으로부터 정제된 단백질은 PBS로 투석하여 버퍼를 교환하였고, 단백질 정량을 한 후 냉동(–20°C)보관하면서 실험에 사용하였다.

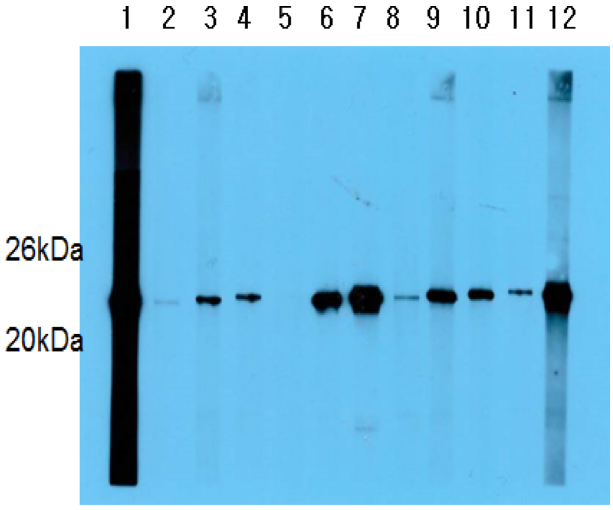

Fig. 3. Western blot analysis for the selection of hybridoma cells producing monoclonal antibodies specific to PAT protein. 10 μg of PAT protein were loaded at each lane, and culture supernatants diluted 1:500 were used. Lane 1: Marker, lane 2-12: culture media of hybridomas.

재조합 PAT 단백질의 항원성 확인 및 hybridoma 개발

정제된 PAT단백질을 이용하여 BALB/C mouse에 2주 간격으로 3차 면역을 실시한 후 마우스 꼬리 정맥에서 채혈하고 간접효소면역분석법으로 항혈청 역가를 측정하여 재조합 PAT 단백질의 항원성을 확인하였다. 그 결과 Fig. 2에서와 같이 PAT단백질로 면역한 대부분의 마우스에서 10^6 배 이상의 희석배수에서도 항체 역가가 나타나 본 연구에서 확보한 재조합 PAT 단백질이 항원성이 높은 것으로 확인되었다. 역가가 높은 마우스를 마지막 4차 면역 후 비장세포(spleen cell)를 분리하여 골수종 세포(myeloma cell)와 세포융합 및 클로닝을 거쳐 단일클론 hybridoma 세포주를 개발하였다. 총 12종의 단일클론 세포주를 확보하였고 western blot으로 확인한 결과, Fig. 3에서 patMab 2와 5번 hybridoma가 생산하는 항체는 PAT 단백질에 반응성이 약한 것으로 판단되어 제외하고 최종 10종의 hybridoma 세포주를 이후의 실험에 사용하였다.

단크론성 항체 정제 및 특성 확인

선정된 10종의 hybridoma의 배양상등액을 이용하여 western blot 상에서의 재조합 PAT 단백질과 실제 GM 옥수수 시료에 대한 반응성을 확인하였다. 그 결과 Fig. 4에서와 같이 PAT는 PATmAb7과 mAb12 2종의 항체만 GM 옥수수 추출물과 반응하는 것을 확인할 수 있었다. 나머지 8종의 항체는 재조합 PAT 단백질에 반응성이 높고 GM 옥수수 추출물에는 반응성이 약한 것으로 확인되었다(data 미제시). PAT 단백질에 대한 항체는 중국의 Xu 등[25]이 보고한 것이 이외에는 외국에서도 보고되고 있지 않으며 국

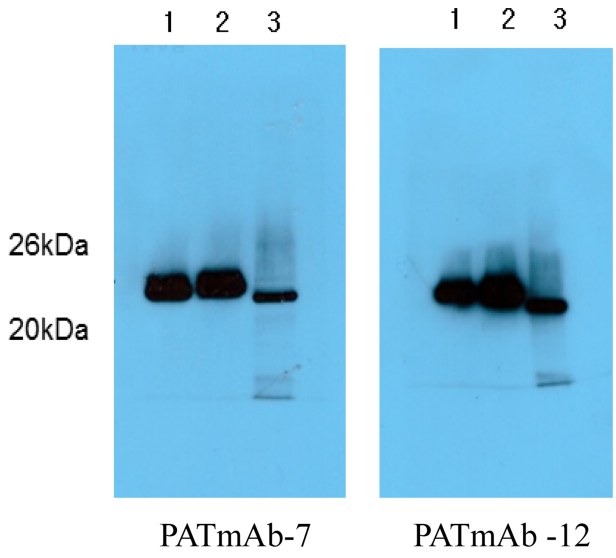

Fig. 4. Western blot analysis of recombinant PAT protein and an extract of GM maize with anti-PAT antibodies. Lane 1: 50 ng recombinant PAT protein, lane 2: 100 ng recombinant PAT protein, lane 3: extract of GM maize. Antibodies were the culture media of hybridomas, PATmAb-7 and PATmAb -12 diluted 1:5,000.

내에서도 유전자 변형 콩에 대한 면역분석법 개발에 관한 연구는 보고되고 있으나, GM 옥수수에 대한 연구는 보고되고 있지 않은 것으로 확인되었다. 그러므로 개발된 PAT 항체는 GM 옥수수를 신속하게 검출할 수 있는 면역분석법 및 바이오센서의 개발에 바이오리셉터로서 활용가능성이 높을 것으로 예상된다.

GM 옥수수에 대한 항체를 확보하기 위해 PATmAb-7 and PATmAb-12 hybridoma cell을 대량으로 증식시킨 후 마우스에 주사하고 복수액을 생산한 후 ammonium sulfate 법과 protein G column을 이용하여 정제를 수행하였고, 그

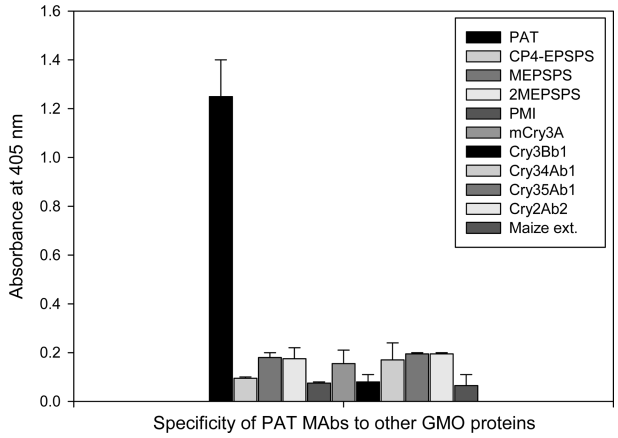

Fig. 6. Immunoreactivity of PATmAb-7 against other recombinant proteins which can be expressed in GMO and the extracts of non-GM maize by indirect ELISA.

정제도를 SDS-PAGE로 확인하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 PATmAb-7과 PATmAb-12 두 항체 모두 대표적인 항체패턴인 heavy chain과 light chain을 나타내었고 면역글로불린(immunoglobulin)임을 확인할 수 있었다. 정제된 항체 2종에 대해 isotype을 확인한 결과 2종 모두 heavy chain과 light chain이 각각 IgG_1과 κ type으로 확인되었다(data 미제시).

정제된 PATmAb-7 and PATmAb-12 항체에 대해 다른 GMO 작물에 도입된 특이 단백질인 MEPSPS, 2MEPSPS, PMI, mCry3A, Cry3Bb1, Cry34Ab1, Cry35Ab1 및 Cry2Ab2와 non-GM 옥수수의 추출물에 대한 교차반응성을 확인한 결과 Fig. 6과 같이 PAT 단백질에만 특이적으로 각각 반응하였고, 일반 콩 및 옥수수 추출물들 및 다른 GMO 작물에 도입된 특이 단백질과 non-GM 옥수수의 추출물에는 교차반응을 보이지 않았다. 이상의 결과로 볼 때 개발된

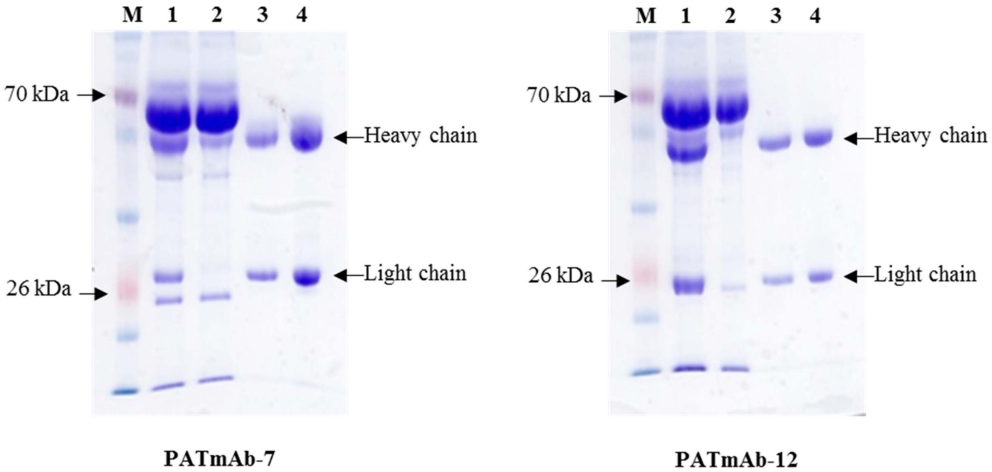

Fig. 5. SDS-PAGE analysis of the purified monoclonal antibodies. Lane M: marker, lane 1: ascites fluids, lane 2: unbound fraction, lane 3 and 4: Elutes, bound fractions.

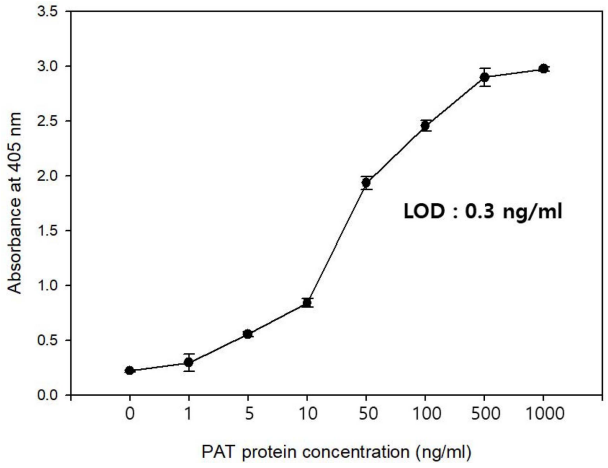

Fig. 7. Standard curve of indirect ELISA for the rapid detection of PAT protein in GM maize.

2종의 항체(PATmAb-7 and PATmAb-12)는 GM 옥수수에서 발현되는 PAT 단백질에 특이적으로 반응하는 항체로 확인되었고, 2종의 항체를 이용한 면역분석법과 바이오센서의 개발 가능성을 제시할 수 있었다.

PAT단백질에 대한 항체와 면역분석법의 개발에 관한 연구는 콩에서 주로 발현되는 제초제내성 단백질 CP4-EPSPS에 비해 미흡한 것으로 확인되고 있다. PAT단백질에 대한 항체 및 면역분석법의 개발은 Xu 등[25]이 GM 유채에서 발현되는 PAT단백질을 검출하기 위한 면역분석법의 개발이 유일한 것으로 조사되었다. 그 연구에서는 다클론성 항체(polyclonal antibody)를 생산하여 효소면역분석법을 개발하였고 민감도는 20 ng/mL였다. 본 연구에서 개발된 효소면역분석법의 감도는 0.3 ng/mL로 Xu 등[25]이 보고한 효소면역분석법보다 매우 높은 감도를 가지는 것으로 확인되었다. 추가로 다클론성항체의 경우 민감도 및 특이성이 실험에 사용된 동물에 따른 차이가 크고, 1회성 생산이라는 단점이 있다. 반면에 단크론성 항체는 확보한 hybridoma를 이용하여 일정한 수준의 특성을 가지는 항체를 꾸준히 생산할 수 있다. 따라서 최근의 면역센서 또는 바이오센서 개발 분야에서는 다클론성 항체에 비해 본 연구에서 개발된 단크론성 항체가 더 적합한 것으로 판단된다.

Acknowledgement

본 연구는 2016년도 식품의약품안전처의 연구개발비(15162MFDS055)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구에서는 유전자 변형 옥수수(GM 옥수수)에 특이한 단크론성 항체를 개발하고 이에 대한특성을 확인하는 연구를 수행하고자 하였다. 먼저 형질전환 대장균으로부터 PAT 단백질을 발현시킬 수 있는 시스템을 확립하였고, 재조합 PAT 단백질을 대량 생산하여 항원으로 사용하였다. 준비된 항원을 면역한 결과 재조합 PAT 단백질의 항원성은 매우 높은 것으로 확인되었으며, 세포융합과 클로닝을 통해 12 종의 hybridoma를 확립하였고 western blot 결과 10 종의 hybridoma가 재조합 PAT 단백질과 강한 반응성을 나타내었다. 10종의 hybridoma가 생산하는 항체가 실제 GM 옥수수에 반응하는지를 추가의 western blot으로 분석한 결과 2종의 단크론성 항체(PATmAb-7 and PATmAb-12)가 재조합 PAT 단백질뿐만 아니라 실제 GM 옥수수 중 PAT와 반응하는 것으로 확인되었다. 항체를 대량 생산하고 정제한 후 2종의 항체는 SDS-PAGE 상에서 대표적인 항체의 분리패턴(heavy와 light chain)을 나타내었고, 전형적인 IgG_1과 κ type으로 확인되었다. 정제된 단크론성 항체는 특성을 조사한 결과 다른 GMO에서 발현될 수 있는 재조합 단백질과 non-GM 옥수수 추출물에는 반응성이 없고 PAT 단백질에만 특이적으로 반응하는 것을 확인할 수 있었다. PATmAb-7 를 이용한 간접효소면역분석법의 검출한계는 0.3 ng/mL 수준으로 기준의 유전자변형 콩 면역분석법과 비교했을 때 높은 민감도를 나타내었다. 이상의 결과로 볼 때 개발된 2종의 항체(PATmAb-7 and PATmAb-12)는 GM 옥수수에서 발현되는 PAT 단백질에 특이적으로 반응하는 항체로 확인되었고, 2종의 항체를 이용한 면역분석법과 바이오센서의 개발 가능성을 제시할 수 있었다.

References

1. Bonny, S.: Genetically modied herbicide-tolerant crops, weeds, and herbicides: Overview and impact. *Environ Manag.*, **57**, 31-48 (2016).
2. Chung, K.H.: Genetically Modified Organisms. *Health and Welfare Forum*, 64-73 (2011).
3. Shin, W.S., Kim, M.H.: Optimized condition of genomic DNA extraction and PCR methods for GMO detection in potato. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**, 591-597 (2003).
4. Available from http://foodsafetykorea.go.kr/portal/board/board.do/, Accessed Aug. 29 (2017).
5. Zhu, H.J., Chen, Y., Li, Y.H., Wang, J.M., Ding, J.T., Chen, X.P., Peng, Y.F.: A 90day safety assessment of genetically modified rice expressing Cry1Ab/1Ac protein using an aquatic animal model. *J. Agric. Food Chem.,* **63**, 3627-3633 (2015).
6. Zou, S., Huang, K., Xu, W., Luo, Y., He, X.: Safety assessment of lepidopteran insect-protected transgenic rice with cry2A gene. *Transgenic Res*., **25**, 163-172 (2016).
7. Hooftman, D.A.P., Bullock, J.M., Morley, K., Lamb, C., Hodgson, D.J., Bell, P., Thomas, J., Hails, R.S.: Seed bank dynamics govern persistence of Brassica hybrids in crop and natural habitats. *Ann. Bot.,***115**, 1-11 (2014).

8. Keese, P.: Risks from GMOs due to horizontal gene transfer. *Environ. Biosafety Res.,* **7**, 123-149 (2008).
9. Delaney, B., Karaman, S., Roper, J., Hoban, D., Sykes, G., Mukerji. P., Frame, S.R.: Thirteen week rodent feeding study with grain from molecular stacked trait lepidopteran and coleopteran protected (DP-ØØ4114-3) maize. *Food Chem. Toxicol*., **53**, 417-427 (2013).
10. Devos, Y., De Schrijver, A., De Clercq, P., Kiss, J., Romeis, J.: Bt-maize event MON 88017 expressing Cry3Bb1 does not cause harm to non-target organisms. *Transgenic Res.,* **21**, 1191-214 (2012).
11. Duke, S.O., Lydon, J., Koskinen, W.C., Moorman, T.B., Chaney, R.L., Hammerschmidt, R.: Glyphosate effects on plant mineral nutrition, crop rhizosphere microbiota, and plant disease in glyphosate-resistant. Crops. *J. Agric. Food Chem*., **60**, 10375-10397 (2012).
12. Cao, S.S., Xu, W.T., Luo, Y.B., He, X.Y., Yuan, Y.F., Ran, W.J., Liang, L.X., Huang, K.L.: Metabonomics study of transgenic *Bacillus thuringiensis* rice (T2A-1) meal in a 90-day dietary toxicity study in rats. *Mol. Bio. Syst.,* **7**, 2304-2310 (2011).
13. Ford, C.S., Allainguillaume, J., Fu, T.R., Mitchley, J., Wilkinson, M.J.: Assessing the value of imperfect biocontainment nationally: rapeseed in the United Kingdom as an exemplar. *New Phytologist.,* **205**, 1342-1349 (2015).
14. Ford, C.S., Allainguillaume, J., Grilli-Chantler, P., Cuccato, J., Allender, C.J., Wilkinson, M.J.: Spontaneous gene flow from rapeseed (*Brassica napus*) to wild *Brassica oleracea*. *Proc. Biol. Sci*., **273**, 3111-3115 (2006).
15. Nilufer, D., Boyacioglu, D.: Comparative study of three different methods for the determination of aflatoxins in tahini., *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3375-3379 (2002).
16. Langone, J.J., Van Vunakis, H.: Aflatoxin B; specific antibodies and their use in radioimmunoassay. *J. Natl. Cancer Inst.* **56**, 591-595 (1976).
17. Available from http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/gmfp/docs/SYHT0H2_report.pdf/, Accessed Nov. 4 (2014).
18. Available from https://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/board/boardDetail.do /, Accessed Mar. 24 (2017).
19. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **15**, 680-685 (1970).
20. Shon, D.H.: Development of immunoassay system for the detection of genetically modified soybeans. *Bull. Food Technol.*, **15**, 59-69 (2002).
21. Kohler, G., Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells producing antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495-501 (1975).
22. Mckearn, T.J., Weiss, A., Stuart, F.P., Fitch, F.W.: Selective suppression of humoral and cell-mediated immune responses to rat alloantigens by monoclonal antibodies produced by hybridoma cell lines. *Transplant Proc.*, **11**, 932-935 (1979).
23. George, C.W., Susott, R.A.: Effects of ammonium phosphate and sulphate on the pyrolysis and combustion of cellulose. USDA Forest Service INT-90 (1971).
24. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 4350-4354 (1979).
25. Xu, W.T., Huang, K.L., Deng, A.K., Luo, Y.B.: Enzyme linked immunosorbent assay for PAT protein detection in genetically modified rape. *Chinese J. Agric. Biotechnol.*, **3**, 177-181 (2006).