

초고성능 액체 크로마토그래피와 tanDEM 질량 분석기를 이용한 글리포세이트 내성 유전자 변형 대두 및 옥수수 스크리닝

응용 자료

식품

저자

Wenjuan Zang, Xiangmin Zhang

Department of Chemistry,

Fudan University,

Shanghai, China

Meiling Lu, Shan Zhou

Agilent Technologies (China)

Limited

Beijing, China

개요

많은 국가에서는 소비자의 선택권을 보호하기 위해 유전자 변형(GM) 농작물을 원료로 생산된 식품을 적절히 표시하도록 요구합니다. 이를 위해서는 GM 농작물로 생산된 식품을 스크리닝할 수 있는 적절한 접근법이 마련되어야 합니다. CP4 EPSP 합성효소 유전자는 대두와 옥수수에 글리포세이트 내성을 부여하기 위해 가장 많이 도입되는 유전자 중 하나입니다. 이 응용 자료에서는 일반적으로 사용되는 DNA 분석법을 보완하는 접근법으로 LC/MS/MS를 활용하여 CP4 EPSP 합성 효소의 특정 펩타이드를 검출할 수 있는 방법을 기술하였습니다. 간략히 설명하면, 시료에서 전체 단백질을 추출한 후 SDS-PAGE 분리법으로 특정 단백질을 농축하고 다량으로 존재하는 간접 단백질을 제거하였습니다. 얻어진 단백질 밴드를 잘라 내어 트립신(trypsin)으로 분해 후 용매상으로 추출하고 진공 건조하여 농축한 시료를 LC/MS/MS의 다중 반응 모니터링(MRM) 모드에서 분석하였습니다. 특정 펩타이드 4종과 관련된 MRM 전이 여덟 개를 선정하여 표적 단백질을 모니터링 하였습니다. 이미 알고 있는 대두 종과 음성 대조군을 분석한 결과, 선정된 MRM 전이를 포함한 펩타이드는 GM 종에서만 관찰됨을 확인할 수 있었습니다. 대두와 옥수수 종의 다른 특성을 이용하여 분석법을 추가로 밸리데이션 하였습니다. 밸리데이션 결과 개발된 분석법의 선택성과 감도가 입증되었으며 글리포세이트 내성을 가지는 GM 종을 원료로 생산된 식품을 정성적으로 스크리닝하는 데 활용할 수 있는 것으로 나타났습니다. 또한, 이 접근법을 확장하여 식품 시료내 다른 외인성 또는 내인성 표적 단백질을 검출하는 데 사용할 수 있습니다.



Agilent Technologies

소개

대두, 옥수수, 사탕무, 유채, 토마토 등을 포함한 다양한 GM 농작물이 많은 국가에서 재배되고 있습니다[1]. 이들 작물은 일반적인 해충에 대한 저항력을 가지도록 유전자 변형되었거나, 잡초 방제용 제초제에 대한 내성 유전자를 도입하였습니다[2]. 그러나 GM 농작물 유래 식품이 건강과 환경에 미치는 영향은 아직 명확히 규명되지 않았습니다. 진행 중인 논의의 결론과 무관하게 일반 대중은 어떤 식품이 GM 농작물을 원료로 생산되었는지 알 권리가 있습니다. 따라서, 일부 국가에서는 GM 농작물 유래 식품을 명확히 구분하여 표시하도록 강력히 권고하고 있습니다[3, 4]. 이를 위해 감독 기관은 국내 및 수출입 시장에서 거래되는 식품을 대상으로 GM 농작물 유래 여부를 일상적으로 스크리닝해야 합니다.

GM 농작물 유래 식품의 스크리닝에는 정량적 실시간 형광 PCR(quantitative real-time fluorescence PCR)를 비롯한 전통적인 DNA 기법이 가장 많이 사용됩니다. 이 기법은 도입된 유전자의 특정 염기서열을 검출하지만 [5], 교차 오염 가능성과 일부 가혹한 제조 공정에서 DNA가 분해될 수 있는 문제점을 안고 있습니다. 대안으로, ELISA나 화학 발광 면역 분석법[6, 7]과 같이 도입 유전자의 발현 산물(단백질)을 검출하는, 단백질에 특이적인 기법이 광범위하게 사용되고 있습니다. 이러한 분석법은 특정 항체의 활용성에 의존하므로 비용이 높다는 단점이 있습니다. 최근 단백질체학 분석법의 발전에 힘입어, LC/MS/MS 분석법으로 특정 펩타이드를 검출하여 원하는 단백질을 스크리닝하는 방법이 많은 관심을 받고 있습니다[8]. LC/MS/MS 기법으로 GM 농작물에 도입된 유전자에 의해 발현된 외인성 단백질을 검출할 수 있습니다. 현재 시판 중인 GM 농작물 중에서 글리포세이트 내성을 갖도록 변형된 농작물이 90%를 차지합니다[9]. CP4 EPSP 합성효소를 발현하는 CP4 EPSP 합성 유전자를 도입하여 글리포세이트 내성을 부여할 수 있습니다. CP4 EPSP 합성효소는 광범위하게 사용되는 제초제인 글리포세이트에 대한 내성이 높아, 농작물 생장에 미치는 영향을 최소화하면서 잡초를 제어할 수 있습니다[2]. 이 응용 자료에서는 글리포세이트 내성 GM 농작물을 모델로 사용하여, 일반적인 DNA 기법을 보완하고 GM 식품내 CP4 EPSP 단백질을 높은 신뢰성으로 검출할 수 있는 스크리닝 분석법을 소개하였습니다.

실험

재료 및 시약

Trifluoroacetic acid(TFA)와 acetonitrile, acetone은 HPLC 등급으로 Merck(독일)사 제품을 사용하였습니다. Dithiothreitol과 iodoacetic acid는 분석용 등급으로 Sigma-Aldrich(미국)사에서 구입하였습니다. 탈이온수는 Milli-Q 초순수 제조장치를 사용하여 실험실에서 생산하였습니다. 서열분석용 등급의 변형 트립신은 Promega(미국)사 제품을 사용하였습니다.

추출 및 전처리 방법

대두나 옥수수를 분말 상태로 분쇄하고, 분말 0.10g을 아세톤 침전법(acetone precipitation)으로 처리하여 단백질 침전물을 얻습니다. 침전물을 진공 건조한 후 SDS 로딩 완충용액에 다시 용해시켜 SDS-PAGE로 분리하였습니다. SDS-PAGE에서 분리된 표적 단백질 밴드를 다음과 같이 처리하였습니다.

1. 단백질 밴드를 잘라 내어 50mM ammonium bicarbonate를 함유한 물/acetonitrile 용액(v/v = 1/1)으로 탈색시킵니다.
2. 탈색된 시료는 60°C에서 1시간 동안 10mM dithiothreitol로 환원시킵니다.
3. 50mM iodoacetic acid 용액에서 45분 동안 알킬화시킵니다.
4. 37°C에서 하룻밤 동안 트립신(효소 대 단백질 비율 = 1:40)으로 분해시킵니다.

얻어진 펩타이드는 다음과 같이 처리하였습니다.

1. 0.1% formic acid/60% acetonitrile을 함유한 수용액에서 30분 동안 초음파 처리(sonication)하여 추출합니다.
2. 침전물을 진공 건조시킵니다.
3. 건조된 침전물을 acetonitrile, formic acid, 물 혼합용액(5:0.1:95)에 다시 용해시킵니다.
4. LC/MS/MS의 MRM 모드에서 분석합니다.

LC/MS 조건

표 1. 기기 조건

LC 조건		ESI-MS/MS 조건	
기기	Agilent 1260 Infinity LC System with built-in degasser	기기	Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS system with an Agilent Jet Stream electrospray ionization source
자동 시료 주입기 (autosampler)	Agilent 1260 Infinity Autosampler	이온화 모드	양이온
컬럼 온도 조절 장치	Agilent 1260 Infinity Thermostatted Column Compartment	건조 가스 온도	350°C
컬럼	Agilent ZORBAX SB-C18, 300 Å pore size, 1.8µm particle size, 2.1 × 150mm(id ×L)	건조 가스 유량	10L/분
컬럼 온도	30°C	분무 가스 압력	45psi
이동상	Aqueous solution containing 0.1% formic acid and 5% acetonitrile.	Sheath 가스 온도	250°C
	Aqueous solution containing 0.1% formic acid and 95% acetonitrile.	Sheath 가스 유량	11L/분
유량	0.2mL/min	캐필러리 전압	4,000V
주입량	5.0µL	노즐 전압	500V
Post time	5min	스캔 모드	다중 반응 모니터링
그레디언트 용리 프로파일	0~5min: hold 0 %B; 5~25min: 0 to 45 %B; 25~30min: 45 to 80 %B; 30~35min: hold 80 %B; 35~40min: 80 to 0 %B ramp down		

결과 및 토의

UHPLC 분리와 MS/MS 검출 최적화

EPSP 합성효소 유전자는 mM 농도의 글리포세이트에 견딜 수 있기에[2], 잡초 방제를 위해 농작물에 사용됩니다. EPSP 합성효소의 분자량(MW)은 47.5 kDa이며, 단백질 서열은 표 2에 수록하였습니다[10]. 이 단백질에서 트립신에 의해 분해되는 위치는 총 40개가 있습니다(표 2).

표 2. CP4 EPSP 합성효소 서열(Q9R4E4), 이론적으로 예측된 트립신 분해 위치(빨간색 밑줄로 표시됨)와 MRM 분석을 위해 선정된 특이 펩타이드(파란색)

10	20	30	40	50
MSHGASSRPA	TARK <u>SSGLSG</u>	<u>TVR</u> IPGD <u>KSI</u>	SHRSF <u>MFGGL</u>	ASGET <u>RITGL</u>
60	70	80	90	100
<u>LEGEDVINTG</u>	<u>KAMQAMGARI</u>	<u>RKEGDTWIID</u>	GVGN <u>NGLLAP</u>	EAPLD <u>FGNAA</u>
110	120	130	140	150
TGC <u>RLTMGLV</u>	GYVDFD <u>STFI</u>	GDASLT <u>KRPM</u>	GRVLN <u>NPLREM</u>	GVQVK <u>SEDGD</u>
160	170	180	190	200
<u>BLPVTLRGPK</u>	<u>TPTPITYR</u> VP	MASAQV <u>KSAV</u>	LLAGLNTPGI	TTVIEPIM <u>TR</u>
210	220	230	240	250
DHTE <u>KMLQGF</u>	GANLT <u>VETDA</u>	DGV <u>RTIBLEG</u>	<u>RGKLTGQVID</u>	VPGD <u>PSSTAF</u>
260	270	280	290	300
PLVA <u>ALLVPG</u>	SDVT <u>ILNVLM</u>	NPT <u>RTGLILT</u>	LQEMGADIEV	INPR <u>LAGGED</u>
310	320	330	340	350
<u>VADLR</u> <u>VRSST</u>	<u>LKGVTVPEDR</u>	APS <u>MIDEYPI</u>	LAVA <u>AAFAEG</u>	ATVMNG <u>LEEL</u>
360	370	380	390	400
<u>BVKESDR</u> <u>LSA</u>	VANG <u>LKLNGV</u>	DCDE <u>GETSLV</u>	<u>VRG</u> RP <u>DGKGL</u>	GNAS <u>GAAVAT</u>
410	420	430	440	450
HLD <u>HRIAMS</u> F	LVM <u>GLVSENP</u>	VT <u>VDDATMIA</u>	TSFPE <u>FM</u> DLM	AGLGAK <u>IELS</u>
DT <u>KAA</u>				

먼저 이미 알고 있는 GM 대두(GM_SB) 모델을 사용하여 대두 전체 단백질을 트립신으로 직접 분해한 후, 표적 모니터링을 할 특정 펩타이드 서열을 결정합니다. 그러나 대두에 여러 간접 단백질이 다량 함유된 이유로 표적 단백질과 연관된 펩타이드가 검출되지 않았습니다. 때문에 SDS-PAGE 기법으로 시료를 전처리하여 전체 대두 단백질 시료에 다량 존재하는 간접 단백질을 제거하였습니다. 대두 전체 단백질 시료 32 μ g을 주입한 그림 1의 레인 2를 보시면, 극미량이지만 분자량 47.5KDa에 해당하는 부분(붉은 사각형으로 강조 표시됨)에서 표적 단백질이 분리된 것을 확인할 수 있습니다. 밴드 세기(명암)를 기준으로 분석한 결과, 총 단백질 대비 표적 단백질 비율은 약 0.1%였습니다.

또 다른 GM 대두 종인 MON 87705에서도 비슷한 단백질 밴드가 관찰되었으나, non-GM 종(대조군)인 A3325에서는 밴드가 더 흐리게 나타났습니다(그림 1). 특정 밴드를 잘라내어 트립신으로 분해 후 분석한 결과, 다량 존재하던 대부분 간접 단백질을 제거할 수 있었으며, LC/MS/MS에서 CP4 EPSP 합성효소와 연관된 펩타이드를 성공적으로 검출하였습니다. 특히 표 2에 파란색으로 표시된 펩타이드 4종이 명확히 검출되었습니다. MassHunter 소프트웨어의 peptide optimizer 기능을 활용하여, 원하는 감도를 얻을 때까지 선정된 펩타이드의 MRM 전이를 최적화하였습니다. 사용된 파라미터는 표 3에 요약하였습니다.

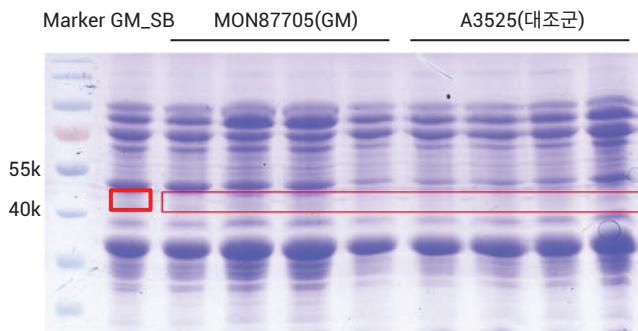


그림 1. SDS-PAGE를 이용한 대두 단백질 분리 빨간색 사각형 표시된 부분은 이론 분자량 47.5KDa에 해당하는 단백질 밴드를 나타냅니다.

표 3. CP4 EPSP 합성효소에 특이적인 펩타이드 측정을 위한 MRM 파라미터

펩타이드	t_R /min	MW/Da	전구 이온 m/z	전구 이온	조각 이온 m/z	조각 이온	조각 이온/V	CE/V
ITGLLEGEDVINTGK	20.41	1557.7	779.9	[M+2H] ²⁺	419.3	y ₄	125	30
ITGLLEGEDVINTGK	20.41	1557.7	779.9	[M+2H] ²⁺	932.6	y ₉	130	30
ITGLLEGEDVINTGK	20.41	1557.7	779.9	[M+2H] ²⁺	1061.5	y ₁₀	125	25
ITGLLEGEDVINTGK	20.41	1557.7	779.9	[M+2H] ²⁺	1174.5	y ₁₁	125	30
LAGGEDVADLR	16.19	1114.5	558.3	[M+2H] ²⁺	288.2	y ₂	130	15
LAGGEDVADLR	16.19	1114.5	558.3	[M+2H] ²⁺	931.5	y ₉	125	25
TPTPITYR	15.18	947.5	474.8	[M+2H] ²⁺	649.4	y ₄	130	15
SSGLSGTVR	6.33	862.4	432.2	[M+2H] ²⁺	689.4	y ₄	125	15

분석법 성능

먼저, 이미 알고 있는 글리포세이트 내성 대두종 MON87705(양성 대조군)와 non-GM 대두종 A3525(음성 대조군)을 사용하여 분석법을 테스트하였습니다. 두 종 모두 선행 연구에서 DNA 기법으로 GM 여부를 밸리데이션하였습니다. 대두 전체 단백질 추출 시료 100 μ g을 겔에

로드하고 표적 단백질 빙대를 잘라 내어 트립신으로 분해한 후 UHPLC/MS/MS로 분석하였습니다. 그림 2에서와 같이, MON87705(GM 종, 기록 b)에서는 선정된 펩타이드 4종과 연관된 MRM 전이에 해당하는 명확한 신호가 검출되었으나, A3525(non-GM종, 기록 a)에서는 신호가 검출되지 않았습니다.

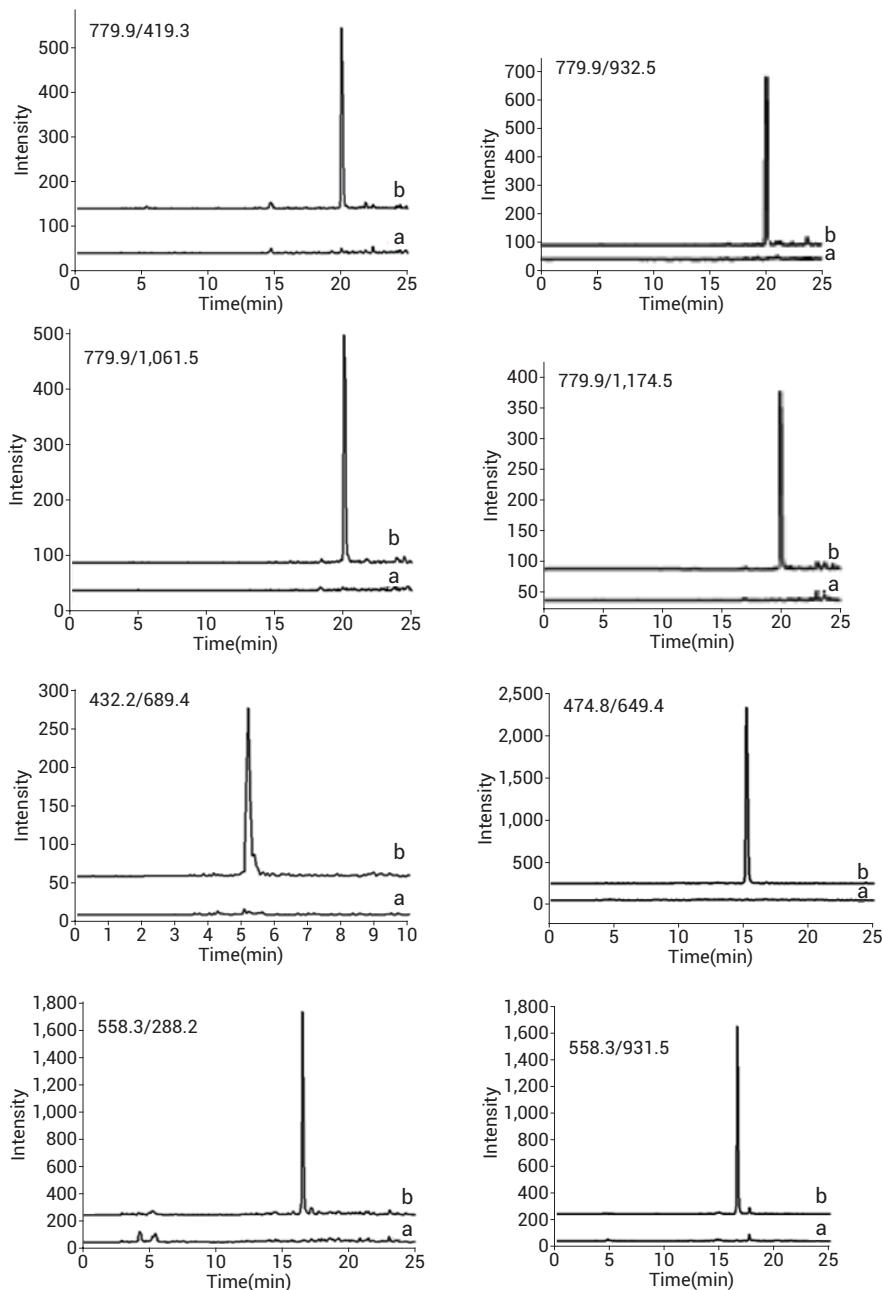


그림 2. 선정된 8개의 추출 MRM 크로마토그램, Non-GM 대두 A3525(a)에서는 신호가 검출되지 않았으며 GM 대두 MON 87705(b)에서는 강한 신호가 검출되었습니다(두 시료 모두 DNA 분석법으로 사전 밸리데이션 되었음).

MRM 크로마토그램에서 신호대 잡음비는 91에서 356 사이였으며, 이 결과는 10배 더 낮은 농도에서도 글리포세이트 내성 대두를 스크리닝 하는데 이 분석법을 사용할 수 있다는 것을 의미합니다. 그림 1에 기반하여 분석한 결과, 전체 단백질 추출물 내 표적 단백질 함량은 0.1%, 표적 단백질의 최저 검출 한계는 0.01 μ g으로 추정되었습니다. 전처리하지 않은 대두 시료 0.1g에서 추출한 전체 단백질을 분석한 결과, 표적 단백질의 최저 검출 한계는 전처리하지 않은 1g 시료당 0.1 μ g으로 추정되었습니다.

다른 대두 및 옥수수 종 분석을 위한 확장 적용

이 연구에서 개발한 분석법을 확장하여 다른 종의 GM 대두 40-3-2와 옥수수 종 NK603 스크리닝에 적용하였습니다. 두 종 모두 선행 연구에서 DNA 분석법으로 스크리닝 및 확인된 바 있습니다. 전처리하지 않은 시료 0.1g을 분석한 결과(그림 3 참고), 두 시료에서 펩타이드 4종과 연관된 MRM 전이 8개가 모두 명확히 검출되었으며 모두 글리포세이트 내성 종이라는 결과를 확인할 수 있었습니다. 이 결과는 DNA 스크리닝 결과와 일치하였습니다. NK603 과 40-3-2에 검출된 동일한 이온 쌍의 상대 세기는 1/2에서 1/3 사이였으며, NK603 종자에 함유된 EPSP 합성효소의 양이 40-3-2보다 적음을 의미합니다.

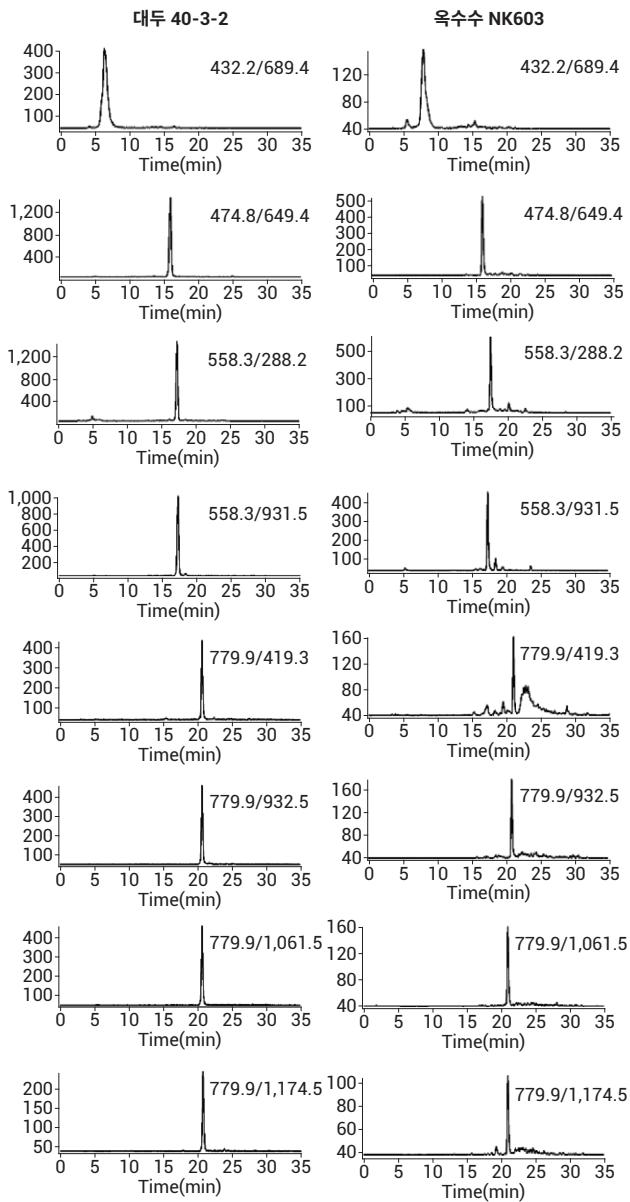


그림 3. 대두 40-3-2(왼쪽)와 옥수수 NK603(오른쪽) 모두 글리포세이트 내성 GM 종이라는 결과를 보여주는 추출 MRM 크로마토그램

무작위 시료 스크리닝

중국에서 유전자 변형 식물 종, 특히 콩과 옥수수의 상업적 재배는 허용되지 않습니다. 지역 대형 마트에서 무작위로 수집한 대두와 옥수수를 이 연구에서 개발한 분석법으로 분석한 결과, 글리포세이트 내성 대두 종은 확인되지 않았습니다. 현지 마트에서 수집한 대두의 전형적인 MRM 크로마토그램을 그림 4에 표시하였습니다. 글리포세이트 내성 종에서 특이적으로 검출되는 펩타이드 4종에 해당하는 피크가 확인되지 않았으며, 머무름 시간 영역(그림 4에서 사각형 점선으로 표시된 부분)을 확대하여 분석한 경우에도 결과는 마찬가지였습니다. 이 결과에 따르면, 무작위로 수집하여 분석한 종은 모두 글리포세이트 내성 GM 종이 아닌 것으로 확인되었습니다.

결론

이 연구에서는 SDS-PAGE로 전처리한 시료를 UHPLC 삼중 사중극자 다중 반응 모니터링 방법으로 분석하여 소량(0.1g)의 대두 또는 옥수수 시료에 극미량으로 존재하는 CP4 EPSP 합성효소를 성공적으로 검출할 수 있는 분석법을 개발하였습니다. 이미 알고 있는 GM 대두 종 MON 87705 와 40-3-2, 옥수수 종 NK603 및 대두 종 A3525(non-GM 대조군)를 사용하여 분석법을 밸리데이션 하였습니다. 현지 마트에서 구입한 대두와 옥수수 종에서 글리포세이트 내성 종은 발견되지 않았습니다. 표적 단백질의 최저 검출 한계는 전처리하지 않은 시료 1.0g 당 0.1 μ g으로 추정되었습니다. 내부 표준 펩타이드를 사용하면 식품 시료내 유전자 도입 단백질 함량을 높은 감도로 정확하게 정량할 수 있습니다. 이 분석법은 다른 글리포세이트 내성 GM 농작물 종을 스크리닝하는데 확장 적용할 수 있습니다. 이 응용 자료에서 소개한 분석법은 식품 시료에 포함된 다양한 외인성 단백질 또는 내인성 단백질을 검출하는 데 확장 적용할 수 있을 것입니다.

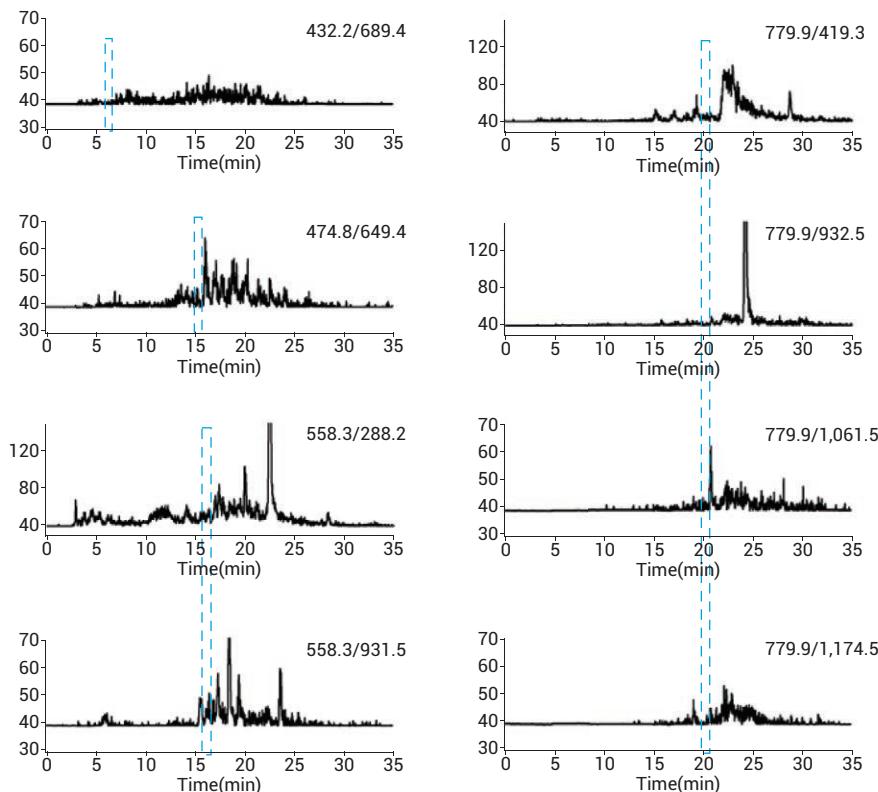


그림 4. 지역 대형 마트에서 구입한 일반적인 시료를 분석한 결과, 선정된 8개의 추출 MRM
크로마토그램에서 CP4 EPSP 합성효소에 특이적인 펩타이드 신호 미검출 사각형 점선으로
표시된 부분은 특정 펩타이드의 머무름 시간 범위를 나타냅니다.

참고문헌

1. A review of the environmental safety of the CP4 EPSPS protein. Center for Environ. Risk Assessment, ILSI Res. Foundation (2010).
2. T. Funke, et al. “Molecular basis for the herbicide resistance of roundup ready crops” *PNAS* **103**(35), 13010-15 (2006).
3. <https://www.loc.gov/law/help/restrictions-on-gmos/eu.php>
4. http://www.moa.gov.cn/fwllm/zxbs/xzxk/bszl/201405/t20140527_3917436.htm
5. M.-A. Fraiture, et al. “Current and new approaches in GMO detection: challenges and solutions” *Biomed. Res. Intern.* **2015** (2015).
6. V. C. AlbrightIII, R. L. Hellmich, J. R. Coats. “A review of Cry protein detection with enzyme-linked immunosorbent assays” *J. Agric. Food Chem.* **64**(11), 2175-2189 (2016).
7. D. L. Ruth, et al. “Immunochemical detection of Cry1A (b) protein in model processed foods made with transgenic corn [J]” *European Food Research and Technology* **229**(1), 15-19 (2009).
8. D. C. Liebler, L. J. Zimmerman. “Targeted quantitation of proteins by mass spectrometry” *Biochemistry* **52**(22), 3797-3806 (2013).
9. S. O. Duke, S. B. Powles. “Glyphosate: a once-in-century herbicide” *Pest. Manag. Sci.* **64**, 319-325 (2008).
10. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9R4E4>

자세한 정보

이러한 데이터는 일반적인 결과를 나타냅니다. 애질런트의 제품 및 서비스에 대한 자세한 정보는 애질런트 웹사이트 (www.agilent.com/chem)를 방문하십시오.

www.agilent.com/chem

애질런트는 이 자료에 포함된 오류 또는 자료의 제공, 이행 또는 사용 등과 관련하여 발생한 부수적인 또는 결과적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2017
2017년 11월 13일
한국에서 인쇄
5991-7804KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies