

# Polymerase chain reaction을 이용한 유전자 변형 식품의 GMO검사기법

문제선, 김형진, 한상배, 이상한, 박성규, 김환묵

대전광역시 유성구 어은동 52번지 305-333  
 한국생명공학연구원 첨단생물소재연구센터 생물활성평가실

인구증가와 이에 따른 식량 부족을 해결하기 위한 방안으로 최소 자원의 투입으로 단위당 생산량을 증가시키기 위한 노력이 경주되어왔다. 1980년대 이전 고전적인 육종 방법에 의한 새로운 품종개발이 이루어져 왔으나, 최근 Biotechnology를 이용한 신기술이 증가하는 식품수요에 대응하는 중요한 수단으로 인식되고 있다. 예를 들어 1999년 미국에서 재배되는 유전자 변형체(Genetically Modified Organism; GMO) 대두는 전체 재배면적의 45%, 옥수수는 40%이상인 것으로 보고되고 있다 (1). 숙성지연 GM-토마토가 최초로 식용으로 허가되어 시판된 이후 대두, 옥수수, 감자 등 많은 수의 GMO가 식품 또는 식품의 원료로서 시판되고 있다 [Table. 1]. GMO를 원료로 하여 생산되는 식품 또는 식품첨가물의 안전성에 대한 논란으로 인해 이들로부터 GMO를 검출하고자 하는 노력이 계속되어 왔으나, 최근 여러 국가가 도입한 표시제 등으로 인하여 그 중요성이 더욱 커질 전망이다.

Table. 1 A summary of the regulatory status for selected genetically modified crop<sup>a</sup>

Crop	Identifier	Trait	*Year
Canola	HCN92	Glufosinate	1996
	GT200	Glyphosate	1996
	NS1473	Imidazolinon	1995
	NS738	Imidazolinon	1995
	23-18-17	Oil content	1994
Flax	Oxy-235	Oxynil	1997
Maize	FP967	Sulfonylurea	1996
	Mon810	ECB	1995
	176	ECB+Glufosinate	1995
	DK4045R	Cyclohexanone	1996
	Mon802	ECB+ Glyphosate	1997
	MS6	MS+ Glufosinate	1999
Papaya	55-1/63-1	Virus Resistant	1996
Potato	RBMT21-129	CPB+virus Resistant	1999
Rice	LLRICE06	Glufosinate	1999
Soybean	W62, W98	Glufosinate	1996
	GTS40-3-2	Glyphosate	1994
	G94-1	Oil content	1997
	ZW20	Virus Resistant	1994
Squash	T120-7	Glufosinate	1998
Sugar beet	GTSB77	Glyphosate	1998
Tomato	FLAVR SAVR	Delayed ripening	1992
Wheat	SWP965001	Imidazolinon	1998

(Agriculture & Biotechnology Strategies Inc.)

\*Year: Planting year. <sup>a</sup> Abbreviations: ECB, European corn borer; MS, Mail sterility; CPB, Colorado potato beetle;

EU는 대두나 옥수수를 원료로 하는 식품에서 GMO의 함량이 1%를 초과할 경우 “Genetically Modified” 라는 표시를 의무적으로 하도록 되어있다. 가까운 일본의 경우 타가수정의 특성을 가진 옥수수를 제외하고 GM-대두의 함량이 5%를 초과할 때 식품에 표시하도록 규정하고 있다. 우리나라에서는 현재 식품의약품안전청에서 유전자 재조합 콩, 콩나물, 옥수수를 주원료로 하는 27개 품목에 대해 표시제를 실시하고 있다. 식품에 첨가된 GMO의 정확한 함량을 검출하는 방법의 개발은 이러한 GM-food 표시제의 이행, 수출입 등 국제교역에 있어서 필수적이라 할 수 있다.

GM-food와 non-GM-food와의 차이를 식별하기 위해서는 도입 유전자 또는 발현된 단백질의 검출에 의존 할 수밖에 없다. 형질전환 과정에서 사용되는 도입유전자는 일반적으로 세 가지 요소로 되어있다. 도입유전자

Table 2. Summary of methods that specifically detect recombinant DNA products produced by GM-foods

Parameter	DNA-based				Protein-based		
	Southern Blot	Qualitative PCR	QC-PCR limiting dilution	Real-time PCR	Western blot	ELISA	Lateral flow strip
Ease of use	Difficult	Difficult	Difficult	Difficult	Difficult	Moderate	Simple
Special equipment	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
Sensitivity	Moderate	Very high	High	High	High	High	High
Duration	6 h	1.5d	2d	1d	2d	30-90 min	10 min
Cost/sample(\$)	150	250	350	450	150	5	2
Quantitative	No	No	Yes	Yes	No	Yes	No
Field test	No	No	No	No	No	Yes	Yes

(23)

의 전사를 on/off하는 promoter, coding region, 전사의 stop signal로서 기능을 하는 terminator로 구성되어있다. 형

1. Sampling of material to be analyzed
2. Homogenizing the sample
3. Isolation and purification of DNA, RNA or protein
4. Detection of DNA, RNA or protein
  - a. PCR based methods
    - i) PCR amplification of target DNA
    - ii) Detection of amplified DNA
  - b. RNA based methods
    - i) Conversion of RNA to cDNA
    - ii) PCR amplification of cDNA
    - iii) Detection of amplified cDNA
  - c. Protein based methods
    - i) Mix with reagents, incubate, rinse
    - ii) Detection of color reaction
5. Identification of the detected molecule  
by size, hybridization, color, intensity, fragments..
6. Quantification to determine amount of GMO, if applicable
7. Interpretation and expression of results

Figure 1. The stepwise process of analyzing for the presence of GMO or GMO derivatives in foodstuffs

질 전환된 곡물이나 그 외 식품의 원료로 사용되는 GMO를 분석, 검출하는 방법은 이들 DNA 분자와 이로부터 발현되는 protein을 확인하는 것이다 [Table. 2]. 각각의 방법에 따라 검출한계, 현장적용의 용이성, 감도 등에 차이를 나타낼 수 있으나 가장 널리 채택되고 있는 방법들이다. GM-food에서 RNA를 검출 대상으로 고려해 볼 수도 있겠으나 가공과정을 거친 식품에서 이를 검출하는 것은 불안정한 RNA의 특성을 고려해 볼 때 현실적으로 거의 불가능하다. GM-food 여부를 판별하기 위해 일반적으로 수행되는 단계별 실험과정은 Fig. 1에 간략히 제시되어있다.

**Table 3.** Examples of published methods to detect GMO derivatives grouped according to categories of specificity

Type of method	Target sequence	References
Method to detect plant derived DNA	Chloroplast tRNA <sup>eu</sup> gene (trnL) intron	(12)
Method to detect Specific plant species	Corn/maize invertase gene(1 copy)	(13)
	Soybean lectin gene(1 copy)	(14)
	Tomato polygalacturonase gene(1 copy)	(15)
General screening methods	CaMV 35S promoter	(16)
	Nopaline synthase terminator	(16)
Gene specific methods	Phosphotricin acetyltransferase gene	(13)
	Cry1A(b) synthetic gene	(13)
Construct specific methods	Bt11: Junction between alcohol dehydrogenase 1S intron IV6 and cry1A(b) gene	(17)
	Bt176: Junction between CDPK promoter and cry1A(b) gene	(18)
	GA21: OTP(enhancer) and EPSPS	(17)
	Mon810:CaMV 35S promoter and hsp70	(19)
	Mon810:hsp70 and Cry1A(b)	(17)
Event specific methods	Bt11: Junction between host plant genome and integrated recombinant DNA	(20)
	RR soybean: Junction between host plant genome and integrated recombinant DNA	(21)

(Entransfood; working group)

도입된 유전자로부터 발현되는 단백질을 검출하는 immuno assay 방법은 현장에서 직접 그 결과를 볼 수 있는 quick stick이나 lateral flow strip 등의 형태로 상용화되어 출시되고 있다. 이에 대한 검출방법, 원리, 감도 등은 추후에 논의하기로 하고 여기에서는 PCR에 의한 검출에 대해서 논의하기로 하겠다.

### PCR

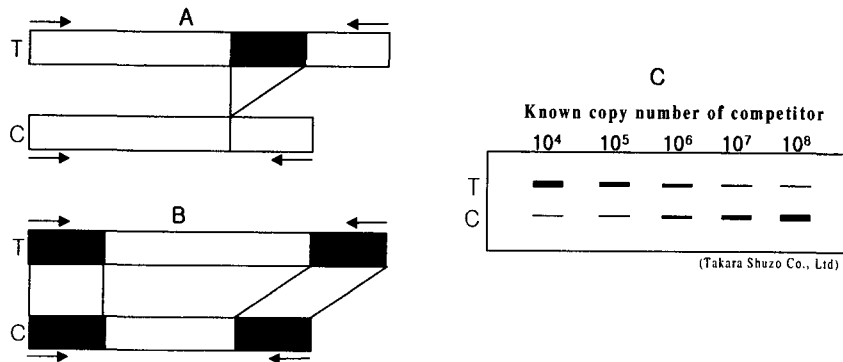
GM-food에서 DNA의 검출법으로 가장 널리 사용되고 있는 Polymerase chain reaction (PCR)은 식품으로부터 추출된 DNA를 template로 하여 도입 유전자의 nucleotide sequences에 특이적으로 결합하는 primer를 제작하여 DNA를 증폭함으로써 제한된 시료로 수 시간 이내에 정성 및 정량분석이 가능한 방법이다. 그러나 DNA

의 절단이나 분해를 촉진하는 nuclease, low pH, heating 등 식품에 존재하는 이러한 요소들로 인해 PCR의 template로 사용 가능한 DNA를 추출하는 것이 검출의 성패를 결정할 수 있다. 실제 식품에서 추출된 DNA를 template로 PCR 분석을 할 경우 세포 또는 조직에서 추출된 DNA와 달리 평균 ~400bp 보다 큰 size의 DNA를 증폭하는 것은 용이하지 않은 것으로 나타났다 (2). Table. 3에 요약된 바와 같이 PCR 분석 방법은 식품에 GMO의 혼입 여부는 물론, 특정 도입 유전자나 immuno assay로 확인이 불가능한 GM Event를 판별할 수도 있다.

### Qualitative PCR

정성분석을 위한 표준 PCR은 증폭된 DNA를 agarose gel에서 확인하여 식품에 GM원료의 첨가유무를 판별하는 방법이다. PCR에 의해 증폭된 DNA는 아래 나열된 여러 가지 다른 분석 방법에 의해 target DNA 여부를 확인 할 수 있다. 증폭된 target DNA의 sequence에 특이적으로 결합할 수 있는 primer로 확인하는 nested PCR, DNA probe를 이용한 southern hybridization, 제한효소로 증폭된 target sequences를 절단하는 방법, 직접 증폭된 DNA의 염기서열 결정 등을 들 수 있다.

도입 유전자의 특정 부위를 PCR에 의해 증폭할 경우 각각의 구성요소(promoter or coding region or terminator)의 일부나 두 구성요소의 flanking sequence를 증폭할 수 있다. 그러나 이러한 구성 요소들이 비록 non-GM-food에 포함되어 있지 않지만, 자연계에 흔히 존재하고 분석 실험실에서 빈번히 사용되는 material이므로 오염에 의해 PCR분석 결과가 false-positive로 나타날 수 있다. 식용으로 허가되어 시판되고있는 GM-작물들에



**Figure 2.** Commonly used competitors and the quantification of initial concentration of target DNA in a sample by competitive quantitative PCR. A. Homologous competitor; It has the same nucleotide sequences as the target DNA, but contains an insertion or a deletion, or has a different restriction site introduced by site-specific mutagenesis. B. Heterologous competitor; It has nucleotide sequences different from the target DNA except for the sequences of the primer binding site. C. Quantification of target DNA; When the target DNA and competitor are amplified, both will compete for the same set of primers. Because of the competition, the ratio of the amounts of the two amplified products reflects the ratio amounts of the target DNA and competitor.

가장 빈도가 높게 포함되어 있는 CaMV(Cauliflower Mosaic Virus) 35S promoter와 NOS(Nopaline synthase) terminator를 Roundup Ready soybean에서 추출한 DNA로부터 증폭하여 비교 분석한 최근 연구결과에 의하면, NOS terminator 부위를 증폭할 경우 상대적으로 높은 빈도의 false-negative 결과가 나타났다 (3). 또한 multiplex-PCR(동일한 reaction에서 둘 이상의 amplicon을 증폭)방법을 이용하여 한 reaction에서 다수의 GM event들을 검출 할 수도 있겠으나 (4) GM-food에서 이를 적용하여 GMO의 혼입 여부를 판별하는데에는 현실적으로 기술적인 한계가 있다.

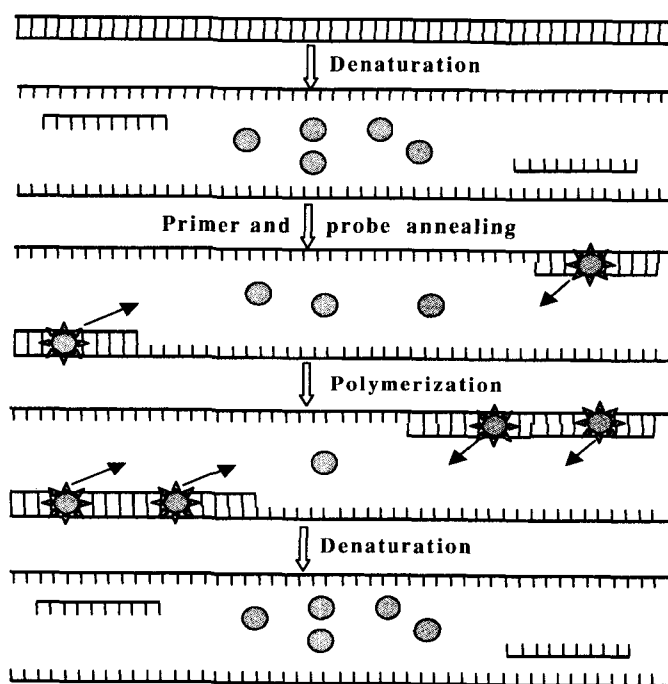
### Quantitative competitive PCR

EU등은 소비자의 알 권리 보호를 위해 GM-food에 표시제를 도입하여 GMO의 혼입량을 규제함에 따라 PCR을 이용한 정량 분석방법의 중요성은, 과학적인 분석의 측면은 물론 사회, 경제적으로도 매우 큰 영향을 미칠수 있다. 위에서 논의한 정성분석방법과 달리 Quantitative competitive PCR은 이미 농도가 정해진 competitor(internal DNA standard)와 알려지지 않은 농도의 target DNA를 co-amplify하여 증폭된 DNA량을 비교하여 target DNA의 starting 농도를 결정 할 수 있다 [Fig. 2]. 사용될 competitor의 형태에 따라 이를 제작 할 때 hairpin structure생성 가능성을 유의하는 것 외 모든 과정이 표준 multiplex-PCR과 비교할 때 큰 차이는 없다. Competitor와 target DNA의 증폭과정에서 나타나는 두 종류의 DNA간의 competition이 이 방법의 정량분석을 위한 기본원리인 반면 이로 인해 분석의 효율이 감소되는 단점이 있으나, 최소 0.1% GMO DNA함량까지 정량 분석이 가능하다 (5). 일반적으로 이 PCR방법에 의해 정확한 정량분석 결과를 반복적으로 얻기 위해서는 10배로 희석된 4가지 template DNA (즉, 0.1, 1, 10, 100%GMO)를 사용하여 적어도 5 replicate를 분석해야 하는 것으로 나타났다 (6).

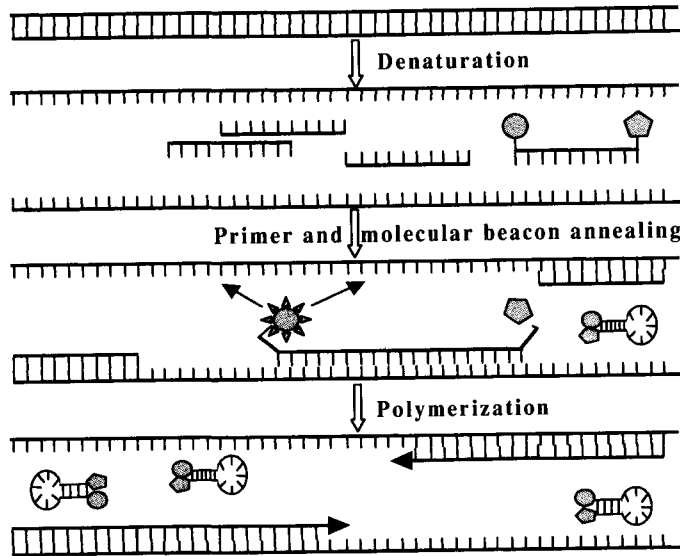
### Quantitative real-time PCR

지금까지 논의된 정성 및 정량분석 PCR방법들은 일종의 end-point 분석법으로 최종적으로 증폭된 target DNA 산물을 확인 또는 비교함으로써 food에 GMO 혼입의 여부 또는 정도를 확인하였다. Quantitative competitive PCR이 가진 단점중의 하나인 plateau effect를 보완함과 동시에 정량 분석이 가능한 PCR법이 최근 개발되어 여러 분야에서 사용되고 있다. 표준 PCR법과 비교할 때 real-time PCR은 dye 또는 probe로 반응의 특이성을 확보하고 여러 가지 표준 PCR의 단점을 보완하여 정량분석을 가능하게 한 PCR 방법이다. 실시간으로 매 cycle마다 filter를 통해 결과를 수집해야하는 특성으로 현재 모든 분석과정이 자동화 되어있다. Fluorescence technique을 적용하여 매 cycle마다 reaction kinetics를 monitoring 하여 유의한 정도의 fluorescence signal이 background signal이상으로 증가되는 threshold cycle(Ct) (7) 을 결정하고, plateau phase에 도달하기 전에 reference와 target의 Ct값, standard curve를 비교하여 target DNA를 정량 할 수 있다. 이러한 Real-time PCR법은 서로 다른 format을 선택하거나 probe hybridization 또는 melt curve analysis (8)를 통해 nonspecific PCR product에 의한 fluorescence signal을 최소화 할 수 있다 (9).

**Dye incorporation;** Real-time PCR의 여러 format 중에서 가장 간단한 방법으로 double-stranded DNA에 binding하는 fluorescence dye의 일종인 SYBR Green을 사용하여 polymerization의 마지막 step에서 발생하는 signal을 측정하여 target DNA를 정량 하는 방법이다 [Fig. 3]. Target specific probe를 필요로 하지 않아 간단한 방법이지만, primer의 specificity에 따라 반응의 특이성이 결정되므로 일반 PCR과 유사한 정확도를 가지고 있어 정확한 정량을 위해 melting curve analysis는 필수적이라 할 수 있다.

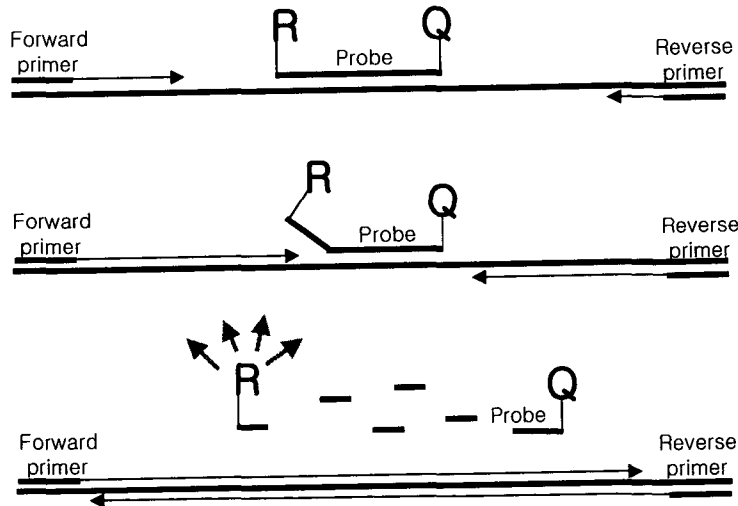


**Figure 3.** Dye incorporation assay. During denaturation, unbound SYBR Green I dye exhibits little fluorescence. At the annealing temperature, a few dye molecules bind to the double-stranded primer/target, resulting in light emission upon excitation. During the polymerization step, more and more dye molecules bind to the newly synthesized DNA, and the increase in fluorescence can be monitored in real-time (22).



**Figure 4.** The molecular beacons assay. Molecular beacons are designed to be complementary to a sequence in the middle of the expected amplicon. During the denaturation step, the molecular beacons assume a random coil configuration and fluoresce. As the temperature is decreased to allow annealing of the primers, stem hybrids form rapidly, preventing fluorescence. However, in the presence of target, molecular beacons also bind to the amplicons and generate fluorescence. When the temperature is increased for the primer extension step, the molecular beacons dissociate from their targets, and fluorescence is again quenched. A new hybridization takes place in the annealing step of every cycle, and the intensity of the resulting fluorescence indicates the amount of accumulated amplicon at the end of the previous cycle (22).

**Molecular beacons;** Stem-and-loop structure를 가진 hybridization probe를 이용한 Real-time PCR 방법으로, hairpin에 해당되는 부위는 target DNA의 염기서열에 complementary하고 loop의 양 말단에 reporter와 quencher가 각각 부착되어 있는 probe (10)를 사용한다 [Fig. 4]. Annealing temperature에 도달하게 되면 probe/target DNA hybrid상태로 fluorophore와 quencher를 분리 시켜 fluorescence를 발생하게된다. 이 방법에 의한 정량분석의 정확도는 dye incorporation보다 높으나 적절한 probe의 제작이 정확한 정량분석의 관건이고 각 probe의 thermal denaturation profile을 확인해야 하는 번거로움이 있다.

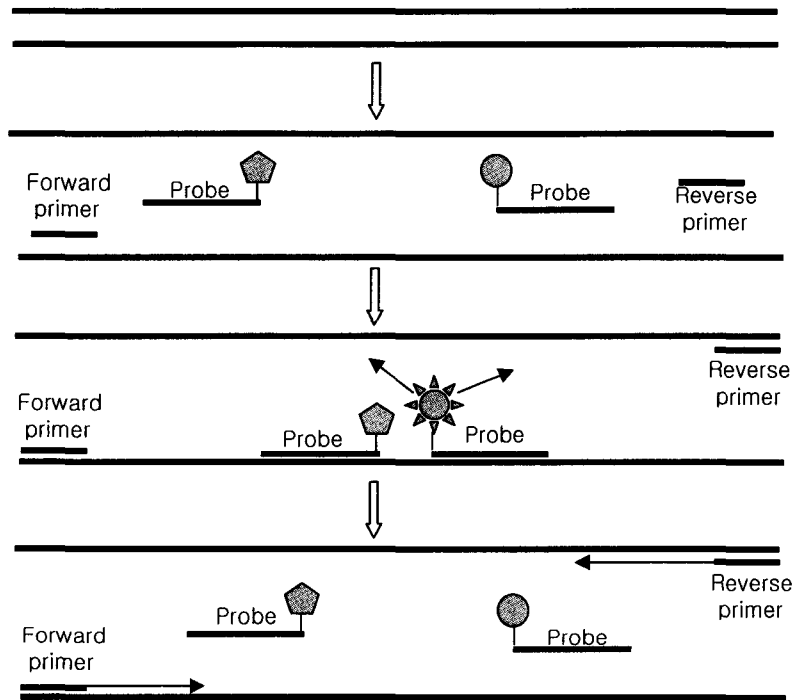


**Figure 5.** The taqman assay. Three parameters affect the performance of the 5'-nuclease assay: the quenching of the intact probe, its hybridization efficiency and efficiency of cleavage by the polymerase. After denaturation, primers and probe anneal. The proximity of the two dyes quenches the signal from the fluorescent dye at the 5' end of the probe. Polymerization proceeds at the same temperature as the annealing step. The polymerase displaces and hydrolyses the labelled probe. The fluorescent dye is released from its proximity to the quencher, and fluorescence is detected. This signal is directly proportional to the number of molecules present at the end of the previous or beginning of the current cycle (22).

발생하게 된다. 이 방법에 의한 정량분석의 정확도는 dye incorporation보다 높으나 적절한 probe의 제작이 정확한 정량분석의 관건이고 각 probe의 thermal denaturation profile을 확인해야 하는 번거로움이 있다.

**Taqman probes;** Taqman probes는 target DNA에 결합하여 PCR반응의 특이성을 높이고 근접한 거리에 위치한 quencher가 reporter dye의 형광방출을 억제한다는 점에서 molecular beacons과 유사하지만, probe가 부여하는 원리는 Taq polymerase의 double-stranded DNA에 대한 5'-exonuclease activity (11)를 이용한다는 점에서 그 차이를 찾아 볼 수 있다 [Fig. 5]. PCR의 annealing/extension step에서 probe가 amplicon에 결합되어 있을 때 5'-end에 위치한 reporter는 3'-end의 quencher에 의해 형광발산이 억제된다. Extension step과정에서 polymerase가 probe/target DNA hybrid duplex에 도달하게 되면 5'-exonuclease activity에 의해 strand substitution이 일어나며, 이 과정에서 probe분해의 결과로, reporter와 quencher간의 적절한 간격에 의해 유지되어 오던 quencher의 억제효과가 제거되어 발산되는 reporter fluorescence를 측정하게 된다. Molecular beacons을 probe로 이용하는 방법과 달리 primer와 probe의 target DNA 결합이 coupled되어 반응의 특이성이 높은 장점이 있다.





**Figure 6.** Hybridization probe assay. During the denaturation step, both hybridization probe remain in solution and separate. Any emission from fluorescein is at 530 nm, and is disregarded by the detector. During the annealing step, the probes hybridize in a head-to-tail arrangement, the two dyes comes in close proximity and the emitted energy excites the second dye, which emits red fluorescent light at a longer wavelength. At the polymerization temperature, both probes return into solution and any emissions from fluorescein are ignored.

**Hybridization probes;** 이 방법에 의한 real-time PCR은 반응의 특이성을 최대화하기 위하여 위에 언급된 방법들과 달리 두 개의 probe를 동시에 사용한다 [Fig. 6]. Donor fluorophore와 acceptor가 각각의 probe 말단에 위치하여 head-to-tail 배열 상태로 target DNA에 결합할 때에만 energy 전달이 가능한 거리에 놓이게 된다. 따라서 PCR반응의 결과로 증폭된 target sequences의 양에 비례하여 fluorescence가 증가하므로 target DNA 이외의 DNA가 증폭될 경우에도 두 개의 probe가 근접한 거리에 위치하여 false결과의 생성이 거의 불가능하다. 또한 taqman assay에서 보여진 probe의 hydrolysis가 없어 melting curve를 만들 수 있는 장점도 있다.

식품에서 유전자변형체를 검출하기 위해 효율적이고 높은 감도를 가진 PCR이 빈번히 사용되어왔다. 위에서 논의된 바와 같이 그 응용 범위가 넓은 PCR 방법이 식품에서 GMO를 검출하고, 정량 및 정성분석의 중요한 도구로서 이용될 수 있다.

## References

1. Beachy, R. N. (1999) Facing fear of biotechnology. *Science* 285, 335
2. Meyer, R. (1999) Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control* 10, 391-399
3. Haslberger, A. G. (2000) Monitoring and labeling for genetically modified product. *Science* 287, 431-432
4. Matsuoka, T. H. et al. (2001) A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize. *J. Food Soc. Japan* 42, 24-32
5. Hardegger, M. et al. (1999) Quantitative detection of the 35S promoter and the NOS terminator using quantitative competitive PCR. *Eur. Food Res. Technol.* 209, 83-87
6. Hubner, P. et al. (2001) Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. *J. AOAC International* 84(6), 1855-1864
7. Higuchi, R. et al. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11, 1026-1030
8. Ririe, K. M. et al. (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 245, 154-160
9. Ahmed, F. E. (2000) Molecular markers for early cancer detection. *J. Environ. Health C18*, 75-125
10. Tyagi, S. & Kramer, F. R. (1996) Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology* 14, 303-308
11. Heid C. A. et al. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6, 986-994
12. Taberlet, P. et al., (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Bio.* 17, 1105-1109
13. Ehlers, B. et al., (1997) Nachweis gentechnischer Veränderungen in Mais mittels PCR. *Bundesgesundhbl.* 4, 118-121
14. Meyer, R. et al., (1996) Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 203, 339-344
15. Busch, U. et al., (1999) Screening- und spezifische Nachweismethode für transgene Tomaten (Zeneca) mit der Polymerasekettenreaktion. *Deutsche Lebensmittelrundschau*, Heft 2, 52-56
16. Pietsch, K. et al., (1997) Screeningverfahren zur Identifizierung "gentechnisch veränderter" pflanzlicher Lebensmittel. *Deutsche Lebensm. Rundsch.* 93, 35-38
17. Matsuoka, T. et al., (2001) A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically

- modified maize. J. Food Hyg. Soc. Japan 42, 24-32
18. Hupfer, C. et al., (1998) Detection of the genetic modification in heat treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. Lebensm. Unters. Forsch. 206(A), 203-207
  19. Zimmermann, A. et al., (1998) A sensitive detection method for genetically modified MaisGard corn using a nested PCR-system. Lebensm.-Wiss. u. Technol. 31, 664-667
  20. Zimmermann, A. et al., (2000). Event specific transgene detection in Bt11 corn by quantitative PCR at the integration site. Lebensm.-Wiss. u. Technol. 33, 210-216.
  21. Berdal, K. & Holst-Jensen A. (in press). RoundupReadyR soybean event specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses. Eur. Food Res. Technol.
  22. Bstn, S. A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J. Mol. Endocri. 25. 169-193
  23. Ahmed, F. E. (2002) Detection of genetically modified organisms in foods. TRENDS in Biotechnology 20(5), 215-223