

PCR을 이용한 국내시장에 유통중인 유전자재조합 콩 및 가공식품의 모니터링

김요영 · 김재환 · 김현중 · 박선희¹ · 우건조¹ · 김해영*

경희대학교 생명과학대학, 식품의약품안전청 식품미생물과¹

(2003년 8월 4일 접수, 2003년 10월 22일 수리)

본 연구에서는 PCR을 이용하여 국내시장에 유통중인 원료콩과 가공식품에 *epsps* 또는 *pat* 유전자가 삽입된 유전자재조합 콩(GMS)의 사용여부를 모니터링하였다. 이러한 GMS의 검출을 위해 3쌍의 primer set을 제작하였고, 각각의 primer들은 GMS에 삽입된 유전자와 특이적으로 반응하여 PCR산물을 생성하였다. 2001년 표시제가 시행되기 이전에 생산된 콩 가공식품과 이후의 제품에 대해 각각 모니터링을 수행하였으며, 표시제 이전에 생산된 제품의 경우 대부분의 미국산 원료에서 *epsps*가 삽입된 GMS가 검출되었으나, 표시제 이후에는 검출되지 않았다.

Key words: 모니터링, 유전자재조합 콩, *epsps*, *pat*, PCR

서 론

생명공학기술의 발달로 제초제에 대한 저항성, 병충해에 대한 저항성, 또는 저장성 및 영양학적으로 향상된 특성을 갖는 유전자재조합작물(genetically modified organism, GMO)을 개발하고, 실용화하는 단계까지 이르렀다.¹⁻³⁾

2003년 3월까지 세계적으로 상품화 등록된 GMO는 대두, 옥수수, 감자, 면화, 토마토 등 16개 작물 75개 품종으로 알려져 있다. 이 가운데 유전자재조합 콩의 경우 상품화된 것은 *epsps* (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) 유전자를 삽입하여 glyphosate 제초제 내성^{4,5)}을 지니게 한 Monsanto사의 제품과 *pat*(Phosphinothricin acetyltransferase) 유전자를 삽입하여 glufosinate ammonium 제초제 내성^{6,7)}이 있는 Aventis Crop Science사의 제품 등이 알려져 있다. 이러한 유전자재조합 콩은 그 자체로서 뿐만 아니라 두부, 두유, 콩기름, 된장, 스낵류 등의 가공식품형태로 광범위하게 소비되고 있다.

유전자재조합식품의 유통 허용 확대와 소비자의 관심의 증대에 따라 우리나라에서도 2001년 3월부터 원료농산물과 7월부터 가공식품에 대해 각각 GMO 표시제도를 시행하고 있기 때문에, 이러한 유전자재조합식품의 표시의 타당성 확인이나 시중유통현황을 알기 위한 모니터링 방법의 확립이 필요하다.

모니터링을 위한 유전자분석기술개발 연구는 특정유전자 검출을 위한 PCR방법과 특정단백질을 이용한 면역학적 방법이 국내외적으로 활발히 진행되고 있다.⁸⁻¹⁰⁾ 특히 가공식품에 적용하기 위한 방법으로는 PCR을 이용한 정성, 정량적 방법을 중심으로 연구 개발되고 있다.¹¹⁻¹²⁾

그러므로, 본 실험에서는 식품 가공산업에 많이 활용되는 농산물중의 하나인 콩의 유전자재조합기술 사용 여부를 PCR을 이

용하여 모니터링 하는 방법을 확립하고자 하였다. 표준물질로는 상품화되어 시중에 유통가능성이 있는 유전자재조합 콩들에 삽입된 *epsps*와 *pat* 유전자를 표준물질로 이용하였다. 삽입된 유전자와 대조구 유전자들을 기본으로 하여 한번의 반응으로 두 종류의 GMS를 구별할 수 있는 multiplex PCR 검출법에 적용 가능한 oligonucleotide primer를 제작하여 시중에 유통 중인 원료콩과 가공식품들을 표시제가 시행된 2001년 7월을 기준으로 표시제 전과 표시제 후의 GM 콩 여부를 모니터링 하였다.

재료 및 방법

재료. PCR을 통한 *epsps* 유전자가 삽입된 GM soybean (GMS)와 non-GMS의 검출법에 사용한 시료는 Fluka(Munich, Germany)사로부터 구입하였고, *pat* 유전자가 포함된 시료는 Aventis 사의 GMS와 동일한 *pat* 유전자가 삽입된 T25 옥수수 표준시료¹³⁾를 일본총합연구소의 Hino 박사로부터 분말형태로 제공받아 이용하였다. 콩 가공식품류의 경우 2001년 이전 제품은 본 연구실에서 냉동건조하여 보관중인 시료를 사용하였고, 최신제품은 식품매장에서 구입하였으며 수분이 있는 시료는 냉동건조하여 분말형태로 제조한 후 사용하였다.

Primer의 제작. GMS 검출을 위한 primer들은 Fig. 1과 같다. 이와 같이 primer들은 GMS에 인위적으로 삽입된 glyphosate(N-phosphono-methylglycine)에 강한 저항성을 갖는 *Agrobacterium tumefaciens* CP4의 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase(*epsps*) gene^{4,5)}과 glufosinate ammonium에 저항을 갖는 *Streptomyces viridochromogenes*의 Phosphinothricin acetyltransferase(*pat*) 유전자^{6,7)}를 근거로 제작하였으며, 대조구 유전자를 확인하는 primer로는 콩에 존재하고 있는 ferritin gene¹⁴⁾을 이용하여 제작하였고, 이들 각각에 대한 유전자 배열은 Table 1에 나타내었다.

DNA의 추출. 원료콩과 콩 가공식품들에서 DNA의 추출은 기존에 보고된 Hexadecyl-trimethyl-ammonium-bromide(CTAB)

*연락처

Phone: 82-31-201-2660; Fax: 82-31-204-8116

E-mail: hykim@khu.ac.kr

Table 1. Sequences of primers used for soybean in this experiment

Primer names	Primer sequences	References
EPSPS 5'	5'-CCTTCATGTTCCGGCGTCTC-3'	(8)
EPSPS 3'	5'-CGCCTTCCCTTACGGATCCTG-3'	
PAT 5'	5'-AAGAGTGGATTGATGATCTAGAGAGGT-3'	(13)
PAT 3'	5'-ATGCCTATGTGACACGTAAACAGTACT-3'	
Ferritin 5'	5'-GGCTCTTGCTCCTTCCAAAGT-3'	This study
Ferritin 3'	5'-CGAGCCAGCGAGACTTGGGGAGC-3'	

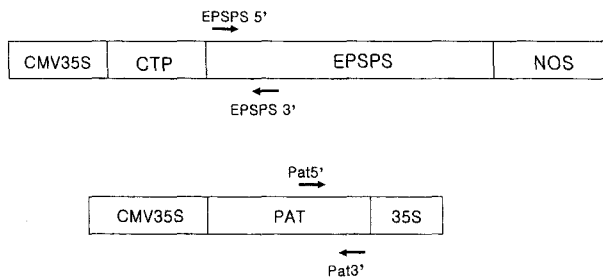


Fig. 1. Schematic diagram of designed PCR primers. CMV35S: Cauliflower mosaic virus 35S promoter, CTP: Chloroplast transit peptide of *Petunia hybrida*, EPSPS: 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of *Agrobacterium tumefaciens*, NOS: nopaline synthase terminator of *A. tumefaciens*, PAT: Phosphinothricin acetyltransferase of *Streptomyces viridochromogenes*, 35S: CMV 35S poly-A signal.

방법¹⁵⁾과 Qiagen 사의 DNeasy Plant Mini kit를 이용하였다. 실험에 이용된 건조시료는 액체질소를 이용하여 파쇄한 후 이용하였고, 수분이 포함된 시료는 냉동건조 후 오염되지 않게 파쇄하여 잘 혼합하여 사용하였다. 각각의 시료는 0.1 g씩 3개의 tube로 나누어 각각 DNA 추출에 이용하였다. 추출된 DNA 들은 UV-spectrophotometer(220S, Hitachi, Japan)를 이용하여 260 nm에서 정량하여 사용하였다. 한편 추출한 DNA는 0.8%의 agarose gel상에서 50 volt로 30분 동안 전기영동하여 추출된 DNA의 상태를 확인 하였으며, marker로는 λ -Hind III(Gibco-BRL, USA)를 사용하였다.

PCR 조건. PCR을 위한 반응용액은 한 시료 당 25 μ l씩 3개를 준비하여 사용하였다. 반응용액 조성은 10 \times PCR buffer 2.5 μ l(TaKaRa, Japan), sense primer 1 μ l(10 pM), antisense primer 1 μ l(10 pM), dNTP 0.5 μ l(10 pM, Gibco-BRL, USA), Taq DNA polymerase(TaKaRa, Japan) 1 unit(0.2 μ l), template DNA는 농도에 따라 1 μ l 부피로 희석하여 thermocycler(MJ Research, USA)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건으로 첫 cycle에서 3분간 95 $^{\circ}$ C에서 수행을 한 후, 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 60 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 40 cycle을 수행하였으며, 마지막 단계로 72 $^{\circ}$ C에서 8분간 수행한 후, 4 $^{\circ}$ C에서 PCR 산물을 보존하였다. PCR 산물은 3% agarose gel상에서 전기영동 후, Image analysis system(Bioneer, Korea)을 사용¹⁶⁾하여 산물의 크기 및 양을 확인하였다.

PCR 산물의 DNA 염기서열 비교. PCR 산물의 DNA 염기서열을 확인하기 위해 agarose gel에서 PCR 산물을 Gel extraction kit(Qiagen, USA)를 이용하여 추출한 후, DNA sequencing에 이용하였다. DNA 염기배열은 ABI PRISM 377

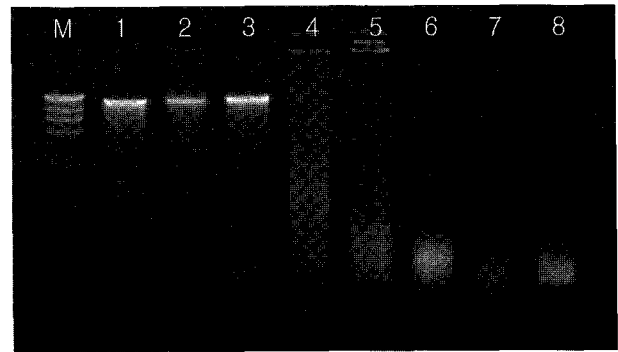


Fig. 2. Genomic DNA patterns isolated from soybeans and soy processed foods. M: marker (λ Hind III), 1: non-GMS, 2: GMS (Monsanto), 3: domestic soybean, 4: tofu, 5: bean soup flour, 6: soy milk, 7: soya based infant formulas, 8: soybean paste.

model(Perkin Elmer, USA)을 사용하여 염기서열을 결정하였다. Cyclic sequencing 반응의 조성으로는 추출된 PCR 산물 10 ng, primer 3 pM, Dye terminator kit 용액 1 μ l, 1 \times PCR buffer 2 μ l을 사용하였으며, 온도 조건으로는 96 $^{\circ}$ C에서 10초간 반응시킨 뒤에 96 $^{\circ}$ C에서 10초, 56 $^{\circ}$ C에서 5초, 60 $^{\circ}$ C에서 25초의 조건으로 25 cycle을 수행하였으며 마지막 반응은 60 $^{\circ}$ C에서 4분간 수행하였다. Cyclic sequencing이 종료되면 3 M Sodium acetate(pH 5.7) 1 μ l, 95% ethanol 12.5 μ l을 첨가한 뒤 -20 $^{\circ}$ C에서 10분간 정치한 뒤 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전하여 건조시킨 뒤 loading buffer(Blue Dextran/EDTA) 2 μ l을 첨가하여 DNA를 녹인 후 5분간 변성시켜 automatic sequencer로서 염기서열을 결정하였다.

결과 및 고찰

Genomic DNA의 추출. 콩과 가공식품에서 추출한 DNA를 0.8%의 agarose gel에서 50 volt로 30분간 전기영동한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 원료 콩에서는 genomic DNA가 거대분자로 존재하나, 두부, 콩국가루, 두유, 이유식, 된장 등의 가공식품에서의 DNA는 분해되어 다양한 작은 크기로 존재하는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 DNA 분포들은 콩의 가공 공정 중에 DNA가 파괴되는 것으로 상대적으로 두부와 두유에 비해 발효과정이 포함된 된장에서 보다 작은 형태의 DNA가 관찰되었다.

Primer를 이용한 PCR 산물 분석. 두 종류의 GM 콩을 검출하기 위하여 Monsanto사의 GMS는 EPSPS 5', EPSPS 3', Aventis 사의 GMS는 PAT 5', PAT 3' primer들과 콩의 내재

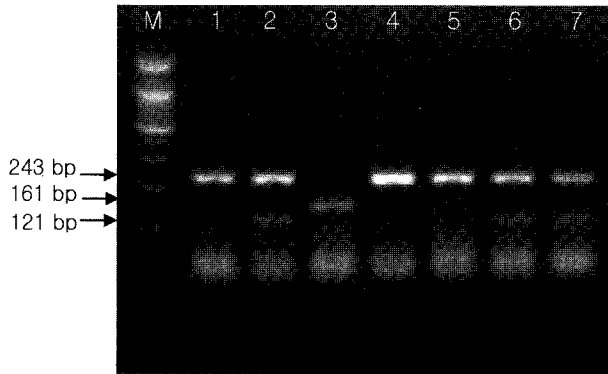


Fig. 3. PCR products using specific GMO primers. M: marker (100 bp DNA ladder), 1: non-GMS, 2: GMS with *epsps*, 3: GM Maize with *pat*, 4-5: domestic soybean, 6-7: GM soybean.

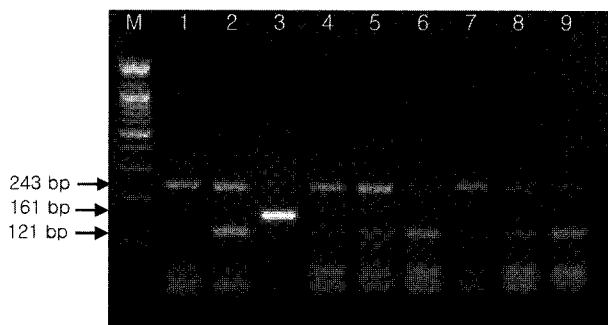


Fig. 4. Multiplex-PCR products amplified from various soy processed foods manufactured before food-labeling system. M: marker (100 bp DNA ladder), 1: non-GMS, 2: GMS with *epsps*, 3: GM Maize with *pat*, 4: bean soup flour, 5: soya based infant formulas, 6: cake made from glutinous rice flour, 7: soya based infant formulas, 8: soymilk, 9: soybean paste.

유전자인 *ferritin* gene을 기초로 하여 제작된 primer set를 하나의 tube에 넣어 한번의 반응으로 동시에 여러 유전자를 확인할 수 있는 multiplex-PCR을 수행하였다. Fig. 3에서는 검색용 primer sets를 사용하여 예상한 결과와 같이 *epsps* 유전자가 삽입된 시료에서는 121 bp, *pat* 유전자가 삽입된 시료에서는 161 bp, 내재 유전자인 *ferritin*에서는 243 bp의 PCR 산물을 확인할 수 있었다. 또한, 실험에 사용한 국내산 콩에서는 *ferritin* 유전자들만이 확인되었다. 그러므로, 본 실험에서 사용한 검색용 primer들은 유전자 재조합된 GMS에 특이적으로 반응함을 관찰할 수 있었으며 GMS의 검출이 PCR을 통하여 가능함을 입증하였다. 또한, 제작한 primer의 특이성을 확인하기 위하여 EPSPS 5'와 EPSPS 3'를 사용하여 얻은 PCR 산물과 PAT 5', PAT 3'를 사용하여 얻은 PCR 산물은 DNA 염기서열분석을 수행하였다. 이러한 PCR 산물의 염기서열은 기존에 보고된 *epsps*,⁸⁾ *pat* 유전자의 염기서열과 비교하여 일치함을 확인하였다.

국내시장에서 콩가공식품의 GM 콩 사용 모니터링. 2001년 7월 유전자재조합 가공식품의 표시제 이전과 이후의 국내식품 시장에서 콩 가공식품들의 GM 여부를 모니터링하기 위해 표시제 이전에 생산된 제품과 이후에 생산된 제품을 각각 수거하여 GM 여부를 확인하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 표시제 이전에 생산된 제품에서는 PCR을 통하여 대부분의 콩가공식품

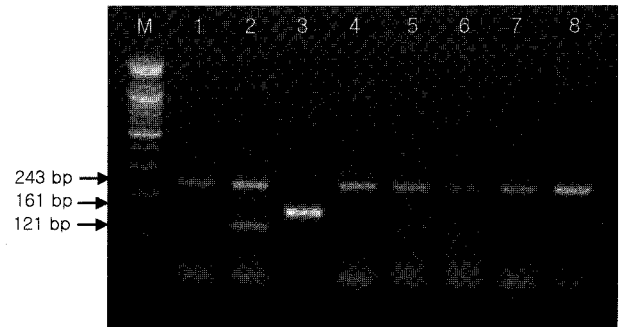


Fig. 5. Multiplex-PCR products amplified from various soy processed foods manufactured after food-labeling system. M: marker (100 bp DNA ladder), 1: non-GMS, 2: GMS with *epsps*, 3: GM Maize with *pat*, 4: tofu, 5: soybean paste, 6: ssamjang, 7: soymilk, 8: soya based infant formulas.

에서 *epsps* 유전자가 포함된 Monsanto사의 GMS가 포함된 결과를 얻었으나, *pat* 유전자가 포함된 Aventis사의 유전자재조합 콩은 확인되지 않았다. 이러한 결과는 표시제 이전 규제가 없었을 때는 미국산 수입콩이 *epsps* 유전자가 삽입된 Monsanto사의 GMS가 혼입되어 대부분의 콩가공식품의 원료로 사용되었기 때문에 검출된 것으로 사려된다. 그러나, 2001년 7월 가공식품의 표시제 이후는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 대부분 콩가공식품에서 non-GMS 또는 일부에서는 미량의 GMS로 판정되었다. 이러한 결과는 표시제 이후에는 수입되는 미국산 콩이 3% 이하의 GMS가 수입되어 가공식품에 이용되었거나, 가공과정에서 DNA의 파괴로 인한 검출밴드의 강도가 약해진 것으로 판단된다. 이를 구별하기 위해서는 3% GMS를 포함한 가공식품을 대조구로 사용하여 분석해야하나 GM 시료의 입수 및 이를 사용한 가공식품의 제조가 실질적으로 불가능하므로 가공식품에 대한 정량분석이 현실적으로 매우 곤란하여 사회적 검증 방법을 통하거나 가공식품의 원재료를 이용한 정량분석의 체계가 요구된다.

감사의 글

이 연구는 식품의약품안전청의 용역연구과제로 수행되었으며 연구비 지원에 감사를 드립니다.

참고문헌

- Dunwell, J. M. (1998) Novel food products from genetically modified crop plants: methods and future prospects. *Int. J. Food Sci. Technol.* **33**, 205-213.
- Dunwell, J. M. (1999) Transgenic crops: The next generation, or an example of 2020 vision. *Ann. Bot.* **84**, 269-277.
- Gasser, C. S. and Fraley, R. T. (1989) Genetically engineering plants for crop improvement. *Science* **244**, 1293-1299.
- Padgett, S. R., Kolacz, K. H., Delannay, X., Re, D. B., Lavallee, B. J., Tinius, C. N., Rhodes, W. K., Otero, Y. I. and Barry, G. F. (1995) Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci.*

- 35, 1451-1461.
5. Barry, G. F., Kishore, G. M., Padgett, S. R. and Stallings, W. C. (1997) Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvyl-3-phosphate. U.S. Patent 5,633,435.
 6. Wohlleben W., Arnold W., Broer I., Hillemann D., Strauch E. and Puhler A. (1988) Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tu494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* **70**, 25-37.
 7. Grammel N., Schwartz D., Wohlleben W. and Keller U. (1998) Phosphinothricin-tripeptide synthetases from *Streptomyces viridochromogenes*. *Biochemistry* **37**, 1596-1603.
 8. Kim, H. J., Park, S. H. and Kim, H. Y. (2001) Study for detection of glyphosate tolerant soybean using PCR. *Korean J. Food Sci. Technol.* **33**, 521-524.
 9. Kwak, B. Y., Ko, S. H., Park, C. W., Son, D. Y. and Shon, D. H. (2003) Development of enzyme-linked immunosorbent assay for glyphosate-tolerant soybeans. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**, 366-372.
 10. Kim, Y. M., Sohn, S. H., Jeong, S. I., Yoon, M. S., Kim, T. S. and Park, Y. H. (2002) Detection methods for genetically modified soybeans. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **45**, 185-189.
 11. Wurz, A., Bluth, A., Zeltz, P., Pfeifer, C. and Willmund, R. (1999) Quantitative analysis of genetically modified organisms (GMO) in processed food by PCR-based methods. *Food Control* **10**, 385-389.
 12. Hubner, P., Studer, E. and Luthy, J. (1999) Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organisms in food. *Food Control* **10**, 353-358.
 13. Matsuoka, T., Kuribara, H., Takubo, K., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Kusakabe, Y., Isshiki, K., Toyoda, M. and Hino, A. (2002) Detection of recombinant DNA segments introduced to genetically modified maize (*Zea mays*). *J. Agri. Food Chem.* **50**, 2100-2109.
 14. Proudhon, D., Wei, J., Briat, J. and Theil, E. C. (1996) Ferritin gene organization: differences between plants and animal suggest possible kingdom-specific selective constraints. *J. Mol. Evol.* **42**, 325-336.
 15. Meyer, R. (1999) Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control* **10**, 391-399.
 16. Kim, T. W., Min, S. G., Choi, D. H., Jo, J. S. and Kim, H. Y. (2000) Rapid Identification of *Lactobacillus plantarum* in kimchi using polymerase chain reaction. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 881-884.

Monitoring of Genetically Modified Soybean and Processed Foods in Korean Market using PCR

Myo-Young Kim, Jae-Hwan Kim, Hyun-Joong Kim, Sun-Hee Park¹, Geon-Jo Woo¹ and Hae-Yeong Kim* (College of Life Sciences, Kyung Hee University, Suwon 449-701 Korea; ¹Divisions of Food Microbiology, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-020, Korea)

Abstract: A method using PCR was developed for the monitoring of genetically modified soybean (GMS) and GMS derived foods utilized in the market. We designed 3 pairs of specific oligonucleotide primers based on *epsps* and *pat* inserted in GMS and ferritin gene as internal standards. Template DNAs isolated from soybean and processed foods were used for multiplex PCR with 3 primer sets. PCR, used with specific primer sets for GMS detection, showed the amplified DNA fragments with GMS template DNA. In this study, GMS containing *epsps* was detected from soy processed foods manufactured before GM food labeling system, however, GMS containing *epsps* or *pat* was not detected from soy processed foods manufactured after GM food labeling system.

Key words: *epsps*, genetically modified soybean, monitoring, *pat*, PCR

*Corresponding author