

콩 및 콩가공식품에서 GMO Detective™ II kit(NEXGEN)을 이용한 RRS gene의 검출에 관한 연구

미생물검사팀

류승희 · 한창호 · 김경식 · 황영숙 · 김미선 · 최병현

Detection of RRS Gene in Soybeans and Soybean Processed Foods by GMO Detective™ II kit(NEXGEN)

Microbial Inspection Team

Seung-hee Ryu, Chan-ho Han, Kyung-sig Kim,
Young-sook Hwang, Mi-sun Kim, and Byung-hyun Choi

Abstract

This study was carried out to confirm that the food derived from soybean contained RRS gene by PCR method. In order to extract DNA from food samples, QIAGEN DNeasy Plant Mini kit was used. In order to detect RRS gene, we used the primer and PCR reagents that concluded GMO Detective™ II kit that was produced NEXGEN biotechnologies, Inc.

Of 73 food samples derived from soybean, RRS genes were detected from 6 food samples(8.2%) of 4 bean-curd, 1 soy milk and 1 fried bean curd. The habitats of 5 samples that RRS gene was detected from were U.S, and 1 sample was not labeled.

Key words : RRS(Roundup Ready Soybean) gene, PCR, DNA, soybean

서 론

사람이 살아가는데 필수 요소인 의식주 중 가장 중요하다고 할 수 있는 먹을 것을 확보하기 위하여 사람들은 예로부터 끊임없이 노력해왔다.

원시시대에 수렵과 채취를 통하여 먹을 것을 해결하는 단계에서, 목축과 재배기술을 개발하였으며, 이어 농지확대, 품종개량, 육종 등의 기술을 개량해 온 것이다.

그러나 세계 인구가 기하급수적으로 증가함에

따라 식량 증산을 위해 기존에 사용해 온 기술보다 좀 더 나은 새로운 기술개발의 필요성이 요구되어 왔다. 이와 더불어 DNA의 발견과 그에 따른 유전자재조합 기술 및 그 기술을 이용한 식량자원 확보가 실용화되어, 제2의 녹색혁명, 21세기의 농업정책으로 기대되기에 이르렀다. 실제로 1994년부터는 유전자재조합 식품의 시장유통이 미국에서 허용되어 지금까지 미국뿐 아니라 유럽, 일본에서도 일부 제품의 식품으로 사용이 허용되고 있다¹⁾.

최근 미국과 캐나다, EU의 곡물 기업에서는 유전자 변형을 포함한 현대 생물학을 채택해서 새로운 식물 다양성을 발전시키고 있다. 미국에서 1999년 재배된 경지면적으로 볼 때, 옥수수의 경우 40%이상, 면화의 50%이상, 콩의 45% 이상이 유전자 재조합된 작물이었고 최근 미국의 슈퍼마켓 식품의 60%가 유전자재조합식품을 포함하고 있다²⁾.

1999년에 재배된 가장 중요한 유전자 재조합 작물은 제초제 내성 콩으로 세계적으로 54%를 차지하고, 다음으로는 해충저항성 옥수수가 19%, 제초제 내성 평지(rape)가 9%를 차지하고 있다³⁾.

소위 유전자재조합식품이라 불리는 재조합 DNA 기술로 만들어진 새로운 식품의 급속한 확산은 그 장점에도 불구하고 특정 사람들 사이에 불안감을 일으키고 있다. 다양한 의견들이 표출되고 있지만 유전자재조합작물과 그 가공식품을 둘러싼 논쟁은 보통 그 안전성과 표시제라는 2가지 주제에 초점이 맞추어지고 있다. 이런 견지에서 많은 국가들과 국제기관들은 일반대중을 위한 제품정보에 중점을 둔 표시제에 대한 논의를 해오고 있다^{4~7)}.

PCR은 유전자재조합식품 표시제의 신뢰도를 강화하기 위한 유망한 기술이다^{8~16)}. PCR에 의한 정성분석방법은 유전자재조합식품 검출을 위한 초기 스크리닝에 적합한 것으로 인정되었고⁸⁾, RT-PCR 또는 경쟁적 정량 PCR(QC-PCR)은 수치적 정보를 얻기 위한 유용한 기술이다^{9~13)}.

본 연구는 GMO DetectiveTM II kit의 프라이머와 PCR시약을 사용하여, 서울 시내에서 유통되고 있는 콩 및 콩 가공식품에서 제초제 내성 콩(Round-up Ready Soybean)의 삽입 유전자인

RRS gene의 검출여부를 조사하였으며, 이를 통해 가공식품에 유전자재조합 원료의 포함여부를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

2002년 7월부터 10월에 걸쳐 서울 시내 유통중인 콩 3건 및 두부, 두유 등 콩을 주원료로 한 가공식품 73종을 구입하여 RRS(Roundup ready soybean) gene의 검출 실험을 하였다.

RRS gene의 검출을 위한 프라이머와 PCR시약은 NEXGEN사의 GMO DetectiveTM II kit에서 제공하는 프라이머를 사용하였다. PCR은 Gene-Amp PCR 9700을 이용하여 실시하였다.

2. 시료 전처리

시료 전처리는 식품의약품안전청의 유전자재조합식품 검사 지침에 따라 실시하였다.¹⁴⁾

콩은 1000알갱이 이상을 취하여 1% SDS(Sodium Dodecyl Sulfate)용액에서 잘 교반하며 세정하였다. 충분히 거품을 낸 후, 알갱이로부터 액을 제거하여 거품이 없어질 때까지 증류수로 10회 이상 잘 헹구어 세정한 후 김와이프스로 수분을 충분히 제거하고 10분간 방치하여 자연 건조시킨 후, 분쇄기를 이용하여 분쇄하였다. 두부 및 두유 등의 가공식품은 55℃ 건조기에서 하룻밤 방치하여 수분을 증발시키고 남은 고형분을 분쇄기로 분쇄하였다.

3. DNA 추출 및 농도측정

QIAGEN DNeasy Plant Mini kit를 이용하여 콩 및 콩을 주원료로 한 가공식품의 DNA를 분리하였다. 또한 양성과 음성 대조군으로 사용할 콩의 DNA도 함께 분리를 하였다.

균질하게 분쇄된 시료 100mg을 1.5ml 튜브에 넣어, 미리 65℃로 가온한 AP1 완충액 400 μ l와 RNase A(100mg/ml) 4 μ l를 가하여 혼합기로 잘 혼합하여, 65℃에서 10분간 반응시키면서 3~5분

마다 한번씩 튜브를 손으로 전도하여 시험재료를 혼합하였다. AP2 완충액 130 μ l를 가하고 얼음 위에 5분간 방치한 후, 14,200g로 5분간 원심분리하였다. 맑은 상층액을 QIA Shredder Spin Column에 가하고 14,200g로 2분간 원심 분리한 후, 칼럼을 통과한 여과액을 새로운 튜브에 옮겼다. 여기에 에탄올을 첨가한 AP3 용액을 1.5배량 가한 후, 즉시 혼합하고 DNeasy Mini Spin Column에 가하였다. 14,200g에서 2분간 원심 분리하여 DNA를 칼럼에 부착시킨 후 칼럼을 통과한 하층액은 버렸다. 칼럼을 AW 용액 500 μ l를 가하여 원심 분리하여 세척한 후, 새로운 1.5ml 튜브에 옮겼다. 미리 65 $^{\circ}$ C로 가온한 멸균수 50 μ l를 가하고 실온에서 5분간 방치한 후, 14,200g로 1분간 원심 분리하여 DNA를 용출시켰다. 용출액을 1.5ml 튜브에 옮기고 동량의 이소프로필알콜을 가하였다. 14,200g로 15분간 4 $^{\circ}$ C에서 원심 분리한 후 침전물에 닿지 않도록 마이크로피펫으로 상층액을 제거하였다. 70% 에탄올 200 μ l을 벽면으로 조심스럽게 가하고 다시 피펫으로 상층액을 제거하고, 14,200g로 1분간 4 $^{\circ}$ C에서 원심 분리하였다. 잔류하는 에탄올을 피펫으로 제거하고 침전물은 건조시켰다. 건조된 침전물에 멸균수 50 μ l를 가하고 15분간 실온에서 방치하여 침전물을 완전히 용해시키고 이것을 DNA시료 원액으로 하였다.

DNA시료 원액 2 μ l를 TE완충액으로 50배 희석하여 260, 280nm에서 각각 흡광도를 측정하였다. 또한 DNA 추출여부를 확인하기 위해 0.8% 아가로스겔(agarose gel) 전기영동을 실시하였다.

4. 정성 PCR(Polymerase Chain Reaction)

RRS(Roundup ready soybean) gene을 검출하기 위한 PCR은 NEXGEN GMO Detective™ II kit를 사용하여 GeneAmp PCR 9700으로 실시하였다.

또한 콩의 DNA가 추출되어 있음을 확인하기 위해 콩의 고유한 유전자인 Lectin gene을 검출하기 위한 PCR도 함께 실시하였다.

1) PCR 반응 시약의 조제

PCR 반응에 필요한 시약과 조성은 Table 1과

같다.

PCR을 하고자 하는 시료수에 맞춰 사용하는 튜브의 수를 정하여 이에 따른 전체 사용액의 양을 여유분을 두고 결정한 후, 위의 액량과 비교하여 적당한 배율이 되도록 template DNA를 뺀 각 액을 혼합조정하여 각 반응튜브에 각 24 μ l씩 소분하였다. PCR반응의 음성대조군(negative control)으로 프라이머를 첨가하지 않은 반응액과 DNA시료액을 첨가하지 않은 것은 별도로 조제하였다.

Table 1. Reagents of PCR reaction for detection of RRS gene in soybean and soybean processed foods

Complement	volumn
5 \times Reaction Cocktail	5 μ l
Primer mixture	4 μ l
Template DNA	x μ l(50~100ng)
Taq DNA polymerase	1 μ l
D.W	to 25 μ l
Total	25 μ l

2) PCR 증폭반응

반응시약을 24 μ l씩 분주한 튜브에 template DNA용액 1 μ l(50~100ng)을 첨가하였다. 시료의 첨가는 음성대조군, 추출한 시료 DNA, 양성대조군의 순서로 행하였다.

모든 용액을 첨가한 후 PCR을 실시하였는데, PCR의 반응조건은 96 $^{\circ}$ C에서 5분간 방치하여 최초의 변성을 일어나게 한 후, 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 변성시키고(denaturation), 62 $^{\circ}$ C에서 30초간 유전자 결합시키며(annealing), 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 증폭반응(extension)이 일어나도록 하는 것을 1회로 하여, 40회 반응시켰다. 40회 반응이 이루어진 후 72 $^{\circ}$ C로 5분간 연장반응을 한 후 4 $^{\circ}$ C에서 보존되도록 설정하였다.

이를 표로 정리하면 Table 2와 같다.

3) 전기영동

위의 PCR 결과 얻어진 반응액을 PCR 증폭 반응액으로 하여, 아가로스겔(agarose gel) 전기영동에 의해 결과를 확인하였다.

Table 2. PCR conditions for detection of RRS gene in soybean and soybean processed foods

	Temperature	Time	No. of cycle
Denaturation	96℃	5min	1 cycle
denaturation	94℃	30sec	40 cycle
annealing	62℃	30sec	
extension	72℃	30sec	
elongation	72℃	5min	1 cycle
preservation	4℃	-	-

0.5×TBE 완충용액에 아가로스겔(LO3, Takara)을 넣고 가열하여 1.8%로 농도를 맞추었다.

PCR 증폭 반응액 7 μ l에 1/6배의 gel loading buffer(Bioneer)를 가하여 겔의 각 홈에 시료를 넣고 같은 겔 위에 Marker DNA(100bp DNA ladder, Bioneer)도 함께 주입하여 100V의 전압에서 전기영동을 하였다. 전기영동이 끝난 후 증류수 100ml당 5 μ l의 이티디움 브로마이드용액(10mg/ml)이 함유된 용액에 전기영동 겔을 넣고, 가볍게 진동시키면서 30분간 염색한다. 염색이 끝난 후 30분간 증류수에 담가 탈색시킨 후 UV transilluminator (Vilber Lumart)로 밴드를 분석하였다.

Table 3. Average concentration and purity of DNA extracted from soybean and soybean processed foods

Classification of samples	No. of samples	Average conc. of DNA (ng/g)	Average purity of DNA (O.D ₂₆₀ /O.D ₂₈₀)
Bean-curd	23	61.4	1.38
Soy milk	22	56.7	1.36
Fried bean curd	4	61.5	1.39
Bean paste	9	67.7	1.38
Soybean	3	66.6	1.60
Bean soup	5	65.6	1.52
Bean sprout	3	63.8	1.54
Others	4	59.0	1.36
Total	73	61.2	1.40

결과 및 고찰

1. DNA 추출

각 시료종류별 DNA 평균 농도와 단백질 대비 평균 순도는 Table 3과 같았다.

DNA 평균농도는 두유가 약간 낮은 수치를 나타냈으나 시료종류별로 큰 차이가 없었으며 전체 평균농도는 61.2ng/g이었다. 여기서 기타시료는 이유식, 콩햄, 콩비지 등이다.

한편, 단백질유래 불순물에 대한 DNA 순도를 알아보기 위해 O.D₂₆₀과 O.D₂₈₀을 측정하여 그 비율을 계산한 결과 전체 평균 1.39이었다. O.D₂₆₀과 O.D₂₈₀ 비율이 1.7에서 2.0 사이의 값이 되어야 DNA순도가 높다고 할 수 있는데, 전체 시료 모두가 그 수치에 달하지 못해 추출된 DNA의 순도가 높지 않음을 알 수 있었다.

단백질 유래 불순물로 인해 PCR 결과에 대한 영향이 우려될 경우 protease로 다시 한 번 처리한 후 DNA를 회수하는 과정이 필요하지만¹⁴⁾, PCR 결과에 크게 영향이 없는 것으로 판단되어 protease 처리과정은 생략하였다.

그리고 추출된 DNA의 크기와 가공과정에서의 파괴 정도를 알아보기 위해 0.8% agarose gel 전기영동을 실시하였다. 추출된 DNA의 전기영동 결과는 Fig. 1과 같았다.

다음의 결과에서 열처리나 가압 과정이 없는 콩국과 콩은 DNA가 파괴되지 않고 원형이 그대로 남아있는 상태이고, 두부, 두유, 유부 등의 가공식품의 경우 가공과정에서 DNA가 파괴되어 다양한 크기의 절편으로 분리되어 추출되는 것을 확인할 수 있었다.

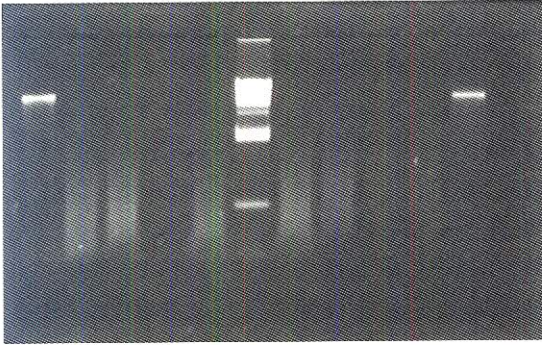


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of DNA from soybean and processed foods derived from soybean. From lane 1 to 11 are bean soup, bean paste, soy milk, soy milk, sundubu(uncurled bean curd), λ Hind III DNA ladder, fried bean-curd, bean-curd, bean-curd, weaning diet, soybean.

2. 정성 PCR에 의한 RRS gene의 검출

Fig. 2는 콩의 내재성유전자에 해당하는 Lectin gene의 검출을 위한 PCR을 실시하여 145bp의 증폭산물을 얻어낸 결과를 나타낸 정기영동 사진이다. 이를 통해 각 시료에서 콩의 유전자가 추출되었음을 확인하였다.

RRS(Round-up Ready Soybean) gene은 1996년 몬산토(Monsanto)사가 개발한 제초제(글리포세이트)에 내성이 있는 콩인 「라운드업레디콩(Roundup Ready Soybean)」에 삽입된 유전자이다. RRS gene을 검출하기 위한 PCR 결과 두부 4건, 두유 1건, 유부 1건에서 254bp의 증폭산물을 얻었다.

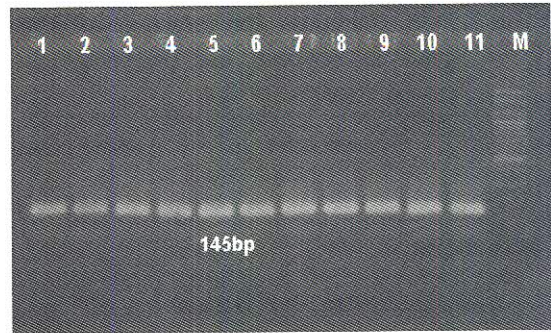


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of nucleic acid amplification products from processed food derived from soybean using Lectin primer (Bean specific primer). From lane 1 to 11 is processed food derived from soybean and lane 12 is 100bp DNA ladder.

RRS gene 검출을 위한 PCR결과의 전기영동 사진은 Fig. 3에 나타내었다.

Fig. 3의 lane 1은 PCR반응의 음성 대조군으로 프라이머를 첨가하지 않은 반응액이며, lane 2는 주형(template) DNA를 첨가하지 않은 대조군이고 lane 3은 유전자 제조합되지 않은 콩의 DNA를 추출하여 대조군으로 하였다. 이들에서는 band를 확인할 수 없어, 시약 등의 오염이 없이 PCR이 제대로 이루어졌음을 확인할 수 있었다.



Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of nucleic acid amplification products from soybean and from processed food derived from soybean using RRS primer(Roundup Ready Soybean specific primer). From lane 1 to 4 are no primer control, no template control, non GM control, 100bp DNA ladder, From lane 5 to 8 are bean-curd, From lane 9 to 11 are soy milk, fried bean-curd, GM control.

lane 5에서 8까지는 두부이고, lane 9와 10은 각각 두유, 유부로 254bp의 band가 확인되어 RRS gene이 검출되었음을 알 수 있었다. 이로써 이들 제품에 사용된 콩 원료에 유전자 재조합된 콩 원료가 섞여있음을 알 수 있었다. 하지만 PCR 반응의 민감도가 높아 GMO(Genetically Modified Organism)함량이 0.1%의 낮은 수준인 경우까지도 검출할 수 있다.¹⁵⁾ 또한 그 검출한계가 0.01%까지 감도가 높아지고 있는 실정이다.¹⁶⁾ 이는 우리나라가 인정하고 있는 비의도적인 혼입치인 3%나, EU가 규정하고 있는 1%의 혼입치¹⁷⁾보다 낮은 수준이기 때문에 정성검사에서 RRS gene이 검출되었다고 해도 유전자재조합식품등의 표시기준¹⁸⁾ 위반이라고 할 수 없다. 이에 따라 유전자재조합식품 정량검사의 필요성이 대두되고 있다. 정성분석결과 GMO 혼입이 확인된 시료에 대한 2차 검정으로 GMO 혼입량을 확인할 수 있는 검정방법을 세계 각 국에서 개발하고 있으나, 정확한 표준정량곡선을 얻기 위한 표준시료 확보 문제, 농산물의 종류에 따라 유전자의 복제수가 달라 이를 보정해야하는 어려움이 있어, 아직까지 국제적으로 공인된 방법은 정해지지 못하고 있다.¹⁶⁾ 이는 앞으로 풀어가야 할 과제이다.

각 가공식품에 사용된 콩 원료의 원산지에 따른 RRS gene 검출율은 Fig. 4에 나타내었다. 전체 검사건수 73건 중 미국산이 43건으로 59%를 차지하고 있다. 뒤를 이어 원산지를 표시하지 않은 제품이 19건으로 26%, 국산이 10건으로 14%, 중국산이 1건으로 1%를 점했다. 그 중 미국산 시료 중 12%를 차지하는 5건에서 RRS gene이 검출되었으며, 원산지 미표시 제품의 5%에 해당하는 1건에서 RRS gene이 검출되었다.

또한 가공식품 종류별 RRS gene의 검출율은 Fig. 5에 나타내었다. 두부 23건 중 4건, 두유 22건 중 1건, 유부 4건 중 1건에서 RRS gene이 검출되었다. 전체적으로는 73건의 시료 중 6건에서 RRS gene이 검출되어 약 8%의 검출율을 보였다.

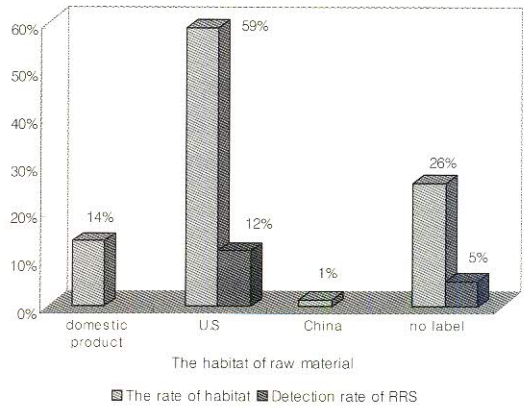


Fig. 4 Detection rates of RRS gene according to the habitat of raw material.

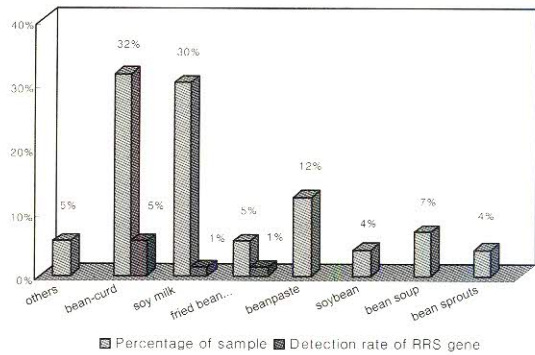


Fig. 5. Detection rates of RRS gene according to the kinds of sample.

결론

콩 및 콩을 주원료로 한 가공식품에 대한 RRS gene의 검출 실험에 대하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. QIAGEN DNeasy Plant Mini kit를 이용하여 추출한 시료의 DNA의 평균농도는 61.2ng/ μ l로, 시료 종류별로 큰 차이가 없었으며, 단백질유래 불순물에 대한 DNA 순도는 평균 1.39로 순도가 낮았다.
2. NEXGEN GMO Detective TMII kit를 사용하여 GeneAmp PCR 9700으로 PCR을 실시한 결과, 콩과 콩 가공식품 73건 중 두

부 4건, 두유 1건, 유부 1건에서 RRS gene 을 검출하였다.

3. RRS gene이 검출된 6건의 콩 가공식품 중 5 건은 콩원료의 원산지가 미국이었고, 1건은 원산지 표시가 없는 제품이었다.

참고문헌

1. 식품의약품안전청 : 유전자재조합식품의 올바른 이해(1998)
2. Beachy, R.N. : Facing fear of biotechnology. *Science*, 285:335(1999)
3. James, C. : Global status of Transgenic Crop in 1999. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications(ISAAA). brief No. 12. Ithaca., NY(1999)
4. Losey, J.E., Rayor, L.S., and Carter, M.E. : Biotechnology and food ingredients, *Nature(London)*, 399:214 (1999)
5. Pimentel, D.S., and Raven, P.H. : Monitoring and labeling for genetically modified products. *Proc. Acad. Sci., USA*, 97:8198(2000)
6. SAP Report No. 2000-07 : Report of FIFRA Scientific Advisory Panel Meeting(2001)
7. Masood, E. : Food scientist in GMO row defends 'premature' warning. *Nature (London)*, 398:98(1999)
8. Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J., and Anklam, E. : IUPAC Collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *J. AOAC Int.*, 82:923(1999)
9. Baitilingom, M., Pijnenburg, H., Gendre, F., and Brignon, P. : Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and roundup ready soybean in some representative foods. *J. Agric. Food Chem.*, 47:5261 (1999)
10. Wurz, A., Bluth, a., Zeltz, P., Pfeifer, C., and Willmund, R. : Quantitative analysis of genetically modified organisms (GMO) in processed food by PCR-based methods. *Food control.*, 10:385(1999)
11. Hubner, P., Studer, E., and Luthy, J. : Quantitation of genetically modified organisms in food. *Nat. Biotech.*, 17:1137 (1999)
12. Hardegger, M., Brodmann, P., and Herrmann, A. : Quantitative detection of the 35S promoter and the NOS terminator using quantitative competitive PCR. *Eur. food Res. Technol.*, 209:83 (1999)
13. Studer, E., Rhyner, C., Luthy, J., and Hubner, P. : Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified soybean and maize. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 207:207(1998)
14. 식품의약품안전청 : 유전자재조합식품 검사이침(2002)
15. Simon, K., and Guy, V.E. : The limits of GMO detection. *Nat. Biotech.*, 19:405 (2001)
16. 식품의약품안전청 : 유전자재조합식품개요 (2002)
17. 농촌진흥청 : 유전자변형농산물(GMO) 검정 기술 워크숍 발표요지 (2001)
18. 식품의약품안전청 : 유전자재조합식품 표시제. (2001)