

A3. GMO 검정기술의 연구개발 동향

Current Status of Detection Methods for Genetically Modified Organisms.

김영미*, 김태산, 박용환
농업과학기술원 생화학과

I. 서 론

유전공학기술을 이용한 유전자변형농작물의 포장 시험재배가 급격히 증가되고 있고 현재 환경 및 식품으로서의 안전성이 확인되어 상품화된 유전자변형작물(Genetically Modified Organism)도 옥수수 13종, 토마토 10종, 콩 5종, 면화 5종, 감자 3, 유채 18종, 애호박 3종, 사탕무 2종, 해바라기 2종, 벼, 단 옥수수, 땅콩, 파파야, 치커리, 호박 등 총 15작물 70여종에 달한다. 또한 GM 농산물의 시중 유통도 증가됨에 따라 국내외적으로 GMO 표시제가 이미 시행되고 있거나 또는 시행 예정으로 있는 실정이다. 우리 나라에서도 2001년 3월부터 농림부의 유전자변형 농산물의 표시제가 시행되고 있고 식품의약품안전청의 GM 식품에 대한 표시제도 2001년 7월부터 시행될 예정이다. 따라서 GMO 검정기술 개발 및 실용화 연구가 활발히 진행되고 최근 검사방법의 국제적인 표준화에 대한 논의도 활발해지고 있다.

현재 국내외적으로 유통되고 있는 GM 농산물을 주로 콩, 옥수수 등으로 이들 작물에 도입된 특성은 제초제저항성 또는 해충저항성 등의 농업적 형질이다. 이러한 형질 발현을 위해 도입된 유전자는 개발회사, 농작물 종류, 목적 등에 따라 제초제저항성유전자, 해충저항성유전자 등의 구조유전자 뿐만 아니라 유전자전환체 선발용 마커유전자 및 도입유전자의 발현을 조절하는 조절부위유전자인 프로모터 및 터미네이터, 발현효율증진을 위한 인트론 등으로 다양하다. 따라서 이렇게 다양한 유전자가 도입된 GMO를 검정하기 위한 기술 개발에는 GM 작물 개발에 대한 유전정보 및 GM 산물의 표준시료 확보가 선행되어야 하며 대표성을 갖는 시료채취 방법 확립 등이 무엇보다 중요하다고 할 수 있다. 본고에서는 최근 국내외적으로 개발·실용화되고 있는 GMO 검정방법과 적용상의 문제점 등에 대하여 알아보하고자 한다.

II. GMO 검정방법

GMO 검정 방법 중 현재 가장 많이 이용되고 있는 것은 효소면역학적

(Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA) 방법과 PCR(Polymerase Chain Reaction)법으로 크게 나눌 수 있다. 그리고 GM 작물의 경우에는 제초제처리 등에 의한 생물학적 검정방법도 적용할 수 있다.

1. 효소면역학적(ELISA) 방법

효소면역학적 방법은 GM 작물에 도입된 유전자에 의해 생산되는 단백질을 특이적으로 인지하는 항체단백질을 이용하는 검정방법으로 검출대상 단백질이 존재하는 GM작물과 농산물 및 원료 등 비가공 식품의 검정에 적합하다. 또한 GM작물의 경우, GM 계통(Transgenic Event)이나 동일식물체라도 조직이나 기관에 따라 GM단백질의 발현 양이 달라질 수 있으므로 GM단백질이 발현되지 않는 기관의 경우에는 검정이 곤란하다.

ELISA법을 이용한 기술로는 GMO 혼입 유무만을 검정하는 Lateral Flow Strip Technology와 정량적으로 분석 가능한 Microtiter Well Assay법이 있다. 특히, GMO 정량분석을 위한 microplate ELISA 검증(validation) 연구로 1998년 ILSI(International Life Sciences Institute) 보고서에 의하면 일반적인 의약 진단용 microplate ELISA의 검출한계는 $10^{-12} \sim 10^{-13}$ M로 알려져 있는데 GM 단백질의 ELISA 분석경우에도 약 10^{-12} M의 검출감도를 나타낸다. GM작물 조직 g당 GM 단백질 양은 $10 \mu\text{g}$ 이상으로 옥수수 종자 1립(약 300mg)을 1 ml의 완충액으로 추출할 때의 GM단백질의 농도는 이론적으로 6×10^{-8} M이다. 1% GMO의 경우 재조합 단백질의 농도는 6×10^{10} M로 ELISA 분석에 의한 검출한계이내에 해당한다.

또한 일반적인 효소면역학적 분석의 정밀도(precision)는 통계적으로 실질적인 반응성에서 5% 미만, 분석에 의해 산출된 농도에서 10% 미만으로 총 15%이하의 변이 정도를 가진다. 따라서 1% GMO를 분석한 실측치는 0.8~1.2 % 범위를 나타낼 수 있으므로 ELISA를 이용한 GMO 정량분석을 실시할 때에는 허용한계치(threshold)에 대한 분석오차범위에 대한 검토가 이뤄져야 할 것이다.

최근 미국곡물화학협회(American Association of Cereal Chemists, AACC) 주관으로 몬산토사 개발 해충저항성 옥수수 계통 Mon810을 대상으로 벨기에 표준물질연구소(Institute for Reference Materials and Measurements, IRMM)에서 0, 0.5, 1, 2%로 제조한 공인표준시료(Certified Reference Material, CRM)와 캐나다 POS Saskatoon에서 0.3, 0.75, 1, 1.25%의 함량별로 제조한 시료로 전세계 20국 40개 실험실이 참여하여 ELISA 국제 인증 협동 테스트가 이루어졌으며 우리나라에서는 농업과학기술원과 식의약청이 참여한 바 있다. 그 결과 ELISA의 정확도(accuracy)는 96.7~100%, 반복성 6.56~18.4%(RSD), 재현성 13.8~23.5%(RSD)로 나타났다.

2. PCR에 의한 검정 방법

PCR 검정법은 GMO에 도입된 유전자 조절부위 또는 도입유전자의 단편을 특이적으로 증폭하는 기술로 원료농산물은 물론 가공품에서도 검정이 가능하며 0.01%까지 검정할 수 있다.

PCR법을 GMO 검정에 적용할 경우 가장 문제가 되는 것은 도입유전자에 대한 유전정보의 확보이며 이러한 유전정보는 GMO 개발회사의 자발적인 협조 없이는 어려운 실정이다. 더욱이 동일한 유전자, 예를 들어 해충저항성 유전자인 CryIA(b)를 도입하더라도 개발회사에 따라 그 염기서열이 변형된 경우가 많아 프라이머 개발은 더욱 어려운 실정이다. 따라서 GMO 검정에 필요한 유전정보에 대한 데이터베이스화 및 국내외 연구기관과의 정보공유가 무엇보다 필요하다.

일반적으로 PCR 검정에 가장 많이 이용되는 프라이머로 켈리플라워 모자이크 바이러스 유래의 프로모터인 CaMV 35S를 검정할 수 있는 프라이머가 있는데 GMO 혼입 유무를 검정하는 1차적인 스크린에 이용 가능하다. 그러나 CaMV35S 바이러스는 자연계에 존재하므로 GMO가 아닌 경우에도 양성반응을 나타낼 수 있으므로 transgenic event 확인이 가능한 도입유전자 특이 프라이머로 재확인함이 바람직하다. Transgenic event 특이 프라이머의 개발 및 특이성 확인을 위해서는 특히, 해당 transgenic event에 대한 표준시료(Reference Material)의 확보가 무엇보다 중요하다.

PCR 검정에서 고려해야 할 사항으로는 시료간의 교차오염이나 PCR 산물인 amplicon 등의 오염에 의한 의사양성(False Positive), DNA 추출과정에서의 PCR 증폭 저해물질의 오염 또는 DNA의 분해 등에 의한 의사음성(False Negative), 프라이머의 특이성, 검출감도, 재현성, 정확도 등이 있다. PCR 스크린법의 검증(validation) 사례로서 유럽의 Joint Research Center(JRC)를 주축으로 EU 13 회원국의 29개 연구실이 참여한 35S 프로모터 특이 프라이머와 Nos 터미네이터 특이 프라이머를 이용한 PCR 검정 Ring Study가 있다. 협동연구의 분석 시료는 IRMM에서 제공한 몬산토사의 제초제저항성 콩 Roundup Ready Soybean(RRS)과 노바티스사의 해충저항성 옥수수 Maximizer(Bt176)의 0, 0.1, 0.5, 2% 혼입 GMO 시료 16점이다. 35S 프로모터 특이 프라이머를 이용한 PCR 스크린은 RRS의 경우에 0.5%까지, Bt176의 경우 2% 포함 시에 100% 검정 가능한 것으로 나타났다. Nos 터미네이터 특이 프라이머를 이용한 PCR 스크린은 RRS의 경우 2% 포함 시에 100%의 정확도를 나타내었다.

3. PCR에 의한 정량적 분석법

PCR을 이용한 정량에는 2가지의 방법이 있는데 경쟁적(quantitative competitive, QC) PCR과 TaqMan chemistry 또는 hybridization probe법을 이용하

여 PCR 반응의 실측치를 측정하는 Real Time PCR(RT-PCR)이 있다. 후자의 real time PCR의 경우에는 형광색소를 이용하여 PCR 반응을 측정하게 되므로 특수한 PCR 정량 전용 기기가 필요하다.

경쟁적 PCR이란 표준(standard) 플라스미드 DNA를 이용하여 검지시료의 DNA의 상대적으로 양을 결정하는 방법으로 동일한 시험관 내에서 standard DNA와 검지시료의 DNA에 대하여 동일한 프라이머가 경쟁적으로 이용하여 증폭된 각각의 PCR 산물의 밴드 강도(intensity)를 비교하여 standard DNA와 시료 DNA 유래의 PCR 산물의 밴드가 같은 강도를 나타내는 평형점을 찾아 정량하게 되므로 반정량적(semi-quantitative) 방법이라 할 수 있다. QC-PCR은 threshold 확인에는 효과적으로 적용할 수 있으나 RRS, Bt176 0, 0.1, 0.5, 5% 시료에 대하여 QC-PCR 이용 validation 연구결과, 25%의 오차가 발생, 75%의 신뢰도를 나타내어 GMO 검정에 실질적으로 적용하기는 곤란한 것으로 나타났다.

TaqMan chemistry에 의한 정량 PCR 분석법은 PCR 증폭과정의 kinetics를 측정하는 원리를 이용한 것으로 형광발색제인 reporter dye와 quencher dye로 이루어진 특이한 probe를 이용한다. DNA에 특이적으로 결합하는 양쪽 프라이머 사이의 염기서열과 상보적인 염기서열을 가지며 양 말단에 형광물질이 결합된 프로브는 Taq DNA polymerase가 프라이머로부터 DNA 합성을 연장하여 나갈 때 5'-exonuclease의 활성화에 의해 프로브의 5' 말단에 결합된 형광물질이 프로브로부터 해리되면서 형광발색을 나타낸다. 이렇게 발산된 형광은 PCR 사이클이 증가함에 따라 증폭되는 DNA 양에 비례하여 증가하게 되는데 PCR의 각 반응사이클에서 나오는 형광시그널을 집적하여 동역학적(kinetics)으로 분석함으로써 실시간별로 반응정도를 확인, DNA 양을 정량하는 것이다. 따라서 알려진 GMO 함량별 표준시료의 PCR 증폭과정의 실시간별 표준곡선과 검지시료를 비교하여 검정시료에 함유된 GMO DNA의 양을 정량하게 된다. Real time PCR에 의한 GMO 검정범위는 0.1%~100%로 알려져 있으며 현재 real time PCR을 이용한 정량분석법의 실용화를 위한 validation 연구가 국내외에서 활발히 이뤄지고 있다. 독일의 Gene Scan이란 검사기관에서 주관한 EU의 8개 실험실의 RT-PCR 이용 정량분석 ring test 결과, 0.5% 시료의 실측치는 $0.4 \pm 0.1\%$ 로 25%의 분석변이정도, 1% 시료의 실측치는 $1.2 \pm 0.1\%$ 로 10%의 변이정도, 2%시료의 실측치는 $1.7 \pm 0.1\%$ 로 12%의 변이정도를 나타내었다. 따라서 RT-PCR을 이용한 검정에서도 GMO 허용한계치에 대한 분석 오차범위를 고려해야 할 것이다.

최근 일본 식품종합연구소에서는 amplicon plasmid를 standard DNA로 하여 RT-PCR에 의한 GMO 정량 검사법을 개발하였고, 현재 일본, 한국, 미국 등의 15개 연구실과의 협동연구를 주관하여 validation 연구를 수행 중에 있다.

4. GMO 검정기술 적용상의 문제점

GMO 검정기술을 실질적으로 적용하는데 해결되어야 할 몇 가지의 문제점이 있는데 시료채취방법이 그 중의 하나이다. GMO 검정에서 나타나는 오차는 시료채취상의 오차와 분석오차를 같이 포함한다. 경우에 따라 시료채취의 오차가 분석오차보다 크게 나타나기도 하여 대표성을 갖는 시료채취법 연구가 요구된다. 또한 시료채취 계획이 자체검정용(Acceptance Sampling)인지 규제목적용(Regulatory Sampling)인지 등의 목적에 따라 달라질 수 있다. 현재 미국 농무부 곡물검사소(Grain Inspection, Packers, and Stockyards Administration, GIPSA)에서는 시료크기에 따른 분석감도(test sensitivity)로 효과적인 시료채취법 연구를 수행 중에 있으며 유럽의 CEN(European Normalization Committee)에서도 연속적인 시료채취법(continuous sampling) 연구를 수행 중에 있다.

GMO 검정에서 해결되어야 할 중요한 문제가 표준시료 확보이다. 현재 벨기에 IRMM에서는 제초제저항성 콩 1종과 Bt 옥수수 2종에 대하여 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 5%의 공인표준시료(Certified Reference Materials, CRM)를 제조하고 있으나 우리나라의 경우 GMO 표시의 허용한계치가 3%이므로 유럽의 공인표준시료를 이용할 수 없는 실정이다. 더욱이 자체적으로 GMO 정량검정을 위한 함량별 표준시료를 제작한다고 하더라도 100%의 표준시료를 입수가 선행되어야만 하나 역시 개발회사의 협조없이는 불가능하다.

또 다른 문제점은 GMO 표시를 위한 허용한계치가 설정되어 있으나 질량(w %)인지 분석상 적용되는 분자단위(mol %)인지에 대한 결정이 확실하지 않으며 아직 기술적으로 표준화된 분석법이 확립되어 있지 않다는 것이다. 따라서 여러 분석방법에 대한 검증(validation) 연구가 필요하며 분석목적 및 분석방법에 따라 시료추출효율 및 정확도(accuracy), 정밀도(precision), 재현성(reproducibility), 검출감도(sensitivity), 특이성(specificity), 변이정도(ruggedness) 등의 사항들이 협동연구(ring test) 등을 통하여 검토되어야 할 것이다.

III. 결 론

현재 우리나라뿐만 아니라 EU, 일본 등 GMO 표시제가 법으로 규정되어 시행되고 있음에도 불구하고 아직 국제적으로 인정하는 검정방법(internationally validated method)은 없는 상태이나 스위스·독일에서는 35S, Nos 프라이머를 이용한 PCR 검정방법을 Swiss·German method라 하여 자국내에서 공식화하고 있다. 그러나 스위스·독일 공인기법은 최근 새롭게 개발되고 있는 기술인 RT-PCR이나 DNA chip 이용기술과 비교하면 낙후된 방법이므로 새로운 GMO 검정방법 개발과 함께 국제적으로 공감대를 형성할 수 있는 GMO 검정기술의 표준화작업이 요구되고 있다. 최근 일본에서 개최된 Codex 특별작업반회의에서는 독일을 중심으로 하여 각국에서 적용할 수 있는 GMO 검정방법의 개발 및 표준화작업을 위한

논의가 이뤄진 바 있으며 국내외 연구기관에서는 GMO 검정기술의 표준화를 위한 validation 연구가 활발히 진행되고 있다.

참고문헌

1. DG JRC. BgVV(2000) Validation of analytical methods for the identification and determination of genetically modified organisms (GMOs) in food and food ingredients.
2. Gilson U. *et al.* (1996) A novel method for real time Quantitative RT-PCR. *Genome Research* 6 : 995-1001
3. Hübner P. *et al.* (1999) Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organisms in food 10 : 353-358
4. ILSI report (1998) Methods for novel foods derived from genetically modified organisms.
5. ILSI report (2000) Development in relation to regulatory requirements for the detection of GMOs in food chain.
6. Jankiewicz A *et al.* (1999) the official method for the detection of genetically modified soybeans(German Food Act LMBG § 35): a semi-quantitative study of sensitivity limits with glyphosate-tolerant soybean(Roundup Ready) and insect-resistant Bt maize(Maximizer)
7. Pietsch K. and Waiblinger H. (1999) Quantification of genetically modified soybeans in food with the LightCycler system.
8. Wurz. A *et al.* (1999) Quantitative analysis of genetically modified organism (GMO) in processed food by PCR-based methods. *Food Control* 10 : 385-389
9. 김태산 등 (2000) 유전자재조합식품의 공인된 검사방법 개발. *환경법학회지* 22 : 87-103