



## 유전자 변형 작물 성분 검출용 PCR Kit의 성능 평가 연구

윤시온 · 정순천 · 윤원기 · 박상규 · 문제선 · 이정현 · 김환목  
한국생명공학연구원 바이오평가센터 LMO평가연구실

### Performance Evaluation of PCR Kits for Detecting Genetically Modified Crop Ingredients

Si On Yun, Soon-Chun Jeong, Won Kee Yoon, Sangkyu Park, Jae Sun Moon,  
Joung Hyun Lee and Hwan Mook Kim

LMO Evaluation Laboratory, Bio-Evaluation Center,  
Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-806, Korea

Received March 9, 2004; Accepted April 7, 2004

**ABSTRACT.** The different social reflections about the benefits and the potential risks of genetically modified (GM) crops have evolved with different reactions in different countries. Many countries including Korea are working toward setting down new guidelines. Korea requires companies to label all food that contains more than 3% GM ingredients. One of the rapid and convenient detection methods of GM ingredients is amplification of the introduced DNAs by polymerase chain reaction (PCR). Many PCR kits for this purpose are commercially available. The objective of this study was to evaluate performance of commercialized GM crop detection kits. The results showed that 6 out of 15 kits tested did not meet the requirements even purposed by the manufacturers themselves in terms of stability, reproducibility, and detection limits, suggesting a potential quality control problem in their design stage or production line. The evaluation also suggests that, although the duplex and triplex detection kits allowed unambiguous detection in a single PCR reaction, the monoplex detection kits were the most sensitive to the detection of GM ingredients. The detection limits also differ between soybean and corn. Results from this study will be useful in the development of sound qualitative tracking systems of GM ingredients for monitoring throughout the cultivation of GM crops, their transboundary movement, and food production using GM grains as well as for complying with government guidelines associated with GM crops.

**Keywords:** Corn, Genetically modified crop, PCR detection kit, Soybean.

## 서 론

최초로 상업화된 유전자변형 토마토 'Flavr Savr'(Sheehy *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1988)에 대한 검정법 개발 연구가 Meyer(1995)에 의해 처음 시도된 후 2001년 말

까지 세계적으로 상품화 승인을 얻은 경우는 옥수수, 토마토, 면화, 콩, 유채, 감자, 호박, 사탕무, 아마, 벼, 파파야, 치커리등 모두 15작물 68종에 달하고(한국생명공학연구원, 2003), 이들의 특성인 제초제저항성, 해충 저항성, 알칼리토양내성, 병저항성에 대한 활발한 연구가 국내뿐만 아니라 국제적으로도 활발하게 진행되고 있다.

최근 유전자 변형 작물의 재배가 급증함에 따라 국내에도 유전자변형 농산물의 수입이 급증하고 있으며 2001년부터 유전자변형 농산물 및 식품에 대한 표시제가 시행되었다. 이에 수반하여 GM(genetically modified) 작물 검정기술 개발 및 실용화 연구가 활발히 진행되고 검출방법

Correspondence to: Hwan Mook Kim, LMO Evaluation Laboratory, Bio-Evaluation Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-806, Korea  
E-mail: hwanmook@kribb.re.kr

Abbreviations: 35S, Cauliflower mosaic virus 35S promoter; EPSPS, 5-endopyruvylshikimate-3-phosphate synthase; GM, genetically modified; NOS, Nopaline synthase terminator; PCR, polymerase chain reaction.

의 국제적인 표준화에 대한 논의도 활발해지고 있다 (Halford와 Shewry, 2000)

현재 국내·외에 유통되고 있는 GM 농산물은 주로 콩, 옥수수, 유채, 면화 등인데, 우리나라의 주요 식량 수입국인 미국의 경우 1999년에 재배된 콩의 전체 재배면적의 45%, 옥수수의 40% 이상이 GM 작물인 것으로 보고된 바 있다(Beachy, 1999). GM 작물의 잠재적인 안전성에 대한 우려가 세계적으로 대두되고 있는 가운데, 우리나라에서도 2001년부터 유전자변형농산물과 콩, 콩나물, 옥수수를 주원료로 하는 27개 식품에 대한 표시제를 의무화하였다(농림부, 2000; 식품의약품안전청 고시, 2001). 따라서 식품에 첨가된 GM 작물의 포함 여부를 검출하는 정성 및 정량적 방법의 개발은 필수적이다. 유전자변형작물이나 식품에서 GM임을 검출하기 위해 개발된 정성 분석방법은 크게 두 가지로 구분될 수 있는데, 유전자변형에 의해 만들어진 단백질을 면역학적, 또는 단백질 화학적으로 분석하는 방법과 유전자변형에 사용되는 변형유전자나 표지유전자를 증폭하여 정성적으로 분석하는 방법(Kuiper, 1999)이 있다. GM 작물 검출기법에 가장 많이 이용되는 것이 PCR을 이용한 스크리닝 방법이며, 최근에는 GM 작물 포함여부를 검정할 수 있는 kit들이 시중에 많이 개발되어 시판되고 있다.

선진국의 기업들은 유전자분석의 수요가 막대할 것으로 예측하여, 단백질이나 변형유전자를 감지할 수 있는 검출법을 산업화하여 분석하고자 하는 시료를 신속하게 정성 분석할 수 있는 kit 형태의 검출제품을 만들어 왔으며, 특히 유전자증폭(PCR)방법에 의해 변형유전자를 감지하는 제품이 많이 출시되고 있다. PCR에 의한 GM 작물 검출 kit 들은 이들 유전자의 coding region의 검출을 위해 제작된 것과, 이들 유전자들이 식물체 내에서 발현되기 위해 필수적인 요소들인 promoter와 terminator에 가장 보편적으로 사용되고 있는 Cauliflower mosaic virus 35S promoter(35S)와 nopaline synthase terminator(NOS)의 검출을 위해 제작된 것이 대부분이다(Kuiper, 1999).

본 연구에서는 유전자 변형 콩(*Glycine max* (L.) Merr.) 과 옥수수(*Zea mays* L.)를 재료로 하여 우리나라의 유전자변형농산물에 대한 정성검정 방법의 하나로 채택된 PCR(국립농산물품질관리원, 2001) 방법에 따라 제작된 국내·외의 정성분석용 GM 작물 검출 kit의 분석 및 검출한계를 시험하였다. 시험에 사용된 15개 kit 중 6개는 예상되는 결과와는 상이한 점과, 본 연구실에서 최적화된 PCR 방법(이하 최적 PCR법)에 의한 검출 한계가 시판되는 kit의 검출 능력보다 뛰어난 것으로 나타나는 점은 현재 시판되는 kit는 생산과 개발에 있어 개선되어야 할 점들을 시사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 전처리

유전자변형 콩 HS2906과 옥수수 FS5661Bt는 GROWMARK®(Bloomington, IL, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 음성대조군으로 사용된 non-GM 콩과 옥수수에는 각각 'Williams82'와 국내 시장에서 구입이 가능한 옥수수 품종 '찰옥수수'를 이용하였다. 시료제조를 위해 각 작물의 종자는 생장기(광도 4000 lx, 16시간 광주기, 23°C, 습도 30%)에서 발아시키고, 2개월 동안 성장시킨 다음 본엽의 일부를 채취하였다.

### DNA 추출

GM 및 non-GM 콩과 옥수수의 DNA는 CTAB method에 의해 추출하였다(Doyle and Doyle, 1990). 추출한 DNA는 A260/280의 값이 1.7~2.0 범위내의 DNA만을 사용하였으며, 농도는 콩의 경우 300 ng/μl, 옥수수는 800 ng/μl로 원액의 농도를 결정하였다.

### Kit의 PCR 분석

전세계에서 2001년과 2002년에 시판되는 것으로 조사되었던 우리나라를 포함한 6개국 10개사(Table 1)의 15개 PCR kit를 구매하여 실험, 분석하였다. 제작회사 명과 각 kit의 이름에 대한 기술은 본 논문의 목적상 생략하였고, 편의상 A에서 J까지 알파벳 순으로 제작사 이름을 기술하고자 한다. 3개 제작사(A, D, 및 E)는 옥수수와 콩에 적합한 시약과 primers가 함유된 별도의 kit를 판매하였고, F사는 옥수수와 콩 분석용 kit에 첨가하여 35S 특이 kit을 판매하였고, 나머지 제작사는 콩과 옥수수의 primers를 하나의 kit에 포함하여 판매하여, 총 15개 kit을 시험하였다. 각 kit는 동봉된 사용지침에 따라 실험하

**Table 1.** List of commercial qualitative GM crops detection kit by polymerase chain reaction

Nationality	Manufacturer	Number of kit	Detection target
Korea	A	2	35S <sup>a)</sup> , NOS <sup>b)</sup>
Korea	B	1	35S, NOS
Korea	C	1	35S, NOS
Korea	D	2	35S, NOS
Japan	E	2	35S, EPSPS <sup>c)</sup>
Germany	F	3	35S, EPSPS, CryIA(b)
Spain	G	1	35S, NOS
SWISS	H	1	35S
USA	I	1	35S, NOS, Bar
USA	J	1	35S, NOS

<sup>a)</sup>Cauliflower mosaic virus 35S promoter.

<sup>b)</sup>Nopaline synthase terminator

<sup>c)</sup>5-endopyruvylshikimate-3-phosphate synthase.

였으며 주형(template)으로 사용된 DNA는 모든 kit에 동일하게 반응 당 1 µl를 사용하였다. 반복성을 확인하기 위해 모든 kit는 최소 2번에 걸쳐 실험하였으며 사용지침과 다른 결과가 나올 시에는 3번~5번까지 반복 실시하였다. 양성 및 음성 대조군은 kit안에 포함되었을 경우에만 추가하였고, 그렇지 않은 경우에는 음성 대조군으로 멸균된 증류수 1 µl를 주형으로 사용하였다. 검출한계 확인을 위해서는 각 종의 DNA를 순차적으로 희석(serial dilution)하여 PCR산물이 확인되지 않는 점까지 실험을 하였다. PCR 기기는 Thermo Hybaid(Thermo, Woburn, MA, USA)를 사용하였다. PCR 후의 산물은 2% agarose gel에 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 gel doc(Biorad, Hercules, CA, USA)으로 확인하였다.

### 염기서열 결정

시료의 동정을 위한 염기서열 확인은 PCR 산물을 agarose gel에서 분리하여 PCR purification kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 정제한 후 유진텍(대전)에 의뢰하였다.

### 최적 PCR법에 의한 실험

시판되는 kit들의 안정성과 재현성을 비교하는 수단으로 DNA의 양과 질 같은 불확실한 문제에 기인하여 본 연구실에서 일반적인 PCR 조건에서 PCR 산물을 얻기가 어려운 경우에 특별히 사용하는 최적화된 PCR 방법을 사용하였다. 본 최적 PCR 반응에서 주목할 점은 extension 온도가 통상적인 72°C 대신에 68°C에서 반응을 수행한 점과 Elongase Enzyme Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, 미국)을 사용했다는 점이다. Elongase는 널리 사용되는 *Taq* polymerase와 *Pyrococcus species* GB-D thermostable DNA polymerase를 혼합한 DNA 중합효소로서 *Taq* polymerase에 부족한 편집기능(3' to 5' exonuclease)을 보완하여 nucleotide misincorporation과 지속적인 primer elongation을 방지하였다. 원액의 농도가 300 ng/µl(콩) 및 800 ng/µl(옥수수)의 DNA를 순차적으로 희석하여 주형으로 사용하였다. 주형 DNA 1 µl, CaMV 35S(628U와 835L), NOS(1U와 256L), EPSPS (5-endopyruvylshikimate-3-phosphate synthase, U와 L)(각10 pmol)의 검출에 특이한 primer(Table 2) 2 µl, 5× buffer 4 µl, 10 mM dNTP 0.4 µl, Elongase(Invitrogen) 0.8 µl를 멸균된 증류수와 혼합하여 전체 20µl의 반응액으로 95°C에서 1분간 열변성 반응 후, 94°C에서 30초, 58°C에서 30초, 68°C에서 30초(EPSPS의 경우는 2.5분)간의 반응을 35회 실시하고 마지막으로 68°C에서

**Table 2.** List of primers for in-house optimized PCR method

Target	Primer	Sequence (5'-3')
35S <sup>a)</sup>	631U	AAGATGCCTCTGCCGACAGT
35S	835L	CGTGTCTCTCCAAATGAAATG
NOS <sup>b)</sup>	1U	GATCGTTCAAACATTTGGCAATA
NOS	256L	CCCGATCTAGTAACATAGATGA
EPSPS <sup>c)</sup>	U	AAACTCGAGGCTTCACGGTCAAGCAGCCG
EPSPS	L	AAAAAGCTTTGGCAGCCTTCGTATCGGAGAG
Lectin	972U	GCTACTTCAAAGTTGAAACCCAG
Lectin	1300L	TAGAAGGTGAAGTTGAAGGAAG
Zein	361U	ATGAAGATGGTCATCGTTCTCG
Zein	650L	ACGTCCATCATCCTCATCTG

<sup>a)</sup>Cauliflower mosaic virus 35S promoter.

<sup>b)</sup>Nopaline synthase terminator.

<sup>c)</sup>5-endopyruvylshikimate-3-phosphate synthase.

5분 동안 신장반응을 실시했다. PCR산물의 확인은 kit의 PCR 분석과 동일하게 실시하였다.

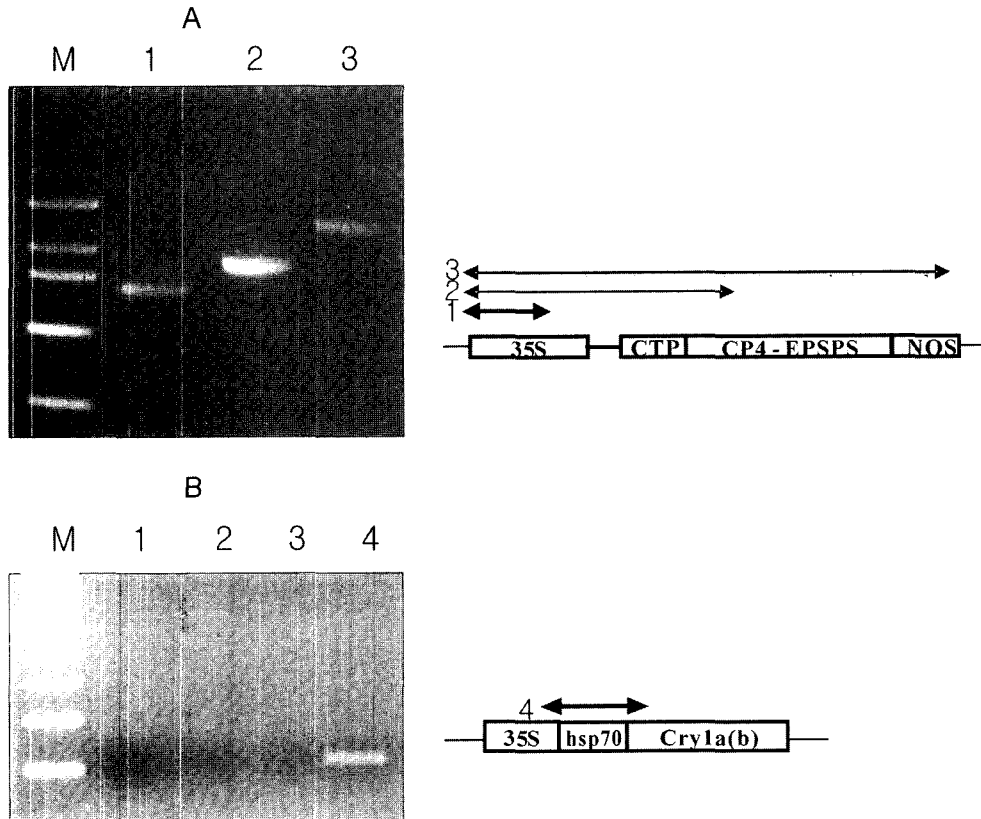
## 결 과

### 시료의 동정

본 실험에 사용된 유전자변형 콩과 옥수수의 동정을 위하여, 가장 일반적으로 사용되는 35S와 NOS에 특이한 primer를 제작하였다(Table 2). 콩의 동정을 위하여 EPSPS 특이 primer를 제작하였고(Table 2), 옥수수의 동정을 위해서는 시판되는 옥수수 event 특이 primer set (Wako, Tokyo, Japan)를 구입하여 PCR을 실시하였다. PCR 결과 콩은 CaMV 35S promoter와 NOS terminator를 보유하고 있고, 옥수수에서는 CaMV 35S만이 검출되었다. Event 특이 primer를 이용하여 증폭된 PCR 산물의 염기서열을 결정하여 확보한 GM콩은 Round-up Ready Soybean(RRS)와 같은 유전자를 가진 것으로 최종 확인되었다. 또한 CaMV 35S를 가진 GM옥수수의 도입유전자는 염기서열 분석 결과에 의하면, *hsp70*의 intron에 해당되는 염기서열에 인접하여 35S와 *cryIA(b)*가 위치하고 있음이 확인되었다. 따라서 확보한 GM 옥수수는 MON810과 같은 유전자를 가진 것으로 확인되었다(Fig. 1).

### Kit의 제조사에서 검출을 목표로 하는 표적유전자의 검출 유무

Kit의 사용지침에 따라 실험하였으며 모두 동일한 양의 주형 DNA와 PCR 기기를 사용하여 환경에 따른 다양성을 최소화하였다. 각각의 kit는 2차례 이상의 반복 실험을 수행하였다. 비특이적인 DNA의 검출로 인해 결과의 판독이 불가능하여 GM 작물 검출 유무를 판단하기 어려운 경우에는 제조 검정과정에서 다른 lot number의 동일한 kit로



**Fig. 1.** Identification of the incorporated event in the GM soybean and corn used in this study. A : PCR products amplified from HS2906 using primer pairs of CaMV 35S 631U-35S 835L(1), 35S 631U-EPSPS L(2), 35S 631U-NOS 256L(3). B : PCR products amplified from FS5661Bt using event specific primer pairs for CBH351 (1), C176-2 (2), Bt11-3 (3), MON810 (4). Genome organization of event HS2906(A) and FS5661Bt(B) in transgenic crops is shown in the right side of the picture. M is 1 kb ladder.

재실험 하였으나 같은 결과를 얻었다. 10사의 kit 중에서 5개사의 kit는 사용지침에서 예측하는 바와는 다른 결과가 나왔다. Fig. 2의 a, b, 및 c는 양질의 kit로 판단되는 대표적인 monoplex, duplex, 및 triplex PCR kit의 결과를 각각 보여주고 있다. 하지만 나머지 kit는 아래의 문제점을 보여 정상적인 정성분석에 사용할 수 없는 것으로 판단되었다. 표적 DNA의 증폭과 더불어 많은 수의 비특이적 배후 산물이 동시에 증폭되거나 표적 산물 이외 한두개 이상의 산물이 증폭되는 경우(Fig. 2d), 양성 대조군이 오염된 경우(Fig. 2d 및 2e), 주형 DNA의 양에 따라 내부 양성 대조군과 표적 산물의 증폭의 정도가 변화하는(Fig. 2e) 등이 전형적인 kit의 결점으로 부각되었다.

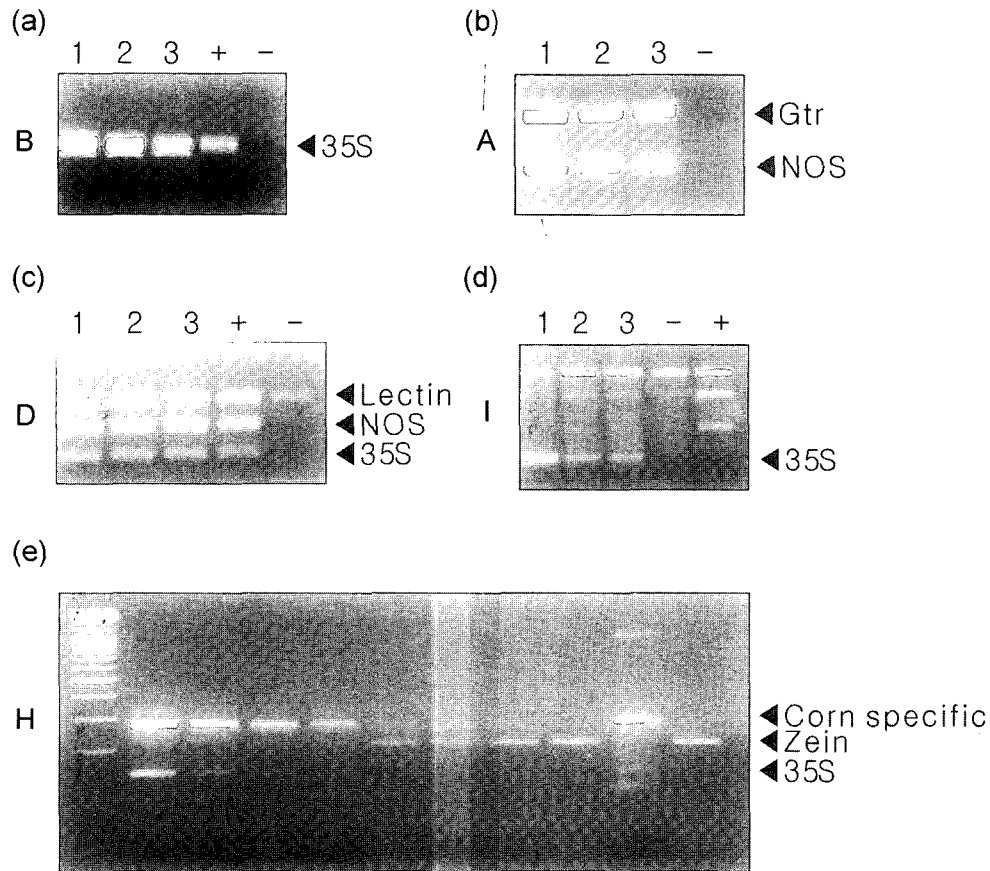
**제조사에서 채택하고 있는 kit의 유형에 따른 분석**

PCR kit는 검출하고자 하는 표적의 수에 따라 monoplex(표적수 1), duplex(2), 및 triplex(3)로 구분된다. kit의 대부분은 도입유전자를 검출하는 monoplex의 형이

가장 많았으며, 이외에 kit는 도입유전자의 검출 뿐만 아니라 내재유전자의 검출이 동시에 일어나는 duplex 또는 triplex이었다. Multiplex PCR은 내재유전자를 동시에 동일한 tube에서 증폭함으로써 사용된 주형 DNA의 종류, PCR 반응에 사용된 시약의 문제점 등을 한 단계로 확인 할 수 있는 장점이 있으나(Permingeat *et al.*, 2002; James *et al.*, 2003), monoplex에 비교하여 duplex는 4배 정도 및 triplex는 100배 정도로 검출 감도에 부정적인 영향을 미친다는 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 3).

**각 kit 및 작물에 따른 kit의 검출의 한계**

PCR GM 작물 검출 kit는 그 원리와 검출 표적면에서 다수의 유사성을 가지고 있다. 하지만 유전자변형 콩 및 옥수수로부터 추출된 DNA 시료를 순차 희석하여 주형 DNA로 사용하여, 동일한 template를 가지고 그 농도를 달리하여 검출의 최저점까지의 결과를 비교해 보았을 때, Fig. 4. A, B, C를 서로 비교하여 나타낸 바와 같이 동일

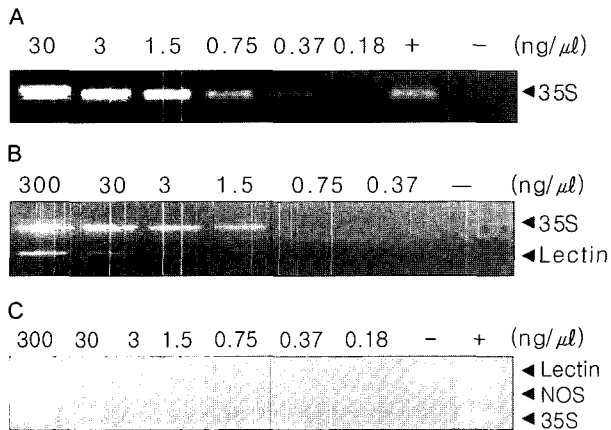


**Fig. 2.** Evaluation of qualitative GM crop detection kits bought from 10 manufacturers. (a) : Monoplex PCR kit. (b) : Duplex PCR kit. (c) : Triplex PCR kit. (d) : High background in addition to a targeted product. (e) : Only the zein and corn specific band, which were used as internal controls, was detected in the reactions (lanes 5, 6, 7, and 8) that contained low levels of template corn DNAs; In this case, positive control contaminated and negative control contained an internal control product. Only representative agarose gel electrophoresis patterns are shown for demonstration purposes. The arrow indicate targeted product(s) produced by each kit. Lanes 1, 2, and 3 except (e) panel are PCR products from three different reactions in which the same reaction condition were applied. In case of (e) panel, the corn template DNAs were serially diluted from lane 1 to lane 8. In case that a kit contains positive control, the positive control (indicated by '+') was run. Negative control (indicated by '-') was always run. In case that a kit did not contain negative control, sterilized water was used. The names of manufacturers are shown in the left side of the picture.

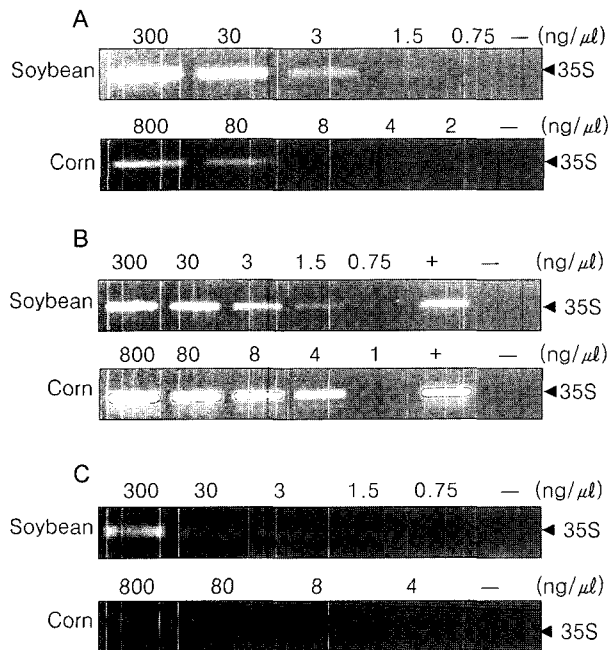
한 주형 DNA를 비교하면 최소 2배에서 최대 10배의 차이를 나타내었다.

PCR에 의한 GM 작물 검출 kit를 사용할 때 사용된 주형 DNA가 어떤 종류인지, 어디에서 어떻게 유래한 것인지에 따라 검출의 한계에 차이가 있기 때문에 콩과 옥수수에 따른 kit의 검출한계에 대한 다양성을 실험했다. 사용된 kit는 모두 검출감도가 가장 높은 monoplex PCR 형태의 kit만을 사용하여 실험했다. 현재 GM 작물의 약 85% 이상을 차지하고 있는 콩과 옥수수를 kit를 이용하여 검출할 경우, 각각의 작물에 따라 검출한계가 차이가 나는지 시험하였다(Fig. 4). Kit의 대부분이 CaMV 35S 또는 NOS를 검출하는 일반적인 검출방법을 채택하고 있는 것을 고려하면, 안정적인 검출을 위해 분

석에 사용되는 작물의 종류에 따라 사용해야 할 주형 DNA의 양은 달리 설정되어야 한다. Kit의 GM 검출한계를 시험하기 위하여 서로 다른 양의 주형 DNA로 표적 DNA의 증폭을 시도하였다. 가장 높은 감도를 나타낸 kit를 확인한 결과 콩의 경우 1.5 ng, 옥수수의 경우 8 ng의 주형 DNA가 표적 DNA의 검출 한계로 나타났다. 3개사 kit 모두 콩 DNA를 사용할 경우 비슷한 검출한계를 보여준 반면, 옥수수 DNA를 사용했을 경우 나타난 결과를 보면 표적 DNA의 검출을 위해 요구되는 주형 DNA의 농도가 최소 3배에서 최대 30배의 차이가 나는 것을 확인할 수 있다. 이 결과는 콩과 옥수수의 유전체 크기가 각각 2,200 Mbp와 5,000 Mbp로 옥수수의 유전체 크기가 약 2.3배가 크기(Arumaganathan and

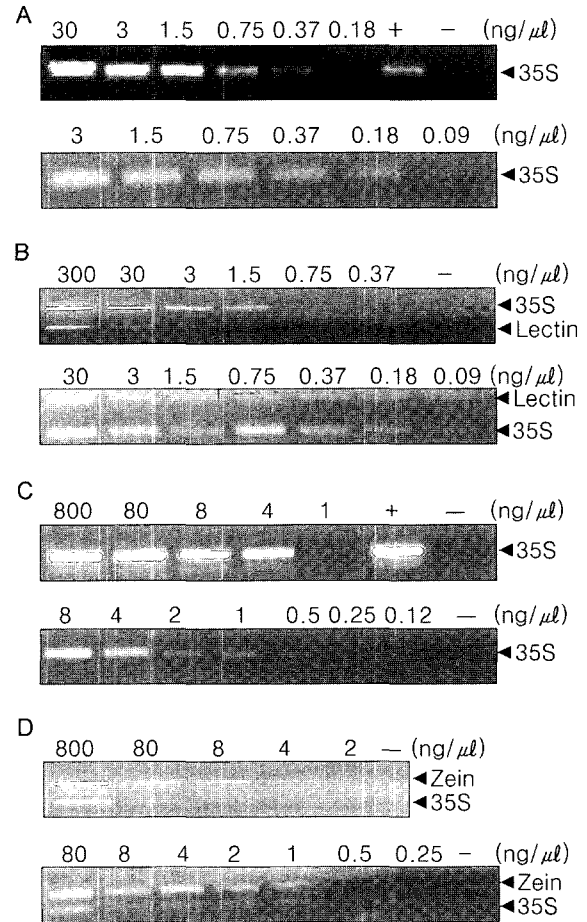


**Fig. 3.** Detection limit of three kit types. A : Monoplex type kit. B : Duplex type kit. C : Triplex type kit. Genomic DNA from HS2906 was used as an template. The amount of template DNA used, positive control (+), and negative control (-) are shown on top of each lane. Positive control was used in case that a kit contained it. Negative control was sterilized water or the one contained in a kit.



**Fig. 4.** Comparison of detection limits on 35S promoter in soybean and corn transgenic lines by several kits. Three of the monoplex type kits that showed the highest sensitivity were evaluated. Genomic DNA from HS2906 and FS5661Bt were used as templates. The amount of template DNA used, positive control (+), and negative control (-) are shown on top of each lane. Positive control was used in case that a kit contained it. Negative control was sterilized water or the one contained in a kit.

Earle, 1991) 때문에 예측될 수 있는 차이보다 훨씬 큰 차이이다.



**Fig. 5.** Comparison between in-house optimized standard PCR method and commercial kits. A : soybean-monoplex. B : soybean-duplex. C : corn-monoplex. D : corn-duplex. In each of A, B, C, and D panels, upper picture was from the optimized standard PCR and lower from a commercial kit. The amount of template DNA used, positive control (+), and negative control (-) are shown on top of each lane. Positive control was used in case that a kit contained it. Negative control was sterilized water or the one contained in a kit.

**Kit와 최적 PCR법에 의한 검출법의 비교**

GM임을 검출하기 위해서 kit를 사용하면 실험이 비교적 쉽고 간단하다는 장점이 있다. 그러나 PCR 검출 감도는 PCR에 사용한 DNA의 순도 및 양, primer의 특이성에 따라 다르게 나타나며 고감도 검출의 경우 0.01%까지 검출이 가능함이 보고된 바 있다(Koppel *et al.*, 1997). 그래서 검출 감도면에서 본 연구실에서 최적 PCR법과 얼마나 차이를 보이는지를 실험했다. HS2906와 FS5661Bt의 genomic DNA를 주형으로 하여 10개 사의 kit와 최적화된 표준 PCR 방법과 비교하였다(Fig. 5). 실험결과 최적화된 PCR 방법으로 검출 하였을 때 kit가 보여주는 검출 능력보다 우월한 것으로 나타났다. Fig. 5에서 나타

난 차이는 비교된 kit의 선발기준(검증에 사용된 kit 중에서 가장 높은 검출한계를 가진 kit)을 고려해 볼 때 실제 나타날 수 있는 감도 차이의 최소 수준에 불과하다. 특히 옥수수를 시료로 사용하여 duplex PCR을 수행할 때 나타나는 검출감도의 차이는 콩에서보다 훨씬 크다. 또한 가장 높은 감도를 나타내는 kit에서조차 kit의 제조사가 제시하는 조건보다 낮게 나타났다.

## 고 찰

본 연구는 상업적으로 국내·외에 유통되고 있는 정성분석용 GM 작물 검출 kit 15종을 구매하여 이들의 검출능력과 검출 감도를 시험하였다. 6개국 10개 회사에서 시판되는 총 15종의 GM 작물 검출 kit를 대표적인 유전자 변형 작물 중 HS2906과 옥수수 FS5661Bt에서 추출한 genomic DNA를 사용하여 비교 시험한 결과는 현재 시판되는 kit들의 문제점과 미래의 kit 제작을 위한 다음과 같은 점들을 시사하였다. 첫째, 10개 제작사 중 5개 제작사의 kit가 사용지침에서 제시된 결과가 나오지 않았던 점과 검출 한계의 차이는 이들 kit의 제작사의 영세성 또는 kit의 시장성이 낮은 이유로 개발 및 생산 단계의 품질관리의 수준이 낮은 것으로 볼 수 있다. 이러한 측면에서 본 연구실에서 시행한 최적 PCR법이 고가의 *Elongase*를 사용하는 단점이 있기는 하나 시판되는 kit보다 검출능력이 우월한 결과는 kit의 단위 가격이 상승되는 측면이 있어도 비전문가 단체를 고려하여 재현성과 안정성이 뛰어난 kit를 제작하는 방안을 제시하고 있다. 둘째, multiplex PCR은 monoplex PCR에 비하여 다양한 장점이 있으나 검출 감도에 부정적인 영향을 주는 것으로 관찰되었다. 이는 multiplex PCR이 2쌍 이상의 PCR primer를 사용하는 문제점이므로, 서로 다른 primer 쌍 사이에 간섭이 최소화된 primer를 작성함에 의해 해결될 수 있을 것이다. 셋째, 유전체의 크기가 2.3배 정도 차이가 나는 콩과 옥수수의 검출한계에 대한 실험은 작물에 따른 고유 검출한계를 시사하지만, 예상되는 검출한계보다 더 큰 차이를 보였다. 넷째, 현재 유통되고 있는 kit의 다수는 35S(promoter)와 NOS(terminator)의 염기서열에 기초한 primer를 함유한 kit가 주류를 이루고 있어서 이미 상업화된 대다수의 event들을 검출하는 데는 용이하다. 하지만, 최근의 GM 작물 개발은 이들 염기서열을 사용하지 않는 도입유전자를 사용하고 있어(Garg *et al.*, 2003; Jang *et al.*, 2003), 계속적인 GM 작물 검출 kit의 개발이 요망된다. 결론적으로, 본 연구는 현재 시판되고 있는 GM 작물 검출 kit는 검출한계를 고려한 설계단계, 안정성과 재현성의 시험 단계, 생산 단계, 신규 event의 개발에 대비한 검출

범위의 확대 등의 부분에서 개선되어야 할 필요가 있음을 시사하였다.

Kit를 이용하여 시험하는 것은 완전한 연구시설이 갖추어지지 않은 단체나 개인들이 작물의 GM 검출을 효과적으로 시행할 수 있도록 하는 장점이 있으나, 본 연구의 결과는 kit의 대부분은 그 본연의 목적조차도 제대로 달성하지 못한 것으로 확인되었다. 이러한 문제점들을 해결하기 위해서는 국가에서 GM 작물 검출 kit를 종류별로 검출하고 이를 표준화할 필요성이 있다고 본다. 또한 이를 표준화하기 위해서는 국가에서 검증 및 인정제도를 마련하여 국가가 인정하는 기준에 적합한 kit를 선발 고시하는 제도적인 장치 마련이 필요하다.

재현성과 안정성이 뛰어난 정성용 GM 작물 검정 kit는 바이오안전성의정서 (<http://www.biodiv.org/biosafety/default.aspx>)의 발효에 따른 유전자변형 작물의 국가간 이동에 대한 감시체계의 구축에 필수적인 도구로 사용될 수 있다. 특히 식량 수입국들은 승인된 GM 작물의 유입 뿐만 아니라 미승인 GM 작물의 국내 유입에 대한 검출체계를 확립하여, 식품 시장 및 국가환경 모니터링을 지속적으로 수행해야 할 처지에 있다. 이러한 측면에서 정성용 GM 작물 검출 kit의 개발과정에서 여타의 kit의 제작에 비교하여 특별히 고려되어야 할 점은 기술적인 측면 이외에도 정부의 법과 규칙에 적합하도록 kit를 제작해야 하는 것이다. 예를 들어, 검출감도 측면에서 볼 때, 정성용 kit라도 우리나라의 GM 작물 혼입 표시기준인 3%(농림부, 2001; 식품의약품안전청, 2001) 혼입률 이상은 검출할 수 있는 kit들이 제작되어, 최소한 표시기준이 되는 한계까지는 검출하는 것이 kit의 본연의 목적이라고 사료된다. 또한, 비영리 사회 단체나 개인이 소비자의 알권리나 국가환경 보호를 위해 사용할 경우를 대비하여 앞으로 개발되는 GM 작물 검출 kit는 관련 연구 기관간의 상호 검정체계를 구축함과 더불어 상업화 이전에 몇몇 단체들에서 시험 사용하여 재현성과 안정성이 보장되는지를 확인하는 절차를 거치는 것이 필요하다.

## 감사의 말씀

이 연구는 과학기술부 시행 국책 생명공학안전성평가기술개발사업 내 LMO의 유전자분석기술개발 과제 및 한국생명공학연구원의 기관고유사업을 통한 연구비 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사하는 바입니다.

## 요 약

유전자변형작물의 이점과 잠재적 위해에 관한 다른 사

회적 인식은 각국에서 다른 반응을 유발시켜왔다. 한국을 포함한 많은 국가는 새로운 규제를 제정하기 위해 부심하고 있다. 한국은 최근에 3% 이상의 유전자변형작물 혼입을 포함하는 모든 식품에 표시제를 실시하였다. 유전자변형작물 혼입을 신속하고 간편하게 검출하는 방법의 하나는 PCR에 의한 도입 DNA의 증폭이다. 이 목적을 위한 많은 PCR kit가 시판되고 있어, 본 연구는 이들 상업화된 유전자변형작물 검출 kit의 성능을 시험하였다. 그 결과 이들 15개 kit 중 6개는 안정성, 재현성 및 검출 한계의 측면에서 제작사 스스로 제시한 요구조건도 충족하지 못하여 이들 kit의 개발 및 생산 단계에서 품질관리에 문제점이 있음을 시사하였다. 본 시험은 또한 duplex와 triplex 검출 kit가 단일 PCR 반응에서 명백한 검출을 보장할지라도, monoplex 검출 kit의 검출 능력이 가장 높다는 것을 시사하였다. 또한, kit들은 콩과 옥수수 사이에서 다른 검출 한계를 보였다. 본 연구의 결과는 GM 작물의 재배, 국가간 이동, GM 작물을 사용한 식품 생산 과정의 모니터링 뿐만 아니라 GM 작물과 관련한 정부의 법규를 준수하기 위한 GM 작물의 혼입의 건전한 과학적 추적체계의 개발에 유용할 것이라 사료된다.

### 참고문헌

- 국립농산물품질관리원 (2001): 유전자변형표시대상농산물의시료 수거및검정방법. 국립농산물품질관리원 고시 제2001-1호.
- 농림부 (2000): 유전자변형농산물표시요령, 농림부 고시 제2000-31호.
- 식품의약품안전청 (2001): 유전자조합식품등의표시기준. 식품의약품안전청 고시 제2001-43호.
- 한국생명공학연구원 바이오안전성정보센터(2003): 2003 바이오 안전성백서, 한국생명공학연구원, 대전, pp. 420.
- Arumuganathan, K. and Earle, E.D. (1991): Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Reporter*, **9**, 208-218.
- Beachy, R.N. (1999): Facing fear of biotechnology. *Science*, **285**, 335.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1990): Isolation of DNA from small amounts of plant tissue. *BRL Focus*, **12**, 13-15.
- Garg, A.K., Kim, J.K., Owens, T.G., Ranwala, A.P., Choi, Y.D., Kochian, L.V. and Wu, R.J. (2003): Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15898-15903.
- Halford, N.G. and Shewry, P.R. (2000): Genetically modified crops: methodology, benefits, regulation and public concerns. *Br. Med. Bull.*, **56**, 62-73.
- Jang, I.C., Oh, S.J., Seo, J.S., Choi, W.B., Song, S.I., Kim, C.H., Kim, Y.S., Seo, H.S., Choi, Y.D., Nahm, B.H. and Kim, J.K. (2003): Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiol.*, **131**, 516-24.
- James, D., Schmidt, A.-M., Wall, E., Gren, M. and Masri, S. (2003): Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean, and canola by multiplex PCR analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 5829-5834.
- Koppel, E., Stadler, M., Luthy, J. and Hubner, P. (1997): Sensitive method for the detection of the genetically engineered soybean "Roundup Ready". *Mitt. Giliete Lebensm. Hyg.*, **88**, 164-175.
- Kuiper, H.A. (1999): Summary report of the ILSI Europe workshop on detection methods for novel foods derived from genetically modified organisms. *Food Control*, **10**, 339-349.
- Meyer, R. (1995): Detection of genetically engineered plants by polymerase chain reaction (PCR) using the FLAVR SAVR tomato as an example. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **201**, 583-586.
- Permingeat, H.R., Reggiardo, M.I. and Vallejos, R.H. (2002): Detection and quantification of transgenes in grains by multiplex and real-time PCR. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4431-4436.
- Sheehy, R.E., Kramer, M.K. and Hiatt, W.R. (1988): Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 8805-8809.
- Smith, C.J.S., Watson, C.F., Ray, J., Bird, C.R., Morris, P.C., Schuch, W. and Frierson, D. (1988): Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature*, **334**, 724-726.