

유전자변형 대두의 빠른 검출을 위한 복합-중합효소연쇄반응/마이크로칩 전기영동법

박미라 · 이해성* · 강성호*

전북대학교 화학과

*기초과학지원연구원 전주분소

(2005. 2. 4 접수)

Multiplex Polymerase Chain Reaction/Microchip Electrophoresis for the Rapid Detection of GMO in Soybean

Mira Park, Haeseong Lee[‡], and Seong Ho Kang*

Department of Chemistry, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, South Korea

[‡]Jeonju Branch of Korea Basic Science Institute, Jeonju 561-756, South Korea

(Received February 4, 2005)

요 약. 유전자조작 물질 (genetically modified organisms, GMOs)과 GMO를 원료로 하여 생산되는 식품이나 식품첨가물의 안정성을 위해 대두의 GMO를 마이크로칩 전기영동법을 사용하여 검출하였다. GM-대두에서 CaMV 35S promoter 특이유전자 (100-bp DNA)를 4개의 합성개시물질을 이용하는 복합-중합효소연쇄반응 (multiplex polymerase chain reaction)으로 증폭하였다. 증폭된 100-bp DNA를 유리재질의 마이크로칩(100 μm 의 이중-T 모양의 주입구, 50 μm -채널폭과 20 μm -채널깊이)에서 0.5% PVP (M_w 1,000,000)를 칩 채널의 코팅젤로, 0.5% PEO (M_w 8,000,000)를 충전젤로 사용하여 117.6 V/cm의 전기장에서 약 80초 안에 대두 안의 GMO를 검출하였다. 본 복합-중합효소연쇄반응/마이크로칩 전기영동법은 현재 주로 사용되는 슬랩젤 전기영동법과 비교하여 볼 때, 높은 분리효능과 약 20배 이상의 빠른 분석을 가능하게 하였다. 복합-중합효소연쇄반응/마이크로칩 전기영동법은 농작물이나 식품의 유전자변형 여부를 빠르고 간단하며 효율적으로 분석할 수 있는 새로운 분석방법이 될 것으로 고려된다.

주제어: 유전자변형물질, 대두, 복합-중합효소연쇄반응/마이크로칩 전기영동

ABSTRACT. We have investigated a multiplex polymerase chain reaction (MPCR)-microchip electrophoresis (ME) method for the rapid detection of genetically modified organisms (GMOs) in soybeans. Using MPCR we amplified 100-bp DNA, which served as target DNA from a CaMV 35S promoter gene, which is contained in most GM-soybeans. The amplified 100-bp DNA fragment was separated in a conventional glass double-T microchip (100 μm offset, 50 μm wide and 20 μm deep), based on gel electrophoretic separation, using a 0.5% poly(vinylpyrrolidone) (M_w 1,000,000) as a coating matrix, and 0.5% poly(ethyleneoxide) (M_w 8,000,000) as a sieving matrix. Under the electric field of 117.6 V/cm, the GM-soybean was analyzed within 80 s at the microchip. Compared to conventional slab gel electrophoresis, analysis time of the GM-soybean decreased approximately 20-fold, with excellent resolving power. The MPCR-ME technique may prove to be a new and effective tool for the analysis of GMO in grains and foodstuffs, due to its speed, simplicity, and high efficiency.

Keywords: GMO, Soybean, Multiplex Polymerase Chain Reaction/Microchip Electrophoresis (MPCR/ME)

서 론

한 종으로부터 유전자를 얻은 후, 이를 다른 종에 삽입하여 생산성 향상과 상품의 품질개선을 위한 유전자조작 물질(genetically modified organisms, GMOs)과 GMO를 원료로 하여 생산되는 식품이나 식품첨가물 등을 유전자조작 식품이라 한다. 이들은 동일 종내의 유전자 전달 뿐만 아니라 자연적으로는 종래 유전자 전달이 불가능하였던 종 사이의 유전자 전달을 가능하게 하여 돌연변이를 인위적으로 양산하는 기술이지만 예측하지 못한 부작용이 발생할 수도 있다.^{1,6} 유전자조작에 의해 삽입된 새로운 유전자가 항상 이론대로 그 성질이 나타나는 것은 아니며, 이종간 교배에 의한 유전자의 전파나 어떤 유전자의 기능이 사라질 수도 있으며 생태계 속의 야생생물체에 영향을 줄 수도 있다. 또한 바이러스 저항성 면역체계의 약화와 더불어 인체에 대한 식품안전성이 검증되지 않아, 체내에 흡수 되었을 경우의 GMO 영향은 아직까지도 밝혀지지 않은 상황이다. 실제 정상대두와 유전자변형대두는 외관상으로는 구분이 되지 않아 식탁 위의 음식물에 대한 안전성을 장담할 수 없다.^{1,3} 따라서 현대사회가 더욱더 유전자변형 식품에 노출이 확대되어 감에 따라 GMO검사의 중요성이 날로 증가되고 있으며, 이를 위한 빠르고 정확한 분석방법의 개발이 절실하다.^{7,8}

현재 사용되고 있는 일반적인 GMO 정성분석법으로는 GMO의 유전자를 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 특이유전자를 증폭하고 이를 검출하는 방법과 효소면역학적 방법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)를 이용하여 특이단백질을 검출하여 GMO를 분석하는 두 가지 방법이 있다.^{9,11} 이 중 PCR을 이용한 유전자분석법은 시료 내의 유전자가 변형된 곡물 혹은 그로부터 유래한 가공물에서 GMO에만 있는 증폭된 특이유전자를 관찰함으로써 GMO 존재 여부를 간단히 검사한다. ELISA를 통한 방법은 조작된 유전자를 검출해내는 것과는 달리 조작된 유전자가 만들어내는 단백질을 항원·항체반응을 이용하여 검출하는 방법이다. 현재의 면역학적인 방법으로는 ELISA 방법이 주로 많이 활용되고 있으며, PCR과 비교하여 볼 때, 빠른 시간 안에 적은 비용으로 GMO 확인이 가능하다는 장점을 가지고 있으나, 도입유전자의 특성상 GM-단

백질의 합성이 없는 경우는 검출이 불가능하다. 또한, 가공식품의 가공과정에서 단백질은 유전자에 비해 훨씬 쉽게 파괴되어 가공식품에 대한 적용이 어렵고 낮은 수준의 GMO 혼입 시에 정확한 정량이 힘들기 때문에 보편적으로 PCR 방법을 사용한다. 그러나 PCR 방법 또한 반응과정과 증폭된 DNA를 확인하는 과정에서 시료와 시약의 소비가 많고 긴 분석시간, 많은 노동력과 오차발생 등의 문제점을 가지고 있다.

마이크로칩 전기영동법(microchip electrophoresis, ME)은 기기의 자동화로 손쉽고 빠른 시간에 분석이 가능하며, pL 이하의 극미량의 시료로도 분석이 가능하다.^{12,20} ME는 기존의 슬랩젤 전기영동법과 비교해 볼 때, 높은 분리효율, 낮은 검출한계와 빠른 분석시간 등의 장점을 가지고 있어 유전자분석을 위한 방법으로 그 중요성이 점점 대두되고 있다.

본 연구에서는 대표적 농작물 중 하나인 대두를 선택하여 유전자조작 유/무를 빠르게 검출할 수 있는 분석방법을 소개한다. 유전자조작 대두의 CaMV 35S promoter로부터 4개의 합성개시물질들을 동시에 사용하는 복합-중합효소연쇄반응(multiplex PCR, MPCR)을 이용하여 특이유전자인 100-bp DNA를 증폭한 뒤,^{12,21,22} 수십 초 내에 DNA를 분석할 수 있는 마이크로칩 전기영동법(microchip electrophoresis, ME)의 조건을 개발하였다. 이러한 MPCR-ME 법은 향후 농작물이나 가공된 식품 속의 GMO를 신속하고 정확히 검사할 수 있는 새로운 분석법으로 응용될 수 있을 것이다.

실 험

시약 및 시료. 1× TBE 완충액(0.089 M Tris, 0.089 M borate, 0.002 M EDTA, pH 8.3)은 미리 혼합되어 시판되는 TBE 분말시료(Amersco, Solon, OH, USA)를 3차 증류수에 녹여 제조하였다. 3차 증류수는 0.22 μm Milli-Q™/Milli-RO Water System (USA)을 이용하여 제조된 것을 사용하였다. 마이크로칩 채널의 코팅젤은 0.5 μg/mL ethidium bromide (EtBr) (Sigma, St. Louis, MO, USA)이 들어있는 1× TBE 완충액에 분자량이 1,000,000인 poly(vinylpyrrolidone) (PVP) (Polyscience, Warrington, England)를 섞어 약 2분 동안 흔들어서 용해시키고 기포를 완전히 제거하기 위해서 2시간 동안 방치한 뒤 0.5%(w/v) PVP로 제조하였다. DNA 분리를 위한 충전젤은 분자량이 8,000,000인 poly

(ethylenoxide) (PEO) (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 0.5 µg/mL EtBr이 들어있는 1× TBE 완충액에 용해시키고, 기포가 생기지 않도록 10시간 이상 천천히 저어주면서 0.5% (w/v) PEO로 제조하여 사용하였다. 100-bp DNA ladder는 Invitrogen (Carlsbad, USA)에서 구입하여, 사용 전에 1× TBE 완충액으로 0.1 µg/mL의 농도로 희석하여 사용하였다. 정상대두와 유전자변형대두는 수입된 대두의 GMO검사를 통해 얻어진 시료로 전북대학교 생체안전성연구소로부터 제공받았다. 대두를 분말로 갈아서 CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)법을 사용하여 정제한 DNA를 얻었다. CTAB 완충액은 0.5 M EDTA (ethylenediamine tetra-acetic acid)의 용액 (pH 8.0) 8 mL, 1 M Tris-염산 완충액 (pH 8.0) 20 mL, 5 M 인산완충식염수 (phosphate buffered saline, PBS) 56 mL를 넣고 증류수로 전체 부피가 약 150 mL가 되도록 한 후, CTAB 4 g을 가하여 완전히 용해시킨다. 여기에 증류수를 넣고 전체 양을 정확히 200 mL로 조정한 후 120°C에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 페놀-클로로포름-이소아밀알콜 혼합액은 1 M TE 완충액 (Tris-EDTA, pH 8.0)으로 포화한 페놀, 클로로포름 및 이소아밀알콜을 25:24:1 (v/v/v)로 혼합하였고 클로로포름-이소아밀알콜을 혼합액은 클로로포름과 이소아밀알콜을 24:1 (v/v)로 혼합하여 제조하였다. TE 완충액은 최종농도가 10 mM Tris-염산용액 (pH 8.0), 1 mM EDTA 용액 (pH 8.0)이 되도록 증류수를 사용하여 제조하였다.

CTAB법을 이용하여 분쇄한 대두에서 DNA를 추출하는 방법은 간단히 다음과 같다. 먼저, 대두 1000개 이상의 알갱이(약 400-500 g)를 1% SDS (sodium dodecyl sulfate)용액에서 잘 교반하고 세정하여 자연 건조시킨 후, 분쇄기를 사용하여 분쇄하였다. 분쇄한 시료(콩 50 mg)를 70% CTAB 완충액 150 µL를 가하여 혼합한 후, 추가로 CTAB 완충액 450 µL를 넣고 다시 혼합을 하여 55°C에서 약 30분간 정치 한 후, 페놀-클로로포름-이소아밀알콜 (25:24:1, v/v/v) 혼합액 500 µL을 가하여 잘 혼합하고 15분간 실온에서 12,000 rpm으로 원심분리를 하였다. 맑은 상층액은 버리고, 침전물에 500 µL의 70% 에탄올을 벽면으로 천천히 가한 후 1분간 원심분리하고, 상층액을 제거한 후 침전물을 건조시킨다. TE 완충액 50 µL를 가하여 잘 혼합한 후, 실온에서 15분간 방치하면서 완전하게 녹인다. 추출된 DNA를 정제하기 위해, 위의 용액에

RNase (10 mg/mL) 5 µL를 가하여 37°C에서 30분간 방치한다. 200 µL의 CTAB 완충액을 가한 후, 클로로포름-이소아밀알콜 혼합액 250 µL를 가하여 혼합기로 가볍게 혼합하여 실온에서 15분간 원심 분리한 후 상층액을 새로운 1.5 µL 튜브에 옮긴다. 이 때 중간층에 닿지 않도록 조심하여 상층액을 취한다. 200 µL의 70% 에탄올을 벽면으로 가하고 다시 상층액을 제거하고, 1분간 원심분리를 하여 잔류하는 에탄올을 제거하고 침전물을 얻는다. 침전물에 50 µL의 멸균수를 가하여 완전히 용해시키고 이를 PCR을 위한 주형-DNA시료로 사용하였다.

PCR을 위한 10× PCR 완충액과 2.5 mM dNTP mix는 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하여 사용하였다. *Taq* DNA polymerase (5 U/µL)는 Super-Bio (Suwon, Korea)제품을 사용하였다. 유전자변형대두는 CaMV 35S promoter에서 특이유전자인 100-bp DNA를 증폭하기 위해 35sp-정방향 합성개시물질 5'-TC GTTC AAGA TGCC TCTG CC-3'와 35sp-역방향 합성개시물질 5'-TT GCTT TGAA GACG TGGT TGG-3'를 사용하였다.^{4,11,21-23} 음성대조군으로 사용한 정상대두 유전자는 대두에 내재된 soybean lectin에서 250-bp 크기의 DNA를 증폭하기 위해 정방향 합성개시물질 5'-CT GACC AGCA AGGC AAAC TC-3'와 역방향 합성개시물질 5'-GT GAAG TTGA AGGA AGCG GC-3'를 사용하였다. 사용한 모든 합성개시물질은 Genotech (Daejeon, Korea)에서 구입하였다.

복합-중합효소연쇄반응. PCR 반응은 열순환기 (Perkin-Elmer model 2400, USA)를 사용하여 다음과 같은 온도조건에 따라 복합-중합효소연쇄반응을 수행하였다. 먼저 95°C에서 DNA를 5분 동안 초기변성을 한다. 그 다음 95°C에서 30초간 변성시키고, 57°C에서 1분간 합성개시물질들을 결합시키고, 72°C에서 30초 동안 신장하는 과정을 40회 반복하고, 72°C에서 7분간 신장을 한다. 증폭이 끝나면 4°C에서 보관한다. 20-µL PCR 반응혼합물의 조성은 다음과 같다. 먼저, 10× PCR 완충용액 I과 II 각각 2.0 µL, 2.5 mM dNTP 3.2 µL, 정방향 합성개시물질과 역방향 합성개시물질은 각각 1 µL씩, *Taq* DNA polymerase 0.4 µL 그리고 정제된 주형-DNA 4 µL을 혼합하고 nuclease free water를 가하여 총 20 µL로 만들었다.

슬랩젤 전기영동. 1× TAE 완충액은 Tris 242 g과 아세트산 (Junsei, Japan) 57.1 mL 그리고 EDTA 37.2

g을 혼합하여 50× TAE 완충액을 제조한 후, 사용 전에 묽혀서 1× TAE 완충액을 제조하였다. 1× TAE 완충액에 아가로스 분말 (Sigma, USA)을 첨가하고 가열하여 용해시킨 후 굳혀서 2% 아가로스젤을 만들었다. 아가로스젤 상에서의 증폭된 DNA 확인은 6× dye (bromo phenol blue/xylene cyanol FF/글리세롤 = 0.25/0.25/30, v/v/v) 1 μL에 PCR 산물 5 μL를 잘 혼합하여 아가로스젤에 주입하고, PCR 산물의 길이를 확인하기 위해 100-bp DNA ladder를 함께 주입하고 진기장을 걸어주었다. 진기영동은 SaB-Cell 기기 (Bio RAD, USA)를 사용하여 상온에서 140 V의 전압으로 60분 동안 실행하였다. 전기영동을 한 후, 아가로스젤을 EtBr 용액에서 약 5분간 염색을 한 후, UV 검출기 Gel Doc 2000 (Bio RAD, USA)를 사용하여 증폭된 DNA 밴드를 확인하였다.

마이크로칩 전기영동. ME에는 다이오드-펌프 고체 레이저 (diode-pumped solid-state laser, 532 nm)와 605 nm의 방출형광을 검출할 수 있는 광증배관, 고전압 전원공급 장치가 설치된 DBCE-100 Microchip CE system (Digital Bio Technology Co., Korea)을 사용하였다. 마이크로칩은 유리 재질로 100 mm-offset double-T를 갖는 십자모양으로 채널은 폭이 50 μm이고 깊이가 20 μm이며 전체 길이는 85 mm이고 저장용기의 직경은 2 mm 이다 (Fig. 1). 시료의 검출은 double-T로부터 22.5 mm 떨어진 지점에서 하였다. 마이크로칩의 이동완충액은 0.5 μg/ml EtBr를 포함한 1× TBE 완충액 (pH 8.3)이었으며, 0.5% PVP (M_n 1,000,000)를 마이크로칩 채널의 코팅제로, 0.5% PEO (M_n 8,000,000)를 충전제로 사용하였다. 모든 젤은 Poly Science (Warrington, England)에서 구입하였다. 충전젤은 ME 완충액 저장용기에 넣고, 3-4분 동안 반대방향의 지

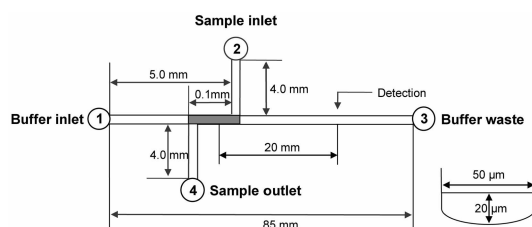


Fig. 1. Layout and dimensions of the single-channel glass microchip used for the fast separation of GM-soybean PCR product. Reservoir 1=buffer inlet. Reservoir 2=sample inlet. Reservoir 3=buffer waste. Reservoir 4=sample outlet.

장용기에서 EYELA A-3S 진공흡입기 (Tokyo Rikakikai Co.)를 사용하여 유체역학적으로 채널에 채웠다. 시료주입은 마이크로칩의 시료주입용기 2 안에 시료를 주입하고 60초 동안 시료주입용기 2 에서 시료배출용기 4로 480 V의 전압을 걸어주어 주입-T 영역에서 제면동전기적 주입법으로 실행하였다. 시료주입 후에 시료주입용기 2와 시료배출용기 4에는 150 V의 전압을 걸어주고 완충액주입구 1 과 시료배출구 4 사이에 1000 V의 전압을 걸어주어 정상대부와 유전자변형대부 속의 증폭된 특이 DNA를 검출하였다.

결과 및 고찰

대두의 유전자형질전환 유/무를 확인하기 위해서 유전자변형 대두의 CaMV 35S promoter 유전자에서 100-bp 크기의 DNA를 증폭하였다. 먼저 CTAB법을 이용하여 분쇄한 대두에서 DNA를 추출한 뒤, 복합-중합효소연쇄반응을 한 시료를 슬랩젤 전기영동을 한 결과, 유전자변형 대두에서는 100-bp의 길이를 갖는 특이 유전자를 확인할 수 있었다 (Fig. 2 lane 4). 2% 아가로스 슬랩젤에 140 V의 전압을 걸어주어 분리한 DNA단편들에서, 유전자변형 대두와 정상 대두의 복합-PCR 산물의 크기는 100-bp DNA ladder 중에서 길이가 같거나(100-bp) 이웃한 길이의(200-bp와 300-bp) DNA들에 대한 이동시간의 미묘로 유전자변형 대두

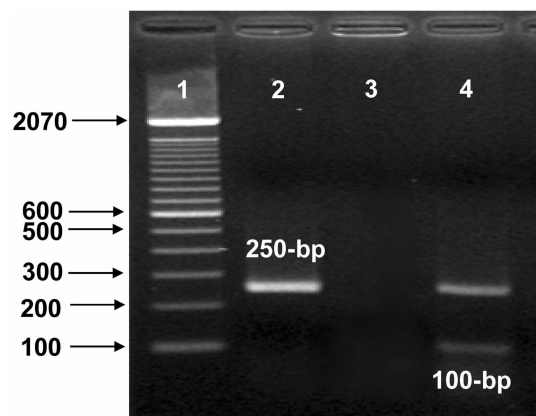


Fig. 2. Slab gel electrophoresis of the GM-soybean DNA PCR product from the CaMV 35S promoter gene. Lane 1, 100-bp DNA ladder (100 μg/ml); lane 2, PCR product from the non GM soybean (lectin); lane 3, nuclease free water; lane 4, PCR product from the GM-soybean.

의 특이유전자인 100-bp DNA를 확인하고 정성분석을 하였다. 또한 PCR 반응이 정상적으로 수행된 것은 정상 대두와 유전자변형 대두에 모두 존재하는 250-bp DNA의 증폭결과, 슬랩젤 전기영동 시 나타나는 250-bp DNA band를 통해 확인할 수 있었다. 즉, 유전자변형 대두의 MPCR 산물(Fig. 2 lane 4)에서 100-bp는 유전자가 변형된 대두임을 나타내는 DNA이며, 250-bp DNA는 모든 대두에서 나오는 기준 DNA로 PCR의 반응이 정상임을 보여준다. 만일 복합-중합효소연쇄반응을 한 대두가 유전자변형이 되지 않았다면, 100-bp DNA는 검출이 되지 않으며, 모든 대두에 들어있는 250-bp DNA만 검출이 된다(Fig. 2 lane 2와 lane 4). 대두 대신에 핵산가수분해효소가 제거된 증류수를 사용한 시료에는 예상한 대로 아무것도 검출이 되지 않았다(Fig. 2 lane 3).

대두에서 MPCR을 이용하여 증폭된 특정한 길이의 DNA를 빠른 시간에 높은 분리효율로 ME에서 분석을 하기 위해, 먼저 가해주는 전기장의 세기에 따른 100-bp DNA ladder 단편들의 이동시간의 영향을 조사하였다. 가해주는 전기장(V/cm)의 세기가 클수록 DNA 단편들의 이동속도는 빨라져서 이동시간이 단축됨을 보여주었다(Fig. 3). 일반적으로 가해주는 전기장의 세기가 커질수록 발생하는 전류가 높아져 주열(Joule)열을 증가시키며, 증가된 열을 빨리 채널 밖으로 발산시키지 못하면, 채널 내의 온도를 증가시켜,

완충액의 점도를 변화시키며 결국은 시료의 이동시간에 대한 재현성을 약화시킨다. 본 실험의 ME조건에서도 마찬가지로 전기장의 세기가 증가됨에 따라 DNA 단편들의 이동시간은 감소되지만, 발생하는 전류가 10 μ A 이하로 작기 때문에 완충액의 온도증가에 영향은 거의 없었다. 이러한 이유는 DNA 단편들을 분리하기 전에, 먼저 0.5% PVP로 칩 내부를 운동역학적으로 코팅을 하고 0.5% PEO를 DNA 단편의 분리를 위한 충전젤로 사용하여 유리칩 내벽에서 발생하는 전기삼투적 흐름(electroosmotic flow, EOF)을 억압했기 때문이며, DNA 단편의 분리가 충전젤 속에서 각 DNA의 전기영동적 이동도 차이에 기인하기 때문이다. 최적의 ME 분리조건에서 117.6 V/cm의 일정한 전기장 가할 때 900 bp 보다 작은 DNA 단편들에 대해 이상적인 피크의 형태를 보여주며 약 2분 안에 바탕선 분리가 됨을 알 수 있었다(Fig. 4A). 100-bp DNA ladder에 대한 DNA 단편들의 길이에 따른 분리 결과에 기초하여 유전자변형 대두와 유전자가 변형되지 않은 대두의 복합-PCR 산물을 ME에 적용하였을 때 유전자변형 대두를 80초 내에 분석됨을 알 수 있었다(Fig. 4B와 Fig. 4C). 즉 정상인 대두에서는 79초 부근에서 250-bp DNA 피크를 보여주며, 유전자변형 대두에서는 250-bp DNA와 함께 약 63초 부근에서 새로운 100-bp의 길이를 갖는 DNA 피크가 나타나 대두의 유전자변형을 쉽게 확인할 수 있었다.

최적의 ME조건에서 유전자변형 대두의 MPCR 산물에 대해 정성 및 정량분석의 가능성을 시도하였다.

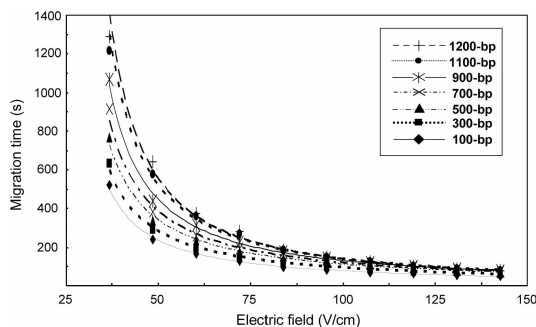


Fig. 3. Relationship between the applied electric field and the migration time of DNA fragments at the ME conditions. ME conditions: applied separation voltage, 0.2-2.0 kV; sample injection, electrokinetic injection for 60 s at 0.48 kV; run buffer, 1 \times TBE buffer (pH 8.3) with 0.5 ppm EtBr; coating gel matrix, 1 \times TBE buffer with 0.5 ppm EtBr plus 0.5% PVP (Mr 1,000,000); sieving gel matrix, 1 \times TBE buffer with 0.5 ppm EtBr plus 0.5% PEO (Mr 8,000,000).

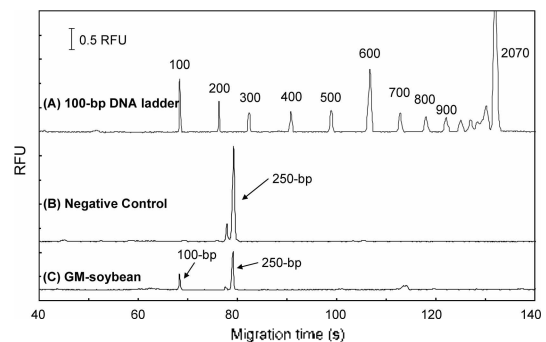


Fig. 4. ME electropherograms of (A) 100-bp DNA ladder, (B) lectin-negative control and (C) GM-soybean. ME separation conditions: applied separation voltage, 1.0 kV; sample injection, Other ME conditions as presented in Fig. 3.

Table 1. Reproducibility of the multi-PCR products of containing GMO and non-GMO based on migration time and peak area ($n = 5$).

Base pair (bp)	Migration time (s)	Peak area
100	68.034 (± 0.115)	0.14265 (± 0.027)
250	77.446 (± 0.134)	0.53037 (± 0.076)

*The data indicates mean \pm standard deviation.

유전자변형 대두의 PCR 산물에 대해 5회 주입하고 분석을 한 뒤 100-bp와 250-bp DNA에 대한 이동시간과 피크면적의 정밀도를 계산한 결과 대두의 유전자변형 유무를 나타내는 100-bp DNA의 경우 68.034(± 0.115)초의 이동시간과 0.14265 (± 0.027)의 피크면적을 보여주었다(Table 1). 이러한 결과는 95%의 신뢰 수준에서 이동시간과 피크면적에 대해 각각 68.034(± 0.143)와 0.143(± 0.034)의 값을 보여준다.

결 론

유전자변형 대두의 간단하고 빠른 분석을 위한 복합-중합효소연쇄반응/마이크로칩 전기영동법 (MPCR/ME)을 사용하였다. 대두를 분말로 분쇄하여 PCR법을 이용하여 유전자변형 대두의 특이유전자로 100-bp DNA를 증폭시키고 증폭된 DNA를 유리재질의 마이크로칩을 이용하여 DNA 단편들의 전기영동적 분리법에 기인하여 약 80초 내에 GM-대두의 분석을 할 수 있었다. 이러한 분석방법은 기존의 PCR/슬랩젤 전기영동법에 비해 최소 20배 이상의 빠른 시간으로 정상대두와 유전자변형 대두를 구별할 수 있었다. 특히 본 연구에서 사용한 MPCR-ME법은 농도에 따른 100-bp DNA의 피크면적을 계산할 수 있어서, 이것을 DNA 농도에 따른 피크면적을 도시하여 표준 100-bp DNA의 검정곡선을 작성하여 시료 GM-대두의 특이유전자를 손쉽게 빠르게 정량분석을 할 수 있는 장점이 있다. 이러한 PCR-ME 법은 대두종의 GMO분석은 물론 다른 농작물이나 가공된 식품 속의 GMO를 신속하고 정확히 검사할 수 있는 새로운 분석법으로 응용될 수 있을 것으로 고려된다.

저자들은 대두 시료를 제공하여 준 전북대학교 생체안정성연구소 및 기초과학연구소에 감사사를 드린다.

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2004-000-10056-0)지원으로 수행하였음.

인 용 문 헌

1. Stave, J. W. *Food control*, **1999**, *10*, 367.
2. Leysen, R. J. F. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2003**, *105*, 471.
3. Caswell, J. A. *Agribusiness* **2000**, *16*, 115.
4. Obeid, P. J.; Christopoulos, T. K.; Ioannou, P. C. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 922.
5. Birch, L.; Archard, C. L.; Parkes, H. C.; McDowell D. G. *Food Control*. **2001**, *12*, 535.
6. Drobnik, J. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **1999**, *44*, 3.
7. Gilbert, J. *Food Control* **1999**, *10*, 363.
8. Alary, R.; Serin, A.; Maury, D.; Jouira, H. B.; Sirven, J.-P.; Gautier, M.-F.; Joudrier, P. *Food Control*, **2002**, *13*, 235.
9. Wurz, A.; Bluth, A.; Zeltz, P.; Pfeifer, C.; Willmund, R. *Food Control*. **1999**, *10*, 385.
10. Giovannini, T.; Concilio, L. *Starch /Stärke* **2002**, *54*, 321.
11. Meyer, R. *Food Control*, **1999**, *10*, 391.
12. Manz, A., Graber, N., Widmer, H. M. *Sens. Actuator B-Chem.* **1990**, *1*, 244.
13. Harrison, D. J., Manz, A., Fan, Z., Luedi, H., Widmer, H. M. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1926.
14. Zhang, L., Dang, F., Baba, Y., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *30*, 1645.
15. Woolley, A. T., Mathies, R. A. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3676.
16. Schmalzing, D., Adourian, A., Koutny, L., Ziaugra, L., Matsudaira, P., Ehrlich, D. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2303.
17. Backhouse, C., Caamano, M., Oaks, F., Nordman, E., Carrillo, A., Johnson, B., Bay, S. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 150.
18. Kim, D.-K., Kang, S. H. *J. Chromatogr. A.* **2005**, *1064*, 121.
19. Kim, Y., Chae, J.-S., Kang, S. H. *J. Korean Chem. Soc.* **2004**, *48*, 483.
20. Jang, S., Cho, K., Chae, J.-S., Kang, S. H. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2004**, *25*, 757.
21. Benfey, P. N.; Chua, N.-H. *Science*, **1990**, *250*, 959.
22. Liu, G.; Su, W.; Xu, Q.; Long, M.; Zhou, J.; Song, S. *Food Control* **2004**, *15*, 303.
23. Ahmed, F. E. *TRENDS in Biotech.* **2002**, *20*, 215.