

PCR 방법과 면역학적 분석법을 이용한 두부와 비지에서 GM 콩의 검출법

김묘영 · 김재환 · 김해영*

경희대학교 식품생명공학과 및 생명자원과학연구소

Detection of Genetically Modified Soybean in *Tofu* and *Biji* using PCR and Immunological Methods

Myo-Young Kim, Jae-Hwan Kim and Hae-Yeong Kim*

Department of Food Science and Biotechnology and Institute of Life Sciences & Resources, Kyung Hee University, Suwon 449-701 Korea

Received January 25, 2005; Accepted March 7, 2005

To monitor GM soybean in soybean processed foods, *tofu* and *biji*, we prepared *tofu* and *biji* containing 0%, 1%, 3%, 5% and 100% GM soybean, respectively. We examined epsps gene inserted in soybean by PCR and EPSPS protein expressed in soybean using western blotting and lateral flow strip test to compare the sensitivity of these methods. A PCR product of 123 bp inserted in GM soybean was detected in all *tofu* and *biji* containing 1%, 3%, 5% and 100% GM soybean with the exception of 0% samples; however, the size of 600 bp inserted in GM soybean was only detected in *tofu* containing 100% soybean and in *biji* containing 5% and 100% soybean. In the protein level, GM soybean product was only detected in *tofu* and *biji* containing 100% GM soybean by western blotting. In addition, only *biji* containing 100% GM soybean was detected by lateral flow strip test. We concluded that in order to detect GM soybean efficiently in processed food, the PCR method is more sensitive than immunological methods. With the PCR method, small size product with approximately 100 bp in PCR product is sensitive to detect GM soybean in processed foods.

Key words: GM soybean, *tofu*, *biji*, epsps, PCR

서 론

생명공학기술을 이용하여 유용한 유전자를 도입시킨 많은 종류의 GMO들의 개발과 투자로 전 세계적으로 재배면적이 2004년 말 기준 8,100만 ha가 재배되고 있으며, 상업화된 GMO품종들도 해마다 증가하고 있다.¹⁾ 상업화된 GMO 가운데에서 콩은 7개 품목이 개발되었으나, glyphosate내성인 몬산토사의 Roundup Ready Soybean이 전 세계적으로 유통되고 있고, 우리나라에서도 대부분의 GM 콩이 몬산토사의 제품으로 유통되고 있는 것으로 보고되었다.²⁾ 이러한 GM콩들은 두부, 두유, 콩기름, 된장, 스낵류 등 가공식품 형태나 사료 등으로 광범위하게 이용되고 있다.³⁾ 그러나, 이러한 GMO들은 인체, 환경, 사회적 위해성에 대한 논란이 국내외적으로 끊임없이 제기되는 상황에서 우리나라를 비롯한 EU, 일본 등 세계 각국에서 GMO 표시제를 도입하여 운영하고 있다. 우리나라에서 수입된 GMO들을 분별 유통을 하더라도 파종, 재배, 수확, 유통과정에서 비의도적으로 GMO와 Non-GMO의 혼입이 이루어지는데 이점을 감

안해 표시제에서는 비의도적 혼입치를 설정하여 운영하고 있다. EU의 경우는 0.9%, 일본, 대만은 5.0%, 우리나라는 3.0%로 설정하여 운영하고 있다.^{4,7)} 이러한 표시제의 조속한 정착과 효율적인 관리를 위해서 체계적인 분별유통과 과학적인 검정방법의 개발의 필요성이 요구되었다. GMO의 주요 검정방법으로는 도입유전자의 DNA를 검출하는 PCR(polymerase chain reaction) 분석법이나 재조합단백질을 검정하는 면역학적 검지방법으로서 ELISA 또는 Western blotting이 GMO 검정에 많이 활용되고 있다.⁸⁻¹⁰⁾ 그러나, GMO를 이용한 가공식품의 경우 각 가공공정에 따른 차이와 혼입율의 차이로 분석에 많은 어려움이 있어, 우리나라에서도 GMO 가공식품에 대한 정성, 정량검사법의 개발 및 표준화 연구가 필요한 실정이다.

본 연구에서는 GM콩을 원료로 한 두부, 비지 등 가공식품에 대하여 우리나라 GMO 표시제의 기준치인 3% 시료들을 준비하여 PCR 방법과 면역학적 분석법을 사용하여 검출의 민감도를 측정하여 가공식품에 대한 검정방법들을 비교하였다.

재료 및 방법

재료. Non-GM콩은 농어촌 유통공사에서 수입된 미국산 콩

*Corresponding author
Phone: 82-31-201-2660; Fax: 82-31-204-8116
E-mail: hykim@khu.ac.kr

을 정량분석하여 GMO가 함유되지 않은 것을 확인한 후, non-GM 콩으로 이용하였으며, GM 콩은 미국 SDI 사로부터 Glyphosate 저항성 콩(Roundup Ready Soybean)을 공급 받아 분쇄하여 사용하였다. 분쇄된 콩 분말을 GM과 non-GM을 각각 무게비율로 혼합한 후 시료로 사용하였다.

가공식품제조. 본 실험의 경우 정확한 혼입비율을 만들기 위하여 분쇄된 콩 분말을 만들어 사용하였다. 콩 분말 100 g에 증류수 1.7 l을 넣고 20분간 가열하였다. 거즈로 거른 후 걸러진 비지와 거즈를 통과한 두유를 채취하여 시료로 사용하였다. 두부는 두유에 엽화마그네슘을 첨가하여 저온 후 5분간 방치하여 응고시킨 시료액을 사각 틀에 넣고 뚜껑으로 눌러 두부를 만들어 시료로 사용하였다. 각각의 시료는 두 개씩 제조하였고, 냉동건조기를 이용하여 시료를 건조한 후, 사용하였다.

Primer의 제작. GMO 검출을 위한 primer는 Fig. 1과 같다. GMO에 삽입된 glyphosate(N-phosphonomethyl glycine)에 강한 저항성을 갖는 *Agrobacterium tumefaciens* CP4의 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase(epsps) 유전자¹¹⁻¹²⁾를 근거로 primer를 제작하였으며 내재 유전자는 콩에 존재하는 ferritin 유전자¹³⁾를 활용하였다. 이들 각각에 대한 유전자 배열은 Table 1에 나타내었다.

DNA 추출. 제조된 두부와 비지 시료들은 동결 건조하여 -70°C에서 보관한 후, 실험에서 각각의 분말형태의 시료를 0.1 g씩 DNeasy Plant Mini kit(Qiagen, USA)을 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 UV-spectrophotometer(Hitachi, Japan)를 이용하여 260 nm에서 정량하였다. 추출된 DNA는 0.8%의 agarose gel상에서 50 volt로 30분 동안 전기영동 하여 상태를 확인하였으며, marker로는 100 bp ladder(Bioneer, Korea)와 λ -HindIII(New England BioLabs Inc., USA)을 사용하였다.

PCR 조건. PCR 반응 용액은 시료 당 25 μ l로 만들어 사용하였다. 반응 용액은 1.5 mM MgCl₂를 포함하는 10 \times PCR buffer(TaKaRa, Japan) 2.5 μ l, 10 nM의 sense primer, 10 nM의 antisense primer, 2 μ l dNTP(2.5 mM each, TaKaRa, Japan) 그리고 50 ng의 template DNA가 포함되도록 하였고, 반응은 thermocycler PTC100-60HB(MJ Research, USA)를 이용하여 수행하였다. PCR 조건으로 첫 cycle에서 95°C에서 3분간 수행하였고 나머지 cycle에서는 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분간 40 cycles을 수행하였으며, 마지막 단계로 72°C에서 8분간 수행한 후, 4°C에서 PCR산물을 보존하였다. PCR 산물은 3% agarose gel상에서 전기영동을 수행하였다.

단백질 추출. 분말형태의 건조된 시료 0.1 g에 lysis buffer(2 M thiourea, 7 M urea, 4%(w/v) CHAPS) 900 μ l와 1%(w/v) DDT 100 μ l를 섞어 3시간 동안 shaking한 후에 12,000 \times g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 상층액과 같은 양의 2 \times sample buffer(25 ml 4xTris-Cl, 20ml glycerol[20%(w/v)], 4 g SDS[4%(w/v)], 2 ml 2-ME, 1 mg bromphenol blue[0.001%(w/v)])와 섞어 95°C에서 5분간 처리한 후 Bradford법으로 단백질을 정량하였으며, 12% SDS-PAGE상에서 추출 패턴을 확인하였다.

Western blotting. 추출된 단백질들은 12% SDS-PAGE 방법을 사용하여 100 volt에서 2시간 전기영동한 후, Mini transblot

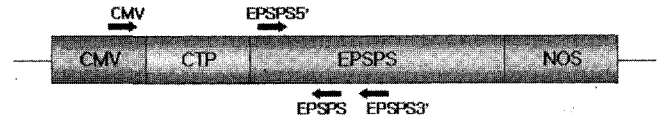


Fig. 1. Schematic diagram of PCR primers used in this study. CMV35S: califlowers mosaic virus 35S promoter, CTP: chloroplast transit peptide of petunia hybrida, EPSPS: 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of *Agrobacterium tumefaciens*, NOS: nopaline synthase terminator of *A. tumefaciens*.

Table 1. Sequences of primers used in this study

Primer names	Primer sequences	References
CMV	5'-CGTTCAAGATGCCTCTGCCGAC-3'	(3)
EPSPS	5'-TCGCCTTCCAGAAGGCCGGT-3'	(3)
EPSPS 5'	5'-CCTTCATGTTCCGGCGGTCTC-3'	(3)
EPSPS 3'	5'-CGCCTTCTTACGGATCCTG-3'	(3)
Ferritin 5'	5'-GGCTCTTGCTCCTTCCAAAGT-3'	(3)
Ferritin 3'	5'-CGAGCCAGCGAGACTTGGGGAGC-3'	(3)

cell kit(Bio-Rad, USA)을 이용하여, gel 상의 단백질을 4°C에서 25 volt로 16시간 동안 nitro cellulose membrane(Schleicher & Schuell, Germany)으로 이동시켰다. Membrane은 6% non-fat milk로 blocking 시킨 후에 10분씩 3회 washing을 수행하였다. 일차항체인 EPSPS 다중항체는 1000:1로 희석하여 2시간 동안 반응시킨 후, 같은 방법으로 washing을 한 후 이차항체인 Anti-mouse IgG(Sigma, USA)를 10000:1로 희석하여 1시간 처리하였고, 위와 동일한 방법으로 washing을 수행하였다. 최종적으로 western blotting 검출은 ECL(Amersham Bioscience, USA)를 사용하여 확인하였다.

Lateral Flow Strip Test. lateral flow strip test(LFST)을 이용하여 콩가공식품인 두부와 비지로부터 제조합단백질을 검출하기 위해 각각 5g의 콩원료, 두부, 비지의 시료들을 튜브에 넣고 제작사가 제시하는 방법에 따라 Trait RUR Bulk Soybean Test Kit와 Trait RUR Toasted Meal Test Kit(Strategic Diagnostics Inc., USA)을 이용하여 5분간 반응시켜 결과를 확인하였다.

결과 및 고찰

가공식품의 Genomic DNA 패턴. 두부와 비지에서 추출한 DNA를 0.8% agarose gel에서 50 volt로 30분간 전기영동을 한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 원료 콩에서는 genomic DNA가 큰 분자로 존재하나, 가공식품인 두부(A)와 비지(B)에서는 큰 분자량의 DNA가 작은 분자량의 DNA들로 파괴된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 현상은 콩의 가공과정 중에 열에 의해 큰 분자량의 DNA가 작은 크기로 파괴된 것으로 생각된다.

PCR을 이용한 가공식품의 GMO 검출. GM 콩의 함량 별 두부와 비지 시료에서 GM 콩을 검출하기 위해 PCR 산물의 크기가 큰 600 bp를 증폭할 수 있는 CMV, EPSPS primer set과 PCR 산물의 크기가 작은 123 bp를 증폭할 수 있는 EPSPS5', EPSPS3' primer set를 각각 이용하였고, 콩의 내재 유전자인 ferritin을 기초로 하여 제작된 242 bp의 산물의 크기를 갖는 primer set을 하나의 tube에 넣어 duplex-PCR을 수행

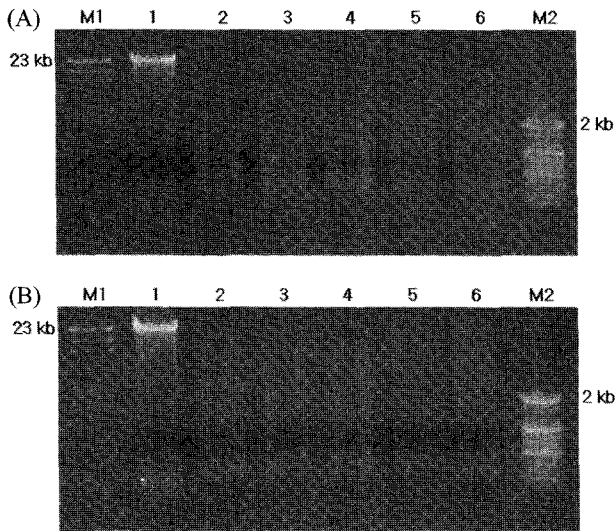


Fig. 2. Genomic DNA patterns of *tofu* (A) and *biji* (B) containing various percentages of GM soybeans. M1: λ -*Hind*III marker, 1: GM soybean with epsps, 2: 0%, 3: 1%, 4: 3%, 5: 5%, 6: 100%, M2: 100 bp DNA ladder.

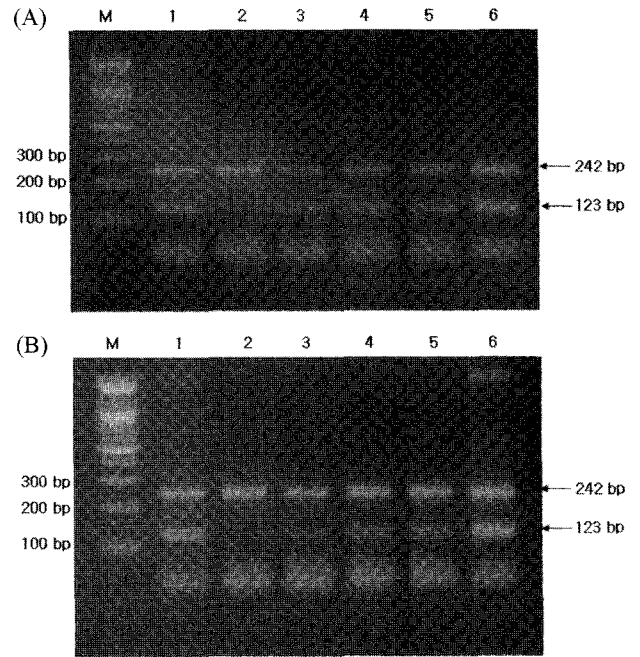


Fig. 4. PCR products amplified from *tofu* (A) and *biji* (B) containing various percentages of GM soybeans with EPSPS5'-EPSPS3' primer set. M: marker (100 bp DNA ladder), 1: GMO with epsps, 2: 0%, 3: 1%, 4: 3%, 5: 5%, 6: 100%.

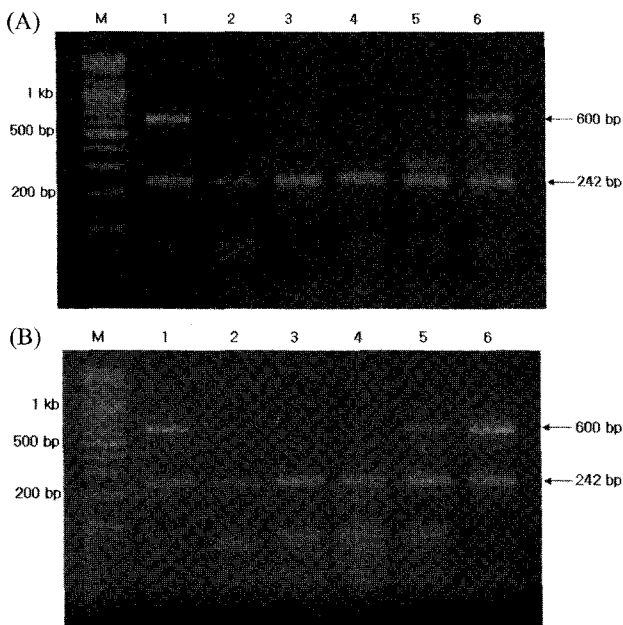


Fig. 3. PCR products amplified from *tofu* (A) and *biji* (B) containing various percentages of GM soybeans with CMV-EPSPS primer set. M: marker (100 bp DNA ladder), 1: GMO with epsps, 2: 0%, 3: 1%, 4: 3%, 5: 5%, 6: 100%.

하였다. 이때 600 bp의 epsps product가 생성되는 실험에서 두부의 경우 Fig. 3A에서와 같이 100% GM 콩을 포함한 두부에서만 검출이 가능하였고, 비지에서는 Fig. 3B에서와 같이 5%, 100%에서 검출이 되었다. 그러나 Fig. 4A, B와 같이 123 bp가 생성되는 실험에서는 0%를 제외한 1%, 3%, 5%, 100% GM 콩을 포함한 두부, 비지 모두에서 검출이 가능한 것으로 나타났다. 이와 같은 실험 결과로부터 GM 콩 가공식품들에 있어서 가공식품 제조 과정 중에 파괴된 작은 분자량의 DNA를 검출하기 위해서는 100 bp 정도의 PCR 산물이 증폭될 수 있는

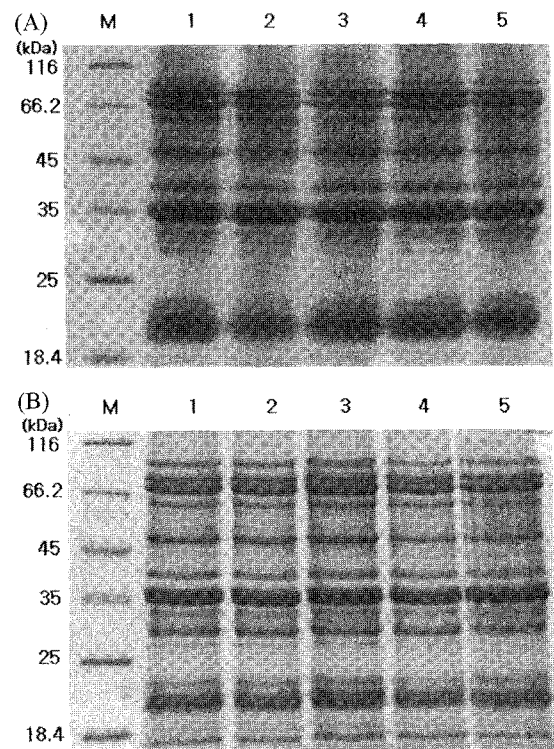


Fig. 5. Protein patterns from *tofu* (A) and *biji* (B) containing various percentages of GM soybeans. M: protein ladder, 1: 0%, 2: 1%, 3: 3%, 4: 5%, 5: 100%.

primer을 사용하는 것이 GM콩을 검출하는데 민감하다는 결론을 얻었다.

면역학적 방법을 이용한 가공식품의 GMO 검출. 두부와 비

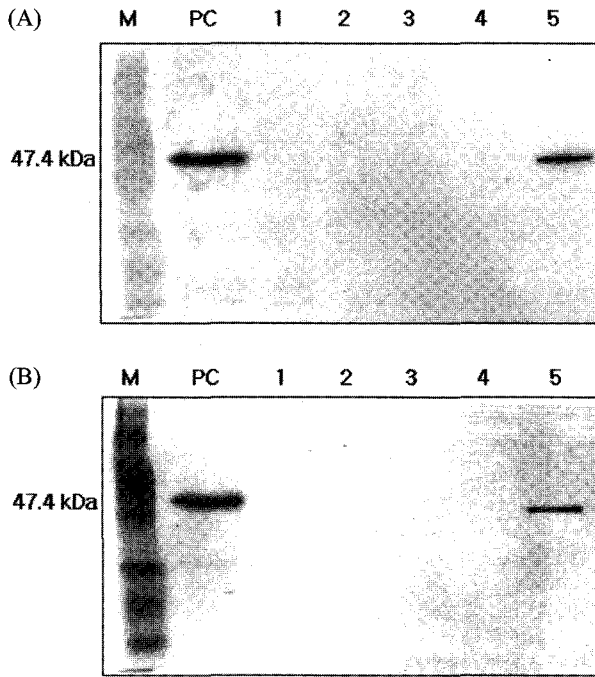


Fig. 6. Western blotting from *tofu* (A) and *biji* (B) containing various percentages of GM soybeans. M: Prestained protein ladder (GIBCOBRL), PC: GMO with epsps, 1: 0%, 2: 1%, 3: 3%, 4: 5%, 5: 100%.

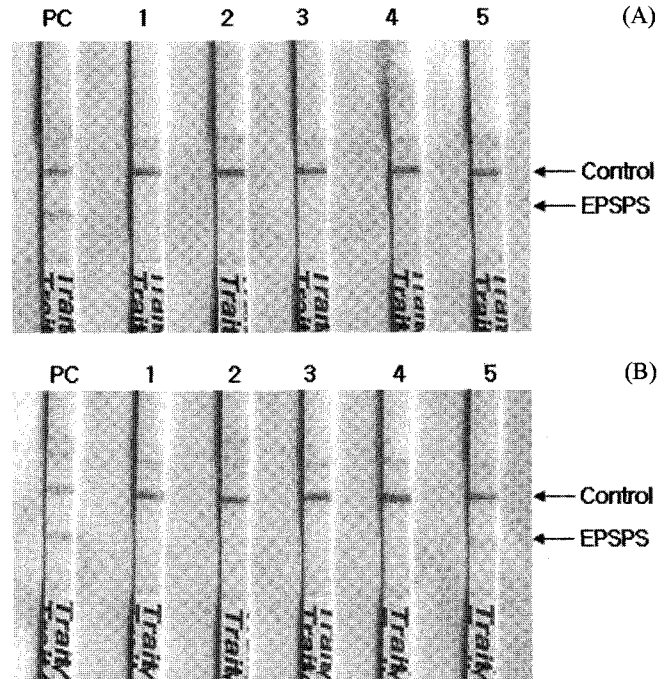


Fig. 7. Lateral flow strip test of *tofu* (A) and *biji* (B) containing various percentages of GM soybeans. PC: GMO with epsps, 1: 0%, 2: 1%, 3: 3%, 4: 5%, 5: 100%.

지로부터 추출한 단백질을 SDS-PAGE로 전기영동을 한 결과 Fig. 5A, B에서 보이는 바와 같이 각각의 두부와 비지의 단백질 패턴이 GM 콩의 함량과 관계없이 동일하게 나타났다. 또한, GM 콩 함량별 두부와 비지 시료를 EPSPS 항체를 이용하여 western blotting을 수행한 결과 Fig. 6A, B에서 보이는 바와 같이 100%의 두부와 비지에서만 검출이 가능한 것으로 나타났으며, LFST를 이용하여 각각의 시료들을 모니터링한 결과 Fig. 7A, B에서 보이는 것과 같이 100% 비지에서만 검출이 가능하였다. western blotting과 달리 LFST에서는 100% 비지에서만 검출이 가능하였는데 이것은 단백질을 직접 추출하여 수행한 것이 아니라 시료와 물을 혼합하여 단지 물에 녹아져 나온 단백질을 검출하였으므로 검출 감도가 보다 약했기 때문이라 생각된다.

결론적으로 현재 우리나라의 GMO표시제의 비의도적 혼입치의 기준인 3%를 모니터링하기 위해서는 원료단계에서는 DNA 검출법과 면역학적인 방법 모두에서 가능하나, 가공식품에서의 모니터링은 100 bp 정도의 산물을 검출할 수 있는 PCR 방법만이 가능하였다.

초 록

GM 콩으로 제조된 두부와 비지 등 콩 가공제품들의 효율적인 모니터링을 위하여 GM 콩이 0%, 1%, 3%, 5%, 100% 함유된 두부와 비지를 제조하여 이들의 삽입유전자인 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase(epsps)를 검출하기 위한 PCR 방법과 EPSPS 발현 단백질을 검출을 위한 western blotting과 lateral flow strip을 사용하여 검출 감도를 비교하였

다. PCR 결과 산물의 크기가 큰 600 bp의 증폭에서 두부의 경우에는 100% GM으로 제조된 두부에서만 확인이 가능하였고, 비지에서는 5%, 100%에서 확인이 되었다. 크기가 작은 123 bp가 생성되는 실험에서는 0%를 제외한 모든 두부와 비지에서 검출되었다. Western blot 결과는 100% 두부, 비지에서만 검출이 되었고, lateral flow strip test에서는 100% 비지에서만 검출되었다. 이러한 결과로부터 GM 콩 가공식품 검출은 면역학적 방법보다는 PCR이 더 높은 민감도가 나타내는 것을 확인하였고, 또한 가공식품에서 효율적인 GMO 검출을 위해서는 100 bp 정도의 작은 크기의 PCR 산물을 이용해야 민감한 검출 결과를 보여주는 것을 확인하였다.

Key words: GM 콩, 두부, 비지, epsps, PCR

감사의 글

본 연구는 경희대학교 교비 연구년 지원과 식품의약품안전청 용역과제 지원사업으로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

참고문헌

- James, C. (2004) Preview: Global status of commercialized biotech/GM crops: ISAAA Briefs No. 32. ISAAA: Ithaca, N.Y.
- Kim, M. Y., Kim, J. H., Kim, H. J., Park, S. H., Woo, G. J. and Kim, H. Y. (2003) Monitoring of genetically modified soybean and processed foods in Korean market using PCR. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**, 344-347.
- Kim, J. H. (2003) Studies on the Polymerase Chain Reaction

- for the Rapid Detection of Genetically Modified Foods. MS Thesis. Kyunghee University.
4. Auer, C. A. (2003) Tracking genes from seed to supermarket: techniques and trends. *Trends Plant Sci.* **8**, 591-597.
 5. Ahmed, F. E. (2002) Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends Biotech.* **5**, 215-223.
 6. Ministry of Agriculture and Forestry. (2000) Regulation concerning the compulsory labeling of genetically modified agricultural organisms. Ministry of Agriculture and Forestry regulation No. 2000-31.
 7. Korea Food and Drug Administration. (2001) Regulation concerning the compulsory labeling of foodstuffs and food ingredients produced from genetically modified organisms. Korea Food and Drug Administration regulation No. 2001-43.
 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. Padgett, S. R., Kolacz, K. H., Delannay, X., Re, D. B., Lavalley, 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.
 12. 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.
 13. 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.