다섯 가지 DNA 추출방법에 의한 옥수수 원료 및 가공시료의 DNA 추출 효율의 비교

이훈희[1] · 송희성 · 김재환 · 이우영[1] · 이순호[1] · 박선희[1] · 박혜경[1] · 김해영*

경희대학교 생명자원과학연구원, [1]식품의약품안전청 영양평가팀

Comparison of the Efficiency from Raw and Processed Corns by Five Different DNA Extraction Methods

Hun-Hee Lee[1], Hee-Sung Song, Jae-Hwan Kim, Woo-Young Lee[1], Soon-Ho Lee[1], Sun-Hee Park[1], Hye-Kyung Park[1] and Hae-Yeong Kim*

Institute of Life Sciences & Resources, Kyung Hee University, Suwon 449-701 Korea
[1]Team of Nutrition Evaluation, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-020 Korea

Received October 19, 2005; Accepted November 25, 2005

In this study, the effects of five extraction methods for raw and processed corns were compared with respect to the integrity, yields and quality of DNA extracted from them and the results were assessed by PCR analysis. From the comparison of five extraction methods, DNA integrity showed a similar pattern. Amounts of genomic DNA obtained from the five extraction methods varies from 0.25 μg to 234 μg per 1 g sample. The DNA yield extracted with CTAB method and DNeasy Plant Maxi kit is greater than that obtained from other extraction methods. These results would be applicable for the selection of an adequate extraction method for specific samples.

Key words: DNA extraction, GM Maize, PCR

서 론

옥수수(*Zea mays* L.)는 식품이나 사료로 사용되는 주된 작물 중에 하나로써 2004년에 전 세계적으로 약 14,000만 ha의 면적에서 7억8백만톤 생산된 것으로 보고 되었으나, 우리나라는 7만톤이 생산되어 자급률이 0.8%에 지나지 않아 대부분을 미국, 중국 등에서 수입에 의존하고 있다.[1-2] 그러므로 유전자재조합 농산물중 많은 부분을 차지하는 옥수수의 경우 미국에서 많은 양이 도입되기 때문에 유전자재조합 옥수수 유입이 불가피한 실정이다. 따라서 국내에서는 유전자재조합 농산물의 혼입여부 확인을 위해 유전자재조합 농산물 표시제를 운영하고 있으며, 이에 따른 비의도적인 혼입치를 3%로 설정하고 있다.[3-4]

현재 유전자재조합 농산물의 검정법으로 DNA를 기초로 한 PCR(Polymerase Chain Reaction) 방법이 민감도와 정확도가 높아 단백질을 기초로 한 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 방법보다 더 많이 전 세계적으로 사용되고 있다.[5-6] 국내에서도 유전자재조합 콩과 옥수수 품종들의 분석을 위하여 PCR 검정방법을 이용한 연구가 수행되었다.[7-10] 지금까지 국내에서 유통되고 있는 다양한 가공식품들의 효율적인 PCR 검정을 위한 DNA 추출법에 대한 비교 연구는 이루어지지 않은 상태이다. 이에 다양한 DNA 추출법의 비교를 통하여 옥수수 원료 및 이를 원료로 이용한 가공식품들의 효율적인 분석 방법을 찾아내는 것이 필요하다.[11-12]

따라서 본 연구에서는 옥수수의 가공식품에서 많이 이용하는 방법으로 원료 옥수수를 고온 및 고압, 굽기, 유탕 가공을 하였다. 그 후, 원료 및 가공된 시료를 식품공전을 통하여 제시된 유전자재조합식품의 시험방법을 포함한 5가지 DNA 추출방법을 이용하여 가공 공정에 따른 DNA의 변화 및 PCR에 의한 검출정도 확인 그리고 현재 상업화된 여러 제조사들의 DNA 추출제품들의 가공식품 적용성을 비교하였다.

재료 및 방법

재료. 본 연구에서는 GM 옥수수 품종인 MON810(Monsanto, USA)과 비형질전환 옥수수(non-GM)를 시료로 사용하였다. 사용된 옥수수 원료는 이물질을 제거하기 위해 흐르는 물에 잘 씻어 준 후, 증류수를 이용하여 10회 씻어 주었다. 세척된 시료는 건조기(VS-1202DS, Vision Sci., Korea)에서 40°C로 하루 동안 건조하였다. 건조된 시료는 입자를 균질화하기 위해 초고속 분쇄기(Puverisette 14, Germany)를 이용하여 입자크기가

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

200 μm 이하가 되도록 분쇄하였다. 균질화된 시료는 가공을 위해 50 m*l*의 멸균된 증류수에 잘 혼합하여 반죽을 만든 후, 일정 크기가 되도록 나누었다.

시료의 가공. 가공 방법은 Autoclaving, Baking, Frying으로 구분 수행하였다.[13] Autoclaving은 고온 및 고압처리를 위하여 Autoclave(GB-506-8, Han Baek CO., Korea)를 이용하여 1.3 kgf/cm^2, 121°C에서 18분간 가공하였고, Baking은 고온처리를 위하여 Dry oven(Imperial V Digital Mechanical, Lab-line Inc., USA)을 이용하여 200°C에서 40분간 가공하였다. 그리고 Frying은 유탕처리를 위해 해바라기유(CJ, Korea)를 이용하여 158°C에서 15초간 가공하였다.

Primer 및 probe 제작. 본 연구에 이용된 primer는 *starch synthase*를 암호화하는 옥수수의 내재유전자 *zSSIIb* 유전자[14]를 표적으로 하여 114 bp의 증폭산물을 얻을 수 있도록 제작되었으며, Real-time PCR를 위한 probe가 함께 제작되었다. 이와 같은 primer와 probe는 일본의 Nippon Gene사에서 제작하여 시판하고 있는 것으로 각각의 염기서열은 비공개로 되어 있다.

DNA의 추출. 옥수수에서의 DNA추출은 식품의약품 안전청 고시(2005-3호)를 통하여 제정된 유전자재조합식품의 DNA 추출방법인 Cetyltrimethyl-ammonium bromide(CTAB, CT)법[15], Qiagen사의 DNeasy plant Maxi kit(QM)를 이용한 방법 외에도 유전자재조합식품검사지침(2002. 6)을 통하여 소개되었던 Promega사의 Wizard Magnetic DNA Purification System for food(PM), Wizard DNA clean-up System(PC)를 이용한 방법을 사용하였다. 또한, iNtRON사의 G-spin IIp Genomic DNA extraction kit for plant(IG)를 이용한 방법도 사용하였다. 모든 시료에 대해 3회 반복하여 DNA를 추출하였다.

DNA의 농도 및 순도확인. DNA 농도는 분광광도계(Ultrospec 4300 pro, Amersham Pharmacia Biotech., Sweden)를 사용하여 측정하였고 PCR반응에 필요한 DNA농도(20 ng/μ*l*)가 되도록 멸균증류수로 희석한 후, –20°C에서 보관하였다. 추출한 DNA(20 ng/μ*l*)는 0.5×TAE(Bioneer, Korea)에서 1.8% agarose gel(Takara, Japan)에 DNA 5 μ*l*와 6×loading dye(Bioneer, Korea) 1 μ*l*을 혼합한 용액을 투여하여 100 volt로 15분간 전기영동 하였고 marker로는 100 bp DNA ladder(Bioneer, Korea)를 사용하였다. 전기영동이 끝난 것은 EtBr(Ethidium Bromide, Bioneer, Korea)로 25분간 염색하고 30분간 탈색하여 Image Analyzer(Gel Doc XR, Bio-Rad, USA)로 확인하였다.

정성분석. PCR 반응용액의 조성은 DNA polymerase(Applied Biosystems, USA) 0.125 μ*l*(0.625 unit), dNTPs(Applied Biosystems, USA) 2 μ*l*(200 μM), 10×PCR buffer 4 μ*l* (Applied Biosystems, USA), primer(Nippon gene, Japan) 0.5 μ*l*(each 0.5 μM), template DNA(20 ng/ μ*l*) 2.5 μ*l*로 최종 반응액이 25 μ*l*가 되도록 조성하였다. PCR은 고온개시(Hot Start)법을 사용하였으며 GeneAmp 9700(Applied Biosystems, USA)을 이용하여 95°C에서 10분간 최초 변성을 시킨 후, 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초를 1회 반복으로 하여 40회 반복하고 마지막으로 72°C에서 7분간 최종 신장하였다. PCR반응에 의한 증폭결과는 0.5×TAE에서 1.8% agarose gel에 PCR 증폭산물 5 μ*l*와 loading dye 1 μ*l*를 혼합한 용액을 투여하여 100 volt로 25분간 전기영동 하였고 marker로는 100 bp DNA ladder를 사용하였다. 전기영동이 끝난 것은 EtBr로 25분간 염색하고 30분간 탈색하여 Image Analyzer로 확인하였다.

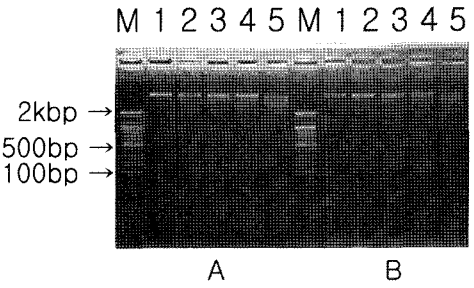

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of genomic DNA extracted from non GM Maize (Raw, A) and MON810 Maize (Raw, B). lane M, 100 bp DNA ladder; lane 1, CT; lane 2, QM; lane 3, PM; lane 4, PC; lane 5, IG.

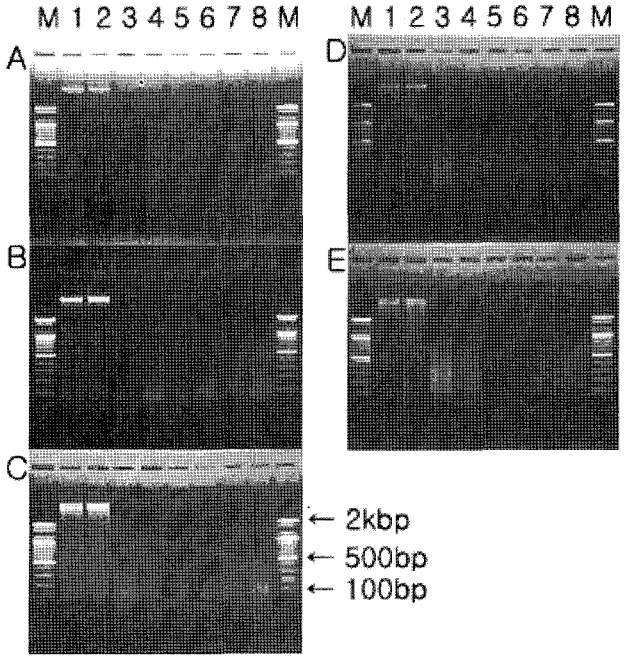

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of genomic DNA extracted from non GM Maize and MON810 Maize with CT (A), QM (B), PM (C), PC (D) and IG (E). lane M, 100 bp DNA ladder; lane 1 (non GM) and 2 (MON810), Raw; lane 3 (non GM) and 4 (MON810), Autoclaving; lane 5 (non GM) and 6 (MON810), Baking; lane 7 (non GM) and 8 (MON810), Frying.

결과 및 고찰

Genomic DNA의 추출방법 비교. 5가지 방법으로 원료 시료 및 가공된 시료의 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 1.8% agarose gel에서 100 volt로 15분간 전기 영동한 결과, 5가지 방법으로 추출한 원료시료의 DNA는 모두 2 kb 이상의 거대분자로 존재하며 유사한 형상의 DNA로 존재하는 것을 확인하였다 (Fig. 1). 5가지 방법으로 추출한 가공시료의 DNA는 분해가 많이 된 분자로 존재하며 모든 추출방법에서 원래의 genomic DNA가 파괴, 분해되어 작은 분자량을 가진 형상의 DNA로 존

Table 1. DNA quantity extracted per 1g of maize powder with five different extraction methods

μg/apply (g)	Raw			Autoclaving			Baking			Frying		
	min	max	mean±SD[1)]	min	max	mean±SD	min	max	mean±SD	min	max	mean±SD
CT	112.50	234.00	175.08±42.18	87.50	229.75	140.79±59.19	80.50	106.75	93.71±11.58	26.75	88.75	58.08±24.80
QM	71.50	114.00	91.33±20.18	20.00	106.50	59.92±38.04	21.50	53.50	43.67±12.51	18.50	50.00	38.92±10.84
PM	26.25	47.25	31.75±7.84	6.50	12.00	9.08±2.48	2.50	15.25	10.38±4.31	5.50	8.25	6.96±1.11
PC	4.73	6.36	5.56±0.58	1.33	2.85	1.96±0.55	0.60	1.64	1.29±0.41	1.36	2.20	1.88±0.38
IG	39.75	91.00	57.21±21.38	0.25	11.00	5.04±4.03	1.25	5.50	3.83±1.85	1.75	19.50	8.46±6.27

[1)]SD: standard deviation

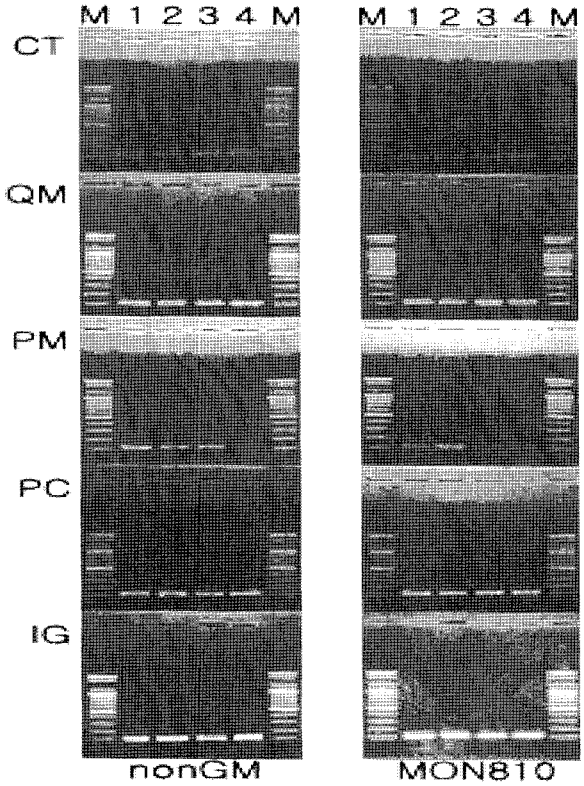

Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of PCR product obtained from genomic DNA of non GM Maize and MON810 Maize with CT, QM, PM, PC and IG. lane M, 100 bp DNA ladder; lane 1, Raw; lane 2, Autoclaving; lane 3, Baking; lane 4, Frying. The primer pairs used for SSIIb-3 (114 bp).

재하는 것을 확인하였다. 또한, 다른 시료에 비해 가공온도가 높고 가공시간이 길었던 baking의 경우, 다른 가공조건으로부터 분리된 DNA에 비해 더 많이 분해가 일어난 것으로 확인되었다(Fig. 2). 이러한 결과는 기존에 보고 된 콩 및 가공식품에서의 파괴된 DNA 패턴과 유사한 결과이다.[16] 분광광도계에 의한 추출된 DNA의 정량적 분석에서 1 g의 시료를 사용한 가공공정을 거치지 않은 원료 시료와 가공공정을 거친 시료의 경우 모두에서 5가지 DNA추출방법 가운데 CTAB법과 QM방법에 의한 DNA추출방법이 높았으며, 상대적으로 빠른 방법인 PM, PC, IG는 원료 시료에서도 낮은 수율을 보였다(Table 1). 또한, DNA형상에서 가장 많이 분해된 것으로 보였던 baking시료의 DNA양이 frying시료에 비해 많은 것으로 나타났다. 이것은 frying가공에서 사용되었던 oil이 DNA추출을 저해시켰기 때문인 것으로 보인다. 이것으로써 autoclaving, baking, frying 가공은 DNA에 손상을 초래할 뿐만 아니라, 열에 노출된 시간 및 온도가 DNA의 변성에 많은 영향을 준다는 것을 확인할 수 있었다. 각각의 추출방법에 따라 추출양의 차이가 있지만, 모든 방법에서 거의 비슷한 형상의 DNA가 추출된다는 것을 확인하였다. 5가지 DNA추출방법 중에는 CTAB법을 이용한 방법이 가장 많은 DNA를 얻을 수 있는 것으로 나타났다. 그러나, 수율이 가장 높은 CTAB법에 의한 DNA추출은 많은 시간이 소요될 뿐만 아니라, phenol과 chloroform 등과 같은 유기용매를 사용해야 한다는 단점을 가지고 있어, QM법이 대체할 수 있는 방법으로 사려된다.

PCR 분석. 5가지 방법으로 추출된 각각의 DNA를 일정농도(20 ng/μl)로 희석하여 template로 이용하고 옥수수의 내재유전자 *zSSIIb* 유전자[14]를 증폭시킬 수 있는 primer를 이용하여 PCR한 결과 거의 차이가 없음을 확인하였다. 다만, PM방법으로 추출된 DNA들의 PCR 결과에서 baking, frying 가공 조건이 원료나 autoclaving 가공 조건에 비해 매우 적은 PCR 산물을 얻은 것으로 확인되었다(Fig. 3). PCR은 DNA의 특정염기서열에 상보적인 primer가 결합하여 일어나는 반응이다. 만약 가공에 의해 임의의 위치에서 DNA가 작은 단위로 파괴되면 PCR의 신장(polymerization) 과정을 저해하여 결국은 증폭산물의 양이 줄어들며 실험의 재현성에도 영향을 주게 된다. 대부분의 PCR에서 증폭산물의 양적인 차이는 있었으나 모두 양성반응을 나타내었다. 이러한 PCR 분석의 표적으로 이용된 옥수수의 내재유전자 *zSSIIb*는 single copy 유전자로써 보고되었으며, 현재 우리나라에서 유전자재조합 옥수수의 정성, 정량 분석에 사용되고 있다(식품의약품안전청 고시 제2005-3호).

감사의 글

이 연구는 식품의약품안전청의 용역연구과제로 수행되었으며 연구비 지원에 감사를 드립니다.

초 록

본 연구는 일반적으로 사용되는 DNA 추출방법들에 대한 효율을 비교하기 위해 수행하였다. 원료 옥수수 및 이를 가공한 시료들로부터 DNA추출을 하였으며, 추출된 DNA의 형상, 농도 및 순도 측정 그리고 PCR 분석 결과를 비교하였다. 5가지 방법으로 옥수수의 DNA를 추출한 결과, 추출방법에 따른 DNA

형상의 차이가 거의 없는 것을 확인하였으나, 각각의 시료들로부터 추출된 DNA의 양은 시료 g당 0.25 μg부터 234.0 μg까지 매우 다양하게 나타났다. 5가지 방법으로 옥수수 시료들의 DNA를 추출한 결과, CTAB법과 DNeasy plant Maxi 키트를 이용한 DNA 추출방법이 높은 수율을 보였다.

Key words: DNA추출, GM옥수수, PCR

참고문헌

1. USDA (2005) World Agricultural Supply Demand Estimates, WASDE-4.
2. Clive, J. (2004) Preview: Global status of commercialized biotech/GM crops. *ISAAA briefs No.* **32**, ISAAA: Ithaca, NY.
3. 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.
4. 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.
5. Bertheau, Y., Diolez, A., Kobilinsky, A. and Magin, K. (2002) Detection methods and performance criteria for genetically modified organisms. *J. AOAC. Int.* **85**, 801-808.
6. Vollenhofer, S., Burg, K., Schmidt, J. and Kroath, H. (1999) Genetically modified organisms in food-screening and specific detection by polymerase chain reaction. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 5038-5043.
7. 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.
8. Hur, M. S., Kim, J. H., Park, S. H., Woo, G. J. and Kim, H. Y. (2003) Detection of Genetically Modified Maize Safety-approved in Korea using PCR. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**, 1033-1038.
9. Lee, S. H., Park, Y. H., Kim, J. K., Park, K. W. and Kim, Y. M. (2004) Qualitative PCR Method for Detection of Genetically Modified Maize Lines NK603 and TC1507. *Agric. Chem. Biotechnol.* **47**, 185-188.
10. Rogan, G. J., Dudin, Y. A., Lee, T. C., Magin, K. M., Astwood, J. D., Bhakta, N. S., Leach, J. N., Sanders, P. R. and Fuchs, R. L. (1999) Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase in roundup ready soybeans. *Food Control* **10**, 407-414.
11. Trifa, T. and Zhang, D. (2004) DNA content in Embryo an Endosperm of Maize Kernel (*Zea mays* L.): Impact on GMO Quantification. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1044-1048.
12. Peano, C., Samson, M. C., Palmieri, L., Gulli, M. and Marmiroli, N. (2004) Qualitative and Quantitative Evaluation of the Genomic DNA Extracted from GMO and Non-GMO Foodstuffs with Four Different Extraction Methods. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 6962-6968.
13. Lee, C. H., Kim, D. C., Chun, J. H., Kim, C. J., Kim, J. B., Kim, J. D. and Son, J. C. (1987) Food Extrusion Technology. Yu-Lim Publishing Co., Korea.
14. Harn, C., Knight, M., Ramakrishnan, A., Guan, H., Keeling, P. L. and Wasserman B. P. (1998) Isolation and Characterization of the *zSSIIa* and *zSSIIb* Starch synthase cDNA clones from Maize Endosperm. Plant Mol. Biol. 37, 639-649.
15. Meyer, R. (1999) Development and Application of DNA Analytical Methods for the Detection of GMOs in Food. *Food Control* **10**, 391-399.
16. Kim, M. Y., Kim J. H., 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.