J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 50(4), 276-280 (2007)

Articles

식품에서 메밀 성분의 검출을 위한 PCR 방법

전영준 · 강은실 · 홍광원*

동국대학교 식품공학과

A PCR Method for Rapid Detection of Buckwheat Ingredients in Food

Young-Jun Jeon, Eun-Sil Kang and Kwang-Won Hong*

Department of Food Science and Technology, Dongguk University, 3Ga 26, Pil-dong, Chung-gu, Seoul 100-715, Korea

Received August 1, 2007; Accepted September 18, 2007

Buckwheat often causes severe allergic reactions in sensitive people. One of the major allergenic proteins in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) has been found to be a BW10KD protein. In this study, we developed a PCR method to detect buckwheat ingredients in food using primers corresponding to the allergenic BW10KD gene. Five pairs of oligonucleotide primers successfully enabled PCR amplification of the specific regions of the genomic BW10KD DNA from buckwheat, but no amplification from seven other cereals and beans (barley, wheat, German millet, African millet, soybean, red bean, and black bean). The proposed PCR method was applied to analyze 12 processed foods (buckwheat flour, buckwheat noodle, buckwheat jelly, wheat noodle, instant noodle, black sesame gruels, sunsik, cookie, misutkaru, and three kinds of cereal); among them, only three samples including buckwheat flour, buckwheat noodle and buckwheat jelly showed a positive reaction to the detection. This PCR method was able to detect as little as 1 ng of common buckwheat DNA. This rapid and specific PCR method would be applicable to detect allergenic buckwheat ingredients in food.

Key words: common buckwheat, PCR detection, food allergen, BW10KD

서 론

메밀은 마디풀과에 메밀속(*Fagopyrum*)에 속하는 일년생 초본으로 식물분류학상 *F. esculentum* Moench., *Fagopyrum rotundatum* Bab., *F. emerginatum* Roth., *F. tataricum* Gaerth., *F. cymosum* Moench., *F. Triangulae* Meissn의 6종으로 분류된다.[1] 이들 중 주로 보통종(Common buckwheat: *F. esculentum*)이 세계 여러 나라에서 재배되고 있고 달단종(Tartarian buckwheat: *F. tataricum*)이 일부 지역에서 재배되고 있다.[2] 국내에서는 주로 보통종인 평창재래종을 재배하고 있으며 메밀식품의 주원료로 사용하고 있다. 메밀은 고혈압, 심혈관 질환 등을 예방하는 효과가 있는 것으로 알려져 있고 독특한 맛과 향이 있어 냉면, 막국수 및 메밀묵 등으로 많이 이용되고 있다.[3,4] 서구에서도 건강식으로 알려져 케익이나 팬케익을 만드는데 이용되며 gluten에 불내성인 환자에게 밀가루의 대용식으로 이용되고 있다.[5] 이와 같이 메밀은 비교적 흔히 섭취 하는 식품 중의 하나이지만 동시에 알레르기 항원성이 매우 높은 식품에 속한다.

메밀에 의한 알레르기는 외국에 비하여 우리나라에서 발생률이 높은 것으로 알려지고 있으며, 국내 알레르기 환자를 대상으로 피부 테스트를 한 결과 약 5%가 메밀 알레르기 양성 반응을 보였다.[6] 208명의 소아알레르기 환자들을 대상으로 경구유발 시험을 실시한 결과 72.3%로 메밀이 가장 흔한 원인식품이었으며 두드러기, 천식, 비염, 결막염 그리고 소화기 증상이 나타났고 심한 경우 아나필락시스 쇼크가 유발되었다고 보고되었다.[7] 또한 일본에서는 메밀을 섭취한 후 약 10%의 환자에서 전신적인 쇼크가 유발 되었다고 보고되었다.[8]

식품 알레르기는 식품 중에 들어 있는 아주 소량의 유발물질에 의해서도 일어날 수 있고 또한 현재 식품알레르기를 치료할 수 있는 마땅한 방법들이 알려져 있지 않으므로 이를 예방하기 위해 감수성이 있는 소비자들은 알레르기 유발물질의 섭취를 엄격히 피해야 한다.[9] 그러나 식품의 부정확한 표시나 가공식품의 제조과정 중 알레르기 유발물질의 비의도적 혼입 등에 의해 소비자들이 항상 알레르기 유발물질을 확인하고 섭취를 피하기는 현실적으로 쉽지 않다.[10] 따라서 소비자를 보호하고 또한 제조업체로 하여금 알레르기 유발물질들의 혼입을 최

*Corresponding author
Phone: +82-2-2260-3369; Fax: +82-2-2285-3988
E-mail: hkwon@dongguk.edu

소화하거나 통제하기 위해서는 제품에 함유된 알레르기 유발물질들을 모니터링 할 수 있는 특이적이고 효율적인 분석방법의 개발이 필요하다.

현재 알레르기 유발물질을 검출하는 대부분의 분석방법은 항원-항체반응을 이용하여 정확도가 높고 사용하기 간편한 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 이용하고 있다.[11,12] 알레르기 유발물질인 단백질을 직접 검출하는 ELISA기술은 사용이 편리한 반면 교차반응이 없는 특이항체를 얻어야 하는 번거로움이 있으며 또한 가공식품의 제조과정 중 알레르기를 유발하는 단백질이 변성되어 그 구조가 변형됨으로써 검출특이성이나 민감성이 감소할 수 있다. 최근에는 검출감도가 매우 뛰어난 polymerase chain reaction(PCR)을 이용하여 알레르기 유발식품의 DNA를 검출하는 방법들이 시도되고 있다.[13] PCR을 이용한 DNA 검출방법은 매우 특이적이고 감도가 뛰어날 뿐 아니라 DNA가 식품의 가공이나 제조과정 중 단백질에 비해 매우 안정하므로, 식품에서 효율적으로 추출할 수 있으며, 유전물질을 분석하는 것이므로 계절이나 지역적으로 식품원료에서 단백질 함량의 차이로 인한 분석결과의 오차를 줄일 수 있다.[14]

메밀에서 알레르기를 일으키는 주요 단백질로는 legumin-like 저장단백질인 BW24KD와 2S-albumin multigene family에 속하는 BW10KD가 알려져 있으며 최근에 BW10KD의 cDNA가 클로닝되어 그 염기서열이 보고되었다.[15] 본 연구에서는 BW10KD 유전자의 염기서열을 이용하여 메밀 특이적인 primer set를 제작하고 가공식품 중에 메밀성분의 존재를 확인할 수 있는 PCR 시스템을 구성하였다. 이 PCR 방법을 이용하여 메밀 이외의 다른 곡류들과 여러 가공식품을 대상으로 PCR 방법의 특이성과 검출한계를 조사하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 DNA 정제. 본 실험에서 사용한 메밀시료는 보통종(*F. esculentum*) 인 평창재래종으로서 강원도 고령지농업연구소에서 제공받았다. 시료는 껍질 및 종피를 완전히 제거한 후 순수 배유 부분인 메밀쌀을 분쇄하여 -20°C에 저장하면서 이용하였다. 그 외의 곡류, 두류 및 가공식품들은 시중에서 구입하여 사용하였다. 곡류나 두류 시료는 막자사발을 이용하여 분쇄한 다음 0.1 g을 취하여 DNeasy Plant Mini Kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 가공식품의 경우는 0.1 g의 시료를 Power Prep™ DNA Extraction kit (Kogenebiotech, Seoul, Korea)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 정제 마지막 단계에서 각 DNA는 100 μl의 멸균 3차 증류수에 녹인 후 분광광도계를 이용하여 그 농도를 측정하고 -20°C에 보관하며 사용하였다.

시약 및 기기. DNA polymerase는 Taq DNA polymerase (Kogenebiotech, Seoul, Korea)를 사용하였고, 모든 PCR 반응은 PCR Express thermocycler(Hybaid, Waltham, MA, USA)를 사용하였다. Agarose를 비롯한 대부분의 시약은 Sigma Chemical Co.의 제품을 사용하였다.

Primer 구성 및 PCR 반응조건. 메밀 보통종에서 BW10KD의 cDNA 염기서열에 특이적인 총 5종의 primers를 합성하여 사용하였으며 각 primer의 위치는 염기서열에 표시하였다(Fig. 1). PCR 반응액의 조성은 0.2 ml tube에 50-100 ng의 template DNA와 각 20 pmol의 forward 및 reverse primer, 5×Taq buffer(with $MgCl_2$ 10 mmol/l, dNTP solution 10 mmol/l) 5 μl와 Taq DNA polymerase (1 unit/μl) 1 μl를 넣은 후 최종 부피가 25 μl가 되도록 멸균증류수를 첨가하였다. PCR 조건은 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 그리고 72°C에서 30초 반응한 것을 1 cycle로 하여 총 40 cycle을 수행하였다. 마지막 40 cycle이 끝난 후 72°C에서 5분간 더 반응시켰다. 증폭된 DNA는 2% agarose gel에서 전기영동을 하여 그 크기를 확인 후 사진을 촬영하였다.

```
                                                    50F ➡
ACCCACAACG ATTCAACACT TAAGAAAACC CACAAATCAA TCCATTCACC ATGAAGCTTT      60
                          82F ➡
CTTGATCCCT AGCAGCTGCA TCTCTCCTTA TTGTGGCTTC GCATGCCGAC AGCCAGATGA     120
GGTCGAAATG CAGGAAACAG ATGAGGATGA TGGAGCCACA ACTTGAGCAA TGTGAGGGTT     180
⬅ 184R
ACATGACAAT GGATATGATG GATGATGATT CCATGAGAGG TCGAGAATGC AGGAGCGAGG     240
                                                281F ➡
AGTCTTGCAT GAGGGGATGC TGCTTGGCAA TGAAGGAGAT GGACGACGAA TGCATGTGCG     300
AGTGGATGAA GATGATGGTT CAACAACAAA GAGGTGAGAT GGGTGAGGAG GATATGAGGA     360
TGGTTATGAG GAAGATGAAG CAGTTGCCTA ACAAGTGTGG AATGGGTCAC ATGAGGTGCC     420
                          ⬅ 450R
ACATGGGGAT CGGAACTAGG GATTACGAGT AATAGATAGA TCTCGGGTTC ATCGTTTTGC     480
TTCTTCTTTG TTTATGAATA AGTAGCTGAC ACTTAGTCCT CTCTCTTGGG GCTGTGCTTT     540
TAGAGAGGGA GGAAGTTTGT GTACCCAGAA GTTGCTTTAT GCTAAGCAGC TTAAATAAAT     600
AAGAATGAAG AGACATTATC TTGTGTAT                                        628
```

Fig. 1. Location of primers in the cDNA sequence of common buckwheat BW10KD gene. The nucleotide sequences of forward (F) and reverse (R) primers are typed in bold. Start (ATG) and stop (TAA) codons of BW10KD gene are underlined.

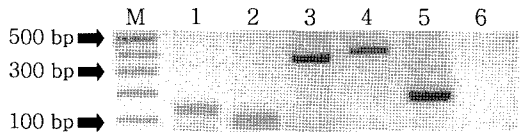

Fig. 2. PCR amplification of the PyeongChang buckwheat DNA with various primer sets. Lane M, 100 bp DNA ladder; lane 1, 50F/184R; lane 2, 82F/184R; lane 3, 82F/450R; lane 4, 50F/450R; lane 5, 281F/450R; lane 6, no template control.

결과 및 고찰

PCR 검사법의 특이성. 메밀의 BW10KD 유전자의 cDNA 염기서열(GenBank accession number: AB055892)을 참고하여 primer 이름의 숫자와 염기서열의 5'-말단 시작부위가 일치하도록 forward primer로 50F, 82F, 및 281F와 reverse primer로 184R 및 450R을 합성하고 그 위치를 Fig. 1에 표시하였다. 총 5개의 primer를 조합하여 50F/184R, 82F/184R, 82F/450R, 50F/450R, 281F/450R과 같은 5종류의 primer set을 구성한 후 평창재래종의 genomic DNA에 대해 PCR을 수행하였다(Fig. 2). 평창재래종의 genomic DNA를 이용하여 각 primer set에 의해 각각 증폭된 DNA 단편(amplicon)의 크기가 cDNA 염기서열상의 각 primer set에서 예상되는 amplicon의 크기(각각 135, 103, 369, 401 및 170 bp)와 거의 유사함으로써 BW10KD 유전자는 intron을 함유하지 않는 것으로 추정된다. 이 primer set들의 메밀특이성을 확인하기 위하여 메밀 이외의 다른 7종의 곡류 및 두류의 DNA를 추출하여 PCR을 수행하였다. 조, 수수, 검은콩, 팥, 대두, 밀, 보리에서 추출한 DNA는 모두 음성반응을 나타내 사용한 5종의 primer set들 모두 메밀에 특이적임을 확인하였다(Table 1).

사용한 primer set 중, 각각 369 bp와 170 bp의 amplicon을 생성하는 82F/450R primer set과 281F/450R primer set의 증폭효율이 가장 우수하여 이 primer set들로 식품중의 메밀성분 검출실험에 사용하였다. 이 두primer set의 식품에 대한 적용가능성을 조사하기 위하여 시판중인 메밀가루를 포함하여 메밀묵, 메밀국수, 검은깨죽, 과자, 라면, 선식, 미숫가루, 3종의 시리얼, 밀국수 등 총 12종의 식품에서 DNA를 추출하여 PCR을 수행하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 메밀가루, 메밀묵 및 메밀국수에서만 369 bp 및 170 bp의 amplicon이 증폭되어 이들이 메밀 성분을 함유하고 있는 것으로 나타났으며 나머지 식품들에서는 메밀특이적인 DNA단편이 증폭되지 않아 메밀 성분을 함유하지 않는 것으로 보인다.

PCR 방법의 검출한계. 메밀에 대한 감수성이 있는 사람들에서 식품알레르기를 유발하는 최소의 메밀섭취량에 대해서는 잘 알려져 있지는 않다. 국내에서 소아 알레르기 환자를 대상으로 식품알레르기 진단을 위한 경구유발시험에서 메밀의 경우, 1 g 미만의 메밀을 입술에 대거나 혀로 핥기만 해도 알레르기 증상을 유발하는 것으로 보고되었다.[7] 땅콩의 경우 땅콩단백질의 양이 100 μg 정도의 적은 양으로도 심각한 알레르기 반응을 일으킬 수 있는 것으로 알려져 있다.[16] 따라서 가능한 극소량의 알

Table 1. Selectivity of the buckwheat-specific PCR

Common name of plant	PCR				
	82F/184R	82F/450R	50F/184R	50F/450R	281F/450R
Common buckwheat	+	+	+	+	+
Barley	-	-	-	-	-
Red bean	-	-	-	-	-
Soybean	-	-	-	-	-
German millet	-	-	-	-	-
African millet	-	-	-	-	-
Black bean	-	-	-	-	-
Wheat	-	-	-	-	-

+, a PCR product of the expected size was observed; -, no PCR product was observed.

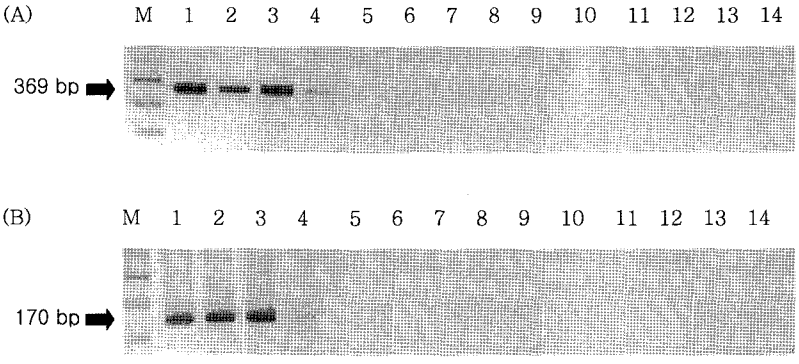

Fig. 3. PCR amplification of the DNA extracts from various foods with 82F/450R (A) and 281F/450R (B) primer sets. Lane M, 100 bp DNA ladder; lane 1, PyeongChang buckwheat; lane 2, buckwheat flour (purchased from a market); lane 3, buckwheat jelly; lane 4, buckwheat noodles; lane 5, black sesame gruels; lane 6, cookie; lane 7, instant noodle; lane 8, sunsik; lane 9, misutkaru; lane 10, breakfast cereal-1; lane 11, breakfast cereal-2; lane 12, breakfast cereal-3; lane 13, wheat flour noodles; lane 14, no template control.

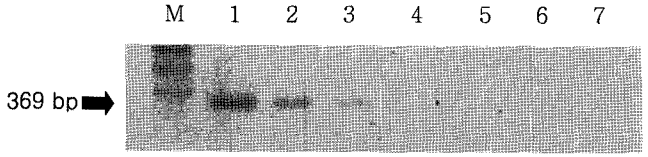

Fig. 4. Detection limit of the PCR system using specific primers 82F/450R. Increasing amounts of purified buckwheat genomic DNA (0.001ng to 100ng) was used. Lane M, 100 bp ladder; lane 1, 100ng; lane 2, 10ng; lane 3, 1ng; lane 4, 0.1ng; lane 5, 0.01ng; lane 6, 0.001ng; lane 7, no template control.

레르기 유발물질을 정확히 검출할 수 있는 방법이 바람직할 것으로 보인다.

메밀특이적인 82F/450R primer set를 이용하여 본 PCR 방법의 메밀에 대한 검출한계를 조사하였다. 정제된 평창재래종의 DNA를 100 ng에서 1 pg까지 10 배씩 단계별로 희석하여 PCR을 수행한 결과, 1 ng까지 검출이 가능하였다(Fig. 4). 본 실험의 경우, 메밀 100 mg에서 약 10-15 μg의 DNA를 추출할 수 있었으므로 1 ng 메밀 DNA에 대한 검출한계는 약 6.7-10 μg에 해당하는 메밀의 존재를 검출할 수 있는 것으로 볼 수 있다. 식품중의 메밀성분을 확인하기 위하여 알레르기 유발단백질의 유전자를 직접 target으로 하는 본 PCR 방법이 메밀에 대한 다른 PCR 방법[4]과 비교해 볼 때 감도가 더 뛰어나지는 않았지만 식품중의 메밀성분을 충분히 검출할 수 있을 것으로 보인다. 극소량의 메밀 DNA를 검출하는 것으로 알려진 real-time PCR 법의 경우, 일반적으로 multiple copy로 존재하는 것으로 알려진 rRNA gene에서 18S와 5.8S rRNA gene 사이에 위치한 internal transcribed spacer (ITS)-1 region과 5.8S rRNA gene 사이의 염기서열 부위를 target으로 하여 50 fg의 메밀 DNA를 검출하였다.[4] 메밀의 rRNA gene 이나 BW10KD gene의 copy 수가 알려져 있지는 않으나 옥수수와 같은 식물의 경우, 종에 따라 rRNA gene의 copy수가 haploid genome 당 1,650-11,500 copies가 있는 것으로 알려져 있다.[17] 따라서 검출하고자 하는 대상 종에 대한 target gene의 선정, target gene 내에서 primer 들의 위치 선정, 보다 증폭 효율이 우수한 DNA polymerase의 사용, PCR 반응조건 의 최적화 등 여러 조건들이 PCR 반응의 특이성이나 검출한계에 미치는 영향을 고려하여 PCR 시스템을 구성하는 것이 바람직할 것으로 보인다.

본 실험은 가공식품에 hidden allergen으로 포함되어 있을 수 있는 메밀의 존재를 확인하기 위하여 메밀의 알레르기 유발단백질의 하나인 BW10KD 유전자를 검출대상으로 하는 PCR 방법을 구성하고 그 특이성 및 검출한계를 조사하였다. 본 PCR 방법은 국내에서 주로 소모되는 메밀 보통종인 평창재래종을 특이적으로 검출할 수 있었으며, 검출한계는 1ng으로 식품 중에 존재할 수 있는 메밀성분을 정확하게 검출하는데 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

초 록

메밀은 과민한 사람에게 식품알레르기를 일으킬 수 있다. 메밀 보통종의 BW10KD 단백질은 알레르기 유발단백질중의 하나로 알려져 있다. 가공식품에 함유된 메밀성분을 검출하기 위하여 메밀의 알레르기 유발단백질인 BW10KD의 유전자에 특이적인 primer를 사용하는 Polymerase Chain Reaction(PCR) 방법을 개발하였다. BW10KD 유전자의 cDNA 염기서열을 이용한 5종의 primer sets로 7 종의 다른 곡류 및 두류(보리, 밀, 조, 수수, 대두, 팥, 검은콩)에 대해 PCR을 수행한 결과, 사용한 primer set 모두 메밀에만 특이적인 반응을 나타냈다. 메밀 특이적 PCR방법을 이용하여 12종의 가공식품(메밀가루, 메밀국수, 메밀묵, 밀국수, 라면, 검은깨죽, 선식, 과자, 미숫가루 및 3종류의 시리얼)을 조사한 결과 메밀가루, 메밀묵 그리고 메밀국수가 메밀 성분을 함유하고 있는 것으로 나타났다. 메밀특이적 PCR 방법은 메밀 보통종의 DNA를 1 ng까지 검출할 수 있었다. 본 PCR 방법은 식품 중에 함유된 메밀 성분을 신속 정확하게 검출하는데 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

Key words: 메밀, PCR 검출, 식품알레르겐, BW10KD

참고문헌

1. Kim, J. K. and Kim, S. K. (2005) Compositions and pasting propertise of *Fagopyrum esculentum* and *Fagopyrum* tartaricum Endosperm Flour. *Korean J. Food Sci. Technol.* **37**, 149-153.
2. Kim, J. K. and Kim, S. K. (2004) Physicochemical properties of buckwheat starches from different areas. *Korean J. Food Sci. Technol.* **36**, 598-603.
3. Suh, Y. J., Yoon, S. H., Shin, Y. S., Choi, J. H., Suh, C. H., Nahm, D. H., Kim, Y. K., Min, U. K. and Park, H. S. (2003) Buckwheat allergy in adults: comparison of specific IgE between homemade ELISA and CAP system, and identification of IgE-binding components. *J. Asthma. Allergy Clin. Immunol.* **23**, 474-482.
4. Hirao, T., Imai, S., Sawade, H., Shimi, N., Hachimura, S. and Kato, H. (2005) PCR method for detecting trace amounts of buckwheat (*Fagopyrum* spp.) in food. *Biosci. Giotechnol. Biochem.* **69**, 724-731.
5. Wang, T. C., Shyur, S. D., Wen, D. C., Kao, Y. H. and Huang, L. H. (2006) Buckwheat anaphylaxis: An unusnal allergy in Taiwan. *Asian Pac. J. Allergy immunol.* **24**, 167-170.
6. Lee, S. Y., Oh, S. J., Lee, K. S., Jang, Y. J., Sohn, M. H., Lee, K. E. and Kim, K. E. (2005) Murine model of buckwheat allergy by intragastric sensitization with fresh buckwheat flour extract. *J. Korea Med. Sci.* **20**, 566-572.
7. Lee. K. Y., Kim, K. E. and Jeoung, B. J. (1997) Immediate type reaction of food allergy confirmed by open food callenge test: Diagnostic value of history and skin test in food allergy. *Pediatr. allergy respire. dis. (Korea)* **7**, 173-186.
8. Nakamura, S. and Yamaguchi, M. (1974/1975) Studies on buckwheat allergose. Report 2: clinical investigation on 169 cases with the buckwheat allergose gathered from the whole country of Japan. *Allergy immunol (Paris)* **20/21**, 457-465.
9. Sampson, H. A. (2004) Update on food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **113**, 805-819.
10. Ewan, P. W. and Clark, A. T. (2001) Long-term prospective observational study of patients with peanut and nut allergy after

participation in a management plan. *Lancet.* **357**, 111-115.
11. Koppelman, S. J., Knulst, A. C., Koers, W. J., Penninks, A. H., Peppelman, H., Vlooswijk, R., Pigmans, I., van Duijn, G, and Hessing, M. (1999) Comparison of different immunochemical methods for the detection and quantification of hazelnut proteins in food products. *J. Immunol. Methods.* **229**, 107-120.
12. Hlywka, J. J., Hefle, S. L., and Taylor, S. L. (2000) A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of almonds in foods. *J. Food Prot.* **63**, 252-257.
13. Poms, R. E., Anklam, E., and Kuhn, M. (2004) Polymerase chain reaction techniques for food allergen detection. *J. AOAC Int.* **87**, 1391-1397.
14. Goodwin, P. R. (2004) Food allergen detection methods: a coordinated approach. *J. AOAC Int.* **87**, 1383-1390.
15. Matsumoto, R., Fujino, K., Nagata, Y., Hashiguchi, S., Ito, Y., Aihara, Y., Takahashi, Y., Maeda, K. and Sugimura, K. (2004) Molecular characterization of a 10-kDa buckwheat molecule reactive to allergic patients' IgE. *Allergy.* **59**, 533-538.
16. Sforza, S., Scaravelli, E. and Corradini, R. (2005) Unconventional method based on circular dichroism to detect peanut DNA in food by means of a PNA probe and a cyanine dye. *Chirality.* **17**, 515-521.
17. McMullen, M. D., Hunter, B., Phillips, R. L., and Rubenstein, I. (1986) The structure of the maize ribosomal DNA spacer region. *Nucleic Acids Res.* **14**, 4953-4968.