

## 유전자변형식물의 검정기술 개발 현황

김재환 · 김영록 · 김해영

# Current status on the development of detection methods for genetically modified plants

Jae-Hwan Kim · Young-Rok Kim · Hae-Yeong Kim

Received: 25 May 2011 / Accepted: 8 June 2011  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** Since the first commercial GM plant, the FlavrSavr tomato, authorized in 1994, more than 140 GM plants were authorized for marketing globally. For the authorization and labelling of GM plants, the detection methods for genes introduced and proteins expressed in GM plants were developed qualitatively and quantitatively. This review presented the detection methods, conventional PCR, multiplex PCR and real-time PCR, for soybean, maize, canola and cotton as the dominant GM plants. Also, microarray assay and nanotechnology as new approaches for detection methods for GM plants were investigated.

### 서론

최근 국제생명공학응용정보서비스 (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications)보고에 의하면 전 세계적으로 유전자변형 (GM) 식물의 상업화는 1994년 처음으로 GM 토마토인 Flavr Savr가 시장에 나온 이후, 옥수수, 면화, 콩, 카놀라 등에서 제초제 저항성 (HT) 과 해충저항성 (IR)이 주를 이루고 있으며, 2010년 현재 140여 품목의 GM 작물이 전 세계적으로 상업화되었다 ([http://cera-gmc.org/index.php?action=gm\\_crop\\_database](http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database)). 또한, 개발된 GM 식물의 재배면적도 지난 15년간에 급격한 증가추세에 있어, 2010년도에는 전 세계 29개국에서 약 1억 4천8백만 ha에서 재배되었다고 보고되었다 (James 2011).

GM 식물 개발은 초창기에는 제초제 내성, 병해충 저항성 등 생산성 증대를 위한 농민중심 개발이었으나, 최근에는 먹는 백신, 면역기능 증강, 품질개선 등 소비자 건강과 직결된 GM 식물 개발과 바이오에너지 생산용 GM 식물 활용으로 농산물 가격이 상승하는 등 일대전환기를 맞이하고 있어 향후 GM 식물 재배희망 농가도 급격히 증가추세에 있다.

우리나라에서도 2008년 1월부터 바이오안전성의정서 및 유전자변형생물체 국가간 이동에 관한 법률이 시행됨에 따라 GM 식물 수입을 위해서 용도별로 소관 부처의 수입 승인이 의무화되고 국가차원의 사후관리 등의 조치를 취해야 함에 따라 개발된 GM 식물에 대한 모니터링 시스템이 필요하게 되었다 (Kim et al. 2010a). 따라서 이들 GM 식물의 검정과 모니터링 활용 연구 그리고 개발된 많은 GM 식물을 검정할 신기술의 개발을 통하여 사후모니터링 체계 확립 및 활용을 통한 GMO 인체 및 환경위해성 관리기술 개발의 적용이 필요하게 되었다 (식품의약품안전청 2007).

GM 식물에 도입된 유전자들은 개발회사, 농작물, 목적 등에 따라 다양하여 제초제저항성유전자, 해충저항성유전자, 바이러스저항성유전자, 선발용 마커유전자 외에도 도입유전자의 발현조절부위 프로모터 및 터미네이터, 발현효율증진을 위한 인트론 등이 있다. 따라서 이들 GM 식물을 검정하는 방법도 도입된 유전자 자체를 검출하거나 도입유전자 산물인 단백질, 또는 유전자도입에 따라 변화되는 물질의 함량이나 조성 등을 분석하여 검정하는 방법 등이 있다.

본 총설에서는 현재 GM 식물의 검정에 적용되고 있는 DNA 및 단백질 검출에 의한 정성, 정량분석 및 최신기법을 중심으로 서술하고자 한다.

J.-H. Kim · Y.-R. Kim · H.-Y. Kim (✉)  
경희대학교 식품생명공학과, 생명자원과학연구원  
(Department of Food Biotechnology and Institute of Life Sciences & Resources, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Republic of Korea)  
e-mail: hykim@khu.ac.kr

## DNA 검정분석방법

### 중합효소연쇄반응 (PCR: Polymerase Chain Reaction)

GMO 검정법으로 가장 널리 사용되고 있는 방법으로 GM 식물 및 이를 이용한 가공식품으로부터 추출된 genomic DNA를 template로 하여 도입 유전자의 염기서열 (nucleotide sequences)에 특이적으로 결합하는 프라이머 (primers)를 제작하여 타겟 DNA를 증폭함으로써 제한된 시료를 수 시간 이내에 정성적으로 분석하는 방법이다. 이러한 PCR을 이용하여 GM 식물을 검정하기 위해서는 대상 GM 식물의 종류와 도입된 유전자에 대한 정보, PCR 프라이머 디자인을 위한 도입유전자의 염기서열 정보, 표준시료의 확보가 가장 중요하다.

우리나라에서도 2001년부터 GM 식물 및 가공식품에 대해 인체안전성이 허가되고, GM 식물 표시제가 시행된 이후, 식품의약품안전청 고시를 통해 GMO 검정에 필요한 정보가 제공되었다. 이러한 방법을 통해 EPSPS가 발현된 GM 콩과 5종의 GM 옥수수를 대상으로 우리나라 식품들에 대한 모니터링 결과가 보고되었다 (김현중 2001; 김묘영 2003; 허문석 2003). 또한, 미승인 GM 쌀에 대한 검사방법도 보고되었다 (Kim et al. 2006a).

### 다중효소중합연쇄반응 (Multiplex PCR)

하나의 튜브 내에서 한번의 PCR반응으로 둘 이상의 타겟 DNA를 증폭시키는 방법으로 각 GM 식물에 대해 여러 종류의 이벤트가 개발되어 이러한 여러 GM 식물의 이벤트들을 동시에 검출할 수 있다는 장점이 있다. 여러 이벤트를 포함하고 있는 작물로 GM 옥수수, 면화, 카놀라 등에 대해서 이러한 multiplex PCR을 활용한 보고가 있다.

GM 옥수수의 경우 8개의 이벤트 분석법 (Onishi et al. 2005; Shrestha et al. 2008; Kim et al. 2006b)과 최근에 추가적인 4개 이벤트인 Event3272, LY038, MIR162, and MON88017 (Kim et al. 2009b)와 GM 콩의 4개 이벤트인 RRS, A2704-12, DP356043-5, MON89788 (Kim et al. 2009c), GM 카놀라의 경우 3개의 이벤트 GT73, MS8xRF3, T45 (Kim et al. 2007), GM 면화의 경우 4개의 이벤트인 MON1445, MON15985, MON88913, LLcotton25 (Kim et al. 2008) 분석방법이 보고되었다.

그러나 multiplex PCR 분석법은 여러 쌍의 primer sets를 이용하여 각각의 타겟 DNA를 같은 조건에서 증폭시켜야하므로 primer들 간의 경쟁을 고려한 최적의 농도를 결정해 주어야 하며, primer들 간의 잘못된 조합으로 목표하지 않은 증폭산물이 얻어지지 않도록 주의하여야 한다. 기존에 보고된 여러 GM 식물들에 대한 multiplex PCR

분석법의 경우 target DNA들이 동량으로 혼입되어 있는 경우에 맞춰 primer 농도, PCR 조건 등이 최적화되어 있기 때문에 여러 GM 식물을 다른 양으로 포함하고 있는 가공식품들의 경우 적용의 한계가 있다.

### Real-time PCR

GMO 정량분석은 시료에서 DNA를 추출한 후 한 쌍의 primer와 하나의 형광 probe를 이용하여 real-time PCR에서 목표 유전자를 증폭시키고 실시간 PCR을 실행하여 얻어진 여러 개의 양성표준시료 및 음성표준시료에 대한 각각의 증폭 곡선을 분석하게 된다. 형광 probe에 따른 검출방법은 크게 2가지로 SYBR Green을 이용한 interchelating 법과 TaqMan probe를 이용한 방법이 있다. 이 가운데 국내의적으로 GMO 정량방법에는 대부분 TaqMan probe를 이용한 방법을 사용하고 있다.

TaqMan probe방법은 5'-말단에 형광물질 FAM 등으로 3'-말단은 quencher 물질 TAMRA 등으로 치환된 oligo-nucleotide를 PCR 반응액에 포함시켜, annealing 단계에서 template DNA에 특이적으로 hybridize하지만 probe상에 quencher에 의해 형광발색이 억제된다. 그러나, extension 반응 시에 Taq DNA polymerase가 갖는 5'→3' exonuclease 활성으로 template에 hybridize한 TaqMan probe가 분해되어 형광색소가 probe에서 유리되면서 quencher에 의한 억제가 풀려서 형광을 나타내고, 이런 형광이 측정되는 것이다.

Real-time PCR 방법은 GMO 함량을 정확히 알 수 있는 표준물질을 기준으로 시료의 GMO 함량을 측정하게 된다. 이러한 GMO 표준물질은 IRMM 등에서 인증한 실제 %별 GMO에서 추출한 DNA용액을 reference material로 사용하거나, GMO에 특이하게 포함되어 있는 이벤트 특이적 유전자와 작물의 내재유전자가 포함되어 있는 표준 플라스미드 (Kuribara 2002)를 만들어 사용한다. 표준 플라스미드 방법은 우리나라, 일본, 중국의 연구자들을 중심으로 개발되었고, 이 방법은 각 품종에 따른 내부표준비를 알고 있어야 정확한 정량 값을 얻을 수 있다. 이러한 표준 플라스미드를 활용한 정량방법들로는 MON863 옥수수, MIR604 옥수수 (Yang et al. 2005; Kim et al. 2009a), 40-3-2 콩 (Zhang et al. 2008), 3개 이벤트 감자 (Rho et al. 2004), MON 15985, MON 88913 면화 (Lee et al. 2007), Oxy-235 카놀라 (Yang et al. 2008) 등의 방법이 보고되고 있다.

직접 표준물을 사용하는 방법은 주로 유럽연합 (EU)을 중심으로 개발되고 있으며, 이 방법은 각 품종마다의 내부표준비를 고려하지 않아도 되는 장점이 있지만, 분석하고자 하는 각 품종의 정확한 함량을 알고 있는 GMO를 확보해야 하는 어려움이 있다. 이러한 직접 표준물을 활용하여 2011년 3월 현재 EU에서는 GM 옥수수, 콩, 감자, 면화, 카놀라, 사탕무, 쌀 등 7개 작물 40개 이벤트에 대

**Table 1** List of GMO detection methods validated in the EU

Crops	Events	Applicants
Soybean	A2704-12	Bayer CropScience
	MON 04032-6	Monsanto Company
	MON 89788	Monsanto Company
	A5547-127	Bayer CropScience
	DP-305423-1	Pioneer Hi-Bred
	DP-356043-5	Pioneer Hi-Bred
Maize	Bt10	Syngenta
	Bt11	Syngenta
	Bt11 sweet	Syngenta Seeds
	Bt11 Field	Syngenta Crop Protection
	NK603	Monsanto Company
	GA21	Monsanto Company
	GA21	Syngenta Crop Protection
	Mon863	Monsanto Company
	1507	Pioneer Hi-Bred, Dow Agrosiences, Mycogen Seeds
	T25	Bayer CropScience
	59122	Pioneer Hi-Bred; Mycogen, Dow AgroSciences
	MIR 604	Syngenta
	MON 810	Monsanto Company
	98140	Pioneer
	MIR162	Syngenta
MON88017	Monsanto Company	
MON 89034	Monsanto Company	
LY038	Renessen LLC	
3272	Syngenta Crop Protection	
Rapeseed	T45	Bayer CropScience
	Ms8	Bayer CropScience
	Rf3	Bayer CropScience
	GT73	Monsanto Company
Cotton	LLCOTTON25	Bayer CropScience
	MON 1445	Monsanto Company
	MON 531	Monsanto Company
	MON 15985	Monsanto Company
	GHB614	Bayer CropScience
	MON 88913	Monsanto Company
3006-210-23/281-24-236	Dow AgroSciences	
Rice	LLRICE62	Bayer CropScience
	LLRICE601	BASF
Potato	EH92-527-1	BASF Plant Science Holding GmbH
Sugar beet	RUR H7	KWS SAAT AG. Monsanto Company

해 GM 개발사가 제출한 real-time PCR 방법을 확인하여 website (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/statusofdoss.htm>)에 공개하고 있으며, Table 1에 요약 정리하였다.

## 단백질 검정 분석방법

### Lateral Flow Strip 이용 분석

GMO에 도입된 유전자가 생산하는 재조합 단백질을 검 사용 strip에 결합시켜 항원·항체 반응을 이용한 진단 기

법으로 주로 1차선별 방법으로 사용되고 있다. 현재 작물 재배지, 종자 보관소 등 현장에서 간단하게 사용할 수 있는 strip형 kit가 Strategic Diagnostics 회사에서 개발한 다양한 종류로 판매되고 있다 (<http://www.sdix.com>). 이러한 strip 제품에서 검출할 수 있는 단백질은 EPSPS, PAT, Cry1Ab, Cry3Bb1, PMI, Cry9C, Cry1F, Cry34Ab1, Cry1Ac, Cry2Ab, VIP3A 등으로 GM 콩, 옥수수, 쌀, 사탕무, 카놀라, 면화, 알파파, 치커리 등에 대한 검사를 수행할 수 있다. 검정에 소요되는 시간은 10분 정도이다. 이 분석법의 장점은 고가의 장비가 필요하지 않고 사용이 간단하며 단시간에 분석할 수 있다는 것이다. 그러나 가공 등을 거친 식품에

는 단백질이 분해되어 사용이 어렵고 도입 단백질의 발현이 없는 GMO에 대해서는 검사가 불가능하다. 이것은 혼입여부만을 검정할 때 적합하다.

### Western Blot

Western blot은 여러 단백질의 혼합물로 된 시료로부터 어떤 특정단백질을 찾아내는 기법으로, 검체시료를 SDS, urea 또는 2-mercaptoethanol과 같은 환원제로 용해시켜 SDS-polyacrylamide gel 전기영동한 후 nitrocellulose 또는 nylon membrane에 옮긴 후 단백질이 옮겨진 membrane 상에서 항원-항체 반응을 이용하여 특정 항체에 대한 항원을 찾아내는 방법이다. 이때 검출대상 항원 단백질과 특이적으로 반응하는 것을 방사성 동위원소로 표식하여 사용하거나 특정 효소인 alkaline phosphatase, horseradish peroxidase 등 또는 형광을 나타내는 색소인 FITC: fluorescein isothiocyanate를 결합시킨 conjugate를 이용하여 원하는 단백질을 membrane 또는 X-ray 필름 상에서 확인하게 된다.

일반적으로 western blot 분석방법은 GMO 분석에 많이 활용되지 않았으나, GM 콩으로 담긴 된장의 숙성기간중 도입단백질의 분해패턴을 보고한 연구가 있다 (Heo et al. 2004).

### 효소면역학적 검지방법 (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)

Immunoassay는 GMO 여부를 분석하는 기술로 널리 사

용되어 오고 또한 새로운 분석기술과 접목되어 진보된 형태로 발전하고 있다 (Brett et al. 1999; Stave 1999). 항체를 이용한 immunoassay는 복잡한 조성의 시료에 존재하는 타겟 단백질을 정성·정량적으로 검출하는데 널리 사용되고 있다. Immunoassay는 과거 1960년 Rosalyn Sussman Yalow와 Solomon Berson에 의해 처음으로 radioimmunoassay가 사용된 이후 1971년 Peter Perlmann과 Eva Engvall의 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent assay)의 방법이 소개되면서 immunoassay의 뛰어난 정확성 (sensitivity)과 선택성 (specificity) 때문에 현재까지 의학진단 및 과학 수사법 등 여러 분야에서 널리 사용되고 있는 검출 방법이다 (Lequin 2005). Immunoassay는 선택적이고 민감한 항체-항원 반응을 기초로 한다. 항체 (antibody)가 특정 target 물질 혹은 특정 항원 (antigen)하고만 결합을 하는 성질을 이용하여 원하는 물질을 쉽게 검출 할 수 있는 매우 큰 장점을 가지고 있다.

이러한 ELISA 방법은 GM 작물에 도입된 유전자에 의해 생산되는 단백질과 특이적으로 결합하는 항체 단백질을 이용하여 정량적으로도 활용할 수 있다. 일반적으로 96개의 well plate의 형태로 시판되고 있는 ELISA plate를 이용한다. 현재 GMO에 발현된 단백질을 검출한 많은 연구가 진행되어 있다. 그러나 검출대상 단백질 자체가 고온, 산 등에 의해 변성되어 3, 4차 구조가 변화하거나, 분해가 되면 항체와의 특이성이 없어지므로 가공식품 중의 재조합 단백질을 검출하는 것은 감도가 훨씬 떨어지거나 확인이 되질 않는다. 제조제저항성 대두의 재조합 단백질 검출용 kit가 시판되고 있으나 열처리한 시료나 발효

**Table 2** List of the IRMM certified reference materials for GMO content ([http://irmm.jrc.ec.europa.eu/reference\\_materials\\_catalogue](http://irmm.jrc.ec.europa.eu/reference_materials_catalogue))

Crops	Events	ERM number
Soybean	RoundupReady soybean	BF410
	356043	BF425
	305423	BF426
Maize	Bt176	BF411
	Bt11	BF412
	MON810	BF413k
	GA21	BF414
	NK603	BF415
	MON863	BF416
	MON863×MON810	BF417
	1507	BF418
	MIR604	BF423
	59122	BF424
	3272	BF420
	98140	BF427
	Cotton	281-24-236×3006-210-23
GHB119		BF428
T304-40		BF429
Sugar beet	H7-1	BF419
Potato	EF92-527-1	BF421

된 시료에서는 검출이 불가능하다. 따라서 효소면역학적 기법에 의한 검지는 원료 (raw material)에 대해서만 가능하다.

검정하려는 GM 옥수수나 GM 대두 등의 GM 종자를 blender 등을 이용하여 마쇄한 후 TBS 완충용액으로 추출한 조단백질을 Bradford 법 등에 의해 추출한 전체 단백질 양을 측정 후 ELISA 검정에 사용한다.

GMO 표준시료 (reference materials)를 IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements)에서 구입 (Table 2)하여 표준단백질로 활용하여 단백질의 정량검사에 활용할 수 있다.

## 최신 분석방법

### 마이크로어레이 기술을 활용한 방법

Microarray 또는 DNA chip으로 불리는 기술을 통하여 slide glass상에 GMO 유전자를 검출할 수 있는 특이적 oligonucleotide probe를 정렬 고정화한 후, 분석하고자 하는 GMO 시료를 PCR을 통해 형광물질을 붙여 얻은 산물과 반응시킨 여러 GMO 이벤트를 동시에 분석하는 방법이다.

현재 GMO로 개발된 콩, 옥수수, 면화, 감자, 카놀라 등의 품종의 삽입유전자 및 내재 유전자를 적당한 크기의 oligonucleotide를 합성하거나, cDNA 형태로 clone하여 효과적인 검출을 위해 DNA chip 제작에 이용하고 있다. GMO 분석을 위한 microarray 접근방법은 기존의 PCR 방법을 응용한 기술로써 각각의 GMO에 도입된 외래유전자들을 타겟으로 하여 특이적인 probe를 선별하고 hybridization시킨 후 image를 분석함으로써 GMO를 판별하는 접근 방법이다. 그러나 현재까지는 genomic DNA 자체를 직접적으로 probe와 hybridization시켜 특이적인 spot signal을 얻을 수 있는 방법을 마련하지 못하고 있는 실정이며, 이러한 접근 방법의 예비실험 단계로써 PCR를 이용하여 target DNA를 증폭한 후 이러한 PCR 산물을 각각의 특이적인 probe와 반응시켜 그에 대한 image를 분석하고 있다.

이와 같이 GMO 분석의 새로운 기술로써 microarray를 이용한 사례로 GM 옥수수와 콩의 검사를 위한 DNA microarray-multiplex PCR법이 보고된 바 있으며 (Germini et al. 2005; Bordoni et al. 2005), 9개의 GM event (Bt176, Bt11, GA21, MON810, CBH351, T25, Topas 19/2, T45, RRS)의 검출을 위한 low-density DNA chip이 보고된 바 있다 (Leimanis et al. 2006). 우리나라에서는 가공식품 내에서 GMO 검정을 하기 위해 2개의 GM 콩, 13개의 GM 옥수수, 3개의 GM 카놀라, 1개의 GM 면화 등 19개의 GMO에 대해 microarray를 적용한 결과 (Kim et al. 2010b)가 있으며 이와 같이 우리나라 자체적인 기술력을 확보함으로써

보다 효율적이고 개선된 새로운 GMO 분석법 마련을 위한 시도들이 진행되고 있다.

### 나노기술을 활용한 GMO 발현단백질의 검출방법

현재 immunoassay에서 가장 많이 쓰이는 방법은 앞서 소개한 ELISA로서 이 방법은 고체물질의 표면에 항체를 고정화하는데 있어서 전문적인 기술을 요하는 여러 단계의 반응을 거쳐야 한다. 그리고 시료에 존재하는 타겟물질들이 고체 표면에 고정된 1차 항체와 결합하기 위해 확산 되어야 하는데 96-well microtiter plate에서 수행 되어질 때 보통 수 시간이 소요된다. 또한 이러한 전통적인 방법은 많은 양의 값비싼 시약을 소비하게 되고 pipetting을 이용한 용액 분배에 있어서 시간과 노동력이 요구된다. 이러한 작업은 높은 정확도와 타겟물질이 낮은 농도로 존재하는 시료에서도 검출이 가능하다는 장점을 가지고 있지만, 숙련된 연구자들에 의해서만 가능하고 시간이 오래 걸리는 단점으로 인해 GMO 검출과 같이 현장 판별이 필요한 경우에는 적용에 어려움이 있다.

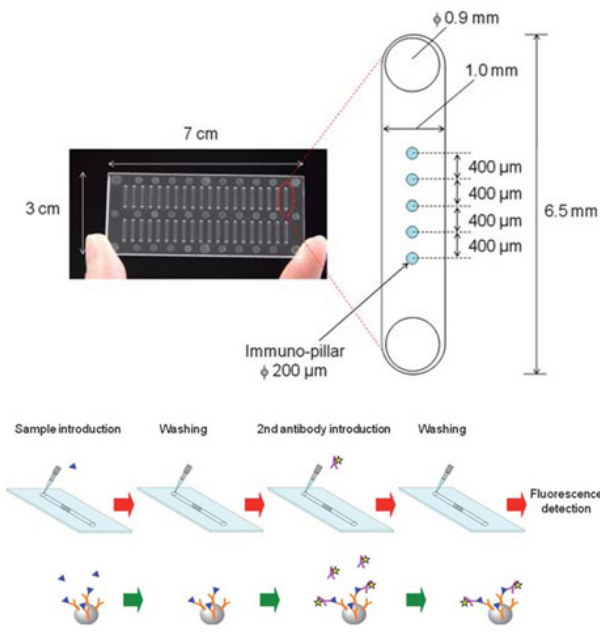
이러한 immunoassay의 단점을 보완한 microfluidic 기술을 이용한 lab-on-a-chip 개발 연구가 활발하게 진행 중이다. 특히 최근에는 평면 (2-D)기반의 검출기기를 입체적 (3-D)인 형태로 구현하는 연구가 진행 중에 있다. 최근 학계에서는 하이드로젤 (hydrogel)을 이용한 방법과 microfluidic 기술을 장비를 이용한 검출 방법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근 나고야대학의 Baba교수 연구실에서는 펌프 없이 손쉽게 시료 및 반응액을 반응채널에 주입하고 항체가 고정된 마이크로비드를 사용한 입체기반의 분석키트를 개발하여 기존의 평면기반 검출방법의 단점을 보완 하였다 (Fig. 1) (Ikami et al. 2010). 이 보고에 따르면 마이크로채널 내에 항체가 고정된 마이크로비드를 포집하고 있는 다수의 하이드로젤 기둥을 만들어 시료 및 반응용액의 원활한 흐름을 유도하고, 하이드로젤 내에 포집되어 있는 Immuno-bead와의 반응성을 높였다. Immuno-bead에는 여러 종류의 항체를 고정화 하여 다중검출이 가능하기 때문에 효과적인 GMO검출 기술로 적용이 예상된다.

한편 분석을 위해 흡광도분석기나 형광측정기와 같은 광학모듈을 필요로 하지 않고 단순히 육안으로 GMO 검출이 가능한 기술도 최근에 보고가 되었다 (Lim et al. 2011). Tricosadiynoic acid (TCDA)와 같이 diacetylene기를 가지고 있는 양친매성 물질은 수용액 상에서 리포솜 (Liposome) 형태로 자기조립 (self-assembly)되고 이중지질막 (Lipid bilayer) 내에 잘 정렬된 diacetylene 단량체들은 UV에 노출되면 광중합 반응이 일어난다. 결과적으로 형성된  $\pi$ -conjugated polymer chain은 리포솜의 안정성을 증대시키고 또한 리포솜에 파란색을 부여한다. 이렇게 형성된

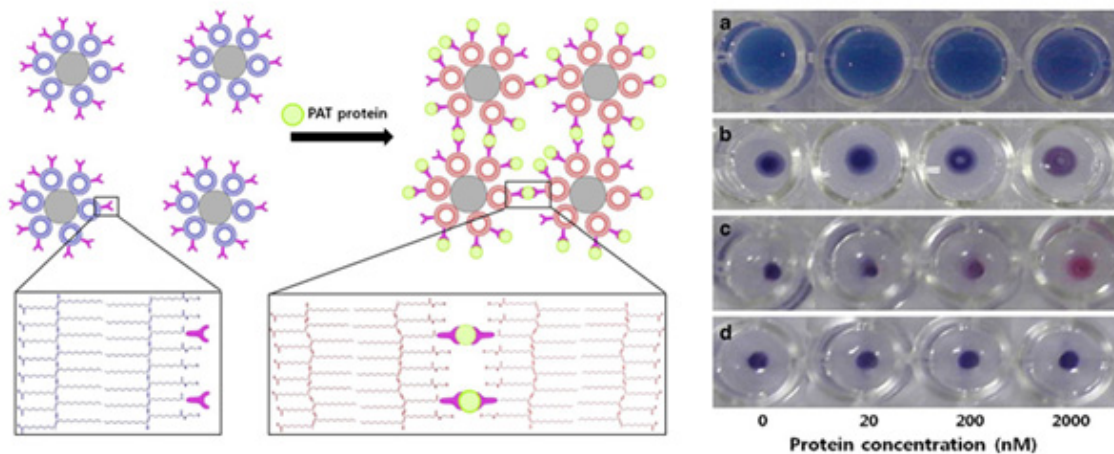
Polydiacetylene (PDA) 리포솜은 열이나 pH 또는 기계적 스트레스와 같은 외부적 요인에 의하여 색변화가 일어나고 이러한 광학적 특성으로 인해 PDA는 훌륭한 센서소재로 관심을 받게 되었다 (Jelinek and Kolusheva 2007; Su et al. 2005; Tieke 1985; Wegner 1969). PDA 리포솜은 초음파와 UV처리를 통해 용액 상에서 쉽게 제작이 가능하며 리포솜 외부표면에 항체나 특정 수용체를 고정화하여 센서소재로 사용되고 있다. 타겟물질이 리포솜 표면에 있는 항체나 수용체와 결합을 하게 되면 리포솜의 polymer

chain의 형태가 변화되고 이로 인한 광학적 특성의 변화는 센서의 기본 메커니즘이 되고 있다. 하지만 단백질과 같이 작은 물질이 PDA 리포솜의 표면에 붙어서 발생하는 기계적 스트레스는 크지 않기 때문에 검출민감도에 한계를 가지고 있으며, 검출한계를 높이기 위해서 결국 광학분석기기를 사용할 수밖에 없다. 이러한 문제점을 개선한 기술이 2011년에 보고되었는데, 타겟물질의 결합에 의해 발생하는 기계적 스트레스를 증폭하기 위해 실리카마이크로비드 (Silica microbead)를 PDA 리포솜에 부착하는 방법을 사용 하였다 (Lim et al. 2011). 실리카마이크로비드 부착으로는 색변화가 유발되지 않지만 시료 중 타겟단백질이 존재할 경우 PDA 리포솜 표면에 있는 항체와의 결합으로 인해 PDA-silica microbead 복합체들이 서로 결합하여 PDA 리포솜의 색전이 작용을 증폭시키는 효과를 발생시킨다. 또한 리포솜 제작 시 광중합이 되지 않는 dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC)을 부분적으로 첨가하여 리포솜의 유동성을 증가시켜 저농도에서도 색전이 현상이 나타날 수 있게 디자인 하여 검출민감도를 향상 시켰다. 이로 인해, 실리카마이크로비드와 복합체를 형성하지 않은 기존의 PDA 리포솜과 비교하여 100배 이상의 신호증폭 효과를 얻을 수 있었으며 제초제 저항성 GMO의 마커단백질인 phosphinothricin acetyltransferase (PAT)에 대한 검출한계는 20 nM에 이르는 것으로 보고되고 있다 (Fig. 2).

보고된 기술의 장점은 그림 2에서 보듯이 타겟물질이 시료에 존재할 때 발생하는 색전이 현상을 육안으로 관찰이 가능하며 간단한 스캐너를 이용해서 정량적분석기기로 개발이 쉽다는 것이다. 이러한 장점은 현장검출에 대한 요구가 높은 GMO 검출시스템 개발에 있어서 적합한 기술로 평가 되고 있다.



**Fig. 1** Photograph and schematic flow chart of the microchip illustrating the assay procedure (Ikami, 2010)



**Fig. 2** Schematic illustration of colorimetric detection for PAT protein by PDA vesicle-silica bead conjugate biosensor (left). Right image shows colorimetric changes of reactions containing free PDA vesicle (a) and PDA vesicle-silica bead conjugates (b-d) in response to varying concentration (0-2  $\mu$ M) of PAT (a-c) and BSA (d)

## 적 요

1994년 처음으로 GM 토마토인 Flavr Savr가 시장에 나온 이후, 2010년 현재 140여 품목의 GM식물이 전 세계적으로 상업화되었다. GM식물들에 대한 안전성 승인여부의 확인 및 표시제관리를 위하여 이들 GM식물내로 도입된 삽입유전자의 정보를 이용한 검정방법이 도입되었으며, 또한 도입유전자의 발현된 단백질을 분석하기 위하여 정성 및 정량을 위한 면역학적 방법이 도입되었다. 본 총설에서는 국내·외적으로 개발된 콩, 옥수수, 카놀라, 면화 등의 GM식물에 적용된 multiplex PCR, real-time PCR 방법과 최신 개발 중인 microarray, 나노기술 등을 활용한 방법들을 조사하였다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21사업 (Grant No. 20080401034032)에 의하여 수행되었다.

## 인용문헌

- 김모영, 김재환, 김현중, 박선희, 우건조, 김해영 (2003) PCR을 이용한 국내시장에 유통 중인 유전자재조합 콩 및 가공식품의 모니터링. *한국농화학회지* 46(4):344-347
- 김현중, 박선희, 김해영 (2001) PCR을 이용한 glyphosate 저항성 콩의 검출법에 관한 연구. *한국식품과학회지* 33: 521-524
- 식품의약품안전청 (2007) 유전자재조합식품의 안전성 평가심사 등에 관한 규정. *식품의약품안전청 고시 제 2007-60호*
- 허문석, 김재환, 박선희, 우건조, 김해영 (2003) PCR을 이용한 국내에서 안전성이 확인된 유전자재조합 옥수수의 분석 방법. *한국식품과학회지* 35(6):1033-1038
- Bordoni R, Germini A, Mezzelani A, Marchelli R, De Bellis G (2005) A Microarray Platform for Parallel Detection of Five Transgenic Events in Foods: A Combined Polymerase Chain Reaction – Ligation Detection Reaction – Universal Array Method. *J Agric Food Chem* 53:912-918
- Brett GM, Chambers SJ, Huang L, Morgan MRA (1999) Design and development of immunoassays for detection of proteins. *Food Control* 10:401-406
- Germini A, Rossi S, Zanetti A, Corradini R, Fogher C, Marchelli R (2005) Development of a Peptide Nucleic Acid Array Platform for the Detection of Genetically Modified Organisms in Food. *J Agric Food Chem* 53:3333-3337
- Heo MS, Kim JH, Shin WS, Park SH, Park HK, Kim MC, Kim HY (2004) Limit of detection for genetically modified soybean in doenjang. *Food Sci Biotechnol* 13(5):657-661
- Ikami M, Kawakami A, Kakuta M, Okamoto Y, Kaji N, Tokeshi M, Baba Y (2010) Immuno-pillar chip: a new platform for rapid and easy to use immunoassay. *Lab on a Chip* 10: 3335-3340
- James C (2011) Global status of commercialized Biotech/GM crops: 2010. ISAAA Brief No. 42. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA): Ithaca, NY
- Jelinek R, Kolusheva S (2007) Biomolecular sensing with colorimetric vesicles, p. 155-180, *Creative Chemical Sensor Systems*
- Kim HY, Kim JH, Oh MH (2010a) Regulation and detection methods for genetically modified foods in Korea. *Pure and Applied Chemistry* 82(1):129-137
- Kim JH, Ahn JH, Seo YJ, Lee WY, Park SH, Kim HY (2008) Multiplex PCR detection of the MON1445, MON15985, MON88913, and LLcotton25 varieties of GM cotton. *Food Sci Biotechnol* 17(4):829-832
- Kim JH, Jee SM, Park CS, Kim HY (2006a) Detection of Transgenic Rice containing Cry1Ac gene derived from *Bacillus thuringiensis* by PCR. *Food Sci Biotechnol* 15(4):625-630
- Kim JH, Kim SY, Lee HJ, YR Kim, Kim HY (2010b) An event-specific DNA microarray to identify genetically modified organisms (GMOs) in processed foods. *J Agric Food Chem* 58:6018-6026
- Kim JH, Kim HY (2009a) Event-specific detection methods for genetically modified maize MIR604 using real-time PCR. *Food Sci. Biotechnol* 18:1118-1123
- Kim JH, Kim TW, Lee WY, Park SH, Kim HY (2007) Multiplex PCR detection of the GT73, MS8xRF3, and T45 varieties of GM Canola. *Food Sci Biotechnol* 16(1):104-109
- Kim JH, Park SH, Kim HY (2009b) Multiplex PCR detection of four events of GM maize (Event3272, LY038, MIR162, and MON88017) *Journal of Korean Society for Applied Biological Chemistry* 52(1):105-107
- Kim JH, Seo YJ, Sun SH, Kim HY (2009c) Multiplex PCR detection for four events of genetically modified soybean, RRS, A2704-12, DP356043-5, and MON89788. *Food Sci Biotechnol* 18(3):694-699
- Kim JH, Song HS, Heo MS, Lee WY, Lee SH, Park SH, Park HK, Kim MC, Kim HY (2006b) Detection of eight different events of genetically modified maize by multiplex PCR method. *Food Sci Biotechnol* 15(1):148-151
- Kuribara H, Shindo Y, Matsuoka T, Takubo K, Futo S, Aoki N, Hirao T, Akiyama H, Goda Y, Toyoda M, Hino A (2002) Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean. *J AOAC Int* 85:1077-1089
- Lee SH, Kim JK, Yi BY (2007) Detection methods for biotech cotton MON 15985 and MON 88913 by PCR. *J Agric Food Chem* 55:3351-3357
- Leimanis S, Hernández M, Fernández S, Boyer F, Burns M, Bruderer S, Glouden T, Harris N, Kaeppli O, Philipp P, Pla M, Puigdomènech P, Vaitilingom M, Bertheau Y, Remacle J (2006) A microarray-based detection system for genetically modified (GM) food ingredients. *Plant Mol Biol* 61:123-139
- Lequin RM (2005) Enzyme immunoassay (EIA)/Enzyme-linked

- immunosorbent assay (ELISA). *Clinical Chemistry* 51:2415-2418
- Lim MC, Shin YJ, Jeon TJ, Kim HY, Kim YR (2011) Microbead-assisted PDA sensor for the detection of genetically modified organisms. *Anal Bioanal Chem* 400:777-785
- Onishi M, Matsuoka T, Kodama T, Kashiwaba K, Futo S, Akiyama H, Maitani T, Furui S, Oguchi T, Hino A (2005) Development of a multiplex polymerase chain reaction method for simultaneous detection of eight events of genetically modified maize. *J Agric Food Chem* 53:9713-9721
- Rho JK, Lee T, Jung SI, Kim TS, Park YH, Kim YM (2004) Qualitative and quantitative PCR methods for detection of three lines of genetically modified potatoes. *J Agric Food Chem* 52:3269-3274
- Shrestha HK, Hwu KK, Wang SJ, Liu LF, Chang MC (2008) Simultaneous detection of eight genetically modified maize lines using a combination of event- and construct-specific multiplex-PCR technique. 56:8962-8968
- Su YL, Li JR, Jiang L, Cao J (2005) Biosensor signal amplification of vesicles functionalized with glycolipid for colorimetric detection of *Escherichia coli*. *Journal of Colloid and Interface Science* 284:114-119
- Stave JW (1999) Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO-future needs. *Food Control* 10:367-374
- Tieke B (1985) Polymerization of butadiene and butadiyne (diacetylene) derivatives in layer structures. *Adv Polym Sci* 71:79-151
- Wegner G (1969) Topochemical reactions of monomers with conjugated triple bonds I. Polymerization of derivatives of 2,4-hexadiyne-1,6-diols in the crystalline state. *A. Naturforschung, Teil B* 24:824-832
- Yang L, Guo J, Zhang H, Liu J, Zhang D (2008) Qualitative and quantitative event-specific PCR detection methods for Oxy-235 canola based on the 3' integration flanking sequence. *J Agric Food Chem* 56:1804-1809
- Yang L, Xu S, Pan A, Yin C, Zhang K, Wang Z, Zhou Z, Zhang D (2005) Event specific qualitative and quantitative polymerase chain reaction detection of genetically modified MON863 maize based on the 5'-transgene integration sequence. *J Agric Food Chem* 53:9312-9318
- Zhang H, Yang L, Guo J, Li X, Jiang L, Zhang D (2008) Development of one novel multiple-target plasmid for duplex quantitative PCR analysis of roundup ready soybean. *J Agric Food Chem* 56:5514-5520