

유전자재조합 감자의 검정을 위한 DNA분리 및 PCR검출의 최적조건 탐색

신원선* · 김명희

한국식품개발연구원 안전성연구팀

Optimized Condition of Genomic DNA Extraction and PCR Methods for GMO Detection in Potato

Weon-sun Shin and Myunghee Kim

Korea Food Research Institute

To compare the quality of genomic DNA extracted from potato for PCR detection, four different methods, such as silica-based membrane method, silica-coated bead method, STE solution treatment, and CTAB-phenol/chloroform method, were evaluated. Also, to remove an excessive carbohydrate from the potato, α - and β -amylase were used individually and in combination. When used both silica-based membrane method and silica-coated bead method combined with enzymes, the genomic DNAs were extracted from the raw potato with high purity for PCR. However, the silica-coated bead method combined with enzyme treatment was the most efficient for extraction of the genomic DNA from the frozen fried potatoes. When applied with STE solution, the highly purified DNA was extracted from the raw potatoes without enzyme treatment in adequate yield for PCR. In cases of processed potatoes, such as frozen-fried potato and fabricated potato chips, CTAB-phenol/chloroform method is mostly feasible for DNA extraction and PCR efficacy at high sensitivity. As the results of PCR amplification, 216bp of PCR product was detected on 2% agarose gel electrophoresis, but any amplicons derived from New leaf and New leaf Y gene was not detected in any sample.

Key words: GMO labelling, potato, DNA extraction method, PCR detection

서 론

생명공학 기술의 발전으로 식량증산, 영양개선, 치료용식품 등의 목적을 위하여 유전자재조합 농작물이 개발되기 시작한 이래, GMO 작물의 주요품목인 대두, 옥수수, 면화 그리고 유채 등의 주요 GMO 작물들의 재배가 매년 급증하고 있으며 1996년 이후 2002년까지 GMO 작물의 재배면적이 전세계적으로 35배 증가하였다⁽¹⁾. 우리나라는 2001년 3월부터 농림부가 콩, 옥수수 및 콩나물에 대해 3%의 비의도적 혼입치가 넘는 경우 유전자재조합 표시를 하도록 의무화하였으며⁽²⁾, 같은 해 7월부터는 식품의약품안전청에서 이를 원료로한 27개의 가공식품에 대하여 표시제도를 시행하도록 의무화하였다^(3,4). 또한, 감자의 경우 1995년 몬산토사에서 개발한 해충저항성 특징을 지니는 유전자재조합 감자가 상품화

된 이래, 1999년에는 해충저항성과 바이러스저항성을 지니는 유전자재조합 감자(NewLeaf plus[®] 및 NewLeaf Y[®])가 상품화되었다⁽⁵⁾. 현재, 국내에서는 안전성판정절차가 완료되지 않은 상태로 상업적으로 판매되지 않고 있으나, 2002년 3월에 가공하지 않은 감자에 대하여 3% 수준에서 표시제 실시가 의무화되었다^(3,4). 표시제도를 실시하기 위해서는 무엇보다 소비자에게 제공되는 정보가 과학적으로 정확한 자료이어야 한다는 점이 중요하기 때문에 유전자재조합 식품 각각의 특성을 고려한 검증 방법을 바탕으로 표시제도의 신뢰성을 확보하는 것이 필요하다. 현재, 전세계적으로 재조합유전자를 검출하기 위한 방법으로 유전자증폭방법인 PCR 법^(6,7), 정량적 PCR법^(8,9), 정량적-경쟁적PCR법⁽¹⁰⁾ 등과 발현된 단백질을 항체결합법에 의해 분석하는 lateral flow strip법 혹은 ELISA⁽¹¹⁾ 등이 개발되어 이용되고 있다.

원료 및 가공식품으로부터 유전자재조합체가 혼입되어 있는지 여부를 확인하기 위하여 실시하는 PCR분석법에는 적절한 시료채취 및 DNA 추출정제 등의 선행과제가 있다⁽¹²⁾. 특히, 원료의 특성에 따라 식품의 matrix가 다르며 또한 가공공정의 영향으로 인하여 유전자가 손상되는 경우가 있기 때문에 PCR을 이용하여 목적유전자를 검출하기 위해서는 순

*Corresponding author : Weon-sun Shin, Korea Food Research Institute, San 46-5, Backhyun-dong, Bundang-gu, Seongnam-shi, Kyunggi-do 463-746, Korea
Tel: 82-31-780-9125
Fax: 82-31-780-9234
E-mail: hime@kfri.re.kr

도가 높고 충분한 양의 genomic DNA를 확보하는 것이 중요하다⁽¹³⁾. DNA추출방법이 적절하지 않을 경우 PCR 증폭 후, 의음성 혹은 의양성의 결과를 초래할 위험성이 있기 때문에 적절한 DNA 추출방법을 확립하는 것이 선행되어야 한다⁽¹³⁾. 따라서, 본 연구에서는 감자에 다량 포함되어 있는 전분을 제거할 수 있는 방법과 다양한 DNA 추출 kit를 이용하여 분리된 DNA의 추출효율 및 순도를 비교하고 이를 이용한 PCR 효능을 검토하였다.

재료 및 방법

시료

본 실험에 사용된 감자는 강원도지역에서 재배·수확한 신선한 생감자와 튀김용으로 반가공된 냉동감자 및 감자스낵을 대형 식품점에서 구입하였다.

시약 및 키트류

본 실험에서 genomic DNA 추출을 위한 상용 kit는 silica 막을 이용한 DNeasy plant maxi kit(Qiagen, USA), silica 코팅된 bead법인 PowerPrep DNA 추출 kit(Kogen Biotech., Korea)를 채택하였으며 CTAB법 및 STE solution 법을 이용하였다. 정성 PCR을 위한 프라이머는 일본 Nippon gene사에서 생산하는 유전자재조합 감자 검출용 프라이머, Pss 3' & Pss 5'(중폭산물: 216 bp), New leaf plus-3' & New leaf plus-5'(중폭산물: 234 bp), New leaf Y-3' & 5'(중폭산물: 225 bp)을 구입하여 사용하였고, Taq polymerase, dNTP, MgCl₂는 Applied Biosystem사 제품을 이용하였다. 그밖의 모든 시약은 분석용 특급시약을 이용하였다. 감자전분을 제거하기 위하여 사용한 효소는 α -amylase(barley malt 유래)와 β -amylase(barley 유래)로 Sigma사의 제품을 구입하여 이용하였다.

시료의 전처리

생감자는 얇게 슬라이스 하여 50°C에서 8시간 방치하여 수분을 제거한 뒤 마쇄기로 균질하게 분쇄하였다. 가공용 가공 감자시료인 감자스낵은 마쇄기로 균질하게 분쇄하여 사용하였으며 튀김용 냉동감자는 시중에서 구입한 후 50°C 건조기에서 하룻밤 방치하여 수분을 증발시키고 남은 고형분을 마쇄기로 곱게 분쇄한 것을 시료로 취하였다. 균질하게 분쇄한 시료는 각 분리방법별, 각 시료별로 50 mL Falcon Tube에 2 g씩 취한 후 밀봉하여 보관하였다. DNA 추출실험은 실험 중에 발생할 수 있는 오염에 많은 영향을 받을 수 있기 때문에 항상 시료 전처리 단계, 모든 실험 단계에서 70% ethanol로 실험대 주위를 깨끗이 닦고 랩을 깔고 실험을 하였고 모든 초자기구는 멸균후 사용하여 오염되지 않도록 주의하였다.

DNA 추출

DNA 추출방법으로 silica 막을 사용한 방법(DNeasy Plant Maxi Kit, Qiagen, USA), silica를 코팅한 bead법(PowerPrep DNA Extraction Kit, Kogen Biotech. Co., Korea), 그리고 STE solution 법과 CTAB법을 이용하였다. 상용 DNA 추출 kit를 이용한 추출방법은 제조회사의 실험지침서에 의거하여

수행하였다. 또한, DNA를 추출하기 전단계에서 과량의 탄수화물을 효과적으로 제거하기 위하여 Kaufman 등⁽¹⁴⁾의 방법을 변형한 STE solution 전처리법을 이용하였다. 이 방법은 얇게 썬 생감자에 액체질소를 부어서 급속냉동시킨 후 30 g을 칭량하여 50 mL Falcon Tube에 담고 4°C에서 냉각시킨 STE solution(0.25 M sucrose, 0.03 M Tris, 0.05 M EDTA)을 가하여 잘 섞고 60분 정도 반응시킨다. Swingbug 타입의 원심분리기를 이용해 1,000×g에서 10분간 원심분리 한 다음 전분이 용출되어 나온 상층액을 버린 뒤 아래에 가라앉은 침전물을 DNA분리용 시료로 회수한다(STE solution 전처리 단계). 시료를 2 g 칭량하여 50 mL Falcon Tube에 담아 15 mL SDS extraction buffer(0.1 M Tris, pH 8.0, 0.05 M EDTA, pH 8.0, 0.1 M NaCl, 1% SDS, 0.01 M 2-isomercaptoethanol)을 첨가한 후 65°C에서 30분간 반응시킨다. 여기에 15 mL potassium acetate를 0.25 M로 농축될 때까지 첨가하고 icebath 상에서 20분간 정치시킨다. 5000 g에서 15분간 원심분리 후 여과하여 걸러진 맑은 용액을 DNA 추출용으로 사용하였다. 동량의 isopropanol이 들어있는 새로운 튜브로 옮긴 후 침전한 DNA를 회수하고 여기에 1 mL TE를 넣어 DNA를 녹인다. 여기에 10 μ L RNase(100 mg/mL)을 첨가한 다음 부드럽게 흔들어서 30분간 반응시킨다. 여기에 2 mL ethanol을 첨가하여 침전시킨 뒤 80% ethanol을 넣어 세척한다. 상층액을 조심스럽게 마이크로피펫으로 제거한 뒤 잔여분의 ethanol을 건조시킨 후 500 μ L TE buffer을 첨가한 뒤 24시간 4°C에서 정치시키면서 DNA를 완전히 용해시킨다.

전분분해용 효소처리

시료에 효소를 처리하는 경우 생감자는 균질하게 분쇄한 감자에 멸균수를 적정량을 붓고 효소가 최적 작용할 수 있도록 pH를 6.0으로 조정하였다. 여기에 α -amylase(100 units), β -amylase(100 units), α -amylase와 β -amylase를 각각 100 units씩 혼합하여 첨가한 후 잘 섞고 65°C에서 3시간 정도 정치한 다음 DNA 추출 kit을 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 또한, 감자를 lysis buffer로 처리하는 단계에서 각각의 효소를 첨가하여 65°C에서 30분동안 반응시키거나, ethanol 침전 후 DNA를 회수하는 단계에서 효소처리를 한 후 DNA를 회수하였다. 냉동 감자 가공품인 경우 순도가 떨어지는 경향을 보여 silica membrane법의 lysis 단계와 ethanol 침전 후 DNA를 회수한 단계, silica 코팅된 bead법의 lysis 단계에 α -amylase(100 units), β -amylase(100 units), α , β -amylase(100 units씩)을 첨가하여 DNA를 추출하였다.

추출 DNA의 확인 및 보관

0.8% agarose gel에서 100 V로 30분동안 전기영동을 실시하여 추출한 DNA integrity를 확인 하였다. 또한 각 시료의 DNA Solution을 특성에 따라 희석배수를 정하여 230, 260, 280 nm에서 각각 흡광도를 측정 후 DNA농도가 50 ng/ μ L가 되도록 하여 추출 DNA의 농도를 계산하였다. 흡광도 측정 결과 O.D260/ O.D230값이 0.7이상, O.D260/ O.D280값이 1.8이상의 값을 기준으로 하여 탄수화물 유래 불순물의 정도와 단백질 유래 불순물의 정도를 판단하였다.

정성 PCR 조건

추출한 감자 DNA를 이용한 정성 PCR분석은 초기 template DNA 양을 50 ng으로 희석하여 사용하였다. 프라이머는 일본 Nippon gene사에서 생산하는 유전자재조합 감자 검출용 프라이머, Pss 3' & Pss 5'(증폭산물: 216 bp), New leaf plus-3' & New leaf plus-5'(증폭산물: 234 bp), New leaf Y-3' & 5'(증폭산물: 225 bp)을 구입하여 사용하였고, 바이오니아사의 AccuPower™ PCR PreMix Kit를 사용하였다. 반응 조건은 식품의약품안전청에서 고시한 유전자재조합 검사지침에 의거하여 94°C에서 10분간 per-denaturation 시킨 후, 95°C에서 30초간 변성(denaturation), 60°C에서 30초간 유전자 결합(annealing), 72°C에서 30초간 증폭 반응(elongation)과정을 40 cycle을 실시한 다음 72°C에서 10분 반응 후 종료하였다⁽¹⁵⁾.

결과 및 고찰

추출된 genomic DNA 순도비교

감자는 약 13-24% 정도의 전분을 함유하고 있으며 전분을 구성하고 있는 아밀로오스와 아밀로펙틴의 비율은 약 2:8 정도이다. 감자전분의 입자의 크기는 33 μm이며 중합도(degree of polymerization)가 500으로 타 곡류의 전분에 비해서 큰 것으로 알려져 있다⁽¹⁶⁾. Figure 1은 전분의 함량이 높은 감자로부터 genomic DNA를 추출하기 위하여 silica membrane 법을 응용한 상용 kit를 이용하여 감자의 주요성분인 전분을 제거할 목적으로 α-amylase 및 β-amylase 를 각각 혹은 혼합하여 처리한 결과이다. 그림에서 제시한 바와 같이 생감자를 균질하게 갈아서 여기에 전분분해효소를 각각 혹은 혼합형태로 첨가하여 반응시킨 시료(A), 균질하게 갈아놓은 감자에 AP 1 buffer(lysis buffer)를 넣은 단계에서 효소처리한 시료(B) 및 genomic DNA를 정제하여 에탄올침전으로 회수한 DNA 용액에 효소를 처리한 시료(C)에서 분리한 genomic DNA를 2% agarose gel상에서 확인하였다. 그 결과, 생감자에 효소를 혼합하여 반응시킨 후 genomic DNA 분리를 한 경우에는 효소로 처리하여도 DNA가 분리되지 않았으나(A), lysis buffer와 함께 첨가하여 효소반응을 시켰을 경우에는 genomic DNA가 분리되었으나 상당량의 DNA가 손상된 형태로 분리되었음을 알 수 있었다(B). 또한, 분리 마지막 단계에서 에탄올침전 후 얻어진 DNA 용액에 효소를 처리한 시

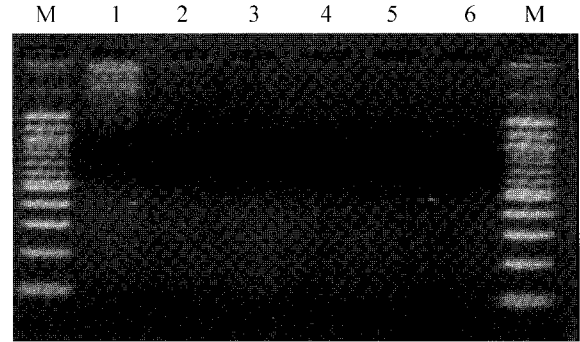


Fig. 2. DNA integrity of extracted genomic DNA using silica-coated bead method: lane 1, raw potato; lane 2, frozen potato 1 (imported); lane 3, frozen potato 2 (imported); lane 4, frozen potato 3 (imported); lane 5, frozen potato 4 (domestic); lane 6, frozen potato 5 (imported).

료에서는 고순도의 genomic DNA가 분리, 정제된 것을 볼 수 있었다(C). 이 결과에서 전분제거를 위하여 효소처리할 경우 DNA를 마지막 cleaning 하는 단계에서 수행하는 것이 고순도의 DNA를 회수할 수 있는 것으로 판단된다. 그러나, 튀김감자용으로 가공하여 냉동상태로 수입하거나 유통하는 감자의 경우, silica membrane kit를 이용하여 효소를 처리하여도 genomic DNA가 추출되지 않은 것으로 나타났다(data not shown).

Figure 2는 생감자와 냉동감자(감자튀김용 반가공품)로부터 silica 코팅된 bead 법을 이용하여 genomic DNA를 추출한 결과로서, 생감자에서 genomic DNA가 분리되었으며(Fig. 2, lane 1) 국내산 및 수입산 냉동감자로부터 genomic DNA가 분리되지 않았음을 보여주고 있다(Fig. 2, lane 2, 3, 4, 5, 6). 그러나, 생감자와 냉동감자를 silica 코팅한 bead kit를 이용한 경우 lysis하는 단계에 각각의 효소를 첨가하여 65°C에서 30분간 반응시킨 다음 genomic DNA를 분리한 결과이다. 생감자로부터는 효소를 처리하지 않은 군(Fig. 3, A-lane 1)을 포함하여 효소를 처리한 시료에서 모두 DNA(Fig. 3, A, lane 2, 3, 4)가 분리되었으나 냉동감자에서는 시료 D와 F 군에서 genomic DNA가 분리된 것으로 나타났다. 이상의 실험결과에서 전분의 아밀로오스를 구성하는 포도당당체의 α-1, 4-결합을 절단하는 α-amylase와 α-1, 6-결합을 절단하는 β-amyl-

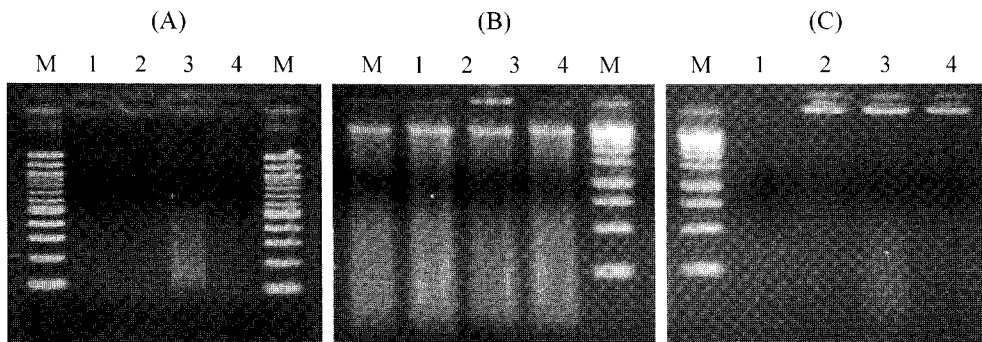


Fig. 1. DNA integrity of extracted genomic DNA using silica membrane method: lane 1, control (no enzyme treatment); lane 2, α-amylase; lane 3, β-amylase; lane 4, α,β-amylase: (A) raw potato treated with enzyme at 65°C for 2.5 hr; (B) enzyme-treated potato with lysis buffer at 65°C for 30 min; (C) genomic DNA treated with enzyme at 65°C for 30 min.

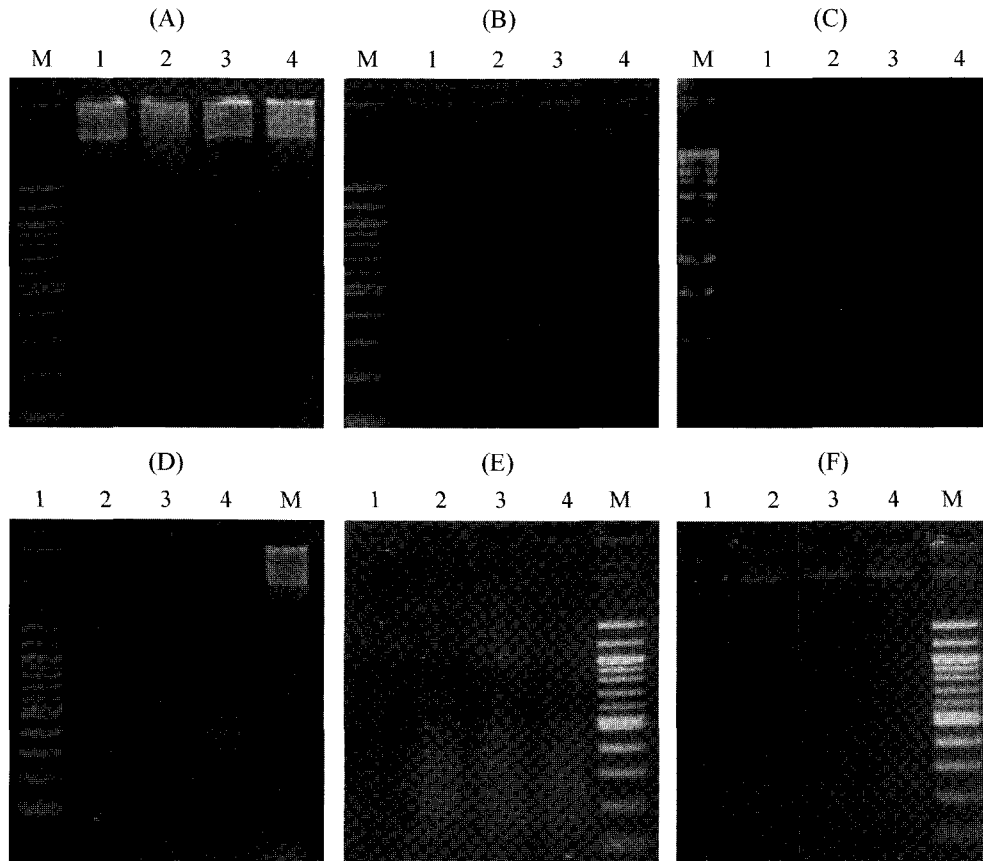


Fig. 3. DNA integrity of genomic DNA extracted using silica-coated beads method : lane 1, control (no enzyme treatment); lane 2, α -amylase; lane 3, β -amylase; lane 4, α,β -amylase: (A) raw potato; (B) frozen potato 1 (imported); (C) frozen potato 2 (imported); (D) frozen potato 3 (imported); (E) frozen potato 5 (domestic); (F) frozen potato6 (imported).

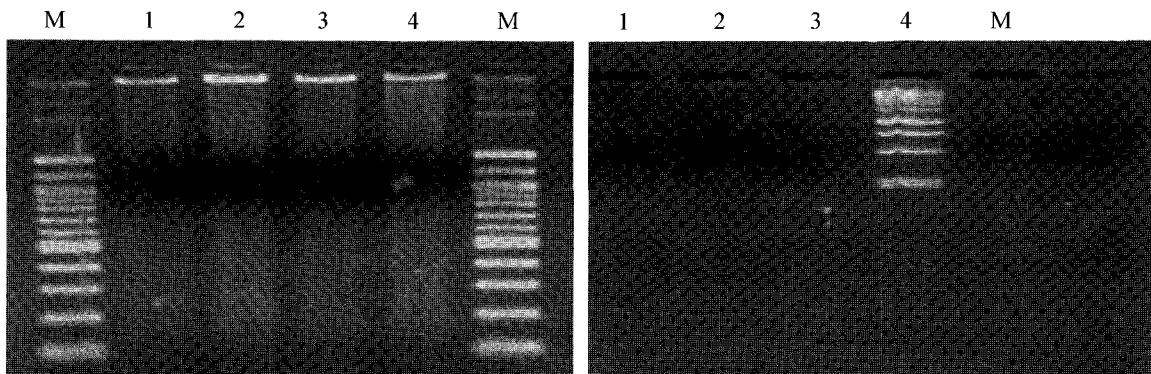


Fig. 4. DNA integrity of genomic DNA using STE solution method: (A) raw potato; (B) frozen potato; lane 1, frozen potato 1; lane 2, frozen potato 2; lane 3, frozen potato 3; lane 4, frozen potato.

yase에 관계없이 genomic DNA가 추출되었으며 타 식품의 성분이 제거된 후의 최종 DNA 용액에서의 작용력이 가장 우수하였다.

Figure 4는 생감자와 냉동감자를 STE 용액을 이용하여 전처리한 후, genomic DNA를 분리한 것이다. 그림 A는 생감자를 STE 용액을 단계별로 처리한 다음, genomic DNA를 추출한 결과로 깨끗한 DNA가 분리 정제된 것을 확인하였다. 그림 B는 냉동감자 4종류를 STE 용액으로 전처리한 다음 genomic DNA를 정제한 결과로 어떤 시료에서도 genomic

DNA는 분리되지 않았다.

추출방법에 따른 genomic DNA의 수율

Figure 5는 상용 DNA 추출 kit를 이용하여 감자로부터 추출한 DNA의 농도와 추출량을 비교한 결과이다. 그리고, silica membrane법으로 추출한 경우 α -amylase와 β -amylase를 처리하였을 때 추출된 DNA농도가 현저하게 증가했으며 효소처리하는 추출된 DNA 용액의 마지막 단계(DNA clean-up step)에서 처리한 경우에 효과가 가장 컸다(Fig. 5-1, A kit). 그리

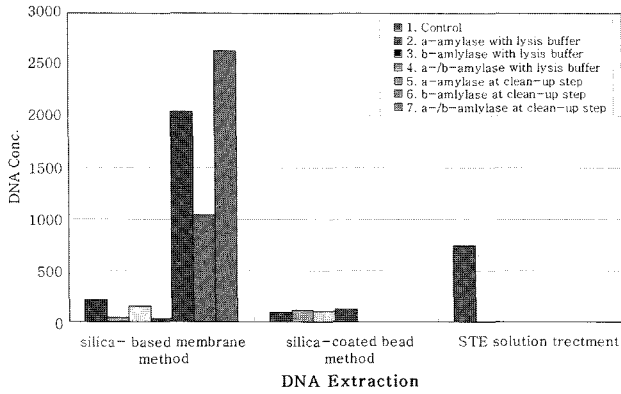


Fig. 5-1. Extracted DNA concentrations of raw potato under various extraction kits: A kit: silica membrane method, B kit: silica-coated beads method, C kit: STE solution method; α-amylase (100 units), β-amylase (100 units), α,β-amylase (100 units).

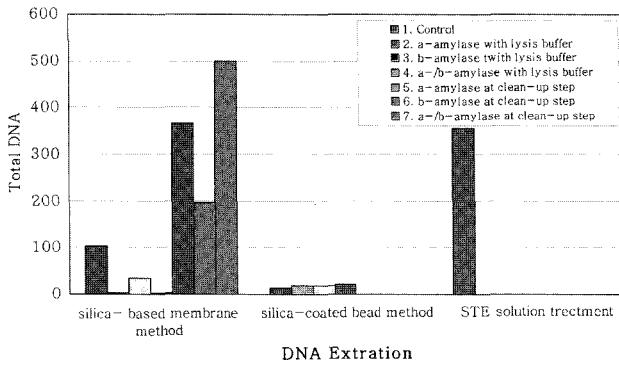


Fig. 5-2. Total DNA amount extracted from raw potato under various extraction method: A kit, silica membrane method; B kit, silica-coated beads method; C kit, STE solution method; α-amylase (100 units), β-amylase (100 units), α,β-amylase (100 units).

나, silica 코팅된 bead 법으로 추출한 경우 효소처리에 대한 효과는 보이지 않았다(Fig. 5-1, B kit). 추출된 genomic DNA의 수율은 각각의 효소처리한 시료군보다 효소를 혼합하여 처리한 군이 추출수율이 높은 것으로 나타났다. 또한, STE solution 으로 전분을 제거하고 난 다음 DNA를 분리정제할 경우 효소처리를 하지 않아도 충분한 양의 DNA가 추출되었음을 알 수 있었다(Fig. 5-1, C kit). 아울러, 추출법에 따른 총 DNA양을 비교한 결과(Fig. 5-2), 효소처리를 하지 않은 시료보다 효소처리를 한 경우에 DNA가 많이 추출되었으며 각각의 효소를 처리한 것보다 α-amylase와 β-amylase를 혼합하여 처리한 경우에 DNA가 더 효과적으로 추출되었다. 그러나, STE 용액으로 감자전분을 제거한 다음 DNA를 추출한 경우 효소처리없이도 DNA가 효율적으로 추출되었다(Fig. 5-2, D kit).

정성 PCR결과

0.8% agarose 전기영동상에서 DNA 추출 확인된 시료를 선택하여 STE 용액을 이용한 감자전분 제거 후 DNA를 추출한 시료와 silica membrane 법으로 추출한 DNA를 이용하여

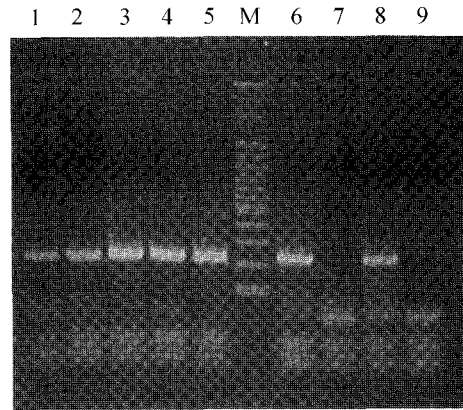


Fig. 6. PCR products amplified with Pss specific primer sets in raw potato: genomic DNA was extracted using STE solution method and silica membrane method; lane 1, STE solution; lane 2, no enzyme treatment; lane 3, α-amylase at lysis step; lane 4, β-amylase treatment at lysis step; lane 5, α/β-amylase treatment at lysis step; lane 6, α-amylase treatment at DNA clean-up step; lane 7, β-amylase treatment at DNA clean-up step; lane 8, α/β-amylase treatment at DNA clean-up step.

PCR 증폭을 한 결과를 Fig. 6에 나타냈다. PCR증폭을 위하여 이용한 프라이머는 감자의 내인성 gene인 Potato sucrose synthase(Pss) 유래 유전자, New leaf plus, New leaf Y 재조합 유전자 염기배열에서 제작한 상용 primer set를 이용하였다. 그 결과, 생감자, 냉동감자 등 13종의 시료에서 효소처리 단계에 관계없이 216 bp 크기의 감자내인성 유전자 절편이 확인되었다. 그러나, α-amylase와 β-amylase를 각각 혹은 혼합형으로 처리한 시료에서 추출한 DNA로 증폭한 경우에 STE 용액으로 처리한 시료와 효소처리를 하지 않고 silica membrane 법으로 추출한 DNA로 증폭시킨 것 보다 증폭산물의 강도가 높았다(Fig. 6, lane 2, 3, 4). Figure 7은 silica-coated bead 법으로 추출한 DNA를 감자의 내인성 유전자 유래의 프라이머(Pss, 216 bp)를 이용하여 PCR 증폭시킨 결과이다. Silica-coated bead 법을 이용한 경우 효소처리없이 추출한 생감자의 DNA를 비롯하여 효소처리한 시료에서 추출한 DNA를 PCR 증폭시킨 경우에 고감도의 증폭산물이 검출되었다. 또한, 냉동가공감자에서 효소를 처리한 냉동감자 시료에서 추출한 DNA를 증폭한 경우, 모든 냉동감자 시료에서 고감도의 증폭산물이 검출되었으며, 효소처리를 하지 않은 경우에는 DNA의 증폭이 일어나지 않은 결과를 포함하여 재현성이 떨어지는 결과를 보였다(Fig. 7-1, lane 6, 10). 또한, 재조합 유전자를 검출하기 위하여 제작한 프라이머인 New leaf plus 프라이머(234 bp)와 New leaf Y 프라이머(225 bp)를 이용하여 PCR 증폭한 결과 어느 시료에서도 재조합 유전자는 검출되지 않았다(Data not shown).

시료를 마쇄하거나 처리할때 세포내의 DNase가 활성화되어 intact genomic DNA를 얻기 어려운 경우에 이들 DNase를 불활성시키기 위하여 phenol 추출법이 권장되고 시료에 지방이 존재하여 층분리가 어려운 시료의 경우 계면활성제인 CTAB을 이용하기도 한다. 특히, 수입감자스낵류 중에서 fabricated potato chip은 감자가루를 이용하여 타 첨가물과 반죽하여 압연, 튀김과정을 거치게 되므로 전체 시료증량에서

요 약

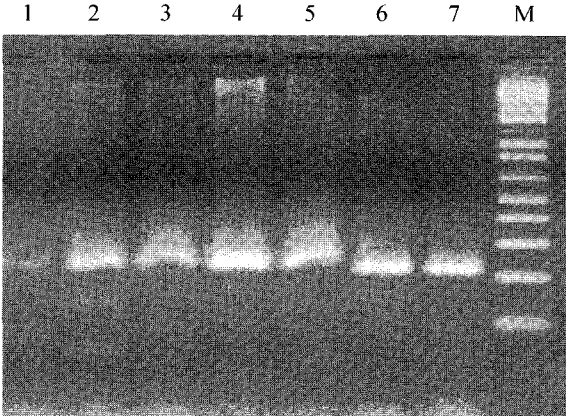


Fig. 7. PCR products amplified with intrinsic primer set derived from potato sucrose synthase (Pss, 216 bp): genomic DNA was extracted using silica-coated bead method; lane 1, raw potato with no enzyme treatment; lane 2, 3, 4, enzyme treatment at lysis step with α -amylase, β -amylase, α + β -amylase; lane 6, frozen potato with no enzyme treatment; lane 7, 8, 9, enzyme treatment at lysis step with α -amylase, β -amylase, α + β -amylase.

국내에서 시판되는 감자와 수입 감자스낵류로부터 상용 DNA 추출 kit 및 CTAB-phenol/chloroform 추출법등을 이용하여 시료특성에 따른 genomic DNA를 추출방법을 선정하고 PCR 정성검사를 실시하였다. 생감자의 경우 STE 용액으로 과량의 전분을 제거한 다음 DNA를 추출한 경우 순도 높은 DNA를 추출할 수 있었으며 상용 추출 kit를 이용한 경우 lysis buffer와 함께 α - β -amylase 를 각각 또는 혼합으로 처리하거나 추출된 DNA 용액에 마지막 단계에서 효소를 처리한 시료군에서 고순도의 DNA를 추출할 수 있었으며, 효소 처리군에서는 α - β -amylase를 혼합으로 처리한 경우에 DNA 추출수율이 높았다. 냉동가공감자의 경우 silica-coated bead 법을 이용하여 효소를 처리한 경우와 CTAB-페놀·클로로포름 처리군에서 DNA가 추출되었다. 또한, 각 방법으로 추출한 DNA에 대하여 감자의 내인성 유전자인 Pss 프라이머를 사용하여 PCR을 한 결과 모든 시료에서 추출된 DNA에 대하여 내부표준유전자 증폭산물이 검출되었다. 고도의 가공처리를 거친 수입 감자스낵(fabricated potato chips)과 냉동가공감자(frozen fried potato) 등은 계면활성제인 CTAB(cetyl trimethyl ammonium bromide)과 페놀-클로로포름 혼합액을 이용하여 추출하고 이를 template 로 하여 PCR 증폭을 실시하였다. 그 결과, Fig. 8에 제시한 바대로 감자의 내인성 유전자인 Pss 특이적 산물인 216 bp의 산물이 냉동감자가공품과 감자칩에서 검출되었으며 재조합유전자인 New leaf plus 유래의 증폭산물(234 bp)와 New leaf Y유래의 증폭산물(225 bp)는 검출되지 않았다. 본 실험의 결과 시료의 가공특성과 적용한 추출 kit 및 방법에 따라 genomic DNA 순도 및 추출 수율이 크게 차이가 났으며 이것이 결국 PCR 결과에 의음성 혹은 의양성 등에 영향을 미치게 될 것으로 판단된다. 또한, 동일한 DNA추출방법에 의해서도 DNA가 추출되지 않은 경우가 있어서 동일한 시료에서 2회 반복 추출하는 것이 의

차지하는 감자원료의 양이 상당히 줄어들게 되며 압출성형 과정을 거치면서 DNA손상이 예측된다. 따라서, 고도의 가공처리를 거친 수입 감자스낵(fabricated potato chips)과 냉동가공감자(frozen fried potato) 등은 계면활성제인 CTAB(cetyl trimethyl ammonium bromide)과 페놀-클로로포름 혼합액을 이용하여 추출하고 이를 template 로 하여 PCR 증폭을 실시하였다. 그 결과, Fig. 8에 제시한 바대로 감자의 내인성 유전자인 Pss 특이적 산물인 216 bp의 산물이 냉동감자가공품과 감자칩에서 검출되었으며 재조합유전자인 New leaf plus 유래의 증폭산물(234 bp)와 New leaf Y유래의 증폭산물(225 bp)는 검출되지 않았다.

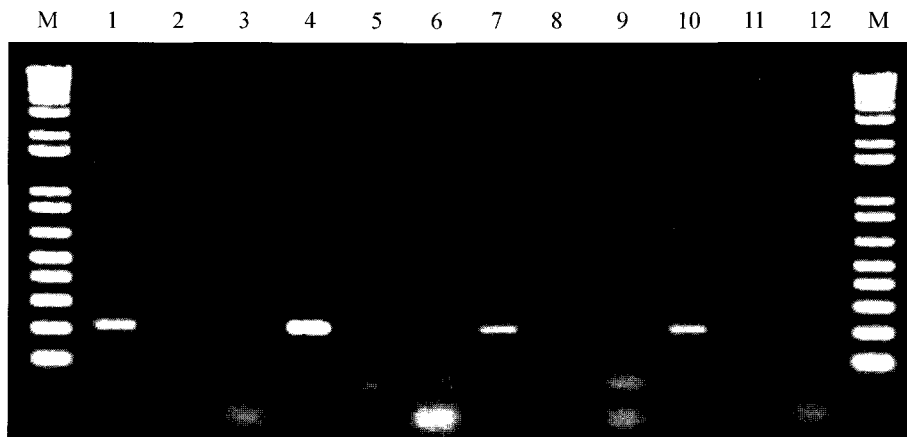


Fig. 8 PCR products amplified with genomic DNAs extracted from imported frozen fried potato and imported potato chips using CTAB method: lane 1, 4, 7, 10, primers-patatin gene-specific primer (Pss); lane 2, 5, 8, 11, New leaf plus gene-specific perimer and lane 3, 6, 9, 12, New leaf Y-gene specific primer; lane 1, 2, 3, frozen potato stick 1; lane 4,5, 6, frozen potato stick 2; lane 7, 8, 9, potato chips 1; lane 10, 11, 12 potato chips 2.

음성결과를 피할 수 있는 방법으로 판단된다.

문 헌

1. James, C. Global review of commercialized transgenic crops: 2001, ISAAA briefs No. 24. pp. 1-31, Ithaca, NY (2001)
2. Ministry of Agriculture and Forest. MAF's GM-food Labelling Standards. Ministry of Agriculture and Forest. No. 2000-31, Seoul, Korea (2000)
3. KFDA. Biotech Labelling Standards for Processed Foods. Korea Food and Drug Administration, No. 2000-43, Seoul, Korea (2000)
4. KFDA. Biotech Labelling Standards for Processed Foods (revised). Korea Food and Drug Administration, No. 2001-43, Seoul, Korea (2001)
5. Jaccaud, E., Hohne, M. and Meyer, R. Assessment of screening methods for the identification of genetically modified potatoes in raw materials and finished products. *J. Agric. Food Chem.* 51: 550-557 (2003)
6. Vollenhofer, S., Burg, K., Schmidt, J. and Kroath, H. Genetically modified organisms in food-screening and specific detection by polymerase chain reaction. *J. Agric. Food Chem.* 47: 5038-5043 (1999)
7. Meyer, R., Chardonnens, F., Huber, P. and Luthy, J. Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Z. Lebnsn. Unters. Forsch.* 203: 339-344 (1996)
8. Vaitilingom, M., Pijinenburg, H., Gendre, F. and Brignon, P. Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and roundup ready soybean in some representative foods. *J. Agric. Food Chem.* 47: 5261-5266 (1999)
9. Wurz, A., Bluth, A., Zeltz, P., Pfeifer, C. and Willmund, D. Quantitative analysis of genetically modified organisms (GMO) in processed food by PCR-based methods. *Food Control* 10: 385-389 (1999)
10. Hubner, P., Studer, E. and Luthy, J. Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organisms in food. *Food Control* 10: 353-358 (1999)
11. Kuiper, H.A. Summary report of the ILSI Europe workshop on detection methods for novel foods derived from genetically modified organisms. *Food Control* 10: 339-349 (1999)
12. Gilbert, J. Sampling of raw materials and processed foods for the presence of GMOs. *Food Control* 10: 363-365 (1999)
13. Brodmann, P. DNA-extraction: Important step of the quantitative detection of GMO in food matrices. *New Food* 5:57-61 (2001)
14. Kaufman, B., Richards, S. and Dierig, D. DNA isolation method for high polysaccharide *Lesqurella* species. *Industrial Crops Products* 9: 111-114 (1999)
15. KFDA. Guideline of Detection Method for Genetically Modified Food. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea (2002)
16. Kim, D.H. Polysaccharide in food, pp. 255-267. In: *Food Chemistry*, Tamgudang Inc., Seoul, Korea (1992)

(2003년 7월 29일 접수; 2003년 8월 21일 채택)