

GMO 분석기술의 최근동향

박영민¹⁾, 한일근²⁾, 이제현^{1a)} / 1) (주)한국유전자검사센터 · 2) 다카라코리아바이오테크놀로지주식회사

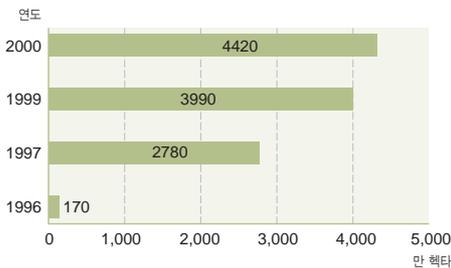
I. GMO 재배현황 및 개발동향

1. GMO 품종 개발소사

- » 1973 미생물을 대상으로 유전자 재조합 성공
- » 1983 식물 유전자 재조합 성공
- » 1987 형질전환 식물 야외 포장 재배 허가
- » 1994 GM 품종(토마토) 농가재배 허가
- » 1996 GM 품종 본격 농가 보급
- » 2000 전세계 4,420만 ha 재배

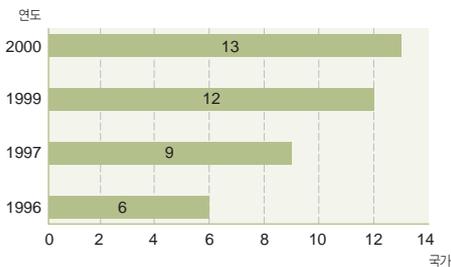
2. GM 작물 전체(세계) 재배면적 및 국가

2000년 기준 전세계 GMO 작물의 재배면적은 100,920만 에이커에 해당하는 4,420만 헥타에 달한다. 이는 영국 국토의 거의 2배에 해당하는 면적이며, 1999년과 비교하여 11% 증가하였다.

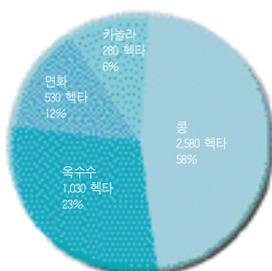


이러한 지난 5년간(1996~2000) GMO 재배 면적의 증가는 25배에 달하였으며, GMO의 재배 국가수도 6개국에서 13개국으로 늘어났다.

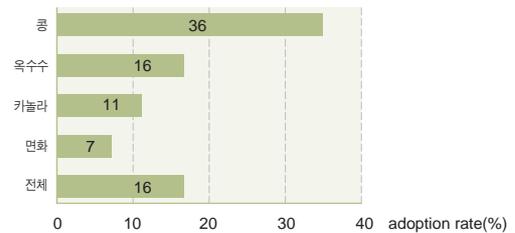
3. GMO 작물별 재배면적 및 비율



2000년 기준으로, 전체 GMO 재배면적에 대하여 GMO 작물별 현황은 콩, 옥수수, 면화, 카놀라의 순서로 재배되고 있으며 비율 및 재배 면적은 다음과 같다.



또한 이들의 전체 해당 작물에 대한 유전자변형 작물의 비율 (adoption rate)은 콩, 옥수수, 카놀라, 면화의 순으로 높았으며, 콩의 경우 미국은 54%, 아르헨티나는 95%, 세계 평균은 36%에 달했다.

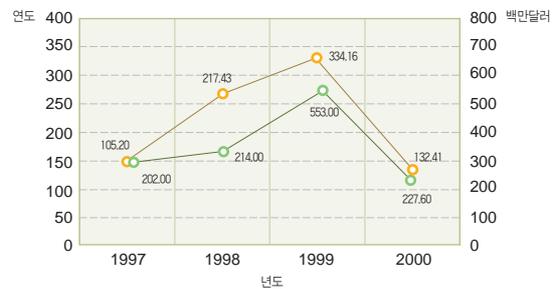


4. GMO 작물의 도입 형질 특성별 면적

지난 5년간 내내 제초제 내성의 도입형질이 재배면적에서 1위를 고수하고 있다. 제초제 내성의 형질은 콩, 옥수수, 면화 등을 통해 전체 면적의 74%인 3,270만 헥타에서 재배되고 있다. 2위를 차지하는 내충성 형질은 2000년 재배 면적이 다소 감소하였다.

도입형질	재배면적 (만 헥타)	비율 (%)
제초제 내성	3,271	74
내충성	830	19
제초제 내성 + 내충성	320	7
바이러스 내성	10	1

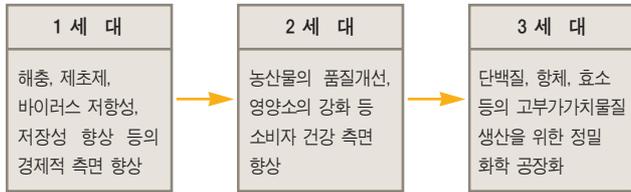
5. 추정수입 GMO 콩, 옥수수



국내 수입 농산물에 대한 GMO의 비율이나 양에 대한 정확한 파악이 힘든 상황이나, 2001년 산업자원부 국정감사 자료에 의하면 1999년 까지 늘어나던 GMO의 수입량 및 그를 위해 지불한 금액은 2000년 GMO에 대한 사회적 인식의 증가로 인해 급격히 감소하였음을 알 수 있다.

6. GMO 향후 개발 방향

현재 재배되고 있는 다수의 GMO 품종은, 생산량 및 저장성의 증대 등 농업경제학적인 측면에 비중을 두고 있으나, 금후의 GMO 품종은 농산물의 품질을 개선하거나 단백질, 항체, 효소 등의 고부가가치 기능성 물질의 생산을 위한 방향으로 전개될 것으로 예상된다.



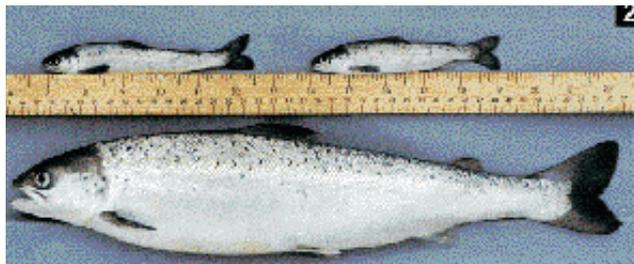
7. GMO 수산물

아직까지 GMO 수산물의 개발은 농산물의 경우에 비해 많이 이루어지지 않았으나, 대체 식량자원으로의 가능성이 높아 활발한 연구가 진행되고 있다.

이미 35종 이상의 GMO 수산물이 개발 되었거나 개발 중에 있으며, 그 중 한 종 이상은 FDA에 식품으로서의 허가를 신청해 놓은 상태이다. 이 같은 GMO 수산물의 개발 동향에 맞추어, 우리 정부는 2001년 8월 28일 수산물에 대한 유전자 조작 여부의 표시를 의무화하는 내용으로 '수산물 품질관리법 시행령(안)'을 심의·의결 했다.

수산물에 대한 유전자 변형의 목적은 성장의 촉진(growth enhancement)과 질병에 대한 내성을 강화(enhanced disease resistance) 하는데 초점이 맞춰져 있으며, 다음과 같은 수산물이 대상으로 연구되고 있다.

Abalone	Atlantic Salmon	Bluntnose bream
Channel catfish	Chinook Salmon	Coho Salmon
Common Carp	Gilthead bream	Goldfish
Killifish	Largemouth bass	Loach
Medaka	Mud carp	Mummichog
Northern pike	Penaeid shrimp	Rainbow trout
Sea bream	Striped bass	Tilapia
Walleye	Zebrafish	etc...



연어 성장호르몬 유전자와 antifreeze 프로모터를 이용한 유전자변형 대서양 연어(아래)와 두 마리의 대조군(위)의 비교 예.

II. 각국의 GMO 규제 및 표시제도 현황

1. E U

GMO에 대한 환경 및 인체 안전성평가를 수행하고 있으며, 살아있는 GMO의 유통은 'GMO 유통지침(90/220/EEC)', GMO 가공식품의 유통은 '신 개발식품 규정(258/97)'을 적용하여 비의도적 혼입허용치 1% 이상의 제품에 대한 표시제도를 시행하고 있다.

2001. 7. 25 EU 집행위원회는 표시제도 강화 규정을 발표하여, i)GMO 식품만 대상으로 하던 것에 GMO 사료를 포함시켰으며, ii)최종산물에 DNA 및 단백질이 검출되지 않는 경우의 표시 예외사항을 삭제 하였다.

1%의 혼입 허용치를 두고 있기는 하나, 사회 전반적인 GMO에 대한 부정적인 인식 등으로 미량의 GMO 혼입조차도 거부하는 성향이 뚜렷하며, 새로운 GMO 함유 식품의 등록이 사실상 중단된 상태이다.

2. 미국

USDA APHIS (농무부 동식물검역소)가 GMO의 환경 방출에 따른 안전성 검토를, EPA (환경보호청)이 농약성분을 가진 GMO의 안전성 검토 및 규제를, FDA (미국 식품의약품안전청) GMO의 식품 및 사료로서 안전성 검토를 수행하고 있다.

미국은 세계 최대의 GMO생산국가로서, GMO가 실질적으로 non-GMO와 동등성이 인정되는 것으로 간주하고 있다. 또한 실질적인 동등성이 인정되는 농산물과 제품에 대한 표시를 의무화할 과학적 근거가 없고 표시제도 자체가 GMO의 위해성을 인정하는 것이라는 입장으로, 강제적인 표시제도는 시행하지 않고있다.

다만 자발적인 표시가 가능하며, 식품이나 사료용의 GMO는 판매 이전에 신고를 의무화하고 있다.

3. 일본

농림수산성이 GMO의 환경 및 사료로서의 안전성 평가를, 후생노동성이 GMO의 식품으로서의 안전성 평가를 수행하여, 2001. 3. 30 현재 6작물 35개 GMO 품목에 대하여 인가하였다.

승인된 GMO 이외 품목에 대해 수입, 유통은 허용되지 않고 있으며, 승인된 GMO 품목의 신선식품 및 가공식품에 대해서는 2001. 04부터 표시제도를 실시하고 있다. 본 표시제도에서 비 의도적인 GMO 혼입 비율은 최대 5%까지 인정하고 있으며, non-GMO를 구분생산, 유통 관리한 증명서를 갖추고 있으면 "유전자 재조합이 아님"을 표시할 수 있다.

4. 오세아니아

ANZFA (호주-뉴질랜드 식품청)은 1999. 05. 13부터 유전자변형 식품 관련규정을 적용하여, 안전성 평가를 통과 및 승인 받지 못한 작물 및 이를 이용한 제품의 경우, 생산 및 판매를 금지하고 있다.

승인품목 중 기존식품과 본질적인 차이(맛, 영양, 사용법 등)가 있는 경우에 표시를 의무화하고 있으나, 2001. 09부터는 기존식품과 본질적인 차이가 없는 경우에도 표시하도록 의무화하였으며, 비 의도적 혼입 허용치는 1%로 정해놓았다.

5. 한 국

농림부에서 콩, 콩나물, 옥수수, 감자 등 농산물의 표시를, 식품의약품안전청에서 가공식품의 표시제도 및 GMO의 안전성 평가를 담당하고 있다.

표시제도는 농수산물관리법에 따라 콩, 콩나물, 옥수수에 대하여 2001. 03. 01부터 시행(감자의 경우 2002. 03. 01 시행)하여 비 의도적 혼입 허용치인 3% 이상의 GMO를 함유하는 경우 표시의 대상이 된다. 콩, 옥수수를 원료로 이용하는 27개 가공식품에 대해서는 2001. 07. 13부터 표시제를 시행하고 있다.

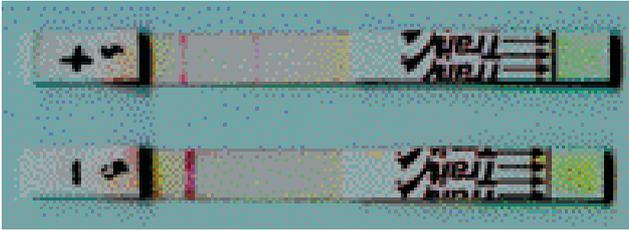
III. GMO 분석법

1. 정성 단백질 분석법

항원항체 반응을 이용한 1차 선별용으로 재배지 등 현장에서 간단하게 검사에 이용할 수 있는 strip형 kit로 판매되고 있다. 현재 제조제 저항성 콩 및 6품종의 Bt 옥수수에 대한 검사가 방법으로 분석할 수 있다.

고가의 장비가 필요 없고 사용이 간단하며 단시간에 분석할 수 있는 장점이 있으나, 가공제품(식품)에는 적용할 수 없고, 도입단백질의 발

현이 없는 GMO에 대해서는 검사가 불가능하다는 단점이 있다.



» Strip 형 immuno assay test kit의 사용 예 «
 Strip 상 밴드 발현의 양상에 따라 판정한다.
 -S : 음성 판정의 예 / +S : 양성 판정의 예

2. 정량 단백질 항원항체 분석법

효소항체 반응(Enzyme-linked Immunosorbent Assay; ELISA)을 응용한 정량법으로 96 well plate의 형태로 상품화되어 시판되고 있다. 현재 제초제 저항성 콩, YieldGard, StarLink 등의 확인이 가능하다. ELISA reader와 숙련된 기술자가 요구되며, 단백질이 파괴되는 가공식품에는 적용할 수 없다.

3. 정성 DNA 분석법 (Qualitative PCR)

Polymerase Chain Reaction(PCR)법을 이용하여 도입된 외래 유전자의 염기 서열을 인식하여 대량으로 증폭한 다음, 가시적으로 도입 유전자의 유무를 확인할 수 있다. 현재 대부분의 상품화된 GMO에 적용 가능하며, 가공식품 등에도 이용할 수 있어 단백질을 이용하는 분석법보다 넓은 범위의 시료를 대상으로 검사를 할 수 있다. 단백질을 이용한 정성분석법에 비해 고가장비 등의 구비가 필요하며 긴 시간을 요한다는 단점이 있다.

PCR에 사용되는 primer의 설계(증폭 부위)에 따라 검사가능 범위가 결정된다.

◆ Common regulatory sequence의 증폭

넓은 범위의 GMO를 대상으로 검사가 가능하여 screening test에 적합

◆ Coding region의 증폭

GMO 품종을 제작할 때 인위적으로 염기서열을 변형할 수 있는 부위로 서열이 보존된 부위를 검사하면 동일한 특성을 갖는 GMO를 검출할 수 있다

◆ 두 elements 이상의 중첩부위 증폭

Event-specific하게 검출할 수 있으나 여러 종류의 GMO에 대하여는 폭 넓게 검출할 수 없다.



Promoter : CaMV P35S, rice-actin promoter, PEP carboxylase...
 Insert sequence : m-HSP70-utr, I/VS6-utr, OTP, m-Adhl introns...
 Coding sequence : CryIa(b), Cry9C, mEPSPS, CP4EPSPS...
 Terminator : CaMV T35S, NOS3', Tr7 3', pPinII 3',...
 » 도입 유전자 모식도와 사용된 elements의 예 «

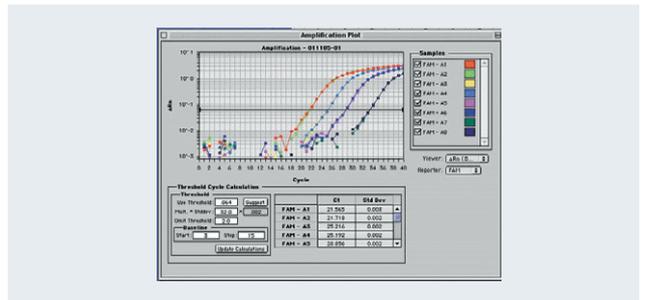
4. 정량 DNA 분석법 (Quantitative PCR)

유전자의 증폭과 함께 증폭산물의 양을 정량적으로 monitoring 해주는 real-time PCR법을 이용하며, 정성 PCR에 필요한 primer set 외에도 형광 탐침(probe)을 함께 사용한다.

Certified Reference Material(CRM)이나 표준 plasmid를 표준물질로 사

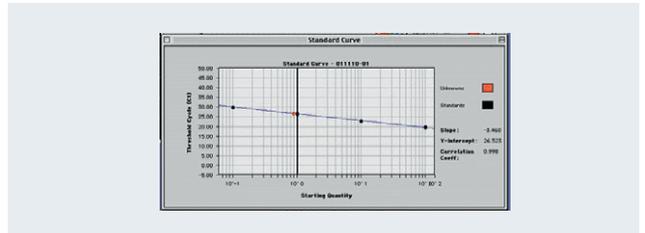
용하여, real-time PCR로 표준물질에 대하여 내재유전자와 외래유전자의 비율로 data를 얻을 수 있다.

이러한 data에 내부표준비 등을 적용하여 검체내에 존재하는 GMO 작물의 비율을 구할 수 있다.



실시간 증폭 곡선의 작성

표준시료(standard sample)와 미지시료(unknown sample)에 대한 증폭을 수행해 증폭곡선을 작성한다. 증폭곡선과 threshold line의 교차점 위치(Ct)는 target DNA 농도의 지수값에 반비례한다.



표준곡선작성

표준시료의 Ct 값을 이용하여 표준곡선을 구할 수 있으며, 표준곡선 상에서의 미지시료의 Ct 값 위치를 통해 미지시료에 포함되었던 target DNA의 양을 구할 수 있다.

$$\text{gene ratio} = \frac{\text{copy\# of introduced gene}}{\text{copy\# of endogenous gene}}$$

introduced gene (도입유전자)

GMO만이 갖는 유전자부위

soybean : CP4EPSPS

maize : CryIa, Cry9C...

universal : CaMV P35S, NOS3' ...

endogenous gene (내재유전자)

해당작물 자체가 갖는 유전자부위

soybean : actin, lectin...

maize : starch synthase, zein...

$$\text{GMO ratio (\%)} = \frac{\text{gene ratio} \times 100}{\text{normalizer}}$$

normalizer (내부표준비)

검사대상의 100% 순수한 GMO 품종에 대한 gene ratio로 정의되며, 각각의 GMO 품종에 대해, 검사에 사용하는 도입유전자와 내재유전자에 종류에 따라 값이 다르다.

IV. 표준 분석법

현재까지 세계적으로 통일된 공인 검사법은 확립되지 않았으며, 한국, EU, 일본 등 지역, 국가에 따라 독립적인 검사법을 정해 검사를 수행하고 있다.

1. E U

Swiss-German method를 공식 검사방법으로 채택하여, 고전적인 정성 PCR방법을 기반으로 수행한다. 검사는 단순한 '검출' 혹은 '불검출'의 결과만을 제공하며, 정량 검사에 대한 방법은 확립되어 있지 않은 상태이다.

Triple-Check System



기본적으로 3곳(promoter, terminator, endogenous gene)의 sequence 유무를 판단하는 방법이며, 실험적으로 가장 간단한 방법이다. Trait의 구분 위해서는 추가의 검사가 필요하다.

2. 한국과 일본

한국은 유전자 재조합 식품 검사법 지침(01. 7)과 유전자 변형 농산물 검정방법 매뉴얼(01. 9)을 통해서, 일본은 농립수산성 JAS 분석시험 핸드북(01. 4)과 후생노동성 검정방법 매뉴얼(01. 5)을 통해 PCR법에 의한 유전자 증폭법을 기본으로 정성 및 정량 분석방법을 표준화하였다.

(1)시료의 분쇄 및 전처리

- 원료 : 표면 오염 제거위한 세정 조작 수행
- 수분이 높은 식품 : 건조 전처리를 수행
- 당분 함량이 높은 가공식품 : 당분제거를 위한 세정조작 수행

(2)DNA 추출 및 정제

CTAB method

- Cetyl trimethyl ammonium bromide이용한다.
- 비용면에서 저렴하다는 장점과 까다로운 작업, 유해 화학물질을 사용한다는 단점이 있다.

Silica-gel membrane-type kit method

- Kit화 되어 많은 제품들이 판매되고 있다.
- 다양한 형태의 가공식품에 적용할 수 있다.
- CTAB method에 비해 높은 회수율과 순도를 보인다.

(3)DNA 농도 및 순도

- 농도 환산 : $1 \text{ O.D}_{260} = 50 \text{ ng/ul}$
- 실험에 적용 가능한 DNA 시료의 순도 범위 :
 - 단백질 함유 $1.7 < \text{O.D}_{260} / \text{O.D}_{280} < 2.0$
 - 탄수화물 함유 $0.8 < \text{O.D}_{260} / \text{O.D}_{230}$

(4)정성 PCR(Qualitative PCR)

»상용화된 GMO 검정용 kit를 사용할 수 있다.

여러 종류의 국내·외 기업이 GMO 분석용 kit를 판매하고 있으며, 이를 이용하여 정성검사를 수행할 수 있다. 단, PCR 산물이 200 bp 보다 큰 경우는 가공품 검사 시에 검출 감도가 떨어지는 문제가 있다. 현재 일본 식품종합연구소가 개발하고 Nippon Gene이 상품화하여 판매하고 있는 primer sets를 식의약청, 농업과학기술원, 농산물품질관리원 등 15개 기관이 검증하여 검사에 채택한 상태이다.

»자체제작 primer set의 이용

Endogenous gene을 동시에 증폭하는 multiplex PCR법으로 실시해야 하며, PCR 산물의 크기가 100~200 bp 되도록 조정하는 것이 좋다. 오염이나 추출한 시료 DNA를 검증할 수 있도록 대조군으로 positive control 및 negative control을 함께 PCR 하여야 한다.

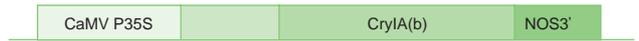
농촌진흥청, 일본 식품종합연구소 공동개발 primer sets

- : screening target
- ■ : specific detection target

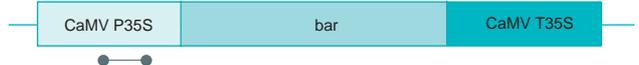
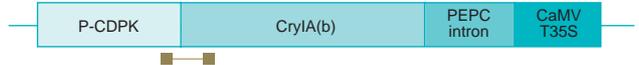
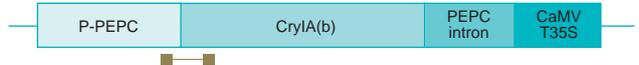
Roundup Ready Soybean



BT11 maize



Event176 maize



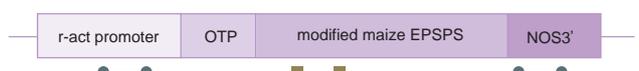
MON810 maize



T25 maize



GA21 maize



(5) 전기영동

Agarose gel 이용하여 증폭된 PCR산물을 가시화하는 방법으로 Ethidium bromide(EtBr)을 이용하여 염색하고 자외선을 조사하여 관찰한다.

(6) 정량 PCR(Quantitative PCR)

실시간(real-time) 정량 PCR기기(예: Smart Cycler)를 사용한다. 표준물질은 일본 식품종합연구소에서 개발하여 상업화한 표준 플라스미드(plasmid)를 사용한다.

표준 플라스미드에는 CaMV P35S와 같은 common regulatory sequence와 각 품종에 따라 특이하게 존재하는 event-specific sequence, 콩, 옥수수 등의 해당 작물이 고유하게 가지고 있는 endogenous reference sequence를 모두 포함하고 있다.

표준 플라스미드를 사용하여 정량을 시도하는 경우, 각 품종에 따른 내부표준비를 알고 있어야 정확한 정량값을 얻을 수 있다.

한국·일본의 공인검사법에 포함되지는 않지만 CRM을 사용하는 방법도 있다. 이는 주로 EU를 중심으로 추진중인 방법에 해당되며, 실

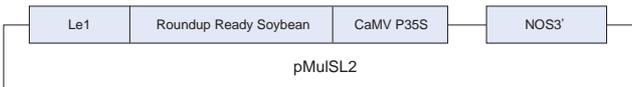
제 GMO에서 추출한 DNA용액을 reference material로 사용한다. 각 품종마다의 내부표준비를 고려하지 않아도 되는 장점이 있지만, 분석하고자 하는 각 품종의 순수한 실제 GMO(CRM)를 확보해야 하는 어려움이 있다.

일본 식품종합연구소 개발 standard plasmid

GM Maize용 standard plasmid



Roundup Ready Soybean용 standard plasmid



품종 및 PCR target에 따른 내부표준비

작물	품종	PCR target 부위		
		CaMV P35S	NOS3'	품종특이 부위
옥수수(maize)	BT11	0.91	0.96	0.50
	GA21	-	1.05	1.40
	T25	0.31	-	0.34
	Event176	0.79	-	2.05
	MON810	0.39	-	0.38
콩(soybean)	Roundup Ready	0.94	1.10	0.95

3. 국제표준화 작업

국제표준의 분석법의 개발 및 확립은 다음과 같은 문제점으로 인해 아직 이루어지지 않고 있다.

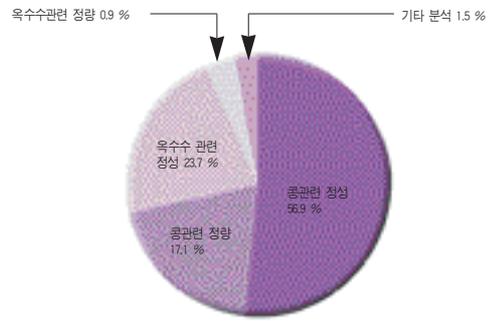
- 가공식품의 경우 DNA 추출, PCR 등에 영향을 미치는 저해물질이 존재하므로, 정성분석에서 위음성(false-negative)에 대한 반복확인 이 필요하다.
- 다른 품종의 오염 등의 문제로, 순수한 표준시료의 확보에 어려움이 있다.
- 정량분석시 실험실간에 편차가 크다. 일반적으로 실험실내 편차의 2배에 달하고 있다.
- 표준물질 선정, DNA추출, PCR과정 등의 차이에 의한 오차가 크다.

특히 원료농산물의 정량분석법에 비하여 가공식품의 경우, 정량 검사 방법의 개발이 미진하고, 개발된 검사방법도 국제적으로 표준화되지 못한 상태이다. 현재 CODEX 등에서 표준화 작업을 진행 중이다.

V. 국내 GMO 제품 및 검사 의뢰 유형

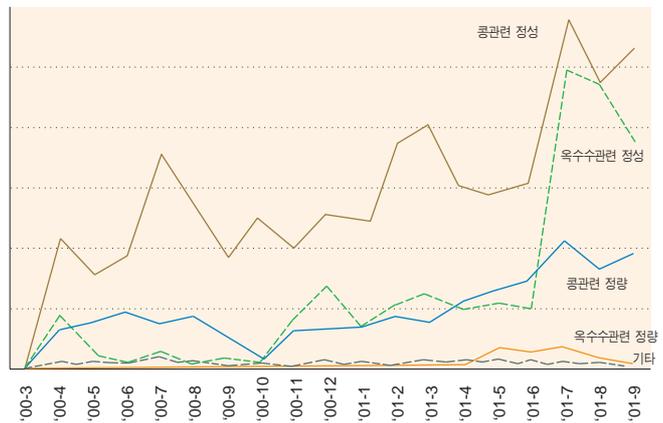
2000년 3월부터 2001년 8월까지 (주)한국유전자검사센터(KGAC)가 의뢰받은 검사 시료를 토대로 한 분석 결과이다.

1. 작물 및 검사종류별 의뢰비율 (전체기간)



상기 기간동안 의뢰 검체는 콩(혹은 그를 이용한 가공품)의 정성 분석이 과반수가 넘는 약 57%를 차지 하였고, 정성, 정량 모두를 합친 콩 관련 분석은 전체의 3/4에 가까운 74%를 차지하였다.

2. 작물 및 검사종류별 의뢰비율 (기간별)



● 참고문헌

- Global Review of Commercialized Transgenic Crops : 2000, Clive James, ISAAA, 20 Dec. 2000
- 유전자변형농산물의 검정기술 개발 배경, 농업과학기술원 이길복, 2001. 8. 7
- 유전자재조합식품의 표시제도와 검사방법, 식품의약품안전청 박선희, 논문기, 2001. 8. 7
- 遺傳子組換え食品検査, 東京農林水産消費技術センター, 2001. 4
- Food Derived from Genetically Modified Organisms and Detection Methods, Wolfram Hemmer, Swiss National Science, Feb. 1997
- Detection and Quantitation Methods for GMO Regulatory Sequence in Processed Foods, Matthew Lorence, Applied Biosystems, 28 Jun. 2001
- 각국의 표시제 관련 동향, 농산물품질관리원 GMO계시관, 2001. 8. 16
- 유전자변형농산물 검정방법 매뉴얼, 농산물품질관리원 시험연구소, 2001. 9. 1
- Transgenic fish for aquaculture, Choy L Hew & Garth Fletcher

국내 최초 GMO 분석서비스
한국유전자검사센터(주)

T.. 02-364-8405~6 F.. 02-364-8407
www.kgac.co.kr

Smart Cycler[®]

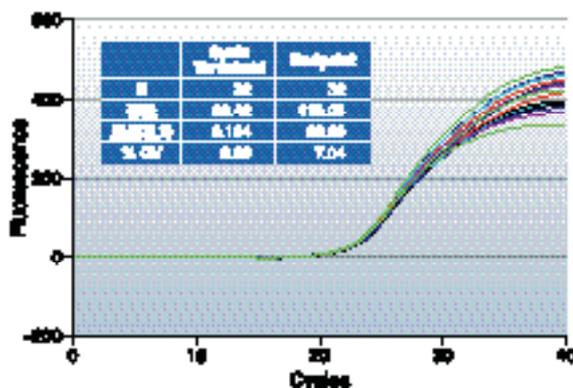
Real Time 모니터링이 가능한 정량 PCR 시스템

Smart Cycler[®]의 1-CORE™ (인공지능 기법/상위 장치 반응) 모듈로 다양한 PCR에 유연하게 대응

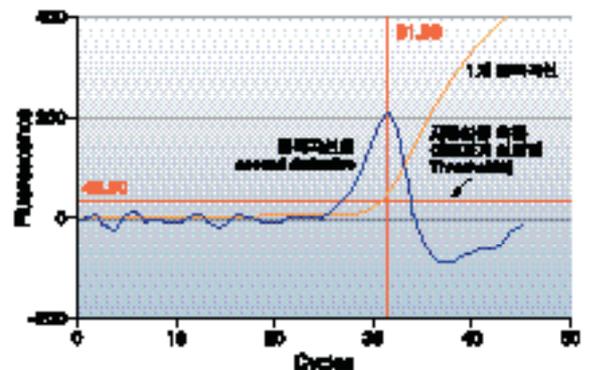


- 고속가열 및 냉각에 의한 증폭시간 단축
- 한대로 16개의 프로그램 동시 실행
- Real time 모니터링
- 4가지 형광 detection
- 반응 볼륨을 6대까지 증설 가능
- 표식시약 및 hybridization probe 등 기존 검출 시스템 대응
- Heating: 10°C/sec, Cooling: 2.5°C/sec
- 정확성: ±0.5%

각 모듈사이의 평행도 비교



■ 직현성과 균일성의 실험결과 ■



■ Threshold-based Detection ■