

실험 가이드북



PCR 을 이용한 GMO 식품 구별

#ED962

IDENTIFICATION OF GENETICALLY MODIFIED FOODS USING PCR

실험 목표

유전자 변형 생물(GMO, Genetically Modified Organism)을 식별하기 위해 학생들은 식품 또는 작물에서 DNA를 직접 추출하고 특정 Primer와 함께 PCR을 수행하여 GM indicator gene의 존재를 파악합니다.

제품 구성품

PCR EdvoBeads PLUS (PCR에 필요한 dNTP, Taq DNA Polymerase Buffer, Taq DNA Polymerase, MgCl₂)

튜브 A Universal DNA Buffer (DNA 버퍼)

튜브 B TE Buffer (TE 버퍼)

튜브 C LyphoPrimer Mix (프라이머)

튜브 D GMO Positive LyphoControl (GMO 양성 대조군)

튜브 E NaCl Solution (염화나트륨 용액)

튜브 F DNA Extraction Buffer (DNA 추출 버퍼)

튜브 G 100 base pair ladder

Proteinase K

시약 및 소모품

UltraSpec-Agarose, TBE Electrophoresis Buffer Powder, SYBR Safe Stain

0.2mL PCR tubes, Plastic Micropestles, Transfer Pipets, Snap-top Microcentrifuge Tubes

필요 장비 및 준비물

실험용 식품 (예)옥수수, 옥수수빵, 옥수수가루, 잣, 케이크 분말, 콩을 원료로한 식품)

(*오트밀, 포테이토칩, 콘칩, 시리얼 등은 추천하지 않습니다.)

PCR기기, 전기영동장치, 전원공급장치, 피펫과 피펫팁, 전자저울, 전자레인지(핫플레이트), 250mL삼각플라스크, 안전장갑, 증류수, 염색용 트레이, Transilluminator, 원심분리기, 향온 수조, 얼음, 얼음 바스켓, isopropanol, 70% ethanol

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

배경지식

GMO의 정의

오래 전에 농부들은 큰 낱알을 생산하는 한 식물과 맛있는 옥수수를 생산하는 다른 한 개의 식물을 알게 되었습니다. (Figure 1A) 두 식물을 교배하여 알이 크고 맛있는 옥수수를 재배할 수 있었습니다. (Figure 1B)

이와 같이 지난 50년 동안 세계 인구는 2배 이상 증가했지만 농경지는 10%만 증가하였습니다. 하지만 선택적인 육종과 새로운 농업 기술로 1인당 식량 생산량은 25% 증가했습니다. 이제 유전 공학을 통해 원하는 형질을 생산하기 위해 DNA서열을 직접 조작



Figure 1A: Traditional varieties of corn.



Figure 1B: Cultivated corn.

할 수 있습니다. 이러한 편집된 유전자는 재조합 DNA 기술을 사용해 몇 주 만에 작물유전자에 삽입하거나 삭제시키거나 돌연변이화 시킬 수 있습니다. 생체 내에서 적절하게 발현되기 위해서는 transgene이 전사를 위해 RNA Polymerase를 불러오는 promoter sequence와 종료신호를 보내는 terminator sequence를 가져야 합니다. (Figure 2)

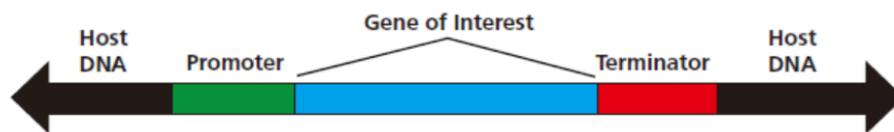


Figure 2: Features of a Transgene.

PCR을 통한 GMO 식별

식품이 유전자조작으로 만들어졌는지 확인하기 위해서 샘플에서 DNA를 추출하고 중합효소연쇄 반응(PCR)을 이용해 분석합니다. 이 기술은 DNA의 특정 영역에 대한 많은 복사본을 빠르게 만들기 때문에 생물학 연구에서 큰 영향을 끼쳤습니다. 이것은 특정 DNA 서열을 표적화하기 위한 짧은 합성 DNA 분자(Primer)를 사용합니다. 이러한 방식으로 PCR은 야생 식물과 GM유기체에서 흔히 볼 수 있는 DNA 서열을 증폭하여 유전적으로 조작된 식물을 구별할 수 있습니다.

첫 번째 프라이머는 Cauliflower Mosaic Virus(CaMV)의 프로모터를 표적으로 합니다. 유전공학자들

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

은 이 프로모터를 이용하는데, 이는 많은 식물 종의 전사 부위에 인식되기 때문입니다.

두 번째 프라이머는 B.thuringiensis(cry1F)에서 분리된 살충제 유전자를 표적으로 합니다. 이 유전자는 옥수수, 목화, 가끔 콩에서 발견됩니다. DNA 추출을 위한 양성대조군으로 식물 엽록체 유전자도 증폭됩니다. (GMO는 옥수수에 특정 곤충에 대하여 살충 효과를 가진 토양미생물인 바실러스 튜링겐시스의 독소유전자를 삽입하여 재배된다. 이 독소유전자가 만드는 'Cry 단백질'은 곤충이 먹으면 곤충의 알칼리성 소화액에서 분해되고 그 분해된 펩타이드가 곤충의 수용체와 결합하여 소화관에 구멍을 뚫어 곤충이 죽게된다. 출처:위키피디아)

※ GMO 옥수수와 콩에 도입된 유전자 사례

작물명	품종명	도입유전자	특성	제조사
옥수수	MON810	cry1Ab	해충저항성	몬산토
	Bt11	cry1Ab, pat	해충/제초제저항성	신젠타
	GA21	mepsps	제초제저항성	몬산토
	NK603	cp4 epsps	제초제저항성	몬산토
	DAS59122-7	cry34Ab1, cry35Ab1, pat	해충/제초제저항성	다우아그로/듀폰 파이어니어
	MIR604	mcry3A, pmi	해충저항성	신젠타
	MON88017	cp4 epsps, cry3Bb1	해충/제초제저항성	몬산토
	MON87460	cspB, nptII	가뭄저항성	몬산토
콩	A5547-127	pat	제초제저항성	바이엘크롭사이언스
	MON87701	cry1Ac, cp4 epsps	해충저항성	몬산토
	DP-305423-1	gm-hra, gm-fad2-1	고올레산생성	파이어니어
	DAS-68416-4	aad-12, pat	제초제저항성	다우아그로사이언스

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

실험 전 준비 (Pre-Lab Preparations)- 지도교사용

모듈 I 준비: 식품에서 DNA 추출

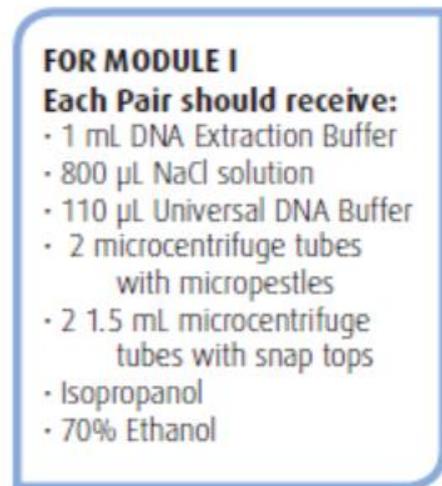
1. 실험 전날 DNA 추출 버퍼(DNA extraction buffer (튜브F))를 실온에 두어 해동합니다. 버퍼는 실험 전 하룻밤 동안 놔둘 수 있습니다.
2. DNA 추출 버퍼에 흰색 침전물이 생긴다면 항온 수조나 인큐베이터 등에서 37°C로 10분간 열을 가해 충분히 녹입니다.

주의: DNA 추출 버퍼는 실험을 시작하기 바로 전에 'Proteinase K'와 섞어야합니다. 준비한 것은 당일 날 사용하거나 바로 쓰지않는다면 냉동 보관해야 합니다.

3. DNA 추출 버퍼(튜브 F)에서 200 μ L를 Proteinase K 튜브에 넣고 몇 분동안 수화(hydrate)되도록 합니다. 용해된 Proteinase K를 남아있는 DNA 추출 버퍼에 다시 넣고 섞습니다. 각 그룹에는 1mL씩 분배합니다.
4. 각 그룹에 800 μ L NaCl 용액(튜브E)를 나눠줍니다.
5. 각 그룹에 범용 DNA 버퍼(Universal DNA buffer(튜브 A)) 110 μ L를 나눠줍니다.
6. isopropanol과 70% ethanol을 실험실에 놔두어 학생들이 공유할 수 있게 합니다.

추가 물품:

- DNA추출을 위한 식품들. 다음 아래의 표를 참조하여 준비합니다.
- 학생들은 원심분리기튜브와 미니막자(micropestle)을 받아야 합니다.



추천 식품	비추천 식품
신선한 옥수수 또는 얼린 옥수수 신선한 파파야 또는 얼린 파파야 옥수수빵 잣 옥수수가루 케이크 가루 콩, 콩기반 가공식품	오트밀 포테이토칩 콘칩 시리얼

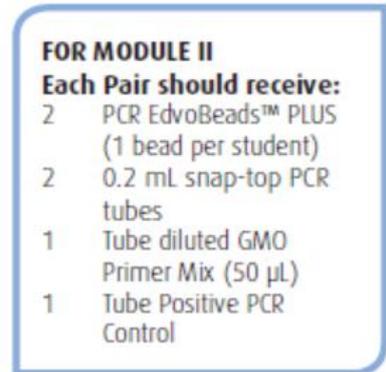
★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

모듈 II 준비: PCR 증폭

PCR 프라이머는 동결건조 혼합물로 제공되며 실험을 수행하기 전에 지도교사가 재수화(rehydrate)해야 합니다. PCR EdvoBeads plus 는 PCR 을 설정하기 전에 나눠 줄 수 있습니다. 비드를 PCR 튜브에 넣고 나눠준 후에는 비드가 수분을 흡수하기 않도록 튜브를 꼭 닫도록 합니다.

주의: PCR EdvoBeads 는 쉽게 깨질 수 있기에 PCR 튜브로 옮기는 동안 주의하도록 합니다.

이 키트는 LyphoControl 과 LyphoPrimer 가 포함되어 있습니다. 이 시약은 색상으로 구분되어 실험이 제대로 진행이 된다면 PCR 반응이 주황색으로 나타납니다. 이 시술은 성공적인 실험을 보장해줍니다.



GMO Primer Mix 준비:

1. TE buffer(튜브 B)를 사용 전 해동하고 잘 섞어줍니다.
2. 프라이머 준비 전 GMO LyphoPrimer Mix(튜브 C)의 바닥에 고체물질이 있는지 확인합니다. 묻쳐있지않다면 원심분리기에 20 초 동안 돌려 줍니다.
3. TE buffer 1mL 를 튜브 C 에 넣어 GMO LyphoPrimer 를 희석합니다. 뚜껑을 잘 닫아 얼음에 꽂아둡니다. 용액은 투명한 노란색이어야하며 잘 녹아 있어야 합니다.
4. 희석된 GMO Primer Mix 50µL 를 원심분리기 튜브에 넣고 "Primer Mix"로 표기합니다. 학생 두 명당 한 개씩 나눠줍니다.



Positive PCR Control 준비

1. GMO Positive LyphoControl Complete PCR Control(튜브 D)에 190µL TE buffer(튜브 B)를 넣습니다. 피펫팅을 하여 잘 섞습니다.
2. 희석된 Positive Control 25µL 를 0.2mL PCR 튜브에 넣습니다.

주의: LyphoControl 에는 이미 필요한 모든 PCR 시약들이 포함되어 있습니다. PCR EdvoBead plus 는 필요하지 않습니다. 희석되면 LyphoControl 은 학생들이 준비한 샘플과 함께 PCR 로 증폭하면 됩니다. 모든 학생들의 겔에 대해 하나의 LyphoControl 반응을 진행합니다. PCR 이 끝나고 control reaction 은 모듈 III 에서 필요할 때까지 -20°C에서 보관될 수 있습니다.

각 학생에게 PCR EdvoBead plus 1개와 0.2ml PCR 튜브를 나눠줍니다.

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

모듈 III 준비: 전기영동

TBE 전기영동 버퍼 준비:

이 실험을 위해 1X TBE Electrophoresis Buffer 를 많이 준비하는 것을 추천합니다. 남은 희석된 버퍼는 나중에 사용이 가능합니다.

1. 3.7L 증류수를 준비합니다.
2. TBE Electrophoresis Buffer 분말을 전부 넣고 잘 섞습니다.
3. '1X TBE 전기영동 버퍼' 라고 표기합니다.

아가로스 겔 준비:

2.0% 아가로스 겔을 4명 당 1개씩 사용하게 됩니다. 7x7 cm 겔 사용을 추천합니다.

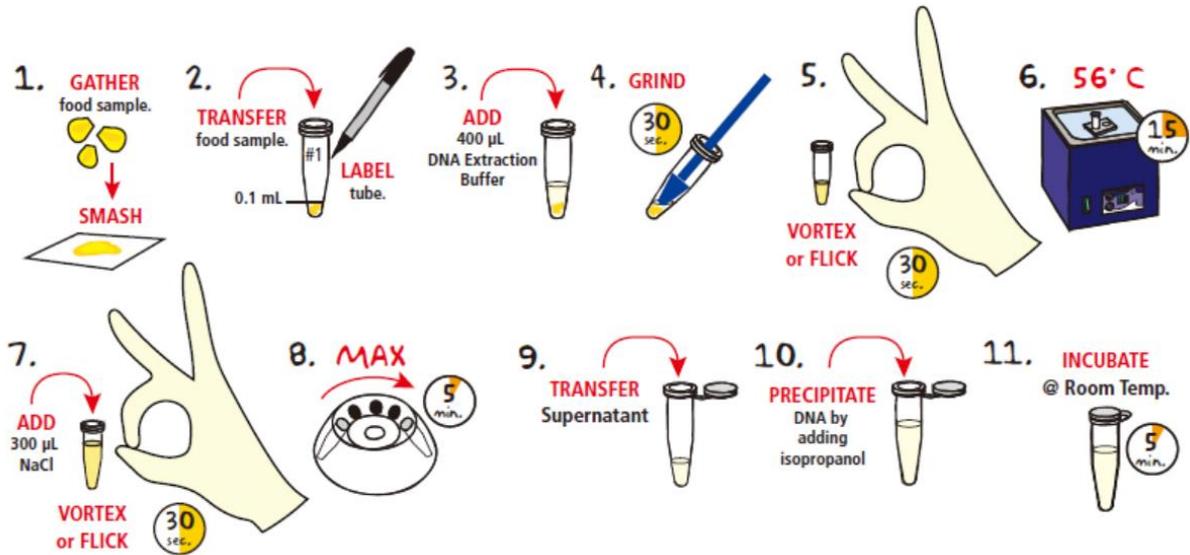
Table D		Batch Prep of 2.0% UltraSpec-Agarose™	
Amt of Agarose	+	1x TBE Electrophoresis Buffer	
5.0 g		250 mL	

희석된 SYBR Safe 준비

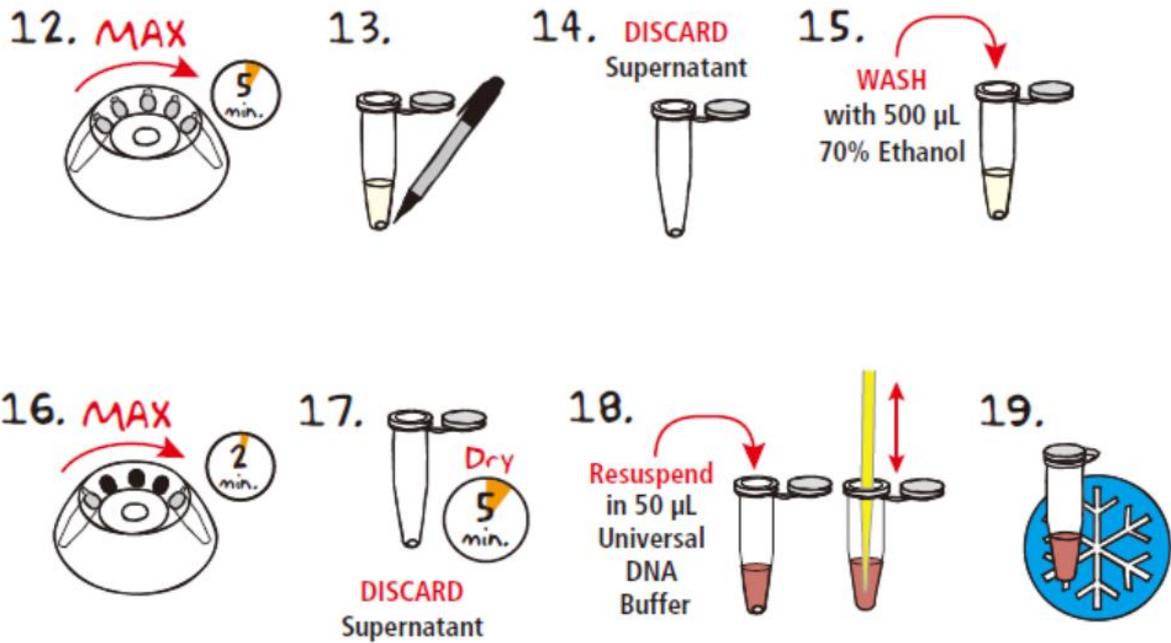
1X TBE 버퍼 250 μ L 을 SYBR Safe 튜브에 넣고 잘 섞어줍니다.

실험 시작 - 학생용

모듈 1 : 식품에서 DNA 추출



1. 깨끗한 종이 위에 준비한 식품을 으깁니다.
2. 원심분리기 튜브의 0.1mL 표시까지 샘플을 채우고 자신의 그룹 번호를 적습니다.
3. DNA Extraction Buffer 400µL 를 넣습니다.
4. 미니마쇄봉(micropestle)으로 조각들이 안남을 정도로 으깨줍니다. 약 30 초동안
5. 볼텍싱을 30 초 합니다.
6. 15 분간 56°C에서 배양합니다.
7. 300µL NaCl 용액을 튜브에 넣고 30 초동안 볼텍싱합니다.
8. 5 분간 원심분리기에 최대 속도로 돌립니다.
9. 상층액을 다른 원심분리기 튜브에 조심스럽게 옮깁니다. 펠릿이 남은 튜브는 폐기합니다.
10. 같은 양 만큼 isopropanol 을 넣어 DNA 를 침전시킵니다. 잘 섞습니다.
11. 5 분간 실온에서 배양합니다.



12. 원심분리기에 튜브를 넣고 최대속도로 5분간 돌립니다.
13. 매우 작은 DNA 펠릿이 보이면 펜으로 동그라미 치십시오.
14. 상층액을 조심스럽게 제거합니다.
15. 500µL의 70% 에탄올을 튜브에 천천히 넣어 펠릿을 세척합니다.
16. 샘플을 다시 원심분리기에 넣고 최대 속도로 2분간 돌립니다.
17. 상층액을 제거하고 5분간 뚜껑이 열린채 놔둬 건조시킵니다. 펠릿은 완전히 건조되어야 합니다.
18. 범용 DNA 완충액(Universal DNA buffer) 50µL를 넣고 피펫팅으로 잘 풀어줍니다.
19. 얼음에 튜브를 꼽아 둡니다.

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

모듈 II: PCR 증폭



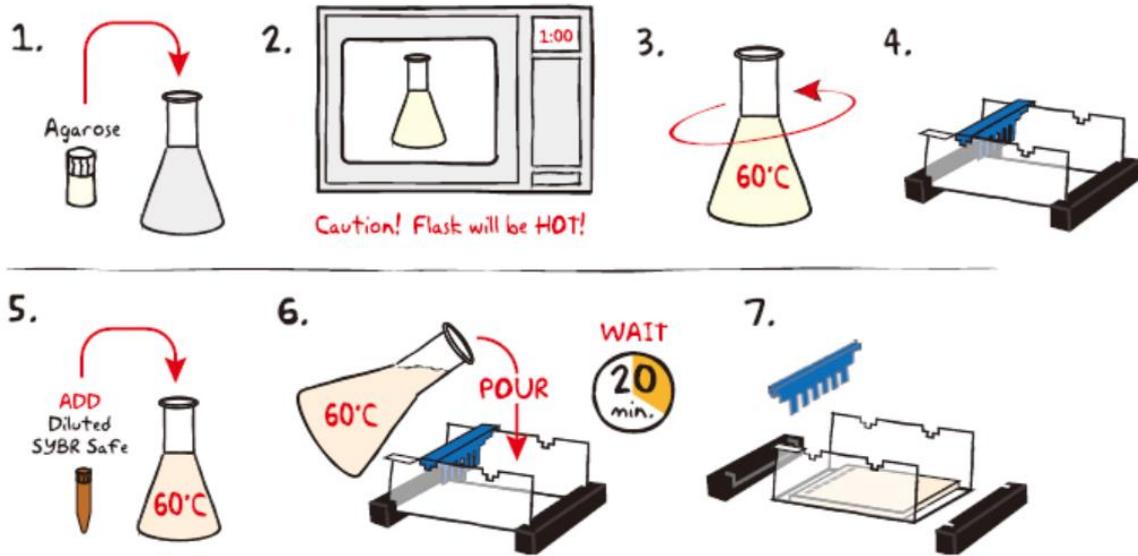
1. 모듈 I 에서 얻은 샘플을 준비합니다. (빨간색 일것입니다.)
2. 0.2mL PCR 튜브에 실험 그룹을 표기합니다.
3. 위의 모듈 I 의 추출된 샘플 5 μ L, GMO Primer Mix 20 μ L, PCR EdvoBead 1 개를 튜브에 넣습니다.
4. PCR 샘플을 잘 섞습니다. PCR EdvoBead plus 가 완전히 용해되었는지 확인합니다. 잘 녹았다면 마지막 나온 색은 밝은 오렌지색일 것입니다.
5. 몇 초간만 원심분리기에 돌려 샘플을 바닥에 모아줍니다.
6. PCR 을 사용해 DNA 를 증폭합니다.

다음의 PCR 사이클을 설정하도록 합니다.

- Initial denaturation 94° C for 5 minutes
 - 94° C for 60 seconds
 - 58° C for 60 seconds
 - 72° C for 60 seconds
 - Final Extension 72° C for 10 minutes
- } 35 cycles

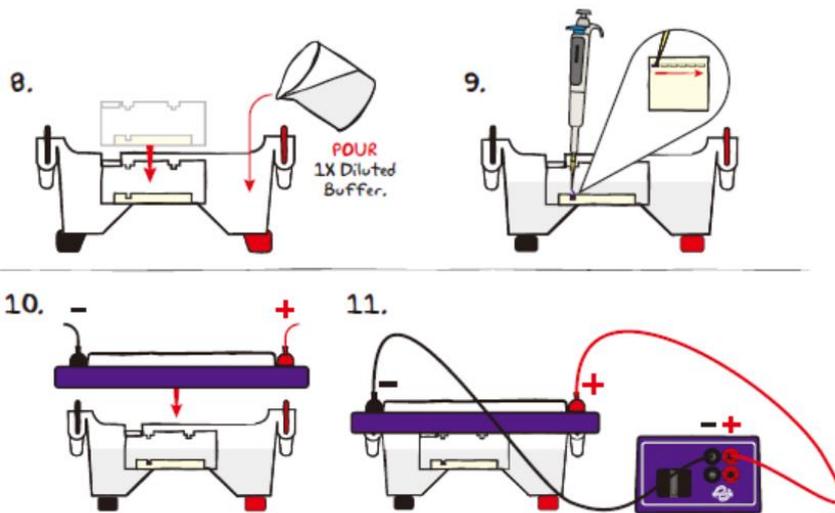
7. PCR 완료 후 튜브를 얼음에 꼽아 둡니다.

모듈 III: 전기영동



1. 아래 Table A표를 참조하여 아가로스 분말과 1X TBE 버퍼를 250mL 플라스크에 넣습니다.
2. 전자레인지에 넣고 1분간 돌려 가열시킵니다. 플라스크를 꺼내 돌려가면 잘 섞입니다. 알갱이가 안보일 때까지 15초 동안 계속 전자레인지에서 가열합니다.
3. 투명하게 다 녹았다면 60°C까지 충분히 식혀줍니다.
4. 아가로스가 식는동안 전기영동 겔 트레이와 고무마개를 결합합니다. Comb을 꼽습니다.
5. 희석된 SYBR Safe 염색약을 Table A표를 참조하여 넣어줍니다.
6. 조립한 겔 트레이에 부어줍니다.
7. 20분 동안 완전히 굳게 합니다. 다 굳은 후 고무마개와 comb을 조심스럽게 빼냅니다.

Table A Individual 2.0% UltraSpec-Agarose™ Gel with Diluted SYBR® Safe Stain				
Size of Gel Casting tray	1X TBE Buffer	+ Ant of Agarose	= TOTAL Volume	ADD Diluted SYBR (Step 5)
7 x 7 cm	25 mL	0.5 g	25 mL	25 µL
7 x 14 cm	50 mL	1.0 g	50 mL	50 µL



8. 겔 트레이를 전기영동 장치에 넣습니다. 1X TBE 버퍼를 부어 겔이 충분히 잠기게 합니다. (각 전기영동장치 모델별 권장양 Table B참조)
9. Table 1을 기준으로 각 well에 샘플을 25 μ L씩 피펫으로 분주합니다.
10. 전기영동장치의 +, - 전극 위치를 확인하고 덮개를 덮습니다.
11. 전원공급장치에 선을 연결하고 Table C를 참조해 전압과 시간을 설정하여 전기영동을 시작합니다.
12. 완료 후 겔트레이를 조심스럽게 빼냅니다.

Table 1: Sample Table

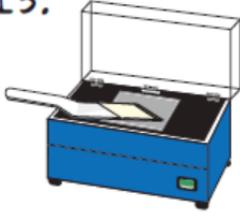
Lane	Recommended	Sample Name
1	100 base pair Ladder	
2	GMO Positive Control	
3	Food Sample 1	
4	Food Sample 2	
5	Food Sample 3	
6	Food Sample 4	

Table B 1x TBE Electrophoresis Buffer	
EDVOTEK Model #	Total Volume Required
M6+	300 mL
M12	400 mL
M36	1000 mL

Table C Time & Voltage Guidelines (2.0% Agarose Gels)	
Volts	Time: 7 x 7 cm gel ~4.0 cm migration
75	75 min.
125	40 min.
150	30 min.

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

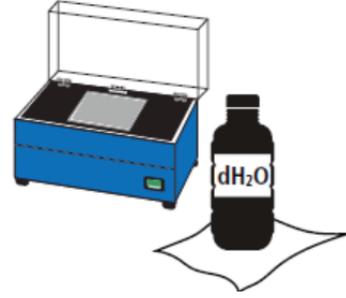
13.



14.



15.



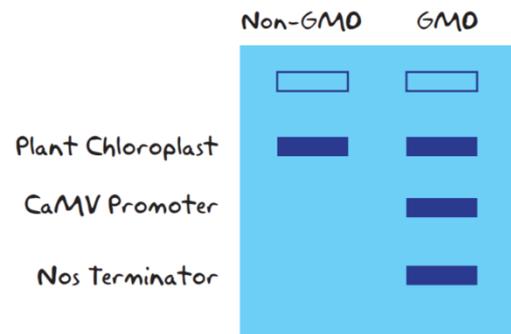
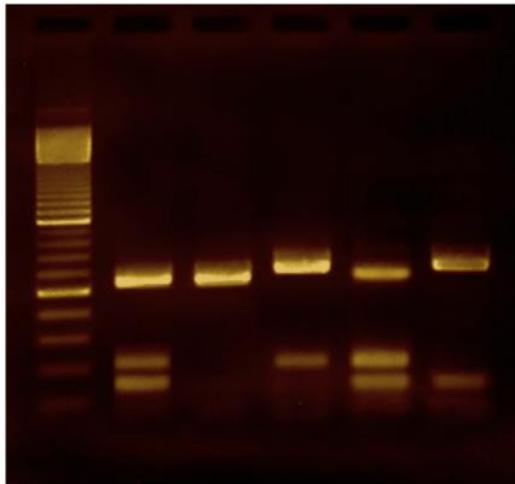
13. 겔이 찢어지거나 파손되지 않게 조심스럽게 트랜스일루미네이터로 옮깁니다.

14. 밴드를 확인합니다.

15. 결과 기록 후 깨끗하게 정리합니다.

실험 결과 및 분석

이 실험은 학생들이 준비한 샘플에 따라 밴드의 결과가 다르게 나옵니다. 식품에서 DNA 정제가 성공적이었다면 PCR 증폭 및 겔 전기영동 결과가 잘 나올 것입니다. 만약 그렇지 않다면 식품에서 DNA추출과정에서 문제가 생겼을 수 있습니다.



Lane	Sample	Analysis
1	100 base pair Ladder	100 bp ladder
2	GMO Positive Control	500 bp plant chloroplast, 200 bp CMV 35s, and 125 bp Cry1F
3	GMO Negative Foodstuff	500 bp plant chloroplast
4	Soy Beans Extraction	500 bp plant chloroplast and 200 bp CMV 35s
5	Corn Bread Extraction	500 bp plant chloroplast, 200 bp CMV 35s, and 125 bp Cry1F
6	Papaya Extraction	500 bp plant chloroplast and 125 bp Cry1F

밴드1: 표준 마커

밴드2: GMO 양성 대조군, CMV 35s와 Cry1F 3개의 밴드

밴드3: GMO 음성 대조군, 제한효소로 잘려지지 않은 비GMO 식품의 엽록소

밴드4: CMV 35s GMO 식품

밴드5: CMV 35s, Cry1F GMO식품

밴드6: Cry1F GMO식품

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.