

석창포 진위판별 시험법

1. 적용범위

본 시험법은 석창포(*Acorus gramineus* Soland.)*를 사용 불가 원료인 수창포(창포, *Acorus calamus* L)**와 구분하기 위한 방법으로 PCR (Polymerase Chain Reaction) 장비를 사용하여 증폭산물의 생성여부로 석창포 및 수창포를 확인하는 정성 분석법이다. 단, 상기 학명이 아닌 원료이거나 유전자가 손상될 가능성이 있는 가공제품에는 적용할 수 없다.

* 「식품의 기준 및 규격」 '별표 2. "식품에 제한적으로 사용할 수 있는 원료"의 목록 (식품의 기준 및 규격 제 2020-55호, 20.06.26 개정)에 따라 기재함

** 「식품의 기준 및 규격」에 등재되지 않은 원료로 식품에 사용할 수 없음. '석창포(石菖蒲)의 감별자료집'에 따라 기재함

2. 검체의 전처리

검체는 분쇄기 또는 막자사발을 이용하여 충분히 분쇄한다. 분말 형태의 검체는 충분히 혼합하여 균질화 한다.

3. 검체의 칭량 및 오염 방지

「식품의 기준 및 규격」의 "제 8. 일반시험법, 10. 식품표시 관련 시험법, 10.1 유전자변형식품의 시험법, 10.1.2 검체의 칭량 및 오염방지" 방법을 따른다.

4. DNA 추출

DNA 추출 시 하나의 분석 검체로부터 적정량을 2회 칭량하여 동시에 DNA를 추출하고 추출된 각각의 DNA는 증류수 등으로 적절히 희석하거나 농축하여 PCR에 사용한다. DNA 추출은 DNeasy plant mini 키트 또는 이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 제품을 사용하고 해당 제조사의 사용방법을 참고하여 DNA를 추출한다.

[예시] DNeasy plant mini 키트 사용방법

4.1 균질화한 시료(약 0.1 g)에 AP1 버퍼 400 μ l 및 RNase A (100 mg/mL) 4 μ l를 넣어 혼합 후 65°C에서 10분간 반응시킨다(반응 중 샘플을 2~3회 혼합 함).

4.2 반응액에 P3 버퍼 130 μ l를 넣고 혼합하여 얼음에 5분간 방치 후 원심분리(20,000 x g, 5분)한다.

4.3 상층액을 QIAshredder Mini spin 컬럼에 옮긴 후 원심분리(20,000 x g, 2분)한다.

4.4 AW1 버퍼를 용출액 1.5배에 해당되게 혼합한 후 DNeasy Mini spin 컬럼에 넣고 원심분리(\geq 6,000 x g, 1분)한다.

4.5 AW2 버퍼 500 μl 로 DNeasy Mini spin 컬럼을 2회 세척한다.

4.6 AE 버퍼 50 μl 를 컬럼에 넣고 5분간 방치 후 원심 분리하여($\geq 6,000 \times g$, 1분) 최종 용출한다.

5. DNA의 농도 및 순도 확인과 농축

「식품의 기준 및 규격」의 “제 8. 일반시험법, 10. 식품표시 관련 시험법, 10.1 유전자 변형식품의 시험법, 10.1.4 DNA의 농도 및 순도 확인과 농축” 방법을 따른다.

6. PCR 반응

6.1 분석원리

앞서 추출한 DNA를 주형으로 증폭시약(*Taq* DNA Polymerase)과 검사하고자 하는 종의 특이 프라이머로 일반 (Conventional) PCR 장비를 이용하여 증폭한 후 전기영동을 통해 증폭산물을 확인한다.

6.2 실험 시 주의사항

PCR 실험 시 결과 판정에 영향을 줄 수 있는 외래 DNA 혼입이나, DNA 분해효소 등 다른 이물의 오염을 주의하도록 한다.

「식품의 기준 및 규격」의 “제 8. 일반시험법, 10. 식품표시 관련 시험법, 10.1 유전자 변형식품의 시험법, 10.1.5 정성 시험, 나. 실험 시 주의사항” 방법을 따른다.

6.3 시약 및 시액

6.3.1 프라이머의 준비

석창포 및 수창포 원료판별 시험법과 관련하여 PCR 반응에 사용되는 프라이머는 표 1과 같다.

표 1. 석창포 및 수창포 원료판별 PCR 반응에 사용되는 프라이머

구분	염기서열 (5'-3')	예상 크기(bp)	
		석창포	수창포
석창포 특이 프라이머	TCT TGC AAC GCT TCC GAC	240	-
	TCC TAG AAA TGT GAA AAA ATA CGT		
수창포 특이 프라이머	CAA AAT TCC AAT TAT GGT ATG TAT	-	409
	TCC TAG AAA TGT GAA AAA ATA CGT		

* 프라이머는 *atpF-atpH* 부위를 사용하였음

6.3.2 PCR용 반응액의 조제

표 1의 프라이머를 사용하면서 반응의 총량을 20 μl 로 할 경우 조성은 표 2와 같다. 다만, 반응액 조성은 사용하는 시약 및 PCR 기기에 따라 다를 수 있으므로 사용시약의 매뉴얼을 참고하여 최적화 할 수 있다. 음성대조군 (NTC, Non Template Control)은 주형 DNA 대신 증류수를 사용하고, 양성대조군은 표준 플라스미드 DNA를 사용하여 시료와 함께 PCR 반응 시킨다. 또한, 오차 발생을 줄이기 위해 하나의 검체에 대하여 1회 추출한 DNA는 동일한 반응액 및 튜브를 사용하여 3반복 시험하여 확인한다.

표 2. 석창포 및 수창포 원료 판별 PCR 검사용 반응액 조성

성분	최종 농도(튜브)	1회 분량(μl)
<i>Taq</i> DNA polymerase*	1.0 U	0.2
PCR 완충액	1 X	2.0
MgCl ₂	2.0 mM	1.6
dNTPs	0.2 mM	1.6
프라이머(정방향/역방향)	1 μM (각각 0.5 μM)	2.0
주형 DNA (5.0 ng/ μl)	5.0 ng	1.0
증류수	반응 총액이 20.0 μl 가 되도록 첨가	
전체량		20.0

*본 시험법은 TaKaRa Taq™(Takara, Japan)사용을 권장하며, 이와 동등한 제품을 사용할 수 있다.

6.4 PCR 증폭

모든 반응액을 분주한 후 PCR을 실시하는데, 기기에 튜브를 장착하고 반응 조건(표 3, 4)을 입력한 후 반응을 개시한다. 이상에서 얻어진 PCR 산물은 바로 전기 영동하여 증폭산물을 확인하거나 냉동 보관한다.

표 3. 석창포 및 수창포 원료판별 PCR 반응 조건

구분	온도	시간	반복수
초기변성(Initial denaturation)	94°C	5분	1
변성(Denaturation)	94°C	30초	30
결합(Annealing)	석창포 : 59°C, 수창포 : 60°C	30초	
신장(Extension)	72°C	30초	
최종신장(Elongation)	72°C	5분	1
보존	4°C	-	-

6.5 유전자 증폭결과 확인

PCR 증폭 결과는 캐필러리(capillary), 아가로스 겔(agarose gel) 또는 폴리아크릴아마이드 겔(polycrylamide gel)을 이용한 전기영동 등으로 확인할 수 있다.

「식품의 기준 및 규격」의 “제 8. 일반시험법, 10. 식품표시 관련 시험법, 10.1 유전자 변형식품의 시험법, 10.1.5 정성 시험, 마. 전기영동에 따른 결과판정” 방법을 따른다.

7. 분석결과 판정

전기영동장치를 이용하여 예상 크기의 증폭산물을 확인한다.

- ① **석창포 특이 프라이머를 사용한 경우**, 석창포에서 240 bp의 증폭산물이 확인되어야 하고, 수창포에서는 증폭산물이 확인되지 않아야 한다.
- ② **수창포 특이 프라이머를 사용한 경우**, 수창포에서 409 bp의 증폭산물이 확인되어야 하고, 석창포에서는 증폭산물이 확인되지 않아야 한다.

시료당 2회 이상 DNA를 추출하고 각 추출물 당 3반복 시험한 결과로 판정을 하며, 모든 결과에서 음성대조군은 증폭산물이 확인되지 않아야 하고, 양성대조군에서는 석창포와 수창포 특이 프라이머에서 각각, 240, 409 bp의 증폭산물이 확인되어야 한다. 만약, 음성대조군에서 증폭산물이 확인되거나 양성대조군에서 증폭산물이 확인되지 않을 경우 재실험을 진행하도록 한다.

검체에서 생성된 증폭산물의 크기를 양성대조군에서 확인된 증폭산물의 크기와 비교하여 결과를 판정한다(결과 예시 참고).

[결과 예시]

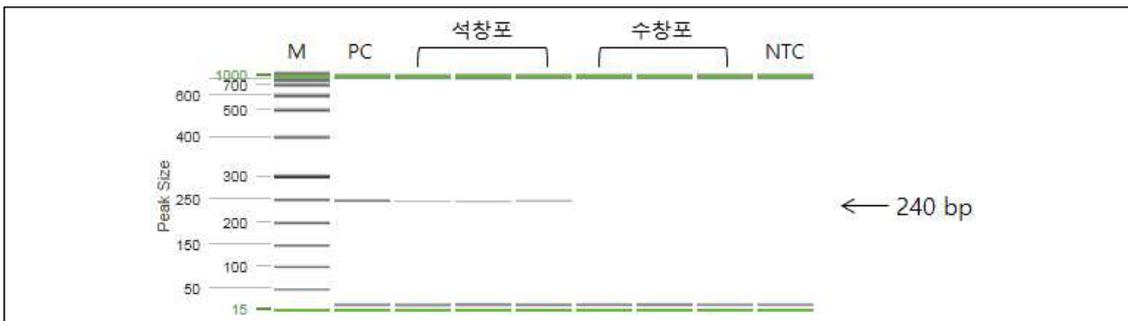


그림 1. 석창포 특이 프라이머 증폭 결과 예시
M; Size Marker (800 bp), PC; 양성대조군 Positive Control, NTC; 음성대조군 Non Template Control

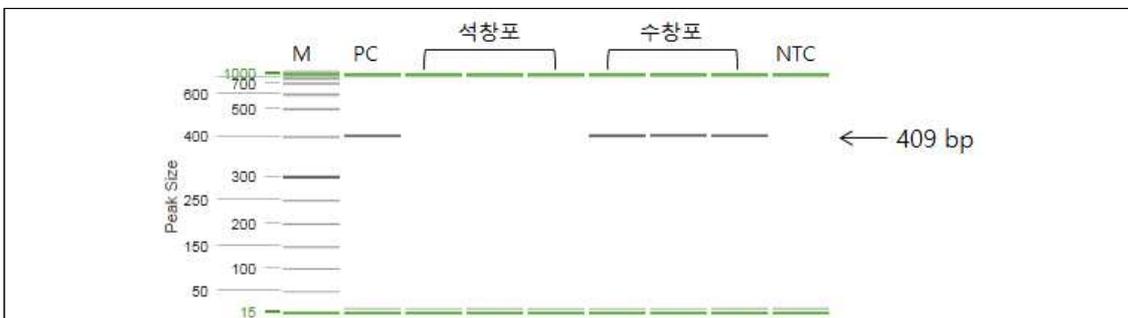


그림 2. 수창포 특이 프라이머 증폭 결과 예시
M; Size Marker (800 bp), PC; 양성대조군 Positive Control, NTC; 음성대조군 Non Template Control