미승인 유전자변형식품(8품종) 시험법

- 감자, 밀, 사탕수수, 쌀, 아마, 파인애플, 호박, 사과 -

식품의약품안전처
식품의약품안전평가원

목 차

1) 유전자변형 감자 AM04-1020 시험법 ·····1
2) 유전자변형 감자 EH92-527-1 시험법 ·····4
3) 유전자변형 감자 PH05-026-0048 시험법 ·····7
4) 유전자변형 Innate 감자 확인 시험법 ·····10
5) 유전자변형 감자 SPS-E12 시험법 ·····13
6) 유전자변형 감자 SPS-Y9 시험법 ·····17
7) 유전자변형 감자 SPS-X17 시험법 ·····21
8) 유전자변형 감자 SPS-F10 시험법 ·····25
9) 유전자변형 감자 SPS-J3 시험법 ·····28
10) 유전자변형 밀 MON71800 시험법 ·····31
11) 유전자변형 사탕수수 CTC-175A 시험법 ·····35
12) 유전자변형 쌀 Bt63 시험법 ·····38
13) 유전자변형 쌀 LLRice62 시험법 ·····42
14) 유전자변형 쌀 LLRice601 시험법 ·····46
15) 유전자변형 아마 FP967 시험법 ·····49
16) 유전자변형 파인애플 EF2-114 시험법 ·····52
17) 유전자변형 호박 CZW3, ZW20 시험법 ·····55
18) 유전자변형 Arctic 사과 확인 시험법 ·····58
19) 유전자변형 사과 GD743 시험법 ·····61

1) 유전자변형 감자 AM04-1020 시험법

감자 또는 그 가공식품에 대하여 국내에서 안전성을 승인받지 않아 식품위생법 제4조에 의해 수입 및 유통 등이 금지된 유전자변형 감자 AM04-1020을 검출하기 위한 시험법이다.

○ 검체의 전처리

식품공전 『10.1. 유전자변형식품의 시험법』 중 『10.1.1 검체의 전처리』에 따라 처리한 후 사용하되, 원곡의 경우 다른 작물의 오염을 방지하기 위하여 10회 이상 충분히 수세, 건조하여 균질하게 분쇄한다.

가공식품의 경우에는 대상 작물을 선별하여 사용하며, 이의 구별하기 어렵거나 혼합된 형태의 검체는 전체를 균질하게 분쇄, 혼합하여 사용할 수 있다.

○ DNA 추출 및 정제

DNA 추출·정제법으로는 계면활성제인 세틸트리메틸암모늄브로마이드(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB)와 페놀-클로로포름 혼합액을 사용하여 DNA를 추출·정제하는 CTAB법과 실리카겔 막 형태, 실리카를 베이스로 한 레진 형태 및 자기흡착 비드 형태 등과 같은 DNA 추출 키트를 이용하는 방법이 있다.

CTAB법은 적용범위가 넓고 PCR의 저해물질이 남을 가능성이 적어 순도 높은 DNA를 얻을 수 있는 방법이며, 시판하고 있는 DNA 추출 키트는 적용 범위가 한정되는 경우가 있어 가공식품의 유형에 따라 적용 가능 여부를 별도로 확인할 필요가 있다.

DNA를 추출·정제 시 하나의 분석 검체로부터 적정량을 2회 칭량하여 동시에 추출하고, 추출한 DNA는 적절히 희석하거나 농축하여 시험에 사용한다.

○ 시약 및 시액

유전자변형 감자 AM04-1020의 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브는 표 1과 같으며, 이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 프라이머, 프로브 및 시약을 사용할 수도 있다.

○ 반응액의 조제

표 1의 프라이머 및 프로브를 사용하면서 PCR 반응액의 총량을 25 μL로 할 경우 PCR 반응액 조성은 표 2와 같다. 다만, PCR 반응액 조성은 프라이머, 프로브와 시약 및 PCR 기기 등에 따라 다를 수 있으므로 시약이나 기기의 사용 매뉴얼을 참고하여 적용한다.

표 1. 유전자변형 감자 AM04-1020의 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브 정보

구분	품목 (증폭산물크기, 반응 온도)	프라이머 프로브	염기서열 (5' → 3')	농도 (nM)
내재	UGPase (88 bp, 60℃)	UGP-af7 UGP-ar8 UGP-sf1 probe	GGA CAT GTG AAG AGA CGG AGC CCT ACC TCT ACC CCT CCG C FAM-CTA CCA CCA TTA CCT CGC ACC TCC TCA-TAMRA	500 500 200
구조	AM04-1020 (110 bp, 60℃)	AM04-5'-f3 AM04-5'-r4 AM04-5'-probe	CCA TCA AGC GTC TAT CAA ATT TTT CAT CTG ATT GTC GTT TCC CGC CTT C FAM-CAG TGT TTG CGA ACG AAC ATT TTA GGA-TAMRA	500 500 200

표 2. 실시간 PCR 반응액 조성

성분	Stock 용액 농도	최종농도 (well)	1회 분량 (μL)
Universal Master Mix	2×	1×	12.5
프라이머	각 25 μM	표 1 참조	
프로브	10 μM		
주형 DNA	20 ng/μL	100 ng	5.0
멸균증류수	반응 총액이 25 μL가 되도록 첨가		
전체량			25.0

표 3. 실시간 PCR 반응조건

단계	온도(℃)	시간	cycle 수
전반응(Pre-PCR incubation)	50	2분	1 cycle
초기변성(Initial denaturation)	95	10분	1 cycle
증폭(Amplification)	95	15초	45 cycles
	표 1 참조	1분	

○ **시험조작**

각 추출 DNA에 대한 PCR은 내재유전자와 도입된 구조유전자에 대한 프라이머 및 프로브로 실시하며, 추출 DNA에 대하여 3회 이상 반복하여 시험한다. PCR 반응 시에는 음성대조구로 주형 DNA 대신 멸균증류수를 사용한 것(NTC, no template control)을, 양성대조구로 비유전자변형(non-GMO) DNA를 함유한 것(동일 작물로서 GMO 0%(w/w) 표준시료에서 추출한 DNA 등)과 검출하고자 하는 유전자변형 DNA를 함유한 것(동일 작물로서 분석 대상 GMO를 포함하는 표준시료에서 추출한 DNA 또는 표준플라스미드 등)을 시료와 함께 시험한다. PCR 반응조건은 대상별 반응조건을 참고하여 사용하는 기기 등에 따라 최적 조건으로 변형하여 사용할 수 있으며, 기기 제조사에 별도 문의하여 적용한다.

○ **분석결과의 해석 및 판정**

PCR이 완료된 후 데이터의 자동 분석 과정을 통해서 threshold line[1]과 Ct값[2]을 구하며, 하나의 추출 DNA에 대하여 3회 반복 시험한 결과, 적어도 2회 이상의 결과 값이 43 미만의 Ct값을 가지고 형광강도가 지수함수적인 증폭이 확인되는 경우를 데이터로서 이용한다.

2회 반복 추출 DNA에 대한 PCR 결과, 확인시험에 의해 내재유전자와 도입된 구조유전자 특이 증폭산물이 모두 확인된 경우 '검출'로 판정하고, 2회 반복 추출 DNA에 대하여 내재유전자의 증폭산물은 모두 확인되나 구조유전자 특이 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 '불검출'로 판정한다.

2회 반복 추출 DNA에서 모두 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 DNA 추출 과정부터 다시 반복 시험하고, 반복시험 후에도 동일하게 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않는 경우 '검사불능'으로 판정한다(표 4).

표 4. 결과 판정의 흐름도(예시)

사례	추출 DNA	결과 분석		GMO 여부 판정
		내재유전자	구조유전자	
사례 1	추출 1	+	+	검출(부적합)
	추출 2	+	+	
사례 2	추출 1	+	-	불검출(적합)
	추출 2	+	-	
사례 3*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	+	-	
사례 4*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	-	/	
사례 5*	추출 1	+	-	재시험
	추출 2	-	/	
사례 6*	추출 1	-	/	검사 불능
	추출 2	-	/	

+ : 목적 유전자의 증폭이 확인됨, - : 목적 유전자의 증폭이 확인되지 않음, / : 시험이 불필요함
* 사례 3~6의 경우 DNA를 추가 추출하여 PCR 시험함

1) threshold line: 분석하고자 하는 유전자의 증폭곡선이 지수함수적으로 증가하는 부분
2) Ct: threshold line과 시료의 증폭곡선과의 교차점에서 구해진 PCR cycle

2) 유전자변형 감자 EH92-527-1 시험법

감자 또는 그 가공식품에 대하여 국내에서 안전성을 승인받지 않아 식품위생법 제4조에 의해 수입 및 유통 등이 금지된 유전자변형 감자 EH92-527-1을 검출하기 위한 시험법이다..

○ 검체의 전처리

식품공전 『10.1. 유전자변형식품의 시험법』 중 『10.1.1 검체의 전처리』에 따라 처리한 후 사용하되, 원곡의 경우 다른 작물의 오염을 방지하기 위하여 10회 이상 충분히 수세, 건조하여 균질하게 분쇄한다.

가공식품의 경우에는 대상 작물을 선별하여 사용하며, 이의 구별하기 어렵거나 혼합된 형태의 검체는 전체를 균질하게 분쇄, 혼합하여 사용할 수 있다.

○ DNA 추출 및 정제

DNA 추출·정제법으로는 계면활성제인 세틸트리메틸암모늄브로마이드(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB)와 페놀-클로로포름 혼합액을 사용하여 DNA를 추출·정제하는 CTAB법과 실리카겔 막 형태, 실리카를 베이스로 한 레진 형태 및 자기흡착 비드 형태 등과 같은 DNA 추출 키트를 이용하는 방법이 있다.

CTAB법은 적용범위가 넓고 PCR의 저해물질이 남을 가능성이 적어 순도 높은 DNA를 얻을 수 있는 방법이며, 시판하고 있는 DNA 추출 키트는 적용 범위가 한정되는 경우가 있어 가공식품의 유형에 따라 적용 가능 여부를 별도로 확인할 필요가 있다.

DNA를 추출·정제 시 하나의 분석 검체로부터 적정량을 2회 칭량하여 동시에 추출하고, 추출한 DNA는 적절히 희석하거나 농축하여 시험에 사용한다.

○ 시약 및 시액

유전자변형 감자 EH92-527-1의 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브는 표 1과 같으며, 이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 프라이머, 프로브 및 시약을 사용할 수도 있다.

○ 반응액의 조제

표 1의 프라이머 및 프로브를 사용하면서 PCR 반응액의 총량을 25 μL로 할 경우 PCR 반응액 조성은 표 2와 같다. 다만, PCR 반응액 조성은 프라이머, 프로브와 시약 및 PCR 기기 등에 따라 다를 수 있으므로 시약이나 기기의 사용 매뉴얼을 참고하여 적용한다.

표 1. 유전자변형 감자 EH92-527-1의 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브 정보

구분	품목 (증폭산물크기, 반응 온도)	프라이머 프로브	염기서열 (5' → 3')	농도 (nM)
내재	UGPase (88 bp, 60℃)	UGP-af7 UGP-ar8 UGP-sf1 probe	GGA CAT GTG AAG AGA CGG AGC CCT ACC TCT ACC CCT CCG C FAM-CTA CCA CCA TTA CCT CGC ACC TCC TCA-TAMRA	500 500 200
구조	EH92-527-1 (110 bp, 60℃)	Event527-bf1 St527-R1 St527-S2	GTG TCA AAA CAC AAT TTA CAG CA TCC CTT AAT TCT CCG CTC ATG A FAM-AGA TTG TCG TTT CCC GCC TTC AGT T-TAMRA	500 500 200

표 2. 실시간 PCR 반응액 조성

성분	Stock 용액 농도	최종농도 (well)	1회 분량 (μL)
Universal Master Mix	2×	1×	12.5
프라이머	각 25 μM	표 1 참조	
프로브	10 μM		
주형 DNA	20 ng/μL	100 ng	5.0
멸균증류수	반응 총액이 25 μL가 되도록 첨가		
전체량			25.0

표 3. 실시간 PCR 반응조건

단계	온도(℃)	시간	cycle 수
전반응(Pre-PCR incubation)	50	2분	1 cycle
초기변성(Initial denaturation)	95	10분	1 cycle
증폭(Amplification)	95	15초	45 cycles
	표 1 참조	1분	

○ **시험조작**

각 추출 DNA에 대한 PCR은 내재유전자와 도입된 구조유전자에 대한 프라이머 및 프로브로 실시하며, 추출 DNA에 대하여 3회 이상 반복하여 시험한다. PCR 반응 시에는 음성대조구로 주형 DNA 대신 멸균증류수를 사용한 것(NTC, no template control)을, 양성대조구로 비유전자변형(non-GMO) DNA를 함유한 것(동일 작물로서 GMO 0%(w/w) 표준시료에서 추출한 DNA 등)과 검출하고자 하는 유전자변형 DNA를 함유한 것(동일 작물로서 분석 대상 GMO를 포함하는 표준시료에서 추출한 DNA 또는 표준플라스미드 등)을 시료와 함께 시험한다. PCR 반응조건은 대상별 반응조건을 참고하여 사용하는 기기 등에 따라 최적 조건으로 변형하여 사용할 수 있으며, 기기 제조사에 별도 문의하여 적용한다.

○ **분석결과의 해석 및 판정**

PCR이 완료된 후 데이터의 자동 분석 과정을 통해서 threshold line[3]과 Ct값[4]을 구하며, 하나의 추출 DNA에 대하여 3회 반복 시험한 결과, 적어도 2회 이상의 결과 값이 43 미만의 Ct값을 가지고 형광강도가 지수함수적인 증폭이 확인되는 경우를 데이터로서 이용한다.

2회 반복 추출 DNA에 대한 PCR 결과, 확인시험에 의해 내재유전자와 도입된 구조유전자 특이 증폭산물이 모두 확인된 경우 '검출'로 판정하고, 2회 반복 추출 DNA에 대하여 내재유전자의 증폭산물은 모두 확인되나 구조유전자 특이 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 '불검출'로 판정한다.

2회 반복 추출 DNA에서 모두 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 DNA 추출 과정부터 다시 반복 시험하고, 반복시험 후에도 동일하게 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않는 경우 '검사불능'으로 판정한다(표 4).

표 4. 결과 판정의 흐름도(예시)

사례	추출 DNA	결과 분석		GMO 여부 판정
		내재유전자	구조유전자	
사례 1	추출 1	+	+	검출(부적합)
	추출 2	+	+	
사례 2	추출 1	+	-	불검출(적합)
	추출 2	+	-	
사례 3*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	+	-	
사례 4*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	-	/	
사례 5*	추출 1	+	-	재시험
	추출 2	-	/	
사례 6*	추출 1	-	/	검사 불능
	추출 2	-	/	

+ : 목적 유전자의 증폭이 확인됨, - : 목적 유전자의 증폭이 확인되지 않음, / : 시험이 불필요함
* 사례 3~6의 경우 DNA를 추가 추출하여 PCR 시험함

3) threshold line: 분석하고자 하는 유전자의 증폭곡선이 지수함수적으로 증가하는 부분
4) Ct: threshold line과 시료의 증폭곡선과의 교차점에서 구해진 PCR cycle

3) 유전자변형 감자 PH05-026-0048 시험법

감자 또는 그 가공식품에 대하여 국내에서 안전성을 승인받지 않아 식품위생법 제4조에 의해 수입 및 유통 등이 금지된 유전자변형 감자 PH05-026-0048을 검출하기 위한 시험법이다.

○ **검체의 전처리**

식품공전 『10.1. 유전자변형식품의 시험법』 중 『10.1.1 검체의 전처리』에 따라 처리한 후 사용하되, 원곡의 경우 다른 작물의 오염을 방지하기 위하여 10회 이상 충분히 수세, 건조하여 균질하게 분쇄한다.

가공식품의 경우에는 대상 작물을 선별하여 사용하며, 이의 구별하기 어렵거나 혼합된 형태의 검체는 전체를 균질하게 분쇄, 혼합하여 사용할 수 있다.

○ **DNA 추출 및 정제**

DNA 추출·정제법으로는 계면활성제인 세틸트리메틸암모늄브로마이드(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB)와 페놀-클로로포름 혼합액을 사용하여 DNA를 추출·정제하는 CTAB법과 실리카겔 막 형태, 실리카를 베이스로 한 레진 형태 및 자기흡착 비드 형태 등과 같은 DNA 추출 키트를 이용하는 방법이 있다.

CTAB법은 적용범위가 넓고 PCR의 저해물질이 남을 가능성이 적어 순도 높은 DNA를 얻을 수 있는 방법이며, 시판하고 있는 DNA 추출 키트는 적용 범위가 한정되는 경우가 있어 가공식품의 유형에 따라 적용 가능 여부를 별도로 확인할 필요가 있다.

DNA를 추출·정제 시 하나의 분석 검체로부터 적정량을 2회 칭량하여 동시에 추출하고, 추출한 DNA는 적절히 희석하거나 농축하여 시험에 사용한다.

○ **시약 및 시액**

유전자변형 감자 PH05-026-0048의 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브는 표 1과 같으며, 이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 프라이머, 프로브 및 시약을 사용할 수도 있다.

○ **반응액의 조제**

표 1의 프라이머 및 프로브를 사용하면서 PCR 반응액의 총량을 25 μL로 할 경우 PCR 반응액 조성은 표 2와 같다. 다만, PCR 반응액 조성은 프라이머, 프로브와 시약 및 PCR 기기 등에 따라 다를 수 있으므로 시약이나 기기의 사용 매뉴얼을 참고하여 적용한다.

표 1. 유전자변형 감자 PH05-026-0048의 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브 정보

구분	품목 (증폭산물크기, 반응 온도)	프라이머 프로브	염기서열 (5' → 3')	농도 (nM)
내재	UGPase (88 bp, 60℃)	UGP-af7 UGP-ar8 UGP-sf1 probe	GGA CAT GTG AAG AGA CGG AGC CCT ACC TCT ACC CCT CCG C FAM-CTA CCA CCA TTA CCT CGC ACC TCC TCA-TAMRA	500 500 200
구조	PH05-026-0048 (103 bp, 60℃)	26-44-RB-393F 26-48-RB-473R 26-48-RB-441-FAM	TTG ATT TAT AGT CGA AGA TCT TTC AAA GCT TGG CGT AAT CAT GGT CAT AG FAM-AAA GGA TAA TTT CAA TTT CAC ACA GG-MGB	500 500 200

표 2. 실시간 PCR 반응액 조성

성분	Stock 용액 농도	최종농도 (well)	1회 분량 (μL)
Universal Master Mix	2×	1×	12.5
프라이머	각 25 μM	표 1 참조	
프로브	10 μM		
주형 DNA	20 ng/μL	100 ng	5.0
멸균증류수	반응 총액이 25 μL가 되도록 첨가		
전체량			25.0

표 3. 실시간 PCR 반응조건

단계	온도(℃)	시간	cycle 수
전반응(Pre-PCR incubation)	50	2분	1 cycle
초기변성(Initial denaturation)	95	10분	1 cycle
증폭(Amplification)	95	15초	45 cycles
	표 1 참조	1분	

○ 시험조작

각 추출 DNA에 대한 PCR은 내재유전자와 도입된 구조유전자에 대한 프라이머 및 프로브로 실시하며, 추출 DNA에 대하여 3회 이상 반복하여 시험한다. PCR 반응 시에는 음성대조구로 주형 DNA 대신 멸균증류수를 사용한 것(NTC, no template control)을, 양성대조구로 비유전자변형(non-GMO) DNA를 함유한 것(동일 작물로서 GMO 0%(w/w) 표준시료에서 추출한 DNA 등)과 검출하고자 하는 유전자변형 DNA를 함유한 것(동일 작물로서 분석 대상 GMO를 포함하는 표준시료에서 추출한 DNA 또는 표준플라스미드 등)을 시료와 함께 시험한다. PCR 반응조건은 대상별 반응조건을 참고하여 사용하는 기기 등에 따라 최적 조건으로 변형하여 사용할 수 있으며, 기기 제조사에 별도 문의하여 적용한다.

○ **분석결과의 해석 및 판정**

PCR이 완료된 후 데이터의 자동 분석 과정을 통해서 threshold line[5]과 Ct값[6]을 구하며, 하나의 추출 DNA에 대하여 3회 반복 시험한 결과, 적어도 2회 이상의 결과 값이 43 미만의 Ct값을 가지고 형광강도가 지수함수적인 증폭이 확인되는 경우를 데이터로서 이용한다.

2회 반복 추출 DNA에 대한 PCR 결과, 확인시험에 의해 내재유전자와 도입된 구조유전자 특이 증폭산물이 모두 확인된 경우 '검출'로 판정하고, 2회 반복 추출 DNA에 대하여 내재유전자의 증폭산물은 모두 확인되나 구조유전자 특이 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 '불검출'로 판정한다.

2회 반복 추출 DNA에서 모두 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 DNA 추출 과정부터 다시 반복 시험하고, 반복시험 후에도 동일하게 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않는 경우 '검사불능'으로 판정한다(표 4).

표 4. 결과 판정의 흐름도(예시)

사례	추출 DNA	결과 분석		GMO 여부 판정
		내재유전자	구조유전자	
사례 1	추출 1	+	+	검출(부적합)
	추출 2	+	+	
사례 2	추출 1	+	-	불검출(적합)
	추출 2	+	-	
사례 3*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	+	-	
사례 4*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	-	/	
사례 5*	추출 1	+	-	재시험
	추출 2	-	/	
사례 6*	추출 1	-	/	검사 불능
	추출 2	-	/	

+ : 목적 유전자의 증폭이 확인됨, - : 목적 유전자의 증폭이 확인되지 않음, / : 시험이 불필요함
* 사례 3~6의 경우 DNA를 추가 추출하여 PCR 시험함

5) threshold line: 분석하고자 하는 유전자의 증폭곡선이 지수함수적으로 증가하는 부분
6) Ct: threshold line과 시료의 증폭곡선과의 교차점에서 구해진 PCR cycle

4) 유전자변형 Innate 감자 확인 시험법

감자 또는 그 가공식품에 대하여 국내에서 안전성을 승인받지 않아 식품위생법 제4조에 의해 수입 및 유통 등이 금지된 유전자변형 Innate 감자(E12, Y9, X17, F10, J3, E24, E56, F37, G11, Gen2-Z6, H37, H50, J55, J78, V11, W8)를 검출하기 위한 시험법이다.

○ 검체의 전처리

식품공전 『10.1. 유전자변형식품의 시험법』 중 『10.1.1 검체의 전처리』에 따라 처리한 후 사용하되, 원곡의 경우 다른 작물의 오염을 방지하기 위하여 10회 이상 충분히 수세, 건조하여 균질하게 분쇄한다.

가공식품의 경우에는 대상 작물을 선별하여 사용하며, 이의 구별하기 어렵거나 혼합된 형태의 검체는 전체를 균질하게 분쇄, 혼합하여 사용할 수 있다.

○ DNA 추출 및 정제

DNA 추출·정제법으로는 계면활성제인 세틸트리메틸암모늄브로마이드(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB)와 페놀-클로로포름 혼합액을 사용하여 DNA를 추출·정제하는 CTAB법과 실리카겔 막 형태, 실리카를 베이스로 한 레진 형태 및 자기흡착 비드 형태 등과 같은 DNA 추출 키트를 이용하는 방법이 있다.

CTAB법은 적용범위가 넓고 PCR의 저해물질이 남을 가능성이 적어 순도 높은 DNA를 얻을 수 있는 방법이며, 시판하고 있는 DNA 추출 키트는 적용 범위가 한정되는 경우가 있어 가공식품의 유형에 따라 적용 가능 여부를 별도로 확인할 필요가 있다.

DNA를 추출·정제 시 하나의 분석 검체로부터 적정량을 2회 칭량하여 동시에 DNA를 추출하고, 추출한 각각의 DNA는 적절히 희석하거나 농축하여 검사에 사용한다.

○ 시약 및 시액

유전자변형 Innate 감자의 검출에 사용하는 프라이머 및 프로브는 표 1과 같으며, 이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 프라이머, 프로브 및 시약을 사용할 수도 있다.

○ 반응액의 조제

표 1의 프라이머 및 프로브를 사용하면서 PCR 반응액의 총량을 25 μL로 할 경우 PCR 반응액 조성은 표 2와 같다. 다만, PCR 반응액 조성은 프라이머, 프로브와 시약 및 PCR 기기 등에 따라 다를 수 있으므로 시약이나 기기의 사용 매뉴얼을 참고하여 적용한다.

표 1. 유전자변형 Innate 감자 스크리닝에 사용하는 프라이머 및 프로브 정보

구분	품목 (증폭산물크기, 반응 온도)	프라이머 프로브	염기서열 (5' → 3')	농도 (nM)
내재	UGPase (88 bp, 60℃)	UGP-af7 UGP-ar8 UGP-sf1 probe	GGA CAT GTG AAG AGA CGG AGC CCT ACC TCT ACC CCT CCG C FAM-CTA CCA CCA TTA CCT CGC ACC TCC TCA-TAMRA	500 500 200
구조	Innate (145 bp, 60℃)	SPS-P1278-Fc3 SPS-P1278-Rc3 SPS-P1278-mP2	CGC TTC ACC AGT ATG ACT GTT TA CAC ACT CTA CCA CAC ACT CTC TAG FAM-TGG TAC TCT AGC TTC TAA GCC-TAMRA	400 400 200

표 2. 실시간 PCR 반응액 조성

성분	Stock 용액 농도	최종농도 (well)	1회 분량 (μL)
Universal Master Mix	2×	1×	12.5
프라이머	각 25 μM	표 1 참조	
프로브	10 μM		
주형 DNA	20 ng/μL	100 ng	5.0
멸균증류수	반응 총액이 25 μL가 되도록 첨가		
전체량			25.0

표 3. 실시간 PCR 반응조건

단계	온도(℃)	시간	cycle 수
전반응(Pre-PCR incubation)	50	2분	1 cycle
초기변성(Initial denaturation)	95	10분	1 cycle
증폭(Amplification)	95	15초	45 cycles
	표 1 참조	1분	

○ **시험조작**

각 추출 DNA에 대한 PCR은 내재유전자와 도입된 구조유전자에 대한 프라이머 및 프로브로 실시하며, 추출 DNA에 대하여 3회 이상 반복하여 시험한다. PCR 반응 시에는 음성대조구로 주형 DNA 대신 멸균증류수를 사용한 것(NTC, no template control)을, 양성대조구로 비유전자변형(non-GMO) DNA를 함유한 것(동일 작물로서 GMO 0%(w/w) 표준시료에서 추출한 DNA 등)과 검출하고자 하는 유전자변형 DNA를 함유한 것(동일 작물로서 분석 대상 GMO를 포함하는 표준시료에서 추출한 DNA 또는 표준플라스미드 등)을 시료와 함께 시험한다. PCR 반응조건은 대상별 반응조건을 참고하여 사용하는 기기 등에 따라 최적 조건으로 변형하여 사용할 수 있으며, 기기 제조사에 별도 문의하여 적용한다.

○ **분석결과의 해석 및 판정**

PCR이 완료된 후 데이터의 자동 분석 과정을 통해서 threshold line[7]과 Ct값[8]을 구하며, 하나의 추출 DNA에 대하여 3회 반복 시험한 결과, 적어도 2회 이상의 결과 값이 43 미만의 Ct값을 가지고 형광강도가 지수함수적인 증폭이 확인되는 경우를 데이터로서 이용한다.

2회 반복 추출 DNA에 대한 PCR 결과, 내재유전자와 도입된 구조유전자 특이 증폭산물이 모두 확인된 경우 '유전자변형 Innate 감자 검출'로 판정하고, 2회 반복 추출 DNA에 대하여 내재유전자의 증폭산물은 모두 확인되나 구조유전자 특이 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 '유전자변형 Innate 감자 불검출'로 판정하며, 유전자변형 Innate 감자 품목을 특정하여야 하는 경우에는 해당 유전자변형 감자 시험법을 적용한다.

2회 반복 추출 DNA에서 모두 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 DNA 추출 과정부터 다시 반복 시험하고, 반복시험 후에도 동일하게 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않는 경우 '검사불능'으로 판정한다(표 4).

표 4. 결과 판정의 흐름도(예시)

사례	추출 DNA	결과 분석		GMO 여부 판정
		내재유전자	구조유전자	
사례 1	추출 1	+	+	검출(부적합)
	추출 2	+	+	
사례 2	추출 1	+	-	불검출(적합)
	추출 2	+	-	
사례 3*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	+	-	
사례 4*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	-	/	
사례 5*	추출 1	+	-	재시험
	추출 2	-	/	
사례 6*	추출 1	-	/	검사 불능
	추출 2	-	/	

+ : 목적 유전자의 증폭이 확인됨, - : 목적 유전자의 증폭이 확인되지 않음, / : 시험이 불필요함
* 사례 3~6의 경우 DNA를 추가 추출하여 PCR 시험함

7) threshold line: 분석하고자 하는 유전자의 증폭곡선이 지수함수적으로 증가하는 부분
8) Ct: threshold line과 시료의 증폭곡선과의 교차점에서 구해진 PCR cycle

5) 유전자변형 Innate 감자 SPS-E12 시험법

감자 또는 그 가공식품에 대하여 국내에서 안전성을 승인받지 않아 식품위생법 제4조에 의해 수입 및 유통 등이 금지된 유전자변형 감자 SPS-E12를 검출하기 위한 시험법이다.

○ 검체의 전처리

식품공전 『10.1. 유전자변형식품의 시험법』 중 『10.1.1 검체의 전처리』에 따라 처리한 후 사용하되, 원곡의 경우 다른 작물의 오염을 방지하기 위하여 10회 이상 충분히 수세, 건조하여 균질하게 분쇄한다.

가공식품의 경우에는 대상 작물을 선별하여 사용하며, 이의 구별하기 어렵거나 혼합된 형태의 검체는 전체를 균질하게 분쇄, 혼합하여 사용할 수 있다.

○ DNA 추출 및 정제

DNA 추출·정제법으로는 계면활성제인 세틸트리메틸암모늄브로마이드(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB)와 페놀-클로로포름 혼합액을 사용하여 DNA를 추출·정제하는 CTAB법과 실리카겔 막 형태, 실리카를 베이스로 한 레진 형태 및 자기흡착 비드 형태 등과 같은 DNA 추출 키트를 이용하는 방법이 있다.

CTAB법은 적용범위가 넓고 PCR의 저해물질이 남을 가능성이 적어 순도 높은 DNA를 얻을 수 있는 방법이며, 시판하고 있는 DNA 추출 키트는 적용 범위가 한정되는 경우가 있어 가공식품의 유형에 따라 적용 가능 여부를 별도로 확인할 필요가 있다.

DNA를 추출·정제 시 하나의 분석 검체로부터 적정량을 2회 칭량하여 동시에 추출하고, 추출한 DNA는 적절히 희석하거나 농축하여 시험에 사용한다.

○ 시약 및 시액

유전자변형 감자 SPS-E12의 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브는 표 1과 같으며, 이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 프라이머, 프로브 및 시약을 사용할 수도 있다.

○ 반응액의 조제

표 1의 프라이머 및 프로브를 사용하면서 PCR 반응액의 총량을 25 μL로 할 경우 PCR 반응액 조성은 표 2, 4와 같다. 다만, PCR 반응액 조성은 프라이머, 프로브와 시약 및 PCR 기기 등에 따라 다를 수 있으므로 시약이나 기기의 사용 매뉴얼을 참고하여 적용한다.

표 1. 유전자변형 감자 SPS-E12 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브 정보

구분	품목 (증폭산물크기, 반응 온도)	프라이머 프로브	염기서열 (5' → 3')	농도 (nM)
내재	UGPase (131 bp, 56℃)	UGP-F1 UGP-R1	GCT GAG GGA AGC GAG ACT GA CAA TCC TTC TTG GGC CTA CCT	500 500
	UGPase (88 bp, 56℃)	UGP-af7 UGP-ar8 UGP-sf1 probe	GGA CAT GTG AAG AGA CGG AGC CCT ACC TCT ACC CCT CCG C FAM-CTA CCA CCA TTA CCT CGC ACC TCC TCA-TAMRA	500 500 200
구조	Simplot E12 (100 bp, 56℃)	SPS-E12-Fr-2 SPS-E12-Rr-2	GGG AGT AGG CTT TAT ACC GAG CCT TGA ATG ATT TGA TAT AAG AAG ATA A	500 500
	Simplot E12 (100 bp, 56℃)	SPS-E12-Fr-2 SPS-E12-Rr-2 SPS-E12-Pr	GGG AGT AGG CTT TAT ACC GAG CCT TGA ATG ATT TGA TAT AAG AAG ATA A FAM-CAA AGT GAC TGA CCG TAG TCC-TAMRA	500 500 200

표 2. 일반 PCR 반응액 조성

성분	Stock 용액 농도	최종농도 (well)	1회 분량 (μL)
DNA polymerase	5 U/μL	0.625 U	0.125
완충액	10×	1×	2.5
$MgCl_2$	25 mM	1.5 mM	1.5
dNTPs	2.5 mM	200 μM	2.0
프라이머	각 25 μM	표 1 참조	
주형 DNA	10 ng/μL	50 ng	5.0
멸균증류수	반응 총액이 25 μL가 되도록 첨가		
전체량			25.0

표 3. 일반 PCR 반응조건

단계	온도(℃)	시간	cycle 수
초기변성(Initial denaturation)	95	10분	1 cycle
변성(denaturation)	95	30초	40 cycles
결합(annealing)	표 1 참조	30초	
신장(extension)	72	30초	
최종신장(elongation)	72	7분	1 cycle
보존	4	-	-

표 4. 실시간 PCR 반응액 조성

성분	Stock 용액 농도	최종농도 (well)	1회 분량 (μL)
Universal Master Mix	2×	1×	12.5
프라이머	각 25 μM	표 1 참조	
프로브	10 μM		
주형 DNA	20 ng/μL	100 ng	5.0
멸균증류수	반응 총액이 25 μL가 되도록 첨가		
전체량			25.0

표 5. 실시간 PCR 반응조건

단계	온도(℃)	시간	cycle 수
전반응(Pre-PCR incubation)	50	2분	1 cycle
초기변성(Initial denaturation)	95	10분	1 cycle
증폭(Amplification)	95	15초	45 cycles
	표 1 참조	1분	

○ **시험조작**

각 추출 DNA에 대한 PCR은 내재유전자와 도입된 구조유전자에 대한 프라이머 및 프로브로 실시하며, 이때 일반 PCR을 사용하는 경우에는 추출 DNA에 대하여 1회 이상, 실시간 PCR의 경우에는 추출 DNA에 대하여 3회 이상 반복하여 시험한다. 각 PCR 반응 시에는 음성대조구로 주형 DNA 대신 멸균증류수를 사용한 것(NTC, no template control)을, 양성대조구로 비유전자변형(non-GMO) DNA를 함유한 것(동일 작물로서 GMO 0%(w/w) 표준시료에서 추출한 DNA 등)과 검출하고자 하는 유전자변형 DNA를 함유한 것(동일 작물로서 분석 대상 GMO를 포함하는 표준시료에서 추출한 DNA 또는 표준플라스미드 등)을 시료와 함께 시험한다. PCR 반응조건은 대상별 반응조건을 참고하여 사용하는 기기 등에 따라 최적 조건으로 변형하여 사용할 수 있으며, 기기 제조사에 별도 문의하여 적용한다.

○ **분석결과의 해석 및 판정**

- 일반 PCR

식품공전 중 유전자변형식품의 시험법에 따라 전기영동을 실시하여 각 프라이머에 특이적인 PCR 증폭산물의 크기를 확인한다.

2회 반복 추출 DNA에 대한 PCR 결과, 확인시험에 의해 내재유전자와 도입된 구조유전자 특이

증폭산물이 모두 확인된 경우 '검출'로 판정하고, 내재유전자의 증폭산물은 모두 확인되나 구조유전자 특이 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 '불검출'로 판정하며, 2회 반복 추출 DNA에서 모두 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 DNA 추출 과정부터 다시 반복시험하고, 반복시험 후에도 동일하게 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않는 경우 '검사불능'으로 판정한다(표 6).

- 실시간 PCR

PCR이 완료된 후 데이터의 자동 분석 과정을 통해서 threshold line[9]과 Ct값[10]을 구하며, 하나의 추출 DNA에 대하여 3회 반복 시험한 결과, 적어도 2회 이상의 결과 값이 43 미만의 Ct값을 가지고 형광강도가 지수함수적인 증폭이 확인되는 경우를 데이터로서 이용한다.

2회 반복 추출 DNA에 대한 PCR 결과, 확인시험에 의해 내재유전자와 도입된 구조유전자 특이 증폭산물이 모두 확인된 경우 '검출'로 판정하고, 내재유전자의 증폭산물은 모두 확인되나 구조유전자 특이 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 '불검출'로 판정하며, 2회 반복 추출 DNA에서 모두 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 DNA 추출 과정부터 다시 반복시험하고, 반복시험 후에도 동일하게 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않는 경우 '검사불능'으로 판정한다(표 6).

표 6. 결과 판정의 흐름도(예시)

사례	추출 DNA	결과 분석		GMO 여부 판정
		내재유전자	구조유전자	
사례 1	추출 1	+	+	검출(부적합)
	추출 2	+	+	
사례 2	추출 1	+	-	불검출(적합)
	추출 2	+	-	
사례 3*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	+	-	
사례 4*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	-	/	
사례 5*	추출 1	+	-	재시험
	추출 2	-	/	
사례 6*	추출 1	-	/	검사 불능
	추출 2	-	/	

+ : 목적 유전자의 증폭이 확인됨, - : 목적 유전자의 증폭이 확인되지 않음, / : 시험이 불필요함
* 사례 3~6의 경우 DNA를 추가 추출하여 PCR 시험함

9) threshold line: 분석하고자 하는 유전자의 증폭곡선이 지수함수적으로 증가하는 부분
10) Ct: threshold line과 시료의 증폭곡선과의 교차점에서 구해진 PCR cycle

6) 유전자변형 Innate 감자 SPS-Y9 시험법

감자 또는 그 가공식품에 대하여 국내에서 안전성을 승인받지 않아 식품위생법 제4조에 의해 수입 및 유통 등이 금지된 유전자변형 감자 SPS-Y9를 검출하기 위한 시험법이다.

○ 검체의 전처리

식품공전 『10.1. 유전자변형식품의 시험법』 중 『10.1.1 검체의 전처리』에 따라 처리한 후 사용하되, 원곡의 경우 다른 작물의 오염을 방지하기 위하여 10회 이상 충분히 수세, 건조하여 균질하게 분쇄한다.

가공식품의 경우에는 대상 작물을 선별하여 사용하며, 이의 구별하기 어렵거나 혼합된 형태의 검체는 전체를 균질하게 분쇄, 혼합하여 사용할 수 있다.

○ DNA 추출 및 정제

DNA 추출·정제법으로는 계면활성제인 세틸트리메틸암모늄브로마이드(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB)와 페놀-클로로포름 혼합액을 사용하여 DNA를 추출·정제하는 CTAB법과 실리카겔 막 형태, 실리카를 베이스로 한 레진 형태 및 자기흡착 비드 형태 등과 같은 DNA 추출 키트를 이용하는 방법이 있다.

CTAB법은 적용범위가 넓고 PCR의 저해물질이 남을 가능성이 적어 순도 높은 DNA를 얻을 수 있는 방법이며, 시판하고 있는 DNA 추출 키트는 적용 범위가 한정되는 경우가 있어 가공식품의 유형에 따라 적용 가능 여부를 별도로 확인할 필요가 있다.

DNA를 추출·정제 시 하나의 분석 검체로부터 적정량을 2회 칭량하여 동시에 추출하고, 추출한 DNA는 적절히 희석하거나 농축하여 시험에 사용한다.

○ 시약 및 시액

유전자변형 감자 SPS-Y9의 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브는 표 1과 같으며, 이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 프라이머, 프로브 및 시약을 사용할 수도 있다.

○ 반응액의 조제

표 1의 프라이머 및 프로브를 사용하면서 PCR 반응액의 총량을 25 μL로 할 경우 PCR 반응액 조성은 표 2, 4와 같다. 다만, PCR 반응액 조성은 프라이머, 프로브와 시약 및 PCR 기기 등에 따라 다를 수 있으므로 시약이나 기기의 사용 매뉴얼을 참고하여 적용한다.

표 1. 유전자변형 감자 SPS-Y9 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브 정보

구분	품목 (증폭산물크기, 반응 온도)	프라이머 프로브	염기서열 (5' → 3')	농도 (nM)
내재	UGPase (131 bp, 56℃)	UGP-F1	GCT GAG GGA AGC GAG ACT GA	500
		UGP-R1	CAA TCC TTC TTG GGC CTA CCT	500
	UGPase (88 bp, 56℃)	UGP-af7	GGA CAT GTG AAG AGA CGG AGC	500
		UGP-ar8	CCT ACC TCT ACC CCT CCG C	500
		UGP-sf1 probe	FAM-CTA CCA CCA TTA CCT CGC ACC TCC TCA-TAMRA	200
구조	SPS-Y9 (129 bp, 56℃)	Y9-mF1	GAA GAC AGC TAT CAA TAT ACT TTA GTA A	500
		Y9-mR1	AAT CTT TTG CCA TAC TCA TAC AGA G	500
	SPS-Y9 (129 bp, 56℃)	Y9-mF1	GAA GAC AGC TAT CAA TAT ACT TTA GTA A	500
		Y9-mR1	AAT CTT TTG CCA TAC TCA TAC AGA G	500
		Y9-mP1	FAM-TGT GCA CCA ATG ATG TCT CAC G-TAMRA	200

표 2. 일반 PCR 반응액 조성

성분	Stock 용액 농도	최종농도 (well)	1회 분량 (μL)
DNA polymerase	5 U/μL	0.625 U	0.125
완충액	10×	1×	2.5
$MgCl_2$	25 mM	1.5 mM	1.5
dNTPs	2.5 mM	200 μM	2.0
프라이머	각 25 μM	표 1 참조	
주형 DNA	10 ng/μL	50 ng	5.0
멸균증류수	반응 총액이 25 μL가 되도록 첨가		
전체량			25.0

표 3. 일반 PCR 반응조건

단계	온도(℃)	시간	cycle 수
초기변성(Initial denaturation)	95	10분	1 cycle
변성(denaturation)	95	30초	40 cycles
결합(annealing)	표 1 참조	30초	
신장(extension)	72	30초	
최종신장(elongation)	72	7분	1 cycle
보존	4	-	-

표 4. 실시간 PCR 반응액 조성

성분	Stock 용액 농도	최종농도 (well)	1회 분량 (μL)
Universal Master Mix	2×	1×	12.5
프라이머	각 25 μM	표 1 참조	
프로브	10 μM		
주형 DNA	20 ng/μL	100 ng	5.0
멸균증류수	반응 총액이 25 μL가 되도록 첨가		
전체량			25.0

표 5. 실시간 PCR 반응조건

단계	온도(℃)	시간	cycle 수
전반응(Pre-PCR incubation)	50	2분	1 cycle
초기변성(Initial denaturation)	95	10분	1 cycle
증폭(Amplification)	95	15초	45 cycles
	표 1 참조	1분	

○ **시험조작**

각 추출 DNA에 대한 PCR은 내재유전자와 도입된 구조유전자에 대한 프라이머 및 프로브로 실시하며, 이때 일반 PCR을 사용하는 경우에는 추출 DNA에 대하여 1회 이상, 실시간 PCR의 경우에는 추출 DNA에 대하여 3회 이상 반복하여 시험한다. 각 PCR 반응 시에는 음성대조구로 주형 DNA 대신 멸균증류수를 사용한 것(NTC, no template control)을, 양성대조구로 비유전자변형(non-GMO) DNA를 함유한 것(동일 작물로서 GMO 0%(w/w) 표준시료에서 추출한 DNA 등)과 검출하고자 하는 유전자변형 DNA를 함유한 것(동일 작물로서 분석 대상 GMO를 포함하는 표준시료에서 추출한 DNA 또는 표준플라스미드 등)을 시료와 함께 시험한다. PCR 반응조건은 대상별 반응조건을 참고하여 사용하는 기기 등에 따라 최적 조건으로 변형하여 사용할 수 있으며, 기기 제조사에 별도 문의하여 적용한다.

○ **분석결과의 해석 및 판정**

- 일반 PCR

식품공전 중 유전자변형식품의 시험법에 따라 전기영동을 실시하여 각 프라이머에 특이적인 PCR 증폭산물의 크기를 확인한다.

2회 반복 추출 DNA에 대한 PCR 결과, 확인시험에 의해 내재유전자와 도입된 구조유전자 특이 증폭산물이 모두 확인된 경우 '검출'로 판정하고, 내재유전자의 증폭산물은 모두 확인되나 구조유전자 특이 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 '불검출'로 판정하며, 2회 반복 추출 DNA

에서 모두 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 DNA 추출 과정부터 다시 반복 시험하고, 반복시험 후에도 동일하게 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않는 경우 '검사불능'으로 판정한다(표 6).

- 실시간 PCR

PCR이 완료된 후 데이터의 자동 분석 과정을 통해서 threshold line[11]과 Ct값[12]을 구하며, 하나의 추출 DNA에 대하여 3회 반복 시험한 결과, 적어도 2회 이상의 결과 값이 43 미만의 Ct값을 가지고 형광강도가 지수함수적인 증폭이 확인되는 경우를 데이터로서 이용한다.

2회 반복 추출 DNA에 대한 PCR 결과, 확인시험에 의해 내재유전자와 도입된 구조유전자 특이 증폭산물이 모두 확인된 경우 '검출'로 판정하고, 내재유전자의 증폭산물은 모두 확인되나 구조유전자 특이 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 '불검출'로 판정하며, 2회 반복 추출 DNA에서 모두 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 DNA 추출 과정부터 다시 반복 시험하고, 반복시험 후에도 동일하게 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않는 경우 '검사불능'으로 판정한다(표 6).

표 6. 결과 판정의 흐름도(예시)

사례	추출 DNA	결과 분석		GMO 여부 판정
		내재유전자	구조유전자	
사례 1	추출 1	+	+	검출(부적합)
	추출 2	+	+	
사례 2	추출 1	+	-	불검출(적합)
	추출 2	+	-	
사례 3*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	+	-	
사례 4*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	-	/	
사례 5*	추출 1	+	-	재시험
	추출 2	-	/	
사례 6*	추출 1	-	/	검사 불능
	추출 2	-	/	

+ : 목적 유전자의 증폭이 확인됨, - : 목적 유전자의 증폭이 확인되지 않음, / : 시험이 불필요함
* 사례 3~6의 경우 DNA를 추가 추출하여 PCR 시험함

11) threshold line: 분석하고자 하는 유전자의 증폭곡선이 지수함수적으로 증가하는 부분
12) Ct: threshold line과 시료의 증폭곡선과의 교차점에서 구해진 PCR cycle

7) 유전자변형 Innate 감자 SPS-X17 시험법

감자 또는 그 가공식품에 대하여 국내에서 안전성을 승인받지 않아 식품위생법 제4조에 의해 수입 및 유통 등이 금지된 유전자변형 감자 SPS-X17을 검출하기 위한 시험법이다.

○ 검체의 전처리

식품공전 『10.1. 유전자변형식품의 시험법』 중 『10.1.1 검체의 전처리』에 따라 처리한 후 사용하되, 원곡의 경우 다른 작물의 오염을 방지하기 위하여 10회 이상 충분히 수세, 건조하여 균질하게 분쇄한다.

가공식품의 경우에는 대상 작물을 선별하여 사용하며, 이의 구별하기 어렵거나 혼합된 형태의 검체는 전체를 균질하게 분쇄, 혼합하여 사용할 수 있다.

○ DNA 추출 및 정제

DNA 추출·정제법으로는 계면활성제인 세틸트리메틸암모늄브로마이드(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB)와 페놀-클로로포름 혼합액을 사용하여 DNA를 추출·정제하는 CTAB법과 실리카겔 막 형태, 실리카를 베이스로 한 레진 형태 및 자기흡착 비드 형태 등과 같은 DNA 추출 키트를 이용하는 방법이 있다.

CTAB법은 적용범위가 넓고 PCR의 저해물질이 남을 가능성이 적어 순도 높은 DNA를 얻을 수 있는 방법이며, 시판하고 있는 DNA 추출 키트는 적용 범위가 한정되는 경우가 있어 가공식품의 유형에 따라 적용 가능 여부를 별도로 확인할 필요가 있다.

DNA를 추출·정제 시 하나의 분석 검체로부터 적정량을 2회 칭량하여 동시에 추출하고, 추출한 DNA는 적절히 희석하거나 농축하여 시험에 사용한다.

○ 시약 및 시액

유전자변형 감자 SPS-X17의 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브는 표 1과 같으며, 이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 프라이머, 프로브 및 시약을 사용할 수도 있다.

○ 반응액의 조제

표 1의 프라이머 및 프로브를 사용하면서 PCR 반응액의 총량을 25 μL로 할 경우 PCR 반응액 조성은 표 2, 4와 같다. 다만, PCR 반응액 조성은 프라이머, 프로브와 시약 및 PCR 기기 등에 따라 다를 수 있으므로 시약이나 기기의 사용 매뉴얼을 참고하여 적용한다.

표 1. 유전자변형 감자 SPS-X17 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브 정보

구분	품목 (증폭산물크기, 반응 온도)	프라이머 프로브	염기서열 (5' → 3')	농도 (nM)
내재	UGPase (131 bp, 56℃)	UGP-F1 UGP-R1	GCT GAG GGA AGC GAG ACT GA CAA TCC TTC TTG GGC CTA CCT	500 500
	UGPase (88 bp, 56℃)	UGP-af7 UGP-ar8 UGP-sf1 probe	GGA CAT GTG AAG AGA CGG AGC CCT ACC TCT ACC CCT CCG C FAM-CTA CCA CCA TTA CCT CGC ACC TCC TCA-TAMRA	500 500 200
구조	SPS-X17 (129 bp, 56℃)	SPS-X17LB-Fr SPS-X17LB-Rr	CAA TCG ATC CCT TCA CTC AG TTT TCT CAA CCT TCG GAC CT	500 500
	SPS-X17 (77 bp, 56℃)	SPS-X17_f SPS-X17_r SPS-X17-p	TAG CAA AAT GGA TTT GTG AG GAT TTT GGA TCA ACC ACA C FAM-ACA CCG GTA TAT ATC CTG CAG CG-TAMRA	400 400 250

표 2. 일반 PCR 반응액 조성

성분	Stock 용액 농도	최종농도 (well)	1회 분량 (μL)
DNA polymerase	5 U/μL	0.625 U	0.125
완충액	10×	1×	2.5
$MgCl_2$	25 mM	1.5 mM	1.5
dNTPs	2.5 mM	200 μM	2.0
프라이머	각 25 μM	표 1 참조	
주형 DNA	10 ng/μL	50 ng	5.0
멸균증류수	반응 총액이 25 μL가 되도록 첨가		
전체량			25.0

표 3. 일반 PCR 반응조건

단계	온도(℃)	시간	cycle 수
초기변성(Initial denaturation)	95	10분	1 cycle
변성 (denaturation) 결합 (annealing) 신장 (extension)	95 표 1 참조 72	30초 30초 30초	40 cycles
최종신장 (elongation)	72	7분	1 cycle
보존	4	-	-

표 4. 실시간 PCR 반응액 조성

성분	Stock 용액 농도	최종농도 (well)	1회 분량 (μL)
Universal Master Mix	2×	1×	12.5
프라이머	각 25 μM	표 1 참조	
프로브	10 μM		
주형 DNA	20 ng/μL	100 ng	5.0
멸균증류수	반응 총액이 25 μL가 되도록 첨가		
전체량			25.0

표 5. 실시간 PCR 반응조건

단계	온도(℃)	시간	cycle 수
전반응(Pre-PCR incubation)	50	2분	1 cycle
초기변성(Initial denaturation)	95	10분	1 cycle
증폭(Amplification)	95	15초	45 cycles
	표 1 참조	1분	

○ **시험조작**

각 추출 DNA에 대한 PCR은 내재유전자와 도입된 구조유전자에 대한 프라이머 및 프로브로 실시하며, 이때 일반 PCR을 사용하는 경우에는 추출 DNA에 대하여 1회 이상, 실시간 PCR의 경우에는 추출 DNA에 대하여 3회 이상 반복하여 시험한다. 각 PCR 반응 시에는 음성대조구로 주형 DNA 대신 멸균증류수를 사용한 것(NTC, no template control)을, 양성대조구로 비유전자변형(non-GMO) DNA를 함유한 것(동일 작물로서 GMO 0%(w/w) 표준시료에서 추출한 DNA 등)과 검출하고자 하는 유전자변형 DNA를 함유한 것(동일 작물로서 분석 대상 GMO를 포함하는 표준시료에서 추출한 DNA 또는 표준플라스미드 등)을 시료와 함께 시험한다. PCR 반응조건은 대상별 반응조건을 참고하여 사용하는 기기 등에 따라 최적 조건으로 변형하여 사용할 수 있으며, 기기 제조사에 별도 문의하여 적용한다.

○ **분석결과의 해석 및 판정**

- 일반 PCR

식품공전 중 유전자변형식품의 시험법에 따라 전기영동을 실시하여 각 프라이머에 특이적인 PCR 증폭산물의 크기를 확인한다.

2회 반복 추출 DNA에 대한 PCR 결과, 확인시험에 의해 내재유전자와 도입된 구조유전자 특이 증폭산물이 모두 확인된 경우 '검출'로 판정하고, 내재유전자의 증폭산물은 모두 확인되나 구조

유전자 특이 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 '불검출'로 판정하며, 2회 반복 추출 DNA에서 모두 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 DNA 추출 과정부터 다시 반복 시험하고, 반복시험 후에도 동일하게 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않는 경우 '검사불능'으로 판정한다(표 6).

- 실시간 PCR

PCR이 완료된 후 데이터의 자동 분석 과정을 통해서 threshold line[13]과 Ct값[14]을 구하며, 하나의 추출 DNA에 대하여 3회 반복 시험한 결과, 적어도 2회 이상의 결과 값이 43 미만의 Ct값을 가지고 형광강도가 지수함수적인 증폭이 확인되는 경우를 데이터로서 이용한다.

2회 반복 추출 DNA에 대한 PCR 결과, 확인시험에 의해 내재유전자와 도입된 구조유전자 특이 증폭산물이 모두 확인된 경우 '검출'로 판정하고, 내재유전자의 증폭산물은 모두 확인되나 구조유전자 특이 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 '불검출'로 판정하며, 2회 반복 추출 DNA에서 모두 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 DNA 추출 과정부터 다시 반복 시험하고, 반복시험 후에도 동일하게 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않는 경우 '검사불능'으로 판정한다(표 6).

표 6. 결과 판정의 흐름도(예시)

사례	추출 DNA	결과 분석		GMO 여부 판정
		내재유전자	구조유전자	
사례 1	추출 1	+	+	검출(부적합)
	추출 2	+	+	
사례 2	추출 1	+	-	불검출(적합)
	추출 2	+	-	
사례 3*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	+	-	
사례 4*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	-	/	
사례 5*	추출 1	+	-	재시험
	추출 2	-	/	
사례 6*	추출 1	-	/	검사 불능
	추출 2	-	/	

+ : 목적 유전자의 증폭이 확인됨, - : 목적 유전자의 증폭이 확인되지 않음, / : 시험이 불필요함
* 사례 3~6의 경우 DNA를 추가 추출하여 PCR 시험함

13) threshold line: 분석하고자 하는 유전자의 증폭곡선이 지수함수적으로 증가하는 부분
14) Ct: threshold line과 시료의 증폭곡선과의 교차점에서 구해진 PCR cycle

8) 유전자변형 Innate 감자 SPS-F10 시험법

감자 또는 그 가공식품에 대하여 국내에서 안전성을 승인받지 않아 식품위생법 제4조에 의해 수입 및 유통 등이 금지된 유전자변형 감자 SPS-F10을 검출하기 위한 시험법이다.

○ 검체의 전처리

식품공전 『10.1. 유전자변형식품의 시험법』 중 『10.1.1 검체의 전처리』에 따라 처리한 후 사용하되, 원곡의 경우 다른 작물의 오염을 방지하기 위하여 10회 이상 충분히 수세, 건조하여 균질하게 분쇄한다.

가공식품의 경우에는 대상 작물을 선별하여 사용하며, 이의 구별하기 어렵거나 혼합된 형태의 검체는 전체를 균질하게 분쇄, 혼합하여 사용할 수 있다.

○ DNA 추출 및 정제

DNA 추출·정제법으로는 계면활성제인 세틸트리메틸암모늄브로마이드(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB)와 페놀-클로로포름 혼합액을 사용하여 DNA를 추출·정제하는 CTAB법과 실리카겔 막 형태, 실리카를 베이스로 한 레진 형태 및 자기흡착 비드 형태 등과 같은 DNA 추출 키트를 이용하는 방법이 있다.

CTAB법은 적용범위가 넓고 PCR의 저해물질이 남을 가능성이 적어 순도 높은 DNA를 얻을 수 있는 방법이며, 시판하고 있는 DNA 추출 키트는 적용 범위가 한정되는 경우가 있어 가공식품의 유형에 따라 적용 가능 여부를 별도로 확인할 필요가 있다.

DNA를 추출·정제 시 하나의 분석 검체로부터 적정량을 2회 칭량하여 동시에 추출하고, 추출한 DNA는 적절히 희석하거나 농축하여 시험에 사용한다.

○ 시약 및 시액

유전자변형 감자 SPS-F10의 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브는 표 1과 같으며, 이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 프라이머, 프로브 및 시약을 사용할 수도 있다.

○ 반응액의 조제

표 1의 프라이머 및 프로브를 사용하면서 PCR 반응액의 총량을 25 μL로 할 경우 PCR 반응액 조성은 표 2와 같다. 다만, PCR 반응액 조성은 프라이머, 프로브와 시약 및 PCR 기기 등에 따라 다를 수 있으므로 시약이나 기기의 사용 매뉴얼을 참고하여 적용한다.

표 1. 유전자변형 감자 SPS-F10 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브 정보

구분	품목 (증폭산물크기, 반응 온도)	프라이머 프로브	염기서열 (5' → 3')	농도 (nM)
내재	UGPase (88 bp, 60℃)	UGP-af7	GGA CAT GTG AAG AGA CGG AGC	500
		UGP-ar8	CCT ACC TCT ACC CCT CCG C	500
		UGP-sf1 probe	FAM-CTA CCA CCA TTA CCT CGC ACC TCC TCA-TAMRA	200
구조	Simplot F10 (111 bp, 60℃)	F10-FI-2-1	AAG GCA ATC TTT CAT AAG CAA C	500
		F10-RI-2	CAC ACA CTT CGT TTA CAC CGG	500
		F10_mP	FAM-ATA ACT GGT CCA GCA GCC AT-TAMRA	200

표 2. 실시간 PCR 반응액 조성

성분	Stock 용액 농도	최종농도 (well)	1회 분량 (μL)
Universal Master Mix	2×	1×	12.5
프라이머	각 25 μM	표 1 참조	
프로브	10 μM		
주형 DNA	20 ng/μL	100 ng	5.0
멸균증류수	반응 총액이 25 μL가 되도록 첨가		
전체량			25.0

표 3. 실시간 PCR 반응조건

단계	온도(℃)	시간	cycle 수
전반응(Pre-PCR incubation)	50	2분	1 cycle
초기변성(Initial denaturation)	95	10분	1 cycle
증폭(Amplification)	95	15초	45 cycles
	표 1 참조	1분	

○ **시험조작**

각 추출 DNA에 대한 PCR은 내재유전자와 도입된 구조유전자에 대한 프라이머 및 프로브로 실시하며, 추출 DNA에 대하여 3회 이상 반복하여 시험한다. PCR 반응 시에는 음성대조구로 주형 DNA 대신 멸균증류수를 사용한 것(NTC, no template control)을, 양성대조구로 비유전자변형(non-GMO) DNA를 함유한 것(동일 작물로서 GMO 0%(w/w) 표준시료에서 추출한 DNA 등)과 검출하고자 하는 유전자변형 DNA를 함유한 것(동일 작물로서 분석 대상 GMO를 포함하는 표준시료에서 추출한 DNA 또는 표준플라스미드 등)을 시료와 함께 시험한다. PCR 반응조건은 대상별 반응조건을 참고하여 사용하는 기기 등에 따라 최적 조건으로 변형하여 사용할 수 있으며, 기기

제조사에 별도 문의하여 적용한다.

○ **분석결과의 해석 및 판정**

PCR이 완료된 후 데이터의 자동 분석 과정을 통해서 threshold line[15]과 Ct값[16]을 구하며, 하나의 추출 DNA에 대하여 3회 반복 시험한 결과, 적어도 2회 이상의 결과 값이 43 미만의 Ct값을 가지고 형광강도가 지수함수적인 증폭이 확인되는 경우를 데이터로서 이용한다.

2회 반복 추출 DNA에 대한 PCR 결과, 확인시험에 의해 내재유전자와 도입된 구조유전자 특이 증폭산물이 모두 확인된 경우 '검출'로 판정하고, 2회 반복 추출 DNA에 대하여 내재유전자의 증폭산물은 모두 확인되나 구조유전자 특이 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 '불검출'로 판정한다.

2회 반복 추출 DNA에서 모두 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 DNA 추출 과정부터 다시 반복 시험하고, 반복시험 후에도 동일하게 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않는 경우 '검사불능'으로 판정한다(표 4).

표 4. 결과 판정의 흐름도(예시)

사례	추출 DNA	결과 분석		GMO 여부 판정
		내재유전자	구조유전자	
사례 1	추출 1	+	+	검출(부적합)
	추출 2	+	+	
사례 2	추출 1	+	-	불검출(적합)
	추출 2	+	-	
사례 3*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	+	-	
사례 4*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	-	/	
사례 5*	추출 1	+	-	재시험
	추출 2	-	/	
사례 6*	추출 1	-	/	검사 불능
	추출 2	-	/	

+ : 목적 유전자의 증폭이 확인됨, - : 목적 유전자의 증폭이 확인되지 않음, / : 시험이 불필요함
* 사례 3~6의 경우 DNA를 추가 추출하여 PCR 시험함

15) threshold line: 분석하고자 하는 유전자의 증폭곡선이 지수함수적으로 증가하는 부분
16) Ct: threshold line과 시료의 증폭곡선과의 교차점에서 구해진 PCR cycle

9) 유전자변형 Innate 감자 SPS-J3 시험법

감자 또는 그 가공식품에 대하여 국내에서 안전성을 승인받지 않아 식품위생법 제4조에 의해 수입 및 유통 등이 금지된 유전자변형 감자 SPS-J3를 검출하기 위한 시험법이다.

○ 검체의 전처리

식품공전 『10.1. 유전자변형식품의 시험법』 중 『10.1.1 검체의 전처리』에 따라 처리한 후 사용하되, 원곡의 경우 다른 작물의 오염을 방지하기 위하여 10회 이상 충분히 수세, 건조하여 균질하게 분쇄한다.

가공식품의 경우에는 대상 작물을 선별하여 사용하며, 이의 구별하기 어렵거나 혼합된 형태의 검체는 전체를 균질하게 분쇄, 혼합하여 사용할 수 있다.

○ DNA 추출 및 정제

DNA 추출·정제법으로는 계면활성제인 세틸트리메틸암모늄브로마이드(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB)와 페놀-클로로포름 혼합액을 사용하여 DNA를 추출·정제하는 CTAB법과 실리카겔 막 형태, 실리카를 베이스로 한 레진 형태 및 자기흡착 비드 형태 등과 같은 DNA 추출 키트를 이용하는 방법이 있다.

CTAB법은 적용범위가 넓고 PCR의 저해물질이 남을 가능성이 적어 순도 높은 DNA를 얻을 수 있는 방법이며, 시판하고 있는 DNA 추출 키트는 적용 범위가 한정되는 경우가 있어 가공식품의 유형에 따라 적용 가능 여부를 별도로 확인할 필요가 있다.

DNA를 추출·정제 시 하나의 분석 검체로부터 적정량을 2회 칭량하여 동시에 추출하고, 추출한 DNA는 적절히 희석하거나 농축하여 시험에 사용한다.

○ 시약 및 시액

유전자변형 감자 SPS-J3의 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브는 표 1과 같으며, 이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 프라이머, 프로브 및 시약을 사용할 수도 있다.

○ 반응액의 조제

표 1의 프라이머 및 프로브를 사용하면서 PCR 반응액의 총량을 25 μL로 할 경우 PCR 반응액 조성은 표 2와 같다. 다만, PCR 반응액 조성은 프라이머, 프로브와 시약 및 PCR 기기 등에 따라 다를 수 있으므로 시약이나 기기의 사용 매뉴얼을 참고하여 적용한다.

표 1. 유전자변형 감자 SPS-J3정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브 정보

구분	품목 (증폭산물크기, 반응 온도)	프라이머 프로브	염기서열 (5' → 3')	농도 (nM)
내재	UGPase (88 bp, 60℃)	UGP-af7 UGP-ar8 UGP-sf1 probe	GGA CAT GTG AAG AGA CGG AGC CCT ACC TCT ACC CCT CCG C FAM-CTA CCA CCA TTA CCT CGC ACC TCC TCA-TAMRA	500 500 200
구조	Simplot J3 (196 bp, 60℃)	SPS-J3-FI SPS-J3-RI_2 SPS-J3-PI_2	CCG GTA CTC AAA TTT GCA A GGT GTT CTT AAT ATC GAG TGT TCT TTA G FAM-CAG GAC AAC CAC AAG CTA GGA-TAMRA	500 500 200

표 2. 실시간 PCR 반응액 조성

성분	Stock 용액 농도	최종농도 (well)	1회 분량 (μL)
Universal Master Mix	2×	1×	12.5
프라이머	각 25 μM	표 1 참조	
프로브	10 μM		
주형 DNA	20 ng/μL	100 ng	5.0
멸균증류수	반응 총액이 25 μL가 되도록 첨가		
전체량			25.0

표 3. 실시간 PCR 반응조건

단계	온도(℃)	시간	cycle 수
전반응(Pre-PCR incubation)	50	2분	1 cycle
초기변성(Initial denaturation)	95	10분	1 cycle
증폭(Amplification)	95	15초	45 cycles
	표 1 참조	1분	

○ **시험조작**

각 추출 DNA에 대한 PCR은 내재유전자와 도입된 구조유전자에 대한 프라이머 및 프로브로 실시하며, 추출 DNA에 대하여 3회 이상 반복하여 시험한다. PCR 반응 시에는 음성대조구로 주형 DNA 대신 멸균증류수를 사용한 것(NTC, no template control)을, 양성대조구로 비유전자변형(non-GMO) DNA를 함유한 것(동일 작물로서 GMO 0%(w/w) 표준시료에서 추출한 DNA 등)과 검출하고자 하는 유전자변형 DNA를 함유한 것(동일 작물로서 분석 대상 GMO를 포함하는 표준시료에서 추출한 DNA 또는 표준플라스미드 등)을 시료와 함께 시험한다. PCR 반응조건은 대상별 반응조건을 참고하여 사용하는 기기 등에 따라 최적 조건으로 변형하여 사용할 수 있으며, 기기

제조사에 별도 문의하여 적용한다.

○ **분석결과의 해석 및 판정**

PCR이 완료된 후 데이터의 자동 분석 과정을 통해서 threshold line[17]과 Ct값[18]을 구하며, 하나의 추출 DNA에 대하여 3회 반복 시험한 결과, 적어도 2회 이상의 결과 값이 43 미만의 Ct값을 가지고 형광강도가 지수함수적인 증폭이 확인되는 경우를 데이터로서 이용한다.

2회 반복 추출 DNA에 대한 PCR 결과, 확인시험에 의해 내재유전자와 도입된 구조유전자 특이 증폭산물이 모두 확인된 경우 '검출'로 판정하고, 2회 반복 추출 DNA에 대하여 내재유전자의 증폭산물은 모두 확인되나 구조유전자 특이 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 '불검출'로 판정한다.

2회 반복 추출 DNA에서 모두 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 DNA 추출 과정부터 다시 반복 시험하고, 반복시험 후에도 동일하게 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않는 경우 '검사불능'으로 판정한다(표 4).

표 4. 결과 판정의 흐름도(예시)

사례	추출 DNA	결과 분석		GMO 여부 판정
		내재유전자	구조유전자	
사례 1	추출 1	+	+	검출(부적합)
	추출 2	+	+	
사례 2	추출 1	+	-	불검출(적합)
	추출 2	+	-	
사례 3*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	+	-	
사례 4*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	-	/	
사례 5*	추출 1	+	-	재시험
	추출 2	-	/	
사례 6*	추출 1	-	/	검사 불능
	추출 2	-	/	

+ : 목적 유전자의 증폭이 확인됨, - : 목적 유전자의 증폭이 확인되지 않음, / : 시험이 불필요함
* 사례 3~6의 경우 DNA를 추가 추출하여 PCR 시험함

17) threshold line: 분석하고자 하는 유전자의 증폭곡선이 지수함수적으로 증가하는 부분
18) Ct: threshold line과 시료의 증폭곡선과의 교차점에서 구해진 PCR cycle

10) 유전자변형 밀 MON71800 시험법

밀 또는 그 가공식품에 대하여 국내에서 안전성을 승인받지 않아 식품위생법 제4조에 의해 수입 및 유통 등이 금지된 유전자변형 밀 MON71800을 검출하기 위한 시험법이다.

○ 검체의 전처리

식품공전 『10.1. 유전자변형식품의 시험법』 중 『10.1.1 검체의 전처리』에 따라 처리한 후 사용하되, 원곡의 경우 다른 작물의 오염을 방지하기 위하여 10회 이상 충분히 수세, 건조하여 균질하게 분쇄한다.

가공식품의 경우에는 대상 작물을 선별하여 사용하며, 이의 구별하기 어렵거나 혼합된 형태의 검체는 전체를 균질하게 분쇄, 혼합하여 사용할 수 있다.

○ DNA 추출 및 정제

DNA 추출·정제법으로는 계면활성제인 세틸트리메틸암모늄브로마이드(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB)와 페놀-클로로포름 혼합액을 사용하여 DNA를 추출·정제하는 CTAB법과 실리카겔 막 형태, 실리카를 베이스로 한 레진 형태 및 자기흡착 비드 형태 등과 같은 DNA 추출 키트를 이용하는 방법이 있다.

CTAB법은 적용범위가 넓고 PCR의 저해물질이 남을 가능성이 적어 순도 높은 DNA를 얻을 수 있는 방법이며, 시판하고 있는 DNA 추출 키트는 적용 범위가 한정되는 경우가 있어 가공식품의 유형에 따라 적용 가능 여부를 별도로 확인할 필요가 있다.

DNA를 추출·정제 시 하나의 분석 검체로부터 적정량을 2회 칭량하여 동시에 추출하고, 추출한 DNA는 적절히 희석하거나 농축하여 시험에 사용한다.

○ 시약 및 시액

유전자변형 밀 MON71800의 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브는 표 1과 같으며, 이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 프라이머, 프로브 및 시약을 사용할 수도 있다.

○ 반응액의 조제

표 1의 프라이머 및 프로브를 사용하면서 PCR 반응액의 총량을 25 μL로 할 경우 PCR 반응액 조성은 표 2, 4와 같다. 다만, PCR 반응액 조성은 프라이머, 프로브와 시약 및 PCR 기기 등에 따라 다를 수 있으므로 시약이나 기기의 사용 매뉴얼을 참고하여 적용한다.

표 1. 유전자변형 밀 MON71800 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브 정보

구분	품목 (증폭산물크기, 반응 온도)	프라이머 프로브	염기서열 (5' → 3')	농도 (nM)
내재	밀 acc (102 bp, 59℃)	WACC-KF WACC-KR	GGA GGC ATG CTT CGC TGT CT CTG CTG CCA TTC CAT TGT TC	400 400
	밀 acc (94 bp, 59℃)	WACC-Rf WACC-KR WACC-p	GCT TCG CTG TCT AAG GTT GT CTG CTG CCA TTC CAT TGT TC FAM-CGG CAA AAC ACC AAT TCA CA-TAMRA	500 500 300
구조	MON71800 (156 bp, 59℃)	M71800-KF M71800-KR	CTC CGA TGA AGT GTG AGT AG CCC CAT TTG GAC GTG AAT GT	400 400
	MON71800 (90 bp, 59℃)	M71800-Rf M71800-Rr M71800-p	CTT CTC TCT CTT TGA ATC TCA ATA C CCA TTT GGA CGT GAA TGT AGA CAC FAM-CCC TCT CTA ATT CGG AAA TC-TAMRA	500 500 500

표 2. 일반 PCR 반응액 조성

성분	Stock 용액 농도	최종농도 (well)	1회 분량 (μL)
DNA polymerase	5 U/μL	0.625 U	0.125
완충액	10×	1×	2.5
$MgCl_2$	25 mM	1.5 mM	1.5
dNTPs	2.5 mM	200 μM	2.0
프라이머	각 25 μM	표 1 참조	
주형 DNA	10 ng/μL	50 ng	5.0
멸균증류수	반응 총액이 25 μL가 되도록 첨가		
전체량			25.0

표 3. 일반 PCR 반응조건

단계	온도(℃)	시간	cycle 수
초기변성(Initial denaturation)	95	10분	1 cycle
변성(denaturation)	95	30초	40 cycles
결합(annealing)	표 1 참조	30초	
신장(extension)	72	30초	
최종신장(elongation)	72	7분	1 cycle
보존	4	-	-

표 4. 실시간 PCR 반응액 조성

성분	Stock 용액 농도	최종농도 (well)	1회 분량 (μL)
Universal Master Mix	2×	1×	12.5
프라이머	각 25 μM	표 1 참조	
프로브	10 μM		
주형 DNA	20 ng/μL	100 ng	5.0
멸균증류수	반응 총액이 25 μL가 되도록 첨가		
전체량			25.0

표 5. 실시간 PCR 반응조건

단계	온도(℃)	시간	cycle 수
전반응(Pre-PCR incubation)	50	2분	1 cycle
초기변성(Initial denaturation)	95	10분	1 cycle
증폭(Amplification)	95	15초	45 cycles
	표 1 참조	1분	

○ **시험조작**

각 추출 DNA에 대한 PCR은 내재유전자와 도입된 구조유전자에 대한 프라이머 및 프로브로 실시하며, 이때 일반 PCR을 사용하는 경우에는 추출 DNA에 대하여 1회 이상, 실시간 PCR의 경우에는 추출 DNA에 대하여 3회 이상 반복하여 시험한다. 각 PCR 반응 시에는 음성대조구로 주형 DNA 대신 멸균증류수를 사용한 것(NTC, no template control)을, 양성대조구로 비유전자변형(non-GMO) DNA를 함유한 것(동일 작물로서 GMO 0%(w/w) 표준시료에서 추출한 DNA 등)과 검출하고자 하는 유전자변형 DNA를 함유한 것(동일 작물로서 분석 대상 GMO를 포함하는 표준시료에서 추출한 DNA 또는 표준플라스미드 등)을 시료와 함께 시험한다. PCR 반응조건은 대상별 반응조건을 참고하여 사용하는 기기 등에 따라 최적 조건으로 변형하여 사용할 수 있으며, 기기 제조사에 별도 문의하여 적용한다.

○ **분석결과의 해석 및 판정**

- 일반 PCR

식품공전 중 유전자변형식품의 시험법에 따라 전기영동을 실시하여 각 프라이머에 특이적인 PCR 증폭산물의 크기를 확인한다.

2회 반복 추출 DNA에 대한 PCR 결과, 확인시험에 의해 내재유전자와 도입된 구조유전자 특이

증폭산물이 모두 확인된 경우 '검출'로 판정하고, 내재유전자의 증폭산물은 모두 확인되나 구조유전자 특이 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 '불검출'로 판정하며, 2회 반복 추출 DNA에서 모두 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 DNA 추출 과정부터 다시 반복시험하고, 반복시험 후에도 동일하게 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않는 경우 '검사불능'으로 판정한다(표 6).

- 실시간 PCR

PCR이 완료된 후 데이터의 자동 분석 과정을 통해서 threshold line[19]과 Ct값[20]을 구하며, 하나의 추출 DNA에 대하여 3회 반복 시험한 결과, 적어도 2회 이상의 결과 값이 43 미만의 Ct값을 가지고 형광강도가 지수함수적인 증폭이 확인되는 경우를 데이터로서 이용한다.

2회 반복 추출 DNA에 대한 PCR 결과, 확인시험에 의해 내재유전자와 도입된 구조유전자 특이 증폭산물이 모두 확인된 경우 '검출'로 판정하고, 내재유전자의 증폭산물은 모두 확인되나 구조유전자 특이 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 '불검출'로 판정하며, 2회 반복 추출 DNA에서 모두 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 DNA 추출 과정부터 다시 반복시험하고, 반복시험 후에도 동일하게 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않는 경우 '검사불능'으로 판정한다(표 6).

표 6. 결과 판정의 흐름도(예시)

사례	추출 DNA	결과 분석		GMO 여부 판정
		내재유전자	구조유전자	
사례 1	추출 1	+	+	검출(부적합)
	추출 2	+	+	
사례 2	추출 1	+	-	불검출(적합)
	추출 2	+	-	
사례 3*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	+	-	
사례 4*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	-	/	
사례 5*	추출 1	+	-	재시험
	추출 2	-	/	
사례 6*	추출 1	-	/	검사 불능
	추출 2	-	/	

+ : 목적 유전자의 증폭이 확인됨, - : 목적 유전자의 증폭이 확인되지 않음, / : 시험이 불필요함
* 사례 3~6의 경우 DNA를 추가 추출하여 PCR 시험함

19) threshold line: 분석하고자 하는 유전자의 증폭곡선이 지수함수적으로 증가하는 부분
20) Ct: threshold line과 시료의 증폭곡선과의 교차점에서 구해진 PCR cycle

11) 유전자변형 사탕수수 CTC175-A 시험법

사탕수수 또는 그 가공식품에 대하여 국내에서 안전성을 승인받지 않아 식품위생법 제4조에 의해 수입 및 유통 등이 금지된 유전자변형 사탕수수 CTC175-A을 검출하기 위한 시험법이다.

○ 검체의 전처리

식품공전 『10.1. 유전자변형식품의 시험법』 중 『10.1.1 검체의 전처리』에 따라 처리한 후 사용하되, 원곡의 경우 다른 작물의 오염을 방지하기 위하여 10회 이상 충분히 수세, 건조하여 균질하게 분쇄한다.

가공식품의 경우에는 대상 작물을 선별하여 사용하며, 이의 구별하기 어렵거나 혼합된 형태의 검체는 전체를 균질하게 분쇄, 혼합하여 사용할 수 있다.

○ DNA 추출 및 정제

DNA 추출·정제법으로는 계면활성제인 세틸트리메틸암모늄브로마이드(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB)와 페놀-클로로포름 혼합액을 사용하여 DNA를 추출·정제하는 CTAB법과 실리카겔 막 형태, 실리카를 베이스로 한 레진 형태 및 자기흡착 비드 형태 등과 같은 DNA 추출 키트를 이용하는 방법이 있다.

CTAB법은 적용범위가 넓고 PCR의 저해물질이 남을 가능성이 적어 순도 높은 DNA를 얻을 수 있는 방법이며, 시판하고 있는 DNA 추출 키트는 적용 범위가 한정되는 경우가 있어 가공식품의 유형에 따라 적용 가능 여부를 별도로 확인할 필요가 있다.

DNA를 추출·정제 시 하나의 분석 검체로부터 적정량을 2회 칭량하여 동시에 추출하고, 추출한 DNA는 적절히 희석하거나 농축하여 시험에 사용한다.

○ 시약 및 시액

유전자변형 사탕수수 CTC175-A의 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브는 표 1과 같으며, 이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 프라이머, 프로브 및 시약을 사용할 수도 있다.

○ 반응액의 조제

표 1의 프라이머 및 프로브를 사용하면서 PCR 반응액의 총량을 25 μL로 할 경우 PCR 반응액 조성은 표 2와 같다. 다만, PCR 반응액 조성은 프라이머, 프로브와 시약 및 PCR 기기 등에 따라 다를 수 있으므로 시약이나 기기의 사용 매뉴얼을 참고하여 적용한다.

표 1. 유전자변형 사탕수수 CTC175-A 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브 정보

구분	품목 (증폭산물크기, 반응 온도)	프라이머 프로브	염기서열 (5' → 3')	농도 (nM)
내재	사탕수수 내재 (88 bp, 61℃)	PUBI-F PUBI-R PUBI-P	ACC ATT ACC CTG GAG GTT GAG A GTC CTG GAT CTT CGC CTT CA VIC-CTC TGA CAC CAT CGA C-MGB	300 300 200
구조	CTC175-A (107 bp, 61℃)	CTC175A-F CTC175A-R CTC175A-P	CAT CTA TGT TAC TAG ATC GGC GC GCA CTG GCA TAA ATA AGC CTG TAG FAM-ATC GAG CTC CCC CAA C-MGB	300 300 200

표 2. 실시간 PCR 반응액 조성

성분	Stock 용액 농도	최종농도 (well)	1회 분량 (μL)
Universal Master Mix	2×	1×	12.5
프라이머	각 25 μM	표 1 참조	
프로브	10 μM		
주형 DNA	20 ng/μL	100 ng	5.0
멸균증류수	반응 총액이 25 μL가 되도록 첨가		
전체량			25.0

표 3. 실시간 PCR 반응조건

단계	온도(℃)	시간	cycle 수
전반응(Pre-PCR incubation)	50	2분	1 cycle
초기변성(Initial denaturation)	95	10분	1 cycle
증폭(Amplification)	95	15초	45 cycles
	표 1 참조	1분	

○ **시험조작**

각 추출 DNA에 대한 PCR은 내재유전자와 도입된 구조유전자에 대한 프라이머 및 프로브로 실시하며, 추출 DNA에 대하여 3회 이상 반복하여 시험한다. PCR 반응 시에는 음성대조구로 주형 DNA 대신 멸균증류수를 사용한 것(NTC, no template control)을, 양성대조구로 비유전자변형(non-GMO) DNA를 함유한 것(동일 작물로서 GMO 0%(w/w) 표준시료에서 추출한 DNA 등)과 검출하고자 하는 유전자변형 DNA를 함유한 것(동일 작물로서 분석 대상 GMO를 포함하는 표준시료에서 추출한 DNA 또는 표준플라스미드 등)을 시료와 함께 시험한다. PCR 반응조건은 대상별 반응조건을 참고하여 사용하는 기기 등에 따라 최적 조건으로 변형하여 사용할 수 있으며, 기기

제조사에 별도 문의하여 적용한다.

○ 분석결과의 해석 및 판정

PCR이 완료된 후 데이터의 자동 분석 과정을 통해서 threshold line[21]과 Ct값[22]을 구하며, 하나의 추출 DNA에 대하여 3회 반복 시험한 결과, 적어도 2회 이상의 결과 값이 43 미만의 Ct값을 가지고 형광강도가 지수함수적인 증폭이 확인되는 경우를 데이터로서 이용한다.

2회 반복 추출 DNA에 대한 PCR 결과, 확인시험에 의해 내재유전자와 도입된 구조유전자 특이 증폭산물이 모두 확인된 경우 '검출'로 판정하고, 2회 반복 추출 DNA에 대하여 내재유전자의 증폭산물은 모두 확인되나 구조유전자 특이 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 '불검출'로 판정한다.

2회 반복 추출 DNA에서 모두 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 DNA 추출 과정부터 다시 반복 시험하고, 반복시험 후에도 동일하게 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않는 경우 '검사불능'으로 판정한다(표 4).

표 4. 결과 판정의 흐름도(예시)

사례	추출 DNA	결과 분석		GMO 여부 판정
		내재유전자	구조유전자	
사례 1	추출 1	+	+	검출(부적합)
	추출 2	+	+	
사례 2	추출 1	+	-	불검출(적합)
	추출 2	+	-	
사례 3*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	+	-	
사례 4*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	-	/	
사례 5*	추출 1	+	-	재시험
	추출 2	-	/	
사례 6*	추출 1	-	/	검사 불능
	추출 2	-	/	

+ : 목적 유전자의 증폭이 확인됨, - : 목적 유전자의 증폭이 확인되지 않음, / : 시험이 불필요함
* 사례 3~6의 경우 DNA를 추가 추출하여 PCR 시험함

21) threshold line: 분석하고자 하는 유전자의 증폭곡선이 지수함수적으로 증가하는 부분
22) Ct: threshold line과 시료의 증폭곡선과의 교차점에서 구해진 PCR cycle

12) 유전자변형 쌀 Bt63 시험법

쌀 또는 그 가공식품에 대하여 국내에서 안전성을 승인받지 않아 식품위생법 제4조에 의해 수입 및 유통 등이 금지된 유전자변형 쌀 Bt63을 검출하기 위한 시험법이다.

○ 검체의 전처리

식품공전 『10.1. 유전자변형식품의 시험법』 중 『10.1.1 검체의 전처리』에 따라 처리한 후 사용하되, 원곡의 경우 다른 작물의 오염을 방지하기 위하여 10회 이상 충분히 수세, 건조하여 균질하게 분쇄한다.

가공식품의 경우에는 대상 작물을 선별하여 사용하며, 이의 구별하기 어렵거나 혼합된 형태의 검체는 전체를 균질하게 분쇄, 혼합하여 사용할 수 있다.

○ DNA 추출 및 정제

DNA 추출·정제법으로는 계면활성제인 세틸트리메틸암모늄브로마이드(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB)와 페놀-클로로포름 혼합액을 사용하여 DNA를 추출·정제하는 CTAB법과 실리카겔 막 형태, 실리카를 베이스로 한 레진 형태 및 자기흡착 비드 형태 등과 같은 DNA 추출 키트를 이용하는 방법이 있다.

CTAB법은 적용범위가 넓고 PCR의 저해물질이 남을 가능성이 적어 순도 높은 DNA를 얻을 수 있는 방법이며, 시판하고 있는 DNA 추출 키트는 적용 범위가 한정되는 경우가 있어 가공식품의 유형에 따라 적용 가능 여부를 별도로 확인할 필요가 있다.

DNA를 추출·정제 시 하나의 분석 검체로부터 적정량을 2회 칭량하여 동시에 추출하고, 추출한 DNA는 적절히 희석하거나 농축하여 시험에 사용한다.

○ 시약 및 시액

유전자변형 쌀 Bt63의 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브는 표 1과 같으며, 이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 프라이머, 프로브 및 시약을 사용할 수도 있다.

○ 반응액의 조제

표 1의 프라이머 및 프로브를 사용하면서 PCR 반응액의 총량을 25 μL로 할 경우 PCR 반응액 조성은 표 2, 4와 같다. 다만, PCR 반응액 조성은 프라이머, 프로브와 시약 및 PCR 기기 등에 따라 다를 수 있으므로 시약이나 기기의 사용 매뉴얼을 참고하여 적용한다.

표 1. 유전자변형 쌀 Bt63의 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브 정보

구분	품목 (증폭산물크기, 반응 온도)	프라이머 프로브	염기서열 (5' → 3')	농도 (nM)
내재	SPS (110 bp, 62℃)	OsSPS-F	GAT CGG TTC CGC CAT TAG CA	300
		OsSPS-R	AAC CGA GCG CGA TCA CTT GC	300
	SPS (79 bp, 60℃)	OsSPS-F	GAT CGG TTC CGC CAT TAG CA	500
		OsSPS-KRr	GAT CGC CGG TTA ATC GCT TC	500
		SPS-p	FAM-TCT CGA TCG AAC AGG GGT AG-TAMRA	200
구조	Bt63 (145 bp, 62℃)	Bt63-KF	CGC GCC ACA TAG CAG AAC TT	400
		Bt63-KR	CAC TCG TCC GGG ATC CTC TA	400
	Bt63 (76 bp, 60℃)	Bt63-KF	CGC GCC ACA TAG CAG AAC TT	500
		Bt63-KRr	ATC AAT GGC CGC ATA ACA GC	500
		Bt63-p	FAM-AAC ATC GCC TCG CTC CAG TC-TAMRA	300

표 2. 일반 PCR 반응액 조성

성분	Stock 용액 농도	최종농도 (well)	1회 분량 (μL)
DNA polymerase	5 U/μL	0.625 U	0.125
완충액	10×	1×	2.5
$MgCl_2$	25 mM	1.5 mM	1.5
dNTPs	2.5 mM	200 μM	2.0
프라이머	각 25 μM	표 1 참조	
주형 DNA	10 ng/μL	50 ng	5.0
멸균증류수	반응 총액이 25 μL가 되도록 첨가		
전체량			25.0

표 3. 일반 PCR 반응조건

단계	온도(℃)	시간	cycle 수
초기변성(Initial denaturation)	95	10분	1 cycle
변성(denaturation)	95	30초	40 cycles
결합(annealing)	표 1 참조	30초	
신장(extension)	72	30초	
최종신장(elongation)	72	7분	1 cycle
보존	4	-	-

표 4. 실시간 PCR 반응액 조성

성분	Stock 용액 농도	최종농도 (well)	1회 분량 (μL)
Universal Master Mix	2×	1×	12.5
프라이머	각 25 μM	표 1 참조	
프로브	10 μM		
주형 DNA	20 ng/μL	100 ng	5.0
멸균증류수	반응 총액이 25 μL가 되도록 첨가		
전체량			25.0

표 5. 실시간 PCR 반응조건

단계	온도(℃)	시간	cycle 수
전반응(Pre-PCR incubation)	50	2분	1 cycle
초기변성(Initial denaturation)	95	10분	1 cycle
증폭(Amplification)	95	15초	45 cycles
	표 1 참조	1분	

○ **시험조작**

각 추출 DNA에 대한 PCR은 내재유전자와 도입된 구조유전자에 대한 프라이머 및 프로브로 실시하며, 이때 일반 PCR을 사용하는 경우에는 추출 DNA에 대하여 1회 이상, 실시간 PCR의 경우에는 추출 DNA에 대하여 3회 이상 반복하여 시험한다. 각 PCR 반응 시에는 음성대조구로 주형 DNA 대신 멸균증류수를 사용한 것(NTC, no template control)을, 양성대조구로 비유전자변형(non-GMO) DNA를 함유한 것(동일 작물로서 GMO 0%(w/w) 표준시료에서 추출한 DNA 등)과 검출하고자 하는 유전자변형 DNA를 함유한 것(동일 작물로서 분석 대상 GMO를 포함하는 표준시료에서 추출한 DNA 또는 표준플라스미드 등)을 시료와 함께 시험한다. PCR 반응조건은 대상별 반응조건을 참고하여 사용하는 기기 등에 따라 최적 조건으로 변형하여 사용할 수 있으며, 기기 제조사에 별도 문의하여 적용한다.

○ **분석결과의 해석 및 판정**

- 일반 PCR

식품공전 중 유전자변형식품의 시험법에 따라 전기영동을 실시하여 각 프라이머에 특이적인 PCR 증폭산물의 크기를 확인한다.

2회 반복 추출 DNA에 대한 PCR 결과, 확인시험에 의해 내재유전자와 도입된 구조유전자 특이

증폭산물이 모두 확인된 경우 '검출'로 판정하고, 내재유전자의 증폭산물은 모두 확인되나 구조유전자 특이 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 '불검출'로 판정하며, 2회 반복 추출 DNA에서 모두 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 DNA 추출 과정부터 다시 반복시험하고, 반복시험 후에도 동일하게 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않는 경우 '검사불능'으로 판정한다(표 6).

- 실시간 PCR

PCR이 완료된 후 데이터의 자동 분석 과정을 통해서 threshold line[23]과 Ct값[24]을 구하며, 하나의 추출 DNA에 대하여 3회 반복 시험한 결과, 적어도 2회 이상의 결과 값이 43 미만의 Ct값을 가지고 형광강도가 지수함수적인 증폭이 확인되는 경우를 데이터로서 이용한다.

2회 반복 추출 DNA에 대한 PCR 결과, 확인시험에 의해 내재유전자와 도입된 구조유전자 특이 증폭산물이 모두 확인된 경우 '검출'로 판정하고, 내재유전자의 증폭산물은 모두 확인되나 구조유전자 특이 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 '불검출'로 판정하며, 2회 반복 추출 DNA에서 모두 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 DNA 추출 과정부터 다시 반복시험하고, 반복시험 후에도 동일하게 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않는 경우 '검사불능'으로 판정한다(표 6).

표 6. 결과 판정의 흐름도(예시)

사례	추출 DNA	결과 분석		GMO 여부 판정
		내재유전자	구조유전자	
사례 1	추출 1	+	+	검출(부적합)
	추출 2	+	+	
사례 2	추출 1	+	-	불검출(적합)
	추출 2	+	-	
사례 3*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	+	-	
사례 4*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	-	/	
사례 5*	추출 1	+	-	재시험
	추출 2	-	/	
사례 6*	추출 1	-	/	검사 불능
	추출 2	-	/	

+ : 목적 유전자의 증폭이 확인됨, - : 목적 유전자의 증폭이 확인되지 않음, / : 시험이 불필요함
* 사례 3~6의 경우 DNA를 추가 추출하여 PCR 시험함

23) threshold line: 분석하고자 하는 유전자의 증폭곡선이 지수함수적으로 증가하는 부분
24) Ct: threshold line과 시료의 증폭곡선과의 교차점에서 구해진 PCR cycle

13) 유전자변형 쌀 LLRice62 시험법

쌀 또는 그 가공식품에 대하여 국내에서 안전성을 승인받지 않아 식품위생법 제4조에 의해 수입 및 유통 등이 금지된 유전자변형 쌀 LLRice62을 검출하기 위한 시험법이다.

○ 검체의 전처리

식품공전 『10.1. 유전자변형식품의 시험법』 중 『10.1.1 검체의 전처리』에 따라 처리한 후 사용하되, 원곡의 경우 다른 작물의 오염을 방지하기 위하여 10회 이상 충분히 수세, 건조하여 균질하게 분쇄한다.

가공식품의 경우에는 대상 작물을 선별하여 사용하며, 이의 구별하기 어렵거나 혼합된 형태의 검체는 전체를 균질하게 분쇄, 혼합하여 사용할 수 있다.

○ DNA 추출 및 정제

DNA 추출·정제법으로는 계면활성제인 세틸트리메틸암모늄브로마이드(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB)와 페놀-클로로포름 혼합액을 사용하여 DNA를 추출·정제하는 CTAB법과 실리카겔 막 형태, 실리카를 베이스로 한 레진 형태 및 자기흡착 비드 형태 등과 같은 DNA 추출 키트를 이용하는 방법이 있다.

CTAB법은 적용범위가 넓고 PCR의 저해물질이 남을 가능성이 적어 순도 높은 DNA를 얻을 수 있는 방법이며, 시판하고 있는 DNA 추출 키트는 적용 범위가 한정되는 경우가 있어 가공식품의 유형에 따라 적용 가능 여부를 별도로 확인할 필요가 있다.

DNA를 추출·정제 시 하나의 분석 검체로부터 적정량을 2회 칭량하여 동시에 추출하고, 추출한 DNA는 적절히 희석하거나 농축하여 시험에 사용한다.

○ 시약 및 시액

유전자변형 쌀 LLRice62의 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브는 표 1과 같으며, 이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 프라이머, 프로브 및 시약을 사용할 수도 있다.

○ 반응액의 조제

표 1의 프라이머 및 프로브를 사용하면서 PCR 반응액의 총량을 25 μL로 할 경우 PCR 반응액 조성은 표 2, 4와 같다. 다만, PCR 반응액 조성은 프라이머, 프로브와 시약 및 PCR 기기 등에 따라 다를 수 있으므로 시약이나 기기의 사용 매뉴얼을 참고하여 적용한다.

표 1. 유전자변형 쌀 LLRice62의 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브 정보

구분	품목 (증폭산물크기, 반응 온도)	프라이머 프로브	염기서열 (5' → 3')	농도 (nM)
내재	SPS (110 bp, 62℃)	OsSPS-F OsSPS-R	GAT CGG TTC CGC CAT TAG CA AAC CGA GCG CGA TCA CTT GC	300 300
	SPS (79 bp, 60℃)	OsSPS-F OsSPS-KRr SPS-p	GAT CGG TTC CGC CAT TAG CA GAT CGC CGG TTA ATC GCT TC FAM-TCT CGA TCG AAC AGG GGT AG-TAMRA	500 500 200
구조	LLRice62 (133 bp, 62℃)	LL62-KF LL62-KR	AAC ACG CAC ACT CAC CTA CT CAG CTG GCG TAA TAG CGA AG	400 400
	LLRice62 (89 bp, 60℃)	LL62-KFr LL62-KR LL62-p	TGC TAA CGG GTG CAT CGT CT CAG CTG GCG TAA TAG CGA AG FAM-GTA TAA ATA ATC GGT GCG GGC-TAMRA	500 500 200

표 2. 일반 PCR 반응액 조성

성분	Stock 용액 농도	최종농도 (well)	1회 분량 (μL)
DNA polymerase	5 U/μL	0.625 U	0.125
완충액	10×	1×	2.5
$MgCl_2$	25 mM	1.5 mM	1.5
dNTPs	2.5 mM	200 μM	2.0
프라이머	각 25 μM	표 1 참조	
주형 DNA	10 ng/μL	50 ng	5.0
멸균증류수	반응 총액이 25 μL가 되도록 첨가		
전체량			25.0

표 3. 일반 PCR 반응조건

단계	온도(℃)	시간	cycle 수
초기변성(Initial denaturation)	95	10분	1 cycle
변성(denaturation)	95	30초	40 cycles
결합(annealing)	표 1 참조	30초	
신장(extension)	72	30초	
최종신장(elongation)	72	7분	1 cycle
보존	4	-	-

표 4. 실시간 PCR 반응액 조성

성분	Stock 용액 농도	최종농도 (well)	1회 분량 (μL)
Universal Master Mix	2×	1×	12.5
프라이머	각 25 μM	표 1 참조	
프로브	10 μM		
주형 DNA	20 ng/μL	100 ng	5.0
멸균증류수	반응 총액이 25 μL가 되도록 첨가		
전체량			25.0

표 5. 실시간 PCR 반응조건

단계	온도(℃)	시간	cycle 수
전반응(Pre-PCR incubation)	50	2분	1 cycle
초기변성(Initial denaturation)	95	10분	1 cycle
증폭(Amplification)	95	15초	45 cycles
	표 1 참조	1분	

○ **시험조작**

각 추출 DNA에 대한 PCR은 내재유전자와 도입된 구조유전자에 대한 프라이머 및 프로브로 실시하며, 이때 일반 PCR을 사용하는 경우에는 추출 DNA에 대하여 1회 이상, 실시간 PCR의 경우에는 추출 DNA에 대하여 3회 이상 반복하여 시험한다. 각 PCR 반응 시에는 음성대조구로 주형 DNA 대신 멸균증류수를 사용한 것(NTC, no template control)을, 양성대조구로 비유전자변형(non-GMO) DNA를 함유한 것(동일 작물로서 GMO 0%(w/w) 표준시료에서 추출한 DNA 등)과 검출하고자 하는 유전자변형 DNA를 함유한 것(동일 작물로서 분석 대상 GMO를 포함하는 표준시료에서 추출한 DNA 또는 표준플라스미드 등)을 시료와 함께 시험한다. PCR 반응조건은 대상별 반응조건을 참고하여 사용하는 기기 등에 따라 최적 조건으로 변형하여 사용할 수 있으며, 기기 제조사에 별도 문의하여 적용한다.

○ **분석결과의 해석 및 판정**

- 일반 PCR

식품공전 중 유전자변형식품의 시험법에 따라 전기영동을 실시하여 각 프라이머에 특이적인 PCR 증폭산물의 크기를 확인한다.

2회 반복 추출 DNA에 대한 PCR 결과, 확인시험에 의해 내재유전자와 도입된 구조유전자 특이

증폭산물이 모두 확인된 경우 '검출'로 판정하고, 내재유전자의 증폭산물은 모두 확인되나 구조유전자 특이 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 '불검출'로 판정하며, 2회 반복 추출 DNA에서 모두 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 DNA 추출 과정부터 다시 반복시험하고, 반복시험 후에도 동일하게 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않는 경우 '검사불능'으로 판정한다(표 6).

- 실시간 PCR

PCR이 완료된 후 데이터의 자동 분석 과정을 통해서 threshold line[25]과 Ct값[26]을 구하며, 하나의 추출 DNA에 대하여 3회 반복 시험한 결과, 적어도 2회 이상의 결과 값이 43 미만의 Ct값을 가지고 형광강도가 지수함수적인 증폭이 확인되는 경우를 데이터로서 이용한다.

2회 반복 추출 DNA에 대한 PCR 결과, 확인시험에 의해 내재유전자와 도입된 구조유전자 특이 증폭산물이 모두 확인된 경우 '검출'로 판정하고, 내재유전자의 증폭산물은 모두 확인되나 구조유전자 특이 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 '불검출'로 판정하며, 2회 반복 추출 DNA에서 모두 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 DNA 추출 과정부터 다시 반복시험하고, 반복시험 후에도 동일하게 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않는 경우 '검사불능'으로 판정한다(표 6).

표 6. 결과 판정의 흐름도(예시)

사례	추출 DNA	결과 분석		GMO 여부 판정
		내재유전자	구조유전자	
사례 1	추출 1	+	+	검출(부적합)
	추출 2	+	+	
사례 2	추출 1	+	-	불검출(적합)
	추출 2	+	-	
사례 3*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	+	-	
사례 4*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	-	/	
사례 5*	추출 1	+	-	재시험
	추출 2	-	/	
사례 6*	추출 1	-	/	검사 불능
	추출 2	-	/	

+ : 목적 유전자의 증폭이 확인됨, - : 목적 유전자의 증폭이 확인되지 않음, / : 시험이 불필요함
* 사례 3~6의 경우 DNA를 추가 추출하여 PCR 시험함

25) threshold line: 분석하고자 하는 유전자의 증폭곡선이 지수함수적으로 증가하는 부분
26) Ct: threshold line과 시료의 증폭곡선과의 교차점에서 구해진 PCR cycle

14) 유전자변형 쌀 LLRice601 시험법

쌀 또는 그 가공식품에 대하여 국내에서 안전성을 승인받지 않아 식품위생법 제4조에 의해 수입 및 유통 등이 금지된 유전자변형 쌀 LLRice601을 검출하기 위한 시험법이다.

○ 검체의 전처리

식품공전 『10.1. 유전자변형식품의 시험법』 중 『10.1.1 검체의 전처리』에 따라 처리한 후 사용하되, 원곡의 경우 다른 작물의 오염을 방지하기 위하여 10회 이상 충분히 수세, 건조하여 균질하게 분쇄한다.

가공식품의 경우에는 대상 작물을 선별하여 사용하며, 이의 구별하기 어렵거나 혼합된 형태의 검체는 전체를 균질하게 분쇄, 혼합하여 사용할 수 있다.

○ DNA 추출 및 정제

DNA 추출·정제법으로는 계면활성제인 세틸트리메틸암모늄브로마이드(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB)와 페놀-클로로포름 혼합액을 사용하여 DNA를 추출·정제하는 CTAB법과 실리카겔 막 형태, 실리카를 베이스로 한 레진 형태 및 자기흡착 비드 형태 등과 같은 DNA 추출 키트를 이용하는 방법이 있다.

CTAB법은 적용범위가 넓고 PCR의 저해물질이 남을 가능성이 적어 순도 높은 DNA를 얻을 수 있는 방법이며, 시판하고 있는 DNA 추출 키트는 적용 범위가 한정되는 경우가 있어 가공식품의 유형에 따라 적용 가능 여부를 별도로 확인할 필요가 있다.

DNA를 추출·정제 시 하나의 분석 검체로부터 적정량을 2회 칭량하여 동시에 추출하고, 추출한 DNA는 적절히 희석하거나 농축하여 시험에 사용한다.

○ 시약 및 시액

유전자변형 쌀 LLRice601의 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브는 표 1과 같으며, 이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 프라이머, 프로브 및 시약을 사용할 수도 있다.

○ 반응액의 조제

표 1의 프라이머 및 프로브를 사용하면서 PCR 반응액의 총량을 25 μL로 할 경우 PCR 반응액 조성은 표 2와 같다. 다만, PCR 반응액 조성은 프라이머, 프로브와 시약 및 PCR 기기 등에 따라 다를 수 있으므로 시약이나 기기의 사용 매뉴얼을 참고하여 적용한다.

표 1. 유전자변형 쌀 LLRice601의 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브 정보

구분	품목 (증폭산물크기, 반응 온도)	프라이머 프로브	염기서열 (5' → 3')	농도 (nM)
내재	SPS (79 bp, 60℃)	OsSPS-F OsSPS-KRr SPS-p	GAT CGG TTC CGC CAT TAG CA GAT CGC CGG TTA ATC GCT TC FAM-TCT CGA TCG AAC AGG GGT AG-TAMRA	500 500 200
구조	LLRice601 (66 bp, 60℃)	SHA040 SHA041 TM098	TCT AGG ATC CGA AGC AGA TCG T GGA GGG CGC GGA GTG T FAM-CCA CCT CCC AAC AAT AAA AGC GCC TG-TAMRA	500 500 200

표 2. 실시간 PCR 반응액 조성

성분	Stock 용액 농도	최종농도 (well)	1회 분량 (μL)
Universal Master Mix	2×	1×	12.5
프라이머	각 25 μM	표 1 참조	
프로브	10 μM		
주형 DNA	20 ng/μL	100 ng	5.0
멸균증류수	반응 총액이 25 μL가 되도록 첨가		
전체량			25.0

표 3. 실시간 PCR 반응조건

단계	온도(℃)	시간	cycle 수
전반응(Pre-PCR incubation)	50	2분	1 cycle
초기변성(Initial denaturation)	95	10분	1 cycle
증폭(Amplification)	95	15초	45 cycles
	표 1 참조	1분	

○ **시험조작**

각 추출 DNA에 대한 PCR은 내재유전자와 도입된 구조유전자에 대한 프라이머 및 프로브로 실시하며, 추출 DNA에 대하여 3회 이상 반복하여 시험한다. PCR 반응 시에는 음성대조구로 주형 DNA 대신 멸균증류수를 사용한 것(NTC, no template control)을, 양성대조구로 비유전자변형(non-GMO) DNA를 함유한 것(동일 작물로서 GMO 0%(w/w) 표준시료에서 추출한 DNA 등)과 검출하고자 하는 유전자변형 DNA를 함유한 것(동일 작물로서 분석 대상 GMO를 포함하는 표준시료에서 추출한 DNA 또는 표준플라스미드 등)을 시료와 함께 시험한다. PCR 반응조건은 대상별 반응조건을 참고하여 사용하는 기기 등에 따라 최적 조건으로 변형하여 사용할 수 있으며, 기기

제조사에 별도 문의하여 적용한다.

○ 분석결과의 해석 및 판정

PCR이 완료된 후 데이터의 자동 분석 과정을 통해서 threshold line[27]과 Ct값[28]을 구하며, 하나의 추출 DNA에 대하여 3회 반복 시험한 결과, 적어도 2회 이상의 결과 값이 43 미만의 Ct값을 가지고 형광강도가 지수함수적인 증폭이 확인되는 경우를 데이터로서 이용한다.

2회 반복 추출 DNA에 대한 PCR 결과, 확인시험에 의해 내재유전자와 도입된 구조유전자 특이 증폭산물이 모두 확인된 경우 '검출'로 판정하고, 2회 반복 추출 DNA에 대하여 내재유전자의 증폭산물은 모두 확인되나 구조유전자 특이 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 '불검출'로 판정한다.

2회 반복 추출 DNA에서 모두 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 DNA 추출 과정부터 다시 반복 시험하고, 반복시험 후에도 동일하게 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않는 경우 '검사불능'으로 판정한다(표 4).

표 4. 결과 판정의 흐름도(예시)

사례	추출 DNA	결과 분석		GMO 여부 판정
		내재유전자	구조유전자	
사례 1	추출 1	+	+	검출(부적합)
	추출 2	+	+	
사례 2	추출 1	+	-	불검출(적합)
	추출 2	+	-	
사례 3*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	+	-	
사례 4*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	-	/	
사례 5*	추출 1	+	-	재시험
	추출 2	-	/	
사례 6*	추출 1	-	/	검사 불능
	추출 2	-	/	

+ : 목적 유전자의 증폭이 확인됨, - : 목적 유전자의 증폭이 확인되지 않음, / : 시험이 불필요함
* 사례 3~6의 경우 DNA를 추가 추출하여 PCR 시험함

27) threshold line: 분석하고자 하는 유전자의 증폭곡선이 지수함수적으로 증가하는 부분
28) Ct: threshold line과 시료의 증폭곡선과의 교차점에서 구해진 PCR cycle

15) 유전자변형 아마 FP967시험법

아마 또는 그 가공식품에 대하여 국내에서 안전성을 승인받지 않아 식품위생법 제4조에 의해 수입 및 유통 등이 금지된 유전자변형 아마 FP967을 검출하기 위한 시험법이다.

○ 검체의 전처리

식품공전 『10.1. 유전자변형식품의 시험법』 중 『10.1.1 검체의 전처리』에 따라 처리한 후 사용하되, 원곡의 경우 다른 작물의 오염을 방지하기 위하여 10회 이상 충분히 수세, 건조하여 균질하게 분쇄한다.

가공식품의 경우에는 대상 작물을 선별하여 사용하며, 이의 구별하기 어렵거나 혼합된 형태의 검체는 전체를 균질하게 분쇄, 혼합하여 사용할 수 있다.

○ DNA 추출 및 정제

DNA 추출·정제법으로는 계면활성제인 세틸트리메틸암모늄브로마이드(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB)와 페놀-클로로포름 혼합액을 사용하여 DNA를 추출·정제하는 CTAB법과 실리카겔 막 형태, 실리카를 베이스로 한 레진 형태 및 자기흡착 비드 형태 등과 같은 DNA 추출 키트를 이용하는 방법이 있다.

CTAB법은 적용범위가 넓고 PCR의 저해물질이 남을 가능성이 적어 순도 높은 DNA를 얻을 수 있는 방법이며, 시판하고 있는 DNA 추출 키트는 적용 범위가 한정되는 경우가 있어 가공식품의 유형에 따라 적용 가능 여부를 별도로 확인할 필요가 있다.

DNA를 추출·정제 시 하나의 분석 검체로부터 적정량을 2회 칭량하여 동시에 추출하고, 추출한 DNA는 적절히 희석하거나 농축하여 시험에 사용한다.

○ 시약 및 시액

유전자변형 아마 FP967의 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브는 표 1과 같으며, 이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 프라이머, 프로브 및 시약을 사용할 수도 있다.

○ 반응액의 조제

표 1의 프라이머 및 프로브를 사용하면서 PCR 반응액의 총량을 25 μL로 할 경우 PCR 반응액 조성은 표 2와 같다. 다만, PCR 반응액 조성은 프라이머, 프로브와 시약 및 PCR 기기 등에 따라 다를 수 있으므로 시약이나 기기의 사용 매뉴얼을 참고하여 적용한다.

표 1. 유전자변형 아마 FP967의 정성시험에 사용하는 프라이머 및 프로브 정보

구분	품목 (증폭산물크기, 반응 온도)	프라이머 프로브	염기서열 (5' → 3')	농도 (nM)
내재	SAD (68 bp, 60℃)	SAD-FW SAD-RV SAD-P	GCT CAA CCC AGT CAC CAC CT TGC GAG GAG ATC TGG AGG AG FAM-TGT TGA GGG AGC GTG TTG AAG GGA-BHQ1	500 500 200
구조	NOST-Spec (105 bp, 60℃)	FW Primer RV Primer FP967-P	AGC GCG CAA ACT AGG ATA AA ACC TTC CGG CTC GAT GTC TA FAM-CGC GCG CGG TGT CAT CTA TG-BHQ1	500 500 200

표 2. 실시간 PCR 반응액 조성

성분	Stock 용액 농도	최종농도 (well)	1회 분량 (μL)
Universal Master Mix	2×	1×	12.5
프라이머	각 25 μM	표 1 참조	
프로브	10 μM		
주형 DNA	20 ng/μL	100 ng	5.0
멸균증류수	반응 총액이 25 μL가 되도록 첨가		
전체량			25.0

표 3. 실시간 PCR 반응조건

단계	온도(℃)	시간	cycle 수
전반응(Pre-PCR incubation)	50	2분	1 cycle
초기변성(Initial denaturation)	95	10분	1 cycle
증폭(Amplification)	95	15초	45 cycles
	표 1 참조	1분	

○ **시험조작**

각 추출 DNA에 대한 PCR은 내재유전자와 도입된 구조유전자에 대한 프라이머 및 프로브로 실시하며, 추출 DNA에 대하여 3회 이상 반복하여 시험한다. PCR 반응 시에는 음성대조구로 주형 DNA 대신 멸균증류수를 사용한 것(NTC, no template control)을, 양성대조구로 비유전자변형(non-GMO) DNA를 함유한 것(동일 작물로서 GMO 0%(w/w) 표준시료에서 추출한 DNA 등)과 검출하고자 하는 유전자변형 DNA를 함유한 것(동일 작물로서 분석 대상 GMO를 포함하는 표준시료에서 추출한 DNA 또는 표준플라스미드 등)을 시료와 함께 시험한다. PCR 반응조건은 대상별 반응조건을 참고하여 사용하는 기기 등에 따라 최적 조건으로 변형하여 사용할 수 있으며, 기기

제조사에 별도 문의하여 적용한다.

○ 분석결과의 해석 및 판정

PCR이 완료된 후 데이터의 자동 분석 과정을 통해서 threshold line[29]과 Ct값[30]을 구하며, 하나의 추출 DNA에 대하여 3회 반복 시험한 결과, 적어도 2회 이상의 결과 값이 43 미만의 Ct값을 가지고 형광강도가 지수함수적인 증폭이 확인되는 경우를 데이터로서 이용한다.

2회 반복 추출 DNA에 대한 PCR 결과, 확인시험에 의해 내재유전자와 도입된 구조유전자 특이 증폭산물이 모두 확인된 경우 '검출'로 판정하고, 2회 반복 추출 DNA에 대하여 내재유전자의 증폭산물은 모두 확인되나 구조유전자 특이 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 '불검출'로 판정한다.

2회 반복 추출 DNA에서 모두 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 DNA 추출 과정부터 다시 반복 시험하고, 반복시험 후에도 동일하게 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않는 경우 '검사불능'으로 판정한다(표 4).

표 4. 결과 판정의 흐름도(예시)

사례	추출 DNA	결과 분석		GMO 여부 판정
		내재유전자	구조유전자	
사례 1	추출 1	+	+	검출(부적합)
	추출 2	+	+	
사례 2	추출 1	+	-	불검출(적합)
	추출 2	+	-	
사례 3*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	+	-	
사례 4*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	-	/	
사례 5*	추출 1	+	-	재시험
	추출 2	-	/	
사례 6*	추출 1	-	/	검사 불능
	추출 2	-	/	

+ : 목적 유전자의 증폭이 확인됨, - : 목적 유전자의 증폭이 확인되지 않음, / : 시험이 불필요함
* 사례 3~6의 경우 DNA를 추가 추출하여 PCR 시험함

29) threshold line: 분석하고자 하는 유전자의 증폭곡선이 지수함수적으로 증가하는 부분
30) Ct: threshold line과 시료의 증폭곡선과의 교차점에서 구해진 PCR cycle

16) 유전자변형 파인애플 EF2-114 시험법

파인애플 또는 그 가공식품에 대하여 국내에서 안전성을 승인받지 않아 식품위생법 제4조에 의해 수입 및 유통 등이 금지된 유전자변형 파인애플 EF2-114를 검출하기 위한 시험법이다.

○ 검체의 전처리

식품공전 『10.1. 유전자변형식품의 시험법』 중 『10.1.1 검체의 전처리』에 따라 처리한 후 사용하되, 원곡의 경우 다른 작물의 오염을 방지하기 위하여 10회 이상 충분히 수세, 건조하여 균질하게 분쇄한다.

가공식품의 경우에는 대상 작물을 선별하여 사용하며, 이의 구별하기 어렵거나 혼합된 형태의 검체는 전체를 균질하게 분쇄, 혼합하여 사용할 수 있다.

○ DNA 추출 및 정제

DNA 추출·정제법으로는 계면활성제인 세틸트리메틸암모늄브로마이드(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB)와 페놀-클로로포름 혼합액을 사용하여 DNA를 추출·정제하는 CTAB법과 실리카겔 막 형태, 실리카를 베이스로 한 레진 형태 및 자기흡착 비드 형태 등과 같은 DNA 추출 키트를 이용하는 방법이 있다.

CTAB법은 적용범위가 넓고 PCR의 저해물질이 남을 가능성이 적어 순도 높은 DNA를 얻을 수 있는 방법이며, 시판하고 있는 DNA 추출 키트는 적용 범위가 한정되는 경우가 있어 가공식품의 유형에 따라 적용 가능 여부를 별도로 확인할 필요가 있다.

DNA를 추출·정제 시 하나의 분석 검체로부터 적정량을 2회 칭량하여 동시에 추출하고, 추출한 DNA는 적절히 희석하거나 농축하여 시험에 사용한다.

○ 시약 및 시액

유전자변형 파인애플 EF2-114의 정성시험에 사용하는 프라이머는 표 1과 같으며, 이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 프라이머 및 시약을 사용할 수도 있다.

○ 반응액의 조제

표 1의 프라이머를 사용하면서 PCR 반응액의 총량을 25 μL로 할 경우 PCR 반응액 조성은 표 2와 같다. 다만, PCR 반응액 조성은 프라이머와 시약 및 PCR 기기 등에 따라 다를 수 있으므로 시약이나 기기의 사용 매뉴얼을 참고하여 적용한다

표 1. 유전자변형 파인애플 EF2-114의 정성시험에 사용하는 프라이머 정보

구분	품목 (증폭산물크기, 반응 온도)	프라이머	염기서열 (5' → 3')	농도 (nM)
내재	내재유전자 (249 bp, 60℃)	WRKY2 F WRKY2 R	CCG CAC CAT GAA GGA TTA CT ATC ACC CTC GAT GGT CTC AC	400 400
구조	EF2-114 (163 bp, 60℃)	Rose-qF Rose-qR	GAT TTG AGG CAT CCT TGC TC CAC GAG TAA CCC CAC TTG GT	400 400

표 2. 일반 PCR 반응액 조성

성분	Stock 용액 농도	최종농도 (well)	1회 분량 (μL)
DNA polymerase	5 U/μL	0.625 U	0.125
완충액	10×	1×	2.5
$MgCl_2$	25 mM	1.5 mM	1.5
dNTPs	2.5 mM	200 μM	2.0
프라이머	각 25 μM	표 1 참조	
주형 DNA	10 ng/μL	50 ng	5.0
멸균증류수	반응 총액이 25 μL가 되도록 첨가		
전체량			25.0

표 3. 일반 PCR 반응조건

단계	온도(℃)	시간	cycle 수
초기변성(Initial denaturation)	95	10분	1 cycle
변성(denaturation) 결합(annealing) 신장(extension)	95 표 1 참조 72	30초 30초 10초	40 cycles
최종신장(elogation)	72	7분	1 cycle
보존	4	-	-

○ **시험조작**

각 추출 DNA에 대한 PCR은 내재유전자와 도입된 구조유전자에 대한 프라이머로 실시하며, 추출 DNA에 대하여 1회 이상 반복하여 시험한다. PCR 반응 시에는 음성대조구로 주형 DNA 대신 멸균증류수를 사용한 것(NTC, no template control)을, 양성대조구로 비유전자변형(non-GMO) DNA를 함유한 것(동일 작물로서 GMO 0%(w/w) 표준시료에서 추출한 DNA 등)과 검출

하고자 하는 유전자변형 DNA를 함유한 것(동일 작물로서 분석 대상 GMO를 포함하는 표준시료에서 추출한 DNA 또는 표준플라스미드 등)을 시료와 함께 시험한다. PCR 반응조건은 대상별 반응조건을 참고하여 사용하는 기기 등에 따라 최적 조건으로 변형하여 사용할 수 있으며, 기기 제조사에 별도 문의하여 적용한다.

○ 분석결과의 해석 및 판정

식품공전 중 유전자변형식품의 시험법에 따라 전기영동을 실시하여 각 프라이머에 특이적인 PCR 증폭산물의 크기를 확인한다.

2회 반복 추출 DNA에 대한 PCR 결과, 확인시험에 의해 내재유전자와 도입된 구조유전자 특이 증폭산물이 모두 확인된 경우 '검출'로 판정하고, 내재유전자의 증폭산물은 모두 확인되나 구조유전자 특이 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 '불검출'로 판정하며, 2회 반복 추출 DNA에서 모두 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 DNA 추출 과정부터 다시 반복 시험하고, 반복시험 후에도 동일하게 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않는 경우 '검사불능'으로 판정한다(표 4).

표 4. 결과 판정의 흐름도(예시)

사례	추출 DNA	결과 분석		GMO 여부 판정
		내재유전자	구조유전자	
사례 1	추출 1	+	+	검출(부적합)
	추출 2	+	+	
사례 2	추출 1	+	-	불검출(적합)
	추출 2	+	-	
사례 3*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	+	-	
사례 4*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	-	/	
사례 5*	추출 1	+	-	재시험
	추출 2	-	/	
사례 6*	추출 1	-	/	검사 불능
	추출 2	-	/	

+ : 목적 유전자의 증폭이 확인됨, - : 목적 유전자의 증폭이 확인되지 않음, / : 시험이 불필요함
* 사례 3~6의 경우 DNA를 추가 추출하여 PCR 시험함

17) 유전자변형 호박 CZW3, ZW20 시험법

호박 또는 그 가공식품에 대하여 국내에서 안전성을 승인받지 않아 식품위생법 제4조에 의해 수입 및 유통 등이 금지된 유전자변형 호박 CZW3, ZW20을 검출하기 위한 시험법이다.

○ 검체의 전처리

식품공전 『10.1. 유전자변형식품의 시험법』 중 『10.1.1 검체의 전처리』에 따라 처리한 후 사용하되, 원곡의 경우 다른 작물의 오염을 방지하기 위하여 10회 이상 충분히 수세, 건조하여 균질하게 분쇄한다.

가공식품의 경우에는 대상 작물을 선별하여 사용하며, 이의 구별하기 어렵거나 혼합된 형태의 검체는 전체를 균질하게 분쇄, 혼합하여 사용할 수 있다.

○ DNA 추출 및 정제

DNA 추출·정제법으로는 계면활성제인 세틸트리메틸암모늄브로마이드(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB)와 페놀-클로로포름 혼합액을 사용하여 DNA를 추출·정제하는 CTAB법과 실리카겔 막 형태, 실리카를 베이스로 한 레진 형태 및 자기흡착 비드 형태 등과 같은 DNA 추출 키트를 이용하는 방법이 있다.

CTAB법은 적용범위가 넓고 PCR의 저해물질이 남을 가능성이 적어 순도 높은 DNA를 얻을 수 있는 방법이며, 시판하고 있는 DNA 추출 키트는 적용 범위가 한정되는 경우가 있어 가공식품의 유형에 따라 적용 가능 여부를 별도로 확인할 필요가 있다.

DNA를 추출·정제 시 하나의 분석 검체로부터 적정량을 2회 칭량하여 동시에 추출하고, 추출한 DNA는 적절히 희석하거나 농축하여 시험에 사용한다.

○ 시약 및 시액

유전자변형 호박 CZW3, ZW20의 정성시험에 사용하는 프라이머는 표 1과 같으며, 이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 프라이머 및 시약을 사용할 수도 있다.

○ 반응액의 조제

표 1의 프라이머를 사용하면서 PCR 반응액의 총량을 20 μL로 할 경우 PCR 반응액 조성은 표 2와 같다. 다만, PCR 반응액 조성은 프라이머와 시약 및 PCR 기기 등에 따라 다를 수 있으므로 시약이나 기기의 사용 매뉴얼을 참고하여 적용한다.

표 1. 유전자변형 호박 정성시험에 사용하는 프라이머 정보

구분	품목 (증폭산물크기, 반응 온도)	프라이머 프로브	염기서열 (5' → 3')	농도 (nM)
내재	phloem lectin (331 bp, 59℃)	PP2-F02 PP2-R01	GCT GGA CAT TCG TGG AAA GA ACA TCC CTT TGC TCC AAT CC	200 200
구조1	ZW20 & CZW3 (231 bp, 59℃)	mg1 WMVcpR003	TAT CTC CAC TGA CGT AAG GGA TGA C TGT TTC TTT TCC TGA ACG AC	400 400
구조2	CZW3 (281 bp, 59℃)	mg1 CMVcpR001	TAT CTC CAC TGA CGT AAG GGA TGA C GTT GCT GGA CGG CTG CTT G	400 400

표 2. 일반 PCR 반응액 조성

성분	Stock 용액 농도	최종농도(well)	1회 분량(μL)
PCR Master Mix	2×	1×	10.0
프라이머	10 μM	표 1 참조	
주형DNA	10 ng/μL	50 ng	5.0
멸균증류수	반응 총액이 20 μL가 되도록 첨가		
전체량			20.0

표 3. 일반 PCR 반응조건

단계	온도(℃)	시간	cycle 수
초기변성(Initial denaturation)	95	10분	1 cycle
변성(denaturation) 결합(annealing) 신장(extension)	95 표 1 참조 72	30초 30초 30초	40 cycles
최종신장(elongation)	72	7분	1 cycle
보존	4	-	-

○ 시험조작

각 추출 DNA에 대한 PCR은 내재유전자와 도입된 구조유전자에 대한 프라이머로 실시하며, 추출 DNA에 대하여 1회 이상 반복하여 시험한다. PCR 반응 시에는 음성대조구로 주형 DNA 대신 멸균증류수를 사용한 것(NTC, no template control)을, 양성대조구로 비유전자변형(non-GMO) DNA를 함유한 것(동일 작물로서 GMO 0%(w/w) 표준시료에서 추출한 DNA 등)과 검출하고자 하는 유전자변형 DNA를 함유한 것(동일 작물로서 분석 대상 GMO를 포함하는 표준시료에서 추출한 DNA 또는 표준플라스미드 등)을 시료와 함께 시험한다. PCR 반응조건은 대상별 반응조건을 참고하여 사용하는 기기 등에 따라 최적 조건으로 변형하여 사용할 수 있으며, 기기

제조사에 별도 문의하여 적용한다.

○ **분석결과의 해석 및 판정**

식품공전 중 유전자변형식품의 시험법에 따라 전기영동을 실시하여 각 프라이머에 특이적인 PCR 증폭산물의 크기를 확인한다.

2회 반복 추출 DNA에 대한 PCR 결과, 확인시험에 의해 내재유전자와 도입된 구조유전자 특이 증폭산물이 모두 확인된 경우 '유전자변형 호박 검출'로 판정하고, 2회 반복 추출 DNA에 대하여 내재유전자의 증폭산물은 모두 확인되나 구조유전자 특이 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 '불검출'로 판정하며, 유전자변형 호박 CZW3 event를 특정하여야 하는 경우에는 해당 유전자변형 호박 시험법(구조2)을 적용한다.

2회 반복 추출 DNA에서 모두 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 DNA 추출 과정부터 다시 반복 시험하고, 반복시험 후에도 동일하게 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않는 경우 '검사불능'으로 판정한다(표 4).

표 4. 결과 판정의 흐름도(예시)

사례	추출 DNA	결과 분석		GMO 여부 판정
		내재유전자	구조유전자	
사례 1	추출 1	+	+	검출(부적합)
	추출 2	+	+	
사례 2	추출 1	+	-	불검출(적합)
	추출 2	+	-	
사례 3*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	+	-	
사례 4*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	-	/	
사례 5*	추출 1	+	-	재시험
	추출 2	-	/	
사례 6*	추출 1	-	/	검사 불능
	추출 2	-	/	

+ : 목적 유전자의 증폭이 확인됨, - : 목적 유전자의 증폭이 확인되지 않음, / : 시험이 불필요함
* 사례 3~6의 경우 DNA를 추가 추출하여 PCR 시험함

18) 유전자변형 Arctic 사과 확인 시험법

사과 또는 그 가공식품에 대하여 국내에서 안전성을 승인받지 않아 식품위생법 제4조에 의해 수입 및 유통 등이 금지된 유전자변형 Arctic 사과를 검출하기 위한 시험법이다.

○ 검체의 전처리

식품공전 『10.1. 유전자변형식품의 시험법』 중 『10.1.1 검체의 전처리』에 따라 처리한 후 사용하되, 원곡의 경우 다른 작물의 오염을 방지하기 위하여 10회 이상 충분히 수세, 건조하여 균질하게 분쇄한다.

가공식품의 경우에는 대상 작물을 선별하여 사용하며, 이의 구별하기 어렵거나 혼합된 형태의 검체는 전체를 균질하게 분쇄, 혼합하여 사용할 수 있다.

○ DNA 추출 및 정제

DNA 추출·정제법으로는 계면활성제인 세틸트리메틸암모늄브로마이드(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB)와 페놀-클로로포름 혼합액을 사용하여 DNA를 추출·정제하는 CTAB법과 실리카겔 막 형태, 실리카를 베이스로 한 레진 형태 및 자기흡착 비드 형태 등과 같은 DNA 추출 키트를 이용하는 방법이 있다.

CTAB법은 적용범위가 넓고 PCR의 저해물질이 남을 가능성이 적어 순도 높은 DNA를 얻을 수 있는 방법이며, 시판하고 있는 DNA 추출 키트는 적용 범위가 한정되는 경우가 있어 가공식품의 유형에 따라 적용 가능 여부를 별도로 확인할 필요가 있다.

DNA를 추출·정제 시 하나의 분석 검체로부터 적정량을 2회 칭량하여 동시에 추출하고, 추출한 DNA는 적절히 희석하거나 농축하여 시험에 사용한다.

○ 시약 및 시액

유전자변형 Arctic 사과의 정성시험에 사용하는 프라이머는 표 1과 같으며, 이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 프라이머 및 시약을 사용할 수도 있다.

○ 반응액의 조제

표 1의 프라이머를 사용하면서 PCR 반응액의 총량을 25 μL로 할 경우 PCR 반응액 조성은 표 2와 같다. 다만, PCR 반응액 조성은 프라이머와 시약 및 PCR 기기 등에 따라 다를 수 있으므로 시약이나 기기의 사용 매뉴얼을 참고하여 적용한다.

표 1. 유전자변형 Arctic 사과의 정성시험에 사용하는 프라이머 정보

구분	품목 (증폭산물크기, 반응 온도)	프라이머 프로브	염기서열 (5' → 3')	농도 (nM)
내재	Its (134 bp, 58℃)	SFI16-Malus-F SFI16-Malus-R	GCG CGG TTG GCA CAA ATG CGC CGA AGC GAG AGC AG	400 400
구조	Arctic (127 bp, 58℃)	Arctic-F2 Arctic-R2	TGA CCC GAA CCA GAC CCA C CAG GAT TCA ATC TTA AGA AAC TTT ATT G	400 400

표 2. 일반 PCR 반응액 조성

성분	Stock 용액 농도	최종농도 (well)	1회 분량 (μL)
DNA polymerase	5 U/μL	0.625 U	0.125
완충액	10×	1×	2.5
$MgCl_2$	25 mM	1.5 mM	1.5
dNTPs	2.5 mM	200 μM	2.0
프라이머	각 25 μM	표 1 참조	
주형 DNA	10 ng/μL	50 ng	5.0
멸균증류수	반응 총액이 25 μL가 되도록 첨가		
전체량			25.0

표 3. 일반 PCR 반응조건

단계	온도(℃)	시간	cycle 수
초기변성(Initial denaturation)	95	10분	1 cycle
변성(denaturation)	95	30초	40 cycles
결합(annealing)	표 1 참조	30초	
신장(extension)	72	30초	
최종신장(elongation)	72	7분	1 cycle
보존	4	-	-

○ **시험조작**

각 추출 DNA에 대한 PCR은 내재유전자와 도입된 구조유전자에 대한 프라이머로 실시하며, 추출 DNA에 대하여 1회 이상 반복하여 시험한다. PCR 반응 시에는 음성대조구로 주형 DNA 대신 멸균증류수를 사용한 것(NTC, no template control)을, 양성대조구로 비유전자변형(non-GMO) DNA를 함유한 것(동일 작물로서 GMO 0%(w/w) 표준시료에서 추출한 DNA 등)과 검출하고자 하는 유전자변형 DNA를 함유한 것(동일 작물로서 분석 대상 GMO를 포함하는 표준시료에서 추출한 DNA 또는 표준플라스미드 등)을 시료와 함께 시험한다. PCR 반응조건은 대상별 반응

조건을 참고하여 사용하는 기기 등에 따라 최적 조건으로 변형하여 사용할 수 있으며, 기기 제조사에 별도 문의하여 적용한다.

○ **분석결과의 해석 및 판정**

식품공전 중 유전자변형식품의 시험법에 따라 전기영동을 실시하여 각 프라이머에 특이적인 PCR 증폭산물의 크기를 확인한다.

2회 반복 추출 DNA에 대한 PCR 결과, 확인시험에 의해 내재유전자와 도입된 구조유전자 특이 증폭산물이 모두 확인된 경우 '유전자변형 Arctic 사과 검출'로 판정하고, 2회 반복 추출 DNA에 대하여 내재유전자의 증폭산물은 모두 확인되나 구조유전자 특이 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 '유전자변형 Arctic 사과 불검출'로 판정하며, event를 특정하여야 하는 경우에는 해당 유전자변형 사과 시험법을 적용한다.

2회 반복 추출 DNA에서 모두 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 DNA 추출 과정부터 다시 반복 시험하고, 반복시험 후에도 동일하게 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않는 경우 '검사불능'으로 판정한다(표 4).

표 4. 결과 판정의 흐름도(예시)

사례	추출 DNA	결과 분석		GMO 여부 판정
		내재유전자	구조유전자	
사례 1	추출 1	+	+	검출(부적합)
	추출 2	+	+	
사례 2	추출 1	+	-	불검출(적합)
	추출 2	+	-	
사례 3*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	+	-	
사례 4*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	-	/	
사례 5*	추출 1	+	-	재시험
	추출 2	-	/	
사례 6*	추출 1	-	/	검사 불능
	추출 2	-	/	

+ : 목적 유전자의 증폭이 확인됨, - : 목적 유전자의 증폭이 확인되지 않음, / : 시험이 불필요함
* 사례 3~6의 경우 DNA를 추가 추출하여 PCR 시험함

19) 유전자변형 사과 GD743 확인 시험법

사과 또는 그 가공식품에 대하여 국내에서 안전성을 승인받지 않아 식품위생법 제4조에 의해 수입 및 유통 등이 금지된 유전자변형 사과 GD743을 검출하기 위한 시험법이다.

○ 검체의 전처리

식품공전 『10.1. 유전자변형식품의 시험법』 중 『10.1.1 검체의 전처리』에 따라 처리한 후 사용하되, 원곡의 경우 다른 작물의 오염을 방지하기 위하여 10회 이상 충분히 수세, 건조하여 균질하게 분쇄한다.

가공식품의 경우에는 대상 작물을 선별하여 사용하며, 이의 구별하기 어렵거나 혼합된 형태의 검체는 전체를 균질하게 분쇄, 혼합하여 사용할 수 있다.

○ DNA 추출 및 정제

DNA 추출·정제법으로는 계면활성제인 세틸트리메틸암모늄브로마이드(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB)와 페놀-클로로포름 혼합액을 사용하여 DNA를 추출·정제하는 CTAB법과 실리카겔 막 형태, 실리카를 베이스로 한 레진 형태 및 자기흡착 비드 형태 등과 같은 DNA 추출 키트를 이용하는 방법이 있다.

CTAB법은 적용범위가 넓고 PCR의 저해물질이 남을 가능성이 적어 순도 높은 DNA를 얻을 수 있는 방법이며, 시판하고 있는 DNA 추출 키트는 적용 범위가 한정되는 경우가 있어 가공식품의 유형에 따라 적용 가능 여부를 별도로 확인할 필요가 있다.

DNA를 추출·정제 시 하나의 분석 검체로부터 적정량을 2회 칭량하여 동시에 추출하고, 추출한 DNA는 적절히 희석하거나 농축하여 시험에 사용한다.

○ 시약 및 시액

유전자변형 사과 GD743의 정성시험에 사용하는 프라이머는 표 1과 같으며, 이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 프라이머 및 시약을 사용할 수도 있다.

○ 반응액의 조제

표 1의 프라이머를 사용하면서 PCR 반응액의 총량을 25 μL로 할 경우 PCR 반응액 조성은 표 2와 같다. 다만, PCR 반응액 조성은 프라이머와 시약 및 PCR 기기 등에 따라 다를 수 있으므로 시약이나 기기의 사용 매뉴얼을 참고하여 적용한다.

표 1. 유전자변형 사과 GD743의 정성시험에 사용하는 프라이머 정보

구분	품목 (증폭산물크기, 반응 온도)	프라이머 프로브	염기서열 (5' → 3')	농도 (nM)
내재	Its (134 bp, 58℃)	SFI16-Malus-F SFI16-Malus-R	GCG CGG TTG GCA CAA ATG CGC CGA AGC GAG AGC AG	400 400
구조	GD743 (229 bp, 58℃)	GM apple 5-F GM apple 5-R	CGC ACA ATC CCA CTA TCC TT GCG TCC CAG TTC CAG AAG	400 400

표 2. 일반 PCR 반응액 조성

성분	Stock 용액 농도	최종농도 (well)	1회 분량 (μL)
DNA polymerase	5 U/μL	0.625 U	0.125
완충액	10×	1×	2.5
$MgCl_2$	25 mM	1.5 mM	1.5
dNTPs	2.5 mM	200 μM	2.0
프라이머	각 25 μM	표 1 참조	
주형 DNA	10 ng/μL	50 ng	5.0
멸균증류수	반응 총액이 25 μL가 되도록 첨가		
전체량			25.0

표 3. 일반 PCR 반응조건

단계	온도(℃)	시간	cycle 수
초기변성(Initial denaturation)	95	10분	1 cycle
변성(denaturation)	95	30초	40 cycles
결합(annealing)	표 1 참조	30초	
신장(extension)	72	30초	
최종신장(elongation)	72	7분	1 cycle
보존	4	-	-

○ **시험조작**

각 추출 DNA에 대한 PCR은 내재유전자와 도입된 구조유전자에 대한 프라이머로 실시하며, 추출 DNA에 대하여 1회 이상 반복하여 시험한다. PCR 반응 시에는 음성대조구로 주형 DNA 대신 멸균증류수를 사용한 것(NTC, no template control)을, 양성대조구로 비유전자변형(non-GMO) DNA를 함유한 것(동일 작물로서 GMO 0%(w/w) 표준시료에서 추출한 DNA 등)과 검출하고자 하는 유전자변형 DNA를 함유한 것(동일 작물로서 분석 대상 GMO를 포함하는 표준시료에서 추출한 DNA 또는 표준플라스미드 등)을 시료와 함께 시험한다. PCR 반응조건은 대상별 반응

조건을 참고하여 사용하는 기기 등에 따라 최적 조건으로 변형하여 사용할 수 있으며, 기기 제조사에 별도 문의하여 적용한다.

○ **분석결과의 해석 및 판정**

식품공전 중 유전자변형식품의 시험법에 따라 전기영동을 실시하여 각 프라이머에 특이적인 PCR 증폭산물의 크기를 확인한다.

2회 반복 추출 DNA에 대한 PCR 결과, 확인시험에 의해 내재유전자와 도입된 구조유전자 특이 증폭산물이 모두 확인된 경우 '검출'로 판정하고, 2회 반복 추출 DNA에 대하여 내재유전자의 증폭산물은 모두 확인되나 구조유전자 특이 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 '불검출'로 판정한다.

2회 반복 추출 DNA에서 모두 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않은 경우에는 DNA 추출 과정부터 다시 반복 시험하고, 반복시험 후에도 동일하게 내재유전자의 증폭산물이 확인되지 않는 경우 '검사불능'으로 판정한다(표 4).

표 4. 결과 판정의 흐름도(예시)

사례	추출 DNA	결과 분석		GMO 여부 판정
		내재유전자	구조유전자	
사례 1	추출 1	+	+	검출(부적합)
	추출 2	+	+	
사례 2	추출 1	+	-	불검출(적합)
	추출 2	+	-	
사례 3*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	+	-	
사례 4*	추출 1	+	+	재시험
	추출 2	-	/	
사례 5*	추출 1	+	-	재시험
	추출 2	-	/	
사례 6*	추출 1	-	/	검사 불능
	추출 2	-	/	

+ : 목적 유전자의 증폭이 확인됨, - : 목적 유전자의 증폭이 확인되지 않음, / : 시험이 불필요함
* 사례 3~6의 경우 DNA를 추가 추출하여 PCR 시험함