

Multiplex PCR 방법을 이용한 국내 승인 5개 LM 유체의 검출법 개발

조범호 · 이종로 · 최원균 · 문정찬 · 신수영 · 엄순재 · 설민아 · 김일룡 · 송해룡

Development of multiplex PCR-based detection method for five approved LM canola events in Korea

Beom-Ho Jo · Jung Ro Lee · Wonkyun Choi · Jeong Chan Moon · Su Young Shin · Soon-Jae Eum · Min-A Seol · Il Ryong Kim · Hae-Ryong Song

Received: 11 May 2015 / Revised: 2 June 2015 / Accepted: 15 June 2015
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Canola is a crop globally used for production of oil and biofuel. Cultivation area and import volume of living modified (LM) canola have been increasing every year. As canola import dependence has reached 100% in Korea, efforts have been made for safety management of LM canola and ecological risk assessment. We developed a set of multiplex PCR method for simultaneous detection of 5 LM canola events (Topas 19/2, Rf3, Ms8, RT73 and T45) approved in Korea. The multiplex PCR assay developed allows amplification of estimated products of 5 LM canolas from event specific primer sets. Primer extension time was skipped for a time-consuming process and two annealing steps (20 cycles at 55°C and 20 cycles at 60°C) were performed for yielding the best result which was sufficient to distinguish five LM canolas. Our results suggest that multiplex PCR method provides a cost and time-effective approach for LM canola detection.

Keywords LM, canola, event, detection, multiplex PCR

서론

캐놀라(Canola; *Brassica napus*)는 식용유를 만드는데 이용할 수 있도록 유채(rapeseed)를 품종 개량하여 재배되고

있는 유지작물이다. 캐놀라에서 착유된 기름은 다른 일반 식용유에 비해 포화지방산 함량이 낮고 불포화지방산이 높은 특징을 갖고 있어 최근 이용량이 급증하고 있다. 캐놀라를 넓은 면적으로 대량 재배하기 위해서 재배 용이성 및 생산량 증대를 목적으로 제초제저항성을 갖는 유전자변형 캐놀라(LM canola)가 개발되었고, 이들 가운데 국내에 승인 유통되고 있는 단일 이벤트로 바이엘크롭사이언스(주)에서 개발된 T45, Topas 19/2, Ms8, Rf3와 몬산토(주)에서 개발한 RT73이 있다. T45와 Topas 19/2는 *pat* 유전자를 삽입하여, phosphinothricin-N-acetyltransferase (PAT) 단백질을 발현시켜 제초제 glufosinate-ammonium의 활성 성분인 phosphinothricin (bialaphos)을 불활성화시킴으로써 내성을 나타내도록 하는 이벤트이다. Ms8, Rf3은 *bar* 유전자를 삽입하여 PAT 단백질을 발현시킴과 동시에 *barnase*, *barstar* 유전자 삽입을 통해 화분형성을 억제 혹은 음성 회복을 유도한 이벤트이며, 몬산토(주)에서 개발한 RT73은 CP4-5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (CP4EPSPS) 및 glyphosate oxidase (Gox) 단백질 발현을 통해 제초제 내성을 갖도록 개발되었다(NIER 2013). 국제생명공학응용정보서비스(International Service for the Acquisition of Agri-biotech Application; ISAAA)의 최근 발표 자료에 따르면 2014년 전 세계적으로 약 1억 8,150만 헥타르(4억 4,800만 에이커)의 농지에서 유전자변형작물이 재배되었으며, 이는 2013년보다 3.5% (620만 ha)증가한 수치로 콩, 면화, 옥수수, 유채(캐놀라)와 같은 주요작물의 세계 전체 농지면적(arable land)의 약 49% 수준에 해당한다(James 2014). 한국바이오안전성정보센터(Korea Biosafety Clearing House; KBCH)의 보고서에 의하면 전세계 캐놀라 총 재배면적 3,400만 ha 중 LM 캐놀라의 재배면적은 820만 ha로 약 24%의 비중을 차지하고 있으며, 이중 약 92%는 캐나다

B.-H. Jo · J. R. Lee · W. Choi · J. C. Moon · S. Y. Shin · S.-J. Eum · M.-A. Seol · I. R. Kim · H.-R. Song (✉)
국립생태원 생태보전연구본부 위해생물연구부
(Bureau of Conservation Ecology, National Institute of Ecology (NIE), Seocheon 325-813, Korea)
e-mail: wpixh@nie.re.kr

(750만 ha)에서 재배되고 있다. 국내에서는 캐놀라유 시장점유율이 콩, 옥수수에 비해 점차 높아지고 있으며, 그 수요가 점차 증가함에 따라서 2011년 이후 착유를 위해 수입되는 캐놀라의 수입량이 큰 폭으로 증가하였다. 캐놀라의 국내 총 수입량 중 2012년 LM 캐놀라의 비중은 100%, 2013년은 67% 정도로 매우 높은 비중을 차지하고 있고, 2013년 농림축산식품 주요 통계자료에 의하면 2012년도 이후 국내 유채 자급률은 0%로 전량 수입에 의존하고 있는 실정이다(KBCH 2014a,b). 따라서, 해마다 증가하는 LM 유채의 수입량과 맞물려 국내 유통과정에서 자연환경으로의 비의도적 유입이 우려되며, 특히 배추, 무, 갯등 십자화과 근연종과의 자연교잡에 의한 유전자이동 가능성이 존재하므로 이에 따른 LM 캐놀라의 자연환경 노출에 관한 안전관리 방안이 반드시 마련되어야만 한다. 국립환경과학원의 「유전자변형생물체의 자연환경 모니터링 및 사후관리」 연구 보고서에 따르면, 2009년에서 2013년 까지 총 6건의 LM 유채가 강원, 인천, 전남에서 비의도적으로 자연생태계에 혼입되어 자생하고 있는 것을 확인한 바 있다. 이처럼 해마다 전국적으로 확대 시행되고 있는 LM 작물의 자연환경 모니터링 사업에 필요한 명확한 판정을 위한 과학적 검출방법은 매우 중요하다. 환경부에서는 LMO의 과학적 사후관리를 위하여 국내 수입 승인 이벤트 중 33개 이벤트(옥수수, 콩, 면화, 유채 및 사탕무)에 대해 이벤트 특이적인 검출기법을 확립하여 사용하고 있다. 하지만 전국적인 모니터링을 통해 수집된 LM 의심시료의 양은 해마다 증가하고 있는데 비해, 연구인력과 연구 기자재는 매우 부족한 실정이다. 따라서, 여러 이벤트를 동시에 검출할 수 있는 multiplex PCR 검출법은 연구 인력, 시간 및 비용을 효율적으로 관리할 수 있는 좋은 대안이 될 수 있다. LM 이벤트의 multiplex PCR 검출법은 LM 콩, 감자 및 옥수수와 같이 두부, 전분을 생산하기 위한 식품용과 사료원료 작물에 한해 매우 활발하게 개발, 보고된바 있다(Kim et al. 2013; Yoo et al.

2013). 하지만 LM 캐놀라에 대한 동시검출 법은 혼합비율로 섞여있는 RT73이벤트에 대한 정량적 모니터링을 위해 real-time PCR에서의 multiplex PCR 법에 대한 내용(Demeke & Ratnaya 2008) 등 일뿐, 환경방출 LMO 모니터링을 위한 여러 LM 캐놀라 이벤트의 multiplex PCR 검출법은 보고된바 없다. 따라서, 본 연구는 국내 승인 유통되는 LM 캐놀라 가운데, 제초제저항성의 특징을 갖는 5개 단일 캐놀라 이벤트(Topas 19/2, Rf3, Ms8, RT73, T45)를 동시에 검출할 수 있는 이벤트 특이적 프라이머를 설계하고, 이를 증폭하는 최적 반응조건을 조사하여, LMO 자연 생태계 모니터링을 보다 효율적으로 할 수 있는 연구체계의 가능성을 제시하고, 이를 위한 기초데이터를 확보함으로써 LM 캐놀라의 비의도적 자연생태계 혼입에 관한 과학적 사후관리 체계를 강화하고자 하였다.

재료 및 방법

표준물질

동시검출기법 개발에 사용된 LM 캐놀라 T45, Topas 19/2, Ms8, Rf3, RT73 및 Non modified 캐놀라의 표준물질은 미국유지화학협회(American Oil Chemists' Society; AOCS, USA)로부터 구입하였다. Seed 상태의 표준물질(RT73)은 genomic DNA를 분리, 정제한 후 genomic DNA 상태로 구입된 표준물질과 함께 PCR의 주형으로 사용하였다.

Genomic DNA 순수 정제

PCR의 주형으로 사용하기 위하여 seed 상태로 구입된 RT73 LM 캐놀라 이벤트 표준물질을 대상으로 genomic DNA를 정제하였다. 구입 당시 캐놀라 seed 상태의 표준물질을 멸균된 막자 사발에서 분쇄한 후, DNeasy Plant Mini Kit

Table 1 Primer pairs for event specific PCR

Event name	Primer name	Sequence (5'- 3')	Product size (bp)	References
Topas 19/2	MDB685-F	GTTGCGGTTCTGTCAGTTCC	95	Mazzara et al. 2011
	KVM180-R	CGACCGGCGCTGATATATGA		
Rf3	KVM84-F	AGCATTTAGCATGTACCATCAGACA	139	Savini et al. 2013
	DPA165-R	CATAAAGGAAGATGGAGACTTGAG		
Ms8	J-Ms8-F	CCAAATAGCCTCCCACCCTATA	250	This study Mazzara et al. 2007
	HCA048-R	GGAGGGTGTTTTTGGTTATC		
RT73	J-RT73-F	CGACGGATCGTAATTTGTCC	317	This study
	J-RT73-R	CTAGCCGTCGATTTCCACATGTGGA		
T45	J-T45-F	CAAGCGTGTCTGCTCCACCATGTT	378	This study
	J-T45-R	GAACATAGATCGAGTCTCCCA		

(QIAGEN, German)를 제공된 매뉴얼에 따라 순수 DNA를 정제하였다. 정제된 genomic DNA와 DNA 상태로 구입된 표준물질 DNA는 1.0% agarose gel 전기영동으로 확인한 후, Nano-drop 2000 (Thermo scientific, USA)으로 정확한 정량을 실시하여, 3차 증류수로 30~40 ng/μl의 농도가 되도록 희석하였다. PCR 최종 반응농도는 1~2 ng/μl가 되도록 하여 사용하였다.

내재유전자 및 이벤트 특이적 primer 제작

캐놀라의 내재유전자인 *Cruciferin A (Cru A, GenBank Accession no. X59294)* 유전자의 염기서열을 기초로 하여 101 bp의 PCR 산물을 얻을 수 있도록 MDB510 : 5'-GGCCAGGG-TTCCGTGAT-3' / MDB511 : 5'-CCGTCGTTGTAGAACC-ATTGG-3' primer 한 쌍을 제작하여 사용하였다(Mazzara et al. 2011). 5개의 이벤트를 동시에 분석하기 위한 multiplex PCR 분석용 primer는 염기서열을 기반으로 한쪽은 도입 유전자가 위치한 좌위에 다른 한쪽은 고유 식물 유전체에 위치한 좌위에 위치하여 특정 이벤트를 특이적으로 검출할 수 있도록 제작하였다. 또한 비교적 PCR 생성물의 크기가 작은 MDB685/KVM180 (Topas 19/2), KVM84/DPA165 (Rf3), HCA048 (Ms8 reverse)는 유럽공동연구센터 (JRC)에서 공인된 보고서에 명시된 primer를 참고하여 제작하였고, multiplex PCR 시 각각의 이벤트를 생성물 크기로 더욱 명확하게 구분할 수 있도록 J-Ms8-F, J-RT73-F/R, J-T45-F/R는 조사된 염기서열(GenBank Accession no. X52283, AX685147, JX139721)을 기초로 생성물의 크기를 조절하여 제작하였으며, 염기서열 분석을 통해 확인하였다(Table 1).

Polymerase chain reaction (PCR) 반응

Non-LM 및 LM 캐놀라의 DNA는 template농도에 의한 편차를 없애기 위해 40 ng/μl의 동일한 농도로 희석하여 진행하였다. 내재유전자 및 각각의 이벤트 특이적 primer 쌍의 반응 여부를 확인한 후, 5개의 LM 캐놀라 이벤트를 한번의 PCR 반응으로 동시에 검출하기 위해 5개 LM 이벤트가 모두 명확히 검출되는 최적 검출조건을 찾을 때까지 primer 농도 및 PCR 반응조건 등을 변경하는 것을 반복하여 최적반응조건을 탐색하였다. 모든 PCR 반응 용액은 Solg™ 2X EF-Taq PCR pre-Mix (SolGent, Korea)를 사용하여 한 시료당 총 30 μl로 반응하였다. 내재유전자 및 각 이벤트 특이적 유전자의 증폭을 위하여 forward 및 reverse primer의 최종 농도를 각각 0.33 pmol, template DNA 최종 반응농도 1~2 ng/μl가 되도록 하고 ProFlex™ Base (Applied biosystems, USA)를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응 혼합물을 95°C에서 5분간 변성시킨 후, 95°C 15초/60°C 20초간 40회 노출시켰고, 신장(extension) 단계는 생

략하여 증폭하였다.

Multiplex PCR은 이벤트 특이적 primer 쌍을 모두 섞은 primer cocktail을 최적 반응조건이 될 때까지 조절하여, 5개 LM 캐놀라 이벤트가 모두 검출되는 조건을 탐색하였고, 분석시간의 효율성을 고려하여 총 PCR 증폭시간이 1시간 내외가 되도록 조절하였다. 생성된 모든 PCR 산물은 LoadingSTAR (DYNEBio, Korea)를 1X가 되도록 혼합하여 2.5% agarose gel 상에서 135 V로 전기영동 하고, Chemi-Doc™ XRS+ (Bio-Rad, USA) 이미지 분석장치를 이용하여 밴드를 확인하였다.

결과 및 고찰

내재유전자 및 이벤트 특이적 primer 쌍의 제작 및 특이성 확인

캐놀라의 내재유전자(*Cru A*) 및 LM 캐놀라 이벤트 특이적 증폭을 위한 primer 쌍의 특이성을 확인하기 위하여 5 LM 캐놀라 표준물질 DNA를 동일하게 희석하여 이를 template로 하여 PCR을 실시하였다. PCR에 사용된 LM 캐놀라 이벤트 특이적 primer 쌍은 Fig. 1에서 표기된 바와 같이 도입유전자 부위와 식물 고유의 유전체 부위를 포함하도록 제작하였고, 생성물의 크기 조절이 필요했던 Ms8, RT73 및 T45에 대해서는 각 생성물을 염기서열 분석하여 primer의 위치와 염기서열 정보를 재확인하였다 (Fig. 2). Fig. 3A에서 보는 바와 같이 구입 및 정제된 genomic DNA는 동일한 양을 전기영동 했을 때, 밴드의 굵기와 진하기에 큰 차이가 없었고, 내재유전자 primer

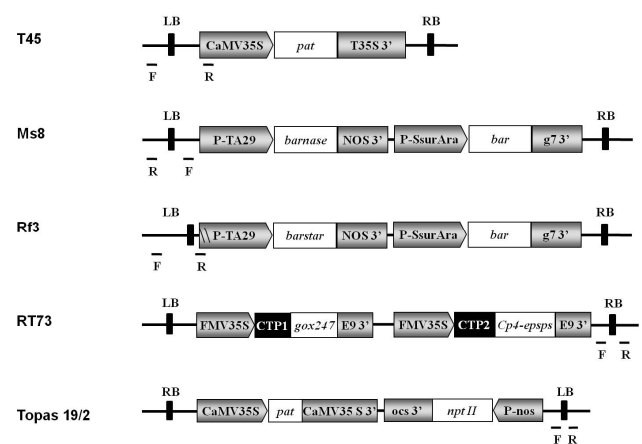


Fig. 1 Schematic diagrams of event-specific primers designed to detect five different LM canola events. The locations of the primers used for the amplification are indicated by bars (F : forward primer, R : reverse primer). All primer pairs were designed with nucleotide sequences of the DNA flanking region and the inserted DNA cassette. (LB, left border; RB, right border; ◻, promoter; ◼, leader sequence encoding a chloroplast transit peptide; ◻, encoding gene; ◻, 3' terminator)

쌍으로부터 모두 101 bp 크기의 밴드가 확인되었다(Fig. 3B). 또한 Fig. 3C에서 보는 바와 같이 캐놀라 이벤트를 특이적 primer 쌍으로부터 제작된 예상 크기의 밴드가 확인되었으며, non-LM 표준물질 DNA에서는 전혀 증폭되지 않았다.

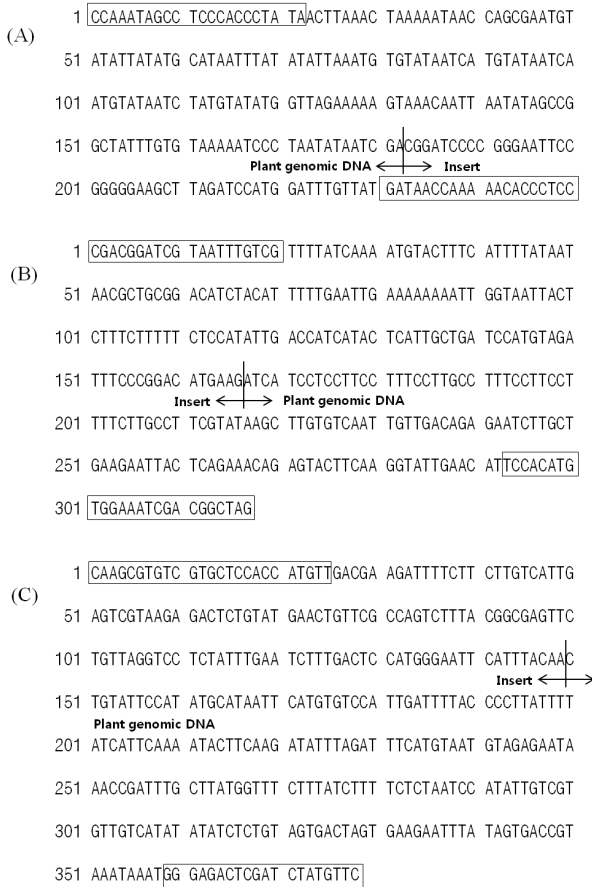


Fig. 2 Nucleotide sequences of plant genome and the inserted DNA cassette identified by DNA sequence analysis. The arrow shows the orientation of the inserted DNA and genome sequence in Ms8 (A), RT73 (B) and T45 events (C). Each box indicates an event specific primer in this study

Multiplex PCR 최적 조건 확립

국내 수입이 승인되어 유통되고 있는 5개 LM 캐놀라 이벤트를 동시에 검출할 수 있는 multiplex PCR 최적조건은 5개 LM 특이적 primer 쌍을 모두 섞은 cocktail을 제조하여 PCR 반응을 수행했을 때, 2.5% agarose gel 상에서 밴드 크기에 의해 명확히 구분되는 조건을 조사하였다. Topas 19/2, RT73, Rf3 primer 쌍은 각각 0.3, 0.5, 0.8 pmol이 최종 반응 농도가 되도록 하고, Ms8과 T45 primer 쌍은 각각 1.0 pmol이 최종반응 농도가 되도록 primer cocktail을 제조하여 사용했을 때 최적의 detection 효율을 나타내었다 (Table 2). PCR 반응 조건은 초기 변성단계(denaturation stage)를 5분간 진행하고, 변성단계 15초, 결합단계(annealing stage) 20초를 총 40회 진행하였고, 분석시간의 단축하기 위하여 신장단계(extension stage)를 생략하였고, 총 반응시간이 1시간 내외가 되도록 하였다. Rf3와 같이 primer GC 비율이 낮아 초기 결합반응이 제한된 primer 쌍의 효율을

Table 2 Effective primer concentrations and product sizes for multiplex PCR of 5 LM canola events

Event name	Primer name	GC (%)	Final primer concentration (pmol)	Product Size (bp)
Topas 19/2	MDB685-F	55.0	0.30	95
	KVM180-R	55.0	0.30	
Rf3	KVM84-F	40.0	0.80	139
	DPA165-R	41.7	0.80	
Ms8	J-Ms8-F	50.0	1.00	250
	HCA048-R	45.0	1.00	
RT73	J-RT73-F	50.0	0.50	317
	J-RT73-R	52.0	0.50	
T45	J-T45-F	56.0	1.00	378
	J-T45-R	47.6	1.00	

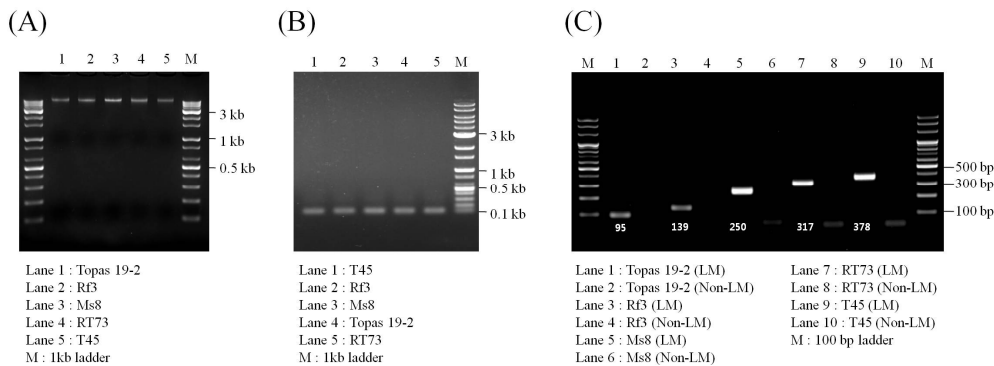


Fig. 3 Genomic DNA qualities of five canola events and the DNA amplifications using newly designed event-specific primer pairs. (A) Genomic DNA of five LM canola events. (B) PCR products (101 bp) amplified by endogenous gene (*Cru A*) specific primers in five LM canola events. (C) DNA amplification using event-specific primers in non-LM canola and five LM events

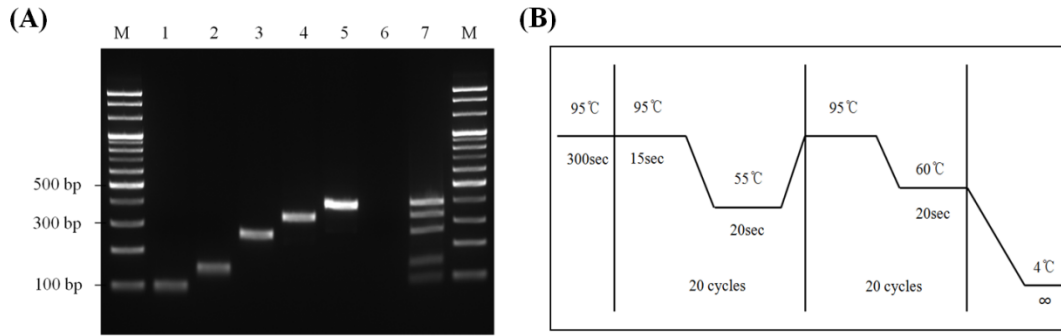


Fig. 4 Electrophoresis gel image of 5 LM canola events using multiplex PCR method. (A) 2.5 % agarose gel image of amplicon by multiplex PCR reaction for five canola events. Lane M, molecular size marker (100 bp DNA ladder); lane 1, Topas 19/2; lane 2, Rf3; lane 3, Ms8; lane 4, RT73; lane 5, T45; lane 6, Non-LM; lane 7, multiplex PCR of five LM canola events. (B) Schematic diagram of optimal multiplex PCR condition

높이기 위하여 결합단계의 결합온도를 55°C 20회, 60°C 20회의 2단계로 나누어 진행하였을 때 최적의 검출효율을 보였다(Fig. 4).

Multiplex PCR 검출법의 활용

2012년 국립환경과학원 연구 보고서(Choi et al. 2012)에 따르면 2009년부터 2012년 까지 수입용도 외 비의도적으로 자연환경에 유출이 확인된 LM 시료가 점차 증가하고 있다. 캐놀라의 경우 국내외 근연종의 야생종 및 재배종이 널리 분포하고 있어 유전자 이동(gene flow) 등에 의한 잡초화 가능성 등의 위해성에 대한 우려의 목소리가 커지고 있어 LMO의 비의도적 자연환경 유출에 대한 적절한 과학적 사후관리가 매우 중요하다(Beckie et al. 2003; Lee et al. 2007; Baek et al. 2008). 부족한 인력 및 연구 인프라에 비해 해마다 증가하는 LM 의심시료를 명확히 분석하여 위해(risk) 요소를 적절히 관리하기 위하여 본 연구에서 제시된 multiplex PCR 검출법은 5회의 단일 LM 이벤트 검출 반응을 1회로 줄임으로써 검출에 소요되는 시간, 연구인력 소모 및 분석 비용을 절감하고, 과거 보고되었던 PCR 검출법에 비해 매우 적은 양의 DNA 시료로도 명확히 검출할 수 있어 매우 효율적으로 활용 가능하다. 연구에서 개발된 multiplex PCR 검출법은 비의도적 유출 LM 캐놀라의 자연환경 모니터링을 위한 기초자료 확보에 기여할 수 있을 것이며, 국내 승인 유통되는 LMO의 과학적 사후관리를 위해 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

적 요

캐놀라(canola)는 식용유 및 바이오 에너지 생산을 위해 전 세계적으로 널리 재배되는 작물이다. 캐놀라의 수요

가 증가하면서 유전자변형 캐놀라에 대한 중요성이 높아짐에 따라 LM 캐놀라 재배면적이 해마다 증가하고 있다. 국내에서는 상업적으로 활용되는 캐놀라를 100% 전량 수입에 의존하고 있으며, 이에 따라 비의도적으로 유출 가능성이 있는 수입 LM 캐놀라의 안전관리 및 생태계 위해성 평가가 요구된다. 본 연구에서는 국내 수입 승인 유통 LM 캐놀라 5개 이벤트(Topas 19/2, Rf3, Ms8, RT73, T45)의 명확한 검출을 위한 동시증폭 검출법(multiplex PCR)을 확립하고자 하였다. PCR 반응 조건은 5개 LM 이벤트가 동시에 명확히 검출되는 최적 primer 농도 및 반응 조건을 통해 Topas 19/2 (95 bp), Rf3 (139 bp), Ms8 (250 bp), RT73 (317 bp), T45 (378 bp)의 서로 다른 생성물 크기로 명확히 구분되도록 하였다. 최적 primer 농도는 반응액 최종농도 0.3~1.0 pmol로 primer 쌍 마다 각각 다른 cocktail을 만들었고, PCR 반응 조건은 95°C 5분 반응 후, 95°C 15초, 55°C 20초 20회 반응하고, 다시 95°C 15초, 60°C 20초 20 회 반응하였을 때 최적 검출이 이루어졌다. 본 연구의 결과로 제시된 multiplex PCR 검출 조건은 국내 수입 유통 LM 캐놀라의 자연환경 모니터링을 위한 검출에 있어 소요되는 연구인력, 비용 및 시간을 보다 효율적으로 개선할 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 2014년 국립생태원 생태보전연구본부 위해생물연구부의 자체 연구과제(NIE-2014-0034)로 수행되었다.

References

Baek HJ, Won SY, Kim JK, Sohn SI, Lee KP, Cho MR, Song JK, Yoon MS, Lee JR, Jin YM, Ryu TH (2008) Study on the gene introgression from GM Chinese Cabbage to major crops in

- cruciferae*. Korean J. Int. Agri. 20(2):124-129
- Beckie HJ, Hugh J, Warwick SI, Nair H, Seeguín-Swartz G (2003) Gene flow in commercial fields of herbicide-resistant canola (*Brassica napus*). Ecol. Appl. 13(5):1276-1294
- Choi HR, Kim YH, Kim SJ, Song HR, Lee JE, Choi JE, Yoon JH (2012) A study environmental monitoring and post-management of LMO (IV). NIER-RP2012-279
- Demeke T, Ratnaya I (2008) Multiplex qualitative PCR assay for identification of genetically modified canola events and real-time event-specific PCR assay for quantification of the GT73 canola event. Food Control. 19(9):893-897
- James C (2014) Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014. ISAAA Brief. No. 49
- Kim JH, Jeong DW, Kim YR, Kwan YK, Rhee GS (2013) Development of a multiplex PCR method for testing six GM soybean events. Food Control. 31:366-371
- Korea Biosafety Clearing House (KBCH) (2014a) Statistics related to GM canola. No. 2014-04
- Korea Biosafety Clearing House (KBCH) (2014b) Trend Report – Crop-specific : Rapeseed/Canola. No. 2014-06
- Lee BK, Kim CG, Park JY, Yi HB, Park KW, Jeong SC, Yoon WK, An JH, Cho KH, Kim HM (2007) Survey of herbicide resistant oilseed rapes around the basin of rivers in Incheon Harbor Area. Kor. J. Weed Sci. 27(1):29-35
- Mazzara M, Bogni A, Savini C, Van Den Eede G (2007) Event-specific Method for the Quantification of Oilseed Rape Line Ms8 Using Real-time PCR. Validation Report and Protocol and Seeds Sampling & DNA Extraction of Oilseed Rape. EUR22917EN
- Mazzara M, Bogni A, Querci M, Van den Eede G (2011) Event-specific Method for the Quantification of oilseed Rape Topas 19/2 Using Real-time PCR. EURL-GMFF. Validation report and protocol. CRLVL12/04VP
- National Institute of Environmental Research (NIER) (2013) The compendium of detection methods for analysis of LMO - 1st edition. ISBN 978-896558-167-3 93530. pp. 42-51
- Savini C, Bogni A, Mazzara M, Van den Eede G (2013) Event-specific Method for the Quantification of oilseed Rape line Rf3 Using Real-time PCR (V.1.01). Validation report, Validation method and Seeds sampling & DNA extraction. EUR26149EN
- Yoo MR, Kim JH, Yea MC, Kim HY (2013) Development of detection method of unapproved genetically modified potato (EH92-527-1) in Korea using duplex polymerase chain reaction. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. 45(2):156-160