

## 국내 승인 LM면화의 자연환경 모니터링을 위한 multiplex PCR 개발

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

### Multiplex PCR method for environmental monitoring of approved LM cotton events in Korea

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

Received: 1 February 2016 / Revised: 29 February 2016 / Accepted: 8 March 2016  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** The growth area of living modified (LM) cotton has steadily increased every year, since its first commercialization in 1996. Development of environmental risk assessment tools and techniques for LM cotton is required for ecosystem safety. We therefore developed multiplex PCR assays for simultaneous detection of two (MON15985, MON531) and four (GHB614, LLCOTTON25, MON88913 and MON1445) LM cotton events approved in Korea, with event specific primer pairs. The PCR reactions were optimized by using event specific primers of six LM cottons at various concentrations. The reactions allows amplification of estimated amplicons of MON15985 (214 bp), MON531 (270 bp), GHB614 (119 bp), LLCOTTON25 (164 bp), MON88913 (276 bp), and MON1445 (389 bp) from multiplex PCR reactions. The multiplex PCR assay developed allowed that two annealing steps (15 cycles at 55°C and 25 cycles at 60°C) were performed for amplification of distinguished two LM cottons, and only one annealing step (50 cycles at 60°C) was necessary for tetraplex PCR. Primer extension step of all PCR reactions was skipped for time-effective amplification. Our methods suggest that two multiplex PCR assays can be cost-effective and a rapid diagnostic tool for environmental LMO monitoring of six LM cottons.

**Keywords** LMO, Cotton, Event, Detection, Multiplex PCR

### 서론

생명공학기술의 발달로 작물의 생산성 증대를 목적으로 개발된 유전자변형생물체(LMO)는 1996년 상업화 이후 지속적으로 증가하고 있다. 면화(cotton)는 아욱과(Malvaceae) 목화속(Gossypium)에 속하는 식물로서 면화는 섬유를 뽑는데 이용되고, 면실유는 식용으로 가공 후 남은 것은 사료로 이용되는 등 다양하게 활용되어 왔다. 옥수수, 대두, 캐놀라와 달리 면화는 아시아에서 대부분 재배와 이용이 이루어지고 있고, 인도와 중국이 최대의 재배국이자 생산국이다. 전세계 면화 재배면적 3,600만 ha 중 LM 면화가 70%인 2,390만 ha를 차지하고 있으며, 이는 전체 LM 작물 재배면적의 14%를 차지하는 수치이다. 우리나라는 세계 1위의 면실(사료용) 수입국이며, 세계 4위의 면실박(목화의 씨에서 기름을 짜내고 남은 찌꺼기) 수입국이다. 2013년 기준 농업용으로 국내 LM 면실 수입량은 14만 7,000톤으로 전체 면실수입량 15만 1,600톤의 97%를 차지한다(James 2014; KBCH 2014).

이처럼 해마다 증가하는 LM 면화의 수입량과 맞물려 국내 유통과정에서 자연환경으로의 비의도적 유입이 우려되고 있는 실정이며, 특히 사료로부터 소화되지 않은 채 배설물로 배출되거나, 축제지 등에서 널리 전파된 사례가 보고되고 있어 LM 면화의 자연환경 노출에 관한 안전관리 방안이 반드시 마련되어야만 한다(NIE 2014).

2000년대 초반부터 국내에서는 사료용 LM 면화 단일 이벤트로 몬산토사(社)에서 개발한 MON531, MON15985, MON1445, MON88913과 바이엘크롭사이언스사(社)에서 개발한 GHB614, LLCOTTON25가 승인 유통되고 있다. MON531과 MON15985는 해충저항성의 특징을 갖도록 만들어진 이벤트로, MON15985는 Cry1Ac와 neomycin-phosphotransferase

B.-H. Jo · M.-A. Seol · S. Y. Shin · I. R. Kim · W. Choi · H.-R. Song · S.-J. Eum · J. R. Lee (✉)  
국립생태원 생태보전연구소  
(Division of Ecological Conservation, National Institute of Ecology (NIE), Seocheon 33657, Korea)  
e-mail: leejr73@nie.re.kr

II (*npt II*) 유전자를 삽입한 MON531에 더하여 Cry2Ab와  $\beta$ -glucuronidase (*Gus*) 단백질을 발현하도록 개발되었고, MON1445와 MON88913은 *Agrobacterium* sp. strain CP4 유래의 *cp4 epsps* 유전자를 삽입하여 제초제 glyphosate에 내성을 갖도록 제작되었다. GHB614는 옥수수에서 유래한 double-mutated 5-enolphruvyl 3-shikimate phosphate synthase (2mEPSPS)를 암호화 하여 glyphosate 제초제내성을 갖도록 제작되었고, LLCOTTON25는 그람 양성 토양박테리아 *Streptomyces hygroscopicus* 유래로 Phosphinothricin-N-acetyltransferase (*PAT*) 단백질을 발현하도록 하는 *bar* 유전자를 삽입하여, 제초제 glufosinate-ammonium의 제초활성성분인 phosphinothricin (bialaphos)을 불활성화 하도록 제작되었다(NIE 2015).

국립생태원에서는 2009년부터 국립환경과학원에서 실시해온 「LMO자연환경 모니터링 및 사후관리」 연구를 2014년부터 이관 받아 수행하고 있으며, 국내 자연생태계에 비의도적으로 유출된 LM 작물의 현황을 파악하고 분석함으로써 LM 작물의 자연환경 유출 실태를 점검하고 있으며, 체계적인 사후관리를 통해 LMO의 안전관리를 위한 기초데이터를 축적하고 있다. 해마다 전국적으로 확대 시행되고 있는 LMO 자연환경 모니터링 사업에서 LMO로 의심되는 시료가 채취될 경우, 이를 명확하게 판정하기 위한 검증된 과학적 검출방법의 확보는 매우 중요하다. 또한, 전국적인 모니터링을 통해 수집된 LM 의심시료의 양이 해마다 증가하고 있는데 비해, 분석에 필요한 연구인력과 연구 기자재는 매우 부족한 실정이다. 따라서, 다수의 단일 이벤트를 동시에 검출할 수 있는 multiplex PCR 검출법은 LM 의심시료 분석 및 판별을 위해 필요한 연구인력, 시간 및 비용을 효율적으로 해결할 수 있는 좋은 방법으로 제시될 수 있다(Fig. 1). 하지만 이와 같은 multiplex PCR 검출법에 대한 연구는 LM 콩, 감자, 옥수수와 같이 두부, 전분 생산을 위한 식품용 GMO와 사료원료 작물에 국한되어 개발된 사례가 보고된바 있

다(Kim et al. 2013; Yoo et al. 2013).

LM 면화 이벤트에 대해서는 단일이벤트 특이적인 정량적 및 정성적 분석법이 개발된 바 있고(Yang et al. 2005; Baeumler et al. 2015), 면화의 경우 4개(MON1445, MON15985, MON88319, LLCOTTON25) 면화 이벤트에 대한 동시 검출용 마커가 개발된 사례가 있다(Kim et al. 2008). 하지만 MON15985 이벤트의 경우 MON531의 hybrid line을 모본으로 개발된 이벤트이기 때문에 별도의 조합을 갖는 동시 검출법이 필요하고, 이를 제외한 다른 이벤트들은 새로운 조합 형태의 동시검출법 개발이 필요하다.

최근 국립생태원에서는 국내 승인 유통 5개 LM 캐놀라에 대한 동시검출법을 개발한 바 있고(Jo et al. 2015), 이어 국내 승인 유통 LM 면화 중 해충저항성 LM hybrid 품종과 이를 모본으로 개발된 2개 LM 면화 이벤트(MON531, MON15985)와 제초제저항성 4개의 LM 면화 이벤트(MON1445, MON88913, GHB614, LLCOTTON25)를 각각 동시에 증폭하는 검출법을 개발함으로써 LMO 자연환경 모니터링으로 채집된 LM 면화 의심시료를 빠른 시간 내 효과적으로 판별 가능한 분석기법을 제공하고, 이를 활용한 LM 면화의 비의도적 자연생태계 혼입에 대한 과학적 사후관리 체계를 강화하고자 하였다.

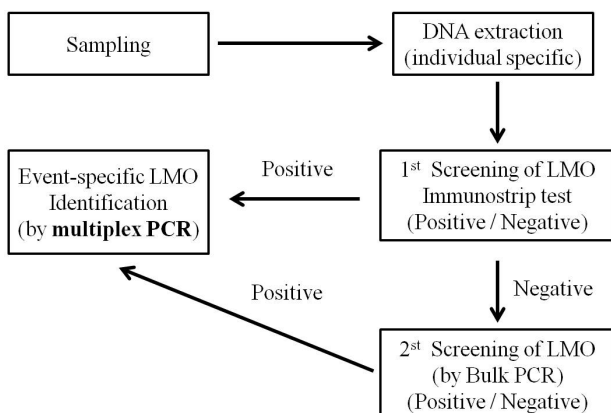
## 재료 및 방법

### 표준물질

동시검출기법 개발에 사용된 LM 면화 MON531, MON15985, MON1445, MON88913, GHB614, LLCOTTON25 및 Non-modified 면화의 표준물질은 미국유지화학협회(American Oil Chemists' Society; AOCS, USA)로 부터 구입하였다. 바이엘크롭사이언스사(社)의 GHB614와 LLCOTTON25 및 non-LM 면화는 앞으로부터 정제된 genomic DNA 상태로 구입하였고, 이를 제외한 나머지 몬산토사(社)의 LM 면화 이벤트들은 분말상태의 시료로 구매하여 genomic DNA를 순수분리, 정제한 후 DNA 상태로 구입된 표준물질과 함께 PCR의 주형으로 사용하였다.

### Genomic DNA 순수 정제

PCR 주형으로 사용하기 위하여 분말상태로 구입된 LM 면화 이벤트 표준물질에서 genomic DNA를 정제하였다. 이미 분말상태의 표준물질을 보다 미세하게 멸균된 막자사발에서 분쇄한 후, DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, German)를 이용하여 제공된 매뉴얼에 따라 순수 DNA를 정제하였다. 정제된 genomic DNA와 DNA 상태로 구입된 표준물질 DNA는 1.0% agarose gel 전기영동으로 확인한



**Fig. 1** Schematic diagrams of LMO environmental monitoring process

후, Nano-drop 2000 (Thermo scientific, USA)으로 정확한 정량을 실시하여, 3차 증류수로 30~40 ng/μl의 농도가 되도록 희석하였다. PCR 반응의 주형으로 사용된 DNA 최종 반응 농도는 1~2 ng/μl가 되도록 하였다.

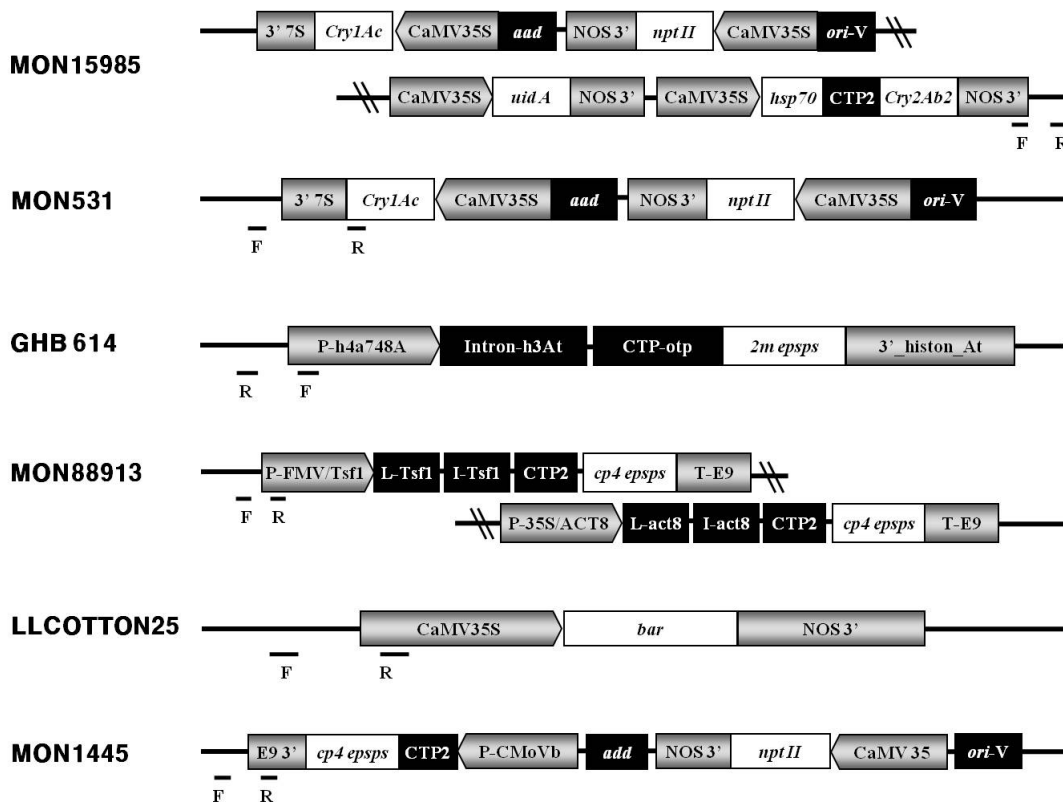
내재유전자 및 이벤트 특이적 primer 제작

면화의 내재유전자인 Fiber-specific acyl carrier protein 1 (*acp1*, GenBank Accession no. U48777) 유전자의 염기서열을 기초로 하여 76 bp의 PCR 산물을 얻을 수 있도록 *acp1* primer 1(5'-ATTGTGATGGGACTTGAGGAAGA-3')와 *acp1* primer 2(5'-CTTGAACAGTTGTGATGGATTGTG-3') 한 쌍을 제작하여 사용하였다(Mazzara et al. 2009). 6개의 이벤트를 동시에 분석하기 위한 multiplex PCR 분석용 primer는 한쪽은 내재유전자, 반대쪽은 plant genome sequence에 위치하도록 하여 특정 이벤트를 특이적으로 검출할 수 있도록 제작하였다(Fig. 2). 각각의 이벤트 특이적 primer는 multiplex PCR 시 각각의 이벤트를 생성물 크기로 명확하게 구분할 수 있도록 생성물의 크기가 전기영동 상에서 식별 가능한 크기로 제작하기 위해 MON15985, MON88913, MON1445의 forward primer 및 GHB614 primer 쌍은

유럽공동연구센터(Joint Research Centre; JRC)에서 공인된 보고서에 명시된 primer를 참고하여 제작하였고, 나머지 primer 들은 조사된 염기서열(GenBank Accession no. AX600160, AX600161, HQ233646, EU030419)을 기초로 생성물의 크기를 조절하여 제작하였다(GMDD 2015) (Table 1).

Polymerase chain reaction (PCR) 반응

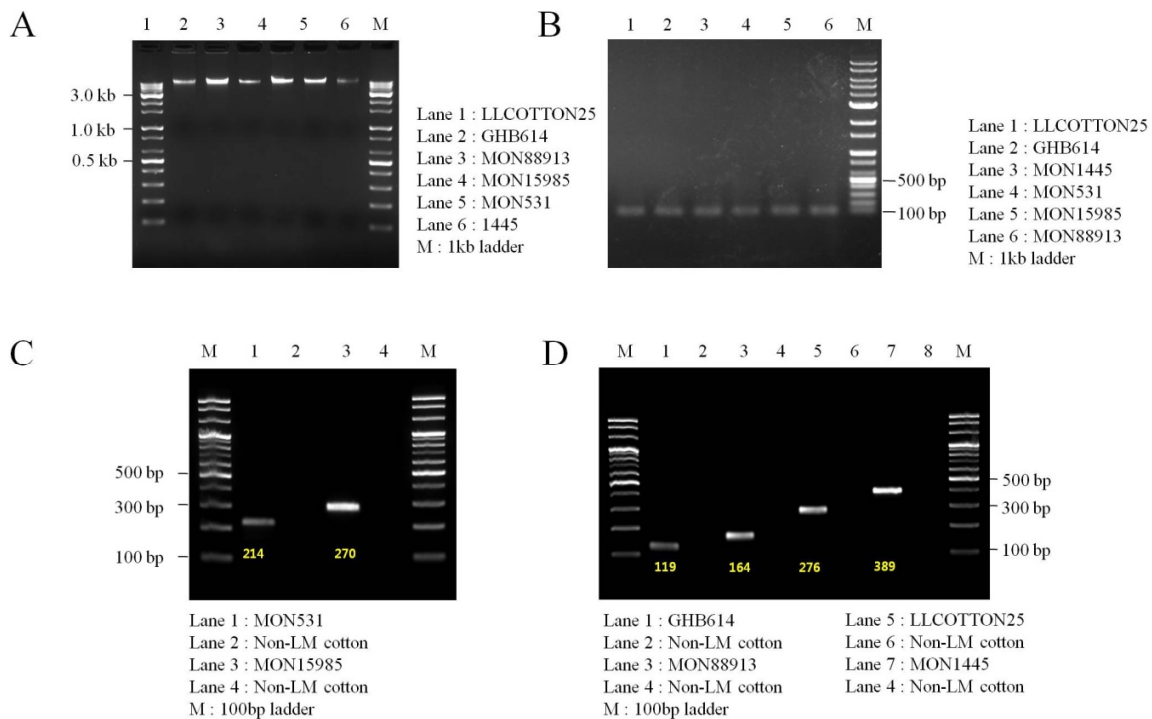
Negative control에 이용될 Non-LM 및 LM 면화 이벤트의 genomic DNA는 template농도에 의한 편차를 줄이기 위해 40 ng/μl의 동일한 농도로 희석하여 진행하였다. 내재유전자 및 각각의 이벤트 특이적 primer 쌍의 반응 여부를 확인한 후, 4개의 LM 면화 이벤트를 한번의 PCR 반응으로 동시에 검출하기 위한 tetraplex PCR과 2개의 LM 면화 이벤트를 동시에 검출하기 위한 duplex PCR에서 모든 이벤트가 밴드로 식별되는 최적 검출조건을 찾을 때까지 primer 농도 및 PCR 반응조건 등 변경을 반복하여 최적반응조건을 탐색하였다. 모든 PCR 반응 용액은 Solg™ 2X EF-Taq PCR pre-Mix (SolGent, Korea)를 사용하여 반응액 총 양 30 μl가 되도록 하여 반응하였다. 내재유전자 및 각각의 이벤트 특이적 PCR 증폭은 forward/reverse primer



**Fig. 2** Schematic diagrams of event-specific primers designed to detect six different LM cotton 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. (◻), promoter; (◼), leader sequence encoding a chloroplast transit peptide; (▭), encoding gene; (▩) 3' terminator)

**Table 1** Primer pairs for event specific PCR

Event name	Primer name	Sequence (5'- 3')	Product size (bp)	References
MON15985	MON15985 F	GTTACTAGATCGGGGATATCC	214	Savini et al. 2008 This study
	J-15985-R	GCCGTCAGGAAAACGTTCTGTGACA		
MON531	J-531-F	GGTACGGATGAGTAGGCCTACTCTT	270	This study
	J-531-R	GCATCCACGGACTCTTTGGCCTCCTT		
GHB614	G614SHA007	CAAATACACTTGGAAACGACTTCGT	119	Mazzara et al. 2007
	G614SHA008	GCAGGCATGCAAGCTTTTAAA		
MON88913	MON88913 R	CAAATTACCCATTAAGTAGCCAAATTAC	164	Delobel et al. 2009 This study
	J-88913-R	CGAGCAGGACCTGCAGAAGCTTGA		
LLCOTTON25	J-LL25-F	CATCATCCGTTTCTTGGACCAC	276	This study
	J-LL25-R	GCCGCCTTTGTACAACCCAGTCAT		
MON1445-2	1445 F	GGAGTAAGACGATTCAGATCAAACAC	389	Mazzara et al. 2008 This study
	J-1445-R	CGTGGCCTTCTATGACCGAAGTT		



**Fig. 3** Genomic DNA qualities of six LM cotton events and the PCR amplifications using newly designed event-specific primer pairs. (A) Genomic DNA of six LM cotton events. (B) PCR products (76 bp) amplified by endogenous gene (*acp 1*) specific primer in six LM cotton events. (C-D) PCR amplification using event-specific primers in negative control (non-LM cotton), two (C: MON531, MON15985) and four (D: GHB614, LLCOTTON25, MON88913, MON1445) LM cotton events

각각 최종 농도 0.33 pmol이 되도록 하였고, template DNA 최종 반응농도는 1~2 ng/μl가 되도록 반응액을 제조한 후, ProFlex™ Base (Applied biosystems, USA) PCR 기기를 사용하여 증폭하였으며, PCR 기본 반응 조건은 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C 15초, 60°C 20초를 40회 수행하였고, 신장(extension) 단계는 생략하였다.

Multiplex PCR은 해당 조합의 이벤트 특이적 primer 쌍을 모두 섞은 primer cocktail을 최적 반응조건이 될 때까지 조절하여, 분석시간의 효율성을 고려하여 총 PCR 반응시간이 1시간 내외가 되도록 조절하였다. 생성된 모든

PCR 산물은 EtBr 대체제품 LoadingSTAR (DYNEBio, Korea)를 1X가 되도록 혼합하여 2.5% agarose gel 상에서 135V로 전기영동 하고, ChemiDoc™ XRS+(Bio-Rad, USA) 이미지 분석장치를 이용하여 밴드를 확인하였다.

## 결과 및 고찰

내재유전자 및 이벤트 특이적 primer 쌍의 특이성 확인  
변화의 내재유전자(*acp 1*) 및 LM 변화 단일이벤트 특이

적 증폭을 위해 제작된 primer 쌍의 반응 적합성을 확인하기 위하여 LM 면화 표준물질 각각의 genomic DNA를 template로 PCR 반응을 실시하였다. Figure 3A에서 보는 바와 같이 표준물질로부터 정제된 genomic DNA는 전기영동했을 때, 농도에 큰 차이 없는 단일 밴드가 확인되었고, 내재유전자 primer 쌍으로부터 모두 76 bp 크기의 특이적 밴드로 나타나 정제된 genomic DNA가 모두 면화로부터 유래 되었으며 *acp 1* 내재유전자 특이적으로 증폭되었음을 확인하였다(Fig. 3B). 또한 Figure 3C 및 D에서 보는 바와 같이 LM 면화 이벤트 특이적 primer 쌍으로부터 예상 크기의 특이적인 밴드가 증폭 되었고, 각각의 밴드를 염기서열 분석한 결과 예상좌위의 염기서열과 일치되었다. 또한, 음성 대조구인 non-LM 표준물질 DNA에서는 전혀 증폭되지 않았다.

**Multiplex PCR 최적 조건 확립**

국내 수입이 승인되어 유통되고 있는 6개 LM 면화 이벤트를 동시에 검출할 수 있는 multiplex PCR 최적조건은 2개 LM 면화 이벤트를 특이적으로 검출하는 각각의 primer 쌍을 모두 섞은 cocktail을 제조하여 PCR 반응을 수행하는 duplex PCR과 4개 LM 면화 이벤트를 특이적으로 PCR 반응을 수행하는 tetraplex PCR로 각 set를 구성하였다.

Duplex PCR 최적 primer 농도는 MON15985 0.66 pmol, MON531 0.33 pmol의 최종반응 농도가 되도록 primer cocktail을 제조하여 반응하였을 때 가장 좋은 검출효율을 보였고, tetraplex PCR 최적 primer 농도는 GHB614 0.3 pmol, MON88913과 LLCOTTON25은 0.2 pmol, MON1445 0.6 pmol의 최종반응 농도로 primer cocktail을 제조하여 반응 하였을 때 가장 좋은 검출효율을 나타내었다(Table 2).

**Table 2** Optimal conditions for multiplex PCR of 6 LM cotton events

Event name	Primer name	GC (%)	Final primer concentration (pmol)	Product Size (bp)
MON15985	MON15985 F	47.6	0.66	214
	J-15985-R	54.2	0.66	
MON531	J-531-F	52.0	0.33	270
	J-531-R	57.7	0.33	
GHB614	G614SHA007	41.7	0.30	119
	G614SHA008	42.9	0.30	
MON88913	MON88913 R	32.1	0.20	164
	J-88913-R	58.3	0.20	
LLCOTTON25	J-LL25-F	50.0	0.20	276
	J-LL25-R	56.0	0.20	
MON1445-2	1445 F	42.3	0.60	389
	J-1445-R	52.2	0.60	

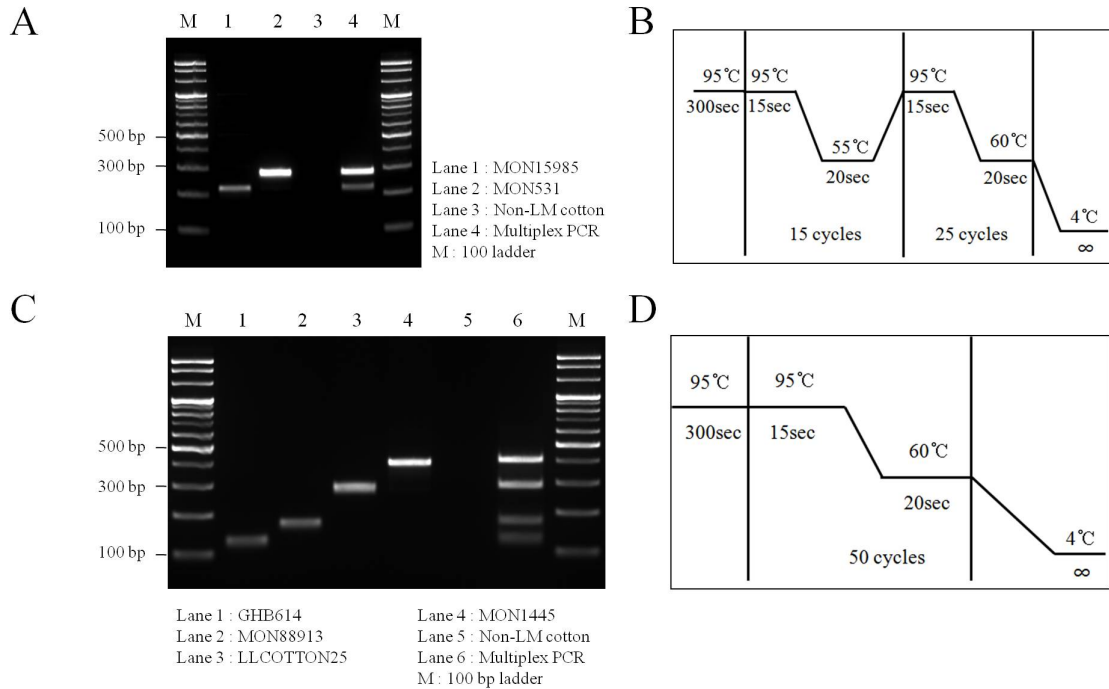
Duplex PCR의 최적 반응조건은 초기 변성단계(denaturation stage)를 5분간 진행하고, 이후 변성단계 15초, 결합단계(annealing stage) 20초를 총 40회 진행하였고, 분석시간을 단축하기 위하여 신장단계(extension stage)를 생략하였으며, 총 반응시간이 1시간 내외가 되도록 하였다. MON15985의 민감도를 높이기 위해 결합단계의 온도(annealing temperature)를 55°C 15회, 60°C 25회의 2단계로 나누어 진행하였을 때 최적의 검출효율을 보였다. Tetraplex PCR의 최적 반응조건은 초기 변성단계(denaturation stage)를 5분간 진행하고, 이후 변성단계 15초, 결합단계(annealing stage) 20초를 총 50회 진행하였고, 마찬가지로 분석시간 단축을 위하여 신장단계(extension stage)를 생략하여 총 반응시간이 1시간 내외가 되도록 하였다(Fig. 4).

**Multiplex PCR 검출법의 활용 사례**

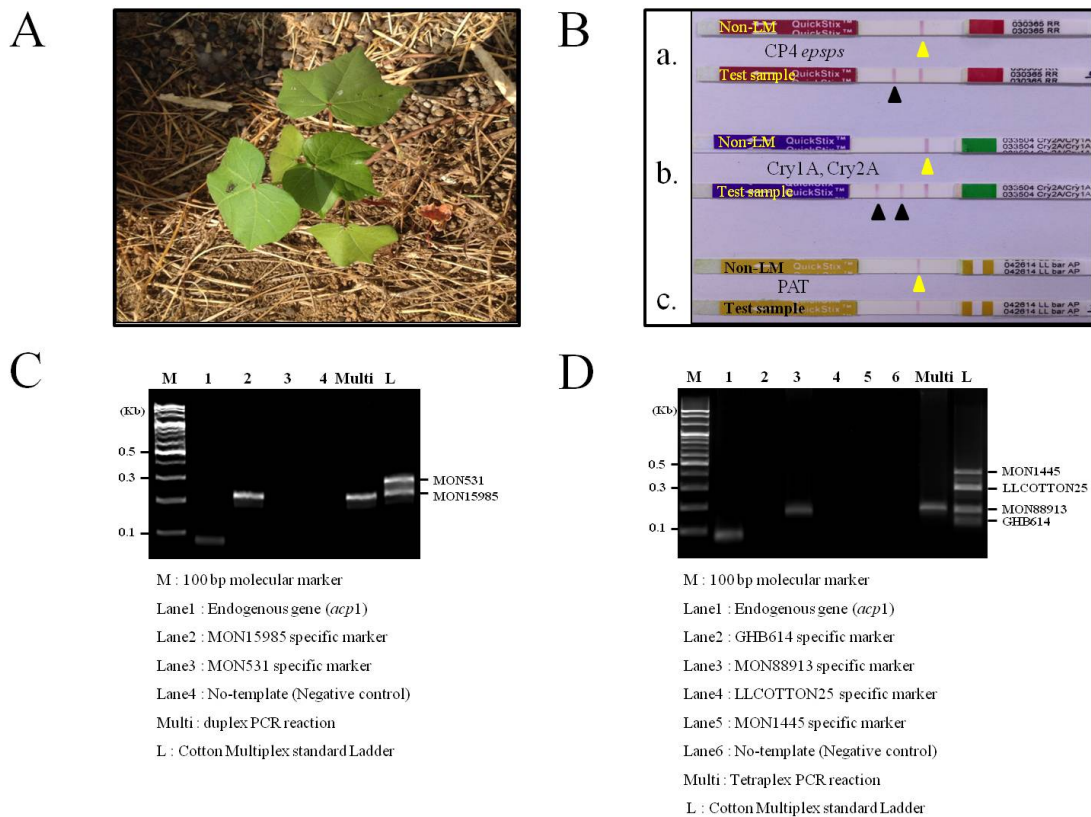
LMO 전국 자연환경 모니터링 및 사후관리 연구를 통해 국내 축산농가 주변에서 채집한 면화의 잎으로부터 genomic DNA를 정제하고, 이를 대상으로 본 연구에서 개발한 multiplex PCR 검출법을 활용하여 반응결과를 조사하였다. 면화는 젓소 사육장 입구에서 단일 자생체로 발견되었으며, 1차 strip test에서 CP4 epsps 양성, Cry 1A, Cry 2A 양성 반응을 보여 LM 면화로 추정되어 duplex PCR 결과 MON15985가 검출되었고, tetraplex PCR 결과 MON88913이 검출되어 MON15985 X MON88913 stack 이벤트로 확인되었다. 본 결과는 해충저항성 이벤트인 MON15985와 제초제저항성 이벤트인 MON88913의 1차 strip test 결과와도 일치되는 양상을 보였다(Fig. 5).

2014년 국립생태원 연구보고서(NIE, 2014)에 따르면 해마다 수입용도 이외 비의도적으로 자연환경에 유출이 확인된 LM 시료가 점차 증가하고 있고, 특히 최근 LM 면화의 유출이 눈에 띄게 증가하고 있다. 면화의 경우 국내 젓소 축산농가에서 원유의 유지방 함유량의 증가를 목적으로 면실종자의 혼합사료를 광범위하게 사용하고 있기 때문에 LM 면화의 유통과정 및 사용 단계에서의 의도하지 않은 유출이 야기되고 있는 실정이다. LM 작물의 자연생태계 비의도적 유출은 생물진화의 교란, 생물 다양성의 파괴, 잡초화 가능성, 도입유전자의 전이, 토양미생물의 군집변화 등과 같은 잠재적인 부정적 영향에 대한 논란이 계속되고 있다. 면화의 경우 종자의 동면가능성 및 관상적 가치에 의한 인위적인 확산 가능성 등 위해성에 대한 우려의 목소리가 커지고 있어 모니터링을 통한 사전 제거 등 적절한 사후관리가 매우 중요하다. 하지만, 해마다 증가하는 LM 의심시료에 비해 부족한 인력과 한정적인 연구인프라는 LMO 사후 안전관리에 큰 걸림돌이 되고 있다.

본 연구를 통해 개발된 LM 면화의 multiplex PCR 검출법은 기존에는 6회의 단일 LM 면화 이벤트 검출 반응으



**Fig. 4** Electrophoresis gel image of six LM cotton events using multiplex PCR methods. (A-B) Duplex PCR reaction for MON15985 and MON531 events. 2.5% agarose gel image of amplicon (A) and its schematic diagram (B) of optimal duplex PCR condition. (C-D) Tetraplex PCR reaction for GHB614, MON88913, LLCOTTON25 and MON1445 events. 2.5% agarose gel image of amplicon (C) and its schematic diagram (D) of optimal tetraplex PCR condition



**Fig. 5** Application of multiplex PCR methods for the collected LM cotton candidates by LMO monitoring. (A) Image of expected LM cotton sample. (B) LMO detection using immunochemical strip test. Yellow arrow is control line and black arrow is positive detection line. (C-D) Analysis of duplex PCR (C) and tetraplex PCR (D) to screen indicated LM cottons

로 얻을 수 있는 분석결과를 단 2회 반응만으로 얻을 수 있고, PCR 반응 조건의 최적화를 통해 기존의 방식에 비해 검출에 소요되는 시간을 최소화 하여 소모되는 연구 인력, 비용 및 시간을 절감할 수 있다. 또한, 과거 보고되었던 PCR 기반의 LMO 검출법에 비해 매우 적은 양의 DNA 시료만으로도 각각의 이벤트를 특이적으로 명확히 검출할 수 있어 짧은 분석시간에도 높은 검출효율을 얻을 수 있다.

현재 국내 수입 승인되어 유통 가능한 LM 면화는 12개 단일이벤트와 12개의 hybrid stack 이벤트가 있다. 본 연구에서 제시된 검출기법은 이 가운데 6개의 단일이벤트에 관한 것으로 6개의 stack 이벤트의 검출을 허용한다. 즉, 검출되지 않는 50%의 이벤트에 대한 지속적인 검출법 개발이 필요하지만 공식적인 표준시료를 확보하기 어려워 관련 연구가 매우 제한적이다. 따라서, LM 이벤트의 자연환경 내 비의도적 유출에 대한 적극적인 사후관리 체계를 위해 해당기관의 제도적인 뒷받침이 필요하며, 지속적인 다양한 검출방법의 개발이 필요할 것이다.

본 연구에서 개발된 multiplex PCR 검출법은 비의도적 유출 LM 면화의 자연환경 모니터링을 위한 기초자료 확보에 기여할 수 있을 것이며, 국내 승인 유통되는 LMO의 과학적 사후관리를 위해 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

## 적 요

면화(cotton)는 섬유를 수확하고, 면실유는 식용으로 가공 후 남은 것은 다시 사료로 이용되어 다방면으로 다양하게 활용되는 작물이다. LM 면화는 옥수수, 대두, 케놀라와 달리 아시아권(중국, 인도 등)에서 가장 많이 재배되고 있으며, 우리나라는 2013년까지 세계 1위의 LM 면실(사료용) 수입국이며, 세계 4위의 면실박 수입국으로 해마다 증가하는 LM 면화의 수입량과 맞물려 유통 및 소비과정에서의 비의도적으로 유출 가능성이 증가함에 따라 LM 면화의 자연생태계 위해성 평가 및 안전관리가 요구된다. 본 연구에서는 국내 수입·승인 LM 면화 6개 이벤트(MON15985, MON531, GHB614, LLCOTTON25, MON88913, MON1445)의 동시증폭 검출법(multiplex PCR)을 개발하여 보다 신속하고 명확한 검출기법을 확립하고자 하였다. 최적 multiplex PCR 반응 조건은 2개 LM 면화 이벤트 MON15985 (214 bp), MON531 (270 bp)와 4개 LM 면화 이벤트 GHB614 (119 bp), LLCOTTON25 (164 bp), MON88913 (276 bp), MON1445 (389 bp)가 한번의 반응에 명확하게 검출되는 최적 반응 조건 및 primer 반응 농도의 조절을 통해 서로 다른 생성물 크기로 명확히 구분되도록 하였고, 최적 primer 농도는 반응액 최종농도 0.2~0.66

pmol로 primer 쌍 마다 각각 다른 최적 농도 조합의 cocktail을 만들어 활용하였다. Duplex PCR 반응 조건은 초기 95°C 5분 반응 후, 95°C 15초, 55°C 20초 15회 반응하고, 다시 95°C 15초, 60°C 20초 25회 반응하였을 때 최적 검출이 이루어졌고, tetraplex PCR 반응 조건은 95°C 5분 반응 후, 95°C 15초, 60°C 20초 50회 반응하였을 때 최적 검출이 이루어졌다. 본 연구에서 개발된 multiplex PCR 검출법은 국내 수입·유통 LM 면화의 자연환경 모니터링에 활용함에 있어 요구되는 연구인력, 시간 및 비용을 보다 효율적으로 개선하는데 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 사 사

본 연구는 2014년도 국립생태원 생태보전연구본부 위해 생물연구부의 자체 연구과제(NIE-2014-0034)로 수행되었다.

## References

- Baumler S, Wulff D, Tagliani L, Song P (2015) A real-time quantitative PCR detection method specific to widestrike transgenic cotton (Event 281-24-236/3006-210-23). *J Agric Food Chem*. 54:6527-6534
- Delobel C, Luque Perez E, Pinski G, Bogni A, Mazzara M, Van den Eede G (2009) Event-specific method for the quantification of cotton MON88913 using real-time PCR - Validation report and protocol. EURL-GMFF Online Publication DOI: 10.2788/58818
- GMO Detection method Database (GMDD) (2016. 01. 20.) <http://gmdd.shgmo.org/>
- James C (2014) Global status of commercialized biotech/GM crops: 2014. ISAAA Brief. No. 49
- Jo BH, Lee JR, Choi W, Moon JC, Shin SY, Eum SJ, Seol MA, Kim IR, Song HR (2015) Development of multiplex PCR-based detection method for five approved LM canola events in Korea. *J Plant Biotechnol*. 42:117-122
- Kim JH, Kim SA, Seo YJ, Lee WY, Park SH, Kim HY (2008) Multiplex PCR detection of the MON1445, MON15985, MON88913, and LLCotton25 varieties of GM cotton. *Food Sci. Biotechnol*. 17:829-832
- 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) (2014) Trend Report - Crop-specific : Cotton. No. 2014-10
- Mazzara M, Bogni A, Van den Eede G (2008) Event-specific method for the quantification of cotton line MON1445 using real-time PCR. EURL-GMFF Online Publication, DOI: 10.2788/4455
- Mazzara M, Savini C, Van Den Eede G (2009) Event-specific method for the quantification of cotton event MON 88913

- using real-time PCR. Protocol. CRLVL05/07VP
- National Institute of Ecology (NIE) (2014) Study on environmental monitoring and post-management of LMO (VI). NIE-2014-0039
- National Institute of Ecology (NIE) (2015) The compendium of detection methods for analysis of LMO. ISBN 979-11-86197-24-0. pp. 74-84
- Savini C, Mazzara M, Munaro B, Van den Eede G (2008) Event-specific method for the quantification of cotton line MON15985 using real-time PCR - Validation report and protocol. EURL-GMFF Online Publication, DOI 10.2788/4378
- Yang L, Pan A, Zhang K, Yin C, Qian B, Chen J, Huang C, Zhang D (2005) Qualitative and quantitative PCR methods for event-specific detection of genetically modified cotton Mon1445 and Mon531. *Transgenic Res.* 14:817-831
- 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.* 45:156-160