

## 유전자변형 면화 MON757, MON88702, COT67B, GHB811의 동시검출법 개발

김일룡, 설민아, 윤아미, 이종로, 최원균\*

국립생태원 생태안전연구소

## Development of simultaneous detection method for living modified cotton varieties MON757, MON88702, COT67B, and GHB811

Il Ryong Kim, Min-A Seol, A-Mi Yoon, Jung Ro Lee and Wonkyun Choi\*

Division of Ecological Safety, National Institute of Ecology (NIE), Seocheon 33657, Republic of Korea

### \*Corresponding author

Wonkyun Choi  
Tel. 041-950-5822  
E-mail. wonkyun@nie.re.kr

**Received:** 14 September 2021

**Revised:** 19 October 2021

**Revision accepted:** 25 October 2021

**Abstract:** Cotton is an important fiber crop, and its seeds are used as feed for dairy cattle. Crop biotechnology has been used to improve agronomic traits and quality in the agricultural industry. The frequent unintentional release of LM cotton into the environment in South Korea is attributed to the increased application of living modified (LM) cotton in food, feed, and processing industries. To identify and monitor the LM cotton, a method for detecting the approved LM cotton in South Korea is required. In this study, we developed a method for the simultaneous detection of four LM cotton varieties, MON757, MON88702, COT67B, and GHB811. The genetic information of each LM event was obtained from the European Commission-Joint Research Centre and Animal and Plant Quarantine Agency. We designed event-specific primers to develop a multiplex PCR method for LM cotton and confirmed the specific amplification. Using specificity assay, random reference material (RM) mixture analysis and limit of detection (LOD), we verified the accuracy and specificity of the multiplex PCR method. Our results demonstrate that the method enabled the detection of each event and validation of the specificity using other LM RMs. The efficiency of multiplex PCR was further verified using a random RM mixture. Based on the LOD, the method identified 25 ng of template DNA in a single reaction. In summary, we developed a multiplex PCR method for simultaneous detection of four LM cotton varieties, for possible application in LM volunteer analysis.

**Keywords:** living modified organisms, LMO, multiplex PCR, cotton

## 서 론

기후변화와 인구증가로 인류는 끊임없이 식량 위기를 겪어 왔으며 이를 극복하기 위한 하나의 대안으로 현대 생명공학을 이용한 유전자변형생물체 (Living modified

organisms; LMO)가 개발되었다. 최근 LM 작물의 재배 면적과 생산량은 꾸준한 증가 추세에 있으며, 주요 4대 작물인 옥수수, 콩, 카놀라, 면화의 LM 작물 재배 면적은 전 세계 29개국에 걸쳐 약 1억 9천만 ha에 이른다 (ISAAA 2019). 특히, LM 면화 (*Gossypium hirsutum*)의 재배 면적은 총 면화 재

배 면적의 약 79%를 차지하고 있으며 우리나라는 축산농가에서 면실(면화의 종자) 사료 이용의 증가로 매년 사료용 LM 면화의 수입이 증가하고 있다(KBCH 2021). 최근 농업생명공학 응용을 위한 국제 서비스(International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications; ISAAA)의 보고에 따르면 면화의 주요 재배국의 LM 면화 채택률은 미국이 98%로 가장 높고 중국(95%), 인도(94%), 아르헨티나(90.5%), 브라질(84%)이 뒤를 잇고 있으며 그 규모는 매년 증가하고 있다(ISAAA 2019).

LM 면화 GHB811은 *Pseudomonas fluorescens* 유래 *hppd*PF W336 유전자와 옥수수 유래 제초제 저항성 유전자인 *zm-2meps* 유전자를 발현시켜 글리포세이트 제초제에 저항성을 갖도록 개발되었다. 토양미생물인 *Bacillus thuringiensis* 유래 Cry51Aa2 단백질을 발현시킨 MON88702는 반시목 면화 해충에 독성을 갖는 이벤트로 최근 면화 해충인 *Orius majusculus*, *Frankliniella fusca*, *Tetranychus urticae*, *Lygus lineolaris*에 대한 위해성 연구가 진행되었다(Cervantes *et al.* 2019; Huseh *et al.* 2020; Kim *et al.* 2021). LM 면화 COT67B와 MON757 이벤트는 신젠타와 몬산토에서 개발한 *B. thuringiensis* 유래 Cry1Ab 단백질을 발현시키며 인시류 해충에 대한 저항성을 갖는다.

다수의 시료 분석 시험에서 분석 시간과 비용, 노동력을 절감할 수 있는 방법으로 다양한 분자진단 분야에서 PCR 기반의 동시검출법이 활용되고 있다(Ali *et al.* 2014). LMO를 검정하기 위한 검출법에서도 동시검출법 개발이 활발하게 이뤄지고 있으며 국내에서는 주로 자연생태계에 비의도적으로 유출된 LMO의 이벤트 검정에 동시검출법이 활용되고 있다. 환경부와 국립생태원의 LMO 동시검출법 개발은 최근 국내 승인된 5개 작물인 옥수수, 콩, 면화, 카놀라, 알팔파를 대상으로 개발 중에 있다(NIE 2020a). LM 면화에 대한 국립생태원 개발 현황은 MON88701, DAS-81910-7, COT102, T304-40을 포함하는 4개 이벤트 동시검출법(Eum *et al.* 2019)을 개발하였으며, MON531, MON15985, MON88913, GHB614, LLCOTTON25, MON1445 6개 이벤트 동시검출법(Jo *et al.* 2016)을 개발하고 여기에 GHB119, 281-3006를 추가하여 8개 이벤트를 1회 PCR 반응으로 검정할 수 있는 고효율의 동시검출법(Kim *et al.* 2019)을 개발하여 LMO 자연환경 모니터링에 활용하고 있다.

본 연구에서는 국내 승인된 LM 면화 4종 이벤트(MON 757, MON88702, COT67B, GHB811)에 대한 이벤트 특이

적인 동시검출법을 개발하였으며 특이도 확인 및 무작위 표준물질(Reference material; RM) 혼합시료 분석, 검출한계(Limit of Detection; LOD) 분석을 통해 동시검출법 성능을 검증하였다. 이번에 개발된 LM 면화 동시검출법은 환경부 및 국립생태원 LMO 자연환경 모니터링 및 사후관리 연구에 활용될 것이며 식물 검역 및 식품 성분 검사에도 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 재료 및 방법

### 1. 표준물질 및 DNA 추출

본 연구에서 사용된 LM 면화 RM GHB811, MON88702, COT67B는 ‘유전자변형생물체 국가간 이동 등에 관한 법률’(이하 LMO법) 통합고시 제6-29조에 따라 LMO 안전관리 담당 정부 부처로부터 제공받아 연구에 활용하였다. 유럽과 미국의 RM 생산기관 및 LMO 개발사에서 RM 생산이 중단된 MON757은 도입유전자 카세트 염기서열과 면화 게놈 유전자 주변 염기서열을 확보하여 plasmid 형태의 RM인 synbiocon을 확보하였다. 종자 형태의 면화 RM은 마쇄 후 Libex NP968 (Tianlong, China)을 사용하여 게놈 DNA (genomic DNA; gDNA)를 추출하였다. 추출 실험 절차는 Tianlong 사의 식물 gDNA 추출 표준 프로토콜에 따라 수행하였다. 그 외 실험에 사용된 비변형(non-LM) 면화 및 LM 면화 RM은 국립생태원에 보유 중인 RM으로부터 추출하여 사용하였다. 추출된 gDNA는 Nano-drop ND2000 (Thermo scientific, USA)으로 정량 후 50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  농도로 희석한 뒤 PCR 반응 전까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

### 2. 프라이머 설계

NCBI GenBank에서 동시검출 PCR 양성대조군으로 사용될 면화 내재유전자 *Alcohol Dehydrogenase C* (*Adh C*, GenBank accession no. AF403365) 염기서열을 확보하여 primer를 제작하였다. 각각의 LM 면화 도입유전자 카세트와 게놈 유전자에 특이적인 증폭 primer 설계를 위하여 국립위원회 공동연구센터 (Joint Research Centre-European Commission; JRC-EC)와 농림축산검역본부 예규 ‘실험실 정밀검역 운영요령’에 제시된 LMO PCR 검사법의 primer 정보를 참고하였다. 모든 primer는 (주)바이오팩트(Daejeon,

Korea)에 의뢰하여 합성하였으며 10 pmole  $\mu\text{L}^{-1}$ 로 희석한 뒤 사용하였다(Table 1).

### 3. Polymerase chain reaction

동시검출 PCR 반응액 조성은 BioFACT™ 2×Lamp Taq PCR Pre-Mix (Biofact, Korea) 15  $\mu\text{L}$ 에 100 ng의 gDNA, 각각의 primer는 최종 농도 0.33  $\mu\text{M}$ 이 되도록 첨가 후 최종 30  $\mu\text{L}$  부피가 되도록 3차 증류수를 첨가하였다. Synbiocon 형태의 MON757 plasmid RM은 면화 게놈 크기를 반영하여 0.0002 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  농도로 사용하였다. PCR 조건은 95°C 5분 변성(denaturation) 1회, 33 cycle의 95°C 30초 변성, 59°C 30초 결합(annealing), 72°C 30초 신장(elongation) 주기로 유전자 증폭 후 최종 신장을 72°C 10분간 1회 수행하였다 (Proplex PCR system, Applied Biosystems, USA). PCR 반응물은 2.5% 아가로즈겔에서 135 V 25분 조건으로 전기영동한 후 Chemi-Doc™ XRS+ (BioRad, USA)로 이미지를 촬영하였다. 동시검출 PCR로 증폭된 각각의 밴드는 (주)바이오팩트(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 염기서열 분석을 통해 증폭 결과를 확인하였다(data not shown).

### 4. 특이도 및 검출한계 검증

개발된 LM 면화 동시검출법의 특이도 검증을 위하여 3종의 non-LM 면화 RM과 11종의 LM 면화 RM을 이용하여 동시검출 PCR 실험을 수행하였다. 또한 단일(4종) 및 가상의 후대교배종(11종) 조합을 4종의 LM 면화 RM을 이용하여 제조 후 동시검출 PCR 증폭 실험을 수행하였다. PCR 반응의 최종 주형 DNA 함량은 400 ng으로 부족한 양의 주형 DNA는 non-LM 면화 gDNA를 첨가하였다. 신규로 개발한 동시검출법의 검출한계(Limit of Detection; LOD) 분석을 위하여 4종의 RM DNA를 혼합한 시료를 100 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  농도부터 순차적으로 1/2씩 멸균된 증류수로 희석하여 준비하고 각각의 농도별로 1  $\mu\text{L}$ 씩 주형으로 사용하여 동시검출 PCR 반응을 수행하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. LM 면화 4종 표준물질 확보

PCR 기반의 LMO 정성 및 정량 분석법 개발의 가장 핵

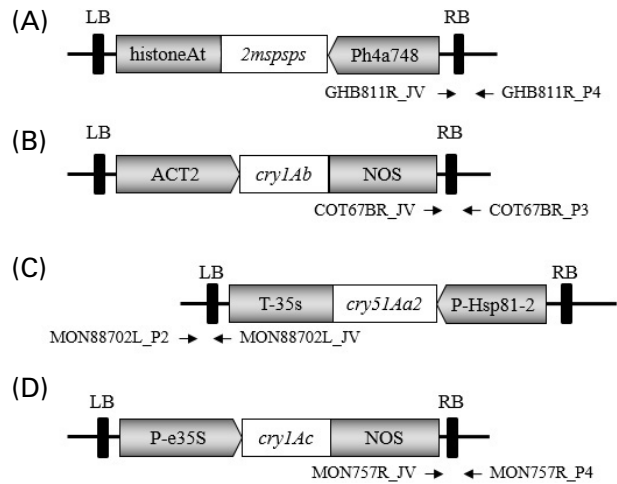
Table 1. Reference materials used in this study

No.	Event name	Cat. No.	CRM(or RM) developer	Confidence level (%)	Certified value ( $\text{g Kg}^{-1}$ )	Uncertainty ( $\text{g Kg}^{-1}$ )	Type
1	MON757	N/A	NIE	N/A	N/A	N/A	Plasmid
2	MON88702	N/A	Monsanto	N/A	N/A	N/A	Powder
3	COT67B	N/A	Syngenta	N/A	N/A	N/A	Powder
4	GHB811	ERM-BF422b	IRMM	95	1000	-15--+0	Powder
5	Non-LM cotton (MON 1445, MON 88701, MON531, MON 15985, MON88913)	0804-A2	AOCS	95	<0.8	0	Powder
6	Non-LM cotton (LLCotton25 and GHB614)	0306-A3	AOCS	N/A	>0.05	0	Powder
7	Non-LM cotton (COT102)	1012-A	AOCS	95	<1	0.5	Powder
8	MON88701	0113-A2	AOCS	95	>991	4	Powder
9	T304-40	ERM-BF429c	IRMM	N/A	100	11	Powder
10	LLCOTTON25	0306-E3	AOCS	N/A	>999.99	0	Powder
11	MON1445	0804-B2	AOCS	95	>991	4	Powder
12	MON531	0804-C2	AOCS	95	>978	10	Powder
13	MON15985	0804-D2	AOCS	95	>996	2	Powder
14	MON88913	0906-D2	AOCS	95	>985	7	Powder
15	GHB614	1108-A6	AOCS	N/A	>999.99	0	Powder
16	GHB119	ERM-BF428c	IRMM	N/A	100	11	Powder
17	281/3006 (281-24-236 × 3006-210-23)	ERM-BF422b	IRMM	N/A	979	N/A	Powder
18	COT102	1012-C2	AOCS	95	>993	-114--+7	Powder

심 요소는 주형 DNA를 추출할 RM의 확보이다(Wu *et al.* 2019). LMO의 RM은 크게 powder 형태와 DNA 형태로 구분되며 각각의 RM은 유럽의 표준물질측정연구소(Institute for Reference Material and Measurement; IRMM)와 미국유지화학회(American Oil Chemists' Society; AOCS) 같은 표준물질 생산기관에서 인증표준물질(Certified Reference Materials)을 개발하여 공급하며 LMO 개발사에서는 수입 및 이용을 위한 LMO 승인 심사 의뢰 시 LMO법에 따라 RM을 용도별 주관 심사기관에 제출하고 있다. 본 연구에서는 환경부 LMO 정성분석법 개발의 일환으로 추진되었으며 검출법 개발에 필요한 RM은 생산기관 및 LMO 관계부처의 협조로 확보하였다. 또한 상업화가 중단된 MON757 이벤트는 기존에 알려진 도입유전자와 옥수수 게놈 주변 염기서열을 이용한 plasmid 형태의 synbiocon으로 합성하여 사용하였다. 최근 IRMM에서는 3종의 LM 옥수수 MON810, DP-98140-6, NK603과 LM 콩 DP-356043-5 이벤트에 대한 plasmid DNA를 개발하여 RM으로 제공하고 있다. 본 연구에서는 plasmid DNA로 제작된 MON757 DNA(약 4Kbp)의 농도를 전체 면화 게놈 크기(약 2.5 Gbp)를 고려하여 다른 3종의 powder 형태의 RM 첨가량( $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ )에 비례하도록  $0.0002 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ 를 주형 DNA로 사용하였다. 동시검출법 개발에서 가장 중요한 요소인 RM은 동일한 농도 및 함량을 사용하여 PCR 실험을 수행하는 것이 핵심이며 RM의 함량을 고려하여 동일한 농도의 주형 DNA를 이용하여 분석을 하여야 유사한 증폭 강도의 밴드를 얻을 수 있다. 본 연구에서도 gDNA RM과 synbiocon 형태의 plasmid DNA RM을 혼합하여 사용하였으며 각각의 분자량을 고려하여 사용량을 조절한 결과 유사한 증폭 강도를 확인할 수 있었다. 또한 본 연구에서 사용된 비변형 LM 면화 3종 및 LM 면화 11종을 IRMM 및 AOCS로부터 확보하여 개발된 동시검출법의 특이도 검증에 활용하였다.

## 2. LM 면화 4종 동시검출법 개발 프라이머 설계

LMO 동시검출법은 다수의 시료 분석에 시간 및 비용을 절감할 수 있는 방법으로 국립생태원에서는 주요 수입 LM 작물인 옥수수, 면화, 콩, 카놀라, 알팔파를 대상으로 개발해왔다(Jo *et al.* 2016; Shin *et al.* 2016; Eum *et al.* 2019; Kim *et al.* 2019; Choi *et al.* 2020; Kim *et al.* 2020; Park *et al.* 2020). 이번 연구에서는 LM 면화 4종에 대한 유전정보를 조사하여 도입유전자 및 주변 염기서열을 확보하였으며 이를 바



**Fig. 1.** Schematic diagrams of transgene cassettes and PCR primers for four LM cottons. Transgene cassettes and primer-binding positions of GHB811 (A), COT67B (B), MON88702 (C), and MON757 (D) are illustrated. The bold lines represent the flanking regions of cotton genome. (RB: Right border; LB: Left border; JV: vector-binding primer; P: cotton genome-binding primer; gray pentagon: Promoter; Open Square: coding gene; gray square: 3' terminator). Arrow indicates primer-binding region.

탕으로 여러 조합의 이벤트 특이적 primer를 설계하였다(Fig. 1). 각각의 primer는 LM 동시검출법 개발을 위한 단일 검출 시험에서 특이적으로 증폭되는 것을 확인하였다(NIE 2019, 2020a). 단일검출 PCR뿐만 아니라 동시검출 PCR 분석법 개발에서 primer dimer의 방지는 비특이적 PCR 생성물의 증폭을 방지하기 위해 프라이머 설계단계에서 반드시 고려되어야 하며 고농도의 primer 사용, cold start PCR, 저효율의 PCR 효소 사용은 primer dimer를 유발한다(Brownie *et al.* 1997). 본 연구에서는 primer 상호 간 dimer가 형성되는지 여부를 조사하기 위해 (주)ThermoFisher에서 제공하는 Multiple Primer Analyzer를 이용하여 여러 조합의 primer를 분석하고 전기영동으로 PCR 증폭 밴드의 크기 차이가 100bp 내외인 조합의 primer 세트를 선정하였으며 이를 이용하여 동시검출 PCR 시험을 수행하였다. 또한 원하는 양의 증폭 이후에는 과증폭이 일어나지 않도록 최소 농도의 primer를 사용하여 비특이적 증폭을 방지하였다.

## 3. LM 면화 4종 동시검출 PCR 개발

최적의 조합으로 선정된 프라이머 세트로 LM 면화 4종의 동시검출 PCR 실험 결과 2.5% 아가로즈겔 전기영동에서 MON757 (151 bp), MON88702 (239 bp), COT67B (334



bp), GHB811 (429 bp) 이벤트 특이적 증폭이 검출하였다 (lanes 1~5 in Fig. 2). 각각의 증폭된 PCR 밴드는 (주)바이오팩트에 의뢰하여 염기서열을 분석한 결과 해당 이벤트의 서열임을 확인하였다(data not shown). 개발된 동시검출법의 PCR 증폭 밴드 크기는 최소 151 bp에서 최대 429 bp로 각 이벤트별 증폭 밴드의 크기 차이는 100 bp 내외로 2.5% 아가로즈겔에서 충분히 구별이 가능하였다. 일반적인 동시검출 PCR 실험의 primer 농도는 0.1~0.5  $\mu$ M이며 DNA copy 수나 구조적 복잡함의 정도에 따라 농도는 조절하여 사용한다(Markoulatos *et al.* 2002). 또한 이전 국립생태원 LM 면화 동시검출 개발 사례에서 증폭 효율을 얻기 위해 primer 농도를 달리하여 PCR 조건을 확립하였다(Jo *et al.* 2016). 하지만 다양한 농도의 primer는 동시검출 효율을 높일 수 있는 반면 실험 수행을 번거롭게 하여 동시검출 PCR 활용을 오히려 저해하는 요소였다. 본 연구에서는 이러한 동시검출 실험의 취약점을 보완하고자 동일 농도(0.33  $\mu$ M)의 primer를 이용하여 유사한 증폭 강도의 효율을 갖는 동시검출법을 개발하였다.

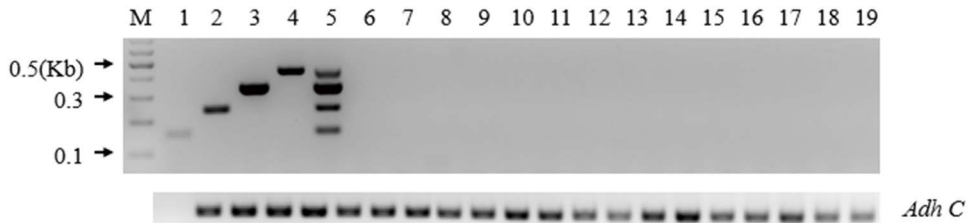
#### 4. 특이도 검증 및 무작위 RM 조합 분석

개발된 동시검출법은 국립생태원 LMO 자연환경 모니터링에서 수집된 LMO 의심개체 정성분석에 활용될 것이다. 신규로 개발된 LM 면화 동시검출법이 여러 이벤트의 도입유전자 카세트와 게놈 유전자에 특이적으로 증폭되는지 확인하기 위하여 국립생태원에 보유 중인 RM을 이용하여 특이도 검증 실험을 수행하였다. 그 결과 3종의 non-LM 면화와 11종의 LM 면화 이벤트의 gDNA를 이용한 동시검출 PCR에서 양성대조군인 내재유전자(*Adh C*)만 증폭되고 나머지 모든 RM에서 증폭되는 밴드를 관찰할 수 없었다(lanes 6~19 in Fig. 2). 따라서 이번에 개발한 LM 면화 동시검출 PCR 방법은 4종의 LM 면화에 특이적으로 반응함을 확인하였다.

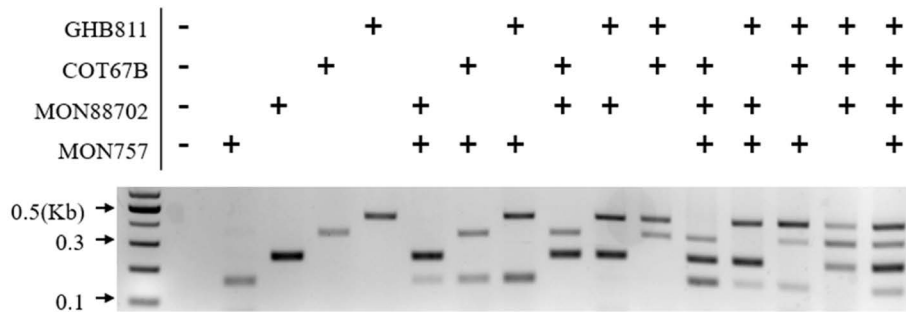
개발된 4종 LM 면화 동시검출법이 다양한 가상의 후대 교배종 조합에서도 분석이 가능한지 검증하기 위해 15종의 RM DNA 조합(random mix)을 이용하여 시험하였다. 6종의 2개 RM 혼합물, 4종의 3개 RM 혼합물 분석에서 각각의 특이적인 이벤트 증폭 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 3). 국내 수입되는 LMO 이벤트의 최근 동향을 분석했을 때 대부분 후대교배종으로 수입되고, 유통이 활발해짐에 따라 국내 생태계로 유출되는 LMO 또한 증가하고 있다(NIE

**Table 2.** List of oligonucleotide primers used to develop four LM cotton events

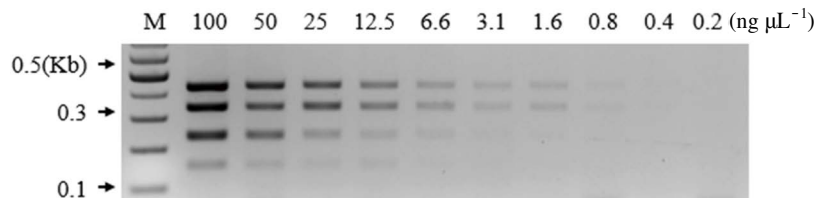
Target	Primer name	Primer sequence (5' - 3')	Size (bp)	Reference
<i>Alcohol Dehydrogenase C</i> (Endogenous gene)	AdhC_F	TCCAGAGGCTCCACTTGAT	178	Eum <i>et al.</i> 2019 Seol <i>et al.</i> 2015
	AdhC_R	CCCACCCTTTTGGTTTAGC		
MON757	MON757_V1	CCGACGTTTGGGTGGAA	151	This work This work
	MON757_P1	TTCTGTTGTTGTGAGCGTGG		
MON88702	MON88702L_JV	CTTTCATTTTATAATAACGCTGCCG	239	Akbar <i>et al.</i> U.S. Patent No US 2017/0166922 A1 This work
	MON88702L_P2	AGCGTGCTCACGACTTAAATTAATAA		
COT67B	COT67BR_JV	CCAGCATGCCGTATCCGCAAT	334	Animal and Plant Quarantine Agency. 2021 This work
	COT67BR_P3	TTGTTGTGCGTGAAGCCTCTGA		
GHB811	GHB811R_JV	TGATCGGGCCCTTAATTAACCC	429	Jansens <i>et al.</i> U.S. Patent No WO2017182420A1 This work
	GHB811R_P4	ACATTGGAGGAACATGGGTCAT		



**Fig. 2.** Establishment of LM cotton multiplex PCR method and verification of specificity. Agarose gel image obtained via multiplex PCR for cotton genomic DNA (lane 1, MON757; lane 2, MON88702; lane 3, COT67B; lane 4, GHB811; lane 5, mixed 4 RMs; lane 6, non-LM cotton (0804-A2); lane 7, non-LM cotton (0306-A3); lane 8, non-LM cotton (1012-A); lane 9, MON88701; lane 10, T304-40; lane 11, LL-COTTON25; lane 12, MON1445; lane 13, MON531; lane 14, MON15985; lane 15, MON88913; lane 16, GHB614; lane 17, GHB119; lane 18, 281/3006; lane 19, COT102). M represents 100 bp marker. Cotton endogenous gene (*Adh C*) was used as the PCR control.



**Fig. 3.** Efficiency testing of cotton multiplex PCR using random RM DNA mixture. Lane 1: non-LM cotton DNA; lanes 2-16: random mixtures of LM cotton RM. M denotes a 100 bp marker.



**Fig. 4.** Limit of Detection (LOD) of LM cotton multiplex PCR. LOD of four cotton multiplex PCR was validated. Four mixed cotton RM DNAs were diluted with distilled water to obtain the indicated concentrations (100, 50, 25, 12.5, 6.6, 3.1, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ). M represents 100 bp marker.

2020b). 이번 LM 면화 동시검출 PCR 분석법은 자연생태계에 비의도적으로 유출된 LM 면화의 이벤트 분석에 사용될 것이며, 이러한 가상의 후대교배종 조합을 활용한 동시검출 PCR 분석법의 효율 검증은 향후 여러 유전자 카세트가 혼합된 유출 LMO의 분석에 활용 가능성을 높여준다.

### 5. 검출한계 검증

LMO 자연환경 모니터링 시료분석 및 검역 등 다양한 용도에서 활용하게 될 LM 면화 동시검출법의 분석대상은 시료의 양과 종류, 상태에 따라 극미량의 DNA로도 PCR 분

석이 가능해야 한다(Eum *et al.* 2019). 개발된 LM 면화 동시검출 PCR법의 LOD 분석을 위해 4개 이벤트의 RM을 균일희석법(serial dilution)으로 100, 50, 25, 12.5, 6.6, 3.1, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  농도로 희석하였다. 희석된 주형 DNA를 이용하여 동시검출 PCR을 수행한 결과 아가로즈겔 전기영동에서 25 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  농도까지 검출이 가능하였다(Fig. 4). PCR 기반의 LMO 검출기술은 시료의 상태와 양에 관계없이 높은 정확도를 보장하기 때문에 다양한 LM 작물의 검출기술에 활용되고 있다. 이번에 개발된 LM 면화 4종에 대한 동시검출법은 높은 민감도와 극미량의 DNA 시료에

서도 각각의 이벤트를 검출할 수 있는 기술로 향후 LMO 자연환경 모니터링 및 수입 농산물 검역, 식품 성분 분석에도 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 적 요

면화는 중요한 섬유 작물로 종자는 가축의 사료로 사용된다. 작물 생명공학은 농업 분야에서 농업적 형질과 질을 향상시키기 위해 활용되어져 왔다. 국내 식품, 사료, 가공 제품에 유전자변형(LM) 면화의 사용이 증가함에 따라 환경으로의 LM 면화의 비의도적 유출 또한 증가하고 있다. LMO 모니터링 사업에서 수집된 LM 면화를 검정하기 위하여 국내 수입 승인된 LM 면화의 검출법 개발이 필요하다. 본 연구에서는 LM 면화 MON757, MON88792, COT67B, GHB811 4종을 대상으로 동시검출법을 개발하였다. 이벤트에 대한 유전 정보는 유럽 JRC와 농림축산검역본부에서 확보하였다. LM 면화의 동시검출법 개발을 위해 이벤트 특이적인 프라이머를 설계하였으며 특이적인 증폭을 확인하였다. 특이도 검정, 무작위 표준물질 혼합물 분석, 검출한계 분석을 통하여 동시검출법의 정확도와 특이도를 검증하였다. 그 결과 본 동시검출법은 각각의 이벤트를 검출할 수 있으며 LM 표준물질을 활용하여 특이도를 검정하였다. 또한 무작위 표준물질 조합도 정확하게 검출할 수 있다. 검출한계 분석에서는 25ng의 미량의 주형 DNA로 단회 분석으로 검출이 가능하다. 결론적으로 4종의 LM 면화 동시검출법을 개발하였으며 LM 면화 자생체 분석에 활용될 것으로 사료된다.

## 사 사

본 연구는 환경부 재원으로 국립생태원 NIE-법정연구-2020-06, NIE-법정연구-2021-06 지원을 받아 수행하였습니다.

## REFERENCES

Animal and Plant Quarantine Agency. 2021. Quarantine Agency Notice. Animal and Plant Quarantine Agency. Gimcheon, Korea. Available from: <http://www.qia.go.kr/bbs/lawAnn/>

[viewLawWebAction.do?id=183929&type=0](http://www.viewLawWebAction.do?id=183929&type=0) (accessed on 1 September 2021).

Akbar W, RS Brown, WC Burns, TL Clark, A Gowda, A Pan, X Shi, JW Stelzer and K Wu. 2017. U.S. Patent No. US 2017/0166922 A1. U.S. Patent and Trademark Office. Washington, DC.

Ali ME, MA Razaak and SB Abd Hamid. 2014. Multiplex PCR in species authentication: Probability and Prospects - a review. *Food Anal. Methods* 7:1933-1949.

Brownie J, S Shawcross and J Theaker. 1997. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Res.* 25:3235-3241.

Cervantes FA, EA Backus, L Godfrey, MG Rojas, W Akbar and TL Clark. 2019. Quantitative differences in feeding behavior of *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae) on transgenic and non-transgenic cotton. *J. Econ. Entomol.* 112:1920-1925.

Choi W, IR Kim, HS Lim and JR Lee. 2020. A multiplex PCR method for the detection of genetically modified alfalfa (*Medicago sativa* L.) and analysis of feral alfalfa in South Korea. *PNIE* 1:83-89.

Eum SJ, IR Kim, HS Lim, JR Lee and W Choi. 2019. Eventspecific multiplex PCR method for four genetically modified cotton varieties, and its application. *Appl. Biol. Chem.* 62:52.

Huseth AS, DA D'Ambrosio and GG Kennydy. 2020. Understanding the potential impact of continued seed treatment use for resistance management in Cry51Aa2.834\_16 Bt cotton against *Frankliniella fusca*. *PLoS One* 15:e0239910.

ISAAA. 2019. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2019: Biotech Crops Drive Socio-Economic Development and Sustainable Environment in the New Frontier. ISAAA Brief No. 55. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. Ithaca, NY.

Jansens S, R Dreesen, W Aartsen, J Vanhaelen, H Moser and G Light. 2017. U.S. Patent No. WO2017182420A1. U.S. Patent and Trademark Office. Washington, DC.

Jo BH, MA Seol, SY Shin, IR Kim, W Choi, SJ Eum, HR Song and JR Lee. 2016. Multiplex PCR method for environmental monitoring of approved LM cotton events in Korea. *J. Plant Biotechnol.* 43:91-98.

JRC. 2021. European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed. European Commission, Joint Research Centre. Brussels, Belgium. Available from: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu> (accessed on 1 September 2021).

KBCH. 2021. KBCH Trend Report. Korea Biosafety Clearing House. Available from: <http://biosafety.or.kr/> (accessed on 1 September 2021).

Kim DW, IR Kim, HS Lim, W Choi and JR Lee. 2019. Development of a multiplex PCR assay to monitor living modified cottons in South Korea. *Appl. Sci.* 9:2688.

- Kim IR, HS Lim, W Choi, DI Kang, SY Lee and JR Lee. 2020. Monitoring living modified canola using an efficient multiplex PCR assay in natural environments in South Korea. *Appl. Sci.* 10:7721.
- Kim YJ, S Kloos, J Romeis and M Meissle. 2021. Effects of mCry51Aa2-producing cotton on the non-target spider mite *Tetranychus urticae* and the predatory bug *Orius majusculus*. *J. Pest Sci.* 94:351–362.
- Markoulatos P, N Siafakas and M Moncany. 2002. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *J. Clin. Lab. Anal.* 16:47–51.
- NIE. 2019. Establishment of Detection Method for LMO. National Institute of Ecology. Seocheon, Korea.
- NIE. 2020a. Establishment of Detection Method for LMO. National Institute of Ecology. Seocheon, Korea.
- NIE. 2020b. Study on Environmental Monitoring and Post-management of LMO. National Institute of Ecology. Seocheon, Korea.
- Park JH, MA Seol, SJ Eum, IR Kim, HS Lim, JR Lee and W Choi. 2020. Development of a multiplex PCR method for identification of four genetically modified maize lines and its application in living modified organism identification. *J. Plant Biotechnol.* 47:309–315.
- Shin SY, HS Lim, MA Seol, YJ Jung, IR Kim, HR Song, JR Lee and W Choi. 2016. Four multiplex PCR sets of 11 LM Maize for LMO environmental monitoring in Korea. *J. Plant Biotechnol.* 43:473–478.
- Wu Y, J Li, X Li, S Zhai, H Gao and Y Li. 2019. Development and strategy of reference materials for the DNA-based detection of genetically modified organisms. *Anal. Bioanal. Chem.* 411:1729–1744.