(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년04월14일
(11) 등록번호 10-2240362
(24) 등록일자 2021년04월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/689 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/689 (2018.05)
C12Q 2600/16 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0144261
(22) 출원일자 2019년11월12일
심사청구일자 2019년11월12일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020180002310 A
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김해영
경기도 용인시 수지구 동천로135번길 21, 1307동 901호(동천동, 한빛마을 래미안 이스트팰리스 3단지)
김현중
서울특별시 동대문구 이문로12길 3-10, 103동 201호(이문동, 래미안이문2차아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 하나

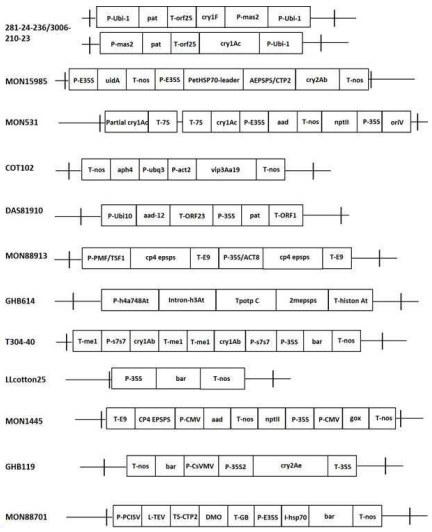
전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 **유전자 변형 면화 검출용 멀티플렉스 PCR 프라이머 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 유전자 변형(Genetically Modified, GM) 목화 검출용 조성물, 키트, 이를 이용한 검출방법 및 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

최진영

경기도 성남시 분당구 내정로166번길 42, 119동 202호(수내동, 파크타운삼익아파트)

이도근

경기도 수원시 영통구 매영로415번길 42-26, 201호(영통동)

(56) 선행기술조사문헌

GENBANK accession no. KJ608145, HQ233646

CN105779611 A

CN103597079 A

CN102952863 A

EUM ET AL, APPL BIOL CHEM., 2019; 62:52

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ01451101
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농업생명공학연구단
연구사업명	차세대바이오그린21사업
연구과제명	유전자변형 면화 및 카놀라 신속모니터링 검사기술개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 제 1 프라이머 세트; 서열번호 3의 염기서열 및 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 제 2 프라이머 세트; 서열번호 5의 염기서열 및 서열번호 6의 염기서열을 포함하는 제 3 프라이머 세트; 서열번호 7의 염기서열 및 서열번호 8의 염기서열을 포함하는 제 4 프라이머 세트; 서열번호 9의 염기서열 및 서열번호 10의 염기서열을 포함하는 제 5 프라이머 세트; 서열번호 11의 염기서열 및 서열번호 12의 염기서열을 포함하는 제 6 프라이머 세트; 서열번호 13의 염기서열 및 서열번호 14의 염기서열을 포함하는 제 7 프라이머 세트; 서열번호 15의 염기서열 및 서열번호 16의 염기서열을 포함하는 제 8 프라이머 세트; 서열번호 17의 염기서열 및 서열번호 18의 염기서열을 포함하는 제 9 프라이머 세트; 서열번호 19의 염기서열 및 서열번호 20의 염기서열을 포함하는 제 10 프라이머 세트; 서열번호 21의 염기서열 및 서열번호 22의 염기서열을 포함하는 제 11 프라이머 세트; 및 서열번호 23의 염기서열 및 서열번호 24의 염기서열을 포함하는 제 12 프라이머 세트;를 포함하는, 유전자 변형(GM) 면화 검출용 조성물로서,

상기 유전자 변형(GM) 면화는 MON531, MON1445, MON15985, 281-24-236/3006-210-23, LLcotton25, MON88913, GHB614, T304-40 X GHB119, GHB119, COT102, DAS81910 및 MON88701로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 이벤트를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항의 조성물을 포함하는,

유전자 변형(GM) 면화 검출용 키트.

청구항 5

제1항의 조성물을 포함하는,

유전자 변형(GM) 면화 검출용 바이오 칩(chip).

청구항 6

대상 시료에 제1항의 조성물을 처리하는 단계;를 포함하는 유전자 변형(GM) 면화 검출방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

중합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction; PCR)을 수행하는 단계;를 추가로 포함하는, 유전자 변형(GM) 면화 검출 방법.

청구항 8

a) 대상 시료에 제1항의 조성물을 처리하는 단계;및

b) 상기 시료 내에 유전자 변형(GM) 면화 포함 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 유전자 변형(GM) 면화 포함 시료의 스크리닝 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

중합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction; PCR)을 수행하는 단계;를 추가로 포함하는, 유전자 변형(GM) 면화 포함 시료의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유전자 변형(Genetically Modified, GM) 목화 검출용 조성물, 키트, 이를 이용한 검출방법 및 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 면화는 세계적으로 2014년 37.0 백만ha가 재배되었고, 유전자 변형(genetically modified, GM) 면화가 전체의 70% 정도를 차지하고 있다. 최근까지 유전자 변형 면화의 재배면적은 '10년에 21.0 백만ha, '12년에 24.3 백만ha 및 '14년에 25.1 백만ha로 증가세에 있고, 유전자 변형 이벤트 승인 수는 2014년 기준 총 52건이었다. 이들의 주요 재배국은 미국, 인도, 중국, 브라질, 아르헨티나, 파키스탄, 파라과이, 남아공, 멕시코, 호주 등이다.

[0003] 최근 면화의 가치 상승에 따라 세계적으로 GM 면화의 재배면적이 늘어나고 있다. 2017년의 경우, 한국에 수입되는 면화 153,100 톤 중 GM 면화는 150,000 톤을 차지하며, 최근 GM 면화 재배 및 분포의 증가로 인하여 비의도적으로 GM 면화가 자연 환경으로 유출되는 사례가 보고되고 있다.

[0004] 유전자 변형 작물(Genetically Modified Crops)은 20년 동안 상업화되어 이용되어 왔고, 수입 허가 및 재배를 각국의 규정에 따라 강하게 규제하고 있으나 여전히 잠재적인 인체 및 환경위해성에 대한 대중적인 논란이 지속되고 있다. 국내에서는 유전자 변형 작물을 수입하기 전에 환경위해성 평가를 완료해야 하고, “유전자 변형생물체(GMO)의 국가 간 이동 등에 관한 통합고시”를 통해 환경 및 국민건강에 대한 잠재적인 위해 효과를 사전에 방지하도록 하며(KBCH, 2007), 농업용유전자 변형생물체의 취급관리 기준에는 이의 목적 이행을 위해서 유통 및 이용 중 유전자 변형작물이 비의도적으로 환경에 방출되지 않도록 규정하여 관리하고 있다

[0005] 한국의 바이오 안전성 정보 센터(Biosafety Clearing-House)에 따르면 현재 13개의 단일종 GM 면화 이벤트와 16개의 교배종 GM 면화 이벤트가 한국으로 수입되는 것으로 승인되었다. 따라서 GM 면화를 효율적으로 관리하고 한국의 자연 환경으로의 오염을 방지하기 위해서는 GM 면화의 효과적인 탐지 및 사후 모니터링 방법이 요구되는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1816558호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 유전자 변형(GM) 면화 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 검출용 조성물을 포함하는 유전자 변형(GM) 면화 검출용 키트 및 바이오 칩(chip)을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 검출용 조성물을 이용해 대상 시료내 GM 면화를 검출할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 검출용 조성물을 이용해 GM 면화 포함 시료의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 측면은, 서열번호 1 내지 26의 염기서열을 포함하는 프라이머 세트로 이루어진 유전자 변형(Genetically Modified, GM) 면화의 검출용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명에서 용어 “유전자 변형(Genetically Modified)”된 작물 또는 유전자 조작 농산물이란, 유전자 변형 기술에 의해 자연에는 없는 새로운 성질을 부여한, 특히, 생산성이 향상되고 상품의 질을 강화한 작물이다.

[0013] GMO(Genetically Modified Organism)는 '유전자 변형 생물체'의 약자이나 주로 농작물을 대상으로 하기 때문에 통상적으로 '유전자 변형 작물'이라고 명명한다. 1994년 미국 칼젠(Calgene)사가 잘 물러지지 않는 토마토를 처음으로 상업화했고 1996년에는 몬산톤사가 대두를, 노바티스사가 옥수수를 각각 상품화했다. 유전자 변형 작물은 일반 소비시장에 첫선을 보이기 시작한 이후 5년 만에 미국의 수수, 대두(콩), 면화의 50% 이상을 차지하였다. 해충 및 질병에 강하고 소출량이 많아 식량난을 해소할 수 있다는 장점이 있으나 장기간 섭취할 경우에도 인간에 무해하다는 점이 분명하게 검증된 바가 없으며, GMO 품종으로 인해 생태계가 교란되는 등 환경재앙이 발생할 수도 있다는 위험성을 안고 있다.

[0014] 본 발명에서 “프라이머 세트”는 정방향(forward) 및 역방향(reverse) 프라이머를 합쳐 동시에 지칭하는 용어로 사용하였다.

[0015] 프라이머 세트의 설계는 A, G, C, T 함량비, 프라이머 결합체(dimer) 형성 방지, 같은 염기서열의 3 회 이상 반복금지 등 여러 가지 제약이 따른다. 그 외에 주형(template) DNA의 양, 프라이머의 농도, dNTP의 농도, Mg2+의 농도, 반응온도, 반응시간 등의 조건이 적정해야 한다.

[0016] 상기 프라이머(primer)는 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 포함하는 짧은 핵산 서열로 상보적인 핵산의 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 핵산 주형의 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능할 수 있다.

[0017] 상기 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있으며, 표적 물질에 존재하는 핵산과 혼성화 되어 상기 표적 물질의 특정 유전자를 증폭하는데 사용될 수 있다.

[0018] 상기 프라이머는 증폭의 효율을 고려하여 구체적으로는 단일쇄일 수 있으며, 디옥시리보뉴클레오타이드(deoxyribonucleotide)일 수 있고, 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.

[0019] 상기 혼성화는 2개의 단일 가닥 핵산이 상보적인 염기 서열들의 페어링(pairing)에 의하여 이합체 구조(duplex structure)를 형성하는 것을 의미한다.

[0020] 상기 혼성화는 단일 가닥 핵산 서열 간의 상보성이 완전할 경우(perfect match) 일어나거나 일부 미스매치(mismatch) 염기가 존재하는 경우에도 일어날 수 있다. 상기 혼성화에 필요한 상보성의 정도는 혼성화 반응 조건에 따라 달라질 수 있으며, 특히 온도에 의하여 제어될 수 있다. 일반적으로, 상기 혼성화 온도가 높으면 완전한 매치일 경우 혼성화가 일어날 가능성이 높으며, 혼성화 온도가 낮으면 일부 미스매치가 존재하더라도 혼성화가 일어날 수 있다.

[0021] 상기 프라이머 세트는 표적 원료에 존재하는 특정 유전자에 혼성화될 수 있으며, 시료 내에 목적하는 원료가 존재하는 경우 중합효소 연쇄반응에 의해 상기 특징적인 유전자의 염기서열이 증폭 되므로 상기 증폭된 산물(amplicon)을 통해 상기 원료의 존부를 판단할 수 있다.

[0022] 상기 프라이머는 기본 성질을 변화시키지 않은 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 즉 핵산 서열이 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형될 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 뉴클레오타이드의 하나 이상의 동족체로의 치환 및 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트 또는 카바메이트 등의 하전되지 않은 연결체나 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 등의 하전된 연결체로의 뉴클레오타이드의 변형이 가능하다. 또한 핵산은 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그날 펩타이드, 폴리 L 리신 등의 단백질, 아크리딘 또는 프소랄렌 등의 삽입제, 금속, 방사성 금속, 철 산화성 금속 등의 킬레이트화제 및 알킬화제 등의 하나 이상의 부가적인 공유 결합된 잔기를 가질 수 있다.

[0023] 또한 상기 프라이머 서열은 검출 가능한 신호를 직접적 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형

시킬 수 있다. 상기 프라이머는 분광학, 광화학, 생화학, 면역화학 또는 화학적 수단을 이용하여 검출될 수 있는 표지를 포함할 수 있다. 유용한 표지는 32P, 형광 염료, 전자 밀집 시약, 효소(일반적으로 ELISA에 이용되는 것), 바이오틴 또는 합텐 및 항혈청 또는 단일클론성 항체가 이용가능한 단백질을 포함한다.

[0024] 상기 프라이머들은 적절한 서열의 클로닝 및 제한효소 분해 및 나랭(Narang)등의 포스포트리에스테르 방법(1979, Meth, Enzymol. 68:90-99), 보카지(Beaucage)등의 디에틸포스포라미다이트 방법(1981, Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862), 및 미국 특허 제 4458066호의 고형물 지지 방법과 같은 직접적인 화학적 합성법을 포함하는 임의의 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다.

[0025] 본 발명의 프라이머 세트는 유전자 변형 작물 게놈 내의 외래 도입유전자와 삽입 인접 염기서열을 바탕으로 작성한 "계통 특이(event-specific) 프라이머"이다. 본 발명의 프라이머 세트를 이용하면 계통을 쉽게 구분할 수 있고, 후대 교배종에 대한 모본 파악이 용이한 것을 특징으로 한다.

[0026] 구체적으로, 상기 유전자 변형(GM) 면화 검출용 조성물은 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 제 1 프라이머 세트; 서열번호 3의 염기서열 및 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 제 2 프라이머 세트; 서열번호 5의 염기서열 및 서열번호 6의 염기서열을 포함하는 제 3 프라이머 세트; 서열번호 7의 염기서열 및 서열번호 8의 염기서열을 포함하는 제 4 프라이머 세트; 서열번호 9의 염기서열 및 서열번호 10의 염기서열을 포함하는 제 5 프라이머 세트; 서열번호 11의 염기서열 및 서열번호 12의 염기서열을 포함하는 제 6 프라이머 세트; 서열번호 13의 염기서열 및 서열번호 14의 염기서열을 포함하는 제 7 프라이머 세트; 서열번호 15의 염기서열 및 서열번호 16의 염기서열을 포함하는 제 8 프라이머 세트; 서열번호 17의 염기서열 및 서열번호 18의 염기서열을 포함하는 제 9 프라이머 세트; 서열번호 19의 염기서열 및 서열번호 20의 염기서열을 포함하는 제 10 프라이머 세트; 서열번호 21의 염기서열 및 서열번호 22의 염기서열을 포함하는 제 11 프라이머 세트; 서열번호 23의 염기서열 및 서열번호 24의 염기서열을 포함하는 제 12 프라이머 세트; 서열번호 25의 염기서열 및 서열번호 26의 염기서열을 포함하는 제 13 프라이머 세트;로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 프라이머 세트로 구성되는 프라이머 세트;로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 것으로 구성될 수 있다.

[0027] 구체적으로, 상기 검출용 조성물은 1, 2, 3 및 13 프라이머 세트로 이루어진 제 1 그룹; 4, 5, 6 및 13 프라이머 세트로 이루어진 제 2 그룹; 7, 8, 9 및 13 프라이머 세트로 이루어진 제 3 그룹; 10, 11, 12 및 13 프라이머 세트로 이루어진 제 4 그룹;으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 그룹을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 본 발명의 다른 측면은, 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 제 1 프라이머 세트; 서열번호 3의 염기서열 및 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 제 2 프라이머 세트; 서열번호 13의 염기서열 및 서열번호 14의 염기서열을 포함하는 제 7 프라이머 세트; 서열번호 19의 염기서열 및 서열번호 20의 염기서열을 포함하는 제 10 프라이머 세트; 서열번호 23의 염기서열 및 서열번호 24의 염기서열을 포함하는 제 12 프라이머 세트;로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 프라이머 세트로 구성되는 프라이머 세트;를 포함하는, 유전자 변형(GM) 면화 검출용 조성물을 제공한다.

[0029] 본 발명에서 용어 “이벤트”는 “계통(系統)”과 동일한 의미로 사용되었으며, 이는 공통된 조상과 유전자형이 같은 개체군을 일컫는 용어로서, 보통 실험생물 중에서 공통 조상에서 유래하고 일정한 형질을 보유하면서 세대를 쌓아가는 개체군을 말한다.

[0030] 유전자 변형 작물의 주요 검정방법으로는 도입유전자의 DNA를 검출하는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)이 국제 표준분석법으로 추천되고 있으며, 정성 분석법으로 도입된 T-DNA 상의 유전자를 검출하는 스크리닝(screening), 유전자 특이(gene specific) 및 구조 특이(construct specific) 방법과 T-DNA가 삽입된 게놈 내의 인접서열과 운반체의 염기서열을 바탕으로 특이 마커를 작성하여 분석하는 이벤트 특이(event specific) 또는 계통 특이 방법으로 구분되고 있다.

[0031] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 12개 단일종 GM 면화 각각에 특이적인 프라이머 세트 1 내지 12를 제작하였으며, 내재 유전자 *Acp1*를 타겟으로 하는 제 13 프라이머 세트를 제작하였다(표 1).

[0032] 본 발명에서 상기 “내재 유전자”란 특정 작물의 게놈에 자연적으로 존재하고 전체 게놈 중에 단일 카피(single copy)로 존재하여 특정작물의 유전자 분석에서 특정 작물의 존재를 알려주는 양성 대조구로 이용될 수 있는 유전자를 의미한다.

[0033] 또한, 상기 프라이머 세트는 선택된 1 종의 프라이머 세트가 포함되거나 2 종 이상의 복수 개의 프라이머 세트가 포함된 형태로 GM 면화의 검출을 위한 프라이머 세트의 그룹을 구성할 수 있으며, 구체적으로 상기 그룹을

구성하기 위한 프라이머 세트는 프라이머 세트 1 내지 12에서 선택된 3개와 내재 유전자를 타겟으로 하는 제 13 프라이머 세트를 포함하여 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 본 발명 일 실시예에서는 상기 본 발명의 각 프라이머 세트들이 12개 단일종 GM 면화 각각에 대해 매우 높은 특이성을 나타냄을 확인하였으며(도 2), 상기 프라이머 세트가 혼합된 경우에도 각 GM 면화를 모두 검출하였는 바(도 3), 본 발명의 상기 프라이머 쌍들은 단독 또는 복합된 형태의 프라이머 세트로서 활용될 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명 일 실시예에서는 본 발명의 프라이머 세트를 구성하는 13쌍의 프라이머 세트에 대한 검출 특이성을 분석하여 사용 가능성을 확인하였으며, 다중-PCR 조건에서 검출 특이 프라이머의 검출한계(LOD)를 측정한 결과, 0.1 내지 0.05% 이상의 농도에서 반응 산물을 나타냄을 확인하였다(도 4).

[0036] 일반적으로 전 세계의 표시제 농도는 국내는 3%로 하고 있으며 유럽연합이 가장 낮은 0.9%로 하고 있다. 반면, 본 발명에 따른 유전자 변형 면화 검출 다중-PCR은 표시제 범위보다 현저히 낮은 농도의 유전자 변형 작물 DNA 시료를 확인할 수 있어 유전자 변형 작물을 무난하게 검출할 수 있으므로, 유전자 변형 면화의 사후 환경 모니터링의 안전관리에 효과적으로 적용할 수 있다.

[0037] 본 발명의 다른 측면은, 상기 조성물을 포함하는 GM 면화 검출용 키트를 제공한다.

[0038] 상기 검출용 키트는 용액, 동결건조 분말, 냉동 용액, 또는 스트립 형태를 가질 수 있으며, 각각의 형태는 당업계에서 통상적인 방법으로 제제화할 수 있다. 예를 들어, 용액 형태의 검출용 키트는 나트륨-인산, 칼륨-인산, 트리스-염산 및 이외의 여러 종류의 완충액 등의 완충액에 단백질 또는 프라이머 등을 별도로 또는 혼합하여 제제화할 수 있으며, 필요에 따라 냉동시키거나 동결 건조할 수도 있다.

[0039] 상기 검출용 키트는 면역측방유동 스트립 방식을 이용한 것일 수 있다. 측방유동분석법(lateral flow assay)은 크로마토그래피 방법을 기본으로 하는 단백질 또는 핵산의 검출 방법이다. 이러한 측방유동분석법은 임신진단, 암진단, 기타 특정 단백질 또는 유전자의 존재 여부 또는 미생물탐지 등 다양한 분야에 널리 사용되고 있다. 측방유동분석법은 항원-항체 반응과 같은 두 물질 간의 특이적인 반응을 기본으로 하는 것으로, 민감도와 특이성이 높고, 빠른시간 내에 결과를 확인할 수 있다는 장점이 있어 질병의 진단 및 빠른 예방 조치를 가능하게 한다.

[0040] 본 발명의 검출용 키트에는 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 GM 면화를 검출하는데 필요한 실험(예: PCR) 및 결과 확인에 필요한 여러 가지 시약들, 예컨대, PCR 조성물, 제한효소, 아가로스, 혼성화 및 전기영동에 필요한 완충용액 등이 추가로 포함될 수 있다. 구체적으로, 상기 PCR 조성물은 역전사 반응에 의해서 합성된 상보적 DNA와 본 발명에서 제공되는 PCR 프라이머 쌍 이외에 적당량의 DNA 중합효소(예, Thermus aquaticus(Taq), Thermus thermophilus(Tth), Thermus filiformis, Thermus flavus, Thermococcus literalis 또는 Pyrococcus furiosus(Pfu)로부터 얻은 열 안정성 DNA 중합효소), dNTP, PCR 완충용액 및 물(dH_2O)을 포함할 수 있다. 상기 PCR 완충용액은 트리스-HCl(Tris-HCl), $MgCl_2$, KCl 등을 포함할 수 있다.

[0041] 또한, 상기 검출용 키트는 RT-PCR 키트일 수 있다. 구체적으로, RT-PCR 조성물을 동결 건조된 형태로 플라스틱 튜브에 담아 제조될 수 있으며, 상기 키트는 RT-PCR 조성물 외에, 분석에 사용되는 적절한 시약 및 도구를 더 포함할 수 있다. 이러한 시약 및 도구로는 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지, 용해제, 세정제 등이 포함된다. 상기 적합한 담체로는, 이에 한정되지는 않으나, 가용성 담체, 예를 들어 당 분야에 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS, 불용성 담체, 예를 들어 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 덱스트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있다

[0042] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 조성물을 포함하는 GM 면화 검출용 바이오 칩(chip)을 제공한다.

[0043] 본 발명에서, 상기 “바이오 칩(chip)”은 DNA 칩이라고도 불리우며, 매우 작은 DNA 조각들이 고체 표면에 집적된 것으로, 플라스틱, 유리, 실리콘 등의 투명 또는 반투명한 재질로 이루어진 기판에 시료용액과 시약을 수용할 수 있는 챔버 및 채널을 포함한 형태일 수 있다.

[0044] 바이오 칩은 두께가 얇고 투명하며 히터블록과의 접촉면적이 넓기 때문에 PCR시간을 크게 단축할 수 있고, 동시에 최소한 수백 개 이상의 유전자를 빠른 시간 안에 검색할 수 있는 장점이 있다. 또한, 고형체를 사용함으로써 아주 적은 양의 유전 물질을 고밀도로 붙일 수 있으며, 동시에 많은 수의 유전자를 검색할 수 있으며, 많은 양의 유전자의 발현 정도를 동시에 측정하거나 게놈의 다양한 부분의 유전자형을 파악하기 위해 사용할 수 있다.

[0045] 바이오 칩은 붙이는 유전물질의 크기에 따라 cDNA(complementary DNA)칩과 올리고뉴클레오티드 칩(oligonucleotide)으로 분류될 수 있다. cDNA 칩에는 최소한 500bp 이상의 유전자(full-length open reading frame 또는 EST)가 포함될 수 있다. 올리고뉴클레오티드 칩에는 10 내지 50개, 구체적으로는 10 내지 30개, 더욱 구체적으로는 15 내지 20개의 염기들로 이루어진 올리고뉴클레오티드가 접착될 수 있고, 칩 내에 포함되는 용액에 포함될 수 있으나, 상기 형태에 한정되지 않으며 필요에 따라 적절히 변형할 수 있다.

[0046] 본 발명의 또 다른 측면은, 대상 시료에 상기 조성물을 처리하는 단계를 포함하는 GM 면화의 검출방법을 제공한다.

[0047] 상기 검출방법에 사용하는 대상 시료는 GM 면화가 발견될 수 있는 모든 물질에서 수득할 수 있다. 구체적으로, 상기 대상 시료는 당업계에서 통상적으로 사용되는 DNA 추출방법을 통해 수득할 수 있으며, 예컨대 알카라인 추출법, 열수추출법, 컬럼 추출법 및 페놀/클로로포름 추출법 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 상기 검출방법은 대상 시료 내 존재하는 GM 면화의 DNA를 검출할 수 있는 특정 방법들을 의미하는 것으로, DNA 서열 분석 방법; 프로브 하이브리드화 방법; 구조 특이적인 절단 분석; 효소 미스매치 절단 방법(enzyme mismatch cleavage method); 중합효소 연쇄 반응(PCR); 측쇄 하이브리드화 방법; 롤링 서클 복제(rolling circle replication); 핵산서열기반 증폭(Nucleic acid sequence based amplification, NASBA); 분자 비콘 기술(molecular beacon technology); E-센서 기술(미국 특허 제6,248,229호 등); 사이클링 프로브 기술(cycling probe technology); 데이드 베링(Dade Behring) 시그날 증폭 방법; 리가제 연쇄 반응; 및 샌드위치 하이브리드화 방법 또는 서던 블로팅(southern blotting)을 이용하는 것일 수 있다.

[0049] 상기 검출방법은 상기 조성물을 이용하여 특정 DNA를 증폭시킨 후, 특정 DNA의 증폭 반응을 확인하는 단계를 통해 수행될 수 있으며, 상기 특정 DNA의 증폭여부를 확인하는 단계는 검출방법의 반응산물이 전기 영동 등을 통하여 예상되는 DNA 산물의 크기와 일치하는지를 확인함으로써 수행될 수 있다.

[0050] 구체적으로, 상기 검출방법은 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)을 수행하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0051] 본 발명에서, 상기 “중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)”은 중합효소를 사용하여 핵산을 연쇄적으로 합성하여 개시 핵산물질을 기하급수적으로 증폭하는 방법으로 당업계에 널리 공지된 것으로, 특정 핵산의 존재 유무를 확인하는 정성분석 PCR, 특정 핵산의 양을 측정하는 정량 PCR 및 PCR 과정을 실시간으로 추적하여 정성 및 정량 분석을 가능하게 하는 실시간 PCR을 모두 포함하는 개념이다.

[0052] 상기 중합효소 연쇄반응은 당업계에 공지된 통상의 PCR 기기를 사용하여 일반적인 반응 조건에 따라 수행되거나, 또는 일부 변형되어 수행될 수 있다. 또한, 상기 PCR 반응 혼합물은 반응완충액, dNTP 및 DNA 중합효소를 포함할 수 있으며, 이의 수행을 위한 설명서를 포함할 수 있다.

[0053] 본 발명 일 실시예에서는 1 종 또는 복수의 GM 면화를 검출할 수 있는 프라이머 세트를 구축하였으며, 상기 프라이머 세트는 민감도가 높아 매우 낮은 수준의 타겟 DNA 농도에서도 효과적으로 타겟 DNA를 증폭할 수 있음을 확인하였다.

[0054] 더욱 구체적으로, 상기 중합효소 연쇄반응은 본 발명의 조성물을 이용한 멀티플렉스 PCR(multiplex PCR) 방법일 수 있다.

[0055] 본 발명에서, 상기 “멀티플렉스 PCR(multiplex PCR)”은 복수의 프라이머 쌍을 동시에 사용하여, 복수의 표적 유전자를 같은 반응액 중에서 증폭하는 방법을 지칭하는 것으로, 본 발명에서는 한 번의 PCR 반응으로 대상 시료내 존재하는 GM 면화를 동시에 검출할 수 있는 방법을 제공한다. 상기 멀티플렉스 PCR은 다양한 시료를 한 번의 증폭 반응으로 확인할 수 있으므로 경제적이고, 시간이 절약될 수 있다.

[0056] 멀티플렉스 PCR을 사용하면 기존 방식의 PCR과 달리 1회의 PCR 반응을 통해 하나 이상의 GM 면화 각각의 특이 지역을 동시에 증폭할 수 있으며, 하나 이상의 프라이머 쌍을 혼합하여 동시에 PCR을 수행함으로써 대상 시료 내 1 종 이상의 유전자를 한 번에 확인할 수 있다.

[0057] 본 발명의 또 다른 측면은, a) 대상 시료에 서열번호 1 내지 26의 염기서열을 포함하는 프라이머 세트로 이루어진 GM 면화 검출용 조성물을 처리하는 단계; 및 b) 상기 시료 내에 유전자 변형(GM) 면화 포함 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 유전자 변형(GM) 면화 포함 시료의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0058] 상기 스크리닝 방법은 특별한 제한 없이 당업계에 공지된 방법에 의해 수행되는 모든 유전자 스크리닝 방법을

통해 수행되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0059] 본 발명의 유전자 변형(GM) 면화 검출용 프라이머 세트를 이용한 멀티플렉스PCR 프라이머는 국내유통 중인 유전자 변형 면화 단일종 12개 및 이들의 교배종 16개를 동시에 효과적으로 검출할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 프라이머 세트는 이벤트 특이 프라이머 쌍으로 개발되었으므로, 다른 계통들 또는 작물들이 혼합된 상태에서도 특이적으로 해당 품목을 검출할 수 있다. 따라서, 유전자 변형 면화의 비의도적인 환경 방출에 따른 모니터링 및 사후 이력 추적에 적용이 가능하며, 국내 수입 유전자 변형체의 환경위해성 안전관리를 효과적으로 수행할 수 있다.

[0060] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0061] 도 1은 12개 단일종 GM 면화 이벤트를 탐지하기 위해 설계된 프라이머 디자인에 사용되어진 이벤트별 삽입 유전자 정보를 개략적으로 나타낸 것이다.

도 2는 12개 단일종 GM 면화 이벤트를 탐지하기 위해 설계된 싱글플렉스 PCR을 통해 특이성을 확인한 결과를 나타낸 것이다(레인 M: 100 bp DNA ladder; 레인 1-12: GM 면화 이벤트(MON531, MON1445, MON15985, MON88701, MON88913, GHB119, GHB614, COT102, LLotton25, 281-24-236 / 3006-210-23, DAS81910-7 및 T304-40xGHB119); 레인 13-15: GM 대두 이벤트(RRS, A2704-12 및 MON89788); 레인 16-18: GM 옥수수 이벤트(MON810, NK603 및 TC1507); 레인 19-21: GM 카놀라 이벤트(T45, MS8 및 GT73); 레인 N: 템플릿 없음).

도 3은 12 개의 GM 면화 이벤트를 탐지하기 위해 확립된 4개의 멀티플렉스 PCR 그룹의 PCR 결과를 나타낸 것이다(**(a)** 그룹 1: 1레인, 281-24-236/3006-210-23; 2레인, MON15985; 3레인, MON531; P레인, 281-24-236/3006-210-23, MON15985, MON531. **(b)** 그룹 2: 1레인, COT102; 2레인, DAS81910; 3레인, MON88913; P레인, COT102, DAS81910, MON88913. **(c)** 그룹 3: 1레인, GHB614; 2레인, T304-40xGHB119; 3레인, LLcotton25; P레인, GHB614, T304-40xGHB119, LLcotton25. **(d)** 그룹 4: 1레인, MON1445; 2레인, GHB119; 3레인, MON88701; P레인, MON1445, GHB119, MON88701. M레인, 100 bp DNA 사다리; N레인, 템플릿 없음).

도 4는 그룹 1 내지 4의 멀티플렉스 PCR 프라이머 세트를 이용한 검출 한계를 확인한 결과를 나타낸 것이다(**(a)** 그룹 1: 281-24-236/3006-210-23, MON15985 및 MON531의 GM 면화 이벤트의 혼합물. **(b)** 그룹 2: COT102, DAS81910 및 MON88913의 GM 면화 이벤트의 혼합물. **(c)** 그룹 3: GHB614, T304-40xGHB119 및 LLcotton25의 GM 면화 이벤트의 혼합물. **(d)** 그룹 4: MON1445, GHB119 및 MON88701의 GM 면화 이벤트의 혼합물. 레인 M: 100 bp DNA ladder; 레인 1-8: 10, 5, 3, 1, 0.5, 0.1, 0.05 및 0.01 %의 GM 면화 이벤트 혼합물; 레인 N: 템플릿 없음).

도 5는 국내에서 승인된 8종의 교배종 GM 면화를 대상으로 멀티플렉스 PCR 검정을 수행하고 그 결과를 나타낸 것이다(레인 1-8: 순서대로 281-24-236/3006-210-23 × COT102 × MON88913, MON88701 × MON88913 × MON15985, COT102 × MON15985 × MON88913, COT102 × MON15985 × MON88913 × MON88701, GHB614 × LLcotton25 × MON15985, GHB614 × LLcotton25, GHB614 × T304-40 × GHB119, GHB614 × T304-40 × GHB119 × COT102; 레인 9: 템플릿 없음).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0062] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0063] **실시예 1. 시료 준비**

[0064] 유전자 변형 면화를 검정하기 위하여, 유전자 변형(GM) 면화 단일품목 중 12종(MON531, MON1445, MON15985, 281-24-236/3006-210-23, LLcotton25, MON88913, GHB614, T304-40×GHB119, GHB119, COT102, DAS81910 및 MON88701), 면화 교배종, GM 대두(RRS, A2704-12 및 MON89788), GM 옥수수(MON810, TC1507 및 NK603), GM 카놀라(GT73, MS8 및 T45)의 인증 표준 물질(Certified Reference Material, CRM)을 Sigma(미국)와 AOCS(the American Oil Chemist's Society, 미국)에서 구입하여 사용하였다.

[0065] **실시예 2. DNA 추출**

[0066] 상기 시료의 유전체 DNA는 DNeasy Plant mini kit(Qiagen GmbH, 독일) 및 FAST Genomic DNA Extraction kit(PINucle, 대한민국)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 추출하였다. 추출된 DNA의 농도 및 순도는 260 nm 및 280 nm 파장에서의 흡광도 비율(A_{260}/A_{280})에 따라 UV 분광 광도계(UV-1700, Shimadzu, 일본)를 사용하여 측정하였다. 추출된 게놈 DNA는 증류수를 이용하여 50ng/㎕로 희석하고, 사용 전 4℃로 저장하였다.

[0067] **실시예 3. 12개 단일종 이벤트 특이적 프라이머의 디자인**

[0068] 국내에 수입 승인된 유전자 변형 면화 단일품목 중 12종에 대하여 공지된 유전자 정보를 수집하고, 이의 유전자 변형 도입유전자와 삽입부위 게놈염기 사이 영역의 검출이 가능하도록 12개 단일종 GM 면화 각각에 특이적인 프라이머 세트를 제작하였다(도 1).

[0069] 12개 단일종 GM 면화 특이적인 프라이머 제작을 위해 참고한 유전자 정보는 다음과 같다. NCBI(National Center for Biotechnology Information)에서는 MON531(Gene accession number: KJ608145), MON1445(KJ608137), MON15985(AX600160),및 LLcotton25(HQ233646)를, 미국 특허 제8735661호에서는 MON88701를, EU-RL GMFF(European Union Reference Laboratory for GM Food & Feed)에서는 281-24-236/3006-210-23(281 f1-5'/281 r2-3') 및 GHB614(SHA007-5'/SHA008-3')를, 식품의약품안전처(MFDS)에서는 COT102(COT102_3_89F/COT102_3_181R) 및 DAS81910(1706-f2/1706-r3)의 유전자 정보를 수집하였고, GHB119 및 T304-40×GHB119 *Li et al.* BMC Biotechnology volume 14, Article number: 43 (2014) 및 중국 특허 CN103333960B에서 유전자 정보를 수집하였으며, MON88913은 *Kim et al,* Food Sci. Biotechnol. Vol. 17, No. 4, pp. 829 ~ 832. (2008)에서 유전자 정보를 수집하였다.

[0070] 또한, 면화 작물임을 확인하기 위해서 면화 내재유전자인 *Acp1*에 대한 특이 프라이머 세트를 제작하였으며, 구체적인 프라이머의 염기 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0071]

세트 번호	서열 번호	프라이머		염기서열 (5'-3')	타겟 면화 이벤트	크기 (bp)
세트 1	1	MON531	Forward	AAA AAC CAA TGC CAC CCC ACT G	MON531	162
	2	MON531	Reverse	TTG GTG TCG GCT TGC AAC TG		
세트 2	3	MON15985	Forward	GGC GGC CGC TCT AGA ACT AGT G	MON15985	137
	4	MON15985	Reverse	GTT GGC CGA ACG CTG TTA TC		
세트 3	5	281-24-236/3006-210-23	Forward	CTC ATT GCT GAT CCA TGT AGA TTT C	281-24-236/3006-210-23	111
	6	281-24-236/3006-210-23	Reverse	GGA CAA TGC TGG GCT TTG TG		
세트 4	7	MON88913	Forward	GCT GAT CCA TGT AGA TTT CCC G	MON88913	141
	8	MON88913	Reverse	AGA AGC GAG ACC TAC AAG CC		
세트 5	9	DAS81910	Forward	AAG CTT AGG TGA TTT CGA TGA TG	DAS81910	120
	10	DAS81910	Reverse	GAC CTC AAT TGC GAG CTT TC		
세트 6	11	COT102	Forward	TCT CCG CTC ATG ATC AGA TTG TC	COT102	101
	12	COT102	Reverse	CAG TAA CAG TAC AGT CGG TGT AGG G		
세트 7	13	LLcotton25	Forward	CAT CAT CCG TTT CTT GGA CCA C	LLcotton25	181
	14	LLcotton25	Reverse	TGC TCT GAG AGG AGC AAC TG		
세트 8	15	T304-40	Forward	GCA AAC TAG GAT AAA TTA TCG CG	T304-40	153
	16	T304-40	Reverse	GCA TCA GCC TTC CCT TAT ACC		
세트 9	17	GHB614	Forward	CAA ATA CAC TTG GAA CGA CTT CGT	GHB614	120
	18	GHB614	Reverse	GCA GGC ATG CAA GCT TTT AAA		
세트 10	19	MON88701	Forward	GCA GAG TTA CAA GAA CAT CC	MON88701	150
	20	MON88701	Reverse	CTC GTT GAC GAA TTC TGC AG		
세트 11	21	GHB119	Forward	AAA ACT TTG TGC AGC CTT CG	GHB119	130
	22	GHB119	Reverse	CGC AAA CTA GGA TAA ATT ATC GC		
세트 12	23	MON1445	Forward	ACG ATT CAG ATC AAA CAC TG	MON1445	103
	24	MON1445	Reverse	CCA ATT GAT TGA CAA CAT GC		
세트 13	25	acp1	Forward	ATT GTG ATG GGA CTT GAG GAA GA	면화 내재 유전자	76
	26	acp1	Reverse	CTT GAA CAG TTG TGA TGG ATT GTG		

[0072] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 서열번호 1 내지 24번으로 이루어진 프라이머 세트 1 내지 12는 각각의 유전자 변형(GM) 면화 단일종을 대상으로 제작되었고, 서열번호 25 내지 26으로 이루어진 프라이머 세트 13은 모든 면화가 공통적으로 포함하고 있으며, 변이가 거의 없이 보존되고 있는 유전자(*Acp1*)를 대상으로 디자인된 것이다.상기 디자인된 13세트의 프라이머는 증폭 효율 증가와 가공식품 적용에 적합하도록 증폭산물의 크기를 모두 약 200 bp 이하로 설계하였고, 설계된 프라이머를 제작 주문하여 사용하였다.

[0073] **실시예 4. 싱글플렉스(singleplex) 및 멀티플렉스(multiplex) PCR 조건 설정**

[0074] PCR 최적 조건을 설정하기 위하여, 상기 실시예 3의 프라이머 세트로 싱글플렉스(singleplex) 및 멀티플렉스(multiplex) PCR을 실시하였다.

[0075] 구체적으로, 싱글플렉스 PCR을 위한 시료의 조성은 1x 반응 완충액(Bioneer, 대한민국), 200μM의 dNTP, 0.5U의 Hotstart Taq 중합 효소(Bioneer, 대한민국), 각 0.4μM의 프라이머 및 50ng의 DNA 주형을 첨가하였고, 최종 부피가 25μL가 되도록 혼합물을 설정하였다.

[0076] 멀티플렉스를 위한 PCR 시료의 조성에서는 Hotstart Taq 중합효소를 0.5U 대신 1.0U가 되도록 첨가하고, 각 프라이머의 첨가량을 달리하는 것 외에는 싱글플렉스 시료 조성과 동일하게 하여 최종 부피가 25μL가 되도록 설정하였다.

[0077] 상기 멀티플렉스 PCR 시료에 첨가되는 각 프라이머의 농도는 하기 표 2에 구체적으로 나타내었다.

표 2

[0078]

그룹 번호	세트 번호	타겟 면화 이벤트	농도(μM)
1	1	MON531	0.28
	2	MON15985	0.4
	3	281/3006	0.8
	13	내재 유전자(*Acp1*)	0.28
2	4	MON88913	0.88
	5	DAS81910	1.8
	6	COT102	0.24
	13	내재 유전자(*Acp1*)	0.2
3	7	LLcotton25	1.4
	8	T304-40	1.4
	9	GHB614	0.6
	13	내재 유전자(*Acp1*)	0.16
4	10	MON88701	2.0
	11	GHB119	0.48
	12	MON1445	2.08
	13	내재 유전자(*Acp1*)	0.16

[0079] 싱글플렉스 및 멀티플렉스 PCR은 유전자증폭기(thermal cycler; PC808, ASTEC, 일본)를 사용하였고, 95℃에서 10 분 동안 예비 배양한 후; (95° C에서 30초, 60° C에서 30초, 72℃에서 30초) 반응을 40회(cycle) 반복하고; 마지막 단계는 72℃에서 7분동안 증폭한 이후 4℃에서 10분간 저장하였다(표 3).

표 3

[0080]

온도	시간	Cycle 수
95℃	10 분	1
95℃	30 초	40
60℃	30 초	
72℃	30 초	
72℃	7 분	1
4℃	10 분	1

[0081] **실험예 1. 싱글플렉스(singleplex) PCR을 통한 특이성 확인**

[0082] 멀티플렉스 PCR의 가능여부를 확인하기에 앞서, 싱글플렉스 PCR을 수행하여 실시예 3에서 설계한 프라이머의 특이성을 확인하였다.

[0083] 상기 실시예 4에서 설정된 싱글플렉스 PCR 조건 하에서, 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 12종의 GM 면화, GM 대두, GM 옥수수 및 GM 카놀라를 포함한 다양한 GM 작물을 대상으로 특이성을 평가하였다.

[0084] 구체적으로, 상기 PCR 반응 후 PCR 산물을 2% 또는 3%(w/v) 아가로스 겔에서 전기 영동하고 각각 자외선(UV)을 조사한 후 결과를 도 2에 나타내었다.

[0085] 도 2에서 M레인은 100bp의 DNA 래더(ladder)이고, 1 내지 12레인은 GM 면화(MON531, MON1445, MON15985, MON88701, MON88913, GHB119, GHB614, COT102, LLotton25, 281-24-236/3006-210-23, DAS81910-7 및 T304-40×GHB119)를, 13 내지 15레인은 GM 대두(RRS, A2704-12 및 MON89788)를, 16 내지 18레인은 GM 옥수수(MON810, NK603 및 TC1507)를, 19 내지 21레인은 GM 카놀라(T45, MS8 및 GT73)이고, N레인은 DNA 주형을 추가하지 않은 대조군이다.

[0086] 도 2에 나타난 바와 같이, 각 프라이머 세트가 목적한 GM 면화 이벤트에서 예상과 일치하는 크기의 PCR 산물을 생성하는 것을 확인하였다.

[0087] 다만, MON531을 타겟으로 하는 1번 프라이머 세트의 경우 MON531 외에 MON15985에도 반응하여 PCR 증폭 산물을 생성하였는데, 이는 MON15985이 MON531의 재조합에서 유래하였기 때문이며, 두 면화의 도입 유전자가 유사하기 때문이다. 이 경우에도 MON15985의 프라이머는 정확하게 MON15985만을 검출하므로 이를 이용하여 양 면화를 구

별할 수 있다.

[0088] 또한, 한국에서 승인된 교배종인 T304-40xGHB119 이벤트(12레인)의 결과로부터, 각각 GHB119 및 T304-40의 프라이머 모두에서 증폭산물을 생성하는 것을 확인하였다.

[0089] **실험예 2. 멀티플렉스(multiplex) PCR의 특이성 확인**

[0090] 본 발명자들은 실험예 1의 싱글플렉스 PCR의 결과를 고려하여 멀티플렉스 PCR을 위한 최적의 각 프라이머 세트의 농도, 증폭 온도 및 시간을 설정하였다.

[0091] 구체적으로, 상기 실시예 4에 기재된 바와 같이 Taq DNA 중합 효소, PCR 완충액, dNTP 및 프라이머 세트와 같은 PCR 조성, 온도 및 시간을 조절하였고, 최적의 멀티플렉스 PCR 조건을 확립하였다.

[0092] 상기 실시예 4에 기재한 바와 같이, 멀티플렉스 PCR의 특이성을 확인하기 위하여 상기한 조건에서 본 발명의 프라이머 세트를 3개씩 4개의 그룹으로 나누었다. 또한, 각 그룹마다 면화의 아실 수송 단백질 1(acyl carrier protein 1, Acp1) 유전자 내재 유전자 증폭을 위한 제 13 프라이머 세트를 포함하여 그룹화 하였다.

[0093] 구체적으로, 멀티플렉스 PCR 그룹 1은 MON531, MON15985 및 281-24-236/3006-210-23의 검출을 위한 것이고; 그룹 2는 MON88913, DAS81910 및 COT102의 검출을; 그룹 3은 LLcotton25, T304-40 및 GHB614의 검출을; 그룹 4는 MON88701, GHB119 및 MON1445의 검출을 할 수 있도록 구성하였다.

[0094] 상기 멀티플렉스 PCR 반응 후 PCR 산물을 2% 또는 3%(w/v) 아가로스 겔에서 전기 영동하고 각각 자외선(UV)을 조사한 후 결과를 도 3에 나타내었다.

[0095] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 모든 샘플에서 내재 유전자(*Acp1*) 밴드가 발견되어 PCR이 정상적으로 이루어져 면화를 검출할 수 있음을 확인하였고, 각 GM 면화 이벤트에 해당하는 특이적인 밴드가 확인되었다.

[0096] 상기 결과는 본 발명의 프라이머가 타겟 GM 면화에서만 증폭되고 타깃을 제외한 나머지 면화에서는 어떤 증폭도 일어나지 않는 것을 나타내는 결과로써, 12종 GM 면화 단일종을 특이적으로 교차반응 없이 검출이 가능함을 나타내는 것이다.

[0097] **실험예 3. 멀티플렉스(multiplex) PCR의 검출한계 확인**

[0098] 유전자 변형 작물 검정에 있어서 비의도적으로 시료 내 DNA가 미량으로 존재할 경우 검출에 어려움이 발생할 수 있으므로, 실제 검출가능한 농도 범위를 확인하고자 검출한계(Limit of detection, LOD)를 확인하였다.

[0099] 멀티플렉스 PCR의 검사를 위한 조건은 실시예 4와 동일하게 수행하였으며, 그룹 1 내지 4의 프라이머 세트를 이용하여 각각 3개의 GM 면화 및 비-GM 면화의 유전체를 혼합한 유전체 DNA(gDNA) 50ng을 이용하였다. 이 때, 각각의 면화 이벤트의 농도는 10, 5, 3, 1, 0.5, 0.1, 0.05 및 0.01%(w/w)가 되도록 하였다(도 4).

[0100] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 여러 종류의 유전자가 혼합되어 있음에도교차반응 없이 각각의 면화 이벤트에 대해 특이적인 밴드가 나타남을 확인하였으며, 특히 그룹 1 내지 3의 프라이머 세트를 이용하면 0.05%의 농도에서도 타겟이 명확히 검출되는 것을 확인하였다.

[0101] 또한, 가장 민감도가 떨어지는 그룹 4의 경우는 약 0.1 내지 0.05%의 검출 한계 값을 가지며, 이는 한국의 비의도적 GM 포함 허용치의 임계 값인 3%보다 현저히 낮은 것으로서, 국내 승인된 GM 면화의 수입관리 검출 및 환경 모니터링에 활용할 수 있는 검출 방법임을 확인하였다.

[0102] **실험예 4. 인증된 교배종 GM 면화에 대한 멀티플렉스 PCR의 검증**

[0103] 본 발명에 따른 멀티플렉스 PCR 기술의 실제적인 적용을 위해서, 국내에서 승인된 8종의 교배종 GM 면화를 대상으로 멀티플렉스 PCR 검정을 수행하고 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0104] 도 5에 나타난 바와 같이, 1 내지 8레인은 각각 교배종 GM 면화를, 9레인은 주형 DNA가 없이 멀티플렉스 PCR을 수행하였으며, 구체적으로 1 내지 8레인은 각각 순서대로 281-24-236/3006-210-23 × COT102 × MON88913, MON88701 × MON88913 × MON15985, COT102 × MON15985 × MON88913, COT102 × MON15985 × MON88913 × MON88701, GHB614 × LLcotton25 × MON15985, GHB614 × LLcotton25, GHB614 × T304-40 × GHB119 및 GHB614 × T304-40 × GHB119 × COT102의 교배종 GM 면화를 검정한 결과를 나타낸 것이다.

[0105] 그 결과, 8개 레인 모두에서 각 교배종의 유래에 해당하는 단일종과 관련된 PCR 증폭 산물이 생성되는 것을 확인하였다.

[0106] 본 발명은 유전자 변형(GM) 면화를 빠르고 정확하게 동정할 수 있도록 GM면화 단일종 12개 및 이들의 교배종 검출용 조성물을 제공하고, 이들을 이용하여 GM 면화를 검출할 수 있는 키트, 바이오 칩 및 검출방법을 제공한다.

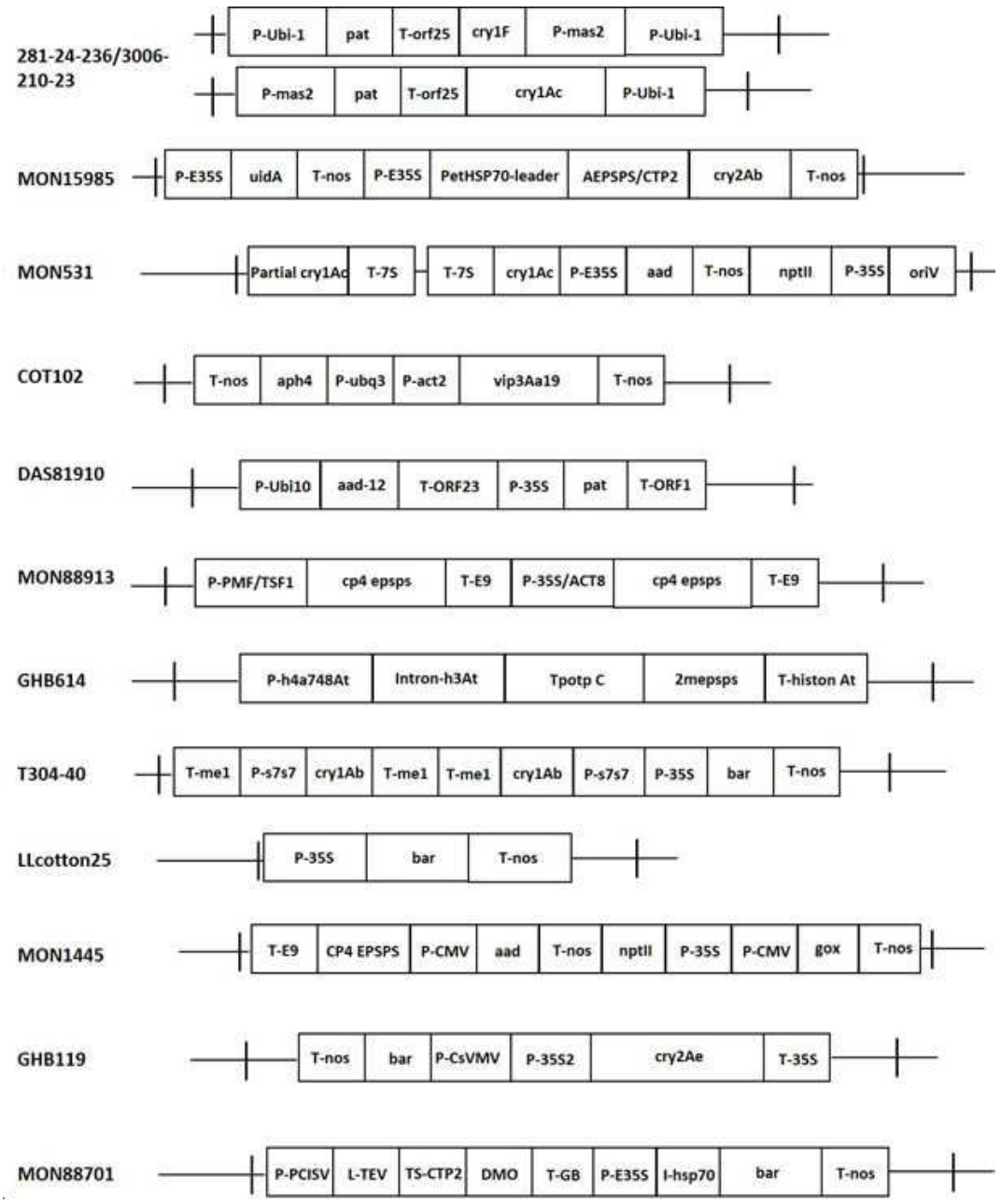
[0107] 본 발명의 유전자 변형(GM) 면화 검출용 멀티플렉스 PCR 프라이머는 다양한 유전자 변형 면화를 동시에 특이적으로 검출할 수 있고, 낮은 농도의 시료에서도 유전자 변형 면화의 확인이 가능함을 확인하였다. 따라서, 이를 이용하여 유전자 변형 면화의 비의도적 환경 방출에 따른 환경 내 자생 유전자 변형 작물의 검출, 농업용 유전자 변형 작물 처리 사업장 및 사료 이용 농가의 주변 환경에 대한 확인, 유전자 변형 작물의 이력 추적 등에 효과적으로 이용될 수 있어, 환경 모니터링의 안전관리 기술로 적용 가능하다.

[0108] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

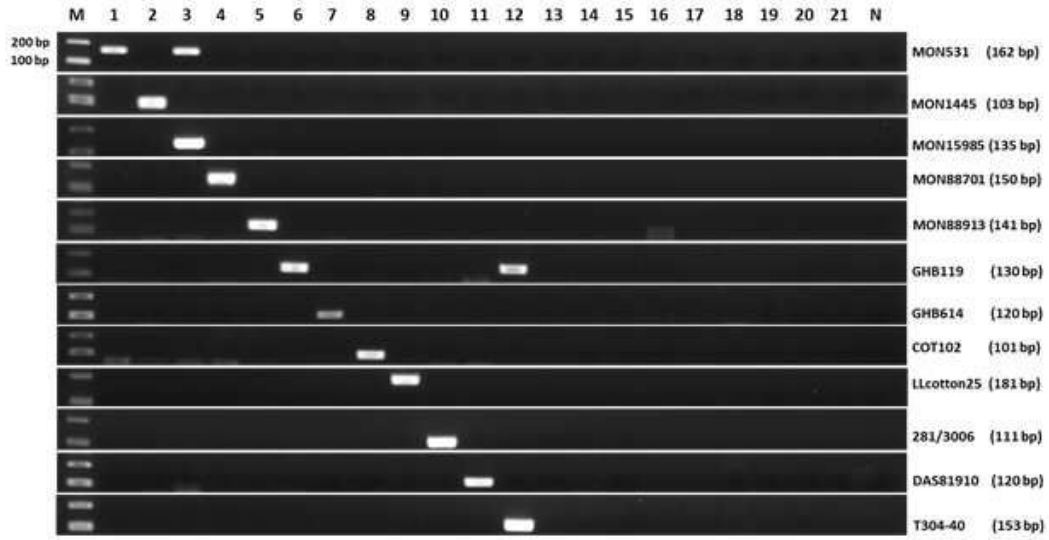
[0109] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

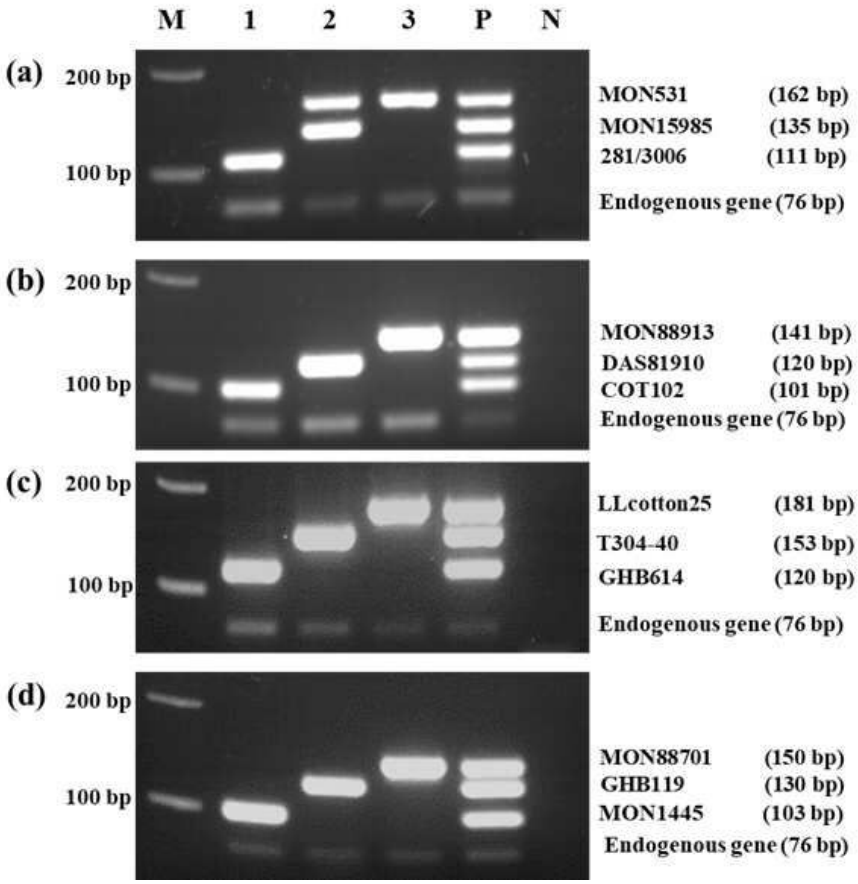
도면1


281-24-236/3006-210-23
P-Ubi-1
pat
T-orf25
cry1F
P-mas2
P-Ubi-1
P-mas2
pat
T-orf25
cry1Ac
P-Ubi-1
MON15985
P-E35S
uidA
T-nos
P-E35S
PetHSP70-leader
AEPSPS/CTP2
cry2Ab
T-nos
MON531
Partial cry1Ac
T-7S
T-7S
cry1Ac
P-E35S
aad
T-nos
nptII
P-35S
oriV
COT102
T-nos
aph4
P-ubq3
P-act2
vip3Aa19
T-nos
DAS81910
P-Ubi10
aad-12
T-ORF23
P-35S
pat
T-ORF1
MON88913
P-PMF/TSF1
cp4 epsps
T-E9
P-35S/ACT8
cp4 epsps
T-E9
GHB614
P-h4a748At
Intron-h3At
Tpotp C
2mepsps
T-histon At
T304-40
T-me1
P-s7s7
cry1Ab
T-me1
T-me1
cry1Ab
P-s7s7
P-35S
bar
T-nos
LLcotton25
P-35S
bar
T-nos
MON1445
T-E9
CP4 EPSPS
P-CMV
aad
T-nos
nptII
P-35S
P-CMV
gox
T-nos
GHB119
T-nos
bar
P-CsVMV
P-35S2
cry2Ae
T-35S
MON88701
P-PCISV
L-TEV
TS-CTP2
DMO
T-GB
P-E35S
I-hsp70
bar
T-nos

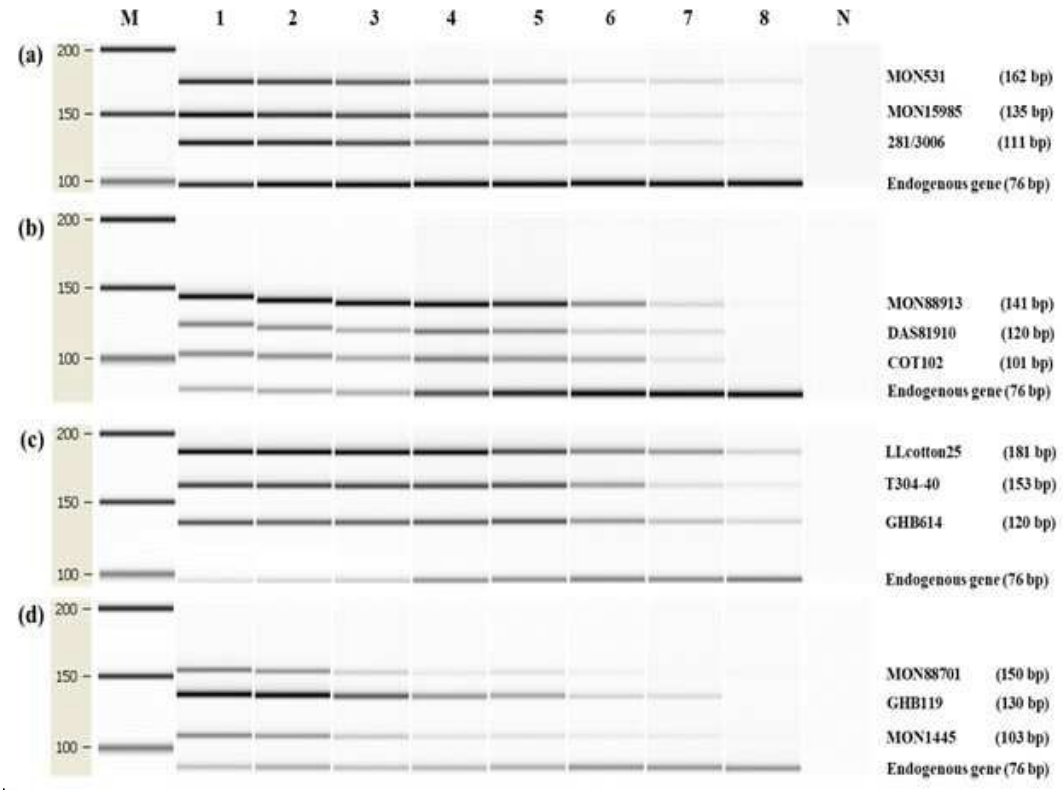
도면2


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 N
200 bp
100 bp
MON531 (162 bp)
MON1445 (103 bp)
MON15985 (135 bp)
MON88701 (150 bp)
MON88913 (141 bp)
GHB119 (130 bp)
GHB614 (120 bp)
COT102 (101 bp)
LLcotton25 (181 bp)
281/3006 (111 bp)
DAS81910 (120 bp)
T304-40 (153 bp)

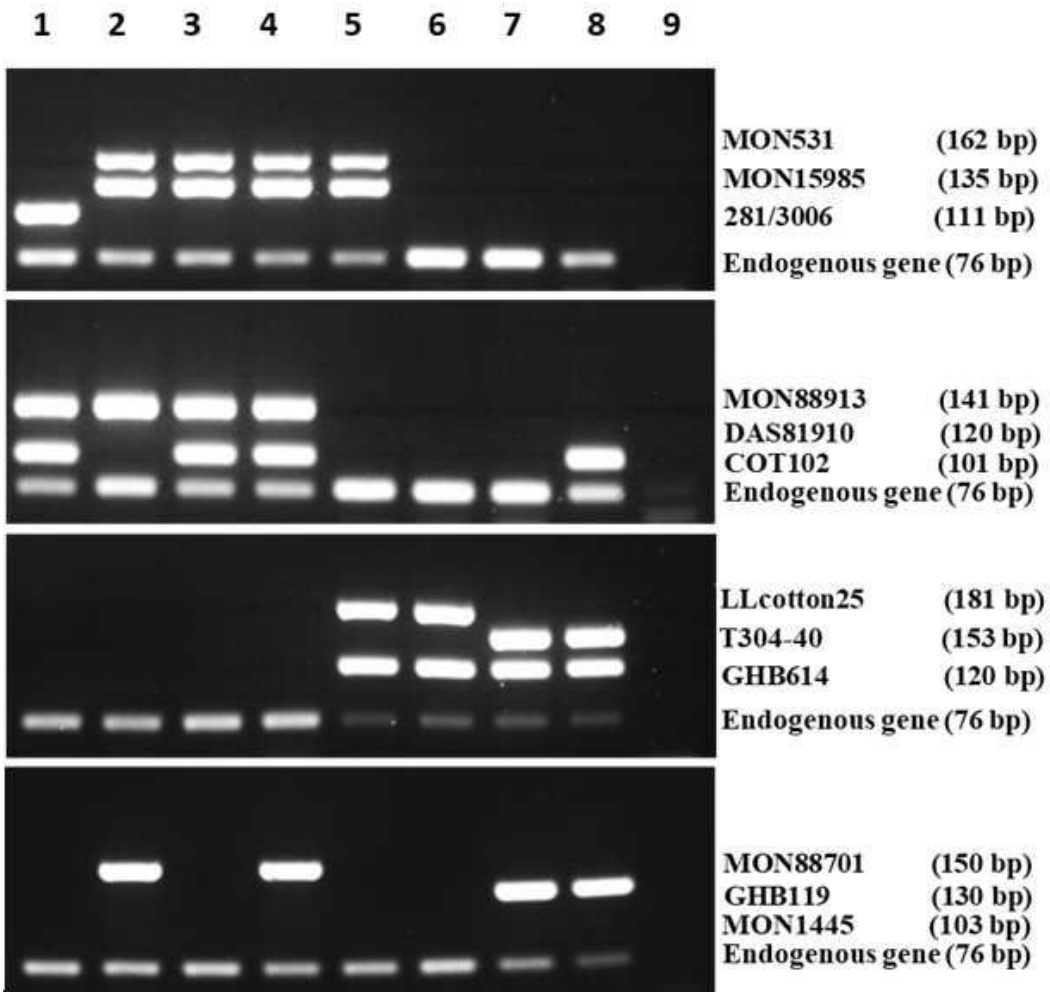
도면3


M 1 2 3 P N
(a)
200 bp
100 bp
MON531 (162 bp)
MON15985 (135 bp)
281/3006 (111 bp)
Endogenous gene (76 bp)
(b)
200 bp
100 bp
MON88913 (141 bp)
DAS81910 (120 bp)
COT102 (101 bp)
Endogenous gene (76 bp)
(c)
200 bp
100 bp
LLcotton25 (181 bp)
T304-40 (153 bp)
GHB614 (120 bp)
Endogenous gene (76 bp)
(d)
200 bp
100 bp
MON88701 (150 bp)
GHB119 (130 bp)
MON1445 (103 bp)
Endogenous gene (76 bp)

도면4


M
1
2
3
4
5
6
7
8
N
(a)
200
150
100
MON531 (162 bp)
MON15985 (135 bp)
281/3006 (111 bp)
Endogenous gene (76 bp)
(b)
200
150
100
MON88913 (141 bp)
DAS81910 (120 bp)
COT102 (101 bp)
Endogenous gene (76 bp)
(c)
200
150
100
LLcotton25 (181 bp)
T304-40 (153 bp)
GHB614 (120 bp)
Endogenous gene (76 bp)
(d)
200
150
100
MON88701 (150 bp)
GHB119 (130 bp)
MON1445 (103 bp)
Endogenous gene (76 bp)

도면5



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> MULTIPLEX PCR PRIMERS FOR DETECTION OF GENETICALLY MODIFIED COTTONS

<130> 19PP31053

<160> 26

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MON531 Forward

<400> 1

aaaaaccaat gccaccccac tg 22

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MON531 Reverse

<400> 2

ttggtgtcgg cttgcaactg 20

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MON15985 Forward

<400> 3

ggcggccgct ctagaactag tg 22

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MON15985 Reverse

<400> 4

gttggccgaa cgctgttatc 20

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 281-24-236/3006-210-23 Forward

<400> 5

ctcattgctg atccatgtag atttc 25

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 281-24-236/3006-210-23 Reverse

<400> 6

ggacaatgct gggctttgtg 20

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MON88913 Forward

<400> 7

gctgatccat gtagatttcc cg 22

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MON88913 Reverse

<400> 8

agaagcgaga cctacaagcc 20

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAS81910 Forward

<400> 9

aagcttaggt gatttcgatg atg 23

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DAS81910 Reverse

<400> 10

gacctcaatt gcgagctttc 20

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COT102 Forward

<400> 11

tctccgctca tgatcagatt gtc 23

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COT102 Reverse

<400> 12

cagtaacagt acagtcggtg taggg 25

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LLcotton25 Forward

<400> 13

catcatccgt ttcttggacc ac 22

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LLcotton25 Reverse

<400> 14

tgctctgaga ggagcaactg 20

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> T304-40 Forward

<400

> 15

gcaaactagg ataaattatc gcg 23

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> T304-40 Reverse

<400> 16

gcatcagcct tcccttatac c 21

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GHB614 Forward

<400> 17

caaatacact tggaacgact tcgt 24

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GHB614 Reverse

<400> 18

gcaggcatgc aagcttttaa a 21

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MON88701 Forward

<400> 19

gcagagttac aagaacatcc 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MON88701 Reverse

<400> 20

ctcgttgacg aattctgcag 20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GHB119 Forward

<400> 21

aaaactttgt gcagccttcg 20

<210> 22

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GHB119 Reverse

<400> 22

cgcaaactag gataaattat cgc 23

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MON1445 Forward

<400> 23

acgattcaga tcaaacactg 20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MON1445 Reverse

<400> 24

ccaattgatt gacaacatgc 20

<210> 25

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> acp1 Forward

<400> 25

attgtgatgg gacttgagga aga 23

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> acp1 Reverse

<400> 26

cttgaacagt tgtgatggat tgtg 24