



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년11월05일
(11) 등록번호 10-2322080
(24) 등록일자 2021년10월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6895 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6895 (2018.05)

C12Q 2561/113 (2019.08)

(21) 출원번호 10-2020-0067809

(22) 출원일자 2020년06월04일

심사청구일자 2020년06월04일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020110063817 A*

Marie-Alice Fraiture et al., Biomed. Res. Int., Article ID 392872, p.1-22, 2015.*

US20060281096 A1

JP2010516270 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

대한민국 (식품의약품안전처장)

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187

주식회사 편어클

경기도 광주시 고불로 44 (중대동, 위너스빌딩)

(72) 발명자

김해영

경기도 용인시 수지구 동천로135번길 21, 1307동 901호(동천동, 한빛마을 래미안 이스트팰리스 3단지)

신민기

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명5로 202, 303동 601호(오송상록롯데캐슬아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 하나

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 유전자변형 대두 검출용 실시간 PCR 프라이머 및 이의 용도

(57) 요약

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

대표도 - 도1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	lecA											
B	P-RbcS4											
C	T-aos											
D	T-E9											
E	pat											
F	CV127											
G	DP-365 423-1											
H	DP-356 643-5											

(52) CPC특허분류

C12Q 2600/13 (2013.01)

(72) 발명자

박새별

경기도 광주시 오포읍 오포로171번길 17-42, 2호(큐브엔파크)

김재환

경기도 용인시 수지구 신봉1로48번길 32, 302동 905호(신봉동, 서흥마을 한화 꿈에그린)

구용의

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187

김지영

경기도 안양시 만안구 명학로13번길 32, 202호(안양동, 신흥빌라)

이도근

경기도 수원시 영통구 매영로415번길 42-26, 201호(영통동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1475010611
과제번호	18162미식안052
부처명	식품의약품안전처
과제관리(전문)기관명	식품의약품안전평가원
연구사업명	식품 등 안전관리(R&D)
연구과제명	유전자변형식품 판별을 위한 Pre-Spotted Plate 시험법 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2018.02.01 ~ 2019.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열, 서열번호 2의 염기서열 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 제1프라이머 및 프로브 세트;

서열번호 4의 염기서열, 서열번호 5의 염기서열 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 제2프라이머 및 프로브 세트;

서열번호 7, 서열번호 8 및 서열번호 9의 염기서열로 이루어진 제3프라이머 및 프로브 세트;

서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12의 염기서열로 이루어진 제4프라이머 및 프로브 세트;

서열번호 13, 서열번호 14 및 서열번호 15의 염기서열로 이루어진 제5프라이머 및 프로브 세트;

서열번호 16, 서열번호 17 및 서열번호 18의 염기서열로 이루어진 제6프라이머 및 프로브 세트;

서열번호 19, 서열번호 20 및 서열번호 21의 염기서열로 이루어진 제7프라이머 및 프로브 세트; 및

서열번호 22, 서열번호 23 및 서열번호 24의 염기서열로 이루어진 제8프라이머 및 프로브 세트;를 포함하는, 유전자변형 대두 검출용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항의 조성물을 포함하는, 유전자변형 대두 검출용 키트.

청구항 4

제1항의 조성물을 포함하는, 유전자변형 대두 검출용 바이오 칩(chip).

청구항 5

제1항의 조성물을 포함하는 qPCR 플레이트(plate)에 대상 시료를 첨가하는 단계;를 포함하는 유전자변형 대두 검출방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

실시간 중합효소 연쇄반응(Real time Polymerase chain reaction; qPCR)을 수행하는 단계;를 추가로 포함하는, 유전자변형 대두 검출방법.

청구항 7

a) 검출용 조성물을 포함하는 qPCR 플레이트(plate)에 대상 시료를 처리하는 단계; 및

b) 상기 시료 내에 유전자변형 대두 포함 여부를 확인하는 단계;를 포함하는, 유전자변형 대두 포함 시료의 스크리닝 방법으로서,

상기 검출용 조성물은 서열번호 1의 염기서열, 서열번호 2의 염기서열 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 제1프라이머 및 프로브 세트; 서열번호 4의 염기서열, 서열번호 5의 염기서열 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 제2프라이머 및 프로브 세트; 서열번호 7, 서열번호 8 및 서열번호 9의 염기서열로 이루어진 제3프라이머 및 프로브 세트; 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12의 염기서열로 이루어진 제4프라이머 및 프로브 세트; 서열번호 13, 서열번호 14 및 서열번호 15의 염기서열로 이루어진 제5프라이머 및 프로브 세트; 서열번호 16,

서열번호 17 및 서열번호 18의 염기서열로 이루어진 제6프라이머 및 프로브 세트; 서열번호 19, 서열번호 20 및 서열번호 21의 염기서열로 이루어진 제7프라이머 및 프로브 세트; 및 서열번호 22, 서열번호 23 및 서열번호 24의 염기서열로 이루어진 제8프라이머 및 프로브 세트; 를 포함하는 것인, 유전자변형 대두 포함 시료의 스크리닝 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

실시간 증합효소 연쇄반응을 수행하는 단계;를 추가로 포함하는, 유전자변형 대두 포함 시료의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

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

배경 기술

[0002] 대두(*Glycine max*)는 세계 많은 지역에서 중요한 농작물이며, 주요 식품공급원이다. 작물학적 형질들 및 생산물 품질의 개선을 위해 생물공학 방법들이 대두에 적용되어왔다. 2014년 한국은 식용으로 콩(대두)을 128만 톤이나 수입하였으며, 이 중 80%인 102만 톤의 대두가 '유전자변형(Genetically Modified, GM) 대두'이다.

[0003] 한국은 매년 100만 톤 이상의 대두를 미국, 브라질, 아르헨티나, 캐나다, 중국 인도 등을 통해 수입하고 있으며, 이 중 중국과 인도를 제외한 미국, 브라질, 아르헨티나, 캐나다 등 대부분의 나라는 유전자변형 대두를 대량으로 생산하고 있는 국가이다.

[0004] 유전자변형식품에 대한 관리 및 소비자의 알 권리 보장을 위하여 한국을 포함한 세계 각 국은 표시제도를 시행하고 있으며, 이에 따라 유전자변형식품에 대한 검사를 진행하고 있다. 그러나, 점점 다양한 유전자변형 대두가 개발됨에 따라 기존 유전자변형 대두의 존재 유무를 판단할 수 있는 스크리닝 방법으로는 모든 유전자변형 대두를 검출하기 위한 목적 및 기능을 충족시키지 못하는 현실적인 한계가 있어왔다.

[0005] 이에, 유전자변형 대두의 한국으로의 유입 및 유통을 엄격히 통제하고, 효율적인 관리 및 식품 내 표시 제도가 잘 이행되기 위해서는, 유전자변형 대두의 효과적인 탐지 및 사후 모니터링 방법이 요구되는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-2098873호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 유전자변형(Genetically Modified, GM) 대두 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 검출용 조성물을 포함하는 유전자변형 대두 검출용 키트 및 바이오 칩(chip)을 제공하는 것이다.

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

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

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명의 일 측면은 서열번호 1의 염기서열, 서열번호 2의 염기서열 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 제1 프라이머 및 프로브 세트; 서열번호 4의 염기서열, 서열번호 5의 염기서열 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 제2프라이머 및 프로브 세트; 서열번호 7, 서열번호 8 및 서열번호 9의 염기서열로 이루어진 제3프라이머 및 프로브 세트; 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12의 염기서열로 이루어진 제4프라이머 및 프로브 세트; 서열번호 13, 서열번호 14 및 서열번호 15의 염기서열로 이루어진 제5프라이머 및 프로브 세트; 서열번호 16, 서열번호 17 및 서열번호 18의 염기서열로 이루어진 제6프라이머 및 프로브 세트; 서열번호 19, 서열번호 20 및 서열번호 21의 염기서열로 이루어진 제7프라이머 및 프로브 세트; 및 서열번호 22, 서열번호 23 및 서열번호 24의 염기서열로 이루어진 제8프라이머 및 프로브 세트;로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 프라이머 및 프로브 세트를 포함하는, 유전자변형 대두 검출용 조성물에 관한 것이다.
- [0012] 본 발명에서 용어 “유전자변형(Genetically Modified, GM)” 된 작물 또는 유전자변형 농산물이란, 유전자변형 기술에 의해 자연에는 없는 새로운 성질을 부여한, 특히, 생산성이 향상되고 상품의 질을 강화한 작물이다.
- [0013] GMO(Genetically Modified Organism)는 '유전자변형 생물체'의 약자이나 주로 농작물을 대상으로 하기 때문에 통상적으로 '유전자변형 작물'이라고 명명한다. 1994년 미국 칼젠(Calgene)사가 잘 물러지지 않는 토마토를 처음으로 상업화했고 1996년에는 몬산토사가 대두를, 노바티스사가 옥수수를 각각 상품화하였다. 유전자변형 작물은 일반 소비시장에 첫선을 보이기 시작한 이후 5년 만에 미국의 옥수수, 대두(콩), 면화의 50% 이상을 차지하였다. 해충 및 질병에 강하고 소출량이 많아 식량난을 해소할 수 있다는 장점이 있으나, GMO를 반대하는 단체들로부터 지속적으로 식품의 안전성과 환경의 위해성에 대해 우려를 나타내고 있다.
- [0014] GMO 및 GMO 식품의 안전성과 환경 위해성에 대한 우려가 급증함에 따라, 국내에서는 식품위생법과 농산물품질관리법에 의거하여 GMO 표시제를 시행하고 있으며, 유전자재조합성분에 대한 정성 및 정량 분석을 제공한다.
- [0015] 국내 GMO 분석은 다음과 같은 두 단계로 진행된다: 첫 번째 단계는 내재유전자와 GM 구조유전자(35S 프로모터, NOS 터미네이터)에 대한 특이적 프라이머로 PCR을 수행하여 1차 확인시험을 수행하는 것이다. 다음 단계는 스크리닝 검사결과에 따라 유전자재조합 이벤트에 대한 2차 확인시험을 실시하는 것이다. 이때, 1차 및 2차 확인시험에 의해 내재유전자와 도입된 재조합유전자 특이 PCR 산물이 모두 확인된 경우 '검출'로 판정되며, 내재유전자의 PCR 산물은 모두 검출되나 재조합유전자 특이 PCR 산물이 검출되지 않은 경우에는 '불검출'로 판정한다. 내재유전자의 PCR 산물이 검출되지 않는 경우에는 '검사불능'으로 판정한다.
- [0016] 최근 GMO에 삽입되는 유전자 요소가 다양해지면서 기존의 35S 프로모터 및 NOS 터미네이터를 포함하고 있지 않은 이벤트가 증가하였고, 유전자변형 대두임에도 불구하고 기존 스크리닝 시험에서 음성결과가 나타나, 이벤트 분석을 위한 추가적인 시험 등이 실시되고 있다.
- [0017] 이에, 본 발명에서는 유전자변형 대두 스크리닝 시험법을 개선, 강화시키기 위한 새로운 모델을 확립하고, 이를 효율적으로 활용할 수 있는 프리-스팟-플레이트(Pre-Spotted Plate) 시험법을 개발하였다. 상기 발명은 스크리닝 단계에서 음성결과로 확인될 경우 2차 이벤트 확인시험이 필요 없이 바로 유전자변형 대두 불검출로 판정할 수 있어 신속하면서도 효율적으로 분석을 진행할 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 “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.
- [0019] 본 발명에서 “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.
- [0020] 본 발명에서 “프리-스팟-플레이트(Pre-Spotted Plate) 시험법”은 실시간 중합효소 연쇄반응(Real time Polymerase chain reaction; qPCR)에 필요한 모든 구성요소를 프리믹스(premix) 형태로 플레이트에 고정화시킨 모델을 일컫는다 (도 1).
- [0021] 본 발명에서 “실시간 중합효소 연쇄반응(Real time Polymerase chain reaction; qPCR)”은 특이 프라이머와 형광물질이 연결된 프로브를 이용하여 PCR 증폭 시 프로브로부터 형광체가 해리되어 형광 발색의 양을 측정하는 원리이다. qPCR 법은 정성 PCR 법과 같이 도입 유전자의 특정 DNA를 검출하는 점은 동일하나, 식물의 내재유전자를 바탕으로 검출 유전자의 비를 측정하기 때문에 정량적으로 도입 유전자의 양을 분석할 수 있는 장점이 있

다. 실질적으로 qPCR법은 유전자변형 농산물의 혼입률 및 식품 가공품의 유전자변형체의 정량 검정에 이용될 수 있다.

[0022] 상기 qPCR에 필요한 구성요소는 프라이머, 프로브 외에 템플릿, DNA 중합효소(예: AmpliTaq Gold DNA 중합효소 등), dNTP, 최적화된 버퍼(Optimized buffer components) 예컨대 PCR 완충용액(트리스-HCL(Tris-HCl), MgCl₂, KCl 등), 물(dH₂O), 패시브 참조 염료(예: ROX 염료) 등을 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니고 qPCR에 필요한 구성요소는 제한없이 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명에서 “프라이머 세트(primer set)”는 정방향(forward) 및 역방향(reverse) 프라이머를 합쳐 동시에 지칭하는 용어로 사용하였다. 프라이머의 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.

[0024] 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.

[0025] 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 혼성화되어 상기 표적 물질의 특정 유전자를 증폭하는데 사용될 수 있다.

[0026] 상기 혼성화는 2개의 단일 가닥 핵산이 상보적인 염기 서열들의 페어링(pairing)에 의하여 이합체 구조(duplex structure)를 형성하는 것을 의미한다. 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.

[0027] 상기 프라이머 세트는 표적 원료에 존재하는 특정 유전자에 혼성화될 수 있으며, 시료 내에 목적하는 원료가 존재하는 경우 중합효소 연쇄반응에 의해 상기 특징적인 유전자의 염기서열이 증폭되므로 상기 증폭된 산물(amplicon)을 통해 상기 원료의 존재를 판단할 수 있다.

[0028] 상기 프라이머는 기본 성질을 변화시키지 않은 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 즉 핵산 서열이 해당 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, 시그널 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.

[0029] 또한 상기 프라이머 서열은 검출 가능한 신호를 직접적 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형시킬 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.

[0030] 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 고히몰 지지 방법과 같은 직접적인 화학적 합성법을 포함하는 임의의 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다.

[0031] 본 발명에서 사용되는 용어 "프로브(probe)"란, 올리고뉴클레오타이드 (즉, 뉴클레오타이드 서열)를 말하는 것으로, 자연적으로 발생하거나, 합성적으로, 재조합적으로, 또는 PCR 증폭에 의해 생산되는 것으로, 목적하는 다른 올리고뉴클레오타이드에 대해 최소 부분에 결합할 수 있다. 프로브는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 프로브는 특정 서열의 검출, 정의 및 분리에 유용하다. 바람직한 양태로서, 본 발명에 사용된 프로브는 형광성, 방사성, 및 발광성 시스템을 포함할 수 있고, 다른 검출 시스템에서 검출할 수 있도록 "리포트 분자"로 표지될

수 있다. 본 발명은 특별한 검출 시스템 또는 라벨에 제한되지 않는다.

- [0032] 구체적으로, 상기 검출용 조성물은 제1프라이머 및 프로브 세트; 및 제2 프라이머 및 프로브 세트 내지 제8프라이머 및 프로브 세트에 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 프라이머 및 프로브 세트를 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 검출용 조성물은 제1프라이머 및 프로브 세트 내지 제8프라이머 및 프로브 세트를 모두 포함할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 제1프라이머 및 프로브 세트 내지 제8프라이머 및 프로브 세트; 및 qPCR 에 필요한 구성요소를 플레이트에 분배하고 qPCR 분석을 실시한 결과, 유전자변형 대두에 대한 특이성 및 민감도가 모두 우수함을 확인하였다 (표 2 및 표 3).
- [0034] 본 발명의 일 실시예에서 추가로 유전자변형 대두를 포함한 가공 식품에 대하여 스크리닝 분석을 수행함으로써, 본 발명의 프라이머 및 프로브를 포함한 검출용 조성물이 식품 및/또는 사료에서 유전자변형 물질을 성공적으로 검출할 수 있음을 확인하였다 (표 4).
- [0035] 본 발명의 다른 측면은 상기 검출용 조성물을 포함하는, 유전자변형 대두 검출용 키트에 관한 것일 수 있다.
- [0036] 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.
- [0037] 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, 짧은시간 내에 결과를 확인할 수 있다는 장점이 있어 질병의 진단 및 빠른 예방 조치를 가능하게 한다.
- [0038] 상기 검출용 키트는 qRT-PCR 키트일 수 있다. 구체적으로, 상기 검출용 키트에는 본 발명의 프라이머 및 프로브 세트를 이용하여 유전자변형 대두를 검출하는데 필요한 실험(예: qPCR) 및 결과 확인에 필요한 기기(예: 형광광도계 등)를 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 조성물은 qPCR 프라이머 및 프로브 세트 외에 적당량의 DNA 증합효소(예: AmpliTaq Gold DNA 증합효소 등), dNTP, PCR 완충용액 및 물(dH₂O)을 포함할 수 있다. 상기 PCR 완충용액은 트리스-HCL(Tris-HCl), MgCl₂, KCl 등을 포함할 수 있다.
- [0039] 또한 상기 키트는 qRT-PCR 구성요소를 포함한 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 텍스트란, 폴리스카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속 및 이들의 조합일 수 있다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 검출용 조성물을 포함하는, 유전자변형 대두 검출용 바이오 칩(chip)에 관한 것일 수 있다.
- [0041] 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.
- [0042] 바이오 칩은 두께가 얇고 투명하며 히터블록과의 접촉면적이 넓기 때문에 PCR 시간을 크게 단축할 수 있고, 동시에 최소한 수백 개 이상의 유전자를 빠른 시간 안에 검색할 수 있는 장점이 있다. 또한, 고정체를 사용함으로써 아주 적은 양의 유전 물질을 고밀도로 붙일 수 있으며, 동시에 많은 수의 유전자를 검색할 수 있으며, 많은 양의 유전자의 발현 정도를 동시에 측정하거나 계놈의 다양한 부분의 유전자형을 파악하기 위해 사용할 수 있다.
- [0043] 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. 올리고뉴클레오타이드 칩에는 10 내지 50개, 구체적으로는 10 내지 30개, 더욱 구체적으로는 15 내지 20개의 염기들로 이루어진 올리고뉴클레오타이드가 접착될 수 있고, 칩 내에 포함되는 용액에 포함될 수 있으나, 상기 형태에 한정되지 않으며 필요에 따라 적절히 변형할 수 있다.

- [0044] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 검출용 조성물을 포함하는 qPCR 플레이트(plate)에 대상 시료를 첨가하는 단계;를 포함하는 유전자변형 대두 검출방법에 관한 것일 수 있다.
- [0045] 상기 qPCR 플레이트는 프리-스팟 플레이트, 즉 qPCR에 필요한 모든 구성요소를 프리믹스(premix) 형태로 고정화된 플레이트를 포함할 수 있다.
- [0046] 상기 검출방법에 사용하는 대상 시료는 유전자변형 대두가 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 추출법일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 상기 검출방법은 대상 시료 내 존재하는 유전자변형 대두의 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) 시그널 증폭 방법; 리가제 연쇄 반응; 및 샌드위치 하이브리드화 방법 또는 서던 블로팅(southern blotting)을 이용하는 것 일 수 있다.
- [0048] 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.
- [0049] 구체적으로, 상기 검출방법은 실시간 중합효소 연쇄반응(real time Polymerase Chain Reaction; qPCR)을 수행하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0050] 상기 qPCR에 대한 설명은 전술한 바와 동일하다.
- [0051] 상기 qPCR은 당업계에 공지된 통상의 PCR 기기를 사용하여 일반적인 반응 조건에 따라 수행되거나, 또는 일부 변형되어 수행될 수 있다. 또한, 상기 qPCR 반응 혼합물은 반응완충액, dNTP 및 DNA 중합효소를 포함할 수 있으며, 이의 수행을 위한 설명서를 포함할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 1종 또는 복수의 유전자변형 대두를 검출할 수 있는 프라이머 및 프로브 세트를 구축하였으며, 상기 프라이머 및 프로브 세트의 특이성 및 민감도가 높아 매우 낮은 수준의 타겟 DNA 농도에서도 효과적으로 타겟 DNA를 증폭할 수 있음을 확인하였다.
- [0053] 본 발명의 또 다른 측면은 a) 검출용 조성물을 포함하는 qPCR 플레이트(plate)에 대상 시료를 처리하는 단계; 및 b) 상기 시료 내에 유전자변형 대두 포함 여부를 확인하는 단계;를 포함하는, 유전자변형 대두 포함 시료의 스크리닝 방법으로서, 상기 검출용 조성물은 서열번호 1의 염기서열, 서열번호 2의 염기서열 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 제1프라이머 및 프로브 세트; 서열번호 4의 염기서열, 서열번호 5의 염기서열 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 제2프라이머 및 프로브 세트; 서열번호 7, 서열번호 8 및 서열번호 9의 염기서열로 이루어진 제3프라이머 및 프로브 세트; 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12의 염기서열로 이루어진 제4프라이머 및 프로브 세트; 서열번호 13, 서열번호 14 및 서열번호 15의 염기서열로 이루어진 제5프라이머 및 프로브 세트; 서열번호 16, 서열번호 17 및 서열번호 18의 염기서열로 이루어진 제6프라이머 및 프로브 세트; 서열번호 19, 서열번호 20 및 서열번호 21의 염기서열로 이루어진 제7프라이머 및 프로브 세트; 및 서열번호 22, 서열번호 23 및 서열번호 24의 염기서열로 이루어진 제8프라이머 및 프로브 세트;로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 프라이머 및 프로브 세트;를 포함하는 것인, 유전자변형 대두 포함 시료의 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0054] 구체적으로, 상기 실시간 중합효소 연쇄반응을 수행하는 단계;를 추가로 포함할 수 있다.
- [0055] 상기 qPCR 플레이트는 프리-스팟 플레이트, 즉 qPCR에 필요한 모든 구성요소를 프리믹스(premix) 형태로 고정화된 플레이트를 포함할 수 있다.
- [0056] 상기 스크리닝 방법은 특별한 제한 없이 당업계에 공지된 방법에 의해 수행되는 모든 유전자 스크리닝 방법을 통해 수행되는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0057] 본 발명의 유전자변형 대두 검출용 프라이머 및 프로브 세트를 포함하는 검출용 조성물은 프리-스폿-플레이트 (Pre-Spotted Plate) 시험법을 통해 정확성 및 재현성을 향상시킬 수 있다.
- [0058] 또한, 본 발명은 기존의 유전자변형 대두 스크리닝 시험방법을 대체하여 유전자변형 대두 분석 시 소요되는 시간을 단축하고, 편의성 증대 및 분석 비용 절감 등의 효과를 얻을 수 있다.
- [0059] 본 발명의 효과는 상기 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0060] 도 1은 qPCR 어레이 레이아웃을 도식화하여 나타낸 것이다.
- 도 2는 qPCR 어레이와 결합된 예측 시스템을 나타낸 것이다(A: 결과 섹션, B: 유전자 정보 섹션).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0061] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명은 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0062] 실시예 1. 시료 준비

- [0063] 특이성 테스트를 위해 한국에서 승인된 17 개의 유전자변형(Genetically Modified, GM) 대두 이벤트(GTS40-3-2, DP-356043-5, DP-305423-1, DAS-68416-4, DAS-44406-6, DAS-81419-2, MON87705, MON87708, MON87701, MON87769, MON89788, CV127, FG72, A2704-12, A5547-127, SYHTOH2, 및 MON87751)를 음성 및 양성 대조군으로 선정하였다.

- [0064] 유전자변형 대두의 인증표준물질 (CRM) (17건)은 기준 물질 측정 연구소 (IRMM, 벨기에 Geel) 및 미국 석유 화학자 협회 (AOCS, 미국 일리노이 주, 어바나)에서 구매하였다.

[0065] 실시예 2. DNA 추출

- [0066] 상기 시료의 유전체 DNA는 Fast genomic DNA 추출 키트 (Pinucle, Yongin, Korea)를 사용하여, 대두 및 가공 식품 시료의 CRM에서 게놈 DNA를 추출하고 Quant-iT™ dsDNA HS 분석 키트 및 Qubit Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 정량화하였다. 추출된 게놈 DNA의 순도는 NanoDrop™ One UV-Vis 분광 광도계 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)로 측정하였다. 추출된 DNA를 20 ng/μL로 희석하고 사용할 때까지 -20℃에서 보관하였다.

[0067] 실시예 3. 특정 프라이머 및 프로브

- [0068] P-RbcS4, T-E9 및 *pat*에 대한 표적 특이적 프라이머 세트 및 프로브는 Primer Designer 프로그램 버전 3.0 (Scientific and Educational Software, Durham, NC, USA)을 사용하여 설계하였다. 다른 프라이머 세트 및 프로브는 표준 탐지 방법으로 한국 식품공전에 채택된 것을 사용하였다. 모든 프라이머 세트와 프로브는 Bionics (서울, 한국)에서 합성하였다. 프라이머 및 프로브의 서열 및 기준은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0069]

타겟	프라이머/프로브	서열 (5'→3')	서열번호
<i>lectin</i>	GM1-F	CCA GCT TCG CCG CTT CCT TC	1
	GM1-R	GAA GGC AAG CCC ATC TGC AAG CC	2
	GM1-P	FAM-CTT CAC CTT CTA TGC CCC TGA CAC-TAMRA	3
T-nos	NOS ter 2-5'	GTC TTG CGA TG ATTA TCA TAT AAT TTC TG	4
	NOS ter 2-3'	CGC TAT ATT TTG TTT TCT ATC GCG T	5
	NOS-Taq	FAM-AGA TGG GTT TTT ATG ATT AGA GTC CCG CAA-TAMRA	6
T-E9	T-E9_MF	CGA CAA CGT TCG TCA AGT TC	7
	T-E9_MR	CCC AAT GCC ATA ATA CTC GAA C	8
	T-E9_NP	FAM-AAT GCA TCA GTT TCA TTG CG-TAMRA	9
P-RbcS4	P-RbcS4-F	AAG CAC CAC TCC ACC ATC AC	10

<i>pat</i>	P-RbcS4-R	AGG TGT TGA GAC CCT TAT CG	11
	P-RbcS4-P	FAM-ACG TGG CAT TAT TCC AGC GG-TAMRA	12
	Pat-F	CGA TCC ATC TGT TAG GTT GC	13
	Pat-R	CCT TGG AGG AGC TGG CAA CT	14
	Pat-P	FAM-ATA CAA GCA TGG TGG ATG GC-TAMRA	15
CV127	SE-127-F4	AAC AGA AGT TTC CGT TGA GCT TTA AGA C	16
	SE-127-R2	CAT TCG TAG CTC GGA TCG TGT AC	17
	SE-127-P3	FAM-TTT GGG GAA GCT GTC CCA TGC CC-TAMRA	18
DP-305423-1	DP305423-F1	CGT GTT CTC TTT TTG GCT AGC	19
	DP305423-R5	GTG ACC AAT GAA TAC ATA ACA CAA ACT A	20
	DP305423-1P	FAM-TGA CAC AAA TGA TTT TCA TAC AAA AGT CGA GA-TAMRA	21
DP-356043-5	DP356-F1	GTC GAA TAG GCT AGG TTT ACG AAA AA	22
	DP356-R1	TTT GAT ATT CTT GGA GTA GAC GAG AGT GT	23
	DP356-P	FAM-CTC TAG AGA TCC GTC AAC ATG GTG GAG CAC-TAMRA	24

*F: forward primer, R: reverse primer, P: probe

실시예 4. PCR 조건

TaqMan[®] 프로브를 사용한 대두 특이 스크리닝 방법을 개발하기 위하여 7500 실시간 PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하였다. UNG (적용된 바이오 시스템), 각 프라이머 500 nM, 프로브 200 nM 및 게놈 DNA 50 ng와 함께 1 x TaqMan[™] Universal Master Mix II를 사용하여 최종 부피 25 μ L에서 스크리닝 PCR 분석을 수행하였다.

qPCR 조건은 50 $^{\circ}$ C에서 2 분 1 회, 95 $^{\circ}$ C에서 10 분, 95 $^{\circ}$ C에서 30 초 45 회 및 60 $^{\circ}$ C에서 1 분이며, 7500 system software로 데이터를 분석하였다.

실시예 5. 예측 시스템

스크리닝 단계에서 양성 신호가 관찰되면, 다음 단계는 신원 및 권한 부여 상태를 평가하는 것이다. 스크리닝 결과를 분석을 위한 예측 시스템을 개발하였다.

도 2에 나타난 바와 같이 상기 시스템은 별도 프로그램 구비없이 엑셀(Excel) 시스템으로 구성되어있다. 구체적으로, 상기 파일은 두 부분으로 구성된다. 하나는 스크리닝 결과를 입력하는 [결과] 섹션이고, 다른 하나는 유전자변형 대두 이벤트의 유전자 정보 섹션이다. 모든 사용자는 [결과] 섹션에서 양의 신호가 관찰된 스크리닝 대상에 1을 입력하여야 하며, 그다음, [No. 이벤트] 셀에서 여러 GM 이벤트를 확인할 수 있다. 마지막으로 유전자 정보 섹션에서 “이벤트” 라고 표시된 예상 GM 이벤트를 확인할 수 있다.

실험예 1. qPCR을 통한 특이성(specificity) 확인

개발된 모든 유전자변형 대두 이벤트를 검출하기 위해, 4 개의 유전적 요소 [리볼로스 1,5-비스포스페이트 카르복실라제 소형 서브 유닛 프로모터 (P-RbcS4), T-nos, 완두콩 E9 터미네이터 (T-E9) 및 *pat* 유전자], 3 개의 유전자변형 대두 이벤트 (CV127, DP305423-1 및 DP356043-5) 및 대두의 내인성 기준 유전자 (*lectin* 유전자)를 선별하여 총 8개의 스크리닝 에세이(*lectin*, T-nos, P-RbcS4, T-E9, *pat*, CV127, DP305423-1, 및 DP356043-5)를 준비하였다. 시료 분석을 위해 96-웰 PCR 플레이트의 각 웰에 8개의 타겟을 분배하고, 상기 에세이를 하나의 세트의 하에 총 5개의 샘플을 이중 테스트하였다 (도 1). 한국에서 승인된 17개의 유전자변형 대두 이벤트를 테스트하여, 스크리닝 분석(screening assays)의 특이성을 평가하였다.

표 2

유전자재조합 이벤트	Ct 값(value)							
	<i>lectin</i>	T-nos	T-E9	<i>pat</i>	P-RbcS4	CV127	DP-305423 -1	DP-356043 -5
RRS	25.01	28.37	-	-	-	-	-	-
A2704-12	25.13	-	-	21.87	-	-	-	-
A5547-127	24.56	-	-	20.85	-	-	-	-
DAS-81419-2	24.76	-	-	22.99	-	-	-	-

DAS-68416-4	25.57	-	-	23.61	-	-	-	-
DAS-44406-6	25.33	-	-	24.10	-	-	-	-
MON87769	25.96	-	27.27	-	-	-	-	-
MON87705	25.00	-	26.21	-	-	-	-	-
MON89788	24.43	-	26.22	-	-	-	-	-
MON87701	24.97	-	-	-	26.33	-	-	-
MON87751	24.94	-	-	-	25.95	-	-	-
MON87708	25.04	-	26.71	-	-	-	-	-
DP-305423-1	24.50	-	-	-	-	-	25.43	-
DP-356043-5	24.93	-	-	-	-	-	-	26.98
SYHT0H2	23.75	24.91	-	20.54	-	-	-	-
CV127	25.69	-	-	-	-	25.95	-	-
FG72	24.33	26.84	-	-	-	-	-	-

[0080] 그 결과, 상기 표 2에 나타난 바와 같이 모두 양성 신호가 나타났으며, 특히 본 발명에서 개발된 T-E9, *pat* 및 P-RbcS4을 이용한 선별 방법에서 성공적으로 증폭되었음을 확인하였다.

[0081] **실험예 2. qPCR을 통한 민감도(sensitivity) 확인**

[0082] 총 복제된 반응의 95% 이상이 양성 신호로 나타났을 때, GM 비율이 다른 27개의 GM 이벤트 복제를 테스트하고 결정하였다(Kim, Yoo, Lee, Hong, & Kim, 2016). 각각의 스크리닝 분석의 LOD는 0.01 % GM 함량이었고, 50 ng 의 게놈 DNA에서 대두 게놈의 4 개 카피(copies)에 상응하였다.

[0083] 대두의 내인성 기준 유전자(*lectin*)의 LOD를 확인하기 위해 10^5 에서 10^1 로 10배 희석된 플라스미드 DNA로 시험 하였다. 10^1 카피를 *lectin*의 LOD로 결정하였다. 상기 DNA 혼합물은 상이한 GM 비율(ratio) 0.1%, 0.05% 및 0.01%로 제조하였으며, 3 명의 다른 실험자들과 함께 상기 LOD 테스트를 3번 수행하였다.

표 3

[0084]

타겟	템플릿	실험자 A		실험자 B		실험자 C	
		Positive signal	Ct mean	Positive signal	Ct mean	Positive signal	Ct mean
<i>lectin</i>	10 copies	9/9	37.27	8/9	39.35	9/9	-
P-RbcS4	0.1%	9/9	31.97	9/9	32.10	9/9	33.49
	0.05%	9/9	32.93	9/9	33.31	9/9	34.89
	0.01%	9/9	35.53	9/9	35.83	9/9	36.70
T-nos	0.1%	9/9	34.08	9/9	34.65	9/9	36.90
	0.05%	9/9	34.72	9/9	36.61	9/9	37.90
	0.01%	9/9	36.67	9/9	38.84	9/9	40.09
T-E9	0.1%	9/9	33.37	9/9	34.64	9/9	35.47
	0.05%	9/9	34.65	9/9	35.33	9/9	36.31
	0.01%	9/9	35.59	9/9	38.22	9/9	38.41
<i>pat</i>	0.1%	9/9	31.75	9/9	33.42	9/9	34.15
	0.05%	9/9	32.86	9/9	34.67	9/9	34.85
	0.01%	9/9	35.65	9/9	37.07	9/9	37.01
CV127	0.1%	9/9	35.79	9/9	35.29	9/9	34.94
	0.05%	9/9	36.96	9/9	36.07	9/9	36.46
	0.01%	9/9	39.26	9/9	38.35	9/9	38.02
DP-305423-1	0.1%	9/9	36.45	9/9	34.13	9/9	33.83
	0.05%	9/9	37.65	9/9	35.23	9/9	34.73
	0.01%	8/9	39.64	9/9	37.63	9/9	37.15
DP-356043-5	0.1%	9/9	36.11	9/9	31.70	9/9	34.09
	0.05%	9/9	36.95	9/9	32.49	9/9	35.09
	0.01%	7/9	39.48	9/9	35.01	9/9	37.69

[0085] 그 결과, 상기 표 3에 나타난 바와 같이, LOD 결과는 한국과 EU에 대한 GMO의 라벨링 요건을 충족시킴을 확인하

였다(농림 수산부, 2000; 유럽위원회, 2003).

[0086] 실험예 3. 가공 식품을 이용한 적용성 테스트

[0087] 스크리닝 분석의 적용 가능성을 시험하기 위해 대두를 함유한 23 개의 가공 식품을 수집하였다. 곡물 분말, 두부, 두유, 스낵 등 23 가지 가공 식품은 한국 (20개 시료), 일본 (2 개 시료), 태국 (1 개 시료)에서 구매하였다. 한국에서 구매한 식품 시료는 미국, 캐나다, 인도 및 호주에서 수입된 콩을 사용하여 생산된 것이다. 상기 시료는 한국, 일본 및 미국의 국내 시장에서 구입한 것이며, 콩 외에 다른 GM 작물은 포함하지 않는다. 수집된 가공 식품은 대두 분말, 건조 시리얼, 두유, 두부, 간식과 같이 제품의 종류에 따라 5개 그룹으로 나뉘었다.

[0088] 정확한 검출을 위하여, 8개의 스크리닝 분석법(screening assays)에 대해 시료를 이중으로 분석하였다. 하나의 웰에서 증폭되었으며, 40 보다 큰 Ct 값을 갖는 시료는 음성으로 결정하였다.

표 4

제품	시료 no.	결과							
		<i>lectin</i>	P-RbcS4	T-nos	T-E9	<i>pat</i>	CV127	DP305423	DP356043
대두 분말	1	+	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	-	-	+	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	-	-	-	-
건조 시리얼	4	+	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	-	-	-	-	-	-	-
	6	+	-	-	-	-	-	-	-
	7	+	-	-	+	-	-	-	-
	8	+	-	-	-	-	-	-	-
	9	+	-	-	-	-	-	-	-
	10	+	-	-	-	-	-	-	-
	11	+	-	-	+	-	-	-	-
	12	+	-	+	+	+	-	-	-
두유 두부	13	+	-	+	+	+	-	-	-
	14	+	-	-	-	-	-	-	-
	15	+	-	+	+	+	-	-	-
	16	+	-	+	+	+	-	-	-
	17	+	-	+	+	+	-	-	-
	18	+	-	+	+	+	-	-	-
	19	+	-	+	+	-	-	-	-
	20	+	-	+	+	+	-	-	-
	21	+	-	+	+	-	-	-	-
간식	22	+	-	+	+	-	-	-	-
	23	+	-	-	-	-	-	-	-

[0090] 그 결과, 상기 표 4에 나타난 바와 같이 23개의 가공 식품 중에 13개의 시료에서 양성 신호가 관찰되었으며, 그 중 9개는 두부 샘플이다. 양성으로 확인된 13개의 샘플에서 검출된 스크리닝 표적은 T-E9, T-nos 및 *pat* 유전자였으며, 실제로 MON89788, RRS (GTS40-3-2) 및 A2704-12가 이 시료들에서 확인되었는 바, 이러한 결과는 유전자변형 대두 이벤트의 유병률이 EU와 동일함을 시사한다(Rosa et al., 2016).

[0091] 상기와 같은 실험을 통해 본 발명의 프라이머 및 프로브 세트가 식품 및 사료에서의 유전자변형 물질을 성공적으로 검출할 수 있음을 확인하였다.

[0092] 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.

[0093] 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

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	lectin											
B	P-RbcS4											
C	T-nos		Sample 1 Rep. 1 Rep. 2		Sample 2		Sample 3		Sample 4		Sample 5	
D	T-E9											
E	pat											
F	CV127											
G	DP-305423-1											
H	DP-356043-5											

도면2

(A)

[Results]								
P-RbcS4	T-nos	T-E9	pat	CV127	DP305423	DP356043	No. of events	
0	0	1	0	0	0	0	5	

(B)

[Genetic information]										
Crops	Events	P-RbcS4	T-nos	T-E9	pat	CV127	DP-305423-1	DP-356043-5	Result	
Soybean (24)	260-05(G94-1, G94-19, G168)	0	1	0	0	0	0	0		
	FG72	0	1	0	0	0	0	0		
	RRS (GT5-40-3-2)	0	1	0	0	0	0	0		
	IND-00410-5	0	1	0	0	0	0	0		
	W62, W98	0	1	0	0	0	0	0		
	MON87705	0	0	1	0	0	0	0	Events	
	MON87708	0	0	1	0	0	0	0	Events	
	MON87769	0	0	1	0	0	0	0	Events	
	MON89788	0	0	1	0	0	0	0	Events	
	MON87712	0	0	0	0	0	0	0	Events	
	MON87701	1	0	0	0	0	0	0		
	MON87751	1	0	0	0	0	0	0		
	A2704-12	0	0	0	1	0	0	0		
	A2704-21	0	0	0	1	0	0	0		
	A5547-127	0	0	0	1	0	0	0		
	A5547-35	0	0	0	1	0	0	0		
	DAS-44406-6	0	0	0	1	0	0	0		
	DAS-68416-4	0	0	0	1	0	0	0		
	DAS-81419-2	0	0	0	1	0	0	0		
	GU262	0	0	0	1	0	0	0		
	BP5-CV127-9	0	0	0	0	1	0	0		
	DP-305423-1	0	0	0	0	0	1	0		
	DP-356043-5	0	0	0	0	0	0	1		
	SYHT0H2	0	1	0	1	0	0	0		

서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> REAL TIME PCR PRIMERS FOR DETECTION OF GENETICALLY MODIFIED SOYBEAN
- <130> 20PP30405

<160> 24
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GM1-F
 <400> 1
 ccagcttcgc cgttccttc 20
 <210> 2
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GM1-R
 <400> 2
 gaaggcaagc ccatctgcaa gcc 23
 <210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GM1-P
 <400> 3
 cttcaccttc tatgccctg acac 24
 <210> 4
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NOS ter 2-5'
 <400> 4
 gtcttgcat gattatcata taatttctg 29
 <210> 5
 <211> 25
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NOS ter 2-3'

<400> 5

cgctatatattt tgttttctat cgcgt 25

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NOS-Taq

<400> 6

agatgggttt ttatgattag agtcccgcaa 30

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> T-E9_MF

<400> 7

cgacaacgtt cgtaagttc 20

<210> 8

<

211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> T-E9_MR

<400> 8

cccaatgcca taatactga ac 22

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> T-E9_NP

<400> 9

aatgcatcag tttcattgcg 20

<210> 10

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> P-RbcS4-F
 <400> 10
 aagcaccact ccaccatcac 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> P-RbcS4-R
 <400> 11
 aggtgttgag acccttatcg 20

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> P-RbcS4-P
 <400> 12
 acgtggcatt attccagcgg 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pat-F
 <400> 13
 cgatccatct gttaggttgc 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pat-R
 <400> 14

ccttggagga gctggcaact	20
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Pat-P	
<400> 15	
atacaagcat ggtgatggc	20
<210> 16	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SE-127-F4	
<400> 16	
aacagaagtt tccgttgagc tttaagac	28
<210> 17	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SE-127-R2	
<400> 17	
cattcgtagc tcggatcgtg tac	23
<210> 18	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SE-127-P3	
<400> 18	
tttggggaag ctgtcccatg ccc	23
<210> 19	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> DP305423-F1	

<400>	19	
cggtgtctct ttttgctag c		21
<210>	20	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	DP305423-R5	
<400>	20	
gtgaccaatg aatacataac acaaacta		28
<210>	21	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	DP305423-1P	
<400>	21	
tgacacaaat gattttcata caaaagtcga ga		32
<210>	22	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	DP356-F1	
<400>	22	
gtcgaatagg ctaggtttac gaaaaa		26
<210>	23	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	DP356-R1	
<400>	23	
tttgatattc ttggagtaga cgagagtg		29
<210>	24	
<211>	30	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> DP356-P

<400> 24

ctctagagat ccgtcaacat ggtggagcac

30

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 8

【변경전】

제7항에 있어서,

상기 실시간 중합효소 연쇄반응을 수행하는 단계;를 추가로 포함하는, 유전자변형 대두 포함 시료의 스크리닝 방법.

【변경후】

제7항에 있어서,

실시간 중합효소 연쇄반응을 수행하는 단계;를 추가로 포함하는, 유전자변형 대두 포함 시료의 스크리닝 방법.