



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년06월05일
(11) 등록번호 10-2540582
(24) 등록일자 2023년06월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6895 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6895 (2018.05)

C12Q 2600/13 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0056232

(22) 출원일자 2021년04월30일

심사청구일자 2021년04월30일

(65) 공개번호 10-2022-0149075

(43) 공개일자 2022년11월08일

(56) 선행기술조사문헌

Patrick Guertler 등, Biomolecular Detection and Quantitation, 17, 100076, 2019.*

KR1020160076120 A

KR1020160143280 A

KR1020180002310 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

국립생태원

충청남도 서천군 마서면 금강로 1210 ()

(72) 발명자

이중로

전라북도 군산시 대명길 13, 101동 1101호 (대명동, 천년가 더스테이)

최원균

전라북도 군산시 공포2로 20, 210동 403호 (조촌동, 푸르지오)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김동완

전체 청구항 수 : 총 2 항

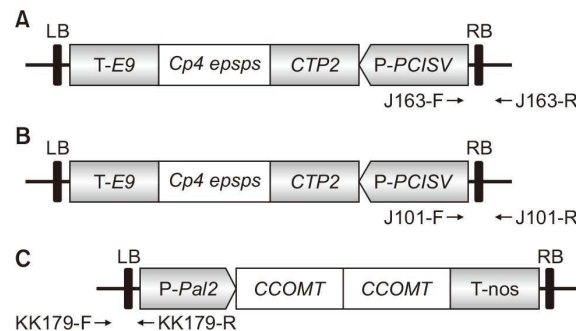
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 유전자변형 알팔파의 동시검출 방법

(57) 요약

본 발명은 유전자변형 알팔파의 동시검출 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 동시검출 PCR 방법을 이용하여 유전자변형 알팔파의 3종의 이벤트 부위(J101, J163 및 KK179)를 동시검출하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김일룡

전라북도 군산시 삼화1길 13, 305호 (문화동, 문화
그린빌A)

임혜송

전라북도 군산시 백토로 53, 204호 (문화동, 문화
그린빌C)

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

유전자변형 알팔파 내의 3종의 알팔파 게놈 DNA와 형질전환 유전자 카세트의 경계 부위인 J163(98 bp), J101(202 bp), KK179(347 bp)의 3종의 이벤트를 부위를 타겟으로 증폭시켜 유전자변형 알팔파를 동시검출하기 위한 방법에 있어서,

상기 J163 부위에 특이적인 서열번호: 1의 J163-F 프라이머와 서열번호: 2의 J163-R 프라이머의 프라이머 쌍,

상기 J101 부위에 특이적인 서열번호: 3의 J101-F 프라이머와 서열번호: 4의 J101-R 프라이머의 프라이머 쌍,

상기 KK179 부위에 특이적인 서열번호: 5의 KK179-F 프라이머와 서열번호: 6의 KK179-R 프라이머의 프라이머 쌍

을 동시에 PCR 프리-믹스 및 게놈 DNA에 첨가시킨 후, 95℃에서 예비 변성 5분간 1주기, 95℃에서 변성, 59℃에서 결합, 72℃에서 신장의 사이클을 35주기 반복하고 72℃에서 최종 신장 1주기로 이벤트를 부위를 PCR 증폭시킨 후,

아가로스 겔 상에 전기영동 시켜 각각 서로 상이한 크기인 98 bp, 202 bp, 347 bp 이벤트 부위의 PCR 생성물을 생성시킴을 특징으로 하는 유전자변형 알팔파의 동시검출 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1항에 있어서, 최소 검출 농도 DNA 양은 12.5 ng/μL 임을 특징으로 하는 유전자변형 알팔파의 동시검출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유전자변형 알팔파의 동시검출 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 동시검출 PCR 방법을 이용하여 유전자변형 알팔파의 3종의 이벤트 부위(J101, J163 및 KK179)를 동시검출하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 1996년 유전자변형 생물체로 알려진 유전자변형(GM) 작물의 최초 상용화 이후 전 세계적으로 GM 작물 재배 전용 면적은 1억 8,980만 헥타르로 꾸준히 증가했다. 주요 GM 작물에는 옥수수, 대두, 면화, 유채가 있으며 최근에는 중요한 다년생 사료 작물로 부상한 알팔파(*Medicago sativa* L.)가 있다. 콩과(Fabaceae) 계통의 일원인 알팔파는 젖소에게 가장 중요한 다년생 사료 작물이며 생산력을 높이는 데에도 사용된다.

[0005] 알팔파의 유전 공학에 대한 집중적인 연구가 농업 성능, 사료 품질 및 산업 속성을 개선하기 위해 수행되어 왔다. 대부분의 연구는 사료 품질 개선, 염분 및 가뭄과 같은 비생물학적 스트레스 요인에 대한 내성 증가, 제초제 내성 증가, 신규 화합물 생산 유도를 위해 형질전환 방법을 적용하는 데 초점을 맞추었다.

[0007] 현재까지 모든 GM 알팔파는 제초제 저항성 및/또는 리그닌 생합성 억제를 통합하여 몬산토 사에 의해 개발되었다. 이러한 이벤트는 한국을 포함한 많은 국가에서 승인되었다. 이벤트 J101 및 J163은 FMV 프로모터의 제어 하에 제초제 글리포세이트에 대한 내성을 제공하는 형질전환 유전자 CP4 epsps를 포함한다. KK179는 RNA 간섭

(RNAi) 기술로 개발되어 S 리그닌 생산의 핵심 효소인 내인성 카페오일-CoA-3-O-메틸트랜스퍼라제(CCOMT) 유전자를 억제한다.

[0009] 이러한 3가지 단일 형질(J101, J163 및 KK179)과 2가지 후대교배종(J101×J163 및 KK179×J101)은 미국, 캐나다, 일본, 멕시코 및 아르헨티나에서 식품 및 사료 생산에 대해 승인되었다.

[0011] 현재 GM 알팔파의 검출 및 식별은 실시간 중합 효소 연쇄 반응(qPCR) 방법을 사용하여 수행된다. 사용 가능한 표준물질(RM)이 부족하기 때문에 본 발명자들은 플라스미드 표준을 사용하여 이벤트-특이적 qPCR 방법을 개발하였다. 본 발명자들은 사용 가능한 데이터를 통해 플라스미드를 합성하고 자체 검출 방법을 검증하였다. qPCR을 위해 FAM, ZEN 및 IBFQ로 이벤트-특이적 프라이머와 프로브를 설계하였으며 증폭 크기는 102bp(J101), 118bp(J163) 및 178bp(KK179) 이었다.

[0013] GM 알팔파에 대한 신뢰할 수 있고 신속하며 비용 효율적인 식별 방법의 확립은 국가간 이동 규제에 중요하다. 정량 PCR은 매우 민감하고 겔 전기영동이 필요하지 않지만 기존의 동시검출 PCR은 정성 분석에 적합하며 일반적인 분자생물학 실험실에서 적용할 수 있다.

[0015] 따라서 이용 가능한 유전 정보를 기반으로 3종의 GM 알팔파 형질(J101, J163 및 KK179)에 대한 이벤트-특이적 동시검출 PCR 검출 방법을 확립하는 것이 요구되어 왔다. 또한 일반 유전자변형생물체(GMO) 검사 방법에 따른 방법을 검증하기 위해 검출 한계(LOD) 분석 및 무작위 RM DNA 분석을 수행하였다.

[0017] 따라서 본 발명자들은 동시검출 PCR 방법의 광범위한 적용 가능성을 확립하고 이를 바탕으로 동시검출 PCR 방법이 시료 내에서 3종의 GM 알팔파(J101, J163 및 KK179)를 검출 및 식별하는 것에 적합하다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 된 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0019] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이용 가능한 유전 정보를 기반으로 3종의 GM 알팔파 이벤트(J101, J163 및 KK179)에 대한 이벤트-특이적 동시검출 PCR 검출 방법을 개발코자 한 것이다. 또한 동시검출 PCR 방법의 광범위한 적용 가능성을 수립하고 이를 바탕으로 한 동시검출 PCR 방법으로 시료 내에서 3종의 GM 알팔파(J101, J163 및 KK179)를 검출 및 식별하는 방법을 개발코자 한 것이다.

과제의 해결 수단

[0021] 본 발명의 목적은 유전자변형 알팔파 내의 3종의 알팔파 게놈 DNA와 형질전환 유전자 카세트의 경계 부위를 타겟으로 유전자변형 알팔파를 동시검출하기 위한 방법에 있어서, 상기 3종의 이벤트는 J163(98 bp), J101(202 bp), KK179(347 bp) 이고 각각의 이벤트 부위에 특이적인 프라이머 쌍을 이용하여 이벤트 부위를 증폭시키고 이를 전기영동 시킨 후 검출함을 특징으로 하는 유전자변형 알팔파의 동시검출 방법을 제공하는 것이다.

[0023] 이때 이벤트 J163 부위에 특이적인 프라이머 쌍은 서열번호: 1의 J163-F 프라이머와 서열번호: 2의 J163-R 프라이머이고, J101 부위에 특이적인 프라이머 쌍은 서열번호: 3의 J101-F 프라이머와 서열번호: 4의 J101-R 프라이머이며, KK179 부위에 특이적인 프라이머 쌍은 서열번호: 5의 KK179-F 프라이머와 서열번호: 6의 KK179-R 프라이머임을 특징으로 한다.

[0025] 또한 이벤트 부위의 증폭 방법은 3종의 프라이머 쌍(서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 서열번호: 5, 서열번호: 6), PCR 프리-믹스 및 게놈 DNA를 첨가하고 95℃에서 예비 변성 5분간 1주기, 95℃에서 변성 30초, 59℃에서 결합 30초, 72℃에서 신장 30초의 사이클을 35주기 반복하고 72℃에서 최종 신장 10분 1주기로 이벤트 특이적 부위를 증폭시킴을 특징으로 한다.

[0027] 한편 최소 검출 농도 DNA 양은 12.5 ng/μL 임을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0029] 본 발명의 효과는 이용 가능한 유전 정보를 기반으로 3종의 GM 알팔파 형질(J101, J163 및 KK179)에 대한 이벤트-특이적 동시검출 PCR 검출 방법을 제공하는 것이다. 또한 동시검출 PCR 방법의 광범위한 적용 가능성을 수립하고 이를 바탕으로 한 동시검출 PCR 방법으로 시료 내에서 3종의 GM 알팔파(J101, J163 및 KK179)를 검출 및 식별하는 방법을 제공하는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 3종의 LM 알팔파 이벤트(A: J163, B: J101, C: KK179)에 삽입유전자 카세트와 특이적 증폭 PCR 프라이머 위치의 개략도를 나타내는 것이다. 프라이머의 결합 예상 위치는 화살표로 나타내었다. 세로 굵은 선은 알팔파 게놈과 삽입유전자 카세트의 경계 영역을 나타낸다(RB: 오른쪽 삽입경계, LB: 왼쪽 삽입경계, F: 정방향 프라이머, R: 역방향 프라이머, 회색 오각형: 프로모터, 열린 사각형: 코딩 유전자, 회색 사각형: 3' 터미네이터).

도 2는 다중 중합 효소 연쇄 반응(PCR) 확립을 나타내는 것이다. (A) 최적의 동시검출 PCR 조건의 개략도이다. (B) 3종의 GM 알팔파 표준물질(레인 1~3), 비변형 알팔파(레인 4)와 혼합표준물질(레인 5)의 동시검출 PCR 증폭 결과를 나타내는 아가로스 겔 이미지이다. 레인 1: J163, 레인 2: J101, 레인 3: KK179, 레인 4: 비변형 알팔파, 레인 5: 혼합된 표준 물질, M: 100 bp DNA 마커이다.

도 3은 동시검출 PCR의 민감도를 나타내는 것이다. (A) 연속 희석된 혼합표준물질 DNA 주형을 사용하여 3종의 알팔파 이벤트에 대한 동시검출 PCR의 검출 한계(LOD)를 나타낸다. (B) 3종의 알팔파 표준물질 DNA의 무작위 혼합물을 사용한 동시검출 PCR의 효율성을 나타낸다. PCR: 중합효소 연쇄 반응, LOD: 검출 한계, RM: 표준물질, M: 100 bp DNA 마커이다.

도 4는 91 개체의 야생 알팔파 표본 분석을 위한 동시검출 PCR 방법의 적용을 나타내는 것이다. (A) 알팔파 시료 채집 장소의 위치를 나타내는 것이다. 채워진 원은 야생 알팔파 표본 채집 장소의 위치를 나타내는 것이다. (B) 91 개체의 시료를 사용한 동시검출 PCR 분석을 나타내는 것이다(레인 1: 비변형 알팔파, 레인 2: J163, 레인 3: J101, 레인 4: KK179, 레인 5: 혼합된 3종의 표준물질, S01-S91: 표본 시료명, M: 100bp DNA 마커).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 본 발명은 유전자변형 알팔파 내의 3종의 알팔파 게놈 DNA와 형질전환 유전자 카세트의 경계 부위인 이벤트 부위를 타겟으로 유전자변형 알팔파를 동시검출하기 위한 방법에 있어서, 상기 3종의 이벤트는 J163(98 bp), J101(202 bp), KK179(347 bp) 이고 각각의 이벤트 부위에 특이적인 프라이머 쌍을 이용하여 이벤트 부위를 증폭시키고 이를 전기영동 시킨 후 검출함을 특징으로 하는 유전자변형 알팔파의 동시검출 방법에 관한 것이다.

[0034] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0036] 동시검출 PCR 구축

[0038] 알팔파 동시검출 PCR 방법을 개발하기 위해 3종의 GM 알팔파 이벤트에 대한 유전 정보를 수집하고(도 1) 이벤트-특이적 PCR 프라이머를 설계하였다(표 1).

표 1

이벤트-특이적 PCR 프라이머 설계

이벤트	프라이머 명칭	서열 (5'-3')	생성물 크기(bp)
J163	J163-F	GGACTGAGAATTAGCTTCCA (서열번호: 1)	98
	J163-R	ACAAGGTCATCCAAACTGAA (서열번호: 2)	
J101	J101-F	GGACTGAGAATTAGCTTCCA (서열번호: 3)	202
	J101-R	ATCTTTACAGTGACAATGTATATGGA (서열번호: 4)	
KK179	KK179-F	GTCTTCAAAATACAAGTCAAACAC (서열번호: 5)	347
	Kk179-R	CTTTCATTTATAATAACGCTGCG (서열번호: 6)	
β-액틴	β-액틴-F	GTCTCTCACGATTTCGCGCT (서열번호: 7)	147
	β-액틴-R	GTTCTATCTATGAAGGATATGCCC (서열번호: 8)	

[0040]

[0042] 알팔파 게놈과 각각의 형질전환 유전자 카세트 경계 영역에 특이적인 프라이머를 설계하여 특이적 증폭이 가능한 프라이머를 선택하였다. 그 결과 모든 PCR 프라이머는 GM 알팔파 이벤트 별로 이벤트 특이적 증폭을 나타내었다(도 2). 이러한 결과는 GM 알팔파 동시검출 PCR이 높은 특이성으로 각각의 이벤트를 동시에 검출할 수 있음을 나타낸다.

[0044] 동시검출 PCR의 민감도

[0046] GMO 샘플 또는 가공식품의 게놈 DNA 양은 GMO 정성분석에는 충분하지 않은 경우가 매우 많다. 따라서 동시검출 PCR에 시료 게놈 DNA를 성공적으로 사용할 수 있는 최소 수준의 검출한계를 확인하는 것이 필수적이다. LOD를 검증하기 위해 3개의 GM 알팔과 게놈 DNA 혼합물을 연속 희석하여 시험하였다(도 3a). 동시검출 PCR 밴드는 DNA 혼합물의 12.5 ng/μL 농도에서 검출이 가능하며 효과적으로 분석을 수행하기 위해 권장되는 최소 DNA 양은 12.5 ng/μL이다.

[0048] 무작위로 혼합된 알팔과 표준물질 DNA를 사용하여 알팔과 동시검출 PCR 방법의 효율성과 민감도를 확인하였다. 알팔과 동시검출 PCR 방법은 모든 무작위 표준물질 DNA 혼합물을 특이적으로 검출할 수 있으며 시료내 DNA의 유무를 효과적으로 식별할 수 있었다(도 3b). 이러한 결과는 현재 국내에서 승인된 2종의 GM 알팔과 후대교배종(J101×J163 및 KK179×J101)을 포함하여 향후 개발이 가능한 모든 조합의 GM 알팔과 후대교배종 이벤트도 본 발명의 동시검출 PCR 방법으로 식별하기에 충분함을 나타낸다.

[0050] 동시검출 PCR의 적용

[0052] GMO 식별을 위한 동시검출 PCR 방법이 GMO 모니터링에서 수집된 GM 샘플 검출에 적용되었다. 알팔과 검체 분석을 위한 동시검출 PCR 방법을 적용하기 위해 국립생물자원관의 야생 알팔과 검체로 본 발명의 멀티플렉스 PCR을 수행하였다(표 2). 2000년부터 2018년까지 수집된 91개의 알팔과 표본을 대상으로 본 발명의 GM 알팔과 동시검출을 사용하여 자연환경에서 의도하지 않게 방출된 GM 알팔과를 식별하고자 하였다(도 4). 동시검출 PCR을 사용하여 91개의 알팔과 표본을 검출한 결과 GM 알팔과는 검출되지 않았으며 이러한 결과는 각각의 이벤트 특이적 단일 검출법 PCR로 확인되었다(데이터 나타내지 않음).

표 2

번호	시료 번호	번호	시료 번호	번호	시료 번호
S04	NIBRVP0000501595	S05	NIBRVP0000292518	S06	NIBRVP0000292523
S07	NIBRVP0000292517	S08	NIBRVP0000441696	S09	NIBRVP0000292533
S10	NIBRVP0000292513	S11	NIBRVP0000292514	S12	NIBRVP0000292516
S13	NIBRVP0000436383	S14	NIBRVP0000354456	S15	NIBRVP0000375266
S16	NIBRVP0000398052	S17	NIBRVP0000385357	S18	NIBRVP0000292529
S19	NIBRVP0000292525	S20	NIBRVP0000292524	S21	NIBRVP0000292522
S22	NIBRVP0000292521	S23	NIBRVP0000292520	S24	NIBRVP0000209546
S25	NIBRVP0000308143	S26	NIBRVP0000303892	S27	NIBRVP0000303891
S28	NIBRVP0000305367	S29	NIBRVP0000317390	S30	NIBRVP0000317395
S31	NIBRVP0000130307	S32	NIBRVP0000428425	S33	NIBRVP0000430227
S34	NIBRVP0000130306	S35	NIBRVP0000130305	S36	NIBRVP0000292527
S37	NIBRVP0000292520	S38	NIBRVP0000489731	S39	NIBRVP0000489213
S40	NIBRVP0000487003	S41	NIBRVP0000555041	S42	NIBRVP0000584727
S43	NIBRVP0000584033	S44	NIBRVP0000595744	S45	NIBRVP0000587621
S46	NIBRVP0000548652	S47	NIBRVP0000350272	S48	NIBRVP0000350674
S49	NIBRVP0000439717	S50	NIBRVP0000575558	S51	NIBRVP0000587695
S52	NIBRVP0000592403	S53	NIBRVP0000575852	S54	NIBRVP0000575853
S55	NIBRVP0000587027	S56	NIBRVP0000606411	S57	NIBRVP0000348540
S58	NIBRVP0000180475	S59	NIBRVP0000230317	S60	NIBRVP0000139629
S61	NIBRVP0000240944	S62	NIBRVP0000217170	S63	NIBRVP0000119898
S64	NIBRVP0000120825	S65	NIBRVP0000120826	S66	NIBRVP0000207750
S67	NIBRVP0000112397	S68	NIBRVP0000456918	S69	NIBRVP0000292526
S70	NIBRVP0000386967	S71	NIBRVP0000305407	S72	NIBRVP0000308144
S73	NIBRVP0000429882	S74	NIBRVP0000308142	S75	NIBRVP0000209991
S76	NIBRVP0000480382	S77	NIBRVP0000477472	S78	NIBRVP0000292519
S79	NIBRVP0000357281	S80	NIBRVP0000292515	S81	NIBRVP0000397803
S82	NIBRVP0000397448	S83	NIBRVP0000375414	S84	NIBRVP0000375030
S85	NIBRVP0000672868	S86	NIBRVP0000638956	S87	NIBRVP0000539399
S88	NIBRVP0000601290	S89	NIBRVP0000603483	S90	NIBRVP0000452750
S89	NIBRVP0000603483	S90	NIBRVP0000452750	S91	NIBRVP0000620900
S90	NIBRVP0000452750	S91	NIBRVP0000620900		

[0053]

[0055] 후대교배종을 포함하여 500개 이상의 GM 이벤트가 전 세계적으로 승인되었다. 일반적으로 GMO의 관리 정책 시작

은 시료 내 GM DNA 또는 단백질의 유무를 기반으로 한다. GM 작물 회사는 지속적으로 새로운 GM 이벤트를 개발하고 있기 때문에 관리가 성공하려면 이러한 이벤트에 대한 검출 및 식별 방법이 확립되어야 한다. 상업적으로 이용 가능한 GM 작물이 다양해지면서 GMO 검출 시스템 또한 다양해지고 있다. 기존 PCR을 사용하는 동시검출 검출 시스템은 형질전환 요소의 검출 및 정량화를 위한 강력한 도구가 될 것이다.

- [0057] 알팔파는 높은 사료 품질로 인해 수십 년 동안 가축 사료로 사용되었다. 또한 알팔파는 방목지의 재건, 산림과 채굴된 토양의 침식 제어 및 감소, 손상된 토지의 재식과 같은 다양한 비농업 목적으로 사용된다. 한국에서 알팔파 종자는 수년간 종자 스프레이를 통해 도로 절단 경사면의 침식 방지에 사용되어 왔으며, 국내 GMO 종자의 혼입허용율을 고려할 때 이러한 행위를 통해 GM 알팔파가 자연 환경으로 의도하지 않게 방출될 수 있다.
- [0059] GM 알팔파의 환경유출을 모니터링 하기 위해서는 시간과 비용 효율적인 검출 방법을 확립해야 한다. 환경부와 국립생태원의 GMO 환경 모니터링 프로그램은 2009년부터 GM 옥수수, 대두, 유채, 면화 환경유출 개체를 조사하고 제거하였다. 그리고 최근 알팔파 수입의 꾸준한 증가와 야생 알팔파의 확산 증가로 인해 알팔파를 GMO 모니터링 대상으로 추가하였다. GM 알팔파에 대한 신뢰할 수 있는 검출 방법은 환경 유출 의심 개체를 식별하고 사후관리를 가능하게 한다.
- [0061] 실시간 PCR에 의한 3종의 GM 알팔파에 대한 이벤트-특이적 검출 방법이 개발되었으며 해당 연구에서는 알팔파 이벤트 J101, J163 및 KK179에 대한 특정 qPCR 검출 방법을 설정하고 GMO 테스트에 대한 EU 지침에 따라 검출 방법을 검증하였다. 내부 검증을 위해 연구 그룹은 LOD 및 유효화 테스트를 수행하였다. 연방 소비자 보호 및 식품 안전국(BVL)이 조직한 7개의 실험실에서도 실험실 간 비교 연구를 수행하였다.
- [0063] 본 발명에서 본 발명자들은 J163, J101 및 KK179에 대한 특정 프라이머를 설계하였다. J101과 J163은 제조제 저항성을 나타내기 위해 동일한 이식 유전자 카세트에 개발되었고(도 1), 따라서 J101과 J163을 확인하기 위해서는 이식 유전자와 식물 게놈에 특이적인 프라이머가 필요하였다. 또한 동시검출 PCR에서 프라이머 간섭을 줄이기 위해 J101 및 J163에 대해 동일한 전이 유전자 결합 프라이머(J163-F 및 J101-F)를 적용하였다.
- [0065] 각 이벤트 특이적 증폭에 대한 PCR 증폭산물 크기는 동시검출 PCR 방법의 성공적인 개발에 중요하다. 3종의 증폭산물 크기가 각각 98bp(J163), 202bp(J101) 및 347bp(KK179)가 되도록 설계하여 이벤트 특이적 동시검출 PCR을 수행하여 2.5% 아가로스 겔에서 PCR 산물을 분리하였다(도 2).
- [0067] 또한 각각의 PCR 증폭산물은 짧은 시간의 아가로스 겔 전기영동으로도 증폭된 산물의 효과적으로 확인할 수 있다. 이러한 결과는 본 발명의 동시검출 PCR 방법이 한 번의 반응에서 3종의 GM 알팔파 식별에 적합하며 분석 수행에 필요한 시간과 비용을 줄일 수 있음을 나타낸다.
- [0069] 동시검출 PCR 방법의 민감도를 평가하기 위해 LOD 분석 및 무작위 RM DNA 혼합물 분석을 수행하였다. 연속적으로 희석된 알팔파 gDNA 혼합물(100 ~ 0.2 ng/μL)이 동시검출 PCR에 사용되었으며 증폭 강도는 DNA 농도에 따라 감소하였다. 동시검출 PCR 밴드가 검출될 수 있는 최소 농도는 12.5 ng/μL 이다. GMO 모니터링에 의해 검출된 대부분의 GM 환경유출 개체는 동형접합체 또는 이형접합체였으며, 이는 게놈 DNA의 절대량이 GMO 식별에 중요하다는 것을 나타낸다.
- [0071] 단일 이벤트와 후대교배종 이벤트 PCR의 비교(도 3B)에서 단일 이벤트 PCR의 증폭 강도는 삼중 적층된 이벤트 PCR의 증폭 강도보다 컸다. 이러한 결과는 GM 알팔파를 검출하는 데 필요한 식물체의 게놈 DNA 최소 농도를 나타낸다.
- [0073] 결론적으로 새로 개발된 GM 알팔파 검출 방법은 단일 및 후대교배종 이벤트 분석에 적합하며 야생 알팔파의 GM 이벤트 분석 및 식별에 적용할 수 있다.
- [0075] 이하 본 발명을 실시예를 통해 더욱 상세히 설명한다.
- [0077] (실시예 1) 표준 물질 및 야생 알팔파 표본
- [0079] GM 알팔파(J101, J163, KK179)에 대한 표준물질은 국립식품의약품안전평가원(NIFDS, 청주)에서 분양받았다. 2000년부터 2018년까지 국내에서 수집된 총 91개의 야생 알팔파 표본 시료는 국립생물자원관(NIBR, 인천)에서 분양받았다. 건조된 알팔파 잎 조직은 DNA 추출시 까지 -80℃에서 보관되었다.
- [0081] (실시예 2) DNA 추출
- [0083] 식물 게놈 DNA는 핵산 추출기(NP986; Tianlong, Xi'an, 중국) 및 핵산 추출 키트(T085H, Tianlong, 중국)를 사용하여 제조자 프로토콜에 따라 알팔파 RM 및 야생 알팔파의 잎 조직에서 추출되었다. 총 DNA 양은 분광 광도

계 ND-2000(Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, 미국)으로 측정하였으며 PCR을 위해 최종 농도를 50ng/μL로 조정하였다. 추출된 모든 DNA는 사용시 까지 -20℃에서 보관하였다.

[0085] (실시예 3) PCR 분석

[0087] GM 알팔파에 대한 유전 정보는 이전 연구(Guertler et al., 2019)로부터 획득하였다. 동시검출 PCR을 확립하기 위해 이벤트 특이적 프라이머를 설계하고 PCR 양성대조군을 위해 β-액틴(GenBank 수탁 번호 EU664318) 증폭 유전자를 사용하였다. 프라이머는 마크로젠(한국, 서울)에서 합성하였으며 핵산분해효소가 없는 물(Qiagen, Hilden, 독일)에 100 μM로 희석하였다. PCR 분석을 위해 30 μL 총 반응 용량에서 게놈 DNA(50 ng) 및 이벤트 특이적 프라이머(0.2 μM)의 각각의 배치와 함께 2X EF-Taq PCR 프리-믹스(Solgent, 한국 대전)를 사용하였다.

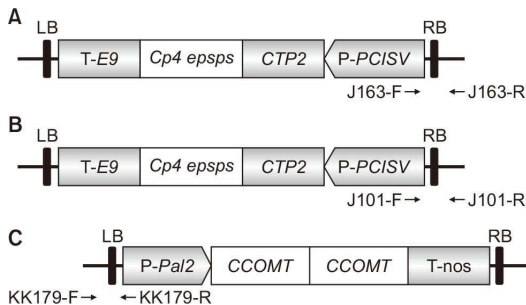
[0089] Proplex PCR 시스템(Applied Biosystems, Waltham, MA, 미국)을 다음 절차에 따라 GM 알팔파의 검출 및 식별을 위해 적용하였다 : 95℃에서 5분 동안 사전 변성; 0.5분 동안 95℃에서 변성, 0.5분 동안 59℃에서 결합 및 0.5분 동안 72℃에서 신장으로 구성된 35 사이클; 및 72℃에서 10분 동안 1회 최종 신장; 하였다. 25분 동안 일정한 전압(135V)으로 2.5 %(w/v) 아가로스 겔에서 겔 전기영동장치를 사용하여 각 PCR 산물의 10 μL 분취하여 전기영동하고 이미지를 Chemi-Doc XRS+(Bio-Rad, Hercules, CA, 미국)으로 촬영하였다.

[0091] (실시예 4) 동시검출 PCR의 민감도 및 적용

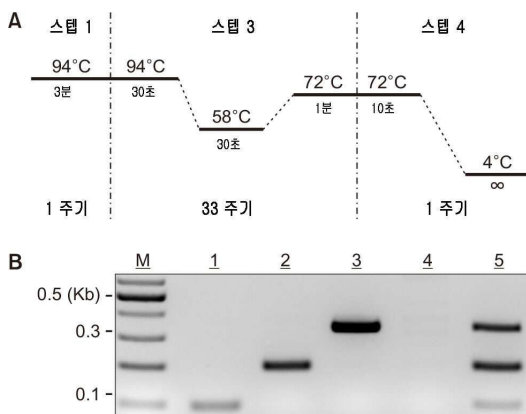
[0093] GM 알팔파 동시검출 PCR 방법의 효율성을 확인하기 위해 3종의 GM 알팔파의 RM DNA 연속 희석, 무작위로 혼합된 RM DNA 주형을 사용한 동시검출 PCR 및 야생 알팔파 시료 분석을 사용하여 검출한계 분석을 수행하였다. 3종의 RM DNA 혼합물을 LOD 분석을 위해 비변형 알팔파 DNA로 연속 희석하였다(100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0 ng/μL). 무작위 혼합 RM DNA 시료를 사용하여 동시검출 PCR 방법의 특이성을 시험하였다. 야생 알팔파 시료 분석을 위한 동시검출 PCR 방법의 실제 적용을 시험하기 위해 국립생물자원관에서 분양받은 91 종 표본의 건조된 잎 시료를 분석하였다.

도면

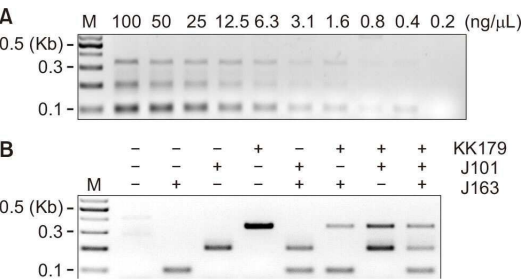
도면1



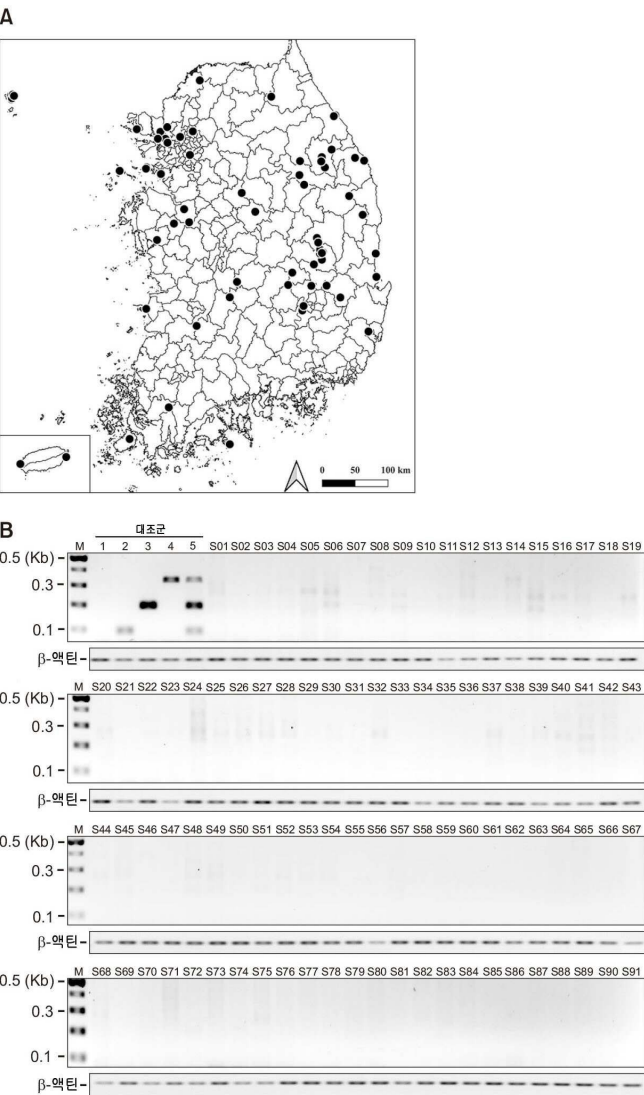
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> NATIONAL INSTITUTE OF ECOLOGY
- <120> Method for simutaneously detecting genetically modified alfalfa
- <130> KP-1055
- <160> 8
- <170> KoPatent In 3.0

<210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 1
 ggactgagaa ttagcttcca 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 2
 acaaggtcat ccaaactgaa 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 3
 ggactgagaa ttagcttcca 20
 <210> 4
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 4
 atctttacag tgacaatgta tatgga 26
 <210> 5
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 5

gtcttcaaaa tacaagtcaa acac 24

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 6

ctttcatttt ataataacgc tgcg 24

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 7

gtctctcacg atttcgcgct 20

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 8

gttcctatct atgaaggata tgccc 25