

국내 LMO 자연환경 모니터링을 위한 11개 LM 옥수수의 동시검출기법 개발

신수영 · 임혜송 · 설민아 · 정영준 · 김일룡 · 송해룡 · 이종로 · 최원균

Four multiplex PCR Sets of 11 LM Maize for LMO environmental monitoring in Korea

Su Young Shin · Hae-Song Lim · Min-A Seol · Young Jun Jung · Il Ryong Kim · Hae Ryoung Song · Jung Ro Lee · Wonkyun Choi

Received: 2 November 2016 / Revised: 15 December 2016 / Accepted: 15 December 2016

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract With the increasing development and commercial use of genetically modified maize, it is essential to develop an appropriate method for detection of individual LMO (Living modified organism) events for monitoring the samples. In South Korea, commercial planting and accidental or unintentional releases of LMOs into the environment were not approved. In this study, to increase the efficiency of LMO detection, we developed simultaneous detection methods for 11 LM maize events. This multiplex PCR detection method is economical, as it saves time, cost and labor. We developed 11 individual LM maize events, and applied 4 multiplex PCR sets to the LM maize samples. These results are confirmed by applying the multiplex analysis of LMO environmental monitoring from 2012 to 2014, which represents the unintentionally released LM maize samples. The data were correlated with event specific PCR results. Our results indicate that the multiplex PCR method developed is suitable for detection of LM maize in LMO monitoring.

Keywords Genetically modified organisms, Event, Multiplex PCR, Maize, Monitoring

서론

생명공학기술이 현대 식량과 사료의 생산성 증대를 위해 인간의 생활에 적용된 이래 다양한 종류의 작물과 생물종이 개발되고 있다. 국제생명공학응용정보서비스(International Service for the Acquisition of Agribiotech Application; ISAAA)의 2015년 발표자료에 따르면 유전자변형(LM) 작물은 전 세계적으로 179 백만 헥타르(ha)로 전체 재배면적 365 백만 헥타르 대비 49%를 차지하고 있다. LM 옥수수의 경우 전체 재배면적 185 백만 헥타르 대비 53.6 백만 헥타르로 29%를 차지한다. 국내 곡물자급률의 지속적인 감소는 수입 곡물량의 증가를 야기시켰으며 주요 곡물량의 대부분은 LM작물이 차지하고 있다(KBCH 2015).

국내 LMO의 이용은 용도별 관계부처의 전문가 위원회에서 승인된 이벤트만을 수입 및 유통하고 있다. 유럽을 비롯한 우리나라에서는 일부 제한된 시험 연구용 재배를 제외하고 LMO의 재배가 엄격히 규제되고 있어 수입되는 LMO의 유통과정에서 발생하는 자연생태계 비의도적 유출은 생물다양성의 위협요인으로 여겨지고 있다. 환경부와 국립생태원은 2009년부터 국내 사용중인 LMO의 자연생태계 유출에 대한 모니터링을 수행 중이다. LM 옥수수의 자연생태계 유출은 수입 항만 주변에서 운송 과정 중에 발생하는 낙곡과 도로 주변으로 떨어진 낙곡의 발아한 자생체, 사료공장 및 축산농가의 주변에서 발생하는 낙곡 및 자생체로 발생원인과 형태가 매우 다양하다.

국내 외 연구진에 의하여 LMO 동시검출 기술개발은 식품 분야에서 수입되는 곡물에 첨가된 LMO의 혼합비율을 검증하거나 식품에 첨가된 LMO의 검출 위주로 진행되어 왔다 (Kim et al. 2010; Oguchi et al. 2010; Shrestha et al. 2010). 여러 종류의 작물과 다양한 조합의 이벤트를 동시에 분석할

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

수 있는 동시검출 기법은 과학적인 LMO 판별을 위한 방법으로 2009년부터 수행중인 LMO 자연환경 모니터링의 LMO 의심시료 분석에도 적용되고 있다. Jo et al. (2015, 2016)에 따르면 LM캐놀라와 LM면화의 동시검출기법 개발을 통해 LMO 판별에 소요되는 비용과 노력을 절감할 수 있다고 보고되었다.

최근 다양한 분석기술의 발달과 신기술의 적용으로 LMO 검출을 위한 기법 개발도 많은 발전이 이뤄졌다. 실제로 Real time PCR 기술(Dörries et al. 2010)과 fluorescence capillary gel electrophoresis 기술(Heide et al. 2008)을 이용하여 식품 등에 첨가된 LMO의 종류를 검출하는 기술들이 개발되고 있으며, 단 한번의 PCR 장비 사용으로 최대 47개 타겟까지 분석할 수 있는 기술들도 개발되어 보고되고 있다(Cottenet et al. 2013). 본 연구에서는 이러한 최신장비와 기술을 이용하여 분석하는 방법보다는 국내 연구실 환경에 맞춰 분자생물학 실험이 가능한 모든 연구실에서 LMO 분석 실험이 가능하도록 기존의 PCR법을 바탕으로 하여 검증의 효율성을 높이기 위한 Multiplex PCR 기법을 개발하고자 하였다. 또한 실제 모니터링에서 채집되는 다양한 형태의 옥수수 시료를 확립된 Multiplex PCR 법에 적용하여 얼마나 효율성이 있는지 확인하였다.

재료 및 방법

표준시료, LM 의심시료 확보 및 DNA 정제

DNA 형태인 T25 이벤트와 분말형태의 이벤트 표준물질(MON810, MIR162, DP098140, Bt176, Bt11, 3272, GA21, NK603, MON89034, TC1507)은 미국유지화학협회(American Oil Chemists' Society, AOCS, USA)로부터 확보하였다. 또한 LM 옥수수 의심시료는 2012년부터 2014년까지 국립환경과학원 환경건강연구부 바이오안전연구팀 및 국립생태원 생태보전연구실에서 수행한 LMO 자연환경 모니터링 연구사업에서 확보한 LM 옥수수 낙곡 및 자생체(잎) 시료를 사용하였다. 표준물질과 LM 모니터링 의심시료의 genomic DNA는 DNeasy Plant mini Kit (Qiagen, German)를 이용하여 제조사의 메뉴얼에 따라 분리 및 정제하였다. 각각의 이벤트로부터 정제한 genomic DNA와 DNA 형태로 구입한 T25 이벤트의 genomic DNA는 1.0% agarose gel에 전기영동 하여 확인하였으며, 극미량 분광광도계(NanoDrop 2000; Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하여 정량 후 멸균된 3차 증류수를 이용하여 30 ng/ul가 되도록 희석하여 사용 전까지 -20°C에 보관하였다.

Table 1 List of oligonucleotide primer for Multiplex PCR

Event Name	Primer Name	Sequence (5'→3')	Primer concentration in multiplex PCR (pmol/ul)	Amplified fragment (bp)	Reference
MON810	MON810 F	GTATGTCCTTCATAACCTTCGCCCG	0.5	390	This work
	MON810 R	CTCTCCAAATGAAATGAACTTCC	0.5		
DP098140	DP098-f6	GTGTGTATGTCTCTTTGCTTGGTCTT	0.25	80	Meyer et al. 2012
	DP098-r2	GATTGTCGTTTCCCGCCTTC	0.25		
MIR162	MIR162-f1	GCGCGGTGTCATCTATGTTACTAG	0.25	92	Randhawa et al. 2014
	MIR162-r1	TGCCTTATCTGTTGCCCTCAGA	0.25		
Bt176	Bt176 F	AACTGGCATGACGTGGGTTTCTGG	0.4	209	Xu et al. 2007
	Bt176 R	TCCGTGGGCGTGGTATCGACTTT	0.4		
Bt11	Bt11 F	ACATTTAATACGCGATAGAAAAC	1	286	Xu et al. 2007
	Bt11 R	ACACCTACAGATTTTAGACCAAG	1.3		
T25	T25ES2F	ACAAGCGTGTCTGCTCCAC	0.4	102	Heide et al. 2008
	T25ES2R	GACATGATACTCCTTCCACCG	0.4		
3272	3272 F	CTGCAGTGAGTGGGCATGATGA	0.7	319	This work
	3272 R	TGCGGTTCTGTCAGTTCCAAAC	0.7		
NK603	NK603 F	CAGACTCCTCCTCTCTCGGCAT	0.7	200	This work
	NK603 R	GGACTATCCCGACTCTCTTCTC	0.7		
GA21	GA21 F	CTTATCGTTATGCTATTTGCAACTTTA	1	112	This work Yang et al. 2007
	GA21-2R	TGGCTCGCGATCCTCCT	1.3		
MON89034	MON89034 F	CGTACGTCAGGGTGCTGCTG	1	210	This work Jo et al. 2015
	J-RT73-F	CGACGGATCGTAATTTGTCG	1.3		
TC1507	TC1507 F	GTGCGACAAAAGCCTCCAAGCG	0.4	130	This work
	TC1507 R	GCAGCTTTGTGCTGATGGGG	0.4		

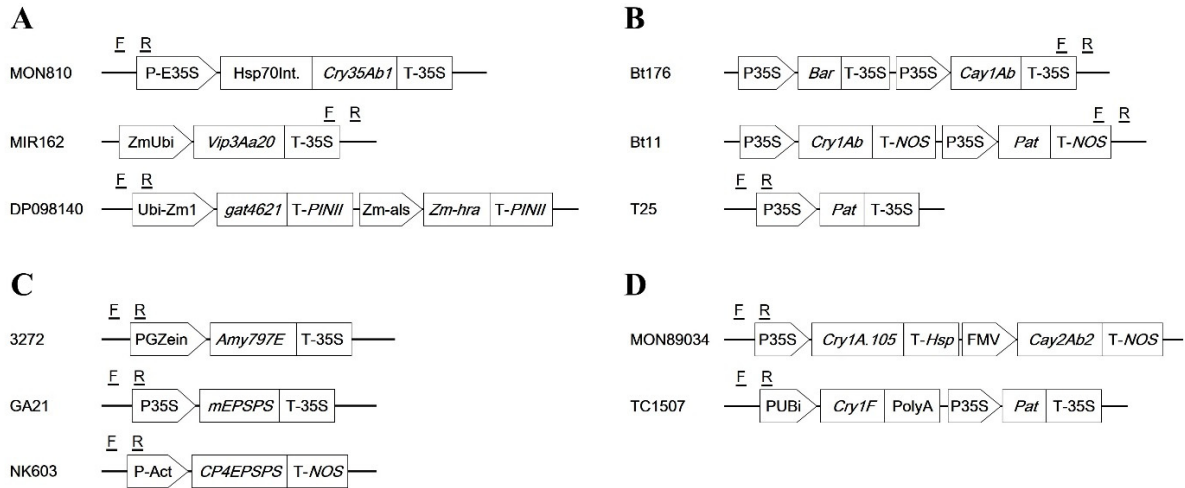


Fig. 1 Schematic diagrams of LM maize events targeted by multiplex-PCR method. The locations of the primers used for the amplification are indicated. The bold lines represent flanking sequence of maize genome: (A) Multiplex PCR Set 1 of MON810, MIR162, and DP098140; (B) Multiplex PCR Set 2 of Bt176, Bt11, and T25; (C) Multiplex PCR Set 3 of 3272, GA21, and NK603; (D) Multiplex PCR Set 4 of MON89034 and TC1507. F, forward primer; R, reverse primer; P, promoter; T, terminator; 35S, cauliflower mosaic virus(CaMV); nos, nopaline synthase; PINII, potato proteinase inhibitor II; ubi, ubiquitin, pat, phosphinothricin acetyl transferase (from *Streptomyces viridochromogenes*); Cry, Sequence encoding Bt endotoxin of Bacillus; FMV, Figwort Mosaic Virus; bar, phosphinothricin acetyl-transferase (from *Streptomyces hygrosopicus*); cp4 epsps, 5-enolpiruvilshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4; Amy797E, A-amylase with ER retention sequence; hsp, heat shock protein; gat4621, glyphosate acetyltransferase; Gzein, maize zein gene

Multiplex PCR Primer 제작

국내 수입·승인된 LM 옥수수 단일이벤트 중 11개 이벤트에 대한 Multiplex PCR법을 확립하기 위해 primer 설계를 수행하였다. 유럽위원회 공동연구센터(Joint Research Centre-European Commission, JRC-EC)와 LM 환경위해성센터(Center for Environmental Risk Assessment, CERA)에 등록된 검출 primer를 바탕으로 각각의 이벤트 별로 증폭된 PCR products를 전기영동하여 확인 한 후 PCR 증폭산물의 사이즈에 따라 Multiplex PCR에 사용 가능한 primer를 선별하였다(Table 1). 사이즈 구별이 되지 않는 이벤트들은 각 이벤트 별 도입유전자 및 전사조절인자들의 유전자 구조와 옥수수의 게놈(Genome) 내 삽입된 주변 염기서열 분석을 위해 LMO 정보검색 사이트(<http://en.biosafetyscanner.org>)를 이용하였다. 각 primer는 옥수수 게놈의 삽입 인근 부위와 각 이벤트의 삽입유전자 부위를 조합하여 특이적으로만 증폭 될 수 있도록 설계하였다(Fig. 1). 이 과정을 통해 이벤트 MON810, 3272, NK603, GA21, MON89034 그리고 TC1507의 검출 primer는 자체적으로 primer를 설계하였다(Table 1). 본 연구에 사용된 모든 primer는 마크로젠(주)에 의뢰하여 제작하였다.

Multiplex PCR 조건 확립

각각의 이벤트 표준물질로부터 분리 정제한 genomic DNA 와 T25 이벤트의 genomic DNA는 30 ng/ul로 희석하여 준비

하였다. 동시검출기법 개발을 위한 각각의 이벤트 단일검출 PCR의 조건은 genomic DNA 2 ul (60 ng)를 주형으로 사용하였으며, 각각의 이벤트 특이적 primer를 2 ul (10 pmol), dNTP 1 ul (2.5 mM dNTP each), 멸균된 증류수를 넣어 각 PCR 튜브당 최종 부피가 30 ul가 되도록 2X EF-Taq PCR Pre-Mix (Solgent, Korea)와 혼합하여 PCR을 수행하였다(Proplex PCR system, Applied Biosystems, USA). PCR 반응 조건은 95°C에서 5분간 변성 후, 95°C 15초, 60°C 20초간 40 cycle 을 결합 및 신장 반응 시킨 뒤 4°C에서 PCR 반응을 중지시켰다. 증폭된 PCR 산물은 100bp DNA ladder (Solgent, Korea) 와 함께 2.5% agarose gel 상에서 135 V로 전기영동 후 Chemi-Doc™ XRS+ (Bio-Rad, USA)를 이용하여 전기영동 결과를 확인하였다. 동시검출을 위한 PCR 조건은 단일 이벤트 검출에서 증폭된 PCR Product 사이즈가 전기영동 상에서 구분되는지 확인 한 후 Multiplex PCR Set 별로 2~3쌍의 primer 농도로 조절하여 최적의 Multiplex PCR 조건을 확립하였다.

LM 의심시료를 이용한 Multiplex PCR 효율 검증

『유전자변형생물체 국가간 이동 등에 관한 법률』 제26조의 2 에 따라 환경부는 국내 수입 유통과정 중 발생한 비의도적 LMO의 자연생태계 환경영향을 조사하기 위하여 매년 LMO 자연환경 모니터링을 수행 중이다. 본 연구에서 사용된 LM 의심시료는 2012년부터 2014년까지 국립환경과학원 및 국립생태원에서 수행한 모니터링 결과 LM 옥수수로 판정된 시료

Table 2 Identification of LMO monitoring samples

Sample No.	Sample type	Event Identification
1	Grain	Bt11
2	Grain	MON810/NK603
3	Grain	MON810/NK603
4	Tissue (leaf)	NK603
5	Tissue (leaf)	NK603
6	Tissue (leaf)	MON810/NK603
7	Grain	MON810/NK603
8	Grain	MON810/NK603
9	Grain	MON810/NK603
10	Tissue (leaf)	Bt11
11	Tissue (leaf)	Bt11/GA21

중에 11개의 낱곡 및 자생체를 대상으로 하였다(Table 2). 순수 분리 정제한 낱곡 및 자생체(잎)의 genomic DNA를 주형으로 이용하여 기 확립된 Multiplex PCR의 효율성을 검증하였다.

결과 및 고찰

LMO 도입유전자 검증 및 Multiplex PCR 구축

기존 검출 primer와 본 연구에서 새롭게 설계된 primer를 조합하여 11개 LM 시료에 대한 Multiplex PCR 기법을 개발하고자 4개의 Multiplex PCR Set (Set1: MON810, MIR162, DP098140; Set2: Bt176, Bt11, T25; Set3: 3272, GA21, NK603; Set4: MON89034, TC1507)을 설정하였다(Fig. 2). 각각의 이벤트 별 Primer 농도는 각각의 Multiplex PCR Set에서 최적의 증폭 효율을 보일 수 있는 농도로 각기 다르게 조절하였다. 각각의 이벤트 별 표준물질을 주형으로 하여 설계한 primer가 정확한 증폭 사이즈를 보이는지 확인하였다(Fig. 2A lane 1, 2, 3; 2B lane 1, 2, 3; 2C lane 1, 2, 3; 2D lane 1, 2). 구축된 단일이벤트 검출결과를 바탕으로 혼합된 DNA 시료에서 Multiplex PCR 효율을 측정하기 위하여 30 ng/ul로 희석된 각각의 genomic DNA를 Set 별로 동일양 혼합 한 뒤 주형으로 사용하여 Multiplex PCR을 수행하였다(Fig. 2A lane 4, 2B lane 4, 2C lane 4, 2D lane 3). 전기 영동 하여 확인한 결과 유사한 증폭 효율을 보이는 Multiplex PCR 밴드를 육안으로 쉽게 구분할 수 있었다.

자연생태계 내 LMO 의심시료 분석결과

최근 통계자료(KBCH, 2015)에 따르면 2015년을 기준으로 국내 수입 및 유통이 승인된 LMO 이벤트는 단일과 후대교배종을 모두 포함하여 136종에 이르며 이중 옥수수는 69개 이벤트에 이른다. 옥수수의 경우 여러 종류의 단일 및 후대

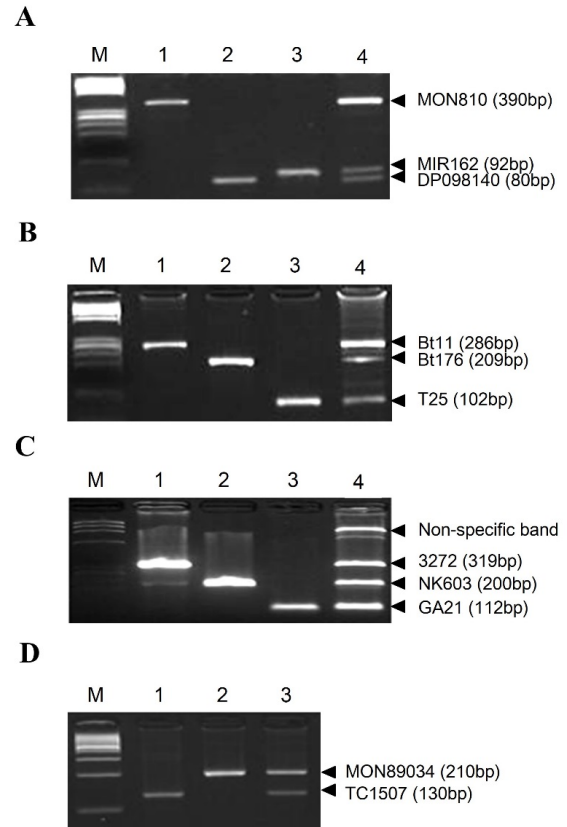


Fig. 2 Establishment of 4 set multiplex-PCR amplification for 11 LM maize events. (A) PCR results of multiplex PCR Set 1. Lane1, MON810; lane2, MIR162; lane 3, DP-098140-6; lane 4, multiplex PCR product of 3 mixed DNA. (B) PCR results of multiplex PCR Set 2. Lane1, Bt11; lane2, Bt176; lane 3, T25; lane 4, multiplex PCR product of 3 mixed DNA. (C) PCR results of multiplex PCR Set 3. Lane1, 3272; lane2, NK603; lane 3, GA21; lane 4, multiplex PCR product of 3 mixed DNA. (D) PCR results of multiplex PCR Set 4. Lane1, MON89034; lane 2, TC1507; lane 3, multiplex PCR product of 2 mixed DNA. Each PCR analysis was performed in duplicate and were electrophoresed on 2.5% agarose gel. Lane M, DNA size marker; Arrow, amplified products of each PCR

교배종 낱알이 혼합되어 수입되므로 모니터링 과정에서 발견되는 LMO 의심 낱곡 및 자생체를 분석하기 전까지는 이벤트를 단정할 수 없으며 특히 최근 주요 재배국에서 후대교배종을 주로 재배하므로 단일검출기법에 의존하여 LMO 자연환경 모니터링 의심시료를 분석하기에는 많은 비용과 시간, 노력이 필요하다. 따라서 국내 재배가 이루지고 있지 않은 LMO의 수입유통 과정 중에 발생하는 비의도적인 생태계 유출에 대해 과학적인 안전관리를 위해서 지속적인 검출법과 Multiplex PCR법 개발이 성공적인 모니터링 수행을 위해 필수적이다(Jo et al. 2015; Jo et al. 2016).

본 연구를 통하여 구축한 Multiplex PCR 기법이 실제 국내 자연환경에 유출된 LM 옥수수 낱곡 및 자생체의 분석에도 적합한지 효율성을 검증하기 위해 2012년부터 2014년까지 LMO 모니터링을 통해 채집된 의심시료 중 11개 시료를

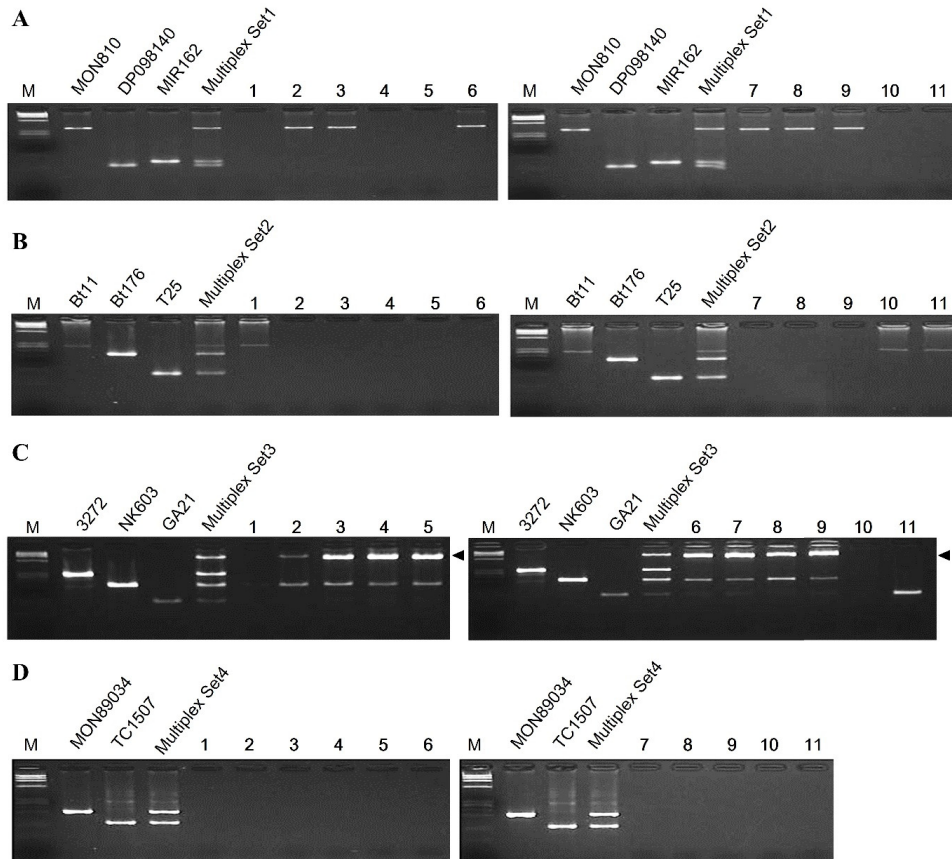


Fig. 3 Detection of 11 LMO monitoring maize samples using multiplex PCR sets. (A-D) PCR results of Set 1, MON810, DP098140, MIR162; Multiplex Set 1, 3 mixed DNA; PCR results of Set 2, Bt11, Bt176, T25; Multiplex Set 2, 3 mixed DNA; PCR results of Set 3, 3272, NK603, GA21; Multiplex Set 3, 3 mixed DNA; PCR results of Set 4, MON89034, TC1507; Multiplex Set 4, 2 mixed DNA; Lanes 1-11, 11 LM Maize samples; Lane M, marker (100bp DNA ladder); Each PCR analysis was performed in duplicate and were electrophoresed on 2.5% agarose gel. Arrow in Fig. 3C represented non-specific amplification band of Multiplex PCR Set 3

대상으로 추출한 genomic DNA를 주형으로 Multiplex PCR을 수행하였다(Fig. 3). 각각의 의심시료를 대상으로 실시한 Multiplex PCR 결과 확보한 11개의 LM 의심시료는 모두 수입이 승인된 LM 옥수수임을 확인할 수 있었다. Multiplex Set 3의 경우 표준물질을 주형으로 실시한 PCR에서 비교적 큰 사이즈에서 non-specific 밴드가 증폭되는 패턴을 보였는데 LM 옥수수를 대상으로 실시한 PCR에서도 동일한 non-specific 밴드가 관찰되었다(Fig. 2C and Fig. 3C). Multiplex Set 4는 11개의 의심시료에서는 포함되지 않는 이벤트로 확인하였으며 추후 추가적인 LM 의심시료 분석을 통해 효율성 검증이 필요할 것으로 사료된다(Fig. 3D). 국립생태원에서 수행하고 있는 LMO 자연환경 모니터링 결과 한해 수집되는 LM 의심시료는 해마다 점차 증가하는 경향을 보이므로 확립된 단일이벤트 검출기법을 바탕으로 효율적인 Multiplex PCR 방법을 구축하는 것은 의심시료 분석에 필요한 자원을 절약하는데 매우 중요한 요소이다. 실제로 본 연구의 결과 11개의 LMO 의심시료를 11개 단일이벤트 검출기법으로 검증하기 위해서는 121회의 PCR 반응이 필요하지만 확립된 4 Set의 Multiplex PCR을 활용하면 44회의 PCR 반응 만으로도 각각

의 의심시료가 어떤 이벤트인지 분석이 가능하다. 따라서 자연생태계에 비의도적으로 유출된 LMO 시료를 과학적으로 분석하기 위해서 지속적인 단일이벤트 검출기법 개발과 Multiplex PCR 개발이 필요하다. Jo et al. (2015, 2016) 등에 의해 개발된 캐놀라와 면화의 multiplex PCR 검출기법이 보고된 바 있으나 본 연구에서 새롭게 개발한 옥수수 multiplex PCR 검출기법은 캐놀라와 면화의 multiplex PCR에 비해 annealing time과 PCR 반응 반복 수를 줄이는 등 옥수수 특이적인 분석법을 확립하여 분석시간을 절약할 수 있으며 LMO 표준물질 뿐만 아니라 채집된 LMO 모니터링 의심시료에서 검출 효율을 검증한 사례라는 점에서 본 연구가 의미가 있다고 사료된다.

전세계적으로 기후변화와 무분별한 경작 등으로 해마다 경작면적이 감소하고 있으며, 꾸준한 인구증가로 인해 향후 식량요구량을 점차 증가될 것이다. 이러한 문제의 대안으로 떠오르고 있는 LM 작물의 개발은 최근 다양한 이슈와 논란들로 LMO의 안전한 이용에 제동이 걸리고 있다. 국내 수입 유통중인 LMO는 각 분야별 전문가에 의해 인체 및 자연생태계에 위해성 여부를 검증 받아야 한다. 하지만 LMO의 국

내 재배가 엄격히 금지된 상황에서 LMO의 자연생태계 유출은 위해성 여부를 떠나 LMO의 안전관리에 문제가 될 수 있다. Multiplex PCR법을 개발하기 위해서는 승인된 이벤트의 유전자 서열 확보는 물론 혼합된 시료에서 이벤트를 효율적으로 검증할 수 있는 Primer의 종류와 농도의 조절이 관건이라 하겠다. 그리고 확립된 검출기법은 실제 LMO 모니터링 시료에 적용함으로써 Multiplex PCR법의 효율성과 효율성을 확인할 수 있다. 본 연구를 통하여 현재 국내 수입 및 유통이 승인된 LM 옥수수 이벤트 중 11개 이벤트에 대한 동시검출 기법을 확립할 수 있었으며 실제 LMO 모니터링에서 채집된 다양한 형태의 시료들을 이용하여 Multiplex PCR의 효율성을 검증하였다. 매년 신규 이벤트가 새롭게 승인되는 국내 여건에서 지속적인 단일이벤트 검출기법과 Multiplex PCR법의 개발은 보다 효율적인 LMO 모니터링 사업의 수행을 위해 필수적이며 LMO 안전관리의 시작이라 할 수 있다.

적 요

유전자변형 옥수수의 개발과 상업적 이용이 증가하면서 유전자변형 옥수수 의심시료의 LMO 이벤트를 확인 할 수 있는 적합한 방법 개발이 필요하다. 국내에서는 상업적 재배와 자연생태계의 의도적·비의도적 LMO의 유출이 허용되고 있지 않다. 본 연구에서는 국내 승인된 11개의 LM 옥수수 이벤트를 동시에 검출할 수 있는 동시검출기법을 개발하였다. 이 방법은 시간과 비용, 노동력을 절감할 수 있는 효율적인 방법으로 4종의 PCR set로 개발하였다. 2012년부터 2014년까지 국립환경과학원 및 국립생태원에서 실시한 LMO 자연환경 모니터링 의심시료를 이용하여 동시검출기법의 효율성을 검증하였다. 이러한 결과를 바탕으로 본 연구의 결과는 LMO 모니터링 시료의 분석에 적합한 방법임을 알 수 있었다.

사 사

본 연구는 2016년 국립생태원 생태보전연구실의 연구과제(NIE-법정연구-2016-11, NIE-법정연구-2016-07)로 수행되었다.

References

BIOSAFETY SCANNER. Available from: <http://en.biosafetyscanner.org/>
Center for Environmental Risk Assessment (CERA). Available from: <http://www.cera-gmc.org/>
Cottenet G, Blanpain C, Sonnard V, Chuar PF (2013) Development and validation of a multiplex real-time PCR method to simultaneously detect 47 targets for the identification of genetically modified organisms. *Anal Bioanal Chem* 450:

6831-6844
Dörries HH, Remus I, Grönewald A, Grönewald C, Berghof-Jäger K (2010) Development of a qualitative, multiplex real-time PCR kit for screening of genetically modified organisms (GMOs). *Anal Bioanal Chem* 936:2043-2054
European Commission, Joint Research Centre (JRC). Available from: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu>
GMO Detection Method Database (GMDD). Available from: <http://gmdd.shgmo.org/index/search>
Heide BR, Drømtorp SM, Rudi K, Heir E, Holck AL (2008) Determination of eight genetically modified maize events by quantitative multiplex PCR and fluorescence capillary gel electrophoresis. *European Food Research and Technology* 227:1125-1137
Jo BH, Lee JR, Choi W, Moon JC, Shin SY, Eum SJ, Seol MA, Kim IR, Song HR (2015) Development of multiplex PCR-based detection method for five approved LM canola events in Korea. *J Plant Biotechnol* 42:117-122
Jo BH, Seol MA, Shin SY, Kim IR, Choi W, Eum SJ, Song HR, Lee JR (2016) Multiplex PCR method for environmental monitoring of approved LM cotton events in Korea. *J Plant Biotechnol* 43:91-98
KBCH: Korea Biosafety Clearing House. [Internet]. 2015. Status of risk assessment of GMO in Korea. Available from: <http://www.biosafety.or.kr>.
Kim SY, Kim JH, Lee HJ, Kim HY (2010) Detection system of stacked genetically modified Maize using multiplex PCR. *Food Sci Biotechnol* 19(4):1029-1033
Meyer W, Caprioara-Buda M, Jeynov B, Corbisier P, Trapmann S, Emons H (2012) The impact of analytical quality criteria and data evaluation on the quantification of genetically modified organisms. *European Food Research and Technology* 235(4): 597-610
National Institute of Ecology (NIE) (2015) Detection methods for analysis of LMO. ISBN 979-11-86197-24-0. 10-43
Oguchi T, Onishi M, Mano J, Akiyama H, Techima R, Futo S, Furui S, Kitta K (2010) Development of multiplex PCR method for simultaneous detection of four events of genetically modified maize: DAS-59122-7, MIR604, MON863 and MON88017. *Food Hygiene and Safety Science* 51(3):92-100
Randhawa GJ, Singh M, Sood P, Bhogre RK (2014) Multitarget real-time PCR-based system: monitoring for unauthorized genetically modified events in India. *J Agric Food Chem* 62(29):7118-7130
Shrestha HK, Hwu KK, Chang MC (2010) Advances in detection of genetically engineered crops by multiplex polymerase chain reaction methods. *Trends in Food Science & Technology* 21:442-454
Xu J, Zhu S, Miao H, Huang W, Qiu M, Huang Y, Fu X, Li Y (2007) Event-specific detection of seven genetically modified soybean and maize using multiplex-PCR coupled with oligonucleotide microarray. *J Agric Food Chem* 55(14):5575-5579
Yang L, Guo J, Pan A, Zhang H, Zhang K, Wang Z, Zhang D (2007) Event-specific quantitative detection of nine genetically modified maize using one novel standard reference molecule. *J Agric Food Chem* 55(1):15-24