

# 한우 및 젃소를 고속으로 판별하기 위한 멀티 플레스 PCR 기술 개발

이진성  
코아바이오시스템(주)  
jslee@corebio.com

## Multiplex PCR Technique for Rapid Detecting of Hanwoo and Holstain

Jin-Sung Lee  
Research Institute of Bioscience & Biotechnology,  
CoreBioSystem Co., Ltd

### 요 약

본 논문은 소의 모색에 관여하는 Melanocortin 1 receptor (MC1R) 유전자의 염기서열을 기초로 정확하게 한우와 젃소를 구분할 수 있는 단일 염기 변이를 이용하여 기존의 방법보다 2배 이상으로 빠른 속도로 한우와 젃소를 판별할 수 있는 multiplex PCR 기술에 관한 것이다. 또한, 동 기술에 적용된 기술에는 기존의 방법으로는 동시 판별을 할 수 없었던 소의 암수 구분이 가능하도록 수컷 판별을 위한 표지 유전자인 SRY 유전자를 적용함으로써 한우와 젃소 그리고 암수를 고속으로 동시 판별이 가능하게 되어 젃소가 한우로 둔갑되는 현재의 불법 유통의 문제점을 해결해 주는 새로운 방법이 될 수 있을 것으로 사료된다.

### 1. 서론

소에서 모색과 관련하여 많은 연구가 이뤄져 왔으며 품종 판별에 적용된 유전자는 18번 염색체상에 위치한 extension 좌위에 존재하는 melanocortin 1 receptor (MC1R) 유전자이다(1~2).

MC1R은 한 개의 G-protein coupled receptor인데 MSH(또는 ACTH)의 결합으로 한 개의 cAMP 의 존신호전달체계를 촉발시켜 tyrosinase의 활성의 증가와 관련된 유전자이며 이 MC1R 유전자의 돌연변이가 모색의 변이를 일으킨다는 사실이 규명됨에 따라 PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 방법을 사용하여 소, 말, 돼지 그리고 면양 등의 다양한 축종을 대상으로 모색변이에 관한 연구가 이루어졌다(3~4).

한우 및 젃소 품종간의 MC1R 유전자 염기서열을 비교분석한 결과 104번 아미노산을 지정하는 코돈에서 한우는 G 염기 하나가 결실됨으로써 발생한 Gly → Val 아미노산의 변화를 기초로 하여 김 등(5)과 정 등<sup>14)</sup>은 이들 염기서열 변화 부위에 대한 MspAI의 PCR-RFLP 패턴을 이용하여 한우와 젃소를 구

분할 수 있는 방법을 제안하였다. 하지만 이와 같은 방법은 목적 유전자를 PCR을 통해서 증폭한 다음 제한효소와 고농도의 전기영동이 수반되는 등 시간과 비용 면에서 한우와 젃소의 품종을 확인하는데 단점으로 지적되고 있다.

따라서 상기와 같은 적용상의 일부 문제점을 해결하기 위해 소에서 MC1R 유전자의 변이부위에 대한 최적의 프라이머 조합을 통해서 제한효소를 처리하지 않고 PCR 만으로 품종을 구분할 수 있는 새로운 프라이머 조합과 함께 암, 수의 판별 동시에 가능한 새로운 방법을 고안하기 위해서 본 연구를 수행하였다.

### 2. 재료 및 실험방법

#### 2.1 공시재료

본 연구에 사용된 소고기 시료는 한우와 젃소고기는 코아바이오시스템(주)에서 한우 젃소 유전자 분석 서비스 후에 보관하고 있는 시료로서 각각 기존의 PCR-RFLP 유전자 분석법으로 결과가 확인된 한우, 젃소고기를 사용하였다.

## 2.2 Genomic DNA 추출

소고기의 genome DNA의 추출은 약 20 mg의 근 조직을 미국 프로메가사의 Wizard Genomic DNA Purification Kit를 사용하여 제조사의 표준 방법을 통해서 추출하였고 최종적으로 TE buffer (10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)로 10 ng/ul로 하여 용리하였다.

## 2.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

MC1R 유전자와 SRY 유전자는 GenBank 의 등록 염기서열을 토대로 하여 한우 및 젃소 특이적인 프라이머를 제작, 합성하였다. PCR 반응을 위해 반응액은 template DNA 2  $\mu$ l(1~10 ng), 각 프라이머는 0.2 uM, 2X PCR Master Mix 2 $\times$  (Core Excel Taq) 을 10 ul로하여 전체 부피를 20 ul로 하여 준비하였다. 기내 증폭에 사용한 PCR 기기는 ABI2 2700 (Applied Biosystem)을 사용하였으며 PCR은 94 $^{\circ}$ C에서 15분간 수행한 후 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 65 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분을 1회전으로 총 40회 반응한 후 최종적으로 72도에서 10분간 last extension을 수행하였다. 증폭산물은 0.5X TAE 완충용액과 DNA 염색을 위한 ethidium bromide (0.5  $\mu$ g/ml)가 함유된 1% agarose gel에서 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 Gel Document System(CoreBioSytem)이용하여 결과를 분석하였다.

## 2.4. 제한효소 처리에 의한 DNA 절단 및 전기영동

PCR 종료 후 MC1R 유전자의 제한효소 처리는 4  $\mu$ l의 증폭산물에 MspAI 제한효소 10X 완충용액 1  $\mu$ l, 제한효소 MspAI(10 u/ $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l를 첨가하고 멸균 증류수로 총부피를 10  $\mu$ l로 조정하여 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 이상 반응하여 절단하였다. MspAI 제한효소에 의해서 절단된 DNA 단편의 확인은 2% Metaphor agarose gel을 통해서 0.5X TAE 완충용액으로 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 % agarose gel에서 전기영동하여 분리한 후 Gel Document System(CoreBioSytem)이용하여 결과를 분석하였다.

## 3. 결과 및 토의

현재 대부분의 한우와 젃소 유전자 판별은 한우의 모색 합성과 관련된 유전자인 MC1R 유전자의 단일 염기 변이를 기초로 MspAI 제한효소의 제한절편 다형성을 기초로 하고 있으나 이들의 판별 과정이 소고기로부터 추출된 DNA로부터 MC1R 유전자의 증폭 및 증폭여부의 확인 과정을 거치고 확인된 증폭산물을 MspAI 제한효소 처리한 다음 2시간 이상

의 반응 거치고 이를 고 농도의 아가로스 겔을 통한 전기영동 과정을 거쳐 분석되고 있어 시간이 많이 소요되며 분석 비용 또한 높다는 단점이 있었다. 본 연구에서는 이러한 단점을 개선하기 위해서 MC1R 유전자의 변이 부위에 기초로 한 부위 특이적 프라이머와 수컷 소의 판별을 위한 SRY 증폭용 프라이머를 통해서 동시에 한우와 젃소를 판별 및 소의 암수를 구별할 수 있는 새로운 multiplex PCR 방법을 개발하였다(그림 1)

본 연구로부터 기존의 PCR-RFLP 방법에 비해서 최소 2배 이상의 고속 판별과 함께 분석에 필요한 비용을 배 이상으로 줄일 수 있는 효과를 기대할 수 있어 한우와 젃소의 유전자 판별에 대한 범용적 적용에 큰 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

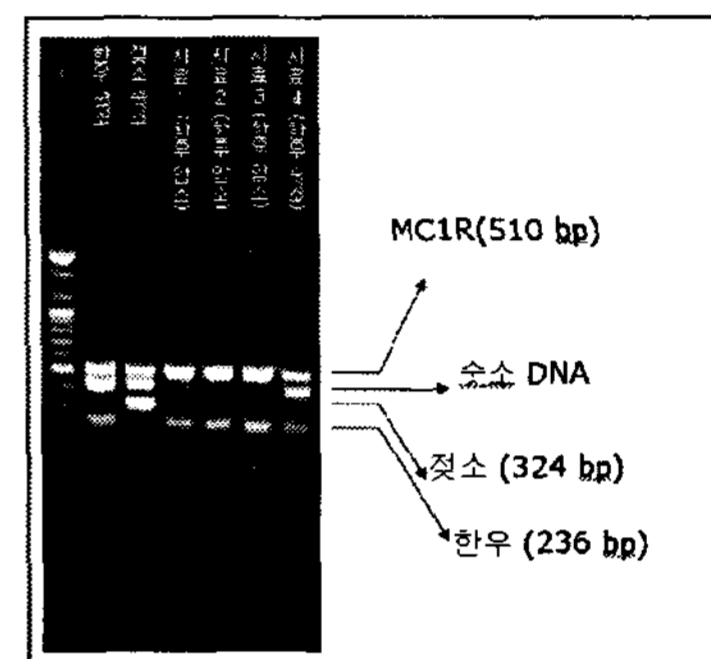


그림 1. 한우와 젃소의 유전자 판별을 위한 고속 multiplex PCR를 통한 검출

## 참고문헌

- [1]. Cone RD, Lu D, Koppula S, et al. 1996. The melanocortin receptors : Agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog Horm Res* 51 :287-317.
- [2]. Klungland H, Vage DI, Gomez-Raya L, et al. 1995. The role of melanocyte- stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm Genome* 6 :636-639.
- [3]. Marklund L, Johansson M, Sandberg K, et al. 1996. A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chesnut coat color in horses. *Mamm Genome* 7 :895-899.
- [4]. Kijas JMH, Wales R, Tomsten A, et al. 1998. Melanocortin receptor 1 (MC1R) mutations and coat color in pigs. *Genetics* 150 :1177-1185.
- [5]. 김태현, 윤두학, 박용우 등. 2000. 소 품종별 melanocortin receptor 1 (MC1R) 유전자의 유전자형 빈도에 관한 연구. *동물자원지* 42 : 735-744.