

미토콘드리아 12S rRNA 유전자의 종 특이적 PCR-RFLP Fingerprint를 이용한 식육 원료의 판별

박종근 · 신기현 · 신성철 · 정구용 · 정의룡*
상지대학교 생명자원과학대학 동물생명자원학부

Identification of Meat Species Using Species-Specific PCR-RFLP Fingerprint of Mitochondrial 12S rRNA Gene

Jong-Keun Park, Ki-Hyun Shin, Sung-Chul Shin, Ku-Young Chung, and Eui-Ryong Chung*
Division of Animal Science and Resources, College of Life Science and Natural Resources,
Sangji University, Wonju 220-702, Korea

ABSTRACT

In order to develop a sensitive and reliable method for the species-specific molecular markers, PCR-RFLP assay of the mitochondrial DNA(mt DNA) 12S rRNA gene was exploited for the identification of the origin of animal meat species including cattle, pig, sheep, goat, horse, deer, chicken, duck and turkey. A specific primer pairs were designed, based on the nucleotide sequences of mt 12S rRNA gene, for the amplification of the highly conserved region in the gene of the animal species using PCR-RFLP technique. mt DNA was isolated from meat samples followed by DNA amplification using PCR with the specific primers. PCR amplification produced an approximately 455 bp fragment in each of these animal meats. To distinguish meat species, the PCR amplicons were digested with restriction endonucleases *Tsp509I* and *MboI*, respectively, which generates distinct RFLP profiles. The DNA profiles digested with *Tsp509I* allowed the clear discrimination in the mammalian meat species and the DNA profiles digested with *MboI* in poultry meat species. Therefore, the PCR-RFLP profiles of mt 12S rRNA gene could be very useful to identify the origin of the raw materials in the raw meats as well as the processed meat products.

Key words : mt DNA 12S rRNA gene, PCR-RFLP, species-specific marker, meat species identification

서론

축산물 수입개방 이후 외국으로부터 각종 식육자원의 수입물량이 매년 증가하는 추세에 있고 국내에서 유통되고 있는 수입육 또는 국산육의 식육형태 다양화로 축종 고유의 조직학적 및 해부학적 특성이 없어져 정확한 식육의 육종 및 축종 구별이 어려워지고 있는 실정이다(Shin *et al.*, 2006). 육류 유통 및 육제품 가공 산업에서 저가의 가금육이 고가의 포유류 고기로 또는 저가의 가금육이 고가의 가금육으로 그리고 값싼 육류가 고급 육류로 둔갑 유통되거나 가공 육제품의 원료로 사용될 경우 이를 과학적으로 식별할 수 있는 기술개발이 필요하다(Calvo *et al.*,

2001; Girish *et al.*, 2005). 특히, 포유류에 비해 닭, 오리 및 칠면조의 조류같이 유연관계가 높은 근연종 간의 동정은 더욱 어려워 축종 감별을 위한 정확한 감식기술 개발이 요청된다(Martin *et al.*, 2007). 특히 이중 혼합육의 가공 육제품 상태에서의 외관이나 관능적 검사에 의한 육종 판별은 거의 불가능하기 때문에 식육이나 가공 육제품의 원료육의 정확한 표시와 소비자들의 신뢰성과 안전성 확보를 위해 제품의 원료육 표시를 객관적으로 검증할 수 있는 과학적인 판별 기술개발이 매우 중요하다. 또한, 사료나 화장품 및 의약품 등의 주원료나 부원료로 첨가된 동물성 성분에 대한 제품 표기의 동일성 여부 및 함량의 유효성 등을 과학적으로 정확하게 확인할 수 있는 기술개발도 시급한 실정이다.

그동안 다양한 축육자원의 축종판별을 위한 기술로 관능적 검사법, 조직학적 검사법, 이화학학적 검사법, 생화학적 검사법, 아미노산 분석법 및 혈청학적 방법 등이 개

*Corresponding author : Eui-Ryong Chung, Division of Animal Science and Resources, College of Life Science and Natural Resources, Sangji University, Wonju 220-702, Korea. Tel: 82-33-730-0541, Fax: 82-33-0503, E-mail: erchung@angji.ac.kr

발되었으나 이 가운데 특히, 면역효소측정법과 등전점(isoelectric focusing) 전기영동, SDS polyacrylamide gel 전기영동 및 two-dimensional electrophoresis(2D-전기영동) 등의 기법이 비교적 정확도가 높은 축종 판별법으로 사용되어져 왔다(Bellagamba *et al.*, 2001). 그러나 이들 중 특이적 단백질에 기초하여 원료육의 종 기원을 판별하는 방법은 특히 열처리 과정을 거친 원료육이나 가공육의 경우 수용성 단백질 및 특이적 항원의 변성으로 감수성이 현저히 떨어지는 문제점을 갖고 있다(Hird *et al.*, 2003).

최근 분자생물학적 기술의 발달에 따라 DNA 분자수준에서 종 특이적 DNA 염기서열 차이에 기초한 PCR(polymerase chain reaction)기법은 종래의 단백질 수준에서 축종감별의 한계성과 문제점을 극복할 수 있는 새로운 축종판별 기술로 활용되고 있다. 특히 PCR 기법은 극소량의 DNA로 *in vitro* 내에서 특정 염기서열영역을 특이적으로 증폭함으로써 신속정확하고 감수성이 매우 높은 축종판별법으로 알려졌다(Arslan *et al.*, 2006). 그동안 PCR의 분자생물학적 기법을 활용한 축종감별법으로 RAPD-PCR, species-specific PCR, PCR-RFLP 및 PCR-DNA sequencing 등이 보고된 바 있다(Shin *et al.*, 2006). 이들 가운데 특히 PCR-RFLP 기법은 DNA 염기서열의 특정한 보존영역을 PCR로 증폭하고 특정 제한효소로 절단하여 중간 유전적 변이성을 검출하여 축종을 판별하는 방법으로 신속성, 정확성 및 재현성이 높은 기술이라고 할 수 있다(Partis *et al.*, 2000).

미토콘드리아는 세포질에 존재하는 소기관으로 세포 내 에너지를 생산하며 미토콘드리아 DNA(mt DNA)는 모계 유전을 통해 다음 세대에 유전물질을 전달하는 것으로 잘 알려져 있다. 동물 mtDNA는 약 16.5 kb 크기의 환형 이중나선구조로 13 종류의 단백질을 지정하는 유전자(ND1-ND6, CytB, COI-III, ATPase 6, 8), 2개의 rRNA를 지정하는 유전자(12S, 16S) 및 22개의 tRNA 유전자 그리고 제어 부위인 D-loop 영역으로 구성되어 있다(Gardner and Snustad, 1984). 동물의 종 감별에는 핵 DNA 보다 mt DNA가 종 특이성, 신뢰성 및 재현성이 높은 것으로 알려져 있다(Branicki *et al.*, 2003). 또한 일반적으로 특정 염기서열의 copy 수가 매우 낮은 핵 DNA와는 달리 세포 당 미토콘드리아 수가 많고 각 미토콘드리아는 다수의 mt DNA를 갖고 있어 종 특이적 미토콘드리아 DNA 염기서열을 이용한 PCR 분석은 축종판별에 매우 효과적인 방법으로 입증되었다(Rodriguez *et al.*, 2005). 그동안 국내 연구자들에 의해 보고된 축종판별에 관한 결과로서 Min 등(1996)은 RAPD 기법을 이용하여 한우, 사슴, 면양 및 산양의 4 축종 육류의 축종판별을 보고 한 바 있으나 RAPD 마커는 PCR 증폭조건에 매우 민감하고 결과의 재현성 및 정확성이 매우 낮은 것이 문제점으로 지적되어(Yu and Pauls, 1992) 현재 이 방법은 축종판별에 거의 사용되지 않고 있

다. 최근에 Shin 등(2006)은 mt DNA의 cytochrome b(*cyt b*) 유전자를 이용한 PCR-RFLP 분석방법으로 각종 육류의 축종판별을 보고한 바 있다. 본 연구는 식육자원 및 원료육의 축종감별에 활용할 수 있는 보다 정확하고 다양한 종 특이적(species-specific) 축종 및 육종 판별용 DNA marker 발굴을 목적으로 mt DNA의 12S rRNA 유전자의 염기서열 정보와 특정 제한효소를 이용한 PCR-RFLP 축종판별 기법을 개발하고자 수행하였다.

재료 및 방법

공시 재료

소(*Bos taurus*), 돼지(*Sus scrofa domestica*), 양(*Ovis aries*), 염소(*Capra hircus*), 사슴(*Cervus nippon*), 말(*Equus caballus*), 닭(*Gallus gallus*), 오리(*Anas poecilorhyncha*) 및 칠면조(*Meleagris gallopavo*) 등 포유류 6종 및 가금류 3종의 총 9종의 식육자원에 대한 원료육의 축종판별에 사용한 공시 재료로서 양고기는 뉴질랜드산 양고기를 수입 회사로부터 냉동육 상태로 구입하여 사용하였고, 말고기는 한국 마사회로부터 시료를 제공 받아 이용하였으며 쇠고기, 돼지고기, 염소고기, 사슴고기, 오리고기, 칠면조고기 및 닭고기는 시중에 유통되고 있는 냉장 또는 냉동육으로부터 축종 별로 6두의 시료를 각각 채취하여 본 연구에 사용하였다.

실험 방법

1) 근육조직으로부터 DNA 분리 및 정제

공시축의 각 근육조직으로부터 mt DNA를 포함하고 있는 total DNA의 추출 및 정제는 Miller 등(1988)의 방법을 일부 수정하여 실시하였다. 즉, 근육조직 5g에 3배의 lysis buffer I(155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 1 mM EDTA)을 첨가한 후 homogenizer를 이용하여 13,000 rpm으로 균질화시킨 다음 3,000 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 침전된 pellet에 lysis buffer II(Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0.5% SDS) 4 mL와 proteinase K(500 µg/mL)를 첨가하고 65°C에서 15분간 배양한 후 RNase(50 µg/mL)를 첨가하고 37°C에서 1시간 처리하였다. 혼합배양액에 6 M NaCl 1.5 mL와 chloroform 4 mL를 첨가하여 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 70% ethanol로 침전 및 세척하고 건조된 DNA를 TE buffer(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)에 용해하여 4°C 보관하였다. 추출한 DNA의 농도는 spectrophotometer를 이용하여 260 nm UV 흡광도에 의해 측정하였다.

2) mt DNA 12S rRNA의 Primer 설계

미토콘드리아 내 12S rRNA 유전자의 특정 염기서열을

부위를 증폭하고자 NCBI GenBank database에 등록되어 있는 소(AY526085), 돼지(AM158316), 양(AY858379), 염소(AF533441), 사슴(AY184434), 말(AY584828), 닭(AP003323), 오리(AY164517) 및 칠면조(MGU83741)의 축종별 12S rRNA 염기서열 정보를 비교분석하여 다음과 같은 primer 쌍을 설계 제작하였다.: Forward 5'-CAA ACT GGG ATT AGA TAC CCC ACT AT-3' 및 Reverse 5'-GAG GGT GAC GGG CGG TGT GT-3'.

3) PCR 기법을 이용한 12S rRNA 유전자 증폭

12S rRNA 유전자의 특정 염기서열 영역의 PCR 증폭을 위한 반응액 조성은 template DNA 50 ng, primer 각 0.1 μ M, dNTP 각 250 μ M, 10 \times PCR buffer 2 μ L 그리고 *Taq* DNA polymerase 1unit을 첨가하여 최종 부피를 20 μ L로 조정하였다. PCR 증폭을 위한 반응조건은 Perkin-Elmer thermal cycler(GeneAmp PCR system 9700, PE Biosystem, Foster City, CA)를 이용하여 94°C에서 5분간 예열 후, 94°C에서 1분간 변성, 60°C에서 1분간 중합 그리고 72°C에서 1분간 신장반응을 총 35회 반복한 다음 마지막으로 72°C에서 5분간 가열 후 PCR 반응을 종료하였다. PCR 산물의 증폭여부 및 DNA 단편의 크기는 2% agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

4) DNA 염기서열 분석 및 제한효소 탐색

12S rRNA 유전자의 RFLP 분석에 가장 적합한 특정 제한효소를 탐색 발굴하기 위해 각 축종별 12S rRNA 유전자의 증폭산물을 ABI prism 310 DNA sequencer(Perkin-Elmer)를 이용하여 염기서열을 분석하고 bioedit program (Iris Pharmaceuticals, Inc., version 7.0.1)으로 축종 간 염기서열을 비교 분석하였다. 축종 간 염기서열 비교분석 정보에 근거하여 인터넷상에서 제공되는 두 종류의 제한효소 탐색 프로그램(http://insilico.ehu.es/restriction/one_seq/와 <http://www.restrictionmapper.org/>)을 활용하여 포유류의 종 감별이 가능한 *Tsp509I*(New England Biolabs, Beverly, MA, USA) 제한효소와 가금류의 종 감별이 가능한 *MboI*(Fermentas, Hanover, MA, USA) 제한효소를 각각 선발 하였다.

5) 12S rRNA 유전자의 RFLP 분석

PCR 종료 후 12S rRNA 유전자의 RFLP 분석을 위해 DNA 증폭산물을 앞서 선발한 *Tsp509I* 및 *MboI* 제한효소를 각각 이용하여 절단하였다. 각 제한효소 5 unit에 DNA 증폭산물 5 μ L를 혼합하여 최종 부피가 10 μ L로 조정한다. 다음 DNA 절단을 위해 37°C incubator에서 5시간 반응시켰다. 반응산물을 3% agarose gel에 전기영동하여 DNA 단편을 분리한 다음 ethidium bromide로 염색하고 UV 조사로 발현된 DNA profile을 검출하였다. 각 DNA 단편의

크기는 100 bp DNA 분자 마커(Takara, Japan)를 이용하여 추정하였다.

결 과

육류 수입개방 및 육제품 가공 산업의 발달에 따라 식육 및 원료육이 더욱 다양화되고 세분화되고 있어 이에 따른 각종 식육자원의 축종 및 육종 감별 기술이 요구되고 있다. 육류 유통 및 육제품 가공 산업에서 저가의 고기가 고가의 육류로 둔갑 유통되거나 가공 육제품의 원료로 사용될 경우 이를 과학적으로 식별할 수 있는 기술개발이 필요하다. 특히, 닭, 오리 및 칠면조 등 조류같이 종간 유연관계가 높은 근연종에서 유래된 육류 동정은 더욱 어려워 가금류의 축종 감별을 위한 정확한 감식기술 개발이 요청된다. 본 연구는 미토콘드리아 12S rRNA 유전자에서 종 특이적 PCR-RFLP marker를 개발하고 이를 각종 식육자원 및 가공 육제품 원료육의 축종판별을 위한 DNA 표지인자로 활용하고자 수행하였다. 포유류 6종(말, 염소, 돼지, 양, 사슴, 소) 및 가금류 3종(닭, 오리, 칠면조)의 총 9종의 축종을 대상으로 GenBank database에 등록된 각 축종의 12S rRNA 염기서열(약 950 bp) 정보를 기초로 하여 종간 공통적으로 보존되어 있는 염기서열 영역 가운데 약 445 bp 크기의 단편을 증폭하기 위한 primer를 설계하고 이 primer 쌍을 합성하여 9종의 상이한 육류 시료를 대상으로 특정 12S rRNA 유전자 영역을 PCR로 증폭한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 예상했던 크기의 12S rRNA DNA 단편이 공시한 9종 모두에서 성공적으로 증폭되었다. 또한, 축종 간에 12S rRNA 유전자의 염기서열 차이를 구명하여 종 간 특이적 RFLP profile을 발굴하기 위하여 9종의 PCR amplicons에 대한 DNA 염기서열을 분석하여 종간 염기서열 차이를 비교하고 염기서열상에서 본 연구에 이용한 *Tsp509I*와 *MboI* 두 종류의 제한효소 염기서열 인지부위를 나타낸 결과는 Fig. 2와 같다.

축종 간 염기서열 비교분석 정보에 근거하여 포유류의 종 감별이 가능한 *Tsp509I* 제한효소 및 가금류의 종 감별

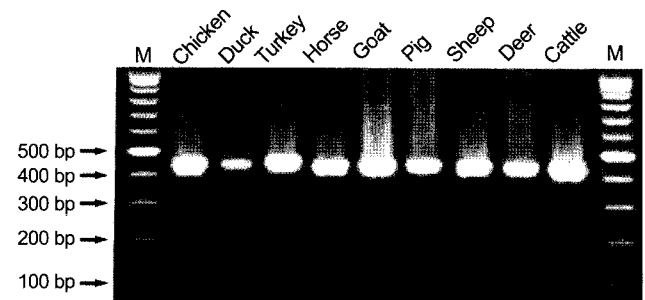


Fig. 1. PCR amplification of mitochondrial 12S rRNA gene in nine animal meat species. DNA amplicons were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis. M: size marker (100 bp DNA ladder).

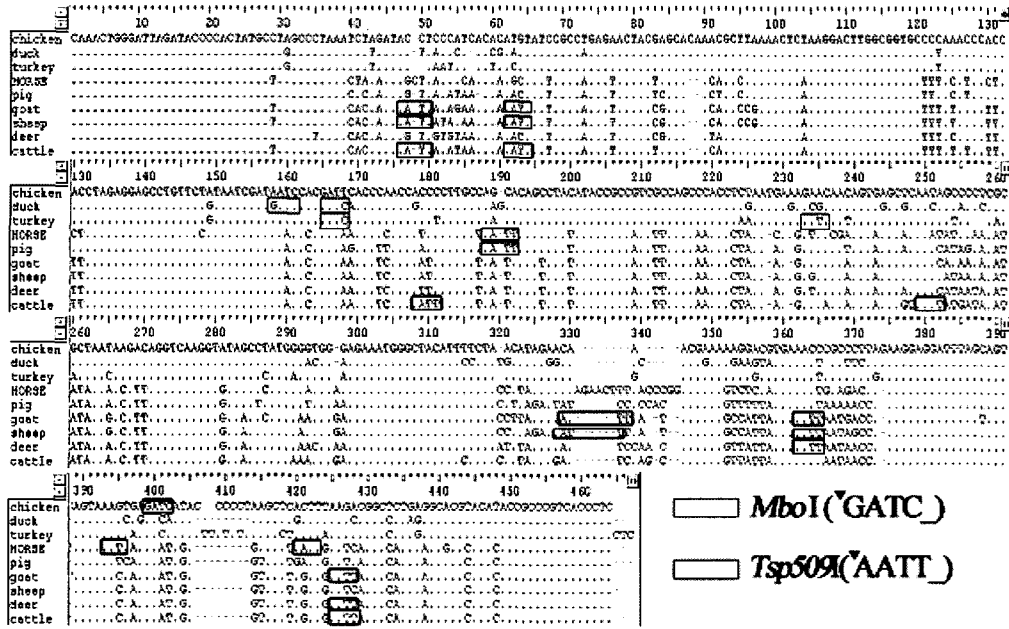


Fig. 2. DNA sequences alignment and restriction enzyme recognition sites of mitochondrial 12S rRNA gene among nine different animal meat species. Closed boxes indicate recognition sites of restriction enzymes.

이 가능한 *MboI* 제한효소를 각각 선발하여 9종간의 RFLP profile을 비교분석하였다. 먼저 *Tsp509I* 제한효소를 이용하여 9종의 DNA 증폭산물을 각각 절단했을 때 6종(말, 염소, 돼지, 양, 사슴, 소)의 포유류에서 각각 종 특이적 RFLP 양상이 관찰되어 축종 감별이 가능하였고 3종의 가금류의 경우는 모두 동일한 RFLP band가 검출되어 종간 구별이 불가능하였다(Fig. 3). 그리고 *MboI* 제한효소를 이용하여 9종의 DNA 증폭산물을 각각 절단한 결과 닭, 오리 및 칠면조 3종의 가금류에서 종별 특이적인 RFLP profile이 검출되어 3종의 가금류 간에 식별이 가능하였고 반대로 9종의 포유류에서는 동일한 DNA profile이 확인되어 종간 감별이 불가능하였다(Fig. 4). 한편, 포유류의 종간 구별이 가능한 *Tsp509I* 제한효소로 절단할 경우 종간 염기서열 차이로 발생하는 제한효소 인지부위에 근거하여 이론적으로 예상되는 종별 DNA 단편의 크기 및 수는

Table 1와 같다. 그러나 DNA 단편 가운데 분자량의 크기가 작은 단편들의 경우 일반적인 1-2% agarose gel 상에서 DNA band가 뚜렷이 검출되지 않았으나 100 bp 이상의 분자량이 비교적 큰 DNA band 만으로도 종간 구별이 가능한 종 특이적인 band 양상을 보여 종간 감별이 충분히 가능하였다. 또한 가금류의 종간 구별이 가능한 *MboI* 제한효소로 절단할 경우 역시 이론적으로 예상되는 종별 DNA 단편의 크기와 수를 Table 1에 제시하였다. 즉, 닭은 64 및 380 bp 크기의 단편 2개, 오리는 7, 155 및 277 bp 크기의 단편 3개 그리고 칠면조는 67, 161 및 217 bp 크기의 단편 3개를 각각 나타내어 이들 3개 가금류간의 종 감별이 가능하였다. 결론적으로 mt DNA 12S rRNA 유전자를 이용한 PCR-RFLP 분석방법과 특정 제한효소 *Tsp509I* 와 *MboI*를 각각 이용하여 검출 가능한 포유류와 가금류의 종 특이적인 RFLP profile은 경제적으로 중요한 다양

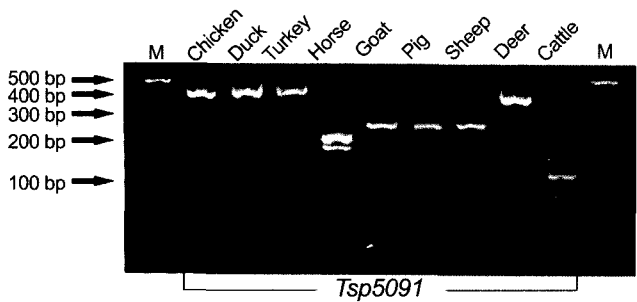


Fig. 3. RFLP profiles of PCR amplicons of 12S rRNA gene digested with *Tsp509I* enzyme in nine animals meat species. M: 100 bp DNA ladder.

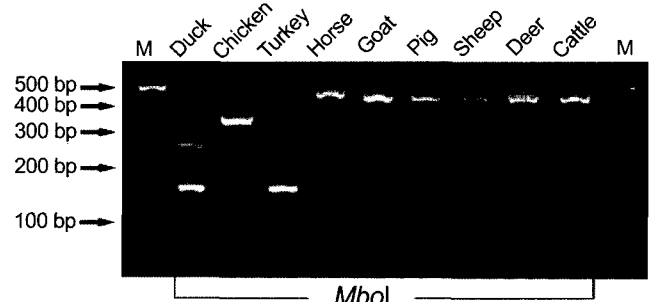


Fig. 4. RFLP profiles of PCR amplicons of 12S rRNA gene digested with *MboI* enzyme in nine animal meat species. M: 100 bp DNA ladder.

Table 1. Inferred number and size of restriction fragments following PCR-RFLP analysis of the 12S rRNA gene with two restriction enzymes (*Tsp509I* and *MboI*)

Speices	<i>Tsp509I</i> fragment size (bp)	<i>MboI</i> fragment size (bp)
Chicken	444	64, 380
Duck	439	7, 155, 277
Turkey	445	67, 161, 217
Horse	19, 45, 185, 202	451
Goat	14, 23, 40, 46, 54, 262	439
Pig	183, 256	440
Sheep	14, 24, 46, 94, 262	440
Deer	39, 54, 346	440
Cattle	14, 40, 46, 68, 114, 158	440

한 원료육 및 식육자원의 축종 및 육종 감별에 매우 유용한 DNA 분자 마커로 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

고 찰

최근 축산물 가공 산업의 발달에 따라 원료 및 구성분에 대한 소비자의 관심이 증대되고 있는 상황이며, 특히 식품의 동물성 성분표시에 대한 동일성 여부 등이 중요한 이슈가 되고 있다(Hird *et al.*, 2003). 전통적으로 각종 혼합육 및 육가공제품에 대한 동물성 성분의 육종판별 기술로서 HPLC의 고성능 액체 크로마토그래피, SDS-PAGE 및 IEF 등의 전기영동법 그리고 ELISA의 면역효소 분석법 등이 사용되어져 왔다(Knuutinen and Harjula, 1998). 그러나 이 기술들은 근육 단백질 조성 및 구조적 차이에 따른 종 특이적 단백질을 검출하는데 목적을 두고 있어, 가공처리 되지 않은 원료육에 대해서는 종 특이적 단백질을 이용하여 축종판별이 가능하지만 이종 혼합육이나 가공 육제품에 대해서는 정확한 육종판별이 어렵고 신뢰성이 현저히 저하된다. 이 같은 이유로는 단일 종의 단백질 profile은 매우 복잡한 banding pattern을 나타내어 다른 종으로부터 유래된 소량의 단백질이라도 종 특이적 단백질 band와 흔히 중첩되어 정확한 해석이 어렵고, 특히 열처리 과정에서 단백질 변성 및 수용성 단백질 profile의 파괴를 일으키기 때문이다(Hird *et al.*, 2003). 그러나 DNA는 가공이나 열처리한 육제품에서도 검출이 가능하여 단백질보다 상대적으로 안정된 분자이고 훨씬 더 많은 생물학적 유전정보를 지니고 있어 유전적 근연관계가 가까운 축종 간에도 구별이 가능하여 분자생물학적 기법을 이용한 DNA 분석은 보다 신속 정확하고 신뢰도 높은 축종판별 기술이라고 할 수 있다(Aida *et al.*, 2005).

그동안 동물종의 육종감별을 위한 분자생물학적 방법으로 DNA hybridization(Chikuni *et al.*, 1994), PCR assay(Calvo *et al.*, 2001), RAPD fingerprinting(Koh *et al.*, 1998) 및 DNA sequencing(Colombo *et al.*, 2002) 등이 여

러 연구자들에 의해 보고되었으나 이들 분석방법은 각각의 장단점을 갖고 있다고 할 수 있다. PCR-RFLP 방법은 앞서 제시한 방법들보다 재현성과 감수성이 높아 실용적인 기술로 알려져 있다(Meyer *et al.*, 1995; Partis *et al.*, 2000; Girish *et al.*, 2005). 일찍이 Chikuni 등(1994)은 *ApaI* 제한효소를 이용한 PCR-RFLP 방법으로 근연관계가 매우 높은 양과 염소 고기를 구별하였고 나아가 Chung 등(2000)은 MC1R 모색발현 유전자의 PCR-RFLP 마커를 이용하여 한우고기를 젓소 및 수입 쇠고기로부터 구별할 수 있는 쇠고기 품종식별 기법을 보고 한 바 있다.

미토콘드리아 DNA(mt DNA)는 핵 DNA에 비해 세포당 copy 수가 많고(동물 세포 당 평균 약 800-1000 미토콘드리아 존재) 염기치환율이 약 5-10배 정도 빨라 염기서열 변이성이 높고 특히, 근연관계가 매우 밀접한 종간 감별에 효과적이어서(Kocher *et al.*, 1989) 기존의 핵 DNA(nuclear DNA) 분석에 비해 보다 더 종 특이적인 특성을 지닌 유용한 분자표지라고 할 수 있다(Martin *et al.*, 2007). 각 mt DNA는 약 16,500 bp의 폐환상 이중분자구조로 12S와 16S 두 종류 rRNA와 22개 tRNA 그리고 호흡효소에 필요한 산화효소로서 cytochrome b(*Cyt b*)와 c 복합체 및 ATP 합성효소 등 13개 단백질 암호화 유전자로 구성되어져 있다(Gardner and Snustad, 1984). 그동안 미토콘드리아 DNA를 구성하는 유전자 가운데 주로 mt DNA *Cyt b* 유전자가 축종감별을 위한 종 특이적 분자표지로 널리 이용되어져 왔다(Bellagamba *et al.*, 2001; Aida *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2006). 그러나, mt DNA 12S rRNA 또는 16S rRNA 유전자를 이용한 축종판별에 관한 연구결과는 현재까지 매우 미흡한 실정이다. 최근 Girish 등(2005)이 처음으로 mt DNA 12S rRNA 유전자의 PCR-RFLP 분석으로 *AluI*, *HhaI*, *ApoI* 및 *BstI* 4종류의 제한효소를 각각 이용하여 특히 종간 근연관계가 가까운 소고기와 Buffalo 육 그리고 양고기와 산양육의 4종류 축종을 대상으로 한 육류 판별법을 보고 한 단편적인 결과만을 뿐이다. 육류 이외에 12S rRNA 유전자의 종 특이적 마커를 이용하여 Lopez-Calleja 등(2004)은 양젓으로부터 염소젓을 검출하였고, Martin 등(2007)은 배합사료 내 동물성 원료육에 대한 반추동물 종 감별을 수행하였다. 또한, Abdulmawjood와 Buelte(2001)은 12S rRNA의 PCR-RFLP분석으로 신선육, 가열육 및 통조림 달팽이 육에서 매우 밀접한 혈연관계가 있는 두 달팽이 아종(*Helix pomatia*와 *Helix luconum*)간을 분류한 바 있다.

본 연구에서는 기존에 보고된 mt DNA *Cyt b* 유전자를 이용한 축종 감별법과 더불어 보다 다양하고 새로운 축종판별법 개발로 육종감별의 정확성, 신뢰성과 실용성을 제고하기 위하여 각종 육제품의 원료육으로 가장 널리 쓰이는 포유류 6종과 가금류 3종의 육류로부터 mt DNA 12S rRNA 염기서열을 분석하였다. 그리고 이들 9종의 육종 간

염기서열 치환을 비교한 결과 수백 종류의 제한효소 가운데 *Tsp509I*은 포유류 그리고 *MboI*은 가금류에서 DNA profile이 종간 특이성과 차별성을 보여 이들 두 가지 제한효소를 각각 이용한 PCR-RFLP 기법으로 원료육에 대한 육종감별이 가능하다는 새로운 사실을 구명하였다. 특히, mt DNA 12S rRNA 유전자의 종 특이적 분자표지는 열처리 공정을 거친 혼합 가공육제품 등 다양한 육제품 원료육의 동물성분 판별에도 매우 효과적으로 사용할 수 있을 것이다.

이상의 연구결과로부터 mt DNA 12S rRNA 유전자의 축종 간 염기서열 변이를 이용하는 PCR-RFLP 분석기법은 mt DNA *Cyt b* 유전자와 함께 종 특이적 분자표지로서 식육자원 및 각종 육가공제품의 육종 및 축종감별을 위한 정확성, 민감성, 재현성 및 신뢰성 높은 판별기술로 실용화가 가능할 것으로 기대된다. 특히, mt DNA 12S rRNA 유전자의 PCR-RFLP 분자표지는 밀접한 유전적 근연관계나 혈연관계를 갖는 동물 종간 식별에 유용한 판별법으로 식육 및 육가공산업에서 다양한 원료육 및 육가공제품의 성분표시에 대한 동일성 검사 등에 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 mt DNA 12S rRNA 유전자의 PCR-RFLP 분석기법을 이용하여 다양한 식육자원 및 각종 가공 육제품의 원료육에 대한 정확하고 재현성 높은 축종 및 육종 감별기술을 개발하기 위하여 수행되었다. 국내에서 유통되고 있는 9종류 축종(소, 돼지, 양, 염소, 말, 사슴, 닭, 오리 및 칠면조)의 육류로부터 12S rRNA 유전자의 특정 염기서열을 포함하는 primer를 설계 제작하여 PCR-RFLP 분석을 실시하였다. 각 공시축의 근육조직으로부터 genomic DNA를 추출하고 PCR 증폭 반응을 수행한 후 얻어진 PCR 증폭산물(약 455 bp)을 *Tsp509I*와 *MboI* 제한효소로 각각 절단한 결과 *Tsp509I* 제한효소는 포유류 6종간에서 그리고 *MboI* 제한효소는 가금류 3종간에서 명확한 차이를 보이는 종 특이적인 PCR-RFLP profile을 검출하였다. 따라서 본 연구에서 개발한 12S rRNA 유전자의 종 특이적 DNA 분자표지는 각종 원료육 및 가공 육제품의 육종 및 축종 판별에 매우 유용한 동물 종 감별 DNA marker로 이용될 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 상지대학교 교내 연구비 지원에 의한 것임.

참고문헌

1. Abdulmawjood, A. and Buelte, M. (2001) Snail species identification by RFLP-PCR and designing of species-specific oligonucleotide primer. *J. Food Sci.* **66**, 1287-1293.
2. Aida, A. A., Che Man, Y. B., Wong, C. M. V. L., Raha, A. R., and Son, R. (2005) Analysis of raw meats and fats of pig using polymerase chain reaction for halal authentication. *Meat Sci.* **69**, 47-52.
3. Arslan, A., Irfan Ilhak, O., and Calicioglu, M. (2006) Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. *Meat Sci.* **72**, 326-330.
4. Bellagamba, F., Valfrè, F., Panseri, S., and Moretti, V. M. (2003) Polymerase chain reaction-based analysis to detect terrestrial animal protein in fish meal. *J. Food Prot.* **66**, 682-685.
5. Branicki, W., Kupiec, T., and Pawlowski, R. (2003) Validation of *cytochrome b* sequence analysis as method of species identification. *J. Forensic Sci.* **48**, 83-87.
6. Calvo, J. H., Zaragoza, P., and Osta, P. (2001) Technical note: A quick and sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment. *J. Anim. Sci.* **79**, 2108-2212.
7. Chikuni, K., Tabata, T., Kosugiyama, M., and Monna, M. (1994) Polymerase chain reaction assay for detection of sheep and goat meats. *Meat Sci.* **37**, 337-345.
8. Colombo, F., Marchisio, E., Pizzini, A., and Cantoni, C. (2002) Identification of goose species (*Anser anser*) in Italian mortara salami by DNA sequencing and a polymerase chain reaction with an original primer pair. *Meat Sci.* **61**, 291-294.
9. Chung, E. R., Kim, W. T., Kim, Y. S., and Han, S. K. (2000) Identification of Hanwoo meat using PCR-RFLP marker of MC1R gene associated with bovine coat color. *Kor. J. Anim. Sci. Technol.* **42**, 379-380.
10. Gardner, E. J. and Snustad, D. P. (1984). Principles of genetics. 7th ed. John Wiley and Sons, New York.
11. Girish P. S., Anjaneyulu A. S. R., Viswas K. N., Shivakumar M., Anand, M., Patel, M., and Sharma, B. (2005) Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Sci.* **70**, 107-112.
12. Hird, H., Goodier, R., and Hill, M. (2003) Rapid detection of chicken and turkey in heated meat products using the polymerase chain reaction followed by amplicon visualization with *visitra green*. *Meat Sci.* **65**, 1117-1123.
13. Knuutinen, J. and Harjula, P. (1998) Identification of fish species by reversed-phase high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J. Chromatogr.* **705**, 11-21.
14. Koh, M. C., Lim, C. H., Chua, S. B., Chew, S. T., and Phang, S. T. W. (1998) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of red meat animal species. *Meat Sci.* **48**, 275-285.
15. Kocher, T. D., Thomas, W. K., Mayer, A., Edwards, S. V.,

- Paabo, S., Villablanca, F. X., and Wilson, A. C. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animal: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 6196-6200.
16. Lopez-Calleja, I., Gonzalez, I., Fajardo, V., Rodriguez, M. A., Hernandez, P. E., Garcia, T., and Martin, R. (2004). Rapid detection of cows' milk in sheeps' and Goats' milk by a species-specific polymerase chain reaction technique. *J. Dairy Sci.* **87**, 2839-2845.
17. Martin, I., Garcia, T., Fajardo, V., Lopez-calleja, I., Hernandez, P. E., Gonzalez, I., and Martin, R. (2007) Species-specific PCR for the identification of ruminant species in feedstuffs. *Meat Sci.* **75**, 120-127.
18. Meyer, R., Hoefelein, C., Luethy, J., and Candrian, U. (1995) Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *J. AOAC Intl.* **78**, 1542-1551.
19. Miller, S. A., Dykes, D. D. and Polesky, H. F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids Res.* **16**, 1215.
20. Min, J. S., Min, B. R., Han, J. Y., and Lee, M. (1996) The identification of species of meat (Korean cattle, deer meat, sheep meat, and goat meat) using random amplified polymorphic DNAs. *Korean J. Anim Sci.* **38**, 231-238.
21. Partis, L., Croan, D., Guo, Z., Clark, R., Coldham, T., and Murby, J. (2000) Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Sci.* **54**, 369-376.
22. Rodriguez, M. A., Garcia, T., Gonzalez, I., Asensio, L., Mayoral, B., Lopez-Calleja, I., Hernandez, P. E., and Martin, R. (2005) TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures. *Meat Sci.* **70**, 113-120.
23. Shin., S. C., Chung, K. Y., and Chung, E. R. (2006) Identification of meat species using PCR-RFLP marker of *cytochrome b* gene. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **26**, 375-379.
24. Yu, K. and Pauls, K. P. (1992) Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucl. Acids Res.* **20**, 2602-2606.

(2007. 5. 23. 접수/2007. 6. 8. 채택)