

## MC1R gene의 PCR-RFLP를 이용한 한우 · 젃소고기 감별

서동균\*

대구광역시 보건환경연구원  
(접수 2008. 08. 20, 게재승인 2008. 09. 23.)

### Analysis of Melanocortin receptor 1 (MC1R) gene differential test for beef species between Hanwoo and Holstein using polmerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

Dong-Kyun Suh

Research Institute of Health & Environment, Daegu Metropolitan City, 706-090, Korea  
(Received August 20, 2008, accepted in revised from September 23, 2008)

#### Abstract

The objective of this study was to differentiate the beef species between Hanwoo and Holstein from a total of 1,081 beef samples using PCR-RFLP of MC1R gene. When a PCR product of 403 bp specific band amplified from bovine MC1R gene sequence was digested with restriction enzyme *MspAII*, Hanwoo type showed 2 bands, 220 bp and 183 bp size bands. Holstein type, however, showed three bands, 220 bp, 138 bp and 45 bp size band, respectively. The results of the differential test for beef species were as following; 7 samples (0.64%) were determined to Holstein type, of which 4 were submitted from administrative authorities, other 3 from self-collection planing, and none from civilian clients including school.

Key word : MC1R gene, *MspAII*, PCR-RFLP.

---

\* Corresponding author

Phone : +82-53-760-1314, Fax : +82-53-760-1302

E-mail : dksuh123@hanmail.net

## 서 론

최근 미국 산 쇠고기 수입개방 조치에 따라 국내 축산업의 건전한 발전과 쇠고기 안전성 및 소비자 보호를 위해 식육 원산지 표시제와 쇠고기 이력추적 시스템 등 법률·행정적인 다양한 조치가 이루어지고 있다<sup>1,2)</sup>. 또한 품종 감별 등 이를 뒷받침하기 위한 과학적인 감별분석법에 대한 연구가 국내외에서 꾸준히 진행되고 있는 실정이다<sup>3-5)</sup>. 소의 모색은 품종의 특징을 구성하는 주요 심사대상 형질이며 개체 및 품종을 식별하는 수단으로도 이용될 수 있는 대표적인 형질의 하나이다. 특히 포유동물의 모색에 관여하는 유전자는 70여개 이상인 것으로 알려져 있고, 소를 비롯한 많은 포유동물에서 모색발현에 관여하는 MSH receptor (Melanocyte-stimulating hormone receptor; *MC1R*) 유전자의 역할에 대해 보고되었으며, 포유동물의 모색은 두 가지 색소, 즉 phaeomelanin (red/yellow)과 eumelanin (brown/black)의 분포에 따라 결정되는데 이들의 색소 세포내 상대적 양은 2개의 진위, *Extention* (E)과 *Agouti* (A)에 의해 조절된다고 보고하였다<sup>6,7)</sup>. 이를 토대로 국내에서 Kim 등<sup>8)</sup>이 한우와 젓소의 피모 색 유전이 같은 양상에 따라 유전되는지 *MC1R* 유전자를 이용한 실험결과를 보고하였으며, 이 방법을 다수의 축산물위생 검사기관이 젓소고기의 한우고기 둔갑판매 방지를 위한 감별검사법으로 이용하고 있다. 본 조사는 우리 연구원에서 2007년부터 특별사업의 일환으로 실시한 쇠고기 유전자 감별사업 결과를 분석하여 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 공시 재료

본 조사에 사용된 검체는 2007년 1월부터 2008년 7월까지 연구원에 의뢰된 쇠고기 총 1,081점을 대상으로 하였으며 -20℃에 보관하

며 실험에 공시하였다 (Table 1). 또한 관내 도축장인 (주)신흥산업에서 검사관의 판정을 받은 한우와 홀스타인 개체로부터 근육조직을 채취하여 각각의 표준 DNA추출을 위한 재료로 사용하였다.

### Genomic DNA 추출

근육조직으로부터의 genomic DNA 추출은 *AccuPrep* DNA extraction kit (Bioneer Co, Korea)을 이용하였다. 시료 25~50 mg을 Tissue Lysis buffer와 Proteinase K로 혼합하여 Binding buffer와 반응시킨 후, Washing 단계를 거쳐 최종 200  $\mu$ l Elution buffer에 용해하여 4℃에 보관하였다.

### PCR

PCR 증폭실험은 Kim 등<sup>8)</sup>의 방법에 준하여 실시하였다. *MC1R* 유전자 증폭을 위한 forward primer는 GTG GAG AAC GTG CTG GTA GT, reverse primer는 TGA CCT TGT GGT TGT AGT AG를 Bioneer Co. (Korea)에 의뢰, 합성하여 사용하였다. PCR 반응은 reaction buffer (500mM KCl; 100mM Tris-Cl, 15mM MgCl<sub>2</sub>; 0.1% triton X-100, Takara Co, Japan) 2.5  $\mu$ l, 2.5mM dNTPs 2  $\mu$ l, template DNA 1  $\mu$ l, 각 10 pmol/ $\mu$ l primer 1  $\mu$ l와 1U Taq polymerase를 넣고 증류수로 최종 부피가 25  $\mu$ l 되게 하였다. PCR 조건은 PCR thermocycler (Biometra, T-Gradient, Germany)를 사용하여 94℃에서 5분간 pre-denaturation 시킨 후 95℃ 30초, 63℃ 30초, 72℃ 1분간 3단계로 35 cycles 수행하고, 마지막으로 72℃ 10분간 final extension 시켰다. 증폭된 산물은 1.5% agarose gel에서 전기 영동하여 UV로 증폭여부를 확인하였다.

### PCR-RFLP

Table 1. Classification of beef samples used in this study according to the client

Group	Total	No (%) of samples submitted by		
		Civilian (Individual/Group)	Administrative authorities	Self collection
Year	1,081 (100)	955 (88.3)	95 (8.8)	31 (2.9)
2008	576	516	60	.
2007	505	439	35	31

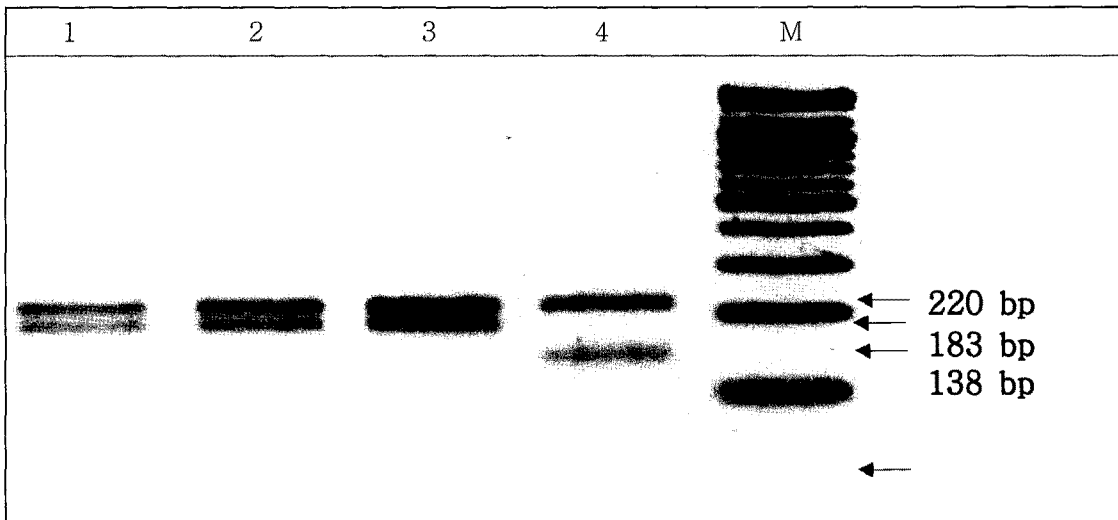


Fig 1. PCR-RFLP analysis of MC1R gene digested with *MspAII* restriction enzyme  
Lane 1~3 : Hanwoo ; lane 4 : Holstein ; lane M : 100 bp ladder marker.

제한효소 처리에 의한 DNA 절단은 PCR 증폭산물 8  $\mu$ l, 10 $\times$ reaction buffer 1.5  $\mu$ l (Promega, USA), Bovine serum albumin 0.15  $\mu$ l, 제한효소 *MspAII* (Promega Co, USA) 0.3  $\mu$ l를 혼합한 후, 최종 부피가 15  $\mu$ l가 되도록 증류수를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 2 시간 반응시켰다. 얻어진 DNA 단편은 2.5% Metaphore agarose gel (FMC Co, USA)에 전기 영동하여 RFLP 패턴을 분석하였다.

### 결 과

#### PCR 및 PCR-RFLP

MC1R 유전자의 변이를 확인하기 위한 PCR 증폭시험 결과 403 bp의 특이적인 단일 밴드를 확인하였으며, PCR 증폭산물에 대해 아미노산을 암호하는 코돈의 치환 여부를 탐색하기 위해 제한 효소 *MspAII*을 처리한 PCR-RFLP 분석 결과, 한우 표준 DNA는 220 bp와 183 bp 두 개의 단편으로, 젓소 표준 DNA는 220 bp, 138 bp 및 45 bp 세 개의 단편으로 분리되었다 (Fig 1).

Table 2. Results of beef differential test between Hanwoo and Holstein

Group	Total	No (%) of samples defined as types	
		Hanwoo	Holstein
Clients	1,081 (100)	1,074 (99.36)	7 (0.64)
Civilian (Individual/Group)	955 (100)	955 (100)	0 (0)
Administrative authorities	95 (100)	91 (95.79)	4 (4.21)
Self collection	31 (100)	28 (90.32)	3 (9.68)

### 유전자 검사

본 사업을 시작한 2007년부터 총 1,081건을 접수하였으며, 의뢰 건의 유형별로는 민원이 955건 (88.3%), 관원이 95건 (8.8%), 연구원 자체 수거가 31건 (2.9%) 순이었다 (Table 1). 의뢰 건에 대한 검사 결과는 Table 2와 같다. 총 의뢰 건수 대비 젓소형은 7건 (0.64%)으로 나타났으며, 의뢰 유형별로 민원은 955건 모두 한우형, 관원은 95건 중 4건 (4.21%), 자체 수거는 31건 중 3건 (9.68%)이었다.

### 고 찰

본 사업은 축산연구소 (현 축산과학원)에서 쇠고기 품종 감별법으로 개발하여 전국 시·도 축산물위생 검사기관에 기술교육을 실시한 후, 기관의 사정에 따라 축산물 유통질서 확립 수단으로 사용하고 있는 실정이다. 연구원은 대구 관내 쇠고기 품종 감별검사를 대부분 축산과학원이나 민간 위탁 검사기관에 의뢰해야 하는 시민의 불편을 해소하고, 젓소 고기의 한우 둔갑판매 방지 및 차단을 위한 수단으로 2007년 1월부터 특별사업으로 추진하고 있으며, 자체 검정시험 결과 PCR 및 RFLP에서 403 bp, 220 bp, 183 bp, 138 bp 및 45 bp의 특이적인 단편을 확인할 수 있었다.

2008년 7월까지 총 1,081건을 접수하였으며, 이 중 88.3%에 해당하는 955건이 민원이었다. 사업 시행 당시의 예상과는 달리 955건의 민원 중에서 축산물 가공업소 및 일반 민원은 31건 (3.2%)이었으며, 학교 급식용 쇠고기 검사 민원이 924건 (96.8%)으로 대부분을 차지하였다. 이는 학교 급식용 쇠고기는 한우고기로 납품을 하고 년 1회 이상 품종 검사를 받도록 한대구광역시 교육청의 지침과 관련이 있으며, 타 시·도 검사기관의 검사건수도 각 지자체의 여건에 따라 영향을 받을 것으로 판단된다.

2007년 7월 기준으로 관내 초등학교 205개 중 152 (74.1%), 중학교 120개 중 65 (54.2%), 고등학교 87개 중 40 (46%)곳이 2008년 7월 현재 본 연구원에 검사의뢰 하였다. 주목할 사항은 관내 유치원 수가 약 300개이나 검사의뢰 건은 고작 1개소 1건이었다는 점이다. 유치원도 많은 어린이가 다니고 또한 급식을 하는 곳이 많은 점을 감안할 때, 한우고기를 급식 시 공급하여야 하는 지침이 있다면 어린이 수 등 나름의 기준을 마련하여 검사의뢰대상에 포함이 되어야 할 것이다. 학교별 의뢰 회수는 살펴보면 총 454개 학교 중 1회 검사의뢰한 곳이 95.6%, 2회 4.2%, 3회 의뢰한 곳이 1개 학교였다. 또한 건 당 의뢰점수는 1~3점이 73.2%를 차지하였으며, 4점 이상 의뢰한 곳은 8.1%였다. 연 최소 1회 이상, 의

뢰 시, 1회 최소 3점 이상 의뢰하는 것이 검정할 수 있는 최소한의 조건이라고 판단될 때, 대부분 학교들이 현재의 검사의뢰 상황을 전반적으로 재고해야 할 것으로 사료된다. 관원은 총 95건으로 대부분 시청이나 구·군에서 관내 한우고기 취급 식당에서 수거하여 의뢰한 검체였다.

연도별로는 사업 시행 첫 해인 2007에 505건이었으나, 2008년 7월 말 현재 576건이 의뢰되어 올 연말까지 작년 대비 2배 이상의 의뢰 건수가 접수될 전망이다. 이처럼 의뢰 건이 증가되는 이유는 최근 미국산 쇠고기 수입 예상에 따라 시민들과 학부모의 쇠고기 안전성에 대한 우려가 반영된 것으로 보이며, 또한 연구원의 찾아가는 민원 서비스 활동이 큰 영향을 미친 것으로 파악된다. 본 연구원은 2005년부터 민원 의뢰 건을 전화로 접수하여 검체를 직접 수거하면서 동시에 상담도 실시하는 민원혁신처리반을 신설하여 운영하고 있다.

1,081건에 대한 검사 결과 7건 (0.64%)이 젓소형으로 나타났으며, 유형별로는 관원이 95건 중 4건 (4.21%), 자체 수거가 31건 중 3건 (9.68%)이 젓소형이었다. 학교 급식용 쇠고기가 대부분인 민원이 모두 한우형으로 나타난 것은 실제로 한우고기를 학교에 납품하는 것으로 판단되나, 시료 채취 및 의뢰과정을 점검해야 할 필요성이 있는 것으로 사료된다. 대부분의 학교에서는 학부모들이 참가한 학교 급식 위원회나 담당 영영사가 직접 시료를 채취하여 의뢰하고 있으나, 극소수 학교는 납품업체에서 바로 검사기관으로 의뢰하게 하는 것으로 파악되어 납품 시료와 검사 시료가 다를 수 있을 가능성이 있다. 상대적으로 공무원이 불시 수거한 관원이나 특히 연구원에서 소비자로서 위장하여 자체 기획 수거한 검체에서 제일 많은 젓소형으로 판정된 것이 이를 뒷받침하는 근거가 될 수 있다. 끝으로 다수의 타 시·도 축산물 위생검사 기관 및 민간 검사기관에서도 동 사업을 추진하고 있으나 이에 대한 보고가 전혀 없어 검

사결과를 비교 분석할 수 없는 실정이므로, 앞으로 전국 시·도 축산물 안전성 검사와 관련, 검사결과를 비교 및 검토할 수 있는 많은 보고가 이루어져야 한다고 사료된다.

## 결 론

2007년 1월부터 2008년 7월까지 연구원에 의뢰된 쇠고기 총 1,081검체에 대하여 실시한 쇠고기 유전자 감별사업 분석결과는 다음과 같다.

1. MC1R 유전자의 변이를 확인하기 위한 PCR 증폭시험 결과 403 bp의 특이적인 단일 밴드를 확인하였다. 또한 PCR 증폭산물에 대한 PCR-RFLP 분석 결과, 한우 표준 DNA는 220 bp와 183 bp 두 개의 단편으로, 젓소 표준 DNA는 220 bp, 138 bp 및 45 bp 세 개의 단편으로 분리되었다.

2. 총 의뢰 건수 대비 젓소형은 7건 (0.64%)으로 나타났으며 의뢰 유형별로는 민원은 95건 모두 한우형, 관원은 95건 중 4건 (4.21%), 자체 수거는 31건 중 3건 (9.68%)이었다.

3. 2007년 7월 기준으로 관내 초등학교 205개 중 152 (74.1%), 중학교 120개 중 65 (54.2%), 고등학교 87개 중 40 (46%)곳이 2008년 7월 현재 본 연구원에 검사의뢰 하였으며 학교별 의뢰 회수는 1회 검사의뢰한 곳이 95.6%, 2회 4.2%, 3회 의뢰한 곳이 1개 학교였다. 4. 건 당 의뢰점 수는 1~점이 73.2%를 차지하였으며, 4점 이상 의뢰한 곳은 8.1%였다. 연 최소 1회 이상, 의뢰 시, 1회 최소 3점 이상 의뢰하는 것이 검정할 수 있는 최소한의 조건이라고 판단될 때, 대부분 학교들이 현재의 검사의뢰 상황을 전반적으로 재고해야 할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 미국산 쇠고기 및 쇠고기 제품 수입위생조건. 농림수산물부 고시 제2008-15호. 2008.

2. 농산물품질관리법 일부 개정법률안. 법률 제9117호. 2008.
3. 이성수, 양보석, 양영훈 등. 2002. 칙소와 비경흑색 한우의 *Melanocortin Receptor 1 (MC1R)* 유전자형 분석. *동물자원지* 44(1) : 23-30.
4. 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.
5. Rana BK, Hewett-Emmett D, Jin L, et al. 1999. High polymorphism at the human Melanocortin 1 receptor locus. *Genetics* 151 : 1547-1557.
6. Jackson IJ. 1994. Molecular and developmental genetics of mouse coat color. *Annu Rev Genet* 28: 189-217.
7. Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, et al. 1993. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles results from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72 : 827-834.
8. 김태현, 윤두학, 박응우 등. 2000. 소 품종별 Melanocortin Receptor 1 (MC1R) 유전자의 유전자형 빈도에 관한 연구. *동물자원지* 42(6) : 735-744