

단일가닥구조다형성-모세관전기영동법을 이용한 한우와 수입우 쇠고기의 빠른 판별법

고혜아 · 이미지 · 이송란[†] · 김관석[†] · 강성호*

전북대학교 화학과 이화학연구소

[†]충북대학교 축산학과

(2008. 8. 20 접수)

Rapid Distinction of Hanwoo and Imported beef by Single Strand Conformation Polymorphism-Capillary Electrophoresis

Hyeah Go, Miji Lee, Songlan Li[†], Kwan-Suk Kim[†], and Seong Ho Kang*

Department of Chemistry and Research Institute of Physics and Chemistry (RINPAC), Chonbuk National University,
Jeonju 561-756, Korea

[†]Department of Animal Science, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

(Received August 20, 2008)

요 약. 단일가닥구조다형성(single strand conformation polymorphism, SSCP)에 바탕을 둔 모세관전기영동법(capillary electrophoresis, CE)을 이용하여 한우와 수입우의 빠르고 간단한 판별법을 개발하였다. 한우와 수입우의 특정한 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 표지인자를 중합효소연쇄반응을 통해 증폭하였다. 증폭된 이중나선-유전자(ds-DNA)에 대해 SSCP 방법을 통해 단일가닥-유전자(ss-DNA) 단편들로 변환시킨 뒤, 2.2%(w/v) poly(ethyleneoxide)(M_n 600 000)와 1.0%(w/v) poly(ethyleneoxide)(M_n 8 000 000)의 혼합젤을 충전시킨 용융-실리카 모세관(75 μ m 내경 \times 365 μ m 외경; 30 cm 유효길이; 50 cm 총길이)을 이용하여 분리하였다. SSCP-CE 방법에 의해 360 V/cm의 전기장에서 한우와 수입우를 단지 13분 이내에 간단히 판별할 수 있었다.

주제어: 한우, 모세관전기영동법, 중합효소연쇄반응, 단일가닥구조다형성

ABSTRACT. We developed a rapid and simple method for distinguish of Hanwoo and imported beef by capillary electrophoresis based on the single strand conformation polymorphism(SSCP-CE). PCR amplification was performed to amplify specific DNA regions spanning single nucleotide polymorphism(SNP) markers to determine between Hanwoo and imported beef. The SSCP ss-DNA fragments from the amplified PCR products were analyzed through the fused-silica capillary(75 μ m I.D. \times 365 μ m O.D.; effective length, 30 cm; total length, 50 cm) filled with the mixed polymer of 2.2%(w/v) poly(ethyleneoxide)(M_n 600 000) and 1.0%(w/v) poly(ethyleneoxide)(M_n 8 000 000) as a sieving matrix. Under the electric fields of 360 V/cm, Hanwoo and imported beef were simply distinguished within only 13 min by SSCP-CE.

Keywords: Hanwoo, Capillary Electrophoresis, PCR, Single Strand Conformation Polymorphism

서 론

최근 한국은 미국, 유럽을 포함한 다양한 국가와의 자유무역협정(free trade agreement, FTA)에 의한 쇠

고기 시장의 전면개방으로 인해 한우와 수입우의 정확하고 빠른 판별법의 개발에 많은 관심이 집중되고 있다. 다른 품종의 소를 구별하기 위해서는 개체의 특징적인 털의 색깔이나 비문 등의 외형적 특성을 보

고 육안으로 구분이 가능하다.¹ 예를 들어, 헤어포드(Hereford) 종은 이마에 흰 반점이 있으며 전체적으로 적갈색을 띄고, 한우는 황갈색을 띄며, 홀스타인(Holstein) 종은 흑백반의 털 색깔을 지닌다.² 그러나 도축한 후에 가공된 쇠고기는 육안으로 정확히 식별하기 쉽지 않다. 따라서 저가로 들여온 수입우가 한우로 둔갑하여 불법적으로 시중에 유통되는 경우로 인해 국내의 많은 축산농가가 경제적 타격을 받고 있으며 농가운영에 어려움을 호소하고 있다. 따라서 한우와 수입우의 객관적이고, 정확한 판별을 위한 과학적인 새로운 분석기술의 개발이 절실히 요구된다.

단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)은 각 개체마다 다른 다양성을 나타내게 하는 요인으로써 단일염기서열의 차이를 말한다. SNP는 인간뿐 아니라 많은 개체들의 질병을 진단하고 유전자 염기서열(DNA sequence)을 분석하는데 응용되고 있다. 또한 SNP를 바탕으로 다양한 돌연변이들의 분석이 가능한데, 이는 세포가 분열할 때 보통은 모세포와 같은 염기서열을 가진 세포를 만들어내지만 가끔씩 변이가 일어나서 다른 염기서열을 가진 돌연변이를 생성하기 때문이다. 이러한 돌연변이의 종류에는 결실, 삽입, 치환³ 그리고 염기 하나만 바뀌는 점돌연변이(point mutation) 등이 있다. 이러한 변이를 검출하기 위한 SNP 분석법에는 단일가닥구조다형성(single strand conformation polymorphism, SSCP),^{4,5} 제한효소 단편크기다형성-중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP),^{6,7} 대립유전자-특이적 중합효소연쇄반응(allele-specific polymerase chain reaction, AS-PCR),⁸ 동적 대립유전자 혼성화(dynamic allele-specific hybridization, DASH)⁹ 등이 있다. 특히 PCR-RFLP 방법은 현재까지 여러 분야에서 많이 응용되며 사용되어 온 방법이나 RFLP 유전자형을 검출하기 위해서는 특정 제한효소를 인지할 수 있는 특정한 염기서열이 존재 할 경우에만 검출이 가능하다는 단점이 있다.¹⁰ 하지만, SSCP 방법은 개체의 정보를 정확히 알지 못하는 돌연변이들이나 유전자의 다형성으로 인한 작은 유전자 단편들을 분석하는데 종종 사용되어왔던 분석기법으로¹¹ 비교적 간단한 처리 방법과 고감도의 검출이 가능한 특징이 있다.^{4,12,13}

기존의 SSCP 방법을 이용한 모세관전기영동법(CE)은 Arakawa¹⁴와 Nishimura¹⁵ 등에 의해 주로 연구되어

왔다. Arakawa의 방법은 자외선(UV) 흡광검출기를 사용해 검출감과 결과의 재현성에 문제점을 보였다.¹⁴ 이러한 단점을 보완하여 레이저-유도 형광검출기(laser-induced fluorescence detector, LIF)를 사용한 Nishimura 연구실에서는 UV 흡광검출기의 단점은 보완하였지만,¹⁵ 고가의 상용화된 CE 시스템을 사용하여 함으로써 저가의 쉽고 간단한 한우판별 분석시스템 및 분석기술 개발에 적용하기에는 어려움이 있다.

본 연구에서는 PCR을 통해 증폭된 한우와 수입우의 SNP 특징표지인자 유전자들을 SSCP에 기인한 CE 방법을 통해 빠르고 정확히 판별할 수 있는 한우와 수입우 판별 분석법을 소개한다. 기존에 사용되는 전통적인 슬랩젤 전기영동법과는 다르게 교차-결합된 폴리아크릴 아마이드 대신 선형 폴리머와¹⁶ 본 연구실에서 자체 제작한 CE-LIF 분석시스템을 사용하여, 빠르고 간단하며 정확하게 한우 특이유전자를 13분 안에 분석하여 판별할 수 있었다.

실 험

시약 및 시료

본 연구에서 사용한 한우와 수입우의 시료는 Genomic DNA Prep Kit(Solgent, Daejeon, Korea)를 이용하여 전라북도 정읍지역에서 사육되고 있는 혈통등록 한우와 국내에 수입된 호주산 및 미국산 쇠고기에서 채취한 DNA시료를 충북대학교 축산학과에서 제공받았다. 한우와 수입우의 감별하기 위한 SNP 표지인자 LM215-1, LM215-2(특허출원번호 10-2007-0077942)와 MC1R 등 세 종류 합성개시물질(primer)을 제작하였고(Table 1), 해당 SNP 존재유무를 확인하기 위해 염기서열 및 유전자형 분석을 통해서 유전자형이 확인된 DNA 시료들만 본 연구에 이용되었다. 1× TBE 완충용액(0.089 M Tris, 0.089 M borate, 0.002 M EDTA, pH 8.45)은 시판되는 TBE 분말시료(Amresco®, Solon, OH, USA)를 구입하여 제조하였다. 브롬화 에티디움(ethidium bromide, EtBr)은 Molecular Probes사(Eugene, Oregon, USA)에서 구입하여 1× TBE 완충용액으로 0.5 ppm이 되도록 제조하여 사용하였고, 핵산가수분해효소가 없는 물(nuclease free water)은 Promega사(Madison, WI, USA)에서 구입하였다. 모세관 내벽의 코팅제로 사용되는 분자량(M_n)이 1 000 000인 poly vinyl pyrrolidone

Table 1. DNA characteristics for the PCR of Hanwoo and imported beef.

SNP marker	Length(bp)	Allele	Primer sequence
LM215-1 T/T	441	T/C	F = AGTGATCAGAACACAGAGGACAGT
LM215-1 C/C			R = TCCACACAATTCTTACCTGGTGG
LM215-2 T/T	441	T/C	F = AGTGATCAGAACACAGAGGACAGT
LM215-2 C/C			R = TCCACACAATTCTTACCTGGTGG
MC1R T/T	154	T/C	F = AACCTGCACTCCCCATGTACTACT
MC1R C/C			R = ACATTGTCCAACCTGCTGCACCACGG

*T/T type is the SNP marker of Hanwoo and C/C type is the SNP marker of imported beef. F = forward primer. R = reverse primer.

(PVP)(Polyscience, Warrington, England)와 충진물질로 사용되는 분자량 600 000과 8 000,000인 PEO는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 0.5 ppm EtBr이 들어있는 1× TBE 완충용액에 넣어 제조하였다. 시료의 길이확인에 사용한 50-bp DNA ladder는 Invitrogen사(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

중합효소연쇄반응

중합효소연쇄반응에서 배양(incubation)은 94 °C에서 15분 동안 1주기로 한 뒤, 변성(denaturation)은 95 °C에서 20초, 합성개시물질 결합(annealing)은 58 °C에서 40초와 DNA 신장(extension)은 72 °C에서 50초로 41 주기로 수행하였다. 그 후에 72 °C에서 5분 동안 1주기로 수행하고 4 °C에서 보관하였다. PCR 반응혼합액 50 µL의 최종 성분조성은 10× h-Taq buffer 5.0 µL, 10 mM dNTP mix 1.0 µL, 정방향 합성개시 물질과 역방향 개시물질(10 pM/mL) 각각 2.0 µL과 h-Taq DNA Polymerase(2.5 U/mL)(Solgent사) 0.5 µL, 핵산가수분해효소가 없는 물 37.5 µL과 2.0 µL의 정제된 유전자 시료이다. 증폭된 시료의 최종 유전자의 길이는 시료 LM215-1과 LM215-2의 경우는 441-bp이고 MC1R은 154-bp이었다.

단일가닥구조다형성

200 µL 튜브에 핵산가수분해효소가 없는 물 9.0 µL를 넣고 증폭된 PCR 산물 1.0 µL를 넣은 후, 95 °C 열탕기(FINEPCR, ALB64, Korea)에서 5분 동안 가열한 뒤, 즉시 1 °C의 얼음중탕에 넣어 5분이 지난 후에 CE 분석을 하였다.

저장용기 완충액 및 충진물질 준비

1× TBE 완충용액은 TBE 분말시료 17.0 g을 3차 증류수에 녹인 후, 0.2 µm 멤브레인-필터(Whatman[®],

Maidstone, England)를 사용해 여과하고, UV-B lamp (G15T8E, 280-315 nm, Philips, Netherlands)로 하루 동안 광표백을 한 뒤에 사용하였다. 저장용기 완충액은 0.5 ppm EtBr이 포함된 1× TBE 완충용액을 사용하였다. 모세관 내벽의 코팅젤은 저장용기 완충용액에 분자량이 1 000 000인 1.0% PVP를 넣고 2분 동안 격렬하게 흔들어 준 뒤 방치하여, 약 2시간이 지난 후에 거품이 완전히 제거되면 사용하였다. PCR 산물의 분리를 위해 사용한 충진젤은 저장용기 완충용액에 분자량이 8 000 000인 1.5%(w/v) PEO를 넣어준 다음 12시간 동안 저어주면서 제조하였다. SSCP 방법을 거친 유전자 단편들을 분리하는 충진젤은 저장용기 완충용액에 분자량 600 000인 2.2%(w/v) PEO와 분자량 8 000 000인 1.0%(w/v) PEO가 혼합되어 있는 혼합젤을 사용하였다. 이때 약 2시간 동안은 혼합젤이 잘 풀릴 수 있도록 빠른 속도로 저어주고, 그 이후 기포가 생기는 것을 막기 위해 젓는 속도를 낮추어 약 12시간 이상 방치한 뒤 사용하였다.

모세관전기영동장치

SSCP 분석을 위한 CE 분석시스템은 본 연구실에서 자체 제작한 것으로 5 mW He-Ne 레이저(λ_{ex} = 543.5 nm, λ_{em} = 610 nm; Melles Griot 05-LGR-193, CA, USA)를 광원으로 사용한 레이저-유발 형광검출기가 부착되어 있다.^{8,17} 간단히 설명하면, 분리관은 75 µm 내경, 365 µm 외경, 유효길이 30 cm, 총길이 50 cm인 용융-실리카 모세관(Polymicro Technologies, AZ, USA)을 사용하였으며, 고전압 전원공급장치(Spellman[®], CZE1000R, NY, USA)을 이용하여 시료 주입과 분리기에 사용하였다. 충진젤과 코팅젤의 충진은 모세관의 한쪽 끝에서 주사기를 이용하여 각각의 젤을 유체역학적으로 주입하였다. 시료의 주입은 계면동전기적으로 60초 동안 120 V/cm의 전기장을 걸어주어 시행하였으며, 시료의 분리는 360 V/cm의 전기장에서 약

13분 동안 수행하였다. 배 실험 후 약 45°C의 미지근한 3차 증류수, 0.1 M NaOH, 상온의 3차 증류수로 각각 10분 동안 씻어준 뒤, 다시 PVP 코팅젤을 흘려주어 모세관 내벽의 전기삼투적 흐름(EOF)을 제거한 후 충전젤을 주입하여 실험을 실시하였다.

결과 및 고찰

전라북도 정유지역의 한우와 앵기스, 시멘탈종 등의 수입우 성숙소 혈액으로부터 DNA를 추출한 뒤, LM215-1, LM215-2 그리고 MC1R 각각의 SNP 표지 인자를 PCR 반응을 통해 증폭시키고 CE 분석시스템에 주입하여 증폭된 DNA의 길이를 확인하였다 (Fig. 1). LM215 PCR 증폭산물(441-bp)에는 두 개의 SNP 좌위가 5-bp 인에 위치해 있는데, 이를 각각 LM215-1와 -2로 명명하였고, 두 SNP 좌위에서 한우 집단은 TT형이 86%와 53%로 존재하나, 수입우 시료에서는 동일한 TT형이 12%와 5%의 낮은 빈도로 분포하고 있다(특허출원번호: 10-2007-0077942). MC1R

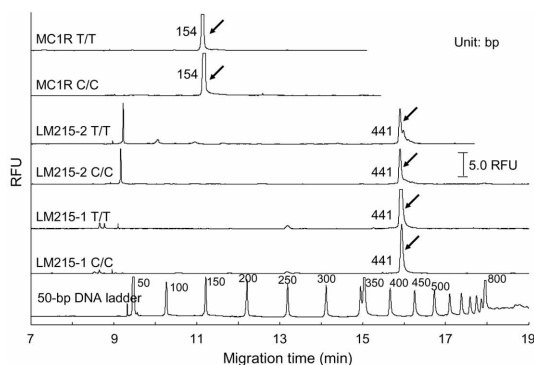


Fig. 1. Representative CE electropherograms of the PCR products of imported beef and Hanwoo with various DNA sequences of LM215-1, LM215-2 and MC1R. CE separation conditions: fused-silica capillary, 75 μ m I.D. \times 365 μ m O.D. \times 50 cm total length, effective length, 30 cm; running buffer, 1 \times TBE buffer (pH 8.45) with 0.5 ppm EtBr; coating gel matrix, 1.0% PVP (M_n 1 000 000) in 1 \times TBE running buffer; sieving matrix, 1.5% PEO (M_n 8 000 000) in 1 \times TBE running buffer; sample injection, electrokinetic injection for 20 s at 60 V/cm; applied separation electric field, 200 V/cm; temperature, 23 $^{\circ}$ C. RFU: relative fluorescence unit. *Indicates: LM215-1 C/C type = imported beef and T/T type = Hanwoo; LM215-2 C/C type = imported beef and T/T type = Hanwoo; MC1R C/C type = imported beef and T/T type = Hanwoo. Arrows indicate the PCR amplified DNA fragments.

은 154-bp인 것을 확인하였다. 이러한 두 개의 SNP 좌위는 각기 고유의 다른 염기 형태를 가진 한우와 수입우 특성상 PCR 증폭 후 단순히 유전자의 길이 차이에 기인한 이동시간에 따른 CE 분리에서는 시료의 길이 차이에 의한 한우와 수입우의 판별이 불가능한데 (Fig. 1), 이러한 문제를 해결하고, 세 개의 SNP 좌위를 효율적으로 분석하기 위해 SSCP 방법을 실험에 도입하였다.

SSCP 방법에 따라 ds-DNA에 95 $^{\circ}$ C 온도를 가하게 되면 ds-DNA가 변성되어서 ss-DNA로 변하게 되며, 이를 약 1 $^{\circ}$ C의 낮은 온도로 갑자기 떨어뜨리게 되면, 한우와 수입우에서 다른 형태의 유전자 염기서열을 가지고 있는 시점에서(예, SNP 표지인자에서 한우는 T/T 형태의 한우와 C/C 형태의 수입우) 다시 각기 초기상태의 ds-DNA로 돌아가지 못하고 ss-DNA 자체 내에서 서로 다른 특유의 유전자 입체구조를 형성하게 된다. 이러한 다양한 입체구조를 가진 유전자 조각들을 전기영동을 하게 되면 유전자 구조상의 변화로 인해 서로 다른 이동속도를 가지게 된다. 따라서 한우와 수입우가 비록 같은 길이의 ds-DNA 구조를 가졌다 할지라도 다른 하나의 유전자 염기(점돌연변이)를 가지고 있으면 SSCP 방법에 의해 새로운 입체구조를 가진 각기 다른 한우와 수입우 유전자 조각들이 고분자 혼합젤이 충전된 모세관을 통과하면서 각기 다른 이동속도를 나타내어 한우와 수입우의 판별이 가능하였다.

먼저 CE에서 SSCP에 의한 다른 유전자 조각들의 빠르고 정확한 분리를 위한 최적의 SSCP-CE 분리조건들을 조사하였다. 이때 모세관 내벽의 코팅젤로 사용한 분자량 1 000 000의 1.0% PVP는 낮은 점도를 가지는 하나의 친수성 고분자로서 젤의 제조와 모세관 내의 충전이 간단하고 용이하였다. 또한 모세관에서 한우와 수입우의 SSCP에 의해 생성된 유전자 조각들에 대해 분리 이동시간의 재현성을 유지시켜 주었다. 이는 PVP가 모세관 내벽을 코팅하면 “전기삼투적 흐름(EOF)”을 억제하여 PVP 코팅을 하지 않은 모세관에서보다 약 10배 정도의 유전자 흡착을 감소시킨다는 기존의 결과와 잘 일치하였다.¹⁸ 따라서 먼저 1.0% PVP를 사용하여 모세관 내벽을 코팅하여 EOF를 억제한 뒤에 다시 PEO 혼합 충전젤을 주입하여 한우와 수입우의 SSCP 유전자 시료를 분리하였다.

PEO 혼합젤은 유전자의 1-bp 길이차이를 분석하는 유전자 염기서열 분석기술^{19,20}에 주로 사용되어왔는데 PEO의 종류와 농도에 따라 분리도의 많은 차이를 보이고 있다.²⁰ 혼합 충전젤에서 일반적으로 길이가 작은 유전자들을 분리하기 위해서는 길이가 짧은 시슬 고분자의 농도를 증가시키고, 길이가 긴 유전자들을 분석하기 위해서는 긴 시슬 고분자의 농도를 증가시키는데, 그 이유는 짧은 시슬 고분자에 작은 공경(pore size)들이 더 많이 존재하므로 긴 시슬 고분자에 비해 더 작은 길이의 유전자들을 분리할 수 있기 때문이다.²⁰ 본 실험에서는 SSCP 방법을 통해 작은 유전자 단편들이 생성되기 때문에, 긴 시슬 고분자인 분자량이 8 000 000인 PEO를 선택하여 먼저 농도를 1.0%로 고정시키고 짧은 시슬 고분자인 분자량이 600 000인 PEO의 농도조성을 1.0~3.0% 범위에서 변화시켜 LM215-1 시료의 이동시간 및 피크의 분리도에 미치는 영향을 조사하였다. 먼저 수입우 시료는 분자량이 600 000인 PEO 1.8%와 2.0%의 농도에는 피크가 3개로 분리됨을 볼 수 있었으나, 2.2%에서 2개의 피크를 보여주었다(Fig. 2A). 또한 2.4%와 2.6%의 농도에서는 뒤쪽에 작은 단편들의 피크들이

같은 시간에 함께 나오으로써 잘 분리가 되지 않아 한우와 수입우를 구분 할 수 있는 특이피크를 찾기 어려웠다. 한우 시료는 분자량이 600 000인 PEO 1.8%, 2.0% 및 2.2%의 농도에서 모두 3개의 재현성있는 특이적인 피크를 보여주었으나, 2.4%에서는 앞쪽 2개의 피크가 분리되고 마지막 피크는 뒤쪽으로 끌려서 다른 단편들과 분리되지 않았으며 2.6% 농도에서는 모든 피크가 하나의 큰 피크로 집속되어 구분이 어려웠다(Fig. 2B). 분리도(R_s)를 비교하면, 수입우는 1.8%, 한우는 2.0%에서 가장 좋은 분리도(예, 수입우 R_s 1.252, 한우 R_s = 1.11 및 1.75값)를 가졌지만 각각의 농도에서는 한우와 수입우를 구별하기 어려운 피크의 형태를 보여 주었다(Fig. 2과 Table 2). 그에 반해 2.2%의 농도에서는 수입우는 2개의 피크와 한우는 3개의 피크로 쉽고 확연히 한우와 수입우를 판별할 수 있는 피크들을 보이며 R_s 또한 수입우는 1.05, 한우는 0.94 및 1.05으로 두번째로 좋은 R_s 값을 가져서 한우와 수입우의 판별의 최적 충전젤 농도는 2.2% PEO(M , 600 000)와 1.0% PEO(M , 8 000 000)의 혼합젤로 선택하였다. 최적의 혼합 충전젤 조건에서 R_s 값에 미치는 전기장의 영향을 200~500 V/cm의 영역에서 조사하였다.

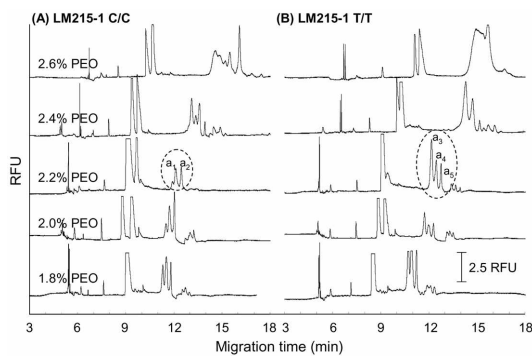


Fig. 2. SSCP-CE electropherograms describe the effect of PEO(M , 600 000) at 1.0% PEO(M , 8 000 000) on the resolution(R_s) for the separation of SSCP DNA fragments of (A) LM215-1 C/C(imported beef) and (B) LM215-1 T/T(Hanwoo). CE separation conditions: fused-silica capillary, 75 μ m I.D. \times 365 μ m O.D. \times 50 cm total length, effective length, 30 cm; running buffer, 1 \times TBE buffer(pH 8.45) with 0.5 ppm EtBr; coating gel matrix, 1.0% PVP(M , 1 000 000) in 1 \times TBE; running buffer: various sieving gel matrix, 1.8%, 2.0%, 2.2%, 2.4%, 2.6% PEO(M , 600 000) - 1.0% PEO(M , 8 000 000) in 1 \times TBE running buffer; sample injection, electrokinetic injection for 60 s at 120 V/cm; applied separation electric field, 360 V/cm at 23 $^{\circ}$ C. RFU: relative fluorescence unit.

Table 2. Effects of PEO(M , 600 000) concentration(w/v%) at 1.0% PEO(M , 8 000 000) on the resolution(R_s) for the separation of SSCP DNA fragments.

PEO Conc.(%)	Imported beef			Hanwoo		
	Peaks	MT(min) ^a	R_s ^b	Peaks	MT(min) ^a	R_s ^b
1.8	a ₁	11.53	1.252	a ₃	10.72	0.71
	a ₂	11.82		a ₂	10.92	
2.0	a ₁	12.13	1.057	a ₃	12.13	1.11
	a ₂	12.44		a ₂	12.38	
	a ₃	12.69		a ₃	12.69	
2.2	a ₁	12.12	1.046	a ₃	12.16	0.94
	a ₂	12.46		a ₂	12.47	
	a ₃	12.76		a ₃	12.76	
2.4	a ₁	13.38	0.952	a ₃	14.29	0.88
	a ₂	13.61		a ₂	14.80	
	a ₃	15.48		a ₃	14.95	
2.6	a ₁	-	-	a ₂	-	-
	a ₂	-		a ₃	-	

^aMT = migration time (min). ^b $R_s = 2(t_2 - t_1)/(w_1 + w_2)$, where t_1 , t_2 , w_1 and w_2 are migration time and peak width of adjacent DNA peaks.

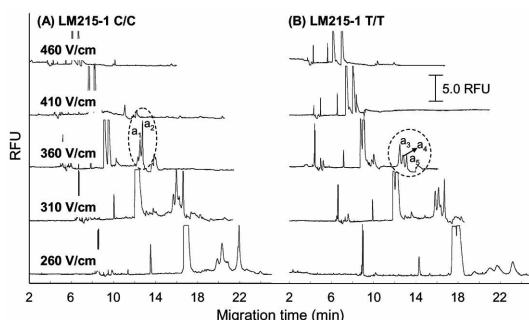


Fig. 3. SSCP-CE electropherograms describe the effect of electric field as (A) LM215-1 C/C(imported beef) and (B) LM215-1 T/T(Hanwoo). CE separation conditions: various applied separation electric field, 260, 310, 360, 410, 460 V/cm; sieving gel matrix, 2.2% PEO(M_r 600 000)–1.0% PEO(M_r 8 000 000) in $1 \times$ TBE running buffer. Other CE conditions are the same shown in Fig. 2.

한우와 수입우 시료 모두 260 V/cm 이하의 전기장에서는 피크의 폭이 넓어져서 특이피크들을 구분하기가 어려웠고 모든 특이피크가 22분 이상의 긴 이동시간을 보이며 빠른 판별을 하기에는 적합하지 않은 조건이었다. 400 V/cm 이상의 전기장에서는 한우와 수입우에서 고유한 특이피크들이 검출되지 않았으며, 310 V/cm와 360 V/cm의 전기장에서 한우 시료는 3

Table 3. Effects of electric field strength on the resolution(R_s) for the separation of SSCP DNA fragments.

Electric field (V/cm)	Imported beef			Hanwoo		
	Peaks	MT(min) ^a	R_s^b	Peaks	MT(min) ^a	R_s^b
260	a ₁ a ₂	-	-	a ₃ a ₄ a ₅	- - -	- - -
310	a ₁ a ₂	15.69 15.98	0.925	a ₃ a ₄ a ₅	15.84 16.15 16.70	0.93 1.62
360	a ₁ a ₂	12.53 12.76	0.979	a ₃ a ₄ a ₅	12.50 12.84 13.14	1.20 1.31
410	a ₁ a ₂	11.09 -	-	a ₃ a ₄ a ₅	- - -	- - -
460	a ₁ a ₂	10.17 -	-	a ₃ a ₄ a ₅	10.14 - -	- - -

^aMT: migration time (min). ^b $R_s = 2(t_2 - t_1)/(w_1 + w_2)$, where t_1 , t_2 , w_1 and w_2 are migration time and peak width of adjacent DNA peaks.

개의 피크가 수입우 시료에서는 2개의 특이피크들이 분리되고 검출되었다(Fig. 3). 하지만 360 V/cm 전기장에서 한우와 수입우의 특이피크들을 모두 13분 내의 가장 빠른 분리시간 안에 수입우는 0.979, 한우는 1.20 및 1.31의 가장 좋은 R_s 값을 보이며 간단히 판별할 수 있었다(Fig. 3 과 Table 3).

따라서, 한우와 수입우의 PCR 시료에 대해 SSCP 방법을 거쳐 생성된 유전자 단편들을 SSCP-CE의 최적 분리조건인 2.2% PEO(M_r 600 000)와 1.0% PEO(M_r 8 000 000) 혼합 충전젤과 360 V/cm의 전기장에서 LM215-1, LM215-2 및 MC1R 시료에 대해 적용하였다(Fig. 4). LM215-1, -2 시료는 수입우에서 a₁, a₂ 2개의 특이피크들이 검출되고, 한우에서는 a₃, a₄ 및 a₅ 3개의 재현성있는 특이피크들이 검출되었다(Fig. 4A). 또한, 각각의 피크의 R_s 와 이동시간의 재현성을 알아보기 위해 평균 \pm 표준편차($n=3$)를 알아보았다. 피크의 이동시간은 수입우의 경우, 피크 a₁, a₂ 각각 12.14 ± 0.04 분과 12.45 ± 0.01 분의 값을 가졌고, R_s 값은 1.00 ± 0.19 을 기록했다. 또한 한우의 경우, 이동시간은 피크 a₃, a₄ 및 a₅ 각각 12.12 ± 0.03 분, 12.46 ± 0.02 분 및 12.78 ± 0.03 분의 값을 보였으며, R_s 는 0.92 ± 0.08 와 0.963 ± 0.12 을 가졌다. 이는 SSCP-CE 시스템을 이용한 한우와 수입우의 판별에 있어서 재현성 있는 데이터를 얻을 수 있음을 보여주는 결과이다. 뿐만 아니라, 같은 조건에서 MC1R 시료의 수입우에서 b₁, b₂, b₃ 및 b₄ 4개의 특이피크들이 검출되었고 한우에서는 b₅, b₆ 2개

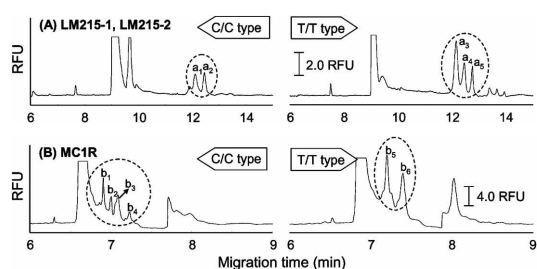


Fig. 4. Representative electropherograms of the Hanwoo and Imported beef DNA of (A) LM215-1, LM215-2 and (B) MC1R in the optimum SSCP-CE separation conditions. SSCP conditions: mixture of nuclease free water 9.0 μ L and PCR product 1.0 μ L, heat at 95 $^{\circ}$ C for 5 min and cool at ice bath at 1 $^{\circ}$ C for 5 min. CE separation conditions: sample injection, electrokinetic injection for 60 s at 120 V/cm; applied separation electric field, 360 V/cm. Other CE conditions are the same shown in Fig. 3.

의 특이피크들이 검출되었다. 또한 각각 3개의 시료 중에서 검출시간을 비교했을 때, MC1R 시료는 다른 두 개의 시료에 비해 약 4분 정도 빠르게 특이피크들이 검출되었다(Fig. 4B). 따라서 각각의 시료에서 특이적으로 검출되는 이러한 재현성 있는 피크들은 한우와 수입우의 빠른 판별과 분석을 가능하게 하였다. 즉, 각각의 시료에서 검출되는 특이피크의 수와 이동시간이 서로 다름에 근거하여 한우와 수입우를 빠르고 간단히 분석하고 판별해 낼 수 있었다.

결 론

PCR을 통해 증폭된 한우와 수입우의 특정 SNP 지표인자인 LM215-1, LM215-2 및 MC1R을 SSCP-CE 방법의 최적 조건인 2.2% PEO(600 000)와 1.0% PEO(8 000 000)로 혼합 충전젤과 360 V/cm의 분리 전기장에서 약 13분 이내에 한우와 수입우를 쉽고 간단히 분석하고 판별할 수 있었다. SSCP 방법은 간단히 시료들에 대한 고유의 유전자 조각들의 생성함을 물론, 시료 준비에 필요한 시간의 단축, 분석경비의 절감과 시료 준비작업의 간소화에 의한 시료의 오염을 최소화할 수 있는 장점을 보였다. 본 연구결과는 최근 FTA에 기인한 쇠고기 시장의 전면개방으로 인해 수입우가 한우로 둔갑하여 야기되는 국내시장의 혼란과 축산업 종사자의 경제적 손실을 최소화 할 수 있는, 하나의 빠르고 간단한 한우와 수입우의 판별 방법을 제시한 것이라 할 수 있다. 아울러 그 밖에 다양한 유전자 돌연변이들의 빠른 분석에 본 기술이 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(2007050-1344006)의 지원에 의해 이루어진 것임.

인용문헌

1. Chung, E. R.; Chung, K. Y. *Korean J. Food Sci.* **2004**, *24*, 355.

2. Koh, B. R. D. *Korean J. Vet. Res.* **2005**, *45*, 351.
 3. Loeb, L. A.; Christians, F. C. *Mutat. Res.* **1996**, *350*, 279.
 4. Kang, S. H.; Jang, S.; Yi, H. K. *J. Korean Chem. Soc.* **2005**, *49*, 537.
 5. Endo, Y.; Zhang, L.; Katashima, R.; Itakura, M.; Doherty, E. A.; Barron, A. E.; Baba, Y. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 3380.
 6. Pourzand, C.; Cerutti, P. *Muta. Res.* **1993**, *288*, 113.
 7. Al Dahouk, S.; Tomaso, H.; Prenger-Berninghoff, E.; Splettstoesser, W. D.; Scholz, H. C.; Neubauer, H. *Crit. Rev. Microbiol.* **2005**, *31*, 191.
 8. Jeon, S.; Eo, S. K.; Kim, Y.; Yoo, D. J.; Kang, S. H. *Talanta* **2007**, *73*, 415.
 9. Prince, J. A.; Feuk, L.; Howell, W. M.; Jobs, M.; Emahazion T.; Blennow, K.; Brookes, A. *J. Genome Res.* **2001**, *11*, 152.
 10. Chung, E. R.; Kim, W. T.; Kim, Y. S.; Han, S. K. *J. Anim. Sci. & Technol.* **2001**, *43*, 45.
 11. Klepárník, K.; Grochová D.; Škopková, Z.; Adam T. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 57.
 12. Nataraj, A. J.; Olivos-Glander, I.; Kusukawa, N.; Highsmith, W. E. Jr. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 1177.
 13. Kang, S. H.; Jang, S.; Park, S. K. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2006**, *27*, 1346.
 14. Arakawa, H.; Nakashiro, S.; Meada, M.; Tsuji, A. *J. Chromatogr. A* **1996**, *722*, 359.
 15. Nishimura, A.; Tshako, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*, 774.
 16. Gao, Q.; Yeung E. S. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 1382.
 17. Jeon, S.; Lee, M. J.; Park, J.; Kang, S. H. *J. Chromatogr. B* **2007**, *854*, 268.
 18. Kaneta, T.; Ueda, T.; Hata, K.; Imasaka, T. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1106*, 52.
 19. Fung, E. N.; Yeung, E. S. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1913.
 20. Kim, Y.; Yeung, E. S. *J. Chromatogr. A* **1997**, *781*, 315.