

변성 고성능 액체 크로마토그래피를 이용한 한우, 젃소 그리고 혼입육의 구분

안영창 · 조민호 · 서재원 · 윤일규 · 정덕현 · 이은영 · 남운형 · 박수민 · 장원철*
단국대학교 첨단과학대학 화학과 및 기초과학연구소/조직재생연구소
(접수 2009. 9. 3; 수정 2009. 10. 16; 게재확정 2009. 10. 20)

Discrimination of Hanwoo from Holstein and Mixed Beef by DHPLC

Young-Chang Ahn, Min-Ho Cho, Jae-Won Seo, Il-Kyu Yoon, Duck-Hyun Jung, Eun-Young Lee,
Youn-Hyoung Nam, Su-Min Park, and Won-Cheoul Jang*

Department of Chemistry, School of Advanced Science and Basic Science Research Institute, Institute of
Tissue and Regeneration Engineering, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

(Received September 3, 2009; Revised October 16, 2009; Accepted October 20, 2009)

요약. 정육 사업에서 고기의 원산지과 종을 표기 하는 것은 육질의 판단에 영향을 미친다. 유전자 마커는 종을 판별하기 위한 증거로 사용되므로, 우리는 한우와 젃소 그리고 혼입육을 판단 할 수 있는 유전자 마커의 개발 계획을 수립하였다. 소의 모든 종은 모색 유전자에 의하여 그 종이 결정되며 모색 유전자의 조절에 의하여 유멜라닌 또는 페오멜라닌이 합성되고, 이로 인하여 모색에 차이가 생기는 점을 이용하여, 종을 판별하는 유전자 마커로 사용된다. 암소와 수소를 판별하기 위하여 Y 염색체 상에 존재하는 성 결정 부위 유전자에 대응하는 프라이머를 제작하였다. 본 연구에서는 모색 유전자와 성 결정 유전자를 다중 증합효소연쇄반응(multiplex-PCR)을 이용하여 증폭하였고, 증폭 산물을 제한 효소 *MspAII*로 소화 시켰다. 이 반응물을 변성 고성능 액체 크로마토그래피(denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)를 이용하여 분석하였다. 분석 결과 6가지의 크로마토그램을 확인 할 수 있었고, DHPLC 분석 방법은 한우, 젃소 그리고 혼입육을 쉽게 구별해 낼 수 있었다.

주제어: 다중 증합효소연쇄반응, 변성 고성능 액체 크로마토그래피, 한우, 모색 유전자

ABSTRACT. In the meat industry, correct breed information in food labeling is required to assure meat quality. Genetic markers provide corroborating evidence to identify breed. We described the development of DNA markers to discriminate between Korean beef cattle (Hanwoo), Holstein, and mixed cow beefs. As most breeds are standardized for coat colour, the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene, involved in the regulation of eu/pheomelanins synthesis, has been suggested as marker for breed traceability of products of animal origin. We also designed sex-determining region Y (SRY) gene specific primers for Y chromosome detection. In this study, fragments of MC1R gene and SRY gene were amplified by multiplex-PCR and subjected to digestion by *MspAII* restriction endonuclease. Reaction products were analysed by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC). As a result, we identified 6 DHPLC peak types from MC1R gene and SRY gene analysis. DHPLC method showed more sensitive than RFLP method for DNA fragments analysis. Therefore, DHPLC method can apply to identify for Hanwoo, Holstein and mixed beef.

Keywords: Multiplex-PCR, DHPLC, Korea beef cattle, MC1R

서론

쇠고기의 가격은 생산지와 종에 의하여 결정되기 때문에 쇠고기의 종을 판별은 매우 중요하며, 정확하고 신속하게 쇠고기의 종을 판별해 낼 수 있는 방법을 필요로 하고 있다.¹ 국내 시장에는 한우, 젖소, 혼입육을 비롯한 호주, 뉴질랜드산 쇠고기 등 수입육이 유통되고 있다. 또한, 한·미 FTA 타결 이후에 미국산 쇠고기의 유통량도 증가하고 있으며, '한우'로 명칭되는 쇠고기의 가격은 다른 종의 고기보다 비싼 가격으로 유통되고 있다. 그러나, 소비자들은 광우병 등의 이유로 인하여 수입육에 대한 걱정, 상품 가격에 대한 정당성 등의 이유로 상품의 정확한 생산지와 종 표시를 원하고 있다.

소의 종은 모색에 의해 판단되는데, 모색 유전자의 중간 차이로 인하여 유델라닌 또는 페오델라닌이 생합성되고, 이로 인하여 모색에 차이가 생긴다.²⁻⁴ 기존 한우와 젖소 및 수입육의 판별에 사용하고 있는 유전자 마커의 경우에 모색유전자 103 ~ 104번 코돈에 위치한 시토신(C)의 결실 유무로 판단하였다. 그러나 한우 경우에도 17% 정도의 유전형의 다형성으로 인하여 103 ~ 104번 코돈에 위치한 시토신(C)이 결실되지 않은 형태도 존재하는 것으로 보고 되었다.⁵

기존 모색 유전자의 유전자형을 검사하는 경우 증합효소연쇄반응 후 제한효소를 이용한 제한절편 길이 다형성(PCR-RFLP)을 agarose gel 전기영동을 사용하여 판단하는 경우가 다수이다.^{6,7} 기존 판별법의 경우 검사자의 육안 판별에 의하여 판독됨으로 인하여 오류와 재현성의 차이가 존재한다. 이 문제점을 극복하기 위하여 본 연구에서는 DHPLC를 이용하여 UV 검출기를 통한 기기적

으로 측정 할 수 있는 방법을 제시하고자 한다.^{8,9}

본 연구에서 한우는 모두 특이적으로 모색유전자의 100번 코돈 부위의 두 번째 염기가 시토신(C)에서 티민(T)으로 치환된 형태를 갖는 점을 이용하여 한우, 젖소 그리고 혼입육을 구별하였다 (Table 1).¹⁰ 성별은 Y 염색체 상에 존재하는 Y 성 결정 유전자를 조사함으로써 구별해 낼 수 있다.¹¹⁻¹⁴ 또한 기존 증합효소연쇄반응 후 전기영동 판독법과 DHPLC의 민감도를 확인하기 위하여 10 ng/μL 농도의 제놈 DNA를 10배씩 희석하여 증합효소연쇄반응 후 agarose gel 전기영동법과 DHPLC의 민감도를 비교 하였다.^{15,17}

소의 모색 유전자와 Y 성 결정 유전자를 multiplex-PCR을 이용하여 증폭한 산물을 제한효소 *MspAII*로 소화시킨 후에 DHPLC를 이용하여 분석하고, 한우, 젖소 그리고 혼입육의 판별에 DHPLC를 이용할 수 있는 방법을 제시하고자 한다.^{18,19}

실험 및 방법

시료

본 실험에서는 한국 축산과학원에서 확인된 한우 암, 수 각 1점의 쇠고기 그리고 젖소 암, 수 각 1점의 쇠고기를 표준 샘플로 사용 하였으며, 충청남도 천안시에 있는 중, 고교를 대상으로 무작위로 100 점의 시료를 수집하여 본 실험에 사용하였다. 추가적으로 수입 쇠고기 샘플로 호주산 10 점, 뉴질랜드산 10 점을 한우 표준 샘플과 비교하였다.

시약 및 기기

시약

조직에서 DNA 추출에는 PrimePrep™ Genomic DNA Isolation Kit from Tissue (GeNet Bio, Korea)를

Table 1. The different of MC1R gene sequence between Hanwoo and Holstein

Breed	MC1R gene sequence
Hanwoo	Caagaaccgcaactgcactcccccattgactactttatctgctgctgctgctgctgacttctggtgagcgtcagcaacgtgctggaacggcagtcattgcccctgctggaggccgtgctctgcccaccaggcggccgtggtgagcagctggacaatgctatcgacgtgctctctgcccattgctggtgctccagccctgctctctctggtgccatt
Holstein	Caagaaccgcaactgcactcccccattgactactttatctgctgctgctgctgctgacttctggtgagcgtcagcaacgtgctggaacggcagtcattgcccctgctggaggccgtgctctgcccaccaggcggccgtggtgagcagctggacaatgctatcgacgtgctctctgcccattgctccagccctgctctctggtgccatt

*Under bar means restriction site of *MspAII*.

사용하였고, 전기영동의 agarose는 QA-Agarose™ (Q-bio gene, USA)을 이용하였다. 변성 고성능 액체 크로마토그래피의 이동상으로 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA), pH 7 (완충용액 A, Transgenomic®, USA)과 0.1 M TEAA, 25% acetonitrile (완충용액 B, Transgenomic®, USA)을 사용하였다.

기기

DNA의 증폭은 GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, USA)를 사용하였고, 다중 중합효소 연쇄반응 산물 확인은 Mupid- α (Advance, Japan)을 사용하였으며, 제한효소 처리 산물의 확인은 WAVE™ 2100 System (Transgenomic, USA)을 사용하였다.

실험 방법

쇠고기에서 genomic DNA 추출

20 mg의 쇠고기를 1.5 mL 원심분리 튜브(tube)에 넣고 200 μ L의 조직분해 완충용액(lysis buffer), Proteinase K (20 mg/mL) 10 μ L를 넣고 섞은 후 항온 수조에서 60 °C로 1 시간 동안 반응시켰다. 반응물을 12,000 rpm에서 2 분간 원심 분리 후에 상층액을 새로운 1.5 mL 튜브에 옮기고, 같은 양의 결합 완충용액(binding buffer)을 첨가하고 섞어주었다.

수집 컬럼(collection column)과 결합 컬럼(binding column)을 결합시키고, 반응물을 결합 컬럼으로 옮긴 후에 12,000 rpm에서 5 분간 원심 분리하였다. 수집 컬럼에 모아진 여과물을 모두 버린 뒤 500 μ L의 세척 완충용액 1(Washing buffer 1)으로 세척하고, 12,000 rpm에서 1 분간 원심 분리하였다. 수집 컬럼에 모아진 여과물을 모두 버린 뒤 500 μ L의 세척 완충용액 2(Washing buffer 2)로 반복 하였다. 수집 컬럼에 모아진 여과물을 모두 버린 뒤 12,000 rpm에서 5 분간 원심 분리하여 결합 컬럼을 건조 시킨 후 결합 컬럼을 새 1.5 mL 튜브에 옮겼다. 100 μ L의 용리완충용액(elution buffer)를 넣고 실온에서 5 분간 반응 시킨 후 12,000 rpm에서 1 분간 원심 분리하고 모아진 용액은 -20 °C에서 보관하였다.

다중 중합효소연쇄반응(multiplex-PCR)

Table 2의 PCR primer set를 이용하여 각 시료의 증폭 산물을 얻었다. 각각 25 μ L의 반응 용액(Table 3)을 0.2 mL 반응 튜브에 넣은 후, GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystem, USA)를 이용해 DNA를 증폭(Table 4)하였다.

Agarose gel 전기영동에 의한 증폭산물의 확인

2%(w/v) agarose gel을 이용하여 Mupid- α (Advan-

Table 2. Primer sequence sets used to amplify MC1R and SRY gene for multiplex-PCR

Primer name	Sequence of primers (5' → 3')	Size of fragment (bp)
MC1R Forward	CAA GAA CCG CAA CCT G	223
MC1R Reverse	AAT GGC ACC CAG GAA GCA GAG	
SRY Forward	AAT TGT TCC AGA GAT TGG TCA	352
SRY Reverse	GCA AAT GGC AGC TAA ACT GG	

Table 3. Condition of working solution for multiplex-PCR

Components of multiplex-PCR	Volume
10X reaction buffer (Tris-HCl; pH 9.0, (NH ₄) ₂ SO ₄ , 20 mM MgCl ₂)	2.5 μ L
10 mM dNTP mix (2.5 mM each.)	2 μ L
MC1R Forward primer (10 pmole/ μ L)	1 μ L
MC1R Reverse primer (10 pmole/ μ L)	1 μ L
SRY Forward primer (10 pmole/ μ L)	1 μ L
SRY Reverse primer (10 pmole/ μ L)	1 μ L
Taq. Polymerase (5 U/ μ L)	0.1 μ L
Template DNA (10 ng/ μ L)	1 μ L
Deionized water	15.4 μ L
Total	25 μ L

Table 4. Condition of multiplex-PCR and PCR cycle

Step	Temp (°C)	Time (sec)	Cycle
Initial denature	94	300	1
Denature	94	30	
Annealing	58	30	35
Extension	72	45	
Last extension	72	210	1

ce, Japan) 전기 영동장치로 multiplex-PCR 산물을 분석하였다. Agarose 2 g을 삼각플라스크(250 mL)에 넣고, 5 X TBE (tris boric acid EDTA) 완충용액 100 mL을 채운 후에 전자레인지에서 3 분 동안 녹인 후 용액을 gel 용기에 부어서 30 분 동안 굳혔다. Gel이 완전히 굳은 후에 comb을 빼고 gel을 수거하였다. Gel을 전기 영동장치에 넣고 0.5 X TBE 완충용액으로 채운 뒤 증폭산물 4 μ L과 6 X BPB (bromo phenol blue) dye 0.8 μ L을 섞어서 4 μ L씩 loading하고 100 V에서 30 분 동안 전기영동 하였다. 그 후에 gel을 전기영동장치에서 꺼낸 뒤 EtBr (ethidium bromide)로 15 분간 염색하고 다시 15 분간 증류수로 DNA 결합하지 못한 EtBr을 씻어냈다. 마지막으로 UV transilluminator 위에 gel을 올려놓고 DNA의 증폭여부를 확인하였다.

제한효소(MspAII)에 의한 증폭산물의 소화

20 μ L의 다중 중합효소연쇄반응산물에 1 μ L의 제한효소(MspAII, Enzymomics, Korea)를 넣은 후에 항온 수조에서 37 °C로 1 시간 동안 반응시켰다.

Agarose gel 전기영동법과 DHPLC 분석법의 민감도 비교

소 제놈 DNA 10 ng/ μ L을 10 배위 단위로 희석하여 Table 2의 SRY primer set를 이용하여 각 시료의 증폭 산물을 얻었다. 각각 25 μ L의 반응 용액 (Table 5)을 0.2 mL 반응 튜브에 넣은 후, GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystem, USA)를 이용해 DNA를 증폭 (Table 4)하였다. 증폭산물을 각각 2% agarose gel 전기영동과 변성 고성능 액체 크로마토그래피를 사용하여 민감도를 비교하였다.²⁰

DHPLC 분석

10 μ L의 시료를 변성 고성능 액체 크로마토그

Table 5. Gradient condition of DHPLC analysis

Step	Time (min)	A buffer (%)	B buffer (%)
Loading	0	65	35
Step 1	1	55	45
Step 2	3.5	45	55
Step 3	6.8	38	42
Step 4	10	35	65
Step 5	13.5	35	65
Start clean	15	0	100
Stop clean	16.5	0	100
Start equilibrate	17.5	65	35
Stop equilibrate	19.5	65	35

래피를 사용하여 Table 5의 조건에서 0.75 mL/min의 유속으로 20 분 동안 분석하였다.^{21,22}

혼입육의 정량 분석

한우와 젖소의 혼합 비율에 따른 정량 검출을 위하여, 한우와 젖소의 제놈 DNA (10 ng/ μ L)를 1:9, 2:8, 3:7 ~ 9:1의 비율로 혼합하여 multiplex-PCR 증폭산물의 제한효소 처리 후 DHPLC로 분석 하였다.

DNA 염기서열분석법에 의한 유전자 판별

MC IR primer set만을 이용해 얻은 DNA 증폭산물을 염기서열분석법 (ABI 3730XL DNA analyzer, Applied Biosystem, USA)으로 분석하여 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에서 비교 후 한우와 젖소의 종임을 확인하였다.

결과 및 고찰

Multiplex-PCR 결과

MC IR primer set와 SRY primer set를 이용하여 증폭한, multiplex-PCR 산물을 2% agarose gel 전기영동법으로 확인 하였다.

민감도 비교

제놈 DNA 10 ng/ μ L을 10 배씩 희석하여 SRY primer set를 이용하여 증폭한 각 시료의 증폭 산물을 agarose gel 전기영동과 DHPLC의 검출 민감도를 비교 하였을 때, DHPLC에서 0.01 ng까지 검출 가능한 것을 확인 하였다.

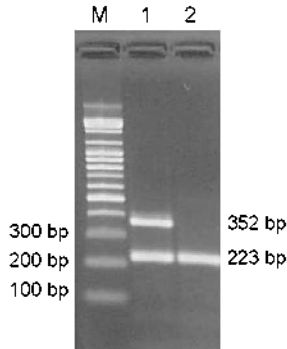


Fig. 1. Multiplex-PCR products were identified by 2% agarose gel electrophoresis. Lane M: DNA size marker, Lane 1: Hanwoo male control sample DNA, Lane 2: Holstein female control sample DNA.

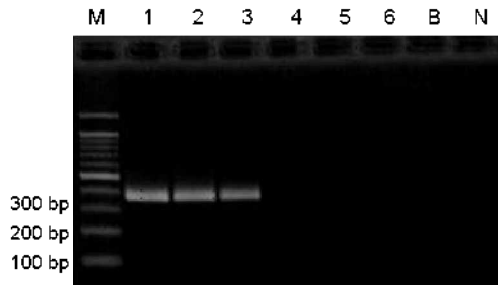


Fig. 2. Detection limit of SRY gene using PCR - agarose gel assay varying dilutions of the SRY gene genomic DNA ranging undiluted DNA to 10^0 were used for the reactions. Lane M: DNA size Marker, Lane 1~6: 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 ng/uL of DNA, Lane B: Blank, Lane N: Negative.

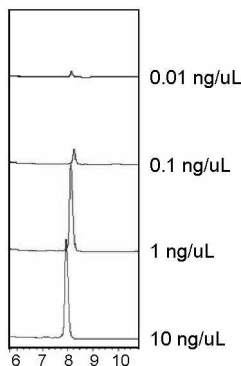


Fig. 3. Detection limit of SRY gene using DHPLC assay varying dilutions of the SRY gene genomic DNA ranging undiluted DNA to 10^0 were used for the reactions.

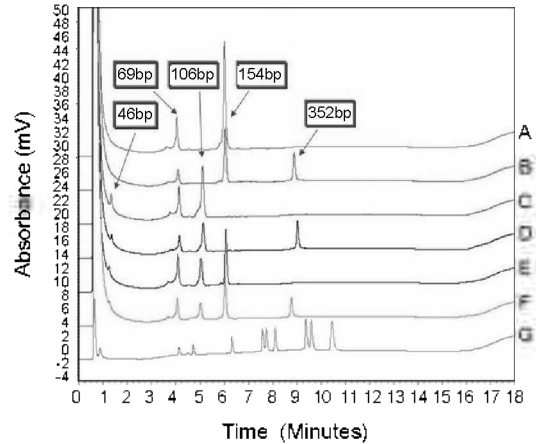


Fig. 4. DHPLC analysis of Hanwoo, Holstein and mixed beef DNA samples. A) Hanwoo female, B) Hanwoo male, C) Holstein female, D) Holstein male, E) Mixed beef (Y chromosome positive), F) Mixed beef (Y chromosome negative). Hanwoo samples had 69 bp and 154 bp peaks. B) Holstein samples had 46 bp, 69 bp and 106 bp peaks. Mixed beef samples had 46 bp, 69 bp, 106 bp, 154 bp peaks. Female or male samples were identified by 352 bp peak. DNA size control: 80 bp, 102 bp, 174 bp, 257 bp, 267 bp, 298 bp, 434 bp, 458 bp, 458 bp (WAVE[®] DNA Sizing Standard, Transgenomic[®], USA)

DHPLC 결과

Multiplex-PCR 증폭산물의 제한효소 처리 후 DHPLC로 분석한 결과, 총 6가지 형태의 크로마토그램(Fig. 4)을 확인 할 수 있었다. DHPLC를 사용하여 한우, 젖소 그리고 혼입육을 선별할 수 있었으며, 동시에 암소와 수소의 판별도 동시에 가능하였다.

혼입육의 정량 분석 DHPLC 결과

한우와 젖소의 제놈 DNA (10 ng/uL)를 1:9, 2:8, 3:7 ~ 9:1의 비율로 혼합하여 multiplex-PCR 증폭산물을 제한효소 처리 후 DHPLC로 분석 하였다.

DNA 염기서열 분석 결과

Multiplex-PCR에 사용된 primer set중에 MC1R primer set만을 사용하여 얻은 증폭산물을 정제하여 DNA 염기서열을 분석 한 결과 한우, 젖소임을 확인하였고, 혼입육에서는 한우, 젖소의 유전자가 섞인 형태의 결과를 확인하였다.

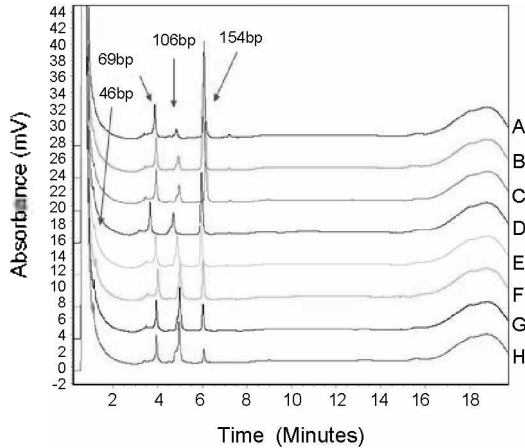


Fig. 5. DHPLC results of mixed beef quantitative analysis. A) Mixed ratio was 0.5 : 9.5 (holstein : hanwoo), B) Mixed ratio was 1 : 9 (holstein : hanwoo), C) Mixed ratio was 2 : 8 (holstein : hanwoo), D) Mixed ratio was 3 : 7 (holstein : hanwoo), E) Mixed ratio was 4 : 6 (holstein : hanwoo), F) Mixed ratio was 5 : 5 (holstein : hanwoo), G) Mixed ratio was 6 : 4 (holstein : hanwoo), H) Mixed ratio was 7 : 3 (holstein : hanwoo). Hanwoo samples had 69 bp and 154 bp peaks. B) Holstein samples had 46 bp, 69 bp and 106 bp peaks. Mixed beef samples had 46 bp, 69 bp, 106 bp, 154 bp peaks. DHPLC method could detect 0.5% of holstein sample DNA in hanwoo sample.

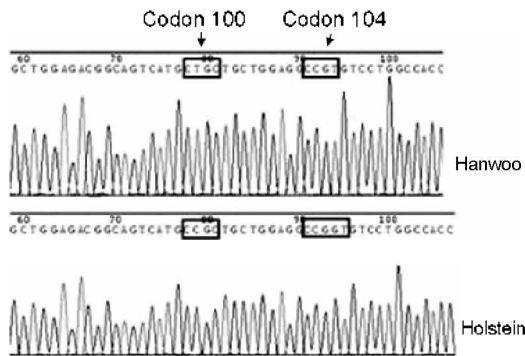


Fig. 6. Sequencing analysis for MC1R gene genomic DNA. Hanwoo : codon 100[CTG], Holstein : codon 100 [CCG].

결론

DHPLC기기는 기존의 HPLC기기에 기초하여 핵산 분석에 특화된 분석 기기이다. 핵산 검출에 특화된 컬럼을 사용하여, DNA나 RNA의 염기의

치환, 결실 또는 삽입의 유무를 분석하는 목적으로 사용되고 있다.

한우 종의 경우 젖소 및 수입 종과는 다르게 보색유전자의 100번 코돈 부위의 두 번째 염기가 시토신(C)에서 티민(T)으로 치환된 형태를 갖고 있다. 이 부위를 제한효소를 사용하여 자른 후에 DHPLC를 사용하여 각 샘플의 DNA 절편 길이 차이를 분석하였고, 각 종에 따른 특유의 크로마토그램을 확인 할 수 있었다. 기존 agarose gel 전기영동을 통한 DNA 절편 길이의 차이를 확인 하는 방법과 DHPLC의 민감도를 테스트한 결과 agarose gel 전기영동은 10 ~ 0.1 ng/uL 의 검출 범위를 보였으며 DHPLC 결과에서도 10 ~ 0.1 ng/uL 의 검출 범위를 보였다.

한우, 젖소, 혼입육, 수입육의 multiplex-PCR DHPLC 분석 결과, 한우 샘플에서 기타 종들과 다른 특유의 결과를 확인하였다. 뉴질랜드 및 호주산 수입육의 판독 결과는 혼입육의 판독 결과와 동일한 multiplex-PCR DHPLC 분석 결과를 확인 하였다. 한우와 그 외 샘플 중에서 한우 샘플만을 특이적으로 찾아 낼 수 있었다. 또한, 한우와 젖소 DNA의 혼합 비율에 따른 검출 결과 10 ng/uL의 DNA 중에 5%의 젖소 DNA 혼합 비율까지 검출 할 수 있었다.

뉴질랜드산과 호주산 사이의 동정은 판독 결과 본 연구에 사용한 primer sets로 확인 할 수 없었다. 그러나, 뉴질랜드산과 호주산의 종 특이적인 DNA 염기서열을 판별 할 수 있는 primer set를 제작한다면 두 종간의 동정도 가능할 것으로 사료된다.

본 연구의 결과, 한우육의 검사 방법으로 DHPLC 를 이용한 본 분석 방법이 유용하게 사용 될 수 있음을 보였다. 앞으로 multiplex-PCR DHPLC 분석 방법의 응용 범위를 넓혀 쇠고기 샘플 이외에 유전자 변형 식품의 검출의 한 방법으로 적용 할 계 획이다.

감사의 글. 이 연구는 2009년도 단국대학교 대학연구비 지원으로 연구되었음.

REFERENCES

1. Sasazaki, S.; Mutoh, H.; Tsurifune, K.; Mannen, H.: *Meat Science*. **2007**, *77*, 161.

2. Matukumalli, L. K.; Lawley, C. T.; Schnabel, R. D.; Taylor, J. F.; Allan, M. F.; Heaton, M. P.; O'Connell, J.; Moore, S. S.; Smith, T. P. L.; Sonstegard, T. S.; Tassel, C. P. V.; *PLoS ONE*. **2009**, *4*, 5350.
3. Harding, R. M.; Healy, E.; Ray, A. J.; Ellis, N. S.; Flanagan, N.; Todd, C.; Dixon, C.; Sajantila, A.; Jackson, I. J.; Birch-Machin, M. A.; Rees, J. L.; *Am. J. Hum. Genet.* **2000**, *66*, 1351.
4. Kijas, J. M. H.; Wales, R.; Tomsten, A.; Chardon, P.; Moller, M.; Andersson, L.; *Genetics*. **1998**, *150*, 1177.
5. Erdal, M. E.; Barlas, I. O.; *Turk. J. Med. Sci.* **2000**, *30*, 501.
6. Lee, S. S.; Yang, Y. H.; Kang, S. Y.; Oh, W. Y.; Yang, B. S.; Ko, S. B.; Oh, S. J.; Kim, K. I.; *J. Anim. Sci. & Technol.* **2000**, *42*, 253.
7. Jose, C.; Borro, G.; Berta, L.; Laorden, S.; Cervantes, C. J.; *Pigment Cell*. **2005**, *18*, 393.
8. Rolando, A.; Stasio, L. D.; *ITAL. J. ANIM. SCI.* **2006**, *5*, 87.
9. Underhill, P. A.; Jin, L.; Lin, A. A.; *Genome Res.* **1997**, *7*, 996.
10. Zhang, C. L.; Fowler, M. R.; Scott, N. W.; Lawson, G.; Slater, A.; *Food Control*. **2007**, *18*, 1149.
11. Dalmasoa, A.; Fontanellab, E.; Piattib, P.; Civeraa, T.; Rosatic, S.; Bottero, M. T.; *Molecular and Cellular Probes*. **2004**, *18*, 81.
12. Pieragostini, E.; Scaloni, A.; Rullo, R.; Luccia, A. D.; *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. **2000**, *127*, 1.
13. Shiu, Y. L.; Millon, L. V.; Skow, L. C.; Honeycutt, D.; Murray, J. D.; Bowling, A. T.; *Chromosome Research*. **2000**, *8*, 45.
14. Go, H.; Lee, M.; Li, S.; Kim, K. S.; Kang, S. H.; *Journal of the Korean Chemical Society*. **2008**, *52*, 6.
15. Footz, T.; Somerville, M. J.; Tomaszewski, R.; Sprysak, K. A.; Backhouse, C. J.; *GENETIC TESTING*. **2003**, *7*, 4.
16. Abbas, A.; Lepelley, M.; Lechevrel, M.; Sichel, F.; *J. Biochem. Biophys. Methods*. **2004**, *59*, 121.
17. Xiao, W.; Oefner, P. J.; *HUMAN MUTATION*. **2001**, *17*, 439.
18. Osipova, G. R.; Karmanov, M. E.; Kozlova, S. I.; Evgrafov, O. V.; *American Journal of Medical Genetics*. **1998**, *76*, 283.
19. Zimmermann, B.; Sheikha, A. E.; Nicolaidis, K.; Holzgreve, W.; Hahn, S.; *Clinical Chemistry*. **2005**, *51*, 1598.
20. Sivakumaran, T. A.; Kucheria, K.; Oefner, P. J.; *CURRENT SCIENCE*. **2003**, *84*, 291.
21. Park, S. B.; Nam, Y. H.; Lee, J. S.; Kang, W.; Jang, W. C.; *Journal of the Korean Chemical Society*. **2006**, *50*, 123.
22. Lee, G.; Lim, K.; Kim, J. B.; *J. Exp. Biomed. Sci.* **2007**, *13*, 71.