

# 식육감별을 위한 미토콘드리아 12S rRNA와 16S rRNA 유전자의 종 특이적 multiplex PCR 기법 개발

고바라다\* · 김지연 · 나호명 · 박성도 · 김용환

광주광역시보건환경연구원 동물위생연구부

(접수 2011. 8. 24; 수정 2011. 12. 8; 게재승인 2011. 12. 12)

## Development of species-specific multiplex PCR assays of mitochondrial 12S rRNA and 16S rRNA for the identification of animal species

Ba-Ra-Da Koh\*, Ji-Yeon Kim, Ho-Myung Na, Seong-Do Park, Yong-Hwan Kim

Department of Veterinary Research, Gwangju Metropolitan City Institute Health & Environment, Gwangju 500-210, Korea

(Received 24 August 2011; revised 8 December 2011; accepted 12 December 2011)

### Abstract

Species-specific PCR assay was developed for detection of cattle, sheep, goat, horse, dog, pig, chicken, duck, goose, and turkey using mitochondrial 12S rRNA and 16S rRNA as target genes. Also, an internal positive control was used to detect possible false negatives by using 18S rRNA gene. We designed species-specific primers with amplicon length of 190, 219, 350, 467, 241, 119, 171, 229, 111 and 268 bp for cattle, sheep, goat, horse, dog, pig, chicken, duck, goose, and turkey respectively. The specificity of the primers was tested against the other 10 non-target animal species and a cross-reaction was not observed. We developed two multiplex PCR assays for the simultaneous identification of Korea's major livestock species (cattle, pig, chicken and duck) and poultry species (chicken, duck, goose and turkey) from analogous samples, retaining the same specificity. The limit of detection of the multiplex PCR assay (cattle, pig, chicken and duck) ranged between 1 pg and 0.1 pg of template DNA extracts from raw meat. Applying multiplex PCR assays to DNA extracts from experimental pork/beef and pork/chicken tested raw and heat-treated (120°C for 30 min) mixtures respectively, detection limit was 0.1% level beef in pork, pork in beef and chicken in pork and 1.0% level pork in chicken. In conclusion, this assay using gel-based capillary electrophoresis would be very useful in highly sensitive and rapid identification of animal species or ingredients in minced meat and other meat products.

**Key words** : Multiplex polymerase chain reaction, Species identification, Mitochondrial 12S rRNA, 16S rRNA

### 서 론

우리나라에서 축산물을 대표하는 소, 돼지, 닭 및

오리는 식생활에 중요한 부분을 차지하는 육류 식품으로, 경제 성장으로 소득수준의 향상과 식생활의 서구화로 육류 소비가 폭발적으로 증가하였다. 현재 축산식품에 대한 소비자의 가장 큰 관심은 축산식품의 안전성과 품질일 것이다. 축산물의 안전성 측면에서

\*Corresponding author: Ba-Ra-Da Koh, Tel. +82-62-613-7653, Fax. +82-62-613-7649, E-mail. barada@korea.kr

알레르기 유발 물질 중 난류(계란)와 돼지고기는 표시사항에 반드시 표시하도록 하고 있어, 육류를 가려 먹어야 하는 소비자에게는 매우 중요한 표시사항 중 하나일 것이다. 채식주의자와 유기농 식품을 선호하는 생활 양식의 차이, 돼지고기를 먹지 않는 종교적 이유, 식이요법 그리고 알레르기 물질과 같은 건강에 대한 우려 때문에 축산물의 표시사항을 자세히 살펴보고 구매하는 소비자가 증가하였다. 부가적으로 정확한 표시사항은 공정한 거래 질서를 확립하는데 매우 중요하다(Ballin, 2010).

농림수산검역검사본부(2011)에서 고시한 축산물의 가공기준 및 성분규격으로 채택된 식육감별법은 glycogen 검사법, 지방검사법 및 자비법이 있다. 그러나 이 검사법의 감별기준은 모호하거나 매우 주관적이고, 유전자혼성화법과 혈청학적 검사법인 면역혈청침강반응, 미량겔 확산법 그리고 한천겔 확산법은 근연종에서 교차반응이 발생하며, 히스티딘 디펩타이드법은 두 가지 이상의 혼합육에서는 식육을 감별할 수 없는 단점이 있다. 미국의 식품안전검사청(FSIS)에서 승인한 식육감별법은 두 가지로써 ELISA-TEK™ (ELISA Technologies, USA)과 같은 상업용 검사키트와 FSIS 실험실에서 식육감별에 일반적으로 사용하지 않는 agar gel immunodiffusion 검사법이 있다(FSIS, 2005).

식육감별의 일반적인 방법은 DNA와 단백질 분석이다. 단백질은 동물이 도축되고 나서 생물학적 활성이 사라지고, 세포 분류에 따라 특성이 달라지며, 열과 압력 처리 과정을 거치는 동안 변성되기 때문에 가공된 시료에서 축종을 감별하기는 매우 어렵다(Montiel-Sosa 등, 2000). DNA도 단백질처럼 열에 의해 일부 변성되지만, 안정되어 있기 때문에 이런 단점을 극복할 수 있다. DNA에 기반을 둔 검사 방법 중 현재까지 가장 잘 활용되는 분자생물학적 방법은 polymerase chain reaction (PCR)이며, 식품 중에 동물에서 유래한 구성 성분을 검출하는 데 있어서 편리성, 신속성 그리고 높은 민감도와 특이성을 지닌 분석 도구이다(Fajardo 등, 2010).

Mitochondrial DNA (mt DNA) 유전자는 여러 가지 장점을 지니고 있어 식육감별을 위한 PCR 기법에 널리 사용되고 있다 (Bottero와 Dalmaso, 2011; Montiel-Sosa 등, 2000). mt DNA 유전자는 첫 번째로 핵 내 DNA보다 세포당 수천 개의 copy number가 있어 열변성에 의해 야기된 DNA 단편으로부터 적절한 크기로 증폭될 수 있다. 두 번째로 다양한 축종에서 보고

된 염기서열의 유용성 뿐만 아니라 동물 mt DNA 유전자 구성에 관한 방대한 정보를 이용하여 PCR 증폭을 위한 축종별 특이 primer를 쉽게 설계할 수 있다. 세 번째로 mt DNA의 큰 변이성 때문에 혼합물에서 신뢰성 있는 축종감별이 가능하다. DNA에 기반을 둔 PCR 방법에 널리 이용된 유전자는 12S rRNA, 16S rRNA, 그리고 cytochrome b (cyt b)와 같은 mt DNA 유전자이며, 반추류(소, 면양, 산양, 사슴), 가금류(닭, 칠면조, 오리, 거위), 개, 고양이, 그리고 돼지와 같은 축종을 감별하였다(Ha 등, 2006; Martín 등, 2007a; Martín 등, 2007b; Tanabe 등, 2007).

mt DNA 유전자에서 일정한 보존부위의 염기서열에 존재하는 돌연변이를 분석하는 PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) 방법은 여러 개의 근연종을 감별하는데 사용되었다(박 등, 2007; Girish 등, 2007; Lanzilao 등, 2005; Montiel-Sosa 등, 2000; Pfeiffer 등, 2004; Wolf 등, 1999). 근연종 감별이나 다양한 동물종을 동시에 감별하는데 여러 개의 제한효소가 종종 필요하므로 RFLP 방법은 비용적인 측면에서 식육감별에 적합하지 않다(Bottero와 Dalmaso, 2011). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) 분석법은 일련의 PCR 증폭산물을 만들 수 있는 genomic DNA의 여러 부위와 상보적인 짧은 임의의 primer를 사용한다(민 등, 1996; Calvo 등, 2001; Rastogi 등, 2007). RAPD는 DNA 염기서열 정보가 거의 없어도 표준물질과 비교를 할 수 있다면 매우 효과적인 기술이다. 이 방법은 DNA 서열 정보가 사전에 필요하지 않기 때문에 가축과 희귀 동물종 감별에 적절하다(Ballin, 2010). 하지만 이 기술은 재현성이 떨어지고 광범위하게 핵산이 붕괴한 가열 처리된 가공식품에 적용하기에는 제약이 따른다(Fajardo 등, 2010). 염기서열 분석법은 정확하고 신뢰성이 있는 방법이지만 두 가지 이상의 축종이 혼합된 시료에는 적용할 수 없어서 일상적인 진단실험에는 적절하지 않다(Bottero와 Dalmaso, 2011).

Laube 등(2003)은 mt DNA 유전자가 아닌 핵 내 DNA를 이용하여 소, 돼지, 닭 등의 가축을 real-time PCR 방법으로 감별하고 정량하였다. Real-time PCR은 반응 후 증폭 산물을 전기영동으로 확인할 필요가 없고 간편하고 신속하게 결과를 얻을 수 있고 교차오염의 위험이 낮고 정량까지 가능하지만, 고가의 시약과 장비 그리고 특이성 높은 probe를 설계하기 위해서는 염기서열 부위를 선정하는데 여러 가지 제약조건이 따른다. 최근에는 유전적 변이성을 검출하는

DNA chip (microarray)이 식육감별 목적에도 적용되었다(Felmer 등, 2008).

두 가지 이상 혼합된 축산물 시료에서 여러 개 축종을 신속하고 간편하게 동시에 감별해 낼 수 있는 장점이 있는 방법은 multiplex PCR 방법이다(Dalmasso 등, 2004; Matsunaga 등, 1999; Tobe와 Linacre, 2008). 하지만 multiplex PCR 방법을 충족시키기 위해서는 축종별 특이적인 primer의 PCR 온도 조건의 일치, 증폭산물의 적절한 크기, 목적 유전자 간에 교차반응을 제거하여야 하는 등 여러 가지 조건이 있다. 이런 이유로 현재까지 수많은 연구자가 PCR 방법을 통해 식육감별에 관한 보고를 하였지만, multiplex PCR 방법에 대한 연구는 미미한 실정이다.

닭고기와 같은 식육을 분쇄하여 식품에 첨가하여 가공·제조하는 생산자는 원료육 등 각종 첨가물에 대한 정보를 제품에 표시할 것을 의무화하고 있다. 축산식품의 표시사항을 허위로 기재하거나 비의도적으로 잘못 표시하거나, 저가의 육류를 부정하게 혼합된 제품 등에 대한 검증과 부정유통을 예방하고 검사할 수 있는 신뢰성 있는 정확한 유전자 검사방법이 현행 축산물의 가공기준 및 성분규격에 시급히 도입되어야 한다. 따라서 이번 연구에서는 소, 면양, 산양, 말, 개, 돼지, 닭, 오리, 거위 및 칠면조의 종에 대한 mt DNA 유전자 중 12S rRNA와 16S rRNA 부위를 이용한 PCR 방법을 개발함과 동시에 국내 식생활에 중요한 부분을 차지하는 소, 돼지, 닭 그리고 오리를 동시에 감별할 수 multiplex PCR 방법을 개발하였다.

## 재료 및 방법

### 공시재료 및 DNA 추출

축종감별을 위한 시료는 소, 돼지, 닭, 오리고기 각 1건을 도축장에서 채취하였다. 동물원에서 사육 중인 말, 면양, 산양, 거위 및 칠면조 혈액 각 1점을 채취하였다. 개와 고양이의 혈액은 동물보호소에 보호 중인 유기동물의 진료시에 각 1건을 채취하였다. 채취된 혈액은 항응고제 처리를 하지 않았다.

소 등 11개 동물종에 대한 각 시료에서 DNA 추출은 Sambrook와 Russell (2001)의 방법을 일부 수정하여 다음과 같이 실시하였다. 시료 0.1~0.3 g과 0.5 ml의 extraction buffer [1 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS]와 proteinase K (10 mg/ml)

10 µl를 MagNA Lyser green bead tube (Roche, Germany)에 넣고 MagNA Lyser (Roche, Germany)기에서 6,000 ×g에서 40초간 2회 분쇄하였다. 분쇄된 시료는 1.5 ml eppendorf (EP) tube에 옮겨 65°C에서 30분간 반응시켰다. 이 혼합액에 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1, v/v) 용액 0.5 ml를 넣고 혼합한 후 실온에서 14,500 ×g으로 3분간 원심 분리하여 단백질을 침전시켰다. 상층액을 새로운 1.5 ml EP tube로 옮겨 isopropanol 600 µl와 혼합하여 실온에서 14,500 ×g로 3분간 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA가 포함된 EP tube에 70% ethanol 700 µl로 2회 세척 후 건조하여 멸균된 3차 증류수를 100~200 µl 가하여 실험에 사용하였다.

소고기와 돼지고기 혼합육 그리고 닭고기와 돼지고기 혼합육에 대한 동시감별과 검출한계 실험을 위해 시료를 가위로 세절하여 준비하였다. 혼합 함량에 따른 검출한계를 검사하기 위하여 소고기와 닭고기 시료들을 각각 돼지고기에 0.1, 1.0, 2.0, 10.0 그리고 50.0% 함유되도록 각각 100 g를 준비하였다. 혼합육에 대한 원료육과 열처리에 따른 검출실험을 위해서 각각의 시료를 120°C에서 30분 동안 가열한 열처리육에서 상기와 같은 방법으로 genomic DNA를 추출하였다.

추출된 DNA는 NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA)를 이용하여 260:280 nm에서 정량한 후 10~100 ng/µl 농도로 정량하여 실험에 사용하였다. 소고기와 돼지고기 또는 닭고기와 돼지고기 혼합육에서 추출한 DNA의 농도는 원료육과 가열 처리육 모두 100 ng/µl 농도로 정량하여 PCR 실험에 사용하였다.

### Primer 설계

동물종별 특이 primer는 clustal X (Ver. 1.8)으로 GenBank database에서 제공된 염기서열을 정렬하여 mt DNA (12S rRNA, 16S rRNA)의 각각 다른 부위를 표적으로 하여 Table 1과 같이 설계한 후 합성하였다 (Bioneer, Korea). 동물종별 특이적인 primer 디자인은 PCR annealing 온도 차이를 최소화하면서 각기 다른 크기로 증폭되도록 설계하였다.

내재성 유전자용(internal positive control, IPC) primer 설계는 11개 동물종에 공통으로 대응하도록 18S rRNA의 최대 공통부위를 검색하여 primer를 설계하였다(Fig. 1).



### Singleplex PCR 반응조건

Singleplex PCR 반응액은 Table 1에서 같은 동물종별 특이 primer를 0.5 μM과 IPC primer를 0.25 μM 되도록 사용하였고, 추출한 DNA (10~100 ng/μl) 2 μl, 비특이 반응을 억제하기 위해서 DMSO를 0.4 μl를 첨가하여 최종부피는 멸균된 3차 증류수로 20 μl로 조정하여 PCR을 하였다. PCR premix 제품은 Maxime PCR PreMix Kit (*i-StarTaq*, iNtRON biotechnology, Korea)을 사용하였다. 동물종별 primer에 대한 특이성 검사를 위해서 소, 면양, 산양, 말, 개, 고양이, 돼지, 닭, 오리, 거위 그리고 칠면조 축종에 대해서 교차반응 여부를 검사하였다.

PCR 반응조건은 95°C에서 5분간 가열하여 변성을 유도하고, 95°C 30초, 57°C 35초, 및 72°C 35초씩 35회 반복하였으며, 최종적으로 72°C에서 5분 반응시켰다. PCR 산물은 QIAxcel system (Qiagen, USA) 장비로 QIAxcel DNA High Resolution kit을 사용하여 전기영동 하였다. 획득된 자료는 전기영동 제조사에서 공급한 Bio Calculator 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

### Multiplex PCR 반응조건 및 검출한계

소, 돼지, 닭 그리고 오리 동시감별과 조류 4종(닭, 오리, 거위 그리고 칠면조)을 위한 multiplex PCR 반응액에 사용된 primer 농도는 Table 2와 같이 사용하였으며, 나머지 반응액 조성은 singleplex PCR 반응과 같았다. 조류 4종 동시감별을 위한 multiplex PCR 반응액에는 IPC primer를 첨가하지 않았다.

소, 돼지, 닭 및 오리 동시 검출과 조류 4종 동시 검출을 위한 multiplex PCR은 singleplex PCR용으로 설계한 각각의 primer를 사용하였다. 동시감별을 위한 온도조건 설정을 위해 54°C부터 65°C까지 12개의 온도 구역을 설정하여 PCR을 하였다.

동물종별 학명의 머리글자에 기초하여 소, 돼지,

닭 그리고 오리 동시 감별을 위한 PCR은 BSGA multiplex PCR로 표기하고 닭, 오리, 거위 그리고 칠면조 동시 감별을 위한 PCR은 GAAM multiplex PCR로 표기하였다.

소, 돼지, 닭 그리고 오리 동시감별에 대한 DNA 민감도 검사를 위해서 4개 축종의 DNA를 100 ng/μl 으로 정량한 후 10배 계단 희석하여 4개 축종 DNA 혼합물 4 μl를 BSGA multiplex PCR에 이용하였다.

## 결 과

### Singleplex PCR 특이성

소 등 10개 동물종별 primer의 특이성을 확인하기 위하여 동물종별 시료에서 DNA를 추출하여 singleplex PCR을 하였다. 동물종별 primer를 이용하여 소 190 bp, 면양 219 bp, 산양 350 bp, 말 467 bp, 개 241 bp, 돼지 119 bp, 닭 171 bp, 오리 229 bp, 거위 111 bp 그리고 칠면조 268 bp의 PCR 산물이 증폭되었다(Fig. 2). 동물종별 특이 primer에 대한 교차반응 여부를 확인하기 위해서 나머지 10개 축종에서도 singleplex PCR을 실시한 결과 칠면조를 제외한 소 등 나머지 9개 축종에서는 IPC primer와 간섭없이 PCR 산물이 확인되었다.

칠면조에 특이적인 primer는 IPC primer와 함께 PCR을 수행하면 고양이, 오리 그리고 칠면조에서 비특이 증폭산물이 확인되었다(Fig. 2J). 그래서 IPC primer를 PCR 반응액에 첨가하지 않고 유전자를 증폭하면 고양이, 오리 그리고 칠면조에서 비특이 증폭산물이 관찰되지 않았다(Fig. 4B).

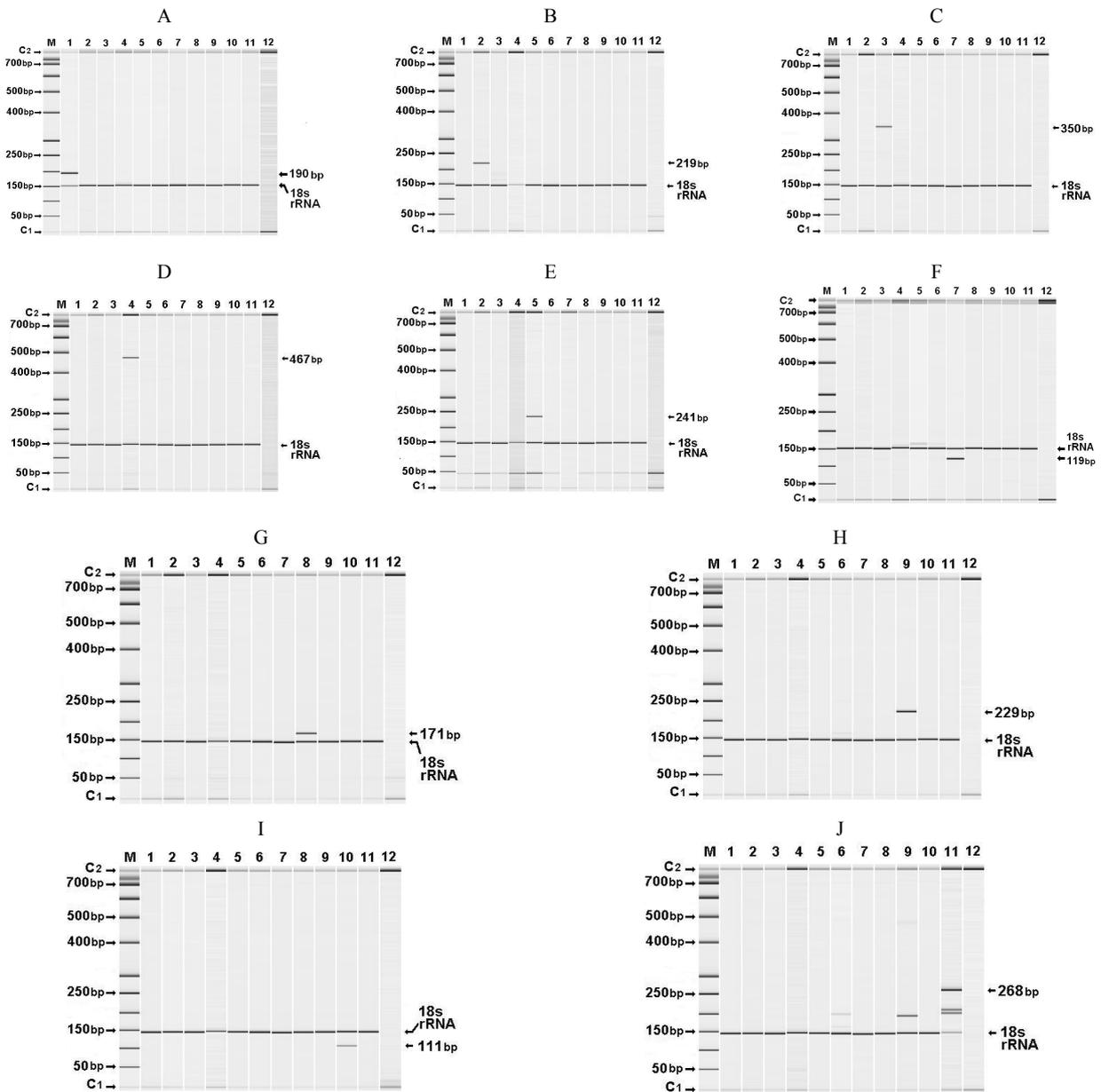
### Multiplex PCR 특이성

국내에서 많이 소비되는 대표적 축종으로 소, 돼지, 닭 그리고 오리 동시에 감별하기 위한 BSGA multiplex PCR의 최적 조건을 설정하기 위해 54°C에서 65°C까지 12개의 온도를 설정하고 PCR을 수행한 결과 4개 축종 모두에서 뚜렷한 유전자 증폭을 보인 온도는 54.0~60.0°C 범위였다. 따라서 BSGA multiplex PCR과 GAAM multiplex PCR의 annealing 온도는 57°C로 설정하였다(Fig. 3).

BSGA multiplex PCR과 GAAM multiplex PCR 검사 결과는 Fig. 4에서 보이는 것과 같이 각 축종에서 원

**Table 2.** Optimum concentration of primers for multiplex PCR

BSGA multiplex PCR	Primer (μM)	GAAM multiplex PCR	Primer (μM)
Cattle	0.4	Chicken	0.5
Pig	0.4	Duck	0.5
Chicken	0.4	Goose	0.5
Duck	0.4	Turkey	0.5
IPC	0.3	IPC	-



**Fig. 2.** Multicapillary electrophoresis size determination panel of singleplex PCR amplification products obtained using (A) cattle-, (B) sheep-, (C) goat-, (D) horse-, (E) dog-, (F) pig-, (G) chicken-, (H) duck-, (I) goose-, (J) turkey-specific primers. Lanes: (M) 50~800 bp (Qiagen); (1) cattle; (2) sheep; (3) goat; (4) horse; (5) dog; (6) cat; (7) pig; (8) chicken; (9) duck; (10) goose; (11) turkey; (12) no template control. C<sub>1</sub> (15 bp) and C<sub>2</sub> (1,000 bp): internal size calibration markers. Separation was performed by method M500 with a 10 seconds injection time.

하는 크기의 PCR 산물이 확인되었으며, 4개 축종의 DNA 혼합물에서도 역시 각 축종별 PCR 산물이 교차 반응이 없이 증폭되었다. GAAM multiplex PCR 검사에는 IPC primer를 포함하지 않았다.

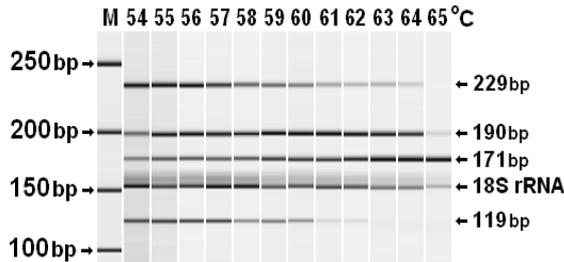
**BSGA multiplex PCR 검출한계**

BSGA multiplex PCR에 대한 검출한계 검사를 위해

서 4개 축종의 DNA를 100 ng/μl로 정량한 후 혼합물을 10배 계단희석하여 실험하였다. 축종별 genomic DNA의 검출한계는 소(190 bp)와 닭(171 bp)은 100 fg/μl까지, 돼지(119 bp)와 오리(229 bp)는 1 pg/μl까지 확인이 가능하였으며, IPC는 1 fg/μl까지 검출이 가능하였다(Fig. 5).

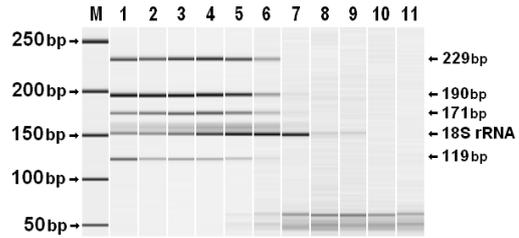
**분쇄 혼합육에 대한 BSGA multiplex PCR 검출한계**

분쇄 혼합육에서 소, 돼지 그리고 닭고기의 함량 (0.1~50.0%)에 따른 검출한계 실험을 위해, 소고기와 돼지고기 분쇄 혼합육 그리고 닭고기와 돼지고기 분쇄 혼합육 각각의 원료육과 가열 처리육 100 g으로부터 DNA를 추출하여 100 ng/μl 농도로 정량하여 BSGA multiplex PCR 실험에 사용하였다.

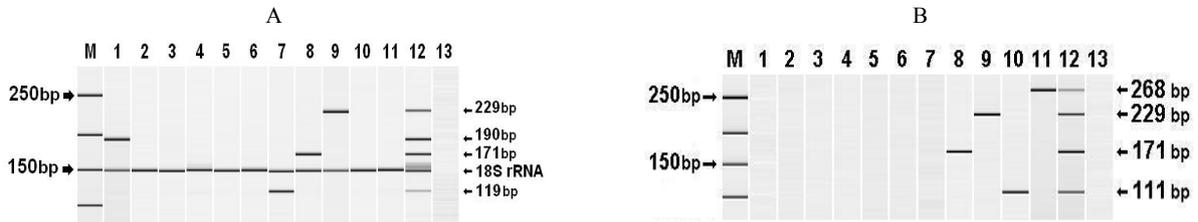


**Fig. 3.** Multicapillary electrophoresis size determination panel of BSGA multiplex PCR for determination on of optimal annealing temperature. The annealing temperature of efficient amplification of cattle, pig, chicken and duck was obtained at 54.0~60.0°C. Lane M: 50~800 bp (Qiagen).

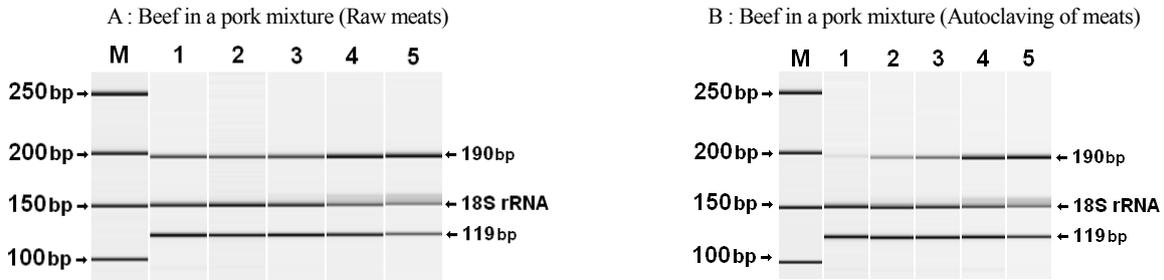
돼지고기에 소고기가 0.1~50.0% 함유된 분쇄 혼합육의 원료육과 가열 처리육에서 소고기의 검출한계는 0.1%이었다(Fig. 6). 소고기에 돼지고기의 함량 별 분쇄 혼합육의 원료육과 가열 처리육에서 돼지고기의 검출한계는 0.1%이었다(Fig. 7). 닭고기에 돼지고기가 0.1~50.0% 함유된 분쇄 혼합육의 원료육과



**Fig. 5.** Sensitivity of the multiplex assay for the detection of cattle, pig, chicken and duck with specific primer sets respectively. The sensitivity of the assay was determined by amplifying 10-fold serial dilutions of DNA from cattle, pig, chicken and duck. Lanes: (M) 50~800 bp (Qiagen); (1) 100 ng; (2) 10 ng; (3) 1 ng; (4) 100 pg; (5) 10 pg; (6) 1 pg; (7) 100 fg; (8) 10 fg; (9) 1 fg; (10) 0.1 fg; (11) 0.01 fg.



**Fig. 4.** Species specificity of the multiplex PCR assay at annealing temperature of 57.0°C. (A) The BSGA multiplex PCR amplification of cattle, pig, chicken and duck with specific primer sets respectively. (B) The GAAM multiplex PCR amplification of chicken, duck, goose and turkey with specific primer sets respectively. Lanes: (M) 50~800 bp (Qiagen); (1) cattle; (2) sheep; (3) goat; (4) horse; (5) dog; (6) cat; (7) pig; (8) chicken; (9) duck; (10) goose; (11) turkey; (12) The mixed DNA of cattle, pig, chicken and duck (A), the mixed DNA of chicken, duck, goose and turkey (B); (13) no template control.



**Fig. 6.** Evaluation of assay sensitivity: progressive dilution of know amounts of a beef in a pork mixture. (A) Samples of raw meats. (B) Samples of autoclave treated meats (121°C for 30 min). Lanes: (M) 50~800 bp (Qiagen); (1) beef 0.1%; (2) beef 1.0%; (3) beef 2.0%; (4) beef 10.0%; (5) beef 50.0%.

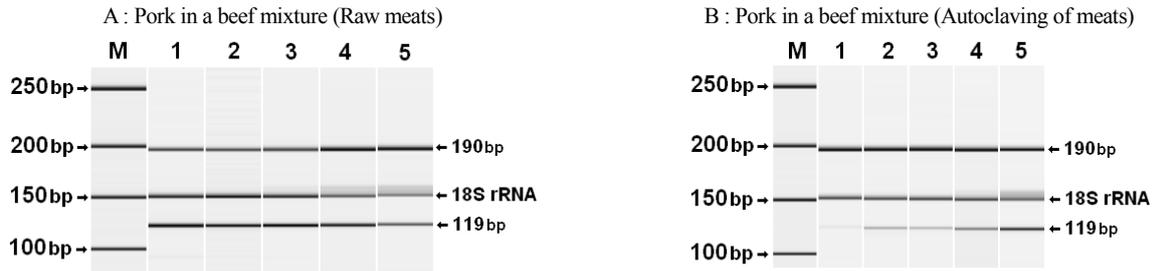


Fig. 7. Evaluation of assay sensitivity: progressive dilution of know amounts of a pork in a beef mixture. (A) Samples of raw meats. (B) Samples of autoclave treated meats (121°C for 30 min). Lanes: (M) 50~800 bp (Qiagen); (1) pork 0.1%; (2) pork 1.0%; (3) pork 2.0%; (4) pork 10.0%; (5) pork 50.0%.

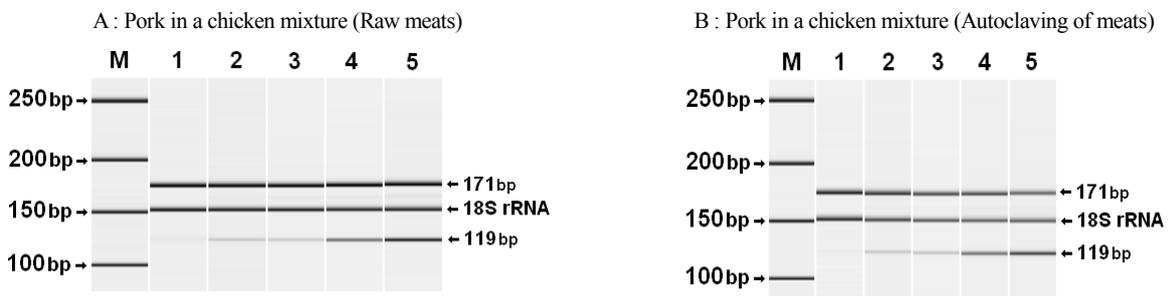


Fig. 8. Evaluation of assay sensitivity: progressive dilution of know amounts of a pork in a chicken mixture. (A) Samples of raw meats. (B) Samples of autoclave treated meats (121°C for 30 min). Lanes: (M) 50~800 bp (Qiagen); (1) pork 0.1%; (2) pork 1.0%; (3) pork 2.0%; (4) pork 10.0%; (5) pork 50.0%.

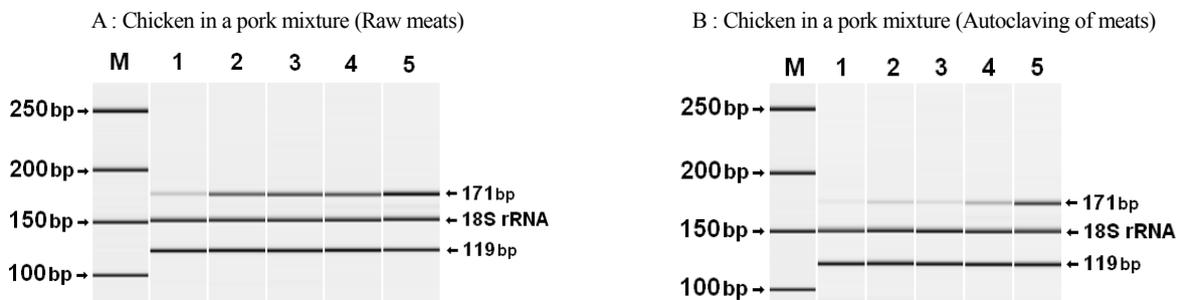


Fig. 9. Evaluation of assay sensitivity: progressive dilution of know amounts of a chicken in pork mixture. (A) Samples of raw meats. (B) Samples of autoclave treated meats (121°C for 30 min). Lanes: (M) 50~800 bp (Qiagen); (1) chicken 0.1%; (2) chicken 1.0%; (3) chicken 2.0%; (4) chicken 10.0%; (5) chicken 50.0%.

가열 처리육에서 돼지고기의 검출한계는 1.0%이었다 (Fig. 8). 돼지고기에 닭고기의 함량별 분쇄 혼합육에서 닭고기의 검출한계는 원료육과 가열 처리육에서 0.1%이었다(Fig. 9).

### 고 찰

이번 연구에서 mt DNA 유전자 중 12S rRNA와

16S rRNA 유전자의 동물종 간 염기서열 변이를 이용하여 설계된 종 특이적인 primer로 포유류 6종(소, 면양, 산양, 말, 개 그리고 돼지)과 가금류 4종(닭, 오리, 거위 그리고 칠면조)을 검출하고 감별할 수 있는 PCR 기법을 개발하였다. 그리고 국내 식생활에 중요한 부분을 차지하는 소, 돼지, 닭 그리고 오리를 동시에 감별할 수 multiplex PCR 기법과 가금류 4종을 동시에 검출할 수 있는 multiplex PCR 기법을 개발하였다.

mt DNA는 모계 유전방식으로 다음 세대로 전달되며 세포핵이 아닌 세포질에 많은 수가 존재한다(DiMauro, 2007). 세포질에 존재하는 한 개의 mt DNA는 핵 DNA보다 세포당 copy number가 많아 동물종 판별에 매우 효과적인 방법으로 보고되었다(Montiel-Sosa 등, 2000). 주로 mt DNA 유전자를 이용한 PCR-RFLP 방법으로 소, 돼지, 닭, 오리를 비롯한 사슴 등의 야생 동물종을 감별하였다(박 등, 2007; Fajardo 등, 2006; Girish 등, 2007; Lanzilao 등, 2005; Montiel-Sosa 등, 2000; Pfeiffer 등, 2004; Wolf 등, 1999). RFLP 방법은 중간 공통적으로 보존되어 있는 염기서열 영역을 선택하여 이곳에 존재하는 단일염기다형성 부위를 인식하는 제한효소로 PCR 증폭산물을 처리하여 절단된 DNA의 크기를 조합하여 동물종을 감별하였다.

12S rRNA 염기서열 부위로 동물종을 감별하기 위해서 박 등(2007)은 *Tsp509I*와 *MboI*를 사용하여 포유류 6종(말, 염소, 돼지, 양, 사슴, 소)과 가금류 3종(닭, 오리, 칠면조)을 감별하였고, Girish 등(2007)은 *HinfI*, *Mph1103I*, *MvaI* 및 *Eco47I*를 사용하여 가금류 5종(닭, 오리, 칠면조, 메추리 및 guinea fowl)을 감별하였다. 그리고 Fajardo 등(2006)은 유럽에서 인기가 증가하고 있는 사슴고기 3종과 소, 면양 그리고 산양을 감별하는데 *MseI*, *MboII*, *BsI* 그리고 *ApoI*를 사용하였다. Pfeiffer 등(2004)은 *cyt b* 부위로 *TSP509*만 사용하여 소, 면양, 산양, 노루, 그리고 고라니를 감별하였지만 돼지 등 다른 동물종에 대한 특이성 실험이 이루어지지 않았다. Lanzilao 등(2005)은 *cyt b* 유전자를 이용하여 낙농산업에서 중요시되는 소, 면양, 산양 그리고 water buffalo를 감별하였고, Wolf 등(1999)은 *tRNA<sup>val</sup>/cyt b* 부위로 11종의 제한효소를 사용하여 소, 돼지, 면양, 산양, 그리고 사슴 등 다양한 야생 동물종까지 감별하였다. 한편, Montiel-Sosa 등(2000)은 D-loop 부위로 소, 닭, 양을 제외한 돼지만 증폭되는 영역을 선정하여 돼지고기와 멧돼지를 *AvaII*를 이용하여 감별하였고 검출한계는 원료육에서 5%였다. 이번 실험에서 multiplex PCR 방법으로 원료육과 가열 처리육에서 소고기와 혼합한 돼지고기의 검출한계는 0.1%였고, 닭고기와 혼합한 돼지고기의 검출한계는 1.0%였다.

RFLP 방법은 아가로스겔에서 낮은 해상도와 분별력으로 판독에 어려움이 있으며, 계통발생학적으로 연관성이 있는 축종감별을 위해서는 두 가지 이상의 제한효소가 필요한 경우가 많으며 PCR 증폭산물의

절단에 요구되는 제한효소 온도가 각기 달라서 큰 비용과 많은 시간이 소요되는 단점이 있지만 다양한 야생 동물종을 감별할 수 있는 연구가 이루어졌다. 이번 실험에서는 사슴에 대한 특이성 실험과 감별을 위한 primer가 제시되지 않았지만, 우리나라에서도 양육산업이 점차 발전하고 있어 감별 기술이 필요할 것으로 생각한다.

사슴에 대한 감별은 우리나라에서 민 등(1996)이 소와 함께 면양과 산양에 대해서 RAPD 방법을 적용하여 소와 사슴은 감별하였지만, 사슴이 면양과 산양에 대해서는 차이점이 나타나지 않았다. Rastogi 등(2007)은 RAPD 방법으로 mt DNA와 핵 내 DNA 활용성의 비교 실험에서 mt DNA가 효과적이라고 보고하였고, Calvo 등(2000)은 돼지, 닭, 오리, 칠면조 그리고 거위를 감별하였고 돼지와 오리고기의 혼합육과 닭고기와 오리고기의 혼합육에 대해서 각 축종을 감별하였다고 보고하였지만, 해상도가 떨어져 쉽게 판독하기 곤란하였으며 실험한 원료육의 DNA 검출한계는 250 pg이었다. 이처럼 RAPD 방법은 가열 처리되거나 혼합된 식육제품의 식육감별이 까다로울 뿐만 아니라 검출한계도 이번 연구에서 보고된 검출한계보다 우수하지 않았다.

Ha 등(2006)은 12S rRNA-tRNA<sup>val</sup>-16S rRNA 부위로 소, 산양, 면양 그리고 사슴을 검출하고 감별하기 위해서 동일한 annealing 온도에서 99~108 bp 범위의 PCR 산물이 증폭되어 가열 처리된 식육에 대해서 감별이 가능하였고, 혼합된 시료에서 검출한계 0.05%이었다. Haunshi 등(2009)은 D-loop 영역의 식용 비둘기 특이 마커(401 bp)를 이용하여 121°C에서 고압 처리된 시료에서 DNA 검출이 가능하였지만, 835 bp를 증폭시키는 돼지고기의 특이 마커는 고압 처리된 시료에서 추출된 DNA를 증폭할 수 없었다. Martín 등(2007a; 2007b)은 가열 처리된 육류에서 추출한 DNA는 저분자 형태로 붕괴되어 있음을 증명하였고, 고양이, 개 그리고 랫트 또는 쥐를 감별하기 위해서 96~108 bp 안의 범위에서 그리고 유전적 근연관계가 가까운 닭, 칠면조, 오리 그리고 거위를 감별하기 위해서 64~122 bp 안의 범위에서 각기 다른 PCR 온도조건에서 12S rRNA 유전자를 증폭하였고 검출한계는 0.1%이었으며, 오리는 64 bp에 불과한 PCR 증폭산물 때문에 primer dimer와 흔히 혼동될 우려가 있었다. 이들 방법은 PCR 산물의 크기의 차이가 몇 bp에 불과하고 PCR annealing 온도가 대부분이 달라 multiplex PCR 방법을 수행하기에는 곤란하였다. 이번 연

구에서는 multiplex 방법으로 닭, 칠면조, 오리, 거위 그리고 칠면조를 동시 감별하기 위해서 PCR 증폭산물의 크기의 적절한 배분과 일정한 annealing 온도가 되도록 primer를 설계하여 효율적으로 축종을 감별하였다(Table 1).

그리고 오리, 칠면조 그리고 거위로부터 닭을 감별하기 위해 Table 1에 제시한 Chicken12S-171F primer의 5'말단에 CAACAG를 추가하고 3'말단에 네 개의 연속된 cytosine 염기 중 한 개를 adenine으로 교체(CCCC→CCaC)하여 설계함으로써 증폭산물의 크기가 171 bp에서 175 bp로 증가하고 Chicken12S-R primer와 상보적인 염기서열을 변화시킴으로써 비특이 반응도 억제할 수 있었다(자료 미제시). 이번 연구에서 제시된 PCR 증폭산물의 크기는 multiplex PCR을 실시한 후 증폭산물을 확인하기 위해 아가로스겔을 사용하기에는 변별력이 떨어져 자동모세관 전기영동 장치(Qiagen, USA)를 이용하였다. 이번 실험에서 multiplex PCR 방법으로 소와 닭의 검출한계는 Martín 등(2007a)이 보고한 닭고기 검출한계 0.1%와 같았지만 Ha 등(2006)의 소고기 검출한계 0.05%보다는 떨어지는 수준이었다. 이번 연구에서 multiplex PCR 방법으로 돼지고기의 DNA를 1 pg/μl까지 검출하였는데 Tanabe 등(2007)이 보고한 *cyt b* 유전자를 singleplex PCR 방법으로 검출한 수준과 같았다.

오리에 특이적인 forward primer인 Duck-1837Fc (Table 1)의 밑줄 쳐진 이탤릭체의 C 염기는 원래 G 염기로서 3개가 연이어 있어서 변형하지 않은 primer로 PCR을 수행하면 같은 종에서 175 bp의 비특이 절편(자료 미제시)이 증폭되어 이를 제거하기 위해서 PCR annealing 온도를 변경하였으나 효과가 없었다. 하지만 본래의 G 염기를 C 염기로 변경한 primer로 실험하면 이 문제점이 해소되었으며 Fig. 2H에서처럼 다른 축종에서 교차반응이 발생하지 않고 특이적으로 작동하였다.

Dalmasso 등(2004)이 12S rRNA와 16S rRNA 등 mt DNA 유전자의 각기 다른 영역을 이용하여 가열 처리된 제품에서 PCR이 이루어지도록 300 bp 이하의 크기로 primer를 디자인하여 사료에 사용된 반추류(소, 산양 그리고 면양), 가금(닭, 칠면조), 돼지 그리고 어류 성분을 동시에 검출하였다. 이 방법은 소해면상뇌증을 예방하기 위해 사료에 사용 금지된 축종과 식육제품의 표시사항 검사를 위한 1차 검색에 유용한 방법으로 생각한다. 이들이 개발한 multiplex PCR 방법은 소, 산양 그리고 면양의 감별이 불가능하며,

닭과 칠면조 역시 구분되지 않아 정확한 축종 감별을 위해서는 추가적인 실험이 필요하다. 따라서 정확한 축종 감별을 위해서는 Martín 등(2007a)이 제시한 가금류 4종과 이번 연구에서 개발한 소, 면양, 산양을 감별할 수 있는 PCR 방법을 병용한다면 식육제품에 사용된 동물종을 신속하고 정확하게 확인할 수 있을 것으로 생각한다. Matsunaga 등(1999)은 *cyt b* 염기서열 부위로 multiplex PCR 방법으로 여섯 가지 축종(소, 면양, 산양, 돼지, 닭 및 말)을 동시에 감별하였고, 민감도는 0.25 ng 수준으로 이번 연구 결과보다 우수하지는 않았다. Haunshi 등(2009)이 보고했던 것처럼 Matsunaga 등(1999)도 120°C에서 30분간 가열 처리된 시료 중 말의 439 bp PCR 산물은 증폭되지 않았다. 이번 연구결과에서 말의 PCR 증폭산물은 467 bp로 가열 처리육에 대한 민감도 실험은 이루어지지 않았으나 이들과 같은 결과가 예측된다. Xu 등(2008)은 Matsunaga 등(1999)이 제시한 방법을 응용한 multiplex 방법을 제시하여 산양을 제외한 다섯 가지 축종을 감별하였고 혼합육의 검출한계는 이번 연구의 결과와 비슷한 0.1% 수준이었고, 이들의 민감도는 0.1 ng으로 축종별로 우리의 결과와 유사하거나 민감하지 못했다.

이번에 개발된 PCR 방법으로 국내에서 유통되는 제품에 대한 표시사항 검증이 이루어져 식육의 유통과 축산물 가공산업에서 저가의 육류를 부정하게 혼합하여 제조하는 것을 방지함으로써 유통구조를 개선하고, 식품에 대한 올바른 정보가 제공되어 소비자의 신뢰를 확보할 수 있을 것으로 생각한다.

## 결 론

소 등 10개 동물종을 감별하기 위해 mt DNA 유전자에 존재하는 핵산 염기서열의 변이에 근거한 종 특이적인 PCR 방법과 여러 가지 동물종을 감별할 수 있는 multiplex PCR 방법을 개발하였고 소와 돼지 또는 닭고기를 혼합하여 가열 처리된 분쇄육에 대한 multiplex PCR 방법이 성공적으로 적용되었다.

1. 종 특이적인 primer를 이용하여 소 190 bp, 면양 219 bp, 산양 350 bp, 말 467 bp, 개 241 bp, 돼지 119 bp, 닭 171 bp, 오리 229 bp, 거위 111 bp 그리고 칠면조 268 bp의 각각 다른 크기의 PCR 산물이 증폭되도록 singleplex PCR 방법을 개발하였다.

2. 소, 돼지, 닭 그리고 오리를 동시 감별할 수 있

는 BSGA multiplex PCR 방법과 닭, 오리, 거위 그리고 칠면조를 감별할 수 있는 GAAM multiplex PCR 방법을 개발하였다.

3. BSGA multiplex PCR 방법을 통한 축종별 최소 검출가능 범위는 소와 닭은 100 fg/μl까지, 돼지와 오리는 1 pg/μl까지 확인이 가능하였으며, IPC는 1 fg/μl까지 검출할 수 있었다.

4. BSGA multiplex PCR 방법으로 원료육과 가열 처리된 분쇄 혼합육에서 소와 닭고기의 검출한계는 0.1%이었고, 돼지고기의 검출한계는 0.1~1.0% 범위 이었다.

이번 연구에서 개발된 PCR 방법은 식육제품을 가공·제조하는 생산자의 실험실 품질 관리와 축산식품의 표시사항에 대한 허위 기재, 비의도적으로 표시 오류 그리고 저가의 육류를 부정하게 혼합한 제품 등에 대한 검증에 활용되어 소비자의 신뢰를 확보하는데 유용한 검사법이 될 것이다.

### 감사의 글

이번 연구는 광주광역시보건환경연구원의 2008년도 연구사업 지원으로 수행되었습니다.

### 참 고 문 헌

농림수산물검역검사본부. 2011. 축산물의 가공기준 및 성분규격. 농림수산물검역검사본부 고시 제 2011-105호.

민중석, 민병록, 한재용, 이무하. 1996. RAPDs를 이용한 육류(한우육, 사슴육, 면양육, 산양육)의 축종 판별. 한국동물자원과학회지 38: 231-238.

박종근, 신기현, 신성철, 정구용, 정의룡. 2007. 미토콘드리아 12S rRNA 유전자의 종 특이적 PCR-RFLP fingerprint를 이용한 식육 원료의 판별. 한국축산식품학회지 27: 209-215.

Ballin NZ. 2010. Authentication of meat and meat products. Meat Science 86: 577-587.

Bottero MT, Dalmaso A. 2011. Animal species identification in food products: evolution of biomolecular methods. Vet J 190: 34-38.

Calvo JH, Zaragoza P, Osta R. 2001. Random amplified polymorphic DNA fingerprints for identification of species in poultry pâté. Poult Sci 80: 522-524.

Dalmaso A, Fontanella E, Piatti P, Civera T, Rosati S, Bottero MT. 2004. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. Mol Cell Probes 18: 81-87.

DiMauro S. 2007. Mitochondrial DNA Medicine. Biosci Rep 27: 5-9.

Fajardo V, González I, López-Calleja I, Martín I, Hernández PE, García T, Martín R. 2006. PCR-RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and goat (*Capra hircus*). J Agric Food Chem 54: 1144-1150.

Fajardo V, González I, Rojas M, García T, Martín R. 2010. A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. Trends in Food Science & Technology 21: 408-421.

Felmer R, Sagredo B, Chávez R, Iraira S, Folch C, Parra L, Catrileo A, Ortiz M. 2008. Implementation of a molecular system for traceability of beef based on microsatellite markers. Chilean J Agric Res 68: 342-351.

FSIS. 2005. Laboratory guidebook. Identification of animal species in meat and poultry products. <http://www.fsis.usda.gov/Ophs/Microlab/MIg17.02.pdf>.

Girish PS, Anjaneyulu AS, Viswas KN, Santhosh FH, Bhilegaonkar KN, Agarwal RK, Kondaiah N, Nagappa K. 2007. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of mitochondrial 12S rRNA gene: a simple method for identification of poultry meat species. Vet Res Commun 31: 447-455.

Ha JC, Jung WT, Nam YS, Moon TW. 2006. PCR identification of ruminant tissue in raw and heat-treated meat meals. J Food Prot 69: 2241-2247.

Haunshi S, Basumatary R, Girish PS, Doley S, Bardoloi RK, Kumar A. 2009. Identification of chicken, duck, pigeon and pig meat by species-specific markers of mitochondrial origin. Meat Science 83: 454-459.

Lanzilao I, Burgalassi F, Fancelli S, Settimelli M, Fani R. 2005. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial *cytb* gene from species of dairy interest. J AOAC Int 88: 128-135.

Laube I, Spiegelberg A, Butschke A, Zagon J, Schauzu M, Kroh L, Broll H. 2003. Methods for the detection of beef and pork in foods using real-time polymerase chain reaction. Food Sci Technol Int 38: 111-118.

Martín I, García T, Fajardo V, López-Calleja I, Rojas M, Pavón MA, Hernández PE, González I, Martín R. 2007a. Technical note: detection of chicken, turkey, duck, and goose tissues in feedstuffs using species-specific polymerase chain reaction. J Anim Sci 85(2): 452-458.

Martín I, García T, Fajardo V, Rojas M, Hernández PE, González I, Martín R. 2007b. Technical note: Detection of cat, dog, and rat or mouse tissues in food and animal feed using species-specific polymerase chain reaction. J Anim Sci 85: 2734-2739.

Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R, Muroya S, Shibata K, Yamada Y, Shimura, Y. 1999. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. Meat Science 51: 143-148.

Montiel-Sosa JF, Ruiz-Pesini E, Montoya J, Roncalés P,

- López-Pérez MJ, Pérez-Martos A. 2000. Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. *J Agric Food Chem* 48: 2829-2832.
- Pfeiffer I, Burger J, Brenig B. 2004. Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and deer by PCR-RFLP. *BMC Genet* 5: 30.
- Rastogi G, Dhame MS, Walujkar S, Kumar A, Patole MS, Shouche YS. 2007. Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. *Meat Science* 76: 666-674.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold spring harbor laboratory press, New York.
- Tanabe S, Miyauchi E, Muneshige A, Mio K, Sato C, Sato M. 2007. PCR method of detecting pork in foods for verifying allergen labeling and for identifying hidden pork ingredients in processed foods. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 1663-1667.
- Tobe SS, Linacre AM. 2008. A multiplex assay to identify 18 European mammal species from mixtures using the mitochondrial cytochrome b gene. *Electrophoresis* 29: 340-347.
- Wolf C, Rentsch J, Hübner P. 1999. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: A reliable method for species identification. *J Agric Food Chem* 47: 1350-1355.
- Xu W, Bai W, Luo Y, Yuan Y, Zhang W, Guo X, Huang K. 2008. A novel common single primer multiplex polymerase chain reaction (CSP-M-PCR) method for the identification of animal species in minced meat. *J Sci Food Agric* 88: 2631-2637.