

Real-Time PCR과 Internal Standard Addition법을 이용한 돼지고기 소시지에 혼합된 닭고기의 정량

이남례 · 주재영 · 여용헌

국방기술품질원

Use of Real-Time PCR and Internal Standard Addition Method for Identifying Mixed Ratio of Chicken Meat in Sausages

Namrye Lee, Jae-Young Joo, and Yong-Heon Yeo

Combat Material Center, Defence Agency for Technology and Quality

ABSTRACT This study examined how much chicken meat was in sausage made with pork. Both real-time polymerase chain reaction (PCR) and internal standard addition were used. Fifty ng of chicken DNA was added to the sausages as an internal standard. The addition of standard DNA increased the amplification efficiency of PCR and confirmed the possibility of quantitative analysis. A QIAamp DNA Micro Kit was used to improve the DNA recovery and amplification efficiency. The density of template DNA and primer were suitable for 3.0~5.0 μ L and 0.5 μ L, respectively. Each DNA of pig and chicken was diluted in 10-fold from steps 50 ng to 0.05 ng. The detection limit of both pig and chicken meat was more than 0.05 ng and the correlation coefficient of the standard curve was at least 0.98. The result of the quantitative analysis after heat treatment of 3 samples of pigs and chickens mixed at 70:30 showed a 5.7% difference (64.3:35.7) between the expected value and measured value. The quantitative value was changed by affecting the DNA according to the heat treatment (70°C, 10 min). An analysis of the pork and chicken content in sausages showed that it was difficult to detect chicken meat and the quantitative value of DNA according to the Ct value was very low. On the other hand, when adding standard material (50 ng of chicken DNA) to the sausages, the Ct value decreased gradually with increasing chicken mixing ratio. Thus, the mixing ratio of chicken in sausages could be estimated.

Key words: gene analysis, sausage, internal standard addition, real-time PCR

서 론

우리나라는 1970년대 이후 지속적인 경제성장과 식생활의 서구화 및 외식산업의 발달로 육류의 소비량이 크게 증가하면서 오늘날 육류는 국민 식생활에 빼놓을 수 없는 중요한 식품으로 인식되고 있다(1). 농림축산식품부(2)의 보고에 의하면 한국의 연간 1인당 육류 소비량은 51.3 kg으로 2009년의 36.8 kg보다 39.4% 증가했다. 특히 돼지고기의 소비량은 24.4 kg으로 가장 높았고, 이어 닭고기(15.4 kg) 및 쇠고기(11.6 kg) 순으로 조사되었다. 육류 소비량은 현대인의 식생활 문화에 많은 영향을 주어 가정에서 직접 요리하기 보다는 외식 위주의 식사 또는 가공식품 등을 이용하는 경향이 점차 높아지고 있으나, 이를 이용한 이중 혼합식품 또는 가짜식품이 난무하면서 사회적으로 큰 문제가 되고 있다(3). 이중 혼합식품 또는 가짜식품 등을 가공하거나 처리하였을

경우 외관이나 관능적 방법으로는 원재료의 판별이 거의 불가능하기 때문에 원재료의 정확한 표시와 소비자들의 신뢰성을 확보하기 위해서는 이를 객관적으로 검증할 수 있는 과학적인 판별기술이 매우 필요하다. 그동안 식육 및 원재료의 다양화 및 세분화로 이들 종을 판별할 수 있는 기술로서 면역효소측정법(4,5), 크로마토그래피(6), 등전점 전기영동법(7) 및 GC, LC, HPLC(8,9) 등을 이용한 다양한 방법들이 시도되어 왔다. 그러나 이들 방법들은 단백질 조성 및 구조적 차이에 의한 종 특이적 단백질(species-specific protein)을 검출하는 방법으로써 이중 간의 식별은 가능하나 동종 간의 판정은 사실상 불가능하였다. 특히 원재료를 분쇄하여 혼합한 가공식품의 경우 단백질의 생물학적 특성이 사라지고 고압살균, 화학처리 및 발효작용 등과 같은 가공공정을 거치는 동안 수용성 단백질 및 특이적 항원의 변성으로 종판별은 더욱 어렵다는 문제점이 있었다(10,11).

1990년대 이후 분자생물학의 급속한 발달로 생물종이 가지고 있는 고유한 유전자 정보를 분석하는 분자유전학적 기법이 식육에 도입되면서 종 특이적 DNA 염기서열 차이로 인한 종판별이 가능해져 종래 단백질 수준에서의 한계점을

Received 17 March 2017; Accepted 14 August 2017

Corresponding author: Namrye Lee, Combat Material Center, Defence Agency for Technology and Quality, Daejeon 35409, Korea
E-mail: nrlee@dtaq.re.kr, Phone: +82-42-580-1064

극복할 수 있는 계기가 되었다. 특히 PCR(polymerase chain reaction)을 이용한 DNA 검출법은 시료로부터 극소량의 DNA를 추출한 후, 종 특이적 프라이머(species specific primer)를 사용해 원하는 부위의 특정 유전자를 단 시간 내에 증폭할 수 있어 국내외적으로 동식물의 유전분석 및 종판별 등에 다양하게 활용되어 왔다(12-19). 종 특이적 프라이머를 이용한 PCR 검출법은 종간 또는 종내에 따라 특이성이 높은 DNA 염기서열만을 탐색한 후 이 부위를 프라이머로 설계 및 합성하고, 시료로부터 충분한 DNA만 확보하면 검출이 가능하다(20,21). 그러나 가공식품의 경우 DNA는 단백질에 비해 매우 안정적이나 가공과정 중에 세포에 포함된 DNA가 많이 손상되어 표적 유전자(target gene)에 대한 PCR 증폭 결과의 재현성을 기대하기 어려우므로 가공시료의 DNA 추출법, DNA 농도 및 PCR 증폭조건 등을 최적화시키는 기술이 필요하다(15,16,21,22). 최근 PCR과 분광형광광도계를 일체화시킨 real-time PCR 기술이 개발되었다(23). 기존 PCR은 증폭을 수행한 후 전기영동으로 확인이 필요한 반면, real-time PCR은 이러한 과정이 없이도 증폭되는 과정마다 증폭산물의 양을 실시간 측정 및 확인할 수 있어 신속·간편하게 분석 결과를 얻을 수 있고, 오염의 위험이 낮아 real-time PCR을 많이 선호하고 있는 추세이다(24). Ct(threshold cycle)값의 비교로 정량분석을 실시하는 real-time PCR은 초기 DNA 양이 많을수록 증폭곡선이 빨리 나타나고 단계적으로 희석한 표준시료에 대해 증폭곡선을 얻게 된다. 반응을 일으키는 최소 threshold를 설정하면 threshold와 증폭곡선이 교차하는 지점으로 Ct값으로 산출한다. Cycle이 진행됨에 따라 유전자가 지수적으로 증가하며, 이론적으로 유전자 간 10배 차이가 날 때 약 3.3 cycle(Slope -3.3)의 Ct값의 차이가 생기며 시료와 표준물질과의 Ct값의 비교로 정량분석을 실시한다. Krcmar와 Rencova(25)는 사료와 어분에 함유된 동물종의 정량을 위해 real-time PCR을 통해 분석을 실시하고 이에 대한 가능성을 제시한 이후, 정량분석에 대한 연구가 점차 활발히 진행되고 있다(26-29). 특히 국내의 경우 Chung 등(12)과 Kim 등(30)이 생육과 열처리된 식육에서 동물종의 특이적 식별을 위해 real-time PCR을 이용해 정량분석을 실시한 바 있다. 그러나 아직 실제 가공식품을 적용한 정량분석은

DNA 농도, 순도 및 PCR 증폭효율 등 기술적 한계로 인해 현재까지 초기 연구에 머물고 있는 실정이다. 본 연구에서는 돼지고기 위주로 제조된 소시지에 저가 원료인 닭고기의 혼합 여부를 판별하기 위한 real-time PCR 정량법과 internal standard addition법을 적용하였으며, 향후 닭고기 외의 타 원료에 대한 정량분석의 기초자료를 제시하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

DNA 회수율을 비교하기 위한 가공되지 않은 표준시료(생육)로서 돼지고기와 닭고기는 식재료 마트에서 조식시료를 각각 구입하여 사용하였다. 소시지 제조용 돼지고기(후지)와 돈지는 SK 축산(Nonsan, Korea)에서, 계육은 하림(Iksan, Korea)에서 구매하였으며 첨가물은 비에치푸드(주)(Gunpo, Korea)를 통해 구입하였다. 돼지고기는 돈지 함량에 따른 차이를 최소화하기 위해 후지 외벽에 부착된 돈지를 0 mm로 제거한 후 돈지를 10%로 일괄 투입하였고, 돈지와 첨가물 및 가수에 의한 영향을 최소화하기 위해 모든 시료에 동량으로 첨가하여 Table 1에 따라 혼합비율에 맞게 그릭슈바인(Seocheon, Korea)에서 제조하였다. 첨가물은 정제소금(HanJusalt Co., Ltd., Ulsan, Korea), 아질산나트륨(General Chemicals, Parsippany, NJ, USA), 인산염(AdityaBirla Chemicals, Mumbai, India), 카제인나트륨(Lactoprot Deutschland GmbH, Kaltenkirchen, German), 대두단백(Archer Daniels Midland, Chicago, IL, USA), L-아스코르빈산나트륨(Zhejiang Jiangshan Chemical Co., Ltd., Shanghai, China), 백설탕(TS Corp., Seoul, Korea), L-글루타민산나트륨(CJ Cheiljedang Corp., Incheon, Korea), 바이오핵산아이지(CJ Cheiljedang Corp.), 미트프로엠(Miteck Korea, Chungbuk, Korea), 솔빈산칼륨(Ningbo Wanglong Technology Co., Ltd., Guangdong, China)을 사용하였다.

DNA 추출키트 선정 및 real time PCR 증폭조건 설정

가공식품은 공정과정 중에 다수의 물리적 또는 화학적 처

Table 1. Composition of sausage samples mixing pork and chicken

Items	Treatments				
	F1	F2	F3	F4	F5
Pork meat (w/w%)	70	65	60	50	40
Pork fat (w/w%)	10	10	10	10	10
Chicken (w/w%)	0	5	10	20	30
Food additives (w/w%) ¹⁾	6.667	6.667	6.667	6.667	6.667
Cold water (v/v%)	13.333	13.333	13.333	13.333	13.333
Total	100	100	100	100	100

¹⁾ Refined salt 1.5%, meatprom 1.5%, sodiumpolyphosphate 0.3%, sodium caseinate 0.5%, soy protein 1.677%, L-ascorbic acid sodium salt 0.05%, white sugar 0.8%, monosodiumglutamate 0.15%, disodium 5-fibonucleotide 0.01%, sodium nitrite 0.01%, potassium sorbate 0.18%.

Table 2. Amplification and optimum condition of real time PCR

Item	Amplification condition	Optimum condition
Template DNA (μL)	1.0, 3.0, 5.0	3.0~5.0
PCR cycles	35, 40, 45	40
PCR solution (μL)	15, 20, 25	20
Primer conc. (10 pmol/ μL)	1.0, 0.5, 0.3	0.5
Annealing/Extension temp ($^{\circ}\text{C}$)	55.0~68.0	62/68
Extension time (s)	33, 40, 60	33

리 등으로 세포가 파괴되어 있을 가능성이 높으므로 가공공정을 거친 시료에서 추출된 DNA는 농도가 낮거나 변성될 가능성이 높고, 또한 추출된 DNA는 각종 첨가제가 포함되어 있어 PCR 증폭과정 중에 저해요소(inhibitor)로 작용할 우려가 높아 실제 DNA 분석에 제한사항이 있을 수 있다. 따라서 시료로부터 DNA 회수율과 PCR 증폭효율을 최대한 높이기 위해서 DNA 추출키트 및 증폭조건을 설정해야 한다. 두 종류의 DNA 추출 키트인 QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)과 HiGene Genomic DNA Prep Kit(Solgent, Daejeon, Korea)을 사용해 각 가공제품에서 추출된 DNA 농도와 순도를 비교하였다. 또한, PCR 증폭조건을 최적화를 위해 Table 2와 같이 7500 real-time PCR system(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하여 template DNA 양, PCR cycle, PCR 반응 조성액, Primer 농도, Annealing 온도, Extention 시간 등을 종합적으로 고려하여 이 중에서 가장 최적화된 조건을 선택하였다.

종 특이적 프라이머 설계

종 특이적 프라이머 설계를 위해 NCBI GenBank(www.ncbi.nlm.nih.gov)에 등록되어 있는 미토콘드리아 DNA(mtDNA), 핵 및 엽록체 DNA에 포함된 유전자에서 해당종의 염기서열 정보를 검색한 후, ClustalW2-Multiple Sequence Alignment를 이용해 염기서열 부위 중에서 종 특이성이 높은 부분만을 선정하여 비교하였다. 또한, 가공식품의 특성을 고려하여 PCR 증폭산물의 크기를 가급적 200 bp 내외로 프라이머를 설계하여 Primer-BLAST를 통해 다른 종과의 교차여부를 확인하였다. 내재유전자(internal positive control, IPC)는 돼지, 닭에 공통으로 대응하도록 16S rRNA의 공통부위를 프라이머로 설계 및 합성하였다(Table 3).

Table 3. Species specific primer information used in this study.

Item	Genes	F/R	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)	Tm ($^{\circ}\text{C}$)
Pig	FGF4	F	CAGGATGGAAAGTAACCCCTGTC	132	62
		R	GAGGCAACTTTTGACTGGCTA		
Chicken	Repeat-containing protein 2-like	F	CTGGGTTGAAAAGGACCACAGT	165	62
		R	GTGACGCACTGAACAGGTTG		
IPC	16S rRNA	F	AGTGACGAAAAATAACAATACAGGA	110	62
		R	GCTGCTGGCACCAGACTT		

시료로부터 DNA 추출

소시지 내 육류가 골고루 산재되도록 믹서기로 완전히 분쇄 및 혼합한 후, 소시지에 포함된 염분 및 양념 등의 저해물질을 제거하기 위해 deionized water로 1~2일간 여러 번 세척하였다. 이렇게 처리된 소시지와 가공되지 않은 표준시료(생육)는 QIAamp DNA Micro Kit의 매뉴얼을 참고하여 DNA를 추출 및 정제하였다. 추출된 DNA는 분광광도계(NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)를 이용하여 230 nm, 260 nm, 280 nm에서 각각 흡광도를 측정하였고, 정량된 DNA는 실험 전까지 냉동 보관하였다. 또한, 돼지고기와 닭고기를 각각 70:30 비율로 혼합하고 70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 가열한 후, 가공시료와 정량값에 대한 차이를 비교하기 위해 상기와 같은 방법으로 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 10 ng/ μL 농도로 정량하여 실험에 사용하였다.

Real-time PCR 증폭산물에 대한 종 특이도 및 민감도 검증

대상 종에 따라 특이적으로 설계된 프라이머가 정확히 생성되는지와 다른 종과의 교차반응 여부를 확인하기 위해 종 특이적 프라이머로 real-time PCR 증폭을 수행한 후, 증폭산물은 TBE buffer(90 mM Tris-borate, 2 mM EDTA, pH 8.0)가 함유된 2% agarose gel로 100 V 정전압에서 약 1시간 전기영동 하였다. Size marker로는 100 bp DNA ladder를 같이 loading 하였고, 전기영동 완료된 이후, GelRed로 염색하고 Gel Image Analyser 상에서 각 종에 따른 특이적 DNA 검출 여부를 확인하였다. 또한, real-time PCR 증폭을 통해 대상 종에 대한 증폭곡선을 확인하였다. 민감도 검증을 위해 돼지와 닭 DNA를 50 ng, 5.0 ng, 0.5 ng 및 0.05 ng으로 각각 10배씩 희석한 template DNA를 차등적으로 적용해 real-time PCR로 증폭하여 민감도(최소 검출한계)를 확인하였다. 결과의 신뢰성을 높이기 위해 3반복 실험을 실시하였다. 통계처리는 각 항목에 따른 실험결과를 SPSS 프로그램(IBM SPSS Statistics 20, Chicago, IL, USA)을 이용하여 처리하였으며 DNA 농도에 따른 민감도는 일원배치 분산분석으로 처리하였고, $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 시료 간의 유의성을 검정하였다.

혼합비율 계산

혼합비율의 계산은 Drummond 등(31)이 보고한 산출계

Table 4. Comparison test of DNA extraction kit

Sample	Kit	Concentration (ng/μL)	Purity	
			260/280 nm	260/230 nm
Viena sausage (Dongwon)	Qiagen	59.1	1.98	1.12
	Solgent	15.9	1.88	0.57

산식을 근거로 하여 산출하였다.

결과 및 고찰

DNA 추출키트 선정

제조사가 다른 소시지(Dongwon F&B, Jincheon, Korea)에 대한 두 종류의 DNA 추출 키트(QIAamp DNA Micro Kit, HiGene Genomic DNA Prep Kit)를 사용해 각 가공제품에서 추출된 DNA 농도와 순도를 비교한 결과는 Table 4와 같다. Table 4에서 보는 바와 같이 Qiagen이 Solgent에 비해 DNA 회수율이 43.2 ng/μL 더 높고 순도(260/280, 260/230) 또한 다소 높거나 또는 유사한 정도로 확인되어 Qiagen을 사용하였다.

표준시료로부터 추출된 DNA 농도 및 순도

표준시료로 사용하기 위해 돼지고기와 닭고기의 조직을 각 25 mg씩 채취하여 DNA를 추출한 후, 분광광도계를 사용해 추출된 DNA 농도와 순도를 측정하였다. 돼지의 DNA 농도는 65 ng/μL였고 단백질 오염도(260/280)는 1.83이며 저해물질 정도를 나타내는 순도(260/230)는 0.98이었다. 닭의 경우 DNA 농도는 72 ng/μL였고 단백질 오염도(260/280)는 1.92이며 저해물질 정도를 나타내는 순도(260/230)는 0.96이었다(data not shown). 분광광도계로 측정할 경우 DNA는 260 nm, 단백질 280 nm, 염과 유기용매는 230 nm에서 파장이 흡수되기 때문에 260/280 값과 260/230 값으로 DNA의 순도를 확인할 수 있고, 260/280 측정치가 1.8~2.0 이상일 경우 순도가 높다고 판단할 수 있다. 본 실험에서도 돼지와 닭의 DNA 농도가 높고 단백질 오염도도 1.83과 1.92로 나타나 표준시료의 DNA 순도가 높다고 볼 수 있다.

소시지에서 추출된 DNA 농도 및 순도

Table 1과 같이 제조한 소시지 각 5점에 대해 QIAamp DNA Micro Kit으로 DNA를 각각 3반복 추출하여 혼합한 후, DNA 평균 농도와 순도를 각각 측정하였다(Table 5). 소시지 혼합시료에 따라 측정된 DNA 농도는 29.78~182.49 ng/μL(평균 88.12 ng/μL)였고, DNA 순도(260/280)는 모두 기준치보다 높은 1.9 이상의 값을 보였으며, 저해물질과 관련된 순도(260/230)에서도 평균 1.38로 매우 양호한 편이었다. 소시지 시료에서 DNA를 추출하기 전에 믹서기로 완전히 분쇄 및 혼합시킨 후, 세 부위를 임의로 채취해 DNA

Table 5. DNA concentration and purity of DNA extracted from samples

Samples ¹⁾	Concentration (ng/μL)	Purity	
		260/280 nm	260/230 nm
F1	182.49	1.99	2.12
F2	56.24	2.12	1.15
F3	59.93	2.07	1.11
F4	31.84	2.33	0.82
F5	29.78	2.20	0.81
Average	88.12	2.14	1.38

¹⁾Samples are the same as in Table 1.

를 추출했음에도 불구하고 시료에 따라 DNA 농도에 차이가 있는 원인은 소시지 제조 시 물리적·화학적 처리를 거치는 동안 시료에 따라 DNA가 포함된 세포의 파괴된 정도가 다르고, 처리된 원료를 배합하거나 또는 케이싱 처리 시 농도가 골고루 분포되어 있지 않을 경우 DNA 농도에 영향을 주는 것으로 판단된다. Nesvadbova 등(32)은 동일한 소시지 8개에서 각각의 DNA를 추출하고 농도를 측정된 결과에서도 소시지에 따라 최소 9.7 ng/μL에서 최대 751.6 ng/μL 까지 차이가 있었음을 보고하였다. Lee 등(33)도 옥수수 원료와 가공원료에 대해 DNA 추출 효율을 비교한 결과에서도 열에 노출된 시간 및 온도에 따라 DNA의 변성에 많은 영향을 주었음을 확인한 바 있다.

Real-time PCR 증폭조건

가공식품은 공정과정을 거치면서 물리적·화학적 처리 등으로 인해 조직세포가 파괴되어 정제된 DNA를 이용하여 PCR을 실시하더라도 주형 DNA가 파괴될 가능성이 높고, 첨가물에 의한 PCR 저해물질이 증폭에 미치는 영향이 매우 크다고 알려져 있다(14,34,35). 소시지에서 추출된 DNA를 이용하여 PCR 증폭효율을 최대한 높이기 위해서는 증폭조건에 대한 테스트가 먼저 선행되어야 한다. 최적화된 PCR 반응액 및 증폭조건을 확인한 결과 최종 PCR 반응액 20 μL에 template DNA(5~10 ng/μL)는 3.0~5.0 μL, primer 농도는 0.5 μL(10 pmol), 2× Cybrgreen buffer는 10 μL로 조정하였을 때 가장 적합하였고, PCR 증폭조건은 annealing 온도를 62°C, extension 온도를 68°C, final extension 시간은 33초, 최종 PCR cycle은 40 cycle로 했을 때 가장 PCR 증폭효율이 좋은 것으로 평가되었다(data not shown).

Real-time PCR을 이용한 종 특이성 검증

돼지고기와 닭고기에서 추출된 DNA를 일정한 농도(10 ng/μL)로 각각 균질화한 후, real-time PCR로 증폭하여 종 특이성을 검증하였다. 종 특이적 프라이머로 증폭하였을 때 PCR 증폭산물, 증폭곡선 및 비특이적인 증폭산물이 생성되는지 여부를 확인하기 위해 real-time PCR 증폭을 수행한 후 증폭곡선을 확인하였고, 또한 agarose gel 전기영동을 통해 증폭된 DNA를 각각 확인하였다(Fig. 1, 2). Agarose gel 상

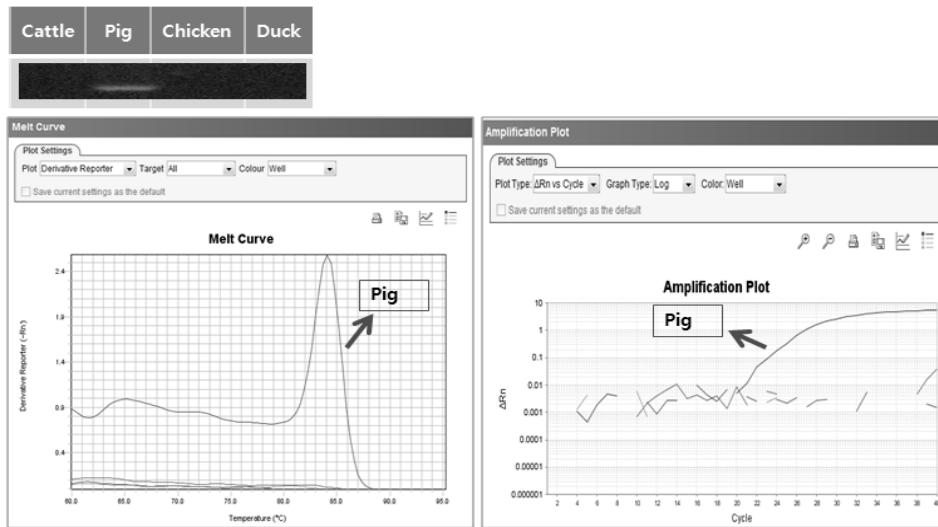


Fig. 1. Specificity test using species specific primers of pig.

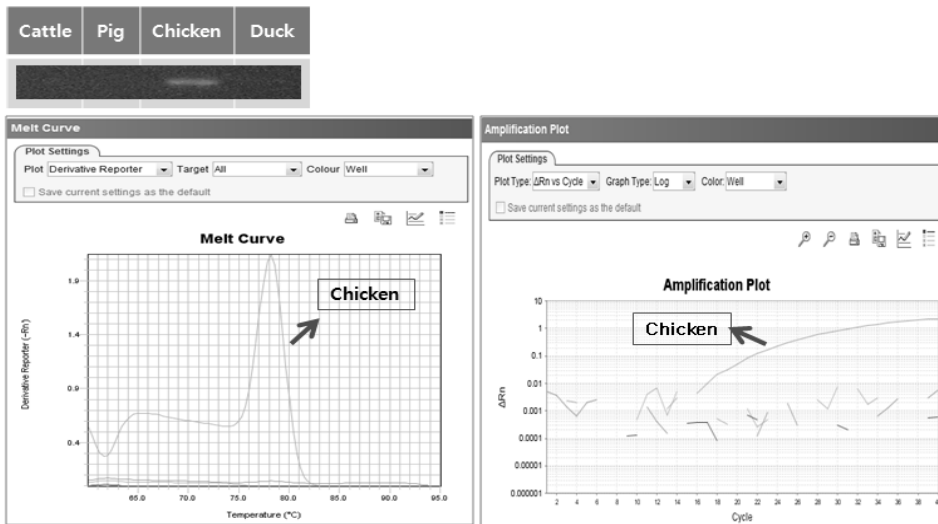


Fig. 2. Specificity test using species specific primers of chicken.

에서 PCR 증폭산물을 확인한 결과 해당되는 종에서만 DNA가 검출되었고, 비특이적 증폭산물은 확인되지 않았다. 또한, real-time PCR 반응에서도 종 특이적 프라이머에서만 증폭곡선이 확인되었고, 비교 종에 대해서는 증폭곡선이 나타나지 않아 서로 간에 교차반응은 없는 것으로 확인하였다.

Real-time PCR을 이용한 민감도 검증

민감도 검증을 위해 돼지고기와 닭고기의 DNA를 50 ng, 5.0 ng, 0.5 ng 및 0.05 ng으로 각각 10배씩 희석한 template DNA를 차등적으로 적용해 real-time PCR로 증폭하여 민감도(최소 검출한계) 테스트를 실시하였다(Table 6). 결과의 신뢰성을 높이기 위해 3반복하여 실험을 진행하여 최소 검출한계를 확인한 결과 0.05 ng으로 확인되었다. 50 ng, 5.0 ng, 0.5 ng 및 0.05 ng의 DNA에 대한 Ct 값은 돼지는 20.10, 22.35, 26.08 및 31.01로 나타났고 닭은 11.87,

Table 6. Sensitivity tests and Ct values for pork and chicken

DNA concentration (ng/μL)	Ct values	
	Pork	Chicken
50	20.10±0.02 ^d	11.87±0.01 ^d
5.0	22.35±0.01 ^c	15.10±0.00 ^c
0.5	26.08±0.02 ^b	18.67±0.01 ^b
0.05	31.01±0.03 ^a	22.48±0.01 ^a

All values represent mean±SD (n=3). Values with different letters (a-d) within a column are significantly different ($P<0.05$).

15.10, 18.67 및 22.48이었다. Ct값을 이용한 표준곡선의 결정계수(R^2)는 돼지고기 0.999, 닭고기는 0.995로 나타나 표준곡선의 linearity가 매우 정량에 적합하였다(Fig. 3).

표준 DNA를 이용한 real-time PCR 정량분석

표준 DNA를 일정한 비율로 혼합하였을 때 혼합비율에

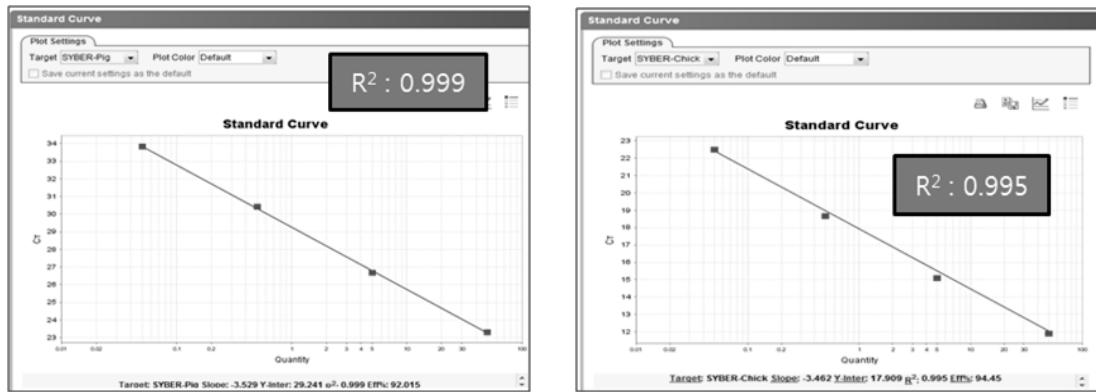


Fig. 3. Standard curves of pig and chicken.

따라 DNA 정량의 차이를 확인하기 위해 돼지고기와 닭고기의 조직에서 추출한 DNA 농도를 20 ng/μL가 되도록 조정 한 후, 닭과 돼지의 혼합비율이 각각 100%+0%, 50%+50%, 30%+70%, 10%+90% 및 0%+100%가 되도록 인위적으로 혼합하여 정량분석을 실시하였다(Table 7). 돼지고기와 닭고기의 DNA를 혼합하지 않았을 경우 Ct값은 전혀 검출되지 않았다. 그러나 닭의 DNA를 100%, 50%, 30% 및 10%로 각각 혼합하여 Ct값을 측정 한 결과 닭의 DNA 함량이 적어 질수록 Ct값은 각각 10.45, 11.33, 13.27 및 14.84로 커졌고 정량값은 상대적으로 낮아졌다. 또한, 돼지의 DNA를 50%, 70%, 90% 및 100%로 각각 혼합하였을 때 Ct값은 각각 22.16, 19.25, 17.79 및 17.75로 나타나 DNA 농도에 따라 Ct값은 변화하였다. 닭과 돼지의 DNA 정량값은 닭은 93, 52, 23 및 8이었고 돼지는 46, 66, 88 및 98로 확인되었다. DNA 정량값으로 혼합비율에 따른 측정치를 산출하여 기대치와 비교한 결과, 닭의 기대치(100%, 50%, 30%, 10%)와 측정치(100%, 53%, 26%, 8%) 간에는 각각 2~4%의 차이만 있었고, 돼지의 기대치(50%, 70%, 90%, 100%)와 측정치(47%, 74%, 92%, 100%) 간에는 2~4%의 차이만 보여 DNA 혼합비율에 의한 정량분석이 가능한 것으로 확인되었다.

가열처리된 시료의 DNA를 이용한 정량분석

돼지고기와 닭고기를 각각 70:30 비율로 혼합하고 70°C에서 10분간 열처리 한 후, 각각 1 g의 시료를 3반복으로 시료를 채취하여 혼합한 다음 DNA를 추출하여 정량분석을 실시하였다(Table 8). 추출된 DNA의 농도와 순도를 확인한 결과 DNA 농도는 106.15 ng/μL, 148.39 ng/μL 및 129.64 ng/μL로 확인되었다(data not shown). 돼지와 닭의 혼합시료 중의 돼지의 Ct값은 25.01, 25.48 및 24.64로 평균 25.04였으며, DNA 정량값은 69, 68 및 70으로 거의 균일하게 나타났다. 닭고기의 Ct값도 24.97, 25.64 및 26.24로 평균적으로 25.62를 보였고, DNA 정량값도 39, 38 및 37로 균일한 분포를 보였다. DNA 정량값을 기준으로 기대치를 산출하였을 때 돼지고기는 64%, 64% 및 65%였고, 닭고기는 36%, 36% 및 35%로 균일한 분포를 보였다. 이러한 결과를 Table 7에 제시한 돼지와 닭의 표준 DNA를 이용한 혼합비(70:30)와 비교한 결과 Ct값은 가열처리에 의해 돼지는 5.79, 닭은 12.35 정도 느린 증폭효율을 보였다. 이러한 결과로 볼 때 생육(raw meat) 또는 가열처리된 시료의 상태에 따라 DNA에 영향을 주어 PCR 증폭효율 및 DNA 정량값에 영향을 주는 것으로 판단되었다. 사골 추출 가공품의 유전자 추출에서도 발효나 숙성 단계가 고유의 유전자를 많이 손실

Table 7. The comparison of Ct and DNA quantification values of pork and chicken using standard DNA

Standard samples	Expected values (%)		Measured values (%)		Ct values		Quantification values (%)	
	Pork	Chicken	Pork	Chicken	Pork	Chicken	Pork	Chicken
1	0	100	0	100	0	10.45	0	93
2	50	50	47	53	22.16	11.33	46	52
3	70	30	74	26	19.25	13.27	66	23
4	90	10	92	8	17.79	14.84	88	8
5	100	0	100	0	17.75	0	98	0

Table 8. The comparison of Ct and DNA quantification values of heat-treated pork and chicken

Sample	Expected values (%)		Measured values (%)		Ct values		Quantification values (%)	
	Pork	Chicken	Pork	Chicken	Pork	Chicken	Pork	Chicken
First	70	30	64	36	25.01	24.97	69	39
Second	70	30	64	36	25.48	25.64	68	38
Third	70	30	65	35	24.64	26.24	70	37

Table 9. The comparison of Ct and DNA quantification values of pork and chicken included in sausage

Samples ¹⁾	Expected values (%)		Measured values (%)		Ct values		Quantification values (%)	
	Pork	Chicken	Pork	Chicken	Pork	Chicken	Pork	Chicken
F1	100	0	100	0	22.49	0	8.96	0
F2	94	6	100	0	25.19	36.33	0.90	0.0002
F3	88	12	100	0	25.66	34.94	0.99	0.0005
F4	75	25	100	0	27.63	35.78	0.30	0.0004
F5	62	38	100	0	30.01	35.56	0.07	0.0003

¹⁾Samples are the same as in Table 1.

하는 결과가 나타났다고 하였으며(36), 고추다대기가 혼입된 불량 고춧가루에 대한 판별에서도 가공과정을 거치면서 첨가된 식품에 존재하는 PCR 저해물질이 PCR에 미치는 영향이 매우 크고 실제로 식품은 다양한 매트릭스를 가지고 있어 가공과정 중 주형유전자의 파괴가 일어나기 때문이라고 하였다(14). 또한, 가열처리된 육류를 대상으로 열처리 온도와 시간 및 특정 유전자에 대한 증폭효율을 비교한 결과 육류 제품은 가열시간과 정도에 따라 특정 유전자의 증폭효율은 달라졌는데, 이러한 원인은 가열온도, 열처리 시간 및 증폭될 DNA 단편에 따라 영향을 받는다고 보고되어 있다(37).

소시지를 이용한 정량분석

소시지 배합원료는 실제 원료육 이외에도 정제염, 인산염, 아질산, 솔빈산 등 여러 종류의 첨가물이 같이 혼합되었으므로 추출된 DNA를 기준으로 배합비를 판단해야 하기 때문에 첨가물을 제외한 순수 원료육만을 기준으로 배합비율로 환산하였다. Table 1과 같이 혼합된 5점 시료(F1~F5)에 대해 순수한 원료육에 대한 배합비는 돼지고기가 각각 100%, 94%, 88%, 75% 및 62% 그리고 닭고기는 각각 0%, 6%, 12%, 25% 및 38%의 비율이었다. 5점 시료에 대한 혼합비율에 따른 기대치와 측정치를 분석하여 정량분석의 가능성을 검토하였다(Table 9). F1~F5의 5점 혼합시료에 대한 Ct값을 측정하여 비교한 결과 돼지는 기대치에 따라 Ct값의 변화가 있었으나, 닭의 경우 기대치에 따른 Ct값 변화는 확인되지 않았다. 또한, DNA 정량값도 DNA 증폭효율이 낮아 기대할 만한 결과가 없어 측정치로 계산하였을 때도 기대치와 차이가 많이 있었다. 이러한 원인은 혼합비율에 회수된 DNA 양에 비해 많은 단백질 및 지방 성분 등이 존재할 경우, 가공공정에서 DNA가 함유된 세포가 많이 파괴되었을 경우, 균질, 분쇄, 배합 및 케이싱 등에 따라 세포의 농도가 달라졌을 경우 등으로 추론할 수 있다. Shin(38)에 의하면 통계적으로 가공식품은 시료를 완벽하게 균질 및 배합시키는 것은 현실적으로 어려우며, 또한 시료에서 100%의 DNA를 회수하기에는 불가능하기 때문에 가공시료에 따라 분석결과에 많은 영향을 주는 것으로 보고되어 있다. 그러나 본 결과에서 돼지와 닭의 Ct값은 기대치 배합비율이 증가할수록 작아지는 경향을 보여줌에 따라 분석방법에 대한 보완이 이루어질 경우 시료의 혼합비율에 따른 Ct값 등을 고려한 혼합비율

계산이 가능할 것으로 판단하였다. 따라서 돼지고기가 포함된 모든 소시지에 내부표준물질(internal standard), 즉 이미 농도를 알고 있는 DNA를 각 소시지에서 추출된 DNA에 첨가한 후 이를 real-time PCR로 증폭했을 때 나타나는 Ct값을 근거로 배합비율 산출이 가능한지를 검토하였다. 소시지에서 원재료의 배합비율이 너무 낮거나 함량 차이가 서로 유사할 경우 PCR 증폭을 실시하더라도 증폭효율을 기대하기 어렵고, 또한 소시지에 포함된 DNA가 변성·파괴된 경우가 많아 실제 PCR 증폭으로 검출된 DNA 정량값이 매우 낮을 가능성이 높기 때문에 내부표준물질을 같이 증폭한 후, 배합비율에 따라 검출된 각각의 Ct값을 근거로 배합비율과의 차이를 대조하여 정량법으로서의 가능성을 검토하였다. Table 1의 5종 소시지에서 추출된 DNA를 이용한 PCR 반응액 조성 시 내부표준물질로서 별도의 표준 DNA(control DNA)를 각각 50 ng씩 첨가하여 real-time PCR로 증폭한 후 각 시료 함량에 따라 측정된 Ct 값을 산출하였다. Table 1의 소시지의 배합비율을 돼지고기와 닭고기 함량만으로 환산할 경우 돼지고기는 각각 100%, 94%, 88%, 75% 및 62%이고, 닭고기는 각각 0%, 6%, 12%, 25% 및 38%라고 할 수 있다. 먼저 소시지 시료에 대해 닭의 표준 DNA(control DNA)를 50 ng 추가하여 3반복 증폭한 후, 검출된 Ct값을 분석하였다(Table 10). 소시지에서 추출된 DNA에 표준 DNA를 추가하여 Ct값을 분석 및 비교한 결과, 각각 평균 28.78, 24.43, 19.35, 19.93 및 15.88로 측정되었다. 즉 소시지에 배합된 닭고기의 함량을 추정할 경우 정량된 Ct값을 기준으로 24.43±0.16으로 측정되었다면 닭고기가 약 6% 정도 배합된 기준으로 예상할 수 있으며, 마찬가지로 다른 닭고기 함량도 Ct값에 의한 표준편차를 고려하여 배합비율

Table 10. Standard deviation and Ct values of chicken DNA using standard DNA

Samples ¹⁾	Chicken contents (%)	Ct values
F1	0	28.78±0.13 ^a
F2	6	24.43±0.16 ^b
F3	12	19.35±0.25 ^d
F4	25	19.93±0.11 ^c
F5	38	15.88±0.21 ^e

¹⁾Samples are the same as in Table 1.

All values represent mean±SD (n=3).

Values with different letters (a-e) within a column are significantly different (P<0.05).

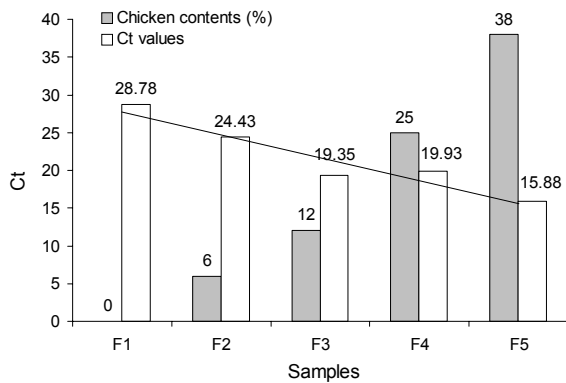


Fig. 4. The comparison of chicken contents and Ct values of sausages using standard DNA of chicken(50 ng). X: samples, Y: Ct values of samples. Samples are the same as in Table 1.

의 추정이 가능하다고 할 수 있다. 따라서 표준 DNA를 추가했을 때 닭의 함량이 증가할수록 Ct값의 추세선도 전체적으로 낮아져 서로 차이를 보임에 따라 Ct값을 근거로 닭의 배합비율 산출이 가능할 것으로 보인다(Fig. 4). 그러나 이와 같은 경우 Ct값을 기준으로 원료육 함량의 확인이 가능하나, Ha(39)에 의하면 real-time PCR은 cycle이 진행됨에 따라 DNA는 지수적으로 증가하며 이론적으로 DNA 간 10배 차이가 있을 때 약 3.3 cycle의 Ct값 차이가 생긴다고 보고되어 있어, 본 실험과 같이 함량이 6%, 12%, 25% 및 38% 차이를 정량하기에는 Ct값의 차이가 너무 작기 때문에 정확한 정량은 아직 한계가 있었다.

Real-time PCR의 정량능력과 정확성은 DNA 추출량에 영향을 미치는 인자인 세포마다 DNA의 양에 따라 영향을 주기 때문에 이러한 문제를 해결하기 위해서는 유전자를 추출하는 처리과정을 동일한 조건으로 고정하여 유전자의 양을 일정하게 얻어야 하지만 실질적인 측면에서 실현 가능성이 매우 낮을 수 있다. 또한, 가공식품에서의 real-time PCR을 통한 정량분석 시 전체적으로 사용된 원료보다 낮게 나타나는 경향을 보였다고 알려져 있어 향후 추가적인 연구를 통한 보완이 더 필요하다고 판단된다.

요 약

본 연구는 돼지고기로 제조된 소시지에 저가원료인 닭고기 혼합비율을 정량하기 위해 real-time PCR 법과 소량 함유된 닭의 정량의 정확도를 높이기 위해 닭의 내부 표준물질들을 첨가하는 방법을 적용함으로써 소시지의 진위판별 가능성을 제시하였다. DNA 회수율과 PCR 증폭효율을 높이기 위해 QIAamp DNA Micro Kit을 사용하였고, 최종 PCR 반응액 20 μ L에 template DNA(5~10 ng/ μ L)는 3.0~5.0 μ L, primer 농도는 0.5 μ L(10 pmol), 2 \times Cybrgreen buffer는 10 μ L로 조정하였을 때 가장 적합하였고, PCR 증폭조건은 annealing 온도를 62 $^{\circ}$ C, extension 온도를 68 $^{\circ}$ C, final extension 시간은 33초, 최종 PCR cycle은 40 cycle로 했을

때 가장 PCR 증폭효율이 좋은 것으로 평가되었다. 돼지와 닭의 DNA를 50 ng에서 0.05 ng으로 순차적으로 10배씩 희석한 template DNA를 이용해 민감도(최소 검출한계)를 확인한 결과 돼지와 닭 모두 0.05 ng 이상으로 각각 확인되었다. 표준곡선의 결정계수(R^2)도 모두 0.995 이상으로 표준곡선의 linearity가 정량에 적합한 것으로 확인되었다. 돼지고기와 닭고기를 각각 70:30 비율로 혼합한 3점의 시료를 70 $^{\circ}$ C에서 10분간 열처리한 후 정량분석을 실시하여 기대치에 의한 측정치를 비교한 결과, 64.3:35.7의 비율로써 평균 5.7%의 차이를 나타내 생육(raw meat) 또는 가열처리된 시료의 상태에 따라 DNA에 영향을 주어 PCR 증폭효율 및 DNA 정량 값에 일부 영향을 주는 것으로 판단되었다. 소시지에 함유된 돼지고기와 닭고기의 함량을 분석한 결과 돼지고기에 비해 닭고기 함량이 적은 소시지에서는 닭고기(6%, 12%, 25%, 38%)의 검출이 어려웠고, Ct(threshold cycle) 값에 따른 DNA 정량값이 매우 낮아 배합비율을 환산이 어려웠다. 그러나 소시지에 닭의 표준물질 DNA(50 ng)를 첨가함으로써 배합비율이 증가할수록 Ct값도 점차 낮아져서 배합비율을 반영하고 있음에 따라 Ct값의 평균치 \pm 오차범위 값으로 간접적으로 배합비율을 추정할 수 있을 것으로 생각되었다.

REFERENCES

1. Heo SE. 2008. Study on the dining space and a meal culture according to the change of residing form. *MS Thesis*. Inha University, Incheon, Korea.
2. Ministry of Agriculture Food and Rural Affairs. 2014. http://www.mafra.go.kr/list.jsp?&newsid=155445233§ion_id=b_sec_1&pageNo=8&year=2017&listcnt=10&board_kind=C&board_skin_id=C3&depth=1&division=B&group_id=3&menu_id=1125&reference=&parent_code=3&popup_yn=&tab_yn=N (accessed Jan 2014).
3. Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25: 169-193.
4. Pineiro M, Pereira MM, Rocha GA, Arnaut LG, Formosinho SJ. 2000. Singlet oxygen quantum yields from halogenated chlorins: Potential new photodynamic therapy agents. *J Photochem Photobiol A Chem* 138: 147-157.
5. Ataman B, Ashley J, Gorczyca D, Gorczyca M, Mathew D, Wichmann C, Sigrist SJ, Budnik V. 2006. Nuclear trafficking of *Drosophila* Frizzled-2 during synapse development requires the PDZ protein dGRIP. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 7841-7846.
6. Vage DI, Klungland H, Lu D, Cone RD. 1999. Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. *Mamm Genome* 10: 39-43.
7. Ochiai A, Mori S, Kawai S, Murata K. 2015. Overexpression, purification, and characterization of ATP-NAD kinase of *Sphingomonas* sp. A1. *Protein Expr Purif* 36: 124-130.
8. Christopoulou E, Lazaraki M, Komaitis M, Kaselimis K. 2004. Effectiveness of determinations of fatty acids and triglycerides for the detection of adulteration of olive with vegetable oils. *Food Chem* 84: 463-474.
9. Aparicio R, Aparicio-Ruiz R. 2000. Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *J Chromatogr A*

- 881: 93-104.
10. Park JK, Shin KH, Shin SC, Chung KY, Chung ER. 2007. Identification of meat species using species-specific PCR-RFLP fingerprint of mitochondrial 12S rRNA gene. *Korean J Food Sci Ani Resour* 27: 209-215.
 11. 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.
 12. Chung ER, Kim WT, Kim YS, Han SK. 2000. Identification of Hanwoo meat using PCR-RFLP marker of MC1R gene associated with bovine coat color. *J Anim Sci Technol* 42: 379-390.
 13. Koh BRD, Kim YH, Park SD, Na HM, Kim JN, Sung CM, Lee SS. 2005. Identification of MC1R gene variants of Hanwoo and Holstein meat using PCR-RFLP. *Korean J Vet Serv* 28: 259-265.
 14. Park YC, Lim JY, Kim MR, Park YE, Lim JD, Hwang CR, Kim KH, Lee JH, Cho TY, Lee HJ, Lee SJ, Han SB. 2012. Identification of faulty red pepper powder containing seasoned red-pepper sauce. *J Fd Hyg Safety* 27: 182-187.
 15. Kim HS, Seo YB, Choi SS, Kim J, Shin J, Yang JY, Kim GD. 2015. Development and validation of multiplex polymerase chain reaction to determine squid species based on 16s rRNA gene. *J Fd Hyg Safety* 30: 43-50.
 16. Her EJ, Ko EK, Seo KH, Kim YJ, Park HJ, Wee SH, Moon JS. 2014. Validation of PCR and ELISA test kits for identification of domestic animal species in raw meat and meat products in Korea. *J Fd Hys Safety* 28: 158-153.
 17. Ilhak OL, Arslan A. 2007. Identification of meat species by polymerase chain reaction (PCR) technique. *Turk J Vet Anim Sci* 31: 159-163.
 18. Kesmen Z, Gulluce A, Sahin F, Yetim H. 2009. Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. *Meat Sci* 82: 444-449.
 19. Yang L, Tan Z, Wang D, Xue L, Guan MX, Huang T, Li R. 2013. Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. *Sci Rep* 4: 4089.
 20. Teletchea F, Maudet C, Hänni C. 2005. Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends Biotechnol* 23: 359-366.
 21. Park YC, Ahn CY, Jin SO, Lim JY, Kim KH, Lee JH, Cho TY, Lee HJ, Park KS, Yoon HS. 2012. Identification of raw materials in processed meat products by PCR using species-specific primer. *J Fd Hyg Safety* 27: 68-73.
 22. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11: 1026-1030.
 23. Bottero MT, Dalmaso A. 2011. Animal species identification in food products: evolution of biomolecular methods. *Vet J* 190: 34-38.
 24. Krcmar P, Rencova E. 2005. Quantitative detection of species-specific DNA in feedstuffs and fish meals. *J Food Prot* 68: 1217-1221.
 25. Yancy HF, Washington JD, Callahan L, Mason JA, Deaver CM, Farrell DE, Ha T, Sespico E, Falmlen D, Myers MJ. 2009. Development, evaluation, and peer verification of a rapid real-time PCR method for the detection of animal material. *J Food Prot* 72: 2368-2374.
 26. Pegels N, González I, López-Calleja I, Fernández S, García T, Martín R. 2012. Evaluation of a TaqMan real-time PCR assay for detection of chicken, turkey, duck, and goose material in highly processed industrial feed samples. *Poult Sci* 91: 1709-1719.
 27. Kesmen Z, Yetim H, Sahin F, Yetim H. 2012. Detection of chicken and turkey meat in meat mixtures by using real-time PCR assays. *J Food Sci* 77: C167-C173.
 28. Okuma TA, Hellberg RS. 2015. Identification of meat species in pet foods using a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay. *Food Control* 50: 9-17.
 29. Kim KH, Kim YS, Kim MR, Lee HY, Jung YK, Lee JH, Chang HS, Park YC, Kim SY, Choi JD, Jang YM. 2014. Development of species-specific primer to determine the authenticity of vegetable raw materials in food. *Food Eng Prog* 18: 419-426.
 30. Drummond MG, Brasii BSAF, Dalsecco LS, Brasil RSAF, Teixeira LV, Oliveira DAA. 2013. A versatile real-time PCR method to quantify bovine contamination in buffalo products. *Food Control* 29: 131-137.
 31. Nesvadbova M, Knoll A, Vastkova A. 2010. Selection of the most suitable method for the extraction of DNA from foods and feeds for species identification. *Acta Univ Agric Silvic Mendelianae Brun* 58: 169-174.
 32. Lee HH, Song HS, Kim JH, Lee WY, Lee SH, Park SH, Park HK, Kim HY. 2005. Comparison of the efficiency from raw and processed corns by five different DNA extraction methods. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 48: 331-334.
 33. Lee JH, Song KY, Hyeon JY, Hwang IG, Kwak HS, Han JA, Chung YH, Seo KH. 2010. Comparison of standard culture method and real-time PCR assay for detection of *Staphylococcus aureus* in processed and unprocessed foods. *Korean J Food Sci Ani Resour* 30: 410-418.
 34. Lee SY, Jang KI, Woo GJ, Kwak HS, Kim KY. 2007. Development of protocol for the effective detection of feline calicivirus as norovirus surrogate in oyster and lettuce. *Korean J Food Sci Technol* 39: 71-76.
 35. Park YC, Kim MR, Lim JY, Park YE, Shin JH, Hwang CR, Lim JD, Kim KH, Lee JH, Cho TY, Lee HJ, Han SB. 2012. A comparison of gene extraction methods for the identification of raw materials from processed meat products. *J Fd Hyg Safety* 27: 146-151.
 36. Sakalar E, Abasiyanik MF, Bektik E, Tayyrov A. 2012. Effect of heat processing on DNA quantification of meat species. *J Food Sci* 77: N40-N44.
 37. Shin WS. 2003. *Development of analytical method for genetically modified maize from processed food*. Ministry of Agriculture Food and Rural Affairs, Sejong, Korea.
 38. Ha SJ. 2013. Rapid detection of clostridium difficile by real-time PCR and whole genome amplification (WGA). *MS Thesis*. Kookmin University, Seoul, Korea.