

분자유전학적인 기술을 이용한 육 감별법

김 태 현

(농촌진흥청 축산기술연구소)

분자유전학적인 기술을 이용한 육 감별법

김 태 현
농진청 축산기술연구소

Abstract

This study was carried out to develop a DNA marker for identifying between Korean cattle (Hanwoo) and other breeds.

First experiment was performed to isolate Hanwoo specific DNA marker at sequence characterized amplified regions (SCARs). Five breeds of cattle including Hanwoo, Holstein, Hereford, Angus and Charolais were represented with the from 8 to 20 individuals. Fourteen primers of 300 arbitrary primers of 10 nucleotides showed reproducible polymorphism across the breeds. An amplified band of 0.9 kb in the primer MG-3 showed the specificity to Holstein breed. And MG-6 and MG-12 detected the Hereford and Hanwoo specific markers at the size of 2.0 kb and 1.0 kb, respectively. A 1.0 kb band of MG-12 was cloned and sequenced. A SCAR primer was designed based on the obtained sequences. It was possible to identify the Hanwoo from Holstein breed.

Second experiment was carried out to observe the genotype frequencies of *MC1R* in 1,044 samples of imported beef and eight different cattle breeds including Hanwoo, Holstein, Angus, Brown-Swiss, Charolais, Limousin, Simmental and Hereford. The primers for the amplification of bovine *MC1R* gene were designed based on a bovine *MC1R* gene sequence (GenBank accession no. Y19103).

A size of 350 bp was amplified by polymerase chain reaction(PCR), digested with two different restriction enzyme, *Bsr*FI and *Msp*A II, and electrophoresed in 2.5% Metaphore agarose gel for determination of genotypes.

Genotype frequencies of Hanwoo were 0.10 in E+e and 0.90 in ee. Allele ED was shown in all of Holstein and Angus breeds tested which have black coat color phenotypes.

We suggested that SCAR marker and the bovine *MC1R* gene could be used as a DNA marker for distinguishing beef between Hanwoo and Holstein.

Key words : *MC1R*, PCR-RFLP, Extension locus, RAPD, SCAR, cattle

I. 서 론

소의 품종은 전세계를 통하여 250여종 이상이 존재하며, 아직도 품종명이 밝혀지지 않은 수백 종류의 소가 존재하는 것으로 알려져 있다. 이들 품종들은 각각 고유의 체형, 신체 각 부위의 형태, 모색, 뿔의 유무와 형태 등의 외모 형태적인 특징을 가지고 있어 외모 형태적 특징을 관찰함으로써 소 품종을 쉽게 구분할 수 있다. 그러나 표현형적으로는 구분이 용이한 소 품종일지라도 도축하여 부분육으로 만들어졌을 때는 전문가라도 판별이 불가능하게 된다. 이와 같은 약점을 이용하여 일부 부도덕한 유통업자들이 수입육과 젓소고기를 한우고기로 둔갑 판매하는 부정 유통 사례가 빈번히 발생되고 있어 한우 사육기반 약화는 물론 한우고기에 대한 소비자들의 신뢰도 하락의 원인이 될 수 있다. 한편 수입쇠고기의 구분판매가 수입쇠고기에 대한 불공정 상거래라고 쇠고기 수출국인 미국과 호주 등이 WTO에 제소함에 따라 빠르면 2001년 상반기부터는 수입쇠고기 전문점이 없어지고 일반 정육점에서 한우고기와 젓소고기는 물론 수입쇠고기도 함께 판매 되어질 것으로 예상됨에 따라 부정유통의 사례는 더욱 빈번해질 것으로 예상된다. 따라서 한우사육농가의 소득보장 및 소비자들을 보호하기 위하여 한우고기의 판별기술 개발은 시급히 해결해야 할 과제임에 틀림없다.

현재 축종판별에 이용되는 방법에는 면역효소측정법(ELISA) (Hayden, 1979; Berger 등, 1988), 등전점 전기영동법 (King과 Kurth, 1982; Sotelo 등, 1993), 기기분석법 (Sinclair 등, 1982; Armstrong과 Leach, 1992) 등이 있으며 비교적 정확도가 높은 방법으로 사용되어 왔다. 이들 방법은 축종간 단백질의 조성 또는 구조의 차이를 보이는 종 특이 단백질(species-specific protein)를 분리함으로써 가능하다. 그러나 아직까지 동종내의 품종간 차이를 보이는 단백질은 보고된 바 없으며 이와 같은 차이를 보이는 단백질의 분리는 쉽지 않을 것으로 판단된다.

최근 분자유전학적 분석기법을 이용하여 종간 또는 품종간 DNA 구조의 차이를 이용하여 종 또는 품종을 판별하려는 연구가 시도되고 있는데, RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction)을 이용하여 한우육과 수입육 그리고 유우육을 판별하려는 연구가 있었으며 (조 와 한, 1994; 이 등, 1994; 민 등, 1995; 민 등, 1996), Kemp와 Teale (1994)이 *B. indicus*와 *B. taurus*를 구분하는데 RAPD marker를 이용한 바 있다. 그러나 이와 같은 연구는 검정두수의 부족과 RAPD 분석방법 중의 가장 큰 단점인 재현성 등의 문제점으로 인해 신뢰도가 낮아 실용화되지는 못하였다. 개발된 RAPD marker에 의한 SCAR (sequence characterized amplified regions)의 개발은 상치에 있어서 질병 저항성 marker에 대하여 처음으로 개발되었으며 (Paran과 Michelmores, 1993), 양의 배자 성 감별 (Gutierrez-Adan 등, 1997), 식물에서 질병 저항성 유전자 (Melotto 등, 1996; Garcia 등, 1996; Naqvi와 Chatto, 1996), 그리고 면양과 산양을 구별하는데(Cargill 등, 1995) 이용된 바 있다.

한편 질적 형질인 포유동물의 모색은 melanocortin receptor 1(MC1R)과 연관되어 있다는 연구 보고가 있으며, E 좌위에서 우성 대립 유전자(E^D)는 균일한 흑모색을 생산하는데 작용하고 열성 대립유전자(e)는 적색/황갈색 색소를 많이 합성하게 된다. 그러나 wild type(E^+)의 경우 A좌위의 대립유전자와의 상호 작용에 의하여 조절되어진다고 한다. 한편 A좌위에는 두 가지 대립유전자 즉 우성(A^+)과 열성(a)이 존재하는 것으로 추정하고 있으며 우성 대립유전자(A^+)는 황갈색 피모

색깔을 생산하며 열성 동형접합체(*aa*)는 균일한 흑모색의 표현형과 관계가 있다고 보고되고 있다 (Hearing과 Tsukamoto, 1991; Jackson, 1993; Robbins 등, 1993; Jackson 1994; Adalsteinnsson 등, 1995).

한편 Robbins 등(1993)에 의하면 생쥐에서 열성 노란 피모색 (*e*)은 frameshift 변이에 의해 수용체 유전자가 본래의 기능을 못하여 eumelanin 합성을 못하고, 반대로 광범위한 진한 피모색깔의 표현형을 나타내는 우성 *E* 대립 유전자는 단일 아미노산의 치환으로 인한 지속적인 활성을 나타내는 수용체 유전자를 암호화하고 있는 결과라고 보고하였다. 또한 *MC1R* 유전자의 변이가 광범위한 동물종에서 색소합성을 변형시키는 것과 연관되어 있다는 연구는 소 (Klungland 등, 1995), 돼지 (Kijas 등, 1998; Ollivier와 Sellier, 1982), 말 (Marklund 등, 1996), 여우 (Vage 등, 1997), 양 (Vage 등, 1999), 개 (Newton 등, 2000) 그리고 닭 (Takeuchi 등, 1997) 등에서 보고되어졌다.

소의 *MC1R* 수용체 유전자에는 세 가지의 대립유전자가 존재하고 우성 대립유전자 E^D 는 missense mutation에 기인하며 흑모색과 관련이 있고, 열성 유전자형(*ee*)은 frameshift 변이에 의해 발생되고 붉은 피모색을 생산하며, E^+ 는 다양한 피모색을 나타내었다. 그리고 이 수용체 유전자는 초위성체와 RFLPs 분석에 의해 염색체 18번에 존재하는 것으로 보고하였다 (Klungland 등, 1995).

따라서 본 실험은 PCR-RAPD 기법을 이용하여 품종 간에 특이성을 보이는 유용인자 개발 및 한우 판별을 위한 특이 marker를 개발한 다음 SCAR (sequence characterized amplified regions) 기법을 이용하여 보다 간편하고 안정되게 품종을 구분할 수 있는 방법과 모색에 관여하는 유전자인 *MC1R*을 이용한 한우고기 판별기술을 개발코자 수행하였다.

실험 1. 품종 특이성을 이용한 한우 판별 표지인자 개발

II. 재료 및 방법

1. 공시재료

축산기술연구소에서 사육중인 한우 및 축협 한우개량부 서산목장의 후보종모우 (약 150두), 홀스테인 (50두), 앵거스 (8두), 샤로레(10두), 헤어포드 (16두)등의 혈액을 채취하여 이용하였다.

2. Genomic DNA 추출

혈액에서의 genomic DNA 추출은 RBC lysis buffer (10mM Tris-Cl pH 7.6, 10mM NaCl, 5mM MgCl₂) 로 적혈구를 10분간 용혈시킨 후 Sambrook 등 (1989)의 방법에 따라 추출하였으며 TE (pH 8.0) 용액에 녹인 다음 50ng/ μ l의 농도로 희석하여 사용하였다.

3. Random primer

사용된 random primer는 UBC (University of British Columbia, Canada)에서 판매하는 G+C 함량이 50~90%인 10 bp의 random primer를 사용하였으며, 총 300개의 random primer를 사용하였다.

4. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNAs) 분석

PCR 수행은 Williams 등 (1990)의 수행방법을 변경 수행하였으며, random primer 300개에 대하여 각 품종당 10개체씩을 DNA를 같은 양으로 섞어 사용하였으며, PCR 증폭반응은 총 25 μ l의 반응액에 genomic DNA (50ng/ μ l), 1 \times reaction buffer (50mM KCl, 10mM Tris-Cl, 1.5mM MgCl₂), dNTP mixture (200 μ M), 1 unit의 Taq DNA polymerase (TaKaRa Co, Japan)을 첨가하여 다음과 같은 조건으로 94 $^{\circ}$ C, 40 $^{\circ}$ C 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 각각 30초, 1분, 2분씩 50 사이클로 프로그램하여 실시하였다. PCR 증폭 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였고, 품종 특이성을 보이는 primer에 대하여는 개체별로 같은 조건으로 수행하였다.

5. 품종특이 밴드 클로닝 및 염기서열 결정

각각의 품종에 대하여 품종특이성을 보이는 밴드는 TOPO TA cloning kit (Invitrogen)을 이용하였으며 host cell은 *E. coli* DH5 α 를 사용하였다.

염기서열 결정은 Big Dye terminator sequencing kit (PE Applied Biosystems)를 이용하여 반응시킨 다음 Automated sequencer ABI 377 (Perkin Elmer)를 이용하였다.

6. SCAR 설계 및 분석

RAPD marker는 부분적인 염기서열을 결정한 후 marker에 대하여 양쪽 끝에서 SCAR primer를 제작하였다. 즉 10bp의 RAPD primer에 끝에서 안쪽으로 10bp 내지 12bp의 염기를 추가하여 제작하였다.

Klungland 등(1995)이 *E* 좌위에서 유전자형을 결정하기 위하여 이용한 방법은 각 개체에 대하여 두 쌍의 primers를 사용하여 두 번의 PCR을 실시하여 증폭된 산물을 각기 다른 제한효소로 절단하는 비교적 복잡한 방법을 거쳤다. 그러나 본 실험에서는 제작한 한 쌍의 PCR primer로 증폭한 PCR 산물을 두 가지 제한효소 (*Bsr*FI I과 *Msp*AI I)를 선정하여 각각 절단할 수 있는 방법의 개발은 물론 더 나아가 두 가지 제한효소를 동시에 한 튜브에서 절단함으로써 기존의 방법에 비하여 간편하고 신속하게 유전자형을 결정할 수 있는 방법을 확립하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. RAPD 분석에 의한 품종특이 밴드

각 품종별 pooled genomic DNA를 주형으로 하여 300개의 random primer 각각에 대하여 PCR을 수행하였다. 많은 수의 primer에서 polymorphic band가 관찰되었으며 그중 품종간 차이를 보이는 14개의 random primer를 선별하였다 (Table 1). 품종간에 차이를 보이는 14개의 random primer에 대해서는 개체별로 같은 조건의 PCR을 다시 수행한 다음 전 개체에서 차이를 보이는 primer를 선별하였다 (Fig. 1, 2, 3). RAPD 방법은 10 bp의 짧은 primer를 사용하기 때문에 전체 유전체 내에 존재하는 DNA 구조상의 차이를 쉽게 관찰할 수 있다는 장점이 있으나 실험특성상 많은 변이에 대하여 민감하게 반응하여 같은 실험 결과를 얻기가 쉽지 않은 점도 있다.

Table 1. Number of RAPD bands per primer in different breeds

Primer	Breeds			
	Hanwoo	Holstein	Angus	Charolais
MG-1	7~ 9(8)	6~ 7(6.7)	9~10(9.3)	8~ 9(8.7)
MG-2	5~ 7(6.6)	4~ 6(5)	6(6)	4~ 6(5)
MG-3	2~ 4(3.2)	3~ 6(3.7)	3~ 6(4)	4~ 7(5.2)
MG-4	5~ 6(5.3)	3~ 4(3.3)	3~ 4(3.7)	4~ 6(4.7)
MG-5	9~14(8.7)	8~10(8.7)	7~ 8(7.7)	6~ 8(7)
MG-6	3~ 5(3.3)	3~ 5(4)	2~ 4(3)	3(3)
MG-7	6~15(9.7)	8~13(10.7)	5~ 8(6.3)	6~ 7(6.7)
MG-8	8~ 9(8.3)	8~13(10.3)	6~11(9)	5~ 8(6.5)
MG-9	6~10(8)	5~ 9(6)	3~ 6(5)	2~ 8(3.8)
MG-10	5~ 7(6)	5~ 7(6.2)	4~ 6(4.8)	4~ 6(4.8)
MG-11	5~10(7.7)	7~10(9.2)	5~ 9(7.5)	9~11(10)
MG-12	7~10(8.1)	8~10(8.8)	7~12(10.8)	12~14(12.3)
MG-13	6~ 8(7)	4~ 9(6.2)	8~10(8.3)	7~11(8.3)
MG-14	8~12(9.6)	8~10(8.3)	5~11(8.3)	7~12(10)

MG-3 primer을 사용하여 RAPD을 수행한 결과 Fig. 1에서 보는 것처럼 약 0.9 kb 정도의 크기에서 홀스테인에서만 특이적으로 나타나는 band를 확인할 수 있었다. 약 20개체에서 같은 양상으로 나타나 홀스테인 판별 마커로서 사용이 가능할 것이다. 이 결과는 조 등 (1997)이 보고한 홀스테인 RAPD marker와 유사한 결과이다. 또한 MG-6의 primer는 헤어포드종에 대해서 약 2.0 kb 정도의 크기에서 특이적으로 증폭되는 양상을 나타내었는데, 이 RAPD marker 또한 수입우육의 많은 부분을 차지하는 헤어포드종의 구분에 이용이 가능할 것이다 (Fig. 2). 헤어포드 같은 수입종의 경우 실험에 사용된 공시두수가 10두 내외로 작아 그 품종을 대표한다고는 할 수 없으므로

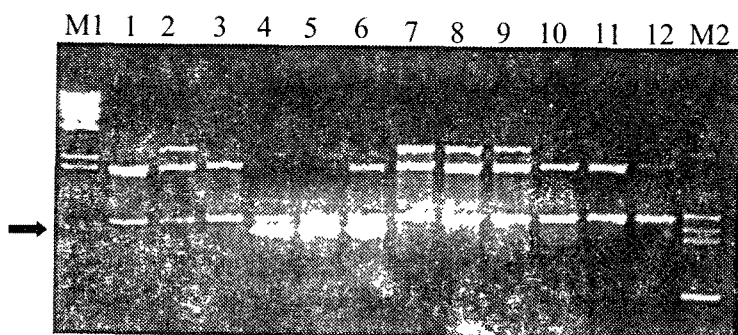


Fig. 1. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of cattle with arbitrary primer MG-3. Arrow indicates 0.9 kb Holstein-specific fragment. M1: Size marker (Lambda-Hind III digested), Lane 1~3 : Hanwoo, Lane 4~6 : Holstein, Lane 7~9 : Angus, Lane 10~12 : Charolais, M₂ : Size marker (100bp ladder).

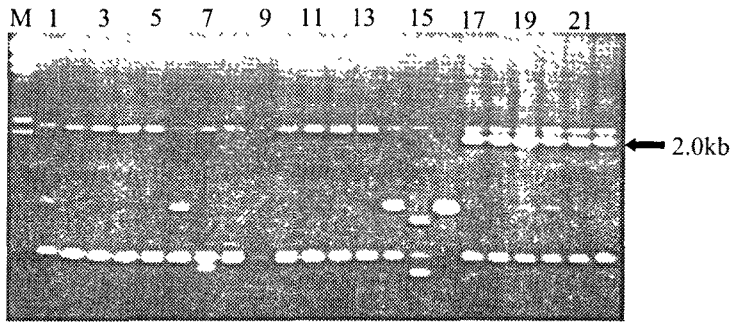


Fig. 2. Breed specific RAPD markers of primer MG-6 in cattle. Arrow indicates 2.0 kb Hereford specific marker. M: Size marker (Lambda- Hind III digested), Lane 1~6 : Hanwoo, Lane 7~11 : Holstein, Lane 12~16 : Angus, Lane 17~22 : Hereford.

좀 더 많은 두수를 대상으로 한 추가적인 실험이 요구된다고 할 수 있다. Fig. 3은 1.0 kb 정도의 크기에서 한우에서만 특이적으로 증폭되는 MG-12 primer의 PCR 결과로서 개체별로 동일한 위치에서 산물이 증폭되었다. 이러한 결과는 기존에 보고되었던 결과 (조와 한 등, 1994; 이 등, 1994; 민 등, 1995; 민 등, 1996)보다 명확하고 한 품종 특이적으로 나타나는 양상으로 RAPD marker로서 사용이 가능할 것이다. 한편 Kemp와 Teale (1994)은 *B. indicus*와 *B. taurus*를 구별 가능한 RAPD marker를 보고한 바 있다.

2. SCAR (sequence characterized amplified regions) marker 개발

한우 특이적으로 나타나는 RAPD 밴드를 클로닝한 후 automatic sequencer ABI 377을 이용하여 염기서열을 결정하였다. Random primer를 포함한 염기에 추가로 10 bp의 염기를 추가하여 SCAR primer을 설계하였다. Fig. 3에서 나타난 MG-12 primer에 대한 RAPD marker를 이용하여 SCAR marker를 개발하였는데 이는 한우에서만 나타나는 RAPD maker를 한우 및 다른 품종의 소와 판별하기 위하여 개발하였다. Fig. 4에서 보듯이 한우와 젓소를 비교하였을 때, SCAR marker의 밴드가 Fig. 3에서 처럼 같은 크기로 증폭되어 한우에서만 나타남을 관찰하였다. 실제

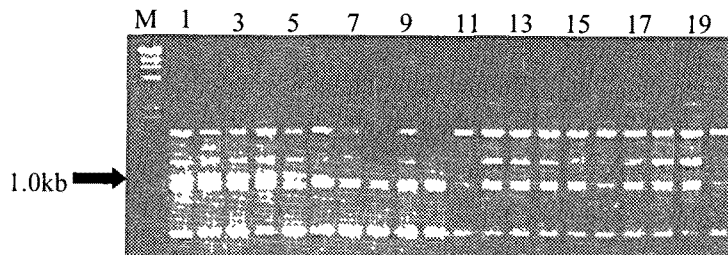


Fig. 3. RAPD analysis of cattle with primer MG-12 with DNA of 5 individual. Arrow indicates the 1.0 kb Hanwoo-specific fragment. M: Size marker (Lambda-Hind III digested), Lane 1~5 : Hanwoo, Lane 6~10: Holstein, Lane 11~15 : Angus, Lane 16~20 : Charolais.

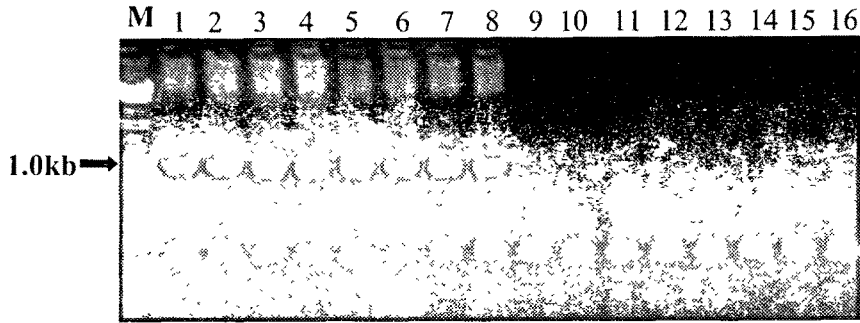


Fig. 4. Agarose gel separation (1.2%) of PCR amplified DNA with Hanwoo-SCAR primer derived from MG-12 RAPD fragment. M: Size marker (Lambda-Hind III digested), Lane 1~8 : Hanwoo, Lane 9~16 : Holstein.

로 한우의 경우 150두를 분석한 결과 전 개체에서 marker의 관찰이 가능하였으며, 젃소의 경우 종모우 및 일반 농가의 유우로서 약 50두를 분석한 결과 관찰되지 않았다. 한우는 축산기술연구소 및 축협 서산 한우개량부의 보증 종모우 및 후보종모의 DNA로서 우리나라의 한우를 대표한다고 할 수 있으므로 단순히 한우 판별뿐 아니라 혈통등록 그리고 육종개량 측면에서의 이용이 가능할 것으로 판단된다.

개발된 RAPD marker에 의한 SCAR marker로의 전환은 상치에 있어서 downy mildew 질병 저항성 marker에 대하여 처음으로 개발되었으며 (Paran과 Michelmore, 1993), 양의 배자 성 감별 (Gutierrez-Adan 등, 1997), 식물에서 질병 저항성 유전자 (Melotto 등, 1996; Garcia 등, 1996; Naqvi와 Chatto, 1996) 그리고 감귤류에서 fruit acidity를 결정하는 유전자에 연관된 marker의 개발 (Fang 등, 1997) 등에서 SCAR marker의 개발이 보고되었다. Cargill 등 (1995)은 면양과 산양의 품종구별을 위하여 RAPD marker를 찾은 다음 이 10 bp의 random primer에 14 bp의 염기를 더 첨가한 SCAR primer를 개발하여 면양에는 645 bp의 band가 나타나며 산양에서는 나타나지 않는 SCAR marker의 개발을 보고하였다.

SCAR는 RAPD에 비해 몇가지 장점이 있는데 RAPD는 짧은 시간내에 marker의 개발이 가능하나 multiple loci의 증폭, dominant한 성질 그리고 실험의 민감성 등이 실용화 문제에 제한이 있다. 즉 priming site에서의 mismatch에 의한 RAPD 다형현상 때문에 긴 SCAR primer에 의한 증폭 산물은 RAPD보다는 보다 정확한 정보를 얻을 수 있으며, dominant한 RAPD marker의 codominant한 SCAR로의 전환은 F₂ 집단에 대한 분석에 많은 도움을 주어 gene mapping등에 유용하게 이용될 수 있다 (Paran과 Michelmore, 1993).

또한 SCAR primer에 대한 annealing 조건이 RAPD 보다 엄격하여 SCAR primer에 의해 한 개의 좌위에 대하여 검색이 가능하다. SCAR의 긴 oligonucleotide primer 사용은 RAPD 분석에 의하여 얻을 수 있는 것보다 안정적이고 재현성이 뛰어나 molecular marker로서의 사용이 가능하여 육종 프로그램에 유용하게 활용할 수 있다 (Paran과 Michelmore, 1993).

한우와 젃소를 제외한 다른 수입종의 경우 공시두수가 적어 비교 대상에서 제외하였으나, 좀더 많은 수입종의 시료 확보 및 개발된 홀스테인, 헤어포드 RAPD marker에 대한 연구 및 한우

SCAR marker의 전체염기서열 결정 및 genomic DNA 상에서의 위치 그리고 repetitive DNA여부 등에 대한 연구가 진행중이다. 또한 한우 교잡우의 경우 이 마커에 대해서 연구가 되지 않았지만, 각 품종별 마커가 개발된다면 이에 대한 해석이 가능할 것이다.

이상의 결과를 종합하여 보면, RAPD 분석에 의한 품종간 특성을 이용한 marker의 개발이 가능함을 알 수 있으며, 이 RAPD maker의 SCAR marker 개발은 보다 안정적이고 재현성 있는 marker로서 사용이 가능하여 한우와 젃소의 판별에 유용하게 이용될 수 있을 뿐 아니라 한우육종·개량, 그리고 한우 품질인증에도 사용될 수 있을 것이며, 또한 다른 품종에 특이적으로 개발된 RAPD marker의 SCAR marker 개발도 요구된다.

실험 2. 모색관련 유전자(MC1R)를 이용한 한우고기판별

I. 재료 및 방법

1. 공시재료

공시재료로는 한우와 홀스타인 품종은 축산기술연구소와 축협 한우개량사업부와 유우개량사업부에서 사육중인 소에서 혈액을 채취하여 이용하였으며, 앵거스와 샤로레는 제주 제동목장 및 축산기술연구소에서 사육중인 것이며, 브라운스위스, 리무진, 심멘탈 및 헤어포드는 미국으로부터 정액을 수입하여 이용하였다. 또한 수입육은 축협유통사업단의 협조를 얻어 브랜드별로 시료를 채취하여 이용하였다.

2. DNA 분리 및 농도측정

Genomic DNA는 전혈 3ml에 대하여 Wizard Genomic Purification Kit (Promega Co, USA)을 이용하여 추출하였으며, 한편 고기로부터 DNA를 추출하기 위해서는 Sambrook 등(1989)의 phenol/chloroform 추출방법을 이용하였다. DNA의 농도는 분광광도계와 agarose gel 전기영동을 하여 농도를 측정하였고, 분석에 이용할 때까지 4°C의 cold chamber에 보관하였다.

3. PCR에 의한 MC1R의 증폭

MC1R 유전자의 변이를 탐색하기 위한 primer는 Kriegesmann 등(1999)이 발표한 MC1R 유전자 (GeneBank accession number Y19103)의 염기서열을 근거로 제작하여 사용하였다.

PCR 반응을 위해 PCR reaction buffer(500mM KCl; 100mM Tris-Cl, pH 8.2; 15mM MgCl₂; 0.1% triton X-100, TaKaRa Co, Japan) 3 μ l, 2.5mM dNTPs 4 μ l, 10 pmole의 primer 1 μ l, 25ng의 genomic DNA, 1U의 Taq DNA polymerase(TaKaRa, Japan)를 넣고 최종 부피가 30 μ l되게 하였다.

PCR 수행은 95°C에서 5분간 predenaturation한 후 94°C 30초와 67°C 1분씩 2 단계 PCR로 35 cycles 수행한 후 마지막으로 72°C에서 5분간 extension을 실시하였으며, PCR이 끝난 후 3 μ l의 PCR 산물을 1.2%의 agarose gel에서 증폭여부를 확인하였다.

4. 제한효소 처리 및 유전자형 결정

유전자형의 결정은 *BsrF* I (Pu ↓ CCGGPy)과 *MspA1* I (CMG ↓ CKG) 두가지 제한효소를 사용하였다.

PCR 산물에 대한 제한효소 처리는 PCR 증폭이 확인된 산물 10 μ l, 1 \times buffer(50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT pH 7.9)와 3 U의 두 가지 제한효소를 각각 다른 튜브에 첨가하여 37°C의 항온수조에서 3시간 처리하였다. 전기영동은 EtBr를 첨가한 2.5%의 Metaphore agarose (FMC Co. USA) gel에서 5 volt/cm로 전기영동을 실시한 후 사진을 촬영하여 유전자형을 결정하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. Primer 제작, PCR 증폭 및 제한효소 처리

소 *MC1R* 유전자의 아미노산 99번째와 104번째의 변이부분을 포함한 단편을 증폭시키기 위한 PCR primer 한쌍을 제작하여 350 bp의 PCR 산물을 얻을 수 있었는데, 62~68°C까지의 광범위한 annealing 온도에서 단일 밴드의 PCR 산물을 얻을 수 있었다. 또한 얻어진 PCR 증폭시킨 PCR 산물에 대하여 99번째 아미노산을 암호하는 코돈인 CTG가 CCG로 치환되었는지의 여부를 탐색하기 위하여 *MspA1* I을 이용하였고, 아미노산 104번째의 아미노산을 암호하는 코돈인 GGT에서 G의 결핍으로 인한 frame shift 변이를 탐색하기 위해서는 제한효소 *BsrF* I을 이용하였다. 얻어진 결과는 Fig. 1에서 보는 것과 같이 여섯 가지의 다른 유전자형을 확인할 수 있었다.

Fig. 1에서 보는 것처럼 PCR 산물을 *BsrF* I으로 절단하였을 경우, 대립유전자 E^D 와 E^+ 는 동일한 밴드양상인 116bp와 234bp의 두 개의 단편으로 분리되었고, e 는 절단되지 않는 350bp를 나타내었다 (Fig. 1 A). 또한 *MspA1* I으로 절단하였을 때 대립유전자 E^D 는 세 개의 단편 즉 48 bp, 106 bp, 그리고 196 bp로 분리되었고, E^+ 와 e 는 같은 밴드양상인 154bp와 196bp의 두 개의 단편으로 나타났다 (Fig. 1 B).

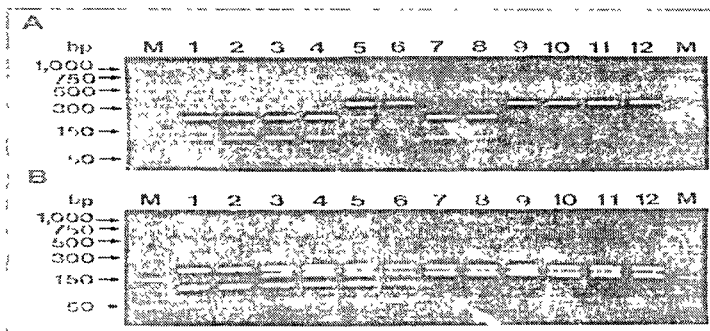


Fig. 1. PCR-RFLP of the bovine *MC1R*

A. *BsrF* I digests

B. *MspA1* I digests

Lane M : PCR size marker, 1 and 2 : $E^D E^D$, 3 and 4 : $E^D E^+$,

5 and 6 : $E^D e$, 7 and 8 : $E^+ E^+$, 9 and 10 : $E^+ e$, 11 and 12 : ee

이러한 결과는 Klungland 등 (1995)이 보고한 바와 같이 세 가지의 대립유전자 즉 E^D , E^+ 및 e 가 존재하며 그것은 각각 99번째와 104번째의 아미노산을 암호하고 있는 코돈의 변이를 분석하여 결정하였는데, *Aci* I과 *Bsr*F I을 이용하여 PCR 산물을 절단하여 각 개체의 유전자형을 결정하였던 결과와 같은 경향을 얻을 수 있었다.

Klungland 등(1995)이 E 좌위에서 유전자형을 결정하기 위하여 이용한 방법은 각 개체에 대하여 두 쌍의 primers를 사용하여 두 번의 PCR을 실시하여 증폭된 산물을 각기 다른 제한효소로 절단하는 비교적 복잡한 방법을 거쳤다. 그러나 본 실험에서는 제작한 한 쌍의 PCR primer로 증폭한 PCR 산물을 두 가지 제한효소 (*Bsr*F I과 *Msp*AI I)를 선정하여 각각 절단할 수 있는 방법의 개발은 물론 더 나아가 두 가지 제한효소를 동시에 한 튜브에서 절단함으로써 기존의 방법에 비하여 간편하고 신속하게 유전자형을 결정할 수 있는 방법을 확립하였다.

2. 소 품종별 유전자형 빈도 분석

한우를 포함한 총 1,044두의 시료에 대하여 PCR-RFLP 분석방법을 이용하여 소 종별로 유전자형 빈도를 분석한 결과를 Table 2에서 보는 것과 같다.

한우 404두의 유전자형을 분석해 본 결과 여섯 가지의 유전자형중에서 E^+e 와 ee 유전자형만이 검출되었으며, ee 유전자형이 전체에서 0.90으로 매우 높은 빈도로 나타났으나, E^+e 형은 0.10으로 낮은 빈도로 보였고 그 외의 다른 유전자형은 전혀 검출되어지지 않았다. 헤어포드에서도 유전자형 E^+e 와 ee 의 빈도가 각각 0.07과 0.93으로 한우와 비슷한 빈도를 보였다. 그러나 브라운스위스와 샤로레에서는 한우와 헤어포드에서는 볼 수 없었던 E^+E^+ 의 유전자형이 각각 0.70과 0.43의 높은 빈도로 검출되었다. 한편 한우와는 달리 흑모색을 가진 홀스타인 339두를 분석한 결과 유전자형 $E^D E^D$, $E^D E^+$ 및 $E^D e$ 가 각각 0.86, 0.00 및 0.14로 나타났으며, 앵거스에서도 각각 0.57, 0.26 및 0.17의 빈도를 나타냈다.

특히 젓소와 앵거스 두 품종에서는 대립유전자 E^D 를 가지지 않는 개체는 발견되지 않아 홀스타인과 앵거스의 모색 유전자형은 한우의 그것과 분명한 차이를 보이는 것으로 인정되었다. 한편

Table 2. Genotype frequencies of *MC1R* gene among cattle breeds

Breed	n	Frequencies of genotype					
		$E^D E^D$	$E^D E^+$	$E^D e$	$E^+ E^+$	$E^+ e$	ee
Hanwoo	404	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.90
Holstein	339	0.86	0.00	0.14	0.00	0.00	0.00
Angus	35	0.57	0.26	0.17	0.00	0.00	0.00
BrownSwiss	30	0.00	0.00	0.00	0.70	0.03	0.27
Chalorais	30	0.00	0.00	0.00	0.43	0.00	0.57
Limousin	29	0.21	0.00	0.38	0.03	0.03	0.35
Simmental	29	0.07	0.03	0.35	0.03	0.03	0.49
Hereford	30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.93
Imported beef	118	0.09	0.06	0.27	0.04	0.18	0.36
Total	1,044	0.21	0.04	0.14	0.14	0.05	0.43

수입육에 대한 유전자형 분석 결과 대립유전자 E^D 를 가진 시료수가 42%를 차지하고 있었다.

따라서 *MCIR* 유전자의 유전자형을 본 연구에서 수행한 방법과 같이 PCR-RFLP 분석방법을 이용한다면 현재 우리나라에서 젓소로 사육하고 있는 홀스타인 고기가 한우고기로 둔갑 판매되는 부정유통을 방지할 수 있는 하나의 DNA 표지인자로서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

한편 국내 쇠고기 부정유통을 방지하여 건전한 유통문화 확립을 위한 한우고기의 판별하기 위한 기술을 개발하려는 연구가 여러 가지 방법에 의하여 시도된 바 있으나 (홍 등, 1998; 이 등, 1994; 조 등, 1994), 지금까지는 주로 RAPD 분석방법을 이용하여 수행한 결과 실험의 재현성 등 여러 가지 문제점이 발생하여 실용화하지는 못하였다. 그러나 보다 최근 홍 등('98)이 개발한 한우 특이 SCAR 마커는 random primer에 비하여 비교적 안정한 마커로 인정받아 현장 적용시험 (blind test)을 수행한 바 있으나 이것 또한 100%의 판별 신뢰도를 보이지는 못하였다. 그러나 *MCIR*를 이용하여 황갈색의 한우와 흑백반의 젓소(홀스타인) 고기를 판별한 결과는 Fig. 1, 2 및 Table 2에서 보는 바와 같이 한우와 홀스타인종의 교잡종이 아닐 경우 정확히 판별이 가능한 결과를 얻어 젓소고기가 한우고기로 부정 유통되는 것을 방지하여 한우농가는 물론 소비자도 보호할 수 있는 실용화 가능성을 높였다고 할 수 있다.

이상의 결과를 고려해 볼 때 소의 *MCIR* 유전자의 변이와 모색의 유전은 Klungland 등(1995)이 보고한 것처럼 아주 밀접한 연관이 있음이 재차 증명되었으나 심멘탈과 리무진의 모색유전자 E 좌위와의 관계에 대해서는 좀 더 연구가 필요하다고 판단되어진다. 소 *MCIR* 유전자의 유전자형을 본 연구에서 제시된 PCR-RFLP 분석방법을 이용한다면 국내에서 부정 유통되는 젓소고기를 감별하는데 이용할 수 있는 하나의 유용한 DNA 표지인자로 활용될 수 있을 것으로 판단된다. 더 나아가 기존에 보고된 방법에 비하여 간편하고 명료하게 결과를 해석할 수 있을 뿐 아니라 예산을 절약할 수 있는 효과적인 방법의 확립으로 판별기술의 실용화에 충분히 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

IV. 적 요

본 연구는 한우고기를 수입육 및 젓소고기 등의 쇠고기를 판별할 수 있는 DNA marker를 개발하기 위하여 수행하였다.

첫 번째 실험으로 RAPD 기법을 이용한 중 특이 marker 개발 및 이 marker의 SCAR marker로의 개발을 목표로 수행되었다. Random primer 300개에 대하여 PCR 수행하여 품종 특이적인 양상을 나타내는 14개 primer를 선별하였고 그 중 MG-3, MG-6, MG-12의 primer는 각각 0.9 kb, 1.0 kb, 2.0 kb의 위치에서 홀스타인, 한우, 헤어포드 특이적인 RAPD 단편을 나타내었다.

이들 단편들 중 한우 특이적인 단편을 클로닝한 후 random primer가 포함된 부분의 염기서열을 결정하였다. 10 bp의 RAPD random primer에 10 bp의 염기를 추가하여 SCAR primer를 제작하였다. SCAR marker의 PCR 수행 결과, RAPD marker와 같은 1.0 kb의 크기에서 한우에서만 특이적으로 하나의 밴드로 증폭이 되었다. 이러한 결과는 젓소 DNA와의 비교실험에서와 같이 Holstein에서는 나타나지 않으면서 한우에서만 단일밴드가 증폭되어 한우와 젓소의 판별에 이용이 가능할 것으로 판단된다.

두 번째 실험으로 포유동물의 모색과 연관된 *MC1R* 유전자 변이와 소 품종간의 유전자형 빈도를 파악하고 한우와 흑모를 가진 홀스테인이나 앵거스와의 판별 가능한 DNA marker로서의 이용성을 알아보기 위하여 수행하였다.

MC1R 유전자의 변이부분을 증폭시킬 수 있는 한쌍의 primer를 제작하여 350 bp 크기의 PCR 산물을 얻어 제한효소 *BsrFI* 과 *MspAI* I 으로 각각 절단한 후 2.5%의 Metaphore agarose gel에 전기영동하여 유전자형을 결정하였다.

소 품종별 유전자형 빈도를 분석한 결과 한우에서는 E^+e 와 ee 유전자형이 각각 0.10과 0.90로 나타난 반면 젖소(홀스테인)에서는 유전자형 $E^D E^D$, $E^D E^+$ 및 $E^D e$ 가 각각 0.86, 0.00 및 0.14, 앵거스에서는 각각 0.57, 0.26 및 0.17의 빈도를 보여 젖소와 앵거스 두 품종 모든 개체가 대립유전자 E^D 를 가지고 있어 한우와는 분명한 차이를 보였다. 그러나 수입육의 경우 분석시료의 43%만이 E^D 를 가지고 있었다.

따라서 *MC1R* 유전자의 유전자형을 PCR-RFLP 방법을 이용한다면 현재 젖소고기가 한우고기로 둔갑 판매되는 부정유통을 방지할 수 있는 하나의 DNA 표지인자로서 활용될 수 있을 것으로 판단되었다.

결론적으로 본 연구에서 개발한 한우 특이 SCAR marker와 *MC1R* 유전자를 이용한다면 국내에서 사육하고 있는 젖소고기가 한우고기로 둔갑판매되는 부정유통사례를 근절할 수 있는 방법이 될 것으로 판단되나 다양한 품종이 교잡된 수입쇠고기와의 판별기술 개발을 위해서는 보다 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Adalsteinsson, S., Bjarnadottir, S., Vage, D. I., and Jonmundsson, J.V. 1995. Brown coat color in Icelandic cattle produced by one loci Extension and Agouti. *J. Hered.* 86:395-398.
2. Armstrong, S. G. and Leach, D. N. 1992. The use of HPLC protein profiles in fish species identification. *Food Chemistry* 44: 147.
3. Berger, R. G., Mageau, R. P., Schwab, B. and Johnston, R. W., 1988. Detection of poultry and pork in cooked and canned meat foods by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71:406-409.
4. Bultman, S.A.J., E.J. Michaud and R.P. Woychik. 1992. Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell*, 71:1195-1204.
5. Cargill, S. L., Anderson, G. B. and Medrano, J. F. 1995. Development of a species-specific marker using RAPD analysis to distinguish between sheep and goats. *Animal Biotechnology* 6(2): 93-100.
6. Fang D. Q., Ferici, C. T. and Roose, M. L. 1997. Development of molecular markers linked to a gene controlling fruit acidity in citrus. *Genome* 40(6): 841-849.
7. Garcia, G. M., Stalker, H. K., Shroeder, E. and Kochert, G. 1996. Identification of RAPD, SCAR and RFLP markers tightly linked to nematode resistance genes introgressed from *Archis*

- cardenasii* into *Archis hypogaea*. *Genome* 39(5): 836-845.
8. Gutierrez-Adan, A., Cushwa, W. T., Anderson, G. B. and Medrano, J. F. 1997. Ovine-specific Y-chromosome RAPD-SCAR marker for embryo sexing. *Anim. Genet.* 28(2):135-138.
 9. Hearing, V.J. and Tsukanmoto, K. 1991. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* 5:2902-2909.
 10. Hyden, A. R., 1979. Immunochemical determination of species of origin of meat products. Univ Microfilms Int., #80-01144. Ph. D. thesis, University of Wisconsin. Madison. WI.
 11. Jackson, I.J. 1993. Color-coded switches. *Nature* 362:587-588
 12. Jackson, I.J. 1994. Molecular and developmental genetics of mouse coat color. *Annu. Rev. Genet.* 23:189-217.
 13. Kemp, S. J., and Teale, A. J. 1994. Random primed PCR amplification of pooled DNA reveals polymorphism in a ruminant repetitive DNA sequence which differentiates *B. indicus* and *B. taurus*. *Anim. Genet.* 25:83-88.
 14. Kijas, J.M.H., R. Wales, A. Tornsten, P. Chardon, M. Moller and L. Andersson. 1998. Melanocortin receptor 1 (*MC1R*) mutations and coat color in pigs. *Genetics* 150:1177-1185.
 15. King, N. L. and Kurth, L. 1982. Analysis of raw beef samples for adulterant meat species by enzyme-staining of isoelectric focusing gels. *J. of Food Sci.* 47:1608
 16. Klunglang, H., and Vage, D.I. 1999. Presence of the dominant extension allele E(D) in red and mosaic cattle. *Pigment Cell Res.* 12 : 391-393.
 17. Klunglang, H., Vage, D.I., Gomez-Raya, L., Adalsteinsson, S., Lien, S. 1995. The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination, *Mamm Genome* 6:636-639.
 18. Lu, D., Willard, D., Patel, I.R., Kadwell, S., Overton, L., Kost, T., Luther, M., Chen, W., Woychik, R.P., Wilkison, W.O., Cone, R.D. 1994. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 371:799-802.
 19. Marklund, L., Moller, J., Sandberg, K., and Anderson, L. 1996. A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (*MC1R*) is associated with the chestnut coat color in horses. *Mamm. Genome* 7:895-899.
 20. Melotto, M., Afanador, L. and Kelly, J. D. 1996. Development of a SCAR marker linked to the I gene in common bean. *Genome* 39(6): 1216-1219.
 21. Mountjoy, K.G., Robbins, L.S., Mortrud, M.T., Cone, R.D. 1992. The cloning of a family of genes that encoded the melanocortin receptors. *Science* 257:1248-1251.
 22. Naqvi N. I. and Chatto, B. B. 1996. Development of a sequence characterized amplified region (SCAR) based indirect selection method for a dominant blast-resistance gene in rice. *Genome* 39(1): 26-30.
 23. Newton J.M., Wilkie A.L., He L., Jordan S.A., Metallinos D.L. Holmes N.G., Jackson I. J., and Barsh G.S. 2000. Melanocortin 1 receptor variation in the domestic dog. *Mamm. Genome*

- 11;24-30.
24. Ollivier, L., and P. Sellier. 1982. Pig genetics: a review. *Ann. Genet. Sel. Anim.* 14:481-544.
 25. Paran, I. and Michelmore, W. 1993. Development of reliable PCR- based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85:985-993.
 26. Perry, W.L., Naudeau, J.H., Jenkins, N.A. 1994. The molecular basis for dominant yellow agouti coat color mutations. *Bioessays.* 16:705-707.
 27. Robbins, L.S., Nadeau, J.H., Johnson, K.R., Kelly, M.A., Roselli-Rehffuss, L., Baack, E., Mountjoy, K.G., Cone, R.D. 1993. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles results from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell.* 72:827-834.
 28. Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning a laboratory manual.* 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory
 29. Sinclair, A. J., Slattey, W. J. and O'Dea, K. 1982. The analysis of polyunsaturated fatty acids in meat by capillary gas-liquid chromatography. *J. of Sci. Food Agric.* 33:771
 30. Sotelo, C. G., Pineiro, C., Gallardo, J. M. and Perez-Martin, R. I. 1993. Fish species identification in seafood products. *Trends in food Sci. & Tech.* 4: 395
 31. Takeuchi, S., Suzuki, H., Yabuuchi, M., and Takahashi, S. 1996. A possible involvement of melanocortin 1-receptor in regulation feather color pigmentation in the chicken. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1308:164-168.
 32. Vage D.I., Klungland H., Lu, D., and Cone R.D. 1999. Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. *Mamm. genome* 10:39-43.
 33. Vage, D.I., D. Lu, H. Klungland, S. Lien, S. Adalsteinsson, and R.D. Cone. 1997. A non-epistatic interaction of Agouti and Extension in the fox. *Vulpes vulpes.* *Nature Genetics.* 15:311-315.
 34. Williams, J. K. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.
 35. 강민수, 김재홍, 박창식, 백동훈, 상병찬, 여정수, 이계승, 이봉덕, 정선부, 최광수, 한성욱, 한재용, 1996. 가축의 품종, 선진문화사 pp. 89.
 36. 강종욱, 정규성, 조규석, 坂田亨一, 유성하. 1992. 한우육과 수입우육의 감별 검사에 관한 연구. *한축지* 34:121-124
 37. 민병록, 한재용, 이무하. 1995. RAPD기법을 이용한 쇠고기 품종 (한우육, 유우육(Holstein육), 수입우육) 구분. *한축지* 37(6):651-660.
 38. 민중석, 민병록, 한재용, 이무하. 1996. RAPDs을 이용한 육류(한우육, 사슴육, 면양육, 산양육)의 축종판별. *한축지* 38(3):231-238.
 39. 이창수, 유명복, 나기준, 조병대, 최병규. 1994. 핵산분석법에 의한 한우의 판별. *한축지* 36(4):369-373.
 40. 조병욱, 한재용. 1994. 한우 특이적 RAPD 표지인자 개발. *한축지* : 36(3) 263-270.

41. 조병욱, 황규춘, 이학교, 이광전, 한재용. 1997. 축우품종의 특성파악을 위한 RAPD에 의한 DNA 표지인자의 이용. 한국동물유전육종학회지 1(1): 49-57.
42. 홍영호, 정일정, 김태현, 김희발, 윤두학, 김형선, 조병욱, 한재용. 1998. 품종 특이성을 이용한 한우 판별 표지인자 개발. 한국동물유전육종학회지. 2:107-114.