

Cytochrome B 유전자의 PCR-RFLP Marker에 의한 식육자원의 축종 판별

신성철 · 최은주 · 허연범 · 백명기 · 권수연 · 김보현 · 정구용¹ · 정의룡*

상지대학교 생명공학과, ¹상지대학교 동물자원학과

서 론

축산물 수입개방 이후 외국으로부터 각종 식육자원의 수입물량이 매년 증가하는 추세에 있고 국내에서 유통되고 있는 수입육 또는 국산육의 식육형태의 다양화로 축종 고유의 조직학적 및 해부학적 특성이 없어져 정확한 식육의 육종 및 축종 구별이 어려워지고 있는 실정이다. 특히, 이종 혼합육의 가공 육제품 상태에서의 외관이나 관능적 검사에 의한 육종판별은 거의 불가능하기 때문에 식육이나 가공 육제품의 원료육의 정확한 표시와 소비자들의 신뢰성과 안전성 확보를 위해 제품의 원료육 표시를 객관적으로 검증할 수 있는 과학적인 판별 기술개발이 매우 중요하다. 또한, 사료나 화장품 및 의약품 등의 주원료나 부 원료로 첨가된 동물성 성분에 대한 제품 표기의 동일성 여부 및 함량의 유효성 등을 과학적으로 정확하게 확인할 수 있는 기술개발도 시급한 실정이다. Cytochrome B 유전자는 척추동물에게만 있는 미토콘드리아 DNA의 일종으로 각 축종별로 고유한 염기서열을 지니고 있는 것으로 알려져 있어 동물의 계통발생학적 연구에 널리 이용되어져 왔고 최근에는 동물의 축종감별에 유용한 후보유전자로 주목되고 있다⁽¹⁾. 본 연구의 목적은 cytochrome B 유전자의 PCR-RFLP 분석기법을 이용하여 다양한 식육자원 및 각종 가공 육제품의 원료육에 대한 정확하고 재현성 높은 축종 및 육종 감별기술을 개발하는데 있다.

재료 및 방법

본 연구에 사용한 공시재료 중에서 면양육은 뉴질랜드산 양고기 수입회사로부터 냉동육 상태로 구입하여 사용하였고, 마육은 한국 마사회로부터 시료를 제공받아 이용하였으며 우육, 돈육, 염소육, 사슴육 및 닭고기는 시중에 유통되고 있는 냉동 또는 냉장육을 구입하여 사용하였다. 각 공시축의 근육조직(약 10g)으로부터 genomic DNA를 추출하고, TE buffer(10mM Tris-HCl pH 0.4, 1mM EDTA)에 용해하여 template DNA 시료로 사용하였다.

7종류의 축종(닭, 양, 돼지, 소, 사슴, 말, 염소)에 대한 cytochrome B 유전자의 PCR-RFLP 분석을 위한 primer 및 제한효소는 Table 1 과 같다. PCR 반응액 조성은

genomic DNA 50ng, sense primer 및 anti-sense primer 각 0.1 μ M, dNTP 각 250 μ M, 10 X PCR buffer 2 μ l, 그리고 Taq DNA polymerase 1 unit을 첨가하여 최종 부피를 20 μ l로 조정하였다. PCR cycle은 최초 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 예비가열 한 후, 94 $^{\circ}$ C에서 20초, 55 $^{\circ}$ C에서 10초, 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 40초간의 cycle을 총 30회 반복한 다음 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 2분간 가열하고 PCR 반응을 종료하였다. PCR 종료 후 각 축종별 PCR 증폭산물을 HaeIII 또는 Hinf I 제한효소로 각각 절단한 다음 4% agarose gel 전기영동으로 DNA band를 검출하고, 각 축종별 RFLP 양상을 비교 분석하였다.

Table 1. Primer sequences and restriction enzymes of cytochrome B gene for PCR-RFLP analysis

Gene	Primer sequence (5' to 3')	Restriction enzyme	Fragment size(bp)
Cytochrome B	CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA	HaeIII,	359
	GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA	Hinf I	

결과 및 고찰

국내에서 유통되고 있는 수입산 및 국내산 식육자원 7종(닭, 양, 돼지, 소, 사슴, 말 및 염소)의 육류를 대상으로 축종 특이적인 PCR-RFLP marker 분석을 위해 cytochrome B 유전자의 특정 염기서열을 포함하는 primer를 이용하여 증폭한 후, PCR 증폭산물의 전기영동상은 Figure 1에 제시된 바와 같다. 본 연구에서 공시한 7종류 축종의 육류시료 모두에서 기대했던 359 bp 크기의 DNA 단편이 검출되어 cytochrome B 유전자의 PCR 증폭이 성공적으로 이루어 졌음을 알 수 있었다. 그리고 각 PCR 증폭산물을 제한효소(HaeIII 또는 Hinf I)로 각각 절단하고 4% agarose gel을 이용하여 전기영동한 후 각 제한효소 인지부위의 수 및 절단 위치에 따라 검출된 PCR-RFLP 전기영동상은 Figure 2와 같고, 축종별 그리고 제한효소별로 확인된 DNA 단편들의 크기 및 수는 Table 2에 제시하였다.

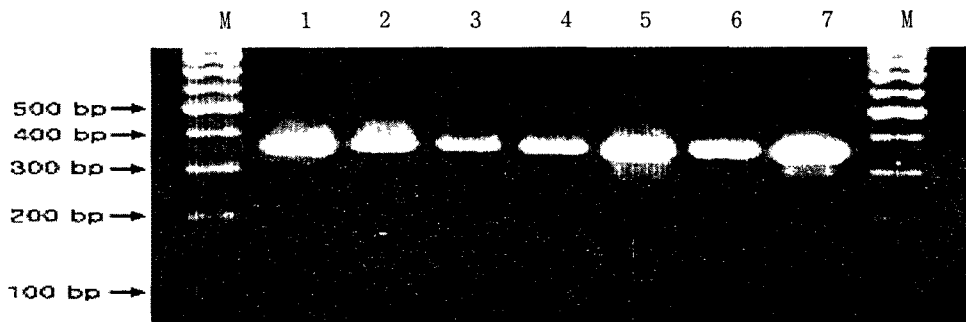


Figure 1. PCR products of cytochrome B gene in seven animal species.

Lane 1, chicken; lane 2, sheep; lane 3, pig; lane 4, cattle; lane 5, deer; lane 6, horse; lane

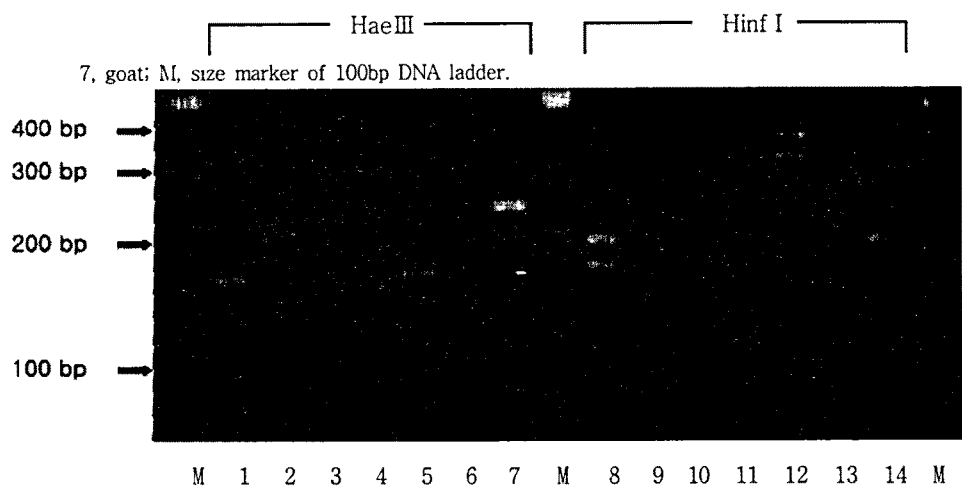


Figure 2. DNA profiles of PCR products of cytochrome B gene digested with HaeIII and Hinf I enzymes in seven animal species, respectively. chicken(lanes 1 and 8), sheep(lanes 2 and 9), pig(lanes 3 and 10), cattle(lanes 4 and 11), deer(lanes 5 and 12), horse(lanes 6 and 13), goat(lanes 7 and 14). M: size marker(100 bp DNA ladder)

Table 2. Inferred restriction fragment sizes following PCR-RFLP analysis of the cytochrome B gene with two restriction enzymes.

Speices	HaeIII fragment size (bp)	Hinf I fragment size (bp)
Chicken	74, 126, 159	<10, 161, 188
Sheep	69, 124, 157	163, 196, 359
Pig	74, 132, 153	uncut (359)
Cattle	78, 281, 359	<55, 115, 195, 359
Deer	72, 126, 159, 281, 285, 359	<55, 304, 359
Horse	<55, 78, 92, 112, 126, 159, 241, 281, 359	161, 198, 241, 320, 359
Goat	<55, 74, 126, 159, 241, 281	161, 198, 359

식육자원 7종류의 축종(닭, 양, 돼지, 소, 사슴, 말, 염소)을 대상으로 cytochrome B 유전자의 특정 염기서열 영역을 PCR로 증폭하고 특정 제한효소(HaeIII 및 Hinf I)로 절단한 결과 Figure 2 및 Table 1에서 보는 바와 같이 각 축종 간의 DNA banding pattern에 명확

한 차이를 보이는 종 특이적인 PCR-RFLP marker가 확인되었다. 따라서, cytochrome B 유전자의 중간 염기서열 보존성이 높은 DNA 영역을 PCR로 증폭한 다음 Hae III 또는 Hinf I 제한효소를 이용하여 검출되는 RFLP marker는 각종 식육 및 가공육제품 원료육의 축종 및 육종 감별에 이용 가능한 결과를 얻었다.

이상의 연구결과로부터 cytochrome B 유전자의 축종 간 염기서열 변이를 이용하는 PCR-RFLP marker 분석 기법은 생리적 및 생물학적 기능이 잘 알려진 특정 주 유전자를 대상으로 제한효소 인지부위 차이에 따른 축종감별 기술로서 random primer를 이용하는 RAPD 또는 SCAR 방법에 비하여 보다 정확하고 안정적이며 재현성이 보장된 분석 결과를 얻을 수 있어 DNA marker를 이용한 새로운 식육자원의 육종 및 축종감별 기술로 실용화가 가능할 것으로 기대된다.

요 약

본 연구는 cytochrome B 유전자의 PCR-RFLP 분석기법을 이용하여 다양한 식육자원 및 각종 가공 육제품의 원료육에 대한 정확하고 재현성 높은 축종 및 육종 감별기술을 개발하기 위하여 수행되었다. 국내에서 유통되고 있는 7종류 축종(닭, 양, 돼지, 소, 사슴, 말, 염소)의 육류로부터 cytochrome B 유전자의 특정 염기서열을 포함하는 primer를 설계 제작하여 PCR-RFLP 분석을 실시하였다. 각 축종의 근육조직으로부터 genomic DNA를 추출하고 PCR 증폭 반응을 수행한 후 얻어진 PCR 증폭산물(359 bp)을 두 종류의 제한효소(Hae III 및 Hinf I)로 각각 절단한 결과 축종 간 그리고 제한효소 간에 명확한 차이를 보이는 종 특이적인 PCR-RFLP marker를 검출하였다. 따라서, 본 연구에서 개발한 cytochrome B 유전자의 종 특이적 PCR-RFLP marker는 각종 식육 및 가공 육제품의 육종 및 축종 판별에 매우 유용한 DNA marker로 이용될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Federica, B. et al. (2001) J. Agric. Food Chem., 49, 3775-3781.
2. Partis, L. et al. (2000) Meat Sci., 54, 369-376.
3. Meyer, R. et al. (1994) J. AOAC Int., 78, 1542-1551.
4. Kingombe, C. I. B. et al. (2001) Meat Sci., 57, 35-41.
5. Matsunaga, T. et al.(1999) Meat Sci., 51, 143-148.