

## PCR-RFLP 분석기법을 이용한 가금육의 종(닭, 칠면조, 오리) 판별 기술 개발

신성철·최은주·이준제·김희선·조하나·전상희·정구용<sup>1</sup>·정의룡\*

상지대학교 생명공학과, <sup>1</sup>상지대학교 동물자원학과

### 서 론

육류 수입개방 및 육제품 가공 산업의 발달에 따라 식육 및 원료 육이 더욱 다양화되고 세분화되고 있어 이에 따른 각종 식육자원의 축종 및 육종 감별 기술이 요구되고 있다. 육류 유통 및 육제품 가공 산업에서 저가의 가금육이 고가의 포유류 고기로 또는 저가의 가금육이 고가의 가금육으로 둔갑 유통되거나 가공 육제품의 원료로 사용될 경우 이를 과학적으로 식별할 수 있는 기술개발이 필요하다. 특히, 포유류에 비해 닭, 오리 및 칠면조의 조류같이 유연관계가 높은 근연종 간의 동정은 더욱 어려워 가금류의 축종 감별을 위한 정확한 감식 기술 개발이 요청된다. 최근 분자생물학 및 분자 유전학 기법의 발달에 따라 동물의 DNA를 직접 이용하는 유전자 분석 기술이 식육의 축종 판별에 도입되어 종 특이적인 DNA 염기서열 차이에 따른 축종 판별은 물론 동종 내 품종 판별의 가능성도 제기되었다<sup>(1),(2),(3)</sup>. 그동안 국내에서 RAPD 기법을 이용한 축종 감별 기술이 보고된 바 있으나 정확성 및 재현성이 낮아 실질적으로 활용하는 데는 한계가 있다. 본 연구는 PCR-RFLP의 유전자 분석기술을 이용하여 가금육의 식육자원으로 가장 널리 사용되고 있는 닭, 오리 및 칠면조 3종의 조류 고기의 육종감별 기술을 개발 이를 산업적으로 실용화하고자 수행하였다.

### 재료 및 방법

본 연구에 사용한 공시재료는 시중에 유통 판매되고 있는 가금육으로 닭고기, 칠면조육 및 오리고기를 각각 10개체씩 구입하여 사용하였다. 각 공시재료의 근육조직(약 10g)으로부터 genomic DNA를 분리 정제하고 TE buffer(10mM Tris-HCl pH 0.4, 1mM EDTA)에 용해하여 DNA 시료로 사용하였다.

가금육 3종(닭, 칠면조, 오리)의 cytochrome B 유전자의 PCR-RFLP 분석을 위한 primer 및 제한효소는 Table 1과 같다. PCR 반응액 조성은 genomic DNA 50ng, forward primer 및 reverse primer 각 0.1 $\mu$ M, dNTP 각 250 $\mu$ M, 10 X PCR buffer 2 $\mu$ l 그리고 Taq DNA polymerase 1 unit을 첨가하여 최종 부피를 20 $\mu$ l로 조정하였다. PCR 증폭은 처음 94 $^{\circ}$ C에

서 1분간 예비가열 한 후, 94℃에서 20초, 55℃에서 10초 그리고 72℃에서 40초간의 회전을 총 30회 반복한 다음 마지막으로 72℃에서 2분간 가열하고 PCR 반응을 종료하였다. PCR 종료 후 각 가금 종별 증폭산물을 HaeIII 및 Hinf I 제한효소로 각각 절단하고, 4% agarose gel 에 전기영동 하여 분리한 후 ethidium bromide 염색을 통해 DNA band를 검출하고, 가금 육종별 DNA의 RFLP 양상을 비교 분석하였다.

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

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

### 결과 및 고찰

본 연구는 국내에서 유통되고 있는 3종의 가금육(닭, 오리 및 칠면조)의 조류 육을 대상으로 축종 특이적인 PCR-RFLP marker 분석을 위해 cytochrome B 유전자의 특정 염기서열을 포함하는 primer를 이용하여 증폭한 후 PCR 증폭산물의 전기영동 결과를 Figure 1에 제시하였다. 가금류 3종의 육류시료 모두에서 예상한 대로 359 bp 크기의 DNA 단편이 검출되어 cytochrome B 유전자의 PCR 증폭이 성공적으로 이루어 졌음을 알 수 있었다. 그리고 각 PCR 증폭산물을 두 종류의 제한효소(HaeIII 및 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 같다. 그리고 축종과 제한효소에 따라 확인된 DNA 단편들의 크기 및 수는 Table 2에 각각 제시하였다.

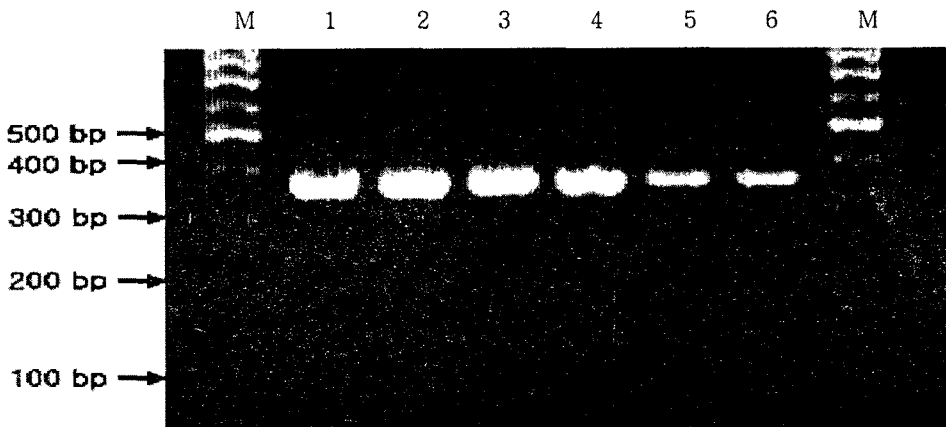


Figure 1. PCR products of cytochrome B gene in three species of poultry. Chicken(lanes 1, 2), turkey(lanes 3, 4), duck(lanes 5, 6); M, 100bp DNA ladder.

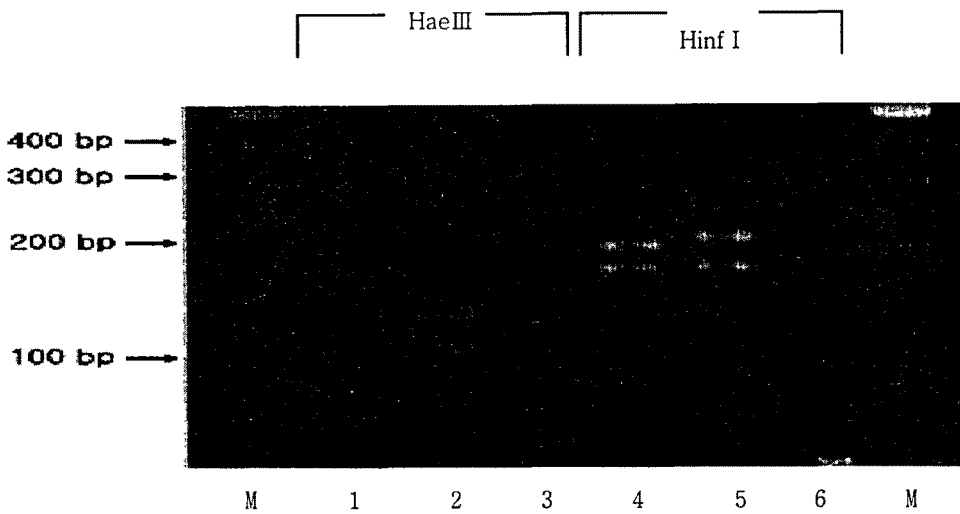


Figure 2. DNA banding pattern of PCR products of cytochrome B gene digested with HaeIII and Hinf I enzymes in three species of poultry, respectively, chicken(lanes 1 and 4), turkey(lanes 2 and 5), duck(lanes 3 and 6). M, 100bp DNA ladder.

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

Speices	HaeIII fragment size (bp)	Hinf I fragment size (bp)
Chicken	74, 126, 159	<10, 161, 188
Turkey	55, 70, 98, 125	161, 196
Duck	78, 281	161, 198

3종류의 가금육 축종(닭, 칠면조 및 오리)을 대상으로 cytochrome B 유전자의 특정 염기 서열 영역을 PCR로 증폭하고 특정 제한효소(HaeIII 및 Hinf I)로 각각 절단한 결과, HinfI 제한효소의 경우 닭고기는 칠면조 및 오리육과 확실한 차이를 보였으나 칠면조육과 오리육 간에는 거의 유사한 크기를 갖는 banding pattern을 보여 두 종간의 구별에 어려움이 있었다. 그러나, HaeIII 제한효소에서는 3종의 가금육 축종간의 DNA banding pattern에 명확한 차이를 보이는 종 특이적인 PCR-RFLP marker가 확인되어 가금육간의 축종판별이 가능하였다. 따라서, cytochrome B 유전자의 중간 염기서열 보존성이 높은 DNA 영역을 PCR로 증폭한 다음 HaeIII 또는 Hinf I 제한효소를 이용하여 검출되는 RFLP 양상은 가금육 및 가

금육을 이용한 가공 육제품 원료육의 축종 및 육종 감별에 유용한 DNA 표지인자로 활용할 수 있다.

이상의 연구결과를 종합해 볼 때 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 가금류 식육자원의 육종 및 축종감별 기술로 실용화가 가능할 것으로 기대된다.

## 요 약

본 연구는 cytochrome B 유전자의 PCR-RFLP 분석기법을 이용하여 다양한 가금류 식육 자원 및 각종 가공 육제품의 원료육에 대한 정확하고 재현성 높은 축종 및 육종 감별기술을 개발하기 위하여 수행되었다. 국내에서 유통되고 있는 중간 근연관계가 높은 3종의 가금육(닭, 칠면조 및 오리)의 육류에서 분리한 DNA 시료를 대상으로 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(HaeIII 및 Hinf I)로 각각 절단한 결과 특히, HaeIII 제한효소에서 가금류의 축종 간 그리고 제한효소 간에 명확한 차이를 보이는 종 특이적인 PCR-RFLP marker를 검출하였다. 따라서, 본 연구에서 개발한 cytochrome B 유전자의 가금류 종 특이적 PCR-RFLP marker는 가금류의 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. Carr, S. M., et al. (1991) Canadian J. Fisheries and Aquatic Sci., 48, 48-52.
5. Hird, H. et al. (2003) Meat Sci., 65, 1117-1123
6. Kingombe, C. I. B. et al. (2001) Meat Sci., 57, 35-41