

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) DNA Marker를 이용한 한국 재래흑염소육 감별

정 의 룡[†]

상지대학교 생명자원과학대학 응용동물과학부

Identification of Korean Native Goat Meat using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) DNA Markers

Eui-Ryong Chung[†]

Division of Applied Animal Sciences, College of Life Science and Natural Resources, Sangji University

Abstract

This study was carried out to develop the breed-specific DNA markers for breed identification of Korean native goat meat using amplified fragment length polymorphism (AFLP)-PCR techniques. The genomic DNAs of Korean native goat, imported black goat and four dairy goat breeds(Saenen, Alpine, Nubian and Toggenburg) were extracted from muscle tissues or blood. Genomic DNA was digested with a particular combination of two restriction enzymes with 4 base(Mse I and Taq I) and 6 base(EcoR I and Hind III) recognition sites, ligated to restriction specific adapters and amplified using the selective primer combinations. In AFLP profiles of polyacrylamide gels, the number of scorable bands produced per primer combination varied from 36 to 74, with an average of 55.5. A total of 555 bands were produced, 149(26.8%) bands of which were polymorphic. Among the ten primer combinations, two bands with 2.01 and 1.26 kb in M13/H13 primer and one band with 1.65 kb in E35/H14 primer were found to be breed-specific AFLP markers in Korean native goat when DNA bands were compared among the goat breeds. In the E35/H14 primer combination, 2.19, 2.03, 0.96 and 0.87 kb bands detected in imported black goat, 2.13 kb band in Saenen breed and 2.08 kb band in Nubian breed were observed as breed-specific bands showing differences between goat breeds, respectively. The E35/H13 primer combination produced four DNA bands distinguished between Korean native goat and Saenen breed. The is study suggested that the breed specific AFLP bands could be used as DNA markers for the identification of Korean native goat meat from imported black goat and dairy goat meats.

Key words : AFLP DNA fingerprinting, breed-specific DNA marker, Korean native goat meat.

서 론

최근 축산물 수입개방에 따른 동물산업 분야의 무한 경쟁 시대를 맞이하여 우리 나라의 기후 풍토에 적합하고 대외경쟁력을 갖춘 축종의 발굴 육성이 중요한 현안으로 주목되고 있는 가운데 우리 나라 재래흑염소는 WTO 체제를 극복할 수 있는 대체작목으로서 가격 경쟁력과 품질 경쟁력을 두루

갖춘 유일한 축종으로 평가되고 있다. 흑염소는 이미 지난 1990년대부터 지육과 생축에 대한 수입개방이 이루어졌으나 국내 사육두수는 매년 지속적으로 증가하여 수입개방 당시인 1990년말 약 21만두에서 1996년도에는 약 70만두로 3배 이상 급신장하였으나 '96년을 정점으로 감소하기 시작하여 2001년도에는 44만두(농림수산통계연보, 2002)로 약 38% 가량 감소하였다. 그 동안 국민소득 증가에 따른 육류소비의 다양화 및 질적 고급화 그리고 건강식품 및 신토불이의 토종 식품을 선호하는 추세에 힘입어 흑염소의 육류소비량이 급증하였고 일부 지역에서는 흑염소 제품을 지역 특산품으로 브랜드화 함으로써 새로운 농가 소득원으로 가능성이 기대

[†]Corresponding author : Eui-Ryong Chung, Division of Applied Animal Sciences, College of Life Science and Natural Resources, Sangji University, Wonju 220-702, Korea. Tel : 82-33-730-0541, Fax : 82-33-730-0503. e-mail : erchung@mail.sangji.ac.kr

되고 있다. 그러나, 현재 토종흑염소는 1963년부터 외국에서 도입된 Saanen 유종 산양과의 누진교배로 인한 잡종화와 특히 90년 이후 수입이 허용된 외국의 육용종 수입흑염소와 무분별한 교잡이 성행하여 순수 혈통이 문란해지고 순종 흑염소로서 순도유지가 매우 심각한 상태에 놓여있을 뿐만 아니라, 흑염소 전문음식점이 늘어나 염소고기의 소비가 증가하고 보신 강장제의 건강 보조식품으로서 흑염소 증탕 가공제품의 수요가 증가함에 따라 이들 외국산 수입흑염소와 육용종 염소육이 재래흑염소육으로 둔갑 판매 유통되는 부조리가 만연하여 순수 재래흑염소 사육농가는 물론 소비자에게도 막대한 경제적 손실과 피해를 주고 사회적으로도 물의를 야기함으로써 국내 흑염소 시장에 큰 혼란을 가져와 우리나라 흑염소 산업의 경쟁력을 약화시키는 문제점으로 지적되고 있다. 따라서, 우리 나라 재래흑염소에 대한 올바른 선별기준을 제시하고 재래흑염소의 순수혈통을 정립하기 위해서는 수입흑염소 품종 및 수입염소육과 차별화할 수 있는 순수 재래흑염소와 흑염소 고기의 품종 및 육종판별 기술개발이 매우 중요하고 시급한 과제라고 할 수 있다.

동물의 종이나 품종식별은 형태, 모색, 체형 등 외형적 특징의 표현형에 근거하여 판별할 수 있으나 표현형으로 구별되는 품종이라 할지라도 도축하여 고기형태로 전환되면 축종 및 품종판별은 거의 불가능하게 된다. 그 동안 각종 원료육과 육제품 등 축육자원의 축종판별을 위한 기술로서 면역효소측정법과 등전점 전기영동법등이 비교적 정확도가 높은 방법으로 사용되어져 왔다. 이들 면역학적 및 전기영동 방법은 축종간에 단백질 조성 및 구조적 차이에 따른 종 특이적 단백질(species-specific protein)을 검출함으로써 축종 식별이 가능하였다. 그러나, 종 특이적 단백질은 종내에서는 동일하기 때문에 동종내 품종간의 판별에 이용은 사실상 불가능하다고 할 수 있다. 식육 단백질은 도축 후에 그들의 생물학적 활성이 소실되고 동물세포의 형태에 따라 특정 단백질의 존재 유무와 성질이 좌우되며 더욱이 가열에 의한 단백질 변성을 일으키는 문제점을 지니고 있다(Calvo et al., 2001).

최근 분자유전학 및 생명공학 기술의 눈부신 발달에 따라 유전자 DNA의 최종 생산물로서 단백질 및 효소 수준에서 구별이 어려운 품종간의 차이는 유전자 분석기법을 이용한 DNA의 분자수준에서 동종 내 품종식별이 가능하게 되었다. DNA 분석기법을 이용한 축종 및 품종 감별법은 DNA의 종이나 품종 특이적 염기서열 차이를 근거해 판별하므로 단백질 분석에 비해 월등히 우수한 고감도 식별능력을 갖고 있음이 잘 알려져 있다. 특히, PCR 기술을 이용한 DNA 분석기법의 개발은 극소량의 DNA 시료로부터 목적으로 하는 염기서열 영역을 *in vitro* 내에서 특이적으로 증폭하여 검정할 수 있고 특히 실험조작이 단순하고 단시간 내 신속하게 결과를

얻을 수 있다는 장점 때문에 식육 및 육제품의 축종 및 품종 판별에 가장 우수한 방법으로 알려져 있다(Matsunaga et al., 1999; Colgan et al., 2001). PCR 기술을 이용하여 DNA 다형 현상을 검출하는 방법 가운데 그 동안 주로 사용되어온 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 기법은 표적 유전자의 특정 염기서열에 대한 사전 정보 없이도 임의의 염기서열을 갖는 primer를 이용하여 genomic DNA를 증폭하고 다형성을 검출함으로써 무한정한 primer의 제작과 이용이 가능하며 각종 동식물의 유전분석 및 종 또는 품종식별에 폭넓게 응용되어져 왔다. 국내의 경우도 그 동안 이 등(1994)과 조와 한(1994)은 한우 품종에 특이적인 RAPD marker를 각각 보고한 바 있고, 그 후 민 등(1995, 1996)은 쇠고기 품종구별 및 각종 육류의 축종판별에 RAPD를 이용하였고, 정 등(1995)도 한우와 구별될 수 있는 Holstein 젖소 품종의 특이적인 RAPD marker를 검출하였다. 최근에 정 등(1999)은 RAPD 기법을 이용하여 한국 재래흑염소의 품종 특이적인 DNA marker를 개발하고 흑염소 품종 판별에 이용 가능성을 제시한 바 있다. 그러나, 이들 RAPD-PCR 방법은 분석기술의 신속성과 간편성에도 불구하고 PCR 증폭조건에 대한 민감성이 특이적으로 높아 분석결과의 재현성이 낮다는 커다란 문제점이 지적되어 왔다.

최근에 PCR 기법을 이용한 새로운 DNA 분석기법으로서 AFLP(amplified fragment length polymorphism) 기법은 기존의 RFLP(restriction fragment length polymorphism)와 RAPD 기술의 장점만을 조합하여 개발한 유전자지문분석기술로서 각종 제한효소 및 primer의 다양한 조합으로 고도의 다형성과 다수의 polymorphic DNA band를 신속하게 검출할 수 있고 재현성이 높기 때문에 DNA 지문분석에 강력한 도구로 인정되고 있다(Vos et al., 1995; Lin et al., 1996). 본 연구는 축산물 수입개방 시대에 외래종 염소 및 염소육 수입에 대응한 한국 재래흑염소 생산농가 및 소비자를 보호하고 수입염소육의 불법 유통판매 근절 및 부정육 검출을 위한 방안으로서 새로운 유전자 지문분석방법인 AFLP-PCR 기법을 이용하여 재래흑염소의 생산, 가공 및 유통과정에서 신용과 품질을 보증할 수 있는 즉, 재래흑염소의 유전적 순수성을 검증하고 수입 염소육과 차별화할 수 있는 순수 재래산양육 판별 기술을 개발하고자 수행하였다.

재료 및 방법

공시재료

본 연구에 사용된 공시재료로서 재래종 흑염소 30두와 수입국이 명확하지 않으나 호주산으로 추정되는 육용종 수입 흑염소 15두는 각 사육농가 및 흑염소 가공장의 협조를 얻

어 도축시 도체로부터 각각 약 10 g의 정육시료를 채취하여 냉장보관 상태로 운반한 후 DNA를 분리하여 냉동 보관하였다. 유용종 염소(Saanen, Alpine, Nubian 및 Toggenburg) 4개 품종은 강원도 홍천의 염소목장에서 각각 10두씩으로부터 혈액시료를 채취하여 genomic DNA 분리를 위한 시료로 이용하였다.

실험방법

1. Genomic DNA 분리 및 정제

1) 근육조직으로부터 DNA의 분리 및 정제

공시축의 각 근육조직으로부터 genomic DNA의 추출 및 정제는 Miller 등(1988)의 방법을 일부 수정하여 실시하였다. 즉, 근육조직 5 g에 3배의 lysis buffer I(155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 1 mM EDTA)을 첨가한 후 homogenizer를 이용하여 13,000 rpm으로 균질화시킨 다음 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 침전된 pellet에 lysis buffer II(Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0.5% SDS) 4 mL와 proteinase K(500 µg/mL)을 첨가하고 65°C에서 15분간 배양한 후 6M NaCl 1.5 mL와 chloroform 4 mL를 첨가하여 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 ethanol로 침전된 DNA를 TE buffer에 용해하여 보관하였다.

2) 혈액으로부터 DNA의 분리 및 정제

혈액 약 5 mL로부터 genomic DNA의 추출 및 정제는 정 등 (2000)의 방법에 따라 추출하여 분리한 DNA는 TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA)에 용해하였고 DNA 농도는 260 nm의 spectrophotometer로 UV 흡착에 의해 측정하였다.

2. DNA 절단 및 Adapter Ligation

Genomic DNA 2 µg을 EcoR I, Taq I, Hind III 및 Mse I(BRL, Germany) 4가지 제한효소를 각각 2종류씩 조합하고 각 제한효소를 5 unit를 첨가하여 최종 부피가 25 µL가 되도록 조정 한 후 37°C와 65°C에서 4시간동안 반응시켜 이중 절단한 다음 2.5 volume의 ethanol을 첨가하여 -70°C에서 1시간동안 침전시키고 14,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 절단된 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 5~7 pmol의 double strand adapter와 1 mM ATP 및 1 unit T4 DNA ligase을 첨가하여 최종 부피가 50 µL가 되도록 조정 한 후 37°C에서 3시간 ligation 시켰다. Ligation된 DNA는 TE buffer를 첨가하여 1:10의 비율로 희석하여 pre-amplification을 위한 재료로 사용하였다.

3. PCR 증폭 및 전기영동

1차 PCR 증폭 반응은 GeneAmp PCR System (Perkin-Elmer Cetus, USA)을 이용하여 다음과 같은 조건하에서 실시하였다. 즉, 반응액은 0.5 mL tube에 희석액 5 µL, 제한효

Table 1. Adapters and selective primers sequences used for AFLP analysis in this study

Adapters	Primer sequences(5' to 3')
<i>EcoRI</i> -adapter	
For strand 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'	E01 : 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3'
Rev strand 3'-AATTTGGTACGCAGTCTAC-5'	E32 : 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAA C-3'
	E35 : 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAC A-3'
	E38 : 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAC T-3'
<i>Taq I</i> -adapter	
For strand 5'-GACGATGAGTCCTGAC-3'	T01 : 5'-GAT GAG TCC TGA CCG AA-3'
Rev strand 3'-CGGTCAGGACTCAT-5'	T32 : 5'-GAT GAG TCC TGA CCG AAA C-3'
	T35 : 5'-GAT GAG TCC TGA CCG AAC A-3'
	T38 : 5'-GAT GAG TCC TGA CCG AAC T-3'
<i>Hind III</i> -adapter	
For strand 5'-GACGATGAGTCCTGA C-3'	H01 : 5'-GAC TGC GTA CCA GCT TT-3'
Rev strand 3'-CTGACGCATGGTCTGA-5'	H11 : 5'-GAC TGC GTA CCA GCT TTA C-3'
	H12 : 5'-GAC TGC GTA CCA GCT TTA G-3'
	H13 : 5'-GAC TGC GTA CCA GCT TTC T-3'
<i>MseI</i> -adapter	
For strand 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'	M01 : 5'-GAT GAG TCC TGA GTA A-3'
Rev strand 3'-TACTCAGGACTCAT-5'	M11 : 5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACA G-3'
	M12 : 5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACT G-3'
	M13 : 5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACA T-3'

소별 one selective primer 각 75 ng, dNTP 각 200 μ m, 10 \times PCR buffer 그리고 Taq DNA polymerase 1unit를 첨가하여 PCR 반응액을 총 20 μ L로 조정하였다. PCR 반응은 최초 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 pre-denaturation을 실시한 다음 denaturation 94 $^{\circ}$ C에서 1분, annealing 56 $^{\circ}$ C에서 1분, extension 72 $^{\circ}$ C에서 1분간의 cycle을 총 30회 반복한 후 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 extension 시킨 다음 TE buffer로 10배 희석하여 다음 과정을 수행하였다. 2차 PCR 증폭반응은 1차 증폭산물 희석액 2 μ L에 two selective primer 각 10~30 ng를 첨가하여 1차 PCR

반응과 동일하게 조정하였다. 반응조건은 touchdown PCR법을 이용하여 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 65 $^{\circ}$ C~56 $^{\circ}$ C(회당 0.7 $^{\circ}$ C씩 감소)에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 60초간 12회 실시 후 annealing 온도를 56 $^{\circ}$ C에서 30초로 고정하여 총 24회를 반복 수행하였다. PCR 증폭산물은 6%의 denaturing polyacrylamide gel(29:1) 전기영동법으로 1,800~2,000 volt에서 약 1.5~2시간동안 전기영동하여 DNA 단편을 분리한 다음 silver staining kit(Bioneer Co.)로 염색하여 DNA band를 검출하였다. 본 연구의 AFLP 분석에 사용한 제한효소와 adaptor 및 selective primer의 sequence는

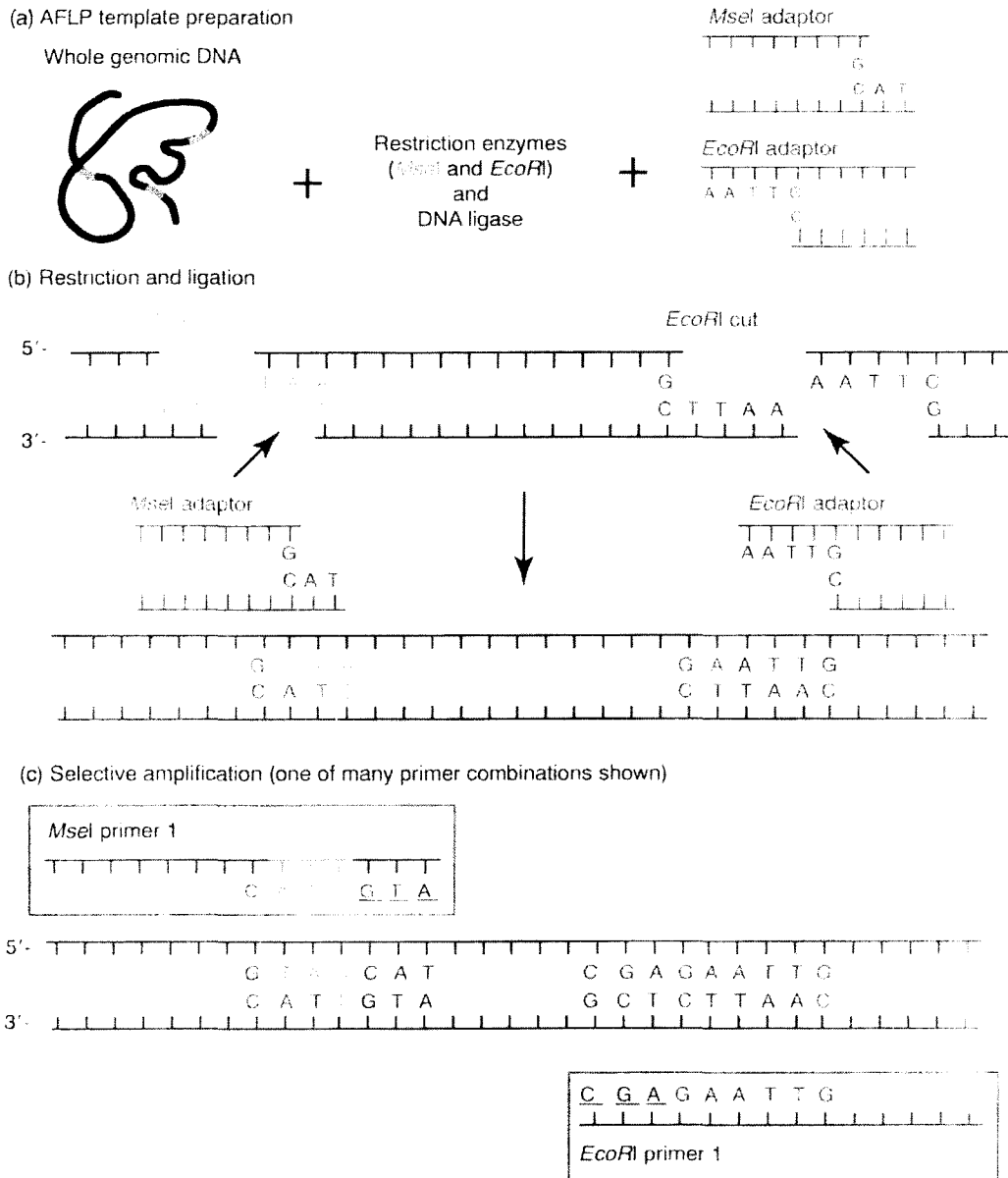


Fig. 1. Schematic representation of the four basic steps of AFLP technique : digestion, ligation, amplification and gel analysis. Genomic DNA was digested by restriction enzymes and adaptors were ligated to the restriction fragments. A subset of the ligated fragments was amplified by PCR using primers with selective nucleotides at the 3'-end. AFLP fingerprinting patterns were visualized by running the amplified products on a denaturing polyacrylamide gel.

Table 1에 나타냈고 이상과 같이 본 실험에서 이용한 AFLP 분석 방법을 도해하여 Fig. 1에 제시하였다.

결과 및 고찰

한국 재래흑염소육의 AFLP 유전자 지문분석

최근 PCR 기술을 이용한 새로운 유전자 지문분석법으로 AFLP 기법은 genomic DNA를 제한효소 인지부위 빈도가 낮은(rare cutting) 제한효소와 빈도가 높은(frequent cutting) 제한효소로 이중 절단한 후 그 DNA 단편들의 양끝을 adaptor로 표지하고, 표지부위의 DNA 염기서열을 바탕으로 특이적인 primer를 PCR primer로 사용하여 특정 제한효소 조합에 의해 생성된 DNA 단편을 증폭시킨 후 이 증폭산물의 DNA band 차이를 종, 품종 및 개체간에 비교 분석하는 기법이다(Vos et al., 1995). AFLP 분석에 이용되는 primer는 adaptor와 제한효소 인지부위의 염기서열과 증폭하고자 하는 특정 DNA 단편 양쪽 말단의 2~3 bp 염기서열(변이부위)로 만들어지며, AFLP 검출능력은 primer sequence 중에서 변이부위 염기서열의 수(n)와 종류에 따라 좌우된다. 보통 3' 말단의 변이부위 염기서열의 수를 1~3을 사용하여 증폭되는 DNA 단편 수의 증감을 조절할 수 있는데 AFLP에 의하여 생성되는 DNA 단편은 약 50~100개로 추정되고 있다. 따라서, AFLP는 RFLP로는 검출하기 어려운 genome내의 제한효소 인지부위 변이를 보다 더 정확하고 용이하게 발굴할 수 있다.

본 연구에서는 4bp와 6bp의 인지부위를 갖는 Mse I과 Taq I 그리고 EcoR I과 Hind III 4종류의 제한효소를 사용하여 이들 제한효소와 primer 조합형에 따른 AFLP 유전자 지문의 출현 양상을 비교 분석하였다. Fig. 2는 우리나라 재래흑염소, 육용종 수입 흑염소 및 4품종의 육용종 염소(Saanen, Alpine, Nubian 및 Toggenburg)로부터 추출한 genomic DNA를 Hind III와 Mse I 제한효소로 절단한 다음 M12/H12의 selective primer 조합형으로 증폭한 후 전기영동하여 검출한 DNA 지문양상을 보여주고 있다. 그리고 Fig. 3과 Fig. 4는 Mse I과 Taq I 그리고 EcoR I과 Hind III 제한효소를 각각 이용하여 절단한 다음 M11/T32와 E35/H13 primer 조합형으로 증폭한 DNA band 양상으로서 약 0.2~1.0 kb 범위에서 품종간 그리고 개체간에 서로 상이한 DNA band pattern 즉, 개체 특이성을 보여주는 AFLP 유전자 지문 양상이 검출되었다. 본 실험의 전기영동상에서 보는 바와 같이 제한효소와 primer 조합형에 따라 특이적인 DNA 지문양상을 나타냈으며 M12/H12(Fig. 2)와 M11/T32(Fig. 3) primer 조합형은 품종내 그리고 품종간에 다양한 개체변이를 보여주고 있으나 E35/H13(Fig. 4) primer 조합형의 경우는 품종내 또는 품종간에 공통적으로 존재하는 DNA band가 확인되었다. 즉, Fig.

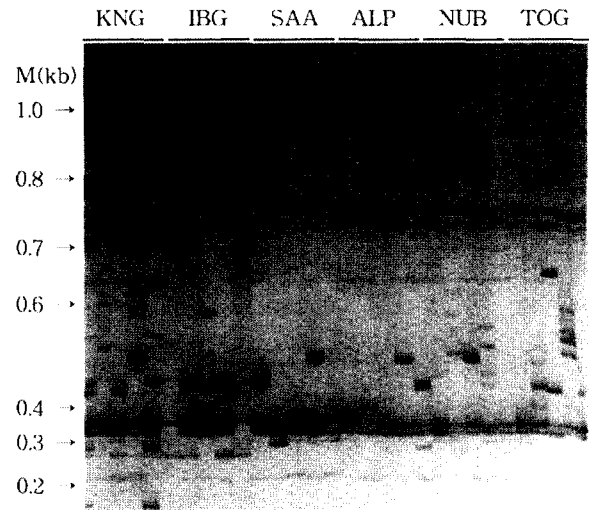


Fig. 2. Comparison of AFLP fingerprint patterns using a primer combination M12/H12 in Korean native goat(KNG), Imported black goat(IBG), Sannen(SAA), Alpine(ALP), Nubian(NUB) and Toggenburg(TOG). M : Molecular size marker.

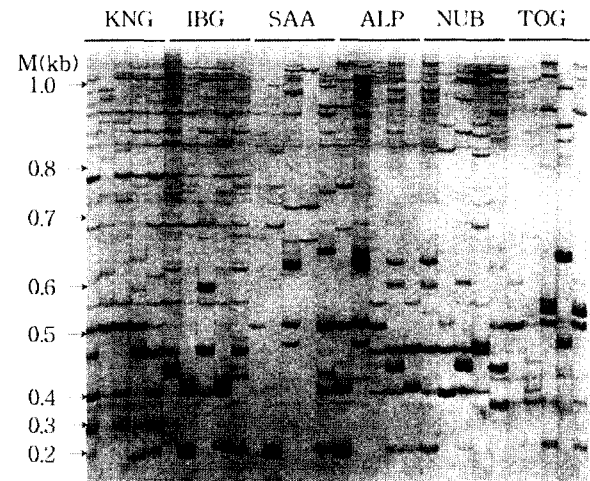


Fig. 3. Comparison of AFLP fingerprint patterns using a primer combination M11/T32 in Korean native goat(KNG), Imported black goat(IBG), Sannen(SAA), Alpine(ALP), Nubian(NUB) and Toggenburg(TOG). M : Molecular size marker.

4에서 보는 바와 같이 약 1.0 kb와 0.65 kb는 재래흑염소, 수입흑염소 및 Alpine종에 공통적으로 존재하는 반면 Saanen종에서는 그 출현이 인정되지 않았고 Nubian과 Toggenburg종은 일부 개체에서만 band가 나타났다. 또한, 0.78 kb band의 경우 재래흑염소에서는 조사한 모든 개체에서 검출되었으나 Saanen종에서는 전혀 그 출현이 인정되지 않았다. 반대로 약 0.8 kb band는 Saanen종 개체에서는 모두 검출되었고 Alpine종에서는 1 개체만이 확인되었으나 재래흑염소와 그 외 타 품종에서는 전혀 출현되지 않았다. 따라서 재래흑염소와 개

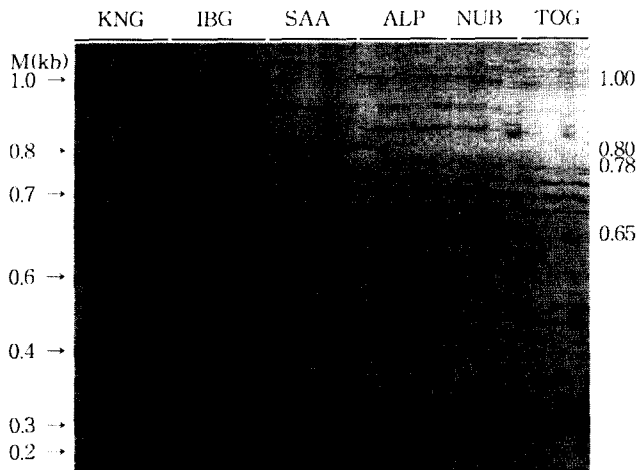


Fig. 4. Comparison of AFLP fingerprint patterns using a primer combination E35/H13 in Korean native goat(KNG), Imported black goat(IBG), Saanen(SAA), Alpine(ALP), Nubian(NUB) and Toggenburg(TOG). M : Molecular size marker. The arrowheads indicate the breed-specific bands.

량종 Saanen 염소 품종간에 뚜렷하게 차이를 보이는 DNA band를 이용하여 두 품종간의 육감별이 재래 흑염소육을 특히, 개량종 Saanen 염소육과 구별이 가능할 것으로 기대된다. 한편, 재래 흑염소육은 비교대상 5개 품종가운데 수입 흑염소육과 공통적인 DNA band가 가장 많은 것으로 나타났으며 DNA 지문양상도 유사성이 매우 높아 우리 나라 재래종 흑염소가 유용종 염소보다는 육용의 수입흑염소와 유전적 근연관계가 더 가까운 것으로 추정되었다.

한편, 재래흑염소 및 육용종 수입 흑염소 그리고 유용종 염소품종의 AFLP 지문분석 결과에 기초하여 4종류의 제한

효소와 10종류의 primer 조합형에 따른 AFLP band의 출현율과 다형성 수준을 비교한 결과는 Table 2에 제시하였다. 우리나라 재래흑염소의 AFLP band 출현율은 약 0.2 kb~1.0 kb 범위에서 검출된 DNA band를 기준으로 10종류의 primer 조합형 가운데 H12/M12, T32/M11 및 T38/M13 primer 조합형에서 각각 평균적으로 74개, 67개 및 62개 순으로 많은 AFLP band가 검출된 반면 E35/H13과 E32/H11 primer 조합형의 AFLP band수는 각각 평균 36개와 42개로 가장 낮은 수준을 나타냈다. 재래흑염소에서 총 555개의 AFLP band를 검출할 수 있었으며 이 가운데 149개의 band가 polymorphic한 band로 확인되었고 각 primer 조합당 평균 AFLP band의 수는 55.5개로 수입 흑염소와 기타 유용종의 52.4~53.8개보다 다소 많은 수의 band들이 검출되었다. 또한, 다형적 band의 수는 primer 조합형에 따라 9~24개로 다양하였으며 평균 다형적 band의 수는 14.9개 였고 이 같은 결과는 Ajmone-Marsan 등(2001)이 7종류의 primer 조합형을 이용하여 Italian 7개 염소품종에서 보고한 평균 31.3 ± 7.3개(22~39개)의 다형적 band 수보다는 상대적으로 낮은 경향이였다. 그리고 재래산양의 AFLP 다형성 비율은 E35/T38 조합형에서 42.0%로 가장 높은 수준을 보인 반면 T38/M13 primer 조합형은 16.0%로 가장 낮은 수준의 AFLP 다형성을 보였으며 재래산양의 평균 다형율은 26.8%로서 수입흑염소와 기타 유용종의 20.2%~25.3% 보다 다소 높은 변이성을 보였다. 한편, 본 연구의 이러한 결과는 Ajmone-Marsan 등(1997)이 Holstein종에서 보고한 다형성 수준 22.0%와 매우 유사한 결과를 보여 이들 제한효소와 primer 조합형은 가축 품종의 AFLP 다형분석에 매우 유용할 것으로 기대된다. 한편, Övilo 등(2000)이 Iberian pig 품종 14두를 대상으로 *EcoR I/Mse I* 제한효소로

Table 2. Level of polymorphism and fingerprinting pattern of AFLP markers in KNG and other five goat breeds

Primer combination	No. of total bands						No. of polymorphic bands						Percentage of polymorphisms					
	KNG	IBG	SAA	ALP	NUB	TOG	KNG	IBG	SAA	ALP	NUB	TOG	KNG	IBG	SAA	ALP	NUB	TOG
E32/T35	58	53	55	55	59	52	19	12	11	10	12	7	33	23	20	18	20	13
E35/T38	57	58	48	53	62	65	24	17	13	19	19	22	42	29	27	36	31	34
E32/H11	42	47	42	59	45	38	12	10	7	15	7	5	29	21	17	25	16	13
E35/H13	36	34	39	36	34	45	9	7	9	7	8	8	25	21	23	19	24	18
T35/H12	59	52	56	44	51	42	13	11	12	16	13	16	22	21	21	36	25	38
T38/H13	48	43	41	38	43	40	11	9	8	11	6	12	23	21	20	29	14	30
T32/M11	67	57	59	66	64	60	24	16	15	19	12	12	36	28	25	29	19	20
T38/M13	62	60	65	55	59	58	10	9	7	9	13	9	16	15	11	16	22	16
H12/M12	74	65	72	68	65	71	15	9	9	15	10	13	20	14	13	22	15	18
H13/M13	52	55	61	60	56	59	12	11	15	14	12	15	23	20	25	23	21	25
Total	555	524	538	534	538	530	149	111	106	135	112	119	269	213	202	253	207	225
Mean	55.5	52.4	53.8	53.4	53.8	53.0	14.9	11.1	10.6	12.8	11.7	11.9	26.9	21.3	20.2	25.3	20.7	22.5

Polymorphism(%) was derived from polymorphic bands divided by total bands.

KNG : Korean Native Goat, IBG : Imported Black Goat, SAA : Saanen, ALP : Alpine, NUB : Nubian, TOG : Toggenburg.

진단한 후 12개의 primer 조합형을 이용하여 총 1,733개의 AFLP band를 검출하고 이 가운데 다형적 band가 106개 (primer 조합 당 평균 8.8개)로 6%의 다형율을 보고하였으며, Knorr 등(1990)은 *Taq I*, *HinP II* 및 *Msp I* 3종류의 제한효소를 닭의 genome mapping을 분석한 결과 36개의 primer 조합형에서 총 377개의 AFLP band를 검출하였고, Herbergs 등(1990)도 닭 품종을 대상으로 *EcoR I/Taq I* 제한효소를 이용하여 AFLP marker를 분석한 바 총 475개의 다형적 band가 검출되어 primer 조합형당 평균 8.5개의 AFLP band를 확인하였다. 국내의 경우 정 등(2000)은 한우에서 총 13 종류의 primer 조합형을 이용하여 AFLP 유전자 지문을 분석한 결과 다형율이 약 66%로 이는 중국 연변황우의 65%와 비슷한 수준이었으나 Holstein종 및 도입육우 품종의 평균 51%에 비해서는 다소 높은 경향이었다고 보고하였다. 또한, 정 등(2001)은 한국재래돼지를 대상으로 조사한 연구에서 평균 AFLP 다형율이 29.8%로 개량종 돼지품종의 20.2~26.1%보다 높은 경향을 보였다고 발표한 바 있다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 AFLP marker 다형성은 각종 제한효소 및 primer 조합형에 따라 큰 차이가 있었으며 또한, 종 또는 품종간에 따라서도 현저한 차이가 존재하고 있음을 시사해 주었다. 이와 같이 AFLP band의 수와 다형성 수준은 사용된 제한효소의 인접부위와 3' 말단부위에 첨가된 selective nucleotide의 G+C 함량 및 primer의 조합형에 따라 크게 좌우되며 일반적으로 genome size에 따라 약 60~150개의 AFLP band가 생성되는 것으로 알려져 있으며 적절한 AFLP primer와 제한효소를 선별하여 이용하면 50~100개의 효과적인 AFLP band를 검출할 수 있음이 보고되었다(Vos et al., 1995; Aart et al., 1998). AFLP 분석을 통해 검출되는 DNA band는 genome 내 산재되어 있는 유전자 돌연변이에 따라 품종 또는 개체간의 유전정보에 매우 귀중한 자료를 제공해 줄 수 있고 특히, 높은 수준의 DNA 다형성은 DNA marker로서 이용 가능성이 증가하게 된다. 따라서, AFLP 유전자 지문분석 기법은 기존의 RAPD와 RFLP 방법에 비해 검출 가능한 polymorphic DNA band의 수가 현저히 많아 고도의 DNA 다형성과 변이성을 확인할 수 있어 동물 종이나 동종 내 품종판별 및 육과 육제품의 품종식별에 유용한 DNA marker로서 활용가치가 높다고 할 수 있다.

한국 재래흑염소육의 품종 특이적 AFLP DNA Marker 검출

DNA 유전자 분석기법을 이용한 식육이나 육제품의 축종 및 품종식별은 주로 DNA hybridization, PCR 유전자 증폭 및 DNA sequencing 등의 방법을 이용하여 왔다(Kingombe et al., 2001). 또한, AFLP-PCR 기법은 기존의 RAPD 및 RFLP

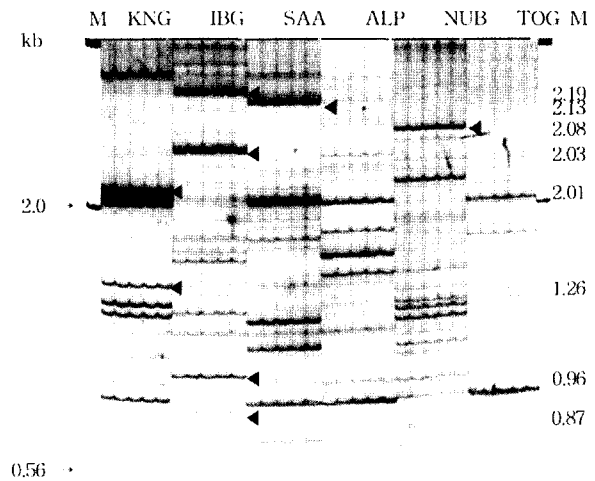


Fig. 5. Comparison of AFLP fingerprint patterns using a primer combination M13/H13 in Korean native goat(KNG), Imported black goat(IBG), Saanen(SAA), Alpine(ALP), Nubian(NUB) and Toggenburg(TOG). M : Molecular size marker. The arrowheads indicate the breed-specific bands.

marker와는 달리 실험결과에 대한 재현성과 신뢰도가 높고 유전적 유사도가 가까운 종이나 품종간에도 고도의 유전적 변이와 다형성을 나타내기 때문에 종 또는 품종 특이적 DNA marker 검출에 매우 효과적인 것으로 알려져 있다(Vos et al., 1995; Lin et al., 1996).

따라서, 본 연구에서는 AFLP-PCR 기법을 이용하여 재래흑염소 품종에 특이적인 DNA band를 개발하고 재래흑염소 육 감별에 이용하기 위한 목적으로 다양한 selective primer 조합형과 각종 제한효소를 이용하여 재래흑염소와 수입흑염소 그리고 유용종 염소 4품종간의 AFLP band 양상을 비교 분석하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 M13/H13 primer 조합형에서 각 염소 품종간의 차이를 명확히 구별할 수 있는 품종 특이적인 AFLP band가 다수 검출되었다. 즉, 재래흑염소에서 공통적으로 출현하는 약 1.26과 2.01 kb 크기의 두 band는 조사한 30두 모두에서 공통적으로 검출되었으나 타 품종의 공시축에서는 전혀 검출되지 않아 재래흑염소에 특이적인 AFLP marker로 확인되었다. 한편, 수입흑염소에서는 0.87, 0.96, 2.03 및 2.19 kb 크기의 4개 band가 분석한 15두에서 공통적으로 확인되어 품종 특이적 band로 확인되었고 Saanen종에서는 2.13 kb 크기의 band 그리고 Nubian종에서는 2.08 kb 크기의 band가 각각 해당 품종의 특이적 DNA band로 검출되었다. 따라서 10종류의 primer 조합형 가운데 M13/H13 primer 조합형에서 가장 많은 품종 특이적 DNA band가 검출되어 재래흑염소육 감별에 가장 이상적인 조합형으로 확인되었다. 또한, E35/H14 primer 조합형에서도 각

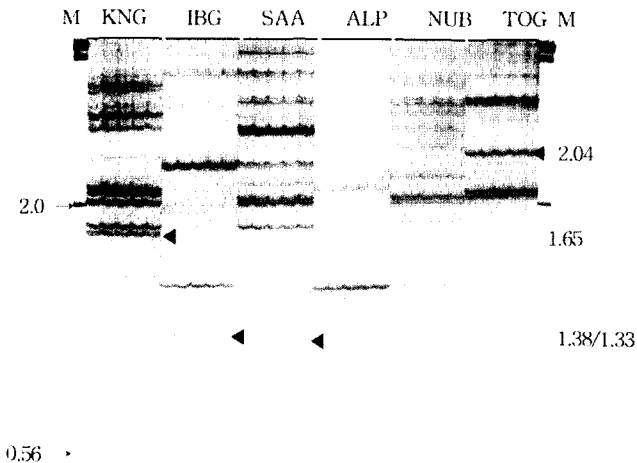


Fig. 6. Comparison of AFLP fingerprint patterns using a primer combination E35/H14 in Korean native goat(KNG), Imported black goat(IBG), Saanen(SAA), Alpine(ALP), Nubian(NUB) and Toggenburg(TOG). M : Molecular size marker. The arrowheads indicate the breed-specific bands.

품종간에 특이적으로 발현하는 band들을 확인할 수 있었는데 재래흑염소에서 1.65 kb band가 조사한 모든 개체에서 검출되어 품종 특이적 DNA marker로 확인되었고 수입흑염소에서는 1.38 kb band가 조사한 개체에서 모두 존재하여 수입흑염소 품종에 특이적인 marker로 추정되며 Saanen종에서는 1.33 kb 그리고 Toggenburg종에서는 2.04 kb band가 각 품종에 특이적인 marker로 확인할 수 있었다. 최근 Ajmone-Marsan 등(1999)은 염소에서 AFLP의 재현율이 95% 이상이라고 보고하고 있어 이들 각 품종 특이적인 DNA band들은 재래흑염소와 수입흑염소 그리고 유용종 염소들간의 품종 구별은 물론 도축 후 정육형태로 유통 판매되는 염소 육과 육제품의 품종식별을 위한 진단기술로 이용 가능한 유전적 표지인자(genetic marker)로 확인되었다. 그러나, 본 연구는 소수의 한정된 시료를 대상으로 한 결과이기 때문에 보다 더 정확한 결론을 얻기 위해서는 조사 두수를 더욱 확대하여 다수의 시료를 대상으로 검증해 볼 필요가 있다고 판단된다.

그 동안 AFLP 기술을 이용하여 종 또는 품종간의 계통 특이적 DNA marker의 검출에 관한 연구는 주로 식물과 미생물을 중심으로 수행되어져 왔으나 최근에 Anderson 등(1998)이 3 품종의 사슴에서 품종 특이적인 AFLP band를 검출하고 AFLP marker가 사슴의 종, 아종 및 계통의 유전적 동정 및 사슴 품종간의 교잡종 식별에 강력한 도구임을 보고한 바 있으며, Nijman 등(1999)은 Bos indicus와 taurus 교잡우 구별에 AFLP marker를 이용 가능성을 제시하고 있다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 DNA band의 고도의 다량성, 재현성 및 다형성의 유전적 특성을 갖는 AFLP-PCR 유전자 분석기법은 정확하면서도 간편하고 신속한 재래흑염소 품종 및 흑염소

육의 육류감별을 위한 매우 유용한 DNA 진단기술이라고 할 수 있다.

요 약

본 연구는 AFLP-PCR 유전자 지문분석 기법을 이용하여 우리 나라 고유의 동물유전자원으로 재래흑염소의 품종 및 흑염소육 감별을 위한 품종 특이적 DNA marker를 개발하고자 수행하였다. 흑염소로부터 추출한 genomic DNA를 EcoR I/Hind III 및 Taq I/Hind III 2종류의 제한효소 조합으로 이중 절단한 후 10종류의 two selective primer 조합형을 이용하여 분석한 결과 각 primer 조합형당 검출된 AFLP band의 수는 36~74개의 범위로 평균 55.5개였다. 그리고 검출된 총 555개의 band 가운데 polymorphic band의 수는 149개로 다형성 수준은 약 26.8%로 추정되었다. 재래흑염소 품종 특이적인 AFLP marker를 탐색하고자 유용종 수입흑염소 및 4품종의 유용종 염소와 AFLP 지문양상을 비교 검토한 결과 M13/H13 primer 조합형에서 2.01과 1.26 kb의 2개 band 그리고 E35/H14 primer 조합형에서 1.65 kb의 1개 band가 재래흑염소의 품종 특이적 AFLP marker로 검출되었다. 그리고 E35/H14 primer 조합형에서 수입흑염소의 2.19, 2.03, 0.96 및 0.87 kb band, Saanen종의 2.13 kb band, Nubian종의 2.08 kb band는 각 해당 품종에만 특이적으로 출현하는 품종 특이적 band로 확인되었다. 또한, E35/H13 primer 조합형에서 재래흑염소를 특히, Saanen종과 식별이 가능한 4개의 DNA band가 확인되었다. 따라서, 본 연구에서 AFLP-PCR 기법을 이용하여 검출한 품종 특이적 DNA band들은 우리 나라 재래흑염소, 수입흑염소 및 유용종 염소품종들간에 명확히 구별되어 재래종 흑염소 육과 육제품의 품종판별에 매우 유용한 DNA marker로 이용 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2001년도 상지대학교 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

참고문헌

1. Aarts, H. J., Van Lith, L. A., and Keijer, J. (1998) High-resolution genotyping of *Salmonella* strains by AFLP-fingerprinting. *Lett. Appl. Microbiol.*, **26**, 131-139.
2. Ajmone-Marsan, P., Valentini, A., Cassandro, M., Vecchiotti-Antaldi, G., Bertoni, G. and Kuiper, M. (1997) AFLP markers for DNA fingerprinting in cattle. *Anim. Genet.*, **28**, 418-426.
3. Ajmone-Marsan, P., Negrini, R., Crepaldi, P., Milanesi, E., Gorni, C., Valentini, A. and Cicogna, M. (2001) Assessing genetic

- diversity in Italian goat populations using AFLP markers. *Anim. Genet.*, **32**, 281-288.
4. Anderson, R. M., Mcewan, K. M., Bixley, M. J. and Tate, M. L. (1998) Identification and mapping of species-specific AFLP bands in deer. *Anim. Genet.*(Suppl. 1), 25, 13-21.
 5. Calvo, J. H., Zaragoza, P. and Osta, R. (2001) Technical note : A quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment. *J. Anim. Sci.*, **79**, 2108-2112.
 6. Colgan, S., O'Brien, L., Maher, M., Shilton, N., McDonnell, K. and Ward, S. (2001) Development of a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal. *Food Research International*, **34**, 409-414.
 7. Herbergs, J., Siwek, M., Crooijmans, R. P., Van der Poel, J. J. and Groenen, M. A. M. (1999) Multicolour fluorescent detection and mapping of AFLP markers in chicken(*Gallus domesticus*). *Anim. Genet.*, **30**, 274-286.
 8. Knorr, C., Cheng, H. H. and Dodgson, J. B. (1999) Application of AFLP markers to genome mapping in poultry. *Anim. Genet.*, **30**, 28-36.
 9. Kingombe, C. I. B., Schlosser, E. L. H., Howald, D., Kuhn, M., and Jemmi, T. (2001) A PCR-based test for species-specific determination of heat treatment conditions of animal meals as an effective prophylactic method for bovine spongiform encephalopathy. *Meat Sci.*, **57**, 35-41.
 10. Lin, J. J., Kuo, J. and Ma, J. (1996) A PCR-based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 3649-3653.
 11. Miller, S. A., Dykes, D. D. and Polesky, H. F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids Res.*, **16**, 1215-1218.
 12. Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Shibata, K., Yamada, J. and Shinmura, Y.(1999) A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Sci.*, **51**, 143-148.
 13. Nijman, I. J., Bradley, D. G., Hanotte, O., Otsen, M. and Lenstra, J. A. (1999) Satellite DNA polymorphisms and AFLP correlate with *Bos indicus-taurus* hybridization. *Anim. Genet.*, **30**, 265-278.
 14. Övilo, C., Cervera, M. T., Castellanos, C. and Martinez-Zapater, J. M. (2000) Characterization of Iberian pig genotypes using AFLP markers. *Anim. Genet.*, **24**, 117-123.
 15. Vos, P., Hogers, R. and Bleeker, M. (1995) AFLP : a new concept for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.*, **23**, 4407-4409.
 16. 민병록, 한재용, 이무하 (1995) RAPD 기법을 이용한 쇠고기 품종(한우육, 유우육(Holstein육), 수입우육) 구분. *한축지*, **37**, 651-660.
 17. 민중석, 민병록, 한재용, 이무하 (1996) RAPDs를 이용한 육류(한우육, 사슴육, 면양육, 산양육)의 축종 판별. *한축지*, **38**, 231-238.
 18. 이창수, 유영복, 나기준, 조병대, 최병규 (1994) 핵산분석법에 의한 한우의 판별. *한축지*, **36**, 369-373.
 19. 조병욱, 한재용 (1994) 한우 특이적 RAPD 표지인자 개발. *한축지*, **36**, 263-271.
 20. 정의룡, 김우태, 김연수, 한상기 (2000) AFLP marker를 이용한 한우의 유전자 지문 분석. *한국동물자원과학회지*, **42**, 391-406.
 21. 정의룡, 김우태, 김연수, 이정구, 한상기 (2001) AFLP Marker를 이용한 한국 재래돼지의 유전적 다양성 및 품종식별. *한국동물자원과학회지*, **43**, 777-788.
 22. 정의룡, 김우태, 한상기 (1995) RAPD-PCR 기법을 이용한 젓소의 DNA 다형분석과 유전적 특성에 관한 연구. *한축지*, **37**, 455-467.
 23. 정의룡, 김우태, 김연수, 김계용, 최순호, 한상기 (1999) DNA 표지인자를 이용한 한국재래산양의 품종식별. *한축지*, **41**, 257-270.
 24. 정의룡, 김우태, 김연수, 한상기 (2000). 소 모색관련 유전자 MC1R의 PCR-RFLP marker를 이용한 한우육 판별. *한국동물자원과학회지*, **42**, 379-390.