

PCR을 이용한 사료중 동물유래  
단백질의 분석방법 개발

연세대학교 공학대학원

생명공학전공

김 익 출

PCR을 이용한 사료중 동물유래  
단백질의 분석방법 개발

지도교수 최 강 열

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2007년 8월 일

연세대학교 공학대학원

생명공학전공

김 익 출

# 김익출의 석사학위 논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 공학대학원

2007년 8월 일

## 감사의글

직장과 학교 그리고 가정에서의 세 가지 역할을 동시에 해나간다는 것이 힘들다는 이유로 처음 학업을 시작하면서 나름대로 배움에 대한 절실한 필요성과 왕성한 의욕을 가지고 시작한 학업의 마지막에서 지난 시간들을 돌아보면 처음 시작할 때의 마음가짐이 많이 흐려지지 않는 않았나 하는 후회를 해보기도 하지만, 개인적으로는 인생에서 하나의 작은 성과라고 생각하며 2년 반 동안의 학업을 무사히 마칠 수 있도록 주변에서 많은 도움주신 분들께 감사드립니다.

부족한 논문이지만 바쁘신 중에도 많은 가르침과 충고, 자상한 조언을 아끼지 않고 지도해주신 최강열 교수님, 성백린 교수님, 신철수 교수님께 깊은 감사를 드리며, 무한한 배움의 세계를 열어주신 박지용 교수님, 이상규 교수님, 오종원 교수님, 정형일 교수님께 감사드립니다.

학업을 시작하면서부터 졸업하는 순간까지 자상하게 배려해 주신 김상범 시험연구소장님을 비롯하여 김진국 팀장님 그리고 본원에서 유전자 분석실의 업무가 원활하게 진행될 수 있도록 많이 도와주시고 지원해주신 심재규 팀장님 이하 구돈회 계장님, 명한식 계장님, 김주창님, 조성환님, 류형걸님, 서수철님, 김황립님, 조주현님께 감사드리며 같은 실험실에서 동고동락하며 많은 도움을 주신 민동명 실장님, 이성훈님께 진심으로 감사드립니다. 휴일에도 나와서 일하는 바쁜 업무에도 불구하고 자기 일처럼 논문준비를 도와주고, 조언을 해준 정진기님과 실험하는데 많은 도움을 준 최정아님, 장은희님께 특별한 감사의 마음을 전합니다.

고향에서 묵묵히 마음속 깊은 믿음으로 응원해주신 아버님, 어머님 그리고 곁에서 고생한다며 힘내라고 용기를 주신 장인 장모님, 많은 시간을 함께 해주지 못해 미안한 흥민이 민철이, 마지막으로 힘들고 지칠 때 마다 옆에서 항상 힘이 되어주고 아이들에게 아버지의 빈 공간을 대신해준 아내 오향미, 모든 분들께 다시 한번 머리 숙여 감사드립니다.

# 목 차

목 차 .....	i
<Figure Index> .....	ii
<Table Index> .....	iii
<Table Index> .....	iv
제 1 장 서 론 .....	1
제 2 장 실험재료 및 방법 .....	12
2.1 실험재료 .....	12
2.2 실험방법 .....	12
2.2.1 DNA 추출 .....	12
2.2.2 Primer design .....	13
2.2.3 PCR 조건 .....	13
제 3 장 결과 및 고찰 .....	20
3.1 육골분 및 positive control용 sample의 DNA 추출 .....	20
3.2 Primer 선발 .....	22
3.3 Primer별 PCR결과 .....	22
제 4 장 결론 .....	30
참고문헌 .....	32
ABSTRACT .....	39

## <Figure Index>

Fig. 1. The areas of BSE occurrence .....	4
Fig. 2. The structure of prion protein .....	6
Fig. 3. Agarose gel containing extracted gDNA from samples of positive control .....	20
Fig. 4. Agarose gel containing extracted gDNA from samples of positive control .....	21
Fig. 5. The PCR result based on B290 primer .....	25
Fig. 6. The PCR result based on B290 primer .....	25
Fig. 7. The PCR result based on P203 primer .....	26
Fig. 8. The PCR result based on P203 primer .....	26
Fig. 9. The PCR result based on CH320 primer .....	27
Fig. 10. The PCR result based on CH320 primer .....	27
Fig. 11. The PCR result based on C248 primer .....	28
Fig. 12. The PCR result based on C248 primer .....	28
Fig. 13. The PCR result based on O403 primer .....	29
Fig. 14. The PCR result based on O403 primer .....	29

## <Table Index>

Table 1. Occurrence states of BSE in each countries .....	2
Table 2. Number of occurrence BSE in each years .....	3
Table 3. The inspection states of BSE in Korea .....	9
Table 4. List of oligonucleotide sequence for bovine .....	15
Table 5. List of oligonucleotide sequence for porcine .....	16
Table 6. List of oligonucleotide sequence for chicken .....	17
Table 7. List of oligonucleotide sequence for cervine .....	18
Table 8. List of oligonucleotide sequence for ovine .....	19
Table 9. List of selected oligonucleotide sequence for each animal in this study .....	24

# 국 문 요 약

## PCR을 이용한 사료중 동물유래 단백질 분석방법 개발

연세대학교 공학대학원

생 명 공 학 전 공

김 익 출

Bovine spongiform encephalopathy (BSE: 소해면상뇌증)의 원인이 scrapie에 감염된 양의 부산물을 급여한 것으로 판명되면서, 세계 각국에서 반추가축의 사료에 동물성 단백질의 혼입을 막기 위한 법적 제재조치가 마련되고 사료중 동물성 단백질의 혼입여부를 검사하기 위한 다양한 방법들이 개발되어 오고 있다. 본 실험은 PCR을 이용한 사료중 동물성 단백질의 혼입여부를 검사하기 위하여 축종별 5종의 primer를 제작하여 사료공장에서 가공과정을 거친 육골분에서 동물성 단백질의 검출가능여부와 primer별 검출 한계치를 결정하기 위하여 축종별 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5%의 시료를 제작하여 실험을 수행하였다.

소의 단백질을 검출하기 위한 B290 primer를 이용했을 경우 모든 육골분에서 290 bp의 band가 나타났고 검출 한계치를 조사한 실험에서도 동일한 size의 band가 0.01%까지 확인되었다. 돼지의 단백질을 검출하기 위한 P203 primer를 이용했을 경우에도 육골분과 검출 한계치를 조사한 실험의 0.01%까지 동일한 203 bp의 band가 나타났으며 닭의 단백질을 검출하기



위한 CH320 primer에서도 육골분과 검출 한계치를 조사한 실험의 0.01%까지 320 bp의 동일한 band를 확인하였다.

C240 primer(사슴)와 O403 primer(양)를 이용하여 수행한 실험의 경우 검출 한계치를 조사한 실험에서는 각각의 primer별로 0.01%까지 예상했던 240 bp와 403 bp의 band가 나타남을 확인하였으나, 육골분에서 실시한 실험에서는 band를 확인할 수 없었다.

위의 두 가지 결과를 종합적으로 고려해 보았을 때, 본 실험에서 사용한 육골분 시료에는 사슴과 양의 단백질들이 함유되어 있지 않은 것으로 보이며, 시료의 채취가 이상적으로 수행되어 진다면 사료중의 동물성 단백질을 검출하는데 있어서 본 실험에서 선발한 primer를 이용한다면 PCR을 이용한 방법이 유용하게 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

---

핵심 되는 말 : BSE, 광우병, Prion, PCR

## 제 1 장 서 론

Bovine spongiform encephalopathy (BSE: 소해면상뇌증)는 전염성 해면상뇌증(TSE: transmissible spongiform encephalopathy)의 일종으로서 소에서 발생하는 만성신경성 질병으로 일명 광우병 또는 프리온질병(prion diseases) 으로 불리고 있다. 이 질병은 신경세포의 공포변성과 중추신경조직의 해면상 변화가 특징으로 2~5년의 다양하고 긴 잠복기와 불안, 보행장애, 기립불능, 전신마비 등의 임상증상을 보이다가 결국은 100% 폐사되는 치명적인 만성 진행성 질병이다. 또한 전염성 해면상뇌증에는 면양 및 산양의 스크래피(scrapie), 사슴류의 만성소모성 질환(chronic wasting disease), 사람의 크로이펠츠 야콥병(variant Creutzfeldt-Jakob disease)등이 있다.<sup>1)</sup>

BSE는 1985년 4월 영국에서 처음으로 임상증상이 발견되었으며, 병리학적 소견을 통해 1986년 11월에 새로운 질병으로 확인되었다. 발견 당시 원인으로는 사료에 혼합된 육골분(MBM: meat and bone meal) 중 scrapie에 감염된 양의 육골분이 포함되어 급여된 것으로 확인되면서 동물에 급여하는 사료에 육골분의 함유 여부에 대한 관심이 집중되어졌다. 영국에서 최초발생 이 후 1989년 아일랜드에서 다시 진단되어지고 현재까지 190,000여건이 발표되어지고 있다. 더욱이 최근에는 유럽지역 뿐만 아니라 미국, 일본 등 전 세계적으로 BSE 전염에 대한보고(Table 1 and 2; Figure 1)가 계속 나오고 있어, 축산업뿐만 아니라 인간의 질병에 있어서도 위협이 되고 있다. 인간에게 있어서는 1996년 새로운 변종의 CJD (new-variant Creutzfeldt-Jakob disease)가 보고되었는데 이는 BSE에 걸린 소로부터 인간에게 감염된 첫 사례로 보고되었다.<sup>2)</sup>

Table 1. Occurrence states of BSE in each countries

Country	Austria	Belgium	Canada	Czech	Denmark	Finland	France	Germany	Greece
Number of Occurrence	5	131	10 (1)	24	15 (1)	1	976 (1)	395 (6)	1
Country	Ireland	Israel	Italy	Japan	Liechtenstein	Luxemburg	Holland	Poland	Portugal
Number of Occurrence	1,579 (12)	1	134 (2)	28	2	3	80	48	996 (8)
Country	Slovakia	Slovenia	Spain	Sweden	Switzerland	England	England	Falkland	Oman
Number of Occurrence	23	6 (1)	654	1	461	184,431	2	1	2

1) Number of occurrence countries based on '06. 8. 14.: Total 25 countries (190,007 cases)

(※The countries, Falkland and Oman, are occurred BSE only in imported cattle)

2) The numbers in a parentheses represent occurrence in imported cattle

The information in this table is described in following web site: <http://www.nvrqs.go.kr>

Table 2. Numbers of BSE occurrence in each year

Num Occurrence ber	Country	Number of occurrence in each years												Total
		Pre-'95	'96	'97	'98	'99	'00	'01	'02	'03	'04	'05	'06	
1	Austria	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2	2	5
2	Belgium	-	-	1	6	3	9	46	38	15	11	2		131
3	Canada	1	-	-	-	-	-	-	-	2	1	1	5	10
4	Czech	-	-	-	-	-	-	2	2	4	7	8	1	24
5	Denmark	1	-	-	-	-	1	6	3	2	1	1		15
6	Finland	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-		1
7	France	13	12	6	18	31	161	274	239	137	54	31		976
8	Germany	4	-	2	-	-	7	125	106	54	65	32		395
9	Greece	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-		1
10	Ireland	115	73	80	83	91	149	246	333	183	126	69	31	1,579
11	Israel	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-		1
12	Italy	2	-	-	-	-	-	48	38	29	7	8	2	134
13	Japan	-	-	-	-	-	-	3	2	4	5	7	7	28
14	Liechtenstein	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	0		2
15	Luxemburg	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	1	0	3
16	Holland	-	-	2	2	2	2	20	24	19	6	3		80
17	Poland	-	-	-	-	-	-	-	4	5	11	19	9	48
18	Portugal	33	31	30	127	159	149	110	86	133	92	46		996
19	Slovakia	-	-	-	-	-	-	5	6	2	7	3		23
20	Slovenia	-	-	-	-	-	-	1	1	1	2	1		6
21	Spain	-	-	-	-	-	2	82	127	167	137	98	41	654
22	Sweden	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
23	Switzerland	186	45	38	14	50	33	42	24	21	3	3	2	461
24	England	161,324	8,149	4,393	3,235	2,301	1,443	1,202	1,144	611	343	225	61	184,431
25	America	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2
Total		161,679	8,310	4,553	3,487	2,637	1,956	2,215	2,179	1,389	878	561	163	190,007

Referenced by web site: <http://www.nvrqs.go.kr>

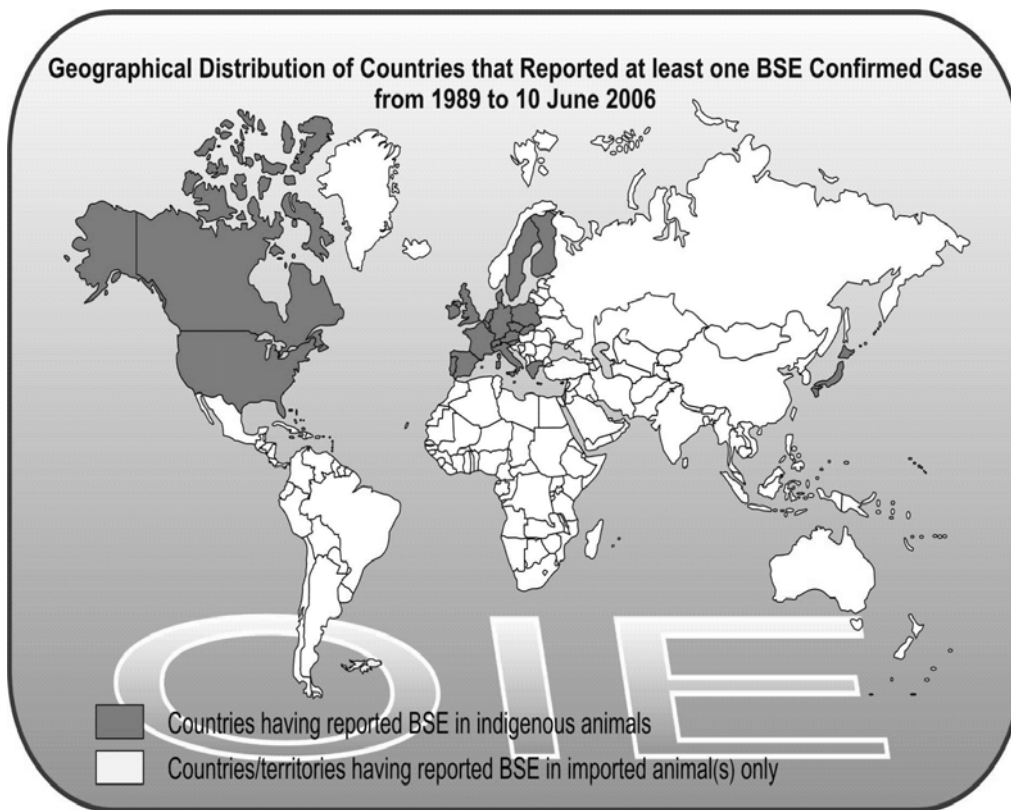


Figure 1. The areas of BSE occurrence. (Based on Office International des Epizooties: OIE, 07. 1. 16)

전염성 해면상 뇌증(TSE)의 원인은 아직 정확하지 않다<sup>3)</sup>. 그러나 “protein only” 가설에 의하면 정상적으로도 정상적인 형태의 cellular prion protein(PrP<sup>c</sup>)에서 단백질분해효소(Proteinase K)에 저항하는 resistant prion protein(PrP<sup>res</sup>)으로의 post-translational modification이 이루어지지만 그 양이 소량이고 과정이 매우 느리다. 그러나 endogenous gene mutation 이나 extrogenous PrP<sup>res</sup>의 섭취에 의해 감염 PrP<sup>res</sup>가 template로 작용하여 그것의 접촉으로 인해 변이과정이 빨라지고, 그 양이 PrP<sup>c</sup>보다 증가하여 발병하는 것으로 알려져 있다<sup>4-6)</sup>. 따라서 host gene이나, transgenes 또는 engrafted tissue에 의해 PrP<sup>c</sup>가 발현되지 않는 동물에서는 TSE가 발병되지 않는 것으로 알려져 있다<sup>7,8)</sup>. PrP<sup>c</sup>와 PrP<sup>res</sup>는 숙주의 같은 유전자에서 유래하여 염증반응이나 면역반응을 유발하지 않으나, 생리·화학적 성질이 상이하여 PrP<sup>res</sup>는 detergent에서 녹지 않으며 열에 강해서 autoclaving시 파괴되지 않고, 단백질분해효소(proteinase K)에 저항성을 보인다<sup>9)</sup>. 이러한 일련의 변화를 통해서 형성된 PrP<sup>res</sup>가 신경계의 lysosome에 축적됨으로써 질병이 진행되어 여러 임상증상을 유발 시키는 것으로 알려져 있다.<sup>2)</sup>

초기 BSE의 원인으로 scrapie병에 걸린 양의 동물성 단백질이 원인으로 판명이 나면서 사료에 대한 검사를 시작하여 2000년 이후 여러 가지 방법을 이용하여 사료에 대한 동물성 단백질 혼입여부에 대한 검사가 강화 되었다. EU는 동물성 단백질 사료의 공급원인 육골분이 BSE의 원인체 인 것으로 추정하고 BSE 청정국으로 인정받기 위해서는 육골분 등 동물성 단백질 사료를 사용하지 않아야 함을 제시 하면서 반추동물용 배합사료에서 동물성 단백질 사료의 교차오염으로 인한 소량이 혼입되었을 경우도 인정

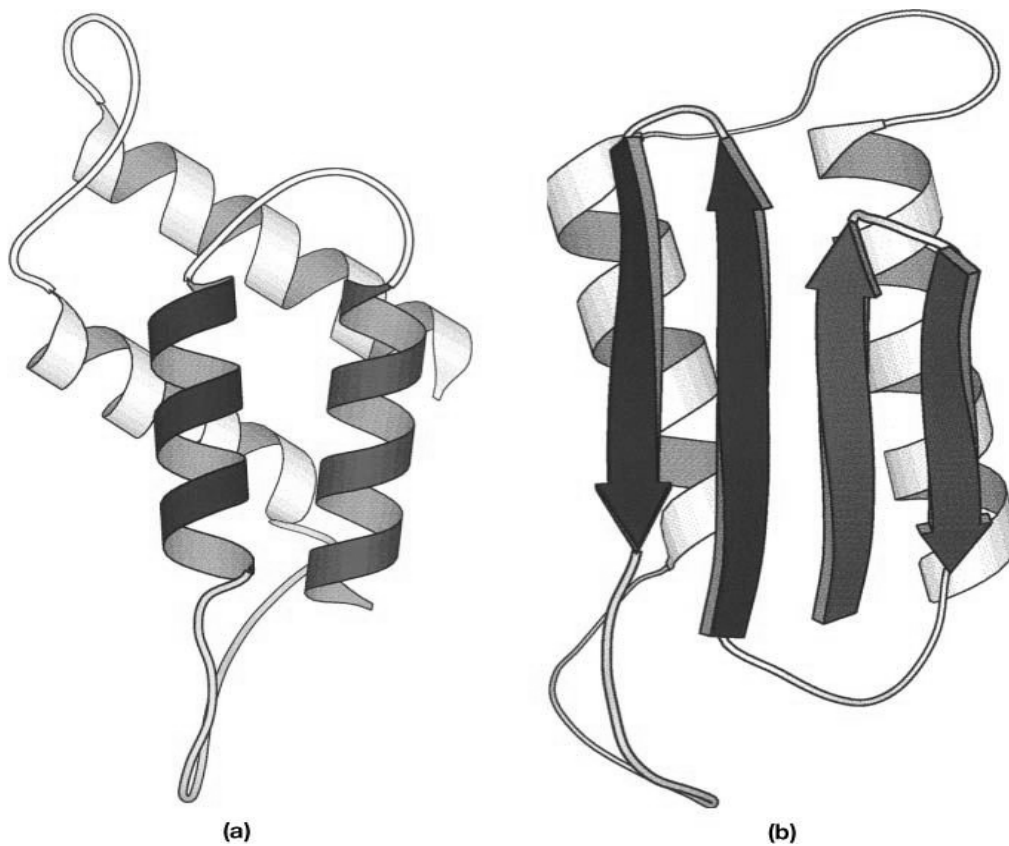


Figure 2. The structure of prion protein. The structure on the left(a) is the normal PrP structure and consists of alpha helices. The structure on the right(b) is the PrP<sup>Sc</sup> structure and consists of beta sheets. The PrP<sup>Sc</sup> structure can pair with the PrP structure and convert it into the scrapie form.

Referenced by web site: <http://www.uccs.edu/~rmelamed/MicroFall2002/Chapter%2010/Prion%20Structure.html>

하지 않았다.

미농무부(USDA: United States Department of Agriculture)의 동식물검역소(APHIS: Animal and Plant Health Inspection Service)는 1989년 이후로 BSE 발생국 및 발생 우려국에 대한 반추가축의 금수조치를 취하고 있으며 USDA의 허가를 받은 과학 연구목적 이외에 육골분(MBM: meat and bone meal), 골분(BM: bone meal), 혈분(BM: blood meal)과 같은 동물성 부산물의 수입을 금지하고 있다. 또한 1997년 8월 FDA는 사료 제조업자들에게 반추동물용 사료에 금지된 물질이 함유되지 않도록 차단할 수 있는 적절한 절차나 관리 시스템에 대한 규정을 강화하였다. 아울러 2001년 9월 일본에서 BSE가 확인됨에 따라 반추가축이나 이의 부산물에 대한 금수조치를 취하였다. 그럼에도 불구하고 2004년 캐나다로부터 수입한 젓소에서 BSE가 확인이 되어 우리나라를 비롯하여 세계 각국에서 미국산 쇠고기의 수입을 금지시켜 미국 내에서 확산 방지 및 청정화를 위한 노력이 진행되고 있으며 이러한 오염원을 사전에 차단하기 위하여 USDA의 농업연구소는 현미경검사법, ELISA검사법, PCR검사법 등 반추가축에서 유래하는 단백질에 대한 검정방법 개발 및 신뢰성을 높이는 연구에 중점적으로 투자하고 있다.

영국 및 EU는 BSE 백서를 발간하여 동물사료 제조과정(구입, 원료의 저장, 혼합, 분쇄, 저장, 운반 등)을 제시하고 동물성 단백질 사료 표시제도, 사료의 교차오염 원인을 규명하도록 하였다. 또한 1994년 이후 모든 포유동물의 조직에서 유래한 단백질을 반추동물용 사료로 사용하는 것을 금지하였으며, EU의 농업각료이사회에서 육골분의 가축사료 사용정지를 결정하였다. 영국에서는 반추동물에 사용되는 사료를 대상으로 일상적으로 ELISA검사법을 실시하도록 규정하였고, EU는 현미경 검사방법을 법적으로 채택하여 현재까지 활용하고 있다.



일본에서는 BSE 발생축이 육골분으로 가공된 사료가 소에 급여된 것으로 확인되면서 모든 국가로부터 육골분 등의 수입 일시정지, 자국산의 사료용, 비료용 육골분 및 육골분 함유 사료, 비료의 제조와 판매를 중지 하였다. 사료내 육골분 혼입여부 검사는 현미경검사법과 ELISA 방법을 채택 하고 있으며, 종 특이적인 primer를 개발 하여 2002년 6월부터 부분적으로 PCR방법을 이용하고 있는 세계에서 몇 안 되는 나라이다.<sup>10)</sup>

우리나라에서는 영국(1996. 3. 22), 네덜란드(1997. 3. 16), 아일랜드(1998. 1. 11), 덴마크(2000. 2. 29)산 소 및 그 생산물 수입을 금지시키고, 2000년 12월 1일 소·양 등 반추가축에 대해서 국내외산 육골분 및 골분사료, 2001년 1월 31일 남은 음식물 사료의 사용을 금지시켰으며 2000년 12월 30일 EU 15개국 회원국 및 2001년 1월 17일 동유럽 15개국으로부터 반추가축과 그 생산물, 동물 유래단백질의 수입을 금지시키고, 2001년 2월 4일 브라질산 반추가축 및 그 생산물의 수입을 금지시켰다<sup>11)</sup>. 또한 반추가축 이외의 가축에 급여하는 사료 또는 사료원료로 사용할 경우 남은 음식물 사료는 100℃에서 30분 이상 가열·처리, 동물성 단백질류 사료는 습열기준 121℃에서 15분 이상 또는 115℃에서 35분 이상 열처리하거나 동등이상의 효력으로 열처리 하도록 규정하였고, 동물성 단백질류 사료와 반추동물용 사료의 제조공정을 완전히 분리 하도록 규정 하였으며<sup>12)</sup>, 1995년부터 2005년까지 임상증상우, Emergency도축우, 폐사우, 정상도축우 12,831두를 대상으로 BSE검사를 실시하였으며 결과 모두 음성이었다.(Table 3).

이와 같이 반추가축 사료에 동물성 단백질의 혼입을 제한하는 법적 제재 조치가 마련되면서 사료중 동물성 단백질 함유 여부에 대한 다양한 검출방법이 시도가 되었다. 검출방법에는 현미경을 이용한 방법, ELISA를 이용한 방법 이외에 PCR을 이용한 방법 등이 있으며 최근 PCR을 이용한 방법에 대한 연구가 활발히 진행되어져 오고 있다.

Table 3. The BSE inspection number of cattle in Korea (Unit : head)

Area	Inspection cattle number											
	year	'96	'97	'98	'99	'00	'01	'02	'03	'04	'05	Total
Seoul		91	73	39	-	12	24	24	24	56	409	752
Busan		59	27	-	3	9	20	21	15	52	42	248
Daegu		15	-	-	-	-	17	20	20	40	43	155
Incheon		30	-	8	9	17	23	12	17	105	264	485
Gwangju		6	-	3	12	24	17	20	20	119	47	268
Daejeon		35	-	3	9	18	16	27	15	39	42	204
Ulsan		-	-	-	-	-	30	25	27	43	40	165
Gyeonggi		205	9	22	51	51	117	218	157	412	924	2,166
Gangwon		327	29	34	40	66	388	126	168	167	299	1,644
Chung Buk		256	9	29	24	52	62	98	80	133	229	972
Chung Nam		133	50	86	38	85	78	105	111	274	296	1,256
Jeon Buk		118	-	38	38	60	75	125	100	178	260	992
Jeon Nam		71	12	17	23	20	49	85	75	182	354	888
Gyeong Buk		150	43	14	33	49	72	96	99	176	297	1,029
Gyeong Nam		97	51	19	13	28	89	156	96	299	588	1,436
Jeju		23	20	-	8	-	17	21	14	48	20	171
Total		1,616	323	312	301	491	1,094	1,179	1,027	2,323	4,154	12,831

Referenced by web site: <http://www.nvrqs.go.kr>

Tartaglia 등(1998)은 소의 mtDNA (mitochondrial DNA)의 ATPase subunit 8에서 ATPase subunit 6의 amino-terminal 부위를 증폭할 수 있는 primer를 이용하여 사료에서 소의 육골분을 검출 해내는 방법이 보고되면서<sup>13)</sup>, 이후 다양한 변이를 보이는 mtDNA에서의 동물 종별 특정 염기서열 부위를 증폭할 수 있는 primer들이 개발이 되고 있으며, 많은 검증실험들이 진행되고 있다. Matsunaga 등(1999)에 의해 염소, 닭, 양, 말, 돼지, 소의 mtDNA의 cytochrome b 유전자들을 비교하여 각 동물별 특정 유전자 부위를 증폭할 수 있는 primer를 design 하여 증폭 절편의 차이로 동물종을 구별할 수 있음이 보고되었고<sup>14)</sup>, Montiel-Sosa 등(2000)이 mtDNA D-loop 영역에서 고도의 동물 종별 특정 부위를 증폭할 수 있는 primer를 design 하여 사료중 육골분에서의 돼지 유래 동물성 단백질의 검출이 가능함을 보고하였다<sup>15)</sup>. Wang 등(2000)은 Tartaglia 등(1998)의 방법을 이용하여 사료중 육골분의 함량이 각각 2.0%, 0.5% 그리고 0.1%에서 검출이 가능함을 보고하였으며<sup>16)</sup>, Myers 등(2001)은 이러한 방법을 검증받고자 각각 4개의 서로 다른 실험실에서 같은 실험을 했을 경우 false positive 결과가 0.83%임을 보고하였다<sup>17)</sup>. 또한 Colgan 등(2001)과 Lahiff 등(2001)도 Tartaglia 등(1998)이 보고한 동물 종별 특이 염기서열 부위를 증폭할 수 있는 primer를 design하여 이용한 결과 육골분의 제조를 각 동물종별로 조합을 하여 제작한 사료를 이용하여 각 해당 동물의 함유 검출여부를 조사하였고<sup>18,19)</sup>, Lahif 등(2001)이 소와 돼지에서 ATPase 6 유전자 부위에서 특이 염기서열 부위를, 돼지에서 ATPase subunit 8 유전자 부위에서 특이 염기서열 부위를 증폭할 수 있는 primer를 design하여 발표하였다<sup>20)</sup>.

최근에는 Bottero 등(2003) mtDNA의 16S rRNA 유전자 부위의 특정 영역을 증폭하여 각 동물별 234 bp에서 265 bp의 상이한 증폭절편크기를 보이는 primer를 design하여 사료의 처리 온도별(134.4℃와 141.9℃), 압력별

(3.03 Pa에서 4.03 Pa까지), 그리고 육골분 함유량 0.0625%에서 검출이 가능함이 보고되었다<sup>21)</sup>. 또한 Kusama 등(2004)은 mtDNA ATPase subunit 8 유전자 부위를 이용하여 포유동물, 반추동물, 소, 양 그리고 염소에서 증폭되는 primer를 이용하여 이들의 육골분 함유량이 0.01%에서도 검출될 수 있음을 보고하였다<sup>22)</sup>.

이렇게 1990년대부터 현재까지 사료중 육골분의 함유 여부를 검출하기 위한 방법으로 PCR 방법을 이용한 연구가 활발히 진행되어지고 있다. 이에 본 실험은 BSE 예방을 위해 소 사료중 동물성유래단백질의 검출방법중 하나인 PCR을 이용한 검사방법 개발을 위해 소, 돼지, 닭, 사슴, 양 5종에 대해 각각의 특이적인 primer를 design하여 이들의 검출 한계치 및 종별 특이성에 대한 분석을 실시하고 국내에서 제작, 판매 되는 육골분에서 각각의 primer들의 검출 가능여부를 시험하였다.

## 제 2 장 실험재료 및 방법

### 2.1 실험재료

본 실험에 사용한 육골분 시료는 일반 사료회사에서 제작되어 국립농산물품질관리원 시험연구소에 성분검정의된 육골분 시료 120점을 사용하였고 축종별 positive control용 시료로 소, 돼지, 닭, 사슴, 양의 근육에서 추출한 DNA를 이용하였으며 각각의 positive control용 시료는 나머지 primer들에 대한 negative control로도 사용하였다. 또한 검출 한계치를 조사하기 위하여 동물성단백질이 함유되지 않은 일반 pellet사료에서 추출한 DNA에 positive control용 시료에서 추출한 DNA를 희석하여 각각 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01%로 각기 다르게 제작하여 사용하였다.

### 2.2 실험방법

#### 2.2.1 DNA 추출

본 실험에서 DNA추출은 Qiagen DNeasy Tissue kit의 방법을 수정하여 이용하였다. 시료 30~100 mg을 1.5 ml tube에 넣고 ATL Buffer 200  $\mu$ l 와 Proteinase 20  $\mu$ l를 첨가하여 강하게 vortex한 후 55°C water bath에서 3시간 배양 시켜서 완전히 용해되었음을 확인하고 RNase A (100 mg/ml)를 5  $\mu$ l넣고 상온(15~20°C)에서 10분간 배양하였다. AL Buffer 200  $\mu$ l를 넣고 10초간 vortex하여 70°C water bath에서 10분간 배양한 뒤 20°C에서 13,000 $\times$ g로 원심분리한 후 상층액을 새로운 tube로 옮기고 ethanol

(96-100%) 200  $\mu$ l를 넣고 10초간 vortex하여 혼합액을 spin column에 넣고 20°C에서 13,000×g로 2분간 원심분리 하였다. column을 새로운 collection tube에 넣고 ethanol이 함유된 Buffer AW1을 500  $\mu$ l 넣고 20°C에서 13,000×g로 1분간 원심분리, 또다시 column을 새로운 collection tube로 옮긴 후 ethanol이 함유된 Buffer AW2를 500  $\mu$ l 넣고 20°C에서 13,000×g로 1분간 원심분리 하였다. 통과한 용액을 버리고 빈 column을 20°C에서 13,000×g로 3분간 원심분리 하여 Column을 건조시켰다. 완전히 건조된 column을 새로운 1.5ml tube로 옮긴 후 2회에 걸쳐서 65°C로 미리 가온한 TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 100  $\mu$ l 넣고 상온에서 5분간 방치한 후 10,000×g로 원심분리 하여 DNA를 획득 하였다. 추출한 DNA는 1% agarose gel에 전기영동 하여 자외선 상에서 밴드를 확인한 후 260nm, 280 nm의 자외선 파장에서 농도 및 순도를 확인한 후 20 ng/ $\mu$ l의 농도로 희석하여 PCR을 위한 template로 -80°C에서 저장 하였다.

## 2.2.2 Primer design

본 실험에 사용된 primer들은 Genebank database의 유전자 염기서열 정보를 이용하여 소, 돼지, 닭, 사슴, 양의 cytochrome oxidase의 유전자 부위에서 축종별로 4~7종, 총 24종의 primer를 제작하여 사용하였다. 제작한 primer에 대한 다른 종과의 상동관계를 확인하기 위하여 NCBI 홈페이지의 blast site에서 primer별 PCR 증폭산물의 염기서열과 Genebank database에 기록되어 있는 염기서열정보들에 대한 homology test를 실시하여 종별 특이성이 있는 것들을 선발하였으며, 각각의 primer들에 대한 정보는 Table 4~8에 제시하였다.

### 2.2.3 PCR 조건

본 실험의 PCR 기기로는 Applide Biosystems사의 GeneAmp PCR System 9700을 사용 하였으며 Taq-Polymerase는 Solgent사의 h-Taq DNA polymerase를 사용하였고 이에 첨부된 반응조건을 수정하여 실시하였다. PCR시약조성은 template DNA 20 ng, dNTP (each 0.2 mM), primers (Forward, Reverse) 0.2 pmole, 10×buffer (MgCl<sub>2</sub> 0.25 mM), Taq polymerase (1.25 unit)을 최종농도로 하여 총 반응액을 50  $\mu$ l로 실시하였다. PCR cycle은 95°C에서 5분간 pre-denaturation을 시킨 후 95°C에서 30초간 denature를 시키고 60°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension시키는 과정을 40 cycle 수행한 후 마지막으로 72°C에서 10분간 최종 extension을 실시하였다.

Table 4. List of oligonucleotide sequences used for detection of bovine cytochrome oxidase

Name	Sequences	Amplicon (bp)	Source
B135	5'-TTC CAA GAT GCA ACA TCA CC-3' 5'-TGT ATG GGT CAG CTT TGT CG-3'	135	cytochrome oxidase <sup>23)</sup>
B156	5'-CTG CAT CAA GAC CAT GAA CC-3' 5'-CGT TCA GAC CGT TAG ATT TTC C-3	156	cytochrome c oxidase <sup>24)</sup>
B169	5'-TAA AGC CAG GGG AGC TAC G-3' 5'-AGG GTT GTT TGG TTC AGA CG-3'	169	cytochrome oxidase <sup>25)</sup>
B212	5'-AAT GCA TTC ATC GAC CTT CC-3' 5'-CCG TTT GCG TGT ATG TAT CG-3'	212	cytochrome b <sup>26)</sup>
B290	5'-TTT TAA TTG GCG GAA GAA GC-3' 5'-AAG TCC CAC TGC TCA ACA CC-3'	290	cytochrome oxidase <sup>27)</sup>



Table 5. List of oligonucleotide sequences used for detection of porcine cytochrome oxidase

Name	Sequences	Amplicon (bp)	Source
P203	5'-ACT TCG GTT CCC TCT TAG GC-3' 5'-GCC TAC GTG GAT GAA TAG GC-3'	203	cytochrome b <sup>28)</sup>
P220	5'-TCA ACA ATT GGC AGA GTA ATC C-3' 5'-TGT GTT GTG TGG GAA TTA TGG-3'	220	cytochrome P450 <sup>29)</sup>
P224	5'-TGG CTC TTC GTC AGA TTG C-3' 5'-CTT AGG AAG TGA TGC CAC AGC-3'	224	cytochrome C oxidase VIIa(COX7A2) <sup>30)</sup>
P296	5'-GCT CAT CTC CAT CTG GAA GC-3' 5'-TGA AAA TGA CCC CTT TGT CC-3'	296	cytochrome p450 <sup>31)</sup>

Table 6. List of oligonucleotide sequences used for detection of chicken cytochrome oxidase

Name	Sequences	Amplicon (bp)	Source
CH320	5'-TGG TAT CAA CCC AGA GAA GAG C-3' 5'-AGG AGG GCG ATG ATA GTG G-3'	320	cytochrome oxidase <sup>32)</sup>
CH335	5'-ACA GCT CAC TTG CCA CAG C-3' 5'-TCC GGA ACC AAA TCA TAA CC-3'	335	Cytochrome c oxidase <sup>33)</sup>
CH446	5'-AGC TGC TAG GAC GGG TAA GG-3' 5'-TAA TCG TCA CAG CCC ATG C-3'	446	cytochrome oxidase <sup>34)</sup>
CH491	5'-AAA CGC CTA TGA CAA GTA CGG-3' 5'-AGC TGG GCA GAG GTA GCC-3'	491	cytochrome P450 <sup>35)</sup>
CH205	5'-AAA CGC CTA TGA CAA GTA CGG-3' 5'-TTC CAA AAA TAC CAC GTT AGG G-3'	205	cytochrome P450 <sup>35)</sup>
CH555	5'-AGC TGG TGT TGT CTC GTT CC-3' 5'-TTC CTC CCT GAT GAC AAA CC-3'	555	cytochrome c oxidase <sup>36)</sup>
CH467	5'-TCC CAA GGT TCT CAT TCA CC-3' 5'-TTC CTC CCT GAT GAC AAA CC-3'	467	cytochrome c oxidase <sup>36)</sup>

Table 7. List of oligonucleotide sequences used for detection of cervine cytochrome b

Name	Sequences	Amplicon (bp)	Source
C220	5'-TTG TAA ACA ACG CAT TTA TTG ACC-3' 5'-CCG TTT GCG TGT ATG TAT CG-3'	220	cytochrome b <sup>37)</sup>
C248	5'-AAC CCT AAC CCG ATT TTT CG-3' 5'-AGT TGT CTG GGT CTC CAA GC-3'	248	cytochrome b
C250	5'-CAC TAC ACA GCC GAC ACA GC-3' 5'-GTC CTC ATG GTA GGA CGT ATC C-3'	250	cytochrome b <sup>38)</sup>
C336	5'-AAC CCT AAC CCG ATT TTT CG-3' 5'-GGG ATT GAT CGT AGG ATT GC-3'	336	cytochrome b

Table 8. List of oligonucleotide sequence used for detection of ovine cytochrome b

Name	Sequences	Amplicon (bp)	Source
O171	5'-TGA TAC TCT CCT TGA TGA CAT GC-3' 5'-CAA GGG GTG TTT TGT TTT GG-3'	171	cytochrome oxidase <sup>39)</sup>
O403	5'-GGA TTC TCA GTA GAC AAA GCT ACC C-3' 5'-GGA CTA GGA TTG AGA GGA TTA GGG-3'	403	cytochrome b <sup>40)</sup>
O300	5'-CCG ATA CAT ACA CGC AAA CG-3' 5'-AAA AAT CCG GTG AGG GTA GC-3'	300	cytochrome b <sup>40)</sup>
O564	5'-CCG ATA CAT ACA CGC AAA CG-3' 5'-TGA GGG GGA GTG TTA AGT GG-3'	564	cytochrome b <sup>40)</sup>

## 제 3 장 결과 및 고찰

### 3.1 육골분 및 positive control용 sample의 DNA추출

Qiagen DNeasy Tissue kit를 본 실험의 조건에 맞도록 수정하여 DNA를 추출한 결과 육골분에서는 200 bp-1.5 kb 정도의 DNA를 확인하였으며, positive control용 sample로부터는 10 kb이상의 DNA를 확인하였다 (Figure 3 and 4).

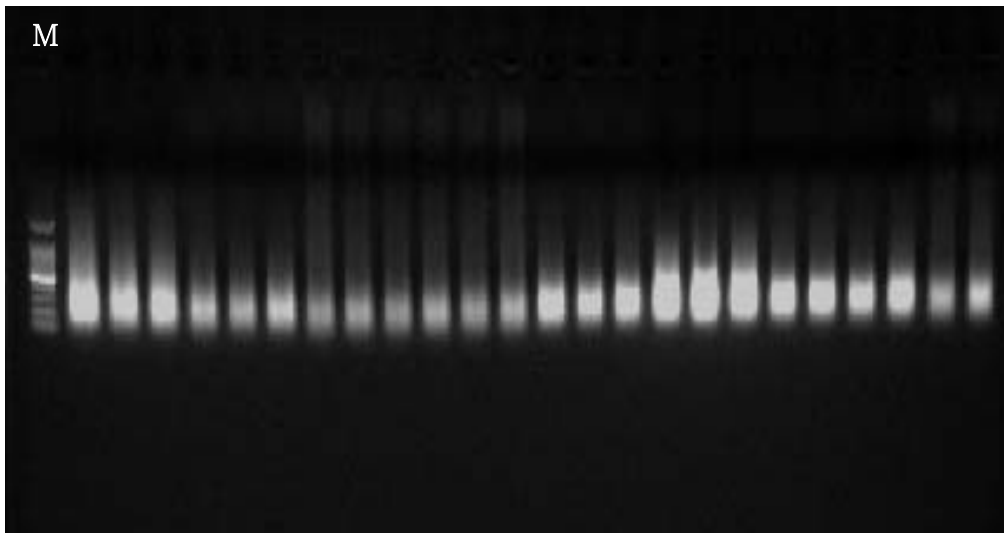


Figure 3. Results of agarose gel electrophoresis of the gDNAs extracted from meat and bone meal (1% agarose gel, M: Takara 100 bp size marker).

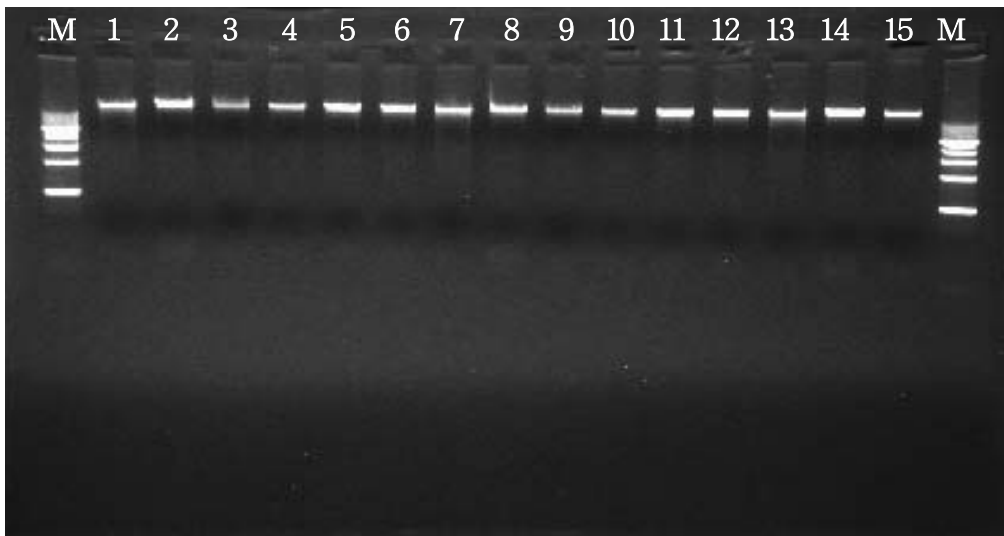


Figure 4. Results of agarose gel electrophoresis of the gDNAs extracted from samples of positive control (M: Takara 1 kb size marker), 1-3: Bovine, 4-6: Porcine, 7-9: Chicken, 10-12: Cervine, 13-15: Ovine

## 3.2 Primer 선발

실험에 사용된 primer들은 Genbank database에서 유전자 염기서열 정보를 이용하여 품종 간 차이가 있는 부위를 확인하여 자체적으로 제작한 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 B290, P203, G320, C248, O403을 최종적으로 선정하였으며 이들에 대한 정보는 Table 9에 기술하였다.

## 3.3 Primer별 PCR 결과

소의 cytochrome oxidase subunit III의 유전자 부위로부터 제작한 B290 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 사료회사에서 제조된 육골분 시료에서 예상했던 290 bp의 PCR 증폭산물을 확인할 수 있었고 검출한계치 조사(5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01%)에서도 290 bp의 PCR 증폭산물을 확인할 수 있었으며 다른 축종의 positive control로 사용한 돼지, 닭, 사슴, 양에서는 PCR 증폭 산물이 발견되지 않았다(Figure 5 and 6). 돼지의 cytochrome b 유전자 부위로부터 제작한 P203 primer를 이용한 PCR실험 결과에서도 육골분 시료와 검출한계치 조사(5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01%)에서 203 bp의 PCR증폭 산물을 확인하였으며 다른 축종에서는 증폭된 PCR산물을 확인할 수 없었다(Figure 7 and 8). 닭의 cytochrome oxidase subunit III 유전자 부위로부터 제작한 CH320 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과에서도 육골분 시료와 검출한계치 조사(5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01%)모두에서 320 bp의 PCR증폭 산물을 확인할 수 있었다(Figure 9 and 10). 이들 3종의 primer는 각각의 동물성단백질의 함유량이 0.01%에서도 검출 가능함을 확인할 수 있었으며, 육골분사료 제조시 처리하는 온도에는 관계없이 동물성 단백질의 검출이 가능함을 확인하였다.

사슴과 양의 cytochrome b 유전자 부위로부터 제작한 C248 primer와 O403 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 검출한계치 조사에서는 0.01%까지 예상했던 248 bp와 403 bp의 PCR증폭 산물을 확인할 수 있었으나 육골분 시료에서는 증폭된 PCR산물을 확인할 수가 없었다(Figure 11~14). 이 2종의 primer의 경우 검출 한계치가 0.01%까지 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.



Table 9. List of selected oligonucleotide sequences for each animal used in this study

Name	Sequences	Anneal Temp (°C)	Position	NCBI Accession No
B290	5'-TTT TAA TTG GCG GAA GAA GC-3' 5'-AAG TCC CAC TGC TCA ACA CC-3'	60	113/132 383/402	AB098796 <sup>27)</sup>
P203	5'-ACT TCG GTT CCC TCT TAG GC-3' 5'-GCC TAC GTG GAT GAA TAG GC-3'	60	95/114 278/297	AY534296 <sup>28)</sup>
CH320	5'-TGG TAT CAA CCC AGA GAA GAG C-3' 5'-AGG AGG GCG ATG ATA GTG G-3'	60	106/127 407/425	AF076356 <sup>32)</sup>
C248	5'-AAC CCT AAC CCG ATT TTT CG-3' 5'-AGT TGT CTG GGT CTC CAA GC-3'	60	75/94 303/322	EF051260
O403	5'-GGA TTC TCA GTA GAC AAA GCT ACC C-3' 5'-GGA CTA GGA TTG AGA GGA TTA GGG-3'	60	444/468 823/846	DQ852082 <sup>40)</sup>

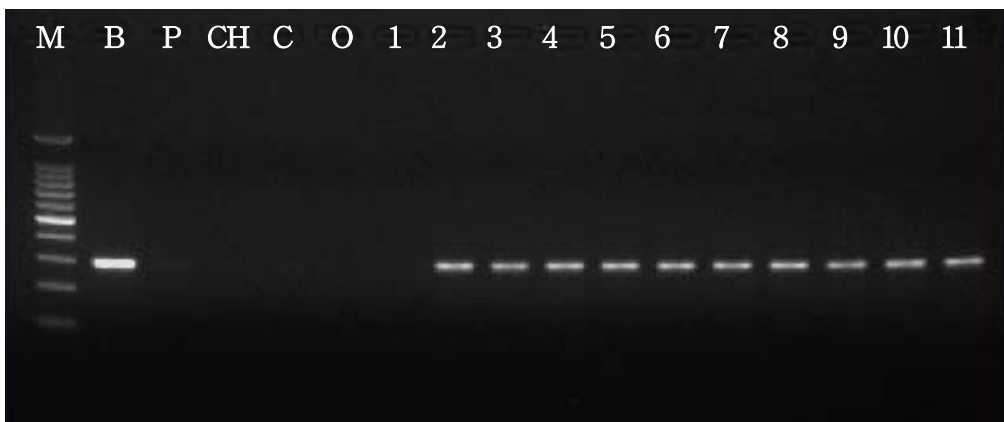


Figure 5. The PCR results based on B290 primer. M: Takara 100 bp size maker, B: Bovine, P: Porcine, CH: Chicken, C: Cervine, O: Ovine, 1: NTC (No Template Control), 2~11: MBM samples issued to NAQS (National Agricultural Products Management Service) made of feed manufacture company

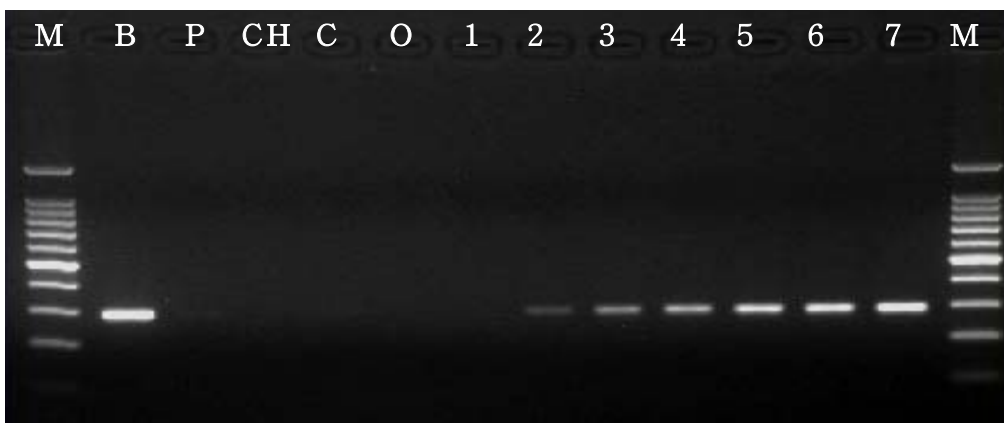


Figure 6. The PCR result based on B290 primer. M: Takara 100 bp size maker, B: Bovine, P: Porcine, CH: Chicken, C: Cervine, O: Ovine, 1: NTC (No Template Control), 2: 0.01% MBM, 3: 0.05% MBM, 4: 0.1% MBM, 5: 0.5% MBM, 6: 1% MBM, 7: 5% MBM

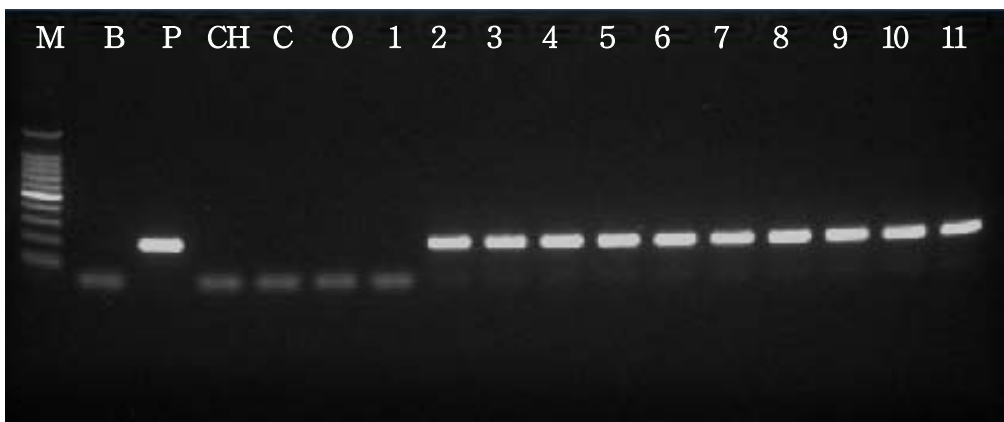


Figure 7. The PCR results based on P203 primer. M: Takara 100 bp size maker, B: Bovine, P: Porcine, CH: Chicken, C: Cervine, O: Ovine, 1: NTC (No Template Control), 2~11: MBM samples issued to NAQS (National Agricultural Products Management Service) made of feed manufacture company

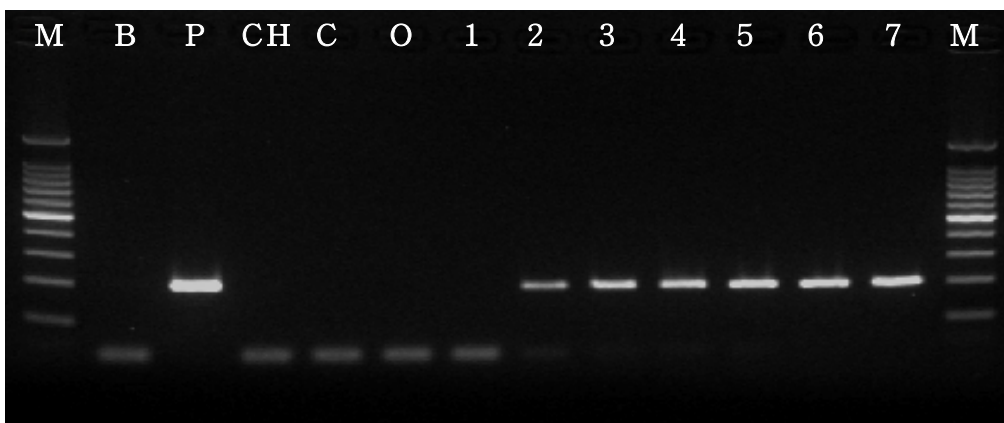


Figure 8. The PCR results based on P203 primer. M: Takara 100 bp size maker, B: Bovine, P: Porcine, CH: Chicken, C: Cervine, O: Ovine, 1: NTC (No Template Control), 2: 0.01% MBM, 3: 0.05% MBM, 4: 0.1% MBM, 5: 0.5% MBM, 6: 1% MBM, 7: 5% MBM

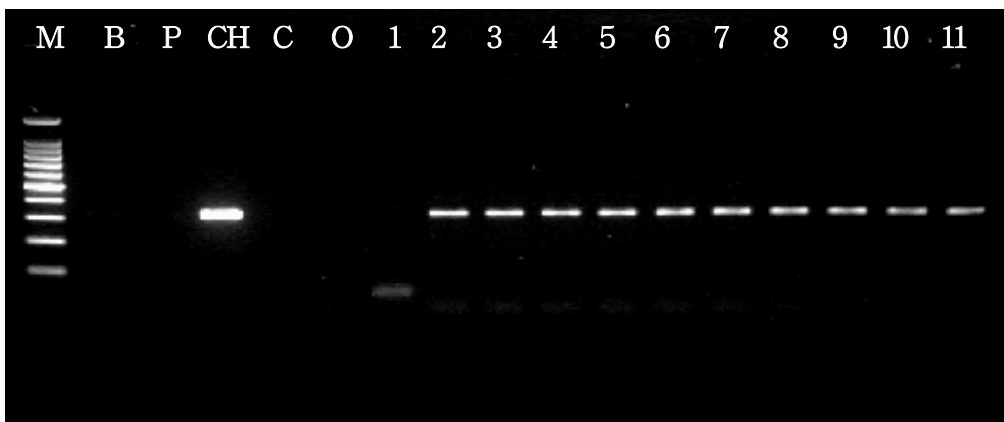


Figure 9. The PCR results based on CH320 primer. M: Takara 100 bp size maker, B: Bovine, P: Porcine, CH: Chicken, C: Cervine, O: Ovine, 1: NTC (No Template Control), 2~11: MBM samples issued to NAQS (National Agricultural Products Management Service) made of feed manufacture company

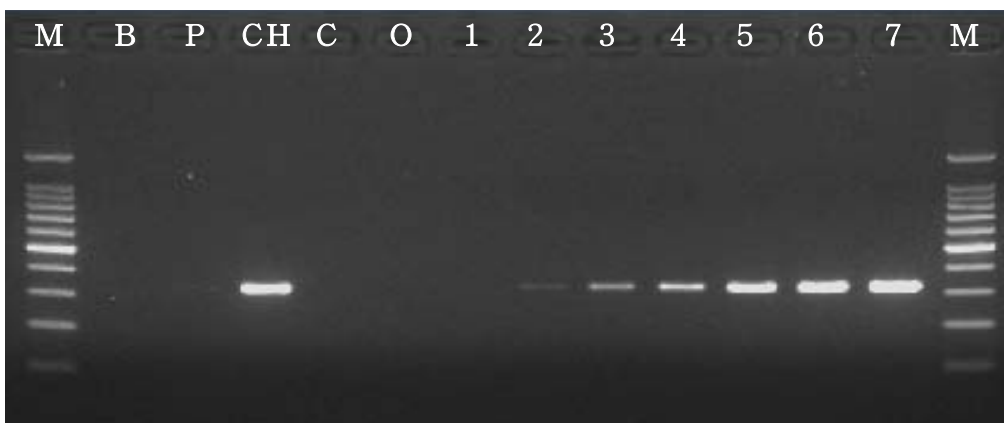


Figure 10. The PCR results based on CH320 primer. M: Takara 100 bp size maker, B: Bovine, P: Porcine, CH: Chicken, C: Cervine, O: Ovine, 1: NTC (No Template Control), 2: 0.01% MBM, 3: 0.05% MBM, 4: 0.1% MBM, 5: 0.5% MBM, 6: 1% MBM, 7: 5% MBM

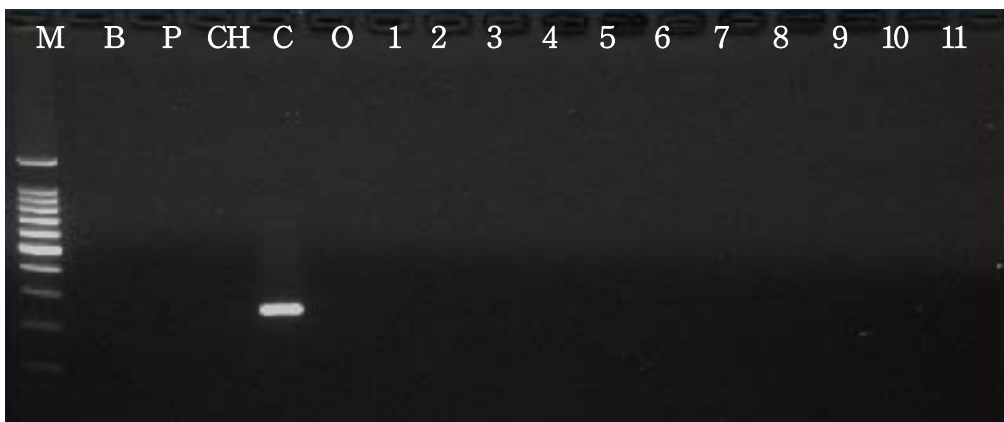


Figure 11. The PCR results based on C248 primer. M: Takara 100 bp size maker, B: Bovine, P: Porcine, CH: Chicken, C: Cervine, O: Ovine, 1: NTC (No Template Control), 2~11: MBM samples issued to NAQS (National Agricultural Products Management Service) made of feed manufacture company

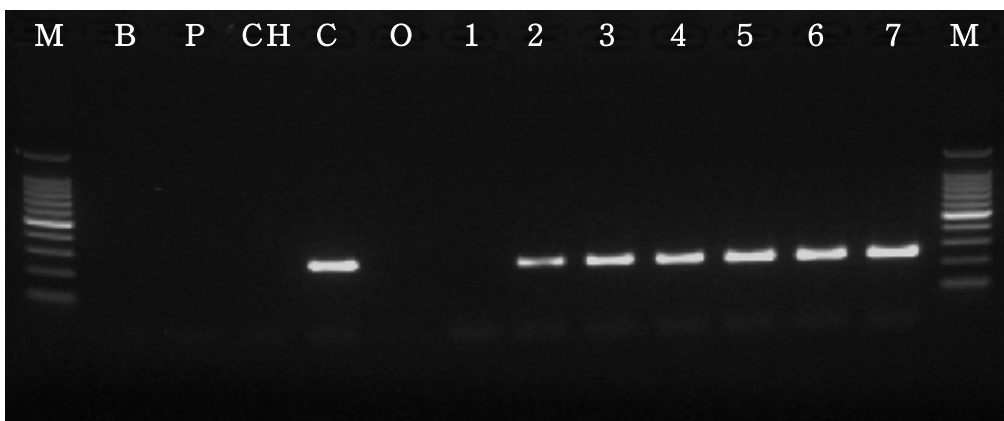


Figure 12. The PCR results based on C248 primer. M: Takara 100 bp size maker, B: Bovine, P: Porcine, CH: Chicken, C: Cervine, O: Ovine, 1: NTC (No Template Control), 2: 0.01% MBM, 3: 0.05% MBM, 4: 0.1% MBM, 5: 0.5% MBM, 6: 1% MBM, 7: 5% MBM



Figure 13. The PCR results based on O403 primer. M: Takara 100 bp size maker, B: Bovine, P: Porcine, CH: Chicken, C: Cervine, O: Ovine, 1: NTC (No Template Control), 2~11: MBM samples issued to NAQS (National Agricultural Products Management Service) made of feed manufacture company

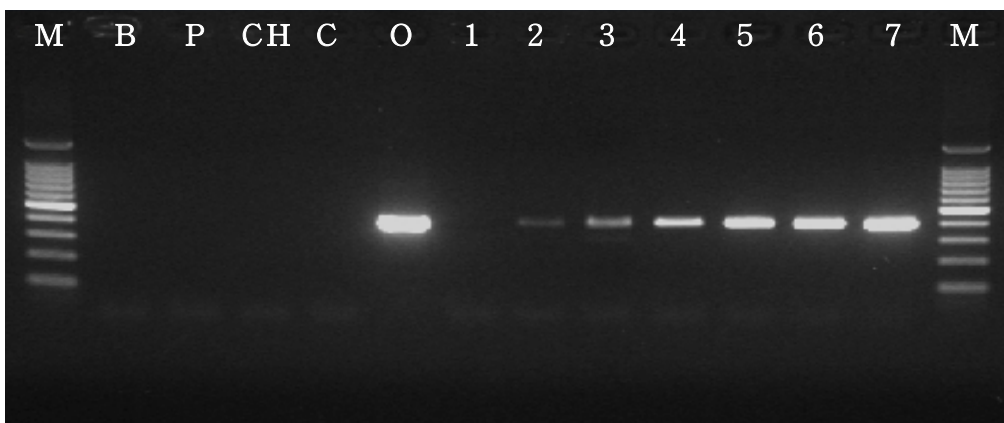


Figure 14. The PCR results based on O403 primer. M: Takara 100 bp size maker, B: Bovine, P: Porcine, CH: Chicken, C: Cervine, O: Ovine, 1: NTC (No Template Control), 2: 0.01% MBM, 3: 0.05% MBM, 4: 0.1% MBM, 5: 0.5% MBM, 6: 1% MBM, 7: 5% MBM

## 제 4 장 결 론

Bovine spongiform encephalopathy (BSE: 소해면상뇌증, 일명 광우병)는 1985년 영국에서 최초로 발견 되었으며, 당시 원인으로서는 사료에 혼입된 육골분 중 scrapie에 감염된 양의 육골분이 포함되어 급여된 것으로 확인 되어 반추가축에 급여 하는 사료에서 동물성 단백질의 함유 여부에 관심이 집중 되었고 이를 검출하는 방법으로 현미경을 이용한 방법 및 ELISA를 이용한 방법 이외에도 PCR을 이용한 방법에 관한 연구가 활발히 이루어져 오고 있다.

본 실험은 최근 빠르게 개발이 진행되고 있는 PCR방법을 이용하여 사료 중 동물성 단백질을 검출하기 위하여 종별 특이적인 primer를 제작 하고, 각각의 primer들의 검출 한계치에 대한 실험과 사료회사에서 가열 등 가공 공정을 거쳐 제작, 유통되는 육골분 시료에서 동물성 단백질의 검출가능 여부를 확인한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

본 실험 중 검출 한계치를 조사한 실험에서는 B290 primer, P203 primer, CH320 primer를 이용하여 수행한 PCR실험의 결과 0.01%까지 각각의 primer별로 예상했던 290 bp, 203 bp, 320 bp의 PCR증폭 산물이 확인된 것으로 보아 사료에서 동물성 단백질 검사에 본 실험에서 제작한 primer를 이용했을 경우 0.01%의 함유량까지는 검출이 가능한 것으로 판단된다.

또한, 각각의 primer에 대한 positive control 외에 다른 축종의 positive control에서 PCR증폭산물이 확인되지 않는 것으로 미루어 볼 때 primer의 종별 특이성을 확인 할 수 있었다.

B290 primer, P203 primer, CH320 primer를 이용하여 수행한 육골분 시료에서의 PCR실험결과 3종의 primer에서 각각의 primer별로 예상했던 290 bp, 203 bp, 320 bp의 PCR증폭 산물이 확인된 것을 볼 때 사료제조사의 가열처리 등 가공공정을 거친 육골분에서도 PCR 방법을 이용하여 동물성 단백질의 검출이 가능할 것으로 여겨진다.

C240 primer, O403 primer를 이용하여 수행한 검출한계 실험결과 positive control에서 primer별로 예상했던 240 bp와 403 bp의 PCR증폭산물을 확인할 수 있었으며, 다른 축종의 positive control에서 PCR증폭산물이 발견되지 않아 primer의 특이성을 확인하였으나, 육골분을 이용한 실험에서는 PCR증폭산물을 확인할 수 없었다.

위의 결론을 종합적으로 고려해 보았을 때 본 실험에서 사용한 육골분 시료에는 사슴과 양의 단백질들이 함유되어 있지 않은 것으로 보이며, 사료에서 동물성단백질의 혼입여부를 검사함에 있어서 시료의 채취가 이상적으로 수행되어 진다면 본 실험에서 선발한 primer를 사용하여 PCR검사법을 이용한 방법이 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각되며, primer별 PCR증폭산물의 크기가 작게는 37 bp에서 크게는 77 bp로 차이가 있으므로, 금후 multiplex PCR의 조건을 찾아서 이용한다면 검사하는데 소요되는 시간 및 인력을 줄일 수 있을 것으로 판단된다.



## 참 고 문 헌

1. 최경묵. 2006. 가축전염병 발생이 축산물 수급 불일치에 미치는 영향 분석. PP 22-24.
2. 농촌진흥청. 1999. 국내 소 광우병 확진 진단 기술의 개발연구. pp. 40-78.
3. Collinge, J., Rossor, M. 1996. A new variant of prion disease. *Lancet* 347: 916-917.
4. Gajdusek, D.C., 1993. Genetic control of nucleation and polymerization of host precursors to infectious amyloids in the transmissible amyloidoses of brain. *British Medical Bulletin* 49: 913-932.
5. Laurent, M. 1997. Autocatalytic processes in cooperative mechanisms of prion disease. *FEBS Letters* 407: 1-6.
6. Prusiner, S.B. 1996. Human prion diseases and neurodegeneration. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 207: 1-17
7. Blattler, T., Brandner, S., Raeber, A.J., Klein, M.A., Voigtlander, T., Weissmann, C., Aguzzi, A. 1997. PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. *Nature* 389: 69-73
8. Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A.,

- Kobayashi, Y., Maino, S., Weissman, C., Aguzzi, A. 1996. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 379: 339-343.
9. Oesch, B., Westaway, D., Walchi, M., McKinley, M.P., Kent, s.B.H., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., Hood, L.E., Prusiner, S.B., Weissmann, C. 1985. A cellular gene encodes scrapie PrP27-30 protein. *Cell* 40: 735-746.
  10. 농촌진흥청. 2005. BSE(소해면상뇌증)관련 사료내 반추동물 유래 동물성단백질 혼입여부 검출방법 개발. pp. 115-132.
  11. 배민식. 2001. BSE(일명 광우병)의 현황과 대책. *입법정보* 제1호 pp 6-21.
  12. 사료관리법 제13조제1항제7호, 농림부 고시 제2001-61호(2001.10.05), 개정 제2002-46호(2002.10.05), 개정.
  13. Tartaglia, M., Saulle, E., Pestaloza, S., Morelli, L., Antonucci, G., Battaglia, P.A. 1998. Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds : A molecular approach to test for the presence of bovine-derived material. *Food Protection* 61: 513-518.
  14. Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, T., Muroya, S., Shibata, K., Yamada, J., Shinmura, Y., 1999. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay.

Meat Science 51: 143-148.

15. Montiel-Sosa, J.F., Ruiz-Pesini, E., Montoya, J., Roncales, P., Lopez-Perez, M.J., Perez-Martos, A. 2000. Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 2829-2832.
16. Wang, R-F., Myers, M.J., Campbell, W., Cao, W-W., Paine, D., Cerniglia, C.E. 2000. A rapid method for PCR detection of bovine materials in animal feed stuffs. *Molecular and Cellular Probes* 14:1-5.
17. Myers, M.J., Friedman, S.L., Farreli, D.E., Dove-Pettit, D.A., Bucker, M.R., Kelly, S., Madzo, S., Campbell, W., Wang, R-F., Paine, D., Cerniglia, C.E. 2001. Validation of a polymerase chain reaction method for the detection of rendered bovine-derived materials in feedstuffs. *Food Protection* 64(4): 564-566.
18. Colgan, S., O'Brien, L., Maher, M., Shilton, N., McDonnell, K., Ward, S. 2001. Development of a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal. *Food Research International* 31: 409-414.
19. Lahiff, S., Glennon, M., O'Brien, I., Lyng, J., Smith, T., Maher, M.,

- Shilton, N. 2001. Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal(MBM). *Molecular and Cellular Probes* 15: 27-35.
20. Lahiff, S., Glennon, M., Lyng, J., Smith, T., Shilton, N., Maher, M. 2002. Real-time polymerase chain reaction detection of bovine DNA in meat and bone meal samples. *Food Protection* 65: 1158-1165.
21. Bottero, M.T., Dalmaso, A.I., Nucera, D., Turi, R.M., Rosati, S., Squadrone, S., Gorla, M., Civera, T. 2003. Development of a PCR assay for the detection of animal tissues in ruminant feeds. *Food Protection* 66: 2307-2312.
22. Kusama, T., Nomura, T., Kadowaki, K. 2004. Development of primers for detection of meat and bone meal in ruminant feed and identification of the animal origin. *Food Protection* 67: 1289-1292.
23. Young, I.G., Anderson, S. 1980. The genetic code in bovine mitochondria: sequence of genes for the cytochrome oxidase subunit II and two tRNAs. *Gene* 12: 257-265.
24. Huttemann, M., Jaradat, S., Grossman, L.I. 2003. Cytochrome c oxidase of mammals contains a testes-specific isoform of subunit VIb-the counterpart to testes-specific cytochrome C. *Molecular Reproduction and Development* 66: 8-16.

25. Verkaar, E.L.C., Nijman, I.J., Boutaga, K., Lenstra, J.A. 2002. Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA Meat Science 60: 365-369.
26. Kikkawa, Y., Amano, T., Suzuki, H. 2006. Analysis of genetic diversity of domestic cattle in east and south-east Asia in terms of variations in restriction sites and sequences of mitochondrial DNA.
27. Ishiwata, H., Katsuma, S., Kizaki, K., Patel, O.V., Nakano, H., Takahashi, T., Imai, K., Hirasawa, A., Shiojima, S., Ikawa, H., Suzuki, Y., Tsujimoto, G., Izaike, Y., Todoroki, J., Hashizume, K. 2003. Characterization of gene expression profiles in early bovine pregnancy using a custom cDNA microarray. Molecular Reproduction and Development 65: 9-18.
28. Niebert, M. Tonjes, R.R. 2005. Evolutionary spread and recombination of porcine endogenous retroviruses in the suiformes. Virology 79: 649-654.
29. Choi, I., Troyer, D.L., Cornwell, D.L., Kirby-Dobbels, K.R., Collante, W.R. Simmen, F.A. 1997. Closely related genes encode developmental and tissue isoforms of porcine cytochrome P450 aromatase. DNA Cell Biology 16: 769-777.
30. Cai, G., Chen, Y., Wang, C., Li, J., Peng, G. Zhang, H. 2007.

Generation and analysis of cDNA sequences derived from a porcine skeletal muscle library.

31. Skinner, T.M., Doran, E., McGivan, J.D., Haley, C.S. Archibald, A.L. 2005. Cloning and mapping of the porcine cytochrome-p450 2E1 gene and its association with skatole levels in the domestic pig. *Animal Genetics* 36: 417-422.
32. Mindell, D.P., Sorenson, M.D. Dimcheff, D.E. 1998. An extra nucleotide is not translated in mitochondrial ND3 of some birds and turtles. *Molecular Biology and Evolution* 15: 1568-1571.
33. International Chicken Genome Sequencing Consortium. 2004. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* 432(7018): 695-716.
34. Dawnay, N., Ogden, R., McEwing, R., Carvalho, G.R. Thorpe, R.S. 2006. Validation of the barcoding gene COI for use in forensics.
35. Kojima, M., Tagami, T. Degawa, M. 2006. Cloning of chicken lanosterol 14alpha-demethylase (CYP51) cDNA: discovery of a testis-specific CYP51 transcript. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 145:

383-389.

36. Caldwell, R.B., Kierzek, A.M., Arakawa, H., Bezzubov, Y., Zaim, J., Fiedler, P., Kutter, S., Blagodatski, A., Kostovska, D., Koter, M., Plachy, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y. Buerstedde, J.M. 2005. Full-length cDNAs from chicken bursal lymphocytes to facilitate gene function analysis. *Genome Biology* 6: R6.
37. Zhang, B.W., Wei, F.W. Li, M. 2005. A applied fecal DNA method to endangered animals.
38. Guha, S., Goyal, S.P. Kashyap, V.K. 2007. Molecular phylogeny of musk deer: A genomic view with mitochondrial 16S rRNA and cytochrome b gene. *Molecular Phylogenetic Evolution* 42: 585-597.
39. Tartaglia, M., Saulle, E. 1998. Rapid communication: nucleotide sequence of porcine and ovine tRNA(Lys) and ATPase8 mitochondrial genes. *Animal Science* 76: 2207-2208.
40. Meadows, J. R., Cemal, I., Karaca, O., Gootwine, E., Kijas, J.W. 2007. Five ovine mitochondrial lineages identified from sheep breeds of the Near East. *Genetics* 175: 1371-1379.

## [ABSTRACT]

### Development of a PCR-based Analysis Method for Animal Derived Proteins in Feed Stuffs

Kim, Ik Chul

Major in Biotechnology

The Graduate School of Engineering

Yonsei University

Supervised by Prof. Kang-Yell Choi

The cause for bovine spongiform encephalopathy (BSE) was known to be caused by mixture of the feed stuff with meat and bone meal (MBM) of scrapie infected sheep. Therefore, many countries legislate against contamination of animal proteins into feed stuffs, and try to develop methods to detect animal proteins in feed stuffs.

In this study, a PCR method for detection of animal proteins in processed MBM was developed by designing series of specific primers. PCRs were performed for threshold detection of the animal proteins in each 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 and 5% of animal samples respectively.

The 290 bp DNA band were visualized in all of MBMs when PCR was performed with the B290 primer (Bovine), and the threshold of detection was 0.01%. The 203 and 320 bp DNA bands were detected in all of MBM when PCRs were performed with P203 (Porcine) and



CH320 (Chicken) primers, respectively. The threshold detection of these were 0.01%.

The threshold of detection was 0.01%, but there were no band was detected in MBM when the C240 (Cervine) and O403 (Ovine) primers were used for PCRs. These results indicate that MBM samples does not have proteins of Cervine and Ovine. The PCR primers developed in this study could be used for detection of animal proteins in feed stuffs.

---

Key words: BSE, Mad cow disease, Prion, PCR