

T0006036

최 종
연구보고서

특이 단백질을 이용한 한우육의 신속·정확한
식별 기술 개발

Development of rapid and accurate technologies to identify
Hanwoo beef using specific proteins

영남대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “특이 단백질을 이용한 한우육의 신속·정확한 식별 기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 10 월 일

주관연구기관명 : 영남대학교
총괄연구책임자 : 최 창 본
세부연구책임자 : 최 창 본
연 구 원 : 최 인 호
연 구 원 : 이 명 훈
연 구 원 : 백 경 훈
연 구 원 : 시 현 정
연 구 원 : 류 혜 명

요 약 문

I. 제 목

특이 단백질을 이용한 한우육의 신속·정확한 식별 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 수입개방화시대를 맞이하여, 값싼 수입 쇠고기가 한우로 둔갑 판매 되는 것을 방지하기 위한 기술을 개발 하고자 수행되었다. 더욱이, 생우의 수입개방화 이후, 외국산 생우를 국내에 들여와서 6개월만 사육하면 “국내산 비육우”로 표시하여 판매를 할 수 있게 되는 데, 이 경우 상당 부분이 한우육으로 둔갑판매 될 수 있는 개연성이 있으며, 이에 대한 농가들의 위기감 등으로 인해 한우 산업 기반이 급격하게 붕괴되고 있다. 또한 둔갑판매로 인해 야기되는 피해는 생산자와 소비자 모두의 부담으로 돌아올 수 밖에 없기 때문에, 값싼 수입 쇠고기 또는 수입산 생우 고기가 한우 고기로의 둔갑 판매 되는 것을 방지할 수 있는 기술의 개발이 시급하다.

본 연구의 최종 목표는, 특정 농장 또는 지역에서 출하된 브랜드 한우육을 신속·정확히 판별해 낼 수 있는 기술을 개발하고, 이를 상용화함으로써 둔갑 판매의 기승으로 인해 실추된 고품질 한우 쇠고기에 대한 소비자적 신뢰를 회복함에 있으며, 더 나아가 한우육과 수입육 까지도 현장에서 신속하게 판별할 수 있는 기술의 개발 가능성을 제시하여 궁극적으로 한우의 국가 경쟁력을 제고시키는데 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 특이항체 생성을 위한 항원의 탐색 및 제조

1) 항원의 탐색

여러 학술지를 검색하여 항체형성이 보고된 peptide를 항원 후보로 선정하였으며, 한우에서는 전혀 발현되지 않는 단백질을 찾아내기 위해 소와 유전적인 상관성이 떨어지는 종을 계통 발생도를 참고해 검색하여 몇 가지 후보군을 확보하였다. 선별한 단백질의 아미노산 서열을 기초로 하여 항원성 부위 (epitope)를 검색하였으며, 그 후 AntheProt와 SciProtein 등과 같은 분석 프로그램으로 antigenic index, surface probability, hydrophilicity, flexible region 등의 항목을 분석하였다.

2) 항원 peptide 제조

한우 면역화 시험을 위해, 앞서 선정한 Protein A 및 Protein B의 sequence를 참고해 peptide 합성 전문 업체에 합성 의뢰하였다. 또한, 특정 항원에 대한 항체의 생성 및 검출을 목적으로 하는 본 연구에서 합성 의뢰한 모든 peptide들은 T-cell immune response가 일반적으로 자연계에 존재하는 L-form peptide보다 높은 것으로 보고된 D-form으로 제작하여 사용하였다.

또한 peptide의 크기가 작기 때문에 면역반응이 약하거나 반응을 일으키지 않을 수 있으므로 면역반응을 유발 또는 촉진시키기 위하여 분자량이 큰 carrier protein을 부착시켜 주었는데, 면역주사를 위한 peptide에는 KLH (Keyhole Limpet Hemacyanin)를, ELISA test나 Western immunoblotting을 통한 항체 검출용 peptide에는 ovalbumin을 carrier protein으로 사용하였다.

3) 유전자 재조합 기술에 의한 항원의 대량 생산

항원으로 선정한 peptide를 합성할 경우 막대한 경비 부담 문제가 있기 때문에 유전자 재조합 기술로 peptide을 대량 생산 할 수 있는 가능성을 검토해 보았다.

선정한 peptide에 대한 상보적인 forward nucleotide와 reverse nucleotide를 pET15b vector에 annealing시켜 cDNA 형태로 제조한 뒤 ligation을 실시하였다. Ligation 된 vector를 DH5 α (competent cell)에 heat shock을 주어 transformation 시켰으며, LB Ampicillin agarose plate에서 배양 후 생성된 colony를 다시 LB liquid culture로 대량 증식 시켰으며, large scale plasmid preparation으로 DNA extraction을 실시하였다.

2. 특이 항체 생성 및 검출

1) 흰쥐(Sprague-Dawley rat)를 이용한 예비시험

한우 브랜드육 식별 기술 개발을 위한 본 연구의 접근방법에 있어서 가장 근본적인 조사항목인 육즙 내 항체 검출 가능성에 관한 검증은 실험용 흰쥐를 이용해 실시하였다.

Sprague-Dawley 흰쥐에 APM (Adipocyte Plasma Membrane)과 BSA (Bovine Serum Albumin)를 면역주사 하였다. 면역주사하기 전과 주사 후에 채혈을 하여 항체의 생성을 비교 하였으며, 8주 후에는 시험동물을 모두 절식사 시킨 후, 적출 가능한 모든 근육조직을 분리하였다. 분리된 근육조직에 saline을 첨가후Stomacher로 타격해 육즙을 생산하였다. 육즙 내 항체의 검출 가능성 및 육즙 내 항체의 검출 수준을 ELISA로 확인하였으며, APM 및 BSA를 전기영동 후 Western immunoblotting을 실시해 항원-항체의 결합 패턴을 확인하였다.

2) 면양에서의 특이항체 생성

한우를 이용한 면역화 시험에 앞서 동일한 반추가축인 면양을 이용한 예비시험을 수행하였다.

Corriedale종 숫면양을 이용하여 면역 반응을 유도하였으며, 면양 근육조직의 분리 는 시험구를 biopsy하여 대퇴이두근을 채취하였으며, 채취한 생검 조직 중 일부는 saline을 첨가한 후 homogenize하여 원심분리 한 뒤 상등액을 채취하였으며, 나머지 일부는 deep freezer에서 냉동시킨 후 상온에서 해동시켜 자연 생성되는 육즙을 채취하였다. 특히, homogenize한 뒤 centrifuge하여 추출한 육즙은 자연 해동하여 생성한 육즙과 비교하여 육즙을 준비하는 방법에 따른 육즙 내 항체의 역가 측정을 위한 시험에 사용되었다.

면양의 육즙을 이용하여 한우 브랜드육 식별 기술 개발을 위한 기초연구로 Primary antibody 희석배율에 따른 육즙 내 항체의 검출 수준, 육즙 생산과정에 따른 육즙 내 항체의 검출 수준, Secondary antibody 희석배율에 따른 항체의 역가 측정, 항원의 적정 coating 농도 구명을 위한 시험 등과 같은 육즙 내 항체의 최적 검출 조건 설정에 관한 연구들을 수행하였다.

또한, 특이 단백질을 면양에게 면역주사 한 뒤 생산한 항혈청 및 육즙이 항원 단백질들과 나타내는 항원-항체 반응의 패턴을 확인하기 위한 Western immunoblotting을 실시하였다.

3) 브랜드육 식별 기술 개발을 위한 한우 면역화 시험

면양을 이용한 면역화 시험을 통해 나타난 항체생산 및 최적의 항체 형성 조건 등

의 결과들을 바탕으로 본격적인 한우 면역화 시험을 실시하였다.

농가 관행법에 따라 사양관리 되어진 출하 1개월 전 한우에게 피하 면역주사를 실시하였으며, 면역주사 이후 4주 후 도축을 실시하였는데 이 때 시험우 근육조직을 **sampling**한 뒤 육즙을 채취하였다. 채취한 육즙을 이용하여 근육조직 부위별 항체 검출 수준, 저장기간별 및 저장 방식별 항체 검출 정도 등을 ELISA를 통해 확인하였다. 또한, 브랜드육의 진위여부를 현장에서 신속·정확하게 식별 할 수 있는 진단 **rapid kit**의 제작을 위한 예비 시험으로 **Dot blot** 등을 실시하였다.

3. 한우 브랜드육 식별 진단 **rapid kit**의 제조

1) 항체 형성을 위한 다양한 조건 탐색

앞서 실시한 실험에서 제시된 조건들을 바탕으로 면역화의 최적조건을 설정하기 위한 한우 면역화 시험을 재실시하였다.

한우에 주사하는 항원(**Protein B synthetic peptide**)량에 따른 항체의 생성도 변화를 점검하기 위해 주사 항원량에 따라 두 그룹으로 구분해 항원을 주사하였으며, **One-shot** 처리구와 **Boosting** 처리구간의 항체 생성 정도를 측정하기 위해 다시 두 그룹으로 구분해 실시하였다.

도축은 **Boosting** 후 2주경과 한 후에 실시하였으며, 도축 후 시험우의 근육조직에서 육즙을 분리 해 항체 생성도 측정에 이용하였다.

2) ELISA 및 **Dot blot**을 통한 항체 생성도 측정

항체 생성도를 측정하기 위해 ELISA를 실시하였다.

또한, **Nitrocellulose membrane**에 항원으로 사용한 **Protein B synthetic peptide**를 각각 **blot**하여 실온에서 건조한 다음 **BSA**용액으로 **blocking**하였다. 항혈청과 육즙을 희석하여 1차 항체로 사용하였으며, **Anti-cow IgG/HRP**를 2차 항체로 사용하였다. 각각의 항체 반응이 끝난 후, **4-chloro-1-naphthol**을 발색 기질로 이용하였다.

3) **Gold conjugate**의 제조

Colloidal Gold에 **free Protein B synthetic peptide**, **KLH - Protein B synthetic peptide conjugate**, **OVA - Protein B synthetic peptide conjugate** 등을 각각 농도별로 첨가하였다. 색의 변화가 일어나지 않는 농도를 최적 농도로 결정하였으며, **colloidal gold**에 각각의 **conjugate**

를 최적 농도로 첨가하여 교반하였다. 교반이 끝난 다음, 첨가하였다. 원심분리 하여 상층액은 버리고, BSA를 첨가하여 현탁 한 후 사용하였다.

4) Immunostrip의 제조

Adhesive card에 nitrocellulose membrane, absorbent pad를 붙인 후 각각의 용액 (free Protein B synthetic peptide, KLH Protein B synthetic peptide conjugate, OVA Protein B synthetic peptide conjugate)을 capture buffer에 희석한 후 분주하여 반응선을 그었으며, 25 % Humidity 이하에서 건조 시킨 후 사용하였다. 대조선에는 goat anti-mouse IgG를 사용하였다.

5) Strip test

Strip을 이용한 면역육즙의 비면역육즙의 판별 가능성을 파악하기 위해 half test를 실시하였다. 96 well plate에 각 well 당 loading buffer와 free Protein B synthetic peptide, KLH - Protein B synthetic peptide conjugate, OVA - Protein B synthetic peptide conjugate, Protein A-gold conjugate) + 소혈청 또는 육즙을 넣고 각각의 strip을 수직으로 꽂아, 결과를 판정하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 특이항체 생성을 위한 항원의 탐색 및 제조

프로그램에서 얻어진 분석 자료를 기초로 항원으로 사용할 peptide 후보군을 최종 선정하였으며, 이들 선정된 후보 peptide들의 proteosomal cleavage prediction, T-cell epitope prediction 등을 웹을 기반으로 한 소프트웨어들을 통해 분석 하였고, 최종적으로 homology를 비교하여 소가 가진 여타 단백질과 homology가 발견되지 않은 Protein A (3mer)와 Protein B (12mer)를 최종 항원으로 선정하였다.

항원 단백질의 대량 확보를 위해 선별한 peptide가 삽입된 vector를 포함하는 균주를 대량 증식 및 vector purification을 실시하였다. Colony 형성을 확인함으로써, 선정한 peptide를 유전자 재조합 기술로 대량 생산할 수 있는 원천 기술을 확보하였다.

2. 특이 항체 형성 및 검출

1) 흰쥐를 이용한 예비시험

APM (adipocyte plasma membrane) 및 BSA (bovine serum albumin)를 면역 주사한 두 처리구 공히 항혈청의 역가가 높게 나타났으며, 육즙의 경우 항혈청 보다는 다소 미약한 반응을 나타내었다. 하지만, 육즙은 비면역혈청과 비교해 81,000배의 희석배율에서도 항원-항체 반응이 확인되었으며, 이는 비록 항혈청의 수준보다는 미약하지만 육즙 내 항체의 생산이 가능하다는 결론을 얻었다. 이러한 항원-항체 반응은 Western immunoblotting으로도 확인되었다.

2) 면양에서의 특이 항체 형성 시험

혈청과 육즙을 이용해 항체의 형성 정도를 측정해 본 결과, peptide를 주사하기 전 (비 면역혈청)과 비교해 면양에서 항체가 다량 검출됨을 확인할 수가 있었다. 항체는 세 처리구 공히 항혈청에서 가장 높은 면역반응을 나타내었으며, 육즙의 경우 항혈청 보다는 항체의 역가가 낮게 나타났지만 비면역혈청과 비교했을 때 항원 peptide에 대한 항체가 다량 검출됨을 확인할 수가 있었다.

2차 항체의 적정 농도를 구하기 위한 ELISA test의 결과, 각 well에 일정한 농도의 항원과 동일한 농도의 1차 항체를 처리해 주더라도 2차 항체의 희석배율의 차이에 의해 항체의 활성은 크게 달라지는 것으로 나타났다.

항원의 적정 coating 농도를 찾자 실시한 ELISA test에서는, 항원의 coating 농도가 10 ng/ml 이상에서부터 반응을 나타내었으며, 100 ng/ml 이상일 경우 안정적인 결과를 도출해 낼 수가 있었다.

Western immunoblotting 결과, 비 면역혈청을 처리한 membrane에서는 어떠한 특이적인 반응도 나타나지 않은 반면 항혈청을 처리한 membrane의 경우는 항원이 결합해 있는 carrier protein을 중심으로 강한 면역반응이 나타났음을 확인할 수가 있었다.

육즙도 항혈청과 마찬가지로 비면역 면양의 육즙에서는 면역반응을 확인할 수 없었으나, 면역주사한 면양의 육즙에서는 ovalbumin과 결합해 있는 peptide에 강하게 결합하고 있음을 확인할 수가 있었다.

3) 브랜드육 식별 기술 개발을 위한 한우 면역화 시험

한우의 경우, 면역 반응을 위한 주사 부위는 국소적인 피하주사로 실시되었지만, 앞다리, 등심 및 뒷다리 등 전체 근육조직 전반에 걸쳐 항체가 생성되었음을 확인할 수가 있다.

육즙 내 항체의 역가는 저장기간 및 저장방법에 따라 다르게 나타났다. 전반적으로 도축 당일의 면역육즙에서 항체가 가장 많이 검출되었으며, 시간이 경과됨에 따라

냉장 보관한 육즙 내 항체의 검출 수준은 서서히 떨어지는 것으로 나타났다. 도축 당일부터 냉동을 실시한 근육에서 추출한 육즙의 경우, 냉장시킨 근육에서 추출한 육즙보다 오히려 항체의 검출 수준은 더 낮게 나타났다. 따라서 진단 시 사용될 육즙은 냉동육에서 추출하는 것보다 냉장육 혹은 생육에서 추출하여 적용하는 것이 더 효과적인 것으로 판단된다.

Boosting 면역주사를 실시한 처리구의 경우, 항체의 검출 정도가 각 개체별로 큰 차이 없이 비면역혈청과 비교해 매우 높은 수준으로 나타났다.

3. 한우 브랜드육 식별 진단 rapid kit의 제조

1) 최적의 항체 형성을 위한 조건 탐색

① 항원 주사량이 항체 형성에 미치는 영향

적절한 최소 항원량의 탐색하기 위한 실험에서, 전체적으로 1 ~ 3 mg의 범위 내에서 큰 변화를 관찰하기 힘들었으며, 면역반응이 잘 일어나지 않는 개체가 있는 것으로 볼 때, 항체의 생성도는 항원의 양보다는 개체의 면역반응도에 더 영향을 받는 것으로 생각된다.

② Boosting이 항체 형성에 미치는 영향

Boosting을 실시한 그룹과 실시하지 않은 그룹간의 항체 생성도는 큰 차이를 나타내지 않았다.

③ Adjuvants의 종류가 항체 형성에 미치는 영향

Adjuvants로 alum과 FCA(Freund's complete adjuvant)를 사용했을 때, 항체의 생성 정도를 비교한 결과, 전반적으로 alum을 사용했을 때보다 FCA를 사용했을 때 항체의 생성 정도가 향상된 것을 확인할 수 있었다.

④ Rapid kit의 strip 제조를 위한 조건 탐색

Protein A에 gold particle을 conjugation함으로서 항원-항체 반응이 steric hindrance로 인한 저해작용 없이 반응을 하게 하였다. 또 Protein A를 이용함으로써 감지된 신호의 증폭 효과를 가져와 육즙에 소량 존재하는 항체의 신호마저 감지할 수 있게 되었다.

⑤ Dot blot을 이용한 조건 탐색

Nitrocellulose membrane에 항원 peptide를 설정된 조건에 따라 각각 binding 시킨 후,

dot blot의 결과, 한우에서 면역반응이 정상적으로 일어난다면 육즙에 포함된 항체를 감지하는 것이 충분히 가능하다는 사실을 확인할 수 있었다.

⑥ 육즙의 희석배율에 따른 strip에서의 반응 변화

이상의 결과들을 바탕으로 sample pad와 case를 첨가한 prototype의 rapid kit을 제작하였다. 양성 대조군으로 사용한 면역 혈청에서는 대조선과 반응선 모두 명확하게 생성된 것을 확인하였으며, 음성 대조군으로 사용한 비면역 육즙에서는 대조선은 명확히 생성되었지만, 반응선은 전혀 생성되지 않았다. 면역 육즙으로 test한 결과, 대조선과 반응선 모두 양성 대조군과 같이 명확히 생성되었다.

지금까지의 결과를 종합해 볼 때, 한우에 특정 단백질을 면역 주사할 경우, rapid kit을 이용해서 빠르고 간편하게 특정 쇠고기를 식별할 수 있다는 가능성을 검증하였다. 그러나 본 연구의 상업화를 위해서는, 반응선의 신호를 좀 더 명확히 하기 위한 조건 탐색, 다양한 sample 조건 및 환경에도 안정된 결과를 얻을 수 있는 방법, 면역성이 떨어지는 한우에 대한 해결책 강구, 소비자가 보다 손쉽게 취급할 수 있는 방식의 채택 등에 대한 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

특히 본 연구의 결과를 특정 브랜드를 대상으로 적용한다면, 브랜드육을 현장에서 신속하고 정확하게 판별할 수 있어 브랜드육의 보호에 큰 역할을 할 수 있을 것으로 기대된다.

◆ 연구개발 활용에 대한 건의

본 연구를 통해서 얻은 결과들을 종합적으로 검토해 보면, 특정 단백질을 한우에 면역주사할 경우 면역주사를 하지 않은 쇠고기에서는 나타나지 않는 특이 항체들을 육즙에서 검출해 낼 수 있었으며(특히 출원 중), 이를 바탕으로 신속한 현장 식별을 위한 시제품을 제작하였다.

본 연구에서 개발된 진단 kit의 오차 범위 최소화와 함께 대규모 한우를 대상으로 한 보강 시험이 수행된다면 본 연구의 상업화를 신속히 마칠 수 있을 것으로 판단되며, 이 경우 본 연구 결과의 홍보, 농가 지원 등의 과정에서 적극적인 정책적 지원이 요구되며 이러한 지원들을 건의합니다.

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title of the project

Development of rapid and accurate technologies to identify Hanwoo beef using specific proteins

II. Purposes and importance of study

The current study was conducted to develop a technology to identify Hanwoo beef from imported beef. Ever since we opened beef market to foreign country, the biggest problems enfacing is that illegal marketing of cheap imported beef as a expensive Hanwoo beef. Furthermore, it is another threat to Hanwoo farmers that beef produced from imported live beef cattle could be labeled as a "domestic beef" if they were raised at least 6 months in Korea. All these situations brought rapid collapses of Hanwoo industry in Korea recently. Thus, it is very urgent and critical to develop technologies to identify Hanwoo beef from imported beef and/or from beef of imported live beef cattle.

Final goal of the current study was to develop and commercialize the developed technologies to identify beef from specific farms and areas and thus, to regain consumer's evaluations about Hanwoo beef which was disregarded because of cheap and false marketing of imported beef. The current study will eventually improve international competitiveness of Hanwoo beef against imported beef.

III. Contents and scopes of the study

1. Screening and synthesis of antigens to produce specific antibodies

1) Screening of antigens

Candidate antigens reported to produce antibodies in various journals were screened based on "species involution tree" which may not have relationship with bovine genetically. Epitopic sites were checked based on the amino acid sequences of selected proteins, and then analysed for antigenic index, surface probability, hydrophilicity, and flexible region using AntheProt and SciProein software.

2) Synthesis of antigenic peptides

The selected peptides, protein A and protein B, were synthesized in commercial company. All peptides synthesized in the current study was a D-form because D-form was reported to have higher T-cell immune response than natural L-form.

Carrier proteins were conjugated to small peptides to stimulate immune responses. KLH (Keyhole Limpet Hemacyanin) was used for immunization and ovalbumin was used for ELISA test and immunoblotting to detect antibodies.

3) Production of the antigens using recombinant DNA technology

The possibilities to produce antigens using recombinant DNA technology was examined in consideration of producing antigens in cheap price.

Forward and reverse nucleotides for the selected peptides were annealed into plasmid vector, pET 15b, and ligated. Ligated vectors were transformed in to DH5 α competent cells by heat shock, and the colonies on ampicillin agarose plates were selected and cultured in LB liquid media for large scale plasmid preparation.

2. Antibody production and detection

1) Preliminary study using Sprague-Dawley rats

The essential part of the current study was to determine the possibilities of detection of any antibodies remaining in the muscle tissue of immunized animals and this was tested by preliminary study using Sprague-Dawley rats.

Sprague-Dawley rats were immunized with APM (adipocyte plasma membrane) and BSA (bovine serum albumin). Blood was taken from animals before and after immunization to test immune responses. And muscle tissue was collected from immunized animals after 8 weeks of immunization. ELISA test and Western immunoblotting were performed to test antibody in both serum and muscle tissue.

2) Development of specific antibodies in sheep

Once again prior to immunization of Hanwoo, further preliminary study was done using sheep since it is ruminant too.

Male Corriedale sheep was immunized to produce antibody. About 20 g of M. biceps femoris was isolated by biopsy after immunization. Half of the muscle sample was homogenized with PBS and the supernatant was collected after centrifugation to use as a meat juice. The other half of the biopsied muscle was frozen in deep freezer and meat juice by thawing the muscle was collected and used.

Studies to detect antibodies in meat juices according to dilution factor of primary antibody, preparation method of meat juices, dilution factors for secondary antibody, and optimum concentrations of antigens for coating were performed as a preliminary studies.

Western immunoblotting was performed too.

3) Immunization of Hanwoo to identify branded Hanwoo beef

Based on the results of optimum antibody production conditions obtained through preliminary studies, immunization of Hanwoo was performed.

Finishing Hanwoo was immunized one month before marketing and muscle was sampled when the animals were slaughtered. Meat juices were used for ELISA to test the

level of antibody reactions, storage times, and how to keep the meat. And dot blotting was performed as preliminary study to develop rapid kit for the identification of branded Hanwoo beef rapidly and accurately.

3. Development of rapid kit to identify Hanwoo beef

1) Screening of various conditions to develop antibody

On the basis of the results obtained from previous experiments, the optimum conditions for immunization of Hanwoo (Korean Cattle) was established.

Hanwoo were randomly allotted in equal numbers into two treatment groups according to the amounts of antigens. Each group was subdivided into booster injection and one-time injection group. Two weeks after boosting injection, all animals were slaughtered and meat juices from muscle were prepared and tested for antibody production.

2) ELISA and dot blot analysis

Antibody titers to the peptides used for immunization were determined using an ELISA.

For dot blot analysis, nitrocellulose membrane was blotted with Protein B synthetic peptide, dried at room temperature, and blocked with BSA solution. The membrane was incubated with meat juice or antiserum, and rabbit anti-cow immunoglobulin conjugated to horseradish peroxidase were used as secondary antibodies. Following the addition of substrate, 4-chloro-1-naphthol, the membrane was incubated until color was developed.

3) Preparation of gold conjugates

A range of concentrations of colloidal gold was added into solutions dissolving free Protein B synthetic peptide, KLH-Protein B synthetic peptide conjugate, and OVA-Protein B synthetic peptide conjugate, respectively. The optimal concentration at which there was no change in color of solution was determined. Ten percent BSA solution was added and stirred. After centrifugation, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in conjugate buffer at the concentration yielding a response.

4) Preparation of the immunostrip

Protein B synthetic peptide-OVA conjugate and goat anti-mouse IgG were applied to the test and control line, respectively, on the nitrocellulose membrane using Matrix 1600 reagent dispenser and dried overnight at 25% humidity. The nitrocellulose membrane and absorbent pad were assembled and attached to a adhesive card.

5) Strip test

The meat juice obtained from immunized Hanwoo was applied to the strip prepared as described. The premixed sample with loading buffer and Protein A-gold conjugate were applied to the strips to evaluate the results.

IV. Results and suggestions for the application of the study

◆ Results of the study

1. Screening and synthesis of antigens to produce specific antibodies

Peptide candidates to be used as antigens were selected from data analysis of computer programs, and proteosomal cleavage prediction and T-cell epitope prediction were analyzed based on web-site supported softwares. Protein A (3 mer) and Protein B (12 mer) which have no homology with any other proteins in bovine species were finally selected as antigens.

Mass growth of E. coli carrying vector with inserts for the selected peptides and vector purification were performed and the possibilities of mass production of antigens with cheap price were tested.

2. Development and detection of specific antibody

1) Preliminary study using Sprague-Dawley rats

Both APM (adipocyte plasma membrane) and BSA (bovine serum albumin) produced

high titers of antiserum. And titers in meat juices were relatively lower than those in antiserum, but were high enough to identify those from non-immunized antiserum. These results were confirmed by Western immunoblotting too.

2) Development of antibody in meat juice of sheep

High antibody titers were confirmed in both antiserum and meat juices of immunized sheep comparing to non-immunized serum. Titers in meat juices were higher than those in non-immunized serum while they were lower than those in antiserum.

The concentrations of secondary antibody were critical to determine titers by ELISA showing that various dilutions of secondary antibody had concentration dependent antigen-antibody reactions.

Antigen-antibody reaction could be detected from 10 ng/ml of antigen coated on the well for ELISA test, and consistent ELISA results could be obtained when more than 100 ng/ml of antigens were coated on the wall.

In Western immunoblotting, antiserum expressed strong reactions around carrier protein whereas non-immunized serum showed no reactions with those protein. These patterns of antigen-antibody reaction in antiserum in immunoblotting appeared same in meat juices showing strong reactions with peptide conjugated to ovalbumin.

3) Immunization of Hanwoo to identify branded beef

High titers of antibody in muscles, fore shank, loin, and hind shank, of Hanwoo was detected by immunization of peptides subcutaneously.

The titers were dependent on storage time and storage methods by showing the highest titers on the same of slaughtering. And the titers were gradually reduced as the storage times went on. Meat juice extracted from frozen muscle on slaughtering date showed lower titers than meat juice extracted from refrigerated muscle which means that refrigerated muscle is much more efficient to prepare meat juice than frozen muscle.

Titers of antibody in meat juice from boosting injected Hanwoo expressed higher level comparing to non-immunized serum.

3. Development of rapid diagnostic kit to identify branded Hanwoo beef

1) Screening of optimum conditions to develop antibody

① Effects of the amount of antigens

There were not a significant differences among the amounts of antigens immunized in the development of antibodies. The sensitivity of individual would be much more important in antibody development than the amount of antigens.

② Effects of boosting injection

There were not a remarkable differences between one-shot immunized animals and boosting immunized animals.

③ Effect of adjuvants

By using alum and FCA (Freund's complete adjuvant) as adjuvants, FCA showed higher titers than alum overall.

④ Screening of conditions to make strip for rapid kit

By conjugation with gold particle to Protein A, antigen-antibody reaction was enhanced without steric hindrance. Furthermore, the use of Protein A had amplifying effects to detect very small amounts of antibody in meat juice effectively.

⑤ Screening of conditions using dot blot

After dot blotting by binding antigenic peptides onto nitrocellulose membrane, it was confirmed that detection of antibody in meat juice is possible as far as immune reaction has been occurred in Hanwoo body.

⑥ Changes in reaction in strip according to dilution factors of meat juice

Rapid kit was invented based on above mentioned preliminary results. Clear development of control and reaction line could be confirmed in immunized serum whereas reaction line could not be detected in negative control group which had a clear control line. Meat juices from immunized animals also showed clear reaction bands same as antiserum.

Overall, the current study confirmed the possibilities to identify specific branded beef rapidly and accurately using rapid kit when the animals are immunized with specific proteins. Further studies, however, such as to enhance the sensitivity of reaction bands, to obtain stable results in various conditions and environments, to solve problems of non-reactive individuals, and to handle these kits easily by consumer group, should be

followed to commercialize the current results.

The current study would be much more beneficial for branded beef because those beef could be identified in the market quickly and easily with the rapid kit invented in this study.

◆ Suggestions for the application of the study

Taken together, the current study confirmed that specific antibodies present in Hanwoo beef produced by immunization with specific proteins could be detected (patent pending), and developed test strip kit for easy field use.

Further studies to minimize variations of diagnostic kits and to confirm the results in large scale of Hanwoo populations are needed to commercialize the current study. And governmental supports to the distribution of kits and to farmers are essential for the commercialization of the current study in the near future.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	23
Chapter 2. The present status of domestic and foreign technology	25
Chapter 3. Contents and results of the study	27
Part I . Contents of the study	27
1. Screening and synthesis of antigens to produce specific antibodies	27
1) Screening of antigens	27
2) Synthesis of antigenic peptides	28
3) Production of the antigens using recombinant DNA technology	29
① Cloning of genes responsible to specific proteins of Hanwoo	29
② Establishment of conditions for vector expression	30
③ Production of specific proteins	32
2. Antibody production and detection	35
1) Preliminary study using Sprague-Dawley rats	35
① Experimental animals	35
② Preparation of antigens and immunization	35
③ Production of antiserum and meat juices	36
2) Development of specific antibodies in sheep	38
① Experimental animals and immunization	38
② Production of antiserum and meat juices	39
③ Purification of antibodies using affinity column	41
④ Establishment of optimum conditions to detect antibodies	41

3) Immunization of Hanwoo to identify branded Hanwoo beef	42
① One-shot treatment	42
② Boosting treatment	44
3. Development of rapid kit to identify Hanwoo beef	45
1) Screening of various conditions to develop antibody	45
2) ELISA and Dot blot analysis	45
3) Preparation of gold conjugate	47
4) Preparation of the immunostrip	47
5) Preparation of half test	47
6) Preparation of prototype kit	48
Part II. Results of the study	49
1. Screening and synthesis of antigens	49
1) Screening and synthesis of antigens using data base	49
2) Production of antigens using recombinant DNA technology	49
2. Development and detection of specific antibody	52
1) Preliminary study using Sprague-Dawley rats	52
2) Development of antibody in meat juice of sheep	56
3) Immunization of Hanwoo to identify branded beef	65
3. Development of rapid diagnostic kit to identify branded Hanwoo beef	72
1) Screening of optimum conditions to develop antibody	72
① Effects of the amount of antigens	72
② Effects of boosting injection	73
③ Effects of adjuvants	74
2) Development for rapid kit	75
① Screening of conditions to make strip for rapid kit	75
② Screening of conditions using dot blot	76
③ Changes in reaction in strip according to dilution factors of meat juice	76

Chapter 4. Degree of attainment and contribution to the related field	81
Chapter 5. Application plan of the results of this study	83
Chapter 6. Foreign technical information collected during this R&D	84
Chapter 7. Reference	85

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	23
제 2 장 국내외 기술개발 현황	25
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	27
제 1 절 연구개발수행 내용	27
1. 특이 항체 생성을 위한 항원의 탐색 및 제조	27
1) 항원의 탐색	27
2) 항원 peptide 제조	28
3) 유전자 재조합 기술에 의한 항원의 대량생산	29
① 한우 특이 단백질 유전자의 확보	29
② 발현 vector의 구성 및 발현 조건 설정	30
③ 특이 단백질의 대량 확보	32
2. 특이 항체 생성 및 검출	35
1) 흰쥐(Sprague-Dawley rat)를 이용한 예비시험	35
① 시험동물	35
② 항원의 준비와 면역주사	35
③ 항혈청 및 육즙의 생산	36
2) 면양에서의 특이항체 생성	38
① 시험동물 및 면역화 과정	38
② 항혈청 및 육즙의 생산	39
③ Affinity column을 통한 항체의 정제	41
④ 최적의 항체검출 조건 설정	41
3) 브랜드육 식별 기술 개발을 위한 한우 면역화 시험	42
① One-shot 처리구	42
② Boosting 처리구	44

3. 한우 브랜드육 식별 진단 rapid kit의 제조	45
1) 항체 생성을 위한 다양한 조건 탐색	45
2) ELISA 및 Dot-blot을 통한 항체 생성도 측정	45
3) Gold conjugate의 제조	47
4) Assay strip의 제조	47
5) Half test	47
6) Prototype kit의 준비	48
제 2 절 연구개발수행 결과	49
1. 항원의 선별 및 제작	49
1) 항원의 선별	49
2) 유전자 재조합 기술을 이용한 항원의 대량 생산	49
2. 특이 항체 생성 및 검출	52
1) 흰쥐(Sprague-Dawley rat)을 이용한 예비시험	52
2) 면양을 이용한 육즙 내 항체 생산 시험	56
3) 브랜드육 식별 기술 개발을 위한 한우 면역화 시험	65
3. 한우 브랜드육 식별 진단 rapid kit의 제조	72
1) 최적의 항체 형성을 위한 조건 탐색	72
① 항원 주사량이 항체 형성에 미치는 영향 조사	72
② Boosting이 항체 형성에 미치는 영향 조사	73
③ Alum 및 FCA와 같은 Adjuvant의 선택이 항체 형성에 미치는 영향	74
2) Rapid kit 제조	75
① Rapid kit의 strip 제조를 위한 조건 탐색	75
② Dot-blot을 이용한 조건 탐색	76
③ 육즙의 희석배율에 따른 strip에서의 반응 변화	76
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	81
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	83
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	84
제 7 장 참고문헌	85

제 1 장 연구개발과제의 개요

1993년 말 UR(Uruguay Round of Multinational Trade Negotiation)협상이 타결됨에 따라, 외래 수입 쇠고기의 무차별적 수입에 따른 불안 및 위기감의 고조로 인하여, 우리나라 한우 사육 두수는 1997년 2,927천두에서 쇠고기 수입이 완전 자유화 된 2001년에 1,476천두로 절반 가까운 감소 추세를 나타내었으며, 한우쇠고기의 시장 점유율 또한 점차적으로 감소하는 추세(1995년 51.4%, 2001년 42.8%, 2002년 34.3%)에 있어 한우 특히, 육우 위주의 축산업 관계자들을 당황하게 하고 있다. 이에 정부는 2000년부터 송아지생산안정사업 및 다산장려금제도 등을 시행했음에도 불구하고 농가의 한우 사육두수는 꾸준히 감소하고 있는 추세이다. 우리 고유의 우수한 유전자원인 한우가 외래 수입육들에게 설자리를 잃어가고 있는 것이다.

이러한 시장개방 체제는 국가 경쟁력을 갖춘 고품질 한우 쇠고기의 생산을 요구하게 되었으며, 이에 한우의 고급육 생산을 위한 연구(거세를 통한 육질개선, 사료급여개선, 사료종류 다양화, 사양기간 장기화 등)들이 꾸준히 진행되어져 오고 있다. 하지만 고급육 생산과정이야말로 또 하나의 가격상승요인으로 작용을 하여 결국 ‘한우는 비싸다’는 소비자적 인식을 떨쳐버리지 못하고 있는 실정이며, 따라서 물밀듯이 들어오는 값싼 외국산 쇠고기에 대한 경제적 경쟁력이 매우 열악한 상황이다.

하지만 시장개방체제 이후 한우 쇠고기의 대외 경쟁력 약화의 가장 근본적인 문제는 바로 값싼 수입육이 한우육으로 둔갑 판매되어지는 부도덕한 유통과정에 있다. 또한, 수입 쇠고기를 국내에 들여와서 6개월만 사육하면 “수입산 국내 비육우”로 표시되어 시중에 유통되는데, 이 “수입산 국내 비육우”가 한우육으로 둔갑판매 될 수 있다는 개연성에 대한 농가들의 위기감 등에 의해 한우 산업 기반이 급격하게 붕괴되고 있는 실정이다.

실제, 백화점, 대형 할인마트 등에서 젓소고기 및 수입쇠고기를 한우고기와 혼합하여 소위 한우고기 선물세트로 제작하여 판매하는 등, 둔갑판매와 관련된 여러 사례들이 종종 보고 되고 있다. 이에 2002년 1월부터 농림부는 축산물 가공처리법 시행규칙을 개정, 육류 판매업자는 거래내역서에 고기의 종류와 물량, 원산지, 매입처 등 거래내역을 기록하고 이를 1년간 보관해야 하는 이른바 ‘식육거래기록의무제(거래내역 비치제)’를 실시하고 있으나, 정부의 지속적인 쇠고기 원산지단속에도 불구하고, 원산지 허위표시 및 미 표시 등 위반사례가 매년 증가(적발건수 : 2000년, 934건 → 2001년, 1,350건 → 2002년, 1,359건)하고 있는 실정이다. 게다가 쇠고기 수출국들 또한 자국산 고급 냉장육 중심의 시식·할인판매 등 다양한 판촉활동을 펼치면서 국내시장을 빠른 속도로 파고들고 있어, 국내 소비자들 사이에서도 ‘수입육은 곧 저급육’이란 인식이 점차 없어지는 추세이며, 냉장 쇠고기에 대한 소비자의 선호도가 높아지면서 국내

식육업체들의 수입육 취급 의향도 부쩍 증가하고 있다.

또한 쇠고기 구분판매제가 폐지되고 동시 판매가 허용됨에 따라 국내 쇠고기 유통 질서에도 큰 변화를 가져왔으며, 이는 한우고기와 수입쇠고기의 가격차, 유통구조 불투명 등이 동시 판매 허용과 맞물려 둔갑 판매가 근절되지 않고 더욱 기승을 부릴 것으로 우려되고 있다.

결국 어떠한 제도적 장치라도 객관성을 띤 판별기술 즉, 간편한 조작만으로 현장에서 누구라도 쉽게 한우육과 수입육을 식별할 수 있는 기술의 개발이 선행되어지지 않고서는 여전히 둔갑판매로 인해 실추된 한우육에 대한 소비자들의 신뢰를 회복할 수 없다고 판단된다.

현재 한우와 젓소고기(특히 Holstein종)는 유전자 감식법에 의해 식별이 어느 정도 가능하지만, 고가의 장비를 사용해야 하며, 분석시간이 오래 소요되며, 분석에 필요한 전문 인력이 요구되는 등 현장에서 신속하게 활용할 수 없다는 단점을 가지고 있다. 더욱이 여타 외래 품종 특히, 우리나라에 많이 수입되는 Hereford종(교잡종 포함)에 대한 판별 신뢰도는 매우 낮은 실정이다. 따라서 한우 산업의 안정적인 발전을 위해서는 한우쇠고기와 타 품종 쇠고기를 정확하고 신속하게 판별할 수 있는 기술이 반드시 개발되어야 할 것이며 더 나아가 경쟁력 있는 한우 고급육 생산과 밀접한 관계에 있는 특정 브랜드 육 즉, 특정 농장과 지역에서 출하한 쇠고기까지 판별할 수 있는 기술의 개발이 필요한 실정이다.

따라서 본 연구는 번역학적인 기법을 이용하여 현장에서 특정 브랜드육과 여타 다른 품종의 쇠고기를 신속·정확하게 식별할 수 있는 진단 기술의 개발을 위해 실시하였다. 본 진단 기술의 개발 및 상업화가 이루어진다면, 둔갑판매로 인해 야기된 경제적 손실뿐만 아니라, 한우육 및 특정 브랜드육에 대한 소비자들의 근본적인 불신을 해소 시킬 수 있을 것으로 기대되며, 더 나아가 본 기술은 경쟁력 있는 브랜드 산업 활성화의 초석이 될 것으로 기대되어, 축산업 전반에 걸쳐 기여하는 바가 크리라 예상된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

현재까지 알려진 육류의 식별을 위한 진단기법들은 대부분 DNA의 다형성에 기초를 두고 있다. Wyman 등(1980)에 의해 최초로 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphisms)기법이 보고된 이후, 축종 특이적 DNA probe에 관한 연구(Chikuni 등, 1990)를 위시해, RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism), MS(Microsatellite), SSCP(Single Strand Conformation Polymorphism), DAF(DNA Amplification Fingerprinting) 등과 같이 분자유전학 분야의 지속적인 발전을 통한 보다 정확하고 신뢰수준이 높은 분석기법들이 개발되어져왔다(Kirby, 1992).

특히 Jeffreys 등(1985)에 의해 개발된 DNA fingerprinting의 경우, 생물체의 유전체상에 나타나는 유전적 변이의 검출과 생물체간의 유전자 구조의 차이(다형성, polymorphism)에 대한 분석이 효율적이라는 장점을 가지고 있으며(Kuhnlein 등, 1989; Kikawa 등, 1995; Pitra 등, 1997), AFLP기법 또한 실험결과에 대한 재현성과 신뢰도가 매우 높고 유전적 유사도가 가까운 종이나 품종 간에도 고도의 유전적 변이와 다형성을 나타내기 때문에, 종 또는 품종 특이적인 DNA marker의 검출에 매우 효과적인 것으로 알려져 있다(Otsen 등, 1996). 우리나라의 경우, RAPD기법을 이용한 한우와 젓소(Holstein)의 판별 신뢰도는 거의 정확하다고 알려져 있으며(김, 2001), 돼지의 경우 microsatellite marker를 이용하여 재래돼지와 랜드레이스를 식별할 수 있는 genetic marker를 개발하였다(김 등, 2001).

하지만 이러한 기법들은 품종에 따라 차이가 나타나며, 면역학적 기법과 비교해 분석에 소요되는 시간이 길며, 고가의 장비 및 분석에 필요한 전문 인력이 요구된다는 단점을 가지고 있다.

이러한 유전자 감식법들과는 달리 항원 또는 항체의 존재를 효소 활성을 이용하여 검출하는 면역학적 기법들은, RIA(Radio immunoassay: 방사 면역 정량법)의 방사성표지를 효소로 바꾸어 놓은 방법으로, 방사성 물질을 사용하지 않는다는 점에서 안전하며 RIA에 비해 감도가 다소 떨어졌으나 최근 사용하는 효소의 종류·결합법 등의 개량으로 RIA와 거의 같은 감도를 얻을 수 있으며, 특히, ELISA와 같은 진단 기법들은 여타 다른 기법들과 비교하여 보다 편리하고, 신속한 진단이 가능하기 때문에(Demeulemester 등, 1991; Hsieh 등, 1996; Janssen 등, 1987; Samarajeewa 등, 1991), 일반적으로 진단 kit 제작 특히, 질병의 조기 진단관련 kit 개발에 가장 많이 활용되어지고 있다(Dong 등, 2003; Langedijk 등, 2001; Soutullo 등, 2001; Drew 등, 1999; Eisler 등, 1998; Cheng 등, 1996; Saravi 등, 1995).

이 외에 품종별 혹은 개체별로 존재하는 특이 단백질을 찾아내어 가축 품종 및 개

체 식별에 활용하는 단백질 다형현상 기법이 있으나, 이는 동일한 축종 내에서도 발현되는 단백질의 변이가 심하여 재현성이 상대적으로 낮은 것으로 알려져 있다.

한편, 소비자에게 정확하고 신뢰성 있는 축산물을 제공하기 위해서는 효율적인 가축의 식별(identification)과 이동경로 간 추적(traceability) 및 조회를 통한 축산물에 대한 완전한 정보, 그리고 유통공급망상의 네트워크 구축 등이 필요하다고 판단한 유럽의 많은 축산 선진 국가들은 Council Regulation(EC) No. 820/97을 기준으로 자국내 축산물의 바코드 라벨시스템을 구현하고 있다. 실질적으로 Council Regulation(EC) No. 820/97에서는 개별 가축에서 최종 판매시점에 이르기까지 특정 축산제품을 연계시켜 주는 참조번호가 포함된 축산물 바코드라벨을 요구하며, 이러한 요구조건을 만족시키기 위해서 도축장에서부터 가공과 포장을 거쳐 최종 판매시점에 이르는 축산물 유통공급망(meat supply chain) 전 과정에 걸쳐 키(key)가 되는 식별코드(identification number)를 이용한 라벨이 가축의 도체 및 부분육에 부착되어야 한다. 아울러 축산물을 컴퓨터 또는 정보시스템을 통해 처리하고 도축장에서 소매점포에 이르기까지 유통공급망에 관련된 모든 당사자간에 필요한 정보의 교환이 가능하도록 하는 축산제품의 코드화와 바코드시스템 및 스캐닝(scanning) 시스템의 도입과 EDI(전자문서교환) 시스템 보급 및 관련 데이터베이스의 구축 등이 우선적으로 이루어져야 하고, 축산물 유통과정에 대한 업무프로세스의 개선, 유통단계별 축산물의 규격화 및 코드화, 관련 상품정보의 데이터베이스 시스템 구축, 국내 축산업 환경의 고려 등이 병행되어 진행되어야 한다. 하지만, 지난 수십 년 동안 문서 위주의 정보교환에만 의존해오고 있는 국내 축산업 상황을 고려해볼 때, 부도덕한 유통과정으로 인해 붕괴위기에 처한 국내 축산업을 치유할 수 있는 시급한 해결책으로 생각하기에는 어려움이 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발수행 내용

1. 특이 항체 생성을 위한 항원의 탐색 및 제조

1) 항원의 탐색

여러 학술지를 검색하여 항체형성이 보고된 peptide들을 항원 후보로 선정하였으며(Lee 등, 2002; Tamar 등, 2002; Tooyama 등, 2000; Kramer 등, 1998; Mohri 등, 1997; Briand 등, 1997; Benkirane 등, 1995), 한우에서는 전혀 발현되지 않는 단백질을 찾아내기 위해 소와 유전적인 상관성이 떨어지는 종을 계통 발생도를 참고해 검색하여 여러 후보군들을 얻어내었다.

선별한 단백질의 아미노산 서열을 기초로 하여 항원성 부위(epitope)를 검색하였는데, 분석 프로그램으로 AntheProt와 SciProtein 등을 이용하였으며(Fig. 1), antigenic index, surface probability, hydrophilicity, flexible region 등의 항목을 분석하였다.

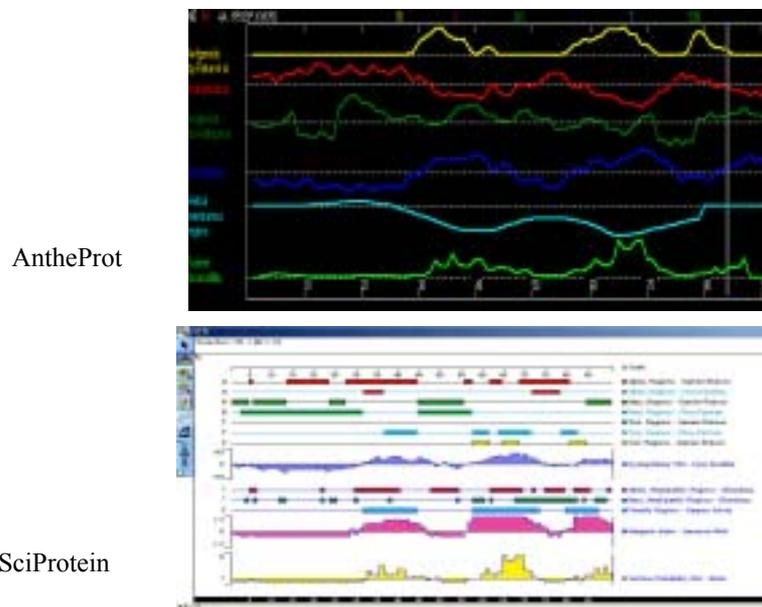


Fig. 1. Antigenic site analysis using programs, AntheProt and SciProtein.

프로그램에서 얻어진 분석 자료를 기초로 항원으로 사용할 peptide 후보군을 최종 선정하였으며, 이들 선정된 후보 peptide들의 proteosomal cleavage prediction, T-cell epitope prediction 등을 웹을 기반으로 한 소프트웨어들(Table 1)을 통해 다시 분석 하였으며, 최종적으로 homology를 비교하여 소가 가진 여타 단백질과 homology가 발견 되지 않은 Protein B의 특정부분(12mer)과 Tooyama 등(2000)이 이미 항체 형성에 문제가 없다고 밝힌 Protein A(3mer)를 항원으로 사용하였다. Protein A, Protein B 등의 후보군들에 대한 정보는 Table 5에 나타내었다.

Table 1. Antigenic site analysis by web programs

Program	Brief Descriptions	Download/www locations
NetChop	A neural network based proteosomal cleavage prediction.	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop
Proprac	A neural network based proteosomal cleavage prediction.	http://paproc.de/
SYFPEITHI	A www service for predicting MHC binding peptides for 24 class I and II alleles of human/mouse and rat.	http://123.2.96.221/Scripts/MHCServer.dll/EpPredict.htm
MAPPP	A complete www service with ORF and MHC binding prediction. It combines both SYFPEITHI and BIMAS	http://www.mpiibberlin.mpg.de/MAPPP/expertquery.html
PREDEP	A structure-based algorithm for prediction of MHC class-I epitopes. Available as www service for 13 alleles of different species.	http://bioinfo.md.huji.ac.il/marg/Teppred/mhc-bind/

2) 항원 peptide 제조

한우 면역화 시험을 위해 앞서 선정된 후보군 peptide(Protein A 및 Protein B)의 sequence를 참고해 항원 peptide를 합성 의뢰하였다((주)웹트론, 대전, 대한민국). 또한, 특정 항원에 대한 항체의 생성 및 진단을 목적으로 하는 본 연구에서 합성 의뢰한 모

은 peptide들은 T-cell immune response가 일반적으로 자연계에 존재하는 L-form peptide보다 높은 것으로 보고 된(Van Regenmortel 등, 1998) D-form으로 제작하여 사용하였다. 실제 L-form peptide와 D-form peptide는 거울 대칭적 구조를 가지고 있다(Fig. 2).

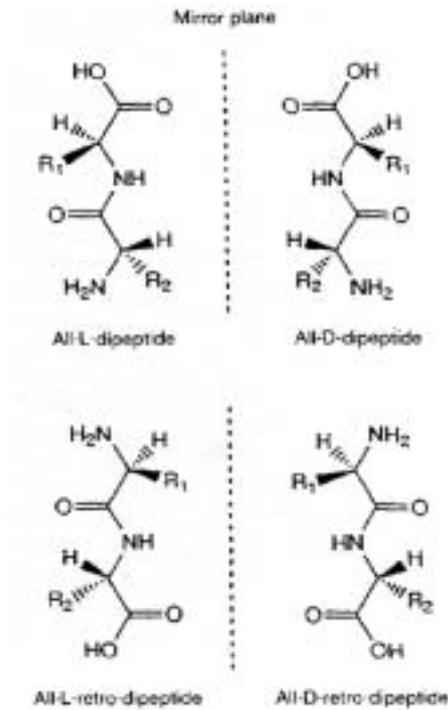


Fig. 2. Mirror symmetry between L- and D-forms of peptides.

또한 peptide의 크기가 작기 때문에 면역반응이 약하거나 반응을 일으키지 않을 수 있으므로 면역반응을 유발 또는 촉진시키기 위하여 분자량이 큰 carrier protein을 부착시켜 주었는데, 면역주사를 위한 peptide에는 KLH(Keyhole Limpet Hemacyanin)를, ELISA test나 Western immunoblotting을 통한 항체 검출용 peptide에는 ovalbumin을 carrier protein으로 사용하였다.

3) 유전자 재조합 기술에 의한 항원의 대량 생산

① 한우 특이 단백질 유전자의 확보

한우에서는 전혀 발현되지 않는 단백질을 찾아내는 작업은, 앞서 언급한 바와 같이, 소와 유전적인 상관성이 떨어지는 종을 계통 발생도를 참고해 검색한 후 여러 분석매체들을 사용하여 최종적으로 homology를 비교하는 과정을 거치면 특이 peptide 후보군들을 충분히 확보할 수 있으므로, 향후 특이 peptide의 계속적인 확보에는 특별한 문제가 없을 것으로 예상된다.

면역주사에 사용될 항원(한우에 존재하지 않는 peptide)의 대량생산 연구를 위한 대상 항원으로는 앞서 선정한 Protein A나 Protein B를 후보로 선정하였는데, Protein A는 3mer만으로 구성된 peptide라 cloning하기 쉽지 않은 까닭에, Protein B의 특정부분(12mer)을 최종적으로 선정하여 진행하였다. 하지만, 12mer peptide만으로도 cloning하기에는 사실상 부적절하다고 판단되어 연속된 최소한의 peptide를 추가로 삽입한 후(22mer, Protein B), peptide cloning을 실시하였다.

선정한 대상 peptide에 대한 cDNA의 합성은 (주)바이오니아(대전 DNA센터, 대한민국)에 합성 의뢰하여 상보적인 forward nucleotide와 reverse nucleotide를 expression vector의 절단부위를 고려해 합성하였으며, 합성 design은 Fig. 3과 같다.

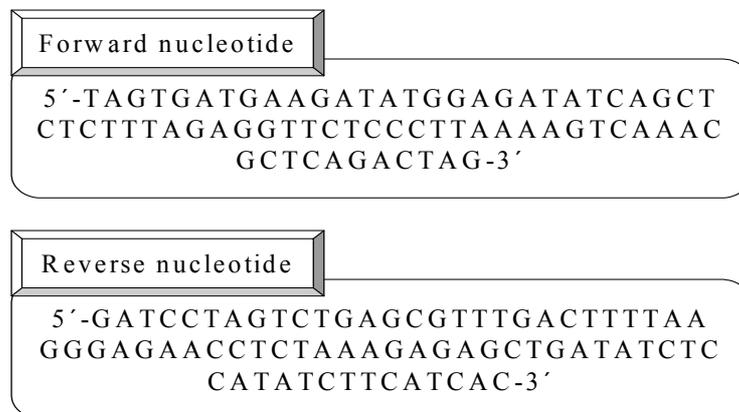


Fig. 3. Sequence of the synthetic cDNA.

② 발현 vector의 구성 및 발현 조건 설정

본 연구에 사용된 expression vector는 pET15b vector를 사용하였다. pET15b vector를 사용한 가장 큰 이유는 nickel column을 사용하게 됨으로써 vector의 정제가 용이하며,

QIAGEN[®] Plasmid Maxi Kit을 사용해 하층에 생성된 pellet으로부터 vector purification을 실시하였다. Purification 전 과정은 QIAGEN[®] Plasmid Maxi Kit과 함께 제공된 QIAGEN[®] Plasmid Purification Handbook의 내용에 따라 실시하였고, purification이 끝난 vector를 agarose gel상에서 전기영동을 실시해 purification 과정이 순조롭게 진행되었는지를 확인해 보았다.

-20 °C에서 보관중인 vector sample을 4 °C로 옮겨 서서히 녹인 후 전기영동을 위한 mixture를 제조했다. Mixture는 vector sample 1 μ l, ddH₂O 12 μ l, 그리고 pET15b vector의 절단부위인 BamH I site를 절단하기 위한 BamH I restriction enzyme(MBI Fermentas, USA) 0.5 μ l와 10 × BamH I Buffer(MBI Fermentas, USA) 1.5 μ l를 넣은 후 6 × type I gel loading buffer 3 μ l 넣어 total volume을 18 μ l로 제조한 뒤, 37 °C water bath에서 incubation(overnight)하여 restriction enzyme이 BamH I site를 절단할 수 있도록 하였다.

0.8% agarose gel mixture(1 × TAE buffer 80 ml, agarose 0.64 g)를 oven에서 가온하여 agarose를 녹이고, EtBr 5 μ l를 첨가한 뒤 상온에서 agarose gel을 제조한 뒤, pET15b vector의 size를 고려해 λ Hind III marker와 37 °C water bath에서 incubation한 mixture를 각각 loading하고, 55 volts, 1시간 30분 동안 전기영동한 뒤 band를 UV trans-illuminator를 통해 관찰하였다. 전기영동 결과 purification이 정상적으로 전개되어 순도 높게 분리된 vector들은 사용 전 까지 -20 °C에서 보관하였다.

③ 특이 단백질의 대량 확보

Peptide cloning을 통한 항원(한우에 존재하지 않는 peptide)의 대량 확보를 위해 합성한 cDNA가 삽입될 pET15b vector의 insert site를 restriction enzyme으로 절단하였다.

Fig. 4에 나타난바와 같이 pET15b vector의 절단 부위 중 Xho I(324) site는 BamH I(319) site나 Nde I(331) site와는 너무 가까워 절단하기 까다롭기 때문에, BamH I과 Nde I site를 restriction enzyme으로 double digestion한 후 합성한 cDNA를 ligation하기로 결정하였다.

Purification한 pET15b vector 100 μ l에 BamH I 및 Nde I restriction enzyme을 각 8 μ l씩 넣고, 2 × Y⁺/Tango[™] enzyme buffer를 60 μ l 첨가한 뒤, ddH₂O 124 μ l를 넣어 total volume 300 μ l인 mixture를 제조하고, 이 mixture를 37 °C에서 15시간 동안 incubation하여 double digestion을 실시하였다. Double digestion 후, restriction enzyme에 의해 절단된 vector를 0.8% agarose gel에서 전기영동 하여 확인하였다.

Ligation을 위한 vector가 준비된 후, 합성 의뢰하여 제조한 forward nucleotide와 reverse nucleotide(Fig. 7)가 상보적인 결합을 할 수 있도록 Hubank 등(1994)의 방법에 따라 annealing을 실시하였다. $1 \times$ EcoR I buffer $43.4 \mu\text{l}$ 에 forward nucleotide 및 reverse nucleotide를 각각 $3.3 \mu\text{l}$ 씩 주입하고 PCR machine을 이용하여 $95 \text{ }^\circ\text{C}$, 1분 \rightarrow $94 \text{ }^\circ\text{C}$, 1분 \rightarrow $93 \text{ }^\circ\text{C}$, 1분 \rightarrow \rightarrow $10 \text{ }^\circ\text{C}$, 1분 \rightarrow end하여 ligation을 위한 synthetic cDNA를 제조하였다. 제조한 cDNA가 annealing과정을 통해 정상적으로 결합하였는지를 확인하기 위해 12% non-denaturing polyacrylamide gel(30% acrylamide/bis 2.66 ml , ddH₂O 5.27 ml , $5 \times$ TBE 2 ml , 10% AMPS $70 \mu\text{l}$, TEMED $3.5 \mu\text{l}$)에 최초 합성 의뢰한 forward nucleotide와 annealing이 끝난 후 생성된 products(cDNA)를 동시에 loading해 전기영동(50 volts , 2 hrs)한 뒤 band의 pattern을 확인해 보았다.

Double digestion한 pET15b vector에 annealing한 cDNA를 insert하기 위해 ligation을 실시하였다. Ligation을 위한 mixture는 T4 ligase $1 \mu\text{l}$, ligase buffer $1 \mu\text{l}$, cDNA $0.4 \mu\text{l}$, pET15b vectors $1 \mu\text{l}$ 에 ddH₂O $6.6 \mu\text{l}$ 를 넣어 total volume이 $10 \mu\text{l}$ 이 되도록 제조하였다. 이 mixture를 $16 \text{ }^\circ\text{C}$ 에서 16시간, $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 에서 10분간 incubation시킨 후, transformation 과정을 실시하였다.

Transformation에 사용된 competent cell은 DH5 α (Introgen Therapeutics, INC., Texas, USA)를 사용하였다. Competent cell $30 \mu\text{l}$ 에 incubation된 mixture sample을 $3 \mu\text{l}$ 넣고 tapping하여 혼합한 뒤, ice에 30분간 정치시켜두었다. 그 후 $42 \text{ }^\circ\text{C}$ 에서 1분간 정치시키고, 다시 ice에 3분간 정치시키는 과정을 반복함으로써 온도 shock을 받은 competent cell이 ligation된 sample을 잘 받아들일 수 있도록 해 주었다. 그 후, LB media $500 \mu\text{l}$ 를 첨가해 주고, shaking incubator에서 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 220 rpm , 1시간동안 shaking하였다.

X-gal(5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside, MBI, USA) $20 \mu\text{l}$ 와 IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside, dioxane free, MBI, USA) $50 \mu\text{l}$ 를 섞은 mixture를 제조하고 LB Ampicillin agarose plate에 분주한 후, 삼각 유리병을 사용하여 plate 상단에 콜고루 퍼트렸다. Shaking이 끝난 product를 X-gal과 IPTG mixture를 뿌려놓은 LB Ampicillin agarose plate에 추가로 분주하고, 15분간 상온에서 정치한 후 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ incubator에서 overnight 시켰다.

Overnight 후 LB plate에 형성된 colony 중 하나를 선택해 liquid culture media(LB media 5 ml + Ampicillin $5 \mu\text{l}$)에 loop로 옮겨 넣은 후, 5 ml liquid culture($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 240 rpm , 9 hrs)를 실시하였다. Liquid culture를 통해 competent cell들을 충분히 증식시킨 후 전체 5 ml 중 2 ml 를 centrifuge($12,000 \text{ rpm}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 min)하고, 그 후 생성된 pellet에

glycerol stock solution(LB media 75 ml, glycerol 25 ml)을 700 μ l 첨가하여 glycerol stock을 만들어 -80 $^{\circ}$ C에 보관해 두었다. Glycerol stock 제조 시 사용된 2 ml를 제외한 나머지 3 ml는 효율적인 DNA extraction을 위한 large scale plasmid preparation에 사용되었다.

3 ml중 1 ml만을 liquid culture media(LB media 2 ml + Ampicillin 2 μ l)에 옮겨 넣은 후, liquid culture(37 $^{\circ}$ C, 220 rpm, 8 hrs)를 실시하여 증식시켰다. 증식 후 다시 1 ml만을 취하여 liquid culture media(LB media 100 ml + Ampicillin 100 μ l)에 넣고 liquid culture(37 $^{\circ}$ C, 220 rpm, 14 hrs)하여 대량 증식시킨 다음, centrifuge(4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm, 15 min)하여 pellet으로 만들었다. 그 후, pellet 외 상등액은 모두 제거하고 -20 $^{\circ}$ C에서 overnight시켰다.

Pellet에 Solution I (25 mM Tris-base pH8.2, 10 mM EDTA, 15% Sucrose, 2 mg/ml Lysozyme) 용액을 6 ml 주입한 후 pellet을 완전히 녹이고, ice에 20분간 정치시켜 두었다. 다시 Solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS) 용액을 추가로 주입하고 ice에 10분간 정치시켜 두었으며, 다시 Solution III (3 M Sodium acetate pH5.2) 용액을 넣고 ice에 20분간 정치시켜 두었다. Centrifuge(12,000 rpm, 30 min)를 하여 상등액만 취하고 상등액을 다시 centrifuge(12,000 rpm, 15 min)한 뒤, RNase를 1 μ l 처리하고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 incubation 하였다.

Incubation이 끝난 후, phenol solution(Phenol:Chloroform:Isoamylalcohol = 25:24:1)을 1:1의 비율로 주입하고, 5분간 vortex한 뒤 3,500 rpm에서 30분간 centrifuge하였으며, 상등액만 취하여 깨끗한 tube로 옮긴 후 다시 phenol solution을 1:1의 비율로 주입하였다. 다시 상등액만 취하여 깨끗한 tube로 옮기고, 100% EtOH를 상등액의 200%, 7.5 M ammonium acetate를 상등액의 10%의 비율로 각각 주입하였으며, -80 $^{\circ}$ C에서 1시간 정치시켰다. 그 후, 12,000 rpm에서 20분간 centrifuge한 뒤, pellet을 제외한 모든 용액을 제거하고, TE buffer를 1,000 μ l 첨가하여 competent cell에서 cloning 된 DNA를 추출하였다.

DNA extraction이 끝난 후, spectrophotometer를 이용하여 DNA의 농도를 측정하였으며, 이 농도를 참고하여 restriction enzyme(*BamH* I 및 *Nde* I)으로 double digestion(37 $^{\circ}$ C, 14 hrs)한 뒤, annealing 한 cDNA와 함께 0.8% agarose gel에 전기영동 해 ligation, transformation 및 DNA extraction 과정이 정상적으로 진행되었는지를 확인하였다.

2. 특이 항체 생성 및 검출

1) 흰쥐(Sprague-Dawley rat)를 이용한 예비시험

한우 브랜드육 식별 기술 개발을 위한 본 연구의 접근방법에 있어서 가장 근본적인 조사항목인 육즙 내 항체 검출 가능성에 관한 검증시험은 실험용 흰쥐를 이용해 실시하였다.

① 시험동물

실내온도 22 ± 0.5 °C, 습도 $50 \pm 5\%$ 환경의 영남대학교 부속 실험동물사육사에서 사육 중인 Sprague-Dawley rat(암컷, 8주령) 4마리를 체중을 고려하여 APM(Adipocyte Plasma Membrane) 처리구와 BSA(Bovine Serum Albumin) 처리구로 구분 배치하였으며(2마리/구), 사료는 실험동물용 일반사료를 자유채식 시켰다. 시험은 8주간 진행되었으며, 시험 시작일로부터 1주 간격으로 처리구별 체중을 측정하여 면역주사로 인해 나타나는 체중의 변화를 관찰하였다.

② 항원의 준비와 면역주사

a. APM Treatment

· First Immunization

APM(1.929 mg / ml) 250 μ g / Saline 1 ml

Freund's Incomplete Adjuvant 1 ml

Freund's Complete Adjuvant 1 ml

Total Amount = 3 ml(1 ml / animals)

· Second and Third Immunization

APM(1.929 mg / ml) 125 μ g / Saline 1 ml

Freund's Incomplete adjuvant 2 ml

Total Amount = 3 ml(1 ml / animals)

b. BSA Treatment

· First Immunization

$$\begin{array}{r} \text{BSA } 0.25 \text{ g / Saline } 1 \text{ ml} \\ \text{Freund's Incomplete adjuvant } 1 \text{ ml} \\ \text{Freund's complete adjuvant } 2 \text{ ml} \\ \hline \text{Total Amount} = 3 \text{ ml} (1 \text{ ml / animals}) \end{array}$$

· Second and Third Immunization

$$\begin{array}{r} \text{BSA } 0.125 \text{ g / Saline } 1 \text{ ml} \\ \text{Freund's Incomplete adjuvant } 2 \text{ ml} \\ \hline \text{Total Amount} = 3 \text{ ml} (1 \text{ ml / animals}) \end{array}$$

면역주사는 두 처리구 공히 3주 간격으로 3회씩 동일한 농도로 실시하였으며, 일반적으로 항원이 soluble proteins일 경우, 흰쥐도 50 ~ 1,000 μg 까지 주사 가능한 것으로 알려져 있으므로(Harlow 등, 1988), 본 시험에서 항원의 주사 농도는 면역학적 기법을 이용한 저지방 육류 생산에 관한 연구에서 항체의 생산 시 면양에게 주입한 농도와 동일하게 최 등(1998)의 방법에 따라 실시하였다. 주사량은 rabbit의 경우 400 μl / site가 적당하다는 보고를 감안하여(Harlow 등, 1988), 두 당 총 1 ml의 항원을 위와 같이 제조한 후 200 μl 씩 목 뒷부분에서 꼬리 방향으로 등선 5부위에 나누어 피하주사 하였다(총 1 ml / 두, 200 μl / site).

③ 항혈청 및 육즙의 생산

면역주사 3일 전과 마지막 면역주사 후 10일 후에 안구채혈법으로 각 처리구별 혈액을 2~3 ml씩 채취하여 상온에 1시간 정치시킨 후 2,800 rpm에서 30분간 원심분리 하여 분리한 혈청을 각각 비 면역혈청 및 항혈청으로 구분하였다. 구분한 항혈청은 시험동물 도살 후 근육에서 생성되는 육즙 내 항체 검출실험 시 양성대조군으로 사용되었다.

마지막 채혈 후 2일 후에 시험동물을 모두 ether에 질식사 시킨 후, 도체에 대한 발골 작업을 통해 4마리 시험구로부터 적출 가능한 모든 근육조직을 분리하였다. 육즙 제조를 위해 각 처리구별 근육 조직 30 g을 zipper bag에 넣고 saline 10 ml를 첨가한 후 Stomacher(LBW400, TMC, Korea)를 사용하여 5분간 육즙을 분리하였다. 그 후,

ELISA test를 통한 육즙과 비 면역혈청 및 항혈청간의 비교실험을 실시해 육즙 내 항체의 검출 가능성 및 육즙 내 항체의 검출 수준을 확인하였으며, APM 및 BSA를 전기영동 후 Western immunoblotting을 실시해 항원-항체의 결합패턴을 확인하였다.

Western immunoblotting을 위해 먼저 APM 및 BSA protein들을 Laemmli(1970)의 방법에 따라 sodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)하여 분자량에 따라 분리하였다.

Separation gel(12%)과 stacking gel(3%)은 PROTEAN II xi | XL Vertical Electrophoresis Cells(Biorad, USA)을 사용하여 제조하였으며, 각각 4.0 ml 30% acrylamide/N,N'-methylene-bisacrylamide, 2.5 ml 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 3.4 ml ddH₂O, 100 μ l 10% SDS, 50 μ l 10% ammonium persulfate, 5 μ l N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine과 1 ml 30% acrylamide/N,N'-methylene-bisacrylamide, 1.25 ml 1 M Tris-HCl(pH 6.8), 7.65 ml ddH₂O, 100 μ l 10% SDS, 50 μ l 10% ammonium persulfate, 10 μ l TEMED로 제조하였다.

APM 및 BSA protein들을 4 × sample dilution buffer(2% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 62.5 mM Tris, 0.001% bromophenol blue, 10% glycerol)에 희석시킨 후, 90~100 °C의 끓는 물에 2~3분간 끓였고, 제조한 stacking gel에 loading 하여 100 volts에서 90분간 전기영동 시켰다. 전기영동이 끝난 gel은 coomassie brilliant blue R-250으로 염색하여 단백질 패턴을 확인하는 한편, Western immunoblotting을 하기 위해 nitrocellulose membrane(HybondTM-C Pure nitrocellulose membrane, Amersham, England)에 electro-transfer하였다.

SDS-PAGE에 의해 APM 및 BSA protein들이 분리된 gel과 gel 크기를 고려해 절단한 nitrocellulose membrane(8 cm × 5.5 cm) 및 8 cm × 10.5 cm로 절단한 Gel blotting paper(Schleicher & Schuell, England)를 blotting buffer(25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.4% glycine, 20% methanol)에 5분간 담근 후, Gel blotting paper → Nitrocellulose membrane → Gel → Gel blotting paper의 순으로 assemble하였다. 그 후 Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell(Biorad, USA)을 이용해 4 °C, 110 volts로 약 90분 동안 nitrocellulose membrane으로 전사시켰으며, transfer가 끝난 nitrocellulose membrane은 zipper bag에 넣어 사용 전 까지 4 °C에서 보관하였고, transfer 한 gel은 coomassie brilliant blue R-250으로 염색하여 SDS-PAGE 후 염색한 gel과 비교하여 transfer된 정도를 확인하였다.

Western immunoblotting은, APM 및 BSA protein들이 전사된 nitrocellulose membrane을 증류수에 10분 정도 적신 다음, TBS-Tween(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 154 mM NaCl, 0.1% Tween 20)으로 10분간 2회 washing 후, 5% skim

milk/TBS-Tween으로 상온에서 1시간 정치시킴으로서 non-specific binding을 block하였다. 그 후 membrane에 APM 및 BSA에 대한 흰쥐의 항혈청 및 육즙을 1% skim milk에 1:10,000배 희석, 첨가하여 2시간 상온에서 binding 시켰다. Primary antibody와의 binding이 끝난 뒤 membrane을 TBS-Tween용액으로 2차례 washing 한 후, secondary antibody로서 anti-rat immunoglobulin G-alkaline phosphatase conjugate(Sigma Chemical, San Diego, USA)를 1% skim milk에 1:10,000으로 희석하여 binding 시켰다. Secondary antibody와의 binding 후, membrane을 3회 TBS-Tween으로 washing 해주었다. Washing 후, 66 μ l Nitroblue tetrazolium(NBT; Sigma Chemical, San Diego, USA)과 33 μ l 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate(BCIP; Sigma Chemical, San Diego, USA)를 함유한 10 ml alkaline phosphatase substrate용액(100 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, pH 9.5)을 nitrocellulose membrane에 첨가하여 암실에서 발색 반응을 시켰으며, 반응이 나타나면 증류수로 여러 번 세척하여 반응을 중지시켰다.

Fig. 5는 Sprague-Dawley 흰쥐를 이용한 육즙 내 항체 검출 시험 전체를 간략하게 나타낸 것이다.

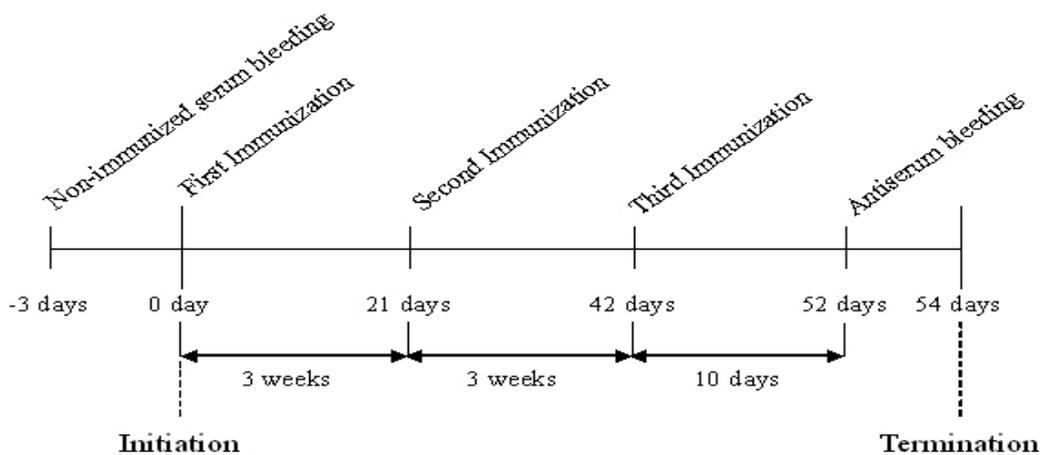


Fig. 5. The experimental design to produce antibody against adipocyte plasma membrane or bovine serum albumin in Sprague-Dawley rats.

2) 면양에서의 특이항체 생성

① 시험동물 및 면역화 과정

한우를 이용한 면역화 시험에 앞서, 동일한 반추가축인 면양 3두를 이용한 항체 검출 및 최적의 항체 형성 조건 등에 관한 예비시험을 수행하였다. 면양은 영남대학교 부설 목장에서 사육 중인 Corriedale종(≒ 60 kg)을 사용하였으며, 항체의 생산을 위한 adjuvant, 주사시기, 주사방법 등은 최 등(1998)의 방법에 따랐다. 면양 A는 Protein A를 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 의 농도로 처리하였고, 면양 B는 항원 농도별 항체 생성을 확인하기 위해 면양 A와 동일한 peptide인 Protein A를 10배 희석한 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 의 농도로 처리하였다. 또한 면양 C는 Protein B를 항원으로 사용해 면양 A와 동일한 농도인 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 을 처리하였다. 각각의 처리구에 따른 항원의 종류와 주사 시 농도, adjuvant 종류 및 최종 주사량은 Table 2에서 나타난바와 같다.

주사는 2 ml의 항원을 면양의 목 뒷부분과 양쪽 서혜부로 나누어 모두 피하주사하였다. 1차 면역주사 후 결합력이 증진된 항체의 생성을 유도하기 위하여 3주 간격으로 2차와 3차 면역주사를 동일한 방법으로 실시하였다(boosting).

Table 2. Experimental design for sheep immunization

Animals	Peptide	Peptide concentration	Adjuvant	Injection amount (peptide:adjuvant ratio)
Sheep A	Protein A	100 $\mu\text{g} / \text{ml}$	Freund's incomplete	2ml(1:1)
Sheep B	Protein A	10 $\mu\text{g} / \text{ml}$	Freund's incomplete	2ml(1:1)
Sheep C	Protein B	100 $\mu\text{g} / \text{ml}$	Freund's incomplete	2ml(1:1)

※ Protein A and B will refer to Table 5.

② 항혈청 및 육즙의 생산

1차 면역주사하기 전과 마지막 면역주사 이후 12일째에 각각 면양의 경정맥 으로부터 혈액을 채취하여 상온에서 1시간동안 정치시킨 후, 2,800 rpm, 30분간 centrifuge 하여 혈청을 분리하였으며, 전자는 비 면역혈청(non-immunized serum), 후자는 면역혈청(antiserum)으로 구분했다.

면양 육즙에서의 항체 검출 유무를 확인하기 위하여 마지막 채혈 후 2일 후에 biopsy를 실시하였다(Fig. 6). 시험 면양(무 처리 면양, 면양 A, 면양 B 및 면양 C)들을

럼푼(바이엘코리아(주))으로 마취 시킨 후(Fig. 6-A) 고농축 아미노산, 비타민, 전해질제인 아미비콤((주)대성미생물연구소)을 근육 주사해 주었으며(Fig. 6-B), 면도로 양모를 제거하고(Fig. 6-C), 수술부위를 충분히 소독한 뒤(Fig. 6-D) 대퇴부를 메스로 절개하여(Fig. 6-E) 대퇴이두근을 각 처리구당 약 20 g씩 채취하였다(Fig. 6-F). 절개한 부위를 봉합 후(Fig. 6-G) 베타딘으로 수술부위를 소독하였고(Fig. 6-H), 수술 후 면양이 완전히 회복할 때 까지 개별사육하며 항생제 투여, 소독 및 관리해주었다(Fig. 6-I).

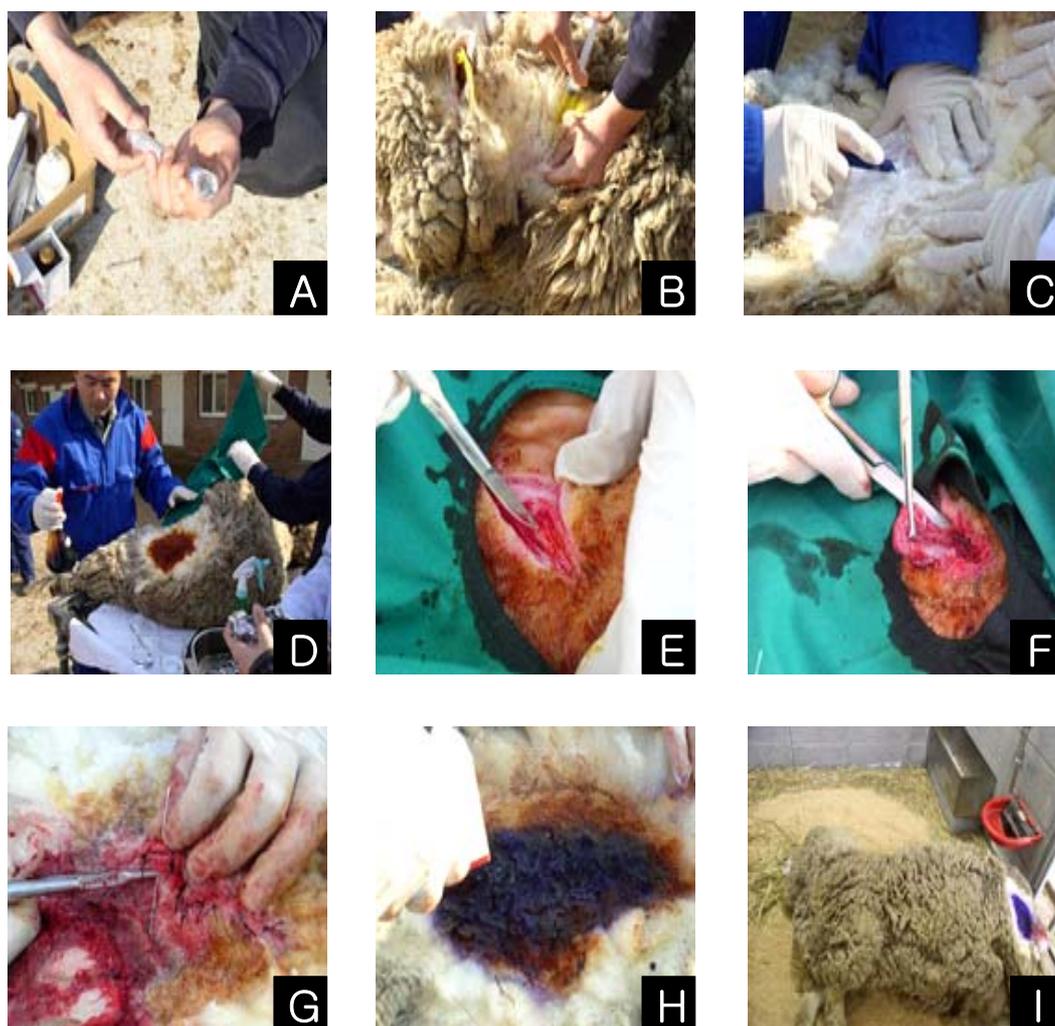


Fig. 6. Photographs showing biopsy procedures in sheep.

채취한 생검 조직 중 10 g은 PBS를 1:1의 비율로 첨가한 후 homogenize하고 1,000 rpm에서 5분간 centrifuge한 뒤 상등액만 채취하여 -20 °C에 보관해두었으며, 나머지 10 g은 -80 °C deep freezer에서 2일간 냉동시킨 후 상온에서 해동시켜 자연 생성되는 육즙을 채취해 -20 °C에 보관해 두었다. 특히, homogenize한 뒤 centrifuge하여 추출한 육즙은 자연 해동하여 생성한 육즙과 비교하여 육즙을 준비하는 방법에 따른 육즙 내 항체의 역가 측정을 위한 ELISA test에 사용되었다.

③ Affinity column을 통한 항체의 정제

항체가 생성된 것을 ELISA test로 확인한 후 항체 검출 조건 탐색의 양성대조군으로 사용하기 위해, 면양의 혈청들을 항원으로 사용한 affinity column(HiTrap Protein G column, Amersham, England)에 통과시킴으로써 sulfur group이 연결된 resin과 반응시켜 공유결합을 만들어 항원 peptide에 대한 특이적인 항체를 분리하였다.

면양의 혈청을 PBS에 10배 희석하여 column에 통과시킨 다음 1 M NaCl이 포함된 PBS로 세척하여 비 특이적이거나 특이도가 낮은 항체를 모두 제거하였다. 항원에 특이적인 항체는 0.1 M glycine(pH 3.0)으로 용출하였으며 용출액을 1 M Tris-Hcl(pH 8.0)으로 중화시켜 변성을 최소화하였다. 분리한 항체를 정량한 후 적정농도로 농축한 다음 SDS-PAGE하여 분리된 band 패턴을 확인하였으며, protease inhibitor를 첨가한 상태로 -70 °C에 보관하였다.

④ 최적의 항체 검출 조건 설정

한우 브랜드육 식별 기술 개발을 위한 기초연구로 최적의 육즙 내 항체 검출 조건 설정에 관한 연구들을 다음과 같이 수행하였다.

a. Primary antibody 희석배율에 따른 육즙 내 항체의 검출 수준

; 동일한 농도의 항원(1 $\mu\text{g} / \text{ml}$)을 96 well plate에 coating 한 후 primary antibody로써 사용되는 비 면역혈청, 항혈청, 비 면역육즙 및 육즙의 농도를 1:100배에서 1:100,000배까지 순차적으로 희석한 뒤 ELISA test하여 희석배율에 따른 항체의 역가를 확인하였다.

b. 육즙 생산과정에 따른 육즙 내 항체의 검출 수준

; 앞서 분리한 두 가지의 sample(근육조직을 homogenize한 뒤 centrifuge하여 생산한 육즙 및 냉동 후 자연 해동하여 생산한 육즙)들을 primary antibody로 1:100배에서 1:100,000배까지 순차적으로 희석하여 동일한 농도로 coating 된 항원($1 \mu\text{g} / \text{ml}$)과 결합시켜 육즙 생산과정에 따른 항체의 역가를 측정 하였다.

c. Secondary antibody 희석배율에 따른 항체의 역가 측정

; 동일한 농도의 항원($1 \mu\text{g} / \text{ml}$) 및 항체에 secondary antibody만 1:500, 1:1,000, 1:2,000, 1:5,000 및 1:10,000으로 희석한 후 ELISA test를 실시하여 최적의 항원-항체반응을 위한 secondary antibody의 적정 농도를 확인하였다.

d. 항원의 적정 coating 농도 구명을 위한 실험

; 항원을 96 well plate의 각 well당 $1 \mu\text{g}$ 에서 $10^{-7} \mu\text{g}$ 까지 순차적으로 희석하여 coating한 다음 affinity column으로 분리한 anti-sheep IgG를 첨가해 ELISA test를 실시함으로써 최적의 항체 검출 조건 탐색을 위한 적정 coating 농도를 확인하였다.

이러한 실험들은 본 한우 브랜드육 식별 기술 개발 연구의 최종목표인 진단 kit의 제작 시 반드시 참고 되어야 할 자료로써 의미가 있기에 실시되었다.

또한, 특이 단백질을 면양에게 면역주사 한 뒤 생산한 항혈청 및 육즙이 항원 단백질들과 나타내는 항원-항체 반응의 패턴을 확인하기 위한 Western immunoblotting을 실시하였다.

3) 브랜드육 식별 기술 개발을 위한 한우 면역화 시험

면양을 이용한 면역화 시험을 통해 나타난 항체생산 및 최적의 항체 형성 조건 등의 결과들을 바탕으로 본격적인 한우 면역화 시험을 실시하였다. 처리구는 실용화를 전제로 단 한번의 면역주사만 실시하는 'One-shot 처리구'와 항체의 활성을 증가시키기 위해 면역주사 이후 boosting 면역주사를 실시한 'Boosting 처리구'로 구분하였으며, 시험 전반의 모식도는 Fig. 7에 나타난바와 같다.

① One-shot 처리구

농가 관행법에 따라 사양관리 되어진 출하 1~2개월 전 한우 3두의 경정맥에서 비

면역혈청을 채혈한 후 면역주사를 실시하였다. 면역주사 시 사용된 항원은 Protein B synthetic peptide로 면양 C에게 면역 주사한 peptide와 동일한 것이며, 면역반응 증진을 위해 첨가한 adjuvant로는 Imject[®] Alum(PIERCE, USA)을 사용했는데, 이는 면양에게 사용한 Freund's계의 adjuvant와는 달리 면역접종으로 인해 발생할지 모르는 항원의 동물체 내 잔류 문제를 고려해 일반 임상 vaccine에서 많이 사용되는 (예:DTP(Diphtheria, Tetanus, and Pertussis) vaccine 등) adjuvant로 대체한 것이다.

면역 항원은 Protein B synthetic peptide(600 $\mu\text{g} / \text{ml}$) 0.3 ml에 PBS(phosphate buffered saline) 0.2 ml을 넣고, alum adjuvant 0.5 ml을 첨가한 후 상온에서 30분간 stir 하여 1 ml / 두씩 제조하였고, 주사는 1 ml의 면역 항원을 목 부위 3곳에 나누어 피하 주사 하였다. 실제 주사한 peptide의 농도는 180 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 로 면양에게 주사한 peptide 농도(100 $\mu\text{g} / \text{ml}$)보다 1.8배가량 증가되었지만, 이는 공시동물의 무게차이(면양 \approx 60 kg, 한우 \approx 600 kg)를 고려하여 결정한 것으로, 면양을 통한 예비시험의 경우와 같이 상업화와 관련된 경제성을 고려하여 최소량의 항원을 면역주사 한 것이라 할 수 있다.

면역주사 이후 4주 후 도축을 실시하였는데, 방혈 시 응고되지 않은 혈액을 채취 하여 원심분리한 뒤 항혈청을 분리하였다. 분리된 항혈청은 비 면역혈청과 함께 면역 주사에 의한 항체 생성 확인을 위한 ELISA test에 사용되었다.

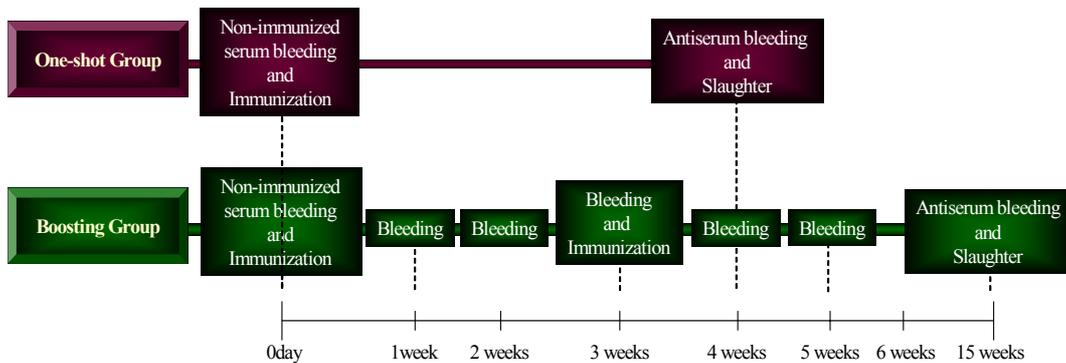


Fig. 7. Immunization schedule for Hanwoo(Korean Cattle).

한우 3두(Hanwoo A, Hanwoo B 및 Hanwoo C)의 도축 시 각 부위별(앞다리, 등심, 뒷다리) 근육조직 또한 약 300 g씩 sampling하였으며, 도축 당일 작업장에서 임의 선 발한 한우(non-immunized Hanwoo)의 근육조직(각 부위별 300 g)도 함께 sampling하였다. 채취한 근육조직들을 준비해 간 ice-box에 담아 4 °C 저온실(영남대학교 축산학과)로 옮긴 후 근육조직에 결합된 지방조직을 최대한 제거하고, 각 근육조직별 중량을 기준으로 다시 4등분(70 ~ 80 g / muscle tissue)하여 zipper bag에 담아 밀폐보관 하였다. 이렇게 4등분한 근육 sample들 중 하나는 도축 당일 -80 °C에서 2시간 냉동시킨 후 자연 해동시켜 육즙을 채취하였으며(day 0), 이 육즙들은 비 면역육즙들과 함께 항체 검출 수준을 비교하기 위한 ELISA test 및 각 부위별 육즙 내 항체 역가 확인을 위한 ELISA test에 사용하였다.

밀폐 보관한 나머지 sample들을 각각 day3, day7 및 day28 sample로 각각 명명하였으며, day3과 day7 sample들은 냉장 보관 후 도축일 이후 3일 및 7일에 육즙을 분리하고, day28 sample은 냉동 보관하여 도축 후 28일에 자연 해동시켜 육즙을 추출 분리하였다. 이렇게 분리한 day0, day3, day7 및 day28 육즙들은 보건사회부에서 발간한 ‘식품공전’ 내 육류 권장 유통기한을 참고해 실험 계획한, 시간 경과에 따른 각 부위별 육즙 내 항체 역가의 변화를 측정하기 위한 ELISA test에 사용되었다.

② Boosting 처리구

한우 브랜드육 식별 진단 기술이 상업화 되었을 때, 농가에서 면역주사 이후 일반적으로 발생할 수 있을 상황(초음파 진단 등을 통한 출하시기의 지연 등)을 고려하여 도축을 boosting 면역주사 이후 12주 후에 실시하였다. Boosting 처리구에 면역주사 된 항원은 One-shot 처리구와 동일한 peptide를 사용하였으며, boosting 면역주사 시 항원의 농도만 절반으로 줄여(300 µg / ml) 동일한 방식으로 제조, 주사하였다.

면역주사 전 경정맥을 통해 채혈을 실시하였으며(비 면역혈청), 그 후 7일 간격으로 채혈을 실시해 ELISA test로 항체 생성 유무 및 boosting injection에 따른 항체 역가의 변화 등을 확인하였다.

도축 시 One-shot 처리구와 동일하게 근육조직을 sampling하였으며(목등심 및 우둔 각 300 g), 지방조직을 최대한 제거한 후 -80 °C에서 2시간 냉동시킨 후 자연 해동시켜 육즙을 생산하였다. 비 면역혈청, 항혈청 및 각 근육조직별 분리된 육즙으로 ELISA test를 실시하여 항체의 생성 유무를 확인하였으며, 또한, 향후 제작 예정인 한우 브랜드육 식별 진단 kit의 개발을 위한 기초연구로 dot-ELISA를 실시하여 항원-항체의 반응성을 확인해 보았다.

Dot-ELISA는 Macedo-Silva 등(2000)의 방법을 다소 수정하여 실시하였다. 한우 특이 peptide를 nitrocellulose membrane에 5 μ l씩 떨어뜨려 상온에서 2시간 흡착시킨 뒤, zipper bag에 밀폐 보관하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 시켰다. Non-specific binding을 막기 위한 blocking solution으로는 5% skim milk를 사용하였으며, 항체들은 One-shot 및 Boosting 처리구의 역가 측정(ELISA)의 결과를 바탕으로 각 처리구별 가장 높은 역가를 가진 항혈청 및 육즙을 각각 1:1,000 및 1:100으로 희석하여 사용하였다. 또한, 비면역혈청 및 비면역육즙도 Dot-ELISA를 실시해 육즙 내 항체의 반응 수준에 따른 대조군으로 사용하였다.

3. 한우 브랜드육 식별 진단 rapid kit의 제조

1) 항체 생성을 위한 다양한 조건 탐색

앞서 실시한 한우 면역화 시험의 결과로 제시된 조건들을 바탕으로 하여 한우에 면역주사 하는 항원량에 대한 항체의 생성도 변화를 점검하기 위해 Protein B synthetic peptide를 항원으로 이용하여 한우를 Table 3과 같이 구분해 면역화 시험을 실시하였다.

Adjuvant로 alum을 처리한 처리군 중 Hanwoo B와 Hanwoo D는 면역력을 증진시키기 위해 boosting immunization을 실시한 시험구이고, 그 밖의 Hanwoo A, Hanwoo C, Hanwoo E 및 adjuvant로 FCA를 처리한 전 처리구는 one-shot 처리구이다. 이는 alum을 adjuvant로 사용한 면역화 시험이 먼저 실시되었는데, 시험 결과로 one-shot 처리구와 boosting 처리구의 수준 차이가 거의 없다는 것에 기초하여 다소 번거로운 조작인 boosting immunization을 굳이 할 필요가 없기 때문에 추가 한우 면역화 시험이 모두 one-shot 처리구로 design되었기 때문이다.

도축은 Boosting 후 2주경과 한 후에 실시하였으며, 도축 후 시험구의 근육조직에서 육즙을 분리 해 항체 생성도 측정에 이용하였다.

2) ELISA 및 Dot blot을 통한 항체 생성도 측정

항체 생성도를 측정하기 위해 ELISA를 실시하였다. 각 well당 항원(Protein B synthetic peptide)을 1 μ g씩 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 coating 하였으며, 실험을 시작할 때 3% BSA 용액으로 blocking 하였다. Primary antibody로 각 well에 10 배씩 연속적으로 희석한 항혈청 또는 육즙을 첨가해 항원-항체 결합을 유도하였다. PBS-Tween을 사용한 세척과정을 거친 다음, anti-(cow IgG)/HRP를 secondary antibody로 첨가하였다. 반

응 후 PBS-Tween 으로 세척한 다음, O-phenylenediamine을 발색기질로 사용하였다. 발색이 적당히 진행되었을 때, 2 N H₂SO₄를 첨가하여 반응을 중단하였으며, 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Table 3. Antigen concentration of Hanwoo(Korean Cattle) retrial

Adjuvant	I D	Antigen Concentration		Group
		Primary immunization	Boosting immunization	
	Hanwoo A	1 mg / ml	-	One-shot
	Hanwoo B	1 mg / ml	0.3 mg / ml	Boosting
Alum	Hanwoo C	3 mg / ml	-	One-shot
	Hanwoo D	3 mg / ml	0.9 mg / ml	Boosting
	Hanwoo E	3 mg / ml	-	One-shot

	No. 1	1 mg / ml	-	One-shot
	No. 2	3 mg / ml	-	One-shot
FCA	No. 3	3 mg / ml	-	One-shot
	No. 4	1 mg / ml	-	One-shot
	No. 5	1 mg / ml	-	One-shot

Dot-blot은 nitrocellulose membrane에 항원으로 사용한 Protein B synthetic peptide를 각각 blot하여 실온에서 건조한 다음 BSA용액으로 blocking하였다. 항혈청과 육즙을 1/100 또는 1/200배 희석하여 primary antibody로 사용하였으며 anti-(cow IgG)/HRP를 secondary antibody로 사용하였다. 각각의 항체 반응이 끝난 과정마다 PBS-Tween으로 세척하였으며, 4-chloro-1-naphthol을 발색 기질로 이용하였다.

3) Gold conjugate의 제조

40 nm Colloidal Gold(BBInternational Ltd Golden Gate ty Gals Avenue Cardiff, CF14 5DX, UK)를 0.25 M K₂CO₃로 pH 9.0에 맞춘 후 Free Protein B synthetic peptide, KLH - Protein B synthetic peptide conjugate, OVA - Protein B synthetic peptide conjugate 등을 각각 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 $\mu\text{l} / \text{ml}$ 의 농도로 첨가하였다. 10분간 교반 후 10% NaCl 용액을 첨가하여 최종 농도가 1%가 되도록 하였으며, 색의 변화가 일어나지 않는 농도를 최적 농도로 결정하였다. 100 ml의 Colloidal Gold에 각각의 conjugate를 최적 농도로 첨가하여 10분간 다시 교반하였으며, 교반이 끝난 다음 10% BSA를 최종 농도가 0.1%가 되도록 첨가하여 다시 2분간 교반하였다. 10,000 \times g에서 1시간 동안 원심분리 하여 상등액은 모두 버리고 520 nm에서 O.D.가 10이 되게 conjugate buffer(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5% BSA, 0.1% PEG)를 첨가하여 현탁한 후 사용하였다. Protein A gold conjugate는 40 nm Colloidal Gold와 같이 BBI사의 제품을 사용하였다.

4) Assay strip의 제조

Adhesive card(4cm \times 30cm, G&L Precision Die Cutting Inc. San Jose, CA, USA)에 nitrocellulose membrane(Millipore 290 Concord Rd. Billerica, MA 01821 USA), absorbent pad(Millipore 290 Concord Rd. Billerica, MA 01821 USA)를 붙인 후 각각의 용액(Free Protein B synthetic peptide, KLH - Protein B synthetic peptide conjugate, OVA - Protein B synthetic peptide conjugate)을 1 mg / ml, 1.5 mg / ml, 2 mg / ml로 capture buffer(phosphate buffer, pH 7.4, 0.5% BSA, 3% Methanol)에 희석한 후 Matrix 1600 Reagent Dispenser(Kinematic Automation, P.O. Box 69, Twain Harte, CA 95383, USA)를 이용해 1 $\mu\text{l} / \text{cm}$ 로 분주하여 반응선을 그었으며, 25% Humidity 이하에서 밤새 건조시킨 후 사용하였다. 대조선(Control line)에는 goat anti-mouse IgG(BBInternational Ltd Golden Gate ty Gals Avenue Cardiff, CF14 5DX, UK) 1 mg / ml를 사용하였다. Strip의 제조에 사용한 재질은 아래 Table 4와 같다.

5) Half test

Strip을 이용한 면역육즙의 비면역육즙의 판별 가능성을 파악하기 위해 half test를 실시하였다. Fig. 8과 같이 96 well plate에 각 well 당 20 μl (loading buffer) + 20 μl (Free Protein B synthetic peptide, KLH - Protein B synthetic peptide conjugate, OVA - Protein B synthetic peptide conjugate, Protein A-gold conjugate) + 5 μl (serum 또는 meat juice)를 넣고 각각의 strip을 수직으로 꽂아 5분 후 결과를 판정하였다.

Table 4. Materials used for the strips

	Absorbent pad (AP26)	Sample pad (AP31)	Conjugate pad (#6613)
Matter	Cellulose	High purity cotton	Glass fiber and PE
Size	30 cm × 30 cm	20 cm × 30 cm	29.5 cm × 50 m
Weight(g / m ²)	320	179	100
thickness(mm)	0.7	0.48	0.42
Flow rate(mm / min)	-	55	-
Pore size(μ m)	3	-	42



Fig. 8. The photograph showing the half test.

6) Prototype kit의 준비

Sample pad를 1% BSA, 0.5% Tween-20을 포함하는 50 mM borate buffer(pH 7.4)로 전처리 한 다음 60 °C에서 건조하였다. 항원을 반응선에, anti-(mouse IgG)를 대조선에 각각 coating한 nitrocellulose membrane을 adhesive card에 부착한 다음, sample pad, adsorption pad와 조합한 후 plastic housing에 넣어 prototype kit을 완성하였다.

완성된 prototype kit에 항혈청과 육즙을 loading하여 반응정도를 살펴보았다.

제 2 절 연구개발수행 결과

1. 항원의 선발 및 제작

1) 항원의 선발

Table 5는 여러 학술지를 검색하여 항체형성이 보고된 peptide를 우선 선정 한 후 AntheProt와 SciProtein 등을 이용하여 antigenic index, surface probability, hydrophilicity, flexible region 등의 항원성을 검색 선정한 peptide 후보군들이다. 선정된 후보군들은 연구개발수행 내용에서도 밝힌바와 같이 proteosomal cleavage prediction, T-cell epitope prediction 등을 분석하였으며, 최종적으로 소에서 발견되는 단백질과 homology를 비교해 일치하지 않는 단백질들을 선정한 것이다.

Table 5. List of antigenic protein candidates

Peptide	Origin	Species	Function
Protein A	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>	Frog	Opioid peptide family
Protein B	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>	Frog	Amphibian defense peptide
Protein C	<i>Callinectes sapidus</i>	Crab	Neuropeptide
Protein D	<i>Periplaneta americana</i>	Cockroach	Neuropeptide

2) 유전자 재조합 기술을 이용한 항원의 대량 생산

항원 단백질의 대량 확보를 위해 선별한 peptide가 삽입될 vector를 포함하는 균주를 대량 증식하였으며 그 후 vector purification을 실시하였다.

Fig. 9는 purification 과정을 거친 pET15b vector를 0.8% agarose gel에서 전기영동한 사진이다. 항원 단백질의 대량 확보를 위해 사용된 pET15b vector는 5,708 bp의 size를 가지는 vector이며(Fig. 4), 이 vector가 Purification 과정을 거친 후 gel상에 확인된 band 역시 5,708 bp 부근에서 단일 band로 나타난 것으로 미루어 vector의 대량 증식 및 purification 과정이 순조롭게 진행되었음을 알 수 있다. 이 vector를 spectrophotometer에서 흡광도 측정(O.D₂₆₀ 및 O.D₂₈₀)해 본 결과 O.D₂₆₀:O.D₂₈₀ ratio가 1.011로 결정되어 vector의 농도 또한 이상 없음을 확인하였다.

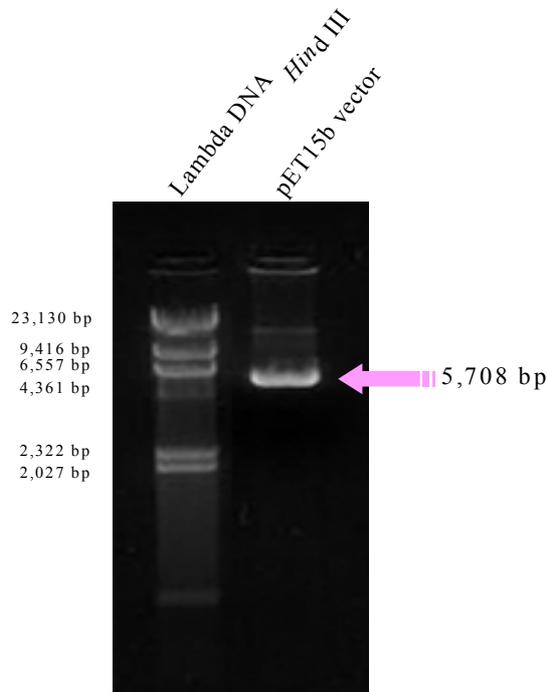


Fig. 9. The result of electrophoresis for pET15b vector purified using QIAGEN[®] Plasmid Maxi Kit.

증식된 pET15b vector에 annealing 한 synthetic cDNA를 삽입하기 위하여 vector를 restriction enzyme들로 절단하였으며, 그 후 0.8% agarose gel에서 전기영동 해 digestion 이 제대로 이루어졌는지 확인하였다(Fig. 10).

Fig. 10에서처럼 두 가지 enzyme에 의한 digestion의 결과로 pET15b vector가 확연히 2개의 band로 분리되어 나타난 것을 확인할 수 있었고, 이로 인해 pET15b vector가 정상적으로 double digestion되었다는 것을 확인할 수 있었다.

Peptide cloning을 위한 vector의 준비가 끝나고 난 후, insert될 cDNA를 제조하기 위해 annealing을 실시하였다. Fig. 11은 선별한 peptide의 sequence에 따라(Fig. 3) 합성 의뢰한 forward 및 reverse nucleotide를 annealing 한 뒤, 12% non-denaturing polyacrylamide gel에서 전기영동 하여 EtBr 염색한 cDNA의 패턴이다. 그림에서 나타난 바와 같이 annealing한 cDNA(≒ 75 bp)는 annealing하지 않은 forward nucleotide(≒ 60 bp)보다 높은 size에서 band를 나타내었으며, 이는 annealing 과정이 제대로 이루어졌음을 의미한다.

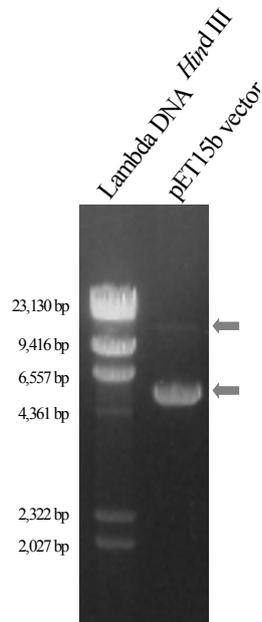
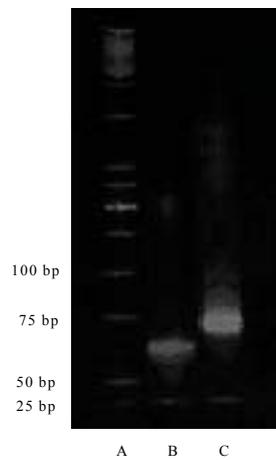


Fig. 10. The result of electrophoresis for a double digested pET15b vector. Restriction enzymes, *BamH* I and *Nde* I, were used to linearize the vector for cloning.



- A : Size marker(25 / 100bp mixed DNA ladder)
- B : Forward nucleotide
- C : Annealed cDNA

Fig. 11. Annealed cDNA band pattern compared with forward nucleotide.

앞서 준비한 double digested pET15b vector에 annealing한 cDNA를 ligation한 뒤, competent cell에 heat shock으로 transformation 과정을 진행하여 colony를 확인 후 다시 liquid culture를 실시하여 대량 증식 시켰다.

이러한 연구의 결과는, 향후 본 연구가 실용화 될 경우 고가로 항원 peptide를 합성하는 것 보다는 유전자 재조합 기술을 이용하여 항원을싼 값에 경제적으로 대량 생산할 수 있는 원천 기술을 확보하였다는 중요한 의미를 지니며, 본 연구의 상업화에 적극 활용할 계획이다.

2. 특이 항체 생성 및 검출

1) 흰쥐(Sprague-Dawley rat)를 이용한 예비시험

Sprague-Dawley 흰쥐를 대상으로 육즙 내 항체 검출 시험을 실시하였으며, 시험 전 반의 시험구 체중 변화는 Fig. 12와 같다.

성장 중인 APM 혹은 BSA 처리구들은 면역주사로 인한 특별한 체중의 감소 없이 전반적으로 고르게 성장하여, 면역주사는 대상동물의 증체에는 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 시험 개시 후 2주 후부터 BSA 처리구의 체중이 APM 처리구와 비교하여 다소 낮아지는 경향을 나타내기 시작하여 시험 종료 시 까지 체중의 차이는 회복되지 않았는데, 통계적 유의수준은 인정되지 않았으며, BSA 처리에 의한 효과라기보다는 각 개체별 유전적 특성에 기인하여 나타난 현상으로 판단된다.

Fig. 13과 14는 마지막 면역주사 이후 10일 후에 실시한 채혈을 통해 확보한 각 처리구별 항혈청 및 도체 발골 작업 후 Stomacher로 생산한 육즙을 비면역혈청과 비교 측정된 ELISA test의 결과이다. 육즙의 경우, 30 g의 근육조직에 saline을 10 ml 첨가하여 생산한 육즙이므로 ELISA 결과로 나타난 raw data에 희석배율에 따른 dilution factor를 고려하여 계산하였다.

두 처리구 공히 각각의 항원에 대해 항혈청의 역가가 가장 높게 나타났으며, 육즙의 경우 항혈청 역가의 30 ~ 50% 정도로 다소 미약한 반응을 나타내었다. 하지만, 육즙은 비면역혈청과 비교해 81,000배의 희석배율에서도 항원-항체 반응이 확인되었으며, 이는 비록 항혈청의 수준보다는 미약하지만 육즙 내 항체의 생산이 가능하다는 점을 시사하므로 매우 중요한 의의를 가진다. 본 흰쥐를 이용한 육즙 내 항체 검출 시험에서 나타난 육즙 내 항체 검출 가능성은 실제 한우 브랜드육 식별 진단 kit 개발 연구에 있어서 매우 중요한 기초 자료로 사용되어질 것으로 생각된다.

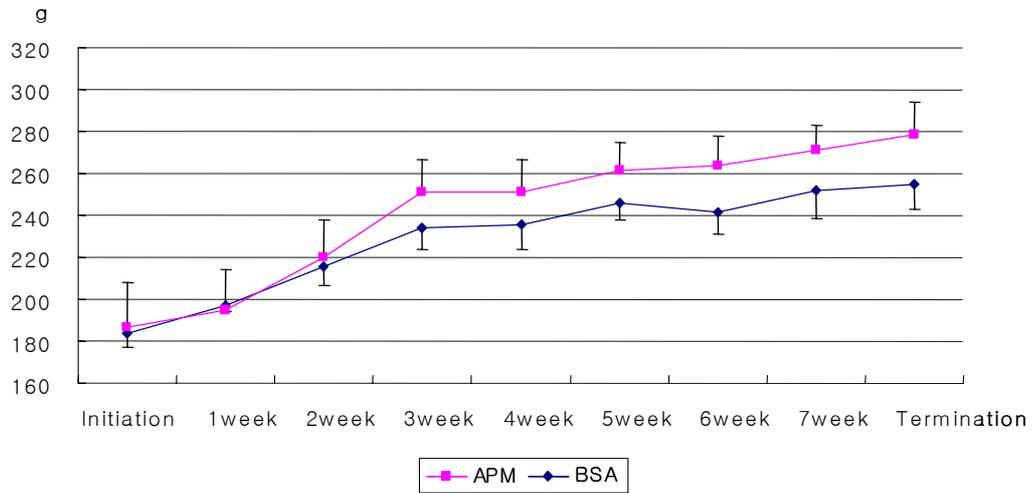


Fig. 12. Changes in the body weight of Sprague-Dawley female rats actively immunized with either APM or BSA. Error bars are expressed as means \pm S.E.

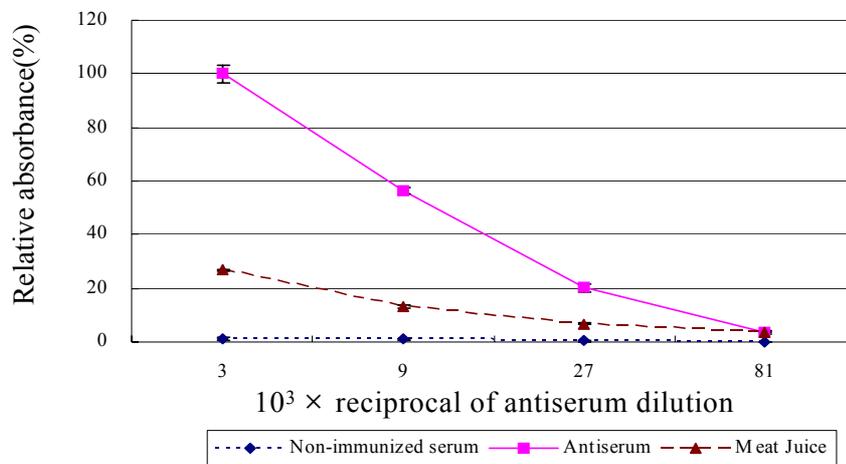


Fig. 13. Reactivity of non-immunized serum, antiserum and meat juice against adipocyte plasma membrane proteins as detected by ELISA. The relative reactivity was expressed as percentage of the maximum optical density of antiserum. Error bars are expressed as means \pm S.E. for 4 time repeats.

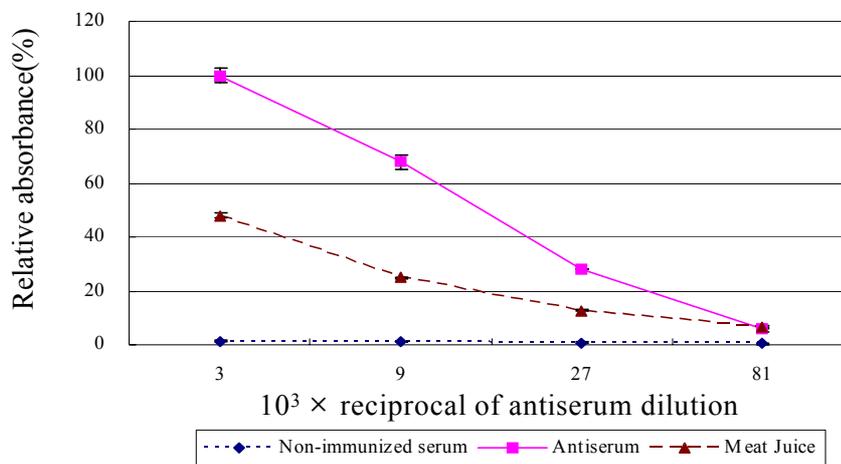


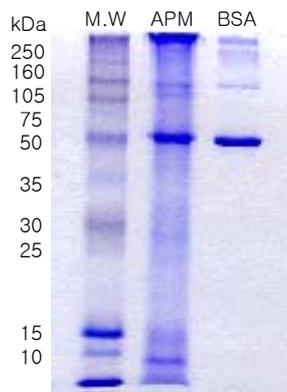
Fig. 14. Reactivity of non-immunized serum, antiserum and meat juice against bovine serum albumin as detected by ELISA. The relative reactivity was expressed as percentage of the maximum optical density of antiserum. Error bars are expressed as means \pm S.E. for 4 time repeats.

ELISA test를 통해 흰쥐 항혈청 및 육즙의 항체 검출을 확인한 후, Western immunoblotting을 실시하여 항체 반응의 패턴을 확인하였다. 항혈청에 비해 육즙 내 항체의 역가가 상대적으로 낮게 나타난 ELISA test 결과에 따라, Western immunoblotting 시 primary antibody로서 육즙의 처리 농도(1:1,000)는 항혈청의 처리농도(1:10,000) 보다 10배 높게 처리해 주었으며, 발색시간은 동일하게 처리하였다.

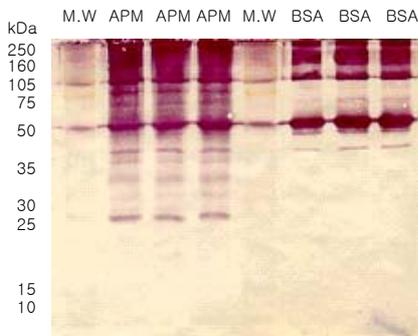
Fig. 15의 A는 APM과 BSA 단백질을 polyacrylamide gel에서 SDS-PAGE하여 단백질을 분자량에 따라 분리한 뒤 coomassie blue로 염색한 gel의 사진이며, Fig. 12의 B와 C는 각각 항혈청과 육즙을 처리한 nitrocellulose membrane을 촬영한 것이다.

그림에서 나타난바와 같이 항혈청 및 육즙은 모두 SDS-PAGE로 분리된 전체 단백질 부위에 고루 항원-항체반응을 나타내었다. 동일한 시간동안 발색반응을 시킨 두 membrane에서 육즙보다 10배 더 희석하여 처리하였음에도 불구하고 항혈청이 가장 높은 반응을 나타내었으며, 육즙의 경우, 항혈청과 동일한 패턴으로 항원-항체 반응을 나타내었으나 항혈청에 비해 반응 역가가 낮은 것으로 나타나 ELISA test와 동일한

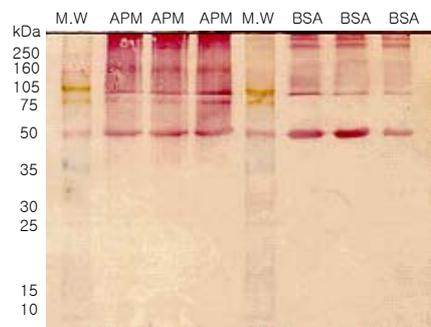
결과를 나타내었다. 이러한 결과는 육즙 내 존재하는 항체의 패턴이 항혈청 내 존재하는 항체의 패턴과 동일하다는 사실을 밝힘과 아울러 primary antibody의 농도조절에 의해 육즙 내 항체의 검출이 분명히 가능해진다는 사실을 제시해, 실질적인 한우 브랜드육 식별 진단 kit의 개발이 가능하다는 사실을 증명해주는 자료라 생각된다. 이러한 진단 kit 제작의 기초 실험의 매우 긍정적인 자료들에 근거하여 한우에 존재하지 않는 단백질을 사용한 육즙 내 특이 항체 검출 시험을 한우와 동일한 반추가축인 면양을 대상으로 실시하였다.



A



B



C

Fig. 15. Western immunoblotting of adipocyte plasma membrane or bovine serum albumin proteins with antiserum(B) or meat juice(C) raised in rat. Anti-rat immunoglobulin G-Alkaline phosphatase conjugate(Sigma Chemical, San Diego, USA) was used as a secondary antibody. (A) is SDS-PAGE pattern of proteins.

2) 면양을 이용한 육즙 내 항체 생산 시험

Fig. 16은 면양 A, 면양 B 그리고 면양 C에게 전술한 peptide를 Table 2에 따라 구분하여 면역주사한 후 생산한 항혈청 및 육즙의 titer를 비면역혈청의 titer와 비교 실험한 ELISA test의 결과이다. 육즙의 경우, 5 g의 근육조직에 saline을 10 ml 첨가한 뒤, homogenize하여 생산한 육즙이므로 ELISA 결과로 나타난 raw data에 희석배율에 따른 dilution factor를 고려하여 계산하였다.

혈청과 육즙을 이용해 항체의 생성정도를 측정해 본 결과, 면양 A, 면양 B, 면양 C 모두 peptide를 주사하기 전(비 면역혈청)과 비교해 항체가 다량 검출됨을 확인할 수가 있었다. 항체는 세 처리구 공히 항혈청에서 가장 높은 면역반응을 나타내었으며, 육즙의 경우 항혈청보다는 항체의 역가가 낮게 나타났지만 비면역혈청과 비교했을 때 항원 peptide에 대한 항체가 다량 검출됨을 확인할 수 있었다. 이와 같이 흰쥐를 이용한 기초연구에 이어 반추가축인 면양에서도 면역주사로 생성된 항체가 혈액뿐만 아니라 육즙에서도 다량 검출된다는 사실로 동물 종에 상관없이 육즙 내 항체의 검출이 가능하다는 사실을 암시하며, 이러한 결과 또한 향후 육즙을 이용한 한우 브랜드육 식별 진단 kit의 개발에 있어 중요한 자료로 활용되어질 것으로 생각된다.

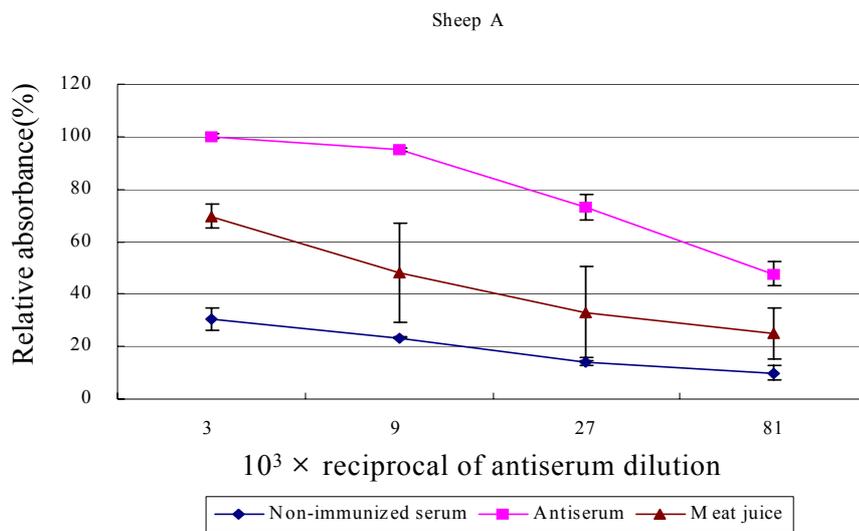


Fig. 16. Reactivity of non-immunized serum, antiserum and meat juice in sheep against synthetic peptides as detected by ELISA. The relative reactivity was expressed as percentage of the maximum optical density of Sheep A antiserum. Error bars are expressed as means \pm S.E. for 4 time repeats.

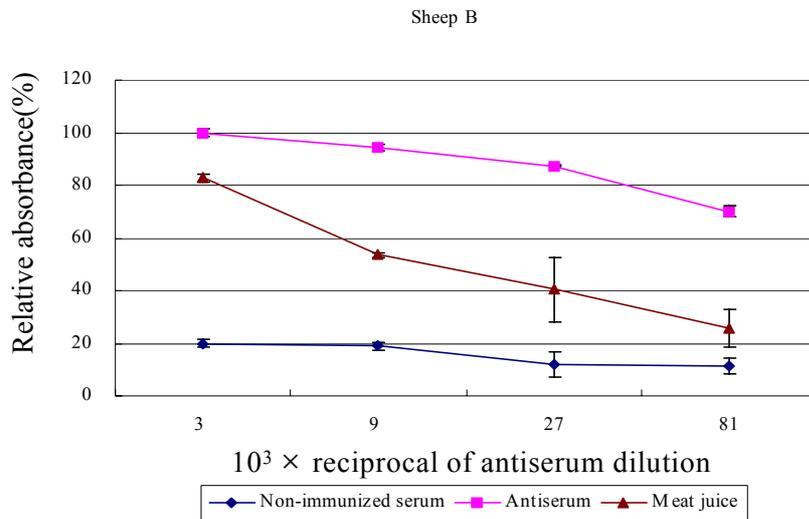


Fig. 16. Reactivity of non-immunized serum, antiserum and meat juice in sheep against synthetic peptides as detected by ELISA(continued). The relative reactivity was expressed as percentage of the maximum optical density of Sheep B antiserum. Error bars are expressed as means \pm S.E. for 4 time repeats.

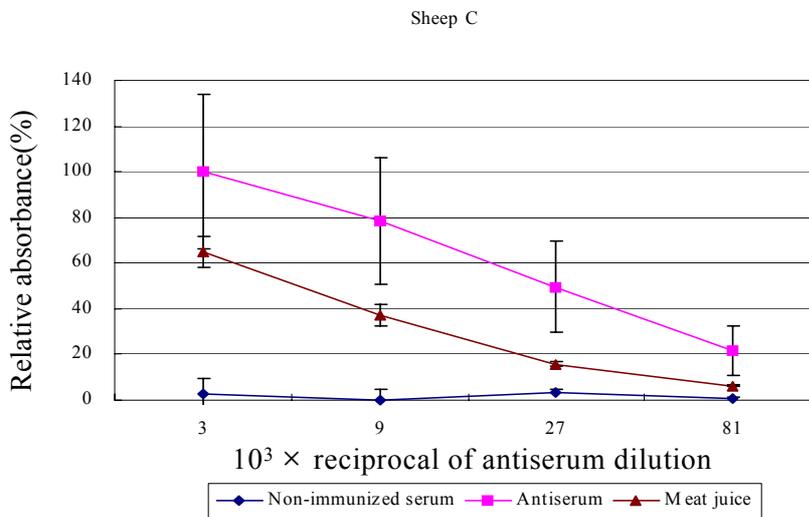


Fig. 16. Reactivity of non-immunized serum, antiserum and meat juice in sheep against synthetic peptides as detected by ELISA(continued). The relative reactivity was expressed as percentage of the maximum optical density of Sheep C antiserum. Error bars are expressed as means \pm S.E. for 4 time repeats.

또한, 100 μg 의 항원을 주사한 면양 A와 10 μg 의 항원을 주사한 면양 B를 비교했을 때 항체의 생성정도가 비슷한 결과를 보여 주어, Nargi 등(1999)이 제시한 것처럼 D-form의 아미노산을 사용할 경우 적은 양의 항원을 사용해도 항체 생성에 문제가 없음을 확인하였으며, 따라서 소량의 peptide 항원만으로 면역반응을 유도할 수 있게 되었으므로 항원 peptide 제작비의 감소 및 peptide량 감소에 따른 기타 첨가물들(carrier protein, adjuvant 등)의 감소 등 경제적 측면에서의 이점이 발생하여, 이는 본 연구결과와 상업화 과정에 있어 매우 긍정적인 요소로 작용하게 될 것으로 생각된다.

Fig. 17은 항체 검출 조건 탐색의 양성대조군으로 사용하기 위해 면양의 혈청들을 affinity column에 통과시킨 후 용출된 fraction 별 특이 항체의 수준을 나타낸 것이다.

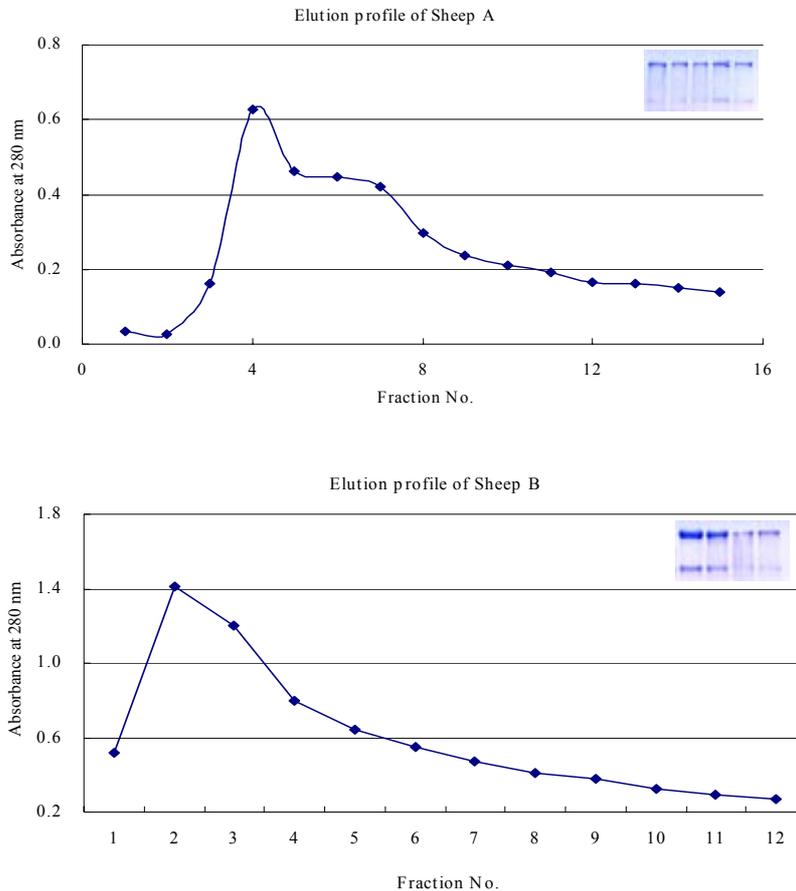


Fig. 17. A elution profiles of antibodies against synthetic peptides using affinity column.

면양 A에서 생산한 항혈청의 경우는 fraction no. 4~8의 얻어진 항체를 purified Anti-sheep A IgG로 결정하였고, 면양 B의 항혈청은 fraction no. 2~5의 얻어진 항체를 purified Anti-sheep B IgG로 결정하였다. 용출한 Anti-sheep IgG들을 fraction no.별로 SDS-PAGE하여 band를 확인하였는데(Fig. 17), IgG의 heavy chain과 light chain size에서 protein band가 확인이 되어 affinity column을 사용한 purification과정이 제대로 진행되었음을 확인할 수 있었다.

Fig. 18은 현재까지 나타난 자료들을 바탕으로 최적의 항원-항체 반응 조건을 탐색하기 위해 primary antibody의 희석배율을 Fig. 16과는 달리하여 ELISA test를 실시한 결과이다.

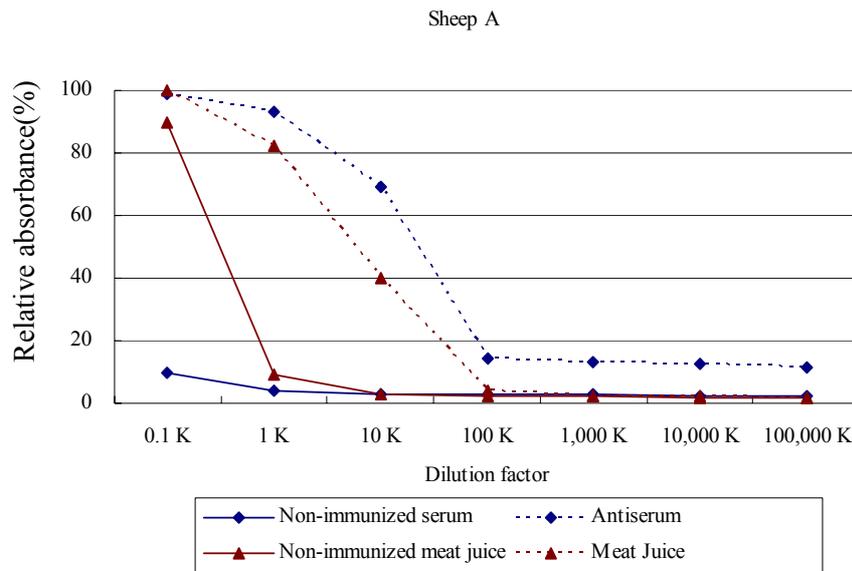


Fig. 18. Reactivity of non-immunized serum, antiserum and meat juices(non-immunized and immunized) in sheep against synthetic peptides depending on dilution ratio of primary antibody. The relative reactivity was expressed as percentage of the maximum optical density of Sheep A meat juice.

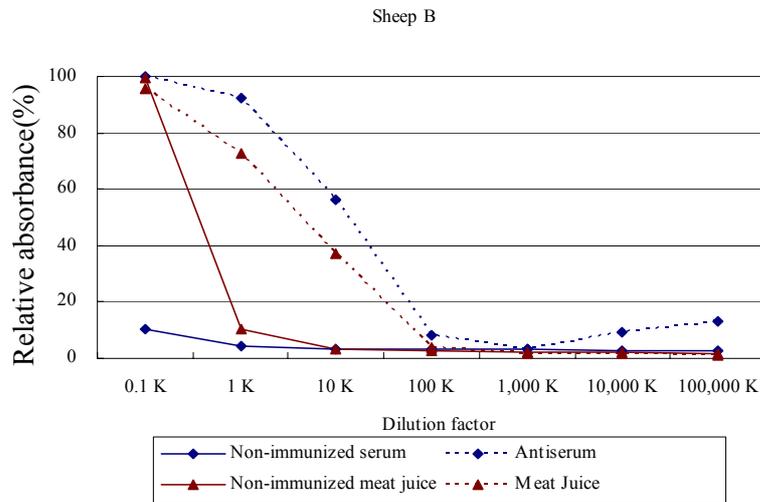


Fig. 18. Reactivity of non-immunized serum, antiserum and meat juices(non-immunized and immunized) in sheep against synthetic peptides depending on dilution ratio of primary antibody(continued). The relative reactivity was expressed as percentage of the maximum optical density of Sheep B antiserum.

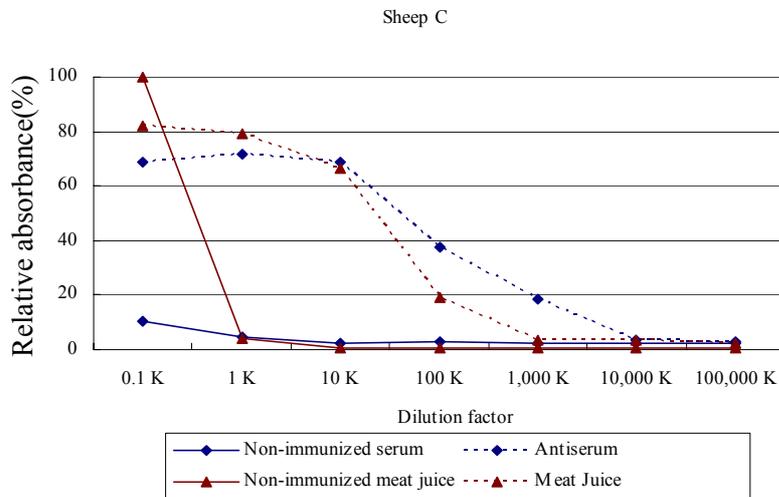


Fig. 18. Reactivity of non-immunized serum, antiserum and meat juices(non-immunized and immunized) in sheep against synthetic peptides depending on dilution ratio of primary antibody(continued). The relative reactivity was expressed as percentage of the maximum optical density of Sheep C non-immunized meat juice.

채취한 생검 조직을 냉동한 뒤 자연 해동시켜 생산한 육즙으로 ELISA test를 실시한 결과, 육즙의 농도가 높을 때(1:100) 면역화를 하지 않았던 생검 조직에서도 높은 항원-항체 반응을 나타내었다. 이는 육즙 원액에 많은 양의 단백질이 존재하기 때문에 나타난 위양성 반응으로 생각되며, 향후 식별 kit의 제작 및 상용화 시 원액 혹은 고농도의 육즙을 진단 kit에 적용하게 되면 이러한 위양성 반응이 나타날 가능성이 매우 큰 것으로 사료된다. 따라서 실제 본 기술이 상업화되어 육즙을 진단 kit에 적용할 경우, 최적의 면역반응을 위한 육즙의 농도 결정이 진단 오차를 줄이는 매우 중요한 요소가 될 것으로 판단되어지고, 또한, 다양한 접근 방법들을 통해 이러한 위양성 반응을 최소화시키기 위한 연구가 지속적으로 수행되어야만 할 것으로 사료된다.

Fig. 19는 육즙을 준비하는 방법에 따라 분리한 2가지 sample 즉, PBS를 첨가한 후 homogenize하여 생산한 육즙과 냉동 후 자연 해동하여 생산한 육즙에서 나타나는 항체의 검출 수준을 비교해 보기 위해 실시한 ELISA test의 결과이다.

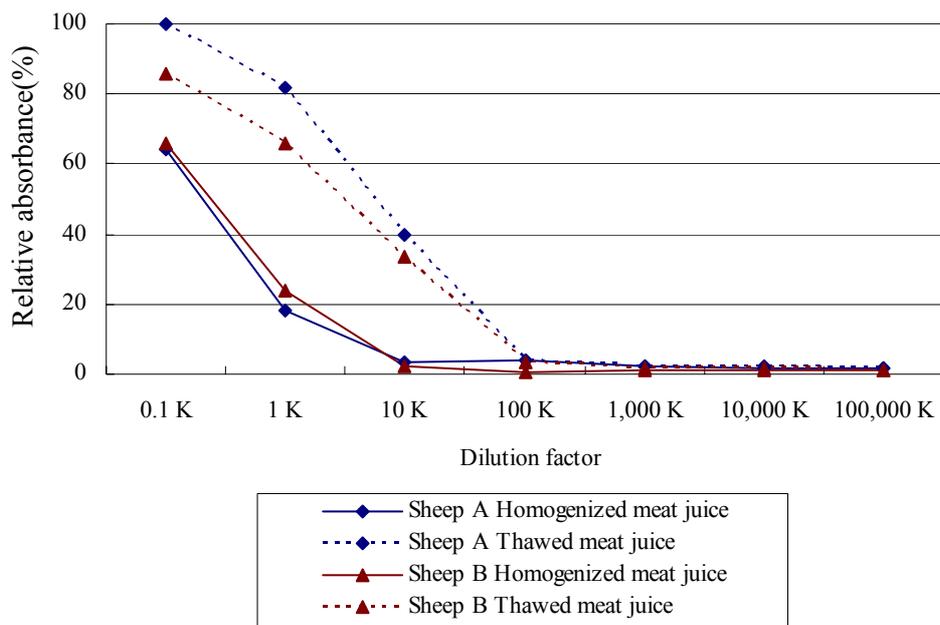


Fig. 19. Comparison of antigen-specific affinity between two methods for the preparation of meat juice. The relative reactivity was expressed as percentage of the maximum optical density of Sheep A thawed meat juice.

항원의 농도를 100 ng / ml으로 동일하게 96 well plate에 coating한 뒤, 각 well에 연차적으로 희석한 각각의 육즙을 첨가하고, 2차 항체 및 기질을 반응하여 항체의 생성 정도를 측정한다. 본 실험에서 냉동 후 자연 해동한 생검 조직으로부터 생산한 육즙이 PBS와 homogenize하여 생산한 육즙보다 훨씬 높은 항원-항체 반응 수준을 나타내었다. 이와 같은 결과는 실제 진단 kit이 상업화되어 진단을 위해 사용될 때, 사용자가 생검 조직을 인위적으로 homogenize해야 하는 불편함 없이, 냉동육에서 자연스럽게 생성되는 육즙을 감별에 즉시 사용할 수 있다는 편의적인 측면을 고려한다면 매우 고무적인 결과로 평가된다.

2차 항체의 희석 배수에 따른 항원-항체 반응 결과를 다양한 희석배율에 따른 반복 실험으로 확인한 결과는 Fig. 20에 나타난바와 같다.

2차 항체의 적정 농도를 구하기 위한 ELISA test의 결과, 각 well에 일정한 농도의 항원과 동일한 농도의 1차 항체를 처리해 주더라도 2차 항체의 희석배율의 차이에 의해 항체의 활성은 크게 달라지는 것으로 나타났다.

Fig. 20에서처럼 2차 항체는 1:500배에서 1:2,000배 사이의 희석배수에서 가장 높은 수준의 반응을 나타내었으며, 1:4,000배 이상의 희석배수에서는 1:10,000배의 희석배수와 비교하여 거의 수준의 차이가 없는 낮은 활성을 나타내었다. 따라서 최적의 항원-항체 반응을 위한 2차 항체의 적정 희석배율은 1:1,000배로 결정하였다.

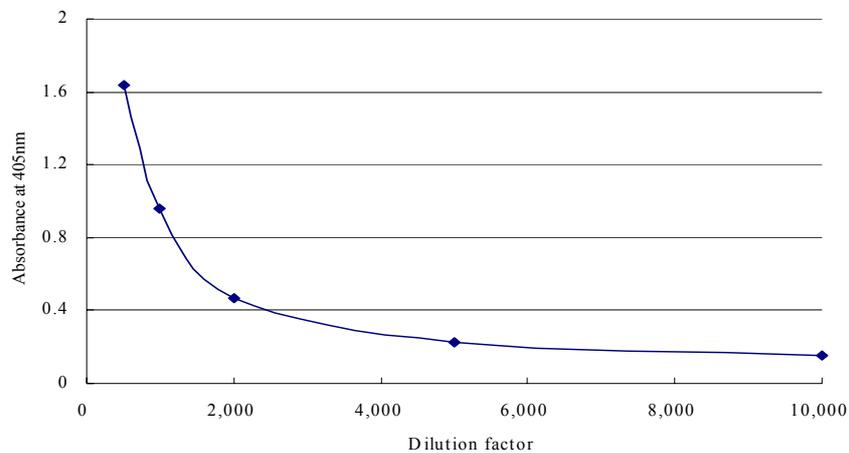


Fig. 20. The result of ELISA to determine the optimal concentration of secondary antibody.

항원의 농도 차에 따른 항원-항체 반응의 결과를 살펴봄으로써, 항원의 적정 coating 농도를 찾고자 실시한 ELISA(Fig. 21)에서는 항원의 coating 농도가 10 ng / ml 이상에서부터 반응을 나타내었으며, 100 ng / ml 이상일 경우 안정적인 결과를 도출해 낼 수가 있었다. 따라서 한우 브랜드육 식별 진단 kit에 coating 될 항원의 농도가 10 ng / ml 이상이면 적정 수준인 것으로 판단된다.

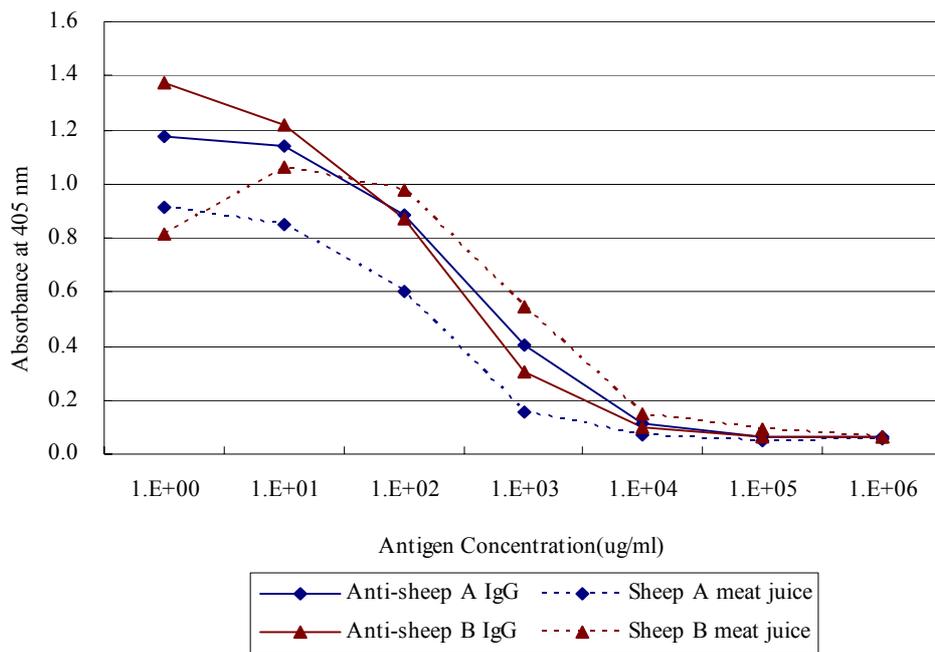


Fig. 21. The result of ELISA to determine the optimal concentration of antigen.

Fig. 22는 항원으로 면역주사 한 특이 단백질들에 대해 면양의 항혈청 및 육즙의 반응 패턴을 확인하기 위하여 실시한 Western immunoblotting의 결과이다.

Fig. 22의 A는 면양 C에게 면역주사하기 전에 채혈하여 분리한 비 면역혈청 (non-immunized serum)과 Protein B synthetic peptide를 주사하여 분리한 항혈청의 Western immunoblotting 결과를 나타낸 것인데, 비 면역혈청을 처리한 membrane에서는 어떠한 특이적인 반응도 나타나지 않은 반면 항혈청을 처리한 membrane의 경우는 항원이 결합해 있는 carrier protein(ovalbumin, 45 kDa)을 중심으로 강한 면역반응이 나타났음을 확인할 수 있다.

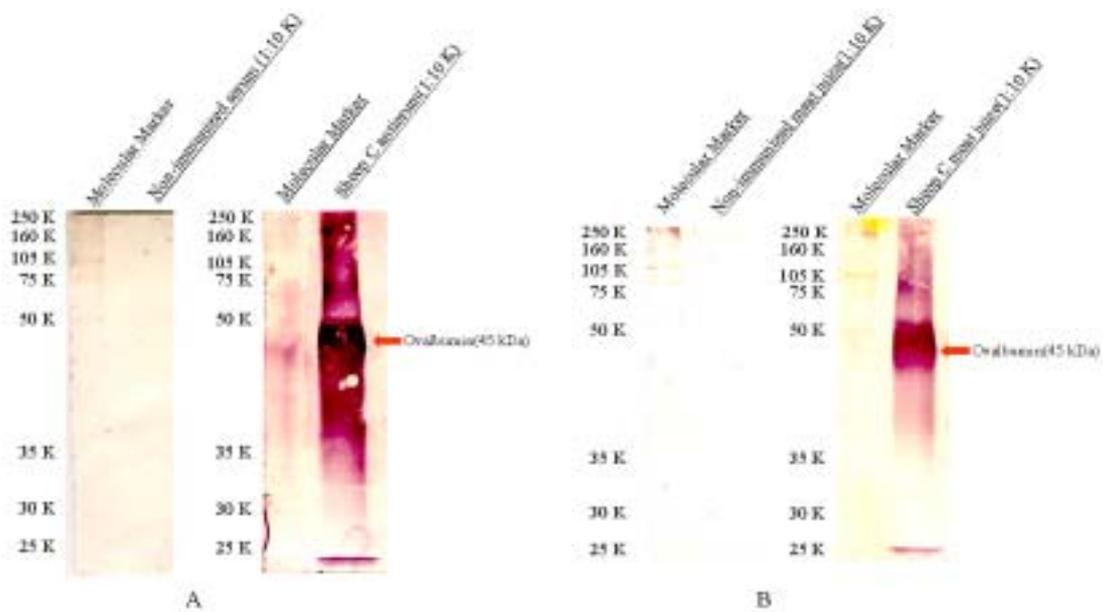


Fig. 22. Western immunoblotting using synthetic peptides as an antigen and antiserum(A) and meat juice(B) as antibodies taken from sheep.

Fig. 22의 B는 면역주사 하지 않은 일반 면양에게 biopsy를 실시해 채취한 근육 조직을 냉동 후 자연 해동하여 생산한 육즙과 Protein B synthetic peptide를 주사한 면양 C의 근육조직으로부터 자연 생산한 육즙을 처리한 membrane의 모습을 나타낸 것이다.

육즙도 항혈청과 마찬가지로 일반 면양의 육즙(비면역육즙)에서는 면역반응을 확인할 수 없었으나, 면역주사한 면양의 육즙에서는 ovalbumin과 결합해 있는 peptide에 강하게 결합하고 있음을 확인할 수 있었다. A와 B에 제시한 membrane들에 처리한 primary antibody의 농도는 흰쥐 육즙 내 항체 검출을 위한 Western immunoblotting 실험 시와는 달리 동일한 배율(1:10,000)로 희석하여 처리하였고, 동일한 시간동안 암실에서 발색반응을 유도하였다. 그 결과 항혈청을 처리한 membrane이 육즙을 처리한 membrane보다 더 높은 면역반응을 나타내었는데, 이는 앞에서 제시한 ELISA test의 결과와 마찬가지로 항혈청의 titer가 육즙보다 높기 때문에 나타난 현상이다. 하지만 육즙을 처리한 membrane(Fig. 22-B)에서 나타난 면역반응 또한 면역반응이 거의 나타나지 않은 비면역육즙과 비교해 매우 높은 수준의 안정적인 면역반응을 나타내고 있다. 결론적으로 면양의 근육조직으로부터 생산한

육즙 내 항체의 역가는 실제 충분히 식별 가능한 면역반응 수준으로 판단되기에, 면양을 통해 확인한 최적의 면역반응 조건들을 배경으로 본격적인 한우 브랜드육 식별 기술 개발에 관한 연구를 실시하였다.

3) 브랜드육 식별 기술 개발을 위한 한우 면역화 시험

현재까지 흰쥐를 이용한 면역화 시험을 통해 육즙 내 항체의 검출 가능성을 제시 하였으며, 면양을 이용한 예비 시험을 통하여 최적의 항원-항체 반응 조건 탐색을 위한 항원, primary antibody, secondary antibody의 적정 농도 규명 등의 기초 연구들을 수행하였다. 이러한 기초 자료들을 바탕으로 한우 브랜드육 식별 기술 개발을 위한 본격적인 한우 면역화 시험을 실시하였다.

Fig. 23은 One-shoot 처리구의 비 면역혈청 및 항혈청의 역가를 측정 한 ELISA test 의 결과이다. 실험에서 사용된 primary antibody(비 면역혈청 및 항혈청)는 모두 1:1,000 의 농도로 희석하여 사용하였다.

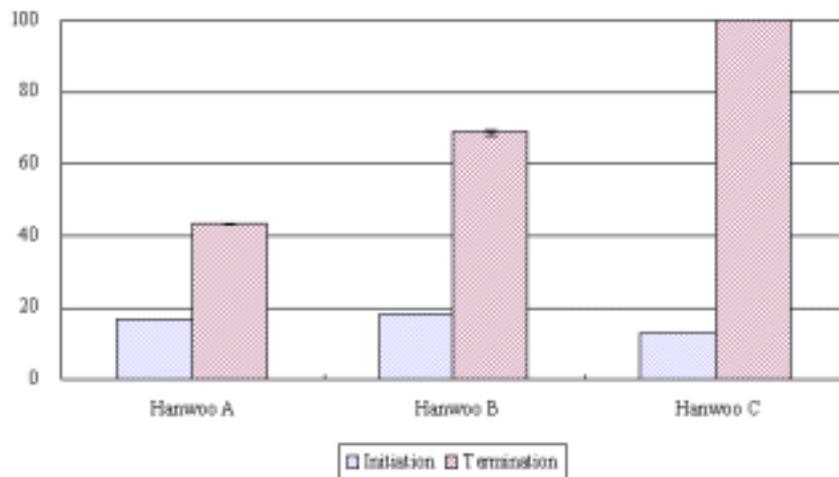


Fig. 23. Titers of antiserum raised against synthetic peptides in three Hanwoo(Korean Cattle) steers individuals immunized with antigen once.

항원을 면역주사하기 전 채혈한 비 면역혈청과 비교해 도축당시 채취한 항혈청은 항원 peptide에 대한 항체를 다량 함유하고 있는 것으로 나타났다. 이는 앞서 시험한 흰쥐 또는 면양에게 외래 항원을 주입한 결과 혈액 내 주입한 외래항원에 대한 항체가 다량 검출된 결과들과 유사한 결과이지만, 한우 특히, One-shot 처리구의 경우 각 개체 간 항체의 검출 수준이 차이가 나는 것으로 나타났다. 동일한 농도의 항원을 동일한 시기에 면역주사 하여 생산한 항혈청이 개체별 항체 검출 수준의 차이를 나타낸다는 것은 한우 브랜드육 식별 진단 kit 개발에 있어 두수 증가에 따른 진단 오차의 범위가 증가할 수 있으므로 심각한 장애요인으로 작용한다 할 수 있다. 따라서 이후 추가 한우 면역화 시험들에서는 이러한 문제점들을 보완할 수 있게끔 주입 항원량의 증가 또는 adjuvant의 교체 등을 신중히 고려하여 실시하였다.

Fig. 24는 One-shoot 처리구 도축 후 생산한 육즙과 면역주사하지 않은 일반 한우로부터 생산한 육즙을 각 부위별로(앞다리, 등심, 뒷다리) 비교 실험한 결과이다. 시험에서 사용된 primary antibody(비면역육즙 및 육즙)는 모두 1:1,000의 농도로 희석하여 사용하였다.

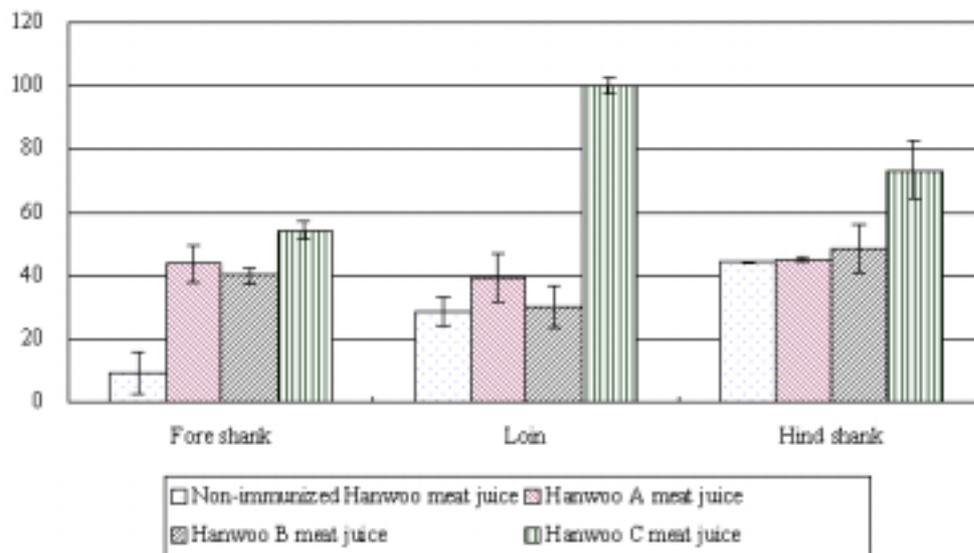


Fig. 24. Titers of meat juice raised against synthetic peptides in three Hanwoo(Korean Cattle) steers individuals immunized with antigen once.

면역주사는 특정부위에 국소적인 피하주사로 실시되었지만, Fig. 24에 나타난바와 같이, 앞다리(Fore shank), 등심(Loin) 및 뒷다리(Hind shank) 등 전체 근육조직 전반에 걸쳐 항체가 생성되었음을 확인할 수 있다. 추후 보다 다양한 조직을 통한 보충 실험이 필요하겠지만, 국소적 면역주사만으로도 전체 근육조직에서 항체를 검출할 수 있다는 사실은 본 기술의 상업화 이후 특별한 전문지식이 없더라도 현장에서 누구나 쉽고 간편하게 본 기술을 적용할 수 있다는 점에서 의미가 있다 할 수 있겠다. 실제 항원을 면역주사 하는데 있어 특별한 기술(항원 주사방법 및 주입부위 등)들이 요구된다면 두수 증가에 따른 기술 인력의 부족 등 상업화에 있어 여러 애로사항이 발생할 가능성이 있기 때문이다.

하지만, 혈액 내 항체의 수준과는 달리 육즙 내 항체들은 항원에 대해 전반적으로 불안정한 반응을 나타내었다. 육즙은 혈액처럼 각 개체별 항체 수준의 차이를 나타내었을 뿐만 아니라, 각 부위별 항체 수준 또한 차이를 나타내었다. 혈액 내 항체의 수준이 가장 높았던 Hanwoo C의 경우 육즙에서도 가장 높은 역가를 나타내는 것으로 밝혀졌으나 근육조직별 역가의 변이가 크게 나타났으며, 차이 또한 큰 것으로 나타났다. Hanwoo A와 Hanwoo B의 경우, 육즙 내 항체의 수준이 Hanwoo C와 비교해 상대적으로 매우 낮았으며, 등심 및 뒷다리 근육조직에서는 비면역육즙과 비교해 차이를 나타내지 못하였다. 이는 면역주사 시 사용된 항원의 농도 및 면역주사 기술 등과 관련이 있는 것으로 예상되며, 추가 한우 면역화 시험에서 주입 항원량을 증가시키게 된 계기를 제공하였다.

Fig. 25는 국내 육류 유통 상황을 고려하여 도축 당일에서 최대 1개월까지의 저장기간 별 육즙 내 항체의 역가 변화를 측정하기 위한 ELISA test 실험의 결과이다.

육즙 내 항체의 역가는 저장기간 및 저장방법에 따라 다르게 나타나는 것으로 확인되었다. 그림에서 나타난바와 같이 전반적으로 도축 당일(0 day)의 면역육즙에서 항체가 가장 많이 검출되었으며, 시간이 경과됨에 따라 냉장 보관한 육즙 내 항체의 검출 수준은 서서히 떨어지는 것으로 나타났다. 도축 당일부터 냉동을 실시한 근육에서 추출한 육즙(day 28)의 경우, 도축 당일의 육즙과 거의 동일한 항체 검출 수준을 나타내리라 예상했으나, day 7일까지 냉장시킨 근육에서 추출한 육즙보다 오히려 항체의 검출 수준은 더 낮게 나타났다. 따라서 진단 시 사용될 육즙은 냉동육에서 추출하는 것보다 냉장육 혹은 생육에서 추출하여 적용하는 것이 더 효과적인 것으로 판단된다. 하지만, 현재 육류 유통 상황을 감안할 때 냉장 혹은 냉동 등의 저장방법에 따라 육즙 내 항체 검출 수준이 차이가 난다는 것은 진단 kit 제작에 있어 또 하나의 문제점으로 작용할 수밖에 없기 때문에, 추후 이에 따른 보다 반복적인 연구 및 해결방안을 모색하여야 할 것으로 생각된다.

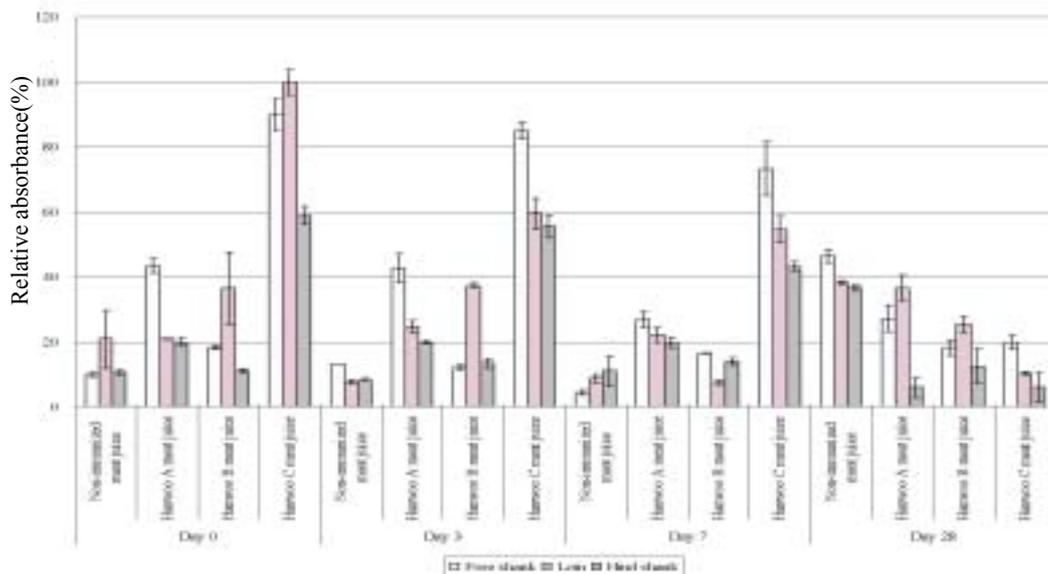


Fig. 25. Changes in the reactivity of antibodies in meat juice with synthetic peptides depending on storage period and muscle.

Fig. 26은 Boosting 처리구의 혈액 내 항체 검출 변화를 시험 시작당시부터 1주일 간격으로 측정된 결과를 나타낸 것이다. 두 시험에서 사용된 primary antibody(비 면역 혈청 및 항혈청)는 모두 1:1,000의 농도로 희석하여 사용하였다.

One-shot 처리구와는 달리 면역 반응의 증진을 위해 boosting 면역주사를 실시한 Boosting 처리구의 경우 항체의 검출 정도가 각 개체별로 큰 차이 없이 비 면역혈청과 비교해 매우 높은 수준으로 나타났다(Fig. 26). 이러한 사실로 미루어 특이단백질을 이용한 한우 면역화에 있어 한번의 면역주사만으로는 각 개체별 안정적인 immune response를 야기하기 어려우며, 다소 비용과 인력이 소모되더라도 boosting immunization을 실시하는 것이 바람직하다 사료된다. 주별 혈청 내 항체의 증가 패턴 역시 boosting immunization을 실시한 이후(3 weeks) 시험우 3두 공히 급격히 상승함을 알 수 있다(Fig. 26).

Fig. 27은 Boosting 처리구의 육즙 내 항체의 수준과 비면역육즙을 각 부위별로(목 등심, 우둔) 비교 실험한 결과이다.

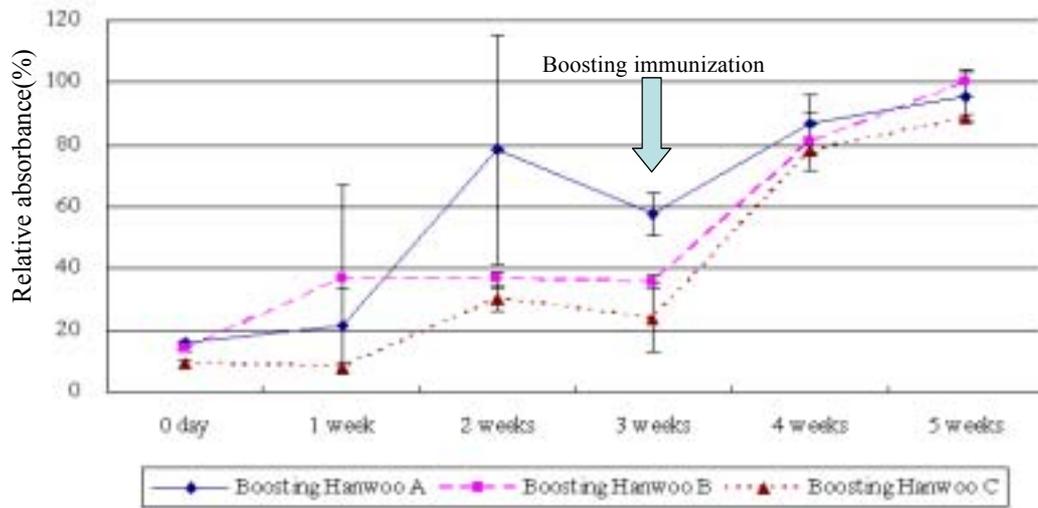


Fig. 26. Changes in the reactivity of antiserum raised against synthetic peptides during immunization periods. The individuals were immunized twice, 0 and 3 weeks.

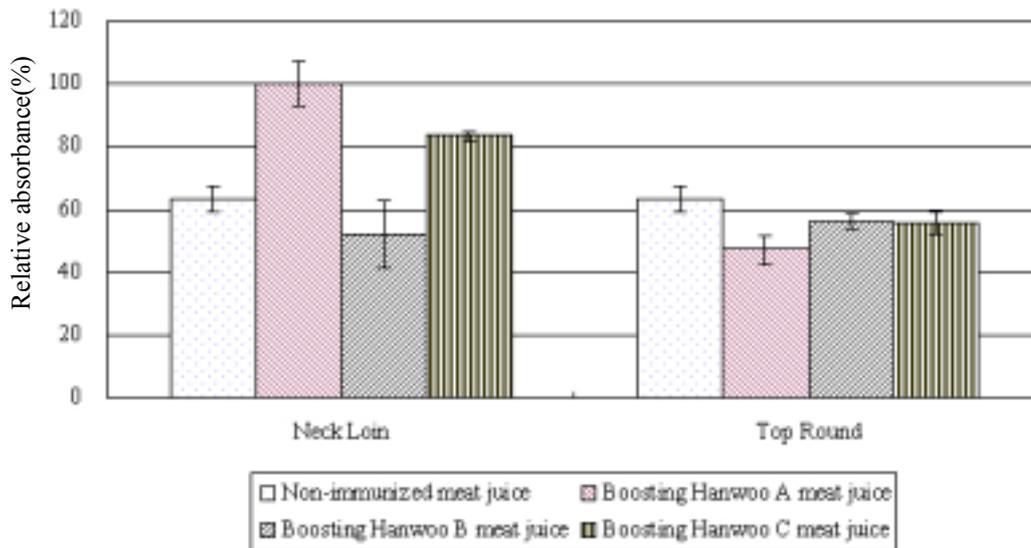


Fig. 27. Changes in the reactivity of antibodies in meat juice of Hanwoo(Korean Cattle) steers of different muscle.

One-shot 처리구의 ELISA test 시 사용된 primary antibody(비면역육즙 및 면역육즙)는 1:1,000의 농도로 희석하여 사용하였으며, Boosting 처리구의 경우 마지막 면역주사 후 12주 경과 후에 도축을 실시한 까닭에 육즙 내 항체의 역가가 상당히 떨어져 1:1,000의 희석 배율에서는 감지할 수 없었으므로, 육즙 원액을 사용하여 실험하였다.

면역주사는 One-shot 처리구와 동일하게 특정부위에 국소적인 피하주사로 실시되었지만, 목등심(Neck Loin)과 우둔(Top Round)에 걸쳐 항체가 생성되었음을 확인할 수 있었다.

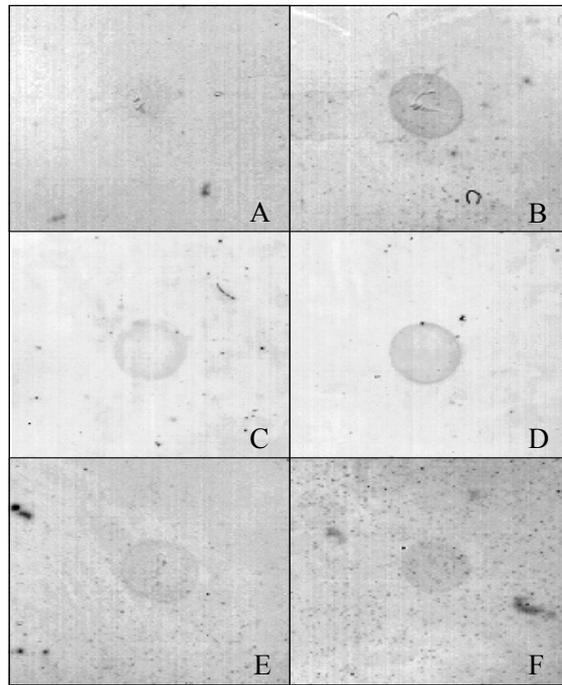
각 처리구별 혈액 내 항체의 수준이 가장 높았던 Hanwoo A의 경우 목등심의 육즙에서도 가장 높은 역가를 나타내는 것으로 나타났으나, 반면 우둔에서는 가장 낮은 역가를 나타내어 근육 조직 부위별 변이가 상당히 큰 것으로 나타났다.

Substrate 처리 후 발색 반응 소요시간 또한 혈액 내 항체 검출 시험 시 소요되었던 시간(약 20~30분)보다 약 4배 더 경과된 후에야 반응을 나타내었으며, 비면역육즙의 역가 또한 One-shot 처리구의 육즙과 비교하여 상대적으로 높게 나타났는데, 이는 앞서 언급한 바와 같이 마지막 면역주사 이후 도축일시 까지 많은 시간이 소요된 까닭에 육즙 내 항체의 역가가 상당히 떨어져 One-shot 처리구와 동일한 농도(1:1,000)로 희석해 사용하지 못하고 육즙 원액을 그대로 사용하였기에 나타난 결과로, Fig. 18에 제시한 것처럼 높은 농도의 육즙을 사용할 경우 발생할 수 있는 위양성 반응일 것으로 추측된다. 하지만, 본 연구기술의 상업화를 위해서는 이러한 요인들 즉, 면역주사 이후 도축시기가 지연되는 등 실제 농가에서 충분히 발생 가능한 상황들에 대한 보다 세밀한 고려가 필요하며, 이에 대한 대비책(도축 지연에 따른 추가 boosting immunization 등)들을 분명히 마련해야 할 것으로 생각된다.

Fig. 28은 비면역육즙과 One-shot 처리구의 육즙을 이용하여 실시한 dot-ELISA의 결과이다. 항혈청의 경우 1:1,000의 농도로 희석하여 처리해 주었으며, 육즙의 경우, 1:1,000의 희석배율에서는 반응이 너무 미약한 관계로 1:100의 농도로 조정하여 처리하였다.

항혈청은 비 면역혈청에 비해 강한 면역 반응을 나타내고 있음이 육안으로도 쉽게 식별 가능하나, One-shot 처리구 또는 Boosting 처리구의 면역육즙들은 비면역육즙보다 다소 강한 반응을 나타내고는 있지만, 낮은 희석배율(1:00)의 육즙에서 발생하는 위양성 반응 때문에 두 처리구간 뚜렷한 차이는 나타나지 않았다. 이러한 위양성 반응을 최소화시키려면 Fig. 18에서 제시한 것처럼 1:1,000 이상의 희석배율로 육즙을 처리해주는 것이 바람직하며, 이를 위해 면역주사 시 사용되는 항원의 농도를 재조정하여 보다 강력한 면역반응을 유도한다든가, adjuvant 및 carrier protein의 선택 등, 항체의 활성을 극대화시킬 수 있는 방안을 모색하는 방법 혹은 비면역육즙 내 위양성 반응

을 나타내는 인자들에 대한 탐색 및 제거방법에 관한 세밀한 연구가 지속적으로 이루어져야 한우 브랜드육 식별 진단 kit 제작이 원활히 이루어 질 것으로 생각된다. 현재 까지 나타난 문제점들은 추가 *in vivo* 및 *in vitro* 실험들을 통해 개선의 여지가 충분히 있는 것으로 생각되며, 면역화 방법의 개선 및 **blocking agent**의 적절한 선정 등에 관한 실험들이 보충된다면 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대되기에 실질적으로 진단 kit에 적용하기 위한 한우 면역화 시험이 추가로 실시되었다.



- A : Non-immunized serum
- B : Antiserum
- C : One-shot Hanwoo C loin non-immunized meat juice
- D : One-shot Hanwoo C loin meat juice
- E : Boosting Hanwoo A neck loin non-immunized meat juice
- F : Boosting Hanwoo A neck loin meat juice

Fig. 28. Dot-ELISA results using synthetic peptides as antigens and antibodies in serum and meat juice of Hanwoo(Korean Cattle) steers.

3. 한우 브랜드육 식별 진단 rapid kit의 제조

1) 최적의 항체형성을 위한 조건 탐색

① 항원 주사량이 항체 형성에 미치는 영향 조사

항원을 peptide로 사용하므로 합성에 드는 비용을 고려할 때, 주사하는 항원의 양이 적을수록 경제적인 면에서 유리하기 때문에 현재까지의 연구결과들을 바탕으로 가장 적절한 최소 항원량의 탐색하기 위해 한우 7두(Hanwoo A, Hanwoo B, Hanwoo C, Hanwoo D, Hanwoo E, Hanwoo P, Hanwoo N)를 사용해 시험을 실시하였다. Table 3에 나타난 바와 같이 처리구는 크게 항원 1 mg 처리구와 3 mg 처리구로 구분하였는데, 항원 1 mg 처리구 중 Hanwoo A는 one-shot 처리하였으며, Hanwoo B는 최초 면역주사 3주 후에 0.3mg의 항원을 boosting immunization으로 주사하였다. 항원 3 mg 처리구 중 Hanwoo C와 Hanwoo E는 one-shot 처리구로 3mg의 항원을 1회 면역주사 하였으며, Hanwoo D는 boosting 처리구로 0.9 mg의 항원을 boosting immunization 실시하였으며, 모든 주사는 앞선 시험들과 동일하게 피하주사로 실시하였다(one-shot 처리구는 도축 3주 전 주사, boosting 처리구는 도축 5주 전 1차 주사 및 도축 2주 전 2차 주사 실시). 이 때 양성 대조군으로 항원을 2 mg 주사한 한우의 육즙(Hanwoo P)을, 음성 대조군으로 비면역한우의 육즙(Hanwoo N)을 사용하였다.

Adjuvant로는 alum을 사용하였고, 도축 시 획득한 근육조직으로부터 자연해동 하여 육즙을 얻었으며, 항체의 생성정도는 ELISA로 확인하였다.

Fig. 29에 나타난 바와 같이 3 mg을 주사한 개체들(Hanwoo C, Hanwoo D, Hanwoo E)은 2 mg을 주사한 개체(Hanwoo P)와는 비슷한 항체 생성도를 나타내었다. 1 mg을 주사한 개체들의 결과를 분석해 보면, Hanwoo B의 항체 생성도는 양성 대조군이나 3 mg을 주사한 개체들과 비슷하였지만, Hanwoo A는 항체 생성도가 다소 낮게 측정되었다. 여기서 나타난 결과로 미루어 보아 항원의 양은 1 mg보다는 3 mg을 주사하는 것이 면역반응 유도에 효과적이라 할 수 있겠으나, 3 mg 처리구 중 Hanwoo D는 항체 생성도가 1 mg 처리구인 Hanwoo A와 비슷한 수준으로 나타나 결국 항원량의 증가가 항체 생성도의 향상에 긍정적 영향을 끼친다는 결론을 내리기는 힘들었다. 전체적으로 항원량의 변화가 항체 생성도를 조금 향상시키는 것으로 보이지만 1 ~ 3 mg의 범위 내에서는 큰 변화를 관찰하기 힘들었으며, Hanwoo D의 경우처럼 면역반응이 잘 일어나지 않는 개체가 있는 것으로 볼 때, 항체의 생성도는 항원의 양보다는 개체의 면역반응도에 더 영향을 받는 것으로 생각된다. 그러므로 항체의 생성에 필요한 최소량의 항원이 어느 정도인지 개체수를 확대해 점검하는 것이 보다 중요할 것이다.

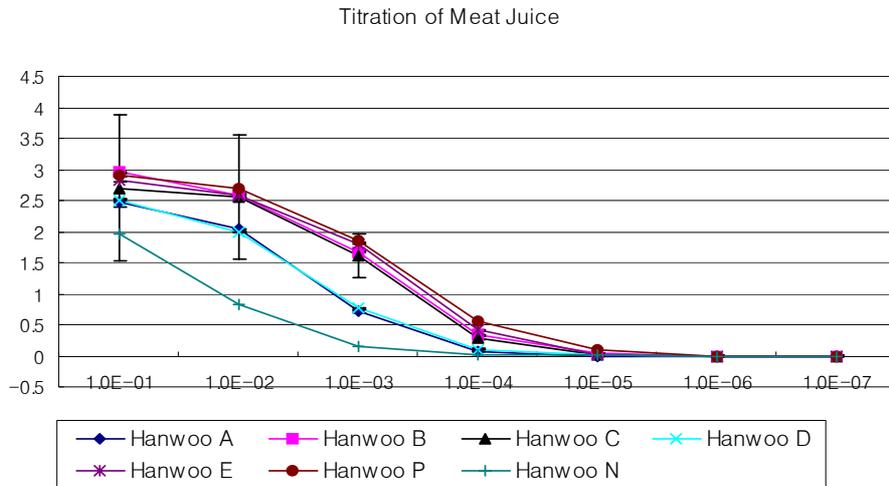


Fig. 29. Antibody titration in immunized meat juice against the peptide conjugates differing in high-(Hanwoo C, D, and E; 3 mg) and low-(Hanwoo A and B; 1 mg) dosage injection.

② Boosting이 항체 형성에 미치는 영향 조사

본 추가시험에서도 항원을 primary injection만 했을 때(one-shot)와 boosting을 추가했을 때의 차이를 ELISA로 titer를 측정해 비교하였다(Fig. 30).

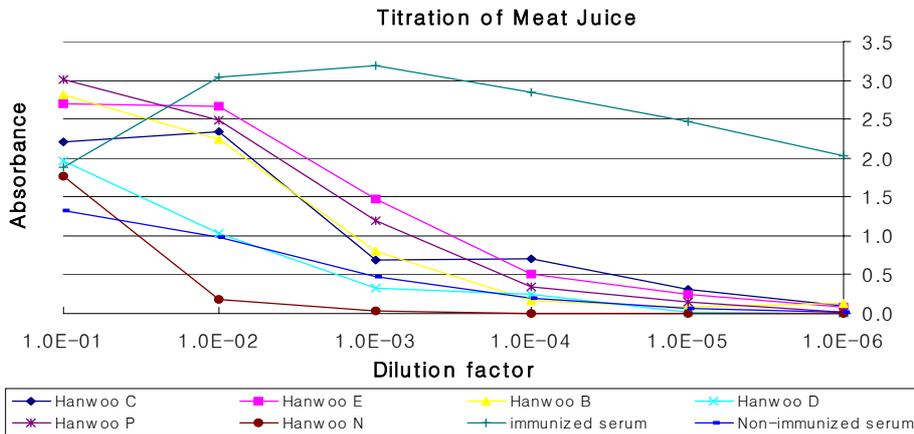


Fig. 30. Antibody titration in immunized meat juice against the peptide conjugates differing in additional boosting(Hanwoo B and D) or not(Hanwoo C and E).

Fig. 30에서 나타난 바와 같이 boosting을 실시한 그룹(Hanwoo B, Hanwoo D)과 실시하지 않은 그룹(Hanwoo C, Hanwoo E)간의 항체 생성도는 큰 차이를 나타내지 않았다. Boosting을 실시한 Hanwoo D의 경우, 오히려 boosting을 하지 않은 개체보다 항체의 생성도가 낮게 측정된 것으로 봐서 항체의 생성도는 boosting에 크게 영향을 받지 않는 것으로 보이지만 이러한 결과 역시 개체수를 확대한 검증이 따라야 할 것으로 보인다.

③ Alum 및 FCA와 같은 Adjuvant의 선택이 항체 형성에 미치는 영향

Adjuvant로 alum과 FCA(Freund's complete adjuvant)를 사용했을 때, 항체의 생성정도를 비교해 보기위해 한우 5두(No. 1, No. 2, No. 3, No. 4, No. 5)를 대상으로 추가 면역화 시험을 진행하였다. 항원의 양은 alum 처리구와 동일하게 하고, 시험 design은 Table 3에 나타난 바와 같으며, 도축 후 근육조직에서 육즙을 얻어 Fig. 31과 같이 ELISA로 titer를 측정하였다.

Fig. 31에 나타난 바와 같이 alum을 adjuvant로 항원을 주사한 대조군 중 가장 titer가 높게 나온 개체에서 얻은 육즙과 FCA를 adjuvant로 항원을 주사한 개체로부터 확보한 육즙의 항체생성 정도를 ELISA를 통해 비교 분석해 보면, 전반적으로 alum을 사용했을 때보다 FCA를 사용했을 때 항체의 생성정도가 다소 향상된 것을 확인할 수 있었다. 물론 alum을 사용해 항체 생성을 유도했을 때와 마찬가지로 FCA를 adjuvant로 사용했을 때 또한 면역반응이 제대로 일어나지 않는 개체(No. 4)가 존재하긴 하였지만, alum보다는 FCA가 면역력 증진에 보다 도움이 되는 것으로 생각된다.

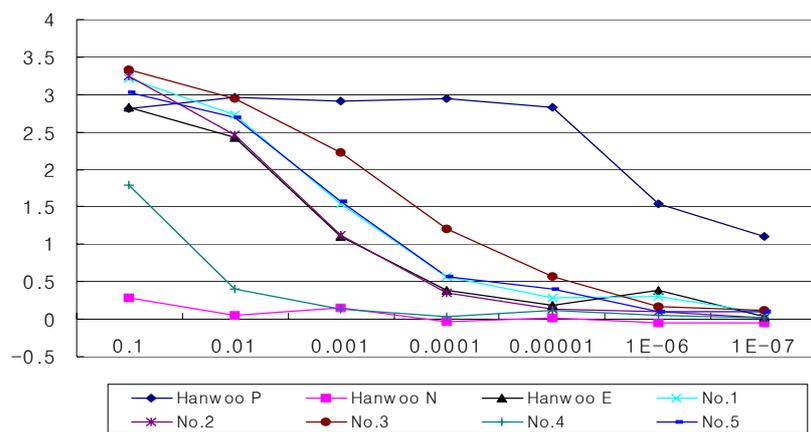


Fig. 31. Antibody titration in immunized meat juice against the peptide conjugates differing in adjuvant, alum(Hanwoo E) and FCA(No.1, 2, 3, 4, and 5).

2) Rapid kit 제조

① Rapid kit의 strip 제조를 위한 조건 탐색

Free peptide(Protein B synthetic peptide)를 capture line에 coating하여 수차례 반응을 유도해 보았으나 아무런 반응이 일어나지 않았다. 이러한 현상은 nitrocellulose membrane을 이용한 dot blot이나 ELISA에서도 동일하게 확인된 현상으로, Protein B synthetic peptide의 작은 분자량 때문에 항체가 결합할 수 있는 반응부위에 제대로 접근하지 못하기 때문인 것으로 생각된다. 이러한 문제를 해결하기 위해, carrier protein 인 ovalbumin이 conjugation된 peptide(OVA - Protein B synthetic peptide conjugate)를 capture line의 coating에 이용하였다.

처음 rapid kit의 제작에 이용하고자 한 방식은 Fig. 32-A에 나타난 것처럼 capture line에 OVA - Protein B synthetic peptide conjugate를, detector에 OVA - Protein B synthetic peptide conjugate와 gold particle의 conjugate를 사용하는 것이었는데, 실제 strip에 coating 한 후 육즙뿐만 아니라 항혈청 또한 여러 차례 전개시켜 보았으나 아무런 반응이 일어나지 않았다. 이는 gold particle과 OVA - Protein B synthetic peptide conjugate를 conjugation했을 때 항체가 결합할 수 있는 부위가 gold particle에 가려지는 steric hindrance 현상 때문인 것으로 추측된다.

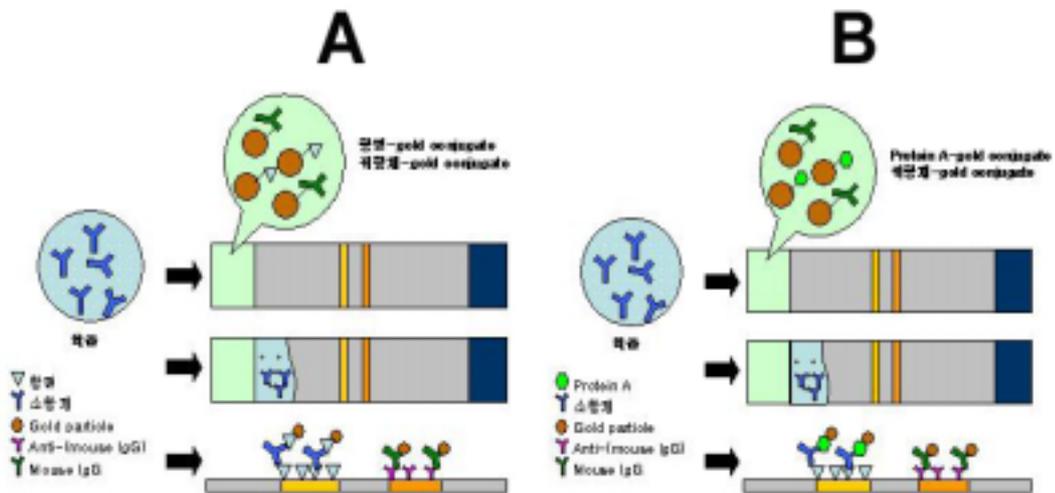


Fig. 32. Principles of the rapid kit manufacture.

따라서 rapid kit 제조 방식을 Fig. 32-B에 나타난 것처럼 항원에 직접 gold particle 을 conjugation하지 않고, Protein A를 이용하기로 결정하였다. 즉 Protein A에 gold particle을 conjugation해 항원에 결합한 항체를 감지할 수 있도록 하여, 결과적으로 항원항체 반응이 steric hindrance로 인한 저해작용 없이 반응을 하게 하였다. 또 Protein A를 이용함으로써 감지된 신호의 증폭효과를 가져와 육즙에 소량 존재하는 항체의 신호마저 감지할 수 있게 되었다. 이러한 사실로 미루어, 신호증폭을 위해 Protein A 보다 오히려 anti-(cow IgG)를 gold particle에 conjugation해 사용하면 특이성이 더 증가해 보다 정확한 결과를 얻을 수 있을 것으로 예상되었다.

② Dot blot을 이용한 조건 탐색

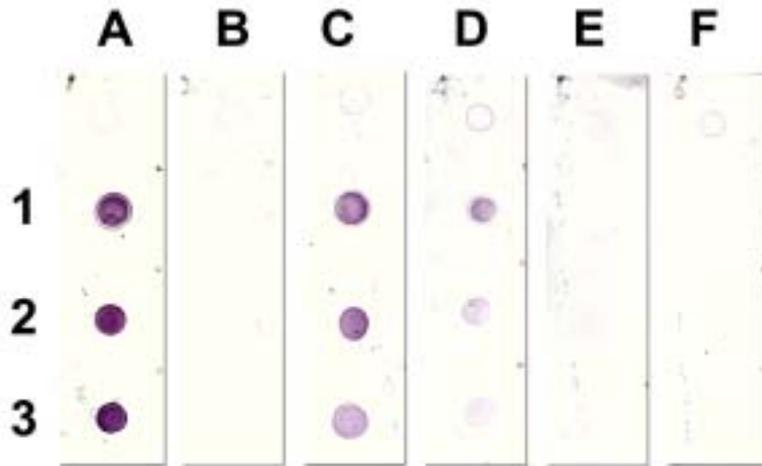
항혈청 또는 육즙을 희석하여 dot blot을 실시하였다. 앞서 실시한 ELISA에서 항체의 형성이 가장 높게 나타난 Hanwoo E와 가장 낮게 형성된 것으로 나타난 Hanwoo D를 실험에 이용하였다.

Fig. 33에 나타난 그림은 nitrocellulose membrane에 항원 peptide를 Row 1 ~ 3에 설정된 조건에 따라 각각 binding 시킨 후, 그림 하단에 표기된 각각의 조건들에 따라 면역반응을 유도해 본 dot blot의 결과이다.

항혈청을 1/1000배 희석하여 처리한 Line A의 경우, binding 된 항원의 농도에 관계 없이 강한 signal을 나타내었으나, 비면역육즙을 처리한 Line B에서는 전혀 반응을 나타나지 않음을 관찰 할 수 있다. Hanwoo E를 처리한 Line C의 경우, 육안으로 분명히 식별할 수 있을 정도의 강한 반응을 나타낸 반면 2배 더 희석하여 처리한 Line D에서는 역시 Line C보다 반응의 정도가 약해진 것을 알 수가 있었다. ELISA에서 항체의 생성도가 낮은 것으로 판명된 Hanwoo D의 경우, 1/100배 희석했을 때 항원의 농도가 2 mg / ml로 binding 되어진 row에서만 겨우 확인이 가능할 정도의 미약한 반응이 나타났으며(Line E), 1/200배 희석하여 처리한 Line F의 경우 반응이 전혀 나타나지 않아 Negative Control을 처리한 Line B와 차이가 없었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, 한우에서 면역반응이 정상적으로 일어난다면 육즙에 포함된 항체를 감지하는 것이 충분히 가능하다는 사실을 확인할 수 있다.

③ 육즙의 희석배수에 따른 strip에서의 반응 변화

육즙의 희석배수에 따른 항원-항체반응의 변화를 실제 strip에 적용시켜 확인 해 보았다. Fig. 34-A는 2배, Fig. 34-B는 4배, Fig. 34-C는 8배, Fig. 34-D는 16배, Fig. 34-E는 100배 희석한 육즙을 각각 반응에 사용하였으며, 사용된 육즙은 FCA를 처리한 한우에서 얻어낸 육즙(No. 1, No. 2, No. 3, No. 4, No. 5)을 이용하였다.



Row 1 : OVA - Protein B synthetic peptide, 2mg / ml
 Row 2 : OVA - Protein B synthetic peptide, 0.2mg / ml
 Row 3 : OVA - Protein B synthetic peptide, 0.02mg / ml

Line	Treatment	Dilution Factor	Line	Treatment	Dilution Factor
A	Antiserum	1:1000	B	Hanwoo N	1:100
C	Hanwoo E	1:100	D	Hanwoo E	1:200
E	Hanwoo D	1:100	F	Hanwoo D	1:200

Fig. 33. The result of dot blot.

Fig. 34-A의 경우, strip의 아랫부분에 gold conjugate와 육즙의 단백질이 침전을 일으켜 더 이상 전개되지 않는 현상을 보였다. 이로 인해 Fig. 34-A-No 3의 경우 대조선 (control line)이 거의 나오지 않는 결과를 나타내기도 했다. 이러한 현상은 희석배수가 높아질수록 점차 사라지기 시작하였으며, 육즙을 8배 이상 희석한 Fig. 34-C의 경우부터는 침전현상이 거의 발생하지 않았다. Fig. 34-C부터는 모든 개체에서 대조선이 명확하게 나온다는 사실로부터 반응이 안정적임을 잘 알 수 있다.

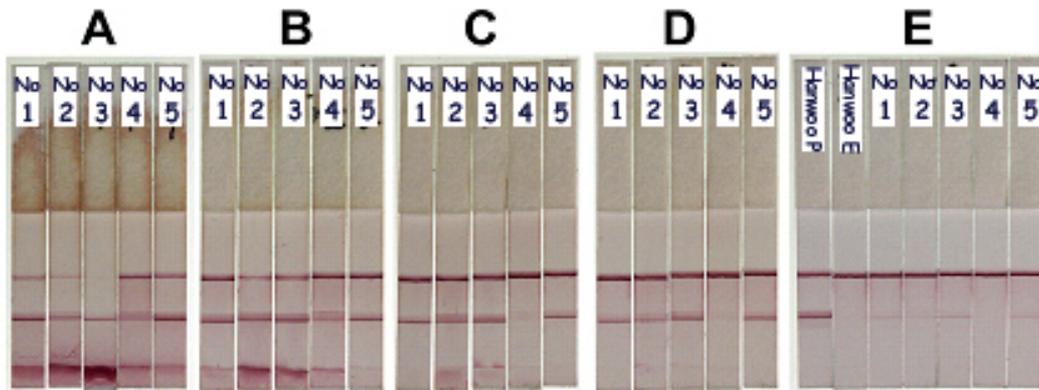


Fig. 34. Determination of the optimum dilution factor of meat juice for application. The immunized meat juice was diluted to 1:2(A), 1:4(B), 1:8(C), 1:16(D), and 1:100(E) and applied to the immunochromaphy strips.

No. 4는 8배 이상 희석일 경우 반응선이 희미해지기 시작했으며 100배 희석 시에는 반응선이 사라졌다. 이는 ELISA를 통한 항체 생성도의 분석에서도 살펴봤듯이, 한우 개체마다 항원에 대한 항체의 생성정도가 틀리는 것을 의미한다. 따라서 항체생성 반응이 잘 일어나지 않는 개체가 어느 정도의 비율로 존재하는지와 이러한 문제를 해결하기 위한 대책을 계속 연구해야 할 것으로 보인다.

항형청의 경우(Fig. 34-E-Hanwoo P), ELISA에서도 잘 보여주듯이 100배 희석에서도 명확한 반응선을 나타내었으며, No. 4를 제외한 나머지 개체에서도 반응선을 확인할 수 있었다. 앞선 연구 분석에서 alum을 adjuvant로 사용했을 때보다 FCA를 사용했을 때가 항체생성 정도가 우수하다는 결과를 ELISA에서 확인할 수 있었는데, 특히 alum을 사용했을 때 가장 항체생성 정도가 우수했던 Hanwoo E에서는 반응선이 감지되지 않아 FCA로 인한 항체 생성도의 차이를 육안으로 직접 확인할 수 있었다.

Fig. 35는 육즙의 희석배율에 따른 변화를 각 개체별로 정리해 살펴본 결과이다. 모든 경우에서 육즙의 희석비율이 낮을 때 gold conjugate가 침전이 생기지만 8배 희석 부터는 침전이 거의 발생하지 않음을 잘 알 수 있다. 특히 No. 2와 No. 3의 경우처럼 과량의 침전으로 인해 대조선 마저 잘 나타나지 않는 경우가 발생하기도 하였다. 이는 육즙의 단백질 및 지방질의 농도가 높기 때문에 단백질과 지방질의 소수성 반응 등으로 인해 침전이 발생하는 것으로 판단된다. 따라서 침전의 발생을 줄일 수 있는 적절한 detergent를 loading buffer에 적용하여 육즙과 loading buffer를 함께 rapid kit에

적용하는 방식이나 혈청만 통과시키는 sample pad를 사용하여 sample 속의 많은 단백질과 지방질 등이 conjugate pad에 이르기 전에 걸러지도록 하는 방식을 적용한다면 훨씬 더 안정적이고 감도가 뛰어난 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

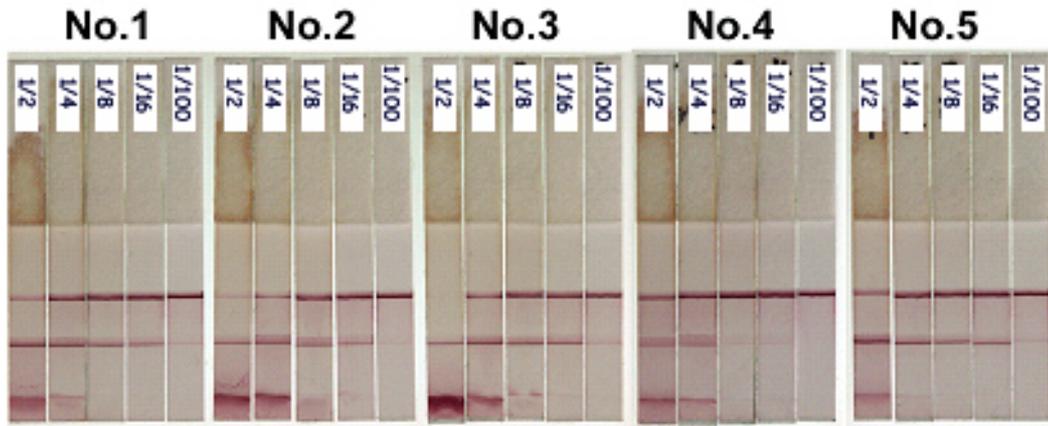
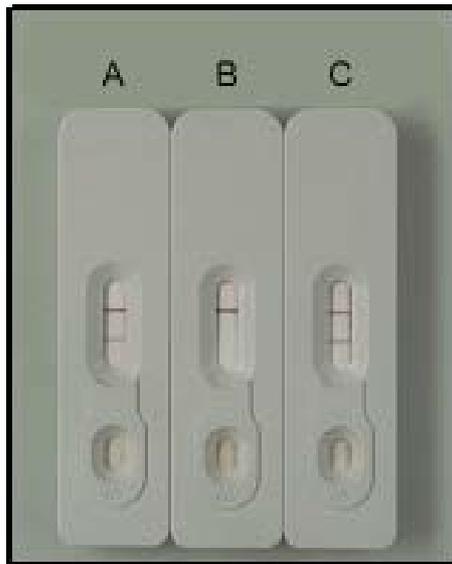


Fig. 35. Comparison of strips resulting from immunized meat juices differing in dilution factors for application.

위에서 실시한 half test의 결과를 기초로 하여 sample pad와 case를 첨가한 prototype의 rapid kit을 제작해 test해 보았다(Fig. 36). Test에 사용한 각 sample은 모두 loading buffer(PBS pH 7.4, 10% Methanol, 0.1% SDS)에 10배 희석하여 사용하였다. 양성 대조군으로 사용한 면역 혈청에서는 대조선과 반응선 모두 명확하게 생성된 것을 확인하였으며, 음성 대조군으로 사용한 비면역육즙에서는 대조선은 명확히 생성되었지만 반응선은 전혀 생성되지 않았다. 면역 육즙으로 test한 결과, 대조선은 명확히 생성된 반면에, 항혈청에 비해 약하긴 해도 명확한 반응선이 생성된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 위에서 실시한 ELISA를 통한 항체의 생성도 측정 결과와도 잘 일치하고 있다.

지금까지의 결과를 종합해 볼 때, rapid kit을 이용한 면역육즙의 감별은 충분히 가능하다는 결론을 얻을 수 있었다. 하지만 현장에서 적용하기 위해서는 아직 좀 더 구체적인 접근을 통해 고려해보아야 할 사항들이 있다. 반응선의 신호를 좀 더 명확히 하기 위한 조건 탐색, 다양한 sample 조건 및 환경에도 안정된 결과를 내는지에 대한 검증, 면역성이 떨어지는 한우에 대한 해결책 강구, 소비자가 보다 손쉽게 취급할 수

있는 방식의 채택 등에 대한 심도 있는 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다. 특정 브랜드를 대상으로 적용해 지금 방식의 드러나지 않은 문제점을 파악하고 개선해 나간다면 브랜드육의 현장 판별기술을 통한 브랜드육의 보호에 큰 역할을 할 것으로 기대된다.



- A : Immunized meat juice
- B : Non-immunized meat juice
- C : Antiserum

Fig. 36. Application of immunized meat juice to the developed immunochromatography strips.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위	목표달성도 (%)
1차 년도 (2002. 10. - 2003. 10.)	◆ 한우 특이 단백질의 screening 및 선발	<ul style="list-style-type: none"> ● 한우 특이 단백질 screen ● 항원성 단백질 선정 <ul style="list-style-type: none"> -3차원 그래픽을 이용한 항원부위 검색 ● 특이 단백질의 항원성 부위 cloning <ul style="list-style-type: none"> -Primer 제작 및 항원 부위 유전자 확보 -발현 vector 구성 ● 항원성 부위의 대량 생산 <ul style="list-style-type: none"> -적절한 발현 체계 선정 -단백질의 발현, 분리 및 정제 	100 100 100 100
	◆ 한우 특이 단백질에 대한 항체 개발	<ul style="list-style-type: none"> ● Carrier 단백질 screen ● 한우 항체에 대한 2차 항체 제조 <ul style="list-style-type: none"> -한우 항체 분리 -한우 항체로 토끼 immunization -한우 항체에 특이적인 토끼 항체 분리 ● 최적의 항체생성 조건 탐색 <ul style="list-style-type: none"> -항원의 양, 면역화 시점 등 ● 항체 titer 점검을 위한 ELISA 조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> -적정 항원 coating 농도, 2차 항체 농도 ● 한우 특이 단백질에 대한 항체 분리 확보 <ul style="list-style-type: none"> -Affinity column 제작 -높은 결합력의 항체 분리 ● 혈액 및 장기(특히 근육) 추출물내 항체 titer 측정 	100 100 100 100 100 100
2차 년도 (2003. 10. - 2004. 10.)	◆ 한우육 판별 Kit 개발	<ul style="list-style-type: none"> ● Kit 제작을 위한 기초 실험 <ul style="list-style-type: none"> -시료에 따른 적정 반응조건 탐색 -최적의 항원/항체 반응조건 확보 -항원고정화 ● 시제품 제작 <ul style="list-style-type: none"> -시제품 제작을 위한 재료 선정 -재현성 조사 ● 시제품의 안정성 조사 <ul style="list-style-type: none"> -시제품간 편차 비교 -보관 조건에 따른 활성 변화 조사 -적정 유효기간 선정 ● 특정 브랜드 육 판별을 위한 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> -브랜드별 특이 단백질 선정 -브랜드별 면역항체 제조 -브랜드 특성화 kit 제작 	100 100 100 100

간편한 조작만으로 현장에서 브랜드 쇠고기를 식별할 수 있는 kit를 제작함으로써, 값비싼 한우 고기의 둔갑 판매를 근절하고, 침체에 빠진 한우 산업을 활성화 할 목적으로 수행된 본 연구는 당초 계획들을 100% 달성하였다. 특히, 본 기술은 2004년 농림과학기술대전에 출품되어 국내 유명 브랜드 한우 단체 관계자들의 지대한 관심을 받았으며, 본 연구가 상업화 되면 한우 산업의 활성화에 크게 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

한우 브랜드육 보호를 목적으로 수행된 본 연구에서는, 국내 한우 브랜드육과 여타 쇠고기를 현장에서 신속·정확하게 식별 할 수 있는 원천 기술을 개발하였다. 현재까지 결과들을 살펴보면, 특정 단백질을 항원으로 이용하여 면역화 과정을 거치게 되면 면역화 시키지 않은 쇠고기에서는 나타나지 않는 특이 항체들을 육즙을 이용해 검출해 낼 수 있었으며, 단 1회의 간단한 면역주사만으로 특정 브랜드 한우 쇠고기를 식별해 낼 수 있었다 (특허 출원 중).

하지만, 보고서에서 고찰한 바와 같이, 본 기술의 상업화를 위해서는 반드시 검증되어야 할 몇몇 과정들이 있다. 특히 면역 시스템의 개체차로 인하여 동일한 항원을 동일량 주입하였음에도 불구하고 항체의 형성 수준에 차이가 나는 것에 대한 보정(진단 kit의 sensitivity를 증대시키는 방안 등), 현재 제작된 진단 kit의 오차범위를 최소화하기 위한 연구 등은 반드시 추가 시험이 필요하며 그러기 위해서는 시험 우의 규모도 크게 늘려 보다 안정성에 기초를 둔 연구들이 향후 수행되어야 할 것이다.

이상의 몇 가지 사항에 대한 검증이 이루어지고 본 기술을 정책적으로 활용할 수 만 있다면, 수입 쇠고기나 외국산 생우로부터 생산된 쇠고기가 한우 쇠고기로서 둔갑되는 것을 방지하고 한우 산업의 활성화에 본 연구의 결과들을 적극적으로 활용할 계획이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

유럽의 많은 축산 선진 국가들은 Council Regulation(EC) No. 820/97을 기준으로 자국내 축산물의 바코드 라벨시스템을 구현하고 있다. 이는 소비자에게 정확하고 신뢰성 있는 축산물을 제공하기 위해서는 효율적인 가축의 식별(identification)과 이동경로 간 추적(traceability) 및 조회를 통한 축산물에 대한 완전한 정보, 그리고 유통공급망상의 네트워크 구축 등이 필요하다고 판단했기 때문이며, 우리나라도 바코드나 전자칩을 한우에 부착하여 생산, 이동, 도축, 유통 과정을 손쉽게 파악할 수 있게 하는 이른바 한우 생산 이력제를 곧 실시한다고 밝히고 있다. 하지만 본 기술과 같이 번역학적 기법에 기초하여 현장에서 간편하게 식별할 수 있는 기술, 특히 쇠고기 식별을 위한 진단 kit의 개발 기술은 본 기술이 독자적인 것으로 보인다.

제 7 장 참고문헌

- 1) Benkirane, N., Guichard, G., Van Regenmortel, M. H. V., Briand, J. and Muller, S. 1995. Cross-reactivity of antibodies to retro-inverso peptidomimetics with the parent protein histone H3 and chromatin core particle. *J. Biol. Chem.* 270(20):11921~11926.
- 2) Briand, J. P., Benkirane, N., Guichard, G., Newman, J. F. E., Van Regenmortel, M. H. V., Brown, F. and Muller, S. 1997. A retro-inverso peptide corresponding to the GH loop of foot-and-mouth disease virus elicits high levels of long-lasting protective neutralizing antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:12545~12550.
- 3) Cheng, C., Chenghua, S., Ping, L., Yizheng, T. and Qingjun, M. 1996. Diagnosis of hepatitis C virus(HCV) infection by antigen-capturing ELISA. *Clin. Diagn. Virol.* 6:137~145.
- 4) Chikuni, K., Ozutsumi, K., Koishikawa, T. and Kato, S. 1990. Species identification of cooked meats by DNA hybridisation. *Meat Sci.* 27:119~128.
- 5) Demeulemester, C., Lajon, A., Abramowski, V., Martin, J. L. and Durand, P. 1991. Improved ELISA and dot-blot methods for the detection of whey proteins in meat products. *J. Sci. Food. Agric.* 56:325~333.
- 6) Dong, L. V., Quyen, L. K., Eng, K. H. and Gopalakrishnakone, P. 2003. Immunogenicity of venoms from four common snakes in the south of Vietnam and development of ELISA kit for venom detection. *J. Immunol. Methods.* 9439:1~19.
- 7) Drew, T. W., Yapp, F. and Paton, D. J. 1999. The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR. *Vet. Microbiol.* 64:145~154.
- 8) Eisler, M. C., Lessard, P., Masake, R. A., Moloo, S. K. and Peregrine, A. S. 1998. Sensitivity and specificity of antigen-capture ELISAs for diagnosis of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma vivax* infections in cattle. *Vet. Parasitol.* 79:187~201.

- 9) Harolw, Ed. and Lane, D. 1988. Antibodies - A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, New York.
- 10) Hsieh, Y. H. P., Johnson, M. A., Wetzstein, C. J. and Green, N. R. 1996. Detection of species adulteration in pork products using agar-gel immunodiffusion and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Food. Qual.* 19:1~13.
- 11) Hubank, M. and Schatz, D. 1994. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic. Acids. Res.* 22(25):5640~5648.
- 12) Janssen, F. W., Voortman, G. and Faaij, J. A. 1987. Detection of wheat gluten, whey protein, casein, ovalbumin, and soy protein in heated products by electrophoresis, blotting, and immunoperoxidase staining. *J. Agric. Food. Chem.* 35:563~567.
- 13) Jeffreys, A. J., Wilson, V. and Thein, S. L. 1985. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature.* 314:67~73.
- 14) Kikkawa, Y., Amano, T. and Suzuki, H. 1995. Analysis of genetic diversity of domestic cattle in East and Southeast Asia in terms of variations in restriction sites and sequences of mitochondrial DNA. *Biochem. Genet.* 33:51.
- 15) Kirby, L. T. 1992. DNA Fingerprinting - An introduction. *W. H. Freeman and Company*, New York.
- 16) Kramer, A., Stigler, R., Knaute, T., Hoffmann, B. and Schneider-Mergener, J. 1998. Stepwise transformation of a cholera toxin and a p24(HIV-1) epitope into D-peptide analogs. *Protein. Eng.* 11(10):941~948.
- 17) Kuhnlein, U., Dawe, Y., Zadworny, D. and Gavora, J. S. 1989. DNA fingerprinting: a tool for determining genetic distances between strains of poultry. *Theor. Appl. Genet.* 77:669.
- 18) Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680.

- 19) Langedijk, J. P. M., Middel, W. G. J., Meloen, R. H., Kramps, J. A. and Smit, J. A. 2001. Enzyme-linked immunosorbent assay using a virus type-specific peptide based on a subdomain of envelope protein E^{ms} for serologic diagnosis of pestivirus infections in swine. *J. Clin. Microbiol.* 39(3):906~912.
- 20) Lee, K. J. and Watson, R. D. 2002. Antipeptide antibodies for detecting crab(*Callinectes sapidus*) molt-inhibiting hormone. *peptides*. 23:853~862.
- 21) Macedo-Silva, A., Barbosa, S. F. C., Alkmin, M. G. A., Vaz, A. J., Shimokomaki, M., Tenuta-Filho, A. 2000. Hamburger meat identification by dot-ELISA. *Meat Sci.* 56:189~192.
- 22) Mohri, H., Asakura, Y., Fukushima, J., Kawamoto, S., Okubo, T. and Okuda, K. 1997. Synthetic peptide from the V3 loop consensus motif with a potent anti-HIV activity inhibits ristocetin-mediated vWF-GPIb interaction. *peptides*. 18:1289~1293.
- 23) Nargi, F., Kramer, E., Mezencio, J., Zamparo, J., Whetstone, C., Van Regenmortel, M. H. V., Briand, J. P., Muller, S. and Brown, F. 1999. Protectoin of swine form foot-and mouth disease with one dose of an all-D retro peptide. *Vaccine*. 17:2888~2893.
- 24) Otsen, M., Beiman, M. D., Kuiper, M. T. R., Pravenec, M., Kren, V., Kurtz, T. W., Jacob, H. J., Lankhorst, A. and Zutphen, B. F. M. 1996. Use of AFLP markers for gene mapping and QTL detection in the rat. *Genomics*. 37(3):289~294.
- 25) Pitra, C., Curson, A., Brown, S., Numberg, P. and Krawczak, M. 1997. An assessment of inbreeding in Asian wild horse population using DNA fingerprinting. *Anim. Reserch.* 45:28~36.
- 26) Samarajeewa, U., Wei, C. I., Huang, T. S. and Marshall, M. R. 1991. Application of immunoassay in the food industry. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 29:403~434.
- 27) Saravi, M. A., Wright, P. F., Gregoret, R. J. and Gall, D. E. J. 1995. Comparative performance of the enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and conventional assays in the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 47:93~99.

- 28) Soutullo, A., Verwimp, V., Riveros, M., Pauli, R. and Tonarelli, G. 2001. Design and validation of an ELISA for equine infectious anemia(EIA) diagnosis using synthetic peptides. *Vet. Microbiol.* 79:111~121.
- 29) Tooyama, I., Abe, H., Renda, T. G. and Kimura, H. 2000. Production of immunohistochemical application of antiserum against Tyr-D-Ala-Phe, a M-terminal tripeptide common to dermorphin/ deltorphin family. *peptides.* 21:1649~1655.
- 30) Van Rgenmortel, M. H. V. and Muller, S. 1998. D-peptides as immunogens and diagnostic reagents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9(4):377~382.
- 31) Wyman A. R. and R. White. 1980. A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc. Natl. Acad. sci.* 77:6754~6758.
- 32) 김태현. 2001. 유전자 감식법 개발 및 활용. 월간한우 10:98~112.
- 33) 김철욱, 여정수, 조광근, 진상근, 오명곤, 박준규, 권은정, 홍연희, 김지현, 이보경, 박다혜, 김재우, 이지홍. 2001. 재래돼지(Korea Native Pigs) 특이 genetic marker와 육질 연관성 분석. *Korean J. Anim. Sci.* 43(6):789~802.
- 34) 보건사회부. 1988. 식품공전. pp. 116~120.
- 35) 최창분, 이명진, 권은진. 1998. 면양을 이용한 돼지 지방세포 원형질막 단백질 특이 항체의 생산. *Korean J. Biomed. Lab. Sci.* 4:57~63.

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.