

GOVP1199801247

최 중
연구보고서

636.213

L293d

v.2

DNA 분석기법을 이용한 한우육
판별의 실용화에 관한 연구

Studies of the Identification of Hanwoo
Meat by DNA Analysis

이전저자 : 농림수산부

충남대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “DNA 분석기법을 이용한 한우육 판별의 실용화에
관한 연구”의 최종보고서로 제출합니다.

1997년 12월

주관연구기관명 : 충남대학교

총괄연구책임자 : 오 흥 록

세부연구책임자 : 상 병 찬

협동연구기관명 : 건국대학교

협동연구책임자 : 이 창 수

요 약 문

I. 제 목

DNA 분석기법을 이용한 한우육 판별의 실용화에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 생산비 절감에 의한 한우육 경쟁력의 한계성 극복

국내 쇠고기 시장은 1993년 UR 협상의 타결로 외국산 수입육이 국내시장에 진출한 이래 매년 그 반입 물량이 늘어나는 추세다. 현재 쇠고기 자급율은 40%까지 떨어질 때도 있었으며, 앞으로 쇠고기 수입을 전면 개방해야 하는 2001년에는 더욱 낮아지리라 예상된다. 이는 수입육이 한우육보다 3-4배나 값싸게 들어오기 때문에 (1995년 1월 기준으로 미국과 호주 소값은 한우값의 약 23%와 약 14% 수준에 불과함) 가격면에서는 경쟁이 어렵기 때문이다. 이는 생산비 절감만으로는 한우산업의 경쟁력을 갖추기에는 한계가 있음을 보여주는 것이다.

한편 국민소득 증대와 더불어 식생활 양식의 변화로 소비자들은 질적으로 우수한 고품질 쇠고기를 선호하는 경향을 보이고 있기 때문에, 경쟁력 강화를 위해서는 생산성 향상과 더불어 고품질의 쇠고기 생산을 유도하면서 수입육과의 차별화를 무엇보다도 우선적으로 정착시키는 것이 매우 중요하고 시급한 문제로 인식되고 있다.

2. 국내 쇠고기 시장의 유통질서 확립과 차별화에 의한 경쟁력 강화

현재 한우육이 수입육보다 보다 높게 형성된 국민의 선호도를 한우라는 상표의 가치성과 더욱 밀접히 연계시킴으로서 한우육의 소비자 계층을 확고히 확보할 필요가 있다. 그러나 소비자들은 쇠고기 유통과정에서 값싼 수입육과 국내산 젓소육

이 고가의 한우육으로 둔갑될 가능성에 대해 매우 높은 불신감을 가지고 있는 것으로 나타나고 있다. 부정 한우육에 대한 이야기는 매년 명절때가 다가오면 마스크의 단골메뉴의 하나로 빠짐없이 등장하고 있다.

실제로 소비자를 대상으로 한 설문조사(1994년)에서 조사 대상의 80% 이상이 수입육이 한우육으로 둔갑되어 판매될 가능성이 있다고 응답하였고, 한우품질만 보장된다면 가격이 비싸더라도 한우육을 구입하겠다고 조사 대상자의 대부분은 밝히고 있다. 유통업과 식육업 종사자들의 견해를 들어보더라도 각각 57%와 26%가 수입쇠고기가 한우육으로 둔갑 판매하고 있다고 대답하고 있다. 가짜 한우육이라는 용어는 한우육에 대한 신뢰를 떨어 뜨려 소비자에 절대적인 영향을 미치고 있음을 잘 알 수 있다.

이처럼 한우산업의 국내 경쟁력을 약화시키는 가장 큰 요인 중의 하나는 무엇보다 한우육에 대한 소비자의 불신감이며 품질보증의 문제해결이 가장 시급한 것으로 드러났다. 한우육 둔갑 가능성에 대한 소비자 불신감이 높다고 한다면 행정당국에서 적극 추진하고 있는 한우 차별화 및 쇠고기의 구별 표시정책이 제대로 정착되기 어렵고, 오히려 수입육을 더욱 선호하는 결과를 초래할 수도 있겠다.

3. 한우육의 품질보증과 판별기술의 개발

한우육의 품질보증은 공신력이 있는 기관에서의 인증과 지속적인 쇠고기의 유통 단속도 필요하겠지만, 한우육을 수입육과 젓소육으로부터 판별할 수 있는 과학적인 판별기술이 뒷받침될 때 소비자들의 한우육에 대한 신뢰감의 회복과 불신감의 해소가 이루어질 수 있을 것이다. 현재 쇠고기의 형태에서 소의 품종간 구별은 외국에서도 과학적인 분석법이 개발되어 있지 않다.

부정 한우육이 사육농가나 소비자들에 미치는 영향이 매우 큼에 비추어 한우육 식별에 대한 학술적인 연구가 국내에서는 꽤 오래 전부터 실시되었고, 이에 대한 학술 보고들이 발표되고는 있으나, 실험실 단계를 넘어서서 실용화 기술로 활용되고 있다는 보고는 아직 없는 실정에 있다. 이렇게 수입육이나 젓소육이 한우육으로 둔갑되더라도 이를 파악할 과학적 분석법이 국내외적으로 없었으나, 본 연구팀

에 의해 첨단기법의 하나인 DNA 분석법으로 한우육 판별이 가능하다는 것을 보고 하였다. 이 판별기술은 실험실 단계에서만 아니라 실용화 기술로서 활용될 수 있음을 이번 현장애로 기술개발사업을 통하여 입증하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 우리 나라 한우집단이 모두 순수품종이 아닌 상황아래서 실험실 규모의 소량의 두수를 대상으로 개발되어진 한우판별기술이 현장에서도 활용될 수 있는지를 검토하기 위하여, 전국의 한우를 대상으로 분석함으로써 판별기술의 실용성 정도를 검증하고자 하였다. 또한 많은 시료를 분석하는 과정에서 야기될 수 있는 문제점들을 분석하여 개선되어야 할 사항은 집중 검토하여, 해결책을 모색하면서 판별기술의 간소화 및 표준화를 실시하였다. 그리고 이 실용화 기술을 희망하는 국가기관이나 단체에 이론교육 및 기술지도를 실시하여 판별기술을 보급하였다. 한편 한우와 비한우 사이에 차이가 나는 원인을 DNA 수준에서 원인을 규명하고자 기초연구도 아울러 실시함으로써 더욱 효율적인 새로운 판별기술 개발을 위한 기초자료로 활용하고자 하였다.

실험실 단계에서 개발된 한우 판별기술이 곧바로 실용화 기술로 적용할 수 없는 이유는 우리나라 한우집단의 특수성에 기인한다. 한우판별기술은 하나의 표지유전자가 밴드 형태로서 한우에는 관찰되지 않았으나 국내 젓소 및 수입육의 서양품종 소에서는 검출된다는 사실에 의존한다. 이 판별기술은 혈통이 순수하다고 여겨지는 한우와 서양소 품종을 대상으로 개발되어졌기 때문에 두 품종간의 교잡인 경우에는 두 품종간의 판별이 어려워진다. 따라서 한우집단 중에 교잡우의 비율이 높으면 상대적으로 판별기술의 현장 실용화률은 떨어지리라 예상된다. 그런데 우리 나라 한우집단내에는 순수 한우만이 존재하는 것이 아니라 교잡우가 상당수 산재해 있으리라

추측된다. 왜냐하면 한때 한우개량을 육질보다는 육량에 중점을 두어 증체 효율이 우수한 샤로레 품종의 유전형질을 상당기간에 걸쳐 보급한 결과로 한우집단에는 외래 유전형질에 오염된 한우가 상당한 비율로 존재하리라 추정된다. 이러한 이유 때문에 많은 두수의 한우를 대상으로 판별검사를 실시함으로써, 판별기술의 실용성 정도를 사전 검증작업을 통하여 파악하게 된다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 한우육 판별의 실용성 검증

가. 전국 지역별 한우의 판별검사

한우 시료는 제주도를 제외한 경기, 강원, 충청, 전라, 경상도로부터 채취되어, 이들로부터 제놈 DNA를 분리, 정제하여 673두에 대한 DNA 분석을 실시하였다. DNA 시료를 증폭한 후 증폭산물중에서 표지유전자의 검출 유무를 살펴보면, 약 96%에 해당되는 644두에서는 표지유전자의 밴드가 검출되지 않았으며, 약 4%의 29두에서만 표지유전자가 관찰되었다.

이는 우리 나라 한우집단을 대상으로 한우판별기술을 적용했을 때 판별의 현장 신용도가 약 96%에 달하고 있음을 보여주는 것이다. 개발된 한우 판별기술의 현장 신용도가 약 96%라고 하는 것은 표지유전자 검출유무를 근거로 하였을 때, 우리 나라 한우집단의 유전적 동질성이 96%라고 해석할 수도 있겠다. 이 수치는 한우개량이 한때 10여년에 걸쳐 농가를 상대로 외래소 품종의 형질을 도입했던 사실에 비추어 볼 때 의외로 높은 수치라 생각되어 진다. 그 이유로서는 도입된 외래형질이 한우와의 거듭된 교배로 인해 많이 희석되었고, 교잡우라 하더라도 한우와 비한우의 두형태 중에서 어느 한쪽의 결과를 따르기 때문으로 생각된다.

*** 한우 및 비한우 육의 판별검사**

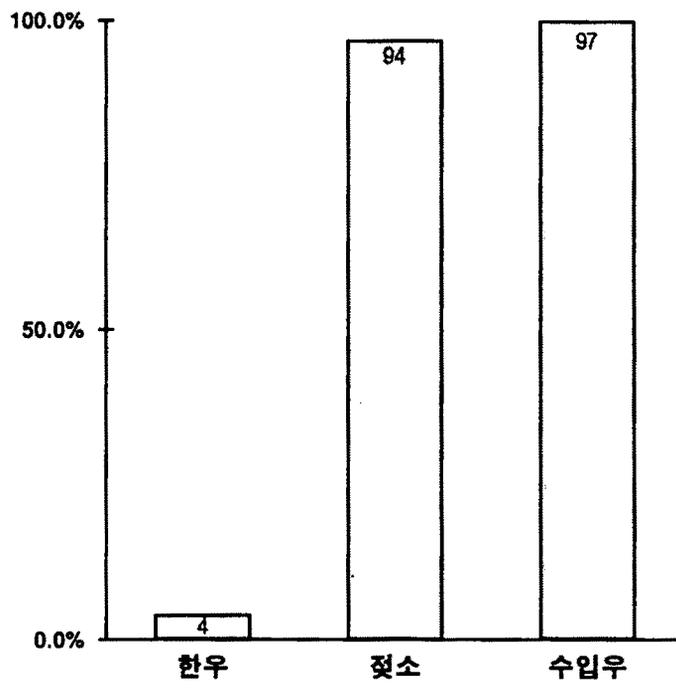
분석시료	개 체 수	표 지 유 전 자		비 율 (%)
		유	무	
한 우	673	29	644	96
국내젓소	141	133	8	94
수입쇠고기	115	112	11	97
계	928			

나. 국내 젓소 및 수입육의 판별검사

국내산 쇠고기의 절반 이상을 차지하고 있는 소의 품종은 그냥 젓소라고도 불리는 유용종인 홀스타인이다. 분석된 젓소 시료 141두 중에서 94%를 차지하는 133두에 DNA 밴드인 표지유전자가 검출되었고, 나머지 6%인 8두에서는 검출되지 않았다. 이 결과는 국내 젓소종에서 표지유전자가 검출될 확률이 94%에 달한다고 할 수 있다.

한편, 미국, 캐나다, 호주, 뉴질랜드로부터 수입되어온 쇠고기 시료를 채취하여 분석해 보면, 총 115개 시료중 97%에 해당하는 112개 시료에서 표지유전자가 검출되었고, 나머지 3개 시료에서는 검출되지 않았다. 이 결과는 수입육에 대해 쇠고기 판별기술의 신용도가 97%에 달하고 있음을 보여주는 것이다.

표지유전자의 검출비율



다. 한우 변이종 및 강화도 교잡우의 판별검사

취소는 일명 호랑이털 소로 불린다. 털 색이 황갈색 바탕에 머리에서 꼬리 끝까지 호랑이 털 무늬처럼 검정색 줄무늬가 산재되어 있다. 취소 10두를 대상으로 한우 판별검사를 실시하였다. 밴드의 검출양상은 한우와 서양소의 경우와 동일하였으나, 표지유전자의 검출비율은 한우와 서양소의 중간형태의 수치를 보였다. 즉 한우형태로서 표지유전자가 없는 것이 4두이며, 나머지 6두는 서양소 형태인 표지유전자를 지니고 있다. 이처럼 취소는 한우와 서양소의 중간형태를 갖고 있기 때문에 유전자원의 개발이란 측면에서 모색 특이성과 표지유전자의 검출 특성을 바탕으로 새로운 한우품종의 형성도 가능하리라 본다.

한편 한우와 사로레의 교잡우는 강화도에서 격리 사육되고 있으며, 이로부터 시료를 채취하여 표지유전자 분석을 실시하였다. 검사 개체수 23두에서 18두(78%)가 한우 형태를 보이며, 5두(22%)가 서양우 형태를 띠고 있었다. 이처럼 교잡우 형태의 검출비율이 서양우보다는 한우 형태 쪽으로 많이 치우쳐 나오는 것은 한우와의 2대, 3대 교잡에 영향을 받았을 가능성이 있겠다.

* 한우 취소 및 교잡우의 판별 검사

분석시료	검사개체수	표 지 유 전 자		비 율 (%)
		유	무	
취 소	10	6	4	40
교 잡 우	23	5	18	78
계	33			56

라. 쇠고기 판별의 블라인드 테스트(Blind test)

한우판별 DNA 진단기술이 실험실 수준에서 뿐만아니라 현장에서도 활용

가능하다는 것이 국내 한우집단을 대상으로 실시한 위의 실험 결과로부터 확인할 수 있었다. 또한 현장실험의 일환으로 blind test를 자체적으로 실시하였다. 연구팀은 시료 채취팀, 분석팀, 평가팀의 세 팀으로 나누어서, 시료내용과 결과내용을 평가팀에 각각 제출하여 결과를 비교 검토하였다. 한우육은 도축장에서 직접 채취하였으며, 수입육은 일반 식육점에서 구입하여 50점을 검사하였다. 그 결과는 약 천두를 대상으로 실시된 위의 결과와 유사한 범위(약 90%)에서 수입육과 한우육이 구별되었다.

2. 한우육 판별기술의 간소화 및 고도화

가. 쇠고기 시료의 DNA 추출법 개량

일반적으로 쇠고기로부터 DNA 추출은 액체질소에서 분말로 만들거나, 분쇄기(homogenizer)로 조직세포를 파쇄하여 실시되었다. 이 방법들은 많은 수의 시료를 동시에 반복적으로 처리해야 하는 실험에서는 많은 시간의 소요와 인력을 필요로 한다. 이러한 문제점을 액체질소나 분쇄기 사용을 피함으로써 추출시간을 약 12시간에서 약 3시간으로 단축하였다. 더욱이 적은 양의 쇠고기(약 10mg)로도 분석이 가능하도록 추출법을 개선하였다. 따라서 쇠고기 시료에서 분석결과를 얻기까지 기존에 2일이 소요되었으나, 추출법의 개량으로 1일 내에 분석을 끝마칠 수 있게 되었다.

쇠고기는 물론 소의 부산물인 꼬리, 사골, 내장에서도 DNA 추출법을 검토하였으며, 이들 DNA 공급원의 차이에 관계없이 쇠고기의 경우와 같이 동일한 판별결과를 얻을 수 있었다.

나. DNA 증폭 혼합액의 간소화

DNA 증폭 혼합액에는 시료의 제놈 DNA, 결합인자, 합성효소, 기질, 완충

액, 증류수의 성분을 첨가하여야 하며, 합성효소인 경우는 활성유지를 위해 냉동보관을 하여야 하고, 얼음 위에서 작업을 하여야 하기 때문에 이에 따른 시간 소요와 다단계 작업으로 인하여 실험에 오류를 범할 수 있는 확률이 높아진다. 따라서 위의 모든 성분이 포함된 한개 튜브에 시료 DNA만 첨가하면 분석되어 질 수 있도록 증폭 혼합액의 실험조건을 검토하여 실험 과정을 간소화시켰다. 이 과정은 많은 시료를 동시에 반복적으로 분석할 때에는 매우 중요한 과정이며, 실험의 오류를 가능한 배제하고 결과의 재현성과 신빙성을 높이는데 기여를 할 것이다.

다. DNA 증폭기의 판별분석에 미치는 영향

DNA 증폭시 특히 random primer를 가지고서 실험하는 경우에는 결과의 재현성을 위해 매우 세심한 주의가 요구된다. 그 이유는 분석법의 검출감도가 매우 높은 반면에, 미세한 주변 변화에 민감하게 반응하여 결과에 영향을 미칠수도 있기 때문이다. 검토사항의 하나로 온도조절장치인 DNA 증폭기를 종류별로 검토하였다. 일반적으로 사용되는 증폭기는 냉각 및 가열 장치의 방식에 따라 공랭식, 수랭식, 펜벨트식 등이 있으며, 어떤 방식의 기기를 사용하여도 분석결과는 동일하였다. 그러나 로버트식의 DNA 증폭기는 이 기기 특성에 적합한 실험조건을 새로이 설정할 필요가 있었다.

라. 표지유전자 검출감도의 향상

한우와 비한우를 식별하는데 사용되는 표지유전자의 밴드 검출감도를 높이고, 시료의 상태 및 실험조건에 따라 약하게 검출되는 밴드의 감도를 높이기 위하여 2단계 증폭방법이 이용되었다. 그 결과 비한우에 있어서 표지유전자의 밴드는 1단계 DNA 증폭 결과보다도 더욱 명료하고 진하게 검출되었으며, 한우에는 이에 해당되는 DNA 밴드가 관찰되지 않았다. 이렇게 밴드검출이 매우 흐릴 때에 2단계 증폭방법은 뛰어난 효과를 발휘하였다. 2단계 DNA 증폭방법을 통하여 1단계 DNA 증폭에서 검출된 주요한(major) 밴

드들은 한우 및 비한우 양쪽 모두에서 관찰되었을 뿐만아니라, 1단계 증폭 처리에서는 불연속적이고 흐리게 검출되거나 미검출된 밴드들(minors)도 2 단계 증폭처리로 관찰되었다.

마. DNA 결합인자의 부분개조 및 결합능 분석

한우 판별용 DNA 결합인자인 primer의 특이적 결합능력을 높이고, 한우 판별에 불필요한 DNA 밴드들의 검출을 억제하기 위하여 길이가 19mer인 primer의 염기서열을 일부 다른 염기로 변경하여 그 결합능을 검토하였다. 임의의 한 염기를 G+C 함량이 낮아지는 쪽으로 다른 염기로 치환하는 방식으로 10 종류의 primer를 제작하여 각각의 결합능을 기존의 primer와 비교 분석하였다. 그 결과 새로 제작된 primer는 종래의 것보다 표지유전자의 검출감도를 높이거나 불필요한 검출 밴드수를 줄이는데 큰 영향을 미치지 못하였다. 현재 사용중인 DNA 결합인자가 지금의 실험조건하에서는 최적의 결합능력을 나타내었다.

바. 표지유전자와 제놈 DNA와의 결합특성 분석

한우 판별용 표지유전자의 특성을 분석함으로써 매우 중요한 사실 하나를 발견하게 되었다. 표지유전자는 한우에서 검출되지 않았는데 이는 증폭된 표지유전자에 해당되는 DNA가 한우의 제놈 DNA내에 존재하지 않다는 것을 의미하는 것은 아니라는 사실이다. 한우에도 비한우처럼 제놈 DNA내에 증폭된 표지유전자와 동일하거나 유사한 염기서열을 가지고 있다는 것이 밝혀졌다. 증폭과정에 있어서 표지유전자가 검출이 되고 안되는 이유는 단지 제놈 DNA에 대한 DNA 결합인자의 결합능력에 차이가 있기 때문에 발생된다는 사실이 여러 각도의 실험을 통하여 확인되었다.

표지유전자인 DNA 단편을 probe로 하여 한우와 비한우의 제놈 DNA와 Southern hybridization을 실시하였다. 즉, DNA probe는 비한우의 PCR 증폭산물을 agarose gel에서 전기영동 후 표지유전자 DNA을 gel로 부터 추출

하여 방사성 물질로 표지하여 준비되었다. Template DNA로서 한우와 비한우의 제놈 DNA는 전기영동 후에 gel 상의 DNA를 filter로 옮겨서 표지유전자 probe와 hybridization을 실시하였다. 그 결과 표지유전자는 두 그룹의 제놈 DNA와 결합하였으며, 그 결합양상도 유사하였다. 결합양상은 뚜렷한 밴드형태가 아닌 불연속적인 밴드 형태로서 관찰되었으며, 이는 표지유전자 DNA가 제놈 DNA 상에 널리 흩어져 존재하고 있음을 시사하는 것이다. 이처럼 DNA 표지유전자에 해당되는 부분이 한우와 비한우의 제놈 DNA에 존재함에도 불구하고, 표지유전자가 비한우에서만 검출되는 이유는 primer 결합인자가 결합하는 제놈 DNA의 염기서열에 있어서 두 그룹간에 차이가 있기 때문이다. 위의 결과로부터 표지유전자는 비한우는 물론 한우의 제놈 DNA 내에도 존재한다는 것이 밝혀졌다.

사. 표지유전자의 염기서열 분석

비한우의 표지유전자를 분리해서 DNA 염기서열을 전부 결정하였다. 염기서열의 길이는 1435bp이었으며, 염기조성은 A가 29%, C가 20%, G가 23%, T가 26%로 G+C 함량은 43%이었다.

표지유전자의 염기서열은 단백질을 coding하는 구조유전자의 특징인 정상적인 ORF(open reading frame) 구조를 가지고 있지 않았으며, 기존에 보고된 염기서열과 비교 분석해 보면 반복 염기서열과 높은 상동성을 보였다. 소에서 보고된 SINE sequence(560bp)와는 78%, PstI family repetitive sequence(506bp)와는 80%, microsatellite(373bp)와는 55% 그리고 interspersed repetitive DNA(387bp)와는 63%의 상동성을 보였다. 이처럼 소의 제놈 DNA에 존재하는 반복 염기서열과 상동성이 높다는 사실은 표지유전자가 제놈 DNA내에 여러개 존재한다는 위의 Southern 결과와 잘 일치한다.

앞으로 한우에서도 비한우의 표지유전자에 해당하는 DNA 단편을 분리하여 구조차이가 규명되어진다면 지금과는 전혀 다른 새로운 형태의 판별기

술도 개발이 가능할 것이다. 현재의 판별기술로도 한우육과 비한우육을 구별하는데 별 어려움은 없지만, 표지유전자 판별에 불필요한 밴드들의 검출을 제거할 수 있다면 판독을 매우 단순화시킬 수 있을 것이다.

3. 기술지도 및 교육

개발된 한우판별기법은 공식력있는 전문기관을 통해서도 그 실용 가능성이 높다고 평가되어 국립농산물 검사소 및 국립환경 보건원에서도 과학적인 한우육 판별 검사법을 도입하고자 준비중에 있다. 본 연구팀은 그 동안 위 기관을 대상으로 교육과 기술훈련을 여러 차례에 걸쳐 실시하였고 한국 소비자 보호원에도 기술을 전수하였다.

기술지도 및 교육실시 실적

기 관	연구원	기 간	내 용
한국소비자보호원	홍준배	1997. 4.8 - 4.10 9.22 - 10.11	- DNA 조작의 기본이론및 실습 - 쇠고기 제놈DNA 추출기술 습득
서울시국립보건 환경원	정지현	1997. 3.11 - 3.12	- DNA 증폭기술 - 쇠고기 판별 실습
국립농산물검사소	이상근	1996, 1997	

4. 활용방안에 대한 건의

DNA 진단에 의한 한우판별기술이 실용성이 있다는 것을 폭넓은 현장실험과 자체적인 Blind test를 통해서도 검증되었다. 또한 현장실험을 거치면서 야기될 수 있는 여러 문제점들도 파악되었고 그 해결책도 제시되었다. 지금까지는 한우육의 객관적 식별이 불가능하였지만 DNA 진단에 의해 한우

와 비한우와의 구별을 과학적으로 판별할 수 있게 되었다. 이러한 판별기술 개발은 우리 고유의 식육자원인 한우를 대상으로 개발되어진 우리 나라 독창적인 연구결과라 할 수 있다.

앞으로 한우판별기술이 한우육의 차별화와 밀접히 연계된다면 축산농가와 소비자의 보호는 물론 한우산업의 경쟁력을 높이는 데에 큰 비중을 담당하리라 기대된다.

가. 한우육 판별에 DNA 검사제도(DNA Inspection System) 도입

한우고기의 품질인증제도 및 전문판매점에 위의 검사제도를 적용함으로써 한우육 차별화의 촉진과 축산농가 보호 및 소비자의 불신감을 해소하는데도 큰 도움이 되리라 생각된다. 또한 백화점이나 전문매장에서 자체적으로 한우육 상품에 “DNA 검사필”이라는 제도를 도입하는 것도 소비자의 신뢰 회복과 불신감 해소는 물론 상품가치를 높이는데 기여할 것이다.

나. 한우의 혈통보존에 활용

일차적으로 후보 및 보증 종모우 선발에 적용하고, 점차 확대하여 한우 등록시에도 DNA 검사를 실시한다. 이렇게 함으로써 표현형으로 드러나지 않는 바람직하지 않은 외래 형질의 확산방지와 제거에 효과를 발휘할 수 있을 것이다.

다. 쇠고기 판별기술 실용화 기법의 시술방식

현재 식품분석 검사항목 중에는 액상시료의 일부 성분분석(pH, 수분, 당도 등의 측정)을 제외하고는 소비자들이 즉석에서 성분을 분석할 수 있는 방법은 없으며, 첨단기술일수록 분석기관에서 여러 실험절차를 거쳐야만 확실한 결과를 얻을 수 있는 것이다. 따라서 소비자들이 즉석에서 한우육을 확인할 수 있는 기술개발의 요구나 기대는 판별기술의 성격상 그리고 현재의 과학기술수준을 초월하는 비현실적인 것으로 사료된다.

SUMMARY

Studies of the identification of Hanwoo meat by DNA analysis

These studies were deal with the development of breed-specific DNA marker which is able to identify Hanwoo and Non-Hanwoo meat, the optimization of amplification condition for the detection of DNA marker and the characterization of the nature of DNA marker.

1. Identification of Hanwoo and Non-Hanwoo cattles by DNA marker

Genetic differentiation between Korean cattle(Hanwoo) and European cattle breed(Non-Hanwoo) was examined by Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD) analysis. Less than 10 polymorphic band were detected and the size of PCR product was between 0.5Kbp and 2.0Kbp. The RAPD patterns were identical among Non-Hanwoo, such as Holstein, Hereford, Angus, Brounswiss, Limousin or Simmental, but the above pattern was different from that of Hanwoo. All bands detected in the Hanwoo samples were observed in Non-Hanwoo cattle samples, but one of the common bands found in samples was not detected in the Hanwoo samples. This band was independent of sex and individuals. This RAPD patterns among several cattle breeds were alike to be clustered into two distinct groups, Hanwoo and Non-Hanwoo, by the absence and presence of one band. This band was 1.4Kbp long. The band may be useful as a marker for identifying a meat of Hanwoo from imported cattle meat.

Actually, the detection of the DNA marker(1.4Kbp) was tested by DNA analysis with 929 samples which were prepared from bloods of 673 Hanwoo cattles and 141 Holstein cattles, from 115 imported cattle meats. The DNA marker was absent in 644 of 673 Hanwoo cattles (96%) but present in 245 of 256 Non-Hanwoo cattles (95%). These results show that the DNA marker is effective to characterize Hanwoo and Non-Hanwoo meat by its detection. This kind of DNA marker, however,

was not useful in detecting unwanted crossbreeding between two cattle breeds, because the band pattern in hybrid cattle shows one of two band patterns in Hanwoo and Non-Hanwoo.

2. Parameters affecting Polymerase Chain Reaction(PCR) in the detection of the breed-specific DNA marker

There were several reports that RAPD markers have extreme sensitivity to amplification conditions and poor reproducibility. The effects of several parameters on PCR amplification in the detection of the 1.4Kbp DNA marker were examined. The PCR program commonly used for RAPD analysis with 19-mer included a 30 sec template denaturing step at 95°C, a 60sec primer annealing step at 36°C and a 90 sec primer extension step at 72°C. Usually, 35 cycles of the three steps were run to detect the DNA marker.

Using small amount(50ng) of genomic DNA on amplification, clearer DNA bands were detected. The higher concentration of the genomic DNA showed a non-discrete size range of amplification.

When the effects of different annealing temperatures(35, 38, 41, 44, or 47°C) on amplification were determined, band patterns were not changed until 41°C. Higher temperature above 44°C prevented DNA amplification.

Different annealing times (60, 90 or 120 sec) gave different band patterns. A longer extension time was required for the longer size of DNA bands and 60 sec was sufficient for the detection of the 1.4Kbp DNA marker.

The re-amplification technique was used for the improvement of band intensity. A 1 μ l aliquot of 1st PCR products was added to a reaction mixture and was re-amplified. No differences in band patterns were found between 1st- and 2nd-PCR products. Several primers with higher G+C content by single base changes were examined to determine the effect in the detection of the 1.4Kbp DNA marker. The change of G+C content produced PCR product, but not the 1.4Kbp marker band.

3. Characterization of the breed-specific DNA marker.

The band intensity of the breed-specific DNA marker would be necessary to be improved. For example, the 1.4Kbp marker band was detected with several bands of different sizes which disturbed the comparison of band pattern between Hanwoo and Non-Hanwoo samples. So it is necessary to be removed these noisy bands, the breed-specific DNA fragment isolated from the gel of marker band was cloned in the pUC 119 vector and the cloned 1.4Kbp product was used as probe to hybridize with restriction enzyme-digested genomic DNA from Hanwoo or Non-Hanwoo samples. Smear bands were detected in both Hanwoo and Non-Hanwoo samples, and hybridization patterns were similar between two samples. This shows that homologous sequences with the 1.4Kbp DNA marker is widely dispersed in Hanwoo as well as Non-Hanwoo. In order to examine further the nature of the DNA marker, the cloned fragment was sequenced and its size was 1435bp long.

The marker sequence reveals homology with bovine microsatellite, alu-like sequence or SINE sequence. This suggests that the binding region of the 1.4Kb DNA marker is positioned in a repetitive DNA element widely dispersed in genomic DNA. Thus, the detection of the breed-specific DNA marker may be due to the difference of the primer oligonucleotide binding with genomic DNA and not be relative with the region of the DNA marker.

Thus the results shows that the region of DNA marker was present in genomic DNA of Hanwoo and Non-Hanwoo. Further studies are required to clone and sequence the DNA fragment in Hanwoo corresponding to the DNA marker detected in Non-Hanwoo sample. This approach may be contributable to make a single band which is a DNA marker.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	20
Chapter 2. Development of breed-specific DNA marker for the identification of Hanwoo meat	25
1. Introduction	25
2. Experimental methods	27
3. Results and discussion	29
4. Summary	60
Chapter 3. Improvement of RAPD techniques for the detection of breed-specific DNA marker	62
1. Introduction	62
2. Experimental methods	63
3. Results and discussion	65
4. Summary	72
Chapter 4. Characterization of the breed-specific DNA marker	75
1. Introduction	75
2. Experimental methods	76
3. Results and discussion	78
4. Summary	90
Chapter 5. Conclusion	92
Chapter 6. Effective use of the developed DNA diagnostics	98
Chapter 7. References	101

목 차

제 1 장 서론	20
제 2 장 한우육 판별기술의 실용성 검증	25
제 1 절 서 설	25
제 2 절 실험방법	27
제 3 절 결과 및 고찰	29
제 4 절 요약	60
제 3 장 한우육 판별기술의 간소화 연구	62
제 1 절 서 설	62
제 2 절 실험방법	63
제 3 절 결과 및 고찰	65
제 4 절 요약	72
제 4 장 한우 판별기술의 고도화 연구	75
제 1 절 서 설	75
제 2 절 실험방법	76
제 3 절 결과 및 고찰	78
제 4 절 요약	90
제 5 장 종합 결론	92
제 6 장 연구성과의 활용계획	98
제 7 장 참고문헌	101

제 1 장 서 론

1. 쇠고기의 시장개방과 한우산업

국내 쇠고기 시장은 1993년 UR 협상의 타결로 외국산 수입육이 국내시장에 진출한 이래 매년 그 반입 물량이 늘어나는 추세다. 현재 쇠고기 자급율은 40%까지 떨어질 때도 있으며, 앞으로 쇠고기 수입을 전면 개방해야 하는 2001년에는 더욱 낮아지리라 예상된다. 이는 수입육이 한우육보다 3-4배나 값싸게 들어오기 때문에 (1995년 1월 기준으로 미국과 호주 소값은 한우값의 약 23%와 약 14% 수준에 불과함) 가격면에서는 경쟁이 어렵기 때문이다. 이는 생산비 절감만으로는 한우산업의 경쟁력을 갖추기에는 한계가 있음을 보여주는 것이다.

한편 국민소득 증대와 더불어 식생활 양식의 변화로 소비자들은 질적으로 우수한 고품질 쇠고기를 선호하는 경향을 보이고 있기 때문에, 경쟁력 강화를 위해서는 생산성 향상과 더불어 고품질의 쇠고기 생산을 유도하면서 수입육과의 차별화를 무엇보다도 우선적으로 정착시키는 것이 매우 중요하고 시급한 문제로 인식되고 있다.

2. 한우육의 차별화와 경쟁력 강화

현재 한우육이 수입육보다 보다 높게 형성된 국민의 선호도를 한우라는 상표의 가치성과 더욱 밀접히 연계시킴으로서 한우육의 소비자 계층을 확고히 확보할 필요가 있다. 그러나 소비자들은 쇠고기 유통과정에서 값싼 수입육과 국내산 젓소육이 고가의 한우육으로 둔갑될 가능성에 대해 매우 높은 불신감을 가지고 있는 것으로 나타나고 있다. 부정 한우육에 대한 이야기는 매년 명절이 다가오면 매스컴의 단골메뉴로 빠짐없이 등장하고 있다.

실제로 소비자를 대상으로 한 설문조사(1994년)에서 조사대상의 80% 이상이 수입육이 한우육으로 둔갑되어 판매될 가능성이 있다고 응답하였고, 한우품질만 보장된다면 가격이 비싸더라도 한우육을 구입하겠다고 조사 대상자의 대부분은 밝히고 있다. 유통업과 식육업 종사자들의 견해를 들어보더라도 각각 57%와 26%가 수

입최고기가 한우육으로 둔갑 판매하고 있다고 대답하고 있다. 가짜 한우육이라는 용어는 한우육에 대한 신뢰를 떨어 뜨려 소비자에 절대적인 영향을 미치고 있음을 잘 알 수 있다.

이처럼 한우산업의 국내 경쟁력을 약화시키는 가장 큰 요인 중의 하나는 무엇보다 한우육에 대한 소비자의 불신감이며, 품질보증의 문제해결이 가장 시급한 것으로 드러났다. 한우육 둔갑 가능성에 대한 소비자 불신감이 높다고 한다면 행정당국에서 적극 추진하고 있는 한우 차별화 및 시행중인 쇠고기의 산지표시 정책이 제대로 정착되기 어렵고 오히려 수입육을 더욱 선호하는 결과를 초래할 수도 있겠다.

3. 한우육의 품질보증과 판별기술의 개발

한우육의 품질보증은 공신력이 있는 기관에서의 인증과 지속적인 쇠고기의 유통 단속도 필요하겠지만, 한우육을 수입육과 젓소육으로부터 판별할 수 있는 과학적인 판별기술이 뒷받침될 때 비로소 소비자들의 한우육에 대한 신뢰감의 회복과 불신감의 해소가 이루어질 수 있을 것이다. 현재 쇠고기의 정육형태에서 소의 품종간 구별은 외국에서도 과학적인 분석법이 개발되어 있지 않다.

부정 한우육이 사육농가나 소비자들에 미치는 영향이 매우 큼에 비추어 한우육 식별에 대한 학술적인 연구가 국내에서는 꽤 오래 전부터 실시되었고, 이에 대한 학술 보고들이 발표되고는 있으나, 실험실 단계를 넘어서서 실용화 기술로 활용되고 있다는 보고는 아직 없는 실정에 있다. 이렇게 수입육이나 젓소육이 한우육으로 둔갑되더라도 이를 판별할 과학적 분석법이 국내외적으로 없었으나, 본 연구팀에 의해 첨단기법의 하나인 DNA 분석법으로 한우육 판별이 가능하다는 것을 보고하였다. 이 판별기술은 실험실 단계에서만 아니라 실용화 기술로서도 활용될 수 있음을 이번 현장어로 기술개발사업을 통하여 입증하였다.

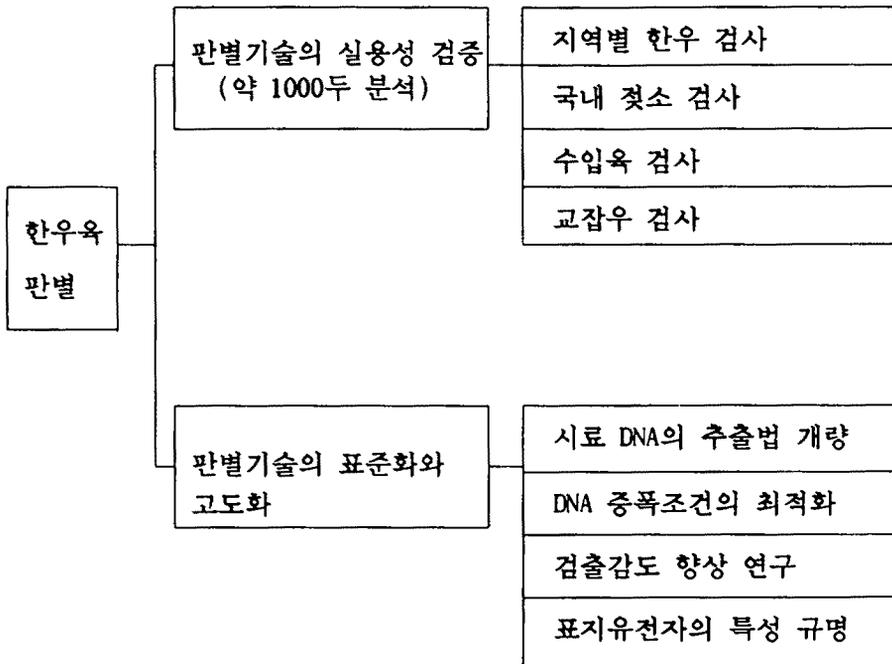
제 1 절 연구개발의 내용 및 필요성

본 연구는 우리 나라 한우집단이 모두 순수 품종이 아닌 상황아래서 실험실 규모의 소량의 두수를 대상으로 개발되어진 한우판별기술이 현장에서 활용될 수 있는지를 검토하기 위하여 전국의 한우를 대상으로 분석해 봄으로써 판별기술의 실용성 정도를 검증하고자 하였다.

또한 많은 시료를 분석하는 과정에서 야기될 수 있는 문제점들을 파악하였고, 개선되어야 할 사항에 대해서는 해결책을 모색하면서 판별기술의 간소화 및 표준화를 검토하였다. 또한 이 실용화 기술을 희망하는 국가기관이나 단체에 이론교육 및 기술지도를 실시하여 판별기술을 보급하였다. 한편 한우와 비한우 사이에 차이가 나는 원인을 규명하고자 관련된 기초연구도 아울러 실시하였다.

실험실 단계에서 개발된 한우 판별기술은 곧바로 현장에 적용할 수 없는 데, 그 이유는 우리 나라 한우집단의 특수성에 기인한다. 한우 판별기술은 하나의 표지유전자가 밴드 형태로서 한우에는 관찰되지 않았으나 국내 젖소 및 수입육의 비한우에서는 검출된다는 사실에 의존한다. 이 판별기술은 혈통이 순수하다고 여겨지는 한우와 서양소 품종을 대상으로 개발되었기 때문에 두 품종간의 교잡인 경우에는 그 품종의 판별이 어려워진다. 따라서 한우집단 중에 교잡우의 비율이 높으면 상대적으로 판별기술의 현장 실용화률은 떨어지리라 예상된다. 그런데 우리 나라 한우 집단내에는 순수 한우만이 존재하는 것이 아니라 교잡우가 상당수 산재해 있으리라 추측된다. 왜냐하면 한때 한우개량을 육질보다는 육량에 중점을 두어 증체효율이 우수한 샤로레 품종의 유전형질을 상당기간에 걸쳐 보급한 결과로 한우집단에는 외래 유전형질에 오염된 한우가 상당한 비율로 존재하리라 추정되 기때문이다. 이러한 이유 때문에 많은 두수의 한우를 대상으로 판별검사를 실시함으로써, 판별기술의 실용성 정도는 현장 검사를 통하여 확인되어야 하겠다. 또한 판별기술이 현장에 적합한 기술로 다듬어지기 위해서도 판별

기법의 표준화와 고도화도 아울러 검토되어야 할 것이다.



제 2 절 연구 내용의 범위

1. 한우육 판별기술의 실용성 검증

- 공시품종 및 두수 : 소 1000두
- 한우와 서양소 품종의 DNA 다형성 분석
- 전국지역별 한우의 판별검사
- 수입쇠고기의 판별검사
- 한우 변이종 및 교잡우의 판별검사

2. 한우육 판별의 간소화 기술개발

- 시료 DNA의 추출법 간소화
- 판별용 표지유전자의 검출 최적화
- 증폭 혼합액의 간소화 및 증폭기 검토
- DNA 결합인자의 부분개조 및 결합능 분석

3. 한우육 판별의 고도화 기술개발

- 표지유전자 검출감도의 향상 연구
- 표지유전자의 클로닝
- 표지유전자와 제놈 DNA와의 결합특성 분석
- 표지유전자의 구조 결정 및 이용성 검토

제 2 장 한우육 판별기술의 실용성 검증

제 1 절 서 설

식품산업의 발달과 시장 개방화로 외국산 농축산물과 그 가공제품들이 국내시장에 많이 유통되고 있으며, 그 차지하는 비율도 점차 늘어가고 있다. 특히 식육 중에서 쇠고기는 국내 소비량의 절반 이상이 수입에 의존하고 있고, 그 비율은 앞으로 더욱 높아지리라 예상되기 때문에 수입쇠고기 와 한우고기를 식별해야할 경우가 있다.

식육의 판별검사를 위한 방법들로는 외관 및 현미경 관찰에 의한 형태적 방법, 면역학적 방법, 아미노산이나 지방산의 분석 및 단백질의 전기영동 법에 의한 이화학적 방법 그리고 DNA 분석법이 있다. 육종감별에 관한 연구는 오래 전부터 실시되어 왔으며, 실제로 위의 방법들을 이용하여 육종 간의 구별이 가능하다. 그러나, 동일한 축종내에서 품종간의 육판별이 외관 관찰법이나 단백질의 전기영동법으로 판별할 수 있다는 보고는 아직 없다. 단백질은 같은 개체라 하더라도 육의 성분이나 조성이 부위에 따라 다를 수 있고, 성장단계나 발육상태에 따라 같지 않다. 따라서 단백질로 품종간을 구별하기 위해서는 부위별이나 주위환경에 영향을 받지 않으면서도 품종 특이적으로 발현되는 단백질을 찾아야 만이 가능하겠으나 그 가능성은 극히 미약하다고 볼 수 있다.

제논 DNA는 개체간에 차이가 날 정도로 DNA 변이가 다양하지만 같은 개체내에서는 부위와 상관없이 동일하다는 특징이 있다. DNA 변이차이를 이용하여 동일 축종내에 품종간 구별이나 더 나아가 같은 품종내에서도 우수 경제형질에 관련된 DNA 표지인자를 개발하고자 하는 연구가 최근에 많은 주목을 받고 있다. DNA 분석방법으로서 제한효소 절단법, hybridization 법, 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)이 있으며, 이들 기술은 필요에 따라 한가지 혹은 두가지 이상 혼합하여 사용되고 있다.

이 중에서 PCR법에 의한 DNA 증폭기술의 개발은 생명과학의 기초분야는 물론 응용분야인 농학, 의학, 식품학 등에도 매우 폭넓게 활용되고 있으며, 실제로 질병진단, 친자나 개체 식별, 성감별과 같은 유전자의 진단 및 분석에 이용되고 있다. PCR 기술의 핵심은 적은 양의 DNA를 가지고 단시간 내에 수십억배로 증폭할 수 있다는데 있다.

최근 DNA 분석법을 도입하여 소 품종간에 특이적으로 검출되는 DNA 표지 인자를 개발하여, 한우육을 서양소 유래의 쇠고기와 식별하는 데에 이용이 가능하다는 것을 보고하였다. 위의 보고에서 제놈 DNA를 제한효소로 절단하여 검출되는 밴드 양상만으로는 소 품종간에 차이를 볼 수 없었으나, PCR법에 기초를 둔 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)법으로 한우와 서양소 품종간에 밴드 검출에 차이가 나는 DNA 표지유전자를 검출하였다. 이 판별기술은 하나의 표지유전자가 밴드 형태로서 한우에는 관찰되지 않았으나, 국내 젓소 및 수입쇠고기의 서양 품종의 소에서는 검출된다는 사실에 의존한다. 이 판별기술은 혈통이 순수하다고 여겨지는 한우와 서양소 품종을 대상으로 개발되어졌기 때문에 두 품종간의 교잡인 경우에는 교잡우로서의 판별이 불가능하다. 따라서 한우집단 중에 교잡우의 비율이 높으면 상대적으로 판별기술의 현장 실용화율은 떨어지리라 예상된다.

이러한 이유 때문에 많은 두수의 한우를 대상으로 한우 판별검사를 실시함으로써 비로소 판별기술이 현장에서 사용 가능한지를 검토하였다. 마찬가지로 수입쇠고기와 국내 사육두수의 절반이나 차지하는 젓소고기와 수입쇠고기에 대해서도 충분한 검토를 실시하였다.

제 2 절 실험방법

1. 제놈 DNA 분석용 시료

제놈 DNA 분석을 위한 공시재료로는 실험 성격에 따라 소의 혈액 및 쇠고기를 사용하였다. 한우 시료는 제주도를 제외한 전국 도별로 그리고 후보 및 보증종모우를 보유하고 있는 한우개량사업소 및 축산기술연구소 고령지 지소 등에서 수집되었다. 서양소 품종의 시료로는 국내 젖소인 홀스타인과 국내 실험용으로 사육되고 있는 샤로레, 헤어포드, 잉거스, 리무진, 심멘탈, 브라운스위스로부터 혈액을 채취하였으며 품종 표시가 없는 수입 쇠고기로부터 조직을 채취하였다. 또한 한우 변이종으로 칩소와 강화도에 격리 사육중인 한우 교잡종의 시료도 수집되었다.

2. 제놈 DNA 추출

혈액과 고기로 부터의 제놈 DNA 추출은 Blin과 Scaffold 방법에 준하여 실시되었다. 채취된 혈액은 1300g에서 15분간 원심하여 분리된 백혈구(buffy coat)층을 채취하여 추출용액(10mM Tris-Cl, 0.1M EDTA, 20ug/ml pancreatic RNase, 0.5% SDS)을 첨가하여 37℃에서 1시간 배양하였다. 고기인 경우에는 그 단편들을 액체 질소내에서 분말로 분쇄한 뒤에 10배의 추출용액을 첨가하여 37℃에서 1시간 배양하였다. 배양후 proteinase K(100ug/ml)를 첨가하고 50℃에서 3시간 처리하였다. 같은 양의 phenol 용액을 첨가하여 10분간 가볍게 흔들어 주면서 변성된 단백질을 제거한 뒤에 ethanol을 첨가하여 제놈 DNA를 침전시켰다.

DNA 순도는 흡광도 A_{260} 과 A_{280} 의 비율로 측정하였으며, 그 비율은 1.7 이상이었다. 또한 추출된 제놈 DNA가 거대 분자량임을 0.8% agarose gel 전

기영동에 의해 확인하였다.

3. 한우판별용 primer의 합성

Oligonucleotide는 DNA 합성기(Applied Biosystems, Inc.)로 phosphoramidate 화학법에 의해 합성되었다. 합성된 시료는 30% ammonium hydroxide로 55℃ 에서 12 시간 처리하고나서 건조 후, 증류수에 녹여 primer로 사용되었다.

4. 제놈 DNA의 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) 분석

증폭반응액 50 μ l 에는 100mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM 0.001% gelatin, 100 μ M 씩의 dATP, dCTP, dGTP와 dTTP, 0.2 μ M primer, 여러 농도의 제놈 DNA와 1 unit의 *Taq* DNA polymerase가 포함되었다. DNA 반응은 특별한 언급이 없는 한 95℃, 36℃ 그리고 72℃에서 각 30초, 60초 그리고 90초씩 35사이클로 프로그램하여 실시되었다.

DNA 증폭산물을 재증폭할 경우에는 제놈 DNA를 제외한 50 μ l의 반응액에 1차 증폭산물을 1 μ l 넣고 위와 동일한 반응조건하에서 증폭을 실시하였다. RAPD 밴드양상에 영향을 미치는 PCR 반응조건의 요인들을 조사할 때에는, 제놈 DNA양은 50, 100, 200 혹은 400ng을 사용하였다. 부착온도의 경우에는 35, 38, 41, 44 혹은 47℃에서, 부착시간의 경우에는 60, 90 혹은 120 초에서 실시되었다. 증폭산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동 후, ethidium bromide로 염색하여 검출하였다. DNA size marker로는 1kb ladder(Gibco BRL)를 사용하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 한우와 서양소 품종의 유전적 다형성 분석

한우와 홀스타인 품종의 혈액에서 추출한 제놈 DNA의 다형성을 RAPD법에 의해 비교 분석한 결과는 Fig.1과 같다. 우리 나라의 젖소는 모두 홀스타인 품종이며, 사육두수도 한우와 거의 비슷하다. DNA 증폭산물 중에서 명료하게 검출되는 밴드 수는 agarose gel의 해상도 상태나 증폭조건 차이에 따라서 변할 수 있겠으나, 약 10개 미만으로, 그 크기는 주로 500bp에서 2kbp사이에 골고루 분포되어 있었다.

한우에서 검출되는 주된 밴드들과 같은 크기의 것들이 홀스타인에서도 대부분 관찰되었다. 그러나 홀스타인에서 검출되는 주된 밴드들 중에는 한우에서 관찰되지 않는 밴드가 있는데, 그 길이는 약 1.4kbp이었다. 이처럼 한우에서는 검출되지 않고 유용종인 홀스타인에서 관찰되는 DNA 단편이 육용종인 헤어포드와 앵거스를 비롯하여 샤로레, 리무진, 심멘탈 그리고 브라운스위스 등 국내에서 수집이 가능한 모든 서양소 품종의 시료들도 분석되었다(표 3). 한우에서 검출되지 않았고 홀스타인에서만 검출되었던 DNA 단편과 같은 이동도를 갖는 밴드가 조사된 모든 서양소에서 검출되었다.

이처럼 DNA 단편의 크기가 약 1.4kbp인 밴드는 한우를 제외한 여러 서양소 품종에 공통적으로 검출되기에 한우 판별을 위한 DNA 표지인자로 이용 가능하다는 것을 실험실 수준에서 재확인할 수 있었다.



Fig. 1. Comparison of RAPD patterns between Hanwoo and Holstein cattles. M, DNA size marker; lane 1, Hanwoo sample; lane 2, Holstein sample.

2. 전국 지역별 한우의 판별검사

한우 시료는 제주도를 제외한 전국 도별 경기도(94두), 강원도(3두), 충청도(88두), 전라도(112두), 경상도(114두)와 한우개량사업소(191두), 고령지시험장(156두) 및 축산기술연구소(30두)로부터 모색이 황갈색인 한우 788여두로부터 시료를 채취하였다. 이들 시료로부터 제놈 DNA를 분리, 정제하여 DNA 분석을 실시하였다(표 1).

DNA 시료에 결합인자인 primer를 첨가하여 증폭반응을 실시해보면 700여 두 중에서 96%를 차지하는 673두에서 증폭산물인 밴드들이 관찰되었다. 나머지 4%에 해당하는 37두에서는 DNA 밴드들이 전혀 관찰되지 않았는데, 이 원인 규명을 위해서는 검출반응 조건에 대하여 좀더 검토할 필요가 있겠다(표 2). 밴드들이 검출된 673두 중에서 판별에 이용되는 표지유전자의 검출유무를 살펴보면 약 96%에 해당되는 644두에서 표지유전자에 해당되는 밴드가 검출되지 않았으며, 약 4%의 29두에서만 표지유전자가 관찰되었다(Fig. 2-26). 이는 한우판별기술의 현장 신용도는 약 96%에 달한다고 할 수 있다. 한우 판별기술의 현장 신용도가 약 96%라고 하는 것은 표지유전자 검출유무를 근거로 하였을 때 우리나라 한우 집단의 유전적 동질성이 96%라고 해석할 수도 있겠다. 이 수치는 한우개량이 10여년에 걸쳐 농가를 상대로 외래소 품종의 형질을 도입했던 사실에 비추어 볼 때 의외로 높은 수치라 생각되어 진다.

그 이유로서 다음과 같은 요인들을 생각해 볼 수 있겠다. 첫째로 도입된 외래 유전형질이 한우와의 거둬진 교배로 인해 많이 희석되었고, 둘째로 한우 판별기술이 교잡우인 경우에도 표지유전자가 한우이거나 비한우라는 두형태중 한쪽을 따르며, 중간형태가 없다는 것이 기대치보다 높은 수치를 가져다준 요인이라 하겠다.

표 1. 전국 지역별 한우시료

한우 사육지역	시료두수
축산기술연구소(수원)	30
고령지시험장	156
한우개량사업소	191
경 기	94
충 북	55
충 남	33
전 북	64
전 남	48
경 북	22
경 남	92
강 원	3
총두수	788

표 2. 한우의 판별검사(단위: 두)

검 사 두 수	밴 드 검 출 두 수	표 지 유 전 자		비 율 (%)
		유	무	
700	673	29	644	95.7

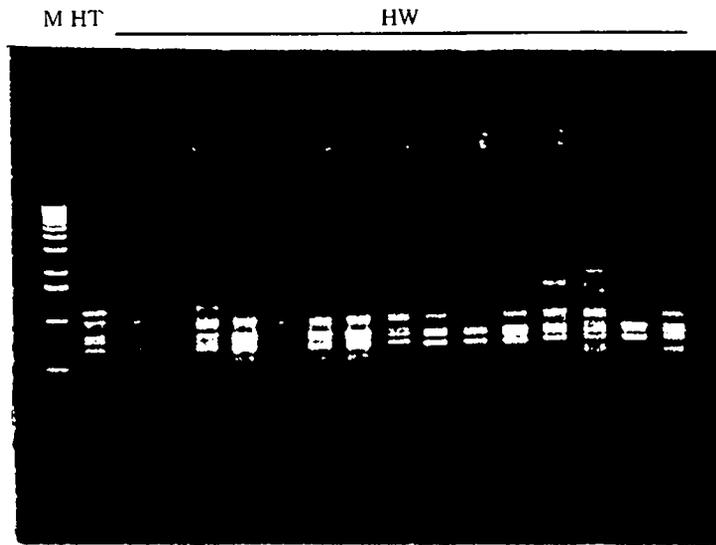


Fig. 2. RAPD patterns in Hanwoo samples.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

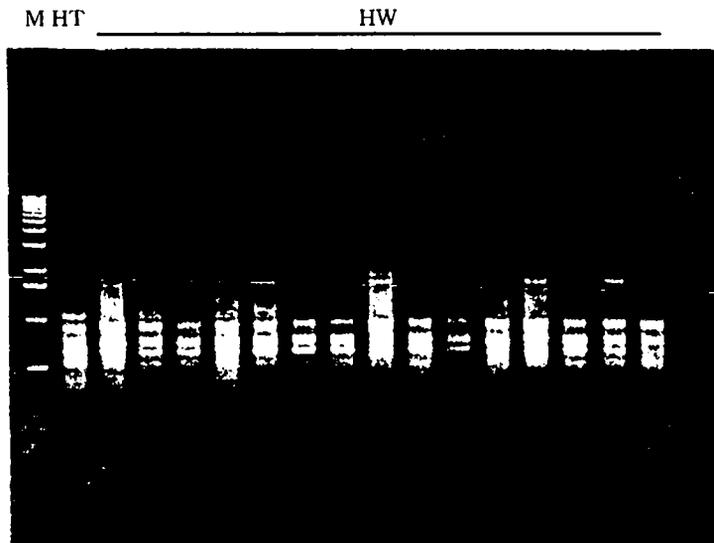


Fig. 3. RAPD patterns in Hanwoo samples.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

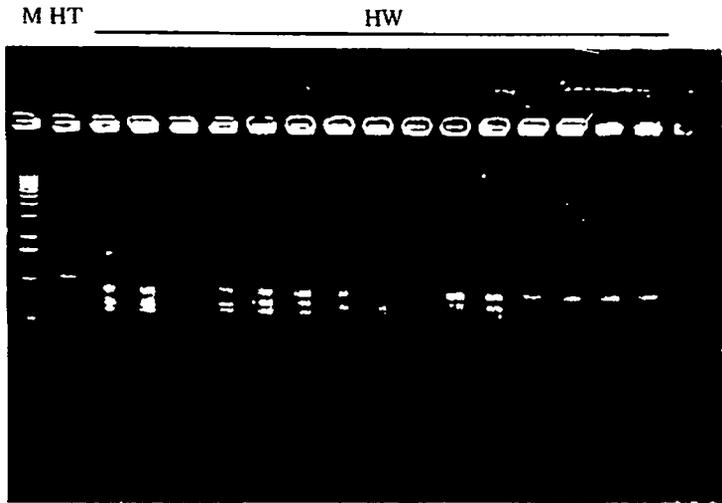


Fig. 4. RAPD patterns in Holsteins cattles.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

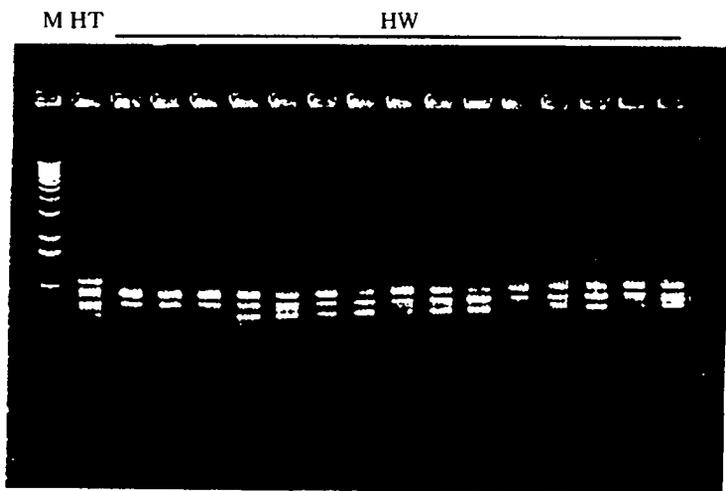


Fig. 5. RAPD patterns in Hanwoo samples.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

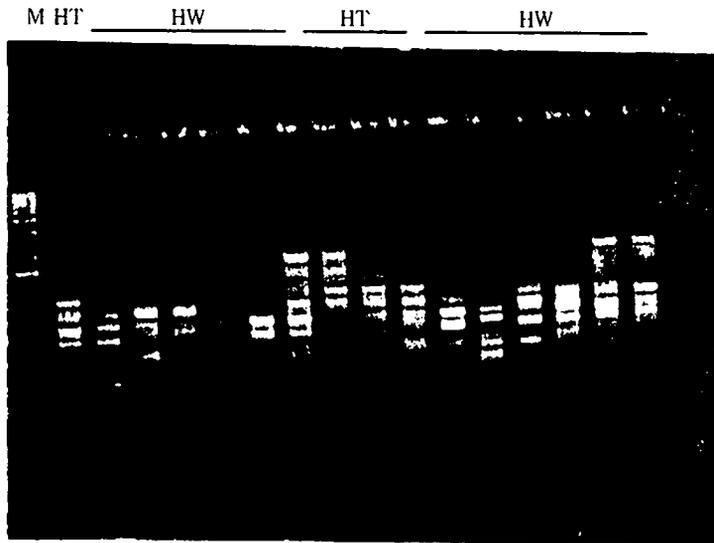


Fig. 6. RAPD patterns in cattle samples.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

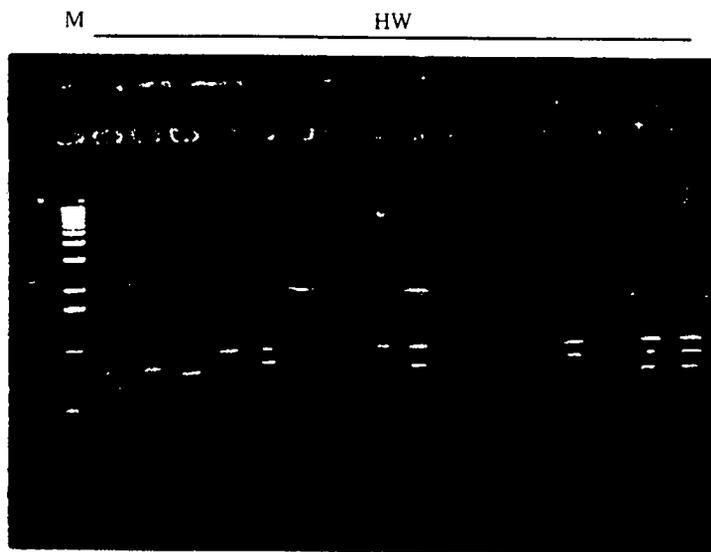


Fig. 7. RAPD patterns in Hanwoo samples.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

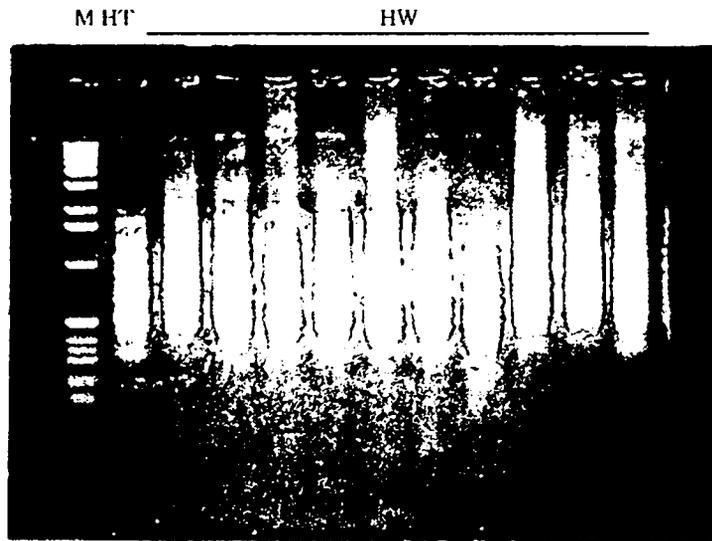


Fig. 8. RAPD patterns in Hanwoo samples.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

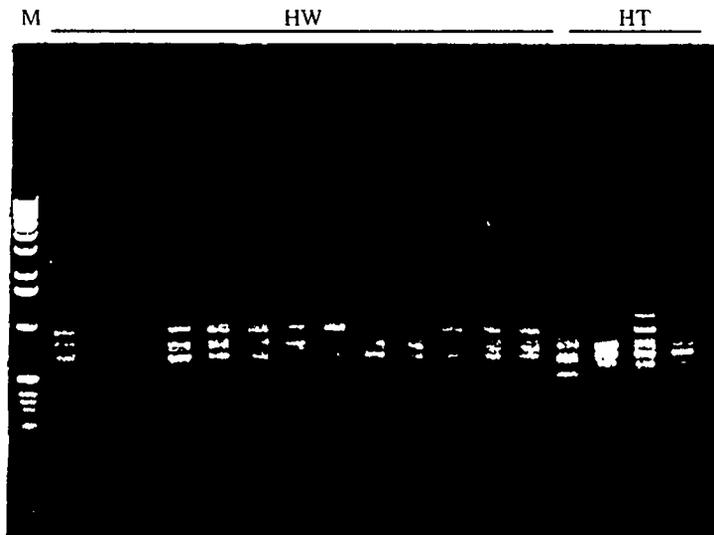


Fig. 9. RAPD patterns in Hanwoo samples.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

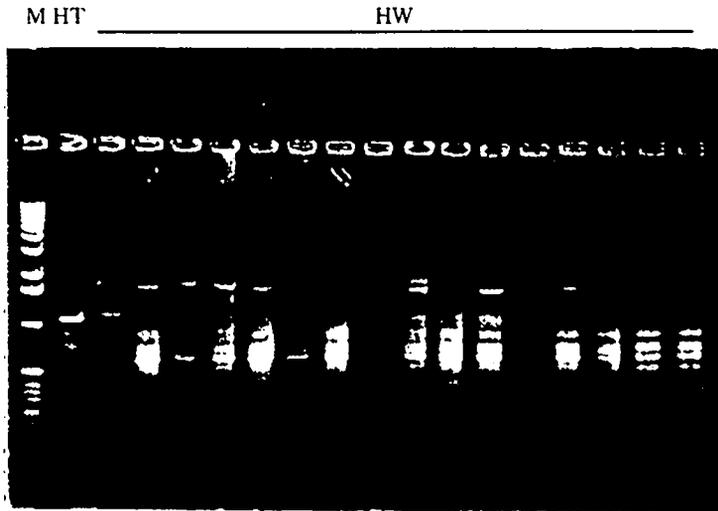


Fig. 10. RAPD patterns in Hanwoo samples.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

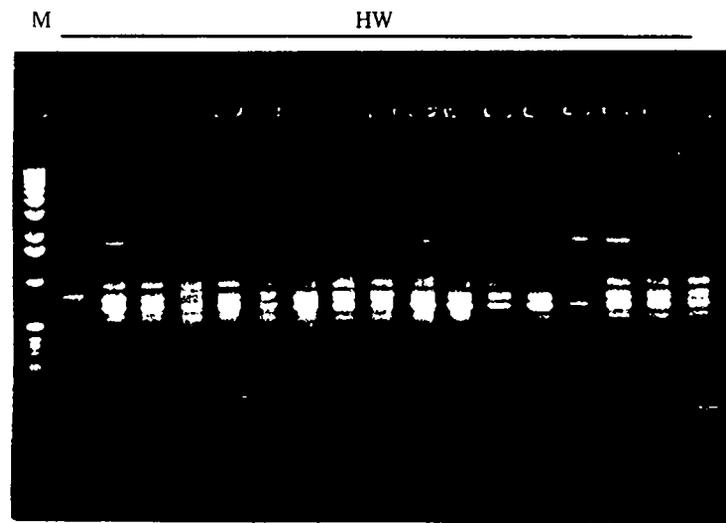


Fig. 11. RAPD patterns in Hanwoo samples.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

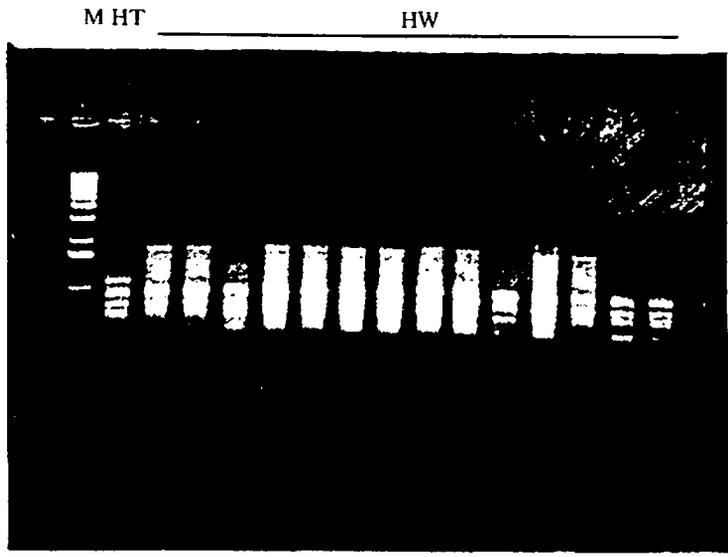


Fig. 12. RAPD patterns in Hanwoo samples.
 M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

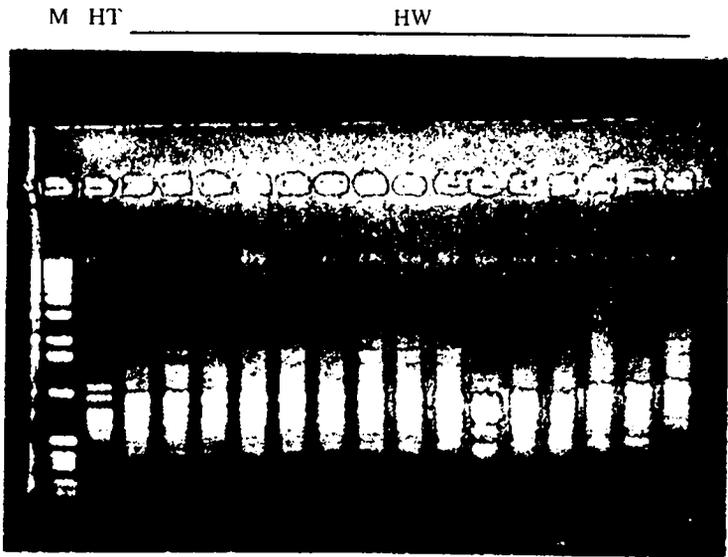


Fig. 13. RAPD patterns in Hanwoo samples.
 M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

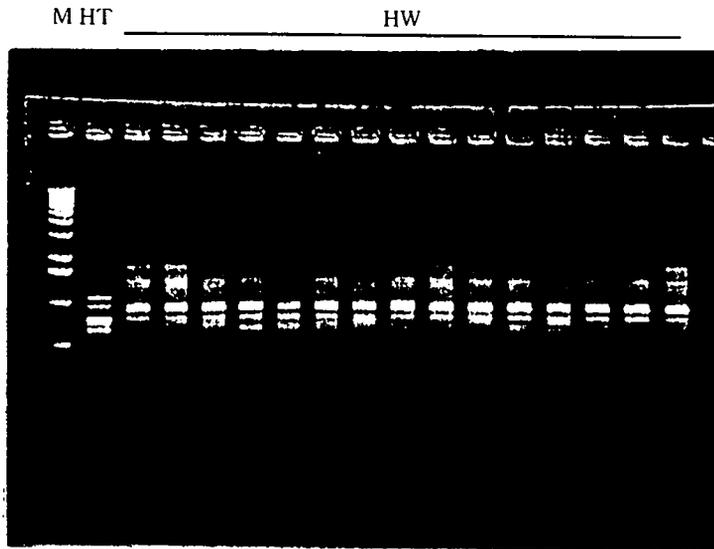


Fig. 14. RAPD patterns in Hanwoo samples.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

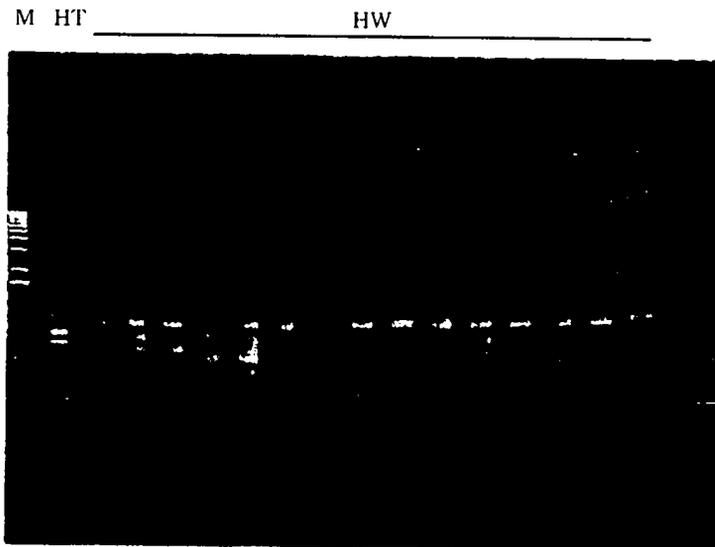


Fig. 15. RAPD patterns in Hanwoo samples.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

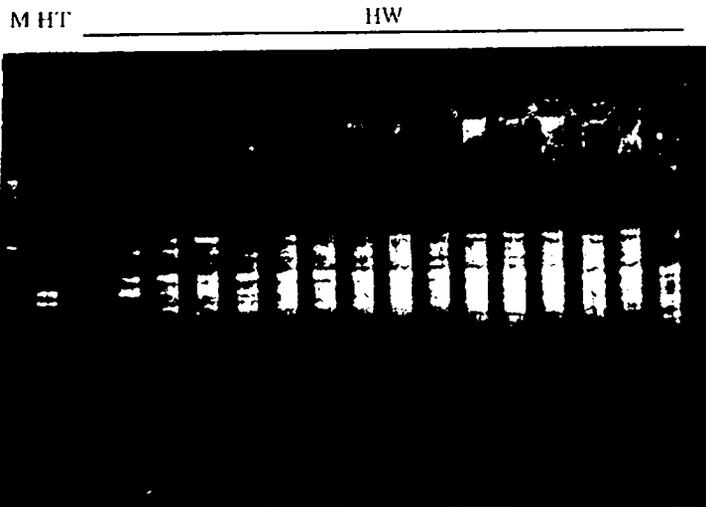


Fig. 16. RAPD patterns in Hanwoo samples.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

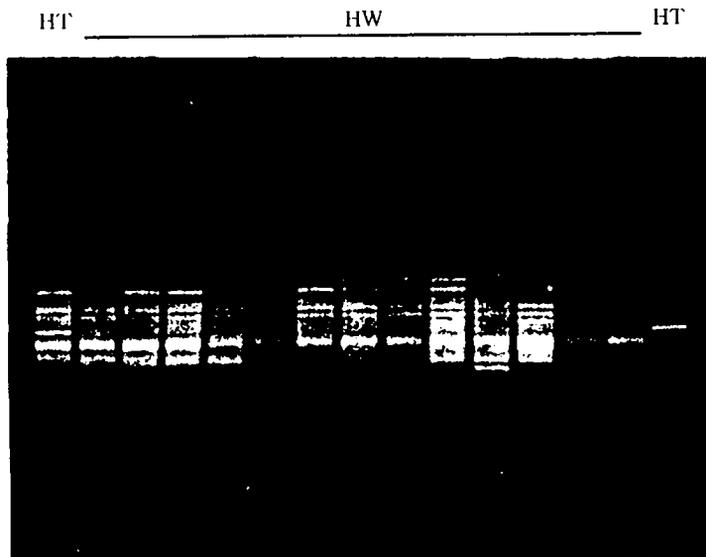


Fig. 17. RAPD patterns in Hanwoo samples.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

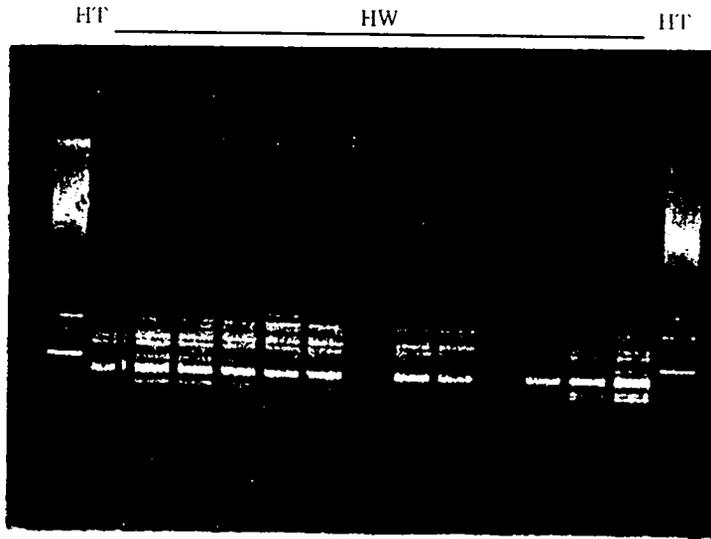


Fig. 22. RAPD patterns in Hanwoo samples.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

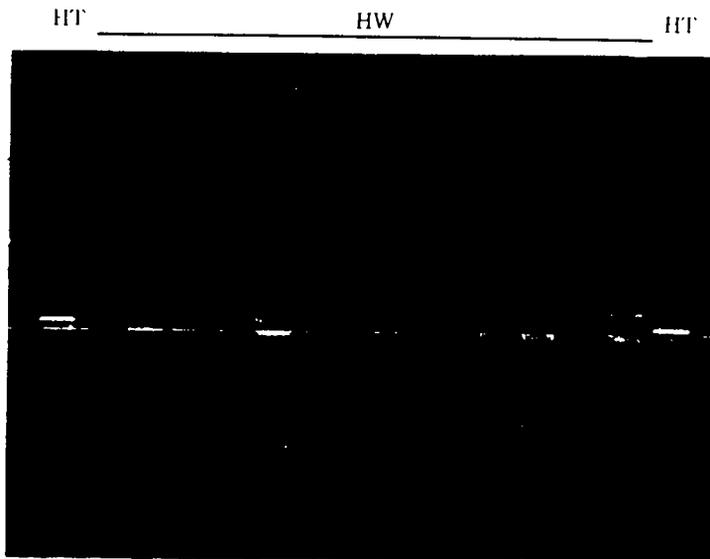


Fig. 23. RAPD patterns in Hanwoo samples.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

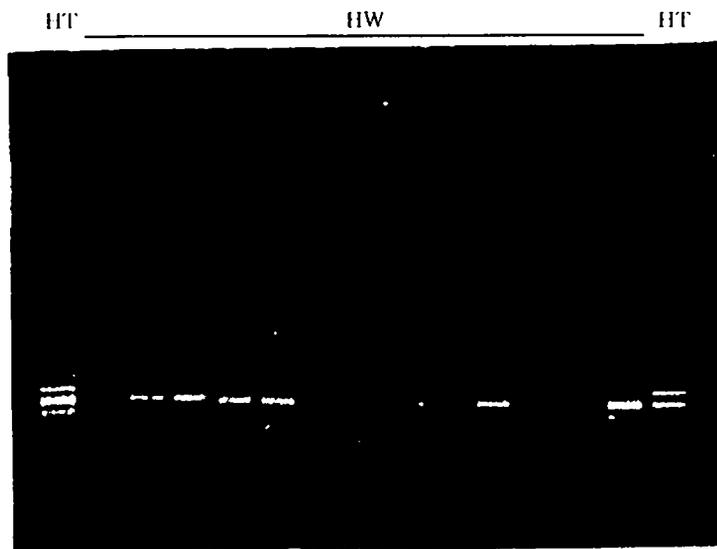


Fig. 24. RAPD patterns in Hanwoo samples.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

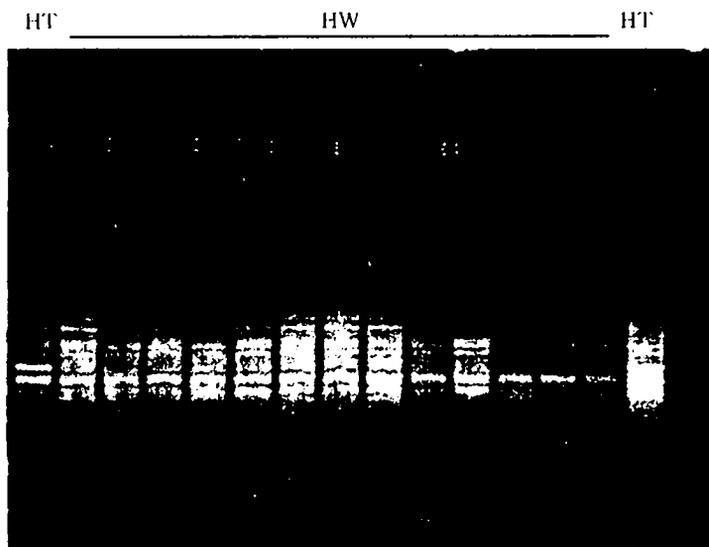


Fig. 25. RAPD patterns in Hanwoo samples.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

3. 국내 젓소 및 서양소 품종의 검정

우리 나라의 젓소는 모두가 홀스타인 품종이며 사육두수도 60만두에 가까운 수준이기 때문에 많은 두수의 홀스타인 개체를 대상으로 판별검사를 실시할 필요가 있다. 또한 수입최고기의 소품종은 최고기 수출국(미국, 캐나다, 호주, 뉴질랜드)에서 절대적인 비율로 사육되고 있는 헤어포드와 앵거스로 이들 품종에 대한 검사를 일부 실시하고 국내에서 연구용으로 사육되고 있는 서양소에 대해서도 검사를 하였다.

분석된 젓소시료 141두 중에서 94%에 해당하는 133두에서 DNA 밴드인 표지유전자가 검출되었고, 나머지 6%인 8두에서는 검출되지 않았다(Fig. 27-34). 이 결과는 국내 젓소집단의 경우에 있어서 표지유전자의 검출비율이 94%에 달하는 것으로서 현장에서의 판별 신용도가 매우 높다고 할 수 있다. 홀스타인 품종을 제외한 헤어포드, 앵거스, 리무진, 심멘탈, 브라운스 위스 품종의 총 36두중에서 32두에서는 표지유전자가 검출되었고, 4두는 한우와 마찬가지로 검출되지 않아서, 검출비율은 88%에 달하였다. 그러나 그 내용을 자세히 살펴보면 검출되지 않았던 시료는 모두 샤로레 품종이었다. 따라서 샤로레를 제외하면 그 밖의 5종류의 품종에서는 표지유전자가 100% 검출되었다. 샤로레 품종에 대해 정확한 판단을 내리기 위해서는 보다 많은 시료를 대상으로 검사를 할 필요가 있다. 젓소와 서양소 품종을 포함한 총 177두에서 표지유전자의 검출비율은 평균 96% 이었다.

표 3. 서양소의 품종별 검정

서양소 품종	검사두수	표지인자 검출유무		비율(%) (무검출수/총두수)
		유	무	
홀스타인	141	133	8	94
헤어포드	5	5	-	100
앵거스	5	5	-	100
샤로레	20	16	4	80
리무진	2	2	-	100
심멘탈	2	2	-	100
브라운스위스	2	2	-	100
총 두수	177	165	12	96

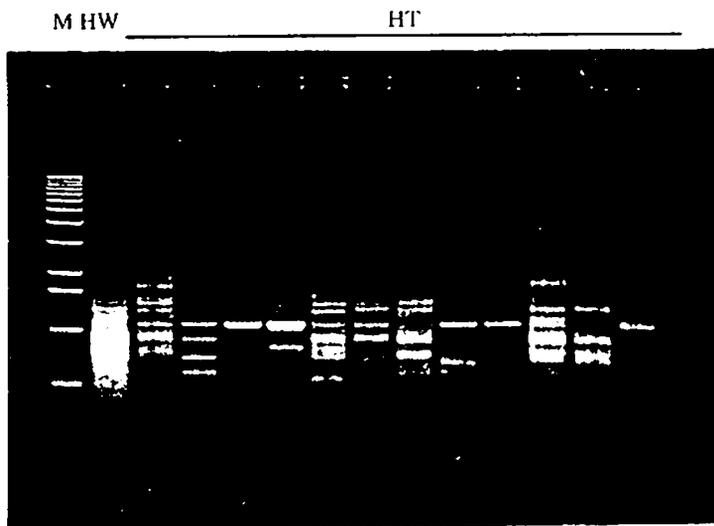


Fig. 27. RAPD patterns in Holstein samples.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

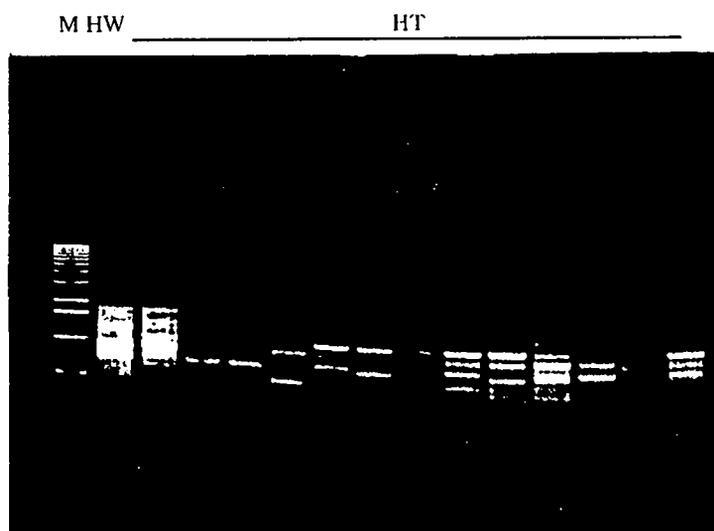


Fig. 28. RAPD patterns in Holstein samples.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

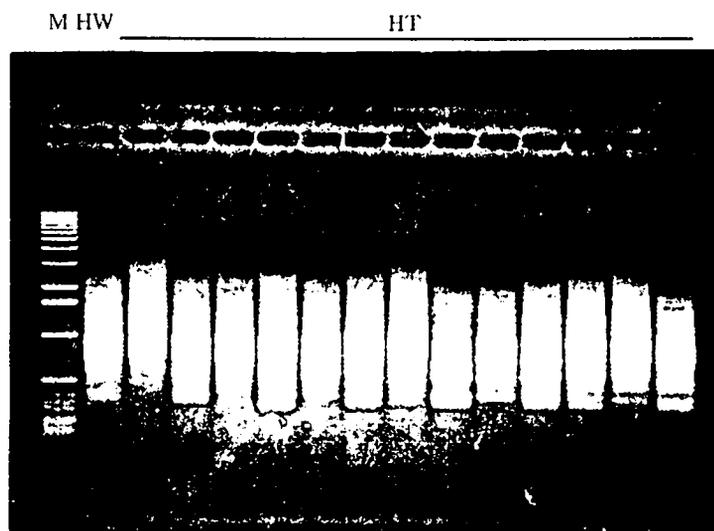


Fig. 29. RAPD patterns in Holstein samples.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

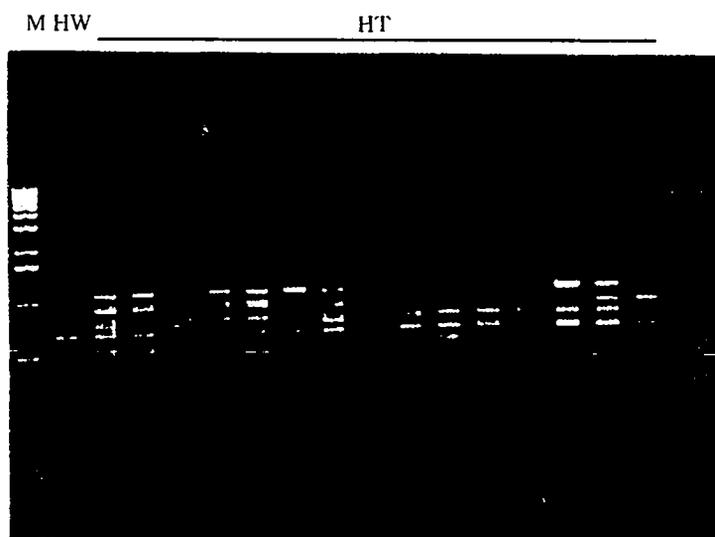


Fig. 30. RAPD patterns in Holstein samples.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

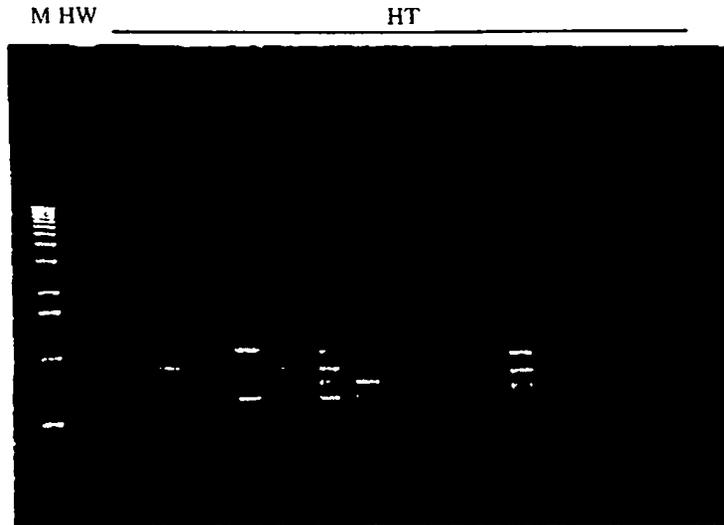


Fig. 31. RAPD patterns in Holstein samples.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

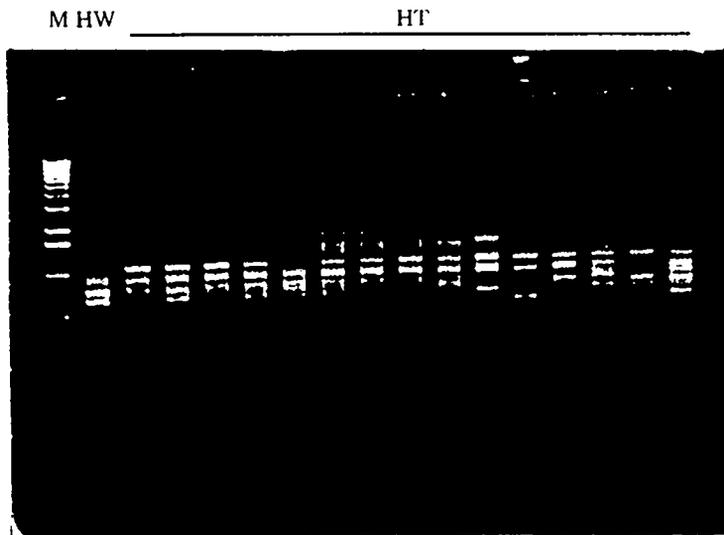


Fig. 32. RAPD patterns in Holstein samples.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

M HW

HT

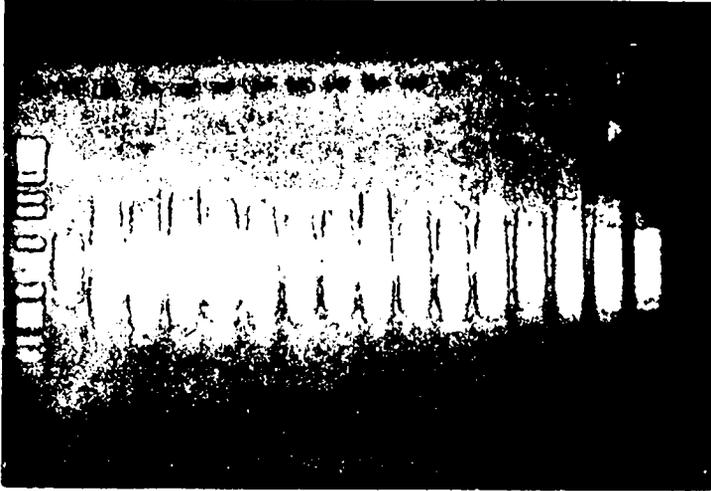


Fig. 33. RAPD patterns in Holstein samples.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

M HW

HT

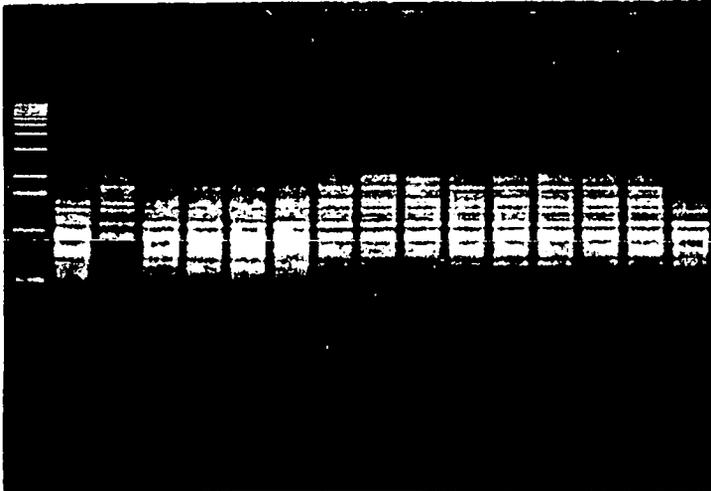


Fig. 34. RAPD patterns in Holstein samples.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo.

4. 수입쇠고기의 판별검사

한우육과 젓소육에서 각각 안심, 등심, 채끝, 우둔, 목심, 앞다리 부위로부터 시료를 채취하여 RAPD 밴드양상을 비교 분석하여 보면, 증폭산물은 모든 부위에서 검출되었으며, 밴드양상도 부위별에 관계없이 동일함을 확인하였다. 그리고 표지유전자는 젓소육에서만 검출되었으며, 한우육에서는 전 부위에 걸쳐서 관찰되지 않았다(표4, Fig. 35). 제놈 DNA의 특징중의 하나는 주위 환경의 변화 즉 가속의 사양조건이나 영양상태에 영향을 받지 않을 뿐만 아니라 한 개체내에서는 부위에 관계없이 동일하다는 사실과 일치한다. 본 실험에서도 살펴보았듯이 같은 소품종내에서 RAPD 밴드양상은 쇠고기 부위별에 관계없이 동일하였다. 따라서 판별용 표지유전자는 모든 부위의 쇠고기는 물론 꼬리, 사골, 족, 도가니뿐만 아니라 내장 등의 분석에도 이용될 수 있는 것이다.

위의 결과를 바탕으로 수입쇠고기를 부위별에 관계없이 미국, 호주, 뉴질랜드 등의 나라별로 채취하여 쇠고기 판별검사를 실시하였다(Fig. 36, 37). 총 115개 시료를 분석한 결과 97%에 해당하는 112개 시료에서는 표지유전자가 검출되었고, 나머지 3개 시료에서는 검출되지 않았다(표 5). 이 결과는 수입쇠고기에 대한 표지유전자의 검출비율이 97%에 달함을 뜻한다. 한편 시중 정육점에서 판매되고 있는 쇠고기를 부위별이나 보존상태에 관계없이 구입하여 분석해 보아도 위의 결과와 일치하였다. 그러나 시중에 유통되고 있는 쇠고기의 시료에 따라서 밴드의 검출감도가 강한 것도 있고 약하게 관찰되는 것도 있었다. 이와 같이 도축장에서 신선하게 채취된 시료와는 달리 유통중인 쇠고기에서는 시료에 따라 밴드의 검출감도에 차이가 있음이 확인되었다. 밴드의 검출감도가 분석시료에 따라 차이가 발생하는 것은 쇠고기 부위별에 따른 차이라기 보다는 시료의 보존기간이나 상태에 그 원인이 있으리라 추측된다.

표 4. 쇠고기의 부위별 검정

부위별 소품종	등심	안심	채끝	우둔	목심	앞다리
한우	X	X	X	X	X	X
젓소	0	0	0	0	0	0

0, 표지유전자 검출; X, 표지유전자 미검출.

표 5. 수입쇠고기의 판별검사

분석시료	시료수	표지유전자		비율 (%)
		유	무	
수입쇠고기	115	112	3	97

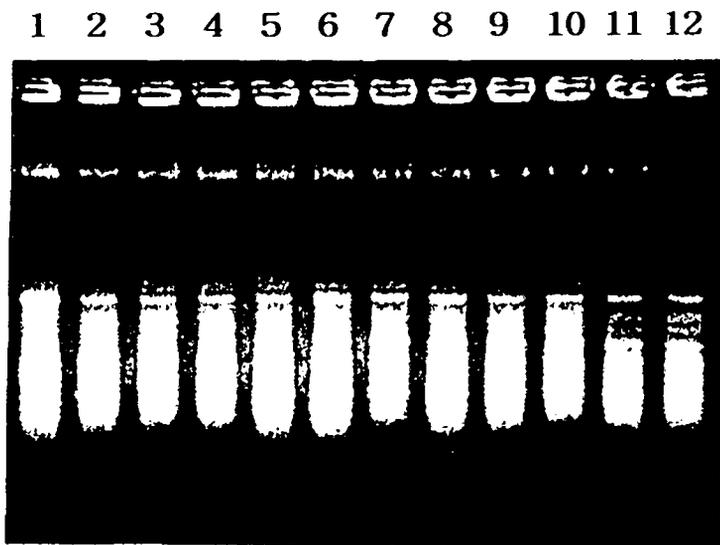


Fig. 35. Comparison of RAPD patterns in various parts of carcass between Hanwoo(lanes 1-6) and Holstein(lanes 7-12). Lanes 1 and 7, loin and chuck; lanes 2 and 8, tender loin; lanes 3 and 9, strip loin; lanes 4 and 10, round; lanes 5 and 11, chuck; lanes 6 and 12, shoulder clod.

M HW HT _____ IM

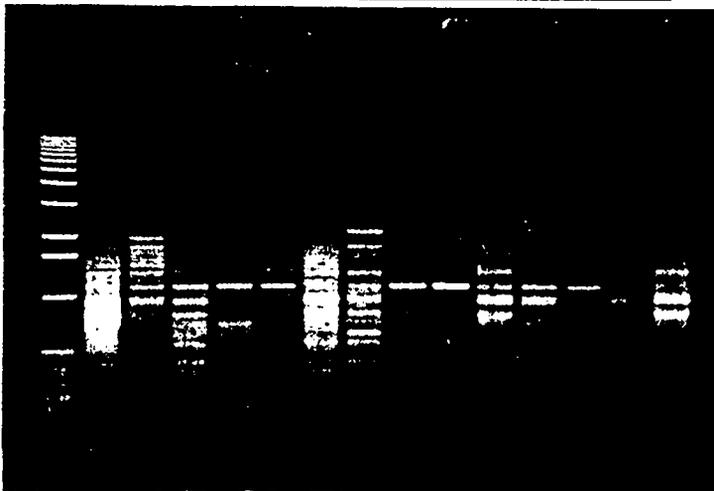


Fig. 36. RAPD patterns in imported cattle meat.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo;
IM, Imported Meat.

M HW HT _____ IM

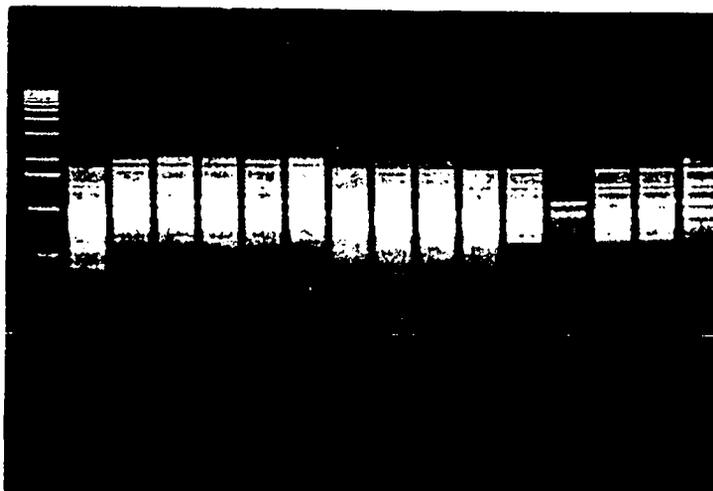


Fig. 37. RAPD patterns in imported cattle meat.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo;
IM, Imported Meat.

5. 한우 변이종 및 교잡우의 판별 검사

가. 한우 변이종

칠소는 일명 호랑이털 소로 불리우는데, 털색이 황갈색 바탕에 머리에 서 꼬리 끝까지 호랑이털 무늬처럼 검정색 줄무늬가 산재되어 있다. 칠소 10두를 대상으로 밴드의 검출양상을 조사해보면, 검출양상은 한우와 서양소의 경우와 동일하였으나, 표지유전자의 검출비율은 한우와 서양소의 중간형태의 수치를 보였다. 즉 한우 형태로서 표지유전자가 검출되지 않는 두수는 4개이며 나머지 6두는 서양소 형태로서 표지유전자가 검출되었다 (표 6, Fig 38-40).

이처럼 칠소는 표지유전자의 검출비율로 보았을때 한우와 서양소의 중간형태를 갖고 있기 때문에 유전자원의 개발이란 측면에서 모색 특이성과 아울러 표지유전자의 검출 특성을 바탕으로 새로운 한우품종의 형성도 가능하리라 본다.

나. 교잡우

한때 한우와 육우의 교잡개량 사업이 제주지구와 강화지구에서 실시되었으며 제주지구에서는 고온 다습한 지역에 적응력이 강한 브라만종 또는 산타종과 교잡을 실시하였고, 강화지구에서는 대형 조속종 육우인 샤로레종과의 교잡사업을 실시하였다. 특히 샤로레종은 어느 육우 품종보다도 성장이 빠르면서 산육능력이 우수하여 일반 농가에도 그 정액을 보급하였던 시기도 있었다. 따라서 한우와 샤로레의 교잡종 시료는 격리 사육되고 있는 강화지구에서 수집하여 표지유전자 분석을 실시하였다.

검사 개체수 23두에서 18두(78%)가 한우형태를 보이며, 5두(22%)가 서양소 형태를 띠고 있었다(표 6, Fig 38-40). 교잡우 형태의 검출비율이 서양소보다는 한우형태 쪽으로 많이 치우쳐 나오는 것은 한우와의 2대, 3대 교잡에 영향을 받았을 가능성이 있겠다.

표 6. 한우 칙소 및 교잡우의 판별 검사

분석 시료	검사 개체 수	표지 유전자		비율 (%)
		유	무	
칙 소	10	6	4	40
교 잡 우	23	5	18	78
계	33	11	22	59

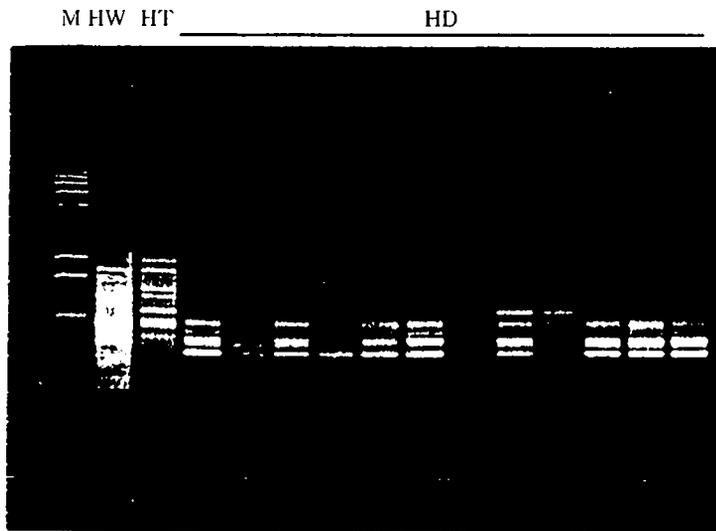


Fig. 38. RAPD patterns in hybrid cattle samples.
 M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo;
 HD, Hybrid cattle.

M HW HT

HD

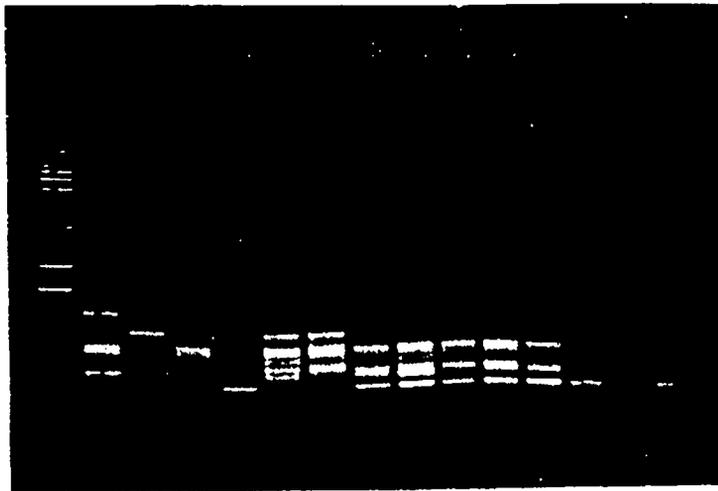


Fig. 39. RAPD patterns in hybrid cattle samples.
M, 1kb ladder; HT, Holstein; HW, Hanwoo;
HD, Hybrid cattle.

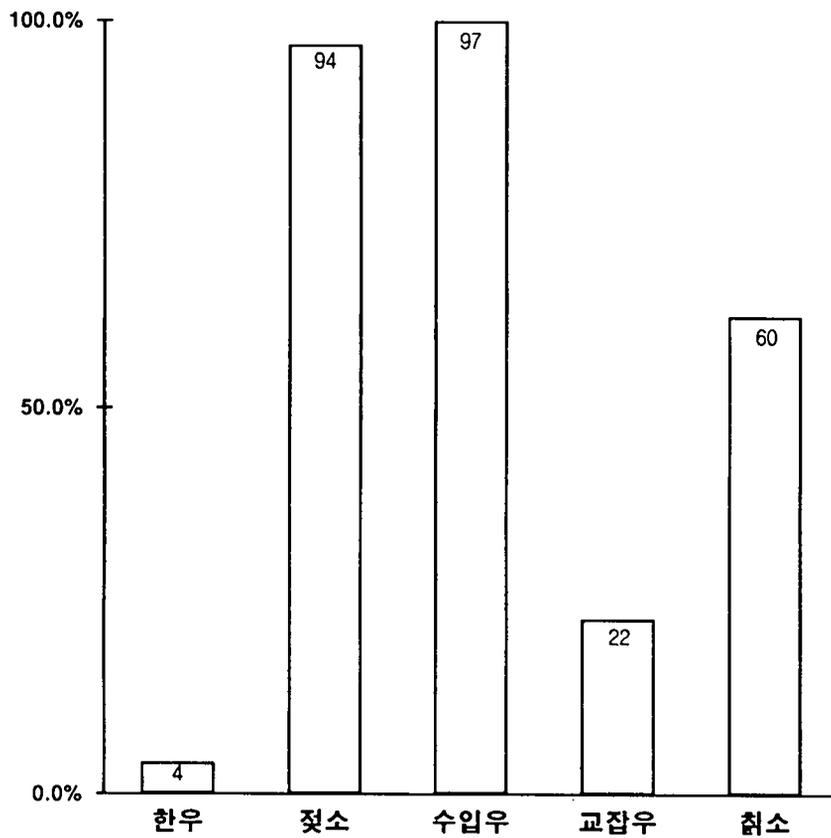


Fig. 40. The ratio on the detection of breed-specific DNA marker among various cattle breeds

6. 쇠고기 판별의 블라인드 테스트(Blind test)

한우판별 DNA 진단기술이 실험실 수준에서 뿐만아니라 현장에서도 활용 가능하다는 것이 국내 한우집단을 대상으로 실시한 위의 실험 결과로부터 확인할 수 있었다. 또한 현장실험의 일환으로 blind test를 자체적으로 실시하였다. 연구팀은 시료 채취팀, 분석팀, 평가팀의 세 팀으로 나누어서, 시료내용과 결과내용을 평가팀에 각각 제출하여 결과를 비교 검토하였다. 한우육은 도축장에서 직접 채취하였으며, 수입육은 일반 식육점에서 구입하여 50점을 검사하였다. 그 결과는 약 천두를 대상으로 실시된 위의 결과와 유사한 범위(약 90%)에서 수입육과 한우육이 구별되었다.

제 4 절 요약

한우 판별기술은 DNA 분석에 의해 하나의 표지유전자가 밴드 형태로서 한우에는 관찰되지 않으나 비한우에서는 검출된다는 사실에 의존한다. 비한우로써 조사된 소품종은 국내 젖소인 홀스타인, 헤어포드, 잉거스, 샤로레, 리무진, 심멘탈, 브라운스위스의 7종류이며, 수입쇠고기에 대해서도 분석을 실시하였다. 그밖에 한우의 변이종 및 교잡우도 분석되었다.

한우 시료는 제주도와 강화도를 제외한 전국적으로 채취된 약 700여두에 대해 DNA 분석을 실시하였으며, 이중 약 96%에 해당하는 한우에서는 판별용 표지유전자가 검출되지 않았으며, 나머지 4%에서는 표지유전자가 검출되었다. 비한우의 검사두수는 총 292두로서 홀스타인이 141두, 홀스타인을 제외한 나머지 6종류의 소품종에서 36두 그리고 수입쇠고기는 미국, 캐나다, 호주산 시료수 115개를 대상으로 조사되었다. 이중 표지유전자가 검출되는 비율은 약 94-97% 범위내에 있었으며, 나머지 비율은 표지유전자가 검출되지 않았다. 한편 호랑이털소이라고도 불리우는 칠포는 표지유전자의

검출비율의 수치가 한우와 비한우의 중간이었다. 강화지구에서 격리 사육되고 있는 한우-샤로레 교잡우는 검출비율이 비한우보다는 한우쪽으로 많이 치우쳐 나왔으며, 이는 여러 대에 걸쳐서 한우와의 교잡이 크게 영향을 미쳤으리라 생각된다. 이상과 같이 약 1000여두의 결과로부터 한우집단이 한우로서 판별이 되고 비한우 집단이 비한우로서 판별되는 비율이 약 96%에 달한다는 것은 실험실 단계에서 개발된 한우판별기술이 현장에서 사용될 수 있음을 입증한 것이라 하겠다.

제 3 장 한우육 판별의 간소화 기술개발

제 1 절 서 설

생물집단내의 다양한 유전적 변이(다형성)를 분석하여 얻어지는 단백질이나 DNA 표지인자는 유전자 지도작성, 질병진단 및 식품의 미생물 오염 분석 그리고 동식물의 육종개량 등 여러 분야에 활용되고 있다.

효소를 포함한 단백질의 다형은 개체나 세포 수준에서 발현되고 있는 유전자를 반영하고 있다. 그러나, 제능 DNA중에서 유전자로서 발현되는 부분은 극히 일부분에 지나지 않으며, 나머지 대부분의 DNA는 기존의 생화학적 분석법이나 유전학적 분석법으로는 검출이 불가능하였다.

DNA 변이는 개체간에도 차이가 날 정도로 다양하며, 그 검출방법 중에서 대표적인 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)법은 제한효소에 의한 DNA 단편을 필터에 전사시킨 후에 DNA probe를 이용하여 다형성을 검출하는 방법이다. 즉 RFLP법은 제한효소 절단과 DNA hybridization에 의해 해석되어지기 때문에 일반적으로 많은 시간과 노력이 필요하다. 영국의 Jefferys 등에 의해 명명된 유전자 지문(DNA fingerprinting)법은 DNA 다형성을 검출하는 RFLP 분석법의 하나이다.

최근 PCR(Polymerase Chain Reaction)반응으로 증폭된 DNA의 길이 차이에 의해 DNA 다형성을 검출하는 방법이 주목을 받고 있다. 그 중 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNAs)법은 증폭 부위의 염기배열에 관한 정보를 필요로 하지 않으며, 단지 한 종류의 합성 primer를 사용한다. 한 종류의 primer는 template DNA의 반대편 가닥에 위치한 두 군데에 결합하며, 증폭산물은 그 결합위치가 증폭되기에 적합한 거리내에 놓이게 되면 생산이 된다.

RAPD법은 RFLP법과 비교해서 제한효소 절단이나, Southern blotting 그

리고 hybridization의 실험절차가 요구되지 않기 때문에 신속하고 경제적이다. 또한 RAPD법은 PCR 반응을 사용함으로써 극미량(수 ng)으로도 분석이 가능하기에 적은 시료로 고감도의 DNA 판별에 큰 효과를 발휘한다. 그러나 RAPD법이 PCR 반응과 한 종류 primer에 의해 분석이 이루어지기 때문에 약간의 반응조건의 차이에 의해서 검출되는 밴드의 숫자나 강도에 변화가 인정되는 등 문제점이 발생될 수 있다. 따라서 PCR 반응은 반응액에 첨가하는 template DNA 그리고 마그네슘 등의 첨가물 농도나 primer의 부착온도를 비롯한 여러 반응온도 등의 요인들에 의해 영향을 받는다. 따라서 PCR 반응조건의 설정에 세심한 주의와 결과의 재현성을 위해 여러 반응조건이 검토되어야만 한다.

앞장에서 언급되었듯이 RAPD법에 의해 소 품종에 특이적으로 검출되는 표지유전자는 한우육을 비한우육으로부터 구별하는데 이용될 수 있음을 보고하였다. 이렇게 개발되어진 한우 판별기법은 고감도의 검출능력을 가지고 있는 반면에 실험조건의 미세 변화나 참여인력의 기술 숙련도에 따라 분석결과에 크게 영향을 미친다. 이러한 문제점들을 배제하기 위하여 분석기법의 표준화 작업으로서 분석의 신속화, 간소화 그리고 검출 최적화를 위한 세심한 검토가 이루어졌다.

제 2 절 실험방법

1. 제놈 DNA 추출

쇠고기로 부터의 제놈 DNA 추출은 eppendorf tube(1.5ml)에 육조직 약 10mg과 추출용액(10mM Tris-HCl, 0.1M EDTA, 20ug/ml pancreatic RNase, 0.5% SDS)을 첨가하여 65℃에서 1시간 처리하였다. 같은 양의 phenol 용액

을 첨가하여 10분간 가볍게 흔들어 주면서 변성된 단백질을 제거한 뒤에 ethanol을 첨가하여 제놈 DNA를 침전시켰다.

DNA 순도는 흡광도 A_{260} 과 A_{280} 의 비율로 측정하였으며, 그 비율은 1.7 이상이었다. 또한 추출된 제놈 DNA가 거대 분자량임을 0.8% agarose gel 전기영동에 의해 확인하였다.

2. 제놈 DNA의 RAPD 분석

증폭반응액 $50\mu\text{l}$ 에는 100mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl_2 , 0.001% gelatin, $100\mu\text{M}$ 씩의 dATP, dCTP, dGTP와 dTTP, $0.2\mu\text{M}$ primer, 여러 농도의 제놈 DNA와 1 unit의 *Taq* DNA polymerase가 포함되었다. DNA 반응은 특별한 언급이 없는 한 95°C , 36°C 그리고 72°C 에서 각 30초, 60초 그리고 90초씩 35사이클로 프로그램하여 실시되었다.

DNA 증폭산물을 재증폭할 경우에는 제놈 DNA를 제외한 $50\mu\text{l}$ 의 반응액에 1차 증폭산물을 $1\mu\text{l}$ 넣고 위와 동일한 반응조건하에서 증폭을 실시하였다. RAPD 밴드양상에 영향을 미치는 PCR 반응조건의 요인들을 조사할 때에는, 제놈 DNA양은 50, 100, 200 혹은 400ng을 사용하였다. 부착온도의 경우에는 35°C , 38°C , 41°C , 44°C 혹은 47°C 에서, 부착시간의 경우에는 60, 90 혹은 120초에서 실시되었다. 증폭산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동 후, ethidium bromide로 염색하여 검출하였다. DNA size marker로는 1kb ladder(Gibco BRL)를 사용하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 시료 DNA의 추출법 간소화

종래에는 쇠고기로부터 손상이 적은 DNA를 추출하기 위해서 조직을 액체 질소에 넣어 돌처럼 굳어지게 한 다음 유발로 갈아 분말로 처리해야 했었다. 위의 방법은 DNA 추출에 상당한 시간이 소요가 되어 쇠고기 판별의 대부분 시간이 DNA 추출단계에서 소모되기 때문에 많은 수의 시료를 동시에 분석하기에는 많은 시간과 인력이 필요로 하였다. 이러한 문제점은 액체질소나 분쇄기를 사용하여 고기를 분말처리하지 않고 적은 덩어리의 조직(약 5mg정도)으로부터 직접 제논 DNA를 추출함으로써 소요시간을 약 12시간에서 약 3시간으로 단축할 수 있었다. 제논 DNA의 추출방법에 관계없이 RAPD 결과는 동일하였으며 검출감도에 있어서도 별다른 차이가 관찰되지 않았다. 한편 쇠고기는 물론 다른 부산물에서도 DNA 판별검사를 활용하기 위하여 털에서도 DNA 추출을 하였으며, 이들 공급원의 차이에 관계없이 판별결과가 동일함도 확인하였다. 따라서 쇠고기 시료에서 분석결과를 얻기까지 기존의 2일은 소요되었으나, 추출법의 개량으로 하루내에 분석을 마칠 수가 있게 되었다.

표 7. 판별검사의 소요시간(단위: 시간)

분석 단계	기 존 법	개 량 법
DNA 추출단계	12	3
DNA 증폭단계	4	4
DNA 전기영동분석	1	1
총 분석 시간	17	8

2. 판별용 표지유전자의 검출 최적화 연구

PCR 반응조건 즉 제능 DNA양, 반응온도 및 반응시간에 따른 RAPD 밴드양상의 변화를 조사하였다(표 8). 우선 PCR 반응 혼합액에 첨가하는 제능 DNA양이 밴드양상과 표지유전자의 검출유무에 미치는 효과에 대해 조사하였다. 제능 DNA양은 50, 100, 200 혹은 400ng을 첨가하였으며(Fig. 41), 그밖의 PCR 반응조건은 동일하였다. 한우품종의 경우는 제능 DNA양이 50ng과 100ng에서 밴드들이 명료하게 관찰되었으나, 200ng과 400ng을 첨가했을 때는 검출밴드들이 확실하지 않고 불연속적으로 나타났다. 한편 홀스타인 품종에서는 한우품종의 결과와는 달리 제능 DNA양이 400ng에서도 표지유전자를 포함한 모든 밴드들이 명료하였다. 두 품종의 RAPD 분석에 필요한 제능 DNA양은 50 μ l의 PCR 반응액에 대해 100ng 이하이었다. 그러나 표지유전자의 안정적인 검출을 위한 제능 DNA양의 범위는 20ng 내지 50ng사이가 보다 적합하다는 것이 많은 시료의 분석을 통해 밝혀졌다. 이처럼 밴드들의 검출감도는 제능 DNA양에 따라 상당히 민감한 반응을 나타냈다. 제능 DNA양이 많다고 해서 검출되는 밴드수가 늘어나는 것은 아니며 밴드의 검출감도에 있어서 오히려 역효과를 가져왔다. 또한 홀스타인 품종에서 검출되는 표지유전자는 첨가된 제능 DNA양에 관계없이 한우품종에서는 관찰되지 않았다.

제능 DNA와 primer가 부착되는 부착시간이 RAPD 밴드양상에 어떠한 영향을 미치는지를 살펴보았다(Fig. 43). 부착시간은 30초 간격으로 60초, 90초 혹은 120초까지 증가시켰다. 시간 증가와 더불어 저분자보다는 고분자 DNA 단편의 검출이 용이하였다. 즉 검출감도가 저분자에서 고분자쪽으로 높아짐을 알 수 있었다. 그러나 부착시간이 120초인 조건에서는 밴드의 전반적인 검출감도가 60초 때와 비교해서 현저하게 감소되었다. 홀스타인 품종의 경우 60초의 부착시간에서는 표지유전자를 중심으로 DNA 크기가 작은 밴드들이 상대적으로 명료하게 검출되었고, 90초에서는 표지유전자를 전후로 해서 밴드들이 검출되었고, 120초에서는 검출감도가 떨어지지만 표지유

전자보다 DNA 크기가 큰 밴드들이 관찰되었다. 홀스타인 품종에서 검출되는 표지유전자는 여러 부착시간의 변화에도 불구하고 한우품종에서는 관찰되지 않았다. 부착시간은 30초로 단축하여도 표지유전자의 검출유무에는 지장이 없었다. 따라서 주어진 조건하에서 부착시간을 가능한 단축하여 PCR 반응을 실시하는 것이 반응이 종료될 때까지 DNA 합성효소의 활성을 높게 유지하는데 도움이 될 것이다.

PCR 반응의 부착온도가 표지유전자의 검출유무에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 43). PCR 반응의 부착온도는 3℃씩 간격으로 35, 38, 41, 44 혹은 47℃에서 실시하였다. 홀스타인 품종에 있어서 표지유전자는 35, 38, 41℃에서 관찰되었으나, 44℃와 47℃에서는 여러 DNA 밴드들이 검출됨에도 불구하고 표지유전자는 검출되지 않았다. 한편 한우품종에서는 부착온도를 35℃에서 47℃까지 변화시켜도 표지유전자에 해당되는 밴드는 전혀 관찰되지 않았다.

RAPD법은 증폭되는 DNA의 염기서열을 모르더라도 길이가 10-mer인 한 종류의 primer를 사용하여 DNA 다형성을 분석할 수 있다는 잇점이 있다. 짧은 길이의 primer로 DNA 변이를 검출하기 위하여 낮은 부착온도에서 PCR 반응을 실시하기 때문에 약간의 조건변화에도 민감한 반응을 보이며, 그 결과 재현성이나 신뢰성 측면에서 문제가 발생할 소지가 있었다. 이러한 문제점을 보완하기 위하여 본 실험에서는 RAPD 분석용 primer의 길이가 19-mer인 것을 사용하였다. 또한, 유용한 RAPD 표지유전자가 일단 선발되었을 경우에는 표지유전자 검출에 필요한 PCR 반응조건의 부착온도를 최대한 높임으로서 template DNA와 primer의 사이에 낮은 염기서열의 상동성에 의해 생길 수 있는 밴드를 배제할 수 있을 것이다. 표지유전자는 일반적인 RAPD 분석조건의 부착온도가 36℃에서 반응을 실시하는 것과는 달리 41℃까지 높여도 안정적으로 검출될 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 한우 품종에서 검출되지 않는 표지유전자는 여러 PCR 반응조건을 달리하더라도 그 결과에는 변함이 없었다.

표 8. 표지유전자 검출에 영향을 미치는 증폭조건

증폭반응조건	분석범위	최적 검출범위
DNA 분석량	25 - 500ng	50ng 이하
결합인자의 부착시간	30 - 120초	30 - 60초
결합인자의 부착온도	35 - 47℃	35 - 41℃

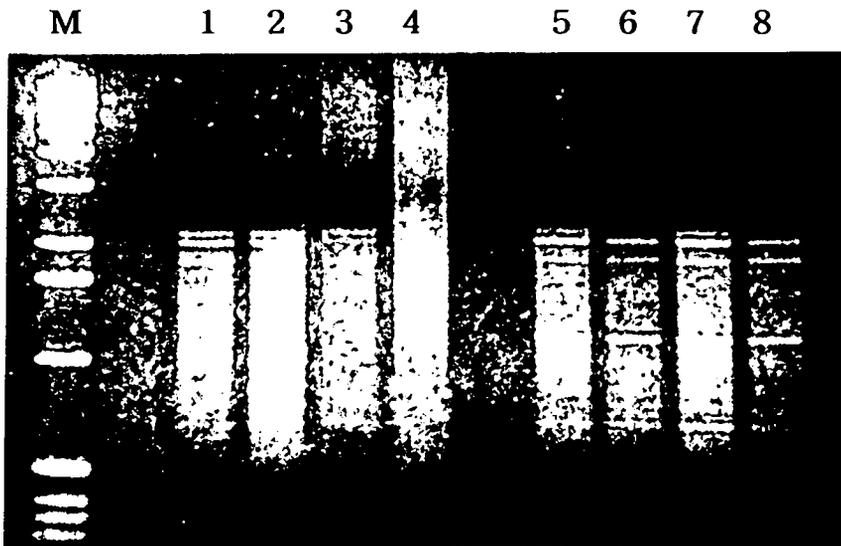


Fig. 41. Effects of the amount of template DNA on RAPD patterns. Hanwoo, lanes 1-4; Holstein, lanes 5-8. Lane 1, 50ng; lane 2, 100ng; lane 3, 200ng; lane 4, 400ng.

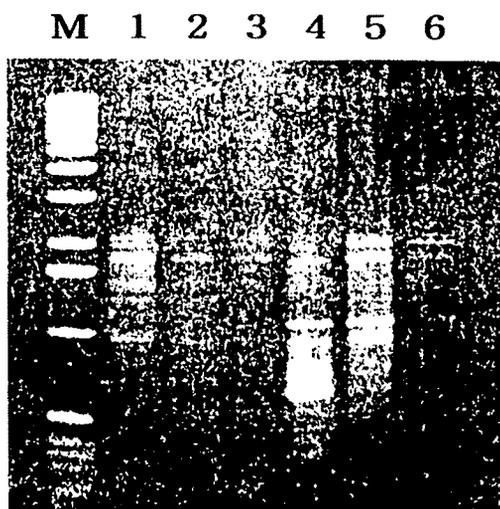


Fig. 42. Effects of annealing time on RAPD patterns.
 Lanes 1 and 4, 30sec; lanes 2 and 5, 90sec; lanes 3 and 6
 120sec(lanes 1-3, Hanwoo samples; lanes 4-6, Holstein
 samples).

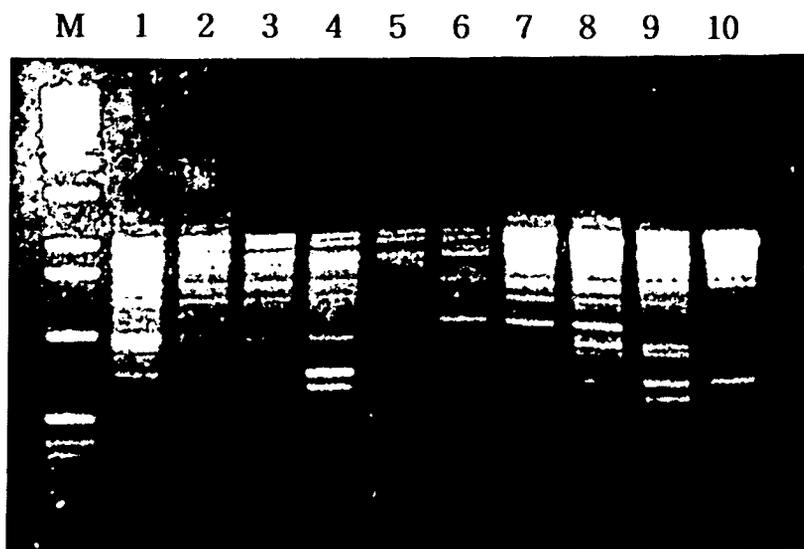


Fig. 43. Effects of annealing temperature on RAPD patterns. Hanwoo, lanes 1-5; Holstein, lanes 6-10. Lane 1, 35°C; lane 2, 38°C; lane 3, 41°C; lane 4, 44°C; lane 5, 47°C.

3. DNA 증폭 혼합액의 간소화 및 증폭기의 검토

가. DNA 증폭 혼합액의 간소화

DNA 증폭 혼합액에는 시료의 제놈 DNA, 결합인자, 합성효소, 기질, 완충액, 중류수가 6단계에 걸쳐서 첨가되어야 하고, 합성효소인 경우는 활성유지를 위해 냉동보관을 하여야 하며, 얼음 위에서 작업을 하여야 하기 때문에, 이에 따른 시간소요와 여러 절차과정으로 실험 결과에 오류가 발생할 수 있는 확률이 높다.

따라서 추출된 제놈 DNA의 시료 첨가만으로 분석되어 질 수 있도록 증폭 혼합액의 실험조건이 검토되었다. 혼합액 성분을 순차적으로 6단계에 걸쳐 첨가할 것을 미리 혼합하여 냉동 보관하였다가 필요시 제놈 DNA를 첨가하여 분석하여도, 즉시 시약을 준비하여 분석된 결과와 차이가 인정되지 않았다(결과 미첨부). 이 실험단계의 개선은 많은 시료를 동시에 반복적으로 분석하여야 하는 현장 기술에 있어서는 결과의 재현성과 신빙성을 높이는 데 큰 기여를 할 것이다.

나. DNA 증폭기의 판별분석에 미치는 영향

DNA 증폭시 특히 random primer를 사용하는 실험인 경우 결과의 재현성에 매우 세심한 검토과정이 요구된다. 그 이유는 분석법의 검출감도가 매우 높은 반면에 미세한 주변 변화에 민감하게 반응하여 결과에 영향을 미치기 때문이다.

실험결과의 재현성 문제로 검토되어야 할 사항의 하나로 DNA 증폭기를 들 수 있다. DNA 증폭기는 온도조절에 관한 기기 특성에 따라 세 가지로 분류할 수 있으며, 분석 결과에 미치는 영향을 검토하였다. 첫째로 일반적인 증폭기는 냉각 및 가열장치에 따라 공냉식, 수냉식, 펜벨트식 등이 있으나, 방식에 관계없이 분석결과는 동일하였다. 둘째는 로버트식의 DNA 증폭기는 현 실험조건하에서 일반 증폭기를 사용했을 때와 동일한 결과를 얻

을 수 없었다. 따라서 이 기기 특성에 적합한 실험조건을 새로 설정할 필요가 있다. 셋째로 증폭시간을 약 4시간에서 1시간 이내로 단축이 가능한 모세혈관식 증폭기는 국내 보급이 매우 미약하여 검토되지 못하였다.

표 9. DNA 증폭기의 판별에의 효과

	일반식	로버트식	모세혈관식
특 징	고정식	회전식	고정식
열전달체	블록	액체	공기
소요시간	4시간	4시간	1시간
판별조건	적합	재검토	미검토

제 4 절 요약

현재의 한우판별기술은 고감도의 검출 능력을 가지고 있음에 반하여 실험조건 미세 변화에 민감하게 반응하기 때문에 손쉽게 사용될 수 있도록 판별기법의 안정화와 간소화 및 표준화에 대한 검토가 필요하였으며, 이에 대한 연구결과는 다음과 같다.

1. 쇠고기의 DNA 추출법 개선

쇠고기의 DNA 추출법은 종래 사용되었던 액체질소나 분쇄기로 사전처리를 하지않고 적은 양의 쇠고기(10mg)를 추출용액이 들어 있는 한개의 원심 튜브를 가지고 처리함으로써 추출단계를 축소할 수 있었으며, 추출시간을

약 12시간에서 약 3시간으로 단축하였다. 따라서 분석 소요시간이 총 2일이 소요되었으나, 추출법 개량으로 하루 내에 분석을 마칠 수 있게 되었다.

2. 표지유전자의 검출 최적화

표지유전자 증폭에 있어서 PCR 반응조건인 제능 DNA양, primer인 결합인자의 반응온도 및 반응시간에 따른 검출양상 및 검출감도에 미치는 영향을 조사하였다.

가. 밴드의 검출감도는 첨가되는 제능 DNA양이 50ng 정도일 때 적합하였으며, 200ng 이상이 되면 밴드검출이 불연속적으로 관찰되는 스머팅(smear)현상이 발생하여 역효과를 초래하였다.

나. DNA 결합인자인 primer의 부착온도는 RAPD 분석에서 적용되는 36℃보다 훨씬 높은 온도인 41℃에서도 표지유전자가 안정적으로 검출된다는 것을 확인하였다.

다. Primer의 부착시간은 시간이 길어질수록 저분자보다 고분자 DNA 단편의 검출감도가 높았으며, 90초까지는 표지유전자가 안정적으로 검출되었다.

3. DNA 증폭 혼합액의 간소화

DNA 증폭 혼합액을 준비하기 위해서는 적어도 효소를 포함한 6단계에 걸쳐서 성분들을 첨가해야 했지만, 이들 성분들을 미리 혼합하여 냉동시켜 미리 보관하였다가 필요시 제능 DNA를 첨가하여 분석하여도 검출감도에는

별다른 영향을 미치지 않았다. 이 실험단계의 개선은 다수 시료를 동시에 분석해야하는 경우에는 결과의 신뢰성을 높이는데 크게 기여할 것이다.

4. 증폭기의 표지유전자 검출에 미치는 영향

표지유전자의 검출에 있어서 자동 온도전환장치인 DNA 증폭기는 냉각 및 가열장치의 방식에 따라 공냉식, 수냉식, 펜벨트식으로 분류할 수 있으나, 방식에 관계없이 분석결과가 동일함을 확인하였다.

제 4 장 한우 판별기술의 고도화 연구

제 1 절 서 설

DNA 다형성을 검색하는 방법중의 하나인 RAPD법은 신속 정확하고, 검출 감도가 뛰어나다는 면에서 널리 활용되고 있다. 본 연구도 이 분석방법을 도입하여 증폭된 표지유전자의 검출유무에 따라 한우와 비한우를 판별하는데 활용되고 있다. 그러나 판별의 장애요인으로써 표지유전자이외에 비연속적인 여러 밴드들이 검출되고 있을 뿐만 아니라, 밝혀지지 않은 불확실한 요인들에 의하여 밴드의 검출감도가 떨어지는 경우가 있다. 앞장에서 언급되었듯이 한우 판별기술은 한우육을 수입최고기로부터 구별하는데 사용될 수 있다는 것이 입증되었지만, 경우에 따라서는 표지유전자의 검출감도를 더욱 향상시킬 필요가 있으며, 판별에 장애가 되는 불필요한 밴드들의 검출을 억제하거나 제거할 수 있다면 한우판별 해석을 매우 단순화시킬 수 있을 것이다. 따라서 표지유전자의 검출감도를 향상시키기 위한 연구로서 증폭산물의 제 2단계 처리와 표지유전자의 결합능 이용 및 결합인자의 염기서열 개조에 관한 내용들이 검토되었다. 또한 불필요한 밴드 검출을 억제하기 위한 기초자료로서 표지유전자의 염기서열을 결정하고 이를 바탕으로 새로운 결합인자를 제작하여 한우 판별용 결합인자로서의 유용성도 검토하였다.

제 2 절 실험방법

1. DNA 분리

가. DNA 분리

DNA 증폭산물 중에서 원하는 단편의 분리는 glass milk (Bio101)를 이용한 방법으로 DNA 전기영동후 원하는 밴드를 잘라서 eppendorf tube에 넣고 NaI 용액을 첨가하여 50℃ 수조에서 agarose gel을 완전히 녹였다. 이 용액에 glass milk 현탁액을 넣고 잘 혼합하여 실온에서 반응시킨 다음 원심 분리하여 상등액을 버리고 침전물은 TE 완충액에 넣어 50℃ 처리로 glass milk에 결합된 DNA 단편을 용출하여 사용하였다.

나. 대장균의 형질전환

형질전환용 대장균을 준비하기 위하여 LB 배지에서 하룻밤을 배양한 E.coli 배양액을 새로운 LB 배지에 접종하여 37℃에서 진탕 배양을 하여 600nm에서 흡광도가 0.4내지 0.6이 되게 하였다. 이 배양액을 0℃에서 10분간 처리한 다음 CaCl₂를 포함하는 TFB 완충용액에 넣어 현탁된 대장균을 competent cell로 사용하였다. 이 현탁액은 일정량 분주하여 초저온 냉동고(-80℃)에 저장하고 형질전환시에 사용하였다. 형질전환은 competent cell 100 μ l에 DNA 0.1 μ g을 넣고 0℃에서 30분간 방치한 후 42℃에 45초간 열 충격을 준 다음 실온으로 식혀서 SOC 배지를 첨가한 후 37℃에서 45분간 225rpm으로 진탕배양하였다. 이 배양액을 100 μ l 내지 200 μ l 씩 항생제가 첨가된 선발용 배지에 도말하여 37℃ 항온기에서 1일 배양하여 형질전환된 대장균을 선발하였다.

다. 대장균으로부터 플라스미드 분리

항생제가 첨가된 TB 배지에 균을 접종하여 37℃에서 12시간 진탕배양한 배양액을 원심분리하여 침전세포를 용액I (50mM glucose, 25mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH8.0)에 현탁한 후 lysozyme(4mg/ml)을 넣어 0℃에 10분간 두었다. 여기에 용액II(0.2N NaOH, 1% SDS)를 넣고 천천히 흔들어서 용균시킨 후 용액III(5M CH₃COOH)를 첨가하고 잘 섞어 0℃에서 15분간 두었다. 이를 원심분리하여 상등액을 새 원심관에 옮겨 에탄올을 첨가하여 plasmid DNA를 침전시켰다. 이를 TE 완충용액에서 녹인 다음 RNase 처리, proteinase K 처리 등을 거쳐 정제시킨 후 실험에 사용하였다.

2. Southern hybridization법

Probe로 사용할 DNA 단편은 agarose gel로부터 용출하여 약 0.5μg내지 10μg의 DNA 단편을 20μl 멸균 증류수에 녹였다. 여기에 dCTP를 제외한 dNTP혼합액 10μl와 반응 완충용액 5μl와 32P-dCTP(50uCi) 5μl를 첨가한 후 DNaseI과 DNA polymeraseI이 적당하게 혼합된 효소 혼합액을 5μl넣어 전체 반응액 부피가 50μl되게 하였다. 이 반응용액을 15℃에 1시간 반응시킨 후 0.2M EDTA 5μl 첨가하여 반응을 정지시켰다. 뉴클레오타이드를 제거하기 위해 sephadex G-50 컬럼을 통과시켜 hybridization-용 probe로 사용하였다. Blotting시킨 나일론 필터를 prehybridization 용액(25mM KPO₄, pH7.4, 5XSSC, 5X Denhardt's soln, 50μg/ml salmon sperm DNA, 50% formamide) 5 ml에 넣고 42℃에서 3시간 이상 prehybridization시킨 후 10% dextran sulfate가 첨가된 hybridization 용액 5ml에 나일론 막을 옮겨서 표식된 DNA를 넣고 이중으로 밀봉하여 42℃에서 20시간 40rpm으로 진탕하면서 반응시켰다. 반응을 마친 나일론 막을 1XSSC-0.1%SDS 용액에 넣고 실온에서 15분간 2회 세척하고 다시 0.5XSSC/0.1%SDS 용액에 넣어 42℃에서 15분간 2회 세척한 후 20분간 풍건해서 크린렛으로 1겹 씩 다음 X-선 필름에 노출시켜 현상하였다.

3. DNA의 염기서열 분석

DNA의 염기서열 분석은 sanger 등의 dideoxy chain termination 방법으로 하였으며 DNA 운반체에 DNA 단편이 삽입된 재조합 DNA를 EXOIII와 S1 nuclease를 사용하여 삽입 단편의 크기를 순차적으로 줄여서 염기서열 분석용 DNA로 사용하였다. 정제된 시료 DNA 1 μ g내지 3 μ g을 eppendorf tube에 넣고, 선상으로 하기 위해 DNA 시료에 2N NaOH-2mMEDTA 용액을 첨가하여 5분간 실온에 방치한 후 5M ammonium acetate(pH7.6)를 첨가하여 중화시키면서 에탄올 처리로 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 증류수로 녹이고 반응 완충액과 universal primer를 넣어 열변성(65 $^{\circ}$ C, 2분간)시킨 다음 실온에서 서서히 식히면서 primer를 template DNA에 결합시킨 후에 [35S]dATP와 sequenase를 넣었다. 이 시료를 실온에서 반응시킨 후 termination 혼합액(ddNTP)이 염기별로 분주된 튜브(25 μ l)에 반응시료 (3.5 μ l)를 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후 반응 정지액을 첨가하였다. 이 시료를 95 $^{\circ}$ C에서 2분간 열 처리하여 변성시킨 다음 8% 염기서열 분석용 polyacrylamide gel에 반응 염기별로 loading하여 55 $^{\circ}$ C에서 2000V로 2시간 전기영동하여 이를 건조시킨 후 실온에서 X선 필름에 노출시켜 나타나는 밴드를 판독하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 표지유전자 검출감도의 향상연구

한우와 서양우 즉 비한우를 식별하는데 사용되는 표지유전자는 시료의

상태 및 실험조건에 따라 약해지는 검출감도를 높이기 위하여 2단계 증폭 방법이 도입되었다. 한우와 홀스타인 품종의 DNA 다형성을 RAPD법으로 비교 분석하기 위하여 1차적으로 증폭된 PCR 산물과 1차 증폭산물을 재증폭하여 얻어진 2차 증폭산물의 밴드양상을 비교 조사하였다(Fig. 44). 1차 증폭산물의 밴드양상은 기존에 보고하였던 결과와 마찬가지로, 표지유전자가 홀스타인 품종에서는 검출되지만 한우품종에서는 관찰되지 않았다. 즉 한우품종에선 검출되지 않았던 표지유전자는 1차 증폭산물을 재증폭하여도 그 결과에는 변화가 없었다. 이 결과는 표지유전자의 검출이 소품종에 매우 특이적임을 뜻한다. 그리고 2차 증폭반응으로 인하여 1차 증폭산물에서 관찰되지 않았던 밴드들이 새롭게 검출되지는 않았다.

이처럼 표지유전자의 검출감도가 약할때는 1차 증폭산물을 재증폭함으로써 결과의 신빙성을 높일 수가 있었는데, 그 이유로서 다음과 같은 요인들을 생각해 볼 수 있다. PCR법의 template DNA로서 1차 증폭반응에서는 제놈 DNA를 사용하는 반면에 2차 증폭반응에서는 1차 증폭산물인 크기가 작은 DNA 단편들을 사용하기에 보다 쉽게 DNA 변성을 시킬 수 있을 것이다. 이로 인하여 결합인자인 primer는 제놈 DNA보다 변성이 쉽게 일어나는 증폭산물 DNA와 더 쉽게 결합할 수 있을 것이다.

한편 한우 판별용 DNA 결합인자인 primer의 특이적 결합능력을 높이고, 한우 판별에 불필요한 DNA 밴드들의 검출을 억제하기 위하여 길이가 19mer 인 primer의 염기서열을 일부 다른 염기로 부분 개조하여 그 결합능을 검토하였다. 임의의 한 염기를 G+C 함량이 낮아지는 쪽으로 다른 염기로 치환하는 방식으로 10 종류의 primer를 제작하여 각각의 결합능을 기존의 primer와 비교 분석하였다. 그 결과 새로 제작된 primer는 종래의 것보다 표지유전자의 의 검출감도를 높이거나 불필요한 검출 밴드수를 줄이는데 큰 영향을 미치지 못하였다. 현재 사용중인 DNA 결합인자가 지금의 실험조건하에서는 최적의 결합능력을 나타내었다.

2. 표지유전자의 특성 연구

가. 표지유전자의 cloning

DNA 증폭산물로부터 표지유전자의 DNA 단편을 분리하기 위하여 우선 agarose gel에서 전기 영동을 하여 밴드 크기별로 분리하였다. 전기영동의 밴드양상은 표지유전자 밴드 외에 다수의 밴드들이 검출되기 때문에, 다른 DNA 단편들의 혼입 가능성을 가능한 배제할 필요가 있겠다. 따라서 표지유전자가 위치하는 밴드의 gel을 절단하여, 이를 template DNA로 사용하여 재증폭을 실시하였다(Fig. 45). 표지유전자의 밴드보다 크기가 큰 밴드들의 검출은 2단계 증폭처리로 거의 배제할 수 있었다. 표지유전자에 해당되는 밴드의 gel로부터 DNA를 용출하였으며 용출된 DNA 단편 말단을 효소 처리로 blunt end로 만든 다음 DNA 운반체인 pUC19의 BamHI 자리에 재조합하여 클로닝하였다. 분리된 클론들로부터 plasmid DNA를 추출하고 제한효소로 처리하여 전기영동한 결과 표지유전자와 같은 크기의 삽입 단편을 확인할 수 있었다(Fig. 45).

나. 표지유전자와 제놈 DNA와의 결합양상

클로닝된 표지유전자의 DNA를 probe로 사용하여 홀스타인은 물론 한우의 제놈 DNA와 어떤 결합 특성을 나타내는지 밝히기 위하여 Southern hybridization 분석을 수행하였다. 홀스타인 및 한우로부터 추출된 제놈 DNA를 EcoRI 제한효소로 절단하고 전기영동 후에 agarose gel상의 DNA를 필터에 옮겨서 방사성 물질로 표식된 표지유전자 DNA와 hybridization을 실시하였다(Fig. 46).

그 결과 표식된 표지유전자는 홀스타인의 제놈 DNA와 결합할뿐 아니라 한우 제놈 DNA와도 반응함을 알 수 있었다. 더욱이 두 소품종간에 결합양상도 거의 동일하였다. 한우 판별용 결합인자인 primer는 한우 제놈 DNA와 결합하지 않지만은 비한우의 표지유전자는 한우의 제놈 DNA와 결합한다는

것을 뜻한다. 이처럼 표지유전자의 염기서열이 한우와 비한우의 제놈 DNA에 모두 존재함에도 불구하고, 표지유전자가 비한우에서만 검출되는 이유는 primer 결합인자가 결합하는 제놈 DNA의 염기서열이 두 그룹간에 차이가 있기 때문이라 하겠다. 한편 결합양상이 뚜렷한 밴드형태가 아닌 불연속적인 밴드 형태로서 관찰되었던 것은 표지유전자가 제놈 DNA상에 널리 흩어져 존재하고 있음을 시사하는 것이다.

M 1 2 3 4 5 6 7 8

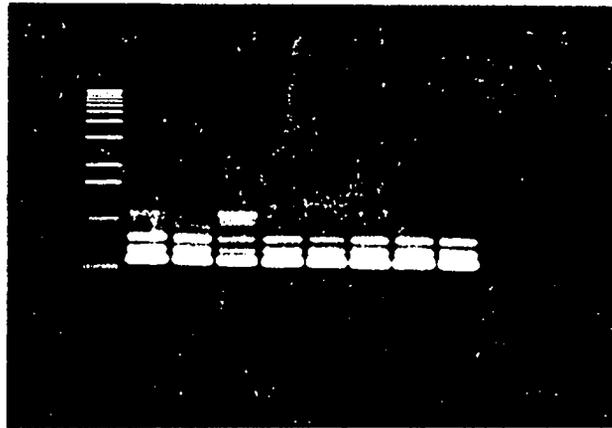


Fig.. 44. Comparison of RAPD patterns between PCR products and re-amplification products. Lanes 1 and 2, 1st amplification in Holstein(HT) and Hanwoo(HW); lanes 3 and 4, re-amplification of 1st PCR product in HT and HW; lanes 5-8, re-amplification of 2nd PCR product(1, 2, 4 or 8ul) in HW.

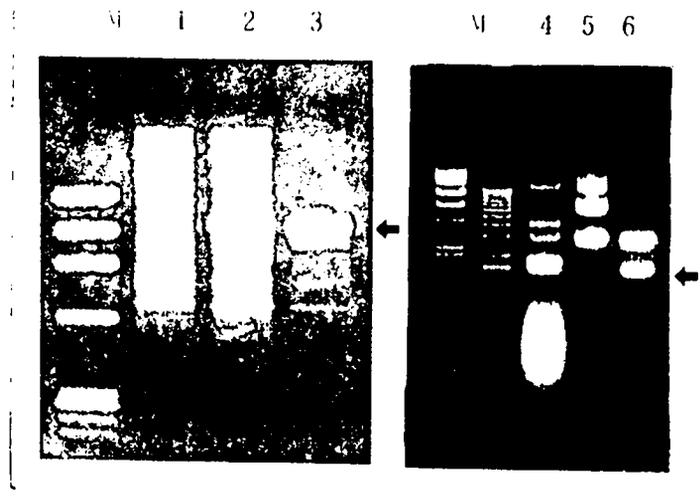


Fig. 45. Subcloning of the breed-specific DNA marker to vector pUC19. M, DNA size marker. Lanes 1 and 2, RAPD pattern in Hanwoo and Holstein, respectively; lane 3, re-amplification with gel containing the band of DNA marker; lane 4, vector only; lane 5, recombinant DNA; lane 6, enzyme-digested recombinant DNA.



Fig. 46. Autoradiograph following hybridization of EcoRI digested genomic DNAs with the cloned breed-specific DNA marker. HW, Hanwoo; HT, Holstein.

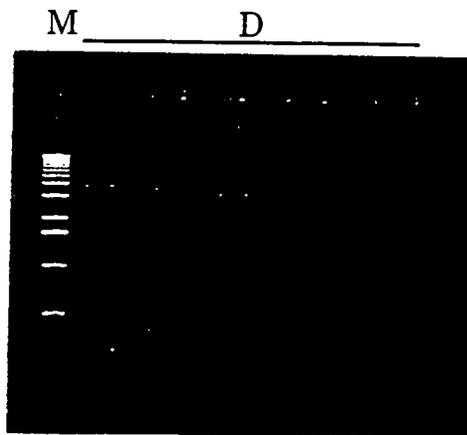


Fig. 47. Sequential deletion of the breed-specific DNA marker which was cloned to pUC19 vector.

다. DNA 표지유전자의 염기서열 결정 및 비교 분석

표지유전자와 상동성이 있는 염기서열이 비한우는 물론 한우의 제놈 DNA 내에 존재한다는 것이 Southern hybridization 분석을 통해 확인되었기 때문에 비한우의 표지유전자를 클로닝하여 염기서열을 결정하였다. 비한우의 제놈 DNA로부터 증폭되어 분리되어진 표지유전자의 염기서열을 결정하기 위하여, EXOIII와 S1 nucleasae를 사용하여 크기가 순차적으로 작은 여러개의 plasmid DNA를 만들었으며(Fig. 47), 합성효소를 이용하여 염기서열을 분석하였다(Fig. 48). 염기서열 분석 결과 표지유전자의 총 길이는 1435 bp이며, 염기조성에 있어서 A가 29%, C가 20%, G가 23%, T가 26%로 G+C 함량은 43%이었다.

표지유전자의 염기서열 특성은 DNA 분석 program을 사용하여 ORF(open reading frame)이나, RNA splicing site 등을 분석해 본 결과 단백질을 coding하는 구조유전자는 아닌 것으로 밝혀졌다. 표지유전자와 기존에 보고된 염기서열과 상동성 검색을 Genebank를 통하여 비교 분석해 보면 다음과 같은 DNA들과 부분적으로 상동성을 보였다. 소에서 보고된 SINE sequence(560bp)와는 78%, PstI family repetitive sequence(506bp)와는 80%, microsatellite(373bp)와는 55% 그리고 interspersed repetitive DNA(387bp)와는 63%의 상동성을 보였다(표 10). 위 염기서열들의 공통적인 특징의 하나는 반복 염기서열이라는 것이다. 이러한 사실은 Southern 분석의 결과인 표지유전자와 제놈 DNA와의 결합양상이 불연속적인 끄슬림(smear) 현상을 설명할 수 있을 것이다. 즉 제놈 DNA 내의 구조유전자는 단독으로 존재하는 것과는 달리 반복 염기서열이 차지하는 비율이 매우 높기 때문에 표지유전자와 결합할 수 있는 부분이 그 만큼 많이 존재할 가능성이 높다 하겠다.

GTGGA	TTCTC	CTTGC	AGTGC	AGGAC	TCTCA	AGAGT	CTTCT	CCAAC	45
ACCAC	AGTTC	AAAAG	CATCA	ATTCT	TTGGT	GCTCA	GCTTT	CTTTA	90
TGGAC	CAACT	CTCAC	ATCTA	TACAT	GACTC	CTGGA	AAAGC	CATAG	135
CCTTG	ACTAG	ACGGA	CCTTT	GTTGG	CAAAG	TAATC	CTCTG	CTTTT	180
TTATA	CTCAG	TGTAG	GTTGG	CCATA	GCTTT	TCTTC	CAAGG	AACAA	225
GTGAA	AGAGA	TCCAA	ATCAT	TGGCC	TGCCT	ATACT	TACTT	ACACA	270
AATGT	CCCAT	AACAG	TCCCT	TTCCC	TGTCC	CTTCA	CTTTC	TACCC	315
TCACA	CAGGC	CCTGA	GTATT	TTCCC	TGAAG	AATGC	CTTTT	ACACA	360
GCGAG	CAATG	GTGAG	GTCTC	CAGGA	GATTT	TAAA	CCAGA	AAGAA	405
ACTGA	ATTGT	GAGGT	GACTG	TTGGG	TGCAG	GGTCA	GGAAG	AAGAA	450
GAAGC	TGAGG	CAAAG	GGACT	AATCA	GGAGG	TGACA	GCAGT	TCAGG	495
GAAAA	TACTC	AGGGC	CTGTG	TGAGG	GTAGA	AAGTG	AAGGG	ACAGG	540
GAAAA	GGACT	GTTAT	GGACA	TTTGG	TGTAA	GTAAG	TATAG	GCAGG	585
CAGGC	CAATG	ATTTG	GACTC	CTTTC	ACTTC	CTTGG	AAGAA	AAGCT	630
ATAGC	CAACC	TAGAC	AGAGT	ATAAA	AAAGC	AGAGG	CATTA	CTTTG	675
CCAAC	AAAGG	TCCAT	CTAGT	CAAGG	CTATG	GCTTT	TCCAG	GAGTC	720
ATGTA	TAGAT	GTGAG	AGTTG	GACCA	TAAAG	AAAGC	TGAGC	ACCAA	765
AGAAT	TGATG	CTTTT	GAACT	GTGGT	GTTGG	AGAAG	ACTCT	TGAGA	810
GTCCT	TGCAC	TGAAG	GAGAT	CCACC	CATCC	ATCCT	AAGGA	GATCA	855
GTCCT	GGGTG	AACAT	TGAAG	NACTG	ATGTT	GAAGC	TGAAA	CTCCN	900
ATATT	TTGGC	CACCT	GATGC	GAAGA	GCTGA	CATCT	TTGGA	AACAC	945
CCTGA	TGCTG	GGAAA	GATTG	AAGGC	AGGAG	GGGAA	GGGGA	TGACA	990
GAGGA	TGAGA	TGGTT	GGATG	GCATC	ACCGA	CTCAA	TGGAC	ATGAG	1035
TTTGA	GCAAA	CTCCA	GGAGT	TGGTG	ATGGA	CAGGG	AGGCT	TGGTG	1080
TGCTG	TGGTT	CGAGG	AGTCA	CAGAG	AGTTG	GACAT	GACTG	AGCAA	1125
CTAAC	TGAAC	TGAAC	TGAAT	TAACT	ATTTA	GTATT	TCTAT	TTACA	1170
AGTGG	TACAG	ACACA	CATCA	CATTT	TAAAT	AGACT	ATTTT	TTAGA	1215
ACACC	TGGAA	TTACA	GAAAA	ATTAC	TATTT	TGAAT	ATGGT	ACAGA	1260
GAGAT	TGCAT	ATAGC	CTGCC	TCAGT	TTCCC	CTACT	AACAT	CCAAC	1305
ATTAG	TGTGG	CACAT	TCGTT	ACAAT	TAGTA	AGCCA	GTGTT	TACAT	1350
ATAAC	TATTA	ATAGA	AGCCC	ATATA	CACGG	CATAG	TTCTT	TCGTT	1395
TTTAT	CTAAG	GTCCT	CTTTT	TGTTT	CAGGA	TCCCA	GGACC		1435

Fig. 48. Sequences of the cloned breed-specific DNA marker

표 10. Genbank database를 이용한 표지유전자(1435bp)의 염기서열과 상동성의 비교분석

Sequences	Sequence size(bp)	Homologous sequence size(bp)	Homologous Rate(%)
Bovine SINE sequence	560	440	78
Cow <i>alu</i> -like art2 repetitive sequence	538	389	72
Bovine <i>Pst</i> family repetitive sequence	506	404	80
<i>B. taurus</i> microsatellite	373	204	55
<i>B. taurus</i> interspersed repetitive DNA	387	246	63

라. 결합인자의 제작 및 그 유용성 검토

비한우의 표지유전자 염기서열을 바탕으로 두 종류의 합성 primer를 새로 제작하여 한우와 비한우의 제능 DNA를 template DNA로 해서 PCR 증폭을 실시하였다. 그 결과 단일 밴드가 비한우에서 뿐만 아니라 한우에서도 검출되었으며, DNA 단편의 크기도 동일하였다(결과 미첨부). 이 결과는 표지유전자가 비한우는 물론 한우에도 존재한다는 가능성을 더욱 뒷받침해 주는 것이라 하겠다. 이상과 같이 비한우와 한우의 구별은 표지유전자의 검출유무로 판별할 수 있는데, 한우에서 표지유전자가 검출되지 않았던 것은 한우에 표지유전자에 해당하는 DNA 단편이 존재하지 않기때문이 아니라, DNA 결합인자인 primer의 결합력이 약하여 주어진 증폭조건하에서 표지유전자를 증폭할 수 없기 때문이라 하겠다. 앞으로 한우에서도 비한우와 마찬가지로 표지유전자에 해당하는 DNA 단편을 클로닝하여 염기서열의 구조를 결정함으로써 염기서열의 세밀한 비교 검토가 필요하다. 염기서열에 차이가 있다면 이를 바탕으로 판별에 불필요한 여러 밴드들을 제거시킬 수 있는 새로운 결합인자의 제작도 가능할 것이다.

제 4 절 요약

1. 표지유전자의 검출감도 향상

쇠고기의 신선도와 그밖에 밝혀지지 않은 원인들에 의해 표지유전자의 검출감도가 떨어질 경우에는 2단계 증폭방법을 통하여 표지유전자의 검출 감도를 향상시킬 수 있었다.

2. 결합인자의 부분 개조와 표지유전자의 검출에 미치는 효과

한우 판별용 DNA 결합인자인 19mer의 염기서열 중 G+C 함량 비율을 12개에서 10개 혹은 8개까지 줄인다 하여도 표지유전자를 제외한 불필요한 밴드들을 줄이는데 효과가 없었으며, 오히려 염기서열을 변경함으로써 검출되었던 표지유전자가 검출되지 않았다. 현재 사용중인 DNA 결합인자가 지금의 실험조건하에서는 최적의 결합능력을 보였다.

3. 표지유전자의 제놈 DNA와의 결합특성

가. 한우판별용 표지유전자를 DNA 운반체에 클로닝하였으며, 이를 DNA probe로 해서 한우와 비한우의 제놈 DNA와 결합특성을 Southern hybridization로 분석해 보면 양쪽 모두와 결합하였다. 즉 표지유전자는 비한우는 물론 한우의 제놈 DNA에도 존재한다는 것을 밝혔다.

나. 표지유전자와 제놈 DNA와의 결합양상은 뚜렷한 밴드형태가 아닌 불연속적인 밴드형태로서 관찰되었으며, 이는 표지유전자가 제놈 DNA상에 널리 흩어져 존재하고 있음을 밝혔다.

4. 표지유전자의 구조분석

가. 비한우로부터 클로닝된 표지유전자의 전 염기서열을 결정하였으며,

그 크기는 1435bp로서, 염기조성은 A가 29%, C가 20%, G가 23%, T가 26%로 G+C 함량은 43%이었다.

나. DNA 분석 program을 사용하여 표지유전자의 ORF(open reading frame)과 구조유전자의 특징인 intron내 splicing site를 분석한 결과 이들에 해당되는 염기서열이 관찰되지 않는 것으로 보아 판별용 표지유전자는 구조유전자가 아닌 것으로 밝혀졌다.

다. 염기서열의 특성을 Genbank를 통해 기존 보고된 염기서열과 비교 분석해 보면 소에서 보고된 반복적인 염기서열 특징을 보이는 SINE sequence, alu-like sequence, microsatellite, interspersed repetitive sequence와 높은 상동성을 보였다. 이렇게 제놈 DNA내 반복서열과 표지유전자가 높은 상동성을 보였다는 사실은 Southern 결과로서 표지유전자와 제놈 DNA와의 결합이 불연속적인 밴드로 검출되는 현상을 잘 설명해주는 것이다.

제 5 장 종합 결론

DNA 분석기법을 이용한 한우육 판별을 위한 실용화 연구를 통하여 한우 판별기술이 우리 나라 한우집단과 수입쇠고기를 대상으로 사용 가능하다는 것을 입증하였으며, 현장 사용시 발생하는 문제점들을 파악하여 이에 대한 해결책도 제시하였다. 또한 표지유전자 특성에 관한 연구를 통해 한우판별 기술을 한차원 높은 고도화된 기법으로 개발 가능한지도 검토하였다. 내용 별로 얻어진 결과를 정리하면 다음과 같다.

1. 한우 판별기술의 실용화 검증

한우육과 수입쇠고기의 판별은 소 품종간의 DNA 구조차이를 이용한 것으로서, 판별의 성공여부는 판별기술 그 자체에 있다가 보다는 외래형질이 상당부분 도입된 한우집단의 동질성 정도에 따라 좌우된다. 전국도별 한우 집단과 국내 젖소인 홀스타인 및 수입쇠고기를 포함하는 시료 약 1000여두를 대상으로 분석을 실시한 결과 판별 비율이 한우와 비한우 모두 약 95%에 달함을 확인하였다.

가. 한우 판별기술은 DNA 분석에 의해 한개 밴드의 검출유무로 소를 두가지 형태인 한우와 비한우로 구별하였다.

나. 검사된 한우시료는 700여두로서 제주도와 교잡우를 사육하고 있는 강화도를 제외한 전국적으로 모색이 황갈색인 한우로부터 채취하였다.

다. 검사된 비한우에는 국내 젖소인 홀스타인외에 서양소 품종 5종류와 수입쇠고기를 포함하였으며, 쇠고기 수입국으로는 미국, 뉴질랜드, 호주,

캐나다이다. 검사 시료수는 약 300점이였다.

라. 한우 판별기술의 판별비율은 한우와 비한우 모두 약 95%에 달하였으며, 이는 검사된 한우 집단 95%는 한우 형태로써 나머지 5%는 비한우 형태로 검출된다는 것을 의미한다. 마찬가지로 비한우 집단의 95%는 비한우 형태로 나머지 5%는 한우 형태로 검출된다는 것을 의미한다.

마. 강화도의 한우 교잡우 및 국내 변이종 한우에 있어서는 표지유전자의 검출양상은 일부는 한우 형태로써 나머지는 비한우 형태로써 검출되었다. 즉 교잡우는 교잡우로서 판별이 불가능하며 한우나 비한우 둘중의 어느 하나의 형태를 따른다는 것을 확인하였다.

2. 한우판별의 향상기술 개발

가. 한우 판별기술은 검출감도가 매우 높은 분석법이기 때문에 현장에서 수집되는 시료의 상태 및 분석 조건들에 따라 매우 민감한 반응을 보였다.

나. 쇠고기 판별에 있어서 도축후 즉시 채취한 신선한 시료인 경우에는 시료 공급원 및 부위별에 관계없이 표지유전자 검출이 밴드로서 명료히 관찰되었지만, 유통기간 및 보존방법의 차이에 따라 검출감도에 변화가 있음을 확인하였다.

다. 표지유전자의 검출감도가 떨어져, 한우와 비한우의 구별이 애매한 경우에는 2단계 증폭방법을 통하여 감도를 높일 수 있었다.

라. 판별의 분석시간은 쇠고기의 DNA 추출법 개량으로 이틀에서 하루로 단축하였으며, 시료도 적은 양(약 10mg)으로도 분석되었다. 또한 여러 증

폭 혼합액을 미리 준비하여 분주한 뒤에 냉동 보존후에도 사용할 수 있음을 확인하였으며, 이로 인해 분석과정의 단순화 및 분석 정확도를 높이는 데 기여하였다.

마. 표지유전자의 증폭조건이 폭넓게 검토되어, 제놈 DNA양, 반응시간 및 반응온도가 밴드 검출감도에 큰 영향을 미친다는 것을 확인하였다. 특히 제놈 DNA양은 극히 제한된 범위 약50ng 이하 내에서만 확실하게 검출되었으며 반응온도는 RAPD법의 primer 결합온도인 36℃보다 훨씬 높은 41℃에서도 안정적으로 결합하였다.

바. DNA 결합인자의 primer 염기서열을 일부 개조하여도(G+C 함량) 표지 유전자의 검출감도를 증대시키거나, 검출되는 여러 밴드들을 제거할 수 없었다. 현재의 DNA 결합인자가 결합능력이 제일높았다.

3. 판별기술의 고도화를 위한 표지유전자의 특성 규명

한우판별의 기준이 되는 표지유전자 검출 이외에 판별에 장애가 되는 불필요한 밴드들의 검출을 근원적으로 제거하기 위하여 우선 연구되어야 할 대상으로써 표지유전자가 분석되었다.

가. 비한우의 DNA 증폭산물에서 검출되는 표지유전자를 전기영동의 agarose gel로부터 DNA를 추출 정제하여 DNA 운반체인 vector(pUC19)에 클로닝하여 특성 분석에 사용되었다.

나. 표지유전자는 한우와 비한우 모두 제놈 DNA에 존재한다는 것을 밝혔다. 표지유전자를 DNA probe로 하여 비한우와 한우의 제놈 DNA와 결합특성

을 Southern hybridization법으로 분석해 보면 비한우는 물론 한우와도 결합함을 알 수 있었으며, 결합양상도 거의 동일하였다.

다. 표지유전자와 제놈 DNA와의 결합양상은 밴드 형태가 아닌 비연속적인 형태로 검출되는 것으로 보아 표지유전자와 결합하는 유사한 염기서열들이 제놈 DNA상에 널리 흩어져 존재하고 있음을 시사하였다.

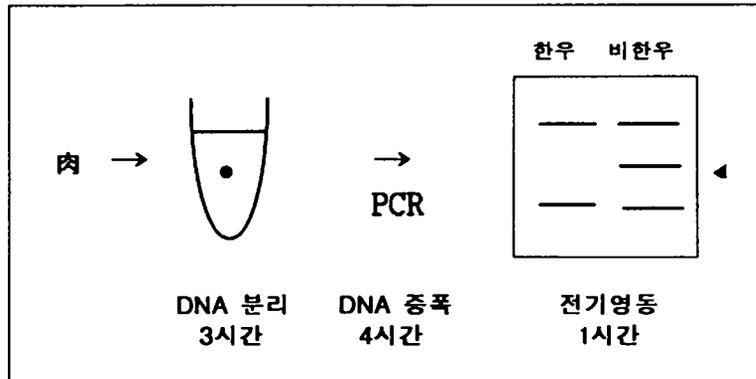
라. 표지유전자의 전 염기서열을 결정하였다. 표지유전자의 길이는 1435bp이며, 네 염기의 조성비율은 A가 29%, C가 20%, G가 23% 그리고 T가 26%이었으며, G+C 함량은 43%이었다. 또한 DNA 분석 program을 통해 구조 유전자의 특징인 정상적인 ORF(open reading frame)의 구조가 결여되어 있음을 확인하였고, 염기서열과의 비교분석을 통하여 기존에 보고된 반복 염기서열과 높은 상동성을 보였다. 이 사실은 위의 Southern 결과로서 밴드가 비연속적으로 검출되는 이유를 설명해 주고 있다.

마. 표지유전자가 모든 소에 공통적으로 존재한다는 것을 PCR 기법으로 재확인하였다. 즉 표지유전자의 염기서열을 바탕으로 DNA 결합인자인 primer를 2종류 제작하여 PCR 증폭을 실시하면 한우와 비한우 모두에서 같은 크기의 단일 밴드가 검출되었다.

바. 표지유전자의 특성 연구를 통하여 한우로부터도 이에 해당되는 DNA 단편을 클로닝해야 할 필요성이 새로이 대두되었으며 이를 통하여 비한우와의 구조 특성 차이를 밝힘으로서 새로운 결합인자의 이용 가능성이 검토되어야 할 것이다.

4. 한우판별의 표준실험법

가. 실험과정



나. 실험법

1) 준비

- 재료 - 쇠고기, 혈액
 시약 - DNA 추출 용액
 - Phenol
 - 판별용 결합인자(primer)
 - *Taq* DNA polymerase
 - 10X PCR Buffer
 500mM KCl
 100mM Tris-HCl(pH 9.0)
 15mM MgCl₂
 0.1% Triton X-100
 - dNTP
 25mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP 혼합액
 기구 - UV spectrophotometer
 - Thermal cycler (DNA 증폭기)
 - 전기영동장치
 - UV illuminator

2) 방법

< DNA 추출 >

쇠고기(약20mg)에 DNA 추출용액과 RNase (20ug/ml)를 첨가한다.



65℃에서 1시간 반응후 phenol 처리로 단백질을 변성시킨다.



12,000rpm에서 10분간 원심후 상층액에 ethanol 첨가로 DNA를 침전시킨다.



< DNA 증폭 >

추출된 DNA(50ng)를 아래와 같은 시약(DNA 증폭반응액)이 들어있는 튜브에 혼합한다.

* DNA 증폭반응액	
10x PCR buffer	5ul
10x dNTP	5ul
Primer(50ng/ul)	1ul
Taq DNA polymerase	1ul
D, D, W.	38ul
<hr/>	
	50ul



* PCR 반응

Preheating	95℃	5분	} 35 cycles
Denaturing	95℃	30초	
Annealing	36℃	60초	
Polymerization	72℃	60초	
Post-reaction	72℃	10분	



< DNA 관찰 >

DNA 증폭산물은 agarose gel에서 전기영동후 ethidium bromide 염색으로 UV 아래서 검출되며, 판별은 밴드 길이가 약 1.4kbp인 표지유전자의 검출 유무로 판단한다.

제 6 장 연구성과의 활용계획

DNA 진단에 의한 한우판별기술이 실용성이 있다는 것을 폭넓은 현장실험과 자체적인 Blind test를 통해서도 검증되었다. 또한 현장실험을 거치면서 야기될 수 있는 여러 문제점들도 파악되었고 그 해결책도 제시되었다. 지금까지는 한우육의 객관적 식별이 불가능하였지만 DNA 진단에 의해 한우와 비한우와의 구별을 과학적으로 판별할 수 있게 되었다. 이러한 판별기술 개발은 우리 고유의 식육자원인 한우를 대상으로 개발되어진 우리 나라 독창적인 연구결과라 할 수 있다.

앞으로 한우 판별기술이 한우육의 차별화와 밀접히 연계된다면 축산농가와 소비자의 보호는 물론 한우산업의 경쟁력을 높이는 데에 큰 비중을 담당하리라 기대된다.

1. 한우육 판별기술의 지도 및 교육

개발된 한우 판별기법은 공식력있는 전문기관을 통해서도 그 실용 가능성이 높다고 평가되어 국립농산물 검사소 및 국립환경 보건원에서도 과학적인 한우육 판별 검사법을 도입하고자 준비중에 있다. 본 연구팀은 그 동안 위 기관을 대상으로 교육과 기술훈련을 여러 차례에 걸쳐 실시하였고 한국 소비자 보호원에도 기술을 전수하였다.

한우육 판별기술의 지도 교육실적

기 관	연구원	기 간	내 용
한국소비자보호원	홍준배	1997. 4.8 - 4.10 9.22 - 10.11	- DNA 조작의 기본이론및 실습
서울시국립보건 환경원	정지현	1997. 3.11 - 3.12	- 쇠고기 제육DNA 추출기술 습득 - DNA 증폭기술
국립농산물검사소	이상근	1996, 1997	- 쇠고기 판별의 실습

2. 한우육 판별에 DNA 검사제도(DNA Inspection System) 도입

한우고기의 품질인증제도 및 전문판매점에 위의 검사제도를 적용함으로써 한우육 차별화의 촉진과 축산농가 보호 및 소비자의 불신감을 해소하는데도 큰 도움이 되리라 생각된다. 또한 백화점이나 전문매장에서 자체적으로 한우육 상품에 “DNA 검사필”이라는 제도를 도입하는 것도 소비자의 신뢰 회복과 불신감 해소는 물론 상품가치를 높이는데 기여할 것이다.

3. 한우의 혈통보존에 활용

일차적으로 후보 및 보증 종모우 선발에 적용하고, 점차 확대하여 한우 등록시에도 DNA 검사를 실시한다. 이렇게 함으로서 표현형으로 드러나지 않는 바람직하지 않은 외래 형질의 확산방지와 제거에 효과를 발휘할 수 있을 것이다.

4. 쇠고기 판별 실용화 기술의 시술방식

현재 식품분석 검사항목 중에는 액상시료의 일부 성분분석(pH, 수분, 당도 등의 측정)을 제외하고는 소비자들이 즉석에서 혹은 매장에서 성분을 분석할 수 있는 방법은 없으며, 첨단기술일수록 분석기관에서 까다로운 여러 실험절차를 거쳐야만 확실한 결과를 얻을 수 있는 것이 보통이다.

따라서 소비자들이 즉석에서 당사자들의 입회하에 간단히 한우육을 확인할 수 있는 기술개발의 요구나 기대는 판별기술의 성격상 그리고 현재의 과학기술의 수준을 초월하는 비현실적인 요구로 생각된다.

제 7 장 참고문헌

1. 康宗玉, 鄭奎成, 曹圭錫, 坂田亮一, 柳尙夏. 1992. 韓牛肉과 輸入牛肉의 鑑別 檢査에 관한 研究. I. 出荷前의 한우육과 수입우육의 肉色素 및 微細構造. 한국축산학회지 34(2):121.
2. 신형두, 이득환, 신언익, 양일석, 권종국. 1993. 혈액 단백질다형에 의한 지역별 한우의 유전거리에 관한 연구. 한국축산학회지 35(50):347.
3. 韓相基, 鄭義龍, 梁敦錫, 申 澈. 1991. 韓牛改良을 위한 乳蛋白質의 遺傳的 多型現像에 관한 研究. 한국축산학회지 33(2):111.
4. 한석현, 박성현, 이정렬, 김인정, 김창규, 이승배, 권명상, 김종배. 1993. DNA의 RFLP 방법을 이용한 한우육과 젓소육(수입육) 구별방법 개발에 관한 연구. 한국축산학회지 35(4):329.
5. 이창수, 유영복, 나기준, 조병대, 최병규. 1994. 핵산 분석법에 의한 한우의 판별. 한국축산학회지 36(4):369
6. 이창수, 오홍록. 1995. PCR법을 이용한 쇠고기의 성판별과 근육부위별 한우와 젓소의 DNA 다형성 분석. 한국축산식품학회지 15(1):26
7. 이창수, 상병찬. 1995. RAPD 분석법에 의한 소품종 판별용 표지인자의 검출 최적화 연구. 한국축산식품학회지 15(1):35
8. 鄭義龍, 柳忠鉉, 鄭鎬英, 金知한, 全基準, 韓相基, 申裕澈. 1993. 肉牛의 遺傳的 標識로서 乳蛋白質의 多型現像에 관한 研究. 한국축산학회지 35(5):347.
9. Patterson RLS. 1985. *Biochemical identification of meat species*. Elsevier Applied Science Publishers, London and New York.
10. Chikumi K, Ozutsumi T, Koishikawa T and Kato S. 1990. Species identification of cooked meats by DNA hybridization assay.

11. Ausubel F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl. 1987. *Current protocols in molecular biology*. Wiley-Interscience, New York
12. Beckman J.S. 1988. Oligonucleotide polymorphisms: a new tool for ic genetics. *Biotechnology* 6:1061.
13. Blin, N. and D.W. Stafford 1976. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 3:2303.
14. Krawetz, S.A., Bricker, R.A., Connor, W., Church, R.B. and Dixon G.H. 1988. Restriction fragment length polymorphism(RFLP) analysis of bovine nuclear protein genes. *Theor. Appl. Genet.* 75:402.
15. John G.K.W., Anne R.K., Kenneth J.L., Rafalski J.A. and Scott V.T. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18(22):6531.
16. Wintero A.K. and Thomsen P.D. 1990. A comparison of DNA-Hybridization, immuno-iffusion, countercurrent immunoelectrophoresis and isoelectric focusing for detecting the mixture of pork to beef. *Meat Sci.* 27:75.