

최 종  
연구보고서

당질공학과 면역학적 기법을 이용한  
한우육 식별 및 실용화 기술개발

Development for Hanwoo Meat  
Identification Using Glycotechnology  
and Immunological Methods

주관연구기관 상지대학교

농 립 부



# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “당질공학과 면역학적 기법을 이용한 한우육 식별 및 실용화 기술개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000. 10. 30

주관연구기관명 : 상지대학교  
총괄연구책임자 : 정 구 용  
연 구 원 : 임 태 진  
연 구 원 : 황 보 식  
연 구 원 : 김 우 태  
연 구 원 : 김 민 성  
연 구 원 : 박 종 은  
연 구 원 : 이 선 영  
연 구 원 : 김 은 선  
연 구 원 : 황 진 익  
연 구 원 : 홍 미 진  
연 구 원 : 차 윤 재  
연 구 원 : 손 준 규  
연 구 원 : 양 용 석

## 요 약 문

### I. 제 목

당질공학과 면역학적 기법을 이용한 한우육 식별 및  
실용화 기술개발

### II. 연구개발의 목적 및 중요성

UR 협상 타결로 쇠고기의 경우 2000년까지 수입제한 제도를 유지 하되 수입 쿼터량은 매년 증가할 예정이며, 2001년부터는 관세 41.2%로 수입자유화를 계획하고 있다. 또한 쇠고기 유통 기한이 진공포장 냉장육의 경우 90일로 연장됨으로써 사실상의 유통 기한이 자율화되었고, 이로 인한 외국산 수입육의 국내 공급이 증가하여 1987년에 90%의 쇠고기 자급율이 값싼 수입쇠고기의 등장으로 1989년에 63%로 급격히 감소하였고, 1991-1992년에는 심지어 50%까지 수입쇠고기가 국내시장을 잠식하여 한우 생산산업의 존폐 위기감이 조성되기도 하였다.

그러나, 1994년부터 시작된 향토 문화의 “신토불이 정신” 홍보와 고급육 생산 기술의 향상 그리고 도축 및 육가공의 현대적 종합 처

리장 설치 등은 한우육의 소비를 증가시켜 1996년 “한우산업의 발전 방향에 관한 양축농가의 여론조사”에서 “한우육 경쟁 자신 있다”라고 답한 양축농가가 80%를 차지하였고, 한우 경영의 지속성 여부를 묻는 질문에도 “종사하겠다”라는 대답이 전체의 75%로 긍정적인 반응을 나타낸 것은 앞으로의 한우산업 발전에 대단히 고무적인 현상으로 해석할 수 있었다. 그러나, 2001년 쇠고기시장 완전 개방에 앞서 한우 산업의 경쟁력 제고를 위한 설문 조사(한국 농어민 신문, 1997. 1. 13)에 따르면, 한우 고기 과잉 공급에 의한 경제적 피해를 예상하여 사육규모를 축소할 계획이 27.5%, 장래가 불안해 조만간 한우 사육을 포기할 계획이 10.0%로 나타나, 축산 농가가 매우 불안해하고 있다는 것이 확인되었다. 따라서 앞으로 쇠고기 시장의 완전 개방에 대처하기 위한 대응 방안으로써 생산성 향상을 통한 원가 절감과 더불어 한우육의 육질 고급화에 대한 공감대가 형성되어 있으나, 가공 및 유통에 대한 과정을 거치면서 젓소육→한우육, 수입육→한우육, 교잡우육→한우육 형태로 둔갑 판매되는 사례가 비일비재하며, 또한 쇠고기 판매 물량 중에서 수입육이 차지하는 비율이 50%에 이르고 국내산 쇠고기의 30~40%정도가 젓소육임을 감안할 때 쇠고기 유통 과정에서 수입육과 국내 젓소육의 상당한 물량이 고급 한우육으로 둔갑되어 판매되고 있다. 따라서 제도적 감시 체계와 과학적 검사방법이 부재된 상황에서 부정육 유통 부조리는 한우 시장에 심각한 타격을 줄 수 있고, 이로 인한 소비자 및 양축 농가의 막대한 손실과 피해는 물론 사회적으로 큰 물의를 일으키는 문제점들을 근본적으로 해결하지 않고서는 한우산업의 안정적 발전을 기대하기 어렵다.

냉장육 유통 시대에 한우 사육농가 및 소비자를 보호하고 수입육

및 젓소육 등이 한우 부정육으로 유통판매되지 않도록 하기 위해서는 한우육 생산, 가공 및 유통과정에서 신용과 품질을 보증할 수 있는 즉, 순수 한우육을 수입육, 젓소육 나아가 교잡우육으로부터 엄격히 구별할 수 있는 첨단 한우육 판별 기술개발이 선결과제이며 초미의 관심사라고 할 수 있다. 따라서, 본 연구의 목적은 당질공학 적 및 면역학적 방법의 연구영역 분야를 동시에 구사하여 최고기 상태에서 순수 한우육을 수입육, 국내산 젓소육 및 교잡우육과 차별화 할 수 있는 과학적인 한우육 품종감별 기술을 개발하고 실용화하는 것이 그 무엇보다 중요하리라 생각한다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

WTO체제 출범에 따른 축산물 수입자유화에 따른 2001년 냉장 우육의 수입 완전 개방에 따라 국내 한우육 산업 분야의 국제 경쟁력 강화가 절대 절명의 시급한 당면 과제로 주목되고 있는 바, 한우 산업의 국가 경쟁력 제고와 식육 유통시장 개방에 따른 대응 전략을 구축하기 위하여 다음과 같은 연구를 수행한다.

#### 1. 단백질공학 및 당질공학 기법을 이용한 한우육 특이 성분의 검색, 정제 및 생화학적 특성 분석

- 한우, Holstein, 수입우 및 교잡우의 육시료 채취 및 확보
- 각 부위별 육단백질의 추출 조건 확립
- PAGE 및 SDS-PAGE에 의한 부위별 우육 구성성분 분석

- 각종 Lectin에 대한 한우육 특이성분 검색
- Lectin column에 의한 표지 당단백질 농축
- 각종 chromatography에 의한 표지 당단백질 정제
- Peptide mapping, 구성 아미노산의 조성 분석 및 부분 아미노산 배열의 분석을 통한 한우육 특이 당단백질의 생화학적 특성 분석
- 당 조성 분석 등에 의한 표지 당단백질의 당쇄 분석
- N-glycanase에 의한 당쇄 절단
- 2-aminopyridine에 의한 형광 labeling
- Gel-filtration에 의한 PA-oligo 당 분획
- DEAE-5PW에 의한 당쇄 정제

## **2. 면역학적 기법을 이용한 한우육 특이 당단백질과 구성당쇄 항체 개발 및 진단용 항체 kit 생산**

- Hapten과 당쇄의 결합
- 당쇄 항원의 면역 및 세포융합
- 당쇄 ELISA와 immunoblotting에 의한 screening 및 당쇄 단일항체 생산
- 당단백질의 면역 및 세포융합
- 당단백질 ELISA와 immunoblotting에 의한 screening 및 당단백질 단일항체 생산
- 한우육 특이 성분(당단백질 및 당쇄)에 대한 단일항체 분석 system 확립
- 단일항체의 실용화 방안 확립
- 한우육 판별 진단용 항체 kit를 이용한 현장검증

○ 분석 system의 홍보 및 특허 출원

## IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

### 1. 단백질 공학 및 당질공학 기법을 이용한 한우육 특이성분의 검색, 정제 및 생화학적 특성 분석

#### 가. 전기영동 및 단백질공학을 이용한 한우육 특이성분의 검색

##### 1) 한우육 특이 성분 검색

육 단백질의 추출방법을 정립하기 위하여 증류수, 0.85% NaCl, 0.5% SDS, 0.5% Triton X-100, 그리고 5M Urea를 이용하여 한우육, 홀스타인육, 수입육, 교잡우육의 각 부위별 추출량을 비교 분석한 결과, 증류수를사용할 경우 다른 용매에 비해 가장 적은 양이 추출되었다. SDS-PAGE를 이용하여 5가지의 각각 상이한 용매로 추출한 육단백질의 구성성분을 분석한 결과, 추출조건에 따른 단백질의 추출량은 상이하였으나 추출된 단백질 중 용매에 따라 특이적으로 추출되는 성분은 없는 것으로 확인되었다. 또한 부위별 구성단백질이 거의 동일한 것으로 확인되어 특별히 부위를 명시하지 않는 한, 본 연구에서는 채끝을 이용하여 분석하기로 하였다.

##### 2) 품종별 헥소오스의 함량

한우육, 홀스타인육, 수입육, 그리고 한우와의 교잡육을 이용하여



헥소스(6탄당)의 함량을 페놀-황산법으로 분석한 결과, 한우육이 가장 많은 당을 함유하고 있는 것으로 나타났다. 홀스타인 및 수입육의 당 함량은 한우육의 약 1/3이었으며, 한우와의 교잡우육은 홀스타인육 및 수입육보다 많은 것으로 나타났다. 부위별 당 함량을 비교한 결과, 채끝부위가 가장 많고 그 다음이 목심, 등심의 순이었으며, 안심이 가장 적은 량을 나타내었다.

### 3) Lectin staining를 이용한 한우육 특이성분의 검색

한우육, 홀스타인육, 수입육, 그리고 교잡우의 수용성 단백질을 이용하여 Con A 및 RCA lectin을 이용하여 분석한 결과, 4가지의 품종간에는 유의적인 친화력의 차이가 없는 것으로 확인되었다. 그러나, WGA의 경우, 한우육과 홀스타인육에서 그 친화성의 차이가 발견되었다. UEA-1의 경우, 수입육은 다른 품종의 당단백질과 상이한 친화력이 있는 것이 확인되었다. 그러나, LCA lectin과의 친화력에는 그 유의성을 발견할 수 없었다. DBA lectin의 경우, 한우에 대한 특이성이 매우 강하여, 한우육의 약 35kDa성분이 특이적으로 결합하였으며, 이 성분은 홀스타인과는 친화성이 없는 것으로 나타났다. 또한 수입우의 경우, 홀스타인과 유사한 반응을 나타내어 약 35kDa성분이 한우 특이적인 성분일 가능성이 시사되었다. 또한, 교잡우의 경우 CB염색은 물론이고, DBA와의 친화력에도 큰 차이가 있는 것이 확인되었다.

### 나. 표지 당단백질의 정제

비가열 및 가열 한우육의 lectin염색의 결과가 거의 동일한 것으

로 확인되었으나, 100℃에서 35초간 가열할 경우, 약 33kDa성분 이외의 다른 성분들은 열에 매우 약한 것으로 확인되었다. 또한 이성분은 LCA lectin과 특이성이 매우 강한 것이 확인되었으며, 가열에 의해 DBA와의 친화력이 상실하는 것으로 나타났다. 가열에 의해 LCA와 특이적으로 결합하는 성분의 분자량은 32.1kDa 확인되었다(이하 이 성분을 HSC32.1이라 칭함). 따라서 본 연구에서는 100℃에서 35초간 가열한 한우육을 정제용 단백질 획분으로 사용하기로 하였다.

수용성 한우육 획분을 100℃에서 35초간 가열한 후, SDS-PAGE법으로 정제한 결과, HSC32.1의 회수율은 약 80% 이상이었다.

#### 다. 표지 당단백질의 생화학적 특성 분석

##### 1) HSC32.1의 아미노산 조성

Trypsin으로 부분 가수분해한 HSC32.1의 아미노산 조성은 역상 크로마토그래피를 이용하여 분석한 결과, 극성 아미노산이 전체의 약 56.5mol%를 차지하고 있는 것이 확인되었다. 또한 전하를 갖고 있는 아미노산 그룹이 약 33.5mol%를 차지하고 있어, HSC32.1는 수용성 polypeptides일 것이라 사료된다.

##### 2) N-말단 아미노산 배열

한우육을 SDS-PAGE로 분리한 후, PVDF막에 전사하여 CB염색을 한 후, CB에 의해 염색된 HSC32.1을 옅어내어 N-말단 아미노산 배열을 조사하였다. 그 결과, N-말단은 acylation에 의해 blocking화되어 있는 것이 확인되어, acylamino acid releasing enzyme을 사용하여, N-말단의 첫 번째 아미노산을 분리시킨 후, 아미노산 배열을 분석하

었다. 그 결과, N-말단은

- N - C - M - G - S - Q - L -

로 확인되었다.

### 3) HSC32.1의 구성 단당 조성

이온교환 크로마토그래피에 의한 HSC32.1의 당 조성을 조사한 결과, HSC32.1의 당 함량은 10.7%로써, Man, Gal, Fuc, GalNAc, 그리고 GlcNAc으로 구성되어 있었다. 온화한 알칼리 처리를 실시한 결과 GalNAc 및 Gal은 약 2/3가 감소하였다. 그러나 Man, Fuc 및 GlcNAc의 양은 거의 변화하지 않는 것이 확인되었다. N-Glycanase에 의해 N-결합당쇄를 유리시킨 후, 당조성을 조사한 결과, 약 65% 이상의 당이 감소하였다. 특히 Man 및 GlcNAc, 그리고 Fuc는 거의 대부분이 유리되었으나, Gal 및 GalNAc은 50%이상이 잔존하고 있었다. N-Glycanase는 N-결합 당쇄의 환원 말단GlcNAc와 Asn사이를 분해하는 효소이며, 따라서, HSC32.1에 결합되어 있는 N-결합 당쇄가 거의 대부분 유리된 것으로 확인되었다. 이상의 결과로부터, HSC32.1은 N- 및 O-결합당쇄를 갖고 있는 것이 확인되었다.

### 4) 각종 Lectin에 대한 HSC32.1의 친화력

한우육을 중류수로 추출하여 SDS-PAGE로 분리한 후, Lectin염색을 실시한 결과, HSC32.1는 본 연구에서 사용한 8가지의 lectin과 모두 반응하였다. 특히 PNA, DBA, RCA-120, 그리고 UEA-1과는 강한 친화력을 나타내었다. LCA lectin의 경우, 교잡우 및 수입육에서는 HSC32.1이 검출되지 않아, 이를 이용한 한우육과 수입육 및 교잡우와의 식별이 가능할 것으로 사료된다. 또한, 한우육 및 홀스타인육

을 100℃에서 35초 가열하여 LCA로 분석할 경우, 홀스타인육에서는 32.1kDa 성분이 검출되지 않았으나, 한우육은 LCA와 특이적으로 반응하였다.

#### 라. 표지 당단백질의 구성당쇄 정제

정제한 HSC32.1을 무수 히드라진으로 당쇄와 펩티드의 결합부위를 절단한 후, 2-PA화하여 DEAE-5PW column을 이용하여 용출시간 37.00분의 중성당과 41.29분의 산성당을 분획하였다. HSC32.1은 중성당과 시알산을 함유한 산성당으로 구성되어 있었으며, 특히 41.29분대의 산성당은 sialidase에 의한 가수분해로 중성당이 검출되는 부분에 용출되었다. 여기서 정제한 산성당 및 중성당 성분을 혼합하여 단일 항체의 시료로 사용하였다.

## 2. 면역학적 기법을 이용한 한우육 특이 당단백질과 구성당쇄 항체개발 및 진단용 항체 Kit 생산

### 가. 면역학적 기법을 이용한 한우육 특이 구성당쇄에 대한 항체개발 및 그 특이성 검증

위에서 정제한 HSC32.1의 당쇄를 Young등의 방법으로 *Salmonella minnesota* R595에 흡착시킨 후, *Salmonella minnesota* R595 250 $\mu$ g의량을 Balb/c mouse에 면역하였으며, 최종 면역 후 3일째 혈액을 채취하여 그 역가를 측정하였다. 그 결과, 본 연구에서 사용한 모든

mouse (총 5마리)에서 0.3~0.4의 역가가 나타났다. 그 중에서 역가가 가장 높은 mouse 3을 사용하여 단일항체를 작성하였다. 2회에 걸친 limiting dilution에 의해서도 한우육만을 인식하는 단일항체를 만드는데는 실패하였다. 그러나, 본 연구진은 지속적으로 당쇄에 대한 단일항체 생산에 관한 연구를 진행해 나아갈 생각이다.

#### 나. 표지 당단백질에 대한 단일항체의 생산

##### 1) 면역 및 Hybridoma의 생산

SDS-PAGE에 의해 정제한 HSC32.1을 PBS (100 $\mu$ l)에 용해시킨 후, 동량의 Complete freud adjuvant와 잘 혼합하여 10 $\mu$ g/mouse가 되도록 BALB/c mouse (5주령)의 피하 복강내에 면역하였다. 면역 2주일 후, Incomplete adjuvant를 사용하여 1차 면역과 동일한 방법으로 면역하였다. 2차 면역 1주일 후, PBS에 녹인 동일한 량의 항원을 꼬리 정맥에 면역시킨 후, 3일째에 항혈청을 분리하여, 그 역가의 상승을 indirect ELISA법을 이용하여 분석한 결과, 면역 횟수 의존적으로 증가하였다. HSC32.1에 대한 역가가 가장 높은 1번 mouse의 복합항체를 이용하여 immunoblotting을 실시한 결과, 본 연구에서 생산된 복합항체는 HSC32.1 뿐만 아니라 한우육의 대부분의 단백질들과도 친화력이 있는 것으로 나타났다.

HSC32.1에 대해 가장 특이하게 반응하고, 역가가 가장 높은 No.1 mouse의 Spleen cell을 이용하여 세포융합을 실시하였다. 24well plate에  $2 \times 10^7$ 개의 세포를 분주한 후 HAT selection을 한 후, 비융합 세포가 완전히 사멸된 후 HT배지로 hybridoma를 배양하였다. 융합된 hybridoma의 성장 및 배양액의 상태를 보면서, ELISA를 실시하

여 0.2이상의 역가를 나타내는 hybridoma를 screening하였다. 융합에 의해 생산된 hybridoma의 clone의 경우, HSC32.1에 대해 특이적인 항체를 생산하는 세포 이외에 다른 성질의 항체를 생산하는 융합 세포도 혼재하는 것이 일반적이므로, ELISA에 의해 확인되는 HSC32.1에 대한 역가는 낮게 나타나는 경우가 많다. 따라서 본 연구에서는 0.2이상의 역가를 나타내는 hybridoma의 배양액을 이용하여 HSC32.1에 대한 특이성을 검사하기 위하여 immunoblotting을 실시하였다. 그 결과, 8개의 hybridoma 중 4개가 HSC32.1와 강하게 반응하였으며, 나머지 4개의 clone은 비 특이적으로 반응하였다. HSC32.1과 강한 친화력이 있는 hybridoma의 경우, IB3, IC2, 그리고 IC4는 HSC32.1뿐만 아니라 저분자의 기타 성분과도 반응하는 것으로 나타났다. IIB2의 경우, HSC32.1와 매우 특이적으로 반응하였으며, 분자량 약 56kDa성분과도 강하게 반응하였다. 그러나, 다른 hybridoma의 특성과 비교할 경우, HSC32.1에 대한 특이성이 매우 강한 것으로 나타나, 이 IIB2 hybridoma를 이용하여 limiting dilution을 실시하기로 하였다.

## 2) Limiting dilution에 의한 단일항체의 생산

세포융합에 의해 만들어진 hybridoma의 배양액을 이용하여 HSC32.1에 대한 특이성을 검색한 결과, IIB2 clone이 가장 HSC32.1에 대해 특이적으로 반응하는 것이 확인되어, 이 hybridoma를 이용하여 limiting dilution을 실시하였다. Feeder cell을 이용하여 희석시킨 hybridoma를 96well plate에 1.5개 hybridoma cell/well의 농도로 분주하여 배양한 배양액을 이용하여 분석한 결과, 대부분의 hybridoma는 HSC32.1와 특이적으로 반응하는 것이 확인되었다. 그러

나, limiting dilution에 의해 screening된 대부분의 hybridoma는 HSC32.1이외에 다른 성분도 같이 인식하는 것으로 확인되었다. HSC32.1에 대한 특이성으로 볼 때, IIB2-2D7 clone가 가장 양호한 것으로 나타났으며, 친화력 또한 강한 것으로 확인되었다. 다른 hybridoma의 경우, HSC32.1보다 조금 높은 분자를 인식하고 있으면서, HSC32.1과의 친화력이 낮은 것이 확인되어, 본 연구에서는 IIB2-2D7을 이용하여 limiting dilution을 지속적으로 실시하였다.

2번째 limiting dilution에서는 96well plate에 hybridoma cell을 0.7개/well의 농도로 분주하였으며, 배지의 색이 혼탁하게 되거나, 단일 clone으로서 그 크기가 well의 1/3이상 성장했을 때, ELISA를 실시하여 positive clone을 screening하였다. 이렇게 선택된 monoclones을 이용하여 immunoblotting을 실시한 결과, 한우육의 특이성분인 HSC32.1을 인식하는 hybridoma를 얻는데 성공하였다 (IIB2-2D7-3B5 및 IIB2-2D7-3G11).

#### 다. 단일항체를 이용한 한우육 판별 시스템 검증

##### 1) Hybridoma IIB2-2D7-3B5의 대량생산

HSC32.1 특이적인 hybridoma인 IIB2-2D7-3B5가 생산하는 항체를 대량생산하기 위하여 5마리의 Balb/c mouse에 IIB2-2D7-3B5 cell을  $2 \times 10^6$ /마리가 되게 0.5ml의 PBS에 현탁한 후, 복강내에 주사하였다. 주사 후, 18일째 되었을 때(복부가 팽창하여 죽기 직전의 상태), 복부를 절개하여 복강내의 腹水를 회수하였다. 그 결과, 마리당 평균 18.2mg이 회수되었으며, SDS-PAGE에 의한 분석결과 IgG인 것으로 나타났다.

## 2) Hybridoma IIB2-2D7-3B5의 특이성 검증

Immunoblotting을 이용하여 단일항체와 홀스타인육과 교차반응을 조사한 결과, 홀스타인육과 매우 강하게 결합하는 것이 확인되었다. 수입육의 경우, 한우육과는 다소 친화력이 떨어지지만 HSC32.1와 동일한 크기의 성분과 반응하는 것으로 나타났다. Blocking제의 농도를 0.1%에서 0.5%로 높여서 실험한 결과, 한우육의 HSC32.1 성분과는 매우 약하게 반응하였으나, 홀스타인육과는 매우 강한 친화력이 있는 것이 확인되었다. 또한 수입육의 경우 거의 반응하지 않는 것으로 확인되었다.

열변성에 따른 각 시료의 결합력의 변화를 살펴본 결과, 100℃에서 10초간 가열할 경우, 한우육 및 수입육은 매우 약하게, 그리고 홀스타인육은 매우 강하게 반응하였다. 20초간 가열할 경우, 한우육은 그 결합력을 완전히 상실하였으며, 수입육은 약하게 반응하였으나, 거의 결합력을 상실하였다. 그러나, 홀스타인육은 강한 반응성을 나타내고 있는 것이 확인되었다.

## 3) 한우육 식별을 위한 실용화 모델 설정

### 가) 현장 적용 가능성 검토

한우육 식별을 위한 최적의 분석 모델을 설정하기 위하여, 먼저 면역학적 기법에 가장 많이 이용되는 ELISA법 및 Immunoblotting법의 장단점을 살펴보면 다음과 같다.



실험기법	장 점	단 점
ELISA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 시료 요구량이 미량( ~ug)</li> <li>- 감도가 매우 높음</li> <li>- 다량의 시료를 검색</li> <li>- 짧은 분석시간 (약 5시간이 소요)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 분석기기가 필요</li> <li>- Quality control을 위한 실험기법 필요</li> <li>- 정확성을 위한 전문가 필요</li> <li>- 비교적 높은 재료비</li> </ul>
Immuno-blotting	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 시료 요구량이 미량( ~mg)</li> <li>- 감도가 높음</li> <li>- 짧은 분석시간 (약 5시간이 소요)</li> <li>- 비교적 간단한 실험기법</li> <li>- 비교적 값싼 재료비</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 분석기기가 필요</li> <li>- 제한된 시료의 검색</li> </ul>

이상의 장단점을 비교 분석한 결과, 현장에서 요구되는 신속, 정확성을 만족시키기 위해서는 개선해야 할 점이 많다. 아직 모델을 설정하는 시점이기는 하지만, 위에서 제시된 장단점을 보완할 수 있는 새로운 기법의 도입이 요구된다. 항체를 고정화시킨 진단용 Kit의 개발 문제가 남아 있으나, 본 연구진에 의해 수행할 수 있는 한계를 벗어나고 있으며, 이는 본 연구가 완료된 후 고려하여도 늦지 않으리라 사료된다. 따라서 본 연구진은 보다 현장성이 있는 기법의 일환으로 Dot-blotting 기법을 검토해 보기로 하였다.

나) Dot-blotting에 의한 한우육 판별법 검증

한우육, 홀스타인육, 그리고 수입육을 well당 1 $\mu$ g 분주했을 경우, 비 가열육에서는 모든 시료가 반응하였으나, 100 $^{\circ}$ C에서 20초간 가열할 경우, 한우육은 모두 열변성된 것으로 나타났으나, 홀스타인육과 수입육은 반응하였다. 본 연구에서 밝혀진 바와 같이 비록 한우육이

negative로 검색이 가능하지만 최근 문제시 되고 있는 수입육과의 식별은 보다 확실하고 정확하게 이루어질 수 있게 되어, 한우육의 안정적인 발전에 크게 기여할 수 있으리라 확신한다.

### 3. 연구결과의 활용에 대한 건의

한우육의 유통은 근본적으로 부정육, 즉 수입육, 젓소육, 교잡육을 엄격히 구별할 수 있는 판별기술조건이 선행될 때만이 한우를 사육하는 생산농가 및 소비자를 보호할 수 있고, 유통자에게는 고급육 판매를 권장하여 한우육에 대한 신용과 품질을 향상시킬 수 있다. 따라서 한우육 판별 기술 개발은 국가 정책상 초미의 관심사이며, 이와같은 선행조건이 충족될 경우, 한우 브랜드화 사업으로 ① 값싸고 품질 좋고 안전성이 뛰어난 한우 고급육의 생산 및 유통을 위한 노력 ② 규격이 균일화된 한우육 생산 및 유통 ③ 생산, 도축, 가공, 유통의 현대화·시스템화 및 위생화 ④ 소비자 위주로의 인식 및 개념 전환 등의 방안이 요구되고 있으나, 이를 위한 필수적 요건인 한우육 식별법이 아직까지 완전히 확립되어 있지 않은 현 시점에서, 본 연구진에 의해 확립된 식별법은 그 가치가 매우 높으리라 확신한다.

이러한 연구의 성과를 현장에 적용하기 위해서는 보다 간편한 방법, 즉 Kit화가 이루어져야 할 것이다.

가. 본 연구에서 성공적으로 개발한 분석 기술 및 항체를 관련기관(축산물 검사소, 농협중앙회, 육가공 업체, 농산물검사소 등)에 집체교육 등을 통하여 전수할 필요성이 있을 것으로 사료된다.

나. 필요에 따라서 본 연구에서 만든 한우육에 대한 항체를 공급하고, 그 분석기법을 직접 전수하는 방안도 강구되어야 할 것으로 사료된다.

다. 저장기간 중에 방생하는 육즙을 직접 이용할 수 있는 방안을 강구하기 위해서 보다 간편한 단백질 정량법의 개발·보급이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

라. 둔갑육 유통을 근원적으로 봉쇄하고, 건전한 유통질서의 확립 및 소비자의 권익보호를 위한 조속한 Kit화가 이루어져야 할 것이다.

마. Lectin staining과 Immunoblotting기법은 감도가 매우 우수한 반면 실험조작이 복잡하며, ELISA는 정량적 분석을 위한 분석요원 및 고가의 분석기기가 필요한 단점이 있으므로 이를 보완할 수 있는 장비 또는 기법의 개발이 이루어져야 하리라 사료된다.

바. Dot-blotting의 경우, 단백질의 농축이 용이하고 전처리 과정이 매우 단순하여, 현장에서도 쉽게 적용할 수 있으리라 사료되며, 1회 분석에 필요한 시간이 매우 짧으며, 다수의 시료를 동시에 분석할 수 있는 기법이므로 이를 보급하기 위한 적절한 조치가 마련될 수 있도록 지속적인 지원이 있어야 할 것으로 사료된다.

사. 현장 적용의 측면도 매우 중요하지만, 학문적 가치를 높이기 위한 연구도 아울러 진행되어야 할 것으로 사료되며, 이를 위한 적절한 지원이 있기를 기대한다.

기본적으로 새로운 분석방법의 활용은 식육문화의 올바른 정착을 위해서 필수적으로 필요한 과정이며, 생산자 및 소비자의 인식과 국내 육류시장의 건전한 풍토 조성에 크게 기여할 것으로 생각한다. 또한, 본 연구진에 의해 확립된 system은 국내·외적으로 연구된 사

례가 없어, 이를 적극 홍보하여 현장에서의 유통질서 문란행위를 근  
절시키기 위한 노력이 강도 높게 단행되어야 할 것으로 생각한다.

## **SUMMARY**

### **I. Identification, purification and biochemical specification of Hanwoo meat-specific components using protein engineering and glycobiology techniques**

#### **1. Identification of Hanwoo meat-specific components using electrophoresis and protein engineering techniques**

##### **1) Extraction of meat proteins**

Amount of meat proteins were the least when 4 different breed (Hanwoo, Holstein, Imported or Cross-bred) meat samples were extracted with distilled water compared with 0.85% NaCl, 0.5% SDS, 0.5% Triton X-100 or 5 M Urea. Extraction of various parts of meat samples with 5 different extraction buffer, followed by SDS-PAGE showed that composition of meat protein were not affected by either extraction buffers or parts of meats employed. Striploin was used to identify Hanwoo meat-specific components if specific part of the meat is not mentioned in this study.

## 2) Hexose contents among 4 different breed meat samples

Hexose contents using phenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> method were higher in Hanwoo meat than any other breed meat samples. In particular, hexose contents in Hanwoo meat were three times higher than those in Holstein or imported meat samples. Hexose contents were higher in striploin than loin&chuk or loin and were lowest in tenderloin.

## 3) Identification of Hanwoo meat-specific components using Lectin staining

Analysis of lectin staining using ConA or RCA lectins showed no differences in affinity among 4 different breed meat protein samples. Hanwoo and Holstein meat proteins had affinity for WGA lectin. Compared for other breed meat proteins, imported meat proteins had affinity for UEA-1 lectin but not for LCA lectin. Hanwoo meat proteins, which are approximately 35kDa had significant affinity for DBA lectin and it was identified as Hanwoo meat-specific component.

## 2. Purification of marker (Hanwoo meat-specific) glycoprotein

Similar result for lectin staining was obtained between

intact and heat-denaturation of Hanwoo meat proteins. Meat protein components other than approximately 33kDa was susceptible for heat denaturation at 100°C for 35 seconds. The approximately 33kDa component had very high affinity for LCA lectin. However, heat denaturation of this component resulted in loss in affinity for DBA. The exact molecular weight of this component, which showed high affinity for LCA after heat denaturation at 100°C for 35 seconds, was 32.1kDa (called HSC32.1 in this report). Uptake of HSC32.1 was over 80% after heat denaturation at 100°C for 35 seconds, followed by SDS-PAGE purification.

### **3. Biochemical analysis of marker glycoprotein**

#### **1) Amino acid composition of HSC32.1**

HSC32.1 was treated with trypsin and applied to reverse chromatography to identify the amino acid composition. Approximately 56.5 mol% and 33.5mol% of amino acids were polar and charged, respectively, suggesting that HSC32.1 is highly soluble.

#### **2) Amino acid sequence at N-terminal**

Hanwoo meat proteins were separated on SDS-PAGE, transferred to PVDF mambrane and then stained using coomassie brilliant

blue dye (CB). CB stained HSC32.1 band was cut and determined for N-terminal amino acid distribution. Because N-terminal of HSC32.1 was blocked by acylation, the first amino acid was separated using acyl amino acid releasing enzyme. The N-terminal amino acid distribution of HSC32.1 was as follows: - N - C - M - G - S - Q - L -

### 3) Monosaccharide composition of HSC32.1

Analysis of ion exchange chromatography showed that sugar content of HSC32.1 was 10.7% and consisted of Man, Gal, Fuc, GalNAc and GlcNAc. Mild alkaline treatment caused decrease in amounts of GalNAc and Gal by 2/3 but not in Man, Fuc or GlcNAc. Approximately more than 65% of sugar was decreased by N-glycanase (detachment of N-linked sugar chain). In particular, most of Man, GlcNAc and Fuc were detached but more than 50% of Gal and GalNAc were still present. Since N-glycanase attacks the bond between GlcNAc and Asn at reduced terminal of N-linked sugar chain, most of N-linked sugar residues attached to HSC32.1 were released. From these finding, HSC32.1 contained N- as well as O-linked sugar chains.

### 4) Affinity of HSC32.1 for various lectins

Lectin staining analysis demonstrated that HSC32.1 had positive reaction with all lectins employed in the present study. In particular, HSC32.1 showed high affinity for PNA,



DBA, RCA-120 and UEA-1. Since HSC32.1 was not present in cross-bred and imported meats, these two breed meats were distinguished from Hanwoo meat by LCA lectin staining analysis. In addition, heat denaturation at 100°C for 35 seconds, followed by LCA lectin staining allowed to distinguish Hanwoo meat from Holstein meat because 32.1kDa component in Hanwoo meat but not in Holstein meat reacted specifically to LCA lectin.

#### **4. Purification of sugar chain of marker glycoprotein**

By treatment of purified HSC32.1 with anhydrous hydrazine to break the bond between sugar chain and peptide, followed by analysis of ion exchange chromatography using DEAE-5PW, neutral sugar with elution time of 37.0 minutes and acidic sugar with elution time of 41.29 minutes were fractioned. HSC32.1 consisted of neutral sugar and acidic sugar containing sialic acids. In particular, treatment of acidic sugar with elution time of 41.29 minutes with sialidase resulted in elution in the same fraction where neutral sugar was eluted. Thus, combined purified acidic and neutral sugars were used for monoclonal antibody preparation.

## **II. Development of antibodies against Hanwoo meat-specific glycoproteins as well as sugar chain and production of diagnostic antibody kit**

### **1. Development and specification of antibodies against Hanwoo meat-specific sugar chain**

BALB/c mouse was immunized to 250 ug of purified HSC32.1 sugar chain after absorbed on *Salmonella minnesota* R595. Animals (n=5) were immunized 4 times at 4 day intervals. Blood samples were collected at 3 day after final immunization for determination of antibody titer, which ranged from 0.3 to 0.4. Spleen cells from mouse #3, whose titer was highest among 5 animals, was fused with P3X63Ag8-6.5.3 myeloma cells using 45% PEG. After HAT selection, first and second limiting dilutions were performed using positive hybridoma with highest titer (called H2G5). However, monoclonal antibody to specifically recognize Hanwoo meat was not successively produced.

### **2. Development of antibodies against Hanwoo meat-specific glycoproteins**

### 1) Immunization and Hybridoma Production

Purified HSC32.1 by SDS-PAGE was dissolved in 100  $\mu$ l of PBS and then mixed with equal amount of complete Freund's adjuvant. 10  $\mu$ g of the immunogen was injected intraperitoneally to BALB/c mouse. Two weeks after first immunization, second immunization was performed using incomplete Freund's adjuvant. One week after second immunization, same amount of immunogen dissolved in PBS was injected to tail vein. Antiserum was collected 3 days later and indirect ELISA was performed to determine the antibody titer. Antiserum from mouse #1 showed the highest titer. Immunoblotting analysis demonstrated that the polyclonal antibody produced from mouse #1 had affinity for most of Hanwoo meat proteins as well as HSC32.1. Spleen cells from mouse #1 reacting highly specifically with HSC32.1 were used for cell fusion.  $2 \times 10^7$  cells per well were plated in 24 well plate. After HAT selection, fused cells were incubated with HT medium. Hybridoma cells with titer more than 0.2 were screened and tested antibody reactive with HSC32.1 using immunoblotting. Four (IB3, IC2, IC4 and IIB2) among 8 hybridomas reacted strongly with HSC32.1. IB3, IC2 and IC4 hybridomas reacted with HSC32.1 as well as other low molecular components. IIB2 hybridoma reacted with approximately 56kDa component but very specifically with HSC32.1 compared with IB3, IC2 or IC4 hybridomas.

## 2) Production of monoclonal antibody by limiting dilution

Analysis of screening to test the specificity of the culture supernatant from fused hybridomas demonstrated that IIB2 hybridoma clone was most reactive with HSC32.1 among hybridomas tested. Therefore, limiting dilution was performed using IIB2 hybridoma clone. The hybridoma was diluted with feeder cells, plated on well (1.5 cells per well) and cultured. Analysis of screening of the culture supernatant from the hybridomas showed that most of hybridoma cells reacted specifically with HSC32.1 as well as other components. Among them, IIB2-2D7 clone had the most specific reaction with HSC32.1 and very high affinity as well. Therefore, limiting dilution was performed using IIB2-D7 hybridoma clone. In this limiting dilution, the hybridoma cells were plated in each well (0.7 cell per well) of 96 well plate and then cultured. When the culture supernatant turned turbid or the sing clone was grown up to 1/3 of the size of well, positive clone was screened using ELISA. Using immunoblotting of the positive clone, two hybridoma clones (IIB2-2D7-3B5, IIB-2D7-3G11) to react specifically with HSC32.1, which is Hanwoo meat-specific protein component, were successfully obtained.

## 3. Evaluation of Hanwoo meat identification using monoclonal antibody

1) Mass production of Hybridoma IIB2-2D7-3B5

To produce large quantities of monoclonal antibody against HSC32.1, Hybridoma IIB2-2D7-3B5 cells ( $2 \times 10^6$ ) dissolved in PBS were injected intraperitoneally to BALB/c mouse. Ascitic fluid was collected 18 days after injection. Average 18.2 mg of the antibody was recovered and classified as IgG by SDS-PAGE analysis.

2) Evaluation of specificity of monoclonal antibody from Hybridoma IIB2-2D7-3B5

Immunoblotting analysis showed that the monoclonal antibody reacted strongly with Holstein meat. Imported meat reacted with the component which is same size of HSC32.1 although the affinity was low. The monoclonal antibody reacted very weakly with HSC32.1 from Hanwoo meat, very strongly with Holstein meat but hardly with imported meat by increasing blocking reagents from 0.1% to 0.5%. When the meat samples were heat-denatured at 100°C for 10 seconds, the monoclonal antibody reacted very weakly with Hanwoo or imported meats but very strongly with Holstein meat. When the meat samples were heat-denatured at 100°C for 20 seconds, the monoclonal antibody lost to react with Hanwoo meat or very weakly with imported meats but still very strongly with Holstein meat.

3) Evaluation of Hanwoo meat identification using dot-blotting

When Hanwoo, Holstein or imported meat samples were plated in well (1 $\mu$ g per well), no heat-denatured meat samples of all breed reacted. Hanwoo meat samples failed to react but Holstein and imported meat samples reacted by heating the meat samples at 100°C for 20 seconds.

# **CONTENTS**

## **Chapter 1. Introduction**

## **Chapter 2. Identification, purification and biochemical specification of Hanwoo meat-specific components using protein engineering and glycobiology techniques**

### **1. Introduction**

### **2. Materials and Methods**

- 1) Samples
- 2) Extraction of protein
- 3) Determination of protein content
- 4) Analysis of SDS-PAGE
- 5) Analysis of western blotting and lectin staining
- 6) Analysis of sugar
- 7) Condensation of marker components using precipitation with ammonium sulfate
- 8) Purification of marker components using DEAE-sepharose ion exchange chromatography

- 9) Purification of marker components using SDS-PAGE
- 10) Analysis of amino acid composition
- 11) Analysis of amino acid sequence at N-terminal
- 12) Peptide mapping using trypsin
- 13) Analysis of monosaccharide
- 14) Analysis of affinity for lectins

### **3. Results and Discussion**

- 1) Identification of Hanwoo meat-specific components using electrophoresis and protein engineering techniques
- 2) Identification of marker glycoprotein
- 3) Purification of Hanwoo meat-specific glycoprotein
- 4) Biochemical analysis of marker glycoprotein
- 5) Purification of sugar chains of marker glycoprotein

### **4. References**

## **Chapter 3. Development of antibodies against Hanwoo meat-specific glycoproteins as well as sugar chain and production of diagnostic antibody kit**



## **1. Introduction**

## **2. Materials and Methods**

- 1) Samples
- 2) Extraction of protein
- 3) Determination of protein content
- 4) Analysis of SDS-PAGE
- 5) Analysis of western blotting
- 6) Analysis of dot-blotting
- 7) Immunization with HSC32.1
- 8) Production of hybridoma cells
- 9) Analysis of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
- 10) Analysis of immunoblotting
- 11) Hybridoma cloning

## **3. Results and Discussion**

- 1) Production of monoclonal antibody against sugar chain of HSC32.1
- 2) Production of monoclonal antibody against glycoprotein of HSC32.1
- 3) Establishment of system for identification of Hanwoo meat

## **4. References**

# 목 차

## 제 1 장 서 론

### 제1절 연구개발의 배경 및 필요성

1. 연구의 배경
2. 연구의 필요성
  - 가. 기술적 측면
  - 나. 경제·산업적 측면
  - 다. 사회·문화적 측면

### 제2절 국내외 연구개발 현황

### 제3절 연구개발 목적 및 범위

## 제2장 단백질 공학 및 당지공학 기법을 이용한 한우육 특이성분의 검색, 정제 및 생화학적 특성분석

### 제1절 서 설

### 제2절 재료 및 연구방법

1. 공시료

2. 단백질 추출
3. 단백질 정량
4. SDS-PAGE 분석
5. Western blotting 및 Lectin 염색
6. 당 분석
7. 염색에 의한 표지성분의 농축
8. DEAE-sepharose ion-exchange chromatography에 의한 표지성분의 정제
9. SDS-PAGE에 의한 표지 단백질의 정제
10. 아미노산 조성 분석
11. N-말단 아미노산 배열 분석
12. 트립신 처리에 의한 peptide map
13. 단당 분석
14. Lectin과의 친화력

### 제3절 결과 및 고찰

1. 전기영동 및 단백질 공학을 이용한 한우육 특이성분 검색
2. 표지 당단백질의 검색
  - 가. 품종별 헥소오스의 함량
  - 나. Lectin staining을 통한 한우육 특이성분의 검색
  - 다. 내열성 단백질을 이용한 한우육 표지성분의 검색
3. 한우육 특이 당단백질의 정제
  - 가. 전기영동에 의한 표지성분의 정제
  - 나. DEAE-sepharose ion-exchange chromatography에

- 의한 표지성분의 정제
4. 표지 당단백질의 생화학적 특성분석
    - 가. 한우육 특이성분의 분자량
    - 나. HSC32.1의 아미노산 조성
    - 다. N-말단 아미노산 배열
    - 라. Peptide mapping과 부분 아미노산 배열
    - 마. HSC32.1의 구성 단당 조성
    - 바. 각종 Lectin에 대한 HSC32.1의 친화력
  5. 표지 당단백질의 구성 당쇄 정제

#### 제4절 참고문헌

### 제 3 장 면역학적 기법을 이용한 한우육 특이 당단백질과 구성당쇄 항체개발 및 진단용 항체 Kit 생산

#### 제1절 서 설

#### 제2절 재료 및 연구방법

1. 공시료
2. 단백질 추출
3. 단백질 정량
4. SDS-PAGE분석
5. Western blotting

6. Dot-blotting
7. HSC32.1의 면역
8. Hybridoma cells의 생산
9. Enyme-linkedd immunosorbent assay (ELISA)
10. Immunoblotting
11. Hybridoma의 cloning

### 제3절 결과 및 고찰

1. HSC32.1의 당쇄에 대한 단일항체의 생산
  - 가. HSC32.1당쇄의 정제
  - 나. 당쇄의 면역 및 그 역가 분석
  - 다. 당쇄에 대한 단일항체의 생산
2. HSC32.1의 당단백질에 대한 단일항체의 생산
  - 가. 면역 및 역가 검증
  - 나. Hybridoma의 생산
  - 다. Limitting dilution에 의한 ksdlfgkdcp의 생산
3. 한우육 식별 시스템의 확립
  - 가. 당쇄를 이용한 한우육 식별
  - 나. 항체를 이용한 한우육 식별
  - 다. Dot-blotting에 의한 한우육 식별
4. 한우육 식별 방안

### 제4절 참고문헌

# 제 1 장 서 론

## 제 1 절 연구개발의 배경 및 필요성

### 1. 연구의 배경

GNP 만불시대를 맞이한 우리 나라의 국민 식생활 패턴은 다양한 소비 형태의 변화로 말미암아 농산물 중 쌀을 포함한 곡류의 소비는 감소된 반면 상대적으로 축산물의 소비는 지속적인 증가 추세를 나타내고 있다. 1995년 연간 축산물 생산량은 총 5조 9천억원 규모로서 이중 한우가 차지하는 비율은 1조 8천억원으로 약 30%를 차지하고 있다. 또한 육류 소비량은 식육 문화의 다양화로 연평균 6.7%씩 증가하고 있으며, 1995년도 1인당 육류 소비량이 27.5 kg으로 이 중에서 쇠고기의 소비량은 연 10.3%의 가장 높은 소비 증가율(95년/90년)을 보이고 있다.

특히 축산물의 UR 협상 타결로 쇠고기의 경우는 2000년까지 수입 제한 제도를 유지하되 수입 쿼터량은 매년 증가할 예정이며, 2001년부터는 관세 41.2%로 수입자유화를 계획하고 있다. 또한 쇠고기 유통 기한이 진공포장 냉장육의 경우 90일로 연장됨으로써 사실상의 유통 기한이 자율화되었고, 이로 인한 외국산 수입육의 국내 공급이 증가하여 1987년에 90%의 쇠고기 자급율이 값싼 수입쇠고기의 등장으로 1989년에 63%로 급격히 감소하였고, 1991-1992년에는 심지어 50%까지 수입쇠고기가 국내시장을 잠식하여 한우 생산산업의 존폐 위기감이 조성되기도 하였다.

2001년 쇠고기시장 완전 개방에 앞서 한우 산업의 경쟁력 제고를 위한 설문 조사(한국 농어민 신문, 1997. 1. 13)에 따르면, 한우 고기 과잉 공급에 의한 경제적 피해를 예상하여 사육규모를 축소할 계획이 27.5%, 장래가 불안해 조만간 한우 사육을 포기할 계획이 10.0%로 나타나, 축산 농가가 매우 불안해하고 있다는 것이 확인되었다. 따라서 앞으로 쇠고기 시장의 완전 개방에 대처하기 위한 대응 방안으로써 생산성 향상을 통한 원가절감과 더불어 한우육의 육질 고급화에 대한 공감대가 형성되어 있으나, 가공 및 유통에 대한 과정을 거치면서 젓소육→한우육, 수입육→한우육, 교잡우육→한우육 형태로 둔갑 판매되는 사례가 비일비재하며, 또한 쇠고기 판매 물량 중에서 수입육이 차지하는 비율이 50%에 이르고 국내산 쇠고기의 30~40%정도가 젓소육임을 감안할 때 쇠고기 유통 과정에서 수입육과 국내 젓소육의 상당한 물량이 고급 한우육으로 둔갑되어 판매되고 있다. 따라서 제도적 감시 체계와 과학적 검사방법이 부재된 상황에서 부정육 유통 부조리는 한우 시장에 심각한 타격을 줄 수 있고, 이로 인한 소비자 및 양축 농가의 막대한 손실과 피해는 물론 사회적으로 큰 물의를 일으키는 문제점들을 근본적으로 해결하지 않고서는 한우산업의 안정적 발전을 기대하기 어렵다.

따라서, 본 연구의 목적은 당질공학적 및 면역학적 방법의 연구영역 분야를 동시에 구사하여 쇠고기 상태에서 순수 한우육을 수입육, 국내산 젓소육 및 교잡우육과 차별화할 수 있는 과학적인 한우육 품종감별 기술을 개발하고 이를 kit화하여 산업적으로 실용화하는데 있다.

## 2. 연구의 필요성

### 가. 기술적 측면

한우육 판별기술 개발은 국제시장 자유화에 따른 외국산 수입육과 국내산 젓소육의 한우 둔갑육 유통을 근본적으로 차단하여 수입육 및 젓소육과 차별화함으로써 한우사육 농가를 제도적으로 보호함은 물론 판매시장 보호, 소비자의 신뢰도 구축 등 부정육 유통근절과 수입개방화 시대에 국내 한우 산업을 안정적으로 발전시킬 수 있는 과학적 감시 체제 기반을 마련할 수 있어 반드시 해결해야 할 현실적 과제라고 할 수 있다.

그 동안 축육자원의 축종 판별을 위한 기술로서 관능적 검사법, 혈청학적 검사법, 이화학적 검사법, 생화학적 검사법 및 면역학적 방법 등이 개발되어 왔고, 특히 면역학적 방법 중 복합항체 (polyclonal antibody)를 이용한 면역효소측정법(ELISA)과 IEF 기술을 이용한 단백질 전기영동 방법이 축종판별에 비교적 정확도가 높은 방법으로 사용되어졌다.

또 다른 접근방법으로서, 최근 분자생물학 및 분자유전학 기법의 발달에 따라 유전자 분석기술이 육의 축종판별에 도입되어 종 특이적인 DNA 염기서열 차이에 따른 축종판별은 물론 동일 축종 내 품종 판별의 가능성도 제기되었다. 국내에서도 최근 일부 연구자들이 PCR-RAPD (random amplified polymorphic DNA) 기법을 이용하여 한우 특이적 DNA 표지인자를 개발하고 이를 이용하여 한우육 판별에의 응용을 시도한 바 있다. 그러나, RAPD 기법을 이용한 지금까지의 연구 결과를 종합하여 볼 때, 산업적 실용화를 이룩하기 위해서는



앞으로도 계속하여 많은 연구가 심도있게 진행되어야 할 필요가 있다고 판단된다.

최근에 본 연구진은 육 품종 감별의 새로운 접근 방법으로서 세포막 당쇄(sugar chain)에 대한 특이적 Lectin을 사용하여 당질공학적 연구를 수행한 결과, 일본의 재래소인 和牛육과 미국산 수입육을 각각 특이적으로 식별 가능한 미량의 당단백질이 존재하고 있다는 사실을 발견하였고, 이러한 결과는 Lectin을 이용하여 품종 특이 당단백질 표지인자를 검출할 수 있음은 물론이고 이를 이용한 우육 품종 감별의 가능성을 높게 시사하고 있다.

본 연구에서는 2001년 쇠고기 시장이 완전 개방되기 전까지 국내 시장에서 유통 판매되고 있는 순수 한우육과 수입육 및 젓소육을 신속·정확하고 간편하게 판별할 수 있는 실용성 높은 식별 기술을 개발하고 이를 산업적으로 실용화하여 실제의 검사업무에 활용할 수 있는 과학적인 한우육 감별 기술 체계가 조속히 확립되도록 할 것이며, 이와 같은 목표를 달성하기 위해 당질공학적 기법을 이용하여 표지 당단백질을 정제하고, 한우육 당단백질의 특이적인 당쇄와 특이적으로 반응하는 Lectin을 검색하며, 또한 한우육 특이성분(당단백질 및 그 당쇄)에 대한 단일항체를 만들어 면역학적 방법에 의한 한우육 식별 단일항체 kit를 개발하고자 한다. 또한, ELISA법을 이용하여 한우육 표지 당단백질의 당쇄와 특이적으로 결합하는 Lectin kit의 개발을 실시하는 등, 이 두 가지 방법을 활용하여 검사기술의 효율성과 실용성이 극대화된 새로운 첨단 한우육 판별기술 체계를 확립하고자 한다.

#### 나. 경제·산업적 측면

한우육의 보호는 한우산업이 농촌경제에 차지하는 비중을 생각할 때 매우 중요하며, 특히 한우는 우리 나라의 지역에서 수천년 동안 함께 살아온 역사성을 인식하여 그 자원 보존은 물론 올바른 육류소비 문화를 확립하여야 한다. 또한 1992년부터 실시된 S.B.S(업계간 자율 구매)제도의 확대에 인하여 수입육이 대도시를 포함한 중소도시로 확산함에 따른 유통질서의 재확립을 위하여 축종 및 품종간 판별기술 개발을 확립하여 유통거래 문화를 정확시켜야 한다. 이러한 목적을 달성하기 위해서는 한우육에 대한 객관적이고 과학적인 지표를 제공하므로써 한우육 둔갑 현상 등 최고기 부정불법 유통체계의 문제점을 근본적으로 해결할 수 있고 고급육 생산을 통한 한우육의 국내 수요창출과 품질 경쟁력 확보로 한우 사육농가의 소득 증대 효과를 기대할 수 있다.

한우육과 약 3~4배의 가격 차이로 유통되는 저가의 수입육이 고가의 한우육으로 둔갑 판매되므로써 소비자들이 연간 약 9,000 억원에 해당되는 상당한 경제적 피해를 입고 있다. 따라서, 한우육 신뢰도의 하락에 따른 양축농가의 경제적 불이익과 생산 의욕 감소를 방지하고 순수 한우 유전 자원의 보존을 위해 한우육 판별 기술의 체계가 반드시 확립되어야 한다.

현재 축종 및 품종판별법으로 그 이용성이 검토되고 있는 분자 생물학적인 접근 방법은 genomic DNA의 정제 및 보존상의 문제가 대두되고 있으며, PCR의 응용에 따른 전문적인 기술적 기법 및 실용에 따른 소요 경비가 매우 높아 유통 현장에서의 실용성 적용에 문제점이 제시되고 있어, 처리 구별에 따른 유의성 및 재현성을 높이기 위한 축종 및 품종 판별 방안이 검토되어야 한다.

이러한 관점에서 한우육 표지 당단백질의 당쇄와 특이적으로 반응하는 Lectin을 이용하면 기존의 방법보다 신속하게 그 결과를 명확히 판별할 수 있어 현장에서의 응용가능성이 매우 높은 것으로 판단되고 있다.

#### 다. 사회·문화적 측면

국내 쇠고기 유통시장에서 수입육과 젓소육이 한우육으로 둔갑되어 판매되는 사례가 비일비재하므로써 소비자들의 한우육에 대한 불신감이 증폭되고 심지어 사회적으로 큰 물의를 야기시키고 있어, 이에 대한 대책마련의 일환으로서 한우육 판별 기술 개발이 사회·문화적인 측면에서 크게 요구되어지고 있다. 한우육의 부정판매 행위가 사회적 문제로서 소비자 단체 및 언론 기관 등의 관심과 불신이 갈수록 증폭되고 있어, 수입육이나 젓소육의 판매과정에서 불법 유통의 부조리를 근본적으로 해결할 수 있는 법적, 제도적 장치의 일환으로써 부정육 식별 기술 개발이 시급히 요청되고 있다. 따라서 한우육 판별 기술을 개발함으로써 둔갑 판매 등 부정 축산물의 발생 여지를 사전에 차단하여 육류유통 거래질서 확립에 견인차 역할을 담당할 수 있다. 또한 부정 유통육 식별기술 개발로 한우육에 대한 소비자의 신뢰도 제고와 사회적 인식 변화로 한우육 소비촉진 및 고급육 생산 확대에 크게 기여할 수 있다.

## 제 2 절 국내외 연구개발현황

육의 축종감별 방법으로서 관능 검사에 의한 방법, 면역학적 방법, 이화학적 방법, 생화학적 방법 등의 다양한 분석 방법 (Hitchcock와 Crimes, 1985)이 개발 보고되어져 있지만 이 중에서 면역학적 방법과 전기영동법이 수용성 근장단백질 및 각종 효소의 축종별 특이성을 이용한 육의 축종감별에 비교적 유효한 것으로 알려져 있다. 그러나, 종래의 항원항체 반응을 이용한 면역법은 역가 높은 항혈청 제작의 기술적 어려움과 한천 gel에서 단순한 확산법에 의존하였지만 최근에는 검출 능력이 개량 진보된 ELISA법(Patterson 등, 1984; Jones와 Patterson, 1985)이 개발되어 활용되고 있다.

한편, 최근에 분자생물학 및 생명공학 기술의 눈부신 발달에 따라 단백질 및 효소 수준에서 검출 곤란한 시료분석은 유전자 분석기법을 이용하여 DNA 수준에서의 식별 가능성을 모색하고 있다. 특정 단백질의 아미노산 배열과 이들의 DNA 염기배열을 비교할 경우 DNA 구조상의 차이가 단백질구조 차이보다 크기 때문에 축종판정에 단백질보다 DNA를 이용하는 것이 훨씬 더 효과적인 것으로 보고되고 있다. 그러나, 포유동물의 genomic DNA은 약 30억 염기대의 고분자량이기 때문에 제한효소로 절단한 후에 생성되는 DNA 단편의 수는 무수히 많아 일반적인 전기영동상에서는 각 DNA band의 구별이 어려운 상태로 관찰되는 것이 보통이다. 따라서 동일 축종내의 품종간에 이 방법을 적용하기에는 부적절한 것으로 알려져 있다. 또한, 분자생물학적 방법들은 genomic DNA의 보존상태에 크게 의존하며, 잘 보존된 시료 이외에는 그 결과의 재현성이 낮아지기 때문에 신뢰도에 문제

점이 있는 것으로 사려되고 있다(이 등, 1994). 분자생물학적 기법은 이용되어지는 기자재 및 재료비의 비용이 많으며, 전처리 과정이 복잡하여 현장에서의 관련성이 결여된다는 지적도 제시되고 있다. 이와같이 식육 및 육제품의 축종 및 품종 감별은 단백질 및 핵산을 중심으로 연구가 진행되어져 왔으며, 특히 전기영동에 의한 표지 단백질의 검출, 혈액 단백질의 유전자좌의 다형성, 축종간 satellite DNA의 반복배열을 이용한 probe의 개발, cytochrome b 유전자의 염기서열 차이를 이용한 축종감별 연구가 활발히 이루어져 왔으나, 이들 대부분의 방법들에서 축종감별은 가능하나 동일 축종내 품종감별에는 한계가 있고 나아가 실용화 단계까지 접근하기 위해서는 해결해야 할 문제점이 많은 것으로 보고되어져 있다.

지금까지 국내·외적으로 식육감별법 개발을 위하여 당질공학적 기법을 이용한 실례는 없다. 그러나 본 연구진은 이같은 이론적 배경을 근거로 Lectin을 이용하여 일본의 재래종 和牛육과 미국산 수입육(헤어포드)을 각각 특이적으로 식별 가능한 미량의 당단백질을 일부 검출·확인하는데 성공하였다. 또한, 한우육과 젃소(Holstein종)육 간의 당단백질 pattern 및 당단백질의 단당 함량의 차이도 발견하였다. 이러한 실험적 근거를 토대로 실제 검사 업무에 응용하기 위한 판정 기술의 현장 적용성, 시료 처리의 간편성, 저렴한 실험비 등의 조건을 만족시키는 품종 식별의 새로운 기술개발을 검토하기로 하였다.

### 제 3 절 연구개발 목적 및 범위

쇠고기 유통 과정에서 저가의 수입육과 국내산 젓소육이 고가의 한우육으로 둔갑되어 판매되는 부조리가 만연되어 있는 현실에서 매년 증가하는 외국산 쇠고기 수입육 물량에 비추어 볼 때 국내산 고급 순수 한우육을 보호 육성할 수 있는 제도적 장치가 시급히 마련되어야 하며, 이를 위해 한우육을 다른 품종의 쇠고기와 명확히 구별할 수 있는 과학적이고 객관적인 한우육 판별기술 개발이 필연적으로 요구되고 있다. 이러한 시대적 요구에 부응하고, 한우육 판정의 정확성, 신속성 및 간편성을 극대화할 수 있고 이를 바탕으로 한우육 진단용 kit (한우육 특이적 당 단백질 및 특이적 당쇄에 대한 단일항체 kit)의 개발과 제작으로 산업적 실용화를 모색하기 위하여 다음과 같이 연구를 수행하였다.

구 분	연구개발목표	연구 개발 내용 및 범위
1차년도 (1997년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>전기영동 및 단백질이 공학을 이용한 한우 육 특이 성분 검색</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 축종 및 품종별 육식별에 관한 자료 및 기술정보 수집</li> <li>- 우육 시료 (한우, Holstein젖소, 수입육우 및 교잡우) 채취 및 확보</li> <li>- 부위별 육단백질 추출 조건 확립</li> <li>- SDS-PAGE에 의한 우육 구성성분 분석</li> <li>- 각종 Lectin에 대한 한우육 구성 당단백질의 특이성 검색</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>표지 성분 대항체 단일항체 생산 기술 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 동물세포 증식 기술의 최적 조건 확립</li> <li>- 항체 형성세포와 골수종세포의 세포융합 기술 확립</li> <li>- ELISA 분석 조건 확립</li> <li>- Immunoblotting법의 확립</li> <li>- Limiting dilution 기술 확립</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>한우육 특이 당단백질 정제</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lectin column에 의한 표지 당단백질의 농축</li> <li>- 각종 chromatography에 의한 표지 당단백질의 정제</li> </ul>
2차년도 (1998년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>표지 당단백질에 대한 단일항체 생산</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 항원 면역</li> <li>- 세포융합</li> <li>- ELISA 및 immunoblotting에 의한 screening</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>표지 당단백질의 구성당쇄 정제</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- N-glycanase에 의한 구성당쇄의 절단</li> <li>- 2-aminopyridine에 의한 형광 Labeling</li> <li>- Gel filtration에 의한 구성당쇄의 분획</li> <li>- DEAE-5PW에 의한 구성당쇄의 정제</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>표지 당단백질의 생화학적 특성 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peptide mapping 및 구성 peptide의 아미노산 조성 분석</li> <li>- 부분 아미노산 배열의 분석</li> <li>- 당 조성 분석</li> </ul>

구분	연구개발목표	연구 개발 내용 및 범위
3차년도 (1999년)	○ 표지 당단백 질의 구성당 쇄에 대한 단일항체 생 산	- Hapten과 당쇄의 결합 - 항원면역 및 세포융합 - ELISA 및 immunoblotting에 의한 screening - 단일항체의 특이성 검증 - 단일항체의 대량생산
	○ 표지 당단백 질에 대한 단일항체 생 산	- 단일항체의 특이성 검증 - 단일항체의 대량생산
	○ 한우육 판별 용 단일 항체 의 분석 system 확립	- 한우육 특이 성분 (당단백질 및 당쇄) 단 일항체의 분석 system 확립 - 단일항체의 실용화 방안 검토
	○ 한우육 판별 기술 개발의 산업적 실용 화	- 한우육 식별 진단용 항체 kit을 이용한 현 장검증 - 분석 system의 홍보 및 특허출원



## 제 2 장 단백질공학 및 당질공학 기법을 이용한 한우육 특이성분의 검 색, 정제 및 생화학적 특성 분석

### 제 1 절 서 설

최근 동물세포, 특히 포유동물에 있어서의 당단백질, 당지질 및 proteoglycan(muco 다당)의 당쇄에 dynamic한 새로운 생물 활성이 계속적으로 발견되어, 당쇄가 핵산, 단백질에 이어 제3의 Chain(사슬, 鎖)”으로써 인식되기 시작하고 있으며, 의학, 약학, 화학, 공학, 생물학, 그리고 농학 등의 다양한 연구 분야에 있어서도 크게 주목을 받기 시작하고 있다(Ashwell와 Harford, 1982; Rademacher 등, 1988; Sharon과 Lis, 1989, 1993; Drickamer와 Carver, 1992; Irimura 등, 1993; Nakamori 등, 1993). 이것은 세포막 표면의 당쇄 복합 분자나 올리고당쇄가 세포-세포간의 상호작용, 세포-기질접착, Virus-숙주 상호작용 뿐만 아니라 세포증식 및 분화등에서 매우 중요한 작용을 하고 있기 때문이다(高橋禮子, 1989; Sharon과 Lis, 1993; 永井克孝, 1994; 入村達郎, 1996).

당단백질에 결합되어 있는 N- 및 O-결합 당쇄는 그 단백질을 발현하는 품종에 따라 각각 다른 Glycosyltransferase가 존재하거나 그 활성에 차이가 있어 매우 다양하게 생합성 된다고 보고되어져 있으며(Greenwalt 등, 1990; Ito 등, 1993), 암 등의 종양이 발생하면 몇몇 전이효소의 활성이 바뀌고, 그에 따라 특정의 당을 많이 함유

하는 당쇄가 생합성되며 이를 이용하여 질환의 유무를 검진하는 것도 가능하다는 것이 시사되어 있다(Hakomori, 1981,1989; Chanh 등, 1987; Hannun, 1989; Yamashita 등, 1989; Ogiso 등, 1992; 永井克孝, 1994). 또한 당쇄는 단백질이나 핵산과는 달리 여러 가지 물리적인 처리에도 안정하여 (예를 들면, hydrazine으로 110℃에서 4시간 처리하여도 단백질은 거의 모두 분해되지만 당쇄는 분해되지 않음) 가열제표육의 품종식별에도 매우 유효하게 사용되리라 생각된다(高橋禮子, 1989; Suzuki 등, 1991; 永井克孝, 1994).

Lectin은 당과 신속하게 그리고 선택적이며 가역적으로 결합하는 단백질이다. 1950년대까지의 생물학자들은 Lectin이 식물에만 존재하는 것으로 생각하였으나, 그후 많은 연구에 의해 자연계에 널리 존재한다는 사실이 밝혀졌다. Lectin은 그 특이성이 매우 높아 단당 뿐 만아니라 올리고당도 특이적으로 인식하기 때문에, 극소량의 당쇄를 분리하여 분석하거나 당단백질의 분획 또는 세포 특이적으로 생합성되는 특이적인 당단백질의 검색을 위한 조직염색 등에 이용되기 시작하면서 그 중요성이 크게 대두되고 있다(Osawa, 1985; Zacheis 등, 1986; Yamashita 등, 1989; Ito 등, 1993). 현재까지는 당결합특이성이 다른 수많은 Lectin이 발견되어 정제되어 있으며, 당에 대한 결합 특이성도 밝혀져 있다.

개개의 Lectin의 응집활성에 대한 각종 단당의 저해능력을 조사하여 당을 분류하면 당의 C3 및 C4의 수산기의 배위에 따라 당을 4군(fucose결합 Lectin, galactose 또는 N-acetyl-galactosamine 결합 Lectin, mannose 결합 Lectin 및 N-acetyl-glucosamine결합 Lectin)으로 분류할 수 있다(Osawa, 1985; 高橋禮子, 1989; 永井克孝, 1994). 이 분류법에서 제 2군에 속하는 Lectin은 강약의 차이가 있

더라도 Gal 및 GalNAc의 양자에 의해 결합활성이 저해되며, 또한 제 3군에 속하는 Lectin도 Man와 Glu의 양자에 친화성을 가지고 있는 것이 많다(Dorland, 1981; Cummings와 Kornfeld, 1984; 永井克孝, 1994). 그러나 같은 군에 속하는 것도 그 결합특이성을 조사해 보면 각각 차이가 나는 것을 발견할 수 있다. 그것은 Lectin이 단당 뿐만이 아니고 그 anomer 배위, 당배열, 또는 결합 위치까지도 식별하여 인식하기 때문이다(永井克孝, 1994). 현재 여러가지 Lectin에 대해서 올리고당 수준에서의 결합특이성에 대한 연구가 진행되고 있으며, 이러한 성질을 이용한 품종간의 특이적인 당체의 검색은 가능 하리라 생각된다.

## 제 2 절 재 료 및 연 구 방 법

### 1. 공 시 료

한우육은 가락동 축산물 공판장에 반입된 종축개량협회 서산농장의 후대검정우 50두로부터 등심, 목심, 안심, 그리고 채끝을 각각 구입하여 사용하였다. 홀스타인육은 횡성산업 및 가락동 집배사업소에서 구입하였으며, 한우 × 홀스타인 교잡우(F1 25두) 및 한우 × 샤롤레와의 교잡우(F1 25두)는 가락동 축산물 공판장의 협조를 얻어 구입하였다. 수입육(북미산 에버딘앵거스)은 축협중앙회 인천사업소에서 구입하여 시료로 사용하였다. 실험에 사용한 시약은 생화학 실험용을 사용하였다.

## 2. 단백질 추출

채취한 원료육을 지방, 인대 등을 제거한 후 각각 3 g을 saline solution (0.85% NaCl, 2 mM PMSF, 0.02% NaN<sub>3</sub>을 함유) 12 ml에 첨가하여 4℃에서 1분간 균질(Ultraturrax T25, Germany, 24,000 rpm)한 후 4℃에서 7,500×g로 15분간 원심 분리하여 그 상등액을 분취하여, 염용성 단백질로 사용하였다(Fig. 1-1).

수용성 단백질의 추출은, 2 mM PMSF, 0.02% NaN<sub>3</sub>을 함유한 증류수 12 ml에 원료육을 3g씩 첨가하여 염용성 단백질의 추출 방법과 동일한 방법으로 처리하였다. 0.5% SDS (2 mM PMSF, 0.02% NaN<sub>3</sub>을 함유) 및 0.5% Triton X-100 (2 mM PMSF, 0.02% NaN<sub>3</sub>을 함유)을 사용하여 위와 동일한 방법으로 균질한 후, 실온에서 3시간 가용화 시켰으며, 원심분리에 의해 추출된 단백질을 상등액으로 회수하였다. 분취한 염용성, 수용성, 0.5% SDS, 그리고 Triton X-100으로 추출한 단백질은 1.5 ml tube에 넣어 -20℃에서 보관하면서 실험에 이용하였다.

## 3. 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry법(1951)을 보완한 Markwell법(1978)을 사용하였으며, 표준 물질은 BSA를 사용하였다.

## 4. SDS-PAGE분석

SDS-PAGE분석은 Leammli의 방법(1970)을 이용하였으며, Acrylamide와 bis-acrylamide의 농도는 37:1로 하였다. 분리 겔의

농도는 9%~15%, 농축 겔은 3%를 사용하였으며, 전기 영동에 의해 분석한 단백질은 2.5% CB로 염색 한 후, 45% Methyl alcohol의 washing solution(CH<sub>3</sub>OH : CH<sub>3</sub>COOH : D. W. =45 : 10 : 45)으로 탈색 하여 축종별 구성 단백질의 패턴을 검사하였다.

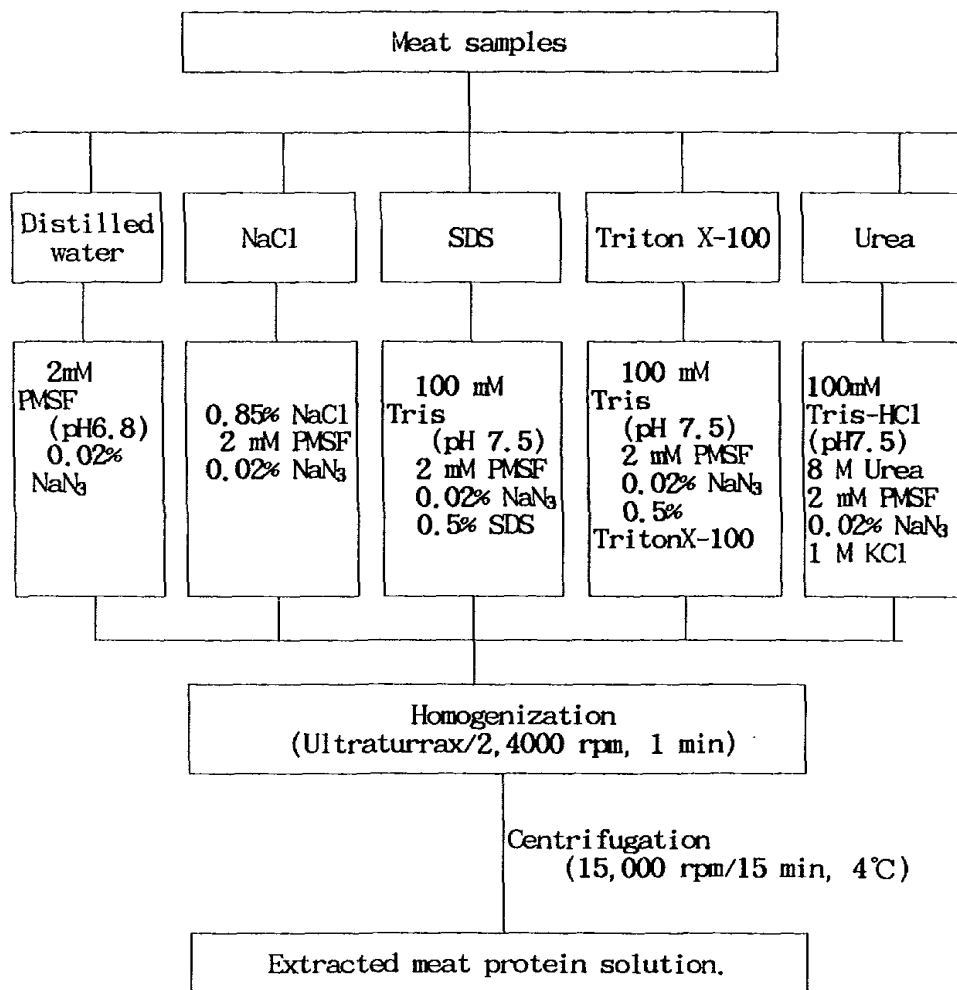


Fig. 1-1. Extraction of meat samples.

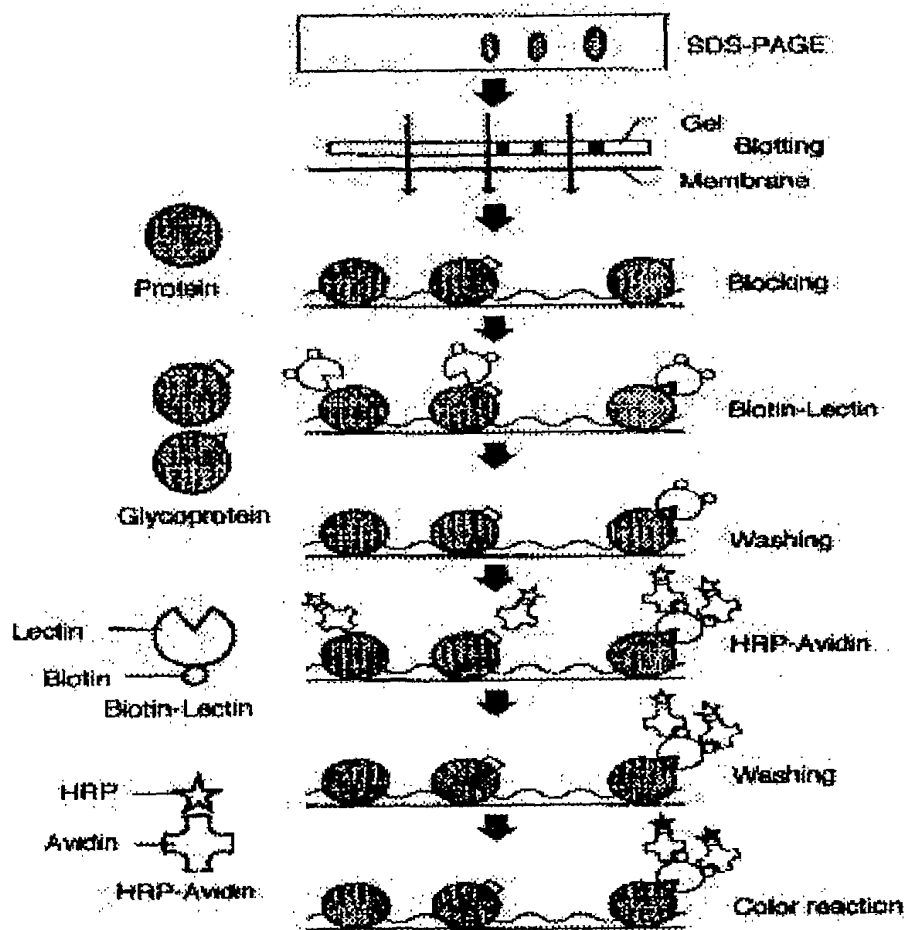


Fig. 1-2. Scheme of western blotting for lectin staining

## 5. Western blot 및 Lectin 염색

추출한 시료를 SDS-PAGE로 분석한 후, Semi-dry 전사 장치 (Trans-blot SD, Bio-Rad)를 사용하여  $2.5\text{mA}/\text{cm}^2$ 에서 20분간 PVDF막에 전사하였다(平野, 1988, Fig. 1-2). Blot후, PVDF막을 10mM Tris-HCl 완충액(0.15M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4)에서 10분간 세척한 후, Lectin염색(Hwangbo, 1996)을 실시하였다.

## 6. 당분석

한우육 및 흘스타인육의 구성 단당의 함량을 페놀-황산법(Dubois 등, 1956)을 이용하여 분석하였다. 먼저, D-glucose를 이용하여 표준곡선을 작성하였으며( $y=(\text{net absorbance}+0.0314)94.34$ ), 이 1차 회귀방정식을 이용하여 시료중의 당의 함량을 측정하였다.

## 7. 염색에 의한 표지성분의 농축

수용성 단백질 중의 한우육 특이성분을 농축하기 위하여 50% 및 75% 포화 유안암모늄염으로 염색하였다. 시료 용액과 50% 포화 유안암모늄염을 혼합하여 4°C에서 1시간 가용화시킨 후, 1시간 정치하였다. 단백질 용액을 18,000rpm에서 20분간 원심분리한 후, 침전물을 투석하였다. 상청액에 포화 75% 유안암모늄염 용액이 되도록 유안암모늄염을 첨가한 후, 동일한 방법으로 단백질을 침정시킨 후 각각의 획분을 투석하였다. 투석한 시료는 동결건조한 후, SDS-PAGE로 분석하였으며, 표지성분의 농축물을 이용하여 Ion-exchange chromatography에 사용하였다.

## 8. DEAE-sepharose ion-exchange chromatography에 의한 표지성분의 정제

유안침전물을 2mM PMSF, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 0.5% SDS를 함유한 Tris-HCl (pH 7.5)용액으로 용해시킨 후, 상기 용액으로 평형화시킨 DEAE-sepharose column으로 분리하였다. 용출 속도는 15ml/hr으로 하였으며, 용출액은 280nm에서 흡광도를 측정한 후, 각 획분은 증류수로 투석하여 동결건조하였다.

## 9. SDS-PAGE에 의한 표지 단백질의 정제

전기영동한 겔을 CB로 염색한 후, 10% ethanol과 7% acetic acid를 이용하여 탈색하였다. 겔의 background가 완전히 없어질 때까지 탈색한 후, 증류수로 20분간 세척하였으며, 표지 단백질의 부분을 잘라 내어 2~3 mm의 크기로 겔을 절단하였다. 겔은 cellulose dialysis tube (Sigma)에 넣어 0.1% SDS를 함유하는 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)완충액으로 투석한 후, 유리되어 나온 단백질을 아세톤으로 농축하였다. 정제한 단백질을 SDS-PAGE로 분석하여 단백질의 정제도를 확인하였다(Fig. 1-3).

## 10. 아미노산 조성 분석

단백질 50 $\mu$ g에 6M HCl 250 $\mu$ l에 용해하여, 110 $^{\circ}$ C도에서 24시간 가수분해한 후, 감압건조에 의해 HCl을 제거한 후, ethanol/water/



trimethylamine(2:2:1) 20 $\mu$ l를 첨가하여 실온에서 20분간 반응시킨 후 감압 건조시켰다. PTC-유도체는 HPLC용 ODS칼럼을 이용하여 분석하였다(Fig. 1-4). 용출액은 용액 A(0.1M ammonium acetate 완충액, pH 6.0/acetonitrile=95:5)과 용액 B(water /acetonitrile=40:60)을 사용, 10분(A:B=100:10), 12분(A:B=50:50), 14분(A:B=10:100), 18분(A:B= 10:100)과 같은 단계로 용출 시켰다. 검출은 254nm에서 실시하였다.

#### 11. N-말단 아미노산 배열 분석

정제한 PAS-4의 N-말단은 block되어 있어서, deblocking kit를 사용하여 acyl화된 N-말단의 첫 번째 아미노산을 분리시킨 후, Fig. 1-5와 같이 N-말단 아미노산 배열을 분석하였다. 한우육 수용성 획분을 SDS-PAGE로 분리한 후, PVDF막에 전사하였다. CB염색한 PVDF막으로부터 한우육 특이성분을 잘라낸 후, acylamino acid releasing enzyme을 사용하여 N-말단의 첫 번째 아미노산을 분리시킨 후, 두 번째의 아미노산 배열부터 Applied Biosystem의 Model 476 protein sequencer를 이용하여 아미노산 배열을 분석하였다(Fig. 1-5).

#### 12. 트립신처리에 의한 peptide map

단백질: 효소=50:1의 농도로 하여, 5M 요소를 함유한 50mM Tris-염산 완충액 (pH 7.8, 200 $\mu$ l)에 가용화하여 37 $^{\circ}$ C에서 6시간 동안 부분 가수분해시킨 후, 100 $^{\circ}$ C에서 2분간 가열하였다. 1500rpm에서 15분간 원심분리시킨 뒤, 상층액을 분석하였다(Fig. 1-6). 용출액은



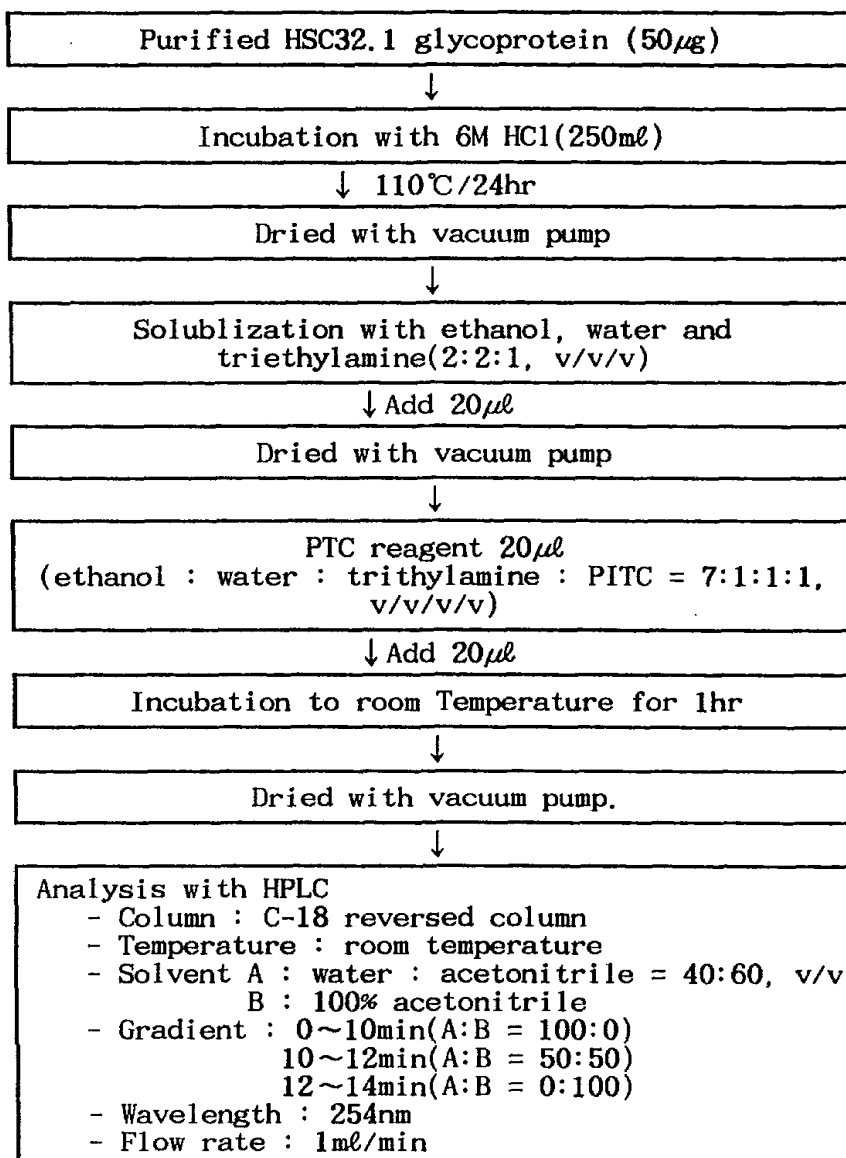


Fig. 1-4. A scheme for amino acid analysis of HSC32.1.

SDS-PAGE and electroblotting (in to PVDF)

↓ CB staining/destaining with 60% MeOH

The bands were cut out and treated with 0.5% PVP-40

↓ incubation at 37°C for 30min

Digestion of proteins

↓ 5-10 $\mu$ g of trypsin in 100 $\mu$ l of

0.1M ammonium bicarbonate buffer(pH 8.0)

incubation at 37°C for 24hr

↓

Tryptic peptides solution

↓ washing with 100 $\mu$ l DDW

100 $\mu$ l of 50% pyridine and 10 $\mu$ l of PITC

↓ incubation at 60°C for 1hr

Added 1ml of benzene/ethylacetate(1:1.v/v)

↓ washing the upper phase (three times)

Performic acid solution

(9ml performic acid and 1ml hydrogen peroxide)

↓ incubation at 0°C for 1hr and dried

Digestion with AARE

↓ 50mU AARE and incubation at 37°C for 12hr

Analysis of amino acid with sequencer

Fig. 1-5. Deblocking of N-terminal blocked protein from electroblotted PVDF membrane.

### 13. 단당분석

중성당은 4M TFA로 100℃에서 2시간, 아미노당 6M HCl로 100℃에서 4시간 가수분해를 실시했다. TFA과 HCl을 진공상태에서 제거시킨 후, 새롭게 조제한 포화탄산나트륨수용액 100 $\mu$ l를 첨가한 뒤, 8 $\mu$ l 무수초산을 첨가하였다. 그 후, 실온에서 30분간 반응시킨 후, Dowex 50(H<sup>+</sup>)으로 탈염하였다. 탈염 후, 동결건조 시킨 시료를 실험 조건에 따라 다른 단당유도체를 만들어 단당분석에 사용하였다(Fig. 1-7).

탈염후 동결건조 시킨 시료에 50 $\mu$ g에 상당하는 2-PA용액을 첨가하여 90℃에서 15분간 반응시킨 후, 건조시켰다. 건조물에 dimethyl-amino borane complex 50 $\mu$ g(초산에 가용시킴)을 첨가하고 80℃에서 80분간 반응을 시켰으며, 과량의 2-PA는 benzene으로 제거하였다. 2-PA 유도체단당은 HPLC용 TSK gel Sugar AXI칼럼을 이용하여 분석하였다. 용출액은 10% acetonitrile을 함유한 0.7M 붕산완충액(pH 8.0)을 사용하였으며, 형광검출기(310nm/380nm)를 사용하여 측정하였다.

### 14. Lectin과의 친화력 검증

중류수에 의해 가용화 시킨 한우육을 SDS-PAGE로 분석한 후 Semi-Dry blotting 장치를 사용하여 PVDF막에 전사 시켰다. 전사시킨 PVDF막은 각종 Peroxidase-labelled lectins을 사용하여 염색하였다.

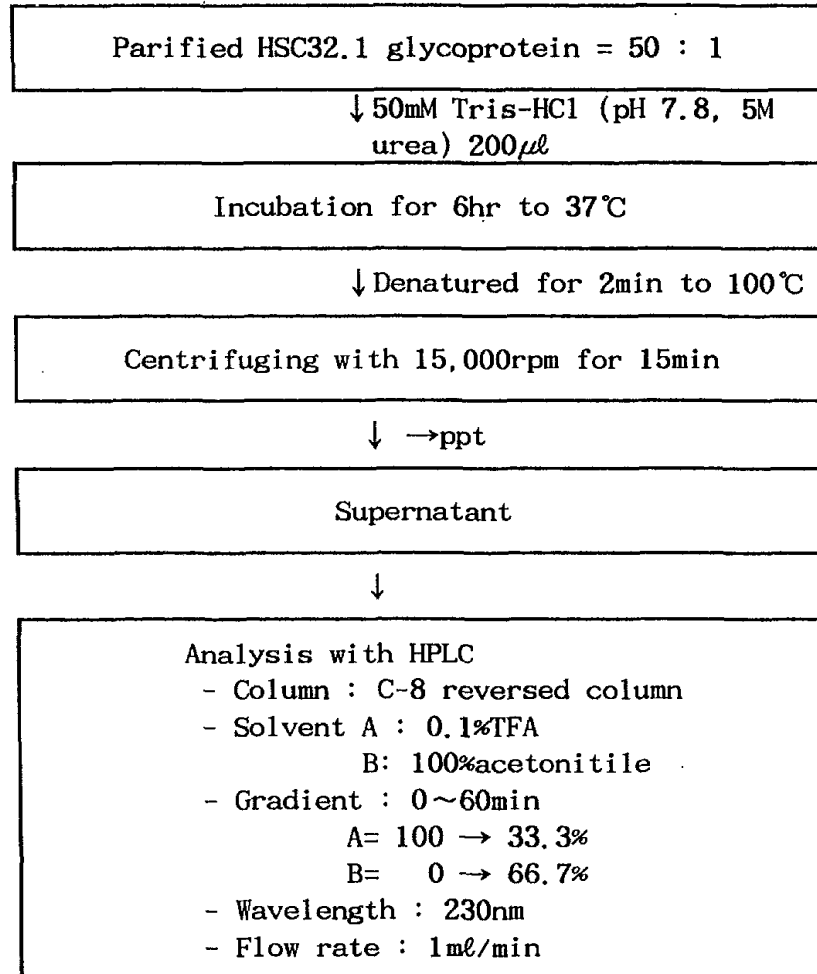


Fig. 1-6. A scheme for peptide wapping of HSC32.1 glycoprotein.

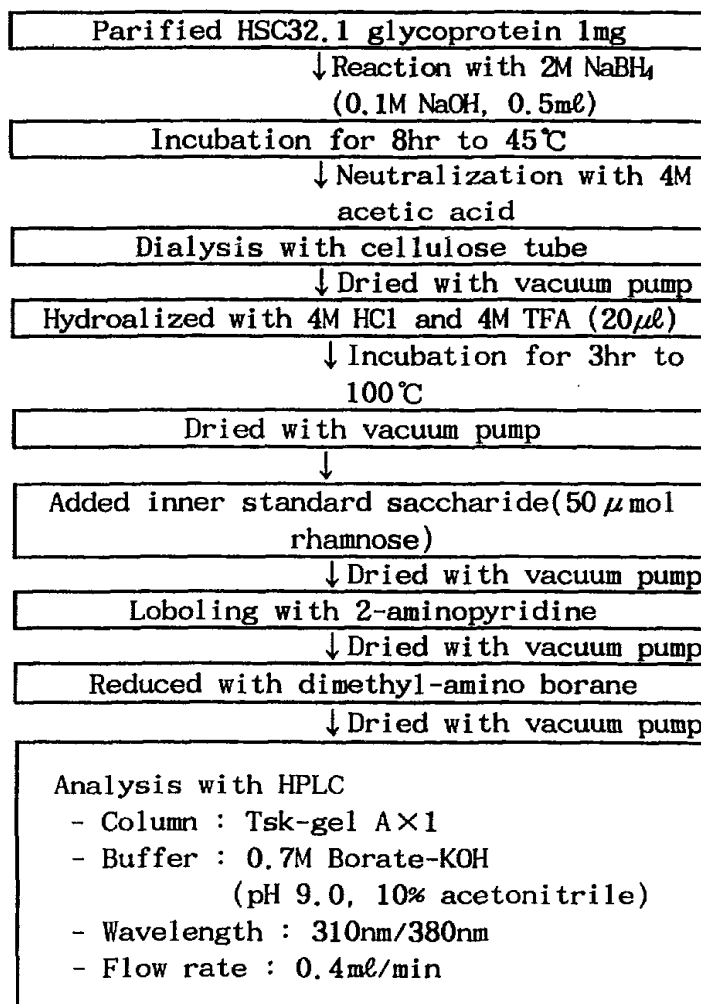


Fig.1-7. A scheme of mannosaccharide analysis with 2-PA labeling method.

## 제 3 절 결과 및 고찰

### 1. 전기영동 및 단백질 공학을 이용한 한우육 특이 성분 검색

#### 가. 추출용매에 따른 단백질 추출량의 비교

육 단백질의 추출방법을 정립하기 위하여 증류수, 0.85% NaCl, 0.5% SDS, 0.5% Triton X-100, 그리고 5M Urea를 이용하여 한우육, 홀스타인육, 수입육, 교잡우육의 각 부위별 추출량을 비교 분석하였다. 각 추출 용매에 따른 품종별 채끝부위의 추출량을 비교한 결과, 동일 용매에 따라 품종별 추출량에는 큰 차이가 없었으나, 추출 용매에 따라 상이하게 추출되는 것이 확인되었다(Table 1-1). 그 중에서 증류수로 추출한 것이 다른 용매로 추출한 것에 비해 가장 적은 양이었다. 또한, SDS에 의해 가장 많은 단백질이 유리되었으며, 상대적으로 수입육의 추출량이 가장 많았다. 이는 육의 유통 과정 중에 일어나는 근육세포막의 파괴, 또는 근육조직의 변성에 의해 육 단백질이 용이하게 추출되는 것으로 사려된다. 등심, 안심, 그리고 목심의 추출량도 이와 유사한 경향을 나타내었다.

세포막 단백질의 추출에는 일반적으로 이온성이 강한 계면활성제를 사용한다. 본 연구에서 SDS로 추출한 것이 가장 많은 단백질이 추출되어 나온 것도 육의 세포막 성분이 다량으로 추출되어 나온 것이라 사료된다. 계면활성제를 사용할 경우, 단백질 용액으로부터 계면활성제를 제거하는데 많은 어려움이 있으며, 특히 이온성이 강할 경우, 여러 가지 문제점을 야기 시킨다. 따라서, 본 연구에서는 SDS에 의해 특이하게 추출되어 나오는 성분을 검사한 후, 특이한 성분



이 없다면 이를 사용하지 않고 추출한 단백질 용액을 사용하기로 하였다.

Table 1. Comparison of soluble protein amounts among Hanwoo, Holstein, crossbred and imported beef extracted with distilled water, NaCl, 0.5% SDS, 0.5% Triton X-100 and 5M urea.

( $\mu\text{g/g}$  protein)

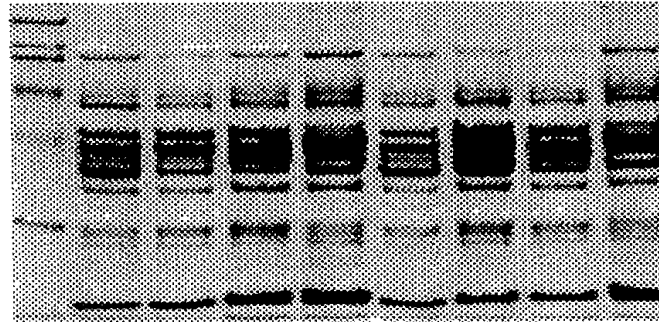
	Hanwoo	Holstein	Crossbred	Imported
Distilled water	11.2 $\pm$ 0.6	14.2 $\pm$ 0.4	10.5 $\pm$ 0.3	16.4 $\pm$ 0.7
NaCl	13.3 $\pm$ 0.8	17.6 $\pm$ 0.3	14.2 $\pm$ 0.5	18.3 $\pm$ 0.3
SDS	36.2 $\pm$ 0.6	26.3 $\pm$ 0.7	29.4 $\pm$ 0.4	39.3 $\pm$ 0.4
Triton X-100	25.2 $\pm$ 0.4	22.2 $\pm$ 0.8	21.3 $\pm$ 0.4	27.5 $\pm$ 0.2
Urea	27.5 $\pm$ 1.2	25.4 $\pm$ 1.0	25.1 $\pm$ 0.2	28.8 $\pm$ 0.2

#### 나. SDS-PAGE에 의한 품종별 구성단백질 분석

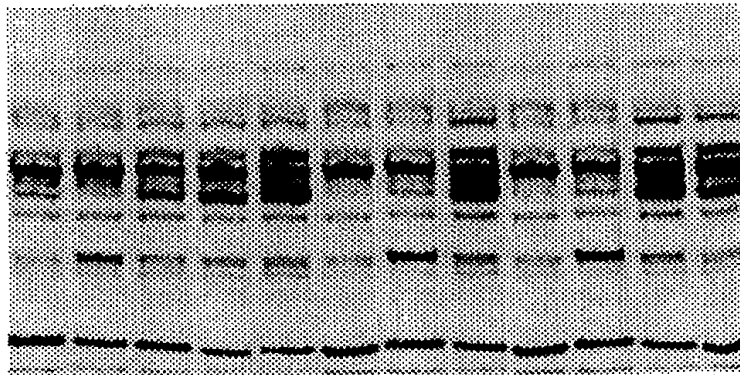
SDS-PAGE를 이용하여 5가지의 각각 상이한 용매로 추출한 육단백질의 구성성분을 분석한 결과, 추출조건에 따른 단백질의 추출량은 상이하였으나, 추출된 단백질 중 용매에 따라 특이적으로 추출되는 성분은 없는 것으로 확인되었다(Fig. 1-8). 다른 추출조건과 비교할 경우, SDS 및 Urea에 의해 고분자 성분이 다소 많이 추출되었으나,

전체적인 구성단백질의 조성에는 유의적인 차이가 없었다. 또한 CB 염색에 의하여 부위별 구성 단백질에는 유의성이 없었으므로(Fig. 1-8), 증류수를 이용하여 추출한 단백질 획분을 이용하여 본 연구를 진행하기로 하였다. 증류수로 추출한 수용성 획분을 사용할 경우, 저장기간에 발생하는 육즙을 시료로 사용할 수 있는 장점이 있다. 그러나, 육즙의 성분은 저장기간에 따라 그 조성이 다르므로, 이를 보완할 방안도 강구되어야 할 것이라 생각한다.

채끝, 등심, 우둔을 이용하여 각 부위별로 특이하게 추출되어 나오는 성분이 있는지를 검색한 결과, 구성 성분에는 큰 차이가 없는 것이 확인되었다(Fig. 1-9). 따라서 이후의 본 연구 시료는 채끝을 이용하여 분석하기로 하였다. 채끝의 경우, 등급을 받을 때 노출되는 부위로써 시료의 채취가 쉬울 뿐만 아니라, 고급 부위로 인식되고 있으므로, 시료로 사용하기에는 최적이라 생각한다. 등심을 사용하여도 무방하다고 생각되나, 이를 이용할 경우, 원료육의 비용이 과다하게 들며, 우둔의 경우, 냉장 중 온도에 의한 육질의 손실이 많이 발생한다. 이러한 문제점을 종합적으로 생각할 때, 채끝을 사용하는 것이 가장 무방할 것으로 사료된다.



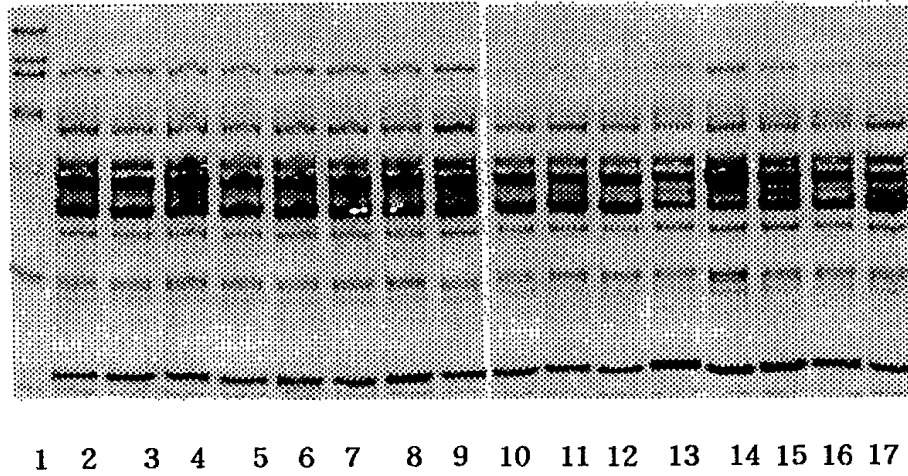
1 2 3 4 5 6 7 8 9



10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

Fig. 1-8. SDS-PAGE patterns of soluble protein from various parts of Hanwoo meat extracted with distilled water, NaCl, SDS, Triton X-100 or urea.

Lane 1, molecular weight markers; 2, 6, 10, 14, 18, loin; 3, 7, 11, 15, 19, loin and chuck; 4, 8, 12, 16, 20, tenderloin; 5, 9, 13, 17, 21, striploin. Lanes 2 to 5, distilled water; 6 to 9, NaCl; 10 to 13, SDS; 14 to 17, Triton X-100; 18 to 21, urea. 15 $\mu$ g of soluble protein was loaded per well.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Fig. 1-9. SDS-PAGE patterns of soluble protein from Hanwoo, Holstein, crossbred or imported beef extracted with distilled water. Lane 1, molecular weight markers; 2 to 5, Hanwoo; 6 to 9, Holstein; 10 to 13, crossbred; 14 to 17, imported.

## 2. 표지 당단백질의 검색

### 가. 품종별 헥소오스의 함량

품종식별을 위한 지금까지의 연구를 보면, 단백질 또는 유전자를 이용한 특이성분의 검색이 주종을 이루어 왔다. 그러나 품종 특이적 성분의 검출, 또는 동일 축종내의 품종 식별은 거의 불가능한 것으로 확인되고 있다. 따라서 본 연구에서는 세포막을 구성하고 있는 품종 특이적인 당체의 검색을 통한 한우육 특이성분의 검색을 실시하기로 하였다.

한우육, 홀스타인육, 수입육, 그리고 한우와의 교잡육을 이용하여 헥소스(6탄당)의 함량을 페놀-황산법으로 분석한 결과, 한우육이 가장 많은 당을 함유하고 있는 것으로 나타났다(Table 1-2). 홀스타인 및 수입육의 당 함량은 한우육의 약 1/3이었으며, 한우와의 교잡육은 홀스타인육 및 수입육보다 많은 것으로 나타났다. 부위별 당 함량을 비교한 결과, 채끝부위가 가장 많고, 그 다음이 목심, 등심의 순이었으며, 안심이 가장 적은 양을 나타내었다(Table 1-2). 본 연구에서 확인된 바와 같이 한우육이 다른 품종과 비교할 때, 다량의 당을 함유하고 있으며, 이러한 당의 구조를 이용한 연구는 그 전례가 없어, 본 연구진은 당단백질의 당체를 이용한 한우육의 식별을 검토하기로 하였다.

또한, 시간적 여유가 없어 한우육의 유무만을 검증하고자 할 경우, 본 연구에서 밝혀진 바와 같이 페놀-황산법으로 당의 함량이 많고 적음으로도 식별할 수 있으리라 생각한다. 그러나 보다 과학적이고 정확한 식별을 위해서는 보다 체계적인 시스템의 정립이 필요하

리라 생각한다. 이러한 관점에서 지금까지 연구한 사례가 없는 한우육의 당단백질 중 측쇄로 결합되어 있는 당쇄의 구조를 이용한 분석법의 확립은 그 의의가 매우 크다고 할 수 있을 것이다.

Table 1-2. Amounts of hexose from various parts of Hanwoo in comparison with Holstein, crossbred or imported beef

	Hexose (mg/g)*			
	Hanwoo	Holstein	Crossbred	Imported
Loin	79.3 ± 2.7	26.9 ± 2.7	21.8 ± 1.1	52.3 ± 2.7
Loin and chuck	85.2 ± 3.5	32.2 ± 1.6	31.7 ± 2.5	55.2 ± 3.2
Tenderloin	62.5 ± 3.8	21.5 ± 0.7	29.3 ± 1.8	49.3 ± 2.7
Striploin	91.2 ± 3.9	34.9 ± 2.3	32.3 ± 2.2	58.3 ± 1.9

\* values are expressed as means ± SEM of 5 samples.

#### 나. Lectin staining를 이용한 한우육 특이성분의 검색

한우육, 홀스타인육, 수입우육, 그리고 교잡우육에서 추출한 수용성단백질을 사용하여 한우 특이적인 당쇄를 검증하기 위한 lectin

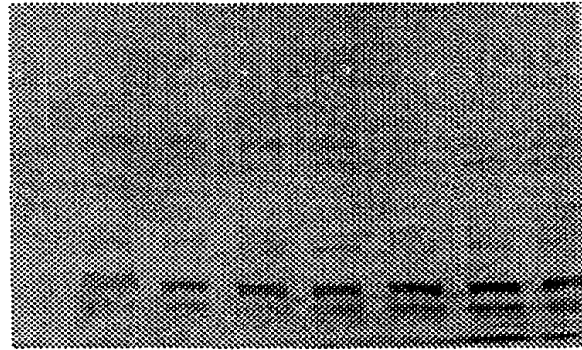
staining을 실시하였다. 각 품종별 15 $\mu$ g의 수용성 단백질을 SDS-PAGE (10~15%)로 분리한 후, western blotting기법을 사용하여 PVDF막에 단백질을 전사한 후, HRP-lectin kit으로 분석하였다.

각 품종으로부터 추출한 수용성 육단백질을 peroxidase-labelled Con A 및 RCA lectin을 이용하여 분석한 결과, 4가지의 품종간에는 유의적인 친화력의 차이가 없는 것으로 확인되었으나(Fig. 1-10), WGA의 경우, 한우육과 홀스타인육에서 그 친화성의 차이가 발견되었으나(Fig. 1-11). 홀스타인육의 경우, 고분자 물질 중에 WGA lectin과 결합하는 성분이 다량으로 존재하는 것이 확인되었으나, 한우육에는 이러한 성분이 거의 없었다. WGA lectin의 친화적 특성으로 볼 때, 홀스타인육의 경우 비환원말단에 시알산이 많이 결합되어 있거나, N-결합 당쇄의 환원말단인 GlcNAc에 Fucose가 결합되어 있기 때문인 것으로 추측된다. 또한 Con A 및 WGA의 경우, N-결합 당쇄와 그 친화성이 강하며, RCA의 경우 비환원말단에 유리된 Gal가  $\beta 1 \rightarrow 4$ 의 형태로 GalNAc와 결합되어 있는 당쇄와 친화성이 강한 것으로 보고되어 있어, 우육에 존재하는 당쇄는 모두 이러한 구조를 갖고 있을 것으로 생각한다.

PNA의 경우 품종별 유의적인 차이는 발견되지 않았으나(Fig. 1-12), PHA의 경우, 수입육에 없는 당쇄가 한우육, 홀스타인육, 그리고 교잡우육에서 발현되고 있는 것으로 나타났다(Fig. 1-12). 따라서 수입육과 기타 품종을 식별하고자 할 경우, PHA lectin을 이용할 수 있을 것으로 사려된다. PHA는 N-결합 당쇄의 중심 구조의 Man  $\alpha 1 \rightarrow 3$ Man결합의 비환원 말단 Man의 1, 6위에 다른 단당이 결합되어 있을 경우 강한 친화력을 가지며, 또한 비환원 말단에 결합되어 있는 Gal을 제거하면 그 친화력을 상실하는 성질에 비추어볼 때 수입

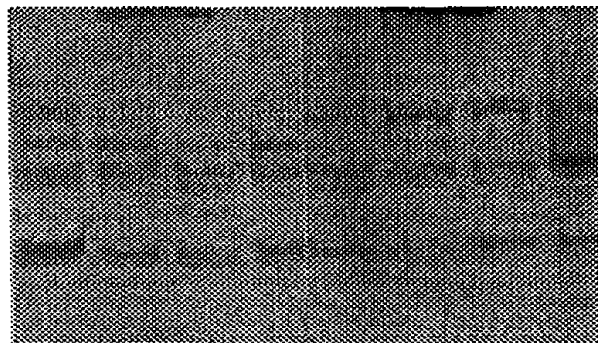
육은 Man  $\alpha$  1 $\rightarrow$ 3Man결합의 비환원 말단 Man에 Gal이 결합되어 있지 않은 당쇄를 갖고 있을 것으로 추측된다.

A



1 2 3 4 5 6 7 8

B



1 2 3 4 5 6 7 8

Fig. 1-10. Lectin staining of Hanwoo, Holstein, crossbred and imported beef with Con A or RCA.

Pannels A, Con A; B, RCA. Lanes 1, 2, Hanwoo; 3,4, crossbred; 5, 6, Holstein; 7, 8, imported.



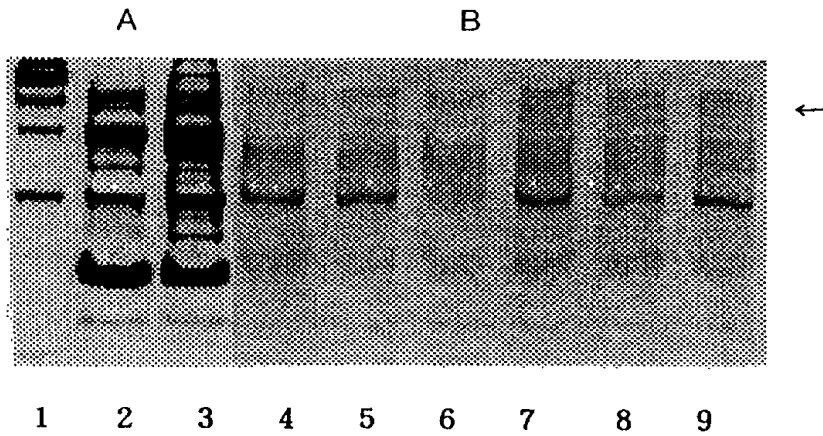


Fig. 1-11. Lectin staining of Hanwoo and Holstein meats with WGA for analysis of Hanwoo specific components. Pannels A, CB staining; B, WGA lectin. Lanes 1, molecular weight markers; 2, 4, 5, 6, Hanwoo; 3, 7, 8, 9, Holstein. 15% (A, B) and 10% (C, D) polyacrylamide gels were used in this study.

UEA-1의 경우, 수입육은 다른 품종의 당단백질과 상이한 친화력이 있는 것이 확인되었다(Fig. 1-13). UEA-1은 Fuc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4결합에 친화성이 있는 것으로 보고되어 있어, 수입육의 경우, 이러한 구조를 함유하고 있지 않을 가능성이 시사되었다. 한우육과 홀스타인육, 그리고 교잡우육간에는 그 유의성이 발견되지 않았으나, 수입육을 한우육으로 부정유통할 경우, 이를 식별할 수 있을 것으로 생각한다.

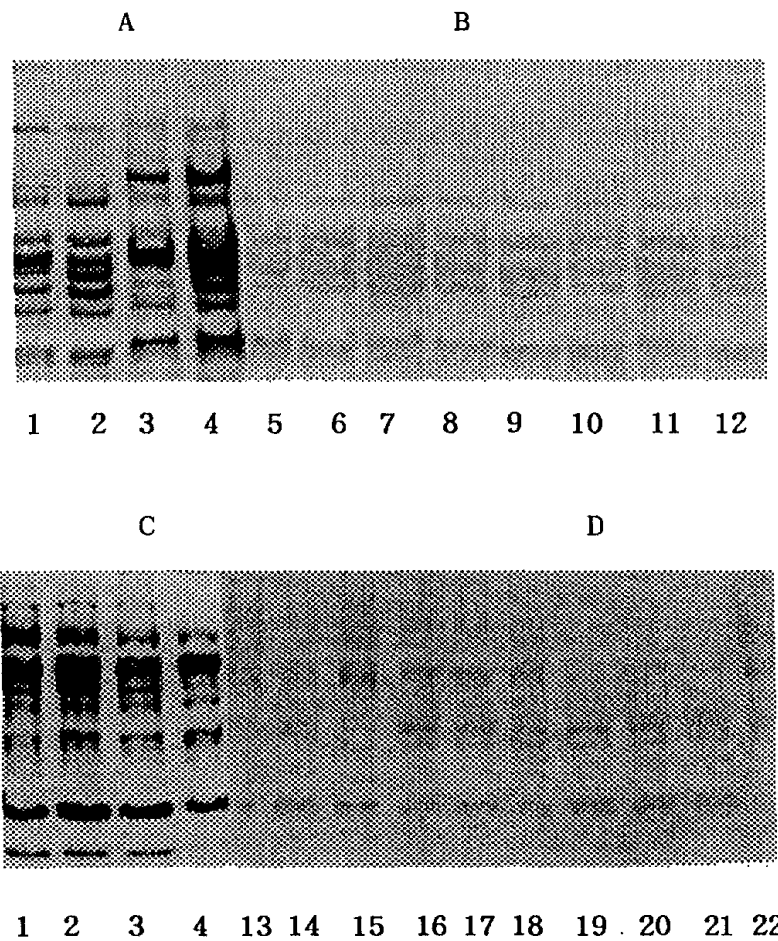


Fig. 1-12. Lectin staining of Hanwoo, Holstein, crossbred and imported beef with PNA (B) or PHA (D).  
 Pannels A, C, CB staining; B, D, lectin staining.  
 Lanes 1, 5, 6, 19, 20, 21, Hanwoo; 2, 7, 8, 16, 17, 18, Holstein; 3, 9, 10, 22, crossbred; 4, 11, 12, 13,14, 15, imported.

그러나, LCA lectin과의 친화력에는 그 유의성을 발견할 수 없었다(Fig. 1-13). 일반적으로 LCA lectin은 N-결합 당체의 중심 구조를 인식하는 것으로 알려져 있으며, Con A, WGA등의 결과와 일치하는 경향을 나타내었다.

DBA lectin의 경우, 한우에 대한 특이성이 매우 강하여, 한우육의 약 35kDa성분이 특이적으로 결합하였으며, 이 성분은 홀스타인과는 친화성이 없는 것으로 나타났다(Fig. 1-14). 또한 수입우의 경우 홀스타인과 유사한 반응을 나타내어 약 35kDa성분이 한우 특이적인 성분으로 확인되었다(Fig. 1-15). 교잡우의 경우, CB염색은 물론이고, DBA와의 친화력에도 큰 차이가 있는 것이 확인되어, 약 35kDa성분이 한우육 특이적인 당단백질로 규명하였으며, 이 성분을 이용할 경우, 최근 크게 문제가 되고 있는 품종간 둔감육의 구분이 매우 용이하게 이루어지리라 생각된다(Fig. 1-16).

CB염색에 의해 동일한 염색 양상을 나타내었으나, lectin에 의해 상이한 염색 양상을 나타내는 것은, 동일한 아미노산 조성을 갖고 있는 polypeptide라 하더라도, 품종에 따라 전이효소의 활성이 상이하다는 것을 의미하는 것이라 생각한다. 이는 지금까지 보고된 결과와 동일한 것으로, DBA lectin에 의해 확인된 성분을 이용하여 동일 품종간 식별이 가능하다는 것을 입증하는 것이다. DBA lectin은 O-결합 당체의  $\alpha$ -GalNAc 및 비환원 말단에 GalNAc이 유리된 상태로 존재할 경우 그 친화력이 높으며, O-결합 당체의 존재 유무를 확인할 때 많이 이용되는 것으로 알려져 있다. 따라서 수입육, 즉 에버딘앵거스종, 그리고 홀스타인육의 약 35kDa성분은 O-결합 당체가 없거나, 또는 N-결합 당체의 비환원말단에  $\alpha$ -GalNAc이 유리된 상태로 존재하는 당체를 함유하고 있지 않은 것으로 생각된다.

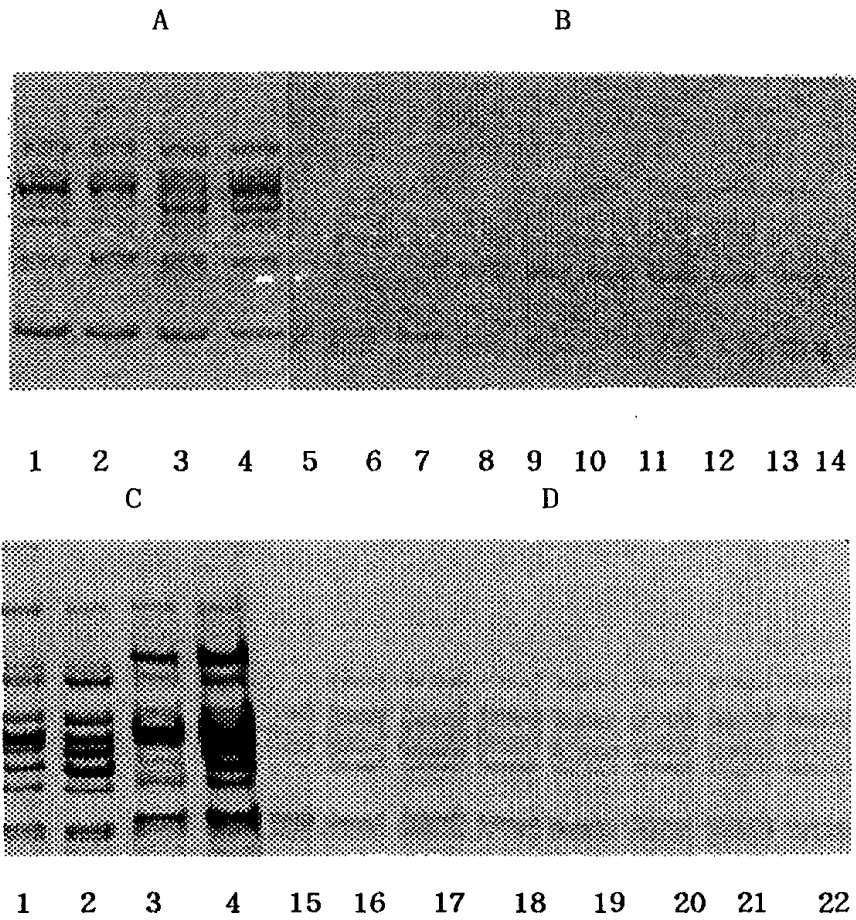


Fig. 1-13. Lectin staining of Hanwoo, Hlstein, crossbred and imported beef with UEA-1 (B) or LCA (D). Pannels A, C, CB staining; B, D, lectin staining. Lanes 1, 11, 12, 13, 15, 16, Hanwoo; 2, 8, 9, 10, 17, 18, Holstein; 3, 14, 19, 20, crossbred; 4, 5, 6, 7, 21, 22, imported.

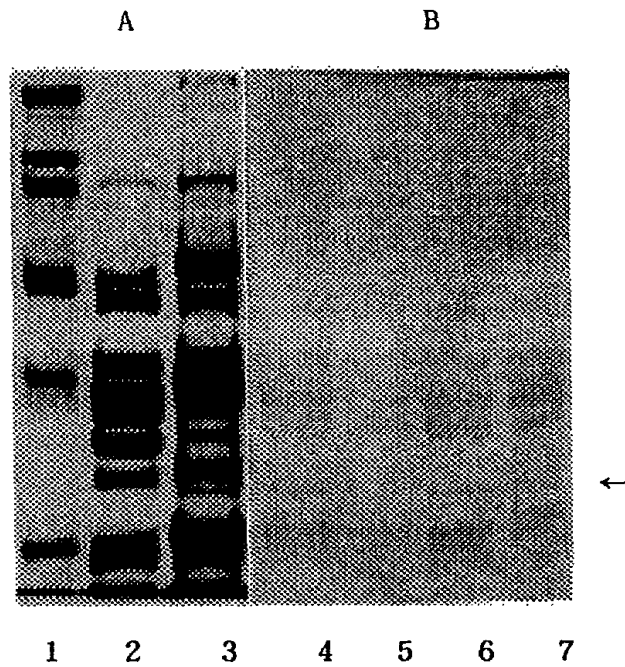


Fig 1-14. DBA Lectin staining patterns of Hanwoo and Holstein meats.

Pannels A, CB staining; B, lectin staining. Lanes 1, molecular marker; 2, 4, 6 Hanwoo; 3, 5, 7, Holstein.

지금까지의 동일 품종간의 식별에는 크게 단백질과 핵산이 중심이 되었으나, 그 결과에 큰 진전이 없는 것으로 보고되고 있어, 본 연구진에 의해 확인된 방법을 이용한다면, 동일 품종간의 식별법에 관한 연구에 있어서 큰 변혁을 일으킬 수 있으리라 생각한다.

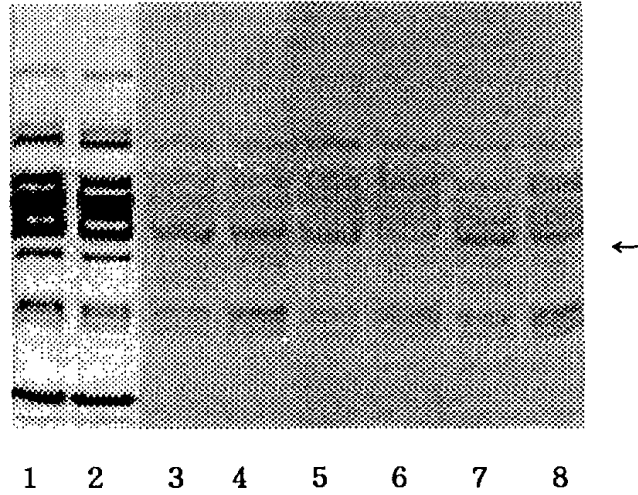


Fig. 1-15. Lectin staining of Hanwoo and imported beef with DBA for analysis of Hanwoo specific components.

Lanes 1 and 2, CB staining; 3 to 8, DBA lectin staining. Lanes 1, 3, 5, 7, Hanwoo; 2, 4, 6, 8, imported meat.

Polyacrylamide concentrations was 10%.

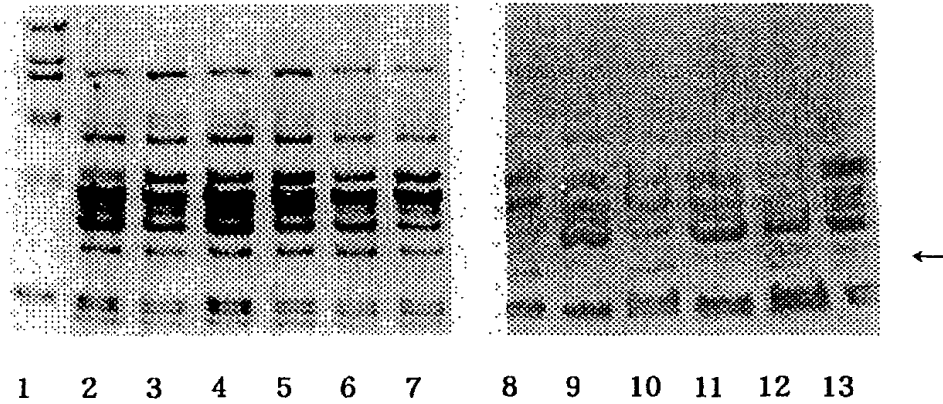


Fig. 1-16. SDS-PAGE and lectin staining with DBA of Hanwoo and crossbred beef for analysis of Hanwoo specific components.

Lanes 1 to 7, CB staining; 8 to 13, DBA lectin staining; 1, molecular weight marker; 2, 4, 6, 8, 10 and 12, Hanwoo; 3, 5, 7, 9, 11 and 13, crossbred.

#### 다. 내열성 단백질을 이용한 한우육 표지성분의 검색

일반적으로 당채는 열에 대하여 그 내성이 매우 강하며, 순수한 물인 경우, 100℃이상에서 가열하더라도 구조적 분해는 일어나지 않는 것으로 보고되고 있다. 따라서 가열온도와 가열시간을 달리하면 서, Polypeptide chain의 분해 또는 절단, 중합 등을 유도한 후,

SDS-PAGE 및 Lectin염색을 실시하였다. 그 결과 37°C, 45°C, 55°C, 그리고 75°C에서 각각 10분간 가열하였으나, 가열온도에 따라 품종간 특이적으로 분해되거나 열변성되어 침전하는 성분은 없는 것으로 나타났다.(Fig. 1-17). 그러나, 가열온도가 상승함에 따라 미량성분으로 보이는 peptide들이 많이 검출되었으며, 이는 고분자들이 열에 의해 변성되기 때문에 발생하는 것이라 사료된다. LCA를 이용한 lectin염색에서도, 한우육 특이적으로 반응하는 성분은 발견되지 않았다(Fig. 1-18). 따라서, 이 보다 더 높은 고온의 열에 대한 내성을 가진 성분이 존재하는지의 여부를 조사하기 위하여, 각 시료를 100°C에서 30초 및 35초간 가열하였다.

100°C에서 30초간 가열할 경우, 한우육 및 교잡우의 약 32.1kDa 성분(이하 HSC32.1이라 칭함, Hanwoo specific component 32.1kDa)이 내열성 성분으로 확인되었으나, 수입우 및 홀스타인은 이 성분이 거의 확인되지 않았다(Fig. 1-19, lanes 6, 7). 즉, 저온에서 가열할 경우, 거의 열변성되지 않거나, 특이하게 열변성되어 침전하는 성분이 없는 것으로 확인되었으나, 가열온도가 상승함에 따라 품종간 내열성 성분이 다르다는 것이 입증되었다.

LCA를 이용한 lectin염색에 의해서도 이 성분은 홀스타인 및 수입우에는 HSC32.1이 관찰되지 않았으나, 한우육은 특이적으로 반응하였다(Fig. 1-19, lanes 6~8). 따라서 이 성분이 한우육 특이적인 것으로 사료되며, 이 성분을 검색함으로써 품종간 한우육 식별은 가능할 것으로 판단된다. 홀스타인육의 경우, 한우육보다 분자량이 적은 성분이 특이적으로 농축되었으나, 수입육에서는 없었다. 수입육의 경우, 그 유통기간이 길고, 이에 따른 육질의 변화가 다른 육에 비해 큰 것이기 때문에 열에 의한 저항성도 다소 떨어지기 때문이라



생각된다. 교잡우의 경우, 한우육과 거의 같은 내열성을 나타내었으며, 100℃이상에서 가열할 경우 한우육과 교잡우의 식별은 불가능할 것으로 사료된다.

100℃에서 35초간 가열하였을 때, 이 HSC32.1은 한우육 특이적 성분으로 확인되었으며, 열에 대한 내성이 매우 강한 것이 시사되었다(Fig. 1-20, lanes 8). 따라서, 한우육을 수입육, 홀스타인육과 식별하고자할 경우, 100℃에서 30초, 또는 35초 가열한 후, LCA lectin을 이용하여 분석하면 될 것이라 생각한다. 또한 홀스타인의 경우, 약 28kDa의 성분이 특이적으로 나타났으며, 이 성분은 비가열육에서는 발견되지 않았던 성분으로 가열에 의해 열변성된 glycopeptide가 농축되어 나타난 것으로 생각되었다(Fig. 1-20, lane 6). 따라서 100℃에서 35초 홀스타인육을 가열한 후, LCA lectin을 이용하여 이성분을 확인하는 것 만으로도 홀스타인육의 구별은 가능할 것으로 사려된다. 수입육의 경우, 100℃에서 30초 가열할 경우와 거의 같았으나, 고분자 성분이 열변성되어 침전하는 것으로 나타났다(Fig. 1-20, lane 7).

100℃에서 1분간 가열할 경우, 한우육 및 홀스타인육 특이적인 성분은 더욱 농축되는 것이 확인되었으며(Fig. 1-21, lanes 5, 7), LCA에 대한 친화성은 가열시간이 짧은 것과 거의 동일하였다. 그러나, 수입육의 경우, 대부분의 단백질이 열변성되어 침전하는 것으로 나타났으며(Fig. 1-21, lanes 2, 6), LCA와 친화력을 나타내는 peptide도 거의 없었다. 이상의 결과, 특이성분의 농축정도와 다른 성분과의 식별력 등을 고려할 때, 100℃에서 35초간 가열한 시료가 가장 이상적일 것이라 사료되며, 이 후의 연구에는 100℃에서 35초간 가열한 시료를 이용하기로 하였다.

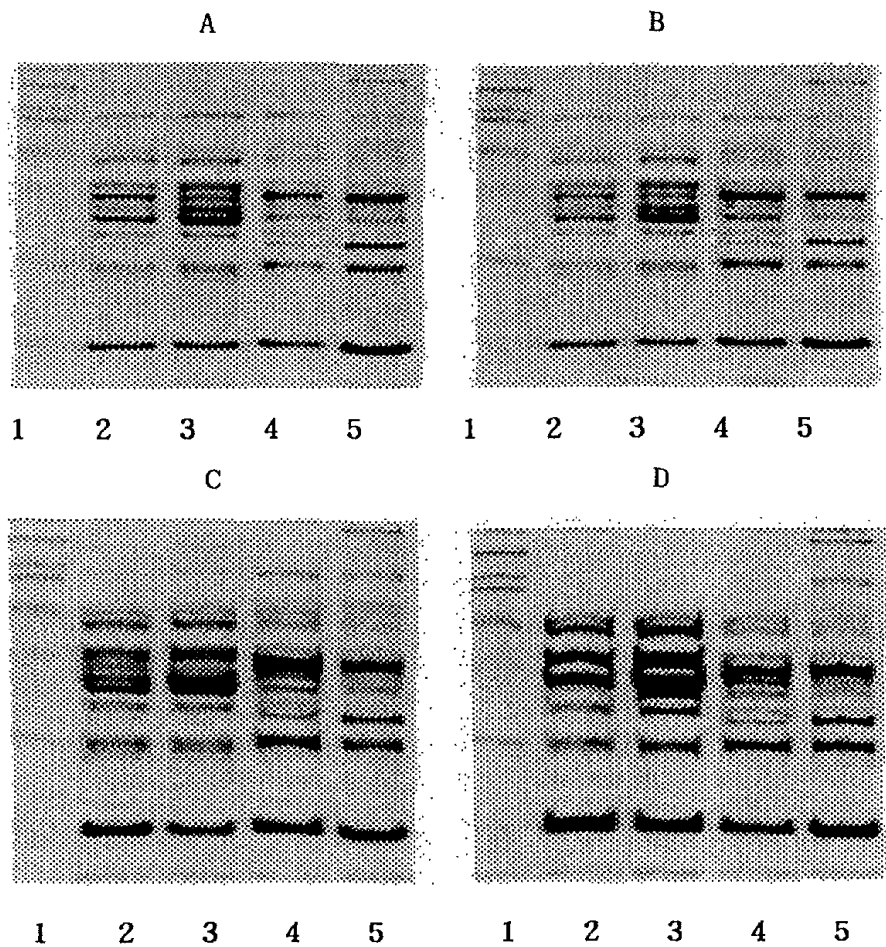


Fig. 1-17. SDS-PAGE patterns of denatured Hanwoo, crossbred, Holstein and imported beef at 37, 45, 55 and 75°C for 10 min.

Panels A, 37°C; B, 45°C; C, 55°C; D, 75°C. Lanes 1, molecular weight marker; 2, Hanwoo; 3, crossbred; 4, imported; 5, Holstein.

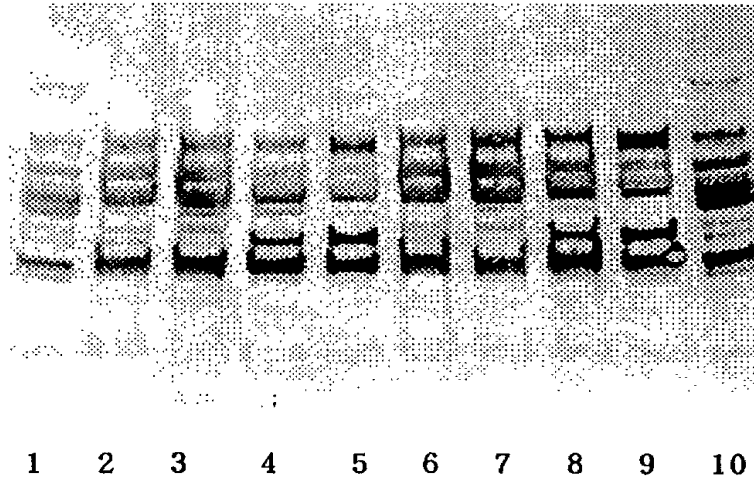


Fig. 1-18. Lectin staining of denatured Hanwoo, crossbred, Holstein and imported beef at 55 and 75°C for 10 min with LCA.  
 Lanes 2 to 5, denatured at 55°C; 6 to 9, 75°C; 1, 10, native Hanwoo; 2, 6, Hanwoo; 3, 7, crossbred; 4, 8, imported; 5, 9, Holstein.

가열 변성시킨 각 시료를 DBA로 분석한 결과, HSC32.1에 해당하는 성분은 검출되지 않았다. 따라서, 비가열육의 약 35kDa 성분은 열에 매우 약하거나, 또는 DBA와 친화력을 나타내는 glycopeptide 부분이 절단되었을 가능성이 시사되었다. 그러나 우육을 100°C에서 1분 이상 가열할 경우, CB염색에 의해 확인되는 성분은 거의 없는 것으로 나타났으나, lectin염색을 할 경우, 미량의 열변성 glycopeptide가 존

제하고 있는 것이 확인 되었다(Fig. 1-20). Glycopeptide를 면역원으로 사용할 경우, 일정한 크기이상의 분자를 가질 필요성이 있으며, 양적으로도 문제가 되지 않아야 함으로, 량적으로 보다 많은 100℃에서 35초간 가열한 후, 내열성 한우육 성분을 이용하여 본 연구과제를 진행하기로 하였다.

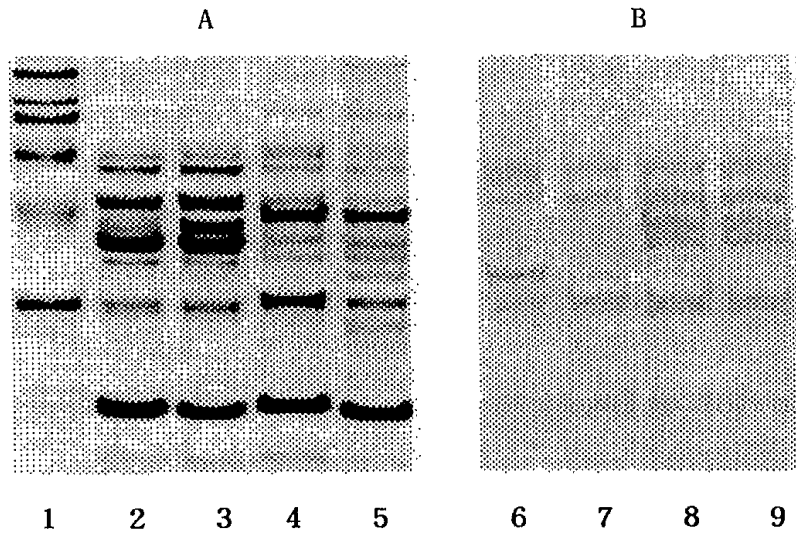


Fig. 1-19. SDS-PAGE and lectin staining of denatured Hanwoo, crossbred, Holstein and imported beef at 100℃ for 30 sec with LCA.

Panels A, CB; B, lectin staining. Lanes 1, molecular weight marker; 2, 9, Hanwoo; 3, 8, crossbred; 4, 7, imported; 5, 6, Holstein.

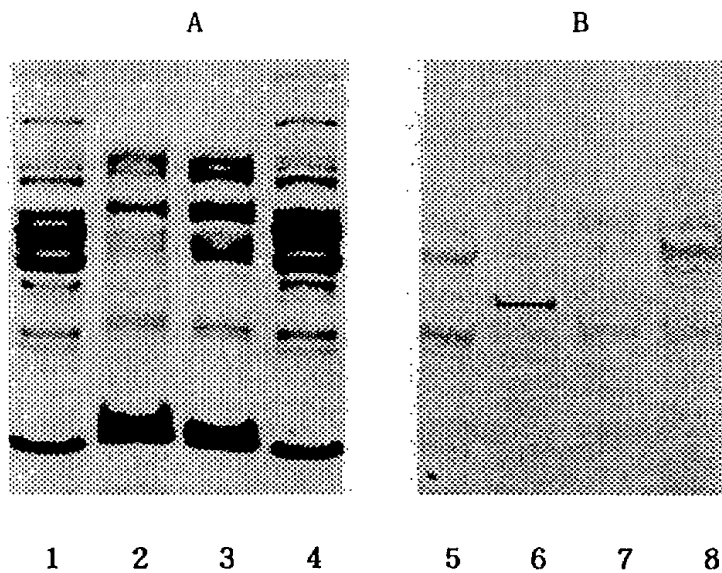


Fig. 1-20. SDS-PAGE and lectin staining of denatured Hanwoo, crossbred, Holstein and imported beef at 100°C for 35 sec with LCA. Panels A, CB; B, lectin staining. Lanes 1, 5, native Hanwoo; 2, 6, Holstein; 3, 7, imported; 4, 8, Hanwoo.

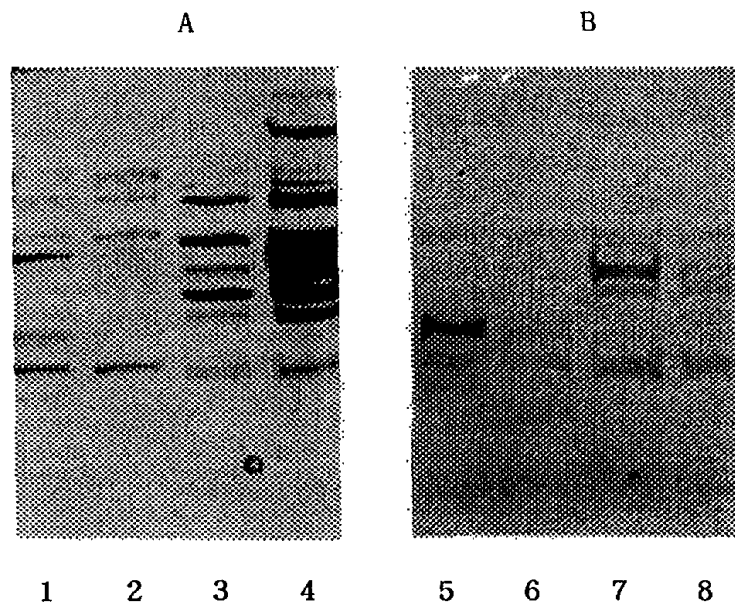


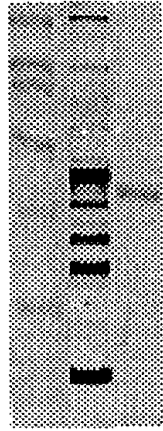
Fig. 1-21. SDS-PAGE and lectin staining of denatured Hanwoo crossbred, Holstein and imported beef at 100°C for 1 min with LCA. Panels A, CB; B, lectin staining. Lanes 1, 5 Holstein; 2, 6, imported; 3, 7, Hanwoo; 4, 8 native Hanwoo.

### 3. 한우육 특이 당단백질의 정제

#### 가. 전기영동에 의한 표지성분의 정제

100℃에서 35초간 가열한 내열성 한우육 단백질을 SDS를 함유한 10% polyacrylamide겔을 이용하여 15 mA/1.5시간 전기영동한 후, 2.5% CB를 이용하여 5분간 염색하고 10% 에탄올로 탈색하였다(Fig. 1-3). 특이성분의 Band를 분리하여 0.1% SDS용액을 이용하여 투석한 후, SDS용액에 유리된 단백질을 회수한 결과, 약 80%의 회수량을 나타내었다. 약 70-90%의 회수가 가능하다는 지금까지 보고와 거의 일치하는 결과를 얻을 수 있었다. 겔로부터 정제한 한우육 특이성분을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 단일성분으로 정제된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1-22). 정제량은 비록 적다고 할 수 있으나, 단일성분으로 간단히 정제할 수 있다는 점에서 본 정제법은 매우 유용하게 사용될 수 있으리라 생각된다.

따라서, 본 연구과제중에 확립한 SDS-PAGE에 의한 정제법을 이용함으로써 막대한 시간과 예산이 필요한 단백질 정제를 간단하고 신속하게 수행할 수 있게 되어, 단백질에 대한 연구는 물론이고 단일항체 생산에 필요한 항원의 조제방법으로 크게 이용될 수 있으리라 사료된다. 또한 수입육 완전개방을 목전에 두고 있는 현실을 감안할 때, 본 연구진이 수행한 단백질 정제법은 본 연구과제의 성공적인 수행을 위하여 크게 기여할 것으로 생각한다.



1 2 3

Fig. 1-22. SDS-PAGE patterns of purified Hanwoo specific component.

Lanes 1, molecular marker; denatured at 100°C for 35 sec); 2, purified HSC32.1.

#### 나. DEAE-sepharose ion-exchange chromatography에 의한 표지성분의 정제

한우육의 수용성 획분을 50% 및 70% 포화 유산용액을 이용하여 염석한 후, 표지성분을 농축하였다. 그 결과, 70% 포화유산의 침전물에 다량의 표지성분이 농축되었으며(Fig. 1-23), 이 획분을 증류수를 이용하여 3일간 투석한 후, 동결건조하여 정제용 시료로 사용하였다. 현재 이 성분의 정제를 위하여 DEAE-sepharose ion exchange



chromatography를 실시하였으며, 그 용출 양상은 Fig. 1-24과 같다. 각 용출 성분을 투석한 후, 동결건조하여 SDS-PAGE에 의한 각획분의 구성성분을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 다른 성분들이 다량으로 함유되어 있었다.

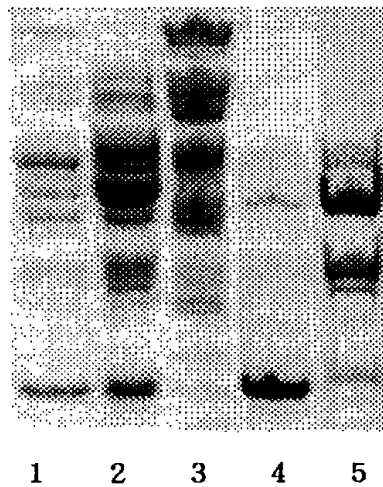


Fig. 1-23. SDS-PAGE patterns of fractionated Hanwoo meat with ammonium sulfate.  
Lanes 1, Hanwoo; 2, 50% ammonium sulfate supernatant; 3, 50% ammonium sulfate ppt.; 4, 75% ammonium sulfate supernatant; 5, 75% ammonium sulfate ppt.

단일항체의 생산 및 HSC32.1의 생화학적 특성 분석, 그리고 결합되어 있는 당쇄의 분석 등을 위하여, DEAE-chromatography로 분획한 성분을 Gel-filtration 및 Affinity chromatography 등을 병행

하여 실시하였으나, HSC32.1을 단일성분으로 정제할 수 없었다. 일반적으로 단백질 성분을 분리·정제하기 위해서는 다양한 chromatography를 병행하여 실시하여야 한다. HSC32.1의 농축 및 이온교환 chromatography에 의해 단백질을 분리한다는 것은 매우 어려운 것이므로, gel-filtration이나 affinity chromatography 등도 아울러 실시하여야 할 것이다.

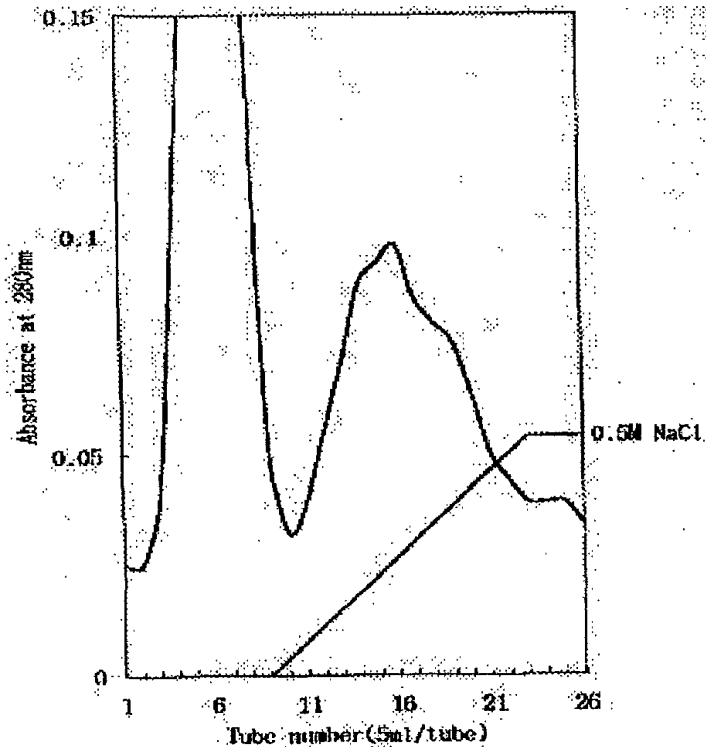


Fig. 1-24. Elution pattern of ammonium sulfate fraction for Hanwoo specific component purification.

그러나, 본 연구과제는 정해진 시간내에 일정한 목적을 달성하여야 한다는 현실적 어려운 점이 있어, 이러한 각종 chromatography를 지속적으로 실시한다는 것은 여러 가지 문제점을 내포하게 된다. 따라서, 량적으로는 부족하다고 할 수 있으나, SDS-PAGE법에 의한 단백질의 정제법이 확립되어 있어, 이를 이용하여 정제한 시료를 이용하여 이후의 분석을 실시하였다.

#### 4. 표지 당단백질의 생화학적 특성 분석

##### 가. 한우육 특이성분의 분자량

SDS-PAGE에 의한 단백질의 분자량 측정은 표준 분자량 maker (myosin: 205 kDa;  $\beta$ -galactosidase, 116 kDa; phosphorylase, 97.4 kDa; bovine serum albumin, 66 kDa; ovalbumin, 45 kDa; carbonic anhydrase, 29 kDa)를 사용하여 15% Acrylamide농도에서 측정하였다. 그 결과, LCA lectin에 의해 특이적으로 반응하는 가열육 성분의 분자량은 32.1kDa로 확인되었다. 이 분자량은 SDS-PAGE에 의한 분자량으로써, 시알산의 유무나 당의 결합, 그리고 당쇄의 함량에 따라 다소 차이가 있으리라 사료된다.

##### 나. HSC32.1의 아미노산 조성

Trypsin으로 부분 가수분해한 HSC32.1의 아미노산 조성은 역상 크로마토그래피를 이용하여 검사하였다. 그 결과, 극성 아미노산이 전

체의 약 56.5mol%를 차지하고 있는 것이 확인되었다. 또한 전하를 갖고 있는 아미노산 그룹이 약 33.5mol%를 차지하고 있어, HSC32.1는 수용성이 강한 성질이 있음이 시사되었다(Table 1-3, Fig. 1-25).

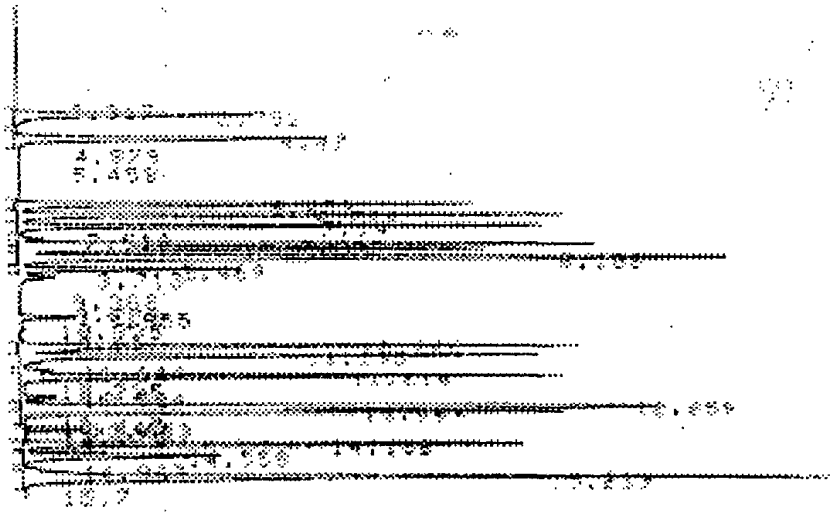


Fig. 1-25. Amino acid analysis patterns of HSC32.1 glycoprotein from Hanwoo meat by reversed-phase HPLC

비극성 아미노산 그룹 중에서 proline의 함량이 상대적으로 많아, 복잡한 3차 구조를 형성하고 있지 않을 것으로 판단되며, 메티오닌의 함량이 가장 적은 것으로 나타났다.

Table 1-3. Amino acid composition of HSC32.1 glycoprotein from Hanwoo meat (mol%).

Amino acids	HSC32.1 (mol%)
Nonpolar	
Alanine	3.8
Glycine	6.2
Isoleucine	5.9
Leucine	6.3
Methionine	1.7
Phenylalanine	4.8
Proline	7.3
Valine	7.6
Polar (uncharged)	
Cystine	2.3
Serine	8.2
Threonine	9.3
Tyrosine	3.2
Polar (charged)	
Aspartic acid	8.2
Glutamic acid	7.3
Arginine	6.2
Histidine	3.4
Lysine	8.4

아미노산의 조성을 분석한 결과, 본 연구에서 밝혀진 한우육 특이 성분인 HSC32.1가 수용성 획분에 유리되어 나오는 것과 일치하는 결

과였으나, 소수성 아미노산 그룹을 약 43.6mol% 함유하고 있어, 조직 염색 등을 통한 HSC32.1의 근육내 국재성을 해명하지 않는 한 HSC32.1의 특성을 단정하기는 어려울 것으로 사료된다. 또한, 아미노산의 1차구조를 완전히 해명하여, HSC32.1의 분자 생물학적 기능 및 특성을 해석하는 것이 매우 중요한 일이라 사료되며, 본 연구과제와는 무관하나 HSC32.1이 지금까지 밝혀지지 않은 성분이라면, 이 성분에 대한 가치는 한우육 특이적 성분이라는 가치 이외에 그 생화학적 특성에 대한 학문적 가치도 매우 클 것으로 생각한다.

#### 다. N-말단 아미노산 배열

한우육을 SDS-PAGE로 분리한 후, PVDF막에 전사하여 CB염색을 실시하였다. CB염색에 의해 염색된 HSC32.1을 오려내어 N-말단 아미노산 배열을 조사하였다. 그 결과, N-말단은 acylation에 의해 blocking화되어 있는 것이 확인되어, acylamino acid releasing enzyme을 사용하여, N-말단의 첫 번째 아미노산을 분리시킨 후, 아미노산 배열을 분석하였다. 그 결과, N-말단은



로 확인되었다. Deblocking효소에 의한 N-말단 아미노산 배열의 분석은, 시약 또는 불순물의 혼입이 많아 긴 배열은 분석할 수 없었다. 본 연구에서 확인된 배열을 이용하여 지금까지 밝혀진 다른 단백질과의 유의성을 검사하고 있는 중이며, 또한 본 성분에 대한 연구를 지속적으로 진행하여 아미노산의 1차 구조는 물론이고, 본 성분의 기능을 해석하여야 할 것으로 사료된다.

#### 라. Peptide mapping과 부분 아미노산 배열

5M 요소를 함유한 50mM Tris-염산 완충액 (pH 7.8, 200 $\mu$ l)에 가용시킨 HSC32.1을 37 $^{\circ}$ C/6시간 부분 가수분해시킨 후, ODS C18 역상 칼럼을 이용하여 분석하였다. 그 결과, HSC32.1은 Fig. 1-26와 같은 분리 양상을 나타내었으며, 분리된 각 펩티드 중 용출시간 27.32분, 30.73분, 그리고 33.57분의 분획을 분취하여 부분 아미노산 배열을 조사하기로 하였다.

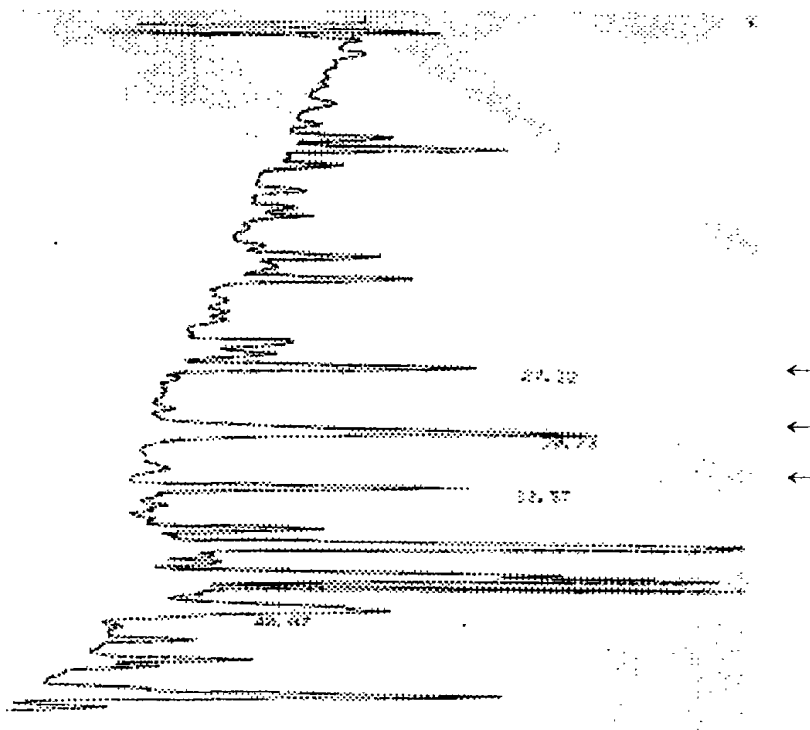


Fig. 1-26. Peptide mapping of HSC32.1 from Hanwoo meat.

HSC32.1의 내부 부분 아미노산의 배열이 명확하게 밝혀질 경우, 본 연구에서 확인된 한우육 특이성분인 HSC32.1성분의 특징, HSC32.1성분과 유의성이 있는 다른 육 단백질, 또는 기타 단백질과의 특성 비교, 그리고 아미노산의 1차구조를 해석하는데 큰 도움이 되리라 생각한다. 이는 생체 내에서의 HSC32.1의 기능을 해석하는데도 큰 도움이 되리라 생각한다. 또한, 한우의 우수성을 홍보하는 자료로써도 이용될 수 있으리라 사료된다.

#### 마. HSC32.1의 구성 단당 조성

이온교환 크로마토그래피에 의한 HSC32.1의 당 조성을 조사한 결과, HSC32.1의 당 함량은 10.7%로써, Man, Gal, Fuc, GalNAc, 그리고 GlcNAc으로 구성되어 있었다(Table 1-4, Fig. 1-27). 다량의 Man과 GalNAc의 존재하는 것으로 보아 HSC32.1에는 N- 및 O-결합 당쇄를 함유하고 있을 가능성이 시사되었다. 온화한 알칼리 처리를 실시한 결과 GalNAc 및 Gal은 약 2/3가 감소하였다. 그러나 Man, Fuc 및 GlcNAc의 양은 거의 변화하지 않는 것이 확인되었다(Table 1-4). 알칼리 처리에 의해 O-결합 당쇄를 유리시키는 수단의 하나로 사용되고 있으므로, HSC32.1에는 O-결합 당쇄를 갖고 있는 것이 시사되었다.

N-Glycanase에 의해 N-결합당쇄를 유리시킨 후, 당조성을 조사한 결과, 약 65% 이상의 당이 감소하였다. 특히 Man 및 GlcNAc, 그리고 Fuc는 거의 대부분이 유리되었으나, Gal 및 GalNAc은 50%이상이 잔존하고 있었다(Table 1-4). N-Glycanase는 N-결합 당쇄의 환원 말단 GlcNAc와 Asn사이를 분해하는 효소이며, 따라서, HSC32.1에 결합되



어 있는 N-결합 당쇄가 거의 대부분 유리된 것으로 확인되었다. 이상의 결과로부터, HSC32.1는 N- 및 O-결합당쇄를 갖고 있는 것이 확인되었다.

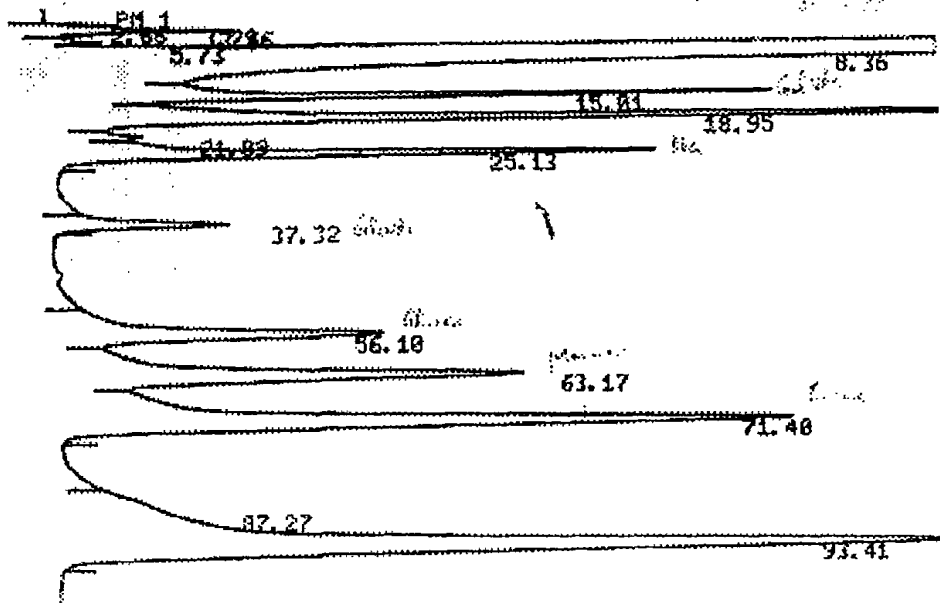


Fig. 1-27. Carbohydrate analysis patterns of HSC32.1 glycoprotein from Hanwoo meat with anion exchange column.

본 연구에 의해 밝혀진 바와 같이, HSC32.1에는 N- 및 O-결합 당쇄를 모두 갖고 있는 것이 확인되어, 각종 lectin과의 결합력을 조사하여 HSC32.1에 결합되어 있는 당쇄의 구조를 추측해 보기로 하였

다.

Table 1-4. Carbohydrate composition of HSC32.1 glycoprotein from Hanwoo meat.

Carbohydrate	$\mu\text{g}/\text{mg}$ protein	Alkaline treat.	N-glycanase treat.
N-acetylgalactosamine	$24.9 \pm 0.8$	$5.2 \pm 0.2$	$18.3 \pm 0.2$
N-acetylglucosamine	$18.7 \pm 0.4$	$18.1 \pm 0.3$	$0.4 \pm 0.1$
Mannose	$32.4 \pm 0.8$	$30.9 \pm 0.4$	$1.4 \pm 0.2$
Fucose	$10.4 \pm 0.8$	$8.6 \pm 0.2$	$2.1 \pm 0.4$
Galactose	$20.8 \pm 0.9$	8.50.3	$9.3 \pm 0.3$
Sialic acid			
Total	107.2	71.3	31.5

The amounts are shown as the mean  $\pm$  SD of triplicate assays.

#### 바. 각종 Lectin에 대한 HSC32.1의 친화력

Lectin은 당결합성 단백질로써, 그 종류에 의해 결합하는 당쇄구조가 다르며, 당쇄 구조해석의 방법으로 이용되어지고 있다. 한우육을 중류수로 추출하여 SDS-PAGE로 분리한 후, PVDF막에 전사하여, HRP-lectin kit를 사용하여 lectin염색을 실시하였다. 그 결과 HSC32.1는 본 연구에서 사용한 8가지의 lectin과 모두 반응하였다. 특히 PNA, DBA, RCA-120, 그리고 UEA-1과는 강한 친화력을 나타내었다(Table 1-5).

LCA lectin의 경우, 교잡우 및 수입육에서는 HSC32.1이 검출되지 않아, 이를 이용한 한우육과 수입육 및 교잡우와의 식별이 가능할 것으로 사료된다. 또한 이곳에서는 나타내지 않았으나, 한우육 및 홀스타인육을 100℃에서 35초 가열하여 LCA로 분석할 경우, 홀스타인육에서는 HSC32.1이 검출되지 않았으나, 한우육은 LCA와 특이적으로 반응하였다. 이는 홀스타인육의 HSC32.1이 열에 의하여 열변성되기 쉽거나, 가열에 의해 당쇄부분의 펩티드가 변화되는 것으로 사료되었다. 또한 LCA를 이용할 경우, 한우육과 홀스타인육의 식별이 가능함을 시사하는 매우 획기적인 결과라 할 수 있을 것이다.

PNA의 경우, 한우 HSC32.1을 특이적으로 인식하는 것으로 나타났으며, 홀스타인 및 교잡우는 거의 반응하지 않거나, 반응하더라도 매우 약한 친화력이 있는 것으로 나타났다.

DBA의 경우, 한우의 HSC32.1성분과 매우 강하게 반응하였으나, 홀스타인, 교잡우, 그리고 수입육과는 반응하지 않는 것이 확인되어, 여러 가지 육 혼합물 중의 한우육을 식별할 경우, 이 lectin을 사용하면 가능할 것으로 사료된다.

다량의 Man과 GlcNAc의 존재, N-Glycanase에 의해 거의 대부분의 Man 및 GlcNAc의 유리, N-결합 당쇄와 친화성을 나타내는 lectin인 Con A, RCA와 강한 친화성, 그리고 O-결합 당쇄와 강하게 결합하는 PNA와 친화성을 나타내는 결과 등으로 보아, HSC32.1은 N- 및 O-결합 당쇄를 함유하고 있는 것이 시사되었다. 한우육의 특이 성분으로 확인된 HSC32.1의 당쇄구조는 이후의 연구에서 매우 중요하게 인식되며, HSC32.1의 당쇄에 대한 항체의 생산 또는 HSC32.1의 당쇄를 이용한 한우육의 판별 기법의 확립을 위한 연구가 보다 구체적으로 진행되어야 할 것으로 판단된다.

Table 1-5. Interaction of HSC32.1glycoprotein in the water soluble fraction transferred to a PVDF membrane with horse radish peroxidase-lectins.

Lectins Sample	Con A	LCA	PHA-E4	PNA	DBA	WGA	RCA-120	UEA-1
Hanwoo	+	+	+	++	++	++	++	++
Holstein	+	+	+	±	-	+	+	+
Crossed-bread	+	-	+	±	-	-	+	+
Imported meat	+	-	+	+	-	+	-	-

++ bound strongly, + bound, ± probably bound, - unbound to lectins.

### 5. 표지 당단백질의 구성 당체 정제

정제한 HSC32.1을 무수 히드라진으로 당체와 펩티드의 결합부위를 절단한 후, 동결건조하였다. 동결건조한 HSC32.1를 이용하여 단당분석에서 설명한 바와 같이 2-PA화하여 DEAE-5PW column에 의한 이온교환 크로마토그래피를 실시하였다 그 결과, 용출시간 37.00분의 중성당과 41.29분의 산성당을 분획하는 것이 가능하였다(Fig. 1-27). 용출시간 15.94분대에 검출된 피크는 2-PA를 비롯한 시약 성분으로

확인되었다.

HSC32.1는 중성당과 시알산을 함유한 산성당으로 구성되어 있었으며, 산성당은 sialidase에 의한 가수분해로 중성당이 검출되는 부분에 용출되었다. 당쇄에 대한 단일항체를 생산하기 위하여 여기서 정제한 중성당 및 산성당의 혼합물을 사용하였다.

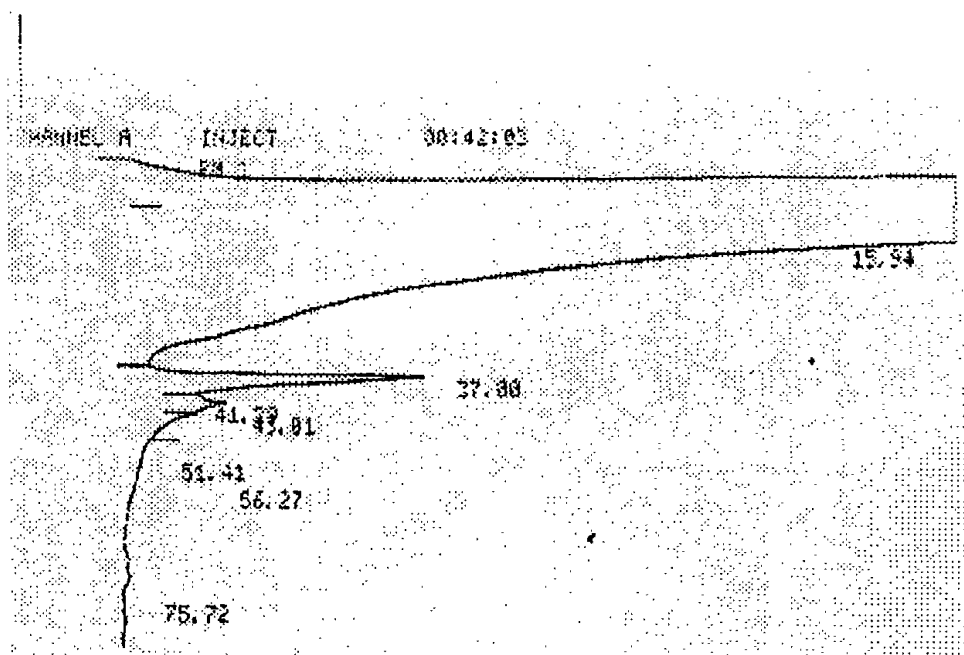


Fig. 1-28. Separation on DEAE-5PW HPLC of oligosaccharides obtained from HSC32.1 glycoprotein.

## 제 4 절 참고문헌

- Ashwell, G., Harford, H. 1982. Carbohydrate-Specific Receptors of the Liver. *Annu. Rev. Biochem.* 51:531
- Bailey, E., Lear, T. L. 1994. Comparison of Thoroughbred and Arabian Horses Using RAPD Markers. *Anim. Genet.* 25:105
- Bleil, J. D., Wassarman, P. M. 1980. Mammalian Sperm-Egg Interaction: Identification of a Glycoprotein in Mouse Egg Zonae Pellucidae Possessing Receptor Activity for Sperm. *Cell.* 20:873
- Chikuni, K., Ozutsumi, K., Koishikawa, T., Kato, S. 1990. Species Identification of Cooked Meats by DNA Hybridization Assay. *Meat Sci.* 27:119
- Chikuni, K., Tabata, T., Kosugiyama, M., Monama, M. 1994. Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Sheep and Goat Meats. *Meat Sci.* 37:337
- Cummings, R. D., Kornfeld, S. 1984. The Distribution of Repeating [Gel  $\beta$ 1, 4GlcNAc  $\beta$ 1.3] Sequences in Asparagine-Linked Oligosaccharides of the Mouse Lymphoma Cell Line Bw5147 and Pha 2.1. *J. Biol. Chem.* 259:6253
- Dorland, L. 1981. Primary Structure of the Carbohydrate Chain of Soybean Agglutinin. *J. Biol. Chem.* 256:7708
- Drickamer, K., Carver, J. 1992. Carbohydrates and Glycoconjugates: Upwardly Mobile Sugars Gain Status as

Information-Bearing Molecules. In: Current Opinion in Structural Biology. 2:653

Ebbehoj, K. F., Thomsen, P. D. 1991a. Differentiation of Closely Related Species by DNA Hybridization. Meat Sci. 30:359

Ebbehoj, K. F., Thomsen, P. D. 1991b. Species Differentiation of Heated Meat Products by DNA Hybridization. Meat Sci. 30:221

Goerlich, R., Greuel, E. 1986. Der Nachweis Nativer und Hitzedenaturierter Muskel-Proteine Von Rind und Kaenguruh Mit Hilfe Muriner Mono-Arch. Leb. Mitt. Hyg. 4:87

Greenwalt, D. E., Watt, K. W. K., Hasler, T., Howard, R. J., Patel, S. 1990. Structural, Functional, and Antigenic Differences between Heart Endothelial CD36 and Human Platelet CD36. J. Biol. Chem. 265:16296

Gwakisa, P. S., Kemp, S. J., Teale, A. J. 1994. Characterization of Zebu Cattle Breeds in Tanzania Using Random Amplified Polymorphic DNA Markers. Animal Genetics. 25:89

Hakomori, S. 1981. Glycosphingolipids in Cellular Interaction, Differentiation, and Oncogenesis. Annu. Rev. Biochem. 50:733

Hannun, Y. A., Bell, R. M. 1989. Functions of Sphingolipids and Sphingolipid Breakdown Products in Cellular Regulation. Science. 243:500

Hwangbo, S., 1996. Biochemical and molecular biological studies on PAS-4 glycoprotein of milk fat globule membrane.

Irimura, T., Nakamori, S., Matsushita, Y., Taniuchi, Y., Todoroki, N., Tsuji, T., Izumi, Y., Kawamura, Y., Hoff, S. D.,

Cleary, K. R., Ota, D. M. 1993. Colorectal Cancer Metastasis Determined by Carbohydrate-Mediated Cell Adhesion: Roll of Sialyl-Le<sup>x</sup> Antigens. In: Seminars in Cancer Biology. 4:319

Ito, K., Okada, Y., Ishida, K., Minamura, N. 1993. Human Salivary Endo-N-Acetyl glucosaminidase as Specific for Complex Type Sugar Chains of Glycoproteins. J. Biol. Chem. 268:16074

Kawashima, I., Nakamura, O., Tai, T. 1992. Antibody Responses to Ganglio-Series Gangliosides in Different Strains of Inbred Mice. Mol. Immunol. 29:625

Kemp, S. J., Teale, A. J. 1994. Randomly Primed for Amplification of Pooled DNA Reveals Polymorphism in a Ruminant Repetitive DNA Sequence Which Differentiated Bos Indicus and B. Taurus. Animal Genetics. 25:83

Köhler, G., Milstein, C. 1975. Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. Nature. 256:495.

Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins durin the assembly of the head of bacteriophage. Nature, 227:680.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. R. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265.

Markwell, M. A. K., S. M. Hass, L. L. Bieberand and N. E. T. Tolbert, 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. Anal. Biochem., 87:206.



Nakamori, S., Kameyama, M., Imaoka, S., Furukawa, H., Ishikawa, O., Sasaki, Y., Kabuto, T., Iwanaga, T., Matsushita, Y., Irimura, T. 1993. Increased Expression of Sialyl Lewis-X Antigen Correlates with Poor Survival in Patients with Colorectal Carcinoma: Clinica-Pathological and Immunohistochemical Study. *Cancer Res.* 53:3632

Ogiso, M., Irie, A., Kubo, H., Hoshi, M., Komoto, M. 1992. Senile Cataract-Related Accumulation of Lewis<sup>x</sup> Glycolipid in Human Lens. *J. Biol. Chem.* 267:6467

Osawa, T. 1985. *Lectin And Cell Biology.* Scientific Press. 1

Patterson, R. M., Whittaker, R. G., Spencer, T. L. 1984. Improved Specie Identification of Raw Meat by Double Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Sci. Food Agric.* 35:1018

Rademacher, T. W., Arekh, R. B. P., Week, R. A. D. 1988. *Glycobiology. Annu. Rev. Biochem.* 57:785

Rodriguez, E., Garcia, M. T., Morales, P., Gonzalez, I., Sanz, B., Hernandez, P. E. 1994. Sandwich ELISA for Detection of Goats' Milk in Ewes' Milk and Cheese. *Food Agric. Immunol.* 6:105

Sharon, N., Lis, H. 1989. Lectins as Cell Recognition Molecules. *Science.* 246:227

Sharon, N., Lis, H. 1993. Carbohydrates in Cell Recognition. *Scientific American.* 4:16

Suzuki, S., Kondo, A., Kato, I., Hase, S., Ikenaka, T. 1991. Analysis of High-Performance Anion-Exchange Chromatography of

Component Sugars as their Fluorescent Pyridylamino Derivatives. Agric. Biol. Chem. 55:283

Watkins, W. M. 1980. Biochemistry and Genetics of the Abo, Lewis, And P Blood Group Systems. In: Advances in Human Genetics. Vol. 10, Plenum Press, New York. 1-136

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers Useful as Genetic Markers. Nucleic Acids Res. 18:6531

Wintero, A. K., Thomsen, P. D., Davies, W. 1990. A Comparison of DNA-Hybridization, Immunodiffusion, Counter Current Immuno-Electrophoresis and Isoelectric Focusing for Detecting the Mixture of Pork to Beef. Meat Sci. 27:7

Yamamoto, F. 1990. Molecular Genetic Basis of the Histoblood Group Abo System. Nature, London. 345:229

Yamashita, K., Koide, N., Endo, T., Iwaki, Y., Kobata, A. 1989. Fractionation of L-Fucose-Containing Oligosaccharides on Immobilized Aleuria Aurantia Lectin. J. Biol. Chem. 264:2415

Zacheis, M., Giacoletto, K., Schwartz, B. D. 1986. Analysis of Normal Human Tonsil Class II Antigen Glycosylation by Lectin Affinity Chromatography. J. Biol. Chem. 261:17004

古川 清. 1992. 蛋白質・核酸・酵素, 複合糖質, 公立出版社. 32:2076

入村達郎. 1996. 日經Science. 日經Science社. 111:7

永井克孝. 1994. 糖鎖-I. 糖鎖와 生命. 동경화학동인

- 永井克孝. 1994. 糖鎖-II. 糖鎖와 病態. 동경화학동인
- 永井克孝. 1994. 糖鎖-III. 糖鎖의 分子設計. 동경화학동인
- 高橋禮子. 1989. 糖蛋白質糖鎖研究法. 학회출판센타. 23:1
- 민병록, 한재용, 이무하. 1995. RAPD 기법을 이용한 쇠고기 품종 [한우육, 유우육 (Holstein육), 수입우육] 구분. 한축지 37:651
- 이창수, 유영복, 나기준, 조병대, 최병규. 1994. 핵산분석법에 의한 한우의 판별. 한국축산학회지. 36:369
- 정의룡, 김우태, 한상기. 1995. RAPD-PCR 기법을 이용한 젖소의 DNA 다형분석과 유전적 특성에 관한 연구. 한축지. 37:455
- 조병대, 한재용. 1994. 한우 특이적 RAPD 표지인자 개발. 한국축산학회지. 36:263

# 제 3 장 면역학적 기법을 이용한 한우 육 특이 당단백질과 구성당쇄 항체개발 및 진단용 항체 Kit 생산

## 제 1 절 서 설

항체는 외부에서 들어온 이물질인 항원에 대한 반응으로 B 세포(B lymphocyte)에서 생산되는 단백질이다. 대부분의 항원은 항체에 결합하여 반응을 자극하는 특수한 부위인 항원결정소(antigenic determinant)를 여러개 가지고 있기 때문에 항원이 동물에 주입되면 각각의 항원결정소에 대해 각기 다른 클론의 항체형성세포(antibody-forming cell)가 생성된다. 이와같이 항원 전체에 대해 생성된 항체는 복합항체라고 불리운다. 반면에, 하나의 특이한 항원 결정소에 대해 반응하는 항체를 단일항체라고 한다.

축종별 육식별에 사용되고 있는 면역학적 방법에는 Ouchterlony double immunodiffusion 방법과 ELISA 방법이 있다(Hitchcock와 Crimes, 1985). 이중에서 ELISA는 민감하고 특이적이며 신뢰성이 높아 정성적 screening 방법과 정량적 진단 방법으로, 특히 식품의 미량성분 분석에 가장 널리 이용되고 있는 면역학적 방법이다. 육의 축종식별에 사용되고 있는 ELISA 방법은 혈청단백질(Kang'ethe 등, 1982; Griffiths와 Billington, 1984; Patterson 등, 1984;

Patterson과 Spencer, 1985; Jones와 Patterson, 1985,1986) 또는 근 수용성단백질(Martin 등, 1988a,b)에 대한 복합항체를 사용하여 실시되어왔다.

이와 같이 복합항체를 이용한 면역학적 방법을 사용하여 정확하고 민감도 높게 축종간 차이를 구별할 수 있지만, 높은 titer를 지닌 특이한 항혈청(antiserum)의 생산이 필요하고, 또한 정제되지 않은 항혈청으로부터 축종 특이한 항체를 얻는데 시간 및 비용이 많이 요구되고 있다. 이러한 어려움 들은 특히 장기적 관점에서 볼 때 기술적 quality control의 심각한 문제점으로 야기된다. 이에 대한 해결책으로 단일 세포계(cell line)로부터 생물학적 활력 및 일정한 특이성을 지닌 단일항체를 지속적으로 생산할 수 있는 hybridoma 생산기술은 1975년 Köhler와 Milstein에 의해 소개된 방법으로, 항체 형성세포와 골수종세포(myeloma cell)를 융합하여 hybrid 세포를 생산한 다음, hybrid 세포들이 생성하는 항체의 종류에 따라 분리한 뒤 원하는 특이성을 지닌 항체만을 생성하는 세포를 선택, 배양하여 단일항체를 생산하는 것으로 지금까지 다양한 생명과학분야에서 많이 이용되고 있다.

지금까지 육단백질에 대한 단일항체를 이용한 ELISA 방법은 유즙(Garcia 등, 1990, 1991; Rodriguez 등, 1994) 또는 육(Goerlich와 Greuel, 1986; Martin 등, 1989,1991; Chung, 1992)의 축종판별에 사용되어 왔으나, 본 연구진이 아는 범위 내에서는, 국내·외적으로 동일 축종내 품종 특이 단백질이 보고된 바 없으며, 또한 동일 축종의 품종판별에 단일항체가 사용되어 진 바 없는 것으로 알고 있다. 지난 10여 년간 의학 및 생물학 연구에 있어서 단일항체는 생체 성분의 검출, 정량, 농축 또는 정제의 수단으로서 매우 중요한 역할

을 담당하게 되었다.

그러나, 현재 많은 종류의 단일항체가 시판되고 있으나, 그 가격이 매우 비싸고 또한 특정한 목적의 항체 구입이 어려워, 특정한 연구목적에 부합되는 단일항체를 제작할 필요성이 크게 대두되고 있다. Hybridoma 기술을 이용한 단일항체 제작의 기술은 이미 확립되어 있으나, 단일항체의 제작법과 응용에 관한 기술이 동물의 사육법, 동물의 면역법, 세포배양법, 면역학적 측정법 등의 폭넓은 지식과 기술을 배경으로 구성되어 있어, 계획하여 실행하는 단계까지는 극복하여야 할 문제점이 매우 많다. 본 연구진은 다년간 단일항체 생산, 항체의 역가 및 특이성 연구를 통한 기술 축적으로 본 연구과제를 수행하여 나가는 데 어려움이 없으리라 사려된다.

종양관련 항원으로 동정된 ganglioside에 의한 종양면역 치료법의 가능성을 모색한 연구의 하나로 *S. minnesota*에 흡착시킨 후 ganglioside 당쇄에 대한 단일 항체를 만든 결과, 높은 항체가를 나타내는 hybridoma를 얻을 수 있었고(Kawashima 등, 1992), 당쇄 특이적 단일항체의 도입에 의해 종래의 복합항체에 의한 해석에서는 불가능했던 분화항원이나 암관련 항원 또는 세포접착 분자로서의 당쇄의 동정 등이 가능하게 되었다(永井克孝, 1994).

따라서, 본 연구과제에서는 한우육 표지 당단백질을 이용한 단일항체의 생산 뿐 만 아니라, 표지 당단백질의 구성 당쇄에 대한 단일항체의 생산을 실시하여 한우육 식별법을 정립하기 위한 연구를 수행하였다.

## 제 2 절 재료 및 연구방법

### 1. 공시료

원료육은 서산농장 후대김정우, 횡성산업, 가락동 집배사업소, 성신산업, 한국냉장, 건국햄에서 구입하였으며, 수입육(북미산 에버딘 앵거스)은 축협중앙회 인천사업소에서 구입하여 시료로 사용하였다.

### 2. 단백질 추출

채취한 원료육을 지방, 인대 등을 제거한 후 각각 3 g을 증류수 12 ml에 첨가하여 4℃에서 1분간 균질(Ultraturrax T25, Germany, 24,000 rpm)한 후 4℃에서 7,500×g로 15분간 원심 분리하여 그 상등액을 분취하여, 수용성 단백질로 사용하였다.

### 3. 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry법(1951)을 보완한 Markwell법(178)을 사용하였으며, 표준 물질은 BSA를 사용하였다.

### 4. SDS-PAGE분석

SDS-PAGE분석은 Leammli의 방법(1970)을 이용하였으며, acrylamide와 bis-acrylamide의 농도는 37:1로 하였다. 분리 겔의 농도는 9%~15%, 농축 겔은 3%를 사용하였으며, 전기 영동에 의해

분석한 단백질은 2.5% CB로 염색 한 후, 45% Methyl alcohol의 washing solution( $\text{CH}_3\text{OH} : \text{CH}_3\text{COOH} : \text{D. W.} = 45 : 10 : 45$ )으로 탈색 하여 축종별 구성 단백질의 패턴을 검사하였다.

## 5. Western blot

추출한 시료를 SDS-PAGE로 분석한 후, Semi-dry 전사 장치 (Trans-blot SD, Bio-Rad)를 사용하여  $2.5\text{mA}/\text{cm}^2$ 에서 10분간 PVDF막에 전사하였다(平野, 1988). Blot후, PVDF막을 10mM Tris-HCl 완충액 (0.15M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4)에서 10분간 세척한 후, lectin염색(Hwangbo, 1996)을 실시하였다.

## 6. Dot-blotting

PVDF막을 장착시킨 Dot-blotting장치를 진공펌프에 연결한 후, 수용성 단백질 용액을 분주하는 방법으로 단백질을 고정시켰다. 단백질이 고정된 PVDF막을 PBS-Tween용액으로 5분간 세척한 후, 1:50,000으로 희석시킨 한우육 특이적인 1차항체 용액을 넣어  $37^\circ\text{C}$ 에서 1.5hr 결합시켰다. PBS-Tween용액으로 3회 세척한 후, 1:1,000으로 희석시킨 HRP-conjugated mouse IgG를 넣어  $37^\circ\text{C}$ 에서 1.5hr 결합시켰다. 반응이 끝난 PVDF막을 PBS-Tween으로 3회 세척한 후, 0.05% DBA를 함유한 0.01%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 로 반응시켰다.

## 7. HSC32.1의 면역



BALB/c mouse (5주령, ♀)의 복강 피하 내에 정제한 한우 특이성 분(HSC32.1)을 면역하였다( $10\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ , PBS:complete adjuvant = 1:1). 1차면역 2주일 후, 1차면역과 동일한 양의 항원을 PBS에 녹인 후 incomplete adjuvant와 1:1로 혼합하여 면역하여 복강 피하 내에 면역하였다. 1주일후, mouse의 꼬리 정맥으로부터 혈액을 채취하여 3,000 rpm/10min 원심 분리하여 얻은 항혈청을 사용하여 ELISA 및 immunoblotting을 실시하여 HSC32.1에 대한 그 특이성을 조사하였다. HSC32.1에 대한 특이적인 항체를 생산하는 mouse의 꼬리 정맥에 HSC32.1항원 용액( $10\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  in PBS)을 주사하였다(3차 면역).

## 8. Hybridoma cells의 생산

Mouse의 꼬리 정맥에 3차면역을 한지 3일 후, mouse의 비장을 사용하여 세포 융합을 실시하였다. 비장을 멸균한 가위로 세절한 후, 냉각된 DMEM배지 1ml에 넣은 후 압착에 의해 비장 조직을 파괴하였다. 비장 세포가 유리된 세포 현탁액을 nylon filter ( $70\mu\text{m}$ , Falcon)로 여과하여 조직을 제거한 후, 세포액을 1,000 rpm/10 min, 실온에서 원심 분리하여 비장세포를 조제하였다. 조제한 비장 세포와 배양해 둔 myeloma cells과 혼합하여(myeloma cells : spleen cells = 1 : 10), 45% PEG를 이용하여 세포 융합을 실시하였다. 24 well plate에  $2\times 10^6\sim 1\times 10^7$ 의 비장 세포/well이 되도록 1ml씩 분주한 후, 5% CO<sub>2</sub>배양기(상대 습도 95%), 37°C에서 배양하였다. 배양 1일 후, HAT배지에 의한 HAT selection을 실시하였다. Colony의 성장을 관찰하면서 약 14일 후부터 세포 배양액을 사용한 ELISA에 의해 HSC32.1에 대하여 양성 반응을 나타내는 hybridoma cells을

screening하였다(Fig. 2-1).

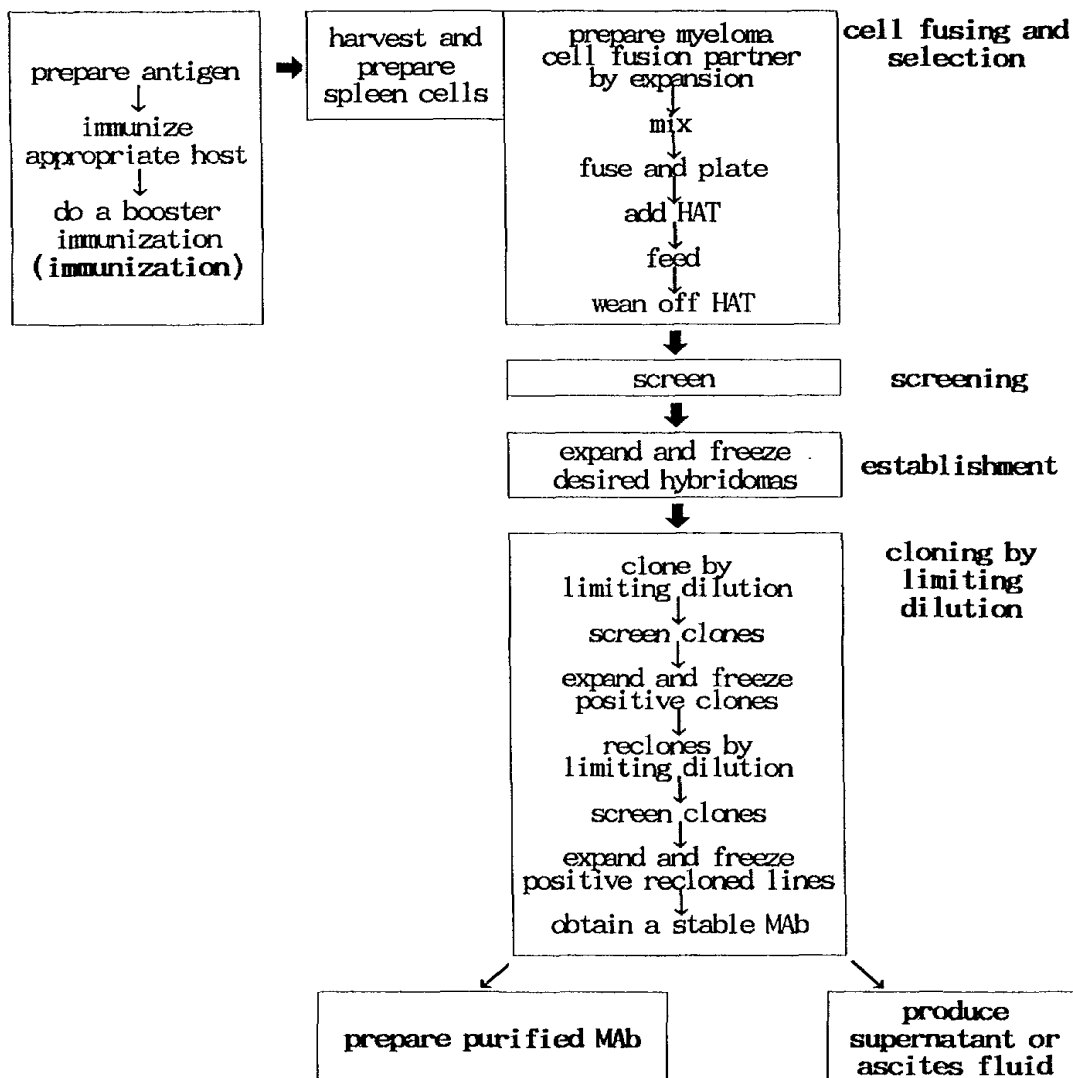


Fig. 2-1. Protocols of monoclonal antibody production.

## 9. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

HSC32.1에 대한 hybridoma cells의 배양액 중에 분비되어 있는 항체의 역가를 조사하기 위하여 ELISA를 실시하였다(Hornbeck, 1992, Fig. 2-2).  $1\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ 가 되도록 PBS에 분산 시킨 HSC32.1를 ELISA용의 polystyrene plates (96 wells)에 분주한 후,  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 16시간 plate에 결합시켰다. 이 plates를 0.05% Tween 20을 함유한 PBS-buffer (PBS-Tween용액)를 사용하여 3회 세척한 후, 1% BSA를 사용하여 blocking하였다(1hr/실온). PBS-Tween으로 3회 세척한 후, 1차 항체로써 배양액  $100\mu\text{l}/\text{well}$ 첨가하여  $37^{\circ}\text{C}/1.5\text{ hr}$ 반응시켰다. PBS-Tween으로 5,000배 희석한 alkaline phosphatase conjugated anti-mouse IgG를  $100\mu\text{l}/\text{well}$ 첨가하여,  $37^{\circ}\text{C}/1.5\text{ hr}$ 반응시켰다. PBS-Tween으로 세척한 후, 1% p-nitrophenyl phosphate disodium salt를 함유한 0.5% diethanol amine용액(pH 9.7)을 사용하여 반응시킨 후, 405 nm에서 그 흡광도를 측정하였다.

## 10. Immunoblotting

한우육을 SDS-PAGE로 분리한 후, Semi-dry blotting장치(Sarto blot-II, USA)를 사용하여 PVDF막에 blotting하였다(平野, 1988). Blotting한 PVDF막에 1차항체로써 세포 배양액(0.1~0.5 ml)을 넣어  $37^{\circ}\text{C}/1.5\text{ hr}$ 반응시켰다. PBS-Tween을 이용하여 10분 간격으로 3번 세척하였다. PBS-Tween으로 1,000배 희석시킨 HRP-conjugated anti-mouse IgG를 2차항체로 사용하여  $37^{\circ}\text{C}/1.5\text{ hr}$ 반응시킨 후, 0.01%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 와 0.05% diaminobenzidine을 함유한 10 mM Tris-HClbuffer (pH 7.2)를 기질 용액으로 사용하여 HSC32.1특이적

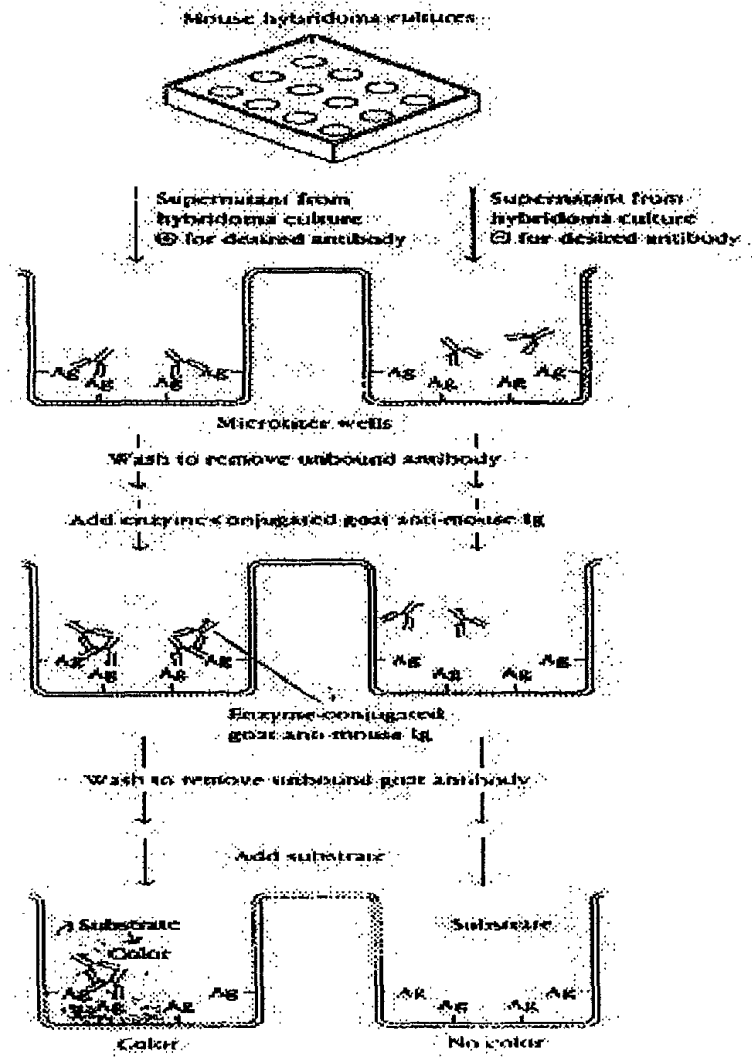


Fig. 2-2. Screening for specificity of monoclonal antibody using ELISA.

인 성분을 검출하였다.

### 11. Hybridoma의 cloning

ELISA에 의해 양성인 hybridoma cells를 이용하여 한계 희석을 실시하였다. BALB/c mouse (4주령, ♀)로부터 흉선을 적출 하여, 비장 세포의 조제와 동일한 방법으로 흉선 세포를 조제하였다. 한계 희석은 96 well plate를 이용하여 0.8~3개 hybridoma cells/ $1 \times 10^6$ 흉선 세포의 비율로 희석하여 200 $\mu$ l/well씩 분주하였다. Colony가 well 표면적의 약 1/5이 될 때까지 배양한 후, 100 $\mu$ l의 배양액을 이용하여 ELISA를 실시하였다. ELISA에 의해 양성인 hybrideoma cells의 배양액을 이용하여 immunoblotting에 의해 HSC32.1에 대한 특이성을 조사하였다. 단일 colony가 얻어질 때까지 계속해서 한계 희석을 실시하였다.

## 제 3 절 결과 및 고찰

### 1. HSC32.1의 당쇄에 대한 단일항체의 생산

#### 가. HSC32.1 당쇄의 정제

정제한 HSC32.1 2mg과 무수히드라진 3ml를 혼합한 후, 감압하에서 100 $^{\circ}$ C/24시간 처리하여 당쇄와 펩티드의 결합부위를 절단하였다. 동결건조한 건조물을 2-aminopyridine (2-PA)으로 형광 표식한 후, 과

량의 2-PA 등의 시약은 벤젠을 이용하여 제거하였다. 2-PA 표시 HSC32.1의 당쇄부분은 DEAE-5PW column을 이용하여 정제하였다(Fig. 2-3). 그 결과, 용출시간 37.00분의 중성당과 41.29분의 산성당을 분획하는 것이 가능하였다. 용출시간 15.94분대에 검출된 피크는 2-PA를 비롯한 시약 성분으로 확인되었다. 일반적으로 산성당의 경우, 비환원말단에 결합되어 있는 시알산에 의한 것이며, 이러한 시알산은 전하를 띠고 있으므로, 이온교환 크로마토그래피에 의해 용출이 늦게 이루어진다. 따라서, 41.29분에 용출된 산성당을 sialidase를 사용하여 비환원말단의 시알산을 제거하였으며, 시알산이 제거된 산성당은 중성당이 용출되는 시간대에 유리되었다.

본 연구에서는 항원으로 사용할 당쇄의량을 많이 확보하고, 흡착시키는 미생물에 줄 수 있는 영양을 최소화하기 위하여 중성당 및 산성당 획분을 모두 항원으로 사용하였다.

#### 나. 당쇄의 면역 및 그 역가 분석

위에서 정제한 HSC32.1의 당쇄를 Kawashima등의 방법(1992)으로 *Salmonella minnesota* R595에 흡착시킨 후, *Salmonella minnesota* R595 250 $\mu$ g의량을 Balb/c mouse에 면역하였다. 면역은 4일 간격으로 총 4회 면역하였으며, 최종 면역후 3일째 혈액을 채취하여 그 역가를 측정하였다. 그 결과, 본 연구에서 사용한 모든 mouse (총 5마리)에서 0.3~0.5의 역가가 나타났다(Fig. 2-4). 일반적으로 당쇄에 대한 항체를 생산할 때, 그 역가의 상승은 단백질보다 다소 약한 것으로 알려져 있다. 그러나 본 연구에서는 0.4 이상의 역가를 나타내는 mouse가 있어(mouse 3), 이를 사용하여 단일항체를 작성하였다.

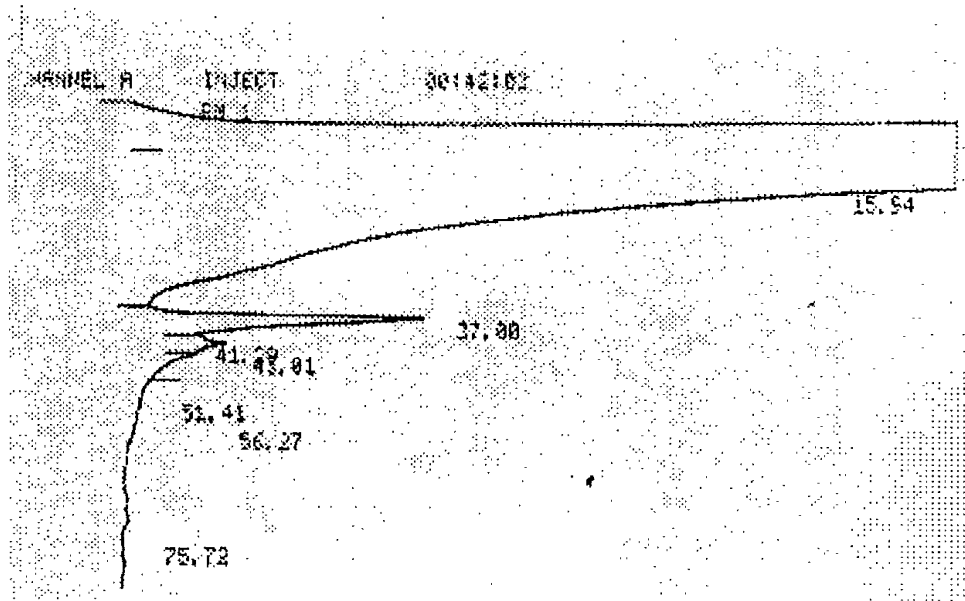


Fig. 2-3. Separation on DEAE-5PW HPLC of oligosaccharides obtained from HSC32.1 glycoprotein.

#### 다. 당쇄에 대한 단일항체의 생산

45% PEG를 이용하여 mouse의 비장세포와 P3X63Ag8- 6.5.3 myeloma 을 융합한 후, HAT selection을 실시하였으며, positive hybridoma

중 가장 역가가 높은 hybridoma (H2G5라 칭함)를 이용하여(Fig. 2-5) 1차 및 2차 limiting dilution을 실시하였다.

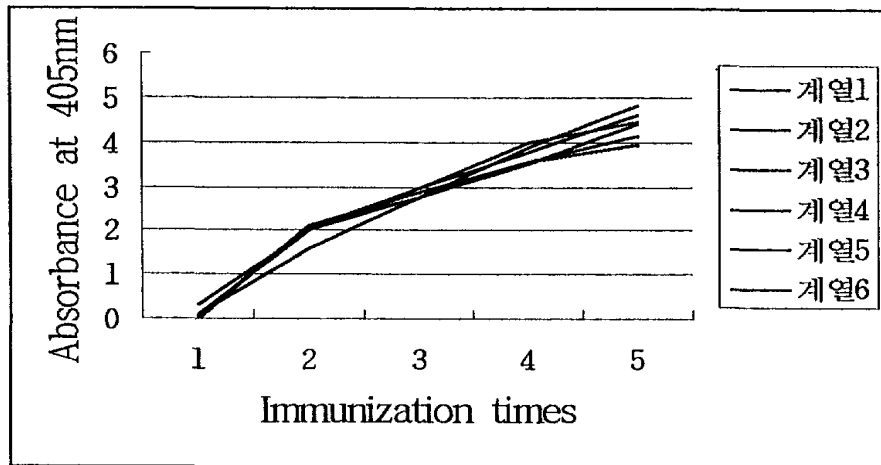


Fig. 2-4. Indirect ELISA of Hanwoo specific component (HSC32.1) sugar chain with anti-HSC32.1 sugar chain antibody.

1차 때는 2.0개/well의 농도로 hybridoma를 분주하였으며, 2차 때는 0.8개/well hybridoma의 농도로 실시하였다. 1차 limiting dilution후에 얻은 hybridoma중에는 한우육만을 특이적으로 반응하는 것이 없었다. 또한, 2차 limiting를 실시하였으나, 홀스타인 및 수입육과의 교차반응이 심한 등, 한우육만을 인식하는 단일항체는 생산되지 않았다.



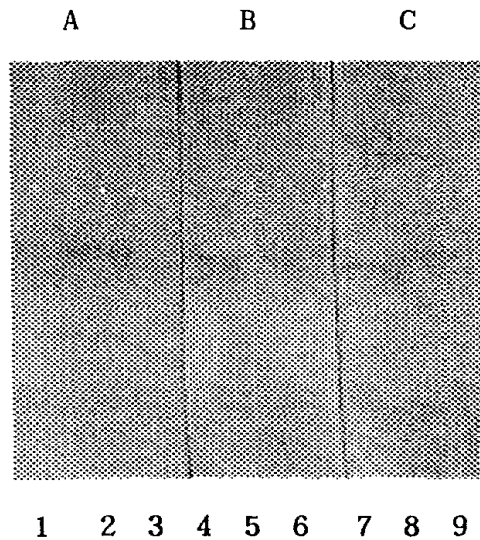


Fig. 2-5. Immunoblotting patterns with anti-HSC32.1 sugar chain hybridomas.

Lanes 1, 4, 6, Hanwoo meat; 2, 4, 7, holstein meat; 3, 6, 9, imported meat. Panels A, fusion hybridoma (H2G5); B, H2G5-G6 first limiting dilution hybridoma; C, second limiting dilution hybridoma.

지금까지 발표된 바에 의하면, 당쇄에 대한 단일항체의 생산은 매우 어려우며, 생산된다 하더라도 그 역가가 매우 낮은 것으로 보고되어 있다. 또한, HSC32.1은 DBA lectin에 대해 다른 품종에는 발견되지 않는 특이적 성분으로 확인되어 있으나, DBA lectin은 한우육

및 기타 품종의 성분과도 반응하는 것이 확인되어 있어, 생산된 항체가 다른 품종과도 결합하는 것은 당연한 결과라 사료된다. 당쇄에 대한 항체는 그 가치가 매우 높으므로, 연구과제가 종료되더라도 본 연구진에서는 한우육 positive hybridoma를 이용하여 지속적으로 당쇄에 대한 항체의 생산을 실시할 계획이다.

## 2. HSC32.1의 당단백질에 대한 단일항체의 생산

### 가. 면역 및 역가검증

HSC32.1에 대한 특이항체를 생산하기 위해 Fig. 2-1과 같은 방법으로 단일항체 생산을 위한 연구를 진행하였다. SDS-PAGE에 의해 정제한 HSC32.1을 PBS ( $100\mu\text{l}$ )에 용해시킨 후, 동량의 Complete freund's adjuvant와 잘 혼합하여  $10\mu\text{g}/\text{mouse}$ 가 되도록 BALB/c mouse (5주령)의 피하 복강내에 면역하였다. 면역 2주일 후, Incomplete adjuvant를 사용하여 1차 면역과 동일한 방법으로 면역하였다. 2차 면역 1주일 후, PBS에 녹인 동일한 량의 항원을 꼬리 정맥에 면역시킨 후, 3일째에 항혈청을 분리한 후, 그 역가의 상승을 indirect ELISA법을 이용하여 분석한 결과, 면역 횟수 의존적으로 증가하였다(Fig. 2-6). HSC32.1에 대한 역가가 가장 높은 1번 mouse의 복합항체를 이용하여 immunoblotting을 실시한 결과, 본 연구에서 생산된 복합항체는 HSC32.1 뿐만 아니라 한우육의 대부분의 단백질들과도 친화력이 있는 것으로 나타났다(Fig. 2-7). 그러나, 이러한 현상은 복합항체의 일반적인 특성으로, 이러한 복합항체를

이용할 경우 한우육의 식별은 불가능하므로, HSC32.1만을 인식하는 항체를 얻기 위해 단일항체 생산을 실시하였다. 항원으로 사용한 정제 HSC32.1을 정맥에 주사하고 3일이 경과된 시점에서 세포융합을 실시하여 HSC32.1 특이적인 항체를 생산하는 hybridoma를 만들었다.

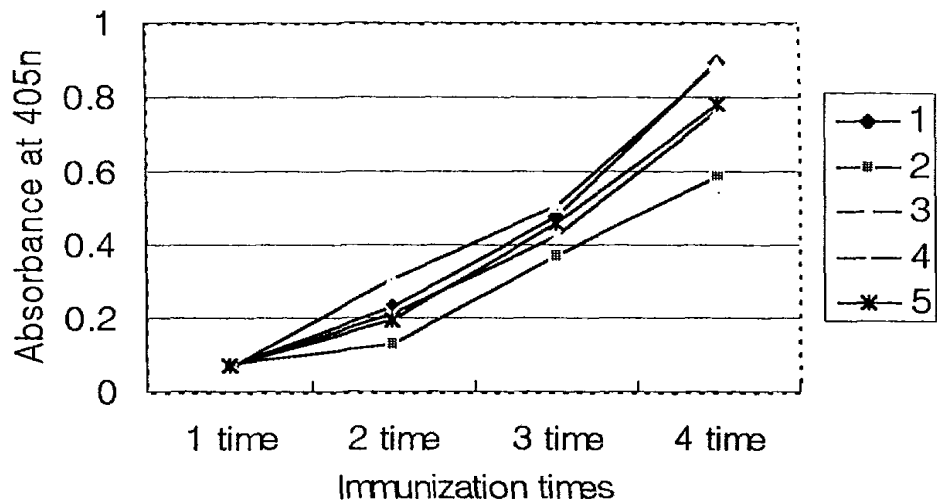
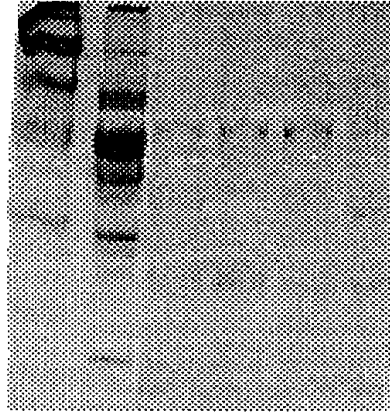


Fig. 2-6. Indirect ELISA of Hanwoo specific component (HSC32.1) glycoprotein with HSC32.1 polyclonal antibody.



1 2 3 4 5 6

Fig. 2-7. SDS-PAGE and immunoblotting patterns with anti-serum (No1 mouse from Fig. 2-6) to Hanwoo meat.

Lanes 1 and 2, SDS-PAGE; 3 to 6, immunoblotting; 1, molecular markers; 2 and 3, Hanwoo meat; 4, Holstein meat; 5, crossbred meat; 6, imported meat.

#### 나. Hybridoma의 생산

HSC32.1에 대해 가장 특이하게 반응하고, 역가가 가장 높은 No.1 mouse의 Spleen cell을 이용하여 세포융합을 실시하였다(Fig. 2-1). 24well plate에  $2 \times 10^7$ 개의 세포를 분주한 후 HAT selection을 한 후, 비 융합 세포가 완전히 사멸된 후 HT배지로 융합세포를 배양하였다. 융합된 hybridoma의 성장 및 배양액의 상태를 보면서, ELASA

를 실시하여 0.2이상의 역가를 나타내는 hybridoma를 screening하였다(Fig. 2-8).

**24 well plates I**

	1	2	3	4	5	6
A	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
B	0.000	0.129	0.437	0.186	0.172	0.000
C	0.000	0.234	0.136	0.339	0.297	0.000
D	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

**24 well plates II**

	1	2	3	4	5	6
A	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
B	0.000	0.476	0.182	0.243	0.115	0.000
C	0.000	0.127	0.332	0.499	0.109	0.000
D	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Fig. 2-8. Indirect ELISA of HSC32.1 with fusion hybridomas.

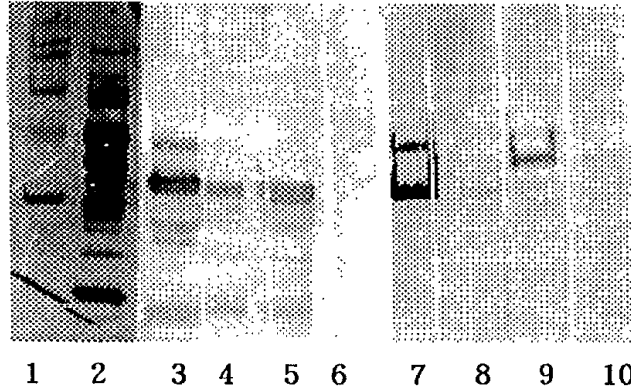


Fig. 2-9. SDS-PAGE and immunoblotting patterns with anti-HSC32.1 hybridomas.

Lanes 1 and 2, SDS-PAGE; 3 to 10, immunoblotting; 1, molecular markers; 2, Hanwoo meat; 3, IB3; 4, IC2; 5, IC4; 6, IC5; 7, IIB2; 8, IIB4; 9, IIC3; 10, IIC4.

융합에 의해 생산된 hybridoma의 clone의 경우, HSC32.1에 대해 특이적인 항체를 생산하는 세포 이외에 다른 성질의 항체를 생산하는 융합세포도 혼재하는 것이 일반적이므로, ELISA에 의해 확인되는 HSC32.1에 대한 역가는 낮게 나타나는 경우가 많다. 따라서 본 연구에서는 0.2이상의 역가를 나타내는 hybridoma와 HSC32.1에 대한 특이성을 검사하기 위하여 immunoblotting을 실시하였다. 그 결과, 8개의 hybridoma 중 4개가 HSC32.1와 강하게 반응하였으며, 나머지 4개의 clone은 비 특이적으로 반응하였다(Fig. 2-9). HSC32.1와 강한

친화력이 있는 hybridoma의 경우, IB3, IC2, 그리고 IC4는 HSC32.1 뿐만 아니라 저분자의 기타 성분과도 반응하는 것으로 나타났다. 이렇게 반응하는 한우육의 성분들은 HSC32.1의 분해산물이거나 HSC32.1와 유사한 Epitope를 가지고 있을 것으로 생각된다. IIB2의 경우, HSC32.1와 매우 특이적으로 반응하였으며, 분자량 약 56kDa 성분과도 강하게 반응하였다. 그러나, 다른 hybridoma의 특성과 비교할 경우, HSC32.1에 대한 특이성이 매우 강한 것으로 나타나, 이 IIB2 hybridoma를 이용하여 limiting dilution을 실시하기로 하였다.

비 특이적으로 반응하는 hybridoma 가운데 IIC3의 경우, HSC32.1이 아닌 다른 성분과 매우 특이적인 반응을 나타내었다. 본 연구에서는 이 hybridoma의 특성을 밝히기 위한 연구도 지속적으로 실시하기로 하였다.

#### 다. Limiting dilution에 의한 단일항체의 생산

세포융합에 의해 만들어진 hybridoma의 배양액을 이용하여 HSC32.1에 대한 특이성을 검색한 결과, IIB2 clone가 가장 HSC32.1에 대해 특이적으로 반응하는 것이 확인되어(Fig. 2-9), 이 hybridoma를 이용하여 limiting dilution을 실시하였다. Feeder cell을 이용하여 희석시킨 hybridoma를 96well plate에 1.5개 hybridoma cell/well의 농도로 분주하여 배양한 배양액을 이용하여 분석한 결과, 대부분의 hybridoma는 HSC32.1와 특이적으로 반응하는 것이 확인되었다. 그러나, limiting dilution에 의해 screening된 대부분의 hybridoma는 HSC32.1이외에 다른 성분도 같이 인식하는 것

으로 확인되었다(Fig. 2-10). HSC32.1에 대한 특이성으로 볼 때, IIB2-2D7 clone가 가장 양호한 것으로 나타났으며(Fig. 210, lane 5), 친화력 또한 강한 것으로 확인되었다.

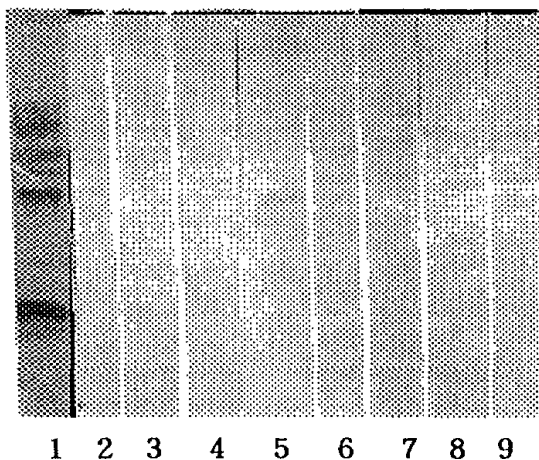


Fig. 2-10. SDS-PAGE and immunoblotting patterns with first limiting dilution hybridomas of IIB2.  
Lanes 1, SDS-PAGE; 2 to 9, immunoblotting; 1, Hanwoo meat; 2, IIB2-1C9; 3, IIB2-1D4; 4, IIB2-1E8; 5, IIB2-2D7; 6, IIB2-2G6; 7, IIB2-3B4; 8, 3F6; 9, IIB2-3F9.

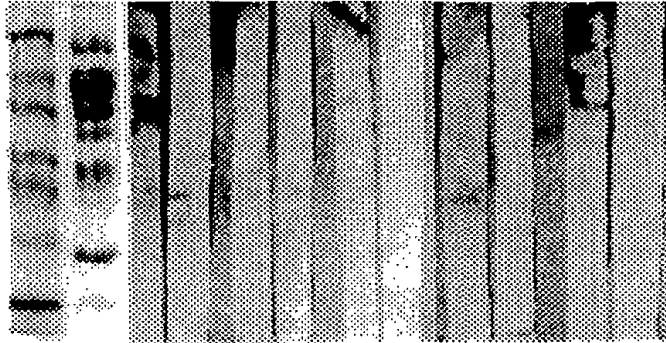
IIB2-2D7의 경우, HSC32.1에 대한 특이성이 매우 강한 것으로 나타났으나, 분자량 약 29kDa성분도 같이 인식하고 있는 것이 확인되었다. 이는 IIB2-2D7이 인식하는 HSC32.1의 부분, 즉 HSC32.1의 epitope부분과 매우 유사한 분자구조를 갖고 있는 단백질이 한우육



에 존재하고 있거나, HSC32.1의 일정 부분이 분해되어 저 분자량으로 검출되었을 가능성을 시사하는 것으로 생각된다. 다른 hybridoma의 경우, HSC32.1보다 조금 높은 분자를 인식하고 있으면서, HSC32.1과의 친화력이 낮은 것이 확인되어, 본 연구에서는 IIB2-2D7을 이용하여 limiting dilution을 지속적으로 실시하였다.

2번째 limiting dilution에서는 96well plate에 hybridoma cell을 0.7개/well의 농도로 분주하였으며, 배지의 색이 혼탁하게 되거나, 단일 clone으로서 그 크기가 well의 1/3이상 성장했을 때, ELISA를 실시하여 positive clone을 screening하였다. 이렇게 선택된 monoclones을 이용하여 immunoblotting을 실시한 결과, 한우육의 특이성분인 HSC32.1을 인식하는 hybridoma를 얻는데 성공하였다 (Fig. 2-11, lanes 9 and 12). IIB2-2D7-3B5 및 IIB2-2D7-3G11은 HSC32.1을 특이적으로 인식하고 있었으며, 그 이외의 단일 clones는 HSC32.1이외에 다른 성분과 친화력이 있는 것으로 나타났다. 특히 IIB2-2D7-3F4(Fig. 2-11, lane 11)의 경우, HSC32.1은 거의 인식하고 있지 않으면서 고 분자량의 성분과 특이적으로 결합하고 있었다.

HSC32.1의 epitope가 펩티드인지 당쇄인지를 확인하기 위하여, HSC32.1을 약한 알카리 처리나 N-glycanase로 처리한 후, IIB2-2D7-3B5 및 IIB2-2D7-3G11를 이용하여 그 반응성을 검사한 결과, N- 및 O-linked oligosaccharide를 분리한 상황에서도 immunoblotting에 의해 반응하는 것이 확인되어, 이 항체는 peptide를 epitope로 하고 있는 것으로 나타났다.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Fig. 2-11. SDS-PAGE and immunoblotting patterns with second limiting dilution hybridomas of IIB2-2D7.

Lanes 1 and 2, SDS-PAGE; 3 to 8, immunoblotting; 1, molecular markers; 2, Hanwoo meat; 3, IIB2-2D7-1D3; 4, IIB2-2D7-1F9; 5, IIB2-2D7-2B7; 6, IIB2-2D7-2G10; 7, IIB2-2D7-2F5; 8, IIB2-2D7-2F11; 9, IIB2-2D7-3B5; 10, IIB2-2D7-3D9; 11, IIB2-2D7-3F4; 12, IIB2-2D7-3G11.

### 3. 한우육 식별 시스템의 확립

#### 가. 당체를 이용한 한우육 식별

##### 1) DBA lectin에 의한 한우육 식별

DBA lectin의 경우, 한우에 대한 특이성이 매우 강하여, 한우육의

약 35kDa 성분이 특이적으로 결합하였으며, 이 성분은 홀스타인과는 친화성이 없는 것으로 나타났다(Fig. 2-12). 또한 수입우의 경우 홀스타인의 친화성과 유사한 반응을 나타내어(Fig. 2-13) 약 32.1kDa 성분이 한우 특이적인 성분으로 확인되었다. 교잡우의 경우, CB염색은 물론이고, DBA와의 친화력에도 큰 차이가 있는 것이 확인되어, 이 성분을 이용할 경우, 한우육을 positive하게 검출할 수 있을 것이다(Fig. 2-14).

또한, WGA lectin의 경우 홀스타인육에서 고분자량의 성분들이 특이적으로 반응하였으므로(Fig. 2-15), 이를 이용한 홀스타인 육의 식별이 가능할 것으로 사료된다.

## 2) LCA lectin을 이용한 한우육 식별

비가열육일 경우, DBA lectin과 반응하는 성분이 다량인 것으로 나타나, 열 변성시킨 후의 시료를 이용하여 한우육의 판별 가능성을 모색하기로 하였다. 100℃에서 30초간 가열할 경우, 한우육 및 교잡우의 HSC32.1이 내열성 성분으로 확인되었으나, 수입우 및 홀스타인은 이 성분이 거의 확인되지 않았다. LCA를 이용한 lectin염색에 의해서도 이 성분은 홀스타인 및 수입우에는 발견되지 않았으며, 한우육 특이적인 성분임이 확인되었다(Fig. 2-16). 100℃에서 35초간 가열하였을 때, 이 HSC32.1은 내열성 한우육 특이적 성분으로 확인되었다. 또한 홀스타인의 경우, 약 28kDa의 성분이 특이적으로 나타났으며, 이는 가열에 의해 열변성된 glycopeptide인 것으로 사료되며, 이성분의 확인만으로도 홀스타인육의 구별은 가능할 것으로 사료된다. 또한 수입육은 완전히 반응성을 상실하였으므로, 한우육의 식별을 위해서는 100℃/35초간 가열한 후, LCA lectin staining가 매우

바람직할 것으로 사료된다.

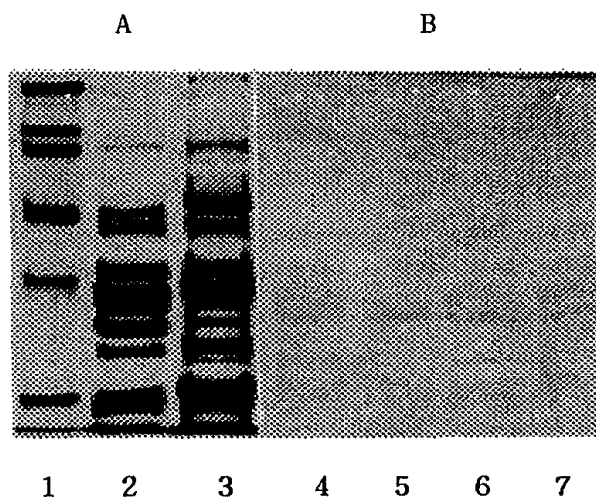


Fig 2-12. DBA Lectin staining patterns of Hanwoo and Holstein meats.

Pannels A, CB staining; B, lectin staining. Lanes 1, molecular marker; 2, 4, 6 Hanwoo; 3, 5, 7, Holstein.

이상의 결과 lectin staining을 이용한 한우육의 식별은 특정한 한 개의 lectin을 사용하더라도 식별이 가능하지만, 연구의 신뢰도를 높이기 위해서는 본 연구에 의해 확인된 바와 같이 여러개의 lectin을 종합적으로 검토하는 것도 매우 좋은 연구방법이 되리라 생각한다. 그러나, 이러한 lectin staining을 실시하기 위해서는 단

백질의 추출, 단백질 정량, 전기영동, blotting, 그리고 lectin과의 반응 등 그 실험조작이 많아 이를 극복할 수 있는 방안이 마련되어야 할 것으로 사료된다.

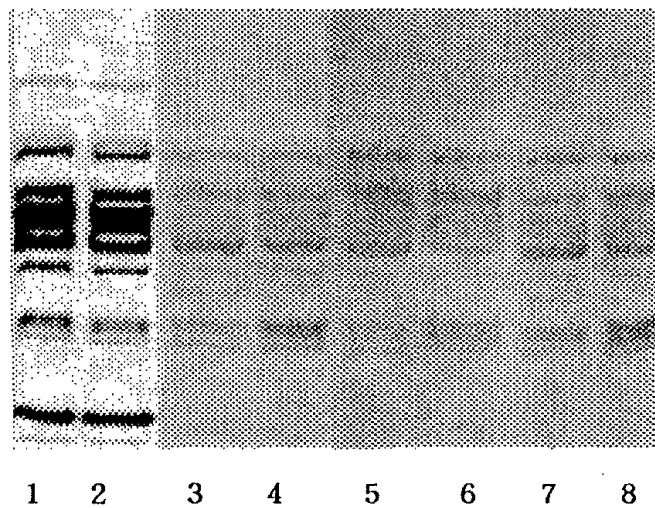


Fig. 2-13. Lectin staining of Hanwoo and imported beef with DBA for analysis of Hanwoo specific components.

Lanes 1 and 2, CB staining; 3 to 8, DBA lectin staining. Lanes 1, 3, 5, 7, Hanwoo; 2, 4, 6, 8, imported.

Polyacrylamide concentrations was 10%.

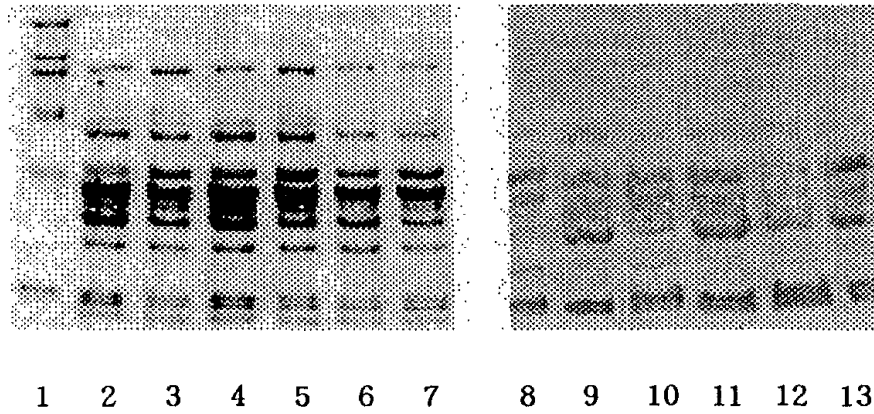


Fig. 2-14. SDS-PAGE and lectin staining with DBA of Hanwoo and crossbred beef for analysis of Hanwoo specific components.

Lanes 1 to 7, CB staining; 8 to 13, DBA lectin staining; 1, molecular weight marker; 2, 4, 6, 8, 10 and 12, Hanwoo; 3, 5, 7, 9, 11 and 13, crossbred.

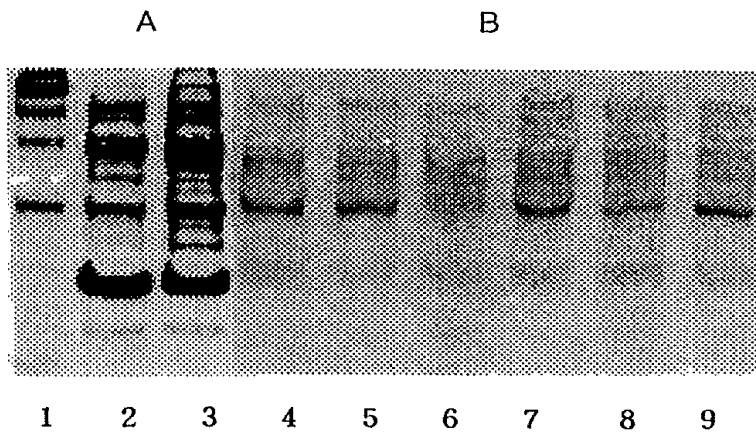


Fig. 2-15. Lectin staining of Hanwoo and Holstein meats with WGA for analysis of Hanwoo specific components. Pannels A, CB staining; B, WGA lectin. Lanes 1, molecular weight markers; 2, 4, 5, 6, Hanwoo; 3, 7, 8, 9, Holstein. 15% (A, B) and 10% (C, D) polyacrylamide gels were used in this study.

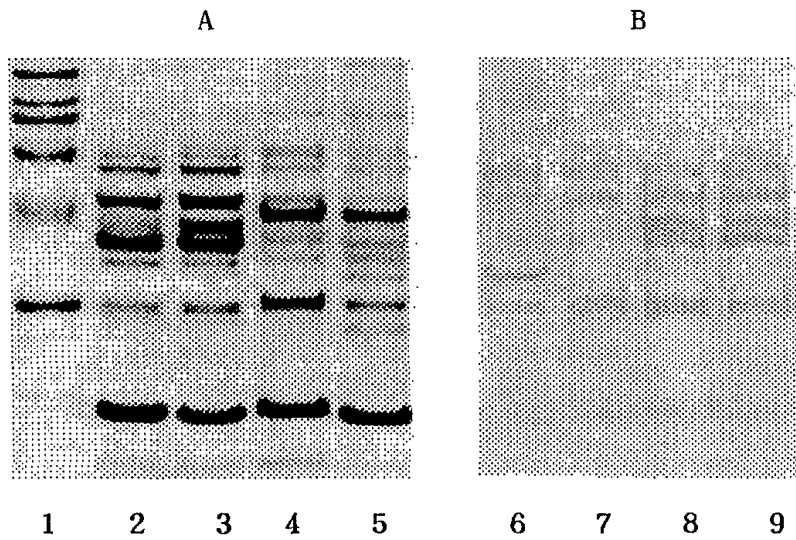


Fig. 2-16. SDS-PAGE and lectin staining of denatured Hanwoo, crossbred, Holstein and imported beef at 100°C for 30 sec with LCA.

Panels A, CB: B, lectin staining. Lanes 1, molecular weight marker; 2, 9, Hanwoo; 3, 8, crossbred; 4, 7, imported; 5, 6, Holstein.

#### 나. 항체를 이용한 한우육 식별

##### 1) Hybridoma IIB2-2D7-3B5의 대량생산

HSC32.1 특이적인 hybridoma인 IIB2-2D7-3B5가 생산하는 항체를



대량생산하기 위한 연구를 실시하였다. 5마리의 Balb/c mouse에 IIB2-2D7-3B5 cell을  $2 \times 10^6$ /마리가 되게 0.5ml의 PBS에 현탁한 후, 복강내에 주사하였다. 주사 후, 18일째 되었을 때(복부가 팽창하여 죽기 직전의 상태), 복부를 절개하여 복강내의 腹水를 회수하였다. 회수한 腹水를 3,000rpm/10분간 원심분리하여 혈구 및 hybridoma를 제거한 후, Protein A-immobilized column affinity chromatography에 의해 정제하였다. 그 결과, 마리당 평균 18.2mg이 회수되었으며, SDS-PAGE에 의한 분석결과 IgG인 것으로 나타났다(Fig. 2-17).

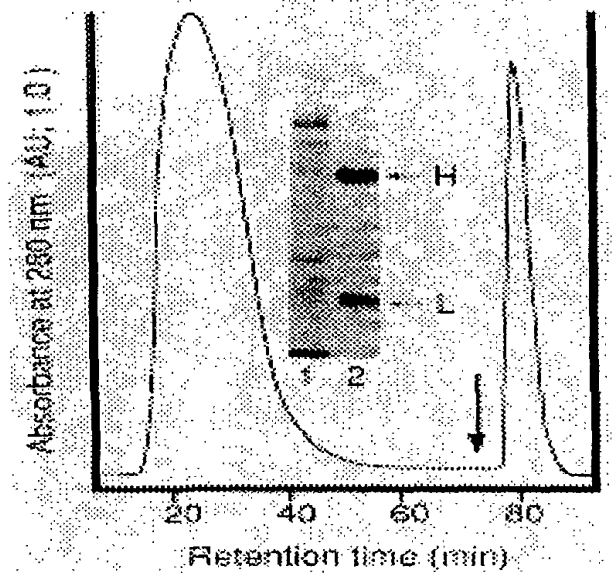


Fig. 2-17. Elution and SDS-PAGE patterns of ascites with Protein A column.

Lanes 1, Whey protein from bovine milk; 2, purified IgG with Protein A affinity chromatography,

## 2) Immunoblotting에 의한 한우육 식별

Immunoblotting을 이용하여 단일항체와 홀스타인육과 교차반응을 조사한 결과, 홀스타인육과 매우 강하게 결합하는 것이 확인되었다 (Fig. 2-18). 수입육의 경우, 한우육과는 다소 친화력이 떨어지지만 HSC32.1와 동일한 크기의 성분과 반응하는 것으로 나타났다. Blocking제의 농도를 0.1%에서 0.5%로 높여서 실험한 결과, 한우육의 HSC32.1성분과는 매우 약하게 반응하였으나, 홀스타인육과는 매우 강한 친화력이 있는 것이 확인되었다. 또한 수입육의 경우 거의 반응하지 않는 것으로 확인되었다. ELISA 및 immunoblotting 등과 같은 면역학적 방법을 이용한 연구에서 비 특이적으로 반응하는 성분을 blocking하기 위해서는 여러 가지 blocking제가 사용된다. 본 연구에서는 gelatin이 가장 유용한 blocking제인 것이 확인되었으며, 그 농도는 0.5%였다. 여기서는 자료를 제시하지 않았으나, blocking제로 많이 사용되고 있는 BSA나 whey 등은 비특이적인 반응을 억제하지 못하는 것으로 나타났다.

열변성에 따른 각 시료의 결합력의 변화를 살펴본 결과, 100℃에서 10초간 가열할 경우, 한우육 및 수입육은 매우 약하게, 그리고 홀스타인육은 매우 강하게 반응하였다(Fig. 2-19). 내열성 한우육 특이성분(LCA lectin staining에 의해 확인)이라 하더라도, 생산된 항체의 epitope가 어느 배열인 것인가에 따라 그 반응력은 다르게 나타나므로, lectin에 의해 검출된 결과와 다소 상이할 수는 있으리라 생각한다.

20초간 가열할 경우, 한우육은 그 결합력을 완전히 상실하였으며, 수입육은 약하게 반응하였으나, 거의 결합력을 상실하였다. 그러나, 홀스타인육은 강한 반응성을 나타내고 있는 것이 확인되었다.

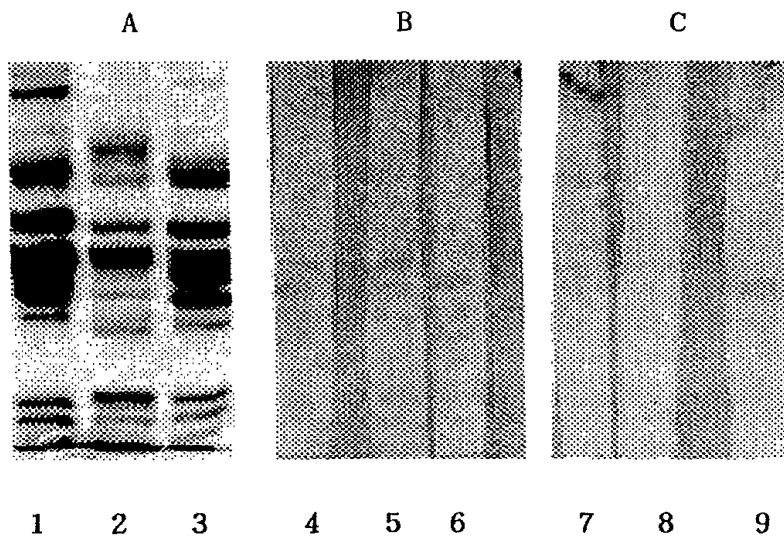


Fig. 2-18. SDS-PAGE and immunoblotting patterns with anti-HSC32.1 hybridomas.

Panels A, SDS-page; B and C, Immunoblotting patterns. Lanes 1, 4, 7, Hanwoo; 2, 5, 8, imported meat; 3, 6, 9, holstein meat. Panel B, 0.1% gelatin for blocking; C, 0.5% gelatin.

100℃에서 20초간 가열할 경우, 대부분의 단백질은 열변성되어 침전한다. 그러나, 앞에서 밝혀진 바와 같이, HSC32.1의 당쇄가 결합되어 있는 부분은 열에 대한 저항성이 매우 강하지만 항체에 의해 결합된 수 있는 epitope부분은 열에 매우 약한 것을 시사한다. EH한, 본 성분은 가열에 의해 발생한 열변성 peptide일 가능성도 시사되어, 이에 대한 지속적인 연구가 진행되어야 하리라 생각한다.

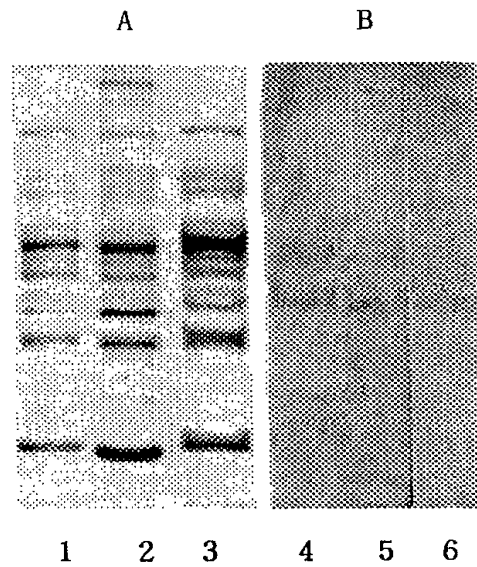


Fig. 2-19. SDS-PAGE and immunoblotting patterns of denatured Hanwoo, imported meat, and Holstein at 100°C for 10 sec.

Panels A, CB: B, immunoblotting with IIB2-2D7-3B5.  
Lanes 1, Hanwoo; 2, imported meat; 3, holstein.

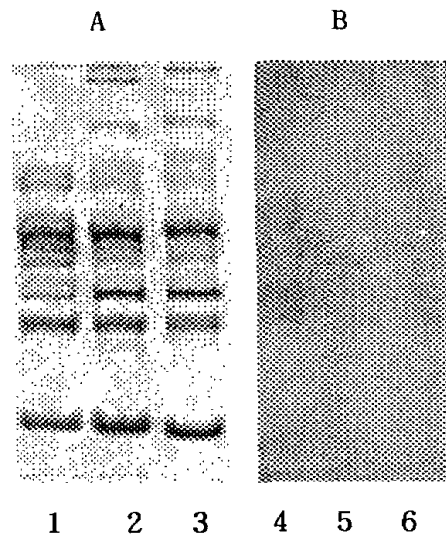


Fig. 2-20. SDS-PAGE and immunoblotting patterns of denatured Hanwoo, imported meat, and Holstein at 100°C for 20 sec.

Panels A, CB: B, immunoblotting with IIB2-2D7-3B5.  
Lanes 1, imported meat: 2, holstein: 3, Hanwoo.

지금까지 분석한 결과, 현장에서 요구되는 신속, 정확성을 만족시키기 위해서는 개선해야 할 점이 많다. 아직 모델을 설정하는 시점이기는 하지만, 위에서 제시된 장단점을 보완할 수 있는 새로운 기법의 도입이 요구된다. 항체를 고정화시킨 진단용 Kit의 개발 문제가 남아 있으나, 본 연구진에 의해 수행할 수 있는 한계를 벗어나고 있으며, 이는 본 연구가 완료된 후 고려하여도 늦지 않으리라 사료된다. 따라서 본 연구진은 보다 현장성이 있는 기법의 일환으로 Dot-blotting 기법을 검토해 보기로 하였다.

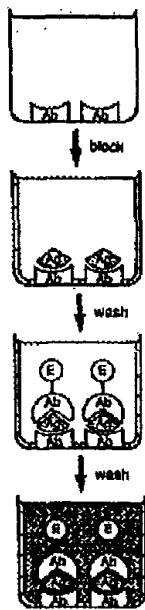
#### 다. Dot-blotting에 의한 한우육 식별

Dot-blotting 기법은 Immunoblotting법과 ELISA법을 절충한 방법으로써, 1회 분석할 수 있는 시료의 수는 1~96개까지 자유롭게 조정할 수 있으며, 필요한 시료의량은 ~ $\mu\text{g}$ 로 충분하다(Fig. 2-21). 또한 사용 실험기기도 간단하여 한가지만으로 충분하다. 분석에 필요한 시간은 약 3.5시간이면 충분하며, 검출 감도가 매우 높다. 이러한 관점에서 본 연구진은 Dot-blotting에 의한 한우육 식별 방안을 검토하기로 하였다.

한우육, 홀스타인육, 수입육으로부터 추출한 수용성 단백질을 각각 10~0.001 $\mu\text{g}/\text{well}$ 의 농도로 분주한 후, PVDF막에 단백질을 고정시켰다. 이 막을 복수로부터 정제한 IIB2-2D7-3B5 항체를 이용하여 그 결합성을 조사한 결과, 검출 감도는 단백질 0.1~1 $\mu\text{g}/\text{well}$ 이었으며, 항체는 건조중량을 기준으로 1:50,000이었다(Fig. 2-22). 홀스타인육의 경우, 그 결합력이 가장 강한 것으로 나타났으며, 0.1 $\mu\text{g}/\text{well}$ 에서도 반응하였다. 수입육의 경우, 홀스타인육보다는 다소 결합력이 떨어지는 것으로 나타났으나, 1 $\mu\text{g}/\text{well}$ 의 농도에서는 충분히 식별할 수 있는 것이 확인되었다. 그러나, 한우육의 경우, 1 $\mu\text{g}/\text{well}$  이하에서는 거의 결합력이 없는 것이 확인되었으며, 이는 immunoblotting의 결과와도 유사한 것이었다.

100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10초, 20초간 가열한 수용성 단백질을 이용하여 분석한 결과, 1 $\mu\text{g}/\text{well}$ 에서는 모든 단백질이 positive반응을 나타내었다(Fig. 2-23). 즉, 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10초간 가열하더라도, 본 항체와 결합하는 부위는 보호되고 있으며, 열변성되어 침전하지 않는 것이라 생각한다.

- Indirect ELISA



Plate에 항체 고정

Block

1차항체 결합

세척

2차항체 결합

세척

발색반응(405nm)

- Immunoblotting (lectin staining)

SDS-PAGE

Transblotting

세척

1차항체결합

(avidin)

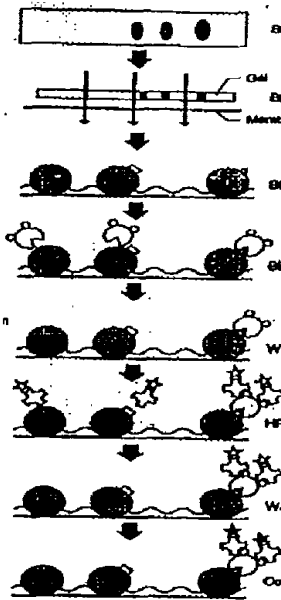
세척

2차항체결합

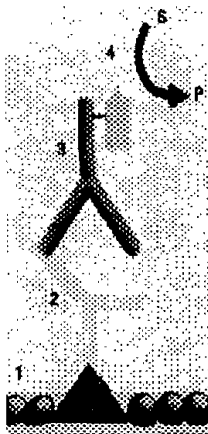
(biotin)

세척

발색반응



- Dot-blotting



1. 96well plate에 시료를 농축하고 blocking제를 이용하여 비 특이적 결합 부위를 blocking
2. HSC32.1에 대해 특이적인 단일항체를 결합 (1차항체)→1.5시간 후, 3회 세척
3. 2차항체(HRPeroxidase)를 결합→1.5시간후, 3회 세척
4. 기질을 이용하여 발색반응

Dot-blotting 장치→

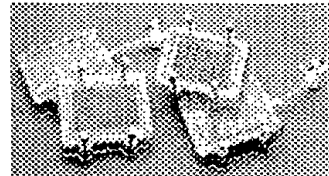


Fig. 2-21. Scheme of ELISA, immunoblotting and dot-blotting.

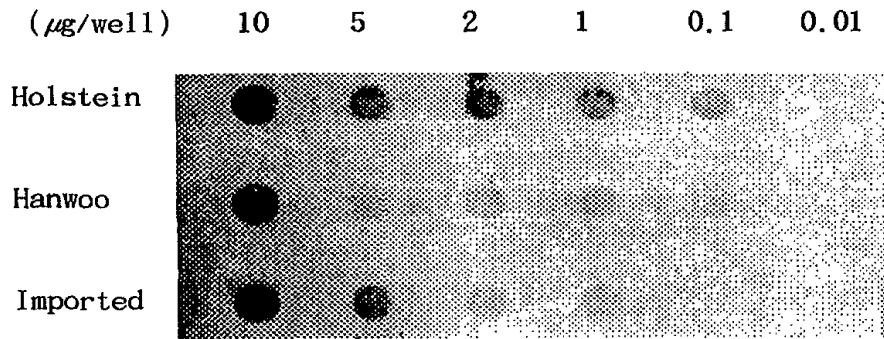


Fig. 2-22. Dot blotting patterns of native water soluble proteins with IIB2-2D7-3B5 monoclonal antibody.

100°C에서 20초간 가열할 경우, 한우육은 항체와의 결합력을 완전히 상실하였다(Fig. 2-23). 그러나, 홀스타인육 및 수입육의 경우, 강한 결합력을 나타내었으며, immunoblotting와 유사한 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 본 연구에서 사용한 25두분의 원료육에서 모두 동일한 반응을 나타내어, 재현성이 매우 높은 것으로 나타났다.

교잡우의 경우, 전기영동이나 lectin staining에 의해 다른 품종의 육과 쉽게 식별할 수 있어, 여기서는 분석하지 않았다. 그러나, 열에대한 저항성 등으로 미루어볼 때, 한우육과 유사한 반응을 나타내리라 생각되며, 품종별 식별 시스템을 현장에 적용하기 위해서 실험을 해 볼 계획이다.



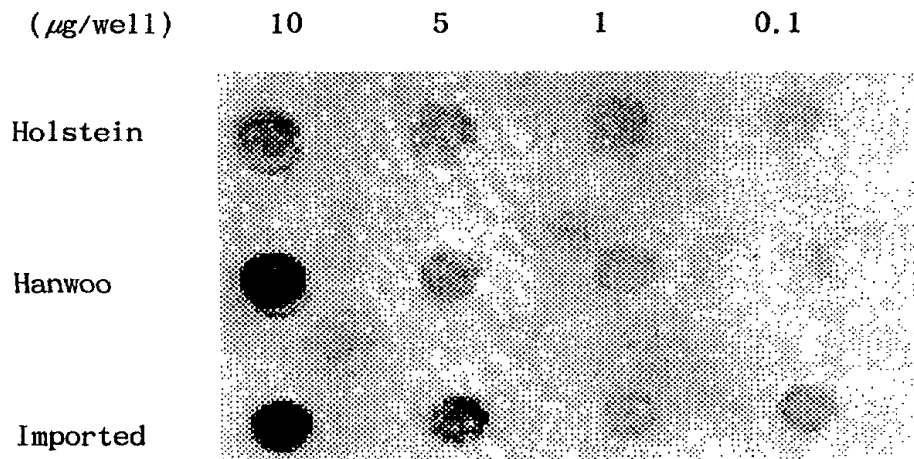


Fig. 2-23. Dot blotting patterns of denatured water soluble proteins at 100°C for 10sec with IIB2-2D7-3B5 monoclonal antibody.

본 연구진이 도입한 Dot-blotting기법은 한우육을 negative하게 검출할 수 있는 것이 확인되었으며, 이러한 기법을 보다 단시간내에 확립할 수 있는 방안을 현재 강구중에 있다. 즉, 1차항체인 단일항체에 효소를 직접 labeling할 경우, 그 분석 시간이 2시간 내외로 단축할 수 있어, 본 실험 기법은 그 효용가치가 매우 높아지리라 생각한다. 또한, 이 기법의 가장 큰 특징중의 하나는 시료의 수 및 시료의 양을 자유자재로 변화시킬 수 있으며, 시료의 양이 매우 미량일 경우, 이를 농축하여 사용할 수 있다는 것이다. 즉, 포

장지에 묻어 있는 육즙을 물로 씻어서 그대로 농축시킬 수도 있으며, 바닥에 떨어진 육즙을 그대로 사용할 수도 있을 것이다. 그러나, 육즙을 그대로 사용할 경우, 저장기간에 따른 세포조직의 손상 정도가 상이하여 육즙 중에 함유되어 있는 단백질의 양이 다르므로, 이를 보완할 방법도 강구되어야 할 것이다.

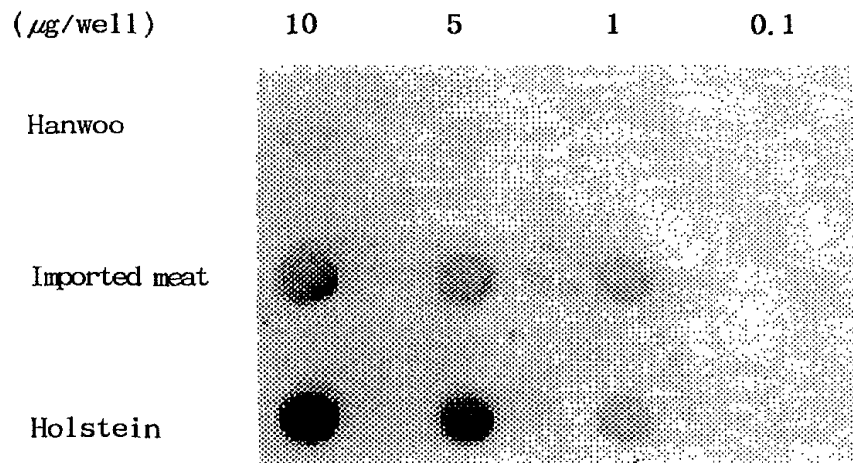


Fig. 2-23. Dot blotting patterns of denatured water soluble proteins at 100°C for 20sec with IIB2-2D7-3B5 monoclonal antibody.

#### 4. 한우육 식별을 위한 방안

한우육, 홀스타인육, 수입육 등 품종간 원료육을 정확하고 과학적으로 식별하여 건전한 유통질서를 확립하고, 국내 축산업의 안정적 발전을 지향하고, 나아가 국민 건강 증진에 기여하기 위하여 본 연구진에 의해 확인된 한우육 식별방안을 제안하고자 한다. 아울러, 본 연구의 성과가 더욱 빛을 발하기 위해서는 보다 지속적인 지원이 있어야 할 것이라 생각한다. 한우육 식별 Kit의 개발을 위해서는 본 연구진에 의해 만들어진 항체의 유효 적절한 응용체계가 하루빨리 구축되기를 바란다.

##### 1) 단백질의 전처리

- 가) 원료육 처리 : 증류수를 이용하여 수용성 단백질을 추출
- 나) 단백질 정량 : Markwell법에 ml한 정량
- 다) 육즙의 이용 : wjdghkrgks 단백질 정량이 선행

##### 2) Lectin staining를 이용한 한우육 식별

- 가) 전기영동 : 10~15% acrylamide gel 전기영동(약 1.5hr)
- 나) Western blotting : Semi-dry기를 이용하여 10분간 실시
- 다) HRP-labelled lectin을 첨가한 후 1.5hr 반응
- 라) 0.1% diaminobenzidine을 이용하여 발색 : 특이성 검증
- 마) 식별 가능한 시료 및 lectin
  - WGA lectin : 한우육 및 홀스타인육을 쉽게 식별
  - DBA lectin : 교잡우를 손쉽게 식별
  - LCA lectin : 내열성 단백질을 이용하여 한우육 식별  
(수입육 및 홀스타인육은 negative)

3) Immunoblotting를 이용한 한우육 식별

가) 전기영동 : 10~15% acrylamide gel 전기영동(약 1.5hr)

나) Western blotting : Semi-dry기를 이용하여 10분간 실시

다) 1차항체로 단일항체(IIB2-2D7-3B5) 반응

라) AP-labelled 2차항체 반응

마) 0.1% p-nitrophenyl phosphate로 반응

바) 식별가능한 시료

- 100℃/20초 가열 : 홀스타인육을 positive하게 검출

- 100℃/20초 가열 : 한우육을 negative하게 검출

4) Dot-blotting을 이용한 한우육 식별

가) 단백질 결합 : 1 $\mu$ g/well농도로 PVDF막에 고정(약 5분)

나) 1차항체로 단일항체(IIB2-2D7-3B5) 반응

다) HRP-labelled lectin을 첨가한 후 1.5hr 반응

라) 0.1% diaminobenzidine을 이용하여 발색 : 특이성 검증

마) 식별 가능한 시료

- 100℃/20초 가열 : 한우육을 negative로 식별

- 100℃/20초 가열 : 홀스타인육을 positive로 검출

- 100℃/20초 가열 : 수입육을 positive로 검출

5) 단일항체에 HRP labelling

본 연구진에 의해 만들어진 IIB2-2D7-3B5 단일항체에 HRP를 직접 labelling할 경우, 상기 분석법은 최소한 1.5~2시간 단축할 수 있다. 따라서 Dot-blotting을 실시할 경우, 2시간 이내에 모든 검출이 완료될 것으로 생각된다. 이러한 검출법의 확립을 위한 지속적인 연구를 진행할 계획이며, 이를 통한 품종별 원료육을 완벽하게 식별할 수 있는 시스템을 구축할 계획이다.

## 제 4 절 참고문헌

Bailey, E., Lear, T. L. 1994. Comparison of Thoroughbred and Arabian Horses Using RAPD Markers. *Anim. Genet.* 25:105

Chanh, T. C., Dreesman, G. R., Kennedy, R. C. 1987. Monoclonal Anti-Idiotypic Antibody Mimics the CD4 Receptor and Binds Human Immunodeficiency Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:3891

Chikuni, K., Tabata, T., Kosugiyama, M., Monama, M. 1994. Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Sheep and Goat Meats. *Meat Sci.* 37:337

Chung, K. Y. 1992. Immunologische Untersuchungen zum Nachweis Nativer und Hitzedenaturierter Schweinefleischanteile in Fleischerzeugnissen Mitteleuropas, ELISA und Monoklonaler Antikörper. Ph.D Dissertation

Ebbehoj, K. F., Thomsen, P. D. 1991a. Differentiation of Closely Related Species by DNA Hybridization. *Meat Sci.* 30:359

Ebbehoj, K. F., Thomsen, P. D. 1991b. Species Differentiation of Heated Meat Products by DNA Hybridization. *Meat Sci.* 30:221

Garcia, T., Martin, R., Rodriguez, E., Azcona, J. I., Sanz, B., Hernandez, P. E. 1991. Detection of Bovine Milk in Ovine Milk by a Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *J. Food Protec.* 54:366

Garcia, T., Martin, R. K., Rodriguez, E., Morales, P.,

Hernandez, P. E., Sanz, B. 1990. Detection of Bovine Milk in Ovine Milk by an Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Dairy Sci.* 73:1489

Goerlich, R., Greuel, E. 1986. Der Nachweis Nativer und Hitzedenaturierter Muskel-Proteine Von Rind und Kaenguruh Mit Hilfe Muriner Mono-Arch. *Leb. Mitt. Hyg.* 4:87

Greenwalt, D. E., Watt, K. W. K., Hasler, T., Howard, R. J., Patel, S. 1990. Structural, Functional, and Antigenic Differences between Heart Endothelial CD36 and Human Platelet CD36. *J. Biol. Chem.* 265:16296

Griffiths, N. M., Billington, M. J. 1984. Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Beef Blood Serum to Determine Indirectly the Apparent Beef Content of Joints and Model Mixtures. *J. Sci. Food Agric.* 35:909

Hakomori, S. 1981. Glycosphingolipids in Cellular Interaction, Differentiation, and Oncogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 50:733

Hitchcock, C. H. S., Crimes, A. A. 1985. Methodology for Meat Species Identification: A Review. *Meat Sci.* 15:215

Hwangbo, S., 1996. Biochemical and molecular biological studies on PAS-4 glycoprotein of milk fat globule membrane.

Jones, S. J., Patterson, R. L. S. 1985. Double-Antibody ELISA for Detection of Trace Amounts of Pig Meat in Raw Meat Mixture. *Meat Sci.* 15:1

Jones, S. J., Patterson, R. L. S. 1986. A Modified Indirect ELISA Procedure for Raw Meat Speciation Using Crude

Anti-Species Antisera and Stabilised Immunoreagents. *J. Sci. Food Agric.* 37:767

Kang'ethe, E. K., Jones, S. J., Patterson, R. L. S. 1982. Identification of the Species Origin of Fresh Meat Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Procedure. *Meat Sci.* 7:229

King, N. L., Kurth, L. 1982. Analysis of Raw Beef Samples for Adulterant Meat Species by Enzyme-Staining of Isoelectric Focusing Gels. *J. Food Sci.* 47:1608

Köhler, G., Milstein, C. 1975. Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature.* 256:495.

Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins durin the assembly of the head of bacteriophage. *Nature,* 227:680.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. R. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.,* 193:265.

Markwell, M. A. K., S. M. Hass, L. L. Bieberand and N. E. T. Tolbert, 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.,* 87:206.

Martin, R., Azcona, J. I., Carcia, T., Hernandez, P. E., Sanz, B. 1988a. Sandwich ELISA for Detection of Horse Meat in Raw Meat Mixtures Using Antisera to Muscle Soluble Proteins. *Meat Sci.* 22:143

Martin, R., Azcona, J. I., Tormo, J., Hernandez, P. E. 1988b.

Detection of Chicken Meat in Raw Meat Mixtures by a Sandwich Enzyme Immunoassay. *Inter. J. Food Sci. Tech.* 23:303

Martin, R., Wardale, R. J., Jones, S. J., Hernandez, P. E., Patterson, R. L. S. 1989. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Specific to Chicken Muscle Soluble Proteins. *Meat Sci.* 25:199

Martin, R., Wardale, R. J., Jones, S. J., Hernandez, P. E., Patterson, L. S. 1991. Monoclonal Antibody Sandwich ELISA for the Potential Detection of Chicken Meat in Mixtures of Raw Beef and Pork. *Meat Sci.* 30:23

Patterson, R. M., Spencer, T. L. 1985. Differentiation of Raw Meat from Phylogenically Related Species by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Meat Sci.* 15:119

Patterson, R. M., Whittaker, R. G., Spencer, T. L. 1984. Improved Species Identification of Raw Meat by Double Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Sci. Food Agric.* 35:1018

Rodriguez, E., Garcia, M. T., Morales, P., Gonzalez, I., Sanz, B., Hernandez, P. E. 1994. Sandwich ELISA for Detection of Goats' Milk in Ewes' Milk and Cheese. *Food Agric. Immunol.* 6:105

Welsh, J., McClelland, M. 1990. Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers. *Nucleic Acids Res.* 18:7213

Whittaker, R. G., Spencer, T. L., Copland, J. W. 1983. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Procedure for Species Identification of Raw Meat. *J. Sci. Food Agric.* 34:1143



Whittaker, R. G., Spencer, T. L., Copland, J. W. 1983. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Procedure for Species Identification of Raw Meat. *J. Sci. Food Agric.* 34:1143

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531

Wintero, A. K., Thomsen, P. D., Davies, W. 1990. A Comparison of DNA-Hybridization, Immunodiffusion, Counter Current Immuno-Electrophoresis and Isoelectric Focusing for Detecting the Mixture of Pork to Beef. *Meat Sci.* 27:7

Yamamoto, F. 1990. Molecular Genetic Basis of the Histoblood Group Abo System. *Nature, London.* 345:229

永井克孝. 1994. 糖鎖-III. 糖鎖의 分子設計. 동경화학동인

高橋禮子. 1989. 糖蛋白質糖鎖研究法. 학회출판센타. 23:1

민병록, 한재용, 이무하. 1995. RAPD 기법을 이용한 쇠고기 품종 [한우육, 유우육 (Holstein육), 수입우육] 구분. *한축지* 37:651

이창수, 유영복, 나기준, 조병대, 최병규. 1994. 핵산분석법에 의한 한우의 판별. *한국축산학회지.* 36:369

정의룡, 김우태, 한상기. 1995. RAPD-PCR 기법을 이용한 젖소의 DNA 다형분석과 유전적 특성에 관한 연구. *한축지.* 37:455

조병대, 한재용. 1994. 한우 특이적 RAPD 표지인자 개발. *한국축산학회지.* 36:263