

소 모색관련 MC1R 유전자의 SNP와 관련한 MGB probe에 기초한 real-time PCR을 이용한 한우육과 Holstein육의 판별

박성도 · 김태중 · 이재일*

전남대학교 수의과대학
(게재승인: 2005년 2월 5일)

Identification of Hanwoo and Holstein meat using MGB probe based real-time PCR associated with single nucleotide polymorphism (SNP) in Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene

Sung-Do Park, Tae-Jung Kim, Jae-Il Lee*

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Accepted: February 5, 2005)

Abstract : The melanocortin 1 receptor (MC1R) plays an important role in regulation of melanin pigment synthesis within mammalian melanocytes. Mutations within the gene encoding MC1R have been shown to explain coat color variations within several mammalian species including cattle. To develop a rapid and accurate method for the identification of Hanwoo meat, we performed a single nucleotide polymorphism (SNP) analysis in Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene using TaqMan[®] MGB probe-based real-time PCR. Two specific probes (one for Hanwoo and the other for Holstein and Black angus) were designed. At the 5' end of 2 TaqMan[®] MGB probes, 6-carboxyfluorescein (FAM) was labeled for Hanwoo, and VIC for Holstein and Black angus. As a result, Hanwoo samples showed FAM-positive signal only, whereas other samples showed VIC-positive. This result suggests that the TaqMan[®] MGB probe based real-time PCR technique would be very accurate, easy and reproducible method to discriminate between Hanwoo meat and Holstein/Black angus meat.

Key words : MC1R gene, coat color, TaqMan[®] MGB probe, real-time PCR, Hanwoo

서 론

국내산 쇠고기의 대부분은 한우육과 젓소육(Holstein), 그리고 일부 수입육인데 소비자들이 한우육을 더 선호함으로 인해 일부에서 젓소육이 한우육으로 둔갑하여 판매되고 있다. 이러한 부정 유통을 근절하기 위해서 수년간 한우육과 젓소육 및 수입육을 감별하기 위한 기술들이 개발되어 온 것이 사실이다. 이중 PCR을 이용하는 DNA 다형 분석기법으로서 RAPD(random amplified polymorphic DNA)는 각종 동물의 유전분석 및 종 또는 품종 식별에 폭 넓게 응용되어 왔는데 [2, 14], 결과의 재현성이나 정확성이 낮아 실용화가 어려웠다. 또 이러

한 RAPD marker의 재현성을 개선하고자 홍 등 [6]은 SCAR(sequence characterized amplified regions) marker를 이용하여 한우육 판별을 시도했으나 정확한 구분이 어려웠다. 2000년 이후에는 주로 소 모색관련 유전자인 Melanocortin 1 receptor(MC1R)를 이용한 여러 감별법이 연구되고 있다. MC1R은 멜라닌의 확산 및 합성을 자극하는 호르몬 수용체로서 적색에 관여하는 phaeomelanin과 갈색 또는 흑색에 관여하는 eumelanin의 색소합성 조절에 중요한 역할을 담당한다 [7, 15]. 정 등 [4]은 MC1R의 PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism) marker를 이용한 한우육 판별법을 보고하였다. 즉 PCR로 증폭된 MC1R gene을 *Bse*118 I, *Msp* I, *Aci* I의 세

*Corresponding author: Jae-Il Lee

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
[Tel: +82-62-530-2854, Fax: +82-62-530-2857, E-mail: jaeil@chonnam.ac.kr]

가지 제한 효소 처리하여 한우육과 젓소육에서 각각 다른 DNA band를 확인하였다. 이 방법은 이전의 RAPD 나 SCAR 방법에 비하여 정확하고 안정적인 분석 결과를 얻을 수 있지만 PCR 후 DNA 정제, 그리고 다시 enzyme 처리과정을 거친 후 agarose gel에 전기영동을 해야 하는 번거로움이 있었다. 또한 정 등 [5]은 MC1R에 대해 PCR-SSCP(single-strand conformation polymorphism) 기법을 이용한 한우육 판별법을 보고하였다. 이 방법에서 한우와 젓소 간에 차이를 보이는 품종 특이적인 SSCP 유전자형을 확인하였다. 이는 RFLP와는 달리 제한 효소가 필요없이 간편하게 돌연변이로 유발된 유전자의 다형성을 직접 검출할 수 있으나, polyacrylamide gel 준비 및 염색 등으로 인한 시간의 문제 및 재현성이 떨어지는 단점이 있었다. 이 외에 PCR-RFLP 분석방법을 이용하여 각 축종에서의 모색 표현형 변이와 MC1R 유전자형간의 관계가 연구, 보고되었다 [1, 3, 4, 9].

SNP(single nucleotide polymorphism)는 하나의 염기 deletion, insertion 또는 substitution 되어 나타나는 것으로 human genome에서 가장 많은 변이의 원인으로 [16] 질병이나 약물의 개발을 위해 많은 연구가 이루어지고 있다 [11, 13]. 우리는 이런 연구 보고들을 기초로 도축되어 쇠고기 형태로 전환되면 품종별 식별이 어려운 문제를 해결하기 위하여 한우육과 젓소육 및 Black angus 육을 짧은 시간내에 정확히 구분할 수 있는 방법을 찾고자 하였다.

재료 및 방법

공시재료

본 연구에 사용된 공시재료는 도축장에서 흰색과 검은색 혼합의 Holstein 20마리, 체모가 완전히 검은 Black angus 5마리, 그리고 완전한 황갈색의 한우 20마리, 흰색과 황갈색의 혼합종인 Hereford(수입산) 10마리로부터 근육을 채취하였다.

DNA purification

근육으로부터의 DNA분리 및 정제는 Miller 등 [12]의 phenol/chloroform 추출방법의 일부를 변형해 실시하였고 DNA는 TE buffer(10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7.4) 적당량을 넣어 재부유 시켜 50 µg/ml 농도로 준비하였다. 분리된 DNA는 1% agarose gel을 사용하여 확인하였다.

Real-time PCR용 primer 및 TaqMan[®] MGB probe MC1R 유전자(AF445642)의 559번째에서 576번째를 forward primer(5'-GCTGGAGACGGCAGTCAT-3')

로, 617번째에서 633번째를 reverse primer(5'-TCCAGCTGCTGCACCAC-3')로 사용하여 75 bp의 PCR 산물을 생산하고자 하였다. Probe로는 한우에 있어 594번째 guanine의 결손된 allele을 인식하는 FAM-labeled reporter 1 TaqMan[®] MGB probe(5'-FAM-CCAGGACACCGCCT-MGB-3')와 guanine이 존재하는 allele을 인식하는 VIC-labeled reporter 2 TaqMan[®] MGB probe(5'-VIC-CCAGGACACCGCCT-MGB-3')를 이용하였다. Allelic discrimination에 사용되는 형광 probe와 5' nuclease assay에 대한 내용은 Livak [10]에 의해 이미 설명된 바 있다. 이 primer set와 probe set는 Assays-by-Design serviceSM(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 40X assay mix로 준비하였다.

PCR에 의한 MC1R의 증폭 및 전기영동

PCR 반응을 위해 반응액은 template DNA 11.875 µl, 40X assay mix 0.625 µl, TaqMan[®] Universal PCR master mix(2X) 12.5 µl로 총 25 µl로 조정하였다. Real-time PCR은 ABI Prism[®] 7000 sequence detection system(Applied Biosystems, USA)을 이용하여 수행되었는데 PCR 수행은 95°C에서 10분간 pre-denaturation한 후 92°C, 15초, 60°C, 1분간의 2단계로 PCR을 40 cycles 수행하였다. PCR 수행이 끝난 후 결과의 분석은 SDS 7000 software(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 실시하였다.

결 과

Forward primer와 reverse primer, 그리고 2가지의 TaqMan[®] MGB probe를 이용하여 소 MC1R 유전자상의 SNP를 구분하기 위한 실험을 실시하였다. 그 결과, 한우 시료들(round)은 fluorescent dye FAM에서만 반응을 보였고 Holstein(diamond)과 Black angus(large square)는 VIC dye에서만 반응을 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 1). 추가적으로 실시한 Hereford(triangle)는 한우와 마찬가지로 FAM dye에서만 반응을 보였다. 즉 한우특이적인 probe는 황갈색 모색을 나타내는 DNA allele에만 결합 후 Taq DNA polymerase에 의해 활성화되어 FAM에 해당하는 형광만을 발현하였고, 황갈색의 모색이 아닌 allele DNA에는 다른 하나의 probe만 결합한 뒤, VIC의 형광만을 발현함을 알 수 있었다. 결과 분석 후 형광분포의 좌표값은 Table 1에 나타나 있다. 이 결과, 본 실험에 사용된 2개의 primer 및 2개의 TaqMan[®] MGB probe를 이용하는 실험은 순수한 황갈색의 모색의 유전자 존재 여부를 검출할 수 있는 방법임을 알 수 있었다. 즉 황갈색을 포함한 품종인 한우나 Hereford 등은 FAM dye의 활성을 볼 수 있는 반면, 황갈색의 모색이 포함되지

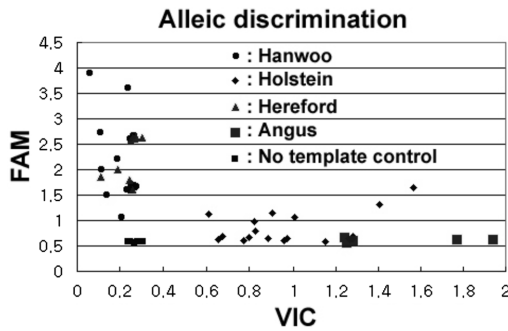


Fig. 1. Genotyping of Hanwoo and non-Hanwoo cattle using novel fluorescent MGB probes. After PCR, increase in VIC and FAM fluorescence representing the presence of Hanwoo and non-Hanwoo alleles, respectively, was measured. Hanwoo (round) and Hereford samples (triangle) distributed only in FAM-positive region, whereas Holstein (diamond) and Black angus samples (large square) in VIC-positive regions. No template controls were double negative (small square).

Table 1. Raw data of fluorescence intensity for allelic discrimination

Sample	VIC	FAM	Sample	VIC	FAM
Han*1	0.233	1.595	Hol11	0.957	0.603
Han2	0.206	1.06	Hol12	1.266	0.624
Han3	0.116	2.01	Hol13	1.273	0.648
Han4	0.246	1.579	Hol14	0.827	0.795
Han5	0.249	2.599	Hol15	1.28	0.646
Han6	0.252	1.597	Hol16	1.279	0.687
Han7	0.24	3.599	Hol17	1.15	0.577
Han8	0.189	2.208	Hol18	0.654	0.623
Han9	0.251	1.589	Hol19	0.611	1.116
Han10	0.11	2.739	Hol20	1.008	1.072
Han11	0.267	1.679	Her*1	0.243	2.627
Han12	0.28	1.676	Her2	0.258	2.643
Han13	0.267	2.674	Her3	0.256	2.636
Han14	0.252	1.644	Her4	0.109	1.851
Han15	0.255	1.702	Her5	0.289	2.63
Han16	0.058	3.897	Her6	0.257	1.606
Han17	0.265	2.649	Her7	0.245	1.795
Han18	0.271	1.656	Her8	0.255	2.61
Han19	0.139	1.501	Her9	0.189	1.997
Han20	0.263	2.659	Her10	0.232	2.572
Hol*1	0.826	0.977	Ang*1	1.254	0.572
Hol2	0.8	0.66	Ang2	1.772	0.633
Hol3	0.772	0.606	Ang3	1.283	0.613
Hol4	1.563	1.636	Ang4	1.938	0.63
Hol5	0.972	0.649	Ang5	1.244	0.669
Hol6	0.887	0.654	NTC*1	0.307	0.583
Hol7	0.677	0.688	NTC2	0.239	0.58
Hol8	1.26	0.643	NTC3	0.266	0.567
Hol9	1.404	1.317	NTC4	0.281	0.581
Hol10	0.91	1.14	NTC5	0.248	0.576

*Han: Hanwoo, Hol: Holstein, Her: Hereford, Ang: Black angus, NTC: no template control

많은 Holstein이나 Black angus는 FAM dye의 활성을 볼 수 없고 VIC dye의 활성만을 보였다.

고 찰

국내산 쇠고기 중 가장 많이 유통되고 있는 것은 한우육과 젓소육이다. 식육을 판매할 때에는 국내산 쇠고기 중 한우육인지 젓소육인지에 대해 정확히 명시할 것을 의무로 하고 있지만 우리나라 소비자들의 한우육 선호 경향 때문에 젓소육으로 명시하지 않거나 한우육으로 바꿔 명시하는 부정 유통이 성행하고 있다. 이로 인해 한우육과 젓소육의 판별법에 대한 필요성이 재고되어 많은 연구가 이루어지고 있다. 특히 최근에는 소의 모색유전자인 *Melanocortin 1 receptor(MC1R)* gene의 SNP를 이용한 판별법이 연구되고 있다. 그 대표적인 것이 제한효소를 이용한 PCR-RFLP법 [4]인데 이는 재현성과 정확성은 뛰어나지만, PCR 후에 다시 제한효소를 처리해야 하는 번거로움이 있고 전기영동을 실시해야 하는 이유로 시간이 오래 걸리고, gel 준비과정상 유해물질의 취급등으로 인하여 문제가 있었다. 또 PCR-SSCP법을 이용한 판별법 [5]은 RFLP와는 달리 제한효소처리 과정은 필요없지만 전기영동에 사용되는 polyacrylamide gel이나 silver staining이 agarose gel이나 ethidium bromide staining에 비해서 제조과정이 복잡하고, 시간이 오래 걸리며, 많은 비용과 장비가 필요하다. 이외에 RAPD 방법을 이용한 실험들 [2, 14]은 결과의 재현성이나 정확성이 낮아 실용화가 어려웠다. 또 이러한 RAPD marker의 재현성을 개선하고자 홍 등 [6]은 SCAR(Sequence characterized amplified regions) marker를 이용하여 한우육 판별을 시도했으나 정확한 구분이 어려웠다.

이러한 이유로 본 실험에서는 TaqMan[®] MGB probe와 2개의 primer set를 이용한 real-time PCR 방법을 통해 신속하고 정확한 구별법을 실시하였다. TaqMan[®] MGB probe 기술은 fluorescence resonance energy transfer (FRET)에 기초를 두고 있다 [8]. PCR 진행 중 Taq DNA polymerase는 template에 binding하고 있는 probe와 접하게 되고 5'-3' exonuclease activity에 의해 probe의 5'쪽을 제거하기 시작하면서 5'에 label되어 있는 형광물질(VIC 또는 FAM)을 제거한다. 이로 인해 형광물질은 활성화되고 이 활성화된 형광물질이 detection된다. 이 방법은 각 형광물질에 의한 형광도의 증가를 통해 찾고자 하는 염기서열의 존재 여부를 분석할 수 있게 된다. 그리고 label되어 있는 형광물질의 종류가 다양해질수록 찾고자 하는 염기서열의 다양성도 증가될 수 있는 장점이 있다.

소의 품종 구별이 외형적 특징에 의존하는 것이 지금

까지의 일반적인 방법이어서 도축하여 쇠고기 형태로 전환되면 품종별 식별은 거의 불가능했다. 또한 유통과정에서 한우육과 젓소육이 한우육으로 둔갑해 판매되는 경우가 발생하였다. 따라서 본 실험에서 사용한 TaqMan® MGB probe를 이용한 real-time PCR 방법은 2시간 이내에 순수한 한우육을 젓소육 및 Black angus육과 명확히 구별할 수 있는 정확하고 간편하며 재현성 있는 감별법이라 판단된다. 하지만 실험결과에서 본 바와 같이 황색 혼합모종(Hereford 등)과 순수황색우(한우)의 분별은 본 실험 방법으로 불가능하다. 황색 이외의 다른 모색이 섞인 품종과 순수황색을 구분하는 방법은 아직 세계적으로 확립된 바가 없기 때문에 우리나라의 수입육우 경우 황색 혼합모종(Hereford 등)이 있음을 감안한다면 이 문제에 대한 연구가 더 요구된다고 할 수 있겠다. 하지만 본 연구방법의 응용은 양축농가 및 소비자를 보호하고 유통과정 중 발생하는 한우 둔갑육을 차단해 쇠고기 시장을 활성화시키고 소비자 및 양축농가의 경제적 손실 및 피해를 줄이고 한우산업의 경쟁력을 강화시킬 수 있으며 나아가 유통과정 중 젓소육이 한우육으로 둔갑되는 문제점을 방지할 수 있을 것이라 판단된다.

참고문헌

1. 김태현, 윤두학, 박용우, 이혜영, 오성중, 정일정, 탁태영, 김경남, 한재용. 소 품종별 Melanocortin Receptor 1(MC1R) 유전자의 유전자형 빈도에 관한 연구. 한국동물자원과학회지 2000, **42**, 735-744.
2. 민병득, 한재용, 이무하. RAPD 기법을 이용한 쇠고기의 품종(한우육, 유우육 (Holstein육), 수입우육) 구분. 한국축산학회지 1995, **37**, 651-660.
3. 이성수, 양영훈, 강승률, 오운용, 양보석, 고서봉, 오성중, 김규일. 한우, 제주재래흑우, 흑모화우와 갈모화우에서의 MSH Receptor(MC1R) 유전자의 유전자형 및 빈도 비교. 한국동물자원과학회지 2000, **42**, 253-260.
4. 정의룡, 김우태, 김연수, 한상기. 소 모색관련 유전자 MC1R의 PCR-RFLP Marker를 이용한 한우육 판별. 한국동물자원과학회지 2000, **42**, 379-390.
5. 정의룡, 김우태, 김연수, 한상기. PCR-SSCP 기법을 이용한 소 MC1R 유전자의 다형성 분석 및 한우육 감별. 한국동물자원과학회지 2001, **43**, 45-52.
6. 홍영호, 정일정, 김태현, 김희발, 윤두학, 김형선, 조병욱, 한재용. 품종 특이성을 이용한 한우 판별 표지인자 개발. 한국동물유전육종학회지 1998, **2**, 107-114.
7. Cone RD, Lu D, Koppula S, Vage DI, Klungland K, Boston B, Chen W, Orth DN, Pouton C, Kesterson RA. The Melanocortin Receptors : Agonists, Antagonists, and the Hormonal Control of Pigmentation. Recent Prog Horm Res 1996, **51**, 287-317.
8. de Kok JB, Wiegerinck ET, Giesendorf BA, Swinkels DW. Rapid Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms Using Novel Minor Groove Binding DNA Oligonucleotides (MGB Probes). Hum Mutat 2002, **19**, 554-559.
9. Joerg H, Fries HR, Meijerink E, Stranzinger GF. Red coat color in Holstein cattle is associated with a deletion in the MSHR gene. Mamm Genome 1996, **7**, 317-318.
10. Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. Genet Anal 1999, **14**, 143-149.
11. McCarthy JJ, Hilfiker R. The use of single-nucleotide polymorphism maps in pharmacogenomics. Nat Biotechnol 2000, **18**, 505-508.
12. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988, **16**, 1215.
13. Nebert DW. Pharmacogenetics and pharmacogenomics : Why is this relevant to the clinical geneticist? Clin Genet 1999, **56**, 247-258.
14. Smith EJ, Jones CP, Bartlett J, Nestor KE. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers for the genetic analysis of relatedness and diversity in chickens and turkeys. Poultry Sci 1996, **75**, 579-584.
15. Vage DI, Klungland H, Lu D, Cone RD. Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. Mamm Genome 1999, **10**, 39-43.
16. Wang D, Fan J, Siao D, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Jsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris M, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson T, Lipshutz R, Chee M, Lander E. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. Science 1998, **280**, 1077-1082.