

DNA hybridization을 이용한 축종특이성 구명

이명헌 · 김상근 · 정갑수* · 박종명*

충남대학교 수의과대학
국립수의과학검역원*
(1999년 2월 1일 접수)

Species characterization of animal by DNA hybridization

Myoung-heon Lee, Sang-keun Kim, Gab-soo Jung* , Jong-myoungh Park*

*College of Veterinary Medicine, Chungnam National University
National Veterinary Research & Quarantine Service**

(Received Feb 1, 1999)

Abstract : DNA hybridization assay using probes prepared from liver was carried out to identify species characterization of the domestic animals. Gel electrophoresis showed that the target DNA extracted from raw muscle were 1kb and uniform pattern while fragments size of heated muscle were irregular. Hybridization was performed by adding 200ng/ml probe in hybridization solution and incubating for 12 hours at 68℃. To obtain good discrimination, applied washing buffer and washing step differently depending on the species. The probes of pig, horse and dog formed the specific hybrids with each target DNA respectively. Although cross reaction was detected in cattle, goat and sheep but signal intensity among these species made the discrimination possible each other. Such pattern was the same in the cases of chicken, turkey and duck. The hybridization pattern of heated muscle was similar to that of raw muscle in general, but the signal intensity was inferior to that of raw muscle. Species identification between closely related animal species, hybridized using the target DNA of such closely related animal species as a blocking agent, remarkable increase of discrimination from the evident decrease of non specific reaction compared with the control group. In addition, in the admixture where certain meat was included in the beef, pork, chicken meat, we could find whether any unjust meat was admixed or not. In this case, detection limit of certain meat in admixture was 1%.

Key words : species characterization, DNA hybridization, muscle.

서 론

생태계의 모든 생명체는 복잡하고 독특한 생장과정을 거치면서 부적절한 환경에 적응하기 위하여 다양하고 광범위한 유전적 변이를 거듭하는 진화과정을 반복한다. 진화과정에서 얻어진 일련의 유전적 변이는 DNA, RNA 및 단백질을 통하여 표현형으로 발현되므로 유전물질은 생체 고유의 특징적인 유전정보를 함축하고 종이나 개체의 차이에 따른 다형을 내포하고 있다^{1,2}. 또한 염색체상의 동일좌위에 동일한 기능을 갖는 유전자간에도 개체나 집단에 따라 차이를 보이는 대립형질이 존재하며 이러한 대립형질간에는 유전자의 염기서열이 상이하다. 따라서 유전물질 특히 DNA의 변이차이에 의하여 개발되는 DNA 표지인자는 동식물의 육종, 친자감별, 개체식별, 유전자지도 작성 및 경제능력 검정 등에 그 이용 가능성이 높다³⁻⁶.

최근에는 종간차이가 주로 DNA 염기서열의 상이성에서 비롯된다는 추론이 지배적이며 이에 따라 DNA 표지인자를 가축의 종 특이성 구명에 응용하려는 시도가 급증하고 있는 추세이다⁷⁻⁹. 1985년 Jeffery *et al*⁹이 myoglobin gene의 repetitive sequence를 표지인자로 genome의 반복염기서열 차이를 분석하는 DNA fingerprinting 기법을 개발한 이래 Burke와 Bruford¹⁰는 조류를 대상으로 종간의 차이를 구명하였고 Ali와 Bala¹¹는 소의 품종을 구분하였다. 한편 국내에서는 이와 안¹²이 M13 bacteriophage DNA를 이용하여 닭과 돼지의 DNA profile을 비교하였고, 여 등¹³은 재래계를 감별하였으며, 민¹⁴은 한우고기의 특이적인 표지인자를 개발하고자 하였다. 축종간 DNA의 상이성을 분석하기 위한 또다른 시도는 제한효소절편다형(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)으로 제한효소가 인지하여 절단한 단편의 다형성을 관찰하는 기술이다¹⁵. Meyer *et al*¹⁶은 growth hormone gene을 primer로 제한효소절편다형과 연쇄중합반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 이용하여 쇠고기, 면양고기에 혼합된 돼지고기를 검출하였으며, Tagliavini *et al*¹⁷은 정육상태의 쇠고기에서 성과 품종을 판별하였다. 제한효소절편다형은 제한효소가 인지하는 부위의 유전적 교차나 점돌연변이 등에 의한 변이를 분석하는 방법으로 제한효소가 인지하지 못하는 부위에서 genome의 다양한 변이를 찾기에는 부적합하며 방사성 동위원소를

사용하는 등 실용적인 측면에도 문제점을 안고 있다. 아울러 PCR을 이용하여 원하는 부위를 증폭하기 위해서는 특정부위의 염기서열에 대한 충분한 정보를 확보해야만 증폭에 필요한 primer 작성이 가능하다. 그러나 염기서열이 밝혀지지 않은 유전자가 밝혀진 유전자에 비하여 훨씬 많고 유전자의 염기서열이 밝혀져 있다 하더라도 그 유전자가 어떤 기능을 하는지 또는 어느 형질에 연관되어 있는지에 대한 정보는 극히 빈약하다. 따라서 특정 유전자를 대상으로 종간의 차이를 보이는 특이적인 표지를 찾기는 매우 어렵다. 근년에는 무작위로 선정된 genome DNA 단편을 증폭하여 개체, 품종, 혹은 종의 유전적 특성을 조사하는 임의증폭다형법(Random Amplified Polymorphism DNAs, RAPD)이 유전물질의 다형성을 해석하는 새로운 기법으로 정착되고 있다. Welsh *et al*¹⁸은 RAPD로 쥐의 strain을 구명하였고, Chikuni *et al*¹⁹은 양고기와 염소고기의 감별을 보고하였으며, Dinesh *et al*²⁰은 어종을 분류하였다. 또한 Gwakisa *et al*²¹은 Zebu cattle의 아종을 구분하였고, Bailey와 Lear²²는 Thoroughbred horse와 Arabian horse의 유전적 특성을 구명하였다. 국내에서는 이 등²이 한우고기와 수입쇠고기 판별을 RAPD로 실시하여 수입우에서만 검출되는 특이 밴드인 HWB(Hanwoo Breed Identification)를 확인하였다. 그러나 RAPD 표지인자는 임의로 선발된 DNA 단편의 다형성을 분석하기 때문에 종 특이적인 probe 작성이 수많은 시행착오와 시간적, 경제적인 노력이 선행되어야 할 뿐만 아니라 동형 접합자상태와 이형 접합자상태를 구분할 수 없다.

Hybridization 기법은 whole chromosomal DNA를 표지인자로 사용하여 종 특이적인 염기서열을 검색하므로써 염기서열이 확인된 primer 없이도 신속하고 정확한 축종 감별이 가능한 것으로 생각된다²³⁻²⁵. DNA hybridization에 의한 종 특이성 분석은 Baur *et al*²⁶에 의하여 처음 소개되었으며 Chikuni *et al*²⁷은 소를 비롯한 3종의 신선육과 가공제품을 대상으로 축종을 감별하였고 Kirsten과 Thomsen²³은 돼지의 genomic DNA에 방사성 동위원소를 표지한 probe를 이용하여 쇠고기속에 혼합된 돼지고기를 검출하였으며 또한 소, 염소, 면양 등 유전적으로 근연관계에 있는 가축을 대상으로 축종을 구분하고자 하였다²⁴. 그러나 현재까지의 연구보고가 주로 일부 축종에 국한된 부분적인 결과이며 특히 유전적으로 근연관계에 있는 축종간의 특성분석에 대한 연구는 빈약한 실

정이다.

따라서 본 연구에서는 소, 재래산양, 면양 등 유전적으로 근친성이 인정되는 축종을 포함한 9종의 가축에서 신선근육과 열처리육을 대상으로 hybridization 기법을 응용하여 DNA의 특성을 구명함과 동시에 신속·정확한 축종감별법을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

공시재료 : 소를 비롯한 주요 가축 9종의 신선한 근육 조직을 공시하였으며 도살 즉시 채취한 간을 이용하여 축종별로 probe를 작성하였다. 열처리육은 신선근육을 110℃, 40분간 처리하여 일반적인 가공조건에 준하였으며 혼합육은 쇠고기, 돼지고기 및 닭고기 등 지정육에 특정육을 각각 1%, 5% 및 10% 비율로 혼합한 다음 열처리육과 동일한 조건으로 처리하였다.

DNA 추출 : 축종별 신선육, 열처리육 및 혼합육에서 DNA 추출은 Maniatis *et al*²⁸의 방법을 변형하였다. 즉, 균질화된 근육조직에 extracting buffer(100mM sodium chloride/5mM EDTA/100mM Tris-HCl/1% SDS/10mM DTT)를 가하여 정치(60℃, 1 hr)시킨 후 phenol 용액(phenol/chloroform/isoamylalcohol, 25:24:1, Sigma)으로 추출하였다. 추출액은 원심분리(12,000rpm, 10 min)하여 상층액을 분리하고 재차 phenol 용액을 가하여 추출과정을 3회 반복하였다. 분리한 상층액에 에탄올과 3M sodium acetate (Sigma)를 혼합하여 -70℃에서 DNA를 침전시키고 다시 원심하여 DNA pellet을 회수하였다. 회수된 DNA는 0.1×TE-buffer(Tris-EDTA buffer, Sigma)에 용해하여 그 농도를 확인한 다음 target DNA로 사용하였다.

Electrophoresis : 추출한 DNA에 loading buffer(0.25% bromphenol blue/0.25% xylene cyanol/30% glycerol/1% SDS/10μM EDTA, pH 8.0)를 가하여 혼합한 다음, 1.2% agarose gel(0.5μg/ml ethidium bromide, 120×100×3mm)에 적용하여 전기영동(5V/cm, 2-3hr)을 실시하였다. 전개용매는 Tris-borate EDTA buffer(0.089μM Tris-borate/0.089μM boric acid/0.002μM EDTA, pH 8.0)를 사용하였으며 molecular size marker(1Kb ladder DNA)를 대조로 UV illuminater(Spectroline, USA)상에서 그 pattern을 관찰하였다.

Probe 작성 : 분쇄한 간 조직에 probe extracting buffer (10mM sodium chloride/5mM EDTA/100mM Tris-HCl/1% SDS)를 첨가하여 정치시킨 다음 phenol 용액으로 3회 추

출하였다. 추출액을 에탄올로 침전시켜 DNA pellet을 회수하고 여기에 ribonuclease-IA(1000μg/ml, Sigma)를 처리하여 RNA를 제거하였다. 다시 phenol 추출과 에탄올 침전을 반복하여 DNA를 정제하였으며 정제된 DNA는 초음파 처리기로 단편화한 후 probe용 DNA로 사용하였다.

Probe의 labeling : Denature 된 DNA에 hexa-nucleotide mixture(BMS)와 dNTP labeling mixture(1mM dCTP/1mM dGTP/1mM dATP/0.65mM dTTP/0.35mM DIG-dUTP, pH 7.5, BMS) 및 Klenow enzyme(2 unit/μl, BMS)을 가하여 37℃에서 24시간 표지하였다. 표지가 완료된 후 EDTA(0.2M, pH 8.0, Sigma)를 가하여 반응을 중지시킨 다음 에탄올로 침전시켜 DNA를 회수하여 probe로 사용하였다.

Hybridization : Milliblotting kit(Millipore)로 target DNA를 nylon membrane(BMS)에 transfer한 다음 UV-illuminater 상에서 5분간 crosslinking 하였다²⁹. 이 Nylon membrane에 hybridization buffer(0.1% N-lauroylsarcosine/0.02% SDS/5×SSC/1% blocking solution)를 가하여 68℃에서 약 1시간 평형화한 후 probe가 첨가된 새로운 hybridization buffer에 다시 충분히 침지시키고 68℃에서 12시간 hybridization 하였다. Hybridization이 끝난 nylon membrane은 washing buffer I (2×SSC/0.1% SDS)로 1차 세척하였으며 2차 세척은 축종에 따라서 washing buffer II (0.1×SSC/0.1% SDS 또는 0.4×SSC/0.1% SDS 또는 2×SSC/0.1% SDS)를 차등 적용하였다. 세척후 nylon membrane은 5μl anti-digoxigenin-alkaline phosphatase conjugate(BMS)와 30분간 반응시킨 다음 NBT(Nitroblue Tetrazolium, BMS) 45μl와 X-phosphate solution(BMS) 35μl를 기질로 암실에서 발색하였다³⁰.

결 과

Target DNA의 전기영동상 : 신선한 근육에서 추출한 DNA는 약 1kb 가량의 균일한 DNA 단편들이 단일 band를 형성하였으며 열처리육의 경우 다양한 크기의 세절단편이 도말상으로 불규칙한 분포를 보여 열처리에 따른 DNA의 변성을 확인할 수 있었다(Fig 1).

축종감별을 위한 hybridization 조건 : 축종감별을 위한 hybridization의 최적조건은 Table 1과 같다. Probe 농도는 모든 축종에서 200ng/ml로 68℃에서 12시간 hybridization 하였고 세척조건은 washing buffer I을 기본 세척액으로 실온에서 5분씩 2회 세척하였으며 2차 세척은 축종별로 세척액을 달리하여 비특이반응을 제거하였다.

Table 1. Hybridization conditions for species identification

Hybridization condition	Species		
	Cattle, Goat, Sheep	Pig, Horse, Dog	Chicken, Duck, Turkey
Probe concentration(ng/ml)	200	200	200
DNA concentration(ng/ml)	5,000	5,000	5,000
Washing buffer II	0.1×SSC	0.4×SSC	2×SSC
Detection time(min)	30	20	40

즉 소, 재래산양 및 면양은 0.1×SSC/0.1% SDS, 돼지, 말 및 개는 0.4×SSC/0.1% SDS, 닭, 칠면조 및 오리는 2×SSC/0.1% SDS를 각각 적용하였다.

DNA hybridization을 이용한 **축종감별** : 각종 가축의 신선육으로부터 추출한 DNA를 간조직의 chromosomal DNA로 작성된 probe와 hybridization 하여 축종감별을 실시하였던 바 돼지, 말 및 개의 probe는 각각 돼지고기, 말고기 및 개고기의 DNA와 특이적으로 hybrids를 형성하여 명확한 발색환을 관찰할 수 있었으며 발색강도는 target DNA의 농도에 비례하였다. 소 probe는 쇠고기는 물론 재래산양의 고기와 면양고기에서도 발색반응을 보인 반면 발색강도는 쇠고기에서 가장 강력하여 비특이반응에 관계없이 축종간 감별이 가능하였다. 이러한 양상은 면양과 재래산양의 probe에서도 유사하였으며 닭, 칠면조 및 오리의 probe에서도 상호 교차반응이 확인되었으나 발색강도 차이에 따른 축종감별이 가능하였다 (Fig 2, 3). 축종별 probe와 열처리육의 DNA hybridization 양상은 대체로 신선육과 동일하여 열처리에 관계없이 9종의 축종을 구분할 수 있었으며 다만 발색강도는 신선육에 비하여 미약한 수준이었다.

DNA hybridization을 이용한 **근연 축종간의 감별** : 유전적으로 근연관계인 소와 면양 및 재래산양, 닭과 칠면조 및 오리간의 교차반응을 개선하고 근연 축종간 감별능을 향상시키고자 blocking agent를 첨가하여 prehybridization을 실시한 후 hybridization 양상을 확인하였다. 면양과 재래산양의 target DNA(100ng)를 blocking agent로 첨가한 경우 무첨가 대조군에 비하여 소 probe의 근연 축종간 감별능이 향상되었으며 면양과 재래산양의 비특이반응은 현저히 감소하였다(Fig 4). 또한 닭의 probe를 이용하여 닭고기를 근연축종인 칠면조고기, 오리고기로 부터 감별하였을 때에도 칠면조고기, 오리고기의 DNA

를 blocking agent로 사용하여 감별능을 개선할 수 있었다 (Fig 5).

혼합육에서 특정육의 감별 : DNA hybridization을 응용하여 쇠고기, 돼지고기 및 닭고기 속에 혼합된 특정육의 축종감별을 시도하여 쇠고기속에 혼합된 돼지고기, 닭고기, 말고기 및 개고기의 검출이 가능함을 확인하였다 (Fig 6). 또한 돼지고기중에 포함된 닭고기, 말고기 및 개고기의 혼입여부를 식별할 수 있었고 닭고기중 말고기 및 개고기도 감별이 가능하였으며 검출한계는 각각 1% 수준이었다(Fig 7, 8).

고 찰

Hybridization은 DNA의 재생과정중 nucleotide 염기쌍의 상보성에 의하여 혼성화 분자가 형성되는 현상을 응용한 유전공학의 가장 핵심적이고 필수적인 기술이다. 일반적으로 이중 가닥 DNA는 고온이나 강알칼리와 같은 가혹조건에서 단선으로 분리되고 다시 재생과정을 거치면서 임의의 hybrids를 형성하여 원래의 형태로 복원된다. 특정 DNA(probe)가 이중 DNA(target DNA)와 혼화될 경우에는 염기쌍의 상보적 특성에 따라 hybrid molecule을 형성하고 이때의 hybrids 형성도나 안정성은 상호간의 유전적인 유연관계를 반영하게 된다. 따라서 DNA hybridization에 의한 genome의 특성분석이 가능할 뿐만 아니라 종 특이성을 확인하여 종을 정의하거나 구별하는데 매우 유용한 것으로 생각된다.

본 연구에서 probe로 사용된 whole chromosomal DNA는 주로 반복염기(repetitive sequence)로 구성되므로 probe와 target DNA의 혼성도는 probe의 반복염기에 대하여 target DNA의 염기쌍들이 어느 정도의 상보성을 보이는지에 따라 달라진다^{24,27}. 유전적 유연관계가 없는 이종간

에는 상보적인 염기쌍의 농도는 상대적으로 감소하며 mismatched base pair의 출현빈도는 높다. 따라서 hybrids는 매우 취약하게 되는데²³ mismatched base pair 1%에 Tm이 1℃ 저하하는 것으로 알려져 있다³¹. Meinkoth와 Wahl³²은 hybrids 형성 효율과 특이성에 영향을 미치는 다양한 요인들의 상관관계를 분석하여 다음과 같은 공식으로 요약하였다.

$$Tm = 81.5^{\circ}C + 16.6 \log M + 0.41(\% G + C) - 500/n - 0.61(\% \text{ formamide}).$$

즉, hybrids의 안정도지수인 Tm(Melting Temperature)은 반응용액의 양이온 농도(M), 염기조성(% guanine + cytosine), hybrids중 최단편의 길이(n) 및 formamide와 같이 helix의 안정도를 저해하는 물질의 농도 등 복합적인 인자에 의하여 결정되는 것으로 생각된다. 본 연구에 공시된 9종의 가축은 각각 염기조성(% G+C)이 상이하므로 이들의 종 특이성을 분석하기 위하여 염류농도를 달리하는 세척액을 차별적용하였으며 이러한 결과는 김³³이 상동성이 높은 축종간에는 저염액에서, 상동성이 낮은 축종간에는 고염액에서 세척하는 것이 바람직하다고 제시한 바와 일치하였다. Hybrids는 단일가닥의 이중 DNA가 접합하여 일부에 염기쌍을 형성하며 이 부위를 중심으로 타 부위도 두 가닥으로 형성된다. 따라서 probe의 반복염기에 대한 target DNA의 상보성이 충분히 확보된다면 hybrids의 형성은 target DNA 농도에 비례하여 증가하며²³ 본 실험에서도 동종의 경우 target DNA의 dotting 양이 많을수록 발색강도는 강력하였다.

한편 생육을 110℃에서 40분간 처리한 열처리육에서도 hybridization에 의하여 축종별로 종 특이성을 구명할 수 있었으며 따라서 육가공제품의 축종감별에도 hybridization 기법은 유용한 것으로 보인다. 그러나 생육에 비하여 발색강도가 미약한 것은 열처리과정중 target DNA의 annealing ability가 감소하는 결과에 연유한 것으로 판단된다^{24,34}.

Buckland³⁵에 의하면 염소와 면양은 DNA 염기서열의 83%, 소와 면양은 70%가 상동적이므로 유전적 근연 관계로 알려져 있다. 본 연구에서는 근연 축종간의 비특이 반응을 줄이고자 근연 축종의 DNA를 첨가하여 probe와 경쟁적으로 반응시킴으로써 개선된 결과를 도출할 수 있었다. 그러나 근연 축종간의 교차반응을 원천적으로 제거하기 위해서는 무엇보다 고도의 종 특이성 염기서열을 포함하는 probe 작성이 효율적이며 근간에는 일부

축종에서 종 특이적인 표지인자를 개발하려는 시도가 진행되고 있다^{24,34}.

본 연구에서는 쇠고기 등 지정육에 혼합된 돼지고기, 닭고기, 개고기 및 말고기를 1% 수준까지 확인할 수 있었으며 이러한 결과로 미루어 볼 때 hybridization 기법은 특정육의 진위여부를 판단하거나 육가공제품에 포함된 부정육을 검색하는 등 실용적인 측면에서도 그 활용가치가 높을 것으로 예측된다. 따라서 DNA hybridization 기법은 막대한 노력과 시간을 요구하는 cloning 과정없이도 신속하고 정확한 결과를 기대할 수 있으므로 축종간의 종 특이성을 구명하여 축종을 감별하는데 유용한 방법으로 판단된다.

결론

소를 비롯한 9종의 주요 가축을 대상으로 축종간 DNA 특성을 구명하고 신속·정확한 축종감별법을 개발하고자 신선육과 열처리육에서 추출한 DNA를 간조직으로부터 작성된 probe와 hybridization을 실시하고 종 특이성을 분석하였다. 신선한 근육에서 추출한 DNA는 약 1kb 가량의 균일한 DNA 단편들이 단일 band를 형성하였으며 열처리육의 경우 다양한 크기의 세절단편이 도말상으로 불규칙한 분포를 보였다. Probe 농도를 200ng/ml로 68℃에서 12시간 hybridization을 실시하고 축종별로 DNA 특성에 따라 세척액 및 세척시간을 차등적용한 결과, 돼지, 말 및 개의 probe는 각각 돼지고기, 말고기 및 개고기에서 추출한 DNA와 특이적으로 hybrids를 형성하여 종 특이성을 확인할 수 있었으며 소, 재래산양 및 면양은 상호 교차반응을 보였으나 축종간 발색강도 차이가 뚜렷하여 감별이 가능하였다. 또한 닭, 칠면조 및 오리에서도 반추수와 동일한 양상이었다. 열처리육으로부터 추출한 9종의 DNA를 축종별 probe와 hybridization한 결과는 대체로 신선육과 유사한 경향이었으나 발색강도는 신선육에 비하여 미약한 수준이었다. 유전적으로 근연 관계인 축종을 감별하고자 감별대상 축종의 target DNA를 blocking agent로 사용하여 무침가 대조군보다 비특이반응을 현저히 줄일 수 있었으며 감별능은 향상되었다. 한편 쇠고기, 돼지고기 및 닭고기에 각각 특정육을 혼합한 혼합육에서는 특정육의 혼재여부를 식별할 수 있었으며 검출한계는 1% 수준이었다.

Legends for figures

- Fig 1. Agarose gel electrophoresis of the DNA extracted from heated muscles(A) and raw muscles(B) of various species. Lane No. 1, cattle : 2, pig : 3, chicken : 4, horse : 5, duck : 6, turkey : 7, sheep : 8, goat : 9, dog : M, molecular size marker(1kb ladder DNA).
- Fig 2. Dot blot hybridization of cattle probe(1), pig probe(2), chicken probe(3), horse probe(4), duck probe(5) with DNA extracted from muscles of various species. B, cattle : P, pig : C, chicken : H, horse : D, duck : T, turkey : S, sheep : N, dog : G, goat. The first well of the upper contained 500ng DNA and 2 fold dilute in a row. The all lower wells contained 500ng DNA of various animals, respectively.
- Fig 3. Dot blot hybridizations of turkey probe(6), sheep probe(7), goat probe(8), dog probe (9) with DNA extracted from muscles of various species. B, cattle : P, pig : C, chicken : H, horse : D, duck : T, turkey : S, sheep : N, dog : G, goat. The first well of upper contained 500ng DNA and 2 fold dilute in a row. The all lower wells contained 500ng DNA of various animals, respectively.
- Fig 4. The two identical dot blot filters hybridized of cattle probe with DNA extracted from closely related species. Used no blocking agent(1), 100ng of sheep and goat DNAs used as blocking agent(2). B, cattle : S, sheep : G, goat.
- Fig 5. The two identical dot blot filters hybridized of chicken probe with DNA extracted from closely related species. Used no blocking agent(1), 100ng of duck and turkey DNAs used as blocking agent. C, chicken : D, duck : T, turkey.
- Fig 6. Detection of various meats in admixture to beef by dot blot analysis. B, cattle : P, pig : C, chicken : H, horse : N, dog : PBM, admixture of pork to beef : CBM, admixture of chicken meat to beef : HBM, admixture of horse meat to beef : NBM, admixture of dog meat to beef. 1, 5 and 10% are proportions of the unjust meat in admixture.
- Fig 7. Detection of various meats in admixture to pork by dot blot analysis. P, pig : C, chicken : H, horse : N, dog : CPM, admixture of chicken meat to pork : HPM, admixture of horse meat to pork : NPM, admixture of dog meat to pork. 1, 5 and 10% are proportions of unjust meat in admixture.
- Fig 8. Detection of various meats in admixture to chicken meat by dot blot analysis. C, chicken : H, horse : N, dog : HCM, admixture of horse meat to chicken meat : NCM, admixture of dog meat to chicken meat. 1, 5 and 10% are proportions of unjust meat in admixture.

참고 문헌

1. Welsh J, Chada K, Dalal SS, *et al.* Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res*, 20: 4965-4970, 1992.
2. 이창수, 유영복, 오성종 등. DNA 다형성 분석에 의한 한우고기와 수입쇠고기의 육질판별. *농시논문집*, 36(1):222-226, 1994.
3. Bumstead N, Palyga J. A preliminary linkage map of the chicken genome. *Genomics*, 13:690-697, 1992.
4. Georges M, Lathrop M, Hilbert P, *et al.* On the use of DNA for linkage studies in cattle. *Genomics*, 6:461-474, 1990.
5. Landegran U, Kaiser R, Caskey T, *et al.* DNA diagnostics molecular techniques and automation. *Science*, 242:229-237, 1988.
6. Rocha JL, Baker JF, Womack JE, *et al.* Statistical associations between restriction fragment length polymorphism and quantitative traits in beef cattle. *J Anim Sci*, 70:3360-3370, 1992.
7. Kashi Y, Lipkin E, Darvasi A, *et al.* Parentage identification in the bovine using 'Deoxyribonucleic acid fingerprinting'. *J Dairy Sci*, 73:3306-3311, 1990.
8. Trommelen GJM, Daas NHG, Jan V, *et al.* Identity and paternity testing of cattle ; Application of a deox-

- ribonucleic acid profiling protocol. *J Dairy Sci*, 76: 1403-1411, 1993.
9. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature*, 314:67-73, 1985.
 10. Burke T, Bruford MW. DNA fingerprinting in birds. *Nature*, 327:149-152, 1987.
 11. Ali SG, Bala S. Detection of genome specific monomorphic loci in *Bos taurus* and *Bubalus bubalis* with oligodeoxyribonucleotide probe. *Animal Genetics*, 24: 199-202, 1993.
 12. 이길재, 안병권. M13 bacteriophage DNA를 이용한 가축의 유전자 지문. *한축지*, 33:32-39, 1991.
 13. 여정수, 김재우, 최창분. 유전자 지문을 이용한 한국 재래계의 식별. *한축지*, 36(3):221-225, 1994.
 14. 민병록. DNA 기법을 이용한 축종(유우육, 한우육, 수입우육) 판별에 관한 연구. 서울대학교 석사학위 논문, 1995.
 15. Wyman AD, White R. A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77:6754-6758, 1980.
 16. Meyer R, Candrian U, L thy J. Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. *J AOAC*, 77(3):617-622, 1994.

17. Tagliavini J, Bolchi A, Bracchi PG, *et al.* Sex determination on samples of bovine meat by polymerase chain reaction. *J Food Sci*, 58:237-238, 1993.
18. Welsh J, Petersen C, McClelland M. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse; Application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acids Res*, 19(2):303-306, 1991.
19. Chikuni K, Tabata T, Kosugiyama M, *et al.* Polymerase chain reaction assay for detection of sheep and goat meats. *Meat Sci*, 37:337-345, 1994.
20. Dinesh KR, Lim TM, Chua KL, *et al.* RAPD analysis; An efficient method of DNA fingerprinting in fishes. *Zool Sci*, 10:849-854, 1993.
21. Gwakisa PS, Kemp SJ, Teale AJ. Characterization of Zebu cattle breeds in Tanzania using random amplified polymorphic DNA markers. *Animal Genetics*, 25: 89-94, 1994.
22. Bailey E, Lear TL. Comparison of Thoroughbred and Arabian horses using RAPD markers. *Animal Genetics*, 25(supplement 1):105-108, 1994.
23. Kirsten FE, Thomsen PD. Species differentiation of heated meat products by DNA hybridization. *Meat Sci*, 30:221-234, 1991.
24. Kirsten FE, Thomsen PD. Differentiation of closely related species by DNA hybridization. *Meat Sci*, 30: 359-366, 1991.
25. Wintr AK, Tomsen PD, Davies W. Comparison of DNA hybridization, immunodiffusion, countercurrent immunoelectrophoresis and isoelectric focusing for detecting the admixture of pork to beef. *Meat Sci*, 27: 75-85, 1990.
26. Baur C, Teifel-Greding J, Leibhardt E. Spezifizierung hitzedenaturierter fleischproben durch DNA-analyse. *Arch Lebensmittelhygiene*, 38:149-176, 1987.
27. Chikuni K, Ozutsumi K, Koishikawa T, *et al.* Species identification of cooked meats by DNA hybridization assay. *Meat Sci*, 27:119-128, 1990.
28. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York: 9.16-9.23, 1982.
29. Church GM, Gilbert W. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81:1991-1995, 1984.
30. Leary JJ, Brigati DJ, Ward DC. Rapid and sensitive colorimetric method of visualizing biotin labeled DNA probes hybridization to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose; Bio-blots. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80:4045-4049, 1983.
31. Bonner TI, Brenner DJ, Neufeld BR, *et al.* Reduction in the rate of DNA reassociation by sequence divergence. *J Mol Biol*, 81:123-135, 1973.
32. Meinkoth J, Wahl G. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal Biochem*, 138:267-284, 1984.
33. 김동현. 유전공학 실험법. 농촌진흥청, 수원:425-426, 1996
34. Kretschmer PJ, Coon HC, Davis A, *et al.* Hemoglobin switching in sheep. *J Biol Chem*, 256(4):1975-1982, 1981.
35. Buckland RA. Sequence and related bovine and caprine satellite DNAs. *J Mol Biol*, 186:25-30, 1985.