

Multiplex allele specific PCR 방법을 이용한 한우고기와 젓소고기의 신속한 판별

고바라다

광주광역시보건환경연구원
(게재승인: 2005년 8월 22일)

Rapid differentiation of Hanwoo and Holstein meat using multiplex allele specific polymerase chain reaction protocols

Ba-Ra-Da Koh

Gwangju Metropolitan Health & Environment Research Institute, Gwangju 500-210, Korea
(Accepted: August 22, 2005)

Abstract : Here I describe a multiplex allele specific PCR-based approach for the rapid detection between Hanwoo and Holstein meat associated with Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene. Specific and universal oligonucleotide primers were used in combination to detect the presence of a single nucleotide polymorphism within the bovine MC1R DNA sequence. The presence of the bovine MC1R gene is indicated by the production of a single control PCR product, whilst positive samples generate an alternative smaller specific product over the same region. The mutations in *MC1R104* codon revealed depending on the presence or absence of an indicative fragment amplified from the wild-type allele of this codon. As little as 0.39 ng and 1.56 ng of genomic DNA of Hanwoo and Holstein could be detected by MAS-PCR assay, respectively. This technique, which is widely used in human genetic screening, provides a reliable and sensitive result that has not been documented for the identification of bovine coat color. The MAS-PCR assay approach was proven to be useful in complementing routine beef DNA analysis for differentiation of these MC1R variants and it would facilitate the screening of deceiving sales of Holstein meat in the butcher shop.

Key words : MC1R gene, coat color, Multiplex allele specific PCR, SNP, Hanwoo

서 론

가축의 털색은 그 개체 및 품종의 특징을 나타낼 뿐 아니라 개체 및 품종을 구별하는 특징으로 널리 이용되어 왔으며, 최근 유전자 분석기술의 발달로 DNA 분자수준에서 종 특이적인 염기서열 차이에 따른 축종 판별이 일부 가능하게 되었다 [2,4,14]. 대부분 소의 품종들은 특징적인 고유한 모색과 무늬를 지니고 있다 [18]. 예를 들면 Hereford 종은 이마에 흰 반점이 있으면서 전체적으로 적갈색의 털을 지니고 있으며, 한우는 황갈색, Holstein은 흑백반의 모색을 지니고 있어 품종별로 특징

적인 모색과 무늬를 표현하고 있다.

소에서 검정색과 붉은색이 가장 흔한 소의 가죽색이며 melanocortin 1 receptor(MC1R) 유전자에 의해 모색이 결정되며, 대표적으로 Angus와 Holstein과 같은 품종이 MC1R 유전자에 의해 모색이 결정된다. 검정색과 붉은색을 조절하는 MC1R 유전자는 18번 염색체의 Extension 좌위에 존재한다 [8,10,13]. 포유동물에서 색소 합성에 관여하는 MC1R 유전자에 발생한 돌연변이가 다양한 모색발현을 일으킨다는 사실이 여러 연구자들에 의해서 규명되었다 [4]. MC1R 유전자에 다형성이 존재하기 때문에, 한우와 Holstein 구별을 위한 PCR-RFLP

*Corresponding author: Ba-Ra-Da Koh
Gwangju Metropolitan Health & Environment Research Institute, Gwangju 500-210, Korea
[Tel: +62-613-5429, Fax: +62-571-0496, E-mail: barada@nvrqs.go.kr]

(restriction fragment length polymorphism) 방법을 이용하여 적절한 유전자 표지를 검색하는 연구가 이루어졌다.

김 등 [2]과 정 등 [4]은 MC1R의 PCR-RFLP marker를 이용하여 한우고기 판별법을 보고하였다. PCR로 증폭된 MC1R 유전자를 *Bse*118 I, *Msp* I, *Aci* I의 세가지 제한효소를 처리하여 한우고기와 젓소고기에서 각각 다른 DNA band를 확인하였다. 한편 PCR-RFLP 방법을 사용하여 소, 말, 돼지, 그리고 면양 등의 다양한 축종을 대상으로 모색변이에 관한 연구가 이루어졌다 [12,13,17,25,26]. 정 등 [5]은 MC1R에 대해 RFLP와 달리 제한효소가 필요없는 PCR-SSCP(single strand conformation polymorphism) 분석방법을 이용하여 품종 특이적인 SSCP 유전자형을 확인하여 한우육 판별법을 보고하였다.

정 등 [4]은 GenBank에 등록된 소염기 서열을 기초로 하여 한우와 Holstein의 MC1R 유전자 염기서열을 분석한 결과 104번 아미노산을 결정하는 코돈에서 Holstein은 GGT(Gly)의 염기서열로 이루어져 있으나 한우는 GTG로 두 번째 Guanine 염기 하나가 결여된 single nucleotide polymorphism(SNP)가 존재함을 확인하였다.

SNP는 개체와 개체간의 DNA에 존재하는 한개 염기 쌍의 차이, 즉 결손, 삽입 또는 치환되는것에 의해 발생되며 사람에서는 유전병을 찾아가는 중요한 시발점이 되고 있다. 염기 3개당 아미노산 하나가 대응하기 때문에 유전자속의 DNA 염기중 하나가 바뀔 경우 아미노산이 바뀌게 되어 단백질 구조 전체가 바뀐다. 소의 경우, MC1R 유전자에 존재하는 SNP에 의하여 품종별로 모색 발현이 달라지게 되었다 [9,24].

SNP의 검출을 위한 가장 확실한 방법은 DNA 염기서열을 분석하는 것이 일반적이지만, 이것은 힘들고 시간이 많이 소모된다는 단점이 있다. 현재까지 개발된 SNP 분석 방법으로는 allele-specific oligo-nucleotide hybridization [23], ligase chain reaction [6], PCR-RFLP [2,4], 형광 probe와 5'-nuclease assay [16], 그리고 allele-specific PCR(AS-PCR) 방법이 있다 [21].

AS-PCR 방법이 대립유전자 사이에서 신뢰성 있는 감별이 성취되기 어려울 것이라고 여러 연구자들이 보고하였지만 [7], 유전자 변위 부위에 제한효소 인지부위가 없어도 염기변화를 검출할 수 있는 AS-PCR 방법이 인간의 유전연구에 성공적으로 적용되어 왔으며 [11,15], 최근에는 소와 사람의 결핵균을 구별하는데 multiplex allele-specific PCR(MAS-PCR) 방법이 이용되었다 [20]. AS-PCR 방법은 primer의 3' 말단이 반드시 DNA template와 상보적이어야 한다는 것에 기초하고 있어, 선택된 한개의 SNP 대립유전자는 SNP 위치에서 3' 말단을 중합하는 primer들을 사용함으로써 특이적으로 증폭되어질

수 있다. *Taq* DNA polymerase은 3'에서 5' 방향으로 exonuclease 활성이 부족하기 때문에, DNA template와 관련되어 3' 말단이 상보적인 primer만이 높은 효율로 증폭되어 SNP typing이 이루어진다.

이 연구는 한우에서 MC1R 유전자중 Guanine 염기 하나가 결실되어 발생한 SNP를 검출하기 위하여 제한효소를 사용하지 않고도 한우고기와 젓소고기를 신속하고 정확하게 감별하기 위한 특이 primer제작과 MAS-PCR방법을 개발하는 것이다.

재료 및 방법

공시재료

본 연구에 사용된 공시재료는 광주지역 도축장에서 수의사의 판정을 받은 한우 24개체, Holstein 30개체, 한우와 Holstein 교잡종(일명 먹우) 3개체와 생우로 수입되어 검역을 받은 후 국내에서 일정기간 사육되어 도축장에 출하된 검정색 Angus 9개체, Hereford 17개체로부터 근육시료를 채취하여 실험에 사용하였다.

Genomic DNA 추출

근육조직(10~20 mg)으로부터 genomic DNA의 추출은 Miller 등 [19]의 phenol/chloroform 추출방법의 일부를 변형하여 실시하였다. Nucleic lysis solution(Promega, USA) 500 μ l에 풀어 65°C에서 30분 정도 반응시킨 후, phenol:chloroform(1:1) 500 μ l를 혼합하여 12,000 rpm에서 3분 정도 원심분리하여 단백질을 제거한 후(필요에 따라 2회 이상 반복) 상층액을 isopropanol 600 μ l와 혼합하여 12,000 rpm에서 5분 정도 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 추출된 DNA는 70% ethanol로 2회 세척 후 65°C에서 5분정도 건조하여 순수한 3차 증류수에 적당량 용해하여 50~150 ng/ μ l 농도로 희석하여 MAS-PCR 수행전까지 -20°C에 보관하였다.

Multiplex allele-specific PCR design

이 연구에서 한우와 Holstein의 MC1R 유전자에서 Guanine 염기 한개의 차이를 구별하기 위해 Fig 1과 같은 방법으로 MAS-PCR이 수행될 수 있도록 primer를 고안하였다. GenBank(Y19103)에 등록된 소의 MC1R 부위의 염기서열을 기초로 하여 Primer Express 소프트웨어(Ver 2.0; Applied Biosystems, USA)을 사용하여 primer들을 설계하였으며, Bioneer(Korea)에 합성을 의뢰하였다. 본 실험에 네가지 primer를 사용하였으며, 내부 역방향 primer인 HanCG-R은 104 코돈 열성유전자형(GTG)의 3개 염기와 3' 말단이 상보적이게 위치하였다(Fig. 1).

결론적으로 MC1R 유전자의 이 위치에서 Guanine 염

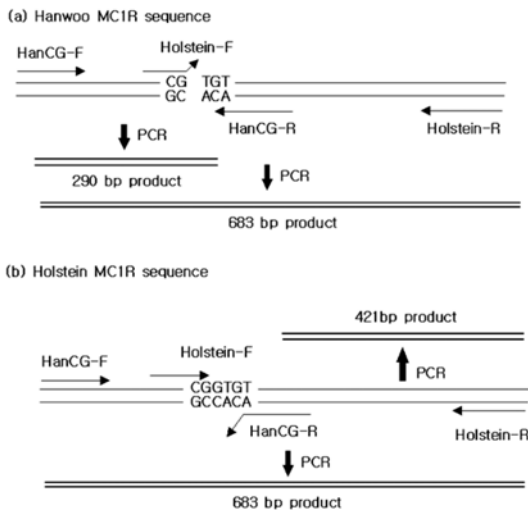


Fig. 1. Schematic view of the MC1R gene fragment targeted by MAS-PCR assay using four primers(HanCG-F and -R, Holstein-F and -R). (a) Hanwoo DNA sequence deleted guanine at the position 310 in the MC1R gene. HanCG-R is a reverse primer able to hybridize both Hanwoo and Hereford MC1R gene. (b) Holstein F is a forward primer able to hybridize Holstein and Angus presenting a single mismatch with the Hanwoo MC1R gene. The 683bp fragment generated from(HanCG-F and -R) is an internal control for the PCR amplification. Short arrows indicate primers.

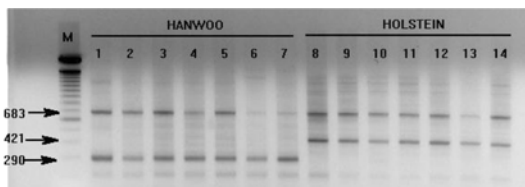


Fig. 2. Multiplex allele specific PCR assay with Hanwoo and Holstein DNA. PCR product as seen on 1.5% agarose gel under UV illumination. Lane M: 100bp DNA ladder (GibcoBRL, USA); lane 1-7: Hanwoo DNA; lane 8-14: Holstein DNA.

기가 결실되어 있다면 290 bp 절편이 외부 순방향 primer HanCG-F와 내부 역방향 primer HanCG-R에 의해서 증폭되어질 것이다(Fig. 2). 만약 Guanine 염기가 결실되지 않은 우성 유전자형인 GGT로 구성되었다면 적절한 PCR 조건하에서, HanCG-R primer의 3' 말단에서 상보적으로 결합되지 않게되고 290 bp PCR 산물은 생성되지 않으며, 3' 말단이 GGT로 배열되어 있는 순방향 Holstein-F primer와 상보적으로 결합하게 되고 외부 역방향 Holstein-R에 의해서 421 bp 절편이 증폭되어질 것이다(Fig. 2).

MC1R 유전자의 MAS-PCR과 AS-PCR 방법을 위한

primer는 다음과 같다. 외부 primer 두개는 HanCG-F(5'-TTCCCTTAActgCACgCCC-3')와 Holstein-R(5'-CgCCCTTgAggCCAAAg-3')이며, 내부 primer는 HanCG-R(5'-TgggTggCCAaggACACg-3')과 Holstein-F(5'-CTgCTggAggCCggTgT-3')이다.

PCR 조건

PCR 반응을 위해 AccuPower® PCR PreMix(Bioneer, Korea)을 사용하였다. template DNA 1 µl, 각 10 pmol/µl primer 1 µl를 첨가하고 멸균증류수로 총 20 µl되게 조정하였다. 증폭은 PCR thermocycler(PTC-200; MJ Research, USA)를 사용하였으며, PCR 수행은 95°C에서 5분간 수행한 후 95°C/40초, 66°C/40초 그리고 72°C/30초에서 5 cycles 수행, 95°C/40초, 64°C/30초 그리고 72°C/30초에서 5 cycles 수행, 95°C/40초, 63°C/30초 그리고 72°C/30초에서 22 cycles 수행한 후 post-elongation을 72°C에서 5분간 DNA 합성을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 20~80 mM Tris-acetate-EDTA(TAE) 완충용액과 DNA 염색을 위한 ethidium bromide(0.5 µg/ml)가 함유된 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 최종산물을 UV transilluminator와 AlphaEase 5.5 software(Alpha Innotech, USA)를 이용하여 확인분석하였다.

MAS-PCR 방법의 민감성 검사

민감성 검사는 한우와 Holstein의 genomic DNA를 NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer(NanoDrop Technologies, USA)를 이용하여 농도를 측정하여 400 ng/µl가 되도록 정량한 후 2배 계단희석하여 MAS-PCR를 실시한 후 특이 증폭산물을 확인하였다.

결 과

MAS-PCR법에 의한 한우와 젃소고기 감별

소의 모색에서 빨강/검정색을 발현시키는 MC1R 유전자내의 변이를 확인하기 위하여 한우와 Holstein에 대하여 4개의 primer를 사용하여 MAS-PCR 방법을 실시한 결과 한우에서는 683 bp와 290 bp band, Holstein과 검정색 Angus종에서는 683 bp와 421 bp band가 동시에 증폭되었다(Fig. 2, 3).

모색이 한우와 유사한 적갈색 Hereford 종에 대해 MAS-PCR 방법을 수행한 결과 Fig 4와 같이 두가지로 구분되었다. 즉 한우와 Holstein에서 볼 수 있는 세가지 PCR 증폭산물이(683, 421, 290 bp) 동시에 나타났으며 (Fig. 4, lane 1-5), 다른 한가지는 한우에서 볼 수 있는 683bp와 290bp band가 증폭되었다(Fig. 4, lane 6-11). 한편 모색이 검정색인 먹우는 일부 Hereford 종에서 나타

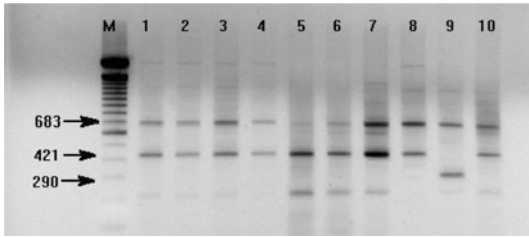


Fig. 3. Ethidium bromide-stained gel of Multiplex allele specific PCR assay. Lane M: 100 bp DNA ladder(GibcoBRL, USA); lane 1-8: Black Angus DNA; lane 9: Hanwoo DNA; lane 10: Holstein DNA.

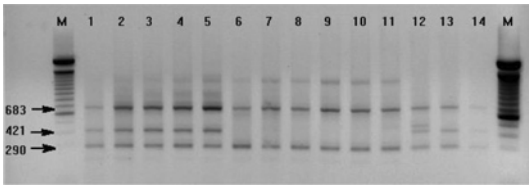


Fig. 4. Ethidium bromide-stained gel of Multiplex allele specific PCR assay. Lane M: 100 bp DNA ladder (GibcoBRL, USA); lane 1-11: Hereford DNA; lane 12-14: Hanwoo/Holstein cross cow DNA.

난 것과 같이 Holstein형(421bp)과 한우형(290bp) PCR 산물이 동시에 증폭되었다(Fig. 4, lane 12-14).

AS-PCR법에 의한 한우와 젓소고기 감별

MC1R 유전자내의 Guanine 염기가 결실되어 있는 한우고기를 검출하기 위하여 HanCG-F primer와 HanCG-R primer 그리고 Holstein-R primer 세가지를 이용하여 AS-PCR를 수행한 결과 한우와 Hereford종 그리고 멧우에서는 683 bp와 290 bp band가 동시에 증폭되었다. 한편 Holstein과 검정색 Angus 중에서는 683 bp band가 증폭되었다(Fig. 5A)

HanCG-R primer를 제외한 나머지 세 개의 primer 즉, HanCG-F와 Holstein-F 그리고 Holstein-R primer를 사용하여 AS-PCR을 수행한 결과 한우와 일부 Hereford 종에서는 421 bp band는 증폭되지 않고 683 bp band가 증폭되었다(Fig. 5B). 그리고 Holstein, 검정색 Angus 중, 일부 Hereford 종 그리고 멧우에서 683 bp와 421 bp band가 동시에 증폭되었다(Fig. 5B).

따라서 MC1R 유전자에서 한우와 Holstein의 SNP를 검출하기 위한 MAS-PCR과 AS-PCR을 통해서 일부 Hereford와 멧우는 양쪽 대립유전자를 모두 지니고 있는 것이 확인되었으며, 한우는 Holstein과 검정색 Angus 그리고 멧우와 MAS-PCR를 통해서 구분이 가능하였다.

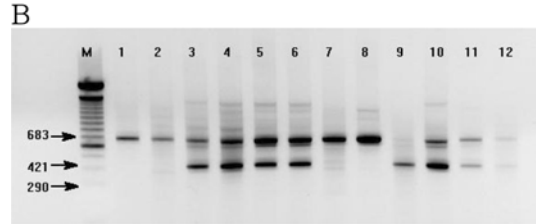
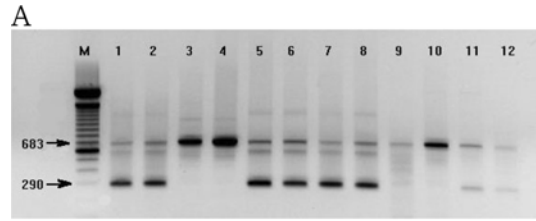


Fig. 5. Allele specific PCR assay with SNP specific primer and two outer primers. Lane M: 100 bp DNA ladder (GibcoBRL, USA); A: Results of PCR with HanCG-R, HanCG-F and Holstein-R primer; B: Results of PCR with Holstein-F, HanCG-F and Holstein-R primer; lane 1, 2: Hanwoo DNA; lane 3, 4: Holstein DNA; lane 5-8: Hereford DNA; lane 9, 10: black Angus; lane 11, 12: Hanwoo/Holstein cross cow DNA.

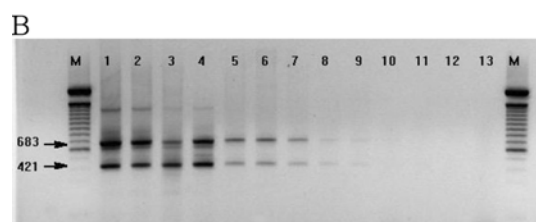
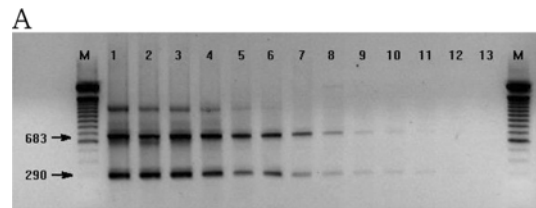


Fig. 6. Sensitivity multiplex allele specific PCR assay to detect MC1R gene of Hanwoo and Holstein. Lane M: 100bp DNA ladder (GibcoBRL, USA); A: Results of PCR with Hanwoo MC1R gene; B: Results of PCR with Holstein MC1R gene; lane 1 to 13, genomic DNA serially two fold diluted from 400 ng to 50 pg.

MAS-PCR법의 민감도

MAS-PCR 방법의 민감성을 조사하기 위해서 한우와 Holstein의 genomic DNA량을 400 ng/μl으로 조정하여 2배 계단희석하여 MAS-PCR 방법을 실시한 결과, 한우

는 0.39 ng/ μ l(Fig. 6A, lane 11), Hostein은 1.56 ng/ μ l(Fig. 6B, lane 9)의 DNA 농도까지 검출이 가능하였다.

고 찰

모든 소는 검정, 적색 또는 흰색의 기본 모색을 가지고 있다 [18]. 즉, 모든 소는 기본 모색에 대한 두가지 유전자들을 가지고 있으므로 6가지의 유전적 조합이 가능하며, 각각의 부모가 지닌 유전자가 후대에 전달된다. 예를들면 검정색에 대한 모색 유전자는 적색에 대한 모색 유전자에 우성이므로 이들 두가지 유전자를 모두 지닌 먹우의 모색은 검정색으로 발현된다.

소에서 털색을 조절하는 유전자는 여러가지가 존재한다. 소에서 13번 염색체의 Agouti 좌위에 agouti signaling protein(ASP) 유전자는 MC1R에서 α -melanocyte stimulating hormone(MSH)의 작용을 방해하며, Dexter종에서 짙은 갈색을 표현하는 tyrosinase related protein 1 유전자는 8번 염색체, 검정색과 붉은색을 조절하는 MC1R 유전자는 18번 염색체의 Extension 좌위에 존재한다 [8,10,13].

MC1R은 MSH와 adrenocorticotropin hormone과 상호작용에 의해 melanin 합성을 상승시킬 수 있다 [25]. Melanosome은 두 가지 형태의 melanin을 합성하는데 검정색과 갈색을 표현하는 eumelanin과 노란색과 붉은색을 나타내는 pheomelanin이다 [22]. Melanin 합성은 MSH와 Agouti 단백질의 길항작용에 의해서 주로 조절되어진다. MSH는 melanocyte의 표면 위에 존재하는 MC1R에 결합하여 eumelanin의 합성을 증가시킨다 [10,26]. 한우의 모색은 MSH가 MC1R에 결합하는 것을 Agouti 단백질이 방해하기 때문에 pheomelanin이 증가되어 황갈색의 모색이 발현되는 것이다.

젓소고기와 한우고기를 감별하기 위한 유전자 분석기술이 여러 연구자들에 의해서 시도된 바 있으나, 지금까지는 주로 random amplified polymorphic DNA(RAPD) 분석방법을 이용하여 수행한 결과 실험의 재현성등 여러 가지 문제점이 발생하여 실용화되지 않았다 [3]. 김 등 [2]과 정 등 [4,5]은 PCR-RFLP법과 PCR-SSCP을 이용하여 모색이 검정색인 품종과 황갈색인 품종에서 각각의 다른 DNA band를 확인하였다. 하지만 이들은 MC1R 유전자의 변이를 확인하기 위해서 제한효소처리 후 절단된 DNA band의 크기가 작아져서 이를 확인하기 위해서 4% metaphore agarose gel 또는 polyacrylamide gel에 전기영동을 한 후 silver stain을 사용하는데 많은 노력과 시간이 소요된다는 단점들이 있었다. 제한효소 등의 불편한 단점들을 보완하면서 SNP typing이 가능한 AS-PCR 방법 최근 여러 연구자들에 의해서 개발되었다 [11,15,20].

일반적으로 AS-PCR 방법은 유전자 변이의 유무를 확인하는 방법이며, 두개의 공통 primer와 SNP 부위의 특이 primer를 사용하기 때문에 같은 크기의 증폭된 PCR 산물을 형성한다. 따라서 primer를 오인하여 사용할 경우 엉뚱한 해석을 초래할 수 있었다. 본 연구에서 개발한 MAS-PCR과 AS-PCR 방법은 primer를 오인하여 사용할 염려가 없을 뿐만 아니라 PCR 수행 후 제한효소 처리없이 한우고기와 젓소고기를 구별해 낼 수 있는 방법이다.

김 등 [1]은 한우에서 MC1R의 Guanine 결실부위를 확인하기 위하여 한우 특이 primer를 이용하여 PCR를 수행한 결과 검정색 먹우가 한우 특이 primer와 상보적으로 결합됨에 따라 한우형으로 감별되었다. 하지만 본 연구에서 Holstein-F primer를 이용한 AS-PCR 방법에 의해 일부 Hereford와 검정색 먹우가 젓소형인 421 bp band가 증폭되었으며(Fig. 5B), MAS-PCR 방법을 통해서 한우형의 290 bp band와 Holstein형의 421 bp band가 동시에 증폭되었다(Fig. 4). 이처럼 MAS-PCR 방법에 의해서 한우형과 Holstein형이 동시에 증폭되는 것은 일부 Hereford와 먹우의 모색 표현형은 각각 적갈색과 검정색이지만 한우형의 적색 대립유전자와 Holstein형의 검정색 대립 유전자를 모두 지니고 있기 때문이다.

한편 Guanine이 결실되지 않은 Holstein형 특이 primer인 Holstein-F를 이용한 AS-PCR 방법을 수행할 경우 HanCG-R primer를 이용할때 보다도 비특이 band가 현저하게 감소하였으며, 한우와 일부 Hereford 개체에서는 공통인 683 bp band가 증폭되고, Holstein과 검정색 Angus, 먹우 그리고 일부 Hereford 개체에서 Holstein형인 421 bp band가 증폭되었다(Fig. 5B). 한편 template DNA의 양을 과도하게 사용하여 MAS-PCR를 수행할 경우, Holstein의 421 bp band와 비슷한 크기의 비특이 band가 증폭이 이루어졌는데, 이것은 HanCG-R primer에 의해서 발생된 것으로 확인되었다. 따라서 annealing 온도를 66°C에서 63°C까지 3단계로 나누어 touch down PCR를 수행하여 비특이 PCR 산물의 생성을 감소시켰다.

본 연구에서, 한우의 MC1R 유전자내의 SNP를 확인하기 위해 네가지 primer를 이용한 MAS-PCR 방법과 HanCG-R primer를 이용하는 것보다 Holstein-F primer를 이용하여 AS-PCR을 수행한 결과가 Fig 2~5에서 보는 바와 같이 황갈색의 한우고기는 흑백반의 Holstein, 검정색 Angus종 그리고 먹우와 쉽게 판별이 가능하였다.

그러나 Hereford종의 모색은 한우처럼 적갈색으로 MC1R 유전자에 근거한 MAS-PCR 방법을 이용하여 한우와 완벽하게 구분되지 않았다. 이것은 Hereford 종의 전체적인 모색은 한우와 유사한 적갈색이지만 얼굴, 허벅부, 기갑부 및 꼬리에 부분적으로 흰 모색을 지니고 있

기 때문인 것으로 추측된다. 따라서 소에서 흰 모색을 발현하는 유전자인 endothelin B receptor와 C-kit receptor에 대한 연구가 더 진행되어야 하겠다.

참고문헌

- 김태중, 박성도, 이재일. 소 모색관련 MC1R 유전자의 SNP와 관련한 3'-tailed primer를 이용한 한우육의 판별. 한국동물자원과학회지 2004, **46**, 897-902.
- 김태현, 윤두학, 박응우, 이혜영, 오성중, 정일정, 탁태영, 김정남, 한재용. 소 품종별 Melanocortin Receptor 1 (MC1R) 유전자의 유전자형 빈도에 관한 연구. 한국동물자원과학회지 2000, **42**, 735-744.
- 민병록, 한재용, 이무하. RAPD 기법을 이용한 최고의 품종(한우육, 유우육 (Holstein육), 수입우육) 구분. 한국동물자원과학회지 1995, **37**, 651-660.
- 정의룡, 김우태, 김연수, 한상기. 소 모색관련 유전자 MC1R의 PCR-RFLP Marker를 이용한 한우육 판별. 한국동물자원과학회지 2000, **42**, 379-390.
- 정의룡, 김우태, 김연수, 한상기. PCR-SSCP 기법을 이용한 소 MC1R 유전자의 다형성 분석 및 한우육 감별. 한국동물자원과학회지 2001, **43**, 45-52.
- Abravaya K, Carrino JJ, Muldoon S, Lee HH. Detection of point mutations with a modified ligase chain reaction (Gap-LCR). *Nucleic Acids Res* 1995, **23**, 675-82.
- Ayyadevara S, Thaden JJ, Shmookler Reis RJ. Discrimination of primer 3'-nucleotide mismatch by taq DNA polymerase during polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 2000, **284**, 11-18.
- Berryere TG, Schmutz SM, Schimpf RJ, Cowan CM, Potter J. TYRP1 is associated with dun coat colour in Dexter cattle or how now brown cow? *Anim Genet* 2003, **34**, 169-175.
- Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999, **234**, 177-186.
- 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.
- Ferrie RM, Schwarz MJ, Robertson NH, Vaudin S, Super M, Malone G, Little S. Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutation in the CFTR gene. *Am J Hum Genet* 1992, **51**, 251-262.
- Kijas JMH, Wales R, Tomsten A, Chardon P, Moller M, Andersson L. Melanocortin receptor 1 (MC1R) mutations and coat color in pigs. *Genetics* 1998, **150**, 1177-1185.
- Klungland H, Vage DI, Gomez-Raya L, Adalsteinsson S, Lein S. The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm Genome* 1995, **6**, 636-639.
- Kriegesmann B, Dierkes B, Leeb T, Jansen S, Brenig B. Two breed-specific bovine MC1R alleles in Brown swiss and saler Breeds. *J Dairy Sci* 2001, **84**, 1768-1771.
- Kwok S, Kellogg DE, McKinney N, Spasic D, Goda L, Levenson C, Sninsky JJ. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Res* 1990, **18**, 999-1005.
- Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* 1999, **14**, 143-149.
- Marklund L, Johansson M, Sandberg K, Andersson L. A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chesnut coat color in horses. *Mamm Genome* 1996, **7**, 895-899.
- McPeake SR. Color pattern inheritance in beef cattle. University of Arkansas Division of Agriculture Cooperative Extension Service, Little Rock, 2004.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988, **16**, 1215.
- Mokrousov I, Otten T, Filipenko M, Vyazovaya A, Chrapov E, Limeschenko E, Steklova L, Vyshnevskiy B, Narvskaya O. Detection of isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis strains by a multiplex allele-specific PCR assay targeting katG codon 315 variation. *J Clin Microbiol* 2002, **40**, 2509-2512.
- Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989, **17**, 2503-2516.
- Riley PA. Melanogenesis and melanoma. *Pigment Cell Res* 2003, **16**, 548-552.
- Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 1986, **324**, 163-166.
- Schork NJ, Fallin D, Lanchbury S. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clin Genet* 2001, **58**, 250-264.

25. **Takeuchi S, Takahashi S.** Melanocortin receptor genes in the chicken-tissue distributions. *Gen Comp Endocrinol* 1998, **112**, 220-231.
26. **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.