

연구과제 최종보고서

과 제 명	산양·면양·염소 구별을 위한 유전자 분석법 개발				
총연구기간	2018년 1월 ~ 2018년 12월	당해연도 연구기간	2018년 1월 ~ 2018년 12월		
수행부서/ 세부수행부서	시험연구소 원산지검정과 (자체)	연구 책임자	구분	직위(급)	성명
			정	과장	한국탁
		부	주무관	김남국	
		참여 연구원	직위(급)		성명
			팀장		최장열
			주무관		최정아
			주무관		박혜민
			주무관		이미정
참여부서					
사업구분	단년도 (√) 다년도 ()	총 (1)개년 중 (1)차 연도			
연구결과 요약	<p>○ 산양·면양·염소 구별을 위한 특이 유전자 발굴 및 판별법 개발</p> <ul style="list-style-type: none">- 직접염기서열 분석을 통한 종구별이 가능한 3종의 유전자 확인- 대립유전자 특이 중합효소 연쇄반응(AS-PCR)법을 이용한 3종 유전자 검출법 확립* 산양, 산양·염소 및 면양 특이 유전자 부위를 이용하여 판별- 시장 유통 시료 등을 통한 판별법 검증 완료* 125 점을 대상으로 판별법 검증 결과 종판별이 가능한 것으로 확인				

산양·면양·염소 구별을 위한 유전자 분석법 개발

1. 연구배경 및 목표

가. 연구배경

국내 염소(양 포함) 고기의 자급률은 약 20%로 수입 의존도가 높은 품목이며, 국내산과 수입산 간 가격차이가 약 2.5배(국내산 30,000원/kg, 외국산 12,000)로 원산지가 둔갑되어 판매될 개연성이 매우 높은 품목 중에 하나이다. 또한 최근 소비량 증가로 2015년 9.2만 톤에서 2017년 말 기준 16.7만 톤으로 수입 또한 꾸준히 증가되고 있으며, 수입산 양 고기(산양·면양)를 국내산 염소 고기로 둔갑하여 판매하는 사례들이 증가되고 있다. 이에 식품의약품안전평가원에서는 '식품 중 사용원료 진위판별 지침서'를 통해 염소(Capra hircus)와 양(Ovis aries)의 판별법을 제시하였으나, 산양과 면양을 판별하지는 못하고 있다. 따라서 염소와 산양, 면양을 명확히 구별하는 과학적인 방법의 개발이 시급한 실정이다.

산양·면양·염소는 소과 양속에 속하며(Figure 1), 양(sheep)의 경우 27개의 염색체를 염소(goat)의 경우 30개의 염색체를 갖는 것으로 알려져 있다. 초위성체(microsatellite) DNA 마커를 이용한 유전자 연구에 따르면 양(면양)과 염소는 유전적으로 매우 유사한 것으로 보고하였고, 유전자 지도(genetic map) 연구에서도 양과 염소의 유전적 특성이 매우 유사함을 보고하였다. 또한 산양과 염소의 기원이 매우 유사, 유전적 차이에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 수입산 양(산양·면양) 고기를 국내산 염소 고기로 둔갑하여 판매되는 거짓 판매 단속 업무 지원을 위해, 유전자 분석법을 활용한 산양·면양·염소 판별 방법을 제시하고자 한다.

나. 연구목표

본 연구에서는 산양·면양·염소 판별이 가능한 유전자 마커(SNP marker)를 발굴하고 검정방법을 개발하여 외국산 산양·면양을 국내산 염소고기로 둔갑 판매하는 원산지 단속 현장 지원에 활용하고자 한다.



2. 연구내용 및 방법

가. 연구내용

1) 표준시료 확보 및 게놈 DNA 추출

산양·면양·염소 구별을 위해 표준시료는 국립축산과학원과 사육농가를 통해 확보하였다. 표준시료 총 23종(산양 5, 면양 13, 염소 5종)을 확보, 종 간 차이가 있는 유전자 부위 탐색에 활용하였다. 시료로부터 게놈 DNA의 추출은 Genome MagExtractor(Toyobo, Japan) 시약을 이용하여 제공되는 표준 방법에 따라 수행하였다. 추출된 게놈 DNA는 전기영동 및 분광 광도계(NanoDrop 2000c, USA)를 이용하여 농도와 순도를 확인한 후 직접염기서열 분석에 활용하였다.

2) 임의증폭다형(RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA) 분석

종구별이 가능한 유전자 부위 탐색을 위해 12종의 random primer를 이용 증폭다형성 분석을 수행하였다. 사용된 primer의 종류는 Table 1과 같으며, PCR 반응은 PTC200(Bio-Rad, USA)을 이용하였으며, 다음과 같은 조건에서 수행되었다. 추출된 게놈 DNA 10ng에 100pmole/ul 농도의 random primer 0.5 ul, Taq

premix(2x, TNT Research, Korea) 10 ul, 증류수 8.5 ul를 첨가한 후 94℃에서 10분간 반응 시킨 후 94℃에서 1분, 55℃에서 1분, 72℃에서 2분간 3단계의 반응을 35회 반복한 후, 마지막으로 72℃에서 7분간 합성 과정을 수행하였다. PCR 반응이 완료된 후 반응산물 8 ul를 1.5% agarose gel에서 120V로 25분간 전기영동 후 UV 상에서 증폭형태를 확인하였다.

Table 1. 임의증폭다형 분석을 위한 random primer

Primer Name	Sequences(5'-3')
URP 1	5'-ATC CAA GGT CCG AGA CAA CC-3'
URP 2	5'-GTG TGC GAT CAG TTG CTG GG-3'
URP 3	5'-CCC AGC AAC TGA TCG CAC AC-3'
URP 4	5'-AGG ACT CGA TAA CAG GCT CC-3'
URP 5	5'-GGC AAG CTG GTG GGA GGT AC-3'
URP 6	5'-ATG TGT GCG ATC AGT TGC TG-3'
URP 7	5'-TAC ATC GCA AGT GAC ACA GG-3'
URP 8	5'-AAT GTG GGC AAG CTG GTG GT-3'
URP 9	5'-GAT GTG TTC TTG GAG CCT GT-3'
URP 10	5'-GGA CAA GAA GAG GAT GTG GA-3'
URP 11	5'-TAC ACG TCT CGA TCT ACA GG-3'
URP 12	5'-AAG AGG CAT TCT ACC ACC AC-3'

3) 직접염기서열 분석 및 유전자변이 발굴

직접염기서열 분석을 위한 프라이머(primer) 디자인은 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 등록된 16,533bp의 미토콘드리아 정보(gi984291203, Naemorhedus goral mitochondrion, complete genome)를 활용하였고, Primer3(<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) 프로그램을 이용하여 증폭산물이 500~700bp가 되도록 하였다(Table 2). 제작된 프라이머를 이용하여 산양, 면양, 염소 각 5두를 증폭한 후 염기서열분석기(DNA Sequencer, AB3730, USA)를 통해 정보를 분석하였다.

Table 2. 직접염기서열 분석을 위한 프라이머 정보

No.	Name	Sequence (3'-5')	size (bp)
1	6F_Goat/Sheep	ACGACCTCGATGTTGGATCAG	615
	6R_Goral	ATGAGAGGGTGAGGTATGGG	
2	7F_Goat/Sheep	CTACGACCYGCCATCCTC	667
	7R_Goral	CATAGCGGAATCGGGGGTAG	
3	8F_Goral	TCCTAGGAGCATTCCATAGCCC	642
	8R_Goat/Sheep	TGAGGCTGTTGATTGAGTTAGGA	

4	9F_Goral	GCCACAGAAGCATCAACCAA	703
	9R_Goral	GCTGTGATTGCTATAAAGGTGG	
5	10F_Goral	TCCACTATCAGGATTTATACC	608
	10R_Goral	TTGATTCCTCTTTTTCCCGTCC	
6	11F_Goat/Sheep	CCGGCAGAGTTTGAAGCTG	608
	11R_Goral	AAAATTGAGGAGACACCTGC	
7	14F_Goral	GAGTGGTTAAACGGATGCCC	617
	14R_Goral	GTAGTCGAAGTTCTCCTGGCT	
8	15F_Goral	TGAAGACCTAACCTTTGACTCTAC	634
	15R_Goral	ACGAGGGGAAGGCCTAGTATT	
9	16F_Goral	ACAAAATAACCCCTTGAGAAACA	600
	16R_Goral	TGTGATTAGTGCTGTTGTGGTACTG	
10	17F_Goral	TTAATTGGAGGAGCTACTCT	632
	17R_Goral	GCGGTTTCCCTCTATAAGGC	
11	18F_Goral	CCTCCGTTCTTCTAGCCTCA	612
	18R_Goat	TATGGAGAAGGGAAGGCGAG	
12	19F_Goat	GAATGCGGATTTGACCCCAT	650
	19R_Goral	TTGATAGTCAGGTTGGGGGTATAAG	
13	20F_Goral	CGGTACCGACTACGTACAAACCT	601
	20R_Goral	AGTTAGATATTGGTTGAACC	
14	21F_Goral	CCCTACCCTTACTAGTCGCA	785
	21R_Goral	TTTGCTCGTTGTGTTGTGA	
15	22F_Goral	TAGCTGCCTGATGACTCTTA	617
	22R_Goral	AAGGGGTAATTGGAGGATTTAT	
16	23F_Goral	ACATTAACAACCCTAATCCT	614
	23R_Goral	GGCAAATTTGAGTTGTCTGGTT	
17	24F_Goral	AACCGCATTTGGCGACATCGG	611
	24R_Goral	AGACTGCCAATAATAAGGGC	
18	25F_Goral	TTTCTCCACATCTGCACCCA	737
	25R_Goral	ACTTGGGCTGTTGAAATGTT	
19	26F_Goral	CCCCACAATTATACACCGCTT	537
	26R_Goral	TACAACTGCTATGGCTACTGA	
20	27F_Goral	AACCCAATCTCCTATTCCATT	530
	27R_Goral	TGTTTTGGTGGGGTTGGGAGGT	
21	30F_Goral	TTCCGACCAATCAGCCAATG	503
	30R_Goral	TGTACCATATACATGTTTAT	
22	31F_Goral	CCAACCTCCCACTCCATATGC	580
	31R_Goral	TGTGAGATGGCCCTGAAGAA	
23	32F_Goral	ATCCGTCCTCATCAACATGC	511
	32R_Goral	AGTGTGTTGAAAGTAGGGGTAAA	
24	33F_Goral	GACTCAGCTATGGCCGTCAA	555
	33R_Goral	TTTGTCACTGCTGTTTCCCG	

직접염기서열 분석을 통해 얻어진 정보를 대상으로 산양·면양·염소 간 차이 유전자 탐색은 Lasergene(DNASTAR, USA)의 SeqMan과 Megalign 프로그램을 활용하였다. 프라이머 디자인을 위한 미토콘드리아 정보를 기준 염기서열

로 활용하여, 각각의 증폭 염기 정보를 비교하여 종간 차이 유전자 부위 탐색을 진행하였다.

4) 대립유전자 특이 중합효소 연쇄반응(AS-PCR, Allele Specific-PCR)법 개발

대립유전자 특이 프라이머 제작은 산양·면양·염소 간 차이가 있는 유전자 부위를 대상으로 염기서열에 따라 특이성을 갖도록 3’말단 염기 중 2 또는 3번째 염기를 임의로 변경하여 제작하였다. 또한 제작된 프라이머 검토크를 위해 Web-based Allele Specific Primer 프로그램(www.4a.biotech.or.th/WASP)을 활용하여, 제작된 프라이머의 적합성을 확인하였다. 제작된 프라이머를 대상으로 온도 및 DNA 농도에 따른 반응성을 확인하여 최종 산양·면양·염소 구별이 가능한 프라이머를 선발하였다. 또한 DNA의 상태 및 반응의 이상 유무 확인이 가능하도록 내부 유전자를 선발, 반응에 포함하였다.

산양·면양·염소의 구별을 위한 PCR 반응은 PTC200(Bio-Rad, USA)을 이용하였으며, DNA 10 ng에 10 pmole/ul 농도의 primer(F/R) 각 0.5 ul, Taq premix(2x, TNT Research, Korea) 7.5 ul, 증류수 5.5 ul를 첨가하였다. 94℃에서 10분간 반응 시킨 후 94℃에서 30초, 61℃에서 30초, 72℃에서 30초 3단계의 반응을 30회 반복한 후, 마지막으로 72℃에서 5분간 합성 과정을 수행하였다. PCR 반응이 완료된 후 반응산물 7 ul를 3% agarose gel에서 120V로 30분간 전기영동 후 UV 상에서 증폭형태를 확인하였다.

반응 온도 및 조건 등 판별법 정립이 완료된 후 시장, 인터넷 및 사육 농장 등을 대상으로 102점의 시료를 확보, 판별법의 정확도 검증을 수행하였다. 정확도 검증은 판별법 개발에 활용된 시료 23점을 포함하여 총 125점을 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 임의증폭다형(RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA) 분석

임의증폭다형분석이란 random primer를 이용하여 게놈 DNA를 증폭한 후 전기영동, 차이가 있는 유전자 증폭산물을 찾고, 차이가 있는 유전자 증폭산물을 이용하여 동·식물 등 종판별(species identification) 등에 다양한 분야에 활용되고 있는 방법이다. 본 연구에서도 산양·면양·염소 종구별을 위해 총 12종의 프라이머를 사용하여 분석을 진행하였다. 12종의 프라이머로 약 100종의 유전자 증

폭산물이 150에서 2,500bp의 범위에서 확인되었다(Figure 2). 중구별을 위해 특이적으로 증폭된 형태를 확인하였으나, 본 실험에서는 산양·면양·염소 간 차이가 나는 증폭산물이 확인되지 않았다. 이러한 결과로 볼 때 산양·면양·염소의 유전적 특성이 매우 유사한 것으로 판단되며, 임의증폭다형 분석을 통한 양·면양·염소 중구별은 어려울 것으로 판단된다.

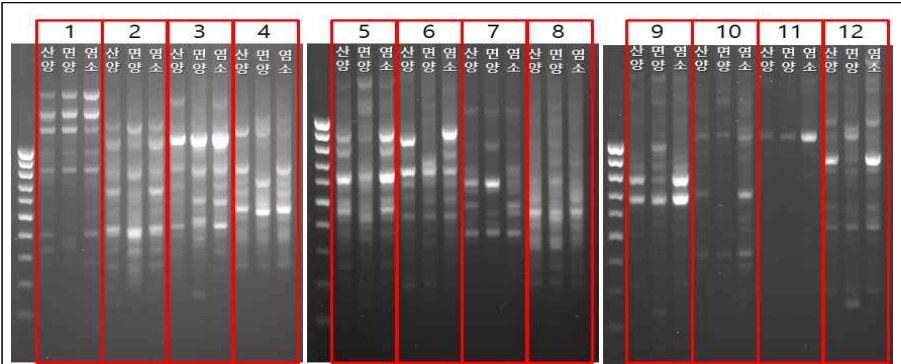


Figure 2 Random primer를 이용한 증폭임다형성 분석 결과

나. 염기서열분석을 통한 후보 유전자변이 발굴

미토콘드리아 DNA 정보는 사람을 포함하여 대부분 종에서 모계로부터 전되어지며, 미토콘드리아 DNA 유전자 중 특히 COI(Cytochrome c Oxidase I), Cytb(Cytochrome b subunit) 등의 유전자가 종판별의 연구 대상으로 이용되고 있다. 본 연구에서도 산양·면양·염소 종판별을 위해 미토콘드리아 DNA를 후보 대상 유전자로 선정하여 분석하였다. 미토콘드리아 정보를 대상으로 직접염기서열 분석을 위하여 총 22세트의 프라이머를 제작(Table 2) 하였으며, 산양·면양·염소 각 1개체를 대상으로 PCR 반응 조건을 검토하였다(Figure 3). PCR 반응에서 단일 증폭산물로 확인되는 14개 영역을 대상으로 각 5개체씩 염기서열 분석을 진행하였고, 직접염기서열분석을 통해 확보된 정보를 Lasergene의 SeqMan 프로그램을 이용하여 비교 분석한 결과 각 종간 차이가 있는 7개의 유전자 부위를 확인하였다(Figure 4).

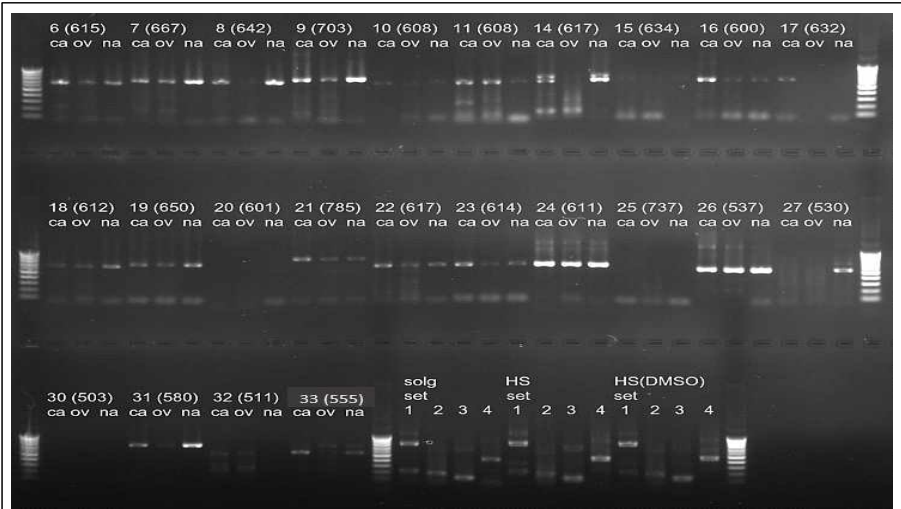


Figure 3 미토콘드리아 영역 직접염기서열 분석을 위한 PCR 조건 검토. na:산양, ov:면양, ca:염소

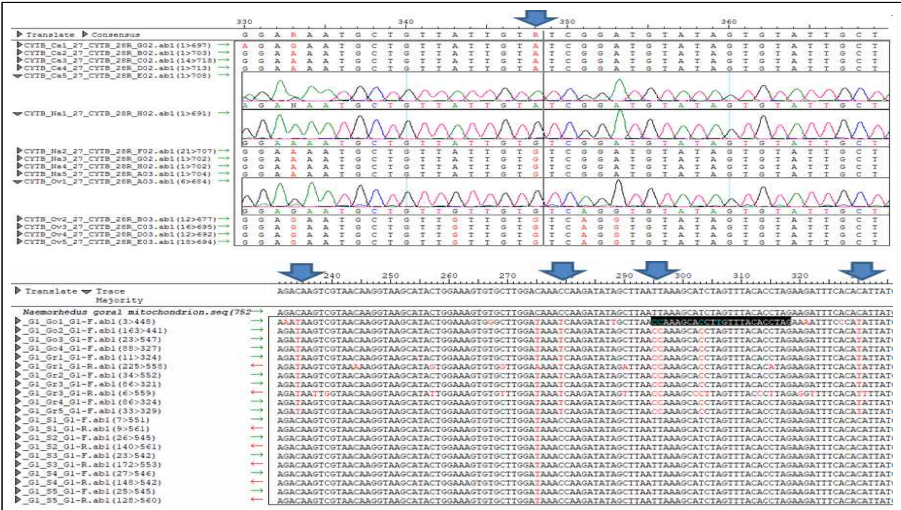


Figure 4 염기서열분석을 통한 차이 유전자부위 확인(일부). Na:산양, Ov:면양, Ca:염소

다. 대립유전자 특이 중합효소 연쇄반응(AS-PCR)법 정립

미토콘드리아 염기서열 분석결과 확인된 7종의 후보 유전자변이를 대상으로

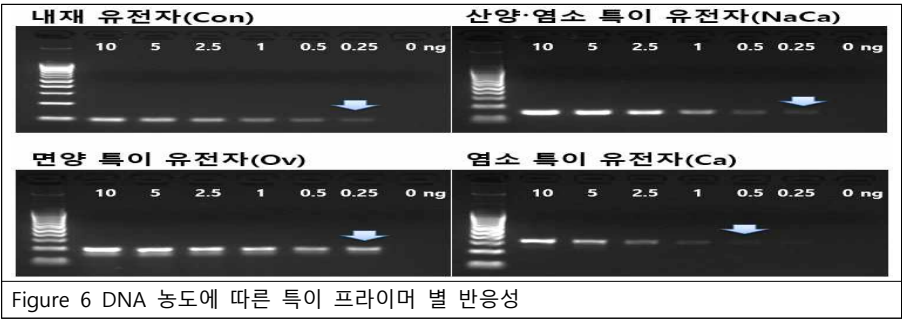
대립유전자 특이 프라이머(allele specific primer)를 제작, 반응 온도 등 실험 조건에 따른 반응 특이성을 검토하였다. 7종의 프라이머 중 3종의 프라이머에서 특이성이 확인되었으며, 염소 특이 프라이머의 경우 염소에서 만 반응하고, 면양 특이 프라이머는 면양에서만, 그리고 산양·면양 특이 프라이머는 산양과 면양에서 반응됨을 확인하였다(Figure 5). 반응에 사용된 프라이머는 아래 표 3에 정리하였다.

Table 3. 산양·면양·염소 구별을 위한 대립유전자 특이 프라이머

구분	Name	Sequence (3'-5')	size (bp)
염소 특이	Ca-F	GCAATACACTATACATCTGAT	310
	Ca-R	ATGGGATTGCTGAAAGAAGATTAG	
면양 특이	Ov-F	AAGATTTACACATTATGAG	210
	Ov-R	AAGGGTTAATCTTTGCTTTTCTGTA	
산양·염소 특이	NaCa-F	CCGTCACCCTCCTCAAGTAA	156
	NaCa-R	CTAGGTGTAAACTAGGTGCTTAGG	
내재유전자	Con-F	GACCCACCAAAATTCAACACA	101
	Con-R	TTGTGGGGTTTTCTTCAAAACC	

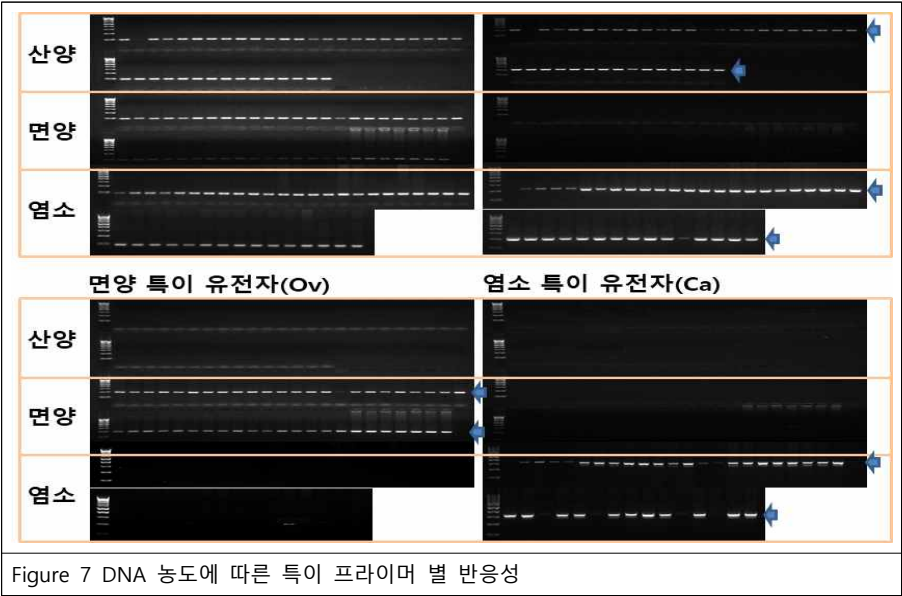


특이성이 확인된 3종의 프라이머를 대상으로 증폭 민감도 확인을 위해 DNA를 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.25 ng의 농도로 순차적으로 희석하여 반응을 확인하였다. DNA 및 실험의 이상 유무 확인을 위한 내재유전자(Con), 산양·염소 특이 유전자(NaCa) 및 면양 특이 유전자(Ov) 프라이머의 경우 최소 0.25 ng에서 확인이 가능하였으나, 염소 특이 유전자(Ca) 프라이머는 0.5 ng 까지 확인되었다(Figure 6). 이러한 결과로 볼 때 안정적인 반응을 위해 최소 0.5 ng 이상의 DNA 농도가 확보되어야 할 것으로 보인다.



라. 산양·면양·염소 판별법 검증

산양·면양·염소 구별을 위한 대립유전자 특이 프라이머 및 반응 조건을 확인한 후 시중 유통 시료 등을 대상으로 검증을 수행하였다. 검증을 위한 PCR 반응에는 DNA 2 ng을 활용하였고, 시료는 판별법 개발에 활용된 23개체를 포함하여 온라인 매장, 시장 및 사육 농가에서 102점, 총 125점을 이용하였다. 내재유전자를 포함하여 4종의 대립유전자 특이 프라이머 반응 결과 125점(산양 39, 면양 47, 염소 39) 모두 명확히 구별하였다(Figure 7).



4. 기대성과 및 활용방안

- **(기대성과)** 산양·면양·염소 판별법 개발로 정확한 종 정보 제공
- **(활용방안)** 산양·면양·염소 종판별로 외국산 산양·면양을 국내산 염소로 거짓 판매하는 원산지 단속 업무 지원

5. 참고문헌

장영미, 이진하, 최장덕, 김규현, 조천호, 이재황, 정유경, 김용상, 김미라, 이호연, 식품 중 사용원료 진위 판별 지침서. 2014. 식품의약품안전평가원

W. Sun, H. Chang, Z. J. Ren1, Z. P. Yang, R. Q. Geng, S. X. Lu, L. Du and K. Tsunoda. Genetic Differentiation between Sheep and Goats Based on Microsatellite DNA. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 2004: 17(5), 583-587.

Maddox JF. A presentation of the differences between the sheep and goat genetic maps. Genet Sel Evol. 2005: 37(1), S1-10.

Pfeiffer I1, Burger J, Brenig B. Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and deer by PCR-RFLP. BMC Genet. 2004: 5(5), 30.

Baek Jun Kim, Yun-Sun Lee, Jung-hwa An, Han-Chan Park, Hideo Okumura, Hang Lee, and Mi-Sook Min. Species and Sex Identification of the Korean Goral(*Nemorhaedus caudatus*) by Molecular Analysis of Non-invasive Samples. Mol. Cells OS, 2008: 30, 314-318.

Dahle, G., M. Rahman, and A. G. Eriksen. RAPD fingerprinting used for discriminating among three populations of Hilsa shad (*Tenulosa ilisha*). Fish. Res. 1997: 32(263), 269.

Mu-Chiou Huang, Yan-Ming Horng, Hsiu-Lin Huang, Yen-Long Sin and Ming-Jaw Chen. RAPD Fingerprinting for the Species Identification of Animals. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 2003: 16(10), 1406-1410.

Choy, Y. H., S. J. Oh and J. O. Kang. Application of RAPD method in meat

for beef breed identification. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 2001: 14, 1655-1658.

손재한, 정영근, 박종철, 김양길, 박종호 , 김경호, 박태일, 김보경, 강천식. RAPD 마커를 이용한 한국말의 유전적 다양성 평가 및 품종 판별. Korean J. Breed. Sci. 2017: 49(2), 65-71.

오홍록, 이창수, 상병찬, 송광택. DNA 분석법에 의한 한우고기 판별. Jour. Agri. Sci. Chungnam Nat'l Univ. 2006: 33(1), 1~10.

Palumbi SR, Cipriano F. Species identification using genetic tools: the value of nuclear and mitochondrial gene sequences in whale conservation. J Hered. 1998; 89(5), 459-64.