pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 31, No. 1, pp. 28~35 (2016)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2016.31.1.28

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

국내에서 유통되는 8종의 식육감별을 위한 multiplex PCR법 개발

허은정 · 고은경[1] · 윤향진[1] · 김연화[1] · 김영조 · 박현정 · 위성환[1] · 문진산[1]*
식품의약품안전처, [1]농림축산검역본부 동물약품관리과

Development of Multiplex PCR Assay for Identification of Eight Species from Meats in Korea

Eun-Jeong Heo, Eun-Kyung Ko[1], Hyang-Jin Yoon[1], Yeon-Hwa Kim[1], Young-Jo Kim, Hyun-Jung Park, Sung-Hwan Wee[1], and Jin-San Moon[1]*
Ministry of Food and Drug Safety, Cheong-ju 28159, Korea
[1]Veterinary Pharmaceutical Management Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Anyang 14089, Korea
(Received September 11, 2015/Revised January 8, 2016/Accepted February 18, 2016)

ABSTRACT - Species identification of animal tissues in meat products is an important issue to protect the consumer from illegal and/or undesirable adulteration; for economic, religious and health reasons. In this reason, accurate analytical methods are needed for the labeling of meat products with requiring simple and fast procedure. Recently, applications of PCR in food analysis have been increased because of their simplicity, specificity and sensitivity. Therefore, in this study, a multiplex PCR assay was developed for the simultaneous identification of eight species of cow, pig, chicken, duck, goat, sheep, horse and turkey from raw meats. The primers were designed in different regions of mitochondrial 16S RNA after alignment of the available sequences in the GenBank database. Two multiplex primer sets were designed as Set 1 (cow, pig, chicken, duck) and Set 2 (goat, sheep, horse, turkey), respectively. Total 274 samples from cow (n = 55), pig (n = 30), chicken (n=30), and duck (n = 30), goat (n = 40), sheep (n = 33), horse (n = 41), and turkey (n = 15) were tested. The primers generated specific fragments of 94, 192, 279, 477 bp (pig, chicken, cow, duck), 670, 271, 152, 469 bp (goat, sheep, horse, turkey) lengths for eight species, respectively. The animal species specificity was 100% in all eight samples in the multiplex PCR assay. The detection limit of the multiplex PCR assay showed from 100 fg to 1 pg of template DNA from extracted from raw meats. When applying multiplex PCR assays to sample from pork/beef and pork/chicken, beef/chicken tested raw mixed meats and heat-treated (83°C for 30min, 100°C for 20min, and 121°C for 10min) mixtures, detection limit was 0.1% level beef, pork and pork in beef and chicken in pork and 1.0% level pork in chicken. This study suggest that the developed multiplex PCR assay can be used for rapid and simultaneous species identification of cow, pig, chicken, duck, goat, sheep, horse and turkey from meats.

Key words : raw meat, meat processed products, differentiation of meat species, PCR

소, 돼지, 닭, 오리고기는 우리나라에서 주로 유통되고 있는 육류이다. 염소, 양, 말, 칠면조는 외국인 이민자 및 유학생 등 이주민들이 최근에 많아지면서 그 소비량이 점차적으로 증가하고 있는 추세이다[15]. 최근 값싼 식품 원료를 사용하거나 표시사항을 허위로 기재하여 소비자를 기만하는 가짜식품(Economically Motivated Adulteration: EMA)의 제조·유통으로 인하여 이에 대한 소비자의 불안감이 높아지고 있다. 이러한 가짜식품은 건전한 식품유통질서를 어지럽히는 주범이기 때문에 국가적 차원에서의 식육안전관리가 필요하다. 특히, 종교적 이유 및 일부 특정 육류에 대한 알러지 반응 등의 문제로 정확한 육제품의 표기는 국내외에서 중요한 사회적 문제로 대두되고 있다[5,8,16,23].

미국 식품의약품안전청(Food and Drug Administration, FDA)과 영국 식품기준청(Food Standard Agency, FSA)에서도 최근에 늘어나는 가짜식품, 가짜 의약품, 가짜 화장품 등에 대한 관리를 강화하고 있으며, 유럽에서는 가짜 원료가 혼입되어있는 식품으로부터 소비자를 보호하기 위

*Correspondence to: Jin-San Moon, Veterinary Pharmaceutical Management Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Anyang 14089, Korea
Tel: 82-31-467-4303, Fax: 82-31-467-4321
E-mail: moonjs727@korea.kr

하여 식품안전과 이력추적제도에 관련된 European Union regulation을 설정하였다[4,13]. 국내에서도 식육가공품의 종류가 다양화되고 세분화 되고 있는 가운데 육가공 제조업체에서 저가의 고기가 고가의 육류로 둔갑되어 유통되거나 가공 육제품의 원료로 사용될 경우에 축산식품의 표시사항을 허위로 기재하거나 비의도적으로 잘못 표시하는 등, 저가의 육류를 부정하게 혼합된 제품 등에 대한 검증과 부정유통을 예방할 수 있는 신속하고 정확한 식육감별법의 개발이 필요한 실정이다[11,23].

현행 축산물의 가공기준 및 성분규격에는 식육감별을 위한 검사법으로서 이화학적 방법, 혈청학적 검사법, 효소면역학적검사법, 유전자검사법이 있다[20]. glycogen검사법, 지방검사법 및 자비법은 식육감별기준이 모호하거나 매우 주관적이고, DNA hybridization법과 혈청학적 검사법인 면역혈청침강반응, 미량겔 확산법 그리고 한천겔 확산법은 근연종에서 교차반응이 발생하며, 히스티딘 디펩타이드법은 두 가지 이상의 혼합육에서는 식육을 감별할 수 없는 단점이 있다[11,16].

식육품종감별에 있어서 최근에 국내외 여러 연구자가 식육감별을 위하여 12S rRNA, 16S rRNA, 그리고 cytochrome b (cyt b)와 같은 미토콘드리아 DNA (mt DNA) 유전자에 기반을 둔 PCR 검사를 활용하고 있다. 이 검사법은 신속성, 민감성, 특이성에서 우수하기 때문에 반추류(소, 면양, 산양, 사슴), 가금류(닭, 칠면조, 오리, 거위), 개, 고양이, 그리고 돼지와 같은 축종을 감별하는데 가장 널리 쓰이고 있다[9,14,17,18,22,24,29]. 특히, mt DNA 유전자는 핵 내 DNA보다 세포당 수천 개의 copy number가 있어 열변성에 의해 야기된 DNA 단편으로부터 적절한 크기로 증폭될 수 있고, 다양한 축종에서 보고된 염기서열의 유용성뿐만 아니라 동물 mt DNA 유전자 구성에 관한 방대한 정보를 가지고 있다. 또한 PCR 증폭을 위한 축종별 특이 primer를 쉽게 설계할 수 있고, mt DNA의 큰 변이성 때문에 혼합물에서 신뢰성 있는 축종감별이 가능하다는 장점을 지니고 있는 것으로 보고되었다[6,16,21,25,30].

최근에는 국내외에서 두 가지 이상의 혼합된 축산물에 대하여 동시에 신속하고 간편하게 감별해 낼 수 있는 장점이 있는 multiplex PCR 방법이 개발되었다[4,7,10,19,30]. 국내에서는 Park 등(2012)[23]이 12S rRNA와 16S rRNA 유전자를 활용하여 10종의 축종에 대한 single PCR법을 개발한 바 있다. 또한, Ko 등(2011)[16]도 12S rRNA와 16S rRNA 유전자를 활용하여 소, 돼지, 닭, 오리 4종과 가금류 4종(닭, 오리, 거위 칠면조)에 대한 multiplex PCR법을 개발하여 각 축종별 1개의 시료를 대상으로 121ºC의 30분 열처리 조건에서 적용하여 평가한 바 있다. 또한, Multiplex PCR법을 충족시키기 위해서는 축종별 특이적인 primer의 PCR 온도 조건의 일치, 증폭산물의 적절한 크기, 표적 유전자 간에 교차반응을 제거해야 하는 등 여러 가지 조건이 만족되어져야 한다고 보고하였다[16]. 이러한 이유로 그동안 국내에서는 식육감별을 위한 multiplex PCR법 개발 및 식육 또는 일부 축산물가공품에 대하여 전처리 조건 및 적용여부 등 제한된 내용의 연구와 평가가 이루어진 실정이다[16,23].

이에 본 연구에서는 국내에서 가장 널리 유통되고 있는 소, 돼지, 닭, 오리, 염소, 양, 말, 칠면조 8종의 식육, 혼합육, 열처리 가공육에 대하여 동시에 신속하게 감별할 수 있는 multiplex PCR법을 개발하였다. 이를 위하여 미토콘드리아 16S RNA에서 종 특이부위를 선발하고 각 종에 대한 특이도를 높이기 위하여 인위적인 미스매치를 주어 프라이머를 제작하여 국내 대표 식육인 소, 돼지, 닭, 오리의 4종 식육과 염소, 양, 말, 칠면조의 4종 식육을 동시에 감별할 수 있는 두 set의 multiplex PCR법을 각각 개발하였다.

Materials and Methods

시료

2012년 1월부터 12월까지 8종 식육의 274개 시료(소 55, 돼지 30, 닭 30, 오리 30, 염소 40, 말 41, 양 33, 칠면조 15두)를 1년 동안 도축장 및 식육판매업체에서 채취하였다. 식육검사법의 축종 특이도와 검출한계를 평가하기 위하여 혼합육 제조 및 열처리 조건은 다음과 같이 실시하였다. 즉, 인위적으로 쇠고기와 돼지고기, 돼지고기와 닭고기, 쇠고기와 닭고기 등 3종으로 각각 혼합하여 쇠고기, 돼지고기, 닭고기를 비율별로 9:1로 혼합하였다. 또한, 쇠고기, 돼지고기, 닭고기 혼합육에 대하여 식육가공품의 가공조건을 고려하여, 83ºC에서 30분, 100ºC에서 20분, 121ºC에서 10분으로 각각 열처리하였다. 식육에 대한 축종 확인을 위하여 미국 식육감별법으로 등재되어 있는 Biokits raw species identification test kit™ 및 Biokits cooked species identification test kit™ (BioKits, USA)로 검사하여 키트의 검사결과와 일치한 시료만 채택하여 PCR 검사에 사용하였다[11].

DNA 추출 및 농도 측정

8종의 식육으로부터 DNA의 추출 및 정제는 Dneasy Blood & Tissue kit (Qiagen GmbH, Hiden, Germany)를 사용하여 실시하였다. 추출 및 정제한 게놈 DNA의 정량분석은 Spectrophotometer AND-1000 (Nanodrop, USA)을 이용하였으며, 260-280 nm에서 흡광도를 측정하여 DNA의 농도와 순도를 확인하였다. 멸균증류수를 이용하여 모두 5 ng/uL로 보정한 후 실험 사용 전까지 –20ºC에 보관하였다.

프라이머 설계 및 PCR 반응 조건

미국의 NCBI (National Center for Biotechnology Infor-

Table 1. DNA sequences of the oligonucleotide primer for identification of the eight animal species in this study

Item	Animal	Primer sequences (5 → 3)	Conc. (pmole/rxn)	Size (bp)
1set	Cow	F : CCCTCTCGACTAAACAACCAAG R : GAAAAATAGATGAGTTAGTTTTTGG	20	279
	Pig	F : TCTCTTAAAAATACATTGGAATTTAGGGgTTT R : tCGAGCtgGGTGATAGCTGG	6	94
	Chicken	F : CGAGCTGaacGATAGCTGGTT R : TGCGGGGAGGGGTGATTA	6	192
	Duck	F : CCCCTCAAAGTGCTAATAGTGACC R : GTAGCTTACTATTGTTGTTTGTGGCAT	6	477
2set	Horse	F : TCCTCTAGCTGGAAATGTGGCG R : TTTGATATTGGGATAGATCCGGT	0.02	152
	Sheep	F : AACATCACCTCCAGCgcCCtTA R : TGGTGGTTGAATTTATTTTCCTTGAGT	0.04	271
	Goat	F : CCCAACAATAGTACAACTAACTCCTAGgCC R : GGATCAATAAGCGATAATTTaATTTGAC	0.02	670
	Turkey	F : GTTTGCCCTCCCGAAACC R : ATAATGTGTTAATGTAAGTTTACGCTGCG	0.02	469

mation)에 등록된 소, 돼지, 닭, 오리, 말, 양, 염소, 칠면조의 미토콘드리아 DNA (16S RNA) 염기서열 정보를 바탕으로 상동성을 검사하여 축종별 종 특이적인 염기서열을 갖는 부분을 선발하였다. 각각의 구간에서 증폭하였을 때 각기 다른 크기의 PCR 증폭산물이 생성될 수 있는 프라이머를 제작한 후 8종의 축종에 대한 감별력이 있는 것을 최종 마커 후보도 선발하도록 최종 선발된 소, 돼지, 닭, 오리 4종의 프라이머 셋트와 말, 양, 염소, 칠면조 4종에 대한 각각의 마커는 150 bp이상에서 700 bp이하의 각기 다른 크기의 PCR 증폭산물이 생성될 수 있도록 설계하였다 (Table 1).

본 연구에서는 국내에서 축산물로 소비되고 있는 8종의 식육 중 주요 식품인 소, 돼지. 닭, 오리와 나머지 4종의 축종으로 구분하여 검사 비용 및 비특이 문제를 해결하여 검사의 정확도를 높이고자 Two set의 Primer를 이용하여 multiplex PCR법을 개발하였다. 즉, Set 1은 소, 돼지, 닭, 오리 검출용으로, Set 2는 양, 말, 염소, 칠면조를 한 번에 검출할 수 있는 용도로 구분하여 각각 4종 개체씩 섞인 게놈 DNA를 이용하였으며, 음성 대조군(negative control)으로는 증류수를 사용하여 교차오염의 여부를 확인하였다. 각각의 primer sequence와 multiplex PCR을 위한 DNA 농도는 Table 1과 같다.

Table 2. PCR reaction and condition of multiplex PCR for for identification of the eight animal species

Amplification reaction	Amplification condition			
2X PCR premix	10.0 μl	95°C	15min	1
Primer F(10p)	1.0 μl	95°C	30sec	
Primer R(10p)	1.0 μl	60°C	30sec	35
Template (5 ng/μl)	2.0 μl	72°C	1min	
D·W	6 μl	72°C	3min	1
Total	20 μl	10°C	forever	

Multiplex PCR 반응에는 Veriti 96 well Thermal Cycler (ABI, USA)를 사용하였고, PCR 반응조건은 95°C에서 15분간 전-변성(pre-denaturation)을 실시한 후 95°C에서 30초간 변성(denaturalization), 58°C에서 30초간 어닐링(annealing), 72°C에서 1분간 연장(extention)을 35 사이클로 수행한 후, 마지막으로 72°C에서 3분간 최종 연장 과정을 수행하였다 (Table 2). PCR 증폭 산물은 증폭된 단편의 크기가 예상된 대립유전자 크기 범위 내에 존재하는지와, PCR 조건의 적정성 여부를 확인하기 위하여 EtBr (ethidium bromide)이 포함된 3% 아가로스 젤에 전기영동하고 UV상에서 관찰하였다.

Multiplex PCR법의 특이도 및 민감도 조사

Multiplex PCR법의 특이도 및 검출한계의 조사를 위해 생육을 포함하여 인위적으로 제조한 국내 대표 식육인 소, 돼지, 닭고기 혼합하고, 식육가공품의 가공조건을 고려하여 열처리하였다. 즉, 쇠고기와 돼지고기, 돼지고기와 닭고기, 쇠고기와 닭고기 등 3종으로 각각 혼합하였다. 혼합비율은 두 종류의 비율이 각각 99.9%, 99%, 90%, 70%, 50%, 30%, 10%, 1%, 0.1%가 되도록 혼합하였다. 또한, 쇠고기, 돼지고기, 닭고기 혼합육에 해당하는 식육가공품의 가공조건을 고려하여, 83°C에서 30분, 100°C에서 20분, 121°C에서 10분으로 각각 열처리한 다음 축종감별의 특이

도와 민감도(검출한계)를 조사하였다.

Results and Discussion

Multiplex PCR법의 최적화

프라이머의 디자인은 PCR 진단법의 특이성을 결정하는데 있어서 가장 중요한 요소이다[19]. 또한, 가공식품의 경우 고압, 살균과 같은 가공처리 과정을 거치면서 단백질 변성 및 수용성 단백질 프로파일의 변화가 일어나기 때문에 최근에 단백질보다 상대적으로 안정성이 유지되는 DNA 분석을 통해 신속 정확하고 신뢰도 높은 PCR 기술로 원료성분을 분석하는 방법을 사용하고 있는 추세이다[1]. 또한, 제조공정 중 가열, 압력 등에 의하여 세포에 존재하는 유전자가 손상되어 PCR 방법을 적용하기 위해서는 PCR 산물의 크기는 가능한 200 bp 이내로 프라이머를 디자인해야 한다[2,27]. 또한, single PCR법의 경우에 식육품종이 많을 경우에 감별실험진행시 각 품종별 프라이머를 사용해야 하는 번거로움이 있다. multiplex PCR법의 경우 감별하고자 하는 품종을 동시에 진단할 수 있어 실험과정의 번거러움이 줄어 좀 더 신속하게 품종감별이 용이한 장점이 있어서 국내외에서 식육감별 목적으로 적용되었다[4,12,16]. 식육감별을 위한 Multiplex PCR법의 민감도는 축종, 유전자, 증폭 유전자의 길이 등에 의해서 차이를 나타낸다[12].

이러한 점을 고려하여 본 연구에서는 민감도 및 특이도가 높은 multiplex PCR법을 개발하고자 미국의 NCBI에 등록된 소, 돼지, 닭, 오리, 말, 양, 염소, 칠면조 8종의 미토콘드리아 16S RNA 염기서열 정보를 바탕으로 소 29개, 돼지 13개, 닭 18개, 오리 10개, 말 22개, 양 9개, 염소 5개, 칠면조 15개의 마커를 일차적으로 선발하였다. 선발된 마커를 이용하여 프라이머를 제작한 후 증폭시켰을 때 소, 돼지, 닭, 오리의 경우에는 50~500 bp 이하로, 말, 양, 염소, 칠면조의 경우에는 150~700 bp 이하의 각기 다른 크기의 PCR 증폭산물이 생성될 수 있도록, 그리고 다른 축종에 교차반응을 보이지 않도록 프라이머를 제작한 다음 축종별 10두씩 genomic DNA를 추출하여 검사를 실시한 결과 소, 오리, 말, 칠면조 4종의 각 프라이머의 경우에는 다른 종에서는 증폭되지 않는 것을 확인할 수 있었다. 이에 반하여 돼지, 양, 염소, 닭의 4종 각 프라이머는 다른 종에 결합하는 비특이 밴드를 형성하였다. 그리하여 특이도를 향상시키기 위해 야생형(wild type)의 염기 위치에 인위적인 미스매치(mismatch) 염기를 삽입하여 비특이 밴드가 증폭되지 않도록 하였다.

프라이머 이외에 multiplex PCR 검사법의 충족시키기 위해서는 PCR 온도 조건의 일치, 증폭산물의 적절한 크기, 표적 유전자 간에 교차반응을 제거해야 하는 등 여러 가지 조건이 만족되어져야 한다[16,28,31]. 이에 본 연구에서는 이러한 점을 감안하여 최종 선발된 종 특이적 전방향 및 역방향 프라이머 셋트에 대해 PCR 증폭산물의 강도를 고려하여 반응당 해당 프라이머의 농도를 Table 1에서와 같이 조절하고, PCR 반응 조건을 평가하였다. 그 결과 검사시료인 DNA (5 ng/uL) 2 uL와 프라이머 믹스 2 uL, 2 X PCR premix 10 uL, 증류수 6 uL를 첨가하여 95°C에서 15분간 전-변성을 실시한 후 95°C에서 30초간 변성, 60°C에서 30초간 어닐링, 72°C에서 1분간 연장을 35사이클 수행한 후 마지막으로 72°C에서 3분간 최종 연장 과정을 수행할 때 가장 적절한 반응 조건을 보이는 것으로 나타났다(Table 2).

Multiplex PCR법의 축종별 민감도 및 특이도

최종 선발된 축종별 PCR 프라이머를 이용하여 증폭된 단편의 크기가 예상된 대립유전자의 크기 범위 내에 존재하는지와 PCR 조건의 적정성을 재평가하기 위하여 본 연구에서 8종의 식육 274개 시료를 대상으로 특이도를 조사하였다. 그 결과 프라이머 Set 1(소, 돼지, 닭, 오리)에서는 소, 돼지, 닭, 오리 4종의 모든 시료의 축종에서 Fig. 1에서와 같이 각각 279, 94, 192, 477 bp의 특이 유전자 증폭산물을 확인할 수 있었다. 또한, 소, 돼지, 닭, 오리의 DNA를 혼합한 시료의 경우 각각의 축종 특이적인 PCR 증폭산물이 검출되었다(Fig. 2). 동일한 시료를 대상으로 프라이머 Set 2(말, 양, 염소, 칠면조)에 적용한 바, 말에서는 152 bp, 양은 271 bp, 염소는 670 bp, 칠면조는 469 bp에서 뚜렷한 PCR 유전자 산물이 확인되었지만, 소, 돼지, 닭, 오리의 시료에는 반응하지 않는 것으로 나타났다(Fig. 3). 또한, 말, 양, 염소, 칠면조와 소, 돼지, 닭, 오리의 DNA를 혼합한 시료에서도 위와 동일한 결과를 나타내었다(Data not shown).

또한, 본 연구에서 개발된 Multiplex PCR법의 검출한계를 조사하기 위하여 축종별로 DNA를 10 ng/μl으로 정량한 후 혼합물을 10배씩 단계 희석하여 반응여부를 조사한 결과, 소, 돼지, 오리에서 100 fg/uL 까지 검출되었고, 닭에서는 1 pg/uL 까지 검출됨을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이러한 결과는 국내에서 Ko 등(2011)[16]이 식육감별을 위하여 미토콘드리아 12S rRNA와 16S rRNA 유전자 종 특이적 BSGA multiplex PCR기법의 검출한계 조사에서 돼

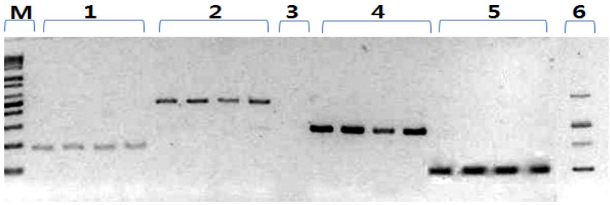

Fig. 1. PCR products for animal species identification of four meats (cow, pork, chicken and duck), respectively. M: 100 bp ladder, 1: chicken, 2: duck, 3: negative control, 4: cow, 5: pig, 6 mixed sample (cow, pork, chicken and duck).

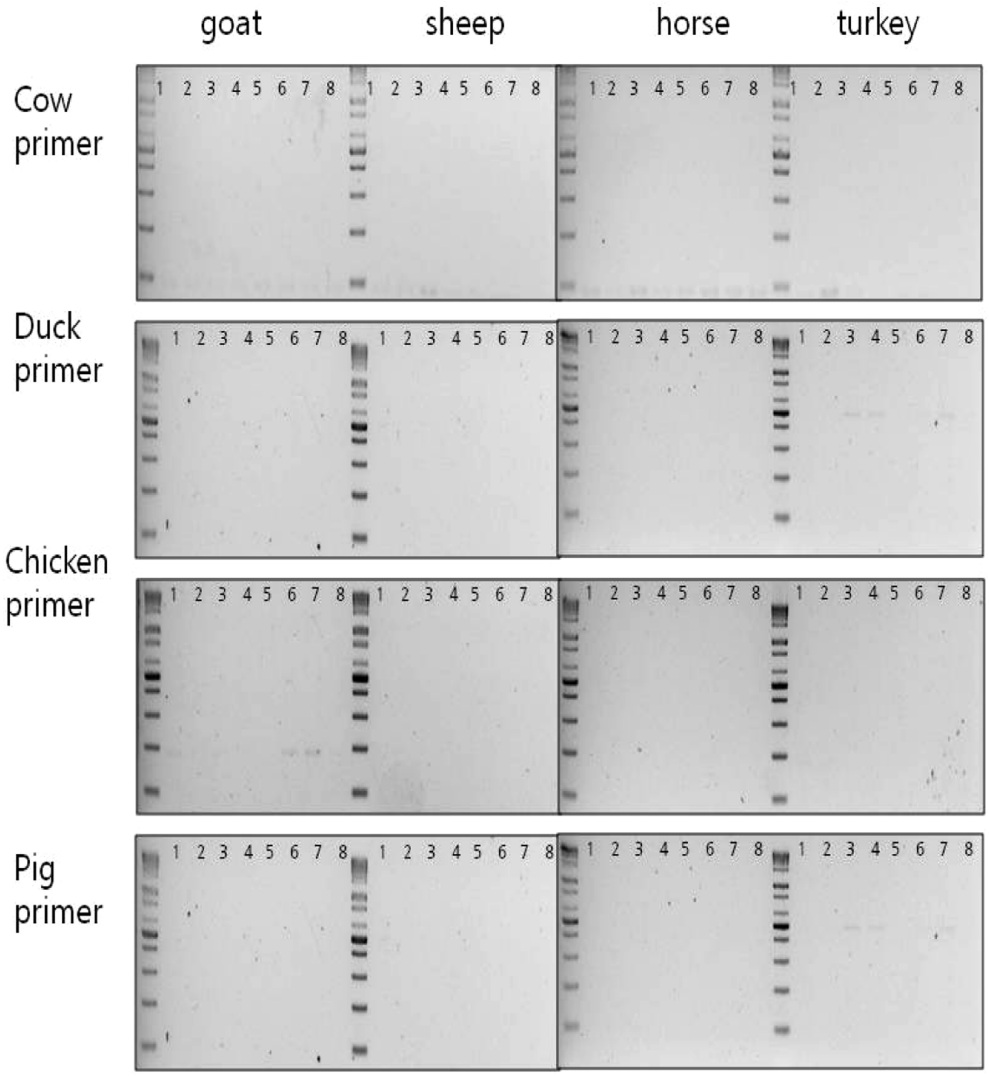

Fig. 2. Specificity test of 4 primer pairs (cow, pig, chicken and duck) for other four animals (goat, sheep, horse and turkey), respectively.

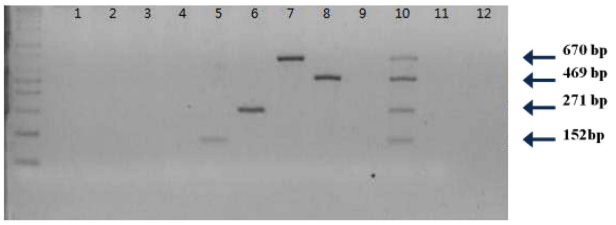

Fig. 3. PCR products for animal species identification of eight meats and mixed meats of eight types (Cow, Pig, Chicken, Duck, Horse, Sheep, turkey, goat), respectively. M: 100 bp ladder, 1: cow, 2: pig; 3: chicken, 4: duck, 5: horse, 6: sheep, 7: goat, 8: turkey, 9: mixed sample (cow, pork, chicken, duck), 10: mixed sample (horse, sheep, goat, turkey), 11 and 12: negative control.

지, 오리에서의 검출한계(1 pg/uL)및 소와 닭고기에서의 검출한계 100 fg/uL와 비교해 볼 때 닭을 제외한 나머지 축종에서 민감성이 더 높은 것으로 나타났다. 또한, Hou 등(2015)[12]이 소, 닭, 오리, 거위에서 multiplex PCR 검사법의 검출한계 0.05ng과 He 등(2015)[10]이 소, 돼지, 양, 오리 고기에서 multiplex PCR 검사법의 검출한계 0.1 ng과 Ali 등(2015)[4]이 고양이, 개, 돼지, 원숭이, 쥐의 식육에서의 검출한계 0.01-0.02 ng를 보인 성적과 비교할 때 본 연구에서 개발된 검사법의 검출한계가 우수한 것으로 나타났다.

한편, 본 연구에서 개발된 multiplex PCR법을 적용하여 국내에서 혼합육에 주로 사용되는 소와 돼지, 돼지와 닭, 소와 닭의 혼합 비율을 각각 99.9%, 99%, 90%, 70%, 50%, 30%, 10%, 1%, 0.1%의 비율로 혼합하여 검출한계를 조사하였다. 그 결과 모든 혼합육에서 마지막 단계의 희석 비율인 0.1% 농도에서도 증폭산물이 검출되었다(Fig. 5A). 또한, 혼합육을 식육가공조건을 고려하여 83°C 20분, 100°C 30분, 121°C 10분 동안 각각 열처리한 다음 축종별 검출한계를 조사한 결과, 소, 돼지고기에서는 0.1% 농도에서, 닭고기에서는 1% 농도에서도 증폭산물이 검출되었다(Fig. 5B). 이러한 결과는 Ha 등(2006)[9]이 12S rRNA-tRNA^{val}-

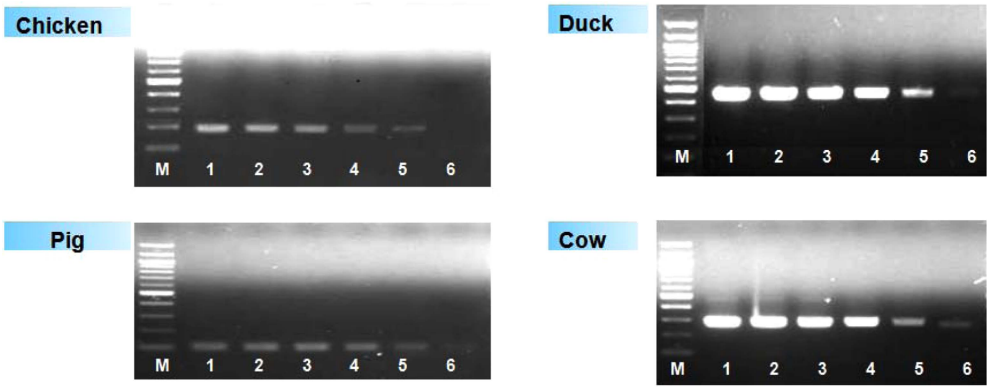

Fig. 4. Detection limit of multiplex PCR assay for four species (cow, pig, chicken and duck) with specific primer sets, respectively. The sensitivity of the assay was determined by amplifying 10-fold serial dilutions of DNA from cattle, pig, chicken and duck. Lanes 1 to 8, genomic DNA 7 fold diluted from 10 ng to 10fg. Lanes: (M) l kb (Qiagen); (1) 10 ng; (2) 1 ng; (3) 100 pg; (4) 10 pg; (5) 1 pg; (6) 100 fg.

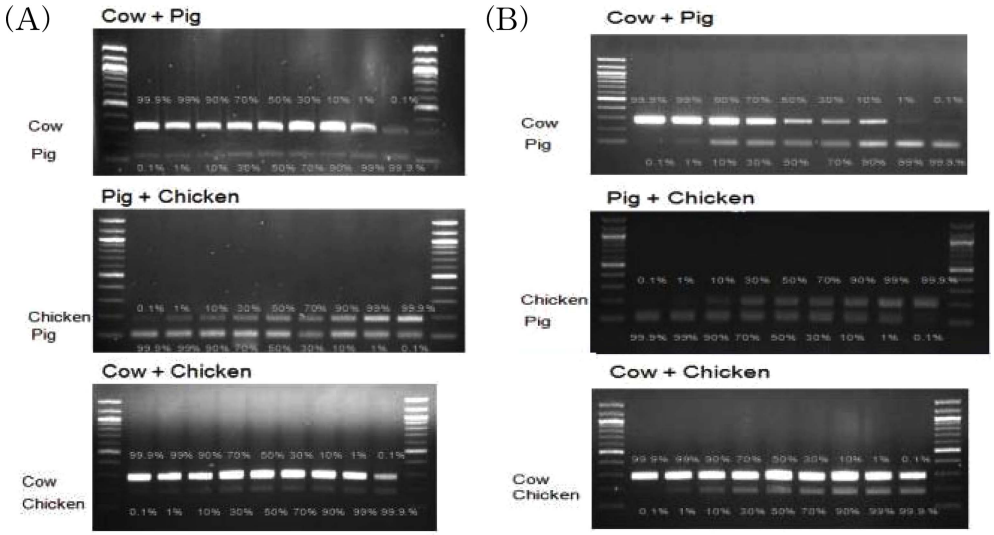

Fig. 5. Comparison of detection limit of mixed raw meats (A) and mixed raw meats were treated at 121°C for 10min (B) of cow, pig and chicken by multiplex PCR assay, respectively.

16S rRNA 부위로 소, 산양, 면양 그리고 사슴을 검출하고 감별하기 위해서 동일한 annealing 온도에서 99~108 bp 범위의 PCR 산물이 증폭되어 가열 처리된 식육에 대해서 감별이 가능하였고, 혼합된 시료에서 검출한계가 0.05%로 조사된 성적과 Ko 등(2011)[16]이 돼지 및 소고기 혼합육과 가열 처리육에서 식육감별을 위하여 미토콘드리아 12S rRNA와 16S rRNA 유전자 종 특이적 BSGA multiplex PCR기법으로 0.1% 조사한 성적과 유사하였다. 또한 Martín 등(2007a)[17]이 닭, 칠면조, 오리 그리고 거위를 감별하기 위해서 64~122 bp안의 범위에서 각기 다른 single PCR 온도조건에서 12S rRNA 유전자를 증폭하였고, 각각의 혼합 시료에서의 검출한계가 0.1%를 나타내었다. 또한 Hou 등(2015)[12]도 소, 돼지고기로부터 닭, 오리, 거위 혼합식육의 검출한계가 0.1%를 나타내어 본 연구 결과도 이와 비슷하게 나타났다. Pegels 등(2012)[26]이 TaqMan real time PCR 법으로 닭, 칠면조, 오리, 거위에서의 검출한계가 0.1%-1%로 보고된 성적과 비교시 유사한 결과를 나타내었다.

위와 같이 본 연구에서 개발되어진 소, 돼지, 닭, 오리의 4종 식육과 염소, 양, 말, 칠면조의 4종 식육을 동시에 감별할 수 있는 두 종류 set의 multiplex PCR법은 분쇄육 등 혼합식육과 열처리 혼합식육에 있어서 국내 대표 식육 8종을 감별하는데 있어서 유용하며, 특이도 및 민감도에 있어서도 우수한 것으로 평가되었다. 향후 다양한 축산물 가공품을 대상으로 축종감별에 대한 종합적인 평가가 이루어진다면 제품의 원재료 표시제를 비롯하여 식육감별을 위한 효과적인 방법으로 제시될 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgment

본 연구는 2012년도 농림축산검역본부의 연구개발사업

의 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구에서는 국내 대표 식육인 소, 돼지, 닭, 오리의 4종 식육과 염소, 양, 말, 칠면조의 4종 식육을 동시에 신속하게 감별할 수 있는 2 set의 multiplex PCR법을 개발하고자 미토콘드리아 16S RNA에서 종 특이부위를 선발하고 각 종에 대한 특이도를 높이기 위하여 인위적인 미스매치를 주어 프라이머를 제작한 후 8종 식육의 274개 시료를 대상으로 특이도와 민감도를 조사하였다. 그 결과 소, 돼지, 닭, 오리 모든 시료에서 각각 279, 94, 192, 477 bp의 증폭산물이, 말, 양, 염소, 칠면조의 모든 시료에서 각각 152 bp, 271 bp, 670 bp, 469 bp에서 뚜렷한 PCR 유전자 산물이 확인되어 모든 축종에서 100%의 특이도를 나타내어 축종별 감별력이 우수한 것으로 나타났다. 8종의 축종별로 DNA를 10 ng/μl으로 정량한 후 혼합물을 10배씩 단계 희석하여 반응여부를 조사한 결과, 소, 돼지, 오리에서는 100 fg까지, 닭에서는 1 pg까지 검출됨을 확인할 수 있었다. 소, 돼지, 닭, 오리고기를 99.9%, 99%, 90%, 70%, 50%, 30%, 10%, 1%, 0.1%의 비율로 혼합한 식육과 83°C 20분, 100°C 30분, 121°C 10분에서 각각 열처리한 가열 혼합육에 대하여 검출한계를 조사한 결과 마지막 단계의 희석 비율인 모든 혼합육의 0.1%에서 검출이 가능하였으며, 열처리 혼합육에서는 닭에서는 1% 농도에서 소와 돼지의 혼합육에서 0.1% 농도에서 검출되어 민감도가 높음을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 개발된 multiplex PCR법은 특이도 및 민감도에 있어서 국내 대표 식육을 감별하는데 있어서 유용한 것으로 평가된다.

References

1. Aida, A.A.: Analysis of raw meats and fats of pigs using polymerase chain reaction for Halal authentication. *Meat Sci.,* **69**, 47-52 (2005).
2. Ali, M.E., Hashim, U., Mustafa, S., Man, Y.C., Dhahi, T.S., Kashif, M.K., Uddin, and Hamid, S.A.: Analysis of pork adulteration in commercial meatballs targeting porcine-specific mitochondrial cytochrome b gene by TaqMan probe real-time polymerase chain reaction. *Meat Sci.*, **91**, 454-459 (2012).
3. Ali, M.E., Razzak, M.A., and Hamid, S.B.A.: Multiplex PCR in species authentication: probability and prospects. *Food Anal. Methods.*, **7**, 1933-1949 (2014).
4. Ali, M.E., Razzak, M.A., Hamid, S.B.A., Rahman, M.M., Al Amin, M., and Rashid, N.R.A.: Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods. *Food Chem.,* **177**, 214-224 (2015).
5. Ballin, N.Z.: Authentication of meat and meat products. *Meat Sci.,* **86**, 577-587 (2010).
6. Bottero, M.T., and Dalmasso, A.: Animal species identification in food products: evolution of biomolecular methods. *Vet. J.*, **190**, 34-38 (2011).
7. Dalmasso, A., Fontanella, E., Piatti, P., Civera, T., Rosati, S., and Bottero, M.T.: A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Mol. Cell Probes.*, **18**, 81-87 (2004).
8. Floren, C., Wiedemann, I., Brenig, B., Schütz, E., and Beck, J.: Species identification and quantification in meat and meat products using droplet digital PCR (ddPCR). *Food chemistry.*, **173**, 1054-1058 (2015).
9. Ha, J.C., Jung, W.T., Nam, Y.S., and Moon, T.W.: PCR identification of ruminant tissue in raw and heat-treated meat meals. *J. Food Prot*., **69**, 2241-2247 (2006).
10. He, H., Hong, X., Feng, Y., Wang, Y., Ying, J., Liu, Q., Qian Y., Zhou X., and Wang, D.: Application of Quadruple Multiplex PCR Detection for Beef, Duck, Mutton and Pork in Mixed Meat. *Journal of Food and Nutrition Research*, **3**, 392-398 (2015).
11. Heo, E.J., Ko, E.K., Seo, K.H., Kim, Y.J., Park, H.J., Wee, S.H. and Moon, J.S.: Validation of PCR and ELISA test kits for identification of domestic animal pecies in raw meat and meat products in Korea. *J. Fd. Hyg. Safety.,* **29**, 158-163 (2014).
12. Hou, B., Meng, X., Zhang, L., Guo, J., Li, S., and Jin, H.: Development of a sensitive and specific multiplex PCR method for the simultaneous detection of chicken, duck and goose DNA in meat products. *Meat Sci.,* **101**, 90-94 (2015).
13. Kane, D.E., and Hellberg, R.S.: Identification of species in ground meat products sold on the US commercial market using DNA-based methods. *Food Control.*, **59**, 158-163 (2016).
14. Kesmen, Z., Gulluce, A., Sahin, F., and Yetim, H. (2009) Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. *Meat Sci.*, **82**, 444-449.
15. Kim, S.E.: A study on livestock products preference and purchasing behaviors. *Korean Journal of Human Ecology*, **15**, 501-512. (2006).
16. Ko., B. R. D., Kim, J.Y., Na, H.M., Park, S.D. and Kim., Y.H.: Development of species-specific multiplex PCR assay of mitochondrial 12S rRNA and 16S rRNA for the identification of animal species. *Korean J. Vet. Serve*., **34**, 417-428 (2011).
17. Martín, I., García, T., Fajardo, V., López-Calleja, I., Rojas, M., Pavón, M.A., Hernández, P.E., González, I., and Martín, R.: Technical note: detection of chicken, turkey, duck, and goose tissues in feedstuffs using species-specific polymerase chain reaction. *J. Anim. Sci.,* **85**, 452-458 (2007a).
18. Martín, I., García, T., Fajardo, V., Rojas, M., Hernández, P.E., González, I., and Martín, R.: Technical note: Detection of cat, dog, and rat or mouse tissues in food and animal feed using species-specific polymerase chain reaction. *J. Anim. Sci.,* **85**, 2734-2739 (2007b).
19. Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Shibata, K., Yamada, Y., and Shinmura, Y.: A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Sci.,* **51**, 143-148 (1999).

20. MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). Standards for processing and ingredients specifications of Livestock products (MFDS notice 2016-14).
21. Montiel-Sosa, J.F., Ruiz-Pesini, E., Montoya, J., Roncalés, P., López-Pérez, M.J., and Pérez-Martos, A.: Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. *J. Agric. Food Chem.,* **48**, 2829-2832 (2000).
22. Park, J.K., Shim, K.H., Shin, S.C., Chung, K.Y. and Chung, E.R.: Identification of meat species using species-specific PCR-RFLP fingerprint of mitochondrial 12S rRNA gene. *Korean J. Food Sci. Anim Res.,* **27**, 209-215 (2007).
23. Park, Y.C., Ahn, C.Y., Jin, S.O., Lim, J.Y., Kim, K.H., Lee, J.H., Cho, T.Y., Lee, H.J., Park, K.S., and Yoon, H.S.: Identification of raw materials in processed meat products by PCR using species-specific primer. *J. Fd Hyg. Safety* **27**, 68-73 (2012).
24. Patil, M.R., Bannalikar, A.S., and Arora, A.V.: Identification of chicken and dog meat by mitochondrial 12S rRNA gene PCR-RFLP. *J. Cell. Tissue. Res*., **15**, 4715-4720 (2015).
25. Paul, D.N., Hebert, A.C., Shelley, L.B., and Jeremy, R.D.: Biological identifications through DNA Barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B*., **270**, 313-321 (2003).
26. Pegels, N., González, I., López-Calleja, I., Fernández, S., García, T., and Martín, R.: Evaluation of a TaqMan real-time PCR assay for detection of chicken, turkey, duck, and goose material in highly processed industrial feed samples. *Poult Sci*., **91**, 1709-1719 (2012)
27. Rahman, M.M., Ali, M.E., Hamid, S.B.A., Mustafa, S., Hashim, U., and Hanapi, U.K.: Polymerase chain reaction assay targeting cytochrome b gene for the detection of dog meat adulteration in meatball formulation. *Meat Sci.*, **97**, 404-409 (2014).
28. Sint, D., Raso, M., and Traugott, M.: Advances in multiplex PCR: Balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods Ecol. Evol*., **3**, 898-905 (2012).
29. Tanabe, S., Miyauchi, E., Muneshige, A., Mio, K., Sato, C., and Sato, M.: PCR method of detecting pork in foods for verifying allergen labeling and for identifying hidden pork ingredients in processed foods. *Biosci. Biotechnol. Biochem.,* **71**, 1663-1667 (2007).
30. Tobe, S.S., and Linacre, A.M.: A multiplex assay to identify 18 European mammal species from mixtures using the mitochondrial cytochrome b gene. *Electrophoresis.,* **29**, 340-347 (2008).
31. Weissenberger, M., Reichert, W., and Mattern, R.: A Multiplex PCR assay to differentiate between dog and red fox. *Forensic Sci Int Genet*., **5**, 411-414 (2011).