



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년02월20일
(11) 등록번호 10-1829230
(24) 등록일자 2018년02월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6888 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0167241
(22) 출원일자 2016년12월09일
심사청구일자 2016년12월09일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020160080858 A*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김의경
경상남도 진주시 가호로 26, 204동 703호 (가좌동, 가좌주공아파트)
허윤위
경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 이재영

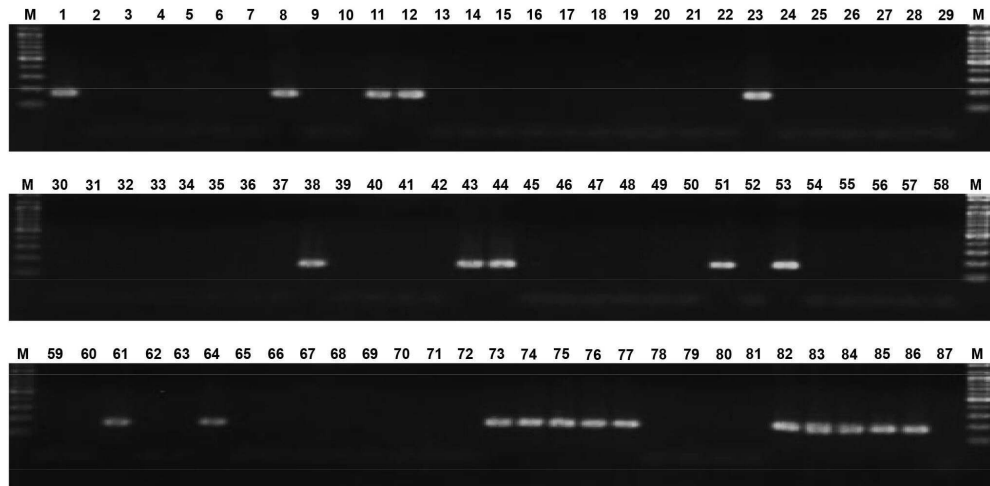
(54) 발명의 명칭 **축산물 가공품에서 원료육을 검출하기 위한 프라이머 세트 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트, 및 서열번호 5 및 서열번호 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는 축산물 가공품에서 축산물 원료육을 검출하기 위한 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트 및 상기 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 이용하여 축산물 가공품에서 축산물 원료육을 검출하는 방법에 관한 것으로, 본 발명의 방법은 식품원료의 허위 기재를 명확하게 구분할 수 있어 가공품의 안정성 확보에 기여할 수 있으며, 수출입 축산물 가공품의 검열 또는 할랄(Halal) 식품들의 성분검사 등에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도2a

a. 소고기 검출 결과



(72) 발명자

황두현

경상남도 진주시 초장로14번길 29, 206동 502호

권영철

부산광역시 사하구 하신번영로159번길 5 (신평동)

(56) 선행기술조사문헌

JP2003230383 A*

KR1020160058301 A

KR1020120038037 A

Shabani et al. Food Chemistry 184 (2015)
203-206

Yang et al. SCIENTIFIC REPORTS vo. 4 no.
4089, pp.1-11

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 및 서열번호 2의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트, 및 서열번호 5 및 서열번호 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 포함하는, 축산물 가공품에서 소고기, 돼지고기 또는 닭고기를 검출하기 위한 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 축산물 가공품에서 소고기, 돼지고기 또는 닭고기를 검출하기 위한 키트.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 완충액을 포함하는 것인 키트.

청구항 6

축산물 가공품에서 총 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 총 DNA를 주형으로 하고, 제1항의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 축산물 가공품에서 소고기, 돼지고기 또는 닭고기를 검출하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열은 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질로 표지되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 증폭 산물의 검출은 DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 축산물 가공품에서 축산물 원료육을 검출하기 위한 프라이머 세트 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 축산물 가공품으로부터 직접 해산 시료를 추출하고 중합효소연쇄반응을 통하여 가공품에 사용된 축산물 원재료(소고기, 돼지고기 또는 닭고기)의 성분을 판별하는 것에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 축산물 가공품의 규모는 2012년에 1조 1천 2백억 원을 형성할 정도로 소비가 증가하고 있으나 그 원재료를 눈으

로 확인할 수 없기에 안정성 등의 문제가 있다. 특히 값싼 식품원료를 사용하거나 식품의 원재료 명을 허위로 기재한 가짜 식품에 의해 알레르기 질환이 유발되는 등의 사건사고가 비일비재하여 소비자들의 불안감이 높아지고 있다. 이에 축산물 가공품을 대상으로 축산물 원재료 성분을 정확하게 검출할 수 있는 방법이 요구되고 있다.

[0003] 기존의 축산물 원재료 판별방법은 축산물 가공품에 사용된 축산물 식육 원재료(가공되지 않은 날 것의 식육)에서 총 DNA를 추출하여 중합효소연쇄반응(PCR) 방법으로 식육 원재료를 판별하는 것으로, 축산물 가공품 그 자체를 시료로 하여 축산물 원재료를 판별하는 방법은 개발된 것이 없는 실정이다.

[0004] 이에 본 발명자들은 기존의 축산물 식육 원재료에서 총 DNA를 추출하여 PCR로 식육 원재료를 판별하는 방법과는 다르게, 다양한 식품 첨가제가 함유되어 있는 축산물 가공품으로부터 직접 총 DNA를 추출하고 소고기, 돼지고기, 닭고기의 표적 유전자를 증폭할 수 있는 특이적인 프라이머를 제작한 후 PCR 조건을 최적화하여 축산물 가공품에 사용된 식육 원재료를 정확하게 판별하는 방법을 개발하였다.

[0005] 한편, 한국등록특허 제1296221호에는 '중합효소연쇄반응을 이용한 축종 판별방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제0527793호에는 '한우육 판별을 위한 프로브 및 이를 이용한 한우육 판별방법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 축산물 가공품으로부터 원료육을 검출하기 위한 프라이머 세트 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 기존의 알려진 식육 원재료 판별용 PCR 프라이머들은 축산물 가공품 그 자체를 시료로 하여 PCR을 수행할 경우 가공품에 첨가된 다양한 식품 첨가제에 의한 PCR 반응 억제로 인해 정확한 분석 결과를 얻기가 어려운 문제점이 있어, 본 발명자들은 축산물 가공품으로부터 직접 총 DNA를 추출하고, 소고기, 돼지고기 및 닭고기의 각 축종에 선택적으로 결합하는 신규의 프라이머를 제작하여 PCR 반응의 조건을 최적화하였다. 그 후, 상기 추출된 DNA 시료를 대상으로 각 축종의 함유 유무를 감별한 결과 시판되고 있는 다양한 축산물 가공품에서 각 축종 성분의 함유를 정확하게 판별함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트, 및 서열번호 5 및 서열번호 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는, 축산물 가공품에서 축산물 원료육을 검출하기 위한 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 축산물 가공품에서 축산물 원료육을 검출하기 위한 키트를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 축산물 가공품에서 직접 총 DNA를 분리하고 상기 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 이용하여 축산물 가공품에서 축산물 원료육을 검출하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 축산물 가공품에서 축산물 원료육을 검출하는 방법은 축산물 가공품으로부터 직접 DNA 시료를 추출하여 각 축종의 사용여부를 검출하는 것으로, 식품원료의 허위 기재를 명확하게 구분할 수 있어 가공품의 안정성 확보에 기여할 수 있으며, 수출입 축산물 가공품의 검열 또는 할랄(Halal) 식품들의 성분검사 등 축산물 가공품을 대상으로 성분 함유 유무를 감별하는 분야에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 소고기, 돼지고기 및 닭고기 식육으로부터 추출한 총 DNA를 이용하여 본 발명의 프라이머를 사용한 PCR 반응산물의 전기영동 결과이다. A, 소고기에 특이적인 프라이머를 이용한 PCR 결과; B, 돼지고기에 특이적인 프라이머를 이용한 PCR 결과; C, 닭고기에 특이적인 프라이머를 이용한 PCR 결과; M, 100bp DNA 크기 마커; 1, 소고기; 2, 돼지고기; 3, 닭고기; 4, 오리고기.

도 2는 표 1의 축산물 가공제품을 대상으로 본 발명의 소고기에 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 결

과(a)와 표 1의 축산물 가공제품을 대상으로 본 발명의 돼지고기에 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 결과(b) 및 표 1의 축산물 가공제품을 대상으로 본 발명의 닭고기에 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 결과(c)를 보여주는 겔 사진이다.

도 3은 공지된 프라이머를 이용하여 표 1의 축산물 가공제품을 대상으로 축산물 원료육을 확인한 PCR 결과로, a는 소고기, b는 돼지고기 그리고 c는 닭고기에 특이적인 프라이머를 사용한 결과이다. 각 도면에서 붉은색으로 표시된 시료번호는 해당 축종의 원료육이 포함된 시료를 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 및 2의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트, 서열번호 3 및 4의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트, 및 서열번호 5 및 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는 축산물 가공품에서 원료육을 검출하기 위한 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 제공한다.
- [0013] 본 발명의 '축산물 가공품'은 포장육, 양념육, 소시지, 햄, 베이컨, 육포 등의 축산물을 주원료로 한 식육가공품을 의미하며, '원료육'은 상기 축산물 가공품 제조에 사용된 소고기, 돼지고기 또는 닭고기 등의 축산물 원재료 성분을 의미한다.
- [0014] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 바람직하게는 상기 3개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상, 2개 이상의 프라이머 세트를 포함할 수 있고, 3개의 프라이머 세트 모두를 포함할 수도 있다.
- [0015] 본 발명의 상기 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트들은, 소고기의 미토콘드리아 16S rRNA 유전자를 증폭하는 서열번호 1 및 서열번호 2의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트, 돼지고기의 시토크롬 B(cytochrome B) 유전자를 증폭하는 서열번호 3 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트 및 닭고기의 시토크롬 B 유전자를 증폭하는 서열번호 5 및 서열번호 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트로, 서열번호 1, 3, 및 5는 정방향 프라이머이며, 서열번호 2, 4, 및 6은 역방향 프라이머이다.
- [0016] 본 발명의 상기 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 각 프라이머의 서열 길이에 따라, 서열번호 1 및 2; 서열번호 3 및 4; 및 서열번호 5 및 6 내의 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 서열번호 1의 프라이머(22개 올리고뉴클레오타이드)는 서열번호 1의 서열 내의 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상의 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 서열번호 1 및 2; 서열번호 3 및 4; 및 서열번호 5 및 6의 염기서열의 부가, 결실 또는 치환된 서열도 포함할 수 있다.
- [0017] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 복제하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥의 올리고뉴클레오타이드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다. 상기 프라이머의 길이 및 서열은 연장 산물의 합성을 시작하도록 허용해야 한다. 프라이머의 구체적인 길이 및 서열은 요구되는 DNA 또는 RNA 표적의 복잡도(complexity) 뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 의존할 것이다.
- [0018] 본 명세서에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)을 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)을 포함할 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 포함하는, 축산물 가공품에서 원료육을 검출하기 위한 키트를 제공한다. 본 발명의 키트에서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs, 버퍼 등을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, PCR 완충액 제조 방법, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물이다. 안내서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨, 및 키트를 포함하는 패키지의 표면에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.
- [0020] 본 발명은 또한,
- [0021] 축산물 가공품에서 총 DNA를 분리하는 단계;

- [0022] 상기 분리된 총 DNA를 주형으로 하고, 상기의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- [0023] 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 축산물 가공품에서 원료육을 검출하는 방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명의 방법은 축산물 가공품에서 직접 총 DNA를 분리하는 단계를 포함한다. 상기 시료에서 총 DNA를 분리하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, CTAB 방법을 이용할 수도 있고, Wizard prep 키트(Promega 사)를 이용할 수도 있다. 상기 분리된 총 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 일 실시예에 따른 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 프라이머로 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다. 표적 핵산을 증폭하는 방법은 중합효소연쇄반응(PCR), 리가아제 연쇄반응(ligase chain reaction), 핵산 서열 기재 증폭(nucleic acid sequence-based amplification), 전사 기재 증폭 시스템(transcription-based amplification system), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 또는 Q β 복제효소(replicase)를 통한 증폭 또는 당업계에 알려진 핵산 분자를 증폭하기 위한 임의의 기타 적당한 방법이 있다. 이 중에서, PCR이란 중합효소를 이용하여 표적 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍으로부터 표적 핵산을 증폭하는 방법이다. 이러한 PCR 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 상업적으로 이용가능한 키트를 이용할 수도 있다.
- [0025] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열은 검출가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 일 구현 예에서, 상기 표지 물질은 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 표지 물질은 Cy-5 또는 Cy-3이다. 표적 서열의 증폭시 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다. 또한, 방사성 물질을 이용한 표지는 PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하면 증폭 산물이 합성되면서 방사성이 증폭 산물에 혼입되어 증폭 산물이 방사성으로 표지될 수 있다. 표적 서열을 증폭하기 위해 이용된 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 상기에 기재된 바와 같다.
- [0026] 본 발명의 방법에 있어서, 축산물 가공품에서 원료육을 검출하기 위한 방법은 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하며, 상기 증폭 산물의 검출은 DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 증폭 산물을 검출하는 방법 중의 하나로서, 겔 전기영동을 수행할 수 있다. 겔 전기영동은 증폭 산물의 크기에 따라 아가로스 겔 전기영동 또는 아크릴아미드 겔 전기영동을 이용할 수 있다. 또한, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지되며, 이렇게 표지된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다. 또한, 방사성 측정 방법은 PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하여 증폭 산물을 표지한 후, 방사성 측정기구, 예를 들면, 가이거 계수기(Geiger counter) 또는 액체 섬광계수기(liquid scintillation counter)를 이용하여 방사성을 측정할 수 있다.
- [0027] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] **재료 및 방법**
- [0029] **축산물 가공품 구입**
- [0030] 축산물 가공품으로부터 원료육 성분을 검출하기 위한 PCR 방법을 개발하기 위하여 경상남도 진주시에 위치하는 대형마트의 축산물 가공식품 매장에서 판매중인 제품들을 무작위로 구매하였다. 구매한 축산물 가공품의 원료표시문구에 기재된 원료육 종류를 정리하면 하기 표 1과 같다.

표 1

축산물 가공제품의 축산물 원료육 구성표

가공품	돼지고기	닭고기	소고기	오리고기	가공품	돼지고기	닭고기	소고기	오리고기
1	+	-	+	-	45	+	-	-	-
2	+	-	-	-	46	+	-	-	-
3	+	-	-	-	47	+	+	-	-
4	+	-	-	-	48	+	+	-	-
5	+	-	-	-	49	+	+	-	-
6	+	-	-	-	50	+	-	-	-
7	+	-	-	-	51	-	-	+	-

8	+	-	+	-	52	-	-	-	+
9	+	-	-	-	53	-	-	+	-
10	+	-	-	-	54	+	-	-	-
11	+	-	+	-	55	+	-	-	-
12	+	-	+	-	56	+	-	-	-
13	+	+	-	-	57	+	-	-	-
14	-	+	-	-	58	-	+	-	-
15	-	+	-	-	59	+	-	-	-
16	-	+	-	-	60	+	-	-	-
17	-	-	-	+	61	+	-	+	-
18	-	+	-	-	62	+	-	-	-
19	-	+	-	-	63	+	-	-	-
20	-	+	-	-	64	+	-	+	-
21	+	-	-	-	65	-	+	-	-
22	+	+	-	-	66	-	+	-	-
23	+	-	+	-	67	-	+	-	-
24	-	-	-	+	68	-	+	-	-
25	+	-	-	-	69	-	+	-	-
26	+	+	-	-	70	+	+	-	-
27	+	-	-	-	71	+	-	-	-
28	+	-	-	-	72	+	-	-	-
29	+	-	-	-	73	-	-	+	-
30	+	+	-	-	74	+	-	+	-
31	+	-	-	-	75	+	-	+	-
32	+	-	-	-	76	+	+	+	-
33	+	-	-	-	77	+	-	+	-
34	-	+	-	-	78	+	-	-	-
35	+	-	-	-	79	+	-	-	-
36	+	-	-	-	80	+	-	-	-
37	+	-	-	-	81	+	+	-	-
38	+	+	+	-	82	-	-	+	-
39	+	-	-	-	83	-	-	+	-
40	+	+	-	-	84	-	-	+	-
41	+	-	-	-	85	-	-	+	-
42	+	-	-	-	86	-	-	+	-
43	+	-	+	-	87	-	+	-	-
44	-	-	+	-					

[0032] 총 DNA 추출 및 정량

[0033] PCR 반응의 양성 대조군으로 소고기, 돼지고기, 닭고기 그리고 오리고기 생육을 이용하였다. 대조군 생육 및 축산물 가공식품 20 mg을 BioMasher II 1회용 균질기(Nippi Inc., 일본)로 분쇄하고, ExgeneTM Cell SV 키트(GeneAll, 한국)를 이용하여 제조사의 지침대로 실시하여 총 DNA를 추출하였다. 추출된 총 DNA는 NanoDrop 1000(Thermo fisher scientific, 미국)을 통하여 정량한 후 일정량을 PCR 반응에 사용하였다.

[0034] 프라이머 제작 및 중합효소연쇄반응(PCR)

[0035] 소고기, 돼지고기, 닭고기에 특이적으로 결합하는 프라이머는 각 원료육에 해당하는 미토콘드리아 DNA(mtDNA) 유전체를 Genbank(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)에서 찾아, 전체를 ClustalW Omega 프로그램(<https://www.clustal.org>)을 이용하여 상동성을 확인한 후, 각각의 원료육에 상동성이 없는 부위를 찾아 최대한 원료육 간에 프라이머의 비특이적 결합(non-specific binding) 부위를 피해 제작하였다. 제작된 소고기, 돼지고기 또는 닭고기에 특이적인 프라이머 정보는 하기 표 2와 같다.

표 2

[0036]

본 발명의 프라이머 염기서열 정보

	프라이머	프라이머 염기서열(5'→3')	표적 유전자
소고기 (cattle)	CF	CTCACAACAGTTTACCAAGAAC (서열번호 1)	mitochondrial 16S rRNA
	CR	GCTACAGTGGGGTTTATTTG (서열번호 2)	
돼지고기 (porcine)	PF	TTACCGTTATAGCAACAGCC (서열번호 3)	시토크롬 B
	PR	GAGGGCGGTAATGATGAATG (서열번호 4)	
닭고기 (chicken)	CHF	CAAACGGCGCCTCATTCTTC (서열번호 5)	시토크롬 B
	CHR	TTGCAAAGGGGAGGAGGAAG (서열번호 6)	

[0037]

또한, 현재 축산물 원료육의 종류를 확인할 수 있는 것으로 검증된 공지된 PCR 프라이머 서열을 합성하여 비교 실험을 함께 수행하였다. 비교 실험에 사용된 PCR 프라이머는 Tanabe S 등(2007, *Biosci. Biotechnol. Biochem* 71:3131-3135)의 저널을 참고하였으며, 프라이머 서열정보는 하기 표 3과 같다.

표 3

공지된 프라이머 염기서열 정보

	프라이머	프라이머 염기서열(5'→3')	반응산물	표적 유전자
소고기	CF3	CCCGATTCTTCGCTTCCAT (서열번호 7)	120bp	시토크롬 B
	CR3	CTACGTCTGAGGAAATTCCTGTTG (서열번호 8)		
돼지고기	PF3	CTTGCAAATCCTAACAGGCCTG (서열번호 9)	132bp	시토크롬 B
	PR3	CGTTTGCAATGTAGATAGCGAATAAC (서열번호 10)		
닭고기	CEF3	TCTGGGCTTAACCTCATACTCACC (서열번호 11)	106bp	시토크롬 B
	CER3	GGTTACTAGTGGGTTTGCTGGG (서열번호 12)		

[0038]

[0039]

PCR 반응은, 소고기 검출의 경우 총 DNA를 5ng/μl의 농도로, 돼지고기의 경우 15ng/μl, 그리고 닭고기의 경우는 1ng/μl의 농도를 사용하였으며, 10pmole 농도의 정방향 및 역방향 프라이머는 각 2μl, dNTPs(2.5mM each)는 4μl, 10X PCR 버퍼(MgCl₂ 포함)는 5μl를 사용하였고, 1 유닛의 Taq DNA 중합효소를 넣고 최종 반응량을 50μl가 되게끔 멸균 정제수로 맞춘 후, Bio-Rad T100 PCR 기기(Bio-Rad, 미국)를 이용하여 수행하였다. PCR 수행조건은 하기 표 4와 같다.

표 4

PCR 조건 및 부산물 크기

target material	primer name	Steps	Temp	Time	Cycle	PCR product size (bp)
cattle	CF CR	Initial denaturation	94°C	10 min	1	167
		denaturation	94°C	1 min		
		annealing	62°C	15 sec	35	
		extension	72°C	45 sec		
		Last extension	72°C	5 min	1	
target material	primer name	Steps	Temp	Time	Cycle	PCR product size (bp)
porcine	PF PR	Initial denaturation	94°C	10 min	1	215
		denaturation	94°C	1 min		
		annealing	60°C	10 sec	35	
		extension	72°C	45 sec		
		Last extension	72°C	5 min	1	
target material	primer name	Steps	Temp	Time	Cycle	PCR product size (bp)
chicken	CHF CHR	Initial denaturation	94°C	10 min	1	315
		denaturation	94°C	1 min		
		annealing	62°C	30 sec	35	
		extension	72°C	45 sec		
		Last extension	72°C	5 min	1	

[0040]

[0041]

최종 PCR 반응산물의 확인은 PCR 반응 산물에 6X DNA 로딩 시약을 10 μ l 첨가하여 교반한 후 2% 아가로즈 겔에 로딩하고, 100V의 전력으로 30분간 전기영동하였다. 그 후, 겔을 EtBr(1 μ g/ml)로 염색하여, gel-doc(Bio-Rad) 기기를 이용하여 촬영하였다.

[0042]

실시예 1. 축산물 가공품에서 축산물 원료육 성분 분석

[0043]

시중에 유통되고 있는 축산물 가공품(표 1)을 대상으로 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 축산물 원료육 성분의 유무를 확인하였다.

[0044]

그 결과, 본 발명의 프라이머를 이용한 축산물 가공품 내의 축산물 원료육 함유 유무 결과는, 표 1에 기재된 각 가공품의 원재료(원료육) 표시 사항과 일치하게 확인되었다(도 2). 즉, 본 발명의 프라이머 세트 및 PCR 조건들이, 다양한 식품 첨가물이 포함되어 있는 가공처리된 축산물 가공품에서부터 직접 핵산 시료를 추출하여 PCR을 수행하여도 원료육 성분을 명확하게 확인할 수 있음을 상기의 결과를 통해 알 수 있었다.

[0045]

반면, 소고기, 돼지고기 또는 닭고기를 확인할 수 있는 것으로 기존에 공지된 프라이머를 이용한 축산물 가공품에서 축산물 원료육 판별 실험 결과에서는 표 1에 기재된 사항과 일치하지 않는 음성의 결과가 확인되었다(도 3). 구체적으로는, 소고기의 시토크롬 B를 표적으로 하는 종 특이적 프라이머를 이용한 PCR 결과, 도 3a에서 확인되는 바와 같이 한 개의 시료에서는 양성(+)의 결과가 확인되었으나(시료 번호 1), 일부의 시료에서는 비특이적 반응으로 두 개의 PCR 반응 산물이 확인되었으며(시료번호 23, 44, 53), 그 외의 시료에서는 PCR 반응이 일어나지 않았음을 확인할 수 있었다(시료번호 8, 11, 12, 38, 43, 51). 즉 공지된 프라이머를 이용한, 축산물 가공식품으로부터 직접 핵산을 추출하여 PCR 반응을 수행한 실험 결과에서는 원료육 함유 유무를 명확하게 판별할 수 없었다. 돼지고기와 닭고기의 경우에도 소고기의 경우와 유사하게, 공지된 프라이머를 이용한 축산물 가공식품으로부터 직접 핵산을 추출하여 PCR 반응을 수행한 실험 결과에서는 원료육 함유 유무를 명확하게 판별할 수 없었다.

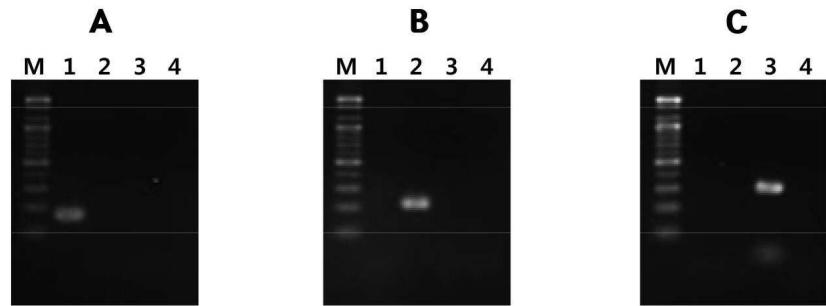
[0046]

상기의 결과를 통해, 본 발명의 각 축종에 대한 특이적 프라이머 세트 및 이를 이용한 축산물 가공품으로부터

원료육을 검출하는 방법은 다양한 첨가물들이 포함되어 있는 가공품으로부터 직접 핵산 시료를 추출하여 원료육을 명확하게 확인할 수 있음을 알 수 있었다. 이에 본 발명의 방법은 추후 축산물 가공품에서 원료 성분의 허위 기재 등을 판별하는 것과 같은 식품 안정성 검사 분야에서 그 활용성이 클 것으로 예상되었다.

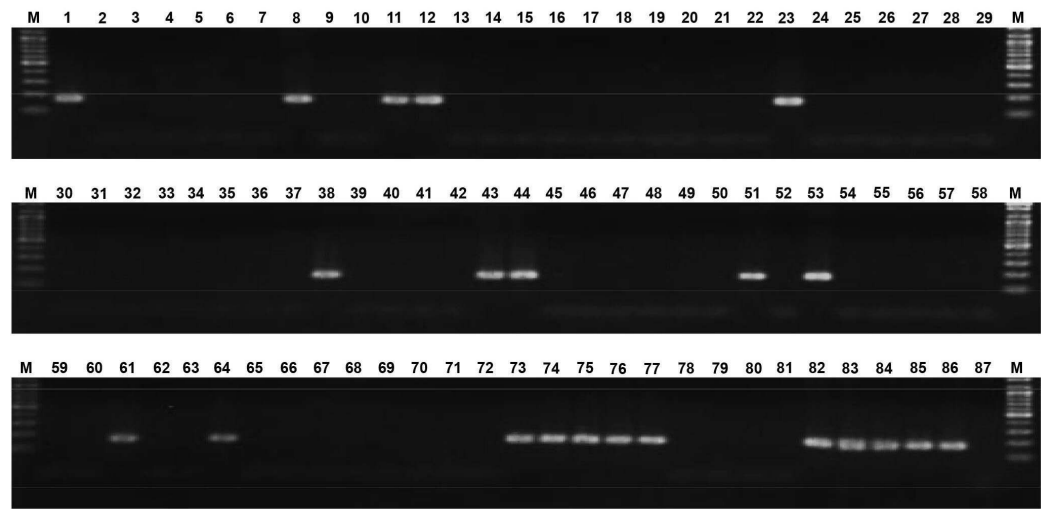
도면

도면1



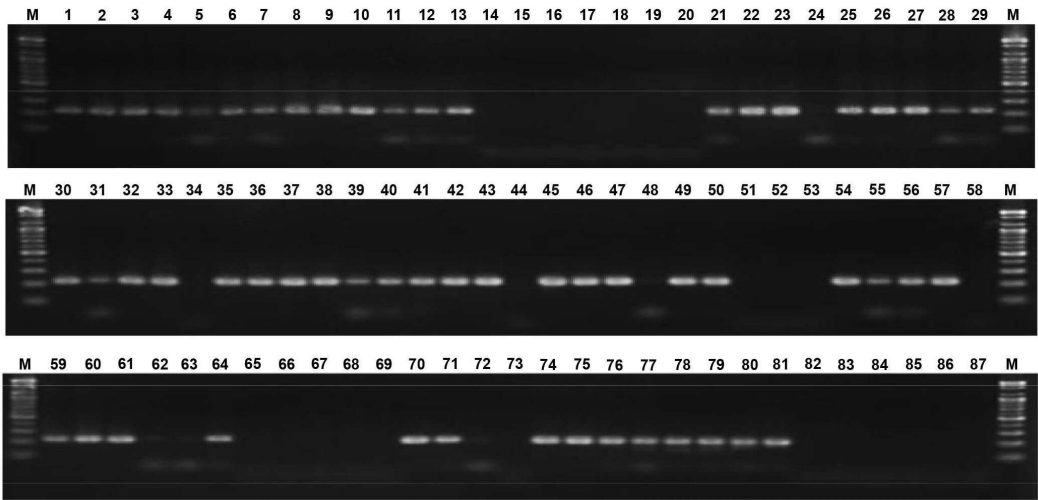
도면2a

a. 소고기 검출 결과



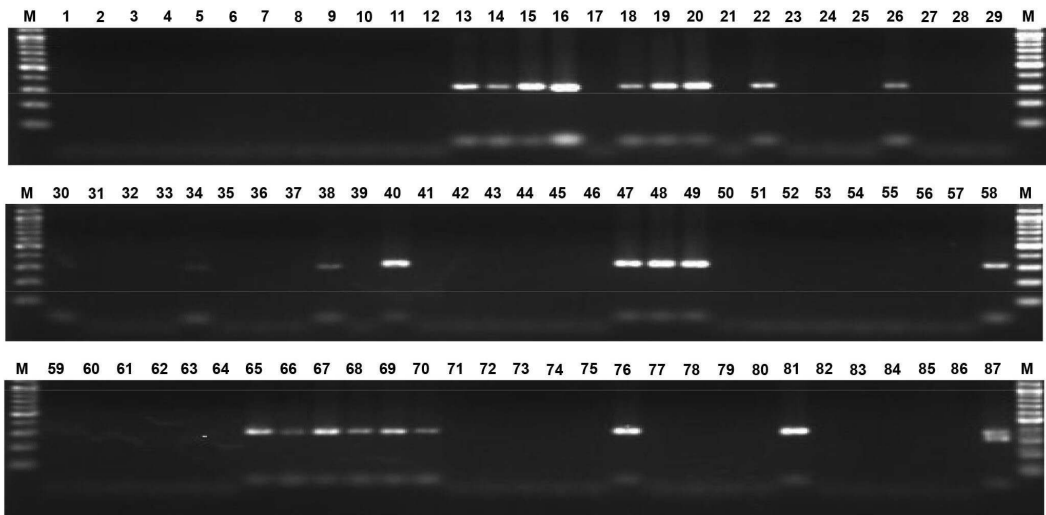
도면2b

b. 돼지고기 검출 결과



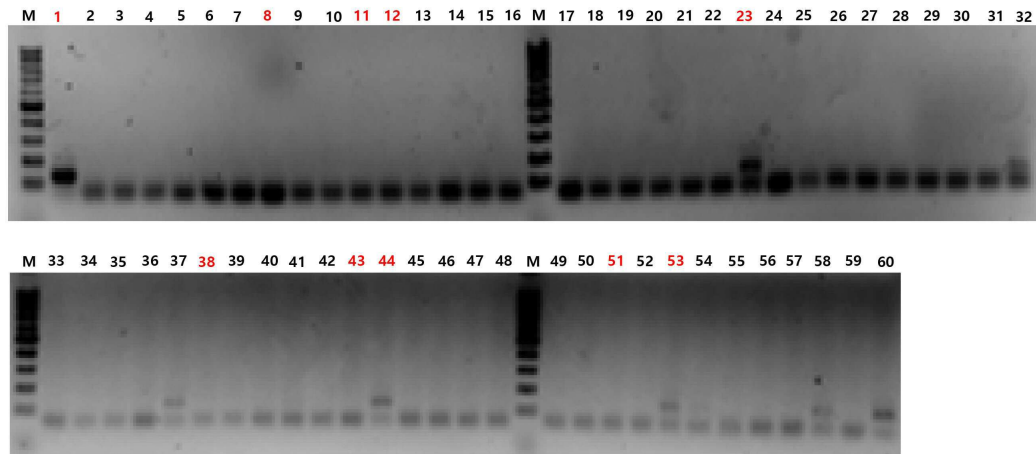
도면2c

c. 닭고기 검출 결과



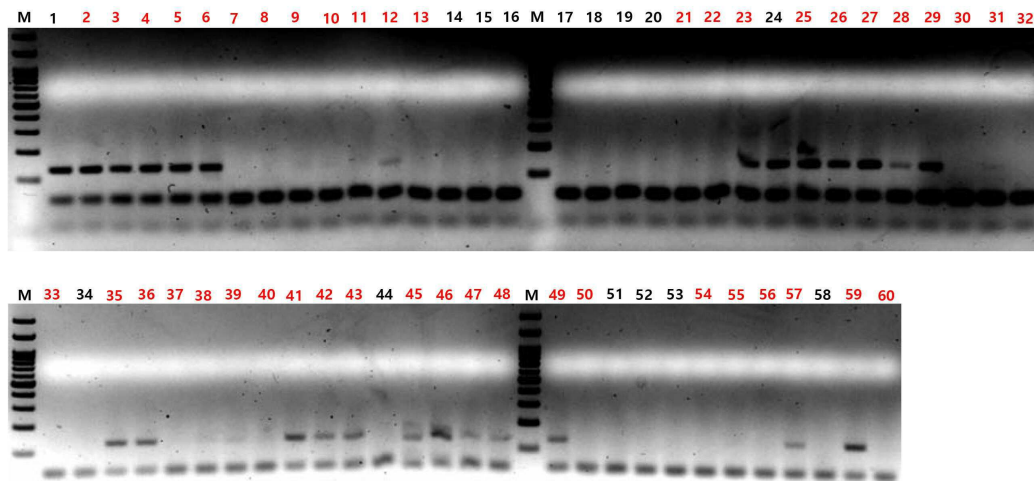
도면3a

a. 소고기 검출 결과 (CF3/CR3 프라이머)



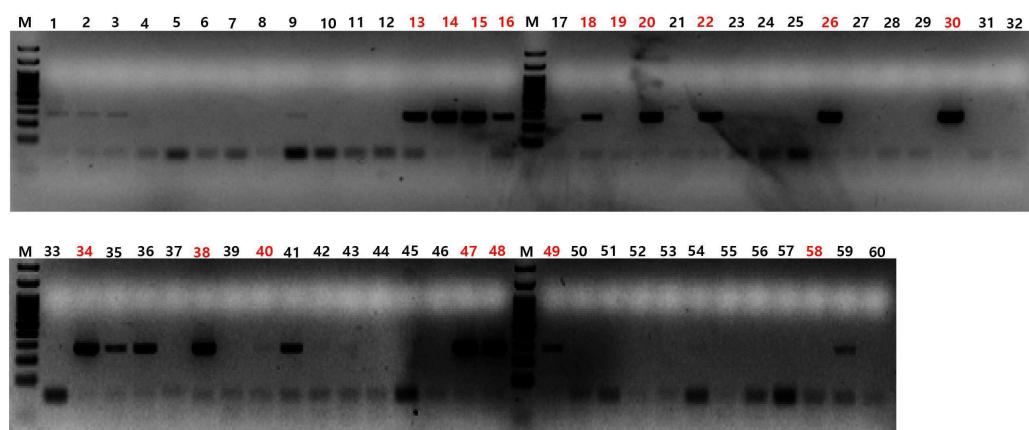
도면3b

b. 돼지고기 검출 결과 (PF3/PR3 프라이머)



도면3c

c. 닭고기 검출 결과 (CEF3/CER3 프라이머)



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Primer set for detecting raw meat from processed meat product and
uses thereof

<130> PN16434

<160> 12

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

ctcacaaca gttaccaag aac 23

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> primer

<400> 2

gctacagtgg ggttatttg 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

ttaccgttat agcaacagcc 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

gagggcggta atgatgaatg	20
<210> 5	
<211> 20	
<212>	
> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 5	
caaacggcgc ctcattcttc	20
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 6	
ttgcaaaggg gaggaggaag	20
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 7	
cccgattctt cgctttccat	20
<210> 8	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 8	
ctacgtctga ggaaattcct gttg	24
<210> 9	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> primer
 <400> 9
 cttgcaaadc ctaacaggcc tg 22
 <210> 10
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 10
 cgtttgcacg tagatagcga ataac 25
 <210> 11
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 11
 tctgggctta actctcatac tcacc 25
 <210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 12
 ggcttactagt gggtttgctg gg 22