

## PCR-RFLP법과 allele-specific PCR법을 이용한 한우고기 판별연구

이승미<sup>†</sup> · 이우원 · 이강록 · 이동수  
축산물위생검사소

### Differentiation of Hanwoo and Other Breeds of Cattle Using PCR-RFLP and Allele-specific PCR

Seung-Mee Lee<sup>†</sup>, Woo-Won Lee, Gang-Rok Lee and Dong-Soo Lee  
Veterinary Service Laboratory

#### Abstract

The melanocortin 1 receptor (MC1R) plays an important role in regulation of melanin pigment synthesis within mammalian melanocyte. Mutation within the gene encoding MC1R was used for differentiation of Hanwoo and Holstein. To develop a rapid and accurate method for the identification of Hanwoo and other breeds of cattle, we performed a single nucleotide polymorphism (SNP) analysis in Melanocortin 1 receptor (PCR-RFLP method) and 8 genes of Hanwoo specific SNP and 7 genes of non-Hanwoo specific SNP (multiplex allele-specific PCR). The PCR-RFLP provides a reliable and sensitive result for the identification of Hanwoo and Holstein (sensitivity 100%), whereas it doesn't guarantee accurate result for differentiation of Hanwoo meat and imported beef (specificity 70%). Another method, allele-specific PCR was proven to be more useful in generating high specificity (92%) to differentiate Hanwoo meat from imported beef. But this method is required to be an additional measure in differentiation of crossbreed meat.

Key Words : MC1R gene, PCR-RFLP, allele-specific PCR, SNP, Hanwoo, imported beef

#### 서 론

국내 유통되고 있는 쇠고기는 대부분 한우육과 젓소육, 그리고 수입육인데 소비자들의 한우육 선호로 인해 젓소육이나 수입육이 한우육으로 둔갑판매되는 경우가 종종 있어왔다. 또한 미국산 쇠고기 수입개방과 더불어 원산지표시제 시행에 따라 한우와 수입쇠고기의 감별에 대한 요구가 높아졌다. 이에 따라 한우와 젓소고기 감별기술의 다양한 연구가 진행되어 왔으며 한우 특이 마커의 개발 등 현재에도 다양한 연구가 진행 중에 있다. 이 중 PCR을 이용하는 DNA 다형 분석기법으로서 RAPD (random amplified polymorphic DNA)는 각종 동물의 유전 분석 및 종 또는 품종 식별에 폭넓게 응용되어 왔는데 결과의 재현성이나 정확성이 낮아 실용화가 어려웠다<sup>1),6),19)</sup>. 2000년 이후에는 주로 소 모색관련 유전자인 Melanocortin 1 receptor (MC1R)를 이용한 여러 감별법이 연구되어 왔다. 소 품종이 가진 특징적인 모색과 무늬를 이용한 기술로 Angus와 Holstein과 같은 품종이 MC1R 유전자에 의해 감별될 수 있다. 검정색

과 붉은색을 조절하는 MC1R 유전자는 18번 염색체의 Extension좌위에 존재하여 포유동물에서 색소합성에 관여하며 이 유전자에 발생한 돌연변이가 다양한 모색발현을 일으킨다는 사실이 여러 연구자들에 의해서 규명되었다<sup>2),11),12),18)</sup>. MC1R 유전자에 다형성이 존재하기 때문에, 한우와 Holstein 구별을 위한 PCR-RFLP(restriction fragment polymorphism)방법을 이용하여 적절한 유전자 표지를 검색하는 연구가 이루어졌다<sup>5),7),14)</sup>. 정 등은 MC1R의 PCR-RFLP를 이용한 한우육 판별법을 보고하였다. 한우와 Holstein의 MC1R유전자 염기서열을 분석한 결과 104번 아미노산을 결정하는 코돈에서 Holstein은 GGT(Gly)의 염기서열로 이루어져 있으나 한우는 GTG로 두 번째 Guanine 염기하나가 결여된 single nucleotide polymorphism(SNP)가 존재함을 확인하였다. 즉 PCR로 증폭된 MC1R gene을 Bse118 I, MSPI, ACI I 세가지 제한 효소를 처리하여 한우육과 젓소육에서 각각 다른 DNA band를 확인하였다. 이 방법은 비교적 정확하고 안정적인 분석결과를 얻을 수 있으나 PCR 후 DNA 정제, 그리고 다시 enzyme 처리

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail : bona4860@korea.kr  
Tel : +82-51-331-0095, Fax : +82-51-338-8266

과정을 거친 후 agarose gel에 전기영동을 해야 하는 번거로움이 있었다. 또한 Limousin 이나 hereford 등과 같이 황색모색을 가진 수입소의 경우 한우와 감별이 불가하였다<sup>1-4</sup>.

SNP는 DNA 염기서열에서 하나의 염기서열 차이를 보이는 유전적 변화 또는 변이, 집단에서 1% 이상의 빈도로 존재하는 2개의 대립 염기서열이 발생하는 위치를 말하며 염기의 결손, 삽입 또는 치환에 의해 발생하며 사람 유전자에서 가장 많은 변이의 원인으로 질병이나 약물의 개발을 위해 많은 연구가 이루어지고 있으며 소에서 MC1R 유전자는 작은 규모의 SNP를 분석하는 방법 중의 하나이다<sup>15),20)</sup>. SNP의 검출을 위한 가장 확실한 방법은 DNA염기서열을 분석하는 것이 일반적이지만, 이것은 힘들고 시간이 많이 소모된다는 단점이 있으며 현재까지 개발된 SNP분석 방법으로는 allele-specific oligo-nucleotide hybridization, ligase chain reaction, PCR-RFLP, 형광 probe와 5'-nuclease assay, allele-specific PCR 방법이 있다<sup>1),7),10),13),21),22)</sup>. MC1R의 최대단점인 황색을 가진 수입쇠고기와의 감별을 위해 한우만의 특이 마커 개발이 계속되어 왔으며 축산과학원과 충북대학교에서 한우감별 마커를 특허 출원하였다<sup>26)</sup>. 한우와 젃소감별 뿐 아니라 수입쇠고기와의 감별을 위해 한우와 비한우 사이에서 빈도차이를 나타내는 SNP를 근거로 하여 한우 특이적 프라이머와 비한우 특이적 마커를 이용한 multiplex allele-specific PCR법이 개발되었다.

본 연구에서는 한우와 젃소 뿐 아니라 수입쇠고기를 감별하기 위해 MC1R법과 개발된 multiplex allele-specific PCR법을 비교·연구하여 신속정확한 감별법을 제시하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 공시 재료

본 연구에서 사용된 공시재료는 도축장에서 도축한 완전한 황갈색의 한우 56마리, Holstein(젃소) 40마리, 교잡우 13마리에서 근육을 채취하였으며 검역원에서 공수된 수입쇠고기 41건을 실험에 사용하였다.

#### Genomic DNA 추출 및 정제

근육조직으로부터 genomic DNA추출은 Miller<sup>16)</sup> 등의 phenol/chloroform 추출방법의 일부를 변형하여 실시하였다.

Nucleic lysis solution(promega, USA) 500  $\mu$ L에 풀어 65 $^{\circ}$ C 30분 반응시킨 후, phenol/chloroform(1:1) 500  $\mu$ L를 혼합하여 12,000 rpm에서 3분 정도 원심분리하여 단백질을 제거한 후 상층액을 isopropanol 600  $\mu$ L와 혼합하여 12,000rpm에서 5분 정도 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 추출된 DNA는 70% ethanol로 2회 세척 후 65 $^{\circ}$ C에서 5분 정도 건조하여 순수한 3차 증류수에 용해하여 50~150 ng/ $\mu$ L 농도로 희석하여 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

#### PCR-RFLP법

GenBank에 등록된 소의 MC1R 부위의 염기 서열을 기초로 하여 primer를 설계하였으며 Bioneer에 합성을 의뢰하였으며 사용한 primer 및 enzyme은 Table 1과 같다. PCR 반응을 위해 PCR Premix(solgent, Korea)를 사용하였으며 template DNA 1  $\mu$ L, 각 10 pmol/ $\mu$ L의 forward, reverse primer 1  $\mu$ L씩을 첨가하고 멸균증류수로 20  $\mu$ L가 되게 조정하였다. 증폭은 PCR thermocycler를 사용하였으며 수행은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 수행 후 95 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분을 35cycle을 수행한 뒤 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켜 PCR을 완료하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 산물을 확인한 후 enzyme 처리 2시간 반응하여 다시 2.5% agarose gel에 전기영동하여 DNA 절편을 확인하였다.

#### Allele-specific PCR

한우와 젃소, 수입쇠고기 판별을 위해 8개의 한우 특이적 프라이머와 7개의 비한우 특이적 프라이머가 포함된 multiple allele-specific PCR premix kit (solgent, Korea)를 이용하였으며 사용된 gene 및 한우 A, B type band size와 비한우 C, D type band size는 Table 2와 같다.

PCR 반응을 위해 template DNA 1  $\mu$ L, premix 12.5  $\mu$ L를 A, B, C, D stripe에 각각 첨가하여 멸균증류수로 25  $\mu$ L가 되게 조정하였다. 증폭은 PCR thermocycler를 사용하였으며 수행은 95 $^{\circ}$ C에서 15분 denaturation 수행 후 95 $^{\circ}$ C에서 20초, 59 $^{\circ}$ C에서 40초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 반응하는 과정을 35 cycle 실시한 후 72 $^{\circ}$ C에서 3분 반응하여 PCR을 완료하였다. 2.5% agarose gel에서 전기영동하여 결과를 분석하였다.

Table 1. Primer and Enzyme for PCR-RFLP

oligo name	sequence(5'→ 3')	product band size	Restriction enzyme
MC1R F	TGC CAA GAA CCG CAA CCT GCA CT	350 bp	<i>MspA1</i> I
MC1R R	GGT GAT GAA GAG CAG GCT GGT GA		

Table 2. Gene and band size for Hanwoo(A, B type) and non-hanwoo(C, D type)

Band	Gene	A-type	B-type	Band	Gene	C-type	D-type
1	LM371-1	501bp	501bp	1	LM215-1	422bp	422bp
2	FASN	449bp	340bp	2	UPK18-2	369bp	372bp
3	CBNU003	302bp	302bp	3	BR36	321bp	320bp
4	BR200	274bp	227bp	4	LM68	276bp	275bp
5	LM215-1	242bp	422bp	5	MGC	250bp	250bp
6	BR187	211bp	268bp	6	Caveolin 3	202bp	202bp
7	LM70	181bp	177bp	7	LM32	166bp	166bp
8	CBNU023	151bp	152bp	-	-	-	-

## 결과 및 고찰

### PCR-RFLP법

소의 모색에서 붉은 피모색(황색)과 검정색을 발현시키는 MC1R의 유전자내의 변이를 확인하기 위하여 공시재료에 대하여 특별히 제작된 primer를 사용하여 PCR을 수행하고 제한효소 처리하여 밴드의 차이를 확인하였다. 유전자의 변이는 99번째 아미노산 코돈인 CTG에서 CCG로 치환되는 SNP를 보이며 제한효소 *MspA1I*을 이용하여 한우형과 젃소형의 구분이 가능하다.

소의 MC1R 수용체 유전자에는 3개의 대립유전자( $E^D$ ,  $e$ ,  $E^+$ )가 존재한다. 한우의 경우 열성유전자인 붉은 피모색( $e$ )이 90% 이상을 보이며 나머지 10%에서 다양한 피모색 유전자형( $E^+$ ,  $E^+$ ,  $E^+e$ )을 가진다고 알려져 있다. 제한효소 처리 시에 한우형 유전자( $E^+$ ,  $e$ )는 154, 196bp를 나타낸다. 따라서 한우형에서는 Fig. 1와 같이 항상 동일한 밴드양상인 154bp와 196bp 두개의 단편을 나타낸다. 젃소형의 경우  $E^D$  유전자를 가짐으로 48bp, 106bp, 196bp 세 개의 단편을 보인다. PCR-RFLP 법을 이용하여 공시재료를 대상으로 분석한 결과 한우고기 56건, 젃소고기 40건의 분석결과 한우고기는 154bp, 196bp 두가지 밴드를 나타내는 한우형으로 젃소고기는 주로 106bp, 196bp 2가지 밴드, 일부는 48bp 세가지 밴드를 나타내는 젃소형으로 판별되어 축종과 100% 일치하는 결과를 보였다. 그러나 수입쇠고기를 대상으로 분석한 결과 Fig. 2와 같이 41건 시료 중 29건에서 106bp가 나타나는 젃소형(비한우형)으로 판별되었으나 12건에서 한우와 일치하는 밴드를 보여 70%의 낮은 판정율을 보였다.

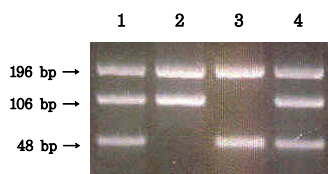


Fig. 1. PCR-RFLP standard marker. Lane 1 : MC1R standard marker, lane 2 : Hanwoo DNA, lane 3 : Holstein DNA, Lane 4 : Crossbreed DNA.

### Allele-specific PCR

한우와 비한우 사이에서 빈도차이(>0.3)를 나타내는 SNP 좌위(locus)를 근거로 A, B, C, D type PCR을 동시에 수행하였다. 8개의 한우특이적 프라이머를 이용한 A, B type의 밴드를 비교하여 A type의 homo개수를 판별하여 4개 이상, 7개의 비한우 특이적 프라이머를 이용한 C, D type의 밴드를 비교하여 C type의 homo개수가 4개 미만일 때 한우로 간주하며 확인은 유전자별 빈도수를 확인할 수 있는 program을 이용하여 판정한다.

Fig. 3은 4 type의 표준 marker의 band 위치를 나타내었으며 표 2와 같은 위치의 밴드를 marker에서 보이고 있다. 한우고기 3건을 분석한 결과는 Fig. 4의 lane 1~3, lane 7~9와 Fig. 5의 lane 1~3, lane 7~9이다. A, B type PCR 결과는 Fig. 4의 lane 1에서 A type의 homo개수는 6, lane 2에서는 4, lane 3에서 5를 보였으며 Fig. 5의 C, D type PCR의 결과 C type의 homo 개수가 lane 1에서 2, lane 2에서 0, lane 3에서 2개를 나타내어 한우로 판정되었다. 반면 수입쇠고기 3건을 분석한 결과는 Fig. 4의 lane 4~6, lane 10~12와 Fig. 5의 lane 4~6, lane 10~12이다. A, B type PCR 결과는 Fig. 4의 lane 4에서 A type의 homo 개수는 0, lane 5에서는 2, lane 6에서 3를 보였으며 Fig 5의 C, D type PCR의 결과 C type의 homo 개수가 lane 4에서 4, lane 2에서 5, lane 3에서 4개를 나타내어 비한우로 판정되었다. 이러한 과정으로 한우고기 56건을 판정한 결과 56건에서 한우형으로 판정되었고 수입쇠고기 41건에 대한 분석은 38건에서 비한우로 판정되어 92%의 정확도를 보였다.

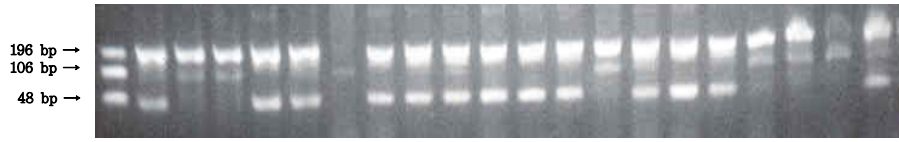


Fig. 2. PCR-RFLP using MC1R gene and MspA1 I in imported beefs.

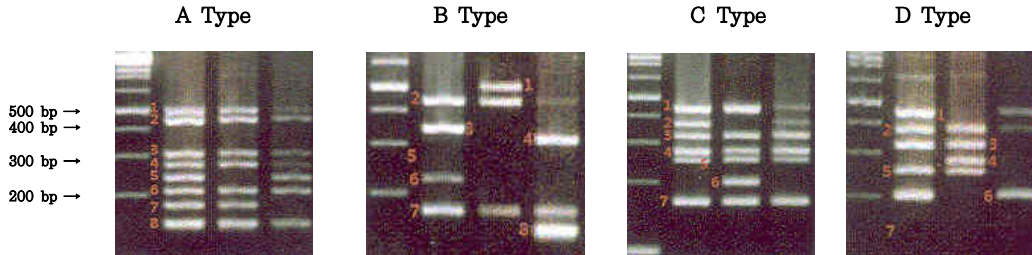


Fig. 3. Multiplex allele-specific PCR using 8 genes of Hanwo specific SNP(A,B) and 7 genes of non-Hanwo specific SNP(C,D)

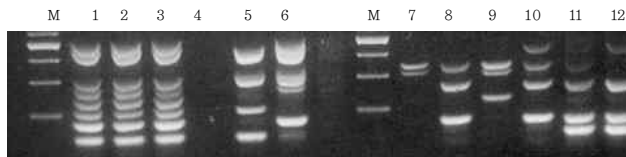


Fig. 4. Allele-specific PCR with Hanwoo specific marker(A, B Type). lane 1~3 : Hanwoo A type, lane 4~6 : imported beef A type, lane 7~9 : Hanwoo B type, lane 10~12 : imported beef B type.

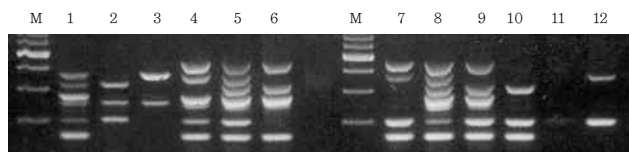


Fig. 5. Allele-specific PCR with non-Hanwoo specific marker(C, D Type). Lane 1~3 : Hanwoo C type, lane 4~6 : imported beef C type, lane 7~9 : Hanwoo D type, lane 10~12 : imported beef D type.

### 결 론

국내 소비자들의 한우고기 선호 및 원산지표시제 시행에 따라 축산물의 정확한 유통에 관심을 가지면서 분자유전학적인 축종감별의 연구가 활발히 진행되어왔다. 그 중 표현형으로 쉽게 판별되는 모색에 관한 유전자의 발현에 영향을 미치는 여러 후보 유전자들 중 MC1R, ASIP 및 TYRP1 유전자는 모색의 표현형 변이에 주된 영향을 미치는 유전자들로 알려져 다수의 선

행 연구가 되었다<sup>4),5)</sup>. 특히 Extension 좌위의 MC1R은 ASIP 유전자와 함께 멜라닌의 확산 및 합성을 자극함으로써 검정색소와 붉은 색소의 발현양을 조절하는 유전자이다<sup>11),12),17)</sup>. 젖소고기와 한우고기를 감별하기 위한 유전자 분석기술이 여러 연구자들에 의해서 시도된 바 있으나, 과거에 연구되었던 random amplified polymorphic DNA(RAPD) 분석방법을 이용하여 수행한 결과는 실험의 재현성 등 여러 가지 문제점이 발생하여 실용화되지 않았다<sup>6),19)</sup>. 김 등과 정 등이 제시한 PCR-RFLP법

과 PCR-SSCP을 이용하여 모색이 검정색인 품종과 황갈색인 품종에서 각각 다른 DNA band를 확인하였다<sup>4),5),7)</sup>. MC1R 유전자의 변이를 확인하기 위하여 제한효소처리 후 절단된 DNA band를 확인하여 한우와 젃소를 구분할 수 있는 분석법을 정립하였고 많은 기관에서 활용되고 있다. 그러나 PCR 산물을 제한효소로 다시 처리해야하고 DNA band 크기가 작아져서 이를 확인하기 위해서는 2~3% metaphore agarose gel 또는 polyacrylamide gel에 전기영동을 한 후 sliver stain을 해야하므로 많은 시간과 노력이 소요된다는 단점들이 있었다. 이러한 제한효소를 이용한 분석의 단점을 보완하면서 SNP typing이 가능한 allele specific PCR 방법들이(AS-PCR) 최근 여러 연구자들에 의해서 개발되었다<sup>23-25)</sup>. 고 등이 고안한 multiplex allele specific PCR방법을 이용한 판별법은 한우의 MC1R 유전자내의 SNP를 확인하기 위하여 네가지 primer를 이용하여 제한효소 처리없이 한우고기와 젃소고기를 구별해내고 비특이 밴드 생성을 감소시키는 편리한 방법을 고안하였다<sup>3),25)</sup>. 그러나 수입종의 Hereford의 모색은 한우처럼 적갈색으로 MC1R 유전자에 근거한 MAS-PCR방법을 이용하여 한우와 완벽하게 구분되지 않았다. 수입우와 한우와의 감별을 위해서는 더 많은 SNP를 이용하면서도 신속한 진단법이 필요하게 되었고 이에 본 연구에서 8개의 한우 특이유전자와 7개의 비한우 특이유전자를 이용한 AS-PCR을 수행하고 이전의 방법과 비교를 하였다. 그 결과 PCR-RFLP법에서의 수입쇠고기와 한우와의 감별법과 AS-PCR법을 비교해본 결과 70%의 정확도에서 92%까지 정확도가 증가하여 본 연구에서 사용된 판별법이 수입쇠고기 판별에서 우수한 효과를 나타내었다. 그러나 교잡우에서의 비한우 판정이 완벽하지 못한 점은 보완해야 할 사항이며 더 많은 교잡우 시료에 의한 정확한 판정이 요구된다. 또한 한우 특이, 비한우 특이 밴드 이외의 비특이 밴드의 출현이 때로 나타나기도 하는데 이는 DNA의 순도와 정제와 관련된다고 사료된다. 이 경우 DNA를 재분리하거나 재시험 시에 보완되어 질 수 있는 사항으로 판단된다. 향후 고시된 한우확인시험법과의 비교분석을 실시하고 단점을 보완한다면 신속한 진단법의 하나로 이용될 수 있으리라 판단된다.

### 참 고 문 헌

1. 박성도, 김태중, 이재일. 소 모색관련 MC1R 유전자의 SNP와 관련한 MBG probe에 기초한 real-time PCR을 이용한 한우육과 Holstein육의 판별. 대한수의학회지 45(1), pp.25~28(2005).
2. 도경탁, 신희영, 이종혁, 김내수, 박응우, 윤두학, 김관석. 한우에서 모색관련 유전자 변이에 관한 연구. 한국동물자원과학회지 49(6), pp.711~718(2007).
3. 고바라다. Multiplex allele specific PCR방법을 이용한 한우고기와 젃소고기의 신속한 판별. 대한수의학회지 45(3), pp.351~357(2005).
4. 정의룡, 정구현. 모색 발현 유전자의 DNA marker를 이용한 쇠고기 품종판별. 한국식품학회지 24(4), pp.355~360(2004).
5. 김태현, 윤두학, 박응우, 이해영, 오성종, 정일정, 탁태영, 김경남, 한재용. 소 품종별 Melanocortin Receptor 1 (MC1R)유전자의 유전자형 빈도에 관한 연구. 한국동물자원학회지 41, pp.735~744(2004).
6. 민병록, 한재용, 이무하. RAPD 기법을 이용한 쇠고기의 품종(한우육, 유우육(Holstein육, 수입유우)구분. 한국축산학회지 37, pp.651~660(1995).
7. 정의룡, 김우태, 김연수, 한상기. 소 모색관련 유전자 MC1R의 PCR-RFLP Marker를 이용한한우육판별. 한국동물자원과학회지, 42, pp.379~390(2001).
8. 김태중, 박성도, 이재일. 소 모색관련 MC1R 유전자의 SNP와 관련한 3'tailed primer'를 이용한 한우육의 판별. 한국동물자원과학회지 46, pp.897~902(2004).
9. 홍영호, 정일정, 김태현, 김희발, 윤두학, 김형선, 조병욱, 한재용. 품종 특이성을 이용한 한우판별 표지인자 개발. 한국동물유전육종학회지 2, pp.107~114(1998).
10. Abravaya K, Carrino JJ, Muldoon S, Lee HH. Detection of point mutations with a modified ligase chain reaction(Gap-LCR). Nucleic Acids Res. 23, pp.675~682(1995).
11. Berryers TG, Schmutz SM, Schimpf RJ, Cowan CM, Pottter J. TYRP1 is associated with dun coat colour in Dexter cattle or how now brown cow? Anim Genet pp.34167~175(2003).
12. 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 51, pp.287~317(1996).
13. Livak KJ. Allele discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. Genet Anal 14, pp.143~149(1999).
14. Joerg H, Freis HR, Meijerink E, Stranzinger GF. Red coat color in Holstein cattle is associated with a deletion in MSHR gene. Mamm Genome 7, pp.317~318(1996).
15. MaCarthy JJ, Hilfker R. The use of single-nucleotide polymorphism maps in pharmacogenomics. Nat Biotechnol 18, pp.505~508(2000).
16. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 16, p1215.(1998).

17. Vage DI, Klungland H, Lu D, Cone RD. Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. *Mamm Genome* 10, pp.39~43 (1999).
18. McPeake SR. color pattern inheritance in beef cattle. University of Arkansas Division of Agriculture Cooperative Extension Service, Little Rock (2004).
19. Smith EJ, Jones CP, Bartlett J, Nestor KE. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers for the genetic analysis of relatedness and diversity in chickens and turkeys. *Poultry Sci* 75, pp.579~584 (1996).
20. Nerbert DW, et al. Pharmacogenetics and pharmacogenomics Why is this relevant to the clinical geneticist? *Clinic Genet.* 56, pp.247~258(1999).
21. 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*, 324, pp.163~166(1986).
22. 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 Acid Res* 17, pp.2503~2516(1989).
23. 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*, 51, pp.251-262(1992).
24. 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 Acid Res*, 18, pp.999~1005(1990).
25. Mokrousov I, Otten T, Filiopenko 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*, 40, pp.2509~2512(2002).
26. 김명철, 박미선, 신형두, 박선희, 박혜경, 김방현, 이우영. 한우판별용 SNP마커조합, 한국특허정보원, 출원번호 1020060112125.