

가열 염소육의 판별을 위한 효소면역측정법

김현정 · 손동화
한국식품개발연구원

An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Cooked Goat Meat

Hyun-Jung Kim and Dong-Hwa Shon
Korea Food Research Institute

Abstract

This study was conducted to develop an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for the determination of cooked goat meat. Muscle proteins were extracted from goat meat by heating at 98°C for 15 min. Major thermostable(TS) protein, whose size and pI are 36 and 38 kDa and 4.5 respectively, were purified by DEAE-Sephadex A-50 and Sephadex G-75 column chromatography. The TS protein was immunized into rabbits in order to produce goat specific antibodies. Competitive indirect ELISA(ciELISA) was established by using the anti-TS antibody. The antibody showed high reactivity toward the TS antigen and the boiled goat meat extract but it did not show any reactivities toward extracts of boiled chicken, pork, lamb, and beef. Thus, this ciELISA developed in this study could be applicable to identify goat species from cooked meat.

Key words : goat meat, thermostable protein, enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

서 론

국제적으로 육류의 교역이 활발해짐에 따라 육종감별의 중요성은 더욱 증가되고 있고 소비자의 권익 보호를 위하여 육제품의 종감별은 다양한 방법으로 시도되어 왔는데 이에에는 면역학적 방법⁽¹⁾, 크로마토그래피 방법⁽²⁾, DNA hybridization법⁽³⁾, 전기영동법⁽⁴⁾ 그리고 polymerase chain reaction(PCR)법⁽⁵⁾ 등이 있다.

이중 면역학적인 방법은 대표적으로 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 들 수 있고 이 방법은 신속하고 정확하며 실험과정이 간단하고 특이성이 높아 시료를 동시에 다량으로 검사해야 하는 현장에서 이용할 경우 매우 효과적이라 할 수 있다^(6,7).

한편, 염소육 분석법은 1980년대 이후부터 ELISA를 통하여 연구되어 왔는데 대부분의 경우 같은 반추동물계육류들과의 교차반응이 심하였다^(8,9). Adagonda 등⁽¹⁰⁾은 염소육을 비롯한 반추 동물육의 분석법을 연

구하였다. 이들은 송아지, 물소, 양, 염소, 돼지의 부신과 근육으로부터 열에 안정하고 ethanol에 침전되는 단백질 분리를 분리하여 이에 대한 항체를 생산하였다. 또한, 면역흡수를 통하여 다른육에 반응하는 항체를 제거함으로써 특이적인 육종분석이 가능하였다⁽¹⁰⁾. 반면 Kang'ethe 등⁽¹¹⁾은 근육으로부터 121°C의 고열에 안정한 단백질을 분리하여 항체를 생산하였으나 양과 염소육 사이에 교차반응이 심하게 나타났다. 한편, 국내에서의 염소육 소비량이 현저하게 증가함에도 불구하고 분석법 개발에 관한 연구는 거의 이루어져 있지 않다.

본 연구에서는 염소육과 다른 육종들(우육, 돈육, 계육, 양육)과의 종판별이 가능한 ELISA를 개발하고자 하였다. 즉 98°C에서 가열 처리한 염소육의 열 안정 단백질을 분리하고 정제하여 이에 대한 특이항체를 토끼에서 생산하였으며 ELISA 조건을 확립하여 다른 육종에 대한 교차반응을 조사하였다.

Corresponding author : Dong-Hwa Shon, Korea Food Research Institute, San 46-1, Backhyun-Dong, Bundang-Gu, Songnam 463-420, Korea
Tel : 82-342-780-9133
Fax : 82-342-709-9876
E-mail : dhs95@kfri.re.kr

재료 및 방법

재료

Trizma® pre-set crystals, phosphate buffered saline

with Tween 20, phosphate-citrate buffer tablet, 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine dihydrochloride(TMB), goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate, Freund's complete adjuvant, incomplete adjuvant와 cellulose tubing은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였다. 항체 생산을 위한 토끼, New Zealand White rabbit(2.5 kg)는 삼육실험동물(오산, 한국)로부터 구입하였고 Nunc사(Roskilde Denmark)의 Microtiter plate from Maxisorp™(#446612)와 THERMOmax™ Molecular Devices사(Sunnyvale, CA U.S.A.)의 Microplate reader를 사용하였다.

열처리에 의한 염소육 단백질의 추출

부위에 관계없이 채취하여 건과 지방을 제거한 염소육에 10배 부피(V/W)의 증류수를 첨가한 후 상온, 60°C, 80°C, 98°C, 121°C의 온도로 15분간 열처리하였다. 처리 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리(Hanil Science, MF-80)하고 그 상정액을 취했다. 회수된 단백질은 SDS-PAGE로 그 분자량의 분포를 확인하였다.

지표단백질의 분리 및 정제

염소육 100 g을 미세하게 다진 후 증류수 400 mL을 가하여 98°C로 가온된 water bath에 넣고 15분간 가열했다. 추출된 시료는 급냉 시켰고 지방층이 충분히 분리된 후 15,000 g에서 30분간 원심분리(Sorval, SS-34 rotor, Dupont, France)하여 불용성 단백질과 지방을 제거했다. 상정액을 취한 후 Whatman filter paper No. 4로 여과시킨 단백질 용액은 DEAE Sephadex A-50(Pharmacia, Sweden)으로 분리하였고 사용한 buffer는 phosphate buffer(pH 6.0)로 NaCl 농도구배 0-1 M으로 용출시켰다. 분리된 단백질은 ultra filtration 방법으로 농축하였고 system은 amicon(stirred cell 8050)으로 filter는 YM10(Diaflo ultrafilters)을 사용하였다. 정제도를 높이기 위해서 Sephadex G-75(Pharmacia)로 겔 여과 크로마토그래피를 실시하였고 buffer는 PBS(pH 7.4) with 0.02% sodium azide(Sigma St. Louis, missouri, USA)를 사용하였다. 정제된 단백질은 SDS-PAGE로 분자량을 확인하였다.

단백질의 분석

단백질 정량은 Lowry법을 보완한 Bicinchoninic acid(BCA) 정량법(Pierce, Rockford, IL, USA)을 사용하였다. 표준물질은 bovine serum albumin(Sigma)을 사용하였으며, Jasco v-550(SSE-343, Japan)의 분광광도계를 이용하여 569 nm에서 측정하였다. SDS-PAGE는

Laemmli법⁽¹²⁾에 따라 실시하였고 분리 gel의 농도는 10%를 사용하였다. 각 well에 loading한 단백질은 1 µg 이었고 100V에서 1시간 동안 실시하였다. 염색은 Coomassie blue R-250으로 하였고 표준단백질은 Sigma 제품을 사용하였다. IEF(isoelectric focusing)를 통한 PI 값의 확인은 Phastsystem(Pharmacia)을 이용하였다. 사용한 gel은 Phastgel IEF 3-9였고 Pharmacia에서 제공된 방법에 준하여 실험하였다.

다른육의 열 안정 단백질의 분리

열 안정 육 단백질을 분리하기 위하여 계육, 돈육, 우육, 양육을 잘게 다진 후 3배량의 물을 첨가하였다. 98°C까지 온도를 높인 water bath에 시료를 넣고 15분간 열처리 한 후 급냉 시켰다. 온도가 충분히 내려간 후 여과지로 걸러서 농도 보정 후 실험에 사용하였다.

항체의 생산

정제된 면역원 500 µg씩을 Freund's complete adjuvant와 유탁액을 만들어 토끼의 뒷발바닥에 피하주사 하였다. 이후 2주 간격으로 추가면역을 실시하였다. 단, 이때는 Freund's complete adjuvant 대신 incomplete adjuvant를 사용하여 등쪽에 피하주사 하였다. 매 면역 일주일 후, 토끼의 귀 정맥으로부터 채혈하고 상온에서 2시간동안 방치하였다. 혈액을 파스퇴르 피펫으로 저어준 후 냉장보관으로 하룻밤 방치한 다음 원심분리(3,000 rpm, 20 min)하여 항혈청을 분리하였다.

항체의 역가조사

항체의 역가는 비경합 ELISA에 의해 측정하였다. 즉, microplate에 TS 면역원을 coating buffer(0.02 M tris buffer, 0.15 M NaCl, pH 9.0)로 2 µg/mL이 되게 희석하여 well에 100 µL씩 넣고 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 각 well을 washing buffer(10 mM phosphate buffered saline, pH 7.4, 0.05% Tween 20)로 3회 세척 후 항TS 항체는 1/10,000로 washing buffer에 희석한 다음 well에 100 µL씩 넣고 1시간 방치하였다. 세척 후 goat anti-rabbit IgG antibody-HRP를 2차 항체로써 1/10,000로 washing buffer에 희석하여 사용하였다. 1시간 처리 후 세척하고 기질용액(0.01% H₂O₂, TMB 0.1 mg/mL in phosphate citrate buffer)을 30분 반응시킨 후 2 M H₂SO₄로 반응을 정지시키고 microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 실시하였다.

간접 결합 ELISA(cIELISA)

2 µg/mL 면역원 100 µL로 coating한 다음 4°C에서 하룻밤 방치한 microplate의 각 well을 washing buffer로 3회 세척 후 생산된 1/10,000로 희석된 항체와 항원의 1:1 혼합액을 washing buffer로 희석하여 well에 100 µL씩 넣고 1시간 반응시킨 후 washing buffer로 3회 세척한 다음 2차 항체를 1/3,000로 washing buffer에 희석해서 100 µL씩 각각의 well에 분주하고 1시간 동안 방치하였다. 이후의 실험과정은 비 결합 간접 방식과 동일하게 실시하였고 교차반응을 확인하는데는 간접 결합ELISA 방식에 준하여 실험하였다.

결과 및 고찰

지표단백질의 선택

육종 판별시 유효한 지표단백질을 선택하기 위해 각 온도별로 열처리하여 시료에서 추출되는 단백질의 분자량을 확인하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 lane 2는 열처리하지 않은 염소육의 수용성 육 단백질의 분포로서 16 kDa과 45 kDa의 단백질이 주요한 band이다. 60°C에서 열처리를 했을 때 45 kDa의 단백질은 불용화 되어 추출액 속에는 존재하지 않았다. Lane 4의 80°C에서 열처리한 경우 뚜렷한 단백질 band가 확인

되지 않았고 이는 80°C의 열 조건하에서는 상온에서 수용성인 단백질이 거의 불용화 되었기 때문이라 할 수 있다. Lane 5의 98°C에서 열처리한 염소육에서 36과 38 kDa의 비교적 순수한 단백질 band가 2개 확인되었고 121°C에서 과도하게 열처리 된 경우에도 36과 38 kDa의 단백질이 존재하였으나 98°C에서 분리된 단백질에 비해서 순도가 낮았으며 전체적으로 band가 퍼져 있었다. 따라서 가열 조리된 염소육의 분석을 위한 지표단백질로서 98°C에서 열처리하였을 때 분리되는 단백질이 적합하였다. 또한 특이 다클론 항체의 생산을 위해 면역원의 정제를 실시하였다.

면역원의 정제

면역원의 정제를 위해서 이온교환 크로마토그래피(DEAE Sephadex A-50)와 겔 여과 크로마토그래피(Sephadex G-75)를 이용하였다. 먼저 이온교환 크로마토그래피에 사용하는 buffer의 pH를 결정하고자 지표 단백질의 PI값은 isoelectric focusing(IEF)을 실시하여 확인하였다. Fig. 2에서와 같이 염소육의 열 안정 단백질의 PI값은 4.5이하였다. 본 연구의 결과는 기존 문헌과도 거의 비슷한 결과라고 할 수 있는데 Adagonda 등에 따르면 염소육의 36 kDa 분자량대의 열 안정 단백질의 PI값은 3.75에서 6.5사이임을 보고하였다⁽¹⁰⁾. 지표단백질을 분리한 음이온교환 크로마토그래피의 profile은 Fig. 3(A)와 같고 TS antigen은 42번에서 48번까지의 분획을 모아서 겔 여과 크로마토그래피를 실시하

Fig. 1. Sodiumdodecyl-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) pattern of goat meat treated various heating conditions for 15min on 10% acrylamide gel.

Lane 1, molecular weight marker; lane 2, raw goat meat extract; lane 3, 60°C heated goat meat extract; lane 4, 80°C heated goat meat extract; lane 5, 98°C boiled goat meat extract; lane 6, 121°C autoclaved goat meat extract.

Fig. 2. Isoelectric-focusing(IEF) pattern of heat stable goat protein on Phastgel IEF 3-9 followed by Coomassie Blue R-250 staining.

Lane 1, PI marker; lane 2, heat stable protein from goat meat.

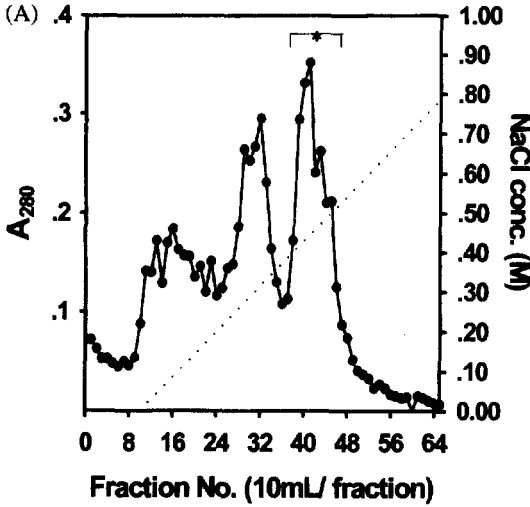


Fig. 3. Chromatogram of heat stable protein from goat meat on DEAE-Sephadex A-50 and SDS-PAGE pattern of purified protein from goat on 10% acrylamide gel.
 (A) A column (2.5×40 cm) was previously equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0). Heat stable goat meat protein was applied and the absorbed protein was eluted by linear gradient of NaCl. (B) Lane 1, molecular weight marker; lane 2, purified thermostable goat meat protein.

였다. 겔 여과 크로마토그래피로 분리하여 정제도가 높은 50 mg의 염소육 중의 열 안정 단백질을 분리, 정제하였다(data 생략). Fig. 3(B)는 정제된 단백질의 전기영동 결과이다.

항체의 생산

염소근육을 열처리(98°C, 15분)하여 얻은 단백질을

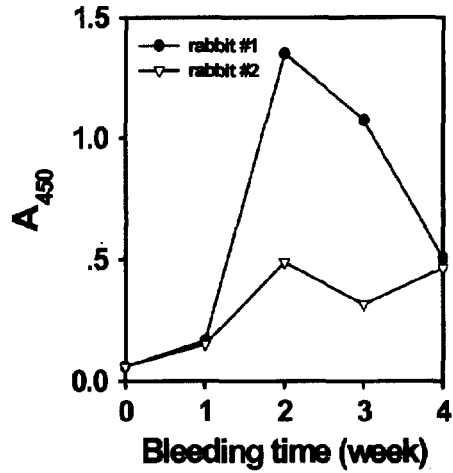


Fig. 4. Production of antibodies by rabbits immunized with thermostable antigen.
 Each rabbit was immunized on week 0, 2, 4, and 6, and bleeding was carried out once every week after each immunization. A₄₅₀ indicates absorbance at 450nm.

이온교환과 겔 여과 크로마토그래피 과정을 거쳐 분리한 지표단백질을 면역원으로 하여 항체를 생산하였다. ELISA는 비경합 간접방식으로 항체를 확인한 결과 1번 토끼의 2차 항혈청에서 항체가 가장 높게 나타났고 3차가 다음으로 높게 나타났다. 그러나 2차 항혈청의 경우 분석용으로 사용하기에는 양이 충분치 않아 1번 토끼의 3차 항혈청을 분석용 항체로 사용하였다(Fig. 4). 본 연구에서 3차와 4차 혈청의 항체가 낮게 나타난 것은 면역원이 실험동물과 같은 포유류에서 유래한 단백질이기 때문인 것으로 추측된다.

육종별 교차반응

재료 및 방법에서 명시된 바와 같이 확립된 ciELISA를 이용하여 항TS 항체의 염소육 검출 한계는 Fig. 5에 명시된 TS antigen의 표준곡선으로부터 산출하는데, 흡광도가 반응성을 보이기 시작하는 항원의 농도인 1 µg/mL 일때의 흡광도치의 90%인 1.35지점의 항원농도인 5 µg/mL임을 확인할 수 있었다. 그리고 ciELISA를 이용하여 처리온도를 달리한 5가지 종류의 육류(소, 닭, 양, 염소, 돼지)의 추출물에 대한 육종별 교차반응을 조사하였다.

첫 번째로 98°C에서 15분간 열처리한 5가지 육의 추출물에 대한 분석을 실시하였다. Fig. 5의 결과에서 본 바와 같이 주 면역원이 지표단백질인 항TS 항체는 다른 육 추출물과의 교차반응을 전혀 나타내지 않아서 염소육을 명백하게 구별할 수 있었다. 또한 염소육을

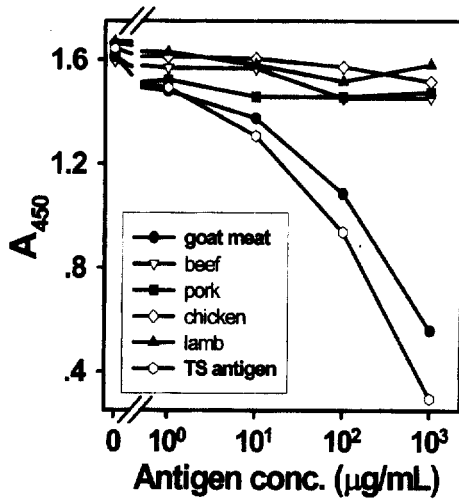


Fig. 5. Cross-reactivities of anti-TS antibody toward heat stable proteins from various animals (goat, lamb, beef, pork, and chicken) meat heated at 98°C for 15 min and TS antigen as determined by ciELISA.

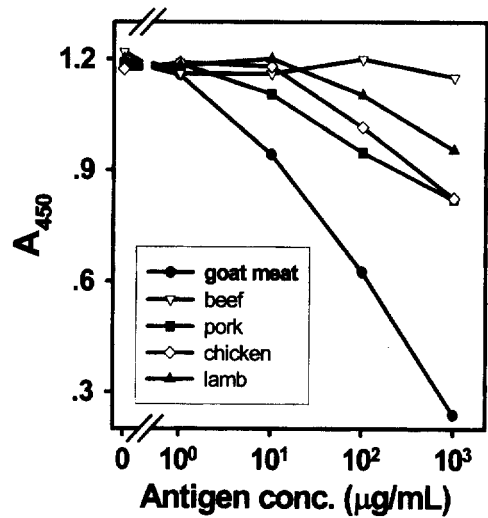


Fig. 6. Cross-reactivities of anti-TS antibody toward heat stable proteins from various animals (goat, lamb, beef, pork, and chicken) meat heated at 121°C for 15 min as determined by ciELISA.

열처리해 분리된 추출물과 지표단백질(TS antigen)에 대한 항체의 반응성은 거의 비슷하게 나타났다. 그 이유는 염소육 추출물과 지표단백질은 전기영동 결과상에서 순도의 차가 있으나 미약하고 ELISA는 특이항체만 관여하여 분석하기 때문에 추측된다. 따라서 항 TS 항체를 이용해서 가열 처리된 염소육의 분석을 할 때는 특별한 전처리 과정 없이 추출물로만 분석해도 적용 가능할 것으로 예상된다. Andrew 등⁽¹³⁾은 Berger 등⁽¹⁴⁾이 확립한 방법으로 양고기와 사슴고기로부터 면역원을 정제하여 다클론 항체를 생산하였다. 기존의 면역흡수 방법과는 다른 방식으로 교차반응을 갖는 항원을 이용하여 항체와 반응시켜 항체의 특이성을 향상시켰다. 실험에서 생산되고 면역흡수된 항체는 생육과 가열육 분석에 사용 가능하였다.

Adagonda 등⁽¹⁰⁾은 가열육 판별을 위한 방법으로 염소육을 121°C에서 열처리 한 후 알콜 침전을 하여 면역원을 분리하였다. 분리된 면역원으로 생산된 항체는 다른 육 추출물과의 교차반응이 심하였고 이를 극복하기 위한 면역흡수 과정이 필수적으로 요구되었다. 본 연구의 지표단백질 정제법을 위의 문헌을 비롯한 기존 보고들과 비교해 볼 때, 분리와 정제과정이 간단하고 수율이 높을 뿐만 아니라 이를 면역하여 얻은 항체의 특이성이 높아서, 면역흡수과정을 거치지 않고도 염소육을 특이적으로 구별이 가능한 장점이 있었다.

두 번째로 121°C에서 15분간 열처리한 육에 대한 분석을 실시하였다. 98°C에서 15분간 열처리한 시료의

경우 보다 121°C에서 열처리한 육에서 약간의 교차반응이 나타났다(Fig. 6). 이러한 결과는 121°C에서 15분간 열처리한 염소육 추출물과 다른육의 추출물이 98°C에서 열처리한 것에 비해 단백질의 구조변화가 많이 일어나 육의 고유한 성질을 지닌 단백질보다 변형된 형태의 단백질의 비율이 높아짐으로써 육 단백질 자체의 특이성이 소실되어 육의 종류에 따라 정도의 차이가 있지만 교차반응증가의 원인이 된다고 할 수 있다. Morales 등은 육에 대한 열처리는 단백질 응집의 원인이 되고 수반되는 교차반응을 유도하는데 이는 과도한 열처리로 인해 단백질이 소수성 아미노산 잔기의 노출을 증가시키고 단백질과 환원당이 고열로 인하여 메일라이드 반응을 유발함으로써 교차반응이 증가되는 것이라 할 수 있다⁽¹⁵⁾. 또한 121°C에서 15분간의 열처리는 통조림 제조나 멸균시 사용되는 열처리로서 그 의미를 둘 수 있는데 상기의 조건에서 추출된 단백질이 생산된 항체에 대하여 여전히 반응성을 갖고 있었고 이는 앞으로 가공 염소육 분석의 활용가능성을 시사하였다.

세 번째로 생육분석에의 이용가능성을 타진하기 위하여 5가지 종류의 생육으로부터 수용성 단백질을 추출한 후 ELISA를 행하였다. 이때, 항TS 항체는 다른 육 뿐 아니라 염소육에 대해서도 반응성을 갖지 않았다(data 생략). 열처리 없이 상온에서 추출되는 염소육의 수용성 단백질이 Fig. 1의 lane 1과 같이 여러 분자량대의 단백질로 존재하나 원심분리를 통하여 육을

제거하고 수용성 단백질만을 열처리하였을 경우 모두 불용성으로 바뀌어 전기영동 결과 band를 확인 할 수 없었다(data 생략). 이는 생육에서 추출된 단백질내에 지표단백질인 TS antigen이 존재하지 않아 항 TS항체와 반응성이 없었다고 생각된다. 따라서 염소육 분석시 열처리과정은 필수적이라 할 수 있고 생육을 분석하고자 할 때, 시료를 간단한 열처리(100°C, 15분)과정을 거쳐 준비함으로써 종판별이 가능하다고 할 수 있다.

요 약

가열 처리된 우육, 돈육, 계육, 양육과 염소육과의 종판별을 위한 효소면역측정법(ELISA)을 확립하기 위하여 염소육을 98°C에서 15분간 열처리해서 추출액을 분리하였다. 열에 안정한 주요 단백질(TS)은 분자량이 36과 38 kDa이었고 두 분자량대의 단백질의 pI값은 4.5로 확인되었으며 면역원으로 사용하기 위해 이온교환(DEAE-Sephadex A-50)과 겔 여과(Sephadex G-75) 크로마토그래피로 정제하였다. 분리, 정제된 TS단백질을 토끼에 면역하여 염소육에 대해 특이성을 갖는 항체를 생산하고 항TS 항체를 이용하여 간접경합 ELISA를 확립하였다. 항TS 항체는 가열 처리된 계육, 우육, 돈육, 양육과는 반응성이 전혀 없었고 동일하게 처리된 염소육과 지표단백질인 TS에만 반응성을 보였다. 따라서, 본 연구에서 확립한 간접경합 효소면역측정법은 가열 처리된 육류 중 염소육 판별에 응용 가능성을 시사하였다.

감사의 글

본 연구는 '98년도 농림기술관리센터의 현장애로기술사업으로 수행되었으며 연구비지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Jones, S.J. and Patterson, R.L.S. Double-antibody ELISA for detection of trace amounts of pig meat in raw meat mixtures. *Meat. Sci.* 15: 1-13 (1986)
2. McCormick, R.J., Reeck, G.R. and Kropf, D.H. Separation and identification of porcine sarcoplasmic proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.* 36: 1193-1196 (1988)
3. Chikuni, K., Ozutsumi, K., Koishikawa, T. and Kato,

- S. Species identification of cooked meats by DNA hybridization. *Meat Sci.* 27: 119-128 (1990)
4. Kim, H. and Shelf, L.A. Characterization and identification of raw beef, pork, chicken and turkey meats by electrophoretic patterns of their sarcoplasmic proteins. *J. Food Sci.* 51: 731-735 (1986)
5. Chikuni, K., Tabata, M., Koishikawa, T., Monma, M. and Saito, M. Polymerase chain reaction assay for detection of sheep and goat meats. *Meat Sci.* 37: 337-345 (1994)
6. Samarajeewa, U., Wei, C.I., Huang, T.S. and Marshall, M.R. Application of immunoassay in the food industry. *Food Sci. and Nutr.* 29: 403-434 (1991)
7. Jones, S.J. and Patterson, R.L.S. A modified indirect ELISA procedure for raw meat speciation using crude anti-species antisera and stabilized immunoreagents. *J. Sci. Food Agric.* 7: 229-240 (1986)
8. Adagonda, T.S., Jaykumar, B.K., Bhushan, M.J. and Shree Kumar, R.P. Use of species-specific antisera to adrenal heat-stable antigens for the identification of raw and cooked meats by agar gel diffusion and counter immuno-electrophoretic techniques. *J. Sci. Food Agric.* 44: 63-73 (1988)
9. Kang'ethe, E.K., Lindqvist, K.J. and Gathuma, J.M. Immunological reactions of thermostable muscle antigens and their possible use in speciation of cooked and fresh animal meats. pp. 129-144. In: *Biochemical Identification of Meat Species.* Elsevier Applied Science Publishers, N. Y., USA (1984)
10. Adagonda, T.S., Umesh, D.K., Jaykumar, B.K., Bhushan, M.J. and Kiran, N.B. Studies on thermostable antigens, production of species antiadrenal sera and comparison of immunological techniques in meat speciation. *Meat Sci.* 33: 121-136 (1992)
11. Kang'ethe, E.K. and Gathuma, J.M. Species identification of autoclaved meat sample using antisera to thermostable muscle antigens in an enzyme immunoassay. *Meat Sci.* 19: 265-267 (1987)
12. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970)
13. Berger, R.G., Mageau, R.P., Schwab, B. and Johnston, R.W. Detection of poultry and pork in cooked and canned meat foods by enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71: 406-409 (1988)
14. Andrews, C.D., Berger, R.G., Mageau, R.P., Schwab, B. and Johnston, R.W. Detection of beef, sheep, deer, and horse meat in cooked meat products by enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 75: 572-576 (1992)
15. Morales, P., Garcia, T., Martin, R., Sanz, B. and Hernandez, P.E. Monoclonal antibody detection of porcine meat. *J. Food Prot.* 57: 146-149 (1994)