

두족류의 진위 판별을 위한 Real-time Quantitative PCR 검사법 개발 및 검증

정인영[†] · 서용배^{1†} · 양지영² · 권기성³ · 김군도^{*}

부경대학교 미생물학과, ¹부경대학교 해양생명과학연구소,
²부경대학교 식품공학과, ³식품의약품안전처 신종유해물질팀

Development and Validation of Quick and Accurate Cephalopods Grouping System in Fishery Products by Real-time Quantitative PCR Based on Mitochondrial DNA

In Young Chung[†], Yong Bae Seo^{1†}, Ji Young Yang², Ki sung Kwon³, and Gun Do Kim^{*}

Department of Microbiology, Pukyong National University, Busan, Korea

¹Institute of Fisheries Science, College of Fisheries Science, Pukyong National University, Busan, Korea

²Department of Food Science & Technology, Pukyong National University, Busan, Korea

³New Hazardous Substance Team, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation,
Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea

(Received May 10, 2018/Revised May 28, 2018/Accepted June 12, 2018)

ABSTRACT - In this study, an approach for the analysis of the five cephalopod species (octopus, long-arm octopus, squid, wet-foot octopus, beka squid) consumed in the Republic of Korea is developed. The samples were collected from the Southeast Asian countries Thailand, Indonesia, Vietnam, and China. The SYBR-green-based real-time qPCR method, based on the mitochondrial DNA genome of the five cephalopods was developed and validated. The intergroup variations in the mitochondrial DNA are evident in the bioinformatic analysis of the mitochondrial genomic DNA sequences of the five groups. Some of the highly-conserved and slightly-varied regions are identified in the mitochondrial cytochrome-c-oxidase subunit I (COI) gene, 16s ribosomal RNA (16s rRNA) gene, and 12s ribosomal RNA (12s rRNA) gene of these groups. To specify each five cephalopod groups, specific primer sets were designed from the COI, 16s rRNA and 12s rRNA regions. The specific primer sets amplified the DNA using the SYBR-green-based real-time PCR system and 11 commercially secured animal tissues: *Octopus vulgaris*, *Octopus minor*, *Todarodes pacificus*, *Dosidicus gigas*, *Sepia esculenta*, *Amphioctopus fangsiao*, *Amphioctopus aegina*, *Amphioctopus marginatus*, *Loliolus beka*, *Loligo edulis*, and *Loligo chinensis*. The results confirmed by a convenient way to calculate relative amplification levels between different samples in that it directly uses the threshold cycles (Ct)-value range generated by the qPCR system from these samples. This genomic DNA-based molecular technique provides a quick, accurate, and reliable method for the taxonomic classification of the animal tissues using the real-time qPCR.

Key words : *Cephalopods*, Mitochondrial DNA, Real-time quantitative PCR, SYBR green

지구 온난화 등으로 인한 해양환경 변화와 연근해 수산생물의 자원관리 부족, FTA 체결 국가에서 수산물 수입 등으로 국민의 식생활에서 중요한 부분인 수산물의 수입

이 해마다 늘어나고 있다. 또한 국민소득의 향상과 건강에 대한 사회 전반의 관심이 높아짐에 따른 수산물에 대한 건강식품으로서 소비자의 선호도가 높아지며 수산물 소비는 늘어나는데 비해 수산물 자급률은 점차 감소하고 있다¹⁾. 수입 수산물의 경우 학명이나 원산지 명칭이 부정확하고, 신고된 사항과 일치하는지 알 수가 없는 경우가 많고, 수산물의 절단이나 분쇄 가공품의 경우에는 대부분 형태학적 방법으로는 판단이 불가능하다. 일반적으로 두족류의 분류는 형태에 근거하여 육안으로 식별하는 방법

*Correspondence to: Prof. Gun-Do Kim, Department of Microbiology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea
Tel: 82-51-629-5618, Fax: 82-51-629-5619
E-mail: gundokim@pknu.ac.kr

[†]In Young Chung and Yong Bae Seo are contributed equally for the work.

을 사용하고 있으나 정확성이 떨어지며 특히, 가공 처리될 경우 형태에 근거한 식별이 불가능한 경우가 자주 발생하고 있다. 따라서, 원산지 판별 수산물 검사의 정확성을 높이고 처리 속도를 향상시키며, 가공품의 종 식별에도 가능한 객관적 종 판별 방법의 확립이 요구된다. 다수의 두족류 중 문어, 낙지, 주꾸미 등이 생물 국내 어획량 감소에 따라 중국, 남미, 동남아시아로부터 수입되고 있으며, 생물이 아닌 절편이나 가공식품에 대한 부정·불량식품 사건 사례가 빈번히 나타나고 있다.

수산생물의 종 분류는 생물자원 관리의 기본 단위이며, 생태계 연구뿐만 아니라 수산 생물 종의 허위 표시 및 부정 혼입 방지를 위한 식품의 안전성 확보 및 국민의 안전한 먹거리를 위협하는 부정·불량식품 근절을 위해 그 중요성이 점차 커지고 있다. 전통적으로 종 구분을 위한 분석법은 각 종이 나타내는 특이적인 단백질 및 DNA 다형성을 바탕으로 한다. 단백질을 이용한 종 판별법은 등전점 전기영동(isoelectric focusing, IEF), 모세관 전기영동(capillary electrophoresis, CE), 고속액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC), 그리고 항체를 이용하는 면역분석법(immunoassay)을 이용한다²⁻⁵. 이처럼 단백질을 이용한 종 판별법은 열처리 및 건조 같은 물리·화학적 조성의 변화와 단백질 구조의 변화로 분석결과와 신뢰성이 낮아져 가공식품에는 적합하지 못하고, 항체를 필요로 하는 면역학적 방법은 유사한 단백질 사이의 교차 반응에 의해 영향을 받을 수 있다^{4,6}. 이와 대조적으로 핵산 기반의 분석법은 특이적이고 민감한 방법으로 열처리나 건조 같은 가공과정을 거친 식품에도 적용이 가능하여 신뢰할 수 있는 종 구분을 위한 분석법이 될 수 있다⁷⁻¹⁰.

생물 종의 판별을 위하여 제한효소단편다형성(restriction fragment length polymorphism, RFLP)^{11,12} 무작위증폭다형 DNA PCR (random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction, RAPD-PCR)^{12,13}, 유전자증폭산물길 이다형성(amplified fragment length polymorphism, AFLP), 종 특이 PCR 프라이머를 이용한 PCR¹⁴⁻¹⁶ 및 real-time qPCR¹⁷⁻¹⁹, DNA 염기서열 분석 등 DNA 염기서열을 기반으로 다양한 분석 방법이 발전되었다^{8,20-23}. 이러한 방법들은 종 구분을 위해 DNA 서열의 변이를 검출하는 정확하고 신뢰할 수 있는 기술이다. 특히, real-time qPCR 분석법의 경우 기존의 PCR 방법보다 빠른 시간 내에 높은 감도로 증폭할 수 있으며, 기존 PCR의 허위 양성(false positive)을 효과적으로 줄일 수 있어 신뢰성을 높일 수 있다. 또한, 제한효소 반응, 아가로스겔 DNA 전기영동 과정 등을 생략하여 결과 도출 시간을 줄일 수 있고, 한번에 많은 시료를 분석할 수 있다.

본 연구에서는 부정·불량식품 유통 근절을 위해 형태학적으로 판별이 어려운 두족류의 정확한 판별 기술을 확

립하기 위해 국제생물바코드컨소시엄(Consortium for the Barcode of Life)에서 제안된 종 판별 바코드 영역인 미토콘드리아 DNA 염기서열의 cytochrome c oxidase I (COI) 유전자 및 16s ribosomal RNA (16s rRNA), 12s ribosomal RNA (12s rRNA) 유전자의 특이 유전자 영역에서 두족류 그룹 특이 프라이머 세트를 설계하였고, 5개 그룹에 대한 정확한 판별이 가능한 real-time qPCR 반응 조건을 확립하고자 하였다. 국내 수산물 시장 및 마트, 태국과 중국 등 국내 및 해외에서 확보한 각 두족류 그룹 생물의 조직에서 DNA를 추출하였고, PCR (Polymerase Chain Reaction)을 통해 COI 유전자 부분과 16s rDNA 유전자 부분을 증폭시켜 염기서열 분석을 통해 종을 확인한 후 판별법 개발 및 검증을 진행하였다.

Materials and Methods

두족류 시료 선정 및 전처리

실험에 사용한 문어류(참문어; *Octopus vulgaris*), 낙지류(낙지; *Octopus minor*), 오징어류(살오징어; *Todarodes pacificus*, 아메리카대왕오징어; *Dosidicus gigas*, 갑오징어; *Sepia esculenta*), 주꾸미류(주꾸미; *Amphioctopus fangsiao*, 모래주꾸미; *Amphioctopus aegina*, 하이야주꾸미; *Amphioctopus marginatus*), 꼴뚜기류(참꼴뚜기; *Loliolus beka*, 창꼴뚜기; *Loligo edulis*, 한치꼴뚜기; *Loligo chinensis*)는 2017년 태국, 인도네시아, 베트남, 서울, 부산, 속초 등에서 확보하였으며, 구입 후 실험 전까지 -20°C 에 보관하였다. 두족류의 원물, 건조 등의 제품은 액체 질소와 막자사발을 이용하여 균질하게 분쇄한 것을 분석 검체로 사용하였다.

Genomic DNA 추출

DNA 추출 시 하나의 분석검체로부터 적정량을 3회 칭량하여 동시에 DNA를 추출하였고, 추출된 각각의 DNA는 적절히 희석하거나 농축하여 PCR에 사용하였다. DNA는 AccuPrep[®] Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 아래와 같이 추출하였다. 추출된 DNA 용액은 바로 실험에 사용하거나 그렇지 않은 경우 4°C (단기 보관)이나 -20°C (장기 보관)에 보관하였다. 추출된 DNA의 농도는 Optizen[™] NanoQ (K LAB KISWIRE, Korea)를 이용하여 측정하였고, 추출된 genomic DNA의 농도를 $10\text{ ng}/\mu\text{L}$ 로 맞추어 real-time qPCR template로 사용하였다.

염기서열 분석

두족류의 판별법 개발을 위한 COI, 16s rRNA, 12s rRNA 유전자의 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 등록된

각 두족류 미토콘드리아 전체 염기서열로부터 확보하였다. 두족류 판별을 위한 후보군으로 문어류(*Octopus*, Oc)는 참문어(*Octopus vulgaris*, *O. vulgaris*, NC_006353.1) 1종, 낙지류(Long arm octopus, Lao)는 낙지(*Octopus minor*, *O. minor*, NC_009690.1), 대만주머니낙지(*Cistopus taiwanicus*, *C. taiwanicus*, KF017605) 2종, 오징어류(Squid, Sq)는 매오징어(*Watasenia scintillans*, *W. scintillans*, AB086202), 살오징어(*Todarodes pacificus*, *T. pacificus*, NC_006354), 아메리카대왕오징어(*Dosidicus gigas*, *D. gigas*, EU068697.1), 호주대왕오징어(*Sepia apama*, *S. apama*, NC_022466), 쇠갑오징어(*Sepiella japonica*, *S. japonica*, NC_017749), 입술무늬갑오징어(*Sepia lycidas*, *S. lycidas*, KJ162574), 참갑오징어(*Sepia esculenta*, *S. esculenta*, NC_009690.1), 파라오갑오징어(*Sepia pharaonis*, *S. pharaonis*, NC_021146) 8종, 주꾸미류(Wetfoot octopus, Wo)는 모래주꾸미(*Amphioctopus aegina*, *A. aegina*, NC_029702.1), 주꾸미(*Amphioctopus fangsiao*, *A. fangsiao*, NC_007896.1), 하이야주꾸미(*Amphioctopus marginatus*, *A. marginatus*, unpublished sequence) 3종, 꼴뚜기류(Beka squid, Bs)는 반원니꼴뚜기(*Loliolus japonica*, *L. japonica*, NC_030208), 인디안꼴뚜기(*Uroteuthis duvauceli*, *U. duvauceli*, NC_027729), 참꼴뚜기(*Loliolus beka*, *L. beka*, NC_028034.1), 창꼴뚜기(*Loligo edulis*, *L. edulis*, AB675081.1), 한치꼴뚜기(*Loligo chinensis*, *L. chinensis*, NC_028189.1), 화살꼴뚜기(*Loligo bleekeri*, *L. bleekeri*, AB029616), 흰꼴뚜기(*Sepioteuthis lessoniana*, *S. lessoniana*, NC_007894) 7종 등 두족류 21종을 선정하였다. 확보된 각 두족류의 미토콘드리아 DNA 서열 중에서 보존적인 COI, 16s rRNA, 12s rRNA 유전자 염기서열을 이용하여 유전자 서열 정렬(sequence alignment)을 통해 두족류를 공통적으로 증폭할 수 있는 프라이머 조합(Ceph_COI_U_F_1; 5'-tat tyt cha caa ayc ata aag a-3', Ceph_COI_U_R_1, 5'-gtt ggr atd gca ata at tatt gt-

3', Ceph_16s_U_F_2; 5'-ttt aat cca aca tcg agg tcg caa -3', Ceph_16s_U_R_2, 5'-ggc tag aat gaa tgg ttg gac gaa-3') 2쌍을 제작하여 종 확인에 사용하였으며, primer 서열 중에는 y (c, t), h (a, t, c), d (g, a, t), r (a, g)의 mixed base code가 포함되어 있다. PCR 증폭을 위한 반응액의 조성은 각 시료에서 추출한 genomic DNA 1 µL (10 ng/µL), forward primer 1 µL (10 pmole), reverse primer 1 µL (10 pmole), *AccuPower® Taq* PCR PreMix, distilled water 17 µL를 포함하여 총 20 µL이며, PCR 반응은 *AllInOne-Cycler™* (Bioneer, Korea)를 사용하였다. PCR 조건은 94°C에서 7분 동안 pre-denaturation 후 94°C에서 30초간 denaturation, 50°C에서 30초간 annealing 및 72°C에서 1분간 extension의 조건으로 35 cycle을 진행하였고 최종적으로 72°C에서 7분 동안 final extension을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 DNA 염기서열 분석 서비스(Macrogen, Korea)를 의뢰하여 염기서열 분석을 진행하였다.

두족류 그룹 특이 프라이머 제작

두족류 5개 그룹에 대한 특이 프라이머 제작을 위하여 European Molecular Biology Laboratory의 Clustal omega (EMBL, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>)를 사용하여 확보된 두족류의 미토콘드리아 DNA 서열 중에서 보존적인 두족류의 COI 유전자 염기서열, 16s rRNA 유전자 염기서열, 12s rRNA 유전자 염기서열을 이용하여 다중 염기서열 정렬을 하였으며, 두족류의 COI, 16s rRNA, 12s rRNA 유전자 염기서열을 분석하였고, 분석된 염기서열로부터 각 두족류 그룹 사이 특이성을 나타내는 염기서열 변이 부분을 탐색하였다. 그룹 특이 프라이머는 real-time quantitative PCR을 고려하여 증폭산물의 크기는 120~150 base pair 사이가 되도록 하였고, 두족류 그룹 특이 프라이머의 제작은 염기서열 변이 부위가 프라이머의 3'말단에 위치하도록 제작하였다. Tm 값은 48~62°C 범위

Table 1. Oligonucleotide primers used in qPCR

Group	Name	Sequences	Product size	Target gene
Octopus	Oc_1	5'- ttc tcc ttt cat ctg cag cag tt -3' 5'- caa gga ttg atg aaa tac ctg cta a -3'	150 bp	<i>COI</i> ¹⁾
Long arm octopus	Lao_1	5'- aat yaa tcc ttt cgt act aaa tta aat t -3' 5'- tta agg tgt aga ggc ttt rtt agg -3'	139 bp	<i>16s rRNA</i> ²⁾
Squid	Sq_1	5'- acg ggc gat atg tac rcr yta -3' 5'- aar tga gct acd rtt trt awt tt -3'	127 bp	<i>12s rRNA</i> ³⁾
Wetfoot octopus	Wo_1	5'- aga ggw gyt ggt ach gga tg -3' 5'- gct cct ara atw gat gar att cct -3'	150 bp	COI
Beka squid	Bs_1	5'- tyt tyg gwa ttt gag cag gvt tag -3' 5'- aac crt gwg cag twa cta cwa c -3'	150 bp	COI

1) *COI*: Cytochrome c oxidase subunit 1, 2) 16s rRNA: 16s ribosomal RNA, 12s rRNA: 12s ribosomal RNA

(All oligonucleotide primers were designed using Primer3 and synthesized from Bioneer, ROK)

Mixed base code: y (c, t); r (a, g); d (g, a, t); w (a, t); h (a, t, c); v (g, a, c)

를 가지며 30~70%의 GC 비율을 고려하여 Table 1과 같이 프라이머 세트들을 디자인하여 올리고 합성(Bioneer, Korea)을 의뢰, 실험에 사용하였다.

Real-time qPCR 분석

Real-time PCR에 사용된 프라이머는 두족류 5개의 각 그룹에 특이적인 각 1쌍을 사용하였다(Table 1). 두족류 5개의 각 그룹에 각각 특이적인 프라이머 세트의 real-time PCR 효율을 확인하기 위해 문어류의 Oc_1_F/R primer, 낙지류의 Lao_1_F/R primer, 오징어류의 Sq_1_F/R primer, 주꾸미류의 Wo_1_F/R primer, 꼴뚜기의 Bs_1_F/R primer를 이용하여 각 두족류 그룹으로부터 증폭된 PCR 산물을 pGEM[®] T-easy vector system (Promega, USA)에 클로닝하였고, DH5 α competent cell (Takara, Japan)에 형질전환 후 ampicillin (50 μ g/mL) 첨가된 LB-agar에서 blue/white colony selection을 통해 단일 colony를 선별하였다. 선별된 colony를 ampicillin (50 μ g/mL) 첨가된 LB 액체배양액에 배양 후 AccuPrep[®] Nano-Plus Plasmid DNA Extraction Kit (Bioneer, Korea)을 이용하여 plasmid DNA를 추출하였다. 추출된 plasmid DNA는 각 두족류 그룹의 판별을 위한 standard curve를 확인하기 위한 standard plasmid DNA로서 각각 10 ng/ μ L, 1 ng/ μ L, 100 pg/ μ L, 10 pg/ μ L, 1 pg/ μ L, 100 fg/ μ L, 10 fg/ μ L로 희석하여 template로 사용하였다. real-time PCR 반응액 조성은 template DNA 1 μ L, forward primer 1 μ L (10 pmole), reverse primer 1 μ L (10 pmole), 2X GreenStar Master Mix 10 μ L, distilled water 7 μ L를 포함하여 총 20 μ L로 준비하였다. Real-time PCR 기기는 QuantStudio 6 Flex real-time PCR instrument system (ABI, USA)를 사용하였으며, 플레이트를 장착하고 분석 프로그램을 작동시켜 시료의 정보를 입력한 후 반응을 개시하였다.

각 두족류 판별을 위한 real-time qPCR 반응 조건은 95°C에서 5분 동안 pre-denaturation 후 95°C에서 15초간 denaturation, 58°C에서 15초간(오징어류 Sq; 50°C/15초간) annealing 및 72°C에서 15초간 extension의 조건으로 35회 반복하여 진행하였다.

각 두족류 조직에서 추출한 genomic DNA를 사용하여, 두족류 그룹 판별을 위한 real-time PCR 증폭을 위한 반응액조성은 각각의 시료에서 추출한 genomic DNA 1 μ L (10 ng/ μ L), forward primer 1 μ L (10 pmole), reverse primer 1 μ L (10 pmole), 2X GreenStar Master Mix 10 μ L, distilled water 7 μ L, 총 20 μ L로 반응액을 준비하여 standard curve를 확인하기 위한 동일한 조건에서 real-time PCR을 수행하였다. 두족류 그룹 판별을 위한 real-time PCR은 각 두족류 그룹 중 확보된 시료에서 추출된 genomic DNA를 template로 사용하였고, 각각의 시료는 3개씩 real-time PCR 반응을 수행하고 반응 종료 후 실험결과를 해석하였다.

Results

두족류 5개 그룹 특이 프라이머

두족류 그룹 판별을 위한 그룹 특이 프라이머를 디자인하기 위하여 미국 국립보건원에서 운영하는 유전자은행(www.ncbi.nlm.nih)에 등록되어 있는 COI 유전자, 16s rRNA 유전자, 12s rRNA 유전자 염기서열을 이용하였다. 실험 대상 시료의 COI 유전자, 16s rRNA 유전자, 12s rRNA 유전자 염기서열을 각각 3 종류 이상 선정하여 이들의 유전적 상동성을 확인하였으며(Fig. 1), 이 결과로부터 real-time qPCR의 적용성을 고려하여 두족류 그룹 판별을 위한 최적의 프라이머를 선정하였다. 본 연구에서 real-time qPCR에 사용된 5쌍의 두족류 그룹 특이 프라이머는 Table 1에 표시되어 있으며(결합부위, supplement data), 제작된 5쌍의 프라이머는 각각의 두족류 그룹 시료에서 특이적으로 증폭하여 두족류 그룹 판별을 할 수 있다.

두족류 5개 그룹의 Quantified Plasmid DNA에서 Real-Time qPCR 결과

두족류 5개 그룹에서 확보한 각각의 standard plasmid DNA를 10배수 희석하여 template로 사용한 real-time qPCR 반응 결과로 문어류, 낙지류, 오징어류, 주꾸미류, 꼴뚜기류 판별을 위한 각 그룹 프라이머 세트의 standard curves를 확보하였고, Table 2에서 나타나는 것과 각 두족류 그룹의 표준 시료의 real-time qPCR 3회 반복한 결과에서 거의 유사한 threshold cycle (Ct) 값을 나타내며, 각 두족류 프라이머 세트의 standard curves 결과에서 기울기(Slope)는 -3.373 ~ -4.082, 상관 계수(R²)는 0.998~1, 증폭 효율은 75.8~97.9%의 범위를 나타내었다(Table 2).

두족류 그룹 특이 real-time PCR 특이성 검사

두족류 13개 시료에서 추출된 genomic DNA를 동일한 농도로 맞추어 template로 사용하고 두족류 그룹 특이 프라이머 세트(Oc_1, Lao_1, Sq_1, Wo_1, Bs_1)를 사용하여 real-time qPCR을 수행하였다. 두족류 13개 시료에서 문어류 특이 프라이머 세트를 사용하여 real-time qPCR을 진행한 결과, 참문어의 시료에서 Ct값 평균이 16.30을 나타내며 다른 시료에서 Ct값의 평균은 약 29 이상으로 분석되었다. 동일한 시료 조건으로 낙지류 특이 프라이머 세트의 real-time qPCR 결과는, 낙지류 시료에서 Ct값 평균이 17.59, 다른 두족류 시료의 Ct값은 검출되지 않거나 검출되는 경우에도 평균 31 이상으로 분석되었고, 오징어류 특이 프라이머 세트의 real-time qPCR 결과는, 오징어류 시료에서 Ct값 평균이 20.08, 다른 두족류 시료의 Ct값은 검출되지 않거나 검출되는 경우에도 평균 31 이상으로 분석되었으며, 일부 주꾸미에서 Ct값이 25.83으로 분석되었고, 주꾸미류 특이 프라이머 세트의 real-time qPCR 결과

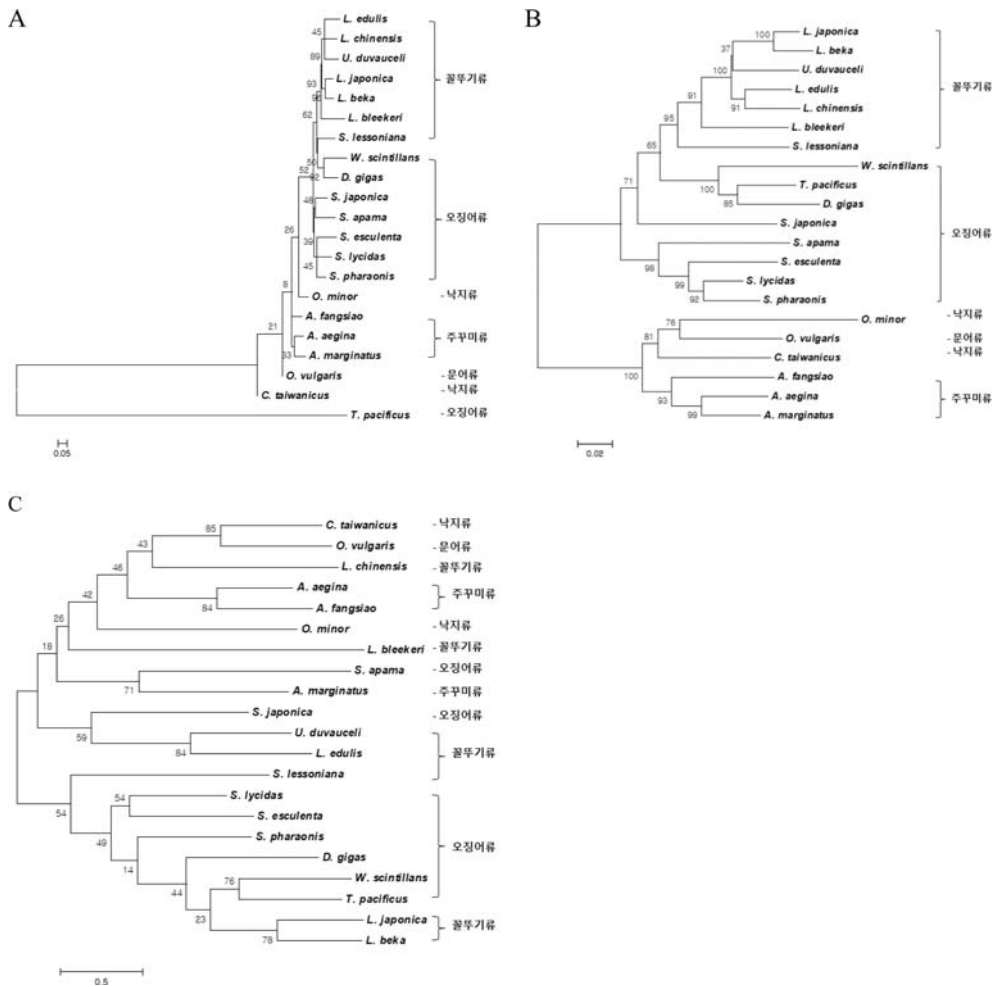


Fig. 1. Evolutionary relationships of COI (A), 16s rRNA (B) and 12s rRNA(C) mitochondrial genes. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method and are in the units of the number of amino acid substitutions per site. All positions containing gaps and missing data were eliminated. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 to identify possible phylogenetic cade.

는, 주꾸미류 시료에서 Ct값 평균이 14.61, 다른 두족류 시료의 Ct값은 평균 31 이상이였으며, 낙지류의 Ct값 평균은 약 25에서 27사이로 분석되었고, 꼴뚜기류 특이 프라이머 세트의 real-time qPCR 결과는, 주꾸미류 시료에서 Ct값 평균이 19.55, 다른 두족류 시료의 Ct값은 평균 29 이상으로 분석되었다. 두족류 그룹의 시료 genomic DNA 에서 각 종의 그룹 특이 프라이머 세트를 사용한 경우에 Ct값은 20 이하로 나타나고, 반면에 그룹 특이 프라이머 세트가 아닌 경우에 Ct값이 평균 30 이상으로 Ct값의 차이가 10 이상 나타나고 있어 특이적 프라이머를 이용하면 두족류 내의 특정 그룹을 특이적으로 분류할 수 있다. 그러나, 일부 주꾸미는 오징어류 특이 프라이머에 교차반응을 나타내지만 Ct값 차이를 통해 비교적 구분이 가능하였고, real-time qPCR 결과에서 두족류의 그룹 특이 프라이머를 사용하였을 때 유사 그룹의 증폭곡선은 목적 그룹의

증폭곡선과 명확한 차이는 나타나고 있다(Table 3). 또한, 각 그룹 특이 프라이머 세트에 의한 Ct값의 분명한 차이를 나타내고 있으므로 두족류 그룹 판별을 위한 좀 더 명확한 차이를 확인할 수 있으며, 오징어류 특이 프라이머에 비교적 약한 교차반응을 나타내는 주꾸미의 경우에도 특이 프라이머 세트에 의한 Ct값의 평균을 분석하였을 때, 평균 5 cycle 이상의 차이를 나타내고 있으며, 주꾸미류 특이 프라이머를 사용하여 검증할 수 있으므로 두족류의 그룹 구분을 명확하게 할 수 있다. 두족류 5 그룹의 반응에서 비특이 프라이머의 경우에도 Ct 값이 타겟보다는 높으나 일부 반응이 일어나고 있어서 SYBR을 이용한 반응에서 melting analysis를 수행하였다. 문어 특이 프라이머의 경우 다른 두족류에서 2개의 peak가 나타나고 Tm 값이 차이를 나타내며, 낙지 특이 프라이머의 경우 다른 두족류에서 2개의 peak가 나타나고 Tm 값이 차이를 나타내

Table 2. Threshold cycle (Ct) values of real-time PCR, quantitatively 3 reacted with standard plasmid DNA of Cephalopod group

Group / primer	Plasmid equivalents	Mean	Standard deviation	Standard curve	
Octopus / Oc_1	10 ng/ μ L	9.748	0.057	Slope	-3.373
	1 ng/ μ L	13.140	0.086		
	100 pg/ μ L	16.583	0.049	Correlation coefficient (R ²)	1
	10 pg/ μ L	19.932	0.045		
	1 pg/ μ L	23.218	0.100	Efficiency (%)	97.9
0	-	-			
Long arm octopus / Lao_1	10 ng/ μ L	11.857	0.110	Slope	-3.686
	1 ng/ μ L	15.508	0.231		
	100 pg/ μ L	19.388	0.306	Correlation coefficient (R ²)	0.998
	10 pg/ μ L	23.169	0.244		
	1 pg/ μ L	26.457	0.230	Efficiency (%)	86.8
0	-	-			
Squid / Sq_1	10 ng/ μ L	12.998	0.097	Slope	-4.082
	1 ng/ μ L	17.014	0.184		
	100 pg/ μ L	21.138	0.153	Correlation coefficient (R ²)	1
	10 pg/ μ L	25.267	0.106		
	1 pg/ μ L	29.284	0.099	Efficiency (%)	75.8
0	-	-			
Wetfoot octopus / Wo_1	10 ng/ μ L	13.047	0.120	Slope	-3.504
	1 ng/ μ L	16.627	0.120		
	100 pg/ μ L	20.050	0.106	Correlation coefficient (R ²)	0.999
	10 pg/ μ L	23.749	0.336		
	1 pg/ μ L	27.006	0.065	Efficiency (%)	92.9
0	-	-			
Beka squid / Bs_1	10 ng/ μ L	11.482	0.268	Slope	-3.633
	1 ng/ μ L	15.061	0.102		
	100 pg/ μ L	18.253	0.149	Correlation coefficient (R ²)	0.998
	10 pg/ μ L	22.254	0.119		
	1 pg/ μ L	26.050	0.204	Efficiency (%)	88.5
0	-	-			

며, 오징어 특이 프라이머의 경우 다른 두족류에서 peak 및 Tm 값이 차이를 나타내었으나 주꾸미와 Tm 값이 유사하고 peak의 수가 같았고, 주꾸미 특이 프라이머의 경우 다른 두족류에서 peak 및 Tm 값이 차이를 나타내었으나 문어와 낙지의 Tm 값과 유사하고 peak의 수가 같았으며, 꼴뚜기 특이 프라이머의 경우 다른 두족류에서 peak 및 Tm 값이 차이를 나타내었으나 오징어와 Tm 값이 유사하고 peak의 수가 같았다. 따라서, 그룹 특이 프라이머를 이용한 본 관별법에서는 대상 두족류에 따라 Tm 값이나 peak의 수에 따라 관별이 불가능한 것으로 판단되었다.

Discussion

진핵생물체는 대부분 미토콘드리아를 가지며, 동물의 미토콘드리아에 존재하는 게놈 DNA는 종에 따라 약 16,000~21,000개의 염기로 구성된 이중나선 DNA로 구성된다. 미

토콘드리아 게놈은 산화적인산화에 필수적인 13개의 소단위 단백질 및 폴리펩타이드로 구성되어 있다. 여기에는 NADH 탈수소효소(NADH-dehydrogenase) 소단위 7개(ND1-6 and ND4L), 시토크롬 B(CytB) 1개, 시토크롬 C 산화효소 소단위 3개(COI-III), ATP 합성효소 2개(ATPase 6 and 8)가 있다. 또한 미토콘드리아 단백질을 합성하기 위해 2개의 리보솜 RNA (12s rRNA and 16s rRNA)와 22개의 운반 RNA (tRNA)를 가지고 있다²⁴. 전형적인 동물의 미토콘드리아 DNA는 높은 돌연변이율을 가지며, 비암호화부분이 작은 DNA이다. 동물의 미토콘드리아 DNA의 진화율은 핵 DNA와 비교하여 유사종 사이의 종 구분 방법에 유용하고 신뢰성을 가진다. 또한, 대부분의 동물 종에서 미토콘드리아 DNA는 모계 유전방식을 가지고 있으므로 동물 유사종 구분을 위한 종 관별 결과를 단순화할 수 있다^{14,25}. 또한 미토콘드리아 DNA는 머리카락과 같이 핵이 없는 조직으로부터 추출할 수 있으며, 세포당 많

Table 3. Threshold cycle (Ct) values and standard deviation of real-time PCR with genomic DNA extracted from Cephalopod group using group specific primer

Primer name	Sample	Ct value		Primer name	Sample	Ct value	
		Ct mean	Ct SD			Ct mean	Ct SD
Oc_1	Bs1	29.23	0.106	Sq_1	Oc3	-	-
	Bs2	29.42	0.040		Lao1	-	-
	Bs3	28.99	0.139		Lao2	-	-
	Wo1	28.98	0.123		Sq1	20.082	0.138
	Wo2	29.29	0.119		Bs1	32.37	0.685
	Oc1	16.30	0.050		Bs2	33.48	0.927
	Lao1	29.44	0.062		Bs3	32.34	1.308
	Lao2	29.29	0.119		Wo1	14.61	0.122
	Sq1	29.11	0.092		Oc1	29.51	0.345
	Sq2	29.08	0.207		Oc2	29.10	0.192
Lao_1	Sq3	29.18	0.287	Oc3	32.68	0.633	
	Bs1	-	-	Lao1	26.82	0.176	
	Bs2	31.72	0.446	Lao2	24.98	0.576	
	Bs3	32.00	0.273	Sq1	32.73	0.525	
	Wo1	33.68	0.464	Sq2	32.06	0.773	
	Wo2	31.52	-	Sq3	32.33	0.360	
	Oc1	32.00	0.298	Bs1	19.55	0.145	
	Oc2	-	-	Wo1	29.54	0.078	
	Oc3	-	-	Wo2	28.95	0.059	
	Lao1	17.59	0.156	Oc1	29.28	0.069	
Sq_1	Sq1	33.59	0.613	Oc2	29.72	0.184	
	Sq2	-	-	Oc3	30.21	0.056	
	Sq3	-	-	Lao1	30.18	0.134	
	Bs1	34.54	-	Lao2	30.46	0.145	
	Bs2	-	-	Sq1	30.02	0.097	
	Bs3	-	-	Sq2	30.25	0.114	
	Wo1	31.25	0.237	Sq3	29.74	0.194	
	Wo2	25.83	0.020	Oc_1, Lao_1,			
	c1	33.29	0.192	Sq_1, Wo_1,	NTC	-	
	Oc2	34.26	0.118	Bs_1		-	

은 복제 수를 가지고 있기 때문에 농도가 낮거나 손상된 DNA 표본으로부터 유사종 구분을 위한 미토콘드리아 DNA 추출이 가능하다^{26,27}.

식품의약품안전처에서는 종 특이적 PCR 분석법을 이용하여 농·축·수산물 및 그 가공품에 대한 ‘식품 중 사용원료 진위 판별 지침서’를 통해 유사종 사이의 판별법을 제시하고 있다²⁸. 오징어류의 경우 종 유사성이 매우 높아 종 판별을 위해 다중 유전자 검사법(Multiplex polymerase chain reaction)을 사용하고 있으나²⁹, real-time qPCR 방법에 비해 제한효소 반응, 아가로즈겔 DNA전기

영동 과정 등이 요구되며, PCR의 허위 양성(false positive)이 나타나거나 한번에 많은 시료를 분석하기 어렵다.

이에 본 연구에서는 이러한 문제점을 극복하기 위한 방법으로 real-time qPCR을 이용하여 두족류를 5개의 그룹으로 구분하고, 각 그룹을 구분할 수 있는 판별 조건을 확립하였다. 두족류를 5개의 그룹 판별을 위한 그룹 특이 프라이머 세트를 사용한 real-time qPCR system을 이용하여 Ct값을 비교 분석하면 두족류를 5개의 그룹 판별이 가능하며, real-time qPCR 조건에서 반응 반복횟수를 30회 이내로 축소하면 두족류를 5개의 그룹 판별에 검출/비검출

의 판별법으로 적용할 수 있을 것으로 판단된다. 따라서 두족류를 비롯하여 그룹 및 종 구분 문제를 야기하는 생물 종의 경우, 판별에 적합한 특이 프라이머 세트를 설계하여 명확한 그룹 및 종 판별 시스템으로 적용할 수 있으며, 본 연구에서 개발된 두족류를 5개의 그룹 판별 분석법은 식품의 안전성 확보 및 유통질서 확립과 소비자 보호와 생산자의 소비자 신뢰를 회복을 위해 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

Acknowledgement

이 논문은 2018년도 식품의약품안전처의 연구개발비(17162미래사064)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문 요약

본 연구는 국내에서 생산되거나 해외에서 수입되어 국내에서 유통되는 수산물 중에서 두족류를 문어류, 낙지류, 오징어류, 주꾸미류, 꼴뚜기류의 5개 그룹으로 구분하여 분석하였다. 두족류 5개 그룹을 판별을 하기 위해 미토콘드리아에 존재하는 유전자를 분석하였고, 그 중에서 COI (mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I), 16s rRNA (16s ribosomal RNA), 12s rRNA (12s ribosomal RNA) 내에서 상당히 유사한 DNA 서열 부분과 일부 서열 변화 부분이 확인되었다. 명확하게 두족류 5개 그룹 판별을 하기 위해 COI, 16s rRNA, 12s rRNA 유전자의 일부 서열 변화 부분에서 그룹 특이적 프라이머 세트를 디자인하였다. 국내·외에서 확보한 두족류 시료(참문어, 낙지, 살오징어, 아메리카 대왕오징어, 갑오징어, 주꾸미, 모래주꾸미, 하이야주꾸미, 참꼴뚜기, 창꼴뚜기, 한치꼴뚜기)의 genomic DNA를 추출하여 각 그룹의 특이적 프라이머를 이용하여 SYBR 기반의 real-time PCR 시스템에 의해 분석되었고, threshold cycle (Ct) value와 같은 real-time PCR 결과 분석에 의해 두족류 내 그룹 판별이 가능하였다(Table 3).

References

1. 해양수산부·한국해양수산개발원: 2017년 3분기 수입 수산물 동향 . pp.4-64 (2017).
2. Bataille M., Crainic K., Leterreux M., Durigon M & De Mazancourt P: Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation. *Forensic Sci. Int.*, **99**, 165-170 (1999).
3. Civera T: Species identification and safety of fish products. *Vet. Res. Commun.*, **27**, 481-489 (2003).
4. Mackie I, et al.: Species identification of smoked and gravad fish products by sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, urea isoelectric focusing and native isoelectric focusing: A collaborative study. *Food Chem.* **71**, 1-7 (2000).
5. Moretti VM, Turchini GM, Bellagamba F, Caprino F: Traceability issues in fishery and aquaculture products. *Vet. Res. Commun.* **27**, 497-505 (2003).
6. Teletchea F: Molecular identification methods of fish species: Reassessment and possible applications. *Rev. Fish Biol. Fish.* **19**, 265-293 (2009).
7. Birstein VJ, Desalle R: Molecular phylogeny of acipenserinae. *Mol. Phylogenet. Evol.* **9**, 141-155 (1998).
8. Brown JR, Beckenbach K, Beckenbach AT, Smith MJ: Length variation, heteroplasmy and sequence divergence in the mitochondrial DNA of four species of sturgeon (Acipenser). *Genetics*, **142**, 525-535 (1996).
9. Chow S, Clarke ME, Walsh PJ: PCR-RFLP analysis on thirteen western Atlantic snappers (subfamily Lutjaninae): A simple method for species and stock identification. *Fish. Bull.* **91**, 619-627 (1993).
10. Wolf C, Rentsch J, Hübner P: PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1350-1355 (1999).
11. Wolf C, Burgener M, Hübner P, Lüthy J: PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: Differentiation of fish species. *LWT - Food Sci. Technol.* **33**, 144-150 (2000).
12. Hubalkova Z, Kralik P, Tremlova B, Rencova E: Methods of gadoid fish species identification in food and their economic impact in the Czech Republic: A review. *Veterinarni Medicina*, **52**, 273-292 (2007).
13. Liu ZJ, Cordes JF: DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, **238**, 1-37 (2004).
14. Sezaki K, Itoi S, Watabe S: A simple method to distinguish two commercially valuable eel species in Japan *Anguilla japonica* and *A. anguilla* using polymerase chain reaction strategy with a species-specific primer. *Fish. Sci.* **71**, 414-421 (2005).
15. Tisza Á, et al.: Identification of poultry species using polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) and capillary electrophoresis-single strand conformation polymorphism (CE-SSCP) methods. *Food Control*, **59**, 430-438 (2016).
16. TANABE S, et al.: 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).
17. Watanabe S, Minegishi Y, Yoshinaga T, Aoyama J, Tsukamoto K: A quick method for species identification of Japanese eel (*Anguilla japonica*) using real-time PCR: An onboard application for use during sampling surveys. *Mar. Biotechnol.* **6**, 566-574 (2004).
18. Kim M, Yoo I, Lee SY, Hong Y, Kim HY: Quantitative detection of pork in commercial meat products by *TaqMan*[®] real-time PCR assay targeting the mitochondrial D-loop region. *Food Chem.* **210**, 102-106 (2016).
19. Amaral JS, Santos G, Oliveira MBPP, Mafra I: Quantitative detection of pork meat by EvaGreen real-time PCR to assess the authenticity of processed meat products. *Food Control*,

- 72, 53-61 (2017).
20. Kim S, Eo HS, Koo H, Choi JK, Kim W: DNA barcode-based molecular identification system for fish species. *Mol. Cells*, **30**, 507-512 (2010).
 21. Hou B, *et al.*: 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).
 22. Yang, L. *et al.* Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. *Sci. Rep.* **4**, (2014).
 23. Ishibashi Y, Saitoh T: Phylogenetic relationships among fragmented Asian black bear (*Ursus thibetanus*) populations in western Japan. *Conserv. Genet.* **5**, 311-323 (2004).
 24. DeSalle R, Williams AK, George M: Isolation and characterization of animal mitochondrial DNA. *Methods in Enzymology*, **224**, 176-203 (1993).
 25. Jenuth JP, Peterson AC, Fu K, Shoubridge EA: Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* **14**, 146-151 (1996).
 26. Rocha-Olivares A, Chávez-González JP: Molecular identification of dolphinfish species (genus *Coryphaena*) using multiplex haplotype-specific PCR of mitochondrial DNA. *Ichthyol. Res.* **55**, 389-393 (2008).
 27. Matsui S, Nakayama K, Kai Y, Yamashita Y: Genetic divergence among three morphs of *Acentrogobius pflaumii* (Gobiidae) around Japan and their identification using multiplex haplotype-specific PCR of mitochondrial DNA. *Ichthyol. Res.* **59**, 216-222 (2012).
 28. 식품의약품안전처 . 식품 중 사용원료 진위 판별 지침서 (V): 유전자분석법 활용 . pp.12-108 (2015).
 29. Kim H.S., Seo Y. B., Choi S.-S., Kim J.-H., Sin J.Y., Yang J.-Y., Kim G.-D. Development and validation of multiplex polymerase chain reaction to determine squid species based on 16s rRNA gene. *J. Fd. Hyg. Safety*, **30**, 43-50 (2015).