



## 종 특이 프라이머를 이용한 동물성 식품원료의 진위 판별법 개발

김규현\* · 이호연 · 김용상 · 김미라 · 정유경 · 이재황 · 장혜숙 · 박용춘<sup>1</sup> · 김상엽<sup>2</sup> · 최장덕 · 장영미

식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 신종유해물질팀

<sup>1</sup>식품의약품안전처 신소재식품과, <sup>2</sup>부산지방식품의약품안전청 유해물질분석팀

### Development of Species-Specific PCR to Determine the Animal Raw Material

Kyu-Heon Kim\*, Ho-Yeon Lee, Yong-Sang Kim, Mi-Ra Kim, Yoo Kyung Jung, Jae-Hwang Lee,  
Hye-Sook Chang, Yong-Chjun Park<sup>1</sup>, Sang Yub Kim<sup>2</sup>, Jang Duck Choi, and Young-Mi Jang

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

<sup>1</sup>Novel Food Division, Ministry of Food and Drug Safety,

<sup>2</sup>Hazardous Substances Analysis Team, Busan Regional Food and Drug Administration

(Received June 28, 2014/Revised August 9, 2014/Accepted October 22, 2014)

**ABSTRACT** - In this study, the detection method was developed using molecular biological technique to distinguish authenticity of animal raw materials. The genes for distinction of species about animals targeted at *Cytochrome c oxidase subunit I (COI)*, *Cytochrome b (Cytb)*, and *16S ribosomal RNA (16S rRNA)* genes in mitochondrial DNA. The species-specific primers were designed by that Polymerase Chain Reaction (PCR) product size was around 200 bp for applying to processed products. The target 24 raw materials were 2 species of domestic animals, 6 species of poultry, 2 species of freshwater fishes, 13 species of marine fishes and 1 species of crustaceans. The results of PCR for Rabbit, Fox, Pheasant, Domestic Pigeon, Rufous Turtle Dove, Quail, Tree Sparrow, Barn Swallow, Catfish, Mandarin Fish, Flying Fish, *Mallotus villosus*, Pacific Herring, Sand Lance, Japanese Anchovy, Small Yellow Croaker, Halibut, Jacopever, Skate Ray, Ray, File Fish, Sea Bass, Sea Urchin, and Lobster raw materials were confirmed 113 bp ~ 218 bp, respectively. Also, non-specific PCR products were not detected in compare species by species-specific primers. The method using primers developed in this study may be applied to distinguish an authenticity of food materials included animal raw materials for various processed products.

**Key words:** Animal raw material, Polymerase Chain Reaction (PCR), Species-specific primer, mitochondrial DNA

최근 값싼 식품원료를 사용하거나 표시사항을 허위로 기재하는 불량식품으로 인해 식품에 대한 불안감이 높아지고 있다. 현재 불량식품의 정의는 식품의 생산·제조부터 유통·판매까지 모든 단계에서 법을 위반한 제품을 말하며, 최근에는 국민에게 불안감을 주는 모든 식품을 의미하고 있다. 이러한 불량식품은 우리의 건강을 위협할 뿐 아니라 건전한 식품유통 질서를 어지럽히는 주범이다. 미국 식품의약품청(FDA), 영국 식품기준청(FSA)에서는 최근에 늘어나는 불량식품, 의약품, 화장품 등에 대한 관리를 강화하고 있으며, 유럽에서는 불량식품으로부터 소비

자를 보호하기 위하여 식품안전과 이력추적제도에 관련된 규정인 European Union regulation (EUR)을 설정하였다. 우리나라에서도 외국처럼 식품에 대한 관리, 감독 강화에 대한 중요성을 인식하면서 식품원료의 진위 여부가 동·식물성 관련 제품의 종 판별과 관련되어 중요한 이슈로 대두되고 있다<sup>1)</sup>.

육제품 가공 산업에서 저가의 가금육 및 포유류 고기가 고급 육류로 둔갑 유통되거나 가공 육제품의 원료로 사용될 경우 이를 과학적으로 식별할 수 있는 기술 개발이 필요하다<sup>2,3)</sup>. 특히 조류들은 유연관계가 높은 근연종 간의 동정은 더욱 어려워 종 판별을 위한 정확한 감식 기술 개발이 필요하다<sup>4)</sup>. 육제품 이외에 어류의 경우에는 기름치를 참치로, 톨라피아를 도미로, 자바리나 능성어를 다급마리로 둔갑되어 유통되는 사례가 발생하고 어류의 소비량이 적지 않은 것을 미루어 볼 때 어류 종 판별에도 관심이 쏟아지고 있는 실정이다<sup>5)</sup>. 지금까지 생물을 분류함에 있

\*Correspondence to: Kyu-Heon Kim, New Hazardous Substance Team, Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, 187 Osongsaengmyeong2-ro, Osong-eup, Heungdeok-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do 363-700, Korea.  
Tel : 82-43-719-4453, Fax : 82-43-719-4450  
E-mail : khkim95@korea.kr

어 형태 및 형질 분석이 주축이 되었고 이것이 계통분류의 근간을 이루어 왔다. 어류의 종 분류 및 계통 연구는 지느러미 모양, 골격 구조, 비늘, 측선 등과 같은 형태형질 및 체폭, 체고 등에 대한 비율과 같은 계측 형질 등을 바탕으로 하고 있다. 하지만 근래에는 형태 형질을 이용한 계통 연구에 많은 문제점들이 발견되면서 과학적으로 확인하는 방법들이 개발되었다<sup>6)</sup>.

식품의 부정확한 사용원료 표시나 제조 과정 중 원재료 외의 값싼 원료들의 혼입을 통제하기 위하여 제품에 함유된 원료 물질을 분석할 수 있는 기술 개발이 필요하다. 따라서 육안으로 원재료를 확인할 수 없거나 의도적으로 소량의 원료를 혼입하여 제조된 식품에 대하여 사용원료를 확인하는 방법에는 이화학적 분석법, 단백질 분석법 및 유전자 분석법 등이 있다. 광합성의 대사경로에 따른 탄소동위원소 비율을 분석하는 이화학적 분석법은 벌꿀의 진위 판별<sup>7,8)</sup>, 분자량이 적은 ion-fragment의 패턴 차이를 이용하여 비교·분석하는 MS-전자코 분석법<sup>9,10)</sup> 등이 있으며, 단백질 분석법은 면역학적 방법<sup>11,12)</sup>이 주로 사용되고 있다. 그러나 이들 종 특이적 단백질에 기초하여 원료육의 종 기원을 판별하는 방법은 특히 열처리 과정을 거친 원료육이나 가공육은 수용성 단백질 및 특이적 항원의 변성으로 감수성이 현저히 떨어지는 문제점을 갖고 있다<sup>13)</sup>. 유전자는 모든 동물 및 식물의 조직 내에 존재하며 식품 제조 공정 중 처리되는 압력, 고열 등에 대하여 단백질 보다 안정성이 높은 장점이 있다. 최근 분자생물학적 기술이 발달하면서 DNA 분자 수준에서 종 특이적 DNA 염기서열 차이에 기초한 PCR 기법은 종래의 단백질 수준에서 지녔던 종 판별의 한계성과 문제점을 극복할 수 있는 새로운 기술로 극소량의 DNA로 *in vitro* 내에서 특정 염기서열 영역을 특이적으로 증폭함으로써 신속 정확하고 감수성이 매우 높은 종 판별법으로 알려져 있다<sup>14)</sup>.

종 판별을 위한 유전자 증폭에는 크게 두 가지로 구분할 수 있다. 첫 번째, 일반 프라이머를 이용하여 증폭 후 염기서열을 결정하고 유전자은행([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi) 등)에 등록되어 있는 염기서열과 비교하여 종을 판별하는 방법으로 증폭 산물의 크기가 650 bp 이상으로 가공식품에 적용하기에는 한계가 있다<sup>15,16)</sup>. 두 번째, 종 특이 프라이머를 이용하는 방법은 증폭 산물의 크기를 200 bp 내외로 개발하기 때문에 가공식품의 제조 공정 중에 유전자가 일부 손상된다고 하여도 적용이 가능하다<sup>17)</sup>.

식품의약품안전처는 2017년까지 동·식물성 식품원료 300종 이상에 대하여 진위 판별법을 마련하고자 하고 있으며, 2010년부터 2012년까지 불량식품 근절을 위해 유전자 분석법을 이용하여 식품 중 동물성(축산물 12종, 수산물 29종) 및 식물성(33종) 사용원료 74종에 대한 진위 판별법을 개발하여 지방식품의약품안전청, 보건환경연구원, 시·도 지자체, 식품위생검사기관 및 산업계 등에 보급하

여 활용하고 있다. 본 연구는 2013년도에 대상종으로 선정된 가축류, 가금류 및 어류를 포함한 동물성 식품원료 총 24종에 대하여 종 특이 프라이머 설계 및 PCR 증폭 조건 등을 확립하여 진위 판별법을 개발하였다. 개발된 판별법은 동물성 식품원료를 사용하여 이용한 가공식품에 대하여 원재료를 확인이 가능하여 향후 과학적 식품감시 및 불량식품 근절에 적극 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

## 재료 및 방법

### 시료 및 시약

본 연구에서 대상종으로 사용된 시료는 동물성 식품원료 24종으로 국립생물자원관 야생생물유전자원센터, 충북 내수면연구소, 야생동물유전자원은행 등 유관기관을 통해 확보하였으며, 일부 시료는 국내 대형마트 등에서 구입하였다. 대상종에 대한 실험은 총 5개 집단으로 나누어 진행하였으며, 사용된 비교종은 Table 2에 기재하였다. 유전자 증폭(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 위한 프라이머 및 *Taq* DNA polymerase는 바이오니아(Bioneer, Korea)에 의뢰하여 합성 또는 구매하였으며, PCR 장비는 C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-RAD Laboratories, Inc. USA)을 사용하였다. 유전자 추출 정제는 DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) 및 AccuPrep® PCR Purification Kit (Bioneer, Korea)를 이용하였다.

### 유전자 추출

DNeasy Blood & Tissue kit를 사용하여 유전자를 추출하였다. 추출 방법은 제조사에서 제공하는 방법에 의거하여 추출하였으며, 최종 용출단계에서는 DNeasy Blood & Tissue kit에 포함되어 있는 멸균증류수를 사용하여 DNeasy Mini spin column으로부터 용출하였다.

### 프라이머 설계

종 특이 프라이머를 설계하기 위하여 미국 국립보건원에서 운영하는 유전자은행([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))에 등록되어 있는 유전자 염기서열을 이용하였다. 대상 유전자는 미토콘드리아 DNA에 존재하는 *12S rRNA*, *16S rRNA*, *Cytb*, *COI*, *COII* 및 *NADH* 유전자 등의 염기서열 정보를 검색하여 확인한 후, ClustalW2-Multiple Sequence Alignment를 이용하여 염기서열 정보를 비교·분석하여 종 특이적인 영역을 포함하는 염기서열에서 프라이머를 설계하였고, 유전자은행(GenBank)에 정보가 없는 경우에는 직접 염기서열을 결정 후 설계하였다. 대상종인 토끼(*Oryctolagus cuniculus*), 여우(*Silurus asotus*), 꿩(*Phasianus colchicus*), 집비둘기(*Columba livia*), 멧비둘기(*Columba rupestris*), 메추리(*Coturnix coturnix*), 참새(*Passer montanus*), 제비(*Hirundo rustica*), 메기(*Silurus asotus*), 쏘가리(*Siniperca*

**Table 1.** Information of species-specific primers and PCR conditions in this study

Item	Name	Primer Sequence(5' → 3')	Amplicons size (bp)	Target gene	PCR condition			
					temp.	time	cycle	
Rabbit	SFI13-Rabbit-F	CAACTTTAGTCTTAATTCACCTCCTC	156	<i>Cytb</i>	1st denaturation	94°C	15min	1
	SFI13-Rabbit-R	AAATAAGGAGGAGAAGAATGGCTACA			denaturation	94°C	30sec	35
				annealing	65°C	15sec		
				extension	72°C	30sec		
				elongation	72°C	5min	1	
Fox	SFI13-Fox-F	CTTCCCGCACCATCAAATATTT	204	<i>Cytb</i>	1st denaturation	94°C	15min	1
	SFI13-Fox-R	AGATGCTCCGTTTGCATGTATGTA			denaturation	94°C	30sec	35
				annealing	65°C	15sec		
				extension	72°C	45sec		
				elongation	72°C	5min	1	
Pheasant	SFI13-Pheasant-F	CGTAATCACAGGCATCACCATCACT	152	<i>Cytb</i>	1st denaturation	94°C	15min	1
	SFI13-Pheasant-R	GGGTGAGTATCAGTGCTAAGCCTAGG			denaturation	94°C	20sec	35
				annealing	68°C	5sec		
				extension	72°C	20sec		
				elongation	72°C	5min	1	
Domestic Pigeon	SFI13-Domestic-F	TTATAGCCACTGCATTCGTAGGA	160	<i>Cytb</i>	1st denaturation	94°C	15min	1
	SFI13-Domestic-R	GTTAATGTAGGGTTATCTACGGAA			denaturation	94°C	30sec	35
				annealing	62°C	15sec		
				extension	72°C	30sec		
				elongation	72°C	5min	1	
Rufous Turtle Dove	SFI13-Rufous-F	ATAACCCGCTCGGTATTTTC	113	<i>Cytb</i>	1st denaturation	95°C	5min	1
	SFI13-Rufous-R	AGCTAGGGTTATTAGAGGAAGGAA			denaturation	95°C	30sec	35
				annealing	62°C	15sec		
				extension	72°C	30sec		
				elongation	72°C	10min	1	
Quail	SFI13-Quail-F	CACTAATAGCCACTGCTTTCGTAGGA	163	<i>Cytb</i>	1st denaturation	94°C	15min	1
	SFI13-Quail-R	GTTAGGGTAGGATTGTCAACTGAA			denaturation	94°C	20sec	35
				annealing	62°C	5sec		
				extension	72°C	20sec		
				elongation	72°C	5min	1	
Tree Sparrow	SFI13-Passer-F	ATTCCTCATCGTAGGCCTCACACTA	167	<i>Cytb</i>	1st denaturation	94°C	15min	1
	SFI13-Passer-R	GGGAGACTAGTAGGGAGAGTATTAATA			denaturation	94°C	30sec	35
				annealing	62°C	15sec		
				extension	72°C	30sec		
				elongation	72°C	5min	1	
Barn Swallow	SFI13-Barn-F	ACTGACCCTAGTACACTTAACCCTA	152	<i>Cytb</i>	1st denaturation	94°C	15min	1
	SFI13-Barn-R	GGGAAGCTAGATCGATGAGTAGTATA			denaturation	94°C	30sec	35
				annealing	60°C	15sec		
				extension	72°C	30sec		
				elongation	72°C	5min	1	

**Table 1.** (Continue) Information of species-specific primers and PCR conditions in this study

Item	Name	Primer Sequence(5' → 3')	Amplicons size (bp)	Target gene	PCR condition			
					temp.	time	cycle	
Catfish	SF113-Catfish-F	ATTCGCCATTGTAGCCGCTACATTA	165	<i>Cytb</i>	1st denaturation	94°C	15minn	1
					denaturation	94°C	30sec	
	annealing	68°C			10sec	35		
	extension	72°C			45sec			
	elongation	72°C			5min	1		
Mandarin Fish	SF113-Mandarin-F	ATACATCGGAAACACCCTCGTCCAA	121	<i>Cytb</i>	1st denaturation	94°C	15minn	1
					denaturation	94°C	30sec	
	annealing	62°C			15sec	35		
	extension	72°C			45sec			
	elongation	72°C			5min	1		
Flying Fish	SF113-Flying-F	CTGCAAGCAGACCATGCTAATTAGA	136	<i>16S</i>	1st denaturation	94°C	15minn	1
					denaturation	94°C	30sec	
	annealing	60°C			15sec	35		
	extension	72°C			30sec			
	elongation	72°C			5min	1		
Mallotus villosus	SF113-Mallotus-F	ATTGTGACTCCTGTCTCTCCTGTCT	151	<i>16S</i>	1st denaturation	94°C	15minn	1
					denaturation	94°C	20sec	
	annealing	62°C			15sec	35		
	extension	72°C			30sec			
	elongation	72°C			5min	1		
Pacific Herring	SF113-Clupea-F	TTATGCCTAGCGGCACAAATCTTAA	178	<i>Cytb</i>	1st denaturation	94°C	15minn	1
					denaturation	94°C	30sec	
	annealing	60°C			15sec	35		
	extension	72°C			30sec			
	elongation	72°C			5min	1		
Sand Lance	SF113-Ammody-F	CTCTGTCTTATCGCACAAATTCTTA	178	<i>Cytb</i>	1st denaturation	94°C	15minn	1
					denaturation	94°C	30sec	
	annealing	60°C			15sec	35		
	extension	72°C			30sec			
	elongation	72°C			5min	1		
Japanese Anchovy	SF113-Anchovy-F	ACTAGCCAACCTGTGAATAAGCGACT	146	<i>16S</i>	1st denaturation	94°C	15minn	1
					denaturation	94°C	30sec	
	annealing	60°C			15sec	35		
	extension	72°C			30sec			
	elongation	72°C			5min	1		
Small Yellow Croaker	SF113-Larimic-F	TGCTTTCATTATGCTCGCAGCCTCA	188	<i>COI</i>	1st denaturation	94°C	15minn	1
					denaturation	94°C	30sec	
	annealing	58°C			15sec	35		
	extension	72°C			30sec			
	elongation	72°C			5min	1		
Small Yellow Croaker	SF113-Larimic-R	TAAGAATCGTTGTGATGAAGTTGAT						

**Table 1.** (Continue) Information of species-specific primers and PCR conditions in this study

Item	Name	Primer Sequence(5' → 3')	Amplicons size (bp)	Target gene	PCR condition			
					temp.	time	cycle	
Halibut	SFI13-Halibut-F	ATGTTAATCACCCAGATTTAACC	177	<i>Cytb</i>	1st denaturation	94°C	15min	1
	SFI13-Halibut-R	ATGTGGAGGTAAATGCAGATAAAGA			denaturation	94°C	20sec	
Jacopever	SFI13-Sebastes-F	ACCAAAGAAGATCCTGTCAAGTAAC	166	<i>16S</i>	annealing	64°C	15sec	35
	SFI13-Sebastes-R	AGATATTCTGTTAATTAGAGCTGCG			extension	72°C	30sec	
Skate Ray	SFI13-Raja-F	CTCCATTAAC TTCATCACCACAATT	179	<i>COI</i>	elongation	72°C	5min	1
	SFI13-Raja-R	AGAAAGTTGTGTGAGATTACGATC			1st denaturation	94°C	15min	1
Ray	SFI13-Ray-F	CATCGTTATATATGAATTACCCC	218	<i>COI</i>	denaturation	94°C	30sec	
	SFI13-Ray-R	GGAGGGAACCCATTTGGCTTACT			annealing	60°C	15sec	35
File Fish	SFI13-File-F	CACTAAAAC TGATCATGAAAAGAC	188	<i>16S</i>	extension	72°C	30sec	
	SFI13-File-R	TAACGCCGGATCAGTAAAGTCAGAA			elongation	72°C	5min	1
Sea Bass	SFI13-SeaBass-F	TGCTTGATTACTCAAATCCTCACAG	185	<i>Cytb</i>	1st denaturation	94°C	15min	1
	SFI13-SeaBass-R	CCCCGCCCAATATGTATGTAAATGC			denaturation	94°C	30sec	
Sea Urchin	SFI13-SeaUrchin-F	GCAGGGATAACAGCGTTATCTTT	127	<i>16S</i>	annealing	60°C	15sec	35
	SFI13-SeaUrchin-R	GACTTTAATGGTCGAACAGACC			extension	72°C	30sec	
Lobster	SFI13-Lobster-F	AAGCCTCATTTGGTGACGATCAAAT	172	<i>COI</i>	elongation	72°C	5min	1
	SFI13-Lobster-R	AAATCTTATATTGTTACATACGGGG			1st denaturation	94°C	15min	1
					denaturation	94°C	20sec	
					annealing	64°C	10sec	35
					extension	72°C	30sec	
					elongation	72°C	5min	1

schzereri), 날치(*Cheilopogon agoo*), 열빙어(*Mallotus villosus*), 청어(*Clupea pallasii*), 까나리(*Ammodytes hexapterus*), 멸치(*Engraulis japonicus*), 참조기(*Larimichthys polyactis*), 넙치(*Paralichthys olivaceus*), 조피볼락(*Sebastes schlegelii*), 홍어(*Okamejei kenojei*), 가오리(*Urolophus aurantiacus*), 말쥐치(*Thamnaconus modestus*), 농어(*Lateolabrax japonicus*), 성게(*Strongylocentrotus intermedius*) 및 바닷가재(*Homarus americanus*)에 대하여 각각 종 특이 프라이머를 설계하였으며(Table 1), 비교·분석에는 BioEdit ver. 7.0.9.0 프로그램을 이용하였다.

### PCR 조건 및 결과 확인

추출 DNA를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR을 위한 반응액의 조성은 주형 DNA 50 ng/μl, dNTPs 200 μM, MgCl<sub>2</sub> 2.0 mM을 각각 0.5 μM이 되게 혼합하였고, 프라이머는 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 10 pmole로 희석하여 각각 1 μl를 혼합하였으며 최종 용량은 20 μl로 하였다. 본 연구에 사용된 종 특이 프라이머와 검출을 위한 최적의 반응조건은 Table 1에 나타내었다. 최종산물의 확인은 반응액 5 μl를 취하여 아가로즈 젤로 100 V, 30분간 전기영동하고 PCR 산물의 확인은 100 bp DNA ladder를 사용하였으며, EtBr로 염색(1 μl/ml)한 후 UV 투영기를 이용하여 결과를 확인하였다.

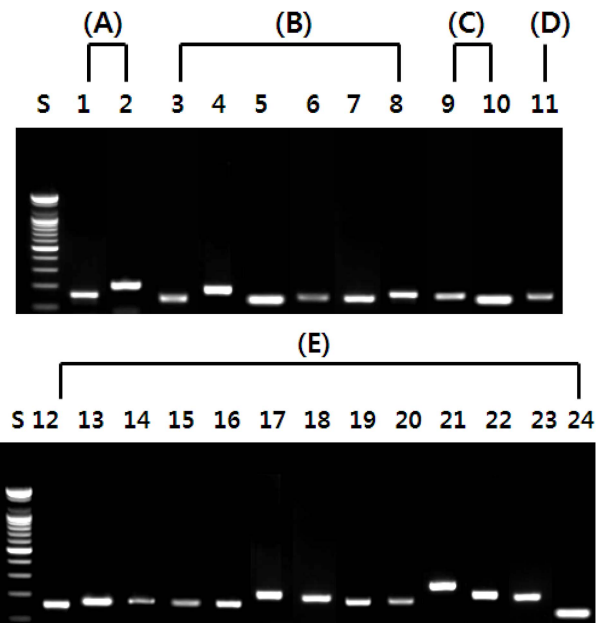
## 결 과

### 종 특이 프라이머 설계

본 연구에서는 동물성 식품원료 24종에 대한 종 특이 프라이머를 개발하기 위하여 미국 국립보건원에서 운영하는 유전자은행(www.ncbi.nlm.nih.gov)에 등록되어 있는 각종들의 염기서열을 이용하여 설계하였다. 대상종인 토끼, 여우, 꿩, 집비둘기, 멧비둘기, 메추리, 참새, 제비, 메기, 쏘가리, 날치, 열빙어, 청어, 까나리, 멸치, 참조기, 넙치, 조피볼락, 홍어, 가오리, 말쥐치, 농어, 성게 및 바닷가재에 대하여 각각 156, 204, 152, 160, 113, 163, 167, 152, 165, 121, 136, 151, 178, 178, 146, 188, 177, 166, 179, 218, 188, 185, 127 및 172 bp의 증폭 산물을 확인하였다(Table 1). 비교종에 대한 비 특이적 밴드의 생성유무를 확인하기 위하여 총 5개 집단으로 나누어 진행하였으며, 사용된 비교종은 Table 2에 표시하였다.

### 가축류의 PCR 결과

토끼와 여우는 미토콘드리아 유전자 중 *Cytb* 부위를 선정하였고 PCR을 수행한 결과 156 bp와 204 bp의 특이 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 1). 그리고 비교종과의 연관성을 확인한 결과 상호간의 비 특이적 밴드는 생성되지 않았다(data not showed).



**Fig. 1.** Detection of positive controls by PCR using species-specific primer [Domestic animals (A), Poultry (B), Freshwater fishes (C), Marine fishes (D) and Crustaceans (E)]. Lane 1; Rabbit, Lane 2; Fox, Lane 3; Pheasant, Lane 4; Domestic Pigeon, Lane 5; Rufous Turtle Dove, Lane 6; Quail, Lane 7; Tree Sparrow, Lane 8; Barn Swallow, Lane 9; Catfish, Lane 10; Mandarin Fish, Lane 11; Lobster, Lane 12; Flying Fish, Lane 13; Mallotus villosus, Lane 14; Pacific Herring, Lane 15; Sand Lance, Lane 16; Japanese Anchovy, Lane 17; Small Yellow Croaker, Lane 18; Halibut, Lane 19; Jacopever, Lane 20; Skate Ray, Lane 21; Ray, Lane 22; File Fish, Lane 23; Sea Bass, Lane 24; Sea Urchin. S; Size marker.

### 가금류의 PCR 결과

꿩, 집비둘기, 멧비둘기, 메추리, 참새 및 제비는 미토콘드리아 유전자 중 *Cytb* 부위를 선정하였고 PCR을 수행한 결과 152, 160, 113, 163, 167 및 152 bp의 특이 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 1). 그리고 비교종과의 연관성을 확인한 결과 상호간의 비 특이적 밴드는 생성되지 않았다(data not showed).

### 민물어류의 PCR 결과

민물어류 중 메기, 쏘가리는 미토콘드리아 유전자 중 각각 *Cytb* 부위를 선정하였고 PCR을 수행한 결과 165 bp와 121 bp의 특이 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 1). 그리고 비교종과의 연관성을 확인한 결과 상호간의 비 특이적 밴드는 생성되지 않았다(data not showed).

### 해양어류의 PCR 결과

해양어류 중 날치, 열빙어, 청어, 까나리, 멸치, 참조기, 넙치, 조피볼락, 홍어, 가오리, 말쥐치, 농어 및 성게는 미토콘드리아 유전자 중 각각 16S, *Cytb* 및 *COI* 부위를 선

**Table 2.** List of compare species corresponding to target species using in this study

	Group	Target Species	Compare Species
1	Domestic Animal	Rabbit	Chicken, Duck, Turkey
2		Fox	Pig, Dog, Rabbit, Cow
3	Poultry	Pheasant	Chicken, Duck, Turkey, Quail, Domestic Pigeon, Rufous Turtle Dove
4		Domestic Pigeon	Chicken, Duck, Turkey, Quail, Pheasant, Rufous Turtle Dove
5		Rufous Turtle Dove	Chicken, Duck, Turkey, Quail, Pheasant, Domestic Pigeon
6		Quail	Chicken, Duck, Turkey, Pheasant
7		Tree Sparrow	Chicken, Turkey, Pheasant, Quail, Domestic Pigeon, Rufous Turtle Dove
8		Barn Swallow	Chicken, Duck, Tree Sparrow, Quail, Domestic Pigeon, Rufous Turtle Dove
9	Freshwater Fish	Catfish	Crucian Carp, Snakehead, Common Carp Leather carp, Mandarin Fish, Korean bullhead
10		Mandarin Fish	Crucian Carp, Common Carp Leather carp, Catfish, Korean bullhead
11	Marine Fish	Flying Fish	Mallotus villosus, Pacific Herring, Walleye Pollock, Chum Salmon, Japanese Anchovy, Sea Urchin
12		Mallotus villosus	Flying Fish, Pacific Herring, Japanese Anchovy, Sand Lance
13		Pacific Herring	Flying Fish, Mallotus villosus, Japanese Anchovy, Sand Lance
14		Sand Lance	Flying Fish, Mallotus villosus, Japanese Anchovy, Pacific Herring
15		Japanese Anchovy	Flying Fish, Sand Lance, Mallotus villosus, Pacific Herring
16		Small Yellow Croaker	Pacific Herring, Flatfish, White Croaker, Yellow Croaker, Flatfish
17		Halibut	Jacopever, Finespotted Flounder, File Fish, Flatfish
18		Jacopever	Halibut, Finespotted Flounder, File Fish
19		Skate Ray	Ray
20		Ray	Skate Ray
21		File Fish	Walleye Pollock, Pacific saury, Chub Mackerel, Finespotted Flounder, Halibut, Jacopever
22	Sea Bass	Brown Croaker, Flathead Mullet, Snapper, Jacopever, Halibut, Flatfish	
23	Sea Urchin	Flying Fish, Chum Salmon, Mallotus villosus, Sea Squirt	
24	Crustaceans	Lobster	Crab, Prawn, Red King

정하였고 PCR을 수행한 결과 136, 151, 178, 178, 146, 188, 177, 166, 179, 218, 188, 185 및 127 bp의 특이 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 1). 그리고 비교종과의 연관성을 확인한 결과 상호간의 비 특이적 밴드는 생성되지 않았다(data not showed).

#### 갑각류의 PCR 결과

갑각류 중 바닷가재는 미토콘드리아 유전자 중 각각 *COI* 부위를 선정하였고 PCR을 수행한 결과 172 bp의 특이 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 1). 그리고 비교종과의 연관성을 확인한 결과 상호간의 비 특이적 밴드는 생성되지 않았다(data not showed).

## 고 찰

최근 국내에서 유통되고 있는 수입육 또는 국산육의 식

육 형태 다양화로 종 고유의 조직학 및 해부학적 특성이 없어지면서 저가의 육류가 고가의 육류로 둔갑 유통되거나 표시사항을 허위로 기재하는 사례들이 빈번히 발생하였다<sup>18)</sup>. 불량식품 사례로는 돼지고기에 소고기 향을 첨가한 장조림, 메기내장을 사용한 창란젓, 무게를 늘리기 위하여 양파 또는 무를 혼합한 다진마늘, 틸라피아를 이용한 도미초밥, 옥수수기름을 혼합한 참기름, 설탕을 먹이로 하여 제조 되었으나 자연꿀로 표시되는 등의 사례가 있다<sup>19)</sup>. 이처럼 국내·외 식품정보, 언론매체 등을 통하여 불량식품으로 제조·유통사례가 높을 것으로 예상되는 종을 선정하여 판별법을 마련하고자 하였다.

각종 혼합육 및 육가공제품에 대한 동물성 사용원료의 육종 관별 기술로서는 HPLC의 고성능액체크로마토그래피, SDS-PAGE 및 IEF 등의 전기영동법 그리고 ELISA의 면역효소 분석법 등이 사용되어 왔다<sup>20)</sup>. 하지만 이 방법들은 근육 단백질 조성 및 구조적 차이에 따른 종 특이적

단백질을 검출하는데 목적을 두고 있어, 가공처리 되지 않은 원료육에는 적용 가능하지만 가공과정을 거치는 식육 추출가공품에는 적용 한계가 있다. 가공식품은 고압, 살균 등과 같은 가공처리 과정을 거치면서 단백질 변성 및 수용성 단백질 프로파일의 변화가 일어나기 때문이다<sup>21)</sup>. 최종목표가 가공식품을 대상으로 하기 때문에 제조 공정 중 열처리, 산처리, 고압조건 등을 감안하여 비교적 안정성이 높은 유전자 분석법을 택하였다. 실제로 식품은 다양한 매트릭스를 가지고 있으며 가공 과정 중 유전자의 손상이 일어나기 때문에 종 특이 프라이머를 설계하여 PCR 후 PCR 산물의 생성 유무로 원료 성분을 판별하는 방법에 대한 연구가 다수 보고되었다<sup>22-24)</sup>. 종 특이 프라이머를 이용하는 장점으로는 분석 시간이 짧고 가공식품처럼 유전자의 크기가 작은 경우에도 적용이 가능하다. 단점으로는 설계된 프라이머가 유사종에서도 증폭 가능성이 있어 프라이머 설계와 유사종에 대한 검증 작업이 필수적이다.

미토콘드리아는 세포질에 존재하는 소기관으로 세포 내 에너지를 생산하며 미토콘드리아 DNA(mt DNA)는 모계 유전을 통해 다음 세대에 유전물질을 전달한다. 동물의 종 감별에는 핵 DNA 보다 mt DNA가 종 특이성, 신뢰성 및 재현성이 높은 것으로 알려져 있고 각 미토콘드리아는 다수의 mt DNA를 갖고 있어 종 특이적 mt DNA 염기서열을 이용한 PCR 분석은 종 판별에 매우 효과적인 방법으로 입증되었다<sup>25,26)</sup>. 동물성 원료는 mt DNA 중에서도 2003년 Hebert 등은 미토콘드리아에 존재하는 유전자(*Cytochrome c oxidase subunit I*, *Cytochrome b*)를 이용하면 신속하고 정확하게 판별할 수 있다고 제안하였으며<sup>27,28)</sup> “DNA barcode” 라는 용어를 처음으로 사용하였다<sup>15)</sup>. *COI* 유전자는 해양 무척추동물의 동정을 위하여 1994년 Folmer 등이 최초로 제안하였으나<sup>12)</sup> 현재 대부분의 동물류에 사용하고 있다<sup>29)</sup>. 본 연구에서는 *COI* 유전자뿐만 아니라 *Cytb* 유전자를 이용하여 종 특이 프라이머를 설계하였는데, *Cytb* 유전자는 전체 1.2 kb로서 mt DNA 내부에 존재하는 중요한 단백질 암호화 유전자들 중 하나이고, 특징적인 모계 유전 양상을 보이고 유전자 재조합이 거의 발생하지 않으므로 종 수준의 분류학적 검토에 많이 이용되고 있다<sup>29)</sup>.

따라서 본 연구에서는 mt DNA 중 *Cytb*, *COI* 및 *16S rRNA* 유전자를 대상으로 하여 가축류, 가금류, 민물어류, 해양어류 및 갑각류 총 24종을 대상으로 선정하고 종 특이 프라이머를 사용하여 예상 크기의 PCR 산물을 확인하였으며, 대상종별 비교종(Table 2)에 대한 비 특이적 밴드가 검출되지 않은 최적의 프라이머 및 PCR 조건을 제시하였다. 개발된 유전자 분석법을 이용하여 동물성 식품 원료가 사용된 식품 원료 및 가공식품의 진위 판별에 활용이 가능할 것으로 기대된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 식품의약품안전평가원 2013년도 연구개발사업 지원비(13161소비자102)에 의해 수행되었으며, 표준시료를 제공하여 주신 국립생물자원관 야생생물유전자원센터, 충북내수면연구소, 야생동물유전자원은행 및 서울대공원 동물연구실에 감사드립니다.

## 요 약

본 연구에서는 식품 중 동물성 사용원료의 진위 판별을 위하여 분자생물학적 기법을 이용한 시험법을 개발하였다. 동물성 식품원료의 종 판별을 위한 유전자로는 미토콘드리아 DNA에 존재하는 *COI*, *Cytb*, 및 *16S rRNA* 유전자를 대상으로 하였으며, 가공식품에 적용하기 위하여 PCR 산물의 크기는 200 bp 내외가 되도록 종 특이 프라이머를 설계하였다. 대상종으로는 가축류 2종, 가금류 6종, 민물어류 2종, 해양어류 13종 및 갑각류 1종, 총 24종을 선정하였으며 종 특이 프라이머를 이용하여 예상되는 PCR 산물의 생성 유무를 확인하였다. PCR을 수행한 결과 토끼, 여우, 꿩, 집비둘기, 멧비둘기, 메추리, 참새, 제비, 메기, 쏘가리, 날치, 열빙어, 청어, 까나리, 멸치, 참조기, 넙치, 조피볼락, 홍어, 가오리, 말쥐치, 농어, 성게 및 바닷가재에 대하여 각각 156, 204, 152, 160, 113, 163, 167, 152, 165, 121, 136, 151, 178, 178, 146, 188, 177, 166, 179, 218, 188, 185, 127 및 172 bp에서 PCR 증폭 산물을 확인하였다. 그리고 프라이머 별로 비교종에서는 비특이적 PCR 산물(non-specific PCR product)은 생성되지 않았다. 본 연구에서 개발된 유전자 분석법을 이용하여 동물성 식품원료가 사용된 식품 원료 및 가공식품의 진위 판별에 활용이 가능할 것이며, 불량식품 근절에 크게 기여할 것으로 기대된다.

## 참고문헌

1. Sawyer, J., Wood, C., Shanahan, D., Gout, S. and McDowell, D.: Real-time PCR for quantitative meat species, *Food Cont.*, **14**, 579-583 (2003).
2. Calvo, J.H., Zaragoza, P. and Pawlowski, R.: Validation of *cytochrome b* sequence analysis as method of species identification, *J. Forensic Sci.*, **79**, 2108-2212 (2001).
3. Girish, P.S., Anjaneyulu, A.S.R., Viswas, K.N., Shivakumar, M., Anand, M., Patel, M. and Sharma, B.: Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene, *Meat Sci.*, **70**, 107-112 (2005).
4. Martin, I., Garcia, T., Fajardo, V., Lopez-calleja, I., Hernandez, P.E., Gonzalez, I. and Martin, R.: Species-specific per for the identification of ruminant species in feedstuffs, *Meat*



- Sci.*, **75**, 120-127 (2007).
5. 정명생, 임경희: 활어의 소비구조 분석에 관한 연구, 한국해양수산개발원 (2003).
  6. Hacia, J.G.: Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays, *Nat Genet.*, **21(1 Supple)**, 42-47 (1999).
  7. Padovan, G.J., De Jong, D., Rodrigues, L.P. and Marchini J.S.: Detection of adulteration of commercial honey samples by the 13C/12C isotope ratio, *Food Chem.*, **82**, 633-636 (2003).
  8. Schellenber, A., Chmielus, S., Schlicht, C., Camin, F., Perini, M., Bontempo, L., Heinrich, K., Kelly, S.D., Thomas, F., Jamin, E. and Horacek, M.: Multielement stable isotope ratio (H, C, N, S) of honey from different european regions, *Food Chem.*, **121**, 770-777(2010).
  9. Hong E.J., Kim K.H., Par S.J., Kang J.W., Kim D.S., Lee H.J., Kim E.J., Lee J.W., Kim S.H., Lee K.H. and Noh B.S.: Discrimination of the salted cuttle fish and the salted mitra squid in economically motivated authentication food using electronic nose based on mass spectrometer, *Food Eng. Progress.*, **15**, 122-129 (2011).
  10. Hong E.J., Kim K.H., Par S.J., Kang J.W., Kim D.S., Lee H.J., Kim E.J., Lee J.H., Lee K.H. and Noh B.S.: Discrimination of shreds of frozen and dried alaska pollack, dried pollack and cod using electronic nose, *Food Eng. Progress.*, **15**, 162-168 (2011).
  11. Fabric, T., Celia, M. and Catherine, H.: Food and forensic molecular identification: update and challenges, *TRENDS in Biotech.*, **23**, 359-366 (2005).
  12. Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and Vrijenjoek, R.: DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, *Mol. Mar. Bio. and Biotech.*, **3**, 294-299 (1994).
  13. Hird, H., Goodier, R. and Hill, M.: Rapid detection of chicken and turkey in heated meat products using the polymerase chain reaction followed by amplicon visualization with vistra green, *Meat Sci.*, **65**, 1117-1123 (2003).
  14. Arslan, A., Irfan Ilhak, O. and Calicioglu, M.: Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique, *Meat Sci.*, **72**, 326-330 (2006).
  15. Hebert P.D., Cywinska, A., Ball, S.L., and deWaard, J.R.: Biological identifications through DNA Barcodes, *Pro. R. Soc. Lond. B.*, **270**, 313-321 (2003).
  16. Michael T.M., Michael B., Ryan Gregory, T. and Alfried P.V.: DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers, *Philosophical Transactions of The Royal Society B.*, **360**, 1925-1933 (2005).
  17. Tomoaki, M., Atsushi, A., Takuma, T., Sumitaka, Y., Yutaka, O. and Manabu, Y.: Identification of animal species using the partial sequences in the mitochondrial 16S rRNA Gene, *Legal Med.*, **11**, 449-450 (2009).
  18. Shin S.C., Chung K.Y. and Chung E.R.: Identification of meat species using PCR-RFLP marker of *cytochrome b* gene, *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, **26**, 375-379 (2006).
  19. Park Y.K., 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).
  20. Knuutinen, J. and Harjula, P.: Identification of fish species by reversed-phase high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection, *J. Chromatogr.*, **705**, 11-21 (1998).
  21. Hird, H., Goodier, R. and Hill, M.: Rapid detection of chicken and turkey in heated meat products using the polymerase chain reaction followed by amplification visualization with vistra green, *Meat Sci.*, **65**, 1117-1123 (2003).
  22. Park J.K., Shin K.H., 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. Ani. Resour.*, **27**, 209-215 (2007).
  23. Kim M.Y., Kim J.H., Kim H.J., Park S.H., Woo G.J. and Kim H.Y.: Monitoring of genetically modified soybean and processed food in korean market using PCR, *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, **46**, 344-347 (2003).
  24. Jeon Y.J., Kang E.S. and Hong K.W.: A PCR method for rapid detection of buckwheat ingredients in food, *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, **17**, 335-341 (2007).
  25. Branicki, W., Kupiec, T. and Pawlowski, R.: Validation of cytochrome b sequence analysis as method of species identification, *J. Forensic Sci.*, **48**, 83-87 (2003).
  26. Rodriguez, M.A., Garcia, T., Gonzalez, I., Asensio, L., Mayoral, B., Lopez-Calleja, I., Hernandez, P.E. and Martin, R.: TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures, *Meat Sci.*, **70**, 113-120 (2005).
  27. Hsieh, H.M., Chiang, H.L., Tsai, L.C., Lai, S.Y., Huang, N.E., Linacre, A. and Lee, J.C.: Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals, *Forensic. Sci. Int.*, **122**, 7-18 (2001).
  28. Wolstenholme, D.R.: Animal mitochondrial DNA: structure and evolution, *Int. Rev. Cytol.*, **141**, 173-216 (1992).
  29. Sunnucks, P.: Efficient genetic markers for population biology, *Trends Ecol Evol.*, **15(5)**, 199-203 (2000).