ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science 2016 Vol. 26. No. 9. 1007~1014 DOI : http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2016.26.9.1007

Rapid and Specific Identification of Genus *Cynoglossus* by Multiplex PCR Assays Using Species-specific Derived from the COI Region

Eun Soo Noh, Hyun Sook Kang, Cheul Min An, Jung Youn Park, Eun Mi Kim and Jung Ha Kang*

Biotechnology Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

Received August 31, 2016 / Revised September 21, 2016 / Accepted September 22, 2016

A highly efficient, rapid, and reliable multiplex polymerase chain reaction based method for distinguishing ten species of genus *Cynoglossus* (*C. senegalensis, C. abbreviates, C. macrolepidotus, C. arel, C. semilaevis, C. interruptus, C. joyneri, C. lingua, C. robustus*, and *C. monodi*) is described. The species-specific primer sets were designed base on the cytochrome oxidase subunit I gene (1,500 bp). The optimal PCR conditions and primers were selected for ten of *Cynoglossus* species to determine target base sequences using single PCR. Multiplex PCR using the ten pairs of primers either specifically amplified a DNA fragment of a unique size or failed, depending on each species DNA. The length of amplification fragment of 208 bp for *C. senegalensis,* 322 bp for *C. abbreviates,* 493 bp for *C. macrolepidotus,* 754 bp for *C. arel,* 874 bp for *C. semilaevis,* 952 bp for *C. interruptus,* 1,084 bp for *C. joyneri,* 1,198 bp for *C. lingua,* 1,307 bp for *C. robustus*, and 1,483 bp for *C. monodi* with the species-specific primers, visualized by agarose gel electrophoresis, allowed perfectly distinction of the *Cynoglossus* species. The multiplex PCR assay can be easily performed on multiple samples and attain final results in less than 6 hours. This technique should be a useful addition to the molecular typing tools for the tentative identification of *Cynoglossus* species.

Key words : *Cynoglossus* spp., mitochondrial DNA, molecular identification, multiplex PCR, species-specific primer

서 론

현대 사회의 국민소득 증가와 생활수준 향상으로 소비자들은 건강관리와 웰빙(well-being)에 대한 관심이 증가하였다. 식생활에서도 웰빙은 기본 조건이 되었으며, 수산물은 단순히 단백질 공급을 위한 식재료가 아닌 건강식품으로 인식이 전환되어 수산물에 대한 관심과 수요가 점차 증가하고 있다[5, 15]. 뿐만 아니라, 소비자들의 기호가 다양해지고, 해외 식자재에 대한 관심의 증가에 따라 수입수산물의 소비 또한 점차 증가하고 있는 추세이다[6]. 이에 따라, 최근 동시다발적 FTA 협상의 증가로 수산물의 수입량이 점차 증가하고 있으며, 비교적 저렴한 가격에 다양한 수산물을 구입할 수 있게 되었다. 그러나, 최근에는 이러한 수입 수산물의 정확하지 않은 국명과 학명의 표기가 알려지며 식품안전성에 심각한문제가 야기되고 있다[9].

소비자들의 수입수산물에 대한 신뢰도를 높이기 위하여 국립수산과학원에서는 '수입어종 분류기술서'를 출간하여 형태학적 및 분자생물학적 방법을 통해 84종의 수입 수산물을 정확히 분류하였다. 그중 참서대과(Cynoglossidae) 어류의 경우 수입명과 표준명이 전혀 일치하지 않은 것을 확인할 수 있었다. 서대 혹은 홍서대라는 이름으로 수입되지만, 큰비늘개서대(*Cynoglossus arel*), 긴개서대(*C. lingua*), 큰입개서대(*C. macrolepidotus*), 기니개서대(*C. monodi*), 세네갈개서대(*C. senegalensis*)로 분류 되었다. 참서대과 어류는 다른 생선들보다 수분함량이 높고, 고단백 저지방식품으로 맛이 뛰어나며, 일부 지역에서 지리적 상품으로 개발하는 등 상업적으로 가치가 높은 어종으로 평가 되고 있다. 하지만, 국내 참서대과 어류의 어획량은 최근 무분별한 남획과 불법 조업으로 인한 자원량 감소, 산란장 파괴등의 원인으로 점차 줄어들고 있는 실정으로 대부분의 국내 유통되는 참서대과 어류는 수입에 의존하고 있는 실정이다[7]. 참서대과 어류는 형태학적으로 매우 유사하여 육안으로 종을 구분하는 것은 매우 어렵기 때문에 정확한 분류가 이루어지지 않은 수입 참서대과 어류의 국내 유통은 소비자의 권리와 유통 질서를 어지럽히는 결과를 초래할 수 있다.

최근 식품의약품안전처에서는 불량식품 근절을 위하여 중합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction: PCR) 분석 기술을 이용해 주재료를 검출 하는 방법을 개발하여 '식품중 사용원료 진위 판별 지침서'를 발간하였다. PCR 분석법은 민감도와 특이도가 우수하며, 짧은 시간에 많은 시료를 분석할 수 있기 때문에 DNA 서열 분석을 통한 종판별에 비해 간편하여 최근 널리 활용이 되고 있는 방법이다[4]. '식품중 사용원료

***Corresponding author**
Tel : +82-51-720-2460, Fax : +82-51-720-2456
E-mail : genetics@korea.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

진위 판별 지침서'에는 현재까지 수입 수산물을 대상으로한 분석법은 미비한 실정이며, 특히 참서대과 어류에 대한 분석법은 연구된 바가 없다.

국내에 서식하는 참서대과 어류는 3속 8종이 있으며[10], 그중 유통이 활발한 용서대(*C. abbreviatus*), 박대(*C. semilaevis*), 칠서대(*C. interruptus*), 참서대(*C. joyneri*), 개서대(*C. robustus*)와 수입 참서대과 어류를 포함하면 국내에 유통되는 참서대과 어류는 모두 10종이 넘는 것으로 확인이 된다. 이들의 정확한 분류 기술은 수입 수산물의 관리뿐만 아니라 국민의 식생활 안전을 위해 필수적이라 할 수 있다. 따라서, 본 연구에서는 모계유전으로 유전자 재조합이 일어나지 않아 유사 종간의 계통 유연관계 연구에 유용한 미토콘드리아 DNA의 cytochrome c oxidase I영역의 서열 분석을 바탕으로 형태학적 구분이 어려운 참서대과 어류 10종의 종간 유연관계를 분석하고, 신속하고 정확한 종판별을 위한 종특이 프라이머와 최적의 PCR조건을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 시료 확보

본 연구에 사용된 참서대과 어류는 2013년 7월부터 2014년 4월까지 총 3회동안 스페인, 방글라데시와 모잠비크로부터 수입되어 국립수산과학원 전략양식연구소 생명공학과에서 수장고에 보관중인 어류 5종(세네갈개서대, 큰비늘개서대, 큰개서대, 긴개서대, 큰입개서대)의 표본 시료 40개체와 부경대학교 해양어류자원 기탁 등록 보존기관으로부터 제공받은 어류 5종(용서대, 박대, 칠서대, 참서대, 개서대)의 표본 시료 15개체를 사용하였다(Table 1).

DNA 추출

각 시료로부터 genomic DNA의 추출 및 정제는 Asahida *et al*. [1]의 방법에 따라 TNES-Urea buffer를 사용하였다. 약 50 mg 의 근육 시료를 480 µl의 TNES-Urea buffer (8 M urea, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 125 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% SDS)와 20 µl의 Proteainase K (20 mg/ml)에 혼합하여 56℃에서 근육조직이 완전히 분해될 때까지 반응시킨다. 그리고 500 µl의 Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol = 25 : 24 : 1 을 넣고 vortexing하여 완전히 섞은 후 13,000 rpm (15,493x g)에서 10분 동안 원심분리 하였다. 그후 상층액을 phenol과 섞이지 않도록 하여 새로운 tube로 옮긴 후 2배의 99.9% ethanol과 0.1배의 3 M sodium acetate를 첨가하여 -70℃에서 약 30분간 반응시킨다. 4℃ 13,000 rpm (15,493x g)에서 10분 동안 원심분리 한 후, 상층액을 제거하고, 1 ml의 70% ethanol을 넣고 vortexing 후 13,000 rpm (15,493x g)에서 5분 동안 원심분리 하였다. 그후 ethanol을 완전히 제거하고 상온에서 10분간 건조하였다. 100 µl의 TE-buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM EDTA)를 넣고 DNA pellet을 녹인 후 5 µl의 RNase (20 µg/ml)를 첨가하여 37℃에서 1시간 반응시킨 후 80℃에서 5분간 반응시킨다. 추출 및 정제한 genomic DNA의 정량은 spectrophotometer (NonoVue, GE healthcare, Sweden)을 이용하였으며, 최종 농도를 10 ng/µl로 정량 후 실험에 사용 하였다.

Table 1. Information of genus *Cynoglossus* species used in this study

Scientific name	Sample site	From
Cynoglossus monodi	Mozambique	NIFS
Cynoglossus robustus	Korea	PKNU
Cynoglossus lingua	Bangladesh	NIFS
Cynoglossus joyneri	Korea	PKNU
Cynoglossus interruptus	Korea	PKNU
Cynoglossus semilaevis	Korea	PKNU
Cynoglossus arel	Bangladesh	NIFS
Cynoglossus macrolepidotus	Bangladesh	NIFS
Cynoglossus abbreviatus	Korea	PKNU
Cynoglossus senegalensis	Spain	NIFS

NIFS, National Institute of Fisheries Science, busan, korea
PKNU, Pukyong National Nuniversity, busan, korea

염기분석 프라이머 제작

미토콘드리아 DNA의 Cytochrome Oxidase subunit I (COI) 영역 전체 유전자 분석을 위해 미국의 National Center for biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih)에 등록된 *Cynoglossus* 속 중 미토콘드리아 DNA의 염기 서열이 완벽하게 분석된 *Cynoglossus semilaevis* (Accession No. NC 012825), *C. zanzibarensis* (Accession No. KJ433559), *C. joyneri* (Accession No. NC030256), *C. gracilis* (Accession No. NC 028540), *C. abbreviates* (Accession No. NC014881), *C. itinus* (Accession No. NC023446), *C. lineolatus* (Accession No. NC 023230), *C. puncticeps* (Accession No. NC023230), *C. bilineatus* (Accession No. NC023226), *C. sinicus* (Accession No. NC 023224)의 유전자 서열을 바탕으로 Bioedit 플랫폼의 Clustal W 프로그램을 사용하여 COI 영역에서의 프라이머 위치를 확인하였다(Table 2).

염기서열 분석

PCR 혼합물 20 µl는 10 pM 참서대과 특이 프라이머 각 1 µl, 10x Takara buffer 2 µl, dNTP 0.8 µl, Takara Ex Taq 0.2 µl, 증류수 14 µl, DNA 1 µl로 구성되었다. PCR 반응조건으로는 먼저 94℃에서 7분간 변성시키고, 94℃에서 45초, 60℃에서 45초, 72℃에서 1분씩 총 35회 반복, 마지막으로 72℃에서 7분간 신장시켜주는 과정을 거쳤다. 증폭된 PCR 산물은 염기서열 분석에 사용하기 위하여 Expin PCR SV (GeneAll Biotechnology, South Korea)를 사용하여 정제하였다. Sanger sequencing은 BigDye terminator v1.1 (Applied Biosystems)

Table 2. Alignment of primer regions with complete mitochondrial sequences of reference species

	8703	8704	8705	8706	8707	8708	8709	8710	8711	8712	8713	8714	8715	8716	8717	8718	8719	8720	8721	
C. semilaevis	T	A	C	C	T	G	T	G	A	T	A	A	T	T	A	C	A	C	G	
C. zanzibarensis	T	A	C	C	T	G	T	G	A	T	A	A	T	T	A	C	A	C	G	
C. joyneri	T	A	C	C	T	G	T	G	A	T	A	A	T	T	A	C	A	C	G	
C. gracilis	T	A	C	C	T	G	T	G	A	T	A	A	T	T	A	C	A	C	G	
C. abbreviates	T	A	C	C	T	G	T	G	A	T	A	A	T	T	A	C	A	C	G	
C. itinus	T	A	C	C	T	G	T	G	A	T	A	A	T	T	A	C	A	C	G	
C. lineolatus	T	A	C	C	T	G	T	G	A	T	A	A	T	T	A	C	A	C	G	
C. puncticeps	T	A	C	C	T	G	T	G	A	T	A	A	T	T	A	C	A	C	G	
C. bilineatus	T	A	C	C	T	G	T	G	A	T	A	A	T	T	A	C	A	C	G	
C. sinicus	T	A	C	C	T	G	T	G	A	T	A	A	T	T	A	C	A	C	G	

	10022626	10022627	10022628	10022629	10022630	10022631	10022632	10022633	10022634	10022635	10022636	10022637	10022638	10022639	10022640	10022641	10022642	10022643	10022644	10022645
C. semilaevis	G	A	A	C	C	T	G	C	T	T	T	C	C	T	A	C	G	A	A	C
C. zanzibarensis	G	A	G	C	C	G	C	C	T	T	T	C	G	T	G	C	G	A	A	C
C. joyneri	G	A	A	C	C	G	G	C	A	T	T	C	G	T	A	C	G	A	A	C
C. gracilis	G	A	A	C	C	T	G	C	T	T	T	C	T	T	A	C	G	G	G	C
C. abbreviates	G	A	A	C	C	T	G	C	C	T	T	C	T	T	A	C	G	A	A	C
C. itinus	G	A	A	C	C	G	G	C	T	T	T	C	G	T	A	C	G	A	A	C
C. lineolatus	G	A	A	C	C	T	G	C	C	T	T	C	T	T	A	C	G	A	A	C
C. puncticeps	G	A	A	C	C	T	G	C	T	T	T	C	G	T	A	C	G	A	A	C
C. bilineatus	G	A	G	C	C	G	G	C	T	T	T	C	G	T	A	C	G	A	A	C
C. sinicus	G	A	A	C	C	C	G	C	T	T	T	C	G	T	A	C	G	A	A	C

에 의해 진행 되었다. 정제된 PCR 반응물 1 µl, 5x BigDye therminator v1.1 sequencing buffer 2 µl, BigDye terminator reaction mix v1.1 0.8 µl, 0.1 pM 정방향 또는 역방향 프라이머 1 µl, 증류수 5.9 µl로 전체 10 µl의 반응액을 준비하였다. Sequencing PCR 조건은 96℃에서 2분간 변성시키고 96℃에서 15초, 50℃에서 5초, 60℃에서 2분씩 총 25회 반복하였다. Sequencing PCR로 증폭된 DNA에 50 ml EDTA (pH 8.0) 1 µl, 600 mM sodium acetate (pH 5.2) 1 µl와 99.9% ethanol 25 ul를 첨가하고, 4℃ 조건의 3,000 rpm (2,272× g)에서 45분간 원심분리 하였다. 그 후 70% ethanol로 세척하였으며, 상온에서 10분간 건조시킨 후 10 µl Hi-Di formamide (Applied BIosystems)로 DNA pellet을 녹여 ABI 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)로 서열 분석을 진행 하였다.

결 과

참서대과 10종의 종특이 영역 탐색

NCBI database에 등록되어있는 COI 유전자 내에서 유전적으로 변이가 심하지 않은 보존서열을 가진 부위를 선택하여 참서대과 특이 정방향 및 역방향 프라이머를 제작 하였다 (Table 3). 제작된 참서대과 특이 프라이머는 참서대과 어종 10종 모두에 적합한 증폭을 나타내었으며, 이를 통해 얻어진 염기서열은 DNASTAR 프로그램의 SeqMan software (Madison, USA)를 이용하여 분석 되었다. 정방향과 역방향 프라이머를 통해 얻어진 서열은 하나의 서열로 조합되었으며, 약 1,500 bp의 COI 유전자 서열을 확보할 수 있었다. DNA Sequence Polymorphism (DnaSP, ver. 5.10.01) 프로그램을 사용하여 종별 haplotype을 분석하였으며, 종내 유전자 변이를 배제하고 모든 개체의 염기서열이 일치하는 동시에 종간에 차이를 나타내는 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism, SNP) 유전자 부위를 확인하였다. 이후 종간 약 100 bp 이상의 서열 차이를 두고 최적의 프라이머 부위를 선택하였으며, 단일염기다형성 유전자가 3′ 말단에 위치하도록 종특

Table 3. Universal primers for genus *cynoglossus* designed from conserved region of COI gene

Primer name	Sequence	Fragment size
Cyno-F	5′-TACCTGTGATAATTACACG-3′	1,500 bp
Cyno-R	5′-GTTCGTACGAAAGACGGTTC-3′	

Table 4. Alignment of species specific primer regions with COI gene

	30													40										50				
C. monodi	C	C	G	G	A	A	T	A	G	T	T	G	G	A	A	C	C	G	C	T	C	T	T	A	G	C	C	T
C. robustus	C	T	G	G	A	A	T	A	G	T	A	G	G	A	A	C	T	G	C	C	C	T	C	A	G	C	C	T
C. lingua	C	T	G	G	T	A	T	A	G	T	A	G	G	A	A	C	T	G	C	C	C	T	A	A	G	C	C	T
C. joyneri	C	C	G	G	A	A	T	A	G	T	A	G	G	A	A	C	T	G	C	C	C	T	A	A	G	C	C	T
C. interruptus	C	T	G	G	A	A	T	A	G	T	C	G	G	C	A	C	A	G	C	T	T	T	A	A	G	C	T	T
C. semilaevis	C	C	G	G	A	A	T	G	G	T	A	G	G	A	A	C	T	G	C	C	C	T	C	A	G	C	C	T
C. arel	C	C	G	G	A	A	T	A	G	T	A	G	G	T	A	C	C	G	C	C	C	T	A	A	G	T	C	T
C. macrolepidotus	C	T	G	G	A	A	T	A	G	T	A	G	G	T	A	C	T	G	C	A	C	T	C	A	G	T	C	T
C. abbreviatus	C	C	G	G	A	A	T	A	G	T	A	G	G	A	A	C	T	G	C	T	C	T	C	A	G	C	C	T
C. senegalensis	C	C	G	G	A	A	T	A	G	T	T	G	G	T	A	C	T	G	C	C	C	T	C	A	G	C	T	T

	160											170										180					
C. monodi	T	A	A	T	G	C	C	G	A	T	T	A	T	A	A	T	T	G	G	A	G	G	A	T	T	T	G	G
C. robustus	T	A	A	T	A	C	C	C	A	T	C	A	T	A	A	T	C	G	G	A	G	G	G	T	T	T	G	G
C. lingua	T	A	A	T	G	C	C	T	A	T	T	A	T	A	A	T	T	G	G	A	G	G	A	T	T	T	G	G
C. joyneri	T	A	A	T	G	C	C	T	A	T	T	A	T	G	A	T	T	G	G	A	G	G	C	T	T	C	G	G
C. interruptus	T	T	A	T	G	C	C	T	A	T	T	A	T	A	A	T	T	G	G	A	G	G	C	T	T	T	G	G
C. semilaevis	T	T	A	T	A	C	C	C	A	T	T	A	T	A	A	T	T	G	G	G	G	G	T	T	T	T	G	G
C. arel	T	A	A	T	A	C	C	T	A	T	C	A	T	A	A	T	C	G	G	A	G	G	C	T	T	T	G	G
C. macrolepidotus	T	A	A	T	A	C	C	T	A	T	C	A	T	A	A	T	C	G	G	A	G	G	T	T	T	C	G	G
C. abbreviatus	T	T	A	T	G	C	C	T	A	T	T	A	T	A	A	T	T	G	G	A	G	G	C	T	T	T	G	G
C. senegalensis	T	A	A	T	A	C	C	T	A	T	T	A	T	G	A	T	T	G	G	A	G	G	C	T	T	T	G	G

	310									320									330								
C. monodi	G	G	A	G	C	T	G	G	T	A	C	A	G	G	A	T	G	G	A	C	C	G	T	T	T	A	T	C
C. robustus	G	G	G	G	C	T	G	G	T	A	C	A	G	G	A	T	G	A	A	C	C	G	T	G	T	A	C	C
C. lingua	G	G	A	G	C	T	G	G	T	A	C	A	G	G	T	T	G	A	A	C	T	G	T	C	T	A	C	C
C. joyneri	G	G	A	G	C	T	G	G	T	A	C	A	G	G	T	T	G	A	A	C	T	G	T	T	T	A	C	C
C. interruptus	G	G	G	G	C	T	G	G	A	A	C	A	G	G	C	T	G	A	A	C	T	G	T	T	T	A	T	C
C. semilaevis	G	G	G	G	C	T	G	G	T	A	C	A	G	G	A	T	G	A	A	C	T	G	T	T	T	A	C	C
C. arel	G	G	A	G	C	T	G	G	T	A	C	A	G	G	C	T	G	A	A	C	C	G	T	A	T	A	T	C
C. macrolepidotus	G	G	A	G	C	T	G	G	T	A	C	A	G	G	A	T	G	A	A	C	A	G	T	A	T	A	T	C
C. abbreviatus	G	G	G	G	C	T	G	G	T	A	C	A	G	G	A	T	G	A	A	C	C	G	T	T	T	A	C	C
C. senegalensis	G	G	A	G	C	T	G	G	A	A	C	G	G	G	A	T	G	A	A	C	T	G	T	A	T	A	C	C

	430													440														
C. monodi	C	T	A	G	G	G	G	C	T	A	T	T	A	A	C	T	T	C	A	T	T	A	C	T	A	C	A	A
C. robustus	C	T	G	G	G	G	G	C	T	A	T	T	A	A	C	T	T	T	A	T	T	A	C	A	A	C	T	G
C. lingua	C	T	T	G	G	G	G	C	T	A	T	T	A	A	T	T	T	T	A	T	C	A	C	T	A	C	A	G
C. joyneri	T	T	A	G	G	G	G	C	A	A	T	C	A	A	T	T	T	T	A	T	T	A	C	C	A	C	A	G
C. interruptus	T	T	A	G	G	T	G	C	T	A	T	T	A	A	T	T	T	T	A	T	T	A	C	T	A	C	A	A
C. semilaevis	T	T	A	G	G	C	G	C	T	A	T	T	A	A	C	T	T	C	A	T	C	A	C	A	A	C	A	G
C. arel	T	T	A	G	G	C	G	C	T	A	T	T	A	A	T	T	T	T	A	T	T	A	C	A	A	C	A	G
C. macrolepidotus	C	T	A	G	G	T	G	C	A	A	T	T	A	A	C	T	T	T	A	T	C	A	C	A	A	C	A	G
C. abbreviatus	T	T	G	G	G	G	G	C	T	A	T	C	A	A	C	T	T	T	A	T	T	A	C	A	A	C	A	G
C. senegalensis	T	T	A	G	G	T	G	C	C	A	T	T	A	A	C	T	T	C	A	T	T	A	C	T	A	C	T	A

	560											570										580					
C. monodi	T	G	C	T	G	G	A	A	T	T	A	C	T	A	T	A	C	T	T	T	T	A	A	C	A	G	A	C
C. robustus	T	G	C	A	G	G	T	A	T	C	A	C	A	A	T	A	C	T	A	T	T	G	A	C	T	G	A	T
C. lingua	T	G	C	A	G	G	T	A	T	T	A	C	A	A	T	A	C	T	G	T	T	A	A	C	A	G	A	T
C. joyneri	T	G	C	T	G	G	A	A	T	T	A	C	T	A	T	A	C	T	A	C	T	C	A	C	A	G	A	T
C. interruptus	G	G	C	G	G	G	C	A	T	C	A	C	T	A	T	G	C	T	C	C	T	T	A	C	C	G	A	C
C. semilaevis	T	G	C	A	G	G	A	A	T	T	A	C	T	A	T	A	C	T	T	C	T	C	A	C	A	G	A	T
C. arel	T	G	C	A	G	G	T	A	T	T	A	C	A	A	T	A	C	T	A	T	T	A	A	C	A	G	A	C
C. macrolepidotus	T	G	C	A	G	G	T	A	T	T	A	C	A	A	T	G	C	T	A	C	T	A	A	C	A	G	A	C
C. abbreviatus	T	G	C	T	G	G	A	A	T	T	A	C	C	A	T	A	C	T	T	C	T	C	A	C	G	G	A	T
C. senegalensis	A	G	C	A	G	G	A	A	T	C	A	C	A	A	T	A	C	T	C	C	T	C	A	C	A	G	A	C

Table 4. Continued

	640																	650									
C. monodi	C	C	A	A	T	C	C	T	C	T	A	C	C	A	A	C	A	C	C	T	A	T	T	C	T	G	A	T
C. robustus	C	C	C	A	T	T	T	T	A	T	A	C	C	A	A	C	A	T	C	T	C	T	T	T	T	G	A	T
C. lingua	C	C	T	A	T	C	C	T	A	T	A	T	C	A	G	C	A	C	C	T	T	T	T	C	T	G	A	T
C. joyneri	C	C	A	A	T	C	C	T	C	T	A	C	C	A	A	C	A	C	C	T	A	T	T	C	T	G	A	T
C. interruptus	C	C	T	A	T	T	T	T	A	T	A	C	C	A	A	C	A	C	C	T	A	T	T	C	T	G	A	T
C. semilaevis	C	C	T	A	T	T	C	T	T	T	A	T	C	A	A	C	A	C	C	T	A	T	T	C	T	G	G	T
C. arel	C	C	C	A	T	T	T	T	A	T	A	T	C	A	G	C	A	C	C	T	T	T	T	C	T	G	A	T
C. macrolepidotus	C	C	T	A	T	C	T	T	A	T	A	T	C	A	A	C	A	T	C	T	C	T	T	C	T	G	A	T
C. abbreviatus	C	C	T	A	T	T	C	T	T	T	A	C	C	A	A	C	A	C	C	T	A	T	T	C	T	G	A	T
C. senegalensis	C	C	T	A	T	C	C	T	C	T	A	C	C	A	A	C	A	C	C	T	G	T	T	C	T	G	A	T

	760																	770									
C. monodi	C	G	G	C	T	A	C	A	T	A	G	G	C	A	T	A	G	T	A	T	G	A	G	C	T	A	T	A
C. robustus	C	G	G	T	T	A	C	A	T	G	G	G	T	A	T	A	G	T	T	T	G	A	G	C	T	A	T	G
C. lingua	C	G	G	C	T	A	C	A	T	G	G	G	C	A	T	G	G	T	T	T	G	A	G	C	T	A	T	A
C. joyneri	T	G	G	A	T	A	T	A	T	A	G	G	T	A	T	A	G	T	A	T	G	A	G	C	T	A	T	A
C. interruptus	C	G	G	T	T	A	C	A	T	G	G	G	T	A	T	G	G	T	C	T	G	A	G	C	T	A	T	G
C. semilaevis	T	G	G	T	T	A	T	A	T	A	G	G	A	A	T	A	G	T	A	T	G	A	G	C	T	A	T	G
C. arel	C	G	G	T	T	A	T	A	T	G	G	G	T	A	T	A	G	T	A	T	G	G	G	C	C	A	T	A
C. macrolepidotus	C	G	G	C	T	A	C	A	T	G	G	G	T	A	T	G	G	T	T	T	G	A	G	C	T	A	T	A
C. abbreviatus	T	G	G	T	T	A	C	A	T	G	G	G	A	A	T	A	G	T	A	T	G	A	G	C	T	A	T	A
C. senegalensis	T	G	G	C	T	A	C	A	T	A	G	G	A	A	T	A	G	T	A	T	G	A	G	C	T	A	T	A

	1,020																	1,030									
C. monodi	G	T	A	T	C	G	T	C	T	T	A	T	C	A	A	A	C	T	C	T	T	C	C	C	T	T	G	A
C. robustus	G	T	A	T	T	G	T	C	C	T	C	T	C	C	A	A	C	T	C	T	T	C	C	C	T	T	G	A
C. lingua	G	A	A	T	C	G	T	T	T	T	A	T	C	T	A	A	T	T	C	C	T	C	T	C	T	T	G	A
C. joyneri	G	G	A	T	T	G	T	C	C	T	G	T	C	A	A	A	C	T	C	C	T	C	C	C	T	C	G	A
C. interruptus	G	A	A	T	T	G	T	T	C	T	T	T	C	A	A	A	T	T	C	T	T	C	A	C	T	T	G	A
C. semilaevis	G	A	A	T	T	G	T	A	T	T	A	T	C	T	A	A	T	T	C	C	T	C	C	C	T	T	G	A
C. arel	G	G	A	T	T	G	T	T	C	T	A	T	C	T	A	A	C	T	C	C	T	C	T	T	T	A	G	A
C. macrolepidotus	G	A	A	T	T	G	T	T	C	T	C	T	C	T	A	A	C	T	C	T	T	C	C	C	T	G	G	A
C. abbreviatus	G	T	A	T	T	G	T	A	T	T	A	T	C	T	A	A	T	T	C	C	T	C	C	C	T	C	G	A
C. senegalensis	G	T	A	T	T	G	T	C	C	T	G	T	C	C	A	A	C	T	C	C	T	C	A	T	T	A	G	A

	1,190																	1,200									
C. monodi	T	C	C	A	C	T	T	T	G	G	A	G	T	G	A	T	A	T	T	C	T	T	A	G	G	A	G	T
C. robustus	T	A	C	A	T	T	T	C	C	T	G	G	T	A	A	T	A	T	T	T	G	T	A	G	G	G	G	T
C. lingua	T	A	C	A	T	T	T	C	C	T	G	G	T	G	A	T	A	T	T	T	G	T	A	G	G	A	G	T
C. joyneri	T	T	C	A	C	T	T	C	C	T	A	G	T	A	A	T	A	T	T	C	G	T	A	G	G	G	G	T
C. interruptus	T	A	C	A	T	T	T	C	C	T	C	G	T	C	A	T	G	T	T	T	G	T	T	G	G	A	G	T
C. semilaevis	T	T	C	A	C	T	T	C	T	T	G	G	T	A	A	T	A	T	T	T	G	T	A	G	G	G	G	T
C. arel	T	A	C	A	T	T	T	C	G	T	A	G	T	A	A	T	A	T	T	T	G	T	A	G	G	G	G	T
C. macrolepidotus	T	A	C	A	T	T	T	C	C	T	A	G	T	A	A	T	A	T	T	T	G	T	G	G	G	A	G	T
C. abbreviatus	T	T	C	A	T	T	T	C	C	T	G	G	T	A	A	T	A	T	T	C	C	T	A	G	G	T	G	T
C. senegalensis	T	C	C	A	T	T	T	T	G	G	G	G	T	Y	A	T	A	T	T	T	G	T	T	G	G	A	G	T

	1,310																	1,320									
C. monodi	C	A	C	A	G	T	C	T	C	C	T	C	C	A	T	T	G	G	C	T	C	C	A	T	G	A	T	C
C. robustus	T	A	C	A	G	T	T	T	C	A	T	C	A	A	T	C	G	G	G	T	C	A	A	T	A	A	T	T
C. lingua	C	A	C	T	G	T	T	T	C	A	T	C	A	A	T	T	G	G	A	T	C	C	A	T	A	A	T	C
C. joyneri	T	A	C	A	G	T	C	T	C	A	T	C	A	A	T	T	G	G	T	T	C	A	A	T	A	A	T	C
C. interruptus	T	A	C	C	G	T	G	T	C	A	T	C	T	A	T	T	G	G	C	T	C	A	A	T	A	A	T	T
C. semilaevis	T	A	C	A	G	T	C	T	C	A	T	C	C	A	T	T	G	G	T	T	C	A	A	T	A	A	T	T
C. arel	C	A	C	A	G	T	C	T	C	A	T	C	A	A	T	T	G	G	G	T	C	A	A	T	A	A	T	C
C. macrolepidotus	C	A	C	G	G	T	T	T	C	A	T	C	A	A	T	T	G	G	C	T	C	A	A	T	A	A	T	T
C. abbreviatus	T	A	C	A	G	T	T	T	C	A	T	C	C	A	T	T	G	G	T	T	C	A	A	T	A	A	T	C
C. senegalensis	T	A	C	A	G	T	C	T	C	A	T	C	C	A	T	C	G	G	C	T	C	T	A	T	A	A	T	C

이 정방향 프라이머를 제작하였다(Table 4).

참서대과 종특이 단일 PCR법

개체 특이성 및 재현성 검증을 위해 각 종당 3개체의 시료를 대상으로 분석을 수행하였다. 먼저 결합 온도의 최대 한계를 확인하기 위하여 gradient PCR 반응을 진행 하였으며, Takara EX Taq을 사용하여 온도 조건을 52℃, 54℃, 56℃, 58℃, 60℃, 62℃로 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동을 하여 증폭 여부를 확인하였다. 사용된 프라이머 조합은 세네갈개서대 F-SEN/Cyno-R, 용서대 F-ABB/Cyno-R, 큰입개서대 F-MAC/Cyno-R, 큰비늘개서대 F-ARE/Cyno-R, F-SEM/Cyno-R, 칠서대 F-INT/Cyno-R, 참서대 F-JOY/Cyno-R, 긴개서대 F-LIN/Cyno-R, 개서대 F-ROB/Cyno-R 그리고 기니개서대는 F-MON/Cyno-R을 사용하여 수행하였다. 후에 다중 PCR 반응 동안 발생할 수 있는 비특이적 증폭 및 프라이머-dimer 형성을 제어하기 위하여 역방향은 프라이머(Cyno-R)를 공통으로 사용하였다. 그 결과, 58~62℃의 annealing 온도에서 모든 종에 대한 종특이적인 증폭 반응이 나타남을 확인할 수 있었다.

참서대과 종특이 다중 PCR법

다중 PCR 증폭을 위한 프라이머 조성은 각각 0.3 µl씩의 정방향 프라이머(F-SEN/F-ABB/F-MAC/F-ARE/F-SEM/F-INT/F-JOY/F-LIN/F-ROB/F-MON)와 0.6 µl의 역방향 프라이머(Cyno-R)를 혼합하여 사용하였으며, 단일 PCR 반응을 통해 확립된 60℃의 annealing 온도에서 동일한 조건으로 PCR 증폭을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물 2 µl를 1% agarose gel에서 1x redsafe (iNtRON, South Korea)와 함께 전기영동하여 확인 하였다. PCR 산물의 크기 차이에 따라 세네갈개서대(208 bp), 용서대(322 bp), 큰입개서대(493 bp), 큰비늘개서대(754 bp), 박대(874 bp), 칠서대(952 bp), 참서대(1,084 bp), 긴개서대(1,198 bp), 개서대(1,307 bp) 그리고 기니개서대(1,483 bp)임을 확인이 가능 하였으며, 비특이적인 증폭 또한 일어나지 않는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 확립된 다중 PCR 분석법의 신뢰성을 검증하기 위해, 실험법의 민감도(sensitivity)를 측정하였다. 종특이 프라이머의 최저 검출농도를 측정하기 위하여 서대류 10종의 genomic DNA를 농도별로 10 ng/µl, 1 ng/µl, 0.1 ng/µl, 0.01 ng/µl으로 희석하여 다중 PCR에서의 민감도를 측정하였으며, PCR은 전술한 바와 같이 Takara EX Taq을 사용하여 동일한 조건으로 진행하였다. 세네갈개서대와 칠서대는 1 ng/µl까지 검출되었고, 용서대, 큰입개서대, 큰비늘개서대, 박대, 참서대, 긴개서대, 개서대, 그리고 기니개서대는 0.1 ng/µl까지 검출됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

고 찰

참서대과 어류는 외형이 매우 유사하여 형태학적 분석으로는 종의 구별에 어려움이 있었으나 최근에는 다양한 분자생물

Table 5. Species specific forward primers designed from COI gene

Primer name	Sequence		Target species	Fragment size
F-MON	5′-AATAGTTGGAACCGCTCTT	-3′	*C. monodi*	1,483
F-ROB	5′-TACCCATCATAATCGGAGGG	-3′	*C. robustus*	1,307
F-LIN	5′-GCTGGTACAGGTTGAACTGTC	-3′	*C. lingua*	1,198
F-JOY	5′-GGGGCAATCAATTTTATTACC	-3′	*C. joyneri*	1,084
F-INT	5′-GGGCATCACTATGCTCCTT	-3′	*C. interruptus*	952
F-SEM	5′-CTATTCTTTATCAACACCTATTCTGG	-3′	*C. semilaevis*	874
F-ARE	5′-TTATATGGGTATAGTATGGGCC	-3′	*C. arel*	754
F-MAC	5′-TTGTTCTCTCTAACTCTTCCCTG	-3′	*C. macrolepidotus*	493
F-ABB	5′-CATTTCCTGGTAATATTCCTAGGT	-3′	*C. abbreviatus*	322
F-SEN	5′-AGTCTCATCCATCGGCTCT	-3′	*C. senegalensis*	208

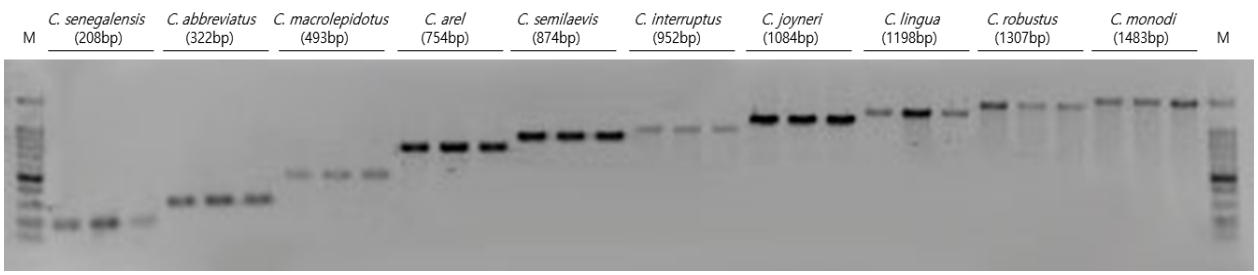

Fig 1. Multiplex PCR product patterns of COI region on mitochondrial DNA using species specific primers. Three specimens of each species were used for the multiplex PCR. A total of 2 µl of each of the multiplex PCR products was separated on a 1% agarose gel. Lane M: 100 bp DNA ladder (iNtRON, South Korea).

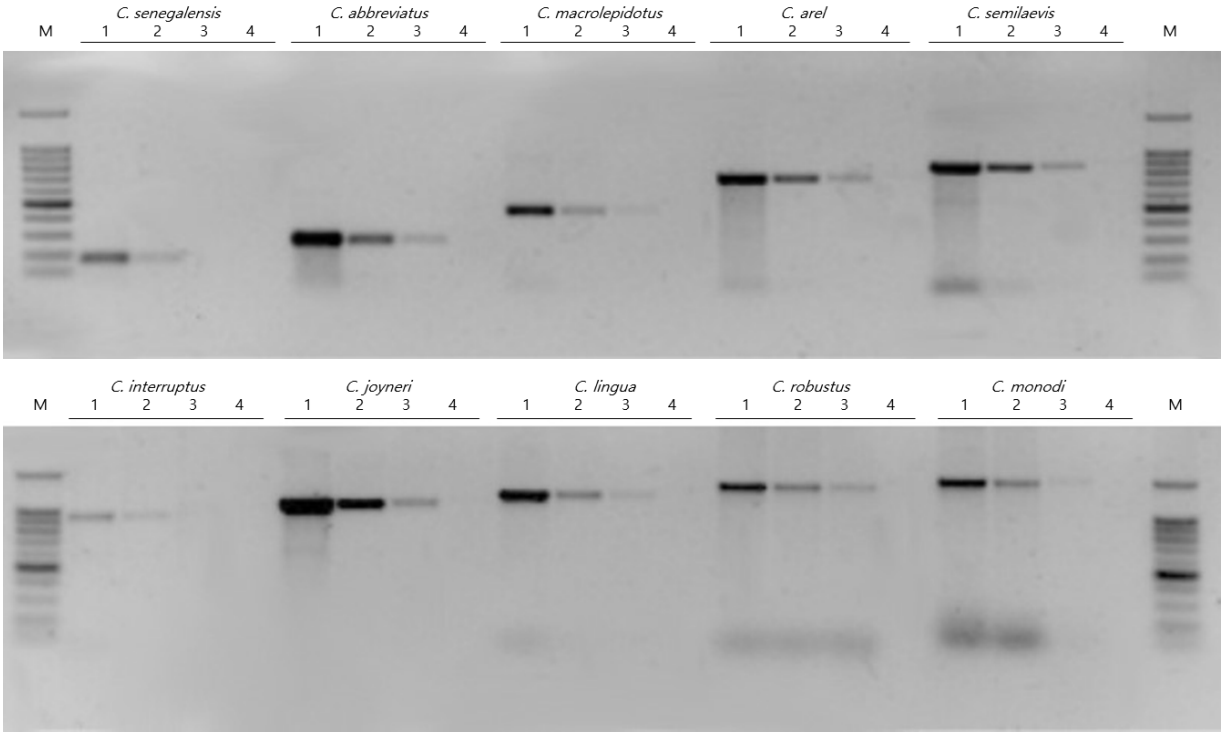

Fig. 2. Sensitivity analysis. Electrophoresis on a 1% agarose gel stained with 1x redsafe (iNtRON, South Korea) showing the PCR reactions for the genomic DNA of ten species of genus *Cynoglossus* with a 10-fold serial diluted from 10 ng/μl to 0.01 ng/μl. Lanes: (M) 100 bp DNA ladder (iNtRON, South Korea); (1) 10 ng; (2) 0.1 ng; (3) 0.01 ng; (4) 0.001 ng.

학적 연구의 발달로 미토콘드리아 유전자 분석을 통해 일부 종에 대한 명확한 종의 동정이 이루어 졌다[13, 14]. 하지만, 유전자 서열 분석을 이용한 종판별은 소비되는 시간과 값비싼 분석 비용의 문제로 경제적 부담이 따른다. 이를 해결하기 위한 일환으로, 비특이적인 프라이머를 사용한 RFLP-PCR [16]과 RAPD-PCR [11]을 이용하여 다양한 종을 판별하는 분석법들이 개발이 되었으나, 각각의 종을 식별하기 위해서는 많은 유전좌위를 필요로 하기 때문에 분석할 수 있는 대상종의 수에 한계가 있다[2]. 하지만, 다중 PCR 분석법의 경우 보다 저렴한 비용과 한번의 PCR반응을 통해 신속하고 정확하게 여러 종의 판별이 가능하기 때문에 최근 미토콘드리아 16S rRNA 유전자내 종특이적 서열을 이용한 식육의 감별[3], 오징어류의 종판별[9]과 젓새우의 원산지판별[8] 등, 수산물과 가공식품을 대상으로 한 분석법에 많이 활용되고 있다. 현재까지 다중 PCR을 이용하여 가장 다양한 종을 분석한 연구로는, 뱀장어속 어류 7종을 판별하는 분석법이나 일부종에 대한 비특이적인 증폭이 관찰되어 다중 PCR 분석 또한 분석 대상의 수에 한계가 나타난다는 것을 알 수 있다[2].

종특이적 PCR 분석법의 정확성을 결정하는 가장 중요한 요소는 프라이머의 제작이다[17]. 일반적으로 서로 다른 속의 경우 유전적인 차이가 크기 때문에 특이 프라이머의 제작이 간편하나 동일한 속의 유사 종간에는 분석대상 종이 많아질수록 종특이적 유전자 영역을 찾는 것이 어렵다. 또한, 다중 PCR의 조건을 확립하기 위해서는 종특이 프라이머들의 결합 온도 조건이 동일하여야 하며, 비특이적인 PCR 반응이 일어나지 않아야 함과 동시에 PCR 증폭 산물의 크기가 서로 달라야 하는 등 여러가지 반응 조건이 부합하여야 한다[12, 18].

본 연구에서는 해당하는 조건에 부합하는 종특이적 프라이머를 제작 하였으며, 참서대과 어류 10종에 대한 프라이머의 종특이성 및 활용 가능성을 검증하였다. 본 분석법은 감별력이 우수하여 참서대과 어류 10종의 정확한 종명 표기가 가능하므로, 향후 수입 수산물의 건전한 유통질서 확립 및 수산물 먹거리 안전성 확보에 기여하여 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2016년도 국립수산과학원 수산과학연구사업 수산 유전자원의 탐색 및 활용(R2016037)과 해양수산부의 R&D 연구사업 “통합형 수산물 감식 정보센터 구축을 위한 실용기술 개발”의 지원으로 수행된 연구입니다.

References

1. Ashahida, T., Kobayashi, T., Saitoh, K. and Nakayama, I. 1996. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffer containing

high concentration of urea. *Fish. Sci*. **62**, 727-730.
2. Fahmi, M. R., Solihin, D. D., Soewardi, K., Pouyaud, L., Shao, Z. and Berrebi, P. 2013. A novel semi-multiplex PCR assay for identification of tropical eels of genus *Anguilla* in Indonesian water. *Fish. Sci*. **79**, 185-191.
3. Heo, E. J., Ko, E. K., Youn, H. J., Kim, Y. H., Kim, Y. J., Park, H. J., Wee, S. H. and Moon, J. S. 2016. Development of multiplex PCR assay for identification of eight species from meats in Korea. *Food. Hyg. Safe. Sci*. **31**, 28-35.
4. Hwang, C. Y., Youn, H. Y. and Han, H. R. 2002. Development of non-invasive recal PCR assay for detecting the *Helicobacter* species infection in dogs. *J. Vet. Clin*. **19**, 295-298.
5. Hwang, S. O. 2014. Eradicate measures in unsanitary food from the perspective of the consumer. *Food Sci. Ind*. **47**, 61-70.
6. Jee, H. W., Lee, Y. G., Kang, D. S., Yoon, Y. J., Choi, Y. C. and Yu, J. W. 2009. Resistance performance of Korean small coastal fishing boat in low-speed range. *Int. J. Nav. Archit. Ocean Eng*. **46**, 10-23.
7. Kang, H. W., Lim, H. K., Kang, D. Y., Han, H. S., Do, Y. H. and Park, J. S. 2012. Maturation and spawning of the female tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* in the West Coast of Korea. *Dev. Reprod*. **16**, 87-93.
8. Kang, J. H., Noh, E. S., Park, J. Y., An, C. M., Choi, J. H. and Kim, J. K. 2015. Rapid origin determination of the Northern Mauxia Shrimp (*Acetes chinensis*) based on allele specific polymerase chain reaction of partial mitochondrial 16S rRNA gene. *Asian-Australas. J. Anim. Sci*. **28**, 568-572.
9. Kim, H. S., Seo, Y. B., Choi, S. S., Kim, J. H., Shin, J. Y., Yang J. Y. and Kim, G. D. 2015. Development and validation of multiplex polymerase chain reaction to determine squid species based on 16s rRNA gene. *Food Hyg. Safe. Sci*. **30**, 43-50.
10. Kim, I. S. and Choi, Y. 1994. A taxonomic revision of the family Cynoglossidae (Pisces, Pleuronectiformes) from Korea. *Bull. Kor. Fish Soc.* **27**, 803-813.
11. Kim, W. J., Kong, H. J., Kim, Y. O., Nam, B. H. and Kim, K. K. 2009. Development of RAPD-SCAR and RAPD-generated PCR-RFLP markers for identification of four *Anguilla* eel species. *Animal Cells Syst*. **13**, 179-186.
12. Koh B. R. D., Kim, J. Y., Na, H. M., Park, S. D. and Kim, Y. H. 2011. Development of species-specific multiplex PCR assays of mitochondrial 12S rRNA and 16S rRNA for identification of animal species. *Kor. J. Vet. Serv.* **34**, 417-428.
13. Kwun, H. J. and Kim, J. K. 2010. Validation of morphology-based identification of two cynoglossidae larvae using mitochondrial DNA. *Fish. Aquatic. Sci*. **43**, 482-488.
14. Kwun, H. J. and Kim, J. K. 2016. Re-identification of two Tonguefishes (Pleuronectiformes) from Korea using morphological and molecular analysis. *Fish. Aquatic. Sci*. **49**, 208-213.
15. Lee, Y. M. and Lee, K. W. 2002. Attitude and behavior of seafood consumption among Korean housewives. *Kor. J. Food Culture* **17**, 111-119.
16. Lin, W. F. and Hwang, D. F. 2008. A multiplex PCR assay for species identification of raw and cooked bonito. *Food Control*. **19**, 879-885.
17. Matusunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Shibata, K., Yamada, Y. and Shinura, Y. 1999. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Sci*. **51**, 143-148.
18. Silfvergrip, A. M. C. 2009. CITES identification guide to the freshwater eels (anguillidae): with focus on the European eel *Anguilla anguilla.* Swedish Environmental Protection Agency Press.

초록 : 다중 PCR 분석법을 이용한 참서대과 어종의 신속하고 정확한 종판별 분석법 개발

노은수 · 강현숙 · 안철민 · 박중연 · 김은미 · 강정하*
(국립수산과학원 생명공학과)

본 연구에서는 국산 참서대과 어류 5종(개서대, 참서대, 칠서대, 박대, 용서대) 및 수입산 참서대과(Cynoglossidae) 어류 5종(기니개서대, 긴개서대, 큰비늘개서대, 큰입개서대, 세네갈 개서대)을 대상으로 분자생물학적 방법을 이용한 신속하고 정확한 종판별법을 검토하였다. 참서대과 어류 10종에 대한 최적의 종 특이 프라이머를 선정하기 위하여 약 1,500 bp의 COI 유전자를 분석하였으며, 종간 특이적인 단일염기다형성 유전자가 3′ 말단에 위치하도록 프라이머를 제작하였다. 제작된 10종에 대한 종특이 정방향 프라이머는 동일한 PCR조건과 전기영동을 통해 육안으로 식별이 가능할 정도의 PCR 산물의 상대적인 크기를 고려하였다. 다중 PCR 분석을 위해 종특이 정방향 프라이머는 모두 혼합되어 사용되었으며, 그 결과 세네갈개서대(208 bp), 용서대(322 bp), 큰입개서대(493 bp), 큰비늘개서대(754 bp), 박대(874 bp), 칠서대(952 bp), 참서대(1,084 bp), 긴개서대(1,198 bp), 개서대(1,307 bp), 기니개서대(1,483 bp)에 해당하는 종 특이적인 증폭을 확인하였다. 또한 이들의 PCR 민감도를 측정한 결과 0.1~1.0 ng/μl의 농도까지 검출이 가능한 것을 확인 하였다. 본 연구에서 확인된 참서대과 어류 10종에 대한 종특이 프라이머는 특이도 및 민감도가 우수하며 향후 수산물의 수출입 및 유통 관리에 사용이 이루어진다면 정확한 종명 표기가 가능하여 국민 먹거리 안전을 위한 효과적인 방법이 될 것이다.