

## Development and Validation of Real-time PCR to Determine *Branchiostegus japonicus* and *B. albus* Species Based on Mitochondrial DNA

In Young Chung<sup>1†</sup>, Yong Bae Seo<sup>1,2\*</sup>, Ji-Young Yang<sup>3</sup> and Gun-Do Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

<sup>2</sup>Institute of Marine Biotechnology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

<sup>3</sup>Department of Food Science & Technology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

Received October 12, 2017 / Revised October 28, 2017 / Accepted November 2, 2017

DNA barcoding is the identification of a species based on the DNA sequence of a fragment of the cytochrome C oxidase subunit I (*COI*) gene in the mitochondrial genome. It is widely applied to assist with the sustainable development of fishery-product resources and the protection of fish biodiversity. This study attempted to verify horse-head fish (*Branchiostegus japonicus*) and fake horse-head fish (*Branchiostegus albus*) species, which are commonly consumed in Korea. For the validation of the two species, a real-time PCR method was developed based on the species' mitochondrial DNA genome. Inter-species variations in mitochondrial DNA were observed in a bioinformatics analysis of the mitochondrial genomic DNA sequences of the two species. Some highly conserved regions and a few other regions were identified in the mitochondrial *COI* of the species. In order to test whether variations in the sequences were definitive, primers that targeted the varied regions of *COI* were designed and applied to amplify the DNA using the real-time PCR system. Threshold-cycle (Ct) range results confirmed that the Ct ranges of the real-time PCR were identical to the expected species of origin. Efficiency, specificity and cross-reactivity assays showed statistically significant differences between the average Ct of *B. japonicus* DNA (21.85±3.599) and the average Ct of *B. albus* DNA (33.49±1.183) for confirming *B. japonicus*. The assays also showed statistically significant differences between the average Ct of *B. albus* DNA (22.49±0.908) and the average Ct of *B. japonicus* DNA (33.93±0.479) for confirming *B. albus*. The methodology was validated by using ten commercial samples. The genomic DNA-based molecular technique that used the real-time PCR was a reliable method for the taxonomic classification of animal tissues.

**Key words** : *Branchiostegus albus*, *Branchiostegus japonicas*, mitochondrial DNA, real-time quantitative PCR

### 서 론

옥돔(*Branchiostegus japonicus*)은 농어목, 옥돔과에 속하는 난류성 어종으로, 세계적으로는 3속 28종이 분포하고 있으며, 우리나라 제주도를 비롯하여 중국, 필리핀, 베트남을 포함하여 북서태평양에 서식한다. 옥돔과에 속하는 종은 옥돔(*B. japonicus*), 옥두어(*B. argentatus*), 등혹점옥두어(*B. argentatus*), 황옥돔(*B. auratus*) 4종이 분포하고 있다[22]. 우리나라에서도 가장 대표적 고급 어종인 옥돔은 제주 특유의 전통 특산물로 아주 오랜 옛날부터 생선 중에서도 가장 귀한 어종으로 알려

져 왔다. 옥돔은 주로 수심 10~300 m 되는 대륙붕 가장자리에 서식하며, 펄이나 모랫바닥에 구멍을 파고 그 속에서 생활하는 습성을 가진 어류이다[25]. 근래에 옥돔의 어획량이 줄어들고 가격이 치솟으면서, 이와 유사한 중국산 옥두어를 옥돔으로 둔갑시켜 판매하는 상황이 급격히 증가하고 있다. 옥두어는 옥돔의 유사 어종으로 흔히 중국산 옥돔 또는 옥두어로 불리는데 옥돔과 동일 종으로 취급되면서 옥돔의 절반 가격 이하로 수입되고 있고, 유통과정에서 옥돔으로 둔갑하는 경우가 빈번히 발생하고 있다. 일반적으로 옥돔 종 간의 분류는 형태에 근거하여 육안으로 식별하는 방법을 사용하였으나 정확성이 떨어지며 특히, 가공 처리될 경우 형태에 근거한 식별이 불가능한 경우가 자주 발생하였다. 따라서, 원산지 판별 수산물 검사의 정확성을 높이고 처리 속도를 향상시키며, 가공품의 종 식별에도 가능한 객관적 종 판별 방법의 확립이 요구되고 있다.

수산생물의 종 분류는 생물자원 관리의 기본 단위이며, 생태계 연구뿐만 아니라 수산생물 종의 허위 표시 및 부정 혼입 방지를 위한 식품의 안전성 확보 및 국민의 안전한 먹거리를

† Authors contributed equally.

\*Corresponding author

Tel : +82-51-629-5618, Fax : +82-51-629-5619

E-mail : gundokim@pknu.ac.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.

위협하는 부정·불량식품 근절을 위해 그 중요성이 점차 커지고 있는 실정이다. 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 이용한다[5, 12, 23, 27, 30]. 이처럼 단백질을 이용한 종 판별법은 열처리 및 건조 같은 물리·화학적 조성의 변화와 단백질 구조의 변화로 분석결과의 판독에 대한 신뢰성이 낮아져 가공식품에는 적합하지 못하고, 항체를 필요로 하는 면역학적 방법은 유사한 단백질 사이의 교차 반응에 의해 영향을 받을 수 있다[16, 27]. 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 있다[6-10, 13-15, 18, 19, 39].

최근에 수산물물을 비롯하여 여러 생물종의 판별을 위하여 제한효소 절단을 이용한 제한효소 단편 다형성(restriction fragment length polymorphism, RFLP) [32, 34], 무작위 증폭 다형 DNA-PCR (random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction, RAPD-PCR), 유전자 증폭산물 길이 다형성(amplified fragment length polymorphism, AFLP), 중 특이 PCR 프라이머를 이용한 PCR [28, 29, 37] 및 real-time PCR [24], DNA 염기서열 분석 등의 DNA를 기반으로 하는 다양한 분석 방법이 발전되었다[1, 17, 20, 26, 35, 36]. 이러한 방법들은 종 구분을 위해 DNA 서열의 변이를 검출하는 정확하고 신뢰할 수 있는 분석기술이다. 특히, real-time PCR 분석법의 경우 기존의 PCR 방법보다 빠른 시간 내에 높은 감도로 증폭할 수 있으며, 기존 PCR의 위양성(false positive)을 효과적으로 줄일 수 있어 신뢰성을 높일 수 있다. 또한, 제한효소 처리, 아가로스겔 전기영동 과정 등을 생략하여 결과 도출 시간을 줄일 수 있고 한번에 많은 시료를 분석할 수 장점을 가지고 있다.

본 연구에서는 부정 식품 유통 근절을 위해 형태학적으로 판별이 어려운 옥돔(*B. japonicus*)과 그 형태학적 유사 어종인 옥두어(*B. albus*)에 대한 정확한 판별 기술을 확립하기 위해 국제생물바코드컨소시엄(Consortium for the Barcode of Life)에서 제안된 종 판별 바코드 영역인 미토콘드리아 DNA 염기서열의 cytochrome c oxidase I (COI) 유전자 영역에서 종 특이 프라이머를 설계, 2종에 대한 정확한 판별이 가능한 real-time PCR 반응 조건을 확립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시료 선정 및 전처리

실험에 사용한 옥돔(*Branchiostegus japonicus*, 5마리, 체장

25~35 cm)과 옥두어(*Branchiostegus albus*, 10마리, 체장 25~35 cm)는 2016년 8월, 2016년 10월, 2017년 6월에 제주 동문시장, 제주 올레시장, 제주시 수산업협동조합에서 구입하였으며, 구입 후 실험 전까지 -20℃에 보관하였다. 옥돔 및 옥두어의 원물, 건조 등의 제품을 액체 질소와 막자 사발을 이용하여 균질하게 분쇄한 것을 분석 검체로 사용하였다.

### Genomic DNA 추출

DNA 추출 시 하나의 분석 검체로부터 적정량을 2회 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. 균질화 시료(약 0.03~0.05 g)에 TL (Tissue Lysis Buffer) 버퍼 200 µl 및 Proteinase K (20 mg/ml) 20 µl를 넣어 혼합 후 60℃에서 1~3시간 반응시켰다(반응 중 샘플을 30분마다 혼합). 반응액에 GC (Binding buffer) 버퍼 200 µl를 넣고 혼합하였고, Isopropanol 100 µl를 넣어 완벽히 혼합한 후 Spin-down 하였다. 상층액을 Binding column에 옮긴 후 원심분리(6,000x g, 1분)하였다. Collection tube에 담긴 Binding column 용출액을 제거하고, W1 버퍼 500 µl를 Binding column에 넣고 원심분리(6,000x g, 1분)하였다. Collection tube에 담긴 Binding column 용출액을 제거하고, W2 버퍼 500 µl를 Binding column에 넣고 원심분리(6,000x g, 1분)하였다. Collection tube에 담긴 Binding column 용출액을 제거하고, 원심분리(10,000x g, 1분)하여 ethanol을 완전히 제거하였다. 새로운 1.5 ml Eppendorf tube에 Binding column을 옮기고 200 µl의 elution buffer를 넣어 1분간 실온에서 반응시킨 후 원심분리(6,000x g, 1분)하였다. 추출된 DNA 용액은 바로 실험에 사용하거나 그렇지 않은 경우, 4℃(단기보관)와 -20℃(장기보관)에 보관하였다. 추출된 DNA의 농도는 Optizen™ NanoQ (K Lab Kiswire, Korea)를 이용하여 측정하였고, 추출된 genomic DNA의 농도를 10 ng/µl로 맞추어 real-time PCR template로 사용하였다.

### COI 유전자의 염기서열 분석

옥돔과 옥두어의 COI 유전자의 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 등록된 옥돔 미토콘드리아 전체 염기서열(NC\_012904.1)과 옥두어 미토콘드리아 전체 염기서열(NC\_012905.1)로부터 확보하였다. 확보된 옥돔과 옥두어의 미토콘드리아 DNA 서열 중에서 보존적인 COI 유전자 염기서열을 이용하여 유전자 서열 정렬(sequence alignment)를 통해 옥돔과 옥두어를 공통적으로 증폭할 수 있는 forward primer (Br\_COI\_U\_F, 5'-TCATTCGAGCAGAAGCTTAGC-3')와 reverse primer (Br\_COI\_U\_R, 5'-GTAGCGGATGTAAAGTATGCA-3') 쌍을 제작하여 종 확인에 사용하였다. PCR 증폭을 위한 반응액 조성

은 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 µl로 총 20 µl로, PCR 반응은 AllInOneCycler™ (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 35회 반복하여 진행하였고 최종적으로 72°C에서 7분 동안 final extension을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 DNA 염기서열 분석 서비스 (Macrogen, Korea)를 의뢰하여 염기서열 분석을 진행하였다.

### 중 특이 프라이머 제작

확보된 옥돔과 옥두어의 미토콘드리아 DNA 서열 중에서 보존적인 COI 유전자 염기서열을 이용하여 유전자 염기서열 정렬을 하였으며, European Molecular Biology Laboratory의 Clustal omega (EMBL, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>)를 사용하여 옥돔과 옥두어 각각의 COI 유전자 1,534 bp의 염기서열을 분석하였다. 두 종에서 얻어진 COI 영역 염기서열은 중간 특이성을 나타내는 염기서열 변이 부분을 탐색하였다. 중 특이 프라이머는 real-time PCR을 고려하여 증폭산물의 크기는 80~200 base pair 사이가 되도록 하였고, 염기서열 변이 부위는 프라이머의 3'말단에 위치하도록 제작하였다. T<sub>m</sub> 값은 57~62°C 범위를 가지며 30~70%의 GC 비율을 고려하여 Table 1과 같이 최종적으로 디자인하여 올리고 합성 (Bioneer, Korea)을 의뢰, 실험에 사용하였다.

### Real-time PCR 분석

Real-time PCR에 사용된 프라이머는 옥돔과 옥두어 종에 특이적인 각 1쌍을 사용하였다(Table 1). 옥돔과 옥두어 종에 각각 특이적인 프라이머 세트의 real-time PCR 효율을 확인하기 위해 옥돔의 Bj-al\_2\_F/R primer와 옥두어 Bal-j\_2\_F/R primer를 이용하여 각 옥돔과 옥두어로부터 증폭된 PCR 산물을 pGEM® T-easy vector system (Promega, USA)에 클로닝 하였고, DH5α competent cell (Takara, Japan)에 형질전환한 후 ampicillin (50 µg/ml)이 첨가된 LB-agar 배지에서 blue/white colony selection을 통해 단일 colony를 선별하였다. 선별된 colony를 ampicillin (50 µg/ml)이 첨가된 LB 액체배양액

에 배양한 후 AccuPrep® Nano-Plus Plasmid DNA Extraction Kit (Bioneer, Korea)을 이용하여 plasmid DNA를 추출하였다. 추출된 plasmid DNA는 옥돔과 옥두어의 판별을 위한 standard curve를 확인하기 위한 standard plasmid DNA로서 각각 10 ng/µl, 1 ng/µl, 100 pg/µl, 10 pg/µl, 1 pg/µl, 100 fg/µl, 10 fg/µl로 희석하여 template로 사용하였다. Real-time PCR 반응액 조성은 template DNA 1 µl, forward primer 1 µl (10 pmole), reverse primer 1 µl (10 pmole), 2X GreenStar Master Mix 10 µl, distilled water 7 µl로 총 20 µl로 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 장치의 덮개 온도(cover temperature)가 105°C 정도인 것이 확인되면 반응을 개시하였다.

Real-time PCR 반응 조건은 95°C에서 5분 동안 pre-denaturation 후 95°C에서 15초간 denaturation, 60°C에서 15초간 annealing 및 72°C에서 15초간 extension의 조건으로 35회 반복하여 진행하였다.

옥돔 및 옥두어 조직에서 추출한 genomic DNA를 사용하여, 옥돔 및 옥두어 판별을 위한 real-time PCR 증폭을 위한 반응액 조성은 각각의 시료에서 추출한 genomic DNA 1 µl (10 ng/µl), forward primer 1 µl (10 pmole), reverse primer 1 µl (10 pmole), 2X GreenStar Master Mix 10 µl, distilled water 7 µl, 총 20 µl로 반응액을 준비하여 standard curve를 확인하기 위한 동일한 조건에서 real-time PCR을 수행하였다. 옥돔과 옥두어 중 판별을 위한 real-time PCR은 옥돔, 옥두어 각각 5개 개체에서 추출된 genomic DNA를 template로 사용하였고, 각각의 시료는 3개씩 PCR 반응을 수행하고 반응 종료 후 실험결과를 해석하였다.

## 결 과

### 옥돔과 옥두어 중 특이 프라이머

옥돔과 옥두어 판별을 위한 중 특이 프라이머를 디자인하기 위하여 미국 국립보건원에서 운영하는 유전자은행([www.ncbi.nlm.nih](http://www.ncbi.nlm.nih))에 등록 되어 있는 COI 유전자 염기서열을 이용하였다. 실험 대상 시료의 COI 유전자 염기서열을 각각 3종류 이상

Table 1. Oligonucleotide primers used in PCR

Species	Name	Sequences	Product size	Target gene
<i>B. japonicus</i>	Bj-al_2	5'- gct agc caa ctc atc ctt aga t -3' 5'- ttt gtt caa gta ggg tga ag -3'	137 bp	COI <sup>1)</sup>
<i>B. albus</i>	Bal-j_2	5'- tcc act tca cag tca tgt ttg t -3' 5'- agc cca gag agg aga ttg ta -3'	138 bp	COI

<sup>1)</sup>COI : Cytochrome c oxidase subunit I

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

		Bj-a1_	
B. japonicus_COX1	gccctagggttttattttcctctttacagtggggggcctaaccggaatcgtagccaac	690	
B. albus_COX1	gccctagggttttattttcctctttacagtgggggactgaccggaatcgtagccaac	690	
	*****		
	2_F		
B. japonicus_COX1	<u>tcaccttagat</u> attgtacttcacgatacatactatgtagtagccacttccactacgtc	720	
B. albus_COX1	tcacccctagacattgtacttcacgatacatactatgtagtagccacttccactacgtc	720	
	*****		
B. japonicus_COX1	ttatccatgggagctgtatttggcaccgtagctggctttatgcactgattccccctattc	750	
B. albus_COX1	ctatccatgggggctgtatttggcatcgtagctggctttatgcactgattccccctattc	750	
	*****		
	Bj-a1_2_R		
B. japonicus_COX1	tccggatatactcttcaccctacttgaacaaaaatccacttcacagtattgttttagga	780	
	Ba1-j_2_F		
B. albus_COX1	tccggatacactttacattctacttgaacaaaaatccacttcacagtcattgtttggga	780	
	*****		
B. japonicus_COX1	gtaaaccttaacattcttcccccaacacttcttgggttagcaggaatgcccgcgcgatac	810	
B. albus_COX1	gtaaaccttaacattcttcccccaacacttcttggcctggcaggaatgcccgcgcgatac	810	
	*****		
B. japonicus_COX1	tcagactaccagatgcttataccctgtgaaacacagtttctcttaggctctttaatc	840	
	Ba1-j_2_R		
B. albus_COX1	tcagattaccggatgcttataccctgtgaaatcaatctctctctggctctttaatc	840	
	*****		

Fig. 1. Primer information for COI region designed from complete mitochondrion sequence of *B. japonicus* (NC\_012904.1) and *B. albus* (NC\_012905.1).

선정하여 이들의 유전적 상동성을 확인하였으며, 이 결과로부터 real-time PCR의 적용성을 고려하여 옥돔과 옥두어 종 판별을 위한 최적의 프라이머를 선정하였고 프라이머의 위치는 Fig. 1에 표시하였다. 본 연구에서 real-time PCR에 사용되는 옥돔과 옥두어 2쌍의 종 특이 프라이머는 Table 1에 표시되어 있으며, 제작된 2쌍의 프라이머는 각각 옥돔과 옥두어의 시료에서 특이적으로 증폭하여 종 판별을 할 수 있다.

**옥돔과 옥두어의 quantified plasmid DNA에서 real-time PCR 결과**

옥돔과 옥두어에서 확보한 각각의 standard plasmid DNA를 10배수 희석하여 template로 사용한 real-time PCR 반응 결과, 옥돔 판별을 위한 프라이머 세트의 standard curves (Fig. 2A)와 옥두어 판별을 위한 프라이머 세트의 standard curves (Fig. 2B)를 확보하였다. 또한 Table 2에서 나타나는 것과 같이 3회 반복한 결과에서 거의 유사한 threshold cycle (Ct) 값을 나타내며, 옥돔 프라이머 세트(Bj-a1\_2)의 standard curves 결과에서 기울기(Slop)는 -3.445, 상관 계수(R<sup>2</sup>)는 0.999, 효율은 95% 이상을 나타내며, 옥두어 프라이머 세트(Ba1-j\_2)의 standard curves 결과에서 기울기(Slop)는 -3.401, 상관 계수(R<sup>2</sup>)는 0.999, 효율은 약 97%을 나타내고 있다(Fig. 2C). 각 프라이머의 검출한계를 standard plasmid DNA의 real-time PCR 결과를 통해 계산 하였을 때 약 2.94x10<sup>3</sup> copy number까지

증폭이 가능하였다.

**종 특이 real-time PCR 특이성 검사**

옥돔과 옥두어의 각 5개 시료의 genomic DNA를 동일한 농도로 맞추어 template로 사용하고 옥돔의 종 특이 프라이머 세트(Bj-a1\_2)와 옥두어의 종 특이 프라이머 세트(Ba1-j\_2)를 사용하여 real-time PCR을 수행하였다. 옥돔과 옥두어의 각 5개의 시료에서 옥돔 종 특이 프라이머 세트를 사용하여 real-time PCR 결과를 분석 결과, 옥돔의 시료에서 Ct 값 평균이 21.85, 옥두어 시료에서 Ct 값 평균이 33.49로 분석되었다. 동일한 시료 조건으로 옥두어 종 특이 프라이머 세트를 사용하여 real-time PCR 결과 옥돔 시료의 genomic DNA에서 옥돔 종 특이적 프라이머(Bj-a1\_02)를 이용한 Ct 평균값은 21.85±3.599이었고, 옥두어 시료의 genomic DNA에서 옥돔 종 특이 프라이머를 이용한 Ct 평균값은 33.49±1.183이었다. 그리고 옥두어 시료의 genomic DNA에서 옥두어 종 특이적 프라이머(Ba1-j\_02)를 이용한 Ct 평균값은 22.49±0.908이었고, 옥돔 시료의 genomic DNA에서 옥두어 종 특이 프라이머를 이용한 Ct 평균값은 33.93±0.479을 나타내었다. 옥돔과 옥두어의 각 종 특이 프라이머의 효율성, 특이성 및 교차 반응성 측정은 통계적으로 유의한 차이를 보여 주었다. 옥돔과 옥두어 시료의 genomic DNA에 대하여 각 종의 종 특이 프라이머 세트를 사용한 경우에 Ct 평균값은 23 이하로 나타나는 반면, 종의

Table 2. Threshold cycle (Ct) values of real-time PCR, quantitatively reacted with standard plasmid DNA of *B. japonicus* and *B. albus*

Species	Plasmid equivalents	Ct value			Mean	Standard deviation
		1	2	3		
<i>B. japonicus</i>	10 ng/μl	9.002	8.956	8.986	8.981	0.023
	1 ng/μl	12.299	12.430	12.127	12.285	0.152
	100 pg/μl	15.750	15.547	15.738	15.678	0.114
	10 pg/μl	19.278	19.166	19.138	19.194	0.074
	1 pg/μl	22.402	22.651	22.509	22.521	0.125
	100 fg/μl	26.266	25.679	26.246	26.064	0.333
	10 fg/μl	29.636	29.582	29.797	29.671	0.112
	0	ND	ND	ND	-	-
<i>B. albus</i>	10 ng/μl	9.003	8.965	8.995	8.988	0.020
	1 ng/μl	12.500	12.143	12.506	12.383	0.208
	100 pg/μl	15.882	15.770	15.728	15.794	0.080
	10 pg/μl	19.652	19.264	19.138	19.351	0.268
	1 pg/μl	22.586	22.664	22.643	22.631	0.040
	100 fg/μl	25.977	26.246	26.136	26.120	0.135
	10 fg/μl	29.431	29.240	29.204	29.291	0.122
	0	ND	ND	ND	-	-

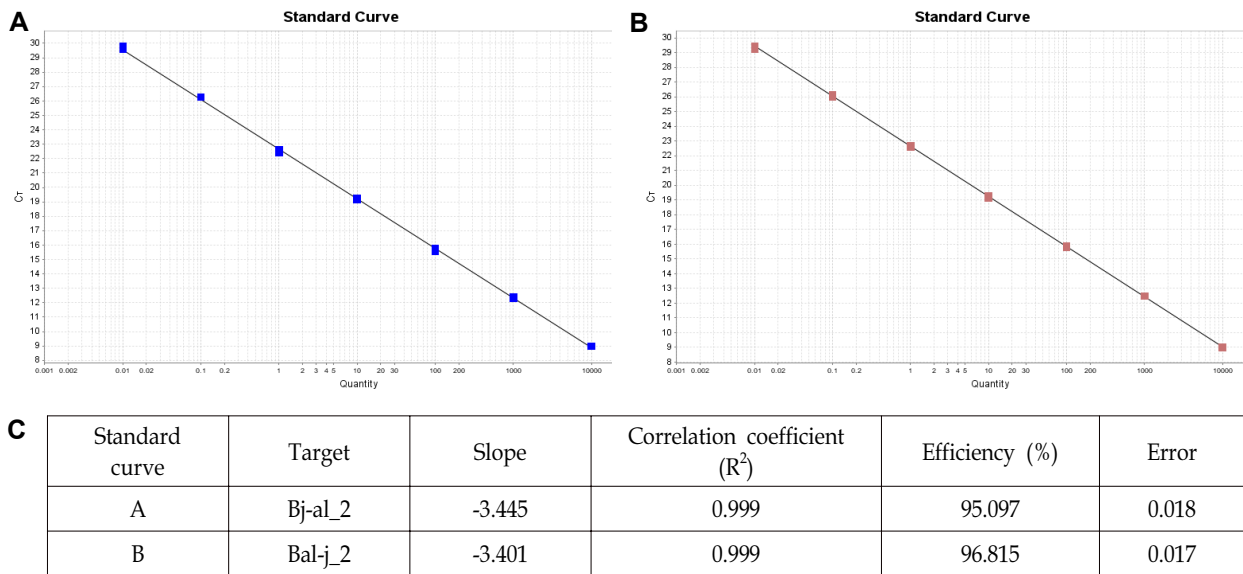


Fig. 2. Standard curve of a 10-fold serial diluted standard plasmid DNA of *B. japonicus* (A) and *B. albus* (B) with averaged results from 3 separately repeated real-time PCR experiments, and parameter values of each standard curve (C). Threshold cycle (Ct) is plotted on the Y-axis and standard plasmid DNA equivalent is plotted on the X-axis.

종 특이 프라이머 세트가 아닌 경우에는 Ct 값이 33 이상으로 나타나고 있어 옥돔과 옥두어 종 특이 프라이머 세트의 비특이적 교차 반응이 나타난다고 볼 수 있다(Fig. 3). 그러나 Fig. 3A의 결과와 Fig. 3B의 결과에서 보듯이 각 종 특이 프라이머를 사용하였을 때 유사종의 증폭곡선은 목적종의 증폭곡선과 명확한 차이를 나타내고 있다. 또한, 각 종 특이 프라이머 세트에 의한 Ct 값의 평균을 분석하더라도, 평균 10 cycle 이상의 차이를 나타내고 있으므로 종 판별을 위한 좀 더 명확한 차이

를 확인할 수 있다(Table 3).

### 고 찰

진핵생물체는 대부분 미토콘드리아를 가지며, 이 미토콘드리아에 존재하는 게놈 DNA는 약 16,000 개의 염기로 구성된 이중나선 DNA로 구성된다. 미토콘드리아 게놈은 산화적 인산화에 필수적인 13개의 소단위 단백질 및 폴리펩티드로 구성

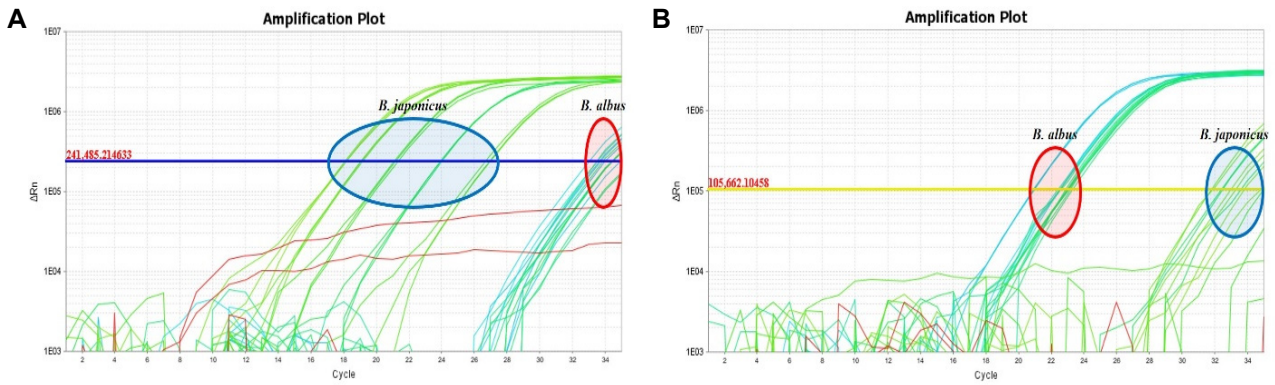


Fig. 3. Amplification of genomic DNA extracted from *B. japonicus* and *B. albus* using Bj-al\_2 primer for *B. japonicus* (A) and Bal-j\_2 primer for *B. albus* (B).

Table 3. Threshold cycle (Ct) values and Standard Deviation of real-time PCR with genomic DNA extracted from *B. japonicus* and *B. albus* using Bj-al\_2 primer for *B. japonicus* and Bal-j\_2 primer for *B. albus*

	Primer set name	Ct value	
		Ct mean	Standard deviation
NTC	Bj-al_2	-	-
	Bal-j_2	-	-
<i>B. japonicus</i> 1	Bj-al_2	18.126	0.062
	Bal-j_2	33.853	0.897
<i>B. japonicus</i> 2	Bj-al_2	19.089	0.048
	Bal-j_2	32.323	0.786
<i>B. japonicus</i> 3	Bj-al_2	26.889	0.143
	Bal-j_2	-	-
<i>B. japonicus</i> 4	Bj-al_2	21.186	0.108
	Bal-j_2	34.985	-
<i>B. japonicus</i> 5	Bj-al_2	23.971	0.034
	Bal-j_2	32.800	0.651
<i>B. albus</i> 1	Bj-al_2	34.245	0.324
	Bal-j_2	23.055	0.085
<i>B. albus</i> 2	Bj-al_2	33.467	-
	Bal-j_2	23.225	0.124
<i>B. albus</i> 3	Bj-al_2	34.410	0.028
	Bal-j_2	22.709	0.178
<i>B. albus</i> 4	Bj-al_2	33.375	0.330
	Bal-j_2	22.542	0.068
<i>B. albus</i> 5	Bj-al_2	34.189	0.665
	Bal-j_2	20.943	0.024

되어 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 포함되어 있다. 또한 미토콘드리아 단백질을 합성하기 위해 2개의 리보솜 RNA (12S rRNA and 16S rRNA)와 22개의 운반 RNA (tRNA)를 가지고 있다[3, 31, 38]. 전형적인 동물의 미토콘드리아 DNA는 높은 돌연변이율을 가지며, 비 암호화부분이 작은 DNA이다. 동물의 미토콘드리아

DNA의 진화율은 핵 DNA와 비교하여 유사종 사이의 종 구분 방법에 유용하고 신뢰성을 가진다. 또한, 대부분의 동물 중에서 미토콘드리아 DNA는 모계 유전방식을 가지고 있으므로 동물 유사종 구분을 위한 종 판별 결과를 단순화 할 수 있다 [21, 33, 35]. 또한 미토콘드리아 DNA는 머리카락과 같이 핵이 없는 조직으로부터 추출할 수 있으며, 세포당 많은 복제 수를 가지고 있기 때문에 농도가 낮거나 손상된 DNA 표본으로부터 유사종 구분을 위한 미토콘드리아 DNA추출이 가능하다[4,

36].

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 있다. 옥돔과 옥두어의 경우 종 유사성이 매우 높아 종 판별을 위해 제한효소 단편 다형성(restriction fragment length polymorphism, RFLP) 분석법을 사용하고 있으나[11], 대상 동일 종에서 서로 유사하거나 동일한 지문(fingerprint)을 나타내는 경우 종간 고유한 지문을 확립하여 분석하기 어려울 수 있다 [36].

이러한 문제점을 극복하기 위한 방법으로 최근에 real-time PCR system이 종 분석에 이용되고 있으며, 특히 본 연구에서 적용하는 real-time PCR system을 이용하여 대서양 고등어 (*Scomber scombrus*)와 유사종과 구분하기 위해 real-time PCR의 Ct 값 분석을 통하여 종 확인이 보고되어 있다[2].

이에 본 연구에서도 기존의 종 판별 문제점을 극복하기 위한 방법으로 real-time PCR을 이용하여 옥돔과 옥두어의 종 판별을 위한 조건을 확립하였다. 옥돔과 옥두어 종 판별을 위한 real-time PCR system에 종 특이 프라이머 세트를 사용하여 Ct 값을 비교 분석하여 종 판별이 가능하며, real-time PCR 조건에서 반응 반복횟수를 30회 이내로 축소하면 종 판별에 검출/비검출의 판별법으로 적용할 수 있을 것으로 판단된다. 따라서 옥돔과 옥두어 뿐만 아니라 종 구분 문제를 야기하는 생물 종의 경우, 종 판별에 적합한 종 특이 프라이머 세트를 설계하여 명확한 종 판별 시스템으로 적용할 수 있으며, 본 연구에서 개발된 옥돔과 옥두어 종 판별 분석법은 사용되는 식품 원료의 안전성 확보, 유통질서 확립 및 소비자 보호와 생산자에 대한 소비자 신뢰를 회복을 위해 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 2017년도 식품의약품안전처의 연구개발비(17162 미래사064)로 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

## References

- Aida, A. A., Che Man, Y. B., Wong, C. M. V. L., Raha, A. R. and Son, R. 2005. Analysis of raw meats and fats of pig using polymerase chain reaction for halal authentication. *Meat Sci.* **79**, 47-52.
- Velasco, A., Sanchez, A., Martinez, I., Santaclara, F. J., Perez-Martin, R. I. and Sotelo, C. G. 2013. Development of a Real-Time PCR method for the identification of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). *Food Chem.* **141**, 2006-210.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J., Staden, R. and Young, I. G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457-465.
- Attardi, G. and Schatz, G. 1988. Biogenesis of mitochondria. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**, 289-333.
- Axayacatl, R. O. and Juan, P. C. G. 2008. Molecular identification of dolphinfish species (genus *Coryphaena*) using multiplex haplotype-specific PCR of mitochondrial DNA. *Ichthyol. Res.* **55**, 389-393.
- Bataille, M., Crainic, K., Leterreux, M., Durigon, M. and de Mazancourt, P. 1999. Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation. *Forensic Sci. Int.* **99**, 165-170.
- Birstein, V. J. and DeSalle, R. 1998. Molecular phylogeny of Acipenserinae. *Mol. Phylogenet. Evol.* **9**, 141-155.
- Brown, J. R., Beckenbach, K., Beckenbach, A. T. and Smith, M. J. 1996. Length variation, heteroplasmy and sequence divergence in the mitochondrial DNA of four species of sturgeon (Acipenser). *Genetics* **142**, 525-535.
- Burgener, M. and Hubner, P. 1998. Mitochondrial DNA enrichment for species identification and evolutionary analysis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **207**, 261-263.
- Cano, R. J., Poinar, H. N., Pieniazek, N. J., Acra, A. and Poinar, G. O. Jr. 1993. Amplification and sequencing of DNA from a 120-135-million-year-old weevil. *Nature* **363**, 536-538.
- Chow, S., Clarke, M. E. and Walsh, P. J. 1993. PCR-RFLP analysis on thirteen western Atlantic snappers (subfamily Lutjaninae): a simple method for species and stock identification. *Fish. Bull.* **91**, 619-627.
- Chung, Y. H., Oh, D. J., Oh, B. S., Chung, M. M., Lee, K. H. and Kim, J. H. 2013. Method for discriminating between *Branchiostegus japonicus* and *Branchiostegus albus* and a kit therefor. Korea patent. Kr-A-1012921690000
- Civera, T. 2003. Species identification and safety of fish products. *Vet. Res. Commun.* **27**, 481-489.
- Collura, R. V. and Stewart, C. B. 1995. Insertions and duplications of mtDNA in the nuclear genomes of Old World monkeys and hominoids. *Nature* **378**, 485-489.
- DeSalle, R., Williams, A. K. and George, M. 1993. Isolation and characterization of animal mitochondrial DNA. *Methods Enzymol.* **224**, 176-204.
- Esposti, M. D., De Vries, S., Crimi, M., Ghelli, A., Patarnello, T. and Meyer, A. 1993. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochim. Biophys. Acta.* **1143**, 243-271.
- Fabrice, T. 2009. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Rev. Fish. Biol. Fisheries* **19**, 265-293.
- Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M. and Wallace, D. C. 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 6715-6719.
- Hayashi, J., Tagashira, Y. and Yoshida, M. C. 1985. Absence of extensive recombination between inter and intraspecies mitochondrial DNA in mammalian cells. *Exp. Cell. Res.* **160**, 387-395.
- Heo, E. J., Ko, E. K., Seo, K. H., Kim, Y. J., Park, H. J., Wee, S. H. and Moon, J. S. 2014. Validation of PCR and ELISA

- test kits for identification of domestic animal species in raw meat and meat products in Korea. *J. Fd. Hyg. Safety* **29**, 158-163.
21. Irwin, D. M., Kocher, T. D. and Wilson, A. C. 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.* **32**, 123-144.
  22. Jenuth, J. P., Perterson, A. C., Fu, K. and Shoubridge, E. A. 1997. Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* **14**, 146-151.
  23. Jeong, M. G. 1998. The fishes of Korea. *Iljisa*, Seoul, Korea. pp. 331-332.
  24. Kim, K. H., Lee, H. Y., Kim, Y. S., Kim, M. R., Jung, Y. K., Lee, J. H., Cho, T. Y., Lee, H. J., Lee, S. J. and Han, S. B. 2014. Development of species-specific PCR to determine the animal raw material. *J. Food Hyg. Safety* **29**, 347-355.
  25. Kim, M., Yoo, I., Lee, S. Y., Hong, Y. and Kim, H. Y. 2016. 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.
  26. Kim, Y. U., Kim, Y. M. and Kim, Y. S. 1994. Commercial fishes of the coastal and offshore waters in Korea. *Nat. Fish. Res. Dev. Agency*, pp. 83.
  27. Liu, B. J., Zhang, B. D., Xue, D. X., Gao, T. X. and Liu, J. X. 2016. Population structure and adaptive divergence in a high gene flow marine fish: the small yellow croaker (*Larimichthys polyactis*). *PLoS One* **11**, e0154020.
  28. Mackie, I., Craig, A., Etienne, M., Jerome, M., Fleurence, J., Jessen, F., Smelt, A., Kruijt, A., Yman, I. M., Ferm, M., Martinez, I., Martin, R. P., Pineiro, C., Rehbein, H. and Kundiger, R. 2000. Species identification of smoked and gravid fish products by sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, urea isoelectric focusing and native isoelectric focusing: a collaborative study. *Food Chem.* **71**, 1-7.
  29. Martín, I., García, T., Fajardo, V., López-Calleja, I., Rojas, M., Pavón, M. A., Hernández, P. E., González, I. and Martín, R. 2007. Detection of chicken, turkey, duck, and goose tissues in feedstuffs using species-specific polymerase chain reaction. *J. Anim. Sci.* **85**, 452-458.
  30. Martín, I., García, T., Fajardo, V., Rojas, M., Hernández, P. E., González, I. and Martín, R. 2007. Technical note: Detection of cat, dog, and rat or mouse tissues in food and animal feed using species-specific polymerase chain reaction. *J. Anim. Sci.* **85**, 2734-2739.
  31. Moretti, V. M., Truchini, G. M., Bellagamba, F. and Caprino, F. 2003. Traceability issues in fishery and aquaculture products. *Vet. Res. Commun.* **27**, 497-505.
  32. Pirger, Z., Ra'cz, B. and Kiss, T. 2009. Dopamine-induced programmed cell death is associated with cytochrome c release and caspase-3 activation in snail salivary gland cells. *Biol. Cell* **101**, 105-116.
  33. Park, J. K., Shin, K. H., Shin, S. C., Chung, K. Y. and Chung E. R. 2012. Identification of meat species using species-specific PCR-RFLP fingerprint of mitochondrial 12S rRNA gene. *Kor. J. Food Sci. An.* **27**, 209-215.
  34. Park, Y. C., Jin, S. O., Lim, J. Y., Kim, K. H., Lee, J. H., Cho, T. Y., Lee, H. J., Han, S. B., Lee, S. J., Lee, K. H. and Yoon H. S. 2012. Application for identification of food raw materials by PCR using universal primer. *J. Fd. Hyg. Safety* **27**, 317-324.
  35. Santaclara, F. J., Espiñeira, M. and Vieites, J. M. 2007. Genetic identification of squids (Families *Ommastrephidae* and *Loliginidae*) by PCR-RFLP and FINS methodologies. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 9914-9920.
  36. Sezaki, K., Itoi, S. and Watabe, S. 2005. 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. *Fisheries Sci.* **71**, 414-421.
  37. Shoko, M., Kouji, N., Yoshiaki, K. and Yoh, Y. 2012. 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.
  38. Tanabe, S., Miyauchi, E., Muneshige, A., Mio, K., Sato, C. and Sato, M. 2007. 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.
  39. Wallace, D. C. 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* **283**, 1482-1488.
  40. Wolf, C., Rentsch, J. and Hubner P. 1999. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1350-1355.



## 초록 : Real-time PCR 분석법을 이용한 옥돔과 옥두어의 종 판별법 개발

정인영<sup>1\*</sup> · 서용배<sup>1,2\*</sup> · 양지영<sup>3</sup> · 김군도<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>부경대학교 미생물학과, <sup>2</sup>부경대학교 해양생명과학연구소, <sup>3</sup>부경대학교 식품공학과)

미토콘드리아 게놈에 존재하는 시토크롬C 산화효소 서브유닛 I (cytochrome C oxidase subunit I, COI) 유전자의 DNA 염기서열을 기반으로 하는 종 판별은 수산물 자원의 지속적인 개발과 어류 다양성 보존을 위해 폭넓게 적용되고 있다. 본 연구에서는 한국에서 소비되는 옥돔과 가짜 옥돔으로 둔갑하는 옥두어의 종 판별을 위한 분석법을 개발하였다. 옥돔과 옥두어, 두 종의 종 판별과 검증에 위해 미토콘드리아 게놈의 DNA 염기서열 차이를 이용하여 real-time PCR법에 의해 분석하였다. 미토콘드리아 DNA 서열의 생물정보학적 분석에서 옥돔과 형태학적 옥돔 유사종인 옥두어, 두 종 사이에 COI 유전자 내에서 상당히 유사한 DNA 서열 부분과 일부 서열 변화 부분이 확인되었다. 명확하게 종 판별을 하기 위해 COI 유전자 내에서 일부 변화된 서열에서 종 특이적 프라이머를 디자인하였다. 10 개체의 옥돔과 옥두어에서 게놈 DNA를 추출하여 옥돔과 옥두어의 종 특이적 프라이머를 이용하여 real-time PCR 시스템에 의해 분석되었다. 이러한 real-time PCR 시스템을 이용한 genomic DNA 기반의 분자 기술은 동물 조직의 분류학적 분류를 위한 신뢰할 수 있는 방법을 제공한다. 옥돔판별을 위해, 옥돔 DNA에서 옥돔 종 특이적 프라이머를 이용한 Ct 평균값( $21.85 \pm 3.599$ )과 옥두어 DNA에서 옥돔 종 특이 프라이머를 이용한 Ct 평균값( $33.49 \pm 1.183$ ) 차이를 나타내었다. 그리고 옥두어판별을 위해, 옥두어 DNA에서 옥두어 종 특이적 프라이머를 이용한 Ct 평균값( $22.49 \pm 0.908$ )과 옥돔 DNA에서 옥두어 종 특이 프라이머를 이용한 Ct 평균값( $33.93 \pm 0.479$ )을 통해 옥돔과 옥두어의 각 종 특이 프라이머의 효율성, 특이성 및 교차 반응성 측정은 통계적으로 유의한 차이를 보여 주었다. 제안된 방법은 10개의 상용 샘플로 검증이 되었다. 따라서, threshold cycle (Ct) value와 같은 real-time PCR 결과 분석에 의해 종 판별이 가능하였다.