

Identification of Salted Opossum Shrimp Using COI-based Restriction Fragment Length Polymorphism

Park Ju Hyeon, Moon Soo Young, Kang Ji Hye, Jung Myoung Hwa, Kim Sang Jo and Choi Hee Jung*

General Affairs Division, National Fishery Products Quality Management Service, Busan 49111, Korea

Received September 14, 2020 / Revised November 17, 2020 / Accepted December 2, 2020

This study developed a species identification method for the salted opossum shrimp of *Acetes japonicus*, *A. chinensis* (Korea, China), *A. indicus* (I, II), and *Palaemon gravieri* based on PCR-RFLP markers. Genomic DNA was extracted from the salted opossum shrimp. The COI gene was used to amplify 519 base pairs (bp) using specific primers. The amplified products were digested by Acc I and Hinf I, and the DNA fragments were separated by automated electrophoresis for RFLP analysis. When the amplified DNA product (519 bp) was digested with Acc I, *A. japonicus*, *A. chinensis* (Korea), and *A. indicus* (II) showed two fragments, whereas a single band of 519 bp was detected in *A. chinensis* (China) and *A. indicus* (I). Also, in the RFLP patterns digested by Hinf I, *A. chinensis* (Korea) and *A. chinensis* (China) showed a single band of 519 bp, while two fragments were observed in *A. japonicus* and *A. indicus* (I) and four fragments in *A. indicus* (II). The PCR amplicon of *P. gravieri* was digested by Acc I into 3 bands of 271, 202, and 46 bp and by Hinf I into a single band of 519 bp. Therefore, salted opossum shrimp-specific RFLP markers showing distinct differences between four species and two sub-species by PCR-RFLP analysis. Thus, the PCR-RFLP markers developed in this study are a good method for identifying the six types of salted opossum shrimp.

Key words : Mitochondrial DNA, PCR-RFLP, salted opossum shrimp, species identification

서 론

국내 유통되고 있는 새우젓은 다양한 작은 새우의 집합체다. 우리나라에 출현하는 새우젓은 *Acetes japonicus*와 *A. chinensis*가 있으며, 이들 종은 서해안을 중심으로 남해 서부 해역에 이르는 수심 30 m 이하의 연안에 서식하는 것으로 보고되고 있다[9]. 최근 어획량 감소로 국내산 젓새우의 경우 수입산에 비해 두 배 이상 높은 가격에 거래되고 있으며, 이에 중국 및 베트남 등으로부터 수입된 새우젓이 국내산으로 둔갑되어 판매되는 사례가 빈번하게 발생되고 있다.

새우젓은 크기가 약 3 cm 이하로 형태학적으로 원산지를 판별하기 매우 어려우며, 새우젓의 원산지표시제 시행에 따라 국내산과 수입산 새우젓의 감별에 대한 요구가 높아졌다. 이에 따라 새우젓의 감별 기술의 다양한 연구가 진행되어 왔으며 국내산 새우젓 특이 마커의 개발 등 현재에도 다양한 연구가 진행 중에 있다. Kang 등은 한국과 중국이 원산지인 *A.*

*chinensis*의 16S rRNA 유전자에서 SNPs 분석하여 대립유전자-특이적 PCR 반응을 이용한 새우젓 원산지 판별법을 보고하였다[10].

대부분의 동물계에서 종의 구분을 위해 가장 많이 사용되는 DNA 표지자는 미토콘드리아 시토크롬 c 산화효소 I번 아단위 (mitochondria cytochrome c oxidase subunit I; mtDNA COI) 유전자이다[5, 14, 15]. mtDNA COI는 진핵생물의 미토콘드리아에 존재하는 막 단백질로서 내호흡의 전자전달계의 최종 과정을 담당하는 효소이다[16]. 이 효소에 이상이 발생하면 치명적인 대사장애가 유발되므로 이 효소를 부호화하는 유전자는 진화과정에서 돌연변이가 드물게 발생하고, 모든 종에서 비교적 보존적인 유사한 염기서열이 공유되어 종 식별에 유용하게 사용된다[16, 19]. mtDNA COI 유전자를 사용한 종식별 연구는 새우와 같은 십각류의 계통발생 및 진화 관계를 조사하는데 이용되어 왔으며[2, 4], 몇몇 종류의 제한효소를 처리시켜 얻은 제한효소 절편 길이 다형성(DNA restriction fragment length polymorphism; RFLP)을 분석함으로써 생물군의 진화적 유연관계를 추정할 수 있는 장점을 소유하고 있다[3].

따라서, 본 연구에서는 새우젓의 mtDNA COI 유전자영역을 대상으로 PCR기반 RFLP 분자 기법을 이용하여 정확한 동정을 수행하여, 원산지/종판별에 활용할 수 있는 과학적 기초 데이터를 제공하고자 하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-400-5662, Fax : +82-51-400-5656

E-mail : cchj77@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.

재료 및 방법

재료

본 연구에서 사용된 재료는 시중에 유통 중인 새우젓 상품을 구입하여 사용하였으며, *A. chinensis* (Korea/China)는 국립수산물품질관리원(NFRDI) 전락양식 연구소 생명공학과에서 보관 중인 표본시료를 제공받아 총 109마리를 실험에 사용하였다.

DNA 추출 및 정제

시중에 염장처리 되어 판매되는 새우젓은 염제거를 위해 100 g 당 수돗물 500 ml로 3반복 세척한 후 Ethanol에 1시간 침지 후 Ethanol을 제거하여 DNA추출에 사용하였다. 총 DNA는 Promega gDNA kit (Promega, A2671)를 사용, 자동 DNA 추출시스템(Biomex FXp, Beckman, USA)을 이용하여 각 샘플로부터 분리하였다. 추출된 DNA는 Nanodrop ND-8,000 분광 광도계(Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하여 정량 화하였다.

mtDNA COI 유전자의 중합효소연쇄반응

PCR 반응은 template DNA 5 µl, GoTaq® G2 DNA Taq Polymerase 0.3 µl, 5X buffer 10 µl, dNTP (10 mM) 1 µl, 10 pmol의 forward와 reverse primer 각 2 µl, sterilized water 29.7 µl를 넣고 혼합한 다음 PCR cyler (Bio-Rad, USA)를 이용

하여 수행하였다. 본 연구에 사용된 종 특이 프라이머와 검출을 위한 최적의 반응조건은 Table 1에 나타내었다. PCR 증폭 산물은 DNA자동전기영동장치(QIAxcel Advanced system, QIAGEN, Germany)에서 DNA의 증폭여부를 확인하였다.

PCR 산물의 제한효소 절편 길이 다형성

RFLP 분석을 위해서 NCBI (National center for biotechnology information)의 GenBank로부터 문헌 및 본 연구 결과 관찰된 *A. japonicus*, *A. chinensis* (Korea), *A. chinensis* (China), *A. indicus* (I), *A. indicus* (II), *Palaemon gravieri*의 mtDNA COI 유전자 염기서열을 확보한 후(Table 2), Bioedit ver. 7.0.5을 이용하여 각각 종별로 특이 SNP를 가진 염기서열을 확인하였다. 제한효소의 선정은 Webcutter 2.0와 Restriction Mapper V3.0을 이용하여, Acc I (GT/MKAC)와 Hinf I (G/ANTC) 두 가지 제한효소로 결정하였다. 각 종별 제한효소단편의 예상 길이는 Table 3과 같다. RFLP 실험에는 Acc I, Hinf I Enzynomics 제품을 사용했으며, 조건은 sterilized water 6 µl, 10X buffer 3 µl, restriction enzyme 1 µl 및 PCR products 20 µl로 총 30 µl의 양을 반응시켰고, 37°C에서 약 3~4시간 반응하였다. 반응이 완료된 산물은 DNA 자동전기영동장치(QIAxcel Advanced system, QIAGEN, Germany)에서 각각 밴드의 위치를 확인 하였다.

Table 1. Information of tiny shrimp-specific primers and PCR conditions in this study

Name	Primer Sequence (5' → 3')	Amplicons size (bp)	Target gene	PCR condition			
				Temp	Time	Cycle	
Acetes COI-F1	5'-CGAGCAGARTTAGGRCARC-3'	519	COI	1st denaturation	95°C	5 min	1
				Denaturation	94°C	30 sec	
				Annealing	52°C	30 sec	35~40
				Extension	72°C	90 sec	
Acetes COI-R1	5'-TAARAGTATWGTAATA GCWCCYGC-3'			Elongation	72°C	7 min	1

Table 2. List of compare species in this study

Family	Genus-species	Source of nucleotide sequence	
		NCBI D/B	This study
Sergestidae	<i>Acetes japonicus</i>	KF977240.1	- 2-2, 14-9, 14-17, 14-28
	<i>A. chinensis</i> (Korea)	JN689221.1	Conducted with fixed-sample from NFRDI 2-3, 2-4, 2-5
	<i>A. chinensis</i> (China)	MK941902.1, MK941910.1	
	<i>A. indicus</i> (I)	HQ630429.1, HQ630454.1, HQ630475.1	- 21-13
	<i>A. indicus</i> (II)	HQ630440.1	- 21-2, 21-5, 21-8, 21-11, 21-16, 21-22
Palaemonidae	<i>Palaemon gravieri</i>	KU899135.1, NC_029240.1	- 1-1, 2-1

Table 3. Restriction fragment length polymorphism of tiny shrimp of mtDNA COI gene sequences

Tiny shrimp species	Total size (bp)	Restriction fragment length (bp)	
		Acc I	Hinf I
<i>Acetes japonicus</i>	519	272, 247	400, 119
<i>A. chinensis</i> (Korea)		272, 247	519
<i>A. chinensis</i> (China)		519	519
<i>A. indicus</i> (I)		519	328, 191
<i>A. indicus</i> (II)		272, 247	283, 119, 72, 45
<i>Palaemon gravieri</i>		271, 202, 46	519

염기서열 분석 및 계통수 작성

유전자 증폭산물은 (주)바이오닉스(Seoul, Korea)에 DNA 염기서열 분석을 의뢰 하였다. 새우젓의 mtDNA COI 유전자의 염기서열은 비교그룹으로 NCBI에 기등록된 데이터들과 NFRDI에서 분양받은 표준시료(*A. chinensis* (Korea, China))의 COI 서열을 이용하였다. Phylogenetic tree는 CLC sequence viewer 8.0 (Qiagen) 프로그램의 비가중 산술평균 분석(UPGMA)법으로 제작하였으며, 염기서열 간의 거리는 Kimura 80 방법으로 수행하였고, Bootstrapping분석은 1,500반복수행하였다. 결과는 phylogram으로 나타냈고 Bootstrap의 수치를 각각의 분지에 표시를 하였다(Fig. 3).

결 과

PCR-RFLP 실험을 이용한 종판별

새우젓에 대한 제한효소 처리 후 얻은 DNA 단편 길이의 크기(bp)와 위치 파악 및 염기서열 분석한 결과, 총 4개의 종 및 2개의 아종이 관찰되었다. *A. japonicus*의 경우 미토콘드리아 COI 부위를 대상으로 PCR한 결과 총 519 bp에서 제한효소 Acc I에 의해 GT/MKAC의 염기서열이 위치한 272 bp 부분을 인식하여 절단하였고, 제한효소 Hinf I에 의해 G/ANTC의 염기서열이 위치한 119 bp 부분을 인식하여 절단하였다(Fig. 1, Fig. 2). *A. chinensis* (Korea)는 제한효소 Acc I에 의해 GT/MKAC의 염기서열이 위치한 272 bp 부분을 인식하

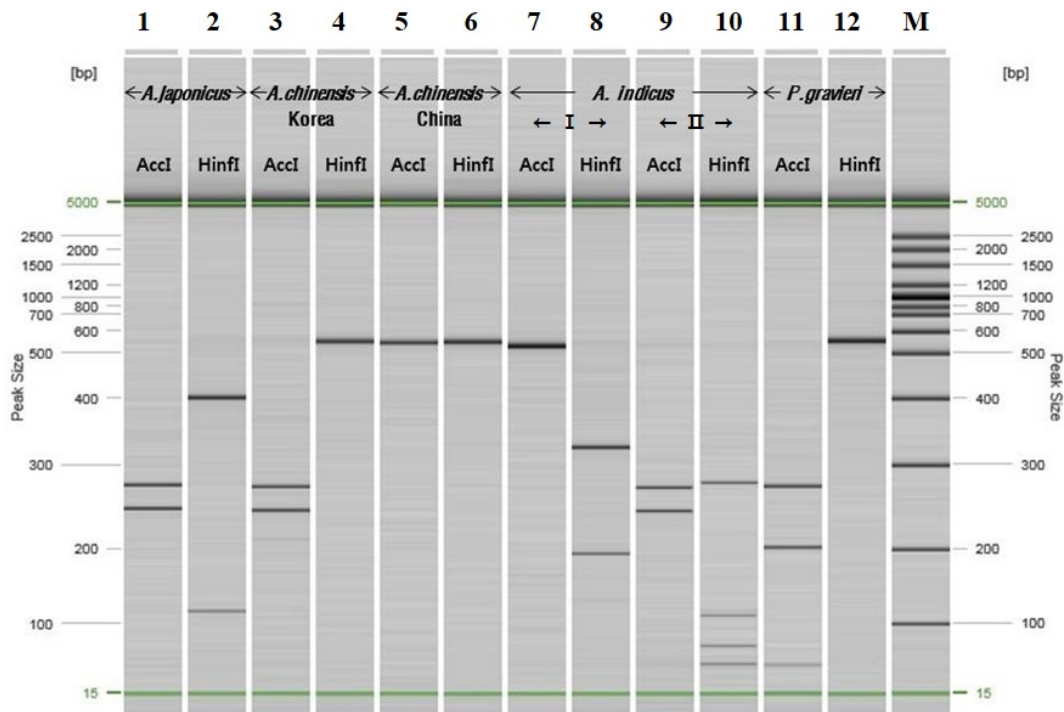


Fig. 1. DNA band obtained from restriction fragment length polyporphism (RFLP) experiments (lanes1~12) in electrophoresis (lanes M : 100~2.5 kb ladder). Lanes 1, 3, 5, 7, 9, 11 represent Acc I products for each of the species. *A. japonicus* (lane 1); *A. chinensis* (Korea) (lane 3); *A. chinensis* (China) (lane 5); *A. indicus* (I) (lane 7); *A. indicus* (II) (lane 9); *P. gravieri* (lane 11). Lanes 2, 4, 6, 8, 10, 12 represent Hinf I products for each of the species. *A. japonicus* (lane 2); *A. chinensis* (Korea) (lane 4); *A. chinensis* (China) (lane 6); *A. indicus* (I) (lane 8); *A. indicus* (II) (lane 10); *P. gravieri* (lane 12).

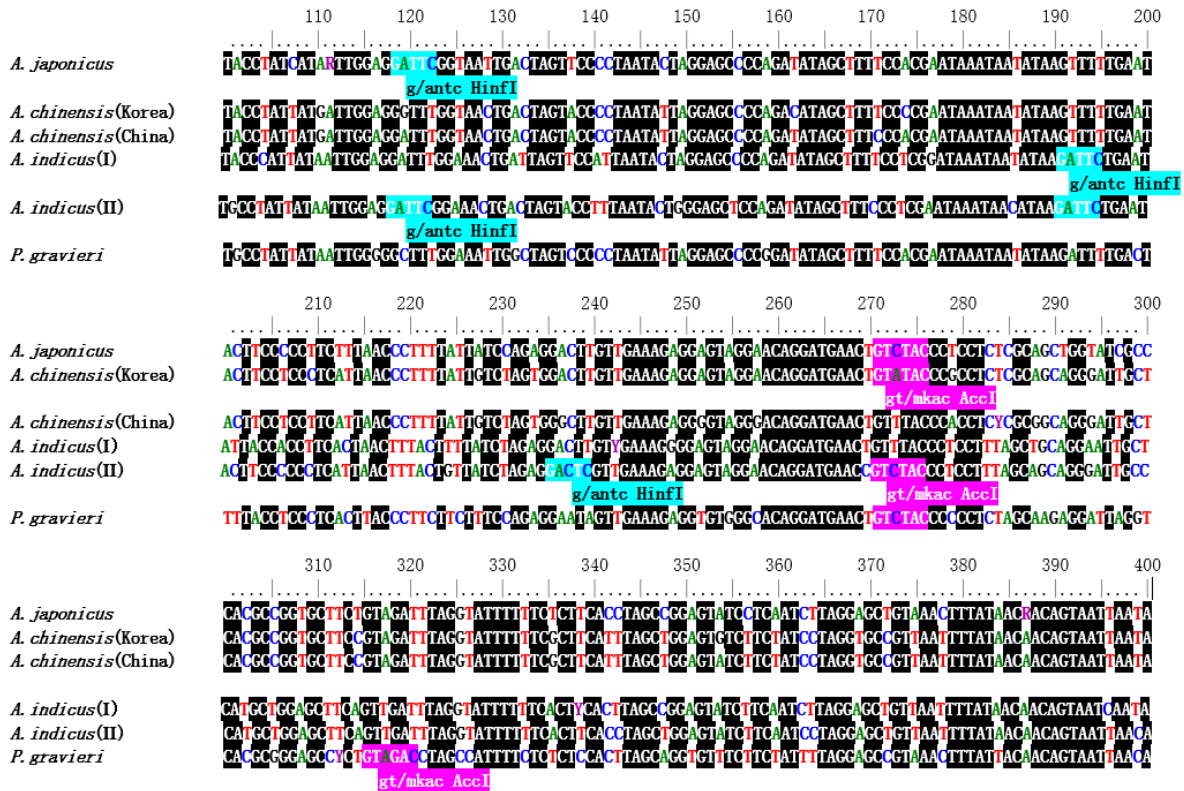


Fig. 2. Alignment from 3' to 5' end of 100~400 bp fragments of mitochondrial DNA CO I for the 4 species and 2 sub species.

여 절단하였고, 제한효소 Hinf I 에 반응하지 않고 1개의 밴드가 나타났으며, *A. chinensis* (China)는 제한효소 Acc I 및 Hinf I 에 반응하지 않고 각각 1개의 밴드가 나타났다(Fig. 1, Fig. 2). *A. indicus* (I)는 제한효소 Acc I 에 반응하지 않고, Hinf I 에 의해 G/ANTC의 염기서열이 위치한 191 bp 부분을 인식하여 절단하였으며, *A. indicus* (II)는 제한효소 Acc I 에 의해 GT/MKAC의 염기서열이 위치한 272 bp 부분을 인식하여 절단하였고, 제한효소 Hinf I 에 의해 G/ANTC의 염기서열이 위치한 236, 191 및 119 bp 부분을 인식하여 절단하여 4개의 밴드가 관찰되었다(Fig.1, Fig. 2). *P. gravieri*는 제한효소 Acc I 에 의해 GT/MKAC의 염기서열이 위치한 316, 271 bp 부분을 인식하여 절단하였고, 제한효소 Hinf I 에 반응하지 않고 1개의 밴드가 나타났다(Fig. 1, Fig. 2).

mtDNA COI 유전자 역의 PCR 결과 및 중간 유연관계 분석

새우젓의 종 동정을 위해 PCR을 수행한 결과 모두 591 bp 의 PCR 증폭산물이 확인되었다(자료 미제시). 이들 PCR 증폭산물의 DNA 염기서열 분석 결과를 토대로 분자생물학적 계통수를 작성하여 정확한 종을 동정하였으며, 그 결과는 Fig. 3과 같다.

NCBI에 기등록된 데이터들의 유연관계를 확인한 결과, 6개의 계통군(clade)을 형성하였다(BS=100%). 먼저, *A. indicus*가

가장 기부에 유전적 거리 9.4%로 2개의 계통군을 형성하였고 (BS=99%), *A. chinensis* (Korea)와 *A. chinensis* (China)는 *A. japonicus* 계통군 사이에서 단계통을 형성하였다. *P. gravieri*는 독립적으로 유집되었다(Fig. 3A).

NCBI에 기등록된 데이터에 본 연구에서 사용한 새우젓의 염기서열과 NFRDI에서 분양받은 표준시료의 염기서열을 융합하여 분석한 결과, 동일 종 내 집단끼리 하나의 계통군으로 묶이는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 3B). 특히, *A. chinensis*는 NFRDI에 분양받은 표준시료인 한국산과 중국산이 같은 그룹 내에서 유전적 거리 4.2%로 산지별로 구별이 되었다.

고 찰

국내 소비자들의 국내산 새우젓 선호 및 원산지 표시제 시행에 따라 수산물의 정확한 유통에 관심을 가지면서 분자유전학적인 원산지/종 판별 연구가 활발히 진행되어왔다. 그중 국내산 새우젓에 대해서는 한국과 중국이 원산지인 *A. chinensis*의 원산지 판별법[10], 한국산 *A. chinensis* [12]와 *P. gravieri* [13]의 미토콘드리아 계놈 해독 등 여러 연구자들에 의해서 시도된 바 있으나, 시중에 유통되는 새우젓에 대해 과거에 연구되었던 분석방법을 이용하여 수행한 결과 분석가능한 종의 제한성, 실험의 재현성 등 단점들이 있었다. 이에 본 연구에서는 국내산 새우젓(*A. japonicus*, *A. chinensis* (Korea), *P. gravieri*)

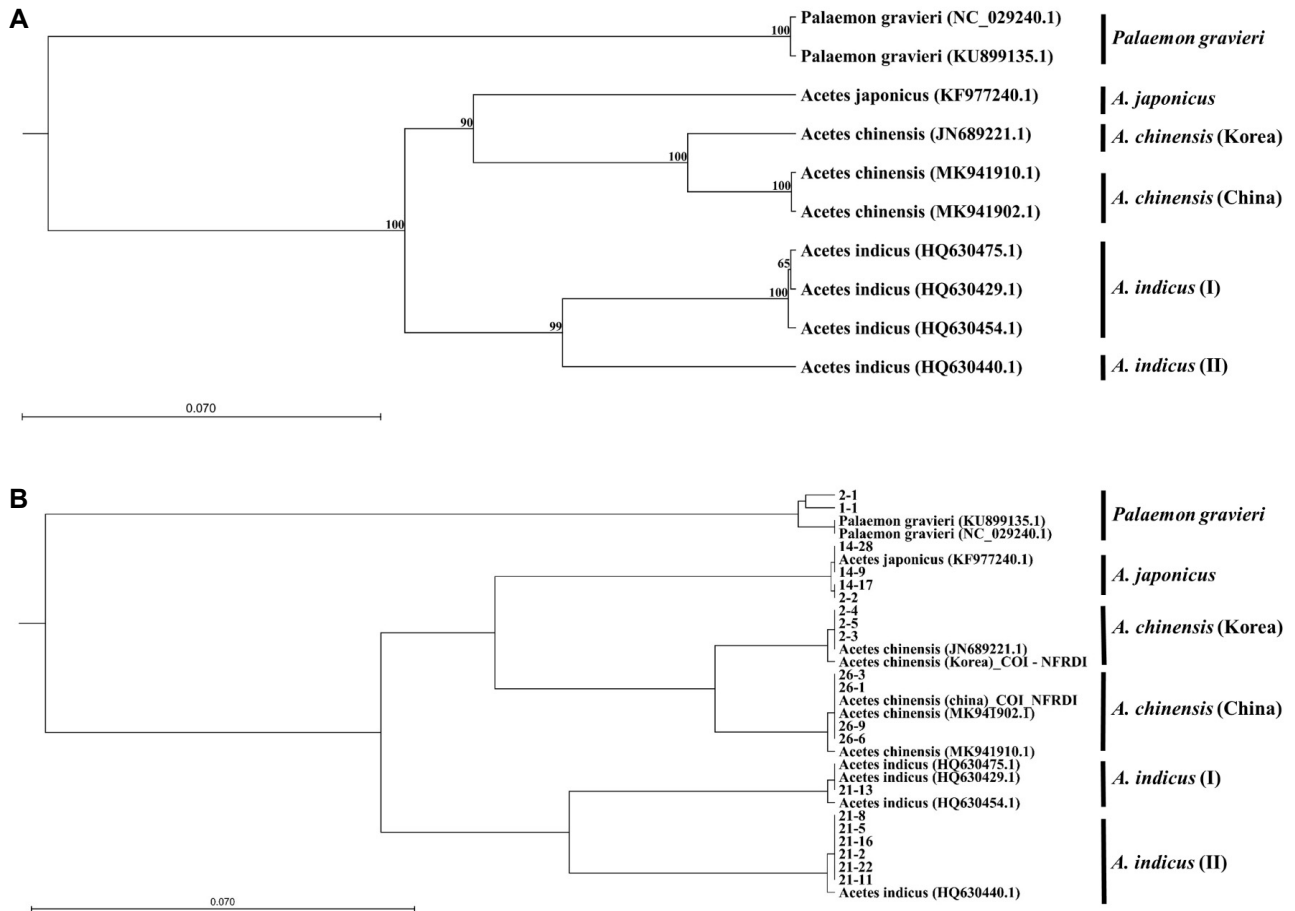


Fig. 3. Phylogenetic tree using Kimura 80 method based on partial COI gene sequence. A: Reference phylogeny with COI gene GenBank. B: Phylogenetic tree of sequences obtained from salted opossum shrimps on market, NFRDI reference sequences and reference sequences. All sequences were aligned, and the tree was constructed using CLC Sequence Viewer 8.0.

외에 아시아 산지의 새우젓의 원료인 *A. indicus* 종 2 type (I, II)과 *A. chinensis* (China)을 동시에 구별해 내고자 하였다.

*A. indicus*는 주로 인도 태평양 서부 및 중부에 서식하며[2], *Acetes* 종 중에서 세계에서 가장 많이 어획되는 종이다. Boon [6]에 따르면, 말레이시아에서 보고된 *A. indicus*는 2개의 계통군이 있는 것으로 알려져 있으며, 2개의 계통군을 개별적으로 분석한 결과, 낮은 유전적 다양성 패턴은 종종 집단유전학에서 질병이나 자연재해 등으로 개체군 크기가 급격히 감소한 이후에 적은 수의 개체로부터 개체군이 다시 형성되면서 유전자 빈도와 다양성에 큰 변화가 생기게 되는 병목 현상으로 해석하였다[8, 18]. 본 연구에서도 유통중인 새우젓에서 추출한 염기서열을 합한 계통수에서 *A. indicus*는 뉴클레오티드 다양성이 관찰되면서, 2개의 계통군을 이루었다. 이 차이를 통해 제한된 시료에 바탕을 둔 것이긴 하지만 *A. indicus* I 과 II를 구분하는 것이 가능하였다. Kang등은 원산지에 따라 *A. chinensis* 16S rRNA 유전자의 염기서열에 차이가 있다고 보고하였는데[10], 본 연구에서 한국과 중국의 *A. chinensis* COI 유전자도 정렬된 염기서열 자료에서 구분할 수 있었다. 이는 같은

속(genus)에 속하는 *A. japonicus*가 원산지에 따라 염기서열의 변화를 보일 가능성이 있음을 암시한다. 그러나 한국과 중국의 *A. japonicus*는 정렬된 염기서열 자료에서 거의 구분할 수 없었다. 중국 기원으로 보고된 서열의 수가 적어 염기서열 판독에 오류가 있을 가능성을 생각하여 한국과 중국 개체를 구분하기 위해서는 추가적인 개체의 확보와 실험이 필요하다고 판단되었다.

PCR-RFLP분자기법은 대구 9종[1], 잉어 8종[21], 아귀목 7종[7], 전복 속 4종[11] 등에 대한 종판별 방법으로 효과적으로 적용된 바 있다. 이러한 방법은 연구 대상 생물 중 개체의 특정 유전자부위를 모두 DNA염기서열 결정없이 개발된 RFLP 마커를 이용하여 실험실에서 유전자 증폭 후 간단한 제한효소처리만으로 비교적 저비용, 단시간에 정확한 종 동정을 수행할 수 있다는 점에서 효율성 있어 오랜기간동안 사용되고 있다 [17, 20]. 본 연구에서는 Acc I와 Hinf I 2가지 제한효소를 사용하여 새우젓 4개 종 및 2개 아종의 COI 서열을 분해하여 각 종에 대한 특정 제한지도를 설정하였다. 또한, PCR-RFLP를 통해 시판 새우젓에서 종을 확인하고 계통수 분석을 수행한

결과, PCR-RFLP로 확인된 종이 염기서열 및 계통수 분석 결과와 일치하여 방법의 정확성을 입증하는 것으로 나타났다. PCR-RFLP에 필요한 절차는 간단하고 빠르기 때문에 중국산 *A. chinensis*이나 동남아시아산 *A. indicus* 등 수입산이 혼합되어 있을 때 신속하게 감별할 수 있다. 그러나 *A. japonicus*에 대한 국내산/수입산을 구분하지 못한 점은 보완해야 할 사항이며 더 많은 새우젓 시료에 의한 정확한 판별이 요구된다.

감사의 글

본 연구는 국립수산물품질관리원 2019년 과학적원산지판별연구에 의해 수행 되었으며, 표준시료를 제공하여 주신 국립수산물과학원 생명공학과에 감사드립니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Akasaki, T., Yanagimoto, T., Yamakami, K., Tomonaga, H., and Sato, S. 2006. Species identification and PCR-RFLP analysis of cytochrome b gene in cod fish (order Gadiformes) products. *J. Food Sci.* **71**, 190-195.
2. Alexander, L. V., Anastasia, A. L. and Jørgen, O. 2016. Phylogeny and classification of the shrimp genera *Acetes*, *Peisos*, and *Sicyonella* (Sergestidae: Crustacea: Decapoda). *Zool. J. Linn. Soc.* **177**, 353-377.
3. Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A. and Saunders, C. V. 1987. Inter-specific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **18**, 489-522.
4. Baldwin, J. D., Bass, A. L., Bowen, B. W. and Clark, W. H. 1998. Molecular phylogeny and biogeography of the marine shrimp *Penaeus*. *Mol. Phylogenet. Evol.* **10**, 399-407.
5. Bang, I. S. and Lee, Y. S. 2014. Molecular phylogenetic study of *Nesiohelix samarangae* based on CO-I Gene. *Kor. J. Malacol.* **30**, 391-397.
6. Boon, Y. W., Taranjeet, K. A. S., Gideon, K. and Han, K. A. O. 2017. Intra- and inter-specific variation of four *Acetes* Species (Crustacea: Decapoda: Sergestidae) sampled along the west coast of peninsular Malaysia. *Sains Malays.* **46**, 2393-2416.
7. Espiñeira, M., González-Lavín, N., Vieites, J. M. and Santaclara, F. J. 2008. Authentication of anglerfish species (*Lophius* spp) by means of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and forensically informative nucleotide sequencing (FINS) methodologies. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 10594-10599.
8. Grant, W. S. and Bowen, B. W. 1998. Shallow population in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J. Heredity.* **89**, 415-426.
9. Jeong, I. J. 2003. Comparative study on the reproductive ecology and population dynamics of *Acetes japonicus* and *Acetes chinensis* on the southwestern coast of Korea. Graduate school of Mokpo National University, Mokpo, Korea.
10. 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.
11. Kang, S. C. 2017. Phylogenetic study of genus *Haliotis* in Korea by PCR-RFLP analysis. Master thesis, Pukyong National University, Busan, Korea.
12. Kim, S. H., Kim, J. Y., Choi, H. G., Park, J. K. and Min, G. S. 2012. Complete mitochondrial genome of the northern mauxia shrimp *Acetes chinensis* (Decapoda, Dendrobranchiata, Sergestoidae). *Mitochondrial DNA* **23**, 28-30.
13. Kim, S. T., Kim, G. R., Yoon, T. H., Kim, C. G., Kim, E. B., Yang, S. J., Baek, S. C., Choi, H. B., Han, K. H., Park, H. and Kim, H. W. 2015. Complete mitochondrial genome of Chinese ditch prawn, *Palaemon gravieri* (Yu, 1930) (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) in Korean waters. *Fish. Aquatic Sci.* **10**, 289-289.
14. Kress, W. J., García-Robledo, C., Uriarte, M. and Erickson, D. L. 2015. DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. *Trends Ecol. Evol.* **30**, 25-35.
15. Layton, K. K. S., Martel, A. L. and Hebert, P. D. N. 2014. Patterns of DNA barcode variation in Canadian marine molluscs. *PLoS One* **9**, e95003.
16. Nadia, H., Imad, N. and Bassam, A. S. 2012. Identification of meat species by PCR-RFLP of the mitochondrial COI gene. *Meat Sci.* **90**, 490-493.
17. Sivaraman, B., Jeyasekaran, G., Shakila, R. J., Alamelu, V., Wilwet, L., Aanand, S. and Sukumar, D. 2018. PCR-RFLP for authentication of different species of processed snappers using mitochondrial D-loop region by single enzyme. *Food Control* **90**, 58-65.
18. Slatkin, M. and Hudson, R. R. 1991. Pairwise comparison of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* **129**, 555-562.
19. Sperling, F. A., Anderson, G. S. and Hickey, D. A. 1994. A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. *J. Forensic Sci.* **39**, 418-27.
20. Wilwet, L., Jeyasekaran, G., Shakila, R. J., Sivaraman, B. and Padmavathy, P. 2018. A single enzyme PCR-RFLP protocol targeting 16S rRNA/tRNA (val) region to authenticate four commercially important shrimp species in India. *Food Chem.* **239**, 369-376.
21. Wolf, C., Hübner, P. and Lüthy, J. 1999. Differentiation of sturgeon species by PCR-RFLP. *Food Res. Int.* **32**, 699-705.

초록 : COI 기반 제한효소 절편 길이 다형성(RFLP)을 이용한 새우젓 분석

박주현 · 문수영 · 강지혜 · 정명화 · 김상조 · 최희정*

(국립수산물품질관리원 운영지원과)

국내 유통되고 있는 새우젓은 다양한 작은 새우의 집합체로, 최근 어획량 감소로 인해 국내산 새우젓의 경우 수입산에 비해 두배 이상 높은 가격에 거래되고 있으며, 이에 중국 및 베트남 등으로부터 수입된 새우젓이 국내산으로 둔갑되어 판매되는 사례가 빈번하게 발생되고 있다. 본 연구에서는 새우젓 *Acetes japonicus*, *A. chinensis* (Korea, China), *A. indicus* (I, II), *Palaemon gravieri* 6종류에 대하여 PCR-RFLP 마커를 개발하였다. 새우젓에서 에탄올로 염을 제거한 후 gDNA를 추출하였고, 새우젓 COI 유전자의 특이 프라이머를 제작, PCR을 진행하여 519 bp의 증폭시켰다. 증폭된 PCR산물의 염기서열분석을 토대로 Acc I, Hinf I 두 가지의 제한효소를 마커로 선정하였고, 전기영동을 통해 결과를 확인하였다. Acc I을 처리한 결과, *A. japonicus*, *A. chinensis* (Korea), *A. indicus* (II)는 272, 247 bp로, *P. gravieri*는 271, 202, 46 bp, *A. chinensis* (China), *A. indicus* (I)는 519 bp로 band를 형성하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Hinf I을 처리한 결과로는 *A. chinensis* (Korea, China), *P. gravieri*는 519 bp로 잘리지 않은 것을 확인한 반면, *A. japonicus*와 *A. indicus* (I)는 2 band, *A. indicus* (II)는 3 band를 형성하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 위의 결과는 국내산과 수입산이 혼합되어있는 새우젓에 있어 보다 신속한 종판별을 할 수 있음을 시사한다.