pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 27, No. 3, pp. 317~324 (2012)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

일반 프라이머를 이용한 PCR의 식품원료 진위 판별에 적용

박용춘* · 진상욱 · 임지영 · 김규헌 · 이재황 · 조태용 · 이화정 · 한상배 · 이상재 · 이광호 · 윤혜성
식품의약품안전청 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 식품감시과학팀

Application for Identification of Food Raw Materials by PCR using Universal Primer

Yong-Chjun Park*, Sang-Ook Jin, Ji-Young Lim, Kyu-Heon Kim, Jae-Hwang Lee, Tae-Yong Cho, Hwa-Jung Lee, Sang-Bae Han, Sang-Jae Lee, Kwang-Ho Lee, and Hae-Seong Yoon
Scientific Food Investigation Team, Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food & Drug Safety Evaluation, Food & Drug Administration, 187 Osongsaengmyeong2-ro, Osong-eup, Cheongwon-gun, Chungcheongbuk-do 363-700, Korea
(Received March 5, 2012/Revised July 8, 2012/Accepted September 17, 2012)

ABSTRACT - In order to determine an authenticity of food ingredient, we used DNA barcode method by universal primers. For identification of animal food ingredients, LCO1490/HCO2198 and VF2/FISH R2 designed for amplifying cytochrome c oxidase subunit1 (CO1) region and L14724/H15915 for cytochrome b (cyt b) region on mitochondrial DNA were used. Livestock (cow, pig, goat, sheep, a horse and deer) was amplified by LCO1490/HCO 2198, VF2/FISH R2 and L14724/H15915 primers. Poultry (chicken, duck, turkey and ostrich) was amplified by LCO1490/HCO 2198 and VF2/FISH R2 primers. But, Fishes (walleye pollack, herring, codfish, blue codfish, trout, tuna and rockfish) were only amplified by VF2/FISH R2 primers. For plant food ingredients, 3 types of primers (trnH/psbA, rpoB 1F/4R and rbcL 1F/724R) have been used an intergenic spacer, a RNA polymerase beta subunit and a ribulose bisphosphate carboxylase region on plastid, respectively. Garlic, onion, radish, green tea and spinach were amplified by trnH/psbA, rpoB 1F/4R and rbcL 1F/724R. The PCR product sizes were same by rpoB 1F/4R and rbcL 1F/724R but, the PCR product size using trnH/psbA primer was different with others for plants each. We established PCR condition and universal primer selection for 17 item's raw materials for foods and determine base sequences aim to PCR products in this study. This study can apply to determine an authenticity of foods through making an comparison between databases and base sequences in gene bank. Therefore, DNA barcode method using universal primers can be a useful for species identification techniques not only raw materials but also processed foods that are difficult to analyze by chemical analysis.

Key words: Universal primer, PCR (Polymerase Chain Reaction), DNA barcode, raw material

값싼 식품원료를 의도적으로 혼합하거나 표시사항을 허위로 기재한 EMA(Economically Motivated Adulteration) 식품의 제조·유통 사례가 급증함에 따라 미국 식품의약품청(www.fda.gov) 및 영국 식품기준청(www.food.gov.uk) 등에서는 EMA 방지를 위한 노력을 하고 있다. EMA 식품의 경우 서류검토, 관능 및 육안 분석방법 등에 의하여 사용원료를 확인할 수 있으나 과학적 시험법의 개발이 요구된다. 육안으로 원재료를 확인할 수 없거나 의도적으로 소량의 원료를 혼입하여 제조된 EMA 식품에 대하여 사용원료를 확인하는 방법에는 이화학적분석법, 단백질분석법, 유전자분석법 등이 있다. 이화학적인 분석법으로는 광합성의 대사경로에 따른 탄소동위원소비율을 활용한 분석법[1,2], 분자량이 적은 ion-fragment의 패턴차이를 이용하여 비교분석하는 MS-전자코 분석법[3,4,5], 함유하고 있는 특정성분 물질의 유무와 함유량을 확인할 수 있는 GC, LC, HPLC 등이 주로 이용되고 있다[6,7].

그리고 분자생물학적 분석기술의 발달에 따라 DNA 분자수준에서 염기서열 차이에 기초한 PCR(Polymerase Chain Reaction) 기법은 종래의 단백질 수준에서 종 감별의 한계성과 문제점을 극복할 수 있는 새로운 기술로 활용되고

*Correspondence to: Yong-Chjun Park, Scientific Food Investigation Team, Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food & Drug Safety Evaluation, Food & Drug Administration, 87 Osongsaengmyeong2-ro, Osong-eup, Cheongwon-gun, Chungcheongbuk-do 363-700, Korea
Tel: 82-43-719-4454, Fax: 82-43-719-4450
E-mail: yongchjun@korea.kr

있다[8,9,10]. 특히 PCR 기법은 극소량의 DNA로 특정 염기서열 영역을 특이적으로 증폭함으로서 신속 정확하고 감수성이 매우 높은 종 판별법으로 알려졌다. 원료 및 가공식품으로부터 다른 원료가 혼입되어 있는지 여부를 확인하기 위하여 원료의 특성에 따라 다른 matrix에서 적절한 DNA추출법이 필요하며 추출방법이 적절하지 않을 경우 PCR 증폭 후 위 음성 혹은 위 양성의 결과를 초래할 수 있기 때문에 적절한 DNA 추출방법을 확립하는 것이 선행되어야 한다. 또한 가공공정의 영향으로 인하여 유전자가 손상되는 경우가 많기 때문에 PCR을 이용하여 목적유전자를 검출하기 위해서는 순도가 높고 충분한 양의 DNA를 확보하는 것이 중요하다.

최근에는 종 동정에 DNA barcode를 활용하는 방법이 많이 연구되고 있다. DNA barcode라는 용어는 2003년 Hebert[11,12]가 최초로 사용한 용어로 종 동정을 위한 최소한의 유전자를 의미하며 이러한 DNA barcode 부위를 증폭하기 위하여 합성된 뉴클레오타이드를 일반 프라이머(universal primer)라 한다. 동물의 경우 미토콘드리아에 존재하는 cytochrome C oxidase subunit 1(CO1), 16S RNA 등을, 식물의 경우는 엽록체에 존재하는 ribulose bisphosphate carboxylase(*rbcL*), maturase(*matK*), intergenic spacer(*psbA-trnH*), RNA polymerase C(*rpoC1*), RNA polymerase beta subunit(*rpoB*), NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit J(*ndhJ*), acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase beta subunit(*accD*) 등을 주로 이용하고 있다[13,14,15,16].

동물의 경우 미토콘드리아는 세포질에 존재하는 소기관으로 세포 내 에너지를 생산하며 미토콘드리아 DNA (mtDNA)는 모계 유전을 통해 다음 세대에 유전물질을 전달하는 것으로 잘 알려져 있다(Fig. 1). 동물 mtDNA는 약 16.5 kb 크기의 환형 이중나선 구조로 13 종류의 단백질을 암호하는 유전자(ND1-ND6, CytB, COI-III, ATPase 6, 8), 2개의 rRNA를 지정하는 유전자(12S, 16S) 및 22개의 tRNA 유전자 그리고 제어 부위인 D-loop 영역으로 구성되어져 있다[17]. 동물의 종 감별에는 핵 DNA보다 mtDNA가 종 특이성, 신뢰성 및 재현성이 높은 것으로 알려져 있다[18]. 또한 일반적으로 특정 염기서열의 복제수가 매우 낮은 핵 DNA와는 달리 세포 당 미토콘드리아 수가 많고 각 미토콘드리아는 다수의 mtDNA를 갖고 있어 종 특이적 미토콘드리아 DNA 염기서열을 이용한 PCR 분석은 종 판별에 매우 효과적인 방법으로 알려졌다. 식물의 경우 유전학적으로 잘 보존되어 있다고 알려진 엽록체상 부위인 *matK, rbcL, rpoC1, psbA-trnH, rpoB, ndh J, acc D*(Fig. 2)와 핵 DNA에 존재하는 ITS, ITS1, ITS2가 대표적으로 알려져 있다. 최근 약용식물을 대상으로 한 연구에는 nuclear ribosomal DNA에 위치한 second internal transcribed spacer(ITS2) 부위가 가장 효율성이 높다고 보고하였다[16].

본 연구는 일반 프라이머를 이용한 유전자 분석법을 통해 가공식품에 사용된 식품원료의 진위여부를 판별할 수

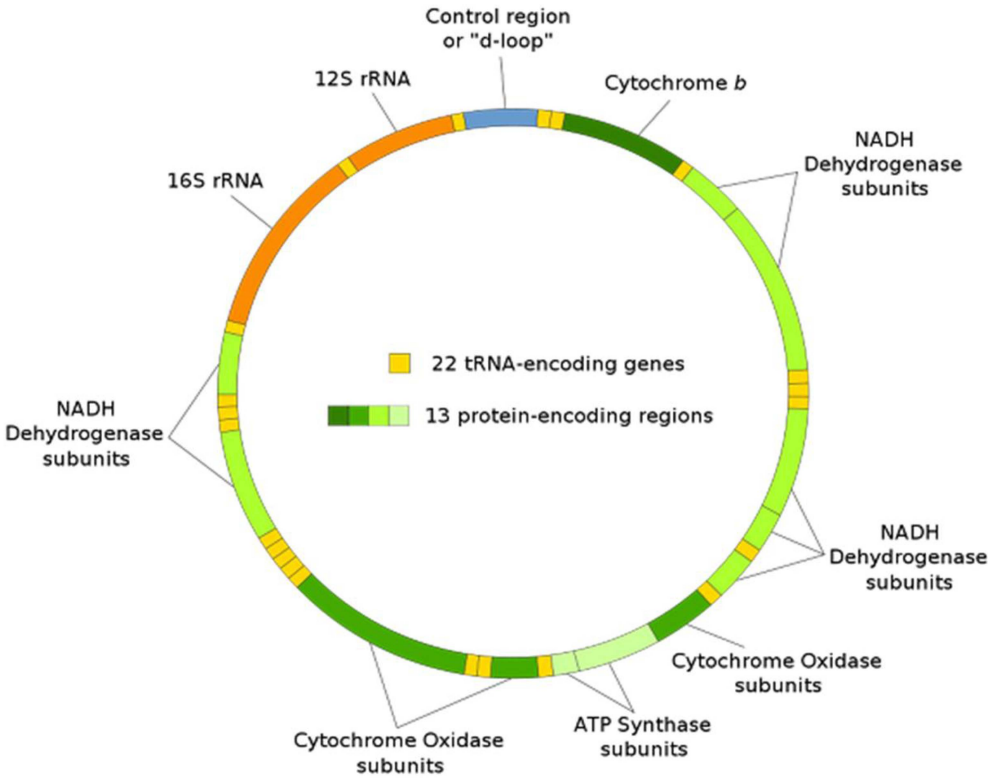

Fig. 1. The structure of mitochondrial DNA in animal cell(source : en.wikipedia.org).

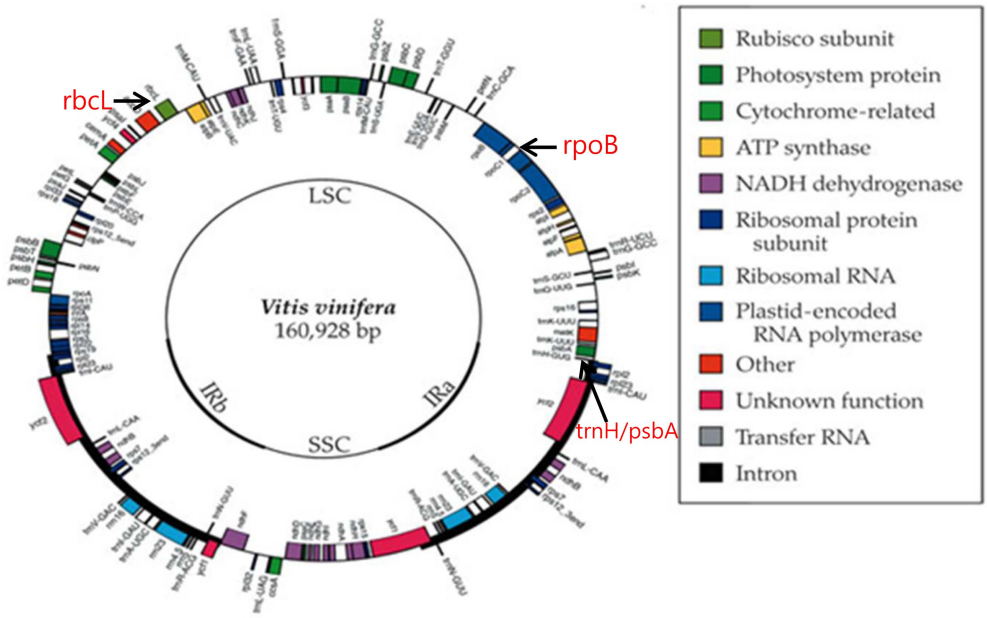

Fig. 2. The structure of DNA in plant cell(source : Plant Systematics, 3rd Edition).

있는 가능성을 제시하였으며 식품원료별 사용가능한 최적의 프라이머와 PCR 조건을 확립하였다. 또한 본 연구에서 확립된 시험법은 식품 중 발견되는 생물체의 이물동정법에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

재료 및 방법

재료선정

국내・외 언론보도 등으로부터 가짜식품의 유통사례 및

Table 1. Information of universal primer used in this study

Species	Target region	Primer	Primer Sequence(5' → 3')	Length(bp)	Ref.
Fishes	CO1	VF2	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CAA CCA ACC ACA AAG ACA TTG GCA C	700~900	Zhang, et al., 2011
		FISH R2	CAG GAA ACA GCT ATG ACA CTT CAG GGT GAC CGA AGA ATC AGA A		
Livestock	CO1	LCO 1490	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G	650~700	Folmer, et al., 1994
		HCO 2198	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA		
	CO1	VF2	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CAA CCA ACC ACA AAG ACA TTG GCA C	700~900	Zhang et al., 2011
		FISH R2	CAG GAA ACA GCT ATG ACA CTT CAG GGT GAC CGA AGA ATC AGA A		
	Cyt b	L14724	CGA AGC TTG ATA TGA AAA ACC ATC GTT G	1,100	Irwin et al., 1991
		H15915	AAC TGC AGT CAT CTC CGG TTT ACA AGA C		
Poultry	CO1	LCO 1490	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G	650~700	Folmer, et al., 1994
		HCO 2198	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA		
	CO1	VF2	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CAA CCA ACC ACA AAG ACA TTG GCA C	700~900	Zhang, et al., 2011
		FISH R2	CAG GAA ACA GCT ATG ACA CTT CAG GGT GAC CGA AGA ATC AGA A		
Plant	trnH/psbA	psbA	GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C	103~1,025	Newmaster & Ragupathy, 2009
		trnH	CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC		
	rpoB	rpoB 1F	AAG TGC ATT GTT GGA ACT GG	800~900	Fazekas et al., 2008
		rpoB 4R	GAT CCC AGC ATC ACA ATT CC		
	rbcL	rbcL 1F	ATG TCA CCA CAA ACA GAA AC	700~900	Fay, et al., 1998
		rbcL 724R	TCG CAT GTA CCT GCA GTA GC		

Table 2. Information of PCR condition used in this study

Primer	Step		Temp.	Time	Cycles
VF2/FISH R2	Initial denaturation		95°C	5 min	35
	Denaturation		95°C	1 min	
	Annealing		variable	1 min	
	Extention		72°C	1 min	
	Elongation		72°C	7 min	
LCO 1490/HCO 2198	Initial denaturation		95°C	5 min	35
	Denaturation		95°C	1 min	
	Annealing		40°C	1 min	
	Extention		72°C	1 min	
	Elongation		72°C	7 min	
L14724/H15915	Initial denaturation		94°C	4 min	35
	Denaturation		94°C	45 sec	
	Annealing		44°C	1 min	
	Extention		72°C	1.5 min	
	Elongation		72°C	7 min	
trnH/psbA, rpoB 1F/4R & rbcL 1F/724R	Initial denaturation		94°C	7 min	35
	Denaturation		94°C	45 sec	
	Annealing	for trnH-psbA	53°C	30 sec	
		for rpoB 1F/4R	55°C	30 sec	
		for rbcL 1F/724R	48°C	30 sec	
	Extention		72°C	1 min	
	Elongation		72°C	7 min	

다소비 식품에 대한 정보를 취합하고 유전자분석법으로 진위판별이 필요한 목록을 작성하였다. 가축의 경우 소, 돼지, 양, 염소, 말, 사슴 등 6종, 가금류의 경우 오리, 닭, 타조, 칠면조 등 4종, 어류의 경우 청어, 명태, 대구, 청대구, 송어, 다랑어, 우럭 등 7종, 식물의 경우 마늘, 양파, 무, 녹차, 시금치 등 5종을 선정하였다.

시약 및 검체 구입

유전자증폭(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 위한 프라이머 및 *Taq* DNA polymerase는 바이오니아(Bioneer, 대한민국)에 의뢰하여 합성 또는 구매하였으며, PCR 장비는 GeneAmp^{TM} PCR System 9700(Applied Biosystems, USA)을 사용하였다. 유전자추출은 DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) 및 DNeasy Plant mini kit(Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 사용하였다. 검체로 사용된 청어, 명태, 대구, 청대구, 송어, 다랑어, 우럭은 대형마트와 수산시장에서 소, 돼지, 양, 염소, 말, 오리, 닭, 타조, 칠면조는 대형마트 또는 사육농장에서, 마늘, 양파, 무, 녹차, 시금치는 재래시장에서 구입하여 사용하였다.

유전자 추출

가축류, 가금류 및 어류는 DNeasy Blood & Tissue kit를 사용하여 유전자를 추출하였으며, 식물류는 DNeasy Plant mini kit를 사용하였다. 추출방법은 제조사에서 제공하는 추출법에 의거하여 추출하였으며, 최종 용출단계에서는 AE 완충용액 대신 멸균증류수를 사용하여 용출하였다.

Polymerase Chain Reaction(PCR) 반응액 조성 및 반응조건

PCR을 위한 반응액의 조성은 주형 DNA 50 ng, dNTPs 200 μM, $MgCl_2$ 2.5 mM, 프라이머 각 0.5 μM이 되게 혼합하였으며 최종 용량은 20 μL로 하였다. 가축류, 가금류 및 어류는 LCO1490/HCO2198, VF2/FISH R2 및 L14724/H15915 프라이머, 식물류는 trnH/psbA, rpoB 1F/4R 및 rbcL 1F/724R 프라이머를 사용하였으며 반응조건은 Table 2에 명시하였다.

결과확인

최종산물의 확인은 반응액 5 μl를 취하여 아가로즈 젤로 100V, 30분간 전기영동하고 EtBr로 염색(1 μg/ml)한 후 UV 투영기를 이용하여 확인하였다.

결 과

일반 프라이머를 이용한 동물성 식품원료의 확인

본 연구에서는 일반 프라이머를 이용하여 식품원료의 진위여부를 확인하고자 하였다. 동물성 식품원료의 경우 사용된 DNA barcode 부위는 cytochrome C oxidase subunit

Table 3. The PCR result from food raw materials using universal primers

Items		Universal primer					
		LCO/ HCO	VF2/ FISH R2	L14724/ H15915	trnH/ psbA	rpoB 1F/4R	rbcL 1F/724R
Fishes	Herring	+++ (55°C)	+ (40°C)	+++ (44°C)	NT	NT	NT
	Pollack	-	++ (40°C)	-	NT	NT	NT
	Trout	-	++ (40°C)	-	NT	NT	NT
	Blue codfish	-	++ (40°C)	-	NT	NT	NT
	Codfish	-	+++ (55°C)	+++ (44°C)	NT	NT	NT
	Tuna	-	+++ (55°C)	+++ (44°C)	NT	NT	NT
	Rockfish	-	+++ (55°C)	+++ (44°C)	NT	NT	NT
Livestock	Sheep	++ (40°C)	+++ (50°C)	+++ (44°C)	NT	NT	NT
	Goat	+ (40°C)	+++ (50°C)	+++ (44°C)	NT	NT	NT
	Cow	+++ (40°C)	+++ (50°C)	+++ (44°C)	NT	NT	NT
	Horse	+ (40°C)	+++ (50°C)	+++ (44°C)	NT	NT	NT
	Deer	+ (40°C)	+ (50°C)	+ (44°C)	NT	NT	NT
	Pig	+++ (40°C)	+++ (50°C)	+++ (44°C)	NT	NT	NT
Fowl	Duck	+ (40°C)	+++ (50°C)	-	NT	NT	NT
	Chicken	+++ (40°C)	+++ (50°C)	-	NT	NT	NT
	Ostrich	+++ (40°C)	+++ (50°C)	-	NT	NT	NT
	Turkey	+++ (40°C)	+ (50°C)	-	NT	NT	NT
Plant	Garlic	NT	NT	NT	+++ (53°C)	++ (55°C)	+++ (48°C)
	Onion	NT	NT	NT	+++ (53°C)	++ (55°C)	+++ (48°C)
	Green tea	NT	NT	NT	+++ (53°C)	+++ (55°C)	+++ (48°C)
	Spinach	NT	NT	NT	++ (53°C)	+++ (55°C)	+++ (48°C)
	Radish	NT	NT	NT	++ (53°C)	+++ (55°C)	+++ (48°C)

※ NT : Not test, The temperature is annealing condition.

1(CO1)부위를 대상으로 한 LCO1490/HCO2198, VF2/FISH R2 프라이머 및 cytochrome b 부위를 대상으로 한 L14724/ H15915를 이용하였다. 식품원료는 가축류 6종(소, 돼지, 양, 염소, 말 및 사슴), 가금류 4종(오리, 닭, 타조 및 칠면조) 및 어류 7종(청어, 명태, 대구, 청대구, 송어, 다랑어 및 우럭)을 대상으로 상기3 종류의 프라이머를 이용하여 DNA 증폭을 유무를 확인하였다. 가축류의 경우 3 종류의 프라이머(LCO1490/HCO2198, VF2/FISH R2 및 L14724/

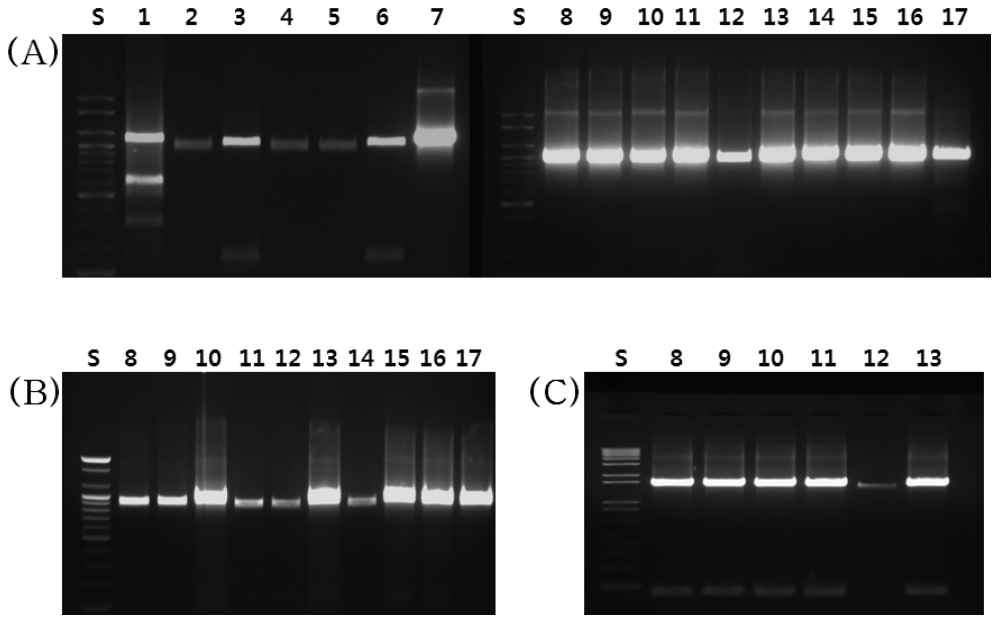

Fig. 3. PCR product patterns of cytochrome c oxidase subunit 1(CO1) and cytochrome b(cyt b) region on mitochondrial DNA using universal primer[VF2/FISH R2 (A), LCO1490/HCO2198 (B), L14724/H15915 (C)]. Lane S; 100 bp ladder, 1; herring, 2; pollack, 3; codfish, 4; blue codfish, 5; trout, 6; tuna, 7; rockfish, 8; sheep, 9; goat, 10; cow, 11; horse, 12; deer, 13; pig, 14; duck, 15; chicken, 16; ostrich, 17; turkey.

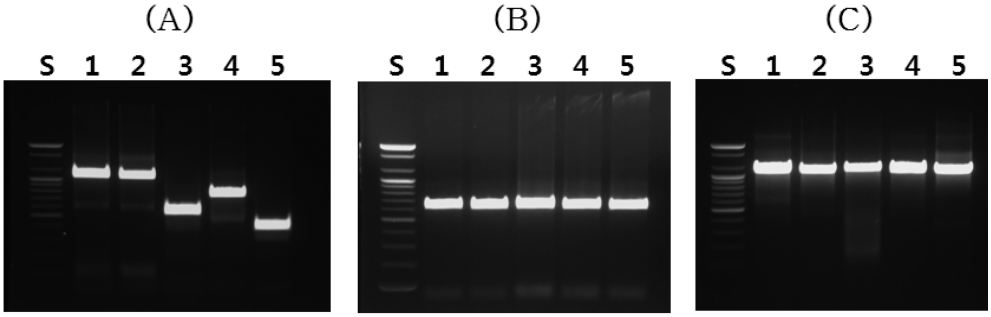

Fig. 4. PCR product patterns of intergenic spacer, RNA polymerase beta subunit, ribulose bisphosphate carboxylase region on chloroplast DNA using universal primer[trnH/psbA (A), rpoB 1F/4R (B), rbcL 1F/724R (C)]. Lane S; 100 bp ladder, 1; garlic, 2; onion, 3; radish, 4; green tea, 5; spinach.

H15915)에서 모두 증폭이 확인되었다. 그러나 재결합 온도의 경우 LCO1490/HCO2198 프라이머는 40ºC, VF2 /FISH R2 프라이머는 50ºC, L14724/H15915 프라이머는 44ºC에서 최적의 재결합 온도로 나타났다. 가금류의 경우 LCO1490/HCO2198 및 VF2/FISH R2 프라이머에서는 증폭이 확인되었지만 L14724/H15915 프라이머를 사용한 경우에는 증폭되지 않았다. 최적의 재결합 온도는 가축류와 동일하게 LCO1490/HCO2198 프라이머에서 40ºC, VF2/FISH R2 프라이머에서 50ºC로 확인되었다. 어류의 경우 VF2/FISH R2 프라이머를 이용한 경우에 한하여 CO1 부위의 증폭을 확인하였으며, 청어, 명태, 청대구 및 송어는 40ºC에서, 대구, 다랑어 및 우럭은 55ºC의 재결합 온도에서 가장 적합한 것으로 확인되었다(Fig. 3).

일반 프라이머를 이용한 식물성 식품원료의 확인

선발된 식물성 식품원료는 마늘, 양파, 녹차, 시금치 및 무 등 총 5종이다. 사용된 유전자 부위는 3종류(*trnH-psbA, rpo B, rbc L*)이며 모두 엽록체 유전자를 대상으로 하였다. 대상유전자 별로 사용된 프라이머별 반응조건은 재결합 온도만 달리하였다. 재결합온도 결정은 40ºC~60ºC사이에서 5ºC씩 변화를 주어(40ºC, 45ºC, 50ºC, 55ºC, 60ºC) 1차적으로 PCR 산물의 결과를 확인하고 증폭이 확인된 온도에서 다시 1ºC씩 변화시키면서 최적의 재결합 온도를 결정하였다. 사용된 5종의 시료는 3종류의 프라이머에서 모두 증폭됨을 확인하였으며 최적의 재결합 온도는 trnH/psbA 프라이머는 53ºC, rpoB 1F/4R 프라이머는 55ºC, rbcL 1F724R 프라이머는 48ºC로 확인되었다(Fig. 4). 또한, rpoB 1F/4R 및 rbcL 1F/724R 프라이머를 이용한 경우 시료별로 증폭

산물의 크기가 일정하게 확인되었지만 trnH-psbA 프라이머에서는 증폭산물의 크기가 시료별로 차이가 있었다.

고 찰

최근 값싼 식품원료를 대체하여 사용하거나 표시사항을 허위로 기재하여 소비자를 기만하는 가짜식품(EMA, Economically Motivated Adulteration)의 제조·유통으로 인하여 식품에 대한 막연한 불안감이 높아지고 있다. 주요 사례로는 돼지고기에 소고기 향을 첨가한 소고기 장조림, 무게를 늘리기 위하여 양파 또는 무를 혼합한 다진마늘 등이 대표적이다. 가짜식품의 경우 서류검토 방법, 관능 및 육안 분석방법 등에 의하여 사용원료의 진위여부를 확인할 수 있으나 객관적이고 정확한 증거자료의 확보를 위해 과학적인 시험법의 개발이 요구된다. 이러한 시험법 중 유전자를 이용한 분석법이 최근 각광을 받고 있다. 유전자는 모든 동물 및 식물의 조직 내에 존재하며 식품제조 공정 중 처리되는 압력, 고열 등에 대하여 단백질 보다 안정성이 높은 장점이 있다. 또한 일반 프라이머를 이용하여 특정 유전자를 특이적으로 증폭시키는 방법은 신속성[11], 간편성, 민감도, 특이도 등이 우수하여 최근에는 식품원료 동정에 점진적으로 사용되고 있다[9,13,19,20,21,22].

동물성 원료의 경우 2003년 Hebert 등은 미토콘드리아에 존재하는 유전자(cytochrome c oxidase subunit, cytochrome b 등)를 이용하면 신속하고 정확하게 판별할 수 있다고 제안하였으며[23,24] “DNA barcode” 이라는 용어를 처음으로 사용하였다[21]. 특히 cytochrome c oxidase subunit 1(CO1) 유전자는 해양무척추동물의 동정을 위하여 1994년 Folmer 등이 최초로 제안하였으나[13] 현재 대부분의 동물류에 사용하고 있는 실정이다[25,26,27]. 식물성원료의 경우는 ribulose bisphosphate carboxylase(*rbc*L), maturase(*matK*), intergenic spacer(*psbA-trnH*), RNA polymerase C(*rpoC1*), RNA polymerase beta subunit(*rpoB*), NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit J(*ndhJ*), acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase beta subunit(*accD*) 등이[16,28,29,30,31], 곰팡이류에는 internal transcribed space(ITS)가 주로 사용되고 있다. 특히 식물류의 경우는 두 가지 이상의 일반 프라이머를 이용 일치여부를 확인하여 종 판별에 사용되고 있다. 일반 프라이머를 이용하는 방법은 PCR 후에 염기서열을 결정하는 단계가 추가되어 비교적 분석시간이 길고, 데이터베이스에 등록되어 있는 염기서열이 없으면 분석이 어려우며, PCR 산물의 크기가(약 650 bp 이상) 커서 가공식품 적용엔 한계가 있다. 그러나 추정되는 원료물질을 모를 경우엔 가장 우선적으로 사용될 수 있는 방법이며 프라이머 개발을 위한 시간적, 경제적인 투자가 필요 없다는 점에서 일반 프라이머의 활용가치가 높다고 할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 동물성 및 식물성 식품원료별 적용 가능한 최적의 프라이머 및 PCR 조건을 제시하였으며, 본 방법은 가짜식품으로 의심되는 식품 분석 시 적용 가능하며, 식품 중 생물체가 이물로 발견 시 정확한 종 동정에 활용도가 매우 클 것으로 기대된다.

감사의 말

본 연구는 식품의약품안전평가원 2011년도 연구개발사업지원비(11161소비연153)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

요 약

본 연구는 식품원료의 진위여부를 판별하기 위한 시험법으로 일반 프라이머를 이용한 DNA barcode 기법을 도입하였다. 동물성식품원료의 경우 미토콘드리아 DNA 중 cytochrome oxidase subunit I(COI) 부위 검출을 위하여 디자인된 프라이머(LCO1490/HCO2198 및 VF2/FISH R2)와 cytochrome b(cyt b) 부위 검출을 위하여 디자인된 프라이머(L14724/H15915)를 사용하였다. 상기 3 종류의 프라이머를 사용하여 가축류 6종(소, 돼지, 염소, 양, 말 및 사슴), 가금류 4종(닭, 오리, 칠면조 및 타조), 어류 7종(명태, 대구, 청대구, 청어, 송어, 다랑어 및 우럭)을 대상으로 PCR 후 전기영동하여 예상되는 PCR 산물의 생성 유무를 확인하였다. 가축류 6종에 대하여는 LCO1490/HCO2198, VF2/FISH R2 및 L14724/H15915 프라이머를 사용한 경우 COI 및 cyt b가 모두 검출되었으며, 가금류 4종은 LCO1490/HCO2198 및 VF2/FISH R2 프라이머를 사용한 경우만 COI이 검출되었다. 또한 어류 7종은 VF2/FISH R2 프라이머를 사용한 경우에만 COI 부위가 검출됨을 확인하였다. 식물의 경우 엽록체 DNA 부위를 이용하여 디자인된 3 종류의 프라이머(trnH/psbA, rpoB 1F/4R 및 rbcL 1F/724R)를 사용하였다. 각각의 프라이머를 이용하여 식물 5종(마늘, 양파, 무, 녹차 및 시금치)에 대하여 실험한 결과 3종류의 프라이머에서 PCR의 산물을 모두 확인하였으며 trnH/psbA 프라이머의 경우 식물 종마다 PCR 산물의 크기는 다르게 검출되었다. 본 연구에서는 17종의 식품원료별 일반 프라이머 및 PCR 조건을 확립하였으며, 생산된 PCR 산물을 대상으로 염기서열을 결정하고 유전자은행에 있는 염기서열과 DB 비교·분석을 통하여 식품에 사용된 원료의 진위여부 판별에 적용이 가능할 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Padovan GJ, D. De Jong, L. P. Rodrigues, J.S. Marchini: Detection of adulteration of commercial honey samples by the 13C/12C isotope ratio, Food Chemistry. **82**, 633-636 (2003).

2. Schellenberg A., S. Chmielus, C. Schlicht, F. Camin, M. Perini, L. Bontempo, K. Heinrich, S. D. Kelly, A. Rossmann, F. thomas, E.Jamin, M. Horacek: Multielement stable isotope ratio (H, C, N, S) of honey from different european regions, Food chemistry. **121**, 770-777 (2010).
3. Hong EJ, Kim KH, Park SJ, Kanf JW, Kim DS, Lee HJ, Kim EJ, Lee JW, Kim SH, Lee KH and Noh BS: Discrimination of the salted cuttle fish and the salted mitra squid in economically motivated authentication food using electronic nose based on mass spectrometer. Food engineering Progress. **15**, 122-129 (2011).
4. Hong EJ, Kim KW, Park SJ, Kim JE, Kim DS, Lee HJ, Kim EJ, Lee JH, Lee KH and Noh BS: Discrimination of shreds of frozen and dried alaska pollack, dried pollack and cod using electronic nose. Food engineering Progress. **15**, 162-168 (2011).
5. Ampuero S, Bogdanov S, Bosset JO: classification of unifloral honey with an MS-based electronic nose using different sampling model, SHS, SPME and INDEX: European Food Res. Technol. **218**, 198-207 (2004).
6. Christopoulou E., M. Lazaraki, M. Komaitis, K. Kaselimis: Effectiveness of determination of fatty acids and triglycerides for the detection of adulteration of olive with vegetable oils, Food chemistry. **84**, 463-474 (2004).
7. Ramon A., Ramon A. R.,: Authentification of vegetable oils by chromatographic techniques, J. Chromatographa A. **881**, 93-104 (2000).
8. Herman B.L.: Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR, J. Dairy. Res., **68**, 429-436 (2001).
9. Kocher T.D., W.K. Thomas, A. Meyer, S.V. Edwards, S. Paabo, F.X. Vellablanca: Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers, Proc, Natl. Acad. Sci, USA, **86**, 6196-6200 (1989).
10. Krcmar P., Rencova E.: Identification of species-specific DNA in feedstuffs. J. Agric. Food. Chem., **51**, 7655-7658 (2003).
11. Brown, W. M., M. George, Jr., A. C. Wilson: Rapid evolution of animal miochondrial DNA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 1967-1971 (1979).
12. Calvo J. H., Zaragoza P., Osta R. Technical note: A quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment, J. Anim. Sci., **79**, 2108-2112 (2001).
13. Folmer O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, and R. Vrijenhoek: DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, Molecular Marine Biology and Biotechnology, **3**, 294-299 (1994).
14. Hebert P. D. N., Retnasingham S, deWaard JR: Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species, Proc R Soc Biol Sci SerB, **270**, S96-S99 (2003).
15. Paul D. N. Hebert, Alina Cywinska, Shelley L. Ball, Jeremy R. deWaard: Biological identifications through DNA Barcodes, Proc. R. Soc. Lond. B. **270**, 313-321 (2003).
16. Shilin Chen, Jingyuan Song: Validation of the ITS2 region as a Novel DNA barcode for identifying medicinal plant species, PLos One, **5**, e8613. dol:10.1371 (2010).
17. Gardner E. J, D. P. Snustad: Principles of genetics 7th de. John wiley and Sons, New York (1984).
18. Branicki W., T. Kupiec, R. Pawlowski: Validation of cytochrome b sequence analysis as method of species identification, J. Forensic Sci.. **48**, 83-87 (2003).
19. Csar Isigidi Bin Kingombe, Elisabeth Lthi, Heidi Schlosser, Denise Howald, Monika Kuhn, Thomas Jemmi. A PCR-based test for species-specific determination of heat treatment conditions of animal meals as an effective prophylactic method for bovine spongiform encephalopathy, Meat Sci., **57**, 35-41 (2001).
20. Fabrice Teletchea, Celia Maudet, Catherine Hanni: Food and forensic molecular identification: update and challenges, TRENDS in biotechnology, **23**, 359-366 (2005).
21. Hebert P. D. N., Cywinska A, Ball S. L., deWaard J. R.: Biological identifications through DNA barcodes, Proc R Soc Biol Sci SerB, **270**, 313-321 (2003).
22. Hurng-Yi Wang, Mung-Pei Tsai, Ming-chung Tu, Sin-Che Lee: Universal primers for amplification of the complete mitochondrial 12S rRNA gene in vertebrates, Zoological Studies, **39**, 61-66 (2000).
23. Hsieh H. M., Chiang H. L., Tsai L. C., Lai S.Y., Huang N. E., Linacre A., Lee J. C.: Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals, Forensic. Sci. Int., **122**, 7-18 (2001).
24. Wolstenholme, D. R: Animal mitochondrial DNA: structure and evolution, Int. Rev. Cytol, **141**, 173-216 (1992).
25. Parodi B., Aresu O., Bini D., Lorenzini R., Schena F., Visconti P., Cesaro M., Ferrera D., Andreotti V., Ruzzon T.: Species identification and confirmation of human and animal cell lines: a PCR-based method, Biotechniques. **32**, 432-440 (2002).
26. Tajima K., Enishi O., Amari M., Mitsumori M., Kajikawa H., Kurihara M., Yanai S., Matsui H., Yasue H., Mitsuhashi T., Kawashima T., Matsumoto M.: PCR detection of DNAs of animal origin in feed by primers based on sequences of short and long interspersed repetitive elements, Biosci. Biotechnol. Biochem. **66**, 2247-2250 (2002).
27. Tomoaki Mitani, Atsushi Akane, Takuma Tokiyasu, Sumitaka Yoshimura, Yutaka Okii, Manabu Yoshida: Identification of animal species using the partial sequences in the mitochondrial 16S rRNA Gene, Legal Medicine, **11**, 449-450 (2009).
28. Fay M. F., Bayer C., Alverson W. S., de Bruijin A. Y., Chase M. W.: Plastid *rbcL* sequence data indicate a close affinity between Diegodendron and Bixa, Taxon, **47**, 43-50 (1998).
29. Fazekas A. J., Burgess K. S., Kesankurti P. R., Graham S. W., Newmaster S. G., Husband B. C.: Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well, Plos ONE, **3**, e2802 (2008).
30. Newmaster S. G., and Ragupathy S.: Testing plant barcoding in a sister species complex of pantropical Acacia(Mimosoidea, Fabaceae), Molecular Ecology Resources, **9**, 172-180 (2009).
31. Gray. M. W., R. Cedergren, Y. Abel, D. Sankoff: On the evolutionary origin of the plant mitochondrion and its genome, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 2267-2271 (1989).