pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 30, No. 1, pp. 43~50 (2015)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2015.30.1.43

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

오징어류 종 판별을 위한 다중 유전자 검사법 개발 및 검증

김현수[1#] · 서용배[1#] · 최성석[1] · 김진희[2] · 신지영[2] · 양지영[2‡] · 김군도[1*‡]
[1]부경대학교 미생물학과, [2]부경대학교 식품공학과

Development and Validation of Multiplex Polymerase Chain Reaction to Determine Squid Species Based on 16s rRNA Gene

Hyunsu Kim[1#], Yong Bae Seo[1#], Seong-Seok Choi[1], Jin-hee Kim[2], Jiyoung Shin[2], Ji-Young Yang[2‡], and Gun-Do Kim[1*‡]
[1]*Department of Microbiology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea*
[2]*Department of Food Science & Technology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea*
(Received September 5, 2014/Revised October 6, 2014/Accepted November 12, 2014)

ABSTRACT - In this study, single PCR and multiplex PCR tests were examined for identification of four types of squid species (giant squid, cuttlefish, octopus, beka squid) purchased from fish market as well as aquatic processed products in Busan. To design the specific primers against each species, the nucleotide sequences of the mitochondrial 16s rRNA gene of *Architeuthis dux, Todarodes pacificus, Enteroctopus dofleini, Enteroctopus megalocyathus, Uroteuthis chinensis, Uroteuthis duvauceli, Uroteuthis edulis* groups were analyzed for the identification of each species registered in the GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) and have been used for comparative analysis. In order to obtain the size variation of amplified fragments on multiplex PCR, we designed KOJ-F, OJ-F, OCT-F, HAN-F, ALLR primers for each species. The optimal PCR conditions and primers were selected for four types of squid species to determine target base sequences in its PCR products. In the case of single PCR, giant squid was only amplified by KOJ-F/ALLR primer; cuttlefish was only amplified by OJ-F/ALLR primer; octopus was only amplified by OCT-F/ALLR primer; and beka squid was only amplified by HAN-F/ALLR primer. For multiplex PCR, the mixture of four kinds of genomic DNA (giant squid, cuttlefish, octopus, beka squid) been prepared as a template and used together with the mixture of KOJ-F/OJ-F/OCT-F/HAN-F/ALLR primers in the reaction. By the multiplex PCR, it is confirmed that four samples are correspond to multiple simultaneous amplicon. Finally, we validated the established methods of multiplex PCR in the aquatic processed products. Although the mitochondrial 16s rRNA primers used in this study was useful as a marker for detection of each species among them, the study indicated that the established multiplex PCR method can be more useful tool for monitoring the processed products.

Key words : Multiplex PCR, Spuid species, 16s rRNA gene, *Todarodes pacificus*

오징어류는 우리나라의 주요 상업어종 중 하나로 오호츠크해에서 남중국해까지 북서태평양 전역에 분포한다. 오징어는 전 세계적으로 안정적인 소비처를 확보하고 있지만, 수급측면에서는 불안정안 모습을 보이며 경기변동에 민감한 모습을 보이고 있다. 또한 중국의 오징어 수요는 세계 오징어 시장에 직접적인 영향을 줄 수 있다는 전망과 함께 이미 세계 최대의 오징어 수입국으로 자리잡고 있다. 특히 중국 내 소비뿐만 아니라 가공 후 재수출의 비중이 크기 때문에 자국 내 소비의 변화와 더불어 오징어 가공무역의 변동이라는 두 가지 요인으로 세계 시장에 직접적인 영향을 미치고 있다[1]. 이와 같이 오징어는 다양한 측면에서 수급 불안정성을 보일 가능성이 크다. 또한 최근 수산업에 대한 인식의 변화와 함께 유통 및 가공 등 관련 산업을 포함하여 영역을 확대해 수산물의 직접적인 소비보다는 수산물 가공식품산업에 대한 비중이 더 커지고 있다[2]. 그 결과 유통, 가공 등을 포함하는 수산업의 범위 및 역할이 중요시되고 있으며 소득 증가, 웰빙, 고령화

*Correspondence to: Gun-Do Kim, Department of Microbiology, Pukyong National University Busan 608-737, Korea
Fax: 82-51-629-5619, E-mail: gundokim@pknu.ac.kr
#Hyunsu Kim and Yong Bae Seo are contributed equally for the work.
‡Gun-Do Kim and Ji-Young Yang are contributed equally for the work.

등에 따른 식생활 습관의 변화로 인해 수산물 소비량은 꾸준히 증가하고 있다[3].

수산물 가공식품에 대한 시장이 점차 확대되면서 이에 따른 법적 규제 역시 강화되고 있는 실정이다[4]. 하지만 어묵, 연육 등과 같은 가공식품의 경우 이들의 원재료의 가공에 따른 형태적 분류가 힘들며, 이에 따른 불량식품 또는 부정식품으로 사용될 잠재적 위해 요소를 가지고 있다. 실제로 이를 이용하여 값싼 식품원료를 의도적으로 혼합하거나 둔갑시켜 표시사항을 허위로 기재한 EMA (Economically Motivated Adulteration) 식품의 제조와 유통이 급증하고 있으며[5], 특히 수산물에 대한 불량식품 사례가 언론 등을 통하여 보도되면서 수산물 식 소재에 대한 불안감이 증가하고 있다. 예를 들면, 오징어 다리를 문어다리와 유사하게 가공하여 적발된 사례, 문어다리를 한치로 둔갑시켜 적발된 사례, 대왕 오징어(페루산)를 국내산 오징어로 허위 기재한 사례 등이 대표적인 예이다.

이에 소비자를 기만하는 행위 근절을 위하여 가짜(불량 또는 부정)식품 판별을 위한 검사지침 마련이 요구되고 있으며, 차후에 발생할 수 있는 수산물 품목에 대해서도 미리 대책을 마련하고, 예방할 수 있는 판별법 마련이 시급하다. 식품의약품안전처에서는 2012년 식품 중 사용원료 진위 판별 지침서(II)를 통해 PCR (Polymerase Chain Reaction)을 이용하여 불량식품 근절을 위한 동물성 및 식물성 원료 등에 대해서 총 74종에 대한 판별법을 수록하였으며[6], 두족류에 해당하는 오징어, 한치, 쭈꾸미, 낙지에 대한 판별법이 이미 마련되어 있는 상황이다. 그러나 지침서에 따르면 이들은 모두 single PCR에 대한 조건이며, 두 가지 이상의 시료를 동시에 검출하기 위한 multiplex PCR에 적용하기 위해서는 몇 가지 문제점이 있다. 우선 이들 사이에 해당하는 PCR 증폭 범위는 212~237 bp로서 단 한 번의 PCR로 약 20 bp 차이에 해당하는 PCR 증폭산물을 아가로즈 젤 상에서 동시에 판별하기 힘들다. 그리고 각각의 종에 대한 프라이머의 결합온도(annealing temperature)는 50~61°C로서 최적 프라이머 결합온도를 설정하는데 어려움이 있다.

따라서 본 연구는 미토콘드리아 DNA 염기서열의 16s rRNA 유전자 분석법[7-11]을 통하여 두족류에 해당하는 대왕오징어(*Architeuthis dux*), 오징어(*Todarodes pacificus*), 문어(*Enteroctopus dofleini and Enteroctopus megalocyathus*), 한치(*Uroteuthis chinensis, Uroteuthis duvauceli and Uroteuthis edulis*)에 대해서 종래의 판별법과 비교하여 신속성 및 효율성 등을 보완하고자 한다. 이를 위해 가공처리가 되지 않은 1차 수산물원료를 이용하여 두 가지 이상의 시료가 혼합된 시료에 대해 동시 다발적으로 검출이 가능한 최적의 프라이머와 PCR 조건을 확립하였다. 최종적으로 1차 수산물원료를 통해 검증된 종 특이 프라이머를 바탕으로 실제 시장에서 유통되고 있는 오징어류가 함유된 가공식품에 대한 적용성 유무를 검토하였다.

재료 및 방법

재료 선정

최근 오징어류에 대한 불량식품 사례에 대해 언론보도를 중점적으로 하여 정보를 취합하고, 그 중 가공 처리를 거친 식품에 대해 육안으로 판별하기 힘들다는 점을 악용해, 가짜식품으로 둔갑이 빈번하게 일어나고 있는 대왕오징어, 오징어, 문어 한치를 실험 종으로 선정하였으며, 각각의 검체에 대해 10 마리씩의 genomic DNA를 추출하여 양성 대조군 및 음성 대조군 시료로 사용하였다. 가공 식품의 경우 오징어류가 하나 또는 두 개 이상이 혼합된 8개의 제품을 선별하여, −20°C에 보관하며 시험에 사용하였다.

Table 1. Information of processed food's components and contents

Company	Components
A	cuttlefish(11.6%), refined salt, starch syrup powder, crystal sugar, seasoning powder, clam powder, pepper powder, shirimp powder, potato starch, freeze-drying ciboule
B	cuttlefish(90.17%), sugar, refined salt, D-sorbitol, citric acid, liquorice, vinegar, sorbate calcium, lactic acid, glycerin esters of fatty acids, sodium lactate
C	octopus(9.47%), red-coat surimi, soybean oil, potato starch, L-sodium glutamate, D-xylose, white sugar
D	cuttlefish(42.75%), octopus(22.5%), yeast, crystal sugar, D-sorbitol, wheat flour, soy protein, egg white, corn starch, emulsifier
E	giant squid(13.4%), potato starch, vitamin B2, disodium succinate, pepper powder, alkali agents for noodles, refined salt, garlic
F	beka squid(89.52%), sorbitol, white sugar, refined salt, L-sodium glutamate, citric acid, succinic acid, complex phosphate, glycine, sorbate calcium, glacial acetic acid
G	cuttlefish(15%), beka squid(10%), octopus(8%), shirimp surimi(20%), mussel(17%), seashells(10%), clam meat(10%)
H	giant squid(40%), octopus slice10%), mussel(20%), clam meat(20%), shirimp susimi(5%)

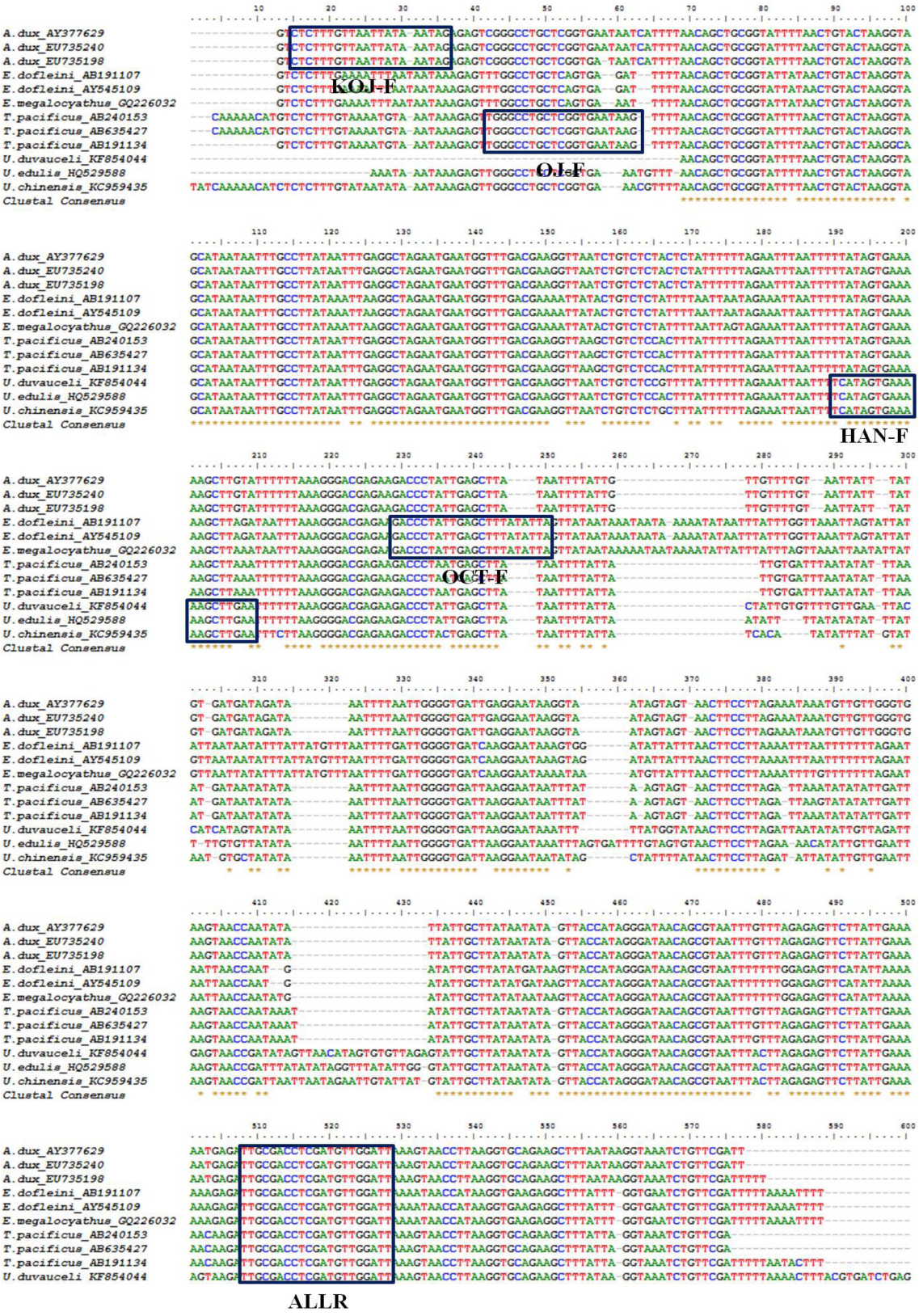

Fig. 1. Nucleotide sequence alignment and primer information designed from 16S rRNA gene of *Architeuthis dux* (Accession No. AY377629, EU735198 and EU735240), *Todarodes pacificus* (Accession NO. AB191134, AB240153 and AB635427), *Enteroctopus dofleini* (Accession No. AB191107 and AY545109), *Enteroctopus megalocyathus* (Accession No. GQ226032), *Uroteuthis chinensis* (Accession No. KC959435), *Uroteuthis duvauceli* (Accession No. KF854044) and *Uroteuthis edulis* (Accession No. HQ529588).

시약 및 검체구입

유전자증폭(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 위한 프라이머 및 PCR premix는 바이오니아(Bioneer, 대한민국)에 의뢰하여 합성 또는 구매하였으며, PCR 장비는 PTC-1148 MJ Mini™ Thermal Cycler (Bio-RAD Laboratories, Inc. USA)을 사용하였다. Genomic DNA의 추출은 DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen GmbH, Hiden, Germany)를 사용하였다. 실험 종으로 사용된 대왕오징어, 오징어, 문어, 한치는 수산시장에서 구입하였으며, 오징어류가 혼합된 가공식품은 소비자들이 손쉽게 접근 가능한 대형 마트 내에서 확보할 수 있는 수산물 냉동 가공식품에 한정하여 시료를 구입한 것으로 현재 국내에서 시판되는 대다수의 냉동 가공식품을 사용하였다. 사용된 가공식품에 대한 조성 및 함유량은 Table 1에 명기하였다.

Genomic DNA 추출 및 정제

대왕오징어, 오징어, 문어, 한치의 생육 및 수산가공식품에 대하여 국내에서 상용화되어 판매되고 있는 DNeasy Blood & Tissue kit를 사용하여 유전자를 추출하였다. 추출방법은 조직을 25 mg 미만으로 잘라 ATL 버퍼 180 ul를 1.5 ml 원심분리튜브에 넣은 후, 단백질 분해효소(proteinase K)를 20 µl 첨가하고 vortexing하여 완전히 섞은 후 조직이 완전히 분해 될 때까지 56°C에서 배양한다. 이후 15초간 vortexing하여 시료에 AL 버퍼 200 µl를 첨가하고 완전히 섞은 후 에탄올(96%-100%) 200 µl를 넣고 완전히 섞는다. 미리 준비한 2 ml Collection tube 안에 DNeasy Mini spin Column을 넣고 침전물을 포함한 혼합물을 컬럼 안에 넣는다. 1분 동안 8,000 rpm으로 원심분리하고 유출액과 Collection tube는 버린다. 새로 준비한 2 ml Collection tube 안에 DNeasy Mini spin Column을 넣고, AW2 버퍼 500 µl를 첨가한다. 그리고 DNeasy membrane을 건조하기 위해서 3분동안 14,000 rpm으로 원심 분리한 후 유출액과 Collection tube는 버린다. 깨끗한 1.5 ml 원심분리 튜브 안에 DNeasy Mini spin Column을 넣고 AE 버퍼 200 µl를 DNeasy membrane에 직접 닿도록 넣고 1분 동안 배양한다. 그리고 1분 동안 8,000 rpm으로 원심 분리하여 유출된 액을 −20°C에 보관하여 이후의 실험에 사용하였다[12-14].

종 특이 프라이머 설계

National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih)에 등록되어 있는 대왕 오징어(*Architeuthis dux*, Accession No. AY377629, EU735198, and EU735240), 오징어(*Todarodes pacificus*, Accession NO. AB191134, AB240153, and AB635427), 문어(*Enteroctopus dofleini*, Accession No. AB191107, AY545109, and *Enteroctopus megalocyathus*, Accession No. GQ226032), 한치(*Uroteuthis chinensis*, Accession No. KC959435, *Uroteuthis duvauceli*, Accession No. KF854044, *Uroteuthis edulis*, Accession No. HQ529588)의 16S rRNA gene 부위에 대한 염기서열을 대상으로 하였으며(Fig. 1) primer design을 위해 BioEdit ver. 7.1.3.0과 ClustalX ver. 1.81 프로그램을 사용하였다. 각 종의 염기서열에서 종 특이적 서열 부분을 중심으로 PCR 결과 이들 size를 200~500 bp 정도의 값이 증폭되도록 디자인하였으며. 이는 현장에서 빠른 시간 안에 가공유통 식품에서 혼합된 시료의 명확한 판별을 위하여 설정한 것이다.

Polymerase Chain Reaction 반응조건

PCR을 위한 반응액은 PCR premix kit (Bioneer, 대한민국)를 이용하여 시료에서 채취한 genomic DNA 1 µl (25~50 ng), 프라이머 각 1 µl (0.5 µM)을 혼합하였으며 최종 용량은 20 µl로 설정 하였다. PCR 반응조건은 95°C에서 5분간 denaturation을 실시한 후 95°C에서 30초, 52°C~58°C에서 30초, 72°C에서 20초를 25 cycle로 한 후 72°C에서 5분간 extension 후 4°C에서 종료하였다.

Single specific PCR의 경우, 대왕오징어는 KOJ-F/ALLR 프라이머, 오징어는 OJ-F/ALLR 프라이머, 문어는 OCT-F/ALLR 프라이머, 한치는 HAN-F/ALLR 프라이머를 사용하였으며 Multiplex PCR과 가공식품의 경우, KOJ-F/OJ-F/OCT-F/HAN-F/ALLR 프라이머를 혼합하여 사용하였다. Multiplex PCR에 대해서는 앞서 추출한 4종의 genomic DNA를 혼합하여 주형으로 사용하였으며 가공식품에 대해서는 각각의 제품에서 추출한 genomic DNA를 주형으로 사용하였다. 반응조건은 Table 2에 명시하였다.

오징어류에 대한 PCR 결과 확인 및 민감도 측정

최종산물의 확인은 반응액 10 µl를 취하여 2% 아가로즈 젤로 100 V, 30분간 전기영동하고 EtBr로 염색(1 µg/ml)한 후 UV투영기를 이용하여 확인하였다. 또한 가공식품에 대해 본 연구에서 제작된 프라이머를 적용할 경우 한계범위의 최저 검출농도를 측정하기 위하여 앞서 추출한 각각의 오징어류 genomic DNA를 농도별로 희석(100 ng/µl, 10 ng/µl, 1 ng/µl, 0.1 ng/µl, 0.01 ng/µl) 하여 single PCR 민감도 측정을 위한 주형으로 사용하였다. 그리고 multiplex PCR에서의 민감도를 확인하기 위해 오징어류 genomic DNA를 1 ng/µl, 0.5 ng/µl, 0.25 ng/µl, 0.12 ng/µl, 0.06 ng/µl 희석하여 주형으로 사용하였다.

가공식품에 대한 PCR 적용성 검토

본 연구에서 디자인된 4종(대왕오징어, 오징어, 문어, 한치)에 대한 종 판별 프라이머를 이용하여 실제 가공식품에 대해 적용성 유무를 검증하기 위하여 대형 마트에서 손쉽게 구할 수 있는 오징어류가 함유된 8개의 가공식품

Table 2. Information of PCR condition used in this study

Primer		Step	Temp.	Time	Cycles
Single PCR	KOJ-F/ ALLR	Initial denaturation	95°C	5 min	25
		Denaturation	95°C	30 sec	
		Annealing	54°C	30 sec	
		Extention	72°C	20 sec	
		Elongation	72°C	5 min	
	OJ-F/ ALLR	Initial denaturation	95°C	5 min	25
		Denaturation	95°C	30 sec	
		Annealing	58°C	30 sec	
		Extention	72°C	30 sec	
		Elongation	72°C	5 min	
	OCT-F/ ALLR	Initial denaturation	95°C	5 min	25
		Denaturation	95°C	30 sec	
		Annealing	52°C	30 sec	
		Extention	72°C	20 sec	
		Elongation	72°C	5 min	
	HAN-F/ ALLR	Initial denaturation	95°C	5 min	25
		Denaturation	95°C	30 sec	
		Annealing	52°C	30 sec	
		Extention	72°C	20 sec	
		Elongation	72°C	5 min	
Multiplex PCR	KOJ-F/ OJ-F/ OCT-F /HAN-F/ ALLR	Initial denaturation	95°C	5 min	25
		Denaturation	95°C	30 sec	
		Annealing	54°C	30 sec	
		Extention	72°C	30 sec	
		Elongation	72°C	5 min	

을 선별하여 구입한 후, 제품에 표기된 오징어류에 대한 종의 일치여부를 판별하였으며, 각각의 가공식품에 대한 조성 및 함유량은 Table 1에 명시하였다.

결과 및 고찰

종 특이 프라이머 디자인

오징어류의 검출을 위한 종 특이 프라이머를 디자인하기 위하여 미국 국립보건원에서 운영하는 유전자은행(www.ncbi.nlm.nih)에 등록 되어 있는 16S rRNA gene 염기서열을 이용하였다. 실험 대상 시료의 16S rRNA 유전자 서열을 각각 3 종류 이상 선정하여 이들의 유전적 상동성을 확인하였으며, 이 결과로부터 single PCR 뿐만 아니라 multiplex PCR의 적용성까지 고려하여 size variation에 기반한 최적의 프라이머를 선정하였다(Fig. 1). 또한, 오징어류 4종에 대한 특이적 프라이머의 결합온도 최적화와 비용절감 등의 효율성을 증대시키기 위하여 역방향에 해당하는 프라이머(ALLR)를 공통으로 고정시켰으며 정방향에 해당하는 4종(KOJ-F, OJ-F, OCT-F, HAN-F)의 프라이머를 통하여 각각의 종 특이적인 염기서열 증폭을 유도하도록 디자인 하였다. 이는 기존 multiplex PCR을 이용한 연구법[15]에 있어 증폭시키고자 하는 시료 수에 따른 프라이머 수가 결정된다. 예를 들면 2종의 시료를 multiplex PCR법으로 detection한다면 4개의 primer를 사용하여 한다. 하지만 이러한 방법은 primer 수에 따른 결합온도의 차이와 primer 디자인의 비용에 있어 비효율적인 측면이 있다. 이에 본 연구에서는 2종 이상의 시료에 있어 각각의 primer를 사용하는 것이 아니라 한쪽 방향의 primer를 동일한 서열로 고정 시켜 4개 이상의 primer가 아닌 3 종류의 primer만으로 2종 이상의 multiplex PCR을 수행할 수 있는 방법을 개발하였다. 이와 더불어, 가공식품에 대하여 적용이 가능하도록 하기 위해 PCR 산물의 크기는 가급적으로 500 bp 이내가 되도록 구성하여 KOJ-F/ALLR, OJ-F/ALLR, OCT-F/ALLR, HAN-F/ALLR, 및 KOJ-F/OJ-F/OCT-F/HAN-F/ALLR의 조합이 이루어지도록 하였으며, 디자인된 프라이머에 대한 정보는 Table 3에 기술하였다.

종 특이 프라이머를 이용한 오징어류 시료의 확인

본 연구에서 디자인된 종 특이 프라이머를 이용하여 수산 시장에서 구입한 오징어류 4종(대왕오징어, 오징어, 문어, 한치)에 대한 PCR을 통해 종 특이적인 염기서열 증폭 유무를 확인하고자 하였다. 우선 각각의 종에 대한 single PCR의 경우 대왕오징어(552 bp), 오징어(458 bp), 문어(247 bp), 한치(354 bp)에 대해서 예상 사이즈와 일치하는 종 특이적 증폭이 일어났으며, 교차반응에 의한 비특이적 밴드는 나타나지 않았다. 또한 표적 genomic DNA를 제외한 다른 종들에 대해서는 증폭이 일어나지 않음을 확인할 수

Table 3. Species-specific primer designed for detection of spuid species

Target region	Primer	Primer Sequence (5' → 3')	Length (bp)
16S rRNA gene	KOJ-F	CTC TTT GTT AAT TAT AAA TAG	552
	OJ-F	TGG GCC TGC TCG GTG AAT AAG	458
	OCT-F	GAC CCT ATT GAG CTT TAT ATT A	247
	HAN-F	TCA TAG TGA AAA AGC TTG AA	354
	ALLR	ATC CAA CAT CGA GGT CGY AA	

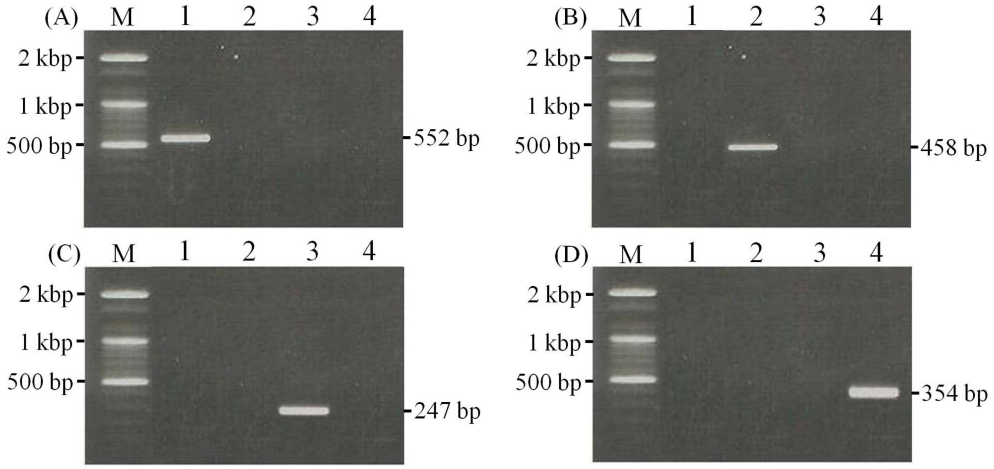

Fig. 2. Single specific PCR product patterns of 16s rRNA region on mithchondria DNA using specific primer[KOJ-F/ALLR (A), OJ-F/ALLR (B), OCT-F/ALLR (C), HAN-F/ALLR (D)]. Lane M; 100 bp ladder, 1; Giant spuid, 2; Cuttlefish, 3; Octopus, 4; Beka spuid.

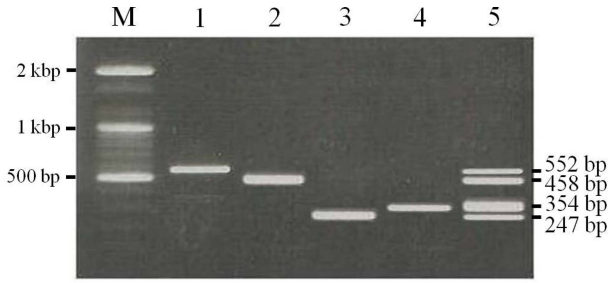

Fig. 3. Multiplex PCR product patterns of 16s rRNA region on mithchondria DNA using specific primer[KOJ-F/OJ-F/OCT-F/HAN-F/ALLR]. Lane M; 100 bp ladder, 1; Giant spuid, 2; Cuttlefish, 3; Octopus, 4; Beka spuid, 5; Mixture of four squid species.

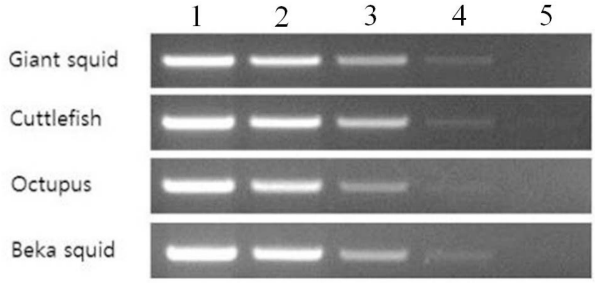

Fig. 4. Sensitivity analysis of the single PCR. giant spuid, cuttlefish, octupus and beka spuid's genomic DNA were dilluted with lane 1; 100 ng/μl, 2; 10 ng/μl, 3; 1 ng/μl,4; 0.1 ng/μl and 5; 0.01 ng/μl.

있었다(Fig. 2). 그리고 각각의 시료에 대해서 증폭된 종 특이적 염기서열의 실제 일치 여부를 판별하기 위해 DNA sequencing (COSMOGEN, Inc. Newyork)을 의뢰한 결과, 모든 시료에 대하여 일치하는 결과를 얻었다(결과 미제시). 그리고 앞서 single PCR에서 검증된 종 특이적 프라이머를 이용하여 multiplex PCR에 적용한 경우 오징어류 4종에 대하여 모두 각각의 종 특이적인 증폭이 동시다발적으로 일어나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

오징어류에 대한 PCR 민감도 및 검출한계

실제 가공식품에 대해 민감도를 검증하기 위해 오징어류 4종에 디자인된 종 특이적 프라이머에 대하여 검출이 가능한 한계 농도를 조사하였다. 주형으로 사용된 genomic DNA의 농도는 100 ng/μl, 10 ng/μl, 1 ng/μl, 0.1 ng/μl, 0.01 ng/μl 으로 희석하여 사용하였으며, 아가로즈 젤 상에서의 loading 양은 10 μl로 설정하였다. Genomic DNA의 농도를 제외한 나머지 PCR 조건은 annealing 온도를 제외하고 (대왕오징어 54ºC, 오징어 58ºC, 문어 52ºC, 한치 52ºC), 모두 동일하게 진행하였다. 앞서 설정된 농도 의존적 single

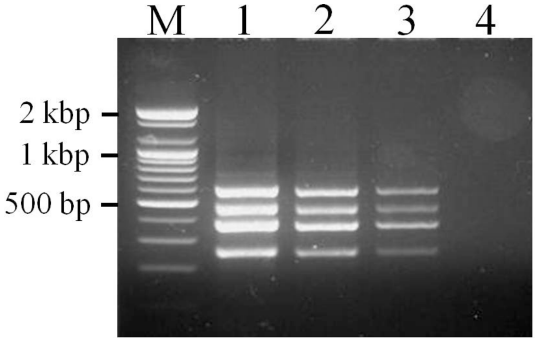

Fig. 5. Sensitivity analysis of the multiplex PCR. giant spuid, cuttlefish, octupus and beka spuid's genomic DNA were dilluted with lane 1; 1 ng/μl, 2; 0.5 ng/μl, 3; 0.25 ng/μl and 4; 0.12 ng/μl.

PCR을 수행한 결과 대왕오징어, 오징어, 문어, 한치에서 모두 약 0.1 ng/μl, multiplex PCR의 경우 약 0.25 ng/μl의 농도까지 검출이 가능함을 확인할 수 있었다(Figs. 4-5).

가공식품에 대한 적용성 검증

가공식품의 경우 고압, 살균과 같은 가공처리 과정을 거

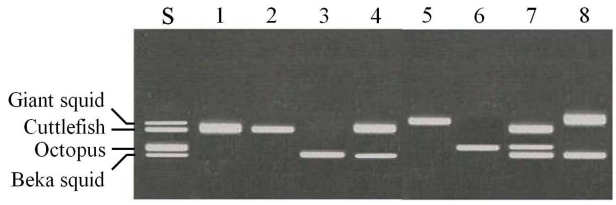

Fig. 6. Validation of multiplex PCR results of eight-products containing squid species. Lane S; multiplex marker, 1; company A, 2; company B, 3; company C, 4; company D with primers KOJ-F/OJ-F/OCT-F/HAN-F/ALLR (A), Lane S; multiplex marker, 1; company E, 2; company F, 3; company G, 4; company H with primers KOJ-F/OJ-F/OCT-F/HAN-F/ALLR (B).

치면서 단백질 변성 및 수용성 단백질 프로파일의 변화가 일어나기 때문에 최근 단백질보다 상대적으로 안정성이 유지되는 DNA 분석을 할 수 있는 PCR법을 이용하여 신속, 정확하게 원료성분을 분석하는 추세이다[16]. 또한, 제조과정에서 가열, 압력 등에 의해 DNA가 손상된 경우 PCR 증폭과정에서 목적 유전자가 제대로 증폭이 이루어지지 않는 현상이 발생하기 때문에 최대한 증폭산물의 크기를 500 bp 이내로 프라이머를 설계해야 한다[17].

따라서, 본 연구에서도 이를 바탕으로 하여 앞서 생물상태의 시료에 대해 검증된 각각의 종 특이적 프라이머를 이용해 가공식품의 적용성 유무를 확인하였다. 조사된 가공식품은 실제 대형 마트에서 유통되고 있는 오징어류가 함유된 가공식품에 대하여 총 8개의 가공식품을 선정하였으며(Table 1), 시료에 대한 전처리는 별도의 과정을 거치지 않고 3차 증류수로 충분히 세척하여 사용하였으며, DNeasy Blood & Tissue kit를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. 각각의 시료에 대하여 추출된 genomic DNA와 KOJ-F, OJ-F, OCT-F, HAN-F 및 ALLR 프라이머를 혼합하여 PCR을 수행한 결과, mutiplex marker와 비교하여 A, B사 제품에서는 오징어에 대한 특이적인 밴드, C사 제품에서는 문어에 대한 특이적인 밴드, D사 제품에서는 오징어와 문어에 대한 특이적인 밴드, E사 제품에서는 대왕오징어에 대한 특이적인 밴드, F사 제품에서는 한치에 대한 특이적인 밴드, G사 제품에서는 오징어, 문어, 한치에 대한 특이적인 밴드, H사 제품에서는 대왕오징어와 문어에 대한 특이적인 밴드를 확인하였다(Fig. 5). 각각의 종 특이적 밴드와 실제 제품에 표기되어 있는 원재료 표시사항을 비교 하였을 때, 모든 제품에 대해서 정확히 일치하는 결과를 확인하였다.

일반적으로 수산물 가공식품과는 달리 식육에 대한 가공식품의 경우 공정라인에 남아있는 다른 축종의 식육 DNA의 혼입이나 제조과정에 사용되는 기계의 공동 사용에 의한 교차오염에 의해 비의도적으로 혼입되는 경우가 자주 발생하는데[18], 본 연구 결과에서는 수산물 가공식품에 대하여 교차오염에 의한 PCR증폭은 확인되지 않았다.

국외에서는 현재 두족류에 대한 종 판별 연구가 미토콘드리아 16s rRNA, cytochrome b, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) PCR 등을 이용하여 보고되고 있으나[19-21], 이들은 모두 single PCR에 의한 조건이며, 증폭산물의 size variation 이 고려되지 않은 universal primer를 이용한 증폭에 기반한 것이다. 따라서 최종적으로 종을 판별하기 위해서는 유전자 염기서열 분석과정을 거쳐야 하기 때문에 많은 시간과 비용이 소모되며, 특히 RFLP PCR의 경우는 재현성 부분에서 신뢰도가 떨어지는 문제점이 있어 실제 가공식품에 이를 적용하기에는 위험성이 따른다. 따라서 본 연구에서는 이러한 문제점들을 보완하여, 각각의 종 특이적 프라이머에 기반한 PCR 증폭산물의 크기 분석만으로 두 개 이상의 목적 시료에 대한 종 판별이 동시에 이루어질 수 있도록 하여 신속성, 비용절감 및 오징어류에 대한 염기서열 상동성 분석을 통한 실험 재현성을 극대화시켰다.

또한, 오징어류 4종에 대한 종 특이적 프라이머는 열처리, 압력, 혼합육에 대해 감별력이 우수한 것으로 확인되었으며, 차후 언론이나 매체를 통해 다른 유사 종에 해당하는 오징어류 불량식품 사례 또는 가공식품업계에서 이슈가 되고 있는 사례 등이 보도되는 대로 해당 시료를 대상 종으로 추가 선정하고, 양성 대조군 및 음성 대조군으로 활용하여 이를 바탕으로 기존에 확립된 오징어류 특이도와 비교 분석 후 지속적으로 데이터베이스가 구축될 수 있는 모니터링 시스템의 기반을 마련함과 동시에 소비자의 건전한 제조・유통업체를 보호할 수 있는 식품안전관리에 기여할 것으로 기대된다.

요 약

본 연구에서는 오징어류에 해당하는 대왕오징어, 오징어, 문어, 한치 및 이를 이용한 가공식품에 대해서 분자생물학적 기법을 활용한 시험법을 검토하였다. 시료 중 원료성분 확인을 위하여 오징어류 4종에 대해 최적의 종 특이 프라이머를 디자인하였으며, 시료로부터 직접 genomic DNA를 추출하여 PCR을 실시하였다. PCR 수행과정에서 반응을 저해하는 염 성분을 제거하기 위하여 증류수를 이용하여 3~4회 세척 후 PCR을 실시한 결과, Single PCR의 경우 대왕오징어(552 bp), 오징어(463 bp), 문어(247 bp), 한치(354 bp)에 해당하는 종 특이적인 증폭산물을 확인하였으며, Multiplex PCR 의 경우 서로 다른 종 사이의 교차반응없이 동시다발적으로 증폭이 일어남을 확인할 수 있었다. 또한 이들 4종에 대해 PCR 민감도를 조사한 결과, 모두 약 0.1 ng/μl의 농도까지 검출이 가능함을 확인하였으며 multiplex PCR의 경우 약 0.25 ng/μl의 농도까지 검출이 가능함을 확인하였다. 이를 이용하여 오징어류가 함유된 수산물 가공식품 8건에 대해 적용성을 검토한 결과, 모든 시료에서 유효한 결과를 확인할 수 있었다. 따라

서 본 연구에서 제작된 오징어류 4종에 대한 종 특이적 프라이머는 생물 상태뿐만 아니라 수산물 가공식품에 대해서도 이를 판별할 수 있어 식품안전관리에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 2014년도 식품의약품안전처의 연구개발비(14162MFDS971)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Nakamura, Y. and Sakurai, Y.: Validation of daily growth increments in statoliths of Japanese common squid, Todarodes pacificus. Nip. Sui. Gak., **57**, 2007-2011 (1991).
2. 소원현, 김하균: 한국 수산물 가공식품기업의 이미지가 제품 평가 및 구매의도에 미치는 영향. *J. Fish. Bus. Adm*., **44(1)**, 1-14 (2013).
3. 임설매, 김기수: 패널자료를 이용한 중국 수산물소비지출에 영향을 미치는 요인에 관한 연구. *J. Fish. Bus. Adm*., **44(2)**, 019-033 (2013).
4. Lee, G.-I. and Kim, S.Y.: An Analysis of Consumption of Fishery Products, “Korean Rural Economic Institute, **26(3)**, 21-38 (2003).
5. Ballin, N.Z., Vogensen, F.K. and Karlsson, A.H.: Species determination-Can we detect and quantify meat adulteration? Meat Science, **83**, 165-174 (2009).
6. 식품의약품안전처: 식품 중 사용원료 진위 판별 지침서(II), In; 유전자분석법 활용, pp. 16-90. (2012).
7. Ha, J.C., Jung, W.T., Nam, Y.S. and Moon, T.W.: PCR identification of ruminant tissue in raw and heat-treated meat meals. *J. Food Prot*., **69**, 2241-2247 (2006).
8. Martín, I., García, T., Fajardo, V., López-Calleja, I., Rojas, M., Pavón, M.A., Hernández, P.E., González, I. and Martín, R.: Detection of chicken, turkey, duck, and goose tissues in feedstuffs using species-specific polymerase chain reaction. *J. Anim. Sci*., **85**, 452-458 (2007a).
9. Martín, I., García, T., Fajardo, V., Rojas, M., Hernández, P.E., González, I. and Martín, R.: 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 (2007b).
10. Tanabe, S., Miyauchi, E., Muneshige, A., Mio, K., Sato, C. and Sato, M.: 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. (2007).
11. 박종근, 신기현, 신성철, 정구용, 정의룡: 미토콘드리아 12S rRNA 유전자의 종 특이적 PCR-RFLP fingerprint를 이용한 식육 원료의 판별. *한국축산식품학회지*, **27**, 209-215. (2007).
12. Choi, W.S., Jeong, J.W., Kim, S.O., Kim, G.Y., Kim, B.W., Kim, C.M., Seo, Y.B., Kim, W.Y., Lee, S.Y., Jo, K.H., Choi, Y.J., Choi, Y.H. and Kim, G.D.: Anti-inflammatory potential of peat moss etracts in lipopolysaccharide-stimulasted RAW 264.7 macrophages. Int. *J. Mol Med. Doi* **10**, 3892 (2014).
13. Jung, H.I., Jo, M.J., Kim, H.R., Choi, Y.H. and Kim, G.D.: Extract of saccharina japonica induces apoptosis companied by cell cycle arrest and endoplasmic reticulum stress in SK-Hep1 human hepatocellular carcinoma cells. *Asian Pac J cancer Prev* **15(7)**, 2993-2999 (2014).
14. Seong, Y.A., Shin, P.G., Yoon, J.S., Yadunandam, A.K. and Kim, G.D.: Induction of the endoplasmic reticulum stress and autophagy in human lung carcinoma A549 cells by anacardic acid. *Cell Biochem Biophys*. **68(2)**, 369-377 (2014).
15. 김재환, 이재은, 유상진, 박영두, 김혜영: Multiplex PCR을 이용한 유전자변형 카네이션의 검출법. *Kor. J. Hort. Sci. Technol*. **28(2)**, 275-280 (2010).
16. Aida, A.A., Che Man, Y.B., Wong, C.M.V.L., Raha, A.R. and Son, R.: Analysis of raw meats and fats of pig using polymerase chain reaction for halal authentication. Meat Sci., **79**, 47-52 (2005).
17. 박용춘, 진상욱, 임지영, 김규헌, 이재황, 조태용, 이화정, 한상배, 이상재, 이광호, 윤혜성: 일반 프라이머를 이용한 PCR의 식품원료 진위 판별에 적용. *J. Fd Hyg. Safety* **27**, 317-324 (2012).
18. 허은정, 고은경, 서건호, 김영조, 박현정, 위성환, 문진산: 국내 유통 식육 및 식육가공품에서 축종감별을 위한 PCR 및 ELISA 검사법 검증. *J. Fd Hyg. Safety* **29**, 158-163 (2014).
19. Espiñeira, M., Vieites, J.M., and Santaclara F.J.: Species authentication of octopus, cuttlefish, bobtail and bottle squids (families Octopodidae, Sepiidae and Sepiolidae) by FINS methodology in seafoods. *Food Chem*. **121**, 527-532 (2010).
20. Santaclara F.J., Espiñeira, M., and Vieites, J.M.: Genetic Identification of Squids (Families Ommastrephidae and Loliginidae) by PCR-RFLP and FINS Methodologies. *J. Agric. Food Chem*. **55(24)**, 9914-9920 (2007).
21. Chapela M.J., Sotelo C.G., Calo-Mata P., Pérez-Martín R.I., Rehbein H., Hold G.L., Quinteiro J., Rey-Méndez M., Rosa C. and Santos A.T.: Identification of Cephalopod Species (Ommastrephidae and Loliginidae) in Seafood Products by Forensically Informative Nucleotide Sequencing (FINS). *Journal of Food science*. **67(5)**, 1672-1676 (2002).