pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 39, No. 3, pp. 209~220 (2024)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2024.39.3.209

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

캐비어를 생산하는 철갑상어의 신속 종판별을 위한 SNP 기반 KASP 분석에 관한 연구

이선희[1‡] · 박보름[1‡] · 김형일[2] · 조수열[3] · 손경훈[1*]
[1]식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 독성평가연구부 첨단분석과
[2]식품의약품안전처 식품안전정책국 식품기준기획관 첨가물기준과
[3]식품의약품안전처 서울지방식품의약품안전청 의료기기안전관리과

A Study on KASP Analysis Based on SNP to Rapidly Identify Caviar-Producing Sturgeon Species

Sun Hee Lee[1‡], Bo Reum Park[1‡], Hyung Il Kim[2], Sooyeul Cho[3], Kyung-Hun Son[1*]
[1]Center for Advanced Analysis, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea
[2]Deputy Director General for Food Standard Planning, Food Safety Policy Bureau, Ministry of Food and Drug Safety Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea
[3]Medical Device Safety Management Division, Seoul Regional Office of Food and Drug Safety, Seoul, Korea

(Received May 8, 2024/Revised June 12, 2024/Accepted June 12, 2024)

ABSTRACT - Cavier is graded as Beluga, Osetra, and Sevruga based on the species of sturgeon (*Acipenser sinensis*). In this study, we developed an analytical method for determining the grade of black caviar using DNA barcodes and KASP markers. To identify the sturgeon species, ten black caviar samples were collected, and a reference DNA barcode library was developed using five genes (namely, 16S ribosomal RNA, *cytochrome b*, *cytochrome c oxidase subunit I*, *cytochrome c oxidase subunit II*, and *NADH dehydrogenase subunit 5* genes). To develop the KASP markers, we selected 11 markers that could distinguish between the five grades of black caviar. As a result, specific markers for each of the targeted caviars were clustered into FAM-positive sections. DNA barcoding and the KASP assay revealed that one Beluga, six Osetra, and three Sevruga were identified among the ten caviar samples. Moreover, we found that the sturgeon species were mislabeled in two products. Here, we aimed to develop a KASP assay based on SNP that allows rapid and easy identification of caviar grade. These methods are expected to contribute to preventing the distribution of illegal products.

Key words: Caviar, Sturgeons, DNA barcode, KASP assay, Molecular identification

캐비어는 바다의 검은 다이아몬드라고 불리며 푸아그라, 트러플과 함께 세계 3대 진미로 여겨진다[1]. 넓은 의미의 캐비어는 생선의 알을 소금에 절인 것을 의미하지만, 통상적으로 캐비어는 철갑상어(*Acipenser sinensis*)의 알을 뜻한다. 캐비어는 철갑상어의 종에 따라 그 종류를 나누는데 대표적인 캐비어 종류로 벨루가(Beluga), 칼루가(Kaluga), 세브루가(Sevruga), 스털렛(Sterlet), 오세트라(Osetra) 등이 있다[2]. 벨루가 캐비어는 *Huso huso*의 알로 19-22년 이상 성장한 암컷 철갑상어에서만 얻을 수 있어 가격도 가장 비싸고 알 크기도 가장 크다[2]. 칼루가는 *H. dauricus*의 알로 암컷 철갑상어가 성숙되는데 14-23년이 걸리며 중국에서 많이 생산된다[2]. 오세트라는 시중에 가장 널리 알려지고 가장 많이 유통되고 있는 캐비어로 약 10년 이상 자란 *Acipenser baerii, A. gueldenstaedtii, A. persicus, A. transmontanus, A. schrenckii* 등에서 얻을 수 있다[2]. 세브루가는 8-10년 자란 *A. stellatus*에서 얻을 수 있으며 스털렛은 3-6년 자란 *A.*

‡ These authors contributed equally to this work.
*Correspondence to: Kyung-Hun Son, Center for Advanced Analysis, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, 28159, Korea
Tel: +82-43-719-5300, Fax: +82-43-719-5300
E-mail: juchan2@korea.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal 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.

*ruthenus*에서 얻을 수 있다[2]. 이렇게 철갑상어가 성숙하여 캐비어를 수확하는데까지 종에 따라 기간이 차이가 나기 때문에 철갑상어 종에 따라 캐비어 가격이 다르다.[3] *H. huso*의 캐비어인 벨루가가 가장 비싸며 그 다음으로는 칼루가, 오세트라, 세브루가, 스털렛이다[3,4].

전 세계적으로 캐비어의 수요량은 증가하고 있으며 철갑상어 알의 한정된 공급으로 인해 철갑상어 알이 아닌 캐비어 대체품들도 등장하였다[5]. 캐비어 대체품들은 정어리, 연어, 송어, 청어의 알을 사용하여 색이나 맛을 비슷하게 구연하면서 가격이 캐비어보다 훨씬 저렴하다[5]. 한국의 캐비어 수입량도 2020년 975 kg에서 2021년 1,446 kg, 2022년에는 2,783 kg, 2023년에는 3,353 kg으로 꾸준히 상승하고있다[6]. 국내 캐비어의 수요가 늘어남에 따라 캐비어 대체품의 유통이 증가할 것으로 예상되며, 캐비어의 등급을 속여 팔거나 캐비어 대체품을 캐비어로 판매하는 불량식품의 유통이 증가할 수 있기 때문에 캐비어 종류의 진위여부를 확인할 수 있는 분석법 확립의 필요하다.

식품 원료의 경우 관능 및 육안 분석방법 등에 의해 원료의 진위 판별이 가능하나 원료를 분쇄하거나 변형, 혼입한 경우가 있기 때문에 유전자 분석법을 사용하여 진위 판별을 하는 분석법도 널리 활용되고 있다[7]. 캐비어의 철갑상어 종 판별을 위한 유전자 분석방법으로는 DNA Sequencing, PCR-Single Strand Confirmation Polymorphism, Species-specific PCR, PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism, Random Amplified Polymorphic DNA, Amplified Fragment Length Polymorphism 등 다양한 분석법이 보고되었다[8].

본 연구에서는 Kompetitive allele specific PCR (KASP) 분석법을 통하여 캐비어의 철갑상어 종을 구별하고자 하였다[9]. KASP는 LGC Biosearch Technologies (Teddington, UK)사에서 개발한 유전자 분석법이며 single nucleotide polymorphisms (SNP) 또는 삽입(insertions), 결손(deletions)을 갖는 대립 유전자에 선택적으로 반응하는 forward primer 한 쌍과 하나의 reverse primer로 구성되어있으며 대립유전자에 선택적으로 반응하여 증폭된 fluorescence resonant energy transfer (FRET) cassette가 형광을 띔으로써 대립유전자를 구별하는 방법[10]으로 DNA 돌연변이 확인이나 동식물의 형질 판별[11,12] 등에 많이 사용되고 있다.

따라서 본 연구에서는 캐비어의 철갑상어 종 판별을 위하여 *Acipenseridae*, *H. huso, H. dauricus, A. stellatus, A. ruthenus*에 특이적인 SNP를 선정하고 이를 표적하는 KASP 마커를 제작하였다. 그리고 검증된 철갑상어 KASP 마커를 이용하여 인터넷을 통해 국내에 판매되고있는 캐비어의 유통 실태를 파악하고 나아가 불법유통을 방지하는데 기여하고자 하였다.

Materials and Methods

시료 및 시약

본 실험에 사용한 캐비어 시료는 2021년 4월부터 7월 사이에 한국의 인터넷 사이트를 통해 유통된 제품 10종을 구입하여 사용하였다. 구매한 캐비어의 정보는 Table 1과 같다. DNA 추출은 DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)을 사용하였으며, PCR 수행은 AccPower PCR master mix (Bioneer, Daejeon, Korea)을 사용하였으며, KASP 분석에서 사용된 KASP assay mix와 KASP V4.0 2X Master Mix/High ROX는 LGC Biosearch Technologies에서 구매하였다.

Genomic DNA 추출

캐비어 유전자 추출은 DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)을 이용하여 추출하였으며 방법은 다음과 같다. 캐비어 10 mg을 취한 후 2 mL microcentrifuge tube에 담아 180 μL의 ATL 버퍼와 20 μL의 Proteinase K를 가한 후 TissueLyser를 사용하여 30 Hz에서 2분 동안 균질화 후 56°C에서 10분간 반응시킨다. 이 반응액에 200 μL의 AL 버퍼와 200 μL의 100% 에탄올을 첨가 후 섞는다. 반응액을 DNeasy mini spin 컬럼에 넣고 1분간 6,000 rpm에서 원심 분리하고 통과한 액을 버린 후, 500 μL AW1 버퍼를 넣고 1분간 6,000 rpm에서 원심 분리하고 통과한 액을 버린다. 이어서 500 μL AW2 버퍼를 넣고 2분간 14,000 rpm에서 원심 분리하고 통과한 액을 버린다. 새로운 2 mL microcentrifuge tube에 컬럼을 옮겨 담고 100 μL AE 버퍼를 넣어 1분간 방치 후 1분간 6,000 rpm에서 원심 분리하여 캐비어 유전자를 용출 한 뒤, 추출한 DNA는 -20°C에 보관하였다.

염기서열 분석 및 종판별

Sequencing에 사용한 primer는 NADH5-F(5'-TTGCCTCATGGTACATACAC-3'), NADH5-R(5'-CGGTGTTGGACCTTCTATTG-3'), COX1-F(5'-CTTAACGCTCAGCCATCTTA-3'), COX1-R(5'-GGTAGAAGTCAGAAGCTCAT-3'), COX2-F(5'-GGCTCATCCATCACAATTAG-3'), COX2-R(5'-TCCGGGTACTGCGTCTAT-3'), cytB-F(5'-GCAATACACTACACAGCTG-3'), cytB-R(GGCGATTACGAATGGTAG-3')를 Macrogen (Seoul, Korea)사에서 합성 및 정제하여 사용하였다. 반응조건은 94°C에서 5분간 열변성 후, 94°C에서 20초, 50°C 20초, 72°C에서 30초로 35회 반복한 후 72°C에서 5분간 더 반응시켰다. PCR 증폭산물은 QIAxcel (QIAxcel advanced, QIAGEN)을 사용해 단일 밴드 확인 후 해당 증폭 산물을 Macrogen사에 염기서열분석을 의뢰하였다. 염기서열 분석이 완료된 염기서열은 NCBI에서 제공하는 BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)를 이용하여 GenBank에 등

Table 1. Labeled species and origin of caviar samples in this study

Sample No.	Labeled grade (species)	Country of origin	CITES label	BLAST Result	Accession number
CV 1	Osetra (*Acipenser gueldenstaedtii*)	Belgium	GUE/C/BE/2021/VE3098/T1149	*Acipenser gueldenstaedtii* (percent identity 99.75- 100%)	OM038620
CV 2	Hybrid Osetra (*Acipenser gueldenstaedtii X Acipenser baerii*)	Belgium	GUEXBAE/C/BE/2021/VE3098/T1154	*Acipenser gueldenstaedtii X Acipenser baerii* (percent identity100%)	OM038639
CV 3	Sevruga	Korea	-[1)]	*Acipenser ruthenus* (percent identity99.75- 100%)	OM038640
CV 4	Kaluga (*Huso dahuricus*)	United Kingdom	DAU/C/CN/2021/GB0010/00023	*Huso dauricus* (percent identity100%)	OM038641
CV 5	Beluga	Korea	-	*Acipenser gueldenstaedtii* or *Acipenser baerii* (percent identity 100%)	-[2)]
CV 6	Osetra	Korea	-	*Acipenser ruthenus* (percent identity 100%)	OM038642
CV 7	Sevruga (*Acipenser stellatus*)	Italy	STE/C/IT/2021/384/OAIIM838	*Acipenser Stellatus* (percent identity 99.62-100%)	OM038643
CV 8	Osetra (*Acipenser gueldenstaedti)*	Italy	GUE/C/IT/2020/384/OAUMM532	*Acipenser gueldenstaedtii* (percent identity99.78-100%)	OM038644
CV 9	Osetra (*Acipenser baerii*)	Korea	-	*Acipenser baerii* (percent identity 100%)	OM038645
CV 10	Osetra (*Acipenser gueldenstaedtii*)	Korea	-	*Acipenser gueldenstaedtii* (percent identity 99.76-100%)	OM038646

[1)] No information on domestically produced products.
[2)] It is difficult to determine the exact number of species.

록되어있는 염기서열 정보와 비교하여 가장 높은 유사성을 보이는 철갑상어 종으로 판별하였다.

특이 SNP 선정 및 KASP 마커 제작

NCBI database (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/)의 유전정보를 기반으로 하여 철갑상어속을 아우르는 SNP

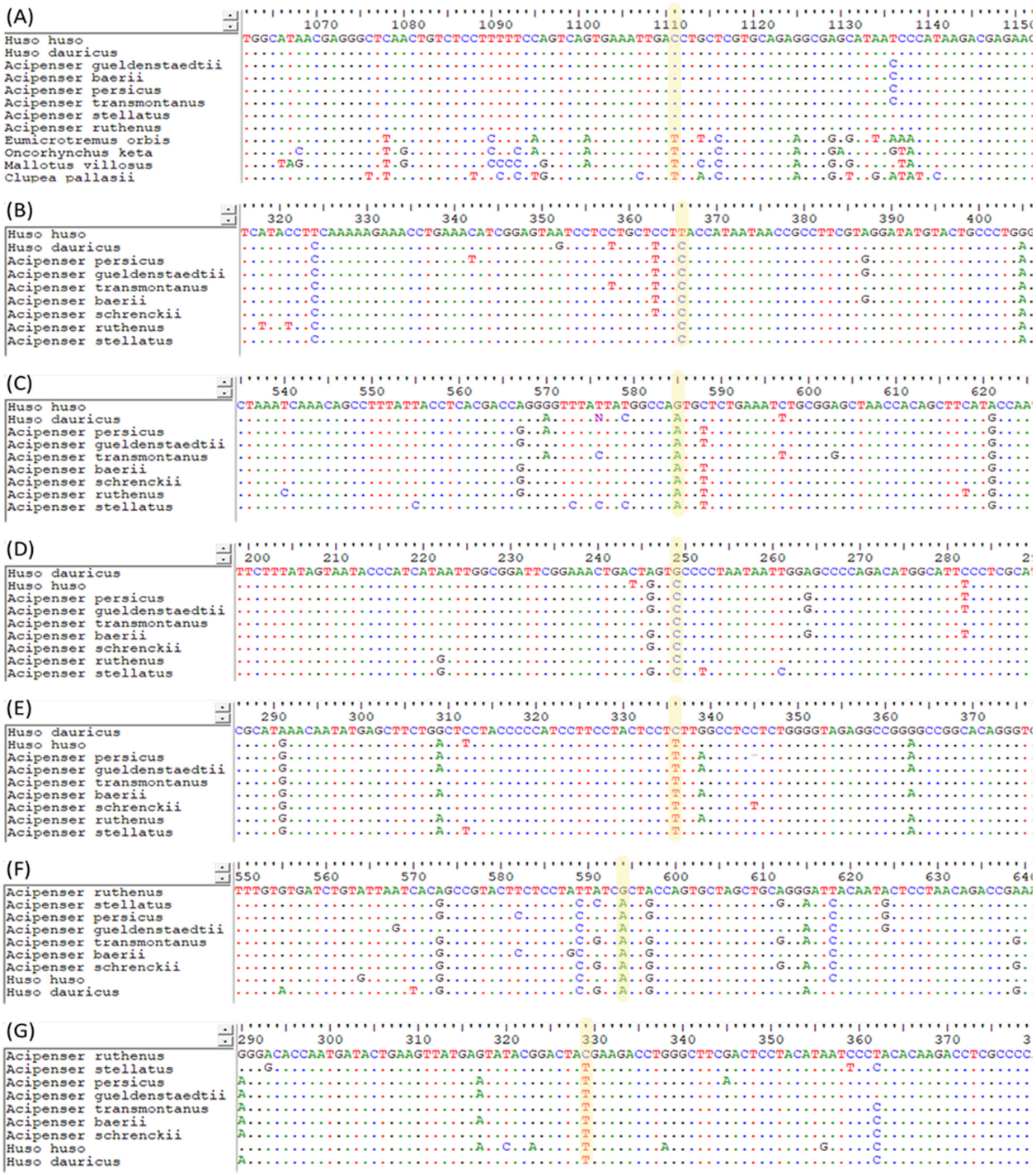

Fig. 1. Acipenser species- specific SNP location.
(A) Acipenser species-specific SNP on 16S ribosomal RNA gene (B) *Huso huso*-specific SNP on *cytochrome b (cytB)* gene (C) *H. huso*-specific SNP on *cytochrome c oxidase subunit II (COX2)* gene (D) *H. dauricus*-specific SNP on *cytochrome c oxidase subunit I (COX1)* gene (E) *H. dauricus*-specific SNP on *COX1* gene (F) *A. ruthenus*-specific SNP on *COX1* gene (G) *A. ruthenus*-specific SNP on *COX2* gene (H) *A. stellatus*-specific SNP on *NADH dehydrogenase subunit 5* gene (I) *A. stellatus*-specific SNP on *COX1* gene (J) *A. schrenckii* and *A. transmontanus*-specific SNP on *cytB* gene (K) *A. baerii*, *A. persicus*, *A. gueldenstaedtii*, *A. schrenckii*, *A. transmontanus*-specific SNP on *cytB* gene.

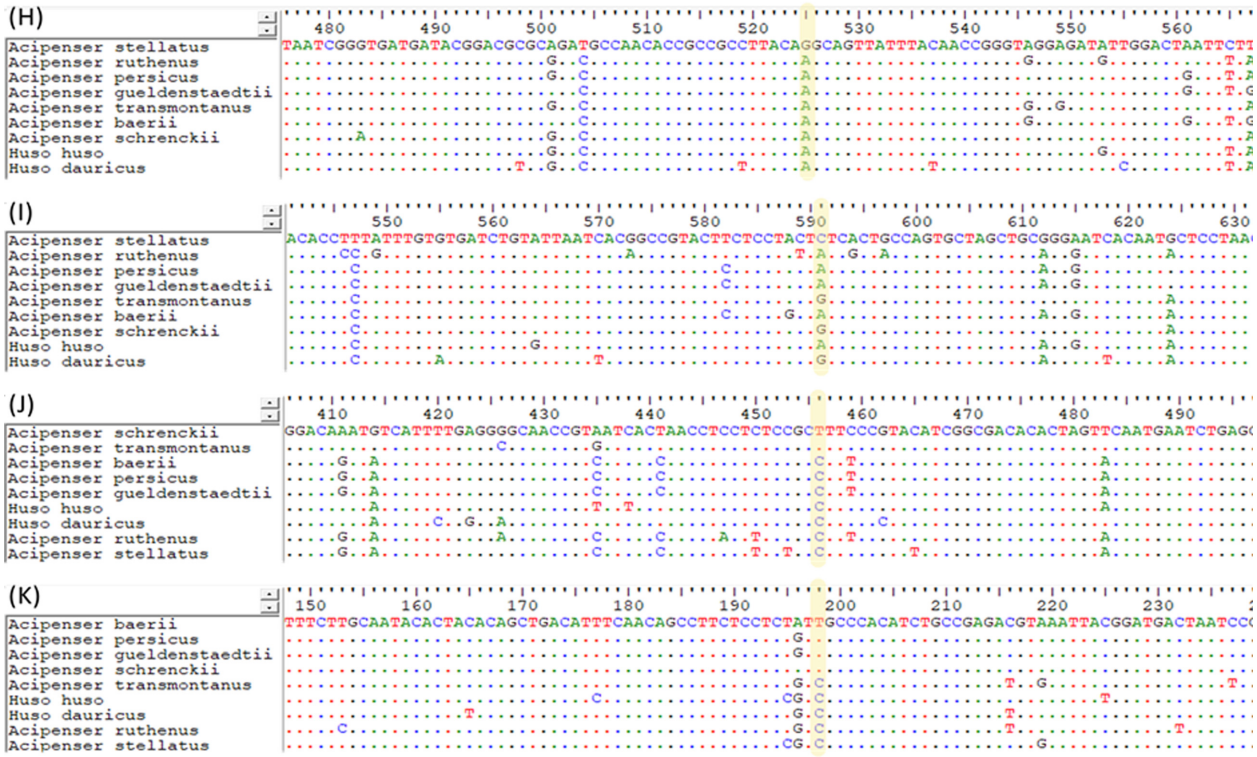

Fig. 1. (Continued) Acipenser species- specific SNP location.

1개와 *H. huso, H. dauricus, A. stellatus, A. ruthenus*, 오세트라 특이 SNP를 2개씩 선정하였다(Fig. 1). 철갑상어속 특이 SNP는 16S ribosomal RNA의 1111번째 뉴클레오타이드(g.1111C)를 선정하였다(Fig. 1A). 철갑상어 속을 표적하는 Acipenser-16S 마커는 16S ribosomal RNA의 1111번째 뉴클레오타이드가 C 일경우 FAM, T 일경우 HEX 형광, 그 이외의 표현형을 가질 경우 형광발현이 없게 제작하였다(Table 2). 벨루가 캐비어를 생산하는 *H. huso*의 종 특이 SNP는, *cytochrome b (cytB)*의 366번째 뉴클레오타이드(g.366T)와 *cytochrome c oxidase subunit II (COX2)*의 585번째 뉴클레오타이드(g.585G)를 선정하였다. (Fig. 1B, 1C). 벨루가 캐비어를 표적하는 Beluga-A 마커는 *cytB*의 366번째 뉴클레오타이드가 T 일경우 FAM, C 일 경우 HEX, 그 외의 표현형을 가질 경우 형광발현이 없게 제작하였고 Beluga-B 마커는 *COX2*의 585번째 뉴클레오타이드가 G 일 경우 FAM, A 일 경우 HEX, 그 외의 표현형을 가질 경우 형광발현이 없게 제작하였다(Table 2). 칼루가 캐비어를 생산하는 *H. dauricus*의 종 특이 SNP는 *cytochrome c oxidase subunit I (COX1)*의 249번째와 336번째 뉴클레오타이드(g.249G, g.336C)를 선정하였다 (Fig. 1D, 1E). 칼루가 캐비어를 표적하는 Kaluga-A 마커는 *COX1*의 249번째 뉴클레오타이드가 G 일 경우 FAM, C 일 경우 HEX, 그 외의 표현형을 가질 경우 형광 발현이 없게 제작하였고 Kaluga-B 마커는 *COX1*의 336번째 뉴클레오타이드가 C 일 경우 FAM, T 일 경우 HEX, 그 외의 표현형을 가질 경우 형광 발현이 없게 제작하였다(Table 2). 세브루가 캐비어를 생산하는 *A. ruthenus*의 종 특이 SNP는 *COX1*의 594번째 뉴클레오타이드(g.594G)와 *COX2*의 329번째 뉴클레오타이드(g.329C)를 선정하였으며(Fig. 1F, 1G), 세브루가 캐비어를 표적하는 Severuga-A 마커는 *COX1*의 594번째 뉴클레오타이드가 G 일 경우 FAM, A 일 경우 HEX, 그 외의 표현형을 가질 경우 형광발현이 없게 제작하였고 Severuga-B는 *COX2*의 329번째 뉴클레오타이드가 C 일 경우 FAM, T 일 경우 HEX, 그 외의 표현형을 가질 경우 형광발현이 없게 제작하였다(Table 2). 스텔렛 캐비어를 생산하는 *A. stellatus*의 종 특이 SNP는 *NADH dehydrogenase subunit 5 (NADH5)*의 525번째 뉴클레오타이드(g.525A)와 *COX1* 591번째 뉴클레오타이드(g.591C)를 선정하였다(Fig. 1H, 1I). Sterlet-A 마커는 *NADH5*의 525번째 뉴클레오타이드가 G 일 경우 FAM, A 일 경우 HEX, 그 외의 표현형을 가질 경우 형광발현이 없게 제작하였고 Sterlet-B 마커는 *COX1* 591번째 뉴클레오타이드가 C 일 경우 FAM, A 일 경우 HEX, 그 외의 표현형을 가질 경우 형광발현이 없게 제작하였다(Table 2). 오세트라 캐비어를 생산하는 철갑상어 중 *A. schrenckii*와 *A. transmontanus*에 대한 특이 SNP는 *cytB*의 456번째 뉴클레오타이드(g.456T)로 선정하였으며(Fig. 1J) 해당 뉴클레오타이드가 T 일 경우 FAM, C 일 경우 HEX 그 외의 표현

Table 2. Sequence of *Acipenser* species-specific KASP markers

Target	Markername	Gene	SNP varient	Forward primer 1	Forward primer 2	Reverse primer
Family Acipenseridae	Acipenser-16S	*16S*	C/T	ATGCTCGCCTCTGCACGAGCAGG	CTCGCCTCTGCACGAGCAGA	ACTGTCTCCTTTTTCCAGTCAGT-GAAATT
Huso huso	Beluga-A	*cytB*	T/C	TCGGAGTAATCCTCCTGCTCCTT	GGAGTAATCCTCCTGCTCCTC	GTACATACCCTACGAAGGCGGT-TAT
	Beluga-B	*COX2*	G/A	TAGCTCCGCAGATTTCAGAGCAC	TTAGCTCCGCAGATTTCAGAGCAT	TTATTACCTCACGACCAGGG-GTTTATTAT
Huso dauricus	Kaluga-A	*COX1*	G/C	GCGGATTCGGAAACTGACTAGTG	GCGGATTCGGAAACTGACTAGTC	GCCATGTCTGGGGCTCCAAT-TATTA
	Kaluga-B		C/T	CTACCCCAGAGGAGGCCAAG	TCTACCCCAGAGGAGGCCAAA	GCTCCTACCCCCATCCTTCCTA
Acipenser ruthenus	Severuga-A	*COX1*	G/A	ACAGCCGTACTTCTCCTATTATCG	TCACAGCCGTACTTCTCCTAT-TATCA	GATCCCTGCAGCTAGCACTGGTA
	Severuga-A	*COX2*	C/T	TACTGAAGTTATGAGTATACG-GACTAC	TGATACTGAAGTTATGAGTATACG-GACTAT	GTAGGAGTCGAAGCCCAGGTCTT
Acipenser stellatus	Sterlet-A	*NADH5*	G/A	CTACCCGGTTGTAAATAACTGCC	TCCTACCCGGTTGTAAATAACT-GCT	AGATGCCAACACCGCCGCCTTA
	Sterlet-B	*COX1*	C/A	ACGGCCGTACTTCTCCTACTC	TCACGGCCGTACTTCTCCTACTA	GGAGCATTGTGATTCCCGCAGCTA
Acipenser baerii, *Acipenser gueldenstaedtii*, *Acipenser persicus,* *Acipenser transmontanus*	Osetra-A	*cytB*	T/C	CGTCTCGGCAGATGTGGGCA	GTCTCGGCAGATGTGGGCG	CTACACAGCTGACATTTCAACAG-CCTT
Acipenser schrenckii, *Acipenser transmontanus*	Osetra-B	*cytB*	T/C	TAATCACTAACCTCCTCTCCGCT	TAATCACTAACCTCCTCTCCGCC	GTGTGTCGCCGATGTACGGGAA

형을 가질 경우 형광발현이 없게 Ostera-A 마커를 제작하였다(Table 2). 또한 오세트라 캐비어를 생산하는 철갑상어 중 *A. baerii, A. persicus, A. gueldenstaedtii, A. schrenckii*에 대한 특이 SNP는 *cytB*의 198번째 뉴클레오타이드(g.198T)를 선정하였으며(Fig. 1K) 해당 뉴클레오타이드가 T 일 경우 FAM, C 일 경우 HEX, 그 외의 표현형을 가질 경우 형광 발현이 없게 Osetra-B 마커를 제작하였다(Table 2).

KASP 분석

KASP assay mix는 LGC genomics (Teddington, UK) 사에 제작을 의뢰하였으며 방법은 다음과 같다. KASP 분석을 위하여 주형 DNA 5 μL, KASP V4.0 2X Master Mix/High ROX (LGC genomics) 5 μL, KASP Assay Mix (LGC genomics) 0.14 μL를 섞어 반응액을 제조하였다. KASP Assay Mix에는 2개의 forward primer와 1개의 reverse primer가 포함되어있으며 KASP Master Mix에는 형광이 붙은 fluorescent resonance energy transfer (FRET)-cassette와 Taq polymerase, dNTP, ROX 형광 등이 포함되어있다. 제조한 반응액은 MicroAmp™ Optical 96 Well Reaction Plate (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)에 분주하여 PCR 증폭 및 분석을 하였다. 각 KASP 마커마다 표적 철갑상어의 염기서열 일부를 합성하여 FAM positive oligo로 사용하며, 해당 SNP에 대립 유전자로 바꿔 합성하여 HEX positive oligo로 사용하여 제작한 KASP 마커의 적합성을 확인하였다. 올리고 뉴클레타이드는 가운데 1개의 염기서열이 다르고 나머지 앞, 뒤 50 bp는 같도록 제작하였으며 제작한 올리고 뉴클레타이드의 서열은 Table 3과 같다. 제작된 올리고 뉴클레타이드는 3차 정제수를 이용하여 1 fmol의 농도로 희석하여 사용하였다. 유전자 증폭 및 분석은 7900 HT real-time PCR system (Applied Biosystems) 기기를 사용하였으며, 소프트웨어는 SDS software (Applied Biosystems)를 사용하였다. PCR 조건은 LGC genomics에서 제공하는 “Guide to running KASP genotyping on the ABI 7900 instrument” 와 동일하게 수행하며 증폭 조건은 61-55°C touchdown protocol 대로 진행하였다.

Results and Discussion

KASP 마커의 SNP 분별력 확인

제작한 KASP마커가 SNP를 구분하는지 확인하기 위해서 1개의 염기서열이 다른 101 bp의 단일가닥의 올리고뉴클레타이드를 합성하였다(Table 3). 예를들어 Acipenser-16S에 대한 FAM positive oligo의 경우 51번째 염기서열이 C이고 HEX positive oligo의 51번째 뉴클레오타이드는 T이며 그 이외에 앞, 뒤 50 bp는 표적하는 철갑상어의 염기서열과 동일하다. 제작한 FAM/HEX positive oligo에 대해 KASP 마커 분석결과, 11개의 마커 모두 각각의 FAM positive oligo에서는 FAM 형광이 확인되어 X축 가까이 위치하고, HEX positive oligo에서는 HEX 양성을 띠며 Y축 가까이 위치 하는 것을 확인하였다(Fig. 2). 따라서 1개의 뉴클레오타이드 표현형의 차이에도 FAM 형광값의 유무로 표적하는 철갑상어의 DNA 유무를 확인할 수 있어 제작한 11개의 KASP 마커가 철갑상어 종을 구분을 위해 사용함에 있어서 타당함을 확인하였다.

캐비어 제품 모니터링

10개의 캐비어에 대해 4개의 유전자(*NADH5, COX1, COX2, cytB*)를 염기서열 분석을 진행하고 BLAST 결과, CV-1, 2, 5, 9, 10은 *A. gueldenstaedtii, A. baerii*와 유전자 상동성이 99.76-100%로 나왔으며 오세트라 캐비어로 확인되었다. *A. gueldenstaedtii*와 *A. baerii*는 유전자 상동성이 매우 높아 4개의 유전자 구간에 대한 염기서열 비교만으로는 정확한 판별이 어려웠다. 따라서 BLAST 결과와 표시사항 내 표기된 철갑상어 종을 통해 CV1, 8, 10은 *A. gueldenstaedtii*에서 유래한 캐비어, CV2는 *A. gueldenstaedtii*와 *A. baerii*의 교잡 철갑상어에서 유래한 캐비어, CV9는 *A. baerii*에서 유래한 캐비어로 판정하였다(Table 1). CV-5는 표시사항에 정확한 철갑상어 종이 쓰여있지않아 판별이 어려웠다(Table 1). CV-3, 6은 *A. ruthenus*에 대해 유전자 상동성이 99.75-100%가 나와 세브루가 캐비어로 확인되었다(Table 1). CV-4는 *H. dauricus*에 대해 유전자 상동성이 100%가 나와 칼루가 캐비어로 확인되었다(Table 1). CV-8은 *A. stellatus*에 대해 유전자 상동성이 99.62-100%가 나와 스털렛 캐비어로 확인되었다(Table 1).

KASP 분석 결과, Acipenser-16S는 10개의 캐비어 모두에서 FAM 형광이 확인되어 모두 철갑상어 알로 판정되었다(Fig. 2, Table 4). 그리고 CV-1, 2, 5, 8, 9, 10은 Acipenser-16S와 Osetra-A에서 FAM 형광이 확인되어 오세트라 종류의 캐비어로 판정하였다(Fig. 2, Table 4). CV-3, 6은 Acipenser-16S와 Sterlet-A, Sterlet-B에서 FAM 형광이 확인되어 *A. ruthenus*에서 유래한 세브루가 캐비어로 판정하였다(Fig. 2, Table 4). CV-4는 Acipenser-16S와 Kaluga-A, Kaluga-B에서 FAM 형광이 확인되어 *H. dauricus*에서 유래한 칼루가 캐비어로 판정하였다(Fig. 2, Table 4). CV-7은 Acipenser-16S와 Sevruga-A, Sevruga-B에서 FAM 형광이 확인되어 *A. stellatus*에서 유래한 세브루가 캐비어로 판정하였다(Fig. 2, Table 4).

캐비어 제품에 표기된 철갑상어 종과 실험을 통한 캐비어 종류 판정결과를 비교했을 때 2개의 제품에서 제품에 표기된 종과 판정된 종이 다른 것으로 확인되었다(Table 5). CV-5는 벨루가 캐비어로 판매되었지만 BLAST 결과와 KASP 결과로 오세트라 캐비어로 판정되었고, CV-6은 오

Table 3. FAM/HEX positive oligo sequence

Marker	FAM positive oligo	HEX positive oligo
Acipenser-16S	ATGGCATAACGAGGGCTCAACTGTCTCCTTTTTCCAGTCAGTGAAATTGAC CTGCTCGTGCAGAGGCGAGCATAACCCCATAAGACGAGAAGACCCTATGG	ATGGCATAACGAGGGCTCAACTGTCTCCTTTTTCCAGTCAGTGAAATTGAT CTGCTCGTGCAGAGGCGAGCATAACCCCATAAGACGAGAAGACCCTATGG
Beluga-A	TCATACCTTCAAAAAGAAACCTGAAACATCGGAGTAATCCTCCTGCTC CTTACCATAATAACCGCCTTCGTAGGGTATGTACTGCCCTGGGGA-CAAATATC	TCATACCTTCAAAAAGAAACCTGAAACATCGGAGTAATCCTCCTGCTC CTCACCATAATAACCGCCTTCGTAGGGTATGTACTGCCCTGGGGA-CAAATATC
Beluga-B	CTAAATCAAACAGCCTTTATTACCTCACGACCAGGGGTTTATTATGGCC AGTGCTCTGAAATCTGCGGAGCTAACCACAGCTTCATACCAATTG-TAGTCGA	CTAAATCAAACAGCCTTTATTACCTCACGACCAGGGGTTTATTATGGCC AATGCTCTGAAATCTGCGGAGCTAACCACAGCTTCATACCAATTG-TAGTCGA
Kaluga-A	TTCTTTATAGTAATACCCATCATAATTGGCGGATTCGGAAACTGACTAGT GCCCCTAATAATTGGAGCCCCAGACATGGCATTCCCTCGCATAAA-CAATAT	TTCTTTATAGTAATACCCATCATAATTGGCGGATTCGGAAACTGACTAGT CCCCCTAATAATTGGAGCCCCAGACATGGCATTCCCTCGCATAAA-CAATAT
Kaluga-B	CGCATAAACAATATGAGCTTCTGGCTCCTACCCCCATCCTTCCTACTCCTCT TGGCCTCCTCTGGGGTAGAGGCCGGGGCCGGCACAGGGTGAACTGTTTA	CGCATAAACAATATGAGCTTCTGGCTCCTACCCCCATCCTTCCTACTCCTTT TGGCCTCCTCTGGGGTAGAGGCCGGGGCCGGCACAGGGTGAACTGTTTA
Severuga-A	CCCCTGTTTGTGTGATCTGTATTAATCACAGCCGTACTTCTCCTATTATC GCTACCAGTGCTAGCTGCAGGGATCACAATACTCCTAACAGAC-CGAAATTT	CCCCTGTTTGTGTGATCTGTATTAATCACAGCCGTACTTCTCCTATTATC ACTACCAGTGCTAGCTGCAGGGATCACAATACTCCTAACAGAC-CGAAATTT
Severuga-A	ATTAAAGCTATGGGACACCAATGATACTGAAGTTATGAGTATACGGACT ACGAAGACCTGGGCTTCGACTCCTACATAATCCCTACACAAGACCTCG-CCCC	ATTAAAGCTATGGGACACCAATGATACTGAAGTTATGAGTATACGGACT ATGAAGACCTGGGCTTCGACTCCTACATAATCCCTACACAAGACCTCG-CCCC
Sterlet-A	TTAATCGGGTGATGATACGGACGCGCAGATGCCAACACCGCCGCCTTA CAGGCAGTTATTTACAACCGGGTAGGAGATATTGGACTAATTCTTAG-CATAGC	TTAATCGGGTGATGATACGGACGCGCAGATGCCAACACCGCCGCCTTA CAAGCAGTTATTTACAACCGGGTAGGAGATATTGGACTAATTCTTAG-CATAGC
Sterlet-B	ACACCTTTATTTGTGTGATCTGTATTAATCACGGCCGTACTTCTCCTACT CTCACTGCCAGTGCTAGCTGCGGGAATCACAATGCTCCTAACAGAC-CGAAA	ACACCTTTATTTGTGTGATCTGTATTAATCACGGCCGTACTTCTCCTACT ATCACTGCCAGTGCTAGCTGCGGGAATCACAATGCTCCTAACAGAC-CGAAA
Osetra-A	TTTCTTGCAATACACTACACAGCTGACATTTCAACAGCCTTCTCCTYTR TTGCCCACATCTGCCGAGACGTAAATTACGGATGACTAATC-CGAAATATTCA	TTTCTTGCAATACACTACACAGCTGACATTTCAACAGCCTTCTCCTYTR TCGCCCACATCTGCCGAGACGTAAATTACGGATGACTAATC-CGAAATATTCA
Osetra-B	GGACAAATGTCATTTTGAGGGGCAACCGTAATCACTAACCTCCTCTCCGCT TTCCCGTACATCGGCGACACACTAGTTCAATGAATCTGAGGCGGCTTTTC	GGACAAATGTCATTTTGAGGGGCAACCGTAATCACTAACCTCCTCTCCGCC TTCCCGTACATCGGCGACACACTAGTTCAATGAATCTGAGGCGGCTTTTC

Table 4. Results of KASP analysis on caviar products

Marker \ Sample No.	CV1	CV2	CV3	CV4	CV5	CV6	CV7	CV8	CV9	CV10
Acipenser-16S	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM	FAM
Beluga-A	N/D[1)]	HEX	HEX	N/D	HEX	HEX	HEX	HEX	N/D	HEX
Beluga-B	HEX	HEX	HEX	N/D	HEX	HEX	N/D	HEX	N/D	HEX
Kaluga-A	HEX	HEX	HEX	FAM	HEX	HEX	HEX	HEX	N/D	N/D
Kaluga-B	N/D	HEX	HEX	FAM	HEX	HEX	HEX	HEX	N/D	N/D
Severuga-A	N/D	N/D	FAM	N/D	N/D	FAM	N/D	N/D	N/D	N/D
Severuga-B	HEX	HEX	FAM	HEX	HEX	FAM	HEX	N/D	HEX	HEX
Sterlet-A	HEX	HEX	N/D	HEX	HEX	N/D	FAM	HEX	HEX	HEX
Sterlet-B	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	FAM	HEX	N/D	HEX
Osetra-A	FAM	FAM	HEX	HEX	FAM	HEX	HEX	FAM	FAM	FAM
Osetra-B	N/D	HEX	N/D	N/D	HEX	N/D	N/D	HEX	HEX	N/D

[1)] N/D = not detected.

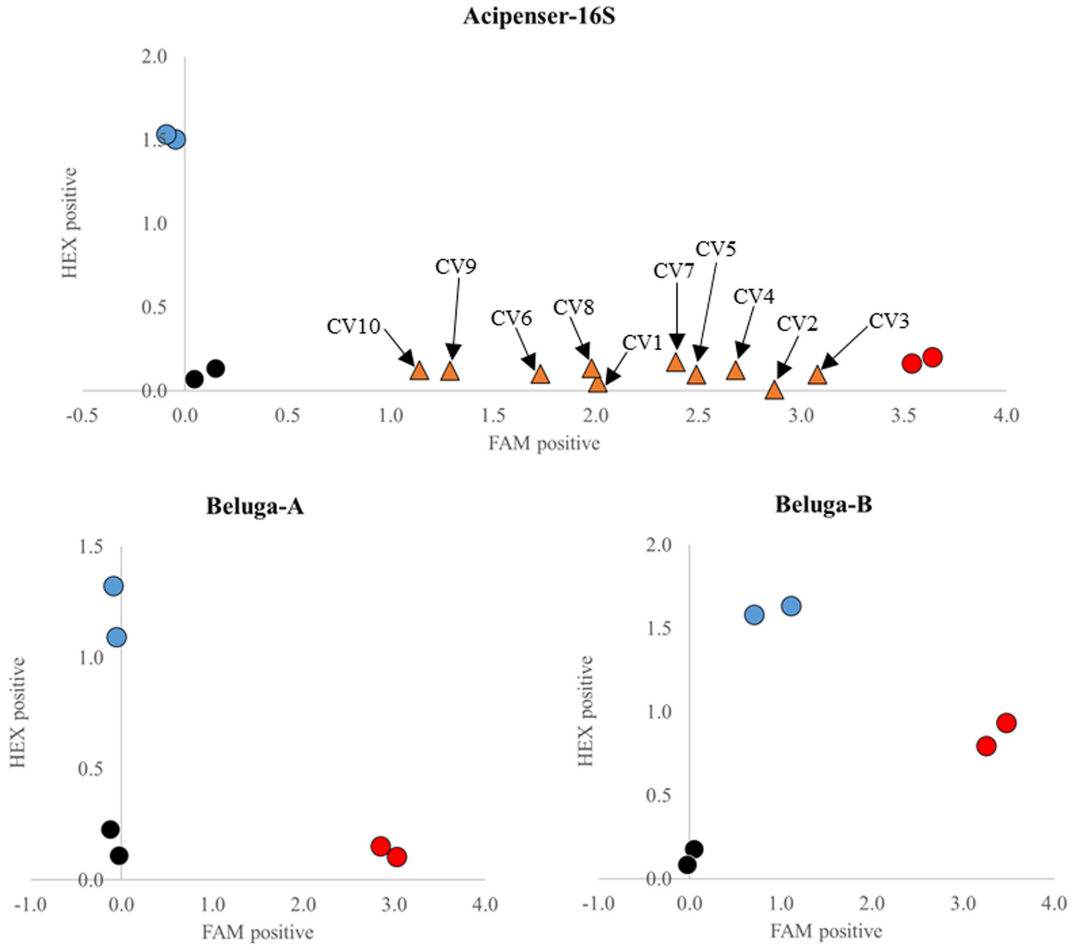

Fig. 2. Endpoint fluorescence scatter plot with 11 KASP markers.
The marker name was indicated on the top of each plot. The X and Y axis represent the FAM (465-510nm) and HEX (533-580nm) values. The black dot represent negative control (DW). The red dot represent FAM positive oligo. The blue dot represent HEX positive oligo. The orange triangle represent caviar sample which emit FAM fluorescence signal on each marker.

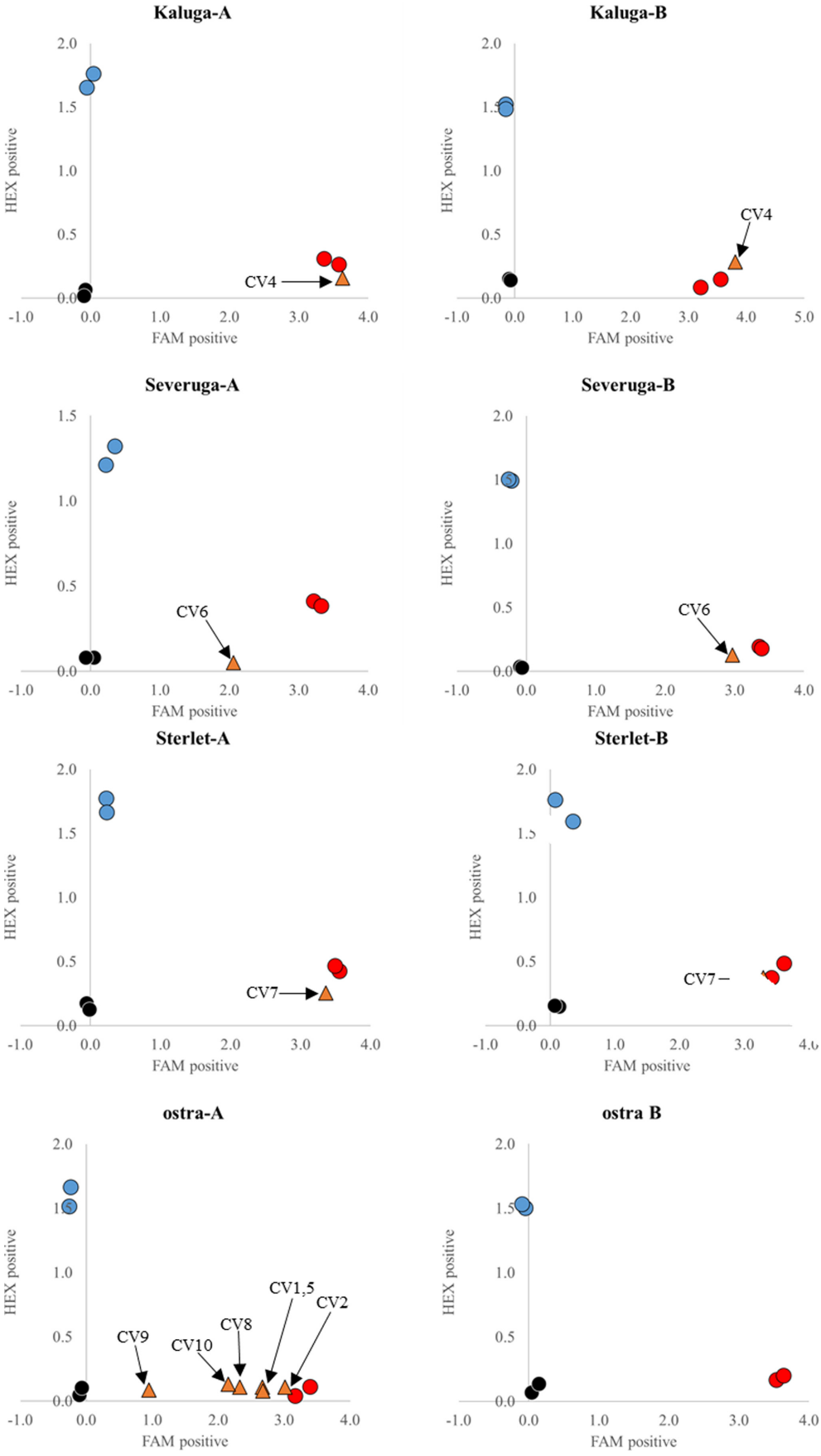

Fig. 2. (Continued) Endpoint fluorescence scatter plot with 11 KASP markers.

Table 5. Comparison of labeling information and BLAST, KASP results

Sample	Labeled grade	BLAST	KASP	Labeling compliance
CV1	Osetra	Osetra	Osetra	Agreement with labeled
CV2	Osetra	Osetra	Osetra	Agreement with labeled
CV3	Sevruga	Sevruga	Sevruga	Agreement with labeled
CV4	Kaluga	Kaluga	Kaluga	Agreement with labeled
CV5	Beluga	Osetra	Osetra	Mislabeled
CV6	Osetra	Sevruga	Sevruga	Mislabeled
CV7	Sterlet	Sterlet	Sterlet	Agreement with labeled
CV8	Osetra	Osetra	Osetra	Agreement with labeled
CV9	Osetra	Osetra	Osetra	Agreement with labeled
CV10	Osetra	Osetra	Osetra	Agreement with labeled

세트라 캐비어로 판매되었지만 BLAST 결과와 KASP 결과로 세브루가 캐비어로 판정되었다(Table 5). 이는 육안으로 캐비어의 종을 판별하기 어렵다는 점을 이용해 비싼 종으로 속여 판매하는 것으로 불량식품에 해당하며 제조 단가를 낮춰 부당 이득을 취하기 위해 제조된 것으로 사료된다.

이처럼 시중에 유통되는 캐비어의 제품을 구매하여 분석하였을 때 캐비어 종류를 속여 판매한 사례가 해외에서도 보고되었다[13-16]. Birstein 등[13]에 따르면 1995년 12월과 1996년 4월 미국 시장에서 유통중인 95개 캐비어를 분석한 결과 17%가 철갑상어 종이 잘못 표기된 것을 보고하였다. 2000년 멸종위기에 처한 야생 동·식물 종의 국제거래에 관한 협약(the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES)회의에서 표준화된 라벨 제도를 소개된 이후 2004년 1월부터 모든 나라에서 생산된 철갑상어는 상업 여부와 유통 규모에 상관없이 포장지에 철갑상어 종, 수확 년도, 수확 국가, 가공공장번호, 제조 식별 번호 등을 명시하도록 하였다[14]. 하지만 Doukakis 등[15]에 따르면 미국 뉴욕에서 유통중인 캐비어 92개에 대해 유전자 분석한 결과, 10%의 제품에서 철갑상어 종이 오표기되어 여전히 판매되었다고 보고하였다. 두 연구 모두 미국 뉴욕에 유통되는 캐비어 중 10% 이상의 제품에서 철갑상어 종 오표기를 확인하였으며 오세트라 캐비어를 벨루가로, 오세트라 캐비어가 세브루가로, *Polyodon spathula*를 세브루가 캐비어로 속여 부당 이득을 취할 목적으로 판매한 것으로 사료된다. Ludwig 등 [16]에 따르면 2011년 4월부터 2012년 2월까지 루마니아와 불가리아에서 유통된 27개 캐비어 중 4개의 제품에서 CITES 라벨과 실제 철갑상어 종이 다르며, 이 역시 오세트라 캐비어를 스털렛이나 벨루가로 속여 부당이득을 취한 것으로 사료된다. 그 외에 4개의 제품은 철갑상어의 알이 아닌 모조품(caviar substitute)으로 판정이 났다. Pappalardo 등[17] 에 따르면 2018년 이탈리아에서 온라인 마켓을 통해 유통중인 14개의 캐비어 제품을 분석한 결과 4개의 제품에서 철갑상어가 아닌 *Mallotus villosus* (열빙어)와 *Eumicrotremus orbis*로 판정되어 캐비어 대체품이 캐비어로 둔갑해 비싸게 팔리고 있다고 보고하였다. 이번 연구를 통해서 한국에서도 더 비싼 값으로 판매되고 있는 철갑상어 종으로 둔갑하여 판매되는 제품들이 이미 유통되고 있음을 확인하였고 한국에서의 캐비어의 소비가 증가할수록 철갑상어 종을 속여 비싸게 판매하거나 철갑상어가 아닌 것을 캐비어로 속여 판매하는 불량식품의 유통이 증가할 것으로 예상된다.

본 연구를 통해서 개발된 KASP 마커를 이용한 철갑상어의 종판별 결과는 염기서열 분석을 통한 종판별 결과와 일치한다. 또한 분석 속도가 빠르며 2개 이상의 DNA가 섞여있는 제품에서도 유전자 분석이 가능하다는 장점이 있다. 염기서열 분석을 위해서는 약 2시간의 PCR 증폭 후 전기영동을 통한 PCR 확인, Sequencing, BLAST의 과정을 거쳐 종을 판별하지만, KASP 분석의 경우 약 1시간 30분의 PCR 증폭이 끝나면 바로 형광값으로 종판별이 가능하다. 또한 KASP 분석은 근연종이 섞여있는 경우에도 형광값으로 분석이 가능한데, 예를들어 *A. ruthenus*에서 유래한 캐비어와 *A. gueldenstaedtii*에서 유래한 캐비어가 섞여 있는 경우 두개 모두 Acipenser 속 철갑상어에서 유래했기 때문에 PCR 결과가 단일 밴드로 확인될 가능성이 높다. 또한 두개의 PCR 증폭산물이 하나의 튜브에 섞여있기 때문에 염기서열 분석시 두개의 염기서열이 섞여 Quality score가 떨어질 수 있다. 하지만 KASP 분석에서는 표적하는 표현형 2개에 대해 각각의 형광값으로 표지되었기 때문에 유전자가 섞여있어도 분석이 가능하다. 예시를 들은 *A. ruthenus*에서 유래한 캐비어와 *A. gueldenstaedtii*에서 유래한 캐비어가 섞여 있는 경우 KASP 분석에서는 Acipenser-16S에서 FAM, Severuga-A에서 FAM, Severuga-B에서 FAM과 HEX 형광이 함께 확인되고, Osetra A 마커에서 FAM이 확인되어 해당 샘플에는 오세트라 캐비어와 세브루가 캐비어가 섞여있다고 알 수 있다. 향후 본 연구에서 검증된 철갑상어 종 특이 KASP

마커가 불량 또는 모조 캐비어 유통 근절을 위한 과학적 근거로 활용될 수 있을 것으로 평가되어진다.

Acknowledgement

본 연구는 2021년와 2023년도 식품의약품안전처의 연구개발비(21201분석연307, 23211분석연241)로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

캐비어에 대한 수요가 증가하면서 캐비어 종류의 진위여부를 확인 할 수 있는 분석법 마련이 필요해졌다. 본 연구에서는 캐비어 종류을 나누는 철갑상어 종 특이 KASP 마커를 개발하였고 모니터링을 통해 국내 유통중인 불법 캐비어 제품을 확인하고자 하였다. 본 연구에서는 *16S ribosomal RNA gene, cytochrome b gene, cytochrome c oxidase subunit I gene, cytochrome c oxidase subunit II gene, NADH dehydrogenase subunit 5 gene*에서 철갑상어 종 특이적인 SNP를 선정하고 이를 표적하는 KASP 마커 11종을 개발하였다. 개발한 KASP 마커를 이용하여 한국의 온라인 마켓에서 유통중인 캐비어 10종을 모니터링 분석한 결과 2개의 제품에서 제품에 표기된 철갑상어 종과 다른 것으로 확인하였으며 두 제품 모두 실제보다 더 비싼 캐비어로 둔갑하여 판매한 것으로 확인되었다. 본 연구를 통해 제작한 KASP 분석방법으로 유통되는 캐비어 종류 분류가 가능하였고 모니터링을 통해 국내 유통되고 있는 불법 캐비어 제품도 확인하였다. 이에 따라 본 연구에서 개발한 SNP기반 KASP 분석법으로 불법 캐비어 제품 유통 근절에 기여 할 수 있을 것으로 기대한다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Sun Hee Lee https://orcid.org/0000-0002-8431-0289
Bo Reum Park https://orcid.org/0000-0003-4082-8956
Hyungil Kim https://orcid.org/0000-0002-8119-8674
Sooyeul Cho https://orcid.org/0000-0001-6513-5879
Kyung-Hun Son https://orcid.org/0009-0008-0060-8936

References

1. Ishihara, A., Kanari, K., Saito, T., Takahashi, S., 2010. The State of Wildlife Trade in Japan. TRAFFIC East Asia-Japan, Tokyo, Japan.
2. Eurpean Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products (EUMOFA), 2021. The caviar market. Production, trade, and consumption in and outside the EU, EUMOFA, Brussels, Belgium.
3. Bronzi, P., Rosenthal, H., Present and future sturgeon and caviar production and marketing: a global market overview. *J. Appl. Ichthyol.*, **30**, 1536-1546 (2014).
4. Caviar Star, (2024, June 12). Why is caviar so expensive? How much is caviar? Caviar's real price. Retrieved from https://caviarstar.com/blog/why-is-caviar-so-expensive-how-much-is-caviar-caviars-real-price/
5. Korea Maritime Institute Overseas Market Research Center, (2024, June 12). Seafood statistics HS code 1604310000. Retrieved from https://kfishinfo.co.kr/kor/view.do?no=626#none
6. Tavakoli, S., Luo, Y.K., Regenstein, J.M., Daneshvar, E., Bhatnagar, A., Tan Y., Hong H., Sturgeon, caviar, and caviar substitutes: From production, gastronomy, nutrition, and quality change to trade and commercial mimicry. *Rev. Fish. Sci. Aquac.*, **29,** 753-768 (2021).
7. Kim, M.J., Hong, Y., Kim, H.Y., Authentication of foods from animal origins using gene analysis. *Food Sci. Ind.*, **47**, 13-19 (2014).
8. Ludwig, A., Identification of Acipenseriformes species in trade. *J. Appl. Ichthyol.*, **24**, 2-19 (2008).
9. Park, B.R., Lee, S.H., Han, K.M., Hwang, J.W., Kim, H.I., Baek, S.Y., Development and utilization of KASP markers for the identification of three types of Ephedra herbs. *Korean J. Pharmacogn.*, **53**, 226-233 (2022).
10. He, C., Holme, J., Anthony, J., SNP genotyping: the KASP assay. *Methods Mol. Biol*, **1145**, 75-86 (2014).
11. Steele, K., Tulloch, M.Q., Burns, M., Nader, W., Developing KASP markers for identification of basmati rice varieties. *Food Anal. Methods*, **14**, 663-673 (2021).
12. Zhang, Y., Liang, D., Huang, H., Yang, Z., Wang, Y., Yu, Y., Liu, L., Zhang, S., Han, J., Xiao, W. Development and application of KASP assays for rapid screening of 8 genetic defects in Holstein cattle. *J. Dairy Sci.*, **103**, 619-624 (2020).
13. Birstein, V.J., Doukakis, P., DeSalle, R., Molecular phylogeny of Acipenserinae and black caviar species identification. *J. Appl. Ichthyol.* **15**, 12-16 (1999).
14. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, 2018. Conservation of and trade in sturgeons and paddlefish. Resolution Conf. 12.7 (Rev. CoP17), Geneva, Switzerland.
15. Doukakis, P., Pikitch, E.K., Rothschild, A., DeSalle, R., Amato, G., Kolokotronis, S.O., Testing the effectiveness of an international conservation agreement: marketplace forensics and CITES caviar trade regulation. *PLoS One*, **7**, e40907 (2012).
16. Ludwig, A., Lieckfeldt, D., Jahrl, J., Mislabeled and counterfeit sturgeon caviar from Bulgaria and Romania. *J. Appl. Ichthyol.*, **31**, 587-591 (2015).
17. Pappalardo, A.M., Petraccioli, A., Capriglione, T., Ferrito, V., From fish eggs to fish name: caviar species discrimination by COIBar-RFLP, an efficient molecular approach to detect fraud in the caviar trade. *Molecules*, **24**, 2468 (2019).