



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

미토콘드리아 DNA에 근거한 두족류
종 판별을 위한 초고속 PCR 분석법의
개발 및 검증

2017년 8월 25일

부경대학교 산업대학원

미생물학과

이혜정

이학석사 학위논문

미토콘드리아 DNA에 근거한 두족류
종 판별을 위한 초고속 PCR 분석법의
개발 및 검증

지도교수 김 군 도

이 論文을 이해정 碩士學位論文으로 提出함

2017년 8월 25일

부경대학교 산업대학원

미생물학과

이 해 정

이혜정의 이학석사 학위논문을 인준함.

2017년 6월 21일

주심 이학박사 김 경 호 (인)

위원 이학박사 전 용 재 (인)

위원 이학박사 김 군 도 (인)

목 차

List of Table.....	ii
List of Figures.....	iii
영문초록.....	iv
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
1.1. 시료 준비	5
1.2. Genomic DNA 추출 및 정제	7
1.3. 두족류 primer design	7
1.4. 일반 PCR 조건	8
1.5. 실시간 고속 PCR 및 유전자형 분석	10
III. 결과 및 고찰	12
1.1. 두족류 6종의 종 특이 영역 탐색	12
1.2. 종 특이 프라이머를 이용한 두족류 시료의 확인	12
1.3. 두족류 qPCR 분석	20
1.4. 두족류 Ultra-Fast PCR 분석	24
1.5. 고찰	28
IV. 요약	30
V. 참고문헌	32

List of Table

Table 1. 일반 PCR 및 실시간 고속 PCR에 사용된 프라이머 세트 9

Table 2. PCR 반응 조건 11



List of Figures

Figure 1. 주꾸미속 <i>Amphioctopus</i> 사진	2
Figure 2. 대표적인 두족류 사진	6
Figure 3. 두족류에 대한 Mitochondrial DNA의 염기서열 분석 결과	14
Figure 4. Genomic DNA를 추출하여 PCR 수행 결과	17
Figure 5. Mitochondria 16s rRNA gene을 이용한 계통수 분석	18
Figure 6. Mitochondria COI gene을 이용한 계통수 분석	19
Figure 7. 두족류 종 판별의 Real-time PCR 결과	20
Figure 8. 두족류 종 판별의 Ultra-Fast PCR 결과	24

Development and Validation of Ultra Fast PCR based Assay to Determine Cephalopods Based on Mitochondrial DNA

Department of Microbiology Hye Jeong Lee
Directed by Professor Gun-Do Kim

In this study, single PCR, real time PCR and Ultra-Fast PCR were examined for identification of six types of Cephalopod (Two skin Webfoot octopus, One skin Webfoot octopus, Long arm octopus, *Octopus vulgaris*, Japanese common squid, *Loligo chinensis*) purchased from markets.

To design the species-specific PCR primers difference the nucleotide sequence of the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I (COI) genes of Two skin Webfoot octopus, One skin Webfoot octopus, Long arm octopus, *Octopus vulgaris*, Japanese common squid and *Loligo chinensis* was analyzed for the identification of each species registered in the GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) and has been analyzed.

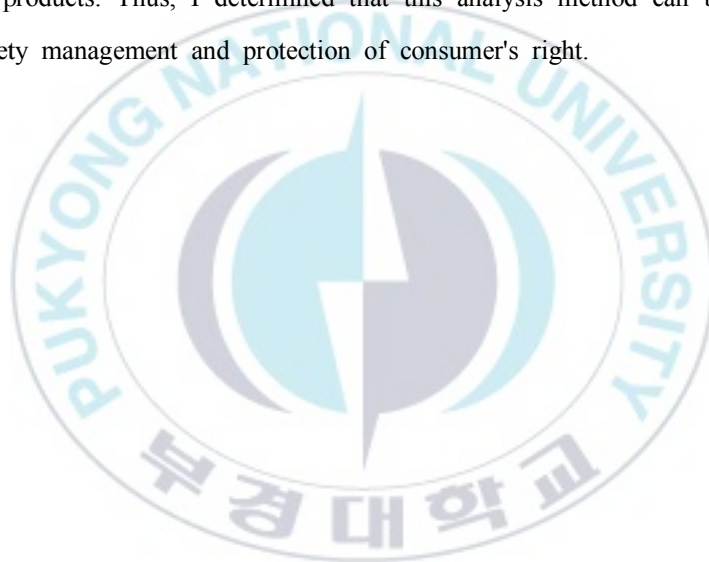
In order to obtain the size variation of amplified fragments through Ultra-Fast PCR, I designed COI (Am_COI_2-1), COI (Af_COI_2-1), COI (Om_COI_2), COI (Tp_COI_3), 16S rRNA (*Octopus vulgaris*), 16S rRNA (*Loligo chinensis*) primers for each species. The optimal PCR conditions and primers were selected for six types of Cephalopod to determine target base sequence in its PCR products.

In the case of ordinary PCR, Two skin Webfoot octopus was only amplified by COI (Am_COI_2-1), One skin Webfoot octopus was only amplified by COI (Af_COI_2-1), Long arm octopus was only amplified by COI (Om_COI_2), Japanese common squid was only amplified by COI (Tp_COI_3), *Octopus vulgaris* was only amplified by 16s rRNA (Ov) and *Loligo chinensis* was only amplified by 16s rRNA (Lc) primer.

As a result, 85, 100, 97, 135, 81 and 168 bp of specific PCR products were

confirmed for each major material such as Two skin Webfoot octopus, One skin Webfoot octopus, Long arm octopus, Japanese common squid, *Octopus vulgaris* and *Loligo chinensis* respectively. The method using species specific primers developed in this study can be easily performed on distinguishing 6 types of Cephalopod and it takes in less than 30 minutes.

I developed diagnostic PCR primer sets for the Ultra-Fast PCR to discriminate 6 different Cephalopod that can run an analysis within 30 minutes and this system is very prompt and precise that it can be applied to not only the living organism but also marine products. Thus, I determined that this analysis method can be utilized for the food safety management and protection of consumer's right.



I. 서론

한국농촌경제연구원의 식품수급표[1]와 통계청의 어업생산통계조사[2] 등에 따르면 우리나라 1인당 수산물 소비량은 2009년 49.8 kg에서 2014년 1인당 수산물 소비량 58.9 kg로 늘어난 수치를 보이고 있다[3]. 해양수산부의 수산정보포털[4]에서 두족류 소비 패턴을 살펴보면 이 역시 꾸준히 증가하고 있는 추세이다.

두족류 중 봄철 대표 수산물중 하나인 주꾸미는 서해안에서 어획량이 크게 줄어 가격이 높아져 수입률이 증가하고 있는 실정으로 국산 주꾸미 어획량은 지난 2007년부터 2010년까지 4천 톤 이상을 유지했으나, 2012년에는 3,415톤 2013년에는 2,340톤, 2014년에는 2,525톤, 2015년에는 2,232톤, 2016년에는 2,312톤[5] 등으로 연간 어획량이 2천 톤 대에 머물고 있다. 이처럼 최근 10년 사이 주꾸미 수요는 늘고 있는데, 국내산 어획량은 약 70% 급감하여 동남아 일대 및 중국에서 주꾸미를 수입하여 요구 물량을 대체하고 있는 추세이며, 주로 가공 또는 절편 형태로 수입되고 있다.

주꾸미(*Amphioctopus fischer*)는 낙지(*Octopus minor*), 돌문어(*Octopus vulgaris*), 문어(*Octopus dofleini*)와 함께 두족강(*Cephalopoda*), 문어목(*Octopoda*), 문어과(*Octopodidae*)에 속하는 두족류로써, 우리나라 남서해안 및 동남아시아 (중국, 태국, 베트남, 인도네시아)에서 출현한다.

주꾸미속(*Amphioctopus*)은 팔의 길이는 외투장의 2-3배 정도이고, 팔의 길이는 유사하거나 옆쪽 팔이 등쪽 팔에 비하여 길고 강건하다. 등쪽 완간막의 깊이는 다른쪽 완간막에 비하여 얇다[6].



Figure 1. 주꾸미속 *Amphioctopus* 사진

주꾸미는 원스킨(One skin)과 투스킨(Two skin)으로 구분되는데, One skin 주꾸미 (*Amphioctopus fangsiao*)는 한국 연안에서 출현하고, 중국, 베트남에서도 주요 수출되며 완장비는 $3 > 4 = 2 > 1$ 이고, 외투 등 면에 나타나는 4-6개의 갈색 세로줄과 양 눈 사이에 백색 반점의 특징이 있다. Two skin 주꾸미 (*A. marginatus*)는 베트남이나 태국에 수출이 가능한 종으로 체표면은 실핏줄 모양의 무늬를 이루고, 양 눈 사이 $\wedge$ 무늬가 거치상이다. 또한 팔 가장자리에 검은 세로줄 띠가 있고, 대부분 외투 등 면에 연한 백색 세로띠가 없다[6].

그러나 가공 및 절편의 형태로 수입되는 주꾸미류의 경우 형태학적으로 One skin과 Two skin 주꾸미를 구별할 수 없다. 이 뿐만 아니라 절편된 Two skin 주꾸미의 경우 낙지, 오징어류와도 구별이 힘들기 때문에 절편된 Two skin 주꾸미를 이용하여 가짜식품(Economically Motivated Adulteration, EMA food) 제조에 이용되는 사례가 발생하고 있다.

또한 사회적으로 수산물의 안전성을 위협하는 일들이 많이 발생하고 있다. “페루산 오징어 다리 52톤을 문어 다리와 유사하게 가공한 후 ‘초밥용 문어다리’로 둔갑하여 판매한 사례 (2009.8.12. 매일경제)” 와, “수입산 낙지와 주꾸미를 ‘국내산

둔갑'이라고 속여 전국의 초·중·고등학교에 급식재료로 납품한 사례 (2015.7.30. MBC뉴스)" 등을 예로 들 수 있다. 이는 수산물에 대한 소비자 불신을 증대시키고 신뢰를 형성하지 못하게 함으로써, 소비자들이 마음 놓고 관련 수산물들을 먹을 수 없는 상황까지 초래했다[7].

이에 소비자를 기만하는 행위 근절을 위하여 검사지침 마련이 요구되어 식품의약품안전처에서는 2014년 식품 중 사용원료 진위 판별 지침서(IV)를 통해 PCR (Polymerase Chain Reaction)을 이용한 동물 및 식물성 원료 중 164종에 대한 판별법을 수록하였으며[8], 두족류에 해당하는 오징어, 한치, 주꾸미, 낙지에 대한 판별법을 마련하였다. 종 판별을 위한 유전자 증폭에는 일반 프라이머(universal primer)를 이용하는 방법[9-12]과 종 특이 프라이머(species-specific primer)를 이용하여 종을 판별하는 방법[13, 14]이 있는데, 일반 프라이머의 경우 대부분 PCR 산물의 크기가 650 bp 이상으로 가공식품에 적용하기에 한계가 있다[15].

국외에서도 미토콘드리아 16S rRNA, cytochrome b, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) PCR을 이용한 두족류의 종 판별 연구가 보고되고 있으나 [16-18], 이것은 single PCR에 대한 조건으로, 증폭산물의 size variation이 고려되지 않은 universal primer를 이용한 증폭에 기반한 것이다. 따라서 이러한 방법으로 종 판별을 하기 위해서는 최종적으로 유전자 염기서열 분석과정을 거쳐야하기 때문에 많은 시간과 비용이 소모된다. 특히 RFLP PCR의 경우 재현성이 낮아 신뢰도가 떨어지는 문제점[19]과 현장 적용이 어려워 실시간으로 분석할 수 없는 단점이 있고, PCR 증폭산물을 아가로스 겔 상에서 판별해야 하는 등 여러 번거로움이 있다.

Real-time PCR 기기는 PCR 반응 중 온도의 증감에 소요되는 시간이 길고, PCR 반응액의 양이 20 μ l 이상으로 많아 PCR 과정에서 빠른 온도변화를 저해하는 요인으로 작용하며, 반응액 내부온도 불균형에 의하여 annealing 효과를 감소시킴으로써 비특이적인 생산물을 합성하는 요인으로도 지적되고 있다[20]. 최근, 이러한 단점을 보완하기 위하여 전용 3차원 마이크로플루이딕 폴리머칩을 사용하여 PCR의 분석에 소요되는 시간을 극단적으로 단축시키고, PCR 반응액의 양을 10 μ l 이하 수준으로 감소시킨 Ultra-Fast PCR 기법이 개발되었다[21, 22].

Ultra-Fast PCR system은 특수한 폴리머 칩(Rapi:chip)을 사용함으로써 일반적인 튜브를 사용하는 경우보다 PCR 반응액의 빠른 열전달이 가능하며, 유전자 증폭 메커니즘은 8 °C/sec의 초고속 가열, 냉각으로 12분 이내에 30 cycle의 PCR 반응을 성공적으로 수행하도록 하여 PCR의 정성분석 결과를 확인 할 수 있게 해준다. 또한 형광분석 모듈을 통해 유전자 증폭 과정에서 발현되는 형광을 실시간으로 감지, 기록함으로써 Ultra-Fast PCR의 소프트웨어를 통해 실시간으로 반응 과정을 관찰, 분석할 수 있게 해준다. 콤팩트하고 휴대하기 쉬운 디자인을 가지고 있어 편리한 위치에 휴대할 수 있으며, 차량 전원 연결 키트를 장착하여 차량 전원에 연결 할 수 있다. 이에 따라 시료가 존재하는 현장으로 이동하여 시료 수집 및 필요한 준비 과정 직후에 현장에서 현장 PCR작업을 수행할 수 있는 큰 장점이 있다.

따라서 본 연구에서는 미토콘드리아 DNA 염기서열의 16s rRNA, Cytochrome C Oxidase subunit I (COI) 유전자 분석법을 통하여 두족류에 해당하는 Two skin 주꾸미(*Amphioctopus marginatus*), One skin 주꾸미(*Amphioctopus fangsiao*), 낙지(*Octopus minor*), 살오징어(*Todarodes pacificus*), 돌문어(*Octopus vulgaris*), 한치꼴뚜기(*Loligo chinensis*)의 유전자 분석을 통해 종 특이 프라이머를 제작하였고, 상기 문제점을 극복하기 위해 현장에서 적용이 가능한 Ultra-Fast PCR 시스템을 이용하여 30분 내에 6종의 두족류 품종 판별이 가능한 시스템을 연구하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1.1. 시료 준비

재료는 수산물 수입업체로부터 베트남에서 수입되는 절단주꾸미(Two-skin 주꾸미, *Amphioctopus marginatus*), 부산 부전시장에서 유통되는 국내산 주꾸미(One-skin 주꾸미, *Amphioctopus fangsiao*), 국내산 낙지(*Octopus minor*), 국내산 살오징어 (*Todarodes pacificus*), 국내산 돌문어(*Octopus vulgaris*) 국내산 한치꼴뚜기(*Loligo chinensis*)를 사용하였으며, 각 품종별 10 개체씩의 다리 조직을 채취하여 시료로 사용하였다.



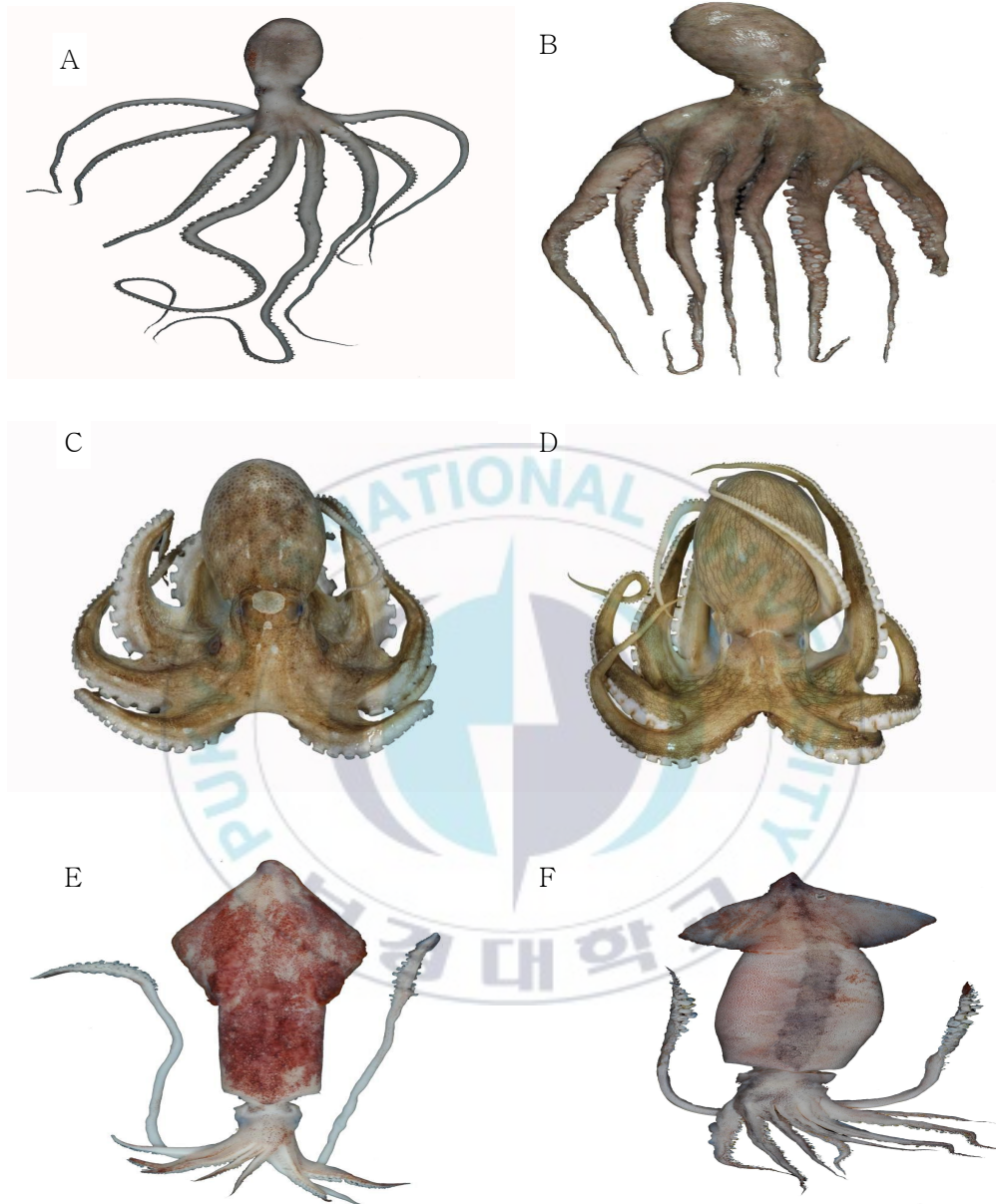


Figure 2. 대표적인 두족류[5]. (A) *Octopus minor*, (B) *Octopus vulgaris*, (C) *Amphioctopus fangsiao*, (D) *Amphioctopus marginatus*, (E) *Loligo chinensis*, (F) *Todarodes pacificus*

1.2. Genomic DNA 추출 및 정제

(주)바이오니아에서 판매되는 genomic DNA extraction kit를 이용하여 genomic DNA 추출하는 방법과, Phenol-chloroform법을 이용하여 추출하였다. 각 샘플의 다리 근육 약 1 g을 파쇄하여 튜브에 담고, 2 mL의 0.1 N NaOH를 첨가한다. Homogenizer로 시료를 파쇄한 후 99℃에서 3분간 incubation 시킨다. 600 µL 상층액을 채취하여 새로운 튜브에 담은 후 동일 부피의 Phenol-chloroform을 첨가한다. 0.1 부피의 3 M sodium acetate를 첨가한 후 동일 부피의 ice-cold absolute ethanol (100%)를 첨가하여 -80℃에서 10분간 incubation한 다음 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후 침전물을 건조하여 ethanol을 제거한 후 20 µL TE buffer로 용해시켜 사용한다.

1.3. 두족류 Primer design

중 특이 프라이머를 설계하기 위하여 미국 국립보건원에서 운영하는 유전자은행 National Center for biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov)에 등록되어 있는 One skin 주꾸미(*Amphioctopus fangsiao*), Two skin 주꾸미(*Amphioctopus marginatus*), 낙지(*Octopus minor*), 돌문어(*Octopus vulgaris*), 살오징어(*Todarodes pacificus*), 한치꼴뚜기(*Loligo chinensis*)의 미토콘드리아 DNA의 16S rRNA gene 부위와 Cytochrome C Oxidase subunit I (COI) gene의 염기서열을 수집하였다. 수집된 염기서열을 비교하여 종 특이적인 부분을 대상으로 primer를 디자인하여 사용하였으며, 이들의 염기서열은 Table 1과 같다.

1.4. 일반 PCR 조건

PCR 반응은 1 μ l의 gDNA와 200 μ M의 dNTP, 0.5U의 GO Taq (Promega), 1.5 mM MgCl₂, 1 X GO Taq buffer, primer (0.5 pM)을 섞은 후 DNA engine (MJ Research, Inc.)에서 반응시켰다. PCR 반응 온도는 94℃에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후, 35 cycle로 94℃ 1분, 42~48℃ 1분, 72℃ 1분 조건으로 반응시키고, final extension은 72℃에서 7분간 진행하였다. 5 μ l의 PCR product를 1.5% agarose gel에 전기영동한 후 EtBr에 염색하여 UV transilluminator 위에서 확인하였다. 남은 PCR product는 QIAquick PCR purification kit (Qiagen)를 사용하여 DNA를 정제한 후 COSMO genetech (Busan, Korea)에 의뢰하여 염기 서열을 분석하였다. 분석한 염기 서열은 ClustalX 및 Genedoc을 이용하여 alignment하여 서열 간의 유사성을 확인하며, 계통수 분석은 MEGA6 (molecular evolutionary genetics analysis)을 이용한 neighbor-joining method로 분석하였다.

Table 1. Ordinary PCR 및 Ultra-Fast PCR에 사용된 프라이머 세트

Target gene	Primer	Sequence	Product size
<i>Amphioctopus fangsiao</i> COI	Left	25mer (5'- ATTACTTTCCTCAGCTGCGGTAGA -3')	100 bp
	Right	24mer (5'- ATCGACGGAGGGTCCTATATGAGC -3')	
<i>Octopus minor</i> COI	Left	24mer (5'- TCTGCAGCTGTTGAAAGAGGAGTA -3')	97 bp
	Right	24mer (5'- TTGCTAGGTCTACAGATGGTCCTG -3')	
<i>Octopus vulgaris</i> 16S rRNA	Left	24mer (5'- GAGCAGGCCCAACTCTTCATTAAA -3')	81 bp
	Right	26mer (5'- GGAATTTGGCAAGGATAAAATTTTCGCC -3')	
<i>Todarodes pacificus</i> COI	Left	23mer (5'- CTCCTTACCAGTGCTAGCAGGTG -3')	135 bp
	Right	25mer (5'- TCGGGATGCCCAAAGAATCAAAATA -3')	
<i>Loligo chinensis</i> 16S rRNA	Left	24mer (5'- TCGTCCCCTTAAGAAATTCAAGCT -3')	168 bp
	Right	24mer (5'- TGAAACGTTTTTAACAGCTGCGGTA -3')	
<i>Amphioctopus marginatus</i> COI	Left	24mer (5'- CCCAGATATAGCATTTCCCCGTA -3')	85 bp
	Right	24mer (5'- GCAGCTGAGGAAAGGAGTAAGGTT -3')	

1.5. Ultra-Fast PCR 및 유전자형 분석

실시간 고속 유전자증폭 반응은 UF-150 GeneChecker Ultra-Fast PCR system (Gene System, Korea)을 이용하여 수행하였다. PCR 반응 혼합 조성물($10\ \mu\text{l}$)은 genomic DNA $1\ \mu\text{l}$ ($20\ \text{ng}/\mu\text{l}$), 2X Rapi Master Mix (Gene System) $5\ \mu\text{l}$, 각 프라이머 $0.5\ \mu\text{l}$ ($10\ \text{pmole}/\mu\text{l}$), 멸균 3차 증류수 $3\ \mu\text{l}$ 를 사용하였으며, PCR 반응 조건은 95°C 30초 반응 후 95°C 5초, 62°C 5초, 72°C 5초의 3단계로 PCR을 50 cycle 수행하였다(Table 2).

Two skin 주꾸미, One skin 주꾸미, 낙지, 살오징어, 돌문어, 한치에 대한 유전자 판별 분석은 상기의 PCR 조건으로 각 품종 당 해당하는 1쌍의 프라이머를 이용하여 수행하였으며, PCR 수행이 끝난 후 결과는 UF-150 GeneChecker Ultra-Fast PCR system 기기에 연결되는 PC (labtop)의 Gene recoder (Gene System) 프로그램을 통해 실시간으로 확인하였다.

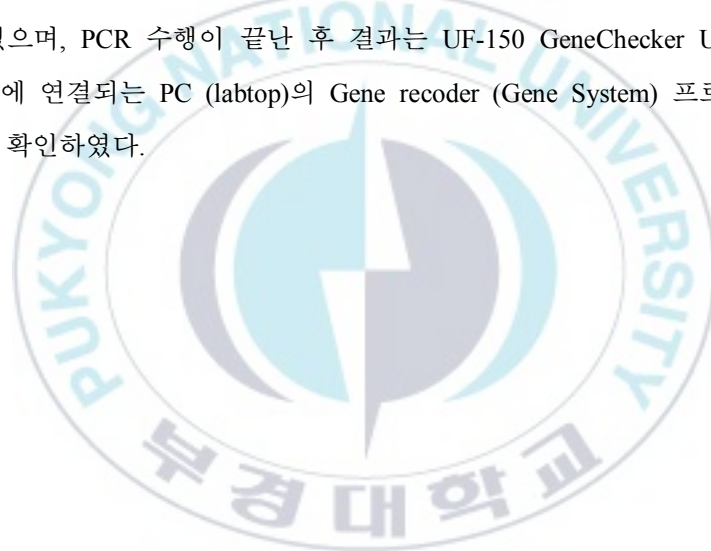


Table 2. PCR 반응 조건의 비교

(A) Condition for ordinary PCR & Real-time PCR

Step	Temperature	Time	Cycles
Pre-denaturation	95℃	5 min	1 cycle
Denaturation	95℃	30 sec	35 cycles
Annealing	62℃	30 sec	
Extension	72℃	30 sec	
Final extension	72℃	7 min	1 cycle

(B) Condition for Ultra-Fast PCR

Step	Temperature	Time	Cycles
Pre-denaturation	95℃	30 sec	1 cycle
Denaturation	95℃	5 sec	50 cycles
Annealing	62℃	5 sec	
Extension	72℃	10 sec	
Final extension	72℃	0 sec	1 cycle

III. 결과 및 고찰

1.1. 두족류 6종의 종특이 영역 탐색

NCBI database에 등록되어있는 16S rRNA와 COI 유전자 내에서 유전적 변이가 심하지 않은 보존서열을 가진 부위를 선택하여 특이 정방향 및 역방향 프라이머를 제작하였으며 이 결과로부터 Single PCR 뿐만 아니라 Ultra-Fast PCR의 적용성까지 고려하여 최적의 프라이머를 선정하였다(Table 1).

1.2. 종 특이 프라이머를 이용한 두족류 시료의 확인

본 연구에서 디자인된 종 특이 프라이머를 이용하여 시장에서 구입한 두족류 6종 Two skin 주꾸미(*Amphioctopus marginatus*), One skin 주꾸미(*Amphioctopus fangsiao*), 낙지(*Octopus minor*), 살오징어(*Todarodes pacificus*), 돌문어(*Octopus vulgaris*), 한치꼴뚜기(*Loligo chinensis*)에 대한 PCR을 통해 각 종의 선택적인 증폭을 확인하고자 하였다(Figure 3).

PCR을 통하여 증폭된 결과물을 전기영동하여 아가로스 겔상에서 확인한 결과는 Figure 2와 같이 한치는 168 bp, 살오징어는 135 bp, One skin 주꾸미는 100 bp, 낙지에서는 97 bp, Two skin 주꾸미는 85 bp, 돌문어는 81 bp 크기와 비슷한 위치에서 PCR 증폭산물이 관찰되었다(Figure 4).

QIAquick PCR purification kit (Qiagen)를 사용하여 DNA를 정제한 후 COSMO geneteck (Busan, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다. 분석한 염기서열은 서열 간의 유사성을 ClustalX 및 Genedoc을 이용하여 alignment하여 확인하였으며, 계통수 분석은 MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)을 이용한 neighbor-joining method로 분석하였다. 계통수 분석은 Figure 5, Figure 6에 나타내었다.

계통수 분석 결과 *A. fangsiao*와 *A. marginatus*는 두족강(Class Cephalopoda Cuvier, 1789), 문어목(Order Octopoda Leach, 1818), 문어과(Family Octopodidae d'Orbigny,

1840), 주꾸미속(Genus *Amphioctopus* Fischer, 1882)에 속한다.

O. minor 과 *O. vulgaris*는 두족강(Class Cephalopoda Cuvier, 1789), 문어목(Order Octopoda Leach, 1818), 문어과(Family Octopodidae d'Orbigny, 1840), 문어속(Genus *Octopus* Cuvier, 1798)에 속한다.

*L. chinensis*는 두족강(Class Cephalopoda Cuvier, 1789), 오징어목(Order Teuthoida Naef, 1916), 꼴뚜기과(Family Loliginidae Lesueur, 1821), 한치꼴뚜기속(Genus *Uroteuthis* Rehder, 1945)에 속하고,

*T. pacificus*는 두족강(Class Cephalopoda Cuvier, 1789), 오징어목(Order Teuthoida Naef, 1916), 살오징어과(Family Ommastrephidae), 참살오징어속(Genus *Todarodes* Steenstrup, 1880)에 속한다[6].



A. Two skin 주꾸미(*Amphioctopus marginatus*)의 Mitochondria COI 염기서열

```

1 atgcgatgaa tattctcaac aaatcataaa gatattggaa cnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
61 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnntaa ttcgaacaga actaggacaa
121 ccaggatctc tattaatga tgatcaatta tataatgtaa ttgtaacagc ccatgcat
181 gtaataatgt ttttccttgt aataccgcta ataattggag gatttggaaa ctgattagta
241 cctttaatat taggtgctcc agatatagca tttcccgta taaataatat aagattctga
301 ttattacccc cttcattaac tttactccta tcctccgctg cagtagaaaag aggtgctggt
361 acaggatgaa cagtataccc tcctctatca agaaacttag cacatatagg accatctggt
421 gacctagcaa ttttctccct acacttagca ggaatttcat caattttagg agcaatcaac
481 ttcattacta ccatcatcaa tatacggtag gaaggatata taatagaacg attaccatta
541 tttgtatgat ctgtatttat tacagcagtc ctattacttt tatcactacc agtactagca
601 gggtcaatta ctatgctctt aactgaccga aacttcaata caacattctt tgatcctaga
661 ggagggtggag accccatcct atatcaacat ttattctgat tttttggtca cccagaagta
721 tatattttta tcttgcccgg attcgggaata atttcccata tcgtttcaca ttattctata
781 aaaaaagaaa cttttggtag tttaggtagt atttatgcaa tattatccat tggtttatta
841 ggattttatt tatgggcccc ccatatatatt acagttggaa tagacgttga tacacgagca
901 tactttacag cgcgaacaat aattattgoc atcccaaccg gaattaaagt ttttagatga
961 ttngctacaa tttatggttc ccctattaaa tatactcccc caatattatg atctntagga
1021 tttattttct tatttactac aggaggatta acagggattg ttttatctaa ttcattatta
1081 gatattatag ttcatgacac atattatgta gtagcacatt tccattatgt attatcaata
1141 ggagcagttt ttgctttatt tgaggatttt acacattgat accctataat tacaggatta
1201 tctttaaacc aacaatatac taaatcccac ttctatataa tattatttgg agtaaatatc
1261 actttctttc cacaacactt cttaggatta gcagggatac cccgacgata ttcagattat
1321 cctgattcct atactaaatg aaacatacta tcttcgatag gatcttttatt atcattaacc
1381 tcaattatat tttttatatt tattgtctga gaaagattaa tctcccaacg aacaattatt
1441 tgatctaacc atttaaatag atcattagaa tgagataatc gattaccagt agactttcat
1501 aatcaaatag aaacaggagc cttattttatt taa

```

B. One skin 주꾸미(*Amphioctopus fangsiao*)의 Mitochondria COI 염기서열

```

1 atgcgatgaa tattttcaac aaatcataaa gacattggta cattatactt tatcttcgga
61 atttgatcag gcctcctagg tacatcttta agcttaataa ttcgaacaga attaggtaaa
121 ccaggatctt tattaatga tgatcaatta tataatgtaa ttgttacagc ccatgcat
181 gtaataatgt ttttttgggt tatacctgtt ataattggag gatttggtaa ctgattagtc
241 cccttaatat taggtgctcc agatatagct tttcctcgta taaataatat aagattctga
301 ttattacctc cctctcttac tttattactt tcctcagctg cggtagaaaag agggagctggt
361 actggatgaa ctgtctatcc acctctatca agtaatttag ctcatatagg accctccgctc
421 gattttagcta ttttctcctt acatttagca ggaatttcat ctattttagg agctattaat
481 tttattacta ctattattaa tatacgttga gaaggatata taatagaacg actcccttta
541 tttgtatgat ctgtctttat tacagctgtt ttattacttc tttcactacc agtacttgct
601 gggtcaatca ctatactttt aactgatcga aatttcaaca caactttttt tgacccaaga
661 ggaggagggt accctatcct atatcaacat ttattttgat tttttggtca tccagaagta
721 tatattttta ttttaccagg atttgggata atttcccata ttgtttccca ttattctata
781 aaaaaagaaa catttggtag attaggaata atttatgcta tattatctat tgggttatta
841 ggattttatt tatgagccca tcatatatatt acagttggaa tagatgttga tacacgagca
901 tattttacag cgcgaacaat aattattgoc atcccaacag gaattaaagt ttttagatga
961 ttagccacaa tttatggatc ccctattaaa tataccctc ctatattatg atcttttaga
1021 tttatttttt tattcaccac aggaggatta acaggaattg tattatctaa ttcattctta
1081 gatattatat tacatgatac atattatgta gtagcacatt tccactatgt cctatcaata
1141 ggagcagttt ttgctttatt tgccggtttt acccaactgat atcctataat tacaggttta
1201 tcattaaatc aacaatatac taaatctcac ttttatataa tatttattgg agtaaatatt
1261 actttttttc cacaacactt tttaggatta gctggtatag cagcagcata ctcagattat
1321 cctgactcct atactaaatg aaatatactt tcatctatag gatctctttt atcattaaca
1381 tctattatat tttttatatt tattgtttga gaaagtttaa tttcacaacg aacagttatt
1441 tgatcaaacc atttaaatag atctttagaa tgagataatc gattaccagt agattttcac
1501 aaccaaatag aaacaggagc cttattttatt taa

```

C. 돌문어(*Octopus vulgaris*)의 Mitochondria 16s rRNA 염기서열

```

1 ccaatatttta taaaattaat taaaaacaat taatcataat caatcctttc gtactaaatc
61 aaataaaaaa ataattttaa agataaaaaac caacctgggtt ttcaccgggtt tgaactcaga
121 tcatgtaaaa ttttaaaaaat cgaacagatt tacctaataa agcctctaca ccttaagggtc
181 aatttttaatc caacatcgag gtcgcaatct cttttttcaa tatgaactct caaaaaaaat
241 tacgctgtta tccctatggt aacttatctt ctaagcaaaa aacttgggtt attcttcaac
301 taaattttaa attaagggaag ttaataaaaac acttttaatt aatttttatt ccttgatcac
361 cccaaccaaa gttattttaca aataaatcat atatataata ctatataata
421 acaaaagctc aatagggtct tttcgtccct ttaaataatt aaagcttttt cactataaaa
481 attaatctct aataaataaa atagagacag ttaaatctct gtcaaaccat tcattctagc
541 cccaatttat agagcaaatt attatgctac cttagtacag ttataatacc gcagctgtta
601 aatatttaac accgagcagg cccaactctt cattaaaaaa actcaaagag acatgttttt
661 gataaacagg cgaattttat ccttgccaaa ttcccttaatt ttactttaat atataaacct
721 atattttatat taattaactt taaattcaaa tactaaaaat aaaactaatt atatatacca
781 tccaaaaata ctcatcttaa catttatatt cactttttat aattaaaaga tatttatcca
841 actgctataa agaaaattta ataataataa taacattaaa aataacaata aagaaaaaat
901 attaatccaa cttcaattaa tcactttatt atatacattc ttacaataat atatgaagct
961 tatcccccac tacttaaaact aaaaaaacta ccaaccataa ataattttta actaacacta
1021 aaatgtaaaa ataaataaac tagctatcat acaaatcgaa tagcatttca ctaccattta
1081 ctcttaaaat aataacttta ccacgttaac tacacataaa atactactaa aacaaataaa
1141 tcttcatatt tcgagaaaat tataatccata aaataatatt attaaacctt tatgcaaaag
1201 gtacaaaact taaattttac tataactaaa ttcacaaaat tctacatcct tctcagtaca
1261 tacaaaataa tttttctata ccattactt taaaatcaaa aactttttatc aatacttcta
1321 ctcaaaaata atatcaaaat aaaaacccaa tctaaa

```

D. 낙지(*Octopus minor*)의 Mitochondria COI 염기서열

```

1 atgcgatgaa ttttttcaac aaatcataaa gatatttgaa cactatatit tttttttgga
61 atctgatcag gtcttctagg aacttcttta agatttaataa ttcgtactga attagggtcaa
121 ccagggtcac tactcaacga tgatcaactt tataatgtta ttgtaactgc acatgcatttt
181 gtaataatth tttttttagt aatacctggt ataactcgag gatttggaaa ttgattagtt
241 ccttttaatt taggtgcacc agatatagca ttccccgaa taaataatat aagatttttga
301 cttcttctc cttccctaac cttattatta acctctgcag ctgttgaaa aggagttaga
361 acaggatgaa ccgtatatcc tcctttatca agaaaatctc ctcatacagg accatctgta
421 gacctagcaa ttttctcact ccatttagca ggaatttcat ctatttttag agctatttaac
481 ttcataacta ctattatcaa tatacgatga gaaggaatc aaatagaacg tcttcccttg
541 tttgtttgat cagtatttat tacagctatc cttcttcttt tatcattacc tgttcttgct
601 ggagctatta ctatattatt aactgatcga aatttttaata ctactttctt tgacccaaga
661 ggaggaggag atccaatctt ataccaacat ttattctgat tctttgggtc tccggaagtt
721 tacattctta ttttaccagg ttttggaaata atctcccaca ttgtatctca ctattcatta
781 aaaaaagaaa catlttgtag tctcggaaata atctatgcaa tactatcaat tggctatta
841 ggattttatt tatgagcaca tcacatatth actgttggtg tagatgtaga tacacgagca
901 ttttttactg ccgcaacaat aattattgca attcctactg gaattaaagt ctttagatga
961 ttagcaacca tttatggatc accaatcaaa tataactcac ctatattatg atctcttggg
1021 tttatttttt tttttacaat aggaggacta acagggtattg ttctatctaa ttcatcttta
1081 gatatttatac tacatgatag ctactatgta gtagcccat tccactatgt tttatccata
1141 ggagcagtat ttgcattatt tgcaggattt aatcattgat accccataat tactggttta
1201 tcatttaaatc aacaatatac taaatcccat ttttatataa tatttattgg agttaatatt
1261 accttttttc cacaacactt tctaggatta gcaggatata cccgtcgata ctcagattac
1321 ccgatttctt atactaaatg aaatatatta tcatcaatag gatcattatt atccttaaca
1381 tctattatatt ttttcatatt tattgtatga gaaagattaa tttctcaacg aactattatt
1441 tgatcaaac accttaaac atccttagaa tgaacaatc gtcttcagat agattttcat
1501 aaccaaatag aaactggagc tttattttat taa

```

E. 살오징어(*Todarodes pacificus*)의 Mitochondria COI 염기서열

```

1 atgcatgac tttttctac aaaccataaa gacattgga ccttatatt tatctttggt
61 atctgggag gactattagg tacatcatta agattaatga ttcgtaccga attaggtcaa
121 cccggatctt tattaatga tgatcaatta tataacgtag tagttactgc tcacggattc
181 attataatgt ttttcatagt tatacctatt ataattggag gatttggtaa ctggttagtt
241 cccttaatat taggtgctcc agatatagca ttcccacgta taaacaatat aagattctga
301 ctacttcctc catccttaac tcttttatta gcttcactcg ctgtagaaag aggagccgga
361 acagggttga cagtttatcc ccctttatct aggaatttat cccatgctgg tccttcagtt
421 gatctagcaa ttttctcact ccacttagct ggtgtctctt ccattttagg tgcaattaat
481 ttcattacaa ctatcttaaa tatacgatga gaaggctctc aaatagaacg tcttccttta
541 tttacatgat ctgtatttat tacagccatt ttattgctac tctccttacc agtgctagca
601 ggtgcaatta ctatgctggt aactgactga aacttcaata ctactttttt tgatcctagt
661 ggagggggag acccaatttt ataccaacat ttattttgat tctttgggca tcccgaagta
721 tataatttaa ttttacctgc ctttggttat atttcacaca ttgtatctca ccactcttta
781 aagaaagaaa tttttggagc tttaggtata atttacgcca tactatcaat tgggtctcta
841 ggtttttatt tctgagcaca tcatatattc accgtaggaa tggatgtaga tactcgagct
901 tatttcacat cagcaacaat aattattgca attcctaccg gaattaaagt atttagttga
961 ttagcaacta tttatggttc tcctattaaa tataatacac ctatactctg agcattaggg
1021 ttcactcttt tatttactgt agggagttta acagggtata ttctttctaa ttcactatta
1081 ggtcttatac ttcataatgc atattatggt gtagctcatt tccattatgt cttatctata
1141 ggagccgtgt tgcgtttatt tgcgtgtttt aaccattgat accctttaat tacaggatta
1201 aactaaacc aacaatgaac caagctcat tttatgacga tattctttag tgtaacgta
1261 actttttttc ctcaacattt tctaggatta gcaggaaatc ctgacggta ctcagattat
1321 ccagattggt atactaaatg aaacatagta tcatctatag gatctataat ttcacttact
1381 agtggtgtgt tctttatttt tattgtttga gaaagtttaa tttcacaacg aactgtgatt
1441 tgatctaacc acataactac atcttttaga tgagacaacc gtcttccagt tgacttccat
1501 agtctccctg aaacaggggc tctttatatt taa

```

F. 한치꽃꾸기(*Loligo chinensis*)의 Mitochondria 16s rRNA 염기서열

```

1 ataacaacaa aaatataata tttatatcat atggaataat catgcatcac acaaattatt
61 tatcttataa taaaaatttt agctttctcc gatcctttcg tactaagaga agcagttata
121 attcttaaaa gatagaaacc aacctggctc acgcccgtct gaactcagat catgtaaaat
181 ttttaaaatc gaacagattt acctcataaa gcttctgcac cttaagggtc ctttaaatcca
241 acatcgaggt cgcaatctta cttttcaata agaactctct aagtaaatga cgctgttatc
301 cctatggtaa ctatattata agcaatacat aatacaattc tattaattaa tcggttactt
361 aattcaacaa tataatatct aaggaaagtt taaaatagct atattattcc ttaatacccc
421 caattaaaaa ttatatagca cattatacat aaatatatgt gataataaaa ttataagctc
481 agtagggctc tctcgtcccc ttaagaaatt caagcttttt cactatgaaa attaatttct
541 aaaaaataaa gcagagacag attaaccttc gtcaaaccat tcattctagc ctcaaatatt
601 aaggcaaat attatgtac ctttagtacg ttaaaatacc gcagctgtta aaacgtttca
661 ccgagcaggc ccaactcttt atttatatta tacaagaga gatgtttttg ataaacaggc
721 gagattaata ttgcccgaat tccttagctt tacttaatta acattttact ccatatatta
781 atcgtttaca cattataatt ctttaaaac tggaacgta ttcaaccaat actcatatca
841 acattatagt taattaaaat tatttataat tatttattag ctacataatt actacctgaa
901 atatatatta aaatataaca aaattaaatc attaagaaaa acaaaacttt taaccttact
961 taaattatac actaaactac acataaaatt ctacaaacct atatgaagct tatcccccat
1021 ataataaact agtattttaa cataaaatta tttaaaaata ctataatact taaatattct
1081 tcaccaataa actagctatg ctaggaaacg ataaacattt cattaccatt cagtaataaa
1141 tatataactt taccacgta acataacatt actaaataaa tcctcctaatt tcgagataat
1201 tctataaaaa atttataata tcatcgacc attatacaaa aggtacaaaa ttttattttt
1261 actaaaaaca aaatataata catcctttac agtacaacta aacaaaattt tatctatact
1321 actaatacc aaataaaaaa caatttcttt tatctatata atacaacgaa caactctata
1381 taagttttta

```

Figure 3. 두족류 6종에 대한 Mitochondrial DNA 염기서열 분석 결과.

(A) *Amphioctopus marginatus*, (B) *Amphioctopus fangsiao*, (C) *Octopus vulgaris*, (D) *Octopus minor*, (E) *Todarodes pacificus*, (F) *Loligo chinensis*

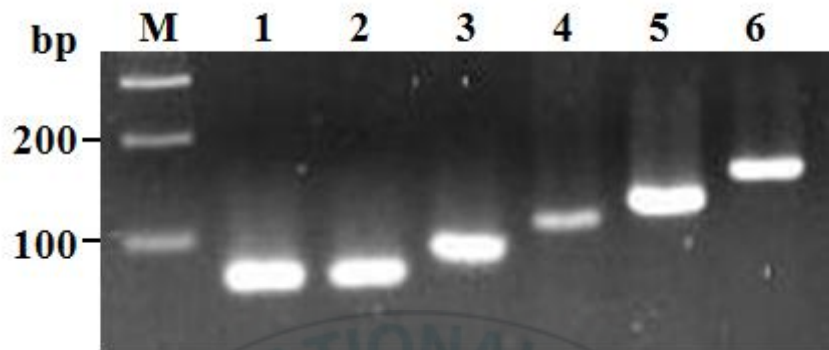


Figure 4. Genomic DNA를 추출하여 PCR 수행한 결과. M: 100 bp DNA ladder, 1; 돌문어, 2; Two skin 주꾸미, 3; 낙지, 4; One skin 주꾸미, 5; 오징어, 6; 한치.

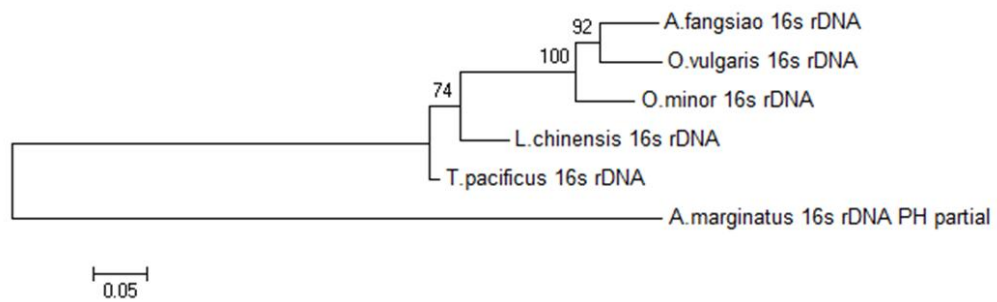


Figure 5. MEGA6 프로그램을 이용한 Mitochondria 16s rRNA gene 계통수 분석



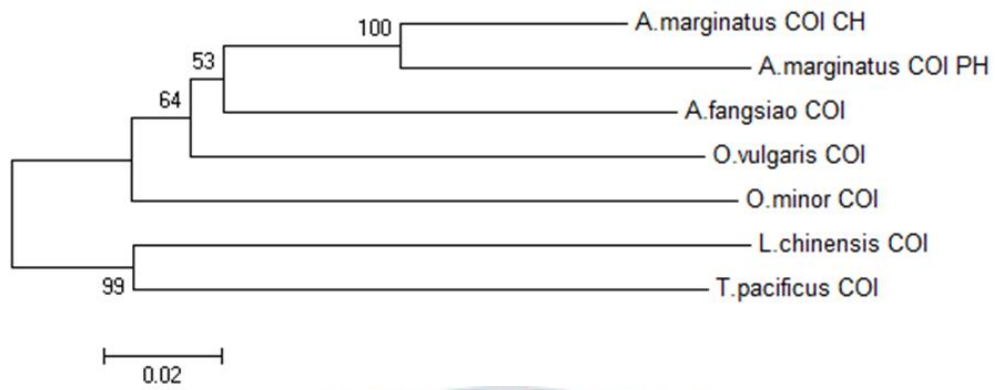


Figure 6. MEGA6 프로그램을 이용한 Mitochondria COI gene 계통수 분석

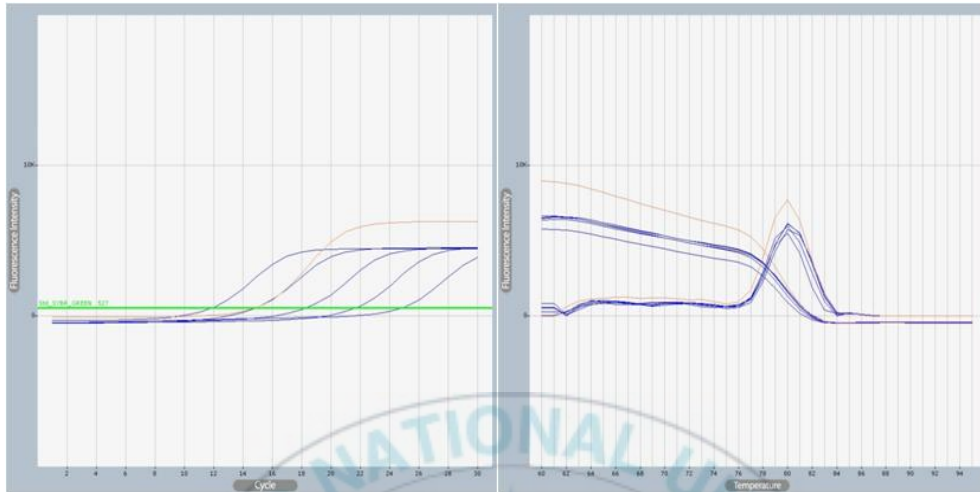


1.3. 두족류 qPCR 분석

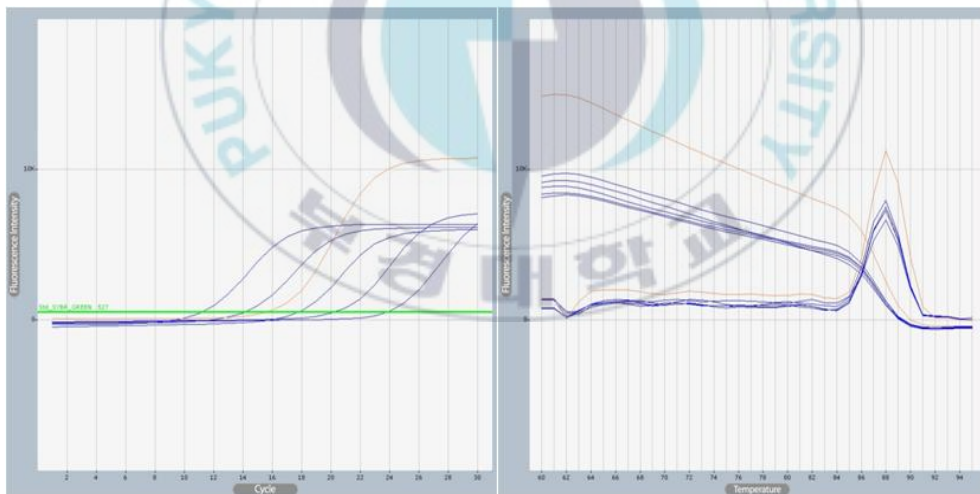
두족류에 대하여 qPCR을 진행한 결과(Figure 7), 두족류의 Real-time PCR 효율범위는 R^2 value (0.983 ~ 0.999), slope (-0.28 ~ -0.32), Efficiency (89 ~ 109%)이었다. 대상 6종의 최소 검출 범위는 10 pg ~ 0.1 pg이다.



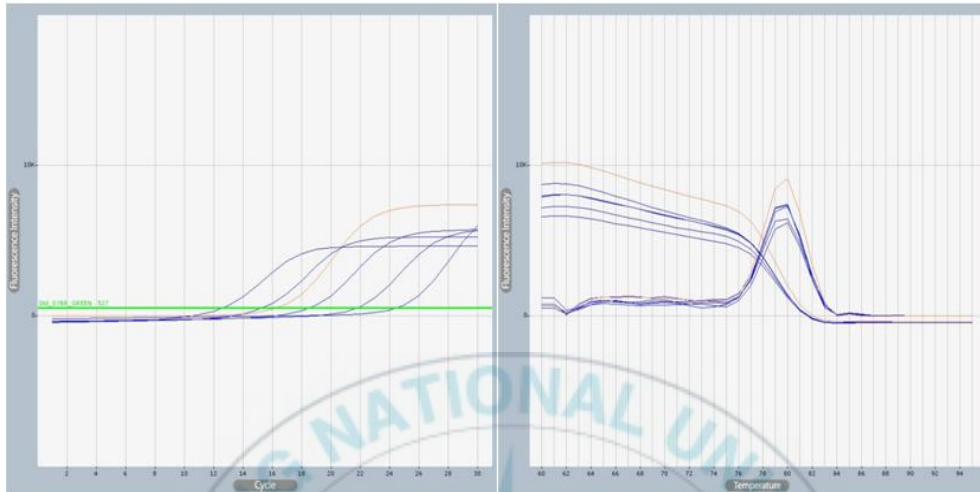
A. Two skin 주꾸미(*Amphioctopus marginatus*)



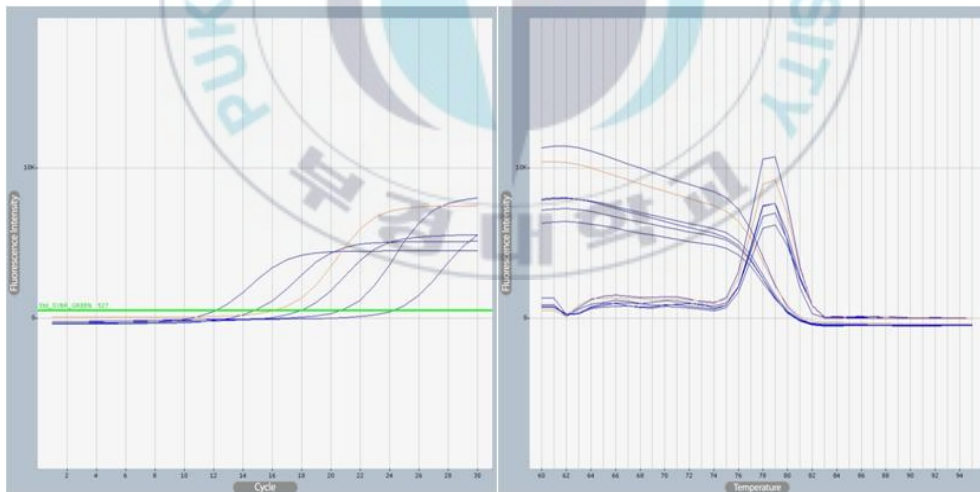
B. One skin 주꾸미(*Amphioctopus fangsiao*)



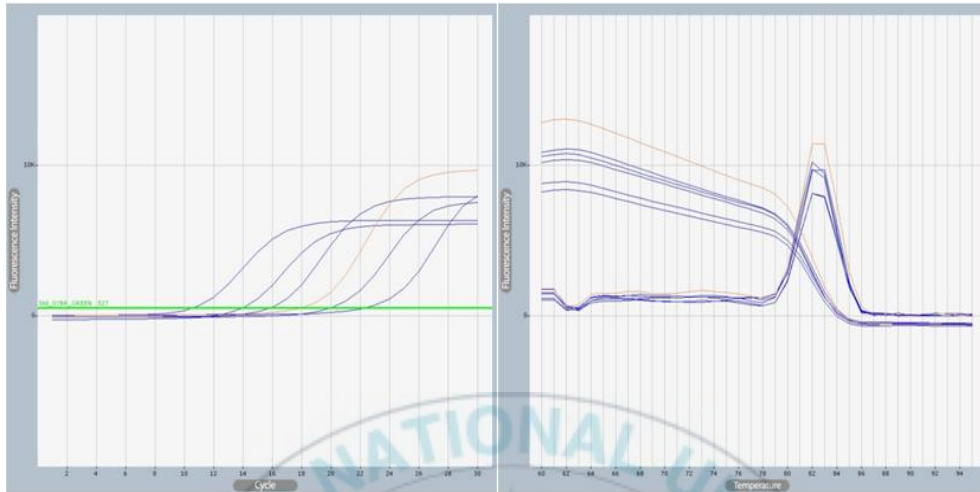
C. 돌문어(*Octopus vulgaris*)



D. 낙지(*Octopus minor*)



E. 살오징어(*Todarodes pacificus*)



F. 한치꼴뚜기(*Loligo chinensis*)

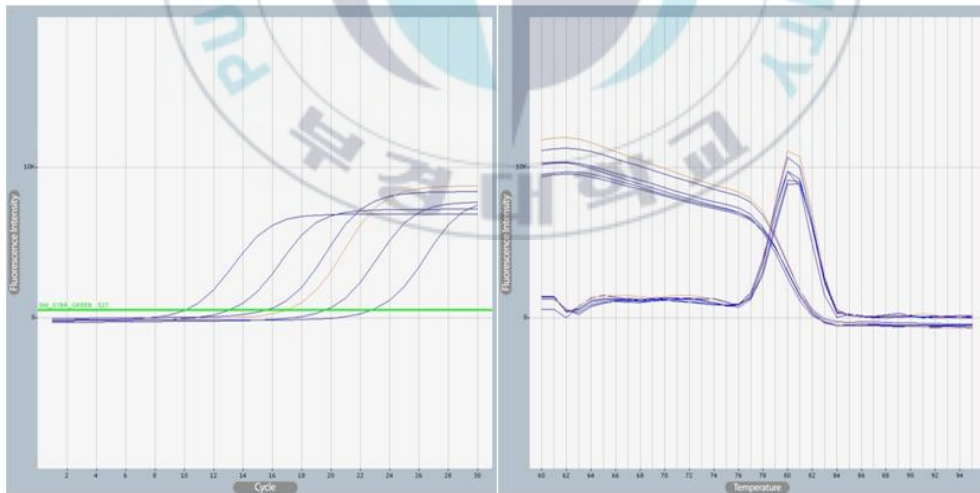


Figure 7. 두족류 6종의 DNA에 대한 Real-time PCR 결과

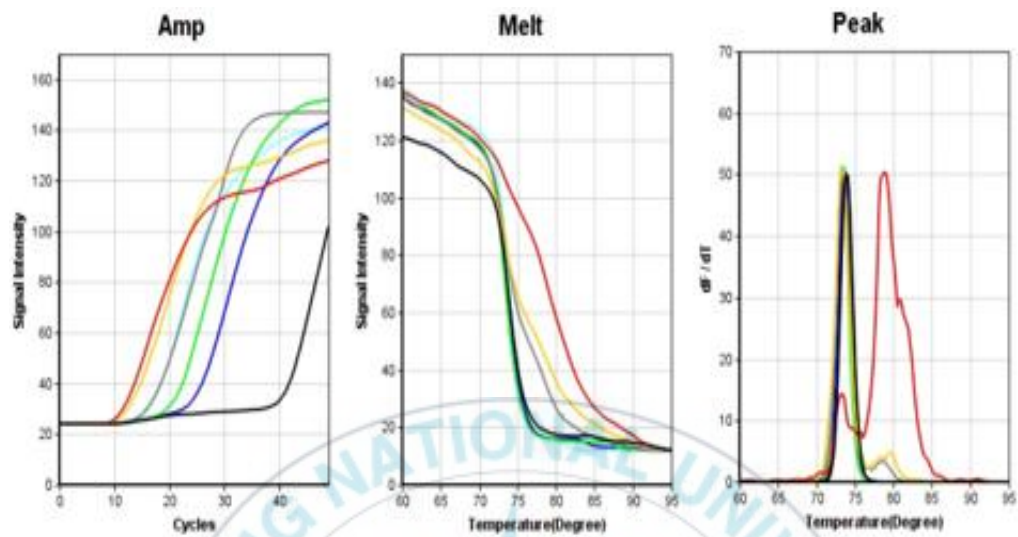
(A) *Amphioctopus marginatus*, (B) *Amphioctopus fangsiao*, (C) *Octopus vulgaris*, (D) *Octopus minor*, (E) *Todarodes pacificus*, (F) *Loligo chinensis*

1.4. 두족류 Ultra-Fast PCR 분석

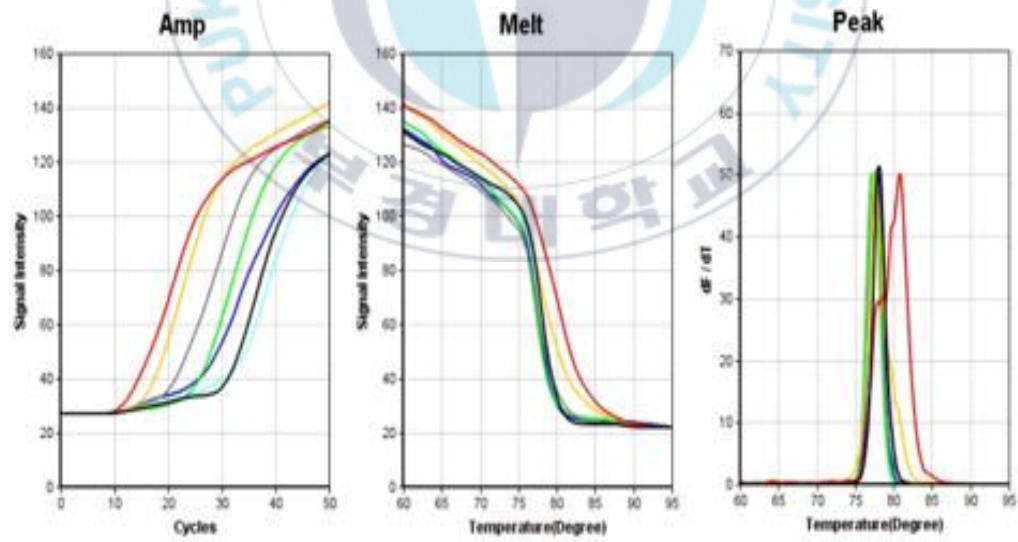
두족류 6종의 Cloned DNA와 genomic DNA를 사용하여 특이성을 확인할 수 있었다. 검출한계는 0.1 pg ~ 1 pg이고, Genomic DNA에서 PCR결과는 Standard의 1 pg ~ 100 pg 사이에서 나타났다. Negative 반응은 cycle 후반부에서만 일부의 증폭이 관측되었다. Melting curve와 peak에서 Real-time PCR의 결과와 약간의 차이를 보였다. Ultra-Fast PCR 결과는 Figure 8에 나타내었다.



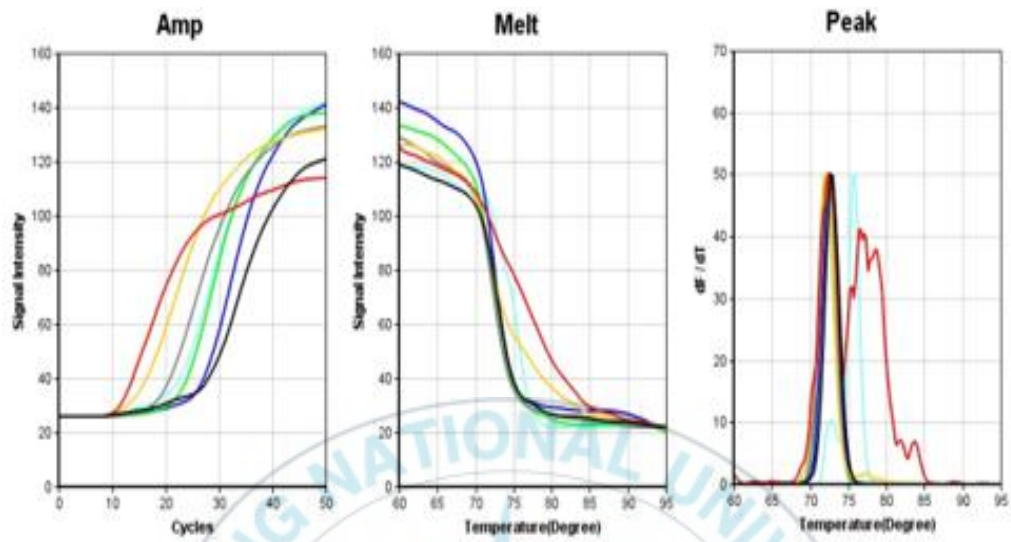
A. Two skin 주꾸미(*Amphioctopus marginatus*)



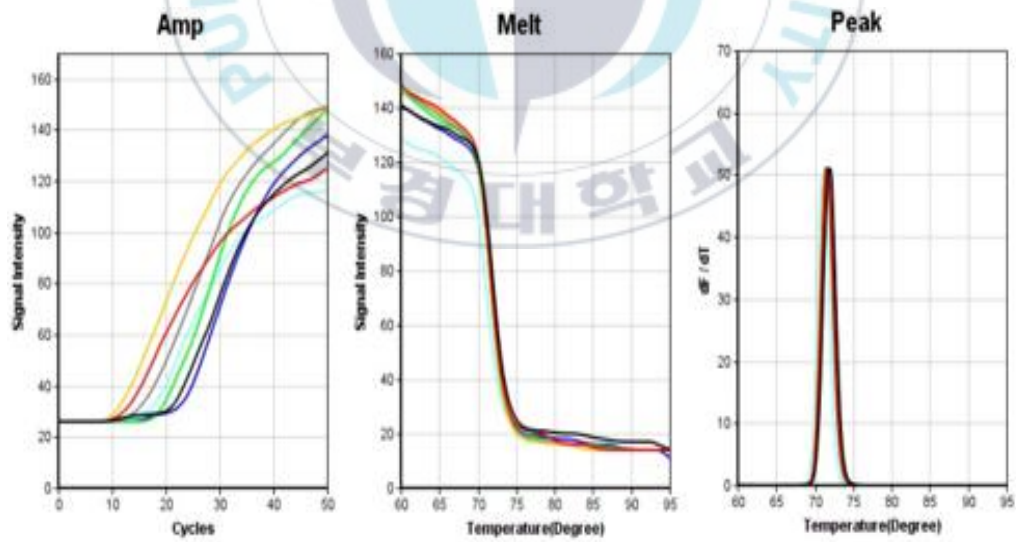
B. One skin 주꾸미(*Amphioctopus fangsiao*)



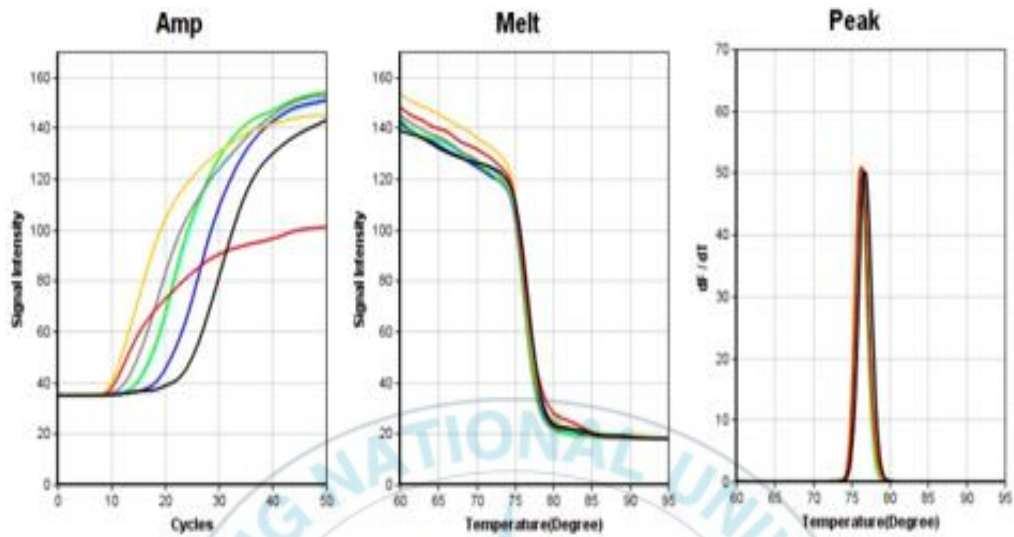
C. 돌문어(*Octopus vulgaris*)



D. 낙지(*Octopus minor*)



E. 살오징어(*Todarodes pacificus*)



F. 한치꼴뚜기(*Loligo chinensis*)

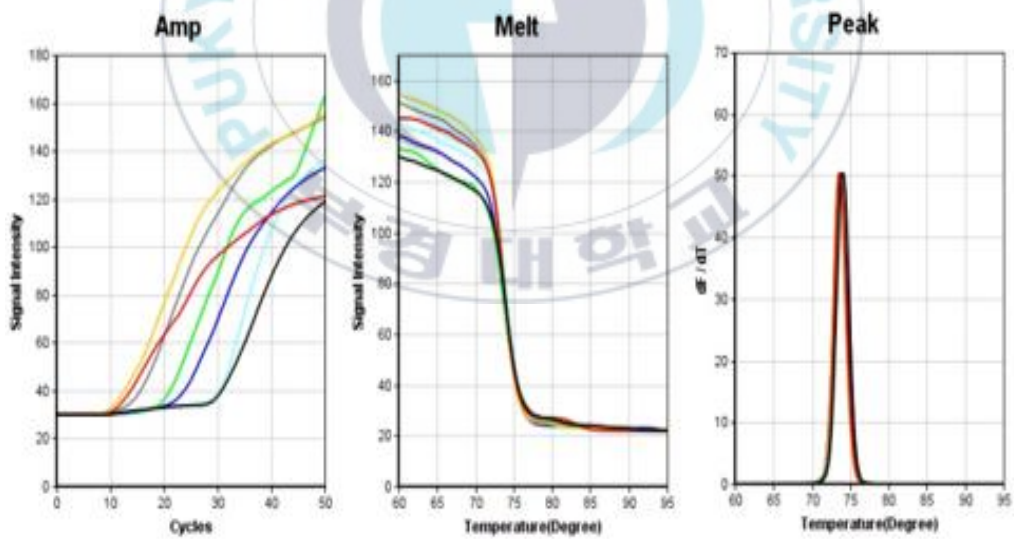


Figure 8. 두족류 6종의 DNA에 대한 Ultra-Fast PCR 결과

(A) *Amphioctopus marginatus*, (B) *Amphioctopus fangsiao*, (C) *Octopus vulgaris*, (D) *Octopus minor*, (E) *Todarodes pacificus*, (F) *Loligo chinensis*

1.5. 고찰

수산물 가공식품이 EMA (Economically Motivated Adulteration) 식품으로 제조, 유통되는 사례가 급증하고 있다. 수산물을 이용한 EMA 식품의 경우 일반 소비자들이 형태학적으로 구분하기 힘들어 저가의 수입산 또는 유사 생물을 이용한 제품을 만들어 소비자들에게 판매하는 경우가 많다. 특히 최근 들어 우리나라 연안에 서식하는 주꾸미의 경우 무분별한 남획으로 개체수가 급감하여 동남아 일대 또는 중국에서 수입하여 대체하고 있다. 동남아 일대에 서식하는 주꾸미류는 One skin 주꾸미와 Two skin 주꾸미가 동시에 서식하고 있는데 우리나라의 경우 식품으로 이용되는 주꾸미는 One skin 주꾸미이며, 우리나라 연안에 서식하지 않는 Two skin 주꾸미의 경우 식품으로 이용되는 사례가 없다.

우리나라 연안에 서식하는 주꾸미의 개체수가 급감하여 중국이나 동남아 일대에서 주꾸미를 수입하고 있으며, 가공 또는 절편으로 만들어 수입하게 된다. 하지만 가공 및 절편으로 수입되는 주꾸미류의 경우 형태학적으로 One skin과 Two skin 주꾸미를 구별 할 수 없다.

이러한 이유로 본 연구에서는 두족류에 포함되어진 대표적인 6가지 (One skin 주꾸미, Two skin 주꾸미, 낙지, 돌문어, 살오징어, 한치꼴뚜기)를 대상으로 명확한 종 판별을 확립하기 위한 방법과 목적하는 DNA단편을 특이적으로 실시간 고속 PCR 분석법에 의해 상대적 정량 측정법을 제시하고자 한다.

현재 두족류에 대한 종 판별 연구가 미토콘드리아 16S rRNA, cytochrome b, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) PCR 등을 이용하여 보고되고 있으나, 이들은 모두 Single PCR에 의한 조건이며, 증폭산물의 size variation이 고려되지 않은 universal primer를 이용한 증폭에 기반한 것으로 최종적인 종 판별을 위해서는 유전자 염기서열 분석과정을 거쳐야 하기 때문에 많은 시간과 비용이 소모된다. 특히 RFLP PCR 경우 재현성 부분에서 신뢰도가 많이 떨어지는 문제점이 있어 실제로 이를 적용하기에는 위험성이 따른다[19]. 또한 기존에 연구되어진 multiplex PCR을 이용한 오징어류 종 판별법은 single PCR과 비교하여 시간적인 측면에서 뿐만 아니라 경제적으로도 장점이 있는 방법이지만, 각 유전자의 PCR 조건을 일치시켜야 하며 또한 증폭산물의 크기가 다르도록 디자인함으로써 아가로스 겔 전

기영동분석에서 확인 가능하여야 하는 번거로움이 있다. 또한 기존의 판별법은 오징어류 4종에 대한 종 판별만 가능하였기 때문에 본 연구에서는 이 이외의 다른 두족류 구분을 위해 미토콘드리아 Cytochrome C oxidase I (COI)의 유전자 부위를 타겟으로 하는 프라이머를 설계하여 이를 이용한 두족류 6종 분류법을 제시하였다. 두족류의 생물학적 시료로부터 간단한 방법으로 Ultra-Fast PCR을 수행하기 위한 DNA를 확보하여 시료 준비 시간을 단축시킬 수 있을 뿐만 아니라, Ultra-Fast PCR 결과만으로도 종 판별이 가능하며 시료 전처리부터 결과확인까지 30분 이내 종 판별이 가능한 분석법을 연구하였다.

본 연구에서는 보여준 Ultra-Fast PCR은 PCR이 가지고 있는 높은 민감도를 크게 희생시키지 아니하며, 30분내의 신속성을 보여준 것이다. 휴대가 불가능했던 기존의 PCR 기기가 가지는 단점은 Ultra-Fast PCR 기기의 소형화 개발 등으로 쉽게 극복될 수 있고 뿐만 아니라 실시간 PCR이 가지고 있는 정량적 분석도 가능하다는 장점을 감안한다면, 정밀 진단을 현장에서 바로 적용시킬 수 있는 민감하고도 신속한 분석방법이 될 수 있을 것이다[23].

이러한 결과를 토대로 기존의 종판별 방법보다 두족류를 신속, 정확하게 현장에서 판별 할 수 있어 앞으로 다른 분류군에서도 적용하고 현장에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

IV. 요약

본 연구에서는 미토콘드리아 DNA 염기서열의 Cytochrome C oxidase I (COI) 유전자 분석법을 통하여 두족류에 해당하는 Two skin 주꾸미, One skin 주꾸미, 돌문어, 낙지, 살오징어, 한치꼴뚜기 품종의 외투 조직에서 추출된 게놈 DNA 중에서 실시간 고속 PCR 반응에 의해 상기 전술한 특정 염기서열 지역의 DNA만을 신속하고, 정확하게 증폭하며, 그 증폭량을 정량적으로 측정할 수 있어, Two skin 주꾸미, One skin 주꾸미, 낙지, 돌문어, 살오징어, 한치꼴뚜기 6 품종을 확실하게 구분할 수 있다.

PCR 반응은 94℃에서 5 분간 초기변성 후, 94℃ 30 초 변성, 62℃ 30초 결합 및 72℃ 30초 신장을 총 35회 반복 수행하였고, 마지막으로 72℃에서 5 분간 최종 신장 반응을 수행하였다. 증폭된 Single PCR 산물은 2% 아가로스 겔에서 전기영동한 후 EtBr로 염색하여 이미지분석기에서 각 품종의 유전자 증폭산물을 확인하였으며, Two skin 주꾸미, One skin 주꾸미, 낙지, 돌문어, 살오징어, 한치꼴뚜기 품종에 대한 PCR 산물들을 유전자 클로닝한 후, 품종 간의 염기서열을 비교 분석한 결과, Two skin 주꾸미는 85 bp, One skin 주꾸미는 100 bp, 낙지는 97 bp, 돌문어는 81 bp, 살오징어는 135 bp 한치꼴뚜기는 169 bp 크기의 DNA 단편이 관찰되었다.

실시간 고속 유전자증폭 반응은 UF-150 GeneChecker Ultra-Fast PCR system (Gene System, Korea)을 이용하여 수행하였다. PCR 반응 조건은 95℃ 30초 반응 후 95℃ 5초, 62℃ 5초, 72℃ 10초의 3단계로 PCR을 50 사이클 수행하였다. 결론적으로, 두족류의 생물학적 시료로부터 간단한 방법으로 Ultra-Fast PCR을 수행하기 위한 DNA를 확보하여 시료 준비 시간을 단축 시킬 수 있고, 정성 분석이 모두 가능하며, 상대적 정량 분석이 가능할 것으로 사료되며, 선발된 각 종 특이 프라이머 세트를 이용한 Two skin 주꾸미, One skin 주꾸미, 낙지, 돌문어, 살오징어, 한치꼴뚜기 품종의 판별이 30분내에 가능한 시스템을 개발하여 빠르고 안전하고 정확하게 수행될 수 있어서 생물 생태뿐만 아니라 수산물 가공식품에 대해서도 이를 판

별할 수 있어 식품안전관리에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.



V. 참고문헌

1. 한국농촌경제연구원 식품수급표
<http://www.krei.re.kr/web/www/search?category=TOTAL&kwd=%EC%8B%9D%ED%92%88%EC%88%98%EA%B8%89%ED%91%9C&detailSearch=&startDate=&endDate=&preKwd=&x=0&y=0>
2. 통계청 어업생산통계조사
http://www.index.go.kr/potal/main/EachDtlPageDetail.do?idx_cd=2748
3. Park, J. A., Jang Y. S. and Kim, D. H. 2014. An analysis on the changes of seafood consumption patterns by demographic characteristics. 45, 001-017.
4. 수산정보포털 품종별 수출입 현황
http://www.fips.go.kr/jsp/dp/pr/pr_kind_list.jsp?menuDepth=040302
5. 수산정보포털 어업생산통계 품종별 현황
https://www.fips.go.kr/jsp/sf/ss/ss_kind_law_list.jsp?menuDepth=070104
6. 식품의약품안전처: 용역연구개발과제 최종보고서 Development of scientific identification methods on similar imported fisheries (Cephalopods)
7. Kim, J. S. 2012. Measuring the Willingness to Pay (WTP) for Raw Seafood-Safety Attributes. 3, 51
8. 식품의약품안전처: 식품 중 사용원료 진위 판별 지침서(IV)

9. Fabrice, T., Celia, M. and Catherine, H. 2005. Food and forensic molecular identification: update and challenges, Trends in Biotech. 23, 359-366.
10. Folmer O, M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Bio and Biotech. 3, 294-299.
11. Paul D, N. Hebert, Alina Cywinska, Shelley L. Ball, Jeremy R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. Lond. B. 270, 313-321.
12. Michael T. Monaghan, Michael Balke, T. Ryan Gregory, Alfried P. Vogler. 2005. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. Philosophical Transactions of The Royal Society B. 360, 1925-1933.
13. Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Paabo, S. and Vellablanca, F. X. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proc, Natl. Acad. Sci., 86, 6196-6200.
14. Tomoaki Mitani, Atsushi Akane, Takuma Tokiyasu, Sumitaka Yoshimura, Yutaka Okii, Manabu Yoshida. 2009. Identification of animal species using the partial sequences in the mitochondrial 16S-rRNA gene. Legal Med. 11, 449-450.
15. Park, Y. C., Lim, J. Y., Kim, M. R., Park, Y. E., Lim, J. D., Hwang, C. R., Kim, K. H., Lee, J. H., Cho, T. Y., Lee, H. J., Lee, S. J., Han, S. B. 2012. Identification of faulty red pepper powder containing seasoned red-pepper sauce. 27, 182-187.

16. Espiñeira, M., Vieites, J. M., and Santaclara F. J. 2010. Species authentication of octopus, cuttlefish, bobtail and bottle squids (families Octopodidae, Sepiidae and Sepiolidae) by FINS methodology in seafoods. *Food Chem.* 121, 527-532.
17. 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(24), 9914-9920.
18. 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. 2002. Identification of Cephalopod species (Ommastrephidae and Loliginidae) in seafood products by forensically informative nucleotide sequencing (FINS). *J. Food Sci.* 67(5), 1672-1676.
19. Kim, H. S., Seo, Y. B., Choi, S. S., Kim, J. H., Shin, J. Y., Yang, J. Y. and Kim, G. D. 2015. Development and validation of multiplex polymerase chain reaction to determine squid species based on 16s rRNA Gene 30, 1229-1153.
20. deMello, A. J. 2003. Microfluidics: DNA amplification moves on. *Nature* 422, 28-29.
21. Cho, J. D., Kim, J. S., Kim, H. R., Chung, B. N. and Ryu, K. H. 2006. Convenient nucleic acid detection for tomato spotted wilt virus:virion captured/RT-PCR (VC/RT-PCR). *Res. Plant Dis.* 12, 139-143.
22. Yoon, D. S., Lee, Y. S., Cho, H. J., Sung, S. W., Oh, K. W., Cha, J. H. and Lim, G. B. 2002. Precise temperature control and rapid thermal cycling in a

micromachined DNA polymerase chain reaction chip. J. Micromech. Microeng. 12, 813-823.

23. Lee, D. W., Kim, E. H., Yoo, M. S., Han, S, H. and Yoon, B. S. 2007. Ultra-Rapid Real-Time PCR for the detection of human immunodeficiency virus (HIV). 43, 91-99.

