(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0054179
(43) 공개일자 2023년04월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6888 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6888 (2018.05)
C12Q 2537/143 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0137869
(22) 출원일자 2021년10월15일
심사청구일자 2021년10월15일

(71) 출원인
순천대학교 산학협력단
전라남도 순천시 중앙로 255(매곡동)
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)
대한민국 (식품의약품안전처장)
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187
(72) 발명자
김나예슬
광주광역시 북구 첨단연신로 166 광주첨단2지구사랑으로부영
박은지
전라남도 여수시 소미1길 39 미소하우스
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정성종

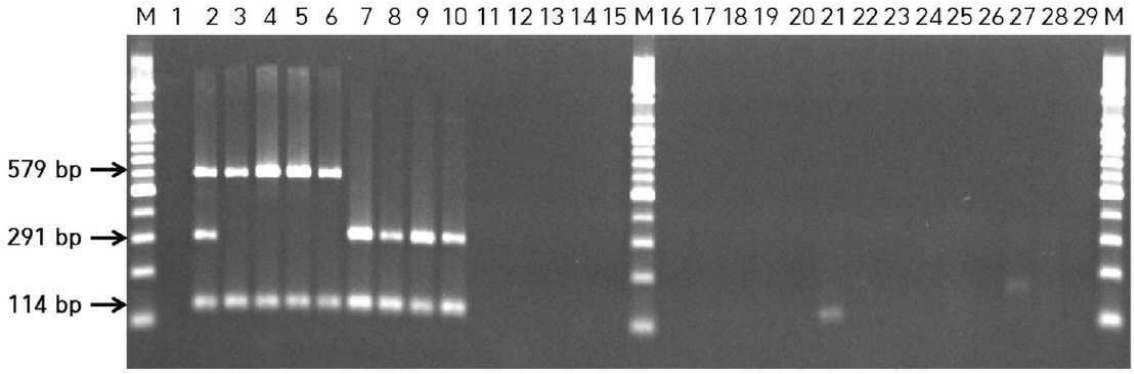
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **다랑어류 및 새치류의 신속 판별용 멀티플렉스 PCR 방법 및 이를 위한 PCR 프라이머**

(57) 요 약

본 발명은 다랑어류와 새치류를 신속하고 정확하게 판별하기 위한 신규 멀티플렉스 PCR용 프라이머 세트 조성물, 상기 조성물을 포함하는 다랑어류와 새치류를 판별하기 위한 키트, 상기 조성물을 이용한 다랑어류와 새치류를 판별하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 다랑어류 및 새치류 판별용 프라이머 세트 조성물을 사용하면 다랑어류 및 새치류의 형태학적 및 단백질 분석법보다 안정하며 높은 특이도와 민감도로서 다랑어류와 새치류를 정확하고 쉽게 판별할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

이서현

서울특별시 은평구 연서로19길 29 희망하우스

문광호

광주광역시 서구 내방로165번길 7-1

양지영

부산광역시 남구 수영로 345 대연힐스테이트푸르지오

김중범

전라남도 순천시 삼산로 103-13 현대아파트

박은미

세종특별자치시 보듬2로 42 도램마을14단지

김형수

충청북도 청주시 서원구 두꺼비로 53 청주산남푸르지오

문귀임

세종특별자치시 조치원읍 도원로 16 자이아파트

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1475010619
과제번호	DY0002256609-17162미래사064-1
부처명	식품의약품안전처
과제관리(전문)기관명	식품의약품안전평가원
연구사업명	불량식품 차단 첨단화 지원
연구과제명	유전정보를 이용한 수산물 품종 판별 및 데이터베이스 구축 연구(1)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	부경대학교
연구기간	2017.02.01 ~ 2021.11.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기서열 및 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 다랑어류 판별용 프라이머 세트; 서열번호 3으로 표시되는 염기서열 및 서열번호 4로 표시되는 염기서열로 이루어진 새치류 판별용 프라이머 세트; 및 서열번호 5로 표시되는 염기서열 및 서열번호 6으로 표시되는 염기서열로 이루어진 다랑어류와 새치류 공통 유전자용 프라이머 세트를 포함하는 다랑어류와 새치류 판별을 위한 멀트플렉스 PCR용 프라이머 세트 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 다랑어류는 참다랑어(*Thunnus thynnus*), 눈다랑어(*Thunnus obesus*), 황다랑어(*Thunnus albacares*) 및 가다랑어(*Katsuwonus pelamis*)로 구성된 군에서 하나 이상 선택되는 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 새치류는 녹새치(*Makaira mazara*), 황새치(*Xiphias gladius*), 돛새치(*Istiophorus platypterus*) 및 청새치(*Tetrapturus audax*)로 구성된 군에서 하나 이상 선택되는 것인, 조성물.

청구항 4

제1항의 조성물을 포함하는 다랑어류 및 새치류의 품종 판별용 키트.

청구항 5

(a) 제1항의 프라이머 세트 조성물을 첨가하여 PCR을 수행하는 단계; 및

(b) PCR 산물에서 다랑어류 및 새치류를 판별하는 단계;를 포함하는, 다랑어류 및 새치류의 품종 판별 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 다랑어류와 새치류를 신속하고 정확하게 판별하기 위한 신규 멀티플렉스 PCR용 프라이머 세트 조성물, 상기 조성물을 포함하는 다랑어류와 새치류를 판별하기 위한 키트, 상기 조성물을 이용한 다랑어류와 새치류를 판별하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 가짜식품(economically motivated adulteration, EMA)이란 비교적 저렴한 식품원료를 사용하거나 허위로 표시사항을 기재하여 경제적 이득을 취하기 위해 부당한 방법으로 제조된 식품이다. 가짜식품은 형태학적으로 유사하거나 가열, 건조 등 가공처리되어 유통, 판매되기 때문에 관능적인 방법으로 판별하기 어렵고, 정확도가 떨어진다. 따라서 육안이나 관능적인 방법 외에 객관적, 신뢰성을 가진 과학적인 판별법이 필요하다. 가짜식품의 식품원료 판별법으로는 등전점 전기영동법(isoelectric focusing, IEF), 면역효소측정법(enzyme immunoassay, EIA) 등을 이용하여 분석하는 단백질 검사법이 있다. 단백질 검사법은 단백질 및 특이적 항원이 가열 등의 가공처리 후에 변성되어 특이도가 떨어지고, 동일종의 경우 단백질 발현이 유사하기 때문에 판별이 불가능한 문제점이 있다(Fabric T *et.al.*, *Trends in Biotechnol*, 23:359-366, 2005). 또한 크로마토그래피로 대표되는 이화학적 검사법에는 GC(gas chromatography), HPLC(high performance liquid chromatography) 등이 있으며 식품원료에 함유된 특정 물질의 정성과 정량이 가능한 장점이 있으나 실험 방법이 복잡하고, 시약 및 장비가 고가라는 단점이 있다. 최근 사용되고 있는 식품원료 판별법으로는 유전자 검사법이 사용되고 있으며 가열 등의 가공처리 후에도 분석이 가능하기 때문에 유용하다. 유전자 검사법의 대표적인 방법은 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)으로 일부 유전자 부위를 특이적으로 증폭시켜 유전자를 분석하는 방법이다. PCR은 특이도와 민감도가 우수하고, 다수의 시료를 단시간에 분석할 수 있기 때문에 단백질 검사법이나 이화학

적 검사법에 비해 실험이 간편하다.

[0003] 다랑어류(tunas)는 농어목(Perciformes) 고등어과(Scombridae)로 참다랑어(*Thunnus thynnus*), 눈다랑어(*Thunnus obesus*), 황다랑어(*Thunnus albacares*), 가다랑어(*Katsuwonus pelamis*) 등이 있으며, 온대 및 열대해역(태평양, 대서양)에 광범위하게 분포하는 회유성 어류이다. 다랑어류는 심해성 어류로 200 m 이상의 깊은 바다에 서식하는 육식성 어류이다. 다랑어류는 DHA(docosa hexaenoic acid) 등 고도 불포화지방산을 다량 함유하고 있으며 동물성 단백질의 주요 공급원으로 높은 선호도를 나타내는 고가의 어류이다. 2004년 중서부태평양수산위원회(western and central pacific fisheries commission, WCPFC)가 설립되어 다랑어류 등 회유성 어류의 어장을 보호하기 위하여 보존관리조치(conservation and management measure, CMM)를 실시함에 따라 다랑어류에 비해 가격이 50-70% 정도 저렴한 새치류(billfish)가 다랑어류로 위변조 되어 유통, 판매되고 있다. 새치류는 다랑어류와 동일한 회유성 어류로 녹새치(*Makaira mazara*), 황새치(*Xiphias gladius*), 돛새치(*Histiophorus orientalis*), 청새치(*Tetrapturus audax*) 등이 있으며 다랑어 연승어업에서 부수적으로 어획되어진다. 통상적으로 다랑어류와 새치류는 유통, 판매 시 스테이크(steak) 또는 덩어리(chunk) 형태의 냉동 제품으로 절단하여 판매하기 때문에 형태학적 판별이 어렵다. 현재 다랑어류와 새치류 판별을 위한 PCR 검사법은 식품의약품안전처의 식품 중 사용원료 진위 판별 지침서에 수록되어있다. 지침서에 수록된 검사법은 다랑어류와 새치류 프라이머(primer)의 결합온도(annealing temperature)가 각각 60℃와 45℃로 설정되어 있어 각각에 대한 단일(single) PCR만이 가능하다. 단일 PCR은 다랑어류와 새치류를 동시에 검출하는 멀티플렉스(multiplex) PCR에 비하여 두 배의 노동력과 시간이 소요된다.

[0004] 이에 본 발명자들은 다랑어류와 새치류 검사법의 검증과 모니터링을 통해 새치류가 다랑어류로 위변조 유통되는 것을 예방하고자 연구 노력한 결과, 스테이크 또는 덩어리 형태로 유통, 판매되어 형태학적 판별이 어려운 다랑어류와 새치류의 종 특이적 멀티플렉스 PCR 프라이머를 개발함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) Fabric T et.al., Trends in Biotechnol, 23:359-366, 2005

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 다랑어류와 새치류를 판별하는데 있어서 종래 PCR 방법보다 민감하고 특이적으로 판별할 수 있는 멀티플렉스 PCR용 프라이머 세트 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 조성물을 포함하는 다랑어류 및 새치류의 품종 판별용 키트를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 프라이머 세트 조성물을 이용하여 다랑어류와 새치류를 종래 방법보다 민감하고 특이적으로 판별할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열 및 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 다랑어류 판별용 프라이머 세트; 서열번호 3으로 표시되는 염기서열 및 서열번호 4로 표시되는 염기서열로 이루어진 새치류 판별용 프라이머 세트; 및 서열번호 5로 표시되는 염기서열 및 서열번호 6으로 표시되는 염기서열로 이루어진 다랑어류와 새치류 공통 유전자용 프라이머 세트를 포함하는 다랑어류와 새치류 판별을 위한 멀트플렉스 PCR용 프라이머 세트 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 다랑어류와 새치류를 판별하기 위한 키트를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 (a) 시료에 상기 프라이머 세트 조성물을 첨가하여 PCR을 수행하는 단계; 및 (b) PCR 산물에서 다랑어류와 새치류를 판별하는 단계를 포함하는 다랑어류 및 새치류 판별 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 가공식품은 열, 건조 등의 처리에 의해 단백질 변성이 일어날 수 있어 최근 단백질에 비해 안정한 유전자를 분석하여 원재료를 판별한다. 다랑어류는 새치류와 비교하여 생물의 형태뿐만 아니라 스테이크(steak) 또는 덩어리(chunk) 형태의 냉동 제품으로 절단하여 유통, 판매되고 있어 형태학적 판별에 어려움이 있고 단백질 변성이 일어날 수 있다. 이에, 본 발명의 프라이머 세트 조성물 및 이를 이용한 판별 방법에 의할 경우 다랑어류 및 새치류의 형태학적 및 단백질 분석법보다 안정하며 높은 특이도와 민감도를 나타내어 다랑어류와 새치류를 정확하고 쉽게 판별할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 프라이머 세트의 특이도를 확인하기 위하여, 다랑어류와 새치류 이외에 19종의 어류를 대상으로 본 발명에 따른 프라이머 세트를 이용한 멀티플렉스 PCR을 수행한 결과를 나타낸 도면이다. 여기에서, 레인 1은 음성 대조군(negative control); 레인 2는 다랑어류 및 새치류 혼합물; 레인 3은 참다랑어(*Thunnus thynnus*); 레인 4는 눈다랑어(*Thunnus obesus*); 레인 5는 황다랑어(*Thunnus albacares*); 레인 6은 가다랑어(*Katsuwonus pelamis*); 레인 7은 녹새치(*Makaira mazara*); 레인 8은 황새치(*Xiphias gladius*); 레인 9는 돛새치(*Istiophorus platypterus*); 레인 10은 청새치(*Tetrapturus audax*); 레인 11은 참돔(*Pagrus major*); 레인 12는 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*); 레인 13은 감성돔(*Acanthopagrus schlegelii*); 레인 14는 옥두어(*Branchiostegus albus*); 레인 15는 광어(*Paralichthys olivaceus*); 레인 16은 참가자미(*Pleuronectes herzensteini*); 레인 17은 삼치(*Scomberomorus niphonius CUVIER*); 레인 18은 고등어(*Scomber japonicus*); 레인 19는 대구(*Gadus macrocephalus*); 레인 20은 보구치(*Pennahia argentata*); 레인 21은 부세(*Larimichthys crocea*); 레인 22는 숭어(*Mugil cephalus*); 레인 23은 참조기(*Larimichthys polyactis*); 레인 24는 틸라피아(*Tilapia mossambica*); 레인 25는 민어(*Miichthys miiuy*); 레인 26은 꽁치(*Cololabis saira*); 레인 27은 연어(*Oncorhynchus keta*); 레인 28은 갈치(*Trichiurus lepturus*); 레인 29는 오징어(*Doryteuthis bleekeri Keferstein*)이고; M은 사이즈 마커이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 프라이머 세트의 (A) 참다랑어(*Thunnus thynnus*), (B) 눈다랑어(*Thunnus obesus*), (C) 황다랑어(*Thunnus albacares*), (D) 가다랑어(*Katsuwonus pelamis*), (E) 녹새치(*Makaira mazara*), (F) 황새치(*Xiphias gladius*), (G) 돛새치(*Istiophorus platypterus*), (H) 청새치(*Tetrapturus audax*)에 대한 민감도를 확인하기 위하여, 다랑어류와 새치류의 gDNA의 농도를 100, 10, 5, 1, 0.1 ng으로 하고 본 발명에 따른 프라이머 세트를 이용한 멀티플렉스 PCR을 수행한 결과를 나타낸 도면이다. 여기에서, 레인 1은 음성 대조군(negative control); 레인 2는 양성 대조군(positive control); 레인 3은 100 ng; 레인 4는 10 ng; 레인 5는 5 ng; 레인 6은 1 ng; 레인 7은 0.1 ng이고, M은 사이즈 마커이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명에서는 스테이크(steak) 또는 덩어리(chunk) 형태로 유통, 판매되어 형태학적 판별이 어려운 다랑어류와 새치류의 종-특이적 프라이머(primer)를 개발하고, 개발된 다랑어류와 새치류 검사법의 검증과 모니터링을 통해 위변조 되어 판매되는 다랑어류의 유통을 예방하고자 하였다. 종-특이적 프라이머 개발은 NCBI에 등록되어 있는 미토콘드리아 유전자 중 COI(cytochrome oxidase subunit I) 유전자 영역을 대상으로 하였다. 다랑어류와 새치류 염기서열의 정리를 위하여 clustal omega 프로그램을 이용하였고, 프라이머의 설계를 위하여 primer3 프로그램을 사용하였다. 특이도 실험 결과, 다랑어류와 새치류의 종-특이적 증폭을 확인하였고, PCR 반응 여부를 확인하기 위한 목적으로 사용된 공통 유전자의 증폭을 확인하였다. 또한, PCR 산물이 참다랑어(*Thunnus thynnus*), 눈다랑어(*Thunnus obesus*), 황다랑어(*Thunnus albacares*) 및 가다랑어(*Katsuwonus pelamis*) 4종의 다랑어류 579 bp, 녹새치(*Makaira mazara*), 황새치(*Xiphias gladius*), 돛새치(*Istiophorus platypterus*) 및 청새치(*Tetrapturus audax*) 4종의 새치류 291 bp, 다랑어류와 새치류 모두 114 bp에서 증폭을 나타내어 PCR 산물 사이에 100 bp 이상의 차이가 나타났고, 육안으로 정확한 판별이 가능함을 확인하였다. 민감도 실험 결과, 참다랑어는 1 ng, 눈다랑어는 5 ng, 황다랑어는 5 ng, 가다랑어는 5 ng, 녹새치는 5 ng, 황새치는 5 ng, 돛새치는 5 ng, 청새치는 5 ng까지 PCR 산물이 생성되었다. 모니터링 실험 결과, 다랑어류 49건, 새치류 1건으로 판정되어 시료의 어종과 실험 결과가 100% 일치함을 확인하였고, 위변조 사례는 나타나지 않았다. 본 발명에서 개발된 다랑어류와 새치류를 판별하기 위한 멀티플렉스(multiplex) PCR 검사법은 특이도와 민감도를 확보하였고, 모니터링을 통해 시중에 유통 중인 다랑어류와 새치류의 판별에 적합함을 확인하였다.

[0015] 따라서 요약하면, 본 발명자들은 다랑어류와 새치류 검사법의 검증과 모니터링을 통해 새치류가 다랑어류로 위변조 유통되는 것을 예방하고자, 다랑어류 및 새치류를 특이적으로 검출하기 위한 멀티플렉스 PCR-기반의 신규

멀티플렉스 PCR 프라이머 세트를 개발함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0016] 하나의 양태로서, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열 및 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 다랑어류 판별용 프라이머 세트; 서열번호 3으로 표시되는 염기서열 및 서열번호 4로 표시되는 염기서열로 이루어진 새치류 판별용 프라이머 세트; 및 서열번호 5로 표시되는 염기서열 및 서열번호 6으로 표시되는 염기서열로 이루어진 다랑어류와 새치류 공통 유전자용 프라이머 세트를 포함하는 다랑어류와 새치류 판별을 위한 멀트플렉스 PCR용 프라이머 세트 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명에서 용어 "판별"은 농어목(Perciformes) 고등어과(Scombridae)에 속하는 참다랑어(*Thunnus thynnus*), 눈다랑어(*Thunnus obesus*), 황다랑어(*Thunnus albacares*), 가다랑어(*Katsuwonus pelamis*) 등의 다랑어류, 다랑어류와 동일한 회유성 어류로서 함께 어획되는 새치류, 예컨대 녹새치(*Makaira mazara*), 황새치(*Xiphias gladius*), 돛새치(*Histiophorus orientalis*), 청새치(*Tetrapturus audax*) 등의 어종의 시료로부터 본 발명의 프라이머 세트에 의하여 다랑어류와 새치류인지 여부를 판단하여 구별하는 것을 의미하며, '구별'과 혼용하여 사용할 수 있다.

[0018] 본 발명에서 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 핵산의 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 핵산 주형의 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다.

[0019] 본 발명에서 용어 "멀티플렉스 PCR(multiplex PCR)"은 복수의 프라이머 쌍을 동시에 사용하여, 복수의 표적 유전자를 같은 반응액 중에서 증폭하는 방법을 의미한다.

[0020] 본 발명의 프라이머 세트를 사용하면 기존 방식의 PCR과 달리 한 번의 PCR 반응을 통해 다랑어류와 새치류에 특이적인 유전자 및 다랑어류와 새치류에 공통적인 유전자를 동시에 증폭할 수 있으므로 다랑어류 및/또는 새치류를 효과적으로 판별할 수 있다.

[0021] 상기 프라이머 설계시, 프라이머의 A, G, C, T 함량비, 프라이머 결합체(dimer) 형성 방지, 같은 염기서열의 3회 이상 반복금지 등 여러 가지 제약이 따르며, 그 외에 단독 PCR 반응조건에 있어서 주형(template) DNA의 양, 프라이머의 농도, dNTP의 농도, Mg^{2+}의 농도, 반응온도, 반응시간 등의 조건이 적정해야 한다.

[0022] 또한, 본 발명과 같이 둘 이상의 프라이머 쌍을 혼합하여 동시에 PCR을 수행함으로써 대상 시료 내 둘 이상의 유전자를 1회에 확인하는 멀티플렉스 PCR 반응에서는, 프라이머 설계시 단독 PCR의 경우와 같은 조건이 더욱 엄격하게 요구되며, 또한 반응 완료 후 겔 상에서 증폭되는 유전자 산물의 구별을 위해서는 유전자 산물의 크기가 각각 구별이 되어야 하는 크기의 제약까지 따른다. 반응조건의 설정에 있어서도 한번에 PCR 하고자 하는 프라이머 모두에 대한 공통의 반응조건이 설정되어야 하므로, 단독 PCR에 비해서 매우 어려운 조건 설정 과정이 요구된다.

[0023] 상기의 프라이머는 기본 성질을 변화시키지 않은 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 즉, 핵산 서열이 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형될 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 뉴클레오타이드의 하나 이상의 동족체로의 치환 및 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트 또는 카바메이트 등의 하전되지 않은 연결체나 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 등의 하전된 연결체로의 뉴클레오타이드의 변형이 가능하다. 또한 핵산은 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그날 펩타이드, 폴리 L 리신 등의 단백질, 아크리딘 또는 프소랄렌 등의 삽입제, 금속, 방사성 금속, 철 산화성 금속 등의 킬레이트화제 및 알킬화제 등의 하나 이상의 부가적인 공유 결합된 잔기를 가질 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명의 프라이머 서열은 검출 가능한 시그날을 직접적 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형시킬 수 있다. 상기 프라이머는 분광학, 광화학, 생화학, 면역화학 또는 화학적 수단을 이용하여 검출될 수 있는 표지를 포함할 수 있다. 유용한 표지는 ^{32}P, 형광 염료, 전자 밀집 시약, 효소(일반적으로 ELISA에 이용되는 것), 바이오틴 또는 합텐 및 항혈청 또는 단일클론성 항체가 이용가능한 단백질을 포함한다.

[0025] 본 발명의 프라이머들은 적절한 서열의 클로닝 및 제한효소 분해 및 나랭(Narang) 등의 포스포트리에스테르 방법(1979, Meth, Enzymol. 68:90-99), 보카지(Beaucage) 등의 디에틸포스포라미다이트 방법(1981, Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862), 및 미국 특허 제4,458,066호의 고형물 지지 방법과 같은 직접적인 화학적 합성법을 포함하는 임의의 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다.

[0026] 본 발명에 있어서, "다랑어류(tunas)"는 농어목(Perciformes) 고등어과(Scombridae)로 참다랑어(*Thunnus thynnus*), 눈다랑어(*Thunnus obesus*), 황다랑어(*Thunnus albacares*), 가다랑어(*Katsuwonus pelamis*) 등이 있으며, 온대 및 열대해역(태평양, 대서양)에 광범위하게 분포하는 회유성 어류이다. 다랑어류는 심해성 어류로 200 m 이상의 깊은 바다에 서식하는 육식성 어류이다. 또한, 다랑어류는 DHA(docosa hexaenoic acid) 등 고도 불포화지방산을 다량 함유하고 있으며, 동물성 단백질의 주요 공급원으로 높은 선호도를 나타내는 고가의 어류이다.

[0027] 본 발명에 있어서, 다랑어류는 이에 제한되지는 않으나, 참다랑어(*Thunnus thynnus*), 눈다랑어(*Thunnus obesus*), 황다랑어(*Thunnus albacares*) 및 가다랑어(*Katsuwonus pelamis*)로 구성된 군에서 하나 이상 선택될 수 있다.

[0028] 본 발명에 있어서, "새치류(Billfishes)"는 상기 다랑어류와 동일한 회유성 어류로서 돛새칫과와 황새칫과에 속하는 어류를 총칭한다. 새치류는 녹새치(*Makaira mazara*), 황새치(*Xiphias gladius*), 돛새치(*Histiophorus orientalis*), 청새치(*Tetrapturus audax*) 등이 있으며 다랑어 연승어업에서 부수적으로 어획되어지는 어종이다. 한편, 새치류는 다랑어류에 비해 가격이 50-70% 정도 저렴하며, 다랑어류로 위변조 되어 유통, 판매되고 있다. 통상적으로 새치류는 다랑어류와 마찬가지로 유통, 판매 시 스테이크(steak) 또는 덩어리(chunk) 형태의 냉동 제품으로 절단하여 판매되어 형태학적 판별이 어려운 어종이다. 새치류는 모든 바다에서 발견되지만, 열대나 아열대 지역의 바다에서 더 자주 발견된다. 황새치는 온대지역에서 발견될 때도 있다.

[0029] 본 발명에 있어서, 새치류는 이에 제한되지는 않으나, 녹새치(*Makaira mazara*), 황새치(*Xiphias gladius*), 돛새치(*Istiophorus platypterus*) 및 청새치(*Tetrapturus audax*)로 구성된 군에서 하나 이상 선택될 수 있다.

[0030] 하나의 구체적 실시에서, 본 발명의 상기 프라이머 세트 조성물은 다랑어류와 새치류에 각각 종-특이적인 프라이머 및 공통 유전자 프라이머로 이루어진 것으로, 다랑어류와 새치류의 판별에 대한 특이성 및 민감도가 높아 다랑어류와 새치류가 생물인 경우 뿐만 아니라 가열, 건조 등의 가공 처리 후에도 다랑어류와 새치류를 정확하게 판별할 수 있다.

[0031] 본 발명의 다랑어류와 새치류 판별을 위한 조성물은 반응 증폭 혼합물을 더 포함할 수 있으며, 반응 증폭 혼합물은 증폭 반응을 수행하기에 필요한 시약, 열 안정성 DNA 중합효소, 데옥시뉴클레오티드, 뉴클레아제가 없는 멸균수 및 2가 금속 양이온을 함유하는 용액 등을 지칭하며, 바람직하게는 반응 완충액, 데옥시뉴클레오티드, DNA 중합효소를 포함할 수 있다.

[0032] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 다랑어류와 새치류 판별을 위한 조성물을 포함하는 다랑어류 및 새치류의 품종 판별용 키트를 제공한다.

[0033] 본 발명의 키트는 다랑어류와 새치류 판별을 위한 조성물 이외에도 증폭 반응을 수행하기에 필요한 시약, 열안정성 DNA 중합효소, 데옥시뉴클레오티드, 뉴클레아제가 없는 멸균수 및 2가 금속 양이온을 함유하는 용액 등을 지칭하며, 바람직하게는 반응 완충액, 데옥시뉴클레오티드, DNA 중합효소를 더 포함할 수 있다.

[0034] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 시료에 서열번호 1로 표시되는 염기서열 및 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 다랑어류 판별용 프라이머 세트; 서열번호 3으로 표시되는 염기서열 및 서열번호 4로 표시되는 염기서열로 이루어진 새치류 판별용 프라이머 세트; 및 서열번호 5로 표시되는 염기서열 및 서열번호 6으로 표시되는 염기서열로 이루어진 다랑어류와 새치류 공통 유전자용 프라이머 세트를 첨가하여 PCR을 수행하는 단계; 및 (b) PCR 산물에서 다랑어류 및 새치류를 판별하는 단계를 포함하는 다랑어류 및 새치류의 품종 판별 방법을 제공한다.

[0035] 본 발명에서 상기 시료는 다랑어류와 새치류를 포함한 다양한 어류로부터 분리한 DNA일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036] 본 발명에 따른 다랑어류와 새치류 판별 방법을 수행함에 있어, 당업자에게 자명한 시료 농도, dNTP 농도와 적합한 온도 등에서 반응을 수행할 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 바람직하게는 PCR 반응 용액 20 ㎕에 5 ㎕의 gDNA, PCR 완충 용액을 사용하는 것이 좋다.

[0037] 또한 PCR을 수행함에 있어, 95℃에서 초기 변성(initial denaturation)을 5분, 95℃에서 20초 동안 변성(denaturation), 50℃에서 20초 동안 어닐링(annealing), 그리고 72℃에서 30초 동안 서열을 신장(extension)시키는 방식으로 한 사이클을 구성하며, 상기 사이클을 25번 반복하고 마지막으로 72℃에서 5분 동안 최종 신장(extension)을 수행한다. 그러나, 상기에서 어닐링 온도를 72℃로 유지하는 경우 나머지의 온도는 PCR 반응을

수행하기에 적합할 정도이면 당업자의 입장에서 적절한 정도로 조절할 수 있다.

[0038] 상기 멀티플렉스 PCR을 수행하여 시료에 존재하는 유전자를 증폭한 후 이를 아크릴아미드 겔 또는 아가로오스 겔에 전기영동하고 밴드를 확인한다.

[0039] 본 발명의 다랑어류 및 새치류 판별 방법을 사용하면 시료로부터 1200 g/㎕에서 1 ng/㎕ 수준까지 유전자를 증폭할 수 있으므로 민감도 및 특이도가 높다는 장점이 있다.

[0040] 이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0041] **준비예 1: 시료 준비**

[0042] 본 발명에 사용된 표준시료 참다랑어(*Thunnus thynnus*), 눈다랑어(*Thunnus obesus*), 황다랑어(*Thunnus albacares*), 가다랑어(*Katsuwonus pelamis*), 녹새치(*Makaira mazara*), 황새치(*Xiphias gladius*), 돛새치(*Istiophorus platypterus*), 청새치(*Tetrapturus audax*) 등을 부경대학교 식품공학과로부터 제공받았고, 모니터링 시료는 시중 유통 중인 다랑어류 총 50건을 구입하여 사용하였다.

[0043] **준비예 2: 게놈 DNA 추출**

[0044] 게놈(genomic) DNA의 추출은 PowerPrep™ DNA Extraction from Food and Feed Kit(Kogenebiotech, Seoul, KOREA)를 사용하였으며, 추출 방법은 제조사의 권장 방법을 따랐다. 추출된 게놈 DNA의 농도 측정은 PICO 200 UV/Vis 분광광도계(Picodrop, Hinxton, UK)를 사용하였다.

[0045] **실험예 1: 종-특이적 멀티플렉스 프라이머 설계**

[0046] 종-특이적 멀티플렉스 프라이머(species-specific multiplex primer)와 공통 유전자 프라이머의 설계는 NCBI(National center for biotechnology information, http://www.ncbi.nlm.nih.gov)에 등록되어 있는 참다랑어(*T. thynnus*), 눈다랑어(*T. obesus*), 황다랑어(*T. albacares*), 가다랑어(*K. pelamis*), 녹새치(*M. mazara*), 황새치(*X. gladius*), 돛새치(*I. platypterus*), 청새치(*T. audax*)의 COI(cytochrome oxidase subunit I) 유전자 염기서열을 대상으로 하였다. Clustal omega(EMBL, http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo) 프로그램을 이용하여 염기서열을 정렬하였고, primer3(http://primer3.ut.ee/) 프로그램을 이용하여 프라이머를 설계하였다.

[0047] **실험예 2: PCR(Polymerase chain reaction) 증폭 반응**

[0048] PCR 증폭 반응은 *AccuPower* PCR PreMix(Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하였고, PCR 반응액 20 ㎕는 게놈 DNA 3 ㎕(10 ng), 프라이머 2 ㎕(10 pmol), 멸균증류수(distilled water) 15 ㎕로 하였다. PCR 장비는 AllInOneCycler™ Fast 96 well PCR system(Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하였으며, PCR 반응 조건은 95℃에서 5분간 초기 변성(initial denaturation)을 실시한 후, 95℃에서 20초간 변성(denaturation), 50℃에서 20초간 어닐링(annealing), 72℃에서 30초간 신장(extension)으로 총 25 사이클(cycle)을 반복하고, 최종적으로 72℃에서 5분간 신장(extension)을 실시하여 PCR을 완료하였다. 최종 증폭산물의 확인은 PCR 산물(product) 3 ㎕를 1.5% 아가로즈 겔에 로딩하고 110 V에서 30분 동안 전기영동하여 확인하였다.

[0049] **실험예 3: 종-특이적 멀티플렉스 프라이머의 특이도 확인**

[0050] 종-특이적 멀티플렉스 프라이머와 공통 유전자 프라이머의 특이도는 참다랑어(*T. thynnus*), 눈다랑어(*T. obesus*), 황다랑어(*T. albacares*), 가다랑어(*K. pelamis*), 녹새치(*M. mazara*), 황새치(*X. gladius*), 돛새치(*I. platypterus*), 청새치(*T. audax*) 8종의 표준시료와, 참돔(*Pagrus major*), 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*), 감성돔(*Acanthopagrus schlegelii*), 옥두어(*Branchiostegus albus*), 광어(*Paralichthys olivaceus*), 참가자미(*Pleuronectes herzensteini*), 삼치(*Scomberomorus niphonius CUVIER*), 고등어(*Scomber japonicus*), 대구(*Gadus macrocephalus*), 보구치(*Pennahia argentata*), 부세(*Larimichthys crocea*), 숭어(*Mugil cephalus*), 참조기(*Larimichthys polyactis*), 틸라피아(*Tilapia mossambica*), 민어(*Miichthys miiuy*), 꽁치(*Cololabis saira*), 연어(*Oncorhynchus keta*), 갈치(*Trichiurus lepturus*), 오징어(*Doryteuthis bleekeri Kefer-stein*) 19종의 어류로부터 추출한 DNA, 및 멸균증류수(음성 대조군(negative control))를 사용하여 평가하였다. 특이도 실험의 주형(template) DNA 농도는 10 ng이 되도록 희석하여 3반복 실험하였다.

[0051] **실험예 4: 종-특이적 프라이머의 민감도 확인**

[0052] 종-특이적 프라이머와 공통 유전자 프라이머의 민감도는 참다랑어(*T. thynnus*), 눈다랑어(*T. obesus*), 황다랑어

(*T. albacares*), 가다랑어(*K. pelamis*), 녹새치(*M. mazara*), 황새치(*X. gladius*), 돛새치(*I. platypterus*), 청새치(*T. audax*)의 게놈 DNA 농도가 100 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng, 0.1 ng이 되도록 희석하여 3회 반복 실험하였다.

[0053] **실험예 5: 모니터링**

[0054] 새치류를 다랑어류로 위변조하여 판매하는 현황을 파악하고자, 다랑어류와 새치류 50건을 개발된 멀티플렉스(multiplex) PCR 검사법을 이용하여 실험하였다. 이때, 다랑어류의 위조는 라벨링 정보와 실험 결과를 비교하여 확인하였다.

[0055] **실시예 1: 종-특이적 멀티플렉스 프라이머 개발 및 이를 이용한 다랑어류와 새치류의 종 판별**

[0056] 형태학적으로 유사한 다랑어류와 새치류의 종 판별을 위해 종-특이적 프라이머를 개발하였다. 종 특이적 프라이머 설계는 NCBI에 등록되어 있는 미토콘드리아 유전자 중 COI(cytochrome oxidase subunit I) 유전자 영역을 대상으로 하였다. Clustal omega 프로그램을 이용하여 염기서열을 정렬하였으며, primer3 프로그램을 이용하여 프라이머를 설계하였다(표 1). 구체적으로, 하기 표 1에 다랑어류와 새치류 종 판별을 위해 설계한 프라이머 서열 및 증폭 산물의 크기를 정리하여 나타내었다.

표 1

[0057]

종(Species)		염기서열(Sequences)	서열 번호	증폭산물 크기 (Product size)	타겟 유전자 (Target gene)
다랑어류 (Tunas)	정방향	5'-CACGGCCTTAAGCTTGCTC-3'	1	579	*COI*[1)]
	역방향	5'-GCAGGGTCGAAGAAGGTTG-3'	2		
새치류 (Billfishes)	정방향	5'-AGCCAACCTGGCGCTTTACTA-3'	3	291	*COI*
	역방향	5'-GTGGGCTAGGTTTCCTGCTA-3'	4		
내재 대조군 DNA (Internal control DNA)	정방향	5'-GCCCACTTCCACTACG-3'	5	114	*COI*
	역방향	5'-GATTTTTGTTCATGTGCTG-3'	6		

[0058] [1)] *COI* : 시토크롬 c 산화효소 서브유닛 I(Cytochrome c oxidase subunit I)

[0059] 상기 개발된 멀티플렉스 프라이머(표 1 참조)를 이용하여 다랑어류와 새치류의 종 판별 실험 결과, 참다랑어(*T. thynnus*), 눈다랑어(*T. obesus*), 황다랑어(*T. albacares*), 가다랑어(*K. pelamis*) 4종의 다랑어류는 579 bp, 녹새치(*M. mazara*), 황새치(*X. gladius*), 돛새치(*I. platypterus*), 청새치(*T. audax*) 4종의 새치류는 291 bp, PCR 유무를 확인하기 위한 다랑어류와 새치류 공통유전자 프라이머는 114 bp의 PCR 산물이 생성되었다(도 1).

[0060] 종래 단일 PCR 분석법(single PCR assay)은 하나의 주형 DNA만 증폭하므로, PCR 밴드(band)가 증폭되지 않으면 주형 DNA가 없는지 또는 PCR 반응이 일어나지 않았는지 구분할 수 없는 단점을 지닌다. 그러나, 본 발명에서 개발한 상기 표 1의 멀티플렉스 프라이머 세트를 이용한 멀티플렉스 PCR 분석법(Multiplex PCR assay)은 내재 대조군 프라이머(control primer)를 가지고 있기 때문에, 주형 DNA가 존재하는지 또는 PCR 반응이 일어나지 않았는지를 구분할 수 있는 이점을 지닌다. 따라서, 내재 프라이머(internal primer)를 포함한 멀티플렉스 PCR 분석법은 PCR 반응 결과 중 위음성(false negatives)을 방지한다. 다만, 앰플리콘(amplicon) 크기를 구별하기 위해 동일한 어닐링 온도를 가진 종-특이적 멀티플렉스 프라이머 세트를 설계하는 것은 용이하지 않다.

[0061] 상기 개발한 표 1의 멀티플렉스 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 PCR을 수행한 결과를 요약하면, 멀티플렉스 프라이머는 다랑어류에서 579 bp 앰플리콘, 새치류에서 291 bp 앰플리콘, 내재 대조군 프라이머에서 114 bp 앰플리콘을 증폭시킴을 알 수 있었다. 이러한 결과는 다랑어류와 새치류를 판별하는 데 적합한 새로운 종-특이적 멀티플렉스 프라이머로 유용하게 사용할 수 있음을 알 수 있었다(도 1).

[0062] **실시예 2: 다랑어류와 새치류에 대한 종-특이적 멀티플렉스 프라이머의 PCR 특이도 확인**

[0063] 특이도란 "목적하는 대상(target)만을 선택적으로 검출하는 능력 및 목적하지 않는 대상을 구별할 수 있는 능력"을 의미한다. 상기 신규 개발한 표 1의 멀티플렉스 프라이머를 이용한 멀티플렉스 PCR 분석 결과, 다랑어류와 새치류 종-특이적 프라이머가 각각 다랑어류와 새치류 주형(template) DNA만을 증폭하여 목적하는 다랑어류와 새치류에 대한 종-특이적 증폭이 가능함을 확인하였다. 한편, 공통 유전자 프라이머, 즉, 내재 유전자 대

조군 프라이머는 다랑어류 4종(참다랑어(*T. thynnus*), 눈다랑어(*T. obesus*), 황다랑어(*T. albacares*), 가다랑어(*K. pelamis*))과 더불어 부세(*Larimichthys crocea*) 주형 DNA를 증폭시켜 비특이적 증폭이 관찰되었으나, 다랑어류와 새치류 PCR 반응 여부를 확인하기 위한 목적은 만족되었다(도 1). 또한, 연어 주형(template) DNA에서 190 bp의 비특이적 증폭이 나타났으나 다랑어류, 새치류 및 공통 유전자 프라이머와 다른 염기쌍(base pair)을 나타내어 개발된 판별법에 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

[0064] 상기 신규 개발된 표 1의 멀티플렉스 프라이머를 이용한 멀티플렉스 PCR 특이도 실험 결과를 요약하면, 다랑어류와 새치류에 대한 종-특이적 증폭을 나타냄을 알 수 있었고, PCR 반응 여부를 확인하기 위한 공통 유전자 프라이머 또한 다랑어류와 새치류에 증폭을 나타내었다. 상세하게는, PCR 산물이 참다랑어(*T. thynnus*), 눈다랑어(*T. obesus*), 황다랑어(*T. albacares*), 가다랑어(*K. pelamis*) 4종의 다랑어류는 579 bp, 녹새치(*M. mazara*), 황새치(*X. gladius*), 돛새치(*I. platypterus*), 청새치(*T. audax*) 4종의 새치류는 291 bp, 다랑어류와 새치류 모두 114 bp에서 증폭을 나타내어 PCR 산물 사이에 100 bp 이상의 차이가 나타났고, 육안으로 정확한 판별이 가능함을 확인하였다(도 1).

[0065] **실시예 3: 다랑어류와 새치류에 대한 종-특이적 멀티플렉스 프라이머의 PCR 민감도 확인**

[0066] 민감도란 "분석 대상물질의 농도 변화에 따른 측정값의 변화에 대한 비율"을 의미한다. 주형으로 사용된 다랑어류와 새치류 게놈(genomic) DNA는 100 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng, 0.1 ng의 농도로 희석하여 민감도 실험의 주형(template) DNA로 사용하였다. 상기 신규 개발된 표 1의 멀티플렉스 프라이머를 이용한 멀티플렉스 PCR 실험 결과, 참다랑어(*T. thynnus*)는 1 ng, 눈다랑어(*T. obesus*)는 5 ng, 황다랑어(*T. albacares*)는 5 ng, 가다랑어(*K. pelamis*)는 5 ng, 녹새치(*M. mazara*)는 5 ng, 황새치(*X. gladius*)는 5 ng, 돛새치(*I. platypterus*)는 5 ng, 청새치(*T. audax*)는 5 ng까지 PCR 산물이 생성되었다(도 2). 다랑어류와 새치류 8종의 실험 결과를 바탕으로 5 ng을 민감도로 판정하였다. 이러한 결과는 PCR 검사법에서 100 ng 이하를 주형 DNA 농도로 설정한다는 일반적인 규칙을 만족하였다.

[0067] 상기 신규 개발된 표 1의 멀티플렉스 프라이머를 이용한 멀티플렉스 PCR 민감도 실험 결과를 요약하면, 다랑어류와 새치류 8종에 대한 멀티플렉스 PCR 분석의 민감도가 5 ng인 것으로 확인되었고, 다랑어류와 새치류를 구별하는데 적합한 멀티플렉스 PCR 분석의 민감도를 나타냄을 알 수 있었다. 따라서, 본 발명에서 개발된 신규한 종-특이적 멀티플렉스 프라이머가 다랑어류와 새치류를 구별하는데 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0068] 상기 일련의 결과를 통해, 다랑어류와 새치류를 판별하기 위한 멀티플렉스(multiplex) PCR 검사법의 특이도와 민감도는 확보되었고, 한 번의 실험으로 다랑어류와 새치류를 모두 검출하여 노동력과 비용을 절감할 수 있음을 알 수 있었다.

[0069] **실시예 4: 다랑어류와 새치류에 대한 종-특이적 멀티플렉스 프라이머를 이용한 멀티플렉스 PCR 분석법에 의한 모니터링**

[0070] 본 발명에서 개발된 다랑어류와 새치류를 판별하기 위한 멀프플렉스 PCR 검사법을 이용하여 시중에 유통 중인 다랑어류와 새치류 시료 50건을 실험하였다(표 2). 하기 표 2에 시중에 유통 중인 다랑어류와 새치류의 모니터링 결과를 정리하여 나타내었다.

[0071] 다랑어류와 새치류에 대한 종-특이적 멀티플렉스 프라이머(표 1 참조)를 이용한 멀티플렉스 PCR 분석법으로 시중에 유통 중인 다랑어류와 새치류의 모니터링 실험 결과, 다랑어류 49건, 새치류 1건으로 판정되었고 다랑어류와 새치류의 위변조 사례는 나타나지 않았다(표 2). 새치류로 확인된 1건의 경우 포장지 전면에 참치라는 글자와 사진을 표기하였으나, 후면의 제품 설명서에는 '흑새치(*I. indica*) 100%'로 표기되어 있어 일반 소비자가 새치를 다랑어류로 혼동하여 구입할 우려가 있는 것으로 판단되었다. 모니터링 결과 제품명과 원재료가 일치하지 않아 소비자에게 혼란을 야기할 수 있으므로, 포장지의 표기 기준에 대한 명확한 기준이 필요함을 알 수 있었다.

표 2

[0072]

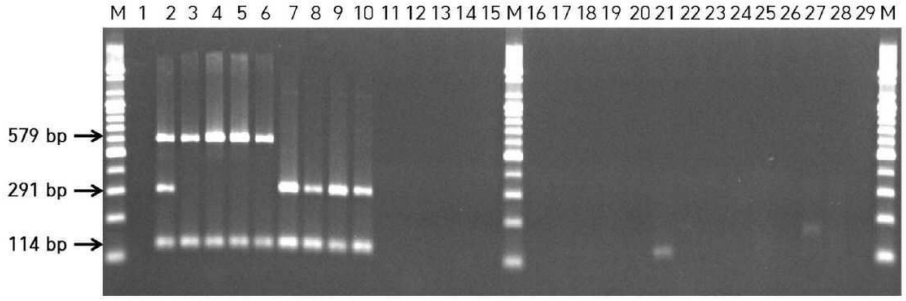
어류 종 (Fish species)	시료 수 (No. sample)	일치 수 (No. agreement)	판단(%) (Decision, %)
다랑어류(Tunas)	49	49	100
새치류(Billfishes)	1	1	100

[0073] 종합하면, 단일(single) PCR 프라이머와 비교하여 멀티플렉스(multiplex) PCR 프라이머는 동일한 어닐링 온도에서 다랑어류, 새치류 및 내재 유전자 대조군에 대한 종-특이적 유전자 증폭이 가능하도록 설계되어야 한다. 또한, 멀티플렉스 PCR 프라이머는 서로 상호작용하지 않도록 설계되어야 한다. 아울러, PCR 증폭 산물은 시각적으로 구별하기 위해 최소 100bp 차이가 있어야 한다. 현재 식품의약품안전처(NIFDS, 2015)에서는 단일 PCR 분석만이 보고되고 있다.

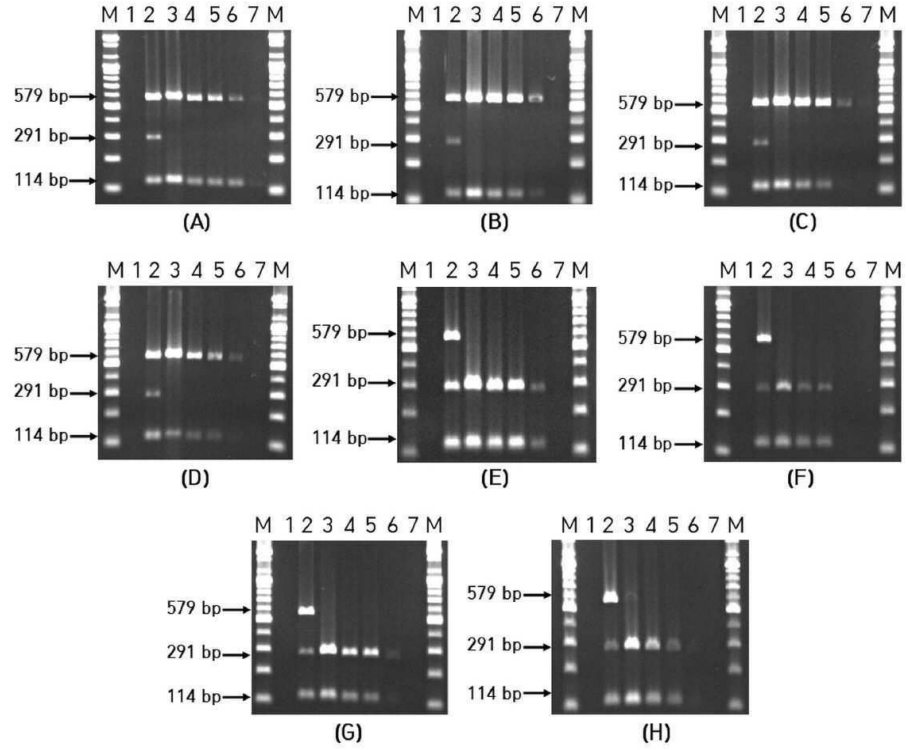
[0074] 본 발명에서 신규 개발한 멀티플렉스 프라이머를 이용한 멀티플렉스 PCR 분석법에 의한 PCR 밴드가 다랑어류에서 579 bp 앰플리콘, 새치류에서 291 bp 앰플리콘, 내재 유전자 대조군 프라이머에서 114 bp 앰플리콘이 증폭됨을 확인하였다. 멀티플렉스 PCR 밴드는 다랑어류와 새치류를 구별하기 위해 100bp 이상 차이가 나며, 민감도는 5 ng인 것으로 확인되었다. 본 발명에서 개발된 종-특이적 프라이머는 다랑어류와 새치류를 구별하는데 적합함을 알 수 있었다. 따라서, 본 발명자들은 본 발명에서 신규 개발한 멀티플렉스 프라이머를 이용한 멀티플렉스 PCR 분석법이 다랑어류와 새치류의 진위 여부를 결정하는 시간과 비용 효율적인 기법임을 알 수 있었다.

도면

도면1



도면2



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION OF SUNCHON NATIONAL UNIVERSITY
Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation
<120> Multiplex PCR assays for discriminating between tunas and billfishes and PCR primer therefor
<130> PA-21-0190
<160> 6
<170> KoPatentIn 3.0
<210> 1
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Forward primer for detecting Tunas
<400> 1
cacggcctta agcttgctc 19

<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Reverse primer for detecting Tunas
<400> 2
gcagggtcga agaaggttg 19
<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Forward primer for detecting Billfishes
<400> 3
agccaacctg gcgctttact a 21
<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220
><223> Reverse primer for detecting Billfishes

<400> 4

gtgggctagg tttcctgcta 20

<210> 5

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for detecting Internal control DNA

<400> 5

gcccacttcc actacg 16

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for detecting Internal control DNA

<400> 6

gatttttgtt catgtgctg 19