



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0114762
(43) 공개일자 2022년08월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6888 (2018.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/6888 (2018.05)

(21) 출원번호 10-2021-0018150

(22) 출원일자 2021년02월09일

심사청구일자 2021년02월09일

기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)

대한민국 (식품의약품안전처장)

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187

(72) 발명자

양지영

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교 대연캠퍼스(대연동)

최이슬

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교 대연캠퍼스(대연동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

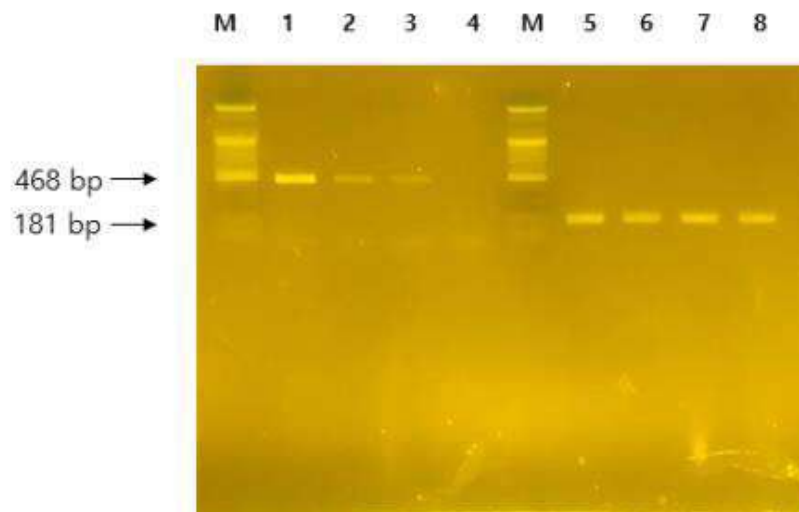
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **참돔 및 홍민어 판별용 바이오마커 및 이의 용도**

(57) 요약

홍민어를 경제적 가치가 높은 어종인 참돔으로 둔갑해 판매하는 것을 적발하기 위해서 그에 대한 식별 방법을 제시하였다. 종래의 어체 자체만을 소비하던 형태에서 수산 식품들의 소비되는 방법이 다양하게 변화하였고, 현재는 회나 가공품으로의 판매 형식으로 급속히 발전되었다. 이에 따라, 가공된 식품에서도 분석할 수 있어야 하고, 여러 종이 혼입되어 있더라도 판별 가능한 방법이 요구되어졌다. 따라서, 본 발명에서 개발한 프라이머를 이용해 multiplex PCR하여 참돔과 홍민어를 명확하게 판별하는 방법을 제시하였다. 이는 각 개체만의 특이적인 서열을 바탕으로 판별하는 것으로, 참돔과 홍민어를 혼용 판매하는 것을 방지할 수 있어 소비자의 권익보호와 소비시장의 활성화에 기여 될 것으로 기대된다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

신지영

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교 대연캠퍼스(대연동)

김종오

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교 해양생명과학연구소(대연동)

박은미

세종특별자치시 보듬2로 42, 1403동 302호(도담동, 도람마을14단지)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1475011710
과제번호	17162미래사064
부처명	식품의약품안전처
과제관리(전문)기관명	식품의약품안전평가원
연구사업명	불량식품 차단 첨단화 지원
연구과제명	수산물 형태학적 분류기준 설정 및 데이터베이스 구축 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	부경대학교 산학협력단
연구기간	2017.02.01 ~ 2021.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 및 서열번호 2의 각각의 염기서열로 표시되는 프라이머 세트; 또는 서열번호 3 및 서열번호 4의 각각의 염기서열로 표시되는 프라이머 세트;를 유효성분으로 포함하는, 참돔(*Pagrus major*) 또는 홍민어(*Sciaenops ocellatus*) 판별용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 서열번호 1 및 서열번호 2의 각각의 염기서열로 표시되는 프라이머 세트는 16S rRNA 임을 특징으로 하는, 참돔(*Pagrus major*) 또는 홍민어(*Sciaenops ocellatus*) 판별용 바이오마커 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 서열번호 3 및 서열번호 4의 각각의 염기서열로 표시되는 프라이머 세트는 12S rRNA 임을 특징으로 하는, 참돔(*Pagrus major*) 또는 홍민어(*Sciaenops ocellatus*) 판별용 바이오마커 조성물.

청구항 4

제1항에 따른 참돔(*Pagrus major*) 또는 홍민어(*Sciaenops ocellatus*) 판별용 바이오마커 조성물; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약;을 포함하는, 참돔(*Pagrus major*) 또는 홍민어(*Sciaenops ocellatus*) 판별용 키트.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함하는 것을 특징으로 하는, 참돔(*Pagrus major*) 또는 홍민어(*Sciaenops ocellatus*) 판별용 키트.

청구항 6

- 1) 참돔(*Pagrus major*) 또는 홍민어(*Sciaenops ocellatus*)가 포함되어 있는 시료에서 DNA를 추출하는 단계;
- 2) 상기 제1항에 따른 프라이머 세트를 포함하는 조성물을 이용하여, 상기 단계 1)에서 분리된 시료의 게놈 DNA의 증폭반응을 수행하여 증폭 산물을 제조하는 단계; 및
- 3) 상기 단계 2)의 증폭 산물을 검출하는 단계;를 포함하는, 참돔(*Pagrus major*) 또는 홍민어(*Sciaenops ocellatus*)의 판별방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 판별방법은,

단계 3)의 증폭 산물을 검출한 후에 전기영동을 통해 DNA 밴드가 468 bp인 경우 참돔으로, DNA 밴드가 181 bp인 경우 홍민어로 판별하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 참돔(*Pagrus major*) 또는 홍민어(*Sciaenops ocellatus*)의 판별방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 1단계의 시료는 가공 처리된 식품인 것을 특징으로 하는, 참돔(*Pagrus major*) 또는 홍민어(*Sciaenops*

ocellatus)의 판별방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 3단계의 검출은 모세관 전기영동, DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행되는, 참돔(*Pagrus major*) 또는 홍민어(*Sciaenops ocellatus*)의 판별방법.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 1단계의 시료는 0.1 ng/μL 내지 1 ng/μL인 것을 특징으로 하는, 참돔(*Pagrus major*) 또는 홍민어(*Sciaenops ocellatus*)의 판별방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 참돔(*Pagrus major*) 및 홍민어(*Sciaenops ocellatus*) 판별용 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 최근 원재료를 값싼 다른 원료로 속여 판매하거나, 표시사항을 허위로 기재하는 등의 식품 불량 판매 사례가 있다(Kim K. H., Kim Y. S., Kim M. R., Lee H. Y., Jung Y. K., Lee J. H., Chang H. S., Park Y. C., Kim S. Y., Choi J. D., Jang Y. M.: Development of species-specific primer to determine the authenticity of vegetable raw materials in food. *Food Eng. Prog.*, 18(4), 419- 426. (2014)). 식품 불량은 식품의 생산, 제조, 유통 그리고 판매까지 모든 단계에서 법을 위반한 제품으로, 최근에는 국민에게 불안감을 주는 식품을 의미한다. 이러한 불법 식품 유통은 국민의 건강을 위협할 뿐만 아니라 식품유통 질서를 어지럽히고 있다. 특히, 이중 혼합 식품이나 불법 식품의 경우 가공시 외관이나 관능적인 방법으로 원재료의 판별이 어려워 가공 후에도 원재료 판별이 가능한 과학적인 판별법이 필요하다. 원재료 판별법에는 단백질 분석법, 이화학적 분석법 및 유전자 분석법 등이 있다(Kim K. H., Lee H. Y., Kim Y. S., Kim M. R., Jung Y. K., Lee, J. H., Chang H. Y., Park Y. C., KIM S. Y. Choi. J. D. and Jang, Y. M.: Development of species-specific PCR to determine the animal raw material. *J. Fd Hyg. Safety*, 29(4), 347-355. (2014)). 단백질을 이용한 판별법에는 등전점 전기영동(Isoelectric focusing, IEF), 모세관 전기영동(Capillary electrophoresis, CE) 등이 있으며(Chung I. Y., Seo Y. B., Yang J. Y. and Kim G. D.: Development and Validation of Real-time PCR to Determine *Branchiostegus japonicus* and *B. albus* Species Based on Mitochondrial DNA. *J. Life Sci.*, 27(11), 1331-1339. (2017)), 이와 같은 단백질을 이용한 판별법은 열처리 및 건조시 단백질이 쉽게 분해될 수 있고, 단백질 변성에 의해 감수성이 떨어진다는 단점이 있어 가공식품에 적합하지 않다(Sivaraman, B., Jeyasekaran, G., Shakila, R. J., Aanand, S., Sukumar, D.: Authentication of nine snapper species by single-strand conformation polymorphism(SSCP) and forensically informative nucleotide sequencing(FINS) methods. *Food Control*, 99, 124-130. (2019)). 이화학적 분석법에는 고속 액체 크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC), 가스 크로마토그래피(Gas Chromatography, GC) 등이 있다(Kim N. Y. S., Yang J. Y. and Kim J. B.: Development and validation of a PCR method to discriminate between *Branchiostegus japonicus* and *Branchiostegus albus*. *J. Food Sci. Technol.*, 51(3), 295-299. (2019)). 크로마토그래피를 이용한 판별법은 특정 물질의 정량 및 정성이 가능하지만 실험 방법이 복잡하고, 고가의 장비를 사용해야한다는 단점이 있다. 반면, 유전자 분석법을 이용한 판별법은 단백질 기반의 판별법보다 특이성 및 감도가 높고, 단백질보다 열에 강하여 가공 처리된 시료에서 보다 안정적인 결과를 얻을 수 있다(Axayacatl RO, Juan PCG.: Molecular identification of dolphinfish species(genus *Coryphaena*) using multiplex haplotype-specific PCR of mitochondrial DNA. *Ichthyol. Res.* 55: 389-393(2008), Hold, G. L., Russell, V. J., Pryde, S. E., Rehbein, H., Quinteiro, J., Vidal, R., Rey-Mendez M., Sotelo C. G., Perez-Martin R. I. and Santos T.

and Rosa, C.: Development of a DNA-based method aimed at identifying the fish species present in food products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(3), 1175-1179. (2001)). 유전자 분석법의 일종인 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)은 일부 유전자를 증폭시키는 방법으로 신속성, 특이도, 민감도, 간편성 등이 우수하여 식품원료 동정에 이용되고 있다 (Park Y. C., Jung Y. H., Kim M. R., Shin J. H., Kim K. H. Lee J. H., Cho T. Y., Lee H. J., Lee S. J. and Han S.B.: Development of Detection Method for *Nippon spinosus*, *Epinephelus bruneus*, and *Epinephelus septemfasciatus* using 16S rRNA Gene. *Kor. J. Food Sci. Technol*, 45(1), 1-7. (2013)).

[0004] 한편, 참돔(*Pagrus major*)은 농어목(*Perciformes*) 도미과(*Sparidae*)에 속하며, 전 세계적으로 33속 155종으로 알려져 있다(Armani, A., Guardone, L., Castigliengo, L., D'Amico, P., Messina, A., Malandra, R., Gianfaldoni D., Guidi, A.: DNA and Mini-DNA barcoding for the identification of Porgies species(family Sparidae) of commercial interest on the international market. *Food Control*, 50, 589-596. (2015)). 참돔은 우리나라 전 연안과 일본, 중국, 하와이 등의 연안에 분포하며, 수심 30~150 m의 대륙붕 암초지대에서 주로 서식한다(Zenitani, H., Onishi, Y., & Obata, Y.: Spawning grounds of red sea bream in the east Seto Inland Sea. *Fisheries Science*, 80(3), 499-504. (2014)). 참돔은 회, 구이 등 다양한 고급 식재료로 이용되며(Jin S. Y., Im Y. J., Choi J. H., Jeong J. M., Nam K. M., Kim D. G., Choi Y. J. and Baeck G. W.: Maturation and Spawning of the Red Seabream(*Pagrus major*) in the South Sea of Korea. *Korean J Fish Aquat Sci*, 53(1), 43-49. (2020)), 많은 수요로 인해 세계적으로 중요한 해양 어종 중 하나이지만(Son M. Y., Choi K. M., Joo M. S., Park C. I.: Molecular Characterization and Expression Analysis of the Interleukin 7 Receptor Alpha Chain(IL-7R α) Gene from Red SeaBream(*Pagrus major*). *JFMSE*, 32(2), 560-569. (2020)), 횡감으로 이용 시 형태학적으로 구분이 어려워 틸라피아, 홍민어 등을 참돔으로 속여 파는 사례가 빈번하게 발생하고 있다(Chung J. Y., Jung Y. M.: A Study on Comparative Analysis of Food Characteristics of Sea Bream and Similar Species. *Culinary Science & Hospitality Research*, 23(2), 159-168. (2017)). 그 중 홍민어(*Sciaenops ocellatus*)는 농어목(*Perciformes*) 민어과(*Sciaenidae*)에 속하며, 미국 대서양 연안 및 멕시코만 북부에 서식하는 온대성 어종으로(Choi Y. U., Rho S. and Lee Y. D.: Effect of Water Temperature and Stocking Density on Growth of Juvenile Red Drum *Sciaenops ocellatus*. *Journal of Aquaculture*, 15(3), 131-138. (2002), Turner, T. F., Richardson, L. R., and Gold, J. R.: Polymorphic microsatellite DNA markers in red drum(*Sciaenops ocellatus*). *Molecular Ecology*, 7(12), 1771-1773. (1998)), 참돔과 형태학적으로 유사하지는 않으나 횡감이나 필렛으로 가공 처리시 판별이 어려워 피해 사례가 발생하고 있다.

[0005] 현재까지 참돔과 홍민어 판별법으로는 SDS-전기영동을 이용한 실험법이 보고되었으나 전기영동 결과 어종 판별에 특이적인 band가 나타나지 않아 새로운 어종 판별 기술이 필요할 것으로 보고하고 있다(Chung J. Y., Jung Y. M.: A Study on Comparative Analysis of Food Characteristics of Sea Bream and Similar Species. *Culinary Science & Hospitality Research*, 23(2), 159-168. (2017)). 따라서, 본 발명에서는 PCR을 이용하여 참돔과 홍민어를 구분할 수 있는 프라이머에 대한 것을 기술적 특징으로 한다.

[0006] PCR 판별 방법에는 Single, Multiplex PCR 또는 Real-time PCR 등이 있다. 현재 PCR을 이용한 진위판별법에는 옥돔과 옥두어 유전자 분석법(Kim N. Y. S., Yang J. Y. and Kim J. B.: Development and validation of a PCR method to discriminate between *Branchiostegus japonicus* and *Branchiostegus albus*. *J. Food Sci. Technol*, 51(3), 295-299. (2019)), 전갱이속 어종 판별법(Park Y. J., Lee M. N., Kim E. M., Noh E. S., Noh J. K., Park J. Y., Kang J. H.: Development of the Duplex PCR Method of Identifying *Trachurus japonicus* and *Trachurus novaezelandiae*. *J. Life Sci*, 28(9), 1062-1067. (2018)), 참서대과 어종 판별법(Noh E. S., Kang H. S., An C. M., Park J. Y., Kim E. M., Kang J. H.: Rapid and Specific Identification of Genus *Cynoglossus* by Multiplex PCR Assays Using Species-specific Derived from the COI Region. *J. Life Sci*, 26(9), 1007-1014. (2016)) 등이 있다. Real-time PCR을 이용한 판별법으로는 옥돔과 옥두어 판별법(Chung I. Y., Seo Y. B., Yang J. Y. and Kim G. D.: Development and Validation of Real-time PCR to Determine *Branchiostegus japonicus* and *B. albus* Species Based on Mitochondrial DNA. *J. Life Sci*, 27(11), 1331-1339. (2017)), 두족류의 진위판별법(Chung I. Y., Seo Y. B., Yang J. Y., Kwan K. S. and Kim G. D.: Development and Validation of Quick and Accurate Cephalopods Grouping System in Fishery Products by Real-time Quantitative PCR Based on Mitochondrial DNA. *J. Fd Hyg. Safety*, 33(4), 280-288. (2018)) 등이 있다. 하지만, 본 발명의 참돔과 홍민어의 식별을 위한 PCR 프라이머는 제공된 바가 없다.

- [0007] Real-time PCR은 기존의 PCR보다 감도가 높고 신속성이 있다는 장점이 있다. 그러나, 고가의 시약과 장비가 필요하고, multiplex PCR 실험법에 비해 두 배의 노동력과 시약이 필요하다는 단점이 있다(Kim N. Y. S., Yang J. Y. and Kim J. B.: Development and validation of a PCR method to discriminate between *Branchiostegus japonicus* and *Branchiostegus albus*. *J. Food Sci. Technol*, 51(3), 295-299. (2019)). 이에 비해, Multiplex PCR은 Real-time PCR에 비해 경제적이고, 실험의 구현이나 장비의 셋팅에 대해서 제약이 거의 없다.
- [0008] 따라서, 본 연구에서는 형태학적으로 유사하지 않지만 회나 필렛 등으로 가공 처리시 유사식품으로 판매될 수 있는 참돔과 홍민어의 multiplex PCR 중 특이 프라이머(Primer)를 개발하고, 개발된 판별법의 검증 및 모니터링을 통해 참돔으로 위변조된 사례를 사전에 예방할 수 있는 분석법을 확립하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 여러 국가에서 인기 있는 어종인 참돔으로 둔갑되어 판매되는 사례가 빈번하게 발생하고 있다. 수산시장 뿐만 아니라 일반 식당에서도 해당 사례가 보고되는 만큼 참돔과 홍민어의 종판별은 상품으로 판매하는 것을 대상으로 할 수 있기 때문에 시료로 일부만 있어도 판별이 가능하고, 신속하고 하게 판별할 수 있어야 한다. 그리고 수산 식품이라는 특성상 원물뿐만 아니라 가공된 식품에서도 분석할 수 있어야 하며, 여러 종이 혼입되어있는 경우에도 판별이 가능해야 한다. 따라서, 본 발명에서는 multiplex PCR을 이용하여 참돔 및 홍민어 판별 방법을 개발하였고, 이를 통해 참돔과 홍민어 각 개체의 특이성에 반응하도록 설계해서 참돔의 둔갑 사기 사례를 방지할 수 있도록 하였다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기한 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2의 각각의 염기서열로 표시되는 참돔(*Pagrus major*)의 프라이머 세트; 서열번호 3 및 서열번호 4의 각각의 염기서열로 표시되는 홍민어(*Sciaenops ocellatus*)의 프라이머 세트;를 유효성분으로 포함하는, PCR 검출 방법으로 참돔(*Pagrus major*) 또는 홍민어(*Sciaenops ocellatus*)의 판별용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 서열번호 1 및 서열번호 2는 각각의 염기서열로 표시되는 프라이머 세트로 16S rRNA에 속하는 프라이머로 유전자 증폭하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0014] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 서열번호 3 및 서열번호 4는 각각의 염기서열로 표시되는 프라이머 세트로 12S rRNA에 속하는 프라이머로 유전자 증폭하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0015] 또한, 상기한 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2의 각각의 염기서열로 표시되는 프라이머 세트; 또는 서열번호 3 및 서열번호 4의 각각의 염기서열로 표시되는 프라이머 세트;를 유효성분으로 포함하는, 참돔(*Pagrus major*) 또는 홍민어(*Sciaenops ocellatus*) 판별용 바이오마커 조성물; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 판별용 키트를 제공한다.
- [0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0017] 마지막으로, 본 발명은 1) 참돔(*Pagrus major*) 또는 홍민어(*Sciaenops ocellatus*)가 포함되어 있는 시료에서 DNA를 추출하는 단계; 2) 상기 제 1항에 따른 프라이머 세트를 포함하는 조성물을 이용하여, 상기 단계 1)에서 분리된 시료의 게놈 DNA의 증폭반응을 수행하여 증폭 산물을 제조하는 단계; 및 3) 상기 단계 2)의 증폭 산물을 검출하는 단계;를 포함하는, 참돔(*Pagrus major*) 또는 홍민어(*Sciaenops ocellatus*)의 판별방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 3단계의 증폭 산물을 검출한 후에 전기영동을 통해 DNA 밴드가 468 bp인 경우 참돔으로, DNA 밴드가 181 bp인 경우 홍민어로 판별하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0019] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 1단계의 시료는 가공 처리된 식품인 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 1단계의 시료는 0.1 ng/μL 내지 1 ng/μL인 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0022] 본 발명은 참돔과 홍민어의 판별을 위한 방법이다. 참돔은 등 쪽에 푸른 반점이 흩어져 있고, 홍민어는 꼬리 쪽에 검은 점이 있어 원물 형태는 쉽게 구분할 수 있으나, 찌거나 필렛 등으로 이용 시 참돔과 홍민어를 구분하기 어렵다. 따라서, 참돔의 종 특이 프라이머를 개발 및 검증하여, 모니터링을 통해 참돔의 위변조 사례를 예방할 수 있을 것이다. 본 발명은 참돔의 여러 불량식품 사례 중 가장 빈번하게 발생하는 참돔과 홍민어를 대상으로 이를 규명하기 위한 multiplex PCR 판별법을 설계하였다.
- [0023] 시료에서 gDNA를 추출하여 PCR을 진행하였으며, 참돔 프라이머의 product size는 468 bp, 홍민어 프라이머의 product size는 181 bp로 설계하였다. Multiplex PCR 결과 참돔과 홍민어에 대한 종 특이적 증폭을 확인할 수 있었으며, 참돔은 468 bp, 홍민어는 181 bp에서 증폭이 확인되었다. 참돔과 홍민어 프라이머는 비특이적인 반응을 나타내지 않아 참돔과 홍민어에 적합한 종 특이 프라이머로 확인되었다. 또한, 참돔과 홍민어 PCR 민감도 실험 결과 참돔 프라이머는 1 ng, 홍민어 프라이머는 0.1 ng 까지 밴드가 확인되어 가장 낮은 민감도인 1 ng까지 검출이 가능함을 확인하였다. 모니터링 결과 참돔으로 구매한 시료 19건 모두 참돔으로 판정되어, 위변조 사례는 발견되지 않았으며 모든 시료에서 유효한 결과를 확인하였다. 따라서 본 연구에서 제작된 참돔과 홍민어 종에 대한 종 특이적 프라이머는 찌감 등 수산물에도 적용할 수 있어 현재 유통 및 판매되고 있는 참돔 및 홍민어 판별에 적합하다고 판단된다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 참돔 및 홍민어의 형태학적 비교에 대해 나타낸 도이다((A) 참돔 원형, (B) 참돔 필렛, (C) 참돔 회, (D) 홍민어의 원형, (E) 홍민어의 필렛, (F) 홍민어의 회).
- 도 2는 본 발명의 참돔과 홍민어의 프라이머를 이용한 single PCR의 산물을 전기영동한 겔 사진에 대한 도이다(Lane M: size marker; lane 1: 음성대조군, lane 2: 참돔 프라이머 사용한 참돔, lane 3: 홍민어 프라이머 사용한 참돔, lane 4: 참돔 프라이머를 사용한 홍민어, lane 5: 홍민어 프라이머를 사용한 홍민어).
- 도 3은 본 발명의 참돔과 홍민어의 특이 프라이머를 이용한 multiplex PCR의 산물을 전기영동한 겔 사진에 대한 도이다(Lane M: size marker; lane 1: 음성대조군, lane 2: 참돔, 홍민어의 프라이머를 사용한 참돔, lane 3: 참돔, 홍민어의 프라이머를 사용한 홍민어).
- 도 4는 본 발명의 참돔과 홍민어 프라이머의 Multiplex PCR 감도를 나타낸 것이다(Lane M: size marker; lane 1: 참돔 100 ng; lane 2: 참돔 10 ng; lane 3: 참돔 1 ng; lane 4: 참돔 0.1ng; lane 5: 홍민어 100 ng; lane 6: 홍민어 10 ng; lane 7: 홍민어 1 ng; lane 8: 홍민어 0.1 ng).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0027] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외

하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0028] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 자세히 설명한다. 다만, 상기 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0030] <준비예>

[0031] 표준시료로 사용된 참돔(*Pagrus major*)과 홍민어(*Sciaenops ocellatus*)는 부산 자갈치 시장에서 구매하였다. 시료는 모두 형태학적으로 판별이 완료된 시료를 사용하였다. 모니터링에 사용된 참돔 시료는 시중에 유통 중인 필렛 제품을 구매하여 사용하였다. 표준시료와 모니터링 시료의 경우 구입 후 조직을 채취해 에펜도르프 튜브에 담은 후 -80℃에서 보관하였다.

[0033] <실시예 1> 목적 유전자의 선택과 프라이머 설계

[0034] 본 연구에서는 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)의 에 등록된 미토콘드리아 전체 염기서열로부터 확보하였다. 참돔(*Pagrus major*) AP002949와 홍민어(*Sciaenops ocellatus*) NC_016867을 선정하였다. 확보된 참돔과 홍민어의 미토콘드리아 DNA 서열 중에서 16S rRNA 또는 12S rRNA 유전자 염기서열을 이용하였고, 염기서열의 정렬에는 Clustal omega(EMBL, <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)를 사용하였다. 프라이머는 150-500 base pair가 되도록 하였고, T_m 값은 58-60℃의 범위를 가지며 GC percent 30 내지 70%의 비율을 고려하여 종 특이 프라이머를 설계하였고, 이를 나타낸 것이 표1이다.

표 1

	서열 번호	염기서열 (5' -3')	T _m (℃)	G+C (%)	증폭크기 (bp)	미토콘 드리아
참돔 F	1	GGG TGG TTA AGA GCA AGC TTA AA	58.2	43.5	468	16S rRNA
참돔 R	2	CAG TGC ATC TTT CGT AGT ACC CTA	58.9	45.8		
홍민어 F	3	AAC CCT ACC GGG CCA TCC	60.1	66.7	181	12S rRNA
홍민어 R	4	TTG AGT GTT TTT CTA GTT GAC GGG	58.4	41.7		

[0038] <실시예 2> 일반 PCR을 이용한 유전자 증폭 및 염기서열 분석

[0039] 우선 참돔과 홍민어의 생물 및 필렛에서 PCR용 샘플을 각각 채취하였다. 도 1은 참돔과 홍민어의 생물, 필렛, 그리고 회의 형태에 대한 것이다.

[0040] PCR 반응액은 각각 genomic DNA 1 μl, 정방향 프라이머(Forward primer) 1 μl, 역방향 프라이머(Reverse primer) 1 μl, prime taq premix(2X)(GENETBIO, Daejeon, Korea), 멸균증류수 17 μl를 포함하여 총 용량이 20 μl가 되도록 하였다. PCR 반응은 AllInOneCycler™(Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 PCR을 진행하였다. PCR 조건은 초기 변성(Initial denaturation)을 95℃에서 5분 실시 후, DNA의 변성(Denaturation)을 95℃에서 20초, 프라이머의 결합(Annealing)을 56℃에서 20초, DNA의 신장(Extension)을 72℃에서 30초로 30 cycle을 반복하고 최종적으로 DNA의 신장(Elongation) 72℃에서 5분간 실시하여 PCR하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.5% 아가로스 겔에 PCR product 2 μl를 로딩하고 110 V에서 20분간 전기영동을 하였다. 참돔은 468 bp, 홍민어는 181 bp에서 증폭 산물을 확인하였다(도 2 참조).

[0042] 표 2는 상기 PCR 조건에 대해서 나타낸 것이다.

표 2

[0044]

Step	Temp.	Time	Cycle
Initial denaturation	95 ° C	5 min	1
Denaturation	95 ° C	20 sec	30
Annealing	56 ° C	20 sec	
Extension	72 ° C	30 sec	
Elongation	72 ° C	5 min	1

[0046] Single PCR의 결과물을 전기영동한 것을 도 2에 나타내었다,

[0047] Multiplex PCR 결과물을 전기영동한 것을 도 3에 나타내었다.

[0049] 실험 결과 참돔 프라이머(Primer)는 참돔 Template DNA만을 증폭하였고, 홍민어 프라이머(Primer) 역시 홍민어 Template DNA만을 증폭하였다. 참돔과 홍민어 프라이머에서 Negative control은 증폭하지 않은 것으로 나타났으며, 이를 통해 참돔과 홍민어에 적합한 종 특이 프라이머로 확인되었다. 따라서, 본 실험에서 설계된 참돔과 홍민어 종 특이 프라이머의 증폭이 확인됨을 알 수 있었다.

[0051] <실시예 3> PCR 민감도 테스트

[0052] 도 4는 설계된 참돔과 홍민어 프라이머 사용시 PCR 민감도를 각각 나타내었다.

[0053] 참돔 프라이머의 민감도는 1 ng, 홍민어 프라이머의 민감도는 0.1 ng 까지 검출이 확인되었다. PCR 분석법에서 Template DNA 농도는 보통 20 내지 100 ng으로 설정하고 있으나, 본 발명의 PCR 민감도는 일반적인 프라이머 민감도 기준보다 우수한 0.1 내지 1 ng으로 나타나 PCR 프라이머로써 적합함을 확인하였다.

[0055] 본 발명은 홍민어를 참돔으로 악의적으로 둔갑하여 판매되는 사례를 단속하기 위한 방법을 제시하고자 한다. 판별을 위한 검출 방법은 수산시장 뿐만 아니라 일반 식당에서도 해당 사례가 보고되는 만큼 참돔과 홍민어의 종을 정확한 식별은 물론, 신속한 결과를 얻을 수 있어야 하며, 생물뿐만 아니라 가공된 식품에서도 분석할 수 있어야 한다. 그리고 섞어 판매하는 경우도 있기에 이를 명확히 판별할 수 있는 것도 중요한 부분이다.

[0056] 본 발명에서는 16S rRNA 또는 12S rRNA로 차이가 있다는 것에 기인해 염기서열을 확인하고, 종 특이 프라이머를 설계하여 유전자를 기반으로 한 참돔 및 홍민어 판별법을 개발하였다. 실험방법을 최적화하기 위해 참돔과 홍민어 샘플로 각기 PCR하여 검증하였으며, 19개의 각기 다른 구입처에서 모니터링을 수행하기도 하였다. 본원의 발명의 프라이머 세트는 참돔, 홍민어만을 특이적으로 증폭하였고, 참돔과 홍민어 각각 DNA 농도 1 ng/μL, 0.1 ng/μL까지의 PCR 민감도를 가지는 것에 대해 확인하였다. PCR 검사는 필수로 요하는 분석장비의 수가 적고 간편하여 현장에서 사용이 가능하다는 장점이 있는데다 대상 종만을 특이적으로 검출하는 것이 가능함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

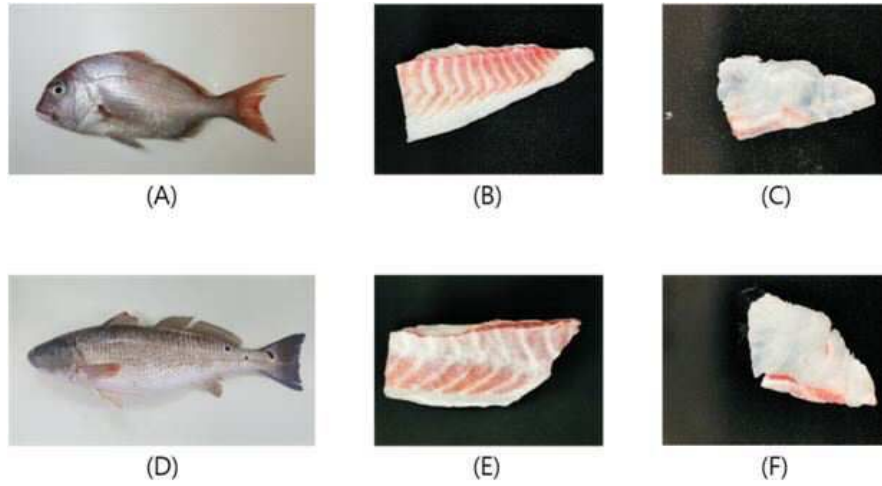
[0057] 따라서, 본 발명에서 개발한 Multiplex PCR을 이용한 참돔 및 홍민어의 판별법은 참돔과 홍민어만을 특이적으로 판별할 수 있으며, 참돔과 홍민어를 혼용 판매하는 것을 방지할 수 있어 소비시장의 활성화에 기여할 뿐만 아니라 소비자의 권익보호에 도움이 될 것으로 기대된다.

[0059] 이제까지 본 발명에 대하여 그 실시예를 들었다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니

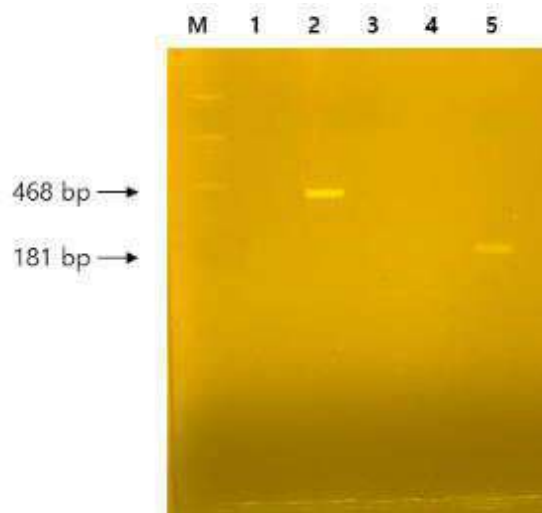
라 특허청구 범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

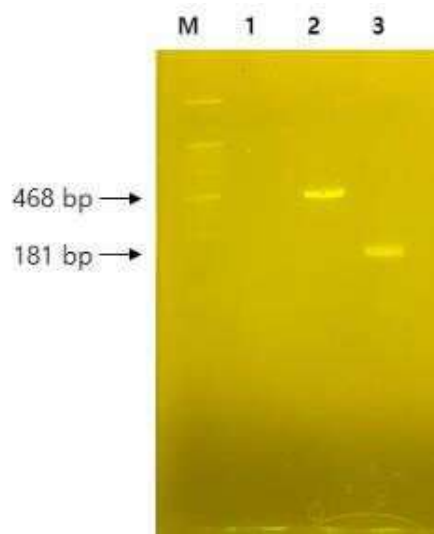
도면1



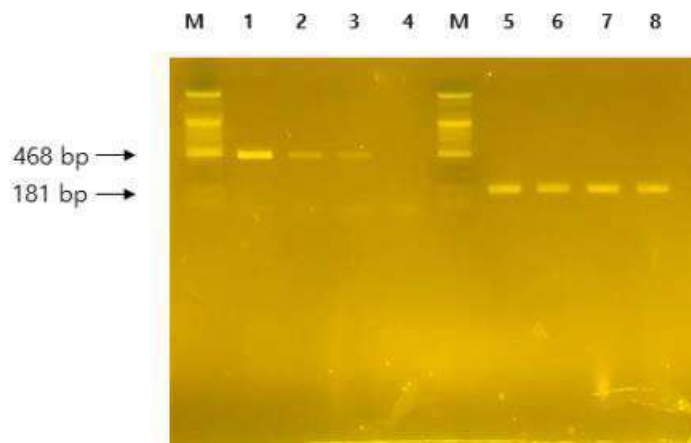
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation
KOREA FOOD & DRUG ADMINISTRATION
- <120> Biomarker for discrimination between Pagrus major and Sciaenops
ocellatus, and its use
- <130> PN2011-546
- <160> 4
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> Pagrus major_F
 <400> 1
 gggtgggttaa gagcaagctt aaa 23
 <210> 2
 <211> 24

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pagrus major_R
 <400> 2
 ttgagtgttt ttctagttga cggg 24
 <210> 3
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sciaenops ocellatus_F
 <400> 3
 aaccctaccg ggccatcc 18
 <210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sciaenops ocellatus_R
 <400> 4
 ttgagtgttt ttctagttga cggg 24