

# Multiplex PCR을 이용한 돌조개상과 (Bivalvia: Arcoidea) 이매패류 4종의 신속한 종 판별법 개발

김용휘, 한호섭, 윤봉한, 박종연<sup>1</sup>, 백인국, 방인철

순천향대학교 생명과학과, <sup>1</sup>주아쿠아바이오텍

## Development of Rapid Identification Method for Four Species of Ark Shells (Bivalvia: Arcoidea) Bivalves Using Multiplex PCR

Yong Hwi Kim, Ho-Seop Han, Bong Han Yun, Jong Yeon Park<sup>1</sup> In Gug Baek and In-Chul Bang

Department of Biology, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University, Asan, Chungnam 31538, Republic of Korea

<sup>1</sup>Aqua Biotech Co., Ltd., 621-6 11-24, Yuseong-daero 1184beon-gil, Yuseong-gu, Daejeon, 34109, Republic of Korea

### ABSTRACT

A multiplex PCR primers (the species-specific primers) set using molecular biological methods targeting four species of ark shells (*Anadara kagoshimensis*, *Tegillarca granosa*, *Anadara broughtonii* and *Cucullaea labiata*) distributed in Korea were built, and a rapid and accurate species identification method was developed. The species-specific primer was designed within the nucleotide sequence of about 573 bp corresponding to the cytochrome c oxidase subunit 1 (*co1*) gene region of mitochondrial DNA, and considering the single nucleotide polymorphism (SNPs) representing inter-species variation excluding intra-species variation, it was designed with an interval of 80-100 bp for each species. As a result, it was confirmed that species-specific bands were formed in the order of *A. kagoshimensis* (160 bp), *T. granosa* (245 bp), *A. broughtonii* (351 bp), and *C. labiata* (471 bp). In addition, in order to measure the limit of multiplex PCR amplification according to the concentration of genomic DNA (gDNA) and the number of PCR amplification repetitions, 15 experimental groups were divided and measured. As a result, when the number of amplification repeats was 25 cycles, the concentration of gDNA was detected down to a minimum of 1 ng/μl. Therefore, the multiplex PCR primer set for four species of ark shells developed in this study is expected to be of great help in accurately and rapidly identifying species in the field, it is thought that economic damage and academic errors caused by misidentification can be prevented.

**Keywords:** Arcoidea, Ark shell, Species-specific primer, *co1*, Multiplex PCR

### 서 론

연체동물문 (Mollusca) 이매패강 (Bivalvia) 돌조개목 (Arcoidea) 돌조개상과 (Arcoidea)에 속하는 돌조개과 (Arcoidea) 및 고갈조개과 (Cucullaeidae) 이매패류는 북서 인

도양에서부터 중국, 우리나라 그리고 일본을 아우르는 인도-태평양 지역에 널리 분포하고 있으며 (Boss, 1971; Poutiers 1998; Bañón *et al.*, 2015; Strafella *et al.*, 2017), 주로 조간대 하부 수심 10-150 m 이내의 갯벌 지역에 서식하는 것으로 알려져 있다 (Nicol, 1950; Yoo, 2000; Kim *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2010; Sougi and Radhakrishnan, 2013; Kim *et al.*, 2019). 또한, 우리나라를 비롯한 동남아시아, 인도양, 서태평양 등지의 여러 나라에서 식용 및 양식 대상 종으로서 수산 산업적 가치를 널리 인정받고 있다 (Sougi and Radhakrishnan, 2013; Suh *et al.*, 2017; Kang *et al.*, 2020).

최근 우리나라의 피조개 수입량은 2019년을 기준으로 517,426 MT을 기록하였으며, 이러한 통계치는 2012년 323,117 MT과 비교하면 약 62.5%의 높은 증가량을 기록하

Received: December 09, 2021; Revised: December 19, 2021;  
Accepted: December 30, 2021

Corresponding author: In-Chul Bang

Tel: +82 (41) 530-1286, e-mail: incbang@sch.ac.kr  
1225-3480/24801

This is an Open Access Article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

었다 (수산물수출정보포털, <https://kfshinfo.co.kr/>). 또한, 우리나라의 꼬막류 양식 생산량은 최근 2019년을 기준으로 11,446 MT을 기록하였으며, 2,715 MT을 기록하였던 2012년과 비교하면 약 421%의 매우 가파른 성장세를 보이고 있다 (해양수산부 통계시스템, <https://www.mof.go.kr/statPortal/main/portalMain.do>). 이에 따라, 우리나라는 꼬막류와 피조개류와 같은 돌조개상과 이매패류를 ‘국산 수산물 및 원양산 수산물 원산지표시 대상 품목’ 중 해면패류로 분류하여 소비자의 알권리 보장과 공정 거래 유도 등 국가 정책을 시행하여 제도적으로 보호하고 있다 (Lee and Hur, 2017).

돌조개상과 이매패류의 성체는 일반적으로 패각에 있는 방사선의 개수와 방사구의 형태 등의 분류학적 진단 형질로 종 동정이 가능하지만, 가공 과정에서 패각으로부터 가식 부위가 분리되어 쉼레 형태로 유통되거나, 자연에서 양식용 치패를 채묘하는 과정에서 여러 종의 치패들이 함께 출현하게 되면 형태학적 종 동정이 매우 어렵기 때문에 오동정으로 인한 경제적 손실과 양식 효율이 감소할 수 있다 (Kim and Woon, 2018). 따라서 국내 수산물 유통 질서 확립을 통한 국민 먹거리 안전 정책 차원에서 이들을 명확히 식별해줄 수 있는 종 판별 유전자 마커 개발이 필요한 실정이다.

분자계통학적 분석 기법을 기반으로 하는 종 판별 유전자 마커 기술은 일반적으로 감수분열 (meiosis) 및 유전자 재조합 (gene recombination) 과정에 참여하지 않고 모계유전 (maternal inheritance)을 하는 특성을 가진 미토콘드리아 DNA의 유전자 영역을 기반으로 활발하게 연구되고 있으며 (Avisé, 2004; Ladoukakis and Zouros, 2017; Rifai *et al.*, 2018), 이를 이용한 multiplex PCR 종 판별법은 염기서열 상에서 직접 중나 및 중간 단일염기다형성 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 부위를 탐색한 후, 종 특이 프라이머를 제작하기 때문에 제한효소 단편 길이 다형성 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 및 증폭 단편 길이 다형성 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 그리고 무작위 증폭 다형성 DNA (Random amplification of polymorphic DNA, RAPD) 등 재래식 방법보다 간편하며, 재현성과 안정성이 뛰어난 것으로 알려져 있다 (Cho *et al.*, 2010; Noh *et al.*, 2017).

본 연구에서는 국내에서 유통되는 돌조개상과 이매패류인 새꼬막 (*Anadara kagoshimensis*), 꼬막 (*Tegillarca granosa*), 피조개 (*Anadara broughtonii*) 및 고갈조개 (*Cucullaea labiata*) 등 4종에 대한 신속하고 정확한 종 판별법을 개발하기 위하여 미토콘드리아 DNA의 cytochrome c oxidase subunit 1 (*co1*) 유전자 영역을 바탕으로 총 4쌍의 종 특이 프라이머를 개발하였으며, 이를 하나의 multiplex PCR 프라이머 세트로 조합하여 국내에서 유통되는 돌조개상

과 이매패류 4종에 대한 분자생물학적 종 판별에 활용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 종 동정 및 시료 확보

본 연구에서 사용된 돌조개상과 이매패류 시료에 대한 분류학적 종 동정과 분류 체계는 국내·외 이매패류의 분류학적 문헌들을 참고하였다 (Poutiers, 1998; Lee and Min, 2007; Lee, 2013; Lee, 2016; Kang *et al.*, 2021).

국내로 수입되어 유통되고 있는 베트남산 고갈조개는 식품의약품안전처 (Ministry of Food and Drug Safety, Republic of Korea) 에서 운영하는 수입식품정보마루 (Imported Food Information Maru, <https://impfood.mfds.go.kr/>) 에서 수입업체와 원산지 조회가 가능한 제품을 구매하여 20개체를 선별한 후 분석에 사용하였으며, 국내산 피조개를 비롯한 새꼬막과 꼬막은 전라남도 함평군 및 보성군 연안 일대에서 포획된 개체들을 현지에서 각각 20개체를 구매하여 사용하였다.

### 2. Genomic DNA 추출

본 연구에서 사용된 돌조개상과 이매패류 시료의 Genomic DNA (gDNA) 는 HiGene™ Genomic DNA Prep Kit (BIOFACT Co., Ltd., Daejeon, Republic of Korea) 를 사용하여 추출한 후, NanoDrop ND-1000 분광광도계 (NanoDrop Technologies/Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) 를 이용하여 260/280 nm의 파장대에서 순도와 추출량을 확인한 후 분석에 사용하였다.

### 3. 미토콘드리아 DNA의 *co1* 유전자 PCR 및 염기서열 분석

추출된 돌조개상과 이매패류의 gDNA 시료는 Folmer *et al.* (1994) 와 Jung *et al.* (2018) 에서 사용된 universal DNA primer (LCO1490 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3', HCO2198 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') 및 PCR 실험 방법에 따라, 미토콘드리아 DNA의 cytochrome c oxidase subunit 1 (*co1*) 유전자 영역을 PCR 증폭한 후 염기서열을 확보하였다.

확보된 *co1* 유전자 염기서열 데이터는 Sequencher® ver. 4.1.4 (Gene codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) 를 이용하여 trimming을 수행하였으며, BioEdit ver. 7.0.9 (Hall, 1999) 의 clustalW (Thompson *et al.*, 1994) 방법을 이용하여 다중염기서열정리 (multiple-alignment) 를 수행하였다. 확보된 573 bp의 *co1* 유전자의 염기서열 데이터는 DnaSP, ver. 6.12.03 (Rozas *et al.*, 2017) 을 사용하여 각각의 haplotype을 선별한 후, 미국 국립생물공학정보센터

**Table 1.** GenBank accession numbers for the cytochrome c oxidase subunit 1 (*co1*) gene haplotypes of mitochondrial DNA of each species used in the present study are shown

Species	Haplotype	GenBank Acc. No.	References
<i>Anadara kagoshimensis</i>	Hap. 1	OL629073	This study
<i>Anadara kagoshimensis</i>	Hap. 2	OL629074	This study
<i>Anadara kagoshimensis</i>	Hap. 3	OL629075	This study
<i>Tegillarca granosa</i>	Hap. 1	OL629076	This study
<i>Tegillarca granosa</i>	Hap. 2	OL629077	This study
<i>Anadara broughtonii</i>	Hap. 1	OL629071	This study
<i>Anadara broughtonii</i>	Hap. 2	OL629072	This study
<i>Cucullaea labiata</i>	Hap. 1	OL629068	This study
<i>Cucullaea labiata</i>	Hap. 2	OL629069	This study
<i>Cucullaea labiata</i>	Hap. 3	OL629070	This study

(National Center for Biotechnology Information, NCBI)에서 운영하는 Genbank®에 등록하여 accession number를 부여 받았다 (Table 1). 이후, BLAST® 웹 프로그램 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)에서 Nucleotide BLAST (blastn) 기능을 사용하여 분자계통학적 및 분류학적 선행 연구 (Liu *et al.*, 2013; Bañón *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2017)에서 발굴된 미토콘드리아 DNA의 *co1* 유전자 염기서열 정보를 참조하여 분석한 후, 종 특이 프라이머 제작에 사용하였다.

#### 4. 종 특이 프라이머 제작 및 Multiplex PCR 프라이머 세트 구축

국내·외 돌조개상과 이매패류 4종에 대한 종 특이 프라이머 (species-specific primer) 제작에 앞서 프라이머 제작의 기본적인 개념은 Dieffenbach *et al.* (1993)를 참고하였으며, 각 종의 *co1* 유전자 염기서열 상에 나타나는 종내 유전적 변이 (intraspecific genetic variation)를 제외한 종간 유전적 변이 (interspecific genetic variation)를 나타내는 SNPs 부위를 탐색하였다. 종 특이 프라이머는 종간 유전적 변이를 나타내는 SNPs 부위를 고려하여 Primer3web ver. 4.1.0 (Koressaar and Remm, 2007; Untergasser *et al.*, 2012; Koressaar *et al.*, 2018)으로 서로 다른 크기의 특이 밴드 (specific band)를 갖는 4쌍의 종 특이 프라이머를 제작하였다. 이후, singleplex PCR을 실시하여 반응 조건을 확립한 후, 4쌍의 종 특이 프라이머들을 조합하여 교차 검증 과정을 거쳐 1개의 multiplex PCR 프라이머 세트를 구축하였다.

#### 5. Multiplex PCR 증폭 조건 및 특이 밴드 확인

추출된 돌조개상과 이매패류 4종의 gDNA 시료와 구축된

multiplex PCR 프라이머 세트를 이용한 증폭 조건 구축 실험은 20  $\mu$ l 용적의 AccuPower® PCR Premix Kit (BIONEER Corp., Daejeon, Republic of Korea)를 사용하였으며, gDNA의 5개 농도 구간 (100 ng/ $\mu$ l, 10 ng/ $\mu$ l, 1 ng/ $\mu$ l, 0.1 ng/ $\mu$ l, 및 0.01 ng/ $\mu$ l)에 따라 4쌍의 종 특이 프라이머를 10 pmole로 희석하여 함께 첨가하고, 확립된 singleplex PCR 반응 조건을 참고하여 증폭 반복 수를 20회, 25회, 30회 등 세 개 구간으로 나누는 후, 세 번의 반복 실험을 통하여 multiplex PCR 증폭 조건 탐색을 수행하였다.

증폭된 PCR 산물은 BIOFACT™의 100 bp Plus DNA Ladder (BIOFACT Co., Ltd., Daejeon, Republic of Korea)와 1.5% 아가로즈 겔을 이용하여 TAE buffer가 담긴 전기영동조에서 20분간 100 v의 전압으로 전기영동을 수행한 후, 특이 밴드를 1차적으로 확인하였다. 이후, 고해상도의 정밀한 특이 밴드 위치를 탐색하기 위하여 전자동 모세관 전기영동 장치 (Fragment Analyzer; Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)를 이용하여 전기영동을 수행한 후, PROsize ver. 3.0.1.6 (Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Germany)을 이용하여 최종적으로 특이 밴드를 분석하였다.

## 결 과

### 1. 돌조개상과 4종 간 *co1* 유전자의 SNPs 영역 탐색

본 연구에서 확보된 돌조개상과 4종의 미토콘드리아 DNA *co1* 유전자 영역 (573 bp)에 대한 총 80개체의 염기서열들을 분석한 결과, 전체 돌연변이 수 (total number of mutations)는 280개인 것으로 관찰되었으며, 이 중에서 222개의 염기서열 위치에서 돌연변이가 나타나, 다형성 부위

돌조개상과 이매패류 4종의 multiplex PCR 판별 마커 세트

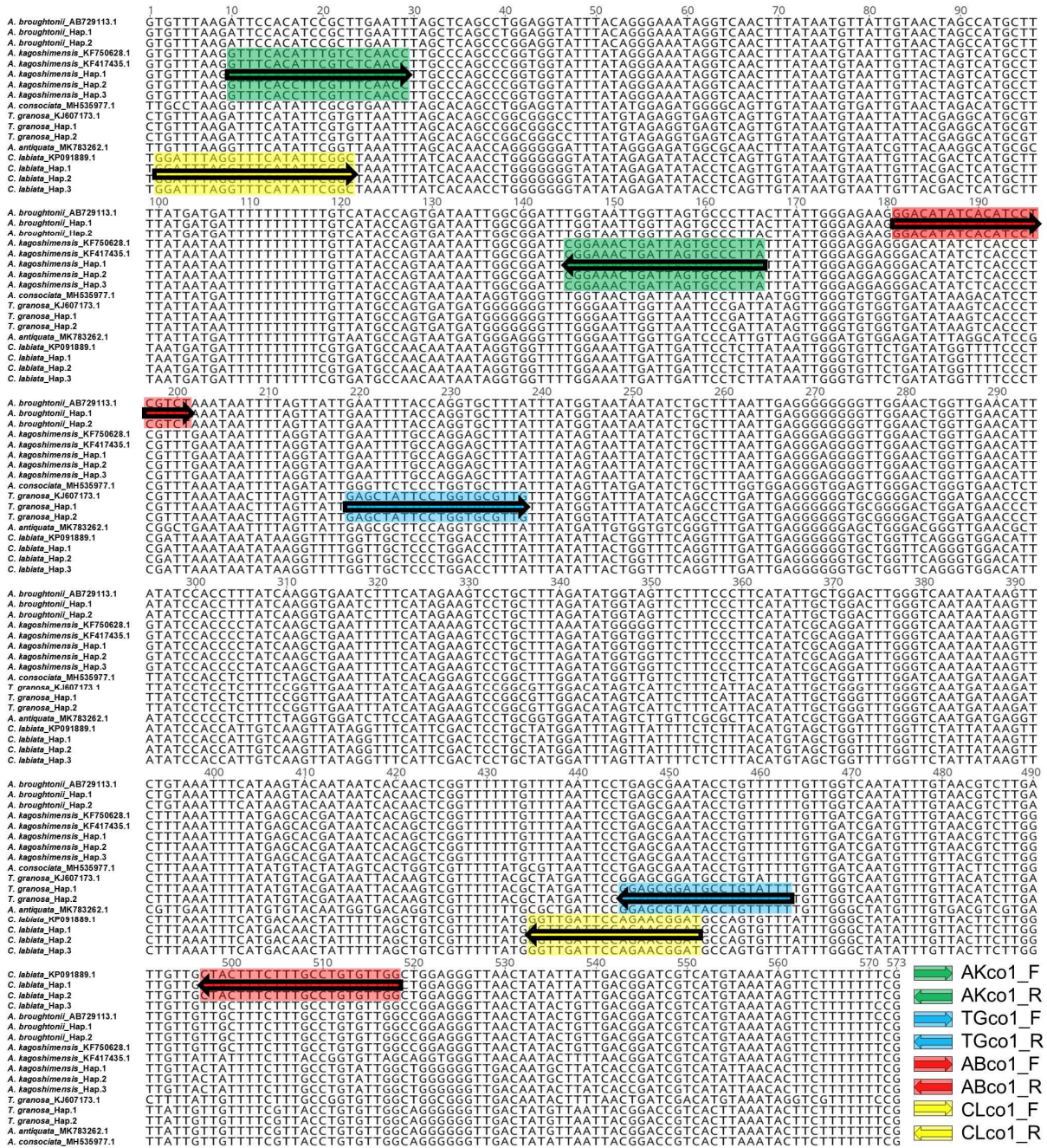


Fig. 1. The single nucleotide polymorphisms (SNPs) and species-specific primer design positions of the cytochrome c oxidase subunit 1 (*co1*) gene for the four species of ark shells. Green box, *Anadara kagoshimensis*; Sky blue box, *Tegillarca granosa*; Red box, *Anadara broughtonii*; Yellow box, *Cucullaea labiata*.

(polymorphic site) 는 전체의 48.9%로 비교적 높았다. 또한, 다형성 부위에서 싱글톤 변이 부위 (singleton variable site) 는 관찰되지 않았으며, 파시모니 정보 부위 (parsimony informative site) 는 222개인 것으로 관찰되었다. 이에 따라, 꼬막과 피조개는 각각 2개의 haplotype이 관찰되었으며, 새고

막과 고갈조개는 각각 3개의 haplotype이 관찰되었다.  
**2. 돌조개상과 4종 간 종 특이 프라이머 제작**  
 돌조개상과 4종 간 *co1* 유전자의 SNPs 부위 탐색 과정에서 관찰된 각 종의 haplotype을 토대로 종내 유전적 변이를 제외

**Table 2.** Information on one multiplex PCR primer set for detection of four species of ark shells developed in present study

Species	Primers	Sequence (5' →3' )	Product size	Target gene
<i>Anadara kagoshimensis</i>	AKco1_F	GTTTCACATTCGTCTCAACC	160	<i>coI</i> <sup>a</sup>
	AKco1_R	TAAGGGCACTAATCAGTTTCCG		
<i>Tegillarca granosa</i>	TGco1_F	GAGCTATTTCCTGGTGCGTTG	245	<i>coI</i> <sup>a</sup>
	TGco1_R	AAAATACAGGCATCCGCTCC		
<i>Anadara broughtonii</i>	ABco1_F	GGACATATCACATCCTCGTC	351	<i>coI</i> <sup>a</sup>
	ABco1_R	CCAACACAGGCAAAGAAAGTAG		
<i>Cucullaea labiata</i>	CLco1_F	GGATTTAGGTTTCATATTCGGC	471	<i>coI</i> <sup>a</sup>
	CLco1_R	ATCCGTTCTGGAATCAACC		

<sup>a</sup>The cytochrome c oxidase subunit 1 gene of mitochondrial DNA



**Fig. 2.** Multiplex PCR product band positions of the cytochrome c oxidase subunit 1 (*co1*) gene on mitochondrial DNA using species-specific primers, Lane 1-3, *Anadara kagoshimensis*; Lane 4-6, *Tegillarca granosa*; Lane 7-9, *Anadara broughtonii*; Lane 10-12, *Cucullaea labiata*; Lane 13, mixture of four species (ark shells); LM, 35-500 bp ladder marker; U, upper marker; L, lower marker.

한 중간 유전적 변이를 나타내는 SNPs 부위만을 선별하였으며, 이에 따라, 약 80 bp에서 100 bp 정도의 염기서열 간격을 두고, 각각의 중간 SNPs 부위가 정방향 및 역방향 프라이머의 3' 말단에 위치하도록 종 특이 프라이머를 제작하였다 (Fig. 1; Table 2).

**3. 돌조개상과 4종 간 종 특이 프라이머를 이용한 singleplex PCR**

제작된 돌조개상과 4종 간 종 특이 프라이머에 대한 재현성

을 검증하기 위하여 각 종당 3개체의 시료를 무작위로 선별한 후 singleplex PCR 분석을 수행하였다. 해당 종 특이 프라이머의 결합 온도 (annealing temperature) 구간을 파악하기 위하여 40-70℃ 구간에서 gradient PCR을 통해 교차 반응을 수행하여 결합 온도 구간 및 최적 결합 온도를 확인하였다. 새꼬막 (AKco1\_F/AKco1\_R) 과 고갈조개 (CLco1\_F/CLco1\_R) 의 경우에는 모두 40-64℃ 온도 범위에서 종 특이적 증폭 반응이 일어났으며, 최적 결합 온도는 58℃로 나타났다 (Table 3). 피조개 (ABco1\_F/ABco1\_R) 와 꼬막 (TGco1\_F/TGco1\_R)

**Table 3.** Four singleplex primer and one multiplex primer set PCR conditions to detect four species of ark shells

	Primer	Steps	Temp.	Time	Cycles
Singleplex PCR	AKco1_F/AKco1_R <sup>a</sup>	Initial denaturation	95°C	5 min	1
		Denaturation	95°C	30 sec	
		Annealing	58°C	30 sec	25
		Extension	72°C	30 sec	
		Final extension	72°C	5 min	1
		Storage	4°C	Infinite	-
	TGco1_F/TGco1_R <sup>b</sup>	Initial denaturation	95°C	5 min	1
		Denaturation	95°C	30 sec	
		Annealing	60°C	30 sec	25
		Extension	72°C	30 sec	
		Final extension	72°C	5 min	1
		Storage	4°C	Infinite	-
	ABco1_F/ABco1_R <sup>c</sup>	Initial denaturation	95°C	5 min	1
		Denaturation	95°C	30 sec	
		Annealing	58°C	30 sec	25
		Extension	72°C	30 sec	
		Final extension	72°C	5 min	1
		Storage	4°C	Infinite	-
	CLco1_F/CLco1_R <sup>d</sup>	Initial denaturation	95°C	5 min	1
		Denaturation	95°C	30 sec	
Annealing		58°C	30 sec	25	
Extension		72°C	30 sec		
Final extension		72°C	5 min	1	
Storage		4°C	Infinite	-	
Multiplex PCR	AKco1_F/AKco1_R <sup>a</sup> TGco1_F/TGco1_R <sup>b</sup> ABco1_F/ABco1_R <sup>c</sup> CLco1_F/CLco1_R <sup>d</sup>	Initial denaturation	95°C	5 min	1
		Denaturation	95°C	30 sec	
		Annealing	58°C	30 sec	25
		Extension	72°C	30 sec	
		Final extension	72°C	5 min	1
		Storage	4°C	Infinite	-

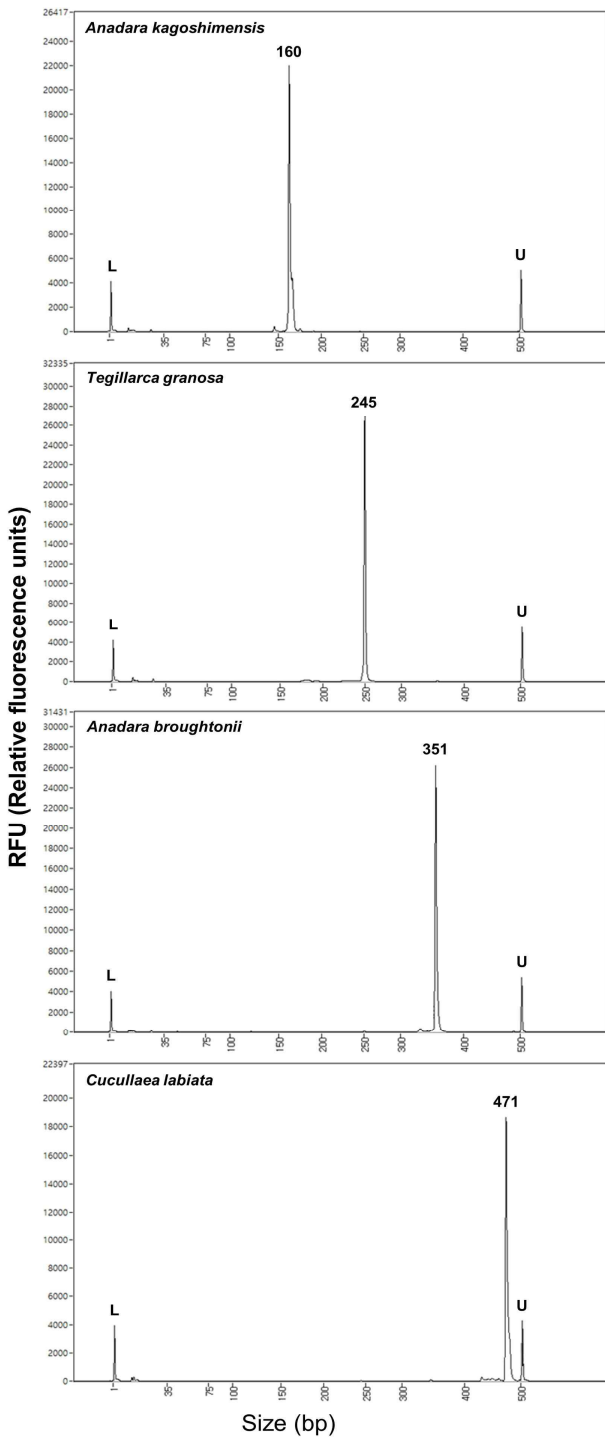
<sup>a</sup>*Anadara kagoshimensis*, <sup>b</sup>*Tegillarca granosa*, <sup>c</sup>*Anadara broughtonii*, <sup>d</sup>*Cucullaea labiata*

의 경우에는 각각 40-60°C와 40-68°C 온도 범위에서 종 특이적인 증폭 반응이 일어났으며, 최적 결합온도는 각각 58°C와 60°C로 나타났다 (Table 3). 이에 따라, 돌조개상과 4종 간 종 특이 프라이머의 singleplex PCR 최적 반응 조건은 Table 3에 나타내었다.

#### 4. 돌조개상과 4종 간 종 특이 프라이머를 이용한 Multiplex PCR

구축된 singleplex PCR 반응 조건을 참고하여 multiplex PCR 검증을 수행한 결과, 비특이적 증폭 반응 및 프라이머 dimer 현상이 나타나지 않는 최적 결합 온도 (optimal

annealing temperature) 는 58°C로 나타났으며, multiplex PCR 반응 조건은 Table 3에 나타내었다. 증폭된 multiplex PCR 산물의 크기를 명확하게 확인하기 위하여 전자동 모세관 전기영동장치를 이용하여 확인한 결과, multiplex PCR 산물의 증폭 크기 차이에 따라 새꼬막 (160 bp), 꼬막 (245 bp), 피조개 (351 bp) 및 고깔조개 (471 bp) 순으로 특이 밴드가 명확하게 관찰되었다 (Fig. 2). 또한, 비특이적인 증폭 반응 여부를 확인하기 위하여 전기영동도 (electropherogram) 를 살펴본 결과, 모든 종의 개체에서 특이 밴드 이외의 비특이적인 증폭 반응은 일어나지 않았다 (Fig. 3).



**Fig. 3.** Results of multiplex PCR DNA fragment analyzer to discriminate four species of ark shells. The Y-axis represents the RFU (Relative Fluorescence Units; indicates the amount of PCR product amplified at a specific band size), and the X-axis represents the size of the ladder marker for each section as DNA fragments are separated during capillary electrophoresis. L, lower marker; U, upper marker.

**5. 돌조개상과 4종 간 Multiplex PCR 증폭 한계 측정**

확립된 돌조개상과 4종에 대한 multiplex PCR 분석 방법의 증폭 한계를 검증하기 위하여 최저 검출 농도 측정과 최소 증폭 반복 수를 측정하였다 (Table 4). 종 특이 프라이머의 최저 검출농도를 측정하기 위하여 돌조개상과 4종의 gDNA를 100 ng/μl, 10 ng/μl, 1 ng/μl, 0.1 ng/μl 및 0.01 ng/μl 등 5개의 농도로 희석한 후, 확립된 multiplex PCR 반응 조건을 이용하여 각 종당 3개씩 증폭 반복 수를 20회, 25회 및 30회 적용하여 민감도를 측정한 결과, 증폭 반복 수가 20회일 경우에는 모든 농도 구간에서 종별 특이 밴드가 검출되지 않았으나 (Table 4), 25회 및 30회일 경우에는 농도 구간 100 ng/μl, 10 ng/μl 및 1 ng/μl에서 종별 특이 밴드가 검출되었으며, 비특이적 밴드는 검출되지 않았다 (Table 4). 따라서 돌조개상과 4종 간의 multiplex PCR 프라이머 세트에 대한 효율적인 증폭 한계는 시간과 시료의 양을 고려할 경우, 증폭 반복 수가 25회일 때, gDNA의 농도는 1 ng/μl인 것으로 나타났다 (Table 4).

**고 찰**

돌조개상과 이매패류는 주로 식용을 목적으로 유통되는 분류군으로서 상업적 가치가 매우 높다. 이들 분류군은 패각이 존재할 경우, 형태학적 분석을 통하여 종 판별이 가능하지만, 가공 과정에서 가식 부위만 채취되어 휠레 상태로 유통될 경우, 형태학적인 종 판별이 불가능한 한계점을 가지고 있다. 따라서 유전자 수준의 정확한 종 판별법이 요구되는 분류군이다. 생물의 유전자는 열과 염 처리 등의 가공 형태에 따라 주형 유전자가 파괴되는 수준이 각각 다르기 때문에 650 bp 이상의 염기서열을 확보하여 중간 식별에 사용하는 것은 효율성이 낮은 경우가 많다 (Park *et al.*, 2012). 따라서 PCR 증폭 산물의 크기를 최소화하여 종 특이 프라이머를 설계하고 특이 밴드 수준에서 종 판별을 진행하는 것이 간편하며 경제적 측면에서 유리한 것으로 알려져 있다 (Park, 2012). 과거에는 주로 RFLP와 AFLP 그리고 RAPD PCR 분석 방법을 이용하여 집단 수준을 구별하거나 순종과 잡종 등을 판별하는 분석 방법들이 연구되었으며 (Andre *et al.*, 1999; Vannarattanarat *et al.*, 2013; Razak *et al.*, 2019), 최근에는 분자생물학적 분석 방법의 다양화와 발달로 미토콘드리아 DNA의 유전자 영역의 SNPs 부위를 활용한 식육 가공품의 사용원료 판별법 (Park *et al.*, 2012), 오징어류의 multiplex PCR 종 판별법 (Kim *et al.*, 2015), 참새대과 어종의 multiplex PCR 종 판별법 (Noh *et al.*, 2016) 그리고 duplex PCR을 이용한 홍합 *Mytilus coruscus*의 신속한 종 판별법 (Kim and Yoon, 2018) 등 다양한 분류군에 대한 종 판별법들이 개발되었다.

**Table 4.** The PCR amplification limit experiment was analyzed by performing PCR at 20 to 30 cycles using genomic DNA (gDNA) diluted from 0.01 to 100 ng/ $\mu$ l, respectively

	Cycles	Primer	Density (ng/ $\mu$ l)				
			100	10	1	0.1	0.01
Multiplex PCR	20	AKco1_F/AKco1_R <sup>a</sup>					
		TGco1_F/TGco1_R <sup>b</sup>	×	×	×	×	×
		ABco1_F/ABco1_R <sup>c</sup>					
		CLco1_F/CLco1_R <sup>d</sup>					
	25	AKco1_F/AKco1_R <sup>a</sup>	○	○	○	×	×
		TGco1_F/TGco1_R <sup>b</sup>					
		ABco1_F/ABco1_R <sup>c</sup>					
		CLco1_F/CLco1_R <sup>d</sup>					
	30	AKco1_F/AKco1_R <sup>a</sup>	○	○	○	×	×
		TGco1_F/TGco1_R <sup>b</sup>					
		ABco1_F/ABco1_R <sup>c</sup>					
		CLco1_F/CLco1_R <sup>d</sup>					

<sup>a</sup>*Anadara kagoshimensis*, <sup>b</sup>*Tegillarca granosa*, <sup>c</sup>*Anadara broughtonii*, <sup>d</sup>*Cucullaea labiata*

미토콘드리아 DNA의 유전자 영역들은 일반적으로 핵 DNA의 유전자 영역들보다 진화 속도가 빠르며, 염기서열 상에서 보존 및 변이 영역이 비교적 잘 구분되어 있기 때문에 많은 생물의 분자계통 및 분류학적 연구에 보편적으로 활용되고 있다 (Miura *et al.*, 2000). 특히 미토콘드리아 DNA의 *co1* 유전자 영역은 일반적으로 대부분의 분류군에 통용되는 대표적인 DNA barcoding 영역으로 알려져 있으며 (Meyer and Paulay, 2005; Wiemers and Fiedler, 2007), 돌조개류의 경우, 미토콘드리아 DNA 마커를 이용한 계통 발생 연구 (Tanaka and Aranishi, 2013), 아드리아해의 새꼬막 *Anadara kagoshimensis*의 형태학적 분석, 분자분류학, 공간 분포 및 예측연구 (Strafella *et al.*, 2017) 등 기존의 분류체계 내에서 종을 식별하거나 새로운 종을 발굴하는 데 활용되고 있다.

본 연구에서는 우리나라를 비롯하여 세계적으로 생산량과 소비량이 높은 수산 자원으로 알려진 새꼬막, 꼬막, 피조개 및 고갈조개 등 4종의 돌조개상과 이매패류를 대상으로 미토콘드리아 DNA의 단백질 코딩 유전자 (protein coding gene, PCG) 인 *co1* 유전자의 염기서열 상에서 SNPs 부위를 탐색하고 종 특이 프라이머를 제작하여 최종적으로 돌조개상과 4종을 신속히 판별할 수 있는 multiplex PCR 분석 방법을 개발하였다. 또한, 종 판별 분석에 사용된 multiplex PCR 프라이머 세트는 종마다 PCR 산물의 크기를 달리하여 설계하였으며, 증폭 한계 측정을 통하여 효율성을 검증하였기 때문에, 실제 산업 현장에서 신속하고 간편한 방법으로 정확한 종 판별을 수행하는

데 활용될 수 있을 것으로 예상된다. 더불어 국내에서 유통되는 국내산 및 수입산 돌조개상과 유사 이매패류에게도 해당 기술을 활용하거나 응용하여 오동정으로 인한 경제적 피해를 줄이고 학술적 오류를 방지할 수 있을 것으로 생각된다.

### 요 약

국내에서 유통되는 국내산 및 수입산 돌조개상과 이매패류 4종 (새꼬막 *Anadara kagoshimensis*, 꼬막 *Tegillarca granosa*, 피조개 *Anadara broughtonii*, 고갈조개 *Cucullaea labiata*) 을 대상으로 분자생물학적 분석 방법을 통하여 종 특이 프라이머를 설계하고, multiplex PCR 프라이머 세트를 구축하여 특이밴드 수준에서 신속하고 정확한 종 판별 방법을 개발하고자 하였다. 종 특이 프라이머는 미토콘드리아 DNA의 cytochrome c oxidase subunit 1 (*co1*) 유전자 영역에 해당하는 약 573 bp의 염기서열 내에서 설계하였으며, 종내 변이를 제외한 종간 변이를 나타내는 단일염기다형성 (single nucleotide polymorphism, SNPs) 부위를 고려하여 종별로 약 80-100 bp의 간격을 두고 설계하였다. 그 결과, 새꼬막 (160 bp), 꼬막 (245 bp), 피조개 (351 bp) 및 고갈조개 (471 bp) 순으로 종간 특이밴드가 형성됨을 확인하였다. 또한, gDNA의 농도와 PCR 증폭 반복 수에 따른 multiplex PCR 증폭 한계를 측정하기 위하여 15개의 실험구로 나누어 분석한 결과, 증폭 반복 수가 25회일 때 gDNA 농도는 최저 1 ng/ $\mu$ l 까지 특이 밴드가 검출되었다. 따라서 본 연구에서 개발된 국



내산 및 수입산 돌조개상과 4종의 multiplex PCR 프라이머 세트는 현장에서 신속하고 간편한 방법으로 정확한 종 판별을 수행하는 데 활용될 수 있을 것으로 예상되며, 동정 착오로 인한 경제적 피해를 줄이고 학술적 오류를 방지할 수 있을 것으로 생각된다.

## 사 사

이 논문은 2021년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원 (과제명: 수산생물 원산지 판별기술 및 현장단속 키트개발, 20200425), 교육부 재원으로 한국연구재단의 지원 (NRF-2021R1A6A1A03039503) 그리고 순천향대학교의 연구비를 지원 받아 수행되었습니다.

## REFERENCES

- Andre, C., Lindegarth, M., Jonsson, P.R. and Sundberg, P. (1999) Species identification of bivalve larvae using random amplified polymorphic DNA (RAPD): differentiation between *Cerastoderma edule* and *C. lamarcki*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **79**(3): 563-565.
- Avise, J.C. (2004) *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. 2nd edition. pp. 684, Sinauer Associates, Sunderland.
- Bañón, R., Fernández, J., Trigo, J.E., Pérez-Dieste, J., Barros-García, D. and De Carlos, A. (2015) Range expansion, biometric features and molecular identification of the exotic ark shell *Anadara kagoshimensis* from Galician waters, NW Spain. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **95**(3): 545-550.
- Boss, K.J. (1982) *Mollusca. In: Synopsis and Classification of Living Organisms*. pp. 1166. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Cho, K.H., Heo, S., Kim, H.R., Kim, J.H., Shin, I.S., Han, S.E., Kim, S.H. and Kim, D.H. (2010) Discrimination of Korean apple cultivars using combination of RAPD-SCAR markers. *Horticultural Science & Technology*, **28**(5): 828-835.
- Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M. and Dveksler, G.S. (1993) General concepts for PCR primer design. *Genome Research*, **3**: S30-S37.
- Feng, Y., Li, Q. and Kong, L. (2015) Molecular phylogeny of Arcoidea with emphasis on Arcidae species (Bivalvia: Pteriomorpha) along the coast of China: Challenges to current classification of arcoids. *Molecular phylogenetics and evolution*, **85**: 189-196.
- Feng, Y., Li, Q., Yu, H. and Kong, L. (2017) Complete mitochondrial genome sequence of *Cucullaea labiata* (Arcoidea: Cucullaeidae) and phylogenetic implications. *Genes & Genomics*, **39**(8): 867-875.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**: 294-299.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**: 95-98.
- Jung, C.K., Oh, B.S., Kim, T.I. and Jin, Y.G. (2010) Effect of heating on the sex maturation and egg development of the ark shell, *Scapharca subcrenata*. *The Korean Journal of Malacology*, **26**(3): 201-209. [in Korean]
- Jung, S.W., Kim, H.J., Park, J.S., Lee, T.K., Shin, K., Jeong, S.Y., Hwang, S.Y. and Yoo, J.W. (2018) Planktonic bivalve larvae identification and quantification in Gomso Bay, South Korea, using next-generation sequencing analysis and microscopic observations. *Aquaculture*, **490**: 297-302.
- Kang, N.S., Kang, D.W., Kang, C.B., Kwak, M.S., Kwun, O.N., Kwon, H.J., Kim, K.M., Kim, M.S., Kim, I.H., Kim, J.H., Kim, H.N., Kim, H.J., Moon, H.W., Bae, S.S., Back, J.W., Shin, M.H., An, Y.R., Won, J.H., Lee, S.H., Lee, S.H., Lim, B.J., Jeong, D.W. and Jeong, H.K. (2021) National List of Marine Species II (Marine Invertebrates). pp. 523, National Marine Biodiversity Institute of Korea, Seochon. [in Korean]
- Kang, S.I., Sohn, S.K., Choi, K.S., Kim, K.H., Kim, Y.S., Lee, J.S., Heu, M.S. and Kim, J.S. (2020) Optimization of the Processing of Seasoning Sauce for Seasoned Broughton's Ribbed Ark *Scapharca broughtonii* Products Using Response Surface Methodology. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **53**(3): 334-341.
- Kim, H.J., Kang, J.S., Jung, S.W. and Park, Y.J. (2019) Changes in planktonic bivalve larvae of *Tegillarca granosa* and *Anadara kagoshimensis* in the Boseong coastal waters of South Korea. *Korean Journal of Environmental Biology*, **37**(3): 351-361.
- 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. *Journal of Food Hygiene and Safety*, **30**(1): 43-50. [in Korean]
- Kim, K.S. and Yoon, S.J. (2018) Development of Duplex-PCR Method for Rapid Identification of Hard-shelled Mussel. *Mytilus Coruscus*. *Journal of Fisheries and Marine Sciences Education*, **30**(4): 1192-1199.
- Koressaar, T. and Remm, M. (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, **23**: 1289-1291.
- Koressaar, T., Lepamets, M., Kaplinski, L., Raime, K., Andreson, R. and Remm, M. (2018) Primer3\_masker: integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics*, **34**: 1937-1938.
- Ladoukakis, E.D. and Zouros, E. (2017) Evolution and

- inheritance of animal mitochondrial DNA: rules and exceptions. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, **24**(1): 1-7.
- Lee, J.S. (2013) Invertebrate Fauna of Korea-Bivalves I (Mollusca: Bivalvia: Pteriomorpha: Arcoida, Mytiloida). vol.19, no.2, pp. 130. National Institute of Biological Resources, Incheon.
- Lee, J.S. (2016) List of Korean Mollusks. pp. 404. The Korean Journal of Malacology, Cheonan. [in Korean]
- Lee, J.S. and Min, D.K. (2007) Korean Names of Foreign Shells Introduced to Korea. *The Korean Journal of Malacology*, **23**(1): 105-154.
- Lee, Y.W. and Hur, Y.S. (2017) A study on application of country of origin labelling system with fishery products. The institute of *Business management*, **40**(2): 125-147. [in Korean]
- Liu, Y.G., Kurokawa, T., Sekino, M., Tanabe, T. and Watanabe, K. (2013) Complete mitochondrial DNA sequence of the ark shell *Scapharca broughtonii*: an ultra-large metazoan mitochondrial genome. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, **8**(1): 72-81.
- Meyer, C.P. and Paulay, G. (2005) DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS biology*, **3**(12): e422.
- Miura, T., Roisin, Y. and Matusmoto, T. (2000) Molecular phylogeny and biogeography of the nasute termite genus *Nasutitermes* (Isoptera: Termitidae) in the Pacific tropics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **17**(1): 1-10.
- Nicol, D. (1950) Recent species of the prionodont pelecypod *Cucullaea*. *Journal of the Washington Academy of Sciences*, **40**: 338-343.
- Park, Y.C., Ahn, C.Y., Jin, S.O., Lim, J.Y., Kim, K.H., Lee, J.H., Cho, T.Y., Lee, H.J., Park, K.S. and Yoon, H.S. (2012) Identification of raw materials in processed meat products by PCR using species-specific primer. *Journal of Food Hygiene and Safety*, **27**(1): 68-73. [in Korean]
- Poutiers, J.M. (1998) Bivalves. FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes. The Living Marine Resources of The Western Central Pacific volume 1. Seaweeds, Corals, Bivalves and Gastropods. pp. 158. Food and Agriculture Organization of The United Nations, Rome.
- Razak, N.F.A., Supramaniam, C.V. and Zieritz, A. (2019) A dichotomous PCR-RFLP identification key for the freshwater mussels (Bivalvia: Unionida) of Peninsular Malaysia. *Conservation Genetics Resources*, **11**(4): 457-464.
- Rifai, N., Horvath, A.R., Wittwer, C.T. and Park, J. (2018) Principles and Applications of Molecular Diagnostics. pp. 422. 1st Edition. Elsevier Science, Amsterdam.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., GN Sánchez-Gracia, A. (2017) DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, **34**: 3299-3302.
- Souji, S. and Radhakrishnan, T. (2013) New Distribution Record and Taxonomy of Two Cucullaeidae Species (Bivalvia: Arcacea) from Thermal Beach, Thoothukudi, South East Coast of India. *International Journal of Science and Research*, **4**(2): 939-943.
- Strafella, P., Ferrari, A., Fabi, G., Salvalaggio, V., Punzo, E., Cuicchi, C., Santelli, A., Cariani, A., Tinti, F., Tasseti, A. and Scarcella, G. (2017) *Anadara kagoshimensis* (Mollusca: Bivalvia: Arcidae) in Adriatic Sea: morphological analysis, molecular taxonomy, spatial distribution, and prediction. *Mediterranean Marine Science*, **18**(3): 443-453.
- Suh, J.S., Kim, T.H., Shin, S.Y., Kahng, H.Y., Ahn, S.Y., Jung, J.S., Kim, Y.S. and Won, N.I. (2017) Geochemical Characteristics and Benthos Distribution in the Three Shellfish Farms in Suncheon Bay, Korea. *Journal of Environmental Science International*, **26**(6): 691-710.
- Sun, S.E., Kong, L., Yu, H. and Li, Q. (2015) The complete mitochondrial genome of *Scapharca kagoshimensis* (Bivalvia: Arcidae). *Mitochondrial DNA*, **26**(6): 957-958.
- Tanaka, T. and Aranishi, F. (2013) Mitochondrial DNA markers for PCR-based phylogenetic analysis of ark shells. *Open Journal of Marine Science*, **3**(4): 182-189.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**: 4673-4680.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M. and Rozen, S.G. (2012) Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, **40**: e115.
- Vannarattanarat, S., Zieritz, A., Kanchanaketu, T., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S. and Hongtrakul, V. (2014) Molecular identification of the economically important freshwater mussels (Mollusca-Bivalvia-Unionida) of Thailand: developing species-specific markers from AFLPs. *Animal genetics*, **45**(2): 235-239.
- Wiemers, M. and Fiedler, K. (2007) Does the DNA barcoding gap exist?-a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in zoology*, **4**(1): 1-16.
- Yoo, S.K. (2000) Shallow Water Aquaculture. 2nd Edition. pp. 639. Guduk Publishing Co. Busan.