참돔과 나일틸라피아의 진위판별 시험법

1. 적용범위

본 시험법은 참돔(*Pagrus major*)을 나일틸라피아(*Oreochromis niloticus*)*와 구분하기 위한 방법으로 PCR (Polymerase Chain Reaction) 장비를 사용하여 증폭산물의 생성여부로 참돔 및 나일틸라피아를 확인하는 정성분석법이다. 단, 상기 학명이 아닌 원료이거나 유전자가 손상될 가능성이 있는 가공제품에는 적용할 수 없다.

* 식품공전「별표 1. "식품에 사용할 수 있는 원료"의 목록」에 따라 기재함 (「식품의 기준 및 규격」(제2022-56호)의 원료 명칭에 따라 기재함)

2. 검체의 전처리

검체는 멸균가위 등을 이용하여 검체에서 지방층을 제외한 살코기부분이나 지느러미 부위를 취하여 잘게 분쇄한 뒤 DNA 추출을 위한 시료로 사용한다.

3. 검체의 칭량 및 오염 방지

「식품의 기준 및 규격」의 "제8. 일반시험법, 10. 식품표시 관련 시험법, 10.1 유전자변형식품의 시험법, 10.1.2 검체의 칭량 및 오염방지" 방법을 따른다.

4. DNA 추출

DNA 추출 시 하나의 분석 검체로부터 적정량을 2회 칭량하여 동시에 DNA를 추출하고 추출된 각각의 DNA는 적절히 희석하거나 농축하여 PCR에 사용한다. DNA는 DNeasy® Blood & Tissue 키트(QIAGEN, Germany, 또는 이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 방법 및 제품)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 아래와 같이 추출한다.

4.1 균질화한 시료(약 25 mg)에 ATL 버퍼 180 ㎕ 및 proteinase K 20 ㎕를 넣어 혼합 후 56℃에서 반응시킨다(시료가 버퍼에 의해 모두 용해될 때까지 충분히 반응시킴).
4.2 반응액에 AL 버퍼 200 ㎕을 넣고 혼합한다.
4.3 반응액에 에탄올(96-100%) 200 ㎕를 넣고 혼합한다.
4.4 반응액을 DNeasy Mini spin 컬럼에 넣고 원심분리(6,000 × g, 1분)한다.
4.5 AW1 버퍼 500 ㎕로 DNeasy Mini spin 컬럼을 세척(6,000 × g, 1분)한다.
4.6 AW2 버퍼 500 ㎕로 DNeasy Mini spin 컬럼을 세척(20,000 × g, 3분)한다.
4.7 AE 버퍼 100 ㎕를 컬럼에 넣고 5분간 방치 후 원심분리(≥6,000 × g, 1분)하여 최종 용출한다.

5. DNA의 농도 및 순도 확인과 농축

「식품의 기준 및 규격」의 "제 8. 일반시험법, 10. 식품표시 관련 시험법, 10.1 유전자 변형식품의 시험법, 10.1.4 DNA의 농도 및 순도 확인과 농축" 방법을 따른다.

6. PCR 반응

6.1 분석원리

앞서 추출한 DNA를 주형으로 증폭시약(*Taq* DNA Polymerase)과 검사하고자 하는 종의 특이 프라이머로 일반(Conventional) PCR 장비를 이용하여 증폭한 후 전기영동을 통해 증폭산물을 확인한다.

6.2 실험 시 주의사항

PCR 실험 시 결과 판정에 영향을 줄 수 있는 외래 DNA 혼입이나, DNA 분해효소 등 이물의 오염을 주의하도록 한다.

「식품의 기준 및 규격」의 "제 8. 일반시험법, 10. 식품표시 관련 시험법, 10.1 유전자 변형식품의 시험법, 10.1.5 정성시험, 나. 실험시 주의사항" 방법을 따른다.

6.3 시약 및 시액

6.3.1 프라이머의 준비

본 시험법과 관련하여 PCR 반응에 사용되는 프라이머는 표 1과 같다.

표 1. 참돔과 나일틸라피아의 원료판별 PCR 반응 검사에 사용되는 프라이머

구 분	염기서열 (5'-3')	예상 크기(bp)	
		참돔	나일틸라피아
참돔 특이 프라이머	CTT CCA CTT CCT TCT ACC T	213	-
	CCT AGC AGG TTC GGG GTG		
나일틸라피아 특이 프라이머	TTT AAA TTC TTT ACC CCC ATT GGC	-	167
	CTG CTT TTA GGC CCA CTA GAA CAT TAG		

* 참돔 프라이머는 CytB(Cytochrome B), 나일틸라피아 프라이머는 16S rRNA를 표적 유전자로 사용하였음

6.3.2 PCR용 반응액의 조제

표 1의 프라이머를 사용하면서 반응의 총량을 20 ㎕로 할 경우 조성은 표 2와 같다. 다만, PCR 반응의 반응액 조성은 사용하는 시약 및 PCR 기기에 따라 다를 수 있으므로 사용시약의 매뉴얼을 참고하여 최적화할 수 있다. 각 PCR 반응 시에는 음성 대조군(NTC, Non Template Control)으로 주형 DNA 대신 증류수를 사용한 것과, 양성대조군(증폭산물의 크기를 확인할 수 있는 플라스미드 DNA)를 시료와 함께 PCR 반응시킨다. PCR에서 생길 수 있는 오차를 감소시키기 위해 하나의 DNA 시료액에 대하여 동일한 PCR 반응액 및 튜브를 사용하여 3반복 시험하여 확인한다.

표 2. PCR 반응액 조성

성분	최종 농도(튜브)	1회 분량(㎕)
Taq DNA polymerase*	1.0 U	0.2
PCR 완충액	1 X	2.0
$MgCl_2$	2.0 mM	1.6
dNTPs	0.2 mM	1.6
프라이머(정방향/역방향)	1 μM(각각 0.5 μM)	2.0
주형 DNA (10 ng/㎕)	10 ng	1.0
증류수	반응 총액이 20 ㎕가 되도록 첨가	
전체량		20

* 이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 내열성 DNA 중합효소(Polymerase)의 경우 사용이 가능함

6.4 PCR 증폭

모든 반응액을 분주한 후 PCR을 실시하는데, 기기에 튜브를 장착하고 반응조건(표 3)을 입력한 후 반응을 개시한다. 이상에서 얻어진 PCR 산물은 바로 전기영동하여 증폭산물을 확인하거나 냉동 보관한다.

표 3. PCR 반응 조건

구분	온도	시간	반복수
초기변성(Initial denaturation)	94℃	10분	1
변성(Denaturation)	94℃	30초	40
결합(Annealing)	60℃	30초	
신장(Extension)	72℃	30초	
최종신장(Elongation)	72℃	5분	1
보존	4℃	-	-

6.5 유전자 증폭결과 확인

PCR 증폭 결과는 캐필러리(Capillary), 아가로스겔(Agarose gel) 또는 폴리아크릴아마이드 겔(Polyacrylamide gel)을 이용한 전기영동 등으로 확인할 수 있다.

「식품의 기준 및 규격」의 "제 8. 일반시험법, 10. 식품표시 관련 시험법, 10.1 유전자 변형식품의 시험법, 10.1.5 정성시험, 마. 전기영동에 따른 결과의 판정" 방법을 따른다.

7. 분석결과 판정

전기영동장치를 이용하여 예상 크기의 증폭산물을 확인한다.

① **참돔 특이 프라이머를 사용한 경우**, 참돔에서 213 bp의 증폭산물이 확인되어야 하고, 나일틸라피아에서는 증폭산물이 확인되지 않아야 한다.

② **나일틸라피아 특이 프라이머를 사용한 경우**, 나일틸라피아에서 167 bp의 증폭산물이 확인되어야 하고, 참돔에서는 증폭산물이 확인되지 않아야 한다.

추출 DNA 시료액 별로 3반복 시험한 결과, 2개 이상의 결과에서 동일한 크기의 밴드가 생성되어야 하며, 모두 음성대조군에서 증폭산물이 확인되지 않아야 하고, 양성대조군에서는 참돔과 나일틸라피아의 특이 프라이머 사용시 각각 213, 167 bp의 증폭산물이 확인되어야 한다. 만약, 음성대조군에서 증폭산물이 확인되거나 양성대조군에서 증폭산물이 확인되지 않을 경우 재실험을 진행하도록 한다.

[결과 예시]

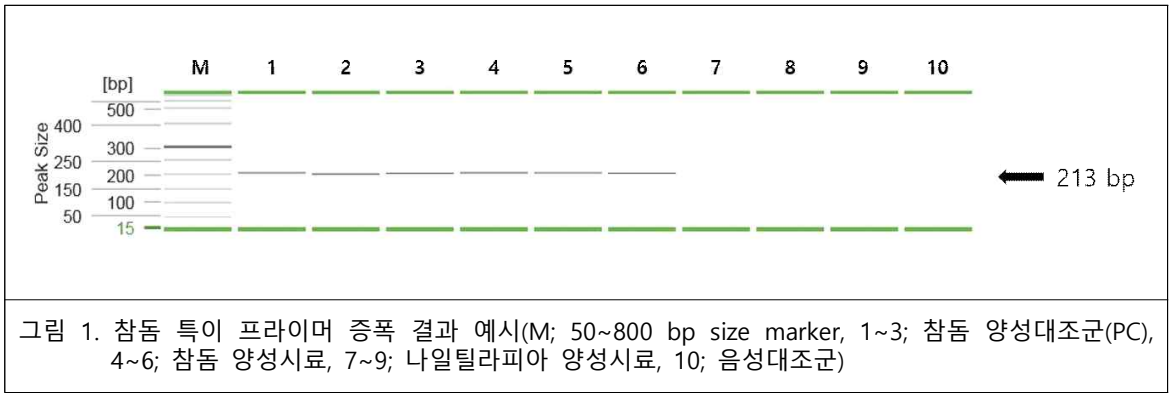

그림 1. 참돔 특이 프라이머 증폭 결과 예시(M; 50~800 bp size marker, 1~3; 참돔 양성대조군(PC), 4~6; 참돔 양성시료, 7~9; 나일틸라피아 양성시료, 10; 음성대조군)

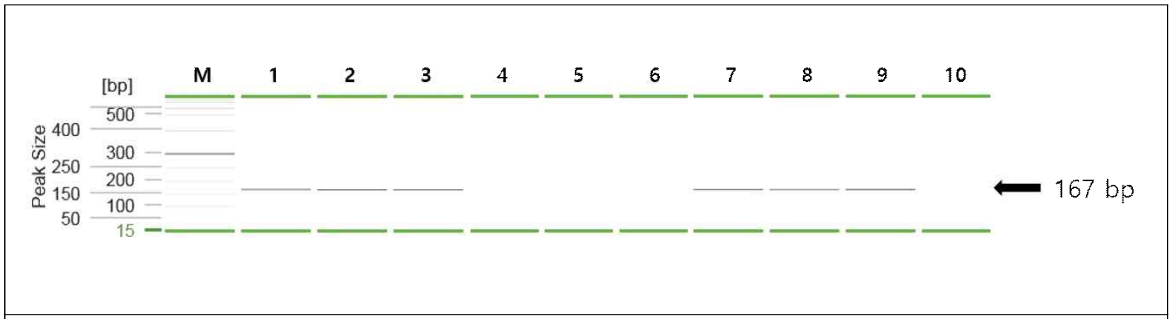

그림 2. 나일틸라피아 특이 프라이머 증폭 결과 예시(M; 50~800 bp size marker, 1~3; 나일틸라피아 양성대조군(PC), 4~6; 참돔 양성시료, 7~9; 나일틸라피아 양성시료, 10; 음성대조군)