

Duplex PCR을 이용한 재첩과 일본재첩 간 신속한 종 판별법 개발

김용휘, 윤봉한, 한호섭, 김혜진, 방인철

순천향대학교 자연과학대학 생명과학과

Development of Rapid Identification Method for Asian Clam, *Corbicula fluminea* and Brackish Water Clam, *Corbicula japonica* Using Duplex PCR

Yong Hwi Kim, Bong Han Yun, Ho-Seop Han, Hye Jin Kim and In-Chul Bang

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

ABSTRACT

A duplex PCR primer set was developed for molecular biological species identification by making species-specific primers for *Corbicula fluminea* and *Corbicula japonica* distributed in Korea. The developed species-specific primers were designed to form an interspecies-specific band around *C. fluminea* 289 bp and *C. japonica* 143 bp by searching for a site of interspecies genetic variation appearing on the nucleotide sequence of the cytochrome c oxidase subunit 1 (*co1*) gene of mitochondrial DNA. A verification experiment was also performed on the duplex PCR primer set by measuring the amplification efficiency for each repeat number and genomic DNA (gDNA) concentration. The duplex PCR primer set finally established was found to require a minimum of 10 ng/μL of gDNA concentration when considering the sample amount and PCR reaction cycle in terms of economic feasibility, and 30 cycles were found to be suitable. Therefore, the duplex PCR primer set between *C. fluminea* and *C. japonica* developed in this study is judged to be able to perform accurate species identification quickly and conveniently by PCR band observation.

Keywords: *Corbicula fluminea*, *Corbicula japonica*, Species-specific primer, *co1*, duplex PCR

서 론

백합목 (Veneroidea) 의 재첩과 (corbiculidae) 에 속하는 재첩속 (*Corbicula*) 이매패류는 아시아, 아프리카 및 호주 등 온·열대 지방에 분포하며 담수와 기수역에 서식한다 (Morton, 1986; Glaubrecht and Korniusshin, 2003; Sousa *et al.*, 2008; Pigneur *et al.*, 2014; Haponiski and Foighil, 2019). 재첩속 이매패류는 전 세계적으로 10종이 보

고되어 있으며 (Lee, 2019), 우리나라에는 재첩 (*Corbicula fluminea*) 을 비롯한 일본재첩 (*Corbicula japonica*), 참재첩 (*Corbicula leana*), 엷은재첩 (*Corbicula papyracea*), 점박이재첩 (*Corbicula portentosa*), 섬재첩 (*Corbicula insularis*), 콩재첩 (*Corbicula fenouilliana*), 대륙재첩 (*Corbicula fluminalis*), 공주재첩 (*Corbicula colorata*) 등 9종의 재첩속 이매패류가 서식하고 있는 것으로 알려져 있다 (Lee, 2016).

우리나라 재첩속 이매패류의 내수면 어업 생산량은 1991년 을 기준으로 1,306 M/T을 기록하여 자원량이 비교적 풍부하였으나 (MMAF, 1997), 하구 환경 변화로 인한 서식 면적 감소와 수질오염에 따른 자원량 감소를 겪으면서 (Jo *et al.*, 1998), 1994년에는 705 M/T의 생산량을 기록하여 감소하기 시작하였으며 (MMAF, 1997), 최근에는 더욱 감소된 230 M/T의 생산량이 집계되어 감소 추세를 계속해서 이어 가고 있는 것으로 나타났다 (MOF, 2021). 한편, 1992년 한·중 수교

Received: December 01, 2022; Revised: December 20, 2022;
Accepted: December 30, 2022

Corresponding author: In-Chul Bang

Tel: +82 (41) 530-1286, e-mail: incbang@sch.ac.kr
1225-3480/24831

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.

를 기점으로 값싼 중국산 수산물들이 국내로 수입됨에 따라, 2012년부터 2019년까지 중국산 재첩속 이매패류의 연간 수입량은 3,877-4,817 M/T 규모를 기록하여 국내 생산량을 월등히 넘어섰다 (K-Fish Information Portal, <https://kfishinfo.co.kr/>). 이에 따라, 수입산 재첩속 이매패류가 국내산으로 둔갑하거나 혼합되어 판매되는 부정 유통 사례도 급격하게 증가하고 있어 (Park *et al.*, 2016), 관계 당국은 일반 소비자에 대한 알권리를 보장하고 공정 거래를 유도하기 위하여 재첩속 이매패류를 ‘내수면 패류’로 분류하고 ‘수산물원산지표시제도’를 법제화하여 소비자와 생산자를 함께 보호하고 있다 (Lee and Hur, 2017).

우리나라 재첩속 이매패류는 중간 형태가 유사하고 종 내 변이도 다양하기 때문에 외부 형질에만 의존하여 종을 식별하는 것은 매우 어려운 것으로 알려져 있다 (Lee and Kim, 1997). 특히, 유통 과정에서 연체 부위만 절단된 상태로 시장에 유통될 경우, 외부 형질에 의한 종 식별이 불가능하다는 문제점이 있다. 따라서, 의도적으로 원산지를 둔갑시키거나 잘못된 지식으로 오동정하여 부정유통하게 될 경우, 사회경제적으로 손실을 야기할 수 있으므로, 이를 예방하기 위하여 분자생물학적 분석 방법을 활용한 객관적인 종 판별법 개발이 필요한 것으로 판단된다.

현재까지 국내에서는 Isozyme을 이용한 한국산 재첩속 이매패류의 계통분류학적 연구 (Lee and Kim, 1997) 와 미토콘드리아 DNA의 *co1* 유전자를 기반으로 한 국내 유통 재첩속 이매패류의 종 동정 연구 (Park *et al.*, 2016) 등이 시도되었다. 그러나, 이러한 분석 방법들은 집단유전학적 및 분자계통학적 유연관계를 확인하는 정밀 분석 방법으로써 유용하지만, 동위효소 분석을 위한 전기영동 후 대상 시료 별로 유전자형을 확인하여 대립유전자 빈도 (allele frequency) 와 이형접합자 빈도 (heterozygosity) 등을 계산하거나 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR) 후 염기서열 결정 등 별도의 분석 과정을 거쳐야 결과를 도출할 수 있기 때문에 많은 시간과 비용이 소모된다. 따라서, 신속하고 정확한 분자생물학적 종 판별 방법으로 미토콘드리아 DNA의 cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*co1*), cytochrome *b* (*cytb*), 12s 및 16s ribosomal RNA (rRNA) 유전자 영역의 염기서열 상에 나타나는 단일염기다형성 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 부위를 활용하여 대상 종마다 종 특이적 프라이머 (Species-specific primer) 를 디자인하고, 이를 한꺼번에 증폭하여 시간과 비용을 줄여 효율을 극대화하는 multiplex PCR 방법이 보편적으로 알려져 있다 (Park *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2018).

현재 국내에는 재첩속 이매패류와 같은 이매패강 (Bivalvia) 에 속하는 홍합 (*Mytilus coruscus*) 을 판별할 수 있는

duplex PCR 방법 (Kim and Yoon, 2018) 과 돌조개상과 (Arcoidea) 이매패류 4종을 판별할 수 있는 multiplex PCR 방법 (Kim *et al.*, 2021) 등이 보고되었다.

본 연구에서는 우리나라에서 주로 유통되는 두 종의 재첩속 (*Corbicula*) 이매패류인 재첩 (*C. fluminea*) 과 일본재첩 (*C. japonica*) 에 대한 미토콘드리아 DNA의 *co1* 유전자 영역을 활용하여 두 쌍의 종 특이적 프라이머를 개발하고 재현성과 효율성을 검증하여 최종적으로 duplex PCR 프라이머 세트를 구축하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료 확보 및 Genomic DNA (gDNA) 추출

본 연구에서 사용된 재첩과 일본재첩의 한·중·일 원산지별 시료 정보는 Table 1에 나타내었으며, 이들에 대한 종 동정과 분류 체계는 Lee (2016, 2019) 를 따랐다. 이들의 Genomic DNA (gDNA) 는 연체 부위 중 발 (foot) 조직 일부를 절단하여 FastDNA[®] Kit (MP Biomedicals[™], Irvine, CA, USA) 를 통해 추출하고, NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 를 이용하여 파장대 260/280 nm에서 추출된 gDNA에 대한 순도와 함량을 확인한 후 분석에 사용하였다.

2. PCR 및 염기서열 분석

위 과정에서 추출된 재첩과 일본재첩에 대한 미토콘드리아 DNA의 cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*co1*) 유전자 영역의 염기서열을 확보하기 위하여, AccuPower[®] PCR PreMix (BIONEER Corp., Daejeon, Republic of Korea) 에 gDNA 100 ng/ μ L 와 본 연구에서 개발된 *co1* 유전자 영역의 sequencing 프라이머 (1,522 bp, Marsh_1F1 5'-GTTGAAGGTGCTAAAGAAGC-3', Marsh_1R1 5'-ACATGCCTATAACATCTCTG-3') 에 대한 10 pmol/ μ L 희석본을 각각 첨가한 후, 3차 증류수를 이용하여 최종 볼륨 (20 μ L) 을 맞추었다. 이후, 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 초기변성 (initial denaturation) 반응과 30초 간 변성 (denaturation) 반응을 유도하고, 52 $^{\circ}$ C에서 30초 간 결합 (annealing) 반응을 유도한 후, 72 $^{\circ}$ C에서 30초 간 신장 (extension) 반응을 35회 반복하였으며, 72 $^{\circ}$ C에서 7분 간 최종 신장 (elongation) 반응을 수행하였다.

생산된 PCR product는 1.5%의 agarose gel 상에서 전기영동을 진행한 후, GelDoc system (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) 을 이용하여 올바른 위치에 증폭 여부를 확인하였으며, 이후 MG PCR Purification Kit (Cancer Rop Co., Ltd., Seoul, Republic of Korea) 를 사

Table 1. List of samples, locality information, and the number of samples for *Corbicula fluminea* and *Corbicula japonica* used in this study

Species	Locality	Country	No. of samples
<i>Corbicula fluminea</i>	Gunsan-si, Jeollabuk-do	Korea	30
	Buan-gun, Jeollabuk-do	Korea	30
	Seocheon-gun, Chungcheongnam-do	Korea	30
	Dandong City, Liaoning Province	China	30
	Donggang City, Liaoning Province	China	30
<i>Corbicula japonica</i>	Hadong-gun, Jeollanam-do	Korea	30
	Saha-gu, Busan-si	Korea	30
	Chiba Prefecture	Japan	30

용하여 정제하였다.

염기서열 생산은 BIOFACT (Daejeon, Republic of Korea) 사에서 취급하는 BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) 를 사용하여 DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) 로 PCR 실험을 수행한 후, ABI PRISM 3730XL Analyzer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) 를 통하여 염기서열 초기 데이터를 생산하였다.

생산된 재첩과 일본재첩의 *co1* 유전자 염기서열 초기 데이터는 FinchTV ver. 1.4 (Geospiza Inc., Seattle, WA, USA; <http://www.geospiza.com/finchtv>) 를 사용하여 수동으로 trimming하고, MEGA ver. 11.0.13 (Tamura *et al.*, 2021) 에 탑재 되어 있는 MUSCLE (Edgar, 2004) 을 사용하여 다중염기서열정리를 수행한 후, 최종적으로 1,522 bp의 *co1* 유전자 염기서열을 결정하였다.

위 과정을 통하여 결정된 재첩과 일본재첩의 *co1* 유전자 염기서열은 DnaSP ver. 6.12.03 (Rozas *et al.*, 2017) 와 Geneious Prime[®] 2022.1.1 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand) 를 통하여 haplotype에 대한 염기서열 분석을 진행하였다. 최종적으로 분석된 각 종의 haplotype 염기서열들은 미국의 국립생물공학정보센터 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 에서 운영하는 GenBank[®]에 등록하여 accession number를 부여 받았다 (Table 1).

3. 종 특이적 프라이머 디자인

재첩과 일본재첩에 대한 종 특이적 프라이머는 위 과정에서 확보된 각 종의 haplotype과 GenBank[®]에 업로드 되어 있는 재첩 (*C. fluminea*, MK392334.1, MK587517.1), 일본재첩 (*C. japonica*, MZ895053.1), 참재첩 (*C. leana*, MW646295.1) 및 Seta-shijimi clam (*C. sandai*, LC623654.1) 등을 포함하여

미토콘드리아 DNA *co1* 유전자 염기서열 상에서 종 내 유전적 변이 (intraspecific genetic variation) 와 종 간 유전적 변이 (interspecific genetic variation) 를 나타내는 SNPs 부위를 탐색한 후, 차 (2000) 에서 권장하는 프라이머 디자인 방법에 따라, Primer3web ver. 4.1.0 (Koressaar and Remm, 2007; Untergasser *et al.*, 2012; Koressaar *et al.*, 2018) 을 이용하여 최종적으로 재첩 289 bp와 일본재첩 143 bp의 증폭 크기를 나타내는 두 쌍의 종 특이적 프라이머를 디자인하였다. 이후, singleplex PCR을 통한 반응 조건과 교차 검증 과정을 통하여 duplex PCR 프라이머 세트를 구축하였다.

4. Duplex PCR 증폭 효율성 평가

Duplex PCR 프라이머 세트에 대한 증폭 효율성 평가는 Kim *et al.* (2021) 에서 시행된 방법에 따라, 0.01 ng/ μ L, 0.1 ng/ μ L, 1 ng/ μ L, 10 ng/ μ L 및 100 ng/ μ L 등 5개의 gDNA 농도 구간을 설정한 후, AccuPower[®] Gold Multiplex PCR PreMix (BIONEER Corp., Daejeon, Republic of Korea) 에 두 쌍의 종 특이적 프라이머를 10 pmol/ μ L로 희석한 mixture를 첨가하고, 위에서 확립된 singleplex PCR 반응 조건과 세 구간의 증폭 반복 수 (20회, 25회 및 30회) 를 각각 적용하여 3회 반복 실험하였다. 이후, Fragment Analyzer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) 를 이용하여 전기영동을 진행한 후, PROsize Data Analysis Software ver. 4.0.2.7 (Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Germany) 를 사용하여 전기영동 분석 결과를 시각화하였다.

결과 및 고찰

1. 미토콘드리아 DNA의 *co1* 유전자 염기서열 분석

재첩과 일본재첩에 대한 *co1* 유전자 영역의 염기서열 분석 결과, 총 1,522 bp의 염기서열이 증폭되었으며, 이에 대한 염

Table 2. GenBank[®] accession numbers of haplotype sequences of cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*co1*) gene of mitochondrial DNA of *Corbicula fluminea* and *Corbicula japonica* collected in this study

Species	Haplotype	GenBank [®] Acc. No.	References
<i>Corbicula fluminea</i>	Hap. 1	OP502752	This study
<i>Corbicula fluminea</i>	Hap. 2	OP502753	This study
<i>Corbicula fluminea</i>	Hap. 3	OP502754	This study
<i>Corbicula fluminea</i>	Hap. 4	OP502755	This study
<i>Corbicula fluminea</i>	Hap. 5	OP502756	This study
<i>Corbicula fluminea</i>	Hap. 6	OP502757	This study
<i>Corbicula fluminea</i>	Hap. 7	OP502758	This study
<i>Corbicula fluminea</i>	Hap. 8	OP502759	This study
<i>Corbicula fluminea</i>	Hap. 9	OP502760	This study
<i>Corbicula fluminea</i>	Hap. 10	OP502761	This study
<i>Corbicula fluminea</i>	Hap. 11	OP502762	This study
<i>Corbicula fluminea</i>	Hap. 12	OP502763	This study
<i>Corbicula fluminea</i>	Hap. 13	OP502764	This study
<i>Corbicula fluminea</i>	Hap. 14	OP502765	This study
<i>Corbicula fluminea</i>	Hap. 15	OP502766	This study
<i>Corbicula fluminea</i>	Hap. 16	OP502767	This study
<i>Corbicula japonica</i>	Hap. 1	OP502768	This study
<i>Corbicula japonica</i>	Hap. 2	OP502769	This study
<i>Corbicula japonica</i>	Hap. 3	OP502770	This study
<i>Corbicula japonica</i>	Hap. 4	OP502771	This study
<i>Corbicula japonica</i>	Hap. 5	OP502772	This study
<i>Corbicula japonica</i>	Hap. 6	OP502773	This study
<i>Corbicula japonica</i>	Hap. 7	OP502774	This study
<i>Corbicula japonica</i>	Hap. 8	OP502775	This study
<i>Corbicula japonica</i>	Hap. 9	OP502776	This study

기 조성 비율은 아데닌 (adenine, A) 23.59%, 티민 (thymine, T) 42.85%, 구아닌 (guanine, G) 21.31% 그리고 시토신 (cytosine, C) 12.25%로 나타나 A+T bias는 약 66.44%인 것으로 나타났다. 따라서, 선행 보고된 재첩과 일본재첩의 미토콘드리아 DNA 게놈의 염기 함량 및 A+T bias와 유사한 수준을 나타내었다 (Wu *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019; Park and Kwak, 2022). 또한, 재첩, 일본재첩, 참재첩 및 Seta-shijimi clam의 염기서열에 대한 다형성 부위 (polymorphic site) 는 총 185개인 것으로 나타나, 전체 염기서열 길이 대비 약 12.16%의 변이율을 보이는 것으로 나타났다. 이 중에서 염기서열 간 SNPs 부위를 나타내는 singleton variable site와 parsimony informative site는 각각 49개와 136개로 나타났으며, 이를 반영하는 재첩과 일본재첩의 haplotype 개수는 각각 16개와 9개인 것으로 나타났다 (Table 2).

2. 재첩과 일본재첩 간 종 특이적 프라이머 디자인

재첩과 일본재첩 간 종 특이적 프라이머를 디자인하기 위하여 각 종의 haplotype의 염기서열 상에서 종내 유전적 변이를 최대한 배제하고, 종 간 유전적 변이가 나타나는 35개의 SNPs 부위를 고려한 후 (Fig. 1), Kim and Yoon (2018) 에 따라 가공 처리 및 첨가물 수준에서 종 동정이 가능하도록 350 bp 이하의 증폭 크기를 갖는 종 간 특이적 프라이머를 디자인하였다. 따라서, 재첩의 종 특이적 프라이머에서 정방향 프라이머인 CF_co1F1은 45 bp와 60 bp의 SNPs 영역이 포함되도록 디자인하였고, 역방향 프라이머인 CF_co1R1은 291 bp와 316 bp의 SNPs 영역이 포함되도록 디자인하여, 총 289 bp의 종 간 특이적 밴드가 증폭되도록 하였다 (Fig. 1; Table 3). 또한, 일본재첩의 종 특이적 프라이머에서 정방향 프라이머인 CJ_co1F1은 1,353 bp의 SNPs 영역이 포함 되도록 디자인하였으며, 역방향 프라이머인 CJ_co1R1은 291 bp와

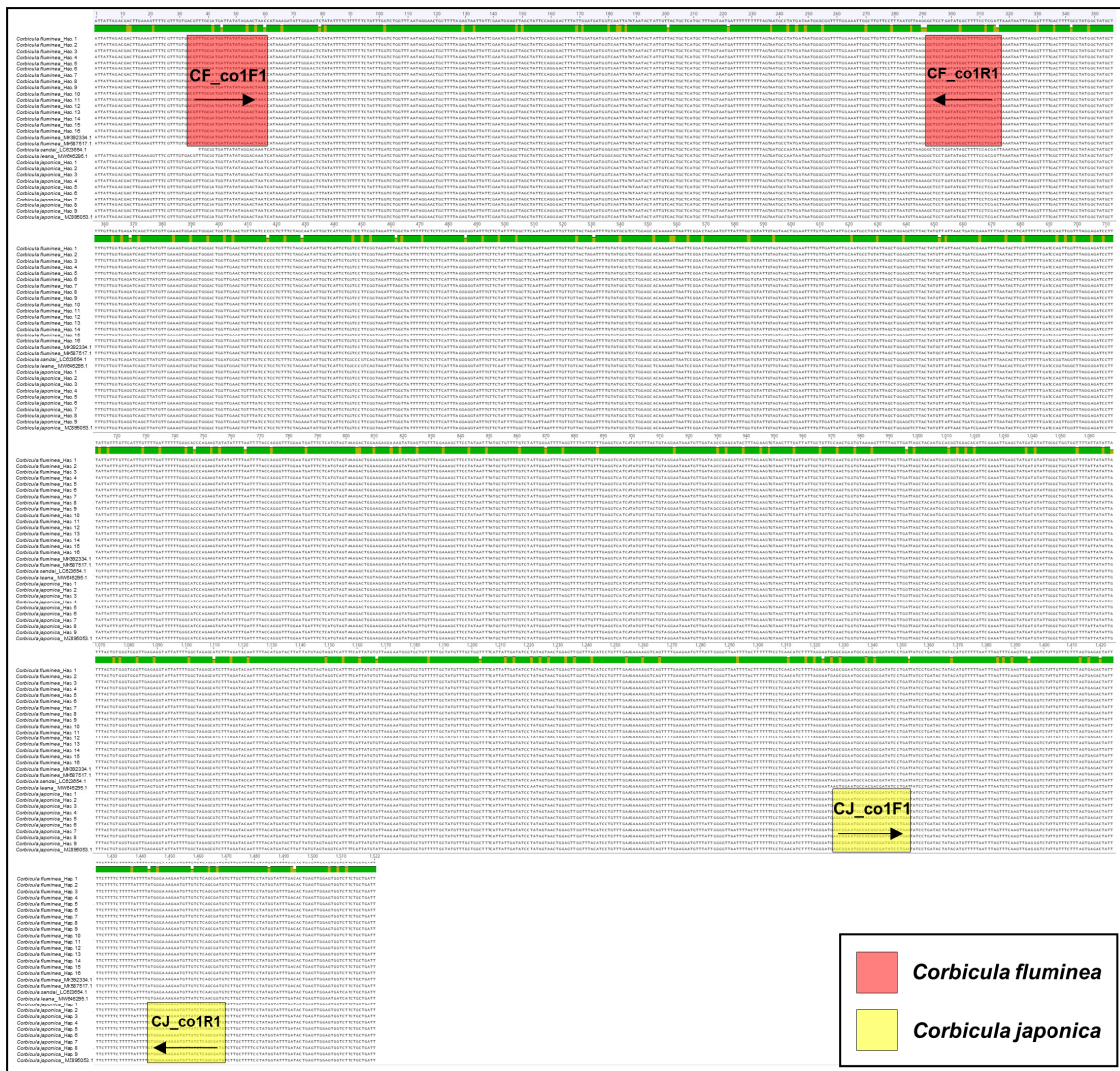


Fig. 1. Species-specific primers design positions according to single nucleotide polymorphisms (SNPs) on the cytochrome c oxidase subunit 1 (*co1*) gene sequence (1,522 bp) of *Corbicula fluminea* and *Corbicula japonica*.

316 bp의 SNPs 영역이 포함 되도록 디자인하여, 총 143 bp의 중간 특이적 밴드가 증폭되도록 하였다 (Fig. 1; Table 3).

3. 재첩과 일본재첩 간 Singlex PCR

위 과정에서 디자인된 중간 특이 프라이머의 특이성과 재현성을 검증하기 위하여 재첩과 일본재첩 집단에 대한 Singlex PCR 실험을 수행하였다. 먼저 종 특이적 프라이머의 결합 온도를 확인하기 위하여 60°C에서 70°C의 온도 범위에서 Gradient PCR 실험을 수행한 결과, 60-62°C의 온도 범위에서 중간 특이적 밴드가 형성 되었다. 또한, primer-dimer 현상 (Das *et al.*, 1999) 을 비롯한 불특정 유사 염기서열에 대한 비특이적 PCR 증폭 현상 (Shigemori *et al.*, 2005) 은

나타나지 않았다. 따라서, singleplex PCR의 최적 결합 온도 (optimal annealing temperature) 는 가장 뚜렷한 종 특이적 밴드가 형성된 61°C로 설정하고 반응 조건과 함께 정리하여 Table 4에 나타내었다.

4. 재첩과 일본재첩 간 Duplex PCR

위 과정에서 설정된 Singleplex PCR 반응 조건을 토대로 재첩과 일본재첩에 대하여 집단 별로 duplex PCR 실험을 수행한 후, 최소 2 bp 수준의 DNA 단편 분해능을 가진 fragment analyzer (Pocernich *et al.*, 2019) 로 전기영동 하여 고해상도의 종 특이적 밴드와 전기영동도 (electropherogram) 를 함께 분석한 결과 (Figs. 2, 3), 재첩의 군산, 부안, 서천 집단과

Table 3. Information on duplex PCR primer set for species identification between *Corbicula fluminea* and *Corbicula japonica* developed in this study

Species	Primers	Sequence (5'→3')	Size	Gene
<i>Corbicula fluminea</i>	CF_co1F1	ACGTTTTCGATGATTATATAGAACTAAC	289	<i>coI</i> ^a
	CF_co1R1	ATCGAGGAAAAGCCATATCAGGAGCC		
<i>Corbicula japonica</i>	CJ_co1F1	AGCGGAATGCCACGGCGATATCCTGAC	143	
	CJ_co1R1	CATCGCTGAGATAACATTCTTTCCAC		

^acytochrome *c* oxidase subunit 1 gene

Table 4. Singleplex and duplex PCR conditions for species identification between *Corbicula fluminea* and *Corbicula japonica*

	Primers	Steps	Temp.	Time	Cycles
Singleplex PCR	CF_co1F1 ^a /CF_co1R1 ^a	Initial denaturation	95°C	3 min	1
		Denaturation	95°C	30 sec	
		Annealing	61°C	30 sec	30
		Extension	72°C	30 sec	
		Final extension	72°C	5 min	1
		Storage	4°C	Infinite	-
	CJ_co1F1 ^b /CJ_co1R1 ^b	Initial denaturation	95°C	3 min	1
		Denaturation	95°C	30 sec	
		Annealing	61°C	30 sec	30
		Extension	72°C	30 sec	
		Final extension	72°C	5 min	1
		Storage	4°C	Infinite	-
Duplex PCR	CF_co1F1 ^a /CF_co1R1 ^a CJ_co1F1 ^b /CJ_co1R1 ^b	Initial denaturation	95°C	3 min	1
		Denaturation	95°C	30 sec	
		Annealing	61°C	30 sec	30
		Extension	72°C	30 sec	
		Final extension	72°C	5 min	1
		Storage	4°C	Infinite	-

^a*Corbicula fluminea*, 289 bp; ^b*Corbicula japonica*, 143 bp

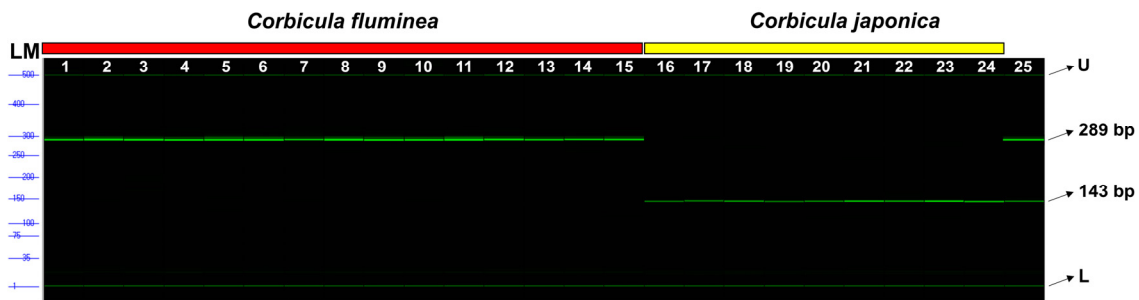


Fig. 2. Specific band positions for species-specific primers in duplex PCR prepared from the nucleotide sequence of the cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*co1*) gene on the mitochondrial DNA of *Corbicula fluminea* (289 bp) and *Corbicula japonica* (143 bp). Lane 1-3, *C. fluminea*, Gunsan-si, Jeollabuk-do, Korea; Lane 4-6, *C. fluminea*, Buan-gun, Jeollabuk-do, Korea; Lane 7-9, *C. fluminea*, Seocheon-gun, Chungcheongnam-do, Korea; Lane 10-12, *C. fluminea*, Dandong City, Liaoning Province, China; Lane 13-15, *C. fluminea*, Donggang City, Liaoning Province, China; Lane 16-18, *C. japonica*, Hadong-gun, Jeollanam-do, Korea; Lane 19-21, *C. japonica*, Saha-gu, Busan-si, Korea; Lane 22-24, *C. japonica*, Chiba Prefecture, Japan; Lane 25, mixture of *C. fluminea* and *C. japonica*; LM, ladder marker (1-500 bp); U, upper marker; L, lower marker.

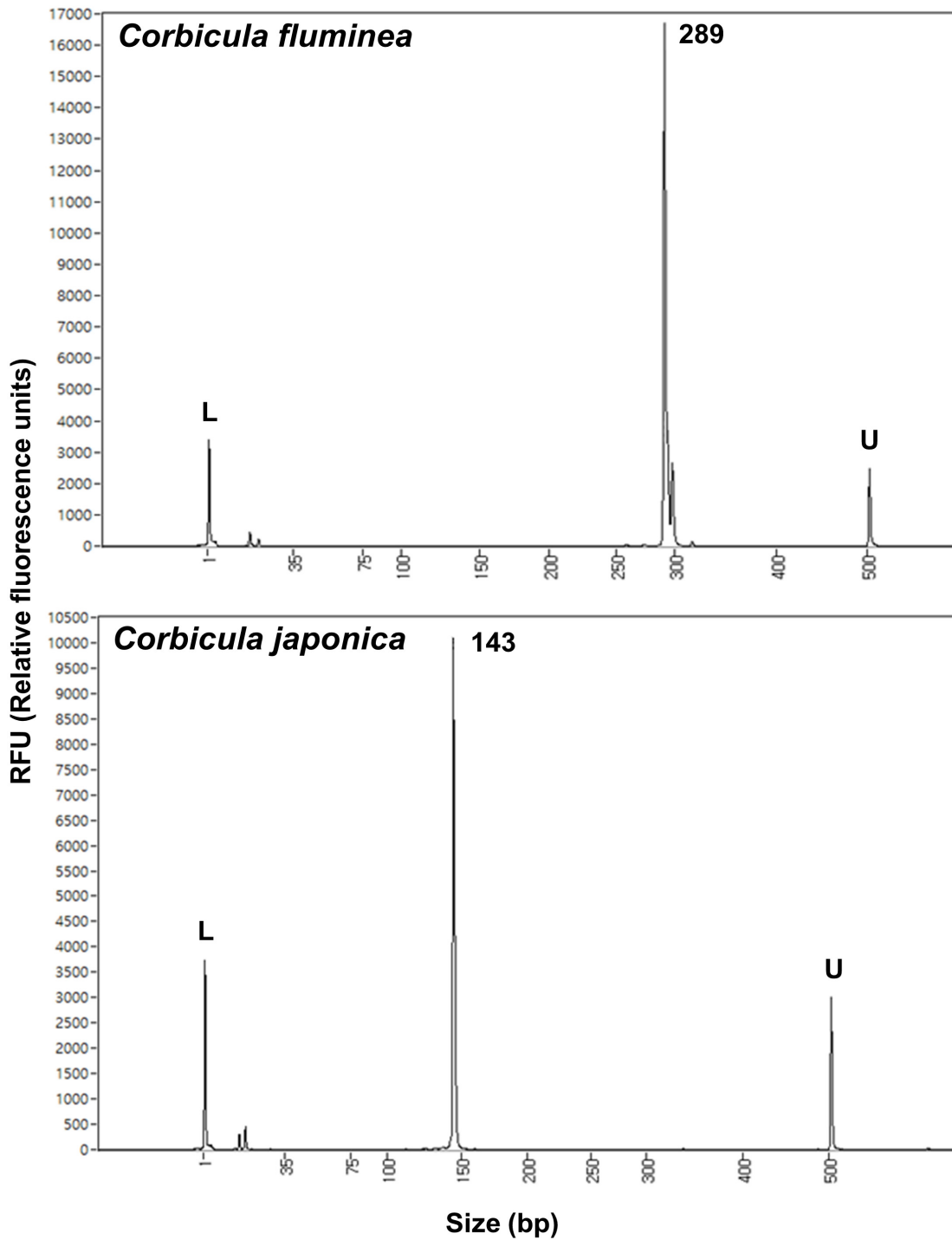


Fig. 3. Fragment analyzer electropherogram results of a duplex PCR primer set for species identification between *Corbicula fluminea* and *Corbicula japonica*. L, lower marker; U, upper marker.

중국 단둥, 동강 집단에 대한 gDNA 시료에서 종 간 특이적 밴드 (289 bp) 가 명확하게 증폭되었으며, 일본제철의 하동,

부산 집단과 일본 지바 집단에 대한 gDNA 시료에서도 종 간 특이적 밴드 (143 bp) 가 명확하게 증폭되었다 (Fig. 2). 또한,

Table 5. Analysis results of experimenting with PCR efficiency from 20 to 30 cycles after diluting the genomic DNA (gDNA) of *Corbicula fluminea* and *Corbicula japonica* from 0.01 to 100 ng/ μ L

	Cycles	Primer	Density (ng/ μ L)				
			0.01	0.1	1	10	100
Duplex PCR	20	CF_co1F1 ^a /CF_co1R1 ^a	×	×	×	×	×
		CJ_co1F1 ^b /CJ_co1R1 ^b	×	×	×	×	×
	25	CF_co1F1 ^a /CF_co1R1 ^a	×	×	×	×	○
		CJ_co1F1 ^b /CJ_co1R1 ^b	×	×	×	×	○
	30	CF_co1F1 ^a /CF_co1R1 ^a	×	×	×	○	○
		CJ_co1F1 ^b /CJ_co1R1 ^b	×	×	×	○	○

^a*Corbicula fluminea*, 289 bp; ^b*Corbicula japonica*, 143 bp

duplex PCR로 인한 primer-dimer 현상과 비특이적 PCR 증폭 반응 여부를 자세히 확인하기 위하여 전기영동도를 관찰한 결과, 재첩과 일본재첩의 증폭 산물에서 중간 특이적 peak가 뚜렷하게 나타났으며, primer-dimer를 비롯한 비특이적 PCR 증폭 반응에 따른 peak는 관찰되지 않았다 (Fig. 3). 따라서, Duplex PCR에서 최적 결합 온도는 singleplex PCR과 동일한 61°C로 나타났으며, 이에 대한 반응 조건은 Table 4에 나타내었다.

5. 재첩과 일본재첩 간 Duplex PCR 증폭 효율성 평가

재첩과 일본재첩에 대한 Duplex PCR의 증폭 효율을 측정하기 위하여 gDNA 검출 농도 구간을 0.01 ng/ μ L부터 100 ng/ μ L까지 구간마다 10배씩 차이를 두고 설정하였으며, 각 검출 농도 구간마다 PCR 반응 주기를 20회, 25회 및 30회로 설정하고 각각 3회 반복하여 실험한 결과, 최대 검출 농도는 PCR 반응 주기가 25회 및 30회 구간에서 100 ng/ μ L인 것으로 나타났으며, 최소 검출 농도는 PCR 반응 주기가 30회 구간에서 10 ng/ μ L인 것으로 나타났다 (Table 5). 한편, PCR 반응 주기가 20회인 검출 농도 구간에서는 종 특이적 밴드가 검출되지 않았다 (Table 5). 따라서, 최종적으로 확립된 Duplex PCR 프라이머 세트는 경제성 측면에서 최소한의 시료량과 PCR 반응 주기를 고려할 경우, gDNA의 농도는 최소 10 ng/ μ L이 필요한 것으로 나타났으며, PCR 반응 주기는 30회가 적합한 것으로 나타났다 (Table 5).

이와 같이 우리나라에서 유통되는 재첩과 일본재첩의 미토콘드리아 DNA *co1* 유전자에 대한 각 종의 haplotype을 이용하여 염기서열 상에 나타나는 중간 SNPs 영역을 탐색한 후, 종 특이적 프라이머를 디자인하였다. 이후, gDNA 검출 농도 구간 및 PCR 주기에 따른 재현성과 효율성 검증 실험을 거친 다음, 최종적으로 duplex PCR 프라이머 세트를 개발하였다. 이에 따라, 우리나라에서 유통되는 재첩과 일본재첩에 대한

duplex PCR 프라이머 세트의 우수한 감별력을 토대로 수산물 유통 질서 확립 및 학술적 오류 방지에 기여할 수 있을 것으로 예상된다.

요 약

국내에서 유통되고 있는 재첩속 이매패류인 재첩 (*Corbicula fluminea*) 과 일본재첩 (*Corbicula japonica*) 의 분자생물학적 종 동정을 위하여 종 특이 프라이머를 디자인하고 검증하여 duplex PCR 프라이머 세트를 개발하고자 하였다. 종 특이 프라이머는 미토콘드리아 DNA의 cytochrome c oxidase subunit 1 (*co1*) 유전자의 염기서열 상에 나타나는 중간 유전적 변이 부위를 탐색하여 재첩 289 bp 및 일본재첩 143 bp의 중간 특이밴드가 형성되도록 디자인하였으며, PCR 증폭 반복 수와 genomic DNA (gDNA) 의 농도에 따른 증폭 효율 측정을 통하여 duplex PCR 프라이머 세트에 대한 검증 실험을 수행하였다. 최종적으로 확립된 duplex PCR 프라이머 세트는 경제성 측면에서 시료량과 PCR 반응 주기를 고려할 경우, gDNA의 농도는 최소 10 ng/ μ L가 필요한 것으로 나타났으며, PCR 반응 주기는 30회가 적합한 것으로 나타났다. 따라서, 본 연구에서 개발된 재첩과 일본재첩의 duplex PCR 프라이머 세트는 종 특이적 밴드 수준에서 간편한 방법으로 신속하고 정확한 종 동정을 수행할 수 있을 것으로 판단되며, 부정 유통 근절과 오동정으로 인한 피해를 예방할 수 있을 것으로 판단된다.

사 사

본 연구에 사용된 재첩류 시료 일부를 제공해 주신 (주)더모아젠의 김무상 박사님과 채준영 선임연구원님께 감사의 말씀을 전해드립니다. 이 논문은 2022년 해양수산부 재원으로 해

양수산과학기술 진흥원의 지원 (과제명: 수산생물 원산지 판별 기술 및 현장단 속 키트개발, 20200425-03) 과 순천향대학교의 지원을 받아 수행되었습니다.

REFERENCES

- Das, S., Mohapatra, S.C. and Hsu, J.T. (1999) Studies on primer-dimer formation in polymerase chain reaction (PCR). *Biotechnology Techniques*, **13**(10): 643-646.
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, **32**(5): 1792-1797.
- Glaubrecht, M. and Korniusin, A. (2003) Toward a systematic revision of brooding freshwater Corbiculidae in Southeast Asia (Bivalvia, Veneroidea): on shell morphology, anatomy and molecular phylogenetics of endemic taxa from islands in Indonesia. *Malacologia*, **45**(1): 1-40.
- Haponski, A.E. and Foighil, D.Ó. (2019) Phylogenomic analyses confirm a novel invasive North American *Corbicula* (Bivalvia: Cyrenidae) lineage. *PeerJ*, **7**: e7484.
- Jo, M.K., Byun K.S. and Jang M.H. (1998) Distribution and Ecology of Genus *Corbicula* in the North KyungSang Province I. Distribution and Classification of Genus *Corbicula* in the North KyungSang Province. *Journal of Aquaculture*, **11**(4): 581-592.
- Kim, K.H., Lee, H.Y., Kim, Y.S., Kim, M.R., Jung, Y.K., Lee, J.H., Chang, H.S., Park, Y.C., Kim, S.Y., Choi, J.D. and Jang, Y.M. (2014) Development of Species-Specific PCR to Determine the Animal Raw Material. *Journal of Food Hygiene and Safety*, **29**(4): 347-355.
- 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.
- Kim, Y.H., Han, H.-S., Yun, B.H., Park, J.Y., Baek, I.G. and Bang, I.-C. (2021). Development of Rapid Identification Method for Four Species of Ark Shells (Bivalvia: Arcoidea) Bivalves Using Multiplex PCR. *Korean Journal of Malacology*, **37**(4): 139-148.
- 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: integrate sequence of template sequence with primer design software. *Bioinformatics*, **34**: 1937-1938.
- Lee, J.S. (2016) List of Korean Mollusks. pp. 404, *The Korean Journal of Malacology*, Cheonan.
- Lee, J.S. (2019) Invertebrate Fauna of Korea: Volume 19, Number 7 Bivalves III Mollusca: Bivalvia: Unionoidea: Unionidae Veneroidea: Kelliellidae, Trapeziidae, Cyrenidae, Glauconomidae, Sphaeriidae, Glossidae, Veneridae. pp. 182, National Institute of Biological Resources, Incheon.
- Lee, J.S. and Kim, J.B. (1997) Systematic study on the genus *Corbicula* (Bivalvia: Corbiculidae) in Korea. *Korean Journal of Systematic Zoology*, **13**(3): 233-246.
- 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.
- MMAF (Ministry of Maritime Affairs and Fisheries). (1997) Statistical yearbook of maritime affairs and fisheries. Ministry of Maritime Affairs and Fisheries, Republic of Korea, 1315pp.
- MOF (Ministry of Oceans and Fisheries). (2021) Statistical yearbook of oceans and fisheries. Ministry of Oceans and Fisheries, Republic of Korea, 500pp.
- Morton, B.S. (1986) *Corbicula* in Asia - an updated synthesis. *American Malacological Bulletin*, **Special Edition 2**: 113-124.
- Park, K.Y. and Kwak, I.S. (2022) Complete mitochondrial genome sequence of a brackish water clam *Corbicula japonica* (Cyrenidae: Bivalvia) collected from an estuary of Gwangyang Bay in Korea. *Mitochondrial DNA Part B: Resources*, **7**(9): 1676-1678.
- Park, S.Y., Kang, S.W., Hwang, H.J., Chung, J.M., Song, D.K., Park, H.S., Han, Y.S., Lee, J.S., Kang J.H. and Lee, Y.S. (2016) A mitochondrial cytochrome oxidase I gene based identification of *Corbicula* ssp. commercially available in South Korea. *Korean Journal of Malacology*, **32**(2): 127-131.
- 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.
- Park, Y.J., Lee M.N., Kim, E.M., Noh, E. Soo., Noh, J.K., Park, J.Y. and Kang, J.H. (2018) Development of the duplex PCR method of identifying *Trachurus japonicus* and *Trachurus novaezelandiae*. *Korean Journal of Life Science*, **28**(9): 1062-1067.
- Pigneur, L.M., Marescaux, J., Roland, K., Etoundi, E., Descy, J.P. and Van Doninck, K. (2011) Phylogeny and androgenesis in the invasive *Corbicula* clams (Bivalvia, Corbiculidae) in Western Europe. *BMC Evolutionary Biology*, **11**(1): 1-16.
- Pocernich, C., Lutgeharm, K. and Wong, K.S. (2019) Highly Resolved Separation of DNA Fragments on the Agilent 5200 Fragment Analyzer System. © Agilent Technologies, Inc. 2019 Printed in the USA, January 24, 2019, 5994-0517EN.
- 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.
- Shigemori, Y., Mikawa, T., Shibata, T. and Oishi, M.

- (2005) Multiplex PCR: use of heat-stable *Thermus thermophilus* RecA protein to minimize non-specific PCR products. *Nucleic Acids Research*, **33**(14): e126-e126.
- Sousa, R., Antunes, C. and Guilhermino, L. (2008) Ecology of the invasive Asian clam, *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in aquatic ecosystems: an overview. *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*, **44**(2): 85-94.
- Tamura, K., Stecher, G. and Kumar, S. (2021) MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, **38**(7): 3022-3027.
- 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.
- Wu, C.D., Zhang, J.Q., Bai, Z.Y., Wang, G.L., Ge, J.Y. and Sun, M.L. (2019) The complete mitochondrial genome of the two kinds of *Corbicula fluminea* (Black and Yellow). *Mitochondrial DNA Part B: Resources*, **4**(1): 1383-1384.
- Zhang, T., Yin, J., Tang, S., Li, D., Liu, X., Gu, X. and Liu, Y. (2019) The complete mitogenome of clam *Corbicula fluminea* determined using next-generation and PacBio sequencing. *Mitochondrial DNA Part B: Resources*, **4**(1): 1660-1661.
- 차대룡. (2000) 1999년도 연수강좌: 중합효소연쇄반응(PCR)을 이용한 연구 기법. 대한신장학회지 부록, **19**(1): 28-40.