

CO-I 유전자 기반 국내 유통 *Corbicula* 속 패류의 종 동정

박소영¹, 강세원¹, 황희주¹, 정종민¹, 송대권¹, 박홍석², 한연수³, 이준상⁴, 강정하⁵, 이용석¹

¹순천향대학교 자연과학대학 생명시스템학과, ²㈜지앤시바이오,
³전남대학교 농업생명과학대학 식물생명공학부, ⁴강원대학교 환경연구소,
⁵국립수산과학원 생명공학과

A Mitochondrial Cytochrome Oxidase I gene based identification of *Corbicula* spp. commercially available in South Korea

So Young Park¹, Se Won Kang¹, Hee Ju Hwang¹, Jong Min Chung¹, Dae Kwon Song¹,
Hong Seog Park², Yeon Soo Han³, Jun-Sang Lee⁴, Jung-Ha Kang⁵ and Yong Seok Lee¹

¹Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University, Asan, Chungnam 31538, Korea

²Research Institute, GnC BIO Co., LTD., 621-6 Banseok-dong, Yuseong-gu, Daejeon 34069, Korea

³Division of Plant Biotechnology, College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea.

⁴Institute of Environmental Research, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon-do, 24341, Korea

⁵National Institute of Fisheries Science, Biotechnology Research Division, Busan, 46083, Korea

ABSTRACT

The natives of the genus *Corbicula* have shown worldwide dispersion in recent times, which has caused great ecological and economic impacts on the introduced ecosystems. The species reported from the genus have been consumed as food and explored for medicine with pharmacological activity. Consequently, the demand of *Corbicula* sp. in the South Korean domestic market has increased and so also it's associated import to the country. However, due to the absence of identification keys of imported *Corbicula*, the market is facing confronting situations. We hypothesized that the mitochondrial Cytochrome Oxidase I gene (CO-I) based molecular profiling could be a necessary technique for identification of *Corbicula* sp. in the South Korea domestic market. The genetic analysis identified both *Corbicula japonica* and *Corbicula fluminea* from the market foods. *C. japonica* and *C. fluminea* are inhabitants in Korea, but *C. fluminea* production has decreased in Seomjingang river basin. Therefore, *C. fluminea* identified from this study, is expected to be imported from China and would have a mixed sales in Seomjingang river side basin.

Key words: cytochrome oxidase I, *Corbicula japonica*, *Corbicula fluminea*, molecular identification

서 론

Received: June 1, 2016; Revised: June 20, 2016; Accepted: June 30, 2016

Corresponding author : Jung-Ha Kang
Tel: +82 (51) 720-2461, e-mail: genetics@korea.kr

Corresponding author : Yong Seok Lee
Tel: +82 (41) 530-3040, e-mail: yslee@sch.ac.kr
1225-3480/24619

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.

국내에 서식하는 재첩과 (corbiculidae) 의 패류는 모두 9종으로 기록되어 있으며, 이중 담수역에 서식하는 재첩 (*Corbicula fluminea*) 과 기수역의 일본재첩 (*C. japonica*) 은 예로부터 기호식품으로 많이 애용되어 왔다 (Lee, 2015).

근래 소비자들의 건강한 먹거리에 대한 관심이 늘어나면서 황달, 천식, 기침 등에 효능이 있는 것으로 알려져 (Chung *et al.*, 2000) 재첩국 또는 재첩회 등의 요리에 대한 소비가 증가하고, 일본으로의 수출 등으로 국내산 재첩류의 수요가 급증하

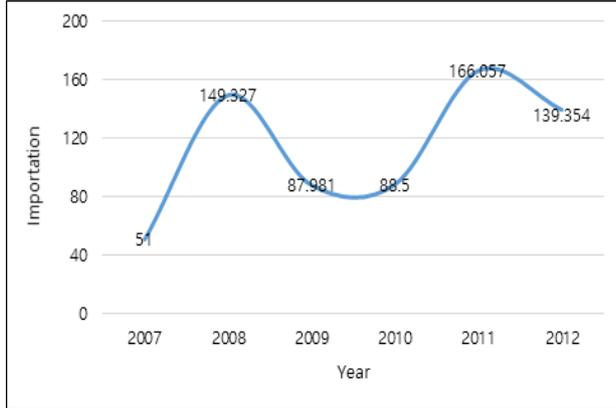


Fig. 1. Annual import of Frozen *Corbicular*.

고 있으나, 주 서식지인 강 하구의 독 건설, 골재채취 등의 환경변화로 서식지가 감소하고 수질 오염 등으로 자원량이 감소하고 있다 (Kim *et al.*, 2002; Ryu *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012).

이에 따라 2007년 51톤의 냉동 재첩살이 수입된 것을 시작으로 2012년에는 약 139톤이 수입되었고 (Fig. 1), 국내 생산량이 감소한 2014년에는 냉동재첩 165톤, 활재첩 4,794톤이 수입되었다 (MFDS, 2015).

그러나 이렇게 수입된 재첩류는 정확한 종의 동정 없이 판매되고 원산지 표기가 없거나 국내산으로 둔갑되는 등의 유통상 혼동을 유발시키고 있다. 국내에서 유통되고 있는 재첩살의 정확한 종의 동정은 소비자의 먹거리 선택에 있어 중요한 사안이며 원산지의 확인에 도움을 줄 수 있을 것으로 예상된다.

본 연구는 국내에서 유통되는 재첩살의 정확한 종 동정을 위하여, cytochrome c oxidase subunit I (CO-I) 유전자의 일부분인 DNA barcode 서열을 활용하였다. DNA barcode는 종을 식별하는데 사용되는 비교적 짧은 유전자 서열로 표준화된 부분으로 변이성이 높지만 종내 변이성이 낮아 종 식별에 유용하게 사용된다. DNA barcode는 미토콘드리아 유전자에서 cytochrome c oxidase subunit I (CO-I) 를 코딩하는 600 base pair 내외를 표준화하여 사용하고 있으며 식물이나 곰팡이에서는 사용할 수 없지만, 연체동물 및 대부분의 동물계에서 종 판별 마커로 사용하고 있다 (Hebert *et al.*, 2003; Park and Kim, 2003; Bang and Lee, 2014; Layton *et al.*, 2014; Kress *et al.*, 2015). 뿐만 아니라 음식으로 조리된 조직에서도 DNA의 추출 및 증폭이 가능하다는 연구 결과도 있다 (Musto, 2011).

이에 따라 본 연구에서는 섬진강 유역의 재첩 전문 식당에서 재첩 국과 재첩회의 연체부에서 DNA를 추출하고 CO-I 서열의 시퀀싱을 통해 정확한 종 동정을 시도 하였고, 이러한 연구를 통해 시중에 유통되는 재첩류의 연체부 만으로도 종 동정이 가능함을 알리고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료 확보

국내 최대 일본재첩 (*C. japonica*) 의 생산지로 알려진 섬진강 (Lee *et al.*, 2011) 유역에서 재첩을 판매하는 식당의 국과 회에 있는 재첩류의 연체부를 수거하여 알코올에 담아 실험실로 운반하였다. 또한 재첩류의 CO-I 서열의 확보를 위해, 국내 노량진수산시장에서 국내산과 중국산 활재첩을 구입하였다. 구입한 국내산 활재첩은 일본재첩 (*C. japonica*), 중국산 활재첩은 재첩 (*C. fluminea*) 으로 확인하였다.

2. CO-I 서열 확보 및 중간 유연관계 분석

1) DNA 추출

수거된 시료에서 10개체를 무작위로 골라, 액화질소를 이용해 급속 냉동 후, 막자 사발을 이용하여 잘게 파쇄하였다. 그런 다음 RNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, USA) 을 사용하여 DNA를 추출하고 분광광도계를 이용하여 농도 1 μg 이상이고 순도 OD 1.8-2.0 에 이르는 것만 사용하였다.

2) CO-I 유전자 서열의 증폭

CO-I유전자의 서열 시퀀싱을 위해 추출한 DNA에서 CO-I 유전자만을 증폭하였다. 사용한 CO-I universal primer는 다음과 같다 (Layton *et al.*, 2014; Hee Ju *et al.*, 2016).

COI-LCO1490 : GGTCAACAAATCTAAAGATATTGG

COI-HCO2198 : TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA

총 20 μl (10 x PCR buffer 2 μl , 10 mM dNTP Mix 0.5 μl , Taq polymerase 0.2 μl , 5 pmol primer 0.5 μl , genomic DNA 2 μl) 의 용량으로 증폭 (ABI 2720 Thermocycler) 하였다. PCR cycle은 96 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3분 간 변성 시킨 후, 96 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20초, 50 $^{\circ}\text{C}$ -55 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20초, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1분 동안 35 cycle로 진행하였다.

3) CO-I 유전자 서열 시퀀싱

증폭 되어진 CO-I 서열은 각각 1 μl 씩 Big Dye Ready Reaction Mix 0.5 μl , 5 x buffer 1 μl , DMSO 0.5 μl , 10 pmol primer 0.5 μl , Grade Water 6.5 μl 와 함께 섞은 뒤, ABI 2720 Thermocycler에서 96 $^{\circ}\text{C}$ 1분간 변성시켰다. 그런 다음, 96 $^{\circ}\text{C}$ 10초, 52 $^{\circ}\text{C}$ 5초, 60 $^{\circ}\text{C}$ 4분 동안 35 cycle로 증폭된 DNA는 에탄올 침전법을 통해 정제한 후 ABI 3730XL DNA analyzer를 이용하여 양방향으로 시퀀싱을 수행하였다.

4) CO-I 서열 확보 및 종간 유연관계 분석

시퀀싱을 통해 확보된 각 샘플의 chromatogram 파일들은 Phred (Ewing and Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998) 프로그램을 이용하여 phred score 20의 조건으로 base calling 한 후, FASTA 포맷으로 변환하였다. FASTA 파일은 다시 cap3 (Huang and Madan, 1999) 프로그램을 이용하여 assembly 하여 CO-I 서열을 확보하였다. 확보 되어진 CO-I 서열들은 연체동물 전용 BLAST 서버 (Lee *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2015) 를 사용하여 분석하였다. Clustalx (Higgins and Sharp, 1988) 프로그램을 이용해 multiple alignment를 진행한 뒤, 정렬된 서열을 기준으로 MEGA (Tamura *et al.*, 2013) 프로그램을 통해 Maximum likelihood 방식으로 phylogenogram을 도식화하였다.

결과 및 고찰

현재까지 NCBI에 등록된 재첩과 (corbiculidae) 패류의 유전정보는 뉴클레오타이드 1,984개, 단백질 765개, Genome 1 개로 확인되었으며 (Table 1), 이 중 cytochrome c oxidase subunit I (CO-I) 유전자는 319개로 확인되었다. 시퀀싱을 통해서 분석된 각 샘플의 CO-I 서열들은 분자계통학적 분석을 위해 NCBI에 등록된 CO-I 서열들과 BLAST (Altschul *et al.*, 1990) 프로그램을 이용하여 상동성 검사를 진행하였다.

DNA가 미검출된 샘플을 제외하고, 시퀀싱을 통해서 분석된

96개체의 CO-I 서열 분석 결과, 살아있는 재첩의 경우, 형태 분석과 동일하게 재첩 (*C. fluminea*) 과 일본재첩 (*C. japonica*) 으로 동정되었다. 또한 섬진강 하구 주변 식당에서 무작위로 수거한 94개체의 재첩류의 연체부를 동일한 방법으로 분석한 결과 재첩 (*C. fluminea*) 과 일본재첩 (*C. japonica*) 이 혼용되고 있음을 확인하였다 (Table 2).

또한 Clustalx 프로그램을 사용하여 multiple alignment 를 수행한 뒤, MEGA 프로그램을 사용하여 molecular phylogenetic 분석을 실시한 결과, 각 식당에서 수거한 재첩류는 재첩 (*C. fluminea*) 과 일본재첩 (*C. japonica*) 으로 확인되었다 (Fig. 2).

재첩 (*C. fluminea*) 과 일본재첩 (*C. japonica*) 은 국내 서식하는 기수 및 담수산 이매패류로 (Lee, 2015), 일본재첩 (*C. japonica*) 은 섬진강 하구 기수지역에, 재첩 (*C. fluminea*) 은 중상류 담수역에서 서식한다. 그러나 출현 빈도는 매우 낮아 섬진강 하구 유역에서 대량의 재첩이 포획되는 것은 거의 불가능하다. 뿐만 아니라 현재 중국으로부터 다량의 재첩 (*C. fluminea*) 수입이 확인되고 있어, 본 실험에서 사용된 재첩류의 연체부는 중국에서 수입된 재첩 (*C. fluminea*) 일 가능성이 높아, 수입된 중국산 재첩 (*C. fluminea*) 이 현지에서 혼합되어 판매되고 있는 것으로 생각된다. 또한 이를 계기로 국내 유통되고 있는 중국산 재첩 (*C. fluminea*) 과 국내산 재첩 (*C. fluminea*) 의 원산지 판별을 위한 비교 분석이 필요할 것으로 사료된다.

Table 1. Status of Corbiculidae genetic sequence data in NCBI

Database name	
Nucleotide	1,984
Protein	765
Genome	1

Table 2. The results of cooked *Corbicular* ssp. CO-I analysis

Restaurant	Status	<i>C. japonica</i>	<i>C. fluminea</i>	Undetected	Total
	Live	1	1	0	1
	Live	0	1	0	1
A	Cooked	6	3	1	10
B	Cooked	0	10	0	10
C	Cooked	4	13	3	20
D	Cooked	19	1	0	20
E	Cooked	19	1	0	20
F	Cooked	1	17	2	20

REFERENCES

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, **215**: 403-410.
- Bang, I.S., and Lee, Y.S. (2014) Molecular Phylogenetic Study of *Nesiohelix samarangae* Based on CO-I Gene. *The Korean Journal of Malacology*, **30**: 391-397.
- Chung, P.-., Park, G.-., Jung, Y., Yong, T.-., Im, K.-., and Soh, C.-. (2000) Medicinal Mollusks in Korea. *The Korean Journal of Malacology*, **16**: 55-60.
- Ewing, B., and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome. Res.*, **8**: 186-194.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome. Res.*, **8**: 175-185.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., and de Waard, J.R. (2003) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **270**: S96-S99.
- Hee Ju, H., Se Won, K., So Young, P., Jong Min, C., Dae Kwon, S., Hyeongchun, P., Hong Seog, P., Yeon Soo, H., Jun-Sang, L., and Yong Seok, L. (2016) Classification and Phylogenetic Studies of Cephalopods from four countries of South-East Asia. *The Korean Journal of Malacology*, **32**: 55-62.
- Higgins, D.G., and Sharp, P.M. (1988) CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*, **73**: 237-244.
- Huang, X., and Madan, A. (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome. Res.*, **9**: 868-877.
- Kang, S.W., Hwang, H.J., Park, S.Y., Wang, T.H., Park, E.B., Lee, T.H., Hwang, U.W., Lee, J.-S., Park, H.S., Han, Y.S., Lim, C.E., Kim, S., and Lee, Y.S. (2014) Mollusks Sequence Database: Version II. *The Korean Journal of Malacology*, **30**: 429-431.
- Kang, S.W., Park, S.Y., Patnaik, B.B., Hwang, H.J., Kim, C., Kim, S., Lee, J.S., Han, Y.S., and Lee, Y.S. (2015) Construction of PANM Database (Protostome DB) for rapid annotation of NGS data in Mollusks. *The Korean Journal of Malacology*, **31**: 243-247.
- Kim, W.-K., Lee, C.-S., Lee, J.-Y., and Hu, S.-B. (2002) Production of Artificial Seedling of the Brackish Water Clam, *Corbicula japonica*. *Journal of Aquaculture*, **15**: 23-29.
- Kress, W.J., García-Robledo, C., Uriarte, M., and Erickson, D.L. (2015) DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, **30**: 25-35.
- Layton, K.K.S., Martel, A.L., and Hebert, P.D.N. (2014) Patterns of DNA Barcode Variation in Canadian Marine Molluscs. *PLoS. ONE*, **9**: e95003.
- Lee, J.-Y., Kim, W.-k., and Lee, C.-s. (2011) Growth and survival of the brackish water clam, *Corbicula japonica* larvae according to rearing conditions. *The Korean Journal of Malacology*, **27**: 337-343.
- Lee, J.B., Shin, Y.J., Lee, J.H., Choi, Y.M., Lee, D.W., and Cha, H.K. (2012) Estimation of potential fishery yield for *Corbicula japonica* in the Seomjin River, Korea. *The Korean Journal of Malacology*, **28**: 91-98.
- Lee, J.S. (2015) National list of species of the Korea [Invertebrates-VI] pp. National Institute of Biological Resources.
- Lee, Y.S., Jo, Y.-H., Kim, D.-S., Kim, D.-W., Kim, M.-Y., Choi, S.-H., Yon, J.-O., Byun, I.-S., Kang, B.-R., Jeong, K.-H., and Park, H.-S. (2004) Construction of BLAST Server for Mollusks. *Korean Journal of Malacology*, **20**: 165-169.
- Musto, M. (2011) DNA quality and integrity of nuclear and mitochondrial sequences from beef meat as affected by different cooking methods. *Food Technology and Biotechnology*, **49**: 523-528.
- Park, J.-K., and Kim, W. (2003) Two *Corbicula* (Corbiculidae: Bivalvia) mitochondrial lineages are widely distributed in Asian freshwater environment. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **29**: 529-539.
- Ryu, D.K., Chung, E.-Y., and Kim, Y.H. (2005) Age and Growth of the Brackish Water Clam, *Corbicula japonica* Prime on the West Coast of Korea. *The Korean Journal of Malacology*, **21**: 57-64.
- Ministry of Food and Drug Safety (2015) Status of importation for fishery product
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., and Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**: 2725-2729.