

mtDNA(D-loop)의 PCR-RFLP를 이용한 녹용의 유전자 판별

이진성*, 오정균**

*(주)나래바이오테크 부설 미생물소재연구소,

** (주)나래바이오테크

e-mail: lejis@naraebio.com, joh@naraebio.com

Discrimination of Deer Antlers using PCR-RFLP of Mitochondrial D-loop Gene

Jin-Sung Lee* and Jung Kyun Oh**

*Research Institute of NaraeBioTech Co., Ltd.,

**NaraeBioTech Co., Ltd.,

요 약

녹용은 사슴의 뿔을 통칭해 일컫는 말로서 우리나라는 전 세계 녹용 소비량의 80%를 점유하고 있다. 하지만 국내에서 선호되는 것은 러시아산 붉은 사슴 즉, 원용으로 칭하는 것으로 가격 면에서 가장 고가이다. 따라서 수입되는 녹용의 일부가 러시아 산으로 둔갑 판매되는 경우가 발생되고 있다. 본 연구의 목적은 현재 주로 수입되는 녹용으로부터 미토콘드리아 DNA(mtDNA)의 D-loop 유전자의 일부를 PCR로 증폭하고 이들의 염기서열 분석을 통해서 각 수입지역 녹용에 특이적인 RFLP 마커를 탐색하고 이를 녹용의 유전자 감별에 적용코자 하는 것이다. 결과적으로 *TaaI*과 *HaeI* 두 종류의 제한효소가 녹용의 원산지를 구별할 수 있는 RFLP 마커로 이용 가능성이 확인되었다.

1. 서론

녹용은 사슴과에 속하는 각종 사슴뿔로서 자라기 시작한지 2개월 이내의 조직이 연하고 털이 골고루 덮혀 있는 수컷의 뿔을 말한다. 녹용은 동양의학에서 많은 질병에 대한 치료제로서 이용되고 있으며, 사슴의 여러 품종 중에 러시아산 붉은 사슴(*Cervus elaphus sibericus*)의 뿔이 고가의 녹용으로 판매되고 있다. 녹용의 품질검사는 주로 외관 관찰에 의한 형태적 방법에 의존하는 것이 현재의 유일한 방법이지만 녹용의 품질을 좌우하는 사슴 품종의 판별은 불가능하다. 특히 녹용의 경우 유통과정에서 일반녹용이 고가에 판매되는 러시아산 붉은 사슴의 뿔로 둔갑 판매되는 유통 부조리 사례가 성행하여 소비자에 막대한 피해로 지적되어 왔다.

최근에 분자 유전학 및 유전학분석 기술의 발달로 DNA 분자 수준에서 종 특이적인 DNA 염기서열 차이에 따른 녹용 판별의 가능성이 제기 되었다.

특히 PCR을 이용하는 DNA 다형 분석기법으로서 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism) 기법은 genomic DNA를 특정한 부위를 인식하는 endonuclease들로 잘라서 만들어진 DNA 조각들이다. 이들 endonuclease가 자르는 부위에서 돌연변이가 일어나면, 자르는 것을 방해하게 되어 변화된 크기의 조각들이 만들어지는데, 품종에 따라 이들 효소의 인식부위가 조금씩 달라서 각각 다른 패턴을 형성하여, DNA표지인자를 탐색하는 기술[1]로서 각종 동물의 유전분석 및 종 또는 품종식별에 폭 넓게 응용되어 왔다[2,3].

포유동물의 mitochondria DNA(mtDNA)는 독자적인 구조와 기능을 가지고 단백질 합성계를 형성한다는 사실이 Hutchison등(1974)에 의해서 보고된 이후 그 동안 많은 연구자들에 의해 mtDNA의 다형성과 변이성에 관한 연구가 이루어져 왔다. 그 동안 여러 연구결과에 의하면 mtDNA는 염기치환율이

genomic DNA보다 약 5-10배 빠르고 (Brown 등, 1979) 상이한 DNA 분자 간에 유전자 교환 현상이 발생하지 않는 모성유전을 하여 그 진화 과정이 단순하며(Brown, 1982) 중간 및 동종 내에 염기치환에 의한 많은 돌연변이를 보유하고 있다는 사실이 여러 포유동물에서 보고(Brown, 1980 ; Lansman 등, 1983)됨에 따라 품종의 기원 진화 과정, 유전적 변이성 추정, 품종 간 유전적 유연관계 및 유전적 차이를 규명하는데 매우 유용한 도구로 이용되어 왔다 (Amano 등, 1994 ; Kikkawa 등, 1995). 특히 mt DNA 염기서열 가운데 tRNA^{Pro}와 tRNA^{Phe} 유전자 사이에 위치하고 있는 D-loop(Displacement loop)영역은 mtDNA의 복제 개시 점으로 전체 mtDNA에 비해 10배 이상 높은 염기치환율과 고 빈도의 염기서열 변이가 존재한다는 사실이 밝혀짐에 따라 (Anderson 등, 1982 ; Lindberg 등, 1989), D-loop영역의 염기서열 차이를 통한 품종 또는 개체 판별, 동정(Kim 등, 1999)과 관련된 새로운 유전정보 원으로서 그 활용이 시도되고 있다[4, 5].

따라서 본 연구는 녹용 mitochondria genome에 존재하는 D-loop 유전자의 변이를 이용하여 녹용의 유전자 감별법에 대한 적용 가능성을 제시하고자 수행하였다.

2. 재료 및 방법

본 연구에 사용된 재료는 (주)주성 제약에서 제공한 63개의 sample에서 사슴뿔의 일부를 채취하였다.

2.1. Genomic DNA의 분리 및 정제

시료로부터 genomic DNA의 분리 및 정제는 proteinase K-lysis방법을 이용한 genomic isolation kit(Qiagen, 독일)를 사용하였고 분리된 DNA는 TE buffer(10mM Tris-Hcl, pH 8.5)에 용해하였다.

2.2. mtDNA D-loop영역의 primer 합성 및 PCR 증폭

녹용의 mtDNA의 D-loop 영역 가운데 475bp 단편을 증폭하기 위한 primer로서 forward primer는 5'GGTTGCTGGTTTCACGCGGCA 그리고 reverse primer는 5'ATTTAAACTATTCCTGACGC의 염기배열을 설계하여 Bioneer(한국)로부터 합성하였

으며, PCR 증폭은 Takara사의 PCR thermal cyclers Dice를 이용하여 다음과 같은 조건하에서 실시하였다. 즉 반응액은 0.5 ml tube에 template DNA 약 100ng, primer 각 0.5uM dNTP 각 200uM, 10x PCR buffer 그리고 Taq DNA polymerase 2 unit를 첨가하여 최종 PCR 반응액을 총 20ul로 조정하였다. PCR cycle은 최초 94°C에서 3분간 예비 가열 후 94°C에서 45초, 54°C에서 45초 그리고 72°C에서 70초를 1회로 하여 총 35회 반복한 후 최종적으로 72°C에서 3분간 last extension을 수행하였다.

2.3. 제한효소 반응과 아가로스 젤 전기영동

PCR 종료 후, mtDNA D-loop영역의 475bp 증폭산물의 제한효소 처리는 PCR product를 PCR purification kit(Qiagen, 독일)로 추출한 다음, 6ul의 증폭산물을 *HhaI*와 *TaqI* 두가지 제한 효소를 이용하여 *HhaI*은 37°C에 *TaqI*은 65°C에서 각각 2시간 이상 반응하여 절단했다. 각 제한 효소로 절단하여 얻어진 DNA단편을 확인하기 위해 2% agarose gel로 전기영동 하여 분리한 후 ethidium bromide 용액으로 염색하여 Gel Document System을 통해서 DNA band를 확인하였다.

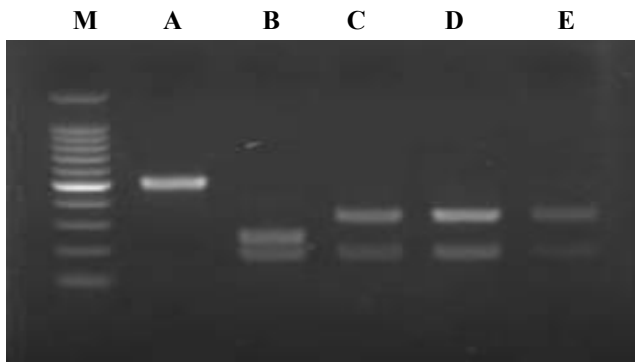
2.4. mt DNAD-loop영역의 염기서열 분석

PCR 증폭산물을 agarose gel로 전기영동 하여 확인한 후 PCR purification kit로 추출한 ABI PrismTM terminator Cycle Sequencing kit(Perkin-Elmer Cetus, USA)를 사용하여 제작회사의 protocol 준하여 DNA sequencer(ABI 3730)를 이용한 Capillary 방식의 형광 염기서열 분석을 수행하였다. 염기서열은 Lasergene program(DNA STAR, Inc., Madison, WI, USA)과 GenBank의 BLAST search를 이용하였다. 염기의 계통학적 관계를 밝히기 위하여 이미 알려진 방법에 따라 Lasergene의 Mega Align module을 이용하였다[11].

3. 결과 및 고찰

녹용을 유전자의 변이로서 수입 국가 혹은 서식 지역을 판별할 수 있는지를 평가하기 위해서 녹용의 mtDNA의 D-loop영역에서 한 쌍의 primer를 제작하여 475bp의 PCR 증폭산물을 얻어 DNA 염기서열을 결정하였다. 결정된 DNA 염기서열을 sequence alignment program인 Lasergene을 통해서 러시아산 붉은 사슴에서 결정된 D-loop 영역의 염기서열과

다른 종에서 결정된 D-loop 영역의 염기서열의 변이를 비교 분석한 결과, 러시아산 붉은 사슴에서 결정된 D-loop 영역은 기존에 보고된 염기서열과 일치 하였으며 본 연구를 통해서 러시아산 붉은 사슴의 D-loop는 두 가지 RFLP 좌위가 있는 것으로 나타났다. 먼저 러시아산 붉은 사슴에서 결정된 D-loop 영역의 153번째 DNA의 염기가 A로, 다른 종에서 결정된 D-loop 영역의 염기서열이 G인 것과 달랐다. 이 부위는 제한효소 *HhaI*의 인식부위 (GCGC)이므로 확인된 DNA 염기변이의 유전자형을 결정하기 위해 *HhaI*에 의한 PCR-RFLP 방법을 수행하였다(그림. 1). 그림 1에서 보는 바와 같이 *HhaI* 제한 효소(GCGC)로 절단하였을 때 인식부위의 변이에 따라 비교한 다른 종들은 310bp와 174bp, 224bp와 174bp의 각각 2개의 단편으로 분리 되었고, 러시아산 붉은 사슴은 G 단일 염기의 결실로 인하여 *HhaI*이 제한효소 인식부위를 절단할 수 없어 475bp의 단일 band 만이 확인되었다.

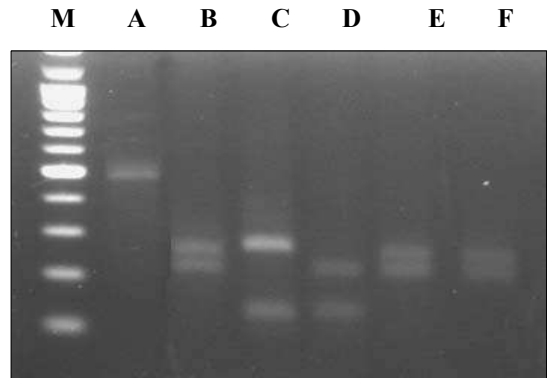


(Fig. 1) PCR-RFLP of D-loop gene in 2% agarose gel following digestion with *HhaI* restriction enzyme. The A (*C. elaphus sibericus*) genotype shows only one fragment of 475bp, while genotypes with C-E (*C. elaphus xanthopygus*, *C. elaphus nelsoli*, *C. elaphus canadensis*) show two fragments of 301bp and 174bp. The B (*C. elaphus bactrianus*) genotype shows two fragments of 224bp and 174bp. M indicates 100bp ladder molecular markers as DNA size marker.

러시아산 붉은 사슴의 D-loop 영역 두 번째 RFLP 좌위는 200번째에 위치한 C로서 비교한 다른 종에서 결정된 D-loop 영역의 염기서열이 T인 것과 달랐다. 이 부위는 제한효소 *TaaI*의 인식부위로 품종별 RFLP 양상은 Fig.2에서 처럼 *TaaI* 제한효소

(ACNGT)로 절단하였을 때 인식부위의 절단 양상에 따라 러시아산 붉은 사슴(A type)를 포함하여 다른 종들은 각각 255bp와 220bp, 276bp와 122bp, 126bp와 129bp 등 각각 2개의 단편으로 분리되었고, 러시아산 붉은 사슴(B type)은 T 단일 염기의 결실로 인하여 제한 효소 인식부위가 소실되어 475bp의 단일 band만이 검출됨이 확인되었다.

이와 같은 결과로 볼 때 녹용에서 추출한 mtDNA의 D-loop 유전자를 두 가지의 제한효소, *HhaI*과 *TaaI* 제한 효소의 절단 패턴의 조합을 이용하면 A와 B 두 가지 형태의 유전자형을 갖는 러시아산 붉은 사슴의 판별이 가능할 것으로 생각되며 이와 같은 유전자형에 대한 RFLP 패턴을 통해서 고가의 러시아산 붉은 사슴 (a,b)의 녹용과 다른 일반 녹용을 감별하는데 유용한 DNA marker로서 이용할 수 있을 것으로 기대된다.



(Fig. 2) PCR-RFLP of D-loop gene in 2% agarose gel following digestion with *TaaI* restriction enzyme. The A (*C. elaphus sibericus*) genotype shows one fragment of 475bp, while genotypes with B (*C. elaphus sibericus*), E and F (*C. elaphus nelsoli* and *C. elaphus canadensis*) genotype show two fragments of 255bp and 220bp. The C genotype (*C. elaphus xanthopygus*) show two fragments of 276p and 122bp. M indicates 100bp ladder molecular markers as DNA size marker.

또한, GeneBank에 등록된 엘크 (*alces alces*), 순록 (*Rangifer tarandus*)의 염기서열을 기초로 하여 두 가지 형태의 러시아산 붉은 사슴의 D-loop 유전자와의 염기서열을 분석하였다. 결과적으로 엘크 사슴의 D-loop 유전자의 153번째 DNA의 염기가 A임

을 확인하였으며 이 부위는 *HhaI* 제한효소 인식부의 결실 부위로서 러시아산 붉은 사슴과는 구별되지는 않지만, 제한효소 *TaqI*의 인식부위가 100bp로 나타나 붉은 사슴의 174bp와는 상이한 RFLP 패턴을 보여 러시아산 붉은 사슴과 엘크도 mtDNA의 D-loop 유전자의 RFLP 패턴으로 판별이 가능할 것으로 생각된다.

우리나라는 대부분의 녹용을 수입에 의존하고 있지만 대부분의 녹용 수요는 고가의 러시아 산 붉은 사슴(원용)에 국한되어 있다. 따라서 중국, 호주, 뉴질랜드 등의 국가에서 수입되는 녹용이 국내에서 유통될 때에 러시아 산 붉은 사슴으로 둔갑 유통, 판매되는 경우가 종종 발생되어 사회 문제가 되고 있다. 또한, 만성소모성 질병(CWD)이 북미에서 발병하면서 *C. elaphus canadensis*, *Alces alces*, 및 녹용으로 사용되지 않는 *Rangifer tarandus*이 중국 등 제3국을 통해 일부가 우리나라로 수입되는 경우가 보고된다는 점을 고려해 보면 mtDNA의 D-loop 유전자의 RFLP 패턴 비교 분석은 러시아산 붉은 사슴의 녹용과 엘크, 순록의 뿔 그리고 여러 일반 녹용의 판별에 매우 유용하게 이용될 수 있을 뿐만 아니라 녹용의 품질 인증 및 부정 유통의 근절에 적용이 가능할 것으로 기대된다.

4. 참고문헌

- [1] 조동욱 : RAPD 분석법을 이용한 산삼 응답 녹용등의 한약재 판별 연구. 한국한의학 연구소 논문집 1995.
- [2] 정의룡, 김우태, 김연수, 한상기 : 소 모색관련 유전자 MC1R의 PCR-RFLP maker 를 이용한 한우 육판별. 한국동물자원과학회지 2000, 42 : 379-390.
- [3] Mehmet Simsek, Nadia Al-Wardy, Mazin Al-Khabory. A polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) test to detect the common mutation(35delG) in the connexin-26 gene. Medical sciences 2001, 1 : 9-12.
- [4] Amano, T., Miyakoshi, Y., Tokada, T., Kikkawa, T. and Suzuki, M. Genetic variats of ribosomal DNA and mitochondrial DNA between swamp and river buffaloes. 1994, Anim. Genet. 25 : 29.
- [5] 정의룡, 김우태, 김연수, 이정구, 한상기: 한우 Mitochondrial DNA D-loop영역의 염기서열 및 유전변이. 한국동물자원과학회지 2002, 223
- [6] 이성수, 고서봉, 오운용, 양영훈, 김규일, 조병욱 : 미토콘드리아 DNA D-loop region의 PCR-RFLP를 이용한 한우, 제주 재래한우와 타 품종과의 유전적 관계 분석. 한축지. 1998, 40 : 335.
- [7] Abe, T., Oishi, T., Suzuki, S., Amano, T., Kondo, K., Nozawa, K., Namikawa, T., Kumazaki, K., Koga, O., Hayashida, S. and Otsuka, J. : Studies on the native farm animals in Asia. I. On blood groups and serum protein polymorphism of East Asian cattle. Jap. J. Zootech. Sci. 1968, 39 : 517.
- [8] Anderson, S., De Druijn, M. H. L., Coulson, A. R., Eperon, V. C., Sanger, F. and Young, I. G. : The complete sequence of the bovine mitochondrial DNA : conserved features of the mammalian mitochondrial genome. J. Mol. Biol. 1982, 156 : 683.
- [9] Bowling, A. T., Del Valle, A. and Bowling, M. : A pedigree-based study of mitochondrial D-loop DNA sequence variation among Arabian horses. Anim Genet. 2000, 31 : 1.
- [10] Brown, W. M. : Polymorphism in mitochondrial DNA of human as revealed by restriction endonuclease analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1980, 77 : 3605.
- [11] Kahng.H.Y.K. Nam JJ.Kukor,B-J.Yoon, D-H. Lee,D,-C. Oh, S-K. Kam, and K.-H.Oh. : PAH utilization by *Pseudomonas rhodesiae* KKI isolated from a former manugactured-gas plant site. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002, 30 : 475-480.