

사슴 미토콘드리아 DNA의 염기서열 및 PCR-RFLP 분석에 의한 녹용의 종 감별

신기현 · 신성철 · 정구용 · 정의룡*

상지대학교 생명자원과학대학 동물생명자원학부

Identification of Deer Antler Species Using Sequence Analysis and PCR-RFLP of Mitochondrial DNA

Ki-Hyun Shin, Sung-Chul Shin, Ku-Young Chung and Eui-Ryong Chung*

Division of Science and Biotechnology, College of Life Science and Natural Resources,
 Sangji University, Wonju 220-702, Korea

Abstract

It is estimated that over 80% of deer antlers produced in the world are consumed in Korea. However, mislabeling or fraudulent replacement of costly antlers with cheaper ones is one of the most common problems in the domestic antler market. Therefore, there is a great need for the development of technology to identify species of antlers. This study was carried out to develop an accurate and reliable method for the identification and authentication of species or subspecies of antlers using DNA sequence analysis and comparison of mitochondrial cytochrome b and D-loop region genes among antlers of five deer species, *Cervus elaphus sibericus*, *Cervus elaphus canadensis*, *Cervus nippon*, *Cervus elaphus bactrianus* and *Rangifer tarandus*. A variable region of cytochrome b and D-loop genes was amplified using PCR with specifically designed primers and sequenced directly. The cytochrome b and D-loop region genes showed different DNA sequences between the species of antlers and thus it is possible to differentiate between species on the basis of sequence variation. To distinguish between reindeer (*Rangifer tarandus*) antlers and other deer antlers, PCR amplicons of the cytochrome b gene were digested with the restriction enzymes *NlaIV* and *TaqI*, respectively, which generates a species-specific DNA profile of the reindeer. In addition, samples of 32 sliced antlers labeled *Cervus elaphus sibericus* from commercial markets were collected randomly and the mt DNA D-loop region of these antler samples was sequenced. Among the antler samples investigated, only 62.5% were from *Cervus elaphus sibericus*, and others were from *Cervus elaphus bactrianus* (25.0%), elk (*Cervus elaphus canadensis*) and reindeer (*Rangifer tarandus*). Our results suggest that DNA sequencing of mt DNA and PCR-RFLP methods using *NlaIV* and *TaqI* enzymes are useful for the identification and discrimination of deer antler species by routine analysis.

Key words : deer antler, mt DNA gene, sequencing analysis, PCR-RFLP, species identification

서 론

우리나라에서 녹용은 예로부터 인삼과 함께 보약 중에서도 으뜸으로 취급하는 동물성 한약재 중 하나이다. 녹용은 사슴뿔의 한약명으로 수사슴의 뿔이 딱딱하게 각질화되기 전에 잘라서 약으로 사용하는 것을 말하며, 사슴뿔은 여름을 전후해서 새로 돌아나는데 이때 새로 돌아난 연한 뿔을 채취하여 건조한 것이 녹용이다(대한약전, 2005).

우리나라는 세계 최대의 녹용 소비국이자 수입국으로서 국내에서 소비되고 있는 녹용 중 약 71%가 수입에 의존되어 유통되고 있다. 현재 우리나라에서 유통되고 있는 녹용으로는 러시아산 원용, 국산 화용, 뉴질랜드산 적록, 중국산 깔깔이, 캐나다 및 미국산 대륙 그리고 알래스카산 순록 등으로 나눌 수 있는데 이 중에서도 일명 '원용'이라 일컬어지고 있는 러시아산 녹용이 최고로 평가받고 있어 다른 산지의 녹용들에 비해 약 3~5배가량 높은 가격으로 판매되고 있다(한국의약품 수출입협회, 2005). 그러나 이들 중 알래스카산 순록은 암, 수 모두 뿔이 나며 회분 함량 검사에서도 기준치 미달로 인해 녹용으로 인정받지 못하고 있으며, 또한 캐나다 및 미국 등 북미 지방에서 생산되는 대륙의 경우 사슴 광우병으로 불리는 만성소모성

*Corresponding author : Eui Ryong Chung, Division of Animal Science and Biotechnology, College of Life Science and Natural Resources, Sangji University, Wonju 220-702, Korea. Tel: 82-33-730-0541, Fax: 82-33-730-0503, E-mail: erchung@sangji.ac.kr

질병(CWD, Chronic Wasting Disease)이 발생하여 지난 2000년 말부터 현재까지 국내 수입이 전면 금지되어 있다. 그럼에도 불구하고 최근 한 언론보도에 따르면 수입금지 조치되어 있는 북미산 대륙이 중국을 통해 밀수되어 국내에 유통되고 있음은 물론, 심지어 러시아산 원용으로 둔갑해 높은 가격에 판매되고 있는 사례가 빈번하게 발생됨에 따라 소비자들의 피해가 속출되고 있는 것으로 나타났다. 이렇듯 국내 녹용의 둔갑판매 및 불법유통이 만연되어 있는 상황이지만, 현재까지 본초학 등 학계에서도 원용에 대한 정의는 문헌적인 수준에 그쳐 있고 실제로 녹용 감별에 대한 검사도 육안에 의한 형태학적 및 관능검사 수준에 지나지 않아 전문가들조차 정확한 녹용의 종 감별 및 원산지를 추정하는 것이 거의 불가능한 실정이다. 따라서 세계 녹용 생산량의 약 80%를 소비하는 최대 녹용 소비 국가로서 대부분의 녹용을 러시아, 중국, 호주 등으로부터 수입에 의존하고 있고 녹용의 원산지와 부위에 따라 가격 차이가 커서 일반 녹용이 고가의 녹용으로 둔갑 유통되는 문제를 근본적으로 해결하기 위해서는 보다 과학적이고 정확한 녹용의 종 감별 기술개발이 시급한 실정이다.

최근 분자생물학 및 유전자 분석 기술의 발달에 따라 DNA 분자수준에서 염기서열 차이를 이용하여 동물의 종(species) 및 아종(sub-species)을 판별할 수 있게 되었다(Arslan *et al.*, 2006). 특히, 미토콘드리아 DNA(mt DNA)는 핵 DNA 보다 염기치환의 진화속도가 빨라 종간 및 종내 변이성이 매우 높고 모계유전을 통해 다음 세대에 유전물질을 전달하기 때문에(Brown *et al.*, 1979), 동물의 종 감별 및 근연관계 분석에 널리 이용되어져 왔다(Partis *et al.*, 2000; Branicki *et al.*, 2003; Rastogi *et al.*, 2007). 따라서 본 연구는 사슴 미토콘드리아 DNA의 cytochrome b 및 D-loop 유전자 영역의 염기서열 변이성 분석을 통하여 국내에서 유통되고 있는 사슴 녹용의 종 판별과 위품 녹용인 순록을 감별하는 기술을 개발하고자 수행하였다. 또한, 본 연구에서 개발한 미토콘드리아 DNA 분석기술을 이용하여 시중에서 유통되고 있는 녹용 원용을 무작위 표본 추출하여 녹용의 종 감별을 조사하였다.

재료 및 방법

공시 재료

현재 우리나라에서 유통되고 있는 대표적인 녹용으로서 혈연 및 근연관계가 없는 러시아산 원용(*Cervus elaphus sibiricus*, 마록), 중국산 깔깔이(*Cervus elaphus bactrianus*, 마록) 및 알래스카산 순록(*Rangifer tarandus*, 순록) 각각의 사슴 종 3 개체와 북미산 대륙(*Cervus elaphus canadensis*, 엘크), 국산 화용(*Cervus nippon*, 꽃사슴)의 13 개체의 녹용 시료 20 g을 채취해 건조시킨 후 공시재료로 사용하였

다. 공시한 사슴 녹용 가운데 러시아산 마록, 중국산 마록 및 알래스카 순록의 표준 녹각절편은 검증된 시료를 다수 확보하는 데에 어려움이 있어 한·중 사슴 국제공동연구 사업을 통하여 중국 길림성 연변대학에서 시료를 제공받았으며 북미산 수입 엘크 및 꽃사슴은 국내 사슴농장에서 절각한 녹각절편을 사용하였다. 한편, 시중에서 러시아산 원용으로 유통되고 있는 절편 녹용 32개를 무작위 구입하여 사슴 종 검증에 사용하였다.

녹용 DNA 분리 및 정제

공시재료로부터 mtDNA를 포함하고 있는 total DNA의 추출 및 정제는 Miller 등(1988)의 방법을 일부 수정하여 실시하였다. 즉, 녹용 3 g에 3배의 lysis buffer I(155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 1 mM EDTA)을 첨가한 후 homogenizer를 이용하여 13,000 rpm으로 균질화시킨 다음 3,000 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 침전된 pellet에 lysis buffer II (Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0.5% SDS) 3 mL과 proteinase K(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 첨가하고 55°C에서 1시간 배양한 후 RNase(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 첨가하고 37°C에서 30분간 처리하였다. 혼합배양액에 6 M NaCl 1.5 mL와 chloroform 3 mL를 첨가하여 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 70% ethanol로 침전 및 세척하고 건조된 DNA pellet을 TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)에 용해하여 spectrophotometer로 260 nm UV 흡광도에 의해 DNA 농도를 측정 후 4°C에 냉장 보관하였다.

mt DNA 유전자 영역의 Primer 설계 및 합성

사슴 미토콘드리아 cytochrome b와 D-loop 유전자의 특정 염기서열 부위의 증폭을 위한 primer의 설계는 NCBI GenBank database에 등록된 cytochrome b(accession no. AB218689) 및 D-loop(accession no. AY970666) 유전자 영역의 염기서열을 이용하였다. 즉, cytochrome b 유전자 영역의 466 bp의 단편을 증폭하기 위하여 forward 5'-GAT ATG AAA AAC CAT CGT TG-3' 및 reverse 5'-CTC AGC CTG ATA TTT GTC CT-3'의 primer 그리고 D-loop 유전자 영역의 1175 bp의 단편을 증폭하기 위해 D-loop forward 5'-TAA ACC AGA AAA GGA GAG CA-3' 및 reverse 5'-CAA ACC TGT GTG TTT ATG GA-3'의 염기서열로 구성된 primer를 각각 설계 합성하였다.

PCR 기법에 의한 mt DNA 유전자 영역의 증폭

mt DNA 유전자의 특정 염기서열 영역의 PCR 증폭을 위한 반응액 조성은 template DNA 50 ng, primer 각 0.1 μM , dNTP 각 250 μM , 10x PCR buffer 2 μL 그리고 *Taq* DNA polymerase 1 unit을 첨가하여 총 volume이 20 μL 가 되도록 하였다. PCR 증폭을 위한 반응조건은 Perkin-Elmer thermal cycler(GeneAmp PCR system 9700, PE Biosystem,

USA)를 이용하여 cytochrome b 유전자는 94°C에서 5분간 예비가열 후, 94°C에서 45초간 변성, 53°C에서 1분간 중합, 그리고 72°C에서 1분 30초간 신장반응을 총 35회 반복한 다음 마지막으로 72°C에서 5분간 가열 후 PCR 반응을 종료하였다. D-loop 유전자는 1분간 변성, 63°C에서 1분간 중합, 그리고 72°C에서 1분 30초간 신장반응을 총 30회 반복하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR 증폭산물의 확인은 2%와 1.5% agarose gel(Gellix™ LF AGAROSE, Korea)을 이용하여 TAE buffer(40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA, pH 8.0)로 전기영동한 후 ethidium bromide 염색을 통하여 발현된 각각의 DNA 밴드를 확인하였다.

PCR 증폭산물의 염기서열 분석

Cytochrome b 및 D-loop 유전자의 염기서열을 분석하기 위하여 PCR Purification kit(SolGent, Korea)를 이용하여 증폭산물을 정제를 한 후, ABI PRISM 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 direct sequencing 방법으로 염기서열을 분석하였다.

녹용 종 및 아종 간 염기서열의 변이성 비교 분석

생물정보학(bioinformatics) 분석을 위해 Bioedit program (Iris Pharmaceuticals, Inc., version 7.0.1)을 이용하여 사슴 종간 염기서열 alignment를 통한 변이성을 비교 분석하였다.

Cytochrome b 유전자의 PCR-RFLP 분석

총 5종의 사슴 녹용에 대한 mt DNA cytochrome b 및 D-loop 유전자의 염기서열을 비교분석한 후, 제한효소 탐색 프로그램(http://insilico.ehu.es/restriction/one_seq/)을 활용하여 cytochrome b 유전자에서 순록을 구별할 수 있는 특정 염기서열 부위를 인지하는 2종류의 제한효소 *NlaIV*와 *TaqI*(New England Biolabs, USA)을 발굴하고 이들 두 종류의 제한효소를 각각 이용하여 DNA 증폭산물을 절단하였다. 각 제한효소 혼합물 5 unit에 DNA 증폭산물 5 μ L

를 혼합하여 총 volume을 10 μ 로 조정된 후, 각 제한효소 활성온도인 37°C와 65°C에서 3시간 동안 반응을 시켰다. 그 후 최종산물을 3% agarose gel(Gellix™ LF AGAROSE, Korea)을 이용하여 전기영동한 후, ethidium bromide로 염색하고 UV상에 발현된 DNA profile을 검출하였다. 검출된 각 DNA 단편의 크기는 1Kb+ DNA ladder(SolGent, Korea)를 이용하여 추정하였다.

결 과

국내에서 유통되는 한방약재 중 녹용은 매년 수요가 증가하는 귀한 고가의 한약재로 취급되어진다. 그러나 국내 수요량의 절반 이상을 수입에 의존하는 실정이고 유통단계에서 저가의 녹용이 고가의 녹용으로 둔갑 판매되거나 수입이 금지된 북미산 녹용이 유통이 되는 현실 속에서 보다 과학적이고 객관적으로 사슴녹용의 종을 정확히 감별할 수 있는 기술이 요구되어 진다. 본 연구는 사슴 미토콘드리아내의 cytochrome b와 D-loop 유전자 영역의 종간 염기서열 변이성 분석을 통해 국내에서 유통 판매되고 있는 녹용의 종 판별 기술을 개발하고자 수행하였다. 국제 유전자 은행인 NCBI GenBank database에 등록된 사슴의 cytochrome b와 D-loop 유전자 영역의 특정한 염기서열 정보를 기초로 각 유전자에 해당하는 특이적인 primer를 설계 합성하고 PCR 증폭을 실시한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 5종의 공시 녹용 모두에서 cytochrome b 유전자의 466 bp 단편과 D-loop 유전자의 1175 bp 단편이 각각 검출되어 두 유전자 영역에서 목적으로 하는 DNA 증폭이 성공적으로 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 또한 5종의 사슴 녹용에서 검출한 mt DNA cytochrome b 및 D-loop 유전자의 PCR 증폭산물에 대한 DNA 염기서열 분석하고 종간 염기서열 정보를 비교 분석한 sequence alignment 결과는 cytochrome b 유전자의 경우 Fig. 2 그리고 D-loop 유전자는 Fig. 3에 각각 제시하였다. 그리고 녹용 종간 mt

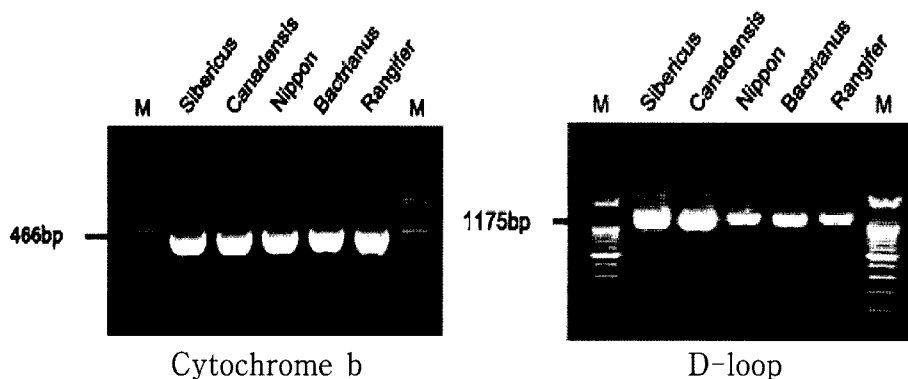


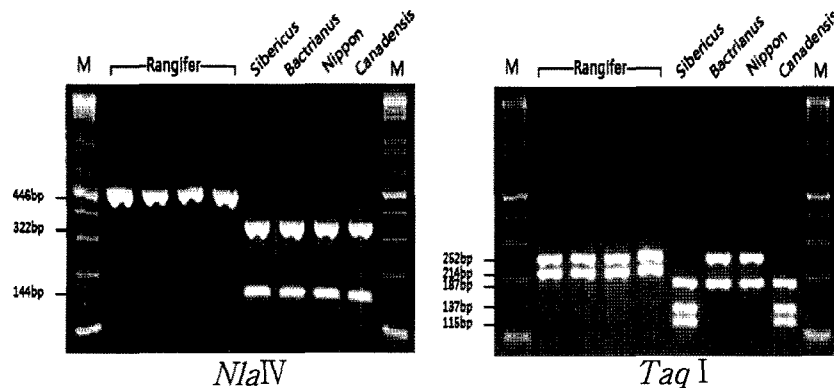
Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the PCR products amplified with specific primers in mitochondrial cytochrome b gene and D-loop region gene of the deer antlers (five species). DNA amplicons were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis. M: molecular size marker (1Kb+ DNA ladder).

Table 1. Comparison of DNA sequence similarity (above the diagonal) and variation (below the diagonal, %) among antlers of five deer species in cytochrome b gene

Variability	Homology	<i>Cervus elaphus sibericus</i>	<i>Cervus elaphus canadensis</i>	<i>Cervus nippon</i>	<i>Cervus elaphus bactrianus</i>	<i>Rangifer Tarandus</i>
<i>Cervus elaphus sibericus</i>	-	-	1	0.963	0.950	0.893
<i>Cervus elaphus canadensis</i>	0	-	-	0.963	0.950	0.893
<i>Cervus nippon</i>	3.7	3.7	-	-	0.946	0.891
<i>Cervus elaphus bactrianus</i>	5.0	5.0	5.4	-	-	0.879
<i>Rangifer Tarandus</i>	10.7	10.7	10.9	12.1	-	-

Table 2. Comparison of DNA sequence similarity (above the diagonal) and variation (below the diagonal, %) among antlers of five deer species in D-loop gene region

Variability	Homology	<i>Cervus elaphus sibericus</i>	<i>Cervus elaphus canadensis</i>	<i>Cervus nippon</i>	<i>Cervus elaphus bactrianus</i>	<i>Rangifer Tarandus</i>
<i>Cervus elaphus sibericus</i>	-	-	0.981	0.950	0.943	0.878
<i>Cervus elaphus canadensis</i>	1.9	-	-	0.949	0.945	0.879
<i>Cervus nippon</i>	5.0	5.1	-	-	0.933	0.898
<i>Cervus elaphus bactrianus</i>	5.7	5.5	6.7	-	-	0.873
<i>Rangifer Tarandus</i>	12.2	12.1	10.2	12.7	-	-

**Fig. 4. DNA profiles of the PCR products of cytochrome b gene digested with *NlaIV* and *TaqI* restriction enzymes in the antlers of the five deer species, respectively. M: molecular size marker (1Kb+ DNA ladder)**

불정보학적 분석에 의한 녹용 중간 유전정보의 동질성 비교를 통해 녹용 중간에 명확한 차이를 보이는 염기서열을 확인할 수 있었고 특히, D-loop 유전자 영역은 cytochrome b 유전자에 비해 더 높은 염기서열 변이를 나타내 D-loop 유전자 영역의 염기서열 분석으로 녹용 원용 및 중간 판별이 가능하였다.

한편, cytochrome b 유전자에서 녹용 중간 특정 염기서열 부위를 인지하는 *NlaIV*와 *TaqI* 제한효소를 이용한 PCR-RFLP 기법으로 순록에 특이적인 RFLP profile을 검출하였다(Fig. 4). 즉, *NlaIV* 제한효소를 이용하여 5종의 녹용 DNA 증폭산물을 각각 절단했을 때 순록의 cytochrome b 유전자 영역에서는 제한효소 인지부위가 존재하지 않아 절단되지 않은 446 bp의 단일 DNA band로 출현하였으나 나머지 4개의 녹용 종에서는 제한효소 인지부위가 존재해 322 bp 및 144 bp 두 개의 단편으로 절단된 DNA band 출현 양상을 나타냈다. 그리고 *TaqI* 제한효소를 이용하여 DNA

를 절단할 경우 순록은 214 bp 및 252 bp 크기를 갖는 두 개의 DNA band로 출현하여 절단된 band의 크기와 수에서 다른 사슴의 녹용과 확실한 차이가 인정되어 사슴의 녹용과 순록 별의 구별이 가능하였다. 또한, *TaqI* 제한효소의 경우 깔깔이와 화용은 27 bp, 115 bp, 137 bp 및 187 bp 크기의 단편을 나타냈고 원용과 대록은 27 bp, 187 bp 및 252 bp 크기의 단편을 보였다. 따라서 러시아산 원용은 중국산 깔깔이 및 국내산 화용의 녹용들과는 DNA band의 크기와 수가 달라 이들 녹용과 판별이 가능하였다. 결론적으로 사슴 mt DNA의 D-loop 유전자의 특정 영역의 염기서열 유전정보 차이를 이용한 분석법으로 녹용의 종 감별이 가능하였고, 특히 cytochrome b 유전자의 특정 염기서열 부위를 인지하는 제한효소를 이용한 PCR-RFLP 기법을 이용하여 녹용으로 인정하지 않는 위품 녹용인 순록을 검출할 수 있게 되어 국내 녹용의 둔갑판매 및 불법유통을 검색할 수 있을 것으로 기대된다.

한편, 녹용 중간 염기서열 변이성이 높은 mt DNA D-loop 유전자의 특정 영역 염기서열 분석(DNA sequencing)기법을 이용하여 시중에서 러시아산 원용으로 유통되고 있는 녹용 절편 32개를 무작위로 표본 추출하여 mt DNA를 분리하고 염기서열을 분석하여 러시아산 원용의 염기서열과 상동성 여부를 분석한 결과 이 가운데 20개(62.5%) 시료는 러시아산 원용(*Cervus elaphus sibericus*)과 99~100% 일치하였으나 나머지 8개(25.0%) 시료는 중국산 마록(*Cervus elaphus bactrianus*)의 염기서열과 99% 일치했고 기타 엘크아종(*Cervus elaphus nelsoni*) 및 순록아종(*Rangifer tarandus groenlandicus*)의 염기서열과 상동성을 갖는 녹용 시료도 각각 2개 및 1개씩 검출되었다. 그리고 1개 녹용시료는 어느 사슴 종과도 97%의 낮은 상동성을 보여 정확한 녹용종 판정이 불가능하였다.

고 찰

우리나라에서 사슴 생산물의 이용은 주로 녹용에 편중되어 있는데 최근 경제성장과 더불어 사슴의 녹용 소비량은 매년 꾸준한 증가추세에 있고 수입량 또한 증가하고 있으나 유통과정에서 저가의 녹용을 값비싼 러시아산 원용으로 둔갑시켜 판매하거나 질환을 유발시키는 이유로 수입금지 처분된 캐나다산 녹용을 중국을 통해 반입하는 불법유통이 사회적으로 문제시 되고 있다. 더구나 지금까지의 녹용의 종 및 원산지 판별은 단지 형태학적 특징이나 관능검사 수준에 머물러 정확한 녹용의 종 및 원산지 판별이 어렵고 판정결과에 대한 재현성과 신뢰성이 현저히 떨어져 녹용의 과학적인 종 감별 기술이 시급히 요구되고 있다. 최근에 첨단 분자생물학적 기술의 발달 보급으로 DNA 분자수준에서 염기서열 차이에 따른 동물 종 판별은 물론 동종 내 아종 판별도 가능하게 되어 지금까지 보고된 축종 및 육종 판별 기술가운데 가장 신속 정확하며 신뢰성이 높은 동물 종 감별기법이라 할 수 있다(Aida et al., 2005).

미토콘드리아의 DNA는 염기치환율이 genomic DNA 보다 약 5~10배 빨라 종간 및 동종내 염기치환에 의한 많은 돌연변이를 보유하고 있어(Brown et al., 1982), mt DNA의 염기서열 정보는 동물의 기원, 진화과정, 집단의 유전적 변이성, 종 및 품종간 유전적 근연관계 및 계통분화 연구 등에 신뢰할 만한 유용한 정보를 제공해 준다(Nagata et al., 1998; Chung et al., 2002). 특히, mt DNA의 유전자 영역 가운데 D-loop는 가장 변이성이 높은 염기서열 영역으로 염기치환율은 다른 염기서열 영역에 비해 약 5배 정도 높은 것으로 추정되고 있다(Aquadro and Greenberg, 1983). 본 연구에서도 사슴 녹용 mt DNA의 종간 염기서열 다양성도 D-loop 유전자 영역이 cytochrome b 유전자에 비해 높은 것으로 나타났다. mt DNA의 염기서열 비

교에서 1% 이상의 차이가 존재하면 유전적 차이를 인정하여 종간 구별에 의미가 있다고 판단할 때 cytochrome b 유전자의 경우 러시아산 원용과 북미산 대륙간의 염기서열이 100% 일치하여 이 두 종간의 구별이 불가능하였으나 다른 녹용 종(국산 화용, 중국산 마록 및 순록)과는 높은 염기서열 차이로 종간 구별이 가능하였다. 그러나 D-loop 유전자 영역의 염기서열 상동성 분석에서는 러시아산 원용과 북미산 대륙간에 약 1.9%의 염기서열 차이가 존재하여 이들 녹용의 종간 판별 가능성을 시사해 주고 있고, 나아가 다른 사슴 종 녹용과도 cytochrome b 유전자 염기서열(3.7~10.7%)에 비해 더 높은 염기서열 차이(5.0~12.2%)를 보여 D-loop 유전자 영역이 염기서열 분석에 의한 사슴 녹용의 종간 판별에 보다 효과적인 것으로 분석되었다. 이러한 mt DNA 유전자 영역의 염기서열 정보 분석으로 사슴 녹용의 종 및 아종 간 구별이 가능하고 원산지도 어느 정도 추정할 수 있으나 녹용의 정확한 원산지 판정을 위해서는 보다 다양한 사슴의 종과 아종 그리고 더 많은 시료를 대상으로 한 비교 연구가 추진되어야 할 필요가 있다. Matsunaga 등(1998)은 일본에서 다른 사슴육에 비해 높은 가격으로 판매되고 있는 일본 꽃사슴(sika deer, *Cervus nippon*) 고기의 육종 감별을 위해 붉은 사슴(red deer, *Cervus elaphus*)의 cytochrome b 유전자 염기서열을 분석한 결과 꽃사슴과 94.1%의 유사성을 보여 이들 두 사슴고기 간의 육종 판별이 가능하다고 발표했으며 타 축종인 소, 돼지, 면양 및 산양과는 각각 84.0, 81.1, 85.5 및 85.6%의 유사성을 나타냈다고 보고한 바 있다. 또한, Irwin 등(1991)의 연구에 의하면 붉은 사슴 품종의 cytochrome b 유전자 염기서열은 fallow 사슴(*Dama dama*)과 86.3% 그리고 검은 꼬리사슴(black tailed deer, *Odocoileus hemionus*)과 86.5%의 유사성을 갖는다는 결과를 제시하였다.

동물 종의 확실한 동정을 위해 특정 유전자의 PCR 증폭산물의 전체 염기배열을 결정할 필요가 있다. 그러나 염기서열의 분석은 짧은 시간 내에 결과를 얻기가 곤란하고 비용이 많이 소요되기 때문에 다수의 검체를 대상으로 검사할 경우 PCR-RFLP 기법을 이용하는 것이 보다 실용적이고 경제적인 분석방법이라고 할 수 있다. 본 연구에서 녹용 cytochrome b 유전자의 염기서열 비교분석에서 특정 염기서열 부위를 인식하여 DNA를 절단할 수 있는 *NlaIV*와 *TaqI* 두 종류의 제한효소를 발견하고 이들 제한효소를 각각 이용한 PCR-RFLP 기법을 통해 순록에 특이적으로 발견되는 DNA profile을 검출하였고 녹용과 순록 빨 간의 판별을 위한 DNA 표지인자로 이용할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, *TaqI* 제한효소를 이용한 RFLP 표지인자는 러시아산 원용을 순록 빨은 물론 나아가 중국산 깔깔이 및 국산 화용의 녹용으로부터 식별이 가능함을 시사하였다. 결론적으로 국내에서 유통되는 녹용의 mt DNA내 cytochrome b 유전자 및 D-loop 유전자 영역의 특정 염기

서열의 중간 변이성 비교 분석으로 녹용의 종 감별이 가능하였고, 또한 cytochrome b 유전자의 종 특이적 PCR-RFLP 분자표지 검출을 통해 녹용과 순록 뿔을 보다 간편하게 판별할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 사슴 mt DNA 염기서열 변이를 이용한 녹용의 종 감별 기술은 고가의 한약 재료인 녹용의 과학적인 종 감별 및 원산지 추정을 통한 녹용의 둔갑판매 및 불법유통을 방지할 수 있는 판별기술로 활용 가능할 것으로 사료된다.

요 약

우리나라는 전 세계 녹용의 약 80% 이상을 소비하고 있는 양록 대국이나 최근 국내 녹용시장에서의 녹용 둔갑판매 및 불법유통 현상이 문제점으로 대두되고 있다. 따라서 본 연구는 녹용의 종 감별 기술을 개발하고자 현재 국내에서 유통되고 있는 러시아산 원용, 북미산 대륙, 국산 화용, 중국산 깔깔이 및 알래스카산 순록 등 5종의 대표적인 녹용들을 대상으로 중간 염기서열 변이성이 매우 높은 유전자로 알려져 있는 mt DNA내 cytochrome b 및 D-loop 유전자 영역의 염기서열 분석 및 중간 변이성 비교 분석을 수행하였다. 각 녹용시료에서 mt DNA를 분리하고 cytochrome b와 D-loop 유전자의 특정 영역을 포함하는 primer를 설계 합성하고 PCR로 증폭한 후 DNA 증폭산물의 염기서열을 분석하여 중간 유전정보의 동일성 여부를 비교한 결과 녹용 종간에 명확한 차이를 보이는 염기서열 부위가 검출되었고 이러한 중간 염기배열 차이에 근거하여 녹용의 종 감별이 가능하였다. 또한, mt DNA cytochrome b 유전자에서 중간 특이적 염기서열을 인지하는 두 종류의 제한효소(*NlaIV* 및 *TaqI*)를 이용한 PCR-RFLP 기법으로 녹용으로 인정되지 않는 순록의 종 특이적 RFLP 분자표지를 검출하였고 이를 이용하여 녹용과 순록 간의 종 판별이 가능하였다. 한편, D-loop 유전자의 특정 영역 염기서열 분석기법을 이용하여 시중에서 러시아산 원용으로 유통되고 있는 녹용 절편 32개를 무작위 표본 추출하여 녹용의 종 감별을 조사한 결과 러시아산 원용으로 인정되는 것은 62.5%에 불과하였고 나머지는 중국산 마록(25.0%)과 엘크 및 순록의 아종으로 추정되는 시료도 일부 검출되었다. 따라서 본 연구를 통해 사슴 녹용 mt DNA 유전자의 염기서열 유전정보 변이 차이를 이용한 염기서열 분석법과 특정 제한효소(*NlaIV* 및 *TaqI*)를 이용한 PCR-RFLP 기법은 녹용의 과학적인 종 감별과 이를 바탕으로 녹용 원산지의 추정도 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2007년도 상지대학교 교내 연구비 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Aida, A. A., Che Man, Y. B., Wong, C. M. V. L., Raha, A. R., and Son, R. (2005) Analysis of raw meats and fats of pig using polymerase chain reaction for halal authentication. *Meat Sci.* **69**, 47-52.
2. Arslan, A., Irfan Ilhak, O., and Calicioglu, M. (2006) Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. *Meat Sci.* **72**, 326-330.
3. Aquadro, F. and Greenberg, B. D. (1983) Human mitochondrial DNA variation and evolution analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics* **103**, 287-312.
4. Branicki, W., Kupiec, T., and Pawlowski, R. (2003) Validation of cytochrome b sequence analysis as method of species identification. *J. Forensic Sci.* **48**, 83-87.
5. Brown, G. G. and Simpson, M. V. (1982) Novel features of animal mt DNA evolution as shown by sequences of two rat cytochrome oxidase subunit genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**, 3246-3250.
6. Brown, W. M., Gorge, M. Jr., and Wilson, A. C. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 1967-1971.
7. Chung, E. R., Kim, W. T., Kim, Y. S., Lee, J. K., and Han, S. K. (2002) Sequence and genetic variation of mitochondrial DNA D-loop region in Korean cattle. *Korean J. Anim. Sci.* **44**, 181-190.
8. Irwin, D. M., Kocher, T. D., and Wilson, A. C. (1991) Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.* **32**, 128-144.
9. Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Nakai, H., Shibata, K., Yamada, J., and Shinmura, Y. (1998) Determination of mitochondrial cytochrome b gene sequence for red deer (*Cervus elaphus*) and the differentiation of closely related deer meats. *Meat Sci.* **4**, 379-385
10. Nagata, J., Masuda, R., Kaji, K., Kaneko, M., and Yoshida, M.C. (1998) Genetic variation and population structure of the Japanese sika deer (*Cervus nippon*) in Hokkaido Island, based on mitochondrial D-loop sequences. *Mol. Ecol.* **7**, 871-877.
11. Partis, L., Croan, D., Guo, Z., Clark, R., Coldham, T., and Murby, J. (2000) Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Sci.* **54**, 369-376.
12. Rastogi, G., Dharne, M. S., Walujkar, S., Kumar, A., Patole, M. S., and Shouche, Y. S. (2007) Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. *Meat Sci.* **76**, 666-674.
13. 대한약전 (2005) 생약규격집. 제8개정판.
14. 한국의약품수출입협회(2005) 2005년도 원산지별 약재용 녹용의 수입 현황. 관세청

(2008. 3. 4 접수/2008. 6. 17 수정1/2008. 7. 24 수정2/
2008. 7. 24 채택)