

Discrimination of velvet antlers' origin using DNA polymorphisms

Hwan-Suck Chung¹, HyeJeong Lee¹, YoungEun Kim², Min-Kyu Shin¹, Moo-Chang Hong¹, Yangseok Kim¹, Hyunsu Bae^{1,*}

¹Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University; ²Purimed R&D Institute, Kyung-Hee University

ABSTRACT

Velvet antlers from *Cervus elaphus* species are one of most famous, expensive and commonly used medicinal materials in traditional oriental medicine. Some distributor had illegal practice of disguising the origin of antlers in Korea market. Therefore, a test to distinguish antler essential to ensure the healthy development of the herbal industry. In this study, the variation in DNA sequences of the mitochondrial ATPase8 and cytochrome-coxidase1 (COI) genes of *Cervus elaphus* from China, the Republic of Altai, and Canada were evaluated. In addition, the sequence variation among, Rein deer and *Cervus elaphus* species was also evaluated. Although these quences of deer from the Republic of Altai and Canada were very similar, polymorphisms that were conserved in each species were observed in the ATPase8 and COI genes. Therefore, these polymorphic markers could be used to distinguish *Cervus elaphus* antlers from different locations.

Key words : *Cervus elaphus*, Velvet antlers, DNA polymorphism

Introduction

녹용은 사슴의 뿔 중 각질화 되지 않은 부드럽고 성장이 빠른 조직을 말한다. 녹용은 한약에서 다양한 질환에 사용되었고 수십 년 전부터 상업적인 목적을 위해 사육되고 있다. 녹용은 정기의 보충, 보혈, 보신 및 관절염 치료 등에 오래 전부터 사용되어 왔다. 성분으로는 keratin이 풍부하며 proteome 분석을 통해

세포 성장, 단백질 신호 전달에 관여하는 성분이 있음이 보고되었다[1]. 최근 녹용의 약리학적 연구를 통하여 항염증 효과, 항 스트레스 효과, 항 노화 효과 등이 밝혀졌다[2].

전 세계에서 생산되는 녹용의 80%가 국내에서 소비될 정도로 한국은 녹용의 최대 소비국이며 대부분의 녹용은 중국, 뉴질랜드, 캐나다, 러시아에서 수입되었었다. 하지만 캐나다산 녹용은 1996년 광록병(chronic wasting disease :CWD) 이 발생한 이후로 더 이상 국내에 수입이 금지되었지만 캐나다산 녹용

* Correspondence: Hyunsu Bae, Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University. Tel: +82-2-961-9316; E-mail:

이 밀수되어 국내에 유통된다는 MBC PD 수첩의 내용은 국민들에게 커다란 충격을 주었다. 특히 각 산지에 따라 성분이나 효능에 대한 어떤 연구도 없음에도 불구하고 한국 소비자들은 러시아산 녹용이 가장 효능이 좋다는 믿음이 있으며 가장 고가에 거래되고 있다.

대부분의 한약은 형태나 조직학적인 관능검사를 통하여 원산지를 판별하게 된다. 하지만 러시아, 뉴질랜드, 중국, 캐나다산 녹용은 형태적으로 매우 유사할 뿐 아니라 대부분 절단된 상태로 유통되므로 관능검사로 판단하기에는 매우 어려운 현실이다.

Mitochondrial DNA (mtDNA)는 동물의 계통 연구에 많이 사용되어 왔으며 nuclear DNA보다 빠르게 변화하므로 매우 유사한 종 사이에서도 유전적인 차이를 보일 수 있다 [3]. cytochrome-c oxidase I (COI) 유전자는 모든 동물에 있으며 유전자의 삽입이나 결손이 별로 없기 때문에 종간에 염기 서열을 분석하는데 간편한 부위 중에 하나이다. 또한 COI 유전자는 같은 종에서도 차이를 보이는 부분이 있으며 일례로 98%이상의 종에서 약 2% 이상의 유전적 차이를 보인다고 한다[4]. 이런 이유로 COI 유전자는 DNA barcode [5]로 이용되고 있으며 조류[6], 균[7] 및 열대 나방의 종을 판별하는데 연구되어 왔다 [8].

Wada 와 Yokohama (Wada and Yokohama., 2004)는 Yeso 꽃사슴에서 mitochondrial DNA의 염기 서열을 연구한 결과 ATPase8 부위에서 가장 많은 유전적 차이가 있음을 보고하였다. 본 연구에서는 COI 와 ATPase8의 염기서열을 분석하여 녹용의 산지별 특정 보존 부위를 확인할 수 있었다.

Materials and Methods

1. 녹용 Sample 선별 및 DNA 추출

퓨리메드(주)와 예손통상에서 샘플을 얻었으며 캐나다산 엘크의 일부는 국내 사슴 농장에서 샘플을 얻었다. Genomic DNA는 0.05 g의 녹용을 Precellys 24 bead-based homogenizer (Stretton Scientific,

Stretton, UK)로 미세한 가루로 파쇄한 후 i-genomic CTB DNA extraction mini kit (iNtRON Biotechnology, Inc. Seongnam, Korea)를 이용하여 추출하였다. DNA는 50-100 μ L의 멸균 정제수로 녹인 후 NanoDrop (NP-1000) Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc, Wilmington, DE)로 농도를 측정하였다.

2. 각 부위의 PCR 증폭

COI 과ATPase8 primer는 Wada와 Yokohama가 사용한 primer를 일부 변형하여 사용하였으며 sequences는 아래와 같다 (Wada and Yokohama., 2004):

ATP8-S: GGA CGC AAT TCC AGG CCG CCT
ATP8-AS: TGCTCACAGGGGAATGGCTATG
COI-S: TTCAATCTACTTCTCCCGCCGC
COI-AS: AGGATAATAGCCGGTAGGATTG

3. PCR 산물의 정제와 sequencing

PCR로 증폭된 유전자는 1.5% low melting agarose gel (Duchefa biochemie B.V. Haarlem, Nederland)로 분리하였으며 Mega quick spinTM PCR & agarose gel extraction kit (iNtRON Biotechnology, Inc. Seongnam, Korea)로 유전자를 추출하였다. 분리된 PCR산물은 코스모진택(주)에 의뢰해 ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA)로 염기 서열을 분석하였다.

4. 결과 분석

Sequence data는 이전에 보고된 적록의 sequence (GeneBank accession number: AB245427)와 비교하였다. sequence는 BioEdit version 5.0.9 [BioEdit (URL: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>)] 프로그램을 이용해 정렬하였으며 phylogenetic tree는 Clustal X (v 1.81) 프로그램을 이용해 neighbor-joining[9]방법으로 분석하였다.

Results and Discussion

러시아산, 중국산, 캐나다산 녹용에서 최소 4개 이상의 샘플을 취해 PCR 증폭 후에 염기서열을 분석하였다. 또한 꽃사슴과 순록의 뿔도 같은 방법으로 분석하였다. 그림 1에서 보는 바와 같이 기존에 알려진 염기서열 *Cervus elaphus* (AB245427)과 비교해 정렬하였다. 캐나다산과 러시아산의 전체적인 염기서열은 매우 유사하였지만 reference sequence (AB245427)

의 8187 번의 염기서열에서 캐나다산만 C nucleotide를 보인 반면 나머지는 T nucleotide를 보였다. 이러한 polymorphism이 개체에서 유지되는지를 확인하기 위하여 러시아산 녹용 53개를 분석한 결과 모든 러시아산 녹용에서 특징적으로 보존되는 부분임을 확인하였다(그림 2). 또한 중국산 녹용에서는 reference sequence의 7885번과 7915번에서 특징적인 염기를 확인하였다.

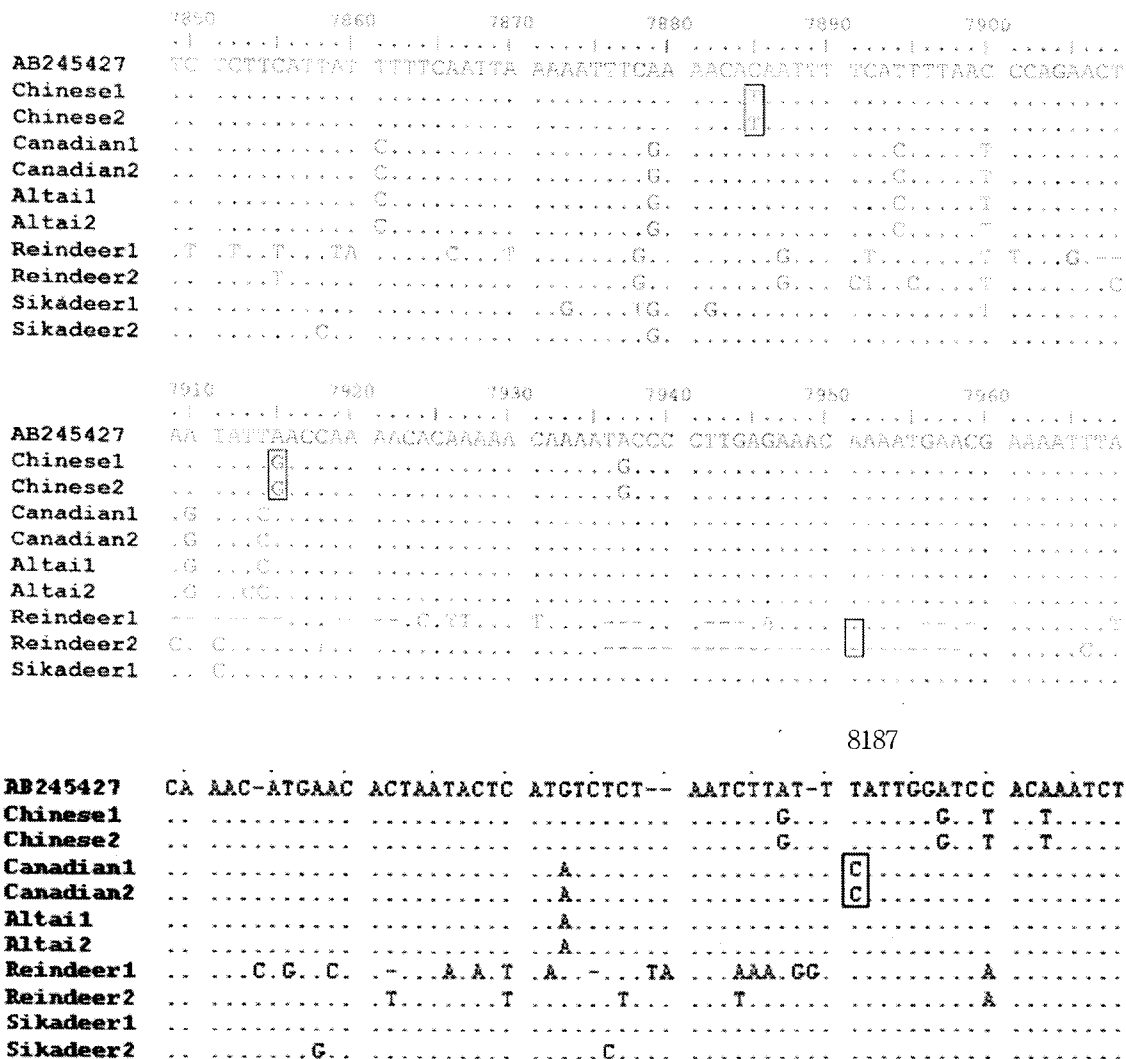


Fig. 1. ATPase8 부위에서 각 녹용의 염기서열 분석.

대쉬 기호(--)는 염기서열이 삽입되거나 삭제된 부분을 표시하고 점은 AB245427와 같은 염기서열일 경우 표시. 박스로 각 산지별 녹용을 구분할 수 있는 마커 표시

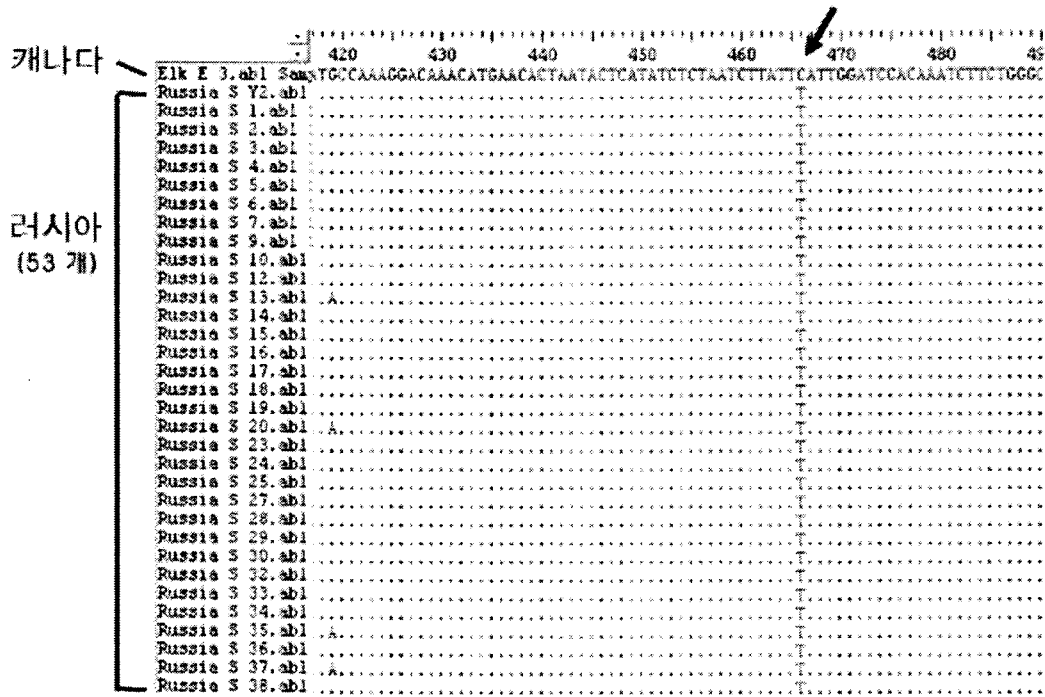


Fig. 2. ATPase8 부위에서 러시아산 녹용의 특징적인 마커(화살표).
53개의 러시아산 샘플 모두를 정렬하였으며 이 중 한 화면에서 보여줄 수 있는 부분을 캡처한 것임.

		5406	5421	5433	5442		
AB245427	5401	CTGTATCTAT	TATTTGGTGC	CTGAGCAGCC	ATAGTAGGGA	CAGCCTTAGA	CCTACTGATT
Chinese1	52	C		G	A		AG
Chinese2	52	C		G	A		AG
NewZealand1	52				A		AG
NewZealand2	52						AG
Canadian1	52				A		AG
Canadian2	52				A		AG
Altai 1	52				A		AG
Altai 2	52	T			A		AG
Sikadeer1	52		C		A		AG
Sikadeer2	52		C		A	T	AG
Reindeer1	48	T	T	T	A	T	C
Reindeer2	52	T	T	T	A	T	C
AB245427	5461	CGTGCCGAAC	TGGCCCAACC	TGCTACTCTA	CTTGGAGATG	ACCAAAATTTA	TAATGTTATC
Chinese1	112	C					C
Chinese2	112	C					C
NewZealand1	112			G	C		
NewZealand2	112						
Canadian1	112			G	C		
Canadian2	112			G	C		
Altai 1	112			G	C		
Altai 2	112			G	C		
Sikadeer1	112		C	G			
Sikadeer2	112			G			
Reindeer1	108	T		G	C	C	T
Reindeer2	112	T		G	C	C	T

Fig. 3. COI 부위에서 각 녹용의 염기 서열 분석.
대쉬 기호(--)는 염기서열이 삽입되거나 삭제된 부분을 표시하고 점은 AB245427와 같은 염기서열일 경우 표시. 박스로 각 산지별 녹용을 구분할 수 있는 마커 표시



Fig. 4. ATPase8과 COI 부분 염기 서열 분석을 통한 녹용의 산지 판별 예. 산지별 녹용의 마커를 조합함으로써 녹용의 산지를 판별할 수 있음을 보여줌.

ATPase 8 부분 외에 COI 부분에서도 유전적다형성을 분석한 결과 중국산은 5406, 5433, 5511번 부위에서 꽃사슴은 5992번에서 순록은 5421, 5442번에서 고유한 nucleotide가 있었다(그림 3). 그림 4는 본 연구에서 얻은 각각의 구분 마커를 바탕으로 시료를 분석한 결과를 예시한 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 앞서 언급한 각 지역에 특징적인 염기 서열을 분석함으로써 녹용의 산지를 판별 할 수 있었다(그림 4).

ATPase 8 부위의 염기 서열을 바탕으로 phylogenetic tree를 만든 결과 러시아산과 캐나다는 하나의 클러스터를 형성하였다. 러시아산과 캐나다는 모두 대륙이지만 러시아산은 Cervus elaphus sibericus (Siberian wapiti) 1종이, 캐나다는 Cervus elaphus nelsoni, Cervus elaphus roosevelti, Cervus elaphus maitobensis, Cervus elaphus nannodes (North American wapiti) [10]

등이 알려져 있다. 본 결과를 바탕으로 캐나다산과 러시아산은 wapiti 종이며 중국과 뉴질랜드 종은 적록이라는 기존의 연구 결과와 유사하였다[10].

본 연구에서 궁극적인 목표는 러시아산과 캐나다산 녹용을 구별하는 기술을 개발하는 것이었다. 러시아산은 가격이 가장 비싼 반면 캐나다는 광록병 발생으로 수입이 금지되어 국내 유통이 금지되었기 때문이다. 특히 두 종 모두 같은 wapiti 계통으로 적록과 wapiti를 구분하는 기술은 기존에 있었으나 wapiti 종 안에서 러시아산과 캐나다산을 구분하는 방법은 없었기 때문이다.

1996년 캐나다의 사슴 농장에서 광록병이 발견되었으며 이후 미국의 다른 주에서도 광록병이 급속히 퍼졌다[11], [12]. 한국에서도 캐나다에서 수입한 엘크가 광록병으로 확인된 사례도 있었다. 현재까지 광록병이 인간에 감염되는지는 불명확하지만 소와 같

은 가축에 전염될 수 있다는 보고가 있기 때문에 광록병이 감염된 지역에서 녹용을 수입하거나 사용하는 것을 막는 것이 광록병의 확산을 막는데 중요하다 [13]. 본 연구를 통하여 mtDNA의 ATPase8과 COI 부위에서 녹용의 종을 판별 할 수 있음을 보고하였다. 하지만 본 결과를 확증하기 위해 더 많은 샘플을 이용한 연구가 필요할 것이다.

Acknowledgements

본 연구는 중소기업청의 지원을 받아 이루어졌음 (S1015952).

References

1. Park HJ, Lee DH, Park SG, Lee SC, Cho S, Kim HK, Kim JJ, Bae H, Park BC: **Proteome analysis of red deer antlers.** *Proteomics* 2004,4 (11):3642-3653.
2. Wang BX, Zhao XH, Qi SB, Kaneko S, Hattori M, Namba T, Nomura Y: **Effects of repeated administration of deer antler extract on biochemical changes related to aging in senescence-accelerated mice.** *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1988, 36(7):2587-2592.
3. Brown WM, George M, Jr., Wilson AC: **Rapid evolution of animal mitochondrial DNA.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979, 76(4): 1967-1971.
4. Hebert PD, Ratnasingham S, deWaard JR: **Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species.** *Proc Biol Sci* 2003, 270Suppl1:S96-99.
5. Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR: **Biological identifications through DNA barcodes.** *Proc Biol Sci* 2003, 270(1512): 313-321.
6. Hebert PD, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM: **Identification of Birds through DNA Barcodes.** *PLoS Biol* 2004,2(10):e312.
7. Seifert KA, Samson RA, Dewaard JR, Houbraken J, Levesque CA, Moncalvo JM, Louis-Seize G, Hebert PD: **Prospects for fungus identification using CO1DNA barcodes, with Penicillium as a test case.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007,104 (10):3901-3906.
8. Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PD: **DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103(4): 968-971.
9. Saitou N, Nei M: **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.** *Mol Biol Evol* 1987,4(4): 406-425.
10. Polzehl RO, Strobeck C: **Phylogeny of wapiti, red deer, sika deer, and other North American cervids as determined from mitochondrial DNA.** *Mol Phylo genet Evol* 1998, 10(2):249-258.
11. Sohn HJ, Kim JH, Choi KS, Nah JJ, Joo YS, Jean YH, Ahn SW, Kim OK, Kim DY, Balachandran A: **A case of chronic wasting disease in an elk imported to Korea from Canada.** *J Vet Med Sci* 2002, 64(9):855-858.
12. Watts JC, Balachandran A, Westaway D: **The expanding universe of prion diseases.** *PLoS Pathog* 2006,2(3):e26.
13. Hamir AN, Kunkle RA, Cutlip RC, Miller JM, O'Rourke KI, Williams ES, Miller MW, Stack MJ, Chaplin MJ, Richt JA: **Experimental transmission of chronic wasting disease agent from mule deer to cattle by the intracerebral route.** *J Vet Diagn Invest* 2005, 17(3):276-281.