

Molecular Identification of Deer Antlers using Nucleotide Sequences of Mitochondrial Displacement Loop Region

Hyun Sook Yoo, Gi Nam Lee and Jin-Sung Lee^{1*}*Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang Univ., 344-2, Shinyong-dong, Iksan-city, Cheonbuk, 570-749, Korea*¹*Department of Genetic Engineering, SungKyunkwan Univ., 300, Cheoncheon-dong, Jangan-gu, Suwon, Kyunggi-do, 440-746, Korea*

Received October 4, 2010 / Accepted November 3, 2010

It is reported that about 80% of deer antlers (*Cervi Pantotricuhum Cornu*) produced in the world are consumed in Korea. Fraudulent replacement or mislabeling of costly deer antlers with cheaper ones, however, is one of the most common problems in the Korean deer antler market. Therefore, there is a continuous need for the development of genetic markers to discriminate between genuine and fraudulent deer antlers. This study was performed to develop a method for the identification and authentication of deer antlers using nucleotide sequence analysis against displacement loop of mitochondrial genome among four deer antlers, *Cervus elaphus sibericus*, *Cervus elaphus bactrianus*, *Cervus elaphus canadensis*, and *Cervus elaphus*, originated from Russia, China, North America and New Zealand, respectively. As a result, multiple-alignment of mitochondrial displacement (D) loop region in 1.2 kb showed that, among the four deer antlers, a deleted sequence of about 70 bps was only found in *Cervus elaphus bactrianus* from China. Finally, *Cervus elaphus bactrianus* among nine samples of deer antlers were successfully identified by PCR using primer amplifying deleted D-loop. *Cervus elaphus bactrianus* was also confirmed from cloning the PCR products and their nucleotide sequence analyses were confirmed. However, no marker to identify *Cervus elaphus sibericus*, *Cervus elaphus canadensis* and *Cervus elaphus* were found in the nucleotide sequences of mitochondrial D-loop. Our results suggest that PCR for deleted D-loop region of mitochondrial DNA are useful for identification and authentication of deer antlers of *Cervus elaphus bactrianus* originating from China.

Key words : Deer Antler, *Cervus elaphus*, mitochondrial DNA, displacement loop region, PCR

서 론

우리나라에서 녹용은 인삼과 함께 으뜸으로 취급하는 한약재이다[19]. 녹용은 사슴(*Cervus elaphus*)뿔의 한약재 명으로 수사슴의 뿔이 경화되어 각질화되기 전에 잘라서 약재로 사용하는 것을 일컫는데 이때 새로 돌아오는 뿔을 채취하여 건조한 것이 녹용이다[21]. 현재 우리나라는 세계 최대의 녹용 수입국이자 소비국으로 세계 녹용 생산량의 80% 이상을 소비하고 있다[30]. 우리나라에서 한약재로 유통되고 있는 녹용의 수입국으로는 러시아, 뉴질랜드, 중국, 캐나다로서 각각 원용(*C. elaphus sibericus*), 적록(*C. elaphus*), 깔깔이(*C. elaphus bactrianus*), 대록(*C. elaphus canadensis*) 등으로 불리는데 이 중에서도 러시아에서 수입되는 녹용은 다른 녹용에 비해 고가로 유통되기 때문에 부정 유통의 주요 표적이 되고 있다[7]. 또한, 캐나다 등 북미주에 서식하는 대록은 만성소모성질환이 발생하여 10여 년 전부터 국내 수입이 금지되고 있음에도 불구하고 중국산으로 불법 유통되는 사례가 빈번히 발생하는 등 소비자 피해가 발생되고 있다.

최근 유전자를 이용한 다양한 분석기법의 발달로 동물의 종 및 그 이하 단위의 분류 군의 구분이 가능해 지고 있다[1,4,8,9]. 특히 진핵세포의 세포질 DNA 중 하나인 미토콘드리아 DNA는 핵 DNA보다 염기치환율, 즉 돌연변이율이 빠르며 이에 따라 종내 및 종간의 변이 축적이 매우 높고 독특한 모계유전 특성을 갖고 있어 동물 종의 동정과 근연관계를 이해하는데 중요한 재료가 되고 있다[2,3,5,6].

따라서 본 연구는 미토콘드리아 DNA 상에서 변이의 축적이 가장 높은 것으로 알려진 미토콘드리아 복제기점인 displacement 영역(D-loop)의 염기서열 특성[6,9,10,11,12]을 분석함으로써 국내에서 유통되는 녹용의 원산지 구분에 대한 분자적 동정의 가능성을 탐색한 결과, 중국산 녹용의 D-loop 영역에서 원산지 특이적인 결실 영역이 존재하고 있음을 확인하여 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

녹용 시료

본 연구에 사용된 녹용은 서울의 경동시장에 위치한 녹용수입회사로부터 수입면장을 확인한 러시아산 원용(*Cervus elaphus sibericus*, 마록), 중국산 깔깔이(*Cervus elaphus bac-*

***Corresponding author**

Tel : +82-31-299-4852, Fax : +82-31-299-4853

E-mail : lejis@daum.net

trianus, 마록), 뉴질랜드산 뉴자(*Cervus elaphus*, 적록) 등 각 13개씩을 구입하여 공시재료로 사용하였다. 또한, 북미산 녹용(*Cervus elaphus canadensis*)은 실제 국내 유통이 금지되었으나 북미에서 수입되어 중국산으로 판매되는 제품을 녹용 수입 회사를 통해서 13점을 구매하여 사용하였다. 이 중에서 각 10개의 시료는 D-loop 영역의 염기서열을 위한 시료로 나머지 3개의 시료들은 원산지 동정을 위한 검정용으로 사용하였다.

Total genomic DNA의 분리, 추출

녹용 시료로부터 genomic DNA의 분리 및 정제는 Matsunaga 등[23]의 방법을 일부 변형하여 다음과 같이 실시하였다. 녹용 1 g에 3배 분량의 lysis buffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 1 mM EDTA)를 첨가한 다음, homogenizer를 사용하여 균질화시킨 후 3,000× g로 15분간 원심분리 하였다. 침전된 pellet에 lysis buffer II (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM EDTA, 10 mM NaCl, 0.5% SDS)를 3 ml 넣고 proteinase K (50 ug/ml)를 첨가한 후에 55°C의 항온기에서 1시간 동안 방치하였다. 이후 RNase (50 ug/ml)를 첨가한 다음 37°C에서 1시간 동안 처리하였다. 이들 혼합액에 6 M NaCl 1.5 ml과 chloroform 3 ml을 첨가하고 잘 혼합한 후에 12,000× g에서 15분간 원심분리 하였다. 이후 상층액을 버리고 DNA 침전물을 TE buffer (10 mM TrisHCl pH 8.0, 1 mM EDTA)에 용해하여 분광광도계를 사용하여 260 nm에서 UV 흡광도를 측정하여 분리한 녹용 DNA의 농도를 결정한 후 TE buffer (10 mM TrisHCl pH 8.0, 1 mM EDTA)를 사용하여 최종 농도가 50 ng/ul이 되도록 희석한 후 냉동 보관하였다. 또한 일부 genomic DNA 추출이 잘 되지 않는 녹용은 Genomic DNA isolation kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 분리, 추출하였다.

미토콘드리아 DNA의 D-loop 영역 PCR

녹용으로부터 미토콘드리아 DNA의 D-loop 영역의 PCR은 NCBI의 GenBank로부터 염기서열이 공개된 AY970666.1 (*Cervus elaphus canadensis*)과 AF058371.1 (*Cervus elaphus sibericus*)의 D-loop 염기서열을 alignment를 통해서 5'-TAA TATACTGGTCTTGTAACACC와 5'-GGGTCGGAAGGCTTG GGACCAACACC의 서열을 설계하여 각각 forward (DL-F)와 reverse primer (DL-R) 명명한 후 합성하였다(Bioneer, Korea). PCR을 위한 반응시약의 조성은 다음과 같이 준비하였다. 즉 최종 PCR 반응액을 20 ul로 기준으로 할 때 PCR 전용 tube에 template DNA를 약 100 ng, primer 각 0.5uM, dNTP 각 200uM, 10x PCR buffer 그리고 ampliTaQ DNA polymerase (Applied Biosystems, USA) 2 unit를 첨가하였다. Thermal cycler Dice (Takara, Japan)를 이용한 PCR 반응 조건은 94°C에서 5분간 최초 변성 후, 94°C에서 45초, 54°C에서 45초 그리고 72°C에서 70초를 1회로 하여 총 35회 반복한 다음 마지막으로 72°C에서 3분간 last extension을 수행하였다. 또한, 미토콘드

리아 D-loop 영역 중에서 결실이 일어나는 부분을 확인하기 위한 primer로서 DL-F1 (5'- AACCTTATGCGCTCGTAGTA)과 DL-R1 (5'-AGTGAAAAGTACATGCTTATA)을 설계하여 사용하였다(Bioneer, Korea). 중국산 녹용의 D-loop 영역 안의 결실 부위를 확인하기 위한 PCR 조건은 94°C에서 5분간 최초 변성 한 다음, 94°C에서 30초, 55°C에서 30초 그리고 72°C에서 30초를 1회로 하여 총 35회 반복한 후, 최종적으로 72°C에서 3분간 last extension을 수행하였다. 이때 사용한 PCR 반응시약은 Top Taq DNA polymerase premix kit (Bioneer, Korea)를 사용하였다.

D-loop 영역의 클로닝

D-loop 영역의 결실부위를 확인하기 위해서 DL-F1과 DL-R1 primer를 통해서 확보된 PCR 산물은 PCR purification kit (CoreBio System, Korea)로 정제한 후, pGEM T vector system (Promega, USA)를 사용하여 16°C에서 12시간 동안 ligation을 수행하였다. HitTM-DH5a competent cell (RBC, Taiwan)을 제조사가 권장하는 방법에 따라서 형질전환 한 다음 LB agar (X-gal, 40 ug/ml; IPTG, 4 mg/ml; ampicillin, 100 ug/ml)에 100ul 도말하고 37°C 항온기에서 16시간 동안 배양하여 흰색의 집락을 선별하였다. 이후 이 집락을 LB broth (ampicillin, 100 ug/ml)에 접종시켜 16시간 동안 진탕 배양 한 후 Plasmid DNA miniprep kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 분리, 정제하여 염기서열 해석을 위한 주형 DNA로 사용하였다.

PCR 산물과 Plasmid DNA의 염기서열 결정

녹용의 미토콘드리아 D-loop 영역 및 D-loop 영역의 결실 부위는 PCR purification kit (Qiagen, Germany)을 이용하여 PCR 증폭산물을 정제한 다음, ABI PRISM 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems, USA)를 사용한 direct sequencing에 의한 염기서열 분석(Bionics, Korea)을 통해서 확인하였다. 이때 D-loop 영역의 염기서열 결정을 위한 sequencing primer로는 DL-F와 DL-R primer를, D-loop 영역 내 삽입 및 결실 부위에 대한 염기서열 결정을 위한 sequencing primer로는 pGemT vector의 M13 universal forward 및 reverse primer를 이용하여 양방향으로 염기서열을 결정하였다.

염기서열 상동성 및 multiple alignment 분석

녹용 미토콘드리아 D-loop 영역에 대한 염기서열 상동성 분석은 NCBI의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 프로그램을 이용하였으며 녹용의 원산지 특이적인 염기서열을 분석하기 위한 multiple alignment 분석은 EMBL-EBI의 ClustalW2 프로그램을 사용하였다.

결 과

녹용은 매년 수요가 증가하는 고가의 한약재로 간주되고

있다. 하지만 국내 수요량의 많은 부분을 수입 녹용에 의존하는 실정이다. 이러한 상황에서 저가의 녹용이 고가로 둔갑 판매되거나 10 여 전부터 수입이 금지된 북미 산 녹용이 유통되는 문제는 과학적인 녹용의 감별 기술 개발을 요구하고 있다.

본 연구는 변이 축적율이 가장 높아 종간의 분류 지표로 주로 사용되고 있는 미토콘드리아 D-loop 영역의 염기서열 분석을 통해서 원산지 특이적인 녹용의 염기서열을 탐색하고자 수행하였다[16-19]. NCBI의 GenBank에서 북미산 사슴 (AY970666.1, *Cervus elaphus Canadensis*) 과 러시아산 사슴 (AF058371.1, *Cervus elaphus sibericus*)의 미토콘드리아 DNA의 D-loop 영역을 선정하고 이들의 염기서열 비교를 통해서 이들 영역을 증폭하기 위한 PCR용 primer를 합성하여 약 1,100~1,200 bp로 예상되는 크기의 PCR 산물을 얻었다(Fig. 1). 아가로스 겔 전기영동을 통해서 증폭이 확인된 PCR 산물은 direct 염기서열 결정법을 통해서 염기서열을 확보한 후 BLAST 상동성 분석을 수행하였다. BLAST 상동성 분석 결과 (Table 1)를 보면 각 10개의 러시아산, 북미산, 뉴질랜드산 녹용의 미토콘드리아 D-loop의 염기서열은 *C. elaphus canadensis*와 가장 높은 염기서열 상동성을 보여주었다. 전체적으로 녹용 미토콘드리아 DNA의 D-loop 영역에 대한 BLAST 상동성은 97%~99% 정도로 본 연구에서 해석한 염기서열이 D-loop 영역임을 알 수 있었다. 하지만 BLAST 상동성 결과에서 보면 러시아산, 북미산 및 뉴질랜드산 녹용이 *C. elaphus canadensis*에서 유래하는 미토콘드리아 D-loop 유전자와 가장 유사하게 나타났다. 일반적으로 *C. elaphus canadensis*는 북미를 서식처로 하는 녹용 사슴으로 분류되는데 반해서 BLAST 분석에서는 다른 녹용 사슴과 높은 상동성을 보이는 일부의 결과로 볼 때 미토콘드리아 DNA를 이용한 BLAST 상동성 분석은 녹용의 원산지 판별에 유용하지 않음을 알 수 있었다. 또한, 중국산 녹용의 경우는 러시아산, 북미산, 뉴질랜드산의 경우보다 낮은 94~95%의 상동성 결과를 나타냈으며 구체적으로 보면 중국산 10개 시료 중에서 3개의 시료(C02, C03, C07)는 *Cervus elaphus macneilli*와, 나머지 7개의 시료(C01, C04, C05, C06, C08, C09, C10)는 *Cervus elaphus red deer*의 D-loop 유전자와 가장 높은 상동성을 보여주었다. 따라서 중국산의 경우도 BLAST 분석을 통해서 정확한 원산지 확인이 어려운 것으로 분석되었다. 결국, 이러한 BLAST 상동성 분석 방법은 미토콘드리아의 D-loop 영역의 염기서열 유사성을 통해서 해당하는 유전자가 녹용사슴으로부터 유래한 것을 확인하는 데에는 유용할 수는 있지만 녹용 사슴의 원산지를 확인 또는 동정하는 데에는 유용한 방법이 아님을 알 수 있었다.

한편, Fig. 1에서 보는 것과 같이 중국산 녹용의 PCR 산물이 러시아산, 북미산, 뉴질랜드산의 것보다 크기가 작게 검출되어 중국산 녹용의 D-loop 영역 내에 결실 부분의 존재를 예상할 수 있었다. 이러한 D-loop 영역의 결실 부위는 DNA 염기서

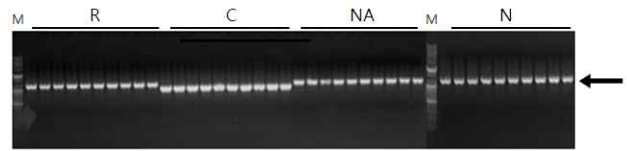


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of D-loop region amplified using DL-F and DL-R primers from antlers exported from Russia (R), China (C), North America (NA), and New Zealand (N), respectively. M indicates a 100 bp ladder as DNA size marker. The arrow indicates target amplicon (about 1.2 kb) of mitochondrial D-loop region of deer antler.

열 결정 후 ClustalW2 프로그램을 이용한 multiple alignment를 통해서 확인할 수 있었다(Fig. 2). Fig. 2는 원산지 별로 각 10개의 녹용 시료, 즉 40 개의 미토콘드리아 D-loop 영역의 multiple alignment 결과 중에서 D-loop의 결실 부위를 포함하는 일부분을 나타낸 것으로 중국산 녹용의 D-loop 영역에 약 60~70 bp의 결실이 있음을 확인할 수 있었다.

녹용의 유연관계에 분석을 통해서 중국산 녹용의 D-loop 영역의 결실부위가 중국산 녹용을 하나의 그룹으로 묶여주는 특성이 되는지를 확인해 보고자 neighbor joining 방법을 통한 phylogenetic tree 분석을 수행하였다. 그 결과 10개의 중국산 녹용은 하나로 그룹화 됨을 볼 수 있는 반면에 러시아산, 북미산 및 뉴질랜드산 녹용들은 수입 국가별 분류와는 다르게 혼재되어 분지되어 그룹화되어 있었다. 이러한 결과로부터 녹용의 D-loop 영역 내 결실 부분은 중국산 녹용을 동정하기 위한 유용한 분자마커가 될 수 있을 것으로 생각된다(Fig. 3). 하지만 미토콘드리아 D-loop 영역의 multiple alignment 분석에서는 러시아산, 뉴질랜드산, 북미산 녹용을 특정하는 원산지 특이적인 염기서열 또는 Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs)을 보이는 단일 염기변이성 마커 등을 확인할 수 없었다. 한편, D-loop 영역의 결실 특성을 이용하여 중국산 녹용의 분자 동정이 가능한 지를 검증해 보고자 D-loop 영역의 결실을 확인할 수 있는 DL-F1과 DL-R1 primer를 선정하여 각 3개의 러시아산, 중국산, 뉴질랜드산 녹용 시료를 대상으로 PCR 검증을 실시하였다. 결과적으로 Fig. 3에서처럼 중국산 녹용의 PCR 산물이 러시아산, 북미산 및 뉴질랜드산에서 보다 약 60~70 bp 작은 크기로 나타나 PCR법을 통한 중국산 녹용의 원산지 추정이 가능함을 확인할 수 있었고 최종적으로 중국산 녹용에 존재하는 결실 부위의 해석은 이들 9개의 PCR 산물을 pGem T vector에 클로닝 한 후 염기서열 분석을 통해서 확인할 수 있었다(Fig. 5).

고 찰

녹용(Cornu Cervi Pantotrichum, deer antler)은 우리나라에서 가장 많이 소비되는 동물성 생약으로써 신농본초경에서

Table 1. BLASTN results of 16 rDNA sequences from reference strains used in this study

Sample name*	Best matched subject	Nucleotide maximum identity(%)
C01	<i>Cervus elaphus</i> macneilli D-loop	1073/1131 (95%)
C02	<i>Cervus elaphus</i> D-loop	1072/1130 (95%)
C03	<i>Cervus elaphus</i> D-loop	1070/1134 (95%)
C04	<i>Cervus elaphus</i> macneilli D-loop	1073/1132 (95%)
C05	<i>Cervus elaphus</i> D-loop	1069/1133 (95%)
C06	<i>Cervus elaphus</i> D-loop	1073/1131 (95%)
C07	<i>Cervus elaphus</i> macneilli D-loop	1071/1131 (95%)
C08	<i>Cervus elaphus</i> D-loop	1076/1129 (95%)
C09	<i>Cervus elaphus</i> D-loop	1077/1135 (95%)
C10	<i>Cervus elaphus</i> D-loop	1078/1136 (94%)
NA01	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1187/1203 (99%)
NA02	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1182/1200 (99%)
NA03	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1185/1199 (99%)
NA04	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1186/1199 (99%)
NA05	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1184/1208 (99%)
NA06	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1186/1207 (99%)
NA07	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1181/1208 (98%)
NA08	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1191/1213 (99%)
NA09	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1191/1213 (99%)
NA10	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1187/1212 (98%),
R01	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1180/1220 (97%)
R02	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1179/1203 (99%)
R03	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1185/1205 (99%)
R04	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1184/1206 (99%)
R05	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1185/1205 (99%)
R06	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1183/1206 (99%)
R07	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1184/1208 (99%)
R08	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1183/1207 (99%)
R09	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1182/1204 (99%)
R10	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1183/1207 (99%)
N01	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1185/1204 (98%)
N02	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1183/1205 (99%)
N03	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1185/1205 (99%)
N04	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1183/1204 (99%)
N05	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1181/1205 (99%)
N06	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1183/1204 (99%)
N07	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1183/1204 (99%)
N08	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1180/1206 (98%)
N09	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1184/1205 (99%)
N10	<i>Cervus elaphus</i> canadensis D-loop	1184/1204 (99%)

*R, C, NA, and N indicate antlers exported from Russia, China, North America, and New Zealand, respectively.

는 강장보신의 효능이 있어 여러 가지 허약증을 치료하는 대표적인 전신 강장약으로 알려져 왔다[7,15]. 최근 녹용의 생물학적 활성 검색에 의하면 조혈모세포의 생성을 촉진시켜 조혈작용과 신체활성을 증가시키고 당 대사를 개선시켜 성장 및 발육을 촉진시키는 효과가 있으며 소화기관 계통의 기능 촉진, 그리고 심혈기관을 항진시킴으로써 강심효과 및 면역증강 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[19,21]. 그러나 Lee 등의 녹용의 원산지에 따른 약효의 비교연구는 녹용이 직접적인 조혈촉진 및 회복 효과의 차이가 없다고 하는 반면에, Kim

등의 조혈과 관련한 유전자인 IL3, GM-CSF 및 TPO 등의 유전자 발현에서 녹용이 원산지별, 부위별로 약간의 차이가 있으나 CD34의 발현과 형태적 변화 관찰에서는 원산지 별로 통계적으로 유의한 효과를 얻지 못했다는 보고로 볼 때 녹용의 원산지에 따른 효능의 규명이 원산지의 감별보다 더 시급한 과제가 아닐까 생각된다.

우리나라에서 사슴 생산물의 이용은 주로 한약제인 녹용에 편중되고 있다. 최근 경제성장과 함께 녹용의 소비량은 매년 꾸준한 증가세를 보이고 있으며 수입량 또한 지속적으로 증가

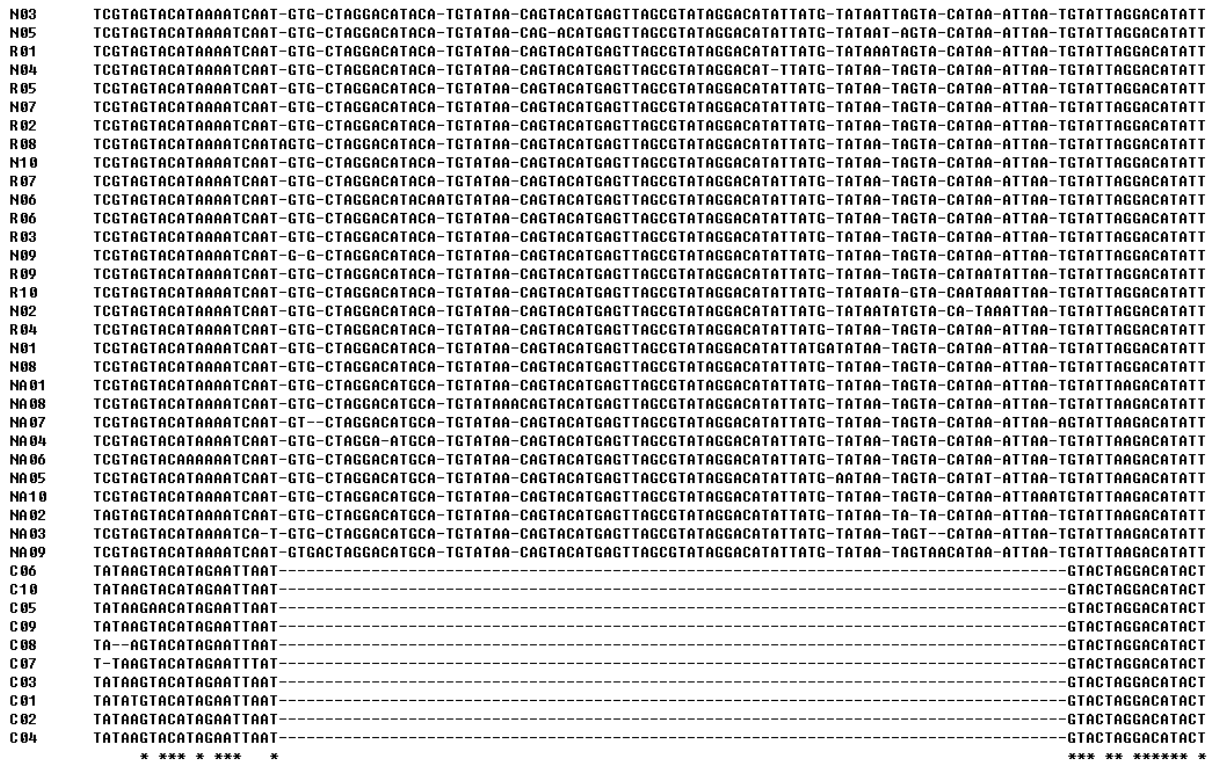


Fig. 2. Multiple-alignment of mitochondrial D-loop region of antlers exported from Russia (R), China (C), North America (NA), and New Zealand (N), respectively. Dash (-) and asterisks (*) indicate deleted sequences and perfect alignment among sequences.

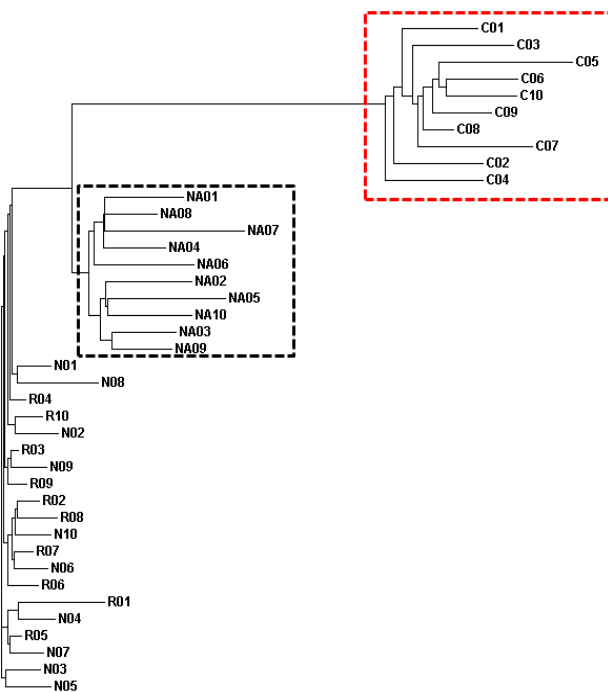


Fig. 3. Phylogenetic tree using nucleotide sequences of mitochondrial D-loop region. R, C, NA, and N indicate antlers exported from Russia, China, North America, and New Zealand, respectively.

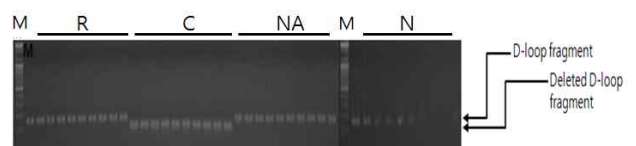


Fig. 4. PCR detection of deleted mitochondrial D-loop region of antler exported from China (C). R, NA, and N indicate antlers exported from Russia, North America, and New Zealand, respectively. Lane M is 100 bp ladder as DNA size marker.

하고 있다. 하지만 유통과정에서 저가의 녹용을 값비싼 러시아산 녹용으로 둔갑시키거나 수입이 금지된 북미산 녹용을 중국을 통해 반입하는 부정 유통 등이 사회적으로 문제시되고 있다.

지금까지의 녹용의 원산지 판별은 단지 형태적 특징이나 관능검사 수준에서 머물러 있어 정확한 녹용의 원산지 구분이 어렵고 판정에 대한 신뢰성이 현저히 떨어져 녹용의 감별 기술이 시급히 필요한 시점이다. 현재 사용되는 한약재 중에서 산삼, 옹담, 녹용 등의 고가 한약재에 대한 진위 검사법은 주로 외관 관찰에 의한 형태적 방법과 향미, 색상 등의 관능검사에 의해서 주로 의존하고 있으며[21] 그 밖에 화학적 조성을 조사하는 이화학적 방법 등이 고려되고 있지만 판별기준에 대한



Fig. 5. Multiple alignment to confirm deleted D-loop region of antler exported from China. B01~3, E01~3 and S01~3 indicate antlers exported from China, New Zealand, and Russia. The asterisk and dash (-) indicate 100% conservative nucleotides and deletion/addition sites, respectively.

절대적인 객관성이 부족하다. 따라서 최근 분자생물학적 기술을 이용한 생물의 종 판별 보고 사례를 통해서 녹용의 원산지 판별에도 이들 기술의 활발한 적용 사례가 보고되고 있다 [20,24,25,27-29].

국내에서 소비되는 국산 녹용은 매화록과 마록으로 크게 구별되어 각각 사슴과(Cervidae)에 속하는 일본사슴(*Cervus nippon terminck*), 붉은사슴(*Cervus elephus L.*) 그리고 북미산 wapiti라고 알려진 북미사슴(*Cervus canadensis*)의 어린 뿔을 잘라 건조시킨 것을 사용하고 있다. 이외에도 녹용은 생산되는 원산지에 따라서 러시아로부터 주로 수입되는 원용, 중국 동북부 지방에서 생산되는 동마록, 신장 지방의 서마록, 그리고 일반적으로 적록 또는 누자로 일컫는 뉴질랜드산과 비교적 체구와 뿔이 큰 것으로 알려진 북미산 사슴인 대록 등의 품목이 유통되고 있다.

한편, 한약재의 유통구조 개선 및 가공 산업 육성방안연구와 보건복지부 주도의 한약재 품질표준화가 추진되면서 한약재의 사용 및 한약의 객관성 확립을 위한 연구가 활발해지고 있다. 최근 서양에서도 동양의학에 대한 관심이 고조되면서 동양의학의 원리, 치료법 및 한약의 약리효과에 관한 많은 논문들이 보고되고 있으며 그 중에서도 최근 Chan은 한약의 과학화를 이루기 위한 방안으로 한약재의 품질표준화, 한약재의 독성평가와 함께 한약재의 진품판별(authentication)을 중요한 과제로 제시하고 있다[7]. 이러한 측면에서 한약재 중에서 대부분을 수입에 의존하는 녹용의 원산지 판별은 다른 어떤 한약재보다 시급하지만 이에 대한 대책은 전무한 상태이다.

대부분의 진핵 세포는 핵 안에 존재하는 핵 DNA (nuclear DNA)와 세포질안에 존재하는 미토콘드리아 및 엽록체 DNA로 구성되어 있는데 이들 유전물질은 개체간에서는 차이가 있으나 동일 개체 내에서는 부위에 상관없이 일정하다. 개체간 DNA의 변이를 확인하기 위해서 염기서열의 변이를 기초로 한 RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA), PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphisms)과 같은 PCR을 이용한 분자생물학적 방법이 주로 사용되고 있다 [16,17,22,27]. 실제로 한우와 젓소의 MC1R (melanocortin 1 receptor) 유전자의 염기서열 중에서 한 개의 염기에서의 결실 돌연변이에 기초한 한우고기 유전자 판별법은 실제로 유통현

장에서 적용되고 있다[12,26].

본 연구에서는 세포질 유전물질인 미토콘드리아 DNA를 대상으로 녹용의 원산지 동정을 수행하였다. 미토콘드리아 DNA를 대상으로 한 것은 미토콘드리아 DNA의 염기치환율이 핵 DNA보다 약 5~10배 이상 빨라 종간 및 종내 염기치환에 의한 많은 돌연변이를 보유하고 있어[3,5,6] 이들의 염기서열 정보는 동물의 기원, 진화과정, 집단의 유전적 구조 및 종간의 유전적 유연관계 및 계통분화 연구 등에 유용한 정보를 제공해 주기 때문이다[11,14,23]. 특히 미토콘드리아 DNA에 존재하는 13개의 단백질 암호화 유전자, 22개의 tRNA 유전자, 2개의 rRNA 유전자 및 DNA 복제개시 부위인 D-loop (displacement loop) 중에서 D-loop 영역은 미토콘드리아 DNA에서 유래하는 여러 유전자들보다 약 5배의 높은 염기치환율을 갖는 것으로 추정되고 있어 이 영역을 이용한 생물종의 감별과 유연관계 연구가 활발히 진행되고 있다[2,3]. 따라서 본 연구에서도 녹용 사슴의 미토콘드리아 DNA의 D-loop 영역을 대상으로 한 원산지 감별의 가능성을 타진해 보았으며, 결과적으로 미토콘드리아 DNA의 D-loop 영역의 염기서열 분석으로 중국산 녹용의 분자적 동정에 유용한 분자마커를 확인하였다. 이러한 중국산 녹용의 미토콘드리아 D-loop영역 내 결실은 본 연구에 사용된 10종의 중국산 녹용 모두에서 확인되었으며 추가로 확보한 3종의 중국산 녹용 시료에서도 결실 부분을 특이적으로 증폭할 수 있는 PCR 검출과 이 PCR 산물의 클로닝을 통한 염기서열 분석을 통해서 최종적으로 확인할 수 있었다.

본 연구를 통해서 중국산 녹용에서만 발견되는 결실 부위를 확인하기 위한 PCR 법은 수입 녹용 중에서 약 22%를 차지하는 중국산 녹용의 감별과 중국산 녹용이 러시아산 녹용으로 둔갑 판매되는 것을 방지하는 데 대단히 유용하게 사용할 수 있을 것으로 사료된다(2006년 한국의약품수출입협회). 하지만, 미토콘드리아 DNA에서 가장 염기치환율이 높다고 알려진 D-loop 영역의 염기서열 분석으로는 러시아산, 뉴질랜드산 그리고 북미산 녹용을 특정하는 원산지 특이적인 염기서열과 RFLP 부위 등을 확인 할 수 없었다. 이러한 결과는 지리적으로 떨어져 있는 녹용 사슴 간에 상당히 높은 근연 관계가 있음을 보여주는 결과가 아닌가 생각된다. 따라서 앞으로 러시아산,

북미산 및 뉴질랜드산 녹용의 원산지 감별은 D-loop 영역 이외에 ATPase 6, ATPase 8, NADH 4, NADH 6 및 Cyt b 등과 같은 미토콘드리아 유래의 다양한 유전자를 대상으로 한 보다 심도 깊은 연구 및 다양한 원산지로부터 다수의 녹용 시료를 대상으로 한 연구가 함께 진행된다면 보다 정확한 녹용의 원산지 감별이 가능하지 않을까 생각된다.

References

- Amano, T., Y. Miyakoshi, T. Tokada, T. Kikawa, and M. Suzuki. 1994. Genetic variants of ribosomal DNA and mitochondrial DNA between swamp and river buffaloes. *Anim Genet.* **25**, 29-26.
- Anderson, S., M. H. L. de Bruijn, A. R. Coulson, I. C. Eperon, F. Sanger, and I. G. Young. 1982. The complete sequence of the bovine mitochondrial DNA : conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* **156**, 683-717.
- Aquadro, F. and B. D. Greenberg. 1982. Human mitochondrial DNA variation and evolution analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics* **103**, 287-312.
- Branicki, W., T. Kupiec, and R. Pawlowski. 2003. Validation of cytochrome b sequence analysis as method of species identification. *J. Forensic Sci.* **48**, 83-87.
- Brown, W. M. 1980. Polymorphism in mitochondrial DNA of human as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 3605-3609.
- Brown, W. M., M. J. Gorge, and A. C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1967-1971.
- Chan, K. 1995. Progress in traditional Chinese medicine. *Trends Pharmacol. Sci.* **16**, 182-187.
- Christian, W., J. R. Rentsch, and P. H. Bner. 1999. PCR-RFLP Analysis of mitochondrial DNA: A reliable method for species identification. *J. Agric. Food Chem* **47**, 1350-1355.
- Chung, E. R. and K. Y. Chung. 2005. Effect of RFLP marker of the mitochondrial DNA D-loop region on milk production in Korean cattle. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **25**, 218-225.
- Cook, C. E., Y. Wang, and G. Sensabaugh. 1999. A mitochondrial control region and cytochrome b phylogeny of sika deer (*Cervus nippon*) and report of tandem repeats in the control region. *Mol. Phylogenet. Evol.* **12**, 47-56.
- Cronin, M. A., L. Renecker, B. J. Poerson, and J. C. Patton. 1995. Genetic variation in domestic reindeer and wild caribou in Alaska. *Anim Genet.* **26**, 427-434.
- Chung, E. R., W. T. Kim, Y. S. Kim, J. K. Lee, and S. K. Han. 2002. Sequence and genetic variation of mitochondrial DNA D-loop region in Korean cattle. *Korean J. Anim. Sci.* **44**, 181-190.
- Dratch, P. and U. Gyllensten. 1985. Genetic differentiation of red deer and North. American elk (Wapiti). *Biol. Deer Production* **22**, 37-40.
- Feldhamer, G. A. 1980. *Cervus Nippon. Mamm. Species* **128**, 1-7.
- Hong, N. D., D. Won, N. J. Kim, S. Y. Chang, W. G. Youn, and H. S. Kim. 1991. Studies on the analysis of constituents of deer hirn (I): Assay of trace elements and TLC pattern analysis of gangliosides. *Korean J. Pharmacogen.* **22**, 171-182
- Hutchison, C. A., J. E. Newbold, S. S. Potter, and M. H. Edgell. 1974. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* **251**, 536-538.
- Hwang, J. S., J. S. Lee, H. A. Kang, S. M. Lee, and H. Y. Sohn. 1997. Genetic relationships among parental *Bombyx mori* strains of the current F1 hybrid silkworm based on RAPD. *Korean J. Appl. Entomol.* **36**, 206-214.
- Irwin, D. M., T. D. Kocher, and A. C. Wilson. 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.* **32**, 128-144.
- Kim, S. H. 2000. Effect of the antler extracts from various origins and parts on homopoietic activity in normal and cyclophosphamide-induced pathologic CD34 cells. *The Annual Report of KFDA* **4**, 627-628.
- Kuwayama, R., and T. Ozawa. 2000. Phylogenetic relationship and European red deer, wapiti, and sika deer inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **15**, 115-123.
- Lee, S. M. 2000. Comparative investigation on the pharmacological effect of antler. *The Annual Report of KFDA* **4**, 626
- Ludt, C. J., W. Schroeder, O. Rottmann O, and R. Kuehn. 2004. Mitochondrial DNA phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*). *Mol. Phylogenet. Evol.* **31**, 1064-1083.
- Matsunaga, T., K. Chikuni, R. Tanabe, S. Muroya, H. Nakai, K. Shibata, J. Yamada, and Y. Shinmura. 1993. 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.
- Michael, M., F. Miyamoto, K. Fred, A. Oliver, and A. Ryder. 1990. Phylogeny and evolution of antlered deer determined from mitochondrial DNA sequences. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **87**, 6127-6131.
- Nagata, J., R. Masuda, K. Kaji, M. Kaneko, and M. C. Yoshida. 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.
- Oh, S. J., T. H. Kim, D. H. Yoon, E. W. Park, H. Y. Lee, I. C. Cheong, T. Y. Thak, K. N. Kim, and J. Y. Han. 2000. A study on genotype frequencies of the bovine melanocortin receptor 1 (MCA1R) in cattle breeds. *J. Ani. Sci. Technol.* **42**, 735-744.
- Partis, L., D. Croan, Z. Gul, R. Clark, T. Coldham, and J. Murby. 2000. Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Sci.* **54**, 369-376.
- Polziehn, R. O. and C. Strobeck. 1998. A phylogenetic comparison of red deer and wapiti using mitochondrial DNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* **22**, 342-356.
- Randi, E., N. Mucci, F. Claro-Hergueta, A. Bonnet, and E. J. P. Douzery. 2001. A mitochondrial DNA control region phylogeny of the cervinae: speciation in *Cervus* and implications for conservation. *Animal Conservation* **4**, 1-11.

초록 : 미토콘드리아 displacement loop 영역의 염기서열을 이용한 녹용의 원산지 동정

유현숙¹ · 이기남¹ · 이진성^{2*}

(¹원광대학교 한의학 전문대학원, ²성균관대학교 유전공학과)

우리나라는 세계 녹용 생산량의 80% 이상을 소비한다. 하지만, 중국산, 뉴질랜드산 녹용과 수입이 금지된 북미산 녹용이 원용이라고 불리는 고가의 러시아산 녹용으로 둔갑 판매, 유통되는 문제가 다수 보고되고 있다. 따라서 본 연구에서는 녹용의 원산지 동정 기술을 개발하고자 러시아, 중국, 뉴질랜드 및 북미산 녹용으로부터 미토콘드리아 D-loop 영역에 대한 원산지 특이적인 분자 마커를 탐색할 목적으로 수행되었다. 결과적으로 중국산 녹용으로부터 약 60~70 bp의 결실 부위를 확인하고 이들 부위를 특이적으로 확인할 수 있는 PCR법을 통해서 중국산 녹용의 정확한 감별 가능성을 확인하였다. 따라서 본 연구는 미토콘드리아 DNA 유래의 유전자들에 대한 염기서열 분석과 이를 이용한 PCR 동정법이 녹용의 원산지 감별에 적용될 수 있음을 보여주는 사례라 생각된다.