# 녹용절편
## Sectilis Cervi Parvum Cornu

이 약은「녹용」을 적당한 방법으로 털을 제거한 다음 얇게 썬 것이다.

**성　　상** 이 약은 「녹용」을 얇게 썬 것으로 두께가 1 ~ 3 mm 정도인 타원형 절편으로 절단면 바깥쪽 껍질은 황갈색 ~ 흑갈색을 띤다. 껍질 안쪽은 연한 노란색 ~ 적갈색 또는 회백색 ~ 적갈색을 띠고 부서지기 쉬우며 무게는 가볍고 질은 비교적 딱딱하며 많은 미세한 구멍들이 있어 해면상을 이룬다.

이 약은 특유한 냄새가 있다.

**확인시험** 1) 이 약의 가루 0.1 g에 물 4 mL를 넣고 수욕 중에서 15 분간 가열하고 식은 다음 여과한다. 여액 1 mL에 닌히드린시액 3 방울을 넣고 흔들어 섞어 5 분간 끓이면 남자색을 나타낸다

2) 위 여액 1 mL에 10 % 수산화나트륨용액 2 방울을 넣고 흔들어 섞은 다음 0.5 % 황산동용액을 떨어뜨리면 남자색을 나타낸다.

**순도시험** **1) 이물** 이 약은 다른 동물의 뼈 또는 뿔 조각이 섞여 있어서는 안된다.

**2) 순록의 뿔** 아래와 같이 시험하였을 때 순록의 뿔이 검출되어서는 안된다.

이 약 10 g을 멸균한 유발과 유봉을 사용하여 액체질소로 순간적으로 조직을 얼린 상태에서 가루로 하여 사용한다. 이 약 100 mg을 정밀하게 달아 유전자 증폭반응 조작에 따라 DNA(이하 유전자라 한다)를 분리·정제하여 검액으로 한다. 따로 녹용의 가루 약 100 mg을 정밀하게 달아 검액과 같이 조작하여 대조액으로 한다.

**유전자 분리 및 증폭반응 (PCR, Polymerase Chain Reaction)**

가) 유전자 분리

이 약 100 mg에 700 μL의 CTAB 용액(50 mM Tris·HCl, 0.7 M NaCl, 50 mM EDTA, 140 mM β-mercaptoethanol) 및 proteinase K 용액 (600 mAU/mL 이상) 20 μL을 넣고 60 ℃ 항온에서 1시간 반응시킨다. 이 반응물에 페놀 · 클로로포름 · 이소아밀알콜혼합액 (25 : 24 : 1) 700 μL를 넣고 12,000 rpm에서 10 분간 원심 분리하여 상층액을 취하고 여기에 클로로포름 · 이소아밀알콜혼합액 (24 : 1) 600 μL를 넣어 12,000 rpm에서 5 분간 원심 분리한다. 다시 상층액을 가지고 차가운 이소프로판올 500 μL를

넣고 잘 섞은 다음 -20 ℃에서 30 분 이상 방치하여 유전자를 침전시킨다. 이 액을 12,000 rpm에서 15 분간 원심 분리하여 상층액은 버리고 침전된 유전자에 70 % 에탄올 500 μL을 벽면으로 천천히 가한 다음 12,000 rpm에 5 분간 원심 분리한다. 상층액은 버리고 침전물인 유전자는 실온에서 자연 건조한 다음 TE 용액 (10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA) 100 μL로 유전자를 녹인다. 필요한 경우 RNase (100 mg/mL, 7000 units/mL) 2 μL를 넣고 37 ℃ 에서 2 시간 반응시킨다. 분리된 유전자는 분광 광도계를 이용하여 흡광도를 측정한 다음 농도 및 순도를 다음과 같이 계산한다.

유전자 농도(μg/mL) = 50 μg/mL × A260 nm × 희석배수

(단, A260 nm = 1 일 때 유전자 농도는 50 μg/mL인 것으로 하여 희석한다)

유전자 순도: A260 nm / A280 nm = 1.7 ~ 2.0

(또는 분리된 유전자는 1.0 % 아가로즈겔 전기영동법으로 농도 및 분리 상태를 확인할 수 있다).

※ 위 시험과정은 상용화된 유전자 분리·정제 키트를 사용할 수 있으며, 해당 제조사의 사용방법을 참고하여 유전자를 분리한다.

※ PCR법은 증폭하고자 하는 주형 유전자가 미량 존재하여도 증폭되므로 분리된 유전자 이외의 유전자가 혼입되지 않도록 실험에 사용되는 기구 및 시약 등의 실험실 환경 관리에 주의해야 한다.

- 실험자는 실험용 고무장갑을 착용하고, 실험대는 70 % 에탄올로 깨끗이 닦는다.

- 유전자를 취급 할 때는 외부 공기와 접촉이 없는 무균상자 등의 독립된 공간을 이용하며, 열에 불안정한 시액을 제외한 micro tube/tip 및 증류수 등은 121 ℃에서 15 분 이상 멸균하여 사용한다.

- 본 실험에서 증류수는 특별한 사유가 없는 한 DNA, DNase 등의 오염이 없는 초순수를 말한다.

나) 유전자 증폭반응 (Polymerase Chain Reaction)

샘플 유전자에 대한 PCR은 2회 확인시험으로 실시하되 반드시 “control primer"와 ”순록 marker primer"를 한 세트로 하여 반응시키고, 실험 조건에 의한 오염을 확인하기 위해 “blank"(주형 유전자 대신 멸균증류수 첨가)을 실험에 포함시킨다.

유전자증폭반응은 멸균된 0.5 mL 튜브에 PCR용 완충액(10 × amplification buffer)[1]에 2 μL, $MgCl_2$ (25 mM) 1.5 μL, dNTP[2] (각 2.5 mM) 2 μL, forward primer (10 pmoL/uL) 1 μL, reverse primer (10

pmoL/uL) 1 μL, Taq polymerase[3] (2.5 units/μL) 0.2 μL와 분리한 주형 유전자[4](농도 약 20 ~ 50 ng)를 1 ~ 2 μL를 넣고 멸균증류수로 최종 반응액을 20 μL로 한다. PCR 반응조건은 아래 표와 같다.

※ 상기 PCR 조건은 기기 및 실험환경에 따라 변형할 수 있으며, PCR에 사용되는 시약도 상용화된 키트를 사용할 수 있으며 제조사의 권장조건을 따른다.

| | 온 도 | 시 간 | cycle 수 |
|---|---|---|---|
| 최초 변성(predenaturation) | 95 ℃ | 2 분 | 1 |
| 변성 (denaturation)<br>결합 (annealing)<br>증폭 (extension) | 95 ℃<br>59 ℃<br>72 ℃ | 30 초<br>20 초<br>30 초 | 35 |
| 최종 증폭 (elongation) | 72 ℃ | 5 분 | 1 |
| 보 존 | 4 ℃ | - | - |

* Primer

| | Control primer (All animal) | 순록 marker primer |
|---|---|---|
| forward | 5′-CAGCCACCGCGGTCATAC-3′ | 5′-CCCCATGCTTATAAGCAAGTACTTGA-3′ |
| reverse | 5′-GCATAGTGGGGTATCTAATCCCA-3′ | 5′-AGCATCCCCCCAAAAATTAAAAA-3′ |

다) 전기영동 및 염색반응

PCR 증폭 결과는 아가로즈 겔 또는 폴리아크릴아마이드 겔을 이용한 전기영동법으로 확인하며, 여기에서는 아가로즈 겔 방법을 제시한다.

① 전기영동

PCR 증폭산물에 1/6의 염색액(gel loading buffer)을 혼합 후 아가로즈 겔의 각 홈(well)에 검액을 넣고, 첫 번째 홈에는 PCR 증폭산물의 크기를 식별할 수 있는 사이즈 마커(100 bp PCR size marker)를 넣는다. 이 때 검액은 10 uL를 넘지 않도록 한다. 전기영동은 겔의 농도와 크기에 따라 전압을 조정하고 염색액에 함유된 "Bromophenol blue"가 겔의 1/2 ~ 2/3 가량 전개되면 전기영동을 끝낸다.

② 겔의 염색

겔의 염색은 에티디움브로마이드(EtBr)용액을 이용하되 아가로즈 겔을 조제할 때 첨가할 수 있으며, 그렇지 않은 경우 EtBr(10 mg/mL) 5 uL을 전

기영동 완충액 100 mL에 희석하여 20 ~30 분 정도 염색한다. 염색한 아가로즈 겔을 다시 전기영동 완충액으로 30 분간 탈색한다.

※ 에티디움브로마이드(EtBr)는 인체에 해로운 시액으로 피부와 직접적인 접촉이 없도록 장갑과 마스크를 착용하고 취급에 주의 한다. 폐액은 반드시 지정된 폐기물통을 이용하여야 한다.

라) 결과 확인 및 판정

염색이 끝난 아가로즈 겔을 영상분석장치(UV trans-illuminator)를 통해 증폭밴드를 확인할 수 있다. 검액이 순록 유전자인 경우 "control primer"와 "순록 marker primer" 모두 양성 반응을 보이며 "control primer"에는 200 bp, "순록 marker primer"에는 386 bp의 증폭밴드가 나타난다. 검액이 녹용 유전자인 경우 "control primer"에는 200 bp의 증폭밴드가 확인되나, "순록 marker primer"에는 증폭밴드가 나타나지 않으며 녹용 대조액과 동일한 양상을 보인다. 본 실험에 대한 결과 판정은 유전자 분리부터 증폭반응까지 2회 반복 실험을 하여 그 결과가 동일하게 나타나야 한다.

주 1) PCR용 완충액(10 x amplification buffer) : 500 mM KCl, 100 mM Tris ·Cl, pH 8.0.

2) dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP) : 유전자를 합성하는 재료가 되는 각 뉴틀레오티드.

3) *Taq* polymerase : 열에 특별히 강한 유전자 합성 효소.

4) 주형 유전자: 증폭 대상이 되는 유전자.

**3) 비소** 이 약을 가지고 「녹용」항에 따라 시험할 때 적합하다.

**건조감량** 12.0 % 이하 (6시간).

**회 분** 33.0 % 이하.

**저 장 법** 밀폐용기.