

## Multiplex PCR을 이용한 4 종류 목향(木香)의 감별

도의정<sup>1,2#</sup>, 이금산<sup>2</sup>, 주영승<sup>3</sup>, 오승은<sup>1\*</sup>

1 : 건국대학교 생명특성화대학 생명과학특성학부 생명과학전공, 2 : 원광대학교 한의과대학 본초학교실,  
3 : 우석대학교 한의과대학 본초학교실

### Identification 4 kinds of Muxiang using Multiplex PCR

Eui Jeong Doh<sup>1,2#</sup>, Guemsan Lee<sup>2</sup>, Young-Sung Ju<sup>3</sup>, Seung Eun Oh<sup>1\*</sup>

1 : Department of Biological Sciences, Konkuk University  
2 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Wonkwang University  
3 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Woosuk University

### ABSTRACT

**Objectives** : Aucklandiae Radix (Muxiang) one of important herbal medicines in oriental medicine, is defined as the dried root of *Aucklandia lappa* (Asteraceae). Owing to the similarities in the morphology and name, Inulae Radix (Tu-Muxiang) and Vladimiriae Radix (Chuan-Muxiang) as well as Aristolochiae Radix (Qing-Muxiang) originated from other medicinal plants are often used as substitutes and/or adulterants of Aucklandiae Radix. Therefore, a reliable authentication of these herbal medicines is necessarily for the public health and prevention of misuse.

**Methods** : 32 samples of medicinal plants supplying Aucklandiae Radix, Inulae Radix, Vladimiriae Radix, and Aristolochiae Radix were collected in Korea and China. The ITS (Internal transcribed spacer) nucleotide sequences of samples were determined. The PCR primers to amplify DNA marker of each herbal medicine were designed basing on the specific ITS regions showing differences in the sequences among medicinal plants.

**Results** : Primer set Al R/IS F designed in this work amplified 220 bp PCR product only in samples of Aucklandiae Radix. In contrast, primer set Ih F/IS R, Vs R/IS F, and AcR F1/Ac R amplified 250 bp product, 356 bp product, and 516 bp product respectively to identify Inulae Radix, Vladimiriae Radix, and Aristolochiae Radix.

**Conclusions** : The primers designed basing on the nucleotide sequences of ITS regions appearing differenced in the sequences among medicinal plants amplified the DNA markers for the identification of Aucklandiae Radix, Inulae Radix, Vladimiriae Radix, and Aristolochiae Radix. These herbal medicines were more efficiently identified by multiplex PCR method using all primers in a single PCR process.

**Key words** : Aucklandiae Radix, Inulae Radix, Vladimiriae Radix, Aristolochiae Radix, DNA Markers, Multiplex PCR

## 서론

목향(木香; Aucklandiae Radix; Muxiang)은 국화(Asteraceae)과의 다년생 초본인 *Aucklandia lappa* Decne의 뿌리이다<sup>1-2)</sup>. 목향에 함유되어 있는 sesquiterpene

lactones과 같은 생리활성물질<sup>3)</sup>에 대한 소화성 궤양<sup>4)</sup>, 어린이 설사<sup>4)</sup>, 만성 위염<sup>5)</sup>, 항염 작용<sup>6-7)</sup> 그리고 암에 대한 효능<sup>8-9)</sup> 연구들이 활발히 수행되고 있다. 그러나 야생 *A. lappa*는 CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora)에 멸종위

\*교신저자 : 오승은, 서울시 광진구 화양동 1 건국대학교 생명특성화대학 생명과학특성학부 생명과학전공  
· Tel : 02-450-3428 · FAX : 02-3436-5432 · E-mail : seunoh@konkuk.ac.kr

#제1저자 : 도의정, 서울시 광진구 화양동 1 건국대학교 생명특성화대학 생명과학특성학부 생명과학전공, 원광대학교 한의과대학 본초학교실  
· Tel : 02-450-3428 · FAX : 02-3436-5432 · E-mail : bluemoon-lion@hanmail.net  
· 접수 : 2014년 4월 25일 · 수정 : 2014년 5월 10일 · 채택 : 2014년 5월 14일

기 2급 식물로 등재되어 있으며, 재배된 *A. lappa* 만 유통할 수 있다<sup>10)</sup>. *A. lappa*는 고지대 식물로 국내에는 자생하지 않고, 중국 운남, 광서 그리고 사천 등에서 재배되고 있다. 목향은 재배되는 지역에 따라 운목향 혹은, 당목향이란 이름으로 유통되나 이는 목향의 이명일 뿐 동일한 *A. lappa*로부터 기인된다<sup>1)</sup>.

현재, 중국 약재시장에서는 유통되는 이름 또는 외부형태적 특징이 유사한 다른 종의 국화과(Asteraceae) 식물 및 쥐방울덩굴과 (Aristolochiaceae) 식물이 목향의 혼·위품으로 유통되고 있다<sup>10-11)</sup>. 우리나라에서는 식물명이 목향인 국화과(Asteraceae) *Inula helenium* L.의 뿌리가 목향(木香)의 대용품으로 사용되어 왔으며 현재는 토목향 (土木香; *Inulae Radix*; Tu-Muxiang) 으로 명명되어 목향(木香)과 분리되어 대한약전외(생약)규격집에 수록되어있다<sup>2)</sup>. 또 다른 국화과 식물인 *Vladimiria souliei* (Franch) Ling, *V. souliei* (Franch) Ling var. *cinerea* Ling 뿌리도 중국 약재시장에서 천목향 (川木香; *Vladimiriae Radix*; Chuan-Muxiang) 이란 이름으로 유통되고 있다<sup>1,10-11)</sup>. 쥐방울덩굴과 (Aristolochiaceae) 의 *Aristolochia contorta* Bge. 와 *Aristolochia debilis* Sieb. et Zucc.의 뿌리 또한 중국 약재시장에서 청목향 (靑木香; *Aristolochiae Radix*; Qing-Muxiang) 이란 이름으로 목향의 혼·위품으로 유통되고 있다<sup>1,10-11)</sup>. 이렇듯 다양한 종의 식물들이 각각 함유하고 있는 생리활성 화합물의 조성 및 함량에 차이가 있음에도 불구하고 목향의 혼·위품으로 유통되고 있는 실정이다<sup>11-12)</sup>. 특히, 청목향의 경우 *Aristolochia* 속 식물에서 흔히 발견되는 aristolochic acids가 함유되어 신장장애와 암을 유발시킬 수 있기 때문에 국내에서는 유통이 금지되어 있다<sup>13-14)</sup>.

따라서, 목향의 정확한 기원식물인 *A. lappa* 를 혼·위품들로부터 명확히 구분할 필요가 있다. 목향 기원식물 감별을 위해 형태학적 기준에 의한 감별<sup>15)</sup>과 GC-MS를 이용한 성분 분석<sup>11)</sup> 방법들이 고안되었다. 그러나 이러한 감별 방법들은 주로 절단된 건조된 유통 시료를 대상으로 하고 있으며, 식물의 성장과 재배 조건에 따라 성분함량이 차이가 발생할 수 있다는 문제점들이 있다<sup>16-17)</sup>. 이를 보완하고자, ITS1 (Internal Transcribed spacer 1)과 ITS2 (Internal transcribed sapcer 2) 부위의 염기서열을 비교하는 DNA Barcoding 기법<sup>10)</sup>과 Chloroplast의 *rbcl*, *matK*, *phyA* 염기서열<sup>18)</sup> 등과 같은 분자생물학적 감별 연구가 수행되었다.

본 연구에서는 기존의 ITS 염기서열을 비교 분석하는 DNA Barcoding 기법을 이용한 감별에서 더 나아가 목향 및 혼·대용품 기원식물 간 차이를 나타내는 ITS의 특정 부위의 염기서열을 이용하여 특이적 프라이머(primer)를 제작하고, 이를 이용한 Multiplex PCR(polymerase chain reaction)을 통해 특이적인 DNA 마커가 증폭되게 함으로써 4 종류의 목향을 효율적으로 감별할 수 있는 방법을 개발하고자하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

본 연구의 대상 시료인 목향 (*Aucklandiae Radix*), 토목

향 (*Inulae Radix*), 천목향 (*Vladimiriae Radix*), 청목향 (*Aristolochiae Radix*)의 건조 및 생체시료를 국내와 중국의 재배지, 자생지 및 약재시장으로부터 수집하였다(Table 1). 수집된 시료들의 감별은 우석대학교 본초학 연구실 및 한국한의학연구원에서 수행하였다.

Table 1. Samples of leaves or dried roots of plants supplying *Aucklandiae Radix*, *Inulae Radix*, *Vladimiriae Radix* and *Aristolochiae Radix* to determine ITS nucleotide sequence

Lane	tissue	Official name	Scientific name	Nationality	Locality	Date of collection
1	L				Sichuan	2011,06
2	L				Sichuan	2011,06
3	L	Aucklandiae			Sichuan	2011,06
4	L	Radix	<i>Aucklandia lappa</i>	China	Sichuan	2012,07
5	L	(Muxiang)			Sichuan	2011,07
6	R				Sichuan	2011,02
7	R				Sichuan	2011,02
8	R				Sichuan	2012,07
9	L				Jeonju	2011,04
10	L				Jeonju	2011,04
11	L				Jeonju	2011,04
12	L	<i>Inulae Radix</i>	<i>Inula helenium</i>	Korea	Jeju	2012,06
13	L	(Tu-Muxiang)			Jeju	2011,06
14	R				Deagu	2011,02
15	R				Seoul	2011,02
16	R				Seoul	2011,02
17	L				Sichuan	2012,07
18	L				Sichuan	2012,07
19	L	<i>Vladimiriae</i>			Sichuan	2012,07
20	R	<i>Radix</i>	<i>Vladimiria souliei</i>	China	Sichuan	2012,07
21	R				Sichuan	2012,07
22	R	(Chuan-Muxiang)			Sichuan	2011,03
23	R				Sichuan	2011,03
24	R				Sichuan	2011,03
25	L				Sichuan	2011,06
26	L				Sichuan	2011,06
27	L	<i>Aristolochiae</i>	<i>Aristolochia debilis</i>	China	Sichuan	2011,06
28	R	<i>Radix</i>			Guangxi	2011,06
29	R				Sichuan	2012,07
30	L	(Qing-Muxiang)			Sichuan	2011,03
31	L		<i>Aristolochia contorta</i>		Sichuan	2011,03
32	R				Sichuan	2011,03

\*R means dried Radix sample collected from market.

\*L means fresh sample collected from cultivated local area.

## 2. 방법

### 1) 게놈 DNA 준비

각 시료의 게놈 DNA는 NucleoSpin<sup>®</sup> Plant II kit (Macherey-Nagel, Dueren, Germany)의 매뉴얼에 따라서 추출하였다. 일부 시료는, DNA의 순도를 높이기 위해 10% cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)와 0.7M NaCl 를 사용하여 페놀화합물과 다당류를 추가로 제거하였다.

### 2) PCR 증폭

ITS 증폭을 위한 PCR은 T-personal cycler (Biometra, Germany)를 사용하여 White 등(1990)의 방법<sup>19)</sup>으로 수행하였다. 600 nM의 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')

과 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 프라이머, 1X BluePreMIX-HF (Macrogen, Korea) 그리고 각 시료로부터 추출한 50 ng의 게놈 DNA를 PCR 증폭에 사용하였다.

95°C에서 5분간 게놈 DNA를 전 변성 시킨 후, 변성과정 (denaturation)은 95°C에서 30 초, 결합과정 (annealing)은 52°C에서 30 초, 신장과정 (extension)은 72°C에서 40 초 PCR 과정을 35 회 반복하였다. 최종 신장 과정은 72°C에서 5 분간 수행하였다. 목향 및 혼·위품 기원식물의 감별을 위한 PCR은 250 nM의 프라이머들을 사용하였다. 그리고 ITS 증폭 때와 동일하게 50 ng 의 게놈 DNA와 1X BluePreMIX-HF (Macrogen, Korea)를 사용하였으며 95°C에서 5 분간 게놈 DNA를 전 변성시켰다. 변성과정은 95°C에서 30 초, 결합과정은 Aucklandiae Radix를 감별하기 위해서는 64.8°C에서, Inulae Radix를 감별하기 위해서는 58°C에서 각각 30 초간 수행하였다. Vladimiriae Radix 감별을 위해서는 63°C에서 Aristolochiae Radix 감별을 위해서는 63.5°C에서 각각 30 초간 수행하였다. 신장과정은 Aucklandiae Radix와 Vladimiriae Radix를 감별하기 위해서는 72°C에서 20 초간, Inulae Radix와 Aristolochiae Radix를 위해서는 72°C에서 30 초로한 PCR 과정을 25 회 반복하였다. 최종 신장 과정은 72°C에서 5 분간 수행하였다. Multiplex PCR은 400 nM 의 Al F 와 Ih F, 200 nM의 IS R 와 IS F, 400 nM의 AcR F1 와 Ac R, 450 nM의 Vs R 프라이머를 사용하였다. 95°C에서 5 분간 전 변성 후 95°C에서 30 초간, 63.5°C에서 30 초간 그리고, 72°C에서 25 초의 과정을 25 회 반복하였다. 최종 신장 과정은 72°C에서 5 분간 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 Safe-white™ (abm, Canada)를 첨가하여 염색 후, 1.5% agarose 겔을 사용하여 전기영동 하였으며, MyImage (Seoulin Biotechnology, Korea)를 사용하여 증폭산물들을 분석하였다.

### 3) PCR 산물의 염기서열 결정

Agarose 겔로부터 분리한 PCR 산물은 MG™ TOPcloner TA kit (Macrogen, Korea)를 사용하여 클로닝 하였다. 클로닝 된 PCR 산물의 염기서열은 Macrogen (Korea)에 의뢰하여 결정하였다.

### 4) 염기서열 분석 및 dendrogram 제작

DNA 염기서열은 Bioedit v7.0.9 (<http://mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>)의 ClustalW Multiple sequence alignment 이용하여 분석하였다. Dendrogram의 작성은 Bioedit의 DNADist를 이용하였다

## 결 과

### 1. ITS 염기서열 결정 및 분석

Table 1에 제시된 시료의 전체 ITS (ITS1, 5.8s rRNA ITS2) 685 - 734bp 크기의 염기서열을 결정하였다(Fig. 1). 천목향을 제외한 수집된 시료의 종 내 염기서열 변이는 관찰되지 않았다. 하지만, 종간에는 명확한 염기서열 차이가 확인되었으며 이러한 ITS 염기서열 차이를 기준으로 4 종류의 목향이 뚜렷이 구분되었다(Fig.2).

청목향 (Aristolochiae Radix) 시료 중, *A. contorta* 와 *A. debillis* 간에는 3 군데에서 염기의 transition이, 4 군데에서 염기의 transversion이 일어나 총 7 군데에서 염기의 차이를 나타내었다(Fig. 1). 국화과 (Asteraceae)인 목향 3 종류와 과 (Family)가 다른 청목향 (Aristolochiae Radix)의 ITS 염기서열은 특히 ITS1과 ITS2 부위 모두에서 현저한 차이를 나타냈다(Fig. 1). 본 연구에서 결정된 ITS의 염기서열은 NCBI의 Genbank에 수록되어있는 ITS1과 ITS2의 염기서열인 AY914821.1 (*A. lappa*), FN870378.1 (*I. helenium*), EU257410.1, EU257422.1 (*A. debills*)와 동일하였다. NCBI Genbank에는 청목향의 또 다른 기원식물인 *A. contorta*의 ITS 염기서열 정보가 수록되어 있지 않아 이 염기서열 정보를 새로이 등재하였다.

천목향 (Vladimirae Radix)의 경우, *V. souliei* 로 수집된 8개 시료 중 3개의 시료 (시료22 - 24)에서 나머지 5개의 시료 (시료17 - 21)와 달리 4 곳의 염기에서 transition이 일어나 종 내 변이가 있음을 확인하였다(Fig. 1). 5개 시료의 ITS1과 ITS2의 염기서열은 NCBI Genbank의 *V. souliei*의 염기서열인 EU257417.1, EU257429.1와 동일하였고, 나머지 3 개 시료의 ITS 염기서열과 일치하는 염기서열은 Genbank에 존재하지 않았다. 따라서, 결정한 3 개 시료의 ITS 염기서열 정보를 Genbank에 새로이 등재하였다.

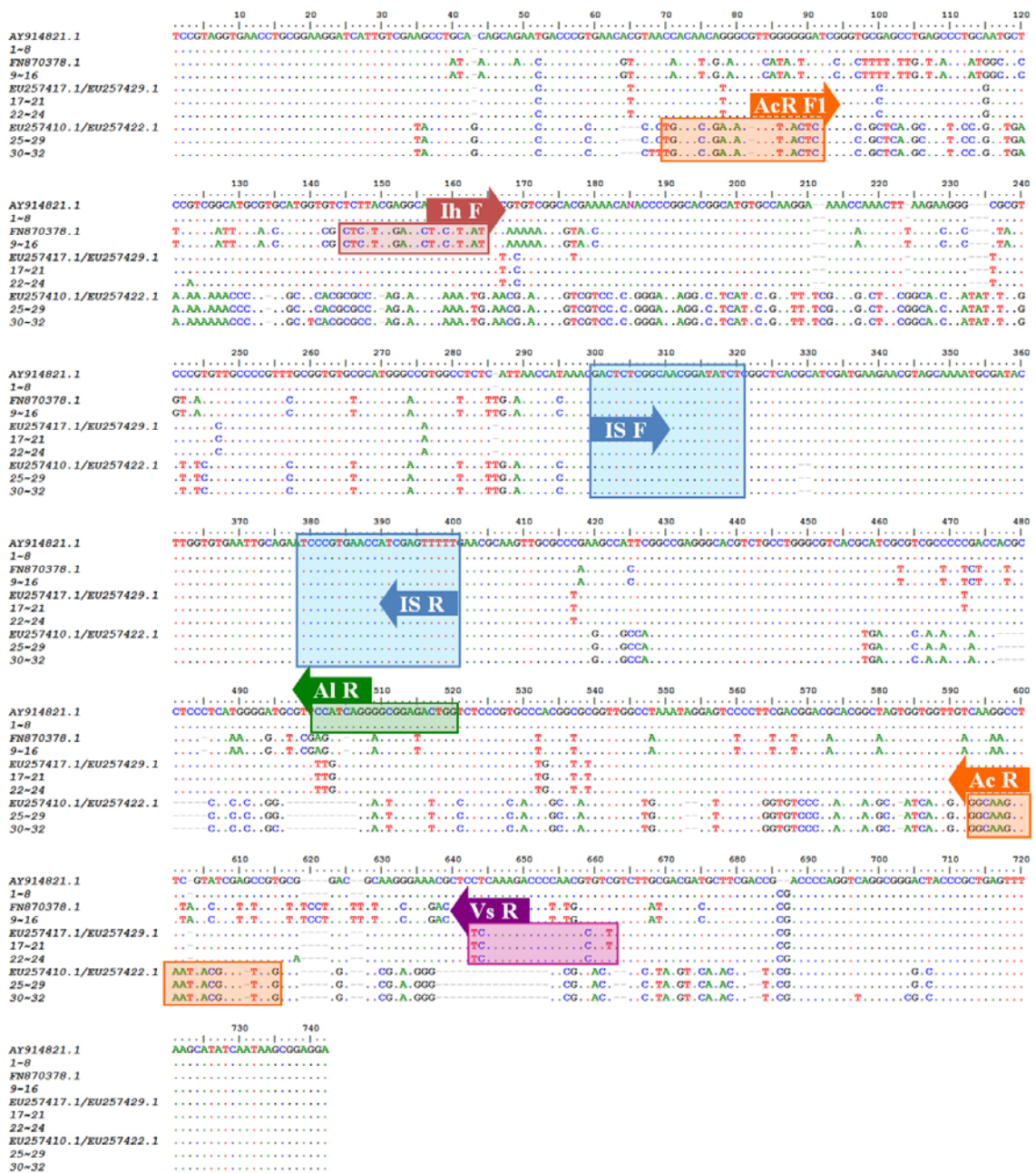


Figure 1. Multiple alignments of ITS sequences of leaves or dried roots of plants supplying Aucklandiae Radix, Inulae Radix, Vladimiriae Radix, Aristolochiae Radix, and deposited in NCBI Genbank. The dots indicate the consensus nucleotide and the dashes represent the gaps. Numbers are sample numbers presented in Table 1.

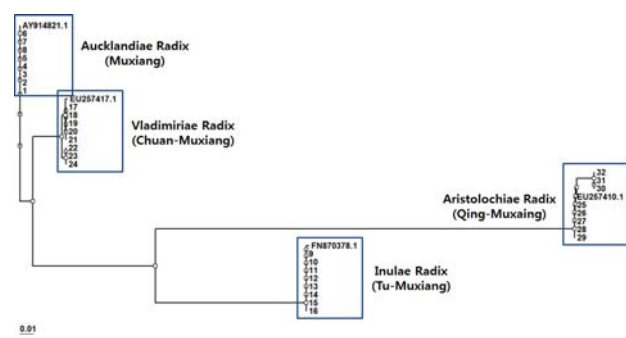


Figure 2. Dendrogram constructed on the basis of ITS nucleotide sequences shown in Figure 1.

## 2. 목향 감별 DNA 마커 제작

결정된 ITS 염기서열 차이를 이용하여, 목향, 토목향, 천목향, 청목향 각각을 감별하는 DNA 마커로 사용될 수 있는 프라이머를 제작하였다(Fig. 1, Fig. 4A). 제작된 프라이머를 이용한 PCR 반응 결과, 프라이머 AI R/ IS F 쌍은 *A. lappa* 시료에서 만 220 bp 특이적 증폭산물을 형성하여 목향 (Aucklandiae Radix)을 다른 혼·위품들로부터 감별할 수 있음을 확인하였다(Fig 3A). 프라이머 Ih F/ IS R 쌍은 *I. helenium* 시료에서만 250bp 증폭산물을 형성하여 토목향 (Inulae Radix) 감별 DNA 마커로(Fig 3B), 프라이머 Vs R/IS F 쌍은 *V. souliei* 및 종내 변이 시료 모두에서 356

bp 증폭산물을 형성하여 천목향(Vladimiriae Radix)을 감별하는 DNA 마커로 사용할 수 있음을 확인하였다(Fig 3C). 또한, 프라이머 AcR F1 / Ac R 쌍은 *A. debilis* 와 *A. contorta* 시료에서만 516 bp 증폭산물을 형성하여 국내에서 유통이 금지되고 있는 청목향(Aristolochiae Radix) 감별 DNA 마커로 사용할 수 있음을 확인하였다(Fig.3D).

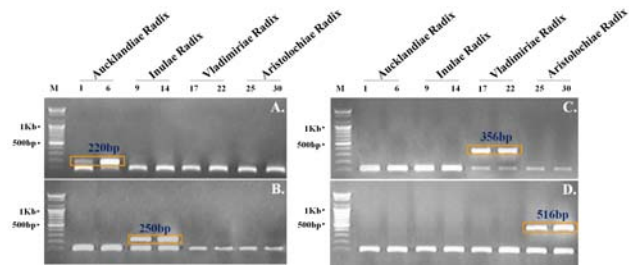


Figure 3. PCR products of primers set AI R/IS F to amplify DNA marker of Aucklandiae Radix(A), Ih F/IS R primer set to amplify DNA marker of Inulae Radix(B), primer set Vs R/IS F to amplify DNA marker of Vladimiriae Radix(C), and primer set AcR F1/Ac R to amplify DNA marker of Aristolochiae Radix(D) Numbers are sample numbers presented in Table 1. M: 100bp ladder.

### 3. multiplex 기법을 이용한 목향(Aucklandiae Radix) 감별

개발된 각각의 특이적 DNA 마커들을 1 회의 PCR 반응을 통해 동시에 증폭시킴으로써, 목향을 혼·위품으로부터 감별하는 동시에 각각의 혼·위품들을 확인 할 수 있는 multiplex PCR 방법을 적용하도록 하였다. 각 시료의 PCR 증폭 반응 오류를 확인하기 위한 internal standard로 4 종의 목향 약재들의 염기서열이 동일한 5.8s rRNA 부위를 이용한 IS F/IS R 쌍을 고안되었으며, 모든 시료에서 공통적으로 100 bp 증폭산물이 생성되도록 하였다(Fig. 1과 4A). 고안된 프라이머 AI R / Ih F / AcR F1 / Ac R / Vs R / IS F / IS R 총 7 개를 동시에 사용한 multiplex PCR 수행한 결과, 목향 (Aucklandiae Radix) 시료에는 100bp와 220 bp의 두 개의 증폭산물이, 토목향 (Inulae Radix) 시료에는 100bp 와 250bp 증폭산물이 형성되었다. 천목향 (Vladimiriae Radix)에서는 100bp와 356 bp의 증폭산물이, 청목향(Aristolochiae Radix)에는 100bp와 516 bp의 증폭산물이 각각 형성되어 개발된 multiplex PCR 방법으로 보다 효율적으로 목향 및 혼·위품을 감별 할 수 있음을 확인하였다 (Fig. 4A, B).

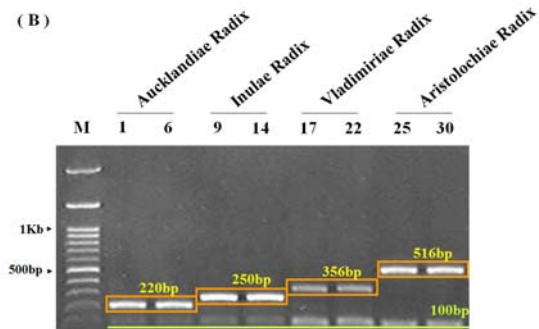
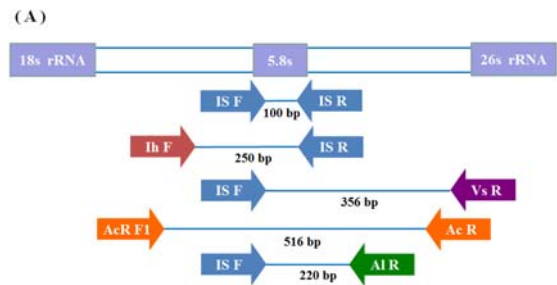


Figure 4. (A) Designed primers for amplify DNA markers of Aucklandiae Radix, Inulae Radix, Vladimiriae Radix, Aristolochiae Radix, and expected size of PCR products. (B). Multiplex PCR product amplified by primer AI R, Ih F, AcR F1, Ac R, Vs R, IS F and IS R. Numbers are sample numbers presented in Table 1. M, 100bp ladder

또한, 4 개의 목향이 서로 혼용되었을 경우를 고려하여, 임의적으로 4 종의 목향 DNA를 혼합하여 multiplex PCR을 수행하였다. 그 결과 단일 종류의 목향 DNA가 들어 있는 시료에서는 DNA 마커와 internal standard 두 개의 증폭산물만 형성되는 반면 목향 및 혼·위품 DNA가 혼합되어 있는 시료에서는 internal standard를 포함, 각각 혼합되어 있는 목향 종류에 해당하는 DNA 마커 증폭 산물까지 여러 개의 증폭 밴드가 형성되었다(Fig. 5).

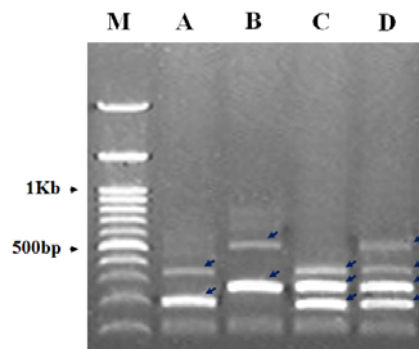


Figure 5. Multiplex PCR with mixed DNA sample of 4 kinds of Muxiang. Lane A; Aucklandiae Radix and Vladimiriae Radix DNA was mixed, Lane B; Inulae Radix and Aristolochiae Radix DNA was mixed, Lane C; Aucklandiae Radix, Inulae Radix and Vladimiriae Radix DNA was mixed, Lane D; Aucklandiae Radix, Inulae Radix, Vladimiriae Radix and Aristolochiae Radix DNA was mixed. Arrow was indicated the amplified products. M, 100bp ladder Vs R, IS F and IS R. Numbers are sample numbers presented in Table 1. M, 100bp ladder



## 고찰

목향 감별에 사용된 ITS(Internal transcribed spacer)는 nuclear ribosomal DNA(nrDNA)의 18s-5.8s-26s rDNA 사이의 지역으로 rRNA를 암호화하고(coding)있으며 진화에 보편적인 18s, 26s 일부분과 5.8s rDNA 지역, 식물 종간 다양성이 나타나는 non-coding 지역인 ITS 1과 ITS 2 부위로 구분된다<sup>20</sup>. ITS 부위의 염기서열은 진화에 따라 빠르게 변화하기 때문에, ITS 염기서열 정보는 특히 식물의 속(genus) 이하 단위에서의 계통학적 유연관계 연구<sup>21-23</sup>, 유전적 다양성 평가<sup>24</sup>, 종 내 변이 연구<sup>25</sup>, DNA barcoding<sup>26</sup>을 위해 널리 사용되고 있다. 이러한 ITS 염기서열은 약용식물의 감별을 위해서도 효율적으로 사용되고 있다<sup>27</sup>. 예를 들어, *Atractylodes* 속<sup>28</sup>, *Bupleurum* 속<sup>29</sup>, *Phyllanthus* 속<sup>30</sup> 등 여러 약용식물 감별에 효율적으로 이용되었다.

분석된 ITS 염기서열을 이용하여 목향 및 혼위품의 기원 식물 간의 유전적 유연관계를 분석한 결과, 동일한 국화과에 속해있는 *A. lappa*와 *V. souliei* 시료 간에 96%의 염기서열 유사성을 보이며 같은 국화과의 *I. helenium* (82%) 보다 상대적으로 매우 높은 유연관계를 지니고 있음을 확인하였다. 이러한 목향 기원식물간의 유연관계는 Shum 등 (2007)에 의하여 수행된 GC-MS를 이용한 목향 약재에 함유하고 있는 휘발성 물질들의 hierarchical clustering 분석 결과와 일치하였다. 이러한 결과는, 약용식물의 감별 및 약용식물 간의 유연관계 연구에 있어 염기서열 정보와 물질 성분 분석이 상호 보완 될 수 있는 가능성을 시사해 준다.

본 연구에서 결정된 ITS 염기서열의 결과에 의하면, 천목향을 제외한 다른 목향 기원식물의 종내 변이는 없었으며, 일부 *V. souliei* 시료를 제외하고는 NCBI의 Genebank에 있는 각 기원식물의 ITS 염기서열과 일치하였다. 천목향(*Vladimiriae Radix*)의 경우, 수집된 8 개 시료 중, 5 개 시료는 NCBI Genebank (EU257417.1/ EU257429.1)의 염기서열과 일치하였으나 다른 3 개의 시료는 4 곳에서 염기의 차이를 나타내었다. 본 연구에 사용된 천향목 시료가 두 개의 종내 변이 그룹으로 구분된다는 사실은 추가적인 *trnL-F* intergenic spacer 염기서열의 비교분석을 통해 확인하였다 (data not shown). 이 결과는, 염기서열 차이를 보이는 3개의 천목향 시료가 *V. souliei* var. *cinerea*와 같은 *V. souliei*의 특정 variety일 가능성이 있음을 시사해주는 것이라 볼 수 있다. 천목향의 경우, *V. souliei* 뿐만 아니라 *V. souliei*의 다른 variety 또한 사용되기 때문에, 천목향 감별 DNA 마커 제작 시 천목향 8 개 시료에서 모두 증폭될 수 있는 프라이머를 제작하였다.

청목향 또한 *A. debilis*와 *A. contorta* 모두를 기원식물로 하기 때문에<sup>1-2</sup>, 본 연구에서는, *A. debilis*와 *A. contorta* 시료 모두에서 516 bp의 청목향 DNA 마커가 증폭되도록 프라이머를 제작하였다. 청목향인 *Aristolochia* 속 기원식물 *A. debilis* 와 *A. contorta* 는 뿌리부위 뿐만 아니라 열매도 마두령(馬兜鈴)으로 명명하여 약재로 사용한다. 그러나 두 약재 모두 국내에서는 식품의약품안전청고시 제2005-54호에 의거 대한약전외한약(생약)규격집에서 삭제되었으며 유통 및 건강기능성 식품류로 사용 금지된 약재이다. 본 연구를 통해 개발된 516 bp의 청목향 DNA 마커가 이들의 효율적인 유통 규

제에 활용 될 수 있을 것이다.

또한, 고안한 모든 DNA 마커들을 1개의 반응 tube에 동시에 넣고 PCR을 진행하는 multiplex PCR을 적용하여 4 개 목향 각각의 기원식물 특이적 증폭산물을 형성함으로써, 목향을 서로 감별하고자 하였다. 이러한 multiplex PCR 방법을 사용할 경우, PCR 과정 중 기술적인 문제로 증폭산물이 증폭되지 않는 false negative 발생 여부를 확인할 수 있고, primer 한 쌍만을 사용하는 각각의 uniplex PCR 보다 경제적이며, 실험과정의 시간을 단축 할 수 있는 장점을 갖고 있다. 이러한 multiplex PCR은 종 감별 뿐만 아니라 Genotyping assay, 동·식물 질병진단, 식품검사, GMO 선별 등 다양한 연구 분야에 활용되고 있다<sup>31-34</sup>.

목향 기원식물 특이적 DNA 마커를 이용한 multiplex PCR 반응 결과 한번의 PCR 반응을 통해 4 개의 목향을 효율적으로 구분할 수 있었다. 또한, 목향의 혼·위품이 혼합되어 유통될 경우를 고려한 4 종류 목향 DNA를 임의적으로 혼합한 시료의 multiplex PCR 수행 시, Fig 5의 결과와 같이 목향과 천목향 DNA가 혼합된 시료에서 각각 220bp와 356bp의 증폭산물이 형성되었으며, 토목향 청목향이 DNA가 혼합된 시료에서는 각각 250bp와 516bp의 증폭산물이 형성되었다. 또한, 목향, 토목향, 천목향 DNA가 혼합되어있는 시료에서는 220bp, 250bp, 356bp의 증폭산물이 형성되었으며, 4가지 종류의 목향 DNA가 모두 혼합되어 있는 시료에서는 4 종류 목향의 특이적 DNA 마커 증폭 산물이 모두 형성되었다. 이 결과를 통해, 본 연구에서 고안된 DNA 마커를 이용한 multiplex PCR 기법은 4 종류 목향 각각의 감별뿐만 아니라 혼합 유통되는 목향 약재 구분에도 효율적으로 적용할 수 있는 새로운 감별 기준이 될 수 있음을 입증하고 있다.

## 결론

본 연구는 4 종류의 목향 감별 위해 DNA 마커를 이용한 보다 명확하고 효율적인 감별 기준을 제시하고자 하였으며 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. ITS 염기서열 차이를 나타내는 특정 부위의 염기서열 정보를 이용하여 고안된 DNA 마커 Al R / Ih F / Vs R / Ac F1 / Ac R / IS F / IS R 는 목향, 토목향, 천목향, 청목향 시료에 각기 서로 다른 크기의 증폭산물을 형성하여 4 종류의 목향을 효율적으로 구분해 낼 수 있었다.
2. 고안된 DNA 마커를 동시에 사용하는 multiplex PCR 기법은 개발된 각각의 마커를 이용한 uniplex PCR 보다 경제적이고 효율적으로 4종류의 목향을 구분 할 수 있었다.
3. 4 종류 목향 DNA를 임의로 혼합한 시료를 이용한 실험을 통해 본 연구에서 개발된 마커들이 목향의 혼위품을 충분히 감별해 낼 수 있음을 검증하였다.

이상으로 본 연구에서 4 종류의 목향 감별을 위해 고안된

DNA 마커들은 혼합 유통되는 시료도 감별해 낼 수 있는 새로운 감별 기준으로 제시 될 수 있을 뿐만 아니라 유통 금지 품목인 청목향의 유통 규제 관리에 있어서도 효율적으로 적용할 수 있을 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 2011년도 식품의약품안전청 용역연구개발과제의 연구개발비지원 (09112 한약재 822)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## References

- China Pharmacopoeia Committee, Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Beijing : China Chemical Industry press, 2005 ; 1 : 41-2, Appendix X : 57.
- Korea Food and Drug Administration, The Korean Herbal Pharmacopoeia, Seoul : Korea Food and Drug Administration press, 2011 : 133-4, 362.
- Li AF, Sun AL, Liu RM, Preparative isolation and purification of costunolide and dehydrocostuslactone from *Aucklandia lappa* Decne by high-speed counter-current chromatography, *J Chromatogr A*, 2005 ; 1076 (1-2) : 193-7.
- Chang HM, But PPH, Pharmacology and applications of Chinese materia medica, Singapore : World Scientific, 1986 : 190-4.
- Taniguchi M, Kataoka T, Suzuki H, Uramoto M, Ando M, Arao K, Magae J, Nishimura T, Otake N, KNagai K, Costunolide and dehydrocostus lactone as inhibitors of killing function of cytotoxic T lymphocytes, *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995 ; 59 : 2064-7.
- Damre AA, Damre AS, Saraf MN, Evaluation of sesquiterpene lactone fraction of *Saussurea lappa* on transudative, exudative and proliferative phases of inflammation, *Phytother Res*, 2003 ; 17 : 722-5.
- Choi HG, Lee DS, Li B, Choi YH, Lee SH, Kim YC, Santamarin, a sesquiterpene lactone isolated from *Saussurea lappa*, represses LPS-induced inflammatory responses via expression of heme oxygenase-1 in murine macrophage cells, *Int Immunopharmacol*, 2012 ; 13 : 271-9.
- Yang L, Chen X, Qiang Z, Jun Y, Ren LS, Xiang T, In vitro anti-Helicobacter pylori action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases, *J Ethnopharmacol*, 2005 ; 98 : 329-33.
- Chen CN, Huang HH, Wu CL, Isocostunolide, a sesquiterpene lactone, induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in human melanoma cells, *Cancer Lett*, 2007 ; 246 : 237-52.
- Chen F, Chan HYE, Wong KL, Wang J, Yu MT, But PPH, Shaw PC, Authentication of *Saussurea lappa*, an endangered medicinal material, by ITS DNA and 5S rRNA Sequencing, *Planta Med*, 2008 ; 74 : 889-92.
- Shum KC, Chen F, Li SL, Wang J, But PPH, Shaw PC, Authentication of Radix Aucklandiae and its substitutes by GC-MS and hierarchical clustering analysis, *J Sep Sci*, 2007 ; 30 : 3233-9.
- State Administration of Traditional Chinese Medicine of People's Republic of China, Chinese Materia Medica, Shanghai : Shanghai Scientific & Technical publishers, 1998 ; 7 : 722-7.
- Lord GM, Tagore R, Cook T, Gower P, Pusey CD, Nephropathy caused by Chinese herbs in the UK, *Lancet*, 1999 ; 354 : 481-2.
- Nortier JL, Martinez M, Schmeiser H, Arlt V, Bieler C, Petain M, Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*), *N Engl J Med*, 2000 ; 342 : 1686-92.
- Korea Food and Drug Administration, The guideline on the visual and organoleptic examination of herbal medicine, Seoul : Korea Food and Drug Administration, vol 1, 2006 : 44, 99, 115.
- Vesela D, Saman D, Valterova I, Vanek T, Seasonal variations in the content of taxanes in the bark of *Taxus baccata* L, *Phytochem Anal*, 1999 ; 10 : 319-21.
- Bae SM, Jin YM, Jeong EH, Kim MB, Shin HY, Ro CW, Lee SC, Studies on proximate composition, Fatty acids and volatile compounds of *Zanthoxylum schinifolium* fruit according to harvesting time, *Korea J Medicinal Crop Sci*, 2011 ; 19 : 1-8.
- Tetsuo OT, Takashi S, Hiroko M, Stefan W, Christoph N, Jin M, Molecular Phylogeny of *Aristolochia sensu lato* (Aristolochiaceae) based on Sequences of *rbcl*, *matK*, and *phyA* Genes, with Special Reference to Differentiation of Chromosome Numbers, *System Bot*, 2006 ; 31(3) : 481-92.
- White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, In PCR protocols: A guide to methods and applications, San Diego : Academic Press, 1990 : 315-322.
- Sonnante G, Galasso I, Pignone D, ITS sequence analysis and phylogenetic inference in the genus

- Lens* Mill, Ann Bot, 2003 ; 91 : 49–54.
21. Gulbitti–Onarici S, Sancak C, Sumer S, Ozcan S. Phylogenetic relationships of some wild wheat species based on the internal transcribed spacer sequences of nrDNA, Curr Sci, 2009 ; 96 : 794–800.
  22. Pandey AK, Ali MA. Molecular markers in plant systematics I: nuclear sequences. In: Plant Sciences Research in India: Challenges and Prospects, India : Botanical Survey of India, 2006 : 21–36.
  23. Choo BK, Moon BC, Ji Y, Kim BB, Choi G, Yoon T, Kim HK. Development of SCAR markers for the discrimination of three species of medicinal plants, *Angelica decursiva* (*Peucedanum decursivum*) *Peucedanum praeruptorum* and *Anthriscus sylvestris*, based on the internal transcribed spacer (ITS) sequence and random amplified polymorphic DNA (RAPD). Biol Pharm Bull, 2009 ; 32 : 24–30.
  24. Mondini L, Noorani A, Pagnotta MA. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. Diversity, 2009 ; 1 : 19–35.
  25. Haque I, Bandopadhyay R, Mukhopadhyay K. Intraspecific variation in *Commiphora wightii* populations based on internal transcribed spacer (ITS1–5.8S–ITS2) sequences of rDNA, Diversity, 2009 ; 1 : 89–101.
  26. Zuo Y, Chen Z, Kondo K, Funamoto T, Wen J, Zhou S. DNA barcoding of *Panax* species, Planta Med, 2010 ; 77 : 182–7.
  27. Zhang YB, Shaw PC, Sze CW, Wang ZT, Tong T. Molecular authentication of Chinese herbal materials. J Food Drug Anal, 2007 ; 15 : 1–9.
  28. Shiba M, Kondo K, Miki E, Yamaji H, Morota T, Terabayashi S, Takeda S, Sasaki H, Miyamoto K, Aburada M. Identification of medicinal *Atractylodes* based on ITS sequences of nrDNA, Biol Pharm Bull, 2006 ; 29 : 315–20.
  29. Xie H, Huo K, Chao Z, Pan S. Identification of crude drugs from Chinese medicinal plants of the genus *Bupleurum* using ribosomal DNA ITS sequences, Planta Med, 2009 ; 75 : 89–93.
  30. Lee SKY, Li PT, Lau DTW, Yung PP, Kong RYC, Fong WF. *Phylogeny* of medicinal *Phyllanthus* species in China based on nuclear ITS and chloroplast *atpB-rbcL* sequences and multiplex PCR detection assay analysis, Planta Med, 2006 ; 72 : 721–6.
  31. Holck A, Pedersen BO, Heir E. Detection of five novel GMO maize events by qualitative, multiplex PCR and fluorescence capillary gel electrophoresis, Eur Food Res Technol, 2010 ; 231 : 475–83.
  32. Mori K, Sakamoto Y, Mukojima N, Tamiya S, Nakao T, Ishii T, Hosaka T. Development of a multiplex PCR method for simultaneous detection of diagnostic DNA markers of five disease and pest resistance genes in potato, Euphytica, 2011 ; 180 : 347–55.
  33. Kim MJ, Kim SH, Kim TS, Kee HY, Seo JJ, Kim ES, Park JT, Chung JK, Lee BK, Lee JE. Molecular Genetic Characterization of Shiga Toxin-producing *E. coli* Isolated from Diarrhea Patients and Cattle in Gwangju Area, Korea J Bacteriol Virol, 2009 ; 39 : 79–95.
  34. Lee MY, Doh EJ, Kim ES, Kim YH, Ko BS, Oh SE. Application of the Multiplex PCR Method for Discrimination of *Artemisia iwayomogi* from Other Artemisia Herbs Biol. Pharm Bull, 2008 ; 31 : 685–90.
  35. Ajzenberg D, Collinet F, Mercier A, Vignoles P, Darde ML. Genotyping of *Toxoplasma gondii* Isolates with 15 Microsatellite Markers in a Single Multiplex PCR Assay, J Clin Microbiol, 2010 ; 48 : 4641–5.