

RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)법을 이용한 한약재의 판별 연구

김대원* 김도균* 안선경* 조동욱*

서론

한약재의 판별은 현재까지 주로 외부 형태와 해부학적 특징 및 이화학적 분석에 의존하여 이루어져 왔다. 그러나 식물체의 형태는 복잡한 대사 경로의 최종 결과로서 유전적으로 독립된 다른 변화가 유사한 형태의 변화로 나타날 수 있는 경우가 있으므로, 계통학적으로 완전히 다른 식물이 유사한 형태를 나타낼 수도 있다. 특히 식물체의 일부분만이 사용되는 한약재의 경우, 원형의 전체적인 특징을 비교할 수 없기 때문에 일부 특정 부위만을 대상으로 식물 종(種)을 구별하는 것이 거의 불가능한 경우가 많다. 특히 한약재가 절편으로 유통되는 경우는 그 판별이 더욱 어려워진다. 일반적으로 이화학적인 분석 방법의 대상이 되는 식물체의 2차 대사산물은 식물체의 생육환경에 따라 차이를 나타내기 때문에, 단순한 이화학적인 분석에 의한 한약재의 판별은 정확성을 지닌 판단의 척도가 되기 어려운 경우도 있다. 그러나 동·식물체의 유전적 성질은 환경에 따라 변화되지 않고 유전에 의하여 전달되는 고유한 정보이기 때문에 유전물질인 핵산(DNA)의 분석은 식물체의 분류 또는 종(種)간 구별에 훌륭한 도구로서 활용되고 있다.^{1) 3)}

생물체의 속(屬)과 종(種) 수준에서 판별에 이용되는 분자생물학적 방법으로는 cpDNA의 RFLP·rDNA의 RFLP·염기서열 결정·nuclear DNA의 RFLP·PCR-based fingerprinting·hybridization-based fingerprinting, alloenzyme 등이 있다.^{4) 6)} PCR 기법을 이용한 DNA fingerprinting의 한 방법인 Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD)법은 하나의 random primer를 이용하여 증폭된 DNA 단편의 다형성을 분석하는 방법으로, 최근 생물 분류에 많이 이용되고 있다.^{7) 8)} RAPD법은 적은량의 DNA를 사용하여 빠른 시간 안에 분석을 할 수 있으며 동위원소등의 위험한 물질을 다루지 않아도 된다는 장점을 가지고 있다. Yoshihiro등⁹⁾은 건조된 인삼뿌리에서 DNA를 분리하고 Panax 속내에서의 RAPD를 비교하였고, Shaw등¹⁰⁾은 Panax 속을 AP-PCR과 RAPD법으로 분석하여 재배연수에 관계없이 동일한 RAPD 형태를 나타내며 종(種)간에 차이를 나타내는 독특한 DNA pattern을 보고하였다. 따라서 임상에서 상용되는 한약재중 고가이며 희소가치가 있고, 진품을 판별하기 어려운 산삼과 웅담등의 약재를 판별하고 그 진품판정을 위한 목적으로 유전자 분석법을 이용하고자 하였다. 이러한 한약재의 진품판정에 유전자를 이용한 판별법의 적용은 향후 한약재의 품질검사를 위한 객관적이며 절대적인 기준을 마련하고 나아가서 한약의 과학화를 위한 기반기술의 확립에 많은 도움이 되리라 생각된다.

* 한국한의학연구원 임상연구부

재료 및 방법

한약재 판별을 위한 식물성 약재로는 산삼의 진위 판별 및 외국(특히 중국)에서 재배된 고려인삼과 우리나라에서 재배된 고려인삼과의 판별을 위한 유전적 분석방법을 마련하기 위해서 인삼류의 시료를 선정하였다. 그리고 모든 생물체의 제놈 DNA가 개체간의 차이는 있으나 같은 개체내에서는 부위와 조직에 상관없이 일정하다는 사실에 근거하여 동물성 약재인 웅담의 진위판별을 위한 표준품으로 곰의 혈액을 사용하였고, 시중에 유통되고 있는 웅담조직의 시료를 비교시료로 사용하였다.

한약재료의 선정

인삼류의 시료로는 인삼연초연구원에서 분양받은 국내산 고려인삼(*Panax ginseng*), 상지대 학교 한의학과 본초학교실에서 분양받은 재배산삼인 장뇌, 일본재배 고려인삼은 일본 국립위생시험소 약용식물 재배시험장에서 채취한 수삼, 중국재배 고려인삼은 국내의 인삼 협동조합 중앙회에서 분양받은 백삼을 사용하였다. 외국삼은 캐나다 온타리오에서 야생하는 서양삼(*Panax quinquefolium*)과 재배삼, 일본 국립위생시험소 약용식물 재배시험장에서 채취한 일본삼(*Panax japonicus*: 죽절삼), 중국 중의연구원 중약연구소에서 분양받은 중국삼(*Panax notoginseng*: 삼칠삼)을 이용하였다(Table 1). 유전자 분석을 위한 웅담의 표준 시료로는 서울대공원 동물원에서 분양 받은 반달곰(*Ursus thibetanus*)·유럽 불곰(*Ursus arctos*) 및 미국 흑곰의 혈액(*Ursus americanus*)을 사용하였고 시중에서 유통되고 있는 웅담(*Fel Ursi*)을 구입하여 비교 시료로 사용하였다(Table 2).

한약재에서 제놈 DNA 분리, 추출

수집된 약재가 건조된 뿌리·신선한 조직·건조된 조직·혈액등 각기 다른 형태와 특성을 지니고 있어 동일한 방법으로 DNA를 분리할 수 없었다. 따라서 DNA의 분리 및 추출을 위한 여러 방법들¹¹⁾중 각 시료에 적당한 방법을 이용하여 DNA를 분리하였다.

인삼 및 출로부터 DNA의 분리

인삼으로부터 DNA의 분리는 Dellaporta 등의 방법¹²⁾을 시료에 따라서 적절하게 응용하여 사용하였다. 먼저 액체 질소로 동결한 인삼시료를 막자사발로 곱게 분쇄하고 2g의 시료를 25ml의 EB 완충용액(1% CTAB, 50mM Tris(pH8.0), 1mM 1,10-phenanthroline, 0.7% NaCl, 1% β -mercaptoethanol)과 섞고 65℃에서 1시간 동안 반응한다. 반응액에 20ml의 chloroform를 첨가하여 잘 섞은 다음 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액의 2/3배의 isopropanol을 첨가하여 침전된 DNA를 취하고 70%의 ethanol로 세척하였다. 공기중에서 건조된 DNA를 TE (10mM Tris, 1mM EDTA)나 3차 증류수에 녹였다. 분리된 DNA는 음이온 교환 칼럼 크로마토그래피

(DNeasy Plant Mini DNA isolation Kit, Qiagen)를 이용하여 순도를 높였다. 분리된 DNA의 순도는 280nm와 260nm에서 흡광도의 비율로 측정하여 그 비율이 1.7 이상인 것만을 사용하였으며 DNA의 농도는 fluorometer (DyNA Quant 200, Hoefer)를 이용하여 측정하였다.

Table 1. *Panax* species used for genetic analysis.

Species	Abbr.	Sample's state	Locality
<i>Panax ginseng</i>	Pa 1	fresh, whole root	Korea
	Pa 2	fresh, whole root	Korea
	Pa 3	dried, whole root	Japan
	Pa 4	dried, whole root	China
<i>Panax quinquefolium</i>	Pa 5	fresh, whole root	Canada
	Pa 6	fresh, whole root	Canada
<i>Panax japonicus</i>	Pa 7	fresh, whole root	Japan
<i>Panax notoginseng</i>	Pa 8	dried, whole root	Chian

* Pa 1 : 국산 고려인삼, Pa 2 : 국산 야생삼(장뇌), Pa 3 : 일본산 고려인삼
 Pa 4 : 중국산 고려인삼, Pa 5 : 북미삼(야생삼), Pa 6 : 북미삼(재배삼)
 Pa 7 : 일본삼(죽절삼), Pa 8 : 중국삼(삼칠삼)

** Abbr. : Abbreviation

Table 2. *Ursus* species used for genetic analysis.

Species	Abbr.	Sample's state	Origin
<i>Ursus thibetanus</i>	U 1	whole blood	Korea
<i>Ursus americanus</i>	U 2	whole blood	America
<i>Ursus arctos</i>	U 3	whole blood	Europe
<i>Fel Ursi</i>	U 4	dried, vesica biliaris	Korea
<i>Fel Ursi</i>	U 5	dried, vesica biliaris	Korea
<i>Fel Ursi</i>	U 6	dried, vesica biliaris	Korea

* U 1 : 반달곰, U 2 : 미국 흑곰, U 3 : 유럽 불곰, U 4, U 5, U 6 : 유통 웅담

** Abbr. : Abbreviation

응답 및 곰 혈액으로부터 DNA의 분리

응답의 유전적 분석을 위한 표준시료로 사용한 곰 혈액으로부터 DNA는 Blin등의 방법¹³⁾을 이용하여 아래와 같이 분리 추출하였다. 혈액 2ml에 4ml의 RBCL 완충용액(Red blood cell lysis buffer ; 10mM Tris-Cl (pH 8.0), 10mM NaCl, 10mM MgCl₂)을 넣고 잘 섞은 다음 3,000rpm에서 원심분리하여 적혈구를 제거하고 침전물인 백혈구를 취하였다. 백혈구 침전물에 lysis buffer(10mM Tris-Cl (pH 8.0), 1mM EDTA, 100mM NaCl, 1% SDS, 200 μ g/ml proteinase K) 1ml를 넣고 56 $^{\circ}$ C에서 2-3 시간 배양하였다. 1ml의 phenol을 첨가하여 잘 흔들어 준 다음 8,000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 취하고, 여기에 phenol 대신 phenol-chloroform을 첨가하고 위의 방법을 반복하였다. 그 결과 얻어진 상층액에 2ml의 cold ethanol을 넣고 섞은 다음 DNA의 침전물이 생기는 것을 확인하였다. DNA 침전물을 유리 막대로 잘 건져 eppendorf tube에 옮긴 다음 건조시켜서 100-200 μ l 3차 증류수에 용해시켰다.

시중에서 구입한 건조된 응답조직(Fel Ursi, gall bladder)에서 DNA 분리는 Gross-Bellard 등의 방법¹⁴⁾을 변형하여 이용하였다. 500~700mg의 응답조직을 digestion 완충용액(100mM NaCl, 10mM Tris-Cl(pH8.0), 25mM EDTA (pH8.0), 0.5%(w/v) SDS, 0.1mg/ml proteinase K) 과 섞은 후 homogenizer로 분쇄하였다. 분쇄한 조직을 50 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 반응하고 동량의 phenol/chloroform으로 처리하여 반응액내의 단백질을 변성시켰다. 원심분리하여 얻은 상등액에 1/10배의 Sodium acetate와 3배의 ethanol을 첨가하여 DNA를 침전시켰다. 70%의 ethanol로 세척한 뒤 RNase를 함유한 TE 완충액에 녹여 RNA를 제거하였다. DNA의 순도가 낮은 경우에는 음이온 교환 칼럼 크로마토그래피(DNeasy Plant Mini DNA isolation Kit, Qiagen)를 이용하여 분쇄물을 제거하였다.

분리된 DNA의 순도는 280nm와 260nm에서 흡광도의 비율로 측정하여 그 비율이 1.7 이상인 것만을 사용하였으며 DNA의 농도는 fluorometer(DyNA Quant 200, Hoefer)를 이용하여 측정하였다.

전기영동

분리한 제놈 DNA와 PCR에 의해 증폭된 RAPD 분석을 위해 horizontal slab agarose gel에서 TBE(89mM Tris base, 89mM boric acid, 2mM EDTA) 완충용액을 사용하여 전기영동 하였다. 전기영동한 gel은 ethidium bromide로 염색하고 ImageMaster VDS(Pharmacia Biotech.)를 이용하여 사진을 촬영하고 분석하였다.

Table 3. Primers used for RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) analysis.

Primer	Sequence
P1	5'-CAGGCCCTTC-3'
P2	5'-TGCCGAGCTG-3'
P3	5'-AGTCAGCCAC-3'
P4	5'-AATCGGGCTG-3'
P5	5'-GGTCCCTGAC-3'
P6	5'-GAAACGGGTG-3'
P7	5'-GGGTAACGCC-3'
P8	5'-GTGATCGCAG-3'
P9	5'-CAGCACCCAC-3'
P10	5'-AGGTGACCGT-3'
P11	5'-AGCCAGCGAA-3'

RAPD 분석을 위한 PCR 조건

RAPD 분석에 사용한 random primer는 Yoshihiro 등(9)이 인삼의 비교분석을 위해 사용한 10 nucleotide구성된 11개의 primer를 이용하였다(Table 3). 인삼 및 옹담 DNA의 RAPD를 위한 반응액은 50ng의 DNA를 template로 사용하고 총 50ul의 volume으로 제조하였으며, 그 조성은 다음과 같다; 10X 반응완충액 5ul, 1.5mM MgCl₂, 0.25mM dNTP, 20pmol primer, 2.5U Taq polymerase(Takara co.). PCR 반응은 Perkin Elmer 사의 GeneAmp PCR system(model 2400)을 이용하였으며, 반응액을 93℃에서 5분간 pre-denaturation한 후, 93℃ 45초·41℃ 50초·72℃ 40초로 40cycle 반응시켰다.

결과 및 고찰

인삼류 약제로부터 DNA의 분리 및 추출

수집된 인삼류 시료는 신선한 뿌리 조직과 건조된 뿌리조직의 형태였으며, 제놈 DNA 추출을 위해 분쇄기로 뿌리조직을 분쇄한 후, 액체질소로 동결하고 막자사발을 이용하여 미세하게 마쇄하였다. CTAB법으로 DNA를 분리·추출하였으며 음이온 교환 크로마토그래피로 DNA를 정제하였다. 분리한 제놈 DNA를 agarose gel 전기영동으로 확인한 결과, 제놈 DNA가 분해된 시료가 많이 있었다(Fig. 2). 건조되지 않은 약재에서 분리한 제놈 DNA는 Fig. 1과 같이 전혀 분해되지 않은 양호한 상태를 나타냈으며 건조된 뿌리시료에서 분리한 제놈 DNA는 약재에

따라 DNA의 분해도가 높은 것과 낮은 것으로 나뉘어 나타났다.

이러한 결과로 미루어 보아 식물성 약재의 제능 DNA의 보존 정도는 약재의 보관과 유통상태의 조건에 영향을 받을 수 있는 것으로 추측되며 이것은 약용식물의 제능 DNA 분해와 더불어 약효성분의 분해가능성을 나타낸다고도 볼 수 있다. 따라서 한약재 DNA의 분해도를 한 약재 품질관리시에 유효약효성분 및 지표물질의 농도와 더불어 측정하여 유통 한약재의 품질 기준을 위한 추가기준으로 사용될 수도 있을 것으로 사료되었다.

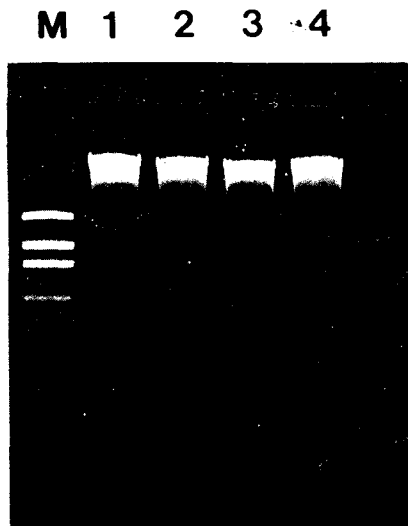


Fig. 1. Genome DNA isolated from fresh root of *Panax* sp.

Lane identification : M; Size marker, lane 1~4; isolated DNA.

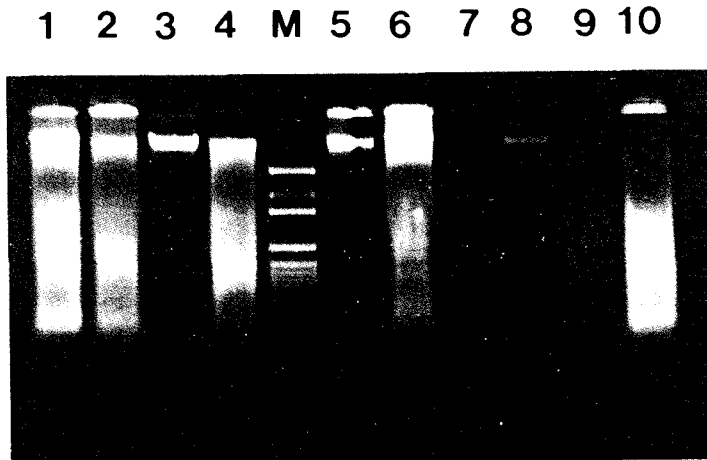


Fig. 2. Genome DNA isolated from dried root of *Panax* sp.
Lane identification : M; Size marker, lane 1~10; isolated DNA.

인삼류 약재의 RAPD

8 종류의 인삼시료에 대해 총 11개의 random primer를 이용하여 RAPD를 실시하고 증폭된 DNA를 전기영동하여 RAPD 결과를 관찰한 결과, 대부분의 시료에서 1개 이상 10여개 정도의 증폭된 DNA band가 나타났으며, 그 크기는 대부분 2kb 이하였다. 비교적 많은 DNA band가 증폭되었기 때문에 전체적인 DNA band pattern의 비교는 적정하지 않다고 판단되어 시료중에 진하게 나타나는 DNA band를 기준으로 각 시료간의 RAPD 결과를 비교하였다.

Primer 1과 primer 10을 이용한 RAPD 1(Fig. 3)과 RAPD 10(Fig. 7)에서는 각각 0.7kb와 0.2kb 크기의 band를 볼 수 있어서 primer 1에 의한 0.7kb band와 primer 10에 의한 0.2kb band는 모든 인삼의 공통적인 marker로 사료되었다. 고려인삼(*Panax ginseng*)과 외국삼(*P. quinquefolium*, *P. japonicus*, *P. notoginseng*)은 primer 3(Fig. 5)을 이용하였을 때 구분이 가능하였는데, 고려인삼의 경우 국내산을 비롯한 중국 및 일본에서 재배된 고려인삼에서 공통적으로 0.9kb 위치에서 독특한 band가 증폭되어, 이 band가 고려인삼만의 특징적인 marker일 것으로 사료되었다. 또한 primer 9를 이용한 RAPD 9(Fig. 6)에서 북미삼(*P. quinquefolium*)은 다른 인삼시료에서는 나타나지 않은 0.8kb의 특징적인 band를 나타내었다. 따라서 우리나라의 산삼, 장뇌와 형태적으로 유사하여 판별이 용이하지 않은 북미 야생삼의 경우는, 본 연구에서 사

용한 primer 3을 이용하여 고려인삼에서만 나타나는 marker의 존재여부와 primer 9를 이용하여 북미삼의 특징적인 marker를 확인함으로써 판별이 가능하리라 판단되었다.

현재 고려인삼은 중국과 일본에서도 재배중인데, 특히 중국에서 재배된 고려인삼(*P. ginseng*)은 저가로 수입되어 국내에서 많이 유통되고 있다. 그러나 국내산 인삼과의 약효유효성분이 비교되지 않았고 최근에는 중국산 수입인삼에서 농약성분의 검출이 문제시되고 있어, 국내산 인삼과의 객관적인 판별을 위한 필요성이 대두되고 있다. 본 실험의 primer 2를 이용한 RAPD 2(Fig. 4)에서는 국내산 고려인삼에서만 0.8kb와 1.5kb 크기의 위치에서 독특한 DNA band가 발견되었다. 따라서 이것을 고려인삼만을 구분해낼 수 있는 primer 3과 함께 이용하면 일본산, 중국산 고려인삼과 국내산 고려인삼과의 유전적인 판별이 가능하리라고 생각되었다.

Shaw등¹⁰⁾은 RAPD법을 이용하여 *P. ginseng*, *P. quinquefolium*, *P. notoginseng*등을 판별할 수 있다고 보고하였으며, Yoshishiro등⁹⁾도 *P. ginseng*, *P. quinquefolium*, *P. japonicus*에서 RAPD법으로 독특하게 증폭되는 DNA band를 보고한 바 있다. 하지만 본 연구결과에서는 위에서 언급한 *Panax* 속(屬)의 네 가지 종(種)을 모두 비교하여 각종을 분류할 수 있는 DNA marker를 검색할 수 있었다. 또한 고려인삼간에도 일본과 중국에서 재배된 것과 국내에서 재배된 인삼간에 차이점을 발견할 수 있었다.

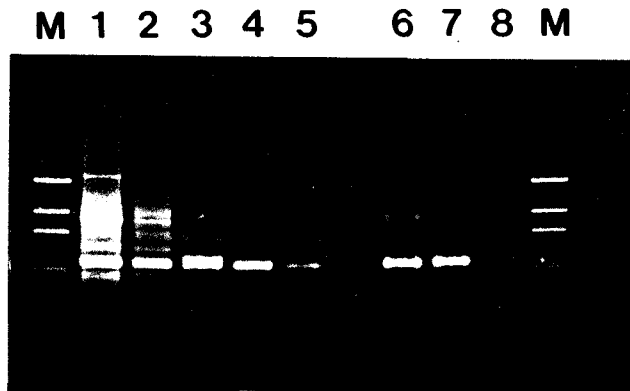


Fig. 3. Random amplified polymorphic DNA patterns of *Panax* species by random primer P1(RAPD 1). Lane identification : M; Size marker, lane 1; Pa 1, lane 2; Pa 2, lane 3; Pa 3, lane 4; Pa 4, lane 5; Pa 5, lane 6; Pa 6, lane 7; Pa 7, lane 8; Pa 8.

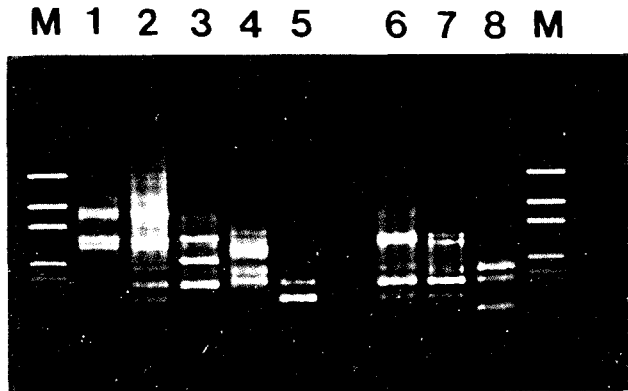


Fig. 4. Random amplified polymorphic DNA patterns of *Panax* species by random primer P2(RAPD 2). Each lane is identical as described in Fig. 3.

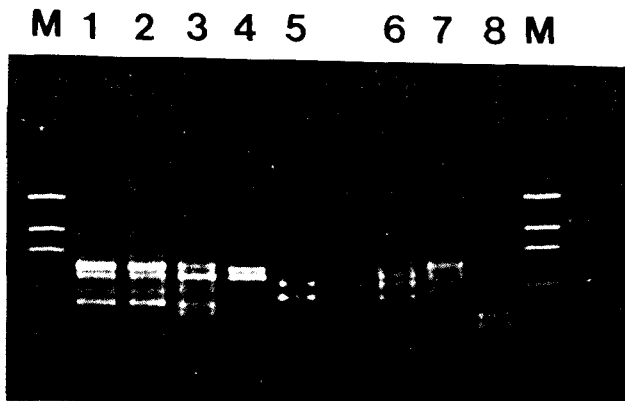


Fig. 5. Random amplified polymorphic DNA patterns of *Panax* species by random primer P3(RAPD 3). Each lane is identical as described in Fig. 3.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 M

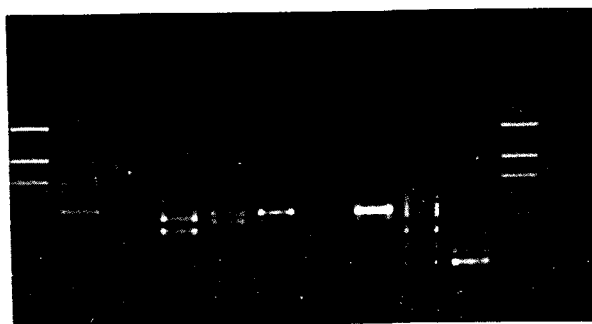


Fig. 6. Random amplified polymorphic DNA patterns of *Panax* species by random primer P9 (RAPD 9). Each lane is identical as described in Fig. 3.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 M

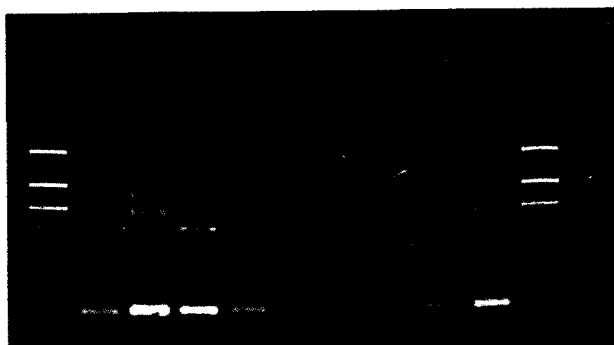


Fig. 7. Random amplified polymorphic DNA patterns of *Panax* species by random primer P10 (RAPD 10). Each lane is identical as described in Fig. 3.

응답(곰 혈액)의 RAPD

제놈 DNA는 개체간의 차이는 있으나 한 개체내에서는 부위에 상관없이 일정하다는 사실에 기초하여 응답의 유전적 분석을 위한 표준시료로는 곰의 혈액을 선택하였고 비교시료로는 유통되는 응답을 사용하여 응답의 진품판별을 위한 유전적 분석을 RAPD법을 이용하여 실시하였다. 혈액으로 분양받은 유럽 불곰(*Ursus arctos*)·반달곰(*Ursus thibetanus*) 및 미국 흑곰(*Ursus americanus*)등의 시료에서는 제놈 DNA를 쉽게 분리할 수 있었으나, 시중에 유통되고 있는 응답은 시료의 상태가 각각 달라 제놈 DNA의 분리가 용이하지 않았다. 따라서 응답조직에서 DNA를 분리한 후 전기영동으로 확인하여 DNA의 상태가 양호한 시료만을 선택하여 RAPD를 수행하였다.

인삼에서 사용한 11개의 primer(Table 3)를 이용하여 3개의 곰 혈액 DNA와 3개의 응답 DNA의 RAPD를 실시하였다. Primer 4·5·6에 의한 RAPD 4·5·6의 결과로 볼 때, 반달곰과 흑곰간의 RAPD pattern은 비교적 유사하게 나타났으며 불곰의 경우는 그 pattern이 다르게 나타났다.(Fig. 8·9·10). 응답시료중 5번 시료의 제놈에서 증폭된 DNA pattern은 4·6번 응답 DNA에서 증폭된 DNA pattern과는 많은 차이가 나타났는데, 이는 5번 응답의 제놈 DNA의 분해에 의한 것이거나, 이 시료가 곰의 응답이 아닌 다른 동물의 쓸개 혹은 다른 장기일 가능성이 있다고 판단되었다.

Primer 8번을 이용한 RAPD 분석(Fig. 11)에서 혈액 DNA의 RAPD pattern이 각기 다른 다형성을 보여 본 실험에서 사용한 3종(種) 곰의 구분을 위한 primer로 이용가능성을 보였으며 응답시료 중 4·6번의 RAPD pattern이 반달곰과 동일한 pattern을 나타내었다. 따라서 primer 5·10번을 이용하여 곰의 특징적인 RAPD를 확인하고 primer 8번을 이용하여 반달곰·흑곰·불곰의 DNA를 확인함으로써 시중에 유통되거나 수입되어온 응답의 진위와 유래를 판별할 수 있을 것으로 기대되었다.

【색인어】 한약재, 유전자 분석, RAPD, 인삼, 응답

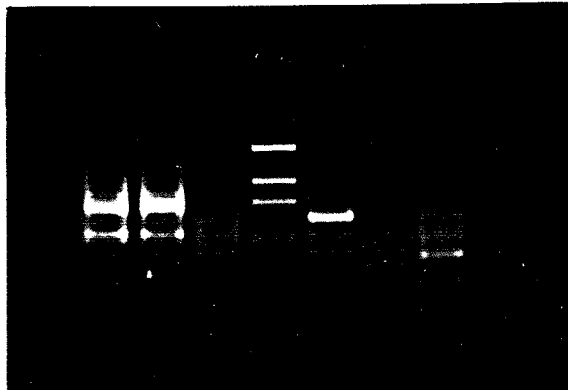


Fig. 8. Random amplified polymorphic DNA patterns of *Ursus* species and *Fel Ursi* by random primer P4 (RAPD 4). Lane identification : M; Size Marker, lane 1; U 1, lane 2; U 2, lane 3; U 3, lane 4; U 4, lane 5; U 5, lane 6; U 6

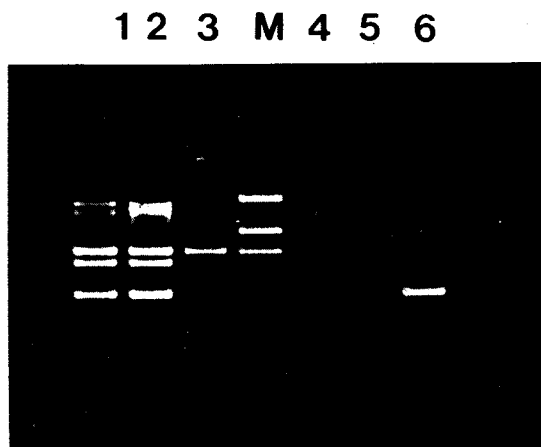


Fig. 9. Random amplified polymorphic DNA patterns of *Ursus* species and *Fel Ursi* by random primer 5 (RAPD 5). Each lane is identical as described in Fig. 8.

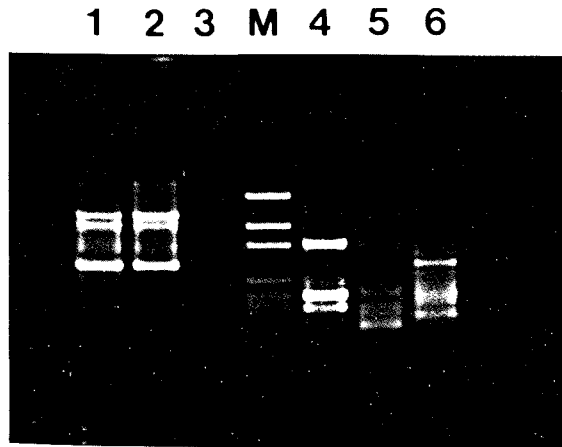


Fig. 10. Random amplified polymorphic DNA patterns of *Ursus* species and *Fel Ursi* by random primer 6 (RAPD 6). Each lane is identical as described in Fig. 8.



Fig. 11. Random amplified polymorphic DNA patterns of *Ursus* species and *Fel Ursi* by random primer 8 (RAPD 8). Each lane is identical as described in Fig. 8.

참고 문헌

1. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 'Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes phylogenetics'. 『In PCR protocols: A guide to methods and application』. San Diego: Academic press, 1990: 315-322.
2. Ruth, J. L., and Fain, S. R. 'The 'indivisualization' of large North American mammals'. 『EXS.』 1993: 67: 429-436.
3. World Society for the Protection of Animals. 'Is it really from a bear?' -A simple method for identifying bear gall bladder.
4. hamby, R. K., and E. A. Zimmer. 'Plant Syst.』 『Evol.』 1988: 160: 29-37.
5. Tanksley, S. D., Young, N. D., Paterson, A. H., and Bonierbale, M. W. 'RFLP mapping in plant breeding. new tools for an old science.』 『Bio/technology』 1989: 7: 257-264.
6. Young, N. D. 'Restriction fragment length polymorphisms and crop improvement.』 『Expt Agric.』 1992: 28: 385-397.
7. Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S. V. 'DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.』 『Nucl. Acid Res.』 1990: 18: 6531-6535.
8. Weising, K., Nybom, H., Wolf, K., and Meyer, W. 'DNA fingerprinting in Plant and Fungi.』 USA: CRC press, 1995: 5-7.
9. Yoshihiro, O., Hitodhi, W., Kayo, Y., and Koichiro, S. 'A rapid method for genomic DNA preparation from dried material of genus Panax ginseng for PCR analysis.』 『Natural Medicine』 1996: 50(1): 24-27.
10. Shaw, P. C., P. B. Paul. 'Authentication of Panax Species and their Adulterants by Random-Primed Polymerase chain Reaction.』 『Planta Med.』 1995: 61: 466-469.
11. Fushimi, H., Komatsu, K., Isobe, M., and Namba, T. '18S ribosomal RNA gene sequence of three Panax species and the corresponding ginseng drug.』 『Biol. Pharm. Bull.』 1996: 19(11): 1530-1532.
12. Dellaporta, S. L., Wood, J., and Hicks, J. B. 'A plant DNA minipreparation: Version II.』 『Plant Mol. Biol. Rep.』 1983: 1(4): 19.
13. Blin, N. and Stafford, D. W. 'A general method for isolation of high molecular DNA from eukaryotes.』 『Nucleic Acids Res.』 1976: 3: 2303.
14. Gross-Bellard, M., Oudet, P., and Chambon, P. 'Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells.』 『Eur. J. Biochem.』 1972: 36: 32.

= **ABSTRACT** =

Identification and classification study of natural products by RAPD analysis

Kim Dae-Weon, PhD* Kim Do-Kyun* An Sun-Kyong* Cho Dong-Wuk, PhD*⁵²⁾

Conventionally, identification and classification methods of natural products include the morphological survey and assay of chemical disposition, Using these methods, however, is not satisfying for the precise identification of natural products because they are often variable in the compositions and morphology. To standardize the natural products identification and classification, genomic DNA analysis such as RAPD, RFLP and Amp-FLP can be adopted for this purpose.

In this study, various ginsengs and bear gall bladder were tested for the development of genetic identification and classification method. Varieties of ginsengs such as, *P. ginseng*, *P. quinquefolium*, *P. japonicus* and *P. notoginseng*, were genetically analyzed by RAPD. Also, DNA isolated from Bear blood and gall bladder, *Ursus thibetanus*, *Ursus americanus* and *Ursus arctos*, were analyzed by the same method. The results demonstrated that the identification and classification of bear gall bladder and various ginsengs were possible by RAPD analysis. Therefore, this method was thought to be used as a additional method for the identification and classification of other natural products.

【Key words】 natural products, genetic analysis, RAPD, Ginseng, bear gall bladder

* Korea Institute of Oriental Medicine