

地黃의 18S rRNA 유전자 염기서열의 분석 및 분류학적 연구

배영민*, 배은하¹, 신동민²

창원대학교 미생물학과, 1: 대전국제학교, 2: 국제한의원

Determination of the DNA Sequence of the 18S rRNA Gene of the *Rehmannia glutinosa* and Its Phylogenetic Analysis

Young-Min Bae*, Rebecca E. Bae¹, Dong-Min Shin²

Department of Microbiology, Changwon University, Changwon, Kyungnam, Korea

1: Taejeon Christian International School, Taejeon, Korea

2: Kukje Clinic of Oriental Medicine, Masan, Kyungnam, Korea

ABSTRACT

Objectives : To determine the DNA sequence of the 18S rRNA gene of the *Rehmannia glutinosa* and analyze it phylogenetically

Methods : Dried root of the *Rehmannia glutinosa* was ground with a mortar and pestle. Glass beads(0.5 mm in diameter), TE buffer and SDS solution were added to that. The mixture was vortexed vigorously and extracted with the mixture of phenol, chloroform and isoamyl alcohol and with the mixture of the chloroform and isoamyl alcohol. The nucleic acids were precipitated with ethanol and resuspended in TE buffer. Contaminating RNA was digested with RNAse A and the DNA was purified further with the GeneClean Turbo Kit. This DNA was used as a template for amplification of the 18S rRNA gene by PCR. The PCR product was cloned in the pBluescript SK II plasmid by blunt-end ligation and the DNA sequence of the insert was determined. This DNA sequence was analyzed phylogenetically by the BLAST program.

Results and Conclusion : Vortexing the ground powder of the dried plant root with glass beads during cell lysis improved recovery of DNA. The DNA sequence of the *Rehmannia glutinosa* 18S rRNA gene was determined and deposited at the GenBank as the accession number DQ469606. Phylogenetic analysis of that sequence showed the relationship between the members of the family of Scrophulariaceae and also the close relationship of the *Buddleja davidii* to the members of the Scrophulariaceae family.

Key words : *Rehmannia glutinosa*, 18S rRNA, PCR, Phylogenetic analysis.

서 론

현재 우리나라에서 한약재의 원료로 많이 재배되고 있는 지황(*Rehmannia glutinosa*)은 중국이 원산지인 귀화식물로서, 현삼과(Scrophulariaceae)로 분류되고 있으며, 그 꽃줄기는 높이가 15-18cm이고, 6-7월에 꽃줄기 끝에 총狀의 꽃이 피는 다년초이다.^{1,2)} 이러한 지황의 뿌리를 말린 것을 地黃이라 하며, 한약재로 널리 사용하고 있다. 地黃은 포제 방법에 따라 生地黃, 乾地黃 그리고 熟地黃의 형태로 사용되고 있다. 막 캐낸 신선한 지황 뿌리를 生地黃, 말린 것을 乾地黃, 그리고 속과 껍이 검게 되고, 윤기가 흐르며 질이 부드럽고 연하며 점조하게 될 때 까지 술에 찌고 말리는 것을 반복한 것을 熟地黃이라고 한다.^{1,3)}

生地黃은 지황의 신선한 뿌리줄기를 채약한 후 모래에 저장한 것으로 길이가 약 6-18cm이고, 지름이 약 0.5-1cm의 방추형 혹은 원기둥 모양으로 만곡되어 있으며, 끝면은 황갈색으로 꺾어지기 쉽고 단면은 육질로 담황색이며 菊花心 모양이다.^{1,3)} 生地黃은 性味가 寒·甘苦하여 清熱涼血 生津潤燥의 효능으로 사용하며, 乾地黃은 性味가 微寒·甘苦하여 滋陰清熱 涼血補血의 효능으로 사용한다. 熟地黃은 性味가 溫·甘하여 補血滋陰 益精填髓의 효능으로 사용한다.³⁾

地黃은 iridoid glycoside, amino acid, carbohydrate, sesquiterpene, phenol성 물질, monoterpene, norcarotenoid 등의 성분을 함유하며, 熟地黃은 stachyose, verbascose, mannotrinose, raffinose, sucrose, glucose, fructose, galactose 등의 당류 및 catalpol, vitamin A, arginine, mannitol, sitosterol 등이 소량으로 함유되어 있다고 보고되어 있다.^{3,4)}

생명체들의 진화적 차이를 비교하기 위해서는 현재 원핵생물들은 16S rRNA의 염기서열, 그리고 진핵생물의 경우에는 18S rRNA의 염기서열을 비교하고 있다.⁵⁾ 하지만 현재 지황의 경우에는 18S rRNA의 염기서열이 전혀 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 지황(*Rehmannia glutinosa*)의 18S rRNA의 완전한 염기서열을 밝혀내고, 이것을 진화적으로 근접한 다른 식물들의 18S rRNA의 염기서열과 비교해 봄으로써 이들 간의 진화적 연관성에 대해서 조사해보았다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용된 한국산 地黃은 경남 마산시 소재의 한의원들에 한약재를 주로 공급하고 있는 제약사를 통해서 수집되었다.

2. 방법

1) DNA 추출

막자사발을 이용하여 地黃을 분쇄하였다. 미세하게 분쇄된 地黃 분말 0.3g을 50ml 용량의 polypropylene tube에 넣고, 여기에 직경이 0.5mm인 glass beads 3ml를 첨가하였다. 여기에 4ml의 TE buffer(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA)와 2ml의 10% SDS를 첨가하였다. 이것을 1분 동안 최고속도로 vortex하였다. 여기에 6ml의 phenol·chloroform·isoamyl alcohol(25:24:1) 혼합액을 첨가하고 다시 한 번 더 vortex하였다. 이것을 20°C에서 9,700 x g의 원심력으로 SS-34 rotor를 사용하여 10분간 원심분리하였다. 상등액을 chloroform·isoamyl alcohol(24:1) 혼합물로 한 번 더 추출하였다. 최종 상등액은 3 M sodium acetate 및 ethanol로 침전시킨 후, pellet을 TE buffer에 녹였다. 여기에 RNase A를 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 유지시켰다. 이것을 Qbiogene의 GeneClean Turbo Kit를 사용하여 정제하였다.

2) PCR Amplification

PCR 반응을 위해서는 DNA template 200 ng, forward primer 2.5 pmol, reverse primer 2.5 pmol, dNTPs mixture 2μl (10 nM each) 그리고 *Pfu* DNA polymerase 1μl (3 U)를 포함하는 100 μl의 반응액에서 반응을 진행하였다. PCR 반응에 사용된 forward primer 및 reverse primer는 Table 1 및 Fig. 1에 표시하였다 (3). 반응조건은 94°C에서 2분간 한 cycle, 그리고 94°C에서 1분, 58°C에서 1분, 72°C에서 3분씩 30 cycle을 진행시킨 후, 최종적으로 72°C에서 10분간 유지시켰다.



Fig. 1. The locations of the two primers used for amplification of the 18S rRNA gene. The forward primer is shown above and the reverse primer shown below. Abbreviations are 18S for 18S rRNA gene, ITS for internal transcribed spacer, and 5.8S for 5.8S rRNA gene.

Table 1. Primers used for amplification of the 18S rRNA gene.

Primer	Sequence
Forward	5'-TTTAGATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'
Reverse	5'-TTTAAAGCTTCCAAGTATCGCATTTCGCT-3'

3) Cloning and DNA Sequencing

PCR 산물은 agarose gel electrophoresis로 분석하여 예상되는 크기의 산물이 생성된 것을 확인한 후에 Promega의 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System으로 정제하였다. 이렇게 정제된 DNA는 *Sma* I으로 절단된 pBluescript SK II plasmid와 섞어서 ligation 반응을 진행시킨 후, *Escherichia coli* DH5 α competent cell을 transformation 시키는 데에 사용되었다. Transformed cells는 ampicillin(100 μ g/ml)을 함유하는 MacConkey agar plate에 도말되었다. 흰색의 colony들로부터 plasmid DNA가 추출되었고, agarose gel electrophoresis를 통해서 예상되는 크기의 insert DNA가 포함되어있는 것을 확인한 후, 염기서열 분석이 수행되었다.

4) Phylogenetic Analysis of the DNA Sequences

얻어진 염기서열은 GenBank의 BLAST program 및 Baylor College의 ClustalW를 이용하여 분석하였다.⁶⁾

결과 및 고찰

地黃으로부터 DNA의 추출. 地黃을 막자사발에서 분쇄하여 가루로 만든 후, 0.3g의 분말로 부터 DNA를 추출하였다. 이때에 glass beads를 첨가하고 vortex를 하였더니 그렇게 하지 않았을 때보다 더 많은 DNA를 얻을 수 있었다 (data not shown). 추출된 DNA의 순도를 확인하기 위하여 OD₂₆₀/OD₂₈₀의 비율을 측정 한 결과, 1.94로 나타났다.

地黃 DNA를 사용한 PCR. 地黃으로부터 추출된

DNA를 template로 하여 PCR을 수행하였다. 이때에 사용된 forward primer는 18S rRNA gene들의 5'-ends의 conserved region을 target으로 하여 제조되었다.⁷⁾ 현삼과 식물들의 18S rRNA genes에서 존재하지 않는 제한효소 *Bgl*II의 인식부위를 forward primer의 5'-말단에 첨가하여서 cloning시에 사용할 수 있도록 하였다. Reverse primer는 5.8S rRNA의 중간부위를 target으로 하여 제조되었는데, 역시 cloning시에 사용하기 위하여 현삼과 식물들의 18S rRNA gene, 5.8S rRNA gene 그리고 사이의 intergenic transcribed spacer에 존재하지 않는 *Hind* III의 인식부위를 첨가하였다. PCR에는 error가 많이 발생하는 *Taq* DNA polymerase 대신에 error가 훨씬 적게 발생하는 *Pfu* DNA polymerase를 사용함으로써 반응 중에 DNA sequence가 변경되는 것을 최소화 하였다.⁸⁾ 이렇게 얻어진 PCR 산물을 agarose gel electrophoresis를 통하여 분석한 결과, 예상한 대로 약 2.1-kb의 DNA가 Fig. 2와 같이 관찰되었다. 또한 PCR 중에 발생할 수 있는 error의 영향을 최소화하기 위하여 insert가 서로 다른 방향으로 삽입되어있는 plasmid들을 콜라내어서 두 plasmid들의 염기서열을 모두 분석하고 비교해서 서로 일치 하는 것을 확인하였다.

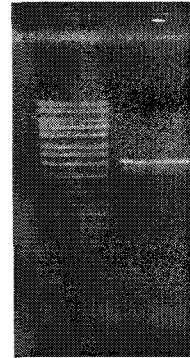


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of the PCR product. Lane 1, 1-kb ladder; Lane 2, PCR product. The lengths of the DNA markers in the 1-kb ladder are 10-kb, 8-kb, 6-kb, 5-kb, 4-kb, 3-kb, 2.5-kb, 2-kb, 1.5-kb, 1-kb, 0.7-kb, 0.5-kb, 0.3-kb from the top.

Phylogenetic analysis of the 18S rRNA gene of the *Rehmannia glutinosa*. 본 연구에서 *Rehmannia glutinosa*의 18S rRNA 유전자의 염기서

열을 밝혀내어 GenBank에 등록하였다(accession number DQ469606). 본 연구에서 밝혀진 염기서열은 18S rRNA 유전자의 coding sequence인 1,803-bp로서, nucleotides의 조성은 A+T가 901개, 그리고 G+C가 902개로서 G+C 함량은 50%로 나타났다. 또한 지황의 염기서열을 BLAST search한 결과, *Avicennia marina* (Verbenaceae, 마편초과), *Paulownia tomentosa* (Scrophulariaceae, 현삼과), *Conopholis alpina* (Orobanchaceae, 열대과), *Buddleja davidii* (Loganiaceae, 마전과) 등의 식물들과 높은 score를 나타내었다. 따라서 이러한 식물들 외에 추가로 현삼과에 속하는 *Pedicularis racemosa*(구름송이풀) 및 *Verbascum thapsus*(우단담배풀)를 추가하여 ClustalW 1.8을 사용하여 multiple sequence alignment를 수행하였다. 이 자료를 가지고 phylogenetic tree를 그린 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에 의하면 phylogenetics를 이용한 분류결과가 기존의 분류결과와 대체적으로 일치하는 것을 알 수 있다. 그러나 마전과에 속하는 *Buddleja davidii*가 현삼과 식물들과 높은 유사성을 보인다는 것이 예상하지 못했던 결과이었다. Taskova et al.은 phylogenetic 분류 결과와 chemosystematic 분류 결과는 서로 잘 일치하지만, 이러한 결과들이 기존의 분류 결과와는 서로 일치하지 않는 점이 많음을 현삼과에 속하는 *Veronica*속 식물들을 분석함으로써 밝혔다.⁹⁾ 따라서 형태에 주로 의존하는 기존의 분류방법을 보완 또는 대체하는 방법으로 18S rRNA 유전자의 염기서열을 이용하면 좀 더 정확한 분류가 될 것으로 판단된다.

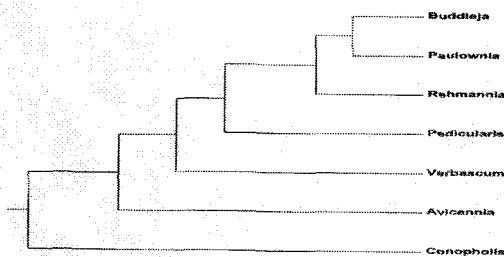


Fig. 3. Rooted phylogenetic tree based on the 18S rRNA sequences for *Rehmannia*

Dong et al.은 널리 쓰이고 있는 한약재인 황기(*Astragalus*)의 5.8S rRNA spacer, ITS 및 18S rRNA 유전자의 염기서열을 2003년에 완전히 밝혀냈다.¹⁰⁾ 또한 Zhao et al.은 2003년에 中國當歸, 韓國當歸, 日本當歸의 5S rRNA의 spacer region의 염기서

열을 완전히 밝혀내서 비교하였다.¹¹⁾ 한 편 국내에서는 최 등이 2004년에 위의 세 가지 當歸의 ITS region의 염기서열을 밝혀내어 서로 비교하였다.¹²⁾ 그러나 현재까지 地黃의 18S rRNA 유전자의 염기서열은 전혀 알려진 것이 없었고, phylogenetics를 연구할 때에 가장 많이 사용되는 염기서열이 원핵생물인 경우에는 16S rRNA, 진핵생물인 경우에는 18S rRNA 임을 감안할 때에 地黃의 18S rRNA의 염기서열을 완전히 밝혀내는 것이 지황과 다른 식물들과의 진화적 연관성을 연구하는 데에 의미있는 것임을 알 수 있다.⁵⁾

지황에서 발견된 물질들 중에서 catalpol은 iridoid glycoside의 일종으로서 현재까지 neuroprotection, anti-inflammatory activity 및 wound healing activity를 가지는 것으로 밝혀져 있다.^{4,13,14)} 그러나 이러한 물질들이 지황 이외의 다른 식물들에서도 발견되고 있음을 감안할 때에 본 연구에서 얻어진 결과를 이용하여 지황과 진화적으로 가까운 식물들을 찾아내고, 그러한 식물들을 화학적으로 분석해 봄으로써 여러 가지 유용한 신물질의 발견, 또는 약용식물들의 품종개량에 기여할 수 있으리라고 여겨진다. 또한 지리적으로 다양한 지역에서 채취된 지황의 18S rRNA 유전자를 분석해 보는 것도 가치가 있는 연구일 것으로 생각된다.

결 과

건조된 지황의 뿌리로부터 DNA를 추출할 때에 파쇄된 분말에 glass bead를 첨가하고 vortex하였더니 DNA의 회수율이 높게 나타났다. 이렇게 얻어진 DNA는 PCR 반응시 template로 사용하는 데에 전혀 문제가 없음을 확인하였다. 본 연구에서는 지황(*Rehmannia glutinosa*)의 18S rRNA 유전자의 염기서열을 최초로 밝혀내고, 그것을 GenBank에 등록하였다 (accession number DQ469606). 이 염기서열을 분자분류학적으로 분석한 결과, 지황을 포함하는 현삼과(Scrophulariaceae) 식물들간의 유사성을 확인할 수 있었고, 또한 마전과(Loganiaceae)에 속하는 *Buddleja davidii*가 현삼과 식물들과 높은 유사성을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

감사의 글

This research was financially supported by the Changwon University in 2005.

참고문헌

1. 박종희. 한국약초도감. 서울: 신일상사. 2004:1201-2.
2. 이창복. 원색대한식물도감. 서울: 향문사. 2003:183.
3. 朱梅芬, 홍선표, 김정숙, 이제현. HPLC를 이용한 地黃의 분석 방법 연구. 대한본초학회지 2003;18:203-9.
4. Li, D. Q., Li, Y., Liu, Y., Bao, Y. M., Hu, B., An, L. J. Catalpol prevents the loss of CA1 hippocampal neurons and reduces working errors in gerbils after ischemia-reperfusion injury. *Toxicol* 2005;46:845-51.
5. Olsen, G. J. and Woese, C. R. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J*. 1993; 7: 113-123.
6. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997;25:3389-3402.
7. Wada, H. and Satoh, N. Details of the evolutionary history from invertebrates to vertebrates, as deduced from the sequences of 18S rRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994;91:1801-4.
8. Cline, J., Braman, J. C., Hogrefe, H. H. PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*. 1996;24:3546-51.
9. Taskova, R. M., Albach, D. C., Grayer, R. J. Phylogeny of Veronica - a combination of molecular and chemical evidence. *Plant Biol*. 2004;6:673-82.
10. Dong, T. T. X., Ma, X. Q., Clarke, C., Song, Z. H., Ji, Z. N., Lo, C. K. and Tsim, K. W. K. Phylogeny of Astragalus in China: molecular evidence from the DNA sequences of 5S rRNA spacer, ITS, and 18S rRNA. *J. Agric. Food Chem*. 2003;51: 6709-6714.
11. Zhao, K. J., Dong, T. T. X., Tu, P. F., Song, Z. H., Lo, C. K. and Tsim, K. W. K. Molecular genetic and chemical assessment of radix Angelica (danggui) in China. *J. Agric. Food Chem*. 2003;51:2576-83.
12. 최호영, 최영주, 이제현, 함인혜. 당귀류 한약재 감별을 위한 ITS 부위의 염기서열 및 AFLP 분석. *대한본초학회지* 2004;19:91-9.
13. Recio, M. C., Giner, R. M., Manez, S., Rios, J. L. Structural consideration on the iridoids as anti-inflammatory agents. *Planta Med*. 1994;60:232-4.
14. Stevenson, P. C., Simmonds, M. S., Sampson, J., Houghton, P. J. and Grice, P. Wound healing activity of acylated iridoid glycosides from *Scrophularia nodosa*. *Phyther. Res*. 2002;16:33-5.