

Random Amplified Polymorphic DNA 분석을 이용한 한속단과 천속단의 감별

이미영, 육진아, 김홍준¹, 김영화, 채병찬, 고병섭

한국한의학연구원, ¹우석대학교 한의과대학

Discrimination of *Phlomis Radix* and *Dipsaci Radix* using the Random Amplified Polymorphic DNA Analysis

Mi-Young Lee, Jin-Ah Ryuk, ¹Hong-Jun Kim, Young-Hwa Kim, Byoung-Chan Chae, Byoung-Seob Ko,

Korea Institute of Oriental Medicine, ¹Woosuk University

As a result to amplifying 12 samples of "Sok-dan" through an random amplified polymorphic DNA (RAPD) method using eighteen UBC and URP primers, distinct band forms enabling discrimination of *Phlomis umbrosa* and *Dipsacus asperoides* were observable in the UBC 320 primer, UBC 367 primer, UBC 385 primer, UBC 414 primer, UBC 423 primer, URP 3 primer, URP 5 primer and URP 9 primer. The polymorph result amplified with a random primer was evaluated through Gelcompar II, showing a result dividable into two groups. The divided groups were the dried sample group of *Dipsacus asperoides* and the group of *Phlomis umbrosa*. In order to recognize the distinction between *Dipsaci Radix* types, the genetic variation of "Sok-dan" produced domestically and imported was evaluated through RAPD, and the potential to distinguish these in forms of dried medicine was identified, presenting a method to authentication of *Phlomis umbrosa* and *Dipsacus asperoides*.

key words : *Dipsaci Radix*, *Phlomis Radix*, discrimination, random amplified polymorphic DNA(RAPD), genetic analysis

I. 서 론

속단(續斷)은 꿀풀과(一科 Labiatae)에 속하는 다년생 초이다. 키는 50~150 cm 쯤 자라고 전체에 잔털이 있고 뿌리에 비대한 덩이뿌리가 5개 정도 달려 있고 네모진 줄기는 곧추서며 달걀꼴의 잎이 마주 난다. 연한 붉은 빛이나 보랏빛 꽃이 여름철에 피는데 우리나라의 북부 산악지대

를 빼고는 산기슭 어디서나 흔하게 자라며, 강장·진통·소염제로 사용되어져 왔다¹⁾.

속단의 기원에 있어서 중국(중국약전, CP)은 토끼풀과(Dipsacaceae)의 천속단(*Dipsacus asperoides* C.Y.Cheng et T.M.Ai)의 뿌리를, 한국(대한약전의 생약규격집, KHP)은 꿀풀과(Labiatae)의 속단(*Phlomis umbrosa* Turcz.)의 뿌리, 일본은 국화과(Compositae)의 *Cirsium*속 식물의 뿌리로 기재되어 있다^{2,3)}. 속단의 이명으로 속절, 접골, 천속단으로 불리기도 하는데⁴⁾ 우리나라는 산토끼꽃(*Dipsacus japonicus* Miq)을 포함하고 있고, 중국은 천속단(*Dipsacus asperoides* C.Y. Cheng et T.M.Ai)만을 인정하고 있다. 현재 속단의 종류로는 천속단, 한속단(*Phlomis umbrosa* Turcz.), 토속단(*Phlomis koraiensis*)등이 있는데 명칭이

□ 접수 ▶ 2007년 2월 23일 수정 ▶ 2007년 4월 2일 채택 ▶ 2007년 4월 16일

□ 교신저자 ▶ 고병섭, 대전광역시 유성구 전민동 461-24 한국한의학연구원

Tel 042-868-9542 Fax 042-863-9434 E-mail bsko@kiom.re.kr

비슷하여 쉽게 구분하기 어렵고, 토속단이 혼용되어 사용될 우려가 있으며, 시중 유통되고 있는 국산속단과 수입속단의 구별이 명확하지 않고 있다. 따라서 속단을 구입할 경우, 천속단과 한속단의 구별없이 판매가 되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 외부형태 특성 및 육안적 관찰 또는 판단으로 판능검사를 실시함으로써 주관적 요인에 의존하고 있는 한약의 구별방법을 PCR (polymerase chain reaction) 분석기술을 이용하여 보다 객관적으로 분석할 수 있는 방법을 개발하고자 한다.

RAPD 방법은 임의의 oligonucleotide primer를 이용하여 핵 DNA를 PCR로 증폭하여 생성된 다양한 DNA 밴드를 비교하는 방법으로서 유전자 지도 작성⁵⁾, 종의 분류와 유연관계⁶⁾, 유용형질을 탐색할 수 있는 표지인자 개발⁷⁾, 집단유전학의 양적유전형질 분석⁸⁾ 등에 많이 이용되고 있다. 또한 RFLP 방법에 비하여 시간과 노력이 적게들 뿐만 아니라 간편하게 분석할 수 있어 많이 이용되고 있다^{9,10)}. 본 연구에서는 속단으로 이용되고 있는 한속단과 천속단의 구별을 위하여 현재 유통되고 있는 속단을 이용하여 RAPD 분석을 통해 유연관계를 확인해보았으며, 쉽게 구별할 수 있는 primer를 선별하여 이를 이용하여 한약의 감별에 이용하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용된 속단은 종자 및 생체식물과 건조약재를 대상으로 분석하였다. 종자는 자생식물 종자은행(자생식물 이용기술 개발 사업단)으로부터 분양받았으며, 건조약재는 시중 유통되고 있는 국산과 수입산 속단을 구입하여 사용하였다 (Table 1).

2. DNA 추출

분양 혹은 구입된 속단 시료 중 종자시료와 생체시료는 DNA 추출은 액체질소를 사용하여 동결시킨 후 마쇄하였다. 그리고 건조 시료는 막자사발을 이용하여 잘게 부수어 사용하였다.

시료를 Doyle와 Doyle (1987) 방법을 응용하여 DNA를 추출하였다. 소량의 시료를 막자사발에 넣고 미세분말 상

Table 1. List of Phlomis Radix and Dipsaci Radix species used in this study

Medicine Name	Species	Nationality	State	Lane
속단	한속단 Phlomis umbrosa Turcz	Korea	Fresh	1*
			Fresh	2*
		China	Dry	3
			Korea	Fresh
		Dry		5
		Dry		6
		Dry		7
		China	Dry	8
	천속단 Dipsacus asperoides C.Y.Cheng et T.M.Ai	China	Dry	9
			Dry	10
			Dry	11
			Dry	12

* : Seed

태로 마쇄한 후, 분말 시료를 500 µl의 lysis buffer에 넣고 10 µl proteinase K를 첨가한 후 37°C 항온기에서 1시간 처리한 뒤 400 µl의 CTAB 완충용액 [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.7 M NaCl, 50 mM EDTA (pH 8.0), 140 mM β-mercaptoethanol]와 혼합한 다음 65°C 항온기에서 30분 처리한다. phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) 600 µl를 첨가한 후 100번 이상 잘 섞은 후 14,000 rpm, 20°C, 10분간 centrifuge 해준 다음 상층 600 µl와 chloroform:isoamylalcohol (24:1)을 합하여 100번 이상 섞어준 다음 14,000 rpm 20°C, 10분 동안 원심분리 시킨다. 상층액 600 µl를 새 e-tube에 넣고 isopropanol 600 µl를 첨가한 다음 수차례 섞은 뒤 10분간 방치 후 14,000 rpm, 20°C, 10분 동안 원심분리 시킨다. 침전된 DNA를 70 % EtOH로 세척하여 건조시킨다. 건조된 DNA를 20-30 µl TE buffer에 용해하여 10 mg/ml RNase를 첨가하고 37°C 항온기에서 30분간 처리한다. 추출된 DNA를 0.8 % agarose gel에서 전기영동하여 확인한 후, DNA 순도검정 및 정량을 실시하였다 (Nanodrop, USA).

3. PCR 증폭반응

PCR 증폭은 White 등 (1990)에 의해 정해진 primer를 사용하였다. PCR 반응용액은 멸균증류수에 10× buffer (750 mM Tris-HCl (pH 8.8), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1 % (v/v) Tween 20), 200 µM dNTP, 2 mM MgCl₂, Thermoprime Plus Polymerase (AB gene, UK), 10 ng DNA를 혼합하여 총 20 µl로 조성하여 실행하였다. Primer는 20-mer인 URP

9개과 10-mer인 UBC 9개를 사용하였다. PCR은 PTC-200 (MJ Reserch, USA)을 이용하여 94°C에서 5분간 pre-denaturation 한 후 94°C에서 30초 denaturation, 37°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extention을 35회 수행하고 마지막으로 72°C에서 10분간 반응시켰다. 증폭한 산물은 1.5 % agarose gel에서 전기 영동하여 EtBr로 염색한 뒤 관찰하였다.

4. 유연관계 분석

증폭된 DNA band 데이터를 전기영동 패턴 비교 분석용 프로그램 GelCompar II program (USA)을 사용하여 유사성에 따른 유연관계 분석방법으로 dendrogram을 작성하였다.

III. 결과 및 고찰

본 실험에 사용된 속단은 국산 속단 6개 시료와 중국산 속단 6개로 모두 12개의 시료를 사용하였다. RAPD 분석을 위해 추출한 12개의 속단 DNA를 확인한 결과 (Fig. 1.), 생체 시료 (1, 2, 4)가 건조 시료에 비해 DNA purification이 높음을 확인할 수 있었다. Purification이 낮은 건조 시료 DNA는 PCR 수행에 있어 생체시료와 달리 MgCl₂의 농도를 2 mM에서 3 mM로 높여 template DNA와 primer간의 결합력을 증가시켜 그 결과를 확인할 수 있었다. 또한, 건조시료의 농도별 (100 ng, 50 ng, 20 ng, 10 ng, 5 ng)로 PCR을 수행한 결과 각각 URP primer는 10 ng, UBC primer는 5 ng에서 반응을 확인하였다.

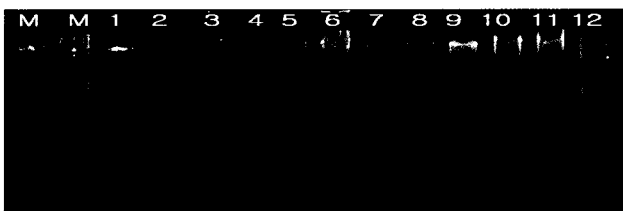


Fig. 1. Genomic DNA of Phlomidis Radix and Dipsaci Radix, M: λ DNA, Hind III.

속단의 종자, 생체 및 건조 시료로부터 추출된 DNA를 UBC primer 9개 (301, 320, 344, 357, 363, 367, 385, 414, 423)와 URP primer 9개 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11)를 사용하여 증폭시킨 결과, 재현성이 높은 URP 3, URP 5, URP 9, UBC 320, UBC 367, UBC 385, UBC 414, UBC 423 primer를

선별하였다 (Fig. 2).

선별된 primer를 이용하여 증폭된 각 primer의 다형성을 확인한 결과, 한속단과 천속단을 구별할 수 있는 다형성 band를 찾을 수 있었다. 특히, URP 5 primer에서 확인된 650 bp, URP 9 primer의 380 bp, 110bp는 한속단과 천속단의 감별마커로 유용하게 이용할 수 있을 것이다 (Fig. 2). 특히, URP 5 primer에서 확인된 650 bp, URP 9 primer의 380 bp, 110 bp 는 한속단과 천속단이 뚜렷하게 구별되었다 (Fig. 2). 선별된 8개의 primer를 이용하여 증폭된 12개의 속단의 다형성 band는 모두 195개를 나타냈으며 평균 25개의 band를 나타냈다. 증폭된 band의 크기는 110-1,500 bp 사이의 범위를 가졌으며 각 개체간의 유전적 동일성 또는 유전적 다형성을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

Table 2. Sequence of primers used in this study

Primers	Sequences (5'-3')	GC content (%)
URP 01	ATC CAA GGT CCG AGA CAA CC	52
URP 02	CCC AGC AAC TGA TCG CAC AC	57
URP 03	GTG TGC GAT CAG TTG CTG GG	57
URP 04	AGG ACT CGA TAA CAG GCT CC	52
URP 05	GGC AAG CTG GTG GGA GGT AC	62
URP 06	ATG TGT GCG ATC AGT TGC TG	48
URP 09	AAT GTG TGG CAA GCT GGT GG	52
URP 10	GAT GTG TTC TTG GAG CCT GT	48
URP 11	GGA CAA GAA GAG GAT GTG GA	48
UBC 301	CGG TGG CGA A	70
UBC 320	CCG GCA TAG A	60
UBC 344	TGT TAG GCA C	50
UBC 357	AGG CCA AAT G	50
UBC 363	ATG ACG TTG A	40
UBC 367	ACC TTT GGC T	50
UBC 385	ACC GGG AAC G	70
UBC 414	AAG GCA CCA G	60
UBC 423	GGG TCT CGA A	60

URP 3 primer에서는 1500 bp, 900 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 110 bp에서 다형성 band를 나타내었으며, *D. asperoides*는 500 bp에서 동일한 band를 보였다 (Fig. 2). URP 5 primer는 1000 bp, 750 bp, 650 bp, 450 bp, 210 bp, 160 bp에서, URP 9 primer는 1000 bp, 700 bp, 500 bp, 380 bp, 300 bp, 200 bp, 110 bp에서, UBC 320 primer에서는 900 bp, 700 bp, 400 bp, 320 bp에서, UBC 367 primer에서는 700 bp, 300 bp, 200 bp에서, UBC 385 primer에서는 600 bp, 500 bp, 450 bp, 400 bp, 300 bp에서, UBC 414 primer에서는 1000 bp, 600 bp, 500 bp 350 bp 그리고 UBC 423 primer에서 800 bp, 600 bp, 550 bp, 320 bp, 250 bp, 200 bp에서 모두 유전적 다형성을 확인하였다 (Fig. 2).

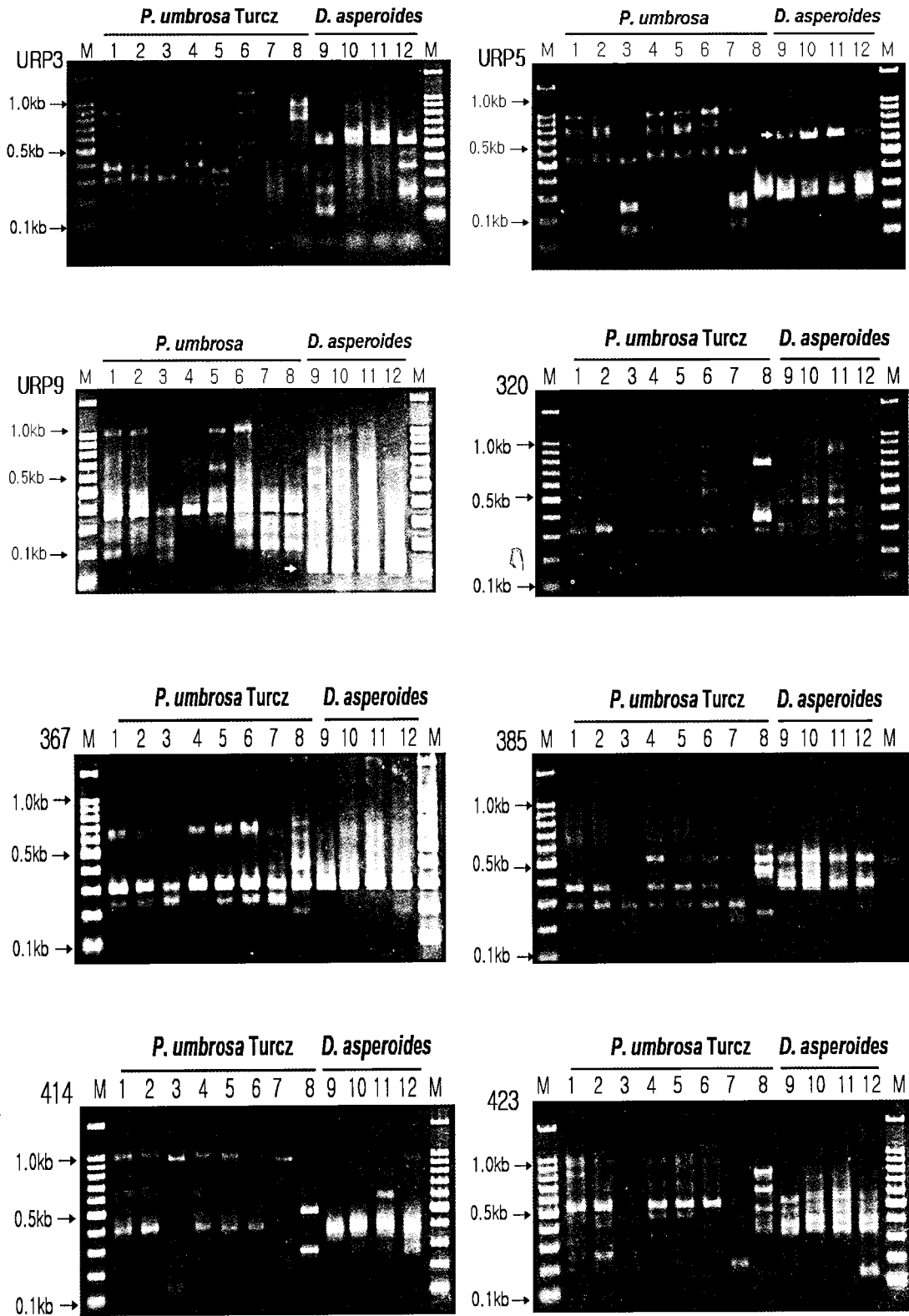


Fig. 2. RAPD polymorphism of *P. umbrosa Turcz* and *D. asperoides*. Number written in bold letter at the upper left side is primer using in the RAPD. Lane 1-12, listed in Table 1. M: 100 bp DNA ladder.

속단 (*Dipsaci Radix*)에 대한 12개 시료를 RAPD 방법으로 증폭하여 Gelcompar II program으로 유연 분석한 결과 다형현상은 각 primer에 따라 10~95%로 나타났으며, 천속단과 한속단은 각각 63%, 57%의 근연관계를 나타내었다 (Fig. 3). 또한 25%의 유연지수기준으로 하여 크게 두 그룹으로 나뉘었다. 그러나 수입산 건조 시료 (lane 3)와 국산 건조 시료 (lane 7)는 천속단과 같은 그룹으로 묶이였으며 근연관계를 나타냈다. 실제로 시중에서 속단을 구입할 경우 천속단과 한속단의 구분없이 모두 속단으로 판매되고 있다는 사실을 확인할 수 있었다. 따라서 정확한 구분없이 유통되고 있는 속단의 구별을 위해 RAPD의 다형성 패턴을 통해 속단을 구별하고자 하였으며, 이에 대한 보다 정확한 구분을 위하여 추후 염기서열분석으로 이를 확인해볼 필요성이 있다.

김등¹¹⁾은 천속단과 한속단의 비교를 TLC (Thin layer chromatography)와 HPLC (High performance liquid chromatography)에 의해 보고하고 있는데, TLC에서는 R_f 0.7의 발색에 의해서 구별할 수 있다고 하였으며, HPLC에 의한 성분분석에서 caffeic acid¹²⁾의 함량은 천속단보다 한속단이 많은 것에 의해 구별할 수 있다고 보고하고 있지만, 이들의 방법은 명확하게 감별을 할 수 없는 것으로 생각된다.

본 연구의 결과에서 얻어진 primer URP 5와 URP 9는 이화학적 방법을 보완하고 보다 명확하게 천속단과 한속단을 구별할 수 있는 방법으로 사료된다.

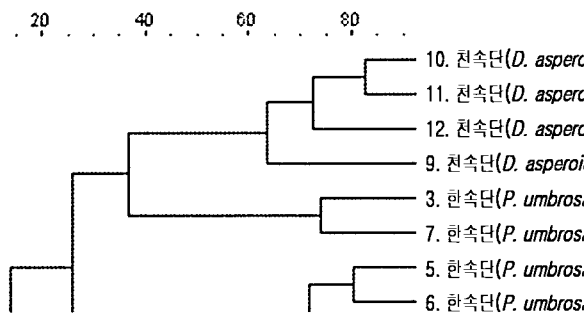


Fig. 3. Dendrogram obtained from *P. umbrosa* and *D. asperoides* based on GelCompar II program.

IV. 결 론

한속단 (*Phlomidis Radix*)과 천속단 (*Dipsaci Radix*)의 12개 시료에 대한 URP primer와 UBC primer를 사용하여 PCR분석을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 속단에 대한 12개 시료를 18개의 primer를 이용한 RAPD 분석 결과, 재현성이 높은 URP 3, URP 5, URP 9, UBC 320, UBC 367, UBC 385, UBC 414, UBC 423 primer가 선발되었다.
2. 선발된 8개의 primer를 이용하여 증폭된 12개의 속단의 다형성 band는 모두 195개를 나타냈으며 평균 25개의 band를 나타냈다. 또한, 증폭된 band의 크기는 110~1,500 bp의 범위를 가졌으며 각 개체 간의 유전적 동일성 또는 유전적 다형성을 확인할 수 있었다.
3. 한속단과 천속단의 종류를 구별할 수 있는 primer는 URP 5, URP 9으로 조사되었으며, URP 5 primer의 650 bp와 URP 9 primer의 380 bp, 110 bp 에서 다형성 band를 확인하였다.
4. RAPD-PCR에 의해 얻어진 dendrogram을 통해 크게 두 개의 군으로 한속단과 천속단이 나뉘어졌으며, 선별된 primer와 유연관계를 통해 속단의 국산속단과 수입속단이 구별됨으로서 향후 이를 통해 감별에 이용할 수 있을 것이다.

V. 참고문헌

1. 식품의약품안전청, 대한약전외한약(생약)규격집, 2002 ; 253, 503
2. 衛生部 藥典委, 중국약전(중약채색도집), 三聯書店, 2000.
3. 지형준, 이상인, 대한약전외한약(생약)규격집주해서, 서울: 한국메디칼인텍스사, 1985.
4. 한국 생약 교수협의회, 본초학(本草學), 사단법인대한약사회, 2002:755-758.
5. Mukai, Y., Y. Suyama, Y. Tsumura, T. Kawahara, H. Yoshimaru, T. Kond, N. Tomaru, N. Kuramoto, and M. Murai, A linkage map for sugi (*Cryptomeria japonica*) based on RFLP, RAPD and isozyme loci, *Theor Appl Genet*, 1995;90:835-840.
6. Kim, K. M, Analyses of Genetic Distance Using RAPDs in Rice, *Korean J. Breed*, 1997;29(3):327-332.
7. Kwon, S. J, S. N. Ahn, J. P. Shu, H. C. Choi, Genetic diversity of Korean Native Rice Varieties, *Korean J. Breed*, 2000;32(2):186-193.
8. Suh, J. P, S. N. Ahn, H. P. Moon, and H. S. Suh, QTL analysis of Low Temperature Germinability in al

- Weedy Rice, *Korea J. Breed*, 1999;31(3):261-267.
9. Kochert, G. RFLP technology, In DNA-based markers in plants. Phillips, R. L. and I. K. Vasil(eds.), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1994;8-38.
10. Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey, DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucl. Acids Res*, 1990;18:6531-6535.
11. 보건복지부, 『표준한약개발 연구 보고서』, 2005;340-344.
12. Kim, S. Y., Kwon, Y. S. and Kim, C. M. Chemical Constituents from *Dipsacus asper*, *Kor. J. Pharmacogn*, 1999;30(4): 420-422.