

꿀풀과 6개종의 Chloroplast 부위 유전자를 이용한 益母草 감별 PCR 분석

이재웅¹, 김영화¹, 최고야¹, 고병섭¹, 김영선¹, 채성욱¹, 이해원¹, 오승은², 박상언³, 이미영^{1*}

1 : 한국한의학연구원 노화연구센터, 2 : 건국대학교 이과대학 생명과학과, 3 : 충남대학교 농업생명과학대학

PCR Analysis for the Discrimination of Leonuri Herba Medicine on the Basis of Chloroplast DNA Sequence Comparison in Six Lamiaceae Species

Jae Woong Lee¹, Young Hwa Kim¹, Goya Choi¹, Byoung Seob Ko¹, Young Sun Kim¹, Sung Wook Chae¹, Hye Won Lee¹, Seung-Eun Oh², Sang Un Park³, Mi Young Lee^{1*}

1 : Aging Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon, Korea,

2 : Department of Biological Sciences, Konkuk University, Seoul, Korea,

3 : Department of Agriculture, Chungnam National University, Daejeon, Korea

ABSTRACT

Objectives : The application of polymerase chain reaction (PCR) for the discrimination of the herbal medicine Leonuri Herba (*Leonurus japonicus*) was evaluated by the comparison of the DNA sequence with Lamiaceae herbal medicine.

Method : Genetic analysis showed that phylogenetic tree and comparing sequences through the DNA analysis of *rbcl* (ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase) region and *trnL-F* (tRNA-Leu, *trnL-trnF* intergeni cspacer, and tRNA-Phe) region of chloroplast DNA from six Lamiaceae sold in market. And we developed IMCF and IMCR primers in order to distinction Leonuri Herba in six Lamiaceae using *rbcl* and *trnL-F* sequences.

Results : Genetic analysis showed that six Lamiaceae showed individual group on phylogenetic tree. PCR amplification product of Leonuri Herba and another five Lamiaceae were developed for amplification of a 281 bp sequence and the specific PCR amplification of a 460 bp sequence that was exclusive to Leonuri Herba was designed using IMCF and IMCR primers.

Conclusion : PCR analysis based on the chloroplast DNA sequences allows the discrimination of Leonuri Herba-based medicine.

Key words : PCR analysis, Chloroplast DNA, *Leonurus japonicus*, Lamiaceae

서론

益母草(Leonuri Herba)는 活血祛瘀藥으로서, 性は 微寒하고 味는 苦辛하여 活血調經·利水消腫하는 효능이 있어 月經不調, 痛經, 經閉, 惡露不盡, 水腫尿少 등을 치료하는 데에 쓰이는 한약재이다¹⁾. 益母草의 기원에 대하여 현행 공정서인 《대한약전 제9개정》²⁾과 《중화인민공화국약전 2010년판》³⁾에서는 “익모초 (*Leonurus japonicus* Houtt.)의 지상부” 로, 《일본약국방 제16개정》⁴⁾에서는 “익모초 (*L. japonicus* Houtt.) 또는 '*L. sibiricus* L.’ 의 개화기의 지상부” 로 각각 정하고 있다. '*L. sibiricus* L.’ 는 익모초의 유사종으로

서 중국에서는 ‘세엽익모초(細葉益母草)’ 라고 한다⁵⁾. 익모초는 한국, 중국 전역, 캄보디아, 일본, 라오스, 말레이시아, 미얀마, 태국, 베트남, 아프리카, 북미 및 남미에 분포하며, 세엽익모초는 중국 하북, 내몽골, 섬서, 산서 지방, 몽골 및 러시아에 분포한다⁶⁾.

익모초를 포함한 꿀풀과 (Lamiaceae) 식물은 세계적으로 200속 3,200여 종이 분포된 것으로 알려져 있다. 국내에는 25속 55여종이 분포되어 있으며 식물 전체에 독특한 향기를 내는 선모로 덮여 있다⁷⁾. 꿀풀과 식물들은 아름다운 꽃과 향기를 지니고 있어 많은 종류들이 관상용으로 재배되거나 기호 식품 및 향료의 원료로 쓰이기도 한다⁸⁾. 꿀풀과에 많이 함유

*교신저자 : 이미영. 한국한의학연구원 노화연구센터.

· Tel : +82-42-868-9504. · Fax : +82-42-868-9301 · E-mail : mylee@kiom.re.kr.

· 접수 : 2011년 4월 26일 · 수정 : 2011년 9월 3일 · 채택 : 2011년 9월 17일

되어있는 천연 정유는 면역성 증강, 항암 및 노화억제 등 약리적인 효과와 항균, 항산화 활성 등을 가지고 있어 의약, 식품 및 화장품에서 이를 이용하려는 연구들이 활발하게 이루어지고 있다⁹⁾. 꿀풀과에 속하는 한약재로는 *Leonurus japonicus* Houttuyn) 외에도 廣藿香 (*Pogostemon cablin* Benth.), 夏枯草 (*Prunella vulgaris* var. *lilacina* Nakai), 丹蔘 (*Salvia miltiorrhiza* Bge.), 薄荷 (*Mentha arvensis* var. *piperascens* Malinv. ex Holm.), 荊芥 (*Schizonepeta tenuifolia* Briq.), 黃芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi), 紫蘇葉 (*Perilla frutescens* var. *acuta* Kudo), 半枝蓮 (*Scutellaria barbata* D. Don) 등이 있는데, 그 외형이 비슷하여 한약재로 쓰이기 위한 유통 과정 중 오용 또는 혼용될 가능성이 있어 정확한 기원의 약재사용에 대한 필요성이 제기되고 있으며 쉽고 명확한 판별법이 요구되어지고 있다.

최근 들어 종간 또는 종 내에서 나타나는 변이를 분자 수준에서 분석하는 방법이 급속히 개발되어지고 있다¹⁰⁾. 식물 유전자원의 분류 및 유연관계를 연구하는 방법으로 식물의 형태적 특성에 의한 군집 분석과 DNA 분석이 많이 이용되어왔으나, 최근에 분자생물학의 발전으로 특정 염기서열의 분석에 의한 분류방법이 개발되어 새로운 분류수단으로 이용되고 있고¹¹⁾, 핵산과 엽록체 DNA의 염기서열 분석을 통해 식물의 계통분류 및 유연관계 분석에 활용하고 있다. 이중 엽록체 DNA의 *trnL*-F 부위를 이용하여 섬기린초의 종내 변이와 지

리적 분포¹²⁾, 한약재 知母의 기원 확인 및 유연관계 분석¹³⁾, 그리고 식물 엽록체 DNA의 *rbcl*, *atpB*, *matK* 부위의 염기서열을 이용하여 식물의 특성을 파악하고 있다¹⁴⁾. 또한 PCR 분석을 통한 한약재의 구별방법을 개발하기 위해 *Artemisiae* 약재로부터 *A. iwayomogi*를 동시에 구별할 수 있는 multiplex PCR 방법을 보고한 바 있고¹⁵⁾, 芍藥類에서 牡丹皮만을 구별할 수 있는 ITS-PCR 방법을 통해 한약을 구별할 수 있는 방법을 제시한바 있다¹⁶⁾.

본 연구에서는 꿀풀과에 속한 한약재인 *Leonurus japonicus*, 廣藿香, 夏枯草, 丹蔘, 薄荷 그리고 荊芥의 chloroplast DNA의 *rbcl* 부위와 *trnL*-F 부위의 염기서열상의 차이를 비교하여 이들 중에서 *Leonurus japonicus*만을 구별할 수 있는 primer를 통해 꿀풀과 중 *Leonurus japonicus*만을 쉽게 감별할 수 있는 PCR 방법을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에서 *Leonurus japonicus*, 廣藿香, 夏枯草, 丹蔘, 薄荷, 荊芥의 *trnL*-F 부위와 *rbcl* 부위를 분석하기 위해 채집된 총 24개의 생체 시료를 실험에 이용하였고 (Table 1), 채집된 시료는 한국한의학연구원에 보관중이다.

Table 1. Lamiaceae species samples used in this study.

Sample Number	Scientific Name	Collected Place	Collection date	Lane
Leonuri Herba 1		Korea	2008. 8. 13	1
Leonuri Herba 2	<i>Leonurus japonicus</i>	Korea	2008. 9. 29	2
Leonuri Herba 3	Houtt.	China	2009. 9. 29	3
Leonuri Herba 4		China	2008. 9. 29	4
Pogostemonis Herba 1		Indonesia	2008. 8. 4	5
Pogostemonis Herba 2	<i>Pogostemon cablin</i>	Indonesia	2008. 9. 23	6
Pogostemonis Herba 3	Benth.	Indonesia	2009. 4. 15	7
Pogostemonis Herba 4		Indonesia	2008. 10. 17	8
Prunellae Spica 1		Korea	2009. 3. 10	9
Prunellae Spica 2	<i>Prunella vulgaris</i> var. <i>lilacina</i>	Korea	2009. 10. 19	10
Prunellae Spica 3	Nakai	China	2007. 6. 5	11
Prunellae Spica 4		China	2009. 6. 5	12
Salviae Miltiorrhizae Radix 1		China	2008. 6. 2	13
Salviae Miltiorrhizae Radix 2	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	China	2008. 8. 4	14
Salviae Miltiorrhizae Radix 3	Bge.	China	2009. 4. 16	15
Salviae Miltiorrhizae Radix 4		China	2009. 10. 19	16
Menthae Herba 1		China	2008. 9. 5	17
Menthae Herba 2	<i>Mentha arvensis</i> var.	Korea	2008. 08. 13	18
Menthae Herba 3	<i>piperascens</i> Malinv. ex Holm.	Korea	2009. 2. 16	19
Menthae Herba 4		Korea	2009. 10. 19	20
Schizonepetae Spica 1		Korea	2004. 9	21
Schizonepetae Spica 2		China	2004. 9	22
Schizonepetae Spica 3	<i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briq.	China	2004. 9	23
Schizonepetae Spica 4		Korea	2004. 9	24

2. DNA 추출

약 100 mg의 시료를 막자사발에 넣고 액체질소를 사용하여 미세분말 상태로 마쇄한 후 Nucleospin[®] Plant II kit (Macherey-Nagel, Germany)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 0.8% agarose gel에서 전기영동 하여 확인한 후, ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Tech, USA)로 DNA 순도검정 및 정량을 실시하였다.

3. Chloroplast 부위의 염기서열 분석

분리된 genomic DNA로부터 chloroplast DNA의 *rbcL*와 *trnL-F* 부위를 분석하기 위해, 각각 *rbcL1F*와 *rbcL1352R*, *trnL-Fc*와 *trnF* primer를 사용하여 염기서열 분석을 위한 PCR을 실시하였다 (Table 2). PCR 조성은 smart 2X PCR pre-mix (Solgent, Korea) 10 ul, DNA 1 ng, 각각의 primer 1 ul를 넣고 최종 20 ul로 하였다. PCR 조건은 95°C에서 2분간 pre-denaturation 한 후 95°C에서 20초 denaturation, 55°C에서 40초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 35회 수행하고 마지막으로 72°C에서 5분간 반응시켰다. 증폭한 산물은 1.5% agarose gel에서 30분간 전기 영동하여 EtBr로 염색한 뒤 관찰하였고, Wizard SV gel and PCR cleanup system (Promega, USA)를 이용하여 정제하였다.

정제된 유전자 증폭 산물을 pGEM T-easy vector (Promega, USA)에 넣고 상온에서 2~3시간동안 ligation 수행 후 형질전환 (transformation) 하였다. LB agar plate에 일정량을 분주하고 37°C 배양기에서 12~16시간 동안 배양하여 white colony만을 선별하고 24시간 배양하였다. 그 후 LB 액체배지로 24시간 배양한 후, 배양액을 원심 분리하여 Plasmid mini-prep Kit (Solgent, Korea)를 이용하여 plasmid만을 분리, 정제하였다.

염기서열의 비교 분석은 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 Blast search한 후 Bioedit (Tom Hall, USA)를 이용하였고, DNASTar Lasergene 7.2 (DNASTar, USA)와 DNASIS[®] MAX-Ver. 2.05 (MiraiBio, USA)를 이용하여 phylogenetic analysis를 실시하였다.

4. 종 특이부위 증폭을 위한 PCR 분석

분석된 *trnL-F*와 *rbcL* 부위의 염기서열을 이용하여 益母草, 廣藿香, 夏枯草, 丹蔘, 薄荷, 荊芥 중 益母草만을 감별하기 위해 primer를 제작하였으며, 그 중 가장 효율이 좋은 IMCF, IMCR, INTF, INTR primer를 선별하였다(Table 2). PCR 조성은 Smart 2X PCR Pre-mix (Solgent, Korea) 15 ul, DNA 5 ng/ul, primer 각 1 ul 넣고 최종 30 ul로 하였다. PCR 조건은 95°C에서 2분간 pre-denaturation 한 후 95°C에서 20초 denaturation, 55°C에서 40초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 25회 수행하고 마

지막으로 72°C에서 5분간 반응시켰다. 증폭한 산물은 1.5% agarose gel에서 30분간 전기 영동하여 EtBr로 염색한 뒤 관찰하였다.

Table 2. PCR primers used in this study.

Primer name	Sequence
<i>trnL-Fc</i>	5' - CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG - 3'
<i>trnF</i>	5' - ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG - 3'
<i>rbcL 1F</i>	5' - ATG TCA CCA CAA ACA GAA AC - 3'
<i>rbcL 1352R</i>	5' - CAG CAA CTA GTT CAG GRC TCC - 3'
IMCF	5' - TGG TGG GAA TTG ATT CTA TA - 3'
IMCR	5' - CCA AGT CCT GCA GCT ATT GA - 3'
INTF	5' - TCC ATT GTA GGA AAT GTA TT - 3'
INTR	5' - CAT CAT CTT TGG TAA AAT CA - 3'

결 과

1. 꿀풀과 6개종의 *trnL-F* 부위 염기서열 비교 분석

꿀풀과에 속하며 널리 쓰이고 있는 한약재인 益母草, 廣藿香, 夏枯草, 丹蔘, 薄荷, 荊芥의 기원을 확인하고 유전적 차이를 확인하기 위해 *trnL-F* 부위의 염기서열 분석을 실시한 결과, 모든 시료에서 870 bp의 동일한 DNA 증폭 단편을 확인할 수 있었다.

염기서열 분석에서 益母草와 廣藿香 시료는 모두 각각 동일한 염기서열을 나타냈다. 한국에서 유통되는 夏枯草는 한국산 (꿀풀, *Prunella vulgaris* var. *lilacina* Nakai)과 중국산 (두메꿀풀, *Prunella vulgaris* L.)으로 구분되는데, 염기서열 분석 결과 한국산은 469 bp와 601 bp에서 C염기, 중국산은 469 bp에서 A염기, 601 bp에서 T염기로 나타나 한국과 중국에서 수집한 夏枯草의 염기서열 부위가 차이를 보임을 확인할 수 있었다. 丹蔘은 분석된 시료에서 모두 같은 염기서열을 나타냈으며 NCBI에 등록되어 있는 丹蔘 (*Salvia miltiorrhiza*, EU220738)과 동일한 염기서열을 나타내었으며, 薄荷 또한 분석된 시료들 모두 동일한 염기서열을 나타냈다. 荊芥는 분석된 시료와 NCBI에 등록되어 있는 荊芥 (*Schizonepeta tenuifolia*, EU186386)가 동일한 염기서열을 지니고 있음을 알 수 있었다.

6개 종 꿀풀과 한약재들의 염기서열 차이를 비교한 결과, 꿀풀과 내에서 6개 종이 각각 명확하게 구별되는 것을 확인할 수 있었다. 그 중 益母草와 가장 큰 유사도를 보이는 한약재는 廣藿香으로 76 bp의 염기서열 차이를 보였고 46 bp의 Gap이 존재해 90% 일치함을 알 수 있었으며 夏枯草는 120 bp의 염기서열 차이와 58 bp의 Gap이 존재해 85%의 유사도를 보여 益母草와 가장 유사도가 적음을 알 수 있었다 (Fig. 1). 이러한 염기서열의 차이는 6개 종 꿀풀과 한약재들의 *trnL-F* 부위 염기서열에서 각 종 (species)을 구분할 수 있는 지표로 활용할 수 있을 것으로 여겨진다.

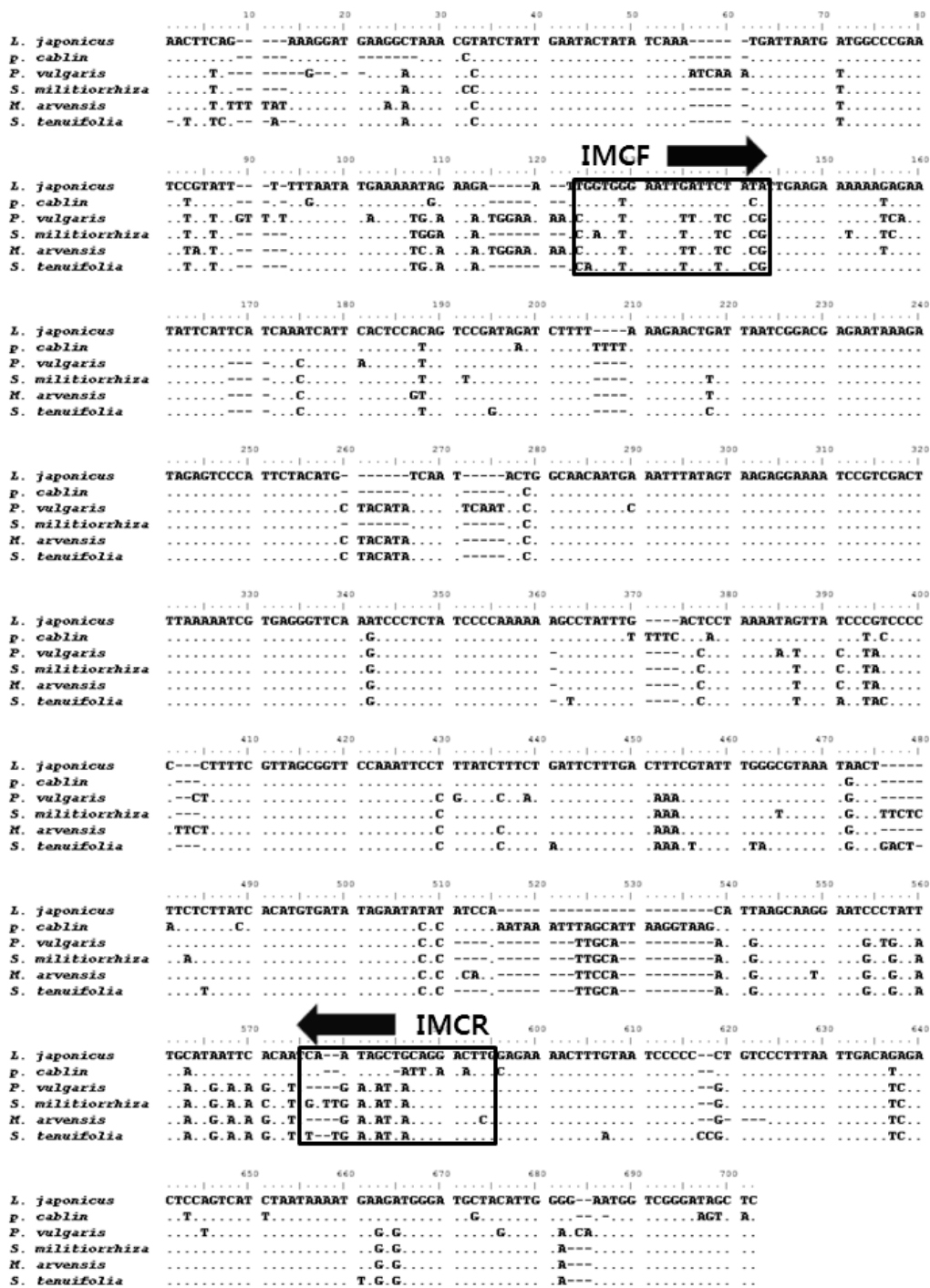


Fig. 1. Comparison of nucleotide sequence of PCR product of six Lamiaceae species amplified using the *trnL-Fc/trrF* primer. The boxed nucleotides indicate a designed primer set for the discrimination of *L. japonicus* in the six Lamiaceae species.

2. 꿀풀과 6개종의 *rbcl* 부위 염기서열 비교분석

같은 시료를 대상으로 *rbcl* 부위의 염기서열 분석을 실시하여 비교한 결과, 분석에 이용된 4개의 益母草는 모두 동일한 염기서열을 나타냈으며 이는 NCBI에 등록된 益母草의 *rbcl* partial sequence (*Leonurus japonicus*, FJ513159)와 서로 100% 일치하였다. 廣藿香은 분석된 시료 모두에서 동일한 염기서열을 나타냈으며 이는 NCBI에 등록되어 있는 廣藿香의 염기서열 (*Pogostemon cablin* Benth., L14406)과

9 bp의 차이를 보여 99%의 유사도를 나타내었다. *trnL-F* 부위와 마찬가지로 夏枯草에서 분석된 *rbcl* 부위의 염기서열을 비교한 결과, 한국산은 622 bp에서 A 염기를 보인 반면 중국산은 G 염기를 보여 *trnL-F* 부위의 염기서열과 동일하게 한국산과 중국산의 염기서열 차이가 있었다. 이들 중 한국산 夏枯草는 NCBI blast 검색 결과 NCBI에 등록되어 있는 夏枯草의 염기서열 (*Prunella vulgaris*, AY395556)과 100% 일치함을 알 수 있었으며, 중국산은 NCBI의 염기서열과 1 bp 차이를 보여 99%의 유사도를 보였다. 丹蔘은 분석된 시

료들 모두 동일한 염기서열을 보였는데, 이들은 NCBI에 등록되어 있는 丹蔘의 *rbcL* partial sequence (*Salvia miltiorrhiza* Bge., FJ513145)와는 2 bp의 염기서열 차이를 보였다. 薄荷의 염기서열은 분석된 시료에서 모두 같은 염기서열을 나타냈으며 이를 NCBI blast search를 이용하여 분석한 결과, 薄荷는 NCBI에 등록되어 있지 않았으며 *M. rotundifolia* (Z37417)와 6 bp의 차이로 99%의 유사도를 나타낸 것을 알 수 있었다. 荊芥는 분석된 시료 모두 동일한 염기서열을 나타냈으며 이는 NCBI에 등록되어 있는 荊芥의 *rbcL* partial sequence (*Schizonepeta tenuifolia* Briq., FJ513155, 703 bp) 염기서열과 100% 일치하는 결과를 나타내었다.

rbcL 부위 염기서열 분석 결과, 여섯 종의 꿀풀과 한약재들 중 荊芥를 제외한 나머지 종(species)은 益母草와 모두 96% 유사도를 보였으나, 荊芥는 益母草와 59 bp의 염기서열 차이와 2 bp의 Gap을 포함하며 95%의 유사도를 보여 *trnL-F* 부위 보다 염기서열의 차이가 적게 나타남을 알 수

있었다.

3. *trnL-F* 부위와 *rbcL* 부위의 유연관계 분석

분석된 6개 종 꿀풀과 한약재들의 *trnL-F* 부위의 염기서열을 이용하여 유연관계를 분석한 결과, 각각 종별로 같은 그룹을 형성하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 그 중 益母草는 廣藿香과 가장 가까운 유연관계를 보였으며, 薄荷와는 가장 먼 유연관계를 보였다. 또한 夏枯草는 한국산과 중국산이 같은 그룹 내에서 산지별로 구별이 되었다 (Fig. 2).

rbcL 부위 염기서열 분석을 통한 꿀풀과 6개종의 유연관계를 확인한 결과, 각 종별로 6개의 그룹을 형성하고 있었으며 益母草는 廣藿香과 가장 먼 유연관계를 나타냈고 丹蔘과 가장 가까운 유연관계를 나타내어 *trnL-F*에서의 유연관계와 동일함을 알 수 있었다. 또한 夏枯草는 *trnL-F*와 마찬가지로 한국산과 중국산으로 지역별 차이를 보여 각각 다른 그룹을 이루는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

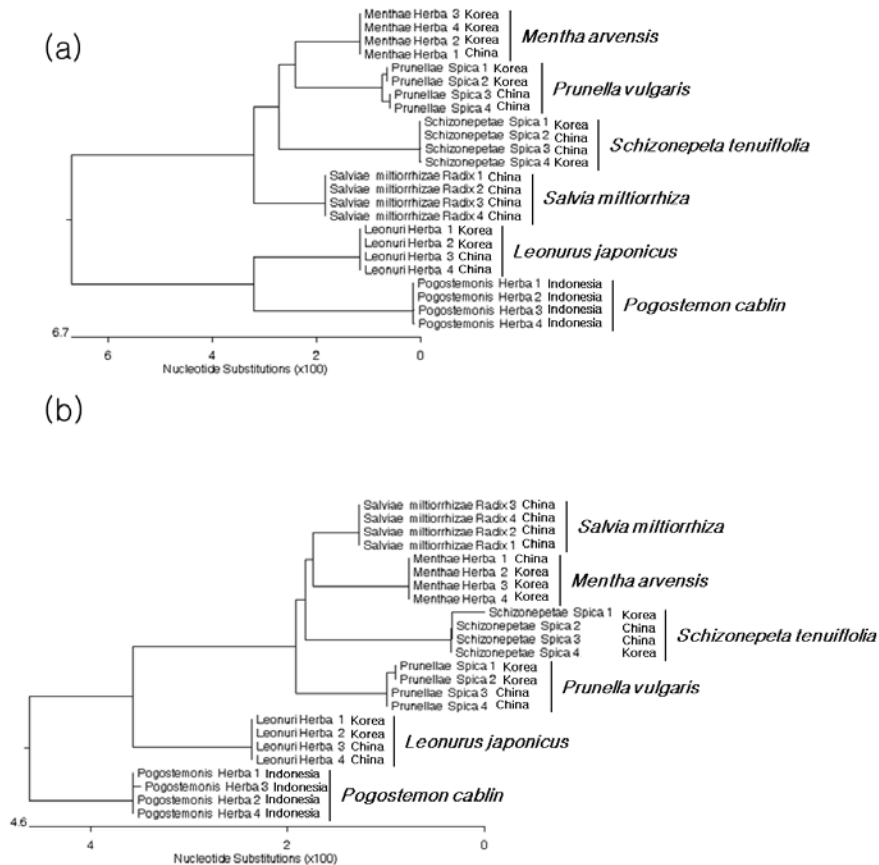


Fig. 2. Phylogenetic analysis of the six Lamiaceae species using chloroplast DNA. (a) Analysis based on sequence data from the *trnL-F* region. (b) Analysis based on sequence data from the *rbcL* region.

4. 특이염기서열을 이용한 益母草 구별 마커 확인

6개 종의 꿀풀과 한약재들 중 益母草만을 구분하기 위한 IMCF와 IMCR primer를 이용하여 확인한 결과, 益母草에서만 460 bp의 PCR product가 생성되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1, 3). 그리고 *trnL-F*와 비교하였을 때 비교적 염기서열의 차이가 적은 *rbcL* 부위를 이용하여 제작된 INTF와 INTR primer는 PCR 분석결과, 여섯 개 꿀풀과 모두 281

bp에서 공통적으로 증폭되었다 (Fig. 4).

제작된 primer들을 이용하여 대상 시료에 적용한 결과, 꿀풀과 6개 시료 모두에서 공통적으로 281 bp의 internal band가 증폭되었고, 益母草에서의 특이 band인 460 bp에서 증폭이 확인되었다. 따라서 6개 종의 꿀풀과 한약재 중 益母草만을 간편하게 구별할 수 있는 특이 구별 primer를 통해 益母草만을 구별할 수 있는 PCR 방법으로 이용할 수 있을 것으로 보인다 (Fig. 5).

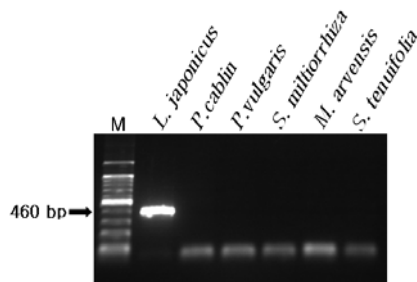


Fig. 3. The PCR product obtained from the six Lamiaceae species using the IMCF and IMCR primers. The 460 bp PCR product was only amplified in *L. japonicus*. M : molecular weight marker.

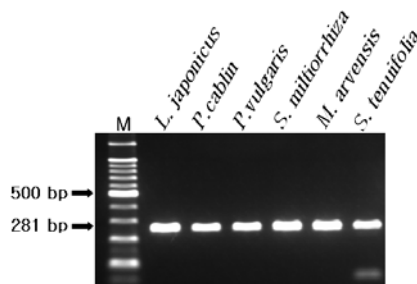


Fig. 4. The PCR product obtained from the six Lamiaceae species using the INTF and INTR primers. The 281 bp PCR product was amplified in all species. M : molecular weight marker.

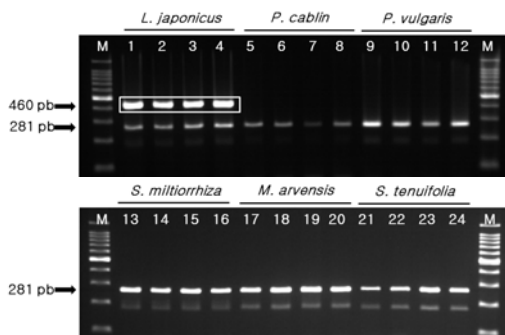


Fig. 5. The PCR product of *L. japonicus* obtained using the IMCF, IMCR, INTF and INTR primers. Lane 1-4 : *L. japonicus* ; lane 5-8 : *P. cablin* ; lane 9-12 : *P. vulgaris* ; lane 13-16 : *S. miltiorrhiza* ; lane 17-20 : *M. arvensis* ; lane 21-24 : *S. tenuifolia*. The 460 bp PCR product was amplified only in *L. japonicus*. The 281 bp PCR product was amplified in all species.

고찰

꿀풀과 한약재를 대상으로 한 기존의 DNA 분석 실험은 주로 종 내에서의 변이를 관찰하기 위한 연구들로 *L. japonicus*, *S. miltiorrhiza*, 그리고 *M. arvensis*에서 AFLP와 RAPD가 이용된바 있다¹⁷⁻²⁰. 이러한 연구들은 종 내에서의 유전적 변이를 확인하여 유전적 유사도의 차이를 보기 위한 실험들인 반면, 본 연구는 6개 종 꿀풀과 한약재들의 chloroplast 부위의 유전자를 분석하여 6개 종 사이의 유연관계를 분석하고 염기서열의 차이를 이용해 이들 중 益母草(*L. japonicus*)만을 구별하기 위한 실험이다.

현재 한약재의 기원 확인 연구와 분류학적 연구에서 chloroplast와 nuclear의 DNA가 많이 이용되고 있다. chloroplast 부위에서는 주로 *rbcL* 부위, *trnL-F* 부위, 그

리고 *matK* 부위가 주로 연구에 이용되고 있으며 nrDNA에서는 ITS 부위가 주로 연구에 이용되고 있다. nrDNA의 ITS 부위는 대부분 모계유전을 하는 chloroplast 부위의 유전자들에 비해서 중간 유전자 변이가 빈번히 이루어지기 때문에 종 내의 변이를 보기 위해 ITS 부위를 더 많이 이용하고 있다. 본 실험에서는 꿀풀과 내에서의 유전자 변이를 확인하고자 하였기 때문에 chloroplast 부위의 *rbcL* 부위와 *trnL-F* 부위의 염기서열을 이용하여 각 시료들의 염기서열 변이를 확인하고 이를 유연관계를 통하여 나타내었다. 이러한 실험은 기존에 *S. tenuifolia*의 기원확인과 유연관계 분석에 chloroplast의 *trnL-F* 부위와 nrDNA의 ITS 부위를 이용한 바 있으며²¹, *Paenonia* 계통의 *P. suffruticosa*와 *P. lactiflora*의 염기서열상 차이를 비교하여 *P. suffruticosa*만을 구별할 수 있는 ITS-PCR 방법을 제시한 바 있다¹⁸. 본 실험에서는 ITS-PCR을 비롯한 실험방법들을 응용하여 꿀풀과 6개종의 유연관계를 분석하였으며 *L. japonicus*만을 구별할 수 있는 PCR 분석법을 제시하였다.

본 연구에서 사용된 chloroplast DNA의 *trnL-F*와 *rbcL* 부위를 이용한 방법은 기존의 RAPD²² 또는 AFLP²³ 방법보다 쉽게 종간의 감별을 할 수 있는 방법으로, 본 연구결과를 통해 꿀풀과 한약재 중 益母草만을 구별하는데 효과적으로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

결론

6개 꿀풀과 한약재의 chloroplast 부위 유전자를 분석하고, 이들 중 益母草만을 구별하기 위한 PCR 분석을 실시한 결과는 다음과 같다.

1. 엽록체의 *trnL-F* 부위 분석 결과, 6개 꿀풀과 한약재는 각 종별로 76 bp에서 120 bp의 차이를 보이며 명확히 구별되는 것을 알 수 있었다.
2. 엽록체의 *rbcL* 부위 분석 결과, 6개 꿀풀과 한약재는 각 종별로 명확히 구분되었으나 그 차이가 *trnL-F* 부위의 염기서열 차이보다 적게 나타남을 알 수 있었다.
3. 엽록체의 *trnL-F* 부위와 *rbcL* 부위의 염기서열을 이용하여 益母草 감별 PCR 분석에 이용될 primer를 제작하여 실험한 결과, 益母草는 460 bp와 281 bp에서 특이적으로 PCR 증폭산물이 생성되는 것을 확인할 수 있었으며, 나머지 5개 꿀풀과 한약재는 281 bp에서만 특이적인 PCR 증폭산물이 생성되는 것을 확인할 수 있었다. 향후 이 연구 결과를 이용하여 다른 혼-오용 한약재의 감별에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청 한약재 과학화사업 (09112한약재890)과 한국한의학연구원(K11101)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Herbology Editorial Committee of Korean Medicine schools, Herbology [Boncho-hak], Seoul : Young-Lim Press, 2004 : 463-4.
2. Korea Food & Drug Administration, The Korean Pharmacopoeia, Ninth Edition, 2007 : 966.
3. State Pharmacopoeia Committee of the People's Republic of China, Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2010 Edition, Beijing : People's Medical Publishing House, 2010 : 272.
4. Ministry of Health, Labour and Welfare of the Japan, The 16th Edition of the Japanese Pharmacopoeia, 2011 : 1591.
5. Wu ZY, Raven PH, eds. Flora of China, Vol. 17(Verbenaceae through Solanaceae). Beijing : Science Press, and St. Louis : Missouri Botanical Garden Press, 1994 : 163.
6. Wu CY, Li HW, eds. Flora Republicae Popularis Sinicae, Vol. 65(2), Beijing : Science Press, 1977 : 508-12.
7. Song YE, Ku CS, Mun SP, Ryu JS, Kim DH, Choi JS, Choi YG. Volatile aroma compounds and their characteristics of *Labiatae* by Solid-Phase Microextraction (SPME), Korean J. Medicinal Crop Sci. 2002 ; 10(2) : 120-5.
8. Lee JC, Choi YH, KIM YH. Essential oils in aerial parts of *Agastache rugosa* O. Kuntze, Korean J. Medicinal Crop Sci. 1994 ; 2(2) : 168-73.
9. Lee BK, Bang JK, Kim JK, Park CB, Kim KS, Kim NH, Song JS, Lee BH. Chemotaxonomy based on essential oil composition in *Elsholtzia ciliata* and *Agastache rugosa* by SDE and headspace, Treat. of Crop Res. 2000 ; 1 : 425-30.
10. Lin JJ, Kuo J, Ma J, Saunders JA, Beard HS, MacDonald MH, Kenworthy W, Ude GN, Matthews BF. Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA mapping techniques, Plant Molecular Biology Reporter, 1996 ; 14(2) : 156-69.
11. Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985 ; 82(20) : 6955-9.
12. Lee W, Park JH. Intraspecific sequence variation of *trnL/F* intergenic region (cpDNA) in *Sedum takesimense* Nakai (*Crassulaceae*) and aspects of geographic distribution, Korean J. Pl. Taxon, 2010 ; 40(3) : 157-62.
13. Kim MK, Baigalmaa J, Sun H, Noh JH, Kim SY, Yang DC. Phylogenetic analysis of Ji-Mo (*Anemarrhena asphodeloides*) on the basis of chloroplast DNA sequences, Korean, J. Medicinal Crop Sci. 2008 ; 16(1) : 20-6.
14. Oh SH, Potter D. Description and Phylogenetic positoin of a new angiosperm family, *Guamatelaceae*, inferred from chloroplast *rbcl*, *atpB* and *matK* sequences, Systematic Botany, 2006 ; 31(4) : 730-8.
15. Lee MY, Doh EJ, Kim ES, Kim YW, Ko BS, Oh SE. Application of the multiplex PCR method for discrimination of *Artemisia iwayomogi* from other *Artemisia* herbs, Biol. Pharm. Bull, 2008 ; 31(4) : 685-90.
16. Lee JW, Kim YH, Ko BS, Ryuk JA, Oh SE, Park SU, Lee MY. ITS-PCR analysis for the discrimination of Moutan Cortex, Korean, J. Medicinal Crop Sci. 2010 ; 18(1) : 40-5.
17. Yu Q, Shen XX, Shen YF, Chen JH, Shi CG, Wang ZA. AFLP analysis of genetic diversity of *Leonurus japonicus* germplasm resources, Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2009 ; 8 : 1296-9
18. Wen CX, Wu ZM, Tian W, Liu M, Zhou QM, Xie XL. AFLP analysis of genetic diversity of *salvia miltiorrhiza* Bge. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2007 ; S2 : 122-5
19. Shasany AK, Darokar MP, Dhawan S, Gupta AK, Gupta S, Shukla AK, Patra NK, Khanuja SPS. Use of RAPD and AFLP markers to identify inter-and intraspecific hybrids of *Mentha*, J. Hered. 2005 ; 96(5) : 542-9.
20. Gobert V, Moja S, Colson M, Taberlet P. Hybridization in the section *Mentha* (Lamiaceae) inferred from AFLP markers, Am. J. Bot. 2002 ; 89(12) : 2017-23.
21. Baigalmaa J, Kim MK, Noh JH, Sun H, Yang DC. Phylogenetic analysis of Schizonepeta Spike on the basis of DNA sequences, Korean J. of Medicinal Crop. Sci. 2009 ; 17(1) : 46-53
22. An SM, Ryuk JA, Kim YH, Chae BC, Kim HJ, Kim KH, Kang KK, Ko BS, Lee MY. Genetic analysis of Polygonati Rhizoma and Polygonati Odorati Rhizoma using random amplified microsatellite polymorphism, Korean J. Medicinal Crop Sci. 2006 ; 14(3) : 125-9.
23. Percifield RJ, Hawkins JS, McCoy JA, Widrechner MP, Wendel JF. Genetic Diversity in *Hypericum* and AFLP Markers for Species-Specific Identification of *H. perforatum* L. Planta Med 2007 ; 73(15) : 1614-21.