

## 유전자 감식에 의한 防風의 감별

최호영, 이상인,<sup>1</sup> 서영배\*<sup>2</sup>

상지대학교 한의과대학, <sup>1</sup>경희대학교 한의과대학, <sup>2</sup>서울대학교 천연물과학연구소

### PCR-mediated RFLP to Identify 'Bangpoong', a Crude Drug

Ho-Young Choi, Sang-In Lee<sup>1</sup> and Youngbae Suh\*<sup>2</sup>

College of Oriental Medicine, Sangji University, Wonju 220-702, Korea;

<sup>1</sup>College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea; and

<sup>2</sup>Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

**Abstract** – Bangpoong (防風) is a popular crude drug used to expel wind from the body surface (祛風解表), to remove dampness (勝濕), and to relieve pain (止痛) and spasm (止痙). In China and Japan, roots of *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. is used as Bangpoong. However, the roots of *Peucedanum japonicum* Thunb. or *Glehnia littoralis* (A. Gray) Fr. Schmidt ex Miquel, being called Sikbangpoong (植防風) and Wonbangpoong (元防風) respectively, are used instead of Bangpoong in Korea. The ITS regions of nuclear ribosomal DNA were analyzed to determine original plants and to design a molecular identification method for the crude drugs used as Bangpoong in Korea and China. It is demonstrated that RFLP analysis via PCR has the great potential as a novel tool to test crude drugs for the quality control and standardization.

**Key words** – Umbelliferae; Bangpoong; ribosomal DNA; PCR; RFLP.

防風은 신농본초경(神農本草經)<sup>1)</sup>上品에 수재된 생약으로서, 辛甘하고 溫한 性味와 祛風解表 勝濕止痛 止痙의 효능으로, 外感風寒으로 인한 頭痛目眩과 周身盡痛 骨節疼痛 四肢攣急 및 風疹癢痒 破傷風 등 증상을 치료하기 위하여 사용되는 것으로 알려져 있다.<sup>2-4)</sup>

현재 중국에서 防風으로 사용되고 있는 식물은 전부 11종이나 되지만,<sup>5,6)</sup> 그 중 산형과에 속하는 다년생 초본인 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk.의 뿌리를 봄이나 가을에 채취하여 건조한 SAPOSHNIKOVIAE RADIX를 정품(正品)으로 사용하며, 일본에서도 SAPOSHNIKOVIAE RA-

DIX를 중국에서 수입하여 사용하고 있다.<sup>7,8)</sup> 한편, 대한약전에 防風은 *Ledebouriella seseloides* Wolff의 뿌리 및 뿌리줄기라고 정의되고 있으나,<sup>9)</sup> 실질적으로 한국에서는 갯방풍 *Glehnia littoralis* (A. Gray) Fr. Schmidt ex Miquel과 갯기름나물 *Peucedanum japonicum* Thunb.의 뿌리가 각각 元防風과 植防風이라는 상품명으로 유통되고 있으며, 이들 약재를 임상에서 防風의 대용으로 사용하고 있다.<sup>10)</sup> *Ledebouriella* (= *Saposhnikovia*) 속에는 전세계적으로 *L. seseloides*와 *L. divaricata*의 두 종이 보고되어 있으며, 전자는 유럽종이며, 후자는 아시아산인 것으로 알려져 있다.<sup>11)</sup> *Ledebouriella*와 *Saposhnikovia*의 속의 처리는 분류학자간의 견해 차이에서 유발되는 일종

\*교신저자 : Fax 02-740-8906

의 분류체계상의 불일치에 불과하지만, 대한약전<sup>9)</sup>에 구태여 유럽종인 *L. seseloides*가 防風의 기원 식물로서 정의되고 있는 것은 합리적이지 못하며, 오히려 아시아종인 *L. divaricata*로 정의하는 것이 오히려 타당할 것이다.

갯방풍의 뿌리인 GLEHNTAE RADIX는 중국에서 北沙參이라는 藥名으로 性은 微寒하고 味는 甘微苦하며, 肺胃經에 들어가, 養陰清肺하고 虛熱을 除하며, 祛痰止咳 養胃生津 滋補하는 효능이 있어, 주로 肺陰不足과 肺虛有熱로 인한 乾咳少痰과 虛勞發熱 및 熱病傷津으로 口渴咽乾한 증상과 만성기관지염 폐결핵 肺 등의 질환에 사용되고 있다.<sup>3,4,12,13)</sup> 갯기름나물의 뿌리인 PEUCEDANI JAPONICI RADIX는 消熱利濕 堅骨益髓 消腫散結의 효능으로 小便淋痛과 高熱抽 紅腫熱痛 無名腫毒 등 증상에 응용하는 것으로 알려져 있다.<sup>13)</sup>

1995년 농수산부 자료에<sup>14)</sup> 따르면 防風의 국내 생산량이 89년에 54.5톤, 90년에 45.6톤, 91년에 93톤, 92년에 184톤, 93년에 735톤, 94년에 362톤, 95년에 328톤으로 최근 그 사용이 급증하는 추세이며, 이 자료에서의 防風은 대부분 植防風 PEUCEDANI JAPONICI RADIX가 차지하고 있으며, 元防風 GLEHNTAE RADIX도 일부 포함되어 있을 것으로 사료된다. 또한 일부 제주도에 防風으로 재배 유통되고 있는 약재는 형태적으로 元防風 (GLEHNTAE RADIX)과 유사하지만, 이것은 제주도에 자생하고 있는 털기름나물 *Libanotis coreana* (Wolff) Kitagawa (= *Seseli coreana* Wolff)의 뿌리로 추정되며, 남 등<sup>10)</sup>은 이 약재가 濟州防風으로 불리우며, 지역적으로 국한되어 유통된다고 보고한 바 있다.

이와 같이 국내에서 防風으로 대용되고 있는 한약재의 경우, 중국과 일본에서 사용되는 *S. divaricata*와는 분류학적으로는 완전히 다른 속 식물인 *G. littoralis*와 *P. japonicum*의 뿌리가 약효실험에 따른 정확한 효능의 검증과 객관적인 감별법이 확립되지 않은 상태에서 혼용되고 있으므로, 防風의 품질관리 및 규격화를 이루기 위해서는 유통되고 있는 한약재의 약효평가에 앞서 우선 사용되고 있는 한약재의 원식물 규명 및 정확한 감별법의 체계 정립이 매우 시급한 실정이다. 한약재의 감별은 현재까지 주로 형태적 특징 및 이화학적 분석에 의존하

여 이루어져 왔으나, 식물체가 나타나는 형태는 복잡한 대사 경로의 최종 산물로서 유전적으로 독립된 다른 변화가 유사한 형태의 변화로 나타날 수 있는 경우가 있으며, 특히 식물체의 일부분만이 사용되는 한약재의 경우, 식물체가 지니는 전체적인 특징을 비교할 수 없기 때문에 일부 특정 부위만을 대상으로 식물 종을 구별하는 것이 거의 불가능한 경우가 많다. 더욱이 한약재가 절편의 형태로 세절되어 유통되는 경우는 그 감별이 더 한층 불가능하게 된다. 이화학적인 분석 방법의 대상이 되는 식물체의 2차 대사산물(예, alkaloid, flavonoid 등)은 식물체의 생육환경에 따라 차이를 나타내기 때문에, 단순한 이화학적인 분석에 의한 한약재의 감별은 정확성을 지닌 판단의 척도가 되기 어려운 경우도 있다.

최근 급속도로 발전하는 분자생물학적 방법은 식물체의 근원적 유전정보를 내포하고 있는 DNA의 직접적인 분석을 더욱 용이하게 하였으며, 특히 polymerase chain reaction (PCR) 방법이 개발되어 시험관 내에서 임의의 DNA 구간을 증폭할 수 있게 됨으로써 극히 미량의 DNA로부터 특정구간의 염기 서열을 결정할 수 있게 되었다. 식물분류학의 목적으로는 흔히 *rbcL*이나 핵 ribosomal DNA 분석이 주로 이루어지고 있으며, 종 수준에서의 유연관계 및 확인은 핵 ribosomal DNA중 internal transcribed spacer (ITS) 구간이 매우 유용한 것으로 알려지고 있다.<sup>15)</sup>

따라서 본 연구에서는 분자유전학적 방법을 이용하여 한국에서 사용되는 元防風 및 植防風의 기원식물을 재확인하고, 이들의 유전적 특성을 현재 중국 및 일본에서 주로 사용되고 있는 防風과 비교하여, 분자유전학적으로 防風類의 정확한 감별법을 개발함으로써, 한약재의 기원식물 규명 및 품질관리 및 규격화를 위한 새로운 방향을 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**재료** - *Saposhnikovia divaricata*, *G. littoralis* 및 *P. japonicum*의 3종은 중국 및 한국에서 재배되고 있거나, 야생에서 생육하고 있는 식물체를 직접 채집하여 사용하였으며, 한약재는 중국, 홍콩 및 국내에서 유통되고 있는 것을 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 식물체 및 한약재의 확증표본은

**Table I.** Plant materials used for DNA analyses. Vouchers are at the herbarium of Natural Products Research Institute, Seoul National University (NPRI) and the herbarium of College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

Species	Sample	Voucher	Origin	Locality	Date
<i>S. divaricata</i>	plant (SG)	CHY96001	cultivated	China: Beijing: Medicinal plant garden	May 1996
	sliced root (SB)	CHY96002	purchased	China: Beijing: Local market	Aug 1994
	sliced root (SH)	CHY96003	purchased	Hongkong: Local market	Oct 1995
	whole plant (SN)	CHY96004	purchased	China: Henan: Local market	Jan 1996
<i>P. japonicum</i>	plant (PB)	CHY96005	cultivated	Korea: Chollanam-do: Buelgyo	Sep 1995
	whole root (PB)	CHY96006	cultivated	Korea: Chollanam-do: Buelgyo	Sep 1995
	sliced root (PJ)	CHY96007	purchased	Korea: Seoul: Kyungdong market (origin: Jeungup)	Sep 1995
	whole root (PY)	CHY96008	cultivated	Korea: Kyungsangbuk-do: Youngju	Sep 1995
<i>G. littoralis</i>	plant (PY)	CHY96009	cultivated	Korea: Kyungsangbuk-do: Youngju	Sep 1995
	plant (GJ)	CHY96010	wild	Korea: Kangwon-do: Joungdongjin	Aug 1995
	whole root (GJ)	CHY96011	wild	Korea: Kangwon-do: Joungdongjin	Aug 1995
	whole root (GB)	CHY96012	cultivated	Korea: Chollanam-do: Buelgyo	Sep 1995
	plant (GB)	CHY96013	cultivated	Korea: Chollanam-do: Buelgyo	Sep 1995
	whole root (GK)	CHY96014	purchased	Korea: Kangwon-do: Gangreung local market	Aug 1995
	whole root (GS)	CHY96015	cultivated	Korea: Kangwon-do: Samchuk	Aug 1995
	plant (GS)	CHY96016	cultivated	Korea: Kangwon-do: Samchuk	Aug 1995
	whole root (GU)	CHY96017	cultivated	Korea: Cheju-do: Hanlim	Oct 1995
	plant (GU)	CHY96018	cultivated	Korea: Cheju-do: Hanlim	Oct 1995

서울대학교 천연물과학연구소 표본실(NPRI)과 경희대학교 한의과대학 본초학교실에 보관되어 있다 (Table I).

**DNA의 추출 및 정제** - 채집된 한약재는 실온에서 보관하여 사용하였으며, 생체로 채집한 식물체는 액체질소에 넣어 막자사발로 파쇄한 후 바로 DNA를 추출하거나, 파쇄된 분말조직을  $-70^{\circ}\text{C}$ 의 초저온냉동고에 보관하여 필요에 따라 사용하였다. DNA의 추출은 Doyle과 Doyle<sup>16)</sup>의  $2\times\text{CTAB}$  방법을 수정하여 실행하였다. 액체질소내에서 파쇄된 분말 조직 혹은 실온 보관중이던 한약재 1-2 g을 막자사발을 이용하여 분쇄하여 50 ml polypropylene tube에 넣은 후 DNA 추출용액(50 mM Tris-HCl, 0.7 M NaCl, 10 mM EDTA, 2% hexadecyltrimethylammonium bromide(CTAB), 0.2%  $\beta$ -mercaptoethanol) 10 ml를 첨가하여  $60^{\circ}\text{C}$  욕조에서 30분간 중탕하였다. 클로로포름 추출( $\text{CHCl}_3$ :isoamyl alcohol, 24:1(v/v))을 거쳐 30% isopropanol로  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 이상 DNA를 침전시킨 후, 2,900 g로  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 원심분리하여 DNA 침전물을 분리하였다. 분리된 DNA 침전물은 70% 에탄올로 세척한 후 5 ml  $1\times\text{TE}$  용액에 용해시킨 다음, 2.5 M ammonium acetate와 70% 에탄올로  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 이상 방치하여, DNA를 재침전

시켰으며, 다시 DNA pellet을 원심분리하였다. 분리된 DNA pellet을 5 ml  $1\times\text{TE}$  용액에 용해한 후, 0.25 M sodium acetate와 70% 에탄올로  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 이상 재침전시킨 다음, 같은 방법으로 DNA pellet을 원심분리하였다. DNA pellet을  $-20^{\circ}\text{C}$  70% 에탄올로 세척하여 원심분리한 후, 에탄올 성분을 완전히 제거되도록 공기 중에서 건조한 다음, 400  $\mu\text{l}$ 의  $1\times\text{TE}$  용액에 용해하였다. DNA 용액은 RNase (Boehringer Mannheim, 독일) 2 units/ml를 처리하고 실온에서 1시간 이상 방치하여 RNA를 제거하고, GeneClean II Kit(Bio 101, CA, 미국)를 사용하여 DNA 용액을 정제하였다. 정제된 DNA 용액의 DNA 농도는 0.7% agarose gel 상에서 EtBr 형광법을 이용하여, 표준 DNA 시료와 비교하여 농도를 추정하거나, 직접 흡광도를 측정하여 그 농도를 계산하였다.

**ITS 구간의 PCR** - PCR은 전체 100  $\mu\text{l}$  부피로 반응을 실행하였으며, 반응용액은 0.5 ng 주형 DNA, 2.5 unit Taq DNA polymerase(Boehringer Mannheim, Germany), 10 mM Tris, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.001% Gelatin이 포함되어 있는 조건에서 dATP, dCTP, dGTP, dTTP가 각각 20  $\mu\text{M}$ , 그리고 primer는 각각 0.5  $\mu\text{M}$ 의 농도로 혼합되었다.

PCR primer는 White 등<sup>17)</sup>에 의하여 고안된 'ITS1'과 'ITS4' primer를 이용하였다. 그리고, PCR 과정 중 증발을 방지하기 위하여 중성오일 1-2방울을 첨가하여 기름막을 반응 용액면 위에 형성하였다. PCR은 95°C에서 3분동안 전처리를 시킨 후 95°C에서 1분의 변성, 55°C 후 52°C에서 1분의 annealing, 72°C에서 45초의 합성으로 이루어지는 온도변이 과정을 30회 반복하였으며, 합성 시간은 첫 회의 45초 이후 매회 3초씩 증가시켰다. 30회의 온도변이 과정을 완료한 후, 72°C에서 7분간의 최종 합성 과정을 첨가하였다.

**ITS 구간의 염기서열 결정** - PCR에 의하여 얻어진 PCR 생성물은 Sequenase PCR Product Sequencing Kit(USB, OH, 미국)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 염기서열 결정반응을 간섭하는 PCR 과정에서 남겨진 primer, dNTP 및 잘못 생성된 단사 DNA를 제거하기 위하여 PCR 생성물에 exonuclease I과 shrimp alkaline phosphatase를 첨가하여 37°C에서 15분 반응시킨 후 80°C에서 15분간 처리하여 이들 효소들을 불활성시켰다. 처리된 PCR 생성물에 primer 20 pmol을 첨가한 후 100°C에서 2분간 변성시킨 후 얼음 속에서 급속히 냉각시켜 primer와 주형 DNA를 annealing 하였다. Sequencing primer로는 우선 PCR 과정에서 사용되었던 White 등의<sup>17)</sup> 'ITS1'과 'ITS4'를 사용하였고 internal sequencing primer로는 역시 White 등에<sup>17)</sup> 의해 고안된 'ITS2'와 'ITS3'을 사용하여 양 방향으로 DNA의 염기서열을 결정하였다. Labeling reaction은 Sequenase kit에 들어있는 labeling reaction component를 이용하였으며, labeling mixture는 새로운 0.5 ml microcentrifuge tube에 Sequenase buffer 2 µl, 0.1 M DTT 1 µl, 1/5X labeling mix 2 µl, <sup>35</sup>S-dATP 0.5 µl, Sequenase 2 µl를 넣은 뒤 얼음 위에서 혼합하여 만들었다. Termination reaction은 dideoxy random termination 방법에 의해 수행하였다. 먼저 multi-well plate의 각 well에 2.5 µl 씩의 ddNTP mix를 넣고, 이에 primer과 annealing된 주형 DNA와 labeling mixture를 섞은 혼합액을 3.5 µl씩 넣어 37°C에서 5분간 반응시킨 후 stop solution을 4 µl씩 첨가하여 반응을 정지시켰다. Termination reaction이 끝난 각 시

료는 40% formamide와 7 M urea가 포함된 6% acrylamide gel에서 전기영동을 수행하였다. 전기영동의 완충용액은 taurine을 함유한 glycerol tolerant gel buffer (protocols for Sequenase PCR Product Sequencing Kit, 2nd ed.: USB, OH, 미국)를 사용하였다. 전기영동 후 gel을 고정액(5% 초산, 20% 메탄올)에서 15분 고정한 후, 85°C 2시간 건조하여 AGFA X-ray 필름으로 24-72시간 노출시켰다.

**염기서열 분석** - ITS 1, 5.8S coding region과 ITS 2의 영역은 Yokota *et al.*,<sup>18)</sup> Baldwin,<sup>19)</sup> Suh *et al.*<sup>20)</sup>의 기준에 발표된 염기서열과 비교하여 결정하였으며, Clustal V program을<sup>21)</sup> 이용하여 일차적으로 염기서열의 정렬을 실행한 후, 최종적으로 육안에 의하여 정렬을 완료하였다. 식물종 간의 유전적 거리는 Kimura<sup>22)</sup>의 two-parameter 방법으로 산출하였으며, PHYLIP(ver. 3.5)에<sup>23)</sup> 포함되어 있는 DNADIST 프로그램을 이용하여 계산하였고, UPGMA<sup>24)</sup> 방법으로 phenogram을 산출하였다.

**RFLP 분석** - 각 종에 대하여 염기서열을 결정한 다음, 70여 종류의 제한효소에 대한 절단 양상을 검색하여 *S. divaricata*, *G. littoralis*, *P. japonicum*의 세 종에서 ITS 구간중 차이를 나타내는 제한효소에 대하여 physical map을 작성하였다. 그 중 일례로서 *Bfa* I의 절편양상이 *S. divaricata*, *P. japonicum* 및 *G. littoralis*의 세 종에서 차이가 나타나는 것을 확인한 후, 이에 대한 절편양상을 조사하였다. 37°C에서 16시간 *Bfa* I을 처리한 후, 2% agarose gel 상에서 50볼트 정전압으로 2시간 전기영동하여 band를 분리하였으며, 전기영동 후 EtBr로 염색하고 380 nm 자외선을 조명하여 제한효소 절편 band를 확인하였다.

## 결과 및 고찰

한국 및 중국에서 防風으로 사용되는 한약재 3종에 대한 nuclear ribosomal DNA 중 ITS 1, ITS 2, 5.8S의 염기서열을 결정한 결과, *S. divaricata*, *P. japonicum*, *G. littoralis*의 세 종에서 ITS 1의 크기는 216-217 bp, ITS 2는 218-220 bp, 5.8S는 170 bp로 나타났다(Fig. 1). *Saposhnikovia di-*

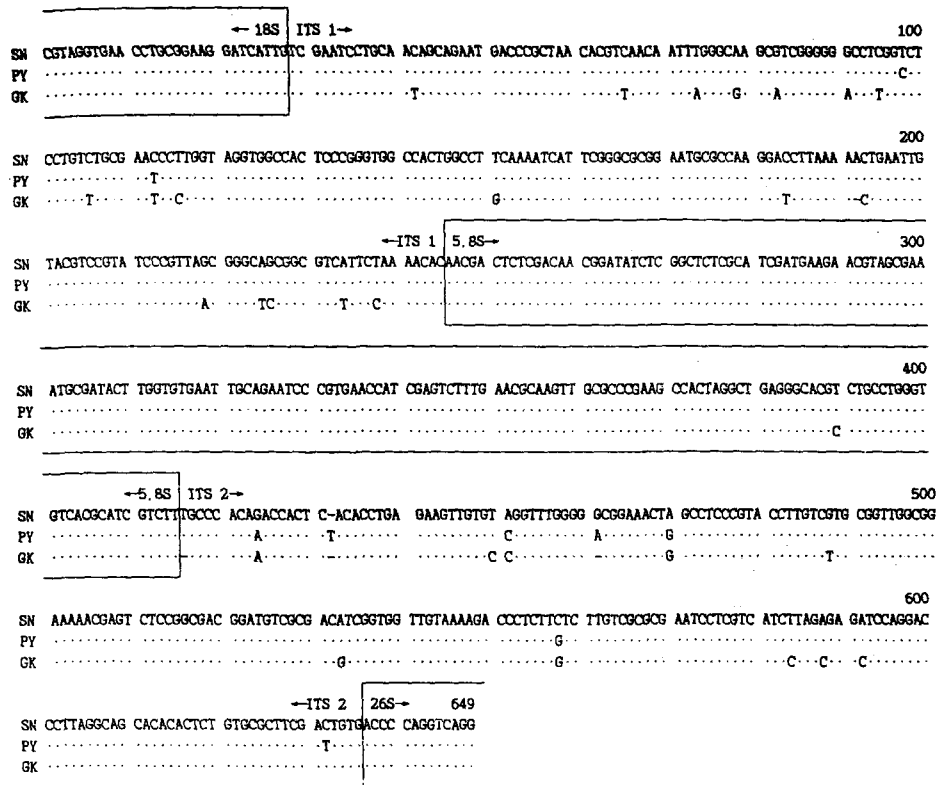


Fig. 1. Aligned sequences of ITS 1 and 2 including 5.8S coding region from *S. divaricata*, *P. japonicum* and *G. littoralis*. The '-' indicates gaps required for alignment and '.' indicates sequences identical with the first sequence.

Table II. Size and base composition of ITS 1, ITS 2 and 5.8S coding regions of nuclear ribosomal DNA

Species	ITS 1		ITS 2		5.8S	
	Length (bp)	GC(%)	Length (dp)	GC(%)	Length (bp)	GC(%)
<i>S. divaricata</i>	217	56.7	220	56.4	170	53.5
<i>P. japonicum</i>	217	57.1	221	55.7	170	53.5
<i>G. littoralis</i>	216	54.6	218	58.7	170	54.1

*varcata*의 ITS 1의 크기는 217 bp, GC 비율은 56.7%였으며, ITS 2의 크기는 220 bp이고, GC 비율은 56.4%였고, 5.8S의 크기는 170 bp, GC 비율은 53.5%로 나타났다. *Peucedanum japonicum*의 ITS 1의 크기는 217 bp이고, GC 비율은 57.1%이며, ITS 2의 크기는 221 bp이고, GC 비율은 55.7%이며, 5.8S의 크기는 170 bp이고, GC 비율은 53.5%였다. *Glehnia littoralis*의 ITS 1의 크기는 216 bp이고, GC 비율은 54.6%이고, ITS 2의 크기는 218 bp이고, GC 비율은 58.7%이며, 5.8S의 크기는 170 bp이고, GC 비율은 54.1%로 나타

났다(Table II).

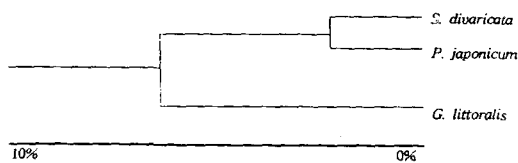
*Saposhnikovia divaricata*, *P. japonicum*, *G. littoralis*의 세 종간의 genetic distance (Kimura's  $K \times 100$ )<sup>22)</sup>를 계산한 결과, ITS 1에 대해서는 1.43-8.56%, ITS 2는 2.78-3.30%, 그리고 ITS 1과 ITS 2를 합한 결과는 2.11-6.62%로 나타났다. ITS 1의 genetic distance를 비교해 보면 *S. divaricata*과 *P. japonicum*은 1.43%이며, *S. divaricata*과 *P. japonicum*은 8.56%이고, *P. japonicum*과 *G. littoralis*는 8.56%였다. ITS 2에서는 *S. divaricata*과 *P. japonicum*은 2.78%

이며, *S. divaricata*과 *P. japonicum*은 4.77%이고, *P. japonicum*과 *G. littoralis*는 3.30%였다. ITS 1과 ITS 2를 합한 결과에서는 *S. divaricata*과 *P. japonicum*은 2.11%이며, *S. divaricata*과 *P.*

*japonicum*은 6.62%이고, *P. japonicum*과 *G. littoralis*는 5.84%로 나타났다(Table III). 이를 근거로 하여 UPGMA<sup>24)</sup>의 방법으로 세 종간의 phenetic tree를 계산한 결과 *S. divaricata*와 *P. japonicum*이 *G. littoralis*에 비해서 서로 가까운 것으로 나타났다(Fig. 2).

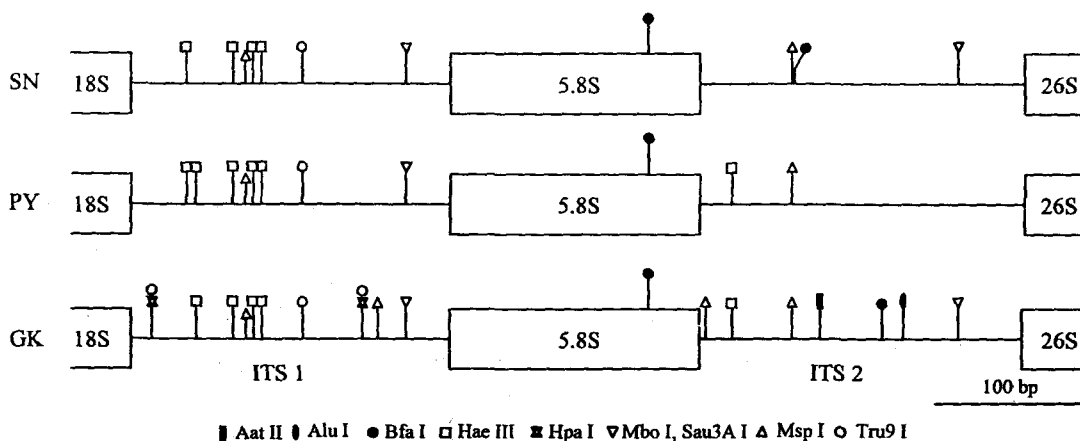
**Table III.** Sequence divergence orf ITS regions. Number of substitutions per 100 sites (Kimura's  $K \times 100$ )<sup>20)</sup> is shown above diagonal and the observed number of nucleotide differences in pairwise comparison below diagonal

	<i>S. divaricata</i>	<i>P. japonicum</i>	<i>G. littoralis</i>
ITS 1			
<i>S. divaricata</i>	-	1.43	8.56
<i>P. japonicum</i>	3	-	8.56
<i>G. littoralis</i>	17	17	-
ITS 2			
<i>S. divaricata</i>	-	2.78	4.77
<i>P. japonicum</i>	6	-	3.30
<i>G. littoralis</i>	10	7	-
ITS 1+ITS 2 (combined)			
<i>S. divaricata</i>	-	2.11	6.62
<i>P. japonicum</i>	9	-	5.84
<i>G. littoralis</i>	27	24	-



**Fig. 2.** A phenogram produced on the basis of nucleotide divergence values (Kimura's  $K \times 100$ )<sup>22)</sup> by UPGMA.<sup>24)</sup>

ITS 부위의 염기서열에 근거하여, *S. divaricata*, *P. japonicum*, *G. littoralis*의 세 종에서 모두 제한효소 절편의 양상이 다르게 나타나는 제한효소를 검색한 결과 *Aat* II, *Alu* I, *Bfa* I, *Hae* III, *Hpa* I, *Mbo* I, *Msp* I, *Sau*3A I, *Tru*9 I 등의 제한효소에 대하여 적어도 한 종 이상에서 절편양상의 차이가 나타나는 것으로 밝혀졌다(Fig. 3). *Saposhnikovia divaricata*의 18S 일부 구간 및 26S 일부 구간을 포함하는 PCR product의 전체 크기는 692 bp로서, *Bfa* I을 처리하면 376 bp, 223 bp, 93 bp의 세 개의 절편으로 나누어지며, *P. japonicum*은 전체 길이가 693 bp로서, *Bfa* I 처리시 376 bp와 317 bp의 두 개의 절편으로, *G. littoralis*는 *Bfa* I 처리시 375 bp, 207 bp, 107 bp의 세 개의 절편으로 나누어지는 것으로 나타났다(Figs. 1 & 3). 중국 북경약용식물원에서 채집한 원식물 및 중국과 홍콩 등지에서 구입한 약재에서 추출된 DNA의 PCR product를 *Bfa* I으로 처리하여 전기영동한 결과 모두 376 bp, 223 bp, 93 bp 세 개의 band로 분리됨에 따라 이들은 모두 *S. divaricata*임이 판명되었고, 한국에서 植防風으로 재배되는 식물체나 유통되는 약재는 376 bp와 317



**Fig. 3.** Restriction site map of ITS regions of nuclear ribosomal DNA.

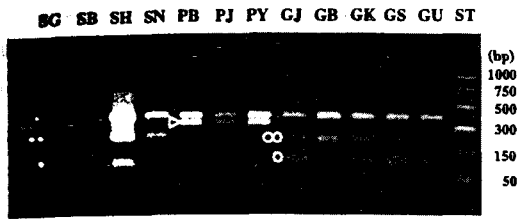


Fig. 4. PCR products of ITS region digested with *Bfa* I. Fragments were separated by electrophoresis in 2.0% agarose gel. Fragments were 380 bp (▷), 220 bp (○○) and 90 bp (○) for *S. divaricata*, 380 bp and 320 bp (▶) for *P. japonicum*, and 380 bp, 210 bp(●●) and 110 bp(●) for *G. littoralis*. See Table I for abbreviation and ST stands for standard molecular size marker.

bp의 두 개의 band가 관찰됨으로써 *P. japonicum*인 것으로 나타났고, 元防風으로 재배되는 식물체나 시장에서 유통되는 약재는 모두 *Bfa* I 처리시 375 bp, 207 bp, 107 bp 등 세 개의 band가 나타남으로써 이들은 *G. littoralis*임이 판명되었다 (Table 1, Fig. 4).

한약재의 연구에서 원식물의 규명과 약재의 감정 및 감별은 가장 우선되어야 하는 것으로, 한약재의 규격화 및 품질관리에 절대적인 기준을 제공하게 된다. 오랜동안의 경험에서 비롯되어 사용되는 한약재는 지역에 따라 다른 이름으로 불리우기도 하며, 지역 및 국가에 다른 종의 식물이 동일한 한약재로서 사용되기도 한다. 또한 유사종의 식물이 전과과정 중의 오류로 인하여 동일한 이름의 약재로 채택되기도 하였다. 한약재의 일차적인 감별은 외부 형태 및 내부의 해부학적 특징에 주로 의존해 왔으나, 식물체가 나타내는 형태적 변이 및 약재의 처리과정 중에서 발생하는 형태적 왜곡은 종종 한약재의 감별에서 중대한 장애요인이 되고 있으며, 특히 약재로 사용되는 식물체의 일부 부위를 비교하여 정확한 기원 식물을 규명하는 것은 매우 어렵기 때문에 보다 객관적이고 확실한 근거를 제시할 수 있는 감별법이 절대적으로 필요하다.

DNA는 생물체가 지니는 유전물질로서 환경요인 등에 의하여 어떠한 영향도 받지 아니하고, 식물 개체의 모든 부위에서 동일하게 나타남으로써, DNA의 직접적인 비교 분석은 한약재의 원식물 규명 및 감별에 매우 효과적인 방법임에 틀림없다. 식물체를 구분 비교할 수 있는 분자생물학적 방법으로는 다양

한 유전자에 대한 RFLP, 염기서열의 결정, PCR-based fingerprinting, hybridization-based fingerprinting, allozymes 등이 있다.<sup>25)</sup>

Ribosomal DNA는 첫째 잘 보존된 coding sequences 때문에 폭 넓은 분류군에서 동일한 primer를 사용하여 PCR을 쉽게 응용할 수 있으며, 둘째 ITS 구간은 비교적 진화속도가 빠르기 때문에 종간에서 충분한 분별력이 나타나며, 산형과의 경우는 이미 많은 종에서 그 사실이 입증되었다.<sup>26)</sup> 따라서 PCR을 이용하여 ITS 구간을 증폭하여 염기서열을 결정하여 제한효소의 절단부위를 정확히 파악함으로써, 이를 기초로 정확한 한약재의 감별법을 마련할 수 있다. 특히 PCR은 미량의 DNA로부터 염기서열을 결정하기 위한 실험에 충분한 양을 시험관 내에서 증폭시킬 수 있으므로, 한약재와 같이 건조된 식물체에서 추출되는 적은 양의 DNA 분석에 그 유용성을 더해주고 있다. 이와 더불어 DNA의 분석은 식물체간의 유전적 분화 정도를 상대적으로 측정할 수 있는 기회를 제공하기 때문에 한가지 약재에 대하여 여러 종의 기원식물이 사용되는 경우, 이들 종의 상대적 유연관계를 추정할 수도 있게 된다.

본 연구에서는 유전자 감식을 응용한 한약재의 새로운 감별법의 하나로, PCR 방법과 제한효소를 이용하여 핵 ribosomal DNA중 ITS 구간을 비교분석함으로써 중국에서 사용되는 防風의 원식물을 포함하여, 중국, 홍콩 등지에서 사용되는 약재 防風과 한국에서 元防風 및 植防風의 상품명으로 대응되는 약재 및 원식물의 감별이 정확하게 이루어질 수 있는 것을 명확하게 제시하였으며, 향후 이와 같은 방법은 현재까지도 혼동되고 있는 많은 경우의 기원식물 규명 및 한약재 감별 등에 매우 유용하게 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 결론

1. 유전자 감식법의 일환으로 핵 ribosomal DNA 중 ITS 구간을 비교 분석한 결과, 중국에서 유통되는 防風은 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk.의 뿌리이고, 국내에서 元防風, 植防風이라는 이름으로 유통되어 防風으로 대응되는 한약재는 각각 *Glehnia littoralis* (A. Gray) Fr. Schmidt ex Miquel, *Peucedanum japonicum*

Thunb.의 뿌리인 것이 명확하게 확인되었다.

2. PCR 방법으로 ribosomal DNA 중 5.8S를 포함하는 ITS 부위를 증폭하면 *Saposhnikovia divaricata*는 전체 길이가 692 bp로서, *Bfa* I 처리시 376 bp, 223 bp, 93 bp의 세 개의 절편으로 *P. japonicum*은 길이가 693 bp로서, *Bfa* I 처리시 376 bp와 317 bp의 두 개의 절편으로, *G. littoralis*는 *Bfa* I 처리시 375 bp, 207 bp, 107 bp의 세 개의 절편으로 분리되어, 각각 특정한 제한효소 절편양상을 나타냄으로써 防風으로 유통되는 한약재는 분자유전학적 방법을 이용하여 매우 정확하게 감별될 수 있으며, 이와 같은 PCR과 RFLP를 병용한 유전자 감식방법은 한약재에 품질관리 및 규격화를 위하여 매우 정확하고 실용성있는 새로운 한약재의 감별법이 될 수 있을 것이다.

### 인용문헌

1. 黃奭(淸) (1987) 神農本草經, 74-75. 中醫古籍出版社, 北京.
2. 江蘇新醫學院 (1979) 中藥大辭典, 644-645, 985-987. 上海科學技術出版社, 上海.
3. 朱有昌 (1989) 東北藥用植物, 827-829, 842-845. 黑龍江科學技術出版社, 黑龍江省.
4. 中華人民共和國衛生部藥典委員會 (1995) 中華人民共和國藥典(一部)(95年版), 126. 廣東科技出版社, 上海.
5. 王建華 (1992) 中藥防風的研究概. 中國藥學雜誌, 27: 323-327.
6. 王建華, 樓之岑 (1988) 防風類中藥原植物的調查鑑定. 中藥通報 13: 9-10.
7. 難波恒雄 (1994) 和漢藥百科圖鑑(I), 81-83. 保育社, 大阪.
8. 日本公定書協會 (1986) 第十一改正 日本藥局方解說書, D868-D869. 廣川書店, 東京.
9. 보건사회부 (1992) 대한약전 제6개정, 1000-1001. 한국메디칼인덱스사, 서울.
10. 南瀆榮 柳庚秀 (1975) 防風의 生藥學的 研究. 생약학회지 6: 151-159.
11. Hiroe, M. (1979) Umbelliferae of world. Ariake Book Company, Kyoto.
12. 中國藥材公司 (1995) 中國常用中藥材, 190-196, 247-253, 394-406. 科學出版社, 北京.
13. 中國藥材公司 (1994) 中國中藥資源志要, 861-862, 871, 877. 科學出版社, 北京.
14. 農林水産部 (1996) '95 特用作物生産實績, 22, 54-55.
15. Soltis, P. S., Soltis, D. E. and Doyle, J. J. (1990) Molecular systematics of plants. Chapman and Hall, New York.
16. Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
17. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. and White, T. (eds.), PCR protocols: a guide to methods and application, 315-322. Academic Press, San Diego.
18. Yokota, Y., Kawata, T., Iida, Y., Kato, A. and Tanifuji, S. (1989) Nucleotide sequences of the 5.8S rRNA gene and internal transcribed spacer regions in carrot and broad bean ribosomal DNA. *J. Mol. Evol.* 29: 294-301.
19. Baldwin, B. G. (1992) Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae. *Mol. Phylogene. Evol.* 1: 3-16.
20. Suh, Y., Thien, L. B., Reeve, H. E. and Zimmer, E. A. (1993) Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. *Amer. J. Bot.* 80: 1042-1055.
21. Higgins, D. G., Bleasby, A. J. and Fuchs, R. (1992) Clustal V: Improved software for multiple sequence alignment. *Computer Applic. Biosci.* 8: 189-191.
22. Kimura, M. (1980) A simple method for estimation evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
23. Felsenstein, J. (1992) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) ver 3.5. The University of Washington, Seattle: Distributed by the author.
24. Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. (1973) Numerical taxonomy, 577. W. H. Freeman and Company, San Francisco.
25. Kurt Weising, Hilde Nybom, Kirsten Wolff, Wieland Meyer (1995) DNA fingerprinting in plants and fungi, 5-7, 24-27, 230-234. CRC Press, USA.
26. Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter, J. M., Wojciechowski, M. F., Campbell, C. S. and Donoghue, M. J. (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 82: 247-277.

(1996년 12월 30일 접수)