

Identification of a *Carduus* spp. Showing Anti-Mycobacterial Activity by DNA Sequence Analysis of Its ITS1, 5.8S rRNA and ITS2

Young-Min Bae*

Department of Microbiology, Changwon University, Changwon, Kyungnam 641-773, Korea

Received March 9, 2010 / Accepted April 19, 2010

It has been reported that extracts of globe thistle (*Echinops spp.*) and thistle (*Cirsium spp.*, *Carduus spp.* and *Onopordum spp.*) have anti-bacterial and anti-fungal activities. Methanol extracts of *Echinops setifer* and *Carduus spp.* were used to test and see if the extracts of these plants could suppress growth of *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium fortuitum*. Although extract of *Echinops setifer* showed no anti-mycobacterial activities, extract of *Carduus spp.* showed inhibition zones when tested with filter discs. Genomic DNA was isolated from *Carduus spp.* and PCR was performed to clone a DNA fragment containing ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2. A 733-bp PCR product was obtained and its DNA sequence was reported to the GenBank (accession number GU188570). BLAST search of the obtained DNA sequence did not show a match with any DNA sequences in the Genbank. *Carduus crispus* and *Carduus defloratus* had the closest phylogenetic relationships to this plant.

Key words : Thistle, anti-mycobacterial activity, *Carduus*, ITS, phylogenetics

서 론

국화과(Compositae)에 속하는 식물들은 쌍떡잎식물 가운데 가장 진화된 식물로 전 세계에 956속 2만여 종이 분포하고, 한국에는 현재 390여 종이 알려져 있다[11,20]. 국화과에는 한약재로 사용되고 있는 많은 식물들이 포함되어 있는데, 본 연구에서는 그 중에서 항미생물 활성이 있는 것으로 이미 보고된 누로(절굿대)와 대계(영경귀) 추출물의 mycobacteria에 대한 항균력을 시험하였다.

누로(漏蘆)는 절굿대의 뿌리를 말린 것으로서, 그 추출물에서 항미생물 활성[4,7]이 확인되었다고 보고되어 있다.

대계(大薊)는 영경귀(thistle)의 뿌리 및 지상부를 일컫는데, 현재까지 대계의 추출물에 함유되어 있는 성분들 중에서 그 구조 및 생리 활성이 밝혀져 있는 것들이 많다. 즉, 대계 추출물은 항암활성[12,14,15], 항미생물활성[1,16-18], 항산화활성[10], 그리고 alcohol의 독성을 완화시켜주는 활성[19] 등을 가지는 것으로 보고되어 있다. 영경귀 역시 국화과의 식물로서 우리나라 전국에 분포하며, 아시아, 유럽, 북미 대륙까지 분포하는 다년초이다[11,20]. 동의보감에는 "대계의 성질은 짙고 따뜻한 쓰며 독이 없다. 어혈을 풀리게 하고, 피를 토하는 것과 코피를 흘리는 것을 멎게 하며, 응중, 음, 버짐을 낮게 한다. 여자의 적백대하를 치료하고, 精을 자양하며, 血을 보한다."라고 기술되어 있다[6].

인류의 역사상 많은 생명을 앗아간 질병 중의 하나인 결핵

은 *Mycobacterium tuberculosis complex*에 속하는 세균들에 의해 야기되는데, 서로 유사한 *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, 및 *M. microti* 등이 *M. tuberculosis complex*에 포함된다[3]. 결핵은 지속적인 항생제들의 개발에 따라 감소추세를 보이다가 1980년대 후반부터 다시 증가추세로 돌아서서 현재는 매년 8백만 명이 새로 감염되고, 2-3백만 명이 죽어가고 있다[3,21]. 세계보건기구(WHO)는 이 질병이 완전하게 퇴치되지 않는다면 20년 이내에 10억 이상의 인구가 결핵에 새롭게 감염되고, 3천 6백만 명이 죽게 될 것이라고 예상하고 있다[21]. *Mycobacterium* 속에 속하는 세균들은 원칙적으로 모두가 인류에 병원균이며, 세포벽에 다량의 mycolic acid를 함유하는 등 여러 가지 독특한 특징들을 공유하고 있다. 따라서 본 연구에서는 여러 다른 미생물들에 대해서 항미생물 활성이 있는 것으로 알려진 누로 및 대계의 추출물이 *Mycobacterium* 속의 세균들인 *Mycobacterium smegmatis* 및 *Mycobacterium fortuitum*의 증식을 억제하는 능력이 있는지를 시험해 보았다. 만일 이 두 종의 식물들로부터 mycobacteria의 증식을 억제하는 물질이 발견된다면 새로운 결핵 치료제로 개발될 가능성이 있기 때문이다.

생명체들의 진화적 차이 및 서로간의 상관관계를 비교하기 위해서는 현재 원핵생물들은 16S rRNA의 염기서열, 그리고 진핵생물의 경우에는 18S rRNA의 염기서열을 비교하고 있다. 또한 식물의 경우에 종(species)의 수준에서의 분류를 위해서는 18S rRNA gene과 5.8S rRNA gene의 사이인 ITS1 (internal transcribed spacer 1), 그리고 5.8S rRNA gene 및 26S rRNA gene의 사이인 ITS2의 염기서열이 많이 사용되고 있다[8,9]. 따라서 본 연구에서는 누로와 대계 추출물이 mycobacteria의

*Corresponding author

Tel : +82-55-213-3483, Fax : +82-55-213-3480

E-mail : yominbae@changwon.ac.kr

증식을 억제하는 능력이 있는지를 확인하고, 억제 능력이 있는 것으로 나타난 대계(영경귀)의 ITS1, 5.8S rRNA 및 ITS2의 염기서열을 밝혀내어 비교분석을 수행하였다.

국화과(Compositae)의 영경귀족(Cardueae)에는 대략 2,500 종 83속의 식물들이 포함되어 있는데, 이중에서도 1,600여 종 36속의 식물들이 다시 영경귀 아족(Carduinae)으로 분류되고 있다. 영경귀 아족 중에서는 *Carduus* 속(대략 90여 종), *Cirsium* 속(200-300여 종) 그리고 *Onopordum* 속(대략 60여 종)이 큰 분류군으로 되어 있다[5]. 영경귀족에는 Echinopinae 아족도 포함되어 있는데 절굿대는 이 아족에 포함된다. *Carduus* 속과 *Cirsium*속을 구분하는 유일한 차이점은 판모(pappus bristle)의 형태 차이이기 때문에, 분류시에 오류가 발생할 가능성도 제기되고 있다[2]. 현재 국내에 자생하는 영경귀의 종에 대해서 보고된 바에 의하면, 한국산 영경귀들은 *Cirsium*속에 속하는 8종이 자생하고 있는 것으로 알려져 있고[22], 귀화종으로는 *Carduus crispus* (지느러미영경귀)와 *Carduus natans* 가 보고되어 있다[13]. 또한 한국에 자생하는 영경귀들의 분류는 전적으로 형태에 의존하고 있기 때문에, 국내에 자생하는 영경귀의 분자유전학적(phylogenetic) 자료는 전혀 알려져 있지 않다. 외국에서는 영경귀의 분류에 분자유전학적인 방법을 많이 사용하고 있는 것을 고려하면 국내산 영경귀들의 분자유전학적인 자료를 확보하여 연구를 하는 것이 시급하다고 할 수 있다[5,23]. 이 경우에 ITS1과 ITS2의 염기서열을 분석하여 서로 비교하는 것이 일반적인 방법인데, 본 연구에서는 강원도 정선 지역에 자생하는 영경귀의 ITS1과 ITS2의 염기서열을 분석하여 GenBank의 BLAST를 통해 분석하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 연구에 사용된 절굿대와 영경귀는 강원도 정선 지역에서 채취된 것들을 사용하였다. 항균력 시험에는 *Mycobacterium smegmatis* mc²155 균주 및 *Mycobacterium fortuitum* ATCC 19542 균주를 사용하였다.

메탄올 추출

절굿대와 영경귀의 건조된 식물체를 A11 basic analytical mill (IKA Works, Inc.)을 이용하여 15-30 초 동안 분쇄하였다. 분쇄된 식물체 0.5 g에 methanol 10 ml를 첨가하여 40°C에서 overnight 동안 유지시키고, tabletop centrifuge로 5 분간 원심 분리시킨 후에 상등액을 취해서 mycobacteria에 대한 증식억제능을 시험하는 데에 사용하였다.

Anti-mycobacterial 활성 측정

Mycobacterium fortuitum 및 *Mycobacterium smegmatis*는 Middlebrook 7H9 medium에서 하루 정도 배양하였다. 이것

을 1/10의 같은 medium으로 희석한 후, 희석된 배양액 1 ml를 Middlebrook 7H9 agar에 spreading하고, 액체가 보이지 않을 때까지 공기로 건조시켰다. 메탄올 추출물의 희석하지 않은 원액 50 μ l, 1/2로 희석된 액 50 μ l 그리고 1/4로 희석된 액 50 μ l를 각각 직경이 8 mm인 filter disc에 떨어뜨리고 건조시켰다. 이렇게 준비된 filter disc를 세균이 도말된 agar plate에 떨어뜨리고, 37°C에서 세균들을 배양하며 inhibition zone의 형성 여부를 관찰하였다. 이때에 추출물이 포함되지 않은 methanol도 50 μ l를 filter disc에 떨어뜨리고 건조시켜서 control로 사용하였다.

식물체로부터 genomic DNA 추출

건조된 영경귀의 뿌리로부터 genomic DNA를 추출하려 시도 하였으나 고분자량의 DNA를 추출하는 데에 실패하였다. 따라서 건조된 영경귀의 잎으로부터 genomic DNA를 추출하였다. 막사발로 분쇄한 건조된 영경귀 잎 30 mg을 OMEGA Bio-Tek (www.omegabiotek.com)의 EZNATM SQ Plant DNA Kit를 사용하여 genomic DNA를 정제하였다.

PCR 증폭

PCR 반응은 DNA template 18 ng, ITS1 primer 2.5 pmol, ITS4 primer 2.5 pmol, dNTPs mixture 2 μ l (10 nM each) 그리고 DyNAzyme EXT DNA polymerase (New England BioLabs) 1 μ l (1 U)를 포함하는 50 μ l의 반응액에서 진행하였다. PCR에는 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')과 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')가 primers로 사용되었다. 반응조건은 94°C에서 2 분간 한 cycle, 그리고 94°C에서 30 초, 53°C에서 30 초, 72°C에서 1 분씩 30 cycle을 진행시킨 후, 최종적으로 72°C에서 5 분간 유지시켰다. PCR에는 proofreading 기능을 가지고 있는 DyNAzyme EXT DNA polymerase를 사용함으로써 DNA 합성 반응 중에 error가 발생하는 것을 최소화 하였다. 이렇게 얻어진 PCR 산물을 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corp.)으로 정제하였다.

Cloning 및 염기서열 분석

위와 같이 정제된 PCR 산물을 ethanol을 사용하여 침전시키고, 정제된 DNA는 Sma I으로 절단된 pBluescript SK II plasmid와 섞어서 ligation 반응을 진행시킨 후, *Escherichia coli* DH5a competent cell을 transformation 시키는 데에 사용하고, transformed cells는 ampicillin (10 μ g/ml)을 함유하는 MacConkey agar plate에 도말하였다. 흰색의 colony들 중에서 3개를 선택하고, 이들로부터 plasmid DNA를 추출하고, agarose gel electrophoresis를 통해서 예상되는 크기의 insert DNA가 포함되어있는 것을 확인한 후, 염기서열 분석을 수행하였다. 염기서열 분석을 위해서는 T3 및 T7 promoter pri-

mers를 사용하여 양쪽 strand를 모두 분석하여 서로 비교하였다. 염기서열 분석은 (주)바이오닉스(서울특별시 구로구 구로 3동 235번지)에 의뢰하였다. 염기서열의 비교분석은 GenBank의 BLAST 및 ClustalW1.83를 통해서 수행하였다.

결과 및 고찰

식물 추출물의 anti-mycobacterial 활성 측정

누로와 대계 추출물을 여러 가지 다른 농도로 희석하여 *M. smegmatis* 및 *M. fortuitum*에 대한 항균력을 filter disc를 사용하여 측정하였다. 그 결과, 누로 추출액은 희석여부와 관계없이 inhibition zone이 전혀 관찰되지 않았다. 그러나 대계의 희석하지 않은 추출액의 경우는 inhibition zone의 직경이 약 14 mm, 1/2로 희석한 경우는 약 12 mm, 그리고 1/4로 희석한 경우는 약 10 mm로 나타났다. 즉, 대계 추출액의 경우는 농도에 따라서 inhibition zone의 크기가 정비례하는 것을 관찰할 수 있었고, 따라서 대계 추출액이 *M. smegmatis* 및 *M. fortuitum*에 대한 항균력을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 대계 추출물이 함유되지 않은 control에서는 inhibition zone이 전혀 관찰되지 않았다. 누로와 대계 추출물이 몇 가지 미생물들에 대해서 항미생물활성을 가지고 있다는 보고를 확인하고 본 연구를 시작하였으나[1,7,18], mycobacteria에 대한 항균력은 대계의 추출물에서만 확인이 되었다. 본 연구에서 대계의 추출물이 anti-mycobacterial activity를 지닌 것으로 밝혀졌기 때문에, 새로운 항결핵 약제의 후보물질이 발견되었다고 본다.

영경퀴로부터의 genomic DNA 추출

대계(영경퀴)의 추출물이 mycobacteria에 대한 항균력을 가지고 있음을 확인하였기 때문에, 본 연구에 사용된 영경퀴의 계통분류학적 분류를 위하여 ITS1, 5.8S rRNA 및 ITS2 DNA 염기서열을 밝혀서 사용하고자 하였다. 따라서 PCR의 template로 사용하기 위하여 영경퀴의 건조된 뿌리로부터 genomic DNA를 추출하려 시도하였다. 그러나 여러 가지 방법들을 시도해 보았으나 평균 크기가 1 kb를 넘는 DNA를 추출할 수가 없었다. 따라서 영경퀴의 건조된 잎을 사용하여 genomic DNA를 추출하려 시도하였는데, 이 경우는 평균 분자량이 10 kb를 훨씬 넘는 DNA를 성공적으로 얻을 수 있었다 (Fig. 1, lane B).

PCR을 통한 영경퀴의 ITS1, 5.8S rRNA, ITS2의 증폭 및 그 염기서열 분석

영경퀴의 genomic DNA를 사용하여 PCR을 수행한 후, 그 산물을 agarose gel로 분석한 결과, 대략 700 bp 정도의 PCR 산물을 확인할 수가 있었다(Fig. 1, lane C). 이와 같이 얻어진 PCR 산물을 pBluescript plasmid에 cloning하여서 DNA sequencing을 수행하였다. 그 결과 733 bp의 염기서열이 밝혀졌

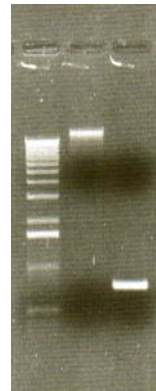


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the *Carduus* spp. JS genomic DNA and its PCR product. Lane A, 1-kb ladder. Lane B, Genomic DNA of *Carduus* spp. JS. Lane C, PCR product. One microgram of genomic DNA and five microliters of the PCR product were analyzed on a 7 cm-long agarose gel at 70 V for 40 min. The positions of 10-kb, 1-kb and 0.5-kb are marked by arrows on the left.

고(Fig. 2), 이 염기서열을 GenBank에 등록하였다(accession number GU188570). 그 결과, 한국에 자생하는 영경퀴로서는 최초로 본 연구에 사용된 영경퀴의 ITS1, 5.8S rRNA 및 ITS2의 염기서열이 GenBank에 등록되게 되었다. 진핵생물들의 종(species) 수준에서의 분자유전학적(phylogenetic) 분류를 위해서는 ITS1과 ITS2의 염기서열을 주로 사용하는데, 현재 국내의 영경퀴의 경우에는 이러한 자료가 알려져 있는 것이 없기 때문에 국내 자생종들과의 추가적인 비교분석은 수행할 수가 없었다.

영경퀴 염기서열의 분자유전학적인 비교분석

본 연구에서 사용된 영경퀴의 ITS1, 5.8S rRNA 및 ITS2의 염기서열을 사용하여 BLAST analysis를 수행한 결과, 염기서열이 완전히 일치하는 생물체는 아직까지 GenBank에 보고된 적이 없고, 가장 유사한 식물은 *Carduus crispus* 및 *Carduus defloratus*로서, 본 연구에 사용된 영경퀴의 DNA는 이들 식물들의 DNA와 각각 3개 및 4개씩의 염기가 다른 것으로 나타났다. 따라서 정확한 명칭이 정해질 때까지 본 연구에 사용된 영경퀴의 명칭을 *Carduus* spp. JS로 사용하기로 하였다. *C. crispus* DNA의 경우에는 *Carduus* spp. JS의 DNA와 비교하면, Fig 2의 염기서열에서 nucleotides 67, 130 그리고 611의 위치에서 서로 다르게 나타났다. 즉, *Carduus* spp. JS의 경우에는 이 위치에서 각각 A, G, T를 가지고 있는데, *C. crispus*의 경우에는 이 위치에서 T, C, C의 염기를 가지고 있는 것으로 보고되었다. *C. defloratus*와 의 경우는 4개의 위치에서 염기서열이

```

                                30                                60
TCCGTAGGTG AACCTGCGGA AGGATCATCG TCGAAGCCTG CACAGCAGAA CGACCCGTGG
                                90                                120
ACATGTAATC ACAGCCGGGC GTCAAAGGTG TCGGGCGTGA GCCCGGTGCT TGTGATGCCT
                                150                                180
CGTCGACGTG TCTCTGCGTT GCCCCGT TTT GGGGCGTCTG GGATGTCGCG TCGGCACCTA
                                210                                240
AACAAACCCC GGCACGGCAT GTGCCAAGGA AAACAAACA TAGGAAAGGT C GCGTCTCGTG
                                270                                300
ATGCCTCGTT CGCGGGGTGT GCATGGGTCG TGGCCTCTCA ATAACCATAA ACGACTCTCG
                                330                                360
GCAACGGATA TCTCGGCTCA CGCATCGATG AAGAACGTAG CAAAATGCGA TACTTGGTGT
                                390                                420
GAATTGCAGA ATCCCGTGAA CCATCGAGTT TTTGAAACGCA AGTTGCGCCC GAAGCCATTC
                                450                                480
GGCCGAGGGC ACGTCTGCCT GGGCGTCAAC CATCGCGTCG CCCGAGACCA CGCCTCATA
                                510                                540
CGGGGGA TGT GTTTGTC TGG GCGGAGAAAT GGTC TCCCGT GCCGTCGGCG CGGTTGCGCT
                                570                                600
AAAAAGGAGT CCCC TTCGAC GGACGCACGG CTAGTGGTGG TTGATAAGGC CTTCGTATCG
                                630                                660
AGCCGTG TGT TGTAGCGC AAGGGAAGCG CTCTCCGTAG ACCCTAATGT GTCGTC TCGC
                                690                                720
GACGATGCTT CGACCGCGAC CCCAGGT CAG GCGGGA CTAC CCGCTGAGTT TAAGCATATC
                                733
AATAAGCGGA GGA
    
```

Fig. 2. DNA sequence of the 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and 26S rRNA gene of *Carduus* spp. JS (GenBank accession number GU188570). Partial sequence of the 18S rRNA corresponds to nucleotides 1-30. The entire sequences of ITS1, 5.8S rRNA and ITS2 are located at 31-290, 291-451 and 452-675, respectively. Partial sequence of 26S rRNA is at nucleotides 676-733. The nucleotides different from those of *C. crispus* are marked by diamonds and different from those of *C. defloratus* by triangles. The nucleotide where *C. defloratus* has an N is marked by an arrow.

서로 다른 것으로 드러났다. 구체적으로는 Fig. 2의 nucleotides 493, 611, 632, 657의 위치에서 *Carduus* spp. JS는 모두 T를 가지는데 반해 *C. defloratus*는 이 위치에서 A, C, N, A를 가지는 것으로 보고되었다. 그런데 nucleotide 632의 위치에서는 GenBank에 등록된 모든 *Carduus* 속의 식물들이 T를 가지고 있기 때문에 이 위치는 대단히 conserved 되어 있다고 볼 수 있고, 따라서 이 위치에서 N을 가지는 것으로 보고된 *C. defloratus*가 실제로는 T를 가지고 있을 가능성이 대단히 높다고 본다. 그렇게 되면 *Carduus* spp. JS는 *C. defloratus*와도 역시 3개의 위치에서 서로 다른 염기서열을 가지게 된다. 이 경우에 *Carduus* spp. JS는 *C. crispus*와 *C. defloratus*의 중간 위치에 정확하게 놓이게 된다(Fig. 3). Song과 Kim 그리고 Jeong et al.에 의하면 한반도에는 8종의 엉겅퀴가 존재하는 것으로 되어있다[10,22]. 또한 Song과 Kim에 의하면 한국산 엉겅퀴속에 대해서는 도감상의 간단한 형태적 기재가 이루어져 있을 뿐 체계적인 연구에 따른 분류는 전혀 되어 있지 않아서 분포 종수에서도 큰 차이를 보여주고 있다고 되어 있다[22]. GenBank에 염기서열이 등록된 *C. crispus*는 Spain에서 채취된 것이고, *C. defloratus*는 독일에서 채취된 것임을 감안하면, 본 연구에서 사용된 엉겅퀴, 즉 강원도 정선 지역에 자생하는 엉겅퀴가 이들 유럽종과 대단히 가깝다는 것을 알 수 있다. 현재 한반도에서는 *C. crispus*는 귀화해서 자생하고 있는 것으로 보

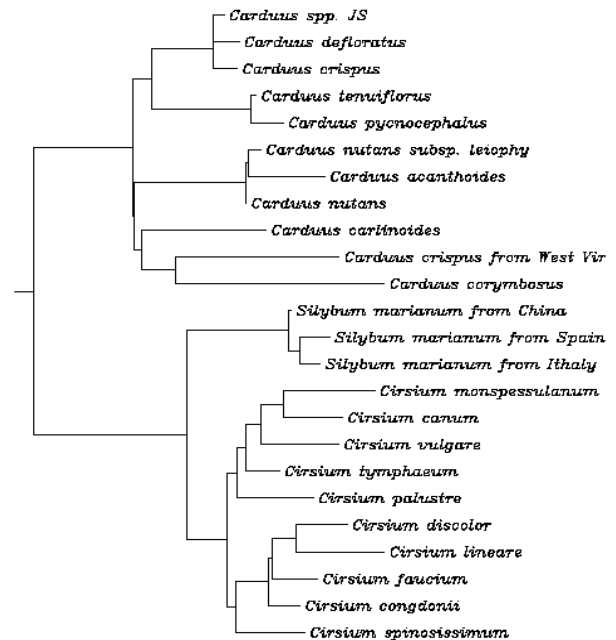


Fig. 3. Phylogenetic tree of selected thistles. Tree was constructed in according to the result obtained from ClustalW1.83 comparison of ITS1, 5.8S rRNA and ITS2 sequences. If the samples were collected in different locations, the locations are shown after the genus and species names.

고가 되어있으나, *C. defloratus*의 존재는 아직까지 보고된 적이 없다. 따라서 *Carduus* spp. JS가 한반도에 귀화해서 자생하는 *C. crispus*의 변종일 수가 있고, 아니면 한반도에서의 존재가 아직까지 보고되지 않은 또 다른 유럽종인 *C. defloratus*의 변종일 가능성도 있고, 또한 이들 두 종간의 교잡종일 가능성도 있다. 현재 국내의 엉겅퀴에 대한 유전학적인 자료가 전무한 상태이기 때문에 좀 더 많은 자료가 알려져야 *Carduus* spp. JS의 정확한 정체를 밝힐 수 있다고 본다.

BLAST search 결과를 토대로 *Carduus* spp. JS와 가장 가까운 엉겅퀴 23종 간의 phylogenetic tree를 작성한 것을 Fig. 3에 나타내었다. 결과를 보면 *Carduus* 속과 *Cirsium* 속은 확연하게 서로 다른 그룹을 형성하고 있는 것을 볼 수 있다. 따라서 Bremmer의 우려에도 불구하고 현재까지는 형태에 의존한 분류와 분자유전학적 분류결과가 서로 잘 일치하고 있다고 볼 수 있다[2].

Jeong et al.에 의하면 통상 엉겅퀴라고 불리는 식물들 간에도 그 유효성분에 있어서의 차이가 크다는 것이 밝혀졌다[10]. 따라서 건조되어 시중에서 약초로 사용되는 한약재들 중에서 genomic DNA의 염기서열을 밝혀서 식물 종을 확인한 다음에 사용하지 않는다면, 그 약효가 서로 확연하게 다를 수 있음을 본 연구에서 추가로 확인할 수 있었다. 물론 형태를 근거로 종(species) 간의 분류를 할 수도 있으나, 종간의 분류에 이용되는 형태적인 기준이 모호하거나, 이러한 기준이 되는 특성들이 식물의 영양상태나 생육환경에 영향을 받을 가능성을 배제할 수가 없기 때문에, 종이나 변종 간의 구분을 위해서는 국내 자생 엉겅퀴의 체계적인 분자유전학적 자료가 더욱 필요하다고 생각된다. 더군다나 이미 가공이 되어서 약재로 시판되는 식물들의 경우에는 형태에 의한 분류가 사실상 불가능하기 때문에, 이런 경우에도 PCR에 의한 분자유전학적 분류가 간단히 사용될 수도 있다고 본다.

그리고 본 연구에 사용된 엉겅퀴와 분자유전학적으로 가까운 종들은 *Cirsium*속의 식물들이 아닌 *Carduus*속의 식물들이기 때문에, mycobacteria에 대한 항균물질의 screening은 *Carduus*속의 식물들로부터 시작하는 것이 유리하지 않는다고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단 기초연구과제(과제번호: KRF-2007-313-E00666)의 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

References

- Barbour, E. K., M. Al Sharif, V. K. Sagherian, A. N. Habre, R. S. Talhouk, and S. N. Talhouk. 2004. Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* **93**, 1-7.
- Bremmer, K. 1994. Asteraceae: cladistics and classification. Timber Press. Poland, OR.
- Dye, C., M. A. Espinal, C. J. Watt, C. Mbianga, and B. G. Williams. 2002. World-wide incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *J. Infect. Dis.* **185**, 1197-1202.
- Fokialakis, N., C. L. Cantrell, S. O. Duke, A. L. Skaltsounis, and D. E. Wedge. 2006. Antifungal activity of thiophenes from *Echinops ritro*. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 1651-1655.
- Haffner, E. and F. H. Hellwig. 1999. Phylogeny of the tribe Cardueae (Compositae) with emphasis on the subtribe Carduinae: an analysis based on ITS sequence data. *Willdenowia* **29**, 27-39.
- Heo, J. 2005. *Dong-Eui-Bo-Gam*. pp. 2977, 3006. Yeogang Press. Seoul.
- Hymete, A., T. H. Iversen, J. Rohloff, and B. Erko. 2005. Screening of *Echinops ellenbeckii* and *Echinops longisetus* for biological activities and chemical constituents. *Phytomedicine* **12**, 675-679.
- Kelch, D. G. and B. G. Baldwin. 2003. Phylogeny and ecological radiation of New World thistles (*Cirsium*, *Cardueae* - Compositae) based on ITS and ETS rDNA sequence data. *Mol. Ecol.* **12**, 141-151.
- Kress, W. J., K. J. Wurdack, E. A. Zimmer, L. A. Weigt, and D. H. Janzen. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 8369-8374.
- Jeong, D. M., H. A. Jung, and J. S. Choi. 2008. Comparative antioxidant activity and HPLC profiles of some selected Korean thistles. *Arch. Pharm. Res.* **31**, 28-33.
- Lee, T. B. 2003. *Coloured flora of Korea*. pp. 183, Hyangmun Publishing Co. Seoul.
- Lee, W. B., H. C. Kwon, O. R. Cho, K. C. Lee, S. U. Choi, N. I. Baek, and K. R. Lee. 2002. Phytochemical constituents of *Cirsium setidens* Nakai and their cytotoxicity against human cancer cell lines. *Arch. Pharm. Res.* **25**, 628-635.
- Lee, Y. M., S. H. Park, J. C. Yang, and H. J. Choi. 2008. Two new naturalized species from Korea, *Carduus natans* and *Lepidium latifolium*. *Korean J. Pl. Taxon.* **38**, 187-196.
- Liu, S., X. Luo, D. Li, J. Zhang, D. Qiu, W. Liu, L. She and Z. Yang. 2006. Tumor inhibition and improved immunity in mice treated with flavone from *Cirsium japonicum* DC. *Int. Immunopharmacol.* **6**, 1387-1393.
- Liu, S., J. Zhang, D. Li, W. Liu, X. Luo, R. Zhang, L. Li, and J. Zhao. 2007. Anticancer activity and quantitative analysis of flavone of *Cirsium japonicum* DC. *Nat. Prod. Res.* **21**, 915-922.
- Loizzo, M. R., G. A. Statti, R. Tundis, F. Conforti, S. Andò, and F. Menichini. 2004. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Cirsium tenoreanum*. *Fitoterapia.* **75**, 577-580.
- Nazaruk, J. and J. Gudej. 2003. Flavonoid compounds from the flowers of *Cirsium rivulare* (Jacq.) All. *Acta. Pol. Pharm.* **60**, 87-89.
- Nazaruk, J. and P. Jakoniuk. 2005. Flavonoid composition and antimicrobial activity of *Cirsium rivulare* (Jacq.) All. flowers. *J. Ethnopharmacol.* **102**, 208-212.

19. Park, J. C., J. M. Hur, J. G. Park, S. C. Kim, J. R. Park, S. H. Choi, and J. W. Choi. 2004. Effects of methanol extract of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* and its principle, hispidulin-7-O-neohesperidoside on hepatic alcohol-metabolizing enzymes and lipid peroxidation in ethanol-treated rats. *Phytother. Res.* **18**, 19-24.
20. Park, J. H. 2004. Atlas of Korean Medicinal Plants. pp. 1201-1202, Shin-Il Press. Seoul.
21. Segovia-Juarez, J. L., S. Ganguli and D. Kirschner. 2004. Identifying control mechanisms of granuloma formation during *M. tuberculosis* infection using an agent-based model. *J. Theor. Biol.* **231**, 357-376.
22. Song, M. J. and H. Kim. 2007. Taxonomic study on *Cirsium* Miller (Asteraceae) in Korea on based on external morphology. *Korean J. Pl. Taxon.* **37**, 17-40.
23. Wang, Y. J., J. Q. Liu, and G. Miehle. 2007. Phylogenetic origins of the Himalayan endemic *Dolomiaea*, *Diplazoptilon* and *Xanthopappus* (Asteraceae: Cardueae) based on three DNA regions. *Ann. Bot.* **99**, 311-322.

초록 : *Mycobacteria*에 대해 항균력을 나타내는 엉겅퀴의 분류를 위한 ITS1, 5.8S rRNA, ITS2의 염기서열 분석

배 영 민*

(창원대학교 미생물학과)

세균 및 진균류의 증식을 억제하는 능력이 있는 것으로 보고된 누로와 대계의 추출물을 사용하여 *Mycobacterium smegmatis* 및 *Mycobacterium fortuitum*의 증식을 억제하는 능력이 있는지를 시험하였다. 그 결과, 누로의 추출물에서는 증식억제능을 발견할 수 없었으나, 대계의 추출물에서는 뚜렷한 증식억제능이 관찰되었다. 따라서 본 연구에 사용된 대계(엉겅퀴)에 대한 분류학적 또는 진화적 분석을 수행하기 위하여 genomic DNA를 추출한 후, ITS1, 5.8S rRNA 유전자 및 ITS2를 포함하는 부분을 PCR로 증폭시켰다. PCR 산물의 염기서열을 분석한 결과, 733-bp의 염기서열이 얻어졌고, 이것을 GenBank에 등록하였다(accession number GU188570). 이렇게 얻어진 염기서열을 사용하여 BLAST analysis를 수행한 결과, 염기서열이 일치하는 생물은 아직까지 GenBank에 보고된 적이 없고, 가장 가까운 식물들은 귀화식물로서 전국적으로 분포하는 *Carduus crispus* (지느러미엉겅퀴) 및 현재까지 국내에 자생하는 것으로 보고된 적이 없는 *Carduus defloratus*로서 각각 3개씩의 염기가 다른 것으로 나타났다.