

약용작물의 기원 판별에 관한 분자생물학적 기술 개발 현황

한은희 · 김윤희 · 이신우

Development of molecular biological techniques for the differentiation of medicinal plant species

Eun-Heui Han · Yun-Hee Kim · Shin-Woo Lee

Received: 5 March 2015 / Revised: 15 March 2015 / Accepted: 15 March 2015
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Medicinal plants resources are becoming important assets since their usages have been expanded to the development of functional foods for human health, more attractive cosmetics, and pharmaceutical industries. However, their phylogenetic origins and names are different from each country and quite often they are mixed each other resulting in the confusion for consumers. In particular, when they are very similar based on their morphological characteristics and distributed as dried roots, it is extremely difficult to differentiate their origins even by specialists. Recently, “DNA barcodes” have been extensively applied to identify their origin of medicinal plant species. In this review, we tried to overview the current research achievements for the development of suitable “DNA barcodes” regarding to the differentiation of medicinal plant species. Furthermore, more advanced techniques including amplification refractory mutation system (ARMS)-PCR, multiplex single base extension (MSBE), high-resolution melting (HRM) curve analyses are also discussed for their practical applications in the authentication of particular medicinal plant species.

서론

최근 약용작물은 기존에 이용되던 한약재뿐만 아니라 기능성 식품, 화장품, 의약품 등의 원료로 그 용도가 점차 확대됨으로서 수요가 기하급수적으로 늘어나고 있는 실정이며 가격 또한 상승하고 있는 실정이다. 그러나 우리나라는 수입에 의존도가 높아 이러한 한약재의 수급불균형이 발생할 가능성이 높다. 또한 한약재의 경우 유통과정에서 그 기원이 부정확하거나 명칭이 유사하여 혼용되는 사례가 많다. 특히 국가별로 한약재를 약으로 사용하면서 약용식물의 기원을 다르게 규정하고 있어 우리나라는 한약재의 정확한 기원을 모르고 위품이 시장에 유통되는 경우가 많아 유통질서가 제대로 확립되지 않아 향후 중국과 일본 등 3국간에 분쟁우려가 많이 발생할 것으로 우려되고 있다. 기존의 관능검사, 형태학적, 이화학적, 세포생화학적 검사법 등에 의존하기보다는 보다 과학적인 진보된 기술의 도입이 시급한 실정이다.

이러한 문제점을 해결하기 위하여 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Sequence Characterized Amplified regions (SCARs), Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS), Amplifcon Length Polymorphism (ALP), Sequence Tagged Site-Restriction fragment Length Polymorphism (STS-RFLP) 등의 분자생물학적 기술을 적용하기 위하여 지난 수년간 많은 연구자들에 의하여 수행되어 왔으나 아직까지 반복성과 신뢰도 등의 문제점으로 인하여 실제 한약재의 위품을 구분하기에 유용한 기술의 개발은 아직 미진한 실정이다.

따라서 최근에는 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)을 보이는 부분을 이용하는 “DNA barcodes”의 개발에 관한 연구에 많은 관심을 갖게 되었다. “DNA barcodes”

E.-H. Han · S.-W. Lee (✉)
경남과학기술대학교, 생명과학대학, 농학 · 한약자원학부
(Dept. of Agronomy & Medicinal Plant Resources, Gyeongnam
National University of Science & Technology, JinJu, Korea)
e-mail: shinwlee@gntech.ac.kr

Y.-H. Kim
경상대학교, 사범대학, 생물교육과 (농업생명과학연구원)
(Dept. of Biology Education, College of Education, IALS,
Gyeongsang National University, Jinju, Korea)

라는 용어는 Arnot et al. (1993)에 의하여 처음 사용되었으며, 그 후 Hebert et al. (2003)에 의하여 cytochrome C oxidase 유전자단편을 이용한 동물의 barcoding에 관한 논문의 발표와 함께 전성기를 맞이하였다. 이후 Consortium for the Barcode of Life (CBOL, <http://barcoding.si.edu>)가 조직되어 국제적인 DNA barcoding연구가 활성화되기 시작하였다. 그러나 아직까지도 동물의 barcode는 미토콘드리아 cytochrome C oxidase I (COI) 유전자에 해당하는 658bp가 가장 유효한 것으로 결정될 수 있었으나 식물의 경우에는 논란이 많고 COI처럼 대표할 수 있는 barcode가 없는 실정이다.

최근에는 Next Generation DNA Sequencing (NGS) 기술의 급속한 발전과 함께 생물다양성의 유지보존과 관련된 자연생태계에서 채취한 샘플 중에서 단일종의 판별, 다양한 가공기술에 의하여 개발된 가공식품에 포함된 단일종의 판별, GMO의 혼재여부 판별 등 다양한 분야에 응용될 수 있는 기술의 개발에 관한 연구가 활발하게 보고되고 있다(Valentini et al. 2008). 따라서 본 리뷰 논문에서는 최근까지 보고된 주요 약용작물 특히 향후 중국, 일본 등과 국가 간 분쟁의 우려가 높은 것으로 사료되는 하수오, 당귀 등의 주요 약용작물을 중심으로 그 기원을 판별하기 위하여 사용된 분자생물학적 기술(DNA barcoding 등)에 관하여 기술의 원리, 성과, 실용화 가능성 그리고 향후 문제점 등을 정리하여 보았다.

식물의 분류에 이용되는 Barcodes 개발 현황

DNA barcoding에 있어서 3가지 주요원칙은 표준화(standardization), 최소화(minimalism), 응용범위(scalability)이라고 기술된바 있다(Hollingsworth et al. 2011). 동물의 경우에는 COI DNA barcode가 이 원칙에 아주 적절한 것으로 확인되었다(Hebert et al. 2003). 그러나 식물의 경우에는 엽록체의 게놈에 존재하는 *rpoC1*, *rpoB*, *matK*, *trnH-psbA*, *rbcL*, *atpF-H*, *psbKI* 유전자 등에 관한 많은 연구결과가 발표되었으나, 현재까지의 연구결과에 의하면 한가지만으로는 충분하지 않으며 이들 중 여러 개를 복합적으로 비교분석한 결과 어느 정도 만족할만한 결과를 얻었다고 하였다. 예를 들면 *rpoC1+rpoB+matK* 또는 *rpoC1+matK+trnH-psbA* (Chase et al. 2007); *rbcL+trnH-psbA* (Kress and Erickson, 2007)등의 조합에 의하여 어느 정도 분류가 가능하였다고 하였다. 또한 CBOL의 Plant working group의 검토 결과에 의하면 *rbcL*과 *matK*를 조합한 경우에 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었으며 이 조합을 “core barcode”로 정한 바 있다(CBOL, 2009).

*matK*와 *rbcL* barcode는 모두 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 엽록체 게놈의 염기서열로부터 프라이머를 디자인하여 전장의 유전자단편을 polymerase chain reaction (PCR)로 증폭하여 얻은 단편을 염기서열로 확인한 것이다. 식물

체의 *matK* 유전자는 진화속도가 가장 빠른 것으로 알려져 있어 동물의 COI barcode와 가장 유사한 것이다. 그러나 불행하게도 애기장대에서 디자인한 프라이머가 모든 식물의 *matK* 유전자를 증폭시킬 수 있는 광역 프라이머로 사용될 수 없다는 게 단점이다. 따라서 clade-specific primer 또는 phylogenetic tree 상에서 보다 가까운 그룹에서 디자인한 프라이머 세트를 다시 개발하여 사용하여야 한다(Wickie et al. 2009; Dunning et al. 2010; Kuo et al. 2011). 반면에 *rbcL* 프라이머는 비교적 넓은 범위의 식물 종을 대상으로 PCR 증폭이 가능하나 그만큼 상동성이 높아 다형성(polymorphism)을 많이 나타내지 않는 것이 단점이라고 알려져 있다.

한편 *rbcL+matK* core barcode에 이어 그 다음으로 많이 연구되어온 엽록체 barcodes는 *trnH-psbA*의 유전자간 DNA (IGS, intergenic spacer) 영역이다. 이 barcodes를 사용하여 *Ficus* (Roy et al. 2010), *Alnus* (Ren et al. 2010), *Quercus* (Piredda, 2010) and *Salix* (von Cräutlein et al. 2011)속의 종간 구분에는 오히려 *rbcL+matK* core barcode보다 좋은 결과를 보였다고 하였다. 또한 *trnL* intron지역 그리고 *trnL*과 *trnF*사이의 IGS 영역 역시 많은 연구대상이 되어 왔다. 특히 *trnL* intron에는 작은 stem-loop구조를 하고 있어 이 지역 주변의 잘 보존되어 있는 양쪽에서 디자인한 프라이머 세트 로 증폭하여 이 영역을 “minibarcodes” 화하여 아주 유용하게 사용될 수 있을 것이라고 주장된 바도 있다(Valentini et al. 2009).

약용작물의 분류 및 위품 판별을 위한 barcodes 개발 현황

이미 전술한 바와 같이 약용작물의 경우에는 국가별로 명칭이 다르고 서로 혼재하여 사용되는 경우가 많으며, 모양이나 형태가 유사한 것을 위품으로 유통되는 경우가 많다. 특히 건조된 뿌리나 약간의 1차 가공과정만 하여도 전문가가 아닌 일반인은 구분을 할 수 없어서 시중에 유통되는 이들 위품을 판별하기 위한 barcodes를 개발한다면 그 응용성은 무한 할 것으로 사료된다.

따라서 약용작물의 구분을 위한 barcodes의 개발은 핵 내 라이보솜 구성 RNA를 암호 하는(nuclear ribosomal) DNA의 internal transcribed spacer region (ITS1과 ITS2)과 엽록체 게놈의 여러 가지 DNA단편을 이용하여 연구되어 왔다. 먼저 ITS를 이용한 연구현황을 Table 1에 요약하였다. 감초 등이 속하여 있는 콩과(Fabaceae)에 해당하는 약용작물들의 ITS2 영역을 PCR로 증폭하여 염기서열분석결과를 비교하여 종내에는 평균 1.7%의 변이를 보이고 전체적으로는 0에서 14.4%까지 변이를 보였다고 하였다. 종간에는 0에서 63%까지의 변이를 보여 평균 8.6%의 변이를 보였다고 하였다. 따라서 시중에 유통되는 위품들의 판별에도 유용하게 사용될 수 있었다고 보고된바 있다

Table 1 List of medicinal plant species that have been differentiated by using internal transcribed spacer (ITS) of nuclear ribosomal DNA as a barcode

Family/genus/species	References	Comments
Fabaceae (<i>Leguminosae</i>)	Gao et al. 2010	(Licorice) <i>Glycyrrhiza uralensis</i>
753 genera 4,800 species	Chen et al. 2010	polymorphism (92.7%)
50,790 plants 12,221 animals	Yao et al. 2010	
Angelica species	He et al. 2011	
Breeae & Cirsii herba	Moon et al. 2013	
Angelica species	Kim et al. 2012	
<i>Schizonepta spike</i>	Baigalmaa et al. 2009	Hyung-Gae
<i>Fallopia multiflora</i>	Sun et al. 2013	
<i>Cnidii Rhizoma</i>	Song et al. 2009	
<i>Fallopia multiflora</i>	Zheng et al. 2009	primer design for differentiation by PCR
<i>Ligusticum chuanxiong hort vs Cnidium officinale Makino</i>	Liu et al. 2002	Chinese Chuanxiong vs Japan Chuanxiong

(Gao et al. 2010). Chen 등(2010)은 753속 4,800종에 해당하는 방대한 시료에 대하여 ITS2 영역의 염기서열을 분석한 결과 92.7%에 해당하는 종의 구분이 가능하여 약용식물의 종간 구분을 위한 범용 바코드로 지정하자고 제의를 하였다. 또한 Yao et al. (2010)도 50,790 종의 식물과 12,221 종의 동물에 대하여 ITS2 영역의 염기서열을 비교분석한 결과 67~91%까지 종의 구분이 가능하였으며 여기에서 ITS2 영역의 secondary structure를 이용하면 범용으로 사용될 수 있는 식물용 barcode의 사용가능성을 제시하였다. 또한 He 등(2011)도 당귀속에 속하는 다양한 종에 대하여 ITS 지역의 염기서열을 비교하여 phylogenetic tree를 제작하여 유연관계를 분석할 수 있었다고 하였다. 특히 중국의 시중에서 말린 뿌리 상태로 유통되어 구분이 어려운 당귀 시료들을 시중에서 수집하여 조사한 결과 일부 위품의 판별이 가능하였다고 하였다. Kim 등(2012)도 ITS 지역을 이용하여 분석한 결과 토당귀와 일당귀가 중국 당귀보다 유연관계가 가까운 것으로 조사되었으며, 한·중·일 3국에서 각기 다른 기원 종으로 규정하고 있는 당귀(當歸)류의 구별을 위해 시중에서 유통 중인 당귀(當歸)를 종별로 3점씩, 총 9점을 구입하여 미각패턴과 ITS DNA의 염기서열을 비교한 결과 일치하는 결과를 얻었다고 보고하였다(Kim et al. 2012).

천궁 역시 ITS1과 ITS2 유전자 단편의 염기서열을 비교

Table 2 Chloroplast barcodes for the differentiation of medicinal plant species

Family/Genus/Species	Chloroplast barcodes	References
<i>Polygonaceae</i>	<i>rbcL</i> , <i>trnH-psbA</i> , <i>ndhJ</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC</i> , <i>accD</i>	Song et al. 2009
<i>Cnidium officinale</i> , <i>Ligusticum chuanxiong</i>	<i>trnK</i>	Zhu et al. 2007
<i>Breeae</i> , <i>Cirsii herba</i>	<i>matK</i> , <i>rbcL</i>	Moon et al 2013
<i>Pinellia species</i>	<i>matK</i> , <i>rbcL</i>	Lee et al. 2013
<i>Fallopia multiflora</i> (Thumb) Harald	<i>matK</i> , <i>rbcL</i> , <i>psbA-trnH</i>	Sun et al. 2013
<i>Fagopyrum species</i>	<i>trnK</i> , <i>matK</i>	Ohsako & Ohnishi, 2001
<i>Cnidium officinale</i> , <i>Ligusticum chuanxiong</i>	<i>matK</i>	Liu et al. 2002
<i>Fallopia multiflora</i> (Thumb) Harald	<i>matK</i>	Yan et al. 2008
<i>Liriope platyphylla</i> Wang et Tang, <i>Phiopogon japonicus</i> Ker-Gwaler	<i>rpoCI</i>	Park et al. 2014

분석한 결과 토천궁과 일천궁, 중국천궁은 모두 천궁속(*Cnidium*) 보다는 고분속(*Ligusticum*)과 같은 분계조를 형성하고 있는 것으로 나타났으며, 또한 한국산 천궁과 중국산 천궁의 두 집단 간에 식별이 가능한 SNPs (Single nucleotide polymorphisms)를 확보하여 서로 간에 구분이 가능하였다고 함(Song et al. 2009). Baigalmaa et al. (2009)은 26계통의 형개(*Schizonepeta spike*)로 알려진 한약재 시료를 채취하여 ITS 영역의 염기서열을 분석하여 비교한 결과 *Schizonepeta tenuifolia* plants로 표기된 9종은 모두 진품으로 판명할 수 있었다고 보고하였다. 또한 Song et al. (2009)은 일천궁, 토천궁, 중국천궁을 수집하여 ITS 영역의 염기서열을 분석한 결과 이들을 구분할 수 있는 SNP들을 확인할 수 있었다고 하였다. 이외에도 6계통의 *Fallopia multiflora*에 속하는 시료를 대상으로 ITS 영역의 SNP를 구분할 수 있는 primer를 디자인하여 위품으로부터 종을 판별하는데 성공하였다고 보고한바 있다(Zheng et al. 2009). 또한 중국의 Liu 등도 이미 2002년도에 일본천궁(*Cnidium officinale* Makino)과 중국천궁(*Ligusticum chuanxiong* Hort)의 ITS 영역의 염기서열을 조사한 결과 단 한 개의 염기 치환이 있었다고 보고하였다(Liu et al. 2002).

다음으로 엽록체 barcodes의 개발을 위한 연구를 Table 2에 요약하였다. 이들을 검토하여 보면 적하수오 등이 속한 붉은조롱과(*Polygonaceae*) 약용작물을 위품으로부터 판별하기 위하여 18종에 속하는 38계통에 대하여 6가지의 엽록체 barcodes와 핵내 존재하는 ITS 등을 PCR로 증폭한 다음 염기서열을 분석하여 조사한 결과 *trnH-psbA*가 가장

높은 다양성을 보였고(20.05%), 위품에 해당되는 유사 약용작물들을 쉽게 판별할 수 가 있었다고 보고하였다(Song et al. 2009). 대계(大薊)와 소계(小薊)의 기원 종을 구분하기 위하여 rDNA-ITS, *matK* 및 *rbcL* 부위 DNA 바코드 분석을 수행한 결과 ITS가 가장 많은 다형성을 보여 이들의 구분은 물론 위품인 *Carduus*속의 지느러미엉겅퀴를 종단위에서 감별할 수 있었다고 보고하였다(Moon et al. 2013). 반하(半夏)의 기원식물을 구분하기위하여 *Pinellia ternata*, *Pinellia pedatisecta*, *Pinellia tripartita*, *Typhonium flagelliforme*에 속하는 19계통을 채취하여 *matK*와 *rbcL*두 유전자 영역의 염기서열을 비교한 결과, *matK* 유전자 영역에서 *rbcL* 유전자 보다 반하류의 종 감별에 유용한 SNP를 다수 포함하고 있어 *matK* 유전자가 *rbcL* 유전자 보다 반하류의 종 감별에 더 유용한 DNA 바코드로 이용될 수 있을 것으로 사료된다고 보고하였다(Lee et al. 2013)

또한 Sun et al. (2013)은 *Fallopia multiflora* 종에 속하는 계통들을 중국의 17성에서 서식 또는 재배되고 있는 야생종과 재배종으로부터 105계통을 수집하여 *matK*, *rbcL*, *psbA-trnH* 그리고 ITS barcodes들을 사용하여 분석한 결과 *psbA-trnH*가 가장 양호한 결과를 보였으며 이들 4가지 barcodes를 조합하여 보다 판별 효율을 증진시킬 수 있었다고 하였다. 또한 *trnK*와 *matK* 영역을 이용하여 *Polygonaceae* 과의 메밀속(*Fagopyrum*)에 속하는 *F. leptopodium*종으로 알려진 10계통과 과 *F. stictice*종으로 알려진 5계통을 대상으로 분석한 결과 상호간에 9개의 염기치환이 있었음을 확인하고 구분이 가능하였다고 하였다(Ohsako & Ohnishi 2001). 이외에도 중국천궁과 일본천궁의 *matK* 영역을 비교분석한 결과 단 하나의 염기치환을 확인하였다고 하였으며(Liu et al. 2002), 중국에서만 서식하는 것으로 알려진 중국 토종인 *Fallopia multiflora* (Thumb) Harald의 *matK* 영역의 염기서열을 이용하여 위품을 구분할 수 있는 SNP를 확인 할 수 있었다고 하였다(Yan et al. 2008). 뿐만 아니라 국내외에서 수집된 26계통의 맥문동에 대하여 *rpoC1* 유전자의 염기서열을 비교분석하여 SNP를 확인하고 이들을 판별할 수 있는 프라이머까지 개발하여 국내특허를 획득한 것으로 알려졌다(Park et al. 2014).

DNA barcodes를 이용한 진보된 기술의 개발현황

전술한바와 같이 DNA barcodes는 SNPs를 찾아내어 상호간에 구분을 하는 기술로 고도로 전문화된 전문가가 필요하다. 따라서 보다 단순화되고 효율적으로 반복이 가능하고 저렴한 가격에 수행할 수 있는 기술들을 개발하여 현장에서 실용화가 가능하여야 한다. 이러한 관점에서 가장 쉬운 방법은 SNP를 포함하는 프라이머를 제작하여 PCR에 의하여 증폭되는 단편을 전기영동하여 밴드의 유무로 판단하는 것일 것이다. 그러나 대부분의 경우

Table 3 Advanced techniques for the identification of medicinal plant species

Techniques	Target regions	Family/Genus /Species	References
ARMS-PCR	<i>Chs</i>	<i>Panax ginseng</i>	Yang et al. 2012 KR Patent 10-2012-0106414
MSBE	<i>trnK</i>	<i>Cnidium officinale</i> <i>Ligusticum chuanxiong</i>	Zhu et al. 2007
HRM	<i>ITS</i> , <i>trnL-F</i> , <i>rpl36-ps8</i>	Berry species	Jaakola et al. 2010
	<i>matK</i>	<i>Hellevorous niger</i> <i>Veratrum niger</i>	Mader et al. 2011
	<i>ITS2</i>	<i>Sideritis species</i>	Kalivao et al. 2014
	Chloroplast <i>IGS(62)</i>	<i>Panax species</i>	Kim et al 2013

에 단 하나 또는 두 개의 염기서열의 차이가 나는 프라이머를 제작하여 PCR을 수행하였을 경우에도 동일한 PCR 산물을 생산하기 때문에 보다 정밀한 기술이 필요하다. 현재까지 이러한 진보된 기술을 이용하여 약용작물에 적용한 사례들을 요약하여 보면 Table 3과 같다.

Amplification refractory mutation system (ARMS)

일반적으로 PCR은 3'-말단의 염기가 주형과 완전히 일치할 때에 가장 확실하게 이용될 수 있는 기술이다. 그러나 실제로는 3'-말단의 염기가 하나 혹은 두개 틀려도 PCR로 증폭이 가능하기 때문에 판별이 어려운 경우가 대부분이다. 따라서 ARMS-PCR은 이러한 문제점을 극복하기 위하여 SNP에 가장 가깝게 인접한 2, 3번째 염기서열을 변경하여 SNP 프라이머의 특이성을 높이고자 하는 기술이다. 실제로 인삼의 경우 금품종과 청선종에만 유일하게 나타나는 SNP를 포함하는 프라이머를 제작하여 ARMS-PCR을 수행한 결과 다른 인삼품종과 구분이 가능한 특정 밴드를 생산할 수 있었다. 이때 프라이머는 SNP가 3'-말단에 위치하게 하고 그로부터 5'-쪽으로 3번째의 염기서열을 변이가 일어나도록 디자인하여 금품종과 청선종은 한 개의 염기서열이 차이가 있으나 다른 품종들은 두 개의 염기서열이 차이가 나게 하여 PCR을 수행하였을 경우 보다 확실하게 밴드의 유무를 확인 할 수 있는 결과를 얻어 이 기술을 특허로 등록 하였다(Yang et al. 2012).

ARMS기술은 Newton et al.(1989)에 의하여 처음 보고된 기술로서, 기본적으로는 allele-specific (AS)-PCR기술이다. 그러나 예를 들어 G가 C로 점 돌연변이(point mutation)가 일어난 경우에 ARMS primer의 3'-말단은 G가되어야 치

Table 4 The strength of mismatch pairings (Little, 1994)

Strength	Mismatch types
Maximum	G-A, C-T, T-T
Strong	C-C
Medium	A-A, G-G,
Weak	C-A, G-T
None	A-T, G-C

환된 C와 결합이 될 것이다. 하지만 이 프라이머는 정상적인 유전자단편과도 G-G mismatch 결합이 가능하며 이는 약한 mismatch이어서 primer의 extension을 효율적으로 저해하지 못하여 PCR반응에 의하여 증폭된 동일한 크기의 밴드를 형성한다. 다만 강한 mismatch에 해당하는 C-C, G-A, A-A의 경우에만 100% 또는 95%까지 염기서열의 합성을 저해할 수 있다. 따라서 3'-말단의 SNP위치에서 2, 3, 4번째에 C-C, G-A, A-A mismatch 염기를 도입하여 제작한 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 100% 저해할 수 있도록 고안한 기술이다. 일반적으로 3'-말단의 SNP가 약하면 두 번째 mismatch는 강한 것으로 디자인한다. 그리고 두 번째 것을 디자인하여 결과를 보고 세 번째 염기를 변경하도록 디자인 것을 시도한다. Litte(1994)는 mismatch결합의 강약을 Table 4와 같이 보고하였으며 이들 조합을 적당하게 사용하여 프라이머를 제작하여 몇 번의 시도를 거쳐 가장 적당한 조건을 설정하는 것이 중요하다고 하였다.

Multiplex Single base Extension (MSBE) 분석기술

이 기술은 일종의 mini-sequencing 기술로 분석하고자 하는 SNP를 포함하는 부위를 증폭한 다음 dNTP와 프라이머를 제거한 후 SNP 바로 앞부분까지를 포함하는 프라이머(extension primer)를 넣고 형광색소로 표지된 ddNTP를 이용하여 하나의 염기만 신장시킨다. 이렇게 하면 서로 다른 형광색을 나타내는 ddNTP중 하나만 신장하고 반응은 종결되며 이를 자동염기서열분석장치를 이용하여 분석하는 기술이다. 따라서 이 기술은 여러 종의 SNP를 포함하는 부위를 이용하여 길이가 서로 다른 여러 개의 extension primer를 사용하면 2종 이상의 시료가 혼재되어 있을 경우에 이들을 구분하기에 용이한 기술이다. 약용작물에 이용된 사례로는 천궁 즉 *Cnidium officinale* (일본에서 사용되는 천궁 학명)과 *Ligusticum chuanxiong* (중국에서 사용되는 천궁 학명)을 확실하게 구분이 가능하였다고 하였다. 보다 자세하게 살펴보면 이들의 속간 구분을 위하여 엽록체 유전자인 *trnK* 유전자의 염기서열을 비교분석하여 상류(upstream)에서 각각 767, 924, 964번째 염기서열에 해당하는 위치에서 나타나는 SNP를 확인하

고, 이 위치에서 각각 14mer, 23mer, 30mer 길이로 디자인된 프라이머를 사용하여 multiplex single base extension (MSBE)을 수행하여 두 종을 쉽게 구분할 수 있었다고 하였다(Zhu et al. 2007). 또한 이 기술로 Dongxiong이라고 불리는 중국의 또 다른 지역에서 재배되고 있는 천궁은 그 기원이 *Cnidium officinale*인 것으로 판명할 수 있었다. 중국에서는 천궁을 Chuanxiong이라고 부르며 일본식발음으로는 Senkyu, 한국에서는 천궁이라고 부른다. 이들의 외부형태학적인 모양은 유사하나 그 식물기원은 서로 다르다. 그러나 *rbcl*유전자와 18S rRNA 유전자의 염기서열을 조사한 결과 상호간에 100% 일치하여 구분이 불가능하였다고 하였다(Fushimi et al. 1997).

High-resolution melting (HRM) curve 분석기술

post-PCR melting curve 분석기술은 SNP를 포함하는 유전자단편을 증폭시킨 다음 초당 0.5~1.0°C씩 온도를 증가시키면서 melting curve를 조사하여 그 차이를 이용하여 종을 판별하는 기술이다. 주로 SYBR Green이라는 형광염색화합물을 사용하는데 이는 이중나선(dsDNA)을 한 DNA의 minor groove에 삽입되면서 강한 발색을 나타낸다. PCR로 이중나선 DNA를 많이 증폭하게 되면 그만큼 상대적으로 발색이 강하여진다. 따라서 SYBR Green dye를 포함하는 반응용액에서 PCR로 증폭시킨 이중나선 DNA를 초당 0.5~1.0°C씩 온도를 올리면서 melting curve를 보면 초기에 많은 양의 이중나선 DNA가 존재하기 때문에 강한 발색에서 온도를 서서히 상승하면서 단일가닥으로 melting되면서 발색정도가 서서히 약하여진다. 이러한 melting curve의 굴곡의 차이를 갖고 data를 분석하거나 또는 시간별 온도에 대한 음의 형광값(-dF/dT)으로 계산하여 얻은 melting peak를 갖고 분석을 한다. 그러나 이 기술로는 아주 적은 수(하나 또는 두 개)의 SNP를 구분할 수 없다는 단점이 있다.

따라서 보다 정밀하고 효율이 뛰어난 것으로 알려진 High Resolution Melting (HRM) Curve analysis 기술이 보고되었다. 이 기술의 기본 원리는 post-PCR melting curve analysis 기술과 동일하다. 그러나 고농도에서도 DNA중합효소의 기능을 저해하지 않는 형광색소인 LC Green PLUS, Eva Green, SYT09, ResoLight 등을 사용하여 모든 증폭된 DNA의 전체 길이에 형광색소가 삽입이 될 수 있도록 하고, 아주 미세한 단위 즉 초당 0.01~0.2°C로 온도상승조절이 가능한 특수 기계(High Resolution Melting Master, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany 또는 Ssofast™ EvaGreen supermix, BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA, Light Cycler® 480)를 사용한다. 이렇게 하면 하나의 SNP차이도 구분이 가능하다. 따라서 이 기술은 극도로 민감하여 해바라기, 땅콩, 옥수수, 참깨, 쌀 등에서 추출한 기름에 적

용하여 상호간에 구분이 가능하다고 보고하였다(Vietina et al. 2013). 이러한 연구결과는 향후 HRM기술의 응용 범위는 각종 한약재의 가공품뿐만 아니라 한약재를 이용한 탕재 등에 적용하는 등 그 응용범위가 크게 늘어갈 것으로 전망된다.

ITS 영역 또는 엽록체 DNA에 해당하는 *trnL-F*, *rpl36-ps8* 영역을 증폭하여 얻은 단편을 대상으로 HRM분석기술을 적용한 결과 시중에 유통되는 야생형은 물론 다양한 베리(berry)종들의 판별이 가능하였다고 하였다. 특히 불과 4시간 내에 DNA시료를 채취하여 HRM분석까지 마칠 수 있었다고 하였다. 또한 가공제품의 원료로 사용되는 혼합시료로부터 손쉽게 특정 종의 존재여부를 판별할 수 있었다고 보고하며, 향후 유통과정에서 위품들을 판별할 수 있는 기술로 크게 이용될 것이라고 예견하였다(Jaakola et al. 2010). 또한 크리스마스장미라고 불리는 *Helleborus niger*와 영국에서 “Black Hellebore”로 불리는 *Veratrum niger*와 시중에 쉽게 혼재하여 유통되므로 이들을 구분하기 위한 barcode로 *matK* 영역을 선택하여 HRM기술을 적용한 결과 1 : 1,000 비율로 모르는 시료에 혼재되어 있거나 1 : 200,000 비율로 *Veratrum niger*가 혼재한 경우에도 판별이 가능할 정도로 민감하였다고 보고하였다(Mader et al. 2011). 또한 최근에는 그리스의 고산지대에서 군락을 이루고 있는 *Sideritis* 종은 약용식물로 향균, 소염, 진정제로 효과가 뛰어나 차로 애용되고 있는 식물인데 다양한 종류의 종이 자라며 일부는 약효가 아주 뛰어나고 일부는 독성도 있는 것으로 알려져 이들을 정확하게 판별할 수 있는 기술이 필요하였다. 따라서 ITS2영역에 대한 HRM분석기술을 적용하여 특별한 처리과정이 필요 없고 짧은 시간에 아주 효율적으로 서로 간에 구분이 가능하였다고 보고된바 있다(Kalivas et al. 2014). 또한 인삼의 엽록체계놈의 모든 유전자간 DNA의 염기서열을 분석하고 이들에 대한 HRM분석기술을 적용하여본 결과 62개의 IGS영역에서 다형성을 확인하였으며 이 중에서 특히 *trnE-trnT*, *trnT-psbD*, *ndhFrpl32*, *rpl14-rpl16* spaces가 인삼종간에 가장 다양성이 높게 나타났으며, 분자시계(molecular clocks)를 계산한 결과 130만 년 전에 *P. notoginseng*이 다른 *Panax* 종으로부터 분지되었을 것이라고 추정하였다(Kim et al. 2013).

사 사

본 연구는 농림축산식품부 농생명산업기술개발사업(과제번호 : 314021-03- 1-SB050)에 의해 이루어진 결과입니다.

References

- Arnot DE, Roper C, Bayoumi RA (1993) Digital codes from hypervariable tandemly repeated DNA sequences in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene can genetically barcode isolates. *Mol Biochem Parasitol* 61:15-24
- Baigalmaa J, Kim MK, Noh JH, Hua S, Yang DC (2009) Phylogenetic analysis of *Schizonepeta Spike* on the basis of DNA sequences. *K J Med Crop Sci* 17:46-53
- CBOL Plant Working Group (2009) A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci* 106:12794-12797
- Chase MW, Cowan RS, Hollingsworth PM, van den Berg C, Madriñán S, Petersen G, Seberg O, Jørgensen T, Cameron KM, Carine M, Pedersen N, Hedderson TAJ, Conrad F, Salazar GA, Richardson JE, Hollingsworth ML, Barraclough TG, Kelly L, Wilkinson M (2007) A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon* 56: 295-299
- Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, Shi L, Zhu Y, Ma X, Gao T, Pang X, Luo K, Li Y, Li X, Jia X, Lin Y, Leon C (2010) Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One* 5:1-8, e8613
- Dunning LT, Savolainen V (2010) Broad-scale amplification of *matK* for DNA barcoding plants, a technical note. *Botanical J of the Linnean Society* 164:1-9
- Fushimi H, Komatsu K, Isobe M, Namba T (1997) A new approach for the identification of a Chinese traditional medicine, “Chuanxiong” by 18S ribosomal RNA gene sequences. *Phytomedicin* 3:387-389
- Gao T, Yao H, Song J, Liu C, Zhu Y, Ma X, Pang X, Xu H, Chen S (2010) Identification of medicinal plants in the family *Fabaceae* using a potential DNA barcode ITS 2. *J Ethnopharmacology* 130:116-121
- He Y, Hou P, Fan G, Song Z, Liu H, Li Y, Zhang Y (2011) Internal transcribed spacers (ITS) identification of *Angelica anomala Lallemand Chuanbaizhi* (in Chinese) cultivars collected in Sichuan and their molecular phylogenetic analysis with other *Angelica L.* species. *J Med Plants Res* 5:3653-3659
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Royal Soc London, series B* 270:313-321
- Hebert PDN, Ratnasingham S, de Waard JR. (2003) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc Biol Sci* 270:S96-99
- Hollingsworth PM, Graham SW, Little DP (2011) Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS One* 6:e19254
- Jaakola L, Suokas M, Haggman (2010) Novel approaches based on DNA barcoding and high-resolution melting of amplicons for authenticity analyses of berry species. *Food Chem* 123:492-500
- Kalivas A, Ganopoulos I, Xanthopoulou A, Chatzopoulou P, Tsafaris A, Madesis P (2014) DNA barcode ITS2 coupled with high resolution melting (HRM) analysis for taxonomic identification of *Sideritis* species growing in Greece. *Mol Biol Rep* 41:5147-155
- Kim JH, Jung JY, Choi HI, Kim NH, Park JY, Lee Y, Yang TJ (2013) Diversity and evolution of major *Panax* species revealed

- by scanning the entire chloroplast intergenic spacer sequences. *Genet Resour Crop Evol* 60:413–25
- Kim YH, Choi G, Lee HW, Lee GH, Chae SW, Kim YH, Lee MY (2012) Comparison of *Angelica* species roots using taste sensor and DNA sequencing analysis. *Kor J Herbology* 27:37–42
- Kress WJ, Erickson DL (2007) A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE* 2: e508.
- Kuo LY, Li FW, Chiou WL, Wang CN (2011) First insights into fern *matK* phylogeny. *Mol Phylo Evol* 59:556–566
- Lee YM, Moon BC, Ji Y, Kim WJ, Kim HK (2013) Molecular Authentication of Pinelliae Tuber from its adulterants by the analysis of DNA barcodes, *matK* and *rbcL* genes. *Kor. J. Herbology* 2013;28(6):53–58
- Little S (1994) Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. In: current protocols in human molecular genetics. (Eds. Nicholas C Dracopoli et al.) Jhon Wiley & Sons, IOnc. New York, pp9.8.1.- 9.8.12
- Liu YP, Cao H, Han GR, Fushimi H, Komatsu K (2002) *MatK* ITS nucleotide sequencing of crude drug chuanxiong and phylogenetic relationship between their species from China and Japan. *Yao Xue Xue Bao* 37:63–68
- Mader E, Ruzicka J, Schmiderer C, Novak J (2011) Quantitative high-resolution melting analysis for detecting adulterations. *Anal Biochem* 409:153–155
- Moon BC, Lee YM, Ji Y, Choi G, Chun JM, Kim HK (2013) Molecular authentication and phylogenetic analysis of plant species for *Breeseae* and *Cirsii* Herba based on DNA barcodes. *Kor J Herbology* 28:75–84
- Newton CR, Graham A, Heptinstall LE (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system(ARMS). *Nucl Acids Res* 17:2503–2516
- Ohsako T, Ohnishi O (2001) Nucleotide sequence variation of the chloroplast *trnK/matK* region in two wild *Fagopyrum* (*Polygonaceae*) species, *F. leptopodium* and *F. statice*. *Genes Genet Syst* 76:39–46
- Park YJ, Kwon SO, Park JW (2014) Identification method of *Liriope* species and identification probe thereof. Korea patent 10-2014-0038154
- Piredda R, Simeone MC, Attimonelli M, Bellarosa R, Schirone B (2010) Prospects of barcoding the Italian wild *dendroflora*: oaks reveal severe limitations to tracking species identity. *Mol Eco Res* 11:72–73
- Ren BQ, Xiang XG, Chen ZD (2010) Species identification of *Alnus* (*Betulaceae*) using nrDNA and cpDNA genetic markers. *Mol Eco Res* 10: 594–605
- Roy S, Tyagi A, Shukla V, Kumar A, Singh UM, et al. (2010) Universal plant DNA barcode loci may not work in complex groups: A case study with Indian *Berberis* species. *PLoS ONE* 5: e13674
- Song IG, An BR, Seo BI, Park SJ (2009) Molecular marker to identify and origin of *Cnidii Rhizoma* from Korea and China. *Kor J Herbology* 24:1–8
- Sun XQ, Bai MM, Yao H, Gao JI, Li MM, Hang YY (2013) DNA barcoding of populations of *Fallopia multiflora*, an indigenous herb in China. *Genet Mol Res* 12:4078–4089
- Valentini A, Pompanon F, Taberlet P (2008) DNA barcoding for ecologists. *Trends Ecol Evol* 24:110–130
- Valentini A, Miquel C, Nawaz MA, Bellemain EVA, Coissac E, Pompanon F, Gielly L, Ruaud C, Nascetti G, Wincker P, Swenson JE, Taberlet P (2009) New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the *trnL* approach. *Mol Ecol Res* 9:51–60
- Vietina M, Agrimonti C, Marmioli N (2013) Detection of plant oil DNA using high resolution melting (HRM) post PCR analysis: A tool for disclosure of olive oil adulteration. *Food Chem* 141:3820–3826
- von Cräutlein M, Korpelainen H, Pietiläinen M, Rikkinen J (2011) DNA barcoding: a tool for improved taxon identification and detection of species diversity. *Biodiversity and Conservation* 20:373–89.
- Wicke S, Quandt D (2009) Universal primers for amplification of the *trnK/matK* region in land plants. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 66:285–88.
- Yan P, Pang QH, Jiao XW, Zhao X, Shen YJ, Zhao SJ (2008) Genetic variation and identification of cultivated *Fallopia multiflora* and its wild relatives by using chloroplast *matK* and 18S rRNA gene sequences. *Planta Med* 74:1504–1509
- Yang DC, Wang HD (2012) SNP primers for Gumpoong and Chungsun selection of Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) and method for Gumpoong and Chungsun distincton using the same. KR patent 10-2012-0106414
- Yao H, Song J, Liu C, Luo K, Han J, Li Y, Pang X, Xu H, Zhu Y, Xiao P, Chen S (2010) Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS ONE* 5:e13102
- Zheng CJ, Zhao SJ, Zhao ZH, Guo J (2009) Molecular authentication of the traditional medicinal plant *Fallopia multiflora*. *Planta Med* 75:870–872
- Zhu S, Fushimi H, Han G, Tsuchida T, Uno T, Takano A, Komatsu K, (2007) Molecular identification of “*Chuanxiong*” by nucleotide sequence and multiplex single base extension analysis on chloroplast *trnK* gene. *Biol Pharm Bull* 30:527–531