大韓本草學會誌 제34권 제6호(2019년 11월)
Kor. J. Herbol. 2019 ; 34(6) : 91-97

ISSN 1229-1765(Print), ISSN 2288-7199(Online)
http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2019.34.6.91.

오이풀, 흰오이풀, 긴오이풀의 NGS 기반 유전체 서열의 완전 해독 및 차세대 염기서열 재분석으로 탐색된 SNP 기반 HRM 분자표지 개발

심미옥#, 장지훈, 정호경, 황태연, 김선영, 조현우*

한국한의약진흥원 한약자원본부

Development of HRM Markers Based on Identification of SNPs from Next-Generation Sequencing of *Sanguisorba officinalis*, *Sanguisorba tenuifolia* f. alba (Trautv. & Mey.) Kitam and *Sanguisorba tenuifolia* Fisch. ex Link

Mi-Ok Sim#, Ji Hun Jang, Ho-Kyung Jung, Taeyeon Hwang, Sunyoung Kim, Hyun-Woo Cho*

National Development Institute of Korean Medicine, Jangheung-gun 59338, Korea

ABSTRACT

Objective : To establish a reliable tool between for the distinction of original plants of Sanguisorbae Radix, we analyzed the complete chloroplast genome sequence of Sanguisorbae Radix and identified single nucleotide polymorphisms (SNPs).

Materials and methods : The chloroplast genome sequence of *Sanguisorba officinalis, Sanguisorba tenuifolia* f. alba (Trautv. & Mey.) Kitam and *Sanguisorba tenuifolia* Fisch. ex Link obtained using next-generation sequencing technology were described and compared with those of other species to develop specific markers. Candidate genetic markers were identified to distinguish species from the chloroplast sequences of each species using Modified Phred Phrap Consed and CLC Genomics Workbench programs.

Results : The structure of the chloroplast genome of each sample that had been assembled and verified was circular, and the length was about 155 kbp. Through comparative analysis of the chloroplast sequences, we found 220 nucleotides, 158 SNPs, and 62 Indel (insertion and/or deletion), to distinguish Sanguisorba officinalis, Sanguisorba tenuifolia f. alba (Trautv. & Mey.) Kitam and Sanguisorba tenuifolia Fisch. ex Link. Finally, 15 specific SNP genetic markers were selected for the verification at positions. Avaliable primers for the dried herb, which is used as medicine, were used to develop the PCR amplification product of Sanguisorbae Radix to assess the applicability of PCR analysis.

Conclusion : In this study, we found that Fendel-qPCR analysis based on the chloroplast DNA sequences can be an efficient tool for discrimination of *Sanguisorba officinalis*, *Sanguisorba tenuifolia* f. alba (Trautv. & Mey.) Kitam and *Sanguisorba tenuifolia* Fisch. ex Link.

Key words : Sanguisorbae Radix, Genetic Marker, Chloroplast Genome, Single Nucleotide Polymorphism(SNP)

Ⅰ. 서 론

오이풀(*Sanguisorba officinalis* Linne)은 장미과 오이풀속에 속하는 여러해살이 풀이며, 오이풀 속은 우리나라에는 오이풀, 긴오이풀, 흰오이풀, 큰오이풀, 산오이풀 등 약 5종이 분포하고 있다[1]. 오이풀은 화상치료, 지혈작용, 구토억제,

*Corresponding author : Hyun-Woo Cho, Korean Medicinal Herbs Research Team, National Development Institute of Korean Medicine, 288 Woodland load, Jangheung, Jeonnam, 59338, Korea.
· Tel : +82-61-860-2814 · Fax : +82-61-864-8706 · E-mail : johw7@nikom.or.kr
First author : Mi-Ok Sim, Korean Medicinal Herbs Research Team, National Development Institute of Korean Medicine, 288 Woodland load, Jangheung, Jeonnam, 59338, Korea.
· Tel : +82-61-860-2814 · Fax : +82-61-864-8706 · E-mail : smo0208@nikom.or.kr
· Received : 17 October 2019 · Revised : 14 November 2019 · Accepted : 30 November 2019

항암 및 항균용으로 사용되는 약용 식물로서 생약명 지유(地楡)의 기원식물이다[2]. 대한민국약전외한약(생약)규격집에 수록된 지유의 기원식물은 장미과(Rosaceae)에 속하는 오이풀(*Sanguisorba officinalis* Linne) 또는 장엽지유의 뿌리를 말한다[2].

일반적으로 절편 형태로 유통되는 약용 식물의 특성상 외형적인 특징으로 기원식물을 구분하기가 매우 어렵기 때문에 위품 또는 다른 종과의 혼용 문제가 일어나고 있다[3]. 이를 해결하기 위해 보다 체계적이고 과학적인 종판별 기술이 요구되고 있으며, 이에 가장 적합한 방법은 DNA 수준에서 종을 식별할 수 있는 분자마커를 활용하는 것이다.

기존의 분자마커를 이용한 식물 DNA 바코딩의 경우 엽록체 유전체에서 변이가 많다고 알려진 rbcL, matK, trnH-GUG-pabA와 같은 특정 유전자나 유전자간부위(intergenic region) 서열의 일부만을 대상으로 개발되어 왔다[4]. 그러나 이들 지역을 증폭하기 위해서 사용되는 보편적인 바코딩 프라이머(universal barcoding primer)는 식물 종에 따라 PCR 증폭 효율이 떨어지거나 증폭이 되지 않는 문제점이 있으며, 증폭이 되었다 할지라도 염기서열의 다형성이 존재하지 않을 수 있는 문제점이 있다[5]. 또한 이들 고변이 지역은 식물에 따라서는 동일한 종내에서도 변이가 발견되는 경우가 있어 동일 종을 다른 종으로 구분할 수 있는 가능성을 내포하고 있다[6].

현재까지 DNA 수준에서 한약재로 널리 사용되고 있는 지유의 기원종을 대상으로 한 판별법은 보고된 바 없으며, 이에, 본 연구에서는 엽록체 유전체의 일부 지역이 아닌 엽록체 전장 유전체 서열을 분석하여 오이풀 속 주요 3종간의 다형성이면서 보다 신뢰할 수 있는 변이 지역을 탐색하여 기원종을 구별하는 분자마커를 개발하고, 좀 더 실용적인 지유의 기원종 판별 기법을 개발하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 식물 재료

NGS를 이용하여 엽록체 유전체 염기서열을 분석하기 위한 식물 재료는 오이풀(*Sanguisorba officinalis*), 긴오이풀(*Sanguisorba longifolia*), 흰오이풀(*Sanguisorba tenuifolia* f. alba) 각 2점씩 한국한의약진흥원에서 수집하였다. 마커 검증을 위한 재료는 오이풀 68점(시중 유통 국산 오이풀 약재 40점, 중국산 오이풀 약재 15점, 한국한의약진흥원 채집/재배 12점, 식약처 표준품 1점), 긴오이풀 18점(한국한의약진흥원 채집/재배 17점, 식약처 표준품 1점), 흰오이풀 11점(한국한의약진흥원 채집/재배 11점)을 이용하였다.

2. 게놈 DNA 추출 및 sequencing

각 검체의 게놈 DNA는 NucleoSpin Plant II(MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG)을 이용하여 추출하였다. 추출된 게놈 DNA의 양은 Qubit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA)을 사용하여 측정하였다. NGS용 검체의 DNA는 총 200ng 이상, 마커 검증용 시료는 최소 0.5 ng/㎕ 씩을 준비하였다. 차세대시퀀싱(NGS)를 수행하기 위해 NEB Next Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, Massachusetts, USA)을 이용하여 각 검체별로 NGS 분석 라이브러리를 제작하였다. NGS 분석 대상 검체별로 구분되는 색인 어댑터를 사용하였고, 세부적인 라이브러리 제작과정은 제품 매뉴얼을 따랐다. 제작된 각 라이브러리는 TapStation HSD5000 (Agilent, Santa Clara, USA)을 이용하여 상태를 분석하고 NGS 분석 적합성을 판정하였다. NGS를 이용한 대량의 유전체 염기서열 데이터 생산은 Illumina platform을 이용하였고 분석 리드 형태와 길이는 Pair-end, 101 방식으로 분석하였다. 검체 당 1 Gb의 데이터양을 생성하였다.

4. 엽록체 유전체 염기서열의 조립 및 검증

검체의 엽록체 전체 유전체 염기서열은 '세포소기관 유전체 염기서열 조립 및 검증 시스템'(GenoTech, Daejeon, Korea)을 이용하여 완성하였다.

5. 종간의 엽록체 유전체 정보분석

조립 및 검증이 완료된 각 시료의 엽록체 유전체 염기서열은 세포소기관 유전자 예측 전용 프로그램인 'GeSeq (http://chlorobox.mpimp-golm.mpg.de/geseq.html)'이용하여 정보를 분석하였다.

6. 종판별을 위한 마커 검증 방법 및 검증 대상 분자마커 선택

각 종별 엽록체 염기서열을 상호 비교하여 종 및 기원 식물을 구분할 수 있는 후보 유전자 마커 발굴하였다. 엽록체 유전체 염기서열을 MPPC(Modified Phred Phrap Consed) 프로그램(GenoTech, Daejeon, Korea)을 이용하여 SNP 등의 변이를 분석하였으며[8], 종 간 변이 분석은 CLC Genomics Workbench의 'Resequencing Analysis' 기능을 이용하였다.

NGS 기반 비교 유전체를 통해 발굴된 오이풀 및 동속 식물의 종 및 기원종 구별 분자마커의 종류와 개수 그리고 검증을 위해 이용될 수 있는 시료 수를 고려하여 ㈜제노텍의 FenDEL-qPCR[8] 법을 적용하였다. FenDEL-qPCR 방법을 적용하기 위해서 FenDEL 프라이머/프로브 디자인 기준을 적용하였다. FenDEL-qPCR 반응을 위해 SNP 마커 별로 아래와 같은 조건으로 반응물을 제조하고 실시간 중합효소 연쇄반응을 수행하였다(Table 1).

Table 1. Reaction preparation and conditions for PCR

	Component	Volume	Conditions
SNP#	(10 pmol/㎕) F primer	1 ㎕	■ 95℃ – 5min ■ 35 cycles for : 95℃ – 30sec 55℃ – 40sec
	(10 pmol/㎕) R primer	1 ㎕	
	(10 pmol/㎕) FenDEL Probe	1 ㎕	
	(10 pmol/㎕) Combo Probe	1 ㎕	
IC	IC F primer	1 ㎕	
	IC R primer	1 ㎕	
	IC Probe	1 ㎕	
	2x FenDEL-qPCR Master Mix	15 ㎕	
	(0.5 ng/㎕) gDNA	2 ㎕	
	PCR Grade water	6 ㎕	
	Total	30 ㎕	

Ⅲ. 결 과

1. NGS를 이용한 지유 및 동속 식물 엽록체 유전체 분석

조립 및 검증이 완료된 오이풀 2개, 긴오이풀 2개, 흰오이풀 2개의 엽록체 유전체 서열의 길이는 155,393bp에서 155,415bp이며 (Table 2), 유전자들의 순서와 방향 등이 종간에 매우 잘 보존되어 있음을 확인하였다. NGS 리드(reads) 중에서 엽록체 염기서열의 리드는 3.94 ~ 8.99 % 분포였으며, 완성된 엽록체 유전체 염기서열의 커버리지는 189 ~ 365 x 이었다. 오이풀 속 식물의 엽록체 유전체는 공통적으로 82개의 단백질을 만드는 유전자, 52개의 tRNA 유전자, 및 4개의 rRNA 유전자로 구성되어 있음을 확인하였으며, 구조상으로 1개의 LSC(large single copy region), 1개의 SSC(small single copy region), 및 2개의 IR(inverted repeat region)을 가지고 있음을 확인하였다.

2. 종판별을 위한 마커 검증 방법 및 검증 대상 분자마커 선택

오이풀을 포함한 동속 식물 3종, 6개 시료의 엽록체 유전체 염기서열을 비교 분석한 결과 유전자 마커로 활용 가능한 변이는 총 179개로 나타났다. SNP 형태의 변이는 101개, InDel 형태의 변이는 78개이며, InDel 변이는 1~7개 염기의 삽입, 결실 형태였다.

오이풀 속에는 20여 종이 알려져 있기 때문에 이론적으로는 5종류의 SNP 마커를 분석하면 모든 종을 구분할 수 있다. 따라서 본 연구를 통해 발굴된 179개 후보를 모두 검증 대상으로 할 필요는 없다. FenDEL-qPCR 방법을 적용하기 위해서는 프라이머 제작이 용이해야 하므로 이를 반영하여 검증 대상 마커를 선별 하였다 (Table 3).

Table 2. Total sequence reads (101-bp paired end) obtained from high-throughput sequencing and percentage of the sequence reads mapped to the reference genome of *Sanguisorba officinalis*, *Sanguisorba longifolia*, and *Sanguisorba tenuifolia* f. alba

Sample	Total reads	Aligned reads	Organelle genome %	Cov[a)]. (x)	Total length (bp)
Sanguisorba officinalis,	6,222,080	239,662	8.99	364	155,393
Sanguisorba tenuifolia f. alba (Trautv. & Mey.) Kitam	7,404,878	166,728	3.94	189	155,415
Sanguisorba tenuifolia Fisch. ex Link	8,410,896	188,944	4.10	224	155,385

[a)]Cov; Approximate Genome-wide Depth of Aligned coverage

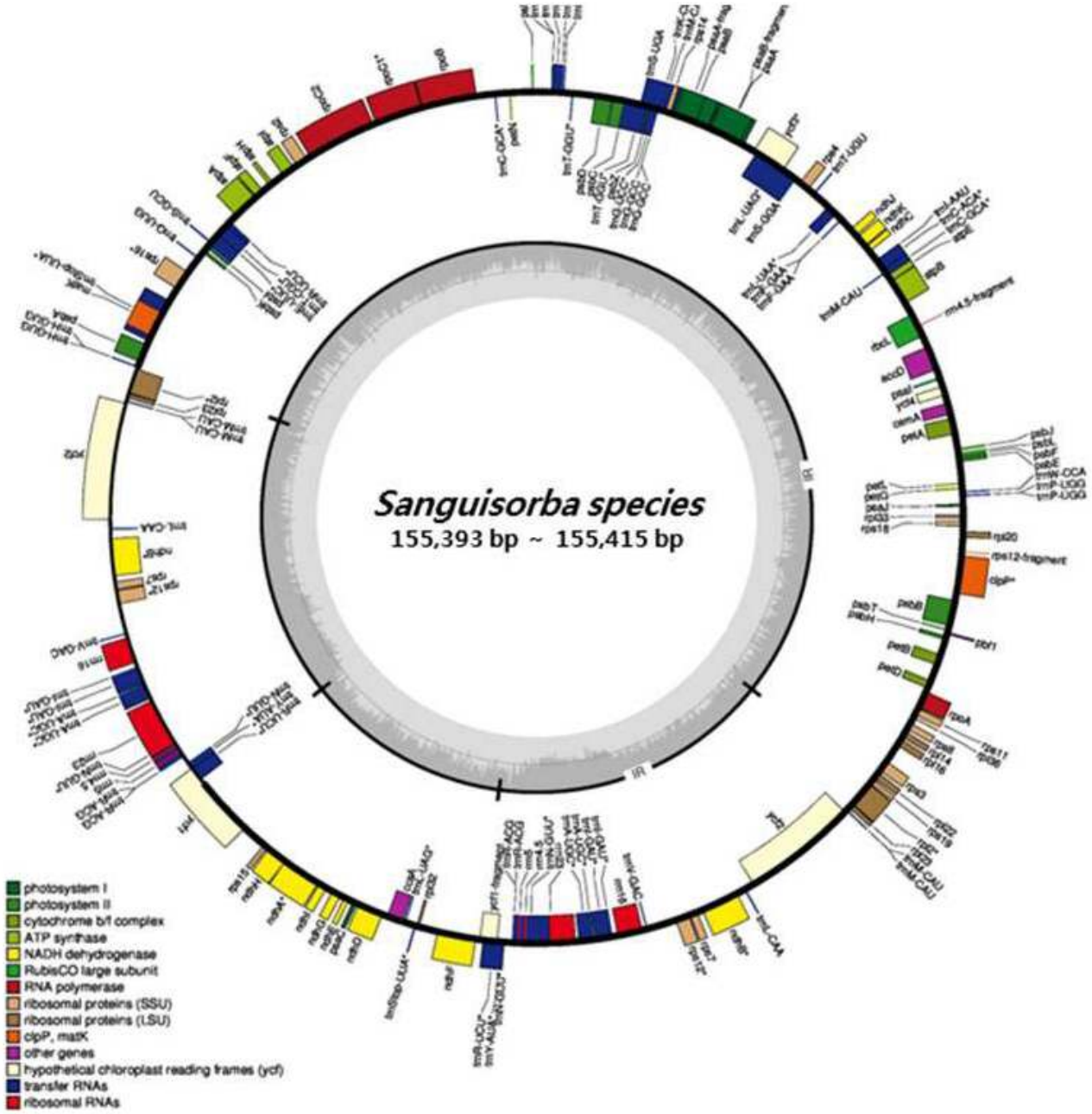

Fig. 1. Circular gene map of the *Sanguisorba officinalis*, *Sanguisorba longifolia*, and *Sanguisorba tenuifolia* f. alba chloroplast (cp) genome. Genes shown inside and outside the circle are transcribed clockwise and counterclockwise, respectively.

2. 종판별을 위한 마커 검증 방법 및 검증 대상 분자마커 선택

오이풀을 포함한 동속 식물 3종, 6개 시료의 엽록체 유전체 염기서열을 비교 분석한 결과 유전자 마커로 활용 가능한 변이는 총 179개로 나타났다. SNP 형태의 변이는 101개, InDel 형태의 변이는 78개이며, InDel 변이는 1~7개 염기의 삽입, 결실 형태였다.

오이풀 속에는 20여 종이 알려져 있기 때문에 이론적으로는 5종류의 SNP 마커를 분석하면 모든 종을 구분할 수 있다. 따라서 본 연구를 통해 발굴된 179개 후보를 모두 검증 대상으로 할 필요는 없다. FenDEL-qPCR 방법을 적용하기 위해서는 프라이머 제작이 용이해야 하므로 이를 반영하여 검증 대상 마커를 선별 하였다 (Table 3).

Table 3. Oligonucleotide sequence of primers

sample No. / Region	S1	S2	S3	S4	S5	For. Primer	Rev. Primer
7498	C	G	C	C	G	GGGCTCAAAAGATCACCATA	TCCGTTACGTATCTTGGTGT
12493	C	C	C	T	C	CCTCTGTATCGCATATGGGT	TTCTATCATAACTCGTTCCAGC
12542	A	A	G	A	A	TGATACAGGGCTCAATGGA	CCATTTCGTCGAGATAAACA
48190	A	C	A	A	C	AAAGAAATAGAGCATGTTGATTA	GAGGGTATTCGCACTGTTC
50046	T	C	T	T	C	CTGCTCAAGACATTATTTTACCAC	ACGATATCCACGATTCCTC
52133	G	G	A	G	G	TCCATTTTAGCTTCGGAGAAT	TTGCTACAAATATGGATTATTGAA
55268	T	T	C	T	T	TTGAGCCCGCTCTGAA	ATATCGAAGAATTGGTGCTG
73028	T	C	T	T	C	TCCTCCAGACGTAGAGCG	ATTTATTGCTTATGTAGCTTACCC
80097	T	T	T	C	T	CGTTTCTTTTGCCTGTTTTTATATAC	ATTGATATGGGTCGACATACA
83789	T	C	T	T	C	TTGTGGTCAGGAACATTGAT	GTAGGAGAGATGGCCGAG
88252	C	T	C	C	T	AAGGAGCGACCCCATTT	GCTAAATGATGGTGTGCAATA
91436	A	G	A	A	G	TCCCTGTGATGGTCCG	CATAATGTGATGTGCTTCCA
111910	G	A	A	A	A	AACACAATGGCGTCTTGATAC	TTCATATATGATTACGGGTCG
122067	G	A	A	A	A	ACAAAGGCTAAGAGAAAAAAGAA	ATTCCAGTAGTTTTTTCATCGC
127958	T	T	G	T	T	CGACCGTGGAAATGGAAAT	GGTGAATACTCAGTTGATCAAC

3. FenDEL-qPCR 방법을 적용하여 마커 검증 실험

NGS 분석에 사용되었던 3종 시료를 대상으로 SyberGreen + FenDEL-qPCR을 시행한 결과 각 마커의 형질이 정확하게 확인되었다 (Fig. 2).

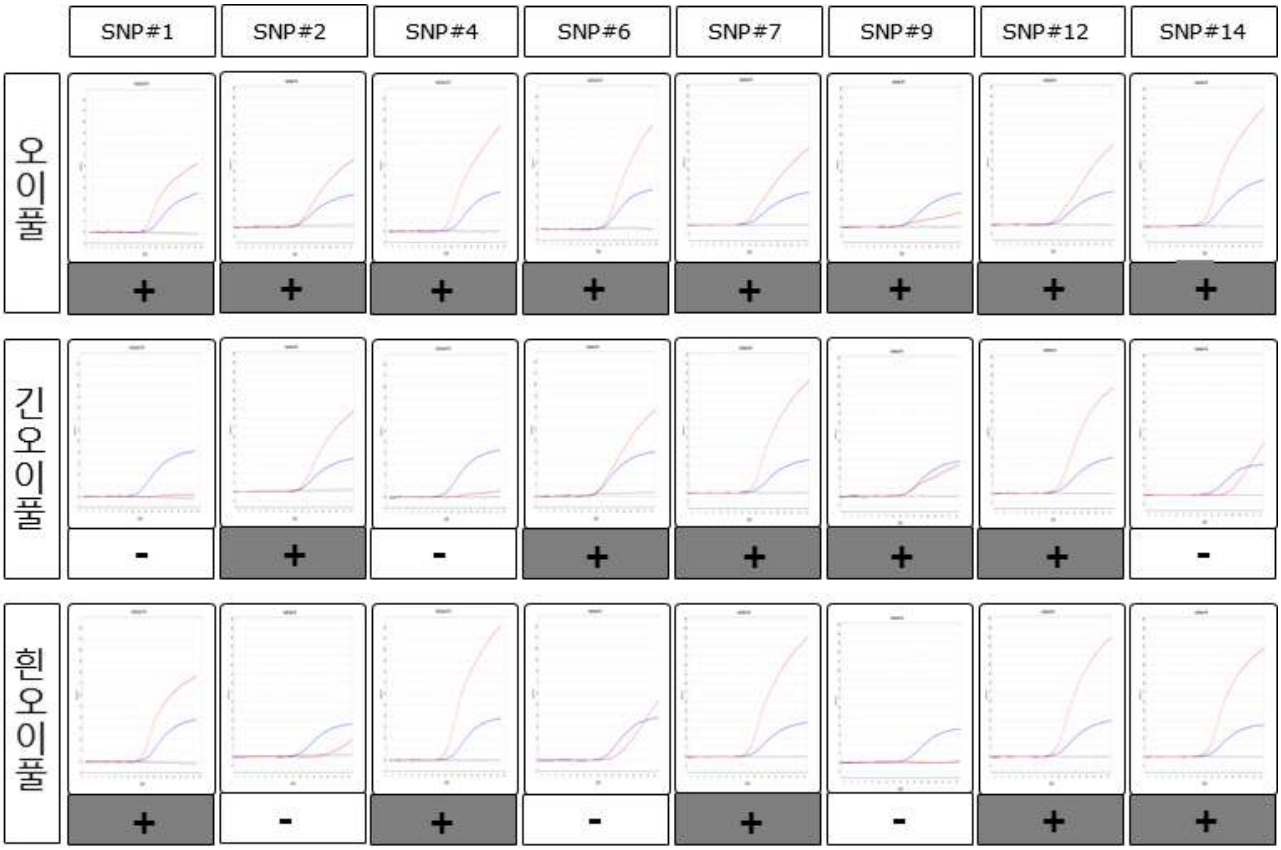

Fig. 2. Results of PCR analysis.

Ⅳ. 고 찰

한약재의 감별이나 기원식물의 종 동정은 한약 표준화에 있어서 매우 중요한 요소로 인식되고 있다. 한약재 감별법으로는 관능감별과 이화학 분석을 통한 감별, 그리고 유전자 분석을 통한 감별법이 일반적으로 사용되고 있다[9]. 하지만 관능감별은 감별자에 따라 그 결과가 차이를 보이는 단점이 있으며, 이화학 분석은 재배지 또는 자생지의 환경 등 여러 가지 요인에 의해 영향을 받아 정확한 기준을 설정하기가 어려운 단점을 가지고 있다[10]. 이러한 단점을 보완하기 위해 최근에는 유전자 감별법이 활발하게 연구되고 있다[11,12]. 그 중 DNA 바코드 분석을 통한 한약재 종 감별법이 이용되고 있으나, 이 역시도 DNA 바코드 분석시 single locus의 variation으로 감별에 제대로 이루어지지 않는 경우도 있다[13]. 최근 NGS 기술의 발달로 다양한 종류의 생물 게놈의 sequencing 데이터가 축적되어 있으며, 이를 기반으로 품종을 구별할 수 있는 DNA marker 개발 연구가 활발하게 진행 되고 있다[11]. 이러한 NGS 기술의 발달로 염기서열 해독 기술이 간편해지고 비용이 저렴해지면서 염기 서열 정보를 바탕으로 하는 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP 정보를 활용한 분자표지가 많이 개발되고 있다[14]. 그리고 이 SNP 정보를 이용한다면 단일 마커 분석에서 더 나아가 다수의 샘플에 대한 다수의 분자표지 분석이 이루어지는 고속대량 유전자형 분석시스템에 적용할 수 있다[15]. 따라서, 본 연구에서는 NGS 분석을 통하여 전체 염기서열을 분석하여 오이풀 속 주요 3종간의 다형성이면서 보다 신뢰할 수 있는 변이 지역을 탐색하여 기원종을 구별하고자 하였다.

NGS 분석을 이용하여 지유로 이용되는 오이풀, 긴오이풀, 흰오이풀 3종에 대해 SNP 지역을 분석하였다. 분석결과, SNP 101개, InDel 형태의 변이는 78개이며, InDel 변이는 1~7개 염기의 삽입, 결실 형태를 보였으며 이를 기반으로 종 판별을 이용한 분자마커를 제작하였다. 이를 이용하여 PCR 분석을 한 결과, 오이풀, 긴오이풀, 흰오이풀의 기원을 판별할 수 있었다. 또한 3종 이외에도 2종인 (큰오이풀, 산오이풀)을 정확하게 판별하기 위해 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 지유속 오이풀 3종을 신속하고 정확하게 감별할 수 있는 분자 마커로 활용하여 지유의 기원확립과 약물 동등성 확보를 위한 표준화 기법으로 충분한 가치가 있으며, 한약재 혼용 및 오용을 방지할 수 있는 기술로 한약재의 생산부터 유통현장에서 사용될 수 있는 기술로 한약재의 표준화 및 산업화에 기여할 것으로 사료된다.

Ⅴ. 결 론

본 연구에서는 지유의 각 기원들을 대상으로 분자생물학적 기법의 일환으로 NGS 염기서열 분석을 통해 오이풀, 긴오이풀, 흰오이풀 종을 판별하고자 하였다.

1. NGS 기술을 이용하여 지유 3종에 대해 엽록체 전체서열을 비교 분석하여, 종특이 유전자를 선별하였다.

2. SNP마커 유전형 조합을 이용하여 종판별법을 제시하였다.

본 감별법 연구를 통해 개발한 분석법은 시중에 유통되고 있는 오이풀(지유)의 위품의 혼용 및 오용을 방지할 수 있으며 한약재 원재료의 품질을 과학적으로 유지하는데 기여할 것으로 사료된다.

References

1. An BJ, Lee SA, Son JH, Kwak JH, Park JM, Lee JY. Cytotoxic and antibacterial activities of Sanguisorba officinalis L. J KOREAN Soc Appl Bi. 2004 ; 47 : 141-145.
2. Seo GE, Kim SM, Pyo BS, Yang SA. Antioxidant Activity and Antimicrobial Effect for Foodborne Pathogens from Extract and Fractions of Sanguisorba officinalis L. Korean J. Medicinal Crop Sci. 2016 ; 24 : 303-308.
3. Moon BC, Lee YM, Choi G, Chun MJ, Kim HK. Molecular Authentication and Phylogenetic Analysis of Plant Species for Breeae and Cirsii Herba based on DNA barcodes. Kor. J. Herbology 2013 ; 28 : 75-84.
4. Hollingsworth PM, Graham SW, Little DP. Choosing and using a plant DNA barcode. PLoS ONE. 2011 ; 6(5) : e19254.
5. Ganie SH, Upadhyay P, Das S, Sharma MP. Authentication of medicinal plants by DNA markers. Plant Gene. 2015 ; 4 : 83-99.
6. Blaxter ML. The promise of a DNA taxonomy. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2004 ; 359 : 669-679.
7. Yang DY, Kim MK, Mohanan P, Mathiyalagan R, Seo KH, Kwon WS, Yang DC. Development of a single-nucleotide-polymorphism marker for specific authentication of Korean ginseng (Panax ginseng Meyer) new cultivar "G-1". J Ginseng Res. 2017 ; 41 : 31-35.
8. Nguyen VB, Park HS, Lee SC, Lee J, Park JY, Yang TJ. Authentication Markers for Five Major Panax Species Developed via Comparative Analysis of Complete Chloroplast Genome Sequences. J. Agric. Food Chem. 2017 ; 65 : 6298-306.
9. Song IG, An BR, Seo BI, Park SJ. Molecular marker to identify and Origin of Cnidii Rhizoma from Korea and China. Kor J Herbology. 2009 ; 24 : 1-8.
10. Zhao ZL, Leng CH, Wang ZT. Identification of Dryopteris crassirhizoma and the adulterant species

based on cpDNA rbcL and translated amino acid sequences. Planta Med. 2007 ; 73(11) : 1230-3.
11. Morishige DT, Klein PE, Hilley JL, Sahraeian SME, Sharma A, Mullet JE. Digital genotyping of sorghum-a diverseplant species with a large repeat-rich genome. BMC Genomics. 2013 ; 14 : 448
12. Austin RS, Vidaurre D, Stamatiou G, Breit R, Provart NJ, Bonetta, D, Zhang J, Fung P, Gong Y, Wang PW McCourt P, Guttman DS. Next-generation mapping of Arabidopsis genes. Plant Journal. 2011 ; 67 : 715-25.
13. Lee YM, Moon BC, Ji Y, Kim WJ, Kim HK. Molecular Authentication of Pinelliae Tuber from its adulterants by the analysis of DNA barcodes, matK and rbcL genes. Kor J Herboogy. 2013 ; 28(3) : 75-84.
14. Hunter KW, Crawford NPS. The future of mouse QTL mapping to diagnose disease in mice in the age of wholegenome association studies. Annu. Rev. Genet 2008 ; 42 : 131-41.
15. Zhou T, Wang Y, Chen JQ, Araki H, Jing Z, Jiang K, Shen J, Tian D. Genome-wide identification of NBS genes in japonica rice reveals significant expansion of divergent non-TIR NBS-LRR genes. Molecular Genetics and Genomics. 2014 ; 271 : 402-5.