

Multiplex-PCR을 이용한 한약재 승마(Genus *Cimicifuga*)의 구별

노종훈, 김명겸, 배갈마, 양덕춘*

Molecular identification of Genus *Cimicifuga* "Seung-MA" by Multiplex PCR

Jong-Hun Noh, Myung Kyum Kim, Baigalmaa Jigden, Deok-Chun Yang*

Korean Ginseng Center for Most Valuable Products & Ginseng Genetic Resource Bank, Kyung Hee University,

1 Seocheon-dong, Giheung-gu Yongin-si, Gyeonggi-do 449-701, South Korea

Objectives

대한약전에서는 한약재 승마의 규격을 세잎승마(*Cimicifuga heracleifolia*), 황새승마(*C. foetida*), 눈꽃승마(*C. dahurica*), 촛대승마(*C. simplex*)로 규정하고 있으며 이는 일본의 규격과 동일하고 중국에서는 촛대승마를 제외한 나머지 세 종을 한약재 승마라고 규정하고 있다. 미나리아재비과의 *Cimicifuga*속에 속하는 여러종의 식물들은 유연관계가 비교적 멀지만 외형적으로 거의 유사한 종들이 있어 한약재 승마의 생산, 채취 및 유통과정에서 오용하거나 위품으로 사용되어지는 것들이 혼재되어 있다. 본 연구에서는 *Cimicifuga*속 식물들 중에서 한국, 중국, 일본에서 규정하고 있는 대표적인 승마를 기존의 외형적인 감별 방법을 보완하기 위한 분자생물학적 방법, 즉 DNA 분자마커를 개발하여 감별하고자 한다.

Material and methods

■ 식물재료

작물과학원과 경희대학교 농장, 식약청 약초시험장, 한택식물원, 신구대학 식물원 등에서 채취한 승마 식물체와 현재 시중에서 유통되고 있는 승마(중국산, 한국산) 한약재를 구입하여 액체질소로 얼린 후 유발에서 마쇄하고 Plant DNA isolation kit(GeneAll 社)를 이용하여 DNA를 추출하였다. agarose gel과 UV spectrophotometer를 이용하여 정량하였다.

■ ITS 염기서열을 결정하기 위해, ITS 영역의 universal primer인 ITSsp1과 ITS4R 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 프라이머의 염기서열은 ITSsp1 (5'-TAC CGA TTG AAT GRT CCG-3')와 ITS4R(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')이었으며 PCR condition은 pre-denaturation 94°C, 5 min; denaturation 94°C, 30 sec; annealing 54°C, 30 sec; extension 72°C, 90 sec; 36 cycles 이었다.

■ 수집한 생체 및 한약재 승마의 염기서열을 분석하여 특이적으로 작용하는 특이 염기서열을 결정하였다. 촛대승마 구별프라이머(simR1, 5'-GGA TGA GTT TAC AAC CAC CCT-3'), 세잎승마 구별프라이머(heraR2, 5'-TGG TTG GGA ACG ACG GTA-3'), 눈꽃승마 구별프라이머(dahuR1, 5'-GTT GCC GAG GAG AGT CGT TTA TA-3'), 황새승마 구별프라이머(foeR2 5'-ACC ATG GTC GAT CCC ATG TCT-3')를 이용하여 Multiplex-PCR을 수행하였다.

Results

■ 본 연구에서 쓰인 승마 생체와 약재는 전국 각지의 식물원과 일반 유통시장에서 얻었으며 이들의 특징적인 DNA sequence를 분석하여 4종의 major 승마를 구별할 수 있는 특이 primer를 제작하였다. 이들 primer를 이용하여 *Cimicifuga* 속에 속하지 않는 위품 승마(*A. diocus*, *A. aethusif-olius*, *K. koreana*, *A. simplicifolia* 등)을 구별할 수 있음을 specific band를 통해 확인하였고 *Cimicifuga* 속이 아닌 위품 승마에서는 universal한 trnL-F 단일 band만 나타나는 것을 확인하였다. 이 primer를 이용하여 현재 유통되고 있는 승마 한약재의 정확한 종감별과 기원을 확립할 수 있을 것으로 생각되어지며 약재의 위품과 오용 여부 또한 감별해 낼 수 있을 것으로 기대된다.

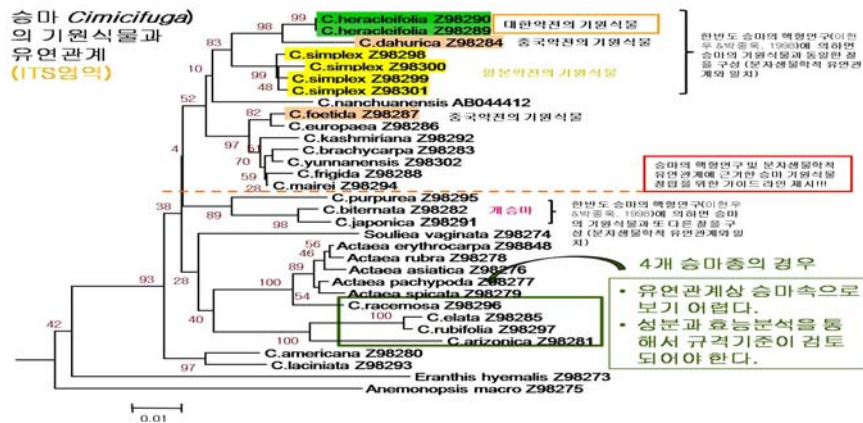


Fig. 1. The Neighbor-joining tree of ITS sequences of species belonging to various species in genus *Cimicifuga*.

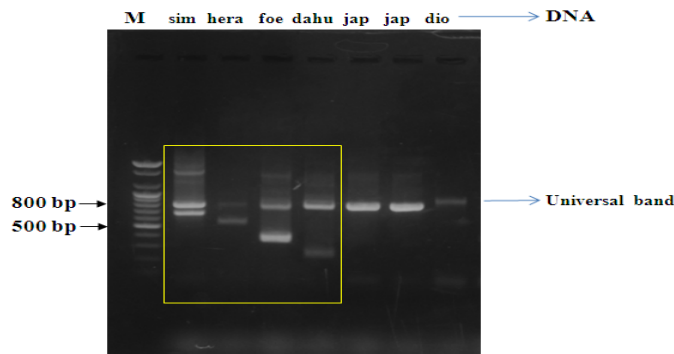


Fig. 2. Multiplex PCR for identification of "Seung-MA"