

RAPD 분석법을 이용한 산삼, 응담, 녹용 등의 한약재 판별연구

조 동욱

한국한의학연구소 기초연구부 기초이론연구실

= Abstract =

Identification study of rare and high-priced natural products used for oriental medicine by RAPD analysis

Dong-Wuk, Cho

Department of medical science and research

Natural products used for oriental medicine often come from various geographical sources, after several different distribution channels. Therefore some form of quality control procedure is required to safeguard natural products for prescriptions purposes. To achieve this, systematic approaches such as morphological examination, microscopic analysis of powdered herbs and chemical analysis can be carried out. However, to ensure absolute criteria for quality assurance of natural products, DNA fingerprinting method such as RAPD(Random amplified polymorphism DNA) analysis can be used for authentication of natural products.

In this study, various oligonucleotide primers will be synthesized for the detection of RAPD markers and also parameters of affecting PCR(Polymerase Chain Reaction) in the detection of RAPD markers of rare and high-priced natural products will be studied with genomic DNA of chosen samples.

【Key words】 authentication of natural products, RAPD analysis

I. 서론

현재 사용되는 한약재 중에서 산삼, 웅담, 녹용 등 고가 한약재의 진품 판별 검사는 주로 외관 관찰에 의한 형태적 방법과 관능검사에 의한 향미, 색상 및 형질을 판별하는 방법에 의존하고 있으며, 그 밖에 화학적 조성을 조사하는 등의 이화학적 방법 등을 생각할 수 있으나, 그 판별기준으로 절대적인 객관성이 결여되어있다고 할 수 있다.

현재 한약재의 유통구조 개선 및 가공산업 육성방안연구와 보건복지부 주도하에 한약재의 품질표준화가 추진되면서 한약재의 사용 및 한약의 객관성 확립을 위한 연구가 활발해지고 있다. 근래 서양에서도 동양의학에 대한 관심이 고조되면서 동양의학의 원리, 치료법 및 한약의 약리학에 대한 논문들이 많이 발간되고 있으며 그 중에서도 최근 Trends in Pharmacological Science에 Kevin Chan(1)이 기고한 "Progress in traditional chinese medicine"에서 한약의 과학화를 이루기 위한 제언으로 한약재의 품질표준화, 한약재의 독성평가와 함께 한약재의 진품판별(authentication)을 중요한 과제로 제시하고 있다.

모든 생물체의 제놈 DNA는 개체간의 차이는 있으나, 같은 개체내에서는 부위와 상관없이 일정하다. 따라서 개체간의 DNA 변이차이를 이용하여 DNA 분석법인 제한효소 절단법, hybridization법, 중합효소연쇄반응(PCR: Polymerase Chain Reaction)법 등으로 유전자를 이용한 개체판별검사가 가능한데 이중에서 중합효소연쇄반응법에 의한 DNA 증폭기술의 개발은 생명과학의 기초분야는 물론 응용분야인 농학, 의학, 식품학 등에도 폭넓게 활용되고 있으며, 실제로 질병진단, 친자나 개체의 식별, 성감별과 같은 유전자의 진단 및 분석에 이용되고 있다(2-4). PCR 기술의 핵심은 목적으로 하는 DNA의 적은 양을 가지고 단시간내에 수십억 배로 증폭할 수 있다는데에 있어 고가의 한약재를 이용하여 DNA 분석법을 실시할때 필요한 시료의 양을 최소화 할 수 있는 장점도 가지고 있다. 최근 국내에서 이 등(5, 6)은 DNA 분석법을 도입하여 소의 품종간에 특이적으로 검출되는 DNA 표시인자를 개발하여, 한우육을 서양소 유래의 수입육과 식별하는데 이용이 가능함을 보고하였다. 위의 보고에서는 제놈 DNA를 제한효소로 절단하여 검출되는 DNA 밴드양상만으로는 소품종간의 차이를 볼 수 없었으나 중합효소연쇄

반응법에 기초를 둔 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)법으로 한우와 서양소의 품종간에 밴드검출 차이가 나는 DNA 표지인자를 검출하였다. 따라서 본 연구에서도 중합효소연쇄반응법에 기초를 둔 RAPD법을 사용하면 판별하고자 하는 고가의 한약재와 유사품종 및 위조품과의 구별이 가능하리라고 기대된다.

II. 본 론

1. RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)법

생물집단내의 다양한 유전적 변이(다형성)를 분석하여 얻어지는 DNA 표지인자는 유전자 지도작성, 질병진단 및 식품의 미생물 오염분석 그리고 동식물의 육종개량 등 여러분야에 활용되고 있다(7, 8). DNA 변이는 개체간에도 차이가 날 정도로 다양하며, 그 검출방법 중에 대표적인 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)법은 제한효소에 의한 DNA 단편을 막(membrane)에 전이시킨 후에 DNA probe를 이용하여 다형성(polymorphism)을 검출하는 방법이다. 하지만 RFLP법은 제한효소 절단과 DNA hybridization에 의해 해석되어지기 때문에 일반적으로 많은 시간과 노력이 요구된다. 한편 중합효소연쇄반응법에 기초를 둔 RAPD법은 증폭 부위의 염기배열에 관한 정보를 필요로 하지 않으며, 단지 한 종류의 합성 primer를 사용한다(9, 10). 한 종류의 primer는 template DNA의 반대편 가닥에 위치한 두군데에 결합하며, 증폭산물은 그 결합위치가 증폭되기에 적합한 거리내에 놓이게 되면 생산이 된다. RAPD법은 RFLP법과 비교해서 제한효소 절단이나, southern blotting 그리고 hybridization 등의 실험절차가 요구되지 않기 때문에 신속하고 경제적이다. 또한 RAPD법은 PCR 반응을 사용함으로써 극미량(수 ng)의 DNA시료로도 분석이 가능하여서, 적은 시료를 이용한 고감도의 DNA 판별에 큰 효과를 발휘할 수 있다.

그러나 RAPD법은 PCR 반응과 한 종류의 primer에 의해 분석이 이루어지기 때문에 약간의 반응조건의 차이에 의해서 검출되는 밴드의 숫자나 강도에 변화가 생기는 등의 문제점이 발생될 수도 있으며 마그네슘 등의 첨가물 농도나 primer의 부착온도를 비롯한 여러 반응온도 등의 요인들에 의해 영향을 받는다. 따라서 효과적인 RAPD 분석을 위해서는 PCR 반응조건의 설정을 위한 연구가 선행되어야 하며, 결과의 재현성을 위해 먼저 여러 반응조건이 검토되어야 한다.

2. 연구내용 및 방법

2-1. Primer 합성

Oligonucleotide는 DNA 합성기로 phosphoramidate 화학법(11)에 의해 합성한다. 합성된 시료는 30% ammonium hydroxide로 55℃에서 12시간 처리하고 나서 건조 후, 증류수에 녹여서 primer로 사용한다.

2-2. 제놈 DNA의 정제

시료에서 제놈 DNA 추출은 Blin과 Stafford(12)의 방법에 준하여 실시한다. 시료는 액체질소를 사용하여 급속 동결 시킨 후에 분쇄하고 proteinase K와 phenol 처리과정을 거친 후, ethanol 첨가로 DNA를 침전시킨다. DNA의 순도는 흡광도₂₆₀과 흡광도₂₈₀의 비율로 측정하여 그 비율이 1.7이상인 것만을 사용한다. 또한 추출된 제놈 DNA가 거대 분자량임을 0.8% agarose gel을 이용한 전기영동으로 확인한다.

2-3. RAPD 분석

증폭반응액 50 μ l에는 100mM Tris.Cl (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 100 μ M씩의 dATP, dCTP, dGTP와 dTTP, 0.2 μ M primer, 여러 농도의 genomic DNA 와 0.5 unit의 *Taq* DNA polymerase를 포함시킨다. DNA 증폭반응은 95℃, 36℃ 그리고 72℃에서 각 1분씩 45사이클로 프로그램하여 실시한다. DNA 증폭산물을 재증폭할 경우에는 제놈 DNA를 제외한 50 μ l의 반응액에 1차 증폭산물을 1 μ l 넣고 위와 동일한 반응조건하에서 증폭을 실시한다.

RAPD 밴드양상에 영향을 미치는 PCR 반응조건의 요인을 조사하기 위해서는 제놈 DNA량은 50, 100, 200 혹은 400ng을 사용하고, 부착온도의 경우에는 35, 38, 41, 44 혹은 47℃에서, 부착시간의 경우에는 60, 90 혹은 120초에서 실시한다.

증폭산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동한 후, ethidium bromide로 염색하여서 320nm의 UV에서 DNA 밴드를 관찰한다. DNA size marker로는 1kb ladder를 사용한다.

III. 결 론

근래 한약재의 품질표준화 추진을 비롯해서 한약재의 사용 및 한방약의 약효에 대한 과학적인 연구가 시도되고 있다. 한약재의 품질표준화를 위해서는 이화학적 검사를 통한 화학적 성분 규명과 더불어 관능검사 등을 이용하여 외관, 향미, 형질 등에 관한 기준 마련 등을 생각할 수 있으나 산삼, 옹담, 녹용 등 고가이며 회소가치가 있고, 진품을 판별하기 어려운 한약재들은 그 진품판정을 위한 연구가 선행되어야 할 것으로 생각된다. 이러한 연구를 위해서 유전공학적인 방법을 적용하여 중합효소연쇄반응(PCR; Polymerase Chain Reaction)법에 기초를 둔 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)법을 사용하면 판별하고자 하는 고가의 한약재와 유사품종 및 위조품과의 구별이 가능하리라고 생각되며 이러한 한약재의 진품판정에 유전자를 이용한 판별법을 적용하는 것은 향후 한약재의 품질검사를 위한 객관적이며 절대적인 기준을 마련하고 나아가서 한약의 과학화를 위한 기반기술의 확립에 많은 도움이 되리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Chan, K. : Progress in traditional chinese medicine. *Trends in Pharmacol. Sci.*, **16**: 182 (1995)
2. Chikuni, K., Ozutsumi, T., Koishikawa, T, and Kado, S. : Species identification of cooked meats by DNA hybridization assay. *Meat Sci.*, **27**, 119 (1990)
3. Wintero, A. K. and Thomsen, P. D. : A comparision of DNA hybridization, immunodiffusion, countercurrent immunoelectrophoresis and isoelectric focusing for detecting the mixture of pork to beef. *Meat Sci.*, **27**, 75 (1990)
4. Agawaia, P. L., Wagner, V. A. and Geldermann, H. : Sex determination and milk protein genotyping of preimplantation stage bovine embryos using multiplex PCR. *Theriogenology*, **38**, 969 (1992)

5. 이창수, 유영복, 나기준, 조병대, 최병규 : 핵산분석법에 의한 한우의 판별. 한국축산학회지, **36**, 35 (1992)
6. 이창수, 유영복, 오성중, 정태영, 류진창 : DNA 다형성 분석에 의한 한우고기와 수입쇠고기의 육질판별. 농업과학논문집, **36**, 222 (1994)
7. Georges, M., Lathrop, M., Hilbert, P., Marcotte, A., Schwers, A., Swillens, S., Vassart, G. and Hanset, R. : On the use of DNA for linkage studies in cattle. *Genomics*, **6**, 461 (1990)
8. Landegren, U., Kaiser, R., Caskey, T. and Hood, L. : DNA diagnostics - molecular techniques and automation. *Science*, **242**, 229 (1988)
9. Waugh, R. and Powell, W. : Using RAPD markers for crop improvement. *TIBTECH.*, **10**, 186 (1992)
10. Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafaiski, J. A. and Tingey, S. V. : DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6531 (1990)
11. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. : Current protocols in molecular biology. Wiley-Interscience, New York, p15. 1. 1-15. 1. 7. (1987)
12. Blin, N. and Stafford, D. W. : A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.*, **3**, 2303 (1976)