

COI 염기서열 기반 백강잠 신속 감별용 SCAR marker 개발 - 백강잠 유전자 감별 -

김옥진[#], 양선규, 노푸름, 박인규, 최고야, 송준호, 문병철^{*}

한국한의학연구원 한약자원연구센터

Development SCAR marker for the rapid authentication of *Batryticatus Bombyx* based on COI Sequences

Wook Jin Kim[#], Sungyu Yang, Pureum Noh, Inkyu Park, Goya Choi
Jun-Ho Song and Byeong Cheol Moon^{*}

Herbal Medicine Resources Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine

ABSTRACT

Objectives : To ensure the safety, quality and pharmacological efficacy of *Batryticatus Bombyx*, it is important to discriminate with adulterants. In Korean Herbal Pharmacopoeias (KHP), the authentic species of *Batryticatus Bombyx* is defined only *Bombyx mori*. Therefore, the aim of this study is establishment of PCR assay method using the sequence characterized amplified region (SCAR) marker based on COI DNA barcode for discriminating six species related to *Batryticatus Bombyx*.

Methods : Seventeen samples of six species (*Bombyx mori*, *Bombyx mandarina*, *Rhodinia fugax*, *Oberthueria caeca*, *Actias artemis*, and *Caligula japonica*) were collected from different habitate and nucleotide sequences of cytochrome c oxidase subunit I(COI) barcode regions were analyzed by Sanger sequencing methods. To develop SCAR-based PCR assay method, we designed species-specific primers based on COI sequence variabilities and verified those specificities using 17 samples of six species as well as commercial herbal medicines.

Results : In comparative multiple analysis of COI sequences, six species were distinguished by species-specific nucleotides at the species level. To develop rapid and reliable PCR assay method for genetic authentication of *Batryticatus Bombyx*, therefore, we designed species-specific SCAR primers based on these nucleotide sequences and confirmed those specificities. Using these SCAR primers, We also established simple conventional PCR assay method using these SCAR primers at the species level.

Conclusions : The comparative analysis of COI sequences and SCAR-based PCR assay methods represented equal results for distinguishing authentic *Batryticatus Bombyx* and adulterations at the species level. Therefore, our results are expected protecting adulteration of herbal medicine *Batryticatus Bombyx*.

Key words : *Bombyx mori*, *Batryticatus Bombyx*, COI, DNA barcoding, SCAR marker

*Correspondence : Dr. Byeong Cheol Moon, Herbal Medicine Resources Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Naju 58245, Republic of Korea.

· Tel : +82-61-338-7126 · Fax: +82-61-338-7135 · E-mail : bcmoon@kiom.re.kr

#First author : Wook Jin Kim, Herbal Medicine Resources Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Naju 58245, Republic of Korea.

· Tel : +82-61-338-7126 · Fax: +82-61-338-7135 · E-mail : bcmoon@kiom.re.kr

· Received : 19 Aug 2019 · Revised : 05 Sep 2019 · Accepted : 25 Sep 2019

I. 서론

동의보감에 기재된 백강잠(白僵蠶)은 소갈증, 고혈압, 당뇨 및 불면증에 효과가 있는 것으로 기록되어 있으며¹⁾, 최근에는 혈당강하, 콜레스테롤 감소, 신장손상 억제, 지방간 억제 등 다양한 질병 예방에 대한 효능이 있는 것으로 밝혀져 건강식품원료로도 이용되고 있다²⁻³⁾. 대한민국약전외한약(생약)규격집(KHP)에 수재하는 백강잠(白僵蠶)은 누에나방과(Bombycidae)에 속하는 누에나방(*Bombyx more*)을 기원종으로 규정하고 있으며, 누에나방 유충이 백강병균(*Beauveria bassiana*)의 감염에 의한 백강병으로 경직사한 몸체를 약으로 처방하도록 하고 있다⁴⁾. 또한, 누에나방은 식품의약품안전처에서 식품원료로 사용이 가능한 종으로 규정하고 있는 반면, 누에나방과에 속한 다른 종들은 식품원료로 사용이 불가하다⁴⁾. 우리나라에는 누에나방과(Bombycidae)에 속한 종으로 누에나방(*Bombyx mori*), 멧누에나방(*Bombyx mandarina*) 및 물결멧누에나방(*Rhodinia fugax*) 3종이 서식하는 것으로 보고된다⁵⁾. 또한, 누에나방과와 근연분류군에 속하는 산누에나방과(Saturniidae)에는 유리산누에나방(*Oberthueria caeca*), 밤나무산누에나방(*Actias artemis*) 및 긴꼬리산누에나방(*Caligula japonica*) 등 11종이 서식하는 것으로 알려져 있으나, 대부분이 희귀종이거나 감소추세종으로 보고된바 있다⁵⁾.

백강잠의 기원종인 누에나방에 대한 연구는 대부분 성분에 대한 효능 또는 형태학적 곤충분류연구가 대부분이며, 우리나라에 서식하는 누에나방상과 분류군에 대한 유전학적 연구는 미비하다⁵⁾. 최근 들어 DNA 바코드 구간을 이용한 분류군의 유전학적 계통 연구, 종 동정 및 감별 연구가 많이 이뤄지고 있으며, 공개된 데이터베이스에 정보가 늘어남에 따라 이를 활용한 종의 분류학적·유전학적 동정 연구도 가능하다⁶⁻⁸⁾. 식물, 미생물에서 주로 사용되는 internal transcribed spacer (ITS)와 다르게 곤충은 미토콘드리아의 cytochrome c oxidase subunit I (COI) 바코드 구간을 이용한 연구가 많이 이뤄져 있다⁹⁻¹¹⁾. 이는 핵내 게놈상에 수천~수십만 copy로 존재하는

ITS와 비교하여, 미토콘드리아 게놈상에 위치하는 COI은 종 내에서는 유전적으로 변이가 많지 않고 종간에는 안정적인 유전 변이를 확인할 수 있어 곤충을 포함한 동물성 자원에 대한 종 동정에 이용되고 있다^{9,12)}. 하지만, 해당 바코드 구간의 정확한 염기서열 확보를 위해 PCR 증폭, 전기영동을 통한 증폭산물의 회수, 염기서열 해독 및 비교분석 등 일련의 작업과정이 번거롭고 시간이 다소 걸린다는 단점이 있다¹³⁻¹⁴⁾. 따라서, 바코드 구간의 염기서열을 바탕으로 종 특이 염기서열 부위만 증폭하고 전기영동을 통해 바코드 구간 염기서열 분석보다 빠르고 간략한 과정을 거치며 동일한 종 동정 결과를 얻을 수 있는 sequence characterized amplified region (SCAR) 마커 개발 연구가 다양한 품목에서 진행되고 있다¹⁵⁻¹⁷⁾.

본 연구에서는 백강잠의 기원종인 누에나방과 이의 근연분류군에 속하는 누에나방, 멧누에나방, 유리산누에나방, 물결누에나방, 긴꼬리산누에나방 및 밤나무산누에나방 6종에 대한 COI 바코드 구간 염기서열을 확보하여 비교·분석하고, 이를 바탕으로 신속·정확한 종 감별이 가능한 SCAR 마커를 개발하여 한약재 백강잠의 감별에 활용하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

본 실험에서 사용된 누에나방, 멧누에나방, 유리산누에나방, 물결누에나방, 긴꼬리산누에나방 및 밤나무산누에나방 6종 17개 시료는 대한민국과 중국의 서로 다른 지역에서 수집된 것을 사용하였다. 누에나방을 제외한 5종 13개 시료는 국립수목원에서 표본으로 제작하여 보관 중인 시료를 분양받았으며, 수집한 시료는 본초학, 동물분류학 및 동물생태학 등의 전문가로 구성된 분류·동정 자문회의의 동정을 거쳐 그 종을 최종 확정하였으며, 각 시료의 추출DNA는 한국한의학연구원 한약표준표본관(IH 표본관 코드 KIOM)에 표본번호를 부여하여 보관하였다.

Table 1. Information of six species used in this study.

Scientific name	Information of sample habitate	Voucher number	Sample name
<i>Bombyx mori</i> (Linnaeus, 1758)*	China	MSZ11	BM#1
	China	MSZ37	BM#2
	China	MSZ38	BM#3
	China	MSZ39	BM#4
<i>Bombyx mandarina</i> (Moore, 1872)†	Ganseong, Goseong, Korea	KNAE515453-35	BA#1
	Jinbu, Pyeongchang, Korea	KNAE473372-36	BA#2
	Daecheong, Incheon, Korea	KNAE478546-37	BA#3
<i>Rhodinia fugax</i> (Butler, 1877)†	Socho, Wonju, Korea	KNAE590301-32	RF#1
	Sicheon, Sancheong, Korea	KNAE342629-33	RF#2
<i>Oberthueria caeca</i> Oberthür, 1880†	Ganseong, Goseong, Korea	KNAE478573-28	OC#1
	Sillim, Wonju, Korea	KNAE478578-29	OC#2
	Girin, Inj, Korea	KNAE434084-30	OC#3

Scientific name	Information of sample habitate	Voucher number	Sample name
<i>Actias artemis</i> (Butler et Grey, 1853) [†]	Jinbu, Pyeongchang, Korea	KNAE479681-51	AR#1
	Gunoe, Wando, Korea	KNAE479673-52	AR#2
<i>Caligula japonica</i> Moore, 1862 [†]	Socho, Wonju, Korea	KNAE433675-53	CJ#1
	Ora, Jeju, Korea	KNAE433674-54	CJ#2
	Jinbu, Pyeongchang, Korea	KNAE433673-55	CJ#3

* There is original species defined as *Batryticatus Bombyx*.

† There is no appropriate official herbal name.

2. DNA 추출

DNA 바코드 분석을 위해 약 100 mg의 시료를 이용하여 DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, USA) 제작자가 제공하는 protocol에 따라 genomic DNA 추출·정제하였으며, 추출 genomic DNA는 UV spectrophotometer (Nanodrop, USA)를 이용하여 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 순도와 정량을 확인하였다. 추출한 genomic DNA는 -20℃에 보관하여 실험에 사용하였다¹⁸⁾.

3. COI 바코드 구간 PCR 증폭 및 염기서열 분석

COI 바코드 구간의 분석을 위해 추출한 약 15 ng의 genomic DNA와 각 0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 의 정방향과 역방향 primer (Table 2)를 SolgTM 2×Taq PCR Smart-MixI (Solgent, Daejeon, Korea)와 혼합하여 반응물이 전체 40 μL 되도록 제조하였으며, DNA Engine Dyad Thermal Cycler (MJ Research, USA)를 이용하여 증폭시켰다. PCR 조건은 95℃에서 2분간 변성시킨 후 95℃ (40초) - 45℃ (40초) - 72℃ (90초) 3단계를 총 35회 반복 수행하고 마지막으로 72℃에서 5분간 합성하는 것으로 반응시켰다. 각 시료당 40 μL 증폭산물을 이용한 전기영동, 증폭산물 회수, T-vector ligation 및 *E. coli* 형질전환 그리고 염기서열 분석은 김 등이 보고한 조건과 동일하게 수행하였다¹⁸⁾.

Table 2. Primers used for the COI sequence analysis.

DNA barcode region	Primer name	Primer sequences (5' → 3')	Reference
COI	COI-C02	AYT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G	Pincheira-Donoso et al., 2013 ⁹⁾
	COI-C04	ACY TCR GGR TGA CCA AAA AAT CA	

4. COI 염기서열 비교분석 및 종 특이적 SCAR primer 제작

확보된 약 700 bp 크기의 COI 염기서열은 BioEdit (버전 7.2.5) 프로그램을 이용하여 편집하였고, 확정된 염기서열 정보는 MEGA 6 (버전 6.06) 프로그램의 Kimura-2-parameter (K2P) 모델을 이용하여 G+C 비율, 종내변이율 및 종간변이율을 통계분석 하였다. 이때, 보다 정확한 종내·종간 염기서열 비교분석을 위해 BioEdit 프로그램의 ClustalW Multiple Alignment를 통해 정렬된 6종 17시료들 간의 염기서열 비교분석에서 COI 바코드 구간의 증폭에 사용된 primer 부위는 편집하여 제외시켰다. 또한, 종 특이적 SCAR 마커 제작을 위해 6종간 염기서열 비교·분석에서 확인된 종 특이 치환 염기를 포함하는 구간을 primer 부위로 선정하였다.

5. SCAR primer의 종 특이성 검증 및 유통품 모니터링

6종 17시료와 제작한 primer를 이용한 종 특이성 및 감별능 검증은 다음과 같은 조건으로 수행하였다. 약 15 ng의 genomic DNA와 각 0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 의 정방향과 역방향 primer를

SolgTM 2×Taq PCR Smart-MixI (Solgent, Daejeon, Korea)와 혼합하여 반응물이 전체 20 μL 되도록 제조하였으며, DNA Engine Dyad Thermal Cycler (MJ Research, USA)를 이용하여 증폭시켰다. PCR 조건은 95℃에서 2분간 변성시킨 후 95℃ (30초) - 55℃ (30초) - 72℃ (30초) 3단계를 총 35회 반복 수행하고 마지막으로 72℃에서 5분간 합성하는 것으로 반응시켰다. 또한, 개발된 SCAR primer를 이용한 최적의 감별능 분석은 김¹⁶⁾ 등이 보고한 방법으로 수행하였다. 개발된 SCAR 마커의 감별능 검증과 유통품의 기원확인을 위해 국내에서 유통되는 백강잠 8개 제품을 구입하여 제품당 50 g의 표본 추출 시료를 전부 분쇄하여 균질화한 가루를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. PCR 반응물 제조 및 조건은 위에 기술한 SCAR primer 종 특이성 검증과 동일한 방법으로 수행하였다.

III. 결 과

1. COI 바코드 구간 증폭 및 염기서열 분석

국제생물바코드 컨소시엄(CBOL, Consortium for Barcode of Life)에서 권장하는 바코드 구간인 COI의 유전자 증폭을 위해 Pincheira-Donoso가 무척추동물 바코드 구간 분석에

적합한 것으로 보고한 특이 primer를 이용하여 누에나방 4개체, 멧누에나방 3개체, 유리산누에나방 2개체, 물결누에나방 3개체, 긴꼬리산누에나방 2개체 그리고 밤나무산누에나방 3개체 총 6종 17개체의 COI 유전자를 증폭한 결과, 실험에 이용한 모든 시료에서 약 600–700 bp 크기의 DNA 절편이 증폭 되었음을 전기영동을 통해 확인하였다. 각각의 시료의 정확한 COI 염기서열 정보 확보를 위해 증폭산물을 *E. coli*에 형질전환하여 6개의 clone을 분석하였으며, 확보된 각각의 시료에 대한 염기서열 정보는 BioEdit과 MEGA 6 프로그램을 이용한 비교분석을 통해 확정하였다(Figure 1). 그 결과 6종

17개체로부터 확보한 COI 부위는 모두 658 bp의 동일한 크기로 존재하였다(Figure 1 and Table 3). 종내변이율은 누에나방과 물결누에나방에서는 확인되지 않았으며 유리산누에나방에서 0.3%로 가장 높게 존재하는 것으로 확인되었다(Table 3). 종간변이율은 물결누에나방(24.78%), 유리산누에나방(24.43%), 밤나무산누에나방(19.55%), 긴꼬리산누에나방(19.16%), 누에나방(16.65%) 그리고 멧누에나방(15.37%) 순으로 높았으며 유전자 염기구성을 보여주는 G+C 비율에 있어서도 종간 차이를 보였다(Table 3).

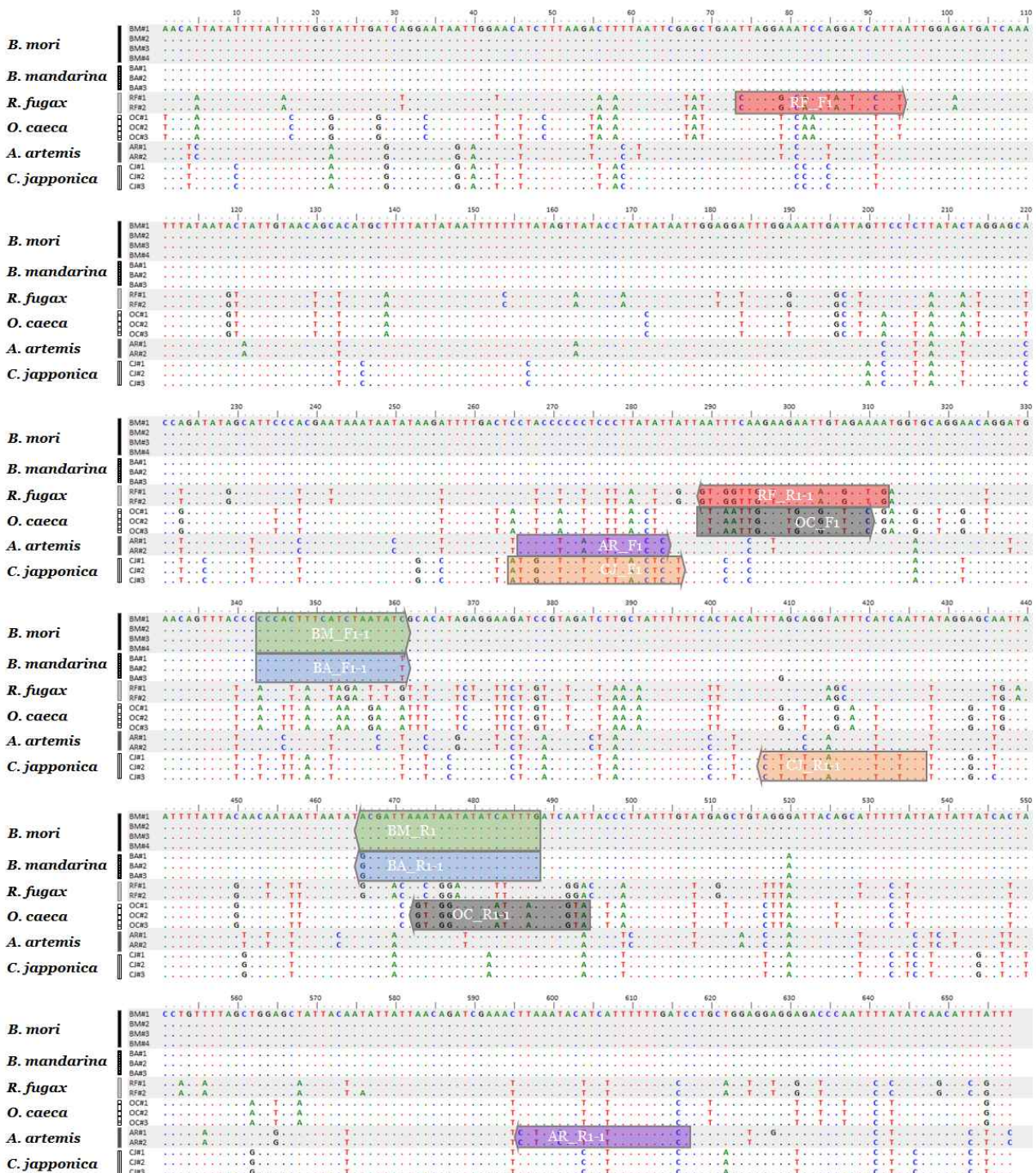


Figure 1. The ClustalW Multiple Alignment using the amplified COI1 sequences in six species related with *Batryticatus Bombyx*. The colored arrows indicate SCAR primer regions used in this assay.

Table 3. Sequence characteristics of COI barcode regions.

Species	COI length (bp)	G+C (%)	Intra-species variability (%)	Inter-species variability (%)
<i>B. mori</i>	658	29.18	0.00 ± 0.00	16.65 ± 9.90
<i>B. mandarina</i>	658	29.08	0.10 ± 0.08	15.37 ± 10.37
<i>R. fugax</i>	658	30.55	0.30 ± 0.00	24.43 ± 4.18
<i>O. caeca</i>	658	28.57	0.00 ± 0.00	24.78 ± 3.65
<i>A. artemis</i>	658	31.84	0.15 ± 0.00	19.16 ± 6.18
<i>C. japonica</i>	658	31.21	0.10 ± 0.08	19.55 ± 4.89

2. COI 염기서열 기반 종 특이 감별용 SCAR 마커 개발

COI 염기서열 분석에 이용된 6종 17개체의 ClustalW Multiple Alignment를 통해 다중염기서열을 정렬하였으며, 이를 토대로 종 특이 염기서열 구간이 포함되도록 primer를 설계하였다(Figure 1, Table 4). 설계한 SCAR primer는 특이성 확보 및 실험 조작성 용이하도록 18~23 mer의 크기로 제작하였으며, 건조 및 가공된 형태의 한약재 특성상 유전자 추출이 쉽지 않고 건조 등의 과정에서 DNA가 파괴된 형태로 추출되는 경우를 감안하여 PCR을 통해 감별에 이용되는 유전자 증폭산물의 크기는 400 bp 이하가 되도록 고려하였다. 그 결과, 누에나방 147 bp, 멧누에나방 147 bp, 유리산누에나방 232 bp, 물결누에나방 206 bp, 긴꼬리산누에나방 352 bp 그리고 밤나무산누에나방 162 bp로 PCR 증폭산물이 생성되도록 SCAR primer가 설계되었다(Figure 1 and Table 4). 특히, 곤충분류학적으로 동속근연종에 속한 누에나방과 멧누에나방은

유전적으로도 매우 유사하여 종간염기서열차이가 거의 없어서 동일한 위치에 SCAR primer를 설계 할 수밖에 없었으며 동일한 크기의 유전자 증폭산물이 생성되지만, 2종은 명확하게 유전자 감별이 가능함을 보여주었다 (Figure 1 and Table 4).

설계된 SCAR primer를 이용한 PCR 검정 결과, 6종 17개 시료에서 예상한 크기의 종 특이적 증폭산물이 해당 종에서만 증폭되는 것을 확인하였다(Figure 2). 특히, SCAR 검정을 통해 분류학적으로 동속의 근연종에 해당하는 누에나방과 멧누에나방의 종간 PCR 증폭산물이 서로 특이적으로 증폭되는 것을 확인함으로써 두 종을 완벽하게 구분할 수 있는 것을 확인하였다(Figure 2). 또한, 설계한 종 특이 SCAR primer는 최적의 증폭산물을 결과로 보이도록 annealing 온도(50, 53, 55℃)를 다양하게 주어 검정하였는데, 그 결과 누에나방과 멧누에나방에서는 50℃에서 유리산누에나방, 물결누에나방, 긴꼬리산누에나방 및 밤나무산누에나방은 55℃에서 최적의 증폭효율을 보였다(Figure 2).

Table 4. List of SCAR primers used for species-specific assay.

Species	Primer	Sequence (5' →3')	Ampli-con(bp)	Anneal-ingtem.(℃)
<i>B. mori</i>	BM_F1-1	CCC CAC TTT CAT CTA ATA GC	147	50
	BM_R1	CAA ATG ATA TAT TAT TTA ATC GT		
<i>B. mandarina</i>	BA_F1-1	CCC CAC TTT CAT CTA ATA GT	147	50
	BA_R1-1	CAA ATG ATA TAT TAT TTA ATC CC		
<i>R. fugax</i>	RF_F1	CTA GGG ACA CCT AGT TCC TTT	232	55
	RF_R1-1	CTA TTC TAC CAA CCA ACA GC		
<i>O. caeca</i>	OC_F1	ATT AAT TGG AAT GAT GGT TGA C	206	55
	OC_R1-1	TAC GAT CTA AAT ATA TAC CGA C		
<i>A. artemis</i>	AR_F1	CTA CCT CCA TCT CTT ACA C	352	55
	AR_R1-1	GGT CAA AAA AAG AAG TGT TAC G		
<i>C. japonica</i>	CJ_F1	ATT GCC TCC TTC TTT AAC TCT T	162	55
	CJ_R1-1	AAT AGA AGA AAT TCC AGC ACG		

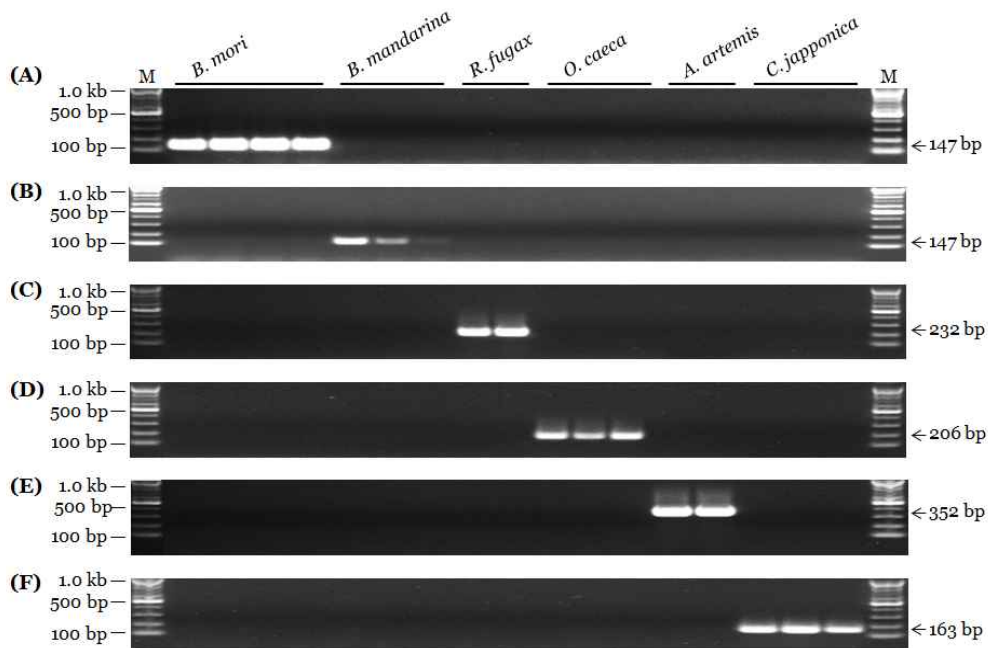


Figure 2. Verification of six species-specific SCAR primers using the conventional PCR assays. (A) Species-specific amplicon in *B. mori* using BM_F1-1/R1 primers. (B) Species-specific amplicon in *B. mandarina* using BA_F1-1/R1-1 primers. (C) Species-specific amplicon in *R. fugax* using RF_F1/R1-1 primers. (D) Species-specific amplicon in *O. caeca* using OC_F1/R1-1 primers. (E) Species-specific amplicon in *A. artemis* using AR_F1/R1-1 primers. (F) Species-specific amplicon in *C. japonica* using CJ_F1/R1-1 primers.

3. SCAR 마커 감별능 및 유통품 기원 검증

본 연구를 통해 확립한 SCAR 유전자 마커의 감별능 검증과 백강잠 유통품의 기원 확인을 위해 한약재 백강잠 유통품 8개 제품을 구입하여 동일한 분석법을 이용하여 유전자 감별을 실시하였다. 분석결과 8개 제품 모두 누에나방의 유충에 백강병균이 감염된 백강잠이 유통되는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 3).

또한, 다른 분류군의 종 혼입여부를 확인하기 위해 실시한 5종의 (멧누에나방, 유리산누에나방, 물결누에나방, 긴꼬리산누에나방 및 밤나무산누에나방) SCAR 마커를 이용한 유전자 분석 결과에서도 명확하게 종 혼입이 없음을 확인하였다. 이상의 결과는 본 연구를 통해 개발한 COI 염기서열 기반 종 특이 SCAR 마커와 유전자 분석법은 백강잠의 기원검정과 유사종의 혼입여부를 종 단위에서 명확하게 가능함을 보여주었다.

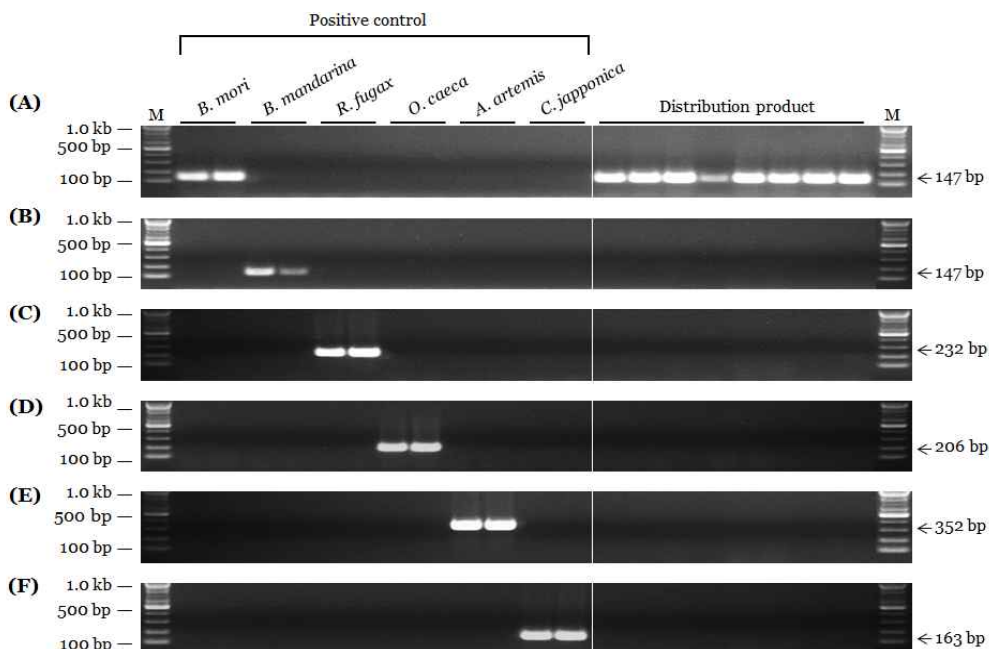


Figure 3. Monitoring of *Batryticatus Bombyx* distributing on herbal medicinal market using the SCAR marker of six species. (A) *B. mori*-specific SCAR analysis using BM_F1-1/R1 primers. (B) *B. mandarina*-specific SCAR analysis using BA_F1-1/R1-1 primers. (C) *R. fugax*-specific SCAR analysis using RF_F1/R1-1 primers. (D) *O. caeca*-specific SCAR analysis using OC_F1/R1-1 primers. (E) *A. artemis*-specific SCAR analysis using AR_F1/R1-1 primers. (F) *C. japonica*-specific SCAR analysis using CJ_F1/R1-1 primers.

IV. 고 찰

백강잠의 기원종은 대한민국약전의한약(생약)규격집과 식품의약품안전처에서 각각 한약재와 식품원료로 사용 가능한 것으로 누에나방 1종만 인정하고 있다⁴⁾. 본 연구에서 대상 분류군으로 포함한 누에나방은 누에나방과에 속하며 근연 분류군으로는 산누에나방과가 포함된다⁵⁾. 우리나라에 서식하는 곤충자원의 분류학적 연구가 보고된 사례가 많지 않아 분류동정 및 생태환경 변화에 따른 현재의 분포 현황을 정확하게 파악하는 것은 쉽지 않다⁵⁾. 따라서 본 연구에서는 우리나라 전국적으로 서식하는 누에나방과(누에나방, 멧누에나방 및 유리산누에나방)와 산누에나방과(물결누에나방, 긴꼬리산누에나방 및 밤나무산누에나방)에 속한 6종 17시료를 대상으로 CBOL⁶⁾에서 권장하는 범용성 바코드 구간인 COI 유전자 염기서열을 비교·분석하였으며, 최종적으로는 COI 바코드 구간의 염기서열 비교 분석을 통하여 신속하며 동일한 검정 결과의 종 감별이 가능하도록 백강잠의 기원종 및 근연분류군에 대한 종 특이 SCAR 마커를 개발하여 정확한 기원의 표준화된 한약재 유통을 위해 유전자 분석법을 개발하고자 하였다^{7,13,14)}.

양서류의 COI 바코드 구간 분석에 매우 적합한 것으로 보고 되는 COI-C02와 COI-C04 primer⁹⁾를 이용하여 PCR 증폭한 결과, 6종 17시료에서 모두 예상된 크기의 DNA 절편이 증폭되는 것을 확인 하였는데, 이는 기존의 COI 바코드 구간 분석에 활용된 COI-F과 COI-R universal primer¹⁹⁾ 조합에서는 증폭된 것과 비교하여 증폭 효율이 뛰어난 것을 확인하였다(자료 미제시). 또한, 각 시료에 대한 증폭산물은 T-vector에 삽입하여 정확한 염기서열 정보를 확보하였고, 염기서열 비교분석을 통해 확정된 유전자정보를 이용하여 종내변이율, 종간변이율, G+C 비율을 확인하였다(Table 3). 염기서열 분석을 통해 6종 모두 동일한 크기의 염기서열을 가지고 있는 것을 확인하였는데, 이는 염기서열의 삽입/결실이 일어나기 쉽지 않은 단백질을 암호화하고 있는 유전자부위의 특징으로 보여 진다^{10,20)}. 또한, 종간 변이율이 높았던 유리산누에나방과 물결누에나방은 ClustalW Multiple Alignment를 통해 염기서열 비교분석 결과에서도 종간 염기의 치환이 많아 다른 4종과 유전적으로 거리가 있음을 동일하게 보여주었다(Figure 1)^{18,20)}.

백강잠의 기원종인 누에나방과 동속근연종에 속하는 위품의 멧누에나방의 COI 바코드 구간 염기서열은 매우 유사하지만, 종을 구분할 수 있는 종 특이 염기가 3곳에 위치하고 있어 이 구간을 포함하여 SCAR primer를 제작하였다(Figure 1 and Table 4)^{13,16)}. 그 외에도 종간 염기서열 비교분석을 통해 유리산누에나방, 물결누에나방, 긴꼬리산누에나방 및 밤나무산누에나방에 대한 SCAR primer를 제작하여 6종에 대한 각각의 종을 PCR 증폭산물의 유무를 통해 종 단위 감별이 가능하도록 설계하였다(Figure 2)^{13,16)}. 또한, 이들 SCAR primer를 이용한 종 특이적 DNA 절편의 PCR 증폭이 가능하고 이들의 감별능을 높이기 위해 최적의 PCR 분석 조건을 확립하였다^{13,14)}. 따라서, 본 연구를 통해 백강잠 기원 검증에 위해 COI 바코드 구간의 염기서열 분석과정 없이 기원종과 동속근연종에 대한 신속 감별이 가능한 SCAR 마커를 개발하였다. 또한 높은 민감도를 보이는 최적의 PCR 분석 조건을 확립하여 유통품에서 감별능을 검증하였다. 이상의 결과는 한약재 백강잠의 기원종 감별과

위품의 혼·오용 방지를 위한 유전자 감별법의 유용한 결과로 향후 기원종에 따른 효능 연구 및 유사품 유통방지에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

V. 결 론

본 연구는 대한민국약전의한약(생약)규격집에 백강잠 기원종으로 수재되어 있는 누에나방과 위품으로 혼·오용 가능성이 높은 동속 또는 근연속의 멧누에나방, 유리산누에나방, 물결누에나방, 긴꼬리누에나방 및 밤나무산누에나방 6종의 COI 바코드 구간 염기서열을 비교분석하였으며, 종간 염기서열의 차이를 이용하여 보다 신속하게 종을 감별 할 수 있는 SCAR 마커를 개발하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 6종 17개체의 COI 바코드 염기서열을 해독하고 유전자 정보를 분석한 결과, 모든 시료에서 658 bp 동일한 길이의 염기로 구성되어 있었으며, 6종 모두 종 감별에 이용할 수 있는 종 특이 염기서열이 존재함을 확인하였다. 특히, 동속근연종인 누에나방과 멧누에나방은 3개의 염기 차이로 매우 유사한 유전자 정보로 구성되어 있으나 염기서열 분석을 통해 두 종을 구별할 수 있음을 확인하였다.
2. 종 단위 감별이 가능한 COI 바코드 염기서열 비교분석을 통해 염기서열 차이를 통해 종을 구별할 수 있는 감별능과 동일한 종 동정 정확성을 가지며 보다 신속하게 종 단위 기원 검증이 가능하도록 COI 바코드 염기서열을 바탕으로 SCAR primer를 제작하여 PCR 증폭용 유전자 마커를 개발하였으며 최적의 PCR 분석법을 확립하였다. 개발된 백강잠 SCAR 마커와 PCR 분석법을 통해 한약재 및 식품원료로 이용되는 백강잠의 기원검증과 위품의 혼·오용 방지를 위한 유전자 감별법으로 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원의 '동의보감 충부약재 활용기반 구축' 과제(KSN1812410)의 지원으로 수행되었으며, 유전자 분석용 표준표본시료를 제공해 주신 국립수목원표본관 및 한국한의학연구원 한약표준표본관, 그리고 시료의 분류·동정에 도움을 주신 분류·동정자문위원님께 감사드립니다.

References

1. Ryu KS, Lee HS, Kim YS. Pharmaco-dynamic study of power in mice administered to maltose, sucrose and lactose. *Korean J Seric Sci*. 1999 ; 41 : 9-13.
2. Oh TW, Kang SY, Kim KH, Song MY, Park YK. Anti-diabetic effect of medicinal plants used for lower wasting-thirst in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kor J Herbology*. 2013 ; 28(5) : 53-60.

3. Yoon SH, Ha H. The effect of Bombycis corpus on Streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Hygienic Sciences*. 2006 ; 6(1-2) : 11-22.
4. Korea Institute of Oriental Medicine. Defining Dictionary for Medicinal Herbs 'Hanyak Giwon Sajeon'. Retrived August 8, 2019, from <http://boncho.kiom.re.kr/codex>.
5. Park KT, Lee JS, Lee SM, Shim SY. Distributional data on the superfamily Bombycoidea (Lepidoptera) in Korea. *Inst of Agri Sci Kangwon Nat Univ*. 1997 ; 8 : 47-81.
6. CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants. *PNAS*. 2009 ; 106(31) : 12794-7.
7. Kim WJ, Yang S, Choi G, Moon BC. Peptide nucleic acid based molecular authentication for identification of four medicinal *Paeonia* species using melting array analysis of the internal transcribed spacer 2 region. *Molecules*. 2017 ; 22 : 1922. doi:10.3390/molecules22111922.
8. Moon BC, Kim WJ, Ji Y, Lee YM, Kang YM, Choi G. Molecular identification of the traditional herbal medicines, *Arisaematis Rhizoma* and *Pinelliae Tuber*, and common adulterants via universal DNA barcode sequences. *Genet Mol Res*. 2016 ; 15(1) : gmr.15017064. doi: 10.4238/gmr.15017064.
9. Pincheira-Donoso D, Bauer AM, Meiri S, Uetz P. Global taxonomic diversity of living reptiles. *PLoS ONE*. 2013 ; 8(3) : e59741.
10. Cho ES, Jung CG, Sohn SG, Kim CW, Han SJ. Population genetic structure of the ark shell *Scapharca broughtonii* Schrenck from Korea, China, and Russia based on COI Gene Sequences. *Mar Biotechnol*. 2007 ; 9 : 203-16.
11. Guan S, Liu H, Zheng Y, Yu D, Nie A, Liu M. Inference of phylogenetics and evolution of *Epinephelus septemfasciatus* and 48 other species of *Epinephelus* genus using mitochondrial CO1 fragment sequences. *Pakistan J Zool*. 2014 ; 46(1) : 67-74.
12. Ganie SH, Upadhyay P, Das S, Sharma MP. Authentication of medicinal plants by DNA markers. *Plant Gene*. 2015 ; 4 : 83-99.
13. Moon BC, Kim WJ, Han KS, Yang S, Kang Y, Park I, Piao R. Differentiating authentic *Adenophorae Radix* from its adulterants in commercially-processed samples using multiplexed ITS sequence-based SCAR markers. *Appl Sci*. 2017 ; 7 : 660. doi:10.3390/app7070660.
14. Noh P, Kim WJ, Yang S, Park I, Moon BC. Authentication of the herbal medicine *Angelicae Dahuricae Radix* using an ITS sequence-based multiplex SCAR assay. *Molecules*. 2018 ; 23(9) : 2134. doi: 10.3390/molecules23092134.
15. Babaei S, Talebi M, Bahar M. Developing an SCAR and ITS reliable multiplex PCR-based assay for safflower adulterant detection in saffron samples. *Food Control*. 2014 ; 35 : 323-8.
16. Kim WJ, Yang S, Choi G, Park I, Noh P, Seo CS, Moon BC. Development of conventional PCR and real-time PCR assays to discriminate the origins of Chinese pepper oil and herbal materials from *Zanthoxylum*. *J Sci Food Agric*. 2019 ; 99(4) : 2021-2029. doi: 10.1002/jsfa.9458.
17. Xiong X, Yao L, Ying X, Lu L, Guardone L, Armani A, Guidi A, Xiong X. Multiple fish species identified from China's roasted *Xue Yu* fillet products using DNA and mini-DNA barcoding: Implications on human health and marine sustainability. *Food Control*. 2018 ; 88 : 123-30.
18. Kim WJ, Yang S, Choi G, Moon BC. Identification of marker nucleotides for the molecular authentication of *Araliae Continentalis Radix* based on the analysis of universal DNA barcode, *matK* and *rbcL*, sequences. *Kor J Herbol*. 2016 ; 31(5) : 15-23.
19. Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PD. DNA barcoding Australia's fish species. *Phil Trans R Soc*. 2005 ; 360 : 1847-57.
20. Kim WJ, Ji Y, Choi G, Kang YM, Yang S, Moon BC. Molecular identification and phylogenetic analysis of important medicinal plant species in genus *Paeonia* based on rDNA-ITS, *matK*, and *rbcL* DNA barcode sequences. *Genet Mol Res*. 2016 ; 15(3) : gmr.15038472. doi: 0.4238/gmr.15038472.