

COI DNA 바코드 염기서열 기반 팽활(蟞蟻) 신속 감별용 SCAR marker 개발

김옥진[#], 노수민, 최고야, 장우종, 문병철^{*}

한국한의학연구원 한약자원연구센터

Development of SCAR marker for the rapid assay of *Paeng-hwal* based on *COI* DNA barcode sequences

Wook Jin Kim[#], Sumin Noh, Goya Choi, Woojong Jang and Byeong Cheol Moon^{*}

Herbal Medicine Resources Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine

ABSTRACT

Objectives : *Paeng-hwal* is described as an insect herbal medicine used for digestive diseases in the *Dong-ui-bo-gam*. The origin of this herbal medicine is limited to several small crabs, such as *Helice tridens*. These crab species cohabit in the same environment and share similar morphological characteristics, making it very difficult to distinguish and collect the individual species for use in dietary supplements or herbal medicines. This study was conducted to develop a genetic identification tool for discriminating among these closely related small crab species.

Methods : *COI* DNA barcode regions of 15 samples from 6 species of small crabs were analyzed to obtain the individual sequences. To identify the correct species, comparative analyses were carried out using the database of the NCBI GenBank and the NIBR. SCAR primers were designed to develop simple and rapid assay methods using inter-species specific sequences. Optimal SCAR assay conditions were established through gradient PCR, and the limit of detection (LOD) was determined.

Results : Six species of small crabs (*Helicana tridens*, *Macrophthalmus abbreviatus*, *Helicana tientsinensis*, *Helicana wuana*, *Chiromantes dehaani*, and *Hemigrapsus penicillatus*), which are distributed as *Paeng-hwal*, were identified through *COI* sequences analysis. We also developed SCAR markers to distinguish between six small crabs at the species level. Furthermore, we established the optimal PCR assay methods and the LOD of each individual species.

Conclusions : The rapid and simple SCAR-PCR assay methods were developed to identify the species and control the quality of herbal medicines for *Paeng-hwal* based on the genetic analyses of *COI* DNA barcodes.

Key words : DNA barcode, SCAR marker, *Helice tridens*, *Paeng-hwal*, Cytochrom Oxidase I (*COI*), Species identification

*Corresponding author : 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 : bccmoon@kiom.re.kr

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

· Tel : +82-61-338-7115

· Fax : +82-61-338-7135

· E-mail : ukgene@kiom.re.kr

· Received : 18 January 2024

· Revised : 22 February 2024

· Accepted : 25 March 2024

I. 서론

생물자원을 이용한 천연물 소재가 고부가가치 산업으로 인식되면서 오래전부터 한약자원으로 이용되어 온 생물종을 대상으로 유효성 평가를 통해 산업화를 위한 소재 발굴 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁻⁴⁾. 이는 나고야의정서 이행을 위한 유전자원법이 2018년 8월 18일 전면 시행에 들어가면서 우리나라 생물자원을 활용한 소재 발굴의 중요성이 더욱 강조되고 있다⁵⁾. 생물자원을 이용한 소재 발굴 연구는 《대한민국약전(KP12)》과 《대한민국약전외한약(생약)규격집(KHP)》에 수재된 한약(생약)의 '기원종' 외에도 고문헌 및 민간요법으로 이용된 종들이 대상 범주에 해당한다.

팽활(虵蝟)은 동의보감 탕액편 충부에 수록된 해(蟹)에 포함된 약재이다⁶⁾. 해(蟹)는 계의 종류에 따라 추모(蟪蛄), 웅검(擁劍) 및 팽활(虵蝟)로 구분하여 사용하였는데, 그 중 팽활(虵蝟)은 집게발이 가장 날카롭고 작은 형태인 계로 '治反胃噎膈'의 효능이 있어 소화기계 질환 치료에 이용한 것으로 기록되어 있다⁶⁾. 최근에 남 등은 팽활(虵蝟) 열수추출물을 세포 및 동물에 처리하여 역류성 식도염 보호 소재로서 가능성을 확인하였다⁷⁾. 이는 오랫동안 동의보감 충부 약재로 이용된 팽활(虵蝟)이 소화기계 질환 치료제로 활용 가능함을 보여준다.

팽활(虵蝟)은 크기가 작은 개 종류를 통칭하는 약명으로 그 기원종으로 방계(*Helice tridens* (De Haan, 1835)), 수동방계(*Helicana wuana* (Rathbun, 1931)) 칠계(*Macrophthalmus japonicus* (De Haan, 1835)), 길계(*Macrophthalmus abbreviatus* Manning & Holthuis, 1981), 갈계(*Helice tientsinensis* (Rathbun, 1931)), 말뚝계(*Chiromantes dehaani* (H. Milne Edwards, 1853)) 및 풀계(*Hemigrapsus penicillatus* (De Haan, 1835)) 등을 포함시킬 수 있다. 또한, 식품의약품안전처에서는 식품원료로 방계와 말뚝계 2종만을 사용 가능한 종으로 규정하고 있어 연구개발소재로 활용하는데 있어 주의가 필요하다. 하지만 이들은 크기가 비슷할 뿐만 아니라 서식지도 동일하여 종을 구분하여 대량으로 채취하여 활용하는 것은 불가능하다. 실제 수산시장에서 많이 판매되고 있는 방계나 칠계는 유사한 크기의 방계, 갈계, 길계 등 여러 종이 혼합된 상태로 유통되고 있다. 우리나라에는 방계와 유사한 크기의 계 10여 종이 서식하는 것을 국립생물자원관 한반도의 생물다양성 홈페이지에서 확인 할 수 있으나, 생태·분류학적 선행연구가 미비한 상태여서 정확한 정보를 확인하기 어렵다⁸⁾.

최근 들어 자동화된 염기서열의 대량분석이 가능해짐에 따라 지구상에 존재하는 생물종의 DNA 바코드 부위 염기서열 정보가 기하급수적으로 축적됨에 따라 쉽게 생물종 동정 및 계통분류학적 유연관계 분석이 가능하게 되었다^{9,10)}. 동물계 종 동정에 범용적으로 이용되는 바코드 구간은 미토콘드리아 Cytochrom Oxidase I (*COI*) 유전자 구간으로 이를 이용한 분류학적 연구나 한약재 감별 연구 사례가 다수 보고되고 있다^{11,12)}.

따라서 본 연구는 한약자원 소재 개발 및 활용 함에 있어 가장 기본이 되고 중요한 평가 단계인 방계와 유사·근연종간의 기원감별을 신속 정확하게 수행하고 DNA 바코드 분석과 동등한 검정 결과를 도출할 수 있는 유전자 진단법을 개발하

고자 하였다. 이를 위해 수산시장에서 방계와 칠계 유통품을 구입하여 형태적으로 차이가 있는 15개체를 구분하여 선별하였고, 범용성 바코드 구간인 *COI*을 이용하여 염기서열 분석하여 확보된 정보를 바탕으로 NCBI GenBank와 국립생물자원관에(NIBR) 등록된 염기서열 정보와 비교·분석하여 종을 동정하였다. 최종적으로 확보된 종들에 대한 종 특이적인 염기서열 정보를 바탕으로 primer를 제작하고 최적의 PCR 조건을 확립하여 신속 감별이 가능한 SCAR 마커로 개발하여 한약자원 소재 개발 연구에 기초자료 및 원료 기원감별을 통한 표준화 수단으로 이용하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료 및 생물표본 제작

본 실험에 사용된 시료는 광주광역시 및 전라남도(나주시, 고흥시 및 완도군) 수산시장에서 방계와 칠계 유통품 각 20 kg을 구매하여 형태 차이가 있는 15개체들을 각각 구분하여 70% 에탄올로 2회 세척 후 3차 증류수로 1회 수세하여 개체별로 표본번호를 부여하여 한국한의학연구원 한약표준자원은행 초저온냉동고에 보관하였으며, 이들로부터 확보한 *COI* 염기서열을 NCBI GenBank 및 NIBR DB에 등록된 염기서열 정보와 비교분석을 통해 최종 확정된 종감별 마커 개발에 이용한 분류군 및 표본은 Table 1에 정리한 바와 같다(Table 1).

2. DNA 추출

Genomic DNA는 DNeasy Blood and Tissue Kit(QIAGEN, USA)에서 제공하는 protocol에 따라 약 100 mg의 시료를 이용하여 추출·정제하였다. 추출한 genomic DNA의 순도(260/280 ratio) 및 정량(260 nm × 50 μg/ml)은 UV spectrophotometer (Nanodrop, USA)를 이용하여 측정하였고, 사용 전까지 -20℃에서 보관하여 실험에 사용하였다.

3. *COI* 바코드 구간 PCR 증폭 및 염기서열 분석

COI 바코드 구간의 PCR 증폭은 추출한 약 20 ng의 genomic DNA, 각 0.5 μmol L⁻¹의 CO1-C02 및 CO1-C04 primer (Table 2), SolgTM 2 × Taq PCR Smart-MixI(Solgent, Daejeon, Korea)를 혼합하여 총 반응 용량이 40 μl이 되도록 제조하였다. PCR은 ProFlex™ PCR System(Applied Biosystems, USA) 장비를 이용하여 95℃-2분(1회), 95℃-1분 → 53℃-1분 → 72℃-1분 30초(35회), 72℃-5분(1회)로 반응시켰다. 각 시료의 증폭 산물은 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동한 후 예상된 700 bp 크기의 겔을 잘라내어 Gel extraction kit(QIAGEN, USA)를 이용하여 회수하였다. 염기서열 분석을 위한 시료 준비는 회수한 *COI* 증폭 산물의 T-vector 삽입, *E. coli* 형질전환 및 colony PCR 분석을 통해 확보하였고, 실험방법은 김 등이¹³⁾ 보고한 조건과 동일하게 수행하였다. 염기서열 분석은 시료당 colony PCR을 통해 T-vector 내에 DNA가 삽입된 4개의 colony를 이용하여 진행하였다.

Table 1. Information on experimental materials used in this study.

Herbal name	Food ingredient	Scientific name	Voucher number	Abbreviation
Paeng-hwal	Possible	<i>Helice tridens</i> (De Haan, 1835)	FB03559143	HTR
			FB03560582	MA-1
	Impossible	<i>Macrophthalmus abbreviatus</i> Manning & Holthuis, 1981	FB03560577	MA-2
			FB03560584	MA-3
			FB03560533	HW-1
	Impossible	<i>Helicana wuana</i> (Rathbun, 1931)	FB03560583	HW-2
			FB03560574	HW-3
	Impossible	<i>Helice tientsinensis</i> (Rathbun, 1931)	FB03561253	HTI-1
			FB03561256	HTI-2
			FB03561252	HTI-3
	Possible	<i>Chiromantes dehaani</i> (H. Milne Edwards, 1853)	FB04927456	CD-1
			FB04927446	CD-2
	Impossible	<i>Hemigrapsus penicillatus</i> (De Haan, 1835)	FB04927450	HP-1
			FB04927443	HP-2
			FB04927447	HP-3

Table 2. Primers used for the COI amplification and sequence analysis.

DNA barcode region	Primer name	Primer sequences (5'→3') [†]	Reference
COI	CO1-C02	AYT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G	Pincheira-Donoso et al., 2013 ¹⁴⁾
	CO1-C04	ACY TCR GGR TGA CCA AAA AAT CA	

[†] Nucleotides represented as degenerate symbols mean a single letter code: Y, A or T; R, A or G.

4. 염기서열 분석 및 종 동정

Sanger sequencing을 통해 확보된 염기서열은 BioEdit (버전 7.2.5) 프로그램을 이용하여 T-vector 부위의 염기서열은 제거하고 COI 바코드 구간의 염기서열 정보만을 확보하였다. 종 동정은 확보된 약 700 bp 크기의 COI 염기서열 정보를 이용하여 NCBI BLAST를 통한 상동성 및 NCBI와 국립생물자원관에 등록된 염기서열 정보와의 유사도 분석을 통해 각각의 종을 확정하였다.

5. 종 특이 SCAR primer 제작 및 검증

종 특이 SCAR primer 제작은 6종 15개 시료들로부터 확보된 약 700 bp 크기의 염기서열을 BioEdit(버전 7.2.5) 프로그램의 ClustalW Multiple Alignment를 이용하여 시료들 간의 염기서열 비교·분석을 통해 중간 특이 염기가 3' 말단에 포함하도록 SCAR primer 부위로 선정하였다. SCAR primer는 길이 19~21 mer, melting temperature 50~60°C, GC 비율 40~60%가 되도록 설계하였다. 제작한 SCAR primer의 종 특이성 검증은 COI 바코드 구간 분석에 사용한 것과 동일한 시료의 genomic DNA를 사용하였고, 6종 가운데 시료가

1개만 확보된 방계는 실험의 오차를 줄이고 신뢰성을 높이기 위해 집게, 다리, 몸통에서 각각 추출한 genomic DNA를 이용하였다. PCR 조성은 약 10 ng의 genomic DNA, 각 0.5 µmol L⁻¹의 SCAR primer F와 R(Table 3), SolgTM 2 × Taq PCR Smart-MixI(Solgent, Daejeon, Korea)를 혼합하여 총 반응용량이 20 µl이 되도록 제조하였다. PCR 조건은 ProFlex™ PCR System(Applied Biosystems, USA) 장비를 이용하여 95°C-2분(1회), 95°C-20초 → annealing temperature-30초(Table 3) → 72°C-20초(35회), 72°C-5분(1회)로 반응시켰다. 또한 최적의 PCR 조건을 탐색하고자 annealing temperature를 50~67°C 범위에서 gradient PCR로 검증하였다.

6. SCAR primer 감도 테스트

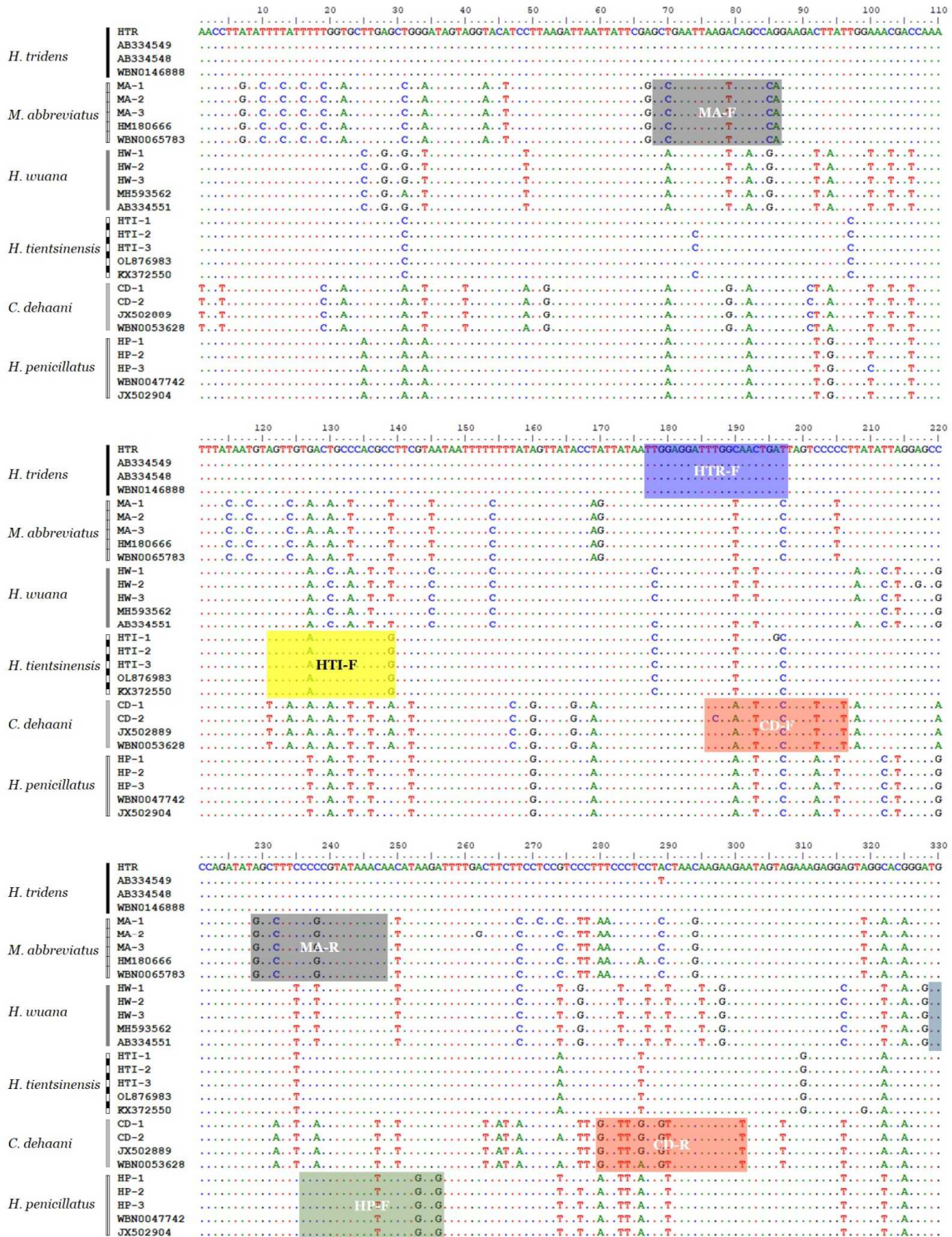
SCAR primer로 사용하기에 적합한 것으로 선발된 SCAR primer 조합 및 PCR 검정에 최적화된 탐색 조건하여 감도 테스트를 실시하였다. Template는 10 ng의 genomic DNA를 10배씩 희석하여 10 ng ~ 10 fg 범위로 테스트하였다.

Ⅲ. 결 과

1. COI 바코드 염기서열 분석을 통한 유통품 분류 및 동정

COI 바코드 구간 증폭은 형태적으로 차이가 있는 유통품 15개체를 이용하여 개체별로 PCR 증폭하였고 전기영동을 통해 약 700 bp 크기의 증폭 산물을 확인하였다. 증폭 산물의 염기서열 해독을 통해 확보된 각 시료의 염기서열 정보를 NCBI

GenBank와 국립생물자원관에 등록된 염기서열 정보와의 상동성 및 유사도 분석을 통해 종을 확인하고 분류하여 확정하였다. 그 결과, COI 바코드 구간 염기서열은 분석한 15개 시료 모두에서 658 bp의 동일한 크기의 유전자로 구성되어 있었으며, 유통품에서 칠게는 확인되지 않고 방게, 길게, 일본방게, 갈게, 말뚝게 및 풀게 6종이 혼재되어 유통되는 것을 확인하였다. 염기서열 분석을 통해 확인한 15개 표본은 방게 1개체, 길게 3개체, 일본방게 3개체, 갈게 3개체, 말뚝게 2개체, 풀게 3개체로 확인되었다(Table 1, Figure 1).



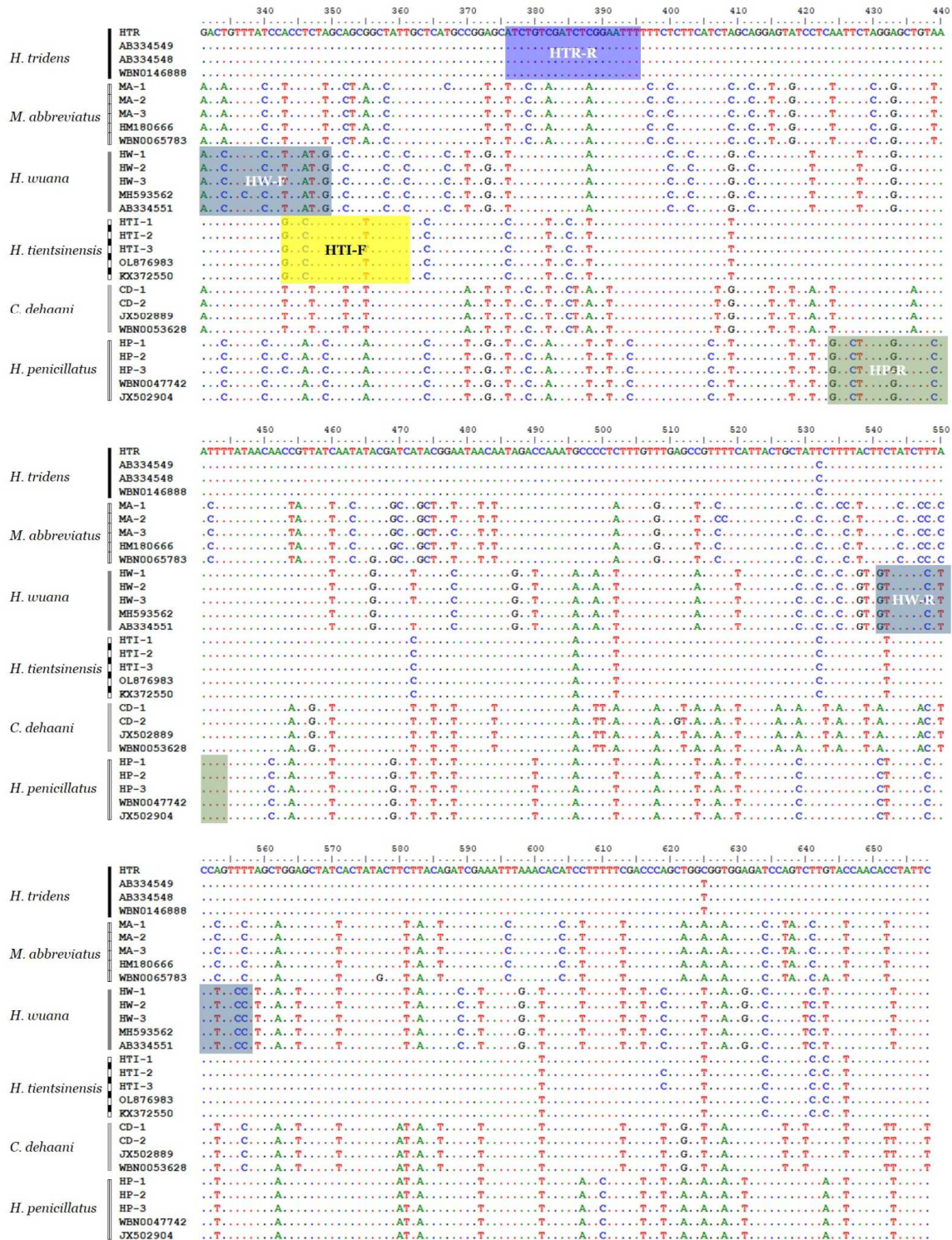


Figure 1. The ClustalW Multiple Alignment using the amplified COI sequences between six species related to *Paeng-hwal*. The colour boxes indicate the species-specific primer designed for SCAR PCR markers. Dots (.) indicate the identical sequences with *H. tridens* HTR.

2. COI 염기서열 기반 종 특이 감별용 SCAR marker 개발

염기서열 분석으로 확보한 6 분류군 15개체(방계 1개체, 길게 3개체, 일본방계 3개체, 갈게 3개체, 말뚝계 2개체, 풀계 3개체)는 종감별용 SCAR marker 탐색에 이용하였다(Table 1,

Figure 1). SCAR primer 탐색을 위해 ClustalW Multiple Alignment 방법으로 6종 15개체의 COI 염기서열을 정렬하였으며, 중간 염기서열 변이가 포함된 구간을 primer 부위로 선정하였다(Figure 1). 각각의 SCAR primer로 증폭되는 PCR 산물의 예상 크기는 방계 220 bp, 길게 181 bp, 일본방계 230 bp, 갈게 241 bp, 말뚝계 115 bp 및 풀계 209 bp였다

(Table 3). SCAR primer와 6종 15개체 시료를 이용한 SCAR 마커의 특이성을 검증한 결과, 방계는 HTR-F와 HTR-R primer를 이용한 PCR 증폭 결과에서 15개 시료 중 방계에서만 220 bp 크기의 종 특이적인 증폭 산물이 확인되었다. 또한, 길게 MA-F/-R, 일본방계 HW-F/-R, 갈게 HTI-F/-R, 말뚝계 CD-F/-R 및 풀계 HP-F/-R 특이 primer를 이용한

검정에서도 예상된 크기의 종 특이적 PCR 증폭산물을 각각 확인할 수 있었다(Figure 2). 최적의 PCR 조건 탐색을 위한 각 SCAR primer 쌍의 annealing 온도를 gradient PCR을 통해 확인한 결과, 방계와 일본방계는 60℃, 길게 63℃, 갈게 65℃, 그리고 말뚝계와 풀계는 55℃에서 종특이적인 PCR 산물을 안정적으로 증폭하는 것으로 확인되었다(Table 3, Figure 2).

Table 3. SCAR primers used for the species-specific assay.

Target species	Primer name	Sequence (5'→3')	Annealing temperature (°C)	Size (bp)
<i>H. tridens</i>	HTR-F	TTG GAG GAT TTG GCA ACT GAT	60	220
	HTR-R	AAA ATT CCG AGA TCG ACA GCT		
<i>M. abbreviatus</i>	MA-F	GCC GAA TTA AGT CAG CCC A	63	181
	MA-R	TGT TTA TAC GCG GGA AGG TC		
<i>H. wuana</i>	HW-F	TGA ACC GTT TAC CCT CCA TCG	60	230
	HW-R	AGG ACA GGA AGA GAT AAC AAC		
<i>H. tientsinensis</i>	HTI-F	AGT TGT AAC TGC CCA CGC G	65	241
	HTI-R	AAT AGC AGC TGC TAG GGA C		
<i>C. dehaani</i>	CD-F	TTG GAA ATT GAC TAG TTC GCT	55	115
	CD-R	CTT CTT GTT AAC AGC AAA GAC		
<i>H. penicillatus</i>	HP-F	CCC CGT ATA AAT AAC ATG ACG	55	209
	HP-R	AAA TTG ACA GCC CCT AAG ATC		

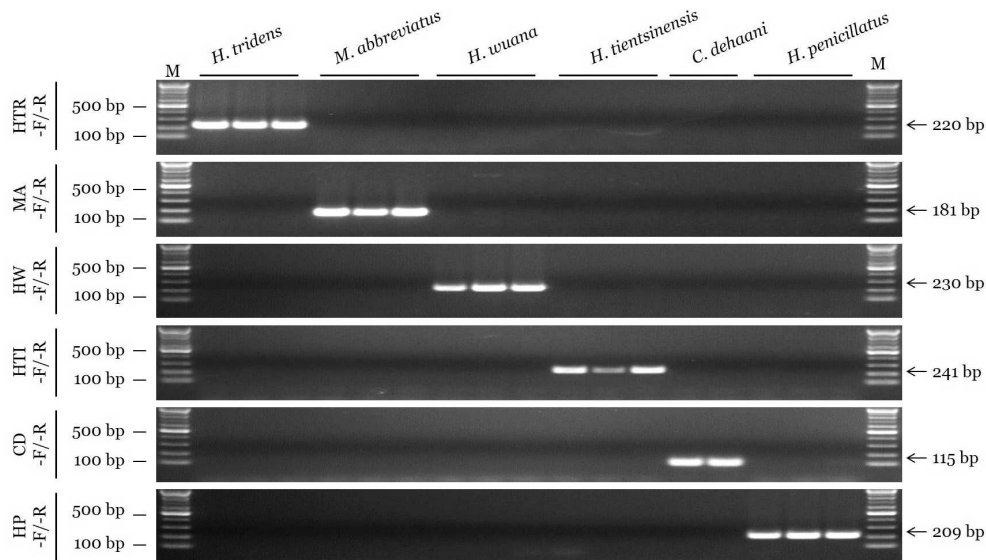


Figure 2. Verification of primer specificity for SCAR markers of six species. The primer combinations used for evaluating species specificity are as follows: HTR-F/-R for *H. tridens*, MA-F/-R for *M. abbreviatus*, HW-F/-R for *H. wuana*, HTI-F/-R for *H. tientsinensis*, CD-F/-R for *C. dehaani*, and HP-F/-R for *H. penicillatus*, as indicated on the left side. M represents a 100 bp DNA ladder, and dashes indicate 100 bp and 500 bp size marker, respectively. Arrowheads indicate the sizes of the PCR products, respectively.

3. SCAR marker 감별 안정성 및 검출한도 검증

대한민국약전(KP) 및 대한민국약전의한약(생약)규격집(KHP)에서 규정하고 있는 기원이 다른 혼오용품이나 약용부위가 아닌 이물 등의 혼입율은 1.0% ~ 5.0% 이하로 규정하고 있으며,

대부분의 품목은 2.0% 이하로 규정하고 있다⁶⁾. 팽활(虻蛄)의 종 감별과 종간 혼입에 따른 이물 혼입을 확인을 통해 SCAR marker 기반의 PCR 분석법이 팽활(虻蛄)의 순도검사에 활용 가능한지 확인하기 위해 각 시료로부터 추출된 DNA 100 fg

(0.001%) ~ 10 ng(100%) 범위로 단계적으로 희석하여 PCR 검출 여부를 확인하였다. PCR 분석 결과, 방게 10 pg, 길게 1 pg, 일본방게 10 pg, 갈게 100 pg, 말뚝게 10 pg, 그리고 풀게 100 pg으로 각각 검출한계를 확인하였다(Figure 3). 검출 한도가 가장 낮게 나온 갈게와 풀게는 100 pg까지 PCR을 통해 검출이 가능하였으며, 이는 이들이 0.1% 이상 혼입되었을

경우에 확인이 가능함을 의미한다. 따라서 본 연구에서 개발한 SCAR PCR 분석법은 팽활(蠃蛄)로 사용할 수 있는 방게, 길게 등 6종을 종단위에서 정확하게 감별할 수 있고 0.1% 이상 혼입 되었을 경우 그 혼입 여부를 확인할 수 있는 안정적인이고 유용한 분석법임을 알 수 있었다(Figure 3).

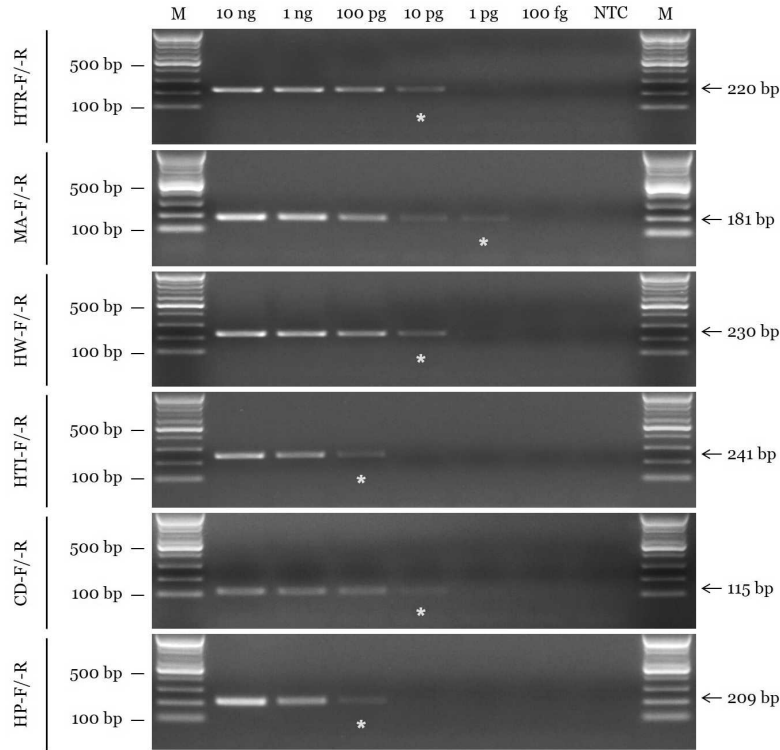


Figure 3. Analysis of detection limit of SCAR markers. Yellow asterisks (*) indicate the concentration of limit of detection (LOD). The primer combinations used for evaluating the LOD are as follows: HTR-F/-R for *H. tridens*, MA-F/-R for *M. abbreviatus*, HW-F/-R for *H. wuana*, HTI-F/-R for *H. tientsinensis*, CD-F/-R for *C. dehaani*, and HP-F/-R for *H. penicillatus*, as indicated on the left side. M represent a 100 bp DNA ladder, and dashes denote the 100 bp and 500 bp size marker, respectively. Arrowheads indicate the size of the PCR products.

IV. 고 찰

전 세계적으로 천연물의약품의 시장 규모가 지속적으로 성장함에 따라 합성약품 또는 천연물 유래 의약품에 비해 연구 개발이 미비한 동물유래 의약품의 제품 개발이 확대될 것으로 전망된다¹⁵⁾. 그런 측면에서 우리나라의 대표적 고문헌인 동의보감에 수재된 층부약재에 대한 유효성·안전성 검증을 통한 임상 활용 근거 확보 및 지속적 활용을 위한 소재 개발 연구가 진행 중이다¹⁵⁻¹⁷⁾. 팽활(蠃蛄)은 소화기계 질환 치료에 오랫동안 이용된 동의보감 탕액편 수록 층부약재로 최근 보고에 따르면 열수추출물을 세포 및 동물에 처리한 결과, 역류성 식도염으로 인한 조직의 손상을 개선하고 NF- κ B의 인산화 및 COX-2와 TNF- α 와 같은 염증성 인자의 발현을 억제함으로써 역류성 식도염 보호 소재로 활용 가능성을 보고한 바 있다⁷⁾.

또한 건강기능식품으로 사용하기 위해서는 식품의약품안전처에서 인정하는 식품 원료로 이용이 가능한 종으로 허가·등록

되어 있어야 하는데, 현재는 방게와 말뚝게 2종으로 제한하고 있다¹⁸⁾. 그럼에도 방게는 일반적인 식재료로 이용되는 칠게와 비슷한 크기와 동일한 서식지로 인해 단일종 채취가 어려운 자원으로 수산시장에서 칠게, 길게 및 갈게 등과 혼합되어 판매되는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 층부약재 해(蟹) 중에서 팽활(蠃蛄)에 해당하는 방게와 이의 유사종을 대상으로 COI 바코드 구간 염기서열 분석하고 이를 바탕으로 이들의 종을 신속하게 감별할 수 있는 SCAR 마커로 개발하여 향후 산업화를 위한 유용 소재로 활용시 품질 관리 및 원료 표준화를 위한 기초자료로 활용하고자 하였다.

유전자 감별실험에 앞서 광주광역시 및 전라남도 소재 수산시장에서 구입한 방게와 칠게 유통품에서 거의 정상, 색깔 및 집게발 모양 등 형태적으로 차이가 있는 15개체를 구분·선별하였고, 개체별로 COI 바코드 구간 염기서열 정보와 NCBI GenBank와 국립생물자원관 생물종다양성 정보에 등록된 염기서열 정보를 비교하여 분류·동정 하였다. 그 결과

구입한 방계와 칠계는 단일종이 아닌 방계 1개체, 길계 10개체, 일본방계 4개체, 갈계 7개체, 말뚝계 2개체 및 풀계 6개체가 혼합되어 있었고, 전체 염기서열은 모두 658 bp로 동일하였다. 하지만 칠계로 채취되어 유통된 구입품에서 칠계는 확인되지 않았다. 이는 칠계가 염기서열 정보에서 길계와 매우 유사하였는데, 칠계와 동속근연종에 속한 길계가 형태적 유사성으로 인해 분류·선별하는 과정 중에 포함되지 못했을 가능성과 길계가 칠계보다 우점종으로 자리 잡아 혼·오용하여 사용되는 것으로 판단된다.

6종 15개체로부터 확인된 *COI* 염기서열 정보를 바탕으로 신속 감별용 SCAR 마커를 탐색하기 위해 염기서열 변이가 있는 부위를 포함하여 종 특이적인 primer를 제작하였고, 종별로 gradient PCR을 진행하여 최적의 PCR 분석 조건을 확립하였다. 그 결과 방계는 220 bp 크기로 60℃에서 종 특이적인 PCR 산물이 확인되었으며, 길계 181 bp는 63℃, 일본방계 230 bp는 60℃, 갈계 241 bp는 65℃, 말뚝계 115 bp는 55℃ 그리고 풀계 209 bp는 55℃에서 PCR 조건이 확립되었다. 또한 혼입된 상태로 유통되는 방계의 특성상 혼입의 정도를 판별할 수 있는 PCR 검출한계를 확인하기 위하여 감도 test를 실시한 결과, 100 pg에서 1 pg까지의 genomic DNA 수준에서 감별능이 확인되어 소재의 품질관리 및 기원 검증을 위해 유용하게 활용될 것으로 판단된다.

V. 결 론

본 연구는 소화기계 질환 치료에 이용된 층부약재 팽활(虻蛄)의 기원종에 포함되는 방계, 길계, 일본방계, 갈계, 풀계 및 말뚝계 6종을 대상으로 *COI* 바코드 구간 염기서열을 비교·분석하였고, 종 특이적 구간을 이용하여 설계·제작한 primer와 최적의 PCR 분석법을 확립하여 유통품에서 신속·정확한 종 동정을 할 수 있는 SCAR 유전자 마커를 개발하여 다음과 같은 결론을 도출하였다.

1. 6종 15개체에서 *COI* 바코드 구간 염기서열 정보를 해독·확보하였으며, NCBI 및 국립생물자원관 DB 정보를 활용한 염기서열 비교·분석을 통해 팽활(虻蛄)로 유통되는 방계 등(길계, 일본방계, 갈계, 풀계 및 말뚝계)의 종 동정을 실시하였고, 중간 염기서열 정보 차이를 통해 종 감별능을 확인하였다.
2. 확보된 *COI* 바코드 구간 종 특이 염기서열을 바탕으로 SCAR primer를 설계하였고, 종 단위 감별이 가능한 최적의 PCR 분석법을 확립하여 신속·간편하면서 6종에 대한 *COI* 바코드 분석과 동등한 검정 결과가 수반되는 유전자 감별법을 개발하였다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원 기본사업인 ‘지속가능한 한약 표준자원 활용기술 개발’ 과제(KSN1822320)의 지원으로 수행되었으며, 시료 확보에 도움을 주신 한약자원연구센터 연구자 분들께 감사드립니다.

References

1. Luo H, Vong CT, Chen H, Gao Y, Lyu P, Qiu L, Zhao M, Liu Q, Cheng Z, Zou J, Yao P, Gao C, Wei J, Ung COL, Wang S, Zhong Z, Wang Y. Naturally occurring anti-cancer compounds: shining from Chinese herbal medicine. *Chinese medicine*. 2019 ; 14(1) : 48.
2. Seo YH, Kim JY, Ryu SM, Hwang SY, Lee MH, Kim N, Son H, Lee AY, Kim HS, Moon BC, Jang DS, Lee J. New sesquiterpene glycosides from the flowers of *Aster koraiensis* and their inhibition activities on EGF- and TPA-induced cell transformation. *Plants*. 2023 ; 12 : 1726.
3. Kim SC, Gu DR, Yang H, Lee SJ, Ryuk JA, Ha H. Isolation and characterization of an anti-osteoporotic compound from *Melia toosendan* fructus. *Pharmaceutics*. 2023 ; 15 : 2454.
4. Kim B. Research on vasorelaxant effects of 20 Korean native plants. *The Korea Journal of Herbology*. 2023 ; 38(5) : 39-47.
5. Kim S. Development of functional food materials using traditional native plant medicines. *Food industry and Nutrition*. 2013 ; 18(20) : 12-16.
6. Korea Institute of Oriental Medicine. Herbal Medicine Resources Research Center ‘Ancient Literature (*gomunheon*)’. 2023 ; Published on the Internet; <https://oasis.kiom.re.kr/herbllib/main.do> (accessed 2023-12-06).
7. Nam HH, Seo YS, Song JH, Lee AY, Noh P, Moon BC, Lee JH. Crab water extract ameliorates reflux esophagitis in Rats. *Herbal Formula Science*. 2022 ; 30(1) : 11-18.
8. National Institute of Biological Resources. Biodiversity of Korean peninsula ‘List of national species (*gukgasaengmuljongmokok*)’. 2023 ; Published on the Internet; <https://species.nibr.go.kr/index.do> (accessed 2023-12-04).
9. Parveen I, Gafner S, Techen N, Murch SJ, Khan IA. DNA barcoding for the identification of botanicals in herbal medicine and dietary supplements: strengths

- and limitations. *Planta Medica*. 2016 ; 82(14) : 1225–1235.
10. Gesto–Borroto R, Medina–Jiménez K, Lorence A, Villarreal ML. Application of DNA barcoding for quality control of herbal drugs and their phytopharmaceuticals. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2021 ; 31 : 1–15.
 11. 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.
 12. 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 COI fragment sequences. *Pakistan J Zool*. 2014 ; 46(1) : 67–74.
 13. Kim WJ, Yang S, Noh P, Park I, Choi G, Song JH, Moon BC. Development SCAR marker for the rapid authentication of *Batryticatus Bombyx* based on COI Sequences. 2019 ; 34(5) : 13–20.
 14. Pincheira–Donoso D, Bauer AM, Meiri S, Uetz P. Global taxonomic diversity of living reptiles. *PLoS ONE*. 2013 ; 8(3) : e59741.
 15. Lee JH, Moon BC, Nam HH, Kim JS. Analysis of trends in patents on insect–derived medicinal materials for skin diseases. *The Korea Journal of Herbology*. 2020 ; 35(2) : 39–46.
 16. Ryu SM, Nam HH, Kim JS, Song JH, Seo YH, Kim HS, Lee AY, Kim WJ, Lee D, Moon BC, Lee J. Chemical constituents of the egg cases of *Tenodera angustipennis* (Mantidis ootheca) with intracellular reactive oxygen species scavenging activity. *Biomolecules*. 2021 ; 11 : 556.
 17. Park G, Moon BC, Ryu SM, Kim WJ, Lim HS. Cicadidae *Periostracum attenuates* atopic dermatitis symptoms and pathology via the regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021 ; 8878153.
 18. Ministry of Food and Drug Safety. *Foodsafetykorea ‘List of Food Ingredients (sikpumwonryomokrok)’*. 2023 ; Published on the Internet; <https://www.foodsafetykorea.go.kr/main.do> (accessed 2023–12–04).