오미자 (五味子) 종 감별을 위한 RAPD 유래 SCAR Marker 및 Multiplex-PCR 기법 개발

이영미 · 문병철 · 지윤의 · 서형석 · 김호경[†]

한국한의학연구원 한약기초연구그룹

Development of RAPD-Derived SCAR Markers and Multiplex-PCR for Authentication of the Schisandrae Fructus

Young Mi Lee, Byeong Cheol Moon, Yunui Ji, Hyeong Seok Seo
and Ho Kyoung Kim[†]

Basic Herbal Medicine Research Group, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea.

ABSTRACT : The fruits of *Schisandra chinensis* have been used as an edible ingredient and traditional medicine in Korea. Due to morphological similarities of dried mature fruits, the correct identification of *S. chinensis* from other closely related Schisandrae species is very difficult. Therefore, molecular biological tools based on genetic analysis are required to identify authentic Schisandrae Fructus. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) were used to develop an easy, reliable and reproducible method for the authentication of these four species. In this paper, we developed several RAPD-derived species specific SCAR markers and established a multiplex-PCR condition suitable to discriminate each species. These genetic markers will be useful to distinguish and authenticate Schisandrae Fructus and four medicinal plants, *S. chinensis*, *S. sphenanthera*, *S. repanda* and *K. japonica*, in species level.

Key Words : SCAR Marker, Multiplex-PCR, *Schisandra chinensis*, *Schisandra sphenanthera*, *Kadsura japonica*, *Schisandra repanda*

서 언

오미자 (五味子)는 오미자과 (Schisandraceae)에 속하는 덩굴성 식물로 우리나라에는 *Schisandra*속 낙엽활엽 덩굴성 식물인 오미자 (*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.)와 흑오미자 (*Schisandra repanda* (Siebold & Zucc.) Radlk., 이명 *S. nigra* Maxim.) 및 *Kadsura*속 상록활엽 덩굴성 식물인 남오미자 (*Kadsura japonica*(L.) Dunal)등 2속 3종이 자생하고 있다 (Lee, 1979). *Schisandra*속 오미자는 지리산, 속리산, 태백산 등 중부 이북지역의 산야에서, 흑오미자는 제주도 한라산의 국소지역에 분포하고 *Kadsura*속 남오미자 (*K. japonica*)는 남부 도서지역과 제주도 저지대의 온난한 지역에 분포하고 있다 (Kim *et al.*, 2010).

우리나라 대한약전 (Korea Food & Drug Administration,

2012)에서 오미자 (五味子)는 오미자 (*S. chinensis*)의 잘 익은 열매로 규정하고 있는 반면, 중국약전에서는 오미자 (*S. chinensis*)의 열매를 북오미자 (北五味子, *Schisandrae Chinensis* Fructus)로 규정하고 있으며 같은 속의 화중오미자 (*Schisandra sphenanthera* Rehder & E.H. Wilson)의 열매를 남오미자 (南五味子, *Schisandrae Sphenantherae* Fructus)로 구별하여 수재하고 있다 (China Pharmacopoeia Committee, 2010). 현재 대한약전에 의하면 오미자 (五味子)는 쉬잔드린 ($C_{24}H_{32}O_7$, 432.51), 고미신 A ($C_{23}H_{28}O_7$, 416.46) 및 고미신 N ($C_{23}H_{28}O_6$, 400.47)의 합이 0.7% 이상 함유되어야 한다고 규정하고 있으나 중국에서 유통되고 있는 남오미자 (南五味子)에서 약리성분인 쉬잔드린 (shizandrin)이 함유되지 않은 것으로 보고되어 약재로서의 효용이 불분명하다. 그러나 최근 우리나라에서 외국산 한약재의 수입이 증가하고 있어 중

[†]Corresponding author: (Phone) +82-42-868-9502 (E-mail) hkkim@kiom.re.kr

Received 2013 April 4 / 1st Revised 2013 April 10 / 2nd Revised 2013 April 16 / 3th Revised April 22 / Accepted 2013 Revised April 22

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

국에서 유통되고 있는 남오미자 (南五味子)가 국내에서 정품으로 규정하고 있는 오미자 (五味子, 중약명 北五味子)와 혼·오용되어 사용될 우려가 있다 (Korea Food & Drug Administration, 2012; Whang, 2003). 또한 화중오미자의 열매인 남오미자 (南五味子, 중약명)는 식물명 *Kadsura*속 남오미자 (*K. japonica*)와 국내에서 통용되는 명명이 같아 혼란이 야기되고 있는 실정이다.

한약재의 대부분은 전통적인 경험과 일부 전문가에 의존하여 육안 등 오감에 의해 판별하기 때문에 여러 가지 오차 및 오류가 발생하기 쉽다. 또한 다양한 한약재가 여러 종의 식물로 규정되어 있을 뿐만 아니라 형태가 비슷한 종으로부터 생산되고 유통되어 기원에 근거한 정확한 관능검사의 체계 확립이 쉽지 않은 실정이다 (Jeong, 2006). 이러한 관능 검사의 단점을 보완하기 위한 방법으로 다양한 분자생물학적 기법이 제시되고 있다. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 분석법은 그 방법이 간단하고 비용이 저렴하면서도 짧은 시간에 적은 DNA 양만으로도 충분한 유전자 다형을 얻을 수 있어 한약재 중 감별에 이용되고 있다 (Sucher and Carles, 2008). 그러나 RAPD 기법은 비특이적 다형을 형성하고 재현성이 낮다는 단점이 있어 Paran과 Michelmores (1993)은 RAPD 분석을 통해 얻은 종 특이적 증폭산물로부터 보다 정확하고 안정적인 Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) 기법을 개발하였다. 이러한 이유로 Kiran 등 (2010)은 한약재 감별을 위한 분자생물학적 기법 중 편리성과 재현성 등의 면에서 가장 효율적인 방법으로 SCAR marker를 제시 하고 있으며, 최근 다양한 약용식물의 감별을 위해 SCAR marker가 개발되고 있다 (Moon *et al.*, 2009; Moon *et al.*, 2011; Choo *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2007).

현재까지 오미자류에 대한 연구는 주로 열매가 지닌 성분의 함량과 효능을 중심으로 진행되었다 (Cho *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2003). 또한 종 특유 형태 및 생리적 특성에 관한 연구 (Kim *et al.*, 2010), 오미자류 23종 잎 표면을 현미경으로 분석한 분류학적인 연구 (Ao *et al.*, 2006), 오미자 (*S. chinensis*)와 화중오미자 (*S. sphenanthera*)의 microsatellite 다형성 분석에 관한연구 (Sun *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2009), 화중오미자 (*S. sphenanthera*)와 녹엽오미자 (*S. viridis*)의 ITS 염기서열 분석을 통한 남오미자 (南五味子) 약재 감별법에 관한 연구 (Gao *et al.*, 2003) 등이 보고되었다. 최근 국내에서 Moon 등 (2010)이 ITS 유전자 염기서열의 종별 비교를 통한 오미자류 중 감별을 위한 DNA barcode를 분석하여 보고하였고, Kim 등 (2012)이 국내 자생종과 중국의 화중오미자 (*S. sphenanthera*)를 대상으로 ITS 염기서열을 이용한 SNP 기반 SCAR marker와 multiplex-PCR 기법을 보고하였다. 하지만 DNA barcode를 이용한 감별 기법은 염기서열 분석으로 인한 복잡한 과정이 요구되며 SNP

를 기반으로 한 multiplex-PCR 기법 또한 혼·오용이 우려되는 오미자류 4종 모두를 감별하기에 부족함이 있어 보다 효율적이고 포괄적인 분자생물학적 판별 기법이 요구되고 있다.

본 연구에서는 4종의 오미자류에 대한 RAPD 중 특이 증폭 산물을 바탕으로 종 감별을 위한 SCAR marker를 개발하였다. 또한 SCAR marker를 이용하여 4종의 오미자류를 동시에 중수준에서 감별할 수 있는 다품종 동시 감별 multiplex-PCR 기법을 개발하여 한약재 오미자 (五味子)의 혼·오용을 막고 국내 자생 오미자류 유전자원 보호 및 새로운 품종으로의 육종 등에 이용 될 수 있는 기초 자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

오미자 (*S. chinensis*)는 국내에서 전북 장수 지역의 재배지와 강원도 평창군, 춘천시의 자생지에서 수집하였으며 국외의 경우 중국 요령성, 길림성의 재배지와 자생지에서 각각 수집하였다. 중국 자생종인 화중오미자 (*S. sphenanthera*)는 중국 하남성 산문협시 일대의 자생지에서 수집하였다. 국내 특산종인 흑오미자 (*S. repanda*)는 제주도 난대산림 연구소와 한라수목원, 그리고 제주도 지역의 3대 자생지 시료를 암그루와 솥그루를 구분하여 수집하였고, 남오미자 (*K. japonica*)는 전남 해남과 완도지역의 자생지와 제주도의 자생지로부터 2009년부터 2010년에 걸쳐 수집하였다. 수집한 시료는 본초학, 생약학, 식물분류학 등의 전문가로 구성된 분류·동정 자문회의 동정을 거쳐 그 종을 최종 확정지어 사용하였으며, 각 시료의 기원식물은 압착표본을 제작하여 한국한의학연구원 한약 표준표본관에 표본번호를 부여하여 보관하였다 (Table 1).

2. DNA 추출

국내·외 자생지 또는 재배지에서 수집하여 -70℃에 보관 중인 기원식물 생체시료 및 약재 시료를 액체질소로 급냉시켜 막자사발을 이용하여 분말상태로 마쇄한 후, DNasey Plant Mini Kit (QIAGEN, CA, USA)을 이용하여 추출·정제하였다. 정제된 DNA는 1.5% agarose gel을 이용하여 전기영동 후, EtBr (Ethidium Bromide)로 염색하여 UV light 상에서 DNA 절편을 확인하였으며, UV spectrophotometer (Nanodrop ND-1000, Nanodrop, DE, USA)를 이용하여 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

3. RAPD 분석

4종의 오미자류 24개 시료의 genomic profile은 10-mer

Table 1. List of plant materials and information used in this study.

Medical Name	Scientific Name	Collection Site	Lane in gel
Schisandrae Fructus	<i>Schisandra chinensis</i> BAIL.	Jangsu Chunbuk, Korea	1
		Jangsu Chunbuk, Korea	2
		Pyeongchang Gangwon, Korea	3
		Chuncheon Gangwon, Korea	4
		Shenyang Liaoning, China	5
		Tilei Jilin, China	6
		Yanbian Jilin, China	7
		Yanbian Jilin, China	8
Fructus Schisandrae Sphenantherae	<i>Schisandra sphenanthera</i> REHD. et WILS.	Xanmenxia Henan, China	9
		Xanmenxia Henan, China	10
		Xanmenxia Henan, China	11
		Xanmenxia Henan, China	12
	<i>Kadsura japonica</i> (L.) DUNAL	Haenam Chunnam, Korea	13
		Yando Chunnam, Korea	14
		Halla Arboretum Jeju, Korea	15
		Seogwipo Jeju, Korea	16
	†	Kwanumsa Jeju, Korea	17
		Halla Arboretum Jeju, Korea	18
		Yeongsil Jeju, Korea	19
		Donnaeco Jeju, Korea	20
		<i>Schisandra repanda</i> (Siebold & Zucc.) RADLK.	21
		Korea Forest Research Institute Jeju, Korea	22
		Korea Forest Research Institute Jeju, Korea	23
		Korea Forest Research Institute Jeju, Korea	24

† There is no official medical name.

RAPD Kit (Operon, CA, USA)을 이용하여 RAPD 분석을 수행하였다. 약 5~20 ng의 total DNA를 주형으로 30 pmole의 RAPD primer 및 2 unit의 DNA polymerase를 최종 30 μ l의 반응용액 (75 mM Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% (v/v) Tween 20, 20 μ M dNTP, 200 μ M MgCl₂)에 각각 첨가한 뒤, DNA Engine Dyad Thermal Cycler (Bio-rad, CA, USA)에서 95°C에서 5분간 predenaturation 한 후 95°C에서 30초 denaturation, 46°C에서 30초 annealing, 72°C에서 45초 extension을 35회 수행하고 마지막으로 72°C에서 5분간 extension 시켰다. 반응이 끝난 증폭산물 중 10 μ l와 6× loading dye 2 μ l를 1.5% agarose gel에 전기영동하여 DNA 절편을 UV상에서 확인하였다. RAPD 분석 결과로부터 종 특이적 증폭산물이 확인된 primer를 선발, 종 특이적 DNA 절편의 다형성을 확인하고 이들 특이 DNA 절편을 회수하여 정제한 뒤, pGEM-Teasy vector (Promega, WI, USA)에 ligation 하여 삽입하였다. 삽입된 증폭산물은 XL1-Blue MRF

competent cell (Stratagene, CA, USA)에 형질 전환하여 ampicillin과 X-gal/IPTG가 첨가된 LB agar 배지에 도말 후 약 20시간 배양하였다. 선별된 White colony를 액체배양하고 Plasmid mini preparation kit (Solgent, Daejeon, Korea)를 이용하여 plasmid DNA를 분리한 후, T7과 SP6 primer를 이용하여 ABI3730 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems, CA, USA)에서 염기서열을 분석하였다.

4. SCAR marker 탐색

분석된 염기서열을 NCBI BLAST search의 수행으로 기존에 알려진 유전자 염기서열과의 유사성 정도를 확인하고 유사성이 없거나 낮은 부위를 이용하여 종 특이적 primer를 제작하여 각 primer 조합에 대한 종 특이적 DNA 절편의 증폭 여부를 확인하였다. 제작된 primer 조합을 이용하여 약 5~20 ng의 total DNA를 주형으로 10 pmole의 primer 및 2 unit의 DNA polymerase를 최종 20 μ l의 반응용액 (75 mM Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% (v/v) Tween 20, 20 μ M dNTP, 200 μ M MgCl₂)에 각각 첨가한 뒤, DNA Engine Dyad Thermal Cycler (Bio-rad, CA, USA)에서 95°C에서 5분간 predenaturation 한 후 95°C에서 30초 denaturation, 58°C에서 30초 annealing, 72°C에서 45초 extension을 30회 수행하고 마지막으로 72°C에서 5분간 extension 시킨 후 종 특이적 DNA 절편의 증폭 유·무와 크기 및 수를 확인하였다.

5. Multiplex-PCR 조건 탐색

약 20 ng의 total DNA를 주형으로 최종 30 μ l의 반응용액 (75 mM Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% (v/v) Tween 20, 20 μ M dNTP, 200 μ M MgCl₂)에 SCAR marker로 확인된 5~20 pmole의 primer와 2 unit의 DNA polymerase를 각각 첨가한 뒤, DNA Engine Dyad Thermal Cycler (Bio-rad, CA, USA)에서 95°C에서 5분간 predenaturation 한 후 95°C에서 30초 denaturation, 53~59°C에서 20~45초 annealing, 72°C에서 45초 extension 30~35회 수행하고 마지막으로 72°C에서 5분간 extension 하였다. primer의 농도, annealing 온도 및 시간, 증폭 횟수 등의 다양한 PCR 조건에서 종 특이적 DNA 절편의 증폭 유·무와 크기, 수, 증폭 양 등을 확인하였고 최적의 multiplex-PCR 조건을 탐색하였다.

결과 및 고찰

1. RAPD 분석

국내·외 각기 다른 재배지로부터 수집한 4종의 오미자류

Table 2. List of operon 10-mer primer sequence used in this study for RAPD analysis.

No.	Primer	Sequence(5' → 3')	No.	Primer	Sequence(5' → 3')
1	OPA1	CAGGCCCTTC	30	OPE1	CCCAAGGTCC
2	OPA12	TCGGCGATAG	31	OPE06	AAGACCCCTC
3	OPA14	TCTGTGCTGG	32	OPE11	GAGTCTCAGG
4	OPA18	AGGTGACCGT	33	OPE18	GGAAGTGCAGA
5	OPB4	GGACTGGAGT	34	OPF3	CCTGATCACC
6	OPB10	CTGCTGGGAC	35	OPF9	CCAAGCTTCC
7	OPB15	GGAGGGTGTT	36	OPF13	GGCTGCAGAA
8	OPB19	ACCCCGGAAG	37	OPF18	TTCCCGGGTT
9	OPC6	GAACGGACTC	38	OPG5	CTGAGACGGA
10	OPC7	GTCCCGACGA	39	OPG7	GAACCTGCGG
11	OPC8	TGGACCGGTG	40	OPG9	CTGACGTCAC
12	OPC9	CTCACCCTCC	41	OPG11	TGCCCCGTCG
13	OPC10	TGTCTGGGTG	42	OPG13	CTCTCCGCCA
14	OPC12	TGTCATCCCC	43	OPG15	ACTGGGACTC
15	OPC13	AAGCCTCGTC	44	OPH2	TCGGACGTGA
16	OPC14	TGCGTGCTTG	45	OPH6	ACGCATCGCA
17	OPC15	GACGGATCAG	46	OPH9	TGTAGCTGGG
18	OPC16	CACACTCCAG	47	OPH15	AATGGCGCAG
19	OPC17	TTCCCCCAG	48	OPH18	GAATCGGCCA
20	OPC19	GTTGCCAGCC	49	OPH20	GGGAGACATC
21	OPC20	ACTTCGCCAC	50	OPI1	ACCTGGACAC
22	OPD5	TGAGCGGACA	51	OPI4	CCGCCTAGTC
23	OPD7	TTGGCACGGG	52	OPI5	TGTTCCACGG
24	OPD10	GGTCTACACC	53	OPI7	CAGCGACAAG
25	OPD11	AGCGCCATTG	54	OPI9	TGGAGAGCAG
26	OPD15	CATCCGTGCT	55	OPI12	AGAGGGCACA
27	OPD16	AGGGCGTAAG	56	OPI14	TGACGGCGGT
28	OPD18	GAGAGCCAAC	57	OPI16	TCTCCGCCCT
29	OPD20	ACCCGGTCAC

Fig. 1. RAPD profiles of *S. chinensis*, *S. spheanthra*, *K. japonica* and *S. repanda* using operon 10-mer primers. Lanes 1 ~ 24 correspond to Table 1. Arrow heads indicate the species-specific RAPD amplicon using development of the SCAR marker. M represents a 1.0 kb plus DNA ladder (Solgent, Daejeon, Korea).

Fig. 3. Nucleotide sequence of the *S. spheanthera* specific PCR amplicon and development of the SCAR marker. A; Nucleotide sequence of the *S. spheanthera* specific PCR amplicon (WWC8-1), B; Confirmation of primer specificity for the SCAR marker. Shaded nucleotides represent the SCAR primer sequences. Lanes 1 ~ 24 correspond to Table 1. Arrow head to the right of the panel indicates the precise size of the SCAR marker. M represents a 100 bp DNA ladder (Solgent, Daejeon, Korea).

Fig. 4. Nucleotide sequence of the *K. japonica* specific PCR amplicon and development of the SCAR marker. A; Nucleotide sequence of the *K. japonica* specific PCR amplicon (NF3-1), B; Confirmation of primer specificity for the SCAR marker. Shaded nucleotides represent the SCAR primer sequences. Lanes 1 ~ 24 correspond to Table 1. Arrow head to the right of the panel indicates the precise size of the SCAR marker. M represents a 100 bp DNA ladder (Solgent, Daejeon, Korea).

특이 SCAR marker의 이용으로 4종의 오미자류 중 우리나라 약전에서 정품 오미자 (五味子)로 규정하고 있는 오미자 (*S. chinensis*)와 나머지 3종의 오미자류를 구분하여 약재의 혼용을 막고 쉬잔드린, 고미신 등의 오미자 (*S. chinensis*) 성분 함량으로 품질을 관리하여 안정된 한약재의 품질확보가 이루어질 수 있을 것으로 기대된다. 또한 WC8-1 F1과 WWC8-1로부터 제작된 WWC8-1 R5 primer 쌍을 이용하여 화중오미

자 (*S. spheanthera*) 특이 증폭 산물을 확인한 결과 106 bp 크기 DNA 절편이 회충오미자 (*S. spheanthera*)에서만 관찰되어 회충오미자 (*S. spheanthera*)를 판별하기 위한 SCAR marker로 이용이 가능할 것으로 판단된다 (Fig. 3).

2) 남오미자 (*K. japonica*) 판별용 SCAR marker 개발

*Kadsura*속에 속해있는 남오미자 (*K. japonica*)는 우리나라

오미자 (五味子) 종 감별을 위한 RAPD 유래 SCAR Marker 및 Multiplex-PCR 기법 개발

Fig. 5. Nucleotide sequence of the *S. repanda* specific PCR amplicon and development of the SCAR marker. A; Nucleotide sequence of the *S. repanda* specific PCR amplicon (BD16-1), B; Confirmation of primer specificity for the SCAR marker. Shaded nucleotides represent the SCAR primer sequences. Lanes 1 ~ 24 correspond to Table 1. Arrow head to the right of the panel indicates the precise size of the SCAR marker. M represents a 100 bp DNA ladder (Solgent, Daejeon, Korea).

Fig. 6. Amplification of a rapid authentication SCAR marker using a combination of SCAR primers in a single multiplex-PCR. Multiplex-PCR products were generated from a combination of the following SCAR primers; WC8-1 F1, OWC8-1 R2, WWC8-1 R5, NF3-1 F1/R1 and BD16-1 F1/R2. Lanes 1 ~ 24 correspond to Table 1. Arrow heads to the right of the panel indicate the precise sizes of the SCAR markers. M represents a 100 bp DNA ladder (Solgent, Daejeon, Korea).

남해안과 남부 섬지역에 분포하고 있으며 건조된 열매의 형태가 우리나라에서 약재로 규정하고 있는 *Schisandra*속 오미자 (*S. chinensis*)와 유사하여 위풍으로 혼·오용되어 사용될 우려가 있다. 남오미자 (*K. japonica*)를 판별하기 위하여 OPF3 Operon 10-mer primer로부터 730 bp 크기의 남오미자 (*K. japonica*) 종 특이 증폭 산물을 NF3-1이라 명명하고 염기서열을 분석하여 SCAR primer 제작과 PCR 증폭을 통하여 종 특이성을 검증하였다. 그 결과 NF3-1 F1과 NF3-1 R1 primer 쌍에서 410 bp 크기의 남오미자 (*K. japonica*) 종 특이적인 DNA 절편을 확인하였다 (Fig. 4). 이를 토대로 *Kadsura*속 남오미자 (*K. japonica*)를 *Schisandra*속 오미자 (*S. chinensis*), 화중오미자 (*S. sphenanthera*), 흑오미자 (*S. repanda*)와 명확히 구별할 수 있게 되었다.

3) 흑오미자 (*S. repanda*) 판별용 SCAR marker 개발

OPD16 Operon 10-mer primer에 의해 증폭된 265 bp 크

기의 흑오미자 (*S. repanda*) 종 특이 증폭산물을 BD16-1로 명명하고 염기서열을 분석하였다. 이를 바탕으로 SCAR primer를 제작하여 PCR 증폭을 통한 흑오미자 (*S. repanda*) 종 특이 DNA 절편의 증폭 유·무를 확인하였다. 그 결과, Fig. 5에서 보는 바와 같이 BD16-1 F2과 BD16-1 R2 primer 쌍에서 205 bp 크기의 흑오미자 (*S. repanda*) 종 특이 DNA 절편을 확인할 수 있었다. 흑오미자 (*S. repanda*)는 우리나라 제주도에 자생하고 있는 특산식물로 열매의 약리 효과와 기호식품으로서의 개발가치가 인정되어 수요가 증대되고 오미자 육종에 있어서 그 기대치가 높아지고 있으나 무분별한 남획으로 자생지가 급격히 줄어들고 있는 실정이다 (Lee *et al.*, 1998). 본 연구에서 흑오미자 (*S. repanda*)를 판별할 수 있는 SCAR marker를 개발함으로써 오미자 (*S. chinensis*), 화중오미자 (*S. sphenanthera*), 남오미자 (*K. japonica*) 열매로부터 흑오미자 (*S. repanda*)를 구별하고, 흑오미자 (*S. repanda*) 유전자원을 기반으로 한 신품종 개발과 국내 자생 특산식물

관리 및 보호에도 유용하게 이용 될 것으로 기대된다.

3. Multiplex-PCR 증폭을 이용한 오미자류 동시 감별법 개발

4종의 오미자류를 보다 명확하고 효과적으로 감별하기 위하여 multiplex-PCR을 수행하였다. 529 bp 크기의 오미자 (*S. chinensis*) 중 특이 WC8-1 F1/OWC8-1 R2 primer 쌍, 106 bp 크기의 화중오미자 (*S. sphenanthera*) 중 특이 WC8-1 F1/WWC8-1 R5 primer 쌍, 410 bp 남오미자 (*K. japonica*) 중 특이 NF3-1 F1/R1 primer 쌍, 205 bp 크기의 흑오미자 (*S. repanda*) 중 특이 BD16-1 F1/R2 primer 쌍을 모두 이용하는 multiplex-PCR 조합에 대한 PCR 증폭 조건을 탐색하였다. 오미자 (*S. chinensis*)와 화중오미자 (*S. sphenanthera*)에서 공통으로 이용되는 primer WC8-1 F1을 포함하는 7개의 primer를 총 30 μ l의 반응용액에 각각 5 pmole의 농도로 첨가하여 58 °C의 annealing 온도에서 30초 동안 반응하고 총 30회 PCR 증폭 하였을 때 각각의 종에 대하여 명확하게 크기가 다른 종 특이적 DNA 절편을 확인할 수 있었다 (Fig. 6). 본 연구에서 개발한 multiplex-PCR 증폭 기법은 오미자류 4종에 대한 종 특이 SCAR marker primer 조합을 동시에 PCR 반응에 이용하여 우리나라 약전에 규정된 정품 오미자 (五味子)와 위품을 구별하기 위한 효과적인 방법으로 이용될 것으로 기대된다.

이상의 결과를 종합하면, 본 연구에서 2속 4종의 오미자류 계통 유전자 지문분석을 통해 종판별에 활용 가능한 SCAR 유전자 마커를 개발하였으며, 한번의 PCR 반응을 통해 4종의 오미자류를 종 단위로 판별할 수 있는 다품종 동시 감별용 multiplex-PCR 기법을 개발하였다. 이러한 결과는 오미자 (五味子)의 대용품 또는 위품으로 사용될 가능성이 있는 화중오미자 (*S. sphenanthera*), 남오미자 (*K. japonica*), 흑오미자 (*S. repanda*) 열매를 분자생물학적 방법으로 구별함으로써 한약재 오미자 (五味子)의 기원확립은 물론 혼용 방지를 위한 객관적인 감별 기술로 활용될 것으로 기대된다. 이러한 객관적 유전자 감별 마커는 한약재 생산단계는 물론 유통현장에서 한약재 대용품이나 위품의 생산·유통을 방지할 수 있는 기술로 활용되어 한약의 효능 동등성 제공과 신뢰 회복에 이바지 할 것으로 기대된다. 뿐만 아니라 유용 식물자원의 기원 확립과 순계 및 계통의 육성에 분자생물학적 방법을 도입함으로써 개체 수준의 동정이 가능하게 되어 육종에 요구되는 시간과 노동력을 줄일 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 한국 한의학연구원 ‘한의원초활용기반구축사업 (K10020)’의 지원에 의해 수행된 연구결과이며, 기원식물 수집과 분류동정자문위원님들께 감사드립니다.

LITERATURE CITED

- Ao CQ. (2006). Morphological characters of leaf epidermis in *Schisandraceae* and their systematic significance. *Journal of Plant Biology*. 49:80-87.
- China Pharmacopoeia Committee. (2010). Pharmacopoeia of the People's Republic of China. China Medical Science Press. Beijing, China. p.61, p.227.
- Cho YJ, Ju IS, Kim BC, Lee WS, Kim MJ, Lee BG, An BJ, Kim JH and Kwon OJ. (2007). Biological activity of Omija(*Schizandra chinensis* Baillon) extracts. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 50:198-203.
- Choo BK, Moon BC, Ji Y, Kim BB, Choi G, Yoon T and Kim HK. (2009). Development of SCAR markers for the discrimination of three species of medicinal plants, *Angelica decursiva*(*Peucedanum decursivum*), *Peucedanum praeruptorum* and *Anthriscus sylvestris*, based on the internal transcribed spacer(ITS) sequence and random amplified polymorphic DNA(RAPD). *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 32:24-30.
- Choi SR, Kim CS, Kim JY, You DH, Kim JM, Kim YS, Song EJ, Kim YG, Ahn YS and Choi DG. (2011). Changes of antioxidant activity and lignan contents in *Schizandra chinensis* by harvesting times. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 19:414-420.
- Gao JP, Wang YH, Qiao CF and Chen DF. (2003). Ribosomal DNA its sequences analysis of the chinese crude drug Fructus Schisandrae Sphenantherae and fruits of *Schizandra viridis*. *Zhngghuo Zhong Yao Za Zhi*. 28:706-710.
- Jeong SY. (2006). Studies on the establishment of guide to authenticate herbal drugs on morphologically. A Korea Food & Drug Administration Research Paper. p.144-147.
- Kim JS, Jang HW, Kim JS, Kim HJ and Kim JH. (2012). Molecular identification of *Schizandra chinensis* and its allied species using multiplex PCR based on SNPs. *Genes & Genomics*. 34:283-290.
- Kim KS, Prak CG and Bang JK. (2003). Varietal and yearly differences of lignan contents in fruits of collected lines of *Schizandra chinensis* Baillon. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 11:71-75.
- Kim SH, Lee KY, Baik ES, Han J and Kang MS. (2010). Morphology and chlorophyll contents of leaf and wood anatomical characteristics of three Schisandraceae species in Korea. *Korean Journal of Plant Resources*. 23:31-37.
- Kiran U, Khan S, Mirza KJ, Ram M and Abidin MZ. (2010). SCAR marker: A potential tool for authentication of herbal drugs. *Fitoterapia*. 81:969-976.
- Korea Food & Drug Administration(KFDA). (2012). The Korean pharmacopoeia(10th Ed.). Korea Food & Drug Administration. Chungwon, Korea. p.76-77.
- Lee CB. (1979). Coloured flora of Korea. Hyangmoonsa. Seoul, Korea. p.375-376.
- Moon BC, Lee YM, Chun JM, Lee AY, Yoon T, Cheon MS, Choo BK and Kim HK. (2009). Development of SCAR markers for the discrimination of Rhei radix et Rhizoma and Rhei undulatai Rhizoma based on the RAPD. *Korean Journal of Herbology*. 24:115-120.
- Moon BC, Ji Y, Seo HS, Lee AY, Chun JM and Kim HK.

- (2010). Molecular authentication of Schisandrae Fructus and analysis of phylogenetic relationship based on nrDNA-its sequences. Korean Journal of Herbology. 25:47-54.
- Moon BC, Ji Y, Lee YM, Chun JM, Lee AY, Choo BK and Kim HK.** (2011). Development of SCAR markers for authentication of Acori Rhizoma based on the analysis of RAPD and multiplex-PCR. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 19:162-169.
- Paran I and Michlmore RW.** (1993). Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance gene in lettuce. Theoretical and Applied Genetics. 85:985-993.
- Park CG, Bang KH, Kim OT, Jin DC and Kim DH.** (2007). Development of SCAR marker for discriminating between violet flowered lines and white flowered lines in Chinese bellflower(*Platycodon grandiflorum A.*). Korean Journal of Medicinal Crop Science. 15:1-5.
- Sucher MJ and Carles MC.** (2008). Genome-based approaches to the authentication of medicinal plants. Planta Medica. 74:603-623.
- Sun Y, Liu YF and Huang HW.** (2009). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Schisandra chinensis*(Turcz.) Baill.(Schisandraceae). Conservation Genetics Resources. 1:119-121.
- Whang WK.** (2003). Studies on the preparation of crude drug (III). A Korea Food & Drug Administration Research Paper. p.43-46.
- Yan B, Wang J, Chen G and Wang T.** (2009). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in a traditional Chinese medicinal plant, *Schisandra sphenanthera*. Conservation Genetics Resources. 10:615-617.