

종 특이 분자마커를 이용한 *Pinellia* 속 3종의 유전자 감별법 개발

김봉섭¹ · 김재환¹ · 김규현^{1*} · 이우규¹ · 김진철¹ · 이상민¹ · 박지영¹ · 이성미¹
오세욱² · 황인영¹ · 김종환¹ · 황진희¹

¹식품의약품안전평가원 의료제품연구부 생약연구과

²식품의약품안전처 바이오생약국 한약정책과

Development of a Genetic Identification Method for 3 Species of Genus *Pinellia* Using Species-Specific Molecular Markers

Bong-Sub Kim¹, Jae Hwan Kim¹, Kyu-Heon Kim^{1*}, Woo Kyu Lee¹, Jin Chul Kim¹, Sang Min Lee¹,
Ji-Young Park¹, Seong Mi Lee¹, Seh Wook Oh², InYeong Hwang¹, Jonghwan Kim¹, and Jinhee Hwang¹

¹Herbal Medicine Research Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, 187 Osongsaengmyeong 2-ro,
Osongseup, Heungdeok-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do 28159, Korea

²Herbal Medicine Policy Division, Ministry of Food and Drug Safety, 187 Osongsaengmyeong 2-ro,
Osongseup, Heungdeok-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do 28159, Korea

Abstract – *Pinellia* Tuber is defined as *Pinellia ternata* Breitenbach (Family Araceae), according to the Korean Pharmacopoeia (KP). Recent studies have reported the mass production of *Pinellia* Tuber using tissue culture technology. However, somatic variations during tissue culture have been reported to produce tuber forms resembling those of *P. pedatisecta*. Additionally, the potential for closely related species, such as *P. tripartita* and *Typhonium flagelliforme*, to be distributed as *Pinellia* Tuber should be monitored carefully for species identification. In this study, we identified indel (insertion/deletion) regions through a comparative analysis of chloroplast genomes and developed specific markers to distinguish *P. ternata* (182 bp) from *P. pedatisecta* (352 bp) and *P. tripartita* (388 bp). Using the developed marker (CP_2F/2R), we established a genetic analysis method that enables the effective and rapid identification of *Pinellia* Tuber and its potential substitutes with a single PCR reaction. This method can also detect the presence of *P. pedatisecta* contamination in mixed samples. The proposed approach is expected to contribute to the quality control of *Pinellia* Tuber, a frequently prescribed herbal medicine, and to prevent misidentification or adulteration.

Keywords – *Pinellia* Tuber, *Pinellia ternata*, Genetic identification, Molecular marker

반하(半夏)는 「대한민국약전」(KP)에 등재된 품목으로, 그 기원을 *Pinellia ternata* Breitenbach (천남성과 Araceae)의 덩이줄기로서 주피를 완전히 제거한 것으로 규정하고 있다.¹⁾ 반하는 한국, 중국 및 일본 등 주로 동북아시아에서 약재로 이용하고 있으며,²⁾ 중화인민공화국약전(ChP), 일본약국방(JP), 대만중약전(THP), 조선민주주의인민공화국약전(DP)에도 기원종을 반하(*P. ternata*)로 기술하고 있다. 한약재 반하는 진해, 거담, 이뇨, 진토, 두통 등에 약리적 효능이 있는 것으로 알려져 있어³⁾ 구토, 기침, 두통, 급성위염 등에 이용

되어 왔다.⁴⁾ 또한, 반하는 국내에서도 자생 또는 재배되고 있으나 주로 외국에서 수입·유통되고 있으며,^{4,5)} 2018년부터 2023년까지 한약재 수입액 상위 10개 품목에 포함되어 있는 다빈도 한약재로 볼 수 있다.⁶⁾

반하와 오혼용 될 수 있는 대표적인 식물로는 호장남성(*Pinellia pedatisecta*), 대반하(*Pinellia tripartita*) 및 수반하(*Typhonium flagelliforme*)가 있다.⁷⁾ 수반하의 경우 형태 구별이 비교적 용이하나, 최근 조직배양 기술을 이용한 반하의 대량 생산 연구에 따르면, 조직배양 시 체세포변이가 발생되어 반하의 형태가 호장남성과 유사할 수 있어^{4,8)} 이를 대비하기 위한 명확한 감별법 개발이 요구되고 있다. 또한, 대반하(*P. tripartita*)는 국내에서 수집·재배되어 반하로 유통

*교신저자(E-mail): khkim95@korea.kr
(Tel): +82-43-719-4816

될 가능성이 있기 때문에 이에 대한 대비가 필요한 상황이다.⁹⁾

반하와 오·혼용 우려가 있는 식물을 감별하기 위한 연구로 DNA 바코드 분석법⁹⁾ 및 SCAR 마커 분석법¹⁰⁾ 등 유전자 분석을 이용하여 신속하고 정확한 종 판별이 가능한 연구가 보고된 바 있다. 또한, 동시에 여러 종을 동정할 수 있는 Multiplex-PCR 기법이 많이 활용되고 있으나, 분석 과정에서 프라이머(Primer) 조성 비율과 반응성을 고려해야 할 뿐만 아니라 프라이머 간 간섭이 있을 수 있다.¹¹⁾ 따라서 본 연구에서는 반하와 호장남성 및 대반하를 한 쌍의 특이 마커를 적용한 1회의 PCR로 대상 품목을 동시에 감별이 가능한 유전자 마커를 개발하여 보다 신속하고 명확하게 감별하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 – 반하와 호장남성 및 수반하 시료는 식품의약품안전평가원에서 분양 중인 표준생약(RMPM, Reference Material of Medicinal Plant Material)을 활용하였고, 대반하는 국립생태원 및 한국한의학연구원에서 분양받아 본 연구에 사용하였다. 분양 및 수집한 시료는 DNA 바코드 프라이머를 이용하여 염기서열 분석과 SCAR 마커¹⁰⁾를 활용하여 동정 후 분석에 이용하였다. 그 외 국내 제주 자생지에서 반하를, 중국 하북성에서 호장남성을, 중국 장시성에서 수반하를 수집하여 SCAR 마커¹⁰⁾를 활용하여 동정 후 본 연구에서 개발한 마커의 적용성을 검토하였다.

DNA 추출 – 표준생약과 수집한 시료를 각 개체별로 곱게 마쇄한 후 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Helden, Germany)에서 제공하는 방법에 따라 Genomic DNA 추출을 진행하였다. 추출한 Genomic DNA는 Biospec-nano (Shimadzu, Japan)를 이용하여 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

염기서열 분석 및 종 특이 구간 탐색 – 종 특이 마커를 제작

하기 위해 NCBI (National Center for Biotechnology Information) Genbank 내 등록된 반하와 호장남성의 Chloroplast genome 염기서열을 참고하였다(*P. ternata*: MT_193722.1, ON_462056.1; *P. pedatisecta*: NC_058756.1, MN_046890.1, OR_772809.1, MZ_702636.1). DNAMAN ver. 7.0 (Lynnon Biosoft, Canada)을 이용하여 정렬한 후 비교하여 종간 특이성을 가진 구간을 탐색하였다. 대반하의 경우 Chloroplast genome 염기서열 데이터가 부족하였으나, 반하와 호장남성의 Chloroplast genome 염기서열을 비교하여 얻은 *petA-psbJ* 부위의 삽입·결실(Insertion/Deletion) 구간을 수집 후 동정된 대반하에 적용하여 해당 마커의 적용 가능성을 확인하였다.

PCR 분석 – 표준생약과 수집한 시료에서 추출한 Genomic DNA와 10 pmol Forward primer 1 µl와 10 pmol Reverse Primer 1 µl 및 PowerAmpTM 2X Premix strip (Kogenebiotech, KOREA)를 최종 20 µl의 반응용액에 첨가하여 C1000 Touch Cycler (Bio-rad, USA)에서 95°C에서 13분 pre-denaturation 후, 95°C에서 30초 denaturation, 55°C에서 30초 annealing, 72°C에서 30초 extension을 35회 수행하고 72°C에서 5분간 final extension 시켰다. 반응이 끝난 증폭산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 증폭 산물을 확인하였다.

결과 및 고찰

특이 마커 제작 – 반하와 호장남성의 Chloroplast genome 내 *petA-psbJ* 구간에서 165 bp의 삽입·결실(Insertion/Deletion) 구간을 확인하였다(Fig. 1). 이 구간을 활용하여 반하와 호장남성 및 대반하를 구별하기 위해 해당 부위를 증폭할 수 있는 특이 마커를 제작하였다(Table 1).

개발 마커의 특이성 확인 – 표준생약 3종(반하, 호장남성, 수반하) 및 대반하 시료를 대상으로 제작한 마커를 이용하여 PCR 수행한 결과, 반하에서 187 bp의 PCR 증폭 산물이, 호장남성에서 352 bp의 PCR 증폭 산물이, 대반하에서 388



Fig. 1. Schematic diagram of developed molecular marker using indel (insertion/deletion) region.

Table I. Developed DNA marker using Indel (insertion/deletion) region of Chloroplast genome

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Species	Expected size(bp)
CP_2F	CCTATTATCCCATCACGGTTCG	<i>P. ternata</i>	182
CP_2R	TATGGTCCCGCTGAGTTCTTAC	<i>P. pedatisecta</i>	352
		<i>P. tripartita</i>	388

Table II. Collecting samples used in this study

Original plant	<i>P. ternata</i>	<i>P. pedatisecta</i>	<i>T. flagelliforme</i>	<i>P. tripartita</i>
Collecting site	Jeju, Korea	Hebei, China	Jiangxi, China	NIE [#] , KIOM [*]
Plants & Specimens	0	0	0	13
	5	4	3	0
Herbal medicine				
	5	5	5	0
RMPPM**				
	10	9	8	13
Total	10	9	8	13

[#]National Institute of Ecology

^{*}Korea Institute of Oriental Medicine

^{**}Reference Material of Medicinal Plant Material

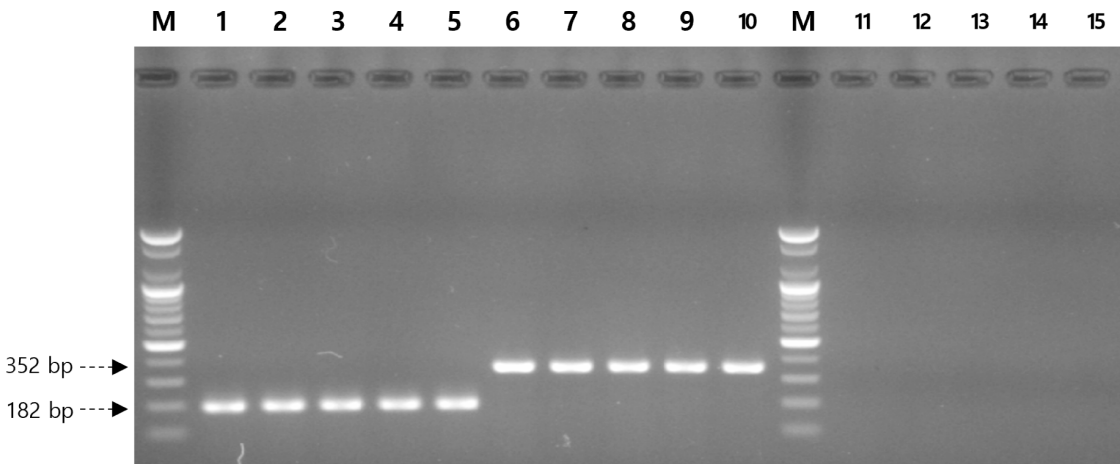


Fig. 2. Result of CP_2F/2R marker for *P. ternata* and *P. pedatisecta*. Lane 1 – 5: *P. ternata* RMPM; lane 6 – 10: *P. pedatisecta* RMPM; lane 11 – 15: *T. flagelliforme* RMPM; M: 100 bp DNA ladder.

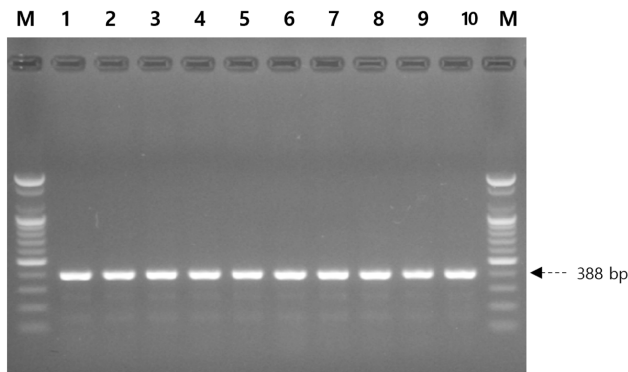


Fig. 3. Result of CP_2F/2R marker for *P. tripartita*. Lane 1 – 10: *P. tripartita* from NIE; M: 100 bp DNA ladder.

bp의 PCR 증폭 산물이 확인되었고 수반하에서는 반응하지 않았다(Fig. 2, 3). 이를 통해 본 연구에서 개발한 특이 마커

(CP_2F/2R)를 활용하여 반하와 호장남성 및 대반하를 동시에 감별할 수 있음을 확인하였다. 특히 마커(CP_2F/2R)를 수집한 시료에 적용한 결과, 제주에서 수집한 반하 시료 5개와 중국 하북성에서 수집한 호장남성 시료 4개 및 한국한 의학연구원에서 분양받은 대반하 시료 3개는 각각 반하와 호장남성 및 대반하로 판정되었으며, 중국 하북성에서 수집한 수반하 시료 3개는 반응하지 않았다(Fig. 4).

특이 마커의 검출한계 확인 – 반하와 오·혼용 우려가 가장 높은 호장남성을 대상으로 검출한계를 실험하기 위해 반하와 호장남성 시료의 비율을 1:1부터 1,000:1까지 혼합하여 검출한계를 확인한 결과, 10:1 비율까지 호장남성의 혼입을 검출할 수 있음을 확인하였다(Fig. 5). 또한, 반하와 호장남성의 Genomic DNA (20 ng/μl)의 비율을 1:1부터 10,000:1까지 혼합하여 검출한계를 확인한 결과, 1,000:1 비율까지 호장남성의 혼입을 검출할 수 있음을 확인하였다(Fig. 6).

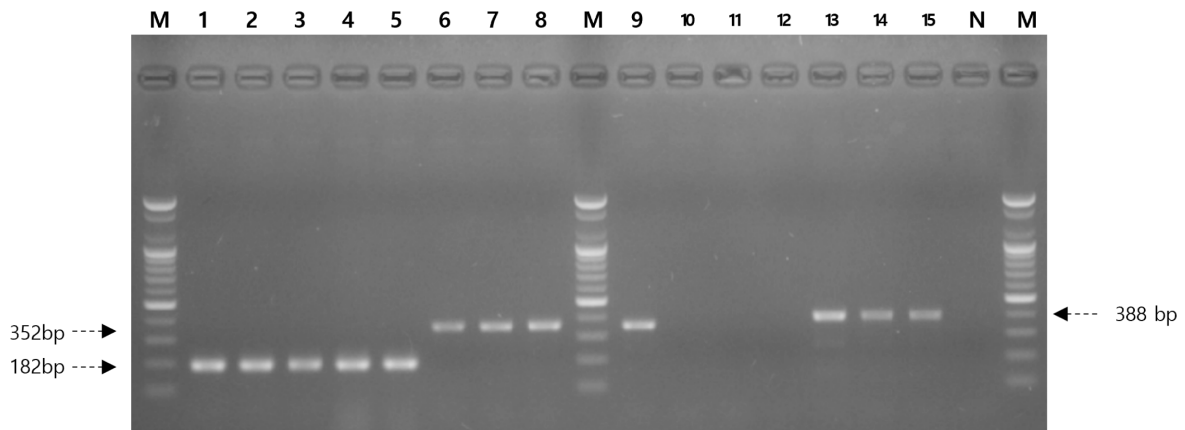


Fig. 4. Result of CP_2F/2R marker for the collecting samples. Lane 1 - 5: *P. ternata* from Jeju; lane 6 - 9: *P. pedatisecta* from Hebei of China; lane 10 - 12: *T. flagelliforme* from Hebei of China; lane 13 - 15: *P. tripartita* from KIOM; N: negative; M: 100 bp DNA ladder.

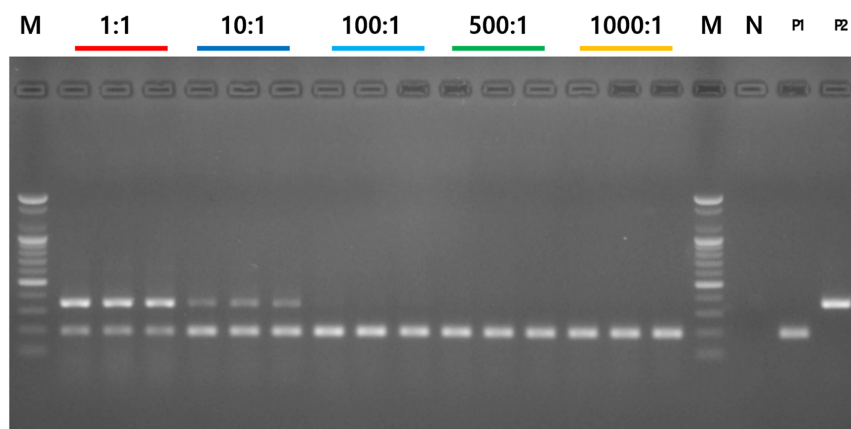


Fig. 5. PCR analysis using CP_2F/2R marker for the mixed samples of *P. ternata* and *P. pedatisecta*. The mixed samples were estimated with each weight ratio (1:1 to 1000:1). For example, 1:1 ratio was mixed with a half of *P. ternata* and *P. pedatisecta*. 10:1 ratio was mixed with 90% of *P. ternata* and 10% of *P. pedatisecta*. M: 100 bp DNA ladder; N: negative control; P1: *P. ternata* positive control; P2: *P. pedatisecta* positive control.

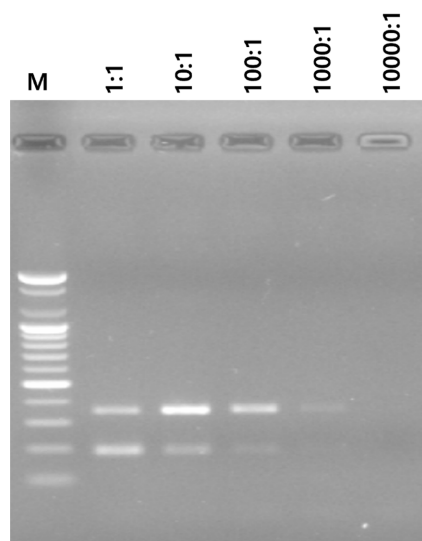


Fig. 6. PCR analysis using CP_2F/2R marker for the mixed DNA of *P. ternata* and *P. pedatisecta*. The mixed DNA was estimated with each weight ratio (1:1 to 1000:1). M: 100 bp DNA ladder.

최근 조직배양기술을 이용해서 재배한 반하의 형태가 호장남성과 유사하다는 보고가 있어^{4,8)} 이를 대비하기 위해 특이 마커(CP_2F/2R)의 호장남성 검출한계를 확인한 결과, 반하와 호장남성 시료의 혼입 비율이 10:1까지 검출할 수 있음을 확인하였다(Fig. 5). 반하와 호장남성 및 대반하는 *Pinellia* 속 식물이지만 수반하의 경우 *Typhonium* 속 식물로, 개발한 마커에 반응하지 않았으나, 반하와 형태적인 차이를 구별할 수 있고, 유전자 분석이 필요한 경우, 선행 연구 결과¹⁰⁾를 활용해 감별이 가능할 것으로 생각된다.

결론

본 연구에서는 Chloroplast genome 비교를 통해 삽입·결실(Insertion/Deletion) 구간을 확인하였고, 이를 활용하여 반하와 호장남성 및 대반하를 구별할 수 있는 특이 마커를 개발하였다. 개발한 특이 마커(CP_2F/2R)를 이용한 유전자 분석법으로 한약재 반하와 오·혼용 우려가 있는 호장남성 및 대반하를 1회의 PCR 만으로 효과적이고 신속하게 감별할 수 있으며, 혼입된 시료에서도 호장남성의 혼입 여부를 확인할 수 있어, 다빈도 한약재인 반하의 품질관리와 오·혼용 방지에 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 식품의약품안전처 연구개발사업의 연구비지원(19171한생약195, 22201한약안141)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 식품의약품안전처. (2023) 대한민국약전 제12개정.
2. Tae, K. H., Kim, D. K. and Kim, J. H. (2005) Analysis of phylogenetic relationship among Korean *Pinellia* Tenore (Araceae) using RAPD markers. *Korean J. Pl. Taxon.* **35**: 161-74.
3. Moon, B. C., Kim, W. J., Ji, Y., Lee, Y. M., Kang, Y. M. and Choi, G. (2016) Molecular identification of the traditional herbal medicines, *Arisaematis Rhizoma* and *Pinelliae Tuber*, and common adulterants via universal DNA barcode sequences. *Genetics and Molecular Research* **15**: doi:10.4238/gmr.15017064.
4. Kang, Y., Choi, J., Lee, K., Moon, B. and Yoon, A. (2016) New insight of various methods for in vitro propagation of *Pinellia ternata* (Thunb.) makinoas Korean traditional herbal medicine (*Pinellia Tuber*). *Korean Herbal Medicine Informatics* **4**: 43-52.
5. Jo, J. E., Lee, A. Y., Kim, H. S., Moon, B. C., Choi, G., Ji, Y. and Kim, H. K. (2013) Content comparative analysis and classification for *Pinellia ternata*, *P. pedatisecta* and *Typhonium flagelliforme* by HPLC-PDA analysis. *Kor. J. Herbology* **28**: 95-101.
6. 식품의약품안전처 (2024) 식품의약품통계연보 제26호.
7. Kim, W. J., Choi, G., Noh, S. and Moon, B. C. (2022) A case report of imports morphological variation of *Pinelliae Tuber* based on the genetic analysis. *Kor. J. Herbol.* **37**: 9-16.
8. Liu, Y., Liang, Z. and Zhang, Y. (2010) Induction and in vitro alkaloid yield of calluses and protocorm-like bodies (PLBs) from *Pinellia ternata*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **46**: 239-245.
9. Lee, Y. M., Moon, B. C., Ji, Y., Kim, W. J. and Kim, H. K. (2013) Molecular authentication of *Pinelliae Tuber* from its adulterants by the analysis of DNA barcodes, *mat K* and *rbc L* genes. *The Korea Journal of Herbology* **28**: 53-58.
10. Lee, Y. M., Ji, Y., Kang, Y. M., Kim, W. J., Choi, G. and Moon, B. C. (2016) Molecular authentication of *Pinelliae Tuber* and its common adulterants using RAPD-derived multiplex sequence characterized amplified region (multiplex-SCAR) markers. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **9**: 40-50.
11. Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H. and Vogt, P. H. (1997) Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Bio Techniques* **23**: 504-511.

(2025. 1. 13 접수; 2025. 2. 10 심사; 2025. 2. 28 게재확정)