

원저

인삼, 산양삼 및 산삼의 부위별 Proteome 분석

• 위종성* · 박희수* · 권기록*
*상지대학교 한의과대학 침구학교실

Proteome Analysis of various types of *Panax ginseng* using 2-Dimensional Electrophoresis

Jong Sung, We* · Hee Soo, Park* · Ki Rok, Kwon*

* Dept. of Acupuncture & Moxibustion, Oriental Medical College, Sangji University

ABSTRACT

Objectives The purpose of this study was to obtain an objective differentiating method for various types of *Panax ginseng*: ginseng, cultivated wild ginseng, and natural wild ginseng which are distinctive according to their growing environment.

Methods The roots, stem, and leaves of several types of ginseng were collected and comparative analysis of proteome was conducted on each part using 2-DE and the results examined.

Results

1. Proteome images of the respective parts within the samples showed spot-matching in most cases, suggesting that they are genetically identical panax ginseng.
2. Similar distribution patters were seen within the different parts of the *Panax ginseng*: ginseng, Chinese cultivated wild ginseng, and the 5 and 10 years old Korean cultivated wild ginseng.
3. For a quantitative evaluation of spots showing differences among the samples, 102 spots from the roots, 109 spots from the stems, and 132 spots from the leaves which showed a difference were selected and centrifugal identification was conducted.
4. Peculiar proteins from each respective part of the Panax ginseng were identified and the top 20 spots with significant differences were selected and analyzed in order to provide a differentiation rate among the samples. The accuracy rate ranged between 23.0-38.8%.
5. Differentiation rate of the top 10 spots with significant differences showed a 50-85% accuracy rate, and the differentiation rate was especially high for the stem of Chinese cultivated wild ginseng and Korean cultivated wild ginseng.

Key word ginseng, cultivated wild ginseng, wild ginseng, 2-dimensional electrophoresis, proteomics

1. 서론

Proteome은 단백질 (protein)과 유전체 (genome)의 합성 용어로서 기능성 단백질을 전체적으로 해석하고 유전체의 기능뿐만 아니라 더 나아가 생물의 기능을 해명하려는 연구 분야이다¹⁾. Proteome 연구의 목적은 여러 생물 종들에 있어서 조직 및 시기 특이적으로 발현하고 있는 단백질의 database을 만들어 생명현상을 이해하고 나아가서 질병을

치료하거나 의약품의 개발, 환경문제와 식량문제를 극복하기 위한 유용한 식물을 만드는데 목적이 있다.

그동안 proteome과 관련한 연구는 주로 동물이나 효모 등을 위주로 진행되어 왔고, 식물에 대한 분석은 아직 초기 단계라고 할 수 있다²⁾.

식물에서도 다양한 단백질 분해기전이 존재하고 이들이 거의 모든 성장과 발달 과정에 중요한 역할을 담당하고 있음은 이미 밝혀진 바이다. 식물은 세포막 내나 엽록체, 미토콘드리아, 그리고 핵 등에 단백질을 함유하고 있지만 동물의 혈

장 등에 비하여 추출량이 상대적으로 적어 분석에 어려운 단점이 있다. 하지만 최근 2-dimensional gel electrophoresis (이하 2-DE)를 이용하여 애기장대 (*Arabinopsis*)³⁻⁴ 나 벼⁵에 대한 proteom 분석이 진행되면서 각각의 전사인자나 생물 합성, 그리고 종간의 특이성 등의 현상을 이해하는데 큰 기여를 하고 있다⁶.

자연산 산삼은 야생상태에서 삼의 씨가 자연적으로 발아하여 성장한 삼을 말하고, 산양삼은 인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer.)이 야생상태에서 자연 발아하여 성장한 산삼의 씨앗을 산에서 재배하거나, 인삼의 씨앗으로 수대에 걸쳐 산에서 재배한 삼을 일컬으며 인삼과 산삼의 중간에 속하는 한약재이다.

최근 세계적으로 well-being에 대한 관심이 높아지면서 산삼, 혹은 산양삼에 대한 국내의 관심 또한 증가되는 추세에 있다.

하지만 몇몇 유통업자들이 중국산 산양삼, 혹은 화기삼 (*Panax quinquefolium*)을 자연산 산삼이나 국내산 산양삼으로 유통시켜⁷ 상도덕을 어지럽히는 경우가 종종 보도되고 있다.

이에 저자는 인삼과 중국산 산양삼, 한국산 산양삼, 그리고 자연산 산삼이 2-DE를 이용한 proteome 분석에서 어떠한 차이를 나타내는지, 그리고 감별 방법으로 적절한지를 평가하기 위하여 본 연구를 시행하였고, 이에 보고하는 바이다.

II. 방법

1. 재료

1) 산삼, 산양삼 및 인삼

① 자연산 산삼

본 실험에 사용한 자연산 산삼은 2006년 8월 강원도에서 채집한 것으로 비교적 채취 후 시간이 오래 경과하지 않아 줄기와 잎의 상태가 양호한 삼 5개를 선별하여 실험에 사용하였다. 뿌리부터 잎까지 전체 길이는 60cm 전후였고, 뿌리의 길이는 뇌두에서 뿌리 끝까지 20cm 전후, 추정 연령은 20년 전후인 삼을 실험에 사용하였다 (Fig. 1).

② 국내산 및 중국산 산양삼

본 실험에 사용한 국내산 산양삼은 2001년에 파종한 5년생과 1996년에 파종하여 재배한 10년생으로, 수령에 따른 특징을 분석하기 위하여 사용하였다. 국내산은 충남 서천시

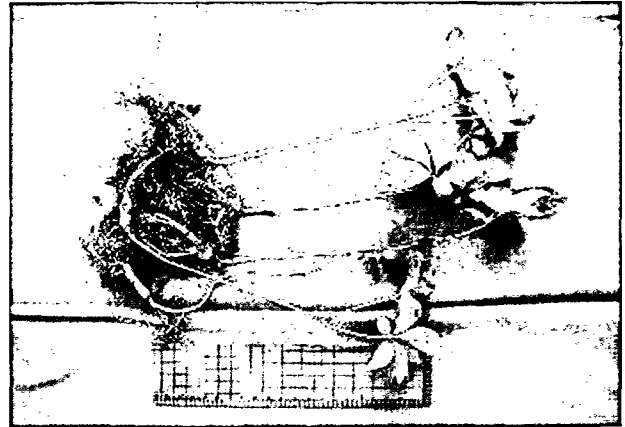


Fig. 1 Wild ginseng collected from Kangwon-do, about 20 years old. It measured about 60cm from leaf to the roots.

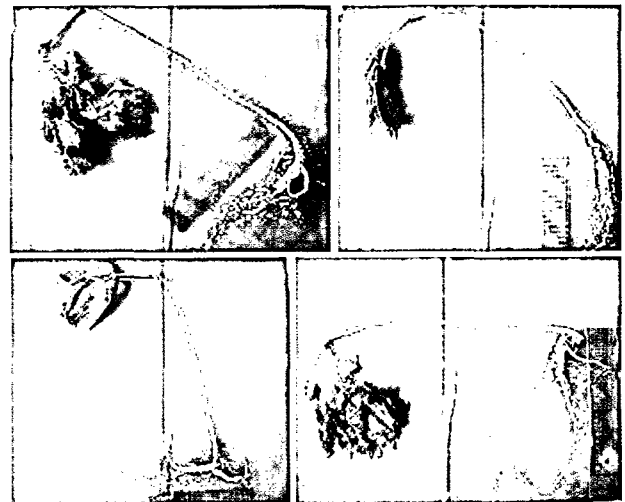


Fig. 2 Chinese cultivated wild ginseng 10 years old from Mt. Changbai at the altitude of 1600m in Jilin, China. Seeded in 1996 and purchased on Oct. 27, 2006.

에 있는 천방농산에서 재배한 것을 사용하였고, 중국산은吉林省 戊松市에 있는 해발 1600m의 장백산 내에서 재배한 10년을 사용하였으며, 재배자가 직접 파종시기를 확인할 수 있는 삼만을 실험에 사용하였다 (Fig. 2-4).

③ 인삼

본 실험에 사용한 인삼은 10년 이상 한약관련 분야에 종사한 전문가가 직접 강원도 홍천군의 인삼 재배농가에서 채취한 5년생 인삼을 실험에 사용하였다 (Fig. 5).

2차원 전기영동을 이용한 단백질 분석에 사용된 재료 urea, thiourea, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), dithiothreitol (DTT), benzimidine, bradford solution, acrylamide,



Fig. 3 Cultivated wild ginseng 5 years old. Seeded in 2001 at ChonBangNongSan and harvested on Aug. 24, 2006.



Fig. 4 Cultivated wild ginseng 10 years old. Seeded in 1996 at ChonBangNongSan and harvested on Aug. 24, 2006.



Fig. 5 The shape of 5 years cultivated ginseng. Seeded in 2001 at the HongChun

Iodoacetamide, bis-acrylamide, sodium dodecyl sulphate (SDS), acetonitrile, trifluoroacetic acid 및 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid은 Sigma-Aldrich (Electrophoresis grade or ACS reagents, Ultrapure, St. Louis U.S.A.) 사의 제품을 사용하였고, pharmalyte (pH 3.5-10)는 Amersham Biosciences (New Jersey, U.S.A) 사의 제품을 사용하였다. IPG Dry Strips (pH 4-10 NL, 24 cm)는 Genomine Inc. (포항, 한국)에서 제작된 제품을 사용하였으며, modified porcine trypsin (sequencing grade)은 Promega 사 (Wisconsin U.S.A.)의 제품을 사용하였다.

2 방법

1) 단백질 추출 (Protein sample preparation)

수종의 삼류로부터 단백질 추출은 다음과 같이 진행되었다. 조직은 10배 부피의 7 M urea, 2 M thiourea, 4%(w/v) (CHAPS), 1%(w/v) (DTT), 2%(v/v) pharmalyte, 1 mM benzamidine로 구성된 시료용액과 혼합되어 homogenizer (Power Gen125, Fisher Scientific, New Jersey, U.S.A.)에

의해 분해되었다. 단백질 추출을 위해서 1시간 동안 vortexing 한 후, 15°C에서 15,000 rpm으로 1시간 동안 원심 분리하여 상층액을 이차원전기영동의 시료로 사용하였다. 단백질의 농도 측정은 Bradford 법[®]으로 수행하였다

2) 이차원 전기영동 (2-dimensional electrophoresis)

일차 Isoelectric focusing (IEF)를 위하여 IPG strips은 7M urea, 2M thiourea, 2% CHAPS, 1% DTT, 1% pharmalyte로 구성된 reswelling 용액으로 상온에서 12-16 시간 정도 reswelling 되었다. Strip 당 시료는 각각 200 μ g씩을 사용하였으며, Amersham Biosciences 사 (New Jersey, U.S.A)의 Multiphore II system을 이용하여 제조회사의 사용매뉴얼에 준수하여 20°C에서 IEF를 수행하였다. IEF 조건은 150V에서 3,500V까지의 도달시간을 3시간 되게 하였으며, 3,500V에서 26시간 지속되도록 하여 최종적으로 96 kWh 가 되도록 설정하였다.

이차적으로 SDS-PAGE를 수행하기 전에 IPG Strips을 1% DTT를 함유한 equilibration buffer (50 mM Tris-Cl, pH 6.8, 6 M urea, 2% SDS, 30% glycerol)로 10분간

incubation 하였으며, 곧바로 2.5% iodoacetamide를 함유한 equilibration buffer로 10분간 더 incubation 하였다. Equilibration이 완료된 strips를 SDS-PAGE gels (20 ×

24 cm, 10-16%) 위에 배열시키고, Hoefer DALT 2D system (Amersham Biosciences, New Jersey, U.S.A)을 이용하여 20°C에서 최종적으로 1.7kVh가 되게 전개하였다.

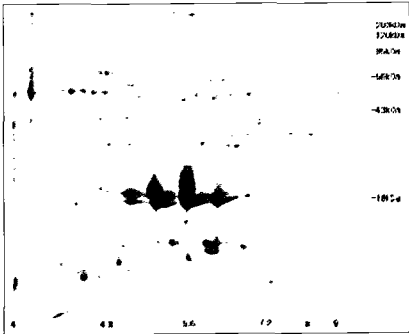


Fig. 6 Full image of 2-dimensional electrophoresis on various ginseng's roots.

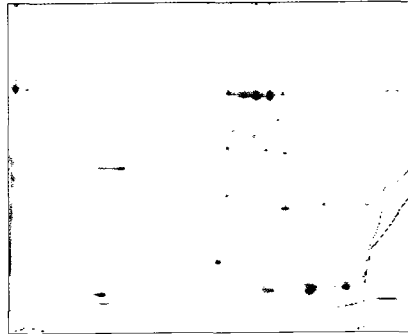


Fig. 7 2-dimensional electrophoresis of roots on cultivated ginseng 5 years old.

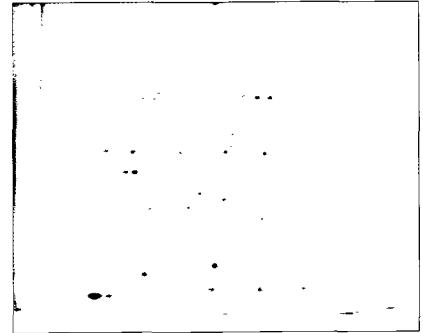


Fig. 8 2-dimensional electrophoresis of roots on Chinese cultivated wild ginseng 10 years old.

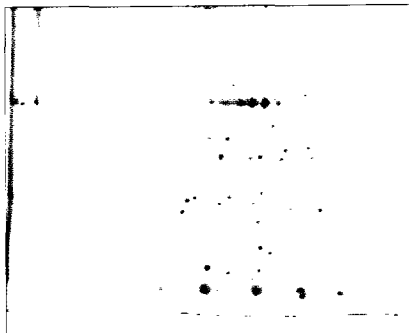


Fig. 9 2-dimensional electrophoresis of roots on Korean cultivated wild ginseng 5 years old.

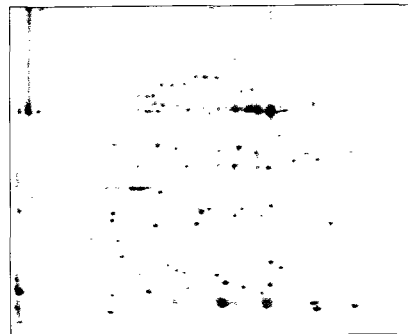


Fig. 10 2-dimensional electrophoresis of roots on Korean cultivated wild ginseng 10 years old.

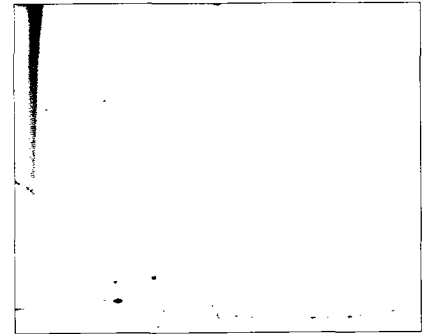


Fig. 11 2-dimensional electrophoresis of roots on wild ginseng about 20 years old.

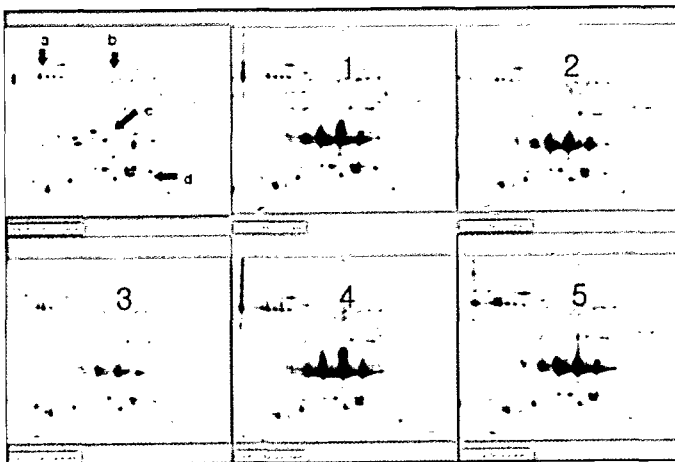


Fig. 12 2-dimensional electrophoresis images of various roots a, b, c, & d points are detected by different distribution of another sample
 1. Chinese cultivated wild ginseng 10 years old.
 2. Cultivated ginseng 5 years old.
 3. Wild ginseng about 20 years old.
 4. Korean cultivated wild ginseng 5 years old.
 5. Korean cultivated wild ginseng 10 years old.

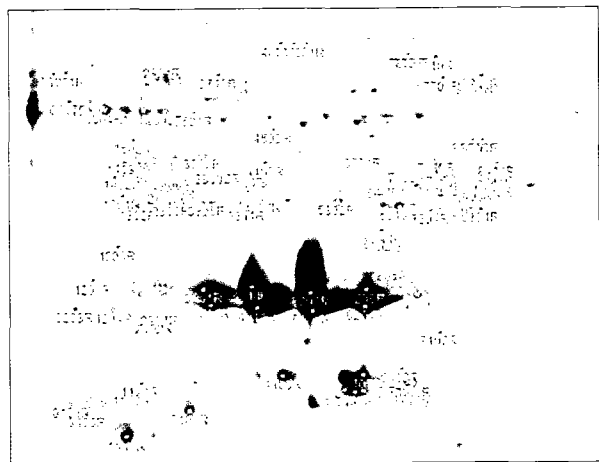


Fig. 13 Marking of different spots on the 2-dimensional electrophoresis pattern among various ginseng's root.

이차원전기영동이 완료된 이차원 젤의 단백질은 Anderson, N.L. 등⁹⁾의 방법에 따라 coomassie G250으로 시각화되었다. 염색된 이차원 젤은 AGFA사 (Mortsel, Belgium)의 Duoscan T1200 스캐너로 스캐닝되어 확장자가 TIFF 인 파일의 형태로 컴퓨터에 저장되었다.

3) 이미지 분석 (Image analysis)

스캐닝된 이미지로부터 단백질 spots의 발현변화 확인을 위한 정량적인 분석은 PD Quest software (version 7.0, BioRad, California, U.S.A.)를 이용하여 수행하였다. 각 spot의 quantity는 total valid spots의 intensity로 평균화 (normalization)되었으며, 대조군에 비해 두 배 이상의 유의한 발현변화를 보여주는 단백질 spot을 선정하였다.

4) 단백질 절편화 (Enzymatic digestion of protein in gel)

단백질 spot은 Shevchenko 등¹⁰⁾의 방법에 따라 modified porcine trypsin을 이용하여 작은 단편으로 분해되었다. 젤 조각으로부터 SDS, 유기용매, 염색시약 등의 불순물을 제거하기 위하여 50% acetonitrile을 사용하여 세척하였다. 세척 후 spot을 100% acetonitrile로 탈수 과정을 거치고 건조시켜 trypsin (8-10 ng/ μ l)으로 reswelling 하고 8-10시간 동안 37 °C에서 incubation 하였다.

5) 단백질 절편들의 sulfonation 과정을 위한 SPITC 처리

Trypsin 처리가 끝난 용액에 SPITC를 20mM NaHCO₃ (pH 9.5)가 되도록 처리한 후, sulfonation과정을 위하여 55 °C에서 5-30분간 두었다 (Rapid Commun. Mass Spectrom. 96102).

SPITC로 sulfonation된 수용액을 C18 Zip Tips (Millipore)을 이용하여 1-5 μ l 부피로 탈염 및 농축하였다. 이 농축액은 동량의 50% aqueous acetonitrile에 포함된 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid와 혼합되었고, 질량분석을 위하여 target plate의 위에 적하되었다.

6) 단백질의 서열 분석 (MALDI-TOF sequencing analysis and database search)

질량분석기는 Ettan MALDI-TOF (Amersham Biosciences, New Jersey, U.S.A)를 사용하였다. Target plate 상에 적하되어 있는 단백질 단편들은 337nm의 N₂ laser 조사에 의해 기화된 다음, 20kV injection pulse에 의해 가속되었다. 300 laser shots의 누적 peaks에 의해 각각의 단백질 spot에 대한 mass spectrum을 구하였다. 분석이 완료

된 mass spectrum으로부터 단백질 서열 분석 후 동정을 위하여 Rockefeller 대학에서 개발한 PepFrag 검색엔진을 이용하였다.

3. 통계 처리

각 시료에 대하여 측정된 spot의 통계처리는 SPSS (SPSS 10.0 for Windows, USA)를 이용하였고, 통계방법은 group 간의 판별분석을 적용하였다.

III. 결과

1. 뿌리에서의 2차원 전기영동 분석

5 년생 인삼, 10 년생 중국산 산양삼, 5 년생 및 10 년생 국내산 산양삼 그리고 자연산 산삼의 뿌리에서 단백질을 추출하여 이차원전기영동을 시행한 후, colloidal CBB 염색 처리한 결과 약 500여개의 spot을 검출하여 분석하였고, 시료간의 개체차가 발현정도에 반영되었다 (Fig. 6).

그 결과 대부분의 spot이 서로 matching 가능한 상태였고, 유전적 상태가 동일한 Panax ginseng임을 알 수 있었다 (Fig. 7-11).

하지만 각각의 시료에서 서로 유전적 배경이 서로 다르고 추정되는 pattern이 a, b, c, 그리고 d 구간에서 발견되었고, 이를 대비한 결과 인삼과 중국산 산양삼이 다른 시료들에 비하여 구분되는 유사한 단백질 분포를 나타내고 있었고, 국내산 산양삼과 자연산 산삼이 다른 시료들과 구분되는 유사한 분포를 나타내고 있었다 (Fig. 12).

자연산 산삼은 다른 시료들이 가장 많은 단백질 분포를 나타내고 있는 중앙 하단부의 pH 5.0-6.0, 18-30 kDa 구간에서 상대적으로 적은 양이 분포함을 알 수 있었다.

시료들 간에 차이를 보이는 101개의 spot이 정량 평가를 위하여 선정되었고 (Fig. 13), 분리 동정을 시행하였으며 (Appendix 1) MALDI-TOF를 이용한 각각의 단백질 spot에 대한 질량분석 스펙트럼을 구하였다. 분석이 완료된 질량분석 스펙트럼으로부터 단백질 서열 분석 후 동정을 수행하였다 (Appendix 4)(Table 1).

〈Table 1〉 Expression level of protein by 2-dimensional electrophoresis in various ginseng's root.

SSP	MR	pI	CCWG	CG	WG	KCWG-5	KCWG-10	SSP	MR	pI	CCWG	CG	WG	KCWG-5	KCWG-10
104	11.43	4.37	1050.32	127.54	1410.69	1098.16	1155.66	4503	49.59	5.42	92.92	25.4	67.91	30.48	88.41
108	10.88	4.45	1779.83	258.37	13391.19	1181.08	1246	4801	92.74	5.46	82.59	24.98	47.14	27.72	30.36
109	11.84	4.47	2341.35	6.03	578.02	313.14	97.92	4802	92.68	5.52	143.38	4.2	58.61	2.13	19.2
203	18.93	4.39	633.71	108.75	836.63	639.73	484.93	5108	12.07	6.08	12826.69	11790.6	3871.72	10925.88	8692.28
607	60.28	4.36	83.8	6.19	1156.95	547.31	459.6	5109	13.22	6.17	20148.33	11528.78	3903.65	7812.86	9113.52
711	73.69	4.35	26.78	62.69	570.13	155.95	1154.86	5111	12.22	5.96	1359.71	1944.84	3426.7	1370.99	2301.85
712	73.48	4.28	88.54	14.84	3168.49	498.92	435.53	5112	12.20	6.16	1309.55	1562.75	384.4	1029.89	1224.18
1113	9.59	4.67	9336.65	5210.03	10615.9	4183.12	7465.34	5207	20.53	5.59	1180.08	1439.85	2503.25	1107.78	1153.27
1120	12.18	4.70	140.39	52.6	75.63	30.2	9.99	5208	18.68	5.60	1523.28	1964.85	3164.07	1207.06	1656.49
1121	12.73	4.75	22.12	231.86	46.19	132.69	83.53	5302	33.03	5.88	1492.42	3385.26	2597.77	2308.8	1454.97
1201	22.00	4.49	310.56	38.8	602.12	127.16	56.69	5801	92.21	5.58	115.36	21.44	21.72	40.18	16.76
1204	18.86	4.60	1719.73	417.31	817.92	224.68	447.32	6102	13.67	6.59	75.45	74.78	22.27	520.55	59.99
1206	26.18	4.63	114.46	105.44	14.19	127.18	113.16	6201	19.05	6.19	21111.47	19997.11	26784.43	23662.72	12000.72
1301	34.22	4.65	207.05	2.17	13.99	133.05	201.08	6205	23.46	6.47	446.12	757.84	173.65	265.57	436.92
1302	32.42	4.74	112.37	90.84	3.62	61.43	49.03	6209	20.83	6.20	809.51	961.75	670.29	614.63	784.79
1402	38.15	4.66	91.68	10	62.57	48.95	55.69	6302	28.35	6.37	162.92	109.65	10	91.05	36.92
1403	41.16	4.67	253.33	73.46	112.32	82.59	55.76	6304	26.95	6.39	250.16	73.46	137.33	74.78	76.43
1404	38.99	4.70	295.76	74.81	443.04	159.85	264.87	6310	32.18	6.57	3010.95	2148.2	2630.35	2424.93	1997.8
1502	46.69	4.71	238.2	72.67	125.77	68.97	162.46	6405	36.25	6.44	29.46	276.46	23.09	115.21	123.47
1503	41.66	4.72	193.23	244.22	157.21	284.99	473.37	6501	42.30	6.18	113.59	19.22	15.73	64.43	71.53
1601	59.95	4.48	314.82	278.73	5536.71	1892.49	2767.7	7105	12.71	6.66	931	1021.37	3584.9	1036.64	271.4
1602	56.94	4.48	1198.55	2267.13	3795.21	3130.45	5436.72	7106	12.58	6.72	4269.4	3227.91	981.52	250.26	948.82
1604	56.63	4.56	6607.38	5598.04	12484.55	10100.24	13698.61	7107	16.59	7.03	138.86	45.56	525.26	33.08	76.22
1613	56.44	4.77	2872.85	2340.28	1083.09	3179.02	3278.73	7108	11.87	6.70	88.49	117.45	14.18	395.6	1015.27
2102	17.84	4.82	582.78	145.06	43.72	13.68	49.43	7203	20.23	6.78	3999.31	3395.48	925.38	6362.82	6017.43
2201	22.23	4.80	269.23	115.66	269.2	69.73	105.17	7205	21.73	6.71	68.79	222.44	18.42	1084.23	133.73
2203	21.79	4.84	1791.96	1478.37	1360.12	1281.28	1574.94	7304	31.45	6.93	265.28	238.3	8.68	119.54	84.57
2204	18.64	4.86	664.61	96.22	7.21	40.89	71.96	7403	39.11	6.67	430.93	1744.19	526.18	734.75	863.53
2303	33.02	4.92	1320.58	338.95	1187.16	951.37	419.38	7410	41.06	7.02	2008.66	165.27	340.19	657.28	206.4
2407	35.38	4.90	228.82	5.23	246.03	63.09	27.54	7411	39.52	7.02	792.77	245.76	1212.43	520.36	263.34
2408	38.00	4.93	731.28	169.43	743.5	343.64	256.8	7413	37.16	7.10	60.63	45	26.67	42.7	18.07
2409	36.10	4.94	340.08	102.08	57.24	41.8	17.82	7414	35.90	7.15	95.41	7.29	84.65	10.29	49
2501	41.84	4.83	904.09	1016.61	592.35	928.47	965.17	7415	38.97	7.15	304.99	460.28	151.88	999.84	462.32
2606	56.12	4.89	1660.18	1239.16	796.23	1169.48	1930.15	7704	69.89	7.07	88.21	9.56	2.54	16.9	20.54
2713	74.50	4.88	459.44	336.67	153.42	393.94	752.75	7803	84.31	6.68	151.78	99.71	69.75	86.78	63.49
2801	78.55	4.87	70.24	6.5	5.4	67.98	14.81	7805	84.16	6.74	163.76	129.57	96.82	140.56	57.8
3103	11.03	5.00	7375.02	8072.83	7541.42	9189.88	7514.22	7810	82.37	6.99	148.29	53.23	95.25	70.24	53.66
3201	21.02	5.08	14554.9	9457.02	7669.05	4432.92	641.95	8301	32.60	7.23	784.04	392.62	319.32	809.89	453.69
3202	19.29	5.11	12805.94	5710.21	810	1177.18	1381.07	8304	31.66	7.61	215.62	58.5	9.09	23.38	37.36
3305	33.02	5.10	1849.87	1038.18	1717.1	691.44	1259.67	8408	35.45	7.52	187.59	188.75	36.59	270.68	180.28
3311	32.08	5.29	151.4	278.58	104.51	38.68	100.84	8409	36.09	7.83	1066.83	2280.06	960.03	928.48	1789.11
3401	39.19	5.14	239.42	140.31	174.18	43.42	112.64	8410	39.03	7.86	266.46	366.66	154.47	431.02	522.28
3402	39.15	5.17	231.37	244.55	137.99	193.43	382.5	8411	40.28	7.87	236.43	95.49	105.9	90.48	288.56
3404	38.34	5.30	113.77	26	22.07	120.27	148.16	8502	46.05	7.48	376.08	215.91	186.51	280.86	218.09
3502	42.23	5.08	1703.93	232.39	467.59	273.02	102.11	8503	46.07	7.62	365.36	196.39	88.01	103.81	214.47
3601	55.68	5.03	72.98	32.53	10	13.92	32.4	8701	67.78	7.54	165.17	131.82	35.99	156.51	168.2
3708	68.77	5.22	233.05	798.24	185.75	168.05	310.24	8702	70.76	7.62	155.09	14.21	11.22	28.27	18.28
3713	71.97	5.16	50.65	42.72	33.95	84	94.04								
4103	13.20	5.46	9389.58	8822.05	8430.16	4991.97	6561.07								
4210	21.21	5.31	1079.21	26247.58	39362.52	808.82	916.75								
4211	18.95	5.34	1430.92	25133.94	2895.5	1333.12	20180.17								
4307	33.38	5.37	73.41	108.11	680.55	290.52	61.42								
4401	37.35	5.31	237.49	42.82	14.57	71.72	42.03								
4403	40.57	5.38	219.45	101.71	314.66	111.93	113.88								

- ▶ CCWG: Chinese cultivated wild ginseng 10 years old.
- ▶ CG : Cultivated ginseng 5 years old.
- ▶ WG : Wild ginseng about 20 years old.
- ▶ KCWG-5: Korean cultivated wild ginseng 5 years old.
- ▶ KCWG-10: Korean cultivated wild ginseng 10 years old.

2. 줄기에서의 2차원 전기영동 분석

5년생 인삼, 10년생 중국산 산양삼, 5년생 및 10년생 국내

산 산양삼 그리고 자연산 산삼의 줄기에서 단백질을 추출하여 이차원전기영동을 시행한 후, colloidal CBB 염색 처리한 결과 약 500여개의 spot을 검출하여 분석을 진행하였고, 시

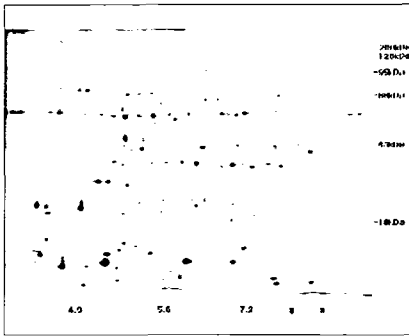


Fig. 14 Full image of 2-dimensional electrophoresis on various ginseng's stems.

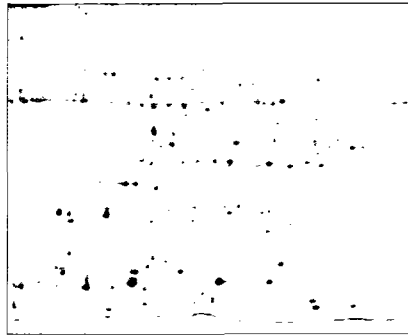


Fig. 15 2-dimensional electrophoresis of stems on cultivated ginseng 5 years old.

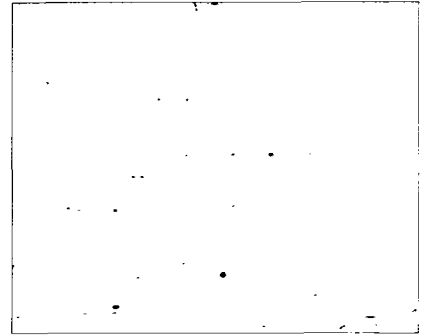


Fig. 16 2-dimensional electrophoresis of stems on Chinese cultivated wild ginseng 10 years old.

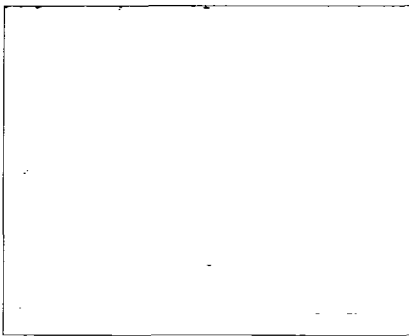


Fig. 17 2-dimensional electrophoresis of stem on wild ginseng about 20 years old.

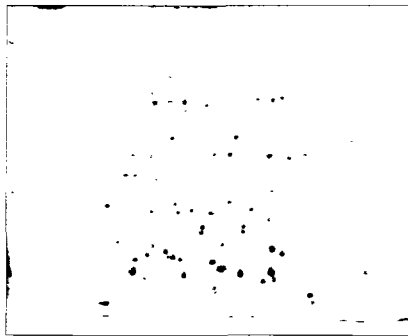


Fig. 18 2-dimensional electrophoresis of stem on Korean cultivated wild ginseng 5 years old.

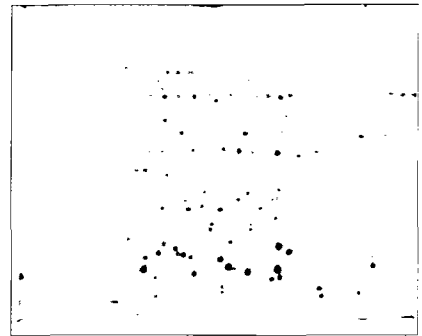


Fig. 19 2-dimensional electrophoresis of stems on Chinese cultivated wild ginseng 10 years old.

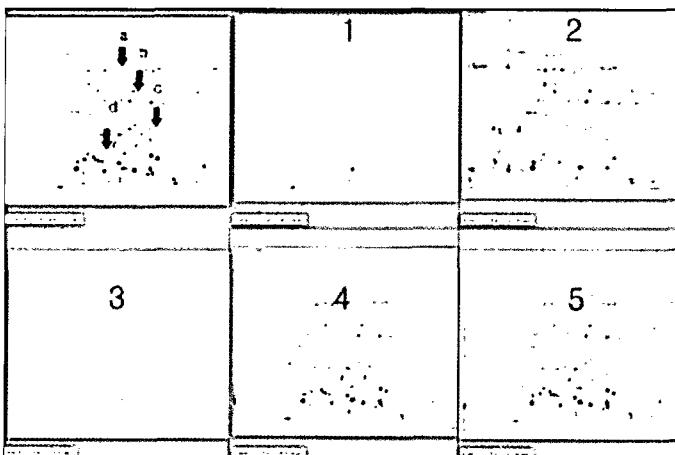


Fig. 20 2-dimensional electrophoresis images of various stems. a, b, c, & d points are detected by different distribution of another sample
 1. Chinese cultivated wild ginseng 10 years old.
 2. Cultivated ginseng 5 years old.
 3. Wild ginseng about 20 years old.
 4. Korean cultivated wild ginseng 5 years old.
 5. Korean cultivated wild ginseng 10 years old.

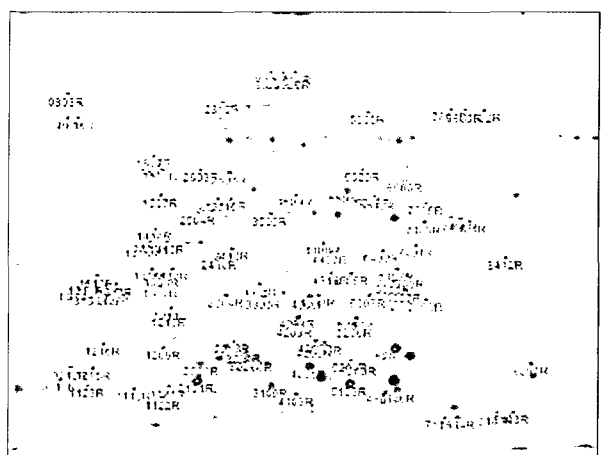


Fig. 21 Marking of different spots on the 2-dimensional electrophoresis pattern among various ginseng's stems.

(Table 2) Expression level of protein by 2-dimensional electrophoresis in various ginseng's stem.

SSP	MR	pI	CCWG	CG	WG	KCWG-5	KCWG-10	SSP	MR	pI	CCWG	CG	WG	KCWG-5	KCWG-10
212	11.93	4.38		614.46			29.76	3808	87.70	5.51		214.16		111.2	118.98
213	10.95	4.31		1863.08			65.74	3811	87.68	5.56		403.73		146.85	214.9
318	20.44	4.43		531.78			2.11	3908	91.71	5.50		195.19			100.47
714	63.31	4.35	1923.49	453.17			684.78	3909	91.33	5.56		480.2			158.54
715	63.21	4.42	1372.75	454.21			316.04	4103	9.90	5.69		1496.15		161.09	706.75
803	76.14	4.35	158.49				781.49	4203	16.09	5.67				5396.11	4530.01
1118	10.29	4.79	1355.21	11822.29		1415.41	1062.5	4204	16.93	5.70				5810.54	3317.67
1121	10.46	4.99		2161.76		78.14	265.58	4205	12.07	5.85		458.74		9849.35	11612.82
1122	9.71	4.96	1954.4	1394.29		976.41	49.6	4206	13.94	5.92		113.05		379.24	1082.72
1123	10.51	4.49		1720.44			40.75	4207	14.38	5.93		160.33			933.38
1209	13.70	4.96				374.17	214.29	4210	14.21	6.04		204.52		2657.75	3455.67
1210	17.23	4.99	296.3	764.14		664.88	276.24	4306	19.44	5.85	939.67	228.42		4866.49	5236.75
1211	18.00	5.00	441.65	771.84		346.41	97.75	4311	19.66	5.96				1264.36	1366.72
1215	11.89	4.53	329.75	4178.83		149.66	166.83	4313	22.89	6.11		1120.25		371.54	791.43
1216	14.05	4.59		2917.88			13.06	4407	26.48	6.11		326.28			137.17
1307	20.95	4.95	4380.22	9029.89		4588.15	1446.92	4408	28.33	6.02		481.77			12.98
1308	22.59	4.95	1629.14	5844.47		1003.61	298.92	4509	39.62	5.67		727.14			3.45
1310	21.12	4.61	3681	4188.28		573.27	27.72	4805	87.62	5.63		78.81		52.98	46.27
1311	21.39	4.48	4819.21	7210.41		522.65	771.71	4914	91.83	5.64		179.89			33.82
1312	19.82	4.61	667.94	1982.2			1.34	5103	10.66	6.36		939.37		12849.85	15216.41
1313	19.81	4.64	566.67	3039.47			5.92	5204	12.60	6.36				132.2	453.62
1314	21.17	4.67	190.73	91.23		98.41	0.45	5206	16.08	6.41				4250.16	2555.65
1315	20.35	4.66	1079.16	201.46		124.29	15.97	5207	16.87	6.43				4163.88	1832.72
1316	19.81	4.47	1639.26	585.82			3.7	5208	12.28	6.48				140.81	361.66
1317	22.53	4.55	582.79	234.85			1.73	5305	22.86	6.36		2084.84		1329	2528.99
1411	28.58	4.90	216.1	1266.3		406.9	139.99	5307	19.65	6.58	445.45	779.03		2133.26	2516.12
1413	28.55	4.98	158.26	783.65		643.64	448.98	5506	40.73	6.31	556.76	3450.13		2773.77	3404.02
1414	31.19	4.92		230.35			32.77	5512	38.67	6.69		298.69			159.87
1415	27.51	4.85	357.89	151.55			19.07	5513	39.27	6.64		124.24			41.5
1416	23.55	4.90		297.31			3.63	5620	46.52	6.51		137.38			61.69
1417	23.57	5.00		243.54			49.67	5805	65.72	6.56		692.06		390.6	252.38
1507	39.44	4.95		575.37			41.68	6101	10.00	6.80				6580.98	6991.79
1602	46.78	4.95		404.17			138.22	6106	10.15	6.95		318.07		5710.04	7640.18
1604	47.89	4.94		313.29			36.39	6204	13.67	6.91		496.12		10283.1	11767.76
1607	50.47	4.91		82.23			3.76	6306	21.69	6.90	594.89	1464.56		1227.57	1374.55
2101	10.90	5.14	4591.81	14478.89		12560.11	16859.89	6307	20.28	7.04		639.06		1163.73	1320.72
2208	12.28	5.16	2781.55	1694.14		3904.88	3619.65	6309	22.50	7.06		404.3		694.81	764.85
2213	14.36	5.31				1054.61	1063.7	6407	23.60	6.94	534.11	992.18		1612.81	1828.21
2304	19.66	5.28	204.35	1501.14		2786.36	2662.43	6409	26.85	6.75		180.89			6.22
2410	25.53	5.24	959.88	130.04			63.43	6608	43.69	7.04		355.23			371.38
2413	27.23	5.31	1056.69	2826.11		1141.92	1542.05	7114	8.48	7.84	732.65	6662.01		3935.59	5562.9
2504	34.95	5.14	1623.55	408.72		1384.79	506.8	7115	8.45	7.63		1612.91		206.23	297.25
2513	38.44	5.29		267.32			79.98	7303	19.07	7.33		1270.05		296.32	851.95
2515	38.59	5.24		274.11			117.33	7401	27.91	7.18	2264.36	361.19		86.76	391.46
2603	46.49	5.15		952.6			590.15	7403	32.74	7.31	1186.02	3232.38		1745.72	2241.18
2606	45.75	5.29	1714.9	5383.54		770.4	2724.78	7408	33.54	7.88				509.49	394.62
2812	71.46	5.26				189.14	403.34	7505	37.47	7.33		208.78			110.18
3109	10.49	5.51		887.65		8195.63	8073.09								
3202	13.38	5.37		1588.05		6269.51	5907.81								
3204	12.71	5.39		113.85		2385.53	3726.59								
3206	12.60	5.43		304.77		6833.03	7218.38								
3305	21.20	5.45				1695.08	1832.76								
3306	19.49	5.47	1380.22			3350.21	4608.29								
3509	34.60	5.50	1996.2	1194.87		580.28	1947.1								

- ▶ CCWG: Chinese cultivated wild ginseng 10 years old.
- ▶ CG : Cultivated ginseng 5 years old.
- ▶ WG : Wild ginseng about 20 years old.
- ▶ KCWG-5: Korean cultivated wild ginseng 5 years old.
- ▶ KCWG-10: Korean cultivated wild ginseng 10 years old.

료간의 개체차가 발현정도에 반영되었다 (Fig. 14).

각각의 패턴에 대한 전체적인 양상은 5년생 국내산 산양삼의 줄기와 10년생 국내산 산양삼의 줄기가 거의 같은 분포를 나타내고 있었다 (Fig. 18-19).

중국산 산양삼은 인삼과 유사한 분포를 나타내었으나 단백질의 분포가 상대적으로 적었고, 특히 pH 4.5-5.0, 25kDa 구간에서 차이를 보였다 (Fig. 15-16). 자연산 산삼은 다른 시료에 비하여 줄기가 가늘고 작아 충분한 단백질을 확보하지 못하여 비교대상에서 제외되었다 (Fig. 17).

각각의 시료에서 서로 유전적 배경이 서로 다르다고 추정되는 pattern이 a, b, c, 그리고 d 구간에서 발견되었고, 특히 25kDa 이하의 d 구간에서 많은 차이를 나타내고 있었다 (Fig. 20).

시료들 간에 차이를 보이는 109 개의 spot이 정량 평가를 위하여 선정되었고 (Fig. 21), 분리 동정을 시행하였으며 (Appendix 2) MALDI-TOF를 이용한 각각의 단백질 spot에 대한 질량분석 스펙트럼을 구하였다. 분석이 완료된 질량분석 스펙트럼으로부터 단백질 서열 분석 후 동정을 수행하였다 (Appendix 4)(Table 2).

3. 잎에서의 2차원 전기영동 분석

5년생 인삼, 10 년생 중국산 산양삼, 5년생 및 10년생 국내산 산양삼 그리고 자연산 산삼의 잎에서 단백질을 추출하여 이차원전기영동을 시행한 후, colloidal CBB 염색 처리한 결과 약 500 여개의 spot을 검출하여 분석을 진행하였고, 시료간의 개체차가 발현정도에 반영되었다 (Fig. 22).

각각의 패턴에 대한 전체적인 양상은 줄기와 마찬가지로 5년생 국내산 산양삼의 잎과 10년생 국내산 산양삼의 잎에서 거의 같은 분포를 나타내고 있었다 (Fig. 25-26). 중국산 산양삼은 인삼과 유사한 분포를 나타내었으나 단백질의 분포가 상대적으로 적었고, 특히 pH 4.5-5.0, 25 kDa 구간에서 차이를 보였다 (Fig. 23-24). 자연산 산삼은 줄기에서의 문제와 동일하게 다른 시료에 비하여 잎이 작아 충분한 단백질을 확보하지 못하여 비교대상에서 제외되었다 (Fig. 27).

각각의 시료에서 서로 유전적 배경이 서로 다르다고 추정되는 pattern이 a, b, c, 그리고 d 구간에서 발견되었고, 특히 25 kDa 이하의 d 구간에서 많은 차이를 나타내고 있었다 (Fig. 28).

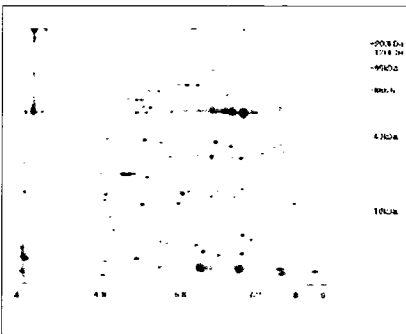


Fig. 22 Full image of 2-dimensional electrophoresis on various ginseng's leaves.

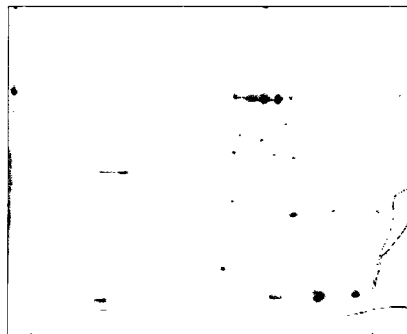


Fig. 23 2-dimensional electrophoresis of leaves on cultivated ginseng 5 years old.

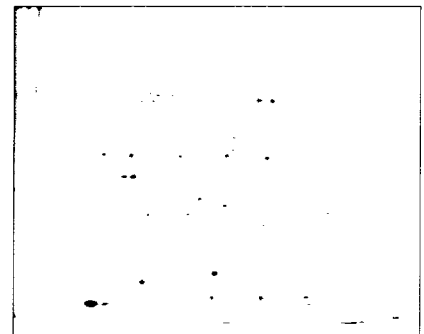


Fig. 24 2-dimensional electrophoresis of leaves on Chinese cultivated wild ginseng 10 years old.

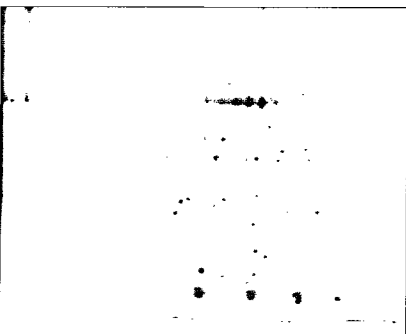


Fig. 25 2-dimensional electrophoresis of leaves on cultivated wild ginseng 5 years old.

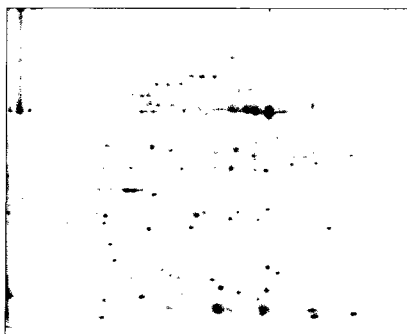


Fig. 26 2-dimensional electrophoresis of leaves on Chinese cultivated wild ginseng 10 years old.

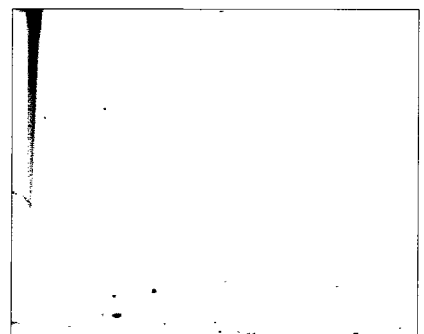


Fig. 27 2-dimensional electrophoresis of leaves on wild ginseng about 20 years old.

<Table 3> Expression level of protein by 2-dimensional electrophoresis in various ginseng's leaf.

SSP	MR	pI	CCWG	CG	WG	KCWG-5	KCWG-10	SSP	MR	pI	CCWG	CG	WG	KCWG-5	KCWG-10
205	17.31	4.49		997.35	1102.53		254.2	4308	21.39	6.01	171.21	173.8		724.44	577.09
309	20.65	4.60	22.42	207.39	386.26		1015.05	4310	24.79	6.19				578.89	261.51
1111	9.16	4.76	29274.97		2810.32		517.89	4311	20.29	6.06	1242.32				16.27
1123	8.99	4.92	7891.02	11364.62	15543.75	2021.54	3164.33	4403	33.81	5.92	975.29	120.63		829.84	1086.12
1201	19.30	4.61	41.85	341.34	590.51		1337.77	4411	31.48	5.73				291.85	25.19
1310	22.58	4.88	368.82	280.02		29.41	900.09	4507	38.33	5.93	339.14			302.12	714.74
1317	20.67	4.94	1148.52	76.62		199.64	2710.74	4510	39.64	5.97	536.98	621.82		1505.27	304.04
1318	21.98	4.95	23.34	372.69		98.75	3097.4	4604	51.66	5.77	226.06	137.94		554.3	658.12
1401	33.53	4.93	3411.51		589.28	183.55	858.32	4702	55.62	5.78				248.74	345.02
1403	33.35	4.76	1009.91		88.2		70.87	4805	70.42	5.68	108.9			110	2090.62
2108	10.81	5.21	8227.65		8861.46	1296.71	4861.71	4808	70.34	5.91	68.09			424.1	1926.51
2201	18.76	4.98	65.53				442.92	4809	93.10	5.91				272.93	811.91
2202	17.11	4.98	308.64				1727.91	4811	92.47	6.08				361.98	748.97
2203	17.88	5.00	127.43				620.39	5104	11.23	6.37		400.52		2838.49	3435.4
2210	18.86	5.23	546.33				711.26	5210	16.40	6.40				397.29	798.84
2211	19.62	5.26	2399.49			1069.31	3359.1	5211	17.19	6.41				424.78	366.71
2305	27.45	5.09	5381.27		758.17	367.84	3566.2	5308	19.91	6.53	416.73	382.55		820.29	983.1
2308	27.38	5.15	5710.85		389.74		4559.65	5310	25.99	6.59		362.04			786.83
2311	25.04	5.24	1401.7	102.47		59.16	356.95	5311	29.65	6.61	331.07			217.46	244.06
2403	33.54	5.13	5106.37		1137.49	330.97	1175.03	5401	33.49	6.20	3290.82	2673.08		3783.6	2758.3
2506	44.82	5.25					363.64	5407	35.88	6.48		166.85		100.7	485.81
2603	52.61	5.21	1760.48			510.25	1878.87	5411	34.53	6.28				180.4	407.25
2711	59.83	5.13					1346.17	5412	35.44	6.30	1634.27				443.32
2713	58.07	5.16					205.07	5505	39.46	6.30	1670.4	1449.74		1660.34	2248.82
2714	59.24	5.21				115.84	2076.9	5514	37.39	6.60		1542.67		104.47	900.07
2715	55.54	5.23	1078.42				647.31	5603	51.90	6.29				497.09	273.79
2716	64.95	5.24					388.6	5701	53.19	6.21	570.52	6471.14		4399.6	4406.74
2717	59.76	5.25					993.29	5703	53.11	6.46	4319.58	14825.69		7711.03	7313.99
2719	56.10	5.27	1276.95				817.68	5801	92.65	6.23				229.91	566.58
3107	11.11	5.50				1154.1	2141.5	5805	92.68	6.41				67.14	194.09
3201	14.60	5.29				31.07	669.04	6101	10.63	6.69	19.2			2019.13	2186.07
3202	13.72	5.36				1243.54	1971.88	6105	11.47	6.84		1923.04		3686.59	4775.26
3203	13.15	5.37				425.42	810.07	6106	10.76	6.90				733.91	1565.46
3204	13.05	5.42				1081.69	2083.68	6201	15.44	6.67		564.25		382.4	383.14
3301	26.55	5.30	1435.64	220.94		388.66	2284.5	6203	14.04	6.87		177.06		4506.47	4944.45
3309	30.02	5.51	301.25			1012.86	872.1	6205	13.34	7.05	571.67	1417.13		2718.78	2777.03
3501	40.24	5.28	830.52			340.34	1811.43	6301	20.04	6.65	363.59	1977.02		1260.92	1242.33
3602	52.63	5.29	1673.75			269.56	1055.25	6302	21.35	6.70	671.76	570.99		990.16	1398.56
3607	51.55	5.47	535.79				98.66	6306	23.36	6.86	828.86	799.35		1560.64	2206.71
3703	64.36	5.31	183.28				1177.38	6309	22.31	6.98	67.25	90.78		299.9	473.37
3704	55.17	5.32	727.89			154.56	947.08	6412	36.18	7.03				345.42	219.99
3710	64.20	5.39	193.9			188.58	1112.91	6414	35.92	6.72	1356.8			850.86	101.51
3713	55.28	5.43	880.38			87.86	642.75	6505	42.25	6.94	68.08	130.07		237.35	270
3715	64.70	5.47	44.66			122.02	412.35	6506	45.65	6.97		174.4		115.91	348.96
3716	64.70	5.49	209.25				1027.97	6507	43.64	7.02	371.96	1426.47		825.22	551.68
3719	59.16	5.51				76.4	253.91	6601	52.45	6.65	5336.38	10863.86		5183.56	4856.18
3805	70.89	5.55	31.54			103.7	581.58	6605	51.19	6.87	4431.96	12968.27		7419.95	7417.17
4101	12.56	5.88				1709.47	3520.44	6610	52.65	7.12	198.39	3648.32		4515.11	3040.4
4103	9.55	5.98	9459.45	3103.89		16628.83	17344.99								
4106	10.06	5.93	5682.43	1175.26		3794.4	866.26								
4201	16.33	5.66					491.42								
4202	17.15	5.70				255.46	441.45								
4302	22.13	5.60	1940.29	728.78		3846.72	5481.11								

- ▶ CCWG: Chinese cultivated wild ginseng 10 years old.
- ▶ CG : Cultivated ginseng 5 years old.
- ▶ WG : Wild ginseng about 20 years old.
- ▶ KCWG-5: Korean cultivated wild ginseng 5 years old.
- ▶ KCWG-10: Korean cultivated wild ginseng 10 years old.

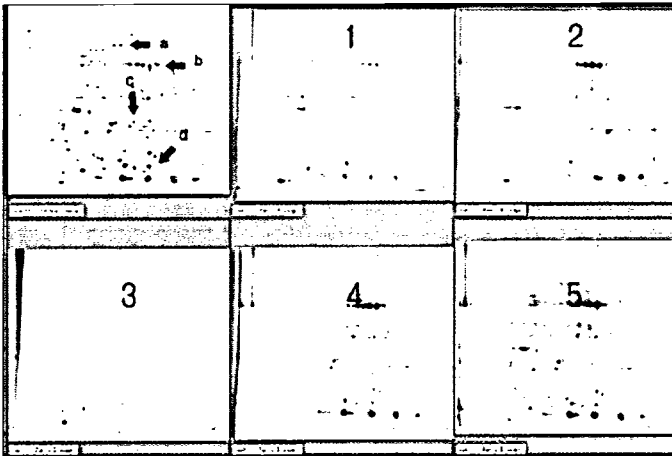


Fig. 28 2-dimensional electrophoresis images of various leaves
 a, b, c, & d points are detected by different distribution of another sample
 1. Cultivated ginseng 5 years
 2. Chinese cultivated wild ginseng 10 years
 3. Wild ginseng about 20 years
 4. Korean cultivated wild ginseng 5 years
 5. Korean cultivated wild ginseng 10 years

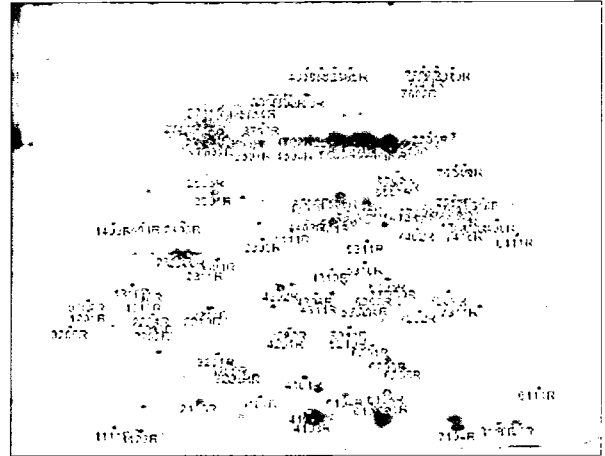


Fig. 29 Marking of different spots on the 2-dimensional electrophoresis pattern among various ginseng's leaf.

시료들 간에 차이를 보이는 132 개의 spot이 정량 평가를 위하여 선정되었고 (Fig. 29), 분리 동정을 시행하였으며 (Appendix 3) MALDI-TOF를 이용한 각각의 단백질 spot에 대한 질량분석 스펙트럼을 구하였다. 분석이 완료된 질량분석 스펙트럼으로부터 단백질 서열 분석 후 동정을 수행하였다 (Appendix 4)(Table 3).

4. 각 부위에 대한 유의성 분석

전체 spot의 통계학적 분석을 시행한 결과 대부분의 단백질이 각 시료에 공유되어 있어서 유의성을 나타내지 않았다 (Fig. 30).

특히 중국산 산양삼과 인삼은 거의 대부분의 spot이 일치되고 있었고, 한국산 산양삼 5년생과 10년생 역시 유사한 분포를 나타내고 있었다.

따라서 수종의 삼류에 대한 proteome 분석이 감별 진단의 목적으로 유용한 지표가 설정될 수 있는지를 확인하기 위하여 각 부위별로 특이성을 나타내는 단백질을 찾아 유의한 차이를 나타내는 상위 20개의 spot을 선정하였다.

그 결과 뿌리에서는 4210, 4211, 5109, 6201, 108, 3201, 3202, 5108, 1604, 1113, 7203, 1601, 4103, 7106, 1602, 712, 7105, 109, 1613, 그리고 511이 채택되었다.

줄기에서는 5103, 6204, 4205, 2101, 1118, 3109, 3206, 6106, 1311, 1307, 3202, 4306, 7114, 1308, 1310, 1216, 2606, 1215, 3204, 그리고 4202가 채택되었다.

잎에서는 1111, 4103, 7104, 8106, 1123, 7202, 5703, 6605, 2108, 6601, 2308, 6203, 5701, 2305, 4106, 2403, 4302, 6610, 5104, 그리고 1318이 채택되었다.

채택되어진 spot들로부터 각 시료들 간의 감별력을 조사한 결과 뿌리에서는 23.0%, 줄기에서는 38.8%, 그리고 잎에서는 33.0%가 나타나 정확도에 문제가 있음을 알 수 있었다.

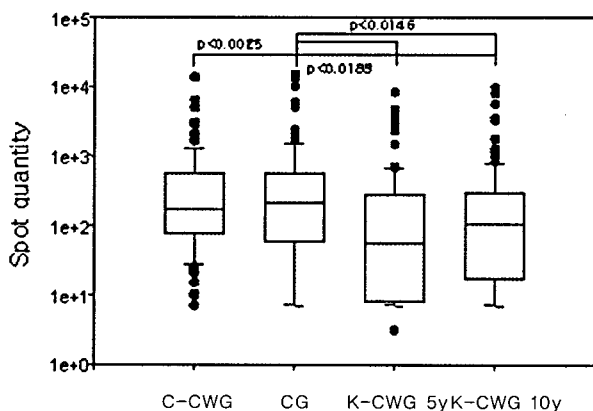


Fig. 30 Statistical analysis of protein spots to the various ginsengs
 CCWG: Chinese cultivated wild ginseng 10 years old.
 CG : Cultivated ginseng 5 years old.
 WG : Wild ginseng about 20 years old.
 KCWG-5: Korean cultivated wild ginseng 5 years old.
 KCWG-10: Korean cultivated wild ginseng 10 years old.

이는 동일한 종에서 유전자의 발현에 의해 나타나는 단백질의 변화량이 크지 않고 조합에 따른 개체차이보다는 공유되어진 부분이 많음을 의미한다.

중국산 산양삼과 한국산 산양삼, 그리고 인삼과 한국산 산양삼의 감별력을 조사하기 위하여 상위 10개의 spot에 의한 감별력을 평가하였다.

뿌리에서 중국산 산양삼과 한국산 산양삼의 감별력은 60.0%를 나타내었고, 인삼과 한국산 산양삼 역시 60.0%를 나타내었다.

줄기에서는 중국산 산양삼과 한국산 산양삼의 감별력은 85%를 나타내었고, 인삼과 한국산 산양삼은 65.0%를 나타내었다.

잎에서 중국산 산양삼과 한국산 산양삼의 감별력은 50%를 나타내었고, 인삼과 한국산 산양삼은 75.0%를 나타내었다.

이상의 결과를 바탕으로 protein spot에 대한 수종의 삼류에 대한 감별 진단은 정량적 평가나 특정 단백질의 조합만으로는 신뢰할만한 정확도를 얻기가 어려웠고, 다른 진단방법을 보조할 수 있는 방법으로 사용이 가능함을 알 수 있었다.

IV. 고찰

유전자의 발현 정보에 대한 정립과 단백질의 분석기술이 발달하면서 기능성 단백질을 연구하는 학문인 Proteomics는 기능적 유전체학의 가장 중요한 분야로 대두되고 있다.²⁾ 미국이나 유럽에서는 생물의 유전자 정보를 해독하는 유전체연구가 활발하게 진행되어 왔으며, 1995년 이후 많은 생물에서 유전체의 전체 염기서열이 결정되어 유전자의 구조와 유전자 발현에 대하여 더 많은 이해가 가능하게 되었다.¹⁾ 그러나 유전체 해석에서 결정된 염기서열로부터 database를 이용한 상동단백질의 검색에 의하여 기능이 추정되는 단백질의 비율은 전 해독 (translation) 산물의 30-50%정도에 지나지 않는다. 그 기능이 알려지지 않은 유전자들을 동정하기 위하여 최근에는 포스트 게놈 연구로서 단백질의 생화학적 및 물리학적 특성을 분석하여 단백질과 그것들을 암호화하는 게놈 DNA와의 관계를 밝히는 연구, 즉 게놈정보를 이용하면서 proteome 연구가 추진되어야 할 필요성이 대두되고 있다.

대다수의 단백질은 해독 중 또는 해독 후에 여러 가지 변형 과정을 거쳐 특유의 입체구조를 갖고 성숙단백질이 된다. 그리고 상호적으로 작용하며 그 기능을 발휘한다. 따라서 단백

질의 기능을 밝히는 경우에는 반드시 기능을 하고 있는 단백질 그 자체를 분석하고, 번역 중 및 번역 후의 변형과정과 입체구조 및 상호작용 등에 관한 정보를 수집할 필요가 있다. 따라서 게놈 해석에 대응하기 위하여 대규모의 고효율적 방법인 단백질 해석, 다시 말하면 proteome의 해석이 필요하다.

오늘날의 proteome 분석을 가능하게 한 접근 방법이 바로 2-DE이다. 2-DE는 한 개체 내에서 발현되는 단백질의 발현 양상과 생리적, 환경적 변화에 따른 발현 정도를 관찰할 수 있다.¹⁰⁾ 또한 분석 대상 단백질들을 세포의 특정 조건에 따라 제조하여 특정한 spot들의 양적인 변화를 보이는 단백질들을 적당한 크기로 잘라 Matrix assisted laser desorption ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) 등의 단백질 질량분석기로 분석하여 아미노산 서열을 결정하고 단백질의 정체를 확인할 수 있는 장점이 있다.¹²⁾

인삼은 오가과 (두릅나무과 ; Araliaceae)에 속한 다년생 초목인 인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 뿌리를 건조한 것¹³⁾으로 人銜, 鬼蓋¹⁴⁾, 土精, 神草, 黃參, 血參, 人微, 玉精¹⁵⁾, 人蔘, 海腹, 皺面還丹¹⁶⁾, 地精¹⁷⁾, 二精¹⁸⁾ 등으로 불리우며, 性은 微寒¹⁹⁾, 小寒¹⁵⁾, 微溫¹⁸⁾, 溫¹⁷⁾하고, 味는 甘¹⁶⁾, 苦¹⁵⁾, 微苦¹⁹⁾하며, 補五臟, 安精神, 定魂魄, 止驚悸, 除邪氣, 明目, 開心, 益智, 久服輕身延年¹⁴⁾, 大補肺中元氣²⁰⁾ 등의 효능이 있고 五勞七傷, 虛損肺脾, 陽氣不足, 短氣少氣, 腸胃中冷, 心腹鼓痛, 胸脇苦滿, 霍亂吐逆²¹⁾ 등에 광범위하게 사용되는 滋補強壯興奮劑이다.

산삼이나 산양삼은 인삼에 비하여 우수한 효능이 있는 것으로 보고되고 있으나²²⁾ 희소성이나 높은 가격 등으로 인하여 인삼에 비하여 체계적이고 과학적인 연구가 진행되지 못한 것이 현실이다. 또한 적절한 품질 관리의 기준이 없어 유통상의 여러 가지 문제점들이 발생하고 있다.²⁾

지금까지 이용된 산삼의 식별방법은 시료에 손상을 전혀 입히지 않는 경험을 바탕으로 한 생육형태의 육안적 분석이 주를 이루었다. 이는 산삼이 매우 희귀하고 고가의 약초라는데 그 원인이 있다. 그러나 생육형태의 분석방법은 과학적이고 신뢰성 있는 결과를 기대하기에 어려운 점이 많아 최근에는 DNA 분석이나 주요 생리활성물질의 분석 등 보다 과학적이고 체계적인 연구방법이 제시되고 있지만^{7, 23)} 산삼이나 산양삼, 그리고 산지에 따른 비교분석 등의 연구는 부족한 실정이다.

따라서 본 연구는 종자의 기원이 동일한 *Panax ginseng* C. A. Meyer 중 생육조건에 따른 분류에 해당하는 자연산 산삼과 산양삼, 그리고 인삼이 구성 성분의 차이, 동일한 산양삼의 경우 지역적인 차이, 그리고 수령에 따른 차이를 객관적이고 과학적으로 검증할 수 있는 지를 알아보고자 시행하였

다. 연구방법으로는 줄기와 잎이 확보된 인삼과 10년생 중국산 산양삼, 5년생 및 10년생 한국산 산양삼, 그리고 약 20년생으로 추정되는 자연산 산삼 시료들을 부위별로 나누어 2-DE를 시행하였다. 이후 gel에서 단백질 spot을 검출하였고, 2-DE 이미지 분석용 장비를 이용하여 측정된 후 비교 분석하였다.

그 결과 모든 부위에서 대부분의 spot들이 서로 matching 가능한 상태였고, 유전적 상태가 동일한 *Panax ginseng*임을 알 수 있었다. 다만 각각의 시료에서 서로 유전적 배경이 서로 다르다고 추정되는 pattern이 발견되었고, 이를 대비한 결과 뿌리에서는 인삼과 중국산 산양삼이 다른 시료들에 비하여 구분되는 유사한 단백질 분포를 나타내고 있었고, 국내산 산양삼과 자연산 산삼이 인삼, 중국산 산양삼과 구분되는 유사한 분포를 나타내고 있었다. 자연산 산삼은 다른 시료들이 가장 많은 단백질 분포를 나타내고 있는 중앙하단부의 pH 5.0-6.0, 18-30 kDa 구간에 상대적으로 적은 양이 분포함을 알 수 있었다.

줄기와 잎의 이미지 분석에서는 결과가 거의 동일하게 나타났다는데, 특히 5년생 국내산 산양삼과 10년생 국내산 산양삼이 거의 같은 분포를 나타내고 있었고, 중국산 산양삼은 인삼과 유사한 분포를 나타내었으나 단백질의 분포가 상대적으로 적었으며, pH 4.5-5.0, 25kDa 구간에서 차이를 보였다.

각각의 시료에서 서로 유전적 배경이 서로 다르다고 추정되는 pattern이 발견되었고, 특히 25 kDa 이하 구간에서 차이를 나타내고 있었다.

자연산 산삼은 다른 시료에 비하여 줄기와 잎이 가늘고 작아 충분한 단백질을 확보하지 못하여 비교대상에서 제외되었다.

시료들 간에 차이를 보이는 spot이 뿌리에서는 102개, 줄기에서는 109개, 그리고 잎에서는 132개가 정량 평가를 위하여 선정되었고, 분리 동정을 시행하였으며 MALDI-TOF를 이용한 각각의 단백질 spot에 대한 질량분석 스펙트럼을 구하였다.

분석된 단백질의 spot을 정량 평가한 결과 인삼과 중국산 산양삼, 그리고 5년생과 10년생 국내산 산양삼이 매우 유사한 분포를 나타내고 있었다. 또한 각 시료들이 상호 공유하고 있는 단백질이 많아 전체적인 정량평가를 통해서는 유의한 차이가 나타나지 않음을 알 수 있었다.

따라서 수종의 삼류에 대한 proteome 분석이 감별 진단의 목적으로 유용한 지표가 설정될 수 있는지를 확인하기 위하여 각 부위별로 특이성을 나타내는 단백질을 찾아 유의한 차이를 나타내는 상위 20개의 spot을 선정한 후 채택된 spot

들로부터 각 시료들 간의 감별력을 조사하였다. 그 결과 뿌리에서는 23.0%, 줄기에서는 38.8%, 그리고 잎에서는 33.0%가 나타나 정확도에 문제가 있음을 알 수 있었다.

현재 사회적인 문제가 되고 있는 중국산 산양삼과 한국산 산양삼, 그리고 인삼과 한국산 산양삼의 감별력을 조사하기 위하여 상위 10개의 spot에 의한 감별력을 평가하였다. 그 결과 뿌리에서는 중국산 산양삼과 한국산 산양삼의 감별력은 60.0%, 인삼과 한국산 산양삼 역시 60.0%를 나타냈다. 줄기에서는 중국산 산양삼과 한국산 산양삼의 감별력은 85%, 인삼과 한국산 산양삼은 65.0%를 나타내었다. 잎에서는 중국산 산양삼과 한국산 산양삼의 감별력은 50%, 인삼과 한국산 산양삼은 75.0%를 나타냈다.

이러한 결과는 단백질 spot 분석만으로 어떤 특정 삼류를 감별 진단하기에는 적합하지 않고, 유전자 분석이나 성분함량 분석 등 다른 진단방법을 보조할 수 있는 방법으로 사용가능함을 알 수 있었다.

향후 지속적인 연구를 통하여 과학적이고 체계적인 *Panax ginseng*의 감별기준이 확립되기를 희망한다.

V. 결론

인삼과 중국산 산양삼, 5년생 및 10년생 국내산 산양삼, 그리고 자연산 산삼의 뿌리, 줄기, 잎에 대하여 2-DE를 이용한 proteome 분석을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 모든 시료들의 부위에 따른 proteome image에서 대부분의 spot들이 서로 matching 가능한 상태를 나타내어 유전적 상태가 동일한 *Panax ginseng*임을 알 수 있었다.
2. 각각의 부위에서 인삼과 중국산 산양삼, 국내산 5년생과 10년생이 유사한 분포를 나타내고 있었다.
3. 시료들 간에 차이를 보이는 spot이 뿌리에서는 102개, 줄기에서는 109개, 그리고 잎에서는 132개가 정량 평가를 위하여 선정되었고, 분리 동정을 시행하였다.
4. 각 부위별로 특이성을 나타내는 단백질을 찾아 유의한 차이를 나타내는 상위 20개의 spot을 선정한 후 각 시료들 간의 감별력을 조사한 결과 23.0- 38.8%의 정확도를 나타내었다.
5. 유의한 차이를 나타내는 상위 10개의 spot에 의한 감별력을 평가한 결과 50-85%의 정확도를 나타내었고, 특히 줄기에서 중국산 산양삼과 한국산 산양삼의 감별력

이 높았다.

Acknowledgement

"This study was supported by a grant of the Oriental Medicine R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea. (B050054)"

참고문헌

- 우선희, 김홍식, 송범현, 이철원, 박영목, 정승근, 조용구. 프로테오믹 해석에 의한 벼 게놈 기능해석과 응용. 한국식물생명공학회지 2003; 30(3): 281-283.
- Park, OK. Proteomic Studies in Plants. *J. of Biochemistry and Molecular Biology* 2004; 37(1): 133-138.
- Zolla, L., Timpero, AM, Walcher, W. and Huber, CG. Proteomics of light-harvesting proteins in different plant species. Analysis and comparison by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Photosystem II. Plant Physiol.* 2003; 131: 198-214.
- Millar, A. H., Sweetlove, L. I., Giege, P. and Leaver, C. J. Analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome. *Plant Physiol.* 2001; 127: 1711-1727.
- Koller, A., Washburn, M. P., Lange, B. M., Andon, N. L., Deciu, C., Haynes, P. A., Hays, L., Schieltz, D., Ulaszea, R., Wei, J., Wolters, D. and Yates, J. R. 3rd. Proteomic survey of metabolic pathways in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99: 11969-11974.
- Zivy, M. and de Vienne, D. Proteomics: a link between genomics, genetics and physiology. *Plant Mol. Biol.* 2000; 44: 575-580.
- 권기록, 서정철. 산삼과 장뇌삼 중 고려삼과 서양삼의 Pyrosequencing법에 의한 감별. *대한본초학회지.* 2004; 19(4): 45-50.
- Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.
- Anderson, N.L., et al., A two-dimensional gel database of rat liver proteins useful in gene regulation and drug effects studies, *Electrophoresis*, 1991; 12: 907-930
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 1996; 68: 850-858.
- Rabilloud, T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics.* 2002; 2: 3-10.
- Dongxia Wang, Suzanne R. Kalb and Robert J. Cotter. Improved procedures for N-terminal sulfonation of peptides for matrix-assisted laser desorption/ionization post-source decay peptide sequencing *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004; 18: 96-102.
- 전국한의과대학 본초학교수공편저, 본초학, 서울, 영림사, 1994; 531.
- 單書健, 神農本草經校證, 吉林省, 吉林科學技術出版社, 1988; 150.
- 吳普, 吳普本草, 北京, 人民衛生出版社, 1987; 14.
- 李時珍, 本草綱目, 北京, 人民衛生出版社, 1982; 699-701.
- 李梴, 醫學入門, 서울, 대성출판사, 1997; 400.
- 唐慎微, 重修政和經史證類備用本草, 台北, 南天書局有限公司, 1976; 145.
- 王好古, 湯液本草, 本草名著集成 北京, 華夏出版社, 1998; 30-31.
- 汪昂, 本草備要, 本草名著集成 北京, 華夏出版社, 1998; 242-243.
- 徐彥純, 本草發揮, 歷代本草精華叢書 二, 上海, 上海中醫藥大學出版社, 1994; 510.
- Byung Sam Yoo, Moon Sik Chang, and Sang Yo Byun. Characterization of cell culture and ginsenoside production by cultured ginseng and wild mountain ginseng. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 2003; 18(2): 133-139.
- Ko, S. R., Choi, K. J., Kim, S. C. and Han, K. H. Content and composition of saponin compounds of Panax species. *Korean J. Ginseng Sci.* 1995; 19: 254-295.