

누에 RAPD-PCR 분석을 위한 기초연구

황재삼 · 이진성 · 이상몽* · 강현아 · 황석조 · 서동상**

농촌진흥청 잠사곤충연구소, *농촌진흥청 연구관리국, **성균관대학교 유전공학과

Fundamental Study for RAPD-PCR Analysis in the Silkworm, *Bombyx mori*

Jae Sam Hwang, Jin Sung Lee, Sang Mong Lee*, Hyun Ah Kang,
Seok Jo Hwang and Dong Sang Suh**

National Sericulture and Entomology Research Institute, R.D.A., Suwon, Korea, 441-100

*Research Management Bureau, R.D.A., Suwon, Korea, 441-707

**Department of Genetic Engineering, University of Sungkyunkwan, Suwon, Korea, 440-746

Abstract

Reproducible the random amplified polymorphic DNAs(RAPDs) patterns were obtained in the two silkworm strains(J111, Galwon) by adjusting concentration optimized of Taq DNA polymerase(one unit), dNTP(200 μ M), $MgCl_2$ (1.5 mM) and template DNA(30 ng). In addition, annealing temperature ranging 35°C to 42°C by the adjusted condition was investigated and fixed at 35°C in this study. Variation among individuals and between male and female of Jam 113 strain was not authorized. DNA polymorphisms among silkworms were authorized by five RAPD markers using OPM04 random primer. Using the primer showing polymorphisms between parents(J111, Galwon) in thirty three individuals, RAPD-PCR for F_2 analysis was performed and segregated 3 : 1 in the F_2 population. Consequently, RAPDs detected in the parents were obtained as genetic markers, which can be used for construction of genetic map for this industrially particular insect, silkworm *Bombyx mori*

Key words : Silkworm, *Bombyx mori*, PCR, RAPD

서 론

분자유전학 기술의 비약적인 발전으로 다양한 생물종에 대한 객관적이면서도 정밀한 비교를 가능하게 하는 여러기술이 축적되었다. 그 대표적인 것이 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) 또는 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)를 이용하는 기술이다. PCR(Polymerase Chain Reaction)을 이용한 RAPD는 임의로 작성한 oligonucleotide를 primer로 하여 DNA를 증폭하는 기술로서 이를 이용하면 신속하게 분자수준의 종분류와 유전자 지도작성이 가능하다. (Williams *et al.* 1990, Waugh & Powell 1992).

최근 RAPD마커를 이용한 유전자 지도작성은 애기장대, 바나나, 상치, 유칼리나무, 닭, 꿀벌등에서 보고되었다(Reiter *et al.* 1992, Faure *et al.* 1994, Kesseli *et al.* 1994, Grattapaglia & Sederoff 1994, Levin *et al.* 1993, Greg & Robert 1995).

특히 RAPD 분석은 각 대상 곤충 및 식물에 따라 genome 크기나 DNA 염기서열 및 세포화학적 편이 다르기 때문에 실험대상에 가장 알맞은 PCR 증폭 반응 조건이 요구된다.

따라서, 본 연구는 누에를 대상으로 하여 RAPD 마커에 의한 누에품종간 유전적 유연관계와 유전자 지도작성을 위한 기초연구로서 누에 RAPD-PCR을 위한 최적의 조건과 누에품종내에서 암수간 개체간 DNA다형

성, 동일한 primer에 의한 누에품종간 다형성 및 양친간 및 양친간의 F₁의 다형화 band에 의한 F₂ 개체간의 분리정도를 검토하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 공시곤충

본 실험에 사용한 누에는 잠사곤충연구소(한국)에서 계대보존하고 있는 J111등 15계통 및 가잠의 선조형으로 보고된 멧누에이다. 누에의 사육은 잠사곤충연구소의 누에육종잡실에서 표준사육법에 의해 사육하였으며, 멧누에는 동연구소의 뽕밭에서 야생하고 있는 것을 채집하여 시험재료로 사용하였다.

2. 후부견사선 추출 및 보관

Genomic DNA의 추출을 위하여 5령 3일째(멧누에의 경우 4령3일째)의 누에 유충을 해부하여 견사선을 꺼내어 차가운 1 X SSC 완충액(0.15M NaCl, 0.015M sodium citrate, pH 7.0)으로 여러번 세척하면서 후부실샘 이외의 조직, 기관, 체액 등을 제거한 후 액체질소(-196°C)에 급속 동결 후 -80°C에 냉동 저장하였다.

3. Genomic DNA 분리

누에 genomic DNA는 Suzuki(1990)의 방법을 일부 변형하여 small scale 방법으로 분리하였다. -80°C에 저장되어 있는 후부 견사선을 꺼내어 시료당 2.5배(W/V)의 DNA 추출용 완충액(0.5% SDS, 5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl(pH7.5), 0.1M NaCl, 10 µg proteinase K/ml)을 첨가 homogenizer로 잘 마쇄하여 37°C에서 10~20분 정도 incubation 후 2 ml의 1M Tris-HCl (pH 7.5)과 3 ml의 phenol을 가하여 조심스럽게 혼합 저온원심(5°C, 5000 rpm)하여 상층액을 취하고 2회의 phenol/chloroform 추출 후 3배의 salted ethanol (2% potassium acetate포함)을 가하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 유리봉으로 spooling하여 70 % ethanol에 washing한 후 건조시켜 1ml의 TE 완충액(20 mM Tris-HCl(pH 8.0) 1 mM EDTA)을 가한 다음, 10 µg/ml의 RNase A를 처리하여 37°C에서 2시간동안 반응 시킨 후 2회의 phenol/chloroform 추출 및 salted ethanol로 DNA를 침전시켜 70 % ethanol에 washing한 다음 건조하여, TE 완충액에 현탁하여 Genomic DNA로 사용하였다.

4. primer와 PCR반응

1) Primer

Table 1. Random primers used for RAPD-PCR analysis of the silkworm, *Bombyx mori*

Primers*	Nucleotide Sequences
OPM 03	5' GGGGGATGAG 3'
OPM 04	5' GGGGGTTGTC 3'
OPM 05	5' GGAACGTGT 3'
OPM 06	5' CTGGCAACT 3'
OPM 07	5' CCGTACTCA 3'
OPM 08	5' TCTGTCCCC 3'

Oligonucleotide primer는 Operon사의 random primer OPM 03- OPM 08 series를 사용하였다(표 1). dNTP 및 Taq DNA polymerase는 한국생공(주) 제품을, PCR 반응기는 화인사(한국)의 제품을 각각 사용하였다.

2) PCR 반응

25 µl용량에 대해 DNA 30 ng, dNTP mixture 200 µM(한국생공), random primer 200 nM, MgCl₂ 1.5 mM 그리고 mineral oil 30 µl를 첨가한 뒤 94°C에서 5분간 DNA를 변성시킨 다음, Taq DNA polymerase(한국생공)를 1 unit 첨가한 후에 다시 94°C에서 90초, 35°C에서 60초, 72°C에서 120초로 45 cycles 후 72°C에서 300초로 last extension하는 것을 기본조건으로 하여 water bath식 PCR robot(화인 PCR)로 누에 RAPD-PCR을 위한 주형 DNA, primer, Taq DNA polymerase의 양, MgCl₂ 농도를 검토하였으며, 이 조건을 기본으로 하여 annealing 온도도 검토하였다.

5. 전기영동

PCR 반응이 끝난 후 12 µl의 증폭된 DNA를 2% agarose gel에 loading하여 110V에서 2시간 30분 동안 0.5 X TBE 완충액(0.0045 M Tris-borate, 0.001M EDTA pH 8.0)하에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색, 자외선(UV)하에서 사진 촬영하였다.

결과 및 고찰

RAPD-PCR 반응의 주요 요인으로 알려진 주형 DNA, dNTP mixture, random primer, Taq DNA polymerase, MgCl₂ 농도를 조사하기 위해 J111 및 Galwon 품종을 공시하여 operon random primer OPM 03 및 OPM 04를 사용하여 누에 RAPD-PCR의 최적 조건을 검토하였다. PCR 기본 반응조건은 전체 25 µl 용량에 대해 DNA 30 ng, dNTP mixture 200 µM, random primer 200 nM 및 Taq DNA

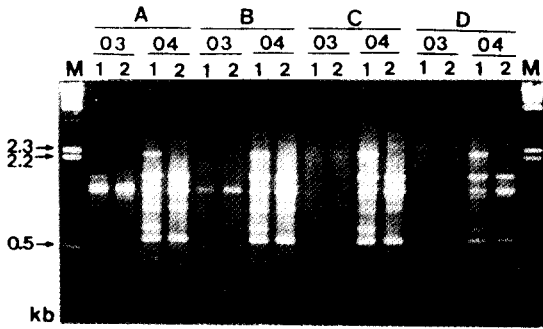


Fig 1. Effect of template DNA amount on RAPD amplification using genomic DNA of silkworm, *Bombyx mori*. Template DNA amount of A, B, C, D were 30, 60, 90 and 120 ng, respectively. 03 and 04 indicate OPM 03, OPM 04 of operon primer. M ; size marker, 1; J111 strain, 2; Galwon strain.

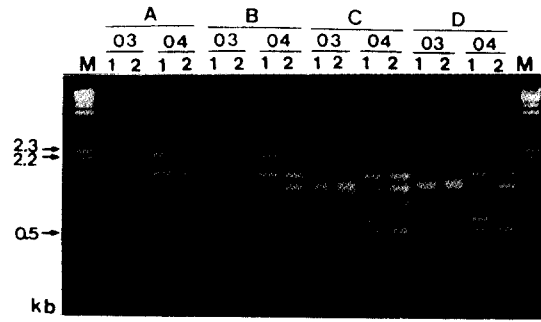


Fig 3. Effect of oligonucleotide random primer amount on RAPD amplification using genomic DNA of silkworm, *Bombyx mori*. Oligonucleotide random primer amount of A, B, C, D were 100, 200, 300 and 400 nM, respectively. See Fig. 1 for further legend.

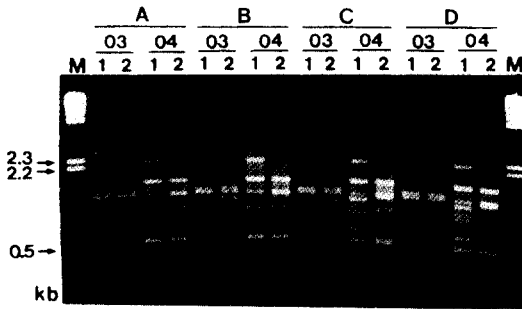


Fig 2. Effect of dNTP mixture concentration on RAPD amplification using genomic DNA of silkworm, *Bombyx mori*. dNTP mixture concentration of A, B, C, D were 100, 200, 300 and 400 μM, respectively. See Fig. 1 for further legend.

polymerase 1.0 unit, MgCl₂ 1.5 mM로 하였다. 또한 annealing 온도에 의한 band의 변이를 배제하기 위하여 본 실험조건에서는 annealing 온도를 35°C로 고정시켰다.

그림 1은 주형 DNA 농도를 30, 60, 90 및 120 ng으로 하여 PCR 반응 후 DNA 생성물을 전기영동한 결과로서 OPM 03 primer에서는 30 ng에서 band의 생성이 가장 뚜렷하였으며, 60 ng에서는 band의 강도가 30 ng보다 약했고, 90 ng 이상에서는 band가 전혀 증폭되지 않았다. OPM 04 primer도 OPM 03 primer와 같이 30, 60, 90 및 120 ng으로 DNA양을 변화시켜서 반응시킨 결과 OPM 03 primer와는 달리 DNA 양에 관계없이 band의 증폭이 뚜렷 하였다. 따라서 누에의 주형 DNA양은 primer종류에 따라 증폭의 정

도가 다소 차이는 있었지만 누에의 주형 DNA농도는 30 ng수준에서 설정하는 것이 최적의 조건이라 생각된다. 이와 같은 결과는 사과, 고추, 파파야의 주형 DNA양이 10 - 30 ng일때 PCR product DNA 생성이 가장 양호하다는 결과와 매우 유사하다(예 등 1994, 양 등 1994, Stiles *et al.* 1993).

dNTP mixture농도를 100, 200, 300 및 400 μM로 하였을 경우 100 μM에서는 band의 강도가 약했으며, 200 μM이상에서는 band의 강도도 강하고 minor band와 major band가 안정되게 증폭되었으므로 (그림 2), 누에의 RAPD-PCR을 위한 최적의 dNTP mixture 농도는 200 μM 수준에서 설정하는 것이 경제적이다 생각된다.

한편, primer의 양을 100, 200, 300 및 400 nM로 하였을 경우 OPM 03 primer에서는 100 nM에서 400 nM로 primer의 양을 증가 시켰을 경우 증가 시킨만큼 band의 강도도 강했다. 또 OPM 04 primer는 primer의 양을 증가 시킴에 따라 0.7 Kb band의 강도가 강했고, 2.2 Kb band의 강도는 약하게 증폭되었다(그림 3). 즉 누에 RAPD-PCR을 위한 최적의 primer 양은 OPM 03 및 OPM 04 primer에서 증폭된 band의 강도로 보아서 300 nM 수준에서 primer 양을 설정하는 것이 적정 조건이라 생각된다. 위의 결과는 primer 양의 변화에 따라 band의 강도를 다르게 나타낼 수 있다는 Weeden(1992)의 보고와 일치하였다.

그림 4는 *Taq* DNA polymerase를 0.5, 1.0, 1.5 및 2.0 unit로 하여 각각 반응시킨 결과 0.5 unit의 조건에서는 band의 강도가 약했고, 1 unit에서 2.0 unit 조건

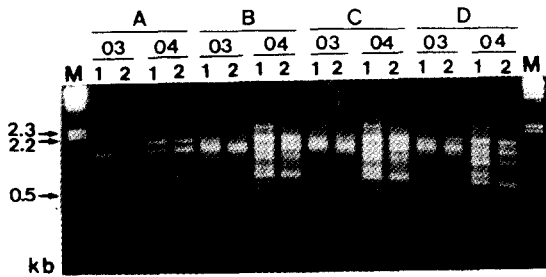


Fig 4. Effect of *Taq* DNA polymerase amount on RAPD amplification using genomic DNA of silkworm, *Bombyx mori*. *Taq* DNA polymerase amount of A, B, C, D were 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 unit, respectively. See Fig. 1 for further legend.

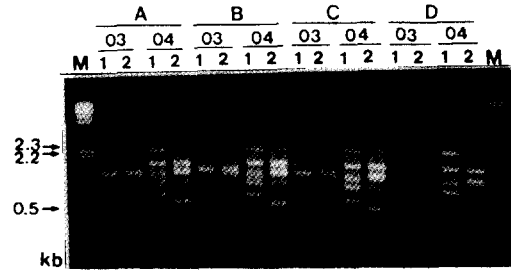


Fig 6. Effect of annealing temperature on RAPD amplification using genomic DNA of silkworm, *Bombyx mori*. Annealing temperature of A, B, C, D were 35, 38, 43 and 47°C respectively. See Fig. 1 for further legend.

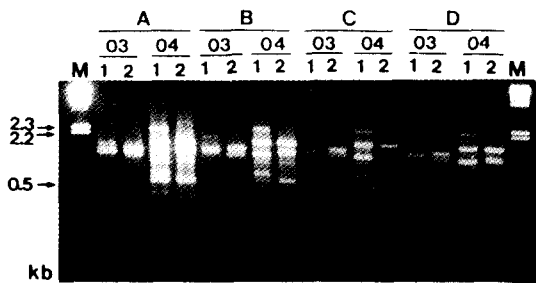


Fig 5. Effect of Mg^{2+} concentration on RAPD amplification using genomic DNA of silkworm, *Bombyx mori*. Mg^{2+} concentration of A, B, C, D were 1.5, 2.5, 3.5 and 4.5 mM respectively. See Fig. 1 for further legend.

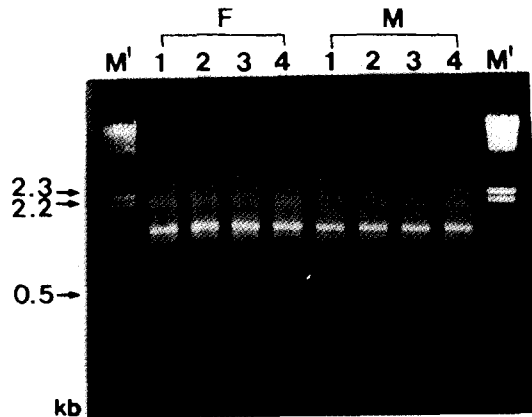


Fig 7. RAPD profile of DNA from both the sexes of authorized parental silkworm strains, JAM 113. The primer used was operon primer OPM 04. F; female, M; male. Lane 1 - 4 indicate individuals of the corresponding sex.

의 범위에서는 band의 강도도 강하고 모든 band들이 안정적으로 증폭되었으므로 누에 RAPD-PCR을 위한 적정 *Taq* DNA polymerase의 양은 최소용량인 1 unit로 설정하였다.

또한, $MgCl_2$ 농도 변이에 따른 RAPD 결과 1.5 mM에서 4.5 mM까지 $MgCl_2$ 의 농도를 증가시킬수록 band의 증폭 정도가 약했다(그림 5). 특히 OPM 04 primer의 Galwon 품종에서는 primer들 사이의 dimer 등이 형성되어 위조의 band가 0.2 Kb이하에서 증폭 되어 major band의 강도를 약화 시켰다. 이 결과는 Muthali(1992)등이 4 mM까지는 $MgCl_2$ 농도를 증가시킬수록 band의 수가 많아졌다는 결과와는 일치되지 않았는데 이는 $MgCl_2$ 농도는 대상 생물에 따라 RAPD-PCR조건이 다를것으로 생각된다. 즉 누에 RAPD-PCR의 적정 $MgCl_2$ 농도는 1.5 mM이 적당한 것으로 생각된다. 이상의 결과 누에 RAPD - PCR을 위한 적정 반응 조건은 전체 용량을 25 μ l로 할 경우

주형 DNA 30 ng, dNTP mixture 200 μ M, primer 300 nM, *Taq* DNA polymerase 1 unit 및 $MgCl_2$ 농도 1.5 mM로 판단된다.

본 실험조건을 기본으로 하여 annealing 온도 조건을 탐색하였다. 35°C, 38°C, 42°C, 47°C의 annealing 온도에 대해 PCR 반응 실험 결과, 35°C, 38°C, 42°C의 annealing온도에서 OPM 03 및 OPM 04 primer 모두 band 생성이 뚜렷하였고, 특히 OPM 03 primer는 47°C annealing 온도에서 band가 전혀 증폭되지 않았으나 OPM 04 primer는 정상적으로 증폭되었다(그림 6). 이것은 아마 random primer의 염기 조성이 annealing온도 차이에 의해 누에 genomic DNA의 증폭 효율과 관계가 있

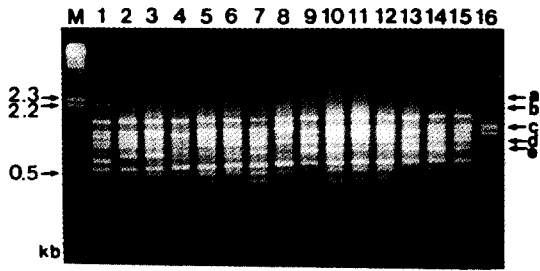


Fig 8. RAPD profile of amplification DNA from sixteen strains using operon primer OPM 04. Lane 1-16 indicate silkworm strains. M ; size marker. Lane 1; J111, Lane 2; N32, Lane 3; N44, Lane 4 ; KJ 16, Lane 5 ; JAM 119, Lane 6; JAM 123, Lane 7; JAM 125, Lane 8; Galwon, Lane 9; C3, Lane 10; C5; Lane 11; C42, Lane 12; JAM 120, Lane 13; JAM 124, Lane 14; JAM 126, Lane 15; Zebra, Lane 16; *Bombyx madarina*.

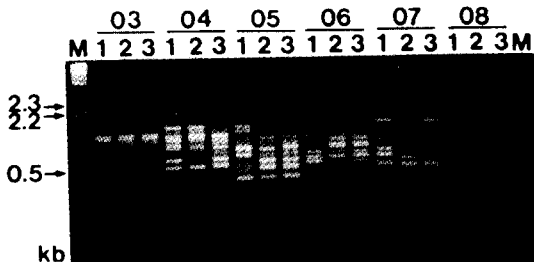


Fig 9. RAPD profile of both parents and F1 using different primers. Lane 1; J111(polyphagous strains), Lane 2; Galwon (unpolyphagous strains), Lane 3 ; J111 X Galwon(F1). 03, 04, 05, 06, 07, 08 indicate OPM 03, OPM 04, OPM 05, OPM 06, OPM 07 OPM 08 of operon primer.

을 것으로 사료된다. 따라서 누에 RAPD-PCR 조건에 알맞은 annealing 온도는 35°C에서 42°C 범위내에서 차이가 없으므로 본 실험에서는 35°C로 고정해서 반응 시켰다.

누에 품종간 RAPD-PCR 분석을 수행하기 위해 누에 품종내에서 개체간 및 암수간의 DNA 다형성을 JAM 113 품종을 OPM 04 primer로 증폭시킨 결과 누에 품종내에서의 개체간 및 암수간의 DNA 다형성이 관찰되지 않았다(그림 7). 즉 공시된 누에 품종은 수십세대 실험집단에서 계대보존되었으므로 유전적으로 매우 homogeneous하다고 생각된다. 따라서 동 실험에 의한 누에 품종간 유전적 유연관계 및 유전지도를 작성하는데 있어서 적합한 실험 재료로 볼 수

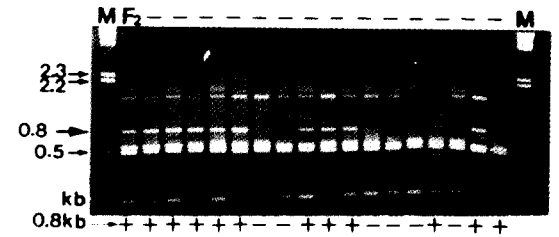
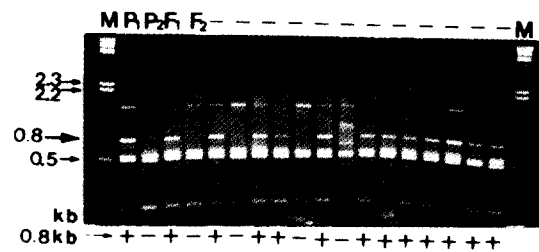


Fig 10. RAPD profile of F₂ segregation in 800 bp band using operon primer OPM 04 P₁(J111), P₂(Galwon), F₁(J111 X Galwon), F₂(Lane 1-33)

있다. 그림 8은 J111등 16계통에 대해 OPM 04 primer를 사용하여 누에 품종간 DNA 다형성을 검토한 결과 5개의(a, b, c, d, e) RAPD marker에 의해 품종간 DNA 다형성이 인정되었으므로 향후 많은 primer를 이용하여 누에 품종간 유전적 유연관계를 분석하는데 응용할 수 있으리라 생각된다. 그림 9는 누에 유전자 지도작성을 위한 광식성 계통인 일본종계 J111과 비광식성 계통인 중국종계 Galwon 품종을 양친으로 하여 양친간 및 양친간의 F1수준에서 primer종류에 따른 다형성을 검토한 결과로서 OPM 03 primer에서는 양친간 및 양친간의 F1사이에서의 증폭된 band의 다형성이 관찰되지 않았으나, OPM 04, OPM 05, OPM 06, OPM 07, OPM 08 primer에서는 양친간 및 양친간의 F1사이에서 증폭된 band의 다형성이 뚜렷하였다. 양친간 및 양친간의 F1사이에서 증폭된 band의 다형성이 뚜렷한 OPM 07 primer를 사용하여 F2 33개체에 대해 F2 분석을 하였다. 그 결과 800 bp의 band가 3:1로 분리되었다(그림 10). 따라서 RAPD-PCR법에 의한 누에 유전자지도 작성이 가능하다고 생각된다.

본 연구는 누에에 있어서 환경적 영향을 배제하고 유전자 그 자체의 차이에 의한 DNA 수준에서 종간 유전적 유연관계 및 유전자 지도작성이 가능하다는 것을 시사하였고, 다른 곤충 RAPD-PCR분석에도 응용이 가능하리라 생각된다.

적 요

누에 RAPD - PCR 최적조건에 대해 실험한 결과, 증합효소 연쇄반응(PCR)의 최적조건은 반응액 25 μ l 에 대해 주형 DNA 30 ng, dNTP mixture 200 μ M, primer 300 nM, *Taq* DNA Polymerase 1.0 unit 및 Mg^{2+} 1.5 mM로 판단되었으며, 또 상기의 실험조건을 기본으로 하여 annealing 온도를 탐색한 결과 35°C-42°C에서 DNA의 증폭이 안정적임이 밝혀졌다. 또한 동일한 품종내에서 개체간 및 암수간의 DNA 다형성은 인정되지 않았고, 품종간 DNA 다형성은 OPM 04 primer를 사용한 결과 5개의 RAPD 마커로 인정 되었다. 양친간 다형성이 인정된 primer를 사용하여 F₂ 33개체에 대해 DNA를 증폭시킨 결과 800 bp band가 3 : 1로 분리되었으므로 누에 품종간 유전적 유연관계 및 유전자 지도작성의 가능성을 제시했다.

사 사

본 연구는 '95 농촌진흥청 농업특정연구개발사업 " DNA 다형현상을 이용한 누에 유전자 해석기술 개발" 과제의 연구결과의 일부입니다.

인 용 문 헌

- Faure, S., J. L. Noyer, J. P. Horry, K. Bakry, C. Lanaud & D. G. de Leon(1994) A molecular marker-based linkage map of diploid bananas. *Theoretical and Applied Genetics*. 87: 517-526.
- Grattapaglia, D & R. Sederoff(1994) Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudotestcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics*. 137: 1121 - 1137.
- Greg, J. hunt & E. P. Robert(1995) Linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers. *Genetics*. 139 : 1371 - 1382.
- Kesseli, R. V., I. Paran & R. W. Michelmore(1994) Analysis of a detailed genetic linkage map of *Lactuca sativa* (lettuce) constructed from RFLP and RAPD markers. *Genetics*. 136: 1435 - 1446.
- Levin, I., L., B. Crittenden & J. B. Dodgson(1993) Genetic map of the chicken Z chromosome using random amplified polymorphic DNA(RAPD) makers. *Genomics*. 16: 224 - 230
- Munthali, M., V. F. L. Brain and H.J. Newbury(1992) The random amplification of polymorphic DNA for fingerprinting plants. *PCR Method and Appli.* 1 : 276 - 278
- Reiter, R. S., J. G. K. Williams, K. A. A. Feldmann, S. V. Tingey & P. A. Scolnick(1992) Global and local genome mapping in arabidopsis thaliana by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 1477 - 1481.
- Stiles, J. I., C. Lemme, S. Sondur, M. B. Morshidi & R. Manshardt(1993) Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*. 85: 697 - 701
- Suzuki, Y., S. Taklya, T. Suzuki, K. Matsuno, M. Fukuda, T. Nagara & N. Ueno(1990)Development transition of silk gene expression in the *Bombyx mori*. " in molecular insect science". pp: 88 - 89. plenum press, New York.
- Waugh & Powell(1992) Using RAPD markers for crop improvement. *TIBTECH*. 10: 186.
- Weeden, N.F., G. M. Timmerman, M. Hemmat, B. E. Kneen & M. A. Lodhi(1992) Identification and reliability of RAPD markers. In: Applications of RAPD technology to plant breeding. pp.12 - 17. Joint Plant Breeding Symposia Series. Minnesota.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafaiski & S. V. Tingey(1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18: 6531 - 6535
- 양 태진, 김 용재, 문 지혜, 박 효근(1994) 고추 유전자 지도작성을 위한 RAPD 기초연구. *韓國園藝學會 論文發表要旨* 第 12卷, 第2號: 112 - 113.
- 에 병우, 박 한용, 신 용익, 이 돈운, 김 정호, 고 광출 (1994) RAPD를 이용한 사과품종의 분류와 품종 판별표지선발. *韓國園藝學會 論文發表要旨* 第 12卷 第2號: 302 - 303.