

누에 유충의 cDNA 유전자 은행 제작 및 cDNA 클론의 부분염기서열 분석

김상현 · 윤은영 · 강석우 · 김근영 · 강석권*

농촌진흥청 잠사곤충연구소, *서울대학교 농업생명과학대학

Construction of the cDNA Library from *Bombyx mori* Larvae and Analysis of the Partial cDNA Sequences

Sang Hyun Kim, Eun Young Yun, Seok Woo Kang, Keun Young Kim and Seok Kwon Kang*
National Sericulture and Entomology Research Institute, R. D. A., Suwon, Korea, *College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea

Abstract

To secure the genetic resources of silkworm, *Bombyx mori*, the cDNA library was constructed with mRNA isolated from fifth instar larvae. Titer of the cDNA library was about 1.3×10^6 plaques in total. We presumed that the titer covered all transcripts existed in *Bombyx mori*. Meanwhile, it is known that partial cDNA sequences, Expressed Sequence Tags (ESTs), have a good value for the discovery of novel genes and the elucidation of their structures. For this purpose, partial cDNA sequencing was carried out from randomly selected cDNA clones in the library. Partial cDNA sequences of 37 clones were determined and an average of 212 nucleotides of sequence can be read from the clone. The ESTs were searched in GenBank database and fifteen ESTs showed significant similarities to enlisted sequences. They included the genes of storage protein, heat shock protein, actin, catalase and so forth. We presumed that the 22 unmatched ESTs were novel genes.

Key words : *Bombyx mori*, cDNA library, Expressed Sequence Tags

서 론

최근의 분자생물학은 인간을 비롯한 다양한 생명체의 유전정보를 밝혀내고 있으며 현존하는 동물종의 75%를 차지하는 거대한 생물군인 곤충에서도 초파리를 중심으로 유전자들의 기능을 알아내기 위한 게놈해석이 진행되고 있다. 이와같은 유전정보의 해석은 생명현상 연구에 확실한 진전을 가져올 것이며, 유전정보 자체가 생명과학은 물론 의학, 농학 및 환경과학 분야에 이르기까지 무한한 응용가능성을 제시할 것이다.

유전정보의 분석방법에는 염색체를 구획정리하여 자리가 결정된 유전자를 꺼내어 그 배열을 알아내는 게놈해석 방법과 cDNA를 이용한 해석방법이 있다. 게놈해석의 경우 엄청난 예산과 기간이 필요하고 또

한 게놈안에서 구조 유전자로 작동하지 않는 많은 염기서열을 배제하지 못하는 문제가 있다. 한편 cDNA를 이용한 분석은 위 문제점을 극복할 수 있어 게놈 분석에 비해 더 효율적인 것으로 알려져 있다. cDNA 염기분석을 이용한 cDNA 카탈로그 작성은 유전자원의 대량확보와 더불어 새로운 유전자의 동정, 염색체 지도작성, 게놈 유전자의 분석에 유용하게 이용된다. 현재 진행되고 있는 발현유전자 꼬리표(ESTs : Expressed Sequence Tags) 생산 작업은 사람, 마우스, 식물, 초파리, 선충 등에서 행하여지고 있으며 (Watson 1990), 효율적인 cDNA 분석을 위해서는 차별화 선별 (differential screening)과 cDNA 유전자 은행 성숙화 (library preprocessing) 방법이 권장되고 있다 (Höög 1991, Fargnoli *et al.* 1990).

곤충은 발생·생육단계에 따라 각각 독특한 유전자에 의해 정교하게 조절되며, 특히 누에는 실험 동물로서의 많은 장점이 있으므로 누에 유전자에 대한 cDNA 카탈로그 작성은 오랜 진화 과정을 거치면서 얻어진 곤충의 다양한 기능을 해석하는데 큰 도움이 될 것이다. 이에 본 연구에서는 누에의 발현 유전자 꼬리표 생산을 통하여 누에 유전자의 대량 확보를 위한 기초단계로, 5령 누에 유충을 이용하여 cDNA 유전자 은행을 작성하였고, 이 유전자 은행의 특성 및 일부 cDNA 클론에 대한 염기서열 분석과 데이터베이스 검색으로 이 유전자들을 동정 하였다.

재료 및 방법

1. 공시재료

본 실험에 공시한 누에는 장려잠품종인 칠보잠 (잠 107×잠108) 이며 누에의 사육은 잠사곤충연구소 잠사시험 표준에 준하였다.

2. Poly A⁺ RNA 분리

액체 질소로 급속 냉동시킨 5령 누에 10 g을 유발에서 마쇄하여 total RNA를 Chirgwin 등 (1979)의 GTC-GHCl 방법을 이용하여 분리하였다. 분리한 total RNA는 전기영동으로 그 양상을 확인하고, 파장 260 nm에서 UV 분광광도계로 정량하여 poly A⁺ RNA분리에 사용하였다. Poly A⁺ RNA 분리에는 Oligo (dT)-셀룰로오즈 칼럼을 이용하였다. 상온에서 약 50 ml의 high salt 완충액으로 보정시킨 칼럼에 65°C로 2분간 열처리하여 최종농도 0.5 M이 되게 NaCl을 첨가한 total RNA 용액을 적하한 후 high salt 완충액으로 eluent가 A₂₆₀<0.01이 될 때까지 씻어 주었다. 이와같이 불순물이 제거된 칼럼에 low salt 완충액을 흘려주어 Poly A⁺ RNA를 분리하였다. Poly A⁺ RNA가 포함된 eluent는 2배량의 냉에탄올로 침전시켜 DEPC를 처리한 증류수에 녹인 후 cDNA 유전자 은행 작성에 사용하였다.

3. cDNA 유전자 은행 제작

cDNA 유전자 은행 제작을 위해 Stratagene사 (CA, U.S.A)의 Uni-ZAP XR vector kit와 Gigapack Packaging Extract를 사용하였다. 실험방법은 제조회사의 권유에 따라 first strand cDNA와 second strand cDNA를 합성하여 blunt end duplex cDNA를 얻었고, 그 말단에 EcoRI adaptor를 붙인후 XhoI으로 절단하여 lamda ZAP II 벡터에 방향성 있게 도입하였다. In vitro packaging은 cDNA가 도입된 벡터를 packaging

component와 섞은 후, 22°C에서 2시간동안 정치하였다. 반응후 500 μl의 SM 완충액과 chloroform을 넣고 cDNA 유전자 은행을 완성하였다.

4. 염기서열 분석 및 검색

염기서열 분석을 위해 cDNA 유전자 은행에서 Short 등 (1988)의 방법으로 *in vivo* excision 하고 Sambrook 등 (1989)의 방법으로 M13K07 helper phage를 사용해 single stranded DNA (ssDNA)를 분리하였다. 분리한 ssDNA는 United States Biochemical (OH, U.S.A)사에서 제시한 Sanger (1981) 방법으로 수행하였고, 사용한 primer는 SK primer (Stratagene, 5' - TCTAGAACTAGTGGATC - 3')이었다. 분리한 주형 ssDNA와 primer를 이용하여 방사선 동위원소로 labelling한 시료는 8% polyarylamide-urea겔에 전개하였고, 전개가 끝난 겔은 3MM paper로 옮겨 건조시킨 후 X-ray 필름에 감광하여 판독하였다. 얻어진 DNA 염기서열은 DNASIS 컴퓨터 프로그램을 이용하여 입력하고 GenBank 데이터베이스에서 DNA 염기 상동성을 검색하였다.



Fig. 1. Formaldehyde agarose gel electrophoresis of RNAs. Total and poly A⁺ RNAs were isolated from *Bombyx mori* by GTC-GHCL methods. M, RNA marker ; 1, total RNA ; 2, poly A⁺ RNA



Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of cDNA. Blunt end duplex cDNA was obtained from poly A⁺ RNA from *Bombyx mori* by Uni ZAP XR vector kit protocol. M, λ /Hind III- Φ X174/Hae III marker ; 1, blunt end duplex cDNA

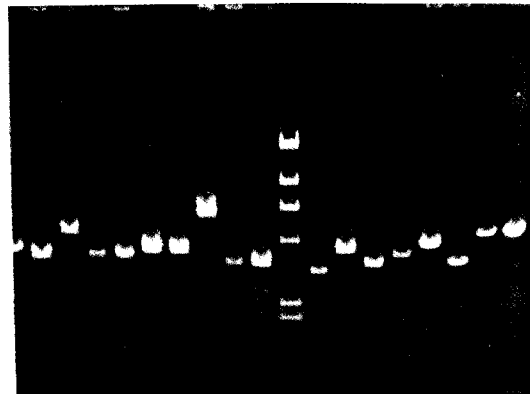


Fig. 3. Restriction endonuclease digestion patterns of the excised plasmid DNAs. Eighteen of the excised plasmids were digested with *EcoRI* and electrophoresed on 0.8% agarose gel. M, λ /Hind III marker ; 1-18, randomly selected *Bombyx mori* clones

Table 1. Characteristics of cDNA libraries from whole body of *Bombyx mori*

Name	Vector	Tissue	Efficiency
λ Bm(Naive)	λ ZAP XR	whole body	1.3×10^6

결과 및 고찰

1. 누에 유충의 poly A⁺ RNA분리와 cDNA 유전자 은행 작성

누에의 cDNA 유전자 은행을 제조하기 위해 액체 질소에 급속 냉동시킨 5령 누에를 마쇄한 후 GTC-GHCl 방법으로 total RNA를 분리하였다. GTC와 GHCl은 RNA 분해효소의 활성을 억제하는 작용을 담당하고 total RNA는 GHCl 용액에 대한 differential solubility에 의해 분리하였다. 그림 1은 1.2% formaldehyde 겔에 total RNA를 전기영동한 것으로서 ribosomal RNA가 다량 존재하였으나 total RNA에서 Oligo (dT)-셀룰로오즈를 이용하여 poly A⁺ RNA를 분리한 결과, ribosomal RNA의 양이 현저히 감소하였고 다양한 크기의 poly A⁺ RNA를 얻을 수 있었다.

순수하게 분리한 poly A⁺ RNA로 부터 Uni-ZAP XR vector kit를 이용하여 cDNA를 합성하였다 (그림 2). Poly A⁺ RNA로 부터 합성한 cDNA는 5'과 3' 말단에 *EcoRI*와 *XhoI* 인식 부위를 각각 부여 하였으며, 이 cDNA를 pBluescript SK phagemid를 포함하는

lamda ZAP II 벡터에 방향성 있게 클로닝하였다. 재조합된 lambda ZAP II DNA를 *in vitro* packaging하여 cDNA 유전자 은행을 제작하였다. 제작한 cDNA 유전자 은행에는 약 1.3×10^6 개의 plaque이 존재하였으며 (표 1), cDNA의 재조합 비율을 알아보기 위하여 이 파아지를 *E. coli* SURE 세포에 감염시킨 후 X-Gal과 IPTG가 첨가된 NZY 배지에서 배양한 결과 98% 이상의 plaque이 cDNA가 도입된 재조합 파아지 plaque으로 확인되었다.

고등생물의 경우 약 10만여 개의 유전자가 있고 이중 약 15%만이 세포 개체들에서 공통적으로 발현되고, 한 세포내에서도 abundant 그룹과 rare 그룹이 존재한다. 초파리의 유전자는 사람의 1/5에 해당하며, 이 비율을 누에에 적용할 때 제작된 cDNA 유전자 은행은 세포내에 적은 양으로 존재하는 poly A⁺ RNA 중을 모두 포함하는 것으로 생각되었다. 제작된 cDNA 유전자 은행에서 벡터내에 삽입된 cDNA 크기를 확인하기 위해서 무작위로 선발한 파아지를 *in vivo* excision 하여 pBluescript SK-로 전환하였다. 환된 플라스미드를 *EcoRI* 제한효소로 절단한 결과

Table 2. Summary of Expressed Sequence Tags (ESTs) of *Bombyx mori*.

Number of ESTs	37 ^a
Database Match	15 ^b
No Database Match	22
Total Reading Bases	7856 bp
Average Reading Bases	212 bp

^{a)} Thirty-seven ESTs were produced from *B.mori* cDNA library ^{b)} Fifteen ESTs sequence showed significant similarities to GenBank database (more than 150 nucleotide in length compared and 60% in match percentage).

Table 3. Expressed Sequence Tags of 37 clones by GenBank database search

Clone	Reading Bases(bp)	Description	Species	Length compared(bp)	Match (%)	Source
Bm13	257	Not identified				
Bm14	257	Not identified				
Bm17	250	Apolipoprotein-III gene	<i>M. sexta</i>	186	68.3	MOTAPOIII
Bm18	278	Catalase gene	<i>D. melanogaster</i>	271	58.3	U00145
Bm19	240	18S rRNA	<i>P. lividus</i>	176	75.6	PL18SRNA
Bm20	251	Mitochondrial cytochrome oxidase	<i>A. mellifera</i>	251	71.3	AMFMTCOX
Bm22	250	Not identified				
Bm24	257	Ribosomal protein gene	<i>D. subobscura</i>	245	70.2	DSRP49G
Bm26	187	Heat shock protein gene	<i>T. cruzi</i>	112	58.9	TCHSPR70
Bm28	240	Not identified				
Bm30	195	Not identified				
Bm31	200	Larval cuticle protein gene	<i>M. sexta</i>	186	59.7	MSLCP14R
Bm33	189	Not identified				
Bm34	227	Not identified				
Bm35	217	Not identified				
Bm36	181	Not identified				
Bm39	225	Not identified				
Bm40	189	Actin 1 gene	<i>B. mori</i>	189	97.9	BMACTAI
Bm41	222	Vacuolar ATPase gene	<i>M. sexta</i>	225	87.6	MSVATP28K
Bm42	235	Not identified				
Bm43	193	Not identified				
Bm44	185	Tropomyosin I gene	<i>D. melanogaster</i>	180	72.2	DROTROI2
Bm45	206	Not identified				
Bm49	262	awd mRNA	<i>D. melanogaster</i>	262	70.2	DMAWDR
Bm50	219	Not identified				
Bm52	188	Not identified				
Bm53	182	Not identified				
Bm54	168	Not identified				
Bm55	163	Not identified				
Bm56	193	LSP gene for hemolymph protein	<i>B. mori</i>	182	84.6	BMOLSP
Bm57	178	Heldup gene	<i>D. melanogaster</i>	144	72.9	DMHELDUP
Bm59	173	Sex specific storage	<i>B. mori</i>	170	97.6	BMSPI
Bm61	181	Ribosomal protein gene	<i>D. melanogaster</i>	173	71.1	DRORPL17A
Bm62	183	Not identified				
Bm63	210	Not identified				
Bm64	211	Not identified				
Bm65	216	Not identified				

* Comparisons with the CD-DATA DNA/Protein Sequence Database (Hitachi) were done by means of the program DNASIS.

평균 약 1kb 정도의 cDNA가 삽입되었음을 확인할 수 있었다 (그림 3).

2. 부분 염기 서열 결정을 통한 발현 유전자 꼬리표 생산

누에 유충의 cDNA 유전자 은행에서 무작위로 *in vivo* excision하여 얻은 박테리아 콜로니로부터 DNA 염기서열 결정을 위해 단쇄 DNA를 분리하였다. 염기서열 분석을 위한 primer는 삽입 cDNA에 가장 근접해 있는 SK primer를 사용하였고 Sanger 방법 (1981)으로 DNA 염기서열을 결정하여 37개 클론에서 발현유전자 꼬리표를 생산할 수 있었다. 클론마다 평균 212 bp의 염기서열을 판독할 수 있었다(표 2).

표 3은 cDNA 염기서열을 GenBank 데이터베이스에서 검색한 자료로서 37개의 발현유전자 꼬리표 중 15개의 cDNA 염기서열은 데이터베이스와의 비교 부위가 150 bp 이상이고 DNA 상동성이 60% 이상으로 기존 데이터와 유의할 만한 상동성을 나타내었다. 또한 22개는 데이터베이스와 비교적 낮은 DNA 상동성을 나타내 새로운 유전자들로 추정할 수 있었다. DNA 상동성 비교에서 비교적 높은 유의성을 나타내는 cDNA 종류로는 우선 유충의 혈림프에서 발견되는 단백질로 함량이 높은 arylphorin 구성 단백질 (Bm17), 암컷 노숙 유충에서 발견되는 난황소 전구체 (Bm59), 최종령 후기에 급격히 증가하는 저장 단백질 (Bm56) 및 열충격 단백질 (Bm26) 등을 합성하는 유전자와 상동성을 나타내는 종류들을 선별할 수 있었다.

Bm40과 Bm44는 actin과 tropomyosin의 유전자와 상동성을 나타내는 종류로 누에의 기동성과 관련된 유전자의 존재를 추정하였고, Bm31은 체벽 형성, Bm20은 미토콘드리아 내막에 있는 전자전달계에서 마지막 단계의 효소인 cytochrome oxidase와 유사한 종류로 추정되었다. Bm18은 곤충의 외분비 샘에서 퀴논생성에 관계하여 반응실의 벽세포에서 분비하는 효소와 유사하며 Bm41은 삼투압 조절 작용에 관련된 cellular pump에 관련된 효소와 유사한 종류로 추정되었다. Bm49와 Bm57은 초파리의 돌연변이에서 나타나는 유전자형으로 누에에서도 이와 유사한 유전자의 존재를 추정할 수 있었다.

특히 15개의 발현 유전자 꼬리표 중 Bm40, Bm56, Bm59 클론들은 이미 누에에서 밝혀진 actin, larval serum protein, sex specific storage protein 유전자와 유사하며, DNA 상동성이 각각 97.9%, 84.6%, 97.6%로 상당히 높게 나타났다. 그러나 상기 3종에 비해 DNA 상동성이 낮은 12개의 클론들은 누에에서 아직

밝혀지지 않은 새로운 유전자로 생각되었다. 따라서 12개 유전자의 정확한 동정은 누에 유전자의 최초 구명 가능성을 내포하고 있다고 생각되며, 15개의 발현 유전자 꼬리표의 확보는 누에의 유전자 지도 작성에 사용되는 표식인자로서의 이용 뿐 아니라 누에의 분자 유전학적 연구에 효과적으로 이용될 것으로 생각된다.

적 요

곤충의 다양한 기능해석을 유전자 수준에서 수행하기 위하여 주요 익충인 누에를 대상으로 유전 자원 확보를 시도하였다. 우선 5령의 누에유충에서 cDNA 유전자 은행을 제작하여 1.3×10^6 개의 cDNA 유전자원을 확보하였다. 누에유충의 cDNA 유전자 은행에서 무작위로 plaques을 선정하였고, 이를 플라스미드로 전환하여 SK primer를 이용한 부분 염기서열을 결정하였다. 결정된 cDNA 클론의 부분 염기서열을 GenBank 데이터베이스에서 검색하여 37개의 발현 유전자 꼬리표를 생산하였다.

이들 중 15개는 데이터베이스와의 비교부위가 150 bp 이상이고 DNA 상동성이 약 60% 이상으로 비교적 높은 DNA 상동 유의성을 나타내는 것으로 혈림프에서 발견되는 수종의 저장 단백질, 곤충의 기동성, 체벽 형성, 효소 및 초파리의 돌연변이 유전자형과 유사한 종류들이었다. 또한 15개의 발현 유전자 꼬리표 중 누에에서 밝혀진 것은 3종이고 그 나머지는 누에에서 처음 밝혀진 것으로 이 클론에 대한 정확한 동정이 요구된다.

인 용 문 헌

- Chirgwin, J. M., A. E. Przybyla, R. J. MacDonald and W. J. Rutter. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18 : 5294-5299.
- Fargnoli, J., N. J. M. Holbrook and A. J. Fornace. 1990. Low Ratio hybridization subtraction. *Anal. Biochem.* 187 : 364-373.
- Höög, C. (1991) Isolation of a large number of novel mammalian genes by a differential cDNA library screening strategy. *Nucleic Acids Res.* 19 : 6123-6127.
- Sambrook, J., E. F. Fritsh and T. Maniatis. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, U. S. A.
- Sanger, F. (1981) Determination of Nucleotide

- Sequences in DNA. Science 214 : 1205-1210.
- Short, J. M., J. M. Fernandez, J. A. Sorge and W. D. Huse. (1988) λ ZAP : A Bacteriophage λ Expression Vector with *in vivo* Excision Properties. Nucleic Acids Res. 16 : 7583-7600.
- Watson, J. D. (1990) The Human Genome Project : Past, Present and Future. Science 248 : 44-49.