

## 누에 배형성기 초기 발현 유전자 개발 연구

최광호\* · 구태원 · 김성렬 · 박승원 · 김성완 · 강석우  
농촌진흥청 국립농업과학원 잠사양봉소재과

### A Study on the Development of an Early Embryonic Gene of the Silkworm, *Bombyx mori*

Kwang-Ho Choi\*, Tae-Won Goo, Seong-Ryul Kim, Seung-Won Park, Sung-Wan Kim, Seok-Woo Kang

Sericultural & Apicultural Materials Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-100, Republic of Korea

(Received April 18, 2012, Accepted October 15, 2012)

#### ABSTRACT

This study was aimed for a development of a useful gene promoter which has a transcript expressional specificity in the early embryonic period of the silkworm, *Bombyx mori*. To select a useful gene expressed in the early embryonic stage, we constructed and analyzed a PCR-base subtraction cDNA library. In subtractive hybridization analysis, we confirmed four clones as differently expressed genes(BmNanos-like, BmNanos-P, BmNanos-O, BmVasa mRNAs). Northern hybridization and real time PCR results reveled that the BmNanos-like gene promoter is suitable for the silkworm transgenic vector system. Further defined studies on molecular functions and biological roles of their promoters will give us well-fined information and its application.

**Key words :** Silkworm, Embryo, Substraction cDNA library

#### 서 론

누에를 이용한 형질전환 연구는 *Trichopusia ni*에서 개발된 전이인자(piggyBac)를 이용한 전이벡터를 제작 배자 발생 초기에 누에알에 주입함으로써 최초로 시도되었다(Tamura et al. 2000, Imamura et al. 2003). 최근에는 이들 누에 형질전환체로부터 collagen 등 인간 유용 재조합단백질을 생산하는 기술에까지 이르게 되었다(Rika et al. 2006, Satoshi et al. 2007). 누에 형질전환체 제작을 위해서는 전이인자를 근간으로 한 목적유전자 운반체의 역할이 무엇보다 중요한데, 높은 수준의 형질전환율과 형질전환체 선발의 효율성이 여기에 기인한다. 또한, 최근에는 선발된 형질전환 누에의 차세대에서 도입된 목적 유전자의 탈락 등 형질전환체의 차세대 영속적인 유전형질의 고정에 관한 문제점이 발생하고 있다(Handler 2001, Satoshi et al. 2007). 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 다양한 기능의 누에 유래 전이인자의 개발, 선발용 마커 유전자 및 transposase 발현을 효율적으로 조절 할 수 있는 프로

모터의 개발 등이 필수적이다.

따라서 본 연구는 누에 형질전환체 개발 시스템 효율 향상을 위한 일환으로서 누에로부터 유용한 유전자 프로모터 개발을 위한 일환으로, 누에 수정난의 배자 발육 초기에 특이적 또는 과발현하는 유전자를 선발하고 그 특성을 분석하고자 한다.

#### 재료 및 방법

##### 1. 공시 재료 및 total RNA 분리

국립농업과학원 잠사양봉소재과에서 인공사료로 사육된 원종 잠124(*Bombyx mori* L.)을 공시재료로 사용하였다. 누에 배자발육 초기 발현 유전자를 선발하기 위한 시료 수집을 위해 산란 직후부터 부화 때 까지 적정 시간별로 100립씩과 각 층대별 시료를 채취하여 total RNA를 분리하였다. 각각의 알 시료는 소형 homogenizer에서, 유충 및 번데기 시료는 액체질소가 담긴 유발에서 마쇄 한 후 Total RNA isolation kit(Qiagen, Valencia, CA)를 사용하여 total

\*Corresponding author. E-mail: ckh@korea.kr

RNA를 순수분리 하였다. 이후 분광광도계로 정량한 후 실험 때까지 -80°C에 보관하였다.

## 2. Subtraction cDNA 유전자은행 제작

산란 2~3시간 경과한 알(Tester)과 산란 21~30시간 경과한 알(Driver)에서 추출된 mRNA로부터 PCR-select™ cDNA Subtraction kit(Clontech, Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 subtraction cDNA 유전자은행을 제작하였다. 우선, 동량의 Tester 및 Driver mRNA(1 µg)로부터 각각의 double strand cDNA를 합성한 후 제한효소 *Rsa* I로 처리하였다. *Rsa* I 처리된 Tester cDNA는 동량의 두 개 그룹으로 나눈 후 각각 adaptor 1과 adaptor 2를 부착시켰다. 1차 subtraction hybridization은 제한효소 *Rsa* I가 처리된 Driver cDNA를 adaptor 1 및 adaptor 2가 부착된 각각의 Tester cDNA 시료와 동량 혼합하고 95°C, 2분간 변성, 68°C, 8시간 신장 시킴으로서 반응을 종료하였다. 계속해서, 1차 hybridization 반응 산물인 두 개의 Tester cDNA를 즉시 혼합, 68°C, 20 시간 동안 2차 hybridization 반응을 유도하였다. 1차 및 2차 hybridization(normalization)을 통해 구축된 배자발생 초기 발현 cDNA 유전자 pool은 각 유전자의 양편에 서로 다른 adaptors가 부착된 것으로서 adaptors 특이 서열 프라이머를 이용하여 1차 PCR(94°C 30초, 66°C 30초, 72°C 90초; 27 cycles) 및 2차 PCR(94°C 30초, 68°C 30초, 72°C 90초; 12 cycles) 후의 순수 정제한 PCR 산물중 200 bp 이상을 순수분리, pGEM-T easy Vector(Promega)에 클로닝 함으로써 subtracted cDNA 유전자은행을 제작하였다.

## 3. Subtractive hybridization

제작된 subtracted cDNA 유전자은행으로부터 1,600여개 클론을 무작위 선발, ampicillin이 첨가된 LB 액상배지 (1 ml)에서 37°C, 12시간 진탕배양한 후 Plasmid miniprep kit(Dyne Bio Inc, Korea)을 사용하여 플라스미드 DNA를 순수 분리하였다. 분리된 플라스미드 DNA는 100°C, 5분간 변성시킨 후 두 장의 나일론 막에 각각 동량(500 ng)을 점적하였다. 차별화선별을 위한 탐침으로는 subtraction cDNA 유전자은행 제작에서의 1차 PCR 산물을 사용하였는데, forward probe(subtracted tester cDNA)와 reverse probe(subtracted driver cDNA)를 각각 제작하여 사용하였다. 탐침제조는 1.5 ml 튜브에 준비된 각각의 subtracted cDNA(100 ng)로부터 Prime-It II random Primer Labeling kit(Stratagene)을 사용하여 방사성동위원소 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dATP (3,000 Ci/mmol)로 표지 후, dot hybridization 분석에 사용하였다. Dot hybridization은 방사선동위원소가 표지된 각각의 subtracted cDNA가 포함된 hybridization 용액 (20% × SSC, 5 × Denhardt's solution, 0.5% SDS, 50 mg/ml

denatured salmon sperm DNA)에서 65°C, 16시간 반응시켰다. 이후 나일론 막은 3회의 세척과정을 거친 후 X-ray film(Kodak)으로 감광하였다.

## 4. Northern hybridization

선발된 누에 배자 초기 발현 주요 유전자의 누에 알 및 발육 시기별 발현 특성 분석을 위해 Northern hybridization 분석을 실시하였다. 알, 유충 및 번데기에서 정제된 각각의 total RNA는 분광광도계를 이용하여 정량하고 각각 2 µg씩 1% formamide agarose gel에 전기영동한 후 10 × SSC buffer에서 6시간 동안 나일론 막에 부착시켰다. 탐침 제작은 순수 정제한 선발 클론(100 ng)을 100°C에서 5분간 변성시킨 후 Primer-It II Random Primer labelling Kit(Stratagene)을 사용하여 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dATP로 표지한 후 혼성화용액(20 × SSC, 10% SDS, 100 × Denhardt's solution)에서 65°C, 16시간 혼성화하였다. 반응된 나일론 막은 2 × SSC와 0.1% SDS로 상온에서 15분간, 0.1 × SSC와 0.1% SDS로 65°C에서 10분간 세척한 후 X-ray 필름에 감광하였다.

## 5. Relative quantitative PCR

산란한 누에의 배자, 유충 및 번데기의 각 시기별 추출된 total RNA로부터 High capacity cDNA Archive kit(Applied Biosystems Co.)을 이용하여 single-strand cDNA를 합성하였다. 발현 전사체 상대정량 분석은 선발 유전자의 특이 서열 프라이머 $\delta$ V과 SYBR Premex Ex Taq(TaKaRa)을 사용하여 ABI PRISM 7300 real-time PCR System(ABI Co.)에서 relative quantitative real time PCR 방법으로 실시하였다. 전사체 발현량 보정을 위한 endogenous control gene으로는 18S rRNA Kit (ABI Co.)를 사용하였다.

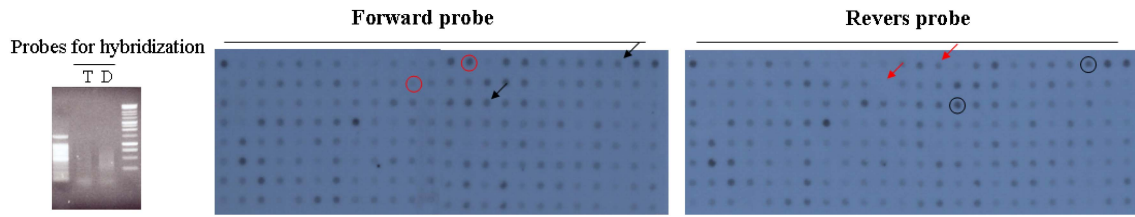
## 6. 염기서열분석 및 정보분석

선발된 차별화발현 클론은 자동염기서열 분석 장치 CEQ 8000 Genetic Analysis System(Beckman caulter, USA)를 사용하여 제조회사의 방법에 준하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열 분석 후 유전자 정보 분석은 BLAST alignments를 통하여 상동성 분석 후 선발 유전자 정보 및 GenBank accession number를 수록하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 배자 초기 특이발현 유전자 선발

누에 배자 초기 특이발현 유전자 선발은 subtraction cDNA 유전자은행을 제작한 후 유전자 차별화 선별(subtraction differential display hybridization)을 사용하였다. Subtraction cDNA 유전자은행 제작은 산란 후 2~3시간 경과한 알의



**Fig. 1.** Differential display dot blots hybridization. T, subtracted tester cDNA for the forward probe; D, subtracted driver cDNA for the tester probe. Red and black arrows indicate differently expressed clones by the forward and reverse probes, respectively.

**Table 1.** Summary of the differently expressed clones by differential display hybridization

No. of total clones tested	No. of differently expressed clones	
	Up-regulated clones in forward probe (2 ~ 3 hrs)	Up-regulated clones in reverse probe (21 ~ 30 hrs)
1,653	4	24

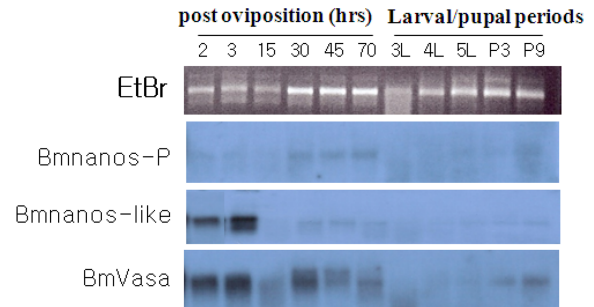
발현 전사체를 Tester로, 산란 후 21~30시간 경과한 알의 전사체를 Driver로 하여 각각 200 bp 이상의 크기로 증폭되는 PCR 산물만을 pGEM-T vector(Promega)에 클로닝하여 subtraction 유전자은행을 제작하였다. 제작된 subtraction 유전자은행으로부터 1,653개 클론을 무작위 추출하여 플라스미드를 순수 분리, 정량한 후 두 장의 나일론 막에 각각 점적(500 ng)하여 차별화 선별을 실시하였다. 탐침 제작은 동일한 양의 subtracted Tester cDNA (forward probe)와 subtracted Driver cDNA(reverse probe)로 각각 제작하였다(Fig. 1).

차별화 선별 결과, 누에 배자 발육시기별 분석된 1,653개 클론 중 28개의 차별화 발현 클론이 최종 확인되었으며, 배자 발생 초기에 특이적으로 발현하는 클론은 모두 4종이 확인되었다. 반대로 배자 발생 경과 21시간 이후에 특이 발현되는 클론은 모두 24종이 선별되었다(Table 1). 선별된 4종 클론의 염기서열 정보 분석 결과, BmNanos protein mRNA, BmNanos-P protein mRNA, BmNanos-O protein mRNA 및 BmVasa protein mRNA와 상당히 높은 수준의 상동성을 보였으며, 이들 유전자 정보는 국제유전자은행에 등록하였다(GenBank accession No. FJ011704 ~ FJ011707).

## 2. 배자 초기발현 선별 유전자 발현특성 분석

누에 배자발생 초기에 특이적으로 발현되는 유전자 즉, forward probe에 대하여 과발현 특성을 갖는 4종 유전자의 누에 발육시기별 발현 특성 분석을 위해 Northern hybridization 및 relative quantitative PCR 분석을 실시하였다.

Northern blot hybridization 분석 결과, BmNanos-O 및 BmVasa-like 유전자의 발현양상은 전반적으로 뚜렷한 발현 시기의 차별화를 확인할 수 없었으나, BmNanos-like의



**Fig. 2.** Northern blot hybridization analysis.

경우는 배자발생 초기(산란 후 2~3시간 경과)에서 집중적인 전사체 발현이 확인되었으며 이후로는 발현되지 않는 양상을 보였다(Fig. 2). 따라서, BmVasa-like 유전자 프로모터는 누에 배자 발생 초기에 transposase 발현을 조절하기 위한 목적으로 형질전환용 전이벡터에 활용이 가능할 것으로 사료된다. Fig. 3은 배자 초기발현 유전자를 대상으로 real time PCR방법으로 누에 배자, 유충기, 번데기 및 성충의 시기별 전사체 발현량을 상대정량한 결과이다. Real time PCR을 위한 주형DNA로서 시간별 배자 14종, 유충 시기별 7종, 번데기 시기 3종 및 우화성충의 total RNA를 사용하여 single-strand cDNA를 합성하여 주형으로 사용하였다. PCR 후 전사체 발현량 보정을 위해 18S rRNA 발현량도 함께 조사하였다. Real time PCR 결과는 Northern hybridization 결과와 매우 유사한 결과를 확인할 수 있었다. 특히, BmNanos-like 유전자는 배자 발생 초기 상당히 높은 발현 수준을 보였는데, 이는 BmNanos-O 유전자의 10배, BmVasa-like 유전자의 20배, 그리고 BmNanos-P 유전자 대비 150배 이상의 전사체 발현 수준을 보였다.

지금까지의 누에 형질전환체 제작 기술은 일본을 중심으로 집중되어 있으며, 개발된 누에 형질전환 기술의 효율은 초파리 형질전환 시스템에 비해 상당히 저조하다. 특히, 누에 형질전환체를 통한 유용 단백질을 대량 생산할 수 있는 누에 자체의 프로모터 또한 매우 제한적으로 개발되어 있는 실정이다(White et al. 1996, Guo et al. 2005, Tomita 2011). 따라서 효과적인 누에 형질전환 기술 개발을 위해서는 누에 유래 다양한 전이인자의 개발

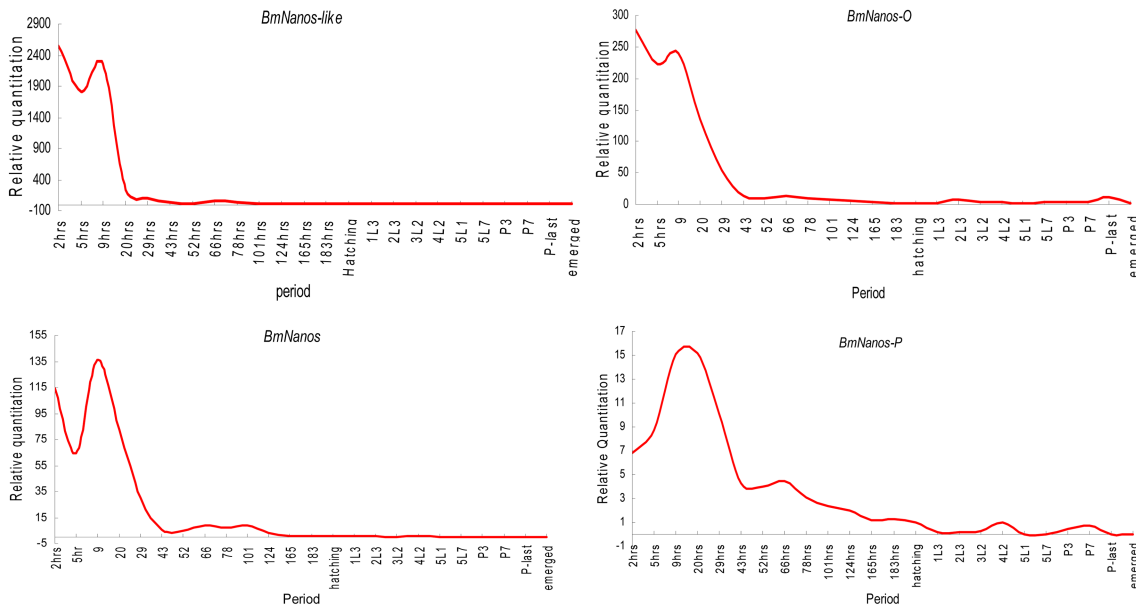


Fig. 3. Relative quantitative analysis. BmA3(*Bombyx mori* actin3) gene was used as control.

과 함께 형질전환 기술의 효율성 제고를 위한 다양한 기능의 누에 유래 유전자 프로모터 및 형질전환체 선발용 마커 유전자 개발 등이 절실하다. 본 연구에서 선발된 4종의 누에 배자 초기발현 유전자는 향후 프로모터 개발 및 분자생물학적 특성 구명 등의 추가적 연구를 통해 효율적인 누에 형질전환 시스템 개발에 기여할 것으로 기대된다.

### 적 요

본 연구는 누에 배자 발생 초기 특이 발현 유전자 프로모터를 개발하기 위한 연구의 일환으로 추진하였다. 누에 초기 및 후기 배자로 부터 분리한 mRNA를 사용하여 subtractive hybridization 분석법으로 누에 배자 발생 초기 특이 발현 유전자 4종을 선발할 수 있었다. 선발된 4종 유전자는 각각 BmNanos protein mRNA, BmNanos-P protein mRNA, BmNanos-O protein mRNA 및 BmVasa protein mRNA 유전자와 매우 높은 상동성을 보였다. 또한, 본 연구에서는 Northern hybridization 분석 및 real time PCR 분석을 통하여 배자 초기에 특이적으로 고발현하는 BmNanos-like 등 4개 선발 유전자의 발현 특성을 확인하였다. 이러한 결과는 추후 추진 할 누에 형질전환용 전이벡터의 효율성 제고를 위한 연구에 활용될 것으로 기대된다.

### 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 농업공동연구사업(No. PJ009044042012)의 지원에 의해 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

### 인용문헌

Guo TQ, Wang JY, Guo XT, Wang SP, Lu CD (2005) Transient in vivo gene delivery to the silkworm *Bombyx mori* by EGT-null recombinant AcNPV using EGFP as a reporter. *Arch. Virol* **150**, 93~105.

Handler AM (2001) A current perspective on insect gene transformation. *Insect Biochem Mol Biol.* **31**, 111~128.

Imamura M, Nakai J, Inoue S, Guo XQ, Kanda T, Tamura T (2003) Target gene Expression using the GAL4/UAS system in the silkworm *Bombyx mori*. *Genetics* **165**, 1329~1340.

Rika H, Tomita M, Yoshzato K (2006) The generation of germline transgenic silkworms for the production of biologically active recombinant fusion proteins of fibroin and human basic fibroblast growth factor. *Biomaterials* **27**, 5715~5724.

Satoshi Y, Zhu Z, Iaso K, Uchino K, Tamada Y, Tamura T, Asakura T (2007) Improving cell-adhesive properties of recombinant *Bombyx mori* silk by incorporation of collagen or fibronectin derived peptides produced by transgenic silkworms. *Biomacromolecules* **8**, 3487~3492.

Tamura T, Thibert T, Royer C, Kanda T, Eappen A, Kamba M, Komoto N, Thomas JL, Mauchamp B, Chavancy G, Shirik P, Fraser M, Prudhomme JC, Couble P (2000). A *piggyBac* element-derived vector efficiently promotes germ-line transformation in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Nat Biotechnol* **18**, 81~84.

Tomita M (2011) Transgenic silkworms that weave recombinant proteins into silk cocoons. *Biotechnol Lett* **33**, 645~654.

White LD, Coares CJ, Atkinson PW, O'Brochta DA (1996) An eye color gene for the detection of transgenic non-drosophilid insects. *Insect Biochem Mol Biol* **26**, 641~644.