

담배가루이(*Bemisia tabaci*, Aleyrodidae, Hemiptera)에서 Virus-induced Gene Silencing (VIGS) Vector를 이용하기 위한 cDNA Library 제작

고나연 · 임현섭 · 유용만 · 윤영남*

충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

Construction of cDNA Library for Using Virus-induced Gene Silencing (VIGS) Vector with the Sweetpotato Whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae)

Na Yeon Ko, Hyoun Sub Lim, Yong Man Yu and Young Nam Youn*

Department of Applied Biology, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

ABSTRACT: The sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, is the major insect pest that transmitted over 100 plant viruses including tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) of tomato plant as virus vector in the world. In this study, cDNA library of whitefly was constructed using Gateway system for selecting target gene in order to control of *B. tabaci* using virus-induced gene silencing (VIGS) vector with RNAi. First of all, when using oligo d(T) primer, the calculated titer of cDNA library was confirmed with 1.4×10^4 clones and average insert sizes was confirmed with 1 kb. However, insert size was very big for construction of cDNA. Otherwise, when using attB-N25 random primer and sonication for 6 sec, the calculated titer of cDNA library was confirmed with 1.04×10^5 clones. But mostly insert band wasn't identified on the electrophoresis, because it seemed that insert size is too small (≤ 100 bp), also the size of identified insert was somewhat big. Finally, when using oligo d(T) primer and sonication for 1 sec, cDNA insert of whitefly was appropriated for VIGS with 300-600 bp. However, cDNA sequence included a poly A and titer was very low to 5.2×10^2 clones. It was supposed that heat shock transformation was used instead of electro-transformation. It is considered that when constructing cDNA library for using VIGS vector, (1) random primer should be used for First strand cDNA synthesis in order to remove poly A and (2) sonication for 1 sec should be performed in order to get appropriated insert size and (3) electro-transformation should be performed in order to improve transformation efficiency.

Key words: *Bemisia tabaci*, cDNA library, RNAi, Gateway cloning

초 록: 담배가루이(*Bemisia tabaci*)는 외래해충으로 바이러스벡터로 작용하여, 토마토의 토마토허황하잎말림병바이러스(TYLCV)를 비롯한 약 100여종의 바이러스를 매개하는 중요한 해충이다. 본 연구에서는 VIGS vector를 이용하여 담배가루이 방제를 위한 target 유전자들을 선별하기 위해 gateway system을 이용한 담배가루이 cDNA library 제작을 시도하였다. 첫 번째 방법으로 oligo d(T) primer를 사용하였을 때, 평균 약 1 kb의 insert와 1.4×10^4 cfu의 titer를 확인하였다. 그러나 insert size가 너무 커서 적절하지 않았다. 두 번째 방법으로 attB-N25 random primer를 이용하고, sonication을 6초 실시하여 다시 진행하였다. 그러나 확인되는 insert size는 다소 컸고, 몇몇은 insert가 너무 작아서 밴드가 확인 되지 않았으며, 1.04×10^5 cfu의 titer를 확인할 수 있었다. 세 번째 방법으로는 oligo d(T) primer를 이용하였고, sonication을 2초 실시하였다. 그 결과 300 bp~600 bp size의 insert가 확인되었으나, electro transformation을 사용한 첫번째, 두번째 방법에 비해 heat shock transformation을 사용하여 titer가 5.2×10^2 cfu로 매우 낮은 것을 확인 할 수 있었다. 결과적으로 cDNA library를 만들 때 먼저 random primer를 사용하여 First strand를 합성하여 poly A를 제거하고, 다음으로 sonication을 1초 실시하여 300~700 bp정도의 적절한 size의 insert를 생성하고, 마지막으로 electro-transformation을 실시하여 transformation 효율을 높인다면 VIGS vector에 적합한 cDNA library를 만들 수 있을 것으로 사료된다.

검색어: 담배가루이, cDNA library, RNAi, Gateway cloning

*Corresponding author: youngnam@cnu.ac.kr

Received January 29 2015; Revised April 20 2015

Accepted May 6 2015

담배가루이(*Bemisia tabaci*)는 노린재목(Hemiptera) 가루이과(Aleyrodidae)에 속하며, 세계자연보전연맹에서 지정한 세계 100대 침입해충 중 하나이다(Boykin et al., 2007). 담배가루이는 직접적인 흡즙 피해와 감로배설로 인해 그을음병을 유발하여 시설재배 작물의 수량과 상품성에 큰 영향을 미치는 주요한 해충으로 알려져 있다(Byrne, 1999; Bedford et al., 1994). 뿐만 아니라 담배가루이는 500종 이상의 넓은 기주범위를 가지고 있으며, 100종 이상의 바이러스를 매개하는 것으로 알려져 있어 각별한 주의가 필요하다(Secker et al., 1998; Jones, 2003).

최근 RNAi (RNA interference)는 농업해충 방제를 위한 대안적 전략으로 여겨지고 있다(Huvenne and Smagghe, 2010; Price and Gatehouse, 2008; Baum et al., 2007). RNAi에 의한 gene silencing은 세포 내로 유입된 dsRNA (double-stranded RNA)가 RNaseIII 활성을 갖는 Dicer라는 효소에 의해 siRNA (21~25 nt)로 잘리고, 이 siRNA는 RISC (RNA induced silencing complex)와 결합 후 상동성의 mRNA에 결합 함으로써 mRNA 발현을 억제시키는 과정을 말하며, 식물에서는 PGTS (post-transcriptional gene silencing)와 비슷한 현상이다(Sijen et al., 2001; Liu et al., 2002; Hahn, 2010).

곤충 유전자는 dsRNA의 직접적인 injection이나 dsRNA를 인공먹이에 섞은 뒤 인공먹이를 곤충에게 섭식시키는 방법으로 유전자 발현량의 감소를 확인할 수 있지만(Bettencourt et al., 2002; Whyard et al., 2009; Luo et al., 2013; Christiaens et al., 2014; Sapountzis et al., 2014; Walshe et al., 2009), 이러한 dsRNA의 전달 방법은 야외포장에서 RNAi 기술을 이용하여 해충을 방제하기에는 어려움이 있어 야외포장에서 RNAi 기술을 사용하기 위해서는 dsRNA의 효과적인 전달방법의 모색이 필요하다.

식물바이러스가 기주세포에 감염되었을 때, 식물은 바이러스 genome을 타겟으로 RNA를 기반으로 하는 방어를 활성화시킨다. VIGS (virus-induced gene silencing)는 이러한 RNA가 매개하는 항 바이러스성 방어기작을 이용하는 기술이다(Lu et al., 2003). VIGS 벡터를 사용하면, 벡터 안에 있는 target 유전자의 mRNA 조각이 발현됨으로써 target mRNA의 knock out이 가능하다. 식물 RNA 바이러스가 복제되면서 만들어지는 dsRNA는 전사 후 유전자 침묵(post transcriptional gene silencing (PTGS))을 유도하게 된다(Baulcombe, 2004). 이러한 VIGS vector에 흡즙형 곤충의 유전자를 cloning하여 식물에 접종하게 되면 virus 복제 과정에서 곤충유전자의 dsRNA가 생성이 되고, 이를 타겟 흡즙형 곤충이 식물을 흡즙할 때 dsRNA를 같이 섭식하여 곤충체내에서 RNAi를 유도할 수 있다.

담배가루이에서도 많은 RNAi 연구가 진행되었다. Chickadee

유전자를 가지고 injection을 통해 실제로 chickadee유전자의 발현량이 감소하는 것을 확인하였으며(Ghanim et al., 2007), 인공먹이에 V-ATPase dsRNA를 섞어 섭식시킴으로써 유전자 발현량의 감소를 확인하였고(Upadhyay et al., 2011), heat shock protein dsRNA를 인공먹이에 섞어 섭식시킴으로써 RNAi를 통해 담배가루이에서 heat shock protein 유전자의 역할을 확인하였다(Lü and Wan, 2011). 이러한 이전 연구들로 담배가루이에서 dsRNA의 injection과 섭식을 통해 RNAi가 가능하다는 것이 입증되었으며, 담배가루이 방제를 위한 RNAi도 시도하고 있다. 그러나 담배가루이의 유전자 구성이 아직 잘 알려지지 않았으며, 오직 담배가루이의 발달 단계에서 몇몇의 EST서열만이 보고되어져 있어(Leshkowitz et al., 2006), RNAi 방제를 위한 target 유전자를 선발하는데 어려움이 있다.

본 연구에서는 VIGS 벡터를 사용하여 담배가루이 RNAi 방제를 위한 target 유전자를 선발하기 위해 방법을 조금씩 수정해 가며 VIGS vector에 적절한 담배가루이 cDNA library를 제작을 시도하였다.

재료 및 방법

실험 곤충 사육 및 채집

담배가루이(*Bemisia tabaci*)의 사육은 곤충사육실에서 25±1℃, 16L:8D, 상대습도 50~60%의 조건으로 아크릴케이지(30×30×50 cm)에서 토마토(서광)를 기주식물로 하여 계대사육하였다. 계대사육중인 담배가루이가 많이 증식하면 흡즙기를 이용하여 담배가루이를 채집하여 total RNA를 뽑을 때까지 -80℃에 보관하였다.

Total RNA 추출 및 mRNA 분리

Trizol reagent(MRC)를 사용하여 담배가루이 total RNA를 추출한 후, 이 total RNA로부터 FastTrack[®] MAG mRNA isolation Kit (Invitrogen)를 사용하여 mRNA를 분리하였다.

cDNA library 제작

cDNA library 제작은 Super Script[®] Full length cDNA Library Construction Kit II protocol (Invitrogen)을 기본으로 방법을 조금씩 수정하여 실험을 실시하였다.

Oligo d(T) primer를 이용한 cDNA library 제작

정제한 mRNA를 Biotin-attB2-oligo d(T) primer를 사용하여 first strand cDNA를 합성하였다(Table 1). 불순물을 제거하기 위해 Ethanol down 후 RNase I 을 처리하여 cDNA를 제외한 주형 RNA를 제거해 주었다. 다시 Ethanol down 후 attB1-adapter-U와 attB1-adapter-L를 annealing시켜 주문 제작한 double-strand 5'attB1 adapter을 T4 DNA ligase를 사용하여 ligation 시켰다(Table 1). Kit를 사용하여 cDNA purification을 실시한 후, LA Taq™ DNA polymerase (Takara)와 attB1-adapter-U primer를 사용하여 second strand를 합성하였다(Table 1). 이렇게 합성된 second strand cDNA는 cDNA Size fraction column을 이용하여 size fraction을 실시 하였다. cDNA의 크기에 따라 총 5개의 fraction으로 분리한 cDNA를 각각 1.5 ml tube에 넣어 ethanol down을 실시한 후, 이중 4번과 5번 fraction을 각각 pDONR™222 vector (Invitrogen)의 att P1, P2 site를 attB1, B2 site를 갖는 담배가루이 cDNA 단편으로 교체하는 BP recombination을 실시하였다. Electro MAX™ DH10B™ T1 Phage Resistant Cells (Invitrogen)를 사용하여 1.8 kV, 200 Ω, 25 μF의 조건으로 electro-transformation을 실시하였다. Transformation된 sample에 SOC 배지(2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose)를 1 ml 추가한 뒤 37°C에서 1시간 shaking incubate 후 cDNA library를 10⁴까지 연속희석 하여 kanamycin (1 μg/ml)을 포함한 LB plate배지 100 μL씩 도말하여 37°C에서 overnight하였다. Overnight 후 colony를 카운팅하여 titer를 측정하였으며, fraction 별 랜덤하게 12개의 plasmid를 isolation 후 제한효소 BsrG I (NEB)을 처리하여 cutting한 뒤 전기영동을 통해 담배가루이 cDNA library insert 크기를 확인 하였다.

N25 random primer와 6초 sonication방법을 이용한 cDNA library 제작

300~700 bp의 cDNA insert를 만들기 위해 정제한mRNA를 Vcx 750 watt ultrasonic processor (SONICS & MATERIALS)를 사용하여 sonication을 6초동안 실시하였다. 잘려진 mRNA 단편을 Biotin-attB2-N₍₂₅₎ primer를 사용하여 first strand cDNA를 합성하였다(Table 1). First strand cDNA를 RNase I 을 처리하여 cDNA를 제외한 주형 RNA를 제거해 주었다. 다시 Ethanol down 후 double-strand 5'attB1 adapter을 T4 DNA ligase를 사용하여 ligation 시켰다(Table 1). Kit를 사용하여 cDNA purification을 실시한 후, LA Taq™ DNA polymerase (Takara)와 attB1-

Table 1. Primers list used in this study

clone	5'-Oligo	5'-Oligo sequence	3'-Oligo	3'-Oligo sequence
Using primers in cDNA library construction				
First_strand synthesis			Biotin-attB2-Oligo d(T)	Biotin-GGG GAC AAC TTT GTA CAA GAA AGT TGG G(T) ₂₂ VN
			Biotin-attB2-(N) ₂₅	Biotin-GGG GAC AAC TTT GTA CAA GAA AGT TGG G(N) ₂₅
AttB1_adapter ligation (double-strand)	attB1-adapter-U	TCG TCG GGG ACA ACT TTG TAC AAA AAA GTT GG		
	attB1-adapter-L	pCCA ACT TTT TTG TAC AAA GTT GTC CCC		
attB-flanked DNA	attB1-adapter-U	TCG TCG GGG ACA ACT TTG TAC AAA AAA GTT GG	Biotin-attB2-Oligo d(T)	Biotin-GGG GAC AAC TTT GTA CAA GAA AGT TGG G(T) ₂₂ VN
Using primers in BP recombination assay				
Whitefly cDNA	pDONR 207 F	TCG CGT TAA CGC TAG CAT GGA TCT C		pDONR 207 R GTA ACA TCA GAG ATT TTG AGA CAC

adapter-U primer를 사용하여 second strand를 합성하였다 (Table 1). 이렇게 합성된 second strand cDNA는 cDNA Size fraction column을 이용하여 size fraction을 실시하였다. 총 9개의 1.5 ml tube에 나눠 받은 cDNA를 ethanol down 후 농도가 잘 나온 5번과 9번 fraction tube를 각각 pDONR™222 Vector (Invitrogen)와 BP recombination을 실시하였다. Electro MAX™ DH10B™ T1 Phage Resistant Cells (Invitrogen)를 사용하여 1.8 kV, 200 Ω, 25 μF의 조건으로 electro-transformation을 실시하였다. Transformation된 sample에 S.O.C 배지를 1 ml 추가한 뒤 37°C에서 1시간 shaking incubate 후 cDNA library를 10⁻⁴까지 연속 희석 하여 kanamycin (1 μg/ml)을 포함한 LB plate 배지 100 μL씩 도말하여 37°C에서 overnight 하였다. Overnight 후 colony를 카운팅하여 titer를 측정하였으며, fraction 별 랜덤하게 12개의 plasmid를 isolation한 뒤 제한효소 *Bsr*G I (NEB)을 처리하여 cutting 후 전기영동을 통해 담배가루이 cDNA library insert 크기를 확인하였다.

Oligo d(T) primer와 2초 sonication 방법을 이용한 cDNA library 제작

정제한 mRNA를 Biotin-attB2-oligo d(T) primer를 사용하여 first strand cDNA를 합성한 뒤 (Table 1), RNase I 을 처리하여 cDNA를 제외한 주형 RNA를 제거해 주었다. 400~500 bp의 cDNA insert를 만들기 위해 first strand cDNA를 Vcx 750 Watt ultrasonic processor (SONICS & MATERIALS)를 사용하여 sonication을 2초동안 실시하였다. 잘려진 single strand cDNA 단편을 다시 ethanol down 후 double-strand 5'attB1 adapter을 T4 DNA ligase를 사용하여 ligation시켰다 (Table 1). Kit를 사용하여 cDNA purification을 실시한 후, *LA* Taq™ DNA polymerase (Takara)와 attB1-adapter-U를 사용하여 second strand를 합성하였다 (Table 1). 양쪽에 att site를 가지는 cDNA만을 증폭하기 위해 att adapter sequence를 가지는 Biotin-attB2-oligo d(T) primer와 attB1-adapter-U primer를 사용하여 PCR 증폭을 실시하였다. PCR 증폭은 initial denaturation 94°C에서 5분간 실시하고, denaturation 94°C에서 45초, annealing 58°C에서 45초, extension 72°C에서 1분으로 20cycles을 실시한 후, 마지막으로 extension을 72°C에서 5분간 실시하였다. PCR 결과는 agarose gel에서 전기영동을 통해 분석하였다. PCR product는 ethanol down 후 pDONR™207 Vector (Invitrogen)와 BP recombination을 실시하였다. One shot® Top10 chemically competent cell (Invitrogen)를 사용하여 42°C에서 45초 incubate 후 ice에 2min incubate하여 heat shock transformation을 실시

하였다. Transformation된 sample에 S.O.C 배지를 1 ml 추가한 뒤 37°C에서 1시간 shaking incubate 후 cDNA library를 10⁻⁴까지 연속 희석 하여 gentamicin (1 μg/ml)을 포함한 LB plate배지 100 μL씩 도말하여 37°C에서 overnight 하였다. Overnight 후 colony를 카운팅하여 titer를 측정하였으며, 랜덤하게 10개의 plasmid를 isolation한 뒤 pDONR 207 F와 pDONR 207 R로 PCR을 실시하여 전기영동을 통해 담배가루이 cDNA library insert 크기를 확인 한 후 적절한 크기의 insert는 sequencing (Macrogen)을 의뢰하여 sequence를 확인하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 이전의 제한효소를 이용한 cloning방법을 사용한 cDNA library 제작이 아닌(Leshkowitz et al., 2006), 박테리오파지 λ의 site-specific homologous DNA 재조합 방식을 응용한 gateway cloning방법을 이용하여 cDNA library를 제작하였다. 이러한 방법은 담배가루이의 다양한 cDNA를 한번에 간단하게 cloning할 수 있어 cDNA library를 제작하기에 적절하다. 뿐만 아니라 att site를 가지는 entry clone에 있는 이 담배가루이 유전자는 att site를 가지는 Destination 벡터라면 어떤 종류의 벡터든 간단하게 cloning이 가능하여 유용하게 사용될 수 있다.

본 연구에서는 VIGS 벡터를 사용하여 담배가루이 RNAi 방제를 위한 target 유전자를 선별하기 위해 방법을 조금씩 수정해가며 VIGS vector에 적절한 담배가루이 cDNA library 제작을 시도하였다.

첫 번째 방법으로, oligo d(T) primer를 사용하였으며, gateway cloning이 가능하도록 att sequence를 붙여 Biotin-attB2-oligo d(T) primer를 제작하여 first strand를 합성하였다. Size fractionating을 5번 실시 하였으며, 그 중 농도가 좋았던 4번, 5번 fraction tube를 BP recombination을 실시하였다. 그 결과, pDONR 222 vector 부분은 약 2.47 kb에서 밴드가 확인이 되며, BP reaction이 잘 이루어지지 않은 *ccdB*와 chloramphenicol 저항성 유전자를 그대로 가지는 background vector의 경우 *Bsr*G I 을 처리할 경우 1.5 kb와 800 bp에서 밴드 2개가 확인이 되는 데 24개의 밴드 중 2개의 sample에서 background vector가 확인되었다 (Fig. 1). 멀티 밴드가 뜨는 것은 담배가루이 insert내에 *Bsr*G I 영역이 존재하여 뜨는 것으로 추측된다. Background vector를 제외한 나머지 sample의 insert size는 평균 1 kb로 확인 되었으며, 1 kb를 넘는 큰 size의 insert도 많이 확인되었다 (Fig. 1). 또한 titer 측정 결과, 1.4×10⁴ cfu의 titer를 확인할 수 있었다 (Table 2).

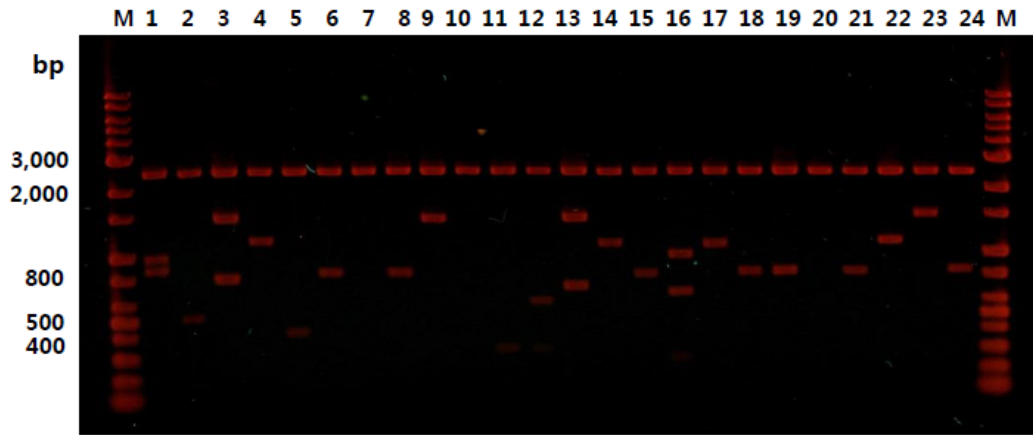


Fig. 1. An electrophoresis of cDNA library construction insert size according to the method 3-1. pDONRTM222 was identified at the point of about 2.47 kb. Plasmids from 24 randomly selected colonies were analyzed on agarose gel for insert size <M: 1 kb Ladder marker; Lane 1~12: fraction 5 whitefly cDNA sample; Lane 13~24: fraction 4 whitefly cDNA sample>.

Table 2. Titer of whitefly cDNA library according to different methods

	Primer for First strand synthesis	Sonication (sec)	Transformation method	Total CFUs (cfu)	Insert size
3-1 method	Oligo d(T) primer	-	Electro-transformation	1.4×10^4	300~2150 bp
3-2 method	N25 random primer	6	Electro-transformation	1.04×10^5	Mostly small (≤ 100)
3-3 method	Oligo d(T) primer	2	Heat shock	5.2×10^2	300~600 bp

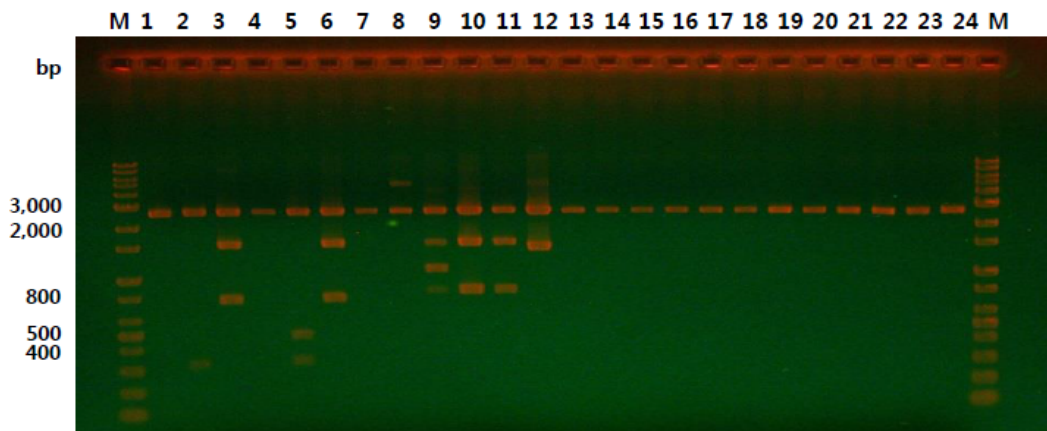


Fig. 2. An electrophoresis of cDNA library construction insert size according to the method 3-2. pDONRTM222 was identified at the point of about 2.47 kb. Plasmids from 24 randomly selected colonies were analyzed on agarose gel for insert size. Fraction 9 wasn't identified any band <M: 1 kb Ladder marker; Lane 1~12: fraction 5 whitefly cDNA sample; Lane 13~24: fraction 9 whitefly cDNA sample>.

두 번째 방법으로, 작은 size의 insert를 만들고자 sonication을 6초동안 실시하여 mRNA 잘라주었다. 그리고 좀 더 다양한 cDNA를 합성하기 위해 N25 random primer에 att sequence를 추가하여 Biotin-attB2-(N)₂₅ primer를 제작하여 first strand를 합성한 후 9번의 size fractionating을 실시한 뒤 농도가 높은 5번과 9번 fraction product를 사용하여 BP recombination을 실시하였다. 그 결과, 총 24개의 밴드 중 8개의 밴드가 확인되었

으며, background vector는 4개의 sample에서 확인이 되었다. Background vector를 제외한 나머지 sample에서 평균 insert size가 1.54 kb로 확인되었고, fraction 9번의 경우 12개 sample 모두 insert 밴드가 확인되지 않았다(Fig. 2). 밴드가 확인되지 않은 것은 single 가닥인 mRNA가 불안정하여 sonication 6초를 실시할 때 너무 잘게 잘려서 100 bp 이하의 너무 작은 insert가 삽입된 것으로 추측되며, 5번 fraction에서 몇 개의 큰 size만

확인된 것으로 추측된다. 또한 titer 측정 결과, 1.04×10^5 cfu의 titer를 확인할 수 있었다(Table 2).

세 번째 방법으로는 oligo d(T) primer를 사용하여 first strand cDNA를 합성하였으며, first strand 합성 후 sonication을 2초동안 실시하였다. 또한 양쪽에 att adapter를 가지는 cDNA만을 증폭시키기 위해 att sequence를 이용해 PCR을 실시하였다. 그 결과, 약 300~600 bp 근처에서 밴드가 희미하게 확인이 되었다(Fig. 3). Insert가 300~600 bp에서 다양하게 확인되어 명확한 밴드가 아닌 끌리듯 확인이 된 것으로 추측된다. 또한 heat shock으로 transformation을 실시한 후 pDONR 207 vector sequence를 이용하여 제작한 primer로 랜덤하게 10개의 colony를

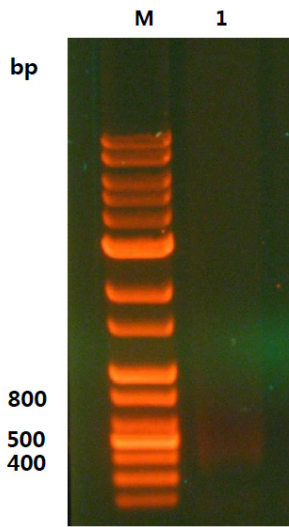


Fig. 3. An electrophoresis of whitefly cDNA amplified using oligo d(T) primer and attB1-adapter-U primer. PCR product was identified with about 300~600 bp <M: 1 kb DNA ladder marker; Lane 1: PCR products>.

PCR한 결과, 300~600 bp 사이에서 다양한 insert가 확인 되었다(Fig. 4). Sequencing 결과 10개 중 3개는 sequencing fail이었고, 모두 poly A를 가지는 것을 확인할 수 있었다. NCBI blast search 결과 3개의 sample은 담배가루이 유전자로 확인되었으며, 나머지 sample은 NCBI에 데이터 정보가 없었다. 그러나 titer 측정 결과, 5.2×10^2 cfu의 titer로 titer가 매우 낮은 것을 확인할 수 있었다(Table 2).

전 연구에서 보면, TRV 벡터를 사용하여 VIGS를 위한 최적화된 cDNA library에 대해 연구되었다(Liu and Page, 2008). Liu and Page (2008)의 논문에서는 cDNA는 poly A와 같은 homopolymeric regions을 포함해서는 안 된다고 보고되었다. Olig d(T) primer를 사용하여 first strand cDNA를 합성할 경우 insert가 Poly A를 포함하여 특이적으로 silencing이 일어나는 것을 방해한다.

또한 Liu and Page (2008)의 논문에서는 cDNA의 크기는 200 bp 이상이 되어야 하고 최대 1,300 bp를 넘지 않는 것이 좋다고 보고되었다. Sonication을 실시하지 않을 경우 최대 2 kb가 넘는 insert 밴드도 확인할 수 있었다. 그러나 sonication을 실시할 경우 insert의 크기가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. mRNA를 sonication 6초를 실시할 경우 mRNA가 불안정하여 100 bp 이하로 잘려 insert 밴드가 확인되지 않는 것으로 추측이 되며, first strand cDNA를 sonication 1초를 실시할 경우 300~600 bp의 적절한 size를 확인할 수 있었다.

또한 transformation 방법은 Electro-transformation 방법을 사용할 경우 heat shock transformation 방법을 사용할 때보다 titer가 10^2 배 가량 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. Heat shock 보다도 electro transformation 방법이 transformation 효율이 더 높은 것을 확인할 수 있었다. Background vector를 줄

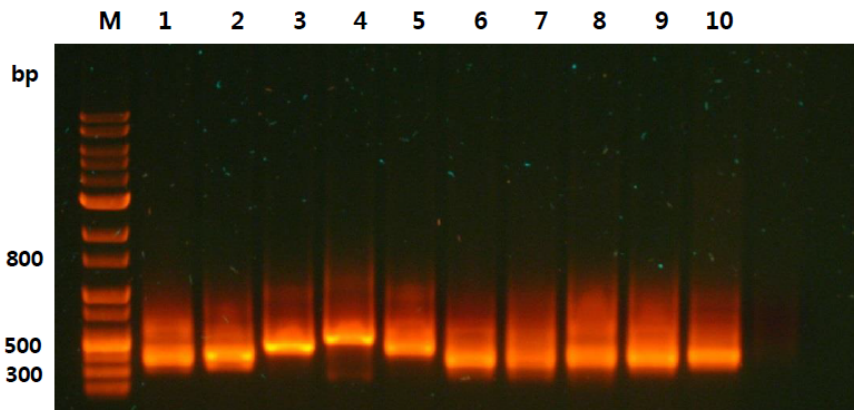


Fig. 4. An electrophoresis of cDNA library construction insert size according to the method 3-3. Plasmids from 10 randomly selected colonies were analyzed on agarose gel for insert size. Size of whitefly cDNA insert was identified with about 500 bp <M: 1 kb Ladder marker; Lane 1~10: whitefly cDNA sample; Lane 11: negative control>.

이기 위해서는 BP recombination시 담배가루이 DNA를 농도를 농축시킨 후 pDONR vector 보다 더 많은 양을 반응시키면 background vector의 양을 줄일 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 2014-2015년도 농림축산식품부 농림수산물식품기술기획평가원의 지원에 의해 수행된 과제입니다(과제번호: 112018-3).

Literature Cited

- Baulcombe, D. 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356-363.
- Baum, J.A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G.R., Feldmann, P., Ilagan, O., Johnson, S., Plaetinck, G., Munyikwa, T., Pleau, M., Vaughn, T., Roberts, J., 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotech.* 25, 1322-1326.
- Bedford, I.D., Briddon, R.W., Brwon, J.K., Rosell, R.C., Markham, P.G., 1994. Geminivirus transmission and biological characterisation of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Ann. Appl. Biol.* 125, 311-325.
- Bettencourt, R., Terenius, O., Faye, I., 2002. Hemolin gene silencing by ds-RNA injected into *Cecropia* pupae is lethal to next generation embryos. *Insect Mol. Biol.* 11, 267-271.
- Boykin, L.M., Shatters, Jr. R.G., Rosell, R.C., Mckenzie, C.L., Bagnall, R.A., De Barro, P., d Frohlich, D.R., 2007. Global relationships of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) revealed using Bayesian analysis of mitochondrial COI DNA sequences. *Mol. Phylogen. Evol.* 44, 1306-1319.
- Byrne, D.N., 1999. Migration and dispersal by the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*. *Agricul. For. Meteorol.* 97, 309-316.
- Christiaens, O., Swevers, L., Smagghe, G., 2014. DsRNA degradation in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) associated with lack of response in RNAi feeding and injection assay. *Peptides* 53, 307-314.
- Ghanim, M., Kontsedalov, S., Czosnek, H., 2007. Tissue-specific gene silencing by RNA interference in the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 732-738.
- Hahn, B.S., 2010. Recent studies on development of transgenic plants induced root-knot nematode resistance by RNA interference suppression of nematode genes and nematode prevention. *Res. Plant Dis.* 16, 10-20.
- Huvenne, H., Smagghe, G., 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. *J. Insect Physiol.* 56, 227-235.
- Jones, D., 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *Euro. J. Plant Pathol.* 109, 197-221.
- Lü, Z.C., Wan, F.H., 2011. Using double-stranded RNA to explore the role of heat shock protein genes in heat tolerance in *Bemisia tabaci* (Gennadius). *J. Exp. Biol.* 214, 764-769.
- Leshkowitz, D., Gazit, S., Reuveni, E., Ghanim, M., Czosnek, H., Mckenzie, C., Shatters, R.L., Brown, J.K., 2006. Whitefly (*Bemisia tabaci*) genome project: analysis of sequenced clones from egg, instar, and adult (viruliferous and non-viruliferous) cDNA libraries. *BMC Genomics* 7,79.
- Liu, E., Page, J.E., 2008. Optimized cDNA libraries for virus-induced gene silencing (VIGS) using tobacco rattle virus. *Plant Methods* 4, 1-13.
- Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S.P., 2002. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J.* 31, 777-786.
- Lu, R., Martin-Hernandez, A.M., Peart, J.R., Malcuit, I., Baulcombe, D.C., 2003. Virus-induced gene silencing in plants. *Methods* 30, 296-303.
- Luo, Y., Wang, X., Yu, D., Chen, B., Kang, L., 2013. Differential responses of migratory locusts to systemic RNA interference via double-stranded RNA injection and feeding. *Insect Mol. Biol.* 22, 574-583.
- Price, D.R., Gatehouse, J.A., 2008. RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends Biotech.* 26, 393-400.
- Sapountzis, P., Dupont, G., Balmand, S., Gaget, K., Jaubert-Possamai, S., Febvay, G., Charles, H., Rahbe, Y., Colella, S., Calevro, F., 2014. New insight into the RNA interference response against cathepsin-L gene in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*: Molting or gut phenotypes specifically induced by injection or feeding treatments. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 51, 20-32.
- Secker, A.E., Bedford, I.D., Markham, P.G., Williams, M.E.C., 1998. Squash, a reliable field indicator for the presence of the B biotype of tobacco whitefly, *Bemisia tabaci*. In: Brighton crop protection conference-pests and Diseases. British Crop Prot. Council, Farnham, UK. pp. 837-842.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H.A., Fire, A., 2001. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107, 465-476.
- Upadhyay, S.K., Chandrashekar, K., Thakur, N., Verma, P.C., Borgio, J.F., Singh, P.K., Tuli, R., 2011. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. *J. Biosci.* 36, 153-161.
- Walshe, D.P., Lehane, S.M., Lehane, M.J., Haines, L.R., 2009. Prolonged gene knockdown in the tsetse fly *Glossina* by feeding double stranded RNA. *Insect Mol. Biol.* 18, 11-19.
- Whyard, S., Singh, A.D., Wong, S., 2009. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 824-832.