

PLANT & FOREST

# Gene functional analysis of *Harmonia axyridis* by *in vitro* transcription

Sang-Eun Park, Young-Nam Youn\*

Department of Agricultural Biology, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

\*Corresponding author: youngnam@cnu.ac.kr

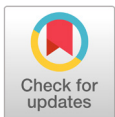
## Abstract

Random genes were screened in two transforming ways to investigate the new genes of a ladybug using the *Harmonia axyridis* cDNA library stock cell cloned in the LITMUS 28i vector in a previous study. Phenotypic variation was observed after injection of the synthesized double-stranded RNA through the *in vitro* transcription process. The cDNA library of *H. axyridis* was transformed into *E. coli* DH5α and 10B competent cells by heat shock. Analysis of the nucleotide sequences of the 42 clones with the insert DNAs revealed that 21 clones were homologous with the genes of insects, and only one clone had a gene from *H. axyridis*. Thirteen of the 21 insect genes were homologous with genes from coleopteran insects. Fourteen genes were selected, which were identified by the gene screening results, and were synthesized as double-stranded RNA through *in vitro* transcription. One microgram of the synthesized double-stranded RNA between segments T1 and T2 were injected using a syringe into each anesthetized fourth larvae which were under 2 days old. As a result, a phenotypic variation appeared in the larva injected with the two genes. While the eggs of *H. axyridis* injected with distilled water hatched out three days after oviposition, the eggs of *H. axyridis* injected with dsHma 06 did not hatch but become shrivel a week after oviposition. Most of the *H. axyridis* injected with dsHma 08 died and were unable to complete the pupation or eclosion during ecdysis.

**Keywords:** gene functional analysis, *Harmonia axyridis*, *in vitro* transcription

## Introduction

무당벌레(*Harmonia axyridis*)는 딱정벌레목(Coleoptera) 무당벌레과(Coccinellidae)에 속하는 곤충으로 중앙아시아, 동아시아의 토착종이며(Dobzhansky, 1933; Majerus, 1994; Codere et al., 1995; Koch, 2003), 여러 종류의 진딧물, 깍지벌레, 응애, 총채벌레 등과 같이 연조직으로 되어있는 해충을 포식하는 주요한 천적으로 알려져 있다(Choi and Kim, 1985; Gordon, 1985; Ferran et al., 1986; Ferran et al., 1996; Hodek and Honek, 1996; Seo and Youn, 2000, 2001; Koch, 2003). 무당벌레는 전세계적으로 약 490속, 4,000여종이 보고되어 있으며(Singh, 1977), 우리나라에서는 38속 74종이 보고되어 있고(ESK and KSAE, 1994), 북아메리카에서 400여 종(Belicek, 1976), 유럽에는 110여종이 분포



### OPEN ACCESS

**Citation:** Park SE, Youn YN. 2019. Gene functional analysis of *Harmonia axyridis* by *in vitro* transcription. Korean Journal of Agricultural Science. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20190031>

**DOI:** <https://doi.org/10.7744/kjoas.20190031>

**Received:** April 11, 2019

**Revised:** May 31, 2019

**Accepted:** June 17, 2019

**Copyright:** © 2019 Korean Journal of Agricultural Science



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

하고 있을 뿐만 아니라 남아메리카, 아프리카 등지에 이르기까지 전 세계적으로 분포하고 있다(Iperti, 1986; Chapin and Brou, 1991; Day et al., 1994; Tedders and Schaefer, 1994; Coderre et al., 1995; Kidd et al., 1995; Lamana and Miller, 1998; Koch et al., 2006; Brown et al., 2007). 또한 무당벌레는 성충과 유충이 모두 작물과 정원 식물에서 흡즙을 하여 피해를 하는 진딧물에 대한 포식력이 뛰어나 생물적 방제인자로서 많이 사용하고 있는 종으로 경제적으로 높은 가치를 가지고 있다(Markkula and Tittanen, 1980; Kauffman and Schwalbe, 1991; Freier and Triltsch, 1995; Seo and Youn, 2000, 2001, 2002; Koch, 2003). 그러나 미국에서 천적으로서 순기능 말고도 농작물을 가해하거나 다른 무당벌레 종의 개체군을 감소시키는 침투외래종으로 보고되기도 하였다(Koch et al., 2004; Roy and Wajnberg, 2008; Kenis et al., 2007; Koch and Galvan, 2008). 한편, 무당벌레의 또 다른 특징은 초시에 나타나는 다양한 색상과 무늬로 이에 관하여 많은 사람들이 연구를 하고 있다. 곤충의 날개에 나타나는 다양한 패턴형성의 메커니즘은 세포생물학적, 유전학적, 생화학적인 측면에서 뿐만 아니라 발생학적인 측면에서도 아주 흥미로운 주제로 다뤄지고 있었으며(Oshima et al., 1956), 무당벌레의 초시무늬의 색상패턴은 과거에 서로 다른 종 혹은 다른 속의 곤충으로 분류되었을 정도로 다형성을 가진다고 보고되었다(Tan, 1946). 또한 Soares et al. (2001)는 100여종 이상의 다른 초시무늬 패턴을 보고하였으며, Tan and Li (1932) 또한 지역별로 다른 200여종 이상의 초시무늬 패턴을 보고한 바 있다. 국내에서는 초시색상 패턴의 유전 및 관련 유전자 탐색을 위하여 곤충의 색소침착에 관여하는 prophenoloxidase (PPO) 유전자가 무당벌레 내에 존재하는지 연구한 바 있으며, amplified fragment length polymorphism (AFLP)를 통해 초시색상패턴의 변이를 분석하여 초시색상과 관련이 있는 AFLP 분자지표 10개 중 5개를 sequence characterized amplified region (SCAR) 분자지표로 성공적으로 전환한 연구가 보고되었다(Kim et al., 2012; Park et al., 2016). 또한 Seo et al. (2007)이 무당벌레 초시무늬의 표현형 변이와 유전적인 상관에 관한 연구에서 유전적인 요인 뿐만 아니라 환경적인 요인이 복합적으로 작용하여 초시무늬를 결정한다고 보고한 바 있으며, 유충시기의 먹이 양, 번데기 기간 동안의 온도와 습도, 계절의 변화 등이 초시무늬 발현 비율에 영향을 미칠 수 있다고 보고되었다(Komai, 1956; Osawa and Nishida, 1992; Grill and Moore, 1998). 이 뿐만 아니라 평균기온과 일조량이 높고 길수록 멜라닌계통의 색소패턴 발현율이 높게 나타난다고 보고된 바 있다(Kang et al., 2009). 그러나 무당벌레 초시무늬 패턴형성에 어떠한 요인에 의해 변이가 일어나는 정확하게 밝혀진 연구가 없다.

RNAi (RNA interference)는 dsRNA (double-stranded RNA)에 의해 배열 특이적으로 mRNA가 분해되는 유전자 발현 억제 현상으로, 세포 내로 dsRNA가 이입되면 RNase III군에 속하는 Dicer에 의해 21 - 25 nt의 siRNA (small interfering RNA)로 절단되고, 이렇게 생긴 siRNA가 RISC (RNA induced silencing complex)와 결합한 후에 상보적인 배열을 갖는 mRNA에 결합하여 선택적으로 분해함으로써 mRNA의 발현을 억제시키는 과정을 거친다(Fire et al., 1998; Sijen et al., 2001; Bellés, 2010). 이러한 RNAi 기법은 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)에서 처음으로 확인한 이후로(Fire et al., 1998), 유전자 기능 분석을 위해 폭넓게 이용하고 있으며(Fjose et al., 2001), 딱정벌레목(거짓쌀도둑 거저리, 무당벌레, 좀남색잎벌레, 운남점얼룩하늘소), 바퀴벌레목(독일바퀴, 이질바퀴), 파리목(노랑초파리, 이집트숲모기, 쉬파리, 구리금파리, 호리꽃등에), 노린재목(담배가루이, 침노린재, 긴노린재), 벌목(양봉꿀벌, 파리금좀벌), 나비목(담배거세미나방, 파방나방, 박각시나방, 화랑곡나방), 메뚜기목(풀무치, 쌍별귀뚜라미), 흰개미목, 풀잠자리목 등 많은 곤충에서 연구되었고(Bellés, 2010; Kim et al., 2015; Ko and Youn, 2015), 농업 환경에서 해충을 방제하기 위해 잠재적으로 사용될 수 있는 새로운 대안으로 제안되고 있다(Baum et al., 2007; Mao et al., 2007; Huvenne and Smagge, 2010). 곤충에서 유전자 기능 분석에 대한 RNAi의 첫 성공적인 적용은 초파리 배아에 dsRNA를 주입한 연구이며(Kennerdell and Carthew, 1998), 그 이후에 다핵배반으로 dsRNA를 주입하는 embryonic RNAi가 보고되었다(Fjose et al., 2001). 그러나 embryonic RNAi는 성충발달을 분석하기에 적합하지 않아 Tomoyasu and Denell (2004)은 곤충 체강으로 dsRNA를 주입하여 성충발달 분석에 용이한 larval RNAi를 보고하였다. dsRNA를 곤충 체내로 전달하는 방법은 먹이에 dsRNA를 처리하여 구강을 통해 전달하는 섭식 방법(feeding), 체내로 주사기로 주입 하는 방법(injection), dsRNA solution에 흠뻑 적셔 흡수시키는 방법(soaking)이 있는데(Yu et al., 2013), 이러한

전달방법은 실제 포장에서 이용하기에 시간과 비용면에서 경제적이지 않아 더욱 효과적인 dsRNA 전달 방법이 필요하다.

본 연구는 무당벌레의 초시무늬에 어떠한 유전자가 관여하는지, 또 아직 밝혀지지 않은 무당벌레의 유전자를 찾아내기 위해서 선행 연구로 완성한 무당벌레의 cDNA library를 gene screening 하였으며, *in vitro* transcription으로 유전자를 선발하고, 선발된 유전자를 RNA interference 기법으로 무당벌레에 적용하여 표현형 변이를 관찰하였다.

## Materials and Methods

### 공시충 채집 및 사육

무당벌레(*Harmonia axyridis*)는 2015년 충청남도 금산군에서 채집한 월동개체군과 2016년 대전광역시 유성구 궁동에서 채집한 야외개체군을 plastic insect breeding dish (직경 10 × 4 cm)에 목화진딧물, 복숭아혹진딧물을 진딧물의 기주 식물과 함께 제공하여 누대사육하였다. 새로 태어난 세대의 4령 유충을 실험에 사용하였고, 모든 사육은 25 ± 1°C, 16L:8D, 상대습도 50-60%의 조건에서 개체 사육하였다.

### 무당벌레 cDNA library 유전자 크리닝

#### *E. coli* DH5α competent cell을 이용한 유전자 스크리닝

##### · *E. coli* 형질전환

LITMUS 28i vector에 클로닝한 무당벌레 cDNA library를 DH5α *E. coli* competent cell에 형질전환 컸다. 살짝 녹여진 DH5α competent cell에 LITMUS 28i vector에 클로닝한 DNA plasmid를 1 μL 넣고, 가볍게 두드려 잘 섞이게 한다. 얼음에 5분 동안 넣어놓은 후에 45초 간 42°C에서 열 충격을 가했다. 열 충격 후, 2분간 얼음에 넣은 다음 LB broth 1 μL를 넣고 37°C 진탕배양기에서 1시간 동안 배양하였다. 1시간 후 ampicillin을 넣은 LB Plate에 300 μL를 도말 하고 37°C에서 하룻밤 동안 배양하였다.

##### · 콜로니 및 Plasmid DNA 분리

37°C에 하룻밤 동안 배양시켰던 ampicillin 배지를 꺼내어 단일 콜로니를 pipette tip을 이용하여 LB broth 3 μL에 분리하였다. 37°C 진탕배양기에서 180 rpm으로 하룻밤 동안 DH5α *E. coli* cell을 배양하였다. LB broth에 하루 동안 배양시킨 cell을 Alkaline Lysis법을 이용하여 DNA를 추출하였다(Bimboim and Doly, 1979).

##### · 제한효소 처리 - *EcoRI*, *HindIII*

*In vitro* transcription을 하기 위해 LITMUS 28i Vector (NEB, Korea)에 무당벌레 cDNA library를 클로닝한 것을 *EcoRI*과 *HindIII*로 처리하여 삽입유전자의 크기를 확인하였다. Plasmid DNA 분리로 얻은 plasmid DNA 7 μL, *EcoRI* (NEB, Korea) 0.5 μL, *HindIII* (NEB, Korea) 0.5 μL, 2.1 buffer 1 μL, 증류수 1 μL (총 10 μL)를 37°C에서 6시간동안 반응시켰다.

#### *E. coli* DH10B competent cell을 이용한 유전자 스크리닝

##### · *E. coli* 전기충격 형질전환

LITMUS 28i vector에 클로닝한 cDNA library는 Electroporator (Bio-Rad, USA)를 이용하여 ElectroMAX™ DH10B Cells (Invitrogen, USA)에 형질전환 시켰다. Electroporator는 voltage 1.8 kV, resistance 200 Ω, capacity 25 uF로 설정하였다. LITMUS 28i Vector (NEB, Korea)에 클로닝한 cDNA library 2 μL를 넣어 총 100 μL를 냉각된 *E. coli* pulser® cuvette (BIO-RAD, USA)

에 전기충격을 주고 나서 SOC medium 900  $\mu\text{L}$ 를 넣어 피펫팅 하였다. 피펫팅을 하고 나서 새로운 1.5  $\mu\text{L}$  Eppendorf tube (Eppendorf, Germany)에 옮겨 1시간 동안 37°C 진탕배양기에서 배양하였다. 1시간 후에 ampicillin이 들어간 LB plate에  $10^1$ 부터  $10^4$ 까지 희석하여 100  $\mu\text{L}$ 씩 도말하고 37°C에 하룻밤 동안 배양 후, 콜로니의 수를 세어 적정농도를 계산하고 무당벌레 유전자 스크리닝하는데 사용하였다. 전기천공법 후에 사용하고 남은 cDNA library는 300  $\mu\text{L}$ 씩 aliquot하여 70% glycerol 200  $\mu\text{L}$ 를 넣은 뒤 부드럽게 인버트 5번하여 -80°C에 library stock으로 보관하였다.

#### · 콜로니 및 Plasmid DNA 분리

37°C에 하룻밤 동안 배양시켰던 ampicillin 배지를 꺼내어 단일 콜로니를 pipette tip을 이용하여 LB broth 3  $\mu\text{L}$ 에 분리하였다. 37°C 진탕배양기에서 180 rpm으로 하룻밤 동안 DH10B *E.coli* cell을 배양하였다. LB broth에 하루 동안 배양시킨 cell을 Alkaline Lysis법을 이용하여 DNA를 추출하였다(Bimboim and Doly, 1979).

#### · 제한효소 처리 - *EcoRI*, *HindIII*

*In vitro* transcription을 하기 위해 LITMUS 28i Vector(NEB, Korea)에 무당벌레 cDNA library를 콜로닝한 것을 *EcoRI*과 *HindIII*로 처리하여 삽입유전자 크기를 확인하였다. Plasmid DNA 분리로 얻은 plasmid DNA 7  $\mu\text{L}$ , *EcoRI* (NEB, Korea) 0.5  $\mu\text{L}$ , *HindIII* (NEB, Korea) 0.5  $\mu\text{L}$ , 2.1 buffer 1  $\mu\text{L}$ , 증류수 1  $\mu\text{L}$  (총 10  $\mu\text{L}$ )를 37°C에서 6시간동안 반응시켰다.

## Double-stranded RNA 합성

### Enzyme cutting - *HpaI*

무당벌레 cDNA library에서 삽입유전자가 확인된 임의의 유전자들을 double-stranded RNA로 합성하기 위해 LITMUS 28i vector에 클로닝되어 있는 plasmid 주형을 제한효소 *HpaI*으로 처리하여 선형(線形)으로 만들었다. 선형의 plasmid DNA 7  $\mu\text{L}$ , *HpaI* (NEB, Korea) 1  $\mu\text{L}$ , Cutsmart Buffer 1  $\mu\text{L}$ , 증류수 1  $\mu\text{L}$  (총 10  $\mu\text{L}$ )를 37°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다.

### Double-stranded RNA 합성

선형으로 만든 DNA 주형과 T7 RiboMax™ Express RNAi system kit (Promega, USA)를 이용하여 14개의 double-stranded RNA를 합성하였다. RiboMax™ Express T7 2X Buffer 10  $\mu\text{L}$ , 선형 DNA template 2  $\mu\text{L}$ , Nuclease-Free Water 6  $\mu\text{L}$ , Enzyme Mix, T7 Express 2  $\mu\text{L}$  (총 20  $\mu\text{L}$ )를 37°C에서 2시간동안 반응 시키고 dsRNA를 annealing 하기 위해 70°C에서 10분동안 반응시킨 뒤 상온에서 20분동안 반응시켰다. dsRNA 이외에 남아있는 DNA template와 ssRNA를 제거 하기 위해서 200배 희석시킨 RNase 1  $\mu\text{L}$ , DNase 1  $\mu\text{L}$ 를 넣고 37°C에서 30분동안 반응시켰다. 반응시킨 dsRNA는 에탄올 다운을 하여 증류수 30  $\mu\text{L}$ 에 용리시켰다.

## Double-stranded RNA 주입

탈피한 후 0-2일이 된 무당벌레 4령 유충에 *in vitro* transcription 과정을 통하여 합성한 dsRNA를 주입하였다. 유충 체내로 직접 전달되게 하도록 dsRNA를 주입하기 3시간 전부터 굶겼으며, 표현형 변화를 효과적으로 비교하기 위해 대조구로서 무처리구, 증류수 주입을 하였다. dsRNA는 syringe (Hamilton, USA)를 이용하여 한 처리구 당 25마리 내외의 무당벌레 4령 유충에 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 를 복부 제 1마디와 제 2마디 사이에 Niimi et al. (2005)의 방법을 참고하여 주입하였다. 주입한 후에 성충이 될 때까지 목화진딧물과 복숭아혹진딧물을 먹이로 제공하였다(Fig. 1).

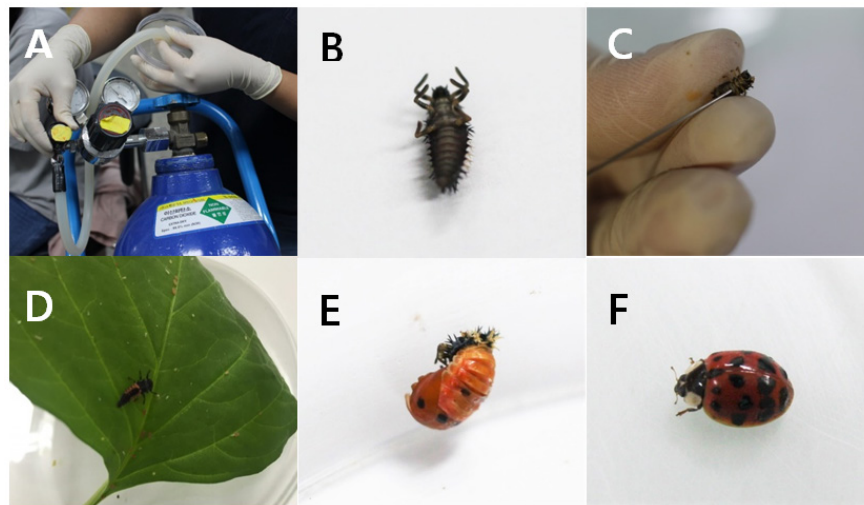
## Results

### cDNA library 유전자 스크리닝

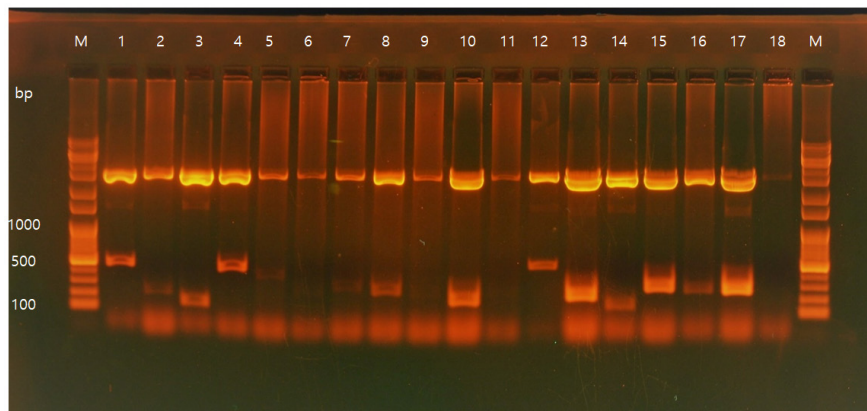
*E. coli* DH5a competent cell을 이용한 유전자 스크리닝

#### · 삽입유전자 크기 확인

열 충격을 통해 얻어진 cDNA library에서 유전자를 선별하고 크기를 확인하기 위해서 10<sup>1</sup>로 희석하여 도말한 ampicillin 배지에서 무작위로 취하여 콜로니 prep을 하였다. Ampicillin 배지에 뜬 콜로니는 총 95개로, 그 중 72개를 콜로



**Fig. 1.** Process of injecting dsRNA into *H. axyridis* abdominal region. A, A ladybug was anesthetized by carbon dioxide gas; B, Anesthetized insect; C, Injection of dsRNA; D, After waking from the anesthetic; E: Pupa; F: Observation of phenotype.



**Fig. 2.** Insert DNA of cDNA library was constructed from *Harmonia axyridis* on the electrophoresis. Plasmid from 18 randomly selected colonies were analyzed on agarose gel for insert size. Insert size was confirmed with the size of 150 - 500 bp. M, 1 kb plus ladder marker; Lane 1 - 18, *Harmonia axyridis* cDNA library random gene insert.

니 prep하였으며, 중복되는 유전자를 제외하고 18개의 삽입유전자가 확인되었고, 그 유전자의 크기는 150 - 500 bp로 다양한 크기를 확인할 수 있었다(Fig. 2).

#### · 염기서열분석 및 NCBI blast

LITMUS 28i vector에 클로닝 되어있던 무당벌레 cDNA library를 스크리닝한 24개의 유전자의 염기서열을 알아보기 위해 plasmid DNA를 분리하였고, 제한효소 *EcoRI*과 *HindIII* 처리를 통하여 삽입유전자를 확인한 후, 염기서열분석을 의뢰하고(Macrogen, Korea), NCBI blast를 통해 중복되는 유전자가 있는지 확인하였다(Table 1). 그 결과 11개의 유전자는 곤충 유전자와 상동성을 보이는 유전자로 확인되었고, 7개는 곤충이 아닌 다른 종의 유전자와 상동성을 보였으며, 무당벌레 유전자는 1개가 확인되었다(Table 4). 무당벌레 유전자가 아닌 곤충 유전자 10개 중 6개가 딱정벌레목으로 무당벌레와 유사한 종의 유전자가 확인되었다.

**Table 1.** NCBI blast search data of *Harmonia axyridis* cDNA library gene screening using *E. coli* DH5 $\alpha$  competent cell for confirm redundancy.

No.	EST blast search	Size (bp)	Identity (%)	Accession number
1	PREDICTED: <i>Alligator sinensis</i> cytochrome P450 2K4-like (LOC102368184), mRNA	476	79	XM_006039181.2
2	<i>Heligmosomoides polygyrus</i> genome assembly H_bakeri_Edinburgh ,scaffold HPBE_scaffold0012539	229	82	LL202189.1
3	PREDICTED: <i>Nicrophorus vespilloides</i> chito oligosaccharidolytic beta-N-acetylglucosaminidase (LOC108559261), transcript variant X3, mRNA	152	86	XM_017916476.1
4	<i>Prevotella fusca</i> JCM 17724 strain W1435 chromosome 1, complete sequence	457	66	CP012074.1
5	<i>Harmonia axyridis</i> holotricin-like peptide mRNA, partial cds	342	97	FJ597735.1
6	PREDICTED: <i>Tribolium castaneum</i> PDZ and LIM domain protein Zasp (LOC658986), transcript variant X3, mRNA	256	76	XM_015980515.1
7	<i>Lingula anatina</i> eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A-like (LOC106150437), mRNA	293	87	XM_013523248.1
8	<i>Dendroctonus ponderosae</i> Seq01036971, whole genome shotgun sequence	259	76	APGK01036961.1
9	PREDICTED: <i>Bombyx mori</i> inverted formin-2-like (LOC101737866), mRNA	252	85	XM_004927481.2
10	<i>Latrodectus Hesperus</i> clone CV6 60S ribosomal protein l27a mRNA, partial cds	207	89	HQ005776.1
11	PREDICTED: <i>Biomphalaria glabrata</i> glutamine synthetase-like (LOC106066039), mRNA	253	78	XM_013225010.1
12	<i>Nicrophorus vespilloides</i> trithorax group protein osa (LOC108557678), transcript variant X2, mRNA	474	75	XM_017914293.1
13	<i>Asobara tabida</i> hch gene for ferritin heavy chain and lch gene for ferritin light chain	220	78	FN395057.1
14	<i>Dendroctonus ponderosae</i> Seq01029514, whole genome shotgun sequence	152	88	APGK01029504.1
15	PREDICTED: <i>Anoplophora glabripennis</i> nuclear transcription factor Y subunit beta (LOC108904243), transcript variant X1, mRNA	289	80	XM_018706714.1
16	<i>Linepithema humile</i> uncharacterized LOC105669426 (LOC105669426), mRNA	261	80	XM_12362388.1
17	PREDICTED: <i>Copidosoma floridanum</i> Y-box factor homolog (LOC106646017), transcript variant X2, mRNA	282	87	XM_014362010.1
18	<i>Streptococcus suis</i> T15, complete genome	177	93	CP006246.1

**Table 2.** *Harmonia axyridis* cDNA library titration after transforming in *E. coli* DH10B competent cell. The cDNA library titration was determined by counting colonies.

Dilution	Amount plated ( $\mu$ L)	Number of colonies/plate	Titration (cfu/ $\mu$ L)	Average titration (cfu/ $\mu$ L)
$10^{-2}$	100	373	$3.73 \times 10^4$	$5.71 \times 10^4$
$10^{-3}$	100	64	$6.4 \times 10^4$	
$10^{-4}$	100	7	$7 \times 10^4$	

***E. coli* DH10B competent cell을 이용한 유전자 스크리닝****· cDNA library 적정농도**

Electroporator를 이용하여 ElectroMAX™ DH10B Cells (Invitrogen, USA)에 무당벌레 cDNA library를 transformation시킨 후 37°C 진탕배양기에서 1시간동안 보관하였다. 1시간 뒤 cDNA library를 10<sup>1</sup>에서 10<sup>4</sup>까지 희석하여 ampicillin배지에 도말한 후 37°C에 하룻밤 동안 배양한 뒤 다음날 꺼낸 다음 콜로니를 세어 cDNA library 적정농도를 측정하였다. 그 결과, 10<sup>4</sup> 희석액을 도말한 배지에서 7개의 콜로니를 확인하였고, 10<sup>3</sup>희석액을 도말한 배지에서는 64개, 10<sup>2</sup>희석액에서는 373개, 10<sup>1</sup> 희석액에서는 셀 수 없을 정도로 많은 콜로니를 확인하였다. 무당벌레 cDNA library cell stock으로 얻어진 적정농도

**Table 3.** NCBI blast search data of clones selected in *E. coli* DH10B competent cell transformed with *Harmonia axyridis* cDNA library.

No.	EST blast search	Size (bp)	Identity (%)	Accession number
1	<i>Paenibacillus odorifer</i> strain DSM 15391, complete genome	386	86	CP009428.1
2	<i>Medicago truncatula</i> clone mth2-7k2, complete sequence	177	85	AC144340.30
3	PREDICTED: <i>Tribolium castaneum</i> uncharacterized LOC100141683, transcript variant X2, mRNA	294	71	XM_001809187.3
4	<i>Parascaris equorum</i> genome assembly P_equorum ,scaffold PEQ_scaffold0036355	304	96	LM499888.1
5	PREDICTED: <i>Agrilus planipennis</i> RNA-binding protein 24-like (LOC108738201), transcript variant X2, mRNA	249	79	XM_018471493.1
6	<i>Papilio xuthus</i> 60S ribosomal protein L13 (LOC106124431), mRNA	273	79	NM_001312365.1
7	<i>Protopolystoma xenopodis</i> genome assembly P_xenopodis_South_Africa ,scaffold PXEA_contig0179453	240	93	LM921808.1
8	PREDICTED: <i>Tribolium castaneum</i> vigilin (LOC658150), mRNA	284	71	XM_008199674.2
9	PREDICTED: <i>Papilio xuthus</i> uncharacterized LOC106120164 (LOC106120164), mRNA	256	76	XM_013315404.1
10	PREDICTED: <i>Meleagris gallopavo</i> myotubularin related protein 9 (MTMR9), mRNA	486	67	XM_010708204.1
11	PREDICTED: <i>Alligator sinensis</i> cytochrome P450 2K4-like (LOC102368184), mRNA	475	79	XM_006039181.2
12	PREDICTED: <i>Tribolium castaneum</i> titin (LOC662729), transcript variant X3, mRNA	477	77	XM_015977784.1
13	<i>Salmo salar</i> clone Contig4326 Cystatin-B putative mRNA, complete cds	133	100	BT058358.1
14	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> strain FDAARGOS_137, complete genome	312	80	CP014057.1
15	<i>Dictyostelium fasciculatum</i> putative glycoside hydrolase (DFA_09374) mRNA, complete cds	265	68	XM_004354675.1
16	PREDICTED: <i>Mustela putorius furo</i> tripartite motif containing 6 (TRIM6), transcript variant X6, mRNA	228	94	XM_004779006.2
17	PREDICTED: <i>Tribolium castaneum</i> death-inducer obliterator 1 (LOC658430), transcript variant X2, mRNA	275	77	XM_964818.4
18	PREDICTED: <i>Cephus cinctus</i> uncharacterized LOC107269745 (LOC107269745), transcript variant X2, mRNA	192	79	XM_015743953.1
19	<i>Ceratina calcarata</i> nuclear hormone receptor E75 (LOC108627169), transcript variant X3, mRNA	197	83	XM_018028265.1
20	<i>Spirometra erinaceieuropaei</i> genome assembly S_erinaceieuropaei ,scaffold SPER_scaffold0179601	315	90	LN215903.1
21	PREDICTED: <i>Tribolium castaneum</i> uncharacterized LOC664518 (LOC664518), mRNA	362	67	XM_008197772.2
22	<i>Heligmosomoides polygyrus</i> genome assembly H_bakeri_Edinburgh ,scaffold HPBE_contig0014130	262	79	LL221712.1
23	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar finitimus YBT-020 plasmid pBMB26, complete sequence	287	93	CP002509.1
24	PREDICTED: <i>Eufriesea mexicana</i> nucleosome assembly protein 1-like 1 (LOC108550806), transcript variant X3, mRNA	275	75	XM_017904673.1

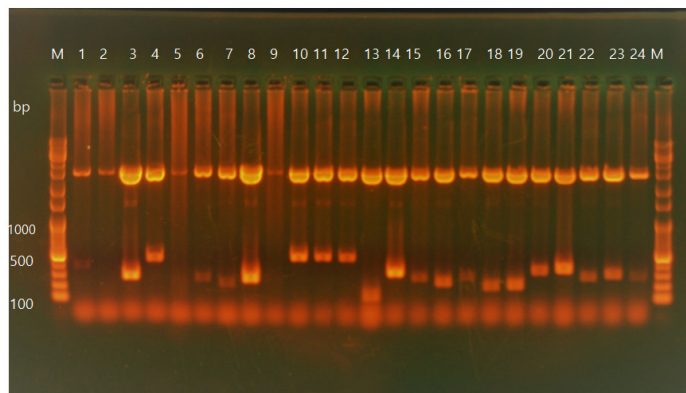
는  $5.71 \times 10^4$ 이었다(Table 2).

#### · 삽입유전자 크기 확인

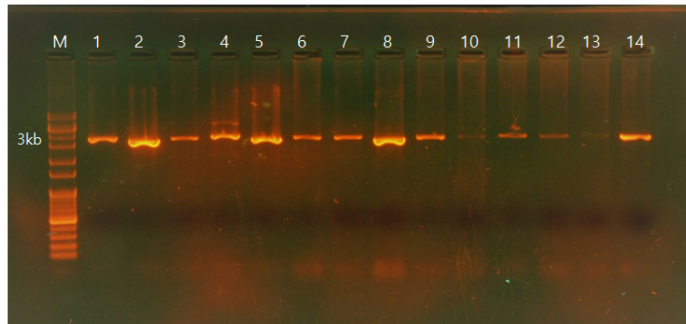
전기충격을 통해 얻어진 cDNA library에서 유전자를 선별하고 크기를 확인하기 위해서  $10^{-1}$ 로 희석하여 도말한 ampicillin 배지에서 무작위로 취하여 콜로니 prep을 하였다. 그 중 24개의 콜로니에서 삽입유전자가 확인되어 유전자를 선별하였고, 그 유전자의 크기는 130 - 500 bp로 다양한 크기를 확인할 수 있었다(Fig. 3).

#### · 염기서열분석 및 NCBI blast

LITMUS 28i vector에 클로닝 되어있던 무당벌레 cDNA library를 스크리닝한 18개의 유전자의 염기서열을 알기 위해 plasmid DNA 분리하였고, 제한효소 *EcoRI*과 *HindIII* 처리를 통하여 삽입유전자를 확인한 후, 염기서열분석을 의뢰하고 (Macrogen, Korea), NCBI blast를 통해 중복되는 유전자가 있는지 확인하였다(Table 3). 그 결과 11개의 유전자는 곤충 유전자와 상동성을 보이는 유전자로 확인되었고, 13개는 곤충이 아닌 다른 종의 유전자가 확인되었으며, 무당벌레 유전자



**Fig. 3.** Insert DNA of plasmid was selected from colonies of *E. coli* transformed with *Harmonia axyridis* cDNA library on the electrophoresis. Plasmid from 24 randomly selected colonies were analyzed on agarose gel for insert size. Insert size was confirmed with the size of 130 - 500 bp. M, 1 kb plus ladder marker; Lane 1 - 24, *Harmonia axyridis* cDNA library random gene insert.



**Fig. 4.** An electrophoresis of cutting plasmid DNA with *HpaI*. Band size was confirmed with 3 - 4 kb. M, 1 kb plus DNA ladder maker; Lane 1 - 14, plasmid DNA was cut with *HpaI*.

**Table 4.** Results of sequencing analysis with a colonies using *E. coli* DH5 $\alpha$  competent cell and *E. coli* DH10B competent cell in NCBI blast search.

Gene	No. of sample obtained by <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	No. of sample obtained by <i>E. coli</i> DH10B
<i>Harmonia axyridis</i>	1	0
Other insects	10	11
Other species	7	13



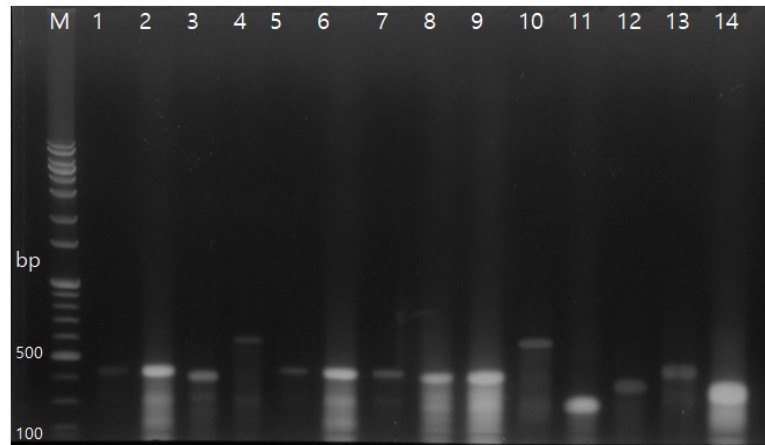
와 상동성을 보이는 유전자는 확인되지 않았다(Table 4). 무당벌레 유전자가 아닌 곤충 유전자 13개 중 6개가 딱정벌레 목으로 무당벌레와 유사한 종의 유전자가 확인되었다.

## 무당벌레 random gene을 이용한 RNAi

### Double-stranded RNA 합성

#### · Enzyme cutting - *HpaI*

열 충격을 통해 선발한 유전자 18개중 5개(Hma 01 - 05)와 electroporator를 통해 선발한 유전자 24개 중 9개(Hma 06 - 14),



**Fig. 5.** An electrophoresis of dsRNA. Band appear on about 300 - 700 bp. M, 1 kb DNA ladder marker; Lane 1 - 14, dsHma 01 - dsHma 14 was synthesized with 300 - 700 bp.

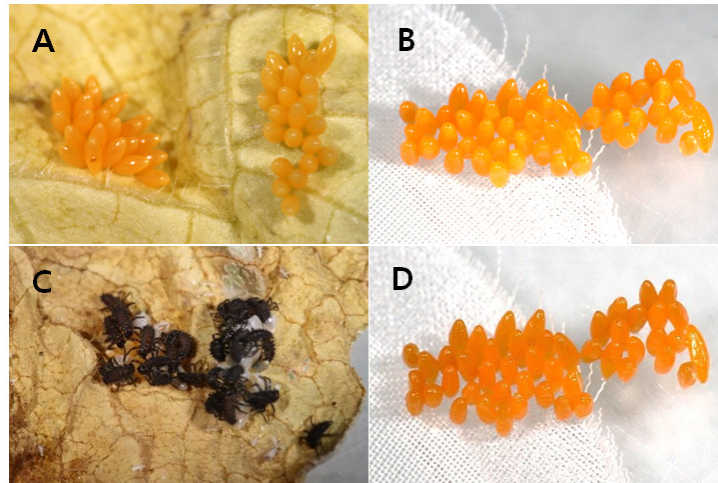
**Table 5.** List of gene information selected to synthesized and injected double-stranded RNA after *H. axyridis* cDNA library gene screening.

dsHma	DNA blast search	Size (bp)	Accession number
01	PREDICTED: <i>Tribolium castaneum</i> PDZ and LIM domain protein Zasp (LOC658986), transcript variant X3, mRNA	256	XM_015980515.1
02	<i>Lingula anatina</i> eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A-like (LOC106150437), mRNA	293	XM_013523248.1
03	<i>Dendroctonus ponderosae</i> Seq01036971, whole genome shotgun sequence	259	APGK01036961.1
04	PREDICTED: <i>Alligator sinensis</i> cytochrome P450 2K4-like (LOC102368184), mRNA	476	XM_006039181.2
05	PREDICTED: <i>Bombyx mori</i> inverted formin-2-like (LOC101737866), mRNA	252	XM_004927481.2
06	PREDICTED: <i>Tribolium castaneum</i> uncharacterized LOC100141683, transcript variant X2, mRNA	294	XM_001809187.3
07	<i>Papilio xuthus</i> 60S ribosomal protein L13 (LOC106124431), mRNA	273	NM_001312365.1
08	PREDICTED: <i>Agrilus planipennis</i> RNA-binding protein 24-like (LOC108738201), transcript variant X2, mRNA	249	XM_018471493.1
09	PREDICTED: <i>Tribolium castaneum</i> vigilin (LOC658150), mRNA	284	XM_008199674.2
10	PREDICTED: <i>Alligator sinensis</i> cytochrome P450 2K4-like (LOC102368184), mRNA	475	XM_006039181.2
11	<i>Salmo salar</i> clone Contig4326 Cystatin-B putative mRNA, complete cds	133	BT058358.1
12	PREDICTED: <i>Mustela putorius furo</i> tripartite motif containing 6 (TRIM6), transcript variant X6, mRNA	228	XM_004779006.2
13	PREDICTED: <i>Tribolium castaneum</i> death-inducer obliterator 1 (LOC658430), transcript variant X2, mRNA	275	XM_964818.4
14	PREDICTED: <i>Cephus cinctus</i> uncharacterized LOC107269745 (LOC107269745), transcript variant X2, mRNA	192	XM_015743953.1

총 14개의 유전자(곤충 유전자9개, 곤충이 아닌 유전자 5개)를 double-stranded RNA로 합성하기 위해 LITMUS 28i vector에 클로닝 되어있는 유전자들에 *HpaI*을 처리하여 원형의 DNA을 선형의 DNA로 만들었다(Table 5). *HpaI*을 처리한 결과 약 3-4 kb정도에서 *HpaI*으로 잘린 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 4).

#### · Double-stranded RNA 합성

Fig. 4에서 확인한 선형의 DNA를 주형으로 T7 RiboMax™ Express RNAi system kit (Promega, USA)를 이용하여 double-stranded RNA (dsHma 01 - dsHma 14)를 합성하였다. 그 결과 약 300 - 700 bp에서 합성된 dsRNA를 확인하였다(Fig. 5).



**Fig. 6.** Comparison of eggs oviposited *Harmonia axyridis* that were injected with dsHma 06 and distilled water A, A day old eggs that oviposited *H. axyridis* injected with distilled water; B, A day old eggs that oviposited *H. axyridis* injected with dsHma 06; C, Three days after *H. axyridis* injected with distilled water oviposit, Hatching; D, A week after, *H. axyridis* injected with dsHma 06 oviposit, not hatched and become shrivel and thick color.

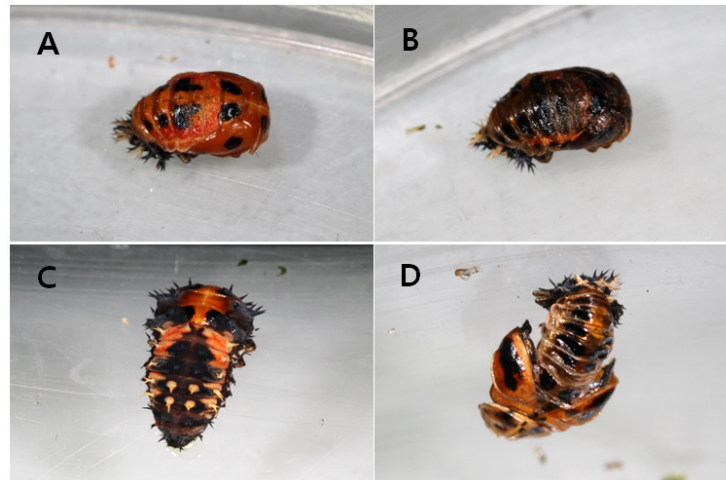
**Table 6.** Results of dsRNA injected into the fourth instar larva on elytra pattern.

Treatment plot	pattern I	pattern II	pattern III	pattern IV	pattern V
dsHma 01	3	10	5	3	0
dsHma 02	3	8	5	2	0
dsHma 03	2	7	3	1	0
dsHma 04	3	11	6	1	0
dsHma 05	6	10	4	4	0
dsHma 06	4	6	5	2	0
dsHma 07	6	8	2	1	0
dsHma 08	2	5	3	3	0
dsHma 09	5	8	6	0	0
dsHma 10	7	9	4	1	0
dsHma 11	5	5	5	3	0
dsHma 12	6	5	7	2	0
dsHma 13	8	10	6	0	0
dsHma 14	7	8	6	2	0
Dry weight	6	12	8	3	0
Non-injection	14	16	13	6	0

Pattern I, no black spots on yellow or red elytra; Pattern II, 1 - 9 black spots on yellow or red elytra; Pattern III, 10 - 18 black spots on yellow or red elytra; pattern IV, 19 black spots on yellow or red elytra; Pattern V, Inexpressible and rare elytra.

### · Double-stranded RNA 주입 후 표현형 변이

실내에서 개체 사육한 무당벌레가 4령이 된지 0 - 2일이 되었을 때, 유충의 복부 제 1마디와 제 2마디 사이에 syringe를 이용하여 double-stranded RNA를 1  $\mu$ L씩 주입하였다. 처리구 설정은 무처리, 증류수, dsRNA 주입 3가지로 하였으며, 그 결과 초시무늬의 표현형을 관찰했을 때 dsHma 01 - dsHma 14에서 모두 대조구와 비슷한 표현형을 나타내는 것을 볼 수 있었다(Table 6). 또한 초시 무늬 외의 표현형 변이를 관찰했을 때는 dsHma 01 - dsHma 05를 주입한 개체들에선 일정한 표현형변이가 관찰되지 않았으며, 성충이 되기 전에 치사한 개체들이 많지만 주입한 다음날 죽거나 변태기가 되기 전에 죽었으며 대조구와 비슷한 양상으로 죽는 것으로 보아, 주입의 충격으로 치사한 것으로 보인다. dsHma 07, dsHma 09 - dsHma 14 주입구도 마찬가지로 일정한 표현형 변이를 관찰 할 수 없었다. 그러나 dsHma 06과 dsHma 08을 주입한 무당



**Fig. 7.** Phenotypic variation after injected dsHma 08. A, Control Pupae; B, Dead pupae that turns black could not eclose into adults; C, larvae that could not melt and died during pupation; D, Pupae that could not be emergence.

**Table 7.** Results of dsRNA injected into the fourth instar larva on phenotypic variation.

Treatment plot	No. of injected larvae	No. of dead larvae	No. of dead pupae	No. of dead adults	No. of normal adults
dsHma 01	28	5	2	0	21
dsHma 02	28	10	0	0	18
dsHma 03	22	7	2	0	13
dsHma 04	25	4	0	0	21
dsHma 05	30	3	3	0	24
dsHma 06	30	4	9	0	17
dsHma 07	24	4	3	0	17
dsHma 08	30	5	12	0	13
dsHma 09	27	5	3	0	19
dsHma 10	25	4	0	0	21
dsHma 11	25	3	4	0	18
dsHma 12	28	7	1	0	20
dsHma 13	30	4	2	0	24
dsHma 14	29	4	2	0	23
Dry weight	37	6	2	0	29
Non-injection	54	4	1	0	49

벌레에서 표현형변이를 보였다(Table 7).

### dsHma 06 주입

dsHma 06의 유전자는 NCBI blast search 결과 *Tribolium castaneum*의 mRNA와 71%의 상동성을 갖는 유전자를 주형으로 합성한 것이며(Table 5), dsHma 06을 주입한 개체들이 용화한 후 죽은 것이 많아 성충이 된 후 장애가 있는지 확인하기 위해 먹이를 공급하여 직경 10 × 4 cm Plastic insect breeding dish에서 사육했으며, 그 결과 산란과정까지 볼 수 있었으나 3일이 지나면 부화되는 대조구와 달리 dsHma 06을 주입한 개체들이 낳은 알은 부화되지 않고 말라 죽었다(Fig. 6).

### dsHma 08 주입

dsHma 08의 유전자는 NCBI blast search 결과 *Agilus planipennis* mRNA와 79%의 상동성을 갖는 유전자를 주형으로 합성한 것이며(Table 5), dsHma 08을 주입한 개체들 중 많은 개체들이 용화를 마치지 못한 채 죽거나, 번데기 상태에서 또는 우화하는 과정에서 죽었다(Fig. 7).

## Discussion

무당벌레(*Harmonia axyridis*)는 포식성 천적으로써 많은 농작물에 피해를 주는 진딧물류의 방제에 사용되고 있으며 초시 무늬와 색상의 다형성이 잘 알려져 있다(Dobzhansky, 1933; Komai, 1956; Osawa and Nishida, 1992). 초시무늬에 관하여 많은 연구들이 있지만(Tan and Li, 1934; Tan, 1946; Komai, 1956; Seo et al., 2008; Michie et al., 2010; Lee et al., 2011), 아직 어떠한 유전자가 초시무늬에 관여하는지 알려지지 않았을 뿐만 아니라 무당벌레의 유전자에 대한 연구가 미비하다.

본 논문에서는 Jung (2016)에 의해 선행연구로 제작된 무당벌레 cDNA library를 이용하여 *in vitro* transcription으로 어떠한 유전자가 무당벌레에 존재하는지 유전자 스크리닝을 하였고, 그 유전자가 어떠한 기능을 하는지 분석하기 위해 RNA interference를 이용하였다. RNAi를 이용한 무당벌레 유전자 연구는 Niimi et al. (2005)가 무당벌레 성충의 다리와 안테나 발달과 관련된 *Distal-less*와 *aristaless* double-stranded RNA를 주입하여 발달을 억제하였고, germ-line transformation 방법의 이용 가능성을 보기 위해 EGFP (enhanced green fluorescent protein) dsRNA를 주입하여 확인하였으며(Kuwayama et al., 2006), 무당벌레의 날개 형성에 중요한 역할을 하는 *vestigial*과 *scalloped* double-stranded RNA를 주입하여 생물적 방제인자로 사용하기 위한 날지 못하는 무당벌레를 유도했다(Ohde et al., 2009). 이와 같은 연구들을 통해 무당벌레 성충 발달을 위해서 유충에서의 RNA interference가 적합하다는 것을 알 수 있다.

본 논문에서는 LITMUS 28i vector에 클로닝한 무당벌레 cDNA library를 두 가지 *E. coli* competent cell에 다른 방식으로 형질전환시켜 그 효율을 비교하였으며, 그 결과 *E. coli* DH5 $\alpha$  competent cell에 열 충격을 가하여 95개의 콜로니를 얻었고, transformation 효율을 높이기 위해 electroporator를 이용하여 *E. coli* 10B competent cell에 전기충격 형질전환을 하여  $5.71 \times 10^4$ 의 cDNA library를 확인하였다(Table 2). 유전자 크기를 확인한 결과, 약 100 - 500 bp의 삽입유전자를 확인하였으며, 이전 연구에서 cDNA 크기가 200 bp 이상, 최대 1,300 bp를 넘지 않아야 하며, 남부옥수수뿌리벌레 (*Diabrotica undecim punctata howardi*)에서 double-stranded RNA의 크기가 60 - 240 bp일 때 95% 이상의 높은 치사율을 보인 것과 비교 하면 합성하기에 적당한 크기의 삽입유전자를 확인한 것을 알 수 있었다(Liu and Page, 2008; Bolognesi et al., 2012). 무당벌레 유전자 스크리닝을 한 뒤, 염기서열분석 결과를 토대로 NCBI blast를 통해 중복되는 유전자를 확인하였으며(Table 1, 3), 그 결과 약 절반이 곤충 유전자와 한 개의 무당벌레 유전자와 상동성을 보이는 유전자를 확인하였다(Table 4). 곤충 유전자 중에서도 대부분이 무당벌레와 같은 딱정벌레목 곤충이었으며 이는 아직까지 무당벌레에 대한 유전자 연구가 많이 되어 있지 않아서 유사한 종의 유전자들로 확인된다는 것을 보여준다. 유전자 스크리닝을 통해 선발된 유전자들을 double-stranded RNA로 합성시켜 무당벌레의 종령 유충의 복부에 주입하고 그에 따른 표현형 변이가 나타나는지 관찰하였다. 표현형 변이로 보이는 두 가지 유전자를 확인하였다. 첫 번째로 난황형성에 장애를 일으키는 변이를 보인 dsHma 06

의 유전자는 거짓쌀도둑거저리(*Tribolium castaneum*)의 유전자로 특징지어지지 않은 유전자로 아직 밝혀진 역할은 없는 유전자였다(Table 5). dsHma 06을 주입한 개체들 중 성충까지 성장한 개체들이 교미 후 산란까지 하였는데, 대조구로서 증류수를 주입한 개체들의 알은 산란한지 3일 만에 부화는 반면 dsHma 06을 주입한 개체들이 산란한 알은 전체가 부화하지 않았다(Fig. 6). 이는 난황형성에 관련된 유전자가 knock-out되어 제대로 된 알을 산란하지 못하고 무당벌레 성충의 정상적인 생식활동을 저지하는 것으로 생각된다. 난황형성에는 유약호르몬(juvenile hormone)과 신경분비호르몬, ecdysteroid (20-hydroxyecdysone, ecdysone) 등의 복합작용으로 조절된다(Zou et al., 1988; David et al., 1998; Kozhanova, 2000; Boo, 2001). 그 중에도 특히 유약호르몬은 난모세포에 난황형성을 촉진시키고 단백질 대사를 조절하여 난 성숙에 관여한다(Hagedorn and Kunkel, 1979; Kozhanova, 2000). 독일 바퀴벌레(*Blattella germanica*)에서 dsBgVgR (vitellogenin receptor)을 중령 약충에 주입하고 8일 후에 절개하였을 때, 기초 난모세포로 vitellogenin의 흡수가 이루어지지 않고 혈림프 내에 vitellogenin이 남아있어 난모세포의 성숙이 이루어지지 않았고 (Ciudad et al., 2006), 꿀벌(*Apis mellifera*), 개참진드기(*Dermacentor variabilis*) 등에서도 dsVgR을 주입하여 난황형성억제 현상을 확인하였다(Amdam et al., 2003; Mitchell et al., 2007; Antonio et al., 2008). 두 번째 변이를 보인 dsHma 08의 유전자는 호리비단벌레(*Agrilus planipennis*)의 유전자로 RNA-binding protein과 관련된 유전자이다(Table 5). RNA-binding protein (RBP)는 세포에서 single 혹은 double stranded RNA와 결합하고 ribonucleoprotein 복합체를 형성하는데 포함되는 단백질을 말한다. RBP는 생물에서 수 많은 역할을 하는데, 그 중 splicing이나 polyadenylation, mRNA stabilization, mRNA localization, translation과 같이 유전자 발현에 있어서 RNA의 전사후 조절에 주요한 역할을 한다(Hogan et al., 2008; Glisovic et al., 2008). 따라서 호리비단벌레와 같은 딱정벌레목인 무당벌레에서도 RNA-binding protein의 유전자로서 작용할 수 있으며, dsHma 08을 주입한 무당벌레의 표현형을 관찰하였을 때, 용화, 우화 모두 완전하게 탈피를 하지 못하고 죽은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 7). 이는 탈피에 관여하는 유전자 발현에 있어서 dsRNA가 작용하여 탈피가 억제되었을 것이라고 생각된다. 이 외에도 *Drosophila*에서 RNA-binding protein R2D2를 이용하여 RNAi pathway를 연구하였고(Liu et al., 2003), 이를 토대로 누에나방(*Bombyx mori*)과 거짓쌀도둑거저리(*Tribolium castaneum*)에 RNAi 시켜 RNA-binding protein R2D2와 Translin의 발현을 가지고 RNAi pathway를 연구가 보고된 바 있다(Swevers et al. 2011).

본 연구에서는 LITMUS 28i vector에 클로닝되어 있는 무당벌레 cDNA library stock cell을 두 가지 방법으로 형질전환하여 유전자 스크리닝 하여 유전자를 선발하였다. *In vitro* transcription을 통해 삽입유전자가 확인된 random gene을 double-stranded RNA로 합성한 후, 무당벌레 4령 유충의 복부에 주입하여 표현형 변이를 관찰하였다. 초시무늬에 관한 표현형 변이는 나타나지 않았지만, 다른 두 가지의 표현형 변이를 확인하였다. 정확한 유전자 확인을 위해서 RACE를 통해 유전자의 full sequence를 알아내고 그 정보를 확인함으로써, 아직 많은 연구가 되어있지 않은 무당벌레 유전자뿐만 아니라 같은 방법을 통하여 다른 곤충의 유전자 기능 분석에도 도움이 될 수 있을 것이라고 사료된다.

## Conclusion

본 연구는 무당벌레의 새로운 유전자 탐색을 위하여 선행연구로 제작한 LITMUS 28i vector에 클로닝한 무당벌레 cDNA library stock cell을 이용하여 두 가지 방법으로 형질전환 시켜 random gene 스크리닝 하였다. 각 유전자의 기능 분석을 위해 *in vitro* transcription 과정을 통하여 double-stranded RNA를 합성하고 주입하여 표현형 변이를 관찰하였다. 무당벌레 cDNA library를 *E.coli* DH5 $\alpha$  competent cell에 열 충격을 가하여 형질전환한 결과 95개의 콜로니를 얻었으며, Electroporator를 이용하여 *E.coli* 10B competent cell에 전기충격 형질전환 시킨 결과  $5.71 \times 10^4$ 의 적정농도를 얻어 효율을 높였다. 형질전환으로 얻은 cDNA library에서 임의로 콜로니를 선택하여 삽입유전자를 확인한 결과, *E.coli* 5 $\alpha$  competent cell에서 약 150 - 500 bp의 크기인 18개의 삽입유전자를 확인할 수 있었고, *E.coli* 10B competent cell에서 약 130 - 500 bp의

크기인 24개의 삽입유전자를 확인할 수 있었다. 삽입유전자가 확인된 무당벌레 cDNA library 유전자의 염기서열을 알기 위해 42개의 표본을 염기서열분석(MacroGen) 의뢰했으며, 그 결과 무당벌레 유전자 1개, 곤충 유전자 21개, 다른 종 20개의 상동성을 보이는 유전자를 확인하였고 곤충 유전자 21개 중 13개가 딱정벌레목 곤충의 유전자였다. 유전자 스크리닝 결과 알아낸 유전자들 중 14개의 유전자를 *in vitro* transcription을 통해 약 300 - 700 bp 크기의 double stranded RNA를 합성하였다. 무당벌레의 종령인 4령 유충에 합성한 double stranded RNA를 복부에 주입하여 표현형 변이를 관찰했으며, 그 결과 두 가지 유전자에서 표현형 변이가 보였다. 증류수를 주입한 개체의 알은 산란하지 3일이 지나고 부화했지만, dsHma 06을 주입한 개체의 알은 1주일이 지나도 부화하지 않고 쪼그라들고 색이 더 진해졌다. dsHma 08을 주입한 개체들의 다수가 용화 혹은 우화를 채 마치지 못하고 탈피 도중에 치사했다.

## Acknowledgements

본 연구는 2018년도 충남대학교 자체연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

## Authors Information

Young Nam Youn, <https://orcid.org/0000-0002-4956-1904>

Sang-Eun Park, Department of Agricultural Biology, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Researcher

## References

- Amdam GV, Simões ZL, Guidugli KR, Norberg K, Omholt SW. 2003. Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnology* 3:1.
- Antonio DSM, Guidugli-Lazzarini KR, Do Nascimento AM, Simoes ZLP, Hartfelder K. 2008. RNAi-mediated silencing of vitellogenin gene function turns honeybee (*Apis mellifera*) workers into extremely precocious foragers. *Naturwissenschaften* 95:953-961.
- Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, 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 Biotechnology* 25:1322-1326.
- Belicek J. 1976. Coccinellidae of Western Canada and Alaska with analyses of the transmontane zoogeographic relationship between the fauna of British Columbia and Alberta. *Questiones Entomologicae* 12:283-409
- Bellés X. 2010. Beyond *Drosophila*: RNAi In vivo and functional genomics in insects. *Annual Review of Entomology* 55:111-128.
- Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7:1513-1523.
- Bolognesi R, Ramaseshadri P, Anderson J, Bachman P, Clinton W, Flannagan R, Ilagan O, Lawrence C, Levine S, Moar W. 2012. Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *PLoS ONE* 7:e47534.
- Boo KS. 2001. Insect hormones and their actions. *Korean Journal of Applied Entomology* 40:155-196. [in Korean]

- Brown PMJ, Adriaens T, Bathon H, Cuppen J, Goldarazena A, Hägg T, Kenis M, Klausnitzer BEM, Kovar I, Loomans AJM, Majerus MEN, Nedved O, Pederson J, Rabitsch W, Roy HE, Ternois V, Zakharov IA, Roy DB. 2007. *Harmonia axyridis* in Europe: Spread and distribution of a non-native coccinellid. In *From Biological Control to Invasion: The Ladybird Harmonia axyridis as a Model Species*. Springer, Dordrecht 53:5-21.
- Chapin JB, Brou V. 1991. *Harmonia axyridis* (Pallas), the third species of the genus to be found in the United States (Coleoptera: Coccinellidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 93:630-635.
- Choi SY, Kim GH. 1985. Aphidivorous activity of a coccinellid beetle, *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae). *Korean Journal of Applied Entomology* 24:11-14. [in Korean]
- Ciudad L, Piulachs MD, Bellés X. 2006. Systemic RNAi of the cockroach vitellogenin receptor results in a phenotype similar to that of the *Drosophila* yolkless mutant. *FEBS Journal* 35:273-325.
- Coderre D, Lucas É, Gagné I. 1995. The occurrence of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) in Canada. *Canadian Entomologist* 127:609-611.
- David SR, Watkinsa NL, Serafina RB, Gilbertb LI. 1998. Ecdysteroids regulate yolk protein uptake by *Drosophila melanogaster* oocytes. *Journal of Insect Physiology* 44:637-644.
- Day WH, Prokrym DR, Ellis DR, Chianese RJ. 1994. The known distribution of the predator *Propylea quatuordecimpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) in the United States, and thoughts on the origin of this species and five other exotic lady beetles in eastern North America. *Entomological News* 105:244-256.
- Dobzhansky T. 1933. Geographical variation in lady-beetles. *The American Naturalist* 67:97-126.
- ESK and KSAE. 1994. Check list of insects from Korea (eds). Kon-Kuk University Press, Seoul, Korea.
- Ferran A, Iperiti G, Kreiter S, Quilicci S, Shanderl H. 1986. Preliminary results of a study of the potentials of some aphidophagous coccinellids for use in biological control. *Ecology of Aphidophaga*, Vol. 2. I. Hodek (ed.). pp. 479-484. Academia, Praha, Czech.
- Ferran A, Niknam H, Kabiri F, Picart J-L, De Herce C, Brun J, Iperiti G, Lapchin L. 1996. The use of *Harmonia axyridis* larvae (Coleoptera: Coccinellidae) against *Macrosiphum rosae* (Homoptera: Sternorrhyncha: Aphididae) on rose bushes. *European Journal of Entomology* 93:59-67
- Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Fjose A, Ellingsen S, Wargelius A, Seo HC. 2001. RNA interference: Mechanisms and applications. *Biotechnology Annual Review* 7:31-57.
- Freier B, Triltsch H. 1995. *Harmonia axyridis* (Pallas) – An interesting ladybird for biological plant protection. *Gesund Pflanzen* 47:269-271.
- Glisovic T, Bachorik JL, Yong J, Dreyfuss G. 2008. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Letters* 582:1977-1986.
- Gordon RD. 1985. The Coccinellidae (Coleoptera) of America north of Mexico. *Journal of the New York Entomological Society* 93:1-912.
- Grill CP, Moore AJ. 1998. Effects of a larval antipredator response and larval diet on adult phenotype in an aposematic ladybird beetle. *Oecologia* 114:274-282.
- Hagedorn H, Kunkel JG. 1979. Vitellogenin and vitellin in insects. *Annual Review of Entomology* 24:475-505.
- Hodek I, Honek A. 1996. *Ecology of Coccinellidae*. Kluwer Academic Publishers, London, UK.
- Hogan DJ, Riordan DP, Gerber AP, Herschlag D, Brown PO. 2008. Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS Biology* 6:e255.
- Huvenne H, Smagghe G. 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest

- control: Review. *Journal of Insect Physiology* 56:216-225.
- Iperti G, 1986. Les coccinellidae de France. *Phytoma* 14:22.
- Jung YB. 2016. cDNA library construction and application of RNA interference for gene functional analysis in *Harmonia axyridis*. M.S. dissertation, Chungnam National Univ., Daejeon, Korea. [in Korean]
- Kang EJ, Jo CW, Park CR, Yoon KS, Kang MA, Kwon HR, Seo MJ, Yu YM, Youn YN. 2009. Effects of environmental factors on elytra colored patterns of multicolored Asian lady beetles, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Koran Journal of Applied Entomology* 48:459-466. [in Korean]
- Kauffman WC, Schwalbe CP. 1991. Plant growth responses to *Aphis fabae* injury: Importance of predation by *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Behaviour and Impact of Ahidophaga*. Polgar L, Chambers RJ, Dixon AFG, Hodek I. (eds.). SPB Academic Publishing, Netherlands.
- Kenis M, Roy HE, Zindel R, Majerus MEN. 2007. Current and potential management strategies against *Harmonia axyridis*. *BioControl* 53:235-252.
- Kennerdell JR, Carthew RW. 1998. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 95:1017-1026.
- Kidd K, Nalepa C, Day E, Waldvogel M. 1995. Distribution of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) in North Carolina and Virginia. *Proceedings of Entomological Society of Washington* 97:729-731.
- Kim JH, Seo EY, Kim JK, Lim HS, Yu YM, Youn YN. 2015. Gene expression in plant according to RNAi treatment of the tobacco Whitefly. *CNU Journal of Agricultural Science* 42:81-86. [in Korean]
- Kim SH, Seo MJ, Park MW, Yu YM, Youn YN. 2012. Molecular cloning of prophenoloxidase (PPO) gene related to melanin formation of elytra of *Harmonia axyridis*. *CNU Journal of Agricultural Science* 39:23-28. [in Korean]
- Ko NY, Youn YN. 2015. Change of population density of tobacco whitefly (*Bemisia tabaci*, Aleyrodidae, Hemiptera) by RNAi. *CNU Journal of Agricultural Science* 42:7-13.
- Koch RL. 2003. The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: A review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *Journal of Insect Science* 3:1-16.
- Koch RL, Burkness EC, Burkness SJW, Huschison WD. 2004. Phytophagous preferences of the multicolored Asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) to autumn ripening fruits. *Journal of Economic Entomology* 97:539-544.
- Koch RL, Galvan TL. 2008. Bad side of a good beetle: The North American experience with *Harmonia axyridis*. *Biocon* 53:23-35.
- Koch RL, Venette RC, Hutchison WD. 2006. Invasions by *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) in the western hemisphere: Implications for South America. *Neotropical Entomology* 35:421-434.
- Komai T. 1956. Genetics of ladybeetles. *Advances in Genetics* 8:155-189.
- Kozhanova NI. 2000. Hormonal regulation of gametogenesis in insect. *Tsitologiya* 42:115-127.
- Kuwayama H, Yaginuma T, Yamashita O, Niimi T. 2006. Germ - line transformation and RNAi of the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*. *Insect Molecular Biology* 15:507-512.
- Lamana ML, Miller JC. 1998. Temperature-dependent development in an Oregon population of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Environmental Entomology* 27:1001-1005.
- Lee DH, Seo MJ, Kang EJ, Park CR, Jo CW, Hwang IC, Yu YM, Youn YN. 2011. Molecular identification of AFLP fragments associated with elytra color variation of the Asian ladybird beetle, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 14:99-105.
- Liu E, Page JE. 2008. Optimized cDNA libraries for virus-induced gene silencing (VIGS) using tobacco rattle virus. *Plant Methods* 4:1-13.
- Liu Q, Rand TA, Kalidas S, Du F, Kim HE, Smith DP, Wang X. 2003. R2D2, a bridge between the initiation and



- effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science* 301:1921-1925.
- Majerus MEN. 1994. Ladybirds. Harper Collins Publishers, Toronto, Canada.
- Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao WY, Wang LJ, Huang YP, Chen XY. 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology* 25:1307-1313.
- Markkula M, Tiittanen K. 1980. Biological control of pests in glasshouses in Finland – the situation today and in the future. *Bulletin SROP/WPRS* 3:127-134.
- Michie LJ, Mallard F, Majerus MEN, Jiggins FM. 2010. Melanic through nature or nurture: Genetic polymorphism and phenotypic plasticity in *Harmonia axyridis*. *Journal of Evolutionary Biology* 23:1699-1707.
- Mitchell III RD, Ross E, Osgood D, Sonenshine DE, Donohue KV, Khalil SM, Thompson DM, Michael RR. 2007. Molecular characterization, tissue-specific expression and RNAi knockdown of the first vitellogenin receptor from a tick. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37:375-388.
- Niimi T, Kuwayama H, Yaginuma T. 2005. Larval RNAi applied to the analysis of postembryonic development in the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*. *Journal of Insect Biotechnology and Sericulture* 74:95-102.
- Ohde T, Masumoto M, Morita-Miwa M, Matsuura H, Yoshioka H, Yaginuma T, Niimi T. 2009. *Vestigial* and *scalloped* in the ladybird beetle: A conserved function in wing development and a novel function in pupal ecdysis. *Insect Molecular Biology* 18:571-581.
- Osawa N, Nishida T. 1992. Seasonal variation in elytral colour polymorphism in *Harmonia axyridis* (the ladybird beetle): The role of non-random mating. *Heredity* 69:297-307.
- Oshima C, Tokuchiro S, Horonori I. 1956. Studies on the mechanism of pattern formation in the elytra of lady beetles. *Genetics* 41:4-20.
- Park CR, Kim JH, Yu YM, Youn YN. 2016. Differentiation of elytra color patterns in multicolored Asian ladybird beetle, *Harmonia axyridis* (Coleoptera; Coccinellidae), using AFLP analyses. *Korean Journal of Applied Entomology* 55:245-256. [in Korean]
- Roy H, Wajnberg E. 2008. From biological control to invasion: The ladybird *Harmonia axyridis* as a model species. *BioControl* 53:1-4.
- Seo MJ, Kang EJ, Kang MK, Lee HJ, Seok HB, Lee DH, Park SN, Yu YM, Youn YN. 2007. Phenotypic variation and genetic correlation of elytra colored patterns of multicolored Asian lady beetles, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in Korea. *Korean Journal of Applied Entomology* 46:235-248. [in Korean]
- Seo MJ, Kim GH, Youn YN. 2008. Differences in biological and behavioral characteristics of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) according to colour patterns of elytra. *Korean Journal of Applied Entomology* 132:239-247. [in Korean]
- Seo MJ, Youn YN. 2000. The Asian ladybird, *Harmonia axyridis*, as biological control agents: I. Predacious behavior and feeding ability. *Korean Journal of Applied Entomology* 39:59-71. [in Korean]
- Seo MJ, Youn YN. 2001. The Asian ladybird, *Harmonia axyridis*, as a biological control agent: Control effects of aphid populations in the greenhouses at different seasons. *CNU Journal of Agricultural Science* 28:18-26. [in Korean]
- Seo MJ, Youn YN. 2002. Effective preservation methods of the Asian ladybird, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae), Asian application strategy for the biological control of aphids. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 5:209-214.
- Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L, Plasterk RH, Fire A. 2001. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107:465-476.
- Singh P. 1977. Artificial diets for insect, mite, and spiders. IFI/Plenum Data Corp., NY, USA.
- Soares AO, Coderre D, Schanderl H. 2001. Influence of prey quality on the fitness parameters of *Harmonia*

- axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae). European Journal of Entomology 98:287-293.
- Swevers L, Liu J, Huvenne H, Smagghe G. 2011. Search for limiting factors in the RNAi pathway in silk moth tissues and the Bm5 cell line: the RNA-binding proteins R2D2 and translin. PLoS ONE 6:e20250.
- Tan CC. 1946. Mosaic dominance in the inheritance of color patterns in the lady-bird beetle, *Harmonia axyridis*. Genetics 31:195-210.
- Tan CC, Li JC. 1932. Variations in the color patterns in the lady-bird beetle, *Ptychanatis axyridis* Pall. Peck National History Bulletin 7:175-193.
- Tan CC, Li JC. 1934. Inheritance of the elytral color patterns of the lady-bird beetle, *Harmonia axyridis* Pallas. The American Naturalist 68:252-265.
- Tedders W, Schaefer P. 1994. Release and establishment of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in the southeastern United States. Entomological News 105:228-243.
- Tomoyasu Y, Denell RE. 2004. Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. Development Genes and Evolution 214:575-578.
- Yu L, Christiaens O, Liu J, Niu J, Cappelle K, Caccia S, Huvenne H, Smagghe G. 2013. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: An overview and future directions. Insect Science 20:4-14.
- Zou Jr. BX, Stoffolana JG, Nordin JH, Yin CM. 1988. Subunit composition of vitellin, and concentration profiles of vitellogenin, and vitellin in *Phormia regina* (Meig.) following a protein meal. Comparative Biochemistry and Physiology 9:861-867.