

RFLP에 의한 누에 계통간의 DNA 다형성 분석

강현아 · 성수일*

농촌진흥청 잠사곤충연구소, 수원대학교

RFLP Analysis of Silkworms for DNA Polymorphism

Hyun Ah Kang, Su Il Seong*

National Sericulture and Entomology Research Institute RDA, Suwon, Korea

*College of Natural Science, The University of Suwon, Suwon, Korea

Abstract

DNA restriction fragment length polymorphisms(RFLPs) were used for the classification of 22 leading silkworm races and wild silkworm, *Bombyx mandarina*. A genomic DNA library from silkworm was partially constructed and was prescreened to evaluate the selected DNA probes. Three DNA probes (SP1-13, SP1-28, 10-42) were selected to determine the polymorphism between silkworm races. As a result, high polymorphism with the probe SP1-28, moderate polymorphism with SP1-13 and monomorphism with 10-42 were observed.

Key words : RFLP, silkworm, polymorphism, probe

緒 論

곤충의 genome 구조에 대한 연구는 독특한 생물적 특성을 가지고 있는 소수의 전형적인 모델을 중심으로 이루어져 왔다. 그 대표적인 예가 초파리로서 이들은 genome size가 작고 염색체 수가 적으며 높은 생식률을 가지고 있고 실험실 내에서 키우기 쉬우며 교배능력이 뛰어나고 무엇보다도 거대염색체를 가지고 있다는 장점이 있다(C.A.Zraket *et al.*, 1990). 그러나 이들에 대한 분류는 지금까지 주로 표현형에 의한 고전적인 유전분석에 의존하여 왔다. 그러나 근래 DNA의 분석기술이 향상되면서 생물의 종 분류에 대한 새로운 방법론이 대두되었다. 그중의 하나가 DNA RFLP법을 이용한 genome 분석법으로 이 방법에 의해 원하는 모든 종에서 실제적인 linkage map의 작성이 가능하게 되었다. 이러한 DNA 수준의 연구는 1980년대 중반부터 구미에서 곤충의 종과 계통의 유연관계를 추정하기 위해 시작되었다. 초기에

는 주로 RFLP를 이용한 미토콘드리아 DNA와 ribosomal RNA 유전자등의 해석이 주류를 이루었으나, 최근에는 DNA fingerprint법, PCR법 등이 개발되어 DNA 다형 검출의 감도와 정도(精度)가 급속히 향상되고 있다. 이와 함께 기술상의 단순화도 병행 발전됨으로써 실제 응용영역도 상당히 광범위해지고 있다.

이러한 DNA 수준의 연구는 곤충의 종이나 계통 분류에 대한 유전해석 및 그것의 식별과 기능 판정까지도 가능하게 해 주기 때문에 집단 유전학, 행동학, 개체군 생태학 등 순수학문분야는 물론 해충방제 등 응용곤충학분야에 종사하는 연구자, 기술자 간에도 주목을 받고 있다. 실제 일본에서는 최근들어 일부의 농업해충을 대상으로 DNA 다형의 검출이 시도되어지고 있다.

RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)란 “제한효소단편길이의 다형”으로 해석되는데, 유전자 DNA의 어느 특정영역을 역시 특정의 제

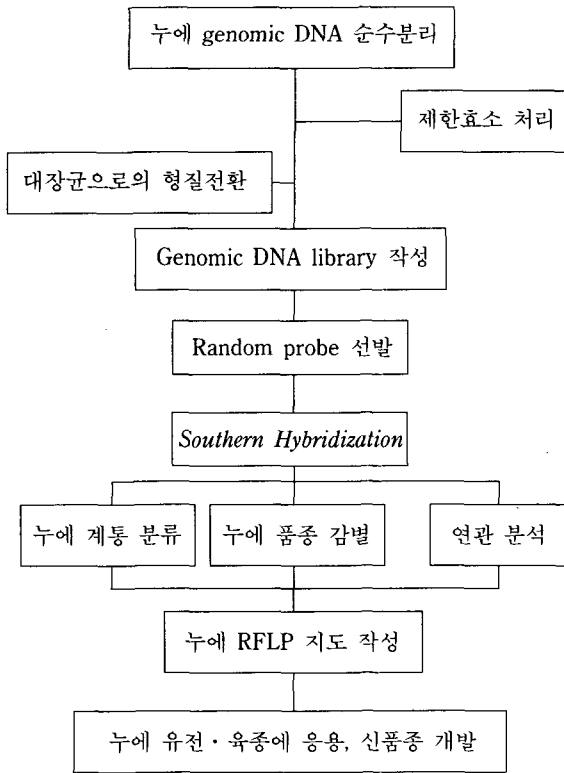
한효소로 처리했을 때 생기는 절단된 단편이 생물의 종 또는 개체에 따라 각각 다를 수 있어 이 상이한 DNA단편을 전기영동적으로 분별하여 유전자의 다형을 알아 보는 방법이다. DNA 단편의 다형이 생기는 원인으로서는 길다란 유전자 내에서 어느 인접하는 2개의 제한효소 절단점 A, B가 있다고 할 때 돌연변이에 의해 인식배열염기가 변화하였다던가, A-B간의 DNA에 결실 또는 삽입이 일어났다거나, 절단점을 보유하고 있는 DNA영역이 다른 DNA영역과 치환되었다거나 하는 경우등을 생각할 수 있다. 따라서 만약 생물의 종간, 품종간 및 개체간에 이와 같은 DNA의 변이가 생기게 되면 당연히 서로 다른 DNA 단편이 얻어지게 되고, 전기영동상에서 제한효소 단편길이의 다형으로 검출 가능하다. DNA 다형은 보통 Southern hybridization에 의해 검출하지만(Southern, 1975) 대상으로 하는 생물종, 제한효소에 절단되는 DNA 영역, 또는 DNA probe의 종류등에 따라서 나타나는 RFLP의 감도는 매우 다를 수 있다.

RFLP에 관한 연구는 Grodzicker *et al.* (1974)이 adenovirus에서 온도 감수성 돌연변이의 유전자 지도 작성에 마커로 이용한 것이 처음이다. 이후, 최초의 병 진단 마커로 이용된 것은 심한 빈혈을 일으키는 sickle-cell anemia였으며(Kan and Dozy, 1978), single copy DNA probe에 의한 RFLP pattern으로 유전, 유전병의 유전자 탐색을 위한 RFLP기법 이용 가능성이 제시 되었다(Botstein *et al.*, 1980; Bishop and Skolnick, 1980). 1983년 Beckman, Soller와 Tanksley는 식물 유전에 대한 기초연구뿐만 아니라 작물육종 program에 RFLP marker의 잠재적 이용성이 높다고 주장하였다. 즉 소수의 구조유전자에 지배되는 양적형질에 관해서는 RFLP이용에 의해 양적형질 유전자좌위(quantitative trait loci, QTL)의 linkage map상의 위치 및 유전자 효과를 해석함으로써 육종상 중요한 양적 형질의 선발이 효율적으로 이루어질 수 있다는 것이다. 지금까지 RFLP법을 이용하여 tomato(Bernatzky and Tanksley 1986), 옥수수(Helentjaris *et al.* 1986), 상치(Landry *et al.* 1987), 그리고 상추노균병을 일으키는 곰팡이(Hulbert *et al.* 1988)등에 대해 부분적인 RFLP 연관지도가 작성되었다.

Molecular marker로서 그간 유용하게 많이 사용되어온 Isozyme에 의한 다형분석은 광범위하게 적

용하기에는 확인 가능한 유전자 좌위가 불충분하고 또한 제한적이다. 그러나 RFLP marker는 (1)유전자 수가 충분하기 때문에 적용범위가 넓고, (2)hetero 개체에서 열성유전자의 검출이 가능하며, (3)DNA의 구조상의 변이를 검출하는 것이므로 재배환경이나, 다른 좌위의 유전자로부터의 영향을 받지 않고 (4) 식물체의 생육단계에 의한 변화가 없어 어린 식물의 사용이 가능하여 조기 검정이 가능하며 (5)실험실에서 계속 실험할 수 있어 연구 진행의 속도가 빠르다는 등 몇가지 탁월한 장점을 갖고 있어 이에 대한 관심이 고조되고 있다(Beckmann and Soller 1989; Murray *et al.*, 1989). 이와 같이 RFLP에 의해 mapping된 marker들은 germplasm 관리로부터 유전적 다양성 분류 및 계통발생과 관련된 문제점들을 체계화하는데 이용할 수 있으며, 또한 유전자 tagging을 통하여 유용한 농업적 특성을 선발하는데 직접적으로 이용할 수 있다. 결국 mapping된 DNA marker들은 목표로 쓰이는 유전자의 산물을 모를때 이들 유전자를 cloning하기 위한 방법으로 또는 목적으로 하는 생물의 genome연구에도 활용가치가 높은 것이다.

나비목 곤충 중 유일하게 linkage map이 작성된 누에(silkworm, *Bombyx mori*)는 고대 중국에서 기원되어 세계로 분포되었다. 잠업은 매우 중요한 산업중의 하나였으며, 특히 경제적으로 가치가 있는 중요한 유전적 특징들이 상당히 많이 규명되었다. 지금까지 알려진 누에의 표식유전자 수는 300여종에 이르고 있으며, 이들 중 연관군 또는 염색체 상의 위치를 알고 있는 유전자는 200여종에 이르고 있다. 이들 유전자중 우리나라에서 유전학적으로 연구된 유전자는 +P(한성 형잠육성에 이용 : T(W; 2)+P), Y(한성황견 누에 품종육성에 이용 : T(W; 2)Y), +W2(한성 흑란누에 품종 육성에 이용 : T9W; 10)+W2)등이 있으나 이들 유전자에 대한 분자수준의 연구는 거의 이루어져 있지 않다. 그러나 외국의 경우, 최근 분자 수준의 분석 기술의 향상에 힘입어 지금까지의 형질 중심의 고전적인 유전자 분석에서 분자 유전학적 해석으로의 방향전환이 활발하게 추진되고 있다. 즉 일본에서는 최근 fibroin, sericin, chorion등 누에의 많은 gene들이 cloning되었고 물리적 유전자 구조도 결정되었다(Suzuki *et al.*, 1990; Goldsmith and Kafatos, 1984). 또한 cDNA 혹은 genomic DNA library로부터 Southern blotting에 의해



[누에에서의 RFLP 실험과정 및 활용 방안]

polymorphic한 pattern을 보이는 clone들이 screening되었고(Goldsmith and Shi, 1991; Yukuhiro *et al.*, 1992), random amplified polymorphic DNA (RAPD)법에 의한 누에의 linkage map도 작성되고 있다(SHIMADA *et al.*, 1991).

누에의 경우 300여 종류의 표식인자에 의해 계통이 분류되고 있으나, RFLP를 이용하면 이보다 훨씬 많은 종류의 유전자 검색이 가능하고 비교적 단기간내에 계통 분류가 가능하다. 그리고 지금까지의 돌연변이를 이용하여 작성된 연관지도는 DNA 수준에서의 유전자 해석이 불가능하므로 RFLP를 이용한 계통 또는 품종간의 동정법개발 및 이에 따른 RFLP 지도 작성이 시급하다. 또한 종래의 표현형 중심의 계대 선발에 의한 누에 육종기간이 소요되나 DNA 다형현상을 이용한 특정 유전자 식별법이 개발되면 정확한 유전자의 검색이 가능하고 육종기간을 단축시킬 수 있어 RFLP 지도작성의 중요성은 아무리 강조하여도 지나침이 없다. 그러나 누에 곤충에서의 이 분

야에 관한 우리나라의 연구수준은 거의 초보적인 단계에 불과하며, RFLP의 분석기술도 아직 확립되어 있지 않은 실정이다.

따라서 본 연구자는 누에에서의 RFLP 관련 기술체계를 확립함과 아울러 유용 probe를 선발함으로써 누에 품종간의 계통분류 및 우수한 누에 품종의 육성을 위한 기초자료를 얻기 위해 이 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1.1. 공시 곤충

본 실험에 사용한 누에품종은 22개의 원종(일본종:잠113, 잠119, 잠121, 잠123, 잠125, 잠127, 잠129, 잠131, 잠133, JS111, 5.3, 중국종:잠114, 잠120, 잠122, 잠124, 잠126, 잠128, 잠130, 잠132, 잠134, CS120, 6.8) 및 멧누에로서, 누에는 잠사곤충연구소의 표준 사육관리법에 따라 뽕잎으로 사육하였다.

2. 실험방법

2.1. 누에 genomic DNA의 분리

누에 총 genomic DNA의 조제는 Tsujimoto and Susuki(1984)의 방법에 준하여 행하였다. 즉 5령2일 유충 50두를 해부하여 후부건사선을 적출한 후 차가운 1×SSC(0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate pH 7.0)에 두번 세척하여 액체질소에 동결, -80℃에 저장하였다. 보존한 후부건사선을 액체질소를 조금씩 가하면서 유발에 갈아 만들어진 조직분말을 5 ml의 DNA 추출용 buffer(0.5% SDS, 5 mM EDTA, 20 mM Tris-Cl(pH 7.5), 0.1 M NaCl, 10 µg/ml proteinase K)에 소량씩 넣었다. Dounce형 호모게나이저로 수회 균일화한 후 37℃에서 10~20분간 배양하였다.

여기에 다시 15 ml의 1 M Tris-Cl(pH 7.5)과 20 ml의 phenol:chloroform:isoamylalcohol(25:24:1)을 가하여 혼합 후 원심분리(4℃, 10,000 rpm, Hanil Centrifuge Co., LTD)하여 상층액을 수집하였다. 상층액에 동량의 phenol:chloroform(1:1) 추출을 2회 반복한 후 최종적으로 모인 수층에 0.8 ml의 5 M NaCl과 20 ml의 isopropanol을 가하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 유리봉으로 건져 20 ml의 TE buffer(20 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 녹인

후 다시 0.8 ml의 5 M NaCl과 20 ml의 isopropanol을 가하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 다시 TE buffer에 용해 후 10 µg/ml의 RNase A(Sigma社 제품)를 가하여 37°C에서 2시간 반응시켰다. 다시 0.1% SDS와 10 µg/ml의 proteinase K를 가하여 37°C에서 2시간 반응 후 20 ml의 phenol : chloroform(1:1)으로 2회 반복 추출하였다. 추출 후 수집된 상등액에 0.8 ml의 5 M NaCl과 20 ml의 isopropanol을 가하여 DNA를 침전시켰고 여기에 5 ml TE buffer를 넣어 용해한 후 이후의 시험에 사용하였다.

2.2. 제한효소 처리 및 agarose gel 전기영동

RFLP assay에 적절한 제한효소를 골라내기 위해 여러가지 제한효소로 추출한 genomic DNA를 절단하여 보았다. 본 실험에 사용한 제한효소는 모두 Koscoco社 제품을 구입하여 사용하였다. 즉 ScaI, XbaI, HindIII, EcoRV, Sau3A, DraI, BamHI, BglII, BglI, EcoRI, PstI을 DNA µg당 각각 10 unit씩 처리하여 37°C에서 최소한 12시간 이상 반응시킨 후 절단된 DNA를 염이 첨가된 ethanol에 침전시켜 TE buffer에 용해한 후 0.8 % agarose gel에 약 40~50 V/cm로 전기영동하였다.

2.3. Genomic DNA library 제작

분리한 total genomic DNA를 EcoRI으로 처리한 후 DNA 절단조각들을 pUC18 vector의 multicloning site에 삽입시켰다. Ligation은 EcoRI으로 자른 DNA 3 µg에 EcoRI으로 잘라 BAP 처리한 pUC18 vector (Pharmacia社 제품) 2 µl를 섞고 T4 DNA ligase (Kosco社 제품, 200,000 U/ml) 1 µl를 넣어 total 20 µl의 반응 혼합액을 만들어 시행하였다(16°C, overnight). 이들 재조합 DNA를 XL1-blue 대장균 strain에 형질전환 시켰다. 형질전환은 competent cell 200 µl에 ligation mixture의 1/10양을 넣고 얼음에서 30분간 방치 후 42°C에서 90초간 heat shock을 주어 행하였다. Heat shock 후 X-gal, IPTG, tetracycline, ampicillin(Sigma社 제품 구입)이 함유된 선택배지에 도말 후 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 그 후 white, ampicillin-resistant colony만을 선발하였다. 선발된 colony를 ampicillin이 첨가된 LB broth에 하룻밤 배양한 후 mini-scale DNA preparation에 의해 대장균으로부터 재조합 DNA를 분리하였다. 분

리한 재조합 DNA는 EcoRI 처리에 의해 삽입된 DNA와 vector를 분리한 후 전기영동으로 확인하였다.

2.4. Random probe 선발 및 labeling

Plasmid mini prep.으로 삽입된 DNA를 확인하여 이들 중 1~3 Kb 크기의 insert만을 agarose gel 상에서 잘라내어 elution kit(Fine PCR Precision Ind. Co.)으로 DNA를 elution한 후 chemiluminescence로 detection하는 DIG-system(Boehringer Mannheim社에서 구입)으로 labeling하였다. 우선 95°C에서 10분간 열처리하여 single strand로 된 plasmid DNA 약 1 µg에 hexanucleotide mixture 2 µl, DIG-labeling mixture 2 µl, klenow enzyme 1 µl(2 unit/ µl)를 넣어 총 20 µl의 반응혼합액을 만든 후 37°C에 3시간 이상 반응 시켰다. 반응 후 EDTA로 반응을 정지시키고 염이 첨가된 ethanol로 labeled DNA를 침전시킨 후 최종 50 µl의 증류수에 녹여 -20°C에 보관하였다.

2.5. Probe의 분양

본 연구에서의 random probe 선발과 병행하여 외부에서 제조된 probe를 일부 수집, DNA 다형성 검토에 참조하였다. 분양받은 probe는 일본 잠사·곤충 농업기술연구소의 Toshiki Tamura 박사로부터의 10-42 였다. 10-42 probe는 pUC19에 삽입되어 있는 insert DNA를 잘라 elution후 위와 같은 DIG-system으로 labeling하여 사용하였다.

2.6. Genomic copy number 추정을 위한 clone의 prescreening

선발한 random probe의 copy수를 추정하기 위하여 분리한 plasmid clone을 EcoRI으로 절단한 후 0.8 % agarose gel에 70V/cm로 3시간 정도 전기영동한 후 변성시켜 nylon membrane (Boehringer Mannheim社 제품)에 vacuum transfer하였다. Membrane에 옮긴 후 UV-crosslinker(Spectronic Co.)를 이용하여 DNA를 filter에 고정시키고 건조시켰다. 누에 genomic DNA를 HindIII로 절단한 후 labeling하여 위에서 만들어진 filter와 hybridization하여 나타난 signal의 강약에 의해 low copy number를 가지는 probe를 선발하였다.

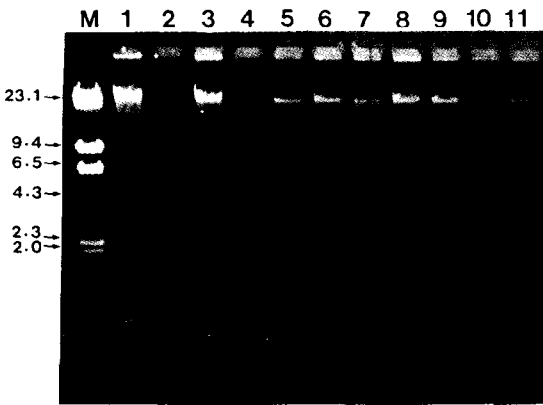


Fig. 1. Agarose gel analysis of posterior silk gland DNA isolated from 5th instar *Bombyx* larvae. Undigested genomic DNAs extracted from the Japanese silkworm strains were subjected to electrophoresis in 0.6% agarose gel buffered with 0.04 M TAE, pH 8.0 and stained with ethidium bromide (1 μ g/ml). Lanes from 1 to 11 contained the genomic DNAs from JAM 113, JAM 119, JAM 121, JAM 123, JAM 125, JAM 127, JAM 129, JAM 131, JAM 133, JS 111 and 5.3, respectively. *Hind*III digested bacteriophage λ DNAs (lane M) were used as molecular weight markers.

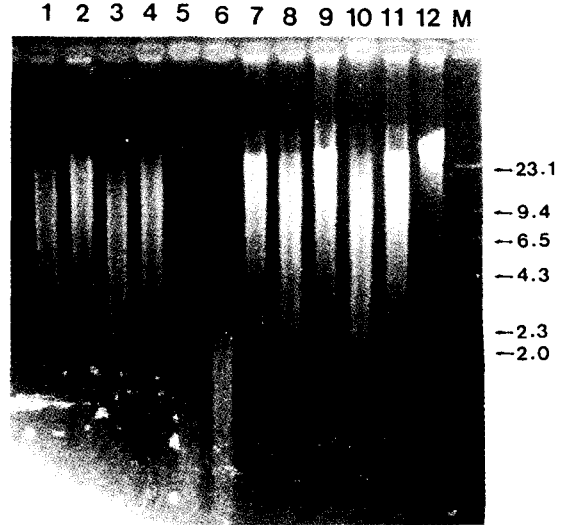


Fig. 2. Evaluation of several restriction enzymes which digest the *Bombyx* DNA to completion with the corresponding enzymes. The DNAs extracted from the silkworm strain, *C*₃ were used for the evaluation 1; *Scal*, 2; *Xba*I, 3; *Hind*III, 4; *Eco*RV, 5; *Sau*3A, 6; *Dra*I, 7; *Bam*HI, 8; *Bgl*III, 9; *Bgl*III, 10; *Eco*RI, 11; *Pst*I, 12; undigested *Bombyx* genomic DNA, M; marker.

2.7. Enzyme screening

선발된 probe에 제한효소 밴드 수 및 polymorphism을 나타내는 적절한 제한효소를 선발하기 위해 일본종, 중국종, 교잡종, 멧누에 각각 1종씩을 *Eco*RI, *Pst*I, *Bam*HI, *Xba*I으로 DNA μ g당 10 unit씩을 각각 처리한 후 선발된 probe와 hybridization하여 이들 중 polymorphism을 보이는 enzyme을 선발하였다.

2.8. Southern Hybridization

장려잠품종 22개 원종 및 멧누에의 genomic DNA 약 3~5 μ g을 선발된 제한효소로 처리한 후(10 unit/ μ g), 전기영동하여 positively charged nylon membrane에 약 2시간 vacuum transfer시켰다. transfer 후 UV-crosslinker로 DNA를 membrane에 고정시키고 hybridization tube에 넣어 68°C에서 2시간 이상 prehybridization시켰다. prehybridization시킨 후 용액을 따라 버리고 95°C에서 10분간 열처리한 denatured DNA probe를 10 ml의 hybridization 용액과 함께 68°C에서 12시간 이상 hybridization 하였다. Hybridization은 20 \times SSC, 10% blocking reagent (Boeh-

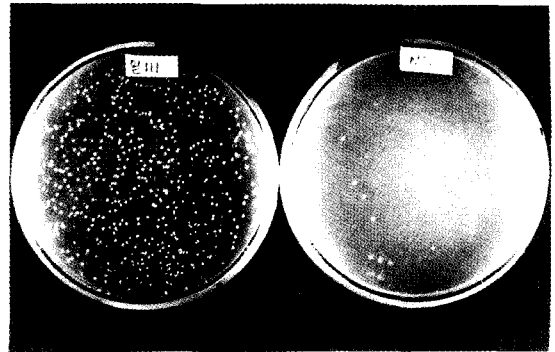


Fig. 3. *E. coli* cells transformed with recombinant pUC 18-*Bombyx* DNA.

ringer Mannheim 社 제품), 10% N-laurylsarcosine, 10% SDS의 조건에서 행하였으며 12시간 이상 반응 후에는 membrane을 high stringency(68°C, 0.1 \times SSC, 0.1% SDS)에서 세척하였다. 세척 후 X-ray film에 2시간 이상 노출시켰다.

결과 및 고찰

1. 누에 Genomic DNA의 순수분리

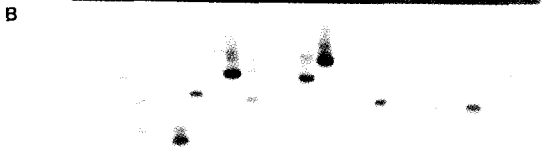
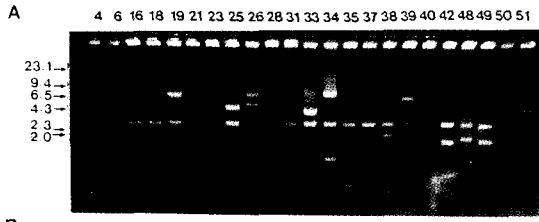


Fig. 4. A) Each plasmid DNA from silkworm clones was digested with *EcoRV* and separated by 0.8% agarose gel electrophoresis. B) Southern blot analysis of the insert DNA with total genomic DNA labeled by the DIG-system.

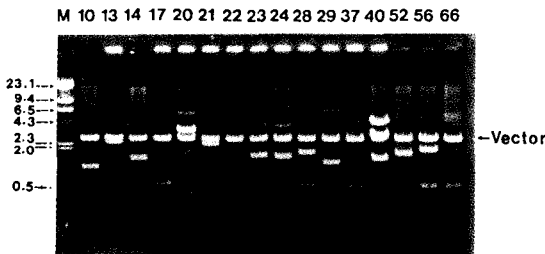


Fig. 5. Selection of several clones to detect polymorphism. One μg of recombinant plasmid DNA was digested with *EcoRI* and analyzed by 0.8% agarose gel electrophoresis.

22계통의 장려잠품종(*Bombyx mori*) 및 야생 멧누에(*Bombyx mandarina*)의 고분자 genomic DNA를 종령 유충의 후부 전사선으로부터 분리, agarose 전기영동한 결과는 그림1과 같다.

품종별로 23.1 Kb을 전후한 고분자 genomic DNA가 비교적 깨끗하게 분리된 것을 알 수 있다.

2. 제한효소의 선발

분리한 누에 genomic DNA를 완전히 소화할 수 있는 제한효소를 선발하기 위해 여러가지 제한효소를 screening하였다. 우선 genomic DNA를 C₃라는 한 품종으로 고정시키고 여기에 *ScaI*, *XbaI*, *Hind III*, *EcoRV*, *Sau 3A*, *DraI*, *BamHI*, *BglII*, *BglI*, *EcoRI*, *PstI* 등 11가지 제한효소를 DNA 1 μg 당 10 unit로 처리한 결과 *XbaI*, *HindIII*, *EcoRI* 등이 다른 en-

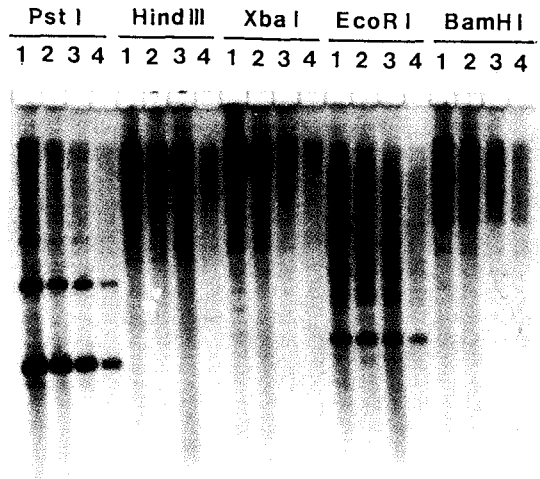


Fig. 6. Restriction patterns of silkworm DNAs. Genomic DNAs from 4 silkworm strains were cut with *PstI*, *HindIII*, *XbaI*, *EcoRI* or *BamHI* and separated by 0.8% agarose gel electrophoresis. Fractionated DNA fragments were blotted for the hybridization with SP1-13 probe. Lanes 1 through 4 contained the restricted DNAs from JAM 121, JAM 122, JAM121 X JAM123, and *Bombyx mandarina*, respectively.

zyme들에 비해 비교적 완전소화 가능한 제한효소로 생각되었다(그림 2). 따라서 삽입시킬 pUC18 vector의 multicloning site와 효소의 가격등을 고려하여 최종 제한효소를 *EcoRI*으로 선발하였다.

3. Genomic DNA library 제작

*EcoRI*으로 자른 DNA를 역시 *EcoRI*으로 잘라 BAP처리한 시판 pUC18 vector에 ligation시켜 재조합 DNA를 얻었다.

이들 재조합 DNA 약 3 μg 을 대장균 XL1-blue에 형질전환시켜 white, ampicillin-resistant colony를 얻었다. 이 경우 DNA library 제작에 사용한 누에 품종에 따라 서로 다른 형질전환 결과를 나타내었는데, 여러 품종을 대상으로 조사한 결과 일111품종을 사용했을 때 가장 많은 형질전환체 얻었으므로 이 후 실험에서는 일111 품종을 이용하였다(그림 3).

4. Genomic copy number 추정을 위한 clone의 prescreening

RFLP검정을 위해서는 single 이나 low copy no.의

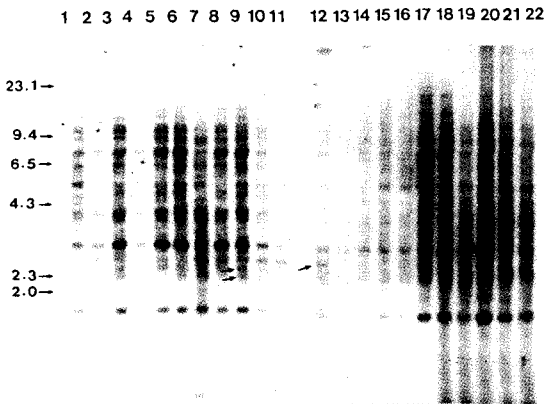


Fig. 7. Southern blot analysis between silkworm strains. Five μ g of DNA was digested with *EcoRI* restriction enzyme and fractionated on 0.8% agarose gel electrophoresis. Probe for the hybridization test were SP1-13. Polymorphic bands are indicated by arrows. Lanes from 1 to 22 contained the restricted DNAs from JAM 113, JAM 119, JAM 121, JAM 123, JAM 125, JAM 127, JAM 129, JAM 131, JAM 133, JS 111, 5.3, JAM 114, JAM 120, JAM 122, JAM 124, JAM 126, JAM 128, JAM 130, JAM 132, JAM 134, CS 120, 6.8, respectively.

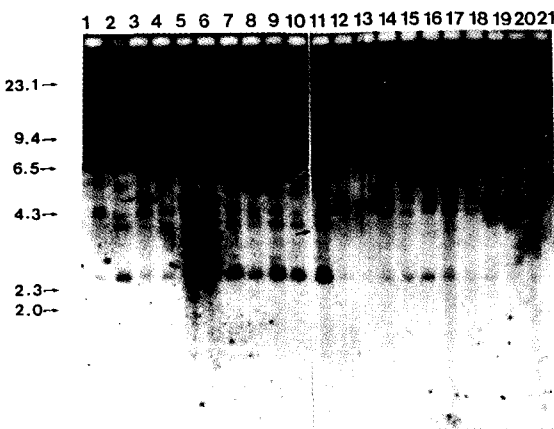


Fig. 8. Southern blot analysis between silkworm strains. Five μ g of DNA was digested with *XbaI* restriction enzyme and fractionated on 0.8% agarose gel electrophoresis. Probe for the hybridization test was SP1-28. Polymorphic bands are restricted DNAs from JAM 113, JAM 119, JAM 121, JAM 123, JAM 125, JAM 127, JAM 129, JAM 131, JAM 133, JS 111, JAM 114, JAM 120, JAM 122, JAM 124, JAM 126, JAM 128, JAM 130, JAM 132, JAM 134, CS 120 and *Bombyx mandarina*, respectively.

probe가 필요하다. 그러나 하나하나의 clone을 모두 다 Southern hybridization으로 검정한다는 것은 시

Table 1. Screening of *Bombyx* random probes constructed from the J111 genomic DNA.

Name of random probe	Insert size	Copy No.
SP1-10	\approx 1 Kb	S/L
SP1-13	\approx 3 Kb	S/L
SP1-14	\approx 1.5 Kb	H
SP1-17	\approx 0.5 Kb	H
SP1-20	\approx 1.3/0.3 Kb	H
SP1-21	\approx 2.3 Kb	H
SP1-22	\approx 3 Kb	S/L
SP1-23	\approx 1.5 Kb	M
SP1-24	\approx 1.5 Kb	S/L
SP1-28	\approx 1.8/0.5 Kb	S/L
SP1-29	\approx 1 Kb	S/L
SP1-37	\approx 0.5 Kb	M
SP1-40	\approx 1.3 Kb	H
SP1-52	\approx 1.8 Kb	H
SP1-56	\approx 2.0/0.5 Kb	H
SP1-66	\approx 0.5 Kb	S/L

H, highly repetitive DNA sequence; M, moderately repetitive DNA sequence; S/L, Single/low copy DNA sequence

간적으로나 경제적으로 매우 어려운 일이다. 그러므로 보다 간편한 probe screening 방법을 모색한 결과 일정한 크기의 digested genomic DNA 단편(약 2~3 Kb)을 DIG-system으로 labeling하여 한번의 southern blotting으로 40여개의 clone을 검색하는 방법을 사용하였다. 즉 *HindIII*를 처리한 약 2 Kb~3 Kb 정도의 genomic DNA가 포함된 agarose gel을 DNA elusion kit으로 elusion(3분~5분)하여 DIG-labeling 하였다. 그리고 약 40개의 clone을 *EcoRI*으로 절단 후 agarose 전기영동하여 알칼리로 변성시킨 후 transfer하여 전술의 Dig-labelled genomic DNA probe와 Southern hybridization 하였다. Hybridization의 결과에서 band부분에 signal이 나타나지 않은 것은 single이나 low copy DNA일 가능성이 높을 것으로 추정하였다(그림 4 A, B).

5. Random probe 선발

누에 genomic library로부터 얻은 clone들 중 약 200개 정도를 mini-prep하여 insert들을 확인하고 이들 중 single 또는 low copy를 나타낼 것으로 예상되는 16개 probe(0.5~3 Kb 정도)의 insert들을 모아 전기영동하여 그 위치를 확인하였다(그림 5). 이와 같은 방법에 의해 선발대상 probe들로부터 single

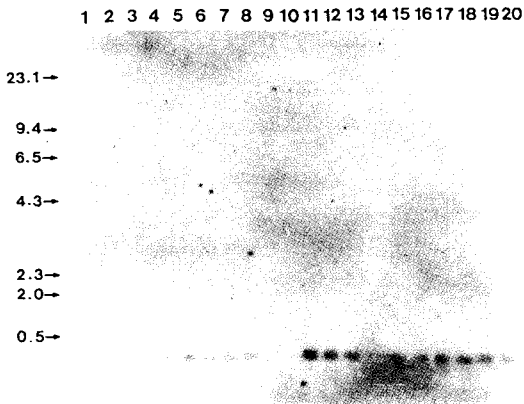


Fig. 9. Southern blot analysis between silkworm strains 5 μ g of DNA were digested with Pst I restriction enzyme and fractionated on 0.8% agarose gel electrophoresis. The probe used was nonradioactive 10-42. See Fig. 8 for the numerals.

또는 low copy로 보이는 16개의 probe을 최종 선발하여 genomic copy 수를 확인해 본 결과 표 1과 같은 성적을 얻었다. 즉, 16개의 probe들 중 누에품종의 다형성 검출에 이용될 수 있는 probe로는 SP1-10을 비롯한 7개이고, 나머지는 모두 high copy를 보이는 것들로 목적하는 probe선발에서 제외하였다.

6. 품종간 DNA 다형성 검출

다음, 이와같이 선발된 probe들이 누에의 각 품종별 DNA 다형성 검색에 실제 유용한지의 여부를 조사하였다. 즉 일본종, 중국종등 probe들과의 hybridization 실험결과로부터 각 품종간의 polymorphism 여부를 검토하였다. Hybridization의 실험결과는 genomic DNA를 어떤 제한효소로 절단했느냐에 따라 서로 polymorphism 출현 정도가 다른 것으로 생각되어 EcoRI, HindIII, PstI, BamHI, XbaI 등 5종의 제한효소에 대한 효소 screening도 병행하였다(그림 6).

본 실험으로부터 유용 probe로 선발된 SP1-1, SP1-13, SP1-22, SP1-24, SP1-28, SP1-29 및 SP1-66 등 7종의 probe 각각에 대하여 각 누에 품종별 DNA polymorphism을 조사하였으나 SP1-13, SP1-28이외는 상당한 polymorphism을 갖지 않았다.

이하 본 실험에 의해 선발된 SP1-13, SP1-28 probe와 외부에서 분양받은 probe을 사용하여 조사한 누에 품종간의 DNA polymorphism 조사결과를

간략히 정리한다.

6.1. probe SP1-13

Genomic DNA를 PstI으로 처리했을 경우 품종간에 뚜렷한 polymorphism을 보이지 않는 두개의 band가 검출되었으나, EcoRI으로 처리했을 때는 moderately repetitive sequence를 보이는 band가 검출되었고 약 2.3~2.5Kb 부근에서 다형성을 보이는 3개의 band들이 검출되었다(그림 7).

6.2. probe SP1-28

SP1-28을 probe로 사용하였을 경우, EcoRI으로 처리한 genomic DNA에서는 4.3 Kb 부근과 6 Kb 부근의 몇몇 minor band에서 품종간의 차이를 나타냈고, XbaI으로 처리한 genomic DNA에서는 4 Kb~6 Kb 사이의 몇몇 band에서 품종간의 다형성을 검출할 수 있었다(그림 8).

6.3. 분양 probe 10-42

Tamura 박사에게서 분양받은 probe 10-42의 경우 enzyme screening에서는 Daizo품종과 C108품종 사이에 polymorphism을 보였으나, 개인적 서신교환에 의해 자료제공 받음), 본 실험에서 공시한 누에품종들과의 hybridization에서는 PstI 제한효소 처리에서 뚜렷한 polymorphism을 보이지 않았다(그림 9).

이상과 같은 실험에서 누에 품종별 Southern blot에 각 probe를 사용했을 경우 예상할 수 있는 것은 highly repetitive sequence의 경우에 multiband를 보일 것이라는 것이다. 왜냐하면 곤충의 genomic DNA에는 repetitive DNA sequence가 존재하며 그러한 sequence는 genome 전체에 고루 퍼져 있기 때문이다. 실제로 Southern hybridization을 해 보면 많은 probe가 multiband를 보이고 있었고 너무 많은 수의 band로 인해 품종간 식별이 불가능하였다. 따라서 누에 품종을 효율적으로 구분하기 위해서는 각 품종당 약 4~5개의 다형성을 보이는 band가 이상적이라고 생각하고 single 혹은 moderately copy 수를 가지는 clone을 선발하고자 노력하였다. 그러나 실제로 이러한 single/low copy 수를 가지는 clone 역시 누에 품종간을 명쾌히 구분해 주지는 못하였다. 이러한 이유는 probe상의 문제도 있을 수 있고 대

상으로 하는 품종들이 유전적으로 서로 유사한 때문 이리라 생각되어지기도 한다. 따라서 앞으로의 반복 된 실험을 통하여 이러한 문제들을 극복하고, 또한 많은 수의 유용 probe를 얻기 위한 노력이 계속되어야 할 것이다.

결 론

본 연구는 누에 genomic DNA library를 작성하고 그로부터 random probe를 선발하여 장려잠품종간의 DNA 다형성의 분석을 목적으로 하였다. Genomic DNA로부터 얻어진 약 2000개의 clone으로부터 200개의 clone을 선정, 유용 probe를 선발한 결과 최종적으로 single 또는 low copy수로 예상되는 7개의 probe를 얻을 수 있었다. 그러나 실제로 probe 선발 과정을 통해 얻어진 probe들은 품종간에 수개내지 수십개의 band를 나타내는 것들이었으나 명확하게 품종간에 차이를 나타내는 probe는 쉽게 찾아지지 않았다. 이러한 결과는 첫째, probe 자체의 문제로서 이들 probe가 품종간에 뚜렷한 다형성을 나타내는 DNA 부위가 아니라는 것과 둘째, 본 실험에 사용된 누에품종들이 실제 농가에서 사육되고있는 장려품종의 원종들로서 오랜기간의 도태과정을 통해 유전적으로 상당히 가까워진 관계로 이들 품종으로부터 얻어진 genomic DNA 자체에 유전적 변이가 크게 존재하지 않을 가능성이 있는 점 등으로 해석 될 수 있다. 이러한 해석은 실제로 일본 국립유전학연구소로부터 분양받은 polymorphic한 probe가 본 실험에 사용된 누에품종 사이에서는 단일 band로 monomorphic하게 나타나고 있는 사실이 이를 뒷받침하고 있다. 따라서 앞으로의 과제는 작성된 genomic DNA library로부터 보다 많은 수의 probe 선발 실험을 통해 품종간 polymorphism을 보이는 유용 probe를 선발하는 일과 한편으로는 선발된 probe와 hybridization 시키는 genomic DNA를 될 수 있는 한 유전적 거리가 먼 누에 품종들을 대상으로 하는 일이다. 실제 미국과 일본에서 누에의 RFLP 나 RAPD map 작성시 유전적으로 원연관계에 있는 C108과 Daizo 품종을 선정하여 사용하고 있는바 이 두 품종은 최근 일본으로부터 입수하여 앞으로 본 연구의 지속적인 수행에 사용할 예정이다.

적 요

RFLP법에 의한 누에품종의 계통분류를 목적으로 유용 probe의 선발 실험을 행하여, 얻어진 2개의 probe SP1-13, SP1-28과 외부에서 분양 받은 probe 10-42을 사용하여 22개 현 장려 누에품종과 멧누에 대한 DNA 다형성을 조사하였다. 조사결과 이들 probe들 중 SP1-28에서 품종간의 다형성을 나타내는 수종의 band가 검출되었고, SP1-13에서도 다형성을 보이는 소수의 band가 인정 되었으나, 10-42으로부터는 모든 품종에서 monomorphic한 한개의 band만이 검출되었다.

인 용 문 헌

- Allard, R. W. (1956) Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity, *Hilgardia* **24**: 235-278
- Beckmann, J. S. and Soller, M. (1983) Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs, *Theor. Appl. Gen.* **67**: 35-43
- Beckmann, J. S. and M. Soller (1989) Backcross inbred lines for mapping and cloning of loci of interest: Development and application of molecular markers to problems in plant genetics. In: Helentjaris, T. and B. Burr (eds). Development and application of molecular markers to problems in plant genetics. Current Communications in Mol. Biol. Cold Spring Harbor Laboratory. pp. 117-122
- Bernatzky, R. and Tanksley, S. D. (1986) Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences, *Genetics* **112**: 887-898
- Bonierbale, M. W., Plaisted, R. L. and Tanksley, S. D. (1988) RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato, *Genetics* **120**: 1095-1103
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. and Davis, R. W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *Am. J. Hum. Genet.*
- Burr, B., Burr, F. A., Thompson, K. H., Albertson, M. C. and Stuber, C. W. (1988) Gene mapping with recombinant inbreds in maize, *Genetics* **118**: 519-526
- C. A. Zraket, J. L. Barth, D. G. Heckel and A. G. Abbott (1990) Genetic linkage mapping with restriction fragment length polymorphisms in the Tobacco budworm, *Heliothis virescens*, *Molecular Insect Science*.
- Chang, C., Bowman, J. L., DeJohn, A. W., Lander, E. S. and Meyerowitz, E. M. (1988) Restriction fragment length polymorphism linkage map for Arabi-

- dopsis thaliana, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 6856-6860
- Collins F. S. and Weissman S. M.** (1984) Directional cloning of DNA fragments at a large distance from an initial probe: a circularization method. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81**: 6812-6816
- Dalls, J. F.** (1988) Detection of DNA "fingerprints" cultivated rice by hybridization with a human minisatellite DNA probe. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **35**: 6831-6835
- Dally, A. and Second G.** (1988) Analysis of total chloroplast DNA RFLPs in cultivated and wild species of rice. Rice Genet. News. **5**: 77-80.
- Dodd, B. E.** (1985) DNA fingerprinting in matters of family and crime, Nature, **318**: 506-507
- Edwards, M. D., C. W. Stuber and J.F. Wendel** (1987) Molecular maize. II. Factors influencing yield and its component traits. Crop. Sci. **27**: 639-648
- Erlich H. A., ed.** (1989) PCR technology, principles and applications for DNA amplification. Stockton Press, New York. 246p.
- Evola, S. V., Burr, F. A. and Burr, B.** (1989) The suitability of restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in maize, Theor. Appl. Gen. **71**: 765-771
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B.** (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction fragment length polymorphisms to a high specific activity, Anal. Biochem. **132**: 6-13
- Gebhardt, C., Blomendahl, C., Schachtschabel, U., Debener, T., Salamin, F. and Ritter, E.** (1989a) Identification of 2n breeding lines and 4n varieties of potato (*Solanum tuberosum*, SSP. *tuberosum*) with RFLP-fingerprints. Theor. Appl. Genet. **78**: 16-22
- Gebhardt, C., Ritter, E., Debener, T., Schachtschabel, U., Walkemeir, B., Uhrig, H. and Salamini, F.** (1989 b) RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*, Theor. Appl. Genet. **78**: 65-75
- Gill, P., Jeffreys, A. J. and Werrett, D. J.** (1985) Forensic applications of DNA "fingerprints", Nature **318**: 577-579
- Goldsmith, M. R. and Shi, J.** (1991) Construction of a molecular linkage map for the silkworm. Proc. of XIX Inter. Natl. Cong. of Entomology, p637.
- Goldsmith, M. G. and Kafatos, F. C.** (1984) Developmentally regulated genes in silkworms. Ann. Rev. Genet. **18**: 443-487. (In Japanese)
- Grodzicker, T., J. William, P. Sharp and J. Sambrook** (1974) Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **39**: 439-46
- Helentjaris T., king G., Slocum M., Siedenstrang C., Wegman S.** (1985) Restriction fragment polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. Plant Mol. Biol. **5**: 109-118
- Helentjaris T., Slocum M., Wright S., Shafer A., Nienhuis J.** (1986) Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. TAG72: 761-769
- Horn, G. T., B. Richards and K. W. Klinger.** (1989) Amplification of a highly polymorphic VNTR segment by the polymerase chain reaction, Nucl. Acids Res. **17**: 2140
- Hulbert, S. H., Ilott, T. W., Legg, E. J., Lincoln, S. E., Lander, E. S. and Michelmore, R. W.** (1988) Genetic analysis of the fungus, *Bremia lactucae*, using restriction fragment length polymorphisms. Genetics **120**: 947-958
- Ishii T., Terach T. and Tsunewaki K.** (1986) Restriction endonuclease analysis of chloroplast DNA from cultivated rice species, *Oryza sativa* and *O. glaberrima*. Jpn. J. Genet. **61**(6): 537-541
- Kan Y. and Dozy A.** (1978) Antenatal diagnosis of sickle-cell anaemia by DNA analysis of amniotic-fluid cells. Lancet **2**: 910-912
- Kirby, L. T.** (1990) DNA fingerprinting: an introduction. Stockton Press, New York.
- Kishimoto N., Yano M., Tanaka T., Saito K., Saito A., agamine M. and Iwata N.** (1989) Linkage mapping of RFLP markers of rice nuclear DNA, morphological markers and isozyme loci in rice (*Oryza sativa* L.). Pages 489-492 in Proc. of the 6th Int'l. Congr. of SABRAO.
- Landry, B. S. and R. W. Michelmore** (1985) Selection of probes for restriction fragment length analysis from plant genomic clones. Plant Mol. Biol. Rep. **3** (4): 174-179
- Landry, B. S., R. V. Kesseli, B. Farrara and R. W. Michelmore** (1987a) A genetic map of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. Genetics **116**: 331-337
- Martin, B., J. Nienhuis, G. King and A. Sohaefer** (1989) Restriction fragment length polymorphisms associated with water use efficiency in tomato. Science **243**: 1725-1728
- Medeiros, A. C., A. M. Macedo and S. D. J. Pena** (1988) A simple non-isotopic method for DNA fingerprinting with M13 phage. Nucl. Acids Res. **16**: 10394
- Murray, M. G., Y. Ma, D. Wast, J. Romero-Severson, J. Cramer, J. Pitas, J. Kirschman, S. DeMars and L. Vilbrandt** (1989) General considerations of building an RFLP linkage map with specific reference to maize. In : Helentjaris, Tand B. Burr (eds). Development and applications of molecular markers to problems in plant genetics. Current Communication in Mol. Biol. Cold Spring Harbor Laboratory. pp. 5-10
- Neinhuis, J., T. Helentjaris, M. Slocum, B. Ruggero and A. Schaefer** (1987) Restriction fragment length

- polymorphism analysis of loci associated with insect resistance in tomato. *Crop. Sci.* **27**: 797.
- Sambrook, J., W. F. Fritsch and T. Maniatis** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vols 1, 2 and ed. Cold Spring Harbor, New York.
- Shimada, T., Fujiwara, H., Hasegawa, T., Maekawa, H., Kovayashi, M. and Fujii, H.** (1991) Detection of DNA polymorphism in *Bombyx mori*. *Proc. of XIX Inter. Natl. Cong. of Entomology*, p637.
- Southern, E. M.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-527
- Suzuki, Y., Takiya, S., Suzuki, T., Hui, C-C., Matsuno, K., Fukuta, M., Nagata, T. and Ueno, K.** (1990) Developmental regulation of silk gene expression in *Bombyx mori*. In "Molecular Insect Science" (H. H. Hagedorn et al. ed) PP83-89., Plenum Press, New York.
- Tanksley, S. D.** (1983) Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1**: 3-8
- Tanksley, S. D., Fulton T. M., Mc Couch S. R., Yu Z. H. and Wang Z. Y.** (1988) RFLP map of rice chromosomes, *Rice Genet. Newsl.* **5**: 128-130
- Wang, Z.Y. and S.D. Tanksley** (1990) Restriction fragment length polymorphism in *Oryza sativa*. *L. Genome* **32**: 1113-1118.
- Westneat, D. F., W. A. Noom, H. K. Reeve and D. F. Aquadro** (1988) Improved hybridization conditions for DNA 'fingerprints' probed with M13. *Nucl. Acids Res.* **16**: 4161
- White, R., M. Leppert, D. T. Bishop, D. Barker, J. Berkowitz, C. Brown, P. Callahan, T. Holm and L. Jerominski** (1985) Construction of linkage maps with DNA markers for human chromosomes. *Nature* **313**: 101-105
- Young, N., D. Zamir, M. W. Ganai and S. L. Tanksley** (1988) Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly linked to the Tm-2a gene in tomato. *Genetics* **120**: 573
- Yukuhiro, K., Kanda, T. and Tamura, T.** (1992) Efficiency in detection of clones showing RFLP in a genomic library of the silkworm, *Bombyx mori*. *Jpn. J. Genet.* **67**: 564.