

누에 미토콘드리아 유전체의 제한효소 지도작성, 클로닝 및 염기서열 분석

이진성 · 성승현¹ · 김용성² · 서동상*

성균관대학교 유전공학과

¹식품의약안전청 국립독성연구소

²한국생명공학연구소 유전체사업단

Sequence Analysis, Molecular Cloning and Restriction Mapping of Mitochondrial Genome of Domesticated Silkworm, *Bombyx mori*

Jin-Sung Lee, Seung-Hyun Sung¹, Yong-Sung Kim² and Dong-Sang Suh*

Department of Genetic Engineering, SungKyunKwan University, Suwon, Korea

¹National Institute of Toxicological Research, Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea

²Genome Center, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology (KRIBB), Taejon, Korea

ABSTRACT

The mitochondrial genome of domesticated silkworm (*Bombyx mori*) was mapped with five restriction endonucleases (*Bam*H I, *Eco*R I, *Hind*III, *Pst*I and *Xba*I), the entire genome was cloned with *Hind*III and *Eco*R I. From the end sequencing results of 5' and 3' region for full genome set of eleven mitochondrial clones, the seven mitochondrial genes (NADH dehydrogenase 6, ATPase 6, ATPase 8, tRNA^{Lys}, tRNA^{Asp}, tRNA^{Thr} and tRNA^{Phe}) of *mori* were identified on the basis of their nucleotide sequence homology. The nucleotide composition of NADH dehydrogenase 6 was heavily biased towards adenine and thymine, which accounted for 87.76%. On basis of the sequence similarity with published tRNA genes from six insect species, the tRNA^{Lys}, tRNA^{Asp} and tRNA^{Thr} were showed stable canonical clover-leaf tRNA structures with acceptable anticodons. However, both the DHU and TyC arms of tRNA^{Phe} could not form any stable stem-loop structure. The two overlapping gene pairs (tRNA^{Lys}-tRNA^{Asp} and ATPase8-ATPase6) were found from our sequencing results. The genes are encoded on the same strand. ATPase8 and ATPase6 overlaps (ATGATAA) which are a single example of overlapping events between abutted protein-coding genes are common, and there is evidence that the two proteins are transcribed from a single bicistronic message by initiation at 5' terminal start site for ATPase8 and at an internal start site for ATPase6. Ultimately, this result will provide assistance in designing oligo-nucleotides for PCR amplification, and sequencing the specific mitochondrial genes for phylogenetics of geographic races, genetically improved silkworm strains and wild silkworm (mandarina) which is estimated as ancestral of domesticated silkworm.

Key words : *Bombyx mori*, mitochondrial genome, restriction map, ND6, ATPase6, ATPase8, tRNA^{Lys}, tRNA^{Asp}, tRNA^{Thr}, tRNA^{Phe}

서 론

미토콘드리아 유전체는 핵 DNA보다 작고 그 구성이 단순하며 모계로만 유전하는 유전특성을 갖는다. 예를 들어 인간의 단일 미토콘드리아 유전체는 평균 핵 DNA(one chromosome)의 1/8000 정도이며 하나의 체세포 전체 염색체의 0.5%의 비율을 차지한다. 전사되는 유전자(transcribed gene) 사이의 intervening sequence와 유전자 사이

의 spacer sequence는 미토콘드리아 유전체에서는 일반적으로 발견되지 않는다. 또한, 진핵생물의 미토콘드리아 유전체는 다양하고 복잡하게 재배열되는 핵 DNA와는 다르게 유전자간의 재배열은 거의 발견되지 않는다(Strachan & Rand, 1993; Rand, 1993; Nei & Kohen, 1983; Cann *et al.*, 1987). 이처럼 미토콘드리아 유전체는 단순한 유전체 구성을 갖으며 핵 DNA의 영향이 배제된 훨씬 직선적인 유전양식을 갖는다. 따라서 생물의 분자 진화를 연구하는

데 있어 유용한 재료가 된다. 게다가 미토콘드리아 유전체가 세포질로 유전되기 때문에 핵-세포질간의 상호 진화 및 기원에 관한 연구에도 유용한 장점이 있다(Wolstenholmn, 1992; Clayton, 1975; Brown, 1985).

현재까지 곤충강내 4목 6종[Hymenoptera ; *Apis mellifera*(GenBank Accession, Number L06178), Diptera ; *Anopheles gambiae*(L20934), *Anopheles quadrimaculatus* (L04272), *Drosophila melanogaster*(U37541), *Drosophila yakuba*(X03240), Orthoptera; *Locusta migratoria* (X80245)]에서 전체 미토콘드리아 유전체의 염기서열이 보고되고 있다(Clary and Wolstenholmn 1985; Garesse, 1985; Croizer and Croizer, 1993; Michell et al., 1993; Beard et al., 1993; Flook et al., 1995). 이것은 GO BASE database에 등록된 130여 종류의 미토콘드리아 유전체 중에서 약 4%를 차지하는 것으로 상대적으로 타 분류군에 비해서 곤충 미토콘드리아 유전체의 광범위한 분석이 이루어지지 않고 있음을 알 수 있다.

누에는 노랑 초파리(*Drosophila melanogaster*)에 버금가는 유전학 재료로서 현재까지 많은 분야, 즉 생리학, 발생학 및 분자생물학 등 생명과학 전 분야에 걸쳐 많이 연구되어 왔다(Udupa et al., 1988; Datta et al., 1988; Li, 1992; Okamoto et al., 1982). 그러나 미토콘드리아 유전체에 관한 연구는 일부 보존성이 강한 유전자들을 대상으로 한 연구이외에는 아직까지 활발하지 못하다(Hwang et al., 1999). 따라서 수백 여 종에 달하는 계통들, 다양한 지리적 품종들 또한, 맷누에와의 누에와의 진화적 관계 등에 관한 연구는 현재까지 미미한 실정이다. 본 연구는 제한효소 지도 작성과 클로닝을 통해 누에의 미토콘드리아 유전체의 전체 염기서열을 결정하고자 수행되었으며 이에 대한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

곤충

공시곤충은 백옥잠으로 농촌진흥청 잠사곤충부에서 분양을 받아 이후의 실험에 사용하였다.

미토콘드리아 유전체의 분리

누에의 미토콘드리아 유전체는 5령 3일째 유충의 후부견사선을 적출하여 Zimmerman(1988) 등의 방법을 일부 변형하여 다음과 분리하였다. 약 1 ug의 후부견사선을 1차로 액체질소로 유발에서 마쇄한 후 STE 완충용액(0.25 M sucrose, 10 mM EDTA, 30 mM Tris, pH 7.5)을 10 ml 첨가하여 다시 한번 마쇄하였다. homogenate를 800 xg로 20분간 4°C에서 원심분리 하여 핵과 세포 잔유물을 제거하

고 상등액을 취하여 12,000 xg로 다시 원심분리 한 후 미토콘드리아가 포함된 침전물을 얻었다. 다시 STE 완충용액을 첨가하여 잘 섞어 준 다음 최종농도가 2%가 되도록 SDS를 넣어 준 후 12,000 xg로 4°C에서 10분간 원심분리 하였다. 2배의 phenol (pH 8.0)을 첨가한 다음 12,000 xg로 4°C에서 10분간 원심분리 하여 상등액을 회수하고 동량의 phenol/chloroform 용액을 넣어 12,000 xg로 4°C에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 다시 회수하여 최종농도가 1 ug/ml이 되도록 RNase A를 넣고 37°C에서 1시간 방치하였다. RNase를 불활성화 시키기 위하여 동량의 phenol 을 넣고 12,000 xg로 4°C에서 10분간 원심분리 하였다. 다시 상등액을 취하여 최종농도가 50 ug/ml이 되도록 proteinase K를 넣고 56°C에서 1시간 방치한 후 phenol을 가하여 proteinase K를 실활 시켰다. Sol A 용액(0.15 M NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8.0)을 최초 조직의 1/20 배를 넣고 잘 섞어 준 다음, 얼음에서 10분간 방치하였다. Sol B(0.18 N NaOH, with 1% SDS)를 최초 조직의 1/5배 넣어 얼음에서 30분간 방치 한 다음 Sol C 용액(1.32 M potassium acetate, pH 4.8)을 최초 조직의 1/10배 넣어 잘 섞어 준 후 다시 얼음에서 10분간 방치하였다. 상기의 phenol 처리 과정을 2회 수행한 다음 최종 얻어진 상등액에 1/10 배의 3 M sodium acetate와 2배의 100% EtOH를 첨가하여 -70°C에서 30분간 방치하였다. 이후 4°C에서 20분간 원심분리 한 후 70% EtOH로 세척 한 다음 건조하여 미토콘드리아 DNA를 분리하였다.

Total genomic DNA의 분리

누에 total genomic DNA는 5령 3일 된 유충의 후부견사선을 적출하여 Suzuki(1990)의 등의 방법을 일부 변형하여 다음과 같이 분리하였다. 후부견사선 시료에 2.5배의 DNA 완충액(0.5% SDS, 5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 10 ug proteinase K)을 첨가하여 homogenizer로 잘 마쇄하여 37°C에서 30분간 반응하였다. 2 ml의 1 M Tris-HCl과 3 ml의 phenol을 가하여 혼합한 후 원심분리(5,000 xg)하여 상등액을 취하고 2회의 chloroform/phenol 추출후 3배의 salted ethanol (2% potassium acetate)를 넣어 원심분리 한 후 DNA를 얻었다. 위의 과정을 2회 반복 수행한 다음, TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 혼탁하였다.

제한효소 지도작성 및 클로닝

미토콘드리아 유전체의 재한효소 지도는 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I 및 *Xba*I 5 종류의 재한효소를 사용하여 작성하였으며, 이를 기초로 하여 *Eco*RI과 *Hind*III 제한효소 처리에 의해서 나타나는 제한단편을 pGEM 3Zf(+) 또

는 pBluescriptSK(+)의 동일 제한효소 부위에 표준방법(Sambrook *et al.*, 1989)에 의하여 클로닝하였다.

Southern hybridization

상기에서 확보한 미토콘드리아 유전체의 확인을 위한 southern 분석은 Southern light detection kit(Tropix, USA)를 사용하였으며, probe DNA의 표지는 biotin labelling kit(GIBCO BRL, USA)를 이용하였다. 전체적인 실험과정은 표준방법(Sambrook *et al.*, 1989)에 준하여 수행하였다.

DNA 염기서열 결정 및 분석

DNA 염기서열 분석은 T7 promoter primer(5'-TAA TA CGACTCACTATAGGGAGA)와 M13 reverse sequencing primer(5'-AACAGTATGACCATG)를 사용하여 BigDye terminator(Perkin-Elmer, USA)와 ABI PRISM 377 DNA Sequencer(Perkin-Elmer, USA)에 의하여 결정하였다. 상동성 분석은 CLUSTAL-W를 이용하여 *yakuba* 및 *melanogaster*의 미토콘드리아 유전자와의 pairwise alignment에 의해서 비교, 분석하였으며 DNA 염기서열의 가공은 Lasergene(DNASTAR, USA), Gentryx(Software development Co, Japan) 및 DNASIS(Hitachi software Co, Japan) program을 이용하여 분석하였다.

결 과

누에에서 분리된 미토콘드리아 유전체를 5가지의 제한효소로 처리하여 각각의 제한효소 별 크기의 합을 산출한 결과, 약 $15.5 \text{ kb} \pm 500 \text{ bp}$ 로 분석되었다(Table 1). 이러한 크기는 현재까지 6종의 곤충에서 보고된 전체 미토콘드리아 유전체의 크기의 범위[작게는 15,364 bp(*Anopheles*

gambiae)에서 크게는 19,517 bp(*melanogaster*)]에 포함되는 것으로 추정되었다. 5가지의 제한효소의 여러 가지 효소별 조합에 의하여 제한효소 지도를 작성한 결과, *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *XbaI*의 제한효소 부위가 각각 2개, 5개, 4개, 2개, 3개인 것으로 분석되었다(Fig. 1). 이렇게 작성된 제한효소 지도를 토대로 하여 누에 미토콘드리아 유전체를 4개의 제한단편으로 만드는 *HindIII*(5.8 kb, 5.5 kb, 2.0 kb, 1.9 kb)와 5개의 제한단편을 생성시키는 *EcoRI*(5.8 kb, 5.5 kb, 2.0 kb, 1.9 kb, 0.5 kb) 단편을 이용하여 pGEM 3Zf(+) 또는 pBluescriptSK(+) vector에 클로닝하였다(Fig. 2). 이러한 두 개의 제한효소에 의해서 나타나는 단편들은 누에 미토콘드리아 유전체 전체를 포함하는 것으로 추정되었다.

상기에서 얻어진 9개의 누에 미토콘드리아 유전체의 클론들이 실제로 정제하여 얻은 미토콘드리아 유전체에서 기원한 클론인지를 확인하기 위해서 전체 누에 genomic DNA를 9개의 제한효소로 절단하고 4개의 *EcoRI* 클론을 probe DNA로 하여 Southern 분석을 수행한 결과, 순수 정제한 미토콘드리아 유전체의 제한단편 양상과 같음을 확인하였다(Fig. 3). 이것은 우리가 클로닝한 제한단편이 미토콘드리아 유전체에서 유래한 클론이라는 것을 증명하는 것이다.

9개의 클론이 실제로 전체 미토콘드리아 유전체를 포함하는지를 확인하기 위해서 각 클론의 end sequencing에 의해서 각 클론들간의 중첩 부위 연결 분석을 수행하였다. Table 2에서 보이는 것과 같이 우리가 선별한 9개의 모든 클론들은 모두 곤충, 특히 전체 염기서열이 완성된 6종의 곤충 미토콘드리아 유전체에 80% 이상의 상동성을 보여 주었다. 따라서 모든 클론들은 미토콘드리아 유전체에서 유래된 것임을 알 수 있었다. 또한, *HindIII*

Table 1. Restriction profile of silkworm mitochondrial genome

Restriction enzyme	No. of restriction fragment	Size of restriction fragment (kb)	Sum. of restriction fragments (kb)
<i>BamHI</i>	2	9.5, 6.0	15.5
<i>EcoRI</i>	5	5.8, 5.5, 2.0, 1.9, 0.5	15.7
<i>HindIII</i>	4	5.8, 5.5, 2.0, 1.9	15.2
<i>XbaI</i>	3	6.5, 5.5, 4.0	16.0

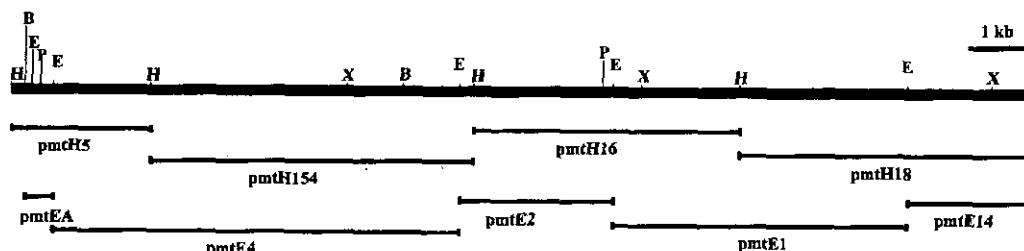


Fig. 1. Restriction map of silkworm (*Bombyx mori*) mitochondrial genome. H, E, B, P and X indicate, *HindIII*, *EcoRI*, *BamHI*, *PstI* and *XbaI*, respectively.

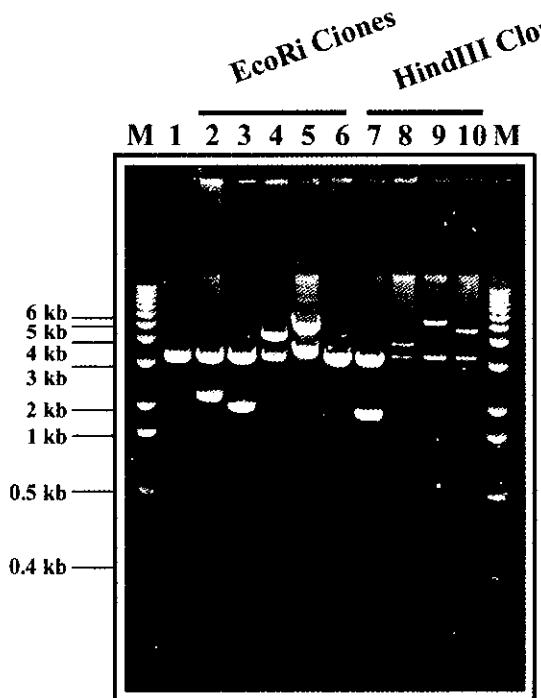


Fig. 2. Molecular cloning of mitochondrial genome digested with *Eco*RI and *Hind*III. *Eco*RI clones (lane 2 to 6) and *Hind*III clones (lane 7 to 10) were digested with *Eco*RI and *Hind*III, and loaded onto 0.8% agarose gel. Lane M and I indicate DNA size marker (kb ladder) and linealized pGem3Zf(+), respectively.

subset 및 *Eco*RI subset 클론들이 모두 크기가 다른 다른 점과 각각의 제한효소의 크기의 합이 일반적인 곤충 미토콘드리아 유전체의 크기와 유사하다는 점으로 보아 우리가 클로닝한 클론은 누에 미토콘드리아 유전체 전체를 포함하는 것으로 최종 확인되었다.

Plasmid DNA의 end sequence 분석으로 tRNA 유전자 47개(tRNA^{Lys}, tRNA^{Asp}, tRNA^{Thr}, tRNA^{Phe}), 3개의 단백질을 암호화하는 유전자(NADH dehydrogenase 6, ATPase 8, ATPase 6)등 7개의 완전한 미토콘드리아 유전자가 동정되었다. 특히 ATPase 8과 ATPase 6은 같은 방향으로 7개의 nucleotide sequence(ATGATAA)가 중첩되어 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이것은 미토콘드리아 유전자가 경제적으로 유전자의 전사 및 발현을 하는 시스템이라는 것을 증명하는 단적인 예라고 생각한다. 세포내 ATP 합성에 관여하는 5개의 complex 중에서 complex I인 NADH ubi-quinone oxidoreductase group에 속하는 미토콘드리아 유전체 유래의 NADH dehydrogenase 6 유전자는 이미 보고된 6종의 곤충의 것과 비교할 때 DNA 수준에서는 51%에서 69%의 상동성을 보여 주었으나 아미노산 수준에서는 23%에서 43%의 낮은 아미노산 상동성을 보여주었다(Fig. 5, 6, Table 3). 따라서 NADH dehydrogenase 6 유전자는 곤충 종간에서 상당히 변이가 심한 유전자로 예상되었다.

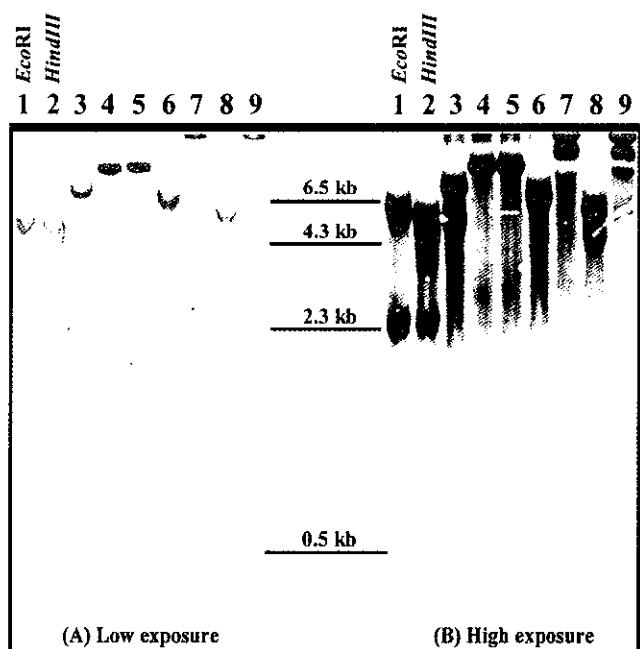


Fig. 3. Total genomic southern blot analysis. Each lane contains silkworm (*Bombyx mori*) total genomic DNA of 10 ug. The five silkworm mitochondrial DNA clones derived from *Eco*RI digestion were used to as probe DNA. Lane 1 to 9 indicate *Eco*RI, *Hind*III, *Bam*HI, *Eco*RV, *Not*I, *Pst*I, *Kpn*I, *Xba*I and *Xho*I, respectively.

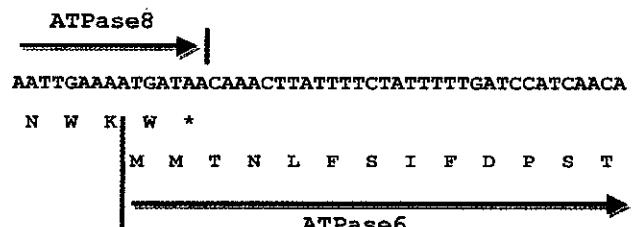


Fig. 4. The overlapped region found in ATPase 8 and ATPase 6 of silkworm mitochondrial genome. The transcriptional direction is shown as arrows. The asterisk indicate termination codon (TAA) of ATPase 8 gene.

그러나 hydropathy 분석은 누에의 미토콘드리아 NADH dehydrogenase 6 유전자가 타 곤충의 것과 놀라운 기능적 유사성을 갖음을 볼 수 있었다(Fig. 7). ATPase 8의 상동성도 DNA 수준 (62%-67%)보다는 아미노산 수준(30%-41%)에서 훨씬 낮은 것을 알 수 있다. ATPase 6 또한, DNA 수준(65%-77%)보다는 아미노산 수준(44%-70%)에서 훨씬 낮음을 보여주었으나 상대적으로 NADH dehydrogenase 6와 ATPase 8보다는 아미노산 상동성이 높음을 알 수 있었다(Table 3). 또한, 3개의 단백질 암호 유전자는 비교한 6종의 곤충 중에서 *quadrivittatus*의 유전자와 가장 높은 유사도를 나타냈다(Michell et al., 1993)(Table 3). 4종의 tRNA 유전자는 비교한 6종의 tRNA 유전자와 전체적으로 50%-94%의 상동성을 나타내었으며 tRNA^{Tyr},

Table 2. End-sequence similarity of mtDNA clones isolated from *Bombyx mori*

Clone	Primer	BLASTN		Identity	BLASTX		Identity	Positive Identity
		Subject	Subject		Subject	Subject		
pMTH5	T7	Drosophila yakuba mitochondrial DNA molecule, Length = 16019	60/69 (86%)	DROME NADH-UBIQUINONE OXI DOREDUCTASE CHAIN 2, Length = 341	33/51 (64%)	40/51 (80%)		
	SP6	Drosophila yakuba mitochondrial DNA molecule, Length = 16019	110/131 (83%)	DROME CYTOCHROME C OXI DASE POLYPEPTIDE III, Length = 262	54/83 (65%)	65/83 (78%)		
pMTH15	T7	L.migratoria mitochondrion complete genome, Length = 15722	135/147 (91%)	DROYA NADH-UBIQUINONE OXI DOREDUCTASE CHAIN 5 Length = 573	148/213 (69%)	170/213 (79%)		
	SP6	L.migratoria mitochondrion complete genome, Length = 15722	153/179 (85%)	DROYA CYTOCHROME B, Length = 378	138/214 (64%)	161/214 (74%)		
pMTH18	SP6	Anopheles gambiae complete mitochondrial genome, Length = 15363	119/137 (86%)	ANOGA NADH-UBIQUINONE OXI DOREDUCTASE CHAIN 1, Length = 314	93/126 (73%)	107/126 (84%)		
pMTH154	T7	Anopheles gambiae complete mitochondrial genome, Length = 15363	174/205 (84%)	SPOFR CYTOCHROME C OXI DASE POLYPEPTIDE III, Length = 147	73/78 (93%)	75/78 (95%)		
	SP6	Luehdorfia puziloi coreana mitochondrial ND5 gene for NADH	175/192 (91%)	NADH-UBIQUINONE OXIDORED UCTASE CHAIN 5, Length = 573	97/188 (51%)	138/188 (73%)		
pMTE1	T7	L.migratoria mitochondrion complete genome, Length = 15722	153/179 (85%)	CYTOCHROME B, Length = 378	119/177 (67%)	130/177 (73%)		
	SP6	Spodoptera frugiperda mitochondrial cytochrome oxidase III mRNA	121/131 (92%)	CYTOCHROME C OXIDASE POLY PEPTIDE III, Length = 147	52/56 (92%)	54/56 (95%)		

Clone	Primer	BLASTN		Identity	BLASTX		Identity	Positive Identity
		Subject	Subject		Subject	Subject		
pMTE2	T7	ausonides large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; Length = 1172	79/87 (90%)	NADH-UBIQUINONE OXIDO REDUCTASE CHAIN 1, Length = 313	30/48 (62%)	38/48 (78%)		
	SP6	Eueides aliphera isolate P-3-1 mitochondrion cytochrome oxidase I and II genes, partial cds, and tRNA-Leu gene, complete sequence, Length = 987	199/222 (89%)	CYTOCHROME C OXIDASE POLYPEPTIDE II, Length = 228	99/133 (74%)	120/133 (90%)		
pMTE4	T7	Drosophila melanogaster complete mitochondrial genome, Length = 19517	82/92 (89%)	ANQOU CYTOCHROME B, Length = 378	39/62 (62%)	51/62 (82%)		
	SP6	Spodoptera frugiperda 16S rRNA gene, Val-tRNA, and Leu-tRNA genes and ND-1 protein gene, 5' end, Length = 2256	247/272 (90%)					
pMTE14	T7	Galleria mellonella mitochondrial cytochrome oxidase II (COII) gene, complete CDs, Length = 687	238/272 (87%)	GALME CYTOCHROME C OXIDASE POLYPEPTIDE II, Length = 228	92/95 (96%)	95/95 (99%)		
	SP6	Drosophila yakuba mitochondrial DNA molecule, Length = 16019	110/131 (83%)	DROME CYTOCHROME C OXIDASE POLYPEPTIDE III, Length = 262	133/195 (68%)			
pMTEA	T7	Spodoptera frugiperda mitochondrial cytochrome oxidase III mRNA, complete CDs, Length = 446	121/131 (92%)	CYTOCHROME C OXIDASE POLYPEPTIDE III, Length = 147	52/56 (92%)	54/56 (95%)		

tRNA^{Lys} 및 tRNA^{Asp}는 높은 유사도를 보인 반면, tRNA^{Phe} 유전자는 상대적으로 낮은 유사도를 보임을 알 수 있었다 (Table 4). 또한, tRNASCAN 프로그램을 이용한 tRNA 유전자의 구조를 분석한 결과, tRNA^{Tyr}, tRNA^{Lys} 및 tRNA^{Asp} 유전자는 안정한 clover-leaf의 전형적인 2차 구조를 보였으나 tRNA^{Phe} 유전자는 DHU과 TψC arms 부위가 안정한 stem-loop를 보여주지 못한 불완전한 2차구조를 보여주었다(Fig. 8).

곤충 미토콘드리아 유전자의 특징 중에 하나는 adenine

(A)과 thymine(T)의 함량이 타 분류군의 것과 높다는 것이다(Fauron & Wolstenholme, 1980). 이와 같은 특징이 누에 미토콘드리아 유전자에서도 같은 경향을 보이는지를 분석하기 위해서 우리가 확인한 것 중 가장 크기가 큰 미토콘드리아 유전자인 NADH dehydrogenase 6의 nucleotide 조성을 분석해 본 결과, 비교한 6종의 곤충 미토콘드리아 NADH dehydrogenase 6 유전자 중에서 가장 높은 A+T 함량(87.76%)을 보여주었으며, cytosine(C)의 비율은 6.59%로서 비교한 6종의 곤충의 것 중에서 가장 낮은 함

Bmo : ATTA---AAATAAT-TTTATCTTCTATA-----T-TAATT--ATAATAACAAGAATTATATA-----TTT---TATAAAATCATCCACTAT--- :	70
Dme :TTC..T....A...AC...----...----...T..CT..TTCC...T..T-----C.AAA...T.....T..G--- :	73
Dya :TTC..T....A...A...----...----...T..CT..TCT...T..T-----TAA...T...C..T..G--- :	73
Aga :CAA..T...TA...AA.A...----...----...ATGC.TA..T...G.T----T..T-----A.ACAA...A...TT...---- :	73
Aqu :CAA..T...TA...AACAA...----...TG..TA..T..T.G.T----C..T..T-----A.ACAA...A..C..TT...---- :	73
Lmi : ..G.TAA.....AA...AAGA.C...----...CA..C.TA...----T-----AT..T-----A.AAA...C...A...---- :	73
Ame :TATT..C..CA.C..A..A.CA.AAATTAA.T..TC..TC..T..T...TTTC..A..T.TAACATT.A.TTAA...----TTTA..AGA : 93	
Bmo : ----CTATAGGAATAAT-AATTCTAA--TACAAACAATAATTACATGT--ATAATTAGAGGA---ATACTAGTTAAAACATA----TTGATTTCA : 150	
Dme : ----.T....T...C-TT..AT...--.T.....TT..GT....-T..C.A.CT...--T..A..AC....GT..T-----A... : 153	
Dya : ----.T....T...C-TT..AT...--.T.....TT..GT....-T..C..TC...--T..A..AC....GT..T-----AC... : 153	
Aga : ----A...TT...C..AT...--.T.....T..TT.A...----T..C..A--T..TA..GT----T..T..T-----T : 153	
Aqu : ----.T...T..AT...--CT.....T..TC..A...----T..T..A.C...A--T..TA..GT..A...----T-----T : 153	
Lmi : ----C..TAT...CC..T..AT...--.T..CT..T..TTA..A...A..C..ACA..A...----G..T-----C..A... : 153	
Ame : CCTT..C..TT..C...--T..AT..T..AT..T..TT..TC..T..T..A..CCT...A..T..TTTAC...A..GT..C..T..A..TCAC..A...A.. : 187	
Bmo : TATATTTTATTTTAATTTTTAGGTGGATTATTAGTATTATTTATGTTCTAGAATTGCATCTAATGAATTATTT-TATTTAACTTAAAT : 246	
Dme :A..A..C..T.....C..AA..ATCT..A..C.....A...AA..T..A..C..A..A... : 250	
Dya : ...C.....A..A..C..T..T.....A..ATC..T..A.....A...AA..T..A..C..A..A... : 250	
Aga : ...G..A.....A..A..C..A..T.....A..TC..T..AT..A.....A...AC...A..CTT... : 250	
Aqu : ...G..A.....A..A..C..A..T.....ACACTCCT..AT..T..A.....A...AC...A..CTT...T.. : 250	
Lmi : ...C.....A..CA..CC.....TA..A...A..C..CA..A..A.....A...A...A----- : 239	
Ame : ...A..G.....A..A..A..TA.....TC..T..AT..TC..T..A-----CC..AA----- : 265	
Bmo : ATAAAAATATAATATTATTATAATAATTATATTATAATAATTATTTAAATTAATTTAAATTTAAATTTAAATGAAAAT : 336	
Dme : ...CTC...TTC..T..C...A..T...--.T...A--T..TT...CATT...A..AG..A..AC...CTTCT..CT..T...T..AAT... : 339	
Dya : ...CTT...TTC..CA...TA..T...T..T...A--T..T..TT...CAATA...C..TG..A..AC..CT..TACT..T...T..AAT... : 339	
Aga : ...C...T..G...G..T...--TTC..C..G..AG...TT..C..T..TT...AG..A..AC..TG..TG..C...--ATT... : 339	
Aqu : ...C..C..G...A..T...--TT..T..A..A..CCT..T..T..T..TT...A..TG..A..CA..T..TG..C...--CTC... : 339	
Lmi : ...TC..A..G...C..T...A..A..T..TT..CAAC...AAT..AC..AGC..TG..A..C..C..ACAG... : 329	
Ame : ...AAGCC..T...CAA..CTT..T..T..A.....ACA..A...-----C..A..AAT... : 331	
Bmo : AACTCAGAAAT-A-AATAAAATTATTACAAAATATTATTTTAATGATGAAAACAAAATTAA--T--TTAAACA-AAATATATAATAATCAAACA : 426	
Dme : ...-T..T...C..CT.....A..T..T...-..C..A..T..-..TA.....TTC...T..CT...T..-..T..TT..CC... : 423	
Dya : ...-C...-..C..CT.....G..A..T...-..C..A..T..-..CA.....TTC...T..CT...T..-..T.....TT..C... : 423	
Aga : ...T...-..G..A...-..T..CA..T..C...-..A..AA..T..-..C..T..-..T..CA.....T..T..-..C..TT..CT... : 423	
Aqu : ...T...-..G..A..T...-..T..CATT...T..-..A..AA..C...-..T..T..-..T..TT...T..T..-..T..TT..C... : 423	
Lmi : ...T..A..A..C..C..G...-..AA..TCT...-..C..AC..CAA...-..T..C..GA..T..C..CC..CAC..GTA..-..T..-..C..C... : 420	
Ame : T..AGACA...-..G..C...-..C...-..A..A..T..-..T..TTG..T...TA..ATC..T..T..T..A...-..T..-..C... : 408	
Bmo : TCATTTTAACAATAATATAATTATTTATGTTAATTTAGTAGCAGTAGTAAAATTACAATATTGTTATGGACCATTACGATCATCAA : 523	
Dme : AAT...A..T...TT...A..A.....AA..C...-..T..TTA..T.....AT..A...A..A...T..T...AT..AT..T : 520	
Dya : AAT...G...TT...A..A.....AA..C...-..A..T..TT.....T..AC..A...A..A..T..TA..C..AT..AT..T : 520	
Aga : AAT..AA..T..T..C..C...A.....C..C..C..T..T..AC.....A..AA.....GC..AT.. : 520	
Aqu : AAT..AA..T..TT..T...A.....T..A..CCC..TC..T..T..ACT.....A..AA.....T.....C..AT.. : 520	
Lmi : GTTA..A..T...T..A..A...A..C...A..CA..T.....C..C..C..AACC..A..TA..TAA..AT.. : 517	
Ame : CT...T..TT...T...-..A..A...-..CCC..A..TTT..A..AC..G...T...GAAA..AAA..A..TC..TAA..AA.. : 499	
Bmo : ATAAATAA : 531	
Dme : C..T...-.. : 525	
Dya : C..T...-.. : 525	
Aga : ..T...-.. : 525	
Aqu : ..T...-.. : 525	
Lmi : GAT...-.. : 522	
Ame : ..AT...-.. : 504	

Fig. 5. Multi-alignment of nucleotide sequences of NADH dehydrogenase 6 gene of *Bombyx mori* and six other insect species. The dot sites identical to silkworm sequence. The dash sites gap for maximum alignment among seven insect species. Bmo, Aga, Aqu, Dme, Dya, Lmi and Ame indicate *B. mori*, *A. gambiae*, *A. quadrimaculatus*, *D. melanogaster*, *D. yakuba*, *L. migratoria* and *A. mellifera*, respectively.

량임을 알 수 있었다(Table 5).

고 찰

본 연구에서는 나비목(lepidoptera) 최초의 미토콘드리아 유전체의 제한효소 지도를 작성하여 2가지 제한효소 set (*EcoRI*, *HindIII*)에 의한 전체 미토콘드리아 유전체를 클로닝하였다. 또한, 약 5 kb의 plasmid end-sequencing에 의해서 tRNA 유전자 4개(tRNA^{Lys}, tRNA^{Asp}, tRNA^{Thr},

tRNA^{Phc}), 3개의 단백질을 암호화하는 유전자(NADH dehydrogenase 6, ATPase 8, ATPase 6)등 7개의 완전한 누에 미토콘드리아 유전자가 확인되었다. 이것은 일반적으로 발견되는 미토콘드리아 유전자 37개의 약 35%이다. 우리가 확인 및 동정한 3개의 단백질 암호 유전자에서 ATPase 6와 ATPase 8은 미토콘드리아 유전자 중에서 가장 크기가 작은 group이다. 또한, 이들 유전자는 일반적으로 타 곤충에서처럼 두 개의 유전자가 중첩되어 있음을 확인할 수 있었다(Michell *et al.*, 1993; Beard *et al.*, 1993; Flook *et*

Bmo : I-KMILSSMLIMMTSIMYFMNHPLSMGMMILMQTMITCMISGMLVKTYWFSYILFLIFLGGLLVLFIYVSSIAS : 73
 Aga : .T....MM.C....F.FMQ.K.....F.....Y.....S. : 74
 Aqu : .T....M.C....F.FMQ.K.....T.F.....Y.....H..S. : 74
 Dme : .IQ...Y....TT.I.FLN.I...A...T.....FV.....T. : 74
 Dya : .IQ...Y....TT.I.F.N.I...A...T.....FV.....T. : 74
 Lmi : .M....M.SSN..NINFMK.....M.T.....FIS....T.E...L....L.T. : 74
 Ame : .MLT..MLSK.F....SM.LTIYLNN.FNSPSM..IY...YS.YM.LMMFT.CS.NS.LI....I....G.LI : 74

Bmo : NELFLFNLMKMLNIIIMMIIIIMMMYFINIKYNNLIENNSEMNKLFTKMLFFNDENKINLNKMYNNQTSFLTM : 147
 Aga :TMSFK.T.FS...FS.S...FEILDKTLIEQF.I.ME--MEK..MTNNLI...I.S...FP.NL... : 146
 Aqu :TMSF..TT.S...FF..T.FFFFIDKSLIEQF.S.ME--ME...FNNNLI...I.F.....FP.NL... : 146
 Dme :NLS.K.T.FSS....F....SFIMDKTSSSLF.M..D--MQSIIN.NS.FM..S.S.....FP.N.... : 146
 Dya :NLS.K.T.FS.F..FF.F..S.ILDKTSITLF.M..E--MQSIIE.NS.FT..S.S.....FP.N.... : 146
 Lmi :KIK..SI..I.Y....ST..YKLDKTISTE..K.SE--IMNLNYS.N-FK.MSTS.V....P.VI... : 145
 Ame : MFS.FIS.INEP.K.K.KPF.QT.F.II.T..IY.K.SQ.E---HY.NYFKN-----MY..MKMN.T.FF : 139

Bmo : MLIIYLFVNVLVAVVKITNIFYGPLRSSNK : 176
 Aga : ...N....T..VT....KK.....PM.- : 174
 Aqu : ...N....T..VT....KK.....PM.- : 174
 Dme : ...N..L.T..V....K..K....MMS- : 174
 Dya : ...N..L.T..V....K..K....MMS- : 174
 Lmi :T.....NQ....KMS- : 173
 Ame :M.I.T..L.T..Y.EKKT..KKK- : 167

Fig. 6. Multi-alignment of amino acid sequences of NADH dehydrogenase 6 gene of *Bombyx mori* and six other insect species. The dot sites identical to silkworm sequence. The dash sites gap for maximum alignment among seven insect species. Bmo, Aga, Aqu, Dme, Dya, Lmi and Ame indicate *B. mori*, *A. gambiae*, *A. quadrimaculatus*, *D. melanogaster*, *D. yakuba*, *L. migratoria* and *A. mellifera*, respectively.

Table 3. Comparison of size and similarity of amino acid sequences and nucleotide sequences of three protein encoded in *Bombyx mori* and six insect mitochondrial genes

Gene	Amino acid						
	B.m	L.m.(%)	D.y(%)	D.m(%)	A.m(%)	A.g(%)	A.q(%)
ATPase8	53	52(30)	53(33)	53(33)	62(32)	53(37)	53(42)
ATPase6	225	225(66)	224(69)	224(69)	226(44)	226(69)	226(70)
ND 6	176	173(39)	174(40)	174(40)	167(23)	174(44)	174(44)
Nucleotide sequence							
ATPase8	162	159(62)	162(65)	162(65)	159(66)	162(64)	162(67)
ATPase6	678	678(74)	675(76)	675(77)	681(65)	681(75)	681(75)
ND 6	531	522(66)	525(67)	525(66)	504(51)	525(66)	525(69)

B.m, L.m, D.y, D.m, A.m, A.g and A.q indicate *B. mori*, *L. migratoria*, *D. yakuba*, *D. melanogaster*, *A. mellifera*, *A. gambiae* and *A. quadrimaculatus*, respectively. (%) indicates the similarities of nucleotide sequences and amino acid sequences predicted from three protein coding genes between B.m and L.m, B.m and D.y, B.m and D.m, B. m and A.m, B.m and A.g, B.m and A.q respectively. ND 6 indicates NADH dehydrogenase 6.

al., 1995). 이것은 진핵생물과 다른 미토콘드리아 유전자의 전사 및 번역의 특성인 bicistronic 전사체에 대한 하나의 예라고 생각된다.

다른 곤충과의 유전자 유사성 분석은 누에의 단백질 암호 유전자가 tRNA 유전자보다 낮은 상동성을 보임을 알 수 있다. 이것은 tRNA 유전자가 곤충 종간에서 훨씬 더 보존성이 강하다는 것으로 추정할 수 있다. 그러나 단백질 암호 유전자(NADH dehydrogenase 6)의 일부분이 보존성이 높은 것을 볼 때 기능적으로 중요한 부분은 다른 핵 DNA 유래의 유전자와 마찬가지로 종간에 걸쳐 잘 보존되어 있는 것으로 추정된다.

현재까지 다양한 분류군에서 미토콘드리아 유전체의 전체 염기서열이 분석되었다. 이와같은 연구는 일반적으로 모든 유전의 특징을 갖는 미토콘드리아 DNA를 대상으로 문자 진화학적 연구에 응용하기 위한 것이다. 특히 다양한 분류군 중에서 포유동물의 연구가 활발히 진행되고 있다(Anderson et al., 1981, 1982). 이것은 인간의 진화 역사를 연구하기 위한 것으로 해석된다. 인간의 미토콘드리아 유전체의 전체 염기서열 결정으로부터 핵 DNA 와는 다른 유전자 구성, codon usage 등 많은 부분에서 미토콘드리아 유전체가 갖는 특징들이 발견되었다. 곤충에 있어서는 현재까지 4목 6종에서 전체 미토콘드리아 유전

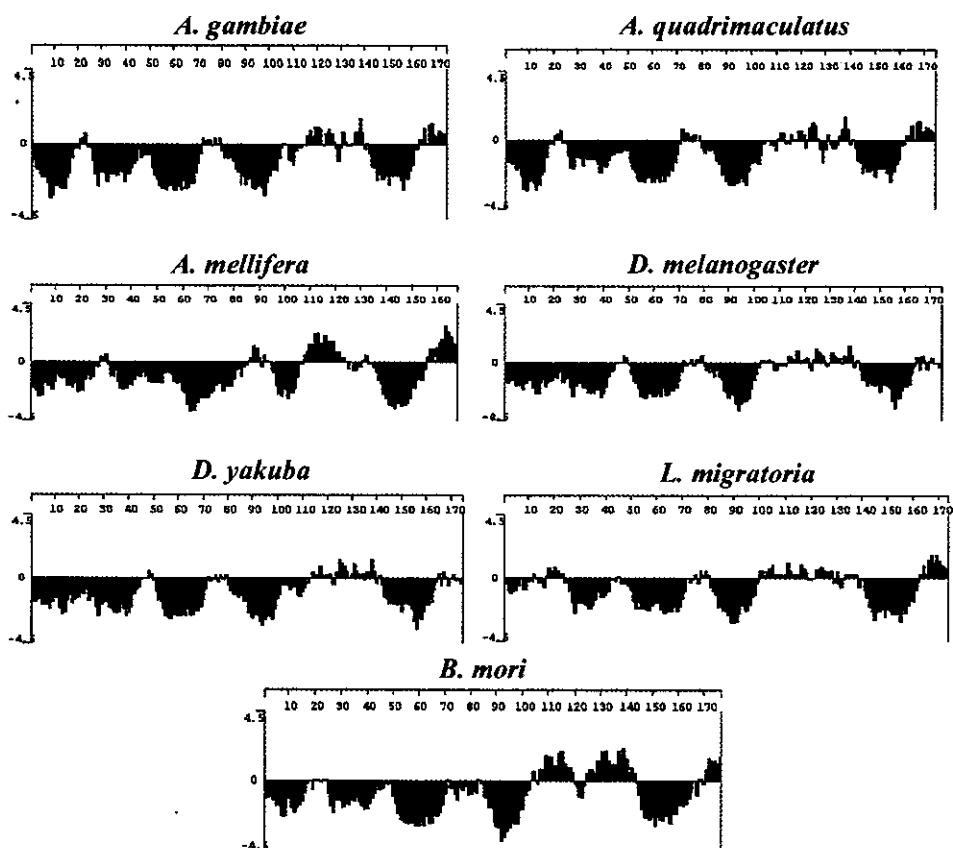


Fig. 7. Comparison of hydropathy profiles of the proteins predicted from NADH dehydrogenase 6 gene of *Bombyx mori* and six other insects. Hydrophobic regions have of > 0, and hydrophilic regions have hydrophathy of 0 <.

Table 4. Comparison of size and similarity of four mitochondrial tRNA genes encoded in *Bombyx mori* and other insect species

tRNA gene	B.m(%)	A.g(%)	A.q(%)	A.m(%)	D.m(%)	D.y(%)	L.m(%)
Thr	66	66(78)	65(86)	78(72)	66(92)	65(92)	64(90)
Lys	70	71(91)	61(90)	69(69)	71(79)	71(80)	71(82)
Asp	67	68(74)	74(71)	69(70)	67(79)	68(80)	64(65)
Phe	66	67(78)	67(77)	69(81)	65(75)	66(78)	66(75)

B.m, L.m, D.y, D.m, A.m, A.g and A.q indicate *B. mori*, *L. migratoria*, *D. yakuba*, *D. melanogaster*, *A. mellifera*, *A. gambiae* and *A. quadrimaculatus*, respectively. (%) indicates the similarities of nucleotide sequences from four tRNA genes between B.m and L.m, B.m and D.y, B.m and D.m, B.m and A.m, B.m and A.g, B.m and A.q respectively.

체가 보고되었다(Clary & Wolstenholme 1985; Garesse, 1985; Croizer & Croizer, 1993; Michell *et al.*, 1993; Beard *et al.*, 1993; Flook *et al.*, 1995). 그러나 누에를 포함하는 나비목 곤충에서는 일부 미토콘드리아 유전자 또는 부분 염기서열 서열이 보고되고 있을 뿐이다(Hwang *et al.*, 1999).

본 연구의 결과는 앞으로 누에의 기원 등의 관한 계통학적 연구에 응용 될 수 있을 것이다. 현재까지 누에의 계통 분석은 변이성이 적은 품종간에서 해석이 효과적인 못한 RAPD(random amplified polymorphic DNA) (Lee *et al.*, 1998), RFLP(restriction fragment length polymorphism)

(Lee *et al.*, 1996) 및 transposable element 분석(Hwang *et al.*, 1999)등에 기초를 해 왔으나 분자적 수준에서의 해석은 arylphorin (Hwang *et al.*, 1999), 12SrRNA (Hwang *et al.*, 1999), 16S rRNA (Hwang *et al.*, 1999)등과 같은 일부의 결과만이 보고되고 있다. 앞으로 우리가 확보한 누에 미토콘드리아 유전체의 전체 염기서열 결정은 곤충강 전체에서 나비목의 분자 분류의 기초 자료로 제공 될 수 있을 것이며 특히, 누에의 선조형이라고 알려지는 맷누에(mandarina)와의 다각적인 분석(DNA 및 아미노산 상동성, 유전자 조성 및 유전자 배열 등)이 이루어 질 수 있을 것이다.

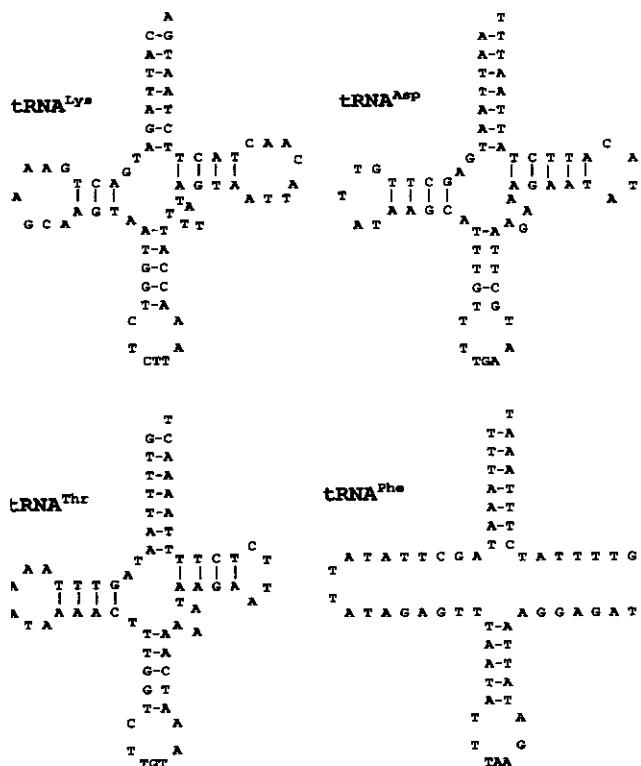


Fig. 8. Secondary structure of four putative transfer RNA genes derived from *Bombyx mori* mitochondrial genome sequence. Lines denote standard Watson-Crick pairs.

적  요

누에 미토콘드리아 유전체가 5가지의 제한효소 (*Bam* HI, *Eco* RI, *Hind* III, *Pst* I, *Xba* I)에 의해 제한효소지도가 작성되었으며 *Eco* RI와 *Hind* III에 의해 생성되는 각각 4개와 5개의 제한단편이 클로닝되어 전체 미토콘드리아 유전체가 클로닝되었다. 9개의 미토콘드리아 유전체 클론의 5' 및 3' 부분의 약 5 kb end sequencing에 의해서 3개의 단백질 암호 유전자(NADH dehydrogenase 6, ATPase 6, ATPase 8)과 4개의 tRNA 유전자 (tRNA^{Lys}, tRNA^{Asp}, tRNA^{Thr}, tRNA^{Phe}) 등 7개의 누에 미토콘드리아 유전체 유래의 유전자가 이미 밝혀진 노랑초파리의 미토콘드리아 유전체와의

상동성 분석에 의하여 동정되었다. NADH dehydrogenase 6 유전자는 adenine과 thymine의 함량이 타 곤충에 비하여 상당히 높은(87.76%) 것으로 분석되었다. 4개의 tRNA 유전자 중에서 tRNA^{Lys}, tRNA^{Asp}, tRNA^{Thr}은 clover-leaf 구조를 갖는 안정된 2차 구조를 형성하였으나 tRNA^{Phe} 유전자는 DHU와 TψC arms의 안정된 stem-loop를 형성하지 못하는 불완전한 2차 구조를 보여주었다. tRNA^{Lys}-tRNA^{Asp}와 ATPase 8-ATPase 6은 같은 strand로 overlapping 되어 있는 것으로 분석되었다. 특히, ATPase 6과 ATPase 8는 7개의 nucleotide(ATGATAA)가 overlap되어 있었으며 타 곤충에서도 발견되는 bicistronic transcription의 작용하는 유전자로 추정된다.

인용문헌

- Anderson, S., Bruijn, M. H. L., Clulson, A. R., Eperon, I. C., Sanfer, F. and Young, I. G. 1982. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA : conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* 156 : 683-717.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., Bruijn, M. H. L. and Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R. and Young, I. G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290 : 457-465.
- Beard, C. B., Mills Hamm, D. and Collins, F. H. 1993. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae* : DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequence of other insects. *Insect Mol. Biol.* 2 : 103-124.
- Brown, W. M. 1985. The mitochondrial genome of animals. In : MacIntyre, R. J. ed., Molecular evolutionary genetics, Plenum Press, New York, pp 95-130.
- Cann, R. L., Stoneking, M. and Wilson, A. C. 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325 : 31-36.
- Clayton, D. A., Smith, C. A. 1975. Complex mitochondria of insect eggs. *Proc. Roy. Soc. (B)* 200 : 11-18.

Table 5. Comparison of nucleotide length and base composition of mitochondrial ND6 gene in *Bombyx mori* and other insect species

Insect	Length (bp)	A(%)	G(%)	T(%)	C(%)	A+T(%)
<i>B.mori</i>	531	236(44.44)	30(5.65)	230(43.31)	35(6.59)	466(87.76)
<i>D.melano.</i>	525	193(36.75)	25(4.76)	255(48.57)	52(9.90)	448(85.33)
<i>D.yakuba</i>	525	190(36.19)	28(5.33)	255(48.57)	52(9.90)	445(84.76)
<i>A.gambiae</i>	525	210(40)	32(6.1)	235(44.95)	47(8.95)	445(84.95)
<i>A.quadrina</i>	525	205(39.05)	28(5.33)	241(45.90)	51(9.71)	446(84.95)
<i>A.mellifera</i>	504	215(42.86)	15(2.98)	222(44.05)	51(10.12)	437(86.90)
<i>L.migratoria</i>	522	245(46.93)	32(6.13)	128(34.10)	67(12.84)	423(81.03)

D.melano and *A.quadrina* indicate *D.melanogaster* and *A.quadrivittata*.

- drial DNA. Int. Rev. Exp. Pathol. 14 : 1-67.
- Clary, D. O. and Wolstenholmn, D. R. 1985. The mitochondrial ·DNA molecule of *Drosophila yakuba* : nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. J. Mol. Evol. 22 : 252-271.
- Crozier, R. H. and Crozier, Y. C. 1993. The mitochondrial genome of the honey bee *Apis mellifera* complete sequence and genome organization. Genetics 133 : 97-117.
- Datta, R. K and Pershad, G. D. 1988. Combining ability among multivoltine by bivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) hybrids. Sericologia 28 : 21-29.
- Debruijn, M. H. L. 1983. *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA, a novel organization and genetic code. Nature 304 : 234-241.
- Fauron, C. M. R. and Wolstenholmn, D. R. 1980. Extensive diversity among *Drosophila* species with respect to nucleotide sequences within the adenine + thymine rich region of mitochondrial DNA molecules. Nucleic Acids Res. 8 : 2439-2452.
- Flook, P. I., Rowell, C. H. and Gellissen, G. 1995. The sequence, organization, and evolution of the *Locusta migratoria* mitochondrial genome. J. Mol. Evol. 41 : 928-941.
- Garesse, R. 1988. *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA : gene organization and evolutionary considerations. Genetics 118 : 649-663.
- Hwang, J. S. Lee, J. S. Goo, T. W. Kang, H. A. Kim, H. R and Kwon, O. Y. 1999. The comparative molecular study between Bombycidae and Saturniidae based on mtDNA and cytochrome oxidase I gene sequences: Implication for molecular evolution. Z. Naturforsch 54c : 587-594.
- Hwang, J. S. Lee, J. S. Goo, Yun, E. Y. Sohn, H. R and Kwon, O. Y. 1999. Molecular genetic relationships between Bombycidae and Saturniidae based on the mitochondrial DNA encoding of large and small RNA. Genetic Analysis 15 : 223-228.
- Hwang, J. S. Lee, J. S. Goo, T. W. Lee, S. Kwon, O. Y and Kim, H. R. 1999. Comparative analysis of nucleotide sequence and codon usage of arylphorin gene cloned from four silk-producing insects and their molecular phylogenetics. J. Life Science 9(1) : 84-89.
- Lee; J. S. Hwang, J. S. Suh, D. S. Lee, S. M. Kang, H. A and Sohn, H. R. Genetic relationship among silkworms by mtDNA RFLP. Korean J. Genetics 18(1) : 49-58.
- Lee, J. S. Hwang, J. S. Sung, S. H. Kim, Y. S. Kim, Y. S and Suh, D. S. 1998. Molecular discrimination among *Antheraea pernyi* (wild silkworm) using DNA polymorphism amplified from Arbitrary primers. J. Life Science 8(1) : 75-78.
- Hwang, J. S. Lee, J. S. Kim, Y. S and Sung Y. M. 1999. Molecular phylogenetics of silkworm (*Bombyx mori*) based on mariner-like elements (MLEs). Korean J. Life Science 9(2) : 176-191.
- Li, W. 1992. Genetic path network among quantitative characters in *Bombyx mori* L. Sericologia 32 : 543-548.
- Michell, S. E., Cockburn, A. F. and Seawright, J. A. 1993. The mitochondrial genome of *Anopheles quadrimaculatus* species A complete nucleotide sequence and gene organization. Genome 36 : 1058-1073.
- Nei, M. and Kohen, R. K. 1983. Evolution of genes and proteins. In chapter 4 (Evolution of animal mitochondrial DNA), Sinauer Associates, Sunderland, MA., USA.
- Okamoto, H. Ishikawa, E and Suzuki, Y. 1982. Sericultural analysis of sericin genes. J. Biol. Chem. 257 : 15,192-15,199.
- Rand, D. M. 1993. Endoderms, ectotherms, and mitochondrial genome size variation. J. Mol. Evol. 37 : 281-295.
- Sambrook, J. Fritsch, E. F and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Strachan, O. and Read, A. P. 1996. Human Molecular Genetics, In chapter 7, BIOS Scientific Publisher Ltd., Magdalen Road, Oxford, UK.
- Suzuki, Y. Takiya, S. Suzuki, T. Hul, C. Matsuno, K. Fukuda, M. Nagara, T and Ueno, N. 1990. Development transition of silk gene expression in the *Bombyx mori*. In molecular insect science, Plenum press, New York, 88-89
- Udupa, S. M. and Gowda, V. 1988. Heterotic expression in silk productivity of different crosses of silkworm, *Bombyx mori* L. Sericologia 28 : 39-399
- Wolstenholmn, D. R. 1992. Animal mitochondrial DNA : structure and evolution. Int. Rev. Cytol. 141 : 173-216.
- Zimmermann, E. G. Alkins, D. R. Planz, J. V and Schurr, H. J. 1988. A rapid procedure for isolating mitochondrial DNA. Gene Anal. Techn. 5 : 102-104.