

누에의 RAPD 분석을 위한 primer의 GC 함량과 사전 제한효소
처리한 주형 DNA의 PCR 증폭효율에 관한 연구Studied on Amplificative Efficiency of PCR of Predigested
template DNA and GC Contents for RAPD Analysis in
the Silkworm, *Bombyx mori*이진성 · 황재삼 · 이상몽¹ · 황석조 · 강현아 · 성승현² · 서동상²Jin Sung Lee, Jae Sam Hwang, Sang Mong Lee¹, Seok Jo Hwang,
Hyun Ah Kang, Seung Hyun Sung² and Dong Sang Suh²

ABSTRACT A set of random primers with various GC contents have been designed for silkworm (*Bombyx mori*) that correspond to DNA fragments amplified by the RAPD-PCR(Random Amplified Polymorphic DNAs-Polymerase Chain Reaction) to analyze genetic polymorphisms. The strength of random primers for RAPD-PCR can be affected by GC contents. Specifically, primers with 50% GC content could amplify DNA fragments, which classified into three groups based on amplification strength (75.5% of bad amplification, 11.1% of poor amplification and 11.1% good and excellent amplification). Data also showed that the higher GC content of primers, the better in amplification strength. However, no amplified products were detected by random primers using 40% GC content. Prior to perform PCR, in most cases, the efficiency of PCR amplification to produce genetic markers was increased by cleavage of templates with restriction endonucleases such as *Bam*HI, *Hind*III, *Xba*I, *Hae*III, *Msp*I and *Rsa*I. Using above 60% GC content primers and pre-digested templates with restriction endonucleases, RAPD-PCR can be applied for studying silkworm polymorphism to identify different silkworm strains and to make linkage map with many advantages compared to traditional RAPDs techniques (in terms of cost, labor and reproducibility).

KEY WORDS Silkworm (*Bombyx mori*), RAPD-PCR, GC content, Predigested template

초 록 RAPD-PCR(Random Amplified Polymorphic DNAs-Polymerase Chain Reaction) 기법에 의해서 누에의 유전적 변이 분석을 위한 첫 단계로 다양한 GC 함량을 갖는 random primer에 의해서 증폭되는 DNA 단편의 양상 및 증폭도를 비교하였다. RAPD-PCR을 위한 random primer의 증폭도는 GC 함량에 의해서 상당히 영향을 받음이 분석되었다. 특히, 50% GC 함량을 갖는 primer는 그 증폭도에 따라서 4가지의 그룹으로 DNA 단편이 증폭되었으며[bad amplification (75.5%), poor amplification (11.1%), good and excellent amplification (11.1%)], primer의 GC 함량이 증가할수록, 훨씬 더 좋은 증폭도를 보여 주었다. 그러나, 40% GC 함량을 갖는 primer에 의해서는 어떤 증폭산물도 관찰되지 않았다. PCR을 수행하기 전에 6가지의 제한효소(*Bam*HI, *Hind*III, *Xba*I, *Hae*III, *Msp*I, *Rsa*I)를 사용하여 누에 genomic DNA를 처리하여 이를 주형 DNA로 하여 RAPD-PCR을 수행한 결과, 유전적 마커의 생산에 대한 효율이 증가함을 알 수 있었다. 이상의 결과를 종합해 볼때 60% 이상의 GC 함량을 갖는 random primer와 전처리한 주형 DNA의 사용은 여러가지 다른 누에 계통의 동정 및 연관관 지도작성에 따른 경비 및 시간을 줄이는데 효율적이라고 사료된다.

검색어 누에, RAPD-PCR, GC 함량, predigested template

농촌진흥청 잠사곤충연구소(National Sericulture and Entomology Research Institute, R.D.A., Suwon, Korea)

¹농촌진흥청 연구 관리국(Research Management Bureau, R.D.A., Suwon, Korea)

²성균관대학교 유전공학과(Department of Genetic Engineering, Univ. of Sungkyunkwan, Suwon, Korea)

서 론

AP-PCR(Arbitrarily Primed-PCR) 또는 DAF(DNA Amplification Fingerprinting)라고도 불리는 RAPDs(Random Amplified Polymorphic DNAs)분석은 임의로 합성한 oligonucleotide를 primer로 하여 실험 대상 생물의 DNA를 증폭하는 기술로서, 증폭 결과로 생성된 DNA 밴드의 유무, 수 및 패턴등의 특성은 계통 발생학적 분석, 품종판별, 유전적 변이 및 연관분석 등에 활발하게 응용되고 있다(Black, 1993; Weish & McCland, 1990; Henry, 1992). 이 기법은 대개 유용 작물인 감자(Motoyuki *et al.*, 1993), 토마토(Micheimore *et al.*, 1991), 벼(Fukuoka *et al.*, 1992) 등에서 유전 육종 연구에 활발히 응용되고 있으며, 곤충을 대상으로 한 경우는 진디(Black *et al.*, 1992; Puterka *et al.*, 1993), 모기(Kambhampati *et al.*, 1992), 매뚜기(Chapco *et al.*, 1992), 꿀벌(Greg & Robert, 1995), 집파리(Gawel & Bartlett, 1993), 벌목(Edward & Hoy, 1993, Saul, 1993) 등에서 동위효소, RAPD 및 RFLPs(Restriction Fragment Length Polymorphisms) 마커를 이용한 유전분석 결과가 보고되었다. 또한, 약 3800여개의 유전자가 이미 동정된 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*)에서는 이 기법을 이용하여 이들 유전자의 고밀도 분석이 활발히 진행되고 있으며(Kafatos *et al.*, 1991), 누에(*Bombyx mori*)에서는 RAPD와 RFLP 마커의 탐색(Doira *et al.*, 1992) 및 이들을 이용한 연관지도 작성(小林正彦, 1995), 성 특이적인 마커의 분리, 동정 및 그 유전현상 등에 관한 연구 보고가 있다(Abe *et al.*, 1995).

그러나 이와같은 RAPD-PCR 분석은 대상 곤충의 genome 부위에서 증폭된 산물의 분석을 목적으로 하는 것이기 때문에 사용할 random primer의 선택 및 그 효율성에 따라 종 특이적인 primer 및 이에 의해 증폭된 마커의 효율 및 생산성이 달라질 수 있다. 또한, 다양한 생물의 genome 염기조성중에서 GC(guanine+cytidine)의 비율에 따라서 사용되는 primer의 GC 함량은 PCR을 수행할 때 상당히 밀접한 관계를 갖기 때문에 primer의 GC 함량은 RAPD 분석시 상당히 중요한 요인이 되며, 따라서 primer의 GC 함량에 따른 PCR 증폭도의 비교 및 분석은 반드시 선행되어야 한다.

따라서 본 연구는 관행의 누에 육종 연구(Moon & Han, 1994) 및 다양한 누에 형질의 유전현상을 PCR 기법에 의해 분석할 때의 선결조건인 종 특이적인 random primer의 선별을 효율적으로 하기 위해서 PCR 증

폭도와 primer의 GC 함량과의 관계 측면에서 primer 선택 조건 및 그 증폭도와 predigested template DNA에 의해 증폭된 RAPD의 양상을 분석하여 앞으로의 누에 분자 육종의 토대를 마련하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시 누에

본 실험에 공시한 누에는 농촌진흥청 잠사곤충연구소의 보존 품종인 일111, 갈원, 잠119, 잠120, 잠121이며, 누에의 사육은 누에 육종연구실의 표준사육법에 준하였다.

2. DNA 추출

누에 genomic DNA는 Suzuki & Takiya(1990)와 Kang & Sung(1995)의 방법을 일부 변형하여 small scale 방법으로 분리하였다. 5령 4일째의 누에 후부견사선을 적출하여 1×SSC(0.15M NaCl, 0.015 M sodium citrate pH 7.0)에 세척한 후, 0.5 ml의 DNA 추출 용액(0.5% SDS, 5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 10 ug proteinase K, pH 7.5)을 첨가하여 microtube type의 homogenizer로 마쇄하였다. 약 20분간 37°C에 방치한 뒤, 1 M Tris-HCl(pH 7.5) 완충액을 200 ul 첨가 한 다음, 0.5 ml의 PC(phenol:chloroform, 1:1) 용액을 첨가하여 4°C에서 12,000×g로 원심분리하였다. 위 과정을 2회 반복한 다음, 상등액을 취하여 3배의 salted ethanol(2% potassium acetate 포함)을 첨가하여 4°C에서 12,000×g로 10분간 원심분리하였다. 70%의 ethanol로 침전된 DNA를 세척한 후, 적당량의 RNase(1 mg/ml)가 포함된 TE 완충용액(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 용해하였다.

3. DNA의 정량

정제된 누에 genomic DNA는 Spectronic genesys (Milton Roy, USA) DNA 정량분석기를 사용하여 260 nm와 280 nm의 파장에서 흡광도의 비가 1.8 이상인 비교적 순수한 DNA(250 ng/ul)를 PCR을 위한 주형 DNA로 사용하였다.

4. PCR

본 연구에 사용한 10-mer의 random primer는 UBC (University of British Columbia, Canada)의 101~200 series를 구입하여(Table 1), 아래와 같이 PCR을 수행하였

Table 1. Nucleotide sequence and amplification strength of random primers for RAPD-PCR analysis in the silkworm

Random primers	Nucleotide Sequence	GC Content(%)	Amplification strength*	Random primers	Nucleotide Sequence	GC Content(%)	Amplification strength*
101	5'-GCGGCTGGAG-3'	80	E	144	5'-AGAGGGTTCT-3'	50	B
102	5'-GGTGGGACT-3'	70	E	145	5'-TGTCGGTTGC-3'	60	P
103	5'-GTGACGCCGC-3'	80	E	146	5'-ATGTGTTGTC-3'	40	B
104	5'-GGGCAATGAT-3'	50	E	147	5'-GTGCGTCCTC-3'	70	E
105	5'-CTCGGGTGGG-3'	80	E	148	5'-TGTCCACCAG-3'	60	B
106	5'-CGTCTGCCCG-3'	80	E	149	5'-AGCAGCGTGG-3'	70	E
107	5'-CTGTCCCTTT-3'	50	B	150	5'-GAAGGCTCTG-3'	60	B
108	5'-GTATTGCCCT-3'	50	B	151	5'-GCTGTAGTGT-3'	50	B
109	5'-TGTACGTGAC-3'	50	B	152	5'-CGCACCAC-3'	80	E
110	5'-TAGCCCCTT-3'	60	B	153	5'-GAGTCAGGAG-3'	60	P
111	5'-AGTAGACGGG-3'	60	E	154	5'-TCCATGCCGT-3'	60	D
112	5'-GCTTGTGAAC-3'	50	E	155	5'-CTGGCGGCTG-3'	80	E
113	5'-ATCCCAAGAG-3'	50	P	156	5'-GCCTGGTTGC-3'	70	E
114	5'-TGACCGAGAC-3'	60	E	157	5'-CGTGGGCAGG-3'	80	E
115	5'-TTCGCGGGC-3'	80	E	158	5'-TAGCCGTGGC-3'	70	B
116	5'-TACGATGACG-3'	50	P	159	5'-GAGCCCGTAG-3'	70	B
117	5'-TTAGCGCTCT-3'	50	E	160	5'-CGATTCAGAG-3'	50	B
118	5'-CCCCTTTTGT-3'	50	B	161	5'-CGTTATCTCG-3'	50	B
119	5'-ATTGGGCGAT-3'	50	E	162	5'-AACTTACCGC-3'	50	B
120	5'-GAATTTCCCC-3'	50	E	163	5'-CCCCCAGAT-3'	70	B
121	5'-ATACAGGGAG-3'	50	B	164	5'-CCAAGATGCT-3'	50	P
122	5'-GTAGACGAGC-3'	60	P	165	5'-GAAGGCACTG-3'	60	B
123	5'-GTCTTTCAGG-3'	50	B	166	5'-ACTGCTACAG-3'	50	B
124	5'-ACTCGAAGTC-3'	50	B	167	5'-CCAATTCACG-3'	50	P
125	5'-GCGGTTGAGG-3'	70	P	168	5'-CTAGATGTGC-3'	50	P
126	5'-CTTTCGTGCT-3'	50	B	169	5'-ACGACGTAGG-3'	60	P
127	5'-ATCTGGCAGC-3'	60	B	170	5'-ATCTCTCCTG-3'	50	B
128	5'-GCATATTCCG-3'	50	B	171	5'-TGACCCCTCC-3'	70	P
129	5'-GCGGTATAGT-3'	50	B	172	5'-ACCGTCGTAG-3'	60	B
130	5'-GGTTATCCTC-3'	50	B	173	5'-CAGGCGGCGT-3'	80	E
131	5'-GAAACAGCGT-3'	50	B	174	5'-AACGGGCAGC-3'	70	E
132	5'-AGGGATCTCC-3'	60	B	175	5'-TGGTGCTGAT-3'	50	B
133	5'-GGAAACCTCT-3'	50	B	176	5'-CAAGGGAGGT-3'	60	E
134	5'-AACACACGAG-3'	50	B	177	5'-TCAGGCAGTC-3'	60	B
135	5'-AAGCTGCGAG-3'	60	B	178	5'-CCGTCATTGG-3'	60	E
136	5'-TACGTCTTGC-3'	50	B	179	5'-TCACTGTACG-3'	50	B
137	5'-GGTCTCTCCC-3'	70	E	180	5'-GGGCCACGCT-3'	80	G
138	5'-GCTTCCCCTT-3'	60	P	181	5'-ATGACGACGG-3'	60	B
139	5'-CCCAATCTTC-3'	50	E	182	5'-GTTCTCGTGT-3'	50	B
140	5'-GTCGCATTTTC-3'	50	B	183	5'-CGTGATTGCT-3'	50	B
141	5'-ATCCTGTTCG-3'	50	B	184	5'-CAAACGGCAC-3'	60	E
142	5'-ATCTGTTCCG-3'	50	B	185	5'-GTGTCTTCAC-3'	50	B
143	5'-TCGCAGAACG-3'	60	P	186	5'-GTGCGTCGCT-3'	70	B

*: B, P and E/G indicate bad, poor, good and excellent amplification.

Table 1. Continued

Random primers	Nucleotide Sequence	GC Content(%)	Amplification strength*	Random primers	Nucleotide Sequence	GC Content(%)	Amplification strength*
187	5'-AACGGGGGAG-3'	70	B	194	5'-AGGACGTGCC-3'	70	E
188	5'-GCTGGACATC-3'	60	G	195	5'-GaTCTCAGCG-3'	60	B
189	5'-TGCTAGCCTC-3'	60	B	196	5'-CTCCTCCCCC-3'	80	B
190	5'-AGAATCCGCC-3'	60	G	197	5'-TCCCCGTTCC-3'	70	B
191	5'-CGATGGCTTT-3'	50	B	198	5'-GCAGGACTGC-3'	70	G
192	5'-GCAAGTCACT-3'	50	B	199	5'-GCTCCCCCAC-3'	80	G
193	5'-TGCTGGCTTT-3'	50	B	200	5'-TCGGGATATG-3'	50	B

*; B, P and E/G indicate bad, poor, good and excellent amplification.

다. 총 25 ul의 반응용액에 genomic DNA 30 ng, dNTP mixture(한국생공, 한국) 200 uM, random primer 100 nM 그리고 Taq DNA polymerase(한국생공, 한국) 1 unit를 첨가한 다음, mineral oil(Sigma, USA)을 30 ul 적하한 뒤, 94°C에서 5분간 열 변성을 시킨 후에 94°C에서 60초, 35°C에서 60초, 72°C에서 90초를 1회로 하여 45회 반응을 수행하였다. 최종 증폭(last extension)은 72°C에서 5분간 수행하였으며, PCR 기종은 water-bath thermal cycler(FINEPCR, 한국)를 사용하였다.

5. 전기영동(agarose gel electrophoresis)

PCR 반응 후 12 ul의 반응용액을 sample buffer(0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 30% glycerol)와 함께 잘 혼합하여 1.5%~2%의 SeaKem GTG agarose(FMC, USA) gel에 loading한 후, TAE 완충용액(0.04 M Tris acetate, 0.001 M EDTA pH 8.0)에서 7.5 volts/cm로 전기영동하였다. 전기영동 후, 5분간 gel 내의 DNA를 EtBr(2 ug/ml)로 염색하고 증류수로 10분간 세척한 다음 자외선(260 nm)하에서 사진촬영(Polaroid 667, USA)하였다.

6. AP-PCR 증폭도 분석

PCR 반응을 수행한 후, 일111과 갈원 계통의 증폭산물의 증폭도는 다음의 3가지 기준으로 분석하였다 (Fig. 1). 1) 증폭이 되지 않았을때를 B(bad amplification), 2) 미약하게 증폭이 되었을때는 P(poor amplification), 3) 증폭이 양호하며, 공시 계통간에서 1-2개의 RAPD 마커가 검출 되었을때를 G(good amplification), 그리고 증폭이 탁월하며, 공시 계통간에 3개 이상의 RAPD 마커가 검출되었을 때를 E(excellent amplification)로 그룹을 정하여 총 100가지의 UBC

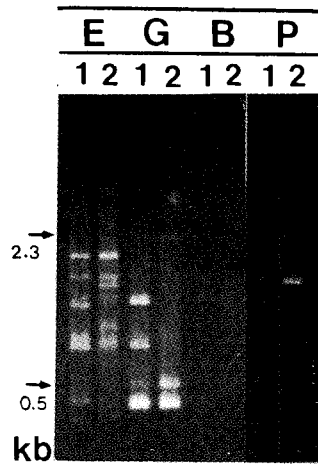


Fig. 1. The amplification strengths of four groups detected by RAPD-PCR in the silkworm, *Bombyx mori*. Lane 1 and 2 are Il111 and galwon strains used as the template DNA. E, G, B and P indicate excellent, good, bad and poor amplification, respectively.

random primer를 분석하였다.

7. 제한효소의 처리

BamHI, HindIII, PstI, RsaI, MspI과 HaeIII(Promega, USA)를 사용하여 누에 genomic DNA를 하룻밤 동안 완전 소화한 다음 phenol 추출과정 및 ethanol 침전과정을 수행한 후, 30 ng/ul의 농도로 하여 TE buffer(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 용해하여 다음의 PCR 반응의 template DNA로 사용하였다.

결과 및 고찰

1. GC 함량과 증폭도

대부분의 RAPD 분석이 상당히 많은 종류의 ran-

dom primer를 사용하기 때문에 각각의 primer에 대한 Tm 값은 고려하지 않고, 일정한 온도조건에서의 PCR 반응도 및 그 조건을 토대로 하여 대량의 RAPD marker를 screening하기 때문에 본 연구에서는 누에 genomic DNA template에 대한 random primer의 annealing 온도를 35°C로 일정하게 고정하고, 이에 따른 100가지의 UBC random primer의 증폭도를 분석하였다.

본 연구에 사용한 100 종류의 UBC random primer 중에서 40%의 GC 함량을 갖는 146번 primer(5'-ATGTGTTGTC-3')로 RAPD-PCR을 수행한 결과, 증폭 산물이 전혀 관찰되지 않았다(Fig. 1). 이와같은 결과는 본 연구에 사용한 100가지의 UBC random primer 중에서 146번 한가지 만이 분석되었기에 그 신뢰도가 미약하지만, 40%의 GC 함량을 갖는 다수의 primer(201-300 series)로 PCR을 수행 했을때도 증폭산물이 거의 관찰되지 않았다(Data not shown). 이상의 결과는 본 연구의 PCR 조건 중 annealing 온도가 35°C로 고정된 점을 감안하면 primer GC 함량이 낮음에 그 원인이 있는 것으로 추정할 수 있다. 따라서, 누에를 대상으로 한 AP-PCR의 경우 40% GC 함량을 갖는 random primer를 선택하는 것은 가능한 한 피해야 할 것으로 생각된다. 공시한 UBC primer 100개 중에서 50%의 GC 함량을 갖는 45개의 random primer로 PCR을 수행한 결과(Table 1, 2), 그 증폭도는 B 그룹이 34개(75.5%), P 그룹은 5개(11.1%)로 39개(81.5%)의 primer는 그 증폭도가 좋지 못하였다. 또한, E 와 G 그룹은 6개(13.3%)로 그 수가 매우 적었다. 이와같은 결과를 GC 함량 40% 수준과 비교할 때 증폭도가 증가함을 알 수

있으며, 40%에서 50%로 primer GC 함량이 증가함에 따라 증폭도도 비례하게 나타난다는 Kazuyishi *et al* (1994)의 결과와 유사하였다.

60%와 70%의 GC 함량을 갖는 각각 26개와 8개의 random primer의 증폭도를 분석한 결과, 60%의 GC 함량을 갖는 26개의 primer 중에서 B 그룹이 13개(50%), P와 EG 그룹이 각각 6개(22.5%)로 분석되었으며, 70%의 GC 함량을 갖는 경우는 B 그룹 6개(37.5%), P 그룹이 2개(12.5%), EG 그룹이 8개(50%)로 나타났다(Table 1, 2). 이상의 결과에서 GC 함량의 증가에 따라서 AP-PCR의 증폭도가 증가한다는 사실은 35도의 annealing 온도에서 primer와 주형 DNA와의 결합력이 증가되기 때문인 것으로 추정되며, 60%에서부터 증폭도가 상당히 증가하는 이유는 누에 genomic DNA의 GC 함량과도 관련이 있을 것이라고 추정된다(Fig. 2). 이것은 초파리에 있어서 70% 보다는 60% GC 함량을 갖는 primer가 보다 더 증폭도가 좋다는 Gawel & McInnis, (1994)의 결과와는 다소 다른 결과이며, 이것은 초파리와 누에라고 하는 종의 차이에서 기인한 결과가 아닌가 생각된다.

공시한 100개의 UBC random primer 중에서 GC 함량이 80%인 12개의 primer로 PCR을 수행하여 그 증폭도를 분석한 결과, B 그룹이 1개(8.3%), EG 그룹이 11개(91.6%)로 나타났으며, P 그룹은 검출되지 않았다(Table 1, 2). 이상에서 GC 함량이 높은 primer로 AP-PCR을 수행할때 그 증폭도도 비례하게 높게 나타남을 알 수 있었으며, 이는 Haymer(1994)의 결과와 상충하였다. 그러므로 계통 및 품종 감별을 위한 DAF(DNA Amplification Fingerprinting) 분석시에는 GC 함량이

Table 2. Efficiency of random primers by RAPD-PCR in the silkworm

Amplification strength*	Total		GC content(%)									
			40		50		60		70		80	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
E & G	32		0		6		6		8		11	
	-	32	-	0	-	13.3	-	22.5	-	50.0	-	91.6
	100		1		45		26		16		12	
P	13		0		5		6		2		0	
	-	13	-	0	-	11.1	-	22.5	-	12.5	-	0.0
	100		1		45		26		16		12	
B	55		1		34		13		6	37.5	1	
	-	55	-	100	-	75.5	-	50.0	-	-	-	8.3
	100		1		45		26		16		12	

*; B, P and E & G indicate bad, poor, good and excellent amplification.

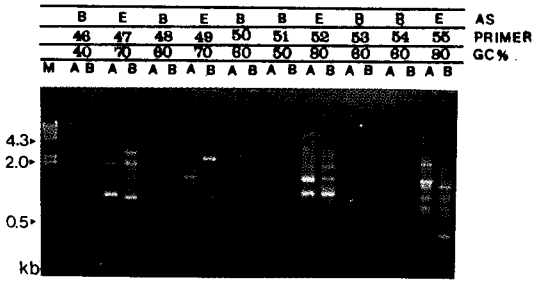


Fig. 2. RAPD-PCR profiles showing relationships between amplification strength(AS) and GC content of the UBC random primers. Lane A and B represent II111 and galwon strains used as the template DNA. M; /*Hin*-dIII DNA size markers.

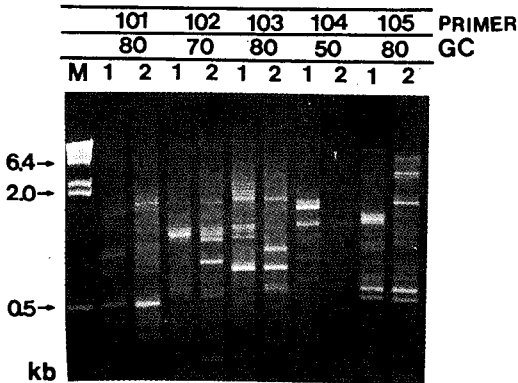


Fig. 3. RAPD patterns amplified using the five UBC random primers. Lane 1 and 2 are II111 and galwon strains used as the template DNA. M; /*Hin*dIII DNA size markers.

80% 정도인 random primer를 선택하는 것이 적은 primer로 다수의 품종 및 계통의 감별을 위해 효과적이라고 생각된다.

2. RAPD pattern

본 연구에서 사용한 전체 100개의 random primer 중에서 증폭산물을 나타내는 primer는 44개(44%)로 조사되었다. 이 중에서 일111과 갈원 두 계통에서 polymorphism을 보이는 primer는 31개(70.4%)이며, 전체 100개의 primer에 대해서는 31개(31%)로 분석되었다(Fig. 3). 또한, polymorphism을 보이는 primer는 GC 함량이 50% 이상인 것으로 조사되었다. GC 함량이 50%, 60%, 70% 및 80%를 갖는 각각 45개, 26개, 16개 및 12개의 primer에서 polymorphism을 보이는 random primer는 각각 6개(13.3%), 6개(13.3%), 8개(50%)

및 11개(91.6%)로 조사되어 AP-PCR에 적합한 ten-mer의 primer는 GC 함량이 60% 이상이 되어야 할 것으로 생각된다. 또한, 이러한 결과는 Fukuoka 등(1992) 및 Williams 등(1990)의 결과와도 일부 일치하였다.

일반적으로 AP-PCR에 사용되는 random primer는 ten-mer(10 oligonucleotides)의 경우 4¹⁰개 즉, 1,048, 576개의 서로 다른 염기배열 조합을 가질 수 있는 것으로 연구자의 의도에 의해서 합성한 것이 아닌 대개 Operon(Operon Technologies, Alameda, USA) 또는 UBC에서 대량으로 제조된 primer series이다(Haymer 1994). 결국, 이와같은 primer series로 PCR을 수행할 경우에 본 연구에서처럼 GC 함량에 따른 증폭산물의 검정을 우선적으로 수행한다면, 종 특이적인 primer를 효과적으로 선별할 수 있을 것이며, 또한 유전분석시에 소요되는 시간과 노력을 상당히 줄일 수 있을 것으로 사료된다.

3. Predigested template를 이용한 RAPD patterns

AP-PCR을 수행하기 전에 누에 genomic DNA를 6 base pair cutter인 *Bam*HI, *Hin*dIII, *Xba*I과 4 base pair cutter인 *Hae*III, *Msp*I, *Rsa*I으로 처리하여 제한효소를 처리하지 않은 조건과 함께 PCR을 수행하여 predigested 주형 DNA의 사용에 의한 RAPD의 밴드양상을 분석하였다. UBC random primer 147번을 이용하여 PCR 반응을 수행한 결과(Fig. 4), uncut template(lane 1, 2, 3)의 RAPD band 양상과는 다른 마커가 *Bam*HI, *Hin*dIII, *Xba*I에서 한개 이상 관찰되었으며, 특히 4 base pair를 인식하여 DNA를 절단하는 *Hae*III, *Msp*I, *Rsa*I의 경우에는 control인 uncut template와 비교시 확연한 주 밴드(major band)의 RAPD 마커가 생산됨을 알 수 있었다. 특히, Fig. 4에서와 같이 *Msp*I으로 처리하여 증폭된 1.9kb 위치의 RAPD 마커등은 이들 잠 119와 잠121 장려잠의 계통 특이적인 band라 생각되진다. 이와같이 제한효소로 처리하고, 또한 처리하지 않은 누에 genomic DNA를 사용하여 증폭되는 RAPD을 양상에 관한 profile은 Table 3과 같다. 1개의 bad amplification과 7개의 good and excellent amplification을 보이는 7개의 random primer를 사용하여 분석한 결과, 107번 primer의 경우에서만 control과 predigested 주형 DNA에서의 RAPD의 밴드 양상이 같았으며, 나머지 114, 115, 119, 120, 137, 147 primer에는 제한효소를 처리한 주형에서 RAPD를 보이는 밴드가 전체적으로 증가하는 경향을 보였다.

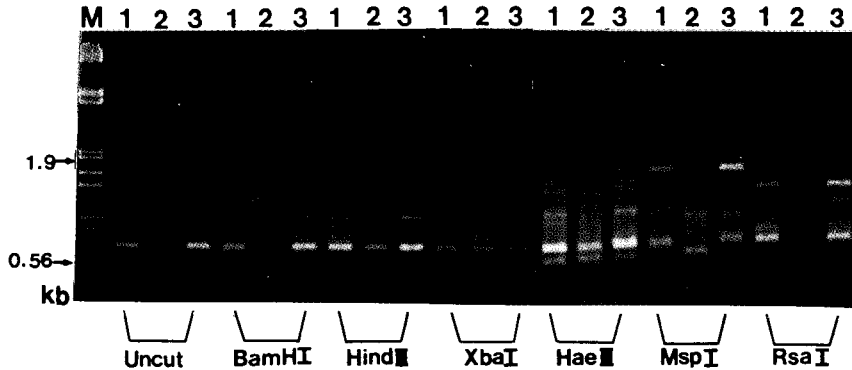


Fig. 4. RAPD patterns amplified using predigested template DNA with six restriction endonucleases. Lane 1, 2 and 3 are Jam119, Jam120 and Jam121 silkworm strains used as the template DNA.

Table 3. Profiles of RAPD-PCR using template DNA predigested with six restriction endonucleases

Restriction endonuclease	Number of RAPD markers							
Uncutted template DNA	1	1	2	4	3	2	2	2
<i>Bam</i> HI	1	3	2	1	1	2	3	4
<i>Hind</i> III	1	2	4	1	1	2	3	4
<i>Xba</i> I	1	1	1	1	3	6	1	2
<i>Hae</i> III	1	1	4	1	2	4	5	5
<i>Map</i> I	1	4	3	1	3	4	5	3
<i>Rsa</i> I	1	3	6	1	2	2	6	6
Random primers	107	114	115	119	120	137	139	147
GC content(%)	50	60	80	50	50	70	50	70
Amplification strength	B	E	E	E	E	E	E	E

누에는 인시목 곤충중에서 유일하게 연관지도가 작성된 산업곤충으로 곤충유전학 연구에 있어 훌륭한 재료로 평가 받고 있다. 그러나 경제 형질과 표현 형질등 다양한 형질과의 관계를 염색체 수준에서, 특히 DNA 수준에서의 체계적인 연구의 부족으로 인해서 분자 육종 연구에 제한이 되고 있다. 따라서 본 연구는 RAPD 마커의 mapping을 통한 누에 genome의 해석을 위한 첫 단계로 PCR 기법을 통해서 RAPD 증폭조건을 random primer의 GC 함량 측면에서 그 증폭도를 분석하였으며 또한, RAPD 마커의 다량확보를 위해서 predigested 주형 DNA의 이용성을 살펴보았다. 본 연구의 결과는 금후 누에의 분자 육종 및 관행 육종에 귀중한 기초자료가 될 것으로 사료된다.

사 사

본 논문의 원고 작성 및 세심한 검토를 해주신 성균

관대학교 생명자원과학대학 유전공학과와 이 석찬 교수님과 본 연구 수행에 여러모로 도움을 준 감사곤충연구소 유전정보연구실의 윤 회영씨께 감사의 말을 전합니다.

인용문헌

- Abe, H., Shimada, T., Yokoyama, T., Oshiki, T. & Kobayashi, M. 1995. Identification of random amplified polymorphic DNA on the W chromosome of the chinese 137 strains of the silkworm, *Bombyx mori*. *Jpn. J. Seric. Sci.* **64**(1): 19-22.
- Black, W. C. 1993. PCR with arbitrary primer; approach with care. *Insect Mol. Biol.* **2**: 1-5.
- Black, W. C., DuTeau, N., Putetka, G., Nechols, J. & Pettorini, J. 1992. Use of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction(RPPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids. *Bull. Ent.*

- Res. **82**: 151-159.
- Chapco, W., Ashton, N., Maetel, R. & Antonishyn, N. 1992. A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systematics of glasshoppers. *Genome* **35**: 569-574.
- Doira, H., Fuji, H., Kawaguchi, Y., Kihara, H. & Fiedman, Y. 1992. Genetical stocks and mutations of *Bombyx mori*: Important genetic resources. Isseido press, Fukuoka, Japan.
- Edwards, O. & Hoy, M. 1993. Polymorphisms in two parasitoids detected using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Biol. Control* **3**: 243-257.
- Fukuoka, S., Hosaka, K. & Kamizima, O. 1992. Use of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) for identification of rice accessions. *Jpn. J. Genet.* **67**:243-252.
- Gawel, N. & McInnis, D. 1994. Resolution populations of the mediterranean fruit fly at the DNA level using random primers for the polymerase chain reaction. *Genome* **37**: 244-248.
- Gerg, J. H. & Robert, E. P. 1995. Linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers. *Genetics* **139**: 1371-1382.
- Haymer, D. S. 1994. Arbitrary(RAPD) primer sequences used in insects. *Insect Mol. Biol.* **3**(3): 191-194.
- Henry, A. E. 1992. Genetic analysis using the polymerase chain reaction. *Annu. Rev. Genet.* **26**: 479-506.
- Kafatos, F. C., Louis, C., Savakis, D. M. & Glover, M. A. 1991. Integrated maps of the *Drosophila genome*: Progress and prospects. *Trends Genet.* **7**:155-161
- Kambhampati, S., Black, W. & Rai, K. 1992. Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations: techniques, statistical analysis and applications. *J. Med. Entomol.* **29**: 939-945.
- Kang, H. A. & Seong, S. I. 1995. RFLP analysis of silkworms for DNA polymorphism. *Korean J. Seric. Sci.* **37**(1): 16-26.
- Kazuyoshi, H. & Robert, Jr. 1994. Random amplified polymorphic DNA markers detected in a segregation hybrid population of *Salanum chacoens* × *S. phureja*. *Jpn. J. Genet.* **69**: 53-66.
- 小林正彦. 1995. 家蠶の致死遺傳子と發生抑制に關する研究. 日本蠶絲昆蟲産業技術研究所(一般研究(A)研究成果報告書)
- Micheimore, R. W., Paran, I. & Kessell, R. V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 9828-9832.
- Moon B. W. & Han K. S. 1994. The test of combining ability and heterosis on the silkworm (*Bombyx mori*) breeding. *Korean J. Seric. Sci.* **36**(1): 8-25
- Motoyuki, M., Kazuyoshi, H., Yoshiki, U. & Chukichi, K. 1993. Rapid identification of japnese potato cultivars by RAPDs. *Jpn. J. Genet.* **68**: 167-174.
- Puterka, G. J., Black, W. C., Steiner, W. M. & Burton, R. L. 1993. Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collection of the russian wheat aphids *Diurahis noxia*, inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. *Heredity* **70**:604-618.
- Saul, G. B. 1993. Gene map of the parasitic wasp, *Nasonia vitripennis*. Genetic map. Ed. **6**: 3277-3280.
- Suzuki, Y., Takiya, S., Suzuki, T., Hul, C., Matsuno, K., Fukuda, M., Nagata, T. & Ueno, N. 1990. Developmental transition of silk gene expression in the *Bombyx mori*. "In molecular insect science". pp: 88-89. Plenum press, New York.
- Weish, J. & McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 7213-7219.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafaiski, J. A. & Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6531-6535.

(1995년 11월 6일 접수)