

누에 RFLP(制限短片 多型現象) 마커 開發

Development of Restriction Fragment Length Polymorphism(RFLP) Markers in Silkworm, *Bombyx mori*

高昇柱¹ · 金泰山¹ · 李永承¹ · 黃在三² · 李相夢²

Seung-Joo GO, Tae-San KIM, Young-Seung LEE, Jae-Sam HWANG and Sang-Mong LEE

ABSTRACT A silkworm *Bombyx mori* genomic DNA library was constructed from polyphagous J111 strain and un-polyphagous C₃ strain to develop the genomic study by DNA makers. Genomic DNAs of two strains were digested with restriction enzyme *EcoRI* and ligated into pUC18. The ligated plasmids were transferred into *E. coli* host strain DH5 α . When the genomic DNAs were hybridized with insert DNAs from transformant, could be categorized from hybridization patterns to three groups as high repetitive sequence, moderately repetitive sequence, and low-copy number sequences. A total of 219 clones containing single or low-copy number sequence inserts were examined for any polymorphisms between two strains of J111 and C₃. Forty six clones showed RFLPs and 10 of these clones were used as a probe for analysis of F₂ population derived from crossing between J111 and C₃ strain. The genetic inheritance tested with each clones will be important tools to construct the genetic map of the silkworm, *Bombyx mori*.

KEY WORDS Silkworm, *Bombyx mori*, RFLP, genomic library

초 록 DNA 多型성을 이용한 누에 遺傳子 解析技術을 開發하기 위하여 廣食性 누에系統 J111과 非廣食性系統 C₃의 DNA를 分離하여 遺傳子 銀行을 製作하였다. 누에의 遺傳子 銀行은 genomic DNA를 *EcoRI*로 切斷한후 pUC18에 ligation 시켜 DH5 α *E. coli*에 形質轉換 시켰다. 형질전환 후 얻어진 colony는 15개 누에 品種의 genomic DNA에 hybridization 하였을 때 누에의 품종에 관계없이 highly repetitive, moderately repetitive 및 single 혹은 low copy number 로 구분되었다. RFLP 마커에 적합한 single 및 low-copy number band만을 形成하는 colony probe을 신속하게 선별하고자 colony 또는 genomic DNA로 hybridization하였다. Single 및 low-copy number의 특성을 가진 219개의 clone을 選拔하여 Hind III 등 8종의 制限酵素別로 處理한 genomic DNA를 利用하여 多型성을 檢定하여 J111과 C₃ 系統간 多型성을 보인 46개의 clone을 選拔하였다. 選拔된 clone의 일부를 J111과 C₃를 交配하여 얻은 F₂의 blot에 hybridization 결과 RFLP clone들이 양친검정에 이용 가능하여 누에 RFLP 연관 地圖 作成의 基盤을 造成하게 되었다.

검색어 핵산표지, 누에, 다형성

누에의 품종을 개량하기 위해서는 지금까지 수행되어온 交雜育種外에 有用 遺傳子를 分離하여 形質轉換 등에 직접 利用하거나 목표로 하는 形質의 표지인자를 선별하여 利用하면 육종효율이 增大되고 단기간내에 목표로 하는 형질의 품종을 개량할 수 있을 것으로 보인다. 누에는 320종의 遺傳의 特性이 分析된 바 있으나 (Doira, 1992) 이러한 特性은 주로 色澤이나 形態의 變이에 의하여 만들어진 것으로서 실제 有用遺傳子의 分離에 연계하여 利用하는 데는 많은 제한이 있다.

최근에 有用遺傳子 선별 및 분리에 많이 利用되고 있는 制限短片長多型現狀(restriction fragment length polymorphism; RFLP)은 有用遺傳子의 分離는 물론 選拔 標識因子로 광범위하게 제작되어 利用하고 있다. (Ahn et al., 1992) RFLP는 DNA 鹽基序列上的 變異 差異를 制限酵素 處理로 正確하게 識別할 수 있는 장점이 있다. DNA의 염기서열이 서로 다른 食料체로부터 分離된 DNA를 特定制限酵素로 切斷하여 생산된 단편들의 RFLP 樣相을 비교하므로써 品種의 多樣성을

¹농업과학기술원 분자유전과(Molecular Division, National Agricultural Science and Technology Institute)

²잠사곤충연구소 유전육종과(Department of Genetics and Breeding, National Sericulture and Entomology Research Institute)

比較하거나 特定遺傳子の 標識因子로 사용하게 된다. 특히 農業에 있어서 중요한 形質인 生理的 特性이나 數量, 品質 및 病蟲害 등의 抵抗性 遺傳子는 遺傳產物이 없거나 모르는 경우가 많아 RFLP 등의 標識因子의 使用이 不可避 하다. 그러나 아직까지 RFLP에 의한 누에의 遺傳子 地圖 作成이나 有用遺傳子の 分離에 利用된 例는 보고된 바 없으며 일부 系統의 多樣性을 比較한 例가 보고되었을 뿐이다(Boucher *et al.*, 1986; Fujiwara *et al.*, 1994)

본 實驗은 누에의 品種改良을 위한 DNA 구조해석 기술을 조기에 개발하고 廣食性 遺傳子를 분리하기 위한 一連의 基礎 研究로서 누에의 産卵 DNA의 特性을 調査하고 遺傳子 地圖 作成 및 品種 多樣性을 검토하기 위한 마커를 開發하고자 着手하였으며 이를 위하여 遺傳子 銀行을 製作하고 이 銀行으로부터 RFLP DNA 단편을 選拔하여 그 特性을 조사하고 遺傳子 地圖 作成 可能性도 검토하였다.

재료 및 방법

實驗 材料

누에의 廣食性과 非廣食性 系統間에 多型性을 보이는 RFLP 標識因子를 探索하고자 蠶絲昆蟲 研究所에서 계대 保存하고 있는 廣食性系統 J111과 非廣食性系統 C₃을 兩親으로 使用하였다. 이들을 交配하여 얻은 F₁을 다시 兄妹 交配하여 F₂를 育成하였다. 品種別 DNA의 特性은 廣食性인 J111의 백옥잠등 15개 品種을 使用하였다. 누에는 蠶絲昆蟲 研究所에서 標準 飼養法에 준하여 飼育된 것이다.

實驗方法

가. DNA의 分離

5령이 지난 50마리의 누에를 시료로 사용하였다. 우선 後部 絹絲腺을 摘出하여 1x SSC (0.15M sodium chloride, 0.015M sodium citrate pH 7.0)로 수회 세척한 것을 液體窒素로 凍結하고 -70°C에 保管하며 使用하였다. 保管 中인 後部絹絲腺을 液體 窒素와 함께 磨碎하여 微細한 粉末로 만들었다. 5 ml의 DNA 抽出用 緩衝溶液(0.5% SDS, 5 mM EDTA, 20 mM Tris HCl, pH 7.5, 0.1 M NaCl, 10 µg/ml proteinase K)을 添加하여 잘 混合한 후 37°C에서 20분간 培養하고 15ml의 1M Tris-HCl, pH 7.5, 20 ml의 phenol/chloroform/isoamylalcohol(25:24:1)을 添加하여 上下로 交代하여 混合하였

다. 混合된 溶液은 6,000 rpm에서 15분간 遠心分離하여 上騰液을 취하고 여기에 phenol/chloroform을 添加하여 2회 더 抽出하였다. 最終 上騰液에 0.8 ml의 5M NaCl를 添加한 후 1배의 isopropanol을 혼합하여 DNA를 沈澱 시켰다. 沈澱된 DNA는 유리봉으로 꺼내어 isopropanol을 揮發 시킨 후 20 ml Tris-EDTA 緩衝液에 녹였으며 DNA가 녹은 溶液에 RNase A를 10 µg/ml 되도록 가하여 37°C에서 2시간 동안 처리하여 RNA를 제거하였다. 동량의 phenol/chloroform을 다시 첨가한 후 遠心分離 하였다. 上騰液에 0.8 ml 5M NaCl을 첨가하고 1배의 isopropanol을 가하여 DNA를 침전시키고 침전된 DNA는 遠心分離로 회수하여 1 ml의 T.E.緩衝液에 녹여 -20°C에 보관하며 사용하였다.

누에 F₂ 個體의 DNA 分離는 個體別로 DNA를 분리 하여야 되므로 앞의 分離方法을 다소 變형시켜 實施하였다. 우선 F₂ 個體가 5령 2-3일 일 때 中部絹絲腺이 包含되게 後部 絹絲腺을 摘出하여 2.0 ml Eppendorf tube에 넣어 -70°C에 보관하였다. 보관 中인 中,後部 絹絲腺을 짧게 절단하고 200 µl DNA 추출용 緩衝液을 넣은 후 교반하면서 마쇄하였다. Proteinase K를 10 µl, RNase를 10 µl씩 각각 첨가한 후 37°C에서 20분간 培養하였다. 배양후 600 µl 1M Tris-HCl(pH 7.5), 800 µl phenol/chloroform/isoamylalcohol을 첨가하여 교반하고 15분간 15,000 rpm으로 遠心分離 하였다. 上騰液을 phenol/chloroform으로 다시 處理하여 抽出한 후 1/10배의 3M Sodium Acetate, pH 5.0 과 3배의 에탄올을 混合하여 DNA를 沈澱시켰다. 沈澱된 DNA는 70% 에탄올로 1회 세척한 후 건조시켜 500 µl의 T.E. 緩衝液에 녹였다.

나. Genomic DNA 銀行 製作

누에의 廣食性 系統 J111 및 C₃의 DNA 2 µg을 制限 酵素 Pst I 이나 Eco R I으로 37°C의 水槽에서 하룻밤 처리한 후 phenol/chloroform으로 抽出하였다. DNA의 크기별 選別은 실시하지 않고 制限酵素로 처리된 DNA 전체를 동일한 制限酵素로 절단하여 정제한 plasmid pUC 18과 ligation 시켰다. ligation은 T₄ ligase을 使用하여 製造會社가 지시한대로 처리하였으며 12°C에서 15시간 정도 實施하였다. ligation 된 plasmid는 DH5α *E. coli*에 Maniatis(1982) 등의 方法에 遵하여 形質轉換 시켰다. 形質轉換은 *E. coli*와 plasmid를 50 mM CaCl₂ 溶液에 혼합하여 어류위에서 30분간 放置한 후 42°C에서 30초간 온도충격을 통해 이루어졌다. 形質轉換體에 LB 培地(Tripton 10 g, Yea-

st Extract 5 g, NaCl 10 g/l)를 첨가한 후 90분간 37°C로培養하고 Ampicilline이添加된選擇培地에接種하였다. 形質轉換된菌體는 37°C에서 15시간 후에 흰색의 colony만을 선발하였다.

다. Colony hybridization

단일 밴드만을形成하는 insert DNA probe를選擇하고자 colony hybridization을 하였다. 形質轉換된 *E. coli* colony를 100개單位로 한 petri-dish에接種하여 하룻밤培養한 후 Hybond nylon membrane (Amersham RPN 82N)에吸着하고 denature solution (1.5M NaCl, 0.5M NaOH)에 5분간 2회 denature시켰다. Denature된 filter는 다시 neutral solution(1.5M NaCl, 0.5M Tris HCl pH 7.2, 0.001M EDTA)에 5분간 2회 neutralization시켰다. 中化가完了된 membrane은 2x SSC에 간단히 세척하여 風乾시킨 후 80°C에서 2시간 baking하여 保管하였다. membrane의 prehybridization은 용액(5xSSPE, 5x Demhardt's solution, 0.1% SDS)에 65°C로 1시간 이상 반응시키고 누에 DNA를 probe로하여 hybridization을 같은溫度에서 12시간 동안 수행하였다. hybridization 후 실온에서 2x SSC+0.1% SDS로 20분간 2회 세척하고 1x SSC+0.1% SDS에 65°C에서 2회 세척한 후 風乾하여 X-ray film에 노출하였다. Probe製造는 [³²P] dCTP와 random primed Kit(B. M. 製品)을使用하여 Nick column(Pharmacia 製品)으로 調製하였다.

라. Probe/制限酵素 組合別 polymorphism 檢定

廣食性인 J111과 非廣食性 C₃의 누에 DNA를 BamHI 등 6종의 制限酵素로 處理하여 切斷된 DNA를 Hybond N⁺ nylon membrane(Amersham)에 轉移하여 hybridization의 재료로 사용하였다. Probe製造는 agarose gel로부터 分離한 insert DNA를 [³²P] dCTP를 利用하여 labelling 하였으며 label의 造作은 Amersham Megaprime DNA labelling system을 使用하여 製品說明書에 따라 造作하였다. Hybridization은 prehybridization을 65°C에서 하룻밤 修行한 후 同一溫度에서 12시간 反應시키고 위에서 설명한 것과 같이 세척하여 X-ray film에 反應시켜 나타난 밴드를 조사하였다.

마. F₂ 누에의 分析

廣食性 系統 J111과 C₃ 系統의 F₂ 分析은 兩親에서 이미 probe/제한효소 조합별 polymorphism을 보인 probe를 中心으로 실시하였다. Blot의 製造는 probe별로 polymorphism을 보인 制限酵素로 切斷하여 1%

Agarose 젤에 電氣泳動한 것을 변성시켜 vacuum transfer기를 利用하여 membrane(Amersham, Hybond N⁺)에 전이하였다. Hybridization은 "라"의 방법에 따라 실시하였다.

결과 및 고찰

누에 Genomic DNA 銀行 製作

누에 廣食性系統 J111의 DNA를 *Pst* I과 *EcoR* I 制限酵素로 절단하여 pUC 18 plasmid vector에 cloning 하였다. cloning 된 plasmid를 DH5α *E. coli*에 形質轉換하여 Ampicillin이 添加된 LBA 選擇培地에 接種한 후 37°C에서 14-15시간 培養하였다. 처리된 制限酵素別 plate에 나타난 colony 수는 *EcoR* I이 많았으며 *Pst* I은 총 colony의 수도 적었으며 ligation이 안된 청색 colony의 수도 많아 形質轉換율이 낮은 것으로 판단되었다. plate에 나타난 colony를 制限酵素別로 각각 500여개씩 임의 選擇하여 삽입된 DNA크기를 조사하고자 boiling법과 alkali 법으로 plasmid를 分離하였다. 分離된 plasmid는 插入된 DNA 切片만을 分離하기 위하여 cloning에 사용하였던 制限酵素로 다시 절단하여 plasmid와 插入 DNA의 크기를 電氣泳動으로 展開하였다(Fig. 1).

制限酵素別 각 plasmid내 삽입 DNA크기는 Table 1에서 보는 바와 같이, 누에의 genomic DNA는 다양한 크기로 插入되어 있었다. 銀行製作을 위하여 genomic DNA를 切斷한 制限酵素 종류별로도 다소 차이가 있어 *Pst* I의 경우 DNA절편의 크기가 3.1 kb이상에서 많았고 *EcoR* I의 경우는 2.0 kb미만에서 많았다. RFLP마커로 使用하기에 편리한 0.5-1.9kb만을 比較하였을 때 *Pst* I의 55개 colony 보다 *EcoR* I의 79개가 많

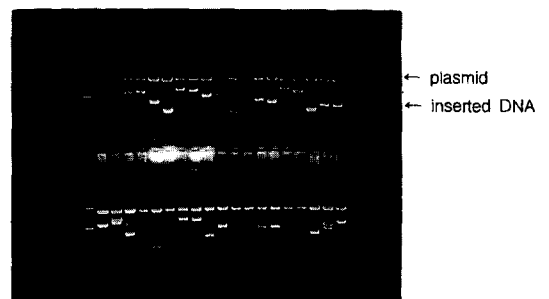


Fig. 1. Separation of insert DNA from plasmid gene library of *B. mori* J111 after digtotion with restriction enzyme *EcoR* I

Table 1. The number of clones with categorized insert size in silkworm genomic DNA library from J 111 strain digested with restriction enzyme, *Pst* I and *EcoR* I.

Insert Size(kb)	Number of clones	
	<i>Pst</i> I	<i>EcoRI</i>
4.4-8	81	22
3.1-4.3	63	53
2.0-3.0	35	74
0.5-1.9	55	79
others	266	272
Total	500	500

았다.

Boucher 등(1986)은 植物 病原菌의 일종인 *Pseudomonas solanacearum*의 경우 插入 DNA의 크기가 다양하였지만 적은 크기의 colony가 많았다고 한 바 있다. Hartung 등(1987)도 *Xanthomonas campestris*의 전체 DNA를 *EcoRI*으로 切斷하여 그중 크기가 1-2kb의 DNA 切片만을 선발하여 遺傳子 銀行을 제작하였다. 한편 植物의 경우는 MacCouch(1990)가 벼의 DNA를 *PstI*으로 切斷하여 설탕 구배 농도에 따라 1-2kb 크기만을 分離하여 遺傳子 銀行을 製作한 바 있어 植物이나 微生物 및 昆蟲에 따라 遺傳子 銀行 製作시 使用하는 制限酵素에 서로 差異가 있음을 보여 주었다.

RFLP probe에 適合한 0.5-2.0kb의 insert DNA를 가진 colony는 19%내외로 比較的 많았으며 vector 보다 큰 insert를 가진 colony도 16% 이상 있었다.

누에 genomic DNA은행의 염기서열 반복성

백옥잠 등 15개 누에 品種의 DNA를 *PstI*으로 切斷하여 membrane에 轉移시킨 후 廣食性 누에 J111 genomic 銀行으로부터 임의 選拔된 clone들을 probe로 하여 Southern hybridization을 하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 SW 195 clone는 누에 品種에 관계 없이 모두 highly repetitive band(A)를 形成하였으며 SW 40 clone는 moderately repetitive band(B)를, SW 29는 low copy number band(C)를 각각 形成하였다.

Primose(1995)는 生物體는 種類에 따라 공통적으로 DNA의 대부분이 반복되어 있다. highly repeated 鹽基는 染色體 주위나 telomeres에 tandem repeat 상태로 있으며 moderately repetitive DNA는 染色體 全體에 分布되어 있다고 하였고 또한 Zraket(1990)등도 꿀벌의 genomic DNA를 *BamHI*으로 切斷하여 製作한 DNA



Fig. 2. Southernblots analysis of DNAs from 15 silkworm lines. They were digested with *PstI* and hybridized to probes of SW195(A), SW 40(B), and SW 29(C), respectively. Silkworm lines are Od YuJam(1), R-Yellow(2), Zebra(3), Galwon(4), BibackJam(5), PndPS(6), S8Re(7), Jam123(8), Jam124(9), Jam125(10), Jam126(11), C₃(12), J111(13), C₃×J111(14), and Baekok Jam(15)

銀行의 clone을 選拔한 결과 highly repeated sequences, moderately repeated sequences 및 low copy-number sequences로 구분할 수 있었다고한 보고와 같이 누에의 경우도 이 세 범주로 구분이 가능하였다.

누에의 genomic clone이 highly repetitive band나 moderately repetitive band를 형성할 경우는 RFLP의 probe로 판독이 곤란한 경우가 많다. 따라서 probe로서 適合한 clone은 low-copy나 single band를 形成하는 clone들이다. 다량의 clone들 중에서 能率的으로 single 및 low-copy clone을 選拔하는 방법은 colony의 plasmid내에 插入되어 있는 insert DNA에 전체 DNA를 probe 로하여 hybridization을 하는 경우가 있다. 한 petri-dish에 100개의 colony를 이식하여 14시간 정도

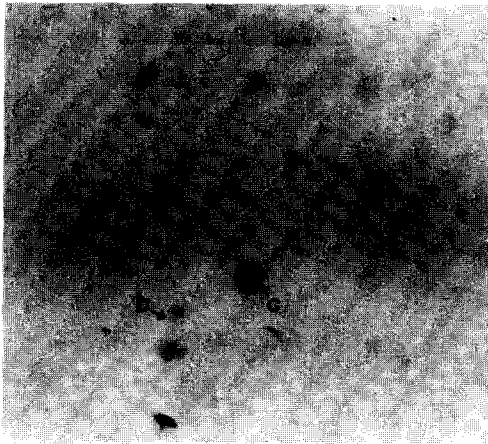


Fig. 3. Individual colony hybridized with *EcoRI* digested silkworm DNA showing single copy clone(a), moderately repetitive clone(b), and highly repetitive clone(c).

37°C에 培養하여 membrane에 轉移한 후 廣食性 누에 J111의 genomic DNA를 probe하여 檢定한 結果 X-ray film의 반응이 濃艶에 따라 多樣하게 구분되었다 (Fig. 3).

Fig. 3의 c와 같이 질게 hybridization 된 것은 copy의 수가 많은 것으로 보며 a는 single copy로 b는 중간 것으로 볼 수 있다. hybridization의 結果가 질게 나타난 것은 clone내 repetitive sequence에 基因하는 것으로 본다

Table 2에서 보는 바와 같이 SW29 clone등 low-copy number의 특성을 보인 19개의 clone을 *DraI*등 8종의 制限酵素로 切斷하여 製作된 廣食性 系統 J111의 genomic DNA membrane에 hybridization한 結果 highly repetitive copy clone은 없었으나 moderately repetitive copy는 다수있었다.

그러나 選拔된 clone의 50% 이상이 single 및 low-copy number를 보이므로써 이 과정없이 直接 多型性을 檢定한 예보다 신속하게 RFLP probe clone을 선발할 수 있었다.

선발된 clone의 RFLP 檢定

廣食性 누에 系統인 J111과 非廣食性 계통인 C₃ 및 이들의 F₁과 백옥잠의 DNA를 *EcoRI*등 8종의 制限酵素로 處理하여 製作된 membrane에 選拔된 probe들의 多型性(polymorphism)을 hybridization으로 檢定하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 SW195 probe clone은

Table 2. Characterization of silkworm DNA clones according to their copy number

Clone	Restriction enzyme*	Insert size(kb)	Copy number
SW29	<i>DraI</i>	2.1	S
SW37	<i>EcoRI, ScaI, PstI</i>	0.8	M
SW40	<i>PstI</i>	0.7	M
SW46	<i>PstI</i>	0.5	M
SW64	<i>PstI</i>	1.7	M
SW195	<i>PstI</i>	1.5	S
SWR1-1	<i>HindIII</i>	1.4	S
SWR1-6	<i>PstI</i>	0.6	S
SWR1-12	<i>XbaI</i>	1.3	M
SWR1-17	<i>EcoRI</i>	0.4	S
SWR1-38	<i>XbaI</i>	0.5	M
SWR1-54	<i>XbaI</i>	1.3	S
SWR1-61	<i>HindIII, PstI</i>	1.5	S
SWR1-64	<i>HindIII, EcoRI, PstI, DraI</i>	0.5	S
SWR2-66	<i>EcoRI</i>	1.0	S
SWR2-38	<i>DraI, EcoRI</i>	0.7	S
SWR2-40	<i>DraI</i>	1.3	S
SWR2-24	<i>EcoRV</i>	2.0	M
SWR2-25	<i>EcoRV, HindIII</i>	1.5	M

1) S:single or low copy number

M:moderately repetitive

*These enzymes were used to digest silkworm DNA, hybridized to selected clone probes.

EcoRI 등 7종의 制限酵素로 處理된 genomic DNA에서 polymorphism을 보이지 않은 반면 *PstI*으로 處理한 것에서는 廣食性(2)과 非廣食性(3) 간에 뚜렷한 polymorphism이 보였으며 F₁은 兩親의 band를 모두 所有하고 있었다. 이와 같이 制限酵素別로 處理하였을 때 polymorphism이 보이는 것은 染色體내 鹽基序列이 서로 다르거나 염색체가 插入, 結實, 逆位 등에 의하여 再配列 된 것을 특정 부위를 인지하여 切斷하는 制限酵素로 處理하였을 때 특정 부위의 위치에 차이가 있으므로 발생하게 된다. 이러한 DNA 단편을 RFLP라고 하며 Botstein(1980)등에 의하여 遺傳的 標識因子로 사용될 수 있다고 제창되었다. RFLP는 遺傳子 地圖作成, 遺傳子 分離, map based cloning 및 遺傳的 차이를 평가하는 수단으로 사용될 수 있다.(Prince *et al.*, 1992)

총 2,153개의 colony를 培養하여 colony 및 插入 DNA hybridization을 實施하여 single 및 low-copy number로 판단되는 219개 균주의 polymorphism을 확인한 結果는 Table 3에 요약하였다.



Fig. 4. Restriction fragment polymorphisms of 4 silkworm lines. DNA was digested with restriction enzymes *EcoRI*, *EcoRV*, *Hind III*, *ScaI*, *DraI*, *BamHI*, *XbaI* or *PstI*, respectively, probed with the clone SW195. Silkworm lines are: *C*₃ (1), J111(2), *C*₃ × J111(3) and Bae-kok-Jam(4).

Table 3에서 보는 바와 같이 廣食性 계통과 非廣食性 계통 사이에 polymorphism을 보이는 46개의 probe clone을 選拔하였다. Clone의 挿入 DNA크기는 대체로 2.0 kb미만으로 작았으며 다양한 制限酵素에서 polymorphism을 보였다. SWR 10-51 clone과 같이 단일 종의 제한 효소에서만 polymorphism을 보인 경우도 있으나 대부분은 2개 이상의 효소에서 polymorphism을 보였다.

누에 F₂ RFLP genotype 檢定

이들 F₂의 genomic DNA는 phenol/chloroform으로 1차 더 처리하여 精製한 후 probe clone별로 알맞은 制限酵素로 처리하여 membrane blot을 製造하였다. SWR1-61 등을 비롯하여 지금까지 選拔된 clone 중 우선 10개의 clone을 hybridization에 probe로 使用하였다. Fig. 5에서 보는바와 같이 hybridization 結果는 F₂ 個體별로 廣食性 계통 J111 系統(P)과 同一한 밴드 형태를 보이는 것과 非廣食性 *C*₃ 系統(U)과 同一한 밴드 형태로 보이는 것외에 兩親 모두 包含한 2개 밴드를 가진 hybrid형으로 區分되었다. SWR1-61 probe clone

Table 3. The list of clones showing polymorphism between J111 and *C*₃ strain DNA digested with 8 restriction enzymes.

Clone No.	Insert size(kb)	Polymorphic restriction enzym
SWR 10-9	0.9	BamHI, PstI
SWR 10-51	1.6	ScaI,
SWR 10-55	1.7	EcoRI, HindIII, Pst I, ScaI
SWR 10-77	1.6	EcoRI
SWR 11-1	1.1	EcoRV
SWR 11-7	0.9	BamHi, EcoRI, EcoRV, HindIII, XbaI
SWR 11-19	1.7	DraI
SWR 11-31	1.8	HindIII, EcoRI, EcoRV
SWR 11-66	0.9	EcoRI
SWR 11-75	1.0	HindIII, XbaI
SWR 11-90	1.3	BamHI
SWR 12-4	1.2	EcoRI
SWR 12-28	1.0	BamHIM EcoRI, HindIII
SWR 12-30	1.2	PstI, ScaI, XbaI
SWR 13-19	1.6	Pt I
SWR 13-41	1.3	EcoRI, EcoRV, PstI, ScaI, XbaI
SWR 13-91	0.7	EcoRI, PtI
SWR 14-5	1.9	EcoRI
SWR 14-7	1.9	HindIII
SWR 14-8	1.0	EcoRI, EcoRV, HindIII, ScaI, XbaI
SWR 14-26	1.3	EcoRI, EcoRV, HindIII, PstI
SWR 14-30	0.8	EcoRV, XbaI
SWR 14-44	0.5	EcoRV, HindIII
SWR 16-26	1.2	PstI, ScaI
SWR 17-9	0.3	HindIII, ScaI
SWR 17-20	1.1	EcoRI, EcoRV, HindIII, ScaI
SWR 17-52	1.0	EcoRI, ScaI
SWR 17-82	1.1	EcoRI, HindIII, ScaI
SWR 19-1	0.7	BamHI, XbaI
SWR 19-4	1.4	EcoRI, HindIII, PstI, ScaI, XbaI
SWR 19-19	0.8	EcoRI, ScaI, VabI
SWR 19-25	1.4	EcoRI
SWR 19-27	1.6	EcoRI, EcoRV, HindIII, PstI, ScaI, XbaI
SWR 19-60	0.6	BamHI, HindIII
SWR 19-73	2.0	XbaI
SWR 20-9	2.0	BamHI
SWR 20-15	0.6	EcoRI
SWR 20-24	1.8	EcoRV
SWR 20-61	0.8	EcoRV, HindIII
SWR 21-24	2.0	PstI, XbaI
SWR 23-64	1.3	BamHI, EcoRI, EcoRV, PstI, ScaI, XbaI
SWR 25-14	0.7	BamHI, EcoRI, EcoRV, ScaI, XbaI
SWR 25-82	2.0	BamHI, EcoRI
SWR 1-6	0-6	XbaI
SWR 1-61	1.5	HindIII
SWR 1-64	0.5	EcoRI

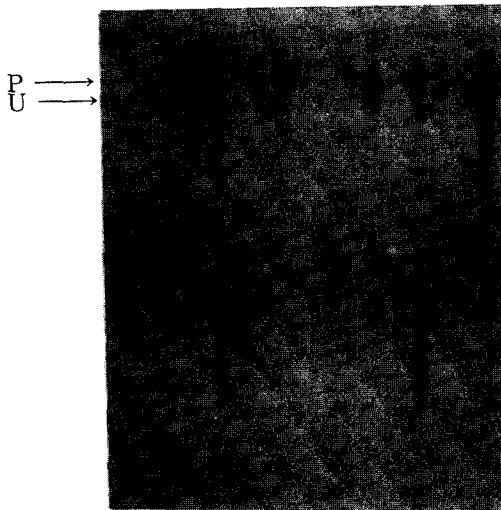


Fig. 5. RFLP autoradiographs F₂ individuals derived from crossing between J111 and C₃ probed with SWR1-61 clone. P:polyphagous line J111, U:unipolyphagous line C₃

의 경우 얻을 수 있는 band 패턴을 調査한 結果 廣食性(P)이 9個體, 非廣食性(U)이 8個體, 兩親의 hybrid가 14個體로 RFLP genotype가 1:2:1의 比率로 分離되었다. 이상의 結果로 보아 SWR1-61 probe은 누에의 廣食性 特性과는 聯關이 없이 獨立 遺傳하는 clone인 것으로 推測되며 Mendel의 유전법칙을 따르고 있었다.

Table 4에서 보는 바와 같이 F₂분석의 結果는 양호하지 않았다. 실제로 F₂분석에는 누에전체 genome을 10-20 CM단위로 고르게 카바할 수 있는 polymorphic probe의 확보가 우선되어야 하고 F₂누에 개체로부터 RFLP 분석에 필요한 충분한 DNA가 확보되어야 함은 물론 각 개체마다 뚜렷이 표현될 수 있는 표현형질을 가져야 하는데 특히 F₂의 1번부터 10번 個體까지는 白色血을 가진 누에로서 黃色血누에보다 크기도 작았으며 分離된 DNA량도 小量이어서 membrane을 製作하기에 충분하지 못하였다. 여기에서 실제로 F₂ 個體의 경우 1번 個體로부터 40번 個體가 각 probe clone마다 同一한 것이 아니어서 linkage 分析을 시도하지 않았

Table 4. RFLP Scoring of parent types on F₂ population derived J111 and C₃ crossing

Probe F ₂	SWR 10	SWR 11-7	SWR 12-4	SWR 13-41	SWR 13-91	SWR 14-8(E)	SWR 14-8(α)	SWR 14-26	SWR 19-1	SWR 1-61
1	A	-	H	B	A	B	A	-	H	B
2	H	-	B	A	H	-	-	-	A	H
3	-	-	H	H	H	-	-	-	H	H
4	H	-	A	B	A	-	-	-	-	-
5	H	-	A	A	A	-	-	-	-	B
6	-	-	B	H	B	-	-	-	-	H
7	-	-	B	H	B	-	-	-	-	H
8	-	-	B	B	A	-	-	-	B	-
9	-	-	B	B	A	-	-	-	H	A
10	-	-	A	H	B	-	B	-	A	H
11	A	A	-	H	A	H	A	-	B	-
12	B	B	H	H	A	H	H	A	H	A
13	A	-	H	B	A	-	B	-	A	B
14	A	-	B	B	H	B	B	H	A	H
15	-	-	A	B	B	A	A	-	B	B
16	H	H	A	B	H	A	H	H	H	H
17	B	A	A	-	A	H	B	B	-	-
18	B	B	B	-	-	H	H	A	B	-
19	B	-	B	H	A	A	B	H	H	B
20	H	A	H	H	H	H	H	A	A	-
21	A	H	A	H	H	A	B	A	A	A
22	H	B	B	H	H	H	H	A	B	A
23	-	-	-	B	H	-	B	B	H	H
24	-	-	H	A	A	-	H	A	H	H
25	B	H	B	-	A	H	H	B	H	H
26	A	A	A	H	H	A	H	A	H	-

Table 4. Continued.

Probe F ₂	SWR 10	SWR 11 - 7	SWR 12 - 4	SWR 13 - 41	SWR 13 - 91	SWR 14 - 8(E)	SWR 14 - 8(α)	SWR 14 - 26	SWR 19 - 1	SWR 1 - 61
27	A	H	H	A	H	A	B	H	A	-
28	A	-	H	B	H	A	B	H	H	A
29	A	H	B	H	B	A	B	B	H	H
30	H	B	B	H	B	B	H	H	B	H
31	H	A	-	H	A	B	B	-	B	A
32	A	H	H	A	A	H	B	B	H	B
33	H	B	H	H	H	H	B	A	A	H
34	H	A	H	-	B	H	H	B	H	-
35	H	A	H	A	H	B	B	H	H	B
36	B	B	H	A	A	A	A	A	B	B
37	H	B	H	A	B	H	-	B	H	A
38	-	B	-	A	A	B	-	-	-	A
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H

A:J111 type band, B:C₃ type band, H:hybrid type band

다. 누에의 F₂ 분석에 의한 linkage map을作成하고자 할 경우 1個體로부터 다량의 DNA를 分離할 수 있는 技術의 開發이 先決되어져야 萬만히 分析할 수 있을 것으로 본다. 分離기술의 開發에 문제가 있을 경우 probe clone을 일차로 micro in situ hybridization 方法에 의한 染色體 별로 區分한 후 區分이 完了된 소수의 probe clone만을 利用하여 1-2매의 blot으로 hybridization하여 linkage 값을 구하는 方法으로 RFLP의 map을 作成할 수 있을 것으로 본다. RFLP probe의 수도 누에의 染色體 n=28에 適合한 것이 150개체 이상은 되어야 할 것으로 보아 이러한 점이 계속 追究될 경우 누에의 genetic map이 作成될 것으로 본다.

이상과 같이 본 研究에서는 누에의 遺傳子 銀行을 작성하였으며 clone들의 特性을 調査하고 廣食性 누에 J111과 非廣食性 누에 C₃간 多型性を 보인 46개의 clone을 選拔하였다. clone중 일부는 F₂를 分析하므로 누에 遺傳子 地圖 作成을 위한 土臺를 마련하였다고 하겠다.

인용문헌

Ahn, S. N., C.N., Bollich and S.D, Tanksly. 1992. RFLP tagging of a gene for aroma in rice. Theor. Appl. Genet. 84: 825-828
 Blanchetot, A. 1991. Genetic relatedness in honey bees as established by DNA fingerprinting. J. of Heredity. 82: 391-396
 Botstein, D., R.L., White, M., Skonick and R.W,

Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Ann. J. Human Genet. 32: 314-331
 Boucher, C.A., A., Martinel, P., Barberis, G., Allgoing and C, Ziscket. 1986. Virulence genes are carried by a megaplasmid of the plant pathogen *Pseudomonas salanacearum*. Molecular and General Genetics. 205: 270-275
 Doira. H. 1992. Genetic stocks of the silkworm. In the Silkworm. 53-81 ed. Tazima., T.
 Fujiwara, H. and H, Maekawa.. 1994. RFLP analysis of chromosomal fragment in genetic strains of *Bombyx mori*, Chromosoma 103: 468-474
 Hartung. J.S. and E.L, Civerolo. 1987. Genomic fingerprints of *Xanthomonas campestris* pv. *citrus* strains from Asia, South America and Florida.. Phytopathology. 77: 282-285
 Maniatis, T., E.F., Fritsch and J, Sambbook. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual pp 174-184. Cold Spring Harbor Laboratory Press. N.Y.
 McCouch, S.R. 1990. Construction and applications of a molecular linkage map of rice based on restriction fragment length polymorphism(RFLP). Ph.D. Dissertation of Cornell University.
 Primrose S.B. 1995. Principles of Genome Analysis. 14-75 Balck Well Science.
 Prince, J.P. and S.D, Tanksley. 1992. Restriction fragment length polymorphism in plant breeding and genetics. Proc. R. Soc. Edinb. 99B: 23-29
 Tamara, T., T., Kanda, K., Yukahiro, Y., Yasukuchi,

- N., Shimizu, K., Hinomoto, K., Shimizu, E., Kosegawa and T., Okajima. 1993.** RFLP patterns detected by the transposons, MAG and K1,4 in silkworm races. Gamms Field Symposia, No. 32: 47-62
- Zraket, C.A., 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*. In Molecular Insect Science(ed. H.H. Hagedorn), 13-20 Plenum. Press, New York.

(1996년 11월 25일 접수)