누에 견사선에서 분리한 RNA binding protein-1 유전자 프로모터 분석

최광호^{1*} · 김성렬¹ · 김성완¹ · 구태원¹ · 강석우¹ · 박승원²

¹농촌진흥청 국립농업과학원 잠사양봉소재과, ²대구가톨릭대학교 의료생명산업대학 생명공학과

Characterization of the RNA binding protein-1 gene promoter of the silkworm silk glands

Kwang-Ho Choi^{1*}, Seong-Ryul Kim¹, Sung-Wan Kim¹, Tae-Won Goo¹, Seok-Woo Kang¹ and Seoung-Won Park²

¹Sericultural & Apicultural Materials Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-853, Korea

²Dep. of Biotechnology, Catholic Univ. of DAEGU, Gyeongsan-si 712-702, Korea

(Received April 06, 2014, Accepted May 22, 2014)

ABSTRACT

We isolated highly-expressed genes in the posterior silk glands of silkworm on a previously study, which one of these was identified as RNA binding protein-1 homologue (RBP-1) gene. In this study, we investigated gene expressional characteristics of the RBP-1 depending on silkworm development stages and several tissues of the larvae, respectively. Northern blot hybridization analysis showed that the RBP-1 gene was expressed high in larval and pupal periods, and highly expressed than endogenous internal control gene (BmA3) on all tested larval tissues. In addition, we isolated and analyzed a phage DNA having 1,660 bp-long promoter region of the RBP-1 gene from a genomic DNA library. To study the RBP-1 gene promoter activity, RBP-1 (-740/+ 30) was amplified by PCR and subcloned into a pGL3 basic vector to generate pGL-RBP1. A luciferase report vector carrying RBP-1 gene promoter (770 bp) was tested by luciferase assay in Sf9 cells. In the result, the RBP-1 gene promoter was more efficient than constitutive promoter (BmA3) by approximately ten percent.

Key words : Silkworm, RNA-binding Protein, Promoter

서 론

누에(*Bombyx mori*)는 산업곤충으로써 오랜 기간 동안 생리·생태적 기초연구 뿐 아니라 실크단백질을 활용한 신소재 개발 등 다양한 연구가 진행되어 왔으며, 최근에는 형질전환누에 개발을 통한 기능성 융합단백질 생산을 위한 연구가 활발하다. 최초의 형질전환 누에 개발 시도는 *Trichopusia ni*에서 개발된 전이인자(piggyBac)로 제작된 전이백터를 누에알에 주입하여 하이브리드 실크를 생산하는 형질전환 누에로 시작되어, 최근에는 collagen과 같은 재조합 단백질을 생산하는 기술에까지 이르게 되었다(Imamura et al. 2003, Rika et al. 2006, Satoshi et al. 2007, Tamura et al. 2000). 형질전환 누에 제작을 위해서는 전이인자를 근간으로 한 목적유전자 운반체의 역할이

중요한데, 높은 수준의 형질전환율과 형질전환체 선발의 효율성이 여기에 기인한다. 또한 최근에는 형질전환 누에의 다음 세대에서 도입된 유전자가 탈락하는 유전형질의 영속성에 관한 문제점도 발생하고 있다(Handler 2001, Satoshi et al. 2007). 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 다양한 전이인자의 개발, 선발용 마커 유전자 및 transposase 발현을 효율적으로 조절할 수 있는 프로모터의 개발이 필수적이다(Choi et al. 2012, Park et al. 2011).

이와 관련한 일련의 연구에서, 누에 후부싯샘으로부터 새로운 고발현 유전자를 선발하고 그 유전자의 프로모터를 개발하기 위한 연구가 진행된 바 있다. 이 선행연구를 통하여 누에 후부싯샘에서 발현하는 발현유전자는행을 제작, dot blot hybridization 선별법으로 실크합성과 관련이 있을 것으로 추정되는 몇 종의 고발현 유전자가 선발되

*Corresponding author. E-mail: ckh@korea.kr

었다(Choi et al. 2007). 본 연구에서는 선행연구를 통해 선발된 누에 후부실샘 고발현 유전자인 RNA binding protein-1 homologue(RBP-1)의 누에 생체 내 발현특성을 조사하였다. 또한 유용 프로모터 개발을 통한 누에 형질 전환 고효율 시스템 구축을 위해 게놈 유전자은행으로부터 RBP-1 유전자의 프로모터 영역을 분리한 후 luciferase 활성분석을 실시하였다. 본 연구를 통해 개발된 RBP-1 유전자 프로모터는 형질전환 누에 시스템 개선에 도입하여 형질전환 누에를 통하여 발현하고자 하는 목적 단백질의 생산 효율성 증대에 기여할 것으로 사료된다.

재료 및 방법

1. 공시 재료

국립농업과학원 잠사양봉소재과에서 사육된 누에 잠 124(*Bombyx mori*)를 공시재료로 사용하였다. RNA binding protein-1 homologue(RBP-1) 유전자의 발현 특성분석을 위하여 3령 누에부터 번데기까지의 발육 시기별 시료와 5령 유충의 두부, 표피, 지방체, 중장 및 실샘을 차가운 PBS(0.1 M phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.0) 용액에서 각각 채취한 후 소형 homogenizer로 마쇄하여 total RNA 추출 때까지 -80°C 에 동결 보관하였다.

2. Total RNA 추출

Total RNA는 조직별로 채취된 시료로부터 TRIZOL Reagent(MRC, Cincinnati, OH)를 사용하여 분리하였다. 마쇄된 시료 100 mg에 1 μL TRIZOL Reagent를 첨가하고 여기에 200 μL 의 chloroform을 더하여 교반한 후 원심분리(15,000 rpm, 20 min)하여 상층액을 새 튜브에 옮겨준 다음 500 μL 의 isopropanol을 첨가하여 교반한 후 다시 원심분리(15,000 rpm, 20 min)하여 RNA pellet만을 수집하였다. 수집된 RNA pellet은 70% 에탄올에 세척한 후 0.2% DEPC가 첨가된 증류수에 녹여 실험 때 까지 -80°C 에 동결 보관하였다.

3. Northern blot hybridization

RBP-1 유전자의 누에 발육시기 및 유충 조직별 발현양상 분석을 위해 Northern blot hybridization 분석을 수행하였다. 준비된 발육시기별 및 조직별 total RNA는 분광광도계로 정량한 후 2 μg 씩 1% formamide agarose gel에 전기영동한 후 $10 \times \text{SSC}$ buffer에서 6시간 동안 나일론 막에 부착시켰다. 탐침제작은 선행연구에서 선발된 RBP-1 cDNA 클론(100 ng)을 100°C , 5분간 변성시킨 후 Primer-It II Random Primer labelling Kit(Stratagene, Valencia, CA)을 사용하여 [α - ^{32}P] dATP로 표지한 후 혼성화용액

($20 \times \text{SSC}$, 10% SDS, $100 \times \text{Denhardt's solution}$)에서 65°C , 16시간 혼성화하였다. 반응된 나일론 막은 $2 \times \text{SSC}$ 와 0.1% SDS 세척액으로 상온에서 15분간, $0.1 \times \text{SSC}$ 와 0.1% SDS 세척액으로 65°C 에서 10분간 세척한 후 X-ray 필름에 감광하였다. 발현양상 비교를 위해 누에 fibroin light chain(fib-L chain) 유전자의 cDNA 단편을 사용하여 동일한 방법으로 탐침을 제작하였다.

4. 게놈 유전자은행 제작

RBP-1 유전자의 5'-UTR(5'-untranslated region) 영역을 클로닝하기 위해 누에 게놈 유전자은행을 제작하였다. 5령 누에 마쇄 시료 5 g을 사용하여 순수 분리한 게놈 DNA에 제한효소 *Sau3A*I으로 부분 절단한 게놈 DNA(300 μg)를 Beckman SW41 rota를 이용하여 5~20% 설탕농도구배 원심분리(35,000 rpm)하여 500 μL 씩 분획하였다. 각각의 분획구는 0.7% agarose 겔에 전기영동하고 단편크기가 15~25 kb 크기의 분획만을 선발하여 2배량의 100% 에탄올로 침전한 다음 침전물과 Lambda DASH II vector(Stratagene, Valencia, CA)를 이용하여 누에 게놈 유전자은행을 작성하였다.

5. 파아지 클론 선발

Lambda DASH II vector에 작성된 누에 게놈 유전자은행의 파아지를 숙주세포(XL-1 Blue MRA P2)에 10^5 pfu 농도로 감염시켜 NZY 고형배지 (NaCl 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g, Yeast extract 5 g, NZ amine 10 g, Bacto agar 15 g/L; pH 7.5)에서 37°C , 10시간 배양한 후 4°C 에 보관하였다. 파아지 플라크를 나일론 막에 전이시킨 후 변성용액(0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl)에서 2분간, 중화용액(1 M Tris-Cl, 1.5 M NaCl; pH 7.5)에서 5분간 차례로 반응시켰다. 반응한 나일론 막은 UV crosslinker(120,000 uJ)에서 30초간 조사하여 DNA를 고정한 다음 혼성화용액($20 \times \text{SSC}$, 10% SDS, $100 \times \text{Denhardt's solution}$)에서 65°C , 16시간 혼성화하였다. 탐침제작은 상기 Northern blot hybridization 탐침 제조와 동일한 방법으로 수행하였다.

파아지 DNA 분리는 Chisholm(1989) 방법에 준하여 수행하였다. 숙주세포(XL-1 Blue MRF')를 NZCYM 액상배지(NZ amine 10 g, NaCl 5 g, Yeast extract 5 g, Casamino acids 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g/L)에 30°C , 16시간 배양한 후 숙주세포의 농도를 10 mM MgSO_4 용액에서 흡광도 $\text{OD}_{600} = 1.0$ 이 되도록 희석하였다. 여기에 양성반응을 보이는 파아지가 들어있는 SM 혼합액을 XL-1 Blue MRF'에 첨가하여 37°C , 30분간 정치한 후 37 mL NZCYM 액상배지에 접종하여 37°C , 12시간 진탕배양 하였다. 배양 후 50 mL을 conical 튜브에 옮겨 100 μL chloroform과 370 μL

nuclease solution(DNase I 50 mg, RNase 50 mg, 30 mM NaOAc, 10 mL, 50% Glycerol)을 첨가하여 37°C, 30분간 반응시켰다. 여기에 NaCl 2.1 g을 가하여 녹이고 4°C에서 10분간 원심분리(9,600 rpm) 한 후 상층액을 제거하였다. 남은 침전물에 500 µL 0.5 M EDTA와 10 µL 10% SDS, 10 µL proteinase K(2.5 mg/mL)를 가하여 65°C, 30분간 처리한 후 phenol/chloroform(24 : 1) 추출법으로 DNA를 추출하고 NaOAc를 최종 농도 0.3 M이 되도록 첨가한 후 2 배량의 100% 에탄올을 가하고 원심분리(15,000 rpm, 5 min) 하여 DNA를 침전시켰다. 이후 70% 에탄올로 세척한 후 100 µL TE 용액에 녹여 사용하였다.

6. 곤충세포 배양 및 프로모터 활성검정

Spodoptera frugiperda 번데기 난소에서 유래한 Sf9 세포주를 10% FBS (Fetal Bovine Serum)를 첨가한 TC-100 배지(SIGMA)를 사용하여 계대배양 하였다. RBP-1 유전자 프로모터 활성 검정을 위해, 게놈 유전자의 -721 ~ +20(740 bp)영역을 PCR하여 클로닝 한 후, pGL-3 Basic vector(Promega, Madison, WI)에 도입하여 pGL-RBP1을 제작하였다. 제작된 pGL-RBP1(0.5 µg)은 배양 세포주(Sf9)가 80% 정도 자란 24 well plate에 2.0 µg(1 : 4, w/w)의 Fugene transfection reagent(Roche, Mannheim, Germany)와 혼합하여 4시간 동안 실온에서 transfection 한 후 신선한 배지를 첨가해 주었다. 72시간 경과 후 phosphate-buffered saline으로 세척한 Sf9 세포주에 110 µL Glo lysis buffer(Promega, Madison, WI)로 용균한 후 luciferase 활성 측정을 위해 동량의 Bright Dlo Substrate(Promega, Madison, WI)와 혼합하여 Luciferase Assay System(Promega, Madison, WI)의 메뉴얼에 준하여 Victor II luminometer microplate reader에서 luciferase 활성을 측정하였다(Niu et al. 2003). 비교 실험으로서 *Bombyx mori* Actin-3(BmA3) 유전자의 프로모터가 도입된 pGL-BmA3를 동일한 방법으로 transfection 한 후 luciferase 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. RBP-1 유전자의 발현특성 분석

RBP-1 유전자의 누에 발육시기별 및 유충 조직별 발현양상을 분석하기 위해 Northern blot hybridization 분석을 수행하였다. RBP-1 유전자의 발현양상 분석을 위한 비교 유전자로서 BmA3 유전자를 사용하였다. 누에 발육시기별 Northern blot hybridization 분석 결과, RBP-1 유전자는 누에 유충기로부터 번데기까지의 시기에 상관없이 대체로 비슷한 발현 패턴을 나타내었으며, 비교구로 사용한 fib-L chain 유전자 보다는 발현량이 다소 적었고 BmA3 유전자와는 대체로 유사한 수준의 발현량이 관찰되었다(그림 1).

RBP-1 유전자의 5령 누에 조직별 발현양상 분석 결과, RBP-1 유전자가 후부실샘으로부터 선발된 고발현 유전자임에도 불구하고, 실샘 뿐 아니라 두부, 표피, 중장 및 지방체에서도 모두 발현하는 것이 확인되었고 조직별 발현 양상도 대체로 비슷한 것을 확인할 수 있었다(그림 2).

Fig. 1. Northern hybridization analysis of the RNA binding protein-1 homologue (RBP-1) gene according to silkworm development stages. Each lane loaded equal amounts of total RNA (2 µg/lane), and hybridized with 100 ng of labeled DNA, respectively. Lane 1, 3rd instar; lane 2, 4th instar; lane 3, 1day of 5th instar; lane 4, 3days of 5th instar; lane 5, 5days of 5th instar; lane 6, 7days of 5th instar; lane 7, pre-pupa; lane 8, 4days after pupated; lane 9, 8days after pupated pupa.

Fig. 2. Northern hybridization analysis of RNA binding protein-1 homologue (RBP-1) gene on various organs of silkworm. Each lane loaded equal amounts of total RNA (2 µg/lane), and hybridized with 100 ng of labeled DNA, respectively. H, head; E, epidermis; M, mid-gut; F, fat body; P, posterior silk gland.

Fig. 3. Construction of restriction enzyme map of the phage DNA including a RNA-binding protein-1 homologue (RBP-1) gene. Phage clone was screened and purified and digested with *EcoRI* (E), *XbaI* (X), and *EcoRI/XbaI* (E/X), respectively. They were expanded and hybridized with radiolabeled RBP-1 cDNA (800 bp) as a probe (panel A). According to these data, restriction enzyme map of the genome clone was constructed including open reading frame and promoter region (panel B).

따라서 선행연구에서 누에 후부실샘 고발현 유전자로 선발된 RBP-1 유전자 프로모터는 곤충 배양 세포계 뿐 아니라 형질전환 누에 제작을 통한 이형단백질 대량생산 시스템에 유용할 것으로 사료된다.

2. RBP-1 유전자 프로모터 영역 구조 분석

RBP-1 유전자의 프로모터를 포함하는 5'-UTR 영역을 클로닝하기 위해 5령 누에로부터 게놈 유전자는행을 제작한 후 800 bp 크기의 RBP-1 cDNA를 탐침으로 제작하여 RBP-1 유전자를 포함하고 있는 파이지 클론을 순수 분리 하였다. 분리된 파이지 클론은 제한효소 *EcoRI*과 *XbaI*, 그리고 *EcoRI* + *XbaI* 조합의 제한효소를 사용한 패턴 분석을 통하여 약 18.7 kb 크기의 제한효소지도도를 작성할 수 있었다(그림 3). 제한효소지도도 작성 후 프로모터 영역 분석을 위해 ORF 영역을 포함하는 부분의 *EcoRI* 및 *XbaI* 제한효소가 처리된 게놈 유전자 단편을 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 RBP-1 유전자 ORF를 포함하여 약 1,660 bp 염기서열을 분석하였다(그림 4).

분석된 염기서열을 바탕으로 promoter prediction program (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)을 사용하여 RBP-1 유전자의 프로모터 영역에 대한 분석을 수행하였다. 분석 결과, RBP-1 유전자의 ORF 영역과 5'-UTR 영역을 포함하는 염기서열에서 전사개시점(ATG, 염기서열 + 31 번)과 인트론-엑손의 경계 부위(GT/AG)를 포함한 RBP-1 유전자 cDNA 클론 정보가 포함되어 있는 것이 확인되었다. 또한, 5'-UTR 영역 중 -554번째 염기서열 영역에서 TATA box 염기서열(5'-TATAAAT-3')이 확인되었고 TATA box로부터 -119번째 염기서열 영역에서 곤충 특유의 cap site 염기서열인 -ATCAT(G)-와 동일한 염기서열을 확인할 수 있었다(그림 4).

3. 프로모터 활성 분석

RBP-1 유전자 프로모터 영역 분석결과를 바탕으로 전사 개시점(ATG, + 31번) 이전부터 상류의 -740 bp 영역까

```

-721 ATGAGATATG ACCGCAAGAA GTTGGACAAA AGAAGAAGAA GAAGAAGACT ATTTCCGAA
-661 TTCGACGCC GTGGTTACGT TACGGGCTTT TTCACCATTT TGGGAAAAAT AATTGAACCT
-601 GTGGAATTGA GAATTAATTA GGGAAATTTG TTGAAATAAT TATTTTATTT ACAAAAATGT
-541 ATCTAATATT TAATATAAAA TGTGATTAAT GTGCTGTTTC AGTTATTTAT TGACCTCTTG
-481 TAAACATTTT GTTTTGACGA TATAGTAGAT TATACGATA GAAACAATTT TGATTCCTTT
-421 TTGAAAAATA TATCATTTTG GGGAAACAAT TTCACATAAA CCGGAAAACT GGAAGGAATA
-361 GACCTGGTAC CCTCACGGTG CCGGTATCCG AACTCCGAAC TATTTGGCCT AAAGGCTAG
-301 ATACCAGGCC ATAACTCCA CAAAAAATAA AAATATCTGA ACTATCCAAC GAGAACAGAG
-241 ATTGAAAACG CTAACCTCAC TAACCTGACC GTTACCGGTA GGGTACGCGT CTACCGCCA
-181 TTTTGTTTGA AAGAGTGATT TTAATAACGG AGGCAACTA ATGTAAATGG TTGTGATAAA
-121 AACGCATTAA AATATTAATT GACCATCCAA AAAGGTAATA GTCTCGCTGA ATAATATTAA
-61 TCTTTATTTA AATGTATTG TGCATGACAA GGAACAATA GTTACCGGCG TGTGTTTAT
1 ATTTAACAGC ATCGTCCACG ATGTACAGCT ATGTGACTG CAAGTTTAT GTTGGAGATT
61 TGGGGAATAA TGCTAGTAAA CCTGACCTTG AAGATGCTTT TCTATATTAT GTTCCACTGA
121 GGAATGTGTG GGTGCAAGA AATCCTCCAG GCTTCGATT TGTGATTC GAAGATCCAC
181 GGAATGCTGA AGACGAGTA AGTGTCTTCT TCAATTTAGT TAAATTTGCT ACTGAATTC
241 AGAAACATGC CATACGTATT TAAGATAGAA AAATTTGCTT AACCTTACAA GATGCCATAT
301 CGTAAACGCA CTGTTTTCGA TGTGATAGAA ACCTTAACCT TAAAGGTTT GACCTTTTAA
361 AAACATGAAA ATTCGATTCT TTGGATAAAC TGCATAACT TATGATTAC CACATTTATT
421 GAGTGTGTTG GGGTCCATC ACTGTCACTC CAGTTGTCCA CTAATGTCCA CTGCTAATT
481 TTAATTTGCT CGTACAATC GATAAATGA ATGTATAG GGCATCGCTG TACAATAGTG
521 GATTGAACTA GTTGTGTTTC AGTGCCTGCG GTACGCTTT CAGATTTTAG GTTCCAAATT
581 TCMAAATTC AGGTACGTGG TTGGATGGA CAGACGATT GCGTCTGAG AGCCCGTGTG
621 GAAATGCTTA ATGGGCGTCC GGTATTTGCG AGCCGCGTCC CACCCTCTCG TTCCGCTCTG
681 CCTCCTCGGC CGTATGATGA TCGTTGTATC GACTCGGCGC ACAGAGGACA CTACGCTCGT
721 GACTGTTCAC GTGCTCGGCG ACACAGGTAA AGCGTTAAAT TCGGTGTGAG GAACCTATT
781 ATTCATTGGC AATAAAATCT CGCTACTCTT CCACCTCTAA ACTCATTGGG AAAAAACAAA
821 ATATTCGAAT TTAGATCTCA TTCCATTGGT TTGATTTG TATACCAATG ATACTATGT
881 TATAGTTTAT CATTGGGTTG TGCGCCGAGA ACGAATCTGT CAGTGTCTGC ACTCTTATT

```

Fig. 4. The nucleotide sequence of partial genomic DNA including promoter region of the RNA-binding protein-1 homologue gene. underlined characters indicate the open reading frame sequence of RNA-binding protein-1 homologue gene. TATA box and cap site are indicated by boxes, respectively.

지 영역을 PCR 증폭 후 promoterless luciferase pGL-3 Basic vector에 도입함으로써 RBP-1 유전자 프로모터 활성검증을 위한 전이벡터인 pGL-RBP를 제작하였다. pGL-RBP는 Sf9 cell에 transfection한 후 3일 경과 후 세포를 수거하여 luminometer에서 luciferase activity를 측정하였다. 프로모터 활성 비교를 위해 Bm3 유전자 프로모터가 도입된 pGL-Bm3를 동일한 조건으로 처리하였으며, 각각의 실험은 3회 반복하여 luciferase 활성 평균값을 측정하였다. Luciferase 활성분석 결과, 대조구인 pGL-Bm3의 luciferase 활성 값(100%) 대비 pGL-RBP에서는 luciferase 활성 값이 110%로서 Bm3 유전자 프로모터 보다 10% 가량 높은 발현효율을 확인하였다(그림 5). Bm3 유전자는 누에의 세포 및 근육을 구성하는 필라멘트형 단백질의 주성분으로서 대부분의 진핵세포에서 확인할 수 있으며, 생체 발육단계에 관계없이 그 발현량이 높은 것으로 알려져 있다. 이러한 이유로 Bm3 유전자 프로모터는 곤

Fig. 5. Relative luciferase activity assay. The mean luciferase activity generated by RNA binding protein-1 promoter(RBP-1, 110%), *Bombyx mori* Actin3 gene promoter (BmA3, 100%), and promoterless pGL-basic vector (Basic vector), respectively. The promoter activities are expressed with that of BmA3 (taken as 100%), which has been normalized to an internal control. The bars represent means from three independent transfection experiments.

충의 세포 및 생체를 통해 이형단백질을 생산하기 위한 발현벡터에 활용될 뿐 만 아니라 형질전환체 제작을 위한 시스템에 널리 활용되고 있다(Imamura et al. 2003, John 2000).

이상의 결과로서, RBP-1 유전자는 누에의 몸전체에서 발현될 수 있으며, 유충으로부터 번데기까지의 조사된 발육시기에서 전체적으로 높은 수준의 발현효율을 보였으며, 기존에 널리 사용되고 있는 BmA3 유전자 프로모터에 비해 약 10% 높은 수준의 프로모터 활성을 갖고 있는 것으로 확인되었다. 따라서 RBP-1 유전자 프로모터는 곤충 세포주 및 형질전환 누에 제작용 시스템에 도입할 경우 목적하는 유용단백질의 생산 효율을 다소 높일 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

효율적인 형질전환 누에 시스템 구축을 위해서는 새로운 전이인자의 개발과 함께 선발을 위한 마커 유전자 및 transposase 발현을 효과적으로 조절할 수 있는 다양한 유전자 프로모터 개발이 필수적이다. 이와 관련하여 선행연구를 통해 누에 후부실샘으로부터 고발현하는 RNA binding protein-1 homologue(RBP-1) 유전자를 선발한 바 있다.

본 연구에서는 RBP-1 유전자의 누에 발육시기별 및 유충 조직별 발현양상을 Northern blot hybridization 방법으로 분석한 결과, RBP-1 유전자는 유충기로부터 번데기 후기까지의 전기간에 걸쳐 발현하였으며, 두부, 표피, 중장, 지방체 및 전사선 등 실험한 모든 유충 조직에서 고발현하는 것으로 관찰되었다. 또한, 누에 게놈 유전자은행을

제작한 후 RBP-1 cDNA 유전자를 탐침으로 5'-UTR 영역을 클로닝하고 luciferase assay 방법으로 RBP-1 유전자 프로모터의 활성을 분석하였다. 실험 결과, RBP-1 cDNA를 탐침으로 RBP-1 유전자 ORF와 5'-UTR이 포함된 약 1,660 bp 영역의 게놈 유전자를 클로닝하였다. RBP-1 유전자 프로모터 활성검정을 위해 전사 개시점(+30)으로부터 상류의 -740 bp 영역을 PCR로 분리한 후 pGL3 basic vector에 도입하여 luciferase 활성 측정을 위한 전이벡터, pGL-RBP1를 제작하였다. 제작된 pGL-RBP1는 곤충 세포주(Sf9)에 transfection 한 후 luciferase 발현량을 측정하고, 기존의 BmA3 유전자 프로모터 대비 10% 가량 높은 발현 효율을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(과제번호: PJ0090442014)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Chisholm D (1989) A convenient moderate-scale procedure for obtaining DNA from bacteriophage lambda. *Biotechniques* **7**, 21~23.
- Choi KH, Goo TW, Yun EY, Hwang JS, Kang SW (2007) Gene expression profile of the posterior silk glands of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Korean J Genetics* **29**(2), 193~201.
- Choi KH, Goo TW, Kim SR, Park SW, Kim SY, Kang SW (2012) A study on the development of an early embryonic gene of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Seri Entomol Sci* **50**(2), 122~125.
- Handler AM (2001) A current perspective on insect gene transformation. *Insect Biochem Mol Biol* **31**, 111~128.
- Imamura M, Nakai J, Inoue S, Guo XQ, Kanda T, Tamura T (2003) Target gene expression using the GAL4/UAS system in the silkworm *Bombyx mori*. *Genetics* **165**, 1329~1340.
- John T (2000) Transgenic methods for increasing *Drosophila* life span. *Mechanism of Aging and Development* **118**, 1~14.
- Niu LL, Kiley LM, Dasgupta R, Kohler P, Christensen BM (2003) Three regulatory regions of the *Aedes aegypti* glutamine synthetase gene differentially regulate expression: identification of a crucial regulator in the first exon. *Insect Mol Biol* **12**(6), 571~579.
- Park SW, Choi KH, Goo TW, Kim SR, Kang SW (2011) Characterization of the promoter controlling the stage-specific gene expression of *Bombyx mori*. *Journal of Life Science* **21**(10), 1466~1472.
- Rika H, Tomita M, Yoshizato K (2006) The generation of germline transgenic silkworms for the production of biologically active recombinant fusion proteins of fibroin and human basic fibroblast growth factor. *Biomaterials* **27**, 5715~5724.
- Satoshi Y, Zhu Z, Iaso K, Uchino K, Tamada Y, Tamura T,

- Asakura T (2007) Improving cell-adhesive properties of recombinant *Bombyx mori* silk by incorporation of collagen or fibronectin derived peptides produced by transgenic silkworms. *Biomacromolecules* **8**, 3487~3492.
- Tamura T, Thibert T, Royer C, Kanda T, Eappen A, Kamba M, Komoto N, Thomas JL, Mauchamp B, Chavancy G, Shirk P, Fraser M, Prudhomme JC, Couble P (2000) A *piggyBac* element-derived vector efficiently promotes germ-line transformation in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Nat Biotechnol* **18**, 81~84.