

2004년도 해양한국발전프로그램(KSGP) 연구개발사업

(기획과제 연구결과 보고서)

**Zebrafish를 이용한 수해양 LMO의 환경
위해성 저감을 위한 평가모델 실험어 개발**

연구 팀 장: 충남대학교 김 철 희 교수

공동 연구원: 제주대학교 이 제 희 교수

목 차

I. 서 론	1
II. 재 료 및 방 법	4
1. 재 료	4
1) 제브라피쉬 사육 및 발생 배 준비	4
2) 유전자 클로닝 시스템	5
3) zebrafish cDNA library 구축	5
2. 방 법	5
(1) zebrafish Melanin Concentrating Hormone 유전자	5
1) NCBI and zfin database에서 MCH 유전자 검색	5
2) MCH 유전자의 ORF를 포함하는 Primer 제작	6
3) 구축된 cDNA로부터 PCR기계를 이용한 MCH 유전자 증폭	6
4) TA-vector에 증폭된 MCH 유전자 클로닝	6
5) DNA sequencer를 이용한 MCH 유전자의 염기서열 분석	7
6) <i>in vitro</i> transcription을 통한 antisense mRNA 합성	8
7) Whole mount <i>in situ</i> hybridization 수행	8
8) 발현 벡터 및 MCH transgenic zebrafish 제작	9
9) 안정적인 MCH transgenic zebrafish line 구축	13
10) heat shock promoter를 이용한 transient expression vector 개발	13
11) hsp-MCH 벡터를 이용한 transgenic zebrafish 제작	14
(2) zebrafish Antifreeze protein 유전자	14
1) NCBI database에서 AFP 유전자 검색	14

2) AFP 유전자의 ORF를 포함하는 Primer 제작	14
3) 구축된 cDNA로부터 PCR기계를 이용한 AFP 유전자 증폭	14
4) TA-vector에 증폭된 AFP 유전자 클로닝	15
5) DNA sequencer를 이용한 AFP 유전자의 염기서열 분석	16
6) in vitro transcription을 통한 antisense mRNA 합성	16
7) Whole mount <i>in situ</i> hybridization 수행	16
(3) zebrafish Growth Hormone 유전자	17
1) NCBI와 ensembl database에서 GH 유전자 검색	17
2) GH 유전자의 ORF를 포함하는 Primer 제작	17
3) 구축된 cDNA로부터 PCR기계를 이용한 GH 유전자 증폭	17
4) TA-vector에 증폭된 GH 유전자 클로닝	17
5) DNA sequencer를 이용한 GH 유전자의 염기서열 분석	17
6) in vitro transcription을 통한 antisense mRNA 합성	18
7) Whole mount <i>in situ</i> hybridization 수행	18
8) 발현 벡터 및 GH transgenic zebrafish 제작	18
III. 연구 결과	19
(1) zebrafish 생체조절물질인 유전자 분리 및 확보	19
1) MCH (Melanin-Concentrating Hormone)	19
2) AFP (Antifreeze Protein)	24
3) GH (Growth Hormone)	27
(2) MCH를 이용한 형질전환 유전자의 발현 모니터링 시스템 개발	32
(3) 형질전환 개발 기술 확립 및 평가모델 실험어 개발	36

(4) 형질전환 유전자의 환경위해성 및 안정성 평가기술 확보	38
IV. 결 론	39
V. 고 찰	40
* 국내학술발표대회	41

I. 서론

수해양은 인류 최대의 단백질 공급원임과 동시에 방대한 유전자 자원의 보고이다. 수·해양으로부터 유전자 자원 확보와 이의 생명 공학적 활용을 통한 고부가가치의 창출은 이미 전 세계 선진 각국의 첨예한 경쟁분야로 대두되고 있다. 선진 각국의 주요 전략은 수·해양으로부터 얻어지는 생물, 물질 및 정보를 공학적으로 활용함으로써 고부가가치와 생산성을 창출해내는 ‘수·해양 생명공학’의 잠재력을 극대화하는 것이다. 이를 위해 선진 각국들은 생명공학기술의 발달과 함께 유전자변형생물체 (Living Modified Organisms, LMOs)를 개발하여 산업화를 목적으로 하는 추세에 있다. 먼저, LMO는 농수산물의 품질향상과 재배나 사육의 용이성, 병충해에 대한 내성 증진에 초점을 맞추어 인류 식량문제를 해결할 것으로 기대되어 왔으나, 최근 LMO의 환경·인체 위해성에 대한 의문이 끊임없이 제시되고 있으며 LMO의 안전성에 대한 대책이 시급한 실정이다. LMO의 개발은 1994년 미국에서 최초로 시작된 무르지 않는 토마토를 시작으로 곡물, 과일, 야채 등 농산물과 환경용 미생물, 수산물에 이르기까지 그 범위가 매우 광범위하다. 현재 미국 FDA에서 식품으로 승인을 받은 것은 40종 이상으로 알려지고 있고, 농수산물 분야의 LMO는 수 천 종 이상이 개발되어졌으며 이미 산업화에 성공하고 있다. 해양 수산물의 경우도 예외가 아니며, 현재 미국 FDA에 계류 중인 유전자변형 대서양 연어의 안정성 승인이 임박하며, 한편은 LMO의 환경위해성 및 안정성에 대한 논란이 거세어지고 있는 실정이다. 특히, 어류 LMO의 경우에는 유전자 재조합 기술을 이용해 고성장이나 질병내성 등의 특정형질을 나타내도록 하는 것으로, 송어 및 연어류, 잉어등에서 성장 가속에 의한 생산기간 단축과 사료 효율의 개선이 보고되고 있으며 점차 그 기술들은 다양한 어종으로 확대되고 있다. 실제적으로, 수산물 LMO는 90년대부터 캐나다와 미국에서 고성장, 항동결 등의 특성이 있는 연어와 송어를 개발한 바 있으며, 현재 미국 FDA에서 식품승인 과정에 있다. 국내에서는 아직 해양수산물 LMO가 산업적으로 유통되고 있지는 않으나 LMO법이 발효되면 환경위해성 심사 등 관련제도가 의무화되고 이와 관련된 각종 기술

개발 등의 사전준비가 필요하다고 본다. 해양 수산 생명체도 예외가 아니며, 수산물의 안정성 증대와 평가기술개발 일환과 유전자재조합 어류 (Genetically Modified fish; GM fish)의 경우 유해성 논란이 있으나 아직 정확히 입증된 바가 없다. 이러한 이유로 소비자의 불신과 거부 반응으로 인해 시급한 대책이 요구되고 있으며, 자연계에 방출 되었을 경우 예기치 못한 환경 생태계 파괴에 대한 안전성 문제의 해결을 위하여 유전자 변형 생물체의 ‘국가 간 이동 등에 관한 법률’ (2001. 3)을 제정하게 되었다. 세계적으로는 이미 연어, 무지개송어 등의 LMO들이 개발되었으며 아직까지 국가 간 상업적 유통은 되지 않고 있지만, 조만간 이들 해양수산 LMO들의 국가 간 이동도 피할 수 없는 실정이다. 따라서 앞으로 전개될 국내 및 국외에서의 유전자 재조합 어류의 개발과 상품화에 따른 국내 수입 및 수출에 대비하여, LMO어류의 인체 및 환경 위해성에 대한 평가와 저감을 위한 노력이 절실히 필요하다. 특히 우리나라 어류양식의 경우에도 수입 종에 의존하는 비율이 매년 높아짐에 따라 국내에서 양식한 어류의 LMO 검증의 필요성이 부각되고 있으며, 유전자변형 어류의 인체 또는 환경 위해성 논란이 대두되고 있다.

본 연구는 최근 동물 유전체의 기능연구에 매우 적합하여 전 세계적으로 급속히 도입되고 있는 새로운 실험 동물인 zebrafish를 이용하여 유전자변형 수산 해양생물의 생산기술 및 그 안정성에 대한 기초 연구를 수행하고자 한다. Zebrafish는 송사리 크기 정도의 소형어류로서 동물사육이 매우 간단하고, 계절에 관계없이 매일 대량의 수정란을 이용할 수 있다는 점, 그리고 발생이 매우 빨라서 만 하루 만에 유전자의 활성평가가 가능하기 때문에 유전체의 대량 기능연구를 목적으로 전 세계적으로 급속하게 도입되고 있는 획기적인 실험동물이다. 또한 대량의 유전학적 연구가 가능하면서도 같은 척추동물인 인간의 유전체와도 매우 유사한 구조와 기능을 가지고 있다는 것이 알려지면서 인간 유전체의 기능연구에도 응용되어지고 있는 실정이다. 특히, 첨단 생명공학기술의 개발과 유전체 연구의 필요성이 증대되고 있는 해양 수산 분야에서도 LMO 개발 및 안전성 평가 모델의 실험어로서 zebrafish와 같은 새로운 실험동물의 도입은 매우 중요하다고 본다. 현재 세계 각국의 생명공학은 하루가 다르게 급속하게 발달을 하고 있어, 유전자변형 해양수산생

물체도 계속 증가하는 추세에 있다. 이러한 추세에 대응하기 위해서는 우리나라에서도 형질전환 모델어류의 개발기술을 정립하고, 형질전환 모델어류를 통한 다양한 실험이 선행되어야 한다. 이러한 해양수산 LMO 기술개발을 통하여 일차적으로 산업화에 이용하고 나아가 LMO에 대한 안전관리 기반을 구축하고, 수입 예상 해양수산물에 대한 검색 및 해양환경 위해성 평가기술을 정립해 나가야 한다.

LMO 제작에 관해서는 이미 농산물의 경우 수 천 종 이상이 개발되었으며, 어류의 경우에도 연어, 무지개송어 등을 비롯해 소수 어종의 연구가 성공리에 수행되고 있다. LMO에 이용되는 형질전환 유전자의 경우 주로 성장호르몬 (Growth Hormone)이나 항동결 (Antifreeze Protein, AFP) 유전자 등을 대상으로 하여 왔으나, 생명공학 전반의 유전체 기능연구와 함께 새로운 생체기능조절 유전자들이 밝혀진다면, 점차로 그 대상 유전자들이 확대될 것으로 추정된다. LMO 제작에는 어종의 형질을 향상시키기 위한 형질전환용 유전자의 발굴과 이들 유전자들을 성공적으로 이식하기 위한 발현벡터 및 유전자 도입기술의 개발과 안정된 LMO의 선별, 관리 및 유지 등의 연구수행이 그 과제라 할 수 있다. 발현벡터의 경우에는 형질전환유전자를 과량발현시키는 유전자프로모터 (promoter)나 특정 조직에 선택적으로 발현시키는 프로모터, 특정한 시기에 필요에 따라 유전자 발현을 유도할 수 있는 프로모터 등이 필요하다. 대표적으로는 beta-actin promoter나 열충격 프로모터 (hsp, heat shock promoter) 등이 이미 개발되어 있다. 또한 형질전환 생물체를 선별, 유지 및 통제하기 위한 모니터링 시스템이 필수적인데 여기에는 형질전환 유전자를 직접 대상으로 한 DNA 증폭 즉, PCR 방법을 이용하거나 해파리 유래의 초록 형광 단백질인 GFP 유전자를 사용하는 방법이 있다. 하지만 경제성, 효율성 측면에서 좀 더 간단하고 안정적인 새로운 형질전환 유전자 발현 모니터링 시스템의 개발도 요구 되어지고 있다. 본 연구팀은 새로운 모델 어종인 zebrafish를 이용하여 이미 GFP 유전자를 발현하는 형질전환동물의 제작에 성공한 경험이 있으며, 현재는 체색 조절 호르몬인 MCH 유전자를 이용한 새로운 모니터링 시스템을 개발하고자 노력하고 있다. 이러한 새롭고 획기적인 형질전환 유전자발현 모니터링 시스템은 LMO개발 이후에 예상되는 LMO의 환경 방출 및 안정성 평가에 효율적인 방법을 제시하게

될 것이다.

따라서 본 과제는 해양수산 LMO의 안전성 대책마련의 일환으로, 새로운 실험동물로 전 세계적으로 급속히 도입되고 있는 zebrafish를 이용하여 LMO 평가모델 실험어의 개발과 함께 LMO의 환경 위해성 안정성 평가의 기술 확보 및 이와 관련한 전문 인력 양성을 목적으로 하고 있다.

II. 재 료 및 방 법

1. 재 료

1) 제브라피쉬 사육 및 발생 배 준비

- 제브라피쉬의 성체는 28.5°C에서 낮 14시간, 밤 10시간의 명암조절을 통해 유지되었다. 수정란은 Ringer's solution (116 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.2)으로 씻어 Petri-dish에서 키웠으며, 발생과정은 해부현미경을 통해 시간별로 관찰 하였고 필요한 단계별 수정란은 시간 (hpf; hours postfertilization at 28.5°C) 및 형태학적인 특징들에 따라 선별하여 4% paraformaldehyde/PBS 로 고정하였다.

그리고 형질전환 어류를 제작하기 위한 DNA microinjection은 수정 후 1세포기때의 수정란을 1.2% agar plate에 정렬시킨 후 injection manipulator에 연결되어 있는 needle에 수직이 되게 cell 을 향하게 한 뒤 picopump에 의한 질소가스의 압력으로 transgene 을 주입시킨다. 이때 transgene은 0.1% phenol red and 0.1M KCl 과 함께 섞어서 사용한다.

- Ampli-Taq Gold polymerase (Perkin-Elmer, CA), 각각의 유전자의 ORF를 포함하는 Forward primer, Reverse primer (GenoTech, KOREA), pGEM-T easy vector (Promega, USA), T₄ DNA ligase (Prpmege, USA), 24hr zebrafish cDNA, Wizard[®]Plus Minipreps DNA Purification Systems Kit. (Promega, WI), QIAEX[®] II Gel extraction kit. (QIAGEN, GERMANY), pCS2+ vector, pCS2+ GFP vector, 형광현미경

(Nikon ECLIPSE TE-2000U), 실체현미경 (Leica S6E), Pneumatic PicoPump, Injection manipulator, 질소가스, *EcoRI* Enzyme (Bioneer, KOREA), Spectrophotometer, Cuvette, UV transilluminator, Alkaline lysis solution I [50 mM glucose, 10 mM EDTA (pH 8.0), 25 mM Tris-Cl (pH 8.0)], Alkaline lysis solution II [0.2 N NaOH, 1% SDS], Alkaline lysis solution III [5 M potassium acetate 60 ml, glacial acetic acid 11.5ml, D.W 28.5 ml]

2) 유전자 클로닝 시스템

- NCBI database와 Ensembl database, TIGR를 이용하여 생체기능 조절 유전자를 검색하고, 이를 다른 종간에 유사성을 확인하기 위해 tblastx, clustalW, protein domain 검색을 위해 Pfam을 수행한다. 클로닝 할 유전자를 zebrafish cDNA library를 이용하여 분리하기 위해 FastPCR과 primer3 site를 이용하여 클로닝 할 유전자의 primer를 제작한다. 이를 pGEM T-easy vector 에 클로닝하고, 염기서열을 분석한다.

3) zebrafish cDNA library 구축

- zebrafish 암.수 여러 쌍을 교배시켜 수정란을 획득하고 필요로 하는 배 발생 단계의 수정란에서 total RNA를 분리하여 1ug 농도로 만들고, 이 total RNA를 template로 한 RT-PCR (Reverse-transcriptase polymerase chain reaction)을 수행하여 first-strand cDNA를 합성하였다.

2. 방 법

(1) zebrafish Melanin Concentrating Hormone 유전자

1) NCBI and zfin database에서 MCH 유전자 검색

- zfin (<http://zfish.wustl.edu/>)과 NCBI database를 이용하여 MCH 유전자를 검색한 결과 pratial로 존재하는 EST clone (fj41b12.y1 + fj41b12.x1r + fj37c10.y1)을 검색하였고, 이를 이용하여 375bp의

MCH 유전자의 full length cDNA의 sequence를 분리한다.

2) MCH 유전자의 ORF를 포함하는 Primer 제작

- FastPCR program과 primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) web site를 이용하여 최적의 효율을 보이는 MCH 유전자의 forward primer 5'-CAAGACAGGAAACAGCAGCCAAACC 와 reverse primer 5'-CCATGTCTTCCCAGAAGTCCTACAC를 제작하였다.

3) 구축된 cDNA로부터 PCR기계를 이용한 MCH 유전자 증폭

- 제작된 primer와 zebrafish adult brain cDNA를 template로 하여 forward, reverse primer (5 μ M) 각각을 2.5 μ l씩 넣고, 10X PCR buffer를 2.5 μ l, 5X Qual-up buffer를 5 μ l, 10 mM dNTP 1 μ l, template 1 μ l, Ampli-Taq Gold polymerase 0.25 μ l, D.W 10.25 μ l를 넣어 총량을 25 μ l로 하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 12분동안 predenaturation을 하고, denaturation 94 $^{\circ}$ C 30초, annealing 55 $^{\circ}$ C 30초, extension 72 $^{\circ}$ C 1min 34cycle로 하여 PCR을 수행하였다.

4) TA-vector에 증폭된 MCH 유전자 클로닝

- PCR로 증폭된 MCH 유전자 product를 pGEM-T easy vector (Promega, USA)에 subcloning 하기 위해 총량을 20 μ l로 하여 PCR로 합성한 product를 1 μ l, pGEM-T easy vector를 0.5 μ l, 10X ligation buffer 2 μ l, T₄ DNA ligase를 0.5 μ l, D.W로 16.5 μ l 넣어 20 μ l를 만든다 . 이 ligation mixture를 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 반응시킨다.
- TA vector에 PCR product를 ligation한 mixture를 transformation 한다. 먼저 *DH5a*라는 strain의 competent cell 100 μ l과 ligation mixture 1 μ l를 섞은 후, 얼음에 30분간 넣는다. 그런 뒤에 42 $^{\circ}$ C 항온수조에 열충격을 1분 30초 동안 주고, 다시 얼음에 2분간 넣는다. 여기에 액체 LB를 1 ml을 넣고, 37 $^{\circ}$ C 배양기에 1시간 동안

배양한 후, X-gal plate (LB, ampicillin)에 도말해서 37°C에서 키운다.

- X-gal plating (LB, ampicillin)된 배지에서 자란 각각의 colony중 흰색의 colony하나를 LB 액체배지+Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 들어 있는 50 ml tube에 접종한다. 이를 37°C 진탕배양기에 넣고, 12-16hr배양한다.
- Wizard[®]Plus Minipreps DNA Purification Systems Kit를 이용하여 plasmid DNA를 분리한다. 12시간 배양된 *E.coli*를 1.5 ml tube에 넣고 12,000rpm에서 2분동안 원심분리하고 상층액을 버리고 cell resuspension solution을 200 μl 넣고 vortex하고, cell lysis solution을 200 μl 넣고 가볍게 흔들어준다. 상온에서 5분간 둔 후, neutralization solution을 200 μl 넣고 4°C에서 15분 둔 후, 12,000rpm에서 15분간 원심분리하고 상등액을 resin과 함께 첨가하여 DNA를 걸러낸다. 이후에 70% ethanol로 씻어주고, 멸균된 1.5 ml tube에 옮겨 TE를 50 μl 넣고 상온에서 2분정도 두고 12,000rpm에서 30초간 원심분리한다. 분리한 plasmid DNA를 spectrophotometer (260nm)를 이용하여 정량한다. 삽입 여부를 확인하기 위해 *EcoR I* Digestion한다. plasmid DNA 2 μl , *EcoR I* enzyme (Bioneer) 1 μl , 10X *EcoR I* buffer 1 μl , D.W 6 μl 를 넣어 총량을 10 μl 으로 하여 37°C 에서 2시간 동안 반응시킨다. 0.7% (0.8-10kb)의 agarose gel에 전기영동하여 확인한다.

5) DNA sequencer를 이용한 MCH 유전자의 염기서열 분석

- 삽입된 DNA의 방향성을 확인한 뒤, GenoTech (<http://www.genotech.co.kr/>) 에 염기서열분석을 의뢰한다. 얻어진 DNA 염기서열 분석결과를 토대로 인터넷을 통한 Genebank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 탐색을 실시하여 유사한 아미노산 서열을 갖는 단백질들을 찾아내고 이들의 유사성을 비교 분석한다.

6) *in vitro* transcription을 통한 antisense mRNA 합성

- zebrafish 발생배에서 MCH 유전자의 발현 양상을 확인하기 위해 pCS2+ vector에 cloning된 MCH 유전자를 *BamH I* 으로 digestion 한 후 phenol:chloroform으로 정제한다. 이 linear form을 template로 이용해 T7 polymerase와 10Xdig-UTP mixture를 이용하여 2시간 동안 37°C에서 incubation하여 MCH antisense mRNA를 합성하였다.

7) Whole mount *in situ* hybridization 수행

- 이는 따로 유전자 발현의 변화를 보기 위해 mRNA를 분리할 필요가 없이 발생 배를 통째로 이용하기 때문에 발생 시간별, 조직부위별 입체적 유전자 발현의 검출이 가능한 방법이다.

- fixation

원하는 발생 단계의 정상 수정란을 microtube에 담아 물을 제거한 후 4% paraformaldehyde를 500 μ l를 넣어 4°C에서 12시간 이상 고정시킨다. 24시간 되는 알은 융막 (chorion)을 미리 제거한 후, 꼬리가 퍼지도록 하여 고정시킨다. 융막이 제거된 embryo들을 PBTw로 5분간 5번 씻고 100% methanol로 두 번 정도 갈아준 후, methanol을 넣어 -20°C에 30분 이상 보관한다. Methanol을 처리하면 장기보관이 가능하다.

- Proteinase K 처리와 hybridization

Methanol에 보관된 embryo들을 75%, 50%, 25% MeOH/PBTw에서 각각 5분씩 점차적으로 씻어준다. PBTw로 5분간 두 번 씻어준 후 24시간 embryo에 proteinase K (10 μ g /ml PBTw)를 500 μ l를 넣고 상온에서 8분 둔다. 그런 후 4% paraformaldehyde을 500 μ l씩 두 번 갈아주고 상온에서 20분간 둔다. PBTw로 5분간 5번 씻어 주는데 이때, embryo가 부서지기 쉬우므로 주의한다. Hybridization solution (50% formamide, 20 \times SSC, 0.1% Tween-20, 5 mg/ml torula RNA, 50 μ g/ml Heparin)을 200 μ l을 넣고, 70°C, 1시간 prehybridization을 시킨 후 probe 1 μ l을 섞어

70°C에서 12시간 혼성화시킨다.

- Probe washing

Probe가 든 용액을 제거한 후 75%, 50%, 25% hybridization solution (50% formamide, 20× SSC, 0.1% Tween-20)/2× SSCTw 용액순으로 각각 70°C상태를 유지하여 10분 간격으로 갈아준 후 2×SSCTw로 한 번 더 갈아준다. 그런 다음 0.2× SSCTw로 30분 간격으로 두 번 갈아주어 hybrid를 하지 못한 probe를 제거해준다. PBTw로 5분간 3번 씻은 후 상온에 5분간 둔다.

- Blocking과 anti-DIG 항체를 이용한 유전자 발현부위 조사

5% bovine serum 200 μ l를 넣고 상온에서 3시간동안 항체반응 전에 차단시킨다. 그런 후 5% bovine serum 300 μ l과 1000배 희석시킨 anti-DIG-AP Fab (150 u/200 μ l, Enzo)를 300 μ l을 섞은 용액에 embryo를 넣고 상온에서 4시간동안 반응시킨다. 상온에서 PBTw로 10분간 6번, 30분간 3번, 넓은 petri dish로 옮겨 1시간 동안 씻어준다. 다시 새로운 microtube로 옮겨 PBT를 채운다. NTMT buffer (0.1 M Tris-Cl pH 9.5, 50 mM MgCl₂, 0.1 M NaCl, 0.1% Tween-20)로 5분간 3번 씻어준 다음 발색 기질인 NBT solution (Boehringer Mannheim) 400 μ l을 넣고 호일로 감싼 후 상온에서 3시간 이상 현미경으로 관찰하면서 염색한다. 염색이 끝난 embryo들은 PBT로 5분간 3번 씻은 후 4% paraformaldehyde로 고정한다.

8) 발현 벡터 및 MCH transgenic zebrafish 제작

- 발현벡터인 pCS2+와 MCH를 TA vector에 subclonig한 pGEM-T easy vector에는 *EcoR I*이라는 클로닝 사이트가 존재하기에 두 개의 벡터를 *EcoR I*으로 자른다. 먼저 pGEM-T easy vector:MCH (145 ng/ μ l)는 DNA sample 4 μ l, *EcoR I* enzyme 2 μ l, 5X *EcoR I* buffer 4 μ l, D.W 10 μ l를 넣어 총량을 20 μ l로, pCS2+(480 ng/ μ l)는 vector 2 μ l, *EcoR I* enzyme 1 μ l, 5X *EcoR I* buffer 2 μ l, D.W 5 μ l를 넣어 총량을 10 μ l로 하여 37°C에서

incubator에서 2시간동안 반응시킨다.

- MCH 정제

*EcoRI*으로 자른 pGEM-T easy vector:MCH를 전부 전기영동하여 UV transilluminator에서 깨끗한 칼로 약 500bp (MCH size)에 있는 밴드를 잘라서 멸균된 1.5 ml tube 넣고, 무게를 측정한다. 그런 뒤에 QIAEX[®] II Gel extraction kit. (QIAGEN, Germany)를 사용하여 실험한다. 먼저 gel에 QX I buffer 3 volume을 넣고, 그 다음으로 bead가 들어있는 QIAEX II solution을 vortex한 뒤 10 μ l를 넣고 1분동안 vortex한다. 이 시료를 50°C 항온수조에서 10-20분동안 반응 시킨다. 이때 QIAEX II에 들어있는 bead와 DNA가 잘 결합하기 위해 2분마다 가볍게 섞는다. 이 시료를 12,000rpm에서 30초동안 원심분리한 후 상등액을 pipette을 사용하여 조심스럽게 버리고, 다시 QX I buffer를 500 μ l넣고, vortex한 후 12,000rpm에서 30초동안 원심분리하여 상등액을 조심스럽게 버린다. (이 단계는 agarose contaminants를 제거하는 단계이다). 그 다음으로 시료에 남아있는 salt contaminants를 제거하기 위해 에탄올이 들어있는 PE buffer를 500 μ l넣고, 12,000rpm에서 30초동안 원심분리하고 상층액을 버린다. 이 단계는 한번 더 수행한다. 그런 뒤 상온에서 pellet이 흰색이 될 때까지 약10-15분동안둔다. Bead에 붙어있는 DNA를 용리하기 위해 Elution buffer (10mM Tris-Cl, pH 8.5) 또는 증류수를 20 μ l 넣고 vortex한 후, 상온에서 5분동안 둔다. 이 시료를 12,000rpm에서 30초동안 원심분리한 후 상등액을 새 tube로 옮긴다. Gel extraction 한 MCH DNA를 정량하기 위해 1/100로 희석하여 spectrophotometer를 이용하여 정량한다.

- 발현 벡터 (pCS2+)정제

pCS2+ 벡터를 *EcoR I* digestion 한 후 그 중 1 μ l를 전기영동해서 잘 잘렸는지 대조군과 비교하여 확인한다. 이 시료 (9 μ l)에 D.W 11 μ l를 넣고 65°C 항온수조에서 15분동안 열을 가하여 restriction enzyme의 활성을 없애고, CIAP (Calf Intestinal Alkaline phosphatase) enzyme 0.5 μ l, 10X CIAP buffer 3 μ l,

D.W 6.5 μl 를 넣고 살짝 vortex한 뒤 가라앉혀 37°C에서 30분동안 반응시킨다. 여기에 (30 μl) TE를 120 μl 첨가한 후 4°C에 보관되어 있는 phenol/chloroform (pH 8.0)을 150 μl (동량)넣고 2분동안 vortex하여 12,000rpm에서 10분동안 원심분리 한다. 이 과정에서 시료에 두층이 생기는데 상등액을 (약 140 μl 정도) 떠서 새 tube에 넣는다. 여기에 chloroform 140 μl (동량)를 넣고 다시 2분동안 vortex한 뒤 12,000rpm에서 10분동안 원심분리 한다. 여기에서도 tube에 용액이 두 층으로 분리되는데 상등액 (130 μl)을 새 tube로 옮긴다. 그런 다음 총량을 500 μl (★)로 정해서 3 M sodium acetate를 50 μl 넣고 나머지 320 μl 를 100% ethanol로 넣는다. 이 시료를 -70°C에서 30분동안 두었다가 원심분리기로 4°C에서 12,000rpm으로 15분동안 원심분리 한다. 조심스럽게 pipette으로 상층액을 제거한 후 70% ethanol을 500 μl (★ 단계과 동량)넣고 vortex한 후 원심분리기로 4°C에서 12,000rpm으로 5분동안 원심분리 한다. 상등액을 pipette으로 조심스럽게 제거한 후 상온에서 10-15분동안 두고, TE 10 μl 를 넣고 vortex하여 녹인 후 살짝 원심분리 한다. 이렇게 정제한 pCS2+ vector (linear form)를 spectrophotometer를 이용하여 정량 한다.

- 정량한 pCS2+ vector와 MCH의 농도를 각각 1 : 1의 비율로 하여 ligation한다. pCS2+ vector (95 ng/ μl) 1 μl 와 MCH (56 ng/ μl) 2 μl 를 넣고 ligase enzyme 1 μl , 2X ligase buffer 10 μl (이상 Promega), D.W 6 μl 를 넣어서 상온에서 3-4시간동안 둔다.
- pCS2+ vector에 MCH를 ligation한 mixture를 transformation한다.
- MCH가 삽입된 발현백터를 확인하기 위해 Transformation해서 얻은 colony 중 16개를 LB^{amp} 배지에 도말하여 37°C의 배양기에서 12-16 시간 동안 배양한다. 도말한 각각의 colony를 백금니로 1.5 ml tube의 벽면에 묻힌다. 여기에 D.W를 30 μl 넣고 현탁시킨 후 4°C에 보관되어 있는 phenol/chloroform (pH 8.0)을 30 μl (동량)넣고 vortex 하여 12,000rpm에서 10분동안 원심분리한다. 각각 시료의 상등액을 10 μl 씩 떠서 전기영동한다. 이때 pCS2+ vector (circular

form)를 대조군으로 같이 전기영동한다.

- Phenol cracking하여 MCH가 vector내 삽입된 시료를 골라 방향성을 확인하기 위해 vector내에 존재하는 SP6, T7 promoter에 각각 결합하는 SP6, T7 primer와 MCH내에 존재하는 reverse primer를 사용하여 colony PCR을 수행한다 . 3개의 시료를 이쭈시게로 끊어서 PCR tube의 벽면에 묻히고, 각각의 시료마다 reverse primer에 SP6 primer와 T7 primer를 각각 2 μ l씩 넣고, 10 mM dNTP 2 μ l, 10X PCR buffer 2 μ l, Taq polymerase 0.2 μ l (1 unit), D.W 11.5 μ l를 넣어서 총량을 20 μ l로 하여 PCR을 수행한다.
- 정방향으로 들어간 pCS2+ MCH 시료를 100 ml의 LB가 들어있는 삼각플라스크에 ampicillin 50 μ g/ml을 넣고 접종한다. 이를 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 12-16hr동안 배양한다. 배양한 시료를 50 ml tube에 나누어 담고 원심분리기로 상온에서 3,000rpm으로 10분동안 원심분리한다. 그 다음에 상등액을 제거하고 Alkaline lysis solution I [50 mM glucose, 10 mM EDTA (pH 8.0), 25 mM Tris-Cl (pH 8.0)]을 5 ml 넣고 vortex하여 여기에 Alkaline lysis solution II [0.2 N NaOH, 1% SDS]를 5 ml 넣고 가볍게 혼합한 뒤 상온에서 5분동안 둔다. 다음으로 Alkaline lysis solution III [5 M potassium acetate 60 ml, glacial acetic acid 11.5 ml, D.W 28.5 ml]를 7.5 ml 넣고, 혼합한 뒤 원심분리기로 4 $^{\circ}$ C에서 3,000rpm으로 20분동안 원심분리하고 상등액을 거르기로 걸러서 ultra centrifuge tube에 넣고, isopropanol 15 ml (동량)을 넣고, vortex후 상온에서 10분동안 둔다. 이 시료를 4 $^{\circ}$ C에서 8,000rpm으로 20분동안 원심분리한 후 상등액을 제거하고 70% ethanol로 씻어준 뒤 상등액을 제거한다. 여기에 TE를 1 ml씩 넣고 vortex한 뒤 여기에 5 M LiCl 1 ml넣고 vortex하여 4 $^{\circ}$ C에 5분동안 둔다. 이 시료를 4 $^{\circ}$ C에서 3,000rpm으로 10분동안 원심분리 한 후 상등액을 490 μ l씩 8개의 1.5 ml tube에 나누어 넣는다. 여기에 isopropanol 490 μ l씩 넣고, 상온에서 10분동안 둔다. 4 $^{\circ}$ C에서 3,000rpm으로 10분동안 원심분리 한 후 상등액을 제거한다. 시료에 70% ethanol 1 ml로 vortex하여 씻은 후 4 $^{\circ}$ C에서 3,000rpm

으로 5분동안 원심분리하여 상등액을 제거한다. TE 12.5 μl 씩 넣고, vortex하여 두 개의 1.5 ml tube로 옮긴다. 여기에 RNase A (20 ug/ml)를 2 μl 씩 넣은 뒤 37°C 항온수조에서 45-60분간 반응시킨다. TE를 450 μl 씩 넣어 총량을 500 μl 로 하여 4°C에 보관되어 있는 phenol:chloroform (pH 8.0) 500 μl (동량)를 넣고, 1분동안 vortex하여 13,200rpm에서 2분동안 원심분리한다. 상등액을 분리한 뒤 chloroform 480 μl (동량)를 넣고, 1분동안 vortex하여 12,000rpm에서 2분동안 원심분리하고 상등액 (450 μl)을 새 tube로 옮긴다. 여기에 0.3 M sodium acetate 과 100% ethanol을 450 μl 를 넣어 상온에서 10분동안 둔다. 이 시료를 12,000rpm에서 10분동안 원심분리하고 상등액을 제거한 후 70% ethanol 씻은 후 상온에서 건조시킨다. 여기에 TE를 넣고, 전기영동으로 확인하고 spectrophotometer를 이용해 DNA를 정량한다.

- 정제한 pCS2+MCH와 pCS2+GFP를 각각 3 : 1 의 비율로 섞어서 이를 다시 phenol red (0.2 M KCl)와 1 : 1로 섞어서 DNA농도를 100 ng/ μl 하여 zebrafish embryo 1-cell stage에 microinjection 한다.

9) 안정적인 MCH transgenic zebrafish line 구축

- 10마리를 사육할 수 있는 2.5 liter 어항에 MCH 발현 벡터를 주입한 zebrafish를 약 3개월간 성체가 될 때까지 키워서, 각각을 wild type과 교미를 시켜서 F1 개체를 얻고, 이들의 흑색 색소포를 실체 현미경하에서 관찰한다. 관찰된 F1중 흑색 색소포의 응집이 있는 개체를 확인하면, 이들의 부모세대인 founder fish 중에 MCH 유전자가 생식세포에 전이되었다는 것을 알 수 있다. 이렇게 MCH 유전자가 생식세포에 전이된 형질전환 zebrafish의 안정적인 line을 구축한다.

10) heat shock promoter를 이용한 transient expression vector 개발

- 형질전환동물을 개발하기 위한 새로운 모니터링 시스템의 개발에 앞서 특정한 시기에 필요에 따라 유전자 발현을 유도할 수 있는 열충격

프로모터 (hsp, heat shock promoter) 를 이용하여 체색조절 호르몬인 MCH 유전자로 새로운 모니터링 시스템을 개발하였다. 먼저, 50 분 동안 40℃에서 열충격을 주면 발현을 하는 hsp promoter를 이용하여, hsp MCH vector를 제작하였다.

11) hsp-MCH 벡터를 이용한 transgenic zebrafish 제작

- 특정한 시기에 MCH 발현을 유도하는 hsp-MCH 벡터를 zebrafish 1세포기에 microinjection하여 열충격에 의한 MCH 유전자의 발현을 흑색색소포의 응집을 관찰하면서, hsp-MCH의 발현을 확인하고, 이들을 wild type과 교배하여 형질전환 여부를 확인하고, 이를 이용하여 안정적인 hsp-MCH transgenic line을 구축한다.

(2) zebrafish Antifreeze protein 유전자

1) NCBI database에서 AFP 유전자 검색

- zfin (<http://zfish.wustl.edu/>)과 NCBI database를 이용하여 AFP 유전자를 검색한 결과 partial로 존재하는 EST clone (fw27d07.y1+fb64g03.x1r)을 검색하였고, 이를 이용하여 395bp의 AFP 유전자의 full length cDNA의 sequence를 분리할 수 있었다.

2) AFP 유전자의 ORF를 포함하는 Primer 제작

- FastPCR program과 primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) web site를 이용하여 최적의 효율을 보이는 AFP 유전자의 forward primer 5'-ACGCAAGGCAACTCTTGCTCAACC와 reverse primer 5'-TGGGTTTACTGAGGTGGCAGCATG를 제작하였다.

3) 구축된 cDNA로부터 PCR기계를 이용한 AFP 유전자 증폭

- 제작된 primer와 zebrafish 10hr nk cDNA를 template로 하여 forward, reverse primer (5 μM) 각각을 2.5 μl씩 넣고, 10X PCR buffer를 2.5 μl, 10 mM dNTP 1 μl, template 1 μl, Taq polymerase 0.25 μl, D.W 15.25 μl를 넣어 총량을 25 μl로 하여

PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 12분동안 predenaturation 을 하고, denaturation 94°C 30초, annealing 52°C 30초, extension 72°C 1분을 30 cycle로 하여 PCR을 수행하였다.

4) TA-vector에 증폭된 AFP 유전자 클로닝

- PCR로 증폭된 AFP 유전자 product를 pGEM-T easy vector (Promega, USA)에 subcloning 하기 위해 총량을 10 μ l로 하여 PCR로 합성한 product를 1 μ l, pGEM-T easy vector를 0.5 μ l, 10X ligation buffer 2 μ l, T₄ DNA ligase를 0.5 μ l, D.W로 6.5 μ l 넣어 10 μ l를 만든다 . 이 ligation mixture를 4°C에서 12시간 동안 반응시킨다.
- TA vector에 PCR product를 ligation한 mixture를 transformation 한다. 먼저 DH5a라는 strain의 competent cell 100 μ l과 ligation mixture 1 μ l를 섞은 후, 얼음에 30분간 넣는다. 그런 뒤에 42°C 항온수조에 열충격을 1분 30초 동안 주고, 다시 얼음에 2분간 넣는다. 여기에 액체 LB를 1 ml을 넣고, 37°C 배양기에 1시간 동안 배양한 후, X-gal plate (LB, ampicillin)에 도말해서 37°C에서 키운다.
- X-gal plating (LB, ampicillin)된 배지에서 자란 각각의 colony중 흰색의 colony하나를 LB 액체배지+Ampicillin (100 μ g/ml)이 들어 있는 50 ml tube에 접종한다. 이를 37°C 진탕배양기에 넣고, 12-16hr배양한다.
- Wizard[®]Plus Minipreps DNA Purification Systems Kit를 이용하여 plasmid DNA를 분리한다. 12시간 배양된 *E.coli*.를 1.5 ml tube에 넣고 12,000rpm에서 2분동안 원심분리하고 상층액을 버리고 cell resuspension solution을 200 μ l 넣고 vortex하고, cell lysis solution을 200 μ l 넣고 가볍게 흔들어준다. 상온에서 5분간 둔 후, neutralization solution을 200 μ l 넣고 4°C에서 15분 둔 후, 12,000rpm에서 15분간 원심분리하고 상등액을 resin과 함께 첨가하여 DNA를 걸러낸다. 이후에 70% ethanol로 씻어주고, 멸균된 1.5

ml tube에 옮겨 TE를 50 μ l 넣고 상온에서 2분정도 두고 12,000rpm에서 30초간 원심분리한다. 분리한 plasmid DNA를 spectrophotometer (260nm)를 이용하여 정량한다. 삽입여부를 확인하기 위해 *EcoRI* Digestion한다. plasmid DNA 2 μ l, *EcoRI* enzyme (Bioneer) 1 μ l, 10X *EcoRI* buffer 1 μ l, D.W 6 μ l를 넣어 총량을 10 μ l으로 하여 37°C 에서 2시간 동안 반응시킨다. 0.7% (0.8-10kb)의 agarose gel에 전기영동하여 확인한다.

5) DNA sequencer를 이용한 AFP 유전자의 염기서열 분석

- 삽입된 DNA의 방향성을 확인한 뒤, GenoTech (<http://www.genotech.co.kr/>) 에 염기서열분석을 의뢰한다. 얻어진 DNA 염기서열 분석결과를 토대로 인터넷을 통한 Genebank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 탐색을 실시하여 유사한 아미노산 서열을 갖는 단백질들을 찾아내고 이들의 유사성을 비교 분석한다.

6) *in vitro* transcription을 통한 antisense mRNA 합성

- zebrafish 발생배에서 AFP 유전자의 발현 양상을 확인하기 위해 TA-vector에 cloning된 AFP 유전자를 *Pst* I 으로 digestion 한 후 phenol:chloroform으로 정제한다. 이 linear form을 template로 이용해 T7 polymerase와 10Xdig-UTP mixture를 이용하여 2시간동안 37°C에서 incubation하여 AFP antisense mRNA를 합성하였다.

7) Whole mount *in situ* hybridization 수행

- MCH antisense mRNA와 동일한 방법으로 AFP antisense mRNA를 probe로 하여 zebrafish 24hr embryo에 AFP transcripts의 발현 양상을 확인하였다.

(3) zebrafish Growth Hormone 유전자

1) NCBI와 ensembl database에서 GH 유전자 검색

- NCBI database를 이용하여 GH 유전자를 검색한 결과 partial로 존재하는 EST clone (AY286447)을 검색하였고, 이를 이용하여 ensembl zebrafish database (<http://www.ensembl.org/>)를 통해 633bp의 GH 유전자의 full length cDNA의 sequence를 분리할 수 있었다.

2) GH 유전자의 ORF를 포함하는 Primer 제작

- FastPCR program과 primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) web site를 이용하여 최적의 효율을 보이는 GH 유전자의 forward primer 5'-GGACAAAATGGCTAGAGCATTGGTG와 reverse primer 5-'GGCTTTGACTAGCAATACATTGGCG를 제작하였다.

3) 구축된 cDNA로부터 PCR기계를 이용한 GH 유전자 증폭

- 제작된 primer와 zebrafish 48hr cDNA를 template로 하여 forward, reverse primer (5 μ M) 각각을 2.5 μ l씩 넣고, 10X PCR buffer를 2.5 μ l, 2.5 mM dNTP 2.5 μ l, template 1 μ l, Taq polymerase 0.25 μ l, D.W 13.75 μ l를 넣어 총량을 25 μ l로 하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분동안 predenaturation을 하고, denaturation 95°C 30초, annealing 58°C 30초, extension 72°C 1분을 30 cycle로 하여 PCR을 수행하였다.

4) TA-vector에 증폭된 GH 유전자 클로닝

- 위에서 말한 MCH 유전자와 AFP 유전자의 클로닝 방법과 동일한 방법을 이용하여 TA 벡터에 클로닝한다.

5) DNA sequencer를 이용한 GH 유전자의 염기서열 분석

- 삽입된 DNA의 방향성을 확인한 뒤, GenoTech (<http://www.genotech.co.kr/>)에 염기서열분석을 의뢰한다. 얻어진

DNA 염기서열 분석결과를 토대로 인터넷을 통한 Genebank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 탐색을 실시하여 유사한 아미노산 서열을 갖는 단백질들을 찾아내고 이들의 유사성을 비교 분석한다.

6) *in vitro* transcription을 통한 antisense mRNA 합성

- zebrafish 발생배에서 GH 유전자의 발현 양상을 확인하기 위해 TA-vector에 cloning된 GH 유전자를 Nco I 으로 digestion 한 후 phenol:chloroform으로 정제한다. 이 linear form을 template로 이용해 sp6 polymerase와 10Xdig-UTP mixture를 이용하여 2 시간동안 37°C에서 incubation하여 AFP antisense mRNA를 합성하였다.

7) Whole mount *in situ* hybridization 수행

- MCH antisense mRNA와 동일한 방법으로 GH antisense mRNA를 probe로 하여 zebrafish 48hr embryo에 GH transcripts의 발현 양상을 확인하였다.

8) 발현 벡터 및 GH transgenic zebrafish 제작

- GH 형질전환 어류를 제작하기 위해 발현 벡터인 CS2+ 벡터에 GH 유전자를 클로닝하였다. 이에 대한 방법은 CS2+ 벡터에 MCH 유전자 클로닝 하는 방법과 유사하게 수행하였으며, GH 발현벡터인 CS+ GH 를 microinjector를 이용하여 zebrafish 1세포기때에 세포질에 주입하였다. 주입된 zebrafish를 성체가 되도록 키운 뒤에 이를 wild type과 교배하여 안정적인 zebrafish GH transgenic을 구축한다.

III. 연구 결과

(1) zebrafish 생체조절물질인 유전자 분리 및 확보

- 동물의 생체기능을 조절할 수 있는 새로운 기능성 유전자나 멜라닌 응집 호르몬 (melanin concentrating hormone) 유전자, 항동결 (AFP, antifreeze protein) 유전자, 성장 호르몬 유전자 (growth hormone), 등의 분리를 위하여 생물 정보학적인 접근방식으로 NCBI database, zebrafish DNA database를 검색하여 관련 유전자의 존재를 확인하였고, 이를 zebrafish cDNA를 이용하여 분리하였으며, zebrafish 생체내에서 어떠한 기능을 하는지 *in vitro* transcription, microinjection, Whole-mount *in situ* hybridization 방법을 이용하여 실험을 진행하였다.

1) MCH (Melanin-Concentrating Hormone)

zebrafish adult brain cDNA 으로부터 분리한 MCH 유전자의 염기서열을 확인하였고, 다른 질병모델동물과 염기서열의 상동성을 확인한 결과 C-terminal에 존재하는 proteolytic cleavage site인 두 개의 arginine site를 관찰할 수 있었다 (그림 1, 2). 또한 시상하부 (hypothalamus)에서 뇌하수체 (pituitary)를 거쳐 혈중으로 분비되는 17개의 (mammalian은 19개) peptide도 다른 질병모델 동물과 94% 이상의 상동성을 확인하였다 (그림 1).

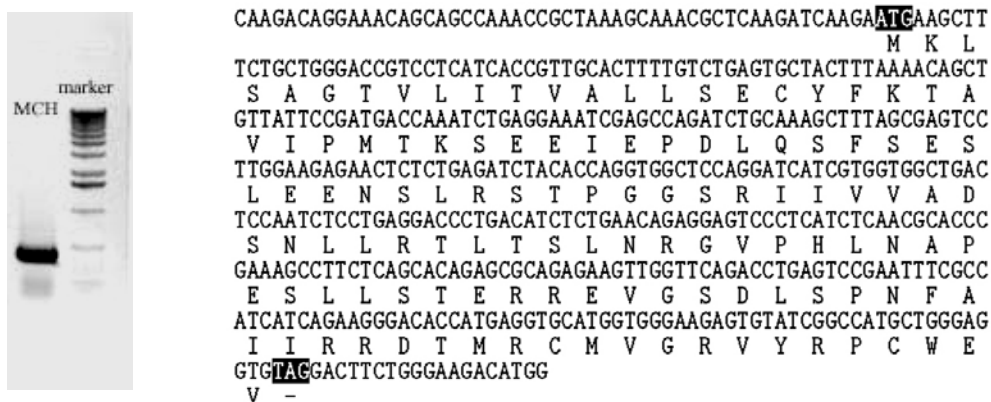


그림 1. zebrafish에서 분리한 MCH 유전자와 염기서열분석 결과

```

humanMCH  MAKVNLSYYILILTFSLFSQGI LLSASKSIRNLDDDMVFNTFRLGKGFKQKEDTAEKSVLA 60
mouseMCH   MAKVTLSSYMLMLAFSLFSQGI LLSASKSIRNLEDDIVFNTFRMGKAFQKEDTAEKSVVA 60
ratMCH     MAKVSLSSYMLMLAFSLFSHQGI LLSASKSIRNVEDDIVFNTFRMGKAFQKEDTAEKSVVA 60
zebraMCH   ---YKLSAGTYLITVALLSECYEKTAVIPMTKSEE-----FRMGKAFQKEDTAEKSVVA 34
           *.*. :. :. :.*.: :.*. . :. :.
           :. :. :.*.: :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :.

humanMCH   PSLEQYKNDESSFMNEEENKYSKNT GSKHNFVNHGLPLNLAIKGYQALKGSVDVFAENGV 120
mouseMCH   PSLEQYKNDESGFMNDDDKNSKNT GSKQNLVTHGLPLSLAVKPYLALKGSVAFVFAENGV 120
ratMCH     PSLEGYKNDESGFMKDDDKTKNT GSKQNLVTHGLPLSLAVKPYLALKGPVAFVFAENGV 120
zebraMCH   PDLQSFSES----LEENSLRSTPGSRIRIIVYAD---SNLLRTLTSLN--RGVPHLNAP 83
           *. * :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :.

humanMCH   QNTESTQEKREIGDEENSAKFPPIGRRDFDLRCMLGRVYRPCWQV 165
mouseMCH   QNAESTQEKREIGDEENSAKFPPIGRRDFDLRCMLGRVYRPCWQV 165
ratMCH     QNTESTQEKREIGDEENSAKFPPIGRRDFDLRCMLGRVYRPCWQV 165
zebraMCH   ESLLST-ERREYVGS-DLSPNEAIIIRB--DTRCMYGRVYRPCWV 124
           :. *.*. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :.

```

그림 2. MCH 유전자의 아미노산 염기서열을 다른 질병모델동물과 비교 분석

MCH 유전자의 생체내 발현 양상을 확인하기 위해 pGEM T-easy vector내의 형질전환 유전자를 vector에 존재하는 promoter를 이용하여 *in vitro* transcription을 통해 mRNA probe를 합성하였고, 인공적으로 합성한 mRNA probe로 특정 zebrafish embryo stage에 whole-mount *in situ* hybridization 방법을 이용하여 유전자의 발현 여부를 확인하였다. 그 결과 MCH 유전자가 수정 후 2-dpf (day post-fertilization)에 뇌 (brain)에 존재하는 시상하부 (hypothalamus)에서 발현하는 것을 확인할 수 있었다(그림 3).

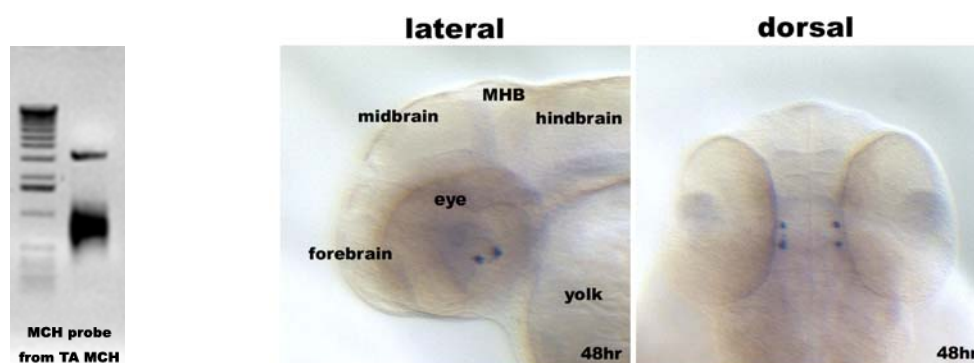


그림 3. in vitro transcription을 통한 Dig-RNA labelling된 MCH mRNA 합

성결과 와 Whole-mount in situ hybridization을 이용한 MCH 유전자의 발현양상을 관찰한 결과 시상하부에서 발현하는 것을 확인

발현 여부를 확인한 형질전환 유전자의 안정성을 조사하기 위해 발현벡터인 pCS2+ vector의 EcoR I site에 클로닝하여 이 발현 벡터를 미세유전자주입기 (microinjector)를 이용하여 약 100pg 정도의 DNA를 zebrafish 수정란의 1세포기의 세포질에 주입하였다 (그림 4).

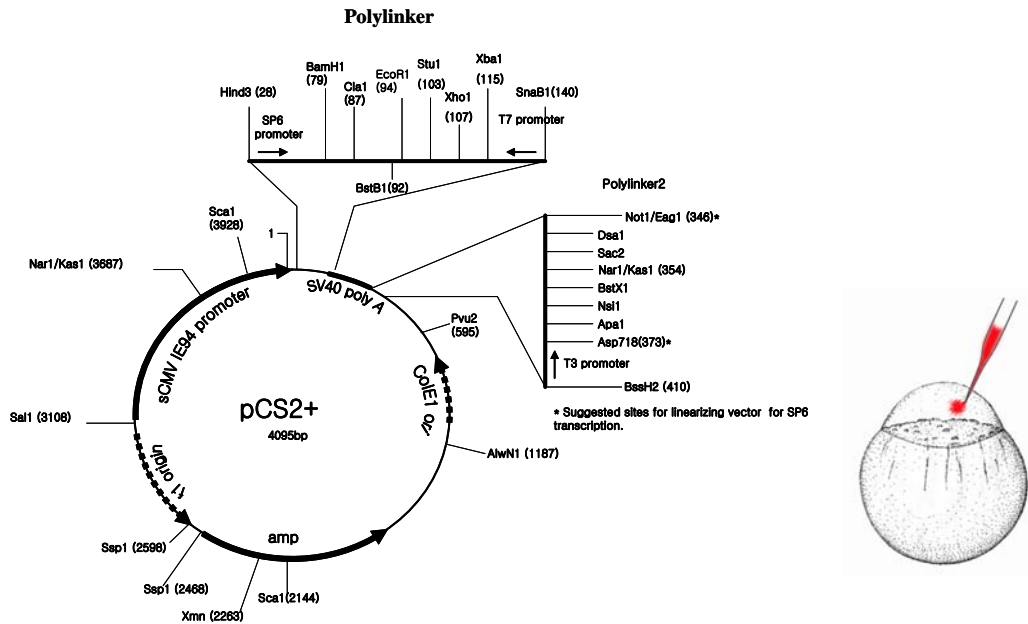


그림 4. zebrafish에서 발현 벡터로 이용되고 있는 pCS2+ map과 1 세포기에 microinjection 모식도

그 결과 형질전환 유전자가 주입된 개체에서 흑색색소포의 응집으로 체색이 희게 된 개체를 확인할 수 있었고, 같이 주입한 GFP 형광 단백질도 모든 조직에서 발현하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 5).

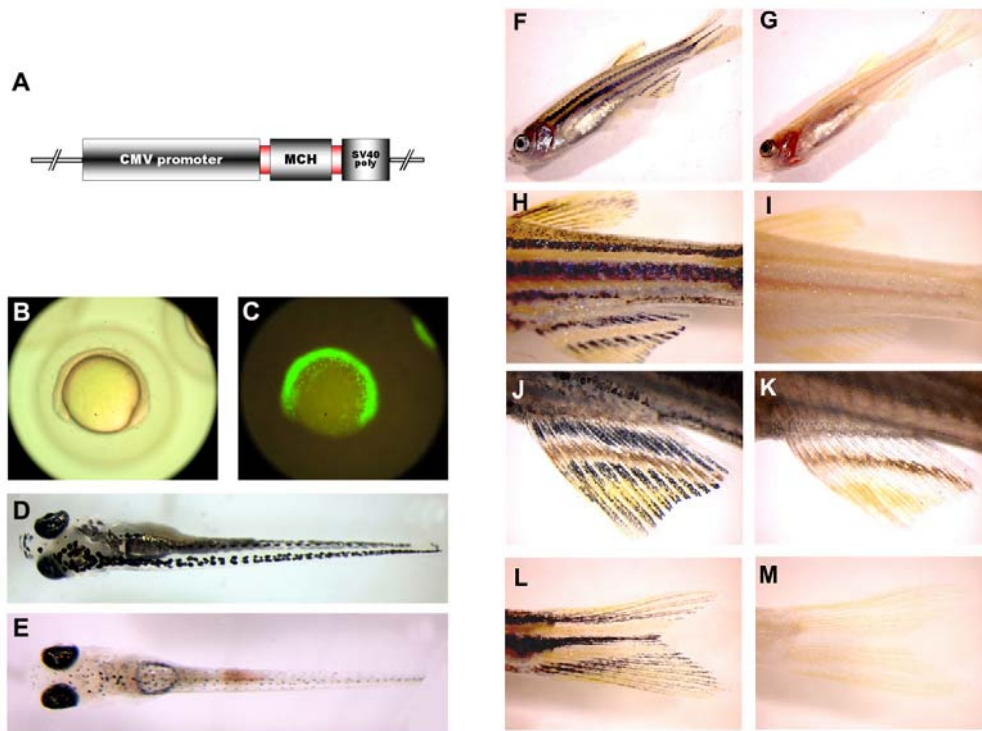


그림 5. 발현벡터에 삽입된 MCH 유전자를 제브라피쉬 발생배의 1 세포기에 미세주입한 후 발생이 지나면서 흑색색소포의 응집을 관찰

MCH 유전자가 주입된 제브라피쉬의 안정적인 형질전환여부를 확인 한 결과 16개체에서 MCH 유전자의 형질전환 여부를 흑색색소포의 응집으로 관찰할 수 있었다. 이를 wild type과 교배 후 F1 세대의 표현형을 관찰해 본 결과 table 1과 같이 B line, F line, C line, I line, J line에서 형질전환여부를 확인할 수 있었고, B line 과 F line의 F1 세대들의 표현형도 형질전환 유전자의 발현을 확인할 수 있었다 (그림 6).

wild type and CMV-MCH injected transgenic embryos

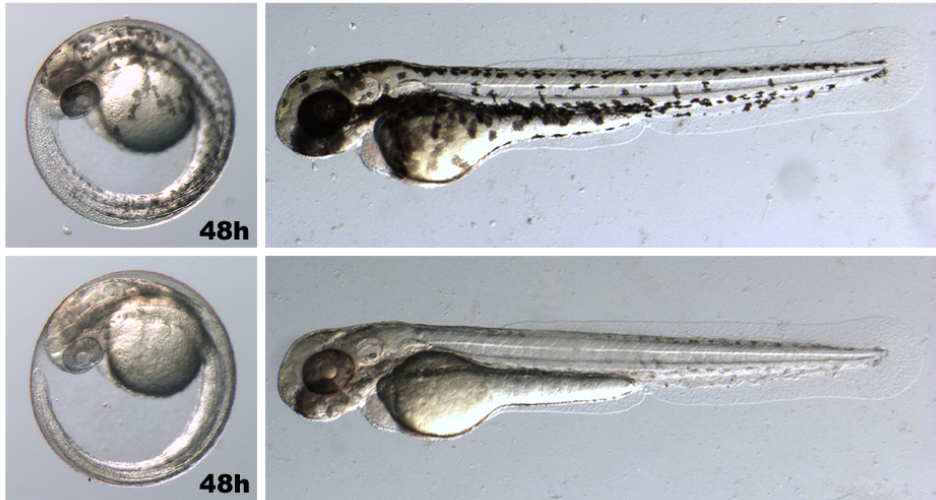


그림 6. 형질전환 된 개체의 F1 세대의 표현형. 형질전환 유전자에 의한 표현형의 변화를 확인할 수 있다.

그리고 B 와 F line의 F1 세대를 wild type과 교배해서 F2 세대의 표현형을 보면 멘델의 분리의 법칙에 맞게 흑색색소포의 응집된 개체가 46.8%에서 부터 55.7%까지 1 : 1의 표현형의 비를 관찰할 수 있었다 (표 1).

Table 1. Mosaicism of founder fish and Mendelian inheritance of the F2 generation.

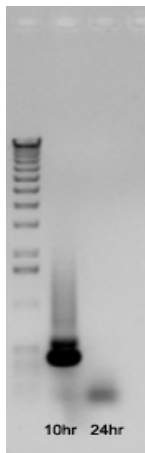
F0 line		F1 positive	F2 positive		remark		
MCH positive/sex	MCH negative/sex	MCH positive line / sex	No.	(%)	F0	F1	F2
A	♂				dead		
B	♂	Bw ^a ♀	211/403	52.3	dead	TG	breeding
		Bw ^b ♂				?	
		Bw ^c ♂	101/184	54.8		TG	breeding
		Bw ^d ♂				?	
		Bw ^e ♂				?	
		Bw ^f ♀				?	
		Bw ^g ♂				?	
		Bw ^h ♀				dead	
		Bw ⁱ ♀				?	
		Bw ^j ♂				?	
		Bw ^k ♂				?	
		Bw ^l ♂	78/140	55.7		TG	dead
		Bw ^m ♂				?	
		Bw ⁿ ♂				?	
		Bw ^o ♂				?	
		Bw ^p ♂				?	
		Bw ^q ♂				?	
		Bw ^r ♂				?	
C	♂	TG identify			dead	breeding	
D	♂				dead		
E	♂				dead		
F	♂	Fw ^a ♀	262/559	46.8	dead	TG	breeding
		Fw ^b ♀	43/87	49.4		TG	breeding
		Fw ^c ♂				?	
		Fw ^d ♂				?	
		Fw ^e ♂				?	
G	♂				dead		
H	♂				MCH positive (dead)	dead	
I	♂	TG identify			MCH positive	breeding	
J	♂	TG identify			MCH positive	breeding	
K	♂				dead		
L	♂				dead		
M	♂				dead		
N	♂				?		
O	♂				MCH positive	breeding	
P	♂				MCH positive (dead)		
	Q	♂			MCH positive (dead)		

표 1. 멘델의 유전법칙에 의한 MCH 형질전환 어류의 표현형 비

2) AFP (Antifreeze Protein)

NCBI database와 zfin database를 검색하여 제브라피쉬 AFP (antifreeze

protein) 유전자의 염기서열을 확인하였고, 다른 모델동물에서 밝혀진 염기서열과 상동성을 비교하였다. 각각 유전자의 ORF (open reading frame)를 포함하는 forward, reverse primer를 제작하고 이를 제브라피쉬의 10hr nk cDNA library를 이용하여, RT-PCR을 수행하여 약 400bp 되는 full length의 AFP 유전자를 분리하였다. 분리한 AFP 유전자 염기서열을 확인하기 위해 TA vector에 클로닝하여 염기서열을 확인하였다 (그림 7).



```

NGGNACACCAACGCGTTGTTTTCTCTNCCATANCGTCGACCTGCAGGCGGCGCGAATT
CACTAGTGNNTACGCAAGGCAACTCTTGCTCAACCCGCAATCATCAAATTCTCCCTCATC
                                     M K F S L I
GCCGTCATTGTTGTTGCTCTGGCCATCGGCTCTGAGTCAGCATCTCTGGTCAAGAGAGAC
A V I V V A L A I G S E S A S L V K R D
GCTCCTGCTGAGCTGGACAAGATCGCCAAGTACTTCCAGGATTTAGTGGACAATCTGAAG
A P A E L D K I A K Y F Q D L V D N L K
AACGTTGAGGGTGTGAGCTGGCCAACAAGGCAATGCTTACCTGGAGCAGAGCAGAGCT
N V E G A E L A N K A N A Y L E Q S R A
CAGTTTCAGCCCATGGTTGAGAAGCTCCAGGAGCAGCTGAAGCCCTTCTCCGGCAACATC
Q F Q P M V E K L Q E Q L K P F S G N I
GAAGAGCAGATCAAGCCTCTGGCTGCCTCCGTCCAGTCTCAGGTTGCCCGCTGGCCGGT
E E Q I K P L A A S V Q S Q V A P L A G
ATGGTCCAGACCCACGTTGAGGACATGATCAAATTTGTTGCTGACCAGGCCAAAGCCATG
M V Q T H V E D M I K F V A D Q A K A M
CTGCCACCTCAGTAAACCCAAATCGAATCCCNCGGCCGCCATGGNGCCGGGANCATGC
L P P Q -

```

그림 7. 제브라피쉬 10hr cDNA로부터 분리한 AFP 유전자와 염기서열 분석

분리한 제브라피쉬 AFP 유전자의 아미노산과 가장 유사한 넙치 (Flounder)간에 상동성을 비교하였다. 그 결과 60%의 상동성을 보였다 (그림 8).

```

FlounderAFP      MKFSLIAAVALLALAQGS-----FAQDAADLEKITQYFENLKNKMTEDVTAFLNNQDVA 54
ZebraAFP         MKFSLIA-VIVVALAIGSESASLVKRDAPAE LDKIAKYFQDLVDNLKN-----VEGAELA 54
***** *  :*** **          : .*:*.***:***:* * :*** :.. :**

FlounderAFP      NQAQTFMQERKTQLEPLATQIQEQLRAAATKFEEHITPLAANV----QPVVENFQQQMEA 110
ZebraAFP         NKANAYLEQSRAQFQPMVEKLQEQLKPFSGNIEEQIKPLAASVQSQVAPLAGMVQTHVED 114
*:*:***** :*:***. :*****. : :*:*.***.* *.. .* :**

FlounderAFP      LVQKLMEKTRSISN--- 124
ZebraAFP         MIKFVADQAKAMLPPQ- 130
::: : :*****

```

그림 8. 제브라피쉬와 넙치간에 AFP 유전자의 상동성 비교

AFP 유전자의 생체 내 발현 양상을 확인하기 위해 pGEM T-easy vector 내의 형질전환 유전자를 Pst I 으로 linear form을 만들고, vector내에 존재하는 promoter를 이용하여 *in vitro* transcription을 통해 mRNA probe를 합성하였다. 인공적으로 합성한 mRNA probe로 24hr zebrafish embryo stage에 whole-mount *in situ* hybridization방법을 이용하여 유전자의 발현 여부를 확인하였다. 그 결과 AFP 유전자가 yolk에서만 발현하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 9).

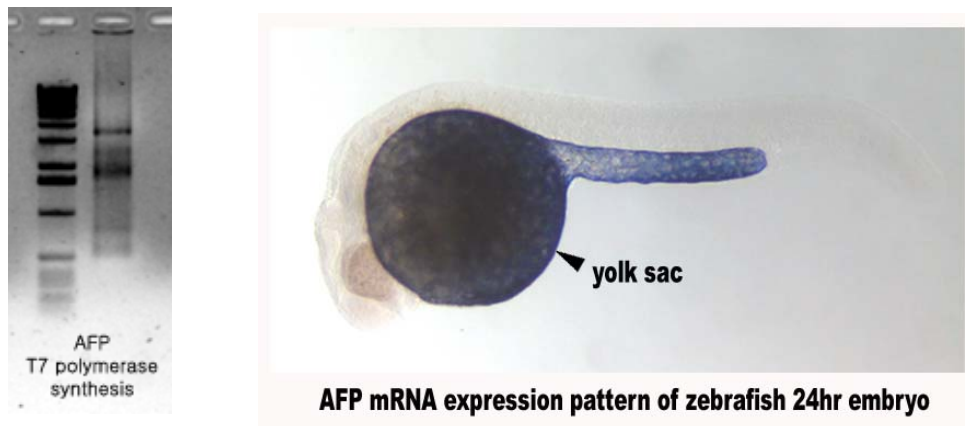
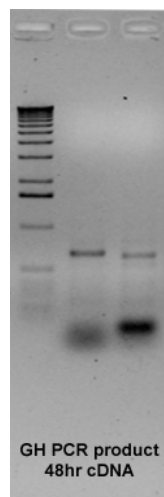


그림 9. *in vitro* transcription을 통한 Dig-RNA labelling된 AFP mRNA 합성결과 와 Whole-mount *in situ* hybridization을 이용한 AFP 유전자의 발현 양상을 관찰한 결과 yolk에서 발현하는 것을 확인 (arrowhead)

3) GH (Growth Hormone)

제브라피쉬에서 growth hormone 유전자를 분리하기 위해 NCBI database를 검색하여 AY286447 이라는 partial clone를 얻었다. 이를 바탕으로 ensembl zebrafish database를 통해 full length cDNA의 염기서열을 확인하였고, 다른 모델동물에서 밝혀진 염기서열과 상동성을 비교하였다. 각각 유전자의 ORF (open reading frame)를 포함하는 forward, reverse primer를 제작하고 이를 제브라피쉬의 48hr cDNA library를 이용하여, RT-PCR을 수행하여 약 650bp 되는 full length의 GH 유전자를 분리하였다. 분리한 GH 유전자 염기서열을 확인하기 위해 TA vector에 클로닝하여 염기서열을 확인하였다 (그림 10).



```

TTGGACAAAATGGCTAGAGCATTGGTGTCTGTGCAGTTGGTGGTGGTTAGTTTGTCTGGTG
      M A R A L V L L Q L V V V S L L V
AATCAGGGGAAAGCCTCCGAAAACCAGGGCTCTTCAGCAAAGCAGTCATCCGTGTGCAA
N Q G K A S E N Q R L F S N A V I R V Q
CACCTTCACCAGCTGGCTGCAAAAATGATTAACGACTTTGAGGAAGGTCTTATGCCTGAG
H L H Q L A A K M I N D F E E G L M P E
GAACGCAGACAGTTGAGTAAAATCTTCCCTCCGTGCTTCTGCAACTCTGACTCCATCGAG
E R R Q L S K I F P P S F C N S D S I E
ACGCCGACGGGAAAAGATGAAAACGAAAAAGCTCTATGTTGAAGCTGCTTCGTATCTCT
T P T G K D E T Q K S S M L K L R I S
TTCCGCCTCATTGAATCCTGGGAGTTTCCAGCCAGACCTTGAGCTCCACTATCTCAAAC
F R L I E S W E F P S Q T L S S T I S N
AGCCTGACCATCGGAAACCCCAACCAATCACTGAGAAACTGGCGGACCTGAAAATGGGC
S L T I G N P N Q I T E K L A D L K M G
ATCAGCGTGTCTCATCAAGGGATGTCTCGATGGACAGCCAAATATGGATGACAACGACTCC
I S V L I K G C L D G Q P N M D D N D S
CTGCCGTTGCTTTTGGAGATTCTACCTGACCGTAGGGGAGACCAGTCTCAGAGAGAGC
L P L P F E D F Y L T V G E T S L R E S
TTTCGCCTGTGGCTGCTTCAAGAAGGACATGCACAAGGTGGAACCTTACCTGAGGGTT
F R L L A C F K K D M H K V E T Y L R V
GCGAATTGCAGGAGATCTCTGGATTCCAACGTACCTGTAGAGGGCGCCAATGTATTGC
A N C R R S L D S N C T L -
TAGTCAAAGCC
    
```

그림 10. 제브라피쉬 48hr cDNA로부터 분리한 GH 유전자와 염기서열 분석

제브라피쉬에서 분리한 210개의 GH 아미노산이 다른 질병모델 동물과의 상동성을 비교하기 위해 NCBI database에서 인간 (human), 마우스 (mouse), 연어 (salmon), 무지개 송어 (rainbow trout), 잉어 (Megalobrama

amblycephala)의 GH 아미노산을 검색한 후 각각의 염기서열을 이용하여 ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)에서 상동성을 비교하였다. 그 결과 종마다 차이는 있지만, 제브라피쉬의 경우 다른 종보다는 잉어와 유사성이 높다는 것을 알 수 있었다 (그림 11).

```

hGH      MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRFLFDNAMLRAHRLHQALAFDYYQEFEEA 60
mGH      MATDSRTSWLLTVSLLCLLWPQEASAFPAMPLSSLFSNAVLRRAQHLLQALADTYKELEA 60
sGH      ----MGQVFLLMPLVLLVSCFLSQGAAMENQ---RLFNIAVNRVQHLLHMAQKMFNDFEGT 53
rtGH     ----MGQVFLLMPLVLLVSCFLSQGAAIENQ---RLFNIAVSRVQHLLHLLAQKMFNDFDGT 53
maGH     ----MARALVLLSVLVSLVNQGTASENQ---RLFNNAVIRVQHLLQLAAKMINDFEDN 53
zGH      ----MARALVLLQLVSVSLVNQKASENQ---RLFSNAVIRVQHLLQLAAKMINDFEEG 53
          ::      :*      ::      .:. *      . : ** . * : *.:** :* . ::::

hGH      YIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLR 120
mGH      YIPEGQRYS-IQNAQAACFCFSETIPAPTGKEEAQQRTDMELLRFSLLLIQSWLGPVQFLS 119
sGH      LLPD-ERRQLNKIFLLDFCNSDSIVSPIDKLETQKSSVLKLLHISFRLIESWEYPSQTLT 112
rtGH     LLPD-ERRQLNKIFLLDFCNSDSIVSPVDKHETQKSSVLKLLHISFRLIESWEYPSQTLI 112
maGH     LLPE-ERRQLSKIFPLSFCNSDSIEAPTQKDETKSSMLKLLRISFRLIESWEFPSQTLS 112
zGH      LMPE-ERRQLSKIFPPSFCNSDSIETPTGKDETKSSMLKLLRISFRLIESWEFPSQTLS 112
          :*. :: . :      :* **:* * .: *: : : **: : : : **: : : : ** * * *

hGH      SVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLLEGIQTLMGRLEDGSPRTG---QIFKQTYSKFDTNH 177
mGH      RIFTNSLMFGTSDR-VYEKLDLEEGIQALMQELEDGSPRVG---QILKQTYDKFDANMR 175
sGH      --ISNSLMVRNSNQ-ISEKLSDLKVGINLLIKGSQDGVLSLDDNDSQQLPYPGNYQNLG 169
rtGH     --ISNSLMVRNANQ-ISEKLSDLKVGINLLITGSQDGVLSLDDNDSQQLPYPGNYQNLG 169
maGH     GAISNSLTVGNPNQ-ITEKLADLKVGISVLIKGLDGPMDENDS LPLP-FEDFYLTMG 170
zGH      STISNSLTIGNPNQ-ITEKLADLKMGISVLIKGLDGPMDENDS LPLP-FEDFYLTVG 170
          :::**      .: : : * ** : ** . *      ** . .      .: :. .

hGH      NDDALLKNYGLLYCFRKMDKVFETFLRIVQCR-SVEGSCGF 217
mGH      SDDALLKNYGLLSFCFKDLHKAETYLRVMKCRRFVSSCAF 216
sGH      GDGNVRRNYELLACFKKDMHKVETYLTVAKRKSLANCTL 210
rtGH     GDGNVRRNYELLACFKKDMHKVETYLTVAKRKSLANCTL 210
maGH     -ESSLRESFRLACFKKDMHKVETYLRVANCRRSLDSNCTL 210
zGH      -ETSLRESFRLACFKKDMHKVETYLRVANCRRSLDSNCTL 210
          .: : : : ** **:*:*:*:* * : ** : : : ** : : : *
  
```

그림 11. 제브라피쉬 GH 유전자와 다른 종간에 유사성 비교 h; human, m; mouse, s; salmon, rt; rainbow trout, ma; Megalobrama amblycephala, z; zebrafish

제브라피쉬에서 분리한 GH 유전자의 생체 내 발현 양상을 확인하기 위해 pGEM T-easy vector내의 형질전환 유전자를 Nco I 으로 linear form을 만들고, vector내에 존재하는 promoter를 이용하여 *in vitro* transcription을 통해 mRNA probe를 합성하였다. 인공적으로 합성한 mRNA probe로 48hr zebrafish embryo stage에 whole-mount *in situ* hybridization 방법을 이용하

여 유전자의 발현 여부를 확인하였다. 그 결과 GH 유전자가 뇌의 배쪽에 존재하는 뇌하수체 (pituitary)에서 발현하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 12).

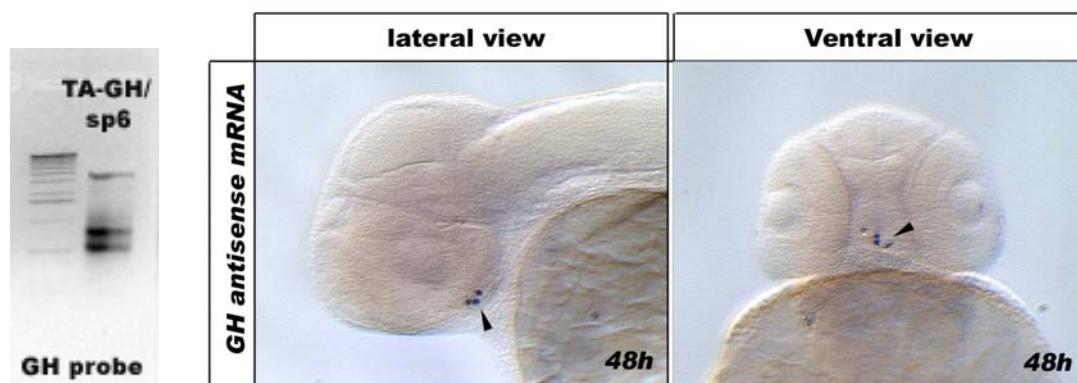


그림 12. in vitro transcription을 통한 Dig-RNA labelling된 GH mRNA 합성결과 와 Whole-mount in situ hybridization을 이용한 GH 유전자의 발현양상을 관찰한 결과 뇌하수체에서 발현하는 것을 확인 (arrow head)

분리한 제브라피쉬 GH 유전자를 생체에서의 기능을 알아보기 위해 발현벡터인 CS2+ 벡터의 EcoR I site에 클로닝하였다 (그림 13). 그리고 어항에 키우면서 wild type과의 표현형을 관찰 비교하였으나, 아직까지는 뚜렷하게 차이나는 점을 관찰 할 수가 없었다.

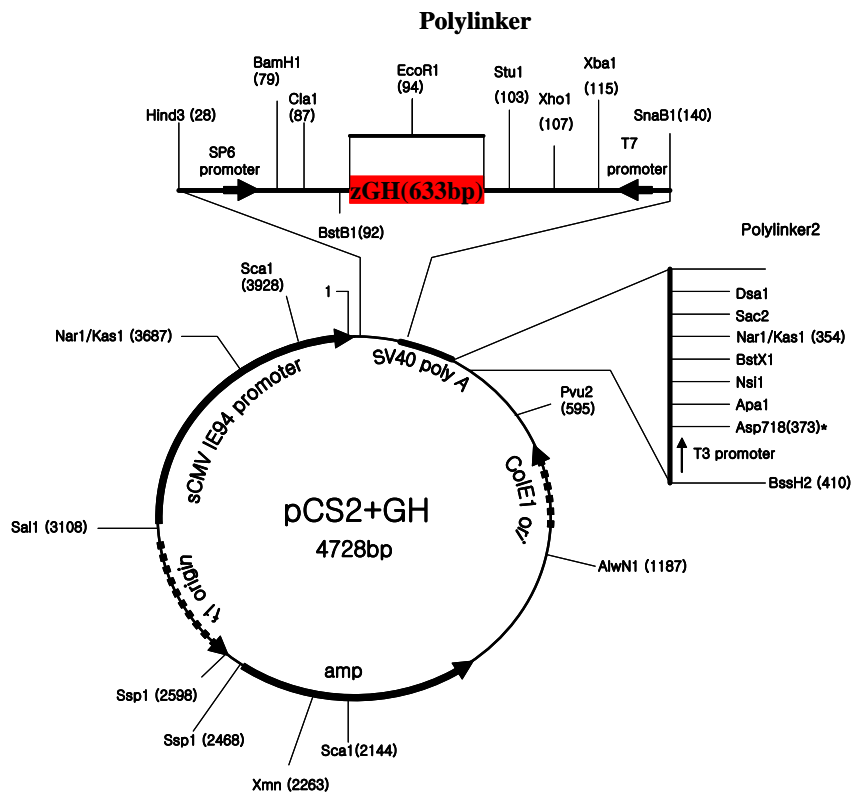


그림 13. GH 발현 벡터 모식도

그래서 제브라피쉬에 주입한 CS2+ GH 의 transcript를 확인하기 위해 injection 한 발생 배를 24시간째에 4% paraformaldehyde로 고정 한 후, 이를 GH antisense mRNA를 이용하여 Whole-mount in situ hybridization 방법으로 주입된 GH의 mRNA를 확인하였다. 그 결과 발생 40hr에 발현하는 GH가 non-injected 발생 배에서는 발현을 하지 않았고, injected 발생 배에서는 GH가 모자이크으로 여러 조직에 발현하는 것을 확인하였다 (그림 14).

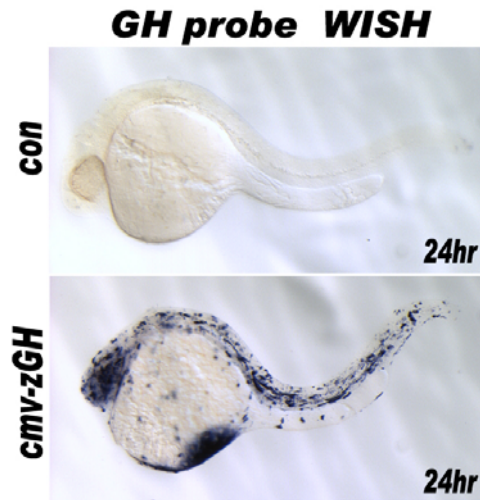


그림 14. CS2+ GH 를 주입한 개체와 wild type을 GH antisense mRNA를 이용하여 발현 양상 확인

이미 성장 호르몬의 활성을 확인한 미꾸라지의 beta-actin promoter와 GH를 제브라피쉬에서 확인하기 위해 다음의 발현백터를 1세포기의 발생배의 세포질에 미세주입을 하였다 (그림 15).

그 결과 미꾸라지의 GH가 모자이크으로 발현하는 개체를 육안으로 확인하였고, 그 개체들을 모아서 무게를 측정하였다. 미꾸라지의 GH가 주입된 개체 중 암컷 2마리, 수컷 3마리와 GH가 주입되지 않은 대조군 개체의 암컷과 수컷의 개체수를 실험군과 동일하게 하여 저울에 무게를 측정한 결과 대조군 개체의 무게는 평균 $n=0.7g$ 이고, 미꾸라지의 GH가 주입된 실험군의 무게는 $n=1.4g$ 으로 조사되었다. 이 결과는 대조군보다 미꾸라지의 GH가 주입된 실험군에서 2배 이상의 성장률을 보인 것으로 생각된다 (그림 16).

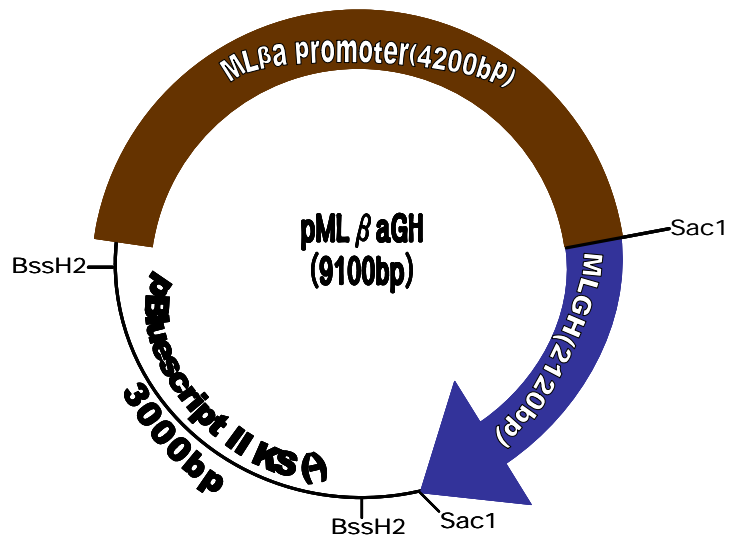


그림 15. 제브라피쉬에 미세주입한 미꾸라지의 GH 발현벡터. 미꾸라지에서 분리한 4.2 kb의 beta-actin promoter와 2.1 kb의 growth hormone이 pBluescript II KS(-) 벡터에 삽입되어 있다.



그림 16. 미꾸라지 GH가 주입된 실험군(아래)과 대조군(위)

(2) MCH를 이용한 형질전환 유전자의 발현 모니터링 시스템 개발

일반적으로 형질전환 유전자의 모니터링은 genomic DNA에 대해 PCR 방법

으로 확인하거나, 최근에는 해파리 유래의 초록형광유전자 (GFP)가 활용되어지고 있다. 본 과제의 주요 목표의 하나는 기존의 모니터링 시스템보다 훨씬 간단하고 효과적인 시스템을 개발하는 데 있다. 그래서 제브라피쉬에서 분리한 생체 조절물질 중 어류의 체색을 조절하는 호르몬인 MCH (Melanin Concentrating Hormone)를 이용하여 형질전환동물의 검색을 위한 실험을 수행하고자 한다. 현재 많이 응용되어지고 있는 GFP 유전자의 경우에는 기본적으로 발색을 위하여 형광 현미경이 필요하나, MCH의 경우에는 단지 육안, 즉 체색의 변화만으로도 형질전환동물의 식별이 가능하기 때문에 LMO개발과 관리, 유지에 획기적인 기술로 응용될 수 있을 것이다. 그러므로 MCH 유전자 도입을 위해서는 여러 가지 발현벡터들이 비교연구 될 것이다. 그래서 우리는 필요한 경우에만 열충격 방법으로 형질전환 유전자의 발현을 유도할 수 있는 제브라피쉬 hsp (heat shock promoter)에 대한 연구를 수행하였다.

이러한 실험은 LMO개발 이후에 예상되는 LMO의 환경방출 및 안정성 평가에 효율적인 방법을 제시하게 될 것이다.

우리는 우선적으로 열충격을 가하면 유전자의 발현을 유도하는 heat shock promoter를 이용하고, 체색을 조절하는 호르몬인 MCH를 reporter로 함으로써 형질전환 동물의 식별에 대해 새롭고 획기적인 형질전환 유전자 발현 모니터링 시스템을 개발하고자 하였다.

먼저, 우리는 열충격을 가하면 유전자 발현을 유도하는 heat shock promoter와 제브라피쉬에서 분리한 MCH 유전자를 클로닝하여 hsp-MCH 벡터를 제작하였다 (그림 17).

그리고 이미 개발한 hsp-GFP 벡터를 이용하여 열충격에 대한 heat shock promoter의 활성 조건을 조사하였다. 그 결과 40°C에서 1시간동안 heat shock를 주면 heat shock promoter의 활성을 형광 현미경 하에서 GFP 단백질을 확인함으로써 조사하였다 (그림 18).

그래서 hsp-GFP 벡터와 hsp-MCH 벡터를 1 : 3 의 비율로 최종 농도를 100 ng/ul로 하여 제브라피쉬 발생배의 1세포기 때에 microinjector를 이용하여 주입하였다. 그리고 발생 34hr 쯤에 열충격을 주고, 2시간 뒤에 관찰하였다 (그림 18).

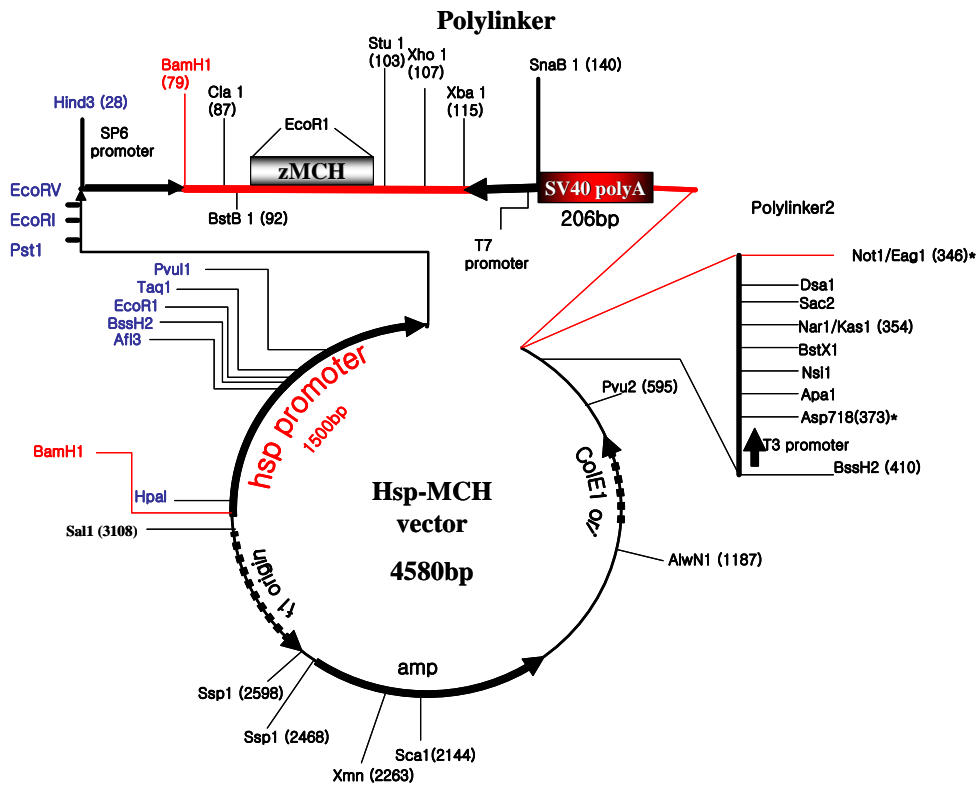


그림 17. heat shock를 가하면 MCH 유전자의 발현을 유도하는 벡터제작

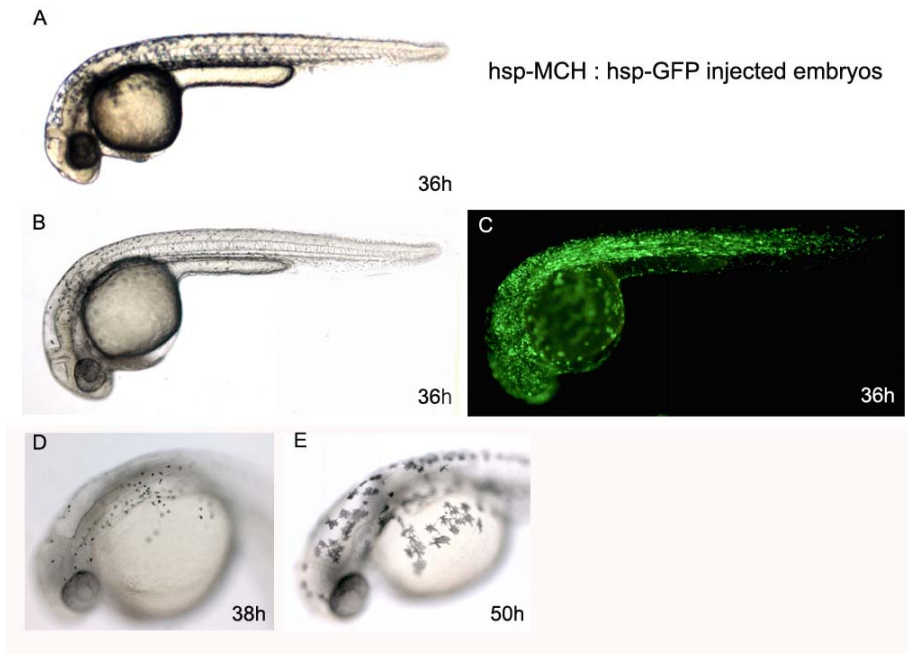


그림 18. hsp-MCH와 hsp-GFP가 주입된 발생배를 수정 후 34hr째에 열충격을 주고 난 뒤 광학 현미경과 형광 현미경하에서 관찰 A. wild type B-E. hsp-MCH : hsp-GFP 벡터가 미세주입 된 개체를 열충격 후에 관찰 B. 광학 현미경 C. 형광 현미경 D. 열충격 후 4hr E. 열충격 후 14hr

대조군이 A와는 달리 B-C를 보면 hsp-MCH와 hsp-GFP 벡터가 주입된 발생배를 열충격 후 관찰한 결과 체색이 희게 된 표현형을 확인할 수 있었고(B), 형광 단백질의 발현도 확인할 수 있었다. D와 E를 보면, 열충격 준 후에 4시간째 체색이 희게 된 개체가 12시간이 지나면 흑색색소포가 정상적으로 발생하는 것을 확인하였다 (그림 18).

그리고 hsp-MCH : hsp-GFP 가 주입된 개체의 형질전환을 확인하기 위해 3개월 뒤 wild type과 교배하였다. 그중 형질전환 유전자가 미세주입 된 암컷 한 마리로부터 얻은 150여마리의 F1 세대를 발생 50시간에 열충격을 주고 10시간 후에 관찰하였다. 그 결과 30마리가 죽고 120마리가 살아남았는데, 그중 43마리에서 형질전환 유전자의 발현을 확인할 수 있었다. 그러나 coinjection한 GFP는 관찰되지 않았다 (그림 19).

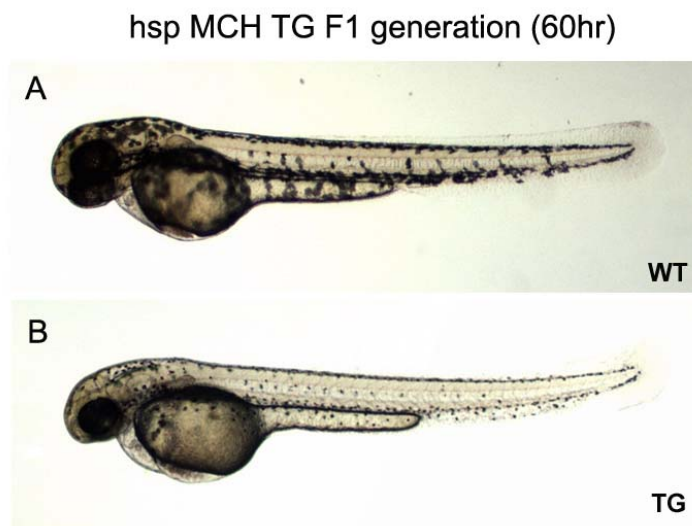


그림 19. hsp-MCH가 형질전환 된 개체의 F1 세대에서 열충격 후의 표현형

(3) 형질전환 개발 기술 확립 및 평가모델 실험어 개발

- DNA microinjection을 통한 형질전환동물 제작시 안정적인 형질전환 어류 개발의 효율성이 낮다. 이것은 미세주입기를 통한 형질전환 유전자를 발생배의 1 세포기때 0.1M KCl이 들어있는 phenol red와 혼합하여 세포질에 주입을 하면, 주입된 형질전환 유전자들은 다시 핵속으로 이동하여 염색체에 들어가게 되고, 염색체가 삽입 된 세포들이 분열을 통해서 하나의 개체로 발생하는데, 이때 안정적인 형질전환 어류를 만들기 위해서는 형질전환 유전자가 그 개체의 germline cell(생식 세포)에 들어가야 한다. 이런 DNA microinjection을 통한 형질전환 유전자의 형질전환 확률은 지금까지의 연구 결과에 의하면 매우 낮은 성공률을 보이는 것으로 알려져 있다.

그래서 우리는 I-Sce I 이라는 meganuclease를 이용하여 형질전환 개발기술의 효율을 높일 수 있는 벡터 시스템을 개발하고자 하였다. meganuclease는 yeast에서 분리한 효소로써 18bp의 염기서열을 인식하여 자르게 되고, 이러한 meganuclease의 효율은 2002년 Jean-stephane Joly에 의해 medaka에서 밝혀졌다. 이들은 meganuclease를 이용하여 형질전환 어류를 제작하였을 시에 30%의 높은 형질전환 효율을 보였다고 한다. 이 meganuclease는 발생배의 세포질에서 transgene을 linear form으로 잘라주고 염색체에 효율적으로 삽입될 수 있게 도와주는 역할을 한다. 그래서 우리는 동물의 모든 세포에서 발현하는 CMV promoter가 존재하는 벡터와 열충격에 의해 유전자의 발현을 유도하는 heat shock promoter가 존재하는 벡터에 Not I, Sal I 제한 효소 인식부위를 이용하여, meganuclease염기서열을 삽입한 효율적인 형질전환 시스템을 개발하였다 (그림 20).

현재 이 벡터에 원하는 형질전환 유전자를 삽입하여 meganuclease 효소와 섞어 발생배의 1 세포기 때 미세 주입하여 좀 더 효율적인 형질전환 어류를 제작하기 위한 실험을 진행 중에 있다.

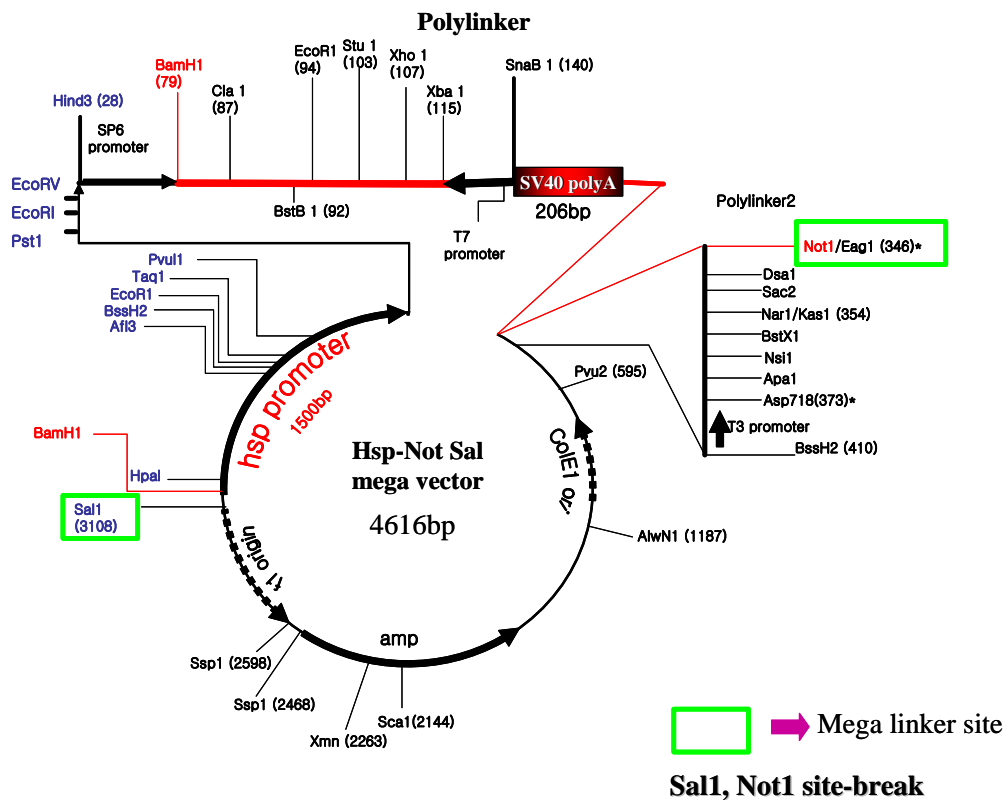
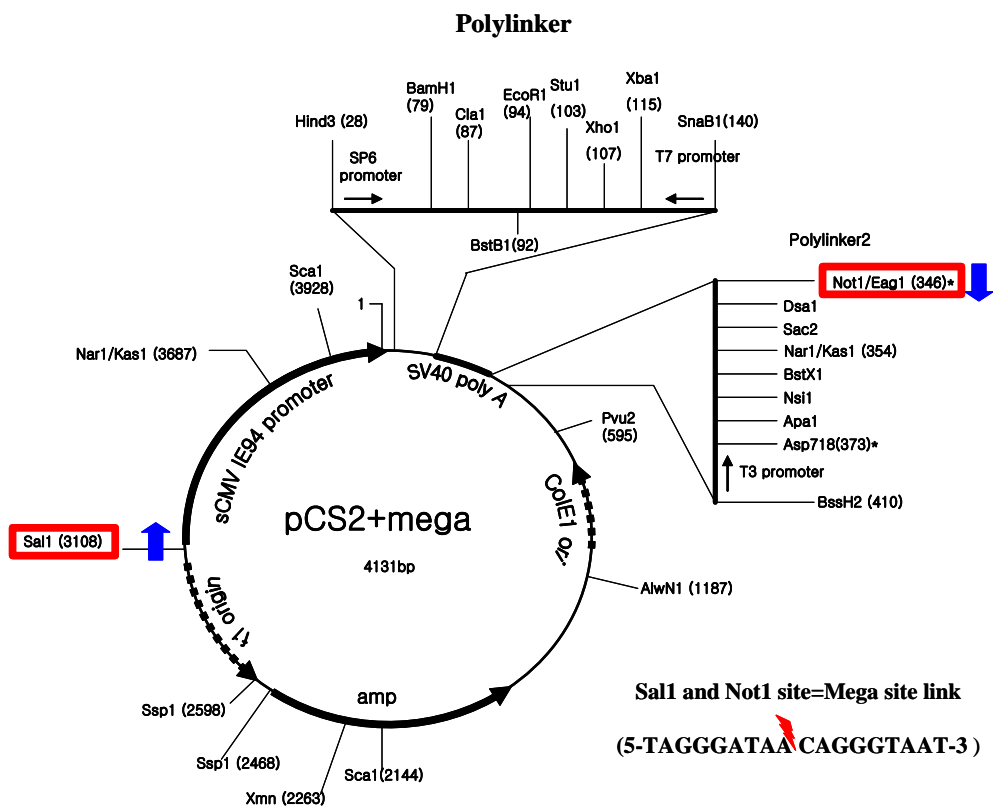


그림 20. 형질전환 개발기술의 효율을 높일 수 있는 벡터 시스템을 개발

(4) 형질전환 유전자의 환경 위해성 및 안정성 평가기술 확보

어종의 형질을 향상시킬 수 있는 새로운 유전자의 확보가 이루어지면 적당한 발현벡터가 선택되어야 하며, 모델 동물을 통하여 유전자의 발현특성을 먼저 확인해 보아야 한다. 먼저 우리는 제브라피쉬의 생체조절물질에 대한 형질전환 유전자를 검색하고 이 유전자를 T-vector에 클로닝 하였다. 그리고 이 형질전환 유전자의 염기서열을 확인하여 다른 질병모델동물에서 밝혀진 염기서열과 상동성을 비교하였다 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). 상동성을 확인한 pGEM-T easy vector내의 형질전환 유전자를 vector에 존재하는 promoter를 이용하여 *in vitro* transcription을 통해 mRNA probe를 합성하였고, 인공적으로 합성한 mRNA probe로 특정 zebrafish embryo stage에 whole-mount *in situ* hybridization방법을 이용하여 유전자의 발현 여부를 확인하였다. 이렇게 제브라피쉬의 생체조절물질에 대한 형질전환 유전자의 발현 여부를 확인하고, 제브라피쉬 생체내에 안정성을 조사하기 위해 발현벡터인 pCS2+ vector와 필요한 경우 즉, 열충격에 의해 형질전환 유전자의 발현을 유도할 수 있는 heat shock promoter 가 존재하는 vector에 클로닝하여 이 DNA를 미세유전자주입기 (microinjector)를 이용하여 약 100 pg 정도의 DNA를 제브라피쉬 수정란의 1세포기의 세포질에 주입하였다. 그 결과 우리가 분리한 세 개의 생체조절물질에 대한 제브라피쉬 발생배에서의 안정성에 대한 기작은 발생이 매우 빠르기 때문에 유전자를 주입한 당일에도 함께 도입한 GFP 유전자의 발현을 통해 확인이 가능하였고, 바로 다음날에 유전자의 발현에 따른 발생상의 특성을 검정할 수 있다. 또한 이러한 시스템을 바탕으로 GFP나 MCH를 이용한 유전자 발현 모니터링 시스템을 통해 안정된 LMO의 선별이 가능하며, 이를 바탕으로 세대교체에 따른 유전자의 발현특성 및 안정성에 대한 연구도 동시에 진행될 수 있을 것이다.

IV. 결 론

우리는 NCBI database와 zfin database를 검색하여 제브라피쉬 유래의 생체조절물질을 조사하였다. 그중 MCH와 AFP, GH의 full length cDNA를 분리하였고, 타종간에 상동성을 비교하기 위해 염기서열을 분석하였다. 그 결과 제브라피쉬 즉, 어류에서부터 고등 동물인 mammalian까지 유전자 염기서열측면에서의 상동성에는 진화적인 측면을 무시할 수는 없지만, 각각의 유전자의 기능은 상당히 유사하다는 것을 whole-mount *in situ* hybridization 방법을 통해서 확인할 수 있었다. 그리고 생체조절물질에서 분리한 MCH 유전자를 이용한 형질전환 동물의 모니터링 시스템은 지금까지 연구해온 GFP나 CAT과는 전혀 다른 개념으로 우리가 육안으로 형질 전환 여부를 확인할 수 있었다. 우리가 필요한 경우에만 형질전환 유전자의 발현을 유도할 수 있는 heat shock promoter를 이용하고 여기에 손쉽게 육안으로 확인할 수 있는 MCH 유전자를 이용하여, 열충격 방법으로 F1 세대에서 형질전환 된 개체를 식별할 수 있었다. 뿐만 아니라 형질전환 개발 기술 확립을 위해 형질전환의 효율을 높일 수 있는 벡터 시스템을 개발하였다. 이 시스템은 이미 medaka에서 형질전환 효율이 높음을 확인하였고, 이에 우리는 모든 세포에 발현하는 CMV promoter가 존재하는 vector와 열충격에 의해 유전자의 발현을 유도하는 heat shock promoter가 존재하는 vector에 meganuclease site를 link시켜 형질전환 효율을 높일 수 있는 벡터 시스템을 개발하였다. 그리고 우리의 실험 모델인 제브라피쉬를 이용하여 다른 어류의 생체조절 물질에 대한 환경위해성 평가 및 안정성 평가 기본 모델을 구축하기 위해 우선적으로 제브라피쉬 유래의 생체조절 물질을 분리하였다. 분리한 생체조절 물질에 대해서 다른 모델동물과 비교하여 기능을 분석하고, 제브라피쉬내에서 발현양상을 *in vitro* transcription과 Whole-mount *in situ* hybridization을 이용하여 확인하였다. 그리고 각각의 생체조절 물질에 대한 안정성을 평가하기 위해 발현벡터를 제작하고, 이를 제브라피쉬 발생배의 1세포기에 microinjector를 이용하여 주입하였다. 그 결과 각각의 생체조절 물질의 작용을 관찰할 수 있었고, 안정성에 대한 평가는 생체조절 물질에 대한 제브라피쉬의 형질전환 어류가 세대를 거쳐 안정적으로 유지되는지는 앞으로 더 지

켜봐야 할 일이다.

이렇게 제브라피쉬를 이용하여 해양수산생물체 유래의 귀중한 유전자원의 발굴하여 지적재산을 획득하고, 이를 이용한 산업적 가치가 있는 LMO의 개발과 그 안정성을 점검함으로써 향후 해양수산자원의 산업화에 크게 기여할 것이다. 그리고, 계놈연구의 결과 쏟아져 나올 수많은 신기능성 유전자들을 이용하여 부가가치가 높은 수산해양 어종을 개발하기 위해 유전자변형기술의 확립은 나아가 차후 예견되는 LMO의 심사평가 업무뿐만 아니라 LMO의 개발에 필요한 기술기반이 될 것으로 기대된다. 또한 형질전환 모델동물의 개발기술은 포스트 계놈시대의 유전체 기능연구에 중요하며 생명공학기술의 산업화의 기반으로 활용가능하게 될 것이고, 덧붙여 산업적 가치가 있는 해양수산 LMO는 직접적으로 경제적 활용이 가능하게 될 것이다.

V. 고 찰

앞으로의 포스트 계놈연구 핵심은 유전체 기능연구에 있으며, 체계적인 기능연구를 위한 동물모델의 개발 및 형질전환 동물의 제작에 필요한 새로운 기능성 유전자의 기술확보는 생명공학 전반의 기술개발에 커다란 효과를 가져 올 것이다. 특히, 발현벡터의 개발 및 새로운 유전자 발현 모니터링 시스템의 개발은 신기능성 유전자의 생체내 역할을 밝히고 나아가 산업적 가치가 있는 LMO의 개발기술과 직접적으로 연관이 있다고 할 수 있다. 이는 우수한 연구인력 양성과 인프라 구축도 확보하여, 예상 해양수산물에 대한 검색 및 해양환경 위해성 평가를 원활히 할뿐만 아니라 해양수산물 LMO의 소비 및 환경안정성을 보장할 수 있다.

* 국내 학술발표대회

2003년 한국분자세포생물학회 및 한국생화학분자생물학회 충청지역 학술발표대회

Isolation and expression pattern of the WH gene in zebrafish and construction of transgenic fish.

JUNG Seung-Hyun, YOO Kyeong-Won, KIM Cheol-Hee

Department of Biology, Chungnam National University, Daejeon, Korea.

WH gene is originally isolated from chom salmon pituitaries and is named for its role in color regulation in teleost fish, in which it is a neurohypophysial hormone. It is synthesized as a preprohormone in the pituitary and is secreted into the circulation. The organization and expression patterns of these gene are highly conserved among different species. We have cloned the zebrafish WH gene cDNA, which encodes a protein highly homologous to other vertebrate WH. By whole-mount *in situ* hybridization, we found that WH gene is expressed in the hypothalamus. Using the expression vector (CS2+CMV-WH), we have injected DNA into the cytoplasm of the fertilized eggs. And we have identified the transgenic zebrafish in which WH gene was stably transmitted in germ cell lines. In future, this transgenic line of zebrafish might be used for a genetic analysis of insertional mutagenesis. [This work was supported by grant Korea Sea Grant Program from Ministry of Maritime Affairs & Fisheries]

2003년 한국분자·세포생물학회 추계학술대회

Isolation of zebrafish MCH gene and its use in transgenesis

JUNG Seung-Hyun, YOO Kyeong-Won, KIM Cheol-Hee*

Department of Biology, Chungnam National University, Daejeon, Korea.

MCH gene is originally isolated from chom salmon pituitaries and is named for its role in color regulation in teleost fish, in which it is a neurohypophysial hormone. It is synthesized as a preprohormone in the pituitary and is secreted into the

circulation. The organization and expression patterns of these gene are highly conserved among different species. In fish, MCH gene is a cyclic 17-amino acid polypeptide with a cysteine-cysteine disulfide bond. We have cloned the zebrafish MCH cDNA, which encodes a protein highly homologous to other vertebrate MCH. By whole-mount in situ hybridization, we found that MCH gene is expressed in the hypothalamus. Using the expression vector, we have injected DNA into the cytoplasm of the fertilized eggs. And we have generated the transgenic zebrafish in which MCH gene was stably transmitted in germ cell lines. Our results suggest that expression of MCH gene provides a simple and highly efficient tool for detection of transgene. In future, this transgenic system might be used for a genetic analysis of insertional mutagenesis. [This work was supported by grant Korea Sea Grant Program from Ministry of Maritime Affairs & Fisheries]

2004년 한국분자세포생물학회 및 한국생화학분자생물학회 충청지역 학술발표대회

Cloning and expression of growth hormone in zebrafish and construction transgenic.

JUNG Seung-Hyun, YOO Kyeong-Won, KIM Cheol-Hee*

*Department of Biology, Chungnam National University, Daejeon, Korea**

The function of growth hormone in vertebrates is mainly associated with the stimulation of body growth and metabolism. The growth hormone is the most abundant hormone secreted by the pituitary gland in the brain and is important in stimulating and regulating of growth. We have cloned the zebrafish (*Danio rerio*) growth hormone that it was isolated from total mRNA of zebrafish 48h embryos using RT-PCR. The open reading frame of zebrafish growth hormone (633 bp) encodes a precursor of 210 amino acid comprising a 26 aa signal peptide and a 184 aa mature protein with four cysteine residues similar to the typical primary structure of mammalian GH precursor. Zebrafish GH shares a low degree of identity (31-38%) with that of human, rat, mouse, salmon, xenopus, but a very high identity (81%) with carp GH. By the whole-mount in situ hybridization revealed that the GH transcript was only specifically expressed in the pituitary gland of brain. Using the expression vector, we try to the growth hormone transgenic zebrafish construction but not yet do it succeeded to dramatically phenotype of growth rate in CMV-GH injected zebrafish. We will construct the GH transgenic fish, and studies on the another biological activity of zGH. [This work was supported by grant Korea Sea Grant Program from Ministry of Maritime Affairs & Fisheries]

감사의 글

본 연구는 2004년도 해양한국발전프로그램(KSGP) 연구개발사업인
기획과제로서 해양수산부의 연구비 수혜에 의하여 이루어진 것임을 밝힙니다.