

미꾸라지, *Misgurnus mizolepis*에 외래 유전자 이식 I. *lacZ*의 reporter 유전자로서의 유용성 검토*

김동수 · 남윤권

부산수산대학교 양식학과

Transfer of Foreign Gene into Mud Loach, *Misgurnus mizolepis**

I. Availability of the *lacZ* as a reporter gene for producing transgenic mud loach

Dong Soo KIM and Yoon Kwon NAM

Department of Aquaculture, National Fisheries University of Pusan,
Pusan 608-737, Korea

ABSTRACT

In order to evaluate the availability of *lacZ* as a reporter gene for producing transgenic mud loach, foreign DNA, bacterial β -galactosidase gene (*lacZ*) was microinjected into mud loach eggs and its insertion and expression were examined. X-gal based histochemical assay, fluorimetric analysis of β -galactosidase with 4-methylumbellifery1- β -D-galactoside (MUG) and molecular biological examination using polymerase chain reaction (PCR), dot blot, southern blot and sequence analysis of PCR products were carried out to analyze both microinjected group and non-injected controls. The results are discussed in this paper.

서 론

어류에 있어 유전자 이식은 최근 몇가지 방법론이 개발되어 있기는 하나, 주로 수정란의 1세포기 또는 난할 초기에 미세현미주입 (microinjection) 방법을 이용, 유용 유전 인자를 직접 수정란의 핵 속에 넣어 그것이 발현되게 함으로써 궁극적으로 chimeric 어류를 생산하고자 하는 것이다. 1984년 최초로 무지개송어를 대상으로 어류에 있어 유용 유전자 이식이 시도된 이래 (Maclean and Talwar 1984) 이제까지 인간 또는 소의 성장 호르몬 유전자를 위시한 몇몇 유용 유전자와 reporter 유전자의

* 본 논문은 교육부 학술진흥재단 1993년도 유전공학 연구비 (과제번호 118-1) 및 해양산업개발 연구센터 (RCOID) 연구비 지원에 의해 수행되었음.

이식이 시도되고 있다 (Chen and Powers 1990 ; Maclean and Penman 1990). 그러나 어류에 대한 유전자 이식은, 최근들어 시도되기 시작한 학문 분야이며, 더우기 어류가 포유류와는 다른 여러 생리, 생화학적 특징을 갖고 있어 아직껏 어류의 유전자 이식을 위한 분자생물학적 기법이 잘 정착되어 있지 못한 실정이다. 따라서 현재까지 어류를 대상으로 수행되어 온 유전자 이식은 몇몇 어종 및 유전자를 제외하면 대부분 model 어종을 가지고 분석이 용이한 reporter 유전자의 이식이 시도되고 있다 (Ozato et al. 1986 ; Chong an Vielkind 1989 ; Stuart et al. 1990).

β -galactosidase gene (*lacZ*)은 *E. coli*의 lactose operon에 관여하는 유전자로서 이의 산물인 β -galactosidase는 여타 유전자 산물에 비해 분석이 용이하며 포유류 뿐만 아니라 (Gording et al. 1987 ; Wolff et al. 1989) 식물 (Teeri et al. 1989 ; Teeri and Herrera-Estrella 1991) 등 여타 유전자 이식에 널리 사용되어 온 reporter 유전자이다. 어류의 유전자 이식 연구도 예외는 아니어서 McEvoy 등(1988)이 본 유전자를 reporter gene으로 사용, 연어과 어류를 대상으로 한 유전자 삽입 및 발현을 보고한 이래, 무지개송어, 잉어, zebrafish 및 chinook salmon 등에서도 β -galactosidase gene을 이식후 이의 삽입 또는 발현을 조사한 바 있다 (Hansen et al. 1991 ; Inoue et al. 1991 ; Bayer and Campos-Ortega 1992 ; Sin et al. 1993).

본 연구는 담수식용 어종인 미꾸라지, *Misgurnus mizolepis*에 외래 유용 유전자 이식을 위한 연구의 일환으로 bacterial β -galactosidase gene을 reporter gene으로 사용, 미꾸라지에 이식함으로써 미꾸라지에 있어 *lacZ*의 reporter gene으로서의 유용성을 검토하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

1-1. 실험어

미꾸라지 (*Misgurnus mizolepis*)는 부산수산대학교 어류육종학 실험실에서 사육하고 있는 개체들을 이용, Kim 등(1992)의 방법에 의거하여 난의 성숙 및 산란을 유도한 후 유전자 이식의 재료로 사용하였다.

1-2. 유전자

본 연구에서 사용된 유전자는, 무지개송어에서 Inoue 등(1991)이 이미 reporter 유전자로 사용한 바 있는 fusion gene인 *pmiwZ* (JRCB deposit No. VE 052)를 사용하였다 (Fig. 1). 유전자 이식에 사용할 plasmid의 준비를 위해 LB 배지를 이용, *pmiwZ*를 함유하고 있는 transformed bacteria를 37 C에서 배양한 후 기존의 alkaline lysis-phenol/chloroform extraction의 miniprep 방법을 수행하여 plasmid를 분리하였다. 이후 Gene Clean Kit (BIO 101 Co., USA)를 이용, 순수한 plasmid를 분리 정제하여 실험에 사용하였다.

2. 방법

2-1. 유전자 이식

성숙한 미꾸라지 암컷 친어로 부터 난을 얻은 후 해부현미경 하에서 micromanipulator를 이용, 10 ug/ml의 농도로 TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) buffer에 녹여진 DNA용액 20 nl를 수 정난에 미세현미주입하였다. 미세현미 주입 처리가 끝난 처리군 및 대조군의 난은 25°C의 항온 수조에 옮겨 부화시켰다.

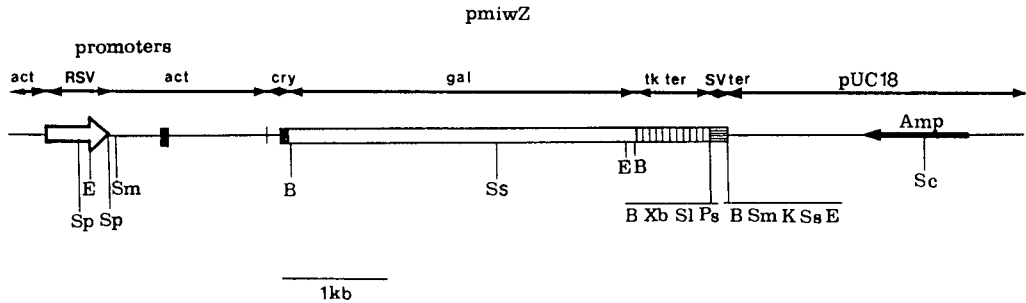


Fig. 1. Partial restriction map of *pmiwZ* containing bacterial β -galactosidase gene.

β -Actin (*act*) and δ -crystallin (*cry*) sequences are shown and their exon sequences by solid boxes. Bacterial sequence (*gal*) is indicated by open box, HSV-tK sequence by box with vertical stripes, SV40 sequence by box with horizontal stripes, and the RSV LTR sequence by open arrow. Restriction sites : B, BamHI ; E, EcoRI ; K, KpnI ; Ps, *pst*I ; Sc, *Sca*I ; S1, *Sal*I ; Sm, *Sma*I ; Sp, *Sph*I ; Ss, *Sst*I ; Xb, *Xba*I.

2-2. 부화율 및 초기생존률

미세현미 주입에 의한 외래 유전자 주입 후 각 실험 반복군의 부화율 및 난황 흡수까지의 초기 생존율을 Kim 등 (1994)의 방법에 따라 대조군과 비교하였다.

2-3. X-gal 염색 분석

유전자 이식 처리된 실험군 및 대조군의 부화 1일된 미꾸라지 자어를 대상으로 X-gal 염색 분석을 통하여 β -galactosidase의 발현 및 활성을 분석하였다. X-gal 염색 및 분석은 Inoue 등 (1991)의 방법을 약간 수정하여 실시하였다. 부화 1일된 개체를 PBS로 2회 세척한 후 1.25% glutaraldehyde에 3시간 고정하였다. 고정된 개체들을 PBS로 15분씩 3회 세척 후 X-gal 염색 용액 (1.2 mM 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside, 0.1% Triton X-100, 1 mM $MgCl_2$, 6 mM $K_4 [Fe (CN)_6]$, 6 mM $K_3 [Fe (CN)_6]$ in PBS)을 이용 37°C에서 3시간 동안 반응시켰다. 염색 반응이 완료된 후 다시 PBS로 3회 세척하고 70% ethanol에 보관하면서 염색 부위 및 염색 정도를 해부현미경 하에서 관찰하였다.

2-4. 4-Methylumbelliferyl- β -D-galactoside (4-MUG) 분석에 의한 β -galactosidase의 활성도 조사

부화 2일된 개체를 대상으로 대조군 및 처리군에서 각각 20마리 씩을 선택하여 MUG 분석을 수행하였다. 분석 방법은 McEvoy 등 (1988)의 방법에 의거하였다. 처리군 및 대조군에서 무작위로 추출한 각 부화 자어를 0.3 ml의 buffer A (10 mM sodium phosphate, pH 7.0 containing 0.1 M NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 0.1% BSA)에 넣고 homogenization을 1분간 수행하였다. homogenization이 완료된 시료에 50 μ l의 substrate solution (0.5% 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside in N'-N-dimethylformamide)을 첨가 후 30°C에서 1시간 방치하여 반응을 유도하였다. 1시간 반응 후 2.5 ml의 stopping buffer (0.1 M glycine-NaOH, pH 10.3)를 넣어 반응을 종료시키고 증류수에 1 : 100으로 희석하여 fluorimeter로 fluorescence unit를 측정하였다.

2-5. Polymerase chain reaction (PCR)

β -galactosidase 유전자의 삽입 여부를 조사하기 위해 대조군 및 처리군의 부화 후 3개월된 개체

각각 30마리씩을 무작위 선택하여 분석을 실시하였다. 각 개체로부터 지느러미 또는 미부정맥으로부터 약 5 μ l의 혈액을 채취한 후 DNA를 추출하여 PCR 분석에 사용하였다. PCR 반응은 50 μ l의 reaction cocktail (10 X PCR buffer 5 μ l, 2 mM dNTPs 5 μ l, 0.1 μ g/ μ l each primer 1 μ l, 25 mM MgCl₂ 5 μ l, H₂O 31.5 μ l, 2.5 unit Taq DNA polymerase)을 만든 후 genomic DNA를 넣어 94°C 1분, 63°C 1분 및 72°C 1분간 30 cycle을 수행하였다. 본 실험에 이용된 primer는 합성된 oligonucleotide인 L106 (5'-CGC CTT GCA GCA CAT CCC CC-3')과 L108 (5'-CTG CCG TCA CTC CAA CGC AG-3')이었다.

2-6. Dot blot 분석

유전자 이식 처리군 및 대조군의 혈액으로부터 high molecular weight genomic DNA를 추출한 후 각 개체당 1 μ g의 DNA를 dot blot 분석에 사용하였다. DNA를 95°C에서 5분간 방치한 후 ice bath를 이용, 시료를 신속히 식힌 후 nylon membrane에 blotting시켰다. Membrane을 denaturation solution에서 1분간, neutralization solution에서 1분간 각각 처리 후 BM사의 manual에 의거하여 2 시간동안 65°C에서 prehybridization을 수행하고 digoxigenin-labeled probe (3kb의 *lacZ* 절편)와 65°C에서 16시간동안 hybridization을 수행하였다. Hybridization 반응 후 Digoxigenin Nucleic Acid Labeling and Detection Kit (BM Co., Germany)를 이용하여 hybridization signal을 분석하였다.

2-7. Southern blot 분석

유전자 이식 처리군 및 대조군의 혈액으로부터 역시 high molecular weight genomic DNA를 추출한 후 각 개체당 30 μ g의 DNA를 southern blot 분석에 사용하였다. 30 μ g의 DNA를 제한효소 (Xba I)로 37°C에서 digestion한 후 0.8% TAE agarose gel을 이용, 40 V에서 12시간 전기영동을 하였다. 전기영동 후 일반적인 capillary transfer method를 이용하여 24시간동안 nylon membrane에 blotting시키고 membrane을 80°C vaccum dry oven에서 건조, 고정시킨 후에 상기의 dot blot에서와 동일한 방법으로 prehybridization, hybridization 및 detection을 수행하였다.

2-8. PCR product sequencing

실험군의 미꾸라지로 부터 얻은 PCR products를 Gene Clean Kit를 이용하여 순수한 amplified PCR products 만을 분리하여 염기서열 분석에 사용하였다. 염기서열 분석은 Kim 등 (1993)의 방법에 의거 수행하였으며 미꾸라지의 대조군 및 처리군 각각 2마리 부터 얻은 8개의 PCR product의 염기서열을 *E. coli* β -galactosidase 유전자의 염기서열과 비교하였다.

2-9. pH에 따른 X-gal 염색 분석

pH 따른 β -galactosidase의 활성을 비교하기 위해 미꾸라지의 초기 발생 단계별 (just hatched larva, yolk sac absorption fry 및 filngerling)로 pH를 4.5, 6.8, 7.4 및 10.0으로 조정하여 X-gal 염색을 실시하였다. 염색 반응이 완료된 후 해부 현미경하에서 각 실험군의 염색강도를 관찰, 분석하였다.

결 과

1. 부화율 및 초기 생존율

미세현미주입시 대조군 및 실험군의 부화율과 초기 생존율을 분석한 결과를 Table 1에 나타내었다. Table 1에서 보듯이 무처리 대조군의 부화율은 50.6~68.2%였으며, 유전자를 이식한 처리군에서는 42.6~71.8%의 부화율을 나타내어 대조군이 약간 높게 나타났으나 통계적 유의차는 없었다

Table 1. Hatching success and early survival rates of microinjected eggs of mud loach, *Misgurnus mizolepis*

Mating number	Exp. group	Hatching rate (%)	Early survival rate (%)*
1	control	114/167 (68.3)	105/114 (92.1)
	injected	130/181 (71.8)	118/130 (90.8)
2	control	79/156 (50.6)	58/ 79 (73.4)
	injected	87/204 (42.6)	69/ 87 (79.3)
3	control	113/181 (62.4)	101/113 (89.4)
	injected	92/160 (57.5)	79/ 92 (85.9)
4	control	117/185 (63.2)	99/117 (84.6)
	injected	73/141 (51.8)	49/ 73 (67.1)
5	control	118/201 (58.7)	89/118 (75.4)
	injected	82/197 (41.6)	65/ 82 (79.3)
Mean± SD**	contro	60.6± 5.9 ^a	83.0± 7.4 ^a
	injected	53.1± 11.1 ^a	80.5± 8.0 ^a

* Up to yolk sac absorption.

** Based on the mean of five females.

Means do not differ at $P < 0.05$.

($P > 0.05$). 난황 흡수까지의 초기 생존율도 무처리 대조군이 73.4~92.1%, 유전자 이식 처리군은 67.1~90.8%으로 나타나 초기 생존률 역시 두 실험군간에 유의적 차이는 관찰되지 않았다 ($P > 0.05$).

2. X-gal 염색 분석

대조군 및 실험군을 X-gal 염색 분석한 결과 대조군과 실험군 모두에서 positive 염색 양상이 관찰되었다. X-gal 염색의 정도는 대조군 및 실험군 모두에서 개체간 차이를 나타내었으며, 미꾸라지 부화 개체의 난황, 척추, 장기 및 미병부위 등에는 거의 모든 개체가 염색이 되는 것으로 나타났다 (Fig. 2). 특히 유전자 이식 처리된 실험군에서는 매우 진한 염색 정도를 보이는 몇몇 개체도 관찰되었다.

3. MUG 분석

부화 자어를 대상으로 MUG 분석을 실시한 결과를 Table 2에 나타내었다. Table 2에서 보듯이 대조군 역시 β -galactosidase의 활성을 보여 개체당 평균 13.7 ± 2.6 의 arbitrary fluorescence unit를 나타내었으며, 유전자 이식 처리군에서는 9.85~55.68의 값을 나타내 개체간 차이를 보였으나 이중 대조군 평균치의 350%를 넘는 개체들도 관찰되었다.

4. PCR 분석

PCR 분석을 수행한 결과 미꾸라지의 대조군 및 유전자가 이식된 처리군 모두에서 모든 개체가 positive (+) 결과를 나타내었으며 L106-L108을 이용하여 증폭된 PCR product는 약 510 bp였다 (Fig. 3).



Fig. 2. Histochemical detection of β -galactosidase expressed in mud loach, *Misgurnus mizolepis* using X-gal staining. Arrow indicates the microinjected fish.

Table 2. Relative yields of β -galactosidase analyzed by fluorimetric assay using 4-methylumbelliferyl β -D-galactoside

Fish number	Arbitrary fluorescence units ^a	Relative β -galactosidase yields ^b
control	13.74 \pm 2.60 ^c	100.0
1	55.68	405.2
2	15.98	116.3
3	17.94	130.2
4	21.80	158.7
5	16.20	132.5
6	14.63	107.9
7	49.50	360.3
8	23.83	173.4
9	19.32	140.6
10	18.48	134.5
11	51.20	372.4
12	25.52	183.4
13	9.85	71.7
14	16.97	138.1
15	15.75	114.6
16	13.70	99.7
17	14.76	107.6
18	11.53	83.9
19	18.40	133.9
20	17.05	124.1

^a Per mg of body weight

^b Unit from fish injected / mean units from controls \times 100

^c Mean \pm SD (n=20)

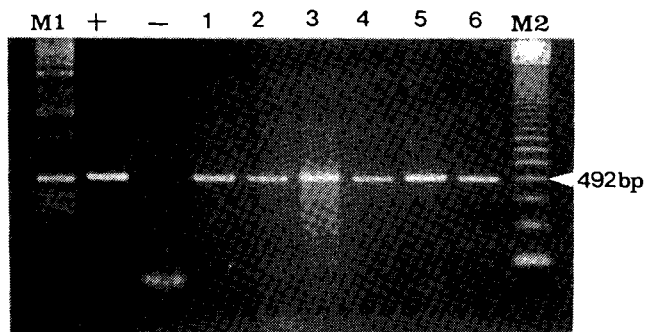


Fig. 3. Ethidium bromide stained 2% agarose gel showing the amplified segments from the genomic DNA of microinjected group (1-3) and non-injected controls (4-6). M1, 1kb ladder ; M2, 123bp ladder.

5. Dot blot 분석

Dot blot 분석 결과 대조군 및 처리군 모두에서 사용한 probe와의 hybridization이 관찰되었다 (Fig. 4).

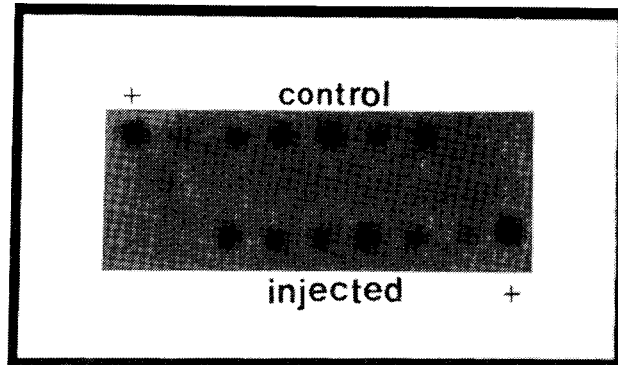


Fig. 4. Dot blot analysis of microinjected group and non-injected controls. One μ g of DNA sample were blotted onto a nylon membrane, denatured, neutralized and hybridized with the digoxigenin labeled about 3 kb *lacZ* fragment.

6. Southern blot 분석

DIG-labeled probe와 hybridization 시킨 결과, 대조군 및 처리군에서 약 6 kb와 3 kb상에서 hybridized band가 관찰되었으며 본 연구에서 분석된 미꾸라지 대조군과 처리군의 개체들은 동일한 결과를 나타내었다 (Fig. 5).

7. PCR products의 염기서열 분석

처리군 및 대조군의 미꾸라지로부터 얻은 PCR product의 약 300 bp를 비교한 결과 조사한 대조군 및 처리군의 모든 개체가 *E. coli* β -galactosidase gene과 높은 homology를 갖는 것으로 나타났으며 이때 개체간 및 PCR product간 차이는 보이지 않았다 (Fig. 6).

8. pH에 따른 X-gal 염색 분석

Table 3에서 보듯이 미꾸라지 각 초기 발생 단계에서 pH별로 X-gal 염색을 실시한 결과 pH 4.5에서 가장 진하게 염색이 되는 것으로 나타났으며 pH가 증가할 수록 그 염색 정도는 감소하여 pH 10.0에서는 거의 염색이 되지 않는 것으로 나타났다. 이러한 pH에 따른 염색 양상은 초기 발생 단계간 차이가 없이 모두 pH 4.5에서 가장 진한 염색이 관찰되었다.

고 찰

Reporter 유전자는 그의 유전자 산물이 분석하기 용이하여 유전자 이식 연구시 promoter의 활성 조사 및 유전자 이식 조건의 확립 등의 연구에 사용되어 진다.

미꾸라지 *lacZ*의 reporter 유전자로서의 유용성 검토

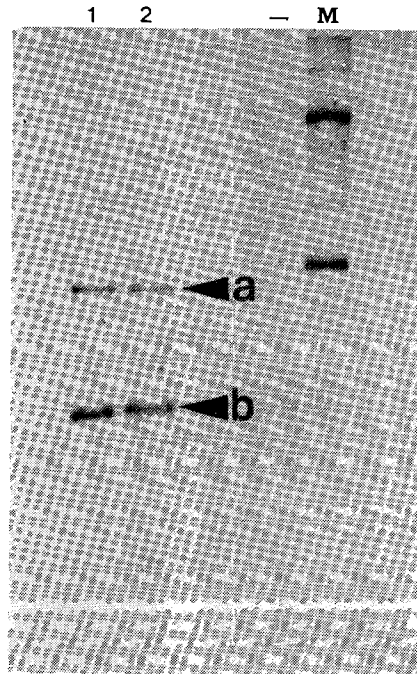


Fig. 5. Genomic southern analysis of microinjected group and non-injected controls. DNA sample were digested with Xba I, separated on a 0.7% agarose gel, blotted onto a nylon membrane and hybridized with the digoxigenin labeled about 3 kb *lacZ* fragment. M, marker ; -, negative control ; 1, non-injected control ; 2, injected fish ; a, 6kb ; b, 3kb.

Table 3. Effects of pH on the activity of β -galactosidase of mud loach, *Misgurnus mizolepis*, based on the analysis of X-gal staining

Developmental stage (days after hatching)	pH			
	4.5	6.8	7.4	10.0
Just hatch (0)	+++*	++	+	-
Yolk sac larvae (1-3)	+++	++	+	-
Fry (4-10)	+++	++	+	-
Fingerlings (11-20)	+++	++	+	-

* Density of X-gal staining : + + +, dark blue ; + +, blue ; +, light blue ; -, unstained

	10	20	30	40	50	60
<i>lacZ</i>	TAATACCGAA	GAGCCCCGCA	CCGATCGCCC	TTCCCAACAG	TTGCGCAGCC	TGAATGGCGA
Mud Loach	TAATACCGAA	GAGGCCGGCA	CCGATCGCCC	TTCCCAACAG	TTGCGCAGNC	TGAATGGCGA
	*	* *				
	70	80	90	100	110	120
<i>lacZ</i>	ATGGCGCTTT	GCCTGGTTTC	CGGCACCAGA	AGCGGTGCCG	GAAAGCTGGC	TGGAGTGC GA
Mud Loach	ATGGCGCTTT	GCCTGGTTTC	CGGCACCAGA	AGCGGTGCCG	GAAAGCTGGC	TGGAGTGC GA
	130	140	150	160	170	180
<i>lacZ</i>	TCTTCCTGAG	GCCGATACTG	TCGCCGTCCC	CTCAAAGTGG	CAGATGCACG	GTTACGATGC
Mud Loach	TCTTCCTGAG	GCCGATACTG	TCGTCGNCCC	CTCAAAGTGG	CAGATGCACG	GTTACGATGC
			*			
	190	200	210	220	230	240
<i>lacZ</i>	GCCCATCTAC	ACCAACGTAA	CCTATCCCAT	TACGGTCAAT	CCGCCGTTTG	TTCCACGGA
Mud Loach	GCCCATCTAC	ACCAACGTGA	CCTATCCCAT	TACGGTCANT	CCGCCGTTTG	TTCCACGGA
		*				
	250	260	270	280	290	300
<i>lacZ</i>	TCCGACGGTT	TGTTACTCGC	TCACATTAA	TGTTGATGAA	AGCTGGCTAC	AGGAAGGCCA
Mud Loach	TCCGACGGGT	TGTTACTCGC	TCACATTAA	TGTTGATGAA	AGCTGGCTAC	AGGAAGGCCA
	*					
	310					
<i>lacZ</i>	GACGCGATTT					
Mud Loach	GACGCGANTT					

Fig. 6. Sequences of β -galactosidase gene segments amplified from mud loach, *Misgurnus mizolepis* aligned with that of a *E. coli* β -galactosidase gene. Asterisks indicate the non-homologous base.

β -galactosidase 유전자는 *E. coli*의 lactose operon에 관여하는 유전자로서 β -galactosidase 유전자는 이미 그 유용성이 인정되어 생쥐 또는 생쥐의 ES cell 등 포유류 (Wolff et al. 1989 ; Suemori et al. 1990) 뿐만 아니라 조류 (Norton and Coffin 1985), 곤충 (Pennock et al. 1984 ; O' Kane and Gehring 1987) 등에서 reporter 유전자로 사용된 바 있으며 식물에서도 널리 이용된 바 있다 (MacGregor et al. 1991 ; Teeri and Herrera-Estrella 1991). 어류에서도 몇몇 어종에 있어서 β -galactosidase 유전자가 reporter 유전자로 이용되어 이미 이식 또는 발현이 이미 보고된 바 있다 (Table 4).

Table 4. A review of *lacZ* transfer to fish

Species	References
Salmon	McEvoy et al., 1988
Carp	Hansen et al., 1991
Rainbow trout	Inoe et al., 1991
Zebrafish	Bayer and Campos-Ortega, 1992
chinook salmon	Sin et al., 1993

X-gal 염색에 의한 β -galactosidase의 염색은 효소 활성의 손실 없이 조직내 발현한 β -galactosidase를 고정시키고 기질과의 반응을 통해 β -galactosidase의 발현 부위 및 발현 정도를 분석하는 방법이다. 이 방법은 다른 분석법에 비해 비교적 분석이 용이하고 일반화되어 있어 β -galactosidase assay에 가장 널리 사용되고 있다. 본 연구에서 미꾸라지에 β -galactosidase 유전자를 이식한 후, 대조군 및 처리군을 X-gal 염색을 통해 분석한 결과 난황, 장기 및 미병 부위 등에서는 대조군 및 처리군의 모든 개체에서 염색 부위가 관찰되었으며 개체간 염색의 정도에 차이를 나타내었다. 특히, 처리군에서는 다른 개체들에 비해 염색이 매우 진하게 되는 개체도 관찰되어 이식된 외래 유전자의 발현 가능성을 나타내었다. 그러나 Inoue 등 (1991)은 본 연구와 동일한 유전자를 가지고 무지개송어에서 분석한 결과, 대조군에서는 전혀 염색이 되지 않는 것으로 보고한 바 있어 본 연구 결과와는 많은 차이를 보였으며 매우 흥미로웠다.

MUG 분석을 수행한 결과 처리군에서 대조군 평균치의 각각 360%, 373% 및 405%를 나타내는 3마리 개체가 관찰되어 역시 외래 유전자의 발현 가능성을 나타내고 있으나 대조군에서도 역시 β -galactosidase의 활성이 관찰되었다. 연어과 어류의 embryo를 대상으로 β -galactosidase 유전자를 이식한 후 이의 발현을 보고한 바 있는 McEvoy 등(1988)도 역시 대조군에서 β -galactosidase의 활성이 관찰됨을 보고하였으며 또한 처리군의 개체중 대조군의 평균치와 비교시 약 330%의 β -galactosidase 활성을 나타내는 개체를 보고한 바 있어 본 연구 결과와 유사하였다.

PCR 분석은 최근 외래 유전자 존재 여부 및 삽입 분석 뿐만 아니라 genome을 대상으로 한 분자생물학적 연구에서 가장 널리 이용되는 방법론으로서 연어과 어류의 정자를 대상으로 Sin 등 (1993)이 *lacZ*를 이식 후 이의 삽입 여부를 분석한 바 있는 등 최근들어 매우 활발히 이용되고 있다. 그러나 본 연구에서 미꾸라지의 β -galactosidase의 삽입 여부를 분석하기 위해 PCR을 수행하였으나 대조군 및 처리군 모두에서 positive (+) 결과를 나타냄으로써 상기의 PCR를 이용한 여타 유전자 이식 연구의 분석 결과와는 달리 미꾸라지는 대상으로 한 β -galactosidase 유전자의 삽입 여부 분석에는 그 적용에 문제가 있는 것으로 나타났다.

Fig. 4 및 Fig. 5에서 보듯이 dot blot 및 southern blot 분석을 수행한 결과, 처리군 및 대조군에서 조사된 모든 개체에서 역시 + hybridized signal이 관찰됨으로서 McEvoy 등(1988), Inoue 등 (1991) 및 Sin 등 (1993)이 보고한 결과와는 다른 양상을 나타내어 미꾸라지를 대상으로 한 유전자 분석에 *lacZ* 유전자의 사용은 신중한 고려가 있어야만 할 것으로 나타났다.

상기의 미꾸라지를 대상으로 β -galactosidase 유전자를 이식하고 분석한 결과로 미루어 볼 때 X-gal, MUG 분석시 조사한 대조군의 모든 개체들이 β -galactosidase의 활성을 나타내었고, PCR, dot, southern blot 분석을 통한 미꾸라지 genome 조사에서의 모두 + 결과를 나타내었다. 이는 미꾸라지 genome상에 β -galactosidase 유전자와 상당한 homology를 갖는 염기서열 뿐만 아니라 미꾸라지 자체에 *E. coli*의 β -galactosidase와 유사한 activity를 나타내는 효소의 존재 가능성을 역시 시사해주는 것이다. 식물에서는 이미 *E. coli*의 β -galactosidase와 유사한 endogenous β -galactosidase가 존재함이 밝혀진 바 있으며 이들 endogenous β -galactosidase에 의한 X-gal 및 MUG의 가수분해가 일어날 수 있음이 알려져 있다 (Herrera-Estrella et al. 1988). 또한 포유류에서도 endogenous β -galactosidase 또는 β -galactosidase like enzyme의 존재가 보고되어 있다 (An et al. 1982). 그러나 아직 어류를 대상으로 endogenous β -galactosidase 유전자에 관해서는 보고된 바 없으며 더우기 유전자 이식 연구와 관련해서 reporter 유전자로서의 유용성 문제를 검토한 예는 전무한 실정이다.

본 연구에서 얻어진 상기의 결과를 바탕으로 미꾸라지의 endogenous β -galactosidase gene 및 β -galactosidase의 존재 가능성을 조사하기 위한 기초 연구로서 유전자 이식 처리군 및 대조군으로부터

얻은 PCR product의 염기 서열을 분석한 결과, Fig. 6에서 보듯이 미꾸라지의 PCR products의 염기서열은 *E. coli*의 β -galactosidase gene과 높은 homology를 나타냄으로서 매우 흥미로운 결과를 보여주었다. 또한 포유류에서 관찰되는 endogeneous β -galactosidase의 활성이 pH의 영향을 받는 사실을 바탕으로 (An et al. 1982) 미꾸라지의 X-gal 염색 분석을 pH별로 수행한 결과 pH 4.5에서 가장 높은 활성을 나타내었으며 pH가 높아짐에 따라 활성이 점점 약해지고 pH 10.0에는 거의 염색이 되지 않아 활성이 없는 것으로 나타났다. 따라서 미꾸라지의 endogeneous β -galactosidase 또는 β -galactosidas like enzyme으로 추정되는 본 효소는 포유류에서 밝혀진 endogeneous β -galactosidase와 마찬가지로 산성 또는 중성에서 활성을 나타내는 것으로 판단된다. 그러나 어류의 경우 포유류와는 달리 그들의 수중 생활권의 특성으로 인해 미생물, 특히 *E. coli*를 비롯한 bacterial β -galactosidase 유전자를 갖는 미생물등과의 접촉이 육상 생물에 비해 훨씬 빈번하며 더우기 미꾸라지의 경우 그 서식지 뿐만 아니라 섭식 형태가 미생물과의 관련이 여타 어종에 비해서도 더 높다는 점을 감안할 때 유전자 분석시 미생물의 오염 가능성 역시 완전히 배제할 수는 없을 것이다.

그러나 endogeneous β -galactosidase gene의 존재 가능성 또는 미생물 오염의 가능성의 양측면 모두를 고려할 때, 앞으로 미꾸라지에 외래 유전자 이식시 reporter 유전자로서 *lacZ*의 사용에는 반드시 신중한 재검토가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

요 약

*E. coli*의 β -galactosidase 유전자를 미꾸라지 수정란에 미세현미 주입하고 이를 분석함으로써 미꾸라지에 외래 유전자 이식을 위한 reporter 유전자로서의 유용성을 검토하였다. X-gal 염색분석, 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside (MUG) 분석을 수행한 결과 유전자 이식 처리군 및 대조군에서 모두 β -galactosidase의 활성이 관찰되었으며 PCR, dot blot 및 southern blot 분석결과 역시 유전자 이식 처리군과 대조군에서 모두 유사한 양상을 나타내었다. 처리군 및 대조군의 PCR product의 염기서열은 *E. coli*의 β -galactosidase 유전자와 매우 높은 homology를 갖고 있었으며 pH에 따른 X-gal 염색 분석을 수행한 결과 미꾸라지에 관찰되는 본 효소는 pH 4.5에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 따라서 앞으로 미꾸라지를 대상으로 한 외래 유전자 이식시 *E. coli*의 β -galactosidase 유전자의 reporter 유전자로서의 사용은 신중한 재검토가 이루어져야만 할 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

- An, G., K. Hidaka and L. Siminovitch. 1982. Expression of bacterial β -galactosidase in animal cells. Mol. Cell. Biol. 2 : 1628-1632.
- Bayer, T. A. and J. A. Campos-Ortega. 1992. A transgene containing *lacZ* is expressed in primary sensory neurons in zebrafish. Development 115 : 412-426.
- Chen, T. T. and D. A. Powers. 1990. Transgenic fish. TIB Tech. 8 : 209-215.
- Chong, S. S. C. and J. R. Vielkind. 1989. Expression and fate of CAT reporter gene microinjected into fertilized medaka (*Oryzias latipes*) eggs in the form of plasmid DNA, recombinant phage particles and its DNA. Theor. Appl. Genet. 78 : 369-380.
- Gording, D. R., J. Rossant, S. Clapoff, M. L. Breitman, L.-C. Tsui. 1987. In situ detection of

- β -galactosidase in lenses of transgenic mice with a gamma-crystallin/*lacZ* gene. *Science* 235 : 456-458.
- Hansen, E., K. Fernades, G. Goldspink, P. Butterworth, P. K. Umeda and K. C. Chang. 1991. Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle. *FEBS* 290 : 73-76.
- Herrera-Estrella L., T. H. Teeri and J. Simpson. 1988. Use of reporter genes to study gene expression in plant cells. p. 1-22. In S.B. Gelvin et al. (Eds). *Plant Molecular Biology Manual*, B1. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Inoue, K., S. Yamashita, N. Akita, T. Mitsuboshi, E. nagahisa, T. Shiba and T. Fujita. 1991. Histochemical detection of foreign gene expression in rainbow trout. *Nippon Susan Gakkaishi* 57 : 1511-1517.
- Kim, D. S., J. H. Kim and I-S. Park. 1992. Induced and multiple spawning by human chorionic gonadotropin injection of loach, *Misgurnus mizolepis* (Teleostomi : Cobitidae). *J. Aquat.* 5 : 109-115.
- Kim, D. S., J.-Y. Jo and T.-Y. Lee. 1994. Induction of triploidy in mud loach (*Misgurnus mizolepis*) and its effect on gonad delvelopment and growth. *Aquaculture* 120 : 263-270.
- Kim K. K., Y. Kim, Y. K. Nam and D. S. Kim. 1993. Genetic stock identification of spotted flounder, *Verasper variegatus* from Yeochun, Korea. *J. Aquat.* 6 : 221-233.
- Macleay, N. and D. Penman. 1990. The application of gene manipulation to aquaculture. *Aquaculture* 85 : 1-20.
- Macleay, N. and S. Talwar. 1984. Injection of cloned genes into rainbow trout eggs. *J. Emb. Exp. Morph.* 82 : 187.
- MacGregor, G. R., G. P. Nolan, S. Fiering, M. Roederer and L. A. Herzenberg. 1991. Use of *E. coli lacZ* (β -galactosidase) as a reporter gene. p. 217-235. In E. J. Murray (Ed). *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7 : Gene Transfer and Expression Protocols. The Humana Press Inc., Clifton, N. J.
- McEvoy, T., M. Stack, B. Keane, T. Barry, J. Sreenan and F. Gannon. 1988. The expression of a foreign gene in salmon embryos. *Aquaculture* 68 : 27-37.
- Norton, P. A. and J. M. Coffin. 1985. Bacterial β -galactosidase as a marker of Rous sarcoma virus gene expression and replication. *Mol. Cell Biol.* 5 : 281-290.
- Ozato, K., H. Kondoh, H. Inogara, T. Iwamatsu, Y. Wakamatsu and T. S. Okada. 1986. Production of transgenic fish : introduction and expression of chicken δ -crystallin gene in medaka embryos. *Cell Differentiation* 19 : 237-244.
- O'Kane, C. J. and W. J. Gehring. 1987. Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 9123-9127.
- Pennok, G. D., C. Shoemaker and L. K. Miller. 1984. Strong and regulated expression of *E. coli* β -galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. *Mol. Cell Biol.* 4 : 399-406.

- Sin, F. Y. T., A. L. Bartley, S. P. Walker, I. L. Sin, J. E. Symonods, L. Hawke and C. L. Hopkins. 1993. Gene transfer in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by electroporating sperm in the presence of pRSV-lacZ DNA. *Aquaculture* 117 : 57-69.
- Stuart, G. W., J. R. Vielkind, J. V. McMurray and M. Westerfield. 1990. Stable lines of transgenic zebrafish exhibit reproducible patterns of transgene expression. *Development* 109 : 577-584.
- Suemori, H. Y. Kadodawa, K. Goto. I. Araki, H. Kondo and N. Nakatsuji. 1990. A mouse embryonic stem cell line showing pluripotency of differentiation in early embryos and ubiquitous β -galactosidase expression. *Cell Differ. Develop.* 29 : 181-186.
- Teeri, T. H. and L. Herrera-Estrella. 1991. The use of *lacZ* as a reporter gene in plants. p. 1-16. In S. B. Gelvin et al. (Eds). *Plant Molecular Biology Manual*, B15. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Teeri, T. H., H. Lehvaslaiho, M. Franck, J. Uotila, P. Heino, E. T. Palva, M. Van Montagu and L. Herrera-Estrella. 1989. Gene fusions to *lacZ* reveal new expression patterns of chimeric genes in transgenic plants. *EMBO J.* 8 : 343-350.
- Wolff, J. A., R. W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani and P. L. Felgner. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247 : 1465-1468.