

## 미꾸라지에 성장호르몬 유전자 이식을 위한 최적 조건 개발\*

김동수 · 남윤권

부산수산대학교 양식학과

### Factors Affecting the Efficiency of Introducing Growth Hormone Gene into Mud Loach : Gene Transfer via Electroporation\*

Dong Soo Kim and Yoon Kwon Nam

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

#### ABSTRACT

Sperm from mud loach (*Misgurnus mizolepis*) were electroporated in the presence of plasmid DNA, pRSV/luc or pMT/hGH over a range of field strength of 0~1,625 V/cm with capacitance from 0 to 1,000  $\mu$ F, and the effects of electroporation on fertilization, hatching, early survival, and efficiency of gene transfer were investigated. Average fertilization rate, hatching rate and early survival rate up to yolk sac absorption of all experimental groups were not significantly different ( $P > 0.05$ ). The proportion of fish carrying pRSV/luc based on the polymerase chain reaction (PCR) analysis was ranged from 0 to 20%, however, the values of gene transfer efficiency from the different electroporation conditions were not significantly different. PCR analysis of pMT/hGH transferred groups revealed that screening of pMT/hGH transferred fish by PCR was difficult because of significant nonspecific amplifications resulted from the homologous sequences in the genome of mud loach.

#### 서 론

어류의 유전자 이식은 micromanipulator를 이용, 어류의 수정란에 직접 외래 DNA를 주입하는 microinjection 방법이 가장 널리 이용되고 있다(Gordon et al. 1980; Wagner et al. 1981; Palmiter et al. 1982). 그러나 이 기법은 어류의 경우 사용하는 난의 종류에 따라 각기 다른 숙련된 기술과 장비를

\* 본 논문은 교육부 학술진흥재단 1994년도 유전공학 연구비 (과제번호 127-1) 지원에 의해 수행되었음

요구하게 됨은 물론, 어류 수정란의 전핵은 직접 관찰하기가 어렵고, 수정후 비교적 단단한 난각 형성으로 인해 microinjection이 매우 불편하고, 대량처리가 불가능하여 transgenic fish의 확보에 제한이 있다는 단점이 있다(Pandian and Marian 1994). 이에 최근들어 microinjection을 대체할 수 있는 보다 간편하고 대량 처리가 가능한 몇몇 유전자 이식의 방법론들이 제시되고 있다(Hackett 1993).

Electroporation은 짧은 전기적 충격에 의해 세포의 channel을 열리게 하고 이때 DNA와 같은 macromolecule이 세포 내로 주입 되도록 하는 방법으로서 정자와 난에 모두 사용할 수 있고 대량처리가 가능하다는 장점이 있다. 이에 Hallerman 등(1989)과 Inoue 등(1990)이 어류 유전자 이식을 위한 방법론으로 electroporation을 사용한 이래, Xie 등(1993)은 loach 와 red crucian carp의 수정란에, 그리고 Sin 등(1993)과 Symonds 등(1994)은 chinook salmon을 대상으로 electroporation된 정자를 이용한 transgenic fish의 생산을 보고한 바있다. 그러나 아직 electroporation된 정자의 수정율과 수정된 난의 부화율, 부화자어의 초기 생존율을 고려한 유전자 이식 효율에 관한 결과는 보고된 바없다.

이에 본 연구는 우리나라 주요 담수 어종인 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)를 대상으로 인간 성장호르몬 유전자를 위시한 유용 유전자를 이식하기 위해 electroporation 기법을 이용, 최적의 유전자 이식 조건을 구하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. Plasmid

본 실험에 사용한 plasmid는 반딧불의 luciferase 유전자를 포함하고 있는 pRSV/luc (deWet et al. 1987) 및 mouse metallothionein promoter와 인간의 성장호르몬 유전자가 융합되어 있는 pMT/hGH 였다(Palmiter et al. 1982). 유전자 이식이 이용하기 위해 기존의 alkaline miniprep 방법을 통해 plasmid DNA를 추출한 후 GeneClean kit (BIO 101 Co. USA)를 이용하여 순수분리한 후 실험에 사용하였다.

### 2. 실험어

유전자 이식을 위해 부산수산대학교 어류 육종학 실험실에서 사육중이던 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)를 친어로 이용하였으며 광주기와 수온 조절을 통해 성숙을 유도하였고 Kim 등(1994)의 방법에 의해 난과 정자를 얻어 실험에 사용하였다. 유전자 이식 처리후 난과 정자는 Kim 등(1995) 방법에 따라 인공 수정시켰으며 25°C 항온 부화조에서 부화시켰다.

### 3. Electroporation

Invitrogen사의 Electroporater II를 유전자 이식을 위해 사용하였다. 정소를 적출후 PBS로 희석한 다음 침전물을 제거시키고 상등액을 원심분리하여 정자를 모은후 450  $\mu$ l의 ice-cold PBS로 희석하였다. 50  $\mu$ l의 plasmid DNA를 첨가하여 최종 DNA 농도가 100  $\mu$ g/ml이 되도록한 후 electroporation을 수행하였다. Electroporation cell은 0.4 cm type을 사용하였으며 electroporation을 수행한 후 PBS로 몇 회 세척 후 최종 500  $\mu$ l의 PBS에 희석하여 난과 인공 수정시켰다.

Electroporation 조건은 0, 250, 500 및 1,000  $\mu$ F의 capacitance와 0~1,625 V/cm 사이의 여러 field strength간의 조합을 통하여 유전자 이식을 시도하였다. 이와 아울러 DNA만 처리한 실험군, DNA없이

electroporation만 수행한 실험군 및 무처리 대조군의 정자 역시 동일한 조건에서 난과 수정시켰다.

#### 4. 수정율, 부화율 및 초기 생존율 조사

수정율은 수정 1시간후 정상적으로 난할을 수행하는 난을 백분율로 나타내었으며, 부화율은 수정 24시간후 생존한 embryo들을 백분율로 나타내었다. 초기 생존율은 부화자어를 대상으로 난황흡수까지 생존한 개체들을 백분율로 나타내었다. 각 실험군들간의 수정율, 부화율 및 초기 생존율에 관한 통계적 유의차는 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

#### 5. 유전자 분석

##### 5-1. DNA 추출

부화 자어를 대상으로 genomic DNA를 추출하여 분석에 사용하였다. 부화자어를 증류수로 2회 세척하고 genomic DNA isolation buffer에 넣은 후 200 µg/ml 의 농도로 proteinase K를 첨가하여 55°C 항온 수조에서 overnight digestion을 수행하였다. Digestion이 완료된 후에 phenol로 1회 phenol/chloroform (1 : 1=v : v)으로 1회 추출한 후 2-propanol로 DNA를 침전시켰다. 70% ethanol로 wash후 건조시킨 다음 1X TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 녹여 실험에 사용하였다.

##### 5-2. Polymerase chain reaction (PCR)

이식된 유전자의 존재 유무를 확인하기 위해 각 실험군으로 부터 부화자어 70~80 마리씩을 무작위로 선택하여 PCR 분석을 수행하였다. PCR은 8µl 의 reaction cocktail buffer (20 mM Tris-Cl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl, 200 µg/ml BSA, 200 µM dNTPs, 100 nM each primer, 0.5 unit Taq DNA polymerase)에 2 µl의 DNA 용액을 첨가후 1605 Air Thermo-Cycler (Idaho Technology Inc., USA)를 이용하여 94°C에서 30초, 60°C에서 20초 그리고 74°C에서 1분 동안 30 cycle을 수행하였다. PCR이 완료된 후 1.2% agarose gel 전기영동을 통해 transgene의 증폭 여부를 확인하였다.

## 결 과

### 1. 수정율, 부화율 및 초기 생존율

pRSV/luc을 이용하여 다양한 조건으로 electroporation된 정자와 인공수정시킨 미꾸라지 수정란의 수정율, 부화율 및 초기 생존율을 Table 1에 나타내었다. 실험군들의 수정율과 부화율은 각각 87.5~92.3% 및 58.5~69.8%로 나타났으며 대조군과 각 실험군들간에 유의한 차이는 관찰되지 않았다( $P > 0.05$ ). 난황 흡수 까지의 초기 생존율을 조사한 결과 78.5~90.0%의 범위로 나타났으며 역시 실험군들간에 통계적 유의차는 없는 것으로 나타났다( $P > 0.05$ ).

### 2. 유전자 이식 효율

동일한 field strength (625 V/cm) 하에서 0, 250, 500 및 1,000 µF의 capacitance 조건을 이용하여 electroporation을 수행한 결과, 0~10.6%의 유전자 이식 효율을 나타내었으나 capacitance의 증가에

따른 유전자 이식 효율의 증가는 관찰되지 않았다(Table 2).

Table 1. Effects of electroporation on fertilization, hatching and early survival rate. N indicates the number of replicate groups

Exp. group		Fertilization (%)	Hatching (%)	Early survival (%)
Con- I * <sup>1</sup>		90.2±3.5 <sup>a</sup> (N=3)	68.2± 8.2 <sup>a</sup> (N=3)	85.2±5.4 <sup>a</sup> (N=2)
Con-II * <sup>2</sup>		89.5±4.1 <sup>a</sup> (N=5)	67.8± 5.4 <sup>a</sup> (N=5)	88.9±6.6 <sup>a</sup> (N=2)
Con-III * <sup>3</sup>		91.0±2.2 <sup>a</sup> (N=2)	65.9± 7.1 <sup>a</sup> (N=2)	87.5±3.8 <sup>a</sup> (N=2)
250 μF	625 V/cm	88.9±3.4 <sup>a</sup> (N=4)	62.7± 3.8 <sup>a</sup> (N=4)	90.0±4.8 <sup>a</sup> (N=2)
	875 V/cm	92.3±4.4 <sup>a</sup> (N=3)	60.3± 6.6 <sup>a</sup> (N=3)	89.9±5.0 <sup>a</sup> (N=2)
	1,125 V/cm	90.8±4.4 <sup>a</sup> (N=3)	59.2±10.5 <sup>a</sup> (N=3)	78.5±8.7 <sup>a</sup> (N=2)
	1,375 V/cm	87.8±5.6 <sup>a</sup> (N=3)	69.8± 9.4 <sup>a</sup> (N=3)	82.0±5.5 <sup>a</sup> (N=2)
	1,625 V/cm	91.5±3.4 <sup>a</sup> (N=3)	55.8± 7.2 <sup>a</sup> (N=3)	88.1±5.0 <sup>a</sup> (N=2)
500 μF	625 V/cm	89.2±6.2 <sup>a</sup> (N=2)	67.3± 6.8 <sup>a</sup> (N=2)	85.5±6.0 <sup>a</sup> (N=2)
1,000 μF	500 V/cm	90.0±4.3 <sup>a</sup> (N=2)	58.5± 5.5 <sup>a</sup> (N=2)	86.7±4.5 <sup>a</sup> (N=2)
	625 V/cm	91.2±2.2 <sup>a</sup> (N=4)	60.0±10.2 <sup>a</sup> (N=4)	88.2±5.6 <sup>a</sup> (N=2)
	750 V/cm	90.2±3.4 <sup>a</sup> (N=3)	65.7± 9.5 <sup>a</sup> (N=3)	89.0±8.0 <sup>a</sup> (N=2)
	825 V/cm	87.5±5.4 <sup>a</sup> (N=3)	64.5± 6.8 <sup>a</sup> (N=3)	85.0±4.8 <sup>a</sup> (N=2)

Means within a column superscripted different letters are significantly different (P < 0.05).

\*1 : without any treatment

\*2 : non-electroporated control in the presence of plasmid DNA

\*3 : electroporated at 1625 V/cm-250 μF without plasmid DNA

Table 2. Effects of capacitance on the efficiency of gene transfer in the condition of electroporation at 625 V/cm of field strength

Capacitance (μF)	No. of fish analyzed	No. of fish carrying pRSV/luc	Incidence of gene transfer (%)
0	85	0	0
250	85	8	9.4
500	85	8	9.4
1,000	85	9	10.6

유전자 이식 효율에 미치는 field strength의 영향을 조사하기 위해 250 μF의 조건하에서 0, 625, 825, 1,125, 1,375 및 1,625 V/cm로 electroporation을 수행한 결과 0~20%로 나타났으며(Table 3), 1,000 μF 하에서 0, 500, 625, 750 및 825 V/cm으로 electroporation을 수행한 결과 0~17.1%의 유전자 이식 효율을 나타내었다(Table 4). 한편 electroporation을 수행하지 않고 plasmid DNA만 처리한 실험군에서는 유전자 이식된 개체가 관찰되지 않았다.

Table 3. Effect of field strength on the efficiency of gene transfer in the condition of electroporation at 250  $\mu$ F of capacitance

Field strength (V/cm)	No. of fish analyzed	No. of fish carrying pRSV/luc	Incidence of gene transfer (%)
0* <sup>1</sup>	80	0	0
0* <sup>2</sup>	80	0	0
625	70	7	10.0
825	70	11	15.7
1,125	70	10	14.3
1,375	70	14	20.0
1,625	70	14	20.0

\*1 : without any treatment

\*2 : non-electroporated control in the presence of plasmid DNA

Table 4. Effect of field strength on the efficiency of gene transfer in the condition of electroporation at 1,000  $\mu$ F of capacitance

Field strength (V/cm)	No. of fish analyzed	No. of fish carrying pRSV/luc	Incidence of gene transfer (%)
0* <sup>1</sup>	80	0	0
0* <sup>2</sup>	80	0	0
500	70	10	14.3
625	70	8	11.4
750	70	8	11.4
825	70	12	17.1

\*1 : without any treatment

\*2 : non-electroporated control in the presence of plasmid DNA

### 3. Polymerase chain reaction (PCR)

이식된 외래 유전자 pRSV/luc의 존재 유무를 분석하기 위해 부화자어를 대상으로 PCR을 분석한 결과 transgene을 갖고 있는 개체에서는 약 600 bp에 해당하는 PCR product가 얻어졌으며 electroporation을 수행하지 않는 모든 대조군들에서는 PCR band가 관찰되지 않았다(Fig. 1).

### 4. pMT/hGH의 이식

상기 pRSV/luc의 결과를 바탕으로 pMT/hGH를 미꾸라지 정자에 동일한 방법으로 유전자 이식을 시도한 결과 수정율과 부화율의 경우 큰 차이가 관찰되지 않아 pRSV/luc의 결과와 일치하였다(data not shown). 그러나 pMT/hGH의 부화자어를 PCR 분석할 경우 17개 set의 primer를 이용하였음에도 불구하고 대조군 및 처리군 모두에서 미꾸라지 자체 genome 내의 많은 nonspecific band가 나타남으로서 미꾸라지의 성장호르몬 유전자를 위시한 homologous 부위들이 완전히 분석되지 않는 한 PCR을 이용한 인간 성장호르몬 유전자의 이식 여부 판별이 불가능한 것으로 나타났다(Fig. 2).

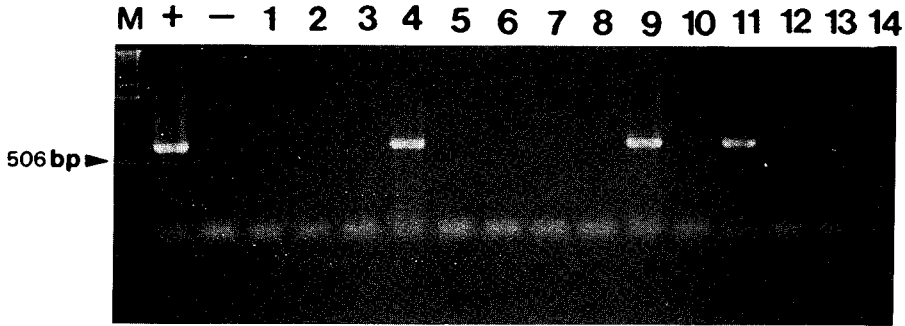


Fig. 1. Ethidium bromide stained 1.2% agarose gel showing the PCR detection of pRSV/luc in the hatched larvae. M, 1 Kb ladder; +, pRSV/luc positive control; -, no template; 1, non-electroporated control; 2-14, electroporated fish (825 V/cm-1,000  $\mu$ F).

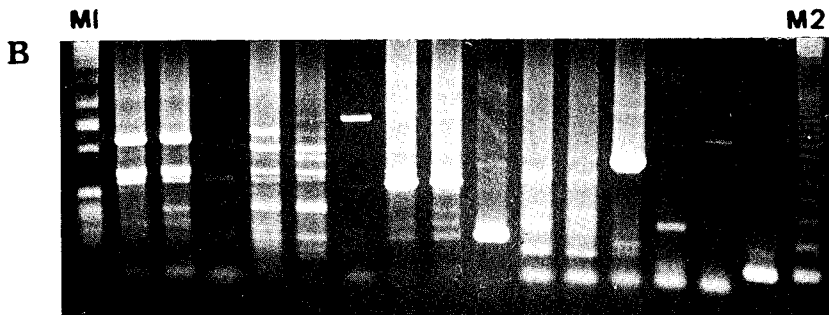
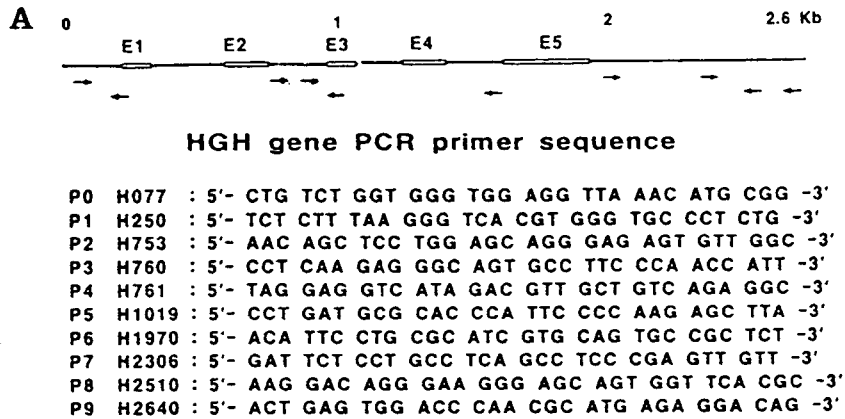


Fig. 2. PCR analysis of pMT/hGH transferred groups. A. Design of primers and PCR strategy. B. Analysis of the PCR products by 1.2% agarose gel. M1, 1kb ladder; M2, 123 bp ladder.

## 고 찰

어류의 종묘생산에 있어 정자의 질은 난질 못지 않게 난의 수정 및 발생능력에 큰 영향을 끼친다. 이에 정자에 electroporation 처리시 수정률 및 부화율은 transgenic fish의 생산에 매우 중요한 요인으로 작용할 수 있다. Chinook salmon의 경우 그의 정자에 electroporation을 수행할 경우 field strength와 pulse length가 증가함에 따라 정자의 운동성이 감소하는 경향이 보고된 바있다(Sin et al. 1993). 그러나 본 연구에서는 다양한 capacitance와 voltage 조건을 이용, electroporation을 수행하였음에도 불구하고 수정율, 부화율 및 초기 생존율에서 실험군간의 유의차는 관찰되지 않았다(Table 1). 이러한 상반된 결과는 어류를 대상으로 electroporation 시킨 정자를 난과 수정시켜 수정율과 부화율을 분석한 예가 없어 명확한 비교 및 결론을 내리기는 곤란하나 종간 그리고 처리 조건간의 차이일 것으로 판단된다.

본 연구에서 얻어진 유전자 이식 효율은 0~20%로 나타나(Table 2) 기존의 결과들과 유사한 양상을 나타내었다(Pandian and Marian 1994). 더우기 최적 이식 조건을 구하기 위해 다양한 capacitance와 voltage를 처리하여 조사했으나 높은 voltage에서 유전자 이식 효율이 약간 증가하는 경향을 나타내었을뿐 각 조건들간 뚜렷한 차이는 관찰되지 않았다. Gagne 등(1991)은 bovine 정자를 대상으로 electroporation을 수행한 결과에서 voltage 및 pulse length를 변화시켜도 그 효율에 유의적인 차이가 없음을 보고한 바 있어 본 연구 결과와 일치하였다. 그러나 electroporation 처리시 유전자 이식 효율은 세포의 종류를 비롯하여 여러 조건들에 의해 영향을 받을 수 있음 역시 보고된 바 있다(Evans et al. 1984 ; Anderson et al. 1991).

본 연구의 대조군 중 electroporation을 하지 않고 단지 sperm mediated를 수행한 실험군에서는 유전자 이식이 이루어지지 않았다. 그러나 Khoo 등(1992)은 zebrafish를 대상으로 정자와 plasmid DNA를 혼합처리만 하여도 유전자 이식이 이루어짐을 보고한 바 있어 본 결과와는 차이를 나타내었다. 반면 Chourrout and Perrot (1992)은 무지개송어에서 sperm mediated 방법만으로는 유전자 이식 효과가 없음을 보고한 바 있다.

pRSV/luc의 electroporation 결과를 토대로 하여 미꾸라지 정자에 pMT/hGH를 이식하였으나 pRSV/luc과는 달리 PCR에 의한 transgene의 검색이 불가능한 것으로 나타났다. 이는 미꾸라지 자체 genome내에 인간의 성장호르몬 유전자와 상당한 homology를 갖는 염기서열이 존재하기 때문으로 여겨지며 이와 유사한 양상이 Kim and Nam (1994)에 의해 이미 보고된 바있다. 따라서 앞으로 유전자가 이식된 개체를 성장시킨 후 Southern blot 분석등을 통해 pMT/hGH의 이식 및 genomic integration 여부에 관한 조사가 이루어져야 할 것이다.

## 요 약

미꾸라지 (*Misgurnus mizolepis*) 정자에 electroporation 처리를 통해 난과 인공수정시킨 후 수정율, 부화율, 초기 생존율 및 유전자 이식 효율을 조사하였다. pRSV/luc을 reporter 유전자로 이용하여 0~1,625 V/cm 의 field strength와 0~1,000  $\mu$ F의 capacitance 범위의 electroporation을 시도한 결과, 실험군간에 수정율, 부화율, 초기 생존율에서 유의한 차이는 나타나지 않았다. 유전자 이식 효율을 PCR 분석으로 조사한 결과, 0~20%로 나타났으며 electroporation 조건에 따라 큰 차이는 관찰할 수 없었다.

그러나 pMT/hGH의 경우, 대조군 및 처리군 모두에서 homology sequence에 의한 nonspecific amplification이 관찰됨으로서 PCR을 이용한 transgene의 검색이 불가능한 것으로 나타났다.

## 참 고 문 헌

- Anderson, M. L. M., D. S. Spandidos and J. R. Coggins, 1991. Electroporation of lymphoid cells : factors affecting the efficiency of transfection. *J. Biochem. Biophys. Methods* 22 : 207-222.
- Chourrout, D. and E. Perrot, 1992. No transgenic rainbow trout produced with sperm incubated with linear DNA. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 1 : 282-285.
- deWet, J. R., K. V. Wood, M. DeLuca, D. R. Helinski and S. Subramani, 1987. Firefly luciferase gene : structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 7 : 725-737.
- Evans, G. A., H. A. Ingraham, K. Lewis, K. Cunningham, T. Seki, T. Moriuchi, H. C. Chang, J. Silver and R. Hymen, 1984. Expression of the Thy-1 glycoprotein gene by DNA-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 5532-5536.
- Gagne, M. B., F. Pothier and M. A. Sirard, 1991. Electroporation of bovine spermatozoa to carry foreign DNA in oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 29 : 6-15.
- Gordon, J. W., G. A. Scangos, D. J. Plotkin, J. A. Barbosa and F. H. Ruddle, 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 : 7380-7384.
- Hackett, P. B., 1993. The molecular biology of transgenic fish. In : *Molecular biology frontiers*. P.W. Hochachka and T.P. Mommsen eds. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, The Netherlands. pp.207-240.
- Hallerman, E. M., A. J. Faras, P. B. Hackett, A. R. Kapuscinski and K. S. Guise, 1989. Attempted introduction of a novel gene into goldfish through electroporation. *J. Cell Biochem., Suppl.* BB : pp. 170.
- Inoue, K., S. Yamashita, J. Hata, S. Kabeno, S. Asada, E. Nagahisa and T. Fujita, 1990. Electroporation as a new technique for producing transgenic fish. *Cell Differ. Dev.* 29 : 123-128.
- Khoo, H. W., L. H. Ang, H. B. Lim and K. Y. Wong, 1992. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into zebrafish. *Aquaculture* 107 : 1-19.
- Kim, D. S., J. -Y. Jo and T. -Y. Lee, 1994. Induction of triploid, in mud loach (*Misgurnus mizolepis*) and its effect on gonad development and growth. *Aquaculture* 120 : 263-270.
- Kim, D. S. and Y. K. Nam, 1994. Transfer of foreign gene into mud loach, *Misgurnus mizolepis*. I. Availability of *lacZ* as a reporter gene for producing transgenic mud loach. *J. Aquacult.* 7 : 41-54.
- Kim, D. S., Y. K. Nam and I. -S. Park, 1995. Survival and karyological analysis of reciprocal diploid and triploid hybrids between mud loach (*Misgurnus mizolepis*) and cyprinid loach (*M. anguillicaudatus*). *Aquaculture* (in printing).
- Palmiter, R. D., R. L. Brinster, R. E. Hammer, M. E. Trumbauer, M. G. Rosenfeld, N. C. Birnberg



- and R. M. Evans, 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300 : 611–615.
- Pandian, T. J. and L. A. Marian, 1994. Problems and prospects of transgenic fish production. *Cur. Sci.* 66 : 635–649.
- Sin, F. Y. T., A. L. Bartley, S. P. Walker, I. L. Sin, J. E. Symonds, 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.
- Symonds, J. E., S. P. Walker and F. Y. T. Sin, 1994. Electroporation of salmon sperm with plasmid DNA : evidence of enhanced sperm/DNA association. *Aquaculture* 119 : 313–327.
- Wagner, T. E., P. C. Hoppe, J. P. Jollick, D. R. Scholl, R. L. Hodinka and J. B. Gault, 1981. Microinjection of a rabbit  $\beta$ -globin gene in zygotes and its subsequent expression in adult mice and their offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 : 6376–6380.
- Xie, Y., D. Liu, J. Zou, G. Li and Z. Zhu, 1993. Gene transfer via electroporation in fish. *Aquaculture* 111 : 207–213.