

어패류 몇 종에 내재되어 있는 β -Galactosidase의 활성 비교*

김대회 · 정창화** · 남윤권** · 민광식 · 김동수**

국립수산진흥원 남해수산종묘배양장

**부경대학교 양식학과

Comparative Study on Endogeneous Activities of β -Galactosidase-like Enzyme in Several Finfishes and Shellfishes*

Dae Hee Kim, Chang Hwa Jeong**, Yoon Kwon Nam**, Kwang Sik Min
and Dong Soo Kim**

Namhae Hatchery, National Fisheries Research and Development Agency,
Namhae 668-820, Korea

**Department of Aquaculture, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Endogeneous activities of β -galactosidase-like enzyme in various tissues from several finfishes and shellfishes were examined by histochemical analysis based on X-gal staining and by fluorimetric measurement using 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside (4-MUG). Species used in this study were 3 freshwater fishes, mud loach (*Misgurnus mizolepis*), common carp (*Cyprinus carpio*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*); 3 marine fishes, olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), stone flounder (*Kareius bicoloratus*) and marbled sole (*Limanda yokohamae*); and 4 shellfishes, abalone (*Haliotis discus hannai*), Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), pearl oyster (*Pinctada fucata martensii*) and ark shell (*Anadara broughtonii*).

The activities of β -galactosidase-like enzyme in all finfishes examined were significantly different among species, with the wide variations between tissues in a species. In general, the tissues such as kidney, intestine and liver were ones which showed the significantly higher values in 4-MUG fluorimetry and deeper staining patterns in X-gal analysis compared to other tissues. On the other hand, serum and muscle revealed the significantly lower activities than others did, regardless of species.

Shellfishes were also found to have endogenous activities of β -galactosidase-like enzyme which were significantly varied depending on both species and organs in a species. Hepatopancreas from all shellfishes examined showed the deepest pattern in X-gal staining and also the highest value in 4-MUG analysis, while activities of β -galactosidase-like enzyme in adductor muscles and mantle muscles from all shellfish species in this study except Pacific oyster were negligible; Pacific oyster had the significant activity of this enzyme in muscle tissues.

Putative endogenous *lacZ* fragment was amplified from both finfishes and shellfishes by polymerase chain reaction (PCR). The molecular size of PCR products was about 510 bp, and there was no difference in size among species examined.

Key words : Endogenous β -galactosidase, X-gal, 4-MUG, Finfish, Shellfish

* 본 연구는 한국과학재단 지정 우수공학연구센터인 부경대학교 해양산업개발연구소 연구비 지원에 의해 수행되었음.

서 론

LacZ 유전자는 *Escherichia coli*에서 lactose 대사에 관여하는 β -galactosidase를 발현하는 유전자로서 그 발현여부를 비교적 쉽게 검증할 수 있어 많은 유전자 이식 실험에 가장 널리 이용되고 있는 reporter 유전자이다(Chen and Powers, 1990; McEvoy et al., 1988). 이에 포유류(Wolff et al., 1990; Takeda and Toyoda, 1991), 식물(Teeri et al., 1989)은 물론 어류를 대상으로 한 유전자 이식에서도 널리 사용되고 있으며 이미 무지개송어(Inoue et al., 1991), 잉어(Hansen et al., 1991), zebrafish(Bayer and Campos-Ortega, 1992) 및 몇몇 연어과 어류(McEvoy et al., 1988; Sin et al., 1993) 등에서 *lacZ* 유전자의 성공적인 이식이 보고된 바 있다.

그러나, 최근 미꾸라지를 대상으로한 유전자 이식 실험에서 외래유전자가 이식되지 않은 대조군에서도 *E. coli*의 *lacZ*와 상당히 유사한 염기서열과 β -galactosidase의 활성이 관찰됨으로써, 어류 자체내에 내재성 *lacZ*의 존재 가능성이 보고된 바 있으며(Kim and Nam, 1994) 이후 송사리(Takagi et al., 1994; Tsai et al., 1995) 및 금붕어(Ueno et al., 1994)를 대상으로한 유전자 이식 연구에서 *lacZ* 유전자의 문제점과 외래 *lacZ* 유전자 발현 분석시 신중한 주의가 필요함이 보고되고 있다. 이들 어종들에서 관찰된 β -galactosidase의 활성은 어류 세포 자체내에 존재하는 내재성 β -galactosidase 또는 β -galactosidase-like enzyme에 기인한 것으로 여겨지며 다른 어종들에도 존재할 것으로 추정되고 있으나 아직 그 정확한 구조와 기능은 물론 조직내에서의 활성도 측정조차 전혀 이루어지지 못한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 우리나라 주 어패류들의 외래유전자 이식을 위한 기초자료를 얻기 위해 이들 어패류들에 내재되어 있는 β -galactosidase의 존재 및 그 활성을 비교분석하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1-1. 담수어

부경대학교 양식학과 양식유전공학 연구실에서 사육중인 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)와 양어장에서 사육중인 잉어(*Cyprinus carpio*) 및 텔라피아(*Oreochromis niloticus*)를 무작위로 선발하여 본 실험에 사용하였다.

1-2. 해산어

통영 근해에서 어획된 문치가자미(*Limanda yokohamae*) 및 돌가자미(*Kareius bicoloratus*)를 활어시장에서 구입한 후 본 연구실에서 유지하며 실험에 사용하였고, 넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 제주도 양식장에서 사육중인 개체를 부경대학교 해양공동연구소로 옮겨 순치 사육 후 실험에 사용하였다.

1-3. 패류

참전복(*Haliotis discus hannai*), 참굴(*Crasostrea gigas*), 진주조개(*Pinctada fucata martensii*) 및 피조개(*Anadara broughtonii*)는 국립수산진흥원 남해수산종묘배양장에서 사육중인 개체를 사용하였다.

2. 방법

2-1. 분석 시료 제작

어류는 마취 후 미부동액으로부터 채혈하여 혈청을 얻은 후, 해부하여 신장, 심장, 뇌, 안구, 비장, 근육, 소화관, 생식소 그리고 위를 적출, 분석에 사용하였다.

패류는 각장, 각고, 각폭 및 체중을 측정된 후 참전복은 아가미, 소화맹낭, 생식소, 장, 폐각근 및 근육을 적출하였으며, 참굴, 진주조개 및 피조개는 아가미, 소화맹낭, 생식소, 폐각근 및 외투근을 적출한 후 실험에 사용하였다.

2-2. X-gal 염색

X-gal 염색을 통하여 β -galactosidase의 활성을 분석하기 위하여 Inoue 등(1991)의 방법을 약간 수정하여 실시하였다. 각 분석용 시료를 PBS(phosphate buffered saline)로 2회 세척한 후

1.25% glutaraldehyde로 24시간 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 반응시켰다. 염색 반응이 완료된 후 다시 PBS로 3회 세척하고 70% ethanol에 보관하면서 염색 부위 및 염색 정도를 해부현미경 하에서 관찰하였다.

2-3. Polymerase chain reaction (PCR)

내재성 β -galactosidase gene의 존재 여부를 분석하기 위해 어패류의 근육조직을 채취한 후 DNA를 추출하여 PCR 분석에 사용하였다. DNA 추출과 PCR 반응은 Kim and Nam (1994)의 방법에 의거하여 수행하였다. PCR 반응은 50 μ l의 reaction cocktail (10 \times PCR buffer 5 μ l, 0.1 μ g/ μ l each primer 1 μ l, 25 mM $MgCl_2$ 5 μ l, H_2O 31.5 μ l, 2.5 unit Tag DNA polymerase)을 만든 후 genomic DNA를 넣어 94°C 1분, 63°C 1분 및 72°C 1분간 30 cycle을 수행하였다. 본 실험에 사용된 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.

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

각 시료들을 4°C로 유지한 상태에서 전자 저

울로 0.1 mg 단위까지 측정된 후 McEvoy 등 (1988)의 방법에 의거하여 β -galactosidase의 활성도를 측정하였다. 각 조직을 300 μ l의 buffer A (10mM sodium phosphate, pH 7.0 containing 0.1M NaCl, 1mM $MgCl_2$, 0.1% BSA)에 넣고 tissue tearor (Biospec Product, USA)를 사용하여 1분간 마쇄하고 마쇄가 완료된 시료에 50 μ l의 substrate solution (0.5% 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside in N,N-dimethylformamide)을 첨가 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. 1시간 반응 후 2.5 ml의 stopping solution (0.1M NaOH, pH 10.3)을 넣어 반응을 종료시키고 증류수로 1 : 100 희석하여 fluorimeter TKO 100 (Hoefer Scientific Co., USA)으로 fluorescence unit를 측정하여 상대적인 효소 활성도를 Braell (1991)의 방법에 의거 분석하였다. 패류에 있어서의 효소활성도는 조직 mg당 fluorescence로하여 계산하였다.

결 과

1. X-gal 염색 분석

어류 6종에 대하여 X-gal 염색을 실시한 결과, 염색의 정도는 종간에 차이가 있었으나, 모든 종에서 positive 염색 양상이 관찰되었다. 또한 개체내 조직간에도 염색 양상과 염색정도 역시 많은 차이가 나타났으며 일반적으로 간, 신장, 소화관의 조직에서 매우 진한 염색이 관찰되었고 반면 근육 조직에서 상대적으로 가장 약한 염색 양상이 관찰되었다(Table 1).

Table 1. Comparison of X-gal staining in the different tissues from six finfishes

Tissue	Density of X-gal staining*					
	Mud loach	Common carp	Nile tilapia	Olive flounder	Stone flounder	Marbled sole
Intestine	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Muscle	-	-	-	-	-	-
Gonad	+	+	++	+	+	+
Heart	+	+	++	+	+	++
Eye	++	+	+	++	+	+
Liver	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kidney	+++	+++	+++	+++	+++	+++

* Intensity of X-gal staining : -unstained, +, light blue ; ++, moderate blue ; +++, strong and deep blue

Table 2. Comparison of X-gal staining in the various organs from shellfishes

Tissue	Density of X-gal staining*			
	Abalone	Pacific oyster	Pearl oyster	Ark shell
Gill	+	++	+	+
Hepatopancreas	+++	+++	++	+++
Gonad	++	++	++	+++
Intestine	++	ND	ND	ND
Adductor muscle	-	+++	-	-
Mantle muscle	-	+++	-	-

* Intensity of X-gal staining : - unstained, +, light blue ; ++, moderate blue ; +++, strong and deep blue ; ND : not determined.

패류 4종의 경우, 분석한 대부분의 조직에서 역시 β -galactosidase의 활성이 관찰되어 소화맹낭에서 가장 강한 염색이 관찰되었고, 생식소 및 아가미에서도 비교적 진한 염색양상을 나타내었다. 그러나 참굴을 제외한 3종의 폐각근 및 외투근에서는 거의 염색이 되지 않아 β -galactosidase의 활성이 가장 낮은 조직으로 판단되었다. 그러나 참굴에 있어서는 폐각근 및 외투근에서도 매우 진한 염색 양상을 나타내었다(Table 2).

2. Polymerase chain reaction (PCR) 분석

어류 6종 및 패류 4종의 근육 조직으로부터 DNA를 추출한 후 PCR을 수행한 결과, 모두 약 510 bp에 해당하는 PCR product가 얻어졌으며 종간 및 개체간 증폭되는 DNA의 크기 차이는 관찰할 수 없었다(Fig. 1).

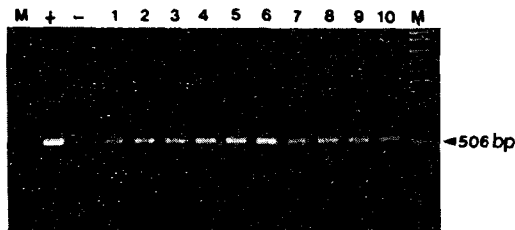


Fig. 1. Ethidium bromide stained 2% agarose gel showing the amplified fragment of putative endogenous *lacZ* gene from several finfishes and shellfishes. M, 1kb ladder ; +, *pmiwZ* containing *E. coli lacZ* gene ; -, water ; 1, mud loach ; 2, nile tilapia ; 3, common carp ; 4, olive flounder ; 4, stone flounder ; 5, marbled sole ; 6, abalone ; 7, Pacific oyster ; 8, pearl oyster ; 9, ark shell.

3. 4-MUG 분석에 의한 β -galactosidase의 활성도 비교 분석

3-1. 어류

담수어 3종과 해산어 3종의 각 장기별 β -galactosidase 효소의 4-MUG 분석 결과는 Table 3과 같다. 본 연구에서 분석한 담수어와 해산어 모든 종의 혈청을 제외한 대부분의 조직에서 β -galactosidase 효소의 활성이 관찰되었으며 혈청에서는 활성이 전혀 관찰되지 않았다.

미꾸라지의 경우, 신장에서 가장 높은 활성을 보였고, 소화관, 간, 비장, 생식소, 심장, 안구의 순으로 활성도가 높게 나타났으며 근육에서 가장 낮은 β -galactosidase의 활성을 보였다. 잉어의 경우도 역시 신장에서 가장 높은 활성을, 근육에서 가장 낮은 활성을 나타내었고 다른 조직들의 경우도 미꾸라지에서와 유사한 경향을 나타내었다. 틸라피아는 소화관에서 가장 높고, 신장, 심장, 비장, 간, 생식소 및 근육의 순으로 높은 활성을 보였다. 틸라피아의 경우 조사한 담수 및 해산어종 중 전반적으로 가장 높은 활성을 보여, 미꾸라지와 비교시 소화관에서는 10배 높은 값을 나타내었고 생식소 및 신장 그리고 간에서는 미꾸라지보다 2배 높은 값을, 또 비장 및 심장의 경우, 각각 약 3배와 10배의 높은 값을 보였다.

해산어인 넙치, 돌가자미 및 문치가자미의 β -galactosidase 효소의 활성도를 조사한 결과 넙치의 각 장기별 효소의 활성도는 간 및 비장에서 높은 값을 보였으며, 근육은 담수어와 차이를 보이지 않았다. 돌가자미와 문치가자미는 신장 및 비장에서 높은 값을 보였으나, 다른 장기에

Table 3. Comparison of endogenous β -galactosidase like enzyme activities (mean \pm SD) in the different tissues from six finfishes

Tissue	Arbitrary activity/mg of tissue (n)*		
	Mud loach	Nile tilapia	Common carp
Serum	0	0	0
Stomach	ND**	13.29 \pm 2.64 (14)	ND
Intestine	7.43 \pm 2.22 (13)*	72.54 \pm 17.44 (9)	10.86 \pm 1.83 (11)
Muscle	0.28 \pm 0.08 (12)	0.28 \pm 0.08 (12)	1.35 \pm 0.35 (12)
Liver	7.35 \pm 1.74 (12)	12.09 \pm 3.55 (14)	10.90 \pm 2.86 (12)
Kidney	18.32 \pm 6.23 (12)	29.27 \pm 7.20 (14)	20.47 \pm 5.47 (12)
Heart	2.08 \pm 0.41 (12)	23.49 \pm 6.93 (14)	4.65 \pm 1.10 (12)
Gonad	4.04 \pm 1.50 (14)	8.74 \pm 6.95 (14)	3.11 \pm 1.06 (9)
Spleen	5.09 \pm 1.96 (12)	15.93 \pm 4.37 (14)	13.29 \pm 2.73 (12)
Eye	1.50 \pm 0.43 (12)	ND	ND
Brain	ND	3.86 \pm 0.60 (14)	3.43 \pm 0.83 (12)

* number of fish analyzed ; ** not determined.

Table 3. Continued

Tissue	Arbitrary activity/mg of tissue (n)*		
	Olive flounder	Stone flounder	Marbled sole
Serum	0	0	0
Stomach	4.11 \pm 1.32 (13)*	6.42 \pm 1.62 (9)	5.18 \pm 1.29 (9)
Intestine	9.79 \pm 4.28 (14)	11.37 \pm 2.52 (7)	11.87 \pm 6.70 (9)
Muscle	0.27 \pm 0.09 (14)	0.43 \pm 0.15 (9)	0.43 \pm 0.11 (9)
Liver	13.45 \pm 3.15 (14)	8.26 \pm 1.68 (10)	3.87 \pm 3.28 (9)
Kidney	7.50 \pm 2.67 (14)	18.01 \pm 2.40 (10)	17.54 \pm 6.28 (9)
Heart	2.82 \pm 1.52 (14)	4.11 \pm 0.98 (9)	8.83 \pm 5.22 (9)
Gonad	ND**	5.04 \pm 2.40 (9)	6.29 \pm 2.65 (8)
Spleen	10.86 \pm 4.61 (14)	16.15 \pm 3.04 (9)	8.35 \pm 3.34 (8)
Eye	1.32 \pm 0.49 (14)	ND	ND
Brain	1.86 \pm 0.45 (14)	2.06 \pm 0.33 (9)	2.68 \pm 0.95 (8)

* number of fish analyzed ; ** not determined.

Table 4. Comparison of endogenous β -galactosidase like enzyme activities (mean \pm SD) in the different tissues from four shellfishes

Tissue	β -Galactosidase like enzyme (ng/mg)			
	Abalone	Pacific oyster	Peaarl oyster	Ark shell
Gill	1.40 \pm 0.26 (6)*	1.86 \pm 0.32 (6)	1.25 \pm 0.07 (6)	1.63 \pm 0.48 (6)
Hepatopancreas	9.75 \pm 1.58 (6)	12.68 \pm 0.78 (6)	7.12 \pm 0.41 (6)	8.38 \pm 3.13 (6)
Gonad	7.35 \pm 2.02 (6)	2.79 \pm 0.47 (6)	1.25 \pm 0.44 (6)	1.37 \pm 0.38 (6)
Intestine	5.25 \pm 0.71 (6)	ND**	ND	ND
Adductor muscle	0.18 \pm 0.04 (6)	12.22 \pm 1.36 (6)	0.19 \pm 0.04 (6)	0.13 \pm 0.03 (6)
Mantle muscle	0.28 \pm 0.04 (6)	6.52 \pm 1.12 (6)	0.57 \pm 0.13 (6)	0.21 \pm 0.04 (5)

* number of fish analyzed ; ** not determined.

서는 큰 차이를 나타내지 않았다.

3-2. 패류

패류 4종의 β -galactosidase의 활성도는 Table 4와 같다. 조사한 4종의 패류 모두 소화맹낭에서

가장 높은 활성도를 보였으며 참굴을 제외한 3종 모두에서 폐각근과 외투근에서 낮은 활성도를 나타내었다. 참전복의 경우, 소화맹낭에서 가장 높은 값을 보여 소화맹낭, 생식소, 소화판, 아가미,

폐각근 및 외투근 순으로 높은 활성을 보였으며 참전복의 생식소는 참굴, 진주조개 및 피조개보다 4~5배 높은 값을 나타내었다. 진주조개와 피조개 역시 소화맹낭에서 가장 높은 값을, 근육조직에서 가장 낮은 값을 보여 참전복의 경우와 유사한 경향을 나타내었다. 참굴에 있어서는 소화맹낭에서 가장 높은 값이 나타났으나, 근육조직에서 참전복, 진주조개 및 피조개 보다 약 10~60배 높은 활성을 보여 차이를 나타내었다.

고 찰

외래 유전자 이식에서 *lacZ*는 그 유전자 발현의 분석이 신속하고 손쉽다는 장점으로 인해 가장 널리 이용되는 reporter 유전자이나 최근들어 몇몇 어종에서 내재성 β -galactosidase의 활성이 보고됨으로서(Kim and Nam, 1994; Ueno et al., 1994; Tsai et al., 1995) 어류 유전자 이식을 위한 *lacZ* 유전자의 문제점과 외래 *lacZ* 유전자 발현 분석시 신중한 주의가 필요함이 보고되고 있다. 이에 본 연구에서는 우리나라 주 어패류들의 외래유전자 이식을 위한 기초자료를 얻기 위해 이들 어패류들에 내재되어 있는 β -galactosidase의 존재 및 활성을 비교분석 하였다.

X-gal 염색에 의한 β -galactosidase의 분석은 효소 활성의 손실 없이 조직내 발현한 β -galactosidase를 고정시키고 기질과의 반응을 통해 발현 부위 및 발현 정도를 분석하는 방법이다. 본 연구에서 조사한 어패류 대부분의 종이 근육부위를 제외한 모든 장기에서 염색 반응을 나타내었다. 이는 *lacZ* 유전자를 이식한 후 발현 검증을 위하여 X-gal 염색을 행한 결과 β -galactosidase gene이 이식되지 않은 대조군 개체에서도 positive의 결과를 나타낸다는 송사리에서의 보고(Takagi et al., 1994; Tsai et al., 1995) 및 금붕어(Ueno et al., 1994)의 결과와 일치하는 것이다. 아울러 패류에 있어서도 β -galactosidase의 활성이 나타난다는 본 연구결과는 아직까지 패류를 대상으로 한 β -galactosidase 활성 측정이 전무한

실정을 고려하면 전세계적으로 최초의 보고로 앞으로 패류를 대상으로 한 *lacZ* 유전자 이식에 중요한 정보를 제공할 수 있을 것이다.

10종의 어패류에 대하여 PCR 기법을 수행한 결과 분석된 종 모두에서 positive의 결과를 보임으로서 이는 미꾸라지에 *Escherichia coli*의 β -galactosidase gene과 homology sequence가 존재한다는 Kim and Nam (1994)의 보고와 일치하였다. 그러나 Ueno 등(1994)은 금붕어를 대상으로 *lacZ* 유전자 이식시 대조군에서는 PCR 반응이 일어나지 않음을 보고한 바 있어 차이를 나타내었다. 차후 다양한 primer 제작 및 보다 자세한 genome 분석기법을 통해 내재성 어패류 *lacZ* 유전자의 구조를 밝힐 수 있는 연구가 뒤따라야 할 것으로 판단된다.

4-MUG 분석은 β -galactosidase의 발현여부를 효소화학적 분석방법에 의해 손쉽게 진단할 수 있는 방법으로 McEvoy 등 (1988)에 의해 연어과 어류의 유전자 이식 분석 방법으로 이용된 바 있다. 본 실험의 4-MUG 분석 결과 혈청에서는 활성도가 극히 낮아 본 효소는 혈청을 통해 다른 장기 혹은 조직으로 전이되지 않는 것으로 사료된다. 뇌에서의 활성도는 담수어의 경우 대체적으로 높고 해산어는 낮은 경향을 보였다. 포유류의 뇌에서 pH 4.5에서 최적 활성을 나타내는 내재성 β -galactosidase가 존재한다는 보고(Shimohama et al., 1989)에 비추어 뇌 조직에서도 본 효소가 중요한 작용을 하는 것을 알 수 있다. 소화관과 간에서는 틸라피아를 제외하고 미꾸라지 및 잉어에서 거의 같은 값을 보여 흥미로웠다. 그러나, 해산어에서는 넙치를 제외하고 돌가자미 및 문치가자미에서 간이 소화관보다 낮은 값을 보였다. 참전복, 피조개 및 진주조개인 경우 소화맹낭에서 높은 값을 나타내어 폐각근 및 외투막에 비하여 20배 정도 높은 활성을 나타내었다. 그러나, 참굴에 있어서는 폐각근 및 외투근에서 다른 패류에 비해 상대적으로 높은 활성을 나타내었다. 이렇듯 4-MUG 분석 결과 주로 소화기관에서 β -galactosidase의 활성이 높게 나

타남은 β -galactosidase gene이 영양분의 소화와 흡수에 관여할 수도 있으리라 추정된다. 아울러 식성간의 활성도 차이, 먹이공급 후의 시간변화와 절식에 따른 본 효소의 발현정도, 그리고 그의 정확한 역할과 작용기전 및 특성에 대한 정확한 동정이 필요한 것으로 판단된다.

이상 본 연구 결과에서와 같이 내재성 β -galactosidase의 활성이 어패류에 존재하고 그 활성이 장기에 따라 서로 다르게 나타나는 것을 고려할 때 앞으로 *lacZ*를 구조유전자로 하는 외래유전자를 reporter 유전자로 어류에 이식실험을 할 때 유전자 발현시기, 분석 대상 조직, 분석조건 등에 관한 보다 세밀한 주의가 필요할 것으로 사료된다.

국문요약

어류 및 패류내에 내재하는 내재성 β -galactosidase의 활성도를 분석함으로써 외래유전자의 이식시 기초자료로 활용하고자 어류 6종 및 패류 4종을 대상으로 본 실험을 행하였다.

어류에 있어서의 X-gal 염색 결과 혈청 및 근육을 제외한 모든 조직에서 모두 positive (+) 염색 양상을 보였다. 패류에 있어서도 어류와 같은 양상을 보여 근육을 제외한 모든 조직에서 모두 positive 염색 양상을 보였으며 더욱이 참굴에 있어서는 폐각근 및 근육에 있어 매우 진한 염색 반응을 보였다.

근육으로 부터 DNA를 추출한 후 PCR을 수행한 결과 모든 종에서 positive (+) 결과를 나타내었으며, 어패류간 그리고 각 개체간 차이는 없었다.

각 장기별 β -galactosidase의 활성도 측정결과 모든 종에 있어서 혈청의 활성도는 무시할 만한 수준이었고, 근육에서 가장 낮게 나타났다. 미꾸라지와 잉어에서는 신장에서 가장 높은 활성을 보였고, 틸라피아는 소화관에서 가장 높은 값을 보였다. 해산어인 넙치의 경우 돌가자미, 문치가자미의 경우에 비해 간에서 활성이 높았다. 그러나

돌가자미 및 문치가자미인 경우 신장에서 가장 높은 값을 보였다.

패류에 있어서는 소화맹낭에서 가장 높은 활성값을 나타내었고 폐각근 및 외투막에서 매우 낮은 활성값을 나타내었다. 그러나, 참굴에 있어서는 참전복, 피조개 및 진주조개 보다는 상대적으로 폐각근 및 외투근에서 높은 활성을 나타내었다.

참고문헌

- 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.
- Braell, W. A., 1991. β -galactosidase assay using the TKO 100 minifluorometer. Hoefer Scientific Instruments. Technical Bulletin # 129.
- Chen, T. T. and D. A. Power, 1990. Transgenic fish. *Trends Biotechnol.*, 8 : 209-215.
- 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.
- Inoue, K., S. Yamashita, N. Akida, T. Mitsuboshi, E. Nagahisa, T. Shiba and T. Fujita, 1991. Histochemical detection of foreign gene expression in rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57 : 1511-1517.
- Kim, D. S., and Y. K. Nam, 1994. Transfer of foreign gene into mud loach, *Misgurnus mizolepis*. I. Availability of the *lacZ* as a reporter gene for production transgenic mud loach. *J. Aquacult.*, 7 : 41-54.
- McEvoy, T. G., 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.
- Shimohama, S., M. B. Rosenberg, A. M. Fagan, J. A. Wolff, M. P. Short, X. O. Breakfield, T. Friedmann and F. H. Gage, 1989. Grafting genetically modified cells into the rat brain : characteristics of *E. coli* β -galactosidase as a reporter gene. *Mol. Brain*

- Res., 5 : 271-278.
- Sin, F. Y. T., A. L. Bartley, S. P. Walkr, 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.
- Takagi, S., T. Sasado, G. Tamiya, K. Ozato, Y. Wakamatsu, A. Takeshita and M. Kimura, 1994. An efficient expression vector for transgenic medaka construction. *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, 3 : 192-199.
- Takeda, S. and Y. Toyoda, 1991. Expression of SV40-*lacZ* gene in mouse preimplantation embryos after pronuclear microinjection. *Mol. Reprod. Devel.*, 30 : 90-94.
- Teeri, T. H., H. Lehtvaslaiho, 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.
- Teeri, T. H. and Herrera-Estrella, 1991. The use of *lacZ* as a reporter gene in plants. p B15 : 1-16. In : SB Gelvin et al. (eds). *Plant Molecular Biology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Tsai, H. -J., S. -H. Wang, K. Inoue, S. Takagi, M. Kimura, Y. Wakamatsu and K. Ozato, 1995. Initiation of the transgenic *lacZ* gene expression in medaka (*Oryzias latipes*) embryos. *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, 4 : 1-9.
- Ueno, K., S. Hamaguchi, K. Ozato, J.-H. Kang and Inoue, 1994. Foreign gene transfer into nigorobuna (*Carassius auratus grandoculis*). *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, 3 : 235-242.
- 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.