

## 외래 유전자가 이식된 동형접합성 미꾸라지 생산

### II. pFV4CAT이 이식된 F<sub>0</sub> 생산

남윤권 · 김철근\* · 김동수

부경대학교 양식학과

\*한양대학교 생물학과

## Production of Homozygous Transgenic Mud Loach (*Misgurnus mizolepis*)

### II. pFV4CAT Transfer by Microinjection

Yoon Kwon Nam, Chul Guen Kim\* and Dong Soo Kim

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

\*Department of Biology, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

A construct containing reporter gene (pFV4CAT) regulated by carp  $\beta$ -actin promoter was microinjected into the one-cell stage egg of mud loach (*Misgurnus mizolepis*), and was successfully expressed, possibly by the integration into the genome. Both mean hatching success and early survival of the microinjected groups were not significantly different with those of control groups ( $P > 0.05$ ). The incidence of transgene was ranged from 7 to 48% based on the PCR and/or Southern blot analyses with the DNA prepared from fin or blood tissue. The spatial and temporal patterns of expression of the pFV4CAT gene, measured by *in situ* immunohistochemical analysis using peroxidase-conjugated anti-CAT antibody, were variable among the experimental individuals. These results suggest that carp  $\beta$ -actin promoter is effective to express other transgene in mud loach, such that this promoter can be useful in the generation of valuable transgenic mud loach.

Key words : Microinjection, pFV4CAT, Expression, Mud loach, *Misgurnus mizolepis*

## 서 론

어류를 대상으로한 유전자 이식은 척추동물의 유전자 발현 양상 및 조절 기능을 연구하는데 매우 유용한 재료로 사용되고 있으며, 아울러 산업적으로 유용한 계통 또는 생체 내에서 합성되는 신물질을 쉽게 생산할 수 있는 방편으로서 전세계적으로 많은 관심을 받고 있다(Hew et al., 1995). 그러나, 아직 포유류를 위시한 여타 동물의 유전자 이식 연구에 비해 어류 유전자 이식은 일천한 역사를 갖고 있으며, 어류 자체

에 대한 정보 부재 및 유전자 이식실험의 재료로서 어류의 장점을 충분히 살릴 수 있는 transgenic system이 정착되어 있지 않아서 몇몇 성공적인 결과를 제외하고는 매우 초보적인 단계에 머물고 있다(Pandian and Marian, 1994). 따라서, 최근 10년간 많은 어종에서 외래 유전자 이식이 시도되고 있으나 아직 stable transgenic line의 형성은 송사리에서 단 1계통만이 형성되었을 뿐(Kinoshita et al., 1996) 안정적인 외래 유전자의 삽입 및 삽입된 유전자의 발현 역시 매우 미비한 실정이다.

미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)는 수정란 및 배(embryo)가 투명하고, 부화 소요 시간이 짧으며, 1세대의 길이가 짧고, 연중 다회산란 기법이 확립되어 있으며, 저산소와 질병에 강할 뿐만 아니라 산란력이 높아 유전자 이식 재료로서 많은 장점을 지니고 있다(Nam et al., 1996).

본 연구는 미꾸라지를 대상으로 어류 유전자 이식의 model system을 개발하기 위한 연구의 일환으로 잉어의  $\beta$ -actin 유전자의 promoter와 chloramphenicol acetyl transferase (CAT) 유전자를 갖고 있는 pFV4CAT을 미꾸라지에 microinjection법으로 이식하여 CAT 유전자의 genomic integration의 가능성 유무와 발현 양상을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험어 및 산란 유도

실험어, 미꾸라지(*M. mizolepis*)는 부경대학교 양식학과 어류 유전공학 실험실에서 사육 중이던 개체를 사용하였으며 Kim et al. (1995) 방법에 의거하여 인공 산란시켜 얻은 정자와 난자를 유전자 이식에 사용하였다.

### 2. 외래 유전자 및 microinjection

외래 유전자(pFV4CAT)는 미국 미네소타 대학의 Hackett 박사가 개발한 유전자(Liu et al., 1990)를 사용하였으며 기존의 conventional alkaline lysis method를 통해 순수 분리 후 microinjection에 사용하였다. Microinjection은 지름 5  $\mu$ m의 glass needle을 이용, 50 g/ml의 농도로 Nam et al. (1996)의 방법에 의해 수행하였다.

### 3. DNA 추출 및 PCR screening

DNA는 부화 2주된 개체의 꼬리 지느러미로부터 기존의 SDS/proteinase K method의 방법(Sambrook et al., 1989) 또는 부화 후 9개월된 개체의 혈액으로부터 본 실험실에서 개발된 핵산을 분리한 후 단백질 분해 효소를 사

용하지 않는 rapid genomic DNA isolation method(특허 출원 08/534,531, USA)를 이용하여 추출하였다.

PCR을 위해 약 0.2  $\mu$ g의 genomic DNA를 reaction mixture (20 mM Tris pH 8.3, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl, 100  $\mu$ g/ml gelatin, 20 pmoles each PCR primer, 50  $\mu$ M of each dNTPs, and 2.5 U *Taq* DNA polymerase)와 혼합한 후 94°C 에서 1 min, 60°C에서 30 sec, 72°C 에서 1 min의 조건으로 30 cycles을 수행하였다. PCR 분석에 사용된 primer set는 Caldovic and Hackett (1995)에 의해 제작된 염기서열을 이용하였다.

### 4. Southern blot 분석

PCR positive개체에서 추출된 DNA 10  $\mu$ g을 제한효소 *Bam* HI으로 digestion하고 capillary method로 nylon membrane에 transfer한 후 digoxigenin-labeled 0.8kb CAT 절편을 probe로 이용, hybridization을 수행하였다. Hybridization 및 detection 과정은 Boehringer Mannheim (Germany)사의 non-radioactive labeling and detection kit의 manual에 따라 수행하였다.

### 5. Immunohistochemistry

외래 유전자 (CAT)의 발현 여부를 분석하기 위해 외래 유전자 산물인 CAT에 대해 peroxidase-conjugated antibody (5Prime-3Prime, Inc., USA)를 이용하여 *in situ* immunohistochemical analysis를 수행하였다. 분석을 위해 각 실험군으로부터 부화 자어 100마리를 무작위로 택하여 분석하였으며 분석 방법은 Caldovic and Hackett (1995)의 방법에 의거하였다.

## 결 과

### 1. 부화율 및 초기 생존율

Microinjection 된 수정란의 부화율은 38.9-

69.1%로 사용된 난에 따라 다양하게 나타나 대조군과 (47.9-73.8%) 비교시 약간 낮은 것으로 관찰되었으나 대조군과의 유의적인 차이는 없었다(P>0.05). 그리고 난황흡수기까지의 초기 생존율은 실험군간 차이를 전혀 관찰할 수 없었다 (data not shown).

2. PCR 분석

부화 후 2주 및 9개월된 개체들을 대상으로 PCR을 통해 외래 유전자 존재 여부를 분석한 결과 7.4-48.1%의 외래 유전자 존재 빈도를 나타냄으로서 microinjection된 group간 다양하게 나타났다(Table 1과 Fig. 1).

Table 1. Incidence of transgene in 2-week-old and 9-month-old mud loach based on the PCR analysis

Experimental group	No. of fish carrying pFV4CAT No. of fish analyzed(%)	
	2-week-old	9-month-old
Non-injected group	0/27 ( 0.0)	0/27 ( 0.0)
Injected group		
# 1	3/27 (11.2)	2/27 ( 7.4)
# 2	5/27 (18.5)	4/27 (14.8)
# 3	3/27 (11.2)	3/27 (11.2)
# 4	8/27 (29.6)	7/27 (25.9)
# 5	13/27 (48.1)	10/27 (37.0)
# 6	7/27 (25.9)	4/27 (14.8)

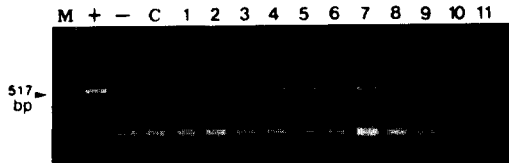


Fig. 1. Et-Br stained agarose gel showing the results of PCR analysis. M, 1 kb ladder ; +, pFV4CAT ; -, negative blank ; C, non-injected fish ; 1~11, microinjected fish.

3. Southern blot

Southern blot 분석 결과, microinjection 되지 않은 대조군에서는 positive한 signal이 전혀 관찰되지 않았다. 반면 PCR positive 개체들을

분석한 결과, Bam HI으로 pFV4CAT을 절단했을 경우 CAT 절편에 해당하는 0.8kb 예상위치에서 모두 band가 정확히 관찰되었다(Fig. 2).

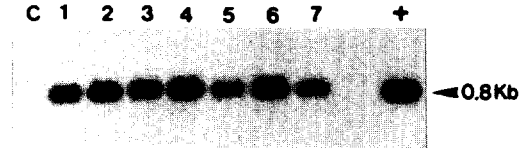


Fig. 2. Genomic southern blot analysis of microinjected and non-injected fish. DNAs were completely digested with Bam HI, electrophoresed in 0.7% TAE agarose gel, transferred to nylon membrane, and hybridized with 11-digoxy-dUTP labeled 0.8kb CAT fragment. C, non-injected fish ; lane 1-7, PCR positive fish ; +, pFV4CAT digested with Bam HI.

4. Immunohistochemistry

외래 유전자의 발현 여부를 immunohistochemistry로 분석한 결과 microinjection 된 수정란의 부화자어들에서 다양한 pattern의 염색 양상이 관찰되었으며 대조군에서도 역시 약간의 희미한 back ground 활성이 관찰되었다(Fig. 3). 개체들마다 염색 부위 및 염색의 농도에 차이가 있었으며 immunohistochemistry를 바탕으로 한 유전자 발현 빈도는 18.0-58.0%로 나타났다(Table 2).



Fig. 3. Expression of CAT protein in newly hatched putative transgenic larvae. The brown staining marks tissues expressing CAT. a, non-injected control ; b, microinjected & expressed fish.

**Table 2. Percent expression of pFV4CAT transgene in newly hatched mud loach larvae based on *in situ* immuno-histochemical analysis**

Experimental group	Proportion (%) of fish expressing pFV4CAT
Non-injected group	0.0
Injected group	
# 1	58.0
# 2	39.0
# 3	18.0
# 4	55.0
# 5	46.0
# 6	31.0

## 고 찰

어류에 있어 수정란에 외래 유전자의 이식을 위한 방법은 여러 가지가 개발되어 있다. 그 중 *microinjection* 방법은 어중에 따라 생존율에 차이를 보이는 단점이 보고되고 있으나, 어류 유전자 이식에 있어 가장 효과적이고 안정적인 방법으로 널리 이용되고 있다(Pandian & Marian, 1994). 본 연구에서도 *microinjection*을 통해 *transgenic founder* 미꾸라지의 생산이 가능함을 나타내었으며, 외래 유전자로 사용된 pFV4CAT은 미꾸라지 세포 내에서 효율적으로 발현할 수 있는 것으로 나타났다. 더욱이 연구 결과 *microinjection*된 미꾸라지 수정란의 부화율과 초기 생존율은 대조군과 비교시 유의적인 차이가 없는 것으로 나타나 본 종의 경우 송사리, zebrafish, 및 연어과 어류 등의 결과와 유사하였다(Pandian and Marian, 1994).

본 연구에서 PCR로 이식된 유전자 존재 여부를 분석한 결과, 부화 후 9개월된 성어에서 7.4-37.0%의 외래 유전자 존재 빈도를 나타냄으로서 기존의 여타 어류 유전자 이식실험에서의 결과보다 비교적 높은 빈도를 나타내었다. 이는 유전자 이식조건, 분석 시기 또는 사용한 외래 유전자의 종류에 기인한 것으로 판단된다(Panman et al., 1990; Pandian and Marian, 1994). 그러나, 앞으로 미꾸라지의 염색질내에 이식된 본 유전

자가 안정적으로 존재할 수 있는 지에 대한 연구를 수행하여야 할 것이다.

부화 후 9개월된 성어의 혈구 세포를 대상으로 Southern blot 분석을 실시한 결과, 외래 유전자 pFV4CAT의 존재 여부를 확인할 수 있어 미꾸라지 염색체 상의 삽입 가능성을 시사하였다. 차후 염색체 상의 삽입 양상, 예컨대 copy 수, concatamerization, 및 high molecular weight band 양상 등을 규명하여야 할 것으로 판단된다.

*In situ* immunohistochemical analysis 결과 이식된 외래 유전자 pFV4CAT은 미꾸라지 자어에서 효율적으로 발현을 할 수 있는 것으로 나타났다. 특히 각 개체마다 다양한 염색의 진하기 및 염색 부위를 보임으로서 F<sub>2</sub> *transgenic fish*는 mosaic 특성을 나타내어 Caldovic and Hackett (1995)의 zebrafish에서의 결과와 유사하였다. 그러나 대조군에서도 관찰된 약간의 염색은 어류 자체내에 존재하는 peroxidase activity 또는 어류 단백질과 분석에 사용한 항체와의 비특이적인 결합에 기인한 것으로 판단되나 차후 보다 자세한 검증이 요구된다.

본 결과를 바탕으로 이식된 유전자의 지속적인 발현 여부와 다음세대로의 전달 양상을 규명할 수 있는 연구가 뒤따라야 할 것이며 궁극적으로 염색체 공학 기법을 위시한 breeding program 통해 *isogenic line*의 형성이 요구된다.

## 요 약

미꾸라지를 대상으로 어류 유전자 이식을 위한 유용 model system으로 개발하기 위한 연구의 일환으로 잉어의  $\beta$ -actin 유전자의 promoter와 CAT 유전자가 융합되어 있는 외래 유전자 (pFV4CAT)를 미꾸라지에 이식, *transgenic founder* 미꾸라지를 생산하였다. PCR 분석 결과, 이식된 외래 유전자는 부화 후 9개월된 성어에서 7.4-37.0%의 빈도로 존재하였으며 Southern blot 분석에 의해서 염색체 상의 삽입 가능성을 나타내

었다. *In situ* immunohistochemical analysis 결과 이식된 외래 유전자는 미꾸라지 세포내에서 비교적 높은 빈도로 발현하였으며 그 발현 양상은 개체마다 다양하게 나타났다.

### 감사의 글

본 연구는 교육부 학술연구조성비(유전공학분야) (과제번호 : 174-1, 1995) 및 한양대학교 교수지원 연구비(1996년)의 지원에 의해 수행되었음.

### 참 고 문 헌

- Caldovic L., and P. Hackett, 1995. Development of position-independent expression vectors and their transfer into transgenic fish. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 4 : 51-61.
- Hew, C. L., G. L. Fletcher and P. L. Davies, 1995. Transgenic salmon : tailoring the genome for food production. *J. Fish. Biol.*, 47 : 1-19.
- 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* 135 : 257-265.
- Kinoshita, M., H. Yoyohara, M. Sakaguchi, K. Inoue, S. Yamashita, M. Satake, Y. Wakamatu and K. Ozato, 1996. A stable line of transgenic medaka (*Oryzias latipes*) carrying the CAT gene. *Aquaculture*, 143 : 267-276.
- Liu, Z., Z. Zhu, K. Roberg, A. J. Faras, K. Guise, A. Kapuscinski and P. Hackett, 1990. The isolation and characterization of the  $\beta$ -actin gene of carp (*Carprinus carpio*). *DNA Seq.*, 1 : 125-131.
- Nam, Y. K., M. S. Kim, H. H. Lee and D. S. Kim, 1996. Production of transgenic homozygous diploid in mud loach (*Misgurnus mizolepis*). I. Transfer of luciferase gene and evaluation of mud loach expression vector. *J. Aquacult.*, 9 : 293-300.
- Pandian, T. J. and L. A. Marian, 1994. Problems and prospects of transgenic fish production. *Curr. Sci.*, 66 : 635-649.
- Penman, D. J., A. J. Beeching, S. Penn and N. Maclean, 1990. Factors affecting survival and integration following microinjection of novel DNA into rainbow trout eggs. *Aquaculture*, 85 : 35-50.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis, 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.