

## 내재적 유전자에 의한 어류난자에서의 hEGF 단백질 생산을 위한 기술개발

황창남<sup>1</sup> · 송기철 · 이재현 · 윤종만<sup>2</sup> · 김기동<sup>3</sup> · 이상호<sup>1</sup> · 박홍양<sup>†</sup>

건국대학교 동물자원연구센터

### Development of Transgenic Fish for the Production of Human EGF Protein

Hwang, C. N.<sup>1</sup>, K. C. Song, J. H. Lee, J. M. Yoon<sup>2</sup>, K. D. Kim<sup>3</sup>, S. H. Lee<sup>1</sup> and H. Y. Park<sup>†</sup>

Animal Resources Research Center, Konkuk University

#### ABSTRACT

Improvement and possible commercialization of a home-made electroporation apparatus(home-made) were further tried to establish a simple and effective introduction of foreign gene into sperm followed by *in vitro* fertilization. Expressions of introduced pJJ9 and pNT plasmids were shown in all fertilized eggs with electroporated spermatozoa. In particular, with this gene transfer system all the fry showed a consistently transient expression in the syncytium of the yolk sac. This fact is important since some required, minute quantity of human proteins can be produced from the established transient expression on the yolk sac of all fry derived from *in vitro* fertilization with electroporated spermatozoa.

To explore tissue-specific expression in fish, which we will use a similar system later, we targeted the nerve tissue to see whether tissue-specific promoter is working in fish properly. pNT plasmid containing a nerve cell-specific tubulin promoter gene demonstrated consistently exact targeted expressions among the developing nerve cells in later stages of embryos and hatched fry. Finally, liver-specific genes are now being cloned by using already selected primers for useful human protein gene fusion.

#### I. 서론

Super fish의 개발을 위해 GH유전자를 주입시킨 결과가 무지개송어, tilapia, 미꾸리, 메기 그리고 금붕어에서 보고되었고(Chourrout 등, 1986; Maclean 등, 1987; Brem 등, 1988; Zhu 등, 1985, 1986;

Dunham and Eash, 1987), 또한, 환경에 대한 저항력의 증가와 서식범위의 확장을 위한 내한성 어류의 개발을 위해 극해지역의 극저온에 서식하는 winter flounder에서 분리한 항동결단백질유전자(anti-freeze protein gene)를 연어류에 주입한 결과가 보고되었다(Fletcher 등 1988). 한편 미세조작기술의 개발을 위해  $\beta$ -galactosidase gene과 neomycin

이 논문은 1998년도 한국학술진흥재단의 학술연구비에 의하여 지원되었음.

<sup>†</sup> Corresponding author : College of Agriculture, Animal and Life Science, Konkuk University

<sup>1</sup> 고려대학교 생명공학원(Division of Life Sciences and Graduate School of Biotechnology, Korea University)

<sup>2</sup> 군산대학교 수족병리학과(Gunsan University)

<sup>3</sup> 서울대학교 농업생명과학대학(School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University)

resistant gene을 이용한 시도가 McEvoy 등 (1988)과 Yoon 등 (1988)에 의해 수행되었고, 그 외에 zebrafish와 medaka를 이용한 발생유전·생물학적 분석을 Stuart 등 (1988), Ozato 등 (1986)이 DNA 미세주입에 의해 매우 효율적인 것으로 보고되고 있다. 그러나 미세 조작 후 생존한 배의 비율, 외래 유전자 발현율은 최고 25% 정도이고 생식질로의 유입까지 성공한 사례는 극히 드물다. 이는 반대로 포유동물 난자 및 배세포들에 있어서 배세포 침입에 의한 유전자이식은 현재 방법의 효율성 재고 및 다른 방법에 의한 유전자 이식 등의 관점에서 더욱 연구가 진행되어야 할 것이다. 특히 체세포에서 개발되어 수행되고 있는 여러가지 DNA transfection 방법들에 비하면 난자 및 초기배세포의 방법은 그 다양성 면에서 더욱 풍부해질 것이다.

정자를 매개체로 한 유전자변환 어류는 Khoo 등 (1992)이 zebrafish 정자와 외래DNA를 단순배양하여 37.5% 발현율을 처음 보고하여 가능성을 보여 주었다. 어류의 경우 특히 난자가 크고, 그 수가 많으므로 기존에 확립된 유전자 미세주입과 비교하여 다수의 난자에 동시에 주입할 수 있는 정자를 이용한 유전자 도입방법을 확립하여 transient expression은 물론, 생식질 이행된 유전자 변환어류의 확립으로 발현된 인간 단백질 의약품이 포함된 추출물의 생물학적 기능검정이 최종목적이지만 transient 발현 체계를 이용하기 위한 유전자 개발과 정자 electroporation 체계의 구축과 개선을 실용적인 수준까지 재고시킬 필요가 있으며 또한 조직 특이적 표적유전자의 발현이 어류에서 가능한지가 먼저 선결되어야 할 것이다. 이를 위해 새로이 구축된 pNT의 조직 특이성을 검토하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물 적응

수컷은 22°C, 암컷은 24°C의 수조에 각각 격리 수용하여 관리하였다. 사육수는 간이 여과기를 이용하여 정화하여 주었고, 조명장치와 timer를 이용하여 광주기를 명(明) 13시간 암(暗) 11시간으로 일정하게 조절하여 주었다.

## 2. 생식세포의 회수, 인공수정 및 초기배양

### 1) 난자의 회수

인위적인 배란유기를 위하여, 미꾸라지 암컷을 200ppm 농도의 2-methylquinoline (Quinaldine, Sigma Co., St. Louis, MO, USA) 수용액이 들어있는 병에 2~3분간 방치하여 마취시킨 후, 체중 1g당 15 IU의 human chorionic gonadotropin(hCG, IVF-C, 5,000IU, LG화학, 전북)을 복강주사하여 난자의 성숙을 유도하였다. hCG주사 13~14시간 후 복부를 압박하여 난자를 회수하였다.

### 2) 정자의 회수

성숙한 수컷 미꾸라지를 희생시킨 후, 복부를 수술용 미세가위로 절개하여 정소를 적출하였다. 적출된 정소를 1ml의 fish Ringer's Solution(fRS; 128mM NaCl, 27mM KCl, 18mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O)이 들어있는 Eppendorf tube에 담근 후, 미세가위를 이용하여 세절하여 정소로부터 정자가 방출되도록 하였다. 회수된 정액은 100×의 광학현미경을 이용하여 정자의 활력을 검사한 후 적절한 경우에만 인공수정에 사용하였다.

### 3) 인공수정 및 배양

인공수정은 kanamycin-supplemented loach culture medium(kLCM; 0.17mM kanamycin in fRS)내에 회수된 난자와 정자회색액을 첨가하여 실시하였으며, 5분 후에 난자를 kLCM으로 3~4회 세척하여 잔여 정자를 제거하였다. 수정란은 kLCM을 이용하여 28°C에서 배양하였다.

## 3. 어류 내재성 유전자 및 인간단백질 유전자의 준비

어류 내재성 난자 특이 유전자를 cloning하기 위해 먼저 기 보고되어 있는 기본 자료를 바탕으로 하여 인터넷상의 Fasta와 Gene Bank search를 하였다. 어류 종간 homology 때문에 rainbow trout와 tilapia의 cDNA full sequence에서 primer쌍을 결정하여 본 실험에 이용하였다. 유전자 도입 및 발현

검색은 초기발생중 유전자 도입의 검색은 *gfp* 또는 *Vg*의 준비된 primer쌍으로 PCR labelling하여 probe로 이용하여 유전자 도입을 검색하고 일부는 reporter 유전자인 *gfp*의 형광 단백질 발현검색에 의해 생체발현을 검색하였다.

#### 4. 정자의 electroporation

외래유전자의 도입기술의 단순화는 본 실험실에서 개발한 electroporator를 사용하여, 정자와 외래 유전자에 대한 electroporation에 의한 수정 전 외래 유전자 도입하기 위해 현재의 외래유전자도입 방법보다 단순화시켜 다수의 난자를 최단시간에 유전자 도입을 수행할 수 있는 기구로 각 다른 전류의 강도에서 정자를 수정 전 electroporation하였다.

electroporation buffer는 Ringer's 용액내에 0.3M sucrose를 첨가하여 이용하였다. 0.05mA의 전류에서 5회의 pulse 조건으로 300 µg/ml 농도의 plasmid DNA를 buffer내에 첨가하여 electroporation을 실시하였다.

#### 5. 유전자의 준비

##### 1) 인간 유용유전자의 분리

본 실험에 이용될 인간 유용유전자로서 human tissue plasminogen activator (tPA)를 준비하기 위해 이에 대한 primer 쌍을 design하였다. 이용될 primer쌍은 5'-GTT CTG AGC ACA GGG CTG GA-3' 및 5'-GGT TGT GGC AAC GGA AAG TA-3'으로 선정하였으며 그 산물의 크기는 2,480 bp이다.

##### 2) 어류 유용유전자의 분리 및 cloning (간세포로부터의 cDNA library 구축)

어류의 유용유전자의 발굴을 위하여 간에서 생산되는 어류 난황물질 중 vitellogenin 유전자를 확보하기 위하여 미꾸라지 간에서 전체 RNA를 분리하였으며, 이를 기초로 mRNA의 분리 및 cDNA library의 구축에 이용될 유전자로서 vitellogenin의 분해산물인 phosvitin의 cDNA 유전자의 primer 쌍과 promoter의 1.67kb에 대한 primer쌍을 선발하였

다. 선정된 primer쌍은 5'-CTT GAA GCT TTC CCT GTT TC-3' 및 5'-GAA TTC AGA CAC GAT CCT AA-3'이었다. 이들 primer쌍에 의한 산물의 크기는 1,221 bp이다.

##### 3) 어류 유용유전자의 분리 및 cloning (genomic DNA로부터 promoter의 cloning)

어류의 vitellogenin에 대한 promoter를 준비하기 위해 internet상의 Query GenBank Database를 이용하여 tilapia (*Oreochromis aureus*)의 5' 지역의 서열을 찾아낸 후 이에 대한 primer쌍을 선정하였다. 선정된 primer쌍은 5'-TTC AGC ATT GCT GAG CAT CG-3' 및 5'-AGG CAG AGG CGT CCT TTT TA-3'이었으며, 산물의 크기는 1,617 bp이다.

##### 4) pNT plasmid 구축

포유류의 조직특이적 유전자의 조절부위(promoter and enhancer)가 어류에서도 그 기능을 수행하는가를 검토하기 위해 Rat의 신경조직특이 유전자인 *Tα1 α-tubulin*의 5'말단 조절부위를 GFP expression vector인 pEGFP-C1에 삽입하였다. pNT-GFP는 *Tα1 α-tubulin*의 5'말단 조절부위를 PCR로 증폭한 다음 pEGFP-c1에서 CMV promoter를 *Ase I/Age I*으로 제거한 절편(DNA fragment)과 ligation 시켜서 만들었다.

##### 5) pNT-gfp-lacZ plasmid

*Tα1 α-tubulin*의 5'말단 조절부위의 조직특이성을 확인하기 위해 사용한 report gene인 GFP는 조직 고정시 비특이적 형광을 보일 수 있다. 이를 보완하기 위해 GFP를 lacZ gene과 접합시킨 dual-reporter system을 사용하였다. pNT-gfp-lacZ의 plasmid는 *A. victoria*의 GFP 및 pMC1871에서 분리된 lacZ를 포함하는 plasmid DNA인 pNT-gfp-lacZ (8.4kb)를 이용하였다. 이 plasmid DNA는 Rat의 *α-tubulin*에서 유래한 5'말단 조절 지역을 promoter 및 3' 말단에 SV40 polyadenylation signals를 이용하고 있다.

##### 6) pJJ9

plasmid는 먼저 *A. victoria*의 GFP 및 *E. coli*의 lacZ를 포함하는 plasmid DNA인 pGFPLacZ(8.4 kb)를 이용하였다. 이 plasmid DNA는 *Xenopus* 유래의 elongation factor 1 $\alpha$ (ef1 $\alpha$ ) 및 3' 말단에 SV40 polyadenylation signals를 가지고 있다.

#### 6. 미꾸라지 난소 cDNA library

미꾸라지 배의 성숙난자 특이 cDNA library 구축하기 위해 PCR-select cDNA subtraction 방법을

이용하였다. 미꾸라지 미성숙난자와 성숙난자로부터 분리한 mRNA를 이용하여 미성숙난자 cDNA (driver cDNA)와 성숙난자 cDNA (tester cDNA)를 합성하였다. 합성된 driver cDNA와 tester cDNA를 제한효소 RsaI로 처리하여 blunt-ended cDNA로 만든 다음 tester cDNA에만 cDNA adaptor를 ligation 하였다. 그런 다음 driver cDNA와 adaptor-ligated tester cDNA를 이용하여 hybridization을 수행함으로써 두 cDNA population에서 hybridized sequences

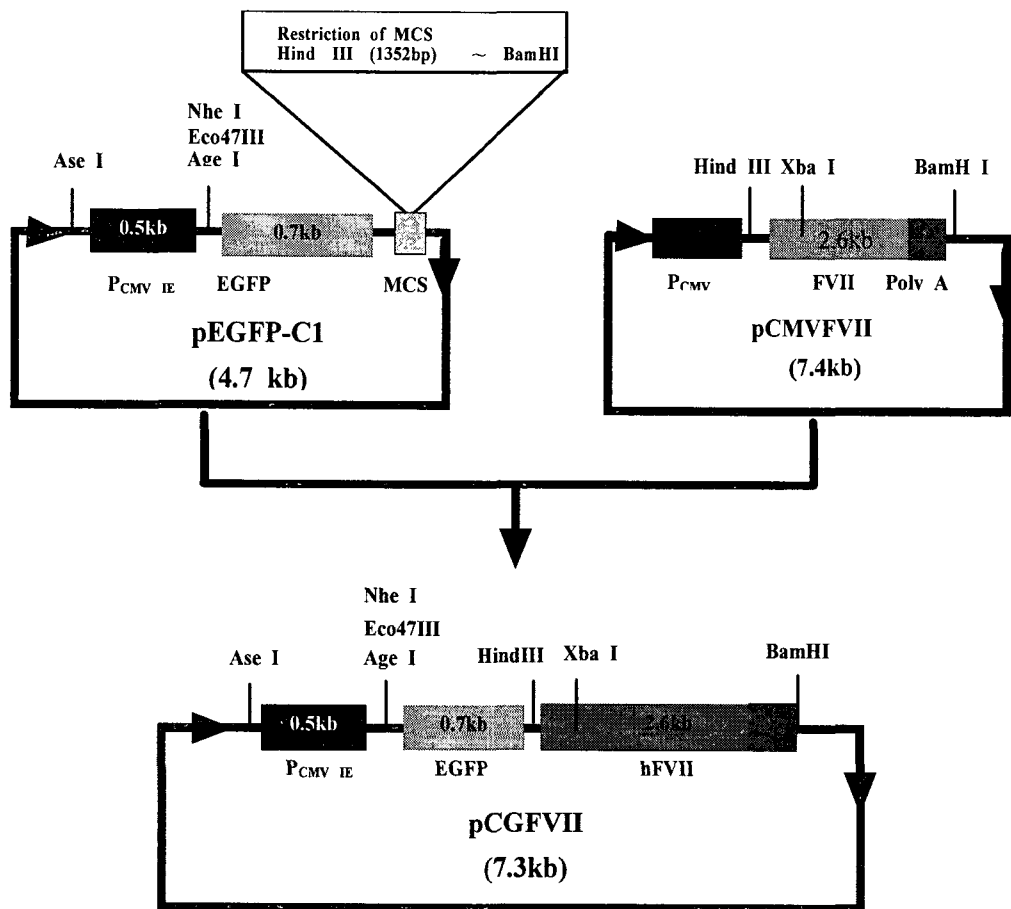


Fig. 1. pEGFP<sub>h</sub>FVII was modified to accept a cloned whole FV II gene from pCMVFV II (Prof. Norman Maclean, Univ. Southampton, U.K.) to be expressed in frame with EGFP followed by FV II (2.6kb) and EGFP fusion protein. pEGFP-C1 (Clontech, Laboratories, Palo Alto, U.S.A.) was restricted with Hind III and BamHI in the multiple cloning site which is located between at the end of EGFP-coding sequence and in front of the stop codons and as insert, FV II was same methods. pEGFP-C1 and FV II coding gene were ligated in the site of Hind III and BamHI by T4 DNA ligase.

는 배제되고 unhybridized sequences (tester cDNA population)에서만 특이적 발현되는 유전자를 선별하였다. hybridization 후 비특이적인 증폭산물은 배제하기 위해 suppression PCR 기법을 이용하여 nested PCR을 수행하였다. 각각의 PCR 증폭산물을 pT-Adv vector에 cloning하였다.

선발된 유전자와 유전자 활성조절부위의 융합에 의한 vector의 구축을 위해 예비단계로 표지유전자(GFP 또는 lacZ 유전자)와 유용유전자의 융합 vector 작성을 작성하여 유전자 활성조절부위의 선택 및 유용유전자 발현 vector 개발하였다. ES 세포내로의 DNA 도입과 삽입검색은 확립된 electroporation 조건을 이용하여 ES 세포내로 vector 도입을 표지유전자의 분석에 통해 유용유전자의 도입 확인하는데 PCR기법을 이용하였다.

### 7. GFP확인 및 lacZ 발현확인

외래 유전자인 GFP의 발현 여부의 확인은 Olympus 형광 현미경 (BH-2 RFCA, Olympus, 일본)하에서 초기배부터 치어시기까지 발생단계별로 관찰하였다. GFP가 발현된 개체는 Hoechst filter하에서 ASA 400 필름을 이용하여 촬영하였다. X-gal staining을 통해 외래유전자의 발현 여부를 확인하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 호르몬-primed 난자 특이 발현유전자의 Cloning

#### 1) 난소조직 cDNA library의 작성

미성숙난자와 성숙난자간의 유전자 library 구축을 위해 hCG 처리 이전 및 처리 이후의 난소 조직으로부터 전체 RNA를 분리하고, mRNA를 oligo-d(T) column을 이용하여 분리한 후 각각의 cDNA library를 구축하였다(Fig. 2).

#### 2. 난소조직의 subtracted cDNA clone의 선별

성숙난자에 특이적으로 발현되는 유전자를 풍부하게 하기 위해 PCR-selected cDNA subtracted

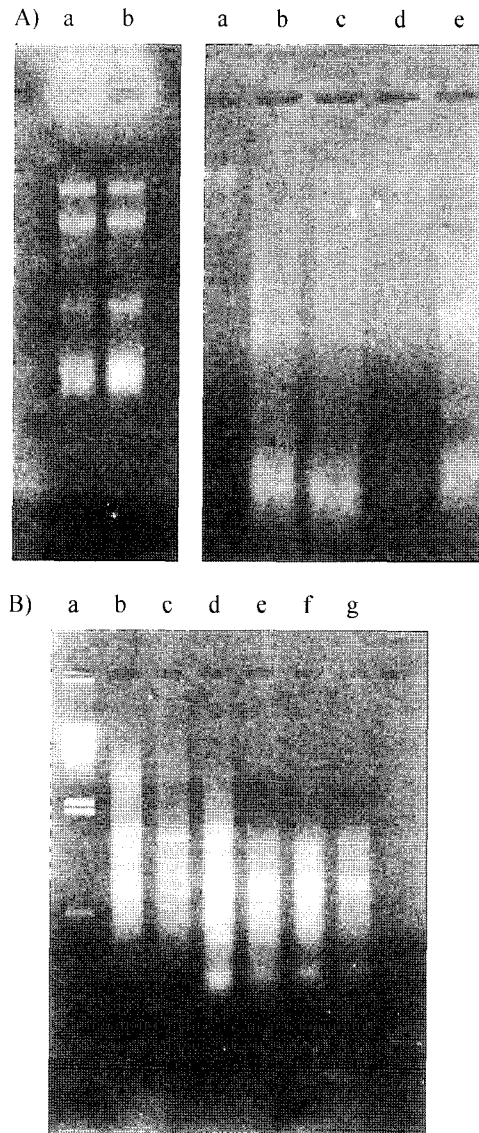


Fig. 2. Total RNA of loach ovary. (A) a, immature ovary; b, mature ovary and mRNA (a, molecular marker; b, c and d, isolated mRNA; e, finally isolated mRNA) and (B) cDNA of synthesised loach ovary and analysis of Rsa I enzyme digestion (a, molecular marker; b, ds SM cDNA; c, ds SM cDNA digested with Rsa I; d, ds tester (hCG-primed) cDNA; e, ds tester cDNA digested with Rsa I; f, ds driver(not primed) cDNA; g, ds driver cDNA digested with Rsa I).

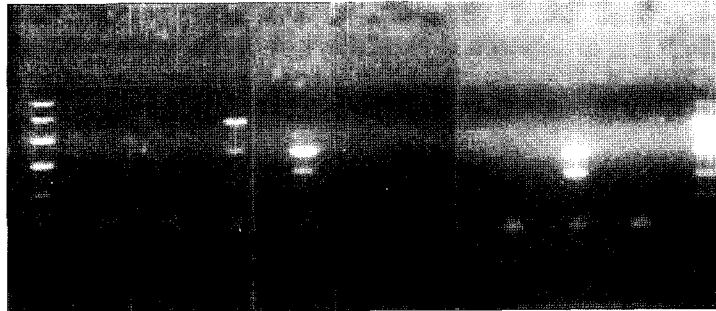


Fig. 3. Selected clones of cDNA from PCR amplification from loach hCG-primed ovary to non-primed ovary cDNA (M, molecular marker; F, 1st PCR; S, 2nd PCR). Identify of PCR amplification secondary PCR with 17 clones.

library screening을 이용하여 tester(hCG 처리구)와 driver(hCG 무처리구)의 ds-cDNA를 합성한 후, 2

**Clone name : SWS15**  
GCTGAATTTAAGCATATTACTAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCTCAGTAGCGGCGA  
GCGAAGAGGGAGGAGCCCAGCGCCGAATCCCCGTCCGCGGGCGGGCGGGAAATGTGGCGTACGGA  
AGTCTGCTCC

**Clone name : SWS31**  
GGCTTCATTTTCTGAAATTTTCTCCTTGGACATGTTGCCACCAGTGTGTTGAGGNAGCTTAGATATAT  
GAGCGTTTCTCCATGCCAAACNATCGCGATTGAGCATTGGGGATGACTTCATAATTTTGACCGGGAC  
AAGANTTGGGANTGTTTTTATAATTTGGAGTTCATTTTGGATCGAATGAAAGTGCTTCNCCTTCCA  
ACCTGGTCNTGCGTTTCCGTAAGGTC

**Clone name : SWS42**  
GTACGGGACGTGCGGTGGCTCGCCTCGCGGGACGCAAGCTCGCTCCCGAGATCCAACTACGAGCT  
TTTTACTGCAGCAACTTTAATATACGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACAGACTGC  
CCTCCAATGGGTTCTCCCCATGGGTTTAGATACCCTTCCATTACAGGCCCCAAANAACTGT

**Clone name : SWS51**  
CTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAGCTTCTTTATTCTAAACACAAAAAGACAGCTGTA  
TATTAATAAAGATACGATTTTAAAACACCTTAGGTCAACACGGTATCATGTATGCAATTAGAAAAC  
ATGCTAAAAGATAAATGGGATGGACTGGTGCAGACTGTAACATAAGCCCCGGGATATATTCTGA  
AGGCATAAGAAAGTATAAAAACAAGTCTTCAGGCTGCTAAAATGGCCAACAGTGCCCCACTTGGTA  
ATTATTGGTCATTGCAACTAATTTGGAAACTAGTACTACAAAATGCATGATATCTGCATTTTATATT  
TAATATAAAAATACACCGAATCTGGGTAACACGTAAGCCAAGGTTTCAAGACTTAAC

**Clone name : SWS71**  
TCGTGGCAGAGTTGCTCTTCAGTGGGGCAGATCCTGAGTCATCATCAATGATCTCATCGGGCTTT  
CTCCTCTTTCATAGATGAAGATGATGGTGACTAGAATAATG

Fig. 4. Finally selected clones name of partial sequences for mature ovary specific clones.

회의 hybridization에 의해 subtracted tester cDNA의 일부를 1, 2차 PCR증폭에 대해 17개의 clone을 확인하였다(Fig. 3).

### 3. Cloned gene의 염기서열 분석

아래의 염기서열은 PCR-selected subtraction 방법에 의해 선발한 clones중 sequencing에 의해 밝혀진 부분적인 염기서열로서 BLAST 또는 FASTA 프로그램을 이용하여 Database상의 자료탐색과 염기서열의 정렬에 homology 분석과 염기서열이 가진 고유의 성질을 분석한 결과의 예는 Fig. 4에 나타나 있다. DNA염기서열 분석결과 SWS51 clone의 경우 homology를 보이는 cloned gene의 절편은 모두 gene이 밝혀지지 않은 genomic DNA의 염

70 bp중 80% 이상의 homology를 보이고 있지만 이들 homology를 보이는 database내의 염기서열들은 모두 gene이 밝혀지지 않은 genomic DNA의 염기서열로 보인다. 따라서, SWS 51 clone은 새로운 유전자 (novel gene)일 가능성이 클 것으로 사료된다.

### 4. Chimaeric 초기배의 생산과 발생유기

Electroporation에 의해 transfect시킨 초기배세포를 분리하여 host blastula에 세포미세주입에 의해 chimaeric 초기배 발생을 유기시킨 결과 대부분의 chimaeric 초기배는 세포융해, 또는 미세주입한 세포괴의 extrusion에 의해 융합배의 형성이 용이하지 않았으나 극히 일부 배에서 생쥐에서의 결과에서나 유사하게 colony형성이 가능함을 보여주었다. 이들 chimaeric 초기배와 electroporated 일부 초기배의 발생 유기 및 사육중 southern blot을 분석한 결과 주입된 유전자는 대부분의 개체에서 episomal 형태로 존재함을 보여주었으며 이 같은 실험결과는 다른 보고자에 의해서 더 흔히 발견되는 것으로써 보다 많은 수의 치어 및 육성에 의해 후기에 유전자의 genome내 삽입 여부 결정하였다 (Fig. 5). 이의 발현정도를 Fig. 6에서 보여주는 것 같이 강하게 발현되는 것이 관찰되었다.

Fig. 5. Southern blot analysis of genomic DNA using FVII DNA probe.

### 5. 외래 유전자 도입기술의 단순화

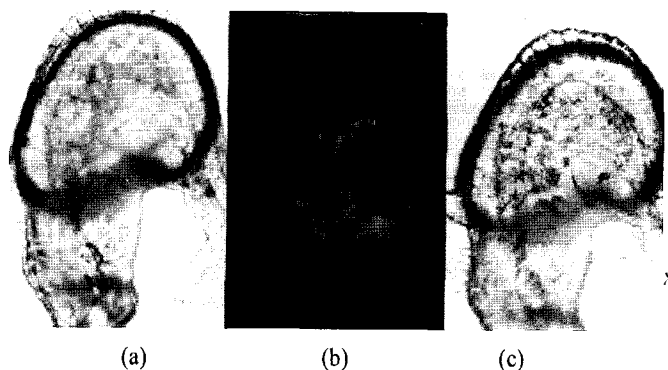


Fig. 6. Expression of a pEGFPPhFVII gene in developing fry. Embryos were microinjection at the 1-cell stages, respectively and allowed to develop upto the neurula, and eyed stages (a, b, c). Bright (a) and fluorescent (b, c) fields were recorded without any further treatment.

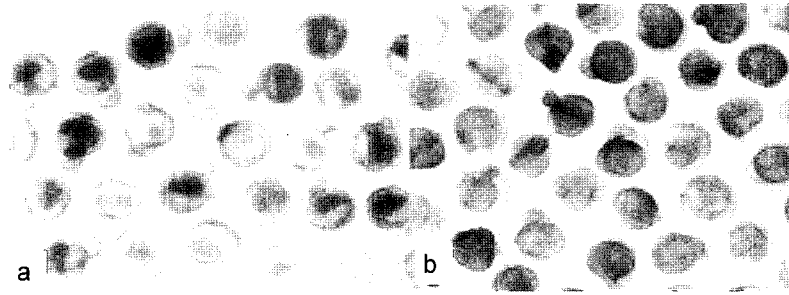


Fig. 7. Massive gene transfer and uniform gene expression in prehatching embryos produced by fertilizing the oocytes with electroporated spermatozoa. Expressed lacZ was found in egg yolk region of all embryos(b). No expression was found in control embryos(a).

Electroporation 처리된 정자를 이용하여 미꾸라지 난자와 수정시킨후 부화전 시기 embryo에서의 외래 유전자의 발현 여부를 lacZ 유전자에 대한 조직화학적 염색법 (X-gal staining)을 통해 관찰한 결과, 유전자 도입을 대량으로 수행할 수 있었으며 동일한 양상의 유전자 발현을 관찰할 수 있었다 (Fig. 7). lacZ 유전자의 발현은 실험군의 경우 모든 embryo에서의 난황지역에서 관찰할 수 있었던 반면, 대조군에서는 lacZ의 발현을 관찰할 수 없었다.

또한 electroporation 처리된 정자를 이용해 수정된 실험군의 일부 치어를 취하여 Southern hybridization을 실시한 결과, 모든 개체에서 도입시킨 외래 유전자의 존재를 확인하였다. Southern hybridization 결과, 외래 유전자는 모두 episomal 상태로 존재하는 것으로 판정되었다.

#### 6. 조직특이 유전자의 발현 검색

앞서 구축한 CMV promoter에 gfp와 lacZ를 연결한 pJJ9은 virus로부터 각 조직에서 보편적으로 발현되도록 본 실험실에서 개발한 이중 reporter 유전자로서 1차년도 연구에서 확립된 미세주입 또는 정자에 매개된 유전자 삽입을 용이하고, 신속하고 대량으로 수행하기 위해 개발된 체계에 2차년도에서 이용할 조직특이 promoter의 개발하고 human protein 유전자의 개발이 우선적으로 수행되어야 한다. 이를 위해 어류에서 조직특이 발현을 검토하기 하기 위해 신경세포특이의 tubulin promoter를

Table 1. Comparison of tissue-specific and ubiquitous promoters for the GFP-LacZ expression following fertilization with electroporated spermatozoa

Types of promoters used <sup>1</sup>	No. of eggs used	No. of expressing the following embryos	
		GFP (%)	LacZ (%)
Control	100	0	0
pCMV-GFP-lacZ	100	0	100
pNT-GFP-lacZ	100	0	100

<sup>1</sup> Electrical strength for electroporation was six pulse at 0.05mA in the presence of 300 µg DNA.

gfp와 lacZ에 연결시켜 pNTgfp-lacZ를 구축하여 정자의 electroporation에 의한 유전자 삽입을 한 후 유전자의 발현을 검색하였다.

Table 1에서 보는 바와 같이 대조구 viral promoter인 pCMV-GFP-lacZ (pJJ9)와 실험구인 pNT-GFP-lacZ에서 보는 바와 같이 조직특이성 promoter의 경우에도 100%의 난자들이 lacZ 발현을 보여 주었다. 따라서 조직특이성의 promoter 경우도 앞서 개발된 체계에 의해 유사한 발현을 보이는 것으로 확인되었다 (Fig. 8). Fig. 4에서 보는 바와 같이 electroporation을 하지 않고 체외수정시킨 신경배기의 초기배는 전혀 lacZ의 발현을 보이지 않는데 비하여, CMV promoter를 이용할 경우 강한 발현을 보여 주었으며, 비록 발현의 강도는 약하지만 유사한 위치에 모든 초기배의 발현을 보여



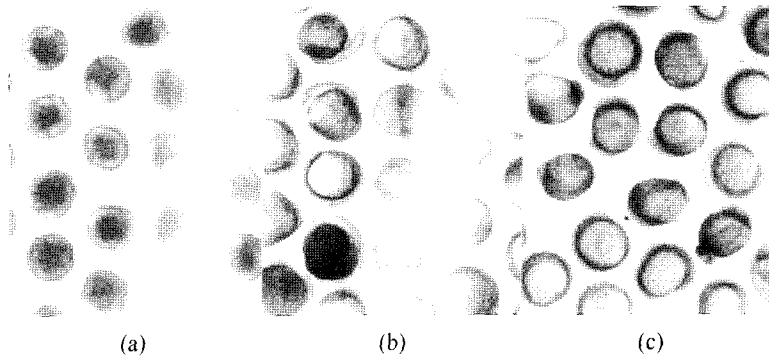


Fig. 8. Gene expression in embryos produced by sperm mediated gene transfer.  
a) control, b) pNT -gfp-lacZ, c) pJJ9

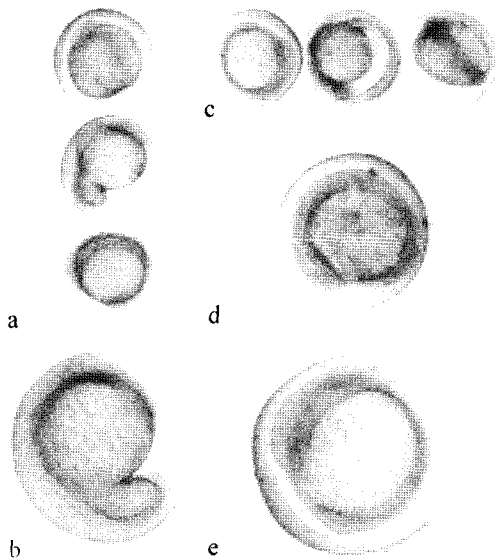


Fig. 9. Representative expression patterns seen among the transgenic embryos when different promoters were used.  
a, b) pJJ9, c, d, e) pNT-gfp-lacZ

주었다. CMV와 NT promoter의 발현강도 및 양식은 서로간에 차이를 보여 주었다. 즉 CMV의 경우 거의 모든 발현양식이 일정하게 난황내피의 합포체세포 (syncytial cells)를 보여 준데 반하여 NT promoter의 경우 비록 난황의 합포체세포에서 발현을 보여 주었지만 체축과 접촉한 신경원조세포들이 존재하는 지역에서 발현이 강하게 나타났으며 발달시기에 따라 점차로 신경계세포로 발현되

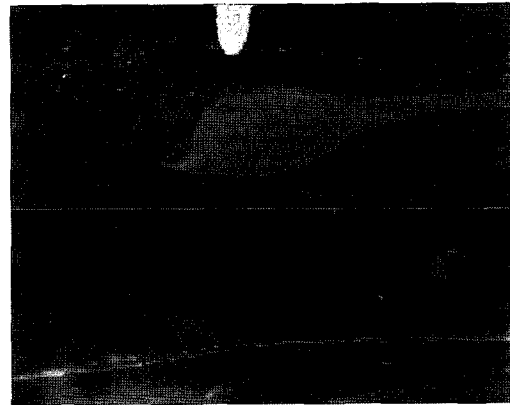


Fig. 10. Tissue specific expression of pNT. Never cells are consistently expressed in later stage of embryos and hatched fry.

었다 (Fig. 9). 이 같은 조직특이성은 hatch 된 fry의 경우에서도 매우 뚜렷하며 미세주입한 경우, 뇌 및 신경조직에 매우 강하게 조직특이적인 발현을 보여 주었다 (Fig. 10).

#### IV. 적 요

기존의 미세주입 및 정자 electroporation에 의한 보다 효율적인 유전자 도입방법을 개선하여 간단하고 고효율성의 유전자 변환기술을 위한 유전자 도입장치의 시제품 개발로 다수의 난자를 전기적으로 단순화할 수 있는 상업화의 가능성을 보여 주었다. 도입된 유전자는 모든 초기배에서 발현됨

을 보여 주었다. 특히 난황내의 합포체세포(syncytium)에서의 transient성의 강한 발현은 전기자극에 의해 많은 수의 난자에 유전자를 도입하고 100% 발현되는 체계를 이용하여 transient 시기에서 인간 유용단백질 생산의 가능성을 타진할 수 있는 결과를 보여 주었다. 어류유전자 발현의 작동되는가를 검색하기 위해 신경세포조직특이 tubulin promoter를 이용한 결과 gfp의 발현이 뇌주변과 척추를 중심으로 체내 전반의 신경세포내에 발현이 강하게 나타남을 보여 주었다. 한편 reporter 유전자 이외에 간세포로부터 전체 RNA를 분리시켜 vitellogenin의 분해산물인 phosvitin cDNA의 길이와 promoter 지역인 1.6 kb에 대한 primer 쌍들을 선정된 상태에서 PCR에 의해 각각 cDNA와 gDNA로부터 cloning 중에 있으며 human factorⅦ과 epidermal growth factor, vitellogenin의 3종의 target 단백질유전자를 구축 및 검정 확인 중에 있다.

## V. 인용문헌

1. Brem, G., Brenig, B., Hürstgen-Schwark, G. and Winnacker, E. 1988. Gene transfer in tilapia. *Aquaculture* 68:209-219.
2. Chourout, D., Guyomard, R. and Houdebine, L. M. 1986. High efficiency gene transfer in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) by microinjection into egg cytoplasm. *Aquaculture* 51:143-150.
3. Dunham, R. A. and Eash, J. 1987. Transfer of the metallothionein-human growth hormone fusion gene into channel catfish. *Trans. Amer. Fisheries Soc.* 116:87-91.
4. Fletcher, G. L., Shears, M. A., King, M. J., Davis, P. L. and Hew, C. L. 1988. Evidence for antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon(*Salmo salar*). *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 45:352-357.
5. Khoo, H. W., Ang, L. H., Lim, H. B. and Wong, K. Y. 1992. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into zebrafish. *Aquaculture* 107:1-19.
6. McEvoy, T., Stack, M., Keane, B., Barry, T., Sreenan, J. and Gannon, F. 1988. The expression of a foreign gene in salmon embryos. *Aquaculture* 68:27-37.
7. Maclean, N., Penman, D. and Zhu, Z. 1987. Introduction of novel genes into fish. *Bio/Technology* 5:257-261.
8. Ozato, K., Kondoh, H., Inohara, H., Iwamatsu, T., Wakamatsu, Y. and Okada, T. S. 1986. Production of transgenic fish: introduction and expression of chicken crystallin gene in medaka embryos. *Cell Differ.* 19:237-244.
9. Stuart, G. W., McMurray, J. V. and Westfield, M. 1988. Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. *Development* 103:403-412.
10. Yoon, S. J., Liu, Z., Kapuscinski, A. R., Hackett, P. B., Faras, A. and Guise, K. S. 1988. Successful gene transfer in fish. *J. Cell. Biochem, Suppl.* 12B:190.
11. Zhu, Z., Li, G., He, L. and Chen, S. 1985. Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish(*Carassius auratus* L.). *Z. Angew. Ichthyol.* 1:31-34.

(접수일자: 2001. 6. 18. / 채택일자: 2001. 7. 20.)