

Expression of Human KCNE1 Gene in Zebrafish

Hyeon Jeong Park and Min Yoo*

Department of Biological Sciences, Keimyung University, Daegu 42601, Korea

Received January 19, 2017 / Revised January 31, 2017 / Accepted January 31, 2017

This study was aimed to produce a transgenic zebrafish expressing the human KCNE1 gene. Initially, the entire CDS of the human KCNE1 gene was amplified from a human genomic DNA sample by polymerase chain reaction using a primer set engineered with restriction enzyme sites (*EcoR* I , *Bam*HI I) at the 5' end of each primer. The resultant 402 bp KCNE1 amplicon flanked by *EcoR*I and *Bam*HI was obtained and subsequently cloned into a plasmid vector pPB-CMVp-EF1-GreenPuro. The integrity of the cloned CDS sequence was confirmed by DNA sequencing analysis. Next, the recombinant vector containing the human KCNE1 (pPB-CMVp-hKCNE1-EF1-GreenPuro) was introduced into fertilized eggs of zebrafish by microinjection. Successful expression of the recombinant vector in the eggs was confirmed by the expression of the fluorescence protein encoded in the vector. Finally, in order to assure that the stable expression of the human KCNE1 gene occurred in the transgenic animal, RNAs were extracted from the animal and the presence of KCNE1 transcripts was confirmed by RT-PCT as well as DNA sequencing analysis. The study provides a methodology to construct a useful transgenic animal model applicable to the development of diagnostic technologies for gene therapy of LQTS (Long QT Syndrome) as well as tools for cloning of useful genes in fish.

Key words : Fluorescence protein, KCNE1, LQTS, microinjection, zebrafish

서 론

Zebrafish (*Danio rerio*)는 분류학상 잉어목(Cypriniformes), 잉어과(Cyprinidae)에 속하며 인도와 파키스탄 등 남아시아의 일부 지역에 분포한다[2, 3]. 연중 산란하여 알을 쉽게 얻을 수 있고 또한 유전적 스크리닝 및 인간과의 유전자 상동성 비교에서도 높은 일치율을 나타내어 질병 등 기전연구에 유용하게 사용될 수 있다[12, 19]. Zebrafish는 질환관련 유전자를 포함하여 적어도 70% 이상의 유전자가 인간과 동일하게 존재한다. 또한 수정란은 투명하여 발생과정을 관찰하기 쉽기 때문에 유전자 조작을 통한 특정 DNA 또는 mRNA 발현을 확인하는데 매우 유리하다[10, 13]. 그리고 수정에서 부화까지 소요되는 시간은 5일 정도로 다른 척추동물 보다 발생 속도가 빠르며, 세대 기간도 2~3개월로 다른 척추동물 보다 짧은 장점을 갖고 있다. 최근에는 척추동물의 발생과 배아 조작, 유전자 도입 등을 연구하는데 좋은 실험동물로 각광받고 있는 추세이다[1, 4, 8].

KCNE1은 QT 연장증후군(LQTS)의 원인 유전자중 하나이

다[17, 20]. 이 유전자는 내이, 심장, 콩팥을 포함한 여러 장기에서 발현되고 있으며, 이 유전자에 의해 생산되는 단백질은 K⁺을 세포 밖으로 운반하는 통로(channel)의 형성에 중요한 역할을 한다. 기능에 장애가 생기면 심장 근육의 재분극(repolarization)이 지연되고 부정맥(심실 빈맥, 심실 세동, 심정지 등)을 일으킴으로서 심장 질환을 야기시킨다. LQTS는 이러한 심장의 신호전달 장애 때문에 발생하는 질환으로 심박동을 유지하기 위한 재분극이 정상적으로 일어나지 못해 의식을 잃거나 돌연사 하는 질환이다[9, 11, 14, 21]. 보고에 의하면 LQTS 환자 중 일부는 가족력을 나타낸다고 알려져 있다. 이는 이 질환에 유전적 소인이 강하게 작용하고 있음을 시사하는 것이다[16]. 심지어는 후천적인 경우일지라도 유전자의 염기서열이 돌연변이가 된 경우가 많기 때문에 유전자 차원에서의 진단 및 치료 연구가 반드시 요구되는 질환이다.

본 연구에서는 인간의 genomic DNA에서 KCNE1 유전자를 분리하였고, 분리된 인간의 KCNE1 유전자를 PBTS (PiggyBac Transposon system) 형광단백질벡터에 클로닝하였다. 그런 다음 클로닝된 플라스미드를 zebrafish 수정란에 microinjection하여 부화된 치어에서 형광발현을 확인하였다. 또한 RT-PCR 및 염기서열 분석을 통해 형광발현된 zebrafish 치어에 인간 KCNE1 유전자가 제대로 삽입되었는지 최종 확인하였다. 이 결과를 통해 transgenic zebrafish를 이용한 유전자 치료용 동물모델의 발판을 마련하였고, 동시에 유산균 등 미생물의 유용 유전자를 분리하여 해양생물에서 발현시키기 위한 가능성을 확인하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-53-580-5537, Fax : +82-53-580-5164

E-mail : ymin@kmu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

재료 및 방법

Zebrafish 수정란

실험에 필요한 수정란을 얻기 위해 3~5월령의 성체 zebrafish를 사육, 교배시켰다. 총 30 cm³ 가량의 플라스틱 수조에 여과장치를 거친 담수를 채우고 그 속에서 사육하였으며, 표준조건에 따라 히터를 이용해 수온은 28±1°C를 유지하였다. 조명과 타이머를 설치하여 광주기를 명기 14시간, 암기 10시간으로 설정하였다. 먹이(Tetra Werke)는 하루 2번 급여하였으며, 먹이를 줄 때 마다 15분 동안 먹을 수 있도록 급여하였다. Zebrafish의 수정란을 채취하기 위해 이전날 암기로 들어가기 전, 알을 아래쪽에서 수집할 수 있도록 특수한 망이 설치된 mating cage에 암컷과 수컷 성어를 1:1~2 비율로 넣고 칸막이로 분리시켰다. 다음날 광주기 시작 직후 칸막이를 분리하여 암수를 섞어 소음을 최소화하고 빛을 쬐어 수정효과를 높였다. 매 10분마다 확인하여 배란에서부터 수정까지 확인 후 거름망과 스포이드를 이용하여 알을 채취하였다. 알을 채취할 때, 난질이 좋지 않은 수정란은 제거하였고 남은 수정란은 오염을 방지하기 위해 zebrafish의 배양수조에 있던 물(fish water)과 methylene blue를 섞어 만든 blue water에 세척하였다.

사용한 vector 및 시약

본 실험에 사용한 zebrafish는 대구 인근 지역의 수족관에서 구입하여 사육하였다. Vector system은 PBTS (PiggyBac Transposon system)였고, plasmid로는 PBTS vector 중 하나인 pPB-CMVp-EF1-GreenPuro vector를 사용하였다. 본 연구에 사용한 일반 시약은 lonza (USA), Sigma (USA), Merck (Germany), BD (USA), Bio Basic (Canada) 등에서 구입하였다. RNA 추출은 RNeasy mini kit (QIAGEN, USA)를 이용하였으며, PCR 시약은 Solgent (Korea) 등에서 구입하였다. cDNA 합성은 PrimeScript™ RT-PCR kit (TaKaRa, Japan)를 이용하였다. Microinjection 용 capillaries는 World Precision Instrument Inc, (Germany)의 제품을 사용하였다. 척추동물 실험을 위해 계명대학교 동물윤리위원회의 승인을 받았고(승인번호 KM 2016-004), LMO 연구실 설치운영신고가 완료된 실험실에서 실험이 진행되었다.

KCNE1 유전자 분리

Human genomic DNA에서 PCR을 통해 hKCNE1 유전자를 분리하였다. PCR primer는 hKCNE1의 5'쪽 ORF-F (GAA TTC ATG ATC CTG TCT AAC ACC AC)와 hKCNE1의 3'쪽 ORF-R (GGA TCC TCA TGG GGA AGG CTT CGT CT)를 제작하여 사용하였다. PCR 반응은 pre-denaturation을 94°C에서 5분간 1회 반응시킨 뒤, denaturation 반응을 94°C에서 30초, annealing 반응을 60°C에서 1분, extension 반응을 72°C에서 1분씩 모두 35회 실시하였다. Post-extension 반응은 72°C

에서 10분간 실시하였다. PCR 산물은 PCR clean up kit (MACHEREY-NAGEL)를 사용하여 정제하였다.

Zebrafish 발현용 plasmid 제작

Zebrafish 수정란에 microinjection하기 위한 plasmid를 만들기 위해 증폭된 hKCNE1과 pPB-CMVp-EF1-GreenPuro vector를 재조합 클로닝하였다. 클로닝 효율을 높이기 위해 먼저 hKCNE1 PCR 산물을 pGEM-T easy vector에 클로닝 하였고, 이를 제한효소 처리하여 EcoR I 과 BamH I 염기서열이 양 끝에 붙은 hKCNE1 insert를 추출해 내었다. 이렇게 준비된 hKCNE1 insert를 EcoR I 과 BamH I 으로 처리된 pPB-CMVp-EF1-GreenPuro vector에 다시 클로닝하였고, DNA 염기서열 분석을 통해 완성된 pPB-CMVp-hKCNE1-EF1-GreenPuro를 최종 확인하였다.

Microinjection

pPB-CMVp-hKCNE1-EF1-GreenPuro plasmid와 PBTS를 활성화하기 위한 pCMV-transposase vector를 동시에 zebrafish 수정란 속으로 microinjection하였다. Capillaries를 puller로 잡아당겨 0.2~0.4 μm인 microneedle을 만든 후 여기에 DNA 용액을 담아 zebrafish의 수정란 1세포기 때 microinjection하였다. DNA 주입 시 수정란 1개 당 498 ng/μl을 녹인 DNA 용액을 65~80 pl씩 microinjection 하였으며, 이때 주입하는 DNA의 양은 수정란 1개당 약 32~39 pg이었다. Sample이 수정란에 잘 injection 되었는지 확인하기 위해 DNA 용액과 phenol red solution을 1:1 비율로 섞어서 사용하였다. 한 개의 수정란에 microinjection하는 DNA의 정확한 양을 알기 위해 수정란에 microinjection하는 sample의 부피를 hemacytometer와 heavy oil을 이용하여 측정하였다. 수정란에 microinjection하게 되는 DNA 용액과 동일한 부피의 sample을 injector를 이용하여 heavy oil에 loading하였는데, 이때 loading된 용액은 구의 형태를 띠게 되므로 hemacytometer로 이 구의 반지름을 측정하여 부피를 계산하였다(구의 부피 = $4/3\pi r^3$). 이 부피를 이용하여 알고 있는 농도의 stock DNA로부터 수정란 1개당 microinjection한 DNA 양을 산출해 낼 수 있었다[5]. Microinjection한 zebrafish의 수정란에서 부화한 치어는 형광현미경을 이용하여 관찰하였다. pPB-CMVp-hKCNE1-EF1-GreenPuro 발현 plasmid의 GFP 발현양상은 실제현미경과 형광현미경으로 관찰하였고, 사진은 D5300 디지털 카메라(Nikon)를 이용하여 촬영하였다.

RT-PCR

pPB-CMVp-hKCNE1-EF1-GreenPuro를 microinjection한 치어와 injection하지 않은 대조군 치어로부터 RNA를 추출하였다. RNA 추출은 RNeasy mini kit를 이용하였으며, 실험은 kit의 설명서를 따라 진행하였다. 분리된 RNA를 주형으로 해

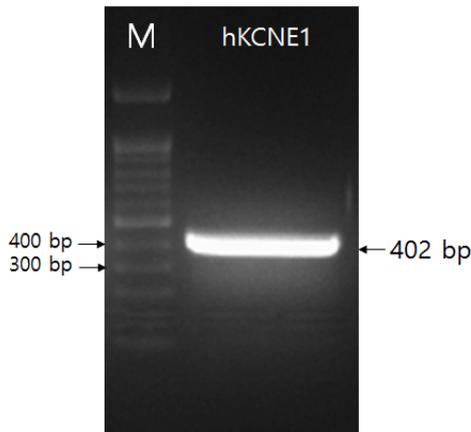


Fig. 1. Electrophoresis of PCR product of hKCNE1 (M: 100 bp ladder).

서 PrimeScript™ RT-PCR kit를 이용해 cDNA를 합성하였다. 합성된 pPB-CMVp-hKCNE1-EF1-GreenPuro를 microinjection한 치어와 injection하지 않은 대조군 치어의 cDNA에서 RT-PCR을 진행하기 위해 hKCNE1 primer (hKCNE1 ORF-F, hKCNE1 ORF-R)를 이용하였다. Pre-denaturation을 95°C에서 2분간 1회 반응한 후, denaturation은 95°C에서 20초, annealing은 60°C에서 40초 반응시켰다. Extension은 72°C에서 1분간 반응시켰고 이 과정을 총 35회 반복한 후 post-extension을 72°C에서 5분간 실시하였다. 전기영동을 통해 결과를 확인하였고 pPB-CMVp-hKCNE1-EF1-GreenPuro를 microinjection한 치어의 RT-PCR 산물을 플라 염기서열을 분석하였다.

결 과

hKCNE1 유전자 확인

Genomic DNA으로부터 hKCNE1을 분리하기 위해 제작된 hKCNE1 primer로 PCR을 진행한 결과 약 402 bp band가 확인되었다. 이는 본 유전자 염기서열의 길이(390 bp)와 각각의 primer에 포함된 제한효소의 염기서열(6자리)를 포함하여

예상했던 크기(402 bp)와 일치하는 결과였다(Fig. 1).

Zebrafish에서 KCNE1을 발현시키기 위한 plasmid 제작과 이용

상기의 hKCNE1 PCR 산물을 먼저 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 pGEM-T easy-hKCNE1 plasmid를 만들었고, 여기에 *EcoR* I 과 *Bam*HI I 을 처리해 분리한 hKCNE1 insert (제한효소 염기서열이 추가됨)를 다시 pPB-CMVp-EF1-GreenPuro vector에 클로닝하여 pPB-CMVp-hKCNE1-EF1-GreenPuro plasmid를 제작하였다. 클로닝 결과는 제한효소 처리에 따른 전기영동과 DNA 염기서열 분석으로 최종 확인하였다. 이로써 microinjection에 사용될 pPB-CMVp-hKCNE1-EF1-GreenPuro plasmid 벡터를 완성하였다(Fig. 2).

Zzebrafish에서 KCNE1 형광발현 확인

클로닝된 pPB-CMVp-hKCNE1-EF1-GreenPuro plasmid를 pCMV-transposase vector와 혼합하여 zebrafish의 수정란 1세포기에 microinjection하였다. Microinjection한지 5일 후에 부화한 치어들을 형광현미경으로 관찰한 결과 대조군에 비하여 pPB-CMVp-hKCNE1-EF1-GreenPuro plasmid를 microinjection한 실험군에서 훨씬 선명한 형광빛이 발현되고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 3). Microinjection을 진행하였던 수정란의 개수는 100여개 이며 그 중 약 10%가 부화 및 이때까지의 생존율을 보였고 치어의 평균 수명은 약 2~5일 정도였다.

RT-PCR을 통한 zebrafish에서의 KCNE1 발현 확인

KCNE1은 전체 CDS (coding DNA sequence)가 exon 하나에만 몰려 있는 것이 특징이다. 때문에 간단한 PCR로도 충분히 DNA의 삽입 여부를 확인 가능하였다. pPB-CMVp-hKCNE1-EF1-GreenPuro에는 두 개의 promoter가 있는데 hKCNE1을 발현시키는 CMV promoter와 형광단백질을 발현시키는 EF1 promoter가 그들이다. 때문에 형광단백질인 GFP (Green fluorescent protein)가 발현되었다 하더라도 hKCNE1

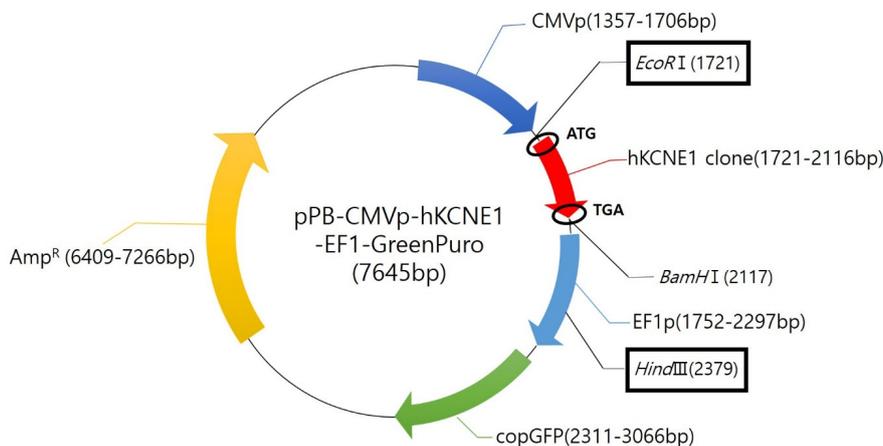


Fig. 2. Map of pPB-CMVp-hKCNE1-EF1-GreenPuro plasmid.

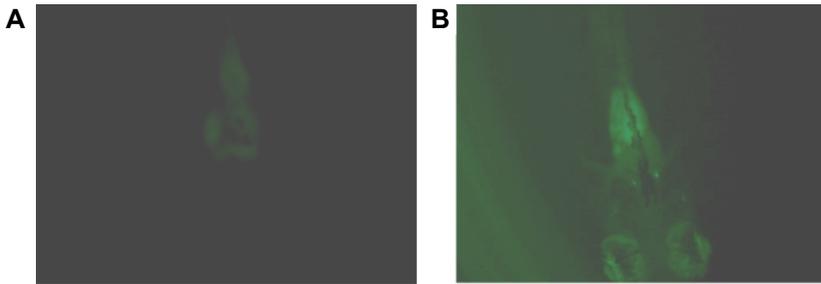


Fig. 3. Results of zebrafish fries. Uninjected (A) and injected (B) with pPB-CMVp-hKCNE1-EF1-GreenPuro plasmid.

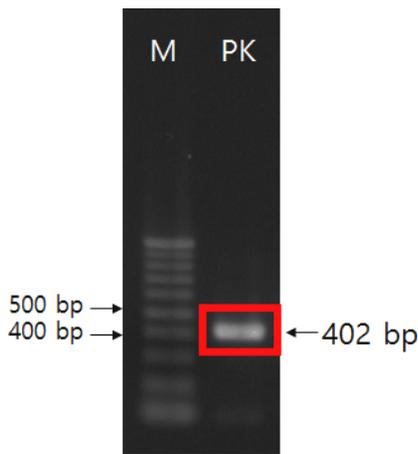


Fig. 4. Electrophoresis of RT-PCR product of cDNA in PK (zebrafish fry microinjected with pPB-CMVp-hKCNE1-EF1-GreenPuro plasmid). (M: 100 bp ladder).

역시 동시에 발현되었는지 여부는 형광발현을 관찰하는 것만으로는 확인할 수 없었다. 따라서 hKCNE1의 발현을 확인하기 위해 형광발현이 확인된 치어에서 RNA를 분리하여 cDNA를 합성하였고 hKCNE1 primer (hKCNE1 ORF-F, hKCNE1 ORF-R)를 이용하여 PCR을 진행하였다. 그리고 전기영동한 결과 원하는 밴드의 크기인 402 bp를 확인하였다(Fig. 4). 이를 다시 DNA 염기서열 분석한 결과 100% hKCNE1과 일치하는

것을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

고 찰

본 연구는 인간의 KCNE1 유전자 (hKCNE1)를 zebrafish에서 발현시킬 수 있는지 여부를 확인하는 것이 일차적 목표였다. KCNE1은 exon과 intron을 포함한 유전자가 구조가 비교적 간단하여 전체 CDS가 exon 3 하나에 모두 들어있다[22]. Zebrafish에서는 KCNE1 유전자가 밝혀지지 않았으나 같은 어류 중 붕어(*Carassius carassius*)의 경우 인간 KCNE1과의 일치율이 78%로 보고되어있다. 이러한 결과를 토대로 zebrafish에 존재하지 않는 인간의 KCNE1을 발현시켜 LQTS의 유전자 치료의 동물모델로서 접근해보고자 하였다.

인간의 KCNE1을 zebrafish 속으로 옮기기 위해 PBTS system을 사용하였다. PBTS는 transposase를 이용하여 염색체 속 특정 부위의 TTAA 염기서열에 원하는 유전자를 집어넣어 유전자 삽입의 효율을 높여주는 시스템이다[7, 15]. 인간의 KCNE1 유전자를 옮겨주는 벡터로는 PBTS의 벡터 중 하나인 pPB-CMVp-EF1-GreenPuro vector를 사용하였다. 이 벡터는 형광단백질벡터이며 벡터만 단독으로 microinjection하거나 cell infection을 진행해도 형광단백질의 발현을 약하게 볼 수 있지만 transposase와 함께 넣게 되면 형광단백질의 발현이 더욱 높아지는 것이 장점이다. 또한 pPB-CMVp-EF1-Green

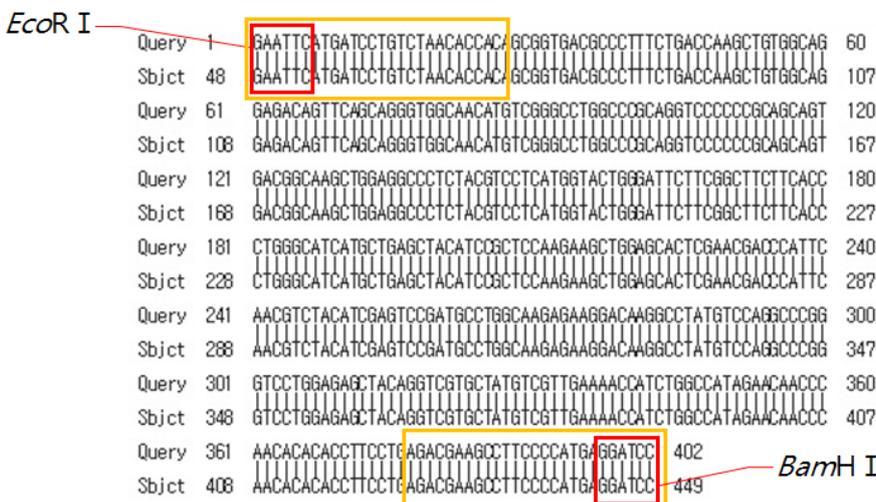


Fig. 5. Result of DNA sequencing of RT-PCR product from PK (zebrafish fry injected with pPB-CMVp-hKCNE1-EF1-GreenPuro plasmid).

Puro vector는 유용유전자를 발현시키는 CMV promoter와 형광유전자(copGFP)를 발현시키는 EF1 promoter를 따로 가지고 있어 유용단백질과 형광단백질이 각각 별도로 발현되는 특징이 있다. 따라서 클로닝된 벡터를 microinjection한 후 형광발현의 확인과 함께 RT-PCR, DNA sequencing으로 zebrafish 속에서 인간 KCNE1 유전자의 최종 삽입여부를 확인할 필요가 있었다.

클로닝한 pPB-CMVp-hKCNE1-EF1-GreenPuro plasmid를 pCMV-transposase vector와 함께 microinjection한 수정란도 아무것도 찢려 넣지 않은 대조군과 동일하게 부화까지는 5일이 소요되었다. 그리고 형광현미경으로 확인한 결과 대조군 치어에 비하여 microinjection된 치어에서 훨씬 밝은 형광발현이 관찰되었다. 그러나 생존율이 차이가 있었는데 microinjection한 치어의 경우 생존율이 10%에 불과하였고, 대부분 부화후 2~5일 정도 생존하였다. 이는 95% 이상의 부화 및 장기 생존율을 나타낸 대조군에 비해 현저히 떨어지는 수치였다. 원인으로서는 DNA 용액의 과다 주입, microinjection시 기술 부족으로 인한 수정란 손상, hKCNE1의 독성효과 등이 제시되고 있지만 추후 검토가 적극적으로 필요한 부분이다. 비록 생존율은 떨어질지라도 zebrafish에서 인간 KCNE1 유전자를 발현시킨 예는 아직 없었다. 따라서 hKCNE1의 발현은 기존의 신경세포 연구에 쓰였던 patch-clamping이나 knockout model과 병행하여 신경자극 전도 연구에 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 특히 수정란이 아닌 2~4세포기에 선택적으로 microinjection함으로써 생존율도 높이고, 조직별 모자이크 발현을 유도할 수 있을 것으로 판단된다.

최근에 형질전환 동물들로부터 factor VIII 등 유용단백질을 만들어내는 연구가 활발하게 진행되고 있다[6, 18]. 유산균 등 미생물에서도 bacteriocin같은 유용 유전자들이 계속 알려지고 있다. 본 연구는 LQTS를 유전자 차원에서 분석, 치료하는 방법을 찾는 발판 마련과 동시에, 유용 유전자들을 어류에서 발현시키기 위한 동물모델의 기초를 제공할 것으로 기대된다.

감사의 글

We thank Dr. Ding Jeak Ling (NUS, Singapore) for kind assistance. 형광발현과 해양 유산균 분리에 조언을 주신 김태완 교수, 구분철, 권모선 박사(대구가톨릭대), 윤재우 교수(계명대 약대)께 감사드립니다. 본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 연구되었음(116166-03-1-HD020).

References

- Amsterdam, A., Burgess, S., Golling, G., Chen, W., Sun, Z., Townsend, K., Farrington, S., Haldi, M. and Hopkins, N. 1999. A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish. *Genes Dev.* **13**, 2713-2724.
- Axelrod, H. R. and Schulz, L. P. 1955. A handbook of tropical aquarium fishes. *McGraw-Hill Book co.* 271.
- Bhimachar, B. S. and Subra Rau, A. 1941. The Fishes of Mysore State. I. fishes of Kadur District. *Half-yearly J.* **1**, 141-153.
- Busch-Nentwich, E., Sollner, C., Roehl, H. and Nicolson, T. 2004. The deafness gene *dfna5* is crucial for *ugdh* expression and HA production in the developing ear in zebrafish. *Development* **131**, 943-951.
- Cho S. W., Park, H. J., Kim, G. Y., Nam, M. K., Kim, H. Y. Ko, I., Kim, C. H. and Rhim, H. 2006. Establishment of the expression system of human HtrA2 in the zebrafish. *J. Life Sci.* **16**, 571-578.
- Chrenek, P., Chrastinova, L., Kirchnerova, K., Makarevich, A. V. and Foltys, V. 2007. The yield and composition of milk from transgenic rabbits. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* **20**, 482-486.
- Ding, S., Wu, X., Li, G., Han, M., Zhuang, Y. and Xu, T. 2005. Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell* **122**, 473-483.
- Driever, W., Stemple, D., Schier, A. and Solnica-Krezel, L. 1994. Zebrafish: genetic tools for studying vertebrate development. *Trends Genet.* **10**, 152-159.
- Geelen, J. L., Doevendans, P. A., Jongbloed, R. J. E., Wellens, H. J. J. and Geraedts, J. P. M. 1998. Molecular genetics of inherited long QT syndromes. *Eur. Heart J.* **19**, 1427-1433.
- Gibbs, P. D. and Schmale, M. C. 2000. GFP as a genetic marker scorable throughout the life cycle of transgenic zebrafish. *Biotechnology* **2**, 107-125.
- Hirao, H., Shimizu, W., Kurita, T., Suyama, K., Aihara, N., Kamakura, S. and Shimomura, K. 1996. Frequency-dependent electrophysiologic properties of ventricular repolarization in patients with congenital long QT syndrome. *J. Amer. Coll. Cardiol.* **28**, 1269-1277.
- Hisaoaka, K. K. and Firlit, C. F. 1962. The embryology of the blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallas). *J. Mor.* **3**, 239-253.
- Huang, H., Ju, B., Lee, K. Y. and Lin, S. 2004. The zebrafish: genetics, genomics and informatics. *Methods Cell Biol.* **77**, 403-411.
- Jackman, W., Friday, K. and Anderson. 1988. The long QT syndromes: A critical review, new clinical observations and a unifying hypothesis. *Prog Cardiovasc Dis.* **31**, 115-172.
- Kato, M., Yamanouchi, K., Ikawa, M., Okabe, M., Naito, K. and Tojo, H. 1999. Efficient selection of transgenic mouse embryos using EGFP as a marker gene. *Mol. Reprod.* **54**, 43-48.
- Keating, M. T. 1996. The long QT syndrome. A review of recent molecular genetic and physiologic discoveries. *Medicine* **75**, 1-5.
- Koo, S. H., Woom, F. H. and Demund, J. D. L. 2006. Genetic polymorphisms in KCNE1, HERG, KCNE1 and KCNE2 genes in the Chises, Malay and Indian populations of Singapore. *Br. J. Clin Pharmacol.* **61**, 301-308.
- Park, J. K., Jeon, I. S., Lee, Y. K., Lee, P. Y., Kim, S. W.,

- Kim, S. J., Lee, H. G., Han, J. H. and Park, C. G. 2003. Increased of the red blood cell in peripheral plasma of transgenic pigs harboring hEPO gene. *Reprod. Dev. Biol.* **27**, 317-24.
19. Patton, E. E. and Zon, L. I. 2001. The art and design of genetic screens: zebrafish. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 956-966.
20. Splawski, I., Jiaxiang, S., Katherine, W. T., Michael, G. V., Michael, H. L. and Mark, T. K. 1998. Genomic structure of three long QT syndrome genes: KVLQT1, HERG, and KCNE1. *Genomics* **51**, 86-97.
21. Viskin, S., Alla, S. R. and Barron, H. V. 1996. Mode of onset of torsade de pointes in congenital long QT syndrome. *J. Amer. Coll. Cardiol.* **28**, 1262.
22. Yeo, S. I., Kim, S. W., Kim, Y. N., You, K. H., Shin, S. W., Kim, M. H., Song, J. C. and Yoo, M. 2002. Complete nucleotide sequence of KCNE1 in Korean genome. *J. Exp. Biomed. Sci.* **8**, 185-188.

초록 : Zebrafish에서 인간 KCNE1 유전자 발현에 관한 연구

박현정 · 유 민*

(계명대학교 생명과학전공)

본 연구에서는 zebrafish에 인간의 KCNE1 유전자가 삽입된 형광단백질 vector를 microinjection하고, 그 발현 여부를 확인하고자 하였다. 먼저 양 말단에 제한효소(*EcoRI*, *BamHI*) site를 넣어 제작한 primer들로 genomic DNA에서 KCNE1 유전자를 분리하였다. 그 결과는 약 402 bp 크기의 DNA band였고 이 PCR 산물을 형광단백질 vector인 pPB-CMVp-EF1-GreenPuro 속에 클로닝하여 pPB-CMVp-hKCNE1-EF1-GreenPuro plasmid를 제작하였다. 이렇게 준비된 형광 vector를 zebrafish 수정란에 microinjection하였고, 부화된 치어에서 RT-PCR과 DNA sequencing을 통해 GFP 및 hKCNE1의 발현을 최종 확인하였다. 본 연구는 향후 QT 연장증후군(LQTS)에 대한 동물 모델로써 신경자극 전도, 유전자 치료, 유용 유전자 클로닝을 위한 기술 개발에 응용될 수 있을 것으로 기대된다.