

Expression of Human Cytochrome b₅ in Zebrafish

Se Mi Han and Min Yoo*

Department of Biology, Keimyung University, Daegu 42601, Korea

Received January 19, 2017 / Revised January 31, 2017 / Accepted February 15, 2017

In this study, we sought to develop an effective cloning system by which human cytochrome b₅ (cyt b₅) is introduced and expressed in zebrafish. First, the 414 bp human cyt b₅ gene was amplified from RNA extracts of HeLa cells using RT-PCR, and the amplicon was subsequently sequenced to confirm that it was intact. Next, cyt b₅ was cloned into the pEGFP-N3 vector, which also encodes a fluorescent gene. One-cell stage zebrafish embryos were microinjected with the recombinant vector containing the cyt b₅ gene. Fluorescence microscopy confirmed high expression of the fluorescent gene in the injected fry compared to the non-fluorescent control fry. Finally, we extracted RNA from the injected fry and performed RT-PCR to determine whether the human cyt b₅ gene is expressed in the transgenic zebrafish. Sequencing analysis further confirmed that the cloned human cyt b₅ gene was intact. The transgenic zebrafish model produced in this study will be a useful tool to study therapeutic approaches to cure various diseases related to the deficiency of functional human cyt b₅ as well as tools for cloning useful genes in fish.

Key words : Cytochrome b₅, HeLa cell, methemoglobinemia, pEGFP-N3, zebrafish

서 론

Cytochrome b₅ (cyt b₅) 유전자는 신체 여러 조직에서 발현되는 housekeeping gene이며, Cyt b₅는 전자전달효소로서 다양한 산화환원반응에 관여한다. Cyt b₅의 유전자는 chromosome 18번에 위치하며[8], 총 6 개의 exon으로 이루어져 있다[16, 26]. Cyt b₅는 두 가지 형태를 갖는데 본질은 동일하지만 소포체에 결합되는 부위, 즉 membrane bound domain 여부에 따라 membrane bound form과 soluble form의 두 가지로 나뉘어진다[6].

Cyt b₅는 주로 간과 혈액에서 많은 연구가 진행되어 왔다. 이는 간이 물질대사의 주된 장소이며, 혈액은 신체 전반에 산소와 양분을 운반하는 중요한 역할을 담당하고 있기 때문이다. Membrane bound form의 경우 간에서 cytochrome P-450이 촉진하는 hydroxylation 반응에 관여하며[13, 18], 사람을 비롯해 닭, 토끼, 소 등의 고등동물에서 이와 관련된 기능들이 차례로 보고되어 있다[4, 5, 7, 20, 26, 27]. 또한 곤충 housefly (*Musca domestica*) [23], 식물 cauliflower (*Brassica oleracea*) [14]에서도 cyt b₅의 mRNA 및 단백질이 발견되었을 정도로 여러 생명체에 깊이 연관되어 있다. 어류인 zebrafish (*Danio rerio*)

에서도 cyt b₅ 유전자가 보고되어 있다[24]. Soluble form은 적혈구에 존재하는 것으로 methemoglobin (metHb) 환원에 직접 관여한다. Hemoglobin (Hb)은 heme iron이 환원된 상태에서 산소를 운반하며, Hb이 산화되어 metHb이 됨으로써 산소와 결합할 수 있는 능력을 잃어버려 methemoglobinemia를 유발하게 된다[10, 12]. 이때 cyt b₅가 산화된 metHb의 95%를 Hb로 환원시키는 역할을 한다[11, 17]. 그밖에도 cyt b₅는 부신, 정소, 혹은 난소와 같은 조직에서 일어나는 steroidogenesis 반응에서 hydrolase의 활성을 조절하기도 한다[15, 18, 22].

Zebrafish (*Danio rerio*)는 경골어류로서 척추동물의 하나이다. Zebrafish의 수정 후 발생배는 직경 약 0.7 mm 정도로 사람의 난자(0.5 mm)보다 약간 큰 편이다. 암컷은 일주일 간격으로 한번에 200~300 개의 많은 알을 낳고 체외수정을 한다. 또한 발생배가 투명하기 때문에 일반 현미경으로 발생의 모든 과정을 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있다. 발생이 매우 빨라서 초기의 세포분열은 15분 간격으로 빠르게 진행되며, 대부분의 조직 및 장기가 하루 만에 거의 모두 형성된다. 어류이기 때문에 허파를 제외한 간, 췌장, 흉선 등 면역을 포함한 대부분의 기관이 있으며, 돌연변이 연구에서 밝혀지는 결과들이 인간의 유전질환과 매우 유사한 것으로 알려져 있다[3]. 동물모델로서 zebrafish의 가장 큰 장점은 사람과 비교할 때 유전자의 구조와 수가 비슷하다는 점이다. 또한 신경계 및 각종 기관형성 과정이 사람과 유사하기에 질병연구를 위한 질환동물모델로서 전 세계적으로 활발한 연구가 이루어지고 있다. Zebrafish의 또 다른 장점은 인간 유전체 기능연구(functional genomics)를 위한 동물모델로서 사용될 수 있으며, 동시에 선충 또는 초파리에서나 가능한 생체 내 세포생물학적 실험과 대규

*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.

모 유전학적인 연구가 가능하다는 점이다[19].

본 연구는 zebrafish에 사람의 *cyt b5* 유전자를 클로닝하여 microinjection하고, 그 발현 여부를 형광단백질(EGFP)과 RT-PCR로 확인한 결과의 보고이다. 이는 유전자치료의 발생 유전학적 기반을 마련하려는 것으로써 methemoglobinemia 및 관련된 선천성 질환을 치료하는데 동물모델로서 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

재료 및 방법

RNA 추출

HeLa cell 배양액이 들어있는 배양접시에서 media를 제거한 다음, 4°C에 보관되어 있던 RNAiso plus 1 ml을 처리하고 상온에 10분간 방치하였다. Pipetting과 scraping을 하여 배양 접시에 붙어있는 cell을 잘 떨어뜨린 다음 microfuge tube에 옮겨 섞고 상온에 3분간 방치하였다. Chloroform 200 μ l를 넣고 뒤집으며 잘 섞어준 다음 다시 상온에 10분간 방치하였다. 원심분리 후 상층액을 버리고 RNA pellet을 57°C에서 DEPC water 50 μ l에 녹여내었다. 그런 다음 1 μ g의 total RNA를 reverse transcription하여 cDNA를 생성하였다.

RT-PCR (Reverse Transcription-PCR)

Cyt *b5* primer는 human cytochrome *b5* mRNA 염기서열에 준하여 제작하였다. Forward primer (*cyt b5F-Xho I* primer)는 제한효소 *Xho I* site를 포함하여 개시코돈 앞쪽에 준하여 만들었고 전체 길이는 27 bp (5'-CTC GAG ATG GCA GAG CAG TCG GAC GAG-3')였다. Reverse primer (*cyt b5R-EcoR I* primer)는 정지코돈을 제외한 3' 쪽 염기서열에 준하여 만들었으며 제한효소 *EcoR I* site를 포함시켜 전체 27 bp (5'-GAA TTC GTC CTC TGC CAT GTA TAG GCG-3')로 제작하였다. PCR tube에 HeLa cell cDNA, *cyt b5F-Xho I* primer (10 pmole/ μ l), *cyt b5R-EcoR I* primer (10 pmole/ μ l) 각각 2 μ l, 2X Taq mastermix 25 μ l, 멸균수 19 μ l를 섞어 전체 부피를 50 μ l가 되게 하였다. Pre-denaturation은 94°C에서 5분간, denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 60°C에서 30초, extension은 72°C에서 30초 반응시켰다. 이 과정을 총 35회 반복한 후, post-extension을 72°C에서 7분간 실시하여 전기영동으로 확인하였다.

pEGFP-N3-cyt *b5* plasmid의 제작

클로닝 효율을 높이기 위하여 PCR 산물을 pGEM-T easy vector에 먼저 클로닝 하였다. 그다음 제한효소 *Xho I* 과 *EcoR I* 을 처리하여 *cyt b5* DNA insert만 잘라내고 형광 vector인 pEGFP-N3에 다시 클로닝함으로써 pEGFP-N3-cyt *b5* plasmid를 제작하였다. pEGFP-N3는 싱가포르국립대학교 Dr. Ding Jeak Ling으로부터 분양받았다.

Zebrafish의 수정란 채취

계명대학교 동물윤리위원회(승인번호: KM 2016-004)의 승인을 받아 zebrafish의 구입과 사육을 진행하였다. Zebrafish는 대구 인근지역 수족관에서 구입하였다. 수정란을 채취하기 전날에 암컷과 수컷 성어를 1:2 비율로 mating cage에 넣고 하루 중 14시간은 밝게, 10시간은 어둡게 빛 주기를 교차시키며 산란을 유도하였다. 대개는 다음날 오전 중 산란된 알을 수거할 수 있었다. 산란된 알 중에는 수정란과 미수정란이 섞여 있었기에 그 중 수정란만을 따로 채취해 실험을 진행하였다. 끝이 뭉툭한 바늘과 스포이드를 이용해 수정란을 채취하였고 오염을 방지하기 위해 blue water로 한 번 헹구어내었다.

Microinjection

정제된 pEGFP-cyt *b5* plasmid DNA를 zebrafish 수정란에 microinjection하였다. 수정란들을 slide glass에 부착시키고 microneedle에 DNA 용액을 넣은 후 micromanipulator를 이용하여 microinjection 하였다. One cell stage의 수정란에 DNA를 주입하였으며, 제대로 injection 되었는지 확인하기 위해 붉은 색의 phenol red solution과 DNA 용액을 1:1 비율로 섞어 사용하였다. 농도가 240 ng/ μ l인 DNA를 105~120 pl씩 injection 하였으며, 이때 주입되는 DNA의 양은 약 25~29 pg이었다. 한 개의 수정란에 microinjection하는 DNA의 양은 hemacytometer와 heavy oil을 이용하여 측정하였다[2]. Microinjection한 수정란과 부화된 치어(fry)에서의 형광발현 관찰은 Stereo-microscope (Samwon, Korea)과 inverted fluorescence-microscope (Nikon, Japan)로 관찰하였고, 사진은 D5300 디지털 카메라(Nikon, Japan)로 촬영하였다.

치어에서의 cyt *b5* 발현 확인

pEGFP-N3-cyt *b5* plasmid DNA를 injection한 치어와 injection하지 않은 대조군의 RNA를 각각 추출하였다. RNA 추출은 RNeasy mini kit (QIAZEN, USA)를 이용하였으며, 실험은 kit의 설명서를 따라 진행하였다. 최종적으로 분리된 RNA를 RNase free water 30 μ l에 녹여내었고 이중 1 μ g의 total RNA를 역전사반응 시켜 cDNA를 생성하였다. 실험에 사용한 primer들은 *cyt b5F-Xho I* primer와 *cyt b5R-EcoR I* primer였고 PCR 반응은 앞에서 설명한 것과 동일한 조건으로 실시되었다. RT-PCR 산물들은 DNA sequencing으로 염기서열을 결정하였고, 기존 NCBI GenBank의 염기서열과 비교, 분석하였다.

결 과

HeLa cell에서 cyt *b5* 증폭

HeLa cell에서 total RNA를 추출하여 전기영동한 결과 28S와 18S rRNA가 뚜렷하게 확인되었다. 이렇게 준비된 total RNA를 template로 해서 *cyt b5* primer들을 이용해 RT-PCR을

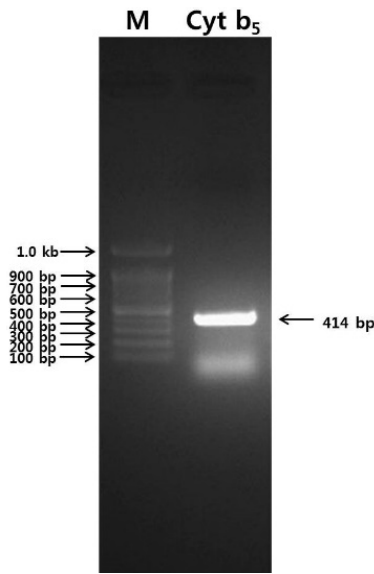


Fig. 1. RT-PCR result showing *cyt b₅* transcript (M: 100 bp ladder).

진행하였고 414 bp의 *cyt b₅* cDNA band가 확인되었다(Fig. 1). 이를 먼저 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 pGEM-*cyt b₅* plasmid를 제작하였다.

pEGFP-N3-*cyt b₅* plasmid의 제작

pGEM-*cyt b₅* plasmid를 *Xho* I 과 *Eco*R I 으로 잘라 *cyt b₅*에 해당하는 414 bp의 band를 분리해내었다. 그런 다음 이를 pEGFP-N3 vector에 클로닝하여 pEGFP-N3-*cyt b₅* plasmid를 제작하였다(Fig. 2).

치어에서 pEGFP-N3-*cyt b₅* plasmid의 EGFP 발현

Zebrafish에 injection한 pEGFP-N3-*cyt b₅* plasmid DNA의

EGFP 발현을 확인하기 위하여 형광현미경으로 조사하였다. One cell stage의 수정란에 microinjection하였으며, 수정 후 5일째 (fry stage)에 관찰하였다. DNA를 microinjection 하지 않은 대조군에서도 원래 zebrafish가 가지고 있는 내생의 형광을 몸의 앞쪽에서 약간 관찰할 수 있었으나 이는 실험군과 비교되지 않을 정도로 미약하였다(Fig. 3A). pEGFP-N3-*cyt b₅* plasmid DNA를 microinjection한 치어에서는 injection하지 않은 대조군에 비해 형광발현이 몸 전체에서 선명하게 관찰되었다(Fig. 3B).

Cyt b₅ 의 발현 여부를 transcription 차원에서 확인하기 위해 치어의 total RNA를 추출하여 RT-PCR을 진행하였다. Primer들은 상기한 *cyt b₅* primer들이었다. 실험의 대조군으로는 β -actin이 사용되었다. pEGFP-N3-*cyt b₅* vector만 microinjection 했을 때에는 아무런 band도 증폭되지 않았다. 그러나 pEGFP-N3-*cyt b₅* plasmid DNA를 microinjection한 치어에서는 *cyt b₅*에 해당하는 414 bp DNA band가 선명하게 확인하였다(Fig. 4). 다시 한 번 microinjection한 치어에서 *cyt b₅* 유전자를 증폭한 결과를 염기서열 분석하였고, 그 결과 *cyt b₅* 유전자가 제대로 삽입되고 발현되었음을 재확인할 수 있었다(Fig. 5).

고 찰

Zebrafish의 수정란에 *cyt b₅* 유전자를 microinjection하여 transgenic zebrafish를 만들었고, 형광현미경으로 EGFP의 발현을 확인하였다. 운반체로는 pEGFP-N3 plasmid를 사용하였는데 이 vector는 insert와 형광유전자가 융합되어 발현되는 것이 특징이다. 즉, 유용단백질과 형광단백질이 연속으로 이어져 fusion 단백질이 만들어진다. 그러므로 EGFP 형광을 확인하면 유용유전자의 발현을 동시에 확인할 수 있는데 그럼에

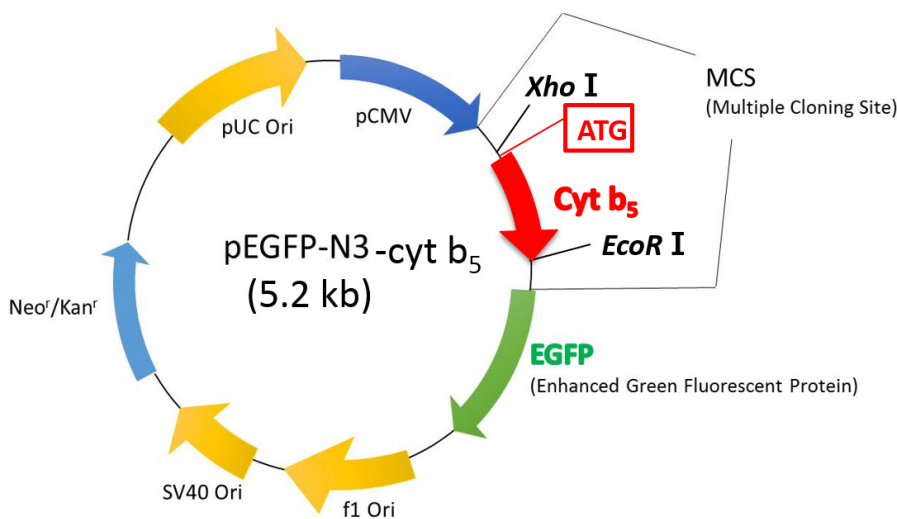


Fig. 2. Structure of pEGFP-N3-*cyt b₅* plasmid.

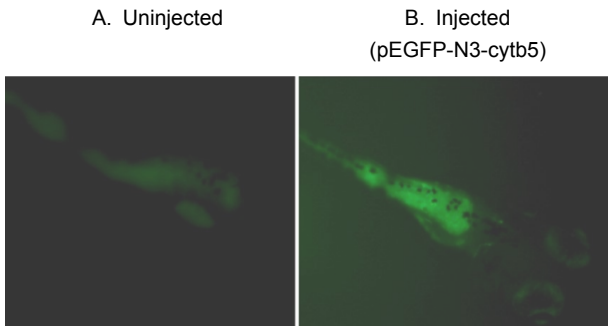


Fig. 3. Comparison of (A) uninjected zebrafish fry and (B) injected zebrafish fry with pEGFP-N3-cyt b₅ plasmid DNA.

도 불구하고 RT-PCR과 DNA sequencing으로 매 과정마다 검증실험을 하였다.

클로닝된 pEGFP-N3-cyt b₅ plasmid를 zebrafish 수정란에 microinjection하기 위해서 DNA 용액의 부피를 측정하였다 [9]. Heavy oil에 DNA 용액을 loading하여 터지지 않는 크기 일 때 hemacytometer를 이용하여 구의 부피를 측정하였다. Zebrafish는 수정 후 5일이 지나면 치어가 되는데 치어까지의 생존율은 약 80%였다. DNA 용액을 많이 injection 하거나 yolk에 injection할 경우에 수정란이 사망하여 치어까지 생존하지 못하였다. 또한 치어가 된 후 생존하는 기간은 약 2-10일 정도였다. 이것은 대조군의 생존률이 95%에 달하고 일단 치어가 되면 성체까지 자라는 것과 비교할 때 다소 떨어지는 수치였다. 때문에 cyt b₅의 발현이 진행됨에 따라 만들어진 fusion

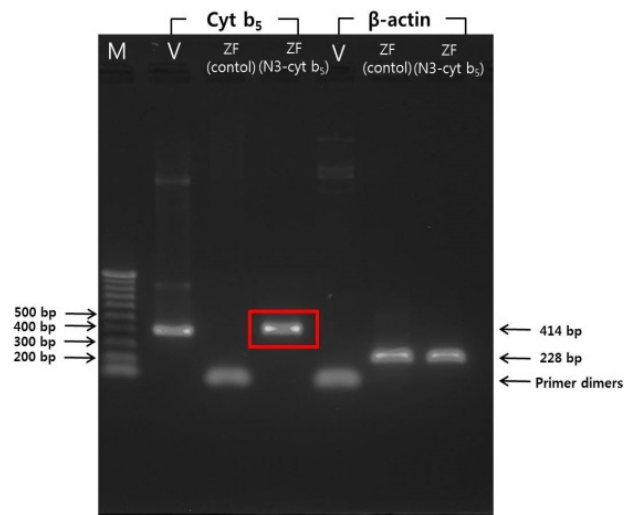


Fig. 4. Results of RT-PCR with primers of cyt b₅ and β-actin (ZF: Zebrafish, V: pEGFP-N3-cyt b₅ plasmid vector, M: 100 bp ladder).

단백질이 독성을 일으키거나 microinjection 과정에서 수정란에 상처가 생기는 등 여러 가지 이유로 오래 살지 못하고 죽는 것으로 사료된다. 대조군의 수정란이 죽는 이유 역시 microinjection 실수이거나 치어가 온도에 적응하지 못하여 죽는 것으로 관찰되어졌다. Zebrafish 치어에 사람의 cyt b₅ DNA가 제대로 전달되었다는 것은 RT-PCR과 DNA sequencing으로 확인하였다.

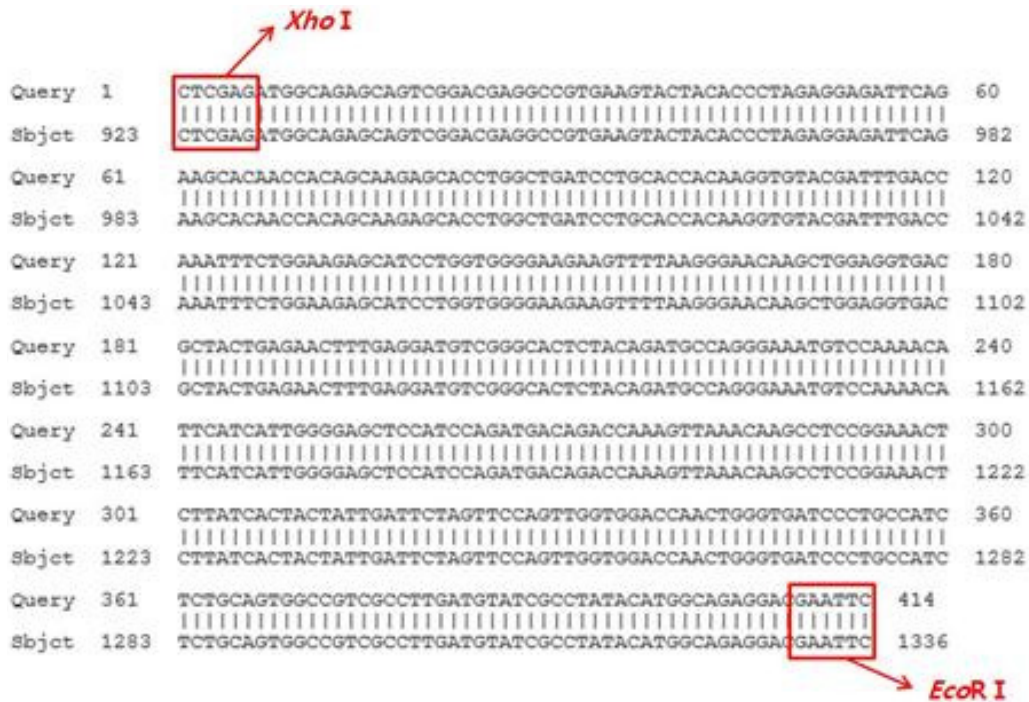


Fig. 5. Result of sequencing of cyt b₅ insert DNA in injected zebrafish fry with pEGFP-N3-cyt b₅ plasmid. Boxed areas indicate restriction enzyme sites. Query sequence (GenBank) matches with experimental result (Sbjct).

Zebrafish를 이용한 형질전환동물 실험이 점차 다양한 분야에서 발표되고 있다. 환경호르몬이 zebrafish의 생식에 어떤 영향을 주는지[1], zebrafish 복부간뇌의 도파민 작동성 신경의 발현에 대한 연구[25], 척추동물의 발생과 질병에 관한 보고 [21] 등 다양한 연구들이 진행되고 있다.

결론적으로 우리는 형광 vector인 pEGFP-N3 vector에 사람의 cyt b₅ 유전자를 클로닝하였으며 이렇게 준비된 pEGFP-N3-cyt b₅ plasmid를 zebrafish 1세포기 수정란에 microinjection하였다. 또한 형광현미경으로 microinjection한 치어에서 fusion 단백질이 발현된 것과 RT-PCR 및 DNA sequencing을 통해 치어에 cyt b₅ 유전자가 제대로 전달되었는지 확인하였다. 이러한 결과를 통해 본 연구에 도입한 기술과 전략들은 향후 cyt b₅가 결핍되어 발생하는 methemoglobinemia 및 관련 선천성 질환을 치료하는데 활용할 수 있을 것으로 기대된다. 동시에 유용 유전자들을 형광 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

- Cheng, X., Chen, X., Jin, X., He, J. and Yin, Z. 2014. Generation and characterization of gsuu: EGFP transgenic zebrafish for evaluating endocrine-disrupting effects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **278**, 78-84.
- Cho, S. W., Park, H. J., Kim, G. Y., Nam, M. K., Kim, H. Y., Ko, I. H., Kim, C. H. and Rhim, H. S. 2006. Establishment of the expression system of human HtrA2 in the zebrafish. *J. Life Sci.* **4**, 571-578.
- Choi, T. Y., Kim, S. M., Sohn, K. C., Kim, C. D., Lee, J. H. and Yoon, T. J. 2007. Zebrafish as an *in vivo* model for the study of skin cells. *J. Invest. Dermatol.* **14**, 37-44.
- Dariusz, N., Fisher, C. W. and Steggle, A. W. 1988. The nucleotide sequence of rabbit liver cytochrome b₅ mRNA. *Protein Seq. Data Anal.* **1**, 351-353.
- Douglas, R. H. and Hultquist, D. E. 1978. Evidence that two forms of bovine erythrocyte cytochrome b₅ are identical to segments of microsomal cytochrome b₅. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 3118-3122.
- Giordano, S. J. and Steggle, A. W. 1991. The human liver and reticulocyte cytochrome b₅ mRNAs are products from a single gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**, 38-44.
- Giordano, S. J. and Steggle, A. W. 1993. Differential expression of the mRNAs for the soluble and membrane-bound forms of rabbit cytochrome b₅. *Biochim. Biophys. Acta* **1172**, 95-100.
- Giordano, S. J., Yoo, M., Ward, D. C., Bhatt, M., Overhauser, J. and Steggle, A. W. 1993. The human cytochrome b₅ gene and two of its pseudogenes are located on chromosomes 18q23, 14q31-32.1 and 20p11.2, respectively. *Human Gen.* **92**, 615-618.
- Greg, C., Marcela, T., Shuo, L. and Sigrid, R. 2006. Fluorescent tagged analysis of neural gene function using mosaics in zebrafish and *Xenopus laevis*. *Brain Res.* **1070**, 150-159.
- Hegesh, E., Hegesh, J. and Kaftory, A. 1986. Congenital methemoglobinemia with a deficiency of cytochrome b₅. *New Engl. J. Med.* **314**, 757-761.
- Jaffe, E. R. 1981. Methemoglobinemia. *Clinics Haematology* **10**, 99-122.
- Jaffe, E. R. 1985. Methemoglobinemia in the differential diagnosis of cyanosis. *Hosp. Pract.* **20**, 92-96, 101-103, 108-110.
- Jagow, G. and Walter, S. 1980. b-type cytochromes. *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 281-314.
- Kearns, E. V., Keck, P. and Somerville, C. R. 1992. Primary structure of cytochrome b₅ from cauliflower (*brassica oleracea*) deduced from peptide and cDNA sequences. *Plant Physiol.* **99**, 1254-1257.
- Kominami, S., Noriyuki, O., Reiko, M., Huang, D. Y. and Shigeki, T. 1992. The role of cytochrome b₅ in adrenal microsomal steroidogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **42**, 57-64.
- Li, X. R., Giordano, S. J., Yoo, M. and Steggle, A. W. 1995. The isolation and characterization of the human cytochrome b₅ gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**, 894-900.
- Mansouri, A. 1985. Methemoglobinemia. *Amer. J. Med. Sci.* **289**, 200-209.
- Mathews, F. S. 1985. The structure, function and evolution of cytochromes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **45**, 1-56.
- Park, H. C. 2010. Zebrafish (*Danio rerio*). *Mol. Cell. Biol. News* 1-11.
- Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Suzuki, A. and Kawasaki, T. 1992. Molecular cloning of rabbit cytochrome b₅ genes: evidence for the occurrence of two separate genes encoding the soluble and microsomal forms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**, 845-851.
- Vacaru, A. M., Unlu, G., Spitzner, M., Mione, M., Knapik, E. W. and Sadler, K. C. 2014. *In vivo* cell biology in zebrafish-providing insights into vertebrate development and disease. *J. Cell Sci.* **127**, 485-495.
- Watanabe, F., Nakano, Y., Saido, H., Tamura, Y. and Yamanaka, H. 1992. Cytochrome b₅/cytochrome b₅ reductase complex in rat liver microsomes has NADH-linked aquacobalamin reductase activity. *J. Nutr.* **122**, 940-944.
- Wheelock, G. D. and Scott, J. G. 1992. Purification and characterization of cytochrome b₅ from the housefly (*musca domestica*). *Comp. Biochem. Physiol. B. Comparative Biochemistry* **101**, 209-215.
- Woods, I. G., Wilson, C., Friedlander, B., Chang, P., Reyes, D. K., Nix, R., Kelly, P. D., Chu, F., Postlethwait, J. H. and Talbot, W. S. 2005. The zebrafish gene map defines ancestral

- vertebrate chromosomes. *Genome Res.* **15**, 1307-1314.
25. Xi, Y., Yu, M., Godoy, R., Hatch, G., Poitras, L. and Ekker, M. 2011. Transgenic zebrafish expressing green fluorescent protein in dopaminergic neurons of the ventral diencephalon. *Dev. Dyn.* **240**, 2539-2547.
26. Yoo, M. and Steggle, A. W. 1988. The complete nucleotide sequence of human liver cytochrome b₅ mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **156**, 576-580.
27. Yoo, M. and Steggle, A. W. 1989. The characterization of three types of partially processed mRNA and two pseudogenes for human liver cytochrome b₅. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**, 18-24.

초록 : Zebrafish에서 human cytochrome b₅의 발현

한세미 · 유 민*

(계명대학교 생물학과)

본 연구에서는 zebrafish에 사람의 cyt b₅ 유전자를 microinjection하여 발현시키고, 그 결과를 형광으로 확인하였다. HeLa cell에서 RT-PCR을 진행한 결과 414 bp의 cyt b₅ band가 증폭되었다. 염기서열 분석으로 재확인된 cyt b₅ insert를 pEGFP-N3의 형광 vector에 클로닝하였고, 이렇게 준비된 pEGFP-N3-cyt b₅ plasmid DNA를 1세 포기의 수정란에 microinjection하였다. cyt b₅를 microinjection한 치어를 형광현미경으로 관찰한 결과 대조군 치어보다 훨씬 선명한 형광을 띠는 것이 확인되었다. 최종적으로 치어에서 RNA를 분리하여 RT-PCR하였고 전기영동과 DNA sequencing으로 fusion 단백질의 발현을 재확인하였다. Cyt b₅의 발현으로 인해 zebrafish의 생존율이 다소 떨어지는 것으로 확인되었기에 독성 문제를 해결하기 위한 연구가 계속 필요할 것으로 사료된다. 이 연구는 향후 cyt b₅가 결핍되었을 경우 발생할 수 있는 여러 질병들을 유전자 차원에서 치료하고, 유용 유전자 클로닝을 위한 기술 개발에 발판이 될 수 있을 것으로 기대된다.