

석사학위논문

자주복 (*Takifugu rubripes*) β -actin promoter의
클로닝과 특성 분석



해양생물공학과

강 경 임

2005년 12월

자주복 (*Takifugu rubripes*) β -actin promoter의
클로닝과 특성 분석

지도교수 여 인 규

강 경 임

이 논문을 이학석사 논문으로 제출함

2005년 12월

 제주대학교 중앙도서관
강경임의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 이 영 돈 (인)

위 원 강 법 세 (인)

위 원 여 인 규 (인)

제주대학교 대학원

2005년 12월

Cloning and characterization of β -actin promoter
from pufferfish (*Takifugu rubripes*)

Kyoung-Im Kang
(Supervised by Professor In-Kyu Yeo)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MARINE BIOTECHNOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2005. 12.

목 차

Abstract	i
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 자주복 β -actin promoter 영역의 염기서열 분석	4
1) 자주복 (Takifugu rubripes)의 genomic DNA 분리	4
2) β -actin promoter 영역의 클로닝과 염기서열 분석	4
(1) β -actin gene의 PCR 증폭 및 클로닝	4
(2) β -actin promoter 영역 증폭을 위한 LA-PCR 반응	5
(3) β -actin promoter 영역의 클로닝	7
(4) β -actin promoter 영역의 염기 서열 분석	8
2. 재조합 pFAP-EGFP 발현 vector 제작	9
3. EGFP reporter 유전자를 이용한 자주복 β -actin promoter 영역의 특성 분석	10
1) 배양 세포주를 이용한 자주복 β -actin promoter 영역의 발현양상 분석	10
2) 제브라피쉬 배에서의 자주복 β -actin promoter 영역의 발현양상 분석	11
III. 결 과	12
1. 자주복 β -actin promoter 영역의 염기서열 분석	12
2. 배양 세포주를 이용한 자주복의 β -actin promoter 영역의 발현양상	17
3. 제브라피쉬 배에서의 자주복 β -actin promoter 영역의 발현양상	20
IV. 고 찰	23
V. 요 약	27
VI. 참 고 문 헌	28
감사의 글	35

Abstract

Most of the transgenic fish studies have been restricted to freshwater teleosts. On the contrary, marine fishes have received little attention despite the fact that they possess higher economic potential in aquaculture. The pufferfish, *Takifugu rubripes* is economically important in marine aquaculture and also is valuable fish in molecular genetics. As an effort to obtain a strong regulatory element for the construction of an endogenous pufferfish expression vector, we isolated and sequenced β -actin promoter, which is highly conserved protein. A reporter gene, EGFP was cloned downstream of the promoter and the transcriptional activity was tested using microinjection of the construct into zebrafish embryos and transfection into CHSE-214 fish cell line and Vero cell line.

The promoter region contains TATA box, CAAT box and CArG motif. Transfection assays revealed that the promoter is functional in CHSE-214 cell line and vero cell line. And expression of EGFP by β -actin promoter was observed in microinjected zebrafish. EGFP was primarily expressed in the epidermis, blood vessels, muscle tissue, yolk sac, notochord, finray, and eyes. The expression pattern was similar when compared with that of CMV promoter. The transient expression results may be exploited in future transgenesis experiments and in other vertebrate animal researches.

I. 서 론

어류는 현재까지 지구상에서 존재하는 척추동물 중의 약 60%를 차지하고 있는 가장 큰 집단이며 진화적으로는 물론 분류학적으로도 매우 다양한 형태로 존재하고 있다 (Nelson, 1988). 이런 이유로 많은 분자생물학적 연구들은 토끼나 생쥐 등의 포유류를 대상으로 진행되어 왔으나, 최근에는 새로운 실험동물 모델로서 어류에 대한 관심이 높아졌다 (Powers, 1989; Shin, 1997). 이에 따라 어류의 분자 생물학적인 연구는 현재까지 알려진 생물들의 유전자 구조, 특징, 발현 조절 기작 등의 비교 연구에 매우 중요하게 다루어지게 되었다 (Powers, 1989; Liu *et al.*, 1990b).

어류는 포유류에 비해 다량의 난(embryo)을 산란하며 실험실내에서도 산란 및 부화가 가능하고 수정란의 크기도 클 뿐만 아니라 발생, 분화 과정의 관찰과 조작이 용이하기 때문에 초기 발생, 분화에 관련된 유전자의 기능 분석 등에 매우 유용하게 사용되고 있다 (Streisinger, 1981; Kimmel, 1989; Powers, 1989; Liu *et al.*, 1990b;). 어류의 유전자는 포유류의 유전자와 높은 상동성을 가지지만 게놈(genome)의 크기가 훨씬 작아 유전자 cloning이나 특성을 분석하는데 용이하다 (Brenner *et al.*, 1993; Elgar *et al.*, 1996). 최근에는 형질전환 어류 (transgenic fish)의 제조를 통해 발생 관련 유전자의 분리 및 기능 분석 등에 관한 연구와 외래 유용한 유전자를 도입함으로써 새로운 형질을 갖는 어류 육종방법에 따른 연구가 많이 진행되고 있다. 대표적으로 틸라피아 (Brem *et al.*, 1988; Martinez *et al.*, 1996; Rahman *et al.*, 1992), 무지개송어 (Gayomard *et al.*, 1989), 대서양 연어 (Shears *et al.*, 1991), 아프리카 메기 (Volckaert *et al.*, 1994) 등이 그 예이다.

이러한 형질전환 어류제작 연구에는 성장호르몬 등의 다양한 유용 유전자의 개발뿐만 아니라 우리가 선택한 유전자를 잘 발현시킬 수 있는 promoter에 관한 연구가 중요하다. Promoter에 따른 연구는 CMV promoter 등 바이러스나 포유류에서 유래한 조절인자를 밝혀내어 발현을 성공시켰으나 이들을 어류에 적용하였을 경우 발현이 제대로 되지 않는 경우가 종종 발생하게 되었다 (Hourrout *et al.*,

1990; Penman *et al.*, 1991). 이런 문제점을 보완하기 위하여 어류에서 유래한 조절인자를 어류에 적용시켰으며 바이러스이나 포유동물에서 유래한 조절요소보다 훨씬 효과가 높다는 연구들이 발표되어 (Maclean *et al.*, 2000) 형질전환 어류 생산의 연구가 더욱 진행되어졌다 (Hwang *et al.*, 2003).

어류 유래의 promoter 연구는 연어의 protamine 유전자 (Jankowski and Dixon, 1984), 무지개송어의 metallothionein A 와 B 유전자 (Zafaulah *et al.*, 1988; Olsson *et al.*, 1995) 제브라피쉬의 myosin heavy chain 유전자 (Muller *et al.*, 1997), 넙치의 antifreeze protein 유전자 (Du *et al.*, 1992; Gong *et al.*, 1995), 초어, 잉어, 송사리의 β -actin 유전자 등 다양하게 이루어졌다 (Liu *et al.*, 1990a; Liu *et al.*, 1990b; Takagi *et al.*, 1994; Noh *et al.*, 2003).

β -actin 유전자는 진핵 세포에 있어서 가장 잘 보존되어 있는 단백질의 하나로 세포 운동성과 구조 등에 관여하며 모든 조직에서 강하게 발현되는 특성을 가지고 있다. 보통 Actin 유전자는 유전자형에 따라 조직 특이적, 발생 특이적 발현양상을 보여주는 특징이 있어 (Gunning *et al.*, 1987; Kusakabe, 1997) 식물, 척추동물, 무척추동물의 연구에 actin promoter를 많이 이용하고 있다 (Liu *et al.*, 1990a; McElroy *et al.*, 1991; Moav *et al.*, 1992; Marta *et al.*, 1999).

특히 β -actin promoter의 경우 각 종간에 높은 상동성을 보이기 때문에 β -actin promoter에 관한 연구는 다양한 어류에서 이루어져왔다. 이 중 잉어 (Liu *et al.*, 1989), 초어 (Liu *et al.*, 1990a), 제브라피쉬 (Kelly and Reversade, 1997), 복어 (Venkatesh *et al.*, 1996), 유럽산 넙치 (Lee *et al.*, 2000a), 모래무지 (Lee *et al.*, 2000b), 버들치 (Lee *et al.*, 2000b)가 현재 보고되고 있다. 또한, β -actin promoter를 이용하여 transgenic medaka (Takagi *et al.*, 1994)을 생산하였으며, 미꾸리의 β -actin gene의 3.2-kb upstream sequences에 GH를 연결한 expression vector를 이용하여 대조구에 비해 30배나 더 무거운 형질전환 미꾸리를 생산하는 연구도 이루어졌다 (Noh *et al.*, 1999; Nam *et al.*, 2001a, 2001b).

자주복 (*Takifugu rubripes*)은 분류학상 복어목 (Tetraodoniformes), 참복과

(Tetraodontidae)에 속하는 회유성 어류로서 우리나라를 비롯한 일본 홋카이도 이남에서부터 동중국해에 걸쳐 널리 분포하고, 우리나라와 일본을 비롯한 동남아시아 지역에서는 맛이 좋고 영양이 풍부하여 식용으로 각광받아 양식되는 고부가가치 어류이다.

자주복은 대략 380 Mb의 유전자를 가지고 있다. 자주복 유전자의 coding region은 인간을 포함한 다른 척추동물이 가지고 있는 coding region과 비교 시, Intron서열을 제거시킨 것과 같은 조밀한 유전자배열을 가지고 있어 (Shin *et al.*, 1997; Brenner *et al.*, 1993; Elgar *et al.*, 1996) 인간유전자의 축소판이라 일컬어지고 있다. 또한 최근 자주복의 완전한 유전자 서열이 밝혀짐(Aparicio *et al.*, 2002)에 따라 다양한 분야에서 자주복을 이용한 연구가 이루어지고 있다. 따라서 자주복으로부터 어류 중에서 유용 유전자를 발견시키는데 적합한 어류기원의 유전자 조절 부위를 제공하고 유전자 조절부위를 포함하는 발현 벡터를 제조함으로써 다양한 형질전환 어류 연구의 가능성을 제시할 수 있을 것이다.

이 연구에서는 기존에 밝혀진 자주복의 β -actin 유전자 서열을 바탕으로 β -actin 유전자의 조절 부위를 분리하여 그 구조적 특징을 분석하고 녹색 형광단백질(Enhance Green Fluroscent Protein : EGFP)인 reporter 유전자를 이용하여 β -actin 유전자 promoter의 기능을 배양 세포주를 이용한 *in vitro* 분석과 실험모델 어종인 zebrafish를 이용한 *in vivo* 분석을 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 자주복 β -actin promoter 영역의 염기서열 분석

1) 자주복 (*Takifugu rubripes*)의 genomic DNA 분리

자주복으로부터 근육을 채취하고 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)을 이용하여 자주복의 genomic DNA를 분리하였다. 분리한 genomic DNA의 농도는 Unicam UV/VIS Spectrometer(He λ ios β , Unicam Ltd, UK)를 이용하여 260 nm에서 optical density를 측정하여 계산하였다.

2) 자주복 β -actin promoter의 클로닝과 염기서열 분석

(1) β -actin gene의 PCR 증폭 및 클로닝

자주복의 β -actin 유전자 부분을 조절하는 promoter를 증폭하기 위해 NCBI database에 등록되어 있는 대서양 연어, 초어, 잉어, 금붕어, 제브라피쉬, 참돔의 β -actin 유전자를 alignment하였다. 보존된 서열을 이용하여 forward (5'-ATGGAGAAGATCTGGCAYCACAC-3')와 reverse (5'-TAYTCCTGCTTGSTRATCCACAT-3') primer를 제작하고 PCR 반응을 수행하였다. 증폭된 자주복의 β -actin 유전자 일부를 pBluescript SK(-)에 클로닝하여 염기서열을 확인하였다.

(2) β -actin promoter 영역 증폭을 위한 LA(Long and accurate) PCR 반응

LA PCR kit (Takara, Japan)의 manual에 따라 자주복의 genomic DNA 5 μ l 을 5 μ l 10 X H buffer, 30 units의 *Hind* III로 처리한 후, 37°C water bath 에서 3시간 동안 반응하여 EtOH 침전과정을 거쳐 DNA만 정제하였고 이를 증류수 10 μ l에 resuspension하였다. *Hind* III로 절단된 자주복의 genomic DNA 5 μ l 을 kit에서 제공된 *Hind* III cassette 2.5 μ l, ligation solution I 15 μ l, ligation solution II 7.5 μ l와 함께 16°C에서 30분간 반응시켰으며, 반응산물은 EtOH 처리를 하고 증류수 5 μ l에 부유시켰다.

LA PCR 을 위한 primer 제작

LA PCR을 수행하기 위하여 LA PCRTM Kit (Takara, Japan)내에 있는 primer C1 (5'-GTACATATTGTCGTTAGAACGCGTTAGAACGCGTAATACGACTCA-3')과 primer C2 (5'-CGTTAGAACGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGA-3')를 사용하였으며 클로닝 한 β -actin 유전자의 염기서열을 바탕으로 reverse primer R1 (5'-TGCTCCTCAGGGCAACTCTCAGCTCGTTGTAGAA-3')과 R2 (5'-TCGTTGTAGAAGGTGTGATGCCAGATCTTCTCCAT-3')를 제작하였다.

1차 PCR

β -actin gene exon 일부와 promoter 부분을 증폭하기 위하여 *Hind* III cassette 가 ligation된 자주복의 genomic DNA 2 μ l를 증류수 32.5 μ l에 희석하여 이를 94°C에서 10분간 전처리하였다. DNA solution에 10 X LA buffer II (Mg²⁺ plus) 5 μ l, dNTP mixture (2.5 mM) 8 μ l, primer C1 1 μ l, primer R1 1 μ l와 Takara LA Taq polymerase (Takara, Japan) 0.5 μ l를 혼합하고 mineral oil 로 PCR reaction solution 위에 얇은 오일 막을 만들어 solution 의 증발을 방지하였다. PCR reaction 은 PTC-150 Minicycler (MJ Research, USA)를 이용하였으며 반응 조건은 최초 denaturation 94°C에서 1분, denaturation 94°C에서 30초, annealing 55°C에서 30초, extension 72°C에서 3분간을 30회 반복하였으며 마지막 extension 은 72°C에서 5분간 반응하였다.

2차 PCR

1차 PCR product를 10배로 희석하여, 이 중 1 μ l를 증류수 31.2 μ l, 10 X LA buffer II(Mg²⁺ plus) 5 μ l, dNTP mixture(2.5mM) 8 μ l, primer C2 1 μ l, primer 1 μ l와 Takara LA Taq DNA polymerase 0.5 μ l를 첨가한 후 반응시켰다. 반응 조건은 최초 denaturation 94°C에서 1분, denaturation 94°C에서 30초, annealing 55°C에서 30초, extension 72°C에서 3분간을 30회 반복하였으며 마지막 extension은 72°C에서 5분간 반응시켰다. 증폭된 PCR product는 1% agarose에 전기 영동하여 확인하였다.



(3) β -actin promoter 영역의 클로닝

Qiaquick PCR Purification kit (Qiagen)을 이용하여 PCR product에 남아있는 primers, nucleotides, polymerase, salts를 제거하고 50 μ l의 elution buffer (10 mM Tris·HCl, pH 8.5)에 DNA를 정제하였다. 정제한 PCR product는 *Taq* polymerase에 의해 합성된 3'의 A를 제거하기 위해 3 \rightarrow 5' exonuclease activity를 갖고 있는 *Pfu* polymerase (stratagene, USA)을 이용하여 polishing하였다. Polishing은 purification kit으로서 정제한 PCR product 30 μ l에 1 μ l의 10 mM dNTP와 10 X cloned *Pfu* buffer(200 mM Tris-HCl pH 8.8, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1% Triton X-100, 1 mg/ml nuclease-free bovine serum albumin)와 2.5 unit의 *Pfu* polymerase를 혼합하여 72°C에서 10분간 incubation하여 실시하였다. 이 blunting된 product를 QIAquick PCR Purification kit (Qiagen)을 이용하여 정제하였고 DNA의 농도를 측정하기 위해 1% agarose gel에서 전기영동을 실시하였다.

Polishing된 자주복의 β -actin promoter region을 *Hind* III로 절단된 pBluescript SK(-) vector (Stratagene, USA)에 ligation하였다. pBluescript SK(-) vector 100 ng에 1 μ l의 T4 DNA ligase buffer (660 mM Tris-HCl pH 7.6, 66 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 1 mM ATP), 4 μ l의 insert DNA, 0.5 μ l의 T4 DNA ligase (Takara, Japan)를 넣고 전체의 volume이 10 μ l가 되게 한 다음 15°C에서 16시간 동안 ligation하였다. Ligation산물은 *E. coli* DH 5 α 에서 형질전환하였다. 5 μ l의 ligation산물을 *E. coli* competent cell 70 μ l와 혼합하여 얼음에서 40분간 방치하고 42°C에서 90초간 heat-shock한 후 LB medium 100 μ l를 가하여 37°C에서 30분간 배양한 뒤 80 μ l을 ampicillin, IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside), X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactopyranoside)이 포함된 LB plate에 도말하여 37°C에서 16시간 배양하였다. 배양한 colony 중 white colony만을 선택하여 ampicillin이 첨가된 LB broth에 접종하여 37°C에서 16시간 배양하였다.

다음날 배양액을 원심분리하여 bacteria pellet을 수집하고 배양액으로부터 AccuPrep™ Plasmid Extraction kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 plasmid

DNA를 분리하였다. 분리한 plasmid DNA는 1% agarose gel에서 전기영동을 통하여 확인하였고 Unicam UV/VIS Spectrometer를 이용하여 260 nm에서 OD (optical density)를 측정한 후 Macrogen (Korea)에 의뢰하여 염기서열을 확인하였다.

(4) β -actin promoter 영역의 염기 서열 분석

확인된 서열은 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>)를 이용해 NCBI의 database에 나와 있는 이미 알려진 다른 유전자들의 서열과 비교 분석하였다.



2. 재조합 pFAP-EGFP 발현 vector 제작

자주복으로부터 분리된 β -actin 유전자 조절 부위의 활성을 확인하기 위하여 reporter 유전자인 EGFP (Enhanced green fluorescent protein)을 갖고 있는 pEGFP-N1 (Clontech) 벡터를 이용하였다. β -actin promoter 클론과 pEGFP-N1을 *EcoRI* (Takara, Japan)과 *KpnI* (Takara, Japan)으로 각각 절단하였다. 처음 *EcoRI* 을 사용하여 절단하였으며 DNA 는 2 μg 에 10 X K buffer 5 μl 와 10 unit의 *EcoRI*을 혼합하여 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 1% agarose gel에서 전기영동하여 잘린 것을 확인하고 에탄올 침전을 통해 정제 후 전체의 양이 50 μg 되도록 10X H buffer 5 μl 와 10 unit의 *KpnI*을 혼합하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간동안 반응을 시켰다. 절단된 DNA는 1% agarose gel 전기영동하여 확인 후 Gel Purification kit (Bioneer, Korea)을 사용하여 정제하였다. 절단된 pEGFP-N1과 β -actin promoter 클론은 T4 DNA ligase를 사용하여 ligation하였으며 ligation반응 총량을 15 μl 로 하고 10 X ligation buffer 1.5 μl , pEGFP-N1 2 μl , insert DNA 4 μl 씩을 넣어 15 $^{\circ}\text{C}$ 에서 16시간 동안 ligation반응을 진행하였다. Ligation 산물은 *E. coli* DH5 α 에 형질전환하였으며 형질전환 과정은 *E. coli* DH5 α competent cell 70 μl 에 ligation 산물 7 μl 을 혼합하여 얼음에서 40분간 배양하고 42 $^{\circ}\text{C}$ 에서 90초간 heat shock을 주어 다시 얼음에 2분간 배양하였다. 이에 LB broth 700 μl 를 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 배양한 후 kanamycin이 들어있는 LB plate에 100 μl 를 도말하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 16시간 배양하였다. 생성된 colony를 kanamycin이 들어있는 LB broth에 접종하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 16시간 배양하였다.

세포주에 transfection하기 위한 plasmid DNA는 재조합된 클론의 colony를 Kanamycin (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)이 들어있는 LB broth에 접종하여 37 $^{\circ}\text{C}$, 250 rpm에서 6시간 배양하였다. 이를 LB-Kanamycin broth 100 μl 에 1/10 희석하여 접종하고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 16시간 배양하였다. 다음날 배양액을 원심분리하여 bacteria pellet을 수집하고 Endofree Maxiprep kit (Bioneer, Korea)을 이용하여 plasmid DNA를 분리하였다. 또한 Plasmid Extraction kit을 이용해 배양된 cell로부터 plasmid DNA를 분리하여 microinjection을 하였다.

3. EGFP reporter 유전자를 통한 자주복의 β -actin promoter 영역의 특성분석

1) 배양 세포주를 이용한 자주복의 β -actin promoter 영역의 발현양상 분석

제작한 클론들의 발현여부를 확인하기 위해 어류 주화 세포인 CHSE-214 (Chinook salmon embryo cell) 그리고 mammalian cell line인 vero cell line 을 가지고 transfection을 하였다. 각각의 cell line들은 75F cell culture flask 에 항생제가 포함되어 있는 MEM10 (Modified Dulbecco's Eagle's Medium, 10% FBS) 배지를 이용하여 monolayer로 자라도록 어류주화세포는 20℃, 포유 동물 세포주는 5% CO₂가 공급되는 37℃에서 배양하였으며 transfection을 하기 하루 전 monolayer로 자란 세포를 EDTA-PBS, EDTA-PBS/Trypsin 용액을 처리하여 세포를 떼어낸 후 혈구계산판을 이용하여 1 mm × 1 mm 안의 세포수를 계수하였다. 계수된 세포수를 24 well에 2×10⁵ cells/ 500 μ l 되게 seeding 하여 항생제가 없는 MEM10 배지를 이용하여 각각 20℃와 37℃에서 배양하였고, 세포가 90-95% confluent로 자랐을 때 Invitrogen사의 Lipofectamine 2000을 사용하여 transfection을 수행하였다.

pFAP-EGFP DNA를 50 μ l의 serum이 없는 MEM 배지에 80 ng이 되도록 혼합하고 다시 50 μ l MEM 배지에 2 μ l의 lipofectamine을 혼합하여 실온에서 5 분간 배양하였다. 희석된 lipofectamine 용액은 준비한 50 μ l의 DNA 희석액을 혼합하여 20분간 실온 처리하였으며 전날 배양된 각 well의 배지를 제거한 후 100 μ l의 DNA와 lipofectamine 혼합액을 각 well에 있는 세포에 넣어주어 rocker 에 3분간 방치하였다. 여기에 혈청이 없는 MEM 배지를 첨가하여 각각 20℃, 37℃에서 4시간 동안 배양하였다. 4시간 후 transfection 혼합액을 제거하고 항생제와 10% FBS가 들어있는 MEM 배지를 첨가하여 각 온도에서 reporter 유전자의 발현을 유도하였다. Transfection 36시간 후 세포를 EDTA-PBS, EDTA-PBS/Trypsin을 처리하였다. 세포를 떼어낸 후 PBS 용액에 세포를 부유시키고 슬라이드 글라스에 세포를 올려놓아 세포주에서 reporter 유전자 발현을 형광 현미경 하에서 관찰하였다.

2) 제브라피쉬 배에서의 자주복의 β -actin promoter 영역의 발현양상 분석

세대가 짧고 많은 개체를 얻을 수 있을 뿐만 아니라 난이 투명하고 조작이 간편하여 실험모델 어류로 사용되고 있는 제브라피쉬의 수정난을 microinjection을 통하여 각 클론들의 활성을 확인하였다.

먼저 제브라피쉬는 수온 28℃에서 낮 14시간, 밤 10시간 주기로 사육시켰으며 microinjection을 수행하기 위해 하루전날 각각 암, 수 제브라피쉬를 유리구슬이 깔려있는 mating tank로 옮기고 어두운 천을 덮어 암기 10시간을 주었다. 다음 날 어두운 천을 걷어내고 강한 형광등으로 수정의 효과를 높였으며 수정된 난을 20 ppm 메틸렌 블루를 첨가한 egg water로 난 주위의 박테리아를 제거하였고 난질이 좋지 않은 난을 일차적으로 제거하기 위해 2-3회 세척하였다.

Microinjection 앞서 제브라피쉬 수정난은 지름이 약 1 mm 정도의 holding slide를 사용하여 한쪽 방향으로 정렬하여 주입시간을 최소화하였으며 첫번째 분열이 일어나기 전에 3 μ m capillary needle과 microinjector (WPI micromanipulator)를 사용하여 microinjection을 실시하였다. 미세주입을 위하여 100 ng의 DNA를 0.5% phenol red가 함유된 0.1M KCl buffer 용액과 1:1 비율로 혼합하여 embryo 당 약 100 pg DNA을 one cell stage 제브라피쉬의 수정난에 주입하였다. 미세주입 후 수정난은 대조군을 두어 분리하였고 egg water에서 5일간 키운 다음 일반 수조로 옮겨 성장시켰다. 제브라피쉬의 유지는 일반적인 방법 (Westerfield, 1995)을 따랐다 .

제브라피쉬에 주입한 자주복의 β -actin promoter의 발현 양상을 확인하기 위해 광학현미경을 이용하여 제브라피쉬의 난막을 핀셋으로 제거한 후 형광현미경으로 유전자의 발현양상을 관찰하였다.

III. 결 과

1. 자주복 β -actin promoter 영역의 염기서열 분석

자주복으로부터 β -actin 유전자 조절부위를 증폭시키기 위한 primer를 제작하기 위하여 이미 알려진 β -actin cDNA의 염기서열을 바탕으로 한 쌍의 primer를 제작하였으며, 이것을 이용하여 자주복의 β -actin 유전자를 확인하였다. 확인된 유전자의 염기서열을 이용하여 R1, R2 primer를 제작하였으며 이것을 이용하여 LA-PCR을 수행하고 β -actin gene의 promoter 부분을 얻었다.

증폭된 자주복의 β -actin gene의 promoter 부분을 염기서열을 분석하기 위해 pBluescript SK(-) vector에 cloning하였다. 이를 통하여 밝혀진 자주복의 β -actin 유전자 조절부위의 서열을 Fig. 1에 나타내었다.

자주복의 β -actin 유전자 조절부분의 서열은 전체 총 2659 bp로서 transcription start site, exon I, intron I, exon II의 앞부분이 증폭되었다 (Fig. 1). Exon I은 총 114 bp로서 1153 bp ~1238 bp에 위치하며 이는 단백질을 암호화하지 않는 mRNA의 시작부위인 5' UTR (5' untranslated region)임을 확인하였다.

진핵 생물들의 promoter를 예측할 수 있는 PPNN (promoter prediction by neural network)의 프로그램을 이용하여 1113 bp - 1163 bp 위치의 염기서열을 promoter로 예측하였으며 TATA box를 예측해주는 TATA box prediction 프로그램과 TATA box를 비롯한 다른 조절부위요소를 예측해주는 SIGNALSGAN 프로그램을 이용하여 다른 진핵생물의 mRNA에서 확인할 수 있는 TATA box, CAAT box, CArG motif 그리고 E-box를 예측하였다. 이는 Fig. 1에서 확인할 수 있듯이 80, 305, 388, 698, 1124 bp 위치에서 TATA box (TATAA), 1059 bp 위치에서 CAAT box (CCAAT), 1089 bp 위치에서 CArG motif (CC(A/T)₆GG), 그리고 130, 422 bp 위치에서 E-box (CA**TG)를 예측함으로써 transcription을 조절하는 부분임이 확인되었다. 이와 더불어 exon I이 끝나는 부분에서 GT서열과 Intron I이 끝나는 부분의 서열 AG는 splicing이 일어나는 엑손-인트론의 연결 부위로 GT-AG 법칙이 적용되고 있었다.

염기서열을 분석함과 동시에 자주복의 β -actin promoter 부분이 다른 어류

종의 것과 얼마나 유사한지를 알아보기 위해 다른 어류들에서 밝혀진 β -actin promoter 서열들과의 비교분석하였다. 그 결과, 나일 틸라피아(*Oreochromis niloticus*)종의 promoter 서열이 80% 상동성으로 우리가 얻어낸 서열과 가장 많이 일치되었으며, 그 다음 일본송사리(*Oryzias latipes*)종 경우에도 77% 정도의 상동성을 보여주었다.

Alignment 결과 현재 알려진 어류들이 β -actin promoter의 보존된 서열들을 확인할 수 있었는데 비교대상이 된 다른 어종들은 담수어임에도 불구하고 해수어인 자주복과 유사한 promoter의 조절 요소를 가지고 있었다.



AAGCTTATAGAGATGGAATCATTTAAAAGCAGCCACTAGAAGGATAATATTCAGTGGG	60
AATAAACTGAATAAATACATATAAGGATGCCACTCAGAAAAGGAAAAGCAAGTGGCAAAG	120
TATA box	
TAAACAAGCACATGTATCTGTGGGTGCTGGTTAAAAGGGGAAGTTGCTCAACAGTTGA	180
E-box	
GAGGAAACTCGGGTGAATAATGGTTCACTTTATAGTTAGATTTGAAACATTTTGGTGT	240
GTCATCGTCTCATTGTTGAAGATGTGAGCAGAATAAAGTAGTATTTAACAATATTAGACA	300
GTGGTATAAGGGTTTCTGTATGGTTGAACTGCAGCTGAAAGCACAACAGATAGTGCTC	360
TATA box	
TCCCACTTCCATTGTGTTAATTTAATAATACTGAAAACTGCTTGTGTTTAAACACCT	420
<u>GCATGTGC</u> AATGCTGCAGGCAATGCAATCTAAATATGATGACTGCCATATCTGTGACTGA	480
E-box	
AAACCAGACACATACAGCACAAAGAGCTTGATCAATAAGGGAGTCTTAGCAGCTGAGGAGT	540
GCAGAGAAGCGATGGCTACATATGTGGTCATTCCCAGCCCTGCCAGGGAATCTTGTGT	600
GTGTCATATGATTGACCTGGTGATGAACTGGCTGTGAGCCACAGTGAAGTTTTGCAAAT	660
CGAATGCTTACATCTGCATCGCCTCTGACATCGTTGATATAAGTGAAGAAGAGGGCA	720
TATA box	
GCCATTGACTAGCAGCCTGGTGGAGTCTGTACAGGGAGGGTCCCAGTACAAATCTCT	780
TCCGTTAACACTTAAGTATGTAAGTCTTGGTGGCAGTGCAGGGCTGTTTGAAGA	840
AAGTCCCAGCATCCTGTAATTGCTAATCAACCGATTAGCAATCTATTATCTTATTAGACC	900
TCGTGGCATTACCCAGTTCCTTTATTTCTTCAGTCTTTGCTATTATCGCCGCTCAT	960
TCTCAACCTCTCTTCCCCTCTCTCTCTCCCTCAAATCGCTAGCCCCAGTGCAG	1020
CAGTGTGCACGCGACGTGCCCTGGTGCATGACGCTGGACCAATCAGAAGGCACGATTCCG	1080
CAAT box	
AAAGTTTACCTTTTATGGCTCGAGCCCGGGCAGCTGACCTAGTTATAAAGACAAGCGCC	1140
CAAT box	
CACAATCCATAG <u>ACTCACTCTGAGCGTGTGACACGCGCTTGTGCGGATTCATTTGCCT</u>	1200
TATA box	
Exon I	
<u>GTACCGTTTCCTTAAGCGAAAACCCCCACCCAAAG</u> gtAAGGCTATGGAGACGTTTAC	1260
AAATGCTTAACATTAGAACGATGTTTACTACGTAAGTGGTACGTTGGCAATTTGTTTTTC	1320
ATAGTTTTTACGAAATTTGGCACCGGACACGAGGTTCTTTGTTAATCACTGACACTAAA	1380

Fig. 1. Nucleotide Sequences of the *Takifugu rubripes* β -actin gene and its upstream region. Sequence in lowercase correspond to the non-transcribed promoter and intron. Sequences in italics correspond to the 5' untranslated region. Exon I and exon II indicated with capitals and underline. non-capitals represented GT/AG role. The underlined sequences correspond to putative regulatory elements.

CGAAGTCTTTACCTAATGTTTTAAAAATGTTGTACAACCTGATTTTTGAGGCGTCTACAG	1440
TAATTAATCGGGCGTATTCGCTGCCCGCAGGTGCTTTCGGATGCAGCCGGCTTTTGCTC	1500
ATGCGATAGGAAATAACGGTTTTACGGTTTTGATAAGTCATGACTTATGTGCGGATTCT	1560
GGACTAGCTTGCCCGGTATGATTCCAAACGATGTGGAGTAGATGATTAAGGTCCCGCTGC	1620
TCCCTTGCAAAATGCAGACGGGTGTGACCTACTTAGTAAGCACGTAAGCTACGACCGCC	1680
TAAGTAAAAACGCCTAACAGCCTGCTTTTGAAACATGCCTGTGGGTACAGGCTGAATGA	1740
AAACCTGAATGAAATCATAAACCATTAAGGGTTTTGATAAGTCATGACTTATGTGCGGAT	1800
TCTGTACTAGCTTGCCCGGTATGATTCCAACGATGTGGAGTTAGATGATTTAGGTTCCGG	1860
CTGCTCCCTTTGTGCGACTGCGACGGGGTGTGACCTACTTTAGTTAGCACGTTATGCCTA	1920
GCCGCACTATGCTAACACCGCCCTACACGCCATGCATTTTTGAAAACCTGCCTGTGGTTC	1980
ACGGTCGTAGGAAATCTCGTAGGTAACCTAAAATTCACATATTTGGACTGTATACGAT	2040
TTTTTTTTTGTCTTCGTCCTATTCAACGTGCCGGTTACATAAAGGGCAATTTATGAATG	2100
ACGATCAGTCTGCGAAAGCGTGGCTTTCGGGAAATTAAGATCAGTCTGGAAC TTGA	2160
CCCATTCATGAATCGGCATGAGTAATGACGCAACCCCCATTAAGGCGTCAGTAATCAGC	2220
CCGAGTTAAAGGATATTAAGCGAGCCGCTGTGACGCAGCTAAATTTAAGTTGCGCGTGA	2280
TTCAATGTAAGGATGTAAGACGTGAGTAGGGGGGAGGAAGCTAGGGACGACAAGGAAGT	2340
CTGGCTTGTAAGTAGAGGGAGTGGTCGCTCAGCTCTGGGCCCGTTAACGCGTAAGTCCG	2400
TTATGGATGTTCTGGCAGCCGCATGGCCCGGTAGCCGCAAAGCTGCTCGAAAACGAA	2460
GTTGGGTAACGGCGCCCTGTCTGCGGTTCACTGACCTGCAGTCTGATCAAAGAGTGA	2520
GCTCATCGAAGCGGATGCTGGAAGGAGATCTGATACTTTAACGTTTTCTCCCCCTCC	2580
C TTTTCTGCag <u>TTGAGCC</u>	2659

Exon II →

Fig. 3. Continued

common carp	43	CCGGGTGTGTGACGCTGGA	CCAAT	CAGAGCG	73
grass carp	23	CCGGGTGTGTGACGCTGGA	CCAAT	CAGAGGG	53
medaka	92	CCCCAGTGAGTGACGCTGGA	CCAAT	CACATGC	123
black carp	23	CCGGGTGTGTGACGCTGGA	CCAAT	CAGAGGG	53
Nile tilapia		GTGAGTGACGCCGGA	CCAAT	CAGGAGG	27
stinging catfish	82	CCCCAGTGAGTGACGCTGGA	CCAAT	CACA-GC	112
pufferfish	10	CCCTGGTGCATGACGCTGGA	CCAAT	CAGAAGG	41
common carp	74	CAGAGCTCCGAAAGTTTA	CCTTTTATGG	CTAG	105
grass carp	54	CAGAGCTCCGAAAGTTTA	CCTTTTATGG	CTAG	85
medaka	124	CGCGATTCCGAAAGTTTA	CCTTTTATGG	AAAG	155
black carp	54	CAGAGCTCCGAAAGTTTA	CCTTTTATGG	CTAG	85
Nile tilapia	28	CGCAATCCGAAAGTTTA	CCTTTTATGG	CTAG	59
stinging catfish	113	CGCGATTCCGAAAGTTTA	CCTTTTATGG	AAAG	144
pufferfish	42	CACGATTCCGAAAGTTTA	CCTTTTATGG	CTCG	73
common carp	106	AGCC-GG-CATCTGCCGTCA-	TATAAA	AGAG	133
grass carp	86	AGCC-GG-CATATGCCGTCA-	TATAAA	AGAG	113
medaka	156	AGCC-GGGCAACGGACGGAC-	TATAAA	TACCA	185
black carp	86	AGCC-GGGCATATGCCGTCA-	TATAAA	AGAG	114
Nile tilapia	60	AGCC-AGGCAACCGACTGAG-	TATAAA	AATCA	89
stinging catfish	145	GGCC-GGGCAACGGACGGAC-	TATAAA	TACCA	174
pufferfish	74	AGCCCGGGCAGCTGACCTAGT	TATAAA	AGACA	105



Fig. 2. Alignment of the conserved region sequences of pufferfish (*Takifugu rubripes*) β -actin promoter with other known β -actin promoters. The sequence of pufferfish β -actin promoter is compared with the sequences of common carp (accession number of M24113), grass carp (M25013), medaka (S74868), black carp (M25013), Nile tilapia (A116536), stinging catfish (AY531754). The three boxes indicate a known conserved region in CAAT box (CCAAT), CAR_G box (CC(A/T)₆GG), TATA box (TATAA).

2. 배양 세포주를 이용한 자주복의 β -actin promoter 영역의 발현양상

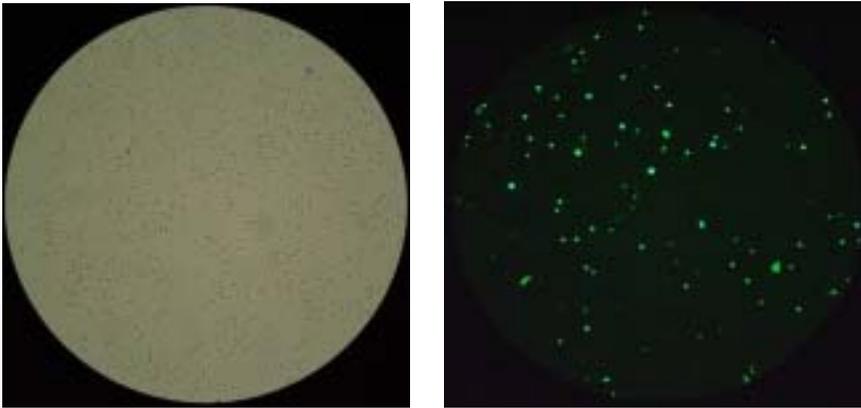
자주복 β -actin 유전자의 promoter 영역과 reporter 유전자인 EGFP 유전자를 연결하여 발현벡터인 pFAP (Fugu β -actin promoter)-EGFP를 제작하였다. 제작된 pFAP-EGFP와 CMV (Cytomegalovirus) promoter를 가진 pEGFP-C1의 발현 양상을 세포주를 이용하여 비교 분석하기 위해 mammalian cell line의 한 종류로 african green monkey의 신장 유래인 vero cell line과 연어 배아 세포주인 CHSE-214 cell line에 transfection하여 EGFP의 발현을 확인하였다.

Mammalian cell line 중 하나인 Vero cell line에서 두 벡터의 발현을 관찰하였다(Fig. 3). Fig. 3(A)는 pEGFP-C1을 Lipofectamine과 1:1의 비율로 transfection한 EGFP 발현을 확인한 결과이다. 왼쪽 사진이 광학현미경을 통하여 관찰한 vero cell의 사진이고, 오른쪽이 형광현미경하에서 EGFP 발현을 찍은 사진으로서 CMV promoter로 인한 단백질 발현을 확인하였다. 자주복 β -actin promoter에 의해 EGFP 발현은 형광현미경 상에서 positive control인 pEGFP-C1의 결과에 못지않게 고른 발현양상을 띠었다 (Fig. 3B). 이 결과는 광학 현미경으로 육안관찰을 하였기 때문에 정확한 발현양은 측정할 수 없었다. 그러나 각각의 결과들의 발현은 각 세포들마다 전체적으로 고른 발현패턴을 나타내어 제작한 발현벡터가 작동하고 있음을 간접적으로 확인하였다.

연어 배아 세포주인 CHSE-214 cell line에서 transfection을 하여 세포내의 EGFP 발현양상을 비교하였다(Fig. 4). Fig. 4(A)는 CMV promoter에 의한 EGFP 발현 결과이고, Fig. 4(B)는 자주복의 β -actin promoter에 의한 EGFP의 발현 결과를 보여주는 사진이다. CHSE-214 cell line에서의 두 발현벡터의 transfection은 어류 주화세포의 특성으로 mammalian cell line만큼 많진 않았지만 발현된 세포의 발광정도는 육안으로 관찰했을 때 mammalian cell line에서와 비슷한 발광을 나타내었다.

정리해서 Lipofectamine을 이용한 transfection의 효율은 각 세포주의 종류와 세포들의 상태에 따라 다르게 나타났지만 β -actin promoter에 의해 발현되는 EGFP의 발현 정도는 차이가 없는 것으로 판단되었다.

(A)



(B)

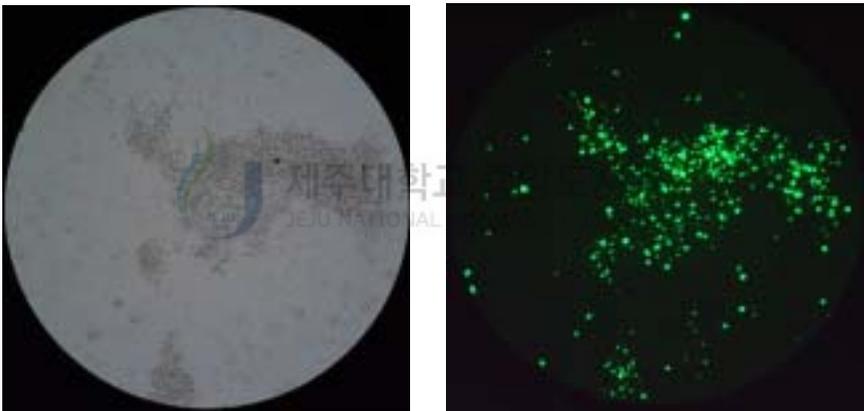
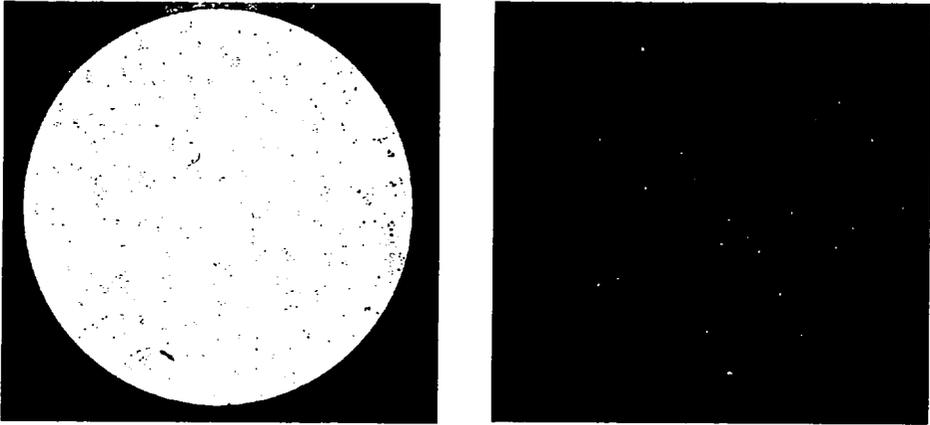


Fig. 3 . Expression of EGFP reporter gene in the mammalian cell line observed by bright field microscopy and fluorescent microscopy.

(A) Transfected pEGFP-C1; (B) Transfected pFAP-EGFP.

(A)



(B)

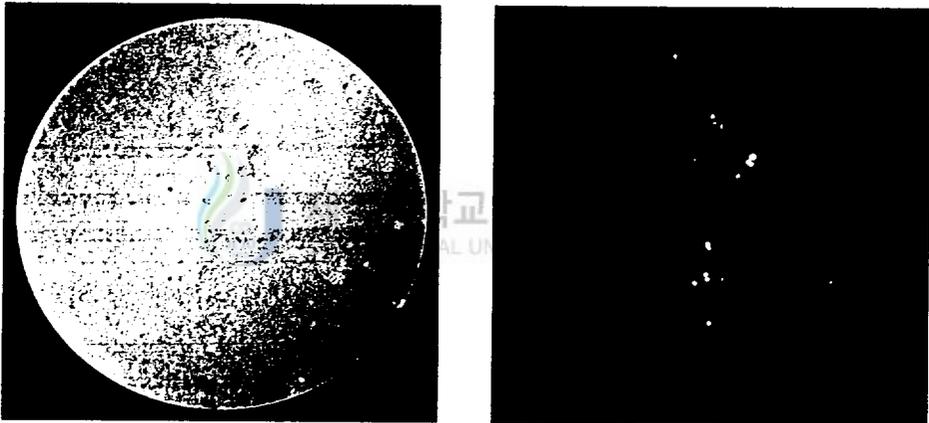


Fig. 4. Expression of EGFP reporter gene in the CHSE-214 cell line observed by bright field microscopy and fluorescent microscopy.

(A) Transfected pEGFP-C1; (B) Transfected pFAP-EGFP.

3. 제브라피쉬 배에서의 자주복의 β -actin promoter 영역의 발현양상

LA-PCR을 통하여 증폭된 자주복의 β -actin gene의 promoter와 형광단백질인 EGFP를 재조합한 pFAP-EGFP, 그리고 CMV promoter와 EGFP를 재조합한 pEGFP-C1 발현백터를 실험모델 어류로 사육되고 있는 zebrafish 수정란에 미세주입시켰다. 주입된 transgene의 발현 유무는 reporter 유전자인 EGFP 발현으로 확인하였으며 발현은 대개 microinjection 12시간 후 처음으로 관찰되었으나 발현이 매우 약하게 나타났으며 그 후 발현량은 점차 증가하는 경향을 나타내었다.

One-cell stage의 수정란에 microinjection 후 48시간 경과 시 pFAP-EGFP와 pEGFP-C1의 EGFP의 발현 양상은 주로 zebrafish 몸체의 근육에서 상대적으로 강한 발현 양상을 보였으며 그 외에도 난황을 덮고 있는 표피세포와 두부 및 눈 주위에서도 형광발현양상을 확인할 수 있었다 (Fig. 6). 이들의 발현패턴은 DNA를 microinjection할 경우 나타나는 전형적인 mosaic expression pattern을 보였다 (Fig. 6, 7). 대부분 어체 전반에 걸쳐서 발현이 관찰되었으며 특히 근육 주변에는 발생이 진행될수록 막대 모양의 발현을 이루었다. 이외에도 심장에서도 EGFP의 발현이 관찰되었는데 심장이 뛰게 되면 형광발현도 같이 깜박이는 현상을 관찰할 수 있었다 (Fig. 7A). 또한 어떤 개체의 경우에는 눈 주위와 아가미 주위에도 발현이 관찰되었으며, 난황과 꼬리부분에서도 역시 mosaic expression pattern을 나타내었다 (Fig. 7). microinjection 후 5일 경과 시 개체에 따른 변이는 있지만 발현 양상이 다소 줄어드는 경향을 보였으며 발현하는 근육조직에서는 더욱 굵고 뚜렷한 발현을 나타내었고 어체의 전체에 걸쳐서 산발적으로 발현을 보였다. 이와 같은 결과를 보면서 기존에 사용되고 있는 CMV promoter에 의한 발현뿐만이 아니라 β -actin promoter에 의한 발현도 어체에 전반적으로 발현된다는 것을 확인하였다.

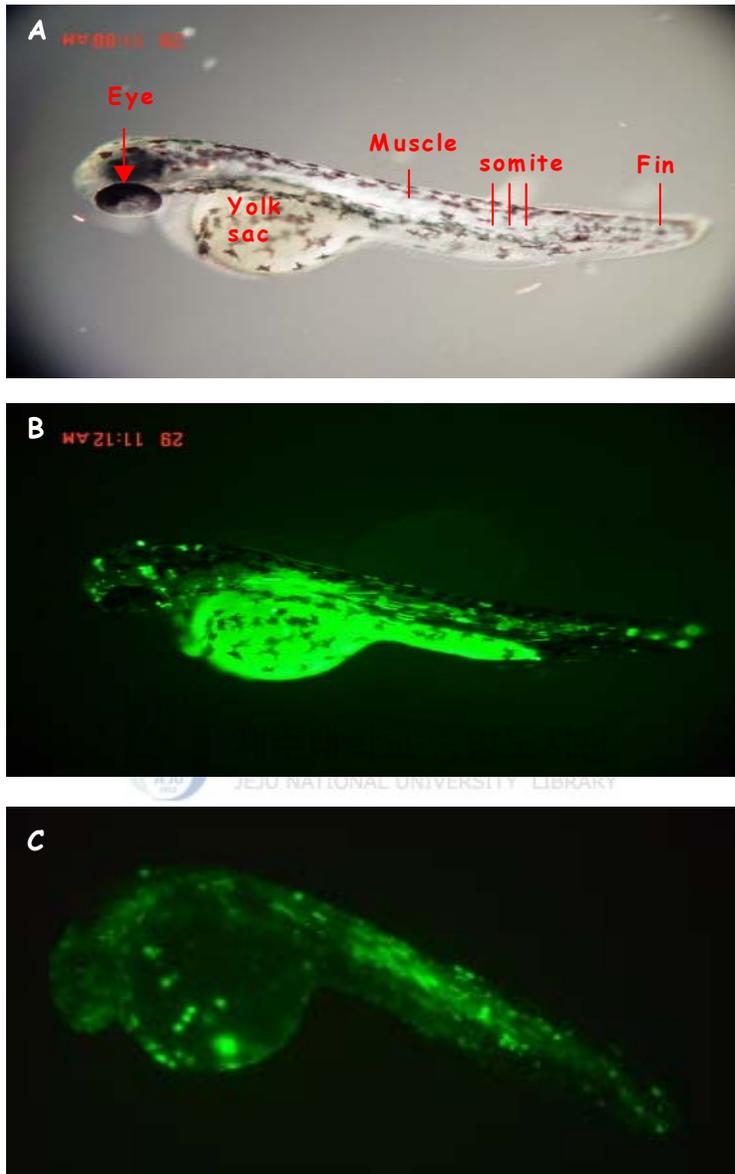


Fig. 5. Expression of EGFP reporter gene of pFAP-EGFP and pEGFP-C1 into zebrafish in the two-day-old transgenic zebrafish.

(A) Non-injected zebrafish observed by bright field microscopy; (B) Injected EGFP-C1 observed by fluorescent microscopy; (C) Injected pFAP-EGFP

observed by fluorescent microscopy.

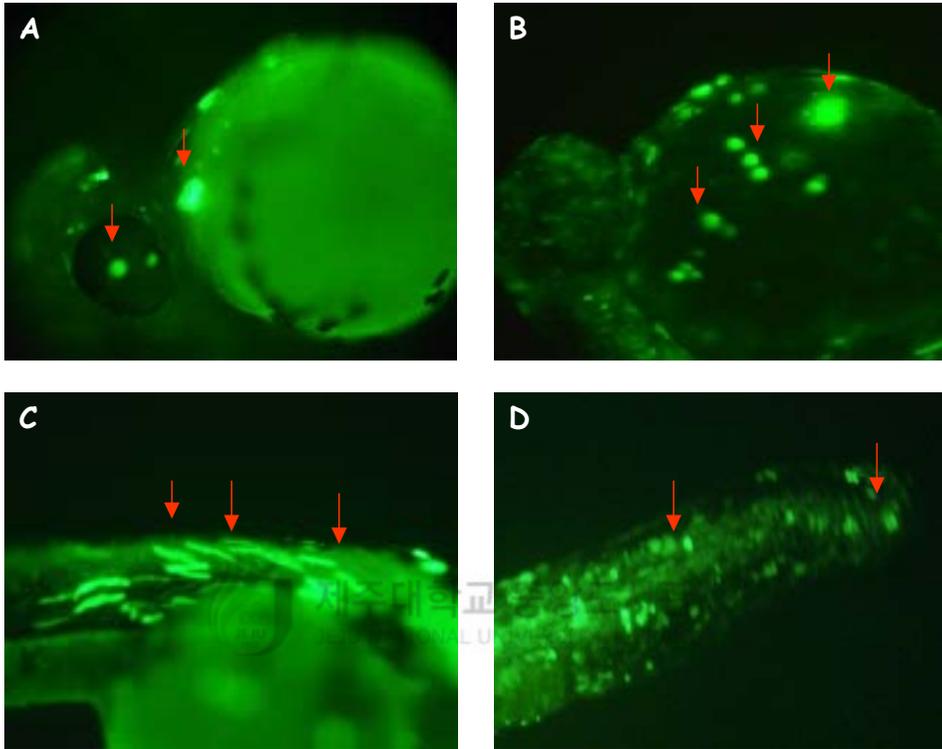


Fig. 6. Expression of EGFP report gene in the 48hr transgenic zebrafish.
Red arrow represented fluorescence expression pattern.
(A) Heart and eye; (B) Yolk sac; (C) Muscle and somite; (D) Tail.

IV. 고 찰

우리나라에서 유전자 조작을 이용한 형질전환 어류에 관한 연구는 대표적으로 담수 어류인 미꾸리리를 대상으로 성공한 예가 보고되고 있다. 그러나 해산어를 대상으로 한 연구는 미미한 실정으로 (Lu *et al.*, 2002) 주로 신속 진단법이나 백신 개발에 대한 연구가 진행되고 있으며 장기적인 어병 대책으로 어류 자체가 가지고 있는 내병성 관련 유전자의 연구도 요구되고 있다. 이에 따른 경제적인 유용성은 물론이고 형질전환 어류의 생체 내에 작용 기작 등을 더 깊게 연구 할 수 있는 계기를 마련하기 때문에 많은 연구진들이 관심을 보이고 있다. 이러한 목표에 도달하기 위해서는 유용 유전자의 스크리닝과 더불어 이들 유전자의 효율적 도입방법의 개발과 함께 유용 유전자의 안정적인고 효율적인 발현을 위한 발현백터의 제작이 필요하다. 이러한 백터를 제조하는데 있어 우리가 원하는 유전자를 효과적으로 발현시킬 수 있는 조절부위의 선택은 무엇보다도 중요하며, 특히 어류 특이적인 발현 백터를 제조함에 있어서는 어류 유래의 조절부위가 적합하다는 연구 결과로 (Maclean *et al.*, 2000) 형질 전환 어류의 조절부위에 관한 연구는 더욱 활발하게 진행되고 있다 (Hwang *et al.*, 2003).

이 연구는 형질전환 어류를 제조하기 위한 시작 단계로서 원하는 유전자의 적절한 발현을 유도하기 위하여 자주복의 모든 조직에서 강력한 발현을 유도함은 물론이고, 종간의 상동성이 높아 다양한 종에서 작용할 수 있다는 장점을 가지고 있는 β -actin gene의 promoter를 증폭하였다. 증폭된 promoter의 유전자의 구조 및 특성을 분석하였으며 β -actin의 조절 부위의 발현 능력을 확인해 봄으로써 어류 특이적 발현 백터 생산의 길을 제시하였다.

클로닝 된 자주복 β -actin 유전자의 조절부위 염기서열은 5' UTR 부분의 exon I 과 exon II를 포함하며 총 2659 bp였으며 자주복의 β -actin gene의 promoter 영역에서 종간에 보존된 염기서열들을 확인하였다. 자주복으로부터 확인된 β -actin promoter서열에서는 CRF/NF 가 결합하며 전사량의 레벨을 조절하는 CAAT box, transcription factor가 결합하는 부위로 RNA polymerase

II가 인식하여 전사 개시를 유도하는 TATA box, E-box가 위치하였다. 또한 전형적인 전사조절 요소의 하나로 심근과 골격근에서 뿐만 아니라 모든 actin 유전자에 존재하며, 특히 α -actin의 경우 근육 특이적 발현에 필수적인 서열로 보고되어진 (Minty and Kedes, 1986; Miwa and Kedes, 1987) CAAT motif (CC(A/T)₆GG)도 확인되었다. 이 서열은 Lui *et al* (1990)에서 강조되었듯이 CAAT box와 TATA box 사이에 존재하며 증폭된 자주복의 서열에서는 exon I 시작서열을 기준으로 한 상위 -29 위치의 TATA box와 -94 위치의 CAAT box 사이인 -64 위치(CCTTTTATGG)에 있었다 (Fig. 1).

현재까지 다양한 종에서 β -actin promoter의 특징에 관한 연구가 이루어졌는데 (Chung and Keller, 1990; Kirchhammer *et al.*, 1996; Mange *et al.*, 1996; Lui *et al.*, 1990b) 자주복의 경우에도 β -actin promoter의 특징이 확인되었다. Promoter 영역은 종간의 위치가 약간씩 다르지만 대부분 transcription start site에서 대략 200 bp안에 존재하고, 전사의 활성화에 관여하여 각 인자들의 서로 다른 결합에 의해 유전자의 발현이 조절되며 대개 TATA box의 upstream에 존재하는 것이 일반적이라 알려져 있다 (Quitschke, 1989). 자주복의 경우, β -actin 유전자의 promoter서열은 약 120 bp정도로 다른 종에 비해 비교적 짧은 promoter를 가지고 있었는데 배양 세포주와 수정란에서 관찰한 EGFP 발현양상이 control 못지않은 것으로 보아 짧지만 전사조절에 꼭 필요한 요소들을 갖추고 있는 것으로 생각된다. 그 외로 전사과정에서 splicing되는 intron I의 시작(GT)과 끝(AG)을 나타내는 intron-exon junction은 보존된 서열로 (Breathnach and Chambon, 1981) 자주복의 exon I과 exon II 사이에서 확인하였다. BLAST 결과는 비번역 exon I과 intron I의 경우 몇몇 담수 양식어종과 유사하나 유전자 서열의 낮은 상동성을 나타내었다. 이는 자주복의 조밀한 염기서열의 구조로 다른 종과의 상동성이 낮은 것이라 추정된다.

위와 같이 분석된 자주복의 β -actin promoter를 이용하여 제작한 pFAP-EGFP를 pEGFP-C1와 함께 배양 세포주와 제브라피쉬의 수정란에 주입함으로써 그 발현 양상을 비교분석하였다. Fig. 3과 Fig. 4의 발현 양상에서와 같이 Mammalian cell line에서만만큼의 효율은 나타내지 않았지만 현미경 상의 발현양

상으로 보아 우리가 제작한 pFAP-EGFP 발현벡터가 pEGFP-C1의 발현과 비슷한 발현을 보임으로서 형질전환어류의 생산에 있어 자주복의 β -actin promoter를 이용한 외래 유전자의 발현에 유용할 것으로 생각된다.

모델 척추동물인 zebrafish의 수정란에 미세주입법을 통하여 *in vivo*상의 promoter 유전자의 발현을 주입한 EGFP 발현으로 확인하였다 (Fig. 5, 6). Microinjection 후 48시간 경과 시 전형적인 mosaic expression pattern을 보였으며 (Fig. 6) Venkatesh (1996)에서처럼 제작된 pFAP-EGFP와 pEGFP-C1 모두 어체 전반적으로 관찰되었으며 근육의 경우 주로 막대모양의 발현을 나타내었다. 도입된 reporter 유전자는 zebrafish의 전 근육에서 강하게 발현됨이 관찰되었고 발현의 범위와 level은 매우 mosaic하고 다양하여 β -actin 유전자의 특징적인 발현 패턴임을 알 수 있었다 (Patwary *et al.*, 1996; Venkatesh *et al.*, 1996). Mosaic 발현양상의 정확한 요인은 밝혀지지 않았으나 DNA injection방법임으로 발현되지 않은 세포의 핵으로부터 방출된 DNA 때문일 것이라고 추측하고 있다 (Volhard and Dahm 2002). 즉, construct가 세포의 핵 내에 들어가야만 효과적인 전사과정이 이루어진다는 의미이다. Zebrafish의 발생시 분할과정에서 똑같이 transgene의 분배가 되지 않는 현상일 것이라 생각되며 이는 injected embryo에서 흔히 볼 수 있는 현상이라고 알려져 있다 (Maclean *et al.*, 1994). 또한 각 세포의 transgene의 복제수가 다르기 때문에 발현의 정도도 달라진다고도 알려져 있는데 (Rohman *et al.*, 2000) 이와 같은 결과는 제브라피쉬, 송사리, 털라피아와 잉어에서도 보고되어있다 (Hwang *et al.*, 2003; Stuart *et al.*, 1990; Tsai *et al.*, 1995).

pFAP-EGFP를 Microinjection 60 시간 후 발현을 조직별로 관찰한 결과는 β -actin promoter로 인하여 거의 모든 몸에서 발현되었다. 특히, 심장에서의 발현은 데이터에는 나타나지 못했지만 발현으로 인한 심장박동 시 형광발현을 확인했는데 이러한 데이터를 통해 수정 직후 one-cell stage에서 인젝션을 하게 된다면 심장을 비롯한 전 조직에서의 발현을 기대할 수 있을 것이라 생각된다.

Microinjection 3일 경과 시 zebrafish에서의 reporter 유전자의 발현을 시간이 지날수록 막대 모양의 형광 단백질의 발현이 크고 굵은 면적으로 발현됨을

확인할 수 있었고 인젝션 후 10일이 지나면 형광발현이 사라지는 경향을 보였다. 하지만 가끔 DNA construct가 매우 강하거나 어류에 따라 약하지만 2주 이상 발현을 하는 개체도 관찰 할 수 있었는데 이는 DNA의 injection인 경우 조직 특이적인 발현패턴이 많이 나타나기 때문이라고 알려져 있다 (Volhard and Dahm, 2002).

따라서 β -actin promoter를 이용한 발현 벡터는 형질전환 어류생산에 관한 연구는 물론 다양한 어류 유전자 연구에서 유용하게 사용할 수 있을 것이라고 생각된다. 또한 positive control로 사용된 CMV promoter를 가진 재조합 벡터와 비교하였을 때 자주복으로부터 제조한 재조합 벡터가 control 못지않은 발현하고 reporter 유전자인 EGFP의 발현은 EGFP의 5' 쪽에 위치하고 있는 자주복의 β -actin promoter의 세기를 간접적으로 시사하고 있기 때문에 우리가 제조한 벡터의 조합이 성공적이었다고 할 수 있다. 미꾸리의 β -actin promoter나 carp의 β -actin promoter 연구에서와 같이 (Noh *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2003) 자주복의 transcription regulatory element를 결손시킨 벡터를 제조하여 각 조절 요소들의 기능에 따른 발현능력을 배양 세포주 또는 어류의 수정란에서 확인하는 기초연구가 필요할 것으로 여겨진다. 그리하여 자주복의 β -actin 유전자의 promoter가 향후 형질 전환 어류 제조를 위한 발현 벡터 제조 시, 도입하고자하는 유용 유전자의 필요한 만큼의 유용한 조절부위로서 그 기능을 수행할 수 있을 것이다. 또한 유용 유전자를 이용한 형질전환 자주복을 생산은 물론 각종 척추동물의 기초 연구에 모델동물로서 이용 가능할 것이라 생각된다.

V. 요약

Transgenic 기술은 담수어종을 중심으로 많은 발전을 이루어왔는데 transgenic fish 제작에서의 성공의 열쇠는 흥미로운 유전자를 선택하는 것은 물론 선택한 유전자를 잘 발현시킬 수 있는 조절요소(regulatory elements)를 찾아내는 것이 중요하다. 많은 연구진들은 바이러스나 포유류에서 유래한 조절인자를 밝혀내어 발현을 성공시켰다. 하지만 어류에서 유래한 조절인자가 더 효과가 뛰어나도록 밝히는 연구들이 발표되었고 transgenic fish 생산연구가 더욱 활발히 진행되어졌다.

이 연구에서는 유전자 연구에도 많이 사용되고 있으며 제주도의 양식 산업에 고부가가치 어종으로 알려진 자주복에서 모든 세포에서 발현을 유도하는 β -actin promoter 영역을 분리하여 염기서열을 분석하였다. 얻어진 β -actin promoter 영역은 EGFP reporter gene과 연결하여 발현 구조를 제작하고 Microinjection과 transfection 방법을 이용함으로써 control과 함께 발현양상을 확인하였다. 그 결과, 총 2659 bp의 염기서열을 얻었으며 TATA box, CAAT box, CArG motif 그리고 E-box 를 확인하였다. 분석된 서열로 발현벡터를 제작하여 실험모델 어류인 zebrafish 수정란, 어류와 포유동물 세포주에서 발현을 관찰한 결과, 세포와 수정란 전체적으로 control 못지않은 reporter gene의 발현으로 제작한 pFAP-EGFP 벡터가 작동됨을 확인하였다. 이 결과들을 바탕으로 자주복 β -actin promoter를 이용한 발현벡터를 다양한 형질전환 어류 연구에 응용할 수 있을 것이라고 여겨진다.

VI. 참고 문헌

- Akinenko, M. A., S. L. Johnson, M. Westerfield and M. Ekker, 1995. Differential induction of four *msx* homeobox genes during fin development and regeneration in zebrafish. *Development.*, Feb, 121(2), 347-57.
- Aparicio, S., J. Chapman, E. Stupka, N. Putnam, J. M. Chia, P. Dehal, A. Christoffels, S. Rash, and A. Smit, 2002. Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science*, 23, 297(5585), 1301-10.
- Breathnach, R., and P. Chambon, 1981. Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 349 -383.
- Brem, G., B. Brenig, G. Horstgen-Schwark and E. L. Winnacker, 1988. Gene transfer in tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Aquaculture*, 68, 209 -219.
- Brenner, S., G. R. Sandford Elgar, A. Macrae, B. Venkatesh and S. paricio, 1993. Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome. *Nature*, 366, 265-268.
- Chung, Y. T. and E. B. Keller, 1990. Positive and negative regulatory elements mediating transcription from the *Drosophila melanogaster* actin 5C digital promoter. *Mol. Cell. Biol.*, 10, 6172-6180.
- Du, S. J., Z. Gong, , C. L. Hew, C. H. Tan and G. L. Fletcher, 1992. Development of an all-fish gene cassette for gene transfer in aquaculture. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1, 290-300.
- Elgar, G., R. Sandford, S. Aparicio, A. Macrae, B. Venkatesh and S. Brenner, 1996. Small is beautiful: comparative genomics with the

- pufferfish(*Fugu rubripes*). Trends. Genet., 12, 145–150.
- Gong, Z., M. J. King, G. L. Fletcher and C. L. Hew, 1995. The antifreeze protein genes of the winter flounder, *Pleuronectes americanus*, are differentially regulated in liver and non-liver tissues. Biochem. Biophys. Res. Commun., 206, 387–392.
- Gunning, p., J. Leavitt, G. Muscat, S. Y. Ng and L. kedes, 1987. A human beta-actin expression vector system directs high-level accumulation of antisense transcripts. Pro. Natl. acad. Sci. USA, 84, 4831–4835.
- Guyomard, R., D. Chourrout, C. Leroux, L. M. Houdebine and F. Pourrain, 1989. Integration and germ line transmission of foreign genes microinjected into fertilized trout eggs. Biochimie., 71, 857–883.
- Hwang, Gyu-Lin, M. Azizzur Rohman and Abdul Razak. Shaharudin, 2003. Isolation and characterization of tilapia β -actin promoter and comparison of activity with carp β -actin promoter. Biochimica., 1625, 11–18.
- Jankowski, J. M. and G. H. Dixon, 1984. Transcription of a trout protamine gene in vitro: the effects of alteration of promoters. J. Biochem. Cell. Biol., 62, 291–300.
- Kelly, G. M. and B. Reversade, 1997. Characterization of a cDNA encoding a novel band 4.1-like protein in zebrafish. Biochem. Cell. Biol., 75, 623 –632.
- Kimmel, C. B., 1989. Genetics and early development of zebrafish. Trends. Genet., 5, 283–288.
- Kirchhamer, C. V., C. H. Yuh and E. H. Davidson, 1996. Modular *cis*-regulatory organization of developmentally expressed genes: two genes transcribed territorially in the sea urchin embryo, and additional examples. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93, 9322–9328.

- Kusakabe, T., 1997. Ascidian actin genes : developmental regulation of gene expression and molecular evolution. *Zool. Sci.*, 14, 707-718.
- Lee, J. S., T. M. Franklin and J. K. Chipman, 2000a. Cloning of the beta-actin gene from the European flounder (*Platichthys flesus*L). *DNA Seq.*, 11, 83-86.
- Lee, J. S., S.-H. Lee and M. C. Gye, 2000b. The β -actin gene of two species of southern top mouth minnow (*Pseudorasbora parva*) and the common fat minnow (*Rhynchocypris oxycephalus*) from the family Cyprinidae. *DNA Seq.*, 11, 301-307.
- Liu, Z., K. Zhu, Roberg, A. J. Faras, K. S. Guise, A. R. Kapuscinski and P. B. Hackett, 1989. The beta-actin gene of carp (*Ctenopharyngodonidella*). *Nucleic. Acids. Res.*, 17, 5850.
- Liu, Z., B. Moav, A. J. Faras, K. S. Guise, A. R. Kapuscinski and P. B. Hackett, 1990a. Functional analysis of elements affecting expression of the β -actin gene of carp. *Mol. Cell. Biol.*, 10, 3432-3440.
- Liu, Z., B. Moav, A. J. Faras, K. S. Guise, A. R. Kapuscinski and P. B. Hackett, 1990b. Development of expression vectors for transgenic fish. *Bio. Technol.*, 8, 1268-1272.
- Liu, Z., B. Moav, A. J. Faras, K. S. Guise, A. R. Kapuscinski and P. B. Hackett, 1991. Importance of the *CATG* box in regulation of β -actin encoding genes. *Gene*, 108, 211-217.
- Lu, Jenn-kan., BO-Hua. Fu, Jen-Leh. Wu, T. Chen and Thomas, 2002. Production of transgenic silver sea bream (*Sparus sarba*) by different gene transfer methods. *Mar. Biotechnol.*, 4, 328-337.
- Maclean, N. and R. J. Laight., 2000. Transgenic fish : an evaluation of benefits and risks. *Fish. Fish.*, 1, 146-172.

- Mange, A., P. Couble and J. C. Prudhomme, 1996. Two alternative promoters drive the expression of the cytoplasmic actin A4 gene of *Bombyx moru*. *Gene.*, 183, 191–199.
- Marta Gomez–Chiarri, Kirby, L. Vicky, Powers and A. Dennis, 1999. Isolation and characterization of an actin promoter from the red abalone (*Haliotis refescens*). *Mar. Biotechnol.*, 1, 269–278.
- McElroy, D., A. D. Blowers, B. Jenes and R. Wu, 1991. Construction of expression of expression vectors based on the rice actin 1(act1) 5' region for use in monocot transformation. *Mol. Gen. Genet.*, 231, 150–160.
- Minty, A. and L. Kedes, 1986. Upstream regions of the human cardiac actin gene that modulate its transcription in muscle cells: presence of an evolutionarily conserved repeated motif. *Mol. cell. biol.*, 6, 2125–2136.
- Miwa, T., L. M. Boxer and L. Kedes, 1987. CARG boxes in the human cardiac alpha–actin gene are core binding sites for positive trans–acting regulatory factors. *Proc. Natl. Acad. USA.*, 84, 6702–6706.
- Moav, B., Z. Liu, Y. Groll and P. B. Hackett, 1992. Selection of promoters for gene transfer into fish. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1, 338–345.
- Muller, F., D. W. Williams, J. Kobolak, L. Gauvry, G. Goldspink, L. Orban and N. Maclean, 1997. Activator effect of coinjected enhancers on the muscle–specific expression of promoters in zebrafish embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 47, 404–412.
- Nam, Y. K., J. K. Noh, Y. S. Cho, H. J. Cho, K. N. Cho, C. G. Kim, and D. S. Kim, 2001a. Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Transgen. Res.*, 10, 353–362.

- Nam, Y. K., J. K. Noh, Y. S. Cho, H. J. Cho, C. G. Kim and D. S. Kim, 2001b. Accelerated growth, gigantism and likely sterility in autotransgenic triploid mud loach *Misgurnus mizolepis*. J. World Aquaculture Soc., 32(3), 53–363.
- Nelson, C., V. R. Albert, H. P. Elsholtz, L. I. W. Lu and M. G. Rosenfeld, 1988. Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor. Science, 239, 1400 –1405.
- Noh, Jae Koo, K.–N. Cho, E. –H. Han and AeRi, Kim, 2003. Genomic Cloning of Mud Loach *Misgurnus mizolepis* (*Cypriniformes Cobitidae*) β –Actin Gene and Usefulness of Its Promoter Region for Fish Transgenesis. Mar. Biotechnol., 5, 244–252.
- Noh, J. K., Cho, K. N., Nam, Y. K., Kim, D. S. and Kim, C. G. 1999. Genomic organization and sequence of the mud loach (*Misgurnus mizolepis*) growth hormone gene: a comparative analysis of teleost growth hormone gene. Mol. Cells., 9, 638–645.
- Olsson, P. E., P. Kling, L. J. Erkell and P. Kille, 1995. Structural and functional analysis of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) metallothionein –A gene. Eur. J. Biochem., 230, 344–349.
- Patwary, M. U., R. M. Ball, C. J. Bird, E. Gjetvaj Sperker, Kenchington & Zouros. 1994. Genetic markers in the sea scallop and their application to aquaculture. Bull. Aquacul. Assoc. Canada., 2, 18–20.
- Penman, D. J., A. Iyengar, A. J. Beeching, A. Rahman, Z. sulaiman, N. Maclean, 1991. Patterns of transgene inheritance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Mol. Reprod. Dev., 30, 201–206.
- Powers, D. A., 1989. Fish as model systems. Science, 246, 352–358.

- Powers, D. A., L. T. Hereford, Cole, T. T. Chen, C. M. Lin, K. Kight, K. Creech and R. Dunham, 1992. Electroporation : a method for transferrin genes into the gametes of zebrafish(*Brachydaniorerio*), channel catfish (*Ictalurus punctatus*), and common carp (*Cyprinus carpio*). Mol. Mar. Biol. Biotechnol., 1, 301–308.
- Quitschke, W. W., Z. Y. Lin, L. DePonti–Zilli and B. M. Paterson, 1989. The β -actin promoter. High levels of transcription depend upon a CCAAT binding factor. J. Biol. Chem., 5, 264(16), 9539–46.
- Rahman, M. A. and N. Maclean, 1992. Production of transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*) by one-cell-stage microinjection. Aquaculture, 105, 219 –232.
- Shears, M. A., G. L. Fletcher, C. L. Hew, S. Gauthier and P. L. Davies, 1991. Transfer, expression, and stable inheritance of antifreeze protein genes in Atlantic salmon (*Salmon salar*). Mol. Mar. Biol. Biotechnol., 1, 58–63.
- Shin, F. Y. T., 1997. Transgenic fish. Rev. Fish Biol. Fisheries, 7, 417 –441.
- Stearley, R. F. and G. R. Smith., 1993. Phylogeny of the Pacific trouts and salmon (*Oncorhynchus*) and genera of the family Salmonidae. Trans. Am. Fish. Soc., 122, 1–33.
- Streisinger G., C. Walker, N. Dower, D. Knauber and F. Singer, 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydani rerio*). Nature., 28, 291(5813), 293–6.
- Stuart, G. W., J. R. Vielkind, J. V. McMurray and M. Westerfield, 1990. Stablelines of transgenic Zebrafish exhibit reproducible patterns of transgenic expression. Development., 109, 577–584.
- 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. Biotechnol.*, 3, 192–199.
- 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. Biotechnol.*, 4, 1–9.
- Venkatesh, B., B. H. Tay, G. Elgar and S. Brenner, 1996. Isolation, characterization and evolution of nine pufferfish (*Fugu rubripes*) actin genes. *J. Mol. Biol.*, 665, 259–655.
- Volckaert, F. A., B. A. Hellemans, P. Galbusera, F. Ollevier, B. Sekkli and A. Belayew, 1994. Replication, expression and fate of foreign DNA during embryonic and larval development of the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3, 57–69.
- Volhard, Nusslein Christiane and Ralf. Dahm, 2002. Zebrafish. Oxford university, pp. 107–141.
- Walters, M. C., S. Fiering, J. Eidemiller, W. Magis, M. Groudine and D. I. Martin, 1995. Enhancers increase the probability but not the level of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92, 7125–7129.
- Zafarullah, M., K. Bonham and L. Gedamu, 1988. Structure of the rainbow trout metallothionein B gene and characterization of its metal-responsive region. *Mol. Cell. Biol.*, 8, 4469–4476.

감사의 글

늘 제 할일을 열심히만 하면 무슨 일이든 잘 풀일 것이다라고 늘 제가 이 길을 선택하는데 자신감을 불어넣어주시고 저를 믿고 이끌어주신 이제희 교수님께 진심으로 감사의 말씀을 드리고 싶습니다. 그에 못지않아 2년간의 학위 과정을 보내면서 많은 가르침을 주셨던 송춘복 교수님, 허문수 교수님, 전유진 교수님 그리고 짧은 시간이었지만 자상하게 저를 이끌어주신 박근태 교수님께 또한 진심으로 감사를 드립니다. 또한 미흡하지만 제 논문을 자상하게 심사해주신 여인규 교수님, 제가 이 길에 들어설 수 있는 계기를 주신 이영돈 교수님께 감사드리고 부족한 저의 논문을 꼼꼼히 읽어주시고 가르침을 주신 사조산업의 강법세 이사님께, 제 논문이 나오기까지 많은 도움을 주신 (주)사조CS산업에도 정말 진심어린 감사를 드립니다.

언제나 따뜻한 충고로 저를 일깨워주신 강도형 선생님, 박경일 선생님, 제 논문 시작부터 끝까지 도움을 주신 송영보 선생님, 이치훈 선생님께 고마움을 전하고 싶습니다. 늘 식구처럼 저를 아껴주신 우리 실험실가족인 마하나마, 프레샤니, 차밀라니, 아노자, 왕닝, 왕창, 이쁜 정아, 은영이, 영주, 영득이, 강록오빠, 상봉오빠에게도 고맙습니다.

그리고 제게 정신적인 지주이고 친오빠, 언니 같은 철홍오빠, 호진오빠, 영미언니, 바쁜 와중에도 어려운 실험은 물론 논문을 봐준 현실언니 너무 고맙고 학위 과정동안 저에게 동기애를 일깨워준 같은 대학원생, 수진오빠, 용욱오빠, 영건오빠, 문휴오빠, 만철오빠, 길남오빠, 상규오빠, 맹진오빠, 태형오빠, 기정이, 민주, 선희, 긴내 더욱 힘내서 열심히 해봅시다. 또한 제가 힘을 얻을 수 있게 언제나 응원해준 우리 지영이, 민정이, 주현이, 소현이, 또한 소리바당 동기들에게, 또 친자매 이상인 짬마언니에게 감사한다는 말 전하고 싶습니다.

항상 한결같은 마음으로 저를 믿어주고 5년 동안 늘 같은 편이 되어준 사랑하는 정호오빠에게 고맙다는 말 꼭 전하고 싶고 마지막으로 저를 믿고 묵묵히 저의 석사 과정을 뒷받침해주시고 몸이 불편하신 와중에도 저의 버팀목이 되어주신 우리 사랑하는 부모님과 동생에게 진심으로 사랑하고 감사드립니다.