



저작자표시-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

교육학 석사학위논문

형질전환 및 일반 제브라피쉬  
(Zebrafish, *Danio rerio*)의  
저온 및 염분 내성 비교



2009년 8월

부경대학교 교육대학원

생물교육전공

박미경

교육학석사학위논문

형질전환 및 일반 제브라피쉬  
(Zebrafish, *Danio rerio*)의  
저온 및 염분 내성 비교

지도교수 최 태 진

이 논문을 교육학석사 학위논문으로 제출 함

2009년 8월

부경대학교 교육대학원

생물교육전공

박 미 경

박미경의 교육학석사 학위논문을 인준함.

2009년 8월 26일



주       심    이학박사   이명숙   인

위       원    이학박사   최태진   인

위       원    이학박사   김군도   인

# 목 차

|                                       |     |
|---------------------------------------|-----|
| 표 목차 .....                            | iii |
| 그림 목차 .....                           | iv  |
| 초        록(Abstract) .....            | 1   |
| I. 서        론 .....                   | 3   |
| II. 재료 및 방법 .....                     | 6   |
| 1. 실험어 선정 및 사육조건 .....                | 6   |
| 가. 제브라피쉬 .....                        | 6   |
| 나. 실험실 사육조건 .....                     | 8   |
| 2. 저온 내성 실험조건 .....                   | 10  |
| 3. 염분 내성 실험조건 .....                   | 12  |
| 가. 조건별 부화율 조사 .....                   | 12  |
| 나. 염분에 대한 96hr-LC <sub>50</sub> ..... | 12  |
| 다. 염분 적응력 .....                       | 13  |
| III. 결        과 .....                 | 14  |
| 1. 저온 내성 실험조건 .....                   | 14  |
| 2. 염분 내성 실험조건 .....                   | 19  |
| 가. 조건별 부화율 .....                      | 19  |
| 나. 염분에 대한 96hr-LC <sub>50</sub> ..... | 21  |

|                   |    |
|-------------------|----|
| 다. 염분 적응력 .....   | 25 |
| IV. 결론 및 고찰 ..... | 27 |
| 1. 저온 내성 .....    | 27 |
| 2. 염분 내성 .....    | 29 |
| 국문 초록 .....       | 31 |
| 감 사 의 글 .....     | 33 |
| 참 고 문 헌 .....     | 34 |



## 표 목 차

|   |    |
|---|----|
| Table 1. Water quality of zebrafish culture tank. ....  | 9  |
| Table 2. Behaviour of transgenic and wild type zebrafish<br>depend on temperature drop. ....              | 17 |
| Table 3. Survival rate of transgenic and wild type zebrafish<br>in accordance with temperature drop. .... | 18 |
| Table 4. Survival rate of transgenic and wild type zebrafish<br>survival at different concentration ....  | 24 |

## 그림 목차

- Fig. 1. External shape of wild type zebrafish (*Danio rerio*, left) and transgenic zebrafish (TK-2, right). ..... 7
- Fig. 2. Culture system for low temperature tolerance experiment. .... 11
- Fig. 3. The process of death of zebrafish due to low temperature. .... 16
- Fig. 4. Hatching rate of wild type and transgenic zebrafish egg at different salinity. .... 20
- Fig. 5. Change of zebrafish's survival rate at each salinity concentration in accordance with exposure day. .... 23
- Fig. 6. Transgenic and wild type zebrafish's survival rate at different salinity concentration. .... 26

Comparison of transgenic and wild zebrafish (*Danio rerio*)  
at low temperature and salinity tolerance.

Mi Gyung Park

*Graduate School of Education*  
*Pukyong National University*

**Abstract**

The temperature and salinity are key factors which are important in the habitat establishment of fish. Wild type zebrafish (*Danio rerio*) has not been reported to be established in Korea. This study was performed to compare the effect of low temperature and salinity on the survival of transgenic and wild type zebrafish in order to find the possibility of transgenic zebrafish settlement in Korea when they are released in nature by accident.

The fish showed slow movement at 15~16°C and stopped food consumption at 9~10°C the initial death of transgenic zebrafish started at 7°C and all of zebrafish died at 5°C. In contrast, wild type zebrafish showed initial death at 6°C and all of them died at 4°C, which indicated that the transgenic fish was more susceptible to cold temperature than wild type zebrafish.

For 96hrs exposure at the salinity of 8, 8.4, 8.8, 9.2, 9.6, 10‰, transgenic zebrafish showed initial death at 9.6‰ after 24hrs exposure while the wild type showed initial death at 10‰ after 24hrs. The 96hr-LC<sub>50</sub> for transgenic zebrafish and wild type zebrafish were 8.65‰ and 9.22‰ respectively. On the comparison

of salinity adaptability of transgenic and wild type zebrafish, transgenic zebrafish died at 6, 6.5, 7‰ after 16 days while wild type zebrafish died only at 7‰ after 18 days. There was no difference in the hatching rate of fertilized eggs for on transgenic and wild type zebrafish in salinity of 0 to 8‰.

In conclusion, transgenic zebrafish was inferior to wild type zebrafish in low temperature and salinity tolerance. Considering that wild type zebrafish has not established in Korea probably due to low temperature, the possible settlement of transgenic zebrafish in Korean natural habitat is very low.



# I. 서론

제브라피쉬는 세대가 짧고 사육 및 번식이 용이해서 의학, 생태, 유전 등 다양한 분야에서 연구의 모델 동물로서 매우 유용하게 사용되어 왔다 (Gong *et al.*, 2003; Hsiao and Tsai, 2003). 최근에는 현대 생명공학기술의 발달과 함께 새로운 유전자를 주입해서 형질 전환된 형광 제브라피쉬가 개발되어 국외에서 유통되고 국내에서도 유통된 적이 있다. Wild type 제브라피쉬(*Danio rerio*)의 경우에는 체측에 뚜렷한 청록색의 가로 줄무늬가 있는 반면, 2008년 1월 1일 “유전자변형생물체의 국가 간 이동 등에 관한 법률(이하 LMO법)”의 발효에 따라 국내에 유통이 금지된 Transgenic 제브라피쉬의 경우에는 체측에 wild type 제브라피쉬와 달리 줄무늬가 없으며, 몸 전체의 채색이 UV 등 하에서는 더욱 밝게 빛을 발하는 오렌지색의 형광빛을 띠고 있어 wild type 제브라피쉬와는 완전히 다르다(Hsiao and Tsai, 2003).

Transgenic 제브라피쉬는 유전자발현을 위해 golden zebrafish  $\alpha$ -actin gene promoter와 sea coral red fluorescent protein이 포함된 construct p- $\alpha$ DsRedITR이 제브라피쉬의 수정 난에 주입되어 만들어졌는데, 이러한 형질전환 어류를 만드는 현재의 형질 전환기술에는 몇 가지 불확실성이 존재한다. 다시 말해, 유전자변형기술(transgenic technique)은 센트럴도그마 즉, 생명현상이 ‘DNA→RNA→Protein’ 라는 과정을 통해 조절된다는 개념을 토대로 하고있다(Quist *et al.*, 2007). 그러나 생명과학이 발달하면서 genome 내 유전자간의 상호작용 및 환경의 영향 등이 있다는 것이 알려졌다

다(Leitch, 2007). 이러한 새로운 사실은 기존 개념이 틀렸다는 것이 아니라 생명현상의 이해를 보완하고, 한편으로 위해성 평가에 있어서 특정 항목에 대한 단순한 접근 보다는 환경과의 상호작용 및 예상하지 못한 결과를 파악하기 위한 다양한 접근이 필요하다는 것을 의미한다.

이러한 측면에서, 형질전환 기술로 탄생되어진 유전자변형 생물체 또한 자연환경이라는 테두리 안에서는 하나의 생물체이며, 생물체라 함은 스스로 자신이 처한 환경에 적응하며 생명활동(번식 및 진화 등)을 영유할 수 있다는 것을 의미한다. 이렇게 한번 환경에 적응하고 확산이 되어 다양한 서식지로 유용형질을 획득한 유전자변형 생물체가 퍼져 나간다면 자연계 내에서 인위적으로 통제하기 어렵게 된다.

현재 국제사회는 이러한 유전자변형 생물체에 대하여 국제조약인 ‘바이오안전성 의정서’를 채택하여 형질 전환된 유전자변형 생물체 즉, LMO에 대하여 국가 간의 이동(수출·입 등)이 발생할 경우 자국 내의 유전자원 및 환경에 대한 위해영향을 사전에 예방하고자 하는 ‘사전에방주의 원칙’에 입각하여 자연 환경에 대한 철저한 위해성 평가를 통해 안전성 확보가 된 LMO 만을 대상으로 수출·입 승인을 하고 있으며, 승인을 받기위한 위해성 평가는 다양한 관점에서 수행되고 있는 실정이다(김형수 등, 2006). 또한, 형광발현 제브라피쉬의 경우 LMO법이 발효되기 이전에는 국내에서도 수입·유통 된 적이 있으나(진케이 사이언스, 광주), 관련법이 발효된 2008년 1월 1일 이후에는 국내 유통 및 생산과 관련하여 직접적으로 단속된 사례는 없다. 그러나 외국에서는 동일 품종에 대해서 자국의 기준에 따른 위해성 평가 및 심사를 거치지 않은 미승인 형광발현 제브라피쉬가 유통되어 국가에서 관련 업체 및 개인에 대한 단속을 수행한 사례가 다 수 있었다(박진일 등, 2007).

제브라피쉬는 일반적으로 인도 북동부 지역, 방글라데시, 네팔의 갠지스

강과 브라마프트라강 유역 등 인도 대륙에 넓게 서식하는 것으로 보고되고 있으며, 특히, 물 흐름이 적고 정적인 상태의 수역과 쌀 재배지의 수로 등에 서식하는 것으로 알려져 있다(Spence *et al.*, 2008; Daniels, 2002).

이러한 일반적인 서식지 측면에서 제브라피쉬가 국내 자연 생태계 내에서 월동을 하지 못할 것으로 추측하고 있으나, 최근 국내 친환경 농법의 일환으로 시행된 논 생태 양식을 위해 수입된 왕우렁이가 겨울철 월동을 통해 우리나라 논 경지 생태환경에 위해요소로 지적되고 있는 실정임을 감안하면 제브라피쉬에 대한 기초 생태연구의 필요성이 충분히 검토되어야 할 것이다(김형수 등, 2006).

따라서, 본 연구는 제브라피쉬를 대상으로 겨울철 우리나라 농수로 및 강변의 온도조건하에서 저온 내성 실험을 통해 국내 자연환경에 노출 되었을 경우 또는, 여름 장마철 등 수량이 많은 시기에 기존 서식지 이외에 기수 혹은 하구연 등으로의 서식지 확대를 통해 야기될 수 있는 생태계 내 상호작용에 대한 영향을 연구하기 위한 기초실험으로써 wild type 제브라피쉬와 transgenic 제브라피쉬를 대상으로 실험실 수준에서의 생태 적응 능력을 평가하고자 수행되었다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험어 선정 및 사육조건

#### 가. 제브라피쉬

Wild type 제브라피쉬는 부산지역 중간 도매상을 통해 대만에서 수입된 개체를 구입한 후, 국립수산물과학원 생명공학연구소 LMO 생태실험실에서 최소 1달 이상 순치한 후 실험에 사용하였다. transgenic 제브라피쉬는 국내에서 2008년 이전 경남지역 관상어 집하장에서 구입하였던 적색형광 발현 제브라피쉬(TK-2)를 실험실에서 유지·사육하며 교배를 통해 얻어진 개체들 중 부모세대와 같은 표현형(적색 형광)을 가지는 개체를 본 실험에 사용하였다(Fig. 1).

실험에 사용된 wild type 및 transgenic 제브라피쉬는 암수 구분 없이 모두  $2 \pm 0.5$  cm 크기의 개체로써, 생식에 가담하지 않은 개체를 사용하였다.



Fig. 1. External shape of wild type zebrafish (*Danio rerio*, left) and transgenic zebrafish (TK-2, right).

## 나. 실험실 사육조건

LMO 생태실험실을 향한 항습기(범양, 냉난방기)를 사용하여 24시간 동일한 조건으로 유지시키며 사육실험에 사용되어지는 친어 수조의 온도를 24℃로 유지하였다. 모든 친어조는 관상어용 스펀지 여과기(브릴란트 트윈 스펀지 여과기, 독일)를 통해 적정 수준의 공기 공급과 함께 수질유지를 하였으며, 실험이 수행되는 동안 실험실의 일주기는 명주기와 암주기를 각각 14hr 및 10hr로 자동조절 되도록 설정하였다.

일반적인 사육 조건하에서의 먹이 공급은 하루 두 번에 걸쳐 오전 10시와 오후 4시에 각각 수조 내 굵이 되는 먹이가 바닥에 떨어지지 않고 제브라피쉬가 충분히 먹을 수 있는 정도의 양을 공급하였다. 수조 청소는 먹이 공급 1시간 후에 사이편을 통해 수행하였으며, 실험에 사용한 제브라피쉬를 사육하는 동안 사육수의 일반적인 수질검사는 다항목 수질측정기 (Multi-Parameter-YSI 600R, 미국)로 분석하였다(Table 1).

Table 1. Water quality of zebrafish culture tank.

|         | Temperature<br>(°C) | Salinity<br>(‰) | Oxygen<br>Saturation(%) | Dissolved<br>Oxygen<br>(mg/ℓ) | pH        |
|---------|---------------------|-----------------|-------------------------|-------------------------------|-----------|
| Mean±SD | 24.20±0.24          | 0.23±0.01       | 83.1±13.1               | 6.93±1.06                     | 7.47±0.16 |
| Minimum | 23.91               | 0.22            | 64.0                    | 5.35                          | 7.30      |
| Maximum | 24.66               | 0.24            | 96.2                    | 7.96                          | 7.68      |

## 2. 저온 내성 실험조건

본 연구에서는 wild type 제브라피쉬와 transgenic 제브라피쉬의 저온 내성에 대한 평가뿐만 아니라 국내 자연환경에서 월동 가능성 평가를 위해서 단시간에 급격한 온도 하락을 통해 제브라피쉬의 온도 내성을 비교하는 방법이 아니라, 하루에 1℃씩 낮추어 먹이를 공급하면서 실험개체가 온도 하락에 적응할 수 있도록 하는 방법을 통해 실험을 수행 하였다.

저온 내성 실험을 위해서 wild type 및 transgenic 제브라피쉬를 LMO 생태실험실 내 항온수조인 제브라피쉬 전문 사육시스템(OKE-2005 L type, 제노믹디자인, 한국)에서 24시간 이상 순치한 후, 온도 내성 실험을 수행하였다(Fig. 2).

사육수의 온도는 최초 사육수온인 24℃에서 20℃까지는 하루에 4℃를 낮추었으며, 20℃부터는 하루에 1℃씩 4℃까지 낮추어 제브라피쉬의 온도 내성에 대한 생태 습성을 관찰하였다.

실험 개체는 system 내 3.5ℓ의 수조에 wild type 제브라피쉬와 transgenic 제브라피쉬를 각각 10마리씩 투입하였으며, 3회 반복하여 실험하였다. 저온으로 인한 폐사 측정기준은 실험어가 자발적인 움직임을 상실하고 외부의 충격에 반응하지 않으며, 균형감각을 잃은 상태인 경우 폐사한 것으로 간주하였다.



Fig. 2. Culture system for low temperature tolerance experiment.

### 3. 염분 내성 실험조건

#### 가. 조건별 부화율 조사

Wild type 및 transgenic 제브라피쉬를 각각 암 : 수 비율을 4 : 8 정도로 단체교배를 통해 얻어진 수정난을 대상으로 염분 농도에 따른 조건별 부화율을 조사하였다.

실험실에 공급되는 수돗물을 브릴란트 트윈 스펀지 여과기가 부착된 40L 용량의 사각수조에서 24hr 동안 공기를 공급 한 후, 실험을 위해 준비해 둔 500ml 비이커에 300ml 공급하였다. 각 실험군의 염분 농도는 99% 정제염(NaCl, Sigma, USA)를 사용하여 각각 수돗물, 2‰, 4‰, 6‰ 및 8‰ 군으로 설정하였으며, 설정된 실험군에는 각각 20개씩의 수정난을 투입한 후, 각각의 부화율을 측정하였다.

#### 나. 염분에 대한 96hr-LC<sub>50</sub>

Wild type 제브라피쉬와 transgenic 제브라피쉬의 염분에 대한 단기적 급성농도 노출에 따른 폐사 경향을 보기 위해서 염분 농도구를 7.0‰, 7.4‰, 7.8‰, 8.2‰, 8.6‰, 9‰로 설정하였다. 또한, 96hr-LC<sub>50</sub>을 보기 위해서 염분에 대한 단기 급성 농도 노출에 따른 폐사 경향의 결과를 바탕으로 염분 농도구를 8.0‰, 8.4‰, 8.8‰, 9.2‰, 9.6‰, 10‰로 설정하였다. 96hr-LC<sub>50</sub> 측정에는 10ℓ 수조에 5ℓ의 실험용액을 채우고 위에서 제시한 염분 농도구에 wild type 제브라피쉬와 transgenic 제브라피쉬를 농도구별

로 각각 10마리씩 총 20마리를 투입하였으며 96hr-LC<sub>50</sub>은 회귀관계식을 통해 산출하였다. 실험에 투입한 모든 개체는 투입 전 24시간 동안 먹이는 공급하지 않았다.

#### 다. 염분 적응력

Wild type 제브라피쉬와 transgenic 제브라피쉬의 염분에 대한 적응력을 비교하기 위해, 10ℓ 수조에 5ℓ의 사육수를 채우고 각 염분 농도구별로 각각 10마리씩 투입하였다. 염분은 3‰에서 시작해서 매일 1‰씩 증가시켜서 5‰, 5.5‰, 6‰, 6.5‰, 7‰로 맞추었으며 먹이는 계속 공급하였다.

먹이는 관상어용 부상사료(테트라민, 독일)를 공급하였으며, 표층에 떠있는 먹이를 실험어가 먹지 못하고 바닥에 떨어지는 시점까지 충분한 양을 하루에 1번 공급하였다. 먹이 공급 1시간 경과 후 사육 수조의 바닥에 남은 먹이 및 배설물은 모두 제거하였다. 사육수는 염분 농도구별로 매일 1ℓ씩 남은 먹이와 분 제거 직 후 각각 수조에 맞는 실험 농도로 보충해 주었다.

### Ⅲ. 결 과

#### 1. 저온 내성 실험

24℃ 적응된 제브라피쉬를 20℃로 온도를 하락시킨 후 매일 1℃ 낮추며 관찰한 결과는 Fig. 3 과 Table 2. 와 같다. 15~16℃에서 먹이를 공급하기 위해 실험자가 접근했을 때 온도변화로 인해 뒤로 물러서는 행동이 관찰되었으며 일부 개체들은 한쪽 구석에 움크리고 머무는 행동을 보이기 시작했다. Wild type 제브라피쉬가 transgenic 제브라피쉬 보다 더 뚜렷한 무리형성 행동을 보였다. 그러나 개체 간에 차이가 있고 계속 움직이고 있어서 정량화할 수는 없었다. 온도가 더 내려감에 따라 움직임이 둔해졌으며 바닥에 가라앉는 개체가 증가했다. 일부 개체는 유영을 하기 위해 꼬리지느러미를 움직이지만, 꼬리지느러미를 움직일 때 잠시 상승한 후 바로 서서히 어류 몸체가 가라앉았고, 이런 움직임이 반복적으로 나타났다.

먹이는 10℃에서는 모든 실험 구에서 다수의 개체가 섭이행동을 보였으나 9℃로 온도가 내려왔을 때에는 wild type 제브라피쉬 실험에서 단 2마리가 약간의 섭이 행동을 보여서 10℃에서 섭이가 가능하나 9℃에서는 섭이가 중단되었다고 할 수 있었다. 온도 하락과 더불어 유영력이 떨어짐에 따라 움직임이 둔해지고 유영력도 떨어져 섭이행동의 효율성도 떨어지는 것으로 보였다. 한편 정상적인 온도에서는 제브라피쉬는 무리를 형성하고 무리와 떨어지지 않는 행동을 보이거나, 온도 하락과 함께 일부 개체를 무리와 떨어져 있는 행동을 보이는 개체가 종종 나타났다. 첫 폐사는 9℃에서

wild type 제브라피쉬 한 마리가 폐사했으나 온도 하락 시 일반적으로 나타나는 움직임이 느려지다가 먹이 섭취가 중단되고 유영력이 떨어져 폐사에 이르게 되는 과정을 보이진 않아서 온도하락이 직접적인 원인이 아닌 것으로 여겨진다. 정상적인 온도 하락에 따른 반응은 보이면서 나타난 폐사는 6°C에서 형질전환 제브라피쉬 집단에서 처음으로 나타났다 (Table 2).

본 실험 결과에서 나타난 일반적인 폐사과정은 Fig. 3 과 같았다. 먼저 움직임이 둔해지고 일부 개체는 정상적인 유영을 하나 바닥으로 가라앉는 모습을 보이는 개체가 있었으며 또한 일부 개체는 바닥에 붙은 채로 계속 머물렀다. 그 후 섭취가 중단되고 무리를 떠나 독단적으로 있는 개체가 증가하였으며, 온도가 더 하락함에 따라 점차 균형을 잃고 호흡만 하는 상태를 유지하다가 결국 폐사하였다.

Wild 제브라피쉬와 transgenic 제브라피쉬에 있어서 폐사과정은 크게 차이가 없었으나 균형 상실 및 폐사에 이르는 온도는 차이가 났다. 6°C에서 wild 제브라피쉬는 일부 개체가 균형을 잃긴 했어도 대부분이 생존한 상황이었지만, transgenic 제브라피쉬 실험 구에서는 과반 수 이상이 폐사함으로 저온 내성 차이를 보였다.

Wild 제브라피쉬와 transgenic 제브라피쉬의 폐사는 7°C에서 처음 나타났으며(Table 3), 형질전환 제브라피쉬가 일반 제브라피쉬에 비해 더 빠른 폐사를 보였다.

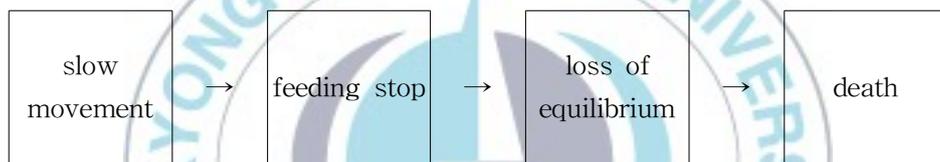


Fig. 3. The process of death of zebrafish due to low temperature.

Table 2. Behaviour of transgenic and wild type zebrafish depend on temperature drop.

| Temperature | Behaviour   |
|-------------|---|
| 15~16℃      | 온도하락으로 사람이 접근이 경계하는 행동이 일어남                               |
| 10~14℃      | 온도하락으로 수영능력이 떨어지고 일부개체는 바닥에 붙어 있음                         |
| 9~10℃       | 섭이가 행동이 중단됨   |
| 7℃          | 형질전환 제브라피쉬에서 균형을 잃은 개체가 나타나고 첫 폐사가 나타남                    |
| 6℃          | 대부분의 형질전환 제브라피쉬가 폐사하였으며, 일반 제브라피쉬도 균형을 잃은 개체 및 폐사 개체가 발견됨 |
| 5℃          | 형질전환 제브라피쉬 모두 폐사  |
| 4℃          | 일반 제브라피쉬 모두 폐사  |

Table 3. Survival rate of transgenic and wild type zebrafish in accordance with temperature drop.

| Temperature<br>(°C) | Wild (%) |       | Transgenic (%) |       |
|---------------------|----------|-------|----------------|-------|
|                     | average  | ±S.D  | average        | ±S.D  |
| 7                   | 100      | 0.00  | 83.33          | 20.82 |
| 6                   | 93.33    | 5.77  | 43.33          | 5.77  |
| 5                   | 73.33    | 15.28 | 0.00           | 0.00  |
| 4                   | 0        | 0.00  | 0              | 0.00  |

## 2. 염분 내성 실험

### 가. 조건별 수정난 부화율

염분 농도별 제브라피쉬의 난 부화율을 알아보기 위해 수돗물(0%), 2%, 4%, 6%, 8%에서 wild type 제브라피쉬와 transgenic 제브라피쉬의 수정난을 받아서 petri dish 에서 부화율을 조사하였으며 그 결과는 Fig. 4 와 같았다.

부화는 4일째부터 시작해서 늦게는 8일 째에 부화하는 개체도 발견되었으며, 부화율은 2%에서 가장 좋았다. 0%과 2%에서는 wild type 제브라피쉬 난의 부화율이 80%로 높았으며, 그 이상의 염분에서는 부화는 가능하나 정상적인 부화가 되지 않았으며 대체로 기형으로 부화하고 체색도 검게 변화하였다. 본 실험 결과에서 2%에서 부화에 더 좋은 효과를 가져왔으며 4%이상에서는 정상적인 부화가 어려운 것으로 나타났다. 두 집단 간의 뚜렷한 차이는 나타나지 않았다.

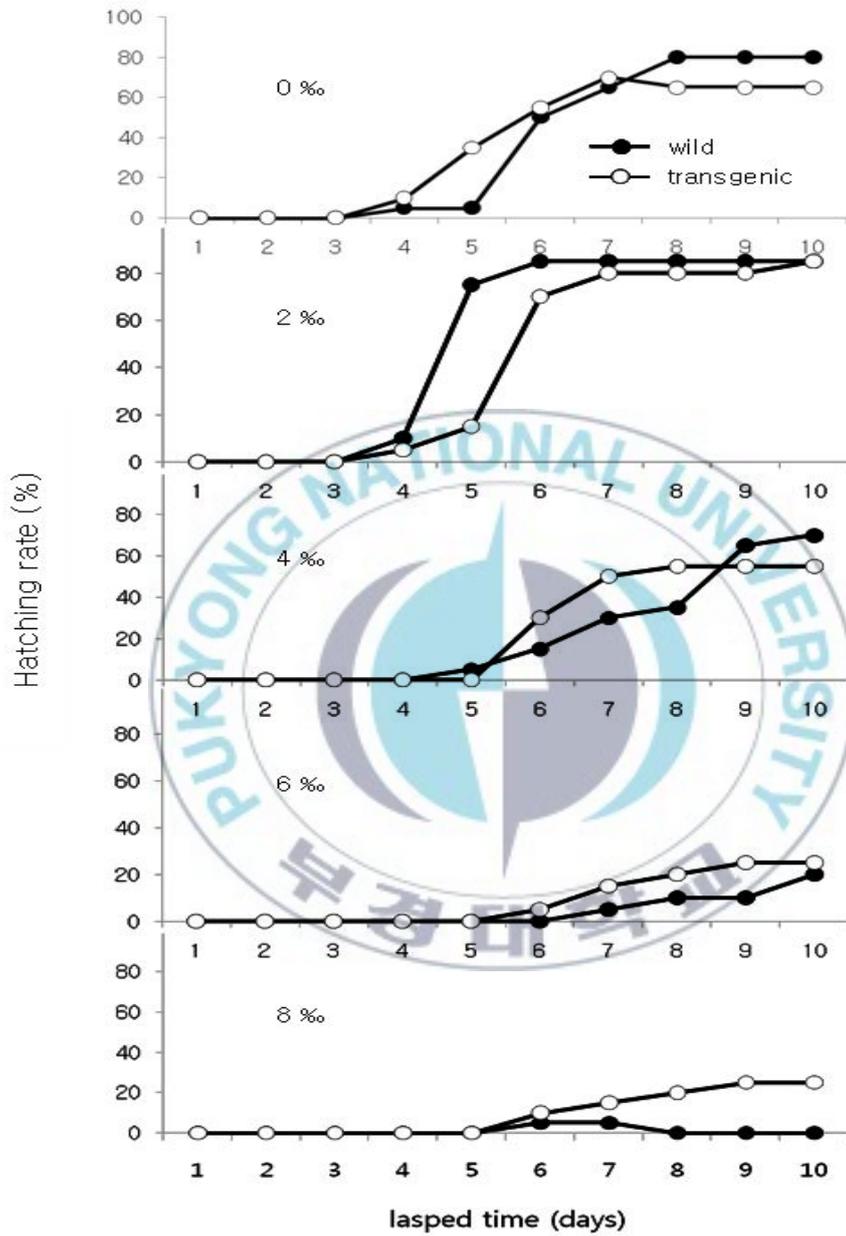


Fig. 4. Hatching rate of wild type and transgenic zebrafish egg at different salinity.

## 나. 염분에 대한 96hr-LC<sub>50</sub>

Wild type 및 transgenic 제브라피쉬와의 염분내성을 비교하기 위해 7%, 7.4%, 7.8%, 8.2%, 8.6%, 9%에서 염분 농도구에 각각 10마리씩 투입하여 노출일수에 따른 생존율 변화를 비교하였다(Fig. 5). Wild type 제브라피쉬는 9% 이하의 염분 농도구에서는 10일간 노출에서 8.2%에서 1마리의 폐사만 나타났을 뿐 다른 농도구에서는 폐사가 전혀 나타나지 않았으며, 9%에서 2일 후부터 9일 째에 20%만이 생존했다. 이에 반해 transgenic 제브라피쉬는 9%에서 첫날부터 폐사가 나타났으며, 다른 염분 농도구에서도 시간이 흘러감에 따라 점차 폐사율이 증가해서 transgenic 제브라피쉬가 wild type 제브라피쉬 보다 염분에 대한 내성이 약한 것으로 나타났다(Fig. 5).

Table 4는 8, 8.4, 8.8, 9.2, 9.6, 10%에서 급성노출에 따른 wild 및 transgenic 제브라피쉬의 96시간 생존율의 변화를 보여준다. Wild type 제브라피쉬는 24시간 노출 시 10%에만 폐사가 일어났으며 48시간째에는 9.6%, 10%에서 각각 70% 및 60%의 생존율을 보였다. 시간이 경과함에 따라 폐사율은 계속 증가하여 72시간째에는 9.2%에서 70%의 생존율을 보였고 96시간째에는 10%에서 모든 개체가 폐사하였고, 8.4%에서는 90% 생존율을 보였다.

반면 transgenic 제브라피쉬에서는 24시간째에 9.6% 및 10% 두 농도구에서 폐사가 일어났으며, 48시간째에 9.2%에서 벌써 생존율이 50%로 감소하였으며 96시간째에는 9.6% 및 10%에서는 모든 개체가 폐사하였고 8%에서도 폐사가 일어나 생존율은 90%를 보였다.

96시간째 폐사율을 기초로 해서 모든 개체가 죽은 농도구 및 모든 개체가 생존한 농도구를 제외하고, 회귀관계식을 얻어 구한 96hr-LC<sub>50</sub>값은 wild type 제브라피쉬와 transgenic 제브라피쉬에서 각각 9.22‰ 및 8.65‰로 나타났다. 결과적으로 wild type 제브라피쉬의 96hr-LC<sub>50</sub>이 transgenic 제브라피쉬보다 높아서 wild type 제브라피쉬가 염분에 대한 내성은 높은 것으로 나타났다.



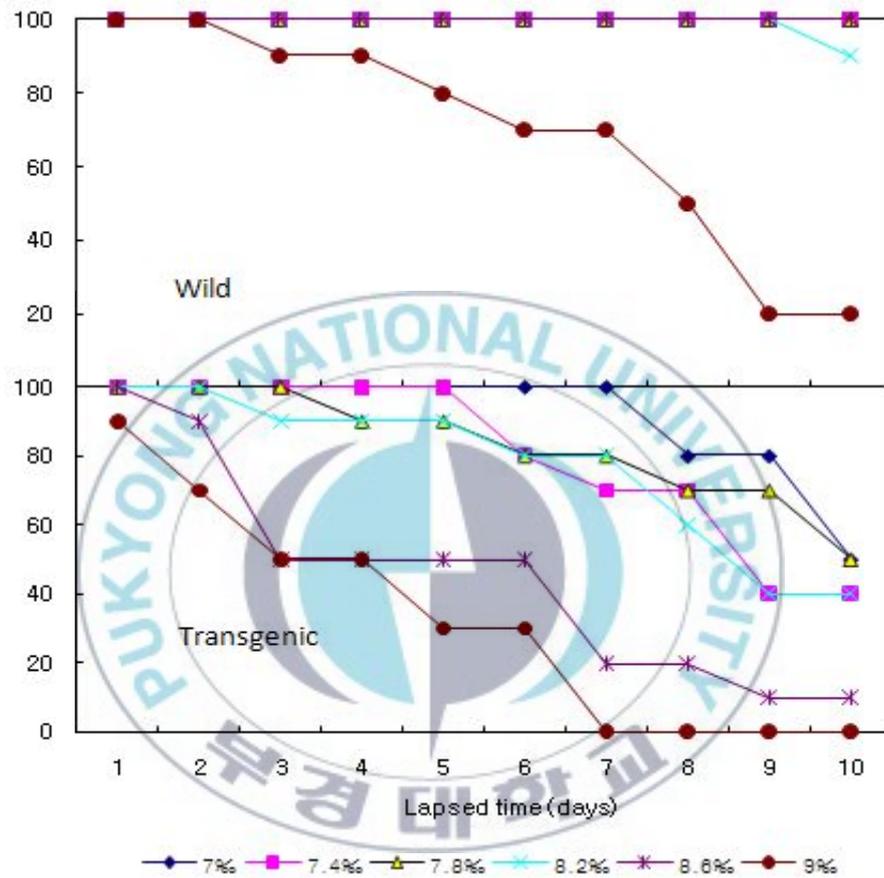


Fig. 5. Change of zebrafish's survival rate at each salinity concentration in accordance with exposure day.

Table 4. Survival rate of transgenic and wild type zebrafish survival at different concentration.

|            | Salinity<br>(‰) | Exposure time (hr) |     |     |     | 96h-LC <sub>50</sub> |
|------------|-----------------|--------------------|-----|-----|-----|----------------------|
|            |                 | 24                 | 48  | 72  | 96  |                      |
| Wild       | 8               | 100                | 100 | 100 | 100 | 9.22‰                |
|            | 8.4             | 100                | 100 | 100 | 90  |                      |
|            | 8.8             | 100                | 100 | 100 | 90  |                      |
|            | 9.2             | 100                | 100 | 70  | 70  |                      |
|            | 9.6             | 100                | 70  | 30  | 20  |                      |
|            | 10              | 90                 | 60  | 10  | 0   |                      |
| Transgenic | 8               | 100                | 100 | 100 | 90  | 8.65‰                |
|            | 8.4             | 100                | 80  | 70  | 40  |                      |
|            | 8.8             | 100                | 100 | 100 | 70  |                      |
|            | 9.2             | 100                | 50  | 40  | 10  |                      |
|            | 9.6             | 90                 | 40  | 20  | 0   |                      |
|            | 10              | 70                 | 20  | 10  | 0   |                      |

#### 다. 염분 적응력

염분에 대한 적응성을 비교하기 위해 NaCl을 공급하여 3‰에서 1‰씩 증가시키고, 5‰부터 0.5‰씩 증가시키면서 유지한 결과는 Fig. 6과 같다. 5, 5.5‰에서는 20일간 사육에서 wild type 제브라피쉬 및 transgenic 제브라피쉬 두 집단에서 모든 개체가 다 생존하여 생존율은 100%를 보였고, wild type 제브라피쉬에서는 6.5‰까지 모든 집단에서 폐사가 나타나지 않아 생존율이 100%였으며 7‰에서 15일째 폐사가 나타나 생존율이 90%였으며 19일째에 또한 생존율은 70%였다. 반면 transgenic 제브라피쉬에서는 6‰에서 16일째 폐사가 나타나 생존율이 90%였으며 실험 종료일까지 추가적인 폐사는 나타나지 않았다. 6.5‰에서는 생존율이 16일째 90%, 17일째 80%, 19일째 70%로 나타났다. 7‰에서는 15일째 90%, 16일째 80%, 17일째 60, 19일째 50, 20일째 40%로 나타났다. Wild type 제브라피쉬는 6.5‰에서는 폐사가 나타나지 않아서 실험 기간 동안 6.5‰까지는 적응이 가능하고 7‰에서 영향을 받는 것으로 나타났으며 반면 transgenic 제브라피쉬는 5.5~6‰에서 생존율이 90%이상이므로 적응이 가능하고 그 이상의 염분 농도에서는 지속적으로 폐사가 일어났다.

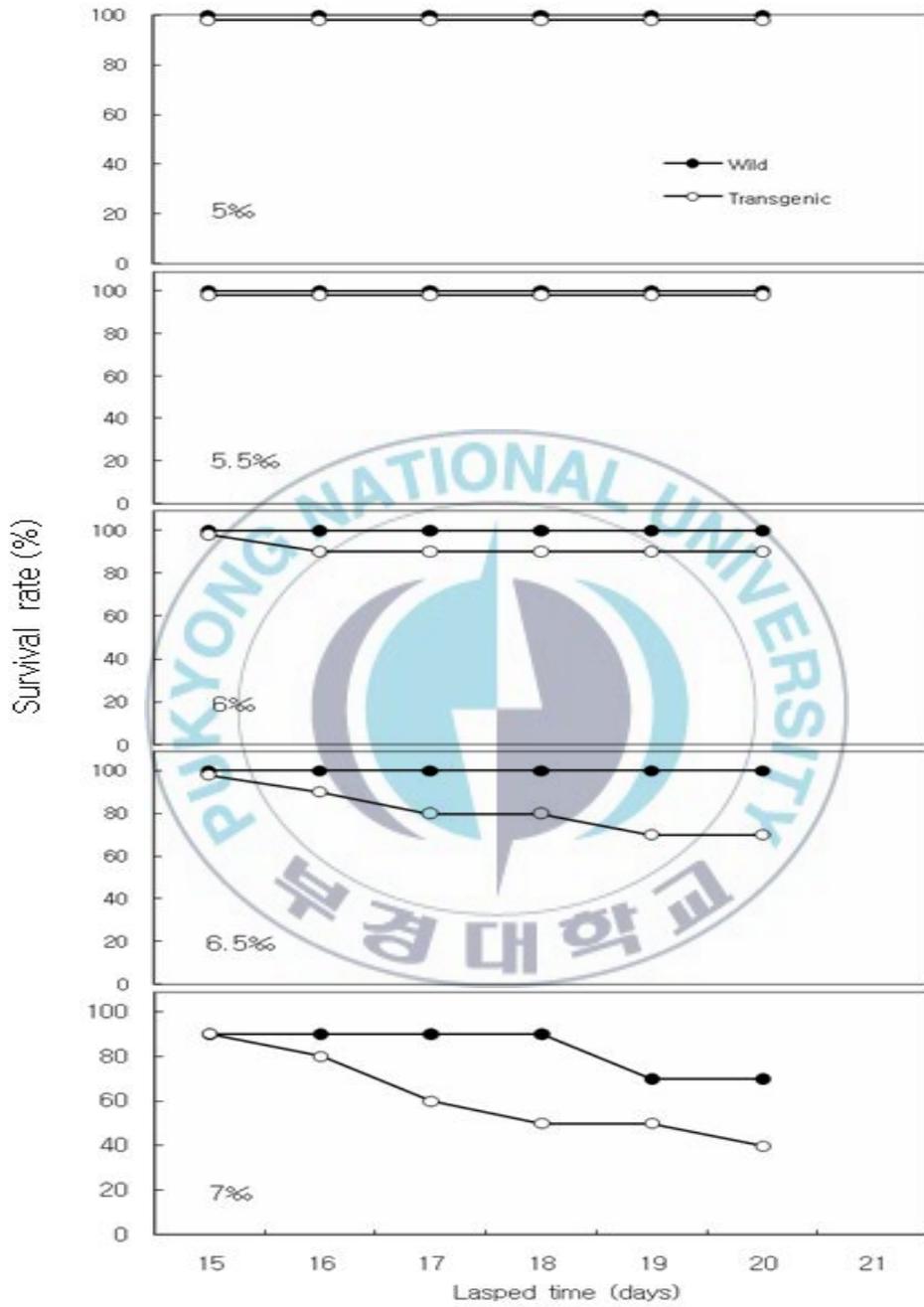


Fig. 6. Transgenic and wild type zebrafish's survival rate at different salinity concentration.

## IV. 결론 및 고찰

### 1. 저온 내성

현재까지 국내 생태계에서 제브라피쉬가 정착하였다는 보고나 채집과정에서 발견되었다는 보고는 없다(박진일 등, 2007). 또한 제브라피쉬는 인도 대륙의 아열대 지역에 서식하므로 겨울철 수온이 내려감에 따라 폐사함으로 정착할 수 없는 것으로 생각된다(김형수 등, 2006). 또한 기존의 분포 지역은 담수 역에서 분포하는 것으로 나타나고 있어서 기수 역이나 해수 역에서는 발견되지 않는다. 그러나 형질전환 형광 제브라피쉬에는 기존에 없던 외래 유전자가 wild type 제브라피쉬의 genome에 이식됨에 따라 다른 유전자의 상호작용 등으로 예상하지 못한 형질을 가지게 될 수 있다.

비록 현재 transgenic 제브라피쉬가 유통이 되지 않지만 2008년 1월 1일 LMO 법이 발효되기 전까지 일반 관상어와 함께 판매되었고, 이전에 판매된 transgenic 형광 관상어가 유통되면서 환경으로 방출되었을 수도 있으므로 비록 국내 생태계에 적응할 가능성이 낮지만 관련 자료가 요구되는 상황이다. 이러한 평가의 첫 출발점은 유전자변형 생물이 기존 생물과 어떻게 달라지는지 파악하는 것이며, 본 실험은 transgenic 제브라피쉬가 저온 내성과 염분 내성에서 wild type 제브라피쉬와 어떻게 다른지 알아보기 위해 수행되었다. 저온 내성은 단지 내성 비교가 아니라 월동 가능성을 평가하기 위함이므로 적응시간을 주기 위해 하루에 1℃씩 하락시키는 방법이 사용되었다.

본 실험에서 wild type 제브라피쉬는 5°C에서 평균 73%의 생존율을 보였으나, transgenic 제브라피쉬는 5°C에서 모두 폐사하였고, wild type 제브라피쉬는 4°C에서 모두 폐사함으로 폐사온도에 있어서 명확한 차이를 보였다. 이를 토대로 판단할 때 transgenic 제브라피쉬는 wild type 제브라피쉬 보다 저온에 대한 내성이 약하고 따라서 wild type 제브라피쉬가 국내 생태계에서 월동을 못할 것으로 고려되는 상황이므로 transgenic 제브라피쉬 또한 월동하지 못할 것으로 여겨진다.

한편, 현재 미국에서 유통되고 있는 유전자변형 형광 제브라피쉬 (Glofish™)에 대한 저온 내성에 대한 연구에서도 비슷한 연구 결과가 보고되었다(Cortemeglia and Beiting, 2006). 20°C와 30°C에서 wild type 제브라피쉬 및 transgenic 제브라피쉬를 각각 적응시킨 후 저온 내성을 비교한 결과에서 wild type 제브라피쉬가 transgenic 제브라피쉬 보다 저온 내성이 강한 것으로 나타났다. 그러나 약 0.3°C의 저온 내성 차이를 보여서 wild type 제브라피쉬 및 transgenic 제브라피쉬가 9개 남서부 주에서는 생존할 가능성이 있다고 언급하고 있다. 특히 제브라피쉬도 남부 지역에 적응할 수 있을 뿐만 아니라 Threadfin shad (*Dorosma petenense*), Mosquito fish (*Gambusia affinis*)처럼 자연 선택에 의해 서식 범위를 확대할 수도 있음을 언급한다. 국내에서 유사한 사례로는 왕 우렁이가 있다. 월동이 불가능할 것으로 여겨졌던 왕 우렁이 (Golden Apple Snail, *Pomacea canaliculata*)가 국내 생태계에 적응, 특히 겨울철 저온에 적응하여 서식 범위를 확대하여 피해를 준 사례가 언론에서 여러 차례 보도된 적이 있다.

저온에 노출되면 나타나는 행동 패턴의 변화는 이미 여러 연구자들에 의해 보고되었으며(Shafland and Pestrak, 1982; Jennings, 1991; Bennett et al., 1997), 그런 행동은 본 실험에서도 나타났다. Cortemeglia(2005)는 10°C까지는 zebrafish가 무리형성을 하고 있는 것으로 보고하였으나 본 실험

결과에서는 15℃ 정도에서 일부 개체는 온도 변화에 한쪽 구석 바닥에 무리를 형성하여 모여 움직임 없이 지속적으로 머무는 현상이 나타났으며, 그 정도는 반복 구마다 약간 달랐다. 이러한 결과는 본 실험의 결과와는 약간의 차이를 보인다. 본 연구에서는 섭이 중지가 9℃에서 나타나 20℃ 적응 집단과 30℃ 적응 집단에서 각각 11℃와 12~13℃로 보고한 결과와는 2℃가 넘는 큰 차이가 있었다. 이러한 차이는 같은 제브라피쉬이지만 개발사가 다르고, 사육 시스템 및 저온 유지 시스템의 차이 등에 환경 및 유전적 차이에 기인하는 것으로 생각된다.

## 2. 염분 내성

제브라피쉬는 인도 북동부 지역, 방글라데시, 네팔의 갠지스강과 브라마프트라강 유역에 주로 서식하며 그 외 여러 지역에서 확인되어 인도 대륙에 넓게 서식하며(Spence *et al.*, 2008), 특히 물 흐름이 적고 정적인 상태의 수역, 쌀 재배지의 수로 등에 서식하는 것으로 알려져 있다(Daniels, 2002). 이러한 서식 특성상 자연 생태계에서는 기수역이나 바다와 같은 염분이 높은 수역에는 노출되지 않는다. 본 실험에서 제브라피쉬의 염분 내성은 96hr-LC<sub>50</sub>이 9.22%이었으며, 또한 염분 농도구를 설정하기 위한 예비 실험에서 96시간 동안에 폐사가 일어나는 농도구와 일어나지 않는 농도구가 매우 좁아서 최저 8%에서 최고 10%로 2% 범위 내에서 농도구가 설정되었다. 이런 좁은 농도구는 제브라피쉬가 오랜 적응과정에서 서식환경이 일정한 염분범위를 벗어나지 않았기 때문으로 여겨진다. 이것은 4% 이상의 염분에서 정상적인 부화가 이루어지지 않는 결과와 일치하며, 또한

Sawant *et al.*(2001)의 보고에서도 난 부화가 4‰에서는 정상적으로 일어나지 않음을 보고하고 있다.

담수어종인 Flathead catfish (*Pylodictis olivaris*)의 96hr-LC<sub>50</sub>은 10.0‰로 보고되어 있으며 (Bringolf *et al.*, 2005), Northern pike의 경우 72hr-LC<sub>50</sub>이 10℃와 18℃에서 각각 11.2‰와 12.2‰으로 보고되고 있으며 (Jacobsen *et al.*, 2007), 본 연구에서는 96hr-LC<sub>50</sub>값이 wild type 제브라피쉬가 9.22‰, transgenic 제브라피쉬가 8.65‰로 나타나 다른 담수 어종에 비해 염분내성이 약한 것으로 보인다.

제브라피쉬가 염분 내성이 높아지거나 날씨가 추워지면 적절한 염분 및 따뜻한 수역을 찾아 또는 먹이를 찾아 이동할 가능성이 있고, 이로 인해 새로운 서식지 확대에 이어질 수 있지만 wild type 제브라피쉬가 기수지역으로 서식지가 확대되었다는 보고가 없으며, 염분 내성에 대한 비교에서 transgenic 제브라피쉬의 염분 내성이 약한 것으로 나타남으로 transgenic 제브라피쉬의 기수역 등으로 서식지를 확대할 가능성은 없는 것으로 보인다.

## 국문 초록

온도 및 염분은 어류의 서식지 정착에서 중요한 요소이다. 일반 제브라피쉬가 한국에서 서식한다는 보고는 없었다. 본 연구는 한국에서 형질전환 제브라피쉬가 우연히 자연에 방출되어 정착을 하였을 때 일어날 수 있는 가능성을 형질전환과 일반 제브라피쉬에 대한 저온 및 염분이 생존에 미치는 영향을 비교하기 위해 수행하였다.

제브라피쉬는 15~16℃에 느린 움직임을 보여주었고 9~10℃에서는 먹이 섭이가 중단되었고 형질전환 제브라피쉬는 7℃에서 첫 폐사가 시작되어 5℃에서 모든 개체가 폐사하였다. 대조적으로, 일반 제브라피쉬는 6℃에서 첫 폐사가 시작되어 4℃에서 모든 개체가 폐사하였는데 이는 형질전환 제브라피쉬가 일반 제브라피쉬보다 낮은 온도에 더 민감하다는 것을 보여준다.

8, 8.4, 8.8, 9.2, 9.6, 10%의 염분에 대한 96시간 노출에서는 형질전환 제브라피쉬는 9.6%에서 24시간 노출 후 첫 폐사가 나타났고, 일반 제브라피쉬는 10%에서 24시간 노출에서 첫 폐사가 나타났다. 염분노출에 따른 96시간 반수치사농도는 형질전환 제브라피쉬와 일반 제브라피쉬에서 각각 8.65%와 9.22%로 나타났다. 형질전환 및 일반 제브라피쉬의 염분적응성을 비교하기 위한 실험에서 형질전환 제브라피쉬는 6, 6.5, 7%에서 16일 이후 폐사가 나타난 반면, 일반 제브라피쉬는 18일째 7%에서 폐사가 나타났다. 0%에서 8%까지 염분 노출에 따른 형질전환 및 일반 제브라피쉬의 수정난에 대한 부화율을 측정된 결과에서는 큰 차이를 보이지 않았다.

결론적으로, 형질전환 제브라피쉬는 일반 제브라피쉬에 비해 저온 및 염분에 대한 내성이 약했다. 일반 제브라피쉬가 저온으로 인해 한국에서 정

착하지 못했다는 점을 고려할 때, 한국 자연 생태계 내에서 형질전환 제브라피쉬의 정착의 가능성 또한 낮다.



## 감사의 글

2년 반이란 이란 대학원 생활을 통하여, 일생을 보냄에 있어 피가 되고 살이 되는 좋은 경험을 많이 하였고, 많은 분들의 따뜻한 관심과 애정 어린 질책 속에 또 다시 한층 성숙해질 수 있었습니다. 이 논문이 완성되기까지 저를 도와주시고 지도해 주신 분들께 적은 지면을 빌려 감사의 마음을 전하고자 합니다.

우선 학부를 마치고 곧장 대학원에 들어와 아무것도 몰랐던 저에게 많은 가르침과 애정을 베풀어 주신 존경하는 최태진 교수님께 진심을 다해 감사의 말씀을 드립니다. 또한, 많이 부족한 저의 논문을 심사해주신 김군도 교수님, 이명숙 교수님께 감사드리며, 김영태 교수님, 이원재 교수님, 김진상 교수님, 이훈구 교수님, 송영환 교수님께 깊은 감사의 말을 드리고 싶습니다.

이 논문을 완성할 수 있게끔 물심양면 도와주신 국립수산과학원 생명공학과에 계신 김경길 과장님, 이상준 연구관님, 지영주 연구관님, 한현섭 연구관님, 김봉석 연구관님께 감사드리며, 매사에 많은 조언과 가르침을 주셨던 박진일 연구사님, 임재현 연구사님, 김형수 연구사님, 김호경 선생님께 감사드립니다. 또한 실험실의 모든 일을 함께 했던 임수연, 김혜민 선생님께 감사드리며, 그 외 2년을 함께 했던 이상숙, 김이경, 박인숙 선생님을 비롯하여 많은 선생님들이 있어 힘들 때나 기쁠 때나 즐겁게 생활할 수 있었습니다.

연구소 생활로 실험실 생활에 다소 소홀함이 있음에도 많은 조언과 도움을 준 경용선배, 상은이 언니, 은정이 언니를 비롯하여 많은 학부 후배들께도 감사의 말씀을 전하며, 항상 곁에서 많은 힘이 되어준 큰 은영, 작은 은영이 언니를 비롯하여 수정, 재유, 호진이 오빠, 지영, 진란, 송이 언니에게도 감사합니다.

졸업을 몇 달 앞두고 가장 힘들 때 옆에서 많은 힘이 되어 준 사랑하는 내 반쪽 자백 왕자님과 나의 오랜 친구들 헤림, 영이, 수진, 달샘, 68계모임 친구들, 그 밖에 언급하지 못한 많은 친구들과 기쁨을 함께 하고 싶습니다.

끝으로, 무한한 사랑과 한없는 희생으로 저를 보살피 주신 사랑하는 엄마, 아빠, 내 동생 정희, 제가 무사히 공부를 마칠 수 있도록 많은 도움을 주신 존경하는 할아버지, 할머니를 비롯한 우리 세 이모들께 사랑하고 감사드린다는 말씀과 함께 이 논문을 바칩니다.

## 참 고 문 헌

- 김형수, 박진일, 백혜자(2006). 유전자변형 형광제브라피쉬의 생태계 위해성평가에 관한 연구. 해양정책연구. vol 2. 1-30.
- 박진일, 임재현, 김형수, 최태진, 이상준, 지영주, 안혜숙, 김우진, 남보혜, 공희정, 김미령(2008). 2007년 유전자변형 수산생물 바이오안전성정보집. 국립수산과학원 생명공학연구소.
- Bennett, W.A., R.J. Currie, P.F. Wagner, and T.L. Beitinger (1997). Cold tolerance and potential overwintering of the red-bellied piranha *Pygocentrus nattereri* in the United States. Transactions of the American Fisheries Society, 126, 841-849.
- Bringolf, R.B., Kwak T.J., Cope W.G. and Larimore M.S. 2005. Salinity tolerance of Flathead catfish: implications for dispersal of introduced populations. Transactions of the American Fisheries Society 134, 927-936.
- Cortemeglia, C. and T.L. Beitinger. 2006, Projected US distributions of transgenic and wild typetype zebra danios, *Danio rerio*, based on temperature tolerance data. Journal of Thermal Biology, 31, 422-428.
- Daniels, R. J. R. 2002. Freshwater fishes of peninsula India. Universities Press, Hyderabad.

Engeszer, R.E., Patterson, L.B. Rao, A.A. and D.M. Parichy. 2007. Zebrafish in the wild type: a review of natural history and new notes form the field. *Zebrafish*, 4, 21-40.

Gong Z., Wan H., Tay T.L., Wang H., Chen M. and Yan T. 2003. Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 308, 58-63.

Hsiao C.D. and Tsai H.J. 2003. Transgenic zebrafish with fluorescent germ cell: a useful tool to visualize germ cell proliferation and juvenile hermaphroditism in vivo. *Developmental Biology*, 262, 313~323.

Jennings, D.P. 1991. Behavioral aspects of cold tolerance in blackchin tilapia, *Sarotherondon melanotheron*, at different salinities. *Environmental Biology of Fishes*, 31, 185-195.

Leitch, AR 2007. The dynamic interplay between genomic DNA and the outside world. *Heredity*, 98: 61-62.

McClure, M.M., McIntyre, R.B., and A.R. McCune. 2006. Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish, *Danio rerio*. *Jorunal of Fish Biology*, 69, 553-570.

Quist, D., Nielsen, K.M., and T. Traavik. 2008. The complex and interactive pathway from (trans) genes to proteins. Tromsø & Tapir Academic Press.

Shafland, P.L., and J.M. Pestrak. 1982. Lower lethal temperatures for fourteen non-native fishes in Florida. *Environmental Biology of Fishers*, 7, 149-156.

Spence, R., Fatema, M.K. Reighard, M., Huq., K.A., Wahab, M.A. Ahmed Z.F. and C. Smith. 2006. The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology*, 69, 1435-1448.

Spence R., Gerlach G., Lawrence C., and C. Smith. 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol. Rev.*, 83, 13-34.