



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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](#)

수산화석사 학위논문

시베리아 철갑상어(*Acipenser baerii*) 세포주에서
재조합단백질 발현에 관한 연구



2019년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 물 학 과

최 재 훈

수산학석사 학위논문

시베리아 철갑상어(*Acipenser baerii*) 세포주에서
재조합단백질 발현에 관한 연구

지도교수 공 승 표

이 논문을 수산학석사 학위논문으로 제출함.

2019년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 물 학 과

최 재 훈

최재훈의 수산학석사 학위논문을 인준함.

2019년 2월



위원장 수산학박사 남 윤 권 (인)

위원 이 학 박사 김 중 명 (인)

위원 농 학 박사 공 승 표 (인)

Studies on the expression of recombinant proteins in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) cell lines

Jae Hoon Choi

Department of Fisheries Biology, The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

In spite of many studies about recombinant protein production from variant kinds of organisms, there has been few studies dealing with fish as a host for production of recombinant proteins. Therefore, current status of the researches about recombinant protein production from fish is still primitive suggesting that a fundamental study regarding such a thing should be performed for utilizing fish cells or fish itself as a platform for recombinant protein production. In this regard, here, I evaluated the feasibility of the expression of recombinant proteins in fish cell lines. In order to do that, I tested the effectiveness of lentiviral vector system for gene delivery into the cell lines from Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and tried to establish stable cell lines which express human recombinant proteins. Lentiviral vectors containing *enhanced green fluorescent protein (EGFP)* gene were prepared in host 293LTV cells and treated to 293LTV cells and

A. baerii cell lines for delivering *EGFP* genes within the cells. Lentiviral vector system successfully transferred *EGFP* genes into 293LTV cells indicating that the system established was operated well. However, it did not transfer *EGFP* genes into *A. baerii* cell lines. To evaluate the ability of *A. baerii* cells to express human recombinant proteins, the expression vectors containing human *insulin* or *erythropoietin* (*EPO*) genes driven by CMV promoter were prepared and transfected into *A. baerii* cell lines. After transfection, all cell lines transiently expressed *insulin* or *EPO* mRNA and subsequently, the cell lines that are consistently expressing *insulin* or *EPO* mRNA were established through antibiotic selection and clonal growth. The analyses of *insulin* or *EPO* protein expression in each stable cell lines showed that putative *insulin* or *EPO* proteins were expressed in the established cell lines suggesting the feasibility of recombinant protein expression in fish cell lines. The results from this study will be able to contribute to development of the system that produces useful recombinant proteins in fish cell lines or fish itself.

목 차

영문 요약(Abstract)	i
목차(Contents)	iii
표 목차(List of Table)	vi
그림 목차(List of Figure)	vii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 세포 배양, 동결 및 해동	5
1. 1. 세포 배양	5
1. 2. 계대 배양	5
1. 3. 세포 동결	6
1. 4. 세포 해동	6
2. 렌티바이러스 벡터 생산 및 감염	7
2. 1. 형광 단백질 발현 벡터 제작	7
2. 2. 렌티바이러스 벡터 생산	8
2. 3. 렌티바이러스 농도측정	9
2. 4. 렌티바이러스 감염	9
2. 5. 세포 독성 및 형질도입 효율 평가	10
3. 재조합 유전자 형질도입 및 발현 확인	10

3. 1. 인간 <i>insulin</i> 및 <i>EPO</i> 발현 벡터 제작	10
3. 2. 플라스미드 벡터와 transfection reagent의 복합체 준비	11
3. 3. 인간 <i>insulin</i> 및 <i>EPO</i> 발현 벡터의 형질도입 및 선별	11
3. 4. RT-PCR	12
3. 5. Western blot	12
III. 결과	17
1. 렌티바이러스 벡터 시스템을 이용한 형질도입	17
1. 1. EGFP 발현 벡터의 염기서열 분석 결과	17
1. 2. 렌티바이러스 감염 시 polybrene의 효과	17
1. 3. 렌티바이러스 농도 측정	18
1. 4. 렌티바이러스 벡터 시스템을 이용한 시베리아 철갑상어 (<i>A. baerii</i>) 세포주 내 형질도입 평가	18
2. 인간 <i>insulin</i> 과 <i>EPO</i> 발현 세포주 확립	26
2. 1. <i>Insulin</i> 및 <i>EPO</i> 발현 벡터의 염기서열 분석 결과	26
2. 2. 인간 <i>insulin</i> 및 <i>EPO</i> 의 일시 발현 검증	26
2. 3. 인간 <i>insulin</i> 및 <i>EPO</i> 를 발현하는 stable cell line 확립	26
2. 4. Stable cell lines의 인간 <i>insulin</i> 및 <i>EPO</i> 단백질 발현평가	27
IV. 고찰	39
국문요약	44
부록	46

참고문헌	47
감사의 글	56



표 목차(List of Tables)

Table 1. Primer sequences used in this study 16

Table 2. Cytotoxicity of lentiviral system on Siberian sturgeon head
kidney and heart-derived cells 24



그림 목차(List of Figures)

Figure 1. Information of vectors used in this study	19
Figure 2. A schematic diagram of lentiviral particles production	20
Figure 3. Result of sequence alignment between <i>EGFP</i> CDS in public database and <i>EGFP</i> clone inserted within pLVX-IRES-Neo vector ...	21
Figure 4. Effects of polybrene on transduction efficiency of lentiviral vector in 293LTV cells	22
Figure 5. Measurement of the percentage of <i>EGFP</i> -positive 293LTV cells after treatment of 10 μ L media containing lentiviral particles ...	23
Figure 6. Morphology of Siberian sturgeon (<i>Acipenser baerii</i>) cell lines used in this study.	25
Figure 7. Sequencing results of human <i>insulin</i> inserted within pTRPML1-HA vector	28
Figure 8. Sequencing results of human <i>erythropoietin</i> (<i>EPO</i>) inserted within pTRPML1-HA vector	29
Figure 9. Transient mRNA expression in <i>Acipenser baerii</i> head kidney	

cell lines transfected with human <i>insulin</i> and his-tagged human <i>insulin</i>	30
Figure 10. Transient mRNA expression in <i>Acipenser baerii</i> head kidney cell lines transfected with human <i>erythropoietin</i> (<i>EPO</i>) and his-tagged human <i>EPO</i>	31
Figure 11. mRNA expression in cell clones after transfection of <i>insulin</i> gene and subsequent selection	32
Figure 12. mRNA expression in cell clones after transfection of <i>erythropoietin</i> (<i>EPO</i>) gene and subsequent selection	33
Figure 13. Human <i>insulin</i> and <i>erythropoietin</i> (<i>EPO</i>) protein expression from stable cell lines	34
Figure 14. Cytotoxicity and transfection efficiency of Lipofectamine TM 2000 on Siberian sturgeon (<i>Acipenser baerii</i>) head kidney cell lines ..	35
Figure 15. Cytotoxicity and transfection efficiency of X-tremeGENE TM HP on Siberian sturgeon (<i>Acipenser baerii</i>) head kidney cell lines	36
Figure 16. Cytotoxicity and transfection efficiency of GeneJuice [®] on Siberian sturgeon (<i>Acipenser baerii</i>) head kidney cell lines	37

Figure 17. Comparison between optimal conditions of cytotoxicity and transfection efficiency of three different transfection reagents on Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) head kidney cell lines 38



I. 서 론

재조합단백질이란 세포나 유기체 내에 재조합유전자가 도입이 되어 생산되는 단백질을 말한다. 현재 재조합단백질 생산에 관한 연구는 박테리아(Swartz, 2001), 효모(Cregg et al., 2000), 사상성 진균(Conesa et al., 2001), 단세포 조류(Fuhrmann et al., 1999; Rasala and Mayfield, 2014), 동식물(Rudolph, 1999; Giddings et al., 2000; Daniell, 2001; Harvey et al., 2002) 그리고 동물 세포(Andersen and Krummen, 2002; Wurm, 2004)에 이르기 까지 다양하게 진행되고 있다. 그러나 효모, 사상성 진균, 단세포 조류에서 생산된 단백질은 면역 반응을 일으키거나 단백질 활성이 떨어질 수 있다(Dyck et al., 2003).

Escherichia coli (*E. coli*)는 ‘바이오리액터’로서 유전정보가 많이 해독되어 있고 배양이 쉬우며 비용이 적게 든다는 것이 특징이다. 1985년, *E.coli*에서 생산한 재조합단백질은 *insulin*을 시작으로 1986년, alpha interferon을 FDA로부터 승인을 받았고, 국내는 1993년 식품의약품안전청(KFDA)에서 alpha interferon과 1996년 somatropin이 승인을 받았다. 그러나 *E. coli*에서 생산된 재조합단백질은 ‘당화과정’과 같은 post-translation 과정이 결여되어 있어 기능성 고분자 단백질을 기대하기 어려운 단점이 있다. 또한 단백질 합성에 있어서 *E. coli*은 포유류에 비해 잦은 오류가 생기며 60 kDa 이상의 단백질은 효율적으로 생산하지 못한다는 단점이 있다(Makrides, 1996, Gräslund et al., 2008).

진핵생물인 효모를 바이오리액터로 활용해 재조합단백질을 생산할 수 있다. 효모 역시 대장균처럼 사용한 역사가 길고 비용이 저렴하다는 장점이 있다. 또한 진핵생물이라는 점에서 *E. coli*에서는 기대하기 힘든

post-translation 과정을 어느 정도 기대할 수 있다는 장점이 있다. 그러나 효모에서 진행되는 당화과정은 포유류와 달리 mannose가 주를 이루고 당화의 끝부분이 sialic acid가 아니기 때문에 포유류에 적용을 했을 때, 올바른 활성을 기대하기 힘들다는 단점이 있다(Hamilton et al., 2006).

유전자 조작 식물을 이용한 플랫폼은 농업 기술을 기반으로 생산량을 쉽게 산업적 수준으로 높일 수 있다는 장점이 있다. 또한, 유전자 조작 식물은 앞선 플랫폼에 비해 관리비가 적고, 작물 자체를 섭취하면 되기 때문에 복잡한 단백질 정제 과정을 줄일 수 있다는 장점이 있다(Kusnadi et al., 1997). 유전자 조작 식물에서 생산한 단백질은 동물 세포에서 생산한 단백질 구조와도 유사하게 생산할 수 있다. 그러나 노지에서 유전자 조작 식물을 기를 시, 꽃가루와 같은 것들을 조절하기가 힘들고 이를 조절하기 위해서 온실에서 기르게 되면 그 만큼 비용이 증가하게 된다는 단점이 있다. 또한 당화과정에 있어서 당화 끝 부분이 sialic acid가 아닐 뿐만 아니라 xylose를 포함하고 있어 사람에게 적용하기에 부적합한 면이 있다. 이러한 면은 현재 당화과정에 관련된 유전자를 조작하여 포유류 세포와 유사하게 만드는 연구가 진행 중이다(Gomord et al., 2005).

형질 전환 동물을 바이오리액터로 사용하게 되면, 복잡한 구조의 재조합단백질도 비교적 저렴하게 많은 양을 생산할 수 있다. 그러나 동물로부터 재조합단백질을 추출하기가 까다롭고 병원체 감염에 대한 형질 전환 동물 관리가 추가적으로 필요하다. 또한 발현시킨 재조합단백질이 형질 전환 동물의 건강에 악영향을 미칠 수 있다(Houdebine, 2007).

세포 배양을 통한 재조합단백질 생산 방식은 실험실 규모에서 생산이 가능하고 재조합단백질의 수확이 쉬우며 다른 생산 방식보다 단기간에 재조합단백질을 얻을 수 있는 장점이 있다(Houdebine, 2009). 동물 세포

배양을 통한 재조합단백질 생산에는 주로 곤충 세포와 포유류 세포가 사용되고 있다. 곤충 세포는 포유류 세포에 비해서 배양하기 쉽고 삼투압에 강하다는 특징이 있다. 곤충 세포에 재조합유전자를 도입할 때는 주로 baculovirus를 이용하는데, 이를 통해서 곤충 세포에 재조합단백질의 발현을 높일 수 있다는 장점이 있다. 또한 인간의 'N-glycan 가공 유전자'를 발현하는 곤충 세포주가 개발 되면서, 인간과 유사한 당화과정 패턴을 가진 단백질을 생산할 수 있게 되었다(van Oers et al., 2015). 그러나 baculovirus는 유전체 내에 단백질 분해 효소를 암호화하고 있기 때문에 재조합단백질 발현을 저해시킬 수 있다(Ikonomou et al., 2003). 포유류 세포에서 재조합단백질 생산은 주로 Chinese hamster ovary cell과 human embryonic kidney cell이 대표적으로 사용된다. 이 세포주들은 고 밀도로 자랄 수 있고 외래 유전자의 도입이 쉽다는 장점이 있다. 또한 세포 배양 배지에 필수적인 성분인 소의 혈청 성분이 들어가지 않은 배지에서도 자랄 수 있어 프리온 감염의 위험성을 줄일 수 있다(Hacker and Balasubramanian, 2016). 그러나 세포 배양을 통해 재조합단백질을 얻는 방식은 생산량을 산업적 수준으로 늘리기 위해서는 비용이 많이 요구 된다(Andersen and Krummen, 2002).

어류 세포는 1962년 rainbow trout (*Salmo gairdneri*)의 생식소 유래 세포주 최초 확립(Wolf and Quimby, 1962)을 시작으로 나일 틸라피아 (Santos Nassif Lacerda et al., 2013), 메기(Noga and Hartmann, 1981), 잉어(Dash et al., 2010) 철갑상어(Kim et al., 2014), 넙치(Meguro et al., 1991), zebrafish (Ho et al., 2014), 일본산 송사리(Hong et al., 1996) 등 2011년 기준 283개의 세포주들이 다양한 어종에서 확립이 되었으나 (Lakra et al., 2011), 어류 세포를 이용한 재조합단백질 생산에 관한 연구는 미비한 상태이다. 현재까지 연구는 어류가 바이오리액터로서 적합한

모델인지 확인하기 위해서 재조합유전자를 발생배아에 미세주입하고 단백질 발현을 확인하는 수준에서 머무르고 있다(Gyulin et al., 2004). 하지만 이는 많은 양의 살아있는 개체를 희생하는 방법이므로 윤리적인 문제를 일으킬 수 있다. 형질전환 어류를 사용하는 방법도 하나의 대안이 될 수 있다. 어류는 번식력이 높고 포유류에 비해 관리비가 적게 들며 발생배아가 체외에서 이루어지기 때문에 외래유전자의 도입이 비교적 쉽다는 장점이 있어 재조합단백질 생산을 위한 ‘바이오리액터’로서 적합한 모델을 기대할 수 있다. 그러나 형질전환 어류를 이용한 재조합단백질 생산에 관한 연구는 아직 미비한 상태이므로 선행연구로서 확립된 어류 세포주로부터 재조합단백질 발현 연구가 필요하다.

따라서 본 연구는 재조합단백질 발현 및 생산을 위한 세포로서 어류 세포의 활용 가능성을 평가하기 위한 연구의 일환으로, 시베리아 철갑상어(*Acipenser baerii*) 유래 세포주에 렌티바이러스 시스템을 이용해 외래 유전자 도입을 시도하고 인간 유전자의 어류 세포 내 도입 및 재조합단백질 발현 여부를 평가하였다. 이를 위해 선행 연구를 통해 확보된 시베리아 철갑상어의 심장 및 두신 유래 세포주(Kim et al., 2014; Ryu et al., 2018)를 대상으로 렌티바이러스 벡터 시스템을 이용한 유전자 도입 방법을 세포 독성과 유전자 도입 효율의 측면에서 평가하였고, 인간 *insulin*과 인간 *erythropoietin (EPO)* 유전자를 *A. baerii* 두신유래 세포주 내 도입하여 mRNA 및 단백질 발현을 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포 배양, 동결 및 해동

1. 1. 세포 배양

시베리아 철갑상어(*A. baerii*)의 심장 및 두신 유래 세포주의 배양은 Leibovitz's L-15 medium (L15; Cellgro, Manassas, VA, USA)에 20% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Cellgro)과 1% (v/v) penicillin-streptomycin (P/S; Gibco, Grand Island, NY, USA)이 첨가된 배지를 사용하여 대기조성을 가진 28℃ 배양기에서 배양하였다. 293LTV cell (Cellbiolabs, Inc, San Diego, CA, USA)은 high glucose에 glutamax가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco)에 10% (v/v) FBS, 0.1 mM Non-essential amino acid (NEAA; Gibco), 2 mM GlutamaxTM (Gibco) 그리고 1 mM Sodium pyruvate (Gibco)가 첨가된 배지를 사용하였고 5% CO₂ 환경의 37℃ 배양기에서 배양하였다. 배지 교체는 2-3일에 한 번씩 실시되었다.

1. 2. 계대 배양

배양 접시에 배양세포가 80% 이상 자랐을 때, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS; Gibco)로 2회 씻은 후, 0.05% Trypsin-EDTA (Gibco)를 사용하여 세포를 배양접시에서 탈착시켰다. 세포 현탁액을 멸균처리 된 5 mL 튜브(Eppendorf, Hamburg, Germany)에 옮기고 동일한

양 의 새 배지를 첨가하여 피펫팅을 통해서 섞어줌으로서 trypsin-EDTA 의 활성을 제거하였다. 이후, 400 g에서 4분간 원심분리하여 세포를 회수 하였고, 0.1% (w/v)의 젤라틴(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 코팅된 배양접시에 1:3 비율로 나누어 배양하였다.

1. 3. 세포 동결

293LTV cell을 동결하기 위해서 배양 중인 세포를 DPBS로 2회 세척 후 0.05% (v/v) trypsin-EDTA로 세포를 탈착시켰다. 탈착된 세포는 배양배지와 1:1로 반응시켜 trypsin-EDTA의 활성을 억제시켰다. 이후 400 g에서 4분간 원심분리를 진행하고 배양배지 1 mL로 세포를 부유시켰다. 부유된 세포 20 μ L와 trypan blue (Gibco) 20 μ L를 섞고 hemocytometer 를 이용해 세포 수를 측정하였다. 측정 후, 3×10^6 293LTV cell을 1.2 mL cryovial (Corning Incorporated, Corning, NY, USA)에 최종 부피가 500 μ L가 되도록 배양 배지와 세포 부유액을 넣고 500 μ L의 동결보존액 [20% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich), 80% (v/v) 배양배지]을 첨가하여 섞었다. 이후 cryocontainer (Nalgene, Rochester, NY, USA)에 cryovial을 넣고 deep freezer (-80°C)에 하루 동안 보관한 뒤 액체질소(-196°C)가 담긴 탱크에 옮겨 사용 시까지 보관되었다.

1. 4. 세포 해동

동결된 *A. baerii* 세포주와 293LTV cell을 해동하기 위해 37°C 항온수조에서 2분 30초간 중탕시켜 해동하였다. 해동된 세포 1 mL을 멸균된 5 mL 튜브(Eppendorf)에 옮기고 배양배지 3 mL를 첨가 후 피펫팅하여 섞

었다. 이후 400 g로 4분간 원심분리를 진행하고 상층액을 제거한 뒤 배양 배지 1 mL로 부유시켰다. 부유된 세포는 0.1% 젤라틴 코팅된 35 mm 배양접시(SPL Life Sciences, Pocheon, Korea)에 배양하였다. 다음날 남아 있는 DMSO 성분을 제거하기 위해서 DPBS 2회 세척 후 배지를 교체해 주었다.

2. 렌티바이러스 벡터 생산 및 감염

2. 1. 형광 단백질 발현 벡터 제작

녹색형광단백질 발현 벡터(pEGFP-N1; Clontech, Mountain View, CA)를 기반으로 제작된 forward 및 reverse primer와 GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA)를 섞고 PCR을 30 cycles (94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 30초) 진행하였다. Primer에 대한 정보는 Table 1에 제시되었다. 확인된 밴드는 gel extraction kit (Genotech, Daejeon, Korea)을 사용하여 분리/정제하였다. 이후, PCR 결과물과 1 µg의 pLVX-IRES-Neo 벡터를 EcoR1 (Enzynomics, Daejeon, Korea)과 Xba1 (Enzynomics) 제한효소로 37°C에서 2시간 처리하였다. 처리된 샘플은 6X DNA loading buffer (Enzynomics)를 섞고 0.6% agarose (Lonza Inc, Rockland, ME, USA) gel에 20분간 전기영동 하여 PCR 산물을 확인하였다. 확인된 밴드는 gel extraction kit (Genotech)을 사용하여 분리/정제하였고 T4 ligase (Enzynomics)를 이용해 녹색형광유전자(EGFP)를 벡터 내 삽입하였다. 삽입된 벡터는 DH5α를 넣고 얼음에서 30분간 반응 후 42°C 항온수조에서 1분간 반응 시켰다. 이후 얼음에 2분간 반응을 시키고

100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 ampicillin이 녹아있는 고체 LB 배지(Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands)에 도말한 뒤 36°C 배양기에서 하루 동안 배양을 진행하였다. 다음날 확인된 colony는 멸균된 10 μL 팁으로 찍어 2 mL의 LB 액체 배지에 접종한 후 37°C 배양기에서 교반과 함께 하루 동안 배양하였다. 배양된 대장균은 위에서 설명한 서브클로닝 조건으로 PCR을 진행하였고, 밴드가 확인된 대장균 FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech, Taiwan)를 이용해 제조사에서 제공한 방법으로 플라스미드를 추출하였다. 확보한 플라스미드는 염기서열 분석(Cosmogenetech, Seoul, Korea)을 통해 최종적으로 목적 유전자 삽입 여부를 확인하였다. pEGFP-N1 및 pLVX-IRES-Neo 벡터 맵은 Figure 1에 제시되었다.

2. 2. 렌티바이러스 벡터 생산

동결된 293LTV cell을 해동한 후 세포의 안정을 위해 계대 배양을 2회 이상 진행하였다. 렌티바이러스 벡터를 생산하기 전날 100 mm 세포 배양 접시에 4×10^6 개의 세포를 뿌리고 5% CO₂ 환경의 37°C 배양기에서 24시간 배양하였다. 다음날 세포가 고르게 퍼져있는 것을 확인한 뒤 Lenti-X™ Packaging Single Shots (VSV-G) (Clontech)을 이용하여 제조사에서 제공하는 방법에 따라 EGFP 유전자가 삽입된 pLVX-IRES-Neo 발현벡터를 세포 내 도입하였다. 렌티바이러스 벡터 생산에 대한 전반적인 과정은 Figure 2에 제시되었다. 도입 후 48시간, 72시간에 바이러스가 함유된 배지를 수거하였다. 48시간에 수거한 배지는 72시간에 수거하기 전까지 4°C에서 보관하였다. 최종적으로 수거한 배지는 cellulose acetate로 만들어진 0.45 μm 주사기 거름망(Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Germany)을

이용해 세포 찌꺼기를 제거하고 200 μ L씩 분주하여 -80℃ deep freezer에 보관하였다.

2. 3. 렌티바이러스 농도측정

24 well plate (SPL Life Sciences)에 농도를 반복 측정할 well 개수와 세포의 수를 측정할 well 개수를 정하고 농도를 측정하기 전날 293LTV cell을 1×10^5 개 접종하고, 5% CO₂ 환경에 37℃에서 24시간 배양하였다. -80℃에 보관되어 있는 바이러스를 꺼내 37℃에서 충분히 녹인 후 20 μ L를 1.5 mL 튜브에 옮겼다. 옮긴 튜브에 배양배지와 polybrene을 넣어 최종부피가 1 mL이 되도록 하였고 polybrene의 농도는 12 μ g/mL로 조정하였다. 이후 배양 중인 세포의 배지를 제거하고 바이러스가 함유된 배지를 각각 500 μ L 씩 주입하였다. 감염 후 24시간 뒤에 DPBS로 2회 세척 후 배지를 교체하였다. 감염 후 72시간 뒤에 고성능 유세포 분석장비(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용해 감염률을 확인하였다.

2. 4. 렌티바이러스 감염

렌티바이러스 감염 전날, 1×10^5 개의 *A. baerii* 세포를 6 well plate (SPL Life Sciences)에 24시간 배양하였다. 감염 당일 날, -80℃에 보관한 렌티바이러스를 37℃에 충분히 녹였다. 배양하고 있는 세포의 각 well에 배지를 제거하고 렌티바이러스가 함유된 배지 1 mL에 배양배지와 polybrene을 섞어 최종 부피가 2 mL이 되도록 하였고 polybrene의 농도는 12 μ g/mL로 조정하였다. 이후 28℃에서 24시간동안 배양하고 배지를 교체해 주었다. 293LTV cell의 경우 앞서 설명한 조건으로 바이러스가 준

비되었다. 감염할 때, 바이러스와 배양배지만 섞은 군 500 μ L와 바이러스, 배양배지 그리고 polybrene (12 μ g/mL)을 섞은 군 500 μ L를 나누어 감염을 시도하였다.

2. 5. 세포 독성 및 형질도입 효율 평가

바이러스 감염 후 72시간 뒤에 0.05% trypsin-EDTA를 처리해 세포를 부유시킨 후, 고성능 유세포 분석기를 통해서 *EGFP* 신호를 분석해 감염 효율을 분석하였다. 생존율 측정은 0.05% trypsin-EDTA로 세포를 부유한 후 trypan blue exclusion assay를 통해 진행하였다.

3. 재조합 유전자 형질도입 및 발현 확인

3. 1. 인간 *insulin* 및 *EPO* 발현 벡터 제작

플라스미드 발현 벡터 (TRPML-HA; Addgene plasmid 52535)에 인간 *insulin*과 *erythropoietin* (*EPO*) 유전자를 각각 삽입하였다. TRPML-HA의 벡터 맵은 Figure 1에 제시되었다. 인간 *insulin*은 PCMV6-XL5 (Origene, Rockville, MD)을, 그리고 *EPO*는 pLenti6.3-h*EPO* (Addgene plasmid 50436)을 이용해 서브클로닝을 진행하였다. 서브클로닝 PCR 조건은 initial denaturation (94°C 5분)을 시작으로 25 cycles (94°C 30초, 59°C 30초, 72°C 45초) 반응시켰다. 만들어진 PCR product와 TRPML-HA는 HindIII 와 Age I 제한효소 (Enzynomics, Daejeon, Korea)를 반응시키고 각각 0.6%, 1.2% agarose gel에 전기 영동하였다. 밴드가 확인된 부위는 gel extraction kit로 PCR product를 정제하였고 제조사에서 제공하

는 방법으로 T4 ligase (Enzynomics)를 반응시켰다. 삽입된 벡터는 DH5α를 넣고 얼음에서 30분간 반응 후 42℃ 항온수조에서 1분간 반응 시켰다. 이후 얼음에 2분간 반응을 시키고 100 µg/mL의 ampicillin이 녹아있는 고체 LB 배지(Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands)에 도말한 뒤 36℃ 배양기에서 하루 동안 배양을 진행하였다. 다음날 확인된 colony는 멸균된 10 µL팁으로 찍어 2 mL의 LB 액체 배지에 접종한 후 36℃ 배양기에서 교반과 함께 하루 동안 배양하였다. 배양된 대장균은 위에서 설명한 서브클로닝 조건으로 PCR을 진행하였고, 밴드가 확인된 대장균은 제조사에서 제공한 방법으로 플라스미드를 추출하였다. 확보한 플라스미드 발현 벡터는 염기서열 분석(Cosmogenetech)을 통해 목적 유전자의 삽입 여부를 확인하였다.

3. 2. 플라스미드 벡터와 형질도입 시약의 복합체 준비

X-tremeGENE™ HP DNA Transfection Reagent (X-tremeGENE™ HP; Roche, Mannheim, Germany)와 세포 내 전달할 플라스미드 벡터와의 복합체를 준비하기 위해서, 3 µg의 발현 벡터와 300 µL의 Opti-MEM을 혼합한 후 X-tremeGENE™ HP를 6 µL를 섞어 주었다. 섞은 복합체는 15분간 상온에 반응시켰다.

3. 3. 인간 *insulin* 및 *EPO* 발현 벡터의 형질도입 및 선별

형질도입하기 전, 6 well plate에 1.5×10^5 개의 *A. baerii* 두신유래 세포를 뿌리고 배양 접시의 80-90%를 덮을 때 까지 배양을 진행하였다. 형질도입 시 DPBS로 2회 세척한 후, L15 배지에 20% (v/v) FBS가 함유된

배지 2 mL로 교체하고 준비된 복합체 250 μ L를 주입한 뒤, 28°C 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 이후, DPBS로 2회 세척을 하고 L15 배지에 20% (v/v) FBS와 1% (v/v) P/S가 함유된 배지 2 mL로 교체해 주었다. 최소 2주 동안 배양 배지에 400 μ g/mL GENETICIN[®] (G418; Sigma-Aldrich)를 첨가하여 항생제 선별을 진행하였다. 이후 0.1% 젤라틴 코팅된 60 mm 배양접시에 저밀도로 (96개 세포) 세포를 접종하여 단일 세포에서 유래된 colony 형성을 유도하였고, 형성된 colony들을 회수 및 증폭 배양한 후 mRNA 및 단백질 발현 분석에 이용하였다.

3. 4. RT-PCR

각 샘플로부터 5 min Cell/Virus RNA Extraction Kit (Biofactories, Monrovia, USA)를 사용하여 제조사가 제공하는 방법으로 total RNA를 추출한 후 DNase I (Sigma-Aldrich)을 처리하였다. 1 μ g total RNA로부터 GoScript reverse transcription system (Promega)을 이용하여 제조사가 제공하는 방법에 따라 cDNA를 합성하였고 인간 *insulin*과 *erythropoietin*의 클로닝에 이용된 것과 동일한 primer로 RT-PCR 분석을 실시하였다(Table 1). PCR은 initial denaturation (94°C, 5분)으로 시작하여 35 cycles (94°C 30초, 59°C 30초, 72°C 45초) 반응시켰다. 만들어진 PCR product는 1.2% agarose gel에 전기 영동하여 확인하였다.

3. 5. Western blot

(1) 샘플 준비

4개의 100 mm plate (SPL Life Sciences)에서 배양한 세포가 90%이상

찾을 때, 0.05% trypsin-EDTA로 세포를 탈착시키고 원심분리를 400 g, 4 분간 진행하였다. 상층액을 제거하고 1 mL DPBS로 세포를 부유시킨 후 동일 조건으로 원심분리를 진행하였다. 상층액을 제거 한 뒤에 200 μ L의 1% (v/v) triton-X가 섞인 DPBS로 부유시켰다. 부유된 세포는 초음파분쇄기를 이용해 세포를 깨뜨렸다. 초음파는 3초 동안 가하고 3초 동안 쉬는 조건으로 총 60초간 진행되었다. 깨진 세포는 동일조건으로 원심분리를 진행하고 상층액을 수거해 1.5 mL 튜브에 옮겼다. 이후, deep freezer에 30분간 얼린 후 2일간 동결건조기(Ilshin Bio Base, Dongducheon, Korea)에서 동결건조를 진행하였다.

(2) Loading gel 제작

Loading gel 틀을 조립 한 후, EVOgel™ (GeneDireX, Las Vegas, NV, USA) 10 mL과 10% (w/v) Ammonium persulfate (Nato Chemical, Tokyo, Japan) 100 μ L 그리고 TEMED (Sigma-Aldrich) 10 μ L를 섞어 틀에 주입하였다. 주입한 gel 위에 80% ethanol을 부은 후 40분간 상온에서 gel을 굳혔다. 상층에 있는 ethanol은 제거한 후 EVOgel™ 5 mL에 Ammonium persulfate 100 μ L과 TEMED 10 μ L를 섞고 stacking gel 부분을 채우고 gel 홈을 끼운 후 1시간동안 상온에서 굳혔다.

(3) 단백질 loading, transfer 그리고 blocking

동결건조 된 단백질은 80 μ L의 3차 증류수에 녹인 후, 단백질 농도를 Pierce® BCA protein assay kit (Thermo scientific, Rockford, IL, USA)를 이용해 측정하였다. 농도 측정은 제조사가 제공한 매뉴얼 방식으로 진행하였다. 28.1 μ g의 단백질을 3차 증류수와 섞어 최종 부피를 20 μ L로 맞추었다. 이후 5X SDS sample loading buffer (Tech & Innovation,

Chuncheon, Korea)를 섞고 5분간 끓는 물에서 변성을 진행하였다. 제작된 loading gel은 loading 틀에 옮긴 후 SDS buffer [25 mM Tris; 192 mM Glycine; 0.1% SDS]에 담근 후, 변성된 단백질 20 μ L를 홈에 주입하고 100 V에서 2시간 30분간 전기영동을 실시하였다. Protein transfer를 진행하기 위해서 polyvinylidene difluoride membrane (Bio Rad, Hercules, CA, USA)를 20분간 methanol에 교반을 진행하고 transfer buffer [25 mM Tris; 192 mM Glycine; 20% Methanol] 상에서 semi-dry transfer 방식으로 100 V에서 1시간 동안 진행하였다. 이 후, membrane은 TBS-T [137 mM Tris; 20 mM NaCl; 0.1% Tween-20] 상에 5% (v/v)의 탈지분유(Bioworld, Atlanta, GA, USA)에 상온에서 1시간 동안 교반을 시켰다.

(4) Primary antibody 와 second antibody 처리

Blocking이 끝난 membrane을 TBS-T에 각각 proinsulin monoclonal antibody (Santa cruz biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)과 *erythropoietin* monoclonal antibody (Santa cruz biotechnology)를 1:200으로 섞고 4°C에서 하루 동안 membrane과 반응을 시켰다. 반응을 마친 membrane은 TBS-T를 3분간 3회에 걸쳐 세척을 진행하였다. 이 후, HRP-conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibody (Thermo scientific)를 상온에서 1시간 동안 반응을 진행하였다. 반응이 끝난 membrane은 TBS-T에서 3분간 3회 세척을 진행하였다.

(5) Visualization

ClarityTM Western ECL Substrate peroxide solution (Bio Rad) 과 ClarityTM Western ECL substrate Luminol/enhancer solution (Bio Rad)

을 섞고 세척이 끝난 membrane과 상온에서 5분간 반응을 시켰다. 반응이 끝난 membrane은 X-ray film에 5분간 노출 시키고 노출 된 film은 developer를 이용해 현상하였다.



Table 1. Primer sequences used in this study

Genes	Primer sequences (5' to 3')		Product size (bp)
	Forward primer	Reverse primer	
<i>Insulin</i>	ACTAAGCTTA GCCCTCCAGG ACAG	GACCGGTCTA GTTGCAGTAG TTCTC	345
His tagged <i>Insulin</i>	GCCGAAGCTT ATGAATTGGG CTTTCTTTA	GACCGGTGTT GCAGTAGTTC TCC	342
<i>EPO</i>	ACTAAGCTTC GAACCATGGG GGTGC	GACCGGTTCA TCTGTCCCCT GTC	594
His tagged <i>EPO</i>	GCCGAAGCTT CGAACCATGG GGTGC	TGACCGGTTT TGTCCCCTGT CCT	591
<i>EGFP</i>	TTGCGGCCGC ATGGTGAGCA AGGGCGA	CGCGGATCCT TACTTGTACA GCTCGTCCA	739

Ⅲ. 결 과

1. 렌티바이러스 벡터 시스템을 이용한 형질도입

1. 1. *EGFP* 발현 벡터의 염기서열 분석 결과

pLVX-IRES-Neo 내에 *EGFP* 유전자를 삽입하고 목적유전자가 오류 없이 삽입되었는지 확인하기 위해서 염기서열 분석을 실시하였다. 분석 결과 도출된 염기서열들을 public database에서 제공되는 CDS와 alignment를 통해 비교하였을 때, 발현벡터 내 삽입된 유전자들이 시작코돈에서 종결코돈까지 100% 일치하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 3).

1. 2. 렌티바이러스 감염 시 polybrene의 효과

렌티바이러스 벡터 시스템을 이용한 형질도입 시 polybrene의 효과를 검증하기 위해, polybrene의 첨가 유무에 따른 형질도입 효율을 비교하였다. 12 μ g/mL polybrene이 첨가된 렌티바이러스 배지와 첨가되지 않은 렌티바이러스 배지를 각각 293LTV cell에 감염시켰고, *EGFP* 발현율에 기초하여 형질도입 효율을 측정하였다. 렌티바이러스를 감염시키지 않은 293LTV cell을 음성대조군으로 이용하였다. 그 결과, 음성대조군에서는 0%의 *EGFP* 발현율이 확인되었고, polybrene을 첨가하지 않은 실험군에서는 42.49%, polybrene을 첨가한 실험군에서는 50.04%의 *EGFP* 발현율이 각각 측정되었다(Figure 4). 결과적으로 polybrene의 첨가가 렌티바이

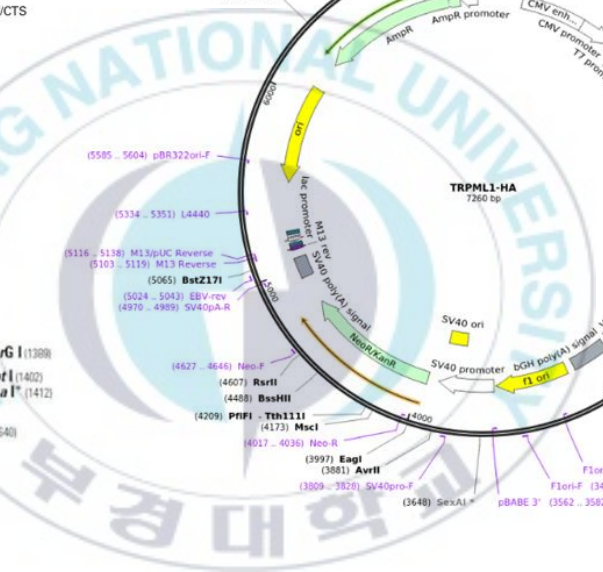
러스 벡터를 이용한 형질도입 시 형질도입 효율을 향상시킬 수 있음이 확인되었다.

1. 3. 렌티바이러스 농도 측정

렌티바이러스의 transducing unit (TU)을 측정하기 위해서 polybrene 12 μ g/mL가 함유된 렌티바이러스 현탁액 10 μ L를 2회 293LTV cell에 감염하였다. 감염 후 72시간 뒤 고성능 유세포 분석기를 통해서 *EGFP* 발현율을 측정한 결과, 각각 2.38%와 1.84%임을 확인하였다(Figure 4). 렌티바이러스 TU를 구하는 공식은 ‘감염 당시 세포의 수 $\times$ 형광 발현비율 / 넣어 준 바이러스 배지 양’ 이므로 생산된 바이러스 농도는 2.11 $\times 10^5$ TU/mL임을 확인하였다.

1. 4. 렌티바이러스 벡터 시스템을 이용한 시베리아 철갑상어 (*A. baerii*) 세포주 내 형질도입 평가

렌티바이러스 벡터 시스템의 *A. baerii* 세포주 내 형질도입 효율을 평가하기 위해서, 심장과 두신 유래 세포주에 2.11 $\times 10^5$ TU의 바이러스를 감염시켰다. 그 결과, 293LTV cell에서는 형광을 발현하는 세포를 확인할 수 있었지만, *A. baerii* 심장유래 및 두신유래 세포주에서는 형광을 발현하는 세포를 확인할 수 없었다. 렌티바이러스의 *A. baerii* 세포주에 대한 세포독성을 측정했을 때, 심장유래 세포주의 생존율은 69.4 $\pm$ 3.9%를 보였고 두신 유래 세포주의 생존율은 84.4 $\pm$ 13.4%로 렌티바이러스를 처리하지 않은 대조군들(심장 유래 세포주: 66.9 $\pm$ 1.7%, 두신 유래 세포주: 92.7 $\pm$ 2.6%)과 비교하여 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Table 2).



- 19 -

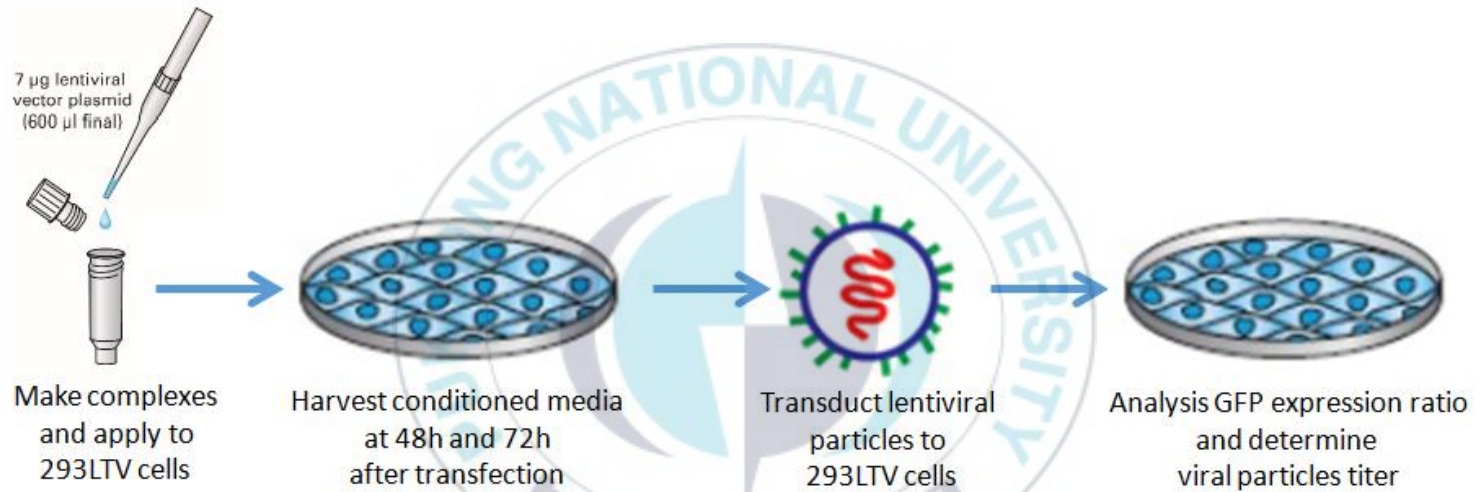


Figure 2. A schematic diagram for lentiviral vector system.

EGFP	-----	0
pLVX_EGFP_CMV-f	TGTTGGCCAGGGGGGAGCTTTATAGCAGAGCTCGTTTASTGAACCGTCAGATCGCTGG	60
EGFP	-----	0
pLVX_EGFP_CMV-f	AGAGCCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGACTCTACTAGAGGATCTAT	120
EGFP	-----ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG	21
pLVX_EGFP_CMV-f	TTCCGGTGAATTCCTCGAGACTAGTTCTAGAGCGGCCGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG	180
EGFP	-----	81
pLVX_EGFP_CMV-f	CTGTTCAACGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGAAGCGAGCTAAACGGCCACAAG	240
EGFP	-----	141
pLVX_EGFP_CMV-f	TTGAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTC	300
EGFP	-----	201
pLVX_EGFP_CMV-f	ATCTGCACCAACGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTGGTGAACCACTGACCTAC	360
EGFP	-----	261
pLVX_EGFP_CMV-f	GGCGTGCAAGTCTTCAGCCGCTACCCGACCATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCC	420
EGFP	-----	321
pLVX_EGFP_CMV-f	GCCATGCCCGAAGGCTAGTCCAGGAGCGACCATCTTCTTCAAGGAGCAGCGCACTAC	480
EGFP	-----	381
pLVX_EGFP_CMV-f	AAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG	540
EGFP	-----	441
pLVX_EGFP_CMV-f	GGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCAGAGCTGGAGTACCACTACAA	600
EGFP	-----	501
pLVX_EGFP_CMV-f	AGCCACAACGCTCTATATCATGGCCGACAGCAGAGGAACGGCATCAAGGTGAATTCAG	660
EGFP	-----	561
pLVX_EGFP_CMV-f	ATCGCCACAACATCGAGGACGGCAGGTGCAGCTCGCCGACCACTACAGCAGAACACC	720
EGFP	-----	621
pLVX_EGFP_CMV-f	CCCATCGGCGACGGCCCGTGCTGCTGCCCGACACCACTACCTGAGCACCAGTCCGCC	780
EGFP	-----	681
pLVX_EGFP_CMV-f	CTGAGCAAGACCCCAACGAGAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTGGTGACCGCC	840
EGFP	-----	720
pLVX_EGFP_CMV-f	GCCGGGATCACTTCGGCATGGAGAGCTGTACAGTAA-----	900
EGFP	-----	720
pLVX_EGFP_CMV-f	CCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCGCTTGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATA	960
EGFP	-----	720
pLVX_EGFP_CMV-f	TGTTATTTTCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGAAACTGGCCCTG	1020
EGFP	-----	720
pLVX_EGFP_CMV-f	TCTTCTTGACGACATTCTAGGGGTCTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGT	1080
EGFP	-----	720
pLVX_EGFP_CMV-f	TGAATGTCTGAAGGAAGCAGTTCTCTGGAAGCTCTTGAAGCAAAACAGTCTGTAG	1140
EGFP	-- 720	
pLVX_EGFP_CMV-f	CG 1142	

Figure 3. Result of sequence alignment between *EGFP* CDS in public database and *EGFP* clone inserted within pLVX-IRES-Neo vector.

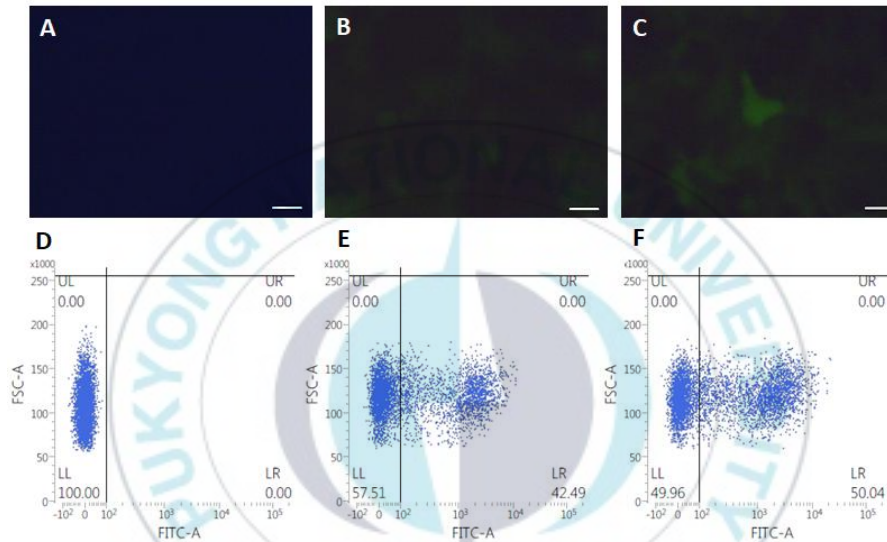


Figure 4. Effects of polybrene on transduction efficiency of lentiviral vector in 293LTV cells. (A) A fluorescent image of 293LTV cells that were not treated with lentiviral vectors. (B) A fluorescent image of 293LTV cells that were treated with lentiviral vectors without polybrene. (C) A fluorescent image of 293LTV cells that were treated with lentiviral vectors with 12 $\mu\text{g/mL}$ polybrene. (D) Percentage of *EGFP*-positive 293LTV cells in non-treated group. (E) Percentage of *EGFP*-positive 293LTV cells in the group that was treated with lentiviral vectors without polybrene. (F) Percentage of *EGFP*-positive 293LTV cells in the group that was treated with lentiviral vectors with 12 $\mu\text{g/mL}$ polybrene. All scale bars are 20 μm .

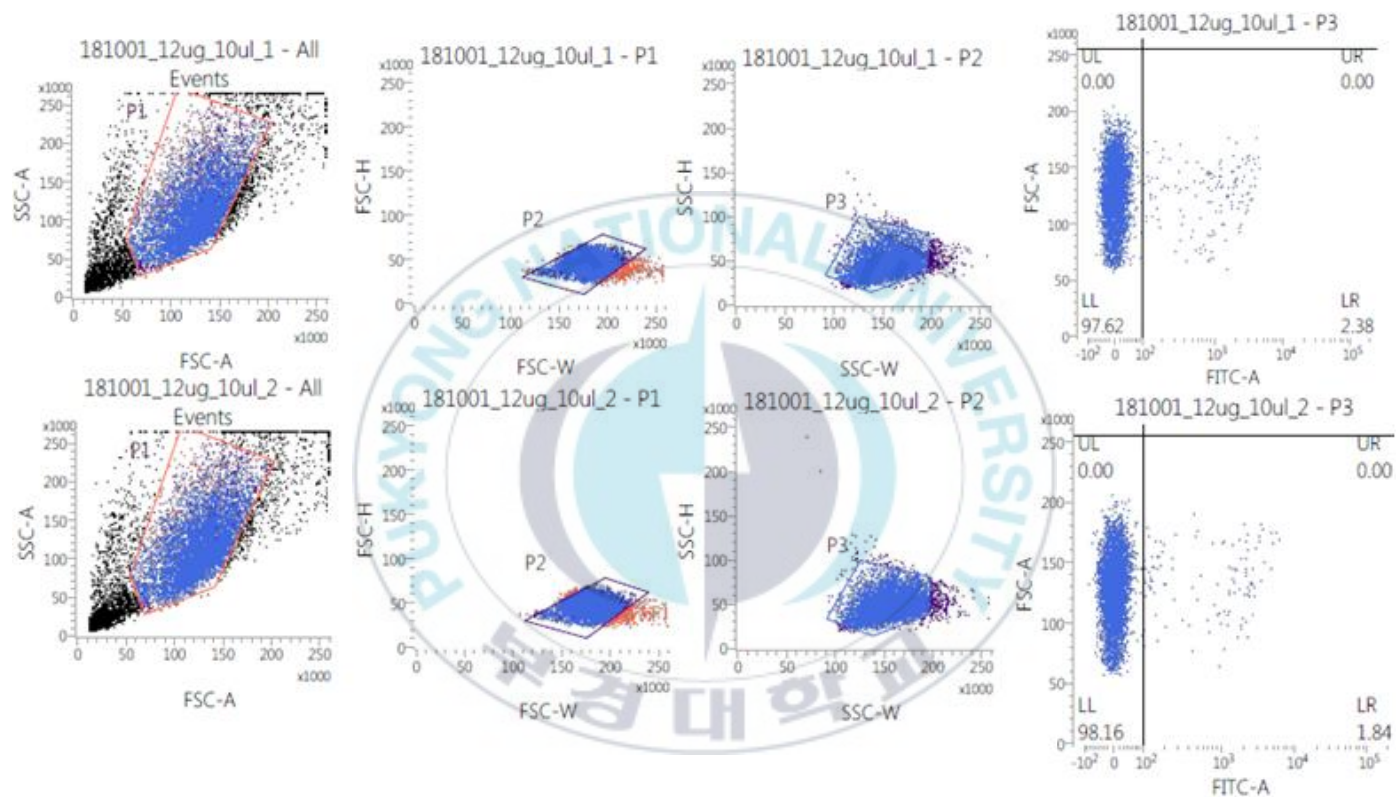


Figure 5. Measurement of the percentage of *EGFP*-positive 293LTV cells after treatment of 10 μ L media containing lentiviral particles. Two independent experiments were performed for calculation of virus titer.

Table 2. Cytotoxicity of lentiviral system on Siberian sturgeon head kidney and heart-derived cells.

Viability (%) of head kidney-derived cells after treatment of lentiviral vectors		Viability (%) of heart-derived cells after treatment of lentiviral vectors	
Control (non-treated cells)	The cells treated with lentiviral vectors	Control (non-treated cells)	The cells treated with lentiviral vectors
92.7±2.6	84.4±13.4	66.9±1.7	69.4±3.9

Data are mean±standard of deviation (SD) of three independent experiments.

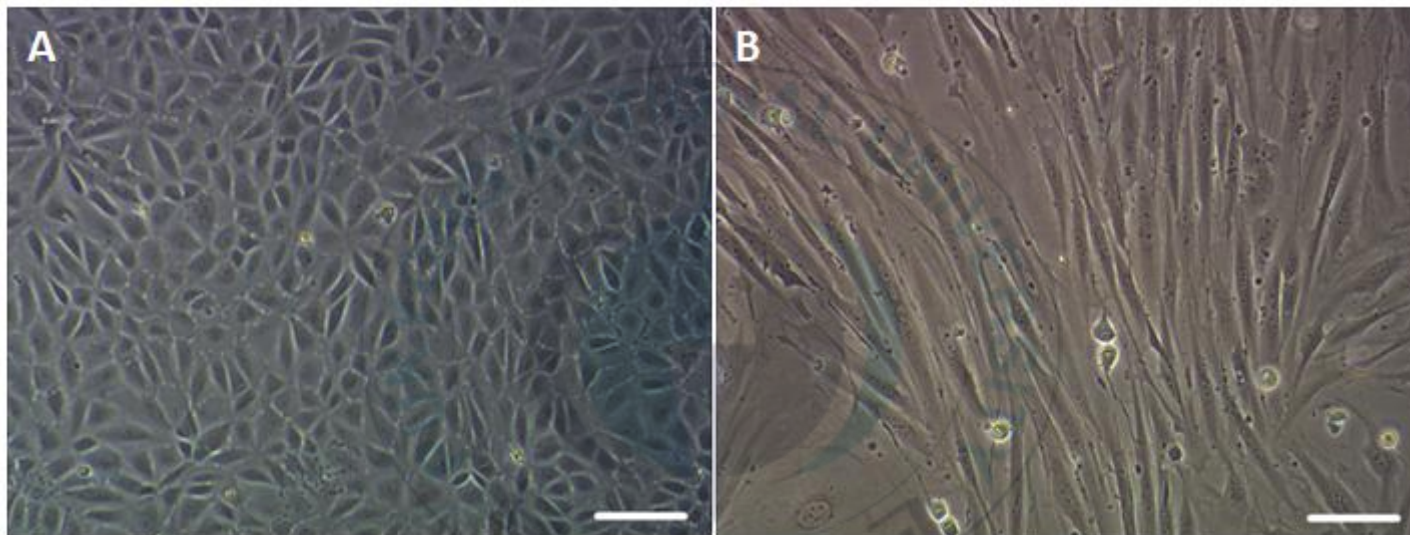


Figure 6. Morphology of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) cell lines used in this study. (A) An *A. baerii* cell line derived from head kidney. (B) An *A. baerii* cell line derived from heart. Both scale bars are 100 μm .

2. 인간 *insulin*과 *EPO* 발현 세포주 확립

2. 1. *Insulin* 및 *EPO* 발현 벡터의 염기서열 분석 결과

pTRPML1-HA 발현 벡터 내 인간 *insulin*과 *EPO* 유전자를 삽입하고 목적유전자가 오류 없이 삽입되었는지 확인하기 위해서 염기서열 분석을 실시하였다. 분석 결과 도출된 염기서열들을 public database에서 제공되는 각 유전자의 CDS와 alignment를 통해 비교하였을 때, *insulin*, his-tagged *insulin*, *EPO*, his-tagged *EPO*를 포함한 모든 발현벡터 내 삽입된 유전자들이 시작 코돈에서 종결코돈까지 100% 일치하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 7, Figure 8).

2. 2. 인간 *insulin* 및 *EPO*의 일시 발현 검증

발현 벡터의 정상적인 작동 여부를 확인하기 위해서 시베리아 철갑상어 (*A. baerii*)의 두신에서 유래한 세포주에 인간 *insulin*과 *EPO* 발현 벡터를 도입하고 72시간 뒤 세포를 회수하여 RT-PCR 분석을 진행하였다. 그 결과, 인간 *insulin*과 his-tagged *insulin* 발현 벡터가 도입된 세포들 모두에서 각각의 mRNA가 발현하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 9). *EPO*의 경우도 마찬가지로 *EPO* 및 his-tagged *EPO* 발현벡터가 도입된 세포들 모두에서 각각의 mRNA가 발현하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 10).

2. 3. 인간 *insulin* 및 *EPO*를 발현하는 stable cell line 확립

도입한 목적유전자를 지속적으로 발현하는 stable cell line을 확립하기 위해서, *insulin*, his-tagged *insulin*, *EPO* 및 his-tagged *EPO* 발현 벡터를 각각 시베리아 철갑상어 두신 유래 세포주 내 형질도입하였고, 항생제 선별 및 클론 배양을 통해 stable cell line을 확보하였다. *Insulin*, his-tagged *insulin*, *EPO* 및 his-tagged *EPO* 각각에 대해 각각 8개의 클론 세포주들을 확보하였고, 각 클론 세포주들의 RT-PCR 분석 결과, *insulin*과 his-tagged *insulin*은 각각 7개와 3개의 클론 세포주에서 mRNA 발현을 확인할 수 있었고(Figure 11), *EPO*와 his tagged *EPO*는 각각 1개의 세포주에서 mRNA 발현을 확인할 수 있었다(Figure 12). 이를 통해서 목적유전자 mRNA를 발현하는 stable cell line이 확보가 확인되었다.

2. 4. Stable cell lines의 인간 *insulin* 및 *EPO* 단백질 발현 평가

목적 유전자의 mRNA를 안정적으로 발현하는 stable cell lines에서 *insulin* 및 *EPO*의 단백질 발현을 평가하였다. *EPO*의 mRNA를 발현하는 stable cell line과 his-tagged *insulin*의 mRNA 발현하는 stable cell line을 배양하였고 단백질 발현을 평가하기 위해서 western blot을 진행하였다. 그 결과 *EPO* stable cell line의 경우, *EPO* 단백질의 예상 크기인 37 kDa 부근에서 anti-*EPO* antibody에 반응하는 단백질 밴드를 확인할 수 있었다. His - tagged *insulin* stable cell line의 경우 예상되는 proinsulin 단백질의 크기인 13 kDa 부근에서는 anti-proinsulin antibody에 반응하는 밴드가 확인되지 않았고, 이보다는 크기가 큰 약 56 kDa 부근에서 대조군에서는 나타나지 않는 단백질 밴드를 확인할 수 있었다(Figure 13).

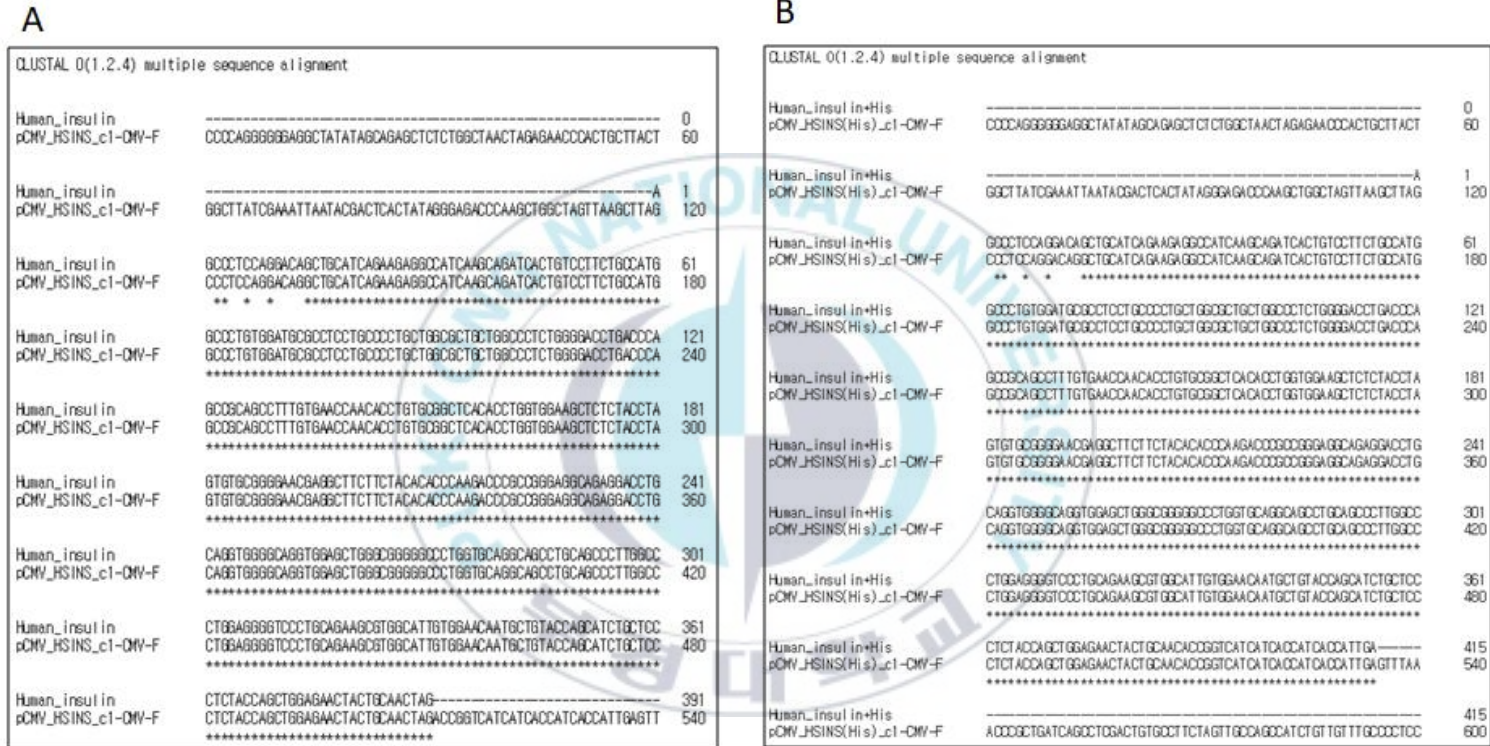


Figure 7. Sequencing results of human *insulin* inserted within pTRPML1-HA vector. (A) Multiple sequence alignment between human *insulin* CDS and human *insulin* inserted within pTRPML1-HA vector. (B) Multiple sequence alignment between human *insulin* CDS and his-tagged human *insulin* inserted within pTRPML1-HA vector.

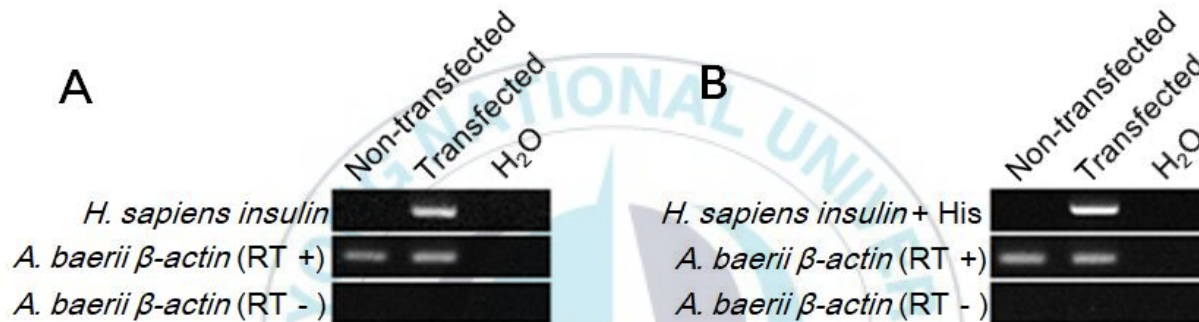


Figure 9. Transient mRNA expression in *Acipenser baerii* head kidney cell lines transfected with human *insulin* and his-tagged human *insulin*. (A) RT-PCR results for *insulin* expression in *A. baerii* head kidney cell lines transfected with human *insulin* expression vectors. (B) RT-PCR results for *insulin* expression in *A. baerii* head kidney cell lines transfected with his-tagged human *insulin* expression vectors.

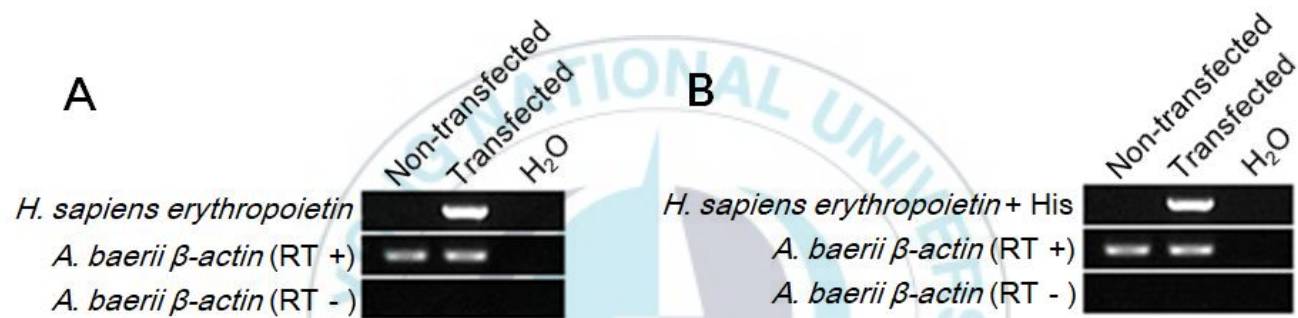


Figure 10. Transient mRNA expression in *Acipenser baerii* head kidney cell lines transfected with human *erythropoietin* (*EPO*) and his-tagged human *EPO*. (A) RT-PCR results for *EPO* expression in *A. baerii* head kidney cell lines transfected with human *EPO* expression vectors. (B) RT-PCR results for *EPO* expression in *A. baerii* head kidney cell lines transfected with his-tagged human *EPO* expression vectors.



Figure 11. mRNA expression in cell clones after transfection of *insulin* gene and subsequent selection. (A) RT-PCR results for *insulin* expression in the cell clones derived from *Acipenser baerii* head kidney cell lines transfected with human *insulin* expression vectors. (B) RT-PCR results for *insulin* expression in the cell clones derived from *A. baerii* head kidney cell lines transfected with his-tagged human *insulin* expression vectors.

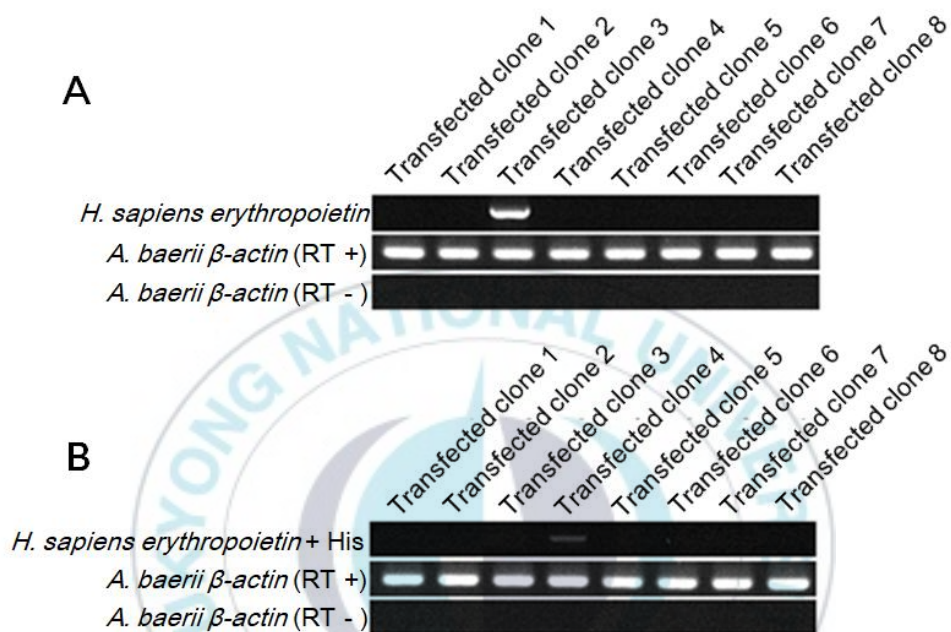


Figure 12. mRNA expression in cell clones after transfection of *erythropoietin* (*EPO*) gene and subsequent selection. (A) RT-PCR results for *EPO* expression in the cell clones derived from *Acipenser baerii* head kidney cell lines transfected with human *EPO* expression vectors. (B) RT-PCR results for *EPO* expression in the cell clones derived from *A. baerii* head kidney cell lines transfected with his-tagged human *EPO* expression vectors.

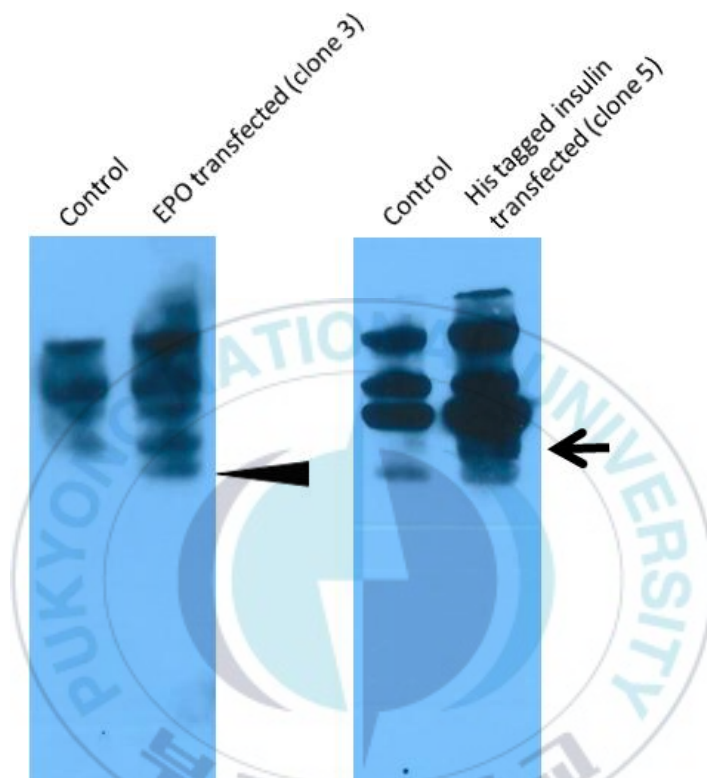


Figure 13. Human *insulin* and *erythropoietin* (*EPO*) protein expression from stable cell lines. Arrowhead and arrow indicate protein sizes of about 37 kDa and about 56 kDa, respectively. Non-transfected *Acipenser baerii* head kidney cell line was used for a control.

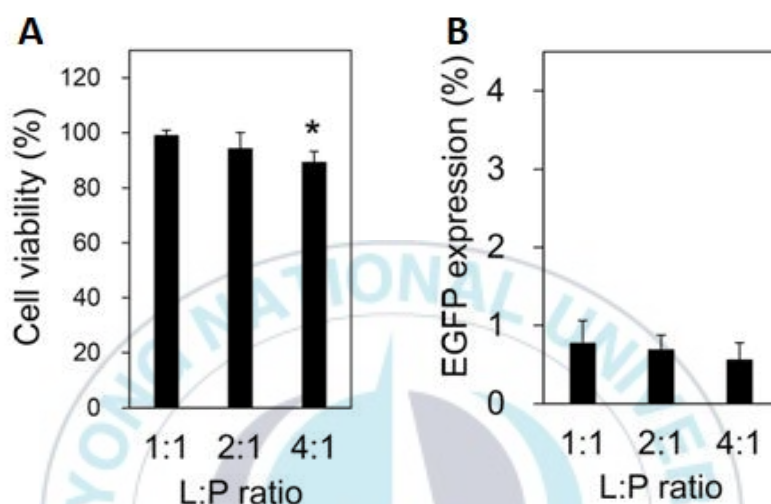


Figure 14. Cytotoxicity and transfection efficiency of Lipofectamine™ 2000 on Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) head kidney cell lines. (A) Cell viability according to Lipofectamine™ 2000 to plasmid ratios. (B) *EGFP* expression according to Lipofectamine™ 2000 to plasmid ratios. Data are expressed as the mean $\pm$ SD of three independent experiments. Asterisk indicates significant difference compared to control (reagent-to-plasmid ratio=0:1). Reprinted by permission from Springer Nature, In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, Gene delivery into Siberian sturgeon cell lines by commercial transfection reagents., Lee JH et al., Copyright © 2019.

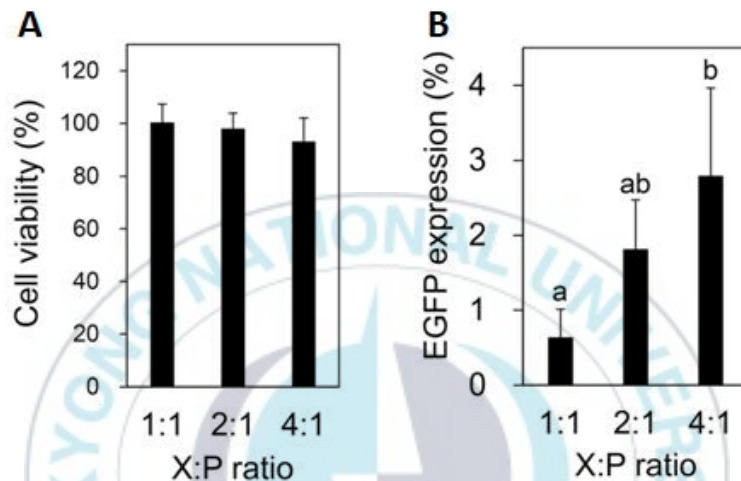


Figure 15. Cytotoxicity and transfection efficiency of X-tremeGENETM HP on Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) head kidney cell lines. (A) Cell viability according to X-tremeGENETM HP to plasmid ratios. (B) *EGFP* expression according to X-tremeGENETM HP to plasmid ratios. Data are expressed as the mean $\pm$ SD of three independent experiments. Letters a and b indicate significant differences, $p < 0.05$. Reprinted by permission from Springer Nature, In Vitro Cellular & Developmental Biology–Animal, Gene delivery into Siberian sturgeon cell lines by commercial transfection reagents., Lee JH et al., Copyright © 2019.

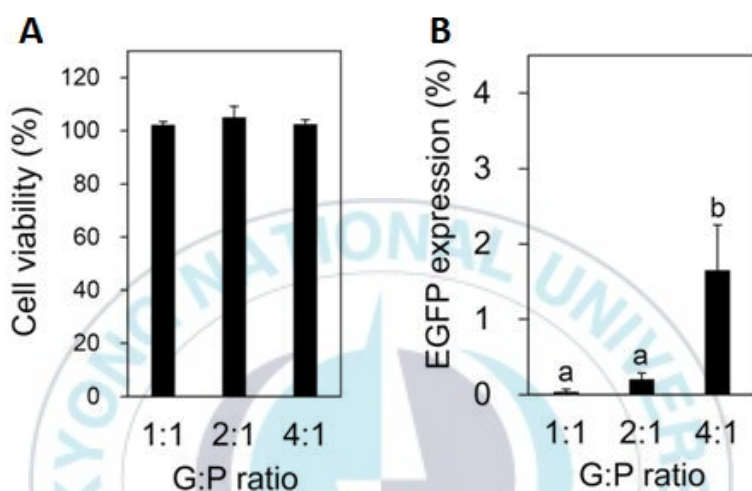


Figure 16. Cytotoxicity and transfection efficiency of GeneJuice® on Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) head kidney cell lines. (A) Cell viability according to GeneJuice® to plasmid ratios. (B) *EGFP* expression according to GeneJuice® to plasmid ratios. Data are expressed as the mean $\pm$ SD of three independent experiments. Letters a and b indicate significant differences, $p < 0.05$. Reprinted by permission from Springer Nature, In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, Gene delivery into Siberian sturgeon cell lines by commercial transfection reagents., Lee JH et al., Copyright © 2019.

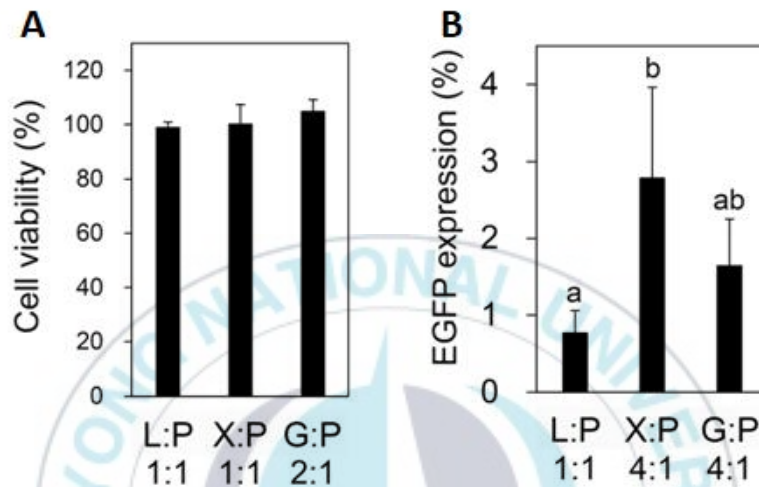


Figure 17. Comparison between optimal conditions of cytotoxicity and transfection efficiency of three different transfection reagents on Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) head kidney cell lines. (A) Comparison of cell viability between the optimal conditions from each transfection reagent. (B) Comparison of *EGFP* expression rate between the optimal conditions from each transfection reagent. Letters a and b indicate significant differences, $p < 0.05$. Reprinted by permission from Springer Nature, In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, Gene delivery into Siberian sturgeon cell lines by commercial transfection reagents., Lee JH et al., Copyright © 2019.

IV. 고 찰

이 실험을 통해서 시베리아 철갑상어(*A. baerii*)의 두신 유래 세포주에 렌티바이러스 벡터 시스템의 외래 유전자 도입효율과 세포독성을 분석하였고 X-tremegeneTM HP를 이용해 *A. baerii*의 두신유래 세포주에 인간 유전자를 도입한 뒤, mRNA와 단백질 발현을 확인하였다.

먼저, *A. baerii*의 두신유래와 심장유래 세포주에 렌티바이러스를 이용해 외래 유전자 도입을 시도하기 전에, 생산된 바이러스의 감염 효율을 높여주기 위해서 polybrene의 유무에 따른 감염 효율 차이를 확인해 보았다. 293LTV cell에 12 $\mu\text{g/mL}$ 의 polybrene이 첨가된 바이러스 현탁액으로 감염을 시도하였을 때, 감염률이 상승된 것을 확인할 수 있었다(50.04% vs 42.49%). 이는 바이러스와 세포막에서 띄는 음전하를 polybrene이 둘 사이의 막전위차를 없애주어 감염효율을 높여준다는 앞선 연구결과들과 일치한다(Coelen et al., 1983; Davis et al., 2002; Davis et al., 2004).

최종적으로 *A. baerii*의 두신유래와 심장유래 세포주에 렌티바이러스 2.11×10^5 TU를 감염시키고 세포독성과 도입효율을 확인해보았다. 렌티바이러스 처리 후 두신유래 세포주의 생존율은 $84.4 \pm 13.4\%$, 심장유래 세포주의 생존율은 $69.4 \pm 3.9\%$ 로 확인하였으나 대조군과($92.7 \pm 2.6\%$, $66.9 \pm 1.7\%$) 유의적인 차이는 없었다. 도입효율의 경우, 형광을 발현하는 세포를 확인할 수 없었다. 따라서 실질적인 렌티바이러스의 감염이 일어나지 않은 것으로 판단되고 렌티바이러스 처리 후 생존율에서 차이가 나지 않는 것 또한 같은 이유에서 기인하는 것으로 생각된다. *A. baerii* 세포주에 대한 렌티바이러스의 정확한 세포독성을 평가하기 위해서는 *A. baerii* 세포를 효율적으로 감염시킬 수 있는 조건의 개발이 선행되어야

할 것이다. Zebrafish 대상의 앞선 연구결과에 따르면, 포유류 세포에 비해 zebrafish 세포주가 약 36배 바이러스 감염률이 낮은 것을 확인된다(Fazio et al., 2017). 본 연구결과 역시 이와 비슷한 양상을 나타내었고, 이는 어류 세포가 포유류 세포에 비해 렌티바이러스 감염이 잘 이루어지지 않는다는 것을 암시한다. 따라서 어류 세포에 렌티바이러스 벡터 시스템을 사용하여 감염률을 높이기 위해서는 바이러스 농축이 필수적으로 필요할 것으로 보이며, 앞서 언급된 바와 같이 어류 세포에 대한 렌티바이러스 최적 감염 조건 연구가 필요할 것으로 생각한다.

본 연구에서는 렌티바이러스 벡터 시스템을 이용한 *A. baerii* 세포주 내 형질도입이 이루어지지 않았고, 따라서 Lee 등의 앞선 연구결과에 기초하여 형질도입 시약(transfection reagent)를 이용하여 외래 유전자를 세포 내 형질도입하였다(Lee et al., 2019). 해당 논문에서는 *A. baerii* 두신 유래 세포주에 최적 형질도입 조건을 찾고자, 3 종류의 형질도입 시약(LipofectamineTM 2000, X-tremeGENETM HP 및 GeneJuice[®])을 다양한 시약/플라스미드 비율로 사용하여, 세포독성 및 형질도입 효율을 평가하였다. 결과를 비교한 그래프를 보면, 각 시약에 대해 약간의 차이는 있으나 전반적으로 생존율이 높은 것을 확인할 수 있다(Figure 14A, Figure 15A, Figure 16A). 그러나 LipofectamineTM 2000의 비율이 높을수록 생존율은 점점 낮아져 시약과 벡터의 비율이 4:1에서 대조군(0:1) 과 유의적인 차이를 보이며 낮아진 것을 알 수 있다(Figure 14A). 이는 cationic liposomal complex를 사용할 경우, 성분이 높을수록 생존율이 떨어진다는 다른 보고들과 일치한다(Cambell, 1983; Mayhew et al., 1987; Filion et al., 1997; Romøren et al., 2004). 형질도입 효율은 최적 조건에서도 1% 미만으로 매우 낮은 형질도입 효율을 나타내었다(Figure 14B). X-tremeGENETM HP의 도입효율은 시약의 비율이 높을수록 점점 높아지

는 경향을 보였고, 1:1과 4:1 사이에서 유의적인 차이를 확인했다(Figure 15B). GeneJuice®의 경우 시약의 비율이 4:1에서 1-2%의 도입효율을 보이며 다른 비율 구간에 비해 유의적으로 높은 것을 확인할 수 있다(Figure 16B). 각 시약 별 최적 도입조건을 비교해보면 X-tremeGENE™ HP이 4:1 비율에서 가장 높은 도입효율을 확인할 수 있었다(Figure 17B). 따라서 *A. baerii* 두신유래 세포주에 인간 유용단백질 유전자를 효율적으로 도입하기 위해서 X-tremeGENE™ HP을 사용하는 것이 적합하다는 것을 알 수 있었다. 한편, Cha 등의 연구결과에 따르면 인간 유래 세포주인 HeLa cell의 경우, Lipofectamine™ 2000에서 42.5±5.9%, GeneJuice®에서 21.5±1.6%, X-tremegene™ HP에서 30.2±1.6%로 어류 세포에 비해 훨씬 높은 수준의 도입효율 나타내었다(Cha et al., 2013). 인간 세포와 어류 세포에서 형질도입 시약을 이용한 형질도입 효율에 대한 이러한 확연한 차이는 어류가 수계 환경에 서식하면서 어류 세포의 인지질 구성성분이나 유동성이 포유류와 차이를 보여 기인한 결과로 추측한다(Bell et al., 1986).

*A. baerii*의 두신유래 세포주에 인간 *insulin*과 인간 *EPO*의 발현백터를 도입했을 때, RT-PCR을 통해서 mRNA가 발현한 것을 확인할 수 있었고 성공적으로 안정화된 세포주를 확보할 수 있었다. *EPO*의 경우, western blot을 통한 단백질 발현을 확인하였을 때, 예상 크기인 37 kDa 부근에서 신호를 확인할 수 있었다. 그러나 his tagged *insulin*의 경우 예상 크기인 (his tagged *proinsulin*) 13 kDa보다 큰 약 56 kDa에서 신호를 확인할 수 있었다. 일반적으로 western blot에서 예상한 밴드 크기보다 큰 부분에서 신호가 나왔다면, 단백질 aggregation 현상을 의심해볼 수 있고 해결책으로는 샘플을 고온에서 조금 더 반응시켜 충분히 단백질 변성을 시켜주는 방법이 있다(Mahmood and Yang., 2012).

그러나 *insulin*은 aggregation외에도 multimer의 형성을 의심해 볼 수 있다. *insulin*은 분비성 단백질로서 translation과정에서 signal peptide가 잘리고 proinsulin 상태로 골지체 안으로 운송이 된다. 이 때, proinsulin의 His B10 site와 Glu B13 site에서 Zn^{2+} 와 Ca^{2+} 와 결합해 tetramer proinsulin을 거쳐 hexamer proinsulin을 형성한다. 이후, 분비소포체에서 trypsin이나 carboxypeptidase 유사 효소와 반응하면서 C-peptide가 잘려 hexamer *insulin*을 형성한다(Dunn., 2005). 한편, *insulin*이 합성되는 과정에서 β -chain의 끝부분의 asparagine이나 glutamine이 공유결합이 되면서 일반 *insulin*보다 size가 큰 dimer를 형성할 수 있다(Hjorth et al., 2016).

하지만, 본 연구에서 확인된 단백질 밴드들의 보다 정확한 평가를 위해서는 *A. baerii* 두신 유래 세포주가 생산하는 각 추정 단백질들의 분리 및 정제와 단백질 구조 분석 및 생물학적 활성 분석과 같은 충분한 특성 분석 과정이 추가적으로 필요할 것으로 생각된다.

본 연구를 통해 어류 세포에 대한 렌티바이러스 벡터 시스템의 활용 가능성을 평가하였고, 인간 유용 단백질을 발현하는 어류 세포주를 확립하였다. 확립된 세포주들의 유전자 및 단백질 발현 분석 결과들을 종합해보면, *EPO*는 mRNA와 단백질 발현을 확인할 수 있었고 *insulin*은 mRNA와 multimer로 추정되는 단백질 신호를 확인할 수 있었다. 추후 재조합단백질의 분리/정제 및 특성분석에 대한 연구와 렌티바이러스의 어류 세포 최적 감염 조건에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다. 본 연구의 결과 및 확립된 세포주들은 어류 세포주 및 어류의 재조합단백질 생산을 위한 연구 기반으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

국문 요약

시베리아 철갑상어(*Acipenser baerii*) 세포주에서 재조합단백질 발현에 관한 연구

최 재 훈

부경대학교 대학원 수산생물학과

다양한 유기체로부터 재조합단백질의 생산에 대한 연구가 많이 진행되었음에도 불구하고, 어류를 이용한 재조합단백질 생산에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 그러므로 어류로부터 재조합단백질을 생산하기 위해서는 어류나 어류세포로부터 재조합단백질을 생산하기 위한 기초 연구가 선행될 필요가 있다. 따라서, 본 연구에서는 어류의 세포주에서 재조합단백질의 발현 가능성을 평가하였다. 이를 위해서 시베리아 철갑상어(*Acipenser baerii*) 유래 세포주에 렌티바이러스 벡터 시스템을 이용한 외래유전자 도입을 시도해 보았고 인간 재조합단백질을 발현하는 어류 세포주를 확립하고자하였다. 초록형광단백질(*EGFP*) 유전자를 보유하고 있는 렌티바이러스 벡터를 이용하여 293LTV 세포와 *A. baerii* 세포에 감염을 시도하였고, 렌티바이러스 벡터 시스템을 통해 *EGFP*가 293LTV 세포에 성공적으로 도입됨으로서 잘 작동할 수 있음을 확인하였다. 그러나 *A. baerii*의 세포주에서는 *EGFP* 도입이 이루어지지 않았다. *A. baerii* 세포의 인간 재조합단백질 발현을 평가하기 위해서, CMV promoter에 의해 조절되는 인

간 *insulin*과 *erythropoietin (EPO)* 유전자를 보유하는 발현백터를 제작하였고, *A. baerii*의 세포주에 도입을 하였다. 도입 후, 인간 *insulin*과 *EPO*가 일시적 mRNA를 발현하는 것을 확인하였고 약물처리와 저밀도 배양을 통해서 지속적으로 각각의 mRNA를 발현을 하는 세포주들을 확립하였다. *Insulin*과 *EPO* mRNA를 발현하는 각 세포주에서 *insulin*과 *EPO*의 단백질 발현을 분석한 결과, *EPO* 및 *insulin*으로 추정되는 단백질들의 발현이 확인되었고, 이는 어류 세포주가 재조합단백질을 생산할 수 있는 가능성을 제시한다. 본 연구결과는 어류 세포주나 어류로부터 재조합단백질을 생산하는 시스템 개발에 기여할 것으로 기대된다.



부 록

SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jan 24, 2019

This Agreement between Jae Hoon Choi ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	4514011447374
License date	Jan 22, 2019
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal
Licensed Content Title	Gene delivery into Siberian sturgeon cell lines by commercial transfection reagents
Licensed Content Author	Ji Hun Lee, Seung Tae Lee, Yoon Kwon Nam et al
Licensed Content Date	Jan 1, 2018
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	non-commercial (non-profit)
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Will you be translating?	yes, without original language
Number of languages	1
Circulation/distribution	<501
Author of this Springer Nature content	no
Title	Studies on the expression of recombinant proteins in Siberian sturgeon (<i>Acipenser baerii</i>) cell lines
Institution name	Pukyong National University
Expected presentation date	Jan 2019
Portions	Figure2
Specific Languages	Korean
Requestor Location	Jae Hoon Choi Korea Busan PKNU Busan, namgoo Korea, Republic Of Attn: Jae Hoon Choi
Billing Type	Invoice
Billing Address	Jae Hoon Choi Korea Busan PKNU Busan, Korea, Republic Of Attn: Jae Hoon Choi
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

참고 문헌

Andersen DC and Krummen L. 2002. Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr Opin Biotechnol.* 13, 117-123.

Bell MV, Henderson RJ and Sargent JR. 1986. The role of polyunsaturated fatty acids in fish. *Comp Biochem Physiol.* 83, 711-719.

Cambell PI. 1983. Toxicity of some charged lipids used in liposome preparations. *Cytobios.* 37, 21-26.

Cha J, Zhang J, Gurbani S, Cheon GW, Li M and Kang JU. 2013. Gene transfection efficacy assessment of human cervical cancer cells using dual-mode fluorescence microscopy. *Opt Soc Am.* 4, 151-159.

Coelen RJ, Jose DG and May JT. 1983. The effect of hexadimethrine bromide (polybrene) on the infection of the primate retroviruses SSV 1/SSAV 1 and BaEV. *Arch Virol.* 75, 307 - 311.

Conesa A, Punt PJ, van Luijk N and van den Hondel CAMJJ. 2001. The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. *Fung Genet Biol.* 33, 155 - 171.

Cregg JM, Cereghino L, Shi J and Higgins DR. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. Mol Biotech. 16, 23 - 52.

Daniell H, Streatfield SJ and Wycoff K. 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. Trends Plant Sci. 6, 219 - 226.

Dash C, Routray P, Tripathy S, Verma DK, Guru BC, Meher PK, Nandi S and Eknath AE. 2010. Derivation and characterization of embryonic stem-like cells of Indian major carp *Catla catla*. J Fish Biol. 77, 1096-1113.

Davis HE, Morgan JR and Yarmush ML. 2002. Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. Biophys Chem. 97, 159 - 172.

Davis HE, Rosinski M, Morgan JR and Yarmush ML. 2004. Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. Biophys J. 86, 1234 - 1242.

Dunn MF. 2005. Zinc - ligand interactions modulate assembly and stability of the *insulin* hexamer - a review. BioMetals. 18, 295-303.

Dyck MK, Lacroix D, Pothier F and Sirard MA. 2003. Making

recombinant proteins in animals - different systems, different applications. Trends Biotechnol. 21, 394-399.

Fazio M, Avagyan S, van Rooijen E, Mannherz W, Kaufman CK, Lobbardi R, Langenau DM and Zon LI. 2017. Efficient transduction of zebrafish melanoma cell lines and embryos using lentiviral vectors. Zebrafish. 4, 379-382.

Filion MC and Philips NC. 1997. Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells. Biochim Biophys Acta. 1329, 345-356.

Fuhrmann M, Oertel W and Hegemann P. 1999. A synthetic gene coding for the *green fluorescent protein* (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant J. 19, 353 - 361.

Giddings G, Allison G, Brooks D and Carter A. 2000. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. Nature Biotechnol. 18, 1151 - 1155.

Gomord V, Chamberlain P, Jefferies R and Faye L. 2005. Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities. Trends Biotechnol. 23, 559-565.

Graslund S, Nordlund P, Weigelt J, Hallberg BM, Bray J, Gileadi O,

Knapp S, Oppermann U, Arrowsmith C, Hui R, Ming J, dhe-Paganon S, Park HW, Savchenko A, Yee A, Edwards A, Vincentelli R, Cambillau C, Kim R, Kim SH, Rao Z, Shi Y, Terwilliger TC, Kim CY, Hung LW, Waldo GS, Peleg Y, Albeck S, Unger T, Dym O, Prilusky J, Sussman JL, Stevens RC, Lesley SA, Wilson IA, Joachimiak A, Collart F, Dementieva I, Donnelly MI, Eschenfeldt WH, Kim Y, Stols L, Wu R, Zhou M, Burley SK, Emtage JS, Sauder JM, Thompson D, Bain K, Luz J, Gheyi T, Zhang F, Atwell S, Almo SC, Bonanno JB, Fiser A, Swaminathan S, Studier FW, Chance MR, Sali A, Acton TB, Xiao R, Zhao L, Ma LC, Hunt JF, Tong L, Cunningham K, Inouye M, Anderson S, Janjua H, Shastry R, Ho CK, Wang D, Wang H, Jiang M, Montelione GT, Stuart DI, Owens RJ, Daenke S, Schutz A, Heinemann U, Yokoyama S, Bussow K and Gunsalus KC. 2008. Protein production and purification. *Nat Methods*. 5, 135-146.

Gyulin H, Ferenc M, Rahman MA, Williams DW, Murdock PJ, Pasis KJ, Geoffrey G, Hamid F and Norman M. 2004. Fish as bioreactors: transgene expression of human coagulation factor VII in fish embryos. *Mar Biotechnol*. 6, 485-492.

Hacker DL and Balasubramanian S. 2016. Recombinant protein production from stable mammalian cell lines and pools. *Curr Opin Struct Biol*. 38, 129 - 136.

Hamilton SR, Davidson RC, Sethuraman N, Nett JH, Jiang Y, Rios S,

Bobrowicz P, Stadheim TA, Li H, Choi BK, Hopkins D, Wischniewski H, Roser J, Mitchell T, Strawbridge RR, Hoopes J, Wildt S and Gerngross TU. 2006. Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science*. 313, 1441-1443.

Harvey AJ, Speksnijder G, Baugh LR, Morris JA and Ivarie R. 2002. Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens. *Nat Biotechnol*. 19, 396 - 399.

Hjorth CF, Norrman M, Wahlund PO, Benie AJ, Petersen BO, Jessen CM, Pedersen TA, Vestergaard K, Steensgaard DB, Pedersen JK, Naver H, Hubalek F, Poulsen C and Otzen D. 2016. Structure, aggregation, and activity of a covalent *insulin* dimer formed during storage of neutral formulation of human *insulin*. *J Pharm Sci*. 105, 1376 - 1386.

Hong Y, Winkler C and Scharl M. 1996. Pluripotency and differentiation of embryonic stem cell lines from the medakafish (*Oryzias latipes*). *Mech Dev*. 60, 33-44.

Ho SY, Goh CW, Gan JY, Lee YS, Lam MK, Hong N, Hong Y, Chan WK and Shu-Chien AC. 2014. Derivation and long-term culture of an embryonic stem cell-like line from zebrafish blastomeres under feeder-free condition. *Zebrafish*. 11, 407-420.

Houdebine LM. 2007. Transgenic animal models in biomedical research. *Methods Mol Biol.* 360, 163–202.

Houdebine LM. 2009. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 32, 107–121.

Ikonomou L, Schneider YJ and Agathos SN. 2003. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol.* 62, 1 - 20.

Kim MS, Nam YK, Park C, Kim HW, Ahn J, Lim JM and Gong SP. 2014. Establishment condition and characterization of heart-derived cell culture in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 50, 909–917.

Kusnadi AR, Nikolov ZL and Howard JA. 1997. Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. *Biotechnol Bioeng.* 56, 473–484.

Lakra WS, Swaminathan TR and Joy KP. 2011. Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: a review. *Fish Physiol Biochem.* 37, 1–20.

Lee JH, Lee ST, Nam YK and Gong SP. 2019. Gene delivery into Siberian sturgeon cell lines by commercial transfection reagents. *In*

Vitro Cell Dev Biol Anim. doi: 10.1007/s11626-018-00316-1.

Mahmood T and Yang PC. 2012. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. N Am J Med Sci. 4, 429 - 434.

Makrides SC. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. Microbiol Rev. 60, 512-538.

Mayhew E, Ito M and Lazo R. 1987. Toxicity of non-drug-containing liposomes for cultured human cells. Exp Cell Res. 171, 195-202.

Meguro Y, Nakai T, Muroga K and Sorimachi M. 1991. A cell line derived from the fin of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Fish Pathol. 26, 69-75.

Noga EJ and Hartmann JX. 1981. Establishment of walking catfish (*Clarias batrachus*) cell lines and development of a channel catfish (*Ictalurus punctatus*) virus vaccine. Can J Fish Aquat Sci. 38, 925-930.

Rasala BA and Mayfield SP. 2014. Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses. Photosynthesis Research. 3, 227-239.

Romøren K, Thu BJ, Bols NC and Evensen Ø. 2004. Transfection efficiency and cytotoxicity of cationic liposomes in salmonid cell lines

of hepatocyte and macrophage origin. *Biochim Biophys Acta*. 1663, 127-134.

Rudolph NS. 1999. Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *Trends Biotechnol*. 17, 367-374.

Ryu JH, Kim MS, Kang JH, Kim DH, Nam YK and Gong SP. 2018. Derivation of the clonal-cell lines from Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) head-kidney cell lines and its applicability to foreign gene expression and virus culture. *J Fish Biol*. 92, 1273-1289.

Santos Nassif Lacerda SM, Costa GM, da Silva Mde A, Campos-Junior PH, Segatelli TM, Peixoto MT, Resende RR and de França LR. 2013. Phenotypic characterization and in vitro propagation and transplantation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) spermatogonial stem cells. *Gen Comp Endocrinol*. 192, 95-106.

Swartz JR. 2001. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol*. 12, 195 - 201.

van Oers MM, Pijlman GP and Vlak JM. 2015. Thirty years of baculovirus - insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. *J Gen Virol*. 96, 6 - 23.

Wolf K and Quimby MC. 1962. Established eurythermic line of fish

cells *in vitro*. Science. 135, 1065-1066.

Wurm FM. 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nat Biotechnol. 22, 1393-1398.



감사의 글

석사학위를 무사히 끝내기 위해서 힘든 일들이 많이 있었지만, 많은 분들의 도움덕분에 잘 해낼 수 있었다고 생각합니다. 이 논문을 완성하기 위해서 꼼꼼한 지도와 관심으로 저를 해주신 공승표 교수님께 감사의 표현을 먼저 드리고 싶습니다. 그리고 논문 심사를 위해서 관심을 가져주신 김종명 교수님과 남윤권 교수님께 감사드립니다. 수업을 통해서 많은 가르침을 주신 김동수 교수님, 김창훈 교수님, 배승철 교수님, 박정환 교수님 그리고 최윤희 교수님께도 감사드립니다.

실험하면서 모르는 것이 있을 때 물어보면 본인 실험이 바빠도 관심을 가져주신 우리 형, 준선! 아니 준형이 형 정말 감사합니다. 늘 에너지 넘치는 모습과 남 몰래 배려해주는 모습에 매일매일 배울 점을 주는 쿠광맨 지훈이, 실험실에서 가끔은 동생으로 가끔은 왕언니로 고민 상담해준 강닥 지혜, 실험실 일을 열심히 도와주고 지금은 호주에서 신나게 놀고 있을 막내 효령이 정말 고맙습니다. 늘 저를 동생으로 귀여워해주신 경묘누나 궁금한 것이 있거나 실험이 잘 안되면 해결방안을 제시해준 미진이 누나, 속이 깊은 바늘남 복기형, 늘 긍정적인 선영이 아니 신영이 감사합니다. 가장 가까워서 같이 고민해주고 기뻐해준 림여킴 여름이 정말 고맙습니다.

대학원 생활을 하면서 같이 지낸 동기들 은정이, 지원이, 하함이, 재현이, 준혁이형, 민혜, 은지, 연우형, 자홍이형 그리고 많은 선배님들과 후배님들께 감사합니다.

14년을 보아도 한결같은 일상패밀리 남훈이, 경택이, 용준이, 제일이 같이 있어줘서 늘 고맙습니다.

마지막으로 짧게 대화해도 내 마음을 이해해주고 말없이 믿어주는 친구

같은 우리 아빠, 아들이라는 두 글자 뒤에 있는 미안함에도 사랑으로 대
해주는 우리 엄마, 정이 많고 다재다능한 우리 효주 그리고 앞으로 많은
것들을 해낼 우리 지우 늘 감사하고 고맙습니다. 감사하는 마음에 보답하
고자 이 논문을 바칩니다.

