수산학석사 학위논문

돌돔(*Oplegnathus fasciatus*)으로부터 항산화 유전자군의 발굴 및 발현 특성 분석

이 논문을 [illegible] 제출함

2005년 2월

부경대학교 대학원

수 산 생 물 학 과

최 별 님

최별님의 수산학석사 학위논문을 인준함

2004년 12월 23일

주 심 이 학 박 사 김 동 수

위 원 이 학 박 사 김 종 명

위 원 수산학 박 사 남 윤 권

목 차

영문요약(Abstract) ····· i

표목차(List of Tables) ····· iii

그림목차(List of Figures) ····· iv

Ⅰ. 서 론 ····· 1

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 3

2.1. 돌돔 간(liver) 및 신장(kidney)조직으로부터 expressed sequence tag (EST)를 이용한 항산화효소 유전자의 탐색 ····· 3

2.1.1. 어류 조직 및 RNA 분리 ····· 3

2.1.2. cDNA library 제작 ····· 3

2.1.3. EST plasmid 클론 확보 ····· 4

2.1.4. DNA 염기서열 및 생물 정보 분석 ····· 4

2.2. Antioxidant enzyme (AOE) 유전자 클로닝 ····· 6

2.2.1. EST 클론의 선발 및 염기서열 분석 ····· 6

2.2.2. Vectorette PCR을 이용한 5'-region의 클로닝 및 염기서열 분석 ····· 6

2.2.3. Degeneracy primer를 이용한 목적유전자 클론의 분리 및 클로닝 ····· 6

2.3. AOE mRNA 발현의 조직분포 양상 분석 ····· 9
2.4. 중금속 처리에 의한 AOE mRNA의 발현 특성 분석 ····· 9
2.4.1. 중금속의 *in vivo* 노출 조건 ····· 9
2.4.2. Northern dot blot을 이용한 mRNA 정량분석 ····· 11
2.4.3. Semi-quantitative RT-PCR을 이용한 mRNA 정량분석 ····· 11

Ⅲ. 결 과 ····· 13
3.1. 돌돔 조직의 expressed sequence tag (EST) ····· 13
3.1.1. Liver의 발현특성 및 EST ····· 13
3.1.2. Kidney의 발현특성 및 EST ····· 14
3.2. MT 및 AOE 유전자 클로닝 ····· 18
3.3. AOE 유전자의 조직 발현 분포양상 ····· 22
3.4. 중금속 처리에 의한 AOE mRNA의 발현 특성 분석 ····· 30
3.4.1 Northern dot blot을 이용한 mRNA 정량분석 ····· 30
3.4.2. 카드뮴 농도별 injection 실험 ····· 30
3.4.3. 치어를 대상으로 한 카드뮴, 아연 immersion 실험 ····· 33
3.4.4. Time course 별 카드뮴 immersion 실험 ····· 36

Ⅳ. 논 의 ····· 38

국문요약 ····· 41
감사의 글 ····· 43
참고문헌 ····· 44

Molecular characterization and expression of antioxidant genes in rockbream (*Oplegnathus fasciatus*)

Byul Nim Choi

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

Abstract

Full-length complementary DNAs encoding metallothionein (MT) and antioxidant enzymes (AOE) were cloned from a marine fish species, rockbream (*oplegnathus fasciatus*) using expressed sequence tags (ESTs), RT-PCR and/or vectorette PCR. Open reading frames (ORFs) of rockbream MT, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferases (GST-alpha and theta), glutathione peroxidase (GPX) and thioredoxin reductase (TR) cDNAs encoded 180, 462, 1581, 669, 729, 462 and 1800 bp respectively. Deduced amino acid sequence of rockbream MT and AOEs shared relatively high homology with other vertebrate orthologues.

Transcripts of most AOE gene were ubiquitously detected in many tissues including brain, gill, intestine, kidney, liver, muscle, skin and spleen, although the expressed levels were variable among tissues.

Based on semi-quantitative RT-PCR and/or scanning densitometry of RNA dot blot hybridization, the transcriptional levels of MT and AOE genes were differentially affected by various experimental exposures to heavy metals. Intraperitoneal injections (0, 2.5, 5.0 or 10.0 mg $CdCl_2$ per kg body weight for 24 hours) and immersions treatments (0, 25, 50 or 100 μM of cadmium or zinc for 72 hours) revealed that (1) the transcriptional regulations of MT and AOE genes were quite dependent upon the different exposure conditions, (2) stimulation of MT, SOD and TR transcripts were more apparent than other AOE genes during heavy metal exposures, (3) the enhanced level of transcripts (MT, SOD and TR) were generally dependent upon the exposure doses of heavy metals, and (4) cadmium was more potent to induce the expression of MT and AOE than zinc. Immersion exposures at 25 μM for prolonged periods up to 14 days also showed that the levels of MT, SOD and TR transcripts were toward higher with longer durations and higher concentrations.

Results from the present study indicate that assessment of transcriptional activity of fish MT and AOE genes at mRNA level might be useful as a sensitive molecular biomarker system to address the oxidative stress caused by heavy metal pollutants in fish.

표목차(List of Tables)

Table 1. Summary of cDNA libraries constructed in this study ····· 5

Table 2. Putative antioxidant enzymes identified from EST screenings of rockbream ····· 7

Table 3. List of designed primers for the cloning of antioxidant enzyme genes ····· 10

Table 4. Summary of liver and kidney EST clones ····· 15

그림목차(List of Figures)

Figure 1. Clustering of rockbream liver and kidney ESTs based on putative best matched organisms. ····· 16

Figure 2. Functional clustering of rockbream liver and kidney ESTs based on putative annotations. ····· 17

Figure 3.1. Nucleotide sequence of MT cDNA and its deduced amino acid sequence. ····· 19

Figure 3.2. Putative model of protein three dimensional structure of rockbream metallothionein. ····· 20

Figure 4. Nucleotide sequence of superoxide dismutase (SOD) cDNA and its deduced amino acid sequence. ····· 21

Figure 5. Nucleotide sequence of catalase (CAT) cDNA and its deduced amino acid sequence. ····· 24

Figure 6. Nucleotide sequence of glutathione-S-transferase alpha (GST-α) cDNA and its deduced amino acid sequence. ····· 25

Figure 7. Nucleotide sequence of glutathione-S-transferase theta (GST-θ) cDNA and its deduced amino acid sequence. ····· 26

Figure 8. Nucleotide sequence of glutathione peroxidase (GPX) cDNA and its deduced amino acid sequence. ····· 27

Figure 9. Nucleotide sequence of thioredoxin reductase (TR) cDNA and its deduced amino acid sequence. ····· 29

Figure 10. Tissue distribution of AOE transcripts based on RNA dot blot analysis. ····· 31

Figure 11. Altered expression of SOD mRNA during experimental exposure to cadmium based on RNA blot hybridization. 32

Figure 12. Altered expression MT and AOE transcripts during acute cadmium exposure by intraperitoneal injection. 34

Figure 13. Effect of Cd and Zn - exposure by immersion on the transcriptional levels of MT and AOEs in liver of rockbream fry. 35

Figure 14. Time course expression of MT and selected AOEs during exposure to cadmium. 37

Ⅰ. 서 론

호흡대사를 하는 모든 생물은 체내에서 필연적으로 reactive oxygen species (ROS)가 생성되며 ROS가 적절히 제거되지 못하면 체내에 세포 구성성분인 지질, 단백질, DNA 등의 손상이 야기되며, 노화의 촉진 및 세포의 apoptosis가 유도된다(Kim et al., 1998). 따라서 생체는 이러한 산화성 스트레스(oxidative stress)로부터 자신을 방어하기 위한 항산화 시스템(anti-oxidant system)을 가지고 있다. 항산화 시스템은 glutathione (GSH), ascorbic acid (AsA), α-tocopherol 등의 저분자량 항산화 물질과 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) 등의 항산화효소 시스템으로 구성된다.

Antioxidant system은 ROS의 제거뿐만 아니라 외부의 스트레스에 대한 생체의 방어기작에도 관여하는 것으로 알려져 있으며 특히 수중생활을 하는 어류의 항산화효소 시스템은 수서환경의 위해성을 모니터링하는 생물학적 지표(biological marker)로서 큰 각광을 받기 시작하고 있다(McFarland et al., 1999; Wedderburn et al., 2000; Peters, 2001; Lionetto et al., 2003; Pandey et al., 2003; Siraj Basha and Usha Rani, 2003; George et al., 2004). 그러나 그 중요성에도 불구하고 어류 항산화효소의 유전정보에 대해서는 많은 연구가 진행되어 있지 못한 실정이며 대부분의 연구들은 조직에서의 효소활성 측정에만 주로 의존하고 있다. 때문에 어류에서 항산화 유전자들의 스트레스에 대한 전사기작의 규명은 물론 다양한 isotype으로 구성된 항산화효소의 발현기작 연구 역시 거의 미비한 실정이다.

따라서 본 논문은 어류 항산화 유전자의 발현기작 규명 및

biomarker로서의 활용을 위한 연구의 일환으로서 우리나라 주요 해산양식어종인 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*)으로부터 항산화효소 유전자들을 발굴하고 이들 유전자군의 생물정보를 수집하여 중금속 노출에 대한 mRNA 발현양상을 분석하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

2.1. 돌돔 간(liver) 및 신장(kidney) 조직으로부터 expressed sequence tag (EST)를 이용한 항산화효소 유전자의 탐색

2.1.1. 어류 조직 및 RNA 분리

cDNA library 구축을 위해 돌돔의 간 및 신장으로부터 해부학적 기법을 이용, 조직을 적출하였으며 각 조직으로부터Tripure reagent (Roche)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 total RNA의 순도를 확인하기 위해 OD 260/280 nm의 흡광도를 측정하였고 전기영동을 통해 18S rRNA ratio를 평가하였다. Total RNA로부터 mRNA의 분리는 mRNA isolation kit (Roche)을 이용하였으며 제조사의 manual에 의거하여 biotin-labelled oligo d(T)20과 streptavidin-coated magnetic particle을 이용, poly(A) fraction의 RNA를 분리하였다. 최종 분리된 5 μg의 poly(A) RNA를 cDNA 합성에 이용하였다.

2.1.2. cDNA library 제작

cDNA library는 ZAP-cDNA Synthesis Kit, ZAP-cDNA Gigapack Ⅲ Gold Cloning Kit (Stratagene)을 이용하여 제작하였다. StrataScript RT (Stratagene)를 이용하여, mRNA로부터 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA 말단은 *Pfu* DNA polymerase로 blunting한 후 EcoR I adaptor를 붙여준 후, phosphorylation하였으며, 반대쪽 말단에 Xho I 처리를 하여 cohesive end를 만들었다. 합성된 cDNA 단편들 중 600 bp 이상의 단편들만을 size fraction을 통해 회수하였고 size fraction이 끝난 후 cDNA

단편들은 Uni-ZAP XR vector에 ligation하였다. Gigapack Ⅲ Gold Packaging extract를 이용하여 bacteriophage 내로 packaging을 수행하였다. Primary cDNA library의 titer를 확인한 후, amplified cDNA library를 제작하였다(Table 1).

2.1.3. EST plasmid 클론 확보

cDNA library excised phage 1 ㎕와 10 mM $MgSO_4$에 suspension된 *E. coli* SOLR cell을 200 ㎕를 섞어준 후, 37 ℃에서 15분간 반응시켜 infection한 후, LB-ampicillin agar 배지에 도말하였다. cDNA를 포함하는 recombinant bacterial 클론들만을 무작위로 선발하였으며 이들로부터 alkaline lysis plasmid miniprep법을 이용하여 cDNA insert를 포함하고 있는 plasmid를 분리하였다. 분리한 plasmid는 0.7% gel에 gel electrophoresis를 통해 확인한 후 염기서열 분석에 이용하였다.

2.1.4. DNA 염기서열 및 생물 정보 분석

EST plasmid 클론은 ABI 3700 자동염기서열 분석기(Applied Biosystem, USA)를 이용하여 single-pass 염기서열 분석을 실시하였으며, 얻어진 raw sequence data는 염기서열 분석 프로그램인 Sequencher 3.1.1. (Gene Code Co. USA)을 이용하여 trimming을 수행하였다. Trimming된 insert의 염기서열을 이용하여 NCBI의 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov)내, BLASTx를 수행하여 GenBank에 등록되어 있는 유전자와의 상동성을 검색을 하였다. 가장 상동성이 높은 유전자 50개를 채택하여 organism과 기능별로 분석하였으며, 상동성 여부는 e-value $\leq 10^{-4}$ 인 유전자만 채택하였다. 유전자의 기능별 분류는 NCBI의 COGs를 model로 이용하였다. 각 EST 클론별로 수립된 생물정보와

Table 1. Summary of cDNA libraries constructed in rockbream

Tissue	Primary size (pfu/ml)	Amplified size (pfu/ml)
Liver	9.5×10^{5}	2×10^{9}
Kidney	5.18×10^{5}	8.5×10^{9}

염기서열 정보를 바탕으로 돌돔의 간 및 신장을 대상으로 데이터베이스를 구축하였다.

2.2. Antioxidant enzyme (AOE) 유전자 클로닝

2.2.1. EST 클론의 선발 및 염기서열 분석

돌돔 간과 신장의 EST DB를 검색하여 antioxidant enzyme 유전자들을 탐색하였다. 5′-UTR 및 전체 ORF를 보유하고 있는 full-length 클론의 경우에는 primer walking을 통해 cDNA의 3′-end까지의 전체 염기서열을 확보하였으며, 5′-end가 결손된 클론의 경우에는 결손된 부분을 vectorette PCR 등을 이용하여 전체 클론을 확보하였다(Table 2).

2.2.2. Vectorette PCR을 이용한 5′-region의 클로닝 및 염기서열 분석

선발된 EST 클론 중 5′-end의 결손을 갖는 클론들을 대상으로 vectorette PCR을 수행하였다. 5′-region을 클로닝하기 위해 염기서열을 이용, 각 클론별로 reverse primer를 디자인하였으며, 이들 insert가 포함된 vector의 multi-cloning 5′-end에 존재하는 SK primer를 forward primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. Vectorette PCR을 통해 증폭된 PCR product는 T-esay vector (Promega, USA)에 TA 클로닝 하였으며, *E. coli* XL-I blue MRF strain에 형질전환 시켰다. 형질전환 bacteria로부터 plasmid를 분리한 후 제한효소 처리 등을 이용하여 요구되는 insert의 클로닝 및 삽입이 이루어 졌는지를 확인하였다. 확인된 클론의 전체 insert의 염기서열은 상기 ABI 3700을 이용하여 분석하였다.

2.2.3. Degenerate PCR를 이용한 목적유전자 클론의 분리 및 클로닝

Table 2. Putative antioxidant enzyme gene (AOE) identified from EST screening of rockbream

GenBank #	Putative annotation	Best matcked organism	E-value
Q9PT92	Catalase	*Danio rerio*	1e-106
P24472	Glutathione-S-transferase alpha	*Mus musculus*	4e-58
NP_598755	Glutathione-S-transferase theta 3	*Mus musculus*	5e-63
AAL08414	Glutathione-S-transferase omega	*Takifugu rubripes*	1e-107
AAO86704	Glutathione peroxidase	*Danio rerio*	1e-80
AAO86703	Phospholipid hydroperoxide Glutathione peroxidase A	*Danio rerio*	2e-75
AAH54599	Thioredoxin reductase 1	*Danio rerio*	1e-106

EST 탐색에 의해 확보되지 못한 목적유전자들을 확보하기 위해서 degeneracy primer를 이용한 RT-PCR 클로닝을 수행하였다. MT는 NCBI의 GenBank에서 perciform의 MT sequence를 확보하여 multi-alignment를 수행하여 degeneracy forward primer인 uniMT 1F를 디자인하여 uniMT 1F/T7 primer로 vectorette PCR을 이용하여 284 bp의 3'단편을 클로닝하고, 그 sequence를 바탕으로 specific primer인 RBMT 1R을 디자인하여 SK/RBMT 1R로 vectorette PCR을 이용하여 277 bp의 5'단편을 클로닝하였다. 3'단편 sequence와 5'단편 sequence로 contig를 만들어 MT cDNA의 full sequence를 확보하였다. SOD는 어류와 포유류의 Cu/Zn SOD sequence를 확보하여 multi-alignment를 수행하여, degeneracy primer인 FISHSOD F1~8을 디자인하였다. 디자인한 SK/FISHSOD R1~8로 간조직의 total RNA에서 RT-PCR하여 1009 bp의 5'단편을 클로닝 하였으며, sequence에서 specific primer인 RBLSOD 1F와 T7 primer로 vectorette PCR을 이용하여 985 bp의 3'단편을 클로닝하여 3'단편 sequence와 5'단편 sequence로 contig를 만들어 SOD cDNA의 full sequence를 확보하였다.

해당 유전자별로 어류 및 포유류에서 밝혀진 염기서열을 바탕으로 다양한 조합의 degeneracy primer들을 합성, RT-PCR을 수행하였으며, 이중 가장 우수한 결과를 보이는 primer set를 선발하여 각 유전자의 cDNA 단편을 확보하였다. RT-PCR은 AccuPower RT-PCR pre-mix (Bioneer, Korea)를 이용하였으며, 유전자별로 증폭조건을 다양하게 조절하여 최적조건을 결정하였다. RT-PCR 산물은 T-easy vector (Promega)에 TA 클로닝 후 염기서열을 결정하였고 BLAST 검색을 통해 해당 유전자와의 충분한 상동성이 존재하는지를 검색하였다. 확보된 단편의 염기서열을 바탕으로 5'-end 및 3'-end 부분까지의 full-length 염기서열 및

클론을 확보하기 위해 vectorette PCR을 이용하였다. 최종 확보된 전체 염기서열을 이용하여 각 해당 유전자별로 상동성 및 기타 생물정보 분석을 실시하였다. 유전자의 클로닝 및 분석에 사용된 primer의 정보는 Table 3에 나타내었다.

2.3. AOE mRNA 발현의 조직분포 양상 분석

각 AOE 유전자의 조직 발현 양상을 알아보기 위하여 돌돔의 간, 신장, 표피, 근육, 장, 뇌, 비장, 아가미로부터 Tripure reagent (Roche)를 이용하여 total RNA를 분리한 후 RNA dot blot을 수행하였다.

RNA dot blot은 nylone membrane에 1 $\mu g/\mu \ell$ total RNA를 0.5 $\mu \ell$씩 조직별로 3반복으로 spotting 한 후, UV-crosslinker를 사용하여 고정화 시켰다. 각 목적 유전자별로 dig-labeled된 probe를 제작하였으며, 해당 probe를 이용하여 50 ℃에서 16시간동안 hybridization반응을 실시하였다. Hybridization이 끝난 membrane을 low stringency buffer (0.1% SDS, 2x SSC)로 2반복으로 실온에서 5분간 wash하였으며, high stringency buffer (0.1% SDS, 0.1x SSC)로 68 ℃에서 10분간 wash하였다. 제조사(DIG-DNA Labeling & Detection Kit, Roche, Germany)의 manual에 의거하여 blocking, antibody 처리 및 signal detection을 수행하였다. Signal 검출이 완료된 membrane은 scanning densitometry를 통해 Quantity-One program (BioRad, USA)으로 분석하였다.

2.4. 중금속 처리에 의한 AOE mRNA의 발현 특성 분석

2.4.1. 중금속의 *in vivo* 노출 조건

첫 번째 *in vivo* 실험에서는 돌돔(평균 어체중: 150 g)의 복강에 0,

Table 3. List of designed primers for the cloning of antioxidant enzyme genes

Gene	Primer label	Primer sequence (5'-3')
MT	RBMT 1F	GACTCAACACACATCACCTG
	RBMT 1R	GAGCCTGTGTGAACTACTTC
SOD	RBLSOD 1F	GGTACTCAAGGCTGTATGTG
	RBLSOD 1R	AGCATTGCCCGTCTTTAGAC
CAT	RBLCAT 1F	TCCAGATCATGACCTTCGAG
	RBLCAT 1R	CTGTTGTAACGTGCCACATC
GST-α	RBLGST01 1F	CTGATTTCCCCAAGACAGCT
	RBLGST01 1R	TCAAACACAGGAAGGTAGCG
GST-θ	RBLGST02 1F	GTCTTCATGTTTGCCAAAGC
	RBLGST02 1R	CAGGCTGCATGATCTCAACT
GPX	RBLGPx-1 1F	ACAGCCAAGCTGCTATCTGG
	RBLGPx-1 1R	GGACTGACCAGGAACTTCTC
TR	RBLTR 1F	ACTACGACCTGATCGTCATC
	RBLTR 1R	GGTGATGCAGTACTCCTTGT

2.5, 5, 10 mg/kg의 카드뮴을 injection하여 18 ℃의 사육수에서 24 hr 동안 순치시킨 후에 간과 신장을 적출하여 분석에 이용하였다.

두 번째 *in vivo* 실험은 돌돔 치어(평균 어체중: 2-3 g)를 대상으로 중금속 종류와 농도를 다르게 하여 처리하였다. 실험어에 아연, 카드뮴을 25, 50, 100 μM로 72 hr 동안 immersion하였으며 72 hr 후, 간과 신장을 적출하여 분석에 이용하였다.

세 번째 *in vivo* 실험은 돌돔(평균 어체중: 150 g)을 0, 1, 4, 7 및 14일 동안 카드뮴을 처리하였다. 카드뮴은 18 ℃에서 25 μM로 immersion하였다. 실험어는 0, 1, 4, 7 및 14일자에 간조직을 적출하여 분석에 이용하였다.

2.4.2. Northern dot blot을 이용한 mRNA 정량분석

목적유전자를 분석하기 위한 적합한 조직을 선택하기 위하여 간, 신장 및 아가미를 대상으로 northern dot blot을 수행하였다. 카드뮴을 time course별로 immersion 처리하여 간, 신장 및 아가미의 total RNA를 정량한 후 nylone membrane에 1 μg씩 spotting하여 고정화하였으며, SOD probe로 분석하였다. Hybridization 반응과 detection 과정은 2.3에서와 동일하게 수행하였다.

2.4.3. Semi-quantitative RT-PCR을 이용한 mRNA 정량분석

분리된 total RNA를 대상으로 DNA의 오염을 제거하기위해 DNase처리한 후 300-500 ng씩을 RT-PCR에 이용하였다. Primer는 각 유전자별로 1F/1R을 사용하였다(Table 2). 목적유전자의 발현양상을 normalization하기 위해서 internal control로서 elongation factor-alpha (EF-α) 또는 beta-actin (β-actin) 유전자를 이용하였다. RT-PCR에 앞서

semi-quantitative 조건을 충족시키기 위해 각 유전자별 PCR cycle 수, PCR 조건 및 input RNA양 등을 최적화하였다. PCR pre-mix (Bioneer, Korea)을 사용하였으며, 증폭된 산물은 1.5% agarose gel에 PCR 산물 8 $\mu\ell$를 전기영동하여 확인하였다. 목적유전자 및 internal control의 증폭 산물의 상대 발현양을 분석하기위해 image analysis software인 Quantity-One (BioRad)을 이용하였다.

Ⅲ. 결 과

3.1. 돌돔의 조직의 Expressed Sequence Tag (EST)

3.1.1. Liver의 발현특성 및 EST

돌돔의 간조직을 대상으로 EST를 수행한 결과 총 548개의 cDNA 클론에서 염기서열을 분석하였다. BLASTx를 사용하여 GenBank에 등록된 유전자와 상동성을 비교하였으며, 이를 토대로 e-value의 분포를 조사한 결과, e < 10^{-100}인 클론이 12.2%, 10^{-100}≤ e <10^{-50}인 클론이 35.6%, 10^{-50}≤ e <10^{-10}인 클론이 29.2%, 10^{-10}≤ e <10^{-4}인 클론이 3.5%였다. e-value < 10^{-4}의 높은 상동성을 나타내는 클론이 441개였으며, e > 10^{-4}의 낮은 상동성을 보이거나(16.4%) match되는 유전자가 없는(3.1%) 클론은 107개였다. GenBank상에 match되는 cDNA 중에서 singleton은 250개, unique gene은 327개였다.

E-value < 10^{-4}의 클론을 대상으로 다음과 같이 10개의 그룹으로 function에 따라 clustering하였다.

(Ⅰ) Genbank에 등록된 유전자와 match되지 않는 그룹
(Ⅱ) 기능이 알려지지 않거나 일반적이 기능만 추측되는 그룹
(Ⅲ) DNA의 복제, 전사, 번역에 관여하는 그룹
(Ⅳ) RNA의 processing과 modification에 관여하는 그룹
(Ⅴ) 면역, chaperones, 항상성 및 방어기작에 관여하는 그룹
(Ⅵ) Signaling, secretion, communication에 관여하는 그룹
(Ⅶ) 세포의 구조, 분열, 운동성에 관여하는 그룹

(Ⅷ) 일반적인 대사과정에 관여하는 그룹

(Ⅸ) Chromatin과 핵 구조에 관여하는 그룹

(Ⅹ) 분류하기 힘들거나 복합적인 기능을 하는 그룹

상동성이 낮거나 match되지 않는 (Ⅰ) 그룹이 20%, (Ⅱ) 그룹이 23%, (Ⅲ) 그룹이 2%, (Ⅳ) 그룹이 10%, (Ⅴ) 그룹이 24%, (Ⅵ) 그룹이 4%, (Ⅶ) 그룹이 2%, (Ⅷ) 그룹이 10%, (Ⅸ) 그룹은 0.18%, (Ⅹ) 그룹은 5%였다. (Ⅰ), (Ⅱ) 그룹을 제외하고, 면역 기능과 관련된 유전자 그룹이 높은 비율을 차지하였다. 가장 높은 상동성을 보이는 organism별로 clustering한 결과 zebrafish를 제외한 어류가 56%로 가장 높았고, 사람을 제외한 포유류가 13%, 사람이 12%, zebrafish가 10% 순으로 나타났다(Figure 1, 2; Table 4).

3.1.2. Kidney 조직의 발현특성 및 EST

신장조직에서는 총 294개의 클론에서 EST를 수행하였다. Match되는(e-value < 10^{-4}) 클론이 207개, match되는 유전자가 없거나 상동성이 낮은 cDNA는 87개였다. 신장조직의 ESTs를 대상으로 e-value의 분포를 조사한 결과, e < 10^{-100}인 클론이 19%로 간에 비해 높았으며, $10^{-100} \leq$ e <10^{-50}과 $10^{-50} \leq$ e <10^{-1}이 25.5%, 23.1%로 조금 낮은 비율을 나타내었다. $10^{-10} \leq$ e <10^{-4}인 클론은 2.7%였으며, e > 10^{-4}의 낮은 상동성을 보이는 클론과 match되지 않는 클론이 24.8%, 4.8%로 간에 비해 높게 나타내었다. Match되는 cDNA 중에서 singleton은 239개, unique gene은 260개였으며, function별로 clustering한 결과 간에 비해 e-value의 분포비율에서와 마찬가지로 (Ⅰ) 그룹이 37%로 높게 나타났으며, (Ⅷ) 그룹이 18%로 높은 비율을 차지하였고, (Ⅴ) 그룹은 간에 비해 낮게 나타내었다.

Table 4. Summary of liver and kidney EST clones

	Liver	Kidney
Total number of cDNAs sequenced	548	294
Matched ESTs †	441	207
Nonredundant unmatched ESTs	250	239
Number of unique genes	327	260

† e-values < 1.00E-4.

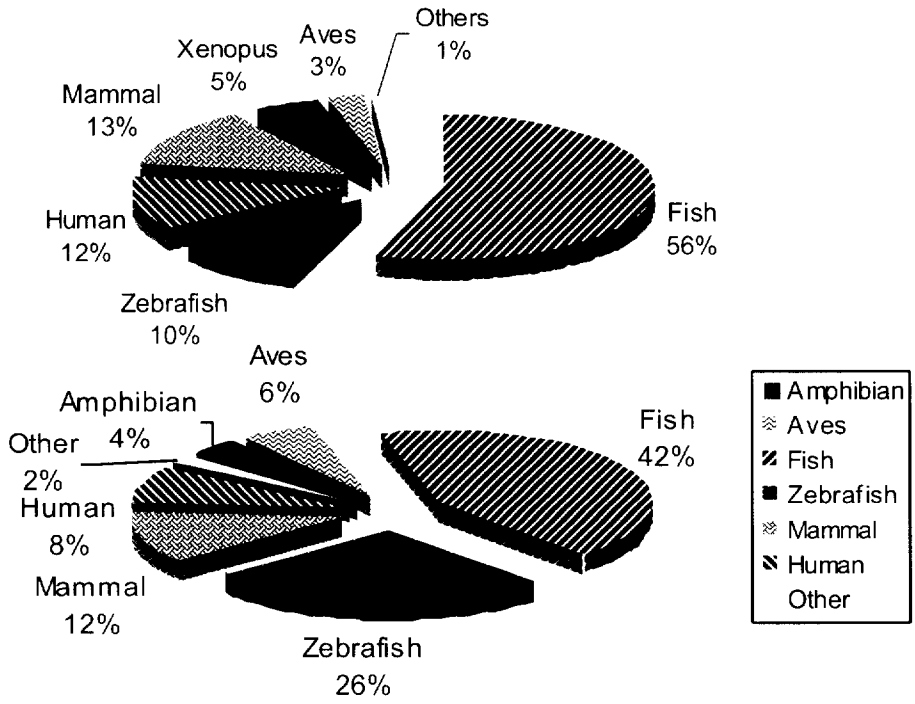

Figure 1. Clustering of rockbream liver and kidney ESTs based on putative best matched organisms.

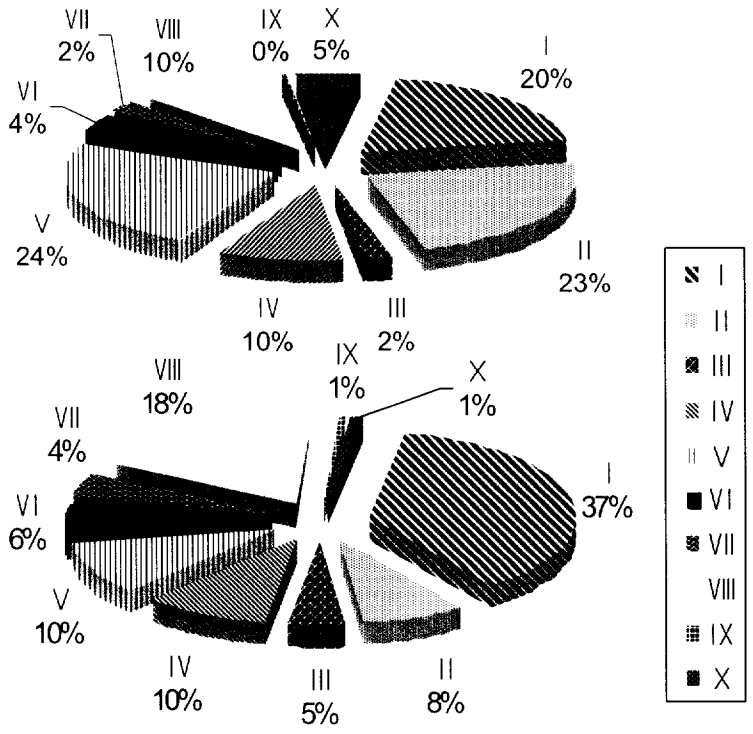

Figure 2. Functional clustering of rockbream liver and kidney ESTs based on putative annotations.

(Ⅰ) No hits or had poor similarity
(Ⅱ) Function unknown or general function prediction only
(Ⅲ) DNA replication, transcription, translation
(Ⅳ) RNA processing and modification
(Ⅴ) Immune function, chaperones
(Ⅵ) Cell signaling, secretion and communication
(Ⅶ) Cell structure, division and motility
(Ⅷ) General metabolism
(Ⅸ) Chromatin and nuclear structure
(Ⅹ) Unassigned class and multiple function

Organism별로 clustering한 결과 간과 마찬가지로 fish가 42%로 가장 높았으며, zebrafish가 26%로 높게 나타났다(Figure 1, 2; Table 4).

3.2. MT 및 AOE 유전자 클로닝

돌돔의 간에서 분리한 MT mRNA는 염기서열을 분석한 결과 180 bp가 60개의 아미노산을 코딩하고 있었으며, 20개의 cysteine 잔기가 잘 보존되어 있었다. 34 bp의 5'-UTR과 162 bp의 3'-UTR을 확인할 수 있었으며, poly (A) sequence의 11 bp 앞에 polyadenylation signal sequence인 AATAAA가 위치하였다(Figure 3.1). 아미노산 서열을 토대로 단백질 3차 구조 예측 모델을 분석한 결과 amino-terminal α-domain과 carboxy-terminal β-domain을 확인할 수 있었다(Figure 3.2).

SOD는 $2 \cdot O^{-}_{2}+2H^{+} \rightarrow 2H_2O_2+O_2$ 반응에 작용하는 효소로서 superoxide의 제거에 주도적인 역할을 한다. Prosthetics group에 따라서 isoform이 결정되며, Cu/Zn SOD, MnSOD, FeSOD, NiSOD, Fe/Mn SOD, Fe/Zn SOD의 isoform이 존재하며 간에서 분리한 SOD는 Cu/Zn SOD로 추정된다. 분리된 SOD의 염기서열을 분석한 결과 5'-UTR이 27 bp이며 462 bp가 154개의 아미노산을 코딩하고 있었으며 3'-UTR은 309 bp이며 poly (A) sequence의 16 bp 앞에 polyadenylation signal sequence인 AATAAA가 위치하였다. 154개의 아미노산 서열에서 구리와 아연의 binding site로서 6개의 histidine 잔기와 1개의 asparagine 잔기가 잘 보존되어 있었으며. disulphide bond를 형성하는 2개의 cysteine 잔기와 superoxide radical을 인식하는 arginine 잔기를 확인할 수 있었다(Figure 4).

Catalase는 SOD에 의해 생성된 과산화수소를 물과 산소로 변화는 촉매반응을 담당하며, SOD와 함께 강력한 항산화 효소로 작용한다. 돌

tgacactgaagactcaacacacatcacctgaaac

ATGGACCCTTGCGACTGCTCCAAGAGTGGAACCTGCAACTGCGGAGGATCCTGCAAGTGC

M D P C D C S K S G T C N C G G S C K C

ACAAACTGCTCTTGCACCACCTGCAAGAAGAGCTGCTGCTCATGCTGCCCATCTGGCTGC

T N C S C T T C K K S C C S C C P S G C

AGCAAGTGCGCCTCTGGCTGCGTGTGCAAAGGGAAGACTTGTGACACCAGCTGCTGTCAG

S K C A S G C V C K G K T C D T S C C Q

taaaaggagcctgcaacatcagccctctgctgcccctgtgatggagcctgtgtgaactacttcgaa

ttaattgcaattgtctatagggaatgatgtcttttgtacttgtcttcaatgttta**ataaa**catgt

ttcctt**aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa**

Figure 3.1. Nucleotide sequence of MT cDNA and its deduced amino acid sequence (showm in single-letter code).

Coding region is noted as uppercases while non-coding region lower cases. Putative polyadenylation signal is underlined and bolded.

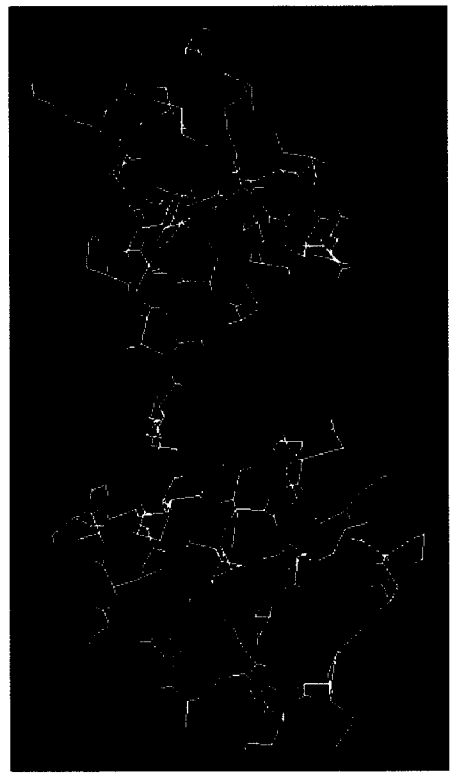

Figure 3.2. Putative model of three dimensional structure of rockbream metallothionein.

ggcacgagggttgaaactactgcaaag

ATGGTACTCAAGGCTGTATGTGTGTTGAAAGGAGCCGGAGAGACCACCGGGACCGTTTAT

M V L K A V C V L K G A G E T T G T V Y

TTTGAGCAGGAGAGTGACTCGGCCCCTGTGAAGCTGACAGGAGAAATCAAAGGCCTCACC

F E Q E S D S A P V K L T G E I K G L T

CCCGGTGAGCATGGTTTCCATGTCCATGCTTTTGGAGACAATACAAACGGGTGCATCAGT

P G E H G F H V H A F G D N T N G C I S

GCAGGCCCTCACTTCAATCCCCACAACAAAAATCATGCTGGTCCTAATGATGCAGAGAGG

A G P H F N P H N K N H A G P N D A E R

CATGTTGGAGACCTGGGGAATGTGACTGCAGGAGCAGATAATGTTGCCAAGATAGACATC

H V G D L G N V T A G A D N V A K I D I

AAGGACCACATAATCACCCTCACTGGCCCCGACTCCATCATTGGCAGAACCATGGTGATC

K D H I I T L T G P D S I I G R T M V I

CATGAGAAGGCCGATGACCTGGGAAAAGGAGGCAATGAGGAGAGTCTAAAGACGGGCAAT

H E K A D D L G K G G N E E S L K T G N

GCTGGTGGACGTCTGGCCTGTGGAGTCATTGGCATCACCCAGtaaatccgccaggacatg

A G G R L A C G V I G I T Q *

gagcactggaaacaacttttcccctcagcacttaataagaccaaccttgctacttgatgtgacag

tttgtccttttcagtactctggctttttatcaactagtcaagagagtagatgagccatgctttac

cctgtccgttcttcatgacaattgtatgtgtgggtttatatgtctgctgattagttttggtccca

aagaattggtaacgcacaagtaataaacagatgtatgcagtttacaaagctaatc**aataaa**ttgt

cagttcatctg**aaaaaaaaaaaaaaaaaaaa**

Figure 4. Nucleotide sequence of superoxide dismutase (SOD) cDNA and its deduced amino acid sequence (shown in single-letter code).

돔의 catalase cDNA의 염기서열은 Figure 5에 나타내었다. Catalase의 5′-UTR이 23 bp이며 1581 bp가 527개의 아미노산을 코딩하고 있으며, 3′-UTR은 1447 bp이며, poly (A) sequence의 15 bp 앞에 polya -denylation signal sequence인 ATTAAA가 위치하였다(Figure 5).

GST는 아미노산 서열의 상동성에 따라 8개의 class (alpha, mu, pi, theta, sigma, omega, kappa, zeta)로 나누어지며 본 연구에서는 GST-α와 GST-θ의 cDNA를 규명하였다. GST-α는 5′-UTR이 80 bp이며 669 bp가 273개의 아미노산을 코딩하고 있으며, 3′-UTR은 276 bp이며 poly(A) sequence의 17 bp 앞에 polyadenylation signal sequence인 AATAAA가 위치한다(Figure 6). GST-θ는 5′-UTR이 20 bp이며 729 bp가 243개의 아미노산을 코딩하고 있으며, 3′-UTR은 519 bp이며 polya -denylation signal로 예측되는 sequence가 ATTAAA, AATAAA로 2군데 존재하였다(Figure 7).

GPX는 168 bp의 5′-UTR, 142개의 아미노산을 코딩하고 있는 462 bp의 ORF, 388 bp의 3′-UTR로 구성되어 있으며 poly (A) sequence의 22 bp 앞에 polyadenylation signal sequence인 AATAAA가 확인되었다 (Figure 8).

TR은 5′-UTR이 207 bp이며 1800 bp가 600개의 아미노산을 코딩하고 있으며 1167 bp의 굉장히 긴 3′-UTR을 가지고 있었다. Poly (A) sequence의 13 bp 앞에 polyadenylation signal sequence인 AATAAA가 위치하였다(Figure 9).

3.3. AOE 유전자의 조직 발현 분포양상

SOD mRNA는 조사한 모든 조직들에서 발현하였으며, 특히 뇌, 신장, 비장에서 높게 발현하였고, 아가미, 장, 간, 근육, 표피에서는 비교적

gtttggtctaagcgtctgtcgag

ATGGCTGACAACAGAGGCAAAGCTACCGATCAAATGAAGACATGGAAGGAGAACAGAAGC

M A D N R G K A T D Q M K T W K E N R S

AGTCAGAGGCCAGACACACTGACCACAGGAGCTGGCCATCCCGTTGGAGACAAGCTGAAC

S Q R P D T L T T G A G H P V G D K L N

CTGCAGACTGCAGGGCCGAGGGGTCCTCTGCTGGTCCAAGATGTGGTCTTCACAGATGAG

L Q T A G P R G P L L V Q D V V F T D E

ATGGCCCACTTTGACCGGGAACGAATCCCAGAGAGAGTGGTGCATGCCAAAGGGGCAGGG

M A H F D R E R I P E R V V H A K G A G

GCGTTTGGCTACTTTGAGGTGACTCACGACATCACTCGCTACTGCAAGGCCAAGGTGTTT

A F G Y F E V T H D I T R Y C K A K V F

GAGCATGTCGGCAAGACTACGCCTATCGCTGTCCGCTTCTCCACTGTGGCTGGTGAATCA

E H V G K T T P I A V R F S T V A G E S

GGATCAGCAGACACAGTGCGAGACCCCCGAGGCTTTGCAGTCAAGTTTTACTCTGAGGAG

G S A D T V R D P R G F A V K F Y S E E

GGCAACTGGGACCTGACGGGCAACAACACCCCCATTTTCTTCATCAGGGATGCCCTGCTG

G N W D L T G N N T P I F F I R D A L L

TTCCCGTCCTTCATCCACTCCCAGAAGCGCAATCCCCAAACCCACATGAAAGACCCCGAC

F P S F I H S Q K R N P Q T H M K D P D

ATGGTGTGGGACTTCTGGAGCCTGAGGCCTGAGAGTCTGCATCAGGTGTCTTTCTTGTTC

M V W D F W S L R P E S L H Q V S F L F

AGCGATCGAGGTTTGCCCGATGGCTACCGTCACATGAACGGCTACGGCTCTCACACGTTC

S D R G L P D G Y R H M N G Y G S H T F

AAACTGGTCAATGCCGCTGGCGAGCGTTTCTACTGCAAGTTCCACTTCAAGACTGATCAA

K L V N A A G E R F Y C K F H F K T D Q

GGAATAAAGAATCTGCCAGTGGAGGAGGCAGACCGCCTGGCCTCCACCAACCCAGATTAT

G I K N L P V E E A D R L A S T N P D Y

GCCATTGGAGACCTGTTCAACGCCATTGCCAACGGCAACTGCCCATCCTGGACCTTCTAC

A I G D L F N A I A N G N C P S W T F Y

ATCCAGATCATGACCTTCGAGCAGGCCGAGAAGTTCCGGTTCAACCCCTTCGATCTTACC

I Q I M T F E Q A E K F R F N P F D L T

AAGATTTGGTCACATAAAGAGTACCCCTTGATCCCCGTGGGCAAAATGGTACTCAACAGG

K I W S H K E Y P L I P V G K M V L N R

AACCCAGTCAACTACTTTGCAGAGGTGGAGCAGCTGGCCTTTGACCCCAGCAACATGCCA

N P V N Y F A E V E Q L A F D P S N M P

CCGGGCATCGAGCCGAGCCCCGACAAGATGCTGCAGGGTCGCCTCTTCTCCTACCCAGAC

P G I E P S P D K M L Q G R L F S Y P D

ACACATCGACACCGGCTGGGAGCCAACTACCTACAGATCCCCGTCAACTGCCCCTTCAGG

T H R H R L G A N Y L Q I P V N C P F R

GCCCGTGTGACCAACTACCAGCGTGATGGTCCGATGTGCATGTTTGACAACCAAGGTGGA

A R V T N Y Q R D G P M C M F D N Q G G

Countinued next page.

GCTCCAAACTACTATCCCAACAGCTTCAGTGCCCCAGAGACCCAGCCGCAGTTTGTGGAG
A P N Y Y P N S F S A P E T Q P Q F V E
TCCAAGTTCAAGGTGTCTCCAGATGTGGCACGTTACAACAGTGCAGATGAAGATAATGTC
S K F K V S P D V A R Y N S A D E D N V
ACACAGGTCCGTACCTTCTACACTCAGGTGCTGAACGAAGAGGAGCGCCAGAGACTTTGC
T Q V R T F Y T Q V L N E E E R Q R L C
CAGAACATGGCAGGGGCCCTGAAGGGAGCCCAGCTCTTCATCCAAAAACGCATGGTCGAG
Q N M A G A L K G A Q L F I Q K R M V E
AACTTGAAGGCTGTCCATCCAGACTATGGAAACAGGGTTCAGACTCTTCTCAACAAGTAC
N L K A V H P D Y G N R V Q T L L N K Y
AATGCGGAGGCCCAGAAGAACACAACTGTGCATGTTTACAGCCGTCCAGGAGCCTCGGCC
N A E A Q K N T T V H V Y S R P G A S A
ATCGCTGCGTCCTCCAAGATGtgatgccttaaatttcaaccaggggcgtccccctcatttatct
I A A S S K M *
aagagcaaatgcacttattgattaccaactgcttctaccagttacaagattggacttaactttccg
attaccattagtggcaagactgaaatactaaccttgtagtgtcagggttggggttagttcatattt
aatttagtcactctgaacagttgatttttcttcaattctcaaagctagcaatattcatgaggctct
tgatctctgacaaaaccctgttgggtaaacttgtcttgattgaacagctgttttgaaaaaattcac
caggatttgtttgttttttataaattgaaacatagactaccattgaccgatgactgtttggtata
taccaaaaacatgccaaacttgagtgctcaacttttaccacataaagccttaaaggaatttaaaag
tattgtattttatttgcattttgatttgattgcattaaatcaattaaccctaactactgttaagta
ctataatgagcaatgattgtttccaataattactcaggttgtgtgtgtgtgtgctactatgttg
tgatgatccaactcttttctttagctaaagtttaaagaaaacaaatccagctaaaatgtcttctgt
taacattcaaataacatttgttaaaaaaaacaaaatctgtcatgccggacgtgtaccgcgtgaatc
ttgaatctgggttcaagttggtaaaataccttgatttgttatgcaggattggcttttggctttgct
aatgccagtggtttgtttcactatggcaataataagctagttttcactcatgcttgactgaaccac
tgataatttgaatgcaccacagacaataattatgaaaaacagtttgtttaattttaaatgagtaga
gttccaatgagaaaccctgccagtcttactattagctgtttctttgtgggcgtctgcatatcatga
agagcaagtttcaagatgaggaattattttcactgcaactggaaatctttagtgccttttttgtg
tactaaaactaccaaatacagattacatcatccttaaactggaagaatcagttatgaattgctctc
tgttcgatattgcagttctcaatgtaatatctgtgtaaagagaactgtacattagtgccatcagta
acttaatgattaaagatgtaaattggcagtaagtgactaataagttctgatctgaaatgatttgaa
atgaataactgcccagtaattccatcctgttgtggtttcattagcattaaacgtaccatgtaacct
gccattgttgtgtatttgtaaactctcaaatgttctcaaaattatttttttttattaatgtccaag
ttgtgaacctctttcagatgagatgtgtattgagtgcctgtattaattaaattgtaatcaaagctt
aaaaaaaaaaaaaaaaa

Figure 5. Nucleotide sequence of catalase (CAT) cDNA and its deduced amino acid sequence (shown in single-letter code).

ctcacttcaccctg
atttccccaagacagctgcggcggtgcacagcttaagatatttacattcccaaaaatactatagcc
ATGGCTGGAAGAGTTGTGCTGCACTACTTCAATGGGAGAGGGAAAATGGAGTCAATCCGC
M A G R V V L H Y F N G R G K M E S I R
TGGCTTTTGACAGTTGCAGGGGTTGAGTTTGATGAGATGTATCTGACAACGCGTGACCAG
W L L T V A G V E F D E M Y L T T R D Q
TATGAAAAACTCTTGAGTGATGGAGCTCTCATGTTCCAACAGGTTCCCATGGTGGAAATC
Y E K L L S D G A L M F Q Q V P M V E I
GATGGCATGAAGCTTGTTCAGACAAAGGCAATCCTGAATTACATCGCAGAGAAGTACAAC
D G M K L V Q T K A I L N Y I A E K Y N
CTTCATGGAACCAATCCCAAAGACCGCGTCACGATCAACATGTACTGCGAGGGGGTGATG
L H G T N P K D R V T I N M Y C E G V M
GATCTCATGGAAATGATCATGATGTTGCCCTTCAGCACAGATCCAAAAGAAAAACTGGAC
D L M E M I M M L P F S T D P K E K L D
ACCATTCAAACTAAAGCAAAGGAGCGCTACCTTCCTGTGTTTGAAAAGGCACTGACTGGG
T I Q T K A K E R Y L P V F E K A L T G
CCCATATACCTGGTGGGAGGTAAACTAAGCTGTGCAGATGTGCAGCTGGTTGAATGCACC
P I Y L V G G K L S C A D V Q L V E C T
CTGATGTTGGAGGAGAAGTTTCCTGGAATCCTTGCCGACTTCCCCAACCTAAAGTCTTTC
L M L E E K F P G I L A D F P N L K S F
CAGGGCAGGATGACCCTGCTTCCCGCCATCAGCAGGTTCCTGCAGCCAGGCAGCAAGAGG
Q G R M T L L P A I S R F L Q P G S K R
AAGCCGCAGCCAGATGAAACCTACGTGAAGACCATCATGGAGGTGTTCAAAATCCAATTT
K P Q P D E T Y V K T I M E V F K I Q F
CCACTGAAGtgaacgatataaaagatccggtccagtcctcacataggcagcgtgaatgattcact
P L K *
atgcaagcatagcacgtacggcatgtggatcaattatatgtgctgctttatgttaacatgaatact
gccctatccatcactaaagaacaaatctatttagcccgaaaggaatctatgtagtctttcataaca
tcatacaggtgttttaatgtgaaggctctacctaataaagtgtttatttttgaggaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Figure 6. Nucleotide sequence of glutathione-S-transferase alpha (GST-α) cDNA and its deduced amino acid sequence (shown in single-letter code).

```
                                                    tgcagccttcagactctgac
ATGATGGAGCTCTATCTCGACCTGCACTCTCAGCCCTGCCGCTCCGTCTTCATGTTTGCC
 M  M  E  L  Y  L  D  L  H  S  Q  P  C  R  S  V  F  M  F  A
AAAGCGGTCGGGATTCCCTTTGAGTTCAAGCTTGTGGACCTCACTTCAGGACAGCAGTAC
 K  A  V  G  I  P  F  E  F  K  L  V  D  L  T  S  G  Q  Q  Y
GGCGAGGAGTTTGGAAAAATCAGCATCTTGAAGAAGGTTCCTGTGATGAAGGATGGAAGC
 G  E  E  F  G  K  I  S  I  L  K  K  V  P  V  M  K  D  G  S
TTCATCCTGGCGGAAAGCGTTGCGATCCTGAAGTACATGGTGCAGAAACATTCGTCGTCA
 F  I  L  A  E  S  V  A  I  L  K  Y  M  V  Q  K  H  S  S  S
GTGGCAGATCACTGGTATCCAGCCGACCTGCAGCAGCGAGCTCGTGTTAATGAATACCTG
 V  A  D  H  W  Y  P  A  D  L  Q  Q  R  A  R  V  N  E  Y  L
TGCTGGCAGCACGTCAACCTCCGAGCTCACGGCTCAAAGGTCTTCCTGCTCAGGGCCATG
 C  W  Q  H  V  N  L  R  A  H  G  S  K  V  F  L  L  R  A  M
TTTCCTGTCATCATGGACATGGAGGTCCCGAAGGAGAAGATGGACGCTGCGGTCGAGGAT
 F  P  V  I  M  D  M  E  V  P  K  E  K  M  D  A  A  V  E  D
CTGAATCAGTCGCTCAACCTGCTGGAGGAGAAATTCCTGCAGAGCAAACCGTTCATCATC
 L  N  Q  S  L  N  L  L  E  E  K  F  L  Q  S  K  P  F  I  I
GGCGACAAAATCTCTCTGGCTGATCTGGTGGCTATAGTTGAGATCATGCAGCCTGTTGGA
 G  D  K  I  S  L  A  D  L  V  A  I  V  E  I  M  Q  P  V  G
GCTGGCCTGGATGTGTTCGAAGGCCGGCCGAAGCTGACCGCCTGGAGAGAGCGAGTGAAG
 A  G  L  D  V  F  E  G  R  P  K  L  T  A  W  R  E  R  V  K
AAGGCGGTCGGTGAGAAGTTGTTTGACGAAGCTCACGACGTGGTCATGAAGGTGAGCAGC
 K  A  V  G  E  K  L  F  D  E  A  H  D  V  V  M  K  V  S  S
CTGCCGGAGAGGATGCAGAACAGCAAACAGCTGGAGATGCTCAAACCGAGGTTTCGGAAG
 L  P  E  R  M  Q  N  S  K  Q  L  E  M  L  K  P  R  F  R  K
CTTTTCAGCtgaagaagtttctgtgtacaaacagacacgatacgacttgtcaaagatgtcaaaaa
 L  F  S  *
tgatcttcatttgtttttaatttcatggttgtttgatgatttttattagcaggtttgtcatgaagt
actgagaaatcatttaaccagctttcatgtattaaaatgttaatgtgaaaactgtgcagctgtgag
tccacataaaatgtctcatgtctcatggattaagtctctacttgcagaaattaaacataatttgat
ttgccaacagaagaatctttattttcatgcagtaaattctgaacaaaatctaaaaacgtactaaat
ggaaactggaactctgaagtttgctttcagaactgttcagccgggaatattcaccagaagaatgaa
gacaaatatgctcattgtgtattaaagatgtatttccttcctgctaaactgatatgaatgaatgct
catttattatccctgtacaaaaatattaaaatgaagcatcaaaataaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaa
```

Figure 7. Nucleotide sequence of glutathione-S-transferase theta (GST-θ) cDNA and its deduced amino acid sequence (shown in single-letter code).

```
                                                gttcatccggagttagagagaatggctgggaatgtc
agaaggttttacgacctgacagccaagctgctatctggagaaagcttcagcttctctgcgctgaag
gggaaagttgtcctcattgagaatgtggcgtctctttgaggaacaacaaccagggactacacgcag
ATGAACGAGCTCCACAATCGGTACTCCGCCAAGGGACTCGTTATTCTGGGTGTGCCCTGC
 M  N  E  L  H  N  R  Y  S  A  K  G  L  V  I  L  G  V  P  C
AATCAGTTTGGACATCAGGAGAACTGCAAGAATGAGGAAATCTTAAAGGCTCTGAAGTAT
 N  Q  F  G  H  Q  E  N  C  K  N  E  E  I  L  K  A  L  K  Y
GTCCGTCCAGGGAATGGCTTTGAACCAAAGTTCCAGCTCCTCGAGAAGGTGGATGTGAAC
 V  R  P  G  N  G  F  E  P  K  F  Q  L  L  E  K  V  D  V  N
GGACAGGATGCCCACCCTTTGTTTGTCTTTCTAAAGGAAAAGCTTCCATTCCCCTGCGAT
 G  Q  D  A  H  P  L  F  V  F  L  K  E  K  L  P  F  P  C  D
GATGCCATGGCTCTCATGACCGATCCAAAGTTCATCATTTGGAGTCCCGTCAGTAGGAAC
 D  A  M  A  L  M  T  D  P  K  F  I  I  W  S  P  V  S  R  N
GACGTCTCCTGGAACTTTGAGAAGTTCCTGGTCAGTCCTGATGGGGAGCCCTACAAGCGC
 D  V  S  W  N  F  E  K  F  L  V  S  P  D  G  E  P  Y  K  R
TACAGCAGAAATTTCCTCACCACTGACATTGAGGCAGATATTAAAGAGCTACTTAAGAGG
 Y  S  R  N  F  L  T  T  D  I  E  A  D  I  K  E  L  L  K  R
GTTAAGtaaagtgtgctacagcgcactctgggtggctgttaaggatgacagttatgaccaccctg
 V  K  *
gccaaaaagattaatcagtacacatctgtttgtggtgttttatcatgtttttccaccttcacagtt
taagtcaattgcaacactcttaagtttgtgatatctccagtgcagtgcactatggttgttcagcct
gtttactcaatgaagacactcctttaagccttttttgtgaggggagtttctgatgaagacgtaaaag
actgactctgccactgtgtataactcatatcacaaagatcttcattaggtagagttaaagaggaaa
aataaacatttaagtgttcctgaaaggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaa
```

Figure 8. Nucleotide sequence of glutathione peroxidase (GPX) cDNA and its deduced amino acid sequence (shown in single-letter code).

ggcacgagggca
gagggagagggaccgaggtcaaacccgcggttcacctgctttataataacttattattttggagg
aagcaccgagagacatttgtacattcaccaagagacggttggtgcggtttgattcgggtttttttc
ctcattctctactcagccgtctgtcggaagcttgccctgcgcaggcagacggaaatacccttgaaa
ATGCCTCCCATCGAAAGTGACACCGGGAAGAATGAACTCAAATCTCGGATACAGCAGCTT
M P P I E S D T G K N E L K S R I Q Q L
ATTGACTCGAATCAAGTGGTGGTTTTCAGCAAGAGCTACTGTCCGTTTTGTGTCAAGGTG
I D S N Q V V V F S K S Y C P F C V K V
AAAGACTTGTTCAAAGAGCTGAAAGTCGAGTGTAATGTGGTGGAGTTGGATCTCATAGAG
K D L F K E L K V E C N V V E L D L I E
GATGGAACCAACTACCAGGAGATGCTGCTCGAGATGACTGGACAGAAAACTGTTCCTAAT
D G T N Y Q E M L L E M T G Q K T V P N
GTCTTCATCAACAAGACGCACATTGGCGGCTGTGACAAAACACTGCAGGCTCATAAAGAC
V F I N K T H I G G C D K T L Q A H K D
GGCAGCCTGCAGCAGCTACTGAGCGGAGAAAATGAAGCTTATGACTACGACCTGATCGTC
G S L Q Q L L S G E N E A Y D Y D L I V
ATCGGAGGAGGATCTGGAGGCCTGGCCTGCTCAAAGGAAGCTGCTATATTGGGGAAGAAG
I G G G S G G L A C S K E A A I L G K K
GCCATGGTACTGGACTATGTTGTGCCCACACCAAAGGGAACCACCTGGGGTCTTGGTGGG
A M V L D Y V V P T P K G T T W G L G G
ACTTGTGTCAATGTGGGCTGCATTCCCAAGAAGCTGATGCACCAGACGGCCTTGCTGGGC
T C V N V G C I P K K L M H Q T A L L G
ACGGCCATGCAGGATGCGCGCAAGTTTGGCTGGGAGTTTGACGAGATAGTGAAACACAAC
T A M Q D A R K F G W E F D E I V K H N
TGGGAGACGATGAAGACGGTGGTGAACAACTACATTGGCTCATTGAACTGGGGCTACAGG
W E T M K T V V N N Y I G S L N W G Y R
GTGGCACTGAGAGACAAGAATGTCAACTATGTCAATGCCTATGCAGAGTTCATTGAACCA
V A L R D K N V N Y V N A Y A E F I E P
CACAAAATCAAGGCAACAAACAAACGAGGGAAGGAGACATTTTACACAGCGGCTAAGTTT
H K I K A T N K R G K E T F Y T A A K F
GTCTTAGCCACAGGCGAGAGGCCGCGCTACCTGGGCATCCCTGGAGACAAGGAGTACTGC
V L A T G E R P R Y L G I P G D K E Y C
ATCACCAGTGACGACCTCTTCTCGTTGTCTTACTGTCCGGGAAAGACCCTGGTGATCGGG
I T S D D L F S L S Y C P G K T L V I G
GCGTCGTATGTGGCTCTGGAGTGTGGTGGTTTCCTGGCCGGCCTGGGTCTCGATGTCACC
A S Y V A L E C G G F L A G L G L D V T
GTCATGGTCCGGTCCATCTTGCTGAGGGGCTTTGACCAAGACATGGCCAACCGTGCCGGA
V M V R S I L L R G F D Q D M A N R A G
GAGCACATGGAGGAGCACGGTGTCAAGTTCCTCCGCAAATATGTCCCTGTAAAGGTAGAG
E H M E E H G V K F L R K Y V P V K V E
GAGCTGGAAGCAGGCACTCCTGGCAGGCTGAAGGTGACAGCCAATTCCACAGAAACCGAT
E L E A G T P G R L K V T A N S T E T D
GAGATCATCGAGGGAGAGTACAACACTGTGCTGATAGCAGTGGGCCGAGATGCGTGCACA
E I I E G E Y N T V L I A V G R D A C T
GACAAGATTGGCCTGGACAAGACAGGGGTCAAAGTCAACCCAAAGAATGGAAAAATTCCA
D K I G L D K T G V K V N P K N G K I P

Countinued next page.

GTGAACGATGAAGAGCAGACCAATGTGCCCCACATCTACACCATTGGAGACATTCTGGAA
V N D E E Q T N V P H I Y T I G D I L E
GGCAAGTGGGAGCTGACACCTGTAGCCATCCAGGCTGGCAAGCTGCTGGCACGACGCCTC
G K W E L T P V A I Q A G K L L A R R L
TATGGGGGCTCGAAACTCAAGTGTGACTATGTCAACGTCCCCACCACTGTCTTCACCCCA
Y G G S K L K C D Y V N V P T T V F T P
CTGGAGTACGGTGCCTGTGGTCTGTCAGAGGAGAGAGCCACTGAGCTCTATGGGAAGGAC
L E Y G A C G L S E E R A T E L Y G K D
AACATTGAGGTGTTCCACAGTCTGTTCTGGCCTCTGGAGTTCACTGTGCCCGGCAGAGAT
N I E V F H S L F W P L E F T V P G R D
AACAACAGGTGCTACGCCAAGATCATCTGCAATAAACTGGACAACGATCGAGTCATTGGG
N N R C Y A K I I C N K L D N D R V I G
TTCCACTATCTGGGTCCAAATGCTGGAGAGGTGACGCAGGGCTTCGGTGCAGCCATGAAA
F H Y L G P N A G E V T Q G F G A A M K
TGTGGTGCCACCAAGGAGCAGCTGGACGGCACCATCGGCATCCACCCAACCTGTGCTGAG
C G A T K E Q L D G T I G I H P T C A E
ATCTTTACCACTTTGGAAGTGACCAAGAGCTCCGGTGGAGACATCACCCAGGCCGGCTGC
I F T T L E V T K S S G G D I T Q A G C
tgaggttaaccctgctcgtttagcgggctgctctcatgttagactctcctaccaactagtaccaac
*
cagtcgaccactaagctcagcctcacctccagctgctcagtttacaggacagttgtttctcaggac
aaacccaacaccgtggccagtgtctgaatcagtgaaagcactcattcaggcttgctgggagctaag
aggtggctgaaaaaaaagccagagctgaggatgcaagtctcaagctctggctgaagtagtttgata
tgagggcagcctgctgaacagcggggttactctgctgatacttctactgggctccaccagtgtgtc
cttctcagaggagcaccaacacacacacactactgcggagtatgtgtgtgtgtttgggctgtttgt
gacatcctggcccgtaacctgaaatattgaggtgggcaaggatcgatgtctctctgcagaagcacc
tgatggcggcccaaacccttcgtccaacccccaacttcaaacccttctcattcatctccagtgtgt
acggattgcatacacagacagatttaatttgaatagacccacggctctgaactctggtccagcttg
tgatggaaatgtattatttaatctggtgtgtgtgtatagattaaatgtcatcttgtctcttctgtt
gagccttcatcattccacacattcctctgaccaggtctttaagatgaaactgagatgtatacatgt
tgctgtcaatacttgtctttgctgtgtggaggcaccagggttttctgccttaaacagatctctacc
aaagtttatctaaacaagtctgcacagagatcaagagcaggcagatgtacacctttcaagcctacg
acacttttggatagaattgaatggaaaatacaaccttaattgtactggatgatgtgtttaaaaaga
aaaacattttcacaagtttttactcaattaatttaatgcttgtttgttgcatcttgctgtttgcct
ctgcattatgtgtatgtaaaagatatattcaatcttctagaggacagtattctggctgctgtcagt
gagtgacattggtcatctgtataaatgacttgtccgttggtgtcaaaccactgtagattacttctc
tcaagatttaataaaagatgaattcacaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Figure 9. Nucleotide sequence of thioredoxin reductase (TR) cDNA and its deduced amino acid sequence (shown in single-letter code).

낮게 발현하였다. Catalase mRNA는 근육에서는 현저히 낮은 반면, 장과 비장에서 높게 발현하였다. GST-α mRNA는 뇌와 아가미에서 낮게 발현되며, 근육에 거의 발현되지 않는 양상을 보인 반면, 신장, 간, 표피, 비장에서는 비교적 높게 발현하였으며, 특히 비장에서 가장 높은 발현율을 보였다. GST-θ mRNA는 간과 장을 제외한 나머지 조직에서는 발현율이 낮았고, 신장과 근육에서는 거의 발현되지 않는 양상을 보였다. GPX mRNA는 근육을 제외한 나머지 조직에서 모두 발현하였으며, 비장, 장 조직 순으로 높게 발현하였다. 아가미와 간에서는 뇌, 신장, 표피에 비해 비교적 낮게 발현하였다. TR mRNA은 뇌, 아가미, 장, 비장에서 비교적 높게 발현하였으며, 신장과 표피에 비해 근육에서 낮게 발현하였고, 간에서는 매우 낮은 발현율을 나타내었다(Figure 10).

3.4. 중금속에 의한 AOE mRNA의 발현 특성 분석

3.4.1 Northern dot blot을 이용한 mRNA 정량분석

실험어에 카드뮴을 처리기간 별로 immersion한 후, 간, 신장, 아가미 조직을 대상으로 northern dot blot을 통하여 SOD mRNA의 발현양상을 분석하였다. 간과 신장 조직에서는 카드뮴 노출기간이 길어질수록 SOD mRNA의 발현양을 증가하는 양상을 보이는 것에 비해, 아가미 조직에서는 유의적인 차이점을 찾을 수 없었다. 또한 신장에 비해 간 조직이 카드뮴에 더 responsive하게 반응하였다. 이와 같은 양상은 densitometry 분석 그래프에서도 잘 보여주고 있다(Figure 11).

3.4.2. 카드뮴 농도별 injection 실험

실험어에 카드뮴을 농도별로 injection한 후, MT와 AOE 유전자의

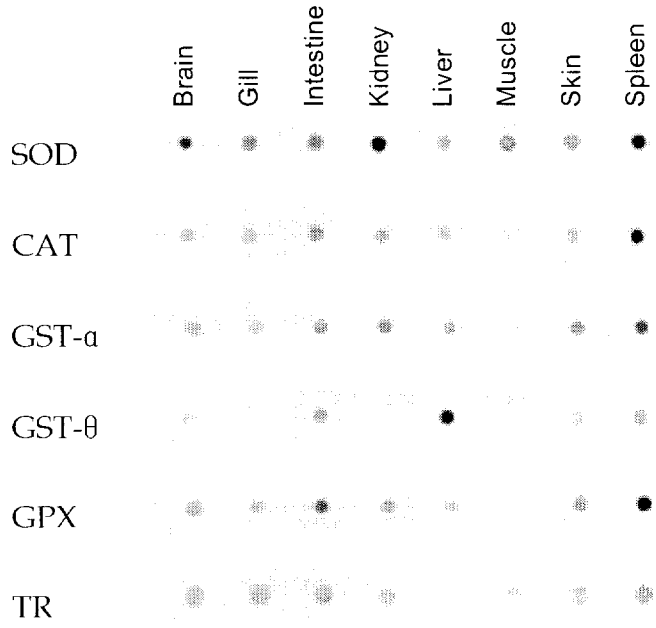

Figure 10. Tissue distribution of AOE transcripts based on RNA dot blot analysis.

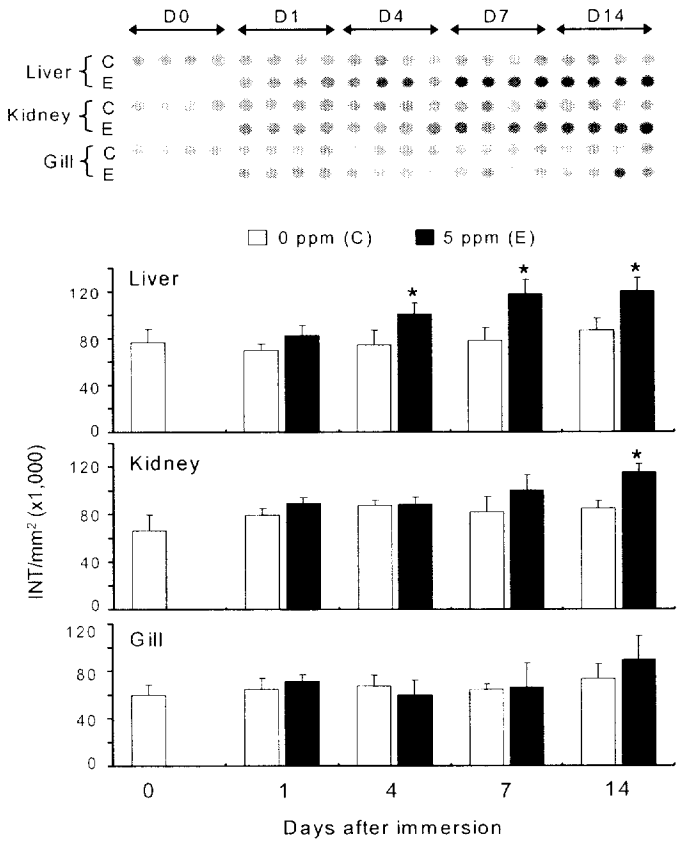

Figure 11. Altered expression of SOD mRNA during experimental exposure to cadmium based on RNA blot hybridization.

발현양상을 분석하기 위하여 semi-quantitative RT-PCR을 수행한 결과 MT, SOD mRNA에서는 처리농도별로 비교적 뚜렷이 증가하는 양상을 보였다. GST-α mRNA는 카드뮴 처리 시 발현율이 증가하였으나, 처리농도에 따른 차이는 나타나지 않은 반면 TR mRNA은 5 mg/kg 처리군에서는 현저히 증가한 후, 10 mg/kg 처리군에서는 낮아지는 양상을 보였다. GPX mRNA는 카드뮴 처리 시 발현율이 현저히 낮아졌으며, Catalase, GST-θ mRNA는 카드뮴 처리에 관계없이 발현율이 일정하였다 (Figure 12).

3.4.3. 치어를 대상으로 한 카드뮴, 아연 immersion 실험

돌돔 치어를 대상으로 카드뮴과 아연을 농도별로 immersion한 결과 카드뮴 처리농도가 증가될수록 MT와 SOD의 발현율이 증가하였다 (Figure 13). Catalse와 GST-α는 카드뮴 50 μM 처리 시 비교적 낮은 증가율을 보였으며, GST-θ는 25 μM 처리군에서 감소하였다가 50 μM 처리군에서는 대조군과 비슷한 발현율을 보였다. GPX는 모든 실험군에서 낮게 발현하였으며, 25 μM 처리군에서 약간 증가하는 양상을 보였다. TR에서는 25 μM 처리군에서 증가한 반면, 50 μM 처리군에서 약간 감소한 후 100 μM 처리군에서 현저히 증가하였다.

아연 처리군의 경우에는 MT는 처리농도가 증가될수록 발현율이 증가하였고 SOD는 처리농도와는 무관하게 대조군보다 높은 발현율을 유지하였다. Catalase와 GST-α, GST-θ, GPX의 경우 대조군과 별 차이가 없었으며, TR은 25 μM 처리군에서 약간 증가하였다가 50 μM 처리군부터 대조군과 비슷하게 발현하였다. 결론적으로 MT, SOD, TR이 다른 목적 유전자들에 비해 높은 유도 발현양상을 보였으며, 전반적으로 카드뮴이 아연보다 이들 유전자들의 up-regulation에 보다 강력한 inducer였다.

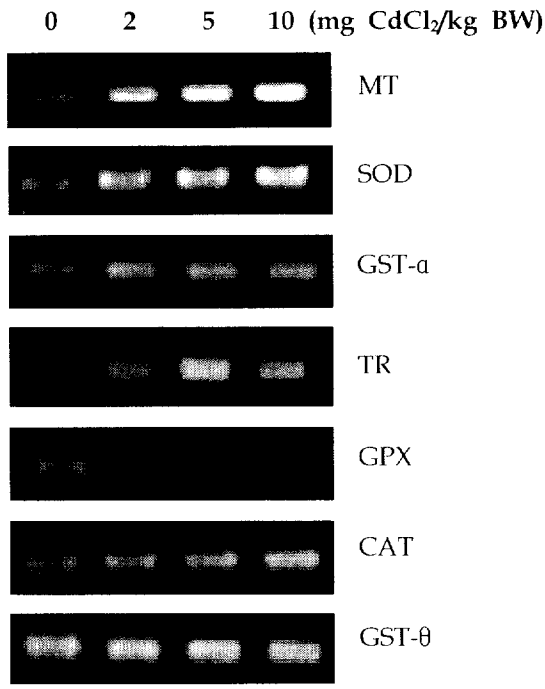

Figure 12. Altered expression MT and AOE transcripts during acute cadmium exposure by intraperitional injection.

Representative gels for the semiquantitative RT-PCR analysis of each gene ase shown.

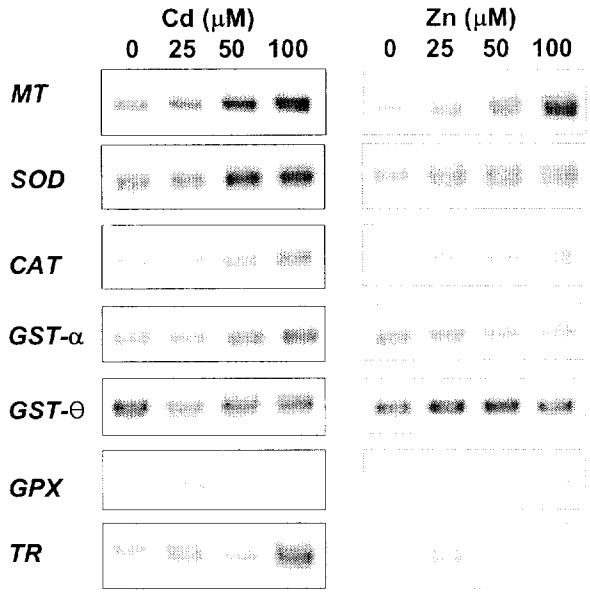

Figure 13. Effect of Cd and Zn - exposure by immersion on the transcriptional levels of MT and AOEs in liver of rockbream fry.

3.4.4. Time course 별 카드뮴 immersion 실험

실험어를 처리 기간별로 카드뮴에 immersion 노출처리한 후, 카드뮴 injection 실험과 치어를 대상으로 한 immersion 노출실험 결과를 바탕으로 중금속에 의해 발현율이 현저히 증가되는 것으로 확인된 MT, SOD, TR의 발현율을 semi-quantitative RT-PCR을 통하여 분석하였다. Internal control로 사용한 β-actin은 카드뮴 처리여부, 처리기간에 관계없이 모두 일정한 발현율을 보여주었으나 MT, SOD, TR은 4일째부터 대조군에 비해 처리군의 발현양이 증가하였으며, 시간이 흐를수록 대조군과의 차이가 증가하였다(Figure 14).

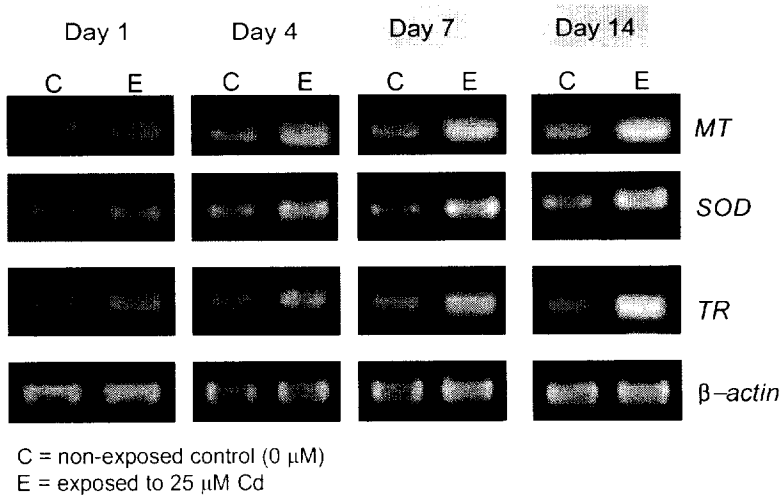

Figure 14. Time course expression of MT and selected AOEs during exposure to cadmium.

Semi-quantitative RT-PCR analysis were performed with β-actin gene as on internal control.

Ⅳ. 논 의

대다수의 오염물질은 생체 내에서 ROS를 유도한다. ROS는 호흡과정 중 전자전달계로부터 이탈된 전자가 산소분자와 결합하여 생성하게 되며, 생체 내에서 생리, 성장에 이용되기도 하고, 병원체로부터 보호하는 역할을 하기도 한다. 그러나 ROS는 높은 반응성을 가지고 있기 때문에 그 수준이 과다할 경우 생체에 다양한 경로의 산화적 손상을 일으키게 된다(Kim et al., 1998). 따라서 항산화 시스템을 분석함으로써 오염환경 또는 생체의 다양한 스트레스 정도를 직·간접적으로 추적·지표화할 수 있는 것으로 알려져 있으며 최근들어 이러한 생체 기작을 이용한 수서환경 평가가 활발히 진행되고 있다(Aurélie et al., 1997; McFarland et al., 1999; Peters et al., 2001; Francesco et al., 2002; Lionetto et al., 2003; Pandey et al., 2003).

어류의 경우 Pandey et al.(2003)는 Yamuna liver의 오염지역과 비오염지역을 선정하여 각각의 지역에서 서식하는 *Wallago attu*의 간, 신장과 아가미에서 AOE의 activity를 비교하여 평가함으로써 오염지역과 비오염지역 간에 서로 다른 활성 수준을 확인한 후 AOE를 biomarker로서 제시하였다(Pandey et al., 2003). 또한 Moshe et al.(2004)은 *Lithognathus mormyrus*의 간에서 MT transcript를 real time PCR로 정량함으로서 보다 정확하고 정량화할 수 있는 결과를 얻었다(Moshe et al., 2004).

본 연구에서는 돌돔에서 MT와 주요 항산화효소인 SOD, CAT, GST, GPX, TR 유전자를 발굴하여 그 특성을 분석하고, oxidative stressor로서 중금속을 처리하여 발현양상을 mRNA 수준에서 분석하고자 하였다.

MT와 AOE 유전자를 확보하기 위하여 돌돔의 EST 데이타베이스

를 구축하여, AOE 유전자를 포함하여 신규 유전자들을 발굴하고 특정조직에서 발현하는 유전 정보를 파악할 수 있었으며(Nam and Kim, 2001), 서로 다른 두 조직에서 얻은 EST를 기능과 organism 별로 clustering함으로써 조직 간의 발현양상 차이점을 확인할 수 있었다.

어류의 AOE 유전자에 대한 연구는 미비한 실정이다. NCBI GenBank에 등록된 어류의 SOD gene은 zebrafish, red seabream 등 7종이 등록되어 있으며, catalase의 경우에는 단 3종만이 등록되어 있다. GPX와 GST 등도 모두 10종을 넘지 않는다. 본 연구를 통해 발굴된 돌돔의 MT, SOD, GST, GPX, TR의 cDNA 염기서열 데이타 등은 향후 어류 특이적인 항산화기작을 이해하는데 도움이 되리라 생각된다. 또한 척추동물 중 가장 하위그룹에 속하는 어류의 염기서열 데이타는 다른 척추동물과 비교함으로서 척추동물의 가장 하등한 어류의 염기서열을 비교분석함으로써 진화론적 접근에도 활용될 수 있을 것이다.

확보한 MT 및 AOE 유전자의 조직별 발현 양상을 분석한 결과 각 목적 유전자 별로 다양한 양상이 관찰되었다. 특히 TR의 경우에는 간에서 현저히 낮은 수준의 발현양상을 보임에도 불구하고 *in vivo* 실험을 통해 중금속 노출에 의한 유의적인 증가발현이 확인되었으므로, 각 조직별 basal transcript level과 *in vivo* 실험에서의 transcript level과 유도 발현간의 보다 자세한 상관관계 규명이 필요할 것으로 판단된다.

AOE 유전자가 중금속에 특이적으로 발현하는지 반응하는 분석하기 위하여 카드뮴을 농도별로 injection하여 RNA dot blot을 수행하여 SOD mRNA level을 분석하였다. Immersion 실험군에서는 RNA dot blot 결과 처리기간에 비례하여 증가하였으며, 간에서 가장 뚜렷한 증가양상을 나타내었다. 돌돔 치어를 대상으로 카드뮴과 아연을 농도별로 immersion 하여, 목적유전자의 발현율을 분석한 결과 아연보다 카드뮴

을 처리했을 때 보다 뚜렷한 발현율의 차이를 보였으며, 특히 다른 AOE 유전자들에 비해 MT, SOD, TR의 transcript들이 카드뮴에서 현저한 증가를 나타냈다. 이것은 MT, SOD, TR이 카드뮴에 특이적으로 반응하는 것을 말하며, 세 유전자가 카드뮴에 sensitive한 biomarker로서 활용될 수 있음을 시사한다. 뿐만 아니라 유전자를 대상으로 카드뮴 노출에 대하여 노출기간별 발현양상을 분석한 결과 4일자부터 MT, SOD, TR의 transcript level이 증가되었다. 그러므로 본 연구를 통하여 MT, SOD, TR의 transcript level을 분석함으로써, 이 세 유전자를 수서환경이 심각한 오염상태에 이르기 전에 환경을 진단하고 예보할 수 있는 early warning biomarker로서의 사용가능성을 잘 보여주고 있다. 향후 다양한 toxic pollutant와 xenobiotic에 대하여 sensitive한 biomarker system을 개발하기 위해서는 보다 많은 데이터의 축적과 AOE gene과 stress -responsive한 gene들 간의 상관관계에 대한 연구가 수반되면 보다 자세한 어류 항산화 기작이 규명될 수 있을 것이다(Sherry, 2003). 이를 위해서는 확보한 EST clone을 이용하여 DNA chip 등을 수행하여 expression database를 확보하고 proteomics 분석과 어체의 반응, 환경, 생태에 대한 분석을 종합하여 관찰할 필요가 있다.

국문요약

우리나라의 연안에 주로 서식하며 주요 해산 양식어종인 돌돔의 간과 신장을 대상으로 cDNA library를 제작하고, 이를 토대로 EST dasebase를 확보하였다. 또한 확보된 DB와 RT-PCR을 이용하여 metallothionein (MT) 및 주요 항산화효소 유전자를 발굴하여 중금속 노출 실험을 수행하여 그 발현양상을 분석하였다. Catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) isotype 3종, glutathione peroxidase (GPX), thioredoxin reductase (TR)은 EST DB를 검색하여 cloning하였고, superoxide dismutase (SOD), metallothionein (MT)는 degeneracy primer를 design하여 cloning하였다.

cDNA를 cloning한 결과 MT는 5′-UTR이 34 bp이며 180 bp가 60개의 아미노산을 코딩하고 있으며, 3′-UTR은 162 bp였다. SOD는 5′-UTR이 27 bp이며 462 bp가 154개의 아미노산을 코딩하고 있으며 3′-UTR은 309 bp였다. Catalase는 5′-UTR이 23 bp이며 1581 bp가 527개의 아미노산을 코딩하고 있으며, 3′-UTR은 1447 bp였다. GST-α는 5′-UTR이 80 bp이며 669 bp가 273개의 아미노산을 코딩하고 있으며, 3′-UTR은 276 bp였다. Gst-θ는 5′-UTR이 20 bp이며 729 bp가 243개의 아미노산을 코딩하고 있으며 3′-UTR은 519 bp이며 polyadenylation signal로 예측되는 sequence가 두 군데 존재하였다. GST-ω는 5′-UTR이 45 bp이며 720 bp가 240개의 아미노산을 코딩하고 있으며 3′-UTR은 329 bp였다. GPX는 5′-UTR이 168 bp이며 426 bp가 142개의 아미노산을 코딩하고 있으며 3′-UTR은 388 bp였다. TR은 5′-UTR이 207 bp이며 1800 bp가 600개의 아미노산을 코딩하고 있으며 3′-UTR은 1167 bp였다. 각

목적 유전자의 sequence와 조직발현양상을 분석하였다.

in vivo 실험 결과 MT와 AOE 유전자는 중금속에 의한 transcript level 변화가 확인되었으며, 그 변화 양상도 AOE 유전자 종류별로 다양하게 나타났다. 사용한 두 종류 중금속 처리에서 아연보다 카드뮴에서 그 변화가 더 뚜렷하였으며 일반적으로 다른 조직보다 간에서 보다 sensitive한 결과가 관찰되었다. 특히 카드뮴 노출시 MT, SOD, TR은 현저히 up-regulation되었고 GPX는 현저히 down-regulation되는 특징이 관찰되었다.

감사의 글

남윤권 교수님의 육종학 수업을 듣고 무작정 교수님을 찾아가 공부를 시작한 지 벌써 3년이나 흘렀습니다. 아무것도 모른 채 처음 접한 실험들이 낯설고 힘들어 할 때도 많았지만 새로운 것을 알아가는 즐거움과 많은 분들의 도움과 격려고 여기까지 올 수 있었습니다. 이 작은 공간을 빌어 마음을 전하고 싶습니다.

먼저 모자란 저를 항상 일깨워 주시고 채워주시는 저의 스승이자 가장 존경하는 scientist, 남윤권 교수님께 감사드립니다. 이 논문을 심사해 주시고 따뜻한 관심과 격려를 보내주신 김동수 교수님과 김종명 교수님께 감사드립니다. 또한 학문적 지식을 넓혀 주신 손철현 교수님, 조재윤 교수님, 허성범 교수님, 김창훈 교수님, 배승철 교수님, 장영진 교수님께도 감사드립니다. 항상 관심으로 지켜봐주신 김기홍 교수님과 김성구 교수님께 감사드립니다.

함께 지내오며 많은 힘이 되어준 조영선님, 하은미님, 남광철님, 후배 김소영, 이상윤에게 깊은 감사를 드립니다. 부족한 저를 항상 챙겨주신 임재현 박사님과 최윤희 박사님께 감사드리며, 첫 시작을 함께하고 이끌어 주신 박지은 선배님께 감사드립니다.

학위과정을 통해 다시금 가족의 소중함을 느낄 수 있었습니다. 항상 저를 염려해 주시고 믿음으로 지켜봐 주신 부모님, 걱정만 끼치는 딸을 사랑으로 감싸 안아주신 김순옥님과 최 열님과 동생 우균이에게 감사드립니다. 마지막으로 저의 든든한 후원자이자 저를 항상 지켜봐 주시는 주님께 감사합니다.

참고문헌

Almeida J.A., Novelli E.L.B., Silva M.D.P. and Júnior R.A. 2001. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Environmental Pollution 114: 169-175.

Andrew P.L.C., Timothy H.J.L. and King Ming C. 2004. Regulation of tilapia metallothionein gene expression by heavy metal ions. Marine Environmental Research 58: 389-394.

Artur K. and Wojciech B. 2003. Structure-function relationships in glutathione and its analogues. Organic & Biomolecular Chemistry 1: 3885-3890.

Aurélie D., Carole C., Marie-Cécile J., Marc B. and Paule V. 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. Aquatic Toxicology 39: 93-110.

Basha P.S. and Ran A.U. 2003. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). Ecotoxicology and Environmental Safety 56: 218-221.

Christopher M.D. and David J.M. 2003. Exercise-Associated Oxidative Stress. Clinical Techniques in Equine Practice 2: 278-291.

Clemente C., Vincenzo C., Rosaria S., Orlando C., Roberta S., Piero A.T. and Elio P. 2003. Phylogenetic divergence of fish and mammalian metallothionein: relationships with structural

diversification and organismal temperature. Journal of Molecular Evolution 57: S250-S257.

Francesco R., David P., Gary W.W., Stefania G., Silvia G., Claudia V.L. and Stefano B. 2002. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). Marine Pollution Bulletin 44: 912-922.

George S., Gubbins M., MacIntosh A., Reynolds W., Sabine V., Scott A. and Thain J. 2004. A comparison of pollutant biomarker responses with transcriptional responses in European flounders (*Platicthys flesus*) subjected to estuarine pollution. Marine Environmental Research 58: 571-575.

Giulia G., Alessandra D.F. and Gaetano C. 2002. Stress-induced changes of plasma antioxidants in aquacultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A 132: 205-211.

Kim M.O. and Phyllis E.B. 1998. Oxidative stress in critical care: Is antioxidant supplementation beneficial? Journal of the American Dietetic Association 98: 1001-1008.

Lionetto M.G., Caricato R., Giordano M.E., Pascariello M.F., Marinosci L. and Schettino T. 2003. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. Marine Pollution Bulletin 46: 324-330.

Marta D., Adela R.R., Guy B., Maria J.B., Marc D.L., Ivana S., Milan V. and Monica N. 2002. Recent developments in quantification methods for metallothionein. Journal of Inorganic Biochemistry. 88: 123-134.

Matthew J.J., Amy H.R., Eric R.L., Alan J.L., Jason W.K., Paul S.G., Gregory W.W. and Robert W.C. 2002. Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from the american oyster, *Crassostrea virginica*. Marine Biotechnology 4: 81-93.

McFarland V.A., Inouye L.S., Lutz C.H., Jarvis A.S., Clarke J.U. and McCant D.D. 1999. Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field-collected brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 37: 236-241.

Moshe T., Nir C., Merav S., Barak H. and Baruch R. 2004. Quantifying fish metallothionein transcript by real time PCR for its utilization as an environmental biomarker. Marine Pollution Bulletin 48: 705-710.

Nam, Y.K. and Kim D.S. 2001. Bioinformatics in fish: its present status and perspectives with particular emphasis on expressed sequence tags - brief review. Journal of Aquaculture 14: 9-16.

Pandey S, Parvez S., Sayeed I., Haque R., Bin-Hafeez B. and Raisuddin S. 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). The Science of the Total Environment 309: 105-115.

Peters L.D., Porte C. and Livingstone D.R. 2001. Variation of antioxidant enzyme activities of sprat (*Sprattus sprattus*) larvae and organic contaminant levels in mixed zooplankton from the Southern North Sea. Marine Pollution Bulletin 42: 1087-1095.

Richard B.S. and Avril D.W. 2001. Three unique experimental fish stories: Poecilia (the past), Xiphophorus (the present), and Medaka (the future). Marine Biotechnology 3: 17-23.

Richard D.P. 1998. The elusive function of metallothioneins. Proceedings of the National Academy of sciences USA 95: 8428-8430.

Rodney S.N., Michael C.S., John S., Richard N.W. and Ronald B.W. 2001. Aquaria fish models of human disease: reports and recommendations from the working groups. Marine Biotechnology 3: 249-258.

Wedderburn J., McFadzen I., Sanger R.C., Beesley A., Heath C., Hornsby M. and Lowe D. 2000. Biomarkers: the application of a suite of techniques to determine environmental quality. Marine Environmental Research 50: 431-441.