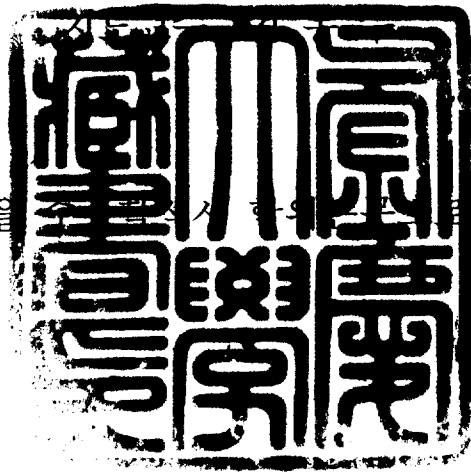


수산학석사 학위논문

새로운 송사리 속 모델 어류 개발

이 논문을 수산학석사 학위논문으로 제출함



2006년 2월

부경대학교 대학원

수산생물학과

손 동 현

손동현의 수산학석사 학위논문을 인준함

2005년 12월 22일

주 심 이 학 박 사 김 중 명



위 원 수 산 학 박 사 남 윤 권

(인)



위 원 이 학 박 사 김 동 수



목 차

목차	i
영문 요약 (Abstract)	iii
표 목차 (List of Tables)	v
그림 목차 (List of Figures)	vii
 I. 서 론	 1
 II. 재료 및 방법	 4
1. 송사리의 형질전환 연구	4
1-1. 실험어 및 인공산란	4
1-2. 유전자	4
1-3. Microinjection	5
1-4. DNA isolation and PCR	9
2. 송사리와 대륙송사리의 잡종	10
2-1. 잡종 송사리 생식소의 조직학적 분석	10
 III. 결 과	 11
1. 송사리 형질전환 연구	11
1-1. ML β -actin ML GH microinjection and PCR analysis	11
1-2. OL β -actin ML GH microinjection and PCR analysis	12

1-3. ML lectin ML GH microinjection and PCR analysis	17
1-4. CP lectin ML GH microinjection and PCR analysis	17
1-5. Hx β -actin Hx GH microinjection and PCR analysis	23
1-6. Sa β -actin Sa GH microinjection and PCR analysis	23
2. 대륙송사리, 송사리 및 잡종송사리의 조직학 적 관찰	29
2-1. 전장 1.0cm에서의 난소 및 정소 발생	29
2-2 전장 1.5 cm에서의 난소 및 정소 발생	29
2-3 전장 2.0 cm에서의 난소 및 정소 발생	30
2-4 전장 2.5 cm에서의 난소 및 정소 발생	30
 IV. 고 찰	 43
 V. 국문 요약	 46
 VI. 감사의 글	 48
 VII. 참고 문헌	 49

Establishment of new rice fish species

Dong Hyun Son

*Department of Fisheries Biology, Graduate School,
Pukyong National University, Busan 608-737, Korea*

Abstract

Medaka (*Orizias latipes*), as small fresh water fish is relatively easy to culture and to stimulate spawning in indoor tanks, and due to the reasons above mentioned, medaka was selected for microinjection of gene to make transgenic fish to use the analysis of hazard model in the ecosystem of aquatic area.

In this study, medaka was used in order to develop as a fish for the analysis of hazard model and to establish the technical method of microinjection of gene. Growth Hormone (GH) of Mud loach (*mizolepis*), Catfish (*Silurus asotus*), Greenling (*Hexagrammos otakii*) etc. were microinjected to fertilization eggs to β -actin promoter, gene injected mud loach GH and common carp (*Cyprinus carpio*) GH into lectin.

After the microinjection, PCR analysis was conducted to analyze

transgenic fish as the results, various homology band were appeared according to primer in the ML β -actin ML GH. In the OL β -actin ML GH, positive band were only appeared in the female site and in CP lectin ML GH, positive band were appeared in the all individuals. And Hx β -actin Hx GH, ML lectin ML GH, Sa β -actin Sa GH, many homology band were appeared, as the result, it was known not easy to develop fast growth transgenic of medaka through the molecular biological analysis.

The above reasons, hybrid between *Orizias latipes* and *Orizias sinensis* was made to develop the model fish having the morphological marker for hazard prevention of ecosystem and the hybrid were used to analyze gonad to know the abilities of fertilization.

As the result, in the female fish of total length of 1.0 cm, the early stage like chromatin nucleolus stage and early peri-nucleolus stage were mainly appeared and the stages of oocyte development between the species were appeared as a similar result. In the female fish of length of 1.5 cm, Chromatin nucleolus stage and early peri-nucleolus stage were mainly appeared as well and late peri-nucleolus stage was relatively much appeared by contrast with the female fish of 1.5 cm. The development stage of oocyte between the species was appeared without any difference, too. In the female fish of total length of 2.0 cm and 2.5 cm, all the same development stage were appeared by contrast with the total length of 1.0 cm and 1.5 cm. The sperm cell were showed, but the difference of the species was not appeared.

The hybrid induced from *Orizias latipes* and *Orizias sinensis* have the merits not to be appeared in the natural world, for the reasons, which is able to use the morphological marker and have the possibilities to develop the hazard analysis model fish for LMO through the study of transgenic.

표 목차 (List of Tables)

Table 1. Rate of Egg quality and hatching out percentage by density of Astaxanthin included in diet	6
Table 2. Genes used in this experiment	7
Table 3. Result of microinjection to medaka fertilized eggs by density of ML β -actin ML GH	8
Table 4. Result of ML β -actin ML GH microinjection to fertilized eggs of medaka	13
Table 5. Result of OL β -actin ML GH microinjection to fertilized eggs of medaka	15
Table 6. Result of ML lectin ML GH microinjection to fertilized eggs of medaka	19
Table 7. Result of CP lectin ML GH microinjection to fertilized eggs of medaka	21
Table 8. Result of Hx β -actin Hx GH microinjection to fertilized eggs of medaka.	25

Table 9. Result of table 8. of Sa β -actin Sa GH microinjection to fertilized eggs of medaka 27

Table 10. The development stage of oocyte of OL, OS, LS, SL of total length of 1.0 cm. 31

Table 11. The development stage of oocyte of OL, OS, LS, SL of total length of 1.5 cm. 34

Table 12. The development stage of oocyte of OL, OS, LS, SL of total length of 2.0 cm 37

Table 13. The development stage of oocyte of OL, OS, LS, SL of total length of 2.5 cm. 40

그림 목차 (List of Figures)

Fig. 1. Result of PCR analysis of ML β -actin ML GH microinjection to Fertilized eggs of medaka	14
Fig. 2. Result of PCR analysis of OL β -actin ML GH microinjection to Fertilized eggs of medaka	16
Fig. 3. Result of PCR analysis of ML lectin ML GH microinjection to Fertilized eggs of medaka	20
Fig. 4. Result of PCR analysis of CP lectin ML GH microinjection to Fertilized eggs of medaka	22
Fig. 5. Result of PCR analysis of Hx β -actin Hx GH microinjection to Fertilized eggs of medaka	26
Fig. 6. Result of PCR analysis of Sa β -actin Sa GH microinjection to Fertilized eggs of medaka	28
Fig. 7. The tissue of oocyte of OS, OL, LS, SL of total length of 1.0 cm ...	32

Fig. 8. The tissue of sperm of OS, OL, LS, SL of total length of 1.0 cm ... 33

Fig. 9. The tissue of oocyte of OS, OL, LS, SL of total length of 1.5 cm ... 35

Fig. 10. The tissue of sperm of OS, OL, LS, SL of total length of 1.5 cm · 36

Fig. 11. The tissue of oocyte of OS, OL, LS, SL of total length of 2.0 cm · 38

Fig. 12. The tissue of sperm of OS, OL, LS, SL of total length of 2.0 cm · 39

Fig. 13. The tissue of oocyte of OS, OL, LS, SL of total length of 2.5 cm · 41

Fig. 14. The tissue of sperm of OS, OL, LS, SL of total length of 2.5 cm · 42

I. 서론

1973년 세계 최초로 두 생물체 사이에 전이된 유전물질이 성공적으로 발현되어 생명공학 기술의 산업화가 활성화되기 시작하면서 과학자들 사이에 이러한 실험 결과가 인체 및 자연 생태계에 미칠 잠재적 위해성에 대한 우려를 제기된 후 1980년대부터 유전자변형생물체(Living Modified Organism : LMO)에 대한 연구개발이 본격화 되었다.

지구의 수계는 인류 최대의 단백질 공급원으로 역할을 해왔고 방대한 수산생물의 생물공학적 연구의 잠재력을 가진 곳이다. 세계적으로 바이오 산업은 기술 혁신을 통하여 국가 간의 경쟁이 심화되고 있고, 이로 인한 고부가가치의 창출은 이미 세계 선진국의 중요한 연구분야로 대두되고 있다. 국가 경쟁력 강화 측면에서 선진농업국들은 생명공학기술의 발달과 함께, 콩과 옥수수등 유전자변형농산물을 대량생산하여 산업화 하고 있는 실정이다.

수산물 LMO의 연구는 주로 성장촉진, 질병내성, 항동결 단백질 개발 등의 목적으로 1980년대부터 본격 개발되어 무지개송어, 연어, 틸라피아 등 전 세계적으로 약 35종 내외의 LMO의 개발이 시도 되었다. 그 중 A/F Protein 사 및 Aqua-bounty사 등에서 유전자 변형 연어를 개발하여 FDA에 승인 요청중에 있다. 우리나라에서는 1997년에 부경대에서 슈퍼미꾸라지를 개발하였으며 국립수산물과학원에서는 우리나라 양식 어류의 대표어종인 넙치의 전 암컷 생산 기술을 개발 하였으며, 주요 양식 생물인 넙치, 전복, 조피볼락, 대하 4종의 각 조직별 발현 유전자를 분석하는 등 수산생물

유전체연구를 강화하고 있다. 이러한 유전자변형 수산물은 부가가치가 높고 경제적인 가치가 있음에도 인체와 환경에 미치는 위해성이 아직 완전히 검증되지 않은 단계에 있을 뿐 아니라 유전자변형 수산물에 대한 부정적인 견해가 많아 상품화에 장애요인으로 작용하고 있다. 그러나 국내 수산물의 수요변동에 따라 유전자변형수산물이 식품, 사료용, 연구시험등의 목적으로 수입되거나 또는 비의도적으로 국가간 이동 등에 의한 국내 유입가능성을 완전히 배제 할 수 없을 것이다. 정부는 2005년 9월 20일 국무회의에서 유전자변형생물체를 수입·생산하거나 연구개발하려면 사전에 승인을 받거나 신고를 해야 하는 등 유전자변형생물체의 국가간 이동등에 관한 법률 시행령을 심의·의결했다.

수산 LMO가 산업적으로 유통되고 있지는 않으나 LMO법이 발효되면 환경위해성 심사 등 관련제도가 의무화되고 이와 관련된 각종 기술 개발 등의 사전준비가 필요할 것이라 생각된다. 세계적으로는 이미 연어와 무지개송어 등의 LMO들이 개발되었으며 아직까지 국가 간 상업적 유통은 되지 않고 있지만, 조만간 이들 수산 LMO들의 국가 간 이동도 피할 수 없는 실정에 있다. 따라서 앞으로 전개될 국내 및 국외에서의 유전자 재조합 어류의 개발과 상품화에 따른 국내 수입 및 수출에 대비하여, LMO어류의 인체 및 환경 위해성에 대한 평가와 저감을 위한 노력이 절실히 필요하다. 특히 우리나라 어류양식의 경우에도 수입 중에 의존하는 비율이 매년 높아짐에 따라 국내에서 양식한 어류의 LMO 검증의 필요성이 부각되고 있으며, LMO가 국민건강과 자연환경에 해를 끼치는 것을 예방하기 위해 LMO의 수입이나 생산·유통등을 사전에 규제하는 제도가 머지않아 도입 될 것이다.

본 연구는 수산생물체에 대한 LMO의 위해성 평가를 위해 송사리(Orizias)속 어류를 도입하고자 하였다. 송사리(Orizias)속 어류는 아시아에

분포하는 소형 담수어로 현재까지 14종이 보고되었으며, 한국산 송사리 속 어류 중 *O.latipes*는 한국과 일본, 중국에 널리 분포하는 종으로서, 한국의 동해로 유입되는 하천지역에 분포하고, *O.sinensis*는 한국과 중국에 분포하는 종으로 한국의 서해로 유입하는 하천에 분포하고 있다(김과 문 1987; Sakaizumi와 Jeon, 1987; Uwa와 Jeon,1987;Kim과 LEE, 1992; 김과 강 1993; 김,1997). 또한 송사리 속 어류는 크기가 작고 사육이 쉽다는 점, 세대가 짧으며 수온조절로 인한 연중산란이 가능해 수산 LMO의 위해성 평가를 위한 모델 실험어로 적합한 장점을 갖고 있다.

수산 LMO 위해성 평가를 위해 송사리 속 어류의 하나인 *O.latipes*를 이용해 형질전환기법을 도입해 6가지의 유전자를 *O.latipes*의 수정란에 주입하는 형질전환실험을 실시하였다. 미꾸라지 성장호르몬에 각각 미꾸라지 β -actin, 송사리 β -actin 벡터를 붙인 유전자와 미꾸라지 성장호르몬에 각각 미꾸라지 lectin과 잉어 lectin 벡터를 붙인 유전자, 그리고 쥐노래미 β -actin 쥐노래미 GH, 메기 β -actin 메기 GH 유전자를 이용하여 실험하였다.

형질전환 분석을 위한 PCR결과, 분석이 불가능할 정도의 homology band가 나타나 분자생물학적인 분석에 어려움을 발견하게 되었다. 따라서 형태학적인 marker를 지닌 모델 어류 개발의 필요성을 느끼게 되었다.

그리하여 자연계에는 존재하지 않는 새로운 marker를 지닌 수산 LMO 위해성 평가 모델 어류 개발을 위해 *O.latipes*와 *O.sinensis*의 잡종을 만들었다. 또한 잡종의 생식능력을 평가하기 위해 잡종송사리의 생식소를 조직학적으로 관찰하여 송사리와 대륙송사리의 생식소와 개체크기별, 발생단계별로 비교하여 생식능력을 확인해 해양수산 LMO위해성 평가 모델어류로서의 가능성을 확인하는데 목적을 두었다.

II. 재료 및 방법

1. 송사리의 형질전환 연구

1-1. 실험어 및 인공산란

실험어는 부경대학교 어류유전육종학 실험실에서 여러세대를 이어져 오며 사육된 송사리를 사용하였다. 인위적인 산란을 유도하기 위해 명암을 각각 14시간과 10시간으로 반복하여 계속 유지하였다. 송사리의 연중산란을 위해 산란수온인 26℃의 수온을 유지하여 성 성숙을 유도하여 매일 아침 산란하게 하였다. 난질향상을 위해 사료는 알테미아와 아스탁산신이 함유된 넙치치어사료를 급여하였다. 최적의 아스탁산신의 농도를 알아보기 위해 1X, 5X, 10X의 농도의 아스탁산신을 사료에 첨가하여 공급하였다. 실험어인 송사리는 15 ℓ 소형유리수조에 3개 실험구 마다 각각 2개수조에 17마리씩 수용하여 6일간 실험하였다. 그 결과 1X에 비해 5X, 10X에서 수정률과 난질이 좋은 것을 현미경으로 관찰하였고 10X의 아스탁산신이 함유된 사료를 공급하였다(Table 1).

1-2. 유전자

송사리 수정란 속에 주입된 6가지 유전자는 미꾸라지(Mud Loach : ML) 성장호르몬(Growth Hormone: GH)에 ML β -actin을 promoter로 한 ML β -actin ML GH와 송사리(*Orizias latipes* ; OL) β -actin을 promoter로 한 OL β -actin ML GH를 사용하였다. 또한 lectin promoter를 사용한 ML

lectin ML GH와 잉어(*Cyprinus Carpio* :CP) lectin ML GH를 사용하였다.

해수어인 쥐노래미 성장호르몬에 쥐노래미(*Hexagrammos otakii* : Hx) β -actin을 promoter로 한 Hx β -actin Hx GH와 담수어인 메기 성장호르몬에 메기(*Silurus asotus* : Sa) β -actin을 promoter로 한 Sa β -actin Sa GH가 사용되었다(Table 2).

1-3. Microinjection

송사리의 수정된 알은 수온 6℃로 incubator에 보관하였고 one celled embryo stage에서 blastmere의 중앙에 미세현미주입(microinjection)하였다. 가장 효율적인 미세주입할 유전자 농도를 파악하기 위해 ML β -actin ML GH를 0.5X(350ng/ μ l), 1.0X(700ng/ μ l), 1.5X(1050ng/ μ l), 2.0X(1400ng/ μ l) 4가지 농도로 미세주입하였다. 수정후 5일이 지난 초기생존율, 부화율, 난황흡수기 생존율, 및 최종생산율을 측정하였다(Table 3). 그 결과 2.0X에서의 수치가 가장 낮았지만 농도에 비해 큰 차이가 나지 않아 2.0X로 각각의 6가지 유전자를 송사리의 수정란에 미세주입하였다. 미세주입된 수정란은 26℃에서 부화시켰고, 각 부화율과 초기생존율을 측정하였다.

Table 1. Rate of Egg quality and hatching out percentage by density of Astaxanthin included in diet

	No.of fish spawned (%)	Fertilization rate (%)	Egg quality (%)			Hatchout (%)
			0	++	+++	
1X (control)	49.51± 3.47 ^a	49.51± 3.47 ^a	94.06 ± 2.39 ^a	5.94 ±2.39 ^a		91.81±1.62 ^a
5X	44.61± 2.07 ^a	84.23± 10.1 ^b	60.44 ±4.52 ^b	38.46 ±7.52 ^b	1.1±1.5 ^a	93.6±3.73 ^a
10X	44.51± 2.07 ^a	78.21± 2.8 ^c	29.35 ±15.64 ^c	48.91 ±15.98 ^b	21.74 ±14.8 ^b	92.26±0.1 ^a

Table 2 Genes used in this experiment

Name of gene	Promoter	Structure of gene
ML β -actin ML GH	ML β -actin	ML GH
OL β -actin ML GH	OL β -actin	ML GH
ML lectin ML GH	ML lectin	ML GH
CP lectin ML GH	CP lectin	ML GH
Hx β -actin Hx GH	Hx β -actin	Hx GH
Sa β -actin Sa GH	Sa β -actin	Sa GH

Table 3. Result of microinjection to medaka fertilized eggs by density of ML β -actin ML GH

	No.of eggs injected	Early survival up to 5days after Fertilization	Hatch out	Early survival up to yolk sac absorbtion	Yield (%)
0.5X (350ng/ μ l)	106	21	21	20	18.87
1.0X (700ng/ μ l)	119	22	22	22	18.49
1.5X (1050ng/ μ l)	95	19	18	18	18.95
2.0X (1400ng/ μ l)	120	16	16	16	13.33

1-4 DNA isolation and PCR (polymerase chain reaction)

각 유전자를 microinjection한 송사리는 치어때는 개체 전체조직을 성어 때는 꼬리지느러미를 절단하여 Rapid gDNA isolation buffer에 넣어 pk를 첨가한 후 조직을 녹였다. 그 후 phenol choroform과 isopropanol을 통해 gDNA를 추출하였다. PCR은 total 20 μ l로 분석하였으며, gDNA 2 μ l, frimer는 forward primer 2 μ l, reverse primer 2 μ l를 넣었고 3 $\times$ DW 14 μ l를 넣어 분석하였다.

6가지 유전자에 각각 다른 primer를 넣어 사용하였다. ML β -actin ML GH는 mgf3와 mgr1(220bp), mgf3와 mgr4(240bp), mgf4와 mgr2(530bp), mgf5와 mgr1(130bp), mgf5와 mgr2(490bp), mgf6와 mgr1(70bp), mgf6와 mgr2(420bp)를 사용하였다. OL β -actin ML GH는 OL b-act 2F와 mGR2를 사용하였고, ML lectin ML GH는 mlectP 2F와 mGR2를 사용하였다. 또한 CP lectin ML GH는 mlectP 2F와 CGHIR을 사용하였고, Hx β -actin Hx GH는 Hexa GH 1F와 Heca GH 1R을 사용하였으며 Sa β -actin Sa GH는 Sab-actP와 saGH 3R을 primer로 사용하였다.

ML β -actin ML GH는 Cycle1에서 95 $^{\circ}$ C 15분 1cycle로 Cycle2에서 94 $^{\circ}$ C 30초, 50 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 1분으로 45회 반복하였으며 Cycle 3에서 72 $^{\circ}$ C 10분 1cycle로 PCR 분석을 하였다. OL β -actin ML GH는 Cycle1에서 94 $^{\circ}$ C 2분 1cycle로 Cycle2에서 94 $^{\circ}$ C 30초, 64 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초로 40회 반복하였으며 Cycle 3에서 4 $^{\circ}$ C 1로 PCR 분석을 하였다. ML lectin ML 호는 Cycle1에서 94 $^{\circ}$ C 2분 1cycle로 Cycle2에서 94 $^{\circ}$ C 30초, 64 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초로 40회 반복하였으며 Cycle 3에서 4 $^{\circ}$ C로 PCR 분석을 하였다. CP lectin ML GH는 Cycle1에서 94 $^{\circ}$ C 2분 1cycle로 Cycle2에서 94 $^{\circ}$ C 60초, 60 $^{\circ}$ C 60초, 68 $^{\circ}$ C 60초로 36회 반복하였으며 Cycle 3에서 4 $^{\circ}$ C 1회로 PCR 분석을 하였다. Hx β -actin Hx GH는 Cycle1에서 94 $^{\circ}$ C 2분 1cycle로 Cycle2에서 94 $^{\circ}$ C

60초, 50℃ 60초, 64℃ 60초로 33회 반복하였으며 Cycle 3에서 4℃ 1회로 PCR 분석을 하였다. Sa β -actin Sa GH는 Cycle1에서 94℃ 2분 1cycle로 Cycle2에서 94℃ 60초, 60℃ 30초, 68℃ 60초로 40회 반복하였으며 Cycle 3에서 4℃ 1회로 PCR 분석을 하였다.

2. 송사리와 대륙송사리의 잡종

자연계에는 존재하지 않는 새로운 형태학적 marker를 지닌 LMO위해성 평가 모델 어류 개발을 위해 송사리와 대륙송사리를 각각 100마리씩 선별하여 교배시켜 잡종 송사리를 생산하였다. 대륙송사리(♀)×송사리(♂)을 SL, 송사리(♀)×대륙송사리(♂)를 LS, 대륙송사리를 OS, 송사리를 OL로 명명하여 표기하였다.

2-1 잡종 송사리 생식소의 조직학적 분석

LMO위해성 평가 모델 어류의 조건을 갖추기 위한 생식능력을 확인하기 위해 잡종송사리(LS, SL)의 생식소, 대륙송사리의 생식소 및 송사리의 생식소를 조직학 적으로 관찰하였다. 생식소는 Bouin's solution에 고정하였고, 파라핀 절편법에 따라 6 μ m로 절편한 후 Hematoxylin-Eosin으로 염색하였다. 생식소는 각각 전장 1.0 cm, 1.5 cm, 2.0 cm, 2.5 cm의 4가지 크기별로 구분하여 관찰하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 송사리의 형질전환 연구.

1-1 ML β -actin ML GH microinjection and PCR analysis

ML β -actin ML GH를 모두 28회에 걸쳐 송사리 수정란 3178eggs에 미세주입(microinjection) 하였다. 주입 후 수온 26℃ incubator에서 발생 및 부화시켰다. microinjection 후 1일후에 56.65%의 생존율을 보였고, 수정 후 5일뒤에는 35.87%가 생존하였다. 부화율은 34.77%였고 수정 후 부화까지는 7~8일이 소요됐으며, 수정된지 5일 후부터 부화까지의 생존율은 큰 차이를 보이지 않았다. 초기치어기까지의 생존율(Yield)은 7.06%를 나타냈다(Table 4).

ML β -actin ML GH에서 8가지 Primer를 사용하였다. mgf3와 mgr1(220bp), mgf3와 mgr4(240bp), mgf4와 mgr1(170bp), mgf4와 mgr2(530bp), mgf5와 mgr1(130bp), mgf5와 mgr2(490bp), mgf6와 mgr1(70bp), mgf6와 mgr2(420bp)등 많은 primer를 사용하였다. marker는 100bp 사용하였고, 1.0% gel에 100V로 전기영동 하였다. 그 결과 primer별로 무수히 많은 homology band가 나타나 positive band가 나타나는 어류를 구분해내기 어려운 결과가 나왔다(Fig. 1).

1-2 OL β -actin ML GH microinjection and PCR analysis

OL β -actin ML GH 에서는 모두 5회에 걸쳐 송사리 수정란 1791eggs에 미세주입(microinjection)하였다. microinjection 후 수은 26℃ incubator에서 발생 및 부화시켰다. 1일후에 생존율은 59.54%를 나타냈고, 수정된지 5일 후에 생존율은 42.18%로 나타났다. 부화율은 40.32%였고, 수정 후 부화까지 7~8일이 소요됐고 5일 후 생존율과 부화율은 큰 차이를 보이지 않았다. 초기치어기까지의 생존율(Yield)은 10.13%를 나타냈다(Table 5).

OL β -actin ML GH를 송사리의 수정란에 microinjection 한 개체들을 PCR분석하였다. primer는 OL b-act 2F와 mGR2를 사용하였다. marker는 100bp를 사용하였고, 1.0% agarose gel에서 100V로 전기영동 하였다.

그 결과, 암컷에서는 positive band가 나타났지만, 수컷에서는 positive band가 나타나지 않았다. 성별로 positive band를 지닌 개체분석에 어려움을 갖고 있어, PCR을 통한 형질전환 어류의 분자생물학적인 분석의 어려움을 발견하였다.

Table 4. Result of ML β -actin ML GH microinjection to fertilized eggs of medaka

No.of experinent	No. of eggs injected	Survival rate (%)	Early survival up to 5days after Fertilization	Hatch out (%)	Yield (%)
28	3178	56.65	35.87	34.77	7.06

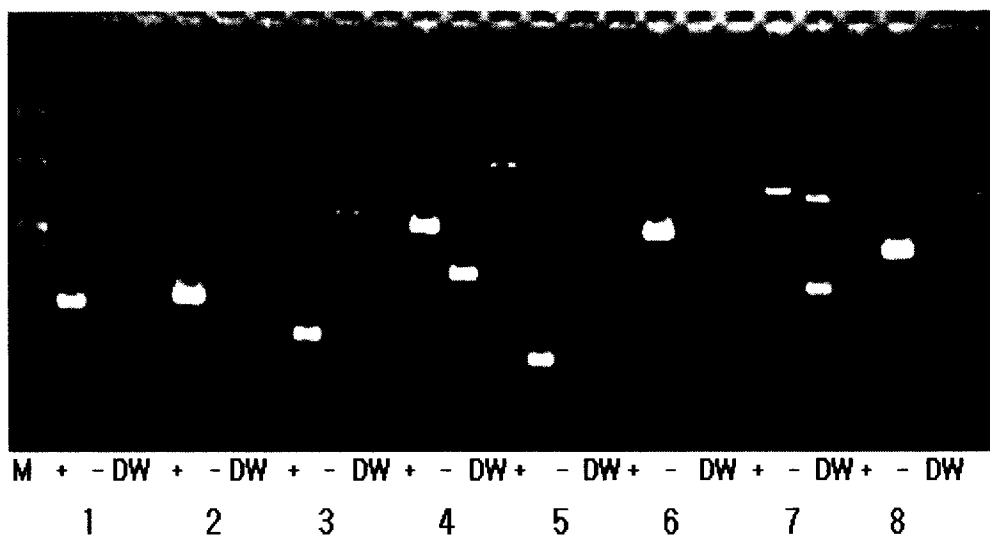


Fig 1. Result of PCR analysis of ML β -actin ML GH microinjection to Fertilized eggs of medaka

※ M : marker , + : plasmid, - : DNA of nagative medaka, DW: 3×DW

Primer 1 : mgf3, mgr1 (220bp), 2 : mgf3, mgr4 (240bp), 3 : mgf4, mgr1 (170bp), 4 : mgf4, mgr2 (530bp), 5 : mgf5, mgr1 (130bp), 6 : mgf5, mgr2(490bp), 7 : mgf6, mgr1 (70bp), 8 : mgf6, mgr2 (420bp)

Table 5. Result of OL β -actin ML GH microinjection to fertilized eggs of medaka

No.of experinent	No. of eggs injected	Survival rate (%)	Early survival up to 5days after Fertilization	Hatch out (%)	Yield (%)
1	424	57.55	24.76	21.7	
2	327	59.02	44.34	41.9	
3	518	66.8	50.19	50.19	
4	264	66.67	61.36	57.58	
5	258	47.67	30.23	30.23	
TOTAL	1791	59.54	42.18	40.32	10.13

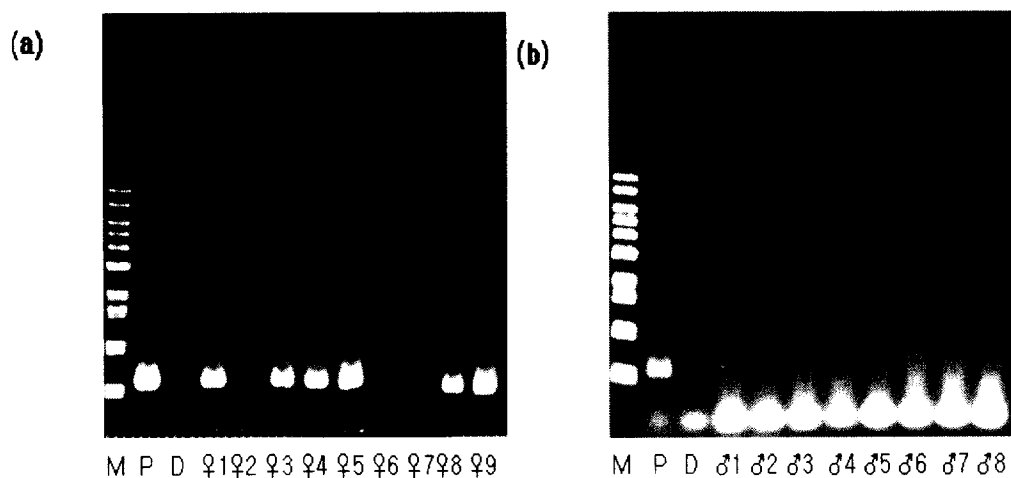


Fig 2. Result of PCR analysis of OL β -actin ML GH microinjection to Fertilized eggs of medaka

※ (a) female, (b) male, M : marker, P : plasmid, D : 3×DW

1-3. ML lectin ML GH microinjection and PCR analysis

ML lectin ML GH 유전자를 총 4회에 걸쳐 송사리의 수정란 537eggs에 미세주입(microinjection) 하였다. 주입 후 수온 26℃ incubator에서 발생 및 부화시켰다. microinjection 후 1일 후에 63.52%의 생존율을 보였고, 수정된 지 5일 뒤에는 35.72%의 생존율을 나타냈다. 부화율은 37.25%로 수정된 지 5일이 지난 후에는 생존율의 차이가 나타나지 않았다. 초기치어기까지의 생존율(Yield)은 8.2%로 나타났다(Table 6).

ML lectin ML GH 유전자를 송사리 수정란에 microinjection 한 개체들을 PCR분석 하였다. primer는 mlectP 2F와 mGR2를 사용하였다. plasmid, microinjection 하지 않은 일반 송사리 및 3차종류수를 대조구로 사용하였다. 1.0% agarose gel에서 100V로 전기영동을 수행하였다. 그 결과, plasmid에서 나타나는 positive band와는 다른 homology band가 많이 나타나 형질전환 여부를 알아보기 힘들어, PCR을 통한 형질전환 어류의 분자생물학적인 분석의 어려움을 발견하였다(Fig. 3).

1-4 CP lectin ML GH microinjection and PCR analysis

CP lectin ML GH는 모두 15회에 걸쳐 송사리 수정란 3521eggs에 미세주입(microinjection)하였다. 주입 후 수온 26℃ incubator에서 발생 및 부화시켰다. microinjection 후 1일 후에 55.41%의 생존율을 보였고, 수정 후 5일 뒤에는 34.73%가 생존하였다. 부화율은 34.08%였고, 수정 후 부화까지는 7~8일이 소요됐으며 5일 후부터 부화까지의 생존율은 큰 차이를 보이지 않았다. 초기치어기까지의 생존율(Yield)은 6.56%를 나타냈다(Table 7).

CP lectin ML GH를 송사리 수정란에 microinjection 한 개체들을

PCR 분석하였다. primer는 mlectP 2F와 CCHIR를 사용하였다. plasmid, CP lectin ML GH를 microinjection하지 않은 일반송사리 및 3차증류수를 대조군으로 사용하였다. 1.0% agarose gel에서 100V로 전기영동을 수행하였다. 그 결과, PCR 분석을 한 모든 개체에서 positive band가 나타나 PCR을 통한 분자생물학적인 분석에 어려움을 발견하였다(Fig. 4).

Table 6. Result of ML lectin ML GH microinjection to fertilized eggs of medaka

No.of experinent	No. of eggs injected	Survival rate (%)	Early survival up to 5days after Fertilization	Hatch out (%)	Yield (%)
1	235	53.19	27.66	27.66	
2	157	64.08	41.63	40.41	
3	75	68.18	36.36	36.36	
4	70	68.63	37.25	37.25	
TOTAL	537	63.52	35.72	35.42	8.2

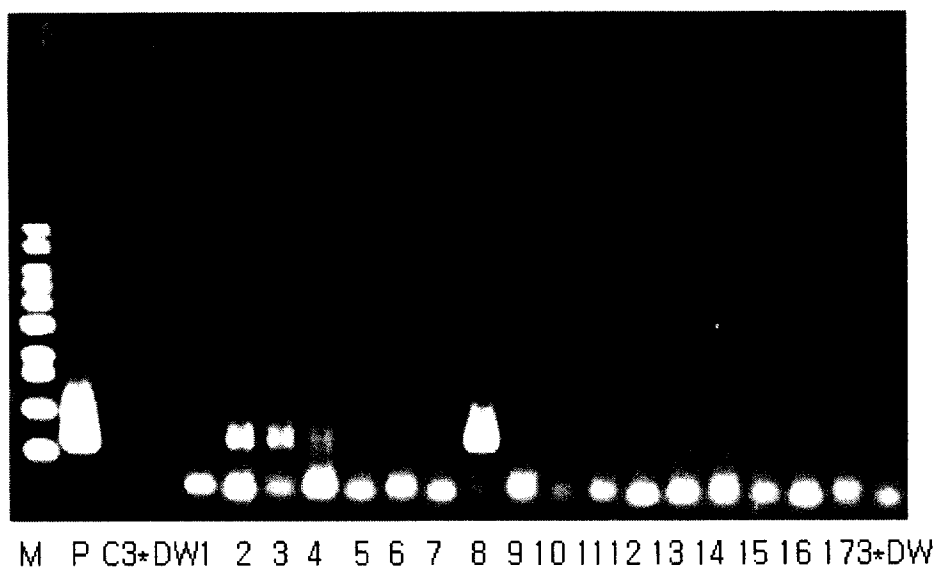


Fig. 3. Result of PCR analysis of ML lectin ML GH microinjection to Fertilized eggs of medaka

※ M : marker, P : plasmid, C : non-injected medaka

1~17: samples from microinjected medaka

Table 7. Result of CP lectin ML GH microinjection to fertilized eggs of medaka

No.of experinent	No. of eggs injected	Survival rate (%)	Early survival up to 5days after Fertilization	Hatch out (%)	Yield (%)
15	3521	55.41	34.73	34.08	6.56

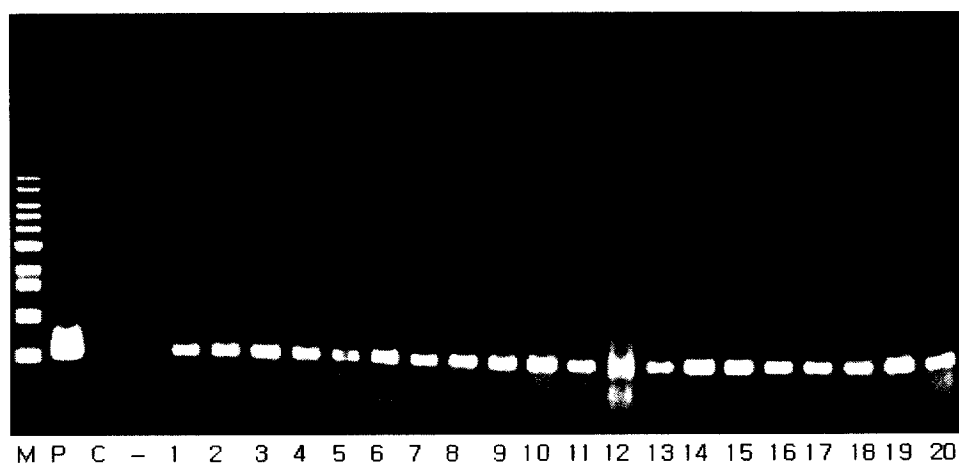


Fig 4. Result of PCR analysis of CP lectin ML GH microinjection to Fertilized eggs of medaka

※ M: marker, P: plasmid C: non-injected medaka

1~20: samples from microinjected medaka

1-5 Hx β -actin Hx GH microinjection and PCR analysis

Hx β -actin Hx GH는 모두 22회에 걸쳐 송사리 수정란 2007eggs에 미세주입(microinjection)하였다. 주입 후 수온 26℃ incubator에서 발생 및 부화시켰다. microinjection 후 1일 후에 57.7%의 생존율을 보였고, 수정된지 5일 뒤에는 24.81%가 생존하였다. 부화율은 23.52%였고, 수정 후 부화까지는 7~8일이 소요됐으며 5일 후부터 부화까지의 생존율은 큰 차이를 보이지 않았다. 초기치어기까지의 생존율(Yield)는 3.37%를 나타냈다(Table 8).

Hx β -actin Hx GH유전자를 송사리 수정란에 microinjection 한 개체들을 PCR분석 하였다. primer는 Hexa GH 1F와 Heca GH 1R(638bp)를 사용하였다. 1.0% agarose gel에서 100V로 전기영동을 수행하였다.

그 결과, plasmid에서 나타나는 positive band와는 다른 homology band가 많이 나타나 형질전환 오류를 알아보기 힘들어, PCR을 통한 형질전환 오류의 분자생물학적인 분석의 어려움을 발견하였다(Fig. 5).

1-6 Sa β -actin Sa GH microinjection and PCR analysis

Sa β -actin Sa GH는 모두 5회에 걸쳐 송사리 수정란 860eggs에 미세주입(microinjection)하였다. 주입 후 수온 26℃ incubator에서 발생 및 부화시켰다. microinjection 후 1일 후에 39.3%의 생존율을 보였고, 수정된지 5일 뒤에는 24.81%가 생존하였다. 부화율은 17.91%였고, 수정 후 부화까지는 7~8일이 소요됐으며 5일 후부터 부화까지의 생존율은 큰 차이를 보이지 않았다. 초기치어기까지의 생존율(Yield)는 10.7%를 나타냈다(Table 9).

Sa β -actin Sa GH유전자를 송사리 수정란에 microinjection 한 개체들을 PCR분석 하였다. primer는 Sab-actP와 saGH 3R을 사용하였다.plasmid, microinjection 하지 않은 일반 송사리 및 3차증류수를 대조구로 사용하였

다. 1.0% agarose gel에서 100V로 전기영동을 수행하였다. 그 결과, plasmid에서 나타나는 positive band와는 다른 homology band가 많이 나타나 형질전환 오류를 알아보기 힘들어, PCR을 통한 형질전환 오류의 분자생물학적인 분석의 어려움을 발견하였다(Fig. 6).

Table 8 Result of Hx β -actin Hx GH microinjection to fertilized eggs of medaka

No.of experinent	No. of eggs injected	Survival rate (%)	Early survival up to 5days after Fertilization	Hatch out (%)	Yield (%)
22	2007	57.7	24.81	23.52	3.37

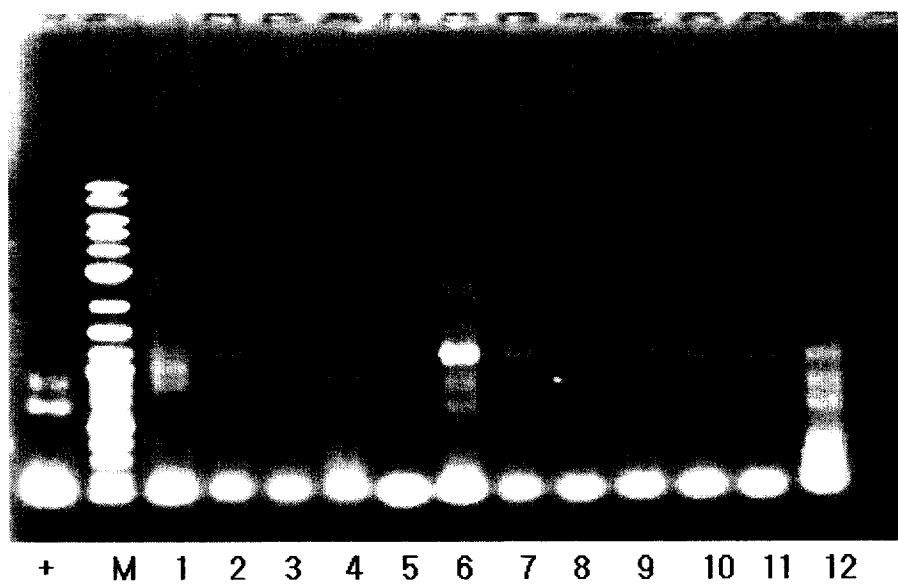
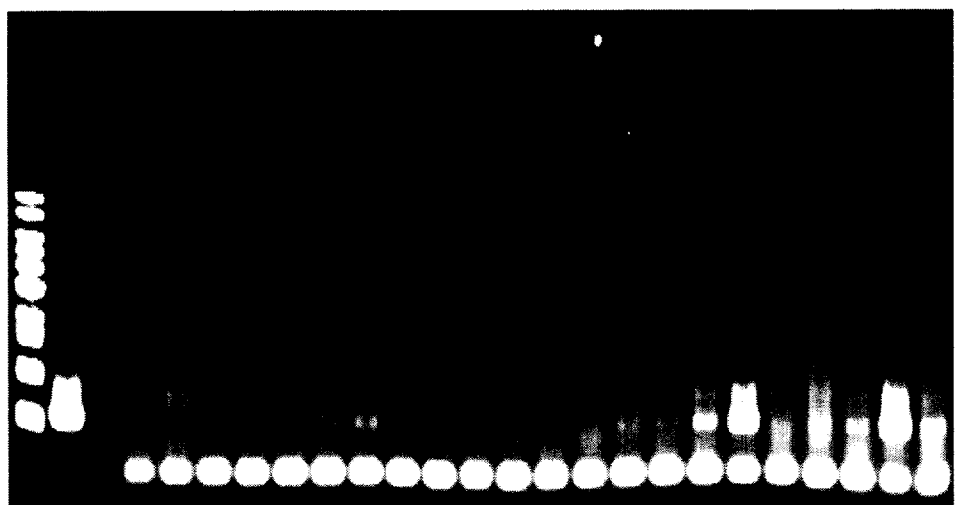


Fig. 5. Result of PCR analysis of Hx β -actin Hx GH microinjection to Fertilized eggs of medaka

※ M : marker, +: plasmid 1~12: samples from microinjected medaka

Table 9. Result of table 8. of Sa β -actin Sa GH microinjection to fertilized eggs of medaka

No.of experinent	No. of eggs injected	Survival rate (%)	Early	Hatch out (%)	Yield (%)
			survival up to 5days after Fertilization		
1	194	43.3	17.01	16.5	
2	212	28.3	16.04	16.04	
3	42	92.68	41.46	39.02	
4	198	40.4	16.67	16.67	
5	215	35.35	17.21	17.21	
TOTAL	860	39.30	17.91	17.67	10.7



M + -DW 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

Fig 6. Result of PCR analysis of Sa β -actin Sa GH microinjection to Fertilized eggs of medaka

※ M : marker +: plasmid -: non-injected medaka, DW: 3×DW

1~21: samples from microinjected medaka

2. 대륙송사리(OS), 송사리(OL), 잡종송사리(LS, SL)의 조직학 적 관찰

대륙송사리, 송사리 및 잡종송사리를 크기별로 각각 전장 1.0 cm, 1.5 cm, 2.0 cm, 2.5 cm 등 4가지 크기에서 생식소를 관찰하였다.

2-1 전장 1.0cm에서의 난소 및 정소 발생.

전장 1.0cm에서 난소는 암수마리의 생식소를 조직학 적으로 관찰하였다. 그 결과 Chromatin nucleolus stage가 가장 많은 비율을 차지하였다. 또한 Late stage인 난소가 조금씩 보이기 시작했다(Table 10)(Fig.7). 대륙송사리(OS), 송사리(OL), 잡종송사리(LS, SL)의 생식소 발달단계가 비슷한 결과를 나타냈다. 정소에서는 정원세포와 정모세포가 관찰되었다(Fig.8).

2-2 전장 1.5 cm에서의 난소 및 정소 발생.

전장 1.5 cm에서 난소와 정소는 암·수 3마리씩 관찰하였다. 그 결과 전장 1.0cm에 비해 Chromatin nucleolus stage의 비율이 줄어든 반면, Late peri-nucleous stage의 비율이 늘어났고, Cortical alveolus stage가 관찰되기 시작했다.(Table 11)(Fig.9) 또한 전장 1.0 cm와 같이 대륙송사리(OS), 송사리(OL), 잡종송사리(LS, SL)의 생식소 발달단계가 비슷한 결과를 나타냈다. 정소에서는 정모세포가 주로 관찰되었다(Fig.10).

2-3 전장 2.0 cm에서의 난소 및 정소 발생.

전장 2.0 cm에서 난소와 정소는 암·수 3마리씩 관찰하였다. 그 결과 난소의 발달단계가 Chromatin nucleolus stage부터 Migratory nucleus stage까지 여러단계의 난소가 관찰돼, 전장 1.5 cm와 전장 2.0 cm 사이에 생식소가 급속도로 발달함을 알 수 있었다. (Table 12)(Fig.11) 또한 대륙송사리(OS), 송사리(OL), 잡종송사리(LS, SL)의 생식소 발달단계가 비슷한 결과를 나타냈다. 정소에서는 정모세포와 정세포가 관찰되었다(Fig.12).

2-4 전장 2.5 cm에서의 난소 및 정소 발생.

전장 2.5 cm에서 난소와 정소는 암·수 3마리씩 관찰하였다. 그 결과 난소의 발달단계가 Chromatin nucleolus stage부터 Migratory nucleus stage까지 여러단계의 난소가 관찰되었고, 전장 2.0 cm에 비해 난소 발달단계가 더욱 고루 분포하는 것이 관찰되었다(Table 13)(Fig.12). 또한 대륙송사리(OS), 송사리(OL), 잡종송사리(LS, SL)의 생식소 발달단계가 비슷한 결과를 나타냈다. 정소에서는 정세포가 전장 2.0 cm에 비해 더욱 활발하게 관찰되었다(Fig.13)

Table 10. The development stage of oocyte of OL, OS, LS, SL of total length of 1.0 cm

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	TOTAL
OL	46	27	3						76
(%)	60.6	35.1	3.9						100
OS	41	18	2						61
(%)	67.2	29.5	3.3						100
LS	47	28	5						80
(%)	58.8	35	6.2						100
SL	75	53	4						132
(%)	56.8	40.2	3						100

1. Chromatin nucleolus stage 2. Early peri-nucleous stage 3. Late peri-nucleous stage 4. Cortical alveolus stage 5. Primary yolk globule stage 6. Secondary yolk globule stage 7. Tertiary yolk globule stage 8. Migratory nucleus stage



OS



OL



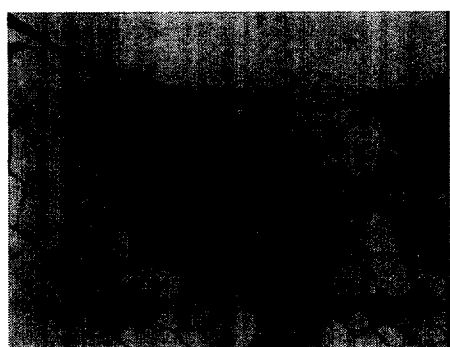
LS



SL

Fig.7. The tissue of oocyte of OS, OL, LS, SL of total length of 1.0 cm

※OL - *Oryzias latipes* ♀ × *O. latipes* ♂, OS - *O. sinensis* ♀ × *O. sinensis* ♂,
LS - *O. latipes* ♀ × *O. sinensis* ♂, SL - *O. sinensis* ♀ × *O. latipes* ♂



OL



OS



LS



SL

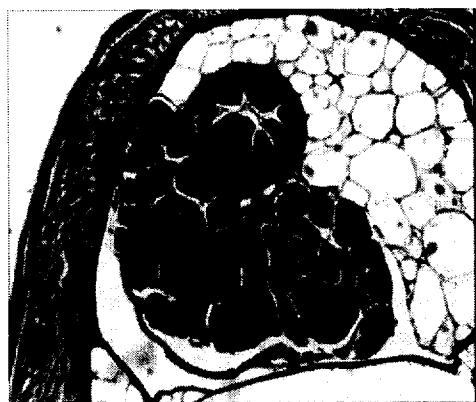
Fig.8. The tissue of sperm of OS, OL, LS, SL of total length of 1.0 cm

※OL - *Oryzias latipes* ♀ × *O. latipes* ♂, OS - *O. sinensis* ♀ × *O. sinensis* ♂,
LS - *O. latipes* ♀ × *O. sinensis* ♂, SL - *O. sinensis* ♀ × *O. latipes* ♂

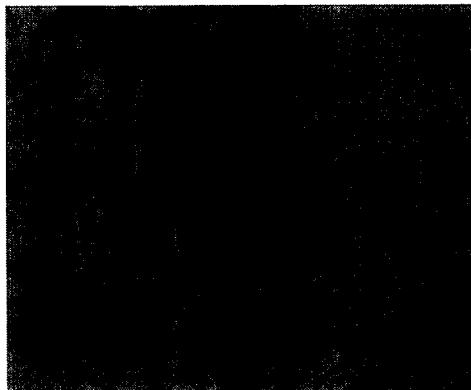
Table 11. The development stage of oocyte of OL, OS, LS, SL of total length of 1.5 cm

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	TOTAL
									L
OL	29	26	12	4					71
(%)	40.9	36.6	16.9	5.6					100
OS	59	48	18	1					126
(%)	46.8	38.1	14.3	0.8					100
LS	37	19	18						74
(%)	50	25.7	24.3						100
SL	44	27	18	2					91
(%)	48.3	29.6	19.8	2.1					100

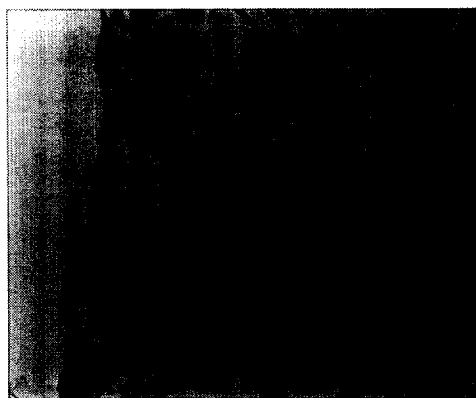
1. Chromatin nucleolus stage ,2. Early peri-nucleous stage 3. Late peri-nucleous stage 4. Cortical alveolus stage 5. Primary yolk globule stage 6. Secondary yolk globule stage 7. Tertiary yolk globule stage 8. Migratory nucleus stage



OL



OS



SL



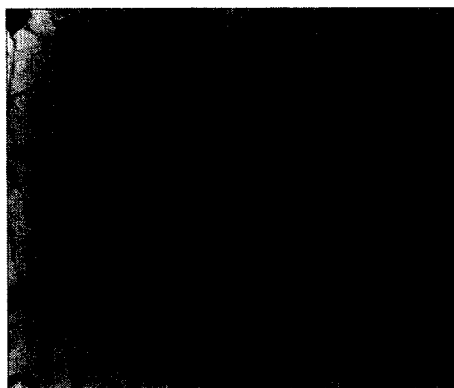
LS

Fig. 9. The tissue of oocyte of OS, OL, LS, SL of total length of 1.5 cm

※OL - *Oryzias latipes* ♀ × *O. latipes* ♂, OS - *O. sinensis* ♀ × *O. sinensis* ♂,
LS - *O. latipes* ♀ × *O. sinensis* ♂, SL - *O. sinensis* ♀ × *O. latipes* ♂



OL



OS



LS



SL

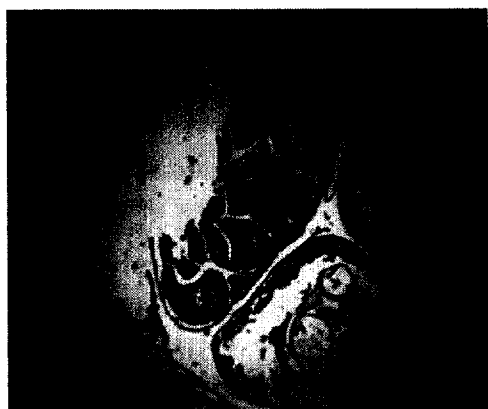
Fig. 10. The tissue of sperm of OS, OL, LS, SL of total length of 1.5 cm

※ OL - *Oryzias latipes* ♀ × *O. latipes* ♂, OS - *O. sinensis* ♀ × *O. sinensis* ♂,
LS - *O. latipes* ♀ × *O. sinensis* ♂, SL - *O. sinensis* ♀ × *O. latipes* ♂

Table 12. The development stage of oocyte of OL, OS, LS, SL of total length of 2.0 cm

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	TOTAL
OL	23	18	9	8	3	6	3	2	72
(%)	32	25	12.5	11	4.2	8.3	4.2	2.8	100
OS	61	38	31	13	8	4	6	5	166
(%)	36.7	22.9	18.7	7.8	4.9	2.4	3.6	3.0	100
LS	41	30	27	6	7	5	6	3	125
(%)	32.8	24	21.6	4.8	5.6	4	4.8	2.4	100
SL	27	33	18	10	6	8	4	0	106
(%)	25.5	31.1	17	9.4	5.7	7.5	3.7	0	100

1. Chromatin nucleolus stage 2. Early peri-nucleous stage 3. Late peri-nucleous stage 4. Cortical alveolus stage 5. Primary yolk globule stage 6. Secondary yolk globule stage 7. Tertiary yolk globule stage 8. Migratory nucleus stage



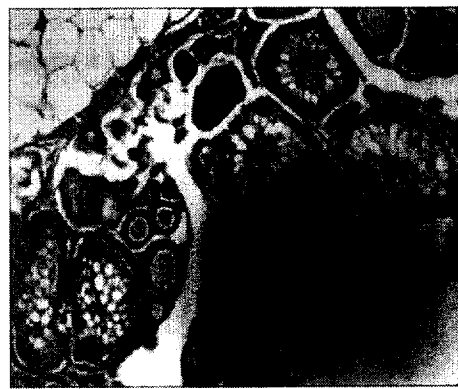
OL



OS



LS



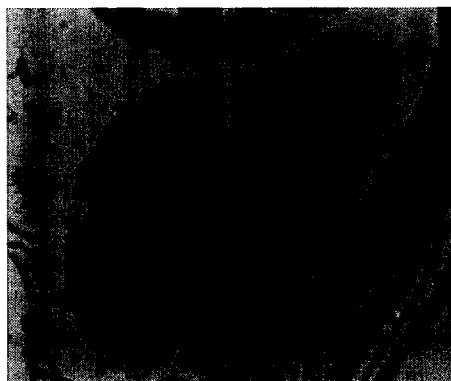
SL

Fig.11. The tissue of oocyte of OS, OL, LS, SL of total length of 2.0 cm

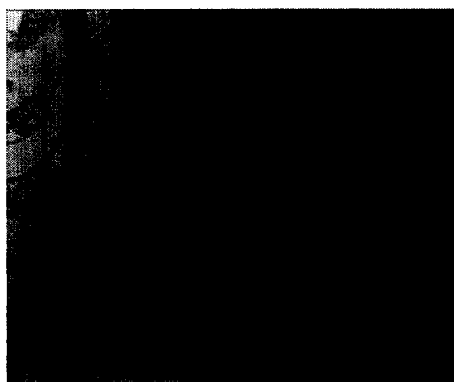
※ OL - *Oryzias latipes* ♀ × *O. latipes* ♂ , OS - *O. sinensis* ♀ × *O. sinensis* ♂
 LS - *O. latipes* ♀ × *O. sinensis* ♂ , SL - *O. sinensis* ♀ × *O. latipes* ♂



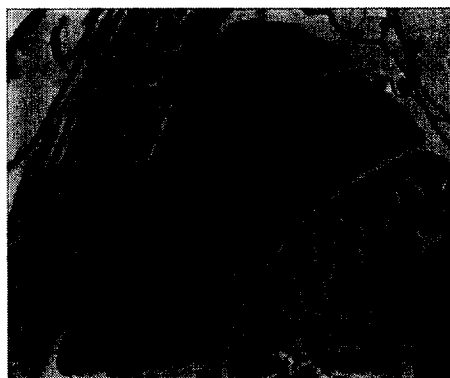
OL



OS



LS



SL

Fig .12. The tissue of sperm of OS, OL, LS, SL of total length of 2.0 cm

※ OL - *Oryzias latipes* ♀ × *O. latipes* ♂ , OS - *O. sinensis* ♀ × *O. sinensis* ♂
 LS - *O. latipes* ♀ × *O. sinensis* ♂ , SL - *O. sinensis* ♀ × *O. latipes* ♂

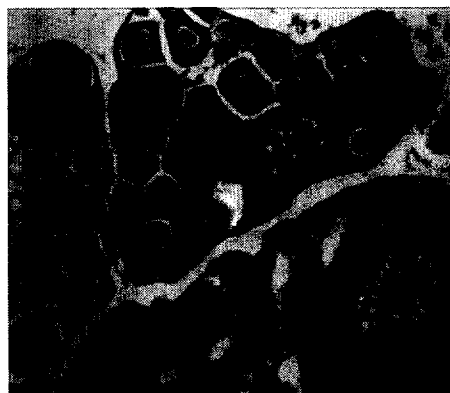
Table 13. The development stage of oocyte of OL, OS, LS, SL of total length of 2.5 cm

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	TOTAL
OL	44	35	44	36	12	9	9	9	198
(%)	22.2	17.8	22.2	18.2	6.1	4.5	4.5	4.5	100
OS	43	28	42	29	11	9	8	8	178
(%)	24.2	15.6	23.6	16.3	6.2	5.1	4.5	4.5	100
LS	45	42	42	25	17	14	10	8	203
(%)	22.2	20.7	20.7	12.3	8.4	6.9	4.9	3.9	100
SL	30	29	22	34	34	12	13	7	181
(%)	16.6	16	12.2	18.8	18.8	6.6	7.2	3.8	100

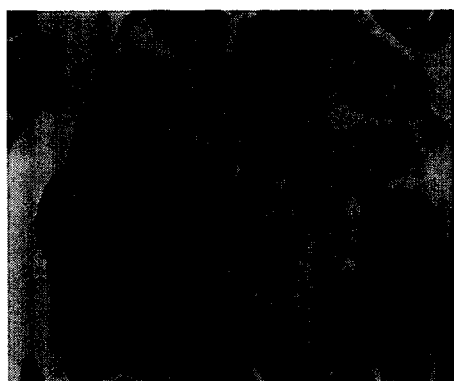
1. Chromatin nucleolus stage ,2. Early peri-nucleous stage 3. Late peri-nucleous stage 4. Cortical alveolus stage 5. Primary yolk globule stage 6. Secondary yolk globule stage 7. Tertiary yolk globule stage 8. Migratory nucleus stage



OL



OS



LS



SL

Fig. 13. The tissue of oocyte of OS, OL, LS, SL of total length of 2.5cm

※ OL - *Oryzias latipes* ♀ × *O. latipes* ♂ , OS - *O. sinensis* ♀ × *O. sinensis* ♂
 LS - *O. latipes* ♀ × *O. sinensis* ♂ , SL - *O. sinensis* ♀ × *O. latipes* ♂



OL



OS



LS



SL

Fig. 14. The tissue of sperm of OS, OL, LS, SL of total length of 2.5 cm

※ OL - *Oryzias latipes* ♀ × *O. latipes* ♂ , OS - *O. sinensis* ♀ × *O. sinensis* ♂
 LS - *O. latipes* ♀ × *O. sinensis* ♂ , SL - *O. sinensis* ♀ × *O. latipes* ♂

IV. 고 찰

본 실험에서는 해양수산 LMO위해성 평가기술을 정립하기 위한 모델 어류로서 송사리를 사용하였다. 송사리는 우선 우리나라에서 쉽게 구할 수 있고, 또한 세대가 짧아 형질전환 어류의 자손에 대한 분석하기 쉽고, 수온 자극을 통해 매일 산란한다는 점에서 실험에 적합하였다.

미세현미주입은 난질에 큰 영향을 미치기 때문에 난질을 높이기 위해 아스탁산신이 함유된 사료와 알테미아를 부화시켜 공급하였다. 산란한 알은 매일 오전 9:00에 수거하여 수온 6℃에 보관하여 발생을 지연시켰고, 미세현미주입은 one-celled stage에서 blastomere의 중앙으로 주입하였다.

형질전환 연구의 다양한 실험을 위해 6가지 유전자를 사용하였다. 우선 미꾸라지 성장호르몬에 프로모터를 다르게 한 4가지 유전자를 사용하였다. 프로모터는 크게 β -actin promoter와 lectin promoter로 나뉘었다. β -actin promoter는 미꾸라지 β -actin promoter와 송사리 β -actin promoter이고, lectin promoter는 미꾸라지 lectin promoter와 잉어 lectin promoter를 사용하였다. 또한 해수어의 한 종인 쥐노래미의 성장호르몬에 쥐노래미 β -actin promoter를 붙인 Hx β -actin Hx GH와 담수어의 한 종인 메기의 성장호르몬에 메기 β -actin promoter를 붙인 Sa β -actin Sa GH를 사용하였다.

ML β -actin ML GH의 미세주입 후 PCR분석 결과 8개의 primer마다 각각 무수히 많은 homology band가 나와 positive band를 구분하기 어려웠다. 결국 ML β -actin ML GH유전자의 분자생물학적인 분석에 어려움을 발견하였다.

OL β -actin ML GH의 미세주입 후 PCR분석 결과, 암컷에서만 positive

band가 나타나는 결과를 나타냈다. 수컷에서는 positive band가 나타나지 않았다. 송사리 β -actin promoter에 따른 성별에 관련된 개체분석에 어려움을 갖게 되었다. OL β -actin ML GH도 PCR 분석을 통한 형질전환 어류의 분자생물학적인 분석의 어려움을 발견하였다.

ML lectin ML GH의 미세주입 후 PCR분석 결과, plamid에 나타나는 positive band와는 다른 homology band가 많이 나타나 형질전환 어류를 구분해내기 힘들어, PCR분석을 통한 형질전환 어류의 분자생물학적인 분석의 어려움을 발견하였다.

CP lectin ML GH의 미세주입 후 PCR분석 결과, 분석한 모든 개체들에게서 positive band가 나타나 형질전환 어류를 구분해내기 힘들어, PCR 분석을 통한 형질전환 어류의 분자생물학적인 분석의 어려움을 발견하였다.

Hx β -actin Hx GH와 Sa β -actin Sa GH의 미세주입 후 PCR 분석 결과, plamid에 나타나는 positive band와는 다른 homology band가 많이 나타나 형질전환 어류를 구분해내기 힘들어, PCR분석을 통한 형질전환 어류의 분자생물학적인 분석의 어려움을 발견하게 되었다.

6가지 유전자를 형질전환 연구에 사용하여 분석한 결과, primer에 따른 수많은 homology band와 성별에 따른 positive band의 유무, 모든 개체에서의 positive band가 보이는 등 분자생물학적 분석을 통한 송사리의 수산해양 LMO위해성 평가 모델 어류 개발에 어려움을 발견하게 되었다. 따라서 분자생물학적 분석을 통한 모델 어류 개발이 아닌, 자연계에는 존재하지 않는 marker를 지닌 새로운 모델 어류 개발이 필요하게 되었다.

본연구에서는 우리나라에서 서식하고 있는 대륙송사리를 이용하여 송사리(*O.latipes*)와 대륙송사리(*O.sinensis*)를 교배하여 잡종을 만들었다. 송사리는 한국의 동해로 유입하는 하천지역에 주로 분포하고, 대륙송사리는 한국

의 서해로 유입하는 하천에 분포하고 있다(김과 문 1987; Sakaizumi와 Jeon, 1987; Uwa와 Jeon, 1987; Kim과 Lee, 1992; 김과 강 1993; 김, 1997). 따라서 지리적으로 격리가 되어 있어 자연 생태계에서는 잡종송사리가 존재하지 않아 잡종송사리만의 형태적인 marker를 가진 해양수산 LMO위해성 평가 모델 어류를 개발하고자 하였다.

잡종송사리의 해양수산 LMO위해성 평가 모델 어류 개발을 위해, 잡종송사리의 생식능력을 확인하고자 하였다. 교배시킨 대륙송사리(♀)×송사리(♂)인 SL와 송사리(♀)×대륙송사리(♂)인 LS를 각각 크기 별로 전장 1.0 cm, 1.5 cm, 2.0 cm, 2.5 cm 때 생식소를 조직학 적으로 관찰하였다. 대륙송사리와 송사리를 대조군으로 하여 같이 관찰하였다. 그 결과 대륙송사리, 송사리 및 잡종송사리의 생식소 발달단계가 비슷하다는 것이 관찰되었고, 전장 1.5 cm에서 2.0 cm사이에 생식소가 급격하게 발달한다는 것이 관찰되었다. 잡종송사리의 생식능력을 확인해 잡종송사리의 수산해양 LMO 위해성 평가 모델 어류의 가능성을 확인하였다.

앞으로 잡종송사리를 활용한 LMO 위해성 평가 실험을 통한 LMO의 위해성 안정성 평가 기술을 확보하여, 산업화에 이용하고 나아가 LMO에 대한 안전관리 기반을 구축하고, 수입 예상 해양수산물에 대한 검색 및 해양환경 위해성 평가기술을 정립해 나가야 할 것이다.

V. 국문 요약

송사리 속 어류는 소형담수어로써 사육이 용이하며 실험실 내 산란유도가 쉬워 외래 유전자이식을 통해 형질전환어류가 유도 될 경우, 해양 수산 LMO의 생태계 위해성 평가 모델 로 사용 가능한 어종이다.

본 연구에서는 송사리(*Orizias latipes*)를 해양 수산 LMO 생태계 위해성 평가 모델 어류로 개발하기 위해 외래 유전자이식 기법을 확립하고자 하였다. 이를 위해 lectin promoter에 미꾸라지 성장호르몬과 잉어 성장호르몬 유전자를 삽입한 유전자, β -actin promoter에 미꾸라지, 메기, 쥐노래미등의 성장호르몬을 수정란에 이식 하였다. 이 후 형질전환어류의 동정을 위해 PCR분석을 실시한 결과, ML β -actin MLGH에서는 primer에 따라 다양한 homology band가 나타났고 OL β -actin MLGH에서는 암컷에서만 positive band가 나타났으며 CP lectin MLGH에서는 모든 개체에서 positive band가 관찰되었다. 또한 쥐노래미 β -actin GH와 ML lectin GH, 메기 β -actin GH에서도 많은 homology band가 나타나 분자 생물학적인 분석을 통한 속성장 형질전환 송사리 동정의 어려움이 관찰되었다. 이에 형태학적 marker를 가진 생태계 위해성 방지 모델어류를 개발하기 위해 우리나라에 서식하는 또 다른 송사리 속 어류인 대륙송사리를 이용하여 잡종을 만들어 그의 생식능력을 판단하기 위해 생식소를 관찰하였다.

그 결과, 전장 1.0 cm의 암컷어류에서는 chromatin nucleolus stage와 early peri-nucleolus stage가 보이는 등 초기 발생단계가 주로 관찰되었으나 종간 생식소발생단계는 서로간 비슷한 결과를 보였고, 전장1.5cm의 암컷 어류들도 chromatin nucleolus stage와 early peri-nucleolus stage가 주로 관찰 되

었으나 1.0 cm의 암컷어류에 비해 late peri-nucleous stage가 많이 관찰되었다. 그러나 종간의 생식소 발생단계는 역시 차이가 나지 않았다. 전장 2.0 cm와 2.5 cm의 암컷 어류들에서는 전장 1.0 cm과 1.5 cm의 어류에 비해 고른 발생단계분포를 나타내었고 정소에서는 정세포가 관찰되었으나 종간의 차이는 관찰되지 않았다.

본 연구에서 유도된 잠종송사리는 자연계에서는 존재하지 않는 장점 때문에 형태학적 marker로 이용할 수 있으므로 형질전환연구등을 통해 해양수산 LMO 생태계 위해성 평가 모델 어류로 개발이 가능할 것으로 생각된다.

VI. 감사의 글

본 논문이 완성되기까지 미흡한 저에게 올바른 학문의 길로 인도하여 주시고 항상 사랑과 격려로 용기를 북돋아 주신 김동수 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

항상 바쁘신 가운데에서도 본 논문을 완성할 수 있도록 아낌없는 조언과 충고로 지도하여 주신 김종명 교수님, 남윤권 교수님 그리고 자상한 관심으로 늘 배려해 주신 손철현 교수님, 조재운 교수님, 허성범 교수님, 장영진 교수님, 김창훈 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 또한 실험을 수행할 수 있도록 도움을 아끼지 않으신 해양대학교 박인석 교수님과 해양연구원에 노충환 선임연구원님께 감사를 드리며, 아울러 해양대학교 김은미 선생님께도 감사를 드립니다.

어류유전육종학실험실에서 끊임없는 관심으로 위로와 격려를 해주신 팽뢰 박사님, 이상윤 박사님, 임재현 박사님, 우선량님, 이수진님 그리고 석사과정을 같이 하였던 이승기님, 강선영님 아울러 말없이 잘 따라주었던 송하연 후배님, 이상재 후배님, 윤미영 후배님, 실험이 안될때마다 많은 도움을 주신 김근룡 박사님, 조영선 선배님, 하은미님, 이상윤님, 박신명님에게 깊은 감사를 드립니다. 같은 과에서 대학원 생활에 도움을 주신 민병화 선배님, 박규진 선배님, 민병희 선배님, 손지형님, 정민환님, 한명석님, 황철희님, 노경언님, 남광철님, 김진주님, 유광열님, 김영철님에게도 감사를 드립니다.

대학원 생활 동안, 언제나 정성으로 뒷바라지 해주신 부모님과 항상 기쁨이 되어주었던 동생 서정이에게 깊은 감사의 마음을 드립니다.
마지막으로 언제나 제 곁에서 변함없이 지켜주신 하나님께 이 논문을 드립니다.

VII. 참고문헌

- Alam S.M., A. Popplewell and N. Maclean. 1996. Germ line and expression of a *lacZ* containing transgene in tilapia (*Oreochromis* Transgenic Res. 5: 87-96.
- Bayer T.A. and J.A. Campos-Ortega. 1992. A transgene containing *lacZ* is expressed in primary sensory neurons in zebrafish. Development 115: 421-426.
- Billard R., A. Fostier, C. Weil, and B. Breton. 1992. The endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. Can. J. Fish Aquat. Sci. 39: 65-79.
- Caldovic L. and P.B. Hackett. 1995. Development of expression and their transfer into transgenic fish. Mol. Mar. Biol. Biol. 4: 51-61.
- Coward K. and N.R. Bromage. 1998. Histological classification of oocyte growth and the dynamics of ovarian recrudescence in *Tilapia zillii*. J. Fish Biol. 53: 285-302.
- Devlin R.H., T.Y. Yesaki, E.M. Donaldson, S.J. Du, and C.L. Hew. 1995. Production of germline transgenic Pacific salmonids with dramatically increased growth performance. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 52: 1376-1384.
- Dunham R.A., A.C. Ramboux, P.L. Duncan, M. Hayat, T.T.

- Chen, C.M. Lin, K. Kight, I. Gonzalez-Villasenor and D.A. Powers. 1992. Transfer, expression, and inheritance of salmonid growth hormone genes in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, and effects on performance traits. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 1: 380-389.
- Fostier A. and B. Jalabert. 1986. Steroidogenesis in rainbow trout (*gairdneri*) at various pre-ovulatory stages: changes in plasma levels and in vivo and in vitro responses of the ovary to salmon gonadotropin. Fish Physiol. Biochem. 2: 87-89.
- Gillet C., B. Breton and R. Billard. 1978. Seasonal effect of exposure to temperature and photoperiod regimes on gonad growth and plasma gonadotropin in goldfish (*Carassius auratus*). Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys 18: 1045-1049.
- Goswami S.V. and B.I. Sundararaj. 1971. In vitro maturation of oocytes of the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch): Effects of mammalian hypophyseal hormones, catfish pituitary homogenate, steroid precursors and metabolites, and gonadal and steroids. J. Exp. Zool. 178: 467-478.
- Gong Z., C.L. Hew and J.R. Vielkind. 1991. Functional analysis and temporal expression of promoter regions from fish antifreeze protein genes in transgenic Japanese medaka

- embryos. Mol. Mar. Biol. Biotech., 1: 64-72.
- Goswami S.V. and B.I. Sundararaj. 1974. Effects of C18, C19, and C21 steroids on in vitro maturation of oocytes of the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). Gen. Comp. Endocrinol. 23: 282-285.
- Haider S. and N.V. Rao. 1992. Oocyte maturation in *Clarias batrachus* III: purification and characterization of maturation inducing steroid. Fish Physiol. Biochem. 9: 505-512.
- Hew C.L., G.L. Fletcher and P.L. Davies. 1995. Transgenic salmon: tailoring the genome for food production. J. Fish Biol. 47: 1-19, (Suppl. A).
- Higashijima S., H. Okamoto, N. Ueno, Y. Hotta, and G. Eguchi. 1997. High-frequency generation of transgenic zebrafish which using promoters of zebrafish origin. *Dev. Biol.* 192: 289-299.
- Hurst C.D., A. Knight and I.J. Bruce. 1999. PCR detection of modified soy and maize in foodstuffs. Mol. Breed. 5: 579-586.
- Iyengar A., F. Muller and N. Maclean. 1996. Regulation and of in fish-a review. Transgenic Res. 5: 147-166.
- Kim. I. S. and K. C. Moon. 1987. The karyotype of a ricefish. *Oryzias latipes* from southern Korea. Korean J. Zool.. 30:

- 379-386 (in Korean).
- Kim. I. S. and E. H. Lee. 1992. New record of the ricefish. *Oryzias latipes sinensis* (Pisces, Oryziidae) from Korea. Korean J. Syst. Zool.. 8: 177-182.
- King W.V., P. Thomas, R.M. Harrell, R.G. Hodson and C.V. Sullivan. maturation of striped bass, *Morone saxatilis* L. Gen. Comp. Endocrinol. 95: 178-191.
- Kinoshita M., H. Totohara, M. Sakaguchi, K. Inoue, S. Yamashita, S. M. Satake, Y. Wakamatsu, and K. Ozato. 1996. A stable line of transgenic medaka (*Oryzias latipes*) carrying the CAT gene. Aquaculture 143: 267-276.
- Kestemont P. 1990. Dynamic aspects of ovogenesis in an fish, the gudgeon *Gobio gobio* L. (Telestoi, Cyprinidae), under controlled temperature and photoperiod conditions. Aquat. Living Resour. 3: 61-74.
- Koetsier P.A., L. Mangel, B. Schmitz, and W. Doerfler. 1996. Stability of transgene methylation patterns in mice: position effects, strain specificity and cellular mosaicism. Transgenic Res. 5: 235-244.
- Lim S.K., H.j. Beak and C.H. Han. 1997. Effects of steroids and hCG on in vitro maturation and ovulation of oocyte in Banded catfish, *Pseudobagrus fulvidraco*. J. Korean Fish. Soc. 30: 203-210.

- Malservisi A. and E. Magnin. 1968. Changements cycliques annuels se produisant dans les ovaires de *Perca flavescens* (Mitchill) de region de Montreal. Nat. Can. 95: 929-945. (in French).
- Masaru M., T. Yamagishi., M. Sakaizumi and S. R. Joen. 1997. Mitochondrial DNA variation in the Korean wild population of medaka, *Oryzias latipes*. Korean J. Limnol. 78: 119-128.
- Stuart G.W., J.R. Vielkind, J.V. McMurray, and M. Westerfield. 1990. Stable line of transgenic zebrafish exhibit reproducible patterns of transgens expression. Development 109: 577-584.
- Nam Y.K., C.H. Noh, D.S Kim. 1999. Transmission and expression of an integrated reporter construct in three generation of transgenic mud loach (*Misgurnus mizolepis*). Aquaculture 172: 229-245.
- Nam Y.K., Y.S. Cho, Y.J. Chang, J.-Y. Jo and D.S. Kim. 2000a. Generation of transgenic homozygous line carrying the CAT gene in mud loach *Misgurnus mizolepis*. Fish. Sci. 66: 58-62.
- Nam Y.K., Y.S. Cho and D.S. Kim. 2000b. Isogenic homozygous transgenic fish induced by artificial

- parthenogenesis. Transgenic Res. 9: 463-469.
- Nam Y.K., J.K. Noh, Y.S. Cho, K.N. Cho and D.S. Kim. 2001. Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach (*Misgurnus mizolepis*). Transgenic Res. 10: 353-362.
- Nam Y. K, M. S. Kim, H. H. Lee and D. S. Kim. 1996. Production of diploid in mud loach (*Misgurnus mizolepis*). I. Transfer of gene and evaluation of mud loach expression vector. J. Aquacult. 9: 293~300.
- Nam T. K, C. G. Kim and D. S. Kim. 1997. Production of homozygous transgenic mud loach (*Misgurnus mizolepis*). II. pFV4CAT transfer by microinjection. J. Aquacult 10: 33~37.
- Ozato K., H. Kondoh, H. Inohara, T. Iwamatsu, Y. Wakamatsu and T.S. Okada. 1986. Production of transgenic fish: introduction and expression of chicken d-crtstallin gene in medaka embryos. Cell Differ. 19: 237-244.
- Rahman M.A. and N. Maclean. 1992. Production of transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*) by one-cell-stage microinjection. Aquaculture 105: 219-232.
- Sakaizumi M. and S. R. Jeon. 1987. Two divergent groups in

- the wild populations of medaka *Oryzias latipes* in Korea. Korean J. Lim. 20: 13-20.
- Simon B.E. and J.A.C. Leong. 2002. Gene transfer to fish cells by attenuated invasive *Escherichia coli*. Mar. Biotechnol. 4: 303-309.
- Stuart G.W., J.R. Vielkind, J.V. McMurray, and M. Westerfield. 1990. Stable line of transgenic zebrafish exhibit reproducible patterns of transgens expression. Development 109: 577-584.
- Uwa. H. and S. R. Jeon. 1987. Karyotypes in two divergent group of a ricefish *Oryzias latipes* from Korea. Korean J. Lim., 20: 139-147.
- Winkler C., J. R. Vielkind and M. Scharthl. (1991). Transient of foreign DNA during embryonic and larval development of the medaka fish (*Oryzias latipes*). Mol. Gen. 226: 129-140.
- 김익수, 김소영. 1993. 한국산 송사리 두 종의 교잡실험. 한국 어류 학회지 5: 113-121.