



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

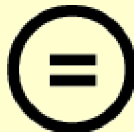
다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

공 학 석 사 학 위 논 문

베타액틴-RFP 형질전환 유전자가 이식된
형질전환 바다 송사리 (*Oryzias dancena*)

계통들의 발현 특징



2012년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

해 양 생 명 공 학 협 동 과 정

김 연 경

공 학 석 사 학 위 논 문

베타액틴-RFP 형질전환 유전자가 이식된
형질전환 바다 송사리 (*Oryzias dancena*)
계통들의 발현 특징

지도교수 남 윤 권

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함

2012년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

해 양 생 명 공 학 협 동 과 정

김 연 경

김연경의 공학석사 학위논문을 인준함.

2012년 2월



주 심 수산학박사 김 종 현



위 원 이 학 박사 김 동 수



위 원 수산학박사 남 윤 권





**Expression characteristics of
transgenic marine medaka (*Oryzias dancena*)
carrying RFP transgene under the control
by its own β -actin regulator**

Youn Kyoung Kim

*Marine Biotechnology Interdisciplinary Graduate Course,
Pukyong National University*

Abstract

Stable transgenic euryhaline marine medaka (*Oryzias dancena*) strains carrying red fluorescence protein (RFP) transgene construct (pod β -actRFP) driven by its own cytoskeletal β -actin promoter were characterized with the purpose of selecting the best model transgenic line for environmental risk assessment associated with living genetically modified fishes. Experimental transgenesis with pod β -actRFP in this species showed, in overall, that the regulatory patterns of transgene could be well in accordance with those of

endogenous β -actin genes in terms of consistent and ubiquitous expression throughout nearly entire life cycle of the transgenic fish. During embryonic development, the onset of transgene expression was usually detected from the neurula stage and the resultant RFP signals continued to adult at maturity. RFP signals were ubiquitously distributed in all the tissues of transgenic fish examined with various expression levels across tissues. Different transgenic lines showed different transgenic genotypes as judged by Southern blot hybridization analysis and they displayed varying degree of RFP intensities in their external phenotypes. However there was no direct relationship between transgene copy numbers and expression strength, indicating that copy number-dependent expression was not achieved in this transgenic group. All of transgenic founders were mosaic in their germ cells. However, most transgenic individuals belonging to subsequent generations could pass on the fluorescent transgene to their offspring with an expected Mendelian ratio. However, a transgenic line having the highest transgene copy number (>240 copies/cell) showed the unstable pattern of germ-line transmission including the loss of transgene. Interestingly, many transgenic females inherited the

RFP proteins to non-transgenic offspring embryos as well as to transgenic offspring. Such non-transgenically transmitted RFP signals was persistent for a considerably long period up to early larval stages, but eventually disappeared with the progress of development and early growth. Results from this study indicate that β -actin promoter is useful for marking whole cells of transgenic fish using fluorescence, which may facilitate the analysis of horizontal and vertical transgene transfer from transgenic fish to other conspecific and/or symbiotic members installed in experimentally designed semi-surrogate ecosystems. However this study suggests also that extensive evaluation of multiple transgenic strains should be made for selecting the suitable and stable transgenic line to be applied to this purpose.

목 차

영문요약 (Abstract)	I
목차 (Content)	IV
표목차 (List of Tables)	VI
그림목차 (List of Figures)	VII
 I. 서론	 1
II. 재료 및 방법	4
1. 실험어의 확보 및 수정란의 수집	4
2. 미세현미주입, 유전자가 이식된 수정란의 관리 및 자치어의 사육 ...	4
(1) 미세현미주입기법	4
(2) 수정란의 부화율, 기형률 및 이식 유전자의 전달 효율 측정	5
(3) 자치어의 사육	5
3. 형질전환 유전자의 형광 단백질 발현 평가	6
4. 형질전환 유전자의 세대 전달 가능성 평가 및 세대 전달 빈도 분석 ...	6
(1) 형질전환 유전자의 세대 전달 가능성의 평가 분석	6
(2) 형질전환 유전자의 세대 전달 빈도	7
5. 형질전환 바다 송사리 계통의 유전자 전달 양상 분석	7
(1) DNA 시료 준비	7
(2) Southern blot 분석	8

III. 결과	10
1. 미세현미주입기법을 이용한 형질전환 유전자의 발현 양상	10
1) 수정란의 부화율 및 형질전환 유전자의 전달 효율	10
2) 형질전환 유전자의 발현 양상	10
2. 형질전환 바다 송사리 계통의 선발 및 확립	13
3. 형질전환 바다 송사리 계통의 형광 단백질 발현 양상 분석	15
1) 계통별 외형의 단백질 발현 양상	15
2) 계통별 난 발생 단계의 형광 단백질 발현 양상	17
4. 형질전환 바다 송사리 계통의 이식 유전자 전달 양상	24
IV. 고찰	27
국문요약	36
감사의 글	37
참고문헌	38

표목차 (List of Table)

Table 1. Percent fertilization, hatching success and transmission of transgene in the crosses between transgenic founders and non-transgenic controls	14
---	----

Table 2. Summary on the germline transmission of RFP transgene from F1 to F2 generation in different transgenic lines	23
---	----



그림 목차 (List of Figure)

Fig. 1. Differential expression patterns of RFP signals in <i>podβ</i> -actRFP-injected embryos. Group A shows the RFP expression over the nearly whole embryonic body and hatched larvae, while Group B represents yolk-dominant distribution of RFP signals. On the other hand, Group C exhibits spot-like RFP signals in epidermis of the yolk and/or embryonic body	12
Fig. 2. External RFP phenotypes of representative transgenic individuals from different transgenic lines under normal daylight conditions	16
Fig. 3. Expression patterns of RFP transgene in F2 embryos and hatched larvae belonging to either BA2 or BA4 transgenic line. Note the gender-specific difference in RFP expression during early development in the transgenic line BA4. The female lineage of BA2 is not available due to the depressed or malformed reproduction of transgenic female adults	20
Fig. 4. Gender-specific expression patterns of RFP transgene in F2 embryos and hatched larvae belonging to either BA1 or BA3 line. The weak or strong RFP intensity achieved in transgenic F1 could be persistent also in F2 embryos belonging to both transgenic lines	21

Fig. 5. Comparative genomic Southern blot hybridization analysis of the
four established transgenic lines 26



I. 서론

1984년 Maclean과 Talwar가 무지개 송어의 수정란에 미세현미 주입기법을 이용한 최초의 어류 유전자 이식이 시도된 이래 (Maclean and Talwar, 1984), 이후 어류에 대한 유전자 정보의 대량 발굴이 이루어지면서 양식 생산성을 증가시키거나 척추동물 유전자 기능을 연구하기 위한 목적으로 많은 형질전환 어류 연구들이 진행되어오고 있다 (Gong et al., 2003, 2004; Ju et al., 2003; Udvardia and Linney, 2003; Nam et al., 2007; Pan et al., 2008). 현재 개발된 유전자변형생물체 (Living Modified Organisms; LMO) 중 미국과 캐나다 합작 회사인 AquaBounty Technologies社에서는 고속 성장 유전자변형 대서양 연어의 양식 산업화를 추진하기 위해 이에 대한 심의가 미국 FDA에서 진행 중에 있다 (www.biosafety.or.kr). 또한 미국의 Yorktown Technologies社가 산호로부터 추출한 형광 단백질 유전자를 이식한 형질전환 zebrafish를 상품명 “Glofish”로 출시되어 미국 등의 일부 국가에서 소비자를 대상으로 판매되었거나 현재 판매되고 있는 실정이다 (www.biosafety.or.kr).

국내에서는 LMO의 위해성 평가와 관련하여 바이오안전성에 관한 카르타헤나 의정서 (Cartagena Protocol on Biosafety)의 국내 이행 규정으로서 “유전자변형 생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률”이 제정되었다. 해양생태계는 육수(담수)생태계에 비하여 다양한 생물종(種)으로 구성되어 복잡한 먹이사슬 구조에 의하여 예측 불가능한 상호작용이 발생할 가능성이 높다. 발생한 문제는 인위적으로 통제할 수 있는

범위와 그 수준이 한정적일 가능성이 높고, 또한 이로 인하여 해양을 공유한 인접국들과의 마찰 발생 가능성 역시 존재한다. 때문에 형질전환 어류의 탈출과 비의도적인 노출로 인한 예측 불가능한 생태계의 생물다양성의 감소 또는 유전적 다양성의 상실 등에 관한 위해성을 탐색하거나 평가하기 위한 연구들이 최근 진행되고 있다 (Wolska., 2003; Harwood and Obrycki, 2006; Rosi-Marshall et al., 2007; Bohn et al., 2008; Douville et al., 2008). 따라서 형질전환 어류의 실용화 이전에 다양한 경로를 통한 해당 LMO의 잠재적 위해성 평가 (risk assessment evaluate)는 더욱 중요시 되고 있다. 그러나 이전의 대부분 연구들은 자연적인 조건을 충분히 반영하지 못한 실험 설계의 결과들로서, 형질전환 어류로부터 야기된 잠재적 위해성을 평가하기 위한 기준 및 지표들로 일반화하기 힘들며 또한 이를 근거로 해양생태계에 미치는 잠재적 위해성을 정확히 평가하기에는 어려움이 있다. 따라서 해양생태계의 위해성 평가를 위한 보다 객관적인 자료의 확보가 요구되고 있으며, 이를 위해서는 특히 해양생태계에 적합한 형질전환 어류 모델의 개발이 필수적이다. 실험실 수준의 모의 해양생태계에 적합한 형질전환 어류의 모델로 활용하기 위해서는 해수조건에서 생리 활성에 영향을 받지 않는 종이어야 함은 물론, 형질전환 표현형의 판독이 용이해야 한다. 또한 생식능력에 장애가 있거나 형질전환 계통의 생존을 저하와 같은 transgene silencing 현상이 유발될 가능성을 고려하여 형질전환 유전자의 복제수가 작으며, 동일한 유전자형을 지속적으로 세대전달하고 대조군의 생존 능력과 비슷한 계통의 선발이 필수적으로 요구된다 (Grabher et al., 2003; Cho et al., 2011).

송사리 속 (genus)의 바다 송사리 (*Oryzias dancena*)는 삼투압

조절 및 해수 적응 능력을 보유하여 해양생태계의 위해성 평가를 위한 모델종으로서 적합하다 (Ozato et al., 1986; Hamada et al., 1998; Chou et al., 2001; Tanaka and Kinoshita, 2001; Inoue and Takei, 2003; Kang et al., 2008; Cho et al., 2010). 다양한 형광 단백질은 도입 유전자 또는 단백질의 전이 유무를 쉽게 관찰·추적할 수 있는 marker gene으로 활용되어 오고 있다. 그 중 인도양의 바다 말미잘류 (*Discodoma* sp.)로부터 동정한 red fluorescent protein (RFP)은 근육 섬유에 지속적으로 증가·축적되어 육안으로 손쉬운 관찰이 가능한 것으로 보고되었다 (Gong et al., 2002; 2003; Wan et al., 2002; Ju et al., 2003; Udvardia and Linney, 2003). 또한 β -actin 유전자 프로모터와 형광 단백질 유전자와의 융합구조로서 어류에 이식된 경우 어류의 대부분 생활사에 걸쳐 전어체에서 형광 단백질을 표현할 수 있음이 실험적으로 보고된바 있다 (Reece et al., 1992; Takagi et al., 1994; Hamada et al., 1998; Yamauchi et al., 2000; Chou et al., 2001; Hwang et al., 2003; Kinoshita et al., 2003; Noh et al., 2003; Brook et al., 2007; Er-meng et al., 2010; Cho et al., 2011).

따라서 본 연구에서는 바다 송사리를 대상으로 (1) 동종의 β -actin promoter의 조절을 받는 RFP를 이용하여 난 발생 단계의 β -actin 유전자의 발현 양상의 특징을 관찰 (2) 형질전환 계통의 자손으로부터 genome 내 유전자 존재 양상과 외부 표현형적 양상의 차이 확인 (3) 형질전환 계통별로 도입 유전자의 세대 전달 양상을 확인하여 해양생태계에 미치는 유전자 전이 위해성을 평가하기 위한 형광 형질전환 바다 송사리 계통의 선발 요건을 제시하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어의 확보 및 수정란의 수집

본 연구에 이용한 바다 송사리는 인도네시아로부터 자연산 개체들을 수입하여 부경대학교 해양용LMO위해성평가센터 (Risk Assessment Center of Marine LMO)에서 사육하고 있는 계통들로부터 확보한 자손 세대를 친어로 사용하였다. 실험어의 일반적인 유지는 Song et al. (2009)의 방법에 따라 실시하였으며, 바다 송사리의 염분도 변화에 대한 적응 능력을 평가한 Cho et al. (2010)의 연구를 바탕으로 사육수는 5 μm 의 미세필터로 여과한 5 ‰ 기수를 제조하여 사용하였다. 사육 수온은 $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 로 유지하면서 알테미아 (*Artemia nauplii*, INVE, USA) 유생과 넙치용 초기미립자사료 (이화사료, 150 μm , 350 μm , 500 μm)를 공급하였다. 바다 송사리의 수정란을 확보하기 위하여 평균전장 30 mm 이상의 암컷 30마리와 수컷 15마리를 순환 여과식 외부 여과기를 장착한 28 L 용량의 유리 수조에서 교배시켜 매일 산란을 유도하였다. 산란한 직후 바다 송사리의 암컷 개체에서 수정란을 분리하여 미세현미주입기법을 수행하기 전까지 난할 속도를 지연시키기 위하여 15°C 의 항온 수조에 보관하였다.

2. 미세현미주입, 유전자가 이식된 수정란의 관리 및 자치어의 사육

(1) 미세현미주입기법

형광 단백질 발현 벡터($\text{pod}\beta\text{-actRFP}$)는 약 3.8 kb의 바다 송사리의 $\beta\text{-actin}$ 유전자의 promoter의 5' 말단과 pDsRed2 plasmid 벡터의

RFP 구조 유전자의 3' 말단을 연결하여 제작한 것을 이용하였다(Cho et al., 2011). 제작된 플라스미드는 제한효소를 이용하여 선형으로 절단한 후 injection buffer (10 mM Tris-Cl, 0.1 mM EDTA, pH8.0)를 처리하여 최종 DNA 농도 100 μ g/ml로 녹여 미세현미주입기법을 수행하였다. Song et al. (2009)의 바다 송사리의 난 발생 연구를 바탕으로 수정란의 1세포기 단계에 할구의 중앙부로 약 50 pg의 유전자를 이식하여 수온 28℃의 담수에서 부화를 유도하였다.

(2) 수정란의 부화율, 기형률 및 이식 유전자의 전달 효율 측정

기형률은 유전자를 이식한 날로부터 7~8일 후 부경대학교 해양용LMO위해성평가센터에서 정한바다 송사리의 기형 조건에 의거하여 선발하였다. 선발된 기형인 난과 유영 및 섭이 활동이 불가능한 부화자어의 누적 개체수의 비율을 조사하였으며, 부화율은 부화자어의 누적 개체수의 비율로 조사하였다. 형광 단백질 발현 벡터의 이식 효율은 유전자를 이식한 수정란을 대상으로 약 20~24 시간 간격으로 형광현미경으로 검정하여 형광 단백질을 발현하는 난의 누적 수를 조사하였다.

(3) 자치어의 사육

미세현미주입기법을 수행한 수정란으로부터 부화한 자어는 150 μ m 망을 부착한 치어통에 수용하여 여과한 5 ‰ 기수에서 사육하였다. 알테미아 유생과 넵치용 초기미립자사료를 충분히 공급하였고 부화 후 약 6주부터는 순환 여과식 외부 여과기를 장착한 소형 유리 수조에서 친어와 동일한 방법으로 사육 관리하였다.

3. 형질전환 유전자의 형광 단백질 발현 평가

형광 단백질 발현 벡터의 특징을 이용하여 형광 단백질의 발현 유무 분석은 휴대용 자외선 손전등 (Amilite, Korea), 형광현미경a (Eclipse E400, Nikon, Japan) 그리고 형광현미경b (AZ100, Nikon, Japan)로 관찰하였다. 어류의 외형으로부터 형광 단백질을 관찰하기 위해 자외선 손전등과 형광현미경b를 이용하여 관찰하였다. 수정란의 발생 단계는 2종의 형광 현미경과 RFP 형광 필터 (Tx-Red filter, Nikon, Japan)를 이용하여 이식 유전자의 단백질 발현 유무를 관찰하였다. 관찰한 결과는 각각의 형광 현미경에 장착되어 있는 전용 카메라, 아트캠 (ARTCAM300MI, ARTRAY, Japan)과 DS-Fi1 (DS-Fi1, Nikon, Japan)를 이용하여 촬영하였다.

4. 형질전환 유전자의 세대 전달 가능성 평가 및 세대 전달 빈도 분석

(1) 형질전환 유전자의 세대 전달 가능성의 평가 분석

형질전환 유전자의 이식군으로부터 어체의 근육 부위에서 형광 단백질이 관찰된 형질전환 F0 (founder generation) 개체들을 대상으로 대조군 (wild-type)과의 교배를 실시하였다. 형질전환 계통이 확립된 F0 개체로부터 확보한 각 hemizygote F1 세대로부터 무작위로 암수 각 3마리씩을 선발하여 대조군과 교배를 수행하였다.

형질전환 유전자의 세대 전달 가능성을 평가하는 방법은 아래와 같다. 대조군과의 교배를 위해서 암수 한 쌍씩 1:1 mating을 기본으로 하되 형질전환 어류가 수컷인 경우, 암컷 3마리와 3:1 mating을 실시하였다. 각 mating은 2 L 용량의 플라스틱 용기에 수용하여 매일 1회 알테미아 유생을 공급하며 수온 및 기수는 친어 관리 방법과 동일

하게 수행하였다. 매일 각 수조별로 산란한 알을 수거하여 해부현미경 (Nicon, Japan)을 이용하여 수정란만을 날자별로 150 μm 의 망이 부착된 부화용 컵에 보관하여 methylene blue를 첨가한 25℃의 0 ‰ 담수에서 부화를 유도하였다.

(2) 형질전환 유전자의 세대 전달 빈도

대조군과 교배를 수행하여 확보한 수정란을 대상으로 부화 단계까지 형광현미경으로 검경하여 형광 단백질이 관찰되는 부화 자어의 누적 개체수를 조사하였다.

5. 형질전환 바다 송사리 계통의 유전자 전달 양상 분석

(1) DNA 시료 준비

형질전환 유전자의 세대 전달이 가능한 라인들로부터 각각의 자손 세대의 자어를 phenotype별로 추출한 어체로부터 꼬리지느러미로 조직을 적출하여 genomic DNA를 추출하였다. gDNA 추출은 Asahida et al. (1996)의 방법에 의거 TNES-Urea buffer (7 M Urea, 10 mM Tris, 125 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% SDS)를 이용하여 시료에 동량의 TE saturated phenol/chloroform과 chloroform isoamyl alcohol을 각각 1회씩 처리하여 순수 genomic DNA를 확보하였다.

양질의 DNA가 추출되었는지 high molecular weight DNA를 전기영동 상으로 확인하였고, 정량분광계(GeneQuantPro, Biochrom Ltd., UK)를 이용하여 genomic DNA의 최종 농도와 순도를 확인한 후 Southern blot 분석에 사용하였다.

(2) Southern blot 분석

대상 형질전환 어류로부터 추출한 gDNA를 도입 유전자의 복제 수 분석을 위해서 제조된 dig-probe를 이용하여 제한효소 *Hind* III 또는 *Dra* II로 절단하고 complete 절단 (full-digestion) 유무를 Et-Br 염색 check-gel로 확인하였다. 절단된 DNA를 다시 UV-visible spectrophotometer로 정량하여 2 µg의 동량 DNA를 large gel에 40 V의 전압으로 17시간 동안 전기영동하였다. 전기영동이 완료되면 DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche Applied Biosciences, Germany)의 manual에 따라 실온에서 depurination, denature, neutralization 과정을 수행하였다. 이때 transgene integration copy 등을 유추하기 위하여 positive plasmid를 함께 전기영동 하였으며, 유전자 이식을 위해 제한 효소 *Cla* I로 절단한 podb-actRFP의 linearized plasmid를 positive lanes으로 이용하였다. 유전자 copy 수는 hemizygous 상태를 기준으로 도입유전자의 분자량 및 숙주 *O. dancena* genome size를 계산하여 copy 수를 조정하여 사용하였다. 따라서 plasmid copy 수를 1, 5, 10, 50, 100 copies/cell 상태로 일반 대조군 바다 송사리의 genomic DNA (*Hind* III-digested, *Dra* II-digested)와 섞어 전기영동하였다. Capillary 방법을 이용하여 DNA를 nylon membrane (Roche Applied Biosciences, Germany)으로 transfer하였다. 전기영동된 DNA 단편들을 nylon membrane으로 옮겨 UV cross linking 과정 후 RFP의 영역을 탐침할 수 있는 DIG-labeled fragment의 probe와 65°C에서 16시간 이상 hybridization 과정을 수행하였다. hybridized signal을 확인하였으며 이때 사용한 probe 표지는 11-dUTP-digoxigenin으로 수행하였다.

Hybridization signal의 detection 과정은 먼저 실온에서 wash solution I (2xSSC, 0.1% SDS) 용액으로 2회 세척한 후 68℃에서 wash solution II (0.5xSSC, 0.1% SDS) 용액으로 2회의 세척 과정을 거쳤다. Maleic acid buffer (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, pH7.5)에서 15분간 교반한 후 1% blocking solution (Roche Applied Biosciences, Germany)과 anti-digoxigenin-AP conjugate (Roche, Mannheim, Germany)를 첨가한 용액에서 각각 1시간씩 반응시켰다. 이후 maleic acid buffer wash 과정을 15분간 2회 실시하고 detection buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, pH9.5)에 membrane을 3분간 침적시킨 후 NBT (nitroblue tetrazolium salt, Sigma, USA)와 BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, Sigma)가 첨가된 발색 용액에 넣어 16시간동안 발색시킨 후 hybridization signal을 확인하였다.

III. 결 과

1. 미세현미주입기법을 이용한 형질전환 유전자의 발현 양상

(1) 수정란의 부화율 및 형질전환 유전자의 전달 효율

새로운 형질전환 어류 연구의 모델인 바다 송사리의 난 발생 단계에서 β -act 유전자의 발현 양상을 관찰하기 위하여 발현 벡터 pod β -actRFP를 총 4회에 걸쳐 480개의 수정란을 대상으로 유전자 이식을 수행하였다. 형질전환 유전자 이식 후 4시간째부터 형광 단백질의 발현 양상을 관찰하기 시작하여, 이후부터는 20~24시간 간격으로 형광현미경a를 이용하여 관찰하였다. 유전자 이식 2일째의 초기 난의 생존율은 $58.1 \pm 8.9\%$ 로 관찰되었으며 난 발생 7~8일째부터 관찰된 누적 기형률은 $12.6 \pm 4.6\%$, 부화율은 $40.3 \pm 11.1\%$ 로 관찰되었다. 유전자 이식 후 1일째에 최초로 형광 단백질이 관찰되었고, 발현이 확인된 난은 총 47개로 형광 단백질 발현 벡터의 이식 효율은 $9.8 \pm 2.5\%$ 로 관찰되었다.

(2) 형질전환 유전자의 발현 양상

바다 송사리의 난 발생 단계에서 형질전환 유전자의 형광 단백질의 최초 발현 개시점, 형광 단백질의 발현 양상을 관찰하였다. 형광 발현이 관찰된 47개의 난 중 후기 낭배기 (late gastrula stage)에서 관찰된 1개의 난을 제외하고 형광 단백질의 일반적인 최초 발현 개시점은 후기 신경배 (late neurula stage)부터인 것으로 관찰되었다. 그러나 9 체절기 (9 somites stage) 이후로는 형광을 발현하는 난을 추가적으로 관찰하지 못하였다. 형광을 발현하는 난의 초기 발현 강도는 매우 낮았으나 체절기 (somites stage)부터 발현 강도가 점차적으로 증가되

는 것으로 관찰되었다.

형광 발현이 확인된 47개의 형질전환 난으로부터 형광이 발현하는 양상에 따라 크게 3개의 그룹으로 나누어 관찰하였다. 배아체 (embryonic body)를 포함하여 형광 발현하는 그룹 A는 17.0%로 나타났다. 난황 (yolk) 또는 배아체와 난황의 경계면에만 형광 발현하는 그룹 B는 63.8%, 그리고 작은 spot 형태의 형광 발현하는 그룹 C는 19.1%로 관찰되었다. 그룹내 난들은 발생이 진행되면서 형광 발현 양상의 변화로 인한 그룹간 이동이 전혀 관찰되지 않았다. 또한 그룹간 발현 양상의 비율은 부화 후에도 지속적으로 유지되는 것으로 관찰되었다. 그러나 각 그룹내 난의 형광의 발현 강도의 증가는 일양하지 않는 것으로 관찰되었다.

형질전환 유전자의 이식군은 약 14일째부터 부화를 시작하는 것으로 관찰되었다. 형광 발현 양상 그룹 B의 부화 자어는 지속적으로 난황 또는 배아체와 난황의 경계면에서만 형광 발현이 확인되었지만 난황이 흡수된 이후에는 더 이상 관찰되지 않는 것으로 확인되었다. 형광 발현 양상 그룹 A의 부화 자어는 충분한 형광 발현으로 육안으로도 관찰되었으나 형광 발현 양상 그룹 C의 부화 자어는 형광현미경을 이용할 경우에만, 매우 협소하면서 산발적으로 어체의 근육 부위로부터 형광 발현이 관찰되었다 (Fig. 1).

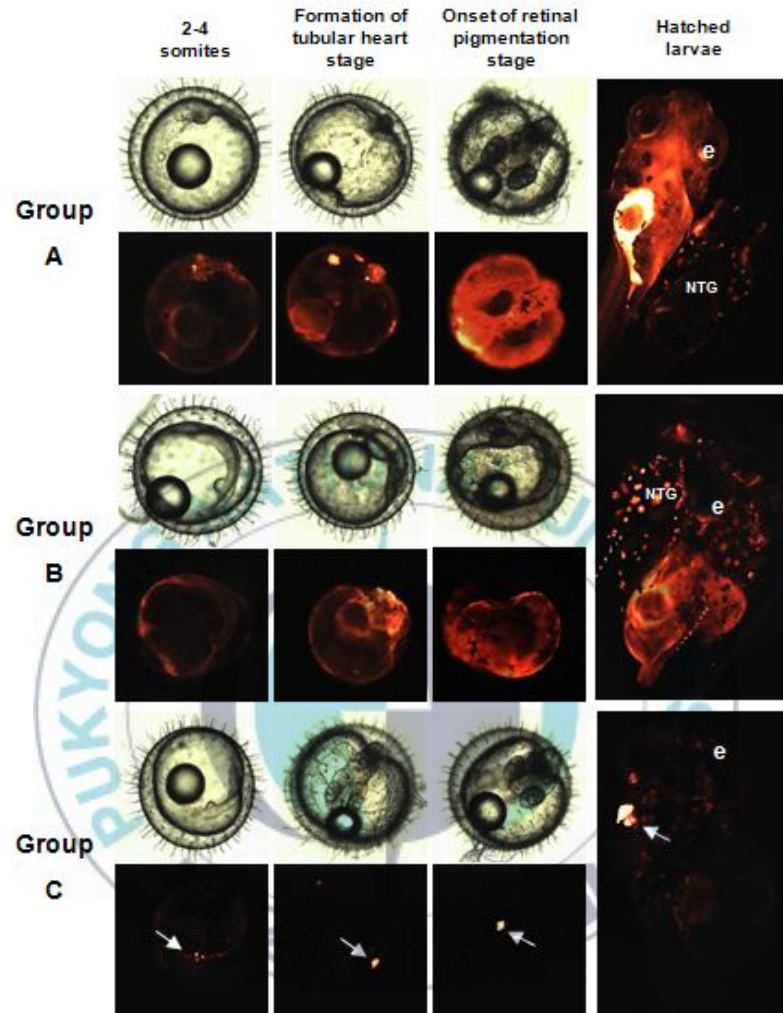


Fig. 1. Differential expression patterns of RFP signals in *podβ*-actRFP-injected embryos. Group A shows the RFP expression over the nearly whole embryonic body and hatched larvae, while Group B represents yolk-dominant distribution of RFP signals. On the other hand, Group C exhibits spot-like RFP signals in epidermis of the yolk and/or embryonic body.

2. 형질전환 바다 송사리 계통의 선발 및 확립

형질전환 바다 송사리의 계통을 확립하기 위하여 부화 후, 4개월이 지난 발현 벡터 $\text{pod}\beta\text{-actRFP}$ 의 이식군으로부터 12마리의 형질전환 F0 개체를 확보하였다. 또한 형질전환 유전자를 후대세대로 전달할 수 있는 가능성을 평가한 결과 계통 확립이 가능한 개체는 총 4마리, 그 중 BA2-F만 암컷이며 나머지는 수컷으로 확인되었다.

형질전환 F0 개체가 수컷인 세 계통(BA1-M, BA3-M, BA4-M)의 형광 단백질의 최초 발현 개시점은 신경배와 초기 체절기 사이로, 이들 계통간의 형광 발현 양상은 동일한 것으로 관찰되었다. BA2-F 계통에 비하여 수정률은 낮은 편이지만 형질전환 유전자의 세대 전달 빈도는 상대적으로 높은 것으로 관찰되었다 (Table 1).

그러나 형질전환 F0 개체들 중 유일하게 암컷인 BA2-F 계통은 maternal 형광 단백질의 영향으로 수컷인 세 계통과는 다른 형광 발현 양상이 관찰되었다. 수정 후 육안으로 관찰이 가능할 정도로 세포 부위의 강하고 선명한 형광이 발현하는 특징이 관찰되었다. 수정 직후부터 형광 발현이 관찰되지 않았던 난으로부터 부화한 개체로부터는 형광 발현이 관찰되지 않았다. 따라서 BA2-F 계통의 수정율은 $99.6\pm 1.3\%$, 형질전환 유전자의 세대 전달 빈도는 $1.7\pm 2.6\%$ 로 확인되었다 (Table 1). BA2-F 계통의 형질전환 hemizygote F1 개체의 초기 생존율은 대조군과 다른 세 계통에 비하여 현저히 낮은 것으로 관찰되었다. 또한 수정 직후부터 형광 발현이 관찰된 난으로부터 부화한 hemizygote F1 개체들 중 일부는 오직 난황에서만 형광 발현하였으며 난황이 흡수된 이후에는 더 이상 관찰되지 않는 것으로 확인되었다.

Table 1. Percent fertilization, hatching success and transmission of transgene in the crosses between transgenic founders and non-transgenic controls

Transgenic line	Fertilization rate (%)	Hatching success (%)	Incidence of RFP-positive embryos (%)
BA1-M	76.5 $\pm$ 39.6	100.0 $\pm$ 0.0	3.4 $\pm$ 3.0
BA2-F	99.6 $\pm$ 1.3	81.0 $\pm$ 13.2	1.7 $\pm$ 2.6
BA3-M	96.7 $\pm$ 5.8	95.8 $\pm$ 4.0	4.4 $\pm$ 4.8
BA4-M	75.9 $\pm$ 19.5	73.9 $\pm$ 17.8	9.2 $\pm$ 5.9

3. 형질전환 바다 송사리 계통의 형광 단백질 발현 양상 분석

(1) 계통별 자손 세대의 외형의 단백질 발현 양상

계통별로 확보한 hemizygote 자손 세대의 외형으로부터 형광 단백질의 발현 양상을 관찰하였다. 형질전환 바다 송사리의 계통 중 형광 단백질의 발현 강도가 가장 높은 BA2-F 계통은 일반 자연광 상태에서 glowing fluorescence를 강하게 발현하며 eye lens 전체에서 uniform한 RFP signal이 관찰되었다. 근육을 포함한 몸 전체에서 강도 높은 형광을 발현하며, 모든 지느러미 역시 자연광 상태에서 red color를 육안으로도 관찰되었다 (Fig. 2A). BA4-M 계통은 형광의 발현 강도는 낮은 편이나 형광 발현의 조직 분포는 BA2-F 계통과 차이가 없이 비교적 온화하고 보편적인 형광을 표현하는 계통이다. 형광의 발현 강도에는 개체별로 약간의 차이가 존재하지만 일정한 수준이며 발현 강도의 편차 또는 변이가 거의 관찰되지 않았다 (Fig. 2B).

그러나 BA1-M 계통과 BA3-M 계통은 형광의 발현 강도에 따라 strong expression group과 weak expression group으로 명확하게 구분되어졌다. 두 계통의 strong expression group은 자연광 상태에서 비교적 높은 발현 강도로 whole body에서 일양하게 관찰되고, weak expression group은 매우 연한 분홍색으로 관찰되었다. BA1-M 계통은 발현 강도 그룹별로 일정한 발현 강도로 관찰되며 개체별 편차나 변이가 크게 관찰되지 않았다. 그러나 BA3-M 계통은 개체내에 발현하는 부위에 따라서 발현 강도의 차이가 존재하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 2C, D).



Fig. 2. External RFP phenotypes of representative transgenic individuals from different transgenic lines under normal daylight conditions.

(2) 계통별 난 발생 단계의 형광 단백질 발현 양상

계통별로 형질전환 유전자가 세대 전달되는 양상을 관찰하기 위하여 BA2-F 계통을 제외한 나머지 계통의 hemizygote F1 세대로부터 확보한 hemizygote F2 세대의 난 발생 단계에서 형광 단백질의 발현 양상 및 그 빈도를 관찰하였다.

형질전환 유전자를 세대 전달하는 hemizygote F1 세대의 수컷으로부터 확보한 hemizygote F2 세대의 난 발생 단계의 형광 발현 양상은 계통별로 차이가 없는 것으로 관찰되었다. 형광 단백질의 발현 개시점은 형질전환 유전자의 이식군의 결과와 동일하게 후기 신경배와 초기 체절기 사이로 관찰되었다. 형질전환 난은 배아체와 난황에서 매우 약한 발현 강도의 형광이 동시에 관찰되었지만, 발생이 진행되면서 배아체와 eye lens의 발현 강도가 상대적으로 증가하는 것으로 관찰되었다. 망막색소 출현 단계 (Onset of retinal pigmentation stage)부터는 형광의 발현 강도가 급격히 증가하여 배아체의 형태가 선명해졌으며, 부화 개체의 형광 발현으로 육안으로도 대조군과 구별이 가능하였다 (Fig. 3과 4).

반면 형질전환 유전자를 세대 전달하는 hemizygote F1 세대가 암컷인 경우에는 수컷으로부터 확보한 hemizygote F2 세대의 형광 발현 양상과 다르게 maternal 형광 단백질의 발현이 관찰되었다. 형광 단백질의 발현 개시점은 배반 형성 단계 (blastodisc)부터이며, 난황과 세포에서 동일한 수준의 매우 높은 발현 강도의 형광이 관찰되었다. 그러나 배아체의 형광 발현 강도는 체절기까지 급격히 증가하는 반면, 난황의 형광 발현 강도는 일시적으로 낮아졌다가 신경배 이후부터 다시 증가하여 배아체의 발현 강도의 수준에 이르게 되는 것으로 관찰되었다. 혈액순환 시작 단계 (onset of blood circulation stage)에서부터 배아체

와 난황 사이에 형광 발현 강도의 차이가 미묘하게 관찰되기 시작하였다. 망막색소 출현 단계에 이르러서 배아체의 형광 발현 강도의 차이에 따라 배아체 발현 그룹과 난황 발현 그룹으로 구분되었다. 배아체 발현 그룹은 난황을 포함한 whole body에서 형광 발현이 관찰되었다. 그러나 난황 발현 그룹은 난황에 비하여 근육에서는 매우 낮은 발현 강도의 형광이 관찰되었다 (Fig. 3, line BA4 F1(F)). 그러나 난황 발현 그룹은 부화 후 3~5주 이후에는 형광 발현이 관찰되지 않았으며, 이러한 양상은 세 계통의 암컷인 형질전환 어류로부터 확보한 hemizygote F2 세대에서 동일하게 관찰되었다 (Fig. 4).

형광의 발현 강도에 따라 strong expression group과 weak expression group으로 명확하게 구분되는 BA1-M 계통과 BA3-M 계통은 계통내 발현 그룹을 대표하는 hemizygote F1 개체를 암수별로 각각 선발하였다. 선발된 hemizygote F1 개체의 형광 발현 강도에 따라 hemizygote F2 세대의 난 발생 단계의 형광 발현 양상 및 강도에 차이가 존재함을 BA1-M 계통과 BA3-M 계통의 암컷으로부터 확인하였다 (Fig. 4).

Strong expression group의 암컷으로부터 형질전환 유전자를 전달받은 hemizygote F2 세대는 수정 직후부터 세포를 포함한 난황에서 강도 높은 형광 발현이 관찰되었고 부화 이후까지 지속적으로 관찰되었다. weak expression group의 암컷으로부터 형질전환 유전자를 전달받은 경우, 형광의 발현 강도가 상대적으로 현저히 낮으며 망막색소 출현 단계 이후부터 일부 난으로부터 난황의 형광 발현이 소멸되는 것이 관찰되었다. 그러나 부화 후 난황을 흡수한 형질전환 개체를 대상으로 형광의 발현 강도를 관찰한 결과, 난 발생 단계의 발현 강도에 비하여 현저히 낮아지는 것으로 관찰되었다 (Fig. 4).

BA1-M 계통의 두 그룹의 수컷으로부터 각각 형질전환 유전자를 전달받은 경우, 망막색소 출현 단계 이후부터 그룹별로 배아체의 형광의 발현 강도에 차이가 존재하였다. 난 발생 단계의 형광 발현 강도는 암컷이 형질전환 유전자를 전달할 경우가 강했지만, 부화 이후에는 수컷이 형질전환 유전자를 전달할 경우에 형광 발현 강도가 월등히 강한 것으로 확인되었다 (Fig. 4). 특히하게 BA3-M 계통의 두 그룹의 수컷으로부터 각각의 형질전환 유전자를 전달받는 경우, weak expression group의 hemizygote F2 개체의 형광 발현 강도가 월등히 높은 것으로 관찰되었다 (Fig. 4).



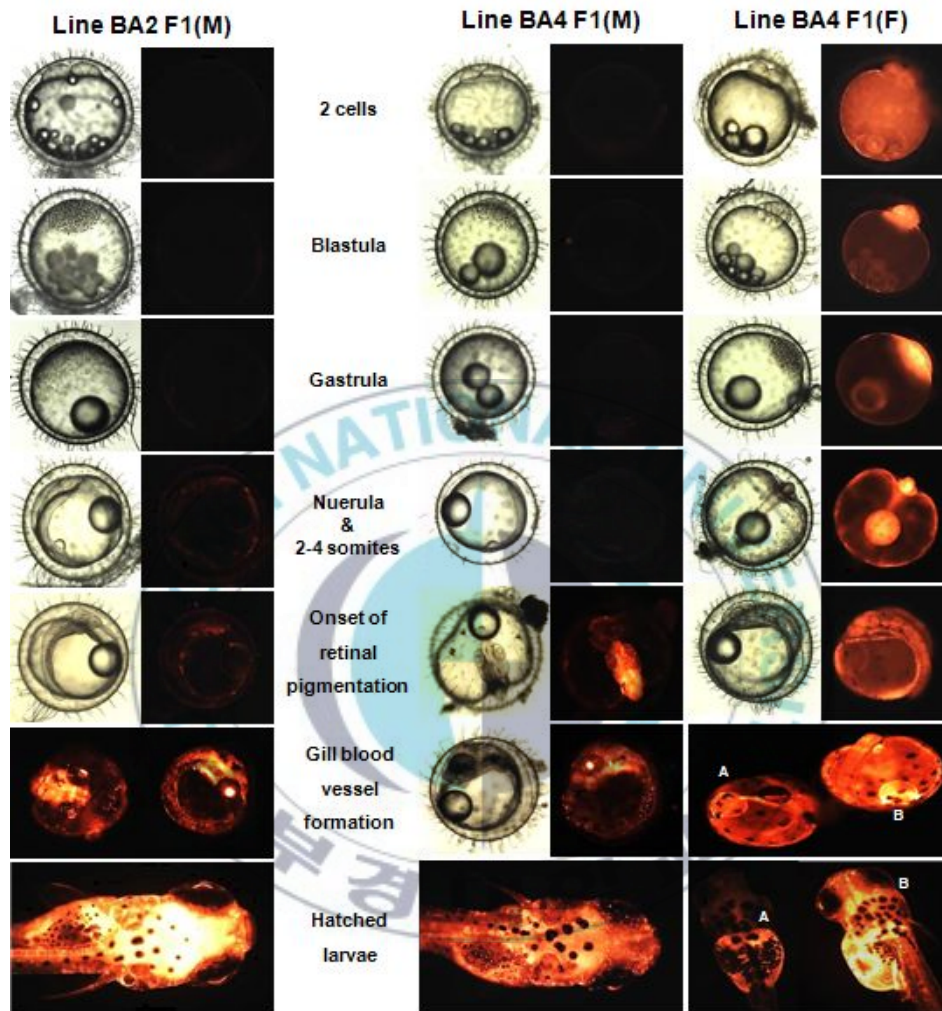


Fig. 3. Expression patterns of RFP transgene in F2 embryos and latched larvae belonging to either BA2 or BA4 transgenic line. Note the gender-specific difference in RFP expression during early development in the transgenic line BA4. The female lineage of BA2 is not available due to the depressed or malformed reproduction of transgenic female adults.



Fig. 4. Gender-specific expression patterns of RFP transgene in F2 embryos and hatched larvae belonging to either BA1 or BA3 line. The weak or strong RFP intensity achieved in transgenic F1 could be persistent also in F2 embryos belonging to both transgenic lines.

계통별로 형광 단백질이 세대 전달되어 발현되는 양상을 관찰한 결과, BA2-F 계통을 제외한 세 계통의 수컷인 hemizygote F1 세대의 형질전환 유전자를 세대 전달하는 빈도는 약 50%에 이르며, 멘델의 유전법칙 (Mendelian ratio)을 따르는 것으로 관찰되었다 (Table 2). 그러나 BA2-F 계통은 교배가 가능한 크기로 성장한 hemizygote F1 세대인 수컷 1미로부터 형질전환 유전자의 세대 전달 빈도는 $9.4 \pm 3.8\%$ 로 매우 저조하여 멘델의 유전법칙을 따르지 않는 것으로 관찰되었다 (Table 2).

형질전환 유전자를 세대 전달하는 hemizygote F1 세대가 암컷인 경우, maternal 형광 단백질의 영향으로 난 발생 초기 단계의 형광 발현 빈도는 100%인 것으로 관찰되었다. 망막색소 출현 단계에서부터 배아체 발현 그룹과 난황 발현 그룹의 비율이 각각 관찰되었고, 부화 후에도 지속적으로 유지되는 것을 확인하였다. 따라서 BA2-F 계통을 제외한 세 계통의 hemizygote F1 세대의 암컷으로부터 형질전환 유전자를 세대 전달하는 빈도는 약 50%에 이르지만 hemizygote F1 세대의 수컷으로부터 전달되는 빈도에 비하여 상대적으로 조금 낮은 것으로 관찰되었다 (Table 2).

Table 2. Summary on the germline transmission of RFP transgene from F1 to F2 generation in different transgenic lines

Transgenic line	Transgenic fish #	Fertilization rate (%)	Hatching success (%)	Maternal expression (%)	Incidence of RFP-positive larvae (%)
BA1-F1-M	#1~#3	91.8 ± 7.3	88.7 ± 7.6	–	44.2 ± 8.6
BA2-F1-M	#1	91.7 ± 5.9	94.8 ± 1.4	–	9.4 ± 3.8
BA3-F1-M	#1~#3	95.4 ± 5.3	91.0 ± 6.2	–	50.0 ± 12.2
BA4-F1-M	#1~#3	91.4 ± 14.7	98.4 ± 3.1	–	47.6 ± 10.2
BA1-F1-F	#1~#3	97.1 ± 5.4	89.9 ± 10.5	57.6 ± 14.6	40.6 ± 15.0
BA2-F1-F	–	–	–	–	–
BA3-F1-F	#1~#3	97.3 ± 5.5	91.7 ± 12.8	50.7 ± 8.5	47.6 ± 10.3
BA4-F1-F	#1~#3	98.5 ± 4.2	96.7 ± 4.0	47.3 ± 8.6	46.9 ± 6.9

4. 형질전환 바다 송사리 계통의 이식 유전자 전달 양상

형질전환 계통별 자손을 대상으로 형질전환 바다 송사리의 계통별 특징적인 형광 단백질의 발현 양상과 삽입된 형질전환 유전자의 구도 사이의 유의적인 관계를 관찰하기 위하여 Southern blot 분석을 이용한 copy 수를 분석하였다.

BA2-F 계통을 대상으로 *Hind* III를 이용한 Southern blot 분석 결과, hybridization band의 크기는 상기 2.3 kb에서부터 20 kb에 이르는 다양한 영역에서 검출되었다. 각 band의 intensity는 서로 다르게 나타나, 4.5~4.6 kb의 영역에서 매우 강한 hybridization signal이 집중되어 있는 것을 확인하였다. 반면 나머지 band들은 positive lane의 signal과 비교해본 결과 1 copy 또는 1 copy 미만인 것으로 관찰되었다 (Fig. 5). 또한 hemizygote F2 세대의 band와 positive plasmid copy들과 비교해 본 결과 BA2-F 계통의 F2 genome내에는 최소 200 copies 이상의 RFP gene이 존재하는 것으로 관찰되었다. BA4-M 계통의 hemizygote F1 및 F2 자손들은 동일한 *Hind* III-genotype이 관찰되어 stable germ-line임을 확인하였다. Target band인 1.24 kb band외에 2개의 minor band는 *Dra* II-genotype를 통하여 관찰되었고 따라서 BA4-M 계통의 genome내에는 최소 30 copies 이상의 copy를 보유하고 있는 것으로 관찰되었다 (Fig. 5).

그러나 *Hind* III 제한효소를 이용하여 Southern blot 분석을 수행할 경우 band들이 혼재되어 RFP 구조 유전자의 copy 수를 정확하게 평가하기가 용이하지 않은 단점이 확인되었다. 따라서 probe가 인식하는 RFP 유전자의 1.24 kb를 포함하는 등 4종의 길이의 fragment들을 생성하는 제한효소 *Dra* II만을 이용하여 2종의 BA1-M 계통과 BA3-M 계통을 대상으로 internal fragment가 splicing 될 수 있도록

hybridization을 수행하였다. 그 결과 상대적으로 low copy number를 갖는 BA1-M 계통의 genotype과 high copy number를 갖는 BA3-M 계통의 genotype으로 구분되는 것으로 관찰되었다.

특히 BA1-M 계통의 경우, 동일 친어로부터 형성된 자손들로부터 copy 수 및 hybridization pattern이 서로 다른 genotype의 차이가 관찰되었다. BA1-low copy 그룹 (strong expression group)과 BA1-high copy 그룹 (weak expression group)으로 구분되었으며 어체 외부의 형광 발현 강도와는 상반되는 것으로 확인되었다 (Fig. 5). BA1-low copy 그룹의 경우, 예상되는 크기의 단일 hybridization signal을 형성, positive lane들과 비교하여 약 2-3 copy/cell에 해당하는 signal intensity를 나타내었다. 반면 BA1-high copy 그룹의 경우, 세포당 25 copies 이상의 transgene을 포함하고 있지만 *Dra* II-digestion에 의해 온전히 분리되지 않은 RFP copy들이 관찰되었으며 BA3-M 계통은 30 copies의 transgene number를 나타내었다 (Fig. 5).

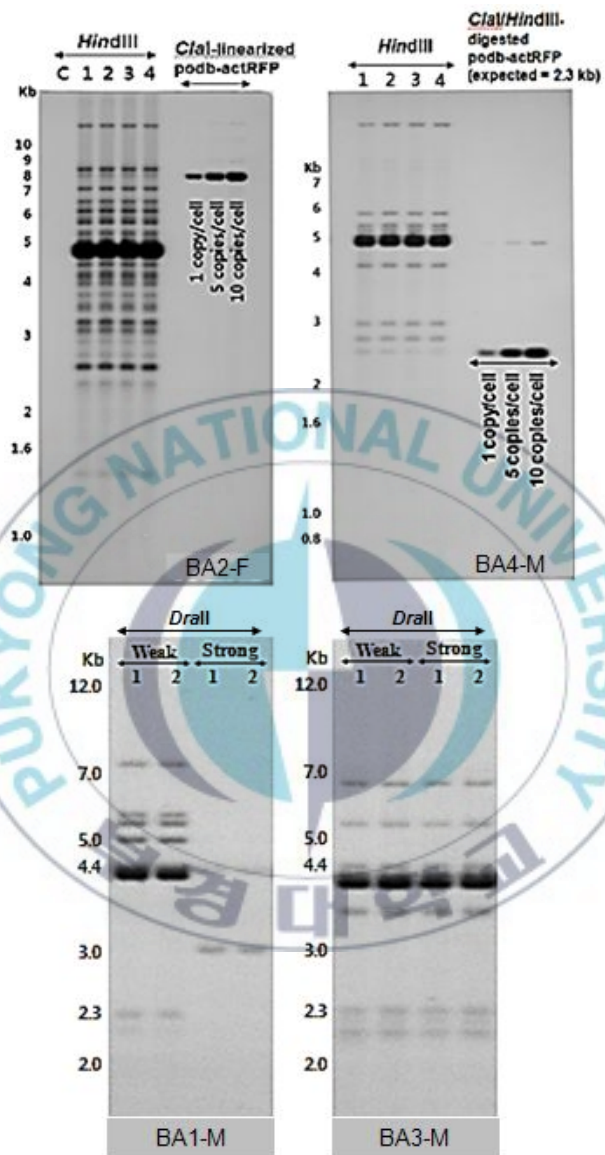


Fig. 5. Comparative genomic Southern blot hybridization analysis of the four established transgenic lines.

IV. 고 찰

본 연구에서 미세현미주입기법을 이용하여 발현 벡터 pod β -actRFP를 바다 송사리의 1~2세포기에 이식한 결과 이전의 연구에서 보고된 바다 송사리의 부화율에 비하여 현저히 낮은 것으로 나타난 반면 기형률은 유의적으로 매우 높은 것으로 나타났다 (Song et al., 2010). 유전자 이식을 수행하지 않은 대조군 (25℃)의 난 발생 속도는 수정 후 약 31시간째에 후기 신경배가 관찰되며, 수정 후 4일째에 망막 색소 출현 단계가 관찰되고 11일째에 부화하였다 (Song et al., 2010). 그러나 형질전환 유전자 이식군 (25℃)은 이식 후 약 2일째, 10일째에 후기 신경배와 망막색소 출현 단계가 관찰되고 이식 후 약 14일째에 부화가 관찰되었다. 또한 28℃의 수온에서 부화를 유도한 유전자 이식군의 난 발생 속도가 25℃의 대조군의 발생 속도와 유사한 것으로 관찰되었다.

본 연구에서 바다 송사리의 내재 유전자의 프로모터를 이용한 형광 단백질 발현 벡터의 이식 효율은 $9.8 \pm 2.5\%$ 로 관찰되었다. zebrafish의 내재 유전자의 프로모터를 이용한 white skirt tetra (*Gymnocorymbus ternetzi*)의 이식 효율과는 비슷한 것으로 나타났지만 (Pan et al., 2008) 동종 또는 이종의 프로모터의 조절을 받는 형광 단백질 발현 벡터를 이식한 Medaka (*Oryzias latipes*)의 이식 효율보다 현저히 낮은 것으로 나타났다 (Chou et al., 2001; Grabher et al., 2003). 반면 이식군의 형광 발현 양상 그룹 A의 비율이 17.0%로 이전의 연구 결과보다 조금 높은 것으로 나타났다 (Grabher et al., 2003).

따라서 미세현미주입기법을 이용한 형질전환 유전자의 이식은 난 발생 속도의 지연과 기형을 및 부화율에 영향을 미치는 단점들을 극복하고 형질전환 유전자의 발현 효율을 향상시키기 위해 바다 송사리의 난이 보유하고 있는 생물학적 특성을 고려한 최적화된 조건이 추가된 미세현미주입기법의 확립이 필요할 것으로 판단된다.

다양한 유전자 이식 기법 중 이식 효율이 높은 것으로 알려진 미세현미주입기법을 이용하여 어류의 수정란에 형질전환 유전자를 이식할 경우, 형질전환 F0 개체에게서 빈번하게 mosaic 현상이 관찰되는 것으로 알려져 있다. 이는 포유류와 달리 어류의 수정란은 전핵의 직접적인 관찰이 용이하지 못하여 이식된 형질전환 유전자의 copy 수가 어류의 조직별 또는 세포별로 다양하게 이식된 결과로 알려져 있다 (Rahman et al., 2000; Hwang et al., 2003). 진핵세포에 있어서 대부분의 세포에서 고르게 발현하는 β -actin 유전자 프로모터의 영향으로 형질전환 F0 개체의 형광 발현 양상은 근육, 지느러미, eye lens 등을 포함한 전 조직에서 다양한 발현 강도로, 이전 연구와 동일하게 mosaic 현상이 관찰되었다 (Chou et al., 2001; Grabher et al., 2003; Cho et al., 2011). 또한 이식군의 형광 발현 양상 그룹 B의 형광 발현 양상은 이전의 연구에서 이중의 내재 유전자 프로모터 조절을 받는 report 유전자의 많은 copy 수로 인하여 heterologous proteins의 발현 현상과 유사한 것으로 관찰되었다 (Williams et al., 1996; Grabher et al., 2003; Hwang et al., 2004). 따라서 이식된 형질전환 유전자의 많은 copy 수로 인하여 유발되는 현상의 발생 빈도를 낮추기 위해서는 기술적인 완성도가 높은 유전자 이식 방법 개발의 필요성이 예상된다.

세포의 골격을 이루는 cytoskeleton의 주된 구성요소로 house keeping gene인 β -actin 유전자를 대상으로 대조군인 바다 송사리의 조직별 전사 발현 분포 및 수준을 분석한 결과, 다른 조직들에 비하여 근육의 발현 수준은 현저히 낮지만 근육에서 형광 발현이 관찰되는 형질전환 F0 개체에 한하여 형질전환 유전자의 세대 전달 가능성을 기대할 수 있다고 보고되었다 (Cho et al., 2011). 따라서 본 연구에서 형질전환 바다 송사리의 계통을 확립하기 위하여 어체의 근육으로부터 형광 단백질의 발현이 관찰되는 형질전환 어류를 대상으로 세대 전달 가능성을 평가하였다.

형질전환 F0 개체들 중 형질전환 유전자를 자손 세대로 전달이 가능한 F0 개체의 비율은 약 33.3%로 확인되었으며, 이는 Medaka를 대상으로 미세현미주입기법을 이용한 연구의 결과들과는 유사한 것으로 나타났다 (Chou et al., 2001; Tanaka et al., 2001; Grabher et al., 2003; Ono et al., 2010). 반면 particle gun method를 이용한 연구의 결과보다는 약 3배 정도 높은 것으로 관찰되었다 (Yamauchi et al., 2000). 형질전환 F0 개체들로부터 F1 세대로 형질전환 유전자를 전달하는 비율은 이전의 Medaka를 대상으로 한 연구에 비하여 낮은 것으로 나타났다 (Yamauchi et al., 2000; Chou et al., 2001; Tanaka et al., 2001; Grabher et al., 2003; Ono et al., 2010).

본 연구에서 미세현미주입기법을 이용하여 형질전환 발현 벡터 pod β -actRFP를 이식한 수정란의 단백질 발현 개시점은 후기 신경배와 초기 체절기 사이로 관찰되었다. 또한 형질전환 유전자를 세대 전달하는 수컷인 형질전환 개체의 형광 단백질의 발현 개시점과 동일한 것으

로 나타났다. 매우 낮은 강도로 발현하는 형광이 관찰되었으며 이는 수정 직후부터 낮은 수준으로 발현하여 낭배기부터 급격히 증가하는 바다 송사리의 β -actin 유전자의 전사 발현과 관계가 있는 것으로 판단된다 (Cho et al., 2011). 또한 형질전환 바다 송사리 계통의 형질전환 난의 발생이 진행되면서 배아체와 eye lens를 중심으로 발현 강도의 증가가 관찰되었다. 특히 망막색소 출현 단계부터는 형광의 발현 강도가 급격히 증가하여 배아체의 형태가 선명히 관찰되었다. 그러나 바다 송사리의 β -actin 유전자의 전사 발현은 낭배기부터 심장박동 시작 단계 (start of heart beating stage)까지 최고 수준으로 증가한 후, 혈액순환 시작 단계부터 절반 수준으로 낮아져 부화 직전까지 지속적으로 감소하는 것으로 보고되어 형광 단백질의 발현 양상과는 차이가 존재하는 것으로 관찰되었다 (Cho et al., 2011). 이러한 차이는 바다 송사리의 β -actin 유전자의 전사 발현 개시점과 β -actin 유전자 promoter의 조절을 받는 형광 단백질의 발현 개시점의 차이는 genome 내에 많은 copy 수의 형질전환 유전자로 인한 내재 유전자의 전사 속도의 지연, RFP의 전사 발현과 단백질 발현간의 속도의 차이 그리고 관찰이 가능할 정도로 형광 단백질이 축적되는데 걸리는 물리적 시간의 필요 등에 의한 것으로 사료된다 (Finley et al., 2001; Wan et al., 2002; Ju et al., 2003; Zeng et al., 2005). 따라서 형질전환 난의 난 발생 단계로부터 RFP의 mRNA 발현 양상을 관찰할 필요가 있을 것으로 예상된다.

본 연구에서 형질전환 유전자를 세대 전달하는 암컷 개체의 난은 수정 직후부터 난황을 중심으로 강렬한 형광 단백질이 관찰되며 점차 세포 또는 배아체로 발현이 집중되었다. 그 후 β -actin 유전자의 전사 발현 수준이 급격히 줄어드는 혈액순환 시작 단계부터 배아체 부위

의 발현하는 형광 강도의 변화가 관찰되었다 (Cho et al., 2011). 망막색소 출현 단계부터 배아체 부위에 비하여 난황의 발현 강도가 상대적으로 높은 난황 발현 그룹이 뚜렷이 관찰되었다. 그러나 부화 후 3~5주째 이후에는 이들 그룹의 난으로부터 더 이상 형광 단백질의 발현이 관찰되지 않는 것으로 나타났다. 이러한 현상은 난 발생 단계에서 발현 강도가 약해지며 부화 직전에 소멸되거나 부화 후 난황이 흡수된 이후에는 더 이상 관찰되지 않는 maternal fluorescence protein과 동일한 것으로 판단된다. 이는 형질전환 어류의 난모세포 또는 생식소의 발생 과정 중 안정하게 합성된 형질전환 유전자의 전사와 단백질에 의한 것으로 비형질전환 자손에게도 세대 전달되어 PCR, Southern blot hybridization 분석으로는 밴드가 관찰되지 않는 것으로 보고되었다 (Chou et al., 2001; Tanaka et al., 2001; Krøvel and Olsen, 2002; Wan et al., 2002; Gong et al., 2003; Ju et al., 2003; Udvadia and Linney, 2003; Zeng et al., 2005; Ono et al., 2010).

대부분의 세포에서 고르게 발현하는 β -actin 유전자 프로모터의 조절로 인하여 내부 장기가 형성되기 시작하는 심장박동 시작 단계부터 심장에서의 발현이 관찰되었다. 또한 망막색소 출현 단계 이후부터는 혈관, 간, 장, 아가미, 생식소 등에서도 형광 단백질의 발현이 추가적으로 관찰되었다. 바다 송사리의 내부 장기 및 전 조직으로부터 β -actin 유전자의 전사 발현 수준에는 큰 차이가 있지만 모두 발현한다고 보고되었다 (Cho et al., 2011). 형질전환 바다 송사리 계통의 외형으로부터 형광 단백질의 발현 양상은 형질전환 어류의 전 생애에 걸쳐 β -actin 유전자 프로모터와 형광 단백질을 이용한 이전의 연구 결과와 동일하게 eye lens, 골격 근육 (skeletal muscle), 지느러미, fin ray 등

에서 지속적으로 발현하는 것이 관찰되었다 (Chou et al., 2001; Kinoshita et al., 2003; Cho et al., 2011). 따라서 본 연구의 형질전환 바다 송사리 계통간의 형광 단백질의 발현 양상에는 차이가 없는 것으로 확인되었으며, 형질전환 유전자의 세대 전달은 안정적으로 이루어지는 것으로 판단된다.

본 연구에서 형질전환 유전자를 세대 전달하는 개체의 외형에 발현하는 형광 단백질의 발현 강도에 따라 maternal fluorescence protein의 수준이 다른 것으로 관찰되었으며 세대 전달되는 발현 강도의 수준과도 일부 유의적인 관계가 있는 것으로 관찰되었다. 난 발생 과정에는 발현하는 maternal fluorescence protein의 영향으로 발현 강도의 수준이 매우 높으나 부화 후 난황이 흡수된 형질전환 개체의 발현 강도의 수준은 상대적으로 매우 낮은 것으로 관찰되었다. 그러나 형질전환 유전자를 세대 전달하는 개체의 형광 발현 강도가 다음 세대로 전달되어 일정한 수준의 형광 발현이 관찰되는 것으로 확인되었다.

반면 형질전환 유전자를 세대 전달하는 개체가 BA3-M 계통의 수컷일 경우, BA1-M 계통의 전 그룹과 BA3-M 계통의 암컷으로부터 관찰된 결과와 상반되게 strong expression group의 자손보다 weak expression group의 발현 강도의 수준이 높은 것으로 난 발생 과정에서 관찰되었다. 그러나 BA3-M 계통의 수컷의 자손을 그룹별로 약 4주간 양성하여 어제 외부의 형광 발현 강도를 관찰한 결과, 형질전환 유전자를 세대 전달한 수컷 개체의 발현 강도와 유사한 수준으로 발현하는 것으로 확인되었다. 따라서 형질전환 유전자를 세대 전달하는 hemizygote F1 개체의 외형의 발현 강도는 자손 세대의 발현 강도의

수준을 결정하는 요인과 유의적인 관계가 존재하는 것으로 사료된다. 그러나 BA3-M 계통의 수컷의 경우, 난 발생 단계에서는 상반된 결과가 관찰되었으므로 자손의 난 발생 단계와 성숙한 개체의 외형으로부터 형광 발현 양상을 지속적으로 관찰할 필요가 있을 것으로 사료된다.

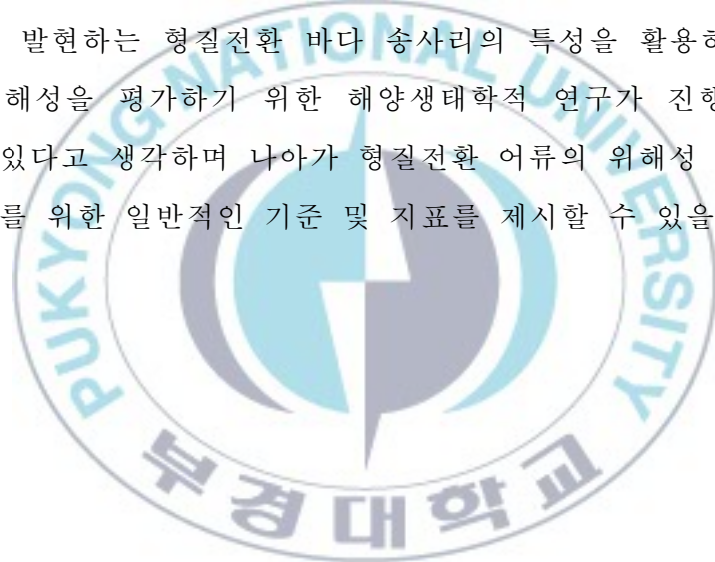
본 연구의 Southern blot hybridization 분석 결과, BA1-M 계통으로부터 관찰된 동일한 형질전환 F0 개체로부터 2종의 genotype이 관찰되는 현상은 mosaic F0 친어가 생식세포에서 서로 다른 transgenic genotype을 동시에 보유하는 것이며, 이는 transgenic status가 서로 다른 생식 세포들이 1 개체에 포함되었기 때문으로 판단된다. 따라서 본 계통을 대상으로 다양한 가설들로 접근하여 그에 따른 과학적 결론이 도출되어야 할 것이며 수세대에 걸친 germ-line의 형성과 외부 표현형 추적이 지속적으로 이루어져야 할 것으로 예상된다. 본 연구에서 계통별로 외형으로부터 관찰되는 형광 발현 강도의 수준은 genome 내에 존재할 것으로 예상되는 copy 수와 유의적인 상관관계가 있다는 연구가 일부 보고되었지만 (Rahman et al., 2000) 이전의 연구에서 보고되었듯이 BA1-M 계통의 결과로부터 연관성이 없다는 것을 확인하였다 (Geurts et al., 2006). 따라서 이식된 형질전환 유전자의 copy 수와 외부 표현형 사이에 상관관계가 존재하지 않는 것으로 판단된다. 세대 전달된 형질전환 유전자는 일반적으로 동일종 내에서 그 기능을 유지하며 형질전환 특징을 자손에게 부여하지만 형질전환 계통 내에 존재하는 많은 copy 수의 형질전환 유전자의 영향으로 전달된 형질전환 유전자 발현의 수준 및 양상에 변화를 야기하게 될 가능성이 높으며 이러한 영향으로 생리적인 변화와 유전자 발현이 소실되는 transgene silencing 현상이 유발될 수 있다고 보고되었다 (Grabher et

al., 2003; Devgan et al., 2004; Kumar et al., 2004; Geurts et al., 2006). 특히 최소 200 copies 이상으로 예상되는 BA2-F 계통의 형질전환 유전자의 세대 전달 빈도는 멘델의 유전법칙을 따르지 않으며 다른 계통에 비하여 현저히 느린 성장 및 성 성숙도, 부화 자어의 낮은 초기 생존율 등이 나타났다. 따라서 형광 단백질 자체는 생물 독성이 없는 무해한 단백질로 알려져 있지만, 그럼에도 불구하고 형광 단백질이 생식소를 포함한 다양한 조직에서 과량 축적될 경우, 생리적인 장애가 유발되어 전체적인 에너지 대사 등에 변화가 있거나 자어의 생식 기능이 관찰될 수 있음을 보여주고 있다. 형질전환 유전자의 많은 copy 수는 외부 표현형의 수준과는 상관없이 transgene silencing 현상이 유발되어 동일한 유전자형의 세대 전달이 불가능한 불안정한 형질전환 계통이 될 가능성이 높을 것으로 판단된다. 따라서 형질전환 유전자 copy 수가 작은 안정적인 계통이 해양생태계 위해성 평가를 위한 연구에 적합한 실험 재료가 될 것으로 예상된다.

본 연구에서 생식학적 교배를 통해서 transgene silencing 현상이 유발된 것으로 의심되는 BA2-F 계통을 제외한 나머지 세 계통의 hemizygote F1 세대를 대상으로 평가한 결과 멘델의 법칙을 따르는 것을 확인하였으며 이는 염색체 상에 형질전환 유전자가 host chromosome의 single locus에 안정되게 삽입된 것으로 판단된다 (Ju et al., 2003). 형질전환 유전자를 세대 전달하는 hemizygote F1 세대가 암컷인 경우에는 maternal fluorescence protein의 영향으로 난 발생 초기 단계의 형광 단백질의 발현 유무로 형질전환 난임을 판단하는 것은 불가능한 것으로 확인되었다. 따라서 형질전환 유전자를 세대 전달하는 개체가 암컷일 경우에는 망막색소 출현 단계 이후의 배아체 발현 그룹

의 비율을 관찰해야하는 것으로 나타났다.

본 연구에서 삼투압 조절 및 해수 적응 능력을 보유하고 있는 바다 송사리를 대상으로 유전자변형생물체로부터 해양생태계에 미치는 위해성을 평가하기에 적합한 안정적인 low copy 수의 계통을 제시하였다. 동종의 β -actin promoter의 조절을 받는 RFP가 이식된 형질전환 바다 송사리의 계통별로 형광 발현 양상과 maternal fluorescence protein 발현 양상의 특성을 규명하였다. 어류의 전 생애에 걸쳐 지속적으로 형광 발현하는 형질전환 바다 송사리의 특성을 활용하여 해양생태계의 위해성을 평가하기 위한 해양생태학적 연구가 진행되어야 할 필요성이 있다고 생각하며 나아가 형질전환 어류의 위해성 및 환경 위해성 평가를 위한 일반적인 기준 및 지표를 제시할 수 있을 것으로 기대된다.



국문 요약

본 연구에서는 해양생태계에서 유전자변형생물체로부터 야기되는 잠재적인 위해성을 평가하기 위한 연구에 적합한 형질전환 어류를 제시하고자 바다 송사리의 β -actin promoter의 조절을 받는 형광 단백질(RFP; dsRed2)을 이식하여 자손 세대로 전달되는 형질전환 유전자의 발현 양상을 관찰하였다.

형질전환 바다 송사리 계통의 형광 단백질의 발현 개시점은 후기 신경배로 관찰되었고, 형질전환 유전자를 다음 세대로 전달하는 암컷인 개체의 수정란으로부터 maternal fluorescence protein의 발현 양상을 관찰하였다. 또한 형질전환 바다 송사리 계통의 형광 발현은 어류의 전 생애에 걸쳐 eye lens, 골격 근육(skeletal muscle), 지느러미, 혈관, 간, 장, 아가미, 생식소 등에서도 관찰되는 것으로 확인되었다.

형질전환 바다 송사리 계통의 F2 세대까지 Southern blot 분석을 수행한 결과, 4종의 계통은 동일한 유전자형을 다음 세대로 안정되게 전달하는 것으로 관찰되었다. 또한 자손 세대의 외부 표현형으로부터 계통별로 일정한 형광 단백질의 발현 양상이 관찰되었다. 그러나 이식된 형질전환 유전자의 copy 수와 외부 표현형 사이에는 유의적인 관계가 존재하지 않음을 BA1-M 계통으로부터 관찰되었다.

감사의 글

우선 누구보다도 본 논문이 완성되기까지 부족한 저에게 많은 것을 가르쳐주셨으며 이 논문을 다듬어주시고 지도해주신 남윤권 교수님께 진심으로 감사드립니다.

부족함이 많은 저이지만 석사 학위의 과정으로 들어설 수 있도록 이끌어주시고 그 꿈을 이룰 수 있도록 많은 관심과 격려로 힘이 되어주신 김동수 교수님께 존경과 더없는 감사를 드립니다.

학위 과정 중 제게 많은 관심으로 충고와 격려를 해주셨던 김종현 박사님, 방인철 교수님, 노충환 박사님 그리고 가까이에서 많은 조언과 도움을 주셨던 조영선 박사님, 윤문근 박사님께 깊은 감사를 드립니다.

가족보다 더 많은 시간 함께하며 같이 고민하고 힘이 되어준 연구실 식구들과 마음의 위안과 평온을 준 박지은님, 정주연님, 고민균님, 최수희님, 강경림님, 이에진님께 감사드립니다. 특히 오랜 시간 많은 일을 함께 겪으며 당근보다는 채찍으로 앞에서 당겨주고 뒤에서 밀어주었던, 그래서 더 의지할 수 있었던 송하연 박사님께 진심으로 고맙고 감사드립니다.

늘 이심전심으로 서로의 행복과 꿈을 바라고 지지하며 서로의 길을 묵묵히 지켜봐준, 많은 걸 배우고 얻었지만 힘들고 많이 외로웠던 시간을 버틸 수 있게 나의 옆에 있어준 오랜 벗과 지인들에게 감사드립니다.

한결같은 마음으로 격려와 사랑만 주시고 믿어주신 가족과 마지막으로 이 모든 것을 느끼고 경험하고 꿈꾸게 해주신 존경하는 부모님께 부족하지만 이 논문을 바칩니다.

V. 참고 문헌

- Asahida T, Kobayashi T, Kenji S and Nakayama I. 1996. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fisheries Sc* 62, 727-730.
- Bohn T, Primicerio R, Hessen DO and Traavik T. 2008. Reduced fitness of *Daphnia magna* fed a Bt-Transgenic maize variety. *Arch Environ Contam Toxicol* 55, 584-592.
- Brooks C, Hwang G and Maclean N. 2007. Transgene activity following somatic transgenesis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J Fish Biol* 70, :234-247.
- Chou CY, Horng LS and Tsai HJ. 2001. Uniform GFP-expression in transgenic medaka (*Oryzias latipes*) at the F0 generation. *Transgenic Res* 10, 303 - 315.
- Cho YS, Lee SY, Kim DS and Nam YK. 2010. Spawning performance, embryonic development and early viability under different salinity conditions in a euryhaline medaka species, *Oryzias dancena*. *Korean J Ichthyol* vol. 22, No. 1, 25 - 33.
- Cho YS, Lee SY, Kim YK, Kim DS and Nam YK. 2011. Functional ability of cytoskeletal b-actin regulator to drive constitutive and ubiquitous expression of a fluorescent reporter throughout the life cycle of transgenic marine

- medaka *Oryzias dancena*. Transgenic Res DOI 10.1007/s11248-011-9501-2.
- Devgan V, Rao MRS and Seshagiri PB. 2004. Impact of embryonic expression of enhanced green fluorescent protein on early mouse development. Biochem Biophys Res Commun 313, 1030 - 1036.
- Douville M, Gagne F, Andre C and Blaise C. 2008. Occurrence of the transgenic corn *cry1Ab* gene in freshwater mussels (*Elliptio complanata*) near corn fields: Evidence of exposure by bacterial ingestion. Ecotoxicol and Environ Saf doi:10.1016/j.ecoenv.2008.02.006.
- Er-meng Y, Xing Y, Hai-ying W, Jun-jie B, Shi-ling X, Hai-hua L and Qing J. 2010. Isolation of *Tanichthys albonubes* b-actin gene and production of transgenic *Tanichthys albonubes*. Fish Physiol Biochem 36, 173-180.
- Finley KR, Davidson AE and Ekker SC. 2001. Three-color imaging using fluorescent protein in living zebrafish embryos. BioTechniques 31, 66-72.
- Geurts AM, Collier LS, Geurts JL, Oseth LL, Bell ML, Mu D, Lucito R, Godbout SA, Green LE, Lowe SW, Hirsch BA, Leinwand LA and Largaespada DA. 2006. Gene mutations and genomic rearrangements in the mouse as a result of transposon mobilization from chromosomal concatemers. PLoS Genet 2, e156.
- Gong Z, Ju B, Wang X, He J, Wan H, Sudha PM and Yan T.

2002. Green fluorescent protein expression in germ-line transmitted transgenic zebrafish under a stratified epithelial promoter from keratin8. *Dev Dyn* 223, 204-215.
- Gong Z, Wan H, Tay T.L, Wang H, Chen M and Yan T. 2003. Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Comm* 308, 58 - 63.
- Gong Z, Wu YL, Mudumana SP and Lin S. 2004. Transgenic fish for developmental biology studies. In: Gong Z, Korzh V (eds) *Zebrafish development and genetics: the zebrafish and medaka models*. World Scientific, Singapore., 476 - 516.
- Grabher C, Henrich T, Sasado T, Arenz A, Wittbrod, J and Furutani-Seiki M. 2003. Transposon-mediated enhancer trapping in medaka. *Gene* 322, 57-66.
- Hamada K, Tamaki K, Sasado T, Watai Y, Kani S, Wakamatsu Y, Ozato K, Kinoshita M, Kohno R, Takagi S and Kimura M. 1998. Usefulness of the medaka beta-actin promoter investigated using a mutant GFP reporter gene in transgenic medaka (*Oryzias latipes*). *Mol Mar Biol Biotechnol* 7, 173 - 180.
- Harwood JD and Obrycki JJ. 2006. The detection and decay of Cry1Ab Bt-endotoxins within non-target slugs, *Deroceras reticulatum* (Mollusca: Pulmonata), following consumption of transgenic corn. *coicotrol Science and Technology*

16(1/2), 77-88.

- Hwang GL, Azizur RM, Abdul RS, Sohm F, Farahmand H, Smith A, Brooks C and Maclean N. 2003. Isolation and characterization of tilapia beta-actin promoter and comparison of its activity with carp beta-actin promoter. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Exp* 1625, 11 - 18.
- Hwang G, Müller F, Rahman MA, Williams DW, Murdock PJ, Pasi KJ, Goldspink G, Farahmand H and Maclean N. 2004. Fish as Bioreactors: Transgene Expression of Human Coagulation Factor VII in Fish Embryos. *Mar. Biotechnol* 6, 485 - 492.
- Inoue K and Takei Y. 2003. Asian medaka fishes offer new models for studying mechanisms of seawater adaptation. *Comp Biochem Physiol B* 136, 635 - 645.
- Ju B, Chong SW, He J, Wang X, Xu Y, Wan H, Tong Y, Yan T, Korzh V and Gong Z. 2003. Recapitulation of fast skeletal muscle development in zebrafish by transgenic expression of GFP under the mylz2 promoter. *Dev Dyn* 227, 14-26.
- Kang CK, Tsai SC, Lee TH and Hwang PP. 2008. Differential expression of branchial Na⁺/K⁺ -ATPase of two medaka species, *Oryzias latipes* and *Oryzias dancena*, with different salinity tolerances acclimated to fresh water, brackish water and seawater. *Comp Biochem Physiol A* 151, 566 - 575.
- Kinoshita M, Yamauchi M, Sasanuma M, Ishikawa Y, Osada T,

- Inoue K, Wakanatsu Y and Ozato K. 2003. A transgene and its expression profile are stably transmitted to offspring in transgenic Medaka generated by the particle gun method. *Zoological Science* 20, 869-875.
- Krøvel AV and Olsen LC. 2002. Expression of a *vas::EGFP* transgene in primordial germ cells of the zebrafish. *Mechanisms of Development* 116, 141-150.
- Kumar A, Crawford K, Flick R, Klevitsky R, Lorenz JN, Bove KE, Robbins J and Lessard JL. 2004. Transgenic overexpression of cardiac actin in the mouse heart suggests coregulation of cardiac, skeletal and vascular actin expression. *Transgenic Res* 13, 531 - 540.
- Macleane N and Talwar S. 1984. Injection of cloned genes into rainbow trout eggs. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 82, 187.
- Noh JK, Cho KN, Han EH, Kim A, Lee JS, Kim DS and Kim CG. 2003. Genomic cloning of mud loach, *Misgurnus mizolepis* (Cypriniformes, Cobitidae) beta-actin gene and usefulness of its promoter region for fish transgenesis. *Mar Biotechnol* 5, 244 - 252.
- Nam YK, Maclean N, Fu C, Pandian TJ and Eguia MRR. 2007. Development of transgenic fish: scientific background. In: Kapuscinski AR, Hayes KR, Li S, Dana G (eds) *Environmental risk assessment of genetically modified organisms*, vol 3. Methodologies for transgenic fish, CABI,

U.K., 61 - 94.

- Macleane N and Talwar S. 1984. Injection of cloned genes into rainbow trout eggs. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 82, 187.
- Ono Y, Kinoshita S, Ikeda D and Watabe S. 2010. Early development of medaka *Oryzias latipes* muscles as revealed by transgenic approaches using embryonic and larval types of myosin heavy chain genes. *Developmental dynamics* 239, 1807-1817.
- Ozato K, Kondoh H, Inohara H, Iwamatsu T, Wakamatsu Y and Ikeda TS. 1986. Production of transgenic fish: Introduction and expression of chicken δ -crystallin gene in medaka embryos. *Cell Differ* 19, 237-244.
- Pan X, Zhan H and Gong Z. 2008. Ornamental Expression of Red Fluorescent Protein in Transgenic Founders of White Skirt Tetra (*Gymnocorymbus ternetzi*). *Mar Biotechnol* 10, 497 - 501.
- Reece KS, McElroy D and Wu R. 1992. Function and evolution of actins. *Evol Biol* 26, 1 - 34.
- Rahman MA, Hwang G, Razak SA, Sohm F and Maclean N. 2000. Copy number related transgene expression and mosaic somatic expression in hemizygous and homozygous transgenic tilapia. *Transgenic Research* 9, 417 - 427.
- Rosi-Marshall EJ, Tank JL, Royer TV, Whiles MR, Evans-White M, Chambers C, Griffiths NC, Polksek J and Stephen

- ML. 2007. Toxins in transgenic crop byproducts may affect headwater stream ecosystems. PNAS 104, 16204-16208.
- Song HY, Nam YK, Bang IC and Kim DS. 2009. Embryogenesis and early ontogenesis of a marine medaka, *Oryzias dancena*. Korean J Ichthyol 21, 227 - 238.
- Takagi S, Sasado T, Tamiya G, Ozato K, Wakamatsu Y, Takeshita A and Kimura M. 1994. An efficient expression vector for transgenic medaka construction. Mol Mar Biol, Biotechnol 3, 192 - 199.
- Tanaka M, Kinoshita M, Kobayashi D and Nagahama Y. 2001. Established of medaka (*Oryzias latipes*) transgenic lined with the expression of green fluorescent protein fluorescence exclusively in germ cells: A useful model to monitor germ cells in a live vertebrate. PNAS, 98, 5, 2544-2549.
- Tanaka M and Kinoshita M. 2001. Recent progress in the generation of transgenic Medaka (*Oryzias latipes*). Zoological Science 18, 615-622.
- Udvadia AJ and Linney E. 2003. Windows into development: historic, current, and future perspectives on transgenic zebrafish. Dev Biol 256, 1 - 17.
- Williams DW, Mu"ller F, Lavender FL, Orba'n L and Maclean N. 1996. High transgene activity in the yolk syncytial layer affects quantitative transient expression assays in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Transgenic Res 5, 433 - 442.

- Wan H, He J, Ju B, Yan T, Lam TJ and Gong Z. 2002. Generation of two-color transgenic medaka using the green and red fluorescent protein reporter genes gfp and rfp. *Mar Biotechnol* (NY) 4, 146-154.
- Wolska KI. 2003. Horizontal DNA transfer between bacteria in the enviroment. *Acta Microbiol, Pol*, 52, 233-243.
- Yamauchi M, Kinoshita M, Sasanuma M, Tsuji S, Terada M, Morimyo M and Ishikawa Y. 2000. Introduction of a foreign gene into Medakafish using the particle gun method. *Jounal of experimental Zoology* 287, 285-293.
- Zeng Z, Liu X, Seebah S and Gong Z. 2005. Faithful expression of living color reporter genes in transgenic medaka under two tissue-specific Zebrafish promoters. *Developmental dynamics* 234, 387-392.