

## 새로운 유전자 탐색을 위한 까막전복 (*Haliotis discus Reeve*)의 dbEST 구축과 형질전환 전복을 위한 유전자 이식기술 개발

Establishment of an dbEST for identification of novel genes from abalone (*Haliotis discus Reeve*) and development of gene transfer techniques for construction of transgenic abalone

주관연구기관	제주대학교
연구책임자	이제희
발행년월	2004-05
주관부처	과학기술부
사업관리기관	한국학술진흥재단
NDSL URL	<a href="http://www.ndsl.kr/ndsl/search/detail/report/reportSearchResultDetail.do?cn=TRKO200900070334">http://www.ndsl.kr/ndsl/search/detail/report/reportSearchResultDetail.do?cn=TRKO200900070334</a>
IP/ID	14.49.138.138
이용시간	2017/11/03 15:20:29

### 저작권 안내

- ① NDSL에서 제공하는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, KISTI는 복제/배포/전송권을 확보하고 있습니다.
- ② NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 상업적 및 기타 영리목적으로 복제/배포/전송할 경우 사전에 KISTI의 허락을 받아야 합니다.
- ③ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 보도, 비평, 교육, 연구 등을 위하여 정당한 범위 안에서 공정한 관행에 합치되게 인용할 수 있습니다.
- ④ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 무단 복제, 전송, 배포 기타 저작권법에 위반되는 방법으로 이용할 경우 저작권법 제136조에 따라 5년 이하의 징역 또는 5천만 원 이하의 벌금에 처해질 수 있습니다.

사 업 명	지역대학우수과학자 육성지원연구
과제번호	R05-2002-000-00396-0

연구과제명(국문)

새로운 유전자 탐색을 위한 까막전복 (*Haliotis discus* Reeve)의  
dbEST 구축과 형질전환 전복을 위한 유전자 이식기술 개발

연구과제명(영문)

Establishment of an dbEST for identification of novel genes from  
abalone (*Haliotis discus* Reeve) and development of gene transfer  
techniques for construction of transgenic abalone

2004 . 5. 31.

주관연구책임자	소속	제주대학교	성명 이 제 희
세부연구책임자	소속		성명
	소속		성명
	소속		성명

한 국 과 학 재 단

# < 목 차 >

## I. 연구계획 요약문

1. 국문요약문 -----	1
----------------	---

## II. 연구결과 요약문

1. 국문요약문 -----	2
2. 영문요약문 -----	3

## III. 연구내용

1. 서론 -----	4
2. 연구방법 및 이론 -----	5
3. 결과 및 고찰 -----	6
4. 결론 -----	17
5. 인용문헌 -----	18

## 〈 연구계획 요약문 〉

중심어	Expressed sequence tag	cDNA
	전복	Actin promoter
	형질전환	Electroporation
연구목표	<p>이 연구의 목표는 다음과 같이 두 가지로 요약할 수 있다.</p> <p>첫째, 까막전복 (<i>Haliotis discus</i> Reeve)의 expressed sequence tag을 제작하여 전복에서 발현되는 새로운 유전자를 찾아내고 유전자의 특성과 기능을 분석한다.</p> <p>둘째, 전복의 수정란에 외래 DNA 분자를 삽입할 수 있는 효과적인 electroporation 방법을 개발하여 형질전환 전복 연구에 기초가 되고자 한다.</p>	
연구내용	<p>전복은 다른 해양 무척추동물에 비해 유전정보, 유전자 이식 방법과 같은 분자 유전학적인 연구가 턱없이 부족한 실정이다. 이런 어려운 연구 배경을 극복하기 위하여 이 연구에서는 전복의 cDNA로 제작한 ESTs database (1,350개의 cDNA clone)를 이용하여 새로운 유전자를 찾아 그 기능을 분석하고, 보다 효과적인 유전자 도입 방법을 개발하고자 한다.</p> <p>1차년도에는 juvenile abalone의 mRNA에서 합성한 cDNA library를 제작하고, 무작위로 선발한 약 1350개 이상의 EST clones의 DNA 서열을 밝혀낸다. 이렇게 밝혀진 서열을 기존의 dbEST와 비교하여 전복에서 발현되는 유전자를 밝히고 그들의 특성을 분석한다.</p> <p>2차년도의 연구는 전복 수정란에 외래 DNA를 주입시키는 효과적인 방법을 개발하기 위해, 까막전복 actin gene의 proximal promoter와 enhancer를 포함하고 GFP를 reporter 유전자로 갖는 발현 벡터를 개발할 것이다. 이렇게 개발한 벡터를 전복의 수정란에 세포성 인자, 전기적인 변수, 물리화학적인 여러 변수들을 고려한 다양한 조건에서 electroporation하고 GFP의 발현 양상을 분석하여 최적의 조건을 찾아 형질전환 전복의 연구에 응용하고자 한다.</p>	
기대효과 (응용분야 및 활용범위 포함)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 이 연구 결과로 분자유전학적인 연구가 미흡했던 전복의 새로운 유전자를 대량으로 확보하게 될 것이며, 전복유래 유전자의 발현 양상에 대한 정보를 얻을 수 있다.</li> <li>2. 이 연구 결과로 인해 형질전환 전복에 관한 연구가 활기를 띠게 되고, 질병에 내성을 갖거나 빠른 성장 등의 새로운 형질을 갖는 전복을 개발할 수 있는 계기가 될 것이다.</li> <li>3. 이번 프로젝트를 실행하는 것은 참여 학생들의 실력을 향상시킬 수 있는 좋은 기회가 될 것이다.</li> </ol>	

☞ **작성시 유의사항**

- 1) 연구계획서(지원신청서) 제출시의 국문 연구요약문을 그대로 작성함 (당초내용을 복사 사용 가능함)
- 2) 본 요약문의 내용은 외부에 공개할 수 있음
- 3) 반드시 **1페이지 이내**로만 기재함

## 〈 연구결과 요약문 〉

중심어	Expressed sequence tag	cDNA
	전복	Actin promoter
	형질전환	Electroporation
연구목표	<p>첫째, 전복 (<i>Haliotis discus</i> Reeve)의 expressed sequence tag을 제작하여 전복에서 발현되는 새로운 유전자를 찾아내고 유전자의 특성과 기능을 분석한다.</p> <p>둘째, 전복의 수정란에 외래 DNA 분자를 삽입할 수 있는 효과적인 electroporation 방법을 개발하여 형질전환 전복 연구에 기초가 되고자 한다.</p>	
연구내용	<p>전복은 다른 해양 무척추동물에 비해 유전정보, 유전자 이식 방법과 같은 분자 유전학적인 연구가 턱없이 부족한 실정이다. 이런 어려운 연구 배경을 극복하기 위하여 이 연구에서는 전복의 cDNA로 제작한 ESTs database (1,170개의 cDNA clone)를 이용하여 새로운 유전자를 찾아 그 기능을 분석하고, 보다 효과적인 유전자 도입 방법을 개발하고자 하였다.</p> <p>1차년도에는 juvenile abalone whole tissue의 mRNA에서 cDNA library를 제작하여, 무작위로 선발한 약 1170개의 EST clones에 대한 DNA 서열분석을 수행하였다. 분석된 서열을 기존의 dbEST와 비교하여 전복에서 발현되는 유전자를 밝히고 그들의 특성을 분석하였다.</p> <p>2차년도에는 전복 수정란에 외래 DNA를 주입시키는 효과적인 방법을 개발하기 위해, 까막전복 actin gene의 proximal promoter와 enhancer를 포함하고 GFP를 reporter 유전자로 갖는 발현 벡터를 제작하였다. 이렇게 제작된 벡터를 전복의 수정란에 세포성 인자, 전기적인 변수, 물리화학적인 여러 변수들을 고려한 다양한 조건에서 electroporation하고 GFP의 발현 양상을 분석하여 최적의 조건을 찾아 형질전환 전복의 연구에 응용하고자 하였다. 그리고 전복유래 항산화효소인 superoxide dismutase, catalase, glutathione-s-transferase와 arylsulfatase의 cDNA를 expression vector에 cloning하여 예상되는 단백질을 얻을 수 있었으며 각 효소의 특성을 분석하고 있다.</p>	
연구성과	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 까막전복 치패로부터 전 조직 (whole tissue) cDNA library를 제작하여, 총 1170개 clone의 염기서열 분석하였다.</li> <li>2. 까막전복과 시볼트전복으로부터 beta-actin promoter를 클로닝하였고, 이 유전자를 외래 유전자 삽입을 위한 expression vector를 제작하였다. 제작된 vector의 활성은 EGFP reporter 유전자와 zebrafish를 이용하여 확인하였다.</li> <li>3. Electroporation 조건 (voltage와 capacitance)을 달리하여 유전자 주입을 시도하였으며 각 조건에 따른 생존률을 확인하였다.</li> <li>4. 전복유래 항산화효소를 cloning하였으며 각 효소의 특성은 recombinant protein을 생산하여 확인하고 있다.</li> <li>5. 이 과제로 인하여 4명의 대학원생에게 분자생물학의 테크닉을 습득할 수 있는 좋은 기회가 되었으며, 학생 나름대로 연구를 수행할 수 있는 실력을 함양할 수 있는 계기가 되었다.</li> </ol>	

### ☐ 작성시 유의사항

- 1) 중심어는 평가자 선정시 직접 활용되므로 정확하게 최대한 기재함
- 2) 다년과제(2년 이상 지원과제)는 연구기간 전체에 대하여 기재하되 연구내용 보다는 연구성과를 중심으로 작성함
- 3) 본 요약문의 내용은 외부에 공개할 수 있으며, 반드시 1페이지 이내로만 작성함

## 〈 EXECUTIVE SUMMARY 〉

Keywords	Expressed sequence tag	cDNA
	Abalone	Actin promoter
	Transgenesis	Electroporation
Purpose	<p>There are two objectives to this proposal:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. to unveil genes expressed in abalone through screening of expressed sequence tags prepared from whole juvenile abalone.</li> <li>2. to develop an efficient method to transfer exogenous DNA molecules into fertilized abalone eggs by electroporation.</li> </ol>	
Contents	<p>Molecular genetic research in aquatic invertebrate, abalone lags far behind the research in other species mostly due to lack of genetic information and gene transfer methods. In order to overcome these problems confronted by researchers, we will make a useful contribution to abalone research by establishing an ESTs database prepared from cDNA of abalone to identify novel genes and characterize the function of genes. We will also develop an efficient way of transferring exogenous DNA into fertilized eggs of abalone.</p> <p>The research efforts concentrated on two main projects:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. to identify genes expressed in abalone, we constructed a cDNA library from mRNA isolated from juvenile abalone and determined the DNA sequences of a large number of clones (1,170 EST clones). The sequences of clones were compared with dbEST to analyze the genes.</li> <li>2. to develop an efficient method of transferring exogenous DNA into fertilized eggs of abalone, we constructed an expression vector containing proximal promoter and enhancer of abalone actin gene to express a reporter gene, EGFP. The vector was introduced into fertilized eggs of abalone by varying electroporation conditions such as voltage and capacitance. We also tried to introduce the expression vector into fertilized abalone embryos by microinjection method.</li> <li>3. We cloned cDNAs of enzymes involved in the protection of cells from the toxic effects of reactive oxygen species and analyzed the structure and function of the enzymes.</li> </ol>	
Expected Contribution	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Constructed a cDNA library from whole abalone and analyzed 1170 cDNA clones</li> <li>2. Cloned beta-actin promoters from two abalone species and constructed expression vectors containing abalone beta-actin promoter and EGFP gene as a reporter. Also tested the activity of the promoters by microinjecting the vector into fertilized zebrafish embryos.</li> <li>3. Obtained survival rates of abalone upon electroporating fertilized embryos with varying voltage and capacitance.</li> <li>4. Cloned genes involved in protecting cells from reactive oxygen species and expressed in <i>E. coli</i>. Purified the proteins and characterizing the enzymes</li> <li>5. Four graduate students had opportunities to learn techniques used in molecular biology and learned to carry out their own experiments independently</li> </ol>	

☐ 작성시 유의사항

- 1) 중심어는 평가자 선정시 직접 활용되므로 정확하게 최대한 기재함
- 2) 다년과제(2년 이상 지원과제)는 연구기간 전체에 대하여 기재하되 연구내용 보다는 연구성과를 중심으로 작성함

## 〈 연구내용 및 결과 〉

▣ 다음 항목을 중심으로 기재하되 총 15쪽 이내로 작성하며 별도의 서식 없이 자유롭게 작성함  
제목은 12point, 본문내용은 10point로 작성하며 줄간 간격은 조정 가능함

### 1. 서론

☞ 작성요령

연구배경, 연구목적, 연구범위 등

전복은 단백질이 풍부하며 지방산, 비타민과 무기질 등 다량의 필수 영양성분이 함유되어 있어 예로부터 환자와 산모의 건강식으로 이용되고 있으며, 경제적 가치뿐만 아니라, 국민의 건강식품으로 각광을 받는 고가의 품종이다. 연간 1회 산란하며 상품가치로의 성장기간이 최소 3-4년이 소요되므로, 빠른 성장률, 성장기간 단축, 년중 다회 산란, 다량의 산란 및 산란시 수정을 향상은 전복의 생산성향상에 중요요인으로 여겨지고 있다. 이에 치패의 성장 속도 향상을 위한 인공배합사료 개발 (Fleming *et al.*, 1996; Bautista-Teruel and Millamena, 1999), 수온과 광주기 (이 등, 2001), 중간육성 (박, 1997), 수용밀도 (김 등, 2000a) 조절과 정자농도에 따른 수정률 향상 (김 등, 2000b) 등의 다양한 연구들이 이루어지고 있다.

또한, 전복은 형태학적으로 유사하고, 전복 자원 육성을 위한 종간 교잡에 의한 잡종형의 형성으로 종 특이성과 종 구분 등의 생물학적 특성을 밝히는데 어려움이 있다. 이를 해결하기 위하여 국내·외에서는 유전학적인 방법으로 폐각조직내 동위효소 분석 (김 등, 1996), RAPD (Huang *et al.*, 2000; 한 등, 2000), minisatellite gene 분석 (Huang *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1998), COI (Cytochrome oxidase subunit I) gene 분석 (지 등, 1999), 정자 침체에 존재하는 lysin 단백질 분자구조 비교 (Kresge *et al.*, 2001)에 근거한 계통학적 종 분류와 핵형 분석에 의한 전복의 염색체수가 확인되었을 뿐 (Miyaki *et al.*, 1997; Miyaki *et al.*, 1999) 전복의 genome과 특정 유전자에 관한 연구는 이루어지고 있지 않은 실정이다. 이외에도 염색체공학 (chromosome engineering) 기법을 이용한 삼배체 전복의 생산이 시도되었고 (지 등, 1997), red abalone (*Haliotis rufescence*)에서는 actin promoter 유전자를 클로닝하여 성장률이 향상된 전복을 생산할 수 있는 expression vector를 개발하였다 (Gomez-Chiarri *et al.*, 1999). 그러나, 이 연구에 사용된 유전자는 전복 유래 유전자가 아닌 coho salmon growth hormone 유전자를 이용한 것이다.

전복 genome에 관한 정보 부족, 전복에서 발현되는 유전자의 일부 제한적 분석과 전복 내 외래유전자의 효율적인 이식 방법의 미 확립은 유전공학기술이 전복에 접목되지 못하고 있는 이유이다. 이런 난점을 해결하기 위해 본 연구에서는 전복 유전자의 발현양상을 분석하기 위하여 EST (Expressed Sequence Tag) database를 구축하고, 전복의 수정란에 외래유전자를 용이하게 이식할 수 있는 방법을 개발함으로써 특정형질을 가진 (내병성, 성장률증가, 저온내성 등) transgenic abalone의 생산을 위한 기반을 확립하고자 하였다.

EST는 특정 개체내 genome의 전사물을 대표하는 것으로 현재 식물, 척추동물, 해양생물 등에서 새로운 유전자를 찾기 위한 방법으로 많이 사용되어지고 있다. GenBank의 EST Database (dbEST)내 등록된 EST수를 보면, 90년도 중반에는 약 40만개 정도였으나, 10년 사이에 3백만개 이상이 등록된 것으로 보아 정보량이 폭발적으로 증가함을 알 수 있다. GenBank내 등록된 어류의 EST는 주요 상업적 이용종과 실험적 모델 어종이 약 2-3%정도를 차지하고 있으나, 아직 패류에 대한 EST 연구는 전무한 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 1차년도에 까막전복에서 발현되는 유전자를 탐색하고 발현된 유전자의 기

능을 확인하기 위한 방법으로 전복에서 발현되는 mRNA를 주형으로 cDNA library를 만들어 일부 cDNA clone (약 1170개의 clones)의 sequence를 분석하였다. 확인된 ESTs의 서열은 dbEST와의 비교 분석하여 다양한 질병, 대사, 발생, 소화 등에 관련된 유전자들과 전복에서 발현되는 새로운 유전자를 확인하였다. 2차년도에는 연구자의 실험실에서 밝힌 까막전복의 actin promoter 유전자와 reporter gene을 이용하여 expression vector를 제작하였다. 이를 zebrafish와 전복 수정란에 이식하여 reporter gene의 발현양상을 분석하였다. 이렇게 확립된 기술은 전복의 transgenic 연구에 기반이 될 것이며, 이 연구에서 밝혀질 새로운 유전자들은 transgenic abalone의 생산, 우량 형질을 갖는 selection breeding, 진화시 중간 유연관계 및 계통분류를 위한 polymorphic marker로 이용할 수 있고, abalone gene mapping, 환경변화 또는 물리적, 화학적 외부자극에 의한 개체내 다양한 전사 조절 기작 등의 연구를 가능하게 할 것이다.

## 2. 연구방법 및 이론

### ☞ 작성요령

연구수행을 위하여 행한 실험, 계산, 측정, 관측, 이론적 해석 가설이나 모델의 설정 등

### 2.1 까막전복(*Haliotis discus Reeve*)으로부터 mRNA 분리

살아있는 전복을 칼을 이용하여 잘게 절단한 다음, 액체질소로 급속 동결하여 mRNA를 추출할 때까지 tube에 넣어  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. mRNA는 폐각을 제외한 약 0.5 g 전 조직에서 hot phenol 방법을 이용하여 total RNA를 분리하였다 (Verwoerd *et al.*, 1989). 분리된 total RNA로부터 poly(A)<sup>+</sup> RNA를 PolyATrack mRNA isolation system (Promega, U.S.A.)을 이용하여 mRNA를 분리하였고 사용할 때까지 ethanol에 침전된 상태로 보관하였다.

### 2.2 Unidirectional sequencing을 위한 cDNA library 제조

cDNA library는 ZAP-cDNA synthesis kit (Stratagene, U.S.A.)을 사용하여 제작하였다. 전복으로부터 추출한 mRNA를 template로 사용하고 특정 제한효소부위인 *Xho*I를 포함하는 hybrid oligo(dT) linker primer, reverse transcriptase, 5-methyl dCTP, dATP, dGTP, dTTP를 사용하여 first strand cDNA를 합성하였다. First strand cDNA 합성후 RNaseH, DNA polymerase, dNTP를 사용하여 second strand cDNA를 합성하고, *pfu* DNA polymerase를 사용하여 cDNA의 말단을 blunt ends로 만들었다. 합성된 double strand cDNA에 *Eco*RI adaptor를 ligation한 다음 *Xho*I으로 절단하여 5'에는 *Eco*RI restriction site를 3'에는 *Xho*I restriction site를 가진 cDNA를 얻을 수 있었다. 절단된 cDNA는 Sepharose CL-2B gel filtration medium으로 size-fraction을 수행한 후, Uni-ZAP vector (Stratagene, U.S.A.)에 삽입하여 phage packaging을 수행하여 primary library titering을 수행하였다.

### 2.3 Plasmid preparation과 DNA sequencing

제작된 primary library에서 plasmid DNA를 얻기 위해 *in vivo* mass excision을 수행하여 총 1170개의 colony를 무작위로 선택하였다. 선택된 colony는 ampicillin이 함유된 LB broth 3 ml에 접종하고  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 배양하였다. Plasmid DNA는 Bioneer사의 *AccuPrep*<sup>TM</sup> Plasmid Extraction Kit을 사용하여 분리하였다. 분리된 plasmid DNA sequencing은 (주)마크로젠에 의뢰하였다. 그리고, sequencing을 위한 primer는 pBluescript SK vector의 multiple cloning site의 서열에서 AB primer 5-CAAAGCTGGAGCTCCACC-3'을 디자인하여 (주)바이오니아에서 합성하여 사용하였다.



## 2.4 염기서열 분석

데이터베이스내의 유전자 또는 단백질에 유사한 유전자를 검색하기 위하여, 염기서열 결정된 모든 clone의 서열을 PHRED program에 입력하여 low quality sequence (ambiguous sequence)를 제거하고, cross\_match program을 이용하여 clone내 벡터서열을 제거하는 trimming 과정을 수행하였다. 이 서열들을 TIGR assembler v 2.0을 이용하여 assembly 과정을 거친 후, BLAST X와 N 알고리즘을 통해 데이터베이스내 유전자 상동성 검색을 수행하였고, E-value  $\leq 10^{-5}$ 을 유의한 값으로 고려하였다.

## 2.5 유전자 이식 vector의 제조

전복의 수정란에 외래유전자의 성공적인 이식을 위하여 다음과 같이 발현 벡터를 제작하였다. 전복 actin promoter를 *EcoRI*과 *BamHI* 제한부위를 가진 primer를 이용하여 PCR 증폭하고 pBluescriptII SK(-)의 *HincII* restriction site에 subcloning하였다. Subclone을 *EcoRI*과 *BamHI*을 이용하여 절단한 다음 정제하고 T4 DNA ligase를 이용하여 같은 제한효소로 절단된 pEGFP-1에 ligation하였다. 전복 actin promoter의 유전자 발현정도를 비교분석하기 위해 사용될 control로서 CMV promoter의 downstream에 EGFP reporter 유전자가 삽입된 pEGFP-C1을 사용하였다.

## 2.6 Zebrafish 수정란을 이용한 전복 유전자 이식 vector의 발현 확인

수정란에 외래유전자를 주입하기 위해서는 많은 수의 수정란과 장기간에 걸친 산란이 필수적이지만 전복은 1년에 1회 (까막전복은 10 - 11월에 산란) 산란하는 동물로서 전복에의 유전자 이식방법의 확립은 다소 어려움이 있다. 이에 수정란과 산란조절이 간단하여 모델동물로 많이 이용되고 있는 zebrafish의 one cell stage embryo에 제작된 유전자 이식 벡터를 microinjection하여 actin promoter의 발현 양상을 형광현미경하에서 관찰하였다.

## 2.7 Electroporation을 이용한 까막전복 수정란내 외래 유전자 도입

UV 자극을 준 해수에 까막전복 암컷과 수컷의 방란과 방정을 유도하였다. 유도된 난과 정자를 수집하여 수정하였다. 수정된 난을 90 micron screen을 이용하여 멸균해수로 세 번 세척하여 수집하고, 과잉의 정자를 제거하였다. 전복 embryo내 외래 유전자를 도입하기 위하여 ECM630 (BTX corporation)을 이용하여 voltage와 capacitance를 달리하여 수행하였다 (50-300V와 25-100 $\mu$ F).

## 3. 결과 및 고찰

### ▣ 작성요령

결과의 해석 또는 다른 결과와의 비교분석 · 장래전망 등

### 3.1 까막전복 치패로부터 제작된 cDNA library 분석 (제주대학교 해양생물공학과 박사과정 강현실)

1년생 까막전복 치패로부터 분리된 mRNA를 이용하여 double strand cDNA를 합성하여 Uni-ZAP XR vector에 ligation 한 후 Gigapack III Gold packaging으로  $1.0 \times 10^7$  pfu/ml의 primary lambda

phage library를 획득하였다. Library의 nonrecombinant 비율은 약 5%이며, 무작위로 20개의 recombinant plaque을 선택하여 PCR 결과, insert size는 약 0.5 kb - 3.0 kb로 분포하고 있음을 확인하였다. Primary lambda phage library로부터 plasmid DNA를 얻기 위해 mass excision을 수행하여  $1 \times 10^6$  pfu의 primary library로부터  $1.2 \times 10^7$  cfu의 phagemid particle을 획득하였고, 이를 alkaline lysis 방법에 의하여 약 1170개의 plasmid DNA를 분리하여 염기서열분석을 수행하였다.

그 결과를 Table 1에 요약하여 나타내었다. 1170개의 clone을 염기서열 분석과 trimming 작업 수행 후 약 1096개의 clone이 유전자 검색에 이용될 수 있게 성공적으로 분석되었다. 이들 서열을 assembly 과정을 수행하여 489개의 clone이 동일 유전자를 갖고 있는 150개의 contig와 동일 유전자를 갖고 있지 않는 607개의 singleton으로 분류되었으며, whole library의 redundancy는 45%로 확인되었다. BLAST algorithm (BLAST N과 X)을 통해 데이터베이스 내 유사한 유전자 검색 시, 757개의 유전자중 424개 (56%)의 서열이 데이터베이스에 등록되어 있는 known gene (37%)과 EST 서열 (19%)에 대하여 유의한 유사성을 보였다. 이중 *Haliotis* 속에서 분석된 cellulase, collagen pro alpha-chain, lysin 또는 microsatellite 서열에 일치하는 약 18개의 유전자 서열도 확인되었다. 그리고, 나머지 333개 (44%)의 서열은 데이터베이스내의 어떤 유전자 서열과도 일치하지 않는 것으로 보아 unknown gene 또는 새로운 유전자로 확인되어 앞으로의 완전한 염기서열 분석과 기능 연구가 필요하다.

424개의 확인된 서열을 cellular putative function에 기초하여 14개의 그룹으로 분류하였다 (Fig. 1); 기능이 밝혀지지 않은 EST 서열에 일치하는 unknown function (34.4%), enzyme (19.1%), structural/cytoskeleton and cell adhesion (10.4%), ribosomal proteins (8.7%), transcription and translation factors (5.2%), signal transduction (5%), carrier and storage proteins (2.8%), cell and organism defense (1.2%), blood coagulation (0.9%), development and growth (1.7%), fertilization (2.1%), ATP and energy metabolism (1.7%), 유전자 서열에 일치하나 기능이 정확히 밝혀지지 않은 unclear classification (4.2%), repeat sequence (2.6%).

Table 1. Characterization of *Haliotis discus* Reeve whole tissue ESTs.

<b>Total number of ESTs sequenced</b>	<b>1170</b>
<b>Total number of ESTs analyzed</b>	<b>1096</b>
<b>Range of insert size</b>	<b>0.5- 3 kb</b>
<b>EST clusters <sup>a</sup></b>	<b>150</b>
<b>Singletons <sup>b</sup></b>	<b>607</b>
<b>Redundancy <sup>c</sup></b>	<b>45% (44.6%)</b>
<b>Known genes</b>	<b>424</b>
<b>No hit</b>	<b>333</b>

**a** ESTs with 90% or greater identity over a 100bp region were clustered.

**b** No match any sequence in the data set to allow assembly

**c** Redundancy= number of ESTs assembled in clusters/total ESTs

Functional group중 가장 큰 그룹은 34.4%와 19.1%를 차지하는 unknown function과 enzyme이며, 두 번째 그룹은 structural/cytoskeleton protein과 ribosomal protein으로 10.4%와 8.7%를 차지한다. 그리고 가장 작은 그룹은 0.9%의 blood coagulation과 1.2%의 cell/organism defense이다. 가장 많은 수의 clone을 갖고 있는 unknown function 그룹의 서열들을 보면, 약 50%의 서열이 zebrafish, mouse, human,

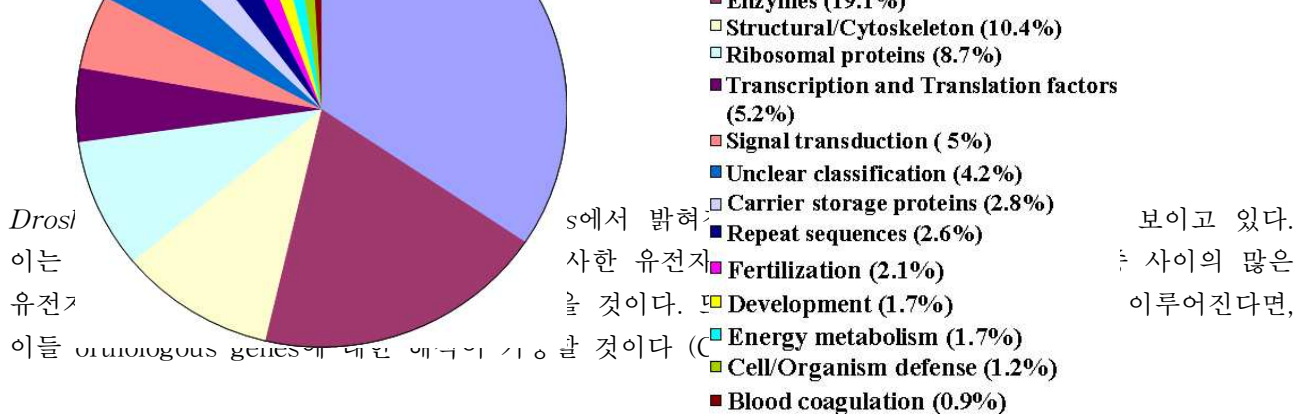


Fig.1. Functional classification of *Haliotis discus* Reeve whole tissue cDNA ESTs. The 424 ESTs were clustered into 14 categories according to their putative function.

두 번째로 다양한 생화학 반응을 촉매하는 enzyme 그룹에서는 81 clone 중 64개의 unique sequence를 확인하였다. enzyme 그룹에 일치하는 81개의 clone을 다시 cellular function에 기초하여 분류하였다 (Fig. 2). 그 결과, 대부분의 유전자가 대사관련 (protein, carbohydrate, energy, lipid and nucleic acid) 유전자에 일치하고 있으며, 이외에도 neurotransmitter, unclear classification (기능이 명확히 확인되지 않은 유전자 서열)과 unknown 서열에 일치함을 확인하였다. 특히, lipid: protein: carbohydrate 비율이 1: 8 : 7를 나타내고 있다. 이는 1년생 까막 전복치패의 경우 해조류의 왕성한 섭취에 의한 체근육의 증가가 활발히 일어나는 시기로, 단백질과 탄수화물 관련 유전자의 발현이 활발히 일어나고 있음을 유추할 수 있다. 대표적인 단백질 대사 관련 유전자로는 단백질의 분해에 관여하는 cathepsin L precursor와 chymotrypsin-like serine proteinase, 탄수화물 대사 관련 유전자로는 cellulase, sulfatase 1 precursor와 iduronate-2-sulfatase를 확인하였다.

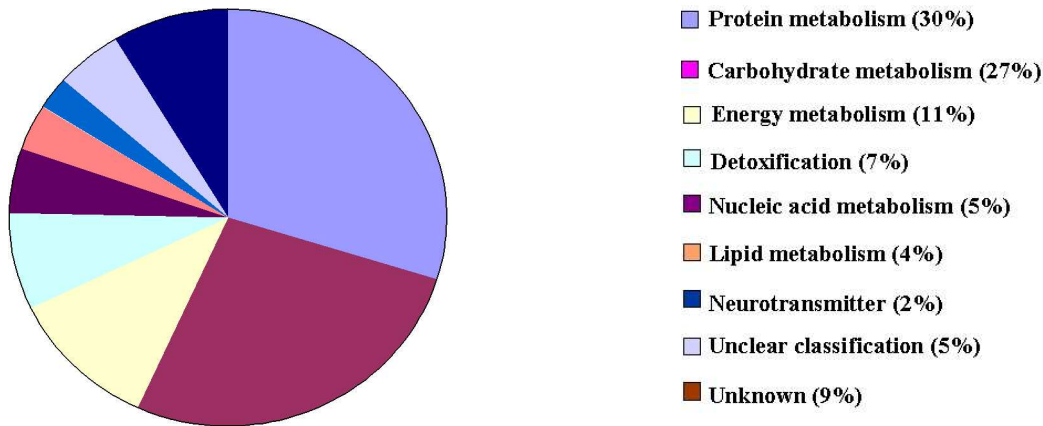


Fig. 2. Functional categorization of enzymes. The 81 sequences were clustered into 8 categories.

Ribosomal protein은 리보솜의 구성원으로 리보솜 assembly와 rRNA 안정화에 관여하는 단백질로 다양한 종에서 만들어진 cDNA library에서 확인되고 있다. 본 연구에서도 두 번째 그룹으로 나타나고 있으며, large와 small ribosomal subunit protein에 일치하는 34개의 unique sequence가 확인되었다. Structural/cytoskeleton protein 역시 제작된 cDNA library에 따라 다양한 유전자들이 발현되고 있다. 본 연구에서는 myosin-regulatory light chain, myosin essential light chain, tubulin α paramyosin, collagen pro α chain 등 세포 골격 유지와 근육 단백질에 관련된 유전자들이 나타나고 있다.

EST 분석과 assembled sequence 결과에 기초하여, 까막전복 전 조직 cDNA library에서 가장 많이 발현되는 유전자 목록을 Table 2에 요약하여 나타내었다. 가장 많이 발현되는 12개의 유전자 중 6개의

유전자가 structural/cytoskeleton 단백질인 calponin-like protein, myosin essential light chain, myosin regulatory light chain, paramyosin, myosin essential light chain과 tubulin  $\alpha$  chain과 관련되었다. 또한, calponin-like protein은 10 copy number를 갖고 있어, 가장 많이 발견되는 clone으로 나타났다. calponin은 세포 골격 구성원뿐만 아니라 smooth muscle내 근육 수축을 관여하는 것으로 알려져 있다 (Jones *et al.*, 2001). 전복은 부착생활을 하는 저서생물로 전체 조직의 2/3를 근육이 차지하고 있어, 근육 운동에 의한 이동, 먹이 섭취 등이 일어나고 있다. 따라서 다량 발현되는 조직들에 관련된 calponin-like protein을 비롯한 여러 근육조직 관련 단백질이 강하게 발현되고 있을 것으로 예상된다.

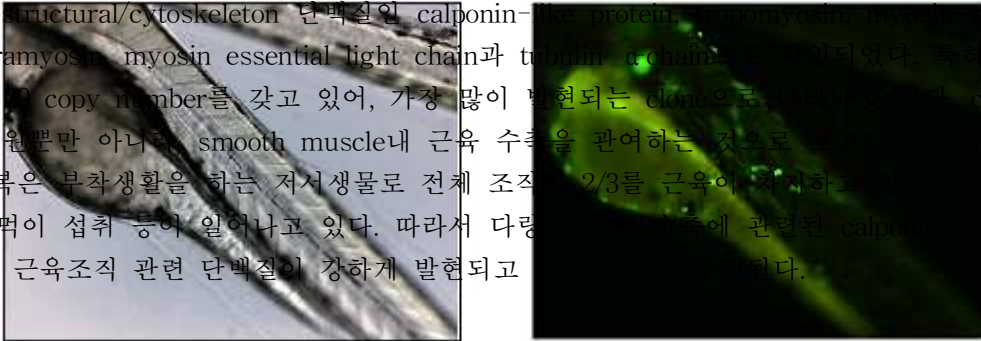


Table 2. Most abundant clones in whole tissue abalone ESTs

Gene description	Organism	Frequency
<b>Calponin-like protein</b>	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<b>29</b>
<b>SHG (unknown)</b>	<i>Littorina littorea</i>	<b>12</b>
<b>Tropomyosin</b>	<i>Haliotis astina</i>	<b>10</b>
<b>Guanine nucleotide binding protein</b>	<i>Petromyzon marinus</i>	<b>10</b>
<b>G-alpha singal transducing</b>	<i>Haliotis rufescens</i>	<b>9</b>
<b>Myosin-regulatory light chain</b>		<b>7</b>
<b>Myc homolog</b>	<i>Crassostrea virginica</i>	<b>7</b>
<b>Fatty acid binding protein</b>	<i>Clonorchis sinensis</i>	<b>6</b>
<b>Tubulin alpha chain</b>	<i>Oikopleura dioica</i>	<b>6</b>
<b>Paramyosin</b>	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<b>6</b>
<b>Ribosomal protein L5</b>	<i>Argopecten irradians</i>	<b>6</b>
<b>Ribosomal protein L7</b>	<i>Crassostrea gigas</i>	<b>6</b>

### 3.2 유전자 이식 벡터의 발현 양상 분석 (제주대학교 해양생물공학과 박사과정 박영미)

Clustal W 1.72를 이용하여 1140 bp의 시볼트의  $\beta$ -actin gene의 서열과 1144 bp의 까막전복의  $\beta$ -actin gene의 서열을 분석한 결과 95% 유사성을 나타내었다. Neural network promoter prediction에 의한 분석 결과 시볼트의  $\beta$ -actin promoter는 425 ~ 475 n.t에 위치하였고, 까막전복은 424 ~ 474 n.t에 위치하였다. SIGNAL SCAN program에 의해 분석된 예상 TATA box는 시볼트  $\beta$ -actin gene의 413 ~ 418 n.t, 까막전복의 435 ~ 440 n.t에서 확인되었다. 시볼트  $\beta$ -actin gene의 372 ~ 376 n.t, 408 ~ 412 n.t 부분이 CAAT box로 예상되었고, 까막전복의 서열에서는 374 ~ 378 n.t, 410 ~ 414 n.t가 CAAT box로 확인되었다.

Exon 1 바로 앞부분의 염기서열에 *Bam*HI 인식 서열을 첨가하여 제작된 reverse primer와 *Eco*RI 인식

A

## B

Fig. 3. Expression patterns of EGFP derived from beta-actin promoters of abalones. Beta-actin promoter of *Haliotis sieboldii* (A) and *Haliotis discus* Reeve (B) was used to express the EGFP reporter in Zebrafish.

서열이 들어있는 5' END의 염기서열을 forward primer로 제작하여 PCR 증폭한 후 *Bam*HI과 *Eco*RI에 의해 double digestion된 pEGFP-1 (Clontech, U.S.A)에 클로닝하여 zebrafish embryo에 microinjection하였다.

Zebrafish embryo에서  $\beta$ -actin promoter (시보트 531 bp, 까막전복 534 bp)에 의해 발현된 EGFP 사진을 나타내었다. cytoskeletal structure의 유지, cell division, phagocytosis, endocytosis, exocytosis에 필요한 진핵생물의 모든 조직에서 발현되는  $\beta$ -actin gene의 promoter에 의한 EGFP 발현을 zebrafish embryo에서 조사하였다. 다양한 어류와 무척추동물에서 실험되어진  $\beta$ -actin promoter를 이용한 zebrafish embryo에서의 reporter gene의 발현 양상과 유사하게 본 실험에서도 조직마다 EGFP 발현이 다양하게 나타났다. 이는 embryo에 microinjection하였을 경우 transgene이 division되는 모든 cell에 분배되지 않았거나 embryo의 각 cell의 DNA에 integration된 transgene copy 수의 차이에 의한 결과로 생각되어진다. 또한, 조직 특이적인 전사 조절인자에 의해  $\beta$ -actin promoter에 의한 전사 효율이 조직마다 차이를 보여 EGFP 발현 양상이 mosaic하게 나타난 것으로 생각된다.

### 3.3 Electroporation을 이용한 외래 유전자 도입에 의한 유전자 발현 분석 (제주대학교 해양생물공학과 박사과정 강현실)

수정란에 외래 유전자를 도입하기 위해서는 많은 수의 수정란과 장기간에 걸친 산란이 필수적이지만 전복의 경우 1년에 1회 (까막전복은 10 - 11월에 산란) 산란하는 동물로 유전자 이식방법의 확립에는 다소 어려움이 있다. 이에 본 연구에서는 2003년 10월 6- 20일 사이 북제주 수산 종묘시험장의 도움을 받아 전복 수정란을 이용한 electroporation을 수행하였다. 총 3회의 실험을 진행하였으며, 외래 유전자는 positive control인 pEGFP-C1과 까막전복 beta actin promoter 유전자를 갖고 있는 pAB-EGFP를 linear DNA 또는 supercoil 형태에 따라 유전자 도입을 시도하였다. 외래 유전자 도입을 위한 electroporation 조건은 Buchanan *et al.*에 의해 eastern oyster (*Crassostrea virginica*) embryo에 이용한 방법을 토대로 사용하였고, 그 결과를 요약하여 Table 3에 나타내었다. Electroporation 12 시간 후, 전복 수정란에서의 EGFP 발현 양상을 형광현미경하에서 관찰하였다. 그 결과, 수정란에서의 EGFP의 발현은 검출할 수가 없었다. 그 원인을 eastern oyster에서 외래유전자가 삽입된 것을 G418 항생제로 selection한 뒤 형광현미경으로 관찰했을 경우 극소수의 oyster로부터 형광단백질이 발현되는 것이 관찰된 것으로 보아 EGFP

유전자가 패류의 경우 발현이 약하게 되거나 발현이 되지 않는 것으로 판단된다 (Buchanan *et al.*, 2001). 이 문제를 극복하기 위하여 유전자 이식 벡터로 이용된 외래 유전자의 수정란 삽입 유무를 확인하기 위하여 벡터내 specific한 primer를 제작하여 수정란으로부터 genomic DNA를 분리하여 PCR 증폭을 행하였으나, electroporation시 사용한 다량의 DNA를 완전히 해수로부터 제거하지 못하여 외래 유전자 도입 유무를 정확히 판단할 수가 없었다.

본 실험에서 외래 유전자 도입 실험은 년 일회 산란시에 수행되어 시간의 한정성과 electroporation시 사용된 ECM630 electroporator는 physical condition이 voltage, capacitance로만 조절이 이루어지기 때문에 더 정확한 electroporation을 위해서 더 정교한 electroporation 조건을 조절할 수 있는 electroporator를 사용할 필요가 있다고 판단된다.

Table 3. Results of *Haliotis discus* Reeve embryo electroporation experiment

Electroporations were performed at various combinations of voltages (50, 100, 200 and 300V) and capacitances (25, 50, 75 and 100 $\mu$ F) using control (without DNA), pEGFP-C1 and pAB-EGFP (supercoil and linear).

1차실험 (2003년 10월 6일)			2차실험 (2003년 10월 16일)			3차실험 (2003년 10월 20일)			
No	conditions		survival	conditions		survival	conditions		survival
	vector	parameter (V, $\mu$ F)	rate (%)	vector	parameter (V, $\mu$ F)	rate (%)	vector	parameter (V, $\mu$ F)	rate (%)
1	-	50,25	80	pEGFP-C1 3회 반복	50,25	90	pAB-EGFP (supercoil)	50,25	95
2	-	100,25	80		50,50	90		50,50	68
3	-	200,25	80		50,75	90		50,75	81
4	-	300,25	80		50,100	85		50,100	90
5	-	50,100	75		100,25	90		100,25	92
6	-	100,100	75		100,50	85		100,50	89
7	-	200,100	50		100,75	82		100,75	98
8	-	300,100	0		100,100	80		100,100	89
9	pEGFP-C1	50,25	80		200,25	90		200,25	91
10		50,50	80		200,50	80		200,50	73
11		50,75	80		200,75	70		200,75	81
12		50,100	65		200,100	50		200,100	50
13		100,25	65		300,25	80		300,25	82
14		100,50	50		300,50	40		300,50	60
15		100,75	50		300,75	20		300,75	32
16		100,100	50		300,100	10		300,100	20
17		200,25	50	pAB-EGFP	50,25	91	pAB-EGFP (linear)	50,25	94
18		200,50	45		50,50	93		50,50	64

19		200,75	50		50,75	91		50,75	86
20		200,100	40		50,100	93		50,100	72
21		300,25	40		100,25	93		100,25	82
22		300,50	20		100,50	89		100,50	80
23		300,75	20		100,75	86		100,75	91
24		300,100	10		100,100	87		100,100	86
25	pAB-EGFP	50,25	80		200,25	87		200,25	86
26		50,50	75		200,50	79		200,50	90
27		50,75	75		200,75	84		200,75	57
28		50,100	75		200,100	69		200,100	49
29		100,25	85		300,25	83		300,25	84
30		100,50	85		300,50	74		300,50	67
31		100,75	70		300,75	29		300,75	52
32		100,100	65		300,100	24		300,100	11
33		200,25	70	-	-	95	-	0,0	
34		200,50	45						
35		200,75	15						
36		200,100	4						
37		300,25	20						
38		300,50	10						
39		300,75	0						
40		300,100	0						
41	-	0,0	95						

### 3.4 전복유래의 유전자 cloning 및 특성분석

#### 3.4.1 SOD

(제주대학교 해양생물공학과 박사과정 Prashani Mudika Ekanayake)

Cu/Zn superoxide dismutase catalyzes the dismutaion of superoxide to hydrogen peroxide and molecular oxygen and thereby neutralizes oxygen radical-mediated toxicity (Ken *et al.*, 2003). The reported medical applications of SOD include anti-inflammation, prevention of oncogenesis and tumor growth, and protection against reperfusion damage of ischemic tissue (Garcia-Gonzalez and Ochoa, 1999; Kondo *et al.*, 1999).

```

CGACAGCCACGAAGGTCATGGTAGCCATGAAGGTCATGGTCATCATGGT      49
AGCCACGAAGGTCATGGTCATCGTGACCATCACAGGAGATGTCGGGAAGAAAACGAGATGCCTATATATATGGGCGATGTAAC      133
ATGGCTATGGACAATGAACCTTCTAAATCCGGGCCACGCAACAATATTACTGGCGCAATCTACTTAAGACAAAAGGTTTCGCGGG
217
M--A--M--D--N--E--P--S--K--S--G--P--R--N--N--I--T--G--A--I--Y--L--R--Q--K--V--R--G--
CCACTGGAGATACTGCTTGAACCTGCGGGGATTCTACGTACCAAGCGGCCATTCTGACCATTCTGTTTCATATGCATGGATTCCAC
301
P--L--E--I--L--L--E--L--R--G--F--Y--V--P--S--G--H--S--D--H--S--V--H--M--H--G--F--H--
GTGCATGAATTTGGCGACTTTAGCGCCGGCTGTACGTCATCCGGCGGCCACTACAACCCCGACGGTGGCGATCACGGGGGTCAC
385
V--H--E--F--G--D--F--S--A--G--C--T--S--S--G--G--H--Y--N--P--D--G--G--D--H--G--G--H--
GATTCAGAAAAAAGACATGCCGGTGATTGGGGCAACATTTCTTGTGATGACGCAGGGGAGGTACACATGAACATGACGGATGAG
469
D--S--E--K--R--H--A--G--D--W--G--N--I--S--C--D--D--A--G--E--V--H--M--N--M--T--D--E--
TACTGCGACCTCTACGGACCCCACTCCATCATCGGCAGAGGCCTTGTGATCCATGAGACCGCAGACCACCTGGGACGAGCACCC
553
Y--C--D--L--Y--G--P--H--S--I--I--G--R--G--L--V--I--H--E--T--A--D--H--L--G--R--A--P--
ATGGGCACCAAAAAGATGAGCGGACACACTGGATATGGAAACGCATGCTGTACAATCGCGAGGACTGGCACGCTGGACTGGGAA
637

```

M--G--T--K--K--M--S--G--H--T--G--Y--G--N--A--C--C--T--I--A--R--T--G--T--L--D--W--E--  
**ATGCTGCTTAAACATAAGCACTAGGGGAAGAAGACCAAGGTTACAGCTTTGACAGGCCTTGACCTGGAATAACATCCCTGAGGA** 721  
M--L--L--K--H--K--H--\*  
CATATTTGCAGCGTTAATCGTCGCGTGTGATGCTAATGGTAGATGTGCCAGACGGTCATTTTCGTTTATTAACCTGTAATCCT 805  
AATCCTGTTCTATACCATCTATTGAATAAACAGGTCGCTTTCCAAACATTTTCAAACCTTGCAAACAAGCCTTTTCAAACACTAA 889  
AATACCATATTTCAAACCTTGAATGACGATATTACCAAGTATTTGATTTGGTTGGGAAGGTTATTGAATTGTCTGAGGGTT 973  
GTGGAAAGGCTTGAAGAGGCGAGCTATTTCTTGGACACATAGCGTAATGGTTTTTCAGACCTGTATGCTATTTCTGGACAGTTTT 1057  
TCCACGTTCCCTCTAAGCTTGGAAATGTTGCTTTTTCTCCAGGGGCTTGTGAATGTATACCTGTTACCTTATATACTAGT 1141  
AAGTAGCATGACCAACTGCGATGACCTCTGTCAAATCCCGCTTCCCGAGGCAAGGGAGTTAACTGACAATAACAGTCCAGTT 1225  
GCAACGTGGAACCTGTTTCAGTTAACGCCCTTGCCTCGGGAAGATGTCAAATTCCTTGGCTGGTGTACATTACATTCATTACCA 1309  
GAAGTACTAGTGAATAGTTACAATGAACCCGCAAGTGTAGATCAGTGAAGAGCTCCATACTTGTTCAGTGCATTT 1393  
CGCGAAGGTTACGGCTAGGTCAGAGACATTCTTTTCGCTTCTGTATAGTGTGCGCTTGTATGAAATCTATGA**aataaa**TTG 1477  
TTTTGAAGAG**AAAAAAA**

Fig. 4. Nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of abalone Cu/Zn SOD. The coding sequence (from 133 to 528) is in bold letters. Amino acid sequence corresponding to mature protein consists of 176 amino acids. The poly (A) tail is in bold capital case and the polyadenylation signal is indicated by bold simple letters. The neucleotide from 1 to 133 and 661 to 1494 indicate 5' UTR and 3' UTR respectively.

Using forward primer (5'-GGTACCATGGCtATGGACAATGAAC-3') and reverse primer (5'-CTCGAGGTGCTTATGTTTAAGCAGC-3'), 528 base pair region of abalone c-DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR). The subsequent product was cloned into pET-29b. The recombinant DNA was then transformed into *E.coli* expression host BL21(DE3).The transformed *E. coli* cells were induced with 1 mM iso-propyl-β-thio-galactopyranoside (IPTG) at 18°C 3 hrs. The expressed enzyme was purified by His-Bind kit (Novagen) under denaturing condition as the enzyme was found to be insoluble. The refolded protein was analysed on 12% SDS-PAGE. The result from SDS-PAGE showed that abalone SOD (aSOD) has an apparent molecular mass of 20 kDa. In comparison to non-induced cells, aSOD was expressed at a tremendously high level within 3 hrs after induction with IPTG. In spite of the huge sum of the expressed SOD, the enzymatic activity was much lower than the expected. This result was in agreement with other reconstituted SODs produced by *E.coli* (Hartman *et al.*, 1986; Hong *et al.*, 1992).

The successful over-expression of aSOD can play a crucial role in protecting organisms against the toxic effects caused by reactive oxygen species (ROS). Further investigation will be carried out to see the response of SOD transgenic zebra fish towards ROS.

### 3.4.2 CATALASE (제주대학교 해양생물공학과 박사과정 Prashani Mudika Ekanayake)

Catalase is a ubiquitous enzyme found to be in both eukaryotes and prokaryotes involved in the protection of cells from the toxic effects of peroxides. It catalyzes the decomposition of hydrogen peroxide to oxygen and water. The level of catalase expression is highly tissue specified (Chen *et al.*, 2004). Presence of catalase is important in the prevention of toxic wastes that would kill the cell. Most catalases exist as tetramers of approximately 65kDa subunits (Bravo *et al.*, 1999).

CACTCTCTACCCATGCAAGTAGCTTGGTCTGCGTAACATCGACAAGCCCTCAACGAACT 60  
GATCCTGGTTTATGCAACCGGTAATTTGACCTGAATAAGCTATACGTCAGAGGAAAGTTCTGCGCTTCTTCACTTCTTAATC 144  
**ATGGCGACCAGGGATAAGGCGTCCGAGCAGCTAAATGAATTCAGCAAAGGACAGAAGAACCAGGATGTCTCTACAACAGGCACA**  
228  
M--A--T--R--D--K--A--S--E--Q--L--N--E--F--S--K--G--Q--K--K--P--D--V--L--T--T--G--T--



321 GGTGCACCTGTGGGCCGTAAGACAGCCACAATGACTGTGGGACCACAGGGCCTGTGTTGTTGCAGGACTTCGTGTTACGGAC  
 G--A--P--V--G--R--K--T--A--T--M--T--V--G--P--Q--G--P--V--L--L--Q--D--F--V--F--T--D--  
 396 GAGATGGCGCATTTCACACAGAGAGAGGATCCCTGAGAGAGTCGTGCATGCTAAAGGAGCAGGGGCGTTCCGGCTACTTGAAATA  
 E--M--A--H--F--N--R--E--R--I--P--E--R--V--V--H--A--K--G--A--G--A--F--G--Y--L--E--I--  
 480 ACACACGACATACCAAGTATTGTAAGCAAAGGTATTTGAACGTGTTGGCAAGAAGACGCCACTTGCTATCAGGTTTTCAACT  
 T--H--D--I--T--K--Y--C--K--A--K--V--F--E--R--V--G--K--K--T--P--L--A--I--R--F--S--T--  
 564 GTAGGTGGTGAAGGGGTGCGCGGACACCGCCAGGGACCCCGGGGGTTCCGCATAAGTTCTACACTGAAGACGGCAACTGG  
 V--G--G--E--K--G--S--A--D--T--A--R--D--P--P--G--V--R--H--K--F--Y--T--E--D--G--N--W--  
 648 GACCTGGTGGCAATAACACTCCC<sub>a</sub>TCTTCTTCATAAGGGACCCATGCTGTTCCCGAGCTTCATCCACACCCAGAAGAGAAAC  
 D--L--V--G--N--N--T--P--I--F--F--I--R--D--P--M--L--F--P--S--F--I--H--T--Q--K--R--N--  
 732 CCCGTTACCAACCTGAAGGACCCGATATGTTCTGGGACTTCATCAGCTGCGTCTGAGACCACCCACAGGTGGCCTTCCTC  
 P--V--T--N--L--K--D--P--D--M--F--W--D--F--I--T--L--R--P--E--T--T--H--Q--V--A--F--L--  
 816 TTCTCGAACCGCGGGACCCAGATGGTTATCGTCACATGAACGGCTATGGCAGCCACACTTCAAGATGGTCAACGCCAAGGGG  
 F--S--N--R--G--T--P--D--G--Y--R--H--M--N--G--Y--G--S--H--T--F--K--M--V--N--A--K--G--  
 900 GAGTGTGTACTGCAAGTTTCACTTCAAGACAACCAAGGCATCAAGAAGTTGACAGGAGCCAGGCTGACAAGCTGGCCAGC  
 E--C--V--Y--C--K--F--H--F--K--T--N--Q--G--I--K--N--L--T--G--A--Q--A--D--K--L--A--S--  
 984 GTGGACCCCGACTACGCCACACGTGATCTGTACAACGCCATCGCCGAGGGCAAGTACCCATCCTGGTCTGTCTTCATACAAGTG  
 V--D--P--D--Y--A--T--R--D--L--Y--N--A--I--A--E--G--K--Y--P--S--W--S--V--F--I--Q--V--  
 1068 ATGAACGTCAAGGATGCTGAGAAGCTCAAGTGAACCCCTTTCGACCTCACCAAGGTGTGGCCCCATGGAGAATACCCCTCATC  
 M--N--V--K--D--A--E--K--L--K--W--N--P--F--D--L--T--K--V--W--P--H--G--E--Y--P--L--I--  
 1152 CCTGTTGGTGCATGGTACTTGACAAGAACCCCAAGAAGTACTTTGCTGACGTGGAACAGATCGCCTTCTCCCGGCGCATATG  
 P--V--G--R--M--V--L--D--K--N--P--K--N--Y--F--A--D--V--E--Q--I--A--F--S--P--A--H--M--  
 1236 GTGACAGGTATTGAGGCCAGCCCCGACAAGATGCTGCAGGGTGCCTCTATTCTGACTCGGACACCCACCGGCATCGTCTCGGC  
 V--T--G--I--E--A--S--P--D--K--M--L--Q--G--R--L--Y--S--Y--S--D--T--H--R--H--R--L--G--  
 1320 AGCAACTACCTGCAACTTCCCGTCAACTGCCCTACAACACCCGCTCAGCAACTACCAGAGAGACGGCCCTCAGTGTGTGGAC  
 S--N--Y--L--Q--L--P--V--N--C--P--Y--N--T--R--L--S--N--Y--Q--R--D--G--P--Q--C--V--D--  
 1404 AACACCAAGGTGGCGCTCCTAATTATTTCCCAACAGTTTCTCCGGCCCCAAGAGGAATCCAAGTGCATGGAGTGCCTTTTC  
 N--N--Q--G--G--A--P--N--Y--F--P--N--S--F--S--G--P--Q--E--E--S--K--C--M--E--C--P--F--  
 1488 AAGCTCTCTGGAGACGTGCCAGATACAGCACAGAGGATGAAGACAACCTCAGCCAAACCGGCATCTTCTGGAAGAAGGTCTCG  
 K--L--S--G--D--V--A--R--Y--S--T--E--D--E--D--N--F--S--Q--T--G--I--F--W--K--K--V--L--  
 1572 CCGCCGGGTGAACGGGACCATCTGATCAACAACCTGGCAGGACATATCATCAACGCCAGGAGTTTCATCCAGAAGCGTGTGTC  
 P--P--G--E--R--D--H--L--I--N--N--L--A--G--H--I--I--N--A--Q--E--F--I--Q--K--R--A--V--  
 GCCAACTTTGGCAAGGGGACCCCGAGTTCGGCCGTCGCCTGCAGGCTGCTCTCAACGCCCTTGAAGTGGAGCCATAGATTCCG 1656  
 A--N--F--G--K--A--D--P--E--F--G--R--R--L--Q--A--A--L--N--A--L--K--V--E--P--\*  
 TTGCAGGCAAAATCCGGAAGTACAGCCTTGTGTACAGAACAGTCTCCAGCGTGTATATTGAACTATGCTGACAGATGAATAACT 1740  
 GATTGTACACAGTACACATCGTTGTATTCTGCTTTGCTTTGTATATCGTGTAGTCCACAAAATAGCAAGATGGAGAGATT 1824  
 AATAAGCATAACAGTGAACCATATGTTTAAAAAGCACTCAAGGAGGCTAAAACGATGAGGGCATAATTTTGAACAGTTACATT 1908  
 TCTGTTACGAATGTTTATTAATAATGAAAGGCTTTGTTTCTTTGGGAAGCGCTCCAAGAATGAGTATGTGCAATTATTGA 1992  
 TCATAAATCTCGTGAAATTATACTGGAAGGGGAATTTAGCTTAATTTTGTCTATTGTAATAGTATGAGAATTTTCTAGTTTAC 2076  
 GTTATTTGTATGTGACTTCAACTAAGGTCAGAAATGCAATTAAGCTTAATAAGCGTTTACATTAAGATAATGTAGCTCTTGT 2160  
 AAACCTCTGGACATTTGGTTGAATTACATTTAATATATGGCAACTATTAGTGAAGCGAAGTGCCTGCATCATATCCACTAG 2244  
 CCCGCGATTATTCTAAAGTTGATTTTACACTCAATGTAAGTATGTTTGGACATAATGTTGATGTTTTCGCTCACACTTCTG 2328  
 TTATACCTTAGGTGAACCGAGAAGACAGAATTAAGCCATCAGCTAAAACACTACATACAAGATCAAGGCACAATTGATTTTTT 2412

```

TTTTTAAATTCTGCCTTGTGTTTGTGAAAATATAACATTTATTTCTTGAAAATTTTCATGCAACATGAAAACCTGAAAAAAATCG 2496
AAAATGCAGTGTGGCATAACGAAGAATGAAAATGTTGGTCAACAGAGTACTATTGTTATATGTTGCCCGTTATTTGCTGCGCT 2580
CTTAATAATCAATACATGGTTGGATAGATATTGATTGAGAAGTAGATGCATGAGCAAGTTCACGTATACAGTGATGCGGAAATT 2664
CCGCATAGAAGCATGTATTCTTCAGCTTATCGCATATTTTCATATGGAAATGGGAATTTACACATTCAATGTACTTAACTGGAT 2748
TCTATAATAATATGTATATTCAATTATTCAAGAGAGGTGATGATAAGACTACAGCTGTAGTGCTACACTTCGGTCCATATTAAG 2832
ATGCaataaaATATTTTGAACAAAAAAAAA

```

Fig.5. Nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of abalone catalase. The coding sequence (from 144 to 1506) is in bold letters. Amino acid sequence corresponding to mature protein consists of 501 amino acids. The poly (A) tail is in bold simple case and the polyadenylation signal is indicated by bold capital letters. The nucleotide from 1 to 144 and 1650 to 2864 indicate 5' UTR and 3' UTR respectively.

By the PCR using forward primer (5'-GGTACCATGGCGACCAGGGATAAG-3') and reverse primer (5'-CTCGAGTGGCTCCACTTTCAAGG-3'), 1500 base pair region of abalone cDNA corresponding to catalase was amplified. The subsequent product was cloned into pET-29b carrying T7 promoter. The recombinant DNA was then transformed into *E.coli* BL21(DE3). The transformed *E.coli* cells were induced with 1 mM iso-propyl- $\beta$ -thio-galactopyranoside (IPTG) at 18°C for 3 hrs. The bacterial cells were collected to purify the enzyme by His-Bind kit (Novagen). Enzyme was first checked for its solubility and then purified under native conditions as it was found to be soluble. The enzyme, catalase, was observed on 12% SDS-PAGE as a dominant band at a position corresponding to approximately 60 kDa. In comparison to non-induced cells, catalase was expressed at a higher level within 3 hrs after induction with IPTG.

The successful over-expression of abalone catalase in *E.coli* can be used in pharmaceutical industry to prevent the toxic effects caused by reactive oxygen species (ROS) as well as in textile industry.

### 3.4.3 Glutathione-S-transferase (제주대학교 해양생물공학과 석사과정 Helani Munasinghe)

Glutathione-S-transferases (GST) are a family of multifunctional enzymes involved in detoxification of xenobiotic agents, drug biotransformation and protection of cells against peroxidative damage. These enzymes catalyze the covalent addition of the tripeptide glutathione to a structurally diverse set of electrophiles increasing their solubility and cellular excretion (Tomarev *et al.*, 1993). Eventhough they are involved in detoxification of environmental mutagens such as polycyclic aromatic hydrocarbons in diet and tobacco smoke, their ability to conjugate isothiocyanates, which are potent inducers of enzymes that detoxify mutagens postulates that it may be involved in susceptibility to cancer (<http://www.cdc.gov/genomics/hugenet/reviews/glutathione.htm>). Further knowledge on these enzymes would provide a means of improving resistance of plants and animals to environmental pollutants and less accumulation of environmental toxins in food products and will also help in prevention of oxidative damage. Cloning and expression of a gene from abalone EST library in *E. coli* BL21(DE3) cells under pET16b with highest similarity to  $\mu$  class glutathione S-transferase from *Crassostrea gigas* resulted in a coding region of 645 bp coding for a 25kD protein with a signal peptide cleavage site at 13-14 amino acids. It contains two Cys and a 1231 bp 3' untranslated region followed by the poly(A) tail. This work is supposed to be useful in elucidating its biological significance in cellular detoxification.

ATGCCTACTCTTGATACTGGGCTATTCGGGGCTTGGCACAGCCTATTCGTCTGCTTCTGAAATATGCTGGAGAAGATTTGACGATGTT  
 142  
M--P--T--L--G--Y--W--A--I--R--G--L--A--Q--P--I--R--L--L--L--K--Y--A--G--E--D--F--D--D--V--  
 ATGTACGAGCAGGGCGATGCCCTGAGTACAGCCGGGAAAGCTGGACCAAAGTGAAGTTCACCCTTGGGCTGCCATCCCCAATCTGCC  
 232  
 M--Y--E--Q--G--D--A--P--E--Y--S--R--E--S--W--T--K--V--K--F--T--L--G--L--P--I--P--N--L--P--  
 TACTATGTGGATGGTAACATTAAGATCACTCAGAGTAATGCGATTCTACGCTACATCGCCAGGAAGCACCAACTCTTGGGGGAAAAAGAG  
 322  
 Y--Y--V--D--G--N--I--K--I--T--Q--S--N--A--I--L--R--Y--I--A--R--K--H--Q--L--L--G--E--K--E--  
 GAGGAGAGGGTCAAGGTTGATGTGATGCTTGACACAGCCATGGACTTCAGAAATGGAATTGTCGGGCTCTGTTACAACCTGAGTTTGAG  
 412  
 E--E--R--V--K--V--D--V--M--L--D--T--A--M--D--F--R--N--G--I--V--G--L--C--Y--N--P--E--F--E--  
 AAGAAGAAGGCTGCCTACTTCGAGGCACTCCCTGCCAAGCTGGAGATGTTCAAGTCTTTCCTTGGGGACCAACAGTTCCTCGCCGGCAGC  
 502  
 K--K--K--A--A--Y--F--E--A--L--P--A--K--L--E--M--F--K--S--F--L--G--D--Q--Q--F--F--A--G--S--  
 AAGGTGACAGTGTGTGACTTTCCAATCTATGAACTCCTGGACCAGACGAGAATAATGCAGCCTGGCAGCCTAgATGCGTTCCCCACGCTG  
 592  
 K--V--T--V--C--D--F--P--I--Y--E--L--L--D--Q--T--R--I--M--Q--P--G--S--L--D--A--F--P--T--L--  
 TTAGCCTTCATGGGTGCGATTGAGGCTCTGCCGCCATCAAGACCTTCATGAGCAGTGCCAAGTTCATCAGGAGACCCATCAACAACAAG  
 682  
 L--A--F--M--G--R--I--E--A--L--P--A--I--K--T--F--M--S--S--A--K--F--I--R--R--P--I--N--N--K--  
 AGTGCCTGTTCAAGTGAACACCACTGTTGTTAATGTAGTTATATGTTGAAACCCGGTGAATCATCTGGGCGCTGTTATCTGGGAGTCAT 772  
 S--A--L--F--K--\*  
 TCCTATCTGTCCATCCCAAGGTTTGAACCTTATTAGAGTAGGCTATCAATACAGTTAATAACAGGACATAGTCATTACGTTTGTGGCAG 862  
 TTATGTAAGGATATTATCTCTGAACTTGTGTTAATATTTGAAAGATTCTTTTCGGCTTTGGAAAAGGCAGGACATATTGTTTGGGTTAGTT 952  
 TATTACACGTTATCTGAAGGATATTGCCATCAGGCTGGAAACCTGGCCAACTTCAAACCAGGCAGTATTGCTAGTCAGCATTATGTGGC 1042  
 AGCACACTCATGTAATATATTTGCATCAAGCTTTTTTCCCGGTGTTACCATTATTATTGATGTATCAATGTGAGTTTGATATGTGT 1132  
 CGGGGGTATTTTGTGGAACATTAGTAGAAGTATTCATTTAGGAAATATGGTGCTGTGGCAACAAAAAACCAAAAACTGATTTCTGTTCT 1222  
 TGGCCATGTGATACTGTGGAGGTACAACATGGCAGCCACTGGCAAGCATCAGCAAGCATCTGATCACATCCATGGATTCTGCTTAGAC 1312  
 GTGCTGCAGGCCATTATTTAGTGTTCATTTGTTATCCGAGGTTTCGTTAAGTATTGTTTACTGAATTGTTTTACTCATTGTGCGAGGAAT 1402  
 GAAAATCAGGTGCACGCTGATCCAGTACTGGGTATAATAAGATCTGTCATGGTCTTAGCGCATTGAGCAGTTGTTGGAAAGTGCCAT 1492  
 ATACAACTTCATTAATGTTATTGTTCATATGCATCTCCACAACTAATGTTTGTAAAAGTGAATAGTTTTCTTTACACAGTTTTTCCGA 1582  
 TTCAGCCAAGGTTTCTTCTTTGTTTTGTTTTGGCAATGGTGAATTTGATTGCTTTTAATTTAAACATCAAGAAGTATATAGAGGGAA 1672  
 ACATTTTTATTAATTTGGAGGTACTTTTGTATGTATTGATTTGCATCCCTCAGCTGTGCCAAACAGACCCGGGCCATGGTTAGAA 1762  
 TCCAGGATTTCAACCCATTTGACCATGGGATAAAGTAAATAGCTGTTTACAGTTTGTTCCTAATCAAGCGAGGCATACATATCCTG 1852  
 TTTTGTGTTGCTTGTGTTGATGGTGCAGACTTATTGCTTTAACATTAAGATAa**at**aaaggAAAATTTTTCTTTCAAAAAAAAAA 1942  
 AAAAAAAAAA

Fig. 6. Nucleotide and deduced amino acid sequence of glutathione-S-transferase. The putative signal peptide is underlined. The poly(A) signal sequence is shown in bold simple case letters. The stop codon is indicated with an asterisk.

### 3.4.3 Arylsulfatase (제주대학교 해양생물공학과 석사과정 Helani Munasinghe)

Sulfatases are a group of enzymes involved in hydrolysis of sulfate ester bonds from a wide variety of substances. The importance of these enzymes is underlined by the presence of several genetic disorders due to single or multiple sulfatase deficiencies. Recent discovery of new sulfated compounds with commercial importance has resulted in a demand for sulfatases, which could be used either as a means of understanding the functional implications of their sulfate groups or to remove sulfate groups for better product quality. For example, it has been identified that sulfated homopolysaccharides are more potent than sulfated heteropolysaccharides as antiviral agents and the presence of sulfate group is necessary for anti-HIV activity of these compounds and the potency

increases with the degree of sulfation (Schaeffer *et al.*, 2000). On the other hand, sulfate groups in agar adversely effect the strength and melting temperature of commercial agarose (Mollet *et al.*, 1998). Considering these commercial values we amplified the full-length cDNA of a sulfatase with highest sequence similarity to *Helix pomatia* sulfatase 1 from the abalone EST library. Expression of this in *E. coli* BL21 DE3 cells under pET16b vector resulted in an expression band corresponding to a 54 kDa protein in an SDS-PAGE. The protein was mainly found in inclusion bodies which could be purified under denaturing conditions using urea. Sequence analysis revealed the presence of seven Cys residues in a coding sequence of 1446 bp coding for a peptide with 481 amino acids with a putative peptide cleavage site at 21-22 amino acids. Surprisingly, the sequence obtained revealed a very short 3' untranslated region comprising only 41 bp followed by the poly(A) tail.

```

AGAAATAGGAAACCAACGTGTAATTCCTGTCCACGGAAGGAGAG      44
ATGTTTGTCCAGTTATTATGCACAGTTTTGGTCATCATCAACCTCTGTGATGACGTTTCTGCAGCAGGACGTCCACGCCATATTGTGTTTC      134
M--F--V--Q--L--L--C--T--V--L--V--I--I--N--L--C--D--D--V--S--A--A--G--R--P--R--H--I--V--F--
ATCGTGGCCGGATGATCTCGGATGGAACGACATTGGCTTTCACAACCCCGATATAATCACACCAACATCGACAAGCTGGCAAGAGAAGGC      224
I--V--A--D--D--L--G--W--N--D--I--G--F--H--N--P--D--I--I--T--P--N--I--D--K--L--A--R--E--G--
TTGCTTCTGAATCATCACTATGTTCAACCACTCTGCAGTCCATCGAGAGCTGCCTTTATGTCCGGCTACTACCCCTTCAAGACAGGTCTG      314
L--L--L--N--H--H--Y--V--Q--P--L--C--S--P--S--R--A--A--F--M--S--G--Y--Y--P--F--K--T--G--L--
CAGCACTCGGTCATTCTGGAGAACCAGCCCGTCTGTCTACCCCTGAATATCACAATCCTGCCACAGAAACTGAAGGAGCTTGGATATGCA      423
Q--H--S--V--I--L--E--N--Q--P--V--C--L--P--L--N--I--T--I--L--P--Q--K--L--K--E--L--G--Y--A--
ACACACATTGTCGGCAAGTGGCACAATGGGTTCTGTAGTTGGAATTGCACCCCGACGTACCGTGGCTTTGACAGCTTCTTTGGCTACTAC      513
T--H--I--V--G--K--W--H--N--G--F--C--S--W--N--C--T--P--T--Y--R--G--F--D--S--F--F--G--Y--Y--
GGCGCATGGAAGACTACTACCCACGTCATTCTGTGGCTTCCTTGACTACCGTAACAACACCACCCCGTTTGGACCGACAACGGCACT      603
G--A--M--E--D--Y--Y--T--H--V--I--R--G--F--L--D--Y--R--N--N--T--T--P--V--W--T--D--N--G--T--
TACTCAACGCTTCGGTTTACTGACGTAGCCACTGACATCATCGAGCGTCACAACCAGAGTCAGCCATTGTTTCTGTACTGCGGTACCAA      693
Y--S--T--L--R--F--T--D--V--A--T--D--I--I--E--R--H--N--Q--S--Q--P--L--F--L--Y--L--A--Y--Q--
GCTGTCCACGGACCTATTGAGGTTCCCGCAAAGTATGAAGCAATGTATCCAACATTAATCAGAAAATCGTCGAAAGTTTTTCGGGAATG      783
A--V--H--G--P--I--E--V--P--A--K--Y--E--A--M--Y--P--N--I--K--S--E--N--R--R--K--F--S--G--M--
GTCTCTGCTCTTGATGAAGCAGTTGGTAACGTAACATAAAACGTTAAGACAAGAGGGTTAATGGACGACACGCTGATTCTGTTCACTGCC      873
V--S--A--L--D--E--A--V--G--N--V--T--K--T--L--R--Q--R--G--L--M--D--D--T--L--I--L--F--T--A--
GATAATGGCGCGGGGTCGACGAATCTGGGAACAACACTACCCTCTGCGTGGAAAGCAAGTTTACCGGTACGAAAGCGGAACGAGAGCTGTG      963
D--N--G--G--G--V--D--E--S--G--N--N--Y--P--L--R--G--S--K--F--T--V--Y--E--G--G--T--R--A--V--
GGCTTCATGTATGGATCGGGTCTCCAAAAGACTGGAAGTGTATTTGACGGGATGATCCACGCCGTGGACTGGCTGCCACCCTGACAGCA      1053
G--F--M--Y--G--S--G--L--Q--K--T--G--T--V--F--D--G--M--I--H--A--V--D--W--L--P--T--L--T--A--
GCTGCCGGGGGACCCAGTGTCCGACCGTACGCGCATCAATCTGTGGCCTAGTCTCAGCACAGCCTCCCGTCCCGCCGCACTGAGGTC      1143
A--A--G--G--T--P--V--S--D--R--D--G--I--N--L--W--P--S--L--S--T--A--S--P--S--P--R--T--E--V--
GTCTACAACACTGACTCGCACCCAGCCCGTTCAAGGACACGCTGCCATCAGAGTGGGTGACTACAAACTGATCGATGGCTACCCGGGA      1233
V--Y--N--Y--D--S--H--P--Q--P--V--Q--G--H--A--A--I--R--V--G--D--Y--K--L--I--D--G--Y--P--G--
CCCTTCCCTGATTGGTACAAGCCTGAACAAGTCACATCTAGTTTGAACACCAGATTCAGCAGGGATTTCGGCCAATCAGTATCAGCTGTTC      1323
P--F--P--D--W--Y--K--P--E--Q--V--T--S--S--L--N--T--R--F--S--R--D--S--A--N--Q--Y--Q--L--F--
AATTTGAAAGATGACCCCAATGAGCGCAACGACCTCTCCAACCTTCGTCCGGACATGGTAAAGAAGCTTGTCTGCCAGACTGGCTGGTAT      1413
N--L--K--D--D--P--N--E--R--N--D--L--S--N--F--R--P--D--M--V--K--K--L--A--A--R--L--A--W--Y--
AAGAAGCAGGCAGTACCACCAACTTCCCTGAGACCCCGACGACCTGAGCAACCTGCACTGTACGGCAATGTCTGGTCTCCTGGCTGG      1503
K--K--Q--A--V--P--P--N--F--P--E--T--P--D--D--L--S--N--P--A--L--Y--G--N--V--W--S--P--G--W--
TGTTGAGAGCTTCTGTGTACTGTCACTGaaataaagTCGATATGTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

C--\*

Fig. 7. Nucleotide and deduced amino acid sequence of arylsulfatase B. The putative signal peptide is underlined. The poly(A) signal sequence is shown in bold simple case letters. The stop codon is indicated with an asterisk.

#### 4. 결론

- 1년생 까막 전복 치패로부터 전 조직 (whole tissue) cDNA library를 제작하여, 총 1170개 clone의 염기서열을 분석하였다.
- BLAST program을 이용한 유전자 검색 결과, 757개의 염기서열 중 데이터베이스내 유전자 또는 단백질에 일치하는 424개의 염기서열과 어떤 상동성도 보이지 않는 333개의 새로운 유전자를 확인하였다.
- 424개의 유사성을 보이는 서열을 cellular putative function에 따라 14개의 목록으로 분류하였다. 그 결과, unknown function과 enzyme이 가장 큰 그룹으로 확인되었다.
- 까막전복 전 조직 cDNA library에서 가장 많이 발현되는 유전자는 calponin-like protein을 포함하여 세포 골격 단백질이 다량으로 발현됨을 알 수 있었다.
- 전복 whole tissue cDNA library를 이용한 EST 분석은 까막전복으로부터 유용 유전자 및 새로운 유전자 탐색에 유용한 방법임을 확인하였다.
- 까막전복과 시볼트전복으로부터 cloning한 beta-actin promoter의 downstream에 EGFP를 reporter로 사용한 vector를 cloning하였다. 이 vector를 zebrafish의 수정란에 microinjection하여 EGFP의 발현양상을 확인하였다. EGFP는 대부분 근육에서 많이 발현되었으며, 그 결과 본 연구진이 cloning한 전복의 beta-actin promoter를 유전자이식 vector의 promoter로 사용할 수 있다는 결론을 얻었다.
- 생존률이 90 - 10%되도록 voltage와 capacitance를 조절해 가면서 electroporation을 3회 (10월6일, 16일 20일)에 걸쳐 수행하였으나 EGFP의 발현을 확인할 수 없었다. 전복의 수정란에 zebrafish에 이용되는 microinjector를 사용하여 microinjection 한 후 EGFP의 발현양상을 확인하고자 하였으나 발현은 관찰되지 않았다. 본 연구진은 살아있는 전복으로부터 유전자 삽입여부를 확인하고자 EGFP를 사용하였으나 EGFP가 oyster에서 극히 제한적으로 발현된다는 보고가 있어 이 연구에서 유전자의 삽입여부를 EGFP의 발현으로는 확인할 수 없었다. 따라서, electroporation에 의한 유전자 삽입을 EGFP가 아닌 다른 reporter 유전자 (beta-galactosidase)를 이용하여 다시 한번 시도할 필요가 있다고 판단된다 (앞에서 밝혔듯이 전복의 수정란은 특정 기간에만 얻을 수 있기 때문에 작년에는 다른 reporter 유전자를 가진 vector의 제조가 시간적으로 어려웠음). 2004년 10월에 다른 reporter 유전자를 사용하여 electroporation을 수행할 예정이다.
- 전복으로부터 얻은 유전자 중 항산화에 관여하는 유전자 (GST, SOD, Catalase)와 arylsulfatase의 full length cDNA를 cloning하여 염기서열을 확인하였다. 이들 효소들을 얻기 위해 pET expression vector에 cloning하였으며 예상되는 크기의 단백질이 발현되는 것을 확인하였다. 이 단백질들을 순수 분리하여 각 단백질의 특성을 분석하고 있다.

#### 5. 인용문헌

- Bautista-Teruel, M. N., and Millamena, O. M. (1999). Diet development and evaluation for juvenile abalone, *Haliotis asinina*: protein/energy levels. *Aquaculture* 178, 117-126.
- Bravo, J., Mate, J.M., Schneider, T., Switala, J., Wilson, K., Loewen, P.C and Fita, I. (1999). Structure of catalase HPII from *Escherichia coli* at 1.9 Å resolution. *Proteins* 34, 155-166.
- Buchanan, J. T., Nickens, A. D., Cooper, R. K., and Tiersch. (2001). Transfection of Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) Embryos. *Mar. Biotechnol.* 3, 322-335.

- Cao, D., Kocabas, A., Ju, Z., Karsi, A., Li, P., Patterson, A., and Liu, Z. (2001). Transcriptome of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): initial analysis of genes and expression profiles of the head kidney. *Anim. Genet.* *32*, 169–188.
- Chen, X., Liang, H., Remmen, H.V., Vijg, J., and Richardson, A. (2004). Catalase transgenic mice: characterization and sensitivity to oxidative stress. *Arch. Biochem. and Biophys.* *422*, 197–210.
- Fleming, A. E., Van Barneveld, R. J., and Hone, P. W. (1996). The development of artificial diets for abalone: A review and future directions. *Aquaculture* *140*, 5–53.
- Garcia Gonzalez, A., and Ochoa, J. L. (1990). Anti-inflammatory activity of *Debrayomyces hansenii*. Cu, Zn-SOD. *Arch. Med. Res.* *30*, 69–73.
- Gomez-Chiarri, M., Kirby, V. L., and Powers, D. A. (1999). Isolation and characterization of an actin promoter from the red abalone (*Haliotis rufescens*). *Mar. Biotechnol.* *1*, 269–278.
- Hartman, J. R., Geller, T., Yavin, Z., Bartfield, D., Kanner, D., Aviv, H., and Gorecki, M. (1986). High-level expression of enzymatically active human Cu/Zn superoxide dismutase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *83*, 7142–7146.
- Hong, Z., LoVerde, P. T., Hammarskjold, M. L., and Rekosh, D. (1992). *Schistosoma mansoni*: cloning of a complementary DNA encoding a cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase and high yield expression of the enzymatically active gene product in *Escherichia coli*. *Exp. Parasitol.* *75*, 308–322.
- Huang, B. X., Peakall, R., and Hanna, P. J. (2000). Analysis of genetic structure of blacklip abalone (*Haliotis rubra*) population using RAPD, minisatellite and microsatellite markers. *Mar. Biol.* *136*, 207–16.
- Huang, B., and Hanna, P. J. (1998). Identification of three polymorphic microsatellites in blacklip abalone, *Haliotis rubra* (Leach) and detection in other abalone species. *J. Shellfish Res.* *17*, 795–99.
- Huang, B., Chai, Z., Hanna, P. J., and Gough, K. H. (1997). Molecular sequences of two minisatellite in blacklip abalone, *Haliotis rubra*. *Electrophoresis* *18*, 1653–1659.
- Jones, M. K., Yang, W., and McManus, D. P. (2001). Immunolocalization of the 38.3 kDa calponin-like protein in stratified muscles of the tail of *Schistosoma japonicum* cercariae. *Parasitol. Int.* *50*, 129–133.
- Ken, C. F., Lin, C. T., Shaw, J. F., and Wu, J. L. (2003). Characterization of fish Cu/Zn superoxide dismutase and its protection from oxidative stress. *Marine Bio-technology.* *5*, 167–173.
- Kondo, T., Terajima, H., Todoroki, T., Hirano, T., Ito, Y., Usia, T., and Messmer, K. (1999). Prevention of hepatic ischemia-reperfusion injury by SOD-Divema conjugate. *J. Surg. Res.* *85*, 26–36.
- Kresge, N., Vacquier, V. D., and Stout, C. D. (2001). Abalone lysin : the dissolving and evolving sperm protein, *Bioessays.* *23*, 95–103.
- Miyaki, K., Matsuda, M., and Tabeta, O. (1999). Karyotype of the giant abalone, *Nordotis madaka*, *Fisheries Science* *65*, 317–8.
- Miyaki, K., Tabeta, O., and Kayano, H. (1997). Karyotypes of the two species of abalone *Nordotis discus* and *N. gigantea*, *Fisheries Science* *63*, 179–180.
- Mollet, J., Rahaoui, A., and Y. Lemoine. (1998). Yield, Chemical Composition and G<sub>1</sub> Strength of Agarocolloids of *Gracilaria gracilis*, *Gracilariopsis longissima* and the newly reported *Gracilaria cf. vermiculophylla* from Roscoff (Brittany, France). *J. Applied Phycol.* *10*, 59–66.
- Schaeffer, D. J., and Krylov, V. S. (2000). Anti-HIV Activity of Extracts and Compounds from Algae and Cyanobacteria. *Ecotoxicol. Environ. safety.* *45*, 208–227.
- Tomarev, S. I., Zinovieva, R. D., Guos, K., and Piatigorsky, J. (1993). Squid Glutathione S transferase. Relationships with other glutathione S transferases and S-crystallins of cephalopods. *J. Biol. Chem.* *268*. 4534–4542.

- Verwoerd, T. C., Dekker, B. M., and Hoekema, A. (1989). A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* 17, 2362.
- 김광수, 김우진, 박승렬 (1996). 전복의 수온 내성에 관한 연구 참전복, *Haliotis discus hannai*의 동위 효소 분석 및 수온 감수성 실험. 1996년도 국립수산진흥원 사업보고서. 253-261.
- 김영섭, 박영조, 남명모, 홍정표, 전경암 (2000a). 수온밀도와 먹이에 따른 전복의 성장. 2000년도 춘계 수산관련학회 공동학술발표회. 227-228.
- 김재우, 이영돈, 김봉래, 한석중, 원승환 (2000b). 시볼트전복, *Haliotis sieboldii*의 수정율 향상을 위한 수정방법과 정자밀도 조절. 2000년도 춘계 수산관련학회 공동학술발표회, 292-293.
- 박찬선 (1997). 전복 중간육성 기술개발 시험. 1997년도 남해수산연구소사업보고서, 319-324.
- 이정안, 진평, 김경선 (2001). 참전복, *Haliotis discus hannai* Ino 종묘의 온도와 광주조건에 따른 대사율의 변화, 2001년 춘계 수산관련학회 공동학술대회 발표요지집. 325-326.
- 지영주, 안혜숙, 민광식, 이정호, 한석중 (1999). 전복의 유전육종연구. 1999년도 국립수산진흥원 사업보고서. 236-245.
- 지영주, 장영진 (1997). 참전복, *Haliotis discus hannai*의 3배체 유도와 생물학적 특성에 관한 연구II, 3배체 성장. *한국양식학회지*. 10, 123-131.
- 한상현, 오문유, 정영환, 오유성, 김신권, 고미희 (2000). Phylogenetic relationship among *Haliotis* spp. distributed in Korea by the RAPD analysis. *한국유전학회지*. 1, 43-49.