

碩 士 學 位 論 文

$\beta$ -actin promoter를 이용한  
growth hormone GFP fusion  
transgene 도입 시 나타나는  
zebrafish의 GFP 발현 양상과 성장



濟 州 大 學 校 大 學 院

水 産 生 命 醫 學 科

韓 松 憲

2008年 2月

$\beta$ -actin promoter를 이용한  
growth hormone GFP fusion  
transgene 도입 시 나타나는  
zebrafish의 GFP 발현 양상과 성장

指導教授 李 濟 熙

韓 松 憲

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2008年 2月

韓松憲의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 여 인 규 (印)

委 員 전 유 진 (印)

委 員 이 제 희 (印)

濟州大學校 大學院

2008年 2月

# Growth and expression pattern of GFP in transgenic zebrafish using its $\beta$ -actin promoter

Song-Hun Han

(Supervised by professor Jehee Lee)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement  
degree of Master of Science

Department of Aquatic Life Medicine

GRADUATE SCHOOL

CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2008

# 목 차

Abstract .....	i
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	4
1. 사육조건과 수정란 수집 .....	4
2. DNA 조작 .....	5
1) $\beta$ -actin promoter 분리 .....	5
2) Growth hormone cDNA 분리 .....	6
3) p $\beta$ GH-EGFP 발현 vector 제작 .....	7
3. Microinjection .....	10
4. 형광 현미경을 통한 GFP 발현 확인 및 체장 측정 .....	11
III. 결과 .....	12
1. p $\beta$ GH-EGFP 발현 vector 제작 .....	12
2. p $\beta$ GH-EGFP 발현 양상 .....	15
3. p $\beta$ GH-EGFP 발현 zebrafish의 생존률 및 체장 측정 .....	19
IV. 고찰 .....	22
V. 요약 .....	25
VI. 참고문헌 .....	26
감사의 글 .....	32

## Abstract

The objective of this study is to make the faster-growing transgenic zebrafish than the non-transgenic control. For this purpose, a transgenic vector has been constructed by using several genes such as  $\beta$ -actin promoter, first exon and intron regions of  $\beta$ -actin, growth hormone and GFP (green fluorescent protein). The recombinant vector was delivered to the one-cell stage of zebrafish eggs through the microinjection method. The expression of transgene in the zebrafish was monitored by observing GFP expression temporally and spatially.

As a result, GFP expression first appeared in the shape of sporadic spots on the embryo at the gastrula period of 50%-epiboly. Later, these spots were transformed to be the rod-shape of GFP expressions at the segmentation period. At the pharyngula and hatching period, GFP was sporadically expressed at the epidermis, muscle tissue, yolk sac, fin-ray, etc.

Among 1,000 eggs microinjected, 16.03% were hatched out. 53.21% of hatched embryos showed GFP expression and some of them showed a maximum of 1.5-fold larger body length than their non-transgenic siblings.

## I. 서론

Zebrafish (*Danio rerio*)는 분류학상 잉어목(Cypriniformes), 잉어과(Cyprinidae)에 속하며 인도와 파키스탄 등 남아시아의 일부 지역에 분포한다(Axelrod and Schultz, 1955; Bhimachar and Suba Rau, 1942). 이 어류는 소형 열대성 민물 어류로서 아름다운 색체를 띠어 세계적으로 인기가 있는 관상어 대상 어종이다. Zebrafish는 연중 산란하여 알을 쉽게 얻을 수 있고, 1회 최대 포란 수는 1,500-1,800개이며, 일반적으로 150-400개의 알을 낳는다(Hisaoka and Firlit, 1962). 이 어류의 수정란은 투명하여 발생과정을 관찰하기 쉽기 때문에 유전자 조작을 통한 특정 DNA 또는 mRNA 발현을 확인하는데 매우 유리하다(Gibbs and Schmale, 2000; Ju et al., 2004). 그리고 수정에서 부화까지의 소요되는 시간은 5일 정도로 다른 척추동물 보다 빠른 발생속도를 갖으며, 세대 기간도 2-3개월로 다른 척추동물 보다 짧은 장점을 갖고 있기 때문에 최근에는 척추동물의 발생과 배아 조작, 유전자 도입 등을 연구하는데 좋은 실험동물로도 각광받고 있다(Amsterdam et al., 1999; Driever et al., 1994).

Growth hormone은 뇌하수체 전엽에서 생산되는 약 22 kDA 정도의 single-chain polypeptide hormone으로서, 척추동물의 초기 발생과 성장에 관여하는 것으로 알려져 있다(Knobel and Hotchkiss, 1964). 또한 growth hormone은 삼투압조절과 번식에 관여 할 뿐만 아니라 탄수화물, 지방 그리고 단백질 대사에도 관여하며(Le Bail and Boeuf, 1997) 포유류와 어류에서 안정적인 단백질 동화 작용을 일으켜 생체 내 질소 유지를 조절하는 역할도 한다(Mauras and Haymond, 2005). 따라서 growth hormone이 과다 발현 되는 어류의 경우 성장 뿐만 아니라 형태, 생리, 대사, 면역 그리고 행동의 넓은 범위까지 영향을 줄 수 있기 때문에 이 호르몬에 대한 연구가 수행되어지고 있다(Devlin et al., 2006).

속성장 또는 거대성장 형질전환 어류를 생산하기 위해 바이러스에서 어류에 이르기까지 다양한 promoter (촉진자)가 사용되고 있으며(Bearzotti et al., 1992; Gaiano et al., 1996), 특히 유전적으로 근연종의 growth hormone과 promoter를 사용하였을 때 효과적인 성장을 보이는 것으로 보고되어졌다(Betancourt et al.,

1993; Alam et al., 1992). 현재까지 이루어진 연구에서는 다양한 promoter를 이용한 대서양 연어, coho 연어 그리고 artic charr을 포함한 연어과 어류를 대상으로 growth hormone을 과다 발현시켜 6배에서 14배의 높은 성장 촉진 효과 관찰할 수 있었다(Du et al., 1992 a, b; Devlin et al., 1994; Pitkanen et al., 1999). 또한 태평양 연어에서 대조구 보다 중량이 37배 증진된 것이 관찰되었고(Devin et al., 1994), 틸라피아(*Oreochromis niloticus*)에서는 3배 정도의 성장 촉진효과를 보였으며(Rahman et al., 1998), 미꾸라지(*Misgurnus mizole*)를 이용한 연구에서는 35배나 빠른 성장 속도를 보였다(Noh et al., 1999; Nam et al., 2001).

성장 호르몬의 과다 발현을 위해 다양한 promoter를 이용한 연구가 보고되고 있다. 앞에 언급한 연어과 어류에서는 모든 연어들이 보유하고 있는 metallothionein-B promoter를 사용하였고, 틸라피아의 경우 ocean pout의 antifreeze gene promoter를 사용하였으며, 미꾸라지의 경우에는 실험 동일어종의  $\beta$ -actin promoter를 사용하였다(Devin et al., 1994; Rahman et al., 1998; Nam et al., 2001). 최근에는 actin promoter 유전자를 이용한 성장 호르몬 과다 발현 연구가 수행되고 있다(Noh et al., 1999; Nam et al., 2001).

Actin은 진화 과정에서 가장 잘 보존되어 있는 단백질 중 하나로서 세포의 미세섬유의 기본적인 구성물로 중요한 역할을 한다(Pollard and Cooper, 1986). 이들 actin은 골격, 심장, 위와 대동맥을 구성하는  $\alpha$ -actin과 세포질 actin인  $\beta$ -,  $\gamma$ -actin으로 이루어져 있다(Vandeserckhove and Weber, 1979).  $\alpha$ -actin 네 개의 조직에 집중되어 특별한 역할을 하며,  $\beta$ ,  $\gamma$ -actin은 많은 조직에서 발견되어 세포내에서 다양한 기능을 하는 것으로 알려져 있다(Clarke and Spudich, 1997). 이들 actin promoter를 이용한 연구에서 zebrafish의  $\alpha$ ,  $\beta$ -actin promoter를 이용한 reporter 유전자인 EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) 재조합 발현 vector를 zebrafish에 microinjection하였을 때 GFP 발현이 다음 세대까지 유지되었다는 보고가 있다(Higashigima et al., 1997). 또한 잉어(common carp)의  $\beta$ -actin promoter의 TATA box, CAAT box와 CArG motif를 보유하는 1000 bp와  $\beta$ -actin 1st exon, 1st intron 지역 까지를 이용한 CAT (bacterial chloramphenicol acetyltransferase) 발현 vector는 1000 bp의

promoter만을 이용했을 때보다 5배 정도 CAT의 강한 발현을 한다고 보고되어 졌다(Liu et al., 1990). 이러한  $\beta$ -actin promoter는 속성장 어류를 생산하는데 있어 유용한 유전자로 볼 수 있다.

어류의 형질전환을 하는데 있어 외래유전자를 수정란에 도입하는 방법에는 microinjection (미세주입법), electroporation (전기 천공법), 바이러스를 이용한 방법, embryonic stem cell (배아줄기세포) 등이 있으나, 현재 가장 많이 시행되어지며 손쉽고 정확하게 수정란에 도입 유전자(transgene)를 주입 할 수 있는 것은 microinjection이다.

따라서 이 연구에서는 zebrafish의  $\beta$ -actin promoter를 Liu et al. (1990)의 방법을 인용한  $\beta$ -actin promoter의 TATA box, CAAT box와 CArG motif를 보유한 1000 bp와  $\beta$ -actin 1st exon1과 1st intron까지를 사용하는 promoter와 zebrafish의 growth hormone, pEGFP-1 vector의 reporter 유전자인 EGFP를 조합한 발현 vector를 제작하여, 이를 microinjector를 통해 수정란에 microinjection하였을 때 나타나는 GFP 발현 양상과 성장에 대하여 분석을 하였다.



## II. 재료 및 방법

### 1. 사육조건과 수정란 수집

성숙한 zebrafish (*Danio rerio*)를 20 L 수조에 암수를 따로 구분하여 수용하였으며, 사육수의 온도는 heater를 이용하여 28°C를 유지하였다. 광주기는 명기 14시간, 암기 10시간으로 autotimer를 이용하여 조절하였다. 사육 시 먹이는 하루 3회 dry pellet과 brine shrimp, 소간을 병행하여 주었다. 주 1회 깨끗한 물을 1/2만 교환 하였으며, aeration을 이용하여 산소를 충분히 공급하였다.

수정란을 받기 위해 암기가 시작되기 1시간 전에 암수를 2:1의 비율로 5 mm net와 heater, aeration을 설치한 10 L 비커로 옮겼으며, 다음날 명기가 시작될 때 소음을 최소화 하고 강한 빛 쬐어 수정 효과를 높였다. 친어는 5 mm net를 분리하여 다른 비커로 옮겨 다시 수정할 수 있도록 하였고, 비커에 남아있는 수정란은 0.3 mm net를 이용하여 난을 수집하였다. 분리된 수정란은 수생균의 증식을 억제하기 위해서 5 ppm 메틸렌 블루를 첨가한 egg water로 1회 세척 후 2 ppm 메틸렌 블루를 첨가한 egg water에 옮겼다. 난질이 좋지 않은 수정란은 제거하였다. 수정이 끝난 친어는 교배 시 상처로 인한 세균 감염을 막기 위해 옥시테트라사이클린계 약제 25 ppm으로 약욕하였다.

## 2. DNA 조작

실험에 사용한 zebrafish의  $\beta$ -actin promoter (accession no. AL929031.3)와 growth hormone (accession no. AJ937858) 서열은 NCBI (National Center for Biothechnology information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 통해 얻을 수 있었으며 이를 기초로 하여 PCR primer를 제작하였다.

### 1) $\beta$ -actin promoter 분리

$\beta$ -actin promoter는 zebrafish 한 마리의 근육을 채취하고, genomic DNA prep kit (Bioneer co., Korea)을 이용하여 genomic DNA를 얻은 후,  $\beta$ -actin promoter와 1st exon, 1st intron을 포함하는 지역(약 2.7 kb)을 PCR 증폭하기 위해 primer zebactin F (5'-GAGAGAATTCTCTGAGAACTTCCATATTTT AGAGGTAA-3')와 zebactin R (5'-GAGAGGTACCGGCTGAACTGTAAGA AAGGGA-3')를 이용하였다. Zebactin F primer에는 제한효소 *EcoRI* (Takara Bio Inc., Japan) 지역을 두었고, zebactin R primer에는 *KpnI* (Takara Bio Inc., Japan) 지역을 두었다(밑줄). PCR 반응은 genomic DNA 1  $\mu$ l, 10 $\times$  *Ex Taq* Buffer 5  $\mu$ l, 10 mM dNTP mix 4  $\mu$ l, primer zebactin F (10 pmole/ $\mu$ l) 2  $\mu$ l, zebactin R (10 pmole/ $\mu$ l) 2  $\mu$ l, 1 unit *Ex Taq* polymerase (Takara Bio Inc., Japan)를 이용하였으며, 증류수를 이용하여 total volume이 50  $\mu$ l가 되도록 하였다. 이때 반응 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 변성시킨 후 denaturation 94 $^{\circ}$ C에서 45초, annealing 53 $^{\circ}$ C 1분, extension 72 $^{\circ}$ C에서 2분 50초간을 30회 반복하였으며, 최종 extension은 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 반응하였다. PCR 증폭 산물은 1% agarose gel 에서 전기 영동하여 2.7 kb정도의 예상 밴드를 확인하였다.

## 2) Growth hormone cDNA 분리

Growth hormone mRNA는 1-2 마리의 zebrafish 뇌하수체를 채취하고, Micro-FastTrack 2.0 Kit (Invitrogen, USA)을 이용하여 total mRNA를 분리한 후, 이 total mRNA를 Superscript III First-strand Synthesis System For RT-PCR (Invitrogen, USA)을 이용하여 cDNA를 합성하였다.

cDNA 합성은 mRNA 5  $\mu$ l, 50  $\mu$ M oligo (dt)<sub>20</sub> 1  $\mu$ l, 10 mM dNTP mix 1  $\mu$ l, DEPC-treated water 3  $\mu$ l를 넣어 65°C에서 5분간 반응한 후 10 $\times$  RT buffer 2  $\mu$ l, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ l, 0.1 M DTT 2  $\mu$ l, RNaseOUT (40 unit/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, SuperScript III RT (200 unit/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l를 넣어 50°C에서 50분, 85°C에서 5분간 반응한다. 반응이 끝나면 다시 RNase H 1  $\mu$ l를 넣은 후 37°C에서 20분간 반응하였고 합성된 cDNA를 이용하여 growth hormone을 PCR 증폭하는데 사용하였다.

이 cDNA에서 growth hormone 지역을 PCR 증폭하기 위해 primer zebgh F (5'-GAGAGGTACCATGGCTAGAGCATTGGTGCTGTTG-3')와 zebgh R (5'-GAGAACCGGTCAGGGTACAGTTGGAATCCAGG-3')를 이용하였다. zebgh F primer에는 제한효소 *Kpn*I (Takara Bio Inc., Japan) 지역을 두었고, zebgh R primer에는 제한효소 *Age*I (New England BioLabs, England) 지역을 두었다(밑줄). PCR 반응은 cDNA 1  $\mu$ l, 10 $\times$  *Ex Taq* Buffer 5  $\mu$ l, 10 mM dNTP mix 4  $\mu$ l, primer zebgh F (10 pmole/ $\mu$ l) 2  $\mu$ l, zebgh R (10 pmole/ $\mu$ l) 2  $\mu$ l, 1 unit *Ex Taq* polymerase (Takara Bio Inc., Japan)를 이용하였으며 증류수를 이용하여 total volume이 50  $\mu$ l가 되도록 하였다. PCR 조건은 94°C에서 2분간 변성시킨 후 denaturation 94°C에서 45초, annealing 55°C 1분, extension 72°C에서 50초간을 30회 반복하였으며, 최종 extension은 72°C에서 7분간 반응하였다. PCR 증폭산물은 1% agarose gel에서 전기 영동하여 630 bp 정도의 예상 밴드를 확인하였다.

### 3) p $\beta$ GH-EGFP 발현 vector 제작

이 실험에서 사용된 pEGFP-1 (BD Biosciences Clontech, USA) vector는  $\beta$ -actin promoter와  $\beta$ -actin 1st exon과 1st intron의 활성과 growth hormone cDNA의 발현을 확인을 위한 reporter 유전자인 EGFP를 보유하고 있다.

p $\beta$ GH-EGFP 발현 vector 제작은 growth hormone PCR 산물과 pEGFP-1 vector를 *KpnI* (Takara Bio Inc., Japan)과 *AgeI* (New England BioLabs, England)으로 다음과 같은 방법으로 절단하였다. 먼저 10 $\times$  L buffer 5  $\mu$ l와 1 unit *KpnI* (Takara Bio Inc., Japan), 각각의 DNA 44  $\mu$ l를 37 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 반응하여 절단하였다. 반응이 끝난 후 1% agarose gel에서 전기 영동하여 vector가 잘린 것을 확인하고 PCR Purification kit (Bioneer Co., Korea)으로 정제하였으며 다시 10 $\times$  NEbuffer 1 5  $\mu$ l와 1 unit *AgeI* (New England BioLabs, England), 앞서 정제 된 DNA 44  $\mu$ l를 *KpnI* (Takara Bio Inc., Japan)과 동일한 반응 조건으로 절단하였다. 반응 후 잘린 DNA를 1% agarose gel에 모두 전기 영동하여 해당 size의 band만을 떼어내어 Gel Extraction kit (Bioneer Co., Korea)를 이용하여 분리하였다. 분리한 growth hormone cDNA와 pEGFP-1 vector는 agarose gel상에서 농도를 확인 한 후 T4 DNA ligase (Takara Bio Inc., Japan)를 사용하여 ligation하였다. Ligation 반응 조건은 10 $\times$  ligation buffer 1.5  $\mu$ l, pEGFP-1 2  $\mu$ l, growth hormone cDNA 2  $\mu$ l, 1 unit ligase를 이용하였으며, 증류수를 넣어 total volume이 15  $\mu$ l가 되도록 하여 16 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안 반응시켰다. pEGFP-1과 growth hormone ligation 산물 5  $\mu$ l는 *E. coli* DH5 $\alpha$  competent cell (Takara Bio Inc., Japan) 50 $\mu$ l에 혼합하여 얼음에서 40분, 42 $^{\circ}$ C에서 90초, 다시 얼음에서 2분 간 넣은 후 LB broth 95  $\mu$ l를 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 배양하는 과정을 거쳐 형질전환 하였으며 형질전환 한 cell은 kanamycin 저항성을 이용하여 kanamycin (50  $\mu$ g/ml)이 들어있는 LB (Luria-Bertani) plate에 70  $\mu$ l를 도말하여 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 배양하였다. 생성된 colony를 kanamycin (50  $\mu$ g/ml)이 들어있는 LB broth 4 ml에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 배양한 후 Plasmid Miniprep kit (Bioneer Co., Korea)을 이용하여 plasmid DNA (pGH-EGFP)를 분리하였다.

분리한 pGH-EGFP와  $\beta$ -actin promoter PCR 산물은 제한효소 *EcoRI* (Takara Bio Inc., Japan)과 *KpnI* (Takara Bio Inc., Japan)으로 절단하였다. 먼저 10× H buffer 5  $\mu$ l와 1 unit *EcoRI* (Takara Bio Inc., Japan), 각각의 DNA 44  $\mu$ l를 37°C에서 12시간 동안 절단하였다. 반응이 끝난 후 1% agarose gel에서 전기 영동하여 pGH-EGFP가 잘린 것을 확인하고 PCR Purification kit (Bioneer Co., Korea)으로 정제하였으며, 다시 10× L buffer 5  $\mu$ l와 1 unit *KpnI* (Takara Bio Inc., Japan), 앞서 정제된 DNA 44  $\mu$ l를 *EcoRI* (Takara Bio Inc., Japan)과 동일한 반응 조건으로 절단하였다. 반응 후 잘린 DNA를 1% agarose gel에 모두 전기 영동하여 해당 size의 band만을 떼어내어 Gel Extraction kit (Bioneer Co., Korea)를 이용하여 분리하였다. 분리한 pGH-EGFP와  $\beta$ -actin promoter를 agarose gel상에서 농도를 확인한 후 T4 DNA ligase (Takara Bio Inc., Japan)를 사용하여 ligation하였으며, 10× ligation buffer 1.5  $\mu$ l, pGH-EGFP 1  $\mu$ l,  $\beta$ -actin promoter 2  $\mu$ l, 1 unit ligase를 이용하였으며, 증류수를 넣어서 total volume이 15  $\mu$ l가 되도록 하여 16°C에서 18시간 동안 반응시켰다. pGH-EGFP와  $\beta$ -actin promoter ligation 산물 5  $\mu$ l는 *E. coli* DH5 $\alpha$  competent cell (Takara Bio Inc., Japan) 50 $\mu$ l에 혼합하여 얼음에서 40분, 42°C에서 90초, 다시 얼음에서 2분 간 넣은 후 LB broth 95  $\mu$ l를 넣어 37°C에서 30분 동안 배양하는 과정을 거쳐 형질전환 하였으며 형질전환 한 cell은 kanamycin 저항성을 이용하여 kanamycin (50  $\mu$ g/ml)이 들어있는 LB plate에 70  $\mu$ l를 도말하여 37°C에서 16시간 배양하였다. 생성된 colony는 kanamycin (50  $\mu$ g/ml)이 들어있는 LB broth 4 ml에 접종하여 37°C에서 16시간 배양한 후 Plasmid Miniprep kit (Bioneer Co., Korea)을 이용하여 plasmid DNA (p $\beta$ GH-EGFP 발현 vector)를 분리하였다.

구조 확인은 먼저 plasmid DNA를 primer zebactin F와 zebgh R을 이용한 PCR 반응을 통하여 얻어진 PCR 산물을 제한효소 *KpnI* (Takara Bio Inc., Japan)으로 자른 후 1차적으로 band size를 확인하였고 2차적으로 (주)솔젠트에 sequence 의뢰를 하였다. PCR 반응은 plasmid DNA 0.5  $\mu$ l, 10× *Ex Taq* Buffer 2  $\mu$ l, 10 mM dNTP mix 2  $\mu$ l, primer zebactin F (10 pmole/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, zebgh R (10 pmole/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, 1 unit *Ex Taq* polymerase를 이용하였으며 증류

수를 이용하여 total volume이 20  $\mu$ l가 되도록 하였다. PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 변성시킨 후 denaturation 94 $^{\circ}$ C에서 45초, annealing 53 $^{\circ}$ C 1분, extension 72 $^{\circ}$ C에서 3분 30초간을 30회 반복하였으며, 최종 extension은 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 반응하였다. 제한효소 반응은 pBGH-EGFP 발현 vector 제작 시 방법과 동일하게 하였다.



### 3. Microinjection

앞서 준비된 zebrafish 수정란을 1.5% agarose gel로 된 홈 두께가 1 mm정도인 holding slide에 세포가 위를 향하도록 정렬한 후 제 1세포기 때 1×90 mm micro capillary (Narishige, Japan)를 microelectrode puller (Sutter Instrument Co., USA)를 이용하여 needle로 만든 후 광학현미경(Olympus SZX9 Stereo Microscope, Japan) 상에서 microinjector (WPI micromanipulator)를 사용하여 DNA를 세포에 주입하였다. DNA 용액은 100 ng/μl pβGH-EGFP 발현 vector와 0.5% phenol red (Junsei, Japan)가 함유된 0.1 M KCl buffer를 1:1로 혼합하였으며, 수정란 당 약 100 pg이 되도록 microinjection을 실시하였다.



#### 4. 형광 현미경을 통한 GFP 발현 확인 및 체장 측정

Microinjection한 zebrafish의 수정란과 부화한 치어는 형광현미경(ZEISS Axioskop 40 FL, USA)을 이용하여 pBGH-EGFP 발현 vector의 GFP 발현양상을 관찰하였으며, 동일한 친어로 부터 얻은 injection을 하지 않은 수정란을 따로 수용하여 GFP를 발현하는 microinjected group과 같은 조건에서 사육하였고 10일 간격으로 현미경 계측장치(K. K. KogaKu)와 vernier calipers를 이용하여 체장을 측정하였다. Microinjection한 group의 생존률과 발현률을 계산하였으며, injection 하진 않은 group과 비교하여 체장을 비교하였다. 체장 비교는 통계 프로그램 SYSTAT 10 software를 이용하여 유의성 검증을 실시하였다.





### Ⅲ. 결과

#### 1. p $\beta$ GH-EGFP 발현 vector 제작

Zebrafish의  $\beta$ -actin promoter 유전자와 growth hormone 유전자는 이미 NCBI의 database에 등록 되어있는 유전자 서열을 기초로 특정 primer zebactin F, R과 zebgh F, R을 각각 제작하였으며, 각각 PCR 증폭을 통하여 해당 size의 DNA (growth hormone cDNA, 630 bp;  $\beta$ -actin promoter gene, 2.7 kb)를 얻을 수 있었다(Fig. 2).

증폭된  $\beta$ -actin promoter와 growth hormone PCR product를 pEGFP-1 vector를 이용하여 재조합 하였으며, Fig. 1과 같은 구조를 갖는 p $\beta$ GH-EGFP 발현 vector를 제작하였다. 이 p $\beta$ GH-EGFP 발현 vector는 primer zebactin F과 zebgh R를 이용한 PCR 증폭과 제한효소 *KpnI*을 이용한 반응을 통해 구조를 확인하였다(Fig 2).

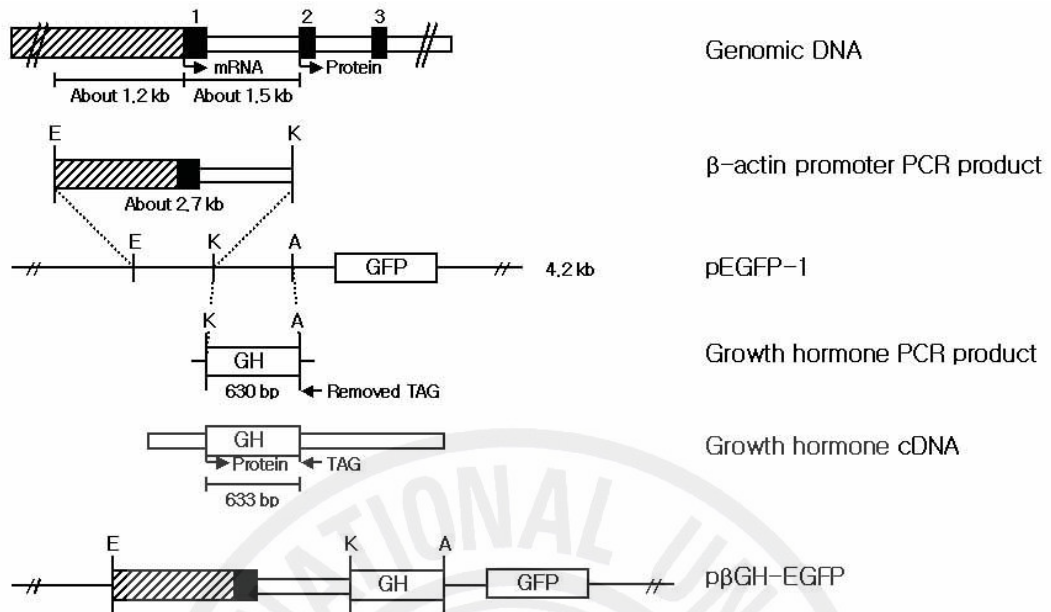


Fig. 1. Schematic diagram of constructs pβGH-EGFP. First and second lines: structure of the β-actin promoter gene. Third line: structure of the pEGFP-1 contained partial MCS (Multiple Cloning Site) and EGFP gene. Fourth and fifth line: structure of the growth hormone gene. Symbols: ▨, 5'-flanking β-actin sequence; ■, exon; □, intron. Restriction enzyme sites: E, *EcoRI*; K, *KpnI*; A, *AgeI*.

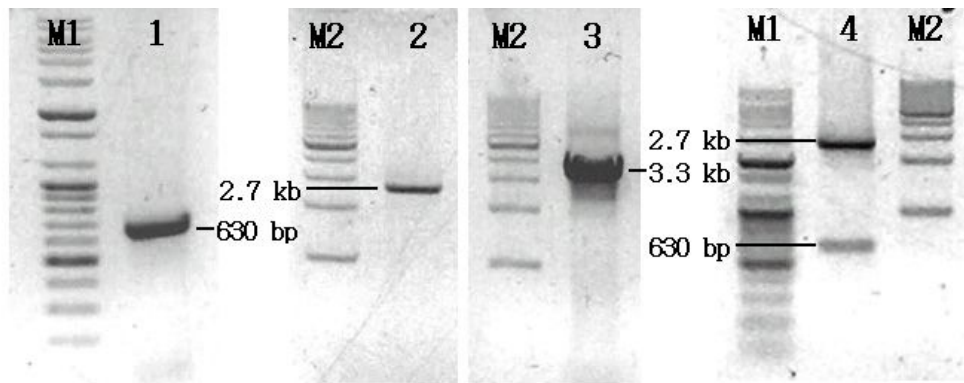
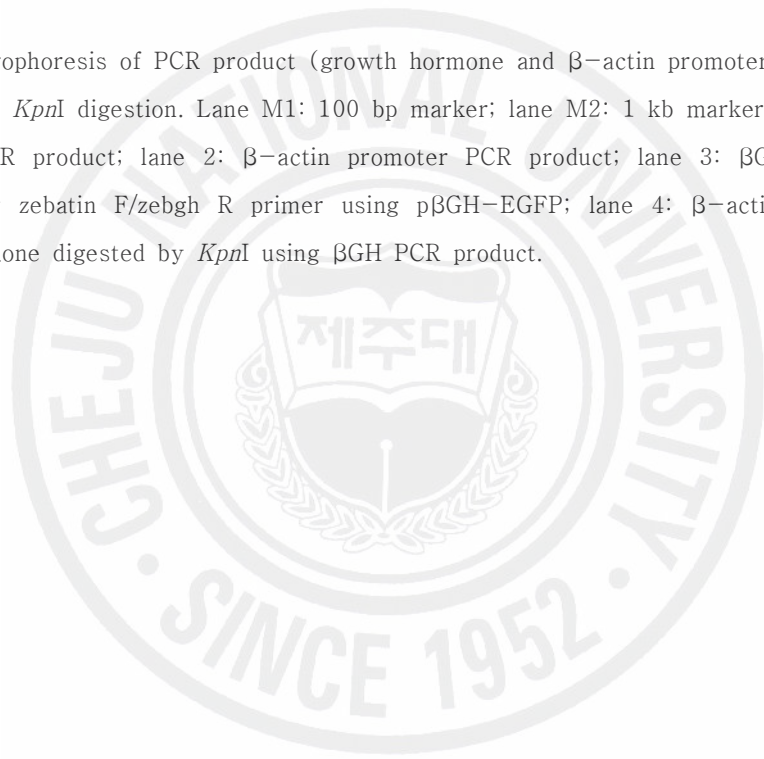


Fig. 2. Electrophoresis of PCR product (growth hormone and  $\beta$ -actin promoter) and  $\beta$ GH PCR product with *KpnI* digestion. Lane M1: 100 bp marker; lane M2: 1 kb marker; lane 1: growth hormone PCR product; lane 2:  $\beta$ -actin promoter PCR product; lane 3:  $\beta$ GH PCR product produced by zebatin F/zebgh R primer using p $\beta$ GH-EGFP; lane 4:  $\beta$ -actin promoter and growth hormone digested by *KpnI* using  $\beta$ GH PCR product.



## 2. p $\beta$ GH-EGFP 발현 양상

Zebrafish의  $\beta$ -actin promoter와  $\beta$ -actin 1st exon, 1st intron, growth hormone을 pEGFP-1 vector에 삽입한 후 재조합 된 p $\beta$ GH-EGFP 발현 vector를 zebrafish의 수정란에 microinjection하였다. 이 결과 Microinjection 된 zebrafish의 수정란과 치어에서 reporter 유전자인 GFP의 발현을 확인 할 수 있었다. 이를 통해 promoter의 기능과 growth hormone의 발현을 간접적으로 확인 할 수 있었다.

제 1 세포기의 수정란에 microinjection 하였을 때, 수정 후 12시간 이전인 blastula period(포배기)까지는 분열하고 있는 세포에서 GFP의 발현을 관찰 할 수 없었다(Fig. 3). 12시간 이후 gastrula period(낭배기) 50%-epiboly로 진행 되었을 때부터 GFP의 발현을 형광현미경 상에서 최초로 관찰 할 수 있었으며 (Fig. 4. E, F), 발현 양상은 난황을 감싸고 있는 피포에 산발적인 점 형태로 발현되었다(Fig. 4. H, I). 또한 발생이 진행됨에 따라 GFP의 발현 양상도 부위에 따라 조금씩 달라지는 것을 확인 할 수 있었다. 세부 기관으로 분화되어지는 segmentation period(분할기)로 진행 되었을 때 GFP 발현 양상은 gastrula period 50%-epiboly 때와는 다르게 분절(somite) 주위의 근육조직에서 얇은 막 대 모양으로 변하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 5. B, C, E, F, H, I). Pharyngula period와 hatching period일 때에는 segmentation period보다 좀 더 자세히 발현을 확인 할 수 있었다. 두부나 꼬리지느러미, 난황을 싸고 있는 부위에서는 gastrula period와 유사한 점 형태로 발현하고 있는 GFP를 관찰 할 수 있었고 밝기는 gastrula period보다 더 밝은 것이 관찰되었다. 등 부위의 근육조직에서의 발현 양상은 segmentation period와 동일하였으며 밝기는 다른 조직과 같이 더욱 밝아지는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 6 and Fig. 7).

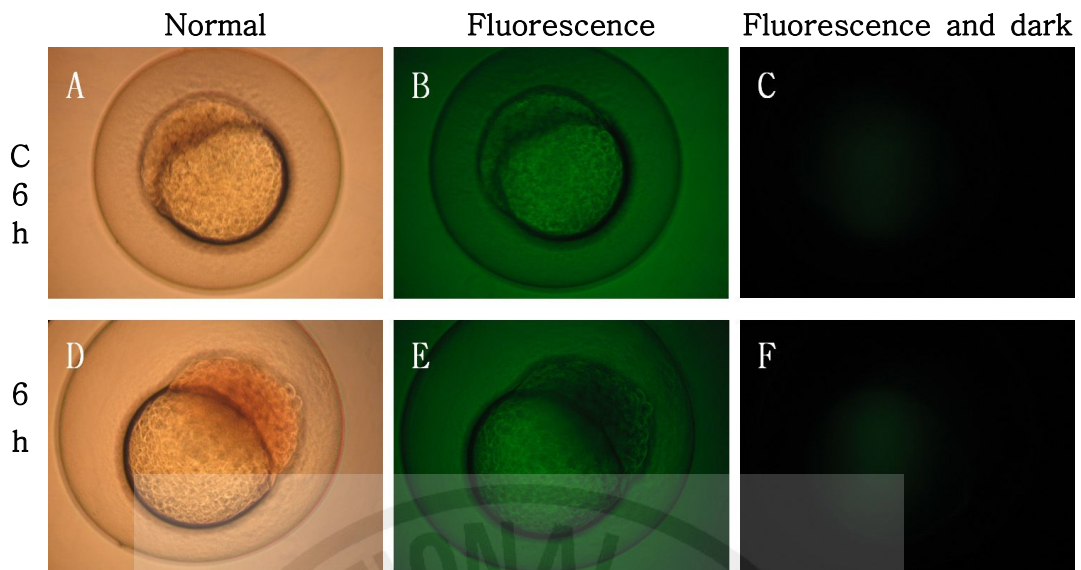


Fig. 3. Development during the blastula period (6 h). A, B, C: Control group (non injection) D, E, F: microinjection group. Normal: bright field microscopy; fluorescence: fluorescence field microscopy; dark fluorescence: dark and fluorescence field microscopy.

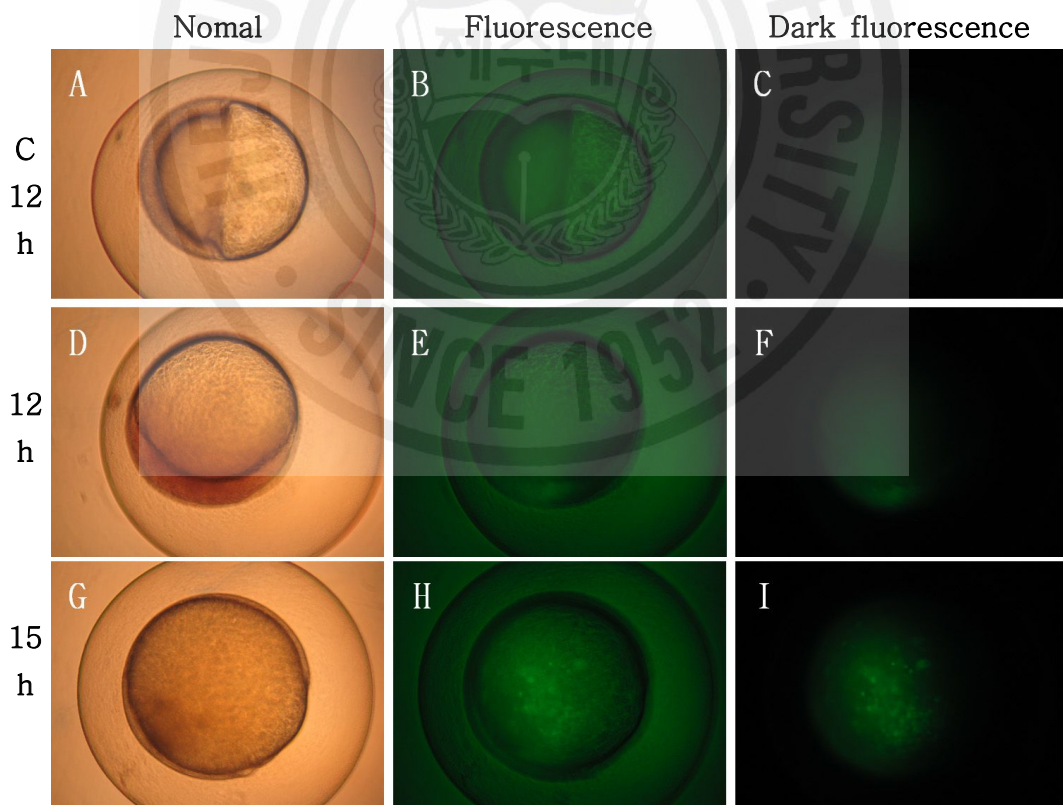


Fig. 4. Development during the gastrula period (C 12 hr: non-injected group; 12 hr, 15 hr; microinjected group).

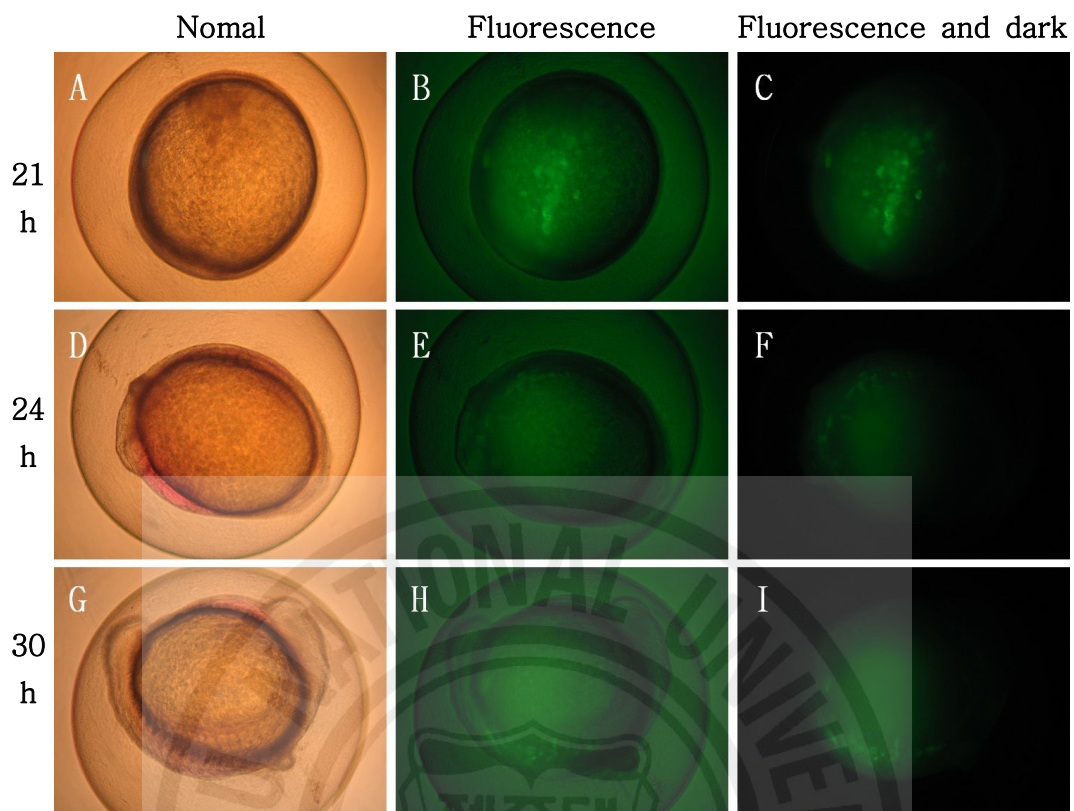


Fig. 5. Development during the segmentation period (12 hr, 24 hr, 30 hr; microinjected group). Normal: bright field microscopy; fluorescence: fluorescence field microscopy; dark fluorescence: dark and fluorescence field microscopy.

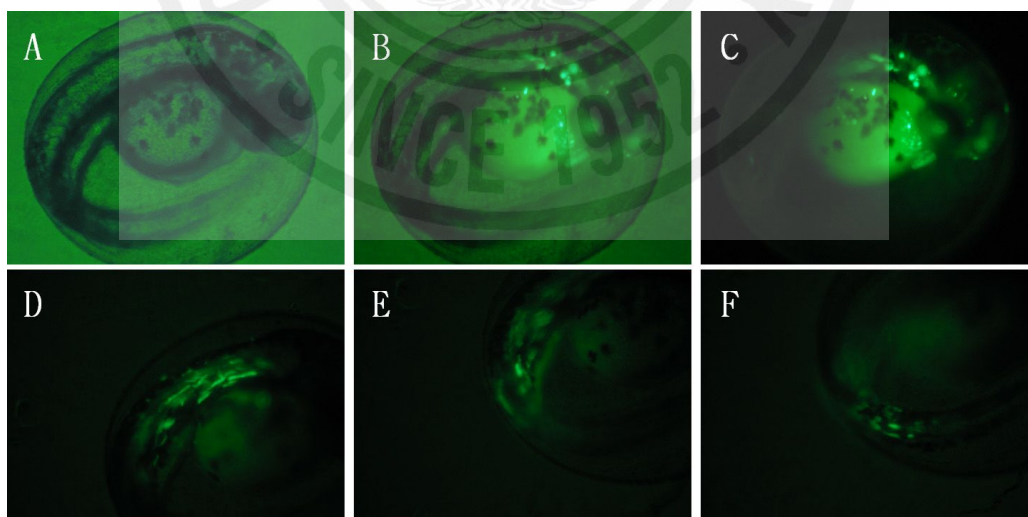


Fig. 6. Development during the pharyngula period (only microinjected group; A: bright field microscopy; B: fluorescence field microscopy; C, D, E, F: dark and fluorescence field microscopy).

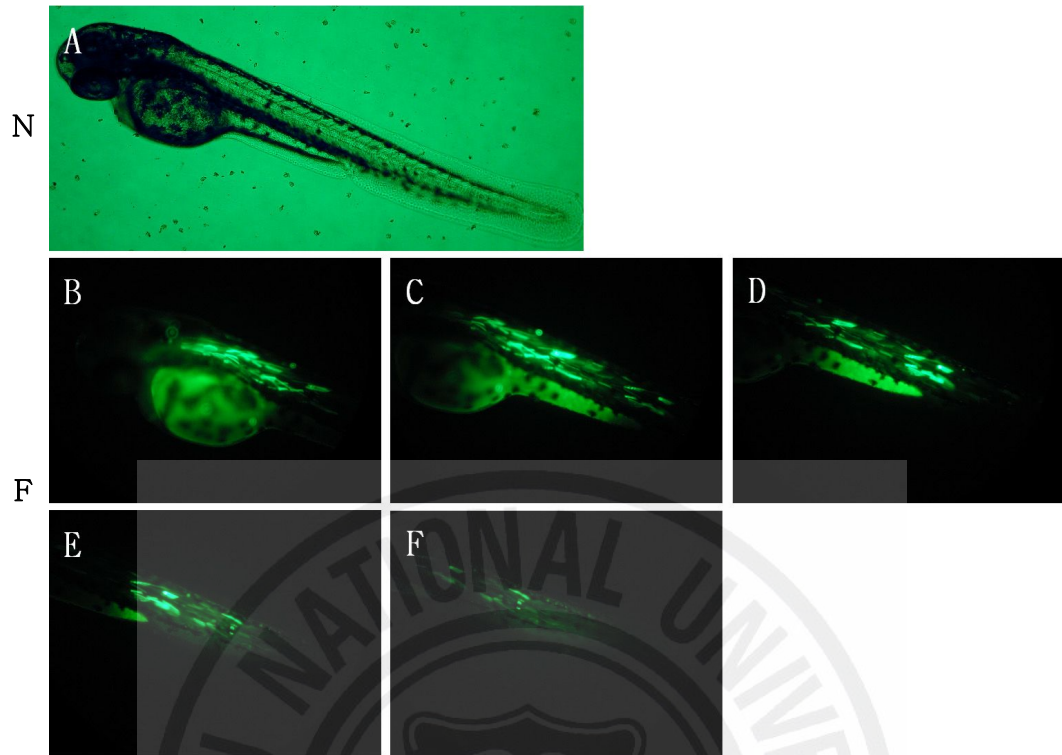


Fig. 7. Development during the hatching period (only microinjected group; N: bright field microscopy; F: dark and fluorescence field microscopy).

### 3. pβGH-EGFP 발현 zebrafish의 생존률 및 체장 측정

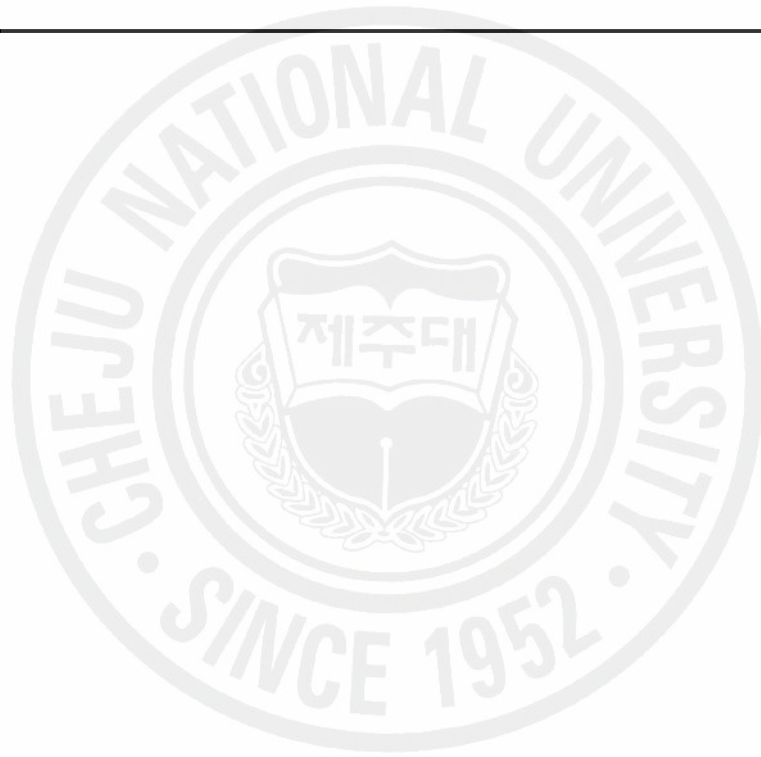
총 973개의 수정란에 pβGH-EGFP 발현 vector를 microinjection하여 156마리가 부화 되었으며(부화율 16.03%) injection을 하지 않은 group은 480마리 중 452마리가 부화되었다(부화율 94.17%)(Table 1). Microinjection한 zebrafish 가운데 발생 과정 중 기형 어류를 제외한 GFP를 발현하는 개체는 83마리였고 생존한 개체 중 발현율은 53.21%였으며(Table 1) microinjection을 시행한 수정란 수에 대한 발현율은 8.63%였다.

부화한지 40일 경과 후, 39마리의 GFP를 발현하는 zebrafish의 체장을 측정한 결과, GFP를 발현하는 zebrafish의 체장은 injection을 하지 않은 group의 체장보다 1.1배 정도 긴 차이를 확인 할 수 있었으나 유의적 차이는 나타나지 않았다(data not shown). 그러나 체장 측정에 사용된 GFP를 발현하는 zebrafish 중 5마리가 injection을 하지 않은 group의 평균값보다 1.5배 정도 긴 체장으로 인해 유의적 차이를 나타냈다(Fig. 7).



Table 1. Hatching and expression incidence of injection group and control group of zebrafish

	No. of individual	No. of hatching	Hatching rates (%)	No. of expression fish	Expression rate to hatching (%)
Injection group	973	156	16.03	83	53.21
Control group	480	452	94.17	—	—



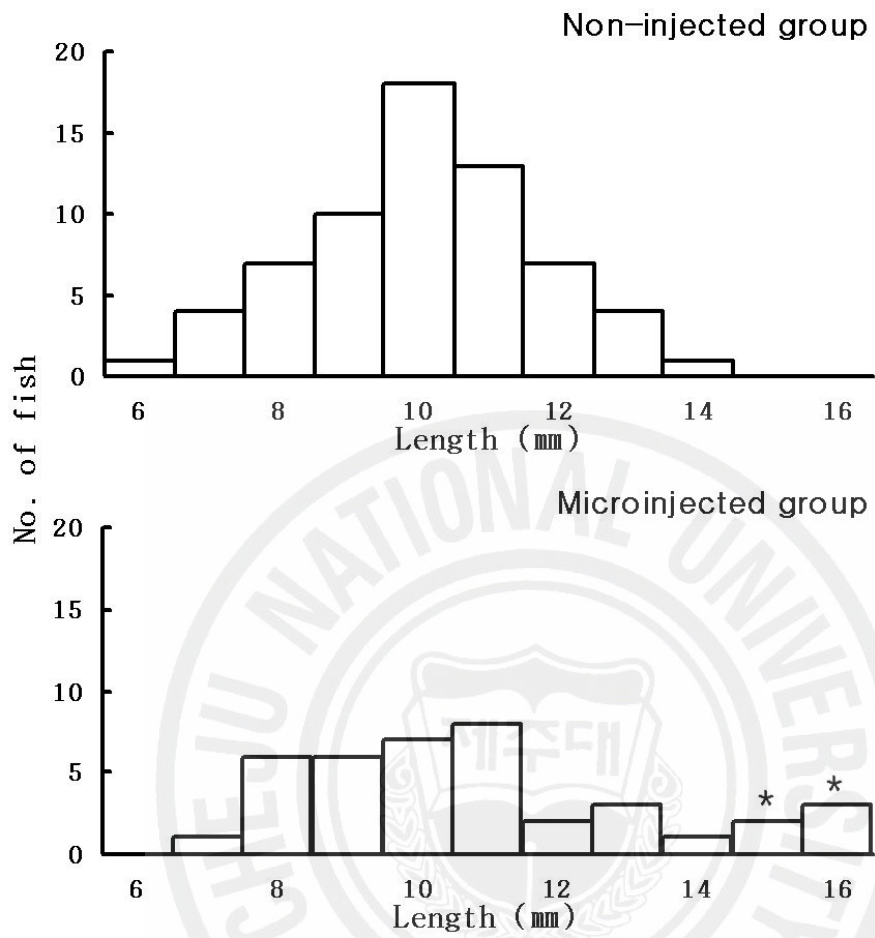


Fig. 8. Frequency distribution of body length in non-injected and microinjected groups of zebrafish at 40 day after hatching. Microinjected group is expressed the EGFP gene. \*  $P < 0.05$  compared with control.

#### IV. 고찰

유전자 재조합 기술과 도입 기술이 발달하여 전 세계적으로 많은 나라에서 특이적인 기능을 갖는 재조합 유전자를 어류에 도입하여 기존의 어류보다 뛰어난 기능을 갖는 어류를 생산하기 위해 많은 연구를 하고 있다(Du et al., 1992a,b; Devlin et al., 1994; Rahman et al., 1998; Pitkanen et al., 1999; Noh et al., 1999; Nam et al., 2001; Lorenzen et al., 1999; LaPatra et al., 2001; Yazawa et al., 2006 ; Shears et al., 1991; Wang et al., 1995; Low et al., 1998). 이 논문에서 다루어진 성장에 관한 연구뿐만 아니라 병원균에 대한 저항력을 갖거나 추위에 대한 저항성을 갖는 특이적인 유전자에 대한 연구도 꾸준히 이루어지고 있다.

이 연구는 실험 어류로서 흔히 사용되는 zebrafish를 대상으로 기존의 어류보다 성장이 빠른 어류를 생산하는데 목적이 있다. 앞서 Liu et al. (1990)이 제시한 잉어(common carp)의  $\beta$ -actin promoter와 1st exon, 1st intron을 이용한 연구를 기초로 zebrafish의 고유  $\beta$ -actin promoter와  $\beta$ -actin 1st exon과 1st intron을 제작하여 promoter로 활용하였으며, 이 결과 수정란과 치어에서의 reporter 유전자인 EGFP의 발현으로 promoter로써 기능을 하는 것을 확인 할 수 있었다.  $\beta$ -actin promoter를 이용한 reporter 유전자인 EGFP의 발현양상은 최초 gastrula period(낭배기) 50%-epiboly 때에 관찰되어졌으며 피포(epiboly) 전 지역에 점 형태로 GFP가 발현 되어졌다. Segmentation period(분할기)로 진행 되었을 때에는 점 형태의 발현이 대부분 얇은 막대 모양으로 변화하였으며, 난황을 감싸고 있는 배 조직 보다는 체절(somite)이 생성되는 등 부위에서 관찰 되어졌다. Pharyngula period와 hatching period에서는 발현이 일어나는 지역에 따라 점 또는 얇은 막대 모양의 발현 양상과 segmentation period(분할기)에 비해 더욱 선명해진 밝기를 확인 할 수 있었다. 기존에 Higashigima et al. (1997)의 연구에서는  $\beta$ -actin promoter와  $\alpha$ -actin promoter를 이용한 GFP의 발현 양상을 확인 하였고, 또한 *in situ* hybridization을 통하여  $\beta$ -actin이 몸 전체에서 발현되어지는 것이 보고되어졌으며, 이 연구와 유사한 결과를 나타내었다.

형질전환 transgene을 microinjection하였을 때 부화율에 대해서는 사용된 유전자와 유전자량, 유전자 길이, 실험어종, needle 굵기에 따라 다양한 변수가 나타난다는 보고가 있다(한국과학기술부, 2000). 또한 zebrafish 수정란에 microinjection을 수행한 연구에서는 promoter에 따라 부화율과 발현율의 차이가 있음을 보여주었다(Ju et al., 1999). 이 연구에서 microinjection을 수행하였을 때 zebrafish의 생존율은 16.03%로 기존의 연구에 비해 낮은 생존율을 보여 microinjection 테크닉에 의한 문제로 생각되었으나 다른 문제로 인해 낮은 생존율이 보일 수 있기 때문에 추가적인 조사가 필요하다. 부화된 어류에 따른 발현율은 53.21%였으나, GFP의 발현 부위와 발현량이 차이가 있는 것을 확인 할 수 있었다.

Growth hormone transgene을 이용한 속성장 또는 거대성장의 형질을 갖는 어류가 많은 연구를 통하여 생산되어지고 있다(Du et al., 1992a,b; Devlin et al., 1994; Rahman et al., 1998; Pitkanen et al., 1999; Noh et al., 1999; Nam et al., 2001). 이 논문에서는 Nam et al. (2001)과 Noh et al. (1999)의 연구와 유사하게 실험 어종의 고유  $\beta$ -actin promoter와 growth hormone 유전자를 이용하여 실험을 수행하였다. 이 결과 GFP가 발현되는 일부 zebrafish의 개체는 control의 평균값과 비교 하였을 때 최대 1.5배 정도의 큰 차이를 보였다 ( $P < 0.05$ ). 하지만 GFP 발현이 일어나는 zebrafish와 control 간의 평균을 비교 하였을 때, 약 1.1배 체장차를 보여, group 간 유의차가 나타나지 않았다(data not shown).

마지막으로 선행되어진 GFP의 fusion protein에 대한 연구에서 angiotensin II receptor-GFP, metabotropic glutamate receptor-GFP, cholecystokinin receptor type A-GFP, gonadotropin releasing hormone receptors-GFP fusion protein이 기존의 receptor와 동일한 기능과 활성을 갖는다는 보고가 있다(Tarasova et al., 1997; Doherty et al., 1999; Chen et al., 2000; Avitan et al., 2007). 위 연구처럼 receptor 유전자에 관한 보고뿐만 아니라 GST (glutathione S-transferase) 유전자에 세포염증과 세포주화성에 관계된 재조합 5Ca 유전자를 융합한 fusion protein을 이용한 활성 실험에서도 GST를 제거한 재조합 5Ca와 동일한 활성을 보였다는 보고가 있다(Boshra et al., 2004). 하지

만 hormone은 hormone receptor 간 특이적인 결합을 하므로 앞서 연구된 결과만으로 growth hormone과 growth hormone receptor 간 GFP가 영향을 주지 않는다고 할 수 없다. 따라서 추가적으로 GFP reporter 유전자를 제거한 growth hormone과 growth hormone receptor 사이에 활성화에 대한 연구가 필요할 것으로 사료되어진다.



## V. 요약

이 연구의 목적은 기존의 zebrafish보다 빠르게 성장하는 zebrafish를 만드는 데 있다. 이를 위한 도입유전자의 vector 조합은 pEGFP-1 vector에  $\beta$ -actin promoter 부위와  $\beta$ -actin 유전자의 1st exon과 1st intron까지를 포함하는 promoter 영역, 그리고 growth hormone 유전자를 사용하였다. 재조합 벡터 도입 방법은 미세주입방법을 사용하였으며 도입된 유전자의 발현 양상은 GFP 표식유전자의 발현을 관찰함으로써 모니터링하였다.

그 결과, 형질전환 zebrafish (*Danio rerio*)에서 표식유전자의 발현은 최초 gastrula period (50%-epiboly)에서 피포를 감싸고 있는 산발적인 점 형태로 나타났다. 또한 segmentation period에서 GFP 발현양상은 일부 점이 가는 막대 모양으로 바뀌는 것을 관찰 할 수 있었다. Pharyngula period와 hatching period에서는 상피, 근육조직, 난황낭, 지느러미에서 GFP의 발현이 관찰되었다.

Microinjection한 약 1,000 개의 수정란 중 16.03%의 알이 부화되었으며, 부화한 치어 중 53.21%에서 GFP 발현이 관찰되었다.

GFP 발현을 보이는 어류와 대조구 어류 사이에 약간의 성장차이를 나타내었으며, microinjection한 어류에서 대조구의 평균보다 최대 1.5배 빨리 성장하는 어류가 관찰되었다.

## VI. 참고 문헌

- Amsterdam, A., S. Burgess, G. Golling, W. Chen, Z. Sun, K. Townsend, S. Farrington, M. Haldi and N. Hopkins. (1999) A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish. *Genes Dev.*, 13: 2713-2724.
- Axelrod, H.R. and L.P. Schulz. (1955) A handbook of tropical aquarium fishes, New York, McGraw-Hill Book co., 271 pp.
- Bearzotti, M., E. Perrot, C. Michard-Vanhe, G. Jolivet, J. Attal, M.C. Theron, C. Puissant, M. Dreano, J.J. Kopchick, R. Powell, F. Gannon, L.M. Houdebine and D. Chourout. (1992) Gene expression following transfection of fish cells. *J. Biotechnol.*, 26: 315-325
- Bhimachar, B.S and A Subra Rau. (1942) The fishes of Mysore State, I. fishes of Kadur District. Half-yearly *J. Mysore Univ. Sect. B.*, 1: 141-153.
- Boshra, H., R. Peters, J. Li and J.O. Sunyer. (2004) Production of recombinant C5a from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): role in leucocyte chemotaxis and respiratory burst. *Fish Shellfish Immunol.*, 17: 293-303.
- Chen, R., Y.V. Mukhin, M.N. Garnovskaya, T.E. Thielin, Y. Iijima, C. Huang, J.R. Raymond, M.E. Ullian and R.V. Paul. (2000) A functional angiotensin II receptor-GFP fusion protein: evidence for agonist-dependent nuclear translocation. *Am. J. Physiol. Renal.*

Physiol., 279: 440–448.

Clarke, M. and J. Spudich. (1977) Nonmuscle contractile proteins the role of actin and myosin in cell motility and shape determination. *Ann. Rev. Biochem.*, 46: 797–822.

Devlin, R.H., L.F. Sundstro and W.M. Muir. (2006) Interface of biotechnology and ecology for environmental risk assessments of transgenic fish. *Trends Biotechnol.*, 24: 89–97.

Devlin, R.H., T.Y. Yesaki, C.A. Biagi, E.M. Donaldson and P. Swanson. (1994) Extraordinary salmon growth. *Nature*, 371: 209–210.

Doherty, A.J., V. Coutinho, G.L. Collingridge and J.M. Henley. (1999) Rapid internalization and surface expression of a functional, fluorescently tagged G protein coupled glutamate receptor. *Biochem. J.*, 341: 415–22.

Driever, W., D. Stemple, A. Schier and L. Solnica-Krezel. (1994) Zebrafish: genetic tools for studying vertebrate development. *Trends Genet.*, 10: 152–159.

Du, S.J., Z.T. Gong, C.L. Hew, C.H. Tan and G.L. Fletcher. (1992a) Development of an all-fish gene cassette for gene transfer in aquaculture. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1: 290–300.

Du, S.J., Z.T. Gong, G.L. Fletcher, M.A. Shears and M.J. King. (1992b) growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an 'all fish' chimeric growth hormone gene construct. *Biotechnology*, 10:



176–181.

Gaiano, N., M. Allende, A. Amsterdam, K. Kawakami and N. Hopkins. (1996) Highly efficient germ–line transmission of proviral insertions in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93: 7777–7782.

Gibbs, P.D. and M.C. Schmale. (2000) GFP as a genetic marker scorable throughout the life cycle of transgenic zebrafish. *Mar. Biotechnol.*, 2: 107–125.

Higashijima, S., H. Okamoto, N. Ueno, Y. Hotta and G. Eguchi. (1997) High–frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using Promoters of zebrafish origin. *Dev. Biol.*, 192: 289–299

Ju, B., Y. Xu, J. He, J. Liao, T. Yan, C.L. Hew, T.J. Lam and Z. Gong. (1999) Faithful expression of Green Fluorescent Protein (GFP) in transgenic zebrafish embryos under control of zebrafish gene promoters. *Dev. Genet.*, 25: 158–167.

Knobil, E. and J. Hotchkiss. (1964) Growth hormone. *Annu. Rev. Physiol.*, 26: 47–74.

Le Bail, P.Y. and G. Boeuf. (1997) What hormones may regulate food intake in fish?. *Aquat. Living Resour.*, 10: 371–379.

Liu, Z., B. Moav, A.J. Faras, K.S. Guise, A.R. Kapuscinski and P.B. Hackett. (1990) Functional analysis of elements affecting expression of the  $\beta$ –actin gene of carp. *Mol. Cell. Biol.*, 10: 3432–3440.

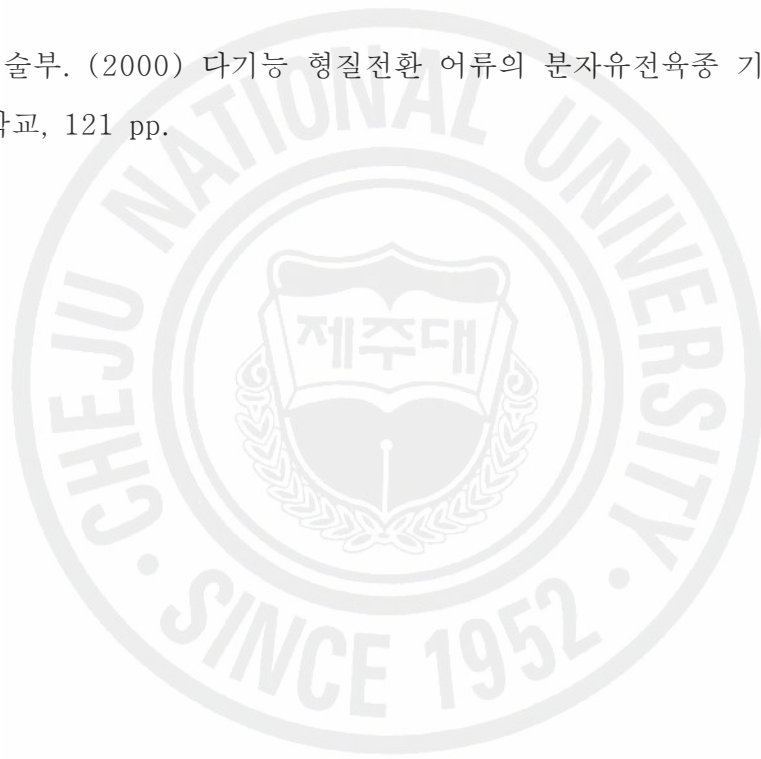
- LaPatra, S.E., S. Corbeil, G.R. Jones, W.D. Shewmaker, N. Lorenzen, E.D. Anderson and G. Kurath. (2001) Protection of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus four days after specific or semi-specific DNA vaccination. *Vaccine*, 19: 4011–4019.
- Lorenzen, N., E. Lorenzen, K. Einer-Jensen, J. Heppell and H.L. Davis. (1999) Genetic vaccination of rainbow trout against viral haemorrhagic septicaemia virus: small amounts of plasmid DNA protect against a heterologous serotype. *Virus Res.*, 63: 19–25.
- Low, W.K., M. Miao, K.V. Ewart, D.S. Yang, G.L. Fletcher and C.L. Hew. (1998) Skin-type antifreeze protein from the shorthorn sculpin, *Myoxocephalus scorpius*. Expression and characterization of a Mr 9,700 recombinant protein. *J. Biol. Chem.*, 273: 23098–23103.
- Mauras, N. and M.W. Haymond. (2005) Are the metabolic effects of GH and IGF-I separable?. *Growth Horm. IGF Res.*, 15: 19–27.
- Nam, Y.K., J.K. Noh, Y.S. Cho, H.J. Cho and K.N. Cho. (2001) Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach, *Misgurnus mizolepis*. *Transgenic Res.*, 10: 353–362.
- Noh, J.K., K.N. Cho, Y.K. Nam, D.S. Kim and C.G. Kim. (1999) Genomic organization and sequence of the mud loach (*Misgurnus mizolepis*) growth hormone gene: a comparative analysis of teleost growth hormone gene. *Mol. Cells.*, 9: 638–645.
- Pitkanen, T.I., A. Krasnov, H. Teerijoki and H. Molsa. (1999) Transfer of

- growth hormone (GH) transgenes into Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) –I. Growth response to various GH constructs. Genet. anal., 15: 91–98.
- Pollard, T.D. and J.A. Cooper. (1986) Actin and actin-binding protein. A critical evaluation of mechanism and functions. Ann. Rev. Biochem., 55: 987–1035.
- Rahman, M.A., R. Mak, H. Ayad, A. Smith and N. Maclean. (1998) Expression of a novel piscine growth hormone gene results in growth enhancement in transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). Transgenic Res., 7: 357–369.
- Shears, M.A., G.L. Fletcher, C.L. Hew, S. Gauthier and P.L. Davies. (1991) Transfer, expression, and stable inheritance of antifreeze protein genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Mol. Mar. Biol. Biotechnol., 1: 58–63.
- Tarasova, N.I., R.H. Stauber, J.K. Choi, E.A. Hudson, G. Czerwinski, J.L. Miller, G.N. Pavlakis, C.J. Michejda and S.A. Wank. (1997) Visualization of G protein-coupled receptor trafficking with the aid of the green fluorescent protein. Endocytosis and recycling of cholecystokinin receptor type A. J. Biol. Chem., 272: 14817–14824.
- Vandeserckhove, J. and K. Weber. (1979) The complete amino acid sequence of actins from bovine aorta, bovine heart, bovine fast skeletal muscle, rabbit slow skeletal muscle. Differentiation, 14: 123–133.

Wang, R., P. Zhang, Z. Gong and C.L. Hew. (1995) The expression of antifreeze protein gene in transgenic goldfish (*Carassius auratus*) and its implication in cold adaptation. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 4: 20-26.

Yazawa, R., I. Hirono and T. Aoki. (2006) Transgenic zebrafish expressing chicken lysozyme show resistance against bacterial diseases. *Transgenic Res.*, 15(3): 385-391

한국과학기술부. (2000) 다기능 형질전환 어류의 분자유전육종 기술 개발. 부경대학교, 121 pp.



## 감사의 글

너무 짧게 느껴졌던 2년 동안의 석사 학위 중 미숙하고 부족한 저에게 지도와 격려를 아끼지 않으시고 잘못된 길로 갈 때는 엄하게 훈계하시며 잘한 일에는 칭찬을 아끼지 않으신 송춘복 교수님께 감사의 마음을 전합니다. 그리고 석사 학위 중 송춘복 교수님을 대신하여 많은 지도와 격려를 해주신 이제희 교수님과 늘 따뜻한 말로 저를 격려해주신 허문수 교수님과 전유진 교수님, 여인규 교수님께 감사드립니다.

실험실 생활과 연구를 하는데 있어서 많은 조언과 도움을 주신 김맹진 선배님과 조미란에게 감사드리며, 어류유전육종 실험실을 나오셔서 저의 연구에 대한 많은 관심을 가져주신 고범석 선배님, 양윤철 선배님, 오상규 선배님에게도 감사드립니다.

그리고 어려울 때 서로에게 힘이 되어주고 웃음을 준 동기 김경주, 김주상, 이승홍, 장태원에게도 감사드리며, 분자유전학실험실, 해양동물생리생태학실험실, 응용미생물&어류질병제어실험실, 해양생물자원이용공학실험의 소속 선후배님께 감사드립니다.

그리고 즐겁게 제 이야기를 들어준 친구들에게 감사의 마음을 전합니다.

마지막으로 뒤에서 큰 힘이 되어주신 부모님과 고운 따님을 주신 장인어른, 하늘에서 저를 지켜봐 주신 장모님, 믿음직한 동생과 처남, 항상 제 옆을 지켜준 사랑하는 아내 양혜영, 이제 막 이가 나기 시작하는 아들 지혁에게 이 작은 결실을 바칩니다.