

## 비스페놀A 처리 수컷 잉어에서 비텔로제닌 mRNA의 발현

박응로 · 최필선 · 이철우 · 류지성 · 남성숙 · 류홍일 · 전성환 · 나진균 · 박광식\*  
국립환경연구원 환경위해성연구과

### Vitellogenin mRNA Induction in Male Carp Treated with Bisphenol A

Eung-Roh Park, Pil-Son Choi, Chulwoo Lee, Jisung Ryu, Seong-Sook Nam, Hong-Il Rhu,  
Seong-Hwan Jeon, Jin-Gyun Na and Kwangsik Park\*

National Institute of Environmental Research, Gyeongseo-dong, Seo-gu, Incheon 404-170, Korea  
(Received May 4, 2001)  
(Accepted June 14, 2001)

**ABSTRACT :** The estrogenic potency of bisphenol A using reverse transcriptase-PCR response of liver vitellogenin mRNA in male carp was studied. For this, six combinations of primers which were synthesized on the basis of cDNA consensus region of various fish species, were evaluated and one pair of primers was selected as the best to show 286 bp size-transcript. By using the selected primers, vitellogenin mRNA induction in carp treated with bisphenol A was measured and the chemical showed dose- and time-dependent induction response. From this result, it was concluded that RT-PCR technique using the selected primers in this study can be used to monitor the estrogenic effects exerted in carp living in Korean freshwater.

**Key Words :** Carp, Vitellogenin, RT-PCR, Bisphenol A

#### I. 서 론

내분비계 장애물질이 수생생물의 기형발생, 암유발, 성비교란 및 개체수 감소 등을 유발시킬 수 있다는 지견이 여러 연구자들에 의해 지속적으로 발표되고 있으며(Bauer 등, 1995; Purdom 등, 1994; Moccia 등, 1981; Blaustein 등, 1995; Guillette 등, 1994) 특히, 인체에 대한 잠재적 위해성 문제가 사회적 이슈로 등장함에 따라(Carlsen 등, 1995; Herman-Giddeon 등, 1997) 그 위해성 평가에 필요한 시험법 개발 연구가 OECD를 중심으로 활발히 수행되고 있다. 최근 OECD 전문가회의에서는 내분비계 장애물질 시험법 테스트포스를 설립하였는데 이 기구는 포유류, 어류, 양서류, 조류 등을 이용한 내분비계장애물질 검색시험법의 국제적 표준화를 위해 다양한 국제 활동을 전개하고 있다. 어류를 이용한 시험법으로서는 수정란 독성시험, 치어 성장시험, 성어의 성장과 성분화시험 및 후세대검증시험법 등에 대한 연구가 가장 광범위하게 수행되고 있으며 이차성징의 변화, 생식기관의 조직학적 변화 및 수컷에서의 vitellogenin 발현을 주요한 측정인자로 고려하고 있다.

Vitellogenin은 척추동물 가운데 비포유류 난생동물의 암컷 혈장에서 발견되는 단백질로서 난황 단백질의 전구체 물질이다. Vitellogenin은 간에서 생성된 후 혈액을 통해 난소로 이동하여 발달중인 난모세포로 흡수된 후 알 내부에서 lipovitelline과 phosvitin으로 전환되는데(Wallace 등, 1974) estrogen은 이러한 vitellogenin의 합성과 분비를 촉진시킨다. vitellogenin의 생성은 일반적으로 estrogen의 체내 농도가 충분한 수준으로 상승하는 산란기의 암컷에서만 유도되는 것으로 알려져 있으며 외부에서 estrogen이나 estrogen 활성이 있는 물질에 노출된 경우에는 수컷이나 미성숙한 암컷에서도 vitellogenin의 합성이 유발되는 것으로 보고되고 있다. 이러한 이유로 난생동물의 수컷에서 유도되는 vitellogenin은 외인성 estrogen 물질에 노출되었음을 암시하는 중요한 지표로 인정되고 있다(Heppeil 등, 1995; Sumpter 등, 1995). 최근 vitellogenin은 수많은 연구자들의 연구대상이 되어 무지개송어 및 집시나방 등에서 유전자의 구조가 밝혀졌다(Nathalie Mouchel 등, 1996; Hirai 등, 1998; Shiv Hiremath 등, 1997). 또한 수컷의 무지개송어를 내분비계 장애물질에 노출시켜 간세포에서 vitellogenin mRNA가 유도되는 것이 확인되었으며(Kwon 등, 1993), 치사량보다 낮은 농도의 내분비계 장애물질에

\*To whom correspondence should be addressed

노출된 수컷 어류의 간에서 vitellogenin mRNA가 발현된다는 사실이 reverse transcriptase-PCR(RT-PCR)법을 이용한 실험의 결과로 보고되었다(Lech 등, 1996).

본 연구에서는 내분비계 장애물질에 대한 수서생태계의 잠재적 위해성을 평가하기 위한 기초연구로서 수컷의 잉어에 대표적인 내분비계 장애물질인 bisphenol A를 처리한 후 RT-PCR법을 이용하여 vitellogenin mRNA의 발현에 대하여 조사하였다. 동시에 국내 서식 어종과 일부 소형 어종을 대상으로 어종간 발현 양상을 비교함으로써 국내 수계의 내분비계 장애물질의 영향을 검색하는데 vitellogenin 유전자의 발현이 분자생물학적 생체지표로서 이용이 가능한지에 대하여 검토하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시약

시험물질과 마취제로 사용한 bisphenol A(4,4'-Isopropylidenediphenol), benzocaine(ethyl *p*-amino benzoate), 17 $\beta$ -estradiol은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서, RNA 추출을 위한 TRIzol<sup>®</sup> reagent는 Life Technologies(Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다. RT-PCR 반응을 위한 시약들은 Takara Shuzo Co. Ltd.(Otsu, Shiga, Japan), 전기영동 겔을 만들기 위한 agarose NA는 Amersham Pharmacia Biotech AB(Uppsala, Sweden)에서 구입하였다. 그리고 시험에 사용한 각종 primer는 Genotech Co. (Daejeon, Korea)에서 합성하여 사용하였다. 또한 cDNA 추출에 필요한 Concert Matrix gel extraction system은 Life Technologies(Grand Island, NY, USA)사의 제품을, transformation에 사용한 pGEM-T easy vector는 Promega Co.(Madison, WI, USA)의 제품을 사용하였으며 transformant의 plasmid 정제에 사용된 Plasmid purification kit는 NucleoGen Co.(Ansan, Korea)의 제품을 사용하였다.

### 2. 시험생물

시험에 사용한 잉어는 청평내수면연구소에서 치어를 분양받아 국립환경연구원 어류사육실에서 사육한 수컷의 개체를 사용하였다. Bisphenol A에 대한 LC<sub>50</sub> 결정 시험에는 체장 20 mm 전후의 치어를 사용하였으며 vitellogenin 유도 시험에는 평균 체장 97.0 $\pm$ 3.75 mm, 체중 10.3 $\pm$ 1.28 g 인 개체를 사용하였다. 모든 시험 개체는 탈염소한 수돗물을 사육수로 이용하여 25 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C로 조절되는 사육실에서 테트라비트를 1일 1회 공급하며 사육하였다.

한편 어종간 비교를 위한 시험어종으로는 잉어과 어류로서 잉어(*Cyprinus carpio*), 이스라엘잉어(*Cyprinus carpio*),

붕어(*Carassius auratus*), 난태생송사리과에서 스워드테일(*Xyphophorus helleri*), 황어과인 왜몰개(*Aphyocypris chinensis*) 그리고 송사리과인 송사리(*Oryzias latipes*)를 선정하였으며 수컷 개체만을 시험어로 사용하였다. 잉어, 이스라엘잉어, 붕어는 청평내수면연구소에서 분양받은 치어를 사육하여 사용하였고 송사리와 스워드테일은 본 연구원 사육실에서 유지, 생산하는 개체를 사용하였으며 왜몰개는 한국화학연구소에서 생산한 개체를 분양받아 시험어로 이용하였다.

### 3. 시험물질 및 처리

시험물질은 대표적인 내분비계 장애물질로 알려진 bisphenol A를 사용하였다. 대조군 및 시험물질의 농도에 따른 5개의 처리군을 설정, 각각 10마리의 잉어를 처리하여 96시간 동안 노출시키면서 치사율을 조사하였다. 24시간마다 치사어의 수를 기록하고 치사개체는 즉시 제거하였으며 Probit 통계처리법을 이용하여 bisphenol A에 대한 잉어의 반수치사농도(LC<sub>50</sub>)를 결정하였다.

Bisphenol A의 농도별 노출에 따른 vitellogenin mRNA의 발현을 조사하기 위하여 본 시험에서 측정한 LC<sub>50</sub> 값(4.7 mg/l)을 기준으로 2배씩 희석한 농도인 1.2, 2.4, 4.7 mg/l에서 96시간 동안 노출시켰으며, 노출 기간에 따른 발현을 조사하기 위해서는 2.4 mg/l에서 0, 1, 2, 4, 8, 16일간 노출시켰다. 어종별 비교 시험에서는 2.4 mg/l 농도의 bisphenol A를 처리한 시험수에 6종의 시험어류를 96시간 처리하였다. 양성대조물질로는 모든 시험에 대해서 0.2 mg/l의 17 $\beta$ -estradiol을 사용하였으며 에탄올만을 처리한 것을 음성대조군으로 하였다. 시험용액은 시험물질을 에탄올에 녹여 stock 용액을 만든 후 시험에 사용한 사육수에 일정한 비율로 희석하여 시험에 적합한 농도로 제조하였다. 시험물질의 노출은 10 l 원형수조에서 시험물질이 첨가된 사육수를 1일 1회 교환하는 반지수식으로 수행하였다.

### 4. RNA 추출 및 RT-PCR 반응

시험물질의 처리가 완료된 개체를 0.05% benzocaine 용액에서 마취시킨 후 해부하여 간조직을 50~100 mg 적출하고 TRIzol<sup>®</sup> reagent를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 260 nm에서 흡광도를 측정하여 추출한 RNA의 농도를 계산하였으며, 이 중 2  $\mu$ g을 RT-PCR 반응에 사용하였다. 타 어종에서 이미 밝혀진 vitellogenin의 아미노산 서열을 비교하여 상동성이 높은 영역에서 5종의 primer와 Lech 등(1996)이 시험에 사용한 1종의 primer를 제작하여 시험에 사용하였으며(Table 1), 대조 유전자로는 forward

**Table 1.** Primer sequences of vitellogenin mRNA for RT-PCR. Primers (No. 1-5) were synthesized on the basis of vitellogenin DNA homologous region of other fishes such as fathead minnow, rainbow trout and killifish; Primer 6 (Vg59) were from the study of Lech et al.,  $y = c + t$ ,  $k = t + g$ ,  $r = a + g$ ,  $m = a + c$

Primer No.	Sequence
1	V1R : 5'-ttt cca cag agt cca cag gtc-3' V1F : 5'-gtg gac tgg atg aag gga cag-3'
2	V2R : 5'-cac agt ttc cag ttg tcg ttc-3' V2F : 5'-gca gat cat tac ggc cgc cct-3'
3	V3R : 5'-ytt cca rtt rtc rtt ytc rtc-3' V3F : 5'-ttr gtn agr gcn gay cay aar-3'
4	V4R : 5'-ytt kat kat ytt ytc ngc ngc-3' V4F : 5'-atm gar agr ctn gar tty gar-3'
5	V5R : 5'-ngt ngc ngc rtc rtt kat rta-3' V5F : 5'-ggg gcn gcn gcn agy gcn tty-3'
6	Vg59 : upstream 5'-ggt tgc cac atc tga aag gac-3' Vg59 : downstream 5'-agg cag aca acg cag cac ag-3'

5'-cct gac cct gaa gta ccc ca-3', reverse 5'-cgt cat gca gct cat agc tc-3'의 서열을 가지는  $\beta$ -actin primer를 합성하여 사용하였다(Lech 등, 1996).

2  $\mu$ g의 RNA와 5U의 AMV Reverse Transcriptase XL을 사용하여 30°C(10분), 55°C(30분), 99°C(5분), 5°C(5분)의 조건에서 반응시켜 20  $\mu$ l의 cDNA를 합성하였다. PCR 반응은 10 $\times$ buffer 10  $\mu$ l(100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl), dNTP 0.8 mM, 각각의 primer 1  $\mu$ M, 2.5 U의 Taq polymerase를 혼합하여 반응시켰다. 이 때의 총부피는 100  $\mu$ l이었으며 94°C(30초), 60°C(30초), 72°C(90초)를 1주기로 하여 총 30회 반응시켰다. 증폭된 cDNA 단편 중 5  $\mu$ l를 취하여 ethidium bromide(0.05  $\mu$ l/ml)가 포함된 1.0% agarose gel에서 전기영동하여 그 결과를 확인하였다.

### 5. 염기서열 분석

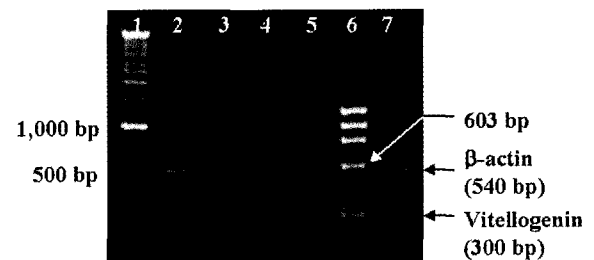
PCR 반응으로 합성한 cDNA 전량(100  $\mu$ l)을 1.0% agarose gel에서 전기영동하고 UV 조사하에서 목적으로 하는 band를 추출한 후 Concert Matrix gel extraction system(Life Technologies)으로 DNA를 elution하였다. Elution한 DNA 4  $\mu$ l와 2 $\times$ buffer 6  $\mu$ l, ligase 1  $\mu$ l, pGEM-T easy vector 1  $\mu$ l를 혼합하여 4°C에서 overnight 배양하고, 대장균 균주 JM109로 제조한 competent cell 80  $\mu$ l를 첨가하였다. 혼합액을 42°C에서 90초간 열처리하고 LB 배지 900  $\mu$ l를 첨가하여 37°C에서 40분간 배양한 후 X-gal과 IPTG, ampicillin을 첨가하여 만든 고체 배지에 50  $\mu$ l씩 도말하여 37°C에서 배양하였다. 약 18시간이 경과한 후 흰색의 colony를 선별하여 ampicillin(20  $\mu$ g/ml)이 포함된 LB 배지(5 ml)에 접종하여 overnight 배양하고 plasmid extraction system(NucleGen Co.)을 사용하여 plasmid를 분리, 정제하였다. 정제된 plasmid는 확인 PCR 과정을 거쳐 생명공학연구소

(Daejeon, Korea) 게놈사업단에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다.

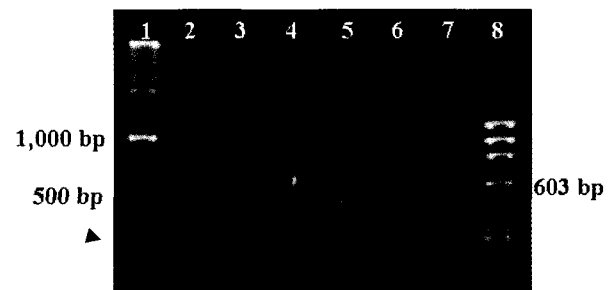
## III. 결과 및 고찰

### 1. Bisphenol A 노출 잉어에서 vitellogenin mRNA의 발현

Bisphenol A 처리 농도를 결정하기 위해서 잉어 치어를 이용하여 급성독성값을 측정한 결과 잉어에서 반수치사농도(LC<sub>50</sub>)는 4.7 mg/로 나타났다. 이 값을 기준으로 2배씩 희석하여 1.2, 2.4, 4.7 mg/의 농도로 bisphenol A를 처리하고 96시간 후에 시험어의 간을 채취하여 RNA를 추출한 후 RT-PCR을 수행한 결과, 시험한 6종의 primer 중 Lech 등(1996)이 사용한 primer(Vg59로 명명)에서 300 bp 보다 작은 크기의 band가 확인되었다. 이 primer를 이용하여 처리 농도에 따른 용량-반응 평가를 수행한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 가장 낮은 농도인 1.2 mg/에서부터 vitellogenin mRNA가 발현되었으며 그 발현량은 농도 의존적



**Fig. 1.** Dose-response of bisphenol A on vitellogenin mRNA induction. cDNA produced by RT-PCR from the liver of carp treated with bisphenol A for 4 days was analyzed using one percent agarose gel. Lane 1: 1-kb cDNA ladder, Lane 2: control; Lane 3-5: bisphenol A treated group. 0.6, 1.2, 2.4 mg/l, respectively. Lane 6:  $\phi$  174/Hae3 cDNA standard, Lane 7: 0.2 mg/l 17 $\beta$ -estradiol treated group.



**Fig. 2.** Time-course of vitellogenin mRNA induction by bisphenol A. cDNA produced by RT-PCR from the liver of carp treated with bisphenol A (2.4 mg/l) was analyzed using one percent agarose gel. Lane 1: 1-kb cDNA ladder, Lane 2-7; 0, 1, 2, 4, 8, 16 days of bisphenol A treated group, respectively, Lane 8:  $\phi$  174/Hae3 cDNA standard.  $\blacktriangleright$  : Vitellogenin mRNA (300 bp).

으로 증가하였다(Fig. 1). 또한 2.4 mg/l의 bisphenol A를 처리하여 노출기간을 달리한 경우에서도 노출 1일째부터 vitellogenin mRNA가 발현되었으며 그 양 또한 노출 시간에 의존하여 증가함을 알 수 있었다(Fig. 2). 이러한 사실에서 primer Vg59에 의해 합성된 cDNA는 bisphenol A에 의해 유도된 것으로 추정할 수 있었다. 그러나 그 크기는 300 bp 보다도 작아서 Lech 등(1996)이 무지개송어에서 보고한 827 bp와는 많은 차이가 있었다. 따라서 합성된 cDNA가 vitellogenin 유전자의 일부인지를 확인하기 위하여 염기서열을 분석하였다.

2. Vitellogenin mRNA의 염기서열 분석

Elution한 DNA를 transformation시킨 후 4개의 흰색 colony를 분리하여 ampicillin이 포함된 LB 배지에서 액체 배양하고 plasmid를 정제하였다. 정제된 plasmid 8 µl에 buffer 1 µl, EcoR1 1 µl를 혼합하여 37°C에서 3시간 30분간 반응시켜 목적으로 하는 DNA 단편이 삽입된 클론을 확인하였다. 총 3개의 시료에서 목적으로 하는 DNA 단편이 삽입되었음을 확인하였고 Vc216으로 명명하였다.

Vc216의 염기서열을 분석한 결과, RT-PCR 반응에 의해 증폭된 DNA의 크기는 같은 primer를 무지개송어에 적용하여 얻어진 vitellogenin cDNA 단편의 크기인 827 bp 보다 훨씬 작은 286 bp로 확인되었다. 이 단편의 염기서열을 BLAST search로 비교한 결과 다른 어종과 homology를 가지는 부분은 255 bp로 나타났으며 이들의 아미노산 서열과 함께 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에서 밑줄 친 부분은 아미노산 서열로 번역하여도 다른 종의 vitellogenin 유전자와 homology를 나타내지 않는 영역이다.

Vc216의 아미노산 서열을 다른 어종의 vitellogenin과 비교한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4에서 보듯이 Vc216은 다른 4종의 vitellogenin 유전자와 비교하였을 때 전체적으로는 54%의 identity와 68%의 homology를 나타

<u>tgattaccacatctg</u>	aaa gga ogg act tgt gga ctc tgt gga aag gct gat gga gag atc aga
	K G R T C G L C G K A D G E I R
cag gag tac acc aca ccc agt gga tac ctg acc aag agt tca gtc agc ttt gcc cac tca tgg	Q E Y T T P S G Y L T K S S V S F A H S W
gtg ctt cct gct gaa agc tgc cgt gat gcc agc caa tgc ogc atg aaa ctt gaa tct gtg aag	V L P A E S C R D A S Q C R M K L E S V X
ctg gag aag cag gtg ata ttg aat ggc cag gaa tct aaa tgc tac tct gtt gag cct gtg ctg	L E K Q V I L N G Q E S K C Y S V E P V L
cgt tgt ctg cct ggc tgt <u>gctgacttatctactc</u>	R C L P G C

Fig. 3. Nucleotide and deduced amino acid sequences of Vc216. The predicted amino acid sequence is shown below the nucleotide sequence. The underline characters indicate no homology region to other species.

Vc216	1	R	R	I	Q	T	S	G	T	S	S	P	A	E	43
RT	1	Q		N	Q	R	S	G	R	T	S				43
BT	1	K	A	T	S	N	V	G	D	R	S	E	Q	T	43
KF I	1	K			I	Q	H	N	G	R	A	N	S		43
KF II	1	Q			V	Q	S	T	N	R	S	N	A	T	43
Vc216	44	C	R	K	L	K	Q	I	L	G	Q	K		L	85
RT	44	E	L	K	L	K	Q	S	I	V	D	D	K		85
BT	44	E	S	H	K	K	R	I	F	E	G	V	K		85
KF I	44	E	R	K	L	Q	Q	T	I	H	G	E	T		85
KF II	44	E	Y	Q	L	K	Q	S	L	E	G	E	K		85

Fig. 4. Comparison of the deduced amino acid sequences of carp with other fish species. Residues identical to those of carp vitellogenin are shaded in black. The numbers of residues are shown at the left and right margin. Vc216, common carp (*Cyprinus carpio*) vitellogenin gene; RT, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vitellogenin I gene; BT, blue tilapia (*Oreochromis aureus*) vitellogenin gene; KF I, killifish (*Fundulus heteroclitus*) vitellogenin I mRNA; KF II, killifish (*Fundulus heteroclitus*) vitellogenin II precursor mRNA. Data are taken from Mouchel et al. (1997) for rainbow trout, Teo et al. (1998) for blue tilapia and LaFleur et al. (1995) for killifish 1 and 2.

내었지만, 무지개송어의 vitellogenin I 유전자와 단독으로 비교한 경우에는 85개 아미노산 중 동일 아미노산 73개와 유사 아미노산 2개가 존재하여 85%의 identity와 88%의 homology를 나타내었다. 또한 killifish와 비교한 경우 vitellogenin I mRNA와는 동일 아미노산 64개, 유사 아미노산 9개로 75%의 identity와 85%의 homology, vitellogenin II precursor mRNA와는 동일 아미노산 63개, 유사 아미노산 7개로 74%의 identity, 82%의 homology를 나타내었다. Blue tilapia의 vitellogenin 유전자와 비교한 경우에도 65%의 identity와 73%의 homology가 있음을 보여주었다.

이상의 실험 결과로부터 수컷의 잉어에 bisphenol A를 노출시켜서 얻은 cDNA 클론은 아미노산 배열이 기 보고된 vitellogenin 유전자와 상당히 높은 수준의 homology를 보여줌으로서 본 유전자가 vitellogenin 유전자의 일부임을 시사하고 있으며, 또한 vitellogenin mRNA의 발현이 노출 농도와 노출기간에 의존적인 관계를 나타낸 것으로 보아 bisphenol A에 의해 vitellogenin이 유도되어 발현된 것으로 추정할 수 있었다(Figs. 1, 2). 따라서 본 연구 결과는 적절한 primer를 사용한 RT-PCR 기법을 통해 내분비계 장애물질의 잠재적 위해성을 평가할 수 있음을 보여주었으며 특히 국내 서식 어종인 잉어의 vitellogenin 유전자는 내분비계 장애물질 영향에 대한 국내 모니터링 연구에 중요한 자료로 활용될 수 있음을 보여주었다.

3. 어종에 따른 vitellogenin mRNA의 발현 비교

잉어에서 Vc216이 합성된 primer를 이용하여 어종간 vitellogenin 발현을 비교하였다. 수컷의 잉어, 이스라엘잉어, 스워드테일, 왜물개, 붕어 및 송사리에 2.4 mg/l의 bisphenol A를 노출시킨 후 RT-PCR 반응 산물을 전기영동한

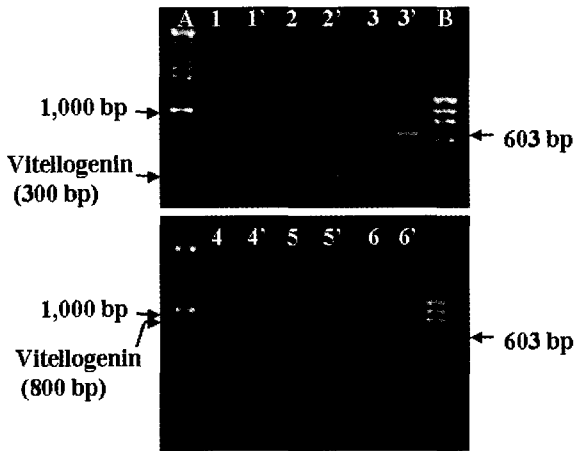


Fig. 5. Comparison of cDNA produced by RT-PCR from different fish species using the same primers for Vc216. Lane A; 500 bp cDNA ladder. Lane B;  $\phi$  174/Hae3 cDNA standard, common carp control group (Lane 1) and bisphenol A treated group (Lane 1'), Israel carp control group (Lane 2) and bisphenol A treated group (Lane 2'), swordtail control group (Lane 3) and bisphenol A treated group (Lane 3'), venus fish control group (Lane 4) and bisphenol A treated group (Lane 4'), crucian carp control group (Lane 5) and bisphenol A treated group (Lane 5'), medaka control group (Lane 6) and bisphenol A treated group (Lane 6'). Only the male adult fishes were used in the test.

결과, 잉어와 이스라엘잉어에서 약 300 bp, 스위드테일과 왜물개에서는 약 800 bp 크기에서 band가 나타났다. 기존 보고에서 북미산메기와 무지개송어의 vitellogenin mRNA의 크기가 827 bp로 나타난 점을 고려하면 스위드테일과 왜물개에서 나타난 band는 vitellogenin 유전자의 일부일 가능성이 있는 것으로 판단되며, 잉어와 이스라엘잉어에서 나타난 300 bp 크기의 band도 본 연구에서 확인한 바와 같이 vitellogenin 유전자의 일부일 가능성이 높은 것으로 추정된다. 한편 송사리와 붕어에서는 본 primer를 이용하였을 경우 vitellogenin 유전자로 추정되는 어떠한 band도 검출되지 않았다(Fig. 5). 이러한 결과는 어종에 따라 bisphenol A에 대한 감수성의 차이가 존재하거나, 시험에 사용한 primer가 적절하지 않았기 때문으로 추정된다. 본 실험에서 검출된 두 종류의 band가 vitellogenin 유전자임을 확인하는 실험이 수행되어야 하겠지만 현재까지의 결과로 볼 때 vitellogenin 유전자는 어종간에 차이가 있는 것으로 판단되며, 보다 많은 연구를 통해 여러 어종에 동시에 적용할 수 있는 primer를 찾아낸다면 RT-PCR법을 이용하여 vitellogenin mRNA 발현을 조사함으로써 내분비계 장애물질의 노출 유무를 판단할 수 있을 것으로 사료된다. 하지만 스위드테일의 경우 국내에 서식하지 않고 다른 어종도 국내 수계에서 채집하기가 쉽지 않으므로 현장 모니터링에 적용하기에는 어려움이 있을 것으로 판단된다. 따라서 현재 본 연구실에서는 국내 하천 및 호소에 가장 널리 분포하는 어종의 하나인 붕어에 적용할 수 있

는 primer를 개발하기 위한 실험을 진행중에 있으며 또한 약 300 bp의 크기를 나타내는 잉어, 이스라엘잉어와 약 800 bp를 나타내는 스위드테일, 왜물개, 무지개송어의 vitellogenin 유전자 사이에 어떠한 차이가 있는지를 분석 중에 있다.

## 참고문헌

- Bauer, B., Fioroni, P., Ide, L., Liebe, S., Oehlmann, J., Stroben, E. and Watermann, B. (1995): TBT effects on the female genital system of *Littorina littorca*: a possible indicator of tributyltin pollution, *Hydrobiology*, **309**, 15-27.
- Blaustein, A.R. and Wake D.B. (1995): The puzzle of declining amphibian populations, *Sci. Am.*, **272**, 52-63.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. and Skakkebaek, N.E. (1995): Declining semen quality and increasing incidence of testicular cancer: is there a common cause?, *Environ. Health Perspect.* **103**, Suppl. 7, 137-139.
- Guillette, L.J. Jr., Gross, T.S., Masson, G.R., Matter, J.M., Percival, H.F. and Woodward, A.R. (1994): Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormones concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida, *Environ. Health Perspect.*, **102**, 680-688.
- Herman-Giddens, M.E., Slora, E.J., Wasserman, R.C., Bourdony, C.J., Bhapkar, M.V., Kock, G.G. and Hasmeyer, C.M. (1997): Secondary sexual characteristics and menses in young girls seen in office practice: A study from the pediatric research in office settings network, *Pediatrics*, **89**, 505-512.
- Heppell S.A., Denslow N.D., Folmar L.C. and Sullivan C.V. (1995): Universal assay for vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens, *Environ. Health Perspect.*, **103**, 9-15.
- Hirai, M., Watanabe, D., Kiyota, A. and Chinzei, Y. (1998): Nucleotide sequence of vitellogenin mRNA in the bean bug, *Riptortus clavatus*: analysis of processing in the fat body and ovary, *Insect Biochem. and Mol. Biol.*, **28**, 537-547.
- Kwon, H.C., Hayashi, S. and Mugiya Y. (1993): Vitellogenin induction by estradiol-17 $\beta$  in primary hepatocyte culture in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Comp. Biochem. Physiol.*, **104B**(2), 381-386.
- LaFleur, G.J. Jr., Byrne, B.M., Kanungo, J. and Nelson, L.D., Greenberg, R.M. and Wallace, R.A. (1995): Fundulus heteroclitus vitellogenin: the deduced primary structure of a piscine precursor to noncrystalline, liquid-phase yolk protein, *J. Mol. Evol.* **41**(4), 505-521
- LaFleur, G.J. Jr., Byrne, B.M., Haux, C., Greenberg, R.M.

- and Wallace, R.A. (1995): Liver-derived cDNAs: Vitellogenins and vitelline envelope protein precursors (choriogenins), *Int. Symp. Reprod. Physiol. Fish*, **5**, 336-338.
- Lech, J.J., Lewis, S.K. and Lifan Ren (1996): *In vivo* estrogenic activity of nonylphenol in rainbow trout, *Fund. Appl. Toxicol.*, **30**, 229-232.
- Moccia, R.D., Leatherland, J.F. and Sonstegard, R.A. (1981): Quantitative interlake comparison of thyroid pathology on Great Lakes coho (*Oncorhynchus kisutch*) and chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) salmon, *Cancer Res.*, **41**, 2200-2210.
- Mouchel, N., Trichet, V., Naimi, B.Y., Le Penne, J.P. and Wolff, J. (1997): Structure of a fish (*Oncorhynchus mykiss*) vitellogenin gene and its evolutionary implication, *Gene*, **197**(1-2), 147-152.
- Nathalie Mouchel, Valerie Trichet, Alexis Bets, Jean-Paul Le Penne and Jacques Wolff (1996): Characterization of vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Gene*, **174**, 59-64.
- Purdom, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.J., Eno, N.C., Tyler, C.R. and Sumpter, J.P. (1994): Estrogenic effects of effluents from sewage treatments work, *Chem. Ecol.*, **8**, 275-285.
- Shiv Hiremath and Kirsten Lehtoma (1997): Complete nucleotide sequence of the vitellogenin mRNA from the gypsy moth: novel arrangement of the subunit encoding regions, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **27**, 27-35.
- Sumpter, J.P. and Jobling, S. (1995): Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment, *Environ. Health Perspect.*, **103**, 173-178.
- Teo, B.Y., Tan, N.S., Lim, E.H., Lam, T.J. and Ding, J.L. (1998) A novel piscine vitellogenin gene: structural and functional analyses of estrogen-inducible promoter, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **146**(1-2), 103-120.
- Wallace R.A. and Bergink W. (1974): Amphibian vitellogenin: Hormonal regulation of hepatic synthesis and ovarian uptake, and conversion to yolk proteins, *Am. Zool.*, **14**, 1159-1175.