工學碩士 學位論文

다이아지논이 송사리 행동과 생물지표로서 Tyrosine Hydroxylase 활성에 미치는 영향

Effect of Diazinon on Behavior and Tyrosine Hydroxylase Activity as a Biomarker in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*)

指導教授 高 星 澈

2001年 2月

韓國海洋大學校 大學院

土木環境工學科

申 聲 佑

본 論文을 申聲佑의 工學碩士 學位論文으로 認准함.

위원장 : 송 영 채 (인)

위 원 : 김 인 수 (인)

위 원 : 고 성 철 (인)

2000년 12월 22일

韓國海洋大學校 大學院

土木環境工學科 申 聲 佑

목 차

List of Tables ···································· ⅳ

List of Figures ···································· ⅴ

ABSTRACT ···································· ⅶ

Ⅰ. 서 론 ···································· **1**

Ⅱ. 연구 배경 및 목적 ···································· **3**

2.1 **다이아지논의 특징 및 환경독성** ···································· 3

2.2 **생태적 위해성 평가에 대한 연구 동향** ···································· 6

2.3 **독성물질에 대한 생리·화학적 연구 동향** ···································· 7

2.4 **연구 필요성 및 목적** ···································· 8

Ⅲ. 실험 재료 및 방법 ···································· **11**

3.1 **화학약품 및 실험어류** ···································· 11

3.1.1 **화학약품** ···································· 11

3.1.2 **실험어류** ···································· 11

3.2 **송사리의 행동반응 조사와 이미지 구현** ···································· 11

3.3 AChE **정량 및 신경전달물질**(neurotransmitter)**의 측정** ···································· 12

3.4 **송사리** ovary cDNA library **및** TH **유전자의** cloning ···································· 13

3.5 **조직 시료 준비 및 총** RNA **추출** ···································· 13

3.5.1 **조직 시료 추출 및 정제** ···································· 13

3.5.2 총 RNA 추출 및 정제 14
3.6 비방사성(non-radioactive) DIG 시스템을 이용한 Northern blot 분석 14
3.7 TH 유전자의 발현 모니터링 16
3.7.1 면역조직화학(immunohistochemistry) 16
3.7.2 RT-PCR 반응 16
3.7.3 Semiquantitative RT-PCR 반응 17
3.7.4 *In situ* 혼성화 반응 18

Ⅳ. 연구 결과 및 고찰 19
4.1 다이아지논 처리에 따른 송사리 행동변화 19
4.1.1 다이아지논 처리 시 이상행동 관찰 19
4.1.2 송사리 반응 행동궤적과 AChE 활성과의 관계 21
4.2 송사리의 AChE 효소활성 및 신경전달물질 효소활성의 측정 26
4.2.1 AChE 효소활성 26
4.2.2 Monoamine oxidase 활성 변화 29
4.3 송사리의 TH 효소활성 31
4.4 송사리의 TH 유전자의 cloning 35
4.4.1 TH 유전자 단백질 아미노산 순서 결정 35
4.4.2 TH 유전자 발현추적을 위한 RT-PCR primer 디자인 35
4.5 송사리의 총 RNA 추출 및 Northern blot 38
4.5.1 총 RNA 추출 38
4.5.2 Northern blot 혼성화 반응에 의한 유전자의 발현조사 39
4.6 면역조직화학(immunohistochemistry)에 의한 TH 단백질의 조직별 발현 41

4.7 **송사리의** TH **유전자의 발현을 추적하기 위한** RT-PCR 43
4.7.1 Diazinon **처리 농도별 및 시간별** RT-PCR 43
4.7.2 TH **유전자의** RT-PCR **및** semiquantitative RT-PCR 46
4.8 *In situ* **혼성화 반응에 의한** TH **유전자의 조직별 발현의 정량적 검출** 49

Ⅴ. 결론 **51**

Ⅵ. 향후 연구 과제 **53**

REFERENCES

List of Tables

Table 4.1 Time course of behavioral toxicity of diazinon in Japanese medaka 20
Table 4.2 Change in acetylcholine esterase activity of Japanese medaka exposed to diazinon (5ppm) for different periods 27
Table 4.3 Change in norepinephrine and serotonin contents of Japanese medaka exposed to diazinon (5ppm) for different periods 32

List of Figures

Fig. 2.1 Structure of diazinon used in this study 4

Fig. 2.2 Biosythetic pathway of catecholamines from phenylalanine 5

Fig. 2.3 OPPT environmental risk assessment process 10

Fig. 4.1 The locomotive tracks of Japanese medaka for the surface movement when not treated with diazinon 22

Fig. 4.2 The locomotive tracks of Japanese medaka for the surface movement when not treated with diazinon 23

Fig. 4.3 The locomotive tracks of Japanese medaka for the intervention of irregular turns when treated with diazinon 0.1 ㎎/L 24

Fig. 4.4 The locomotive tracks of Japanese medaka for the intervention of irregular turns when treated with diazinon 0.1 ㎎/L 25

Fig. 4.5 Inhibition of acetylcholine esterase in Japanese medaka exposed to 0.1 ppm diazinon for different periods 28

Fig. 4.6 Changes of monoamine oxidase in Japanese medaka by exposure to different concentrations of diazinon 30

Fig. 4.7 TH activity in Japanese medaka exposed to different concentrations of diazinon for 24 hrs 33

Fig. 4.8 Change of TH activity in Japanese medaka exposed to 0.1 ppm diazinon for different periods 34

Fig. 4.9 Nucleotide and deduced amino acid sequences of tyrosine hydroxylase from Japanese medaka 36

Fig. 4.10 Comparison of amino acid sequences of tyrosine

hydroxylase. 37
Fig. 4.11 Isolation of total RNA from Japanese medaka 38
Fig. 4.12 Monitoring of TH gene expression in Japanese medaka (body) treated with diazinon through Northern blot hybridization 40
Fig. 4.13 Localization of TH-expressing cells in selected regions of the Japanese medaka 42
Fig. 4.14 Effect of diazinon concentration on the tyrosine hydroxylase (TH) gene expression in the body of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) treated with diazinon overnight 44
Fig. 4.15 Time course of tyrosine hydroxylase (TH) gene expression in the body of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) treated with diazinon (5 ppm) 45
Fig. 4.16 Effect of diazinon concentration on the tyrosine hydroxylase (TH) gene expression monitored by RT-PCR in Japanese medaka treated with diazinon 47
Fig. 4.17 RT-PCR of total RNA from head and body tissues of Japanese medaka using rat actin gene primers 48
Fig. 4.18 *In situ* hybridization for the detection of TH gene expression in head tissue of Japanese medaka treated with diazinon 50

ABSTRACT

Nowadays environmental pollutants have not only increased in quantity but also changed dramatically in quality. In other words, the release of hazardous waste materials into the environment poses serious risks in humans and ecosystem. In order to minimize their environmental risks caused by the wastes the developed countries have established systems for toxicity evaluation of hazardous chemicals, legislation for their proper management plan, and their efficient administration program. Ecological risk is equivalent to product of exposure and hazard of specific chemical or a mixture of chemicals. The risk assessment, therefore, requires a comprehensive measurement of exposure and hazard of the chemicals that can be achieved by toxicity evaluation using a biological system. The biological system includes biomarkers that are molecular and physiological indicators of chemical stress.

Diazinon [O,O-diethylO-(2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimidinyl) phosphorothioate], is an organo-phosphorous insecticide widely used for the control of agricultural and household pests, the toxic effects of which are mainly due to the inhibition of cholinesterase. Diazinon shows a high toxicity to organisms, especially fish and aquatic invertebrates although it has relatively low toxic effects on mammals and humans.

In this study we have tried to develop a biomarker used to elucidate a molecular basis of, and to monitor abnormal behavior caused by diazinon in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) as a model organism. For monitoring experiments at behavioral and molecular biological levels, the fish were treated under different sublethal conditions of diazinon and their behavioral responses were observed.

Organ or tissue-specific detection of TH activity and mRNA as biomarkers will be a useful monitoring tool for neurobehavioral changes in fish influenced by toxic chemicals. Furthermore, quantitative analysis of locomotive patterns and its correlation with the neurochemical and molecular data would be highly useful in measuring toxicity and hazard of various environmental pollutants. This study provides molecular and neurobehavioral bases of a biomonitoring system for toxic chemicals using a model organism such as fish.

Key words; Diazinon, Japanese Medaka (*Oryzias latipes*),
Tyrosine Hydroxylase(TH), Biomonitoring, RT-PCR,
Semiquantitative RT-PCR, Immunohistochemistry

Ⅰ. 서 론

오늘날 환경문제의 접근은 비용절감이 되는 미소 독성 시험(microscale toxicity test)의 개발과 적용으로 환경 독성평가의 획기적인 발전이 이루어지고 있다. 이들 방법이 축소화, 신속화, 자동화의 장점을 지니게 됨으로써 환경모니터링과 환경질의 개선에 유용한 도구로 활용되게 되었다. 이전의 전형적 환경오염 분석은 건강영향을 평가하는 방법으로는 미흡하다는 우려가 증가되고 모든 화학물질을 분석하기에는 고비용이 소요될 뿐만 아니라 신뢰도가 낮다고 지적되고 있다. 또한 화학적 분석법 단일로는 독성반응(toxicity response)과 생체이용률(bioavailability)의 복합적 예측이 불가능하다. 따라서 환경오염평가에 있어서 진보된 분자생물학적 기법의 적용이 필요하게 되었다.

유기인산염(organophosphate)의 개발은 해충구제에 일대 전기를 마련하였다. 유기인산염은 포유동물에 맹독성이므로 농약 취급자와 살포자에게도 유해성이 크다는 것이 유기인산계 농약의 단점이다. 유기인산계 농약은 농작물, 식물, 동물 등에 대한 살균제 및 살충제로서 이용되고 있다(1). 본 연구에 사용된 다이아지논은 유기인계 농약으로서 전 세계적으로 농업용수를 포함한 각 종 지표수를 오염시키고 있다. 이들 유기인계 또는 그 분해산물은 적은 농도에서도 상대적으로 높은 급성독성을 나타내며 더구나 생체 내에 축적이 되어 생리적 교란, 행동 및 형태적 변화를 가져오는 것으로 알려지고 있다. 대부분의 유기인산계 농약은 어떠한 형태든지 신경장애(neuropathy)를 일으킨다(3).

동물의 행동에 있어서 도파민의 역할관련을 살펴보면, 파킨슨씨병은 흑질과 선조체(미상핵과 피각)에서 이상이 발생한 것이며, 흑질에서 뇌내 다른 부분과 선조체(운동, 균형, 걸음)로 가는 시냅스에서 도파민이 결손

되어 병이 생긴다(27,30). 또한 Tyrosine Hydroxylase(TH)는 tyrosine으로부터 DOPA를 합성하는 과정에 작용하는 효소로서 신경전달물질인 도파민, 노르에피네프린(norepinephrine), 에피네프린(epinephrine) 등의 합성속도를 조절하는 역할을 한다. 발달중의 쥐 배아(fetal) 두뇌에서의 TH 관련 페놀아민(phenolamine)과 카테콜아민(catecholamine) 합성경로가 보고되고 있다 (12). 아세틸콜린에스트라아제(AChE)는 콜린에스테라아제중에서 기질특이성이 높고, 특히 아세틸콜린을 중심으로 아세트산에스테르를 분해하는 효소이며, 콜린작동성뉴런의 신경전달물질인 아세틸콜린을 분해하여 흥분전달의 뒤처리를 하는 중요한 생리적 기능을 가진다(14).

본 연구의 결과에 의하면, AChE 활성의 변화와 비정상적인 운동(행동)간에는 서로 상관 관계가 있을 것으로 관찰되었다. 따라서 신경전달물질(예: 아세틸콜린 및 도파민 등)의 생성 및 대사작용과 행동과의 인과관계를 검토함으로써, 어류나 기타 동물의 독성물질처리에 따른 행동을 궁극적으로 분자생물학적 방법으로 분석이 가능할 것이다. 송사리의 다이아지논 처리에 의한 이상적 신경행동 변화는 TH 활성의 저해가 있을 것으로 보인다. 이는 조직 내에서의 *in situ* 시스템을 이용한 TH 유전자 및 단백질 발현의 정량적 농도 검토를 통하여 가능할 것이다.

따라서 본 논문의 결과는 생물지표를 이용한 환경독성물질의 영향평가를 효율적으로 수행하기 위한 생물지표의 탐색 및 개발하는데 크게 기여할 것이며, 수리 및 전산 추적 시스템과 연계하여 환경오염물질의 감지 시스템의 확립을 통한 환경위해성 평가에 상당한 발전이 예상된다.

Ⅱ. 연구 배경 및 목적

2.1 다이아지논의 특징 및 환경독성

다이아지논(Figure 2.1)은 유기인산계 농약으로서 농작물이나 가정의 해충구제로서 전 세계적으로 농업용수를 포함한 각 종 지표수를 오염시키고 있다. 이들 유기인계 또는 그 분해산물은 적은 농도에서도 상대적으로 높은 급성독성을 나타내며 더구나 생체 내에 축적이 되어 생리적 교란, 행동 및 형태적 변화를 가져오는 것으로 알려지고 있다. 특히 중추 신경계에 작용하여 행동의 변화를 초래하며 다이아지논의 주 독성효과로서 콜린에스트라아제(cholinesterase)의 효소활성을 억제시킨다(37). 다이아지논은 환경 내에서 급속하게 분해되어지며, 수생환경으로의 지속적인 유입으로 인하여 어류에 독성 영향을 초래한다. 이런 살충제는 급성 독성이며, 수많은 비표적 종(nontarget species)에 많은 영향을 미친다. 다이아지논은 어류에 비교적 높은 독성을 가지며, 낮은 농도에서도 척추손상의 원인이 되며, 그리고 어류의 행동변화에 영향을 미친다(6,18,41). 살충제에 의한 행동변화는 대부분 신경전달물질인 아세틸콜린, 세르토닌 그리고 노르에피네피린을 변화시키는 것으로 관련된다. 도파민을 포함한 카테콜아민의 합성경로는 Figure 2.2에 제시하였다.

본 연구에 다이아지논을 사용한 이유를 살펴보면, 다이아지논은 벼, 배추, 사과, 복숭아 등에 살포하며 접촉중독, 소화중독, 및 가스중독에 의하여 살충효과를 나타낸다. 다이아지논은 국내에서 가장 많이 사용되는 유기인계 농약의 하나로서 수서 생물에 대한 독성이 강하다. 하천으로 유입되는 경로는 농약제조공장으로부터 직접 하천으로 유출되는 경우와 농약살포에 따른 하천 유입 등이 있다. 다이아지논은 수서 생물뿐 아니

라 인체에 대한 독성도 강하여 음용수 수질기준에도 다이아지논 기준치는 0.02 ㎎/L(또는 20 ppb)로 유기인계농약중 가장 낮게 정해져 있다(파라티온 0.06 ㎎/L이하, 말라티온 0.25 ㎎/L이하, 페니트로티온 0.04 ㎎/L이하). 그러나 하천과 호소의 수질 기준항목에는 포함되어 있지 않아 수서 생물을 농약류로부터 보호할 수 있는 장치가 현재로서는 없는 실정이다.

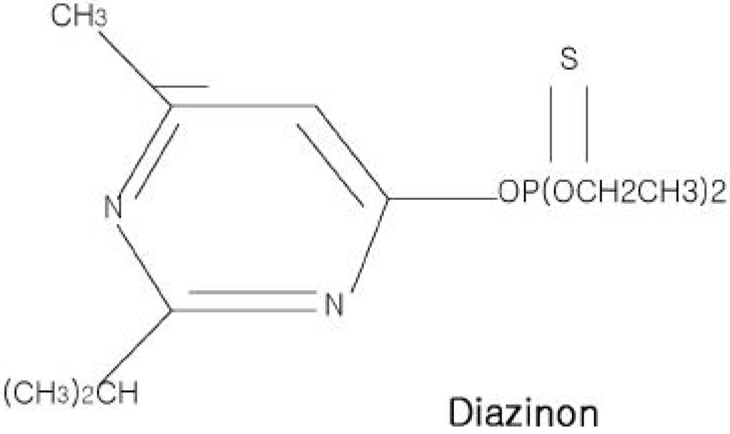


Fig. 2.1 Structure of diazinon used in this study

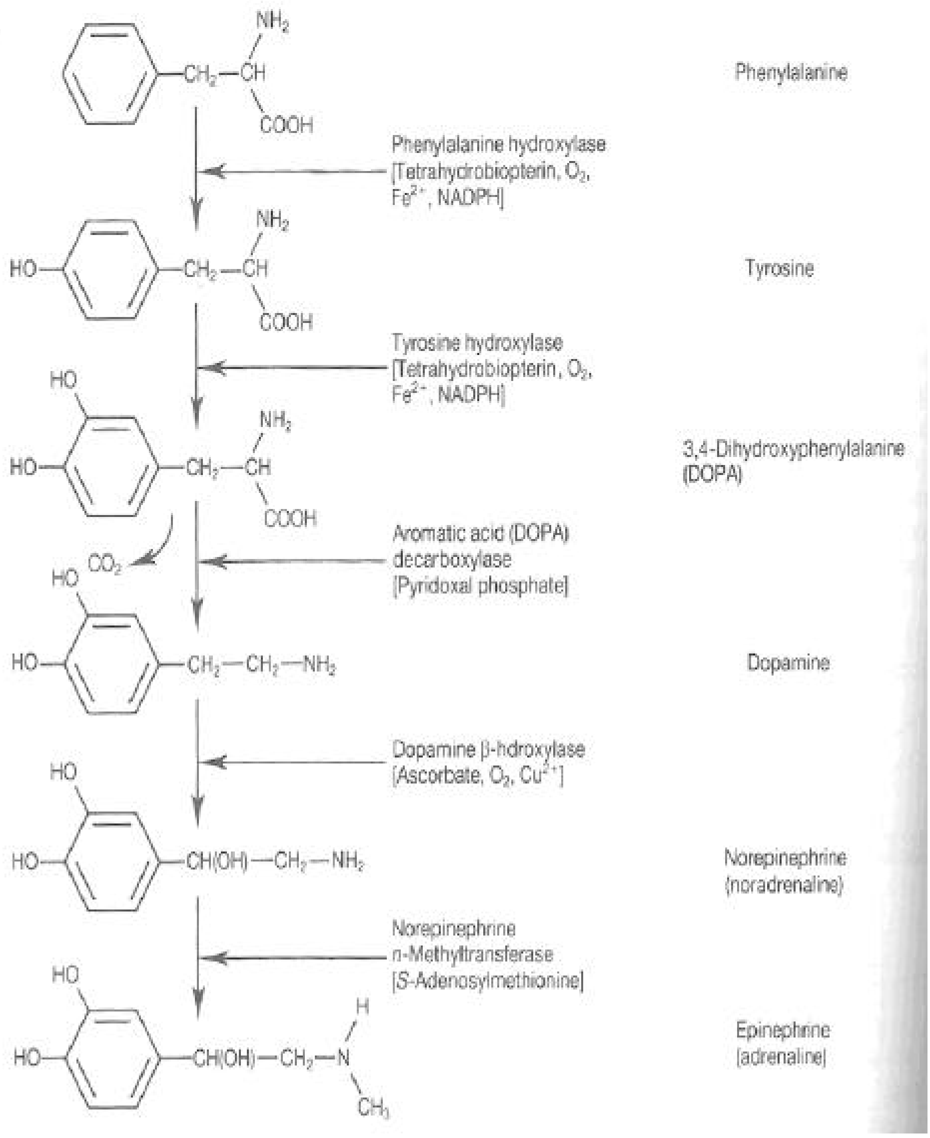


Fig. 2.2 Biosythetic pathway of catecholamines from phenylalanine. The enzymes catalyzing each step of the synthetic pathway are shown and their cofactors are bracketed (Smith, 1996)(28)

2.2 생태적 위해성 평가에 대한 연구 동향

산업화와 도시화에 수반되는 환경오염의 증가에 따라 이를 감소시키기 위한 연구가 활발해지고 있다. 특히 공해물질에 의하여 인간을 포함한 생명체에 치명적인 영향이 발휘되기 전에 이를 예방하고자 하는 다각적인 시도가 선진국을 중심으로 이루어지고 있으며, 우리나라도 최근 들어 연구가 활성화되고 있는 추세이다.

생태학적 위해성 평가에서 가장 근본적인 과제는 환경으로의 화학물질 유출과 그것이 생물체에 줄 영향을 정확히 예측하는 것이다. 생물학적 수용체에 가해지는 위해는 오염물질이 환경(공기, 물, 토양, 식품)으로 유출되면서 시작된다. 오염된 환경매체에 생물체가 노출되는 정도를 외적 용량(external dose)으로 정의하며, 오염물질이 생물체내로 유입된 이후의 농도를 내적 용량(internal dose)으로 정의한다. 생물체가 반응을 나타내는데 필요한 용량을 생물학적 유효량(biologically effective dose)으로 정의한다. 전통적으로 환경위해성은 환경매질 중에 잔존하는 오염성분의 함량으로 평가되었다.

그러나 이러한 방법은 몇 가지 한계점을 가지고 있다. 첫째로 환경 중에 잔류된 화합물을 정량 하는 것이 쉽지 않고 비용이 많이 소요되는 경우가 많다. 둘째로 생물에 의한 이용률(bioavailability)을 이러한 방법으로는 정량화 할 수 없다는 것이다. 예를 들어 환경매질, 화학물질, 생물체의 종류 등에 따라 실제로 오염물질이 생체로 흡수되는 정도는 크게 차이가 난다. 이러한 문제점을 극복하기 위해서 생물체로부터 조직을 채취하여 오염성분을 분석하는 방법을 고려할 수 있지만 엄청난 비용때문에 비현실적이다. 따라서 이화학적 기법에 의한 독성물질의 잔류량 검색만으로 한계가 있으므로, 총체적인 오염상태와 건강성을 파악할

수 있는 생물학적 독성 평가기법(bioassay)의 사용이 필요하다(34).

이러한 문제를 해결하기 위하여 생물지표를 이용한 독성평가 방법이 등장하였다. 미국 과학한림원(National Academy of Sciences)은 생물지표를 “xenobiotic(생체 외 이물질)에 의해서 유도된 생물체의 세포학적 또는 생화학적 변화”로 정의하고 있다. 따라서 유기체내의 생체 외 이물질, 또는 그 대사물, 이들에 의해서 야기된 생물체내의 변화들을 ‘생물지표’로 분류할 수 있다. 예를 들어 PCBs(polychlorinated biphenyls)나 PAHs(polycyclic aromatic hydrocarbons), 일부 농약류등 유독성 생체 외 이물질은 1상계 효소들을 활성화시키는 것으로 알려져 있으므로 이들의 활성변화를 측정하면 생물체가 독성물질에 유해수준으로 노출되었는지 간접적으로 평가할 수 있다.

2.3 독성물질에 대한 생리·화학적 연구 동향

앞에서 언급한 효소 연구는 독성물질에 대한 주요 생리·화학적 연구로 대두되고 있다. 이러한 1상계효소의 유도는 생물체 자체의 보호기작인 것으로 생각되며 동물계에서 일반적으로 일어나는 현상이다. 따라서 1상계효소는 좋은 생물지표가 될 수 있을 것으로 생각된다. 특히 환경중에 주요한 독성성분이 농약, PCB, PAHs로 보고되어 있으므로 어류가 이들에 생리적으로 유해한 농도로 노출되었을 경우 1상 효소계가 활성화되었을 가능성이 높다. 예를 들어 어류가 원유에 노출되었는지 여부를 판정하는 생물지표로 1상계효소가 사용될 수 있음이 여러 연구자들에 의해서 보고되었다(Hohnston, 1995)(23). Fossi등은 유기인계 살충제인 azamethiphos에 노출된 일본 꿩(*Coturnix japonica*)의 혈청 butyrylcholinesterase(BChE)와 카르복실에스트라아제(carboxyesterase) 활성이 현저하게 저하된 것을 보고하였으며, 환경독성평가에서 비 파괴

적인 생물지표로 이용될 수 있음이 보고되었다(Fossi 1992)(16). 글루타치온 S-전이효소(Glutathione S-transferase)나 퀴논 환원효소(quinone reductase)는 독성물질의 대사와 관련된 2상 효소계로서 일부 연구에서 독성물질의 노출여부를 평가하기 위한 생물지표로 사용되었다(Beyer 1994, Soimasuo 1 1995, Celander 1994)(7,9,42). 즉, 동물이 PAH류와 같은 독성물질에 노출되면 이에 대한 반응로서 세포 내 1상 효소계나 2상 효소계의 활성이 증가하게 되는데 이러한 특성을 이용하여 환경독성물질에 노출여부를 판단하는 근거로 사용될 수 있다.

생물지표로 최근에 개발된 vitellogenin(VTG)은 환경 중에 존재하는 에스트로겐(estrogen) 유사활성물질을 탐색하는데 사용된다. 이 단백질을 증가시키는 환경공해물질은 생물의 암수비율을 변화시킴으로서 생태계에 지대한 영향을 미칠 수 있다(Heppel 1995)(20). VTG는 새(avian)와 양서류(amphibian)등의 산란성 척추동물의 난황 전구체이며, 성숙한 암컷에서 생식시기에 분비되는 호르몬인 에스트로겐에 의해 간에서 합성되어진다(Wallace, 1985; Specker et al, 1994). 자연 에스트로겐과 알킬페놀 그리고 그 분해산물을 포함한 쓰레기 처리 공장 배출수가 복합적으로 배출되는 지역에 무지개 송어를 인공 서식시킨 결과, 물고기에서 VTG가 생성되었다는 보고가 있다(Gamble, 1998). 또한 에스트라아제와 AHH(arylhydrocarbon hydroxylase)는 신경독성의 생물지표로 유용한 것으로 보고되어 있다(Fournier 1996)(17).

2.4 연구 필요성 및 목적

환경오염은 오염원인 물질을 크게 두 가지로 구분해 볼 수 있는데, 그 하나는 유기물질(organic matters)에 의한 오염이고, 둘째는 화학물질(inorganic and organic chemicals)에 의한 오염이라고 할 수 있다. 유

기물질에 의한 오염문제는 오래 전부터 환경공학에서 다루어져 온 부분이기 때문에, 처리 및 관리 기술이 비교적 잘 개발되어 있다. 그러나 화학물질(특히 유기화학물질)에 의한 오염문제는 비교적 최근(1970년 이후)에 대두된 것으로, 우리가 사용하고 있는 화학물질의 사용량과 종류가 증가하는 것과 비례하여, 그 심각성도 크게 증가하고 있다. 이와 같은 화학물질의 위해성의 특징은 1) 인체와 환경에 광범위하게 노출되고, 2) 매체간 이동과 생물농축을 통한 피해의 광역화, 3) 비가시적이고, 잠재적 위해성을 내포하고 있다는 점이다. 이러한 유해화학물질들은 기존의 규제방법으로는 효과적으로 대처할 수 없기 때문에, 선진각국에서는 생태독성학적 개념을 환경관리에 도입하고 있는 실정이다. 따라서 폐수에 포함된 유해화학물질의 유입을 최소화하여, 인간의 건강과 수서 생태계의 보전이라는 수질관리의 목표를 달성하기 위해서는, 여러 가지 생태독성학적 개념이 수질관리에 도입되어야 할 것이다. 미 환경처(US EPA) 산하 공해방지 및 독성물질 관리부서(OPPT) 의 위해도 평가 4단계를 Figure 2.3에 나타내었다.

본 연구의 목적은 생물지표를 이용한 환경독성 물질의 영향평가를 효율적으로 수행하기 위한 생물지표의 탐색 및 개발과 생물지표를 이용한 생화학적 독성 메카니즘을 규명하며, 독성물질의 모델 생물체의 행동변이와 관련된 세포 수준의 생리적 메카니즘을 규명한다. 그 생물지표의 한 모델로서 어류(송사리 및 기타 수서 곤충)를 선정하여 다이아지논 및 기타 환경오염물질이 이들의 행동에 어떠한 영향을 미치는지(독성메커니즘)를 생화학적 및 분자생물학적 측면에서 검토하는 것이다. 따라서 본 연구의 세부적 목표는 다음으로 요약된다.

(1) 환경독성물질(다이아지논 등)이 송사리에 미치는 생화학적 독성 평가

(2) 환경독성물질에 대한 송사리의 행동이상과 생화학적 변이와의 관

계를 규명

(3) **생물지표로서의** TH **발현의 분자생물학적 분석**

따라서 본 연구는 주요한 환경오염물질의 독성반응에 민감한 생물지표의 확립이 가능할 것이고 이는 독성물질에 대한 이상반응행동의 수리적 추적시스템과 연계하여 궁극적으로 환경오염물질의 감지시스템의 확립이 가능할 것이며 나아가 환경관리에 있어서 생태독성시험의 활용을 통한 환경 위해성 평가에 상당히 기여할 것이다.

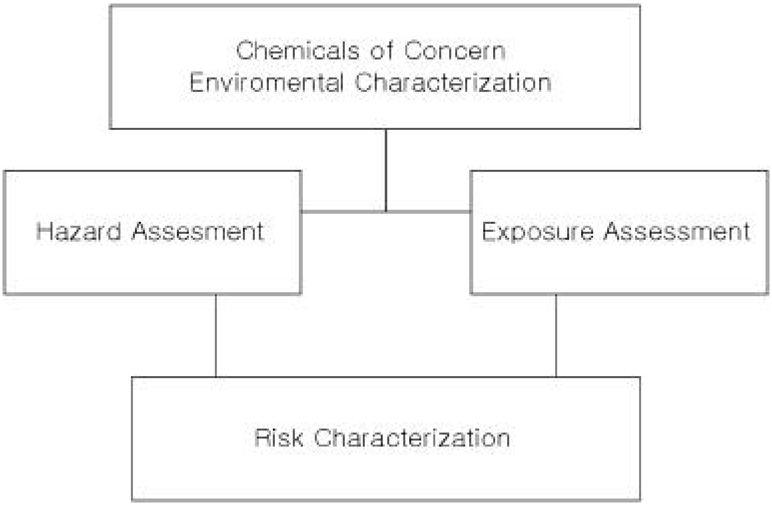


Fig. 2.3 OPPT environmental risk assessment process

Ⅲ. 실험 재료 및 방법

3.1 화학약품 및 실험어류

3.1.1 화학약품

다이아지논(순도: 99%)은 Wako pure chemical industry, LTD(일본)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 1차 실험 시에는 다이아지논을 유기용매인 dimethylsulfoxide(DMSO)를 10 mg/L에 용해시켜 사용하였고, 2차 실험 시에는 Merk index 용해도 60 mg/L (20℃)를 참조하여 다이아지논을 탈 염소 처리된 수도 수에 약 한 시간정도 용해를 시킨 후 정적인 환경상태 하에 송사리에 노출하였다(43).

3.1.2 실험어류

송사리(*Oryzias latipes*)는 한국화학연구소 안전성 연구부(대전)에서 분양 받아서 실험실 조건(실내온도 20℃ 수온 22℃)에서 적응시킨 후 실험어류로 사용하였다. 수조상(40 × 22 × 40cm)에서 탈 염소처리된 수조수(pH=6.5-7.3) 30 L에서 24시간 산소 폭기를 시켜주었다. 적응기간부터 노출실험이 진행되는 동안 산소 폭기를 계속 유지하였고, 먹이는 매일 필요한 양을 주었으나, 노출실험 동안에는 전혀 주지 않았다.

3.2 송사리의 행동반응 조사와 이미지 구현

송사리의 행동 반응 실험은 P대학교 생태·행동 팀의 협조로 5 L 수

조상(40 × 22 × 40cm)에서 각각 실험을 하였고, 그리고 4일간동안 CCTV 카메라를 통하여 연속적으로 관찰하였다. 송사리의 행동은 CCTV 카메라, 비디오, 이미지 조합 프로그램, 궤적 추적 프로그램, 컴퓨터 등으로 구성된 자동연속관찰체제(observation system)를 통해 연속적으로 관찰하고 데이터를 기록하였다.

다이아지논에 처리된 송사리의 이동궤도(locomotive tracks)를 정량적으로 나타내기 위하여 2차원적 퓨리에 전환식(Two-Dimension Fast Fourier Transform(2D-FFT)) 분석(MATLAB® 5.2, The Mathworks, Inc., 1995)을 수행하였다. 시간변수(time domain)로 나타내어진 송사리의 궤적은 2차원적 퓨리에 전환식을 이용하여 빈도변수(frequency domain)로 변환하여 이미지로 나타냄으로써, 각각의 특정 궤적을 강조하여 표출할 수 있었다. 또한 송사리를 다이아지논의 단계별 농도에 시간별로 노출시켜 일반적인 장·단기 행동반응(특이한 활동성, 활동성 변화, 궤적유형 변화 등)을 지속적으로 관찰하였다.

3.3 AChE 정량 및 신경전달물질(neurotransmitter)의 측정

본 연구의 다양한 신경전달물질과의 비교·검토를 위하여 K대학교 생화학 연구실에서 신경전달물질의 효소활성 측정을 실시하였다. 아세틸콜린 에스트라아제(AChE) 정량은 다양한 다이아지논의 농도에 노출된 송사리를 각각 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 그리고 12 시간으로 수행하였으며, 송사리의 머리와 몸통부분 AChE 활성의 측정은 기질로서 45 mM 인산염완충제(phosphate buffer), pH8.0, 0.56 mM 아세틸콜린을 이용한 Eltman 방법을 사용하였다(17). 아세틸콜린, 노르에피네피린 그리고 세르토닌

정량은 Augustinson와 Jacobowitz 방법을 사용하였으며(5,22), 모든 조직의 단백질 정량은 소 혈청 알부민(bovine serum albumin)을 이용한 Lowry 표준방법을 따랐다(29).

3.4 송사리 ovary cDNA library 및 TH 유전자의 cloning

일본의 Japanese medaka Fish Research Community(나고야대학)로부터 송사리 ovary cDNA library를 분양 받아서 1차 증식을 통하여 본 연구에 필요한 충분한 양을 확보하기 위하여 K대학교 생화학과에 의뢰하여, 송사리 cDNA library를 ZAPⅡ 벡터(vector)에 클론 하였다. 이를 forward primer(18mer) 및 reverse Primer(19mer)를 제조 한 후 library의 TH cDNA 단편(fragment)을 증폭하였다. F´One Shot kit (Invitrogen; Rockville, MD)로 형질 전환하였으며, PC 유전자 컴퓨터 프로그램(PC Gene computer program)에 의해서 sequence를 분석하였다.

3.5 조직 시료 준비 및 총 RNA 추출

3.5.1 조직 시료 추출 및 정제

다이아지논으로 처리된 송사리를 액체질소에 순간적으로 냉동한 후, 머리와 몸통으로 잘라서 각각 분리하여 실험에 사용하였다. 조직의 균질화는 Polytron homogenizer를 이용하여 대략적으로 20 mg 조직당 1 ml의 phosphate buffer(pH 8.0, 0.1 M)를 사용하였다.

3.5.2 총 RNA 추출 및 정제

총 RNA 추출은 액체질소에 냉동한 송사리를 머리와 몸통으로 잘라서 각각 분리한 후, RNA 추출 Kit(RNAwiz-Ambion, Inc., 텍사스)및 homogenizer를 이용하여 각각 총 RNA를 추출하였다. RNA 추출을 위한 용액은 모두 0.1% DEPC로 처리한 3차 살균 증류수를 사용하여 제조하였다. 송사리 100 mg 조직당 1 ㎖ RNAwiz를 사용하였고, homogenizer를 이용하여 조직을 완전히 파쇄한 후 균질화하였다. 이후 실험은 RNA 추출 Kit(RNAwiz)에서 제공하는 실험방법에 의하여 실시하였다. 이후에 남아 있을 잔류 DNA의 제거를 위해 100 U RQ1 DNase(1 U of DNase/5g of RNA; Promega, 위스콘신)를 넣고 37℃에서 1시간 정도 반응시켰다. 재 용해 시킨 RNA의 분석은 UV/VIS 분광광도계(Jasco International Co., 일본)와 1% 변성 아가로스 gel(denaturation agarose gel) 전기영동장치를 이용하였다.

3.6 비방사성(non-radioactive) DIG 시스템을 이용한 Northern blot 분석

(1) 변성 gel을 통한 RNA 전기영동

포름알데히드 gel(formaldehyde gel) RNA 전기영동은 Lehrach 등(1977), Goldberg(1980), 그리고 Seed(1982) 방법에 준하여 실시하였다. 먼저 5× 포름알데히드 gel-running buffer를 준비하고, 아가로스(agarose)를 용해시킨 gel을 60℃까지 식혀서 준비된 5× 포름알데히드 gel-running buffer와 포름알데히드를 더하여 1시간정도 실온에 두어서 gel을 식혔다. 추출한 RNA 샘플을 30 ㎍이상을 준비한 후, 5× 포름알

데히드 gel-running buffer와 포름알데히드 그리고 foramide를 넣고 혼합하여 65℃ 10분간 변성시킨 후 전기영동장치에 gel을 분석하였다.

(2) 변성된 RNA의 이동(transfer)

먼저 whatman 종이를 길에 늘어 뜨려서 10×의 SSC(sodium chloride-sodium citrate)에 충분히 적신 후, 그 위에 nylon membrane를 놓고 변성된 RNA를 위에 두었다. Gel을 랩으로 완전히 씌운 다음에 가장자리 부분만 용액이 들어갈 수 있도록 자른 후, 10×의 SSC(sodium chloride-sodium citrate)에 완전히 잠긴 whatman 종이를 놓고 그리고 유리병을 올려서 무게를 실어주고 수평을 맞추었다. membrane에 완전한 흡입을 시키기 위하여 12시간 이상 실시하였고, 완전 흡입 완료 후 membrane을 10× SSC(10 ㎖)로 2번 헹구어 냈다. 그 후에 nylon membrane을 실온에서 건조시켜 80℃에서 1시간 동안 완전히 변성된 RNA를 영구히 고정화시켰다. 혼성화 반응 실험 때까지 nylon membrane을 플라스틱 bag에 놓고 건 냉소 암실에서 보관하였다(8,29).

(3) DNA::DNA 및 RNA::DNA slot blot 혼성화 반응(hybridizations)

Slot blot 혼성화 반응은 Koh 등의 방법에 준하여 실시하였다(26). 먼저 단위 100 ㎠ membrane 필터 당 혼성화 용액을 100 ㎖을 넣어 2시간 동안 예비 혼성화 반응(prehybridization)시켰다. 용액을 버린 후 단위 100 ㎠ filter당 혼성화 용액 25 ㎖을 다시 주입하였다. 혼성화 용액 ㎖ 당 15 ng의 농도로 probe를 주입하고 55℃에서 하룻밤동안 정치하였다. 필터 세정용액은 세척 1(wash 1), 세척 2(wash 2)를 사용하였으며, blocking 반응을 한 후 buffer 2를 항체 용액으로 사용했다. 항체 반응을 실시한 후 membrane을 랩으로 잘 싸서 X-ray 필름을 시그날(signal)의 정도에 따라 노출시켜 X-ray 필름을 현상하였다.

3.7 TH 유전자의 발현 모니터링

3.7.1 면역조직화학(immunohistochemistry)

본 실험은 K대학교 의과대학 해부학교실에 의뢰를 하여 실시하였으며, 쥐 항체(antibody) probe를 이용하여 송사리의 머리와 몸통부분의 TH 단백질의 발현을 비교 검토하였다. 실험은 avidin-biotin complex (ABC) 방법(Hsu *et al*., 1981)에 준하여 실시하였다.

3.7.2 RT-PCR 반응

1차 실험의 경우 일정량의 다이아지논을 DMSO에 녹인 다음, 농도 및 시간별로 송사리에 처리한 후 TH 유전자의 발현정도(mRNA)를 RT (Reverse transcription)-PCR을 이용하여 측정하였다. 2차 실험의 경우 일정량의 다이아지논을 송사리의 배양에 사용된 수도수에 포화시킨 다음, 농도별, 시간별로 송사리에 처리한 후 TH 유전자의 발현정도 (mRNA)를 RT-PCR을 이용하여 측정하였다. 2차 실험에서는 1차 실험과는 달리 RT반응과 PCR반응을 각각 분리하여 실시하였다. RT 반응조건은 Promega에 의해 제시된 방법을 따랐다.

(1) 1차 실험 RT-PCR 반응

1차 실험의 RT-PCR은 총 50 ㎕의 용량으로 실행하였다. 반응물로는 정제수, *Taq* buffer(10X), DTT(0.1 M), $MgCl_2$(30 mM), dNTPs(10 mM), RNasin(40 U/㎕), primer1 & 2, 총 RNA(㎍/㎕), AMV-RT (5 U/㎕), 그리고 *Taq* polymerase(5 U/㎕)가 있다. 반응조건은 역전사가 65℃에서 10분, 변성과정은 94℃에서 5분, 그 뒤 94℃에서 1분, 60℃에서

1분, 72℃에서 1분 동안을 25회 반복하는 열순환과정, 끝으로 추적반응이 72℃에서 5분 동안 실행되었다. Primer는 rat TH 유전자로부터 디자인된 2가지의 oligo primer 즉, foward primer (18 mer) 및 reverse primer (19 mer)를 사용했으며 그 각각은 다음과 같다.

primer1: (forward: 5'-ACAGCTGGAGGACGTGTC-3'),

primer2: (reverse: 5'-CATAGCCCGAATTCCACAG-3').

(2) 2차 실험 RT-PCR 반응

2차 실험에서는 1차 실험과는 달리 RT반응과 PCR반응을 각각 분리하여 실시하였다. 반응물로는 정제수, oliprimer-dT (15 mer), *Taq* buffer(10X), DTT(0.1 M), $MgCl_2$(30 mM), dNTPs(10 mM), RNasin (40 U/㎕), primer1 & 2, 총 RNA(㎍/㎕), AMV-RT (5 U/㎕), 그리고 *Taq* polymerase (5 U/㎕)가 있다. RT 반응조건은 Promega (Madison, 위스콘신)에 의해 제시된 방법을 따랐으며, 변성과정 80℃에서 4분, 역전사가 42℃에서 60분간 실시하였다. 총 25 ㎕의 용량으로 실행하여, PCR 반응에는 이중 5 ㎕만을 취하여 이용하였다. 그리고 난 후 실시한 PCR 반응조건은 변성과정은 94℃에서 5분, 그 뒤 94℃에서 1분, 60℃에서 1분, 72℃에서 2분 동안을 25회 반복하는 열순환과정, 끝으로 추적반응이 72℃에서 5분 동안 실행되었다. Primer는 1차 실험과 동일한 것을 사용하였으며, 총 50 ㎕의 용량으로 실행하였다.

3.7.3 Semiquantitative RT-PCR 반응

표준으로 사용되는 쥐 β-actin 유전자의 동시 증폭을 통한 RT-PCR 시스템을 이용하여, TH 유전자 mRNA 전사를 정량적으로 분석하고 그리고 송사리의 조직 및 기관별로 이들 유전자의 발현을 정량적으로 추적

하기 위하여 실시하였다. 2차 실험 RT-PCR과 동일한 방법으로 실시하였으며, 단지 RT반응시 쥐 β-actin primer를 동시에 사용하였다. PCR 반응조건은 변성과정은 94℃에서 5분, 그 뒤 94℃에서 1분, 55℃에서 1분, 72℃에서 2분 동안을 25회 반복하는 열순환과정, 끝으로 추적반응이 72℃에서 5분 동안 실행되었다. RT 반응에서는 총 25 ㎕의 용량을 실시하였으며, 여기에 5 ㎕만을 PCR 반응에 사용하였다. PCR 반응에는 총 50 ㎕의 용량으로 실행하였으며, 쥐 β-actin primer의 각각은 다음과 같다.

primer1: (forward:5'-GCGACGCGGCCCAGCGCAAG-3'),
primer2: (reverse:5'-GGGGCCACGCGCAGCTCATT-3').

3.7.4 *In situ* 혼성화 반응

RNA probe를 이용한 *in situ* hybridization(Herrington and O'Leary, 1998) 시스템을 이용하여 송사리 조직별(머리)로 TH 유전자의 발현을 정량적으로 검토하였다.

Ⅳ. 연구 결과 및 고찰

4.1 다이아지논 처리에 따른 송사리 행동변화

4.1.1 다이아지논 처리 시 이상행동 관찰

송사리의 다이아지논에 대한 LC_{50} 값은 5 ppm이었으며, 다이아지논 노출 실험 시 송사리의 이상행동을 관찰한 결과를 Table 4.1에 제시하였다. 일반적으로 어류는 인간보다도 수질에 민감한 것으로 여겨지고 있으며, 수질이 양호하거나 정상적이라고 판단되는 곳에서는 어류의 움직임이 완만하고, 특이한 행동특성이 나타나지 않는 것을 볼 수 있다. 그러나 독성물질이나 화학약품 등이 유입되면 어류의 움직임은 평상시 보다 빠른 행동, 수면으로 상승하는 빈도수의 증가, 불규칙한 이동성, 경련, 폐쇄적인 아가미 운동 등이 보고된 이전 연구 결과와도 비슷한 현상을 본 연구에서도 관찰되었다(38). 어류가 독성물질에 노출 시 호흡곤란에 의해 수면으로 떠오려는 부상성, 독성물질을 피해 그 영향이 덜한 방향으로 피하려는 회피성, 평상시 군집을 이루어 행동하다가 비상시 개체간격이 멀어지는 확산성 및 독성물질 유입 시 어류의 행동이 빨라지는 것을 특징적으로 관찰할 수 있었다(2).

Table 4.1 Time course of behavioral toxicity of diazinon in Japanese medaka

exposure / conc.	control	10 ppb	100 ppb	1000 ppb	5000 ppb
0.5 hr	normal	normal	Past locomotion	Past locomotion	Past locomotion
1 hr				erratic movements	erratic movements
2 hr					zig-zag motion
4 hr			surfacing	zig-zag motion	surfacing
6 hr			convusions	opercular movements	opercular movements
12 hr			erratic movements		
24 hr				less active	less active
48hr	normal movements	surfacing distance travel	zig-zag motion	heavy convusions	heavy convusions

4.1.2 송사리 반응 행동궤적과 AChE 활성과의 관계

다이아지논 처리 후 경과 시간에 따른 AChE 효소 활성도와 송사리 반응행동을 P대학교 생물학과 생태 · 행동 팀과 K대학교 생화학 연구실 팀의 실험 자료를 서로 비교 · 분석을 하였다(10,24). 이는 본 연구의 신경전달물질인 TH 유전자와의 효소활성과 송사리 반응행동과의 관계를 알기 위한 기초자료로서 유용하게 활용할 수 있다고 생각된다. 송사리를 독성물질에 노출시키지 않았을 때의 행동 특성을 보면, 일반적으로 움직임의 궤적이 부드럽게 이어졌으며 관찰 수조의 전체면에 걸쳐 유영하였다(Figure 4.1,4.2). 반면에 다이아지논에 대한 송사리의 반응행동을 보면, 부드럽고 연속적인 궤적이 잘 형성되지 않았으며, 관찰 수조의 수변부에서 주로 머물며, 꼬인 실타래와 같은 궤적 양상을 나타내거나 짧은 거리의 반복 운동을 보여 주었다(Figure 4.3,4.4). 시간변수(time domain)로 나타내어진 송사리의 궤적은 2D-FFT를 이용하여 빈도변수(frequency domain)으로 변환하여 이미지로 나타냄으로써, 각각의 특정 궤적을 강조하여 표출할 수 있었다. Figure에 나타난 결과를 보면, 독성물질에 노출시키지 않았을 때의 수조 전체 면에 걸친 활발한 움직임은 분명한 방사상을 나타내었으며, 다이아지논을 처리하였을 때 수면부에서의 복잡하게 꼬인 궤적은 작은 원들이 많이 산포하는 불균형적인 방사상을 보였다.

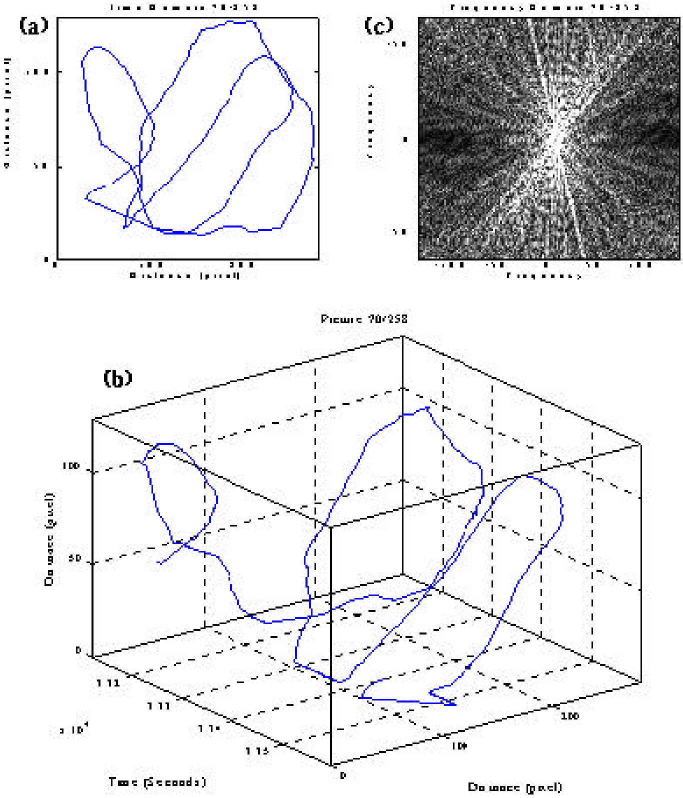


Fig. 4.1 The locomotive tracks of Japanese medaka for the surface movement when not treated with diazinon. (1) 2-D image, (2) 2-D image with time, and (3) 2-D FFT transform(10)

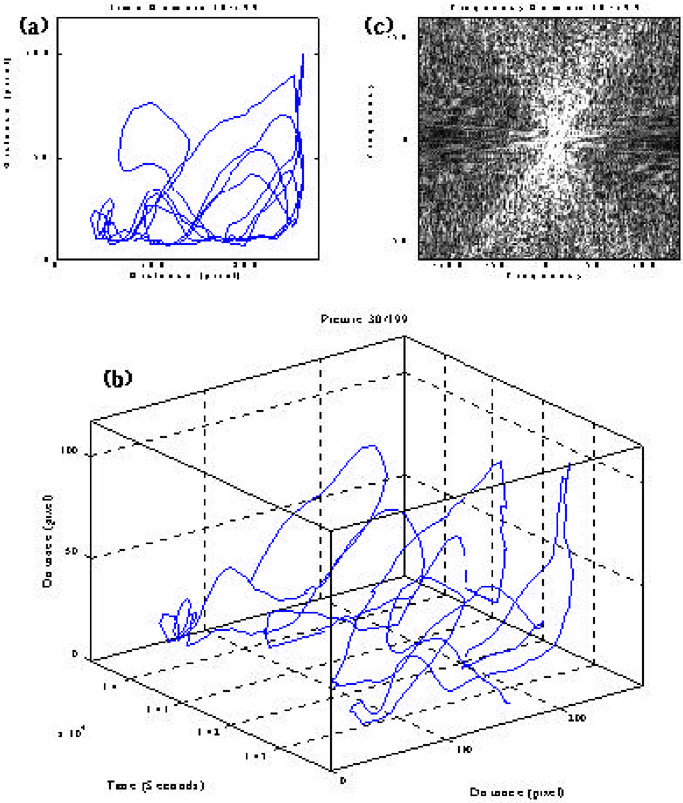


Fig. 4.2 The locomotive tracks of Japanese medaka for the surface movement when not treated with diazinon. (1) 2-D image, (2) 2-D image with time, and (3) 2-D FFT transform(10)

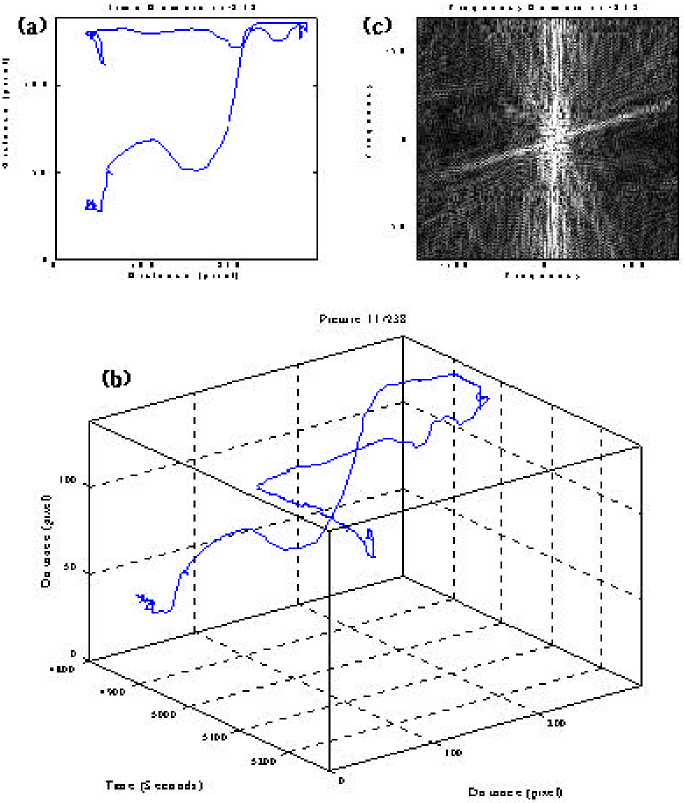


Fig. 4.3 The locomotive tracks of Japanese medaka for the intervention of irregular turns when treated with diazinon 0.1 ㎎/L. (1) 2-D image, (2) 2-D image with time, and (3) 2-D FFT transform(10)

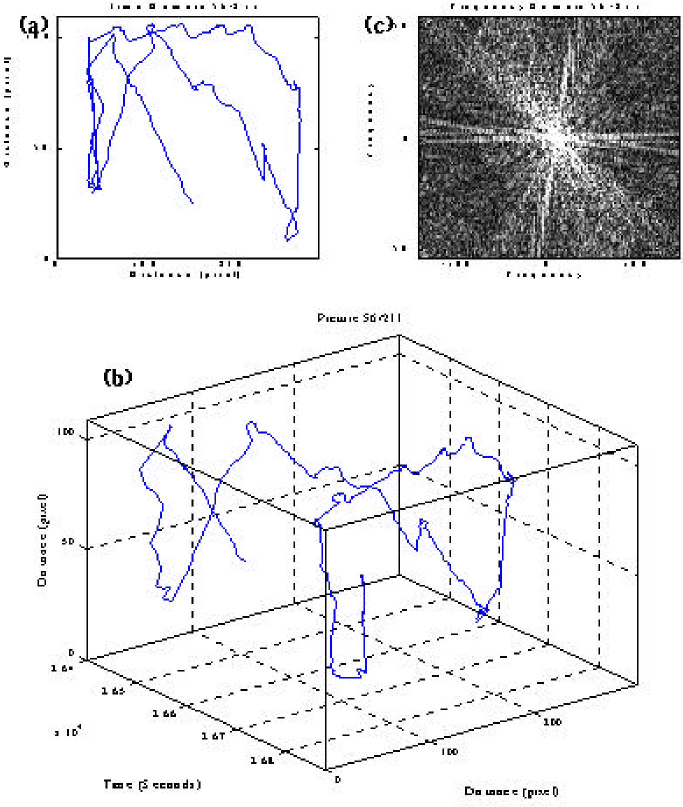


Fig. 4.4 The locomotive tracks of Japanese medaka for the intervention of irregular turns when treated with diazinon 0.1 mg/L. (1) 2-D image, (2) 2-D image with time, and (3) 2-D FFT transform(10)

4.2 송사리의 AChE 효소활성 및 신경전달물질 효소 활성의 측정

농약에 의해서 변화가 일어나는 송사리의 행동이상과 신경전달물질 대사 관련 효소계의 활성변화와의 원인 관계를 추정하기 위하여 본 연구의 TH유전자 효소활성이외에, K대학교 생화학 연구실 팀이 실험한 AChE 효소활성 및 Monoamine oxidase 활성 변화를 분석·비교하였다(24). 송사리 행동의 변화가 카테콜 아민류의 신경전달 물질의 생성에 중요한 역할을 하는 TH 활성과 그 유전자의 발현과 어떤 관계가 있는 지를 관찰되어진 AChE 효소활성 및 Monoamine oxidase 활성 변화와 비교함으로써, 송사리의 행동에 카테콜 아민류의 신경전달 물질의 생성이 어떠한 영향을 미치는지를 생화학적 및 분자생물학적 측면에서 검토하였다.

4.2.1 AChE 효소활성

K대학교 생화학 연구실 팀의 1차실험에서 송사리를 5 ppm Diazinon에 노출시켰을 때 AChE 활성이 Table 4.2에서처럼 30분 이후부터 유의적으로 감소하는 것으로 나타나, 농약이 생물체에 침투하여 효과를 나타내는데 최소 10분 이상이 소요되는 것으로 판단되었다(24). 따라서 고농도의 농약이 하천에 유입되었을 경우, 급성적으로 어류의 행동에 이상을 가져올 수 있을 것으로 추정되었다. 이에 2차 실험에서는 농도를 0.10 ppm으로 낮추어, 낮은 농도에서의 어류의 행동이상을 추정하기 위하여 동일한 실험을 수행하였다. Figure 4.5에 나타낸 바와 같이 30분 이후부터 현저하게 효소활성이 낮아지는 것이 관찰되었으며, 6시간까지

효소활성이 급격히 감소하다가 이후 감소 폭이 둔화되는 경향을 보였다.

Table 4.2 Change in acetylcholine esterase activity of Japanese medaka exposed to diazinon (5ppm) for different periods(24)

Exposure period(min)	**Acetylcholine esterase activity (nmoles substrate hydrolyzed/min/mg protein)**	
	Head	**Body**
0	**69.7±7.8**[*]	**113.4±8.0**
1	**69.6±1.8**	**98.3±6.6**
5	**64.5±1.1**	**98.9±16.2**
30	**56.6±2.2**	**72.7±9.8**
60	**35.5±7.1**	**61.2±13.2**
120	**14.9±4.7**	**14.4±1.0**
360	**8.0±0.2**	**8.9±0.1**

* Mean±SD, Triplicate measurements were performed.

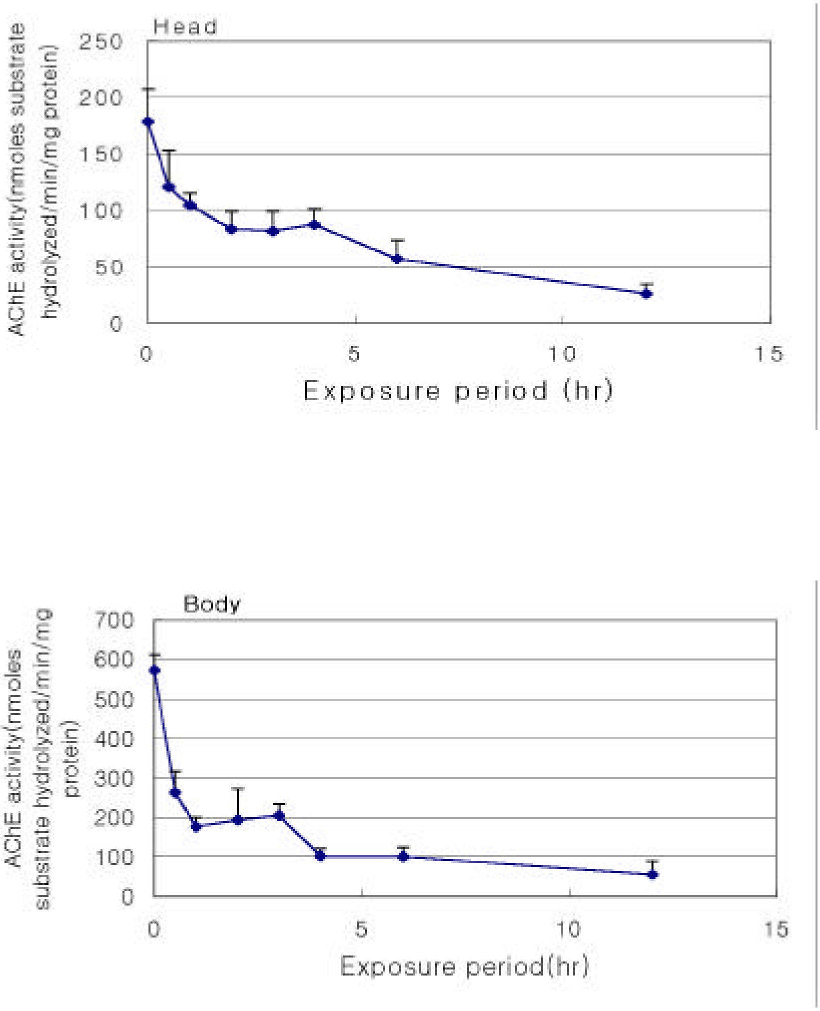
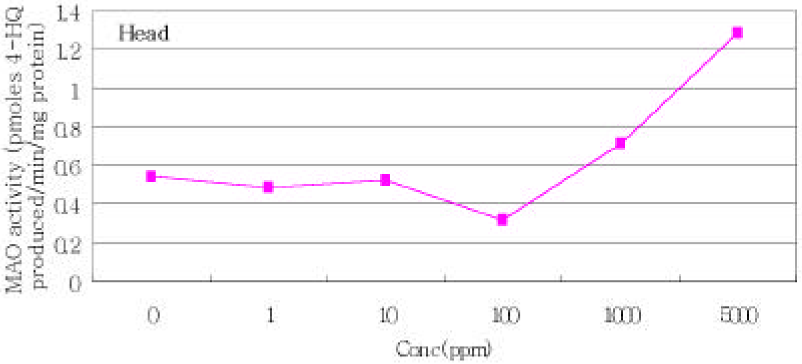


Fig. 4.5 Inhibition of acetylcholine esterase in Japanese medaka exposed to 0.1 ppm diazinon for different periods(24)

4.2.2 Monoamine oxidase 활성 변화

Monoamine oxidase(MAO)는 에피네피린과 노르에피네피린의 분해대사와 관련이 있는 효소로서 이 효소의 저해제는 우울증치료제로 사용된다. 다이아지논에 노출된 송사리의 머리부분에서 MAO 활성은 농도에 비례적으로 증가하는 경향을 보였다. 그러나 몸통부위에서는 머리부위와 달리 처리농도에 무관하게 거의 일정한 수준을 보였다 (Figure 4.6). 이렇듯 다이아지논 처리는 수성 생물에서 monoamine 계열의 신경전달물질의 대사를 증가시켜, AChE의 저해로 인한 아세틸콜린 농도의 증가와 함께 송사리의 행동에 영향을 미칠 가능성이 있는 것으로 평가된다.



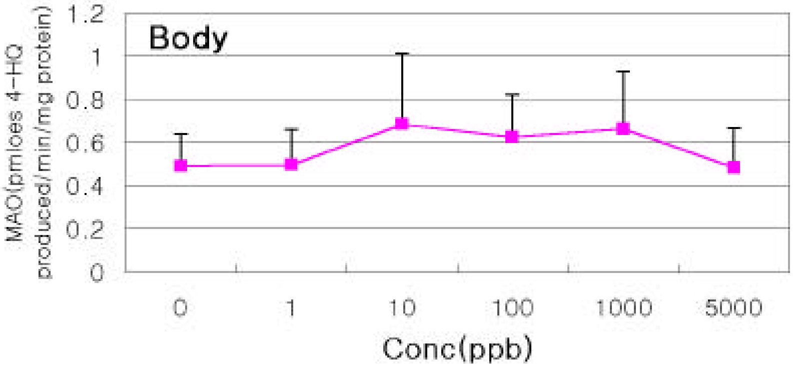


Fig. 4.6 Changes of monoamine oxidase in Japanese medaka by exposure to different concentrations of diazinon(24)

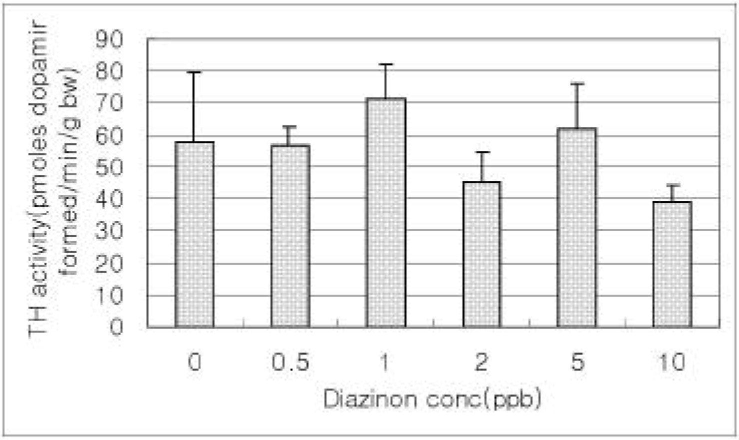
4.3 송사리의 TH 효소활성

TH는 tyrosine으로부터 DOPA를 합성하는 과정에 작용하는 효소로서 신경전달물질인 도파민, 노르에피네피린, 에피네피린 등의 합성속도를 조절하는 역할을 한다. 1차 실험에서 다이아지논에 노출된 송사리에서 Table 4.3과 같이 노르에피네피린 농도의 경시적인 변화가 관찰되어, 이것이 다이아지논에 의한 TH 활성조절과 관련이 있는지 조사하였다. 0 10 ppb Diazinon에 24시간 노출된 송사리의 TH 활성은 40 80 (pmoles dopamine formed/min/g tissue)로 처리농도에 따른 유의적인 차이는 없었다(Figure 4.7). 그러나 100 ppb에 노출된 송사리는 경시적으로 TH 활성이 변화하는 것을 보였다. 즉, 처리 후 10분에 TH 활성이 가장 낮았으나 시간이 경과함에 따라 TH 활성이 회복되는 경향을 보여 처리 후 4시간에는 처리전의 약 60% 수준(몸통부위)까지 회복되었다(Figure 4.8). 이는 1차 실험에서 다이아지논 5 ppm 농도에 노출된 송사리의 경우 시간에 따라 노르에피네피린 농도가 약간 감소하다가 일정시간 경과후(120분) 다시 회복되는 양상을 보인 것과 일치하는 결과였다.

Table 4.3 Change in norepinephrine and serotonin contents of Japanese medaka exposed to diazinon (5ppm) for different periods(24)

Exposure period (min)	**Norepinephrine Conc. (ug/g bw)**	
	Head	**Body**
Control	**2.45±0.38**	**1.29±0.33**
10	**2.21±0.30**	**1.34±0.29**
30	**2.27±0.27**	**1.06±0.20**
60	**2.40±0.70**	**1.02±0.16**
120	**2.66±0.30**	**1.40±0.59**

* Mean±SD, Triplicate measurements were performed.



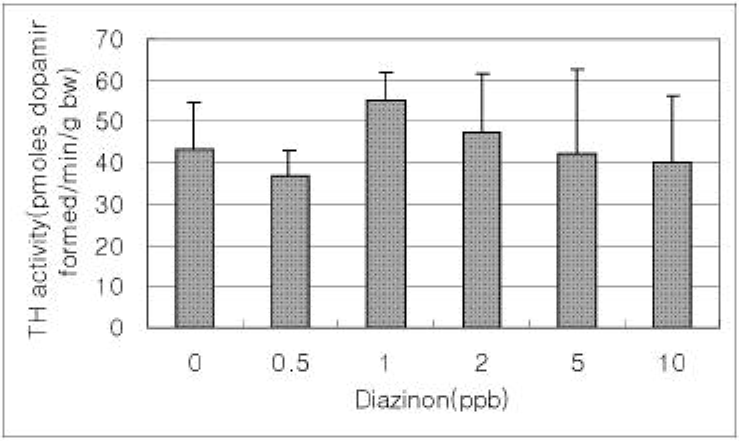
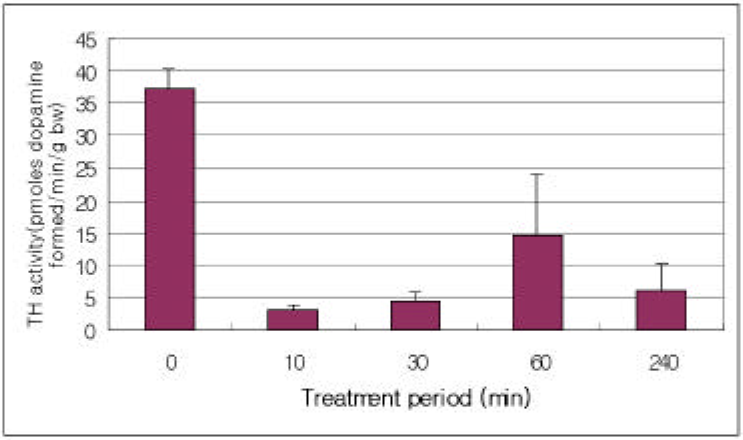


Fig. 4.7 TH activity in Japanese medaka exposed to different concentrations of diazinon for 24 hrs(24)



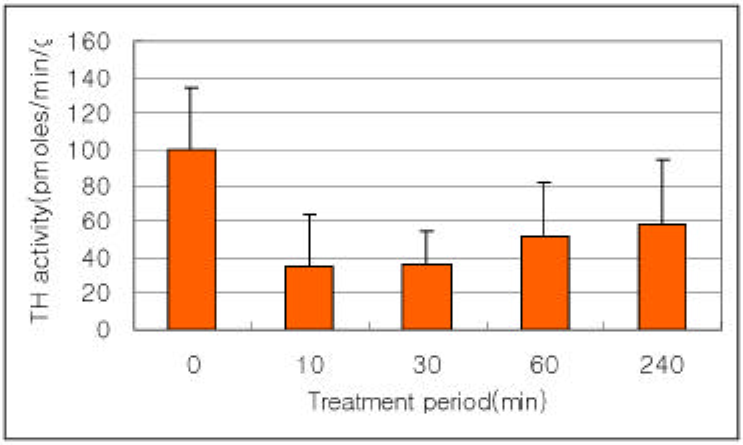


Fig. 4.8 Change of TH activity in Japanese medaka exposed to 0.1 ppm diazinon for different periods(24)

4.4 송사리의 TH 유전자의 cloning

4.4.1 TH 유전자 단백질 아미노산 순서 결정

PCR을 이용한 TH 유전자의 cloning에 사용된 primer를 Figure 4.9와 4.10에 표시하였다. NCBI 유전자 은행(gene bank)의 단백질 상동성 분석 결과, 무지개송어(rainbow trout)와는 92.7%(아미노산), 83%(nucleotide)의 상동성을, 그리고 유럽 전기뱀장어(European eel)은 96.6%(아미노산), 80%(nucleotide)의 상동성을 나타내었다. 실험에 사용된 primer인 쥐 TH DNA sequence를 아미노산배열과 단백질배열로 나타내면 다음과 같다.

Forward primer : aca gct gga gga cgt gt
(protein : Q L E D V S)
Reverse primer : ctg tgg aat tcg ggc tatg
(protein : T V E F G L)

4.4.2 TH 유전자 발현추적을 위한 RT-PCR primer 디자인

쥐 TH 유전자를 포함하여 밝혀진 다른 종의 TH 유전자 서열을 비교 분석한 결과 비교적 높은 유사성이 있음을 밝혔다. 이러한 결과를 토대로 gene probe제조를 위한 PCR 반응에 필요한 2 가지의 oligo primers 즉 forward primer (17 mer) 및 reverse Primer (19 mer)를 제조하였다. Primer의 염기서열은 다음과 같다.

primer 1: (forward: 5'-ACAGCTGGAGGACGTGT-3')

primer 2: (reverse: 5'-CATAGCCCGAATTCCACAG-3').

A CAGCTGGAGGACGTGTCCCGCTTCTTGAAGGAGCGGACTGGCTTCCAGCTGCGACCCGTG
61
Q L E D V S R F L K E R T G F Q L R P V

GCCGGTCTACTGTCCGCCCGTGATTTTCTGGCCAGTCTGGCCTTCCGCGTGTTTCAATGC
121
A G L L S A R D F L A S L A F R V F Q C

ACCCAGTATATCCGCCATGCCTCCTCACCTATGCATTCACCTGAGCCGGACTGCTGCCAT
181
T Q Y I R H A S S P M H S P E P D C C H

GAGCTGTTGGGACATGTACCCATGTTGGCTGACCGCACATTTGCCCAGTTCTCCCAGGAC
240
E L L G H V P M L A D R T F A Q F S Q D

ATTGGACTTGCATCTCTGGGGGCCTCAGATGAAGAAATTGAAAAACTCTCCACGGTGTAC
300
I G L A S L G A S D E E I E K L S T V Y

TGGTTCA**CTGTGGAATTCGGGCTA TG** 327
W F T V E F G L

Fig. 4.9 Nucleotide and deduced amino acid sequences of tyrosine hydroxylase from Japanese medaka. The predicted amino acid sequence is shown below the nucleotide sequence. The bold characters indicate the forward and reverse primers used for the PCR reaction.

```
MEDAKA     QLEDVSRFLK  ERTGFQLRPV  AGLLSARDFL  ASLAFRVFQC  TQYIRHASSP
MHSPEPDCCH
HUMAN      QLEDVSRFLK  ERTGFQLRPV  AGLLSARDFL  ASLAFRVFQC  TQYIRHASSP
MHSPEPDCCH
MOUSE      QLEDVSHFLK  ERTGFQLRPV  AGLLSARDFL  ASLAFRVFQC  TQYIRHASSP
MHSPEPDCCH
RAT        QLEDVSRFLK  ERTGFQLRPV  AGLLSARDFL  ASLAFRVFQC  TQYIRHASSP
MHSPEPDCCH
BOVINE     QLEDVSRFLK  ERTGFQLRPV  AGLLSARDFL  ASLAFRVFQC  TQYIRHASSP
MHSPEPDCCH
CHICKEN    QLEEVSRFLK  ERTGFQLRPV  AGLLSARDFL  ASLAFRVFQC  TQYIRHASSP
MHSPEPDCCH
QUAIL      QLEEVSRFLK  ERTGFQLRPV  RGLLSARDFL  ASLAFRVFQC  TQYIRHASSP
MHSPEPDCCH
EEL        QLEDVSHFLK  ERTGFQLRPV  AGLLSARDFL  ASLAFRVFQC  TQYIRHASSP
MHSPEPDCVH
   ***.**.*** **********   ********* ********** ********** ******** *

MEDAKA     ELLGHVPMLA  DRTFAQFSQD  IGLASLGASD  EEIEKLSTVY  WFTVEFGL
HUMAN      ELLGHVPMLA  DRTFAQFSQD  IGLASLGASD  EEIEKLSTLS  WFTVEFGL
MOUSE      ELLGHVPMLA  DRTFAQFSQD  IGLASLGASD  EEIEKLSTVY  WFTVEFGL
RAT        ELLGHVPMLA  DRTFAQFSQD  IGLASLGASD  EEIEKLSTVY  WFTVEFGL
BOVINE     ELLAHGPMLA  DRTFAQFSQD  IGLASLGVSD  EEIEKLSTLY  WFTVEFGL
CHICKEN    ELLGHVPMLA  DKTFAQFSQD  IGLASLGATD  EEIEKLATLY  WFTVEFGL
QUAIL      ELLGHVPMLA  DKTFAQFSQD  IGLASLGATD  EEIEKLATLY  WFTVEFGL
EEL        ELLGHVPMLA  DRTFAQFSQN  IGLASLGASE  EDIEKLSTLY  WFTVEFGL
   ***.* **** *.*******. *******... *.****.*.  ********
```

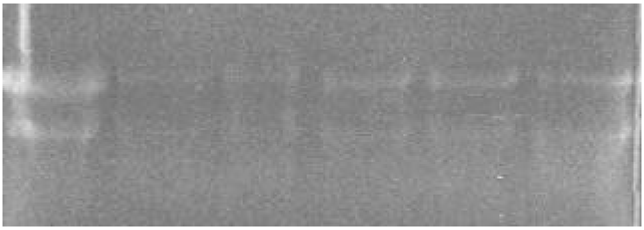
Fig. 4.10 Comparison of amino acid sequences of tyrosine hydroxylase. The sequence for medaka TH is from the present study, human from GenBank accession No. NM000360; mouse brain, M69200; rat, M10244; bovine, M36705; chicken, AJ251387; quail, M24778; European eel enzyme, AJ000731. Asterisks represent identical amino acids (86%), single dots are high similarity, and blank spaces are no homology.

4.5 송사리의 총 RNA 추출 및 Northern blot

4.5.1 총 RNA 추출

다이아지논으로 처리된 송사리를 액체 질소 가스에 순간적으로 냉동한 후 머리와 몸통으로 잘라서 각각 분리한 후, RNA 추출 kit (RNAwiz-Ambion, Inc., 텍사스)및 homogenizer를 이용하여 각각 총 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 변성 gel 상 확인한 결과, Figure 4.11에서와 같이 18S와 28S 크기의 RNA 밴드가 관찰되었다.

(head)



(body)

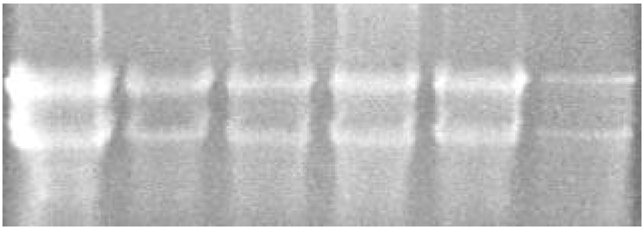


Fig. 4.11 Isolation of total RNA from Japanese medaka

4.5.2 Northern blot 혼성화 반응에 의한 유전자의 발현조사

다양한 다이아지논으로 24시간 처리된 송사리를 머리와 몸통으로 나누어서 총 RNA를 추출 하였다. 머리인 경우는 18S 및 28S rRNA의 band가 뚜렷이 나타나지 않았으며 따라서 Northern blot이나 RT-PCR 실험용으로는 적합하지 않았다. 한편 몸통의 경우 총 RNA 추출을 다이아지논 처리 농도 즉 대조구, 10 ppb 및 1000 ppb등으로 나누어서 Figure 4.12B에 제시하였다. 1000 ppb 처리구의 일부 RNA를 제외하고는 모두 양호하게 RNA가 추출되었다. 따라서 처리에 따른 Northern blot의 시그날 상대적 비교는 가능한 것으로 판단되었다. Figure 4.12A에 보는 바와 같이 대조구 및 10 ppb 처리구 에서는 모두 송사리의 TH 유전자 발현이 나타나지 않았다. 1000 ppb 처리구의 한 시료에서 (Figure A의 화살표로 표시한 부분) 330 bp에 해당하는 mRNA가 확인되었다.

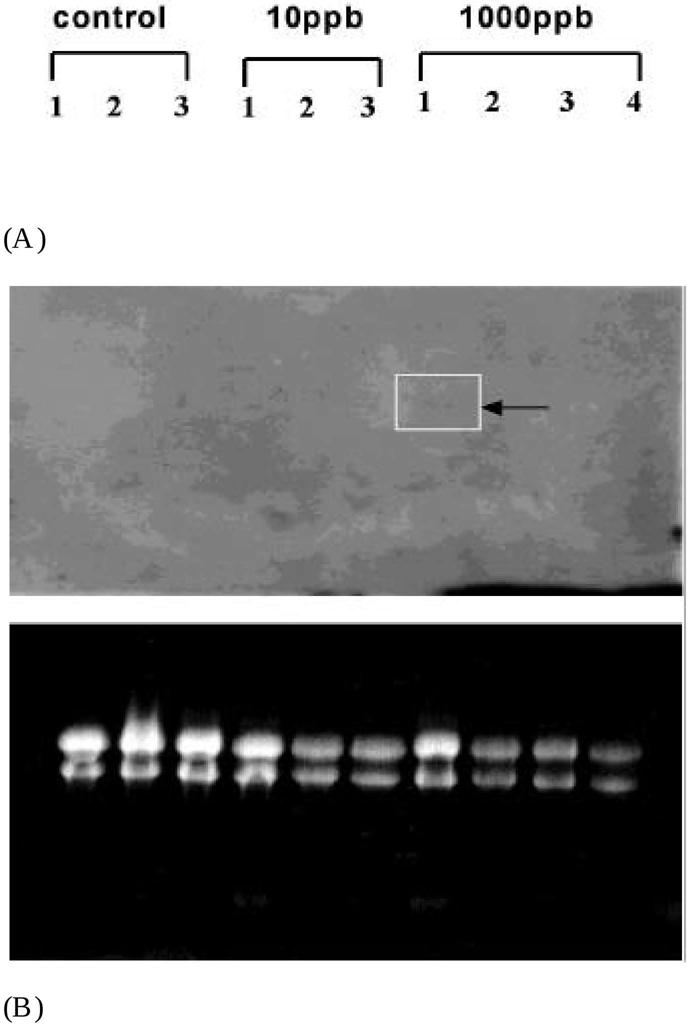


Fig. 4.12 Monitoring of TH gene expression in Japanese medaka (body) treated with diazinon through Northern blot hybridization

4.6 면역조직화학(immunohistochemistry)에 의한 TH 단백질의 조직별 발현

쥐 혈청(antibody) probe를 이용하여 송사리의 머리(뇌부분) 와 몸통(신장)부분의 TH 단백질의 발현을 비교 검토하였다. 실험 결과 송사리의 다이아지논 무처리(대조구)와 다이아지논 처리 1000 ppb의 조직에서 각각 모두 발현하였다. 다이아지논 처리 1000 ppb 에서 약간 억제되는 경향을 나타내었는데, 조직별로 후구(olfactory bublb), 중뇌(midbrain), 간뇌(brain stem)에서 나타났다. 신장부분에서는 뇌 부분에 비해 뚜렷한 차이는 나타나지 않았지만, 다이아지논 처리 1000 ppb에서 약간 억제되는 경향을 나타내었다(Figure 4.13). 본 실험의 분석은 K대학교 해부학 교실에 의뢰하여 실시하였다.

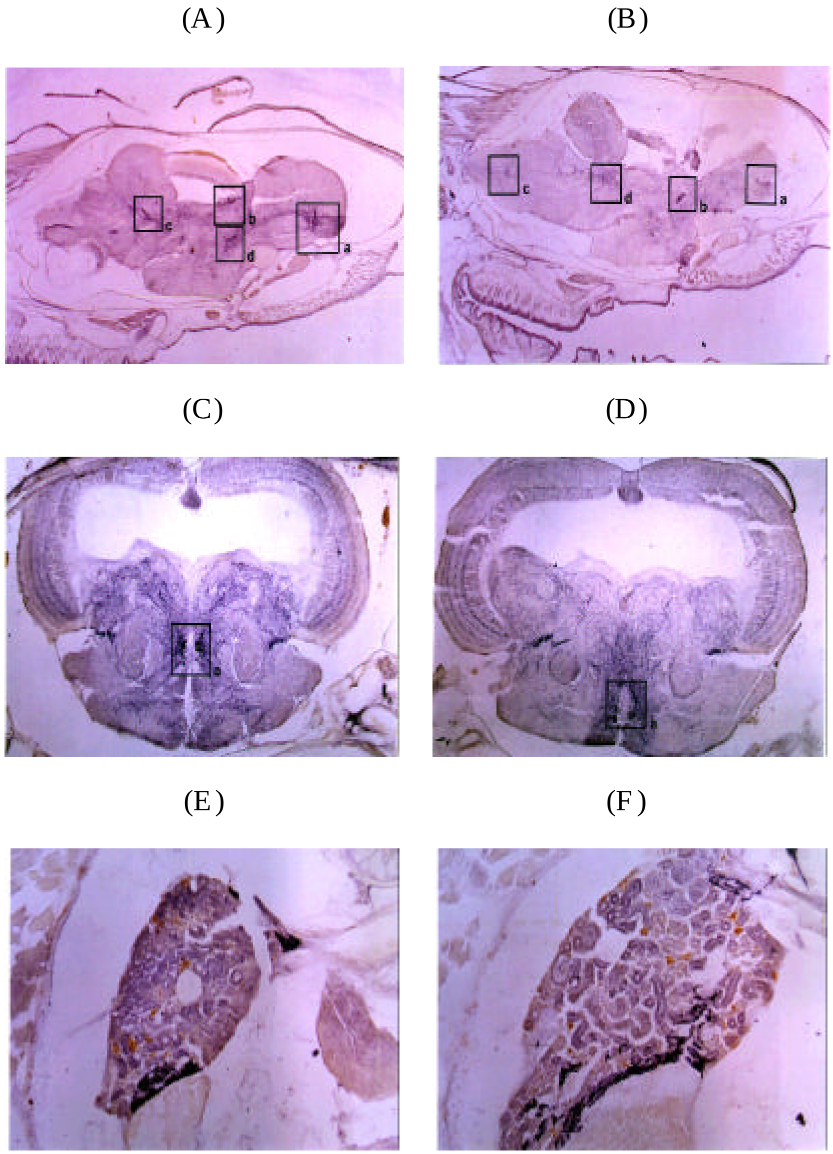


Fig. 4.13 Localization of TH-expressing cells in selected regions of the Japanese medaka. A, C and E, No treatment; B, D and F, diazinon treatment (1000 ppb). A, B, C and D: brain sections, E and F: kidney sections.

4.7 송사리의 TH 유전자의 발현을 추적하기 위한 RT-PCR

4.7.1 다이아지논 처리 농도별 및 시간별 RT-PCR

1차 실험의 경우 일정량의 다이아지논을 DMSO에 녹인 다음, 농도 및 시간별로 송사리에 처리한 후 TH 유전자의 발현정도(mRNA)를 RT-PCR을 이용하여 측정한 결과를 Figure 4.14, 4.15에 제시하였다. RT-PCR조건은 다음과 같았다: Forward primer (18 mer), Reverse primer (19 mer); 반응 조건: 1) reverse transcription: 65℃, 10분; 50℃, 8분 2) denaturing: 94℃, 5분 3) thermocycle: 94℃, 1분; 60℃, 1분; 70℃, 2분(25 순환) 농도에 따른 TH 유전자의 발현정도를 Figure 4.14에 제시하였다. 그림과 같이 330 bp의 cDNA가 증폭이 되었는데, 처리농도별 발현정도는 큰 차이가 없었다. 한편 처리 시간에 따른 TH 유전자의 발현 정도는 Figure 4.15에서 제시하였다. 처리 6시간 이후부터는 대조구나 처리 1시간에 비해 TH cDNA의 증폭량이 증가하는 경향을 보였다. 그러나 다이아지논 처리 농도별 및 처리 시간별 TH 유전자 발현정도의 정량적 비교는 actin primer를 이용한 actin 유전자 발현을 표준으로 하여 일정량의 총 RNA에 대한 TH 유전자 발현의 정량적 검토가 필요 할 것이다.

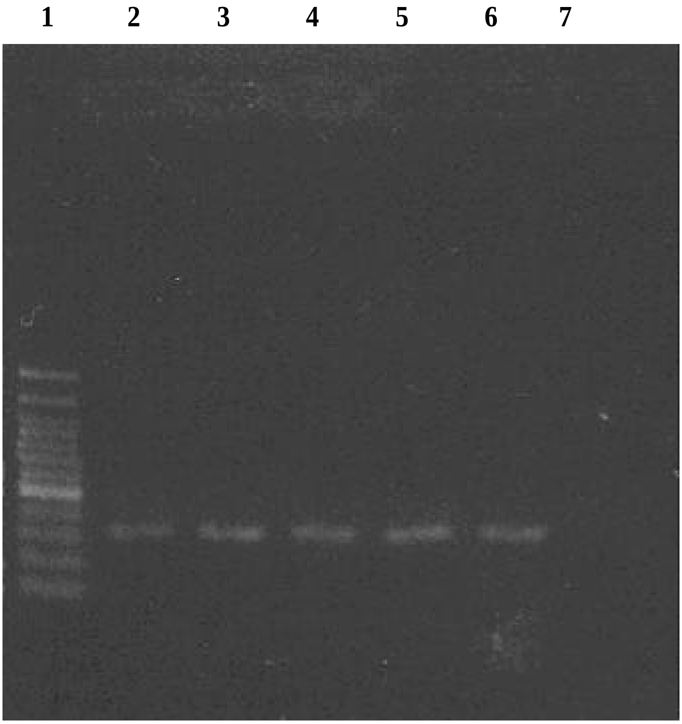


Fig. 4.14 Effect of diazinon concentration on the tyrosine hydroxylase (TH) gene expression in the body of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) treated with diazinon overnight. Lanes: 1, 100bp ladder; 2, plasmid carrying TH gene; 3, DMSO only; 4, 1ppb; 5, 100pb; 6, 5000ppb; 7, a sample treated with RNase

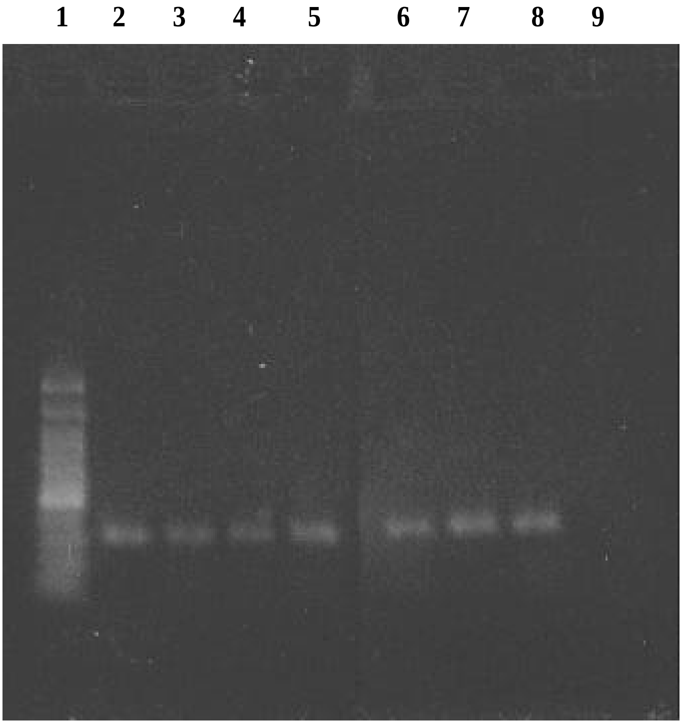


Fig. 4.15 Time course of tyrosine hydroxylase (TH) gene expression in the body of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) treated with diazinon 5 ppm. Lanes: 1, 100bp ladder; 2, plasmid carrying TH gene; 3, 0h; 4, 1h; 5, 6h; 6, 12h; 7, 24h; 8, 48h; 9, 6h sample treated with RNase

4.7.2 TH 유전자의 RT-PCR 및 semiquantitative RT-PCR

2차 실험의 경우 일정량의 다이아지논을 송사리의 배양에 사용된 수도수에 포화시킨 다음, 농도별로 송사리에 처리한 후 TH 유전자의 발현정도(mRNA)를 RT-PCR을 이용하여 측정한 결과를 Figure 4.16에 제시하였다. 2차 실험에서는 1차 실험과는 달리RT반응과 PCR 반응을 각각 분리하여 실시하였다. RT 반응조건은 Promega 에 의해 제시된 방법을 따랐다. 사용된 primer는 Oligo-dT (15 mer)였고, 변성(denauration) 반응은 80℃ 4분간 실시하였고, 확장(annealing)은 42℃ 60분간 실시하였다. 그 다음의 PCR 반응조건은 1차 실험과 동일하였다. 농도에 따른 TH 유전자 및 쥐 β-actin 유전자의 발현정도 (48시간 노출 시)를 Figure 4.17에 제시하였다. 그림과 같이 330 bp의 cDNA가 증폭이 되었는데, 우선 머리와 몸통간의 발현정도의 차이는 별로 나타나지 않았다. 그러나 머리와 몸통 각각의 경우를 볼 때 농도별 차이는 나타났다. 머리인 경우 100 ppb 이하에서는 발현이 약간 억제되는 경향이었으나, 1000 ppb에서는 오히려 증가하는 경향을 보였다. 그러나 5000 ppb 에서는 뚜렷한 감소를 보였다. 한편 몸통인 경우는 100 ppb까지는 대조구에 비해 별다른 차이가 없었다. 그러나 역시 1000 ppb에서는 약간 증가하는 경향을 보였고, 또한 5000 ppb에서는 대조구에 비해 현저한 감소를 보였다. 다이아지논 처리한 농도 5000 ppb 몸통에서는 현저한 증가를 보였다. 그러나, 머리에서는 대조구와 1000 ppb에서만 발현하였다. 그 이유는 명확하지 않지만, 총 RNA 추출시 저농도로 인한 부분적인 분해가 있으리라 생각되어진다. 또한 semiquantitative RT-PCR은 표준으로 사용되는 쥐 β-actin 유전자의 동시 증폭을 통한 RT-PCR 시스템을 이용하여, TH 유전자 mRNA 전사를 정량적으로 분석하고 그리고 송사리의 조직 및 기관별로 이들 유전자의 발현을 정량적으로 추적하기 위하여

실시하였다. 2차 실험 RT-PCR과 동일한 방법으로 실시하였으며, 단지 RT반응시 쥐 β-actin primer를 동시에 사용하였다. 본 연구의 semiquantitative RT-PCR 결과는 TH 유전자 mRNA 전사를 정량적으로 분석할 수 있는 시스템을 확립할 수 있으리라 생각된다.

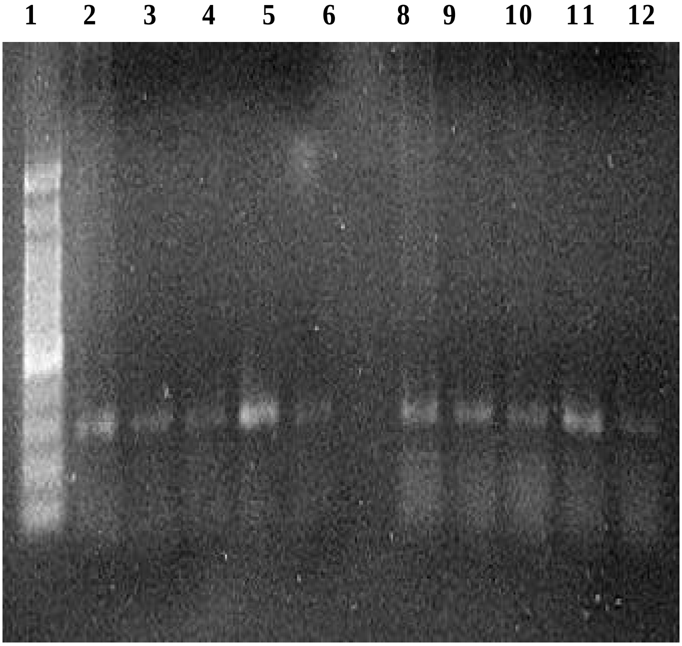


Fig. 4.16 Effect of diazinon concentration on the tyrosine hydroxylase (TH) gene expression monitored by RT-PCR in Japanese medaka treated with diazinon. Lanes: 1, 100bp ladder; 2, Control-Head; 3, 10ppb-Head; 4, 100pb;-Head 5, 1000ppb-Head; 6, 5000ppb-Head; 8, Control-Body; 9, 10ppb-Body; 10, 100pb-Body; 11, 1000ppb-Body; 12, 5000ppb-Body

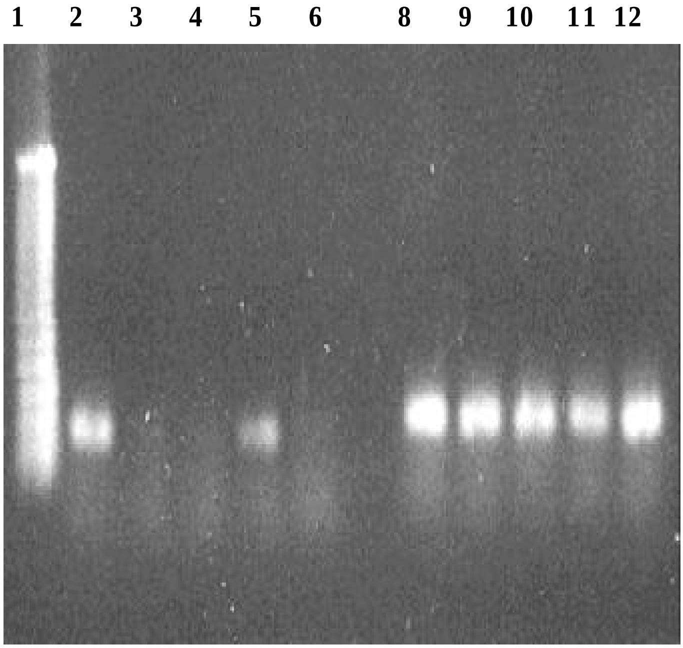


Fig. 4.17 RT-PCR of total RNA from head and body tissues of Japanese medaka using rat actin gene primers. Lanes: 1, 100bp ladder; 2, Control-Head; 3, 10ppb-Head; 4, 100pb;-Head 5, 1000ppb-Head; 6, 5000ppb-Head; 8, Control-Body; 9, 10ppb-Body; 10, 100pb-Body; 11, 1000ppb-Body; 12, 5000ppb-Body

4.8 *In situ* 혼성화 반응에 의한 TH 유전자의 조직별 발현의 정량적 검출

RNA probe나 cDNA probe를 이용한 *in situ* 혼성화(Herrington and O'Leary, 1998)시스템을 이용하여 송사리 조직별(머리부분)로 TH 유전자의 발현을 정량적으로 검토하였다(21). Figure 4.18에 나타난 것처럼 대조구, 10 ppb 및 100 ppb로 처리된 송사리의 뇌조직의 일종인 후구(olfactory bulb)에서 모두 TH 유전자가 발현되는 경향을 보였다. 그러나 본 *in situ* 혼성화 반응의 경우는 TH 유전자 발현의 정량적인 비교는 어려웠다. 따라서 앞으로 보다 해상력있는 *in situ* 혼성화 반응기법의 적용이 요구되어진다. 본 실험의 분석은 경상대학교 해부학 교실에 의뢰하여 실시하였다.

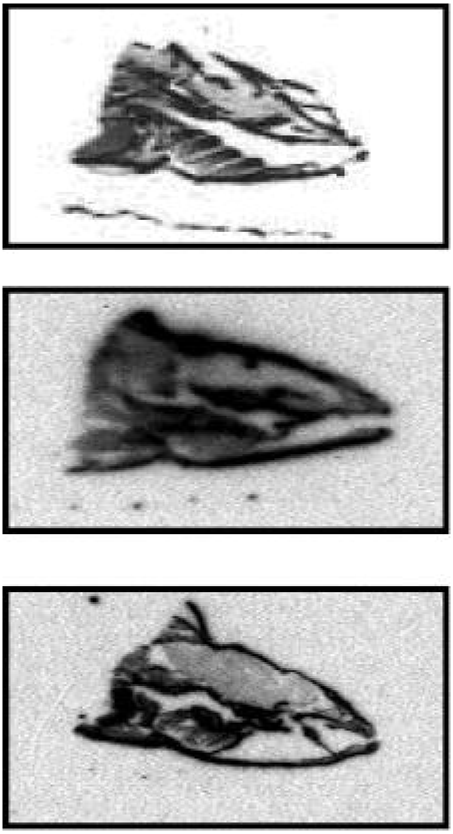


Fig. 4.18 *In situ* hybridization from head tissue of Japanese medaka treated with diazinon

Ⅴ. 결론

본 연구의 장기적 목적은 생물지표를 이용한 환경독성 물질의 영향평가를 효율적으로 수행하기 위한 생물지표의 탐색 및 개발에 있다. 본 연구에서는 생물지표의 한 모델로서 어류(송사리)를 선정하여 유기인산계 농약인 다이아지논이 이들의 행동에 어떠한 영향을 미치는지(독성메커니즘) 그리고 이때의 신경전달물질의 동역학을 생화학적 및 분자생물학적 측면에서 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 송사리의 행동과 다이아지논 처리농도별 관계를 살펴보면, 농도의 증가에 따른 비례적 특이한 행동(표면유형, 경련, 불규칙한 운동 등)이 관찰되었다.

2. 송사리 행동의 변화가 카테콜 아민류의 신경전달물질의 생성에 중요한 역할을 하는 TH 활성의 변화가 경시적으로 변화하는 것을 관찰하였다.

3. AChE 효소활성은 유의적으로 감소하는 것으로 나타나, 다이아지논의 환경유입 시 급성적으로 어류의 행동에 이상을 가져올 수 있을 것으로 추정되었다. 송사리의 머리부분에서 MAO 활성은 농도 비례적으로 증가하는 경향을 보였다.

4. 클론된 TH 유전자 절편(330 bp)의 단백질 및 유전자의 상동성 분석 결과, 무지개송어(rainbow trout)와는 92.7%(아미노산), 83%(nucleotide)의 상동성을, 그리고 유럽 전기뱀장어(European eel)

은 96.6%(아미노산), 80%(nucleotide)의 상동성을 나타내었다.

5. 면역조직화학(immunohistochemistry) 실험을 통한 TH 단백질의 발현 정도를 확인한 결과 다이아지논 처리 1000 ppb (머리(뇌조직)의 일부분인 후구(olfactory bulb), 중뇌(midbrain), 간뇌(brain stem))에서 그 발현이 억제되는 경향을 나타내었다. 몸통(신장부분)에서는 뇌 부분에 비해 뚜렷한 차이는 나타나지 않았지만, 약간 억제되는 경향을 나타내었다.

6. TH 유전자 mRNA의 시간별, 농도별 발현정도는 대조구에 비해 큰 차이가 없었으며, actin primer를 이용한 semiquantitative RT-PCR을 통한 TH 유전자 mRNA 발현은 몸통의 경우에서 5000 ppb에서 억제되는 경향을 보였다.

7. *In situ* 혼성화 반응에 의한 TH 유전자의 단백질 발현은 송사리 뇌조직의 일종인 후구(olfactory bulb)에서 모두 TH 유전자가 발현 되었지만, 기술확립의 미비로 정량적인 비교는 어려웠다.

Ⅵ. 향후 연구 과제

환경위해성 평가에 있어서 독성반응에 민감한 생물지표의 확립을 위하여 다음과 같은 연구를 수행 할 것이다.

1. 송사리 전체 TH 및 AChE(또는 receptor) 유전자의 cloning 및 sequence 분석을 통한 TH 유전자간의 구연관계 분석

2. *In situ* 혼성화 반응에 의한 TH 및 AChE(또는 receptor) 유전자의 조직별 발현의 정량적 검출

3. 유용 유전자 tagging을 통한 transgenic 어류를 개발하여 효율적인 독성감지 시스템을 개발

참고문헌

1. **김오식**, **정현옥**, **김판기**. 1998. “**산업독성학**”. **동화기술**.
2. **이형기**, **이영호**. 1998. “**어류를 이용한 정수장 독성물질 유입 감지시스템 개발에 관한 연구**”. **대한토목학회논문집**, 18(3):289-297.
3. **정명규외** 5**인**. 1997. “**환경독성학 개론**”. **동화기술**.
4. **비교해부학교재연구회**. 1999. “**비교해부학**”. **월드사이언스**.
5. Augustinson, K.B. 1957. Assay methods for choline esterase. In: Glick, D. (ed.) Methods of Biochemical Analysis 5: 43-47.
6. Barabas, K. 1998. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Environmental Health Criteria 1-140.
7. Beyer, J., M. Sandvik., J.U. Skaere., K. Hylland., E. Egaas., and A. Goksoeyr. 1994. Biomarker responses in flounder (Platichthys flesus) exposed by caging to contaminated sediments in Soerfjorden, Norway. International Marine Biotechnology Conference, Tromsoe, Norway, 7-12 Aug.
8. Boeringer-Mannheim Biochemicals Catalogue. 1998. Mannheim, Germany.
9. Celander, M., C. Naef., D. Broman., and L. Foerlin. 1994. Temporal aspects of induction of hepatic cytochrome P450 1A and conjugating enzymes in the viviparous blenny (Zoarces viviparus) treated with petroleum hydrocarbons. Aquat. Toxicol. 29: 183-196.
10. Chon, T.S., N.I. Chung., J.S. Kim., S.C. Koh., and E.Y. Cha. 1999. Computational Patterning on the Locomotive Tracks of Medaka (Oryzias latipes) in Response to Sublethal Treatments of

Diazinon in Semi-Natural Conditions and Changes in Acetylcholine Esterase Activity. Journal of Chemical Ecology.

11. Cousins, M.S., M. Finn., J. Trevitt., D.L. Carriero., A. Conlan., and J.D. Salamone. 1999. The role of ventrolateral striatal acetylcholine in the production of tacrine-induced jaw movements. Pharmacol Biochem Behav. 62(3): 439-47.
12. Coulon, J.F., N.F. Biguet., A. Cavoy., J. Dacour., J. Mallet., and David. 1990. Gene Expression of Tyrosine Hydroxylase in the Developing Fetal Brain. Journal of Neurochemistry. 55: 1412-1417.
13. Dutta, H., J. Marcelino., and C. Richmonds. 1992. Brain acetylcholinesterase activity and optomotor behavior in bluegills, Lepomis macrochirus exposed to different concentrations of diazinon. Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys. 100: 331-334.
14. El-Alfy, D. Schlenk. 1998. Potential mechanisms of the enhancement of aldicarb toxicity to Japanese medaka, Oryzias latipes, at high salinity. Toxicol Appl Pharmacol. 152: 175-83.
15. Ellman, G. L., K. D. Courtney., V. Andres(Jr)., and R.M. Featherstone. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholineesterase activity. Biochemical Pharmacology. 7: 88-95.
16. Fossi, M.C. Nondestructive biomarkers in ecotoxicology. Genetic and Molecular Ecotoxicology. 102(12S): 49-54.
17. Fournier, L., D. Musard., and A. Lecorsier. 1996. Lymphocyte esterases and hydroxylases in neurotoxicology. Vet Hum Toxicol. 38(3): 190-195.
18. Gupta, R.C. 1994. Carbofuran toxicity. J. Toxicol. Environ. Health 43: 383-418.

19. Heath, A.G., J.J. Cech., J.G. Zinkl., and M.D. Steele. 1993. Sublethal effects of three pesticides on Japanese medaka. Arch Environ Contam Toxicol. 25: 485.

20. Heppell, S.A., N.D. Denslow., L.C. Folmar., and C.V. Sullivan. 1995. Universal assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. Environ Health Perspect. 103,7(S): 9-15.

21. Herrington, O'Leary. PCR In situ hybridization. OIRL PRESS. 1998. Hauber W, Lutz S 1999 Dopamine D1 or D2 receptor blockade in the globus pallidus produces akinesia in the rat. Behav Brain Res. 106(1-2): 143-50.

22. Jacobowitz, D.M. and J.S. Richardson. 1978. Method for the rapid determination of norepinephrine, dopamine, and serotonin in the same brain region. Pharmacol. Biochem. Behav. 8: 515-519.

23. Johnston, G. 1995. The studt of interactive effects of pollutants: A biomarker approach. Environmental Toxicology (Hazard to the Environment). 171: 205.

24. Kim, J.S., S.Ch. Koh., S.K. Lee., and T.S. Chon. 1999. Regulation of acetylcholine esterase and neurotransmitters in Oryzias latipes by Diazinon. Korean Journal of Environmental Toxicology. 14(3): 81-85.

25. Kadir, H.A. and C.O. Knowles. 1981. Inhibition of rat brain monoamine oxidase by insecticides, acaricides and related compounds. Gen Pharmacol 12: 239-247.

26. Koh, S.C., J.P. Bowman., and G.S. Sayler. 1993. Soluble methane monoxygenase production and trichloroethylene degradation by a type I methanotroph, Methylomonas methanica 68-1. Appl. Environ.

Microbiol. 59: 960-967.

27. LaHoste, G.J. and J.F. Marshall. 1990. Nigral D1 and striatal D2 receptors mediate the behavioral effects of dopamine agonists. Behav Brain Res. 38(3): 233-42.

28. Lodish, H., D. Baltimore., A. Berk., S.L. Zipursky., P. Matsudaira., and J. Darnell. 1995. Molecular cell biology. Scientific American Books, New York. U.S.A.

29. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough., A.L. Farr., and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193-265.

30. Maggio, R., M. Riva., F. Vaglini., F. Fornai., R. Molteni., M. Armogida., G. Racagni., and G.U. Corsini. 1998. Nicotine prevents experimental parkinsonism in rodents and induces striatal increase of neurotrophic factors. J Neurochem 71(6): 2439-46.

31. Mayorga, A.J., G. Gianutsos., and J.D. Salamone. 1999. Effects of striatal injections of 8-bromo-cyclic-AMP on pilocarpine-induced tremulous jaw movements in rats. Brain Res. 22;829(1-2): 180-4.

32. Naqvi, S.M. and R.H. Hawkins. 1998. Responses and LC50 values for selected microcrustaceans exposed to Spartan, Malathion, Sonar, Weedtrine-D and Oust pesticides. Bull Environ Contam Toxicol. 43(3): 386-93.

33. Nag, M. and N. Nandi. 1987. In vitro and in vivo effect of organophosphate pesticides on monoamine oxidase activity in rat brain. Biosci Rep. 7: 801-803.

34. Ongerth, J.E., R. Wacker., S.E. Strand., and F.B. DeWalle. 1995. Concentration and Biotoxicity Assay of Dilute Aqueous Solutions

of Volatile Chlorinated Organics Using Supercritical Fluid Extraction, J Environ Sci Health-Environ Sci Eng Toxic Hazard Subst Control. A30(8): 1867-1890.

35. Pan, G., and H.M. Dutta. 1998. The inhibition of brain acetylcholinesterase activity of juvenile largemouth bass Micropterus salmoides by sublethal concentrations of diazinon. Environ. Res. 79: 133-137.

36. Poli, A., O. Gandolfi., R. Lucchi., and O. Barnabei. 1992. Spontaneous recovery of MPTP-damaged catecholamine systems in goldfish brain areas. Brain Res. 585: 128-34.

37. Prijono, W.B. and F.A. Leighton. 1991. Parallel measurement of brain acetylcholinesterase and the muscarinic cholinergic receptor in the diagnosis of acute, lethal poisoning by anti-cholinesterase pesticides. J. Wildl. Dis. 27: 110-115.

38. Ram, M.D. and K. Gopal. 1991. Neurobehavioral Changes in Freshwater Fish Channa punctatus Exposed to Fenitrothio. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 47: 455-458.

39. Reddy, P.M., G.H. Philip., and M. Bashamohideen. 1992. Regulation of AChE system of freshwater fish, Cyprinus carpio, under fenvalerate toxicity. Bull Environ Contam Toxicol 1992. 48(1): 18-22.

40. Sambrook, J., E.F. Fritsch., and T. Maniatis. 1990. Molecular cloning, 2nd edition. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring, MA.

41. Smith, G.J. 1993. Toxicology and pesticide use in relation to wildlife:1-10, in Organophosphorus and Carbamate Compounds.

CRC Press, Boca Raton, FL.

42. Soimasuo, R., I. Jokinen., J. Kukkonen., T. Petaenen., T. Ristola., and A. Oikari. 1995. Biomarker responses along a pollution gradient: Effects of pulp and paper mill effluents on caged whitefish. Aquat. Toxicol. 31: 329-345.

43. Susan, B. The Merck Index. Merck & CO., Inc. N.J., U.S.A.

감사의 글

돌아보면 너무나도 아쉬움이 많이 남는 2년의 시간을 이렇듯 마무리하고자 미흡한 글을 남깁니다. 지난 시간을 돌이켜 마음속에 새겨두고 기억나는 얼굴들을 하나씩 여기에 담고자 합니다.

늘 한결같은 마음으로 그 자리에서 아낌없는 사랑을 주신 고성철 지도교수님께 먼저 감사 드립니다. 교수님이 보여주신 열정과 연구 활동을 몸으로 실천하는 제자가 될 것을 약속드리겠습니다. 최선을 다하는 모습에 격려와 박수를 보내주신 환경공학과 박상윤 교수님, 김인수 교수님, 송영채 교수님께 깊은 감사를 드리며, 항상 건강하시길 바라겠습니다.

저의 연구에 직접적으로 많은 지도와 도움을 주신 전태수 교수님, 김정상 교수님, 권오신 교수님, 이성규 박사님께 깊은 감사를 드립니다. 실험적 도움을 주신 히스텍 연구원, 부산대 연구원, 경북대 연구원 님들한테도 감사의 말을 전하고 싶습니다. 이 자리에 있게끔 가르쳐 주신 진주산업대학교 환경공학과 교수님들, 진주전문대학 경영정보과 교수님들한테도 고마움을 전합니다. 낯선 이곳 생활에 버팀목이 되어주신 안종수 교수님께도 진심으로 감사를 드립니다.

2년을 같이 지내온 성진씨, 진석이, 미경이, 정혜 한테도 고맙다는 말 전하고, 늘 형처럼 편하게 대해주신 손평모 형님께도 감사드립니다.
영원한 우리 미생물 실험실 동반자들 경자, 명현이, 성규, 영경이, 상조, 병혁이, 아람이한테도 정말로 고마움을 전하고 싶습니다.
기기실험실 김억조 선생님, 김동근 선생님, 상호, 국진이, 주현이 공학실험실 정희, 희경이, 철민이한테도 감사드리며, 조교 정현이도 고맙습니다.

항상 동생처럼 따뜻하게 잘 대해준 우리 악동들 영기, 상현, 동엽, 태성, 승용, 성구, 권숙, 향, 호일, 장섭, 다슬, 그리고 다른 후배님들 정말로 감사 드리고 사랑한다고 전하고 싶습니다.
고향친구 호성, 상욱, 대현, 동규, 은경, 명미 한테도 고마움 전하고, 진주 친구들에게도 감사의 말 드립니다. 자칭 팔관회 친구들 용훈, 충무, 춘식, 석헌, 창호, 흔욱, 승호 한테도 고맙다는 말 드립니다.

무엇보다 여기까지 오게 해주신 부모님께 모든 것을 돌리고 싶습니다. 보여주신 사랑을 실천하는 아들이 되도록 노력하겠습니다.
항상 곁에서 염려해주신 할머니, 형님들, 누나, 매형, 삼촌내외, 이모내외, 형수님, 숙모님들 한테도 정말 감사하다는 말 드립니다. 귀엽고 사랑하는 우리 조카들도 많이 건강하길 바라고, 착한 미정이가 많이 행복하길 바랍니다.

저를 아시는 모든 이들한테 깊은 감사를 드리며, 항상 노력하며 최선을 다하는 모습으로 삶을 사랑하는 제가 될 것을 지면으로나마 약속드립니다. 작은 행복은 늘 우리 곁에 가까이에 있습니다. 건강하시고, 행복하시길 바라겠습니다.
사랑하는 모든 이들에게 미흡한 저의 논문을 드리고자 합니다.