

# 2014 Lab창의사업 결과보고서

Next Generation Sequencing (NGS) 기술을 이용한  
해산어류배아 발생 독성 연구  
Evaluation of the developmental toxicity in marine fish using the  
Next Generation Sequencing (NGS)

2015. 03

## 제 출 문

한국해양과학기술원장 귀하

본 보고서를 “Next Generation Sequencing (NGS) 기술을 이용한  
해산어류배아 발생 독성 연구” 사업의 보고서로 제출합니다.

2014년 2월 28일

연구책임자 : 정지현

연구원 : 김하나 채영선

## 목 차

요 약 문 .....	V
표 목 차 .....	IX
그림 목차 .....	X
제 1 장 연구의 필요성 .....	1
제 2 장 연구개발 목표 .....	5
제 3 장 연구추진 체계 .....	6
제 4 장 연구개발 내용 및 결과	
제 1 절 원유와 현장 풍화유에 노출된 넙치 배아의 NGS 분석 .....	7
가. 재료 및 방법 .....	7
나. 결과 및 고찰 .....	10
제 2 절 원산지별 수입원유의 발생독성 비교 .....	17
가. 재료 및 방법 .....	17
나. 결과 및 고찰 .....	19
제 5 장 참고문헌 .....	22

## 보고서 초록

과제고유 번호	P99253E	해당단계 연구기간	2014.01.01 -2014. 12. 31	단계 구분	단년도 과제 (종료)
연구사업명	중사업명	Next Generation Sequencing (NGS) 기술을 이용한 해산어류배아 발생 독성 연구			
	세부사업명	Evaluation of the developmental toxicity in fish using the Next Generation Sequencing (NGS)			
연구과제명	대과제명				
	세부과제명				
연구책임자	정지현	해당단계 참여연구원수	총 : 3 명 내부: 3 명 외부:    명	해당단계 연구비	정부: 50,000 천원 기업:        천원 계 :        천원
		총연구기간 참여연구원수	총 : 3 명 내부: 3 명 외부:    명	총 연구비	정부: 50,000 천원 기업:        천원 계 :        천원
연구기관명 및 소속부서명	한국해양과학기술원 /남해연구소		참여기업명		
국제공동연구					
위탁연구					
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 본 연구에서는 Next generation sequencing (NGS) 기술을 이용한 넙치배아의 transcriptom을 대량 발굴하여 발생독성에 연관된 16개 주요 유류독성 진단 지표 목록을 확보.</li> <li>● 원유와 풍화유에 노출된 넙치 배아는 대조구와 비교하여 대부분의 유전자들의 발현이 감소된 결과.</li> <li>● Biotransformation에 연관된 유전자는 유류 노출구에서 유의하게 증가한 반면 translation, wound healing, transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway, fibroblast growth factor receptor signaling pathway에 연관된 유전자는 대부분 발현이 유의하게 감소.</li> <li>● 따라서 넙치배아는 원유노출로 인하여 기관형성 등에 연관된 많은 유전자가 유의하게 감소되어 형태발생에 영향을 미치는 것으로 확인.</li> <li>● 국내의 연간 100만 배럴이상 수입되고 원산지가 다른 원유 4종(Iraq산 Basrah light, Russia산 Sakhalin, Australia산 Pyreness, 국내정제유 S-oil MFO380)을 선별하여 선행 NGS 분석으로 확보된 유전자 목록의 지표를 정량분석.</li> <li>● 노출 시간별 원산지별 유전자의 발현변화와 형태발생 기형빈도를 조사하여 독성 민감도를 분석.</li> <li>● Basrah light(Iraq), Sakhalin(Russia), S-oil MFO380(국내 정제유)에 노출된 넙치배아는 면역 관련 유전자들은 발현이 감소, 심장 형태발생 관련 유전자인 NKX2.7과 microtubule관련 유전자는 모든 실험구에서 발현이 감소된 결과를 보임.</li> <li>● 본 NGS기법으로 노출된 발생독성 지표를 적용한 결과 원유 노출 48시간 이후(부화완료 개체)유전자 발현 패턴은 Australia산 원유를 제외한 Iraq, Russia산 국내 정제유에서 유사한 결과를 보임.</li> <li>● 형태 기형 발생독성은 Basrah light에서 가장 낮게 나타나 산지별 독성 민감도에 차이를 확인.</li> </ul>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	Next Generation Sequencing(NGS), 어류, 배아, 오염, 독성,			
	영 어	Next Generation Sequencing(NGS), Fish, embryo, pollution, toxicity			

# 요 약 문

## I. 제 목

Next Generation Sequencing (NGS) 기술을 이용한 해산어류배아 발생 독성 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

2007년 12월에 발생한 태안 유류 유출 사고로 인하여 수 많은 치어 및 자어가 폐사 되고, 부화율 감소와 수정란의 질적 저하등이 보고되고 있으며, 대량으로 유출된 유류는 연안에 장기간 잔존하며 지속적인 독성영향을 초래한다고 알려져 있다. 그러나 유류 유출이 천해역에서 미치는 영향에 대한 국내 연안서식어류의 생활사에 따른 발생독성영향 민감도 연구결과는 국내·외적으로 매우 미진한 상태이다.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구에서는 의학진단계의 최첨단 기법인 Next generation sequencing (NGS) 기술을 이용한 넙치배아의 transcriptom을 대량 발굴하여 주요 지표 목록을 확보하였다. 또한 국내 연간 100만 배럴이상 수입되고 원산지가 다른 원유 4종을 선별하여 선행연구에서 확보된 유전자 목록의 지표를 정량분석 하였고 시간별 biotransformation 관련 유전자의 발현변화와 형태발생 기형빈도를 조사하여 독성 민감도를 분석하였다.

## IV. 연구개발결과

NGS로 넙치배아의 원유 노출반응 차등 RNA는 HiSeq 2500로 분석하였다. 전체 100 bp 크기의 171.8 million 개의 DNA가 생성되었고, 약 167,000개의 unigene 을 합성하였다. Annotation은 blastx를 이용하여 Zebrafish Gene DB, SwissProt DB, NCBI NR DB 순서로 homology search 를 수행하였으며, cutoff 는 e-value

$1-e^{-5}$  을 기준으로 하였다. Gene ontology 분석은 Function annotation 결과를 이용하여 선택하였다. 본 결과에서 원유와 풍화유에 노출된 넙치 배아는 대조구와 비교하여 대부분의 유전자들의 발현이 감소된 결과를 보였다. biotransformation에 연관된 유전자는 유류 노출구 모두에서 증가한 반면 translation, wound healing, transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway, fibroblast growth factor receptor signaling pathway 에 연관된 유전자는 대부분 발현이 유의하게 감소되었다. 본 결과를 통해 넙치배아는 원유노출로 인하여 기관형성 등에 연관된 많은 유전자가 유의하게 감소되어 형태발생에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 또한 원유 뿐 아니라 풍화된 원유(WF)에 노출된 배아 또한 발생과정이 억제되거나 유의하게 감소된 결과를 보여 원유 유출지역에 잔존 유류에 대한 발생독성을 확인할 수 있었다. NGS 분석결과에서 확인된 차등 발현 유전자목록을 확보하여 Q-PCR로 원산지별 발생독성 영향을 비교한 결과, Basrah light(Iraq), Sakhalin(Russia), S-oil MFO380(국내 정제유)에 노출된 넙치배아는 면역 관련 유전자들은 발현이 감소되었고, 특히 심장형태발생 관련 유전자인 NKX2.7과 microtubule 관련 유전자는 모든 실험구에서 발현이 감소된 결과를 보였고, 원유 노출 48시간 이후(부화완료 개체) 유전자 발현 패턴은 Australia산 원유를 제외한 Iraq, Russia산 국내 정제유에서 유사한 결과를 보였다. 형태기형발생 빈도는 S-oil MFO380에서 가장 높았고, Basrah light에서 가장 낮게 나타나 산지별 독성 민감도에 차이를 확인할 수 있었다.

## V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구는 연구원내 협력인프라가(분석화학분야 등) 충분히 구축되어 있고 NGS 첨단기술과의 접목을 통해 향후 선진 연구그룹으로의 도약하는데 중요한 기초기술이 될 수 있을 것으로 생각된다.

# SUMMARY

## I. Title

Evaluation of the developmental toxicity in fish using the Next Generation Sequencing (NGS)

## II. Necessities and objectives of the Study

Immediately after the Hebei Spirit oil spill (HSOS), fish aquaculture facilities were directly affected by the crude oil. Hatching success rate in marine species declined to lower than 50% in local field for seeding immediately nearby since the spillage that there was continuing controversy about the impacts of residual oil. The survey of juvenile fish population following the HSOS revealed that some resident fish including the greenling was shown low abundance rate of species for four years. The decrease was due to specific timing in some species which was overlapped with hatching or embryonic periods and crude oil persistence. These prompted the laboratory studies on the effects of spilled crude oil on fish development. Furthermore, there is no systematic comparative toxicity study under the environmentally relevant exposure system in marine embryonic fish.

## III. Contents and Scopes of the study

- Comparative study of primary toxicity on marine embryonic fish exposed to crude and weathered Iranian Heavy Crude Oil using Next Generation Sequencing (NGS)
- Comparative transcriptom study of the developmental toxicity from four different geological distinct crude oils under the continuous flow system

## IV. Results

Several complex defects, including the edema, tail fin defecting, spinal curvature and developmental delay were observed in embryos exposed both of FIHCO and EIHCO gravel effluent. In the study, we utilized the high-throughput RNA-seq to characterize the developmental defect from embryos exposed to crude IHCO and weathered IHCO. Total 171.8 million 100 bp were generated on an HiSeq 2500 instrument. About 167,000 of unigenes were generated in this work. In order to further evaluate the quality of assembled gene, 167,046 unigenes were identified on hits to the zebrafish data base with the more stringent criteria of blast score less 100. Most-notably, genes involved the in biotransformation system was up-regulated in embryos exposed to crude and weathered IHCO. However genes involved the translation, wound healing, transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway, fibroblast growth factor receptor signaling pathway response to wounding were significantly down-regulated in embryos exposed to IHCO. In order to validate the differently expressed gene identified by RNA-seq, we selected 16 genes for Q-PCR confirmation. We also have compared the developmental toxicity exposed to four different geological distinct crude oils under the continuous flow system. Embryos exposed to Basrah light(Iraq), Sakhalin(Russia) and S-oil MFO380 were significantly down-regulated the genes involved the immunity and heart tube development. Frequency percentage of pericardium edema, tail fin defect was the highest in embryo exposed to S-oil MFO380. But the frequency of developmental malformation was lower in embryo exposed to Basrah light in the study.

## V. Keywords

Next Generation Sequencing(NGS), Fish, embryo, pollution, toxicity

## 표 목 차

표 1. 냅치배아를 노출시킨 gravel effluent에서 PAHs(ng/L) 농도 .....	16
표 2. Realtime PCR 유전자 서열 및 조건 .....	18

## 그림 목차

그림 1. 넙치배아의 원유 노출장치 .....	9
그림 2. NGS 분석의 QA/QC .....	10
그림 3. 대조구(CF)와 비교하여 원유(FF)와 풍화유(WF)에 노출된 넙치배아의 차등발현 유전자 .....	10
그림 4. 원유에 노출된 넙치배아의 차등 발현된 유전자 목록 및 발현 모식도 .....	12
그림 5. 원유(FF)에 노출된 넙치배아의 유의하게 증가된 유전자 목록 및 Gene Ontology .....	13
그림 6. 원유(FF)에 노출된 넙치배아의 유의하게 감소된 유전자 목록 및 Gene Ontology .....	13
그림 7. 풍화유(WF)에 노출된 넙치배아의 차등 발현된 유전자 목록 및 발현 모식도 .....	14
그림 8. 풍화유(WF)에 노출된 넙치배아의 유의하게 증가된 유전자 목록 및 Gene Ontology .....	15
그림 9. 원유(FF)에 노출된 넙치배아의 유의하게 감소된 유전자 목록 및 Gene Ontology .....	15
그림 10. 원유(FF) 및 풍화유(WF)에 노출된 넙치배아의 형태기형 발생빈도 .....	16
그림 11. 원유산지별 원유 노출배아의 형태기형 발생빈도 .....	19
그림 12. 원유산지별 원유 노출배아의 CYP1A와 AhR 발현변화 .....	20
그림 13. 원유산지별 원유 노출배아의 발생관련 유전자 발현변화 .....	21

# Contents

Summary .....	V
List of Tables .....	XI
List of Figures .....	XIII
Chapter 1. Necessity of the study .....	1
Chapter 2. Objectives of the study .....	5
Chapter 3. Driving approach .....	6
Chapter 4. Results of the study	
Section 1. Next generation sequencing of embryos exposed to crude oil ..	7
A. Materials and methods .....	7
B. Results and Discussion .....	10
Section 2. Comparative study of developmental toxicity on embryos exposed to four geologically distinct crude oils .....	17
A. Materials and methods .....	17
B. Results and Discussion .....	19
Chapter 5. References .....	22

## List of Table

Table 1. The PAHs concentrations (ng/L) in oiled gravel effluent of IHCO in the study .....	15
Table 2. PCR primers and condition in this study .....	17

## List of Figure

Figure 1. Continuous flow system in the study .....	8
Figure 2. QA/QC in Next Generation Sequencing .....	9
Figure 3. Statistics of differently expressed genes in embryos exposed to Fresh and Weathered IHCO .....	9
Figure 4. Summary of gene identification in embryos exposed to Fresh IHCO .....	11
Figure 5. List of statistically different up-regulated genes and Gene Ontology in embryos exposed to Fresh IHCO .....	12
Figure 6. List of statistically different down-regulated genes and Gene Ontology in embryos exposed to Fresh IHCO .....	12
Figure 7. Summary of gene identification in embryos exposed to weathered IHCO .....	13
Figure 8. List of statistically different up-regulated genes and Gene Ontology in embryos exposed to weathered IHCO .....	14
Figure 9. List of statistically different down-regulated genes and Gene Ontology in embryos exposed to weathered IHCO .....	14
Figure 10. Frequency of morphological defects in embryos exposed to Fresh and weathered IHCO .....	15
Figure 11. Frequency of morphological defects in embryos exposed to four geologically distinct crude oils .....	18
Figure 12. Relative expression of CYP1A and AhR in embryos exposed to four geologically distinct crude oils .....	19
Figure 13. Relative expression of genes involved development in embryos exposed to four geologically distinct crude oils .....	20

# 제1장. 연구개발의 필요성

## 1절. 필요성

### 1. 기술적 측면

- 2012년 통계청 자료에 따르면 국내 해상에 발생하는 해양오염사고 중 유류 유출사고가 발생건수 224건 유출량 총 365 kl로 전체 유해물질과 폐기물등을 포함한 전체 해양오염사고의 87%를 차지하고 있으며, 유류 유출 발생지역은 남해안이 가장 빈번하며, 유출량은 2011년과 비교하여 소폭 증가한 추세를 보이고 있다.
- 연안해서 발생하는 유류 유출 사고는 수 많은 치어 및 자어가 폐사되고, 부화율 감소와 수정란의 질적 저하등이 보고되고 있으며(NFRDI, 2009), 대량으로 유출된 유류 등은 연안에 장기간 잔존하며 지속적인 독성영향을 초래한다고 알려져 있다.
- 특히, 천해는 해양생물의 산란 및 보육장으로서, 유출사고가 발생하여 연안이 오염되면 수많은 배아와 치어등은 치명적인 영향을 받게 되고 자원량이 감소되는 등 생태계의 심각한 불균형을 초래하게 된다.
- 그러나 유류 유출이 천해역에서 미치는 영향에 대한 국내 연안서식어류나 연안생물의 생활사에 따른 독성영향 민감도 연구결과는 국내·외적으로 매우 미진한 상태이다.
- 더욱이 우리나라로 수입되는 원유는 연간 약 8억 7천만 배럴로 세계 7위 소비국이며 수입국가 또한 중동, 아시아, 아프리카, 아메리카로 다양하고, 국내 수입원유 종류에 따라 alkane이나 알킬기가 치환된 다환방향족 탄화수소의 조성에 차이를 보이는 것으로 보고되고 있다(김 등 2012).

○ 유류 사고가 환경에 미치는 영향은 유출된 유류의 성질, 독성, 지속성, 누출된 계절과 시기, 누출량, 누출된 해역의 특성 등에 따라 다르나, 다양한 수입 원유에 대하여 산지의 종류 또는 자연 풍화에 따른 생물독성 영향여부에 대한 생리·화학적 비교연구는 거의 찾아 볼 수 없다.

○ 미국의 경우 1989년 발생한 엑손 발데즈호 유출사고 수년이 지난 유출 현장에서 청어 배아의 기형독성 영향이 보고되면서(Brown et al., 1996; McGurk et al., 1996), 최근 유류 누출에 따른 초기생활사에 미치는 독성영향 연구는 중요한 핵심 분야로 부상되고 있다.

○ 지금까지 국내 연안 서식어류 배아의 발생단계에 따른 유류 누출 민감도 연구는 결과는 매우 제한적이며, 특히 아치사 농도수준에서 NGS(Next Generation Sequencing) 기술을 접목하여 유류 조성차이에 따른 형태발생 독성 영향에 대한 연구는 지금까지 전무한 상태이다.

○ 어류의 초기배아는 성어와 비교하여 체표 면적당 오염물질 생체 축적율이 높고, 독성물질에 대하여 높은 민감도를 가지고 있으므로 오염된 환경으로 인한 실제 발현형(phenotype)의 생물 독성영향을 진단하기에 유용한 생활사이다.

○ 또한 전체 RNA transcription을 포함한 발현정도를 분석할 수 있는 NGS 기술의 접목은 다양한 유출 시나리오에 따른 해양생물의 발생단계나 누출정도와 배아의 형태 기형 발생영향메커니즘을 보다 명확히 규명할 수 있을 것으로 판단되며

○ 본 연구를 통하여 국·내외 해상에서 발생하고 있는 해양환경오염사고에 대응한 진단평가분야를 선도할 수 있는 중요한 시발점이 될 수 있을 것으로 생각된다.

## 2. 경제, 산업적 측면

- 국내 해양환경관리를 위한 유해 화합물에 대한 생물체의 피해를 보다 신속하고 정밀하게 분석할 수 있는 독성평가기법의 기술화를 통해 기술이전, 생물학적 위해성 평가 사업등을 통해 산업적 측면등에 기여 가능할 것으로 기대된다.
- 실험에 필요한 어류를 직접 채취하기 위해서 많은 시간과 노동력을 소비하고 있다. 특히, 고가의 어류를 실험 생물로 사용할 경우 유지와 노출실험을 위해 경제적 부담이 매우 크다(예 감성돔, 참돔 등).
- 따라서 실험 비용은 절감할 수 있으면서 동시에 관리가 용이한 어류배아를 활용할 경우 실험자가 실험생물의 질을 직접 관리할 수 있을 뿐 아니라, 최소한의 실험공간으로 짧은 기간(6일 이내)의 독성 영향을 평가할 수 있는 장점을 가지고 있다.

## 3. 사회, 문화적 측면

- 해산 어류가 중요한 단백질원인 국내 사회적 정서를 고려해 볼 때, 본 연구를 통해 해양자원의 보존 나아가서는 건강한 먹거리, 생명의 원천인 해양 자원유지와 보존을 위한 생태계의 위험을 예측하고 관리 할 수 있는 기반을 제공할 수 있을 것이다.
- 또한 신뢰성 있고 체계적인 독성평가 기술로서 국내 해산어 배아를 이용한 유출유 발생독성 연구는 해양환경 오염물질에 대한 법적 또는 사회적 기준 마련에 기여할 수 있는 과학적 근거를 제공할 수 있으므로 우리 원의 궁극적 목적에도 크게 부합될 것으로 사료된다.

## 2절. 국내 · 외 연구동향

- 1989년 발생한 엑손 발데즈 유류 유출사고 이후 어류 초기발생에 미치는 유류의 독성영향에 대한 실험실 연구와 현장 모니터링 연구가 시작되었으며(Incardona et al., 2004; 2009; Marty et al., 1997; Brown et al., 1996).

○ 지금까지 국제 표준시험 어종 및 현장 서식어종의 배아를 이용하여 PAHs 노출로 인한 다양한 기형발생 영향등이 보고된 바 있으며, 배아의 발생 기형을 유발할 수 있는 PAH의 성분 및 농도(1-5 ug/L)에 대한 연구(Carls et al., 1999, 2005; Carls et al., 2008)들이 보고된 바 있다.

○ NGS 기술은 육상생물(포유류)등의 질병진단, 자원복원연구 분야등을 비롯하여 다양하게 적용되고 있으나, 국외 연구진에 의해 유류에 노출된 해산어류 배아의 NGS 기술을 이용한 발생독성 연구는 보고된 바 없다.

○ 국내의 어류 배아를 이용한 생물독성 평가기법은 대부분 급성노출로 인한 치사율변화 및 수정율 변화등이 보고되고 있으며, 유류에 오염된 공극수나 해수에 노출된 PAHs로 인한 어류의 수정율 및 치사율 변화에 따른 연구(국토해양부, 2008, 2009)가 주류를 이루고 있다.

○ 본 연구진에 의한 국내 허베이 사고 유출유에 노출된 zebrafish 배아의 형태기형 발생 및 생화학적 발현 변화에 대한 연구보고가 있다(Jung et al., 2013).

○ 노출기법의 대부분이 해수에 처리물질을 바로 투여하여 독성영향을 연구한 예가 대부분이며 현장 환경을 가깝게 모사한 Continuous flow system을 활용한 유류 노출연구는 거의 찾아 볼 수 없는 실정이다.

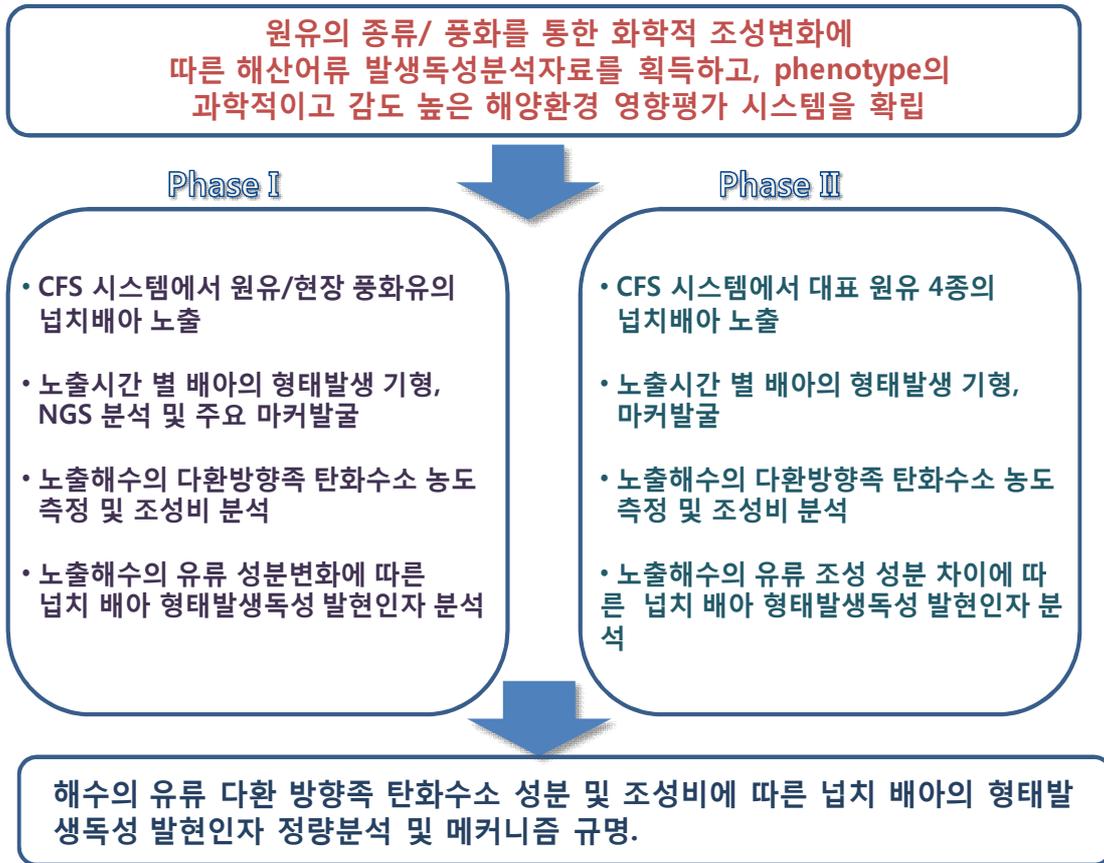
○ 국내 2007년 NGS 기술이 국내 인체 질병 연구분야에 소개된 이후 다양한 생물군에서 활용되고 있으나, 발생단계에 따른 유류 독성 연구분야와 접목한 사례는 찾아 볼 수 없다.

## 제2장. 연구개발목표

---

- 해수내 다환방향족 탄화수소의 조성 변화에 따른 원유와 풍화유의 노출 시간별·발생단계별 독성영향을 비교 분석하여 형태기형발생 메커니즘을 밝힌다.

### 제3장. 연구추진 체계



## 제4장. 연구개발 내용 및 결과

### 제 1 절 원유와 현장 풍화유에 노출된 넙치 배아의 NGS 분석

#### 1. 재료 및 방법

##### 가. 어류 수정란

실험을 위한 인공수정 된 넙치의 수정란은 제주도 이화상록수산에서 구입하였다. 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 수정란은 부상란으로, 사육해수는 마이크로 필터 해수를 공급하며 약하게 에어공급을 하였으며 수온은 14℃를 유지하였다. 실험에 사용한 수정란은 가라앉은 사란은 제거하고 표층에 떠 있는 수정란만을 현미경하에서 선별하여 유류 노출실험에 사용하였다.

##### 나. 노출 시스템

Graveled oil effluent 노출: 깨끗한 자갈 3 kg에 IHCO원유와 IHCO 풍화유 6 g 을 측정 후 Incardona등(2008)의 방법으로 기름을 코팅시켰다. 준비된 자갈은 한국해양과학기술원 남해분원에 설치된 flow-through system을 이용하여 16시간 동안 유수시킨 후 어류 배아 노출실험에 사용하였다. 실험구는 대조구(CF), IHC 원유(FF), IHC 풍화유(WF)로 나누었다(그림 1). 실험구 별로 약 1000개의 수정란을 선별하여 24시간 간격으로 해부현미경하에서 기형발생유무를 관찰하였다. 발현형 기형의 판단은 심장부종, 척추만곡, 꼬리지느러미 기형, 발생지연등으로 나누어 출현빈도를 계산하였다.

##### 다. NGS 데이터 생산

**NGS 데이터 생산:** RNA 서열 생산은 PE100 (paired-end 100bp) 라이브러리 제작 후 Illumina HiSeq 2500 Platform 을 이용하여 Sequencing을 하였으며, 각 샘플당 60.7M~62.8M 개의 리드(read)가 생산되었다. 생산된 서열 중 low quality data 를 제거하고 남은 F의 데이터 총량은 15.7Gbp (giga base pair), SP의 총량은 15.7Gbp 로 이후 분석에 충분한 서열 정보를 얻었다.

**Unigene assembly:** 생산된 서열에서 각 종에 해당하는 Unigene 서열을 얻기 위해서 Trinity 를 이용한 Assembly 와 TGICL을 이용한 Clustering 을 진행하였다. Assembly 결과 F는 166,942

개의 Unigene 서열이 얻어졌으며, 길이의 총합은 171.7Mbp (mega basepair), 평균 1,029bp 가 지고. SP 샘플은 167,049개의 Unigene 이 얻어졌으며, 길이의 총합은 171,8Mbp (meag basepair), 평균 1,029bp 길이를 가지고 있다. *Annotation*: 두 종의 Unigene 에 대한 Function prediction(기능 예측)을 위해서 Blastx를 이용한 Annotation 을 수행하였다. Annotation은 blastx 를 이용하여 Zebrafish Gene DB, SwissProt DB, NCBI NR DB 순서로 homology search 를 수행하였으며, cutoff 는 e-value  $1-e^5$  을 기준으로 하였다. 주종 모두 약 57% 정도의 Unigene 이 Annotation 되었다. *Expression & DEG analysis*: 각 Unigene의 발현량 정보는 RSEM 을 이용하여 측정되었으며, DEG 분석은 R-TCC package 를 이용하여 수행되었다. GO enrichment: 각 Unigene 의 GO 정보는 Function annotation 결과를 이용하여 선택하였다. 이 후 Enrichment 분석은 Fisher-exect test 를 이용하여 분석하였으며, in-house program 을 이용 하였고, cutoff 는 *p*-value 0.001 을 이용하였다. Pathway enrichment : Pathway enrichment 는 David 를 이용하여 진행되었다.

#### 라. PAHs 농도 분석

기기분석은 다환 방향족 탄화수소계열은 GC-MS (Hewlett Packard 5890 gas chromatograph/ 5972 mass selective detector)를 사용하였고, 총석유계탄화수소계열은 GC-FID (Agilent 7890A gas chromatograph/ flame ionization detector)를 사용하여 정량·정성 분석하였다. 분석대상 다환방향족 탄화수소는 총 24종으로 분자량 128의 나프탈렌에서 278의 디벤조[a,h]안트라센까 지 분석했다. 총 PAHs는 EPA (1987)에서 우선관리대상물질로 정하고 있는 16종을 기준으로 계산하였고, 대상 화합물은 본 연구에서 분석한 PAHs는 다음과 같다. Naphthalene (N0), C1-Naphthalene (N1), C2-Naphthalene (N2), C3-Naphthalene (N3), C4-Naphthalene (N4), Acenaphthylene (AY), Acenaphthene (AE), Fluorene (F0), C1-Fluorene (F1), C2-Fluorene (F2), C3-Fluorene (F3), Dibenzothiophene (D0), C1-Dibenzothiophene (D1), C2-Dibenzothiophene (D2), C3-Dibenzothiophene (D3), Phenanthrene (P0), C1-Phenanthrene (C1), C2-Phenanthrene (C2), C3-Phenanthrene (C3), C4-Phenanthrene (C4), Anthracene (ANT), Fluoranthene (FLO), Pyrene (PY0), Benz[a]anthracene (BAA), Chrysene (C0), C1-Chrysene (C1), C2-Chrysene (C2), C3-Chrysene (C3), Benzo[b]fluoranthene (BBF), Benzo[k]fluoranthene (BKF), Benzo[a]pyrene (BAP), Perylene (PER), In.d.eno[1,2,3-cd]pyrene (IDY), Dibenzo[a,h]anthracene (DBA), Benzo[ghi]perylene (BPY).



그림 1. 납치배아의 원유 노출을 위한 유수식 (continuous flow system) gravel effluent 노출장치

## 2. 결과 및 고찰

Transcriptom 분석은 De novo assembly로 수행하였다. RNA 시료의 integrity는 7이하로 분석에 적합한 수준을 보였다. 28s/18s ratio는 1.0이하였다. 그림2와 같이 시료의 sequence quality는 적합하였고, 전체 분석된 유전자의 상동성이 척추동물에서 93%로 나타났다. 원유 노출된 넙치 배아와 풍화유류에 노출된 넙치배아의 증가/감소된 발현된 유전자의 결과는 그림 3과 같았다. 깨끗한 해수에서 발생과정을 거친 대조구와 비교하여 원유 노출구는 97개의 유전자가 증가, 448개의 유전자가 감소되었고 풍화된 유류에 노출된 시료의 경우 108개가 증가 419개가 감소되는 등 대부분의 차등된 유전자는 감소된 결과를 보였다.

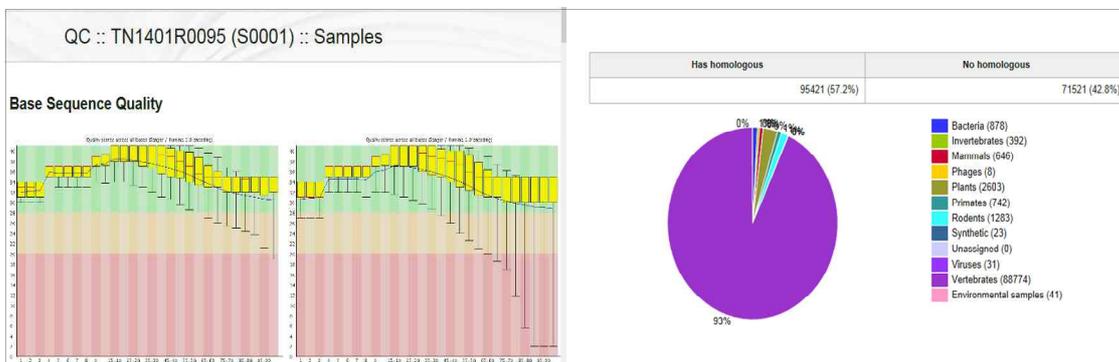


그림 2. NGS분석의 QA/QC 결과

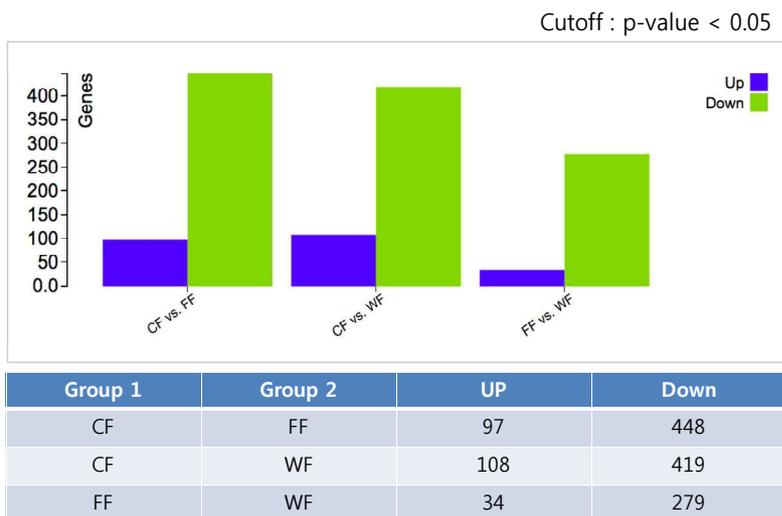


그림 3. 대조구(CF)와 비교하여 원유와(FF) 풍화유(WF)에 노출된 넙치배아의 차등 발현된 유전자 갯수

원유(WF)에 노출된 넙치배아에서 차등(증가 및 감소) 발현된 유전자 목록과 발현 모식도는 그림 4와같이 나타났다. 원유 노출실험에서 발현이 증가된 유전자 상위 목록은 해독효소관련 CYP계와 Ahrr 등이었고, xenobiotic stimulus 반응과 transcription에 관련한 기능의 유전자가 차등 발현한 결과를 보였다. 독성 pathway는 tryptophan 대사관련 유전자 목록이 검색되었다(그림 5). 원유(WF)에 노출된 넙치배아에서 유의하게 발현이 감소된 유전자는 Aplipoprotein, MAPTA등으로 나타났고, translation관련 Go를 가진 유전자들의 기능이 감소되는 결과를 보였다(그림 6).

풍화유(WF)에 노출된 넙치배아에서 차등(증가 및 감소) 발현된 유전자 목록과 발현 모식도는 그림 7과 같이 나타났다. 유의하게 증가된 유전자 목록은 앞서 원유 노출구와 유사한 결과를 보였고 증가한 유전자는 해독효소관련 CYP계와 Ahrr 등이었고, regulation of transcription, DNA-dependent 조절 관련한 기능의 유전자가 차등 발현한 결과를 보였다(그림 8).

대조구와 비교하여 oiled gravel effluent (OGE)의 PAHs 농도는 유의하게 높았다. 노출장치는 지속적으로 깨끗한 해수를 흘려주는 방법을 이용하였으므로 전체적인 PAHs 의 농도가 48시간 경과후 감소한 결과를 보였다. 원유와 풍화유를 처리한 실험구 모두 노출시간이 경과하면서 alkylated PAHs의 농도가 16PAHs 보다 크게 높았고, Iranian 원유의 특성과 유사하게 dibenzothiophene groups의 비율이 높았다(표 1).

원유(WF)에 노출된 넙치배아에서 유의하게 발현이 감소된 유전자는 Aplipoprotein등이 나타났고, fibroblast growth factor receptor signaling pathway, wound healing, response to wounding 등 발생과 체내방어시스템 관련한 기능의 유전자가 감소된 결과를 보였다(그림 9).

본 결과를 통해 넙치배아는 원유노출로 인하여 기관형성 등에 연관된 많은 유전자가 유의하게 감소되어 발생이 억제되는 것으로 나타났으며 특히 심장형성관련유전자 또는 자가 치유 관련한 면역 유전자들이 유의하게 변동한 결과를 보였다. 원유 뿐 아니라 풍화된 원유(WF)에 노출된 배아 또한 발생과정이 억제되거나 유의하게 감소된 결과를 보여 원유 유출지역에 잔존 유류에 대한 발생독성을 확인할 수 있었다. 원유(FIHCO), 풍화유(EIHCO) 모두 넙치배아의 형태기형 발생 빈도를 증가시키는 결과를 보였다. 심장부종(edema)은 95~98%로 나타났고, 발생지연은 14~21%로 나타나 형태기형 발생빈도에 치명적인 영향을 미치는 것으로 나타났다(그림 10).

Name	Desc	U/D
AL935186.6	Uncharacterized protein	
BX296557.7	Uncharacterized protein	
CYR1	cysteine/tyrosine-rich 1	D
EVA1C (2 of 9)	eva-1 homolog C (C. elegans)	D
HAUS2	HAUS augmin-like complex, subunit 2	D
IL17RD (2 of 2)	interleukin 17 receptor D	U
ahrbb	aryl-hydrocarbon receptor repressor b	U
atad1b	ATPase family, AAA domain containing 1b	
cfD	complement factor D (adipsin)	D
cth1	cth1	D
cyb5a	cytochrome b5 type A (microsomal)	
cyp1a	cytochrome P450, family 1, subfamily A	U
cyp1b1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	U
cyp1c1	cytochrome P450, family 1, subfamily C, polypeptide 1	U
her7	hairy and enhancer of split related-7	
hsp90aa1.2	heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1, tandem duplicate 2	U
igfbp5b	insulin-like growth factor binding protein 5b	U
mcat	malonyl CoA:ACP acyltransferase (mitochondrial)	D
mt-atp8	ATP synthase 8, mitochondrial	D
mt-nd1	NADH dehydrogenase 1, mitochondrial	D
mt-nd2	NADH dehydrogenase 2, mitochondrial	D
nanog	nanog homeobox	D
nhp211b	NHP2 non-histone chromosome protein 2-like 1b (S. cerevisiae)	D
nkx2.7	NK2 transcription factor related 7	D
nop10	NOP10 ribonucleoprotein homolog (yeast)	D
prmt6	protein arginine methyltransferase 6	D
rpl28	ribosomal protein L28	D
rplp2l	ribosomal protein, large P2, like	D
si:ch211-66i15.5	si:ch211-66i15.5	D
slc25a15b	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; ornithine transporter) member 15b	U
tnni2b.1	troponin I, skeletal, fast 2b, tandem duplicate 1	D
ugt1a7	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A7	U
wu:fe11b02	wu:fe11b02	
zgc:158463	zgc:158463	

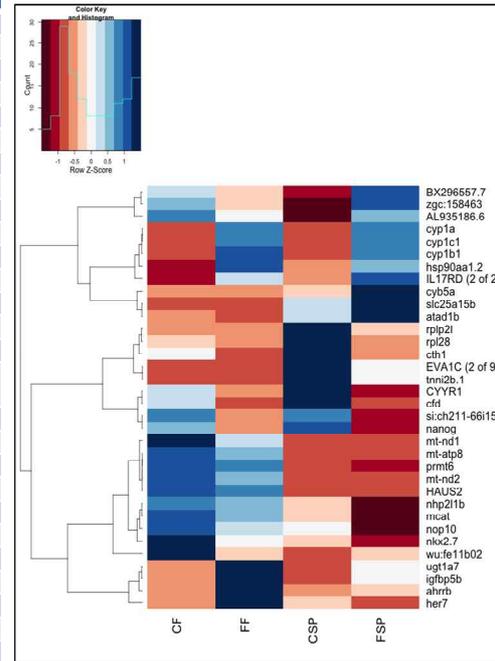


그림 4. 원유에 48시간 노출된 넙치배아의 차등 발현된 유전자 목록(좌)과 발현모식도

Up (Top 5) Cutoff : p-value < 0.05

Name	Log2(fc)	P-val
cyp1a	4.4	0.000
ahrrb	6.0	0.000
cyp1c1	4.2	0.000
si:dkey-34d22.1	4.5	0.000
cyp1b1	3.9	0.000

Go enrichment

Name	Desc	P-val
GO:0006350	Transcription	0.018
GO:0009410	Response to xenobiotic stimulus	0.042

그림 5. 대조구(CF)와 비교하여 원유(FF)에 노출된 넙치배아에서 유의하게 증가된 유전자 상위 5개 목록과 Gene Ontology

Down (Top 5)

Name	Log2(fc)	P-val
Apoc1(aplipoprotein C1-like)	-2.97	0.000
si:dkeyp-75b4.10	-2.53	0.000
MAPTA	-10.1	0.000
s100v1	-2.77	0.000
atp5e	-2.26	0.000

GO

Name	Desc	P-val
GO:0006412	translation	1.22E-40
GO:0006414	translational elongation	4.46E-05

그림 6. 대조구(CF)와 비교하여 원유(FF)에 노출된 넙치배아에서 유의하게 감소된 유전자 상위 5개 목록과 Gene Ontology

Name	Desc	U/D
CABZ01041200.1	Uncharacterized protein	D
EMG1	EMG1 N1-specific pseudouridine methyltransferase	D
EVA1C (2 of 9)	eva-1 homolog C (C. elegans)	D
KLF16	Kruppel-like factor 16	D
ahnak	AHNAK nucleoprotein	D
ahrrb	aryl-hydrocarbon receptor repressor b	U
apobb	apolipoprotein Bb	D
atad1b	ATPase family, AAA domain containing 1b	
capn1a	calpain 1, (mu/I) large subunit a	D
cnpy1	canopy1	
csk	c-src tyrosine kinase	U
cyp1a	cytochrome P450, family 1, subfamily A	U
cyp1b1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	U
cyp1c1	cytochrome P450, family 1, subfamily C, polypeptide 1	U
dpm3	dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 3	D
fabp1b.2	fatty acid binding protein 1b, tandem duplicate 2	D
foxq1a	forkhead box Q1a	U
gmeb1	glucocorticoid modulatory element binding protein 1	U
gstt1a	glutathione S-transferase theta 1a	
hapln1a	hyaluronan and proteoglycan link protein 1a	D
hsp90aa1.2	heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1, tandem duplicate 2	U
igfbp5b	insulin-like growth factor binding protein 5b	U
ldhba	lactate dehydrogenase Ba	U
lum	lumican	D
mcat	malonyl CoA:ACP acyltransferase (mitochondrial)	D
mrps28	mitochondrial ribosomal protein S28	D
nanog	nanog homeobox	D
nkx2.7	NK2 transcription factor related 7	D
ppl	periplakin	D
si:ch211-66i15.5	si:ch211-66i15.5	D
si:dkey-34d22.1	si:dkey-34d22.1	U
ugt1a7	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A7	U

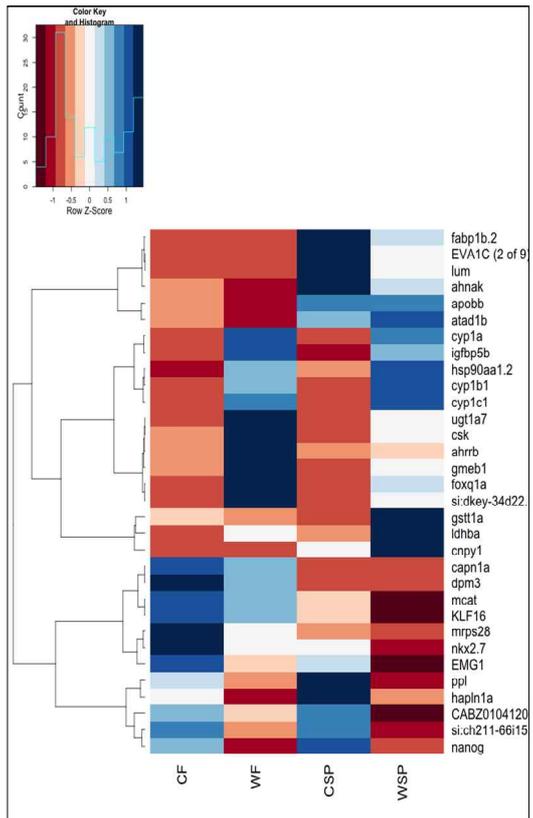


그림 7. 원유에 48시간 노출된 넙치배아의 차등 발현된 유전자 목록(좌)과 발현모식도

### Up (Top 5)

Name	Log2(fc)	P-val
cyp1a	4.82	0.000
cyp1c1	4.25	0.000
ugt1a7	3.92	0.000
si:dkey-34d22.1	4.48	0.000
ahrrb	5.23	0.000

### Go enrichment

Name	Desc	P-val
GO:0006355	regulation of transcription, DNA-dependent	0.0541
GO:0051252	regulation of RNA metabolic process	0.0569

그림 8. 대조구(CF)와 비교하여 풍화유(WF)에 노출된 넙치배아에서 유의하게 증가된 유전자 상위 5개 목록과 Gene Ontology

### Down (Top 5)

Name	Log2(fc)	P-val
BX296557.7	-4.47	0.000
AL935186.6	-4.29	0.000
zgc:158463	-4.22	0.000
Apoc1(aplipoprotein C1-like)	-4.45	0.000
si:dkeyp-75b4.10	-3.72	0.000

### GO

Name	Desc	P-val
GO:0006412	translation	0.0034
GO:0042060	wound healing	0.0306
GO:0030168	platelet activation	0.0339
GO:0007169	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	0.0367
GO:0008543	fibroblast growth factor receptor signaling pathway	0.0394
GO:0009611	response to wounding	0.0474

그림 9. 대조구(CF)와 비교하여 풍화유(WF)에 노출된 넙치배아에서 유의하게 감소된 유전자 상위 5개 목록과 Gene Ontology

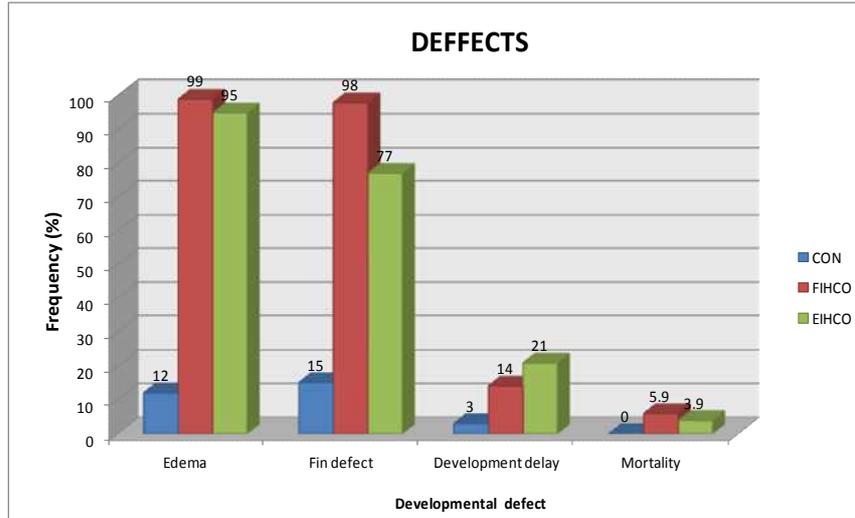


그림 10. 대조구(CON)와 비교하여 원유(FIHCO), 풍화유(EIHCO)에 노출된 넙치배아의 형태기형 발생 빈도

표 1. 넙치배아를 노출시킨 gravel effluent에서 PAHs(ng/L) 농도. Control; embryonic fish exposed to un-oiled gravel effluent, FIHCO; embryonic fish exposed to fresh IHCO gravel effluent, EIHCO; embryonic fish exposed to evaporated IHCO gravel effluent.

Exposure hours	0h			48h		
	Control Oiled gravel effluent	FIHCO Oiled gravel effluent	WIHCO Oiled gravel effluent	Control Oiled gravel effluent	FIHCO Oiled gravel effluent	WIHCO Oiled gravel effluent
Σ 16 PAHs (ng/L)	114	716	651	80	182	250
Σ Alkyl PAHs (ng/L)	146	10582	9381	111	3892	5775
Σ PAHs (ng/L)	263	12054	10755	193	4339	6416
Σ Naph (ng/L)	88	147	63	63	41	23
Σ Flu (ng/L)	8	216	233	7	34	60
Σ DBT (ng/L)	3	755	723	2	265	391
Σ Phen (ng/L)	9	304	304	5	92	146
Σ Chr (ng/L)	1	4	4	nd	3	3

## 제 2 절 원산지별 수입원유의 발생독성 비교

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 어류 수정란

실험을 위한 인공수정 된 넙치의 수정란은 제주도 이화상록수산에서 구입하였다. 넙치의 수정란은 부상란으로, 사육해수는 마이크로 필터 해수를 공급하며 약하게 에어공급을 하였으며 수온은 14℃를 유지하였다. 실험에 사용한 수정란은 가라앉은 사란은 제거하고 표층에 떠 있는 수정란만을 현미경하에서 선별하여 유류 노출실험에 사용하였다 어류 수정란의 유류 노출특이적 발생독성 영향을 연구하기 위하여 Basrah light(Iraq), Pyreness(Australia), Sakhalin(Russia), S-oil MFO380 (국내정제유)에 노출 4h, 8h, 12h, 24h 48h 시간 후 형태기형 및 유전자 발현 변화 등을 측정하였다.

#### 나. 노출 시스템

Graveled oil effluent 노출: 깨끗한 자갈 3 kg에 Basrah light(Iraq), Pyreness(Australia), Sakhalin(Russia), S-oil MFO380 (국내정제유) 원유 3 g 을 측정 후 Incardona 등(2008)의 방법으로 기름을 코팅시켰다. 준비된 자갈은 한국해양과학기술원 남해분원에 설치된 flow-through system을 이용하여 16시간 동안 유수시킨 후 어류 배아 노출실험에 사용하였다 실험구 별로 약 1000개의 수정란을 선별하여 해부현미경하에서 기형발생유무를 관찰하였고 48 시간 후 유전자 분석을 위하여 액체질소에 급속냉동 하였다.

#### 다. Real-time PCR 분석

Embryo는 tube에 500  $\mu$ l의 isogen을 넣고 마쇄한 후 chloroform (SIGMA, USA) 100  $\mu$ l를 첨가하여 실온에 10분간 반응시켰다. 반응이 끝나고 4 °C, 14000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 얻은 상층액 100  $\mu$ l를 새로운 E-tube로 옮겨 동량의 Isopropanol (SIGMA, USA)을 넣고 혼합하여 다시 4 °C, 14000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 상층액을 제거하였다. 침전물에 75 % DEPC ethanol을 500  $\mu$ l첨가하여 세척을 하였고 상층액을 제거하여 침전물을 상온에서 10분간 자연 건조시켜 DEPC D.W로 현탁 후 total RNA를 추출하였다.

노출된 유류의 농도에 대한 유전자의 발현을 정량하기 위하여 Quantitative real time PCR을 수행하였다. 분리한 total RNA를 Takara first strand cDNA synthesis kit (TaKaRa, Japan)을

이용하여 cDNA로 합성하여 cDNA template 2  $\mu$ l와 각각의 forward primer, reverse primer 각각 1  $\mu$ l, SYBR premix Ex Taq II (TaKaRa, Japan) 12.5  $\mu$ l, D.W 8.5  $\mu$ l씩 total volume 25  $\mu$ l만들어서 유전자 조건에 맞춘 온도로 반응하였다.

표 2. Realtime PCR 유전자 서열과 조건

primer name	contains	sequence	PCR conditions
AHH1	Primer1 primer2	GGAGGAGCTTGACCTTAGATTC GCTCTGTAGTCATAGAGCGACAC	30" at 95 °C, 30" at 60 °C, 1' at 72 °C
AHR2	Primer1 primer2	GAAAGTAGAGGCCAAGCAGTCT GAGAGAAGGTACGATCAGGACTC	30" at 95 °C, 30" at 60 °C, 1' at 72 °C
AHRRb	Primer1 primer2	CTATGGTAACGGGATGTACGAC GAGAGTCTCTGAGGACTAAACTGG	30" at 95 °C, 30" at 60 °C, 1' at 72 °C
APOC1L	Primer1 primer2	ATACACAGAGGCTCAGGATGC GGCTGATTTCCCTCTATCTTGGC	30" at 95 °C, 30" at 60 °C, 1' at 72 °C
CIQTNF9	Primer1 primer2	GAGGAGATAAGGGTGATAAGGG GTGGTAGGTGAAAATAGTAGGCC	30" at 95 °C, 30" at 60 °C, 1' at 72 °C
CYP1A	Primer1 primer2	GACTTCATCCCTATCCTCCAGT CCTCTCCTGTATCTCTGGTAAG	30" at 95 °C, 30" at 60 °C, 1' at 72 °C
CYP1B1	Primer1 primer2	GTGACTCTGCTTCTCCCTC GTACTGGAAGAGGTGAAGTCG	30" at 95 °C, 30" at 62 °C, 1' at 72 °C
CYP1C1	Primer1 primer2	CAAGTTTGAGAGACAGTAGGG GCAGTCTGCTTGGCCACTAC	30" at 95 °C, 30" at 60 °C, 1' at 72 °C
DEFBL1	Primer1 primer2	GGTCTTGCCCACTAAGT CACGCAACACAAAAGCC	30" at 95 °C, 30" at 60 °C, 1' at 72 °C
FGF7	Primer1 primer2	GAACACGACTACATGGAGGGAG GTCCACTTTCAGAGGAGTAAG	30" at 95 °C, 30" at 60 °C, 1' at 72 °C
JTB	Primer1 primer2	GTCTCGTTTCCCTGAGAGTGT ATCGACAGCTCTGTACTCGTC	30" at 95 °C, 30" at 60 °C, 1' at 72 °C
LOC	Primer1 primer2	GGCACCCAACTGAAACAC TCAGCACTTCTTGGAGACC	30" at 95 °C, 30" at 60 °C, 1' at 72 °C
MAPTA	Primer1 primer2	CTGGACTTCAGTCGTTCAGT GGGCCTTATCCTTAAAGTCCAG	30" at 95 °C, 30" at 60 °C, 1' at 72 °C
ORG	Primer1 primer2	GTCTCTCTACTAAACCCTGTGG CTGTATGTGTGCGAGCAG	30" at 95 °C, 30" at 60 °C, 1' at 72 °C
OXR1A	Primer1 primer2	GAGGTAGTGTACTGACGGAGTA CTTCTCTATCTGGTGGCCTC	30" at 95 °C, 30" at 60 °C, 1' at 72 °C
RB1	Primer1 primer2	AGGAGTGATCTCCTCTACTGG TAAACAGTCGACTCCGAGGG	30" at 95 °C, 30" at 60 °C, 1' at 72 °C
UGT1A7	Primer1 primer2	CTCTAATGAGTCGAGTGAAGGG CATGAGTAGGACTCCACAACAG	30" at 95 °C, 30" at 60 °C, 1' at 72 °C

## 2. 결과 및 고찰

노출 48시간 후 넙치 배아의 형태발생에 연관된 원산지별 기형의 출현 빈도는 그림 11과 같이 나타났다. 태안유출원유(Iranian Heavy crude oil)와 비교한 결과 S-oil MFO380 (국내정제유)와 Australia산 Pyreness가 심장부종의 빈도가 높았고, 꼬리 지느러미 기형 발현빈도는 MFO380 (국내정제유)와 Russia산 Sakharin에 노출된 배아에서 높게 나타났다. Iraq산 Basrah light이 비교적 심장부종, 척추만곡, 발생지연, 꼬리지느러미 기형등 형태기형 발생빈도가 낮게 나타났다. 본 결과는 통해 어류 배아 발생독성은 비 특이적인 반응이 아닌 일부 원유 조성 및 성분에 따라 특이적일 가능성을 보여주고 있으며 따라서 미래에 유출된 원유의 원산지별로 형태발생 기형 민감도에 대한 예측기술로 활용될 수 있다.

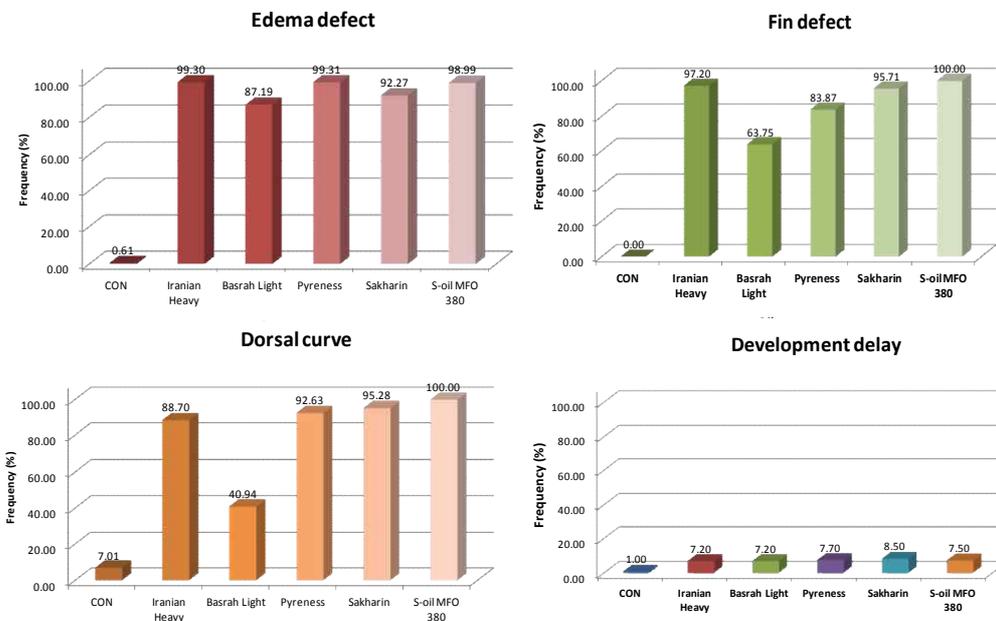


그림 11. 대조구(CON)와 비교하여 원유 산지별 노출된 넙치배아의 형태기형 발생 빈도

어류 배아 발생에 연관된 다양한 유전자의 발현을 정량하여 노출 48시간 후 원산지별 독성영향을 비교 분석한 결과는 그림 12에 나타내었다. Biotransformation에 연관된 유전자인 CYP1A 유전자는 8시간 이후 모든 노출구에서 대체로 발현이 증가 되었으며 특히 국내정제유인 S-oil MFO380에 노출된 배아에서 시간경과에 따라 높게 증가하였다. AhR 유전자의 발현은 원유 노출 4시간 시료에서부터 유의하게 증가하는 민감성을 보였다가 조기에 감소하여 대부분의 노출구에서 대조구와 유사한 수준으로 보여 분해에 민감한 결과를 보였다.

본 연구에서 NGS분석을 통해 유의한 수준으로 차등발현된 유전자를 선별하여 정량하여 비교하였다(그림 13). Basrah light(Iraq), Sakhalin(Russia), S-oil MFO380(국내정제유)에 노출된 넙치배아는 면역 관련 유전자들은 발현이 감소되었고, 특히 심장형태발생 관련 유전자인 NKX2.7과 microtubule관련 유전자는 모든 실험구에서 발현이 감소된 결과를 보였고, 원유 노출 48시간 이후(부화완료 개체)유전자 발현 패턴은 Australia 산 원유를 제외한 Iraq, Russia산 국내 정제유에서 유사한 결과를 보였다.

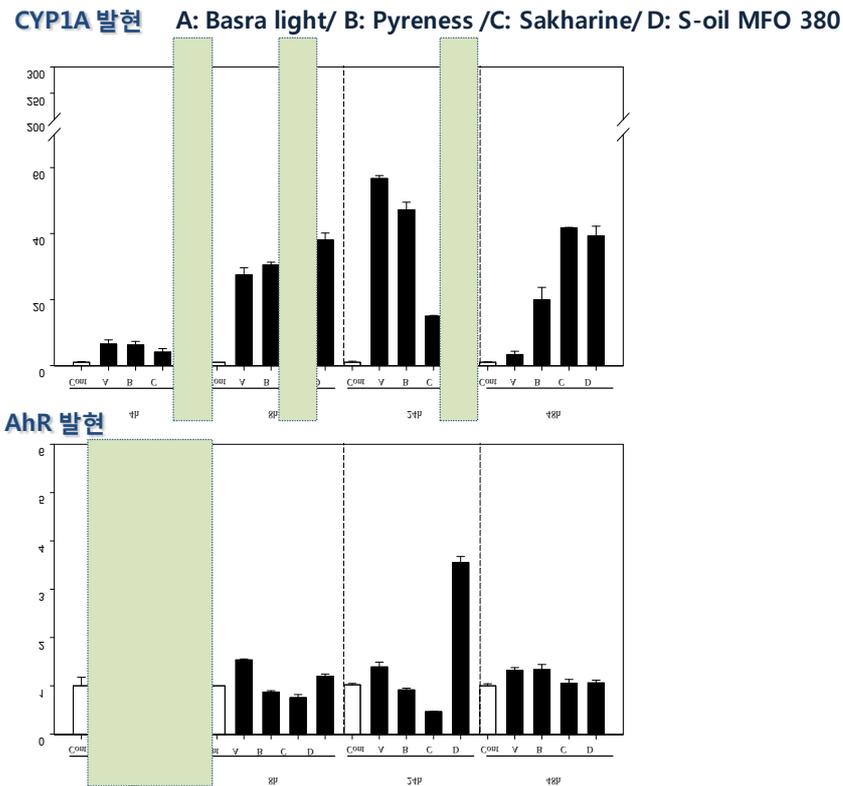


그림 12. 원산지별 원유에 노출된 넙치배아의 CYP1A와 AhR 발현변화

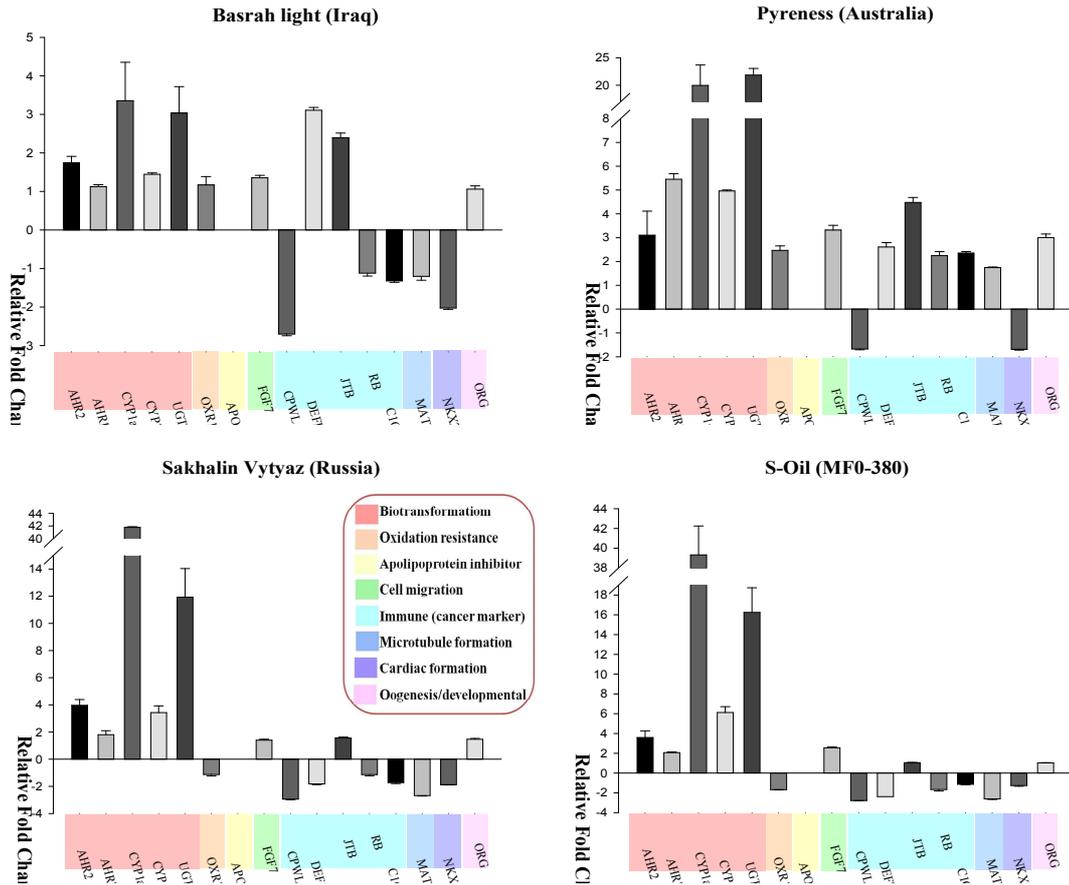


그림 13. 원유 산지별 납치배아의 발생관련 유전자 발현변화, aryl hydrocarbon receptor 2 (AHR2), aryl-hydrocarbon receptor repressor b (AHRRB), cytochrome P450, family 1, subfamily A (CYP1A), cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1 (CYP1B1), cytochrome P450, family 1, subfamily C, polypeptide 1 (CYP1C1), UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A7 (UGT1A7), oxidation resistance 1a (OXR1A), apolipoprotein C-I-like (APOC1), fibroblast growth factor 7 (FGF7), centromere protein W-like (CPWL), Defensin, beta-like 1 (DEFBL1), jumping translocation breakpoint (JTB), Retinoblastoma (RB), C1q and tumor necrosis factor related protein 9 (C1QTNF9), microtubule-associated protein tau a (MATPA), NK2 transcription factor related 7 (NKX2.7), oogenesis-related gene (ORG)

## 제5장. 참고문헌

- 김은식, 안준건, 김기범, 심원준, 주창규, 김문구, 2012. 분자지표 및 탄소안정동위원소 조성비를 이용한 국내 수입주요 원유의 식별. 한국해양환경공학회지 15(3) 247-256.
- Brown, E. D., Baker, T. T., Hose, J. E., Kocan, R. M., Marty, G. D., McGurk, M. D., Norcross, B. L. and Short, J., 1996. Injury to the early life history stages of Pacific herring in Prince William Sound after the Exxon Valdez oil spill. In Proceedings of the Exxon Valdez Oil Spill Symposium, Anchorage, AK, 25 Feb 1993; Rice, S. D., Spies, R. B., Wolfe, D. A., Wright, B. A., Eds.; American Fisheries Society: Anchorage, AK; Vol. 18, 448-462.
- Carls, M. G., Heintz, R. A., Marty, G. D. and Rice, S. D., 2005. Cytochrome P4501A induction in oil-exposed pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* embryos predicts reduced survival potential. Mar. Ecol. Prog. Ser., 301, 253-265.
- Carls, M. G., Holland, L., Larsen, M., Collier, T. K., Scholz, N. L. and Incardona, J. P. 2008. Fish embryos are damaged by dissolved PAHs, not oil particles. Aquat. Toxicol., 88, 121-127.
- Carls, M. G., Rice, S. D. and Hose, J. E., 1999. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval Pacific herring (*Clupea pallasii*). Environ. Toxicol. Chem., 18, 481-493.
- Incardona, J.P., Carls, M.G., Day, H.L., Sloan, C.A., Bolton, J.L., Collier, T.K., Scholz, N.L., 2009. Cardiac arrhythmia is the primary response of embryonic pacific herring (*Clupea pallasii*) exposed to crude oil during weathering. Environ. Sci. Technol., 201-207.
- Incardona, J.P., Collier, T.K. and Scholz, N.Z., 2004. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons, Toxicol. Appl. Pharmacol., 196, 191-205.
- Jung, J. H., Hicken, C. E., Boyd, D., Anulacion B .F., Carl, M. G., Shim, W. J. and Incardona, J .P. 2013. Geologically distinct crude oils cause a common cardiotoxicity syndrome in developing zebrafish, Chemosphere 91 1146-1155
- Marty, G. D., Hose, J. E., McGurk, M. D., Brown, E. D. and Hinton, D. E., 1997. Histopathology and cytogenetic evaluation of Pacific herring larvae exposed to petroleum hydrocarbons in the laboratory or in Prince William Sound, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 54, 1846-1857
- McGurk, M. D. and Brown, E. D., 1996. Egg-larval mortality of Pacific herring in Prince William Sound, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 53, 2343-2354.

OECD, 2008. p122

NFRDI, 2009. Unpublished Data. National Fisheries Research and Development Institute (NFRDI),  
Republic of Korea

국토해양부 2008. 해양유류오염영향조사 및 생태계 복원연구 보고서

국토해양부 2009 해양유류오염영향조사 및 생태계 복원연구 보고서