

202116-3

최 중
연구보고서

뇨에서 백혈구 조절인자를
생산하는 형질전환 가축(소) 생산

Production of Transgenic Bovine Expressing
human Granulocyte Colony-Stimulating Factor
into the Urine

연구기관
한경대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “노에서 백혈구 조절인자를 생산하는 형질전환 가축(소)생산” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 11월 14일

주관연구기관명 : 환경대학교

총괄연구책임자 : 민 관 식

세부연구책임자 : 윤 종 택

연 구 원 : 이 호 준

연 구 원 : 최 은 주

연 구 원 : 정 경 섭

연 구 원 : 김 민 수

연 구 원 : 이 유 연

연 구 원 : 박 종 주

연 구 원 : 정 윤 희

연 구 원 : 강 혜 영

협동연구기관명 : 경북축산연구소

협동연구책임자 : 박 용 수

협동연구기관명 : 경북대학교

협동연구책임자 : 류 재 응

요 약 문

I. 제 목

노에서 백혈구 조절인자를 생산하는 형질전환 가축(소) 생산

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 유전공학 및 세포공학 기술의 발달에 따라 지금까지 생체로부터 미량밖에 얻을 수 없었던 인체생리활성물질을 미생물 또는 세포를 숙주로 이용하여 생산이 가능하게 되었으나, 이러한 방법에는 아직 해결해야 만 하는 많은 문제점들이 남아 있다. 동물세포를 숙주로 이용하는 방법은 의약품의 생리활성 측면에서 미생물을 이용할 때 보다 천연물질과 유사하다고 할 수 있으나, 생산규모를 늘리는 등의 기업화가 곤란하고 원가 절감이 어려운 실정이므로 새로운 생산시스템의 개발이 절실히 요구되어져 왔다.

인체생리활성물질의 대량생산, 생산원가절감, 안정적인 공급을 위하여 유용한 외래 유전자를 가지는 형질전환 가축(transgenic animal)생산 기법을 이용해 인체생리활성물질을 대량생산하는 것이 가장 각광을 받고 있으며, 이러한 기술은 유전자의 탐색 및 재조합, 가축형질전환, 세포복제 및 생리활성검정등으로 구성되어 있고 형질전환기술이 가장 중요한 핵심사항이며 동물세포배양방법 보다 생산비를 1/1000로 줄일 수 있다

따라서, 본 연구의 목적은 형질전환 및 체세포 복제기법을 이용하여 백혈구 생성인자인 human Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF)를 소의 노로 생산하는데 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. hG-CSF 유전자 크로닝 및 발현벡터 구축

가. hG-CSF 유전자 크로닝

나. 조직특이 프로모터 크로닝

1) mUIII promoter 크로닝

2) bovine beta-casein promoter 크로닝

다. 방광 및 유선특이 발현 hG-CSF 발현벡터 구축

라. GFP 발현 벡터 구축

마. EGFP+mUIII+hG-CSF+SV40 및 G418+mUIII+hG-CSF+SV40 발현 벡터구축

2. 동물세포이용 재조합체 생산

가. pcDNA3 동물세포발현용 벡터 재크로닝 및 CHO 세포 transfection

나. hG-CSF발현 클론 선택

다. 동물세포에서 재조합 hG-CSF의 정량분석

라. 재조합체 hG-CSF의 생리활성검토

3. 효과적인 핵이식란 생산방법 확립

가. 전기자극의 융합조건에 따른 융합율

나. 핵치환 후 활성화 조건에 의한 배 발달율

4. 체세포주 확립 및 유전자 도입

가. 체세포주 확립

나. 체세포내 Marker(GFP) 유전자 도입 방법 시도

다. Marker 유전자 도입 체세포 핵치환 발달연구

라. 외래 유전자 도입 체세포 확립 및 핵치환 수정란 체외발달 연구

1) 외래 유전자 도입 체세포 확립

2) 외래 유전자 도입 핵치환 수정란 체외발달 연구

5. 형질전환 생쥐생산

- 가. 노로 G-CSF를 분비하는 형질전환 생쥐생산
- 나. 유선으로 G-CSF를 분비하는 형질전환 생쥐생산

6. 형질전환 복제수정란 대량생산 및 이식

- 가. 체외 수정란 생산 확립 및 미세주입에 의한 수정란 발달
- 나. 수란우의 발정 동기화 및 이식시기의 최적조건 확립
- 다. 복제 수정란의 생산 및 이식
- 라. EGFP+mUII-hG-CSF 미세주입 및 NT 수정란의 형광발현 확인
- 마. EGFP+mUII-hG-CSF 미세주입 및 핵치환 수정란이식

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 재조합체 hG-CSF의 생리활성 분석 및 발현백터 구축

CRL세포로부터 hG-CSF 유전자를 크로닝하여 이를 pcDNA3 벡터를 활용하여 재조합체를 생산하는 시스템을 확립하였으며, 이렇게 생산되어진 재조합체의 생리활성 분석을 위하여 생쥐에 주사하여 백혈구수의 증가분석을 위하여 60 pg을 2회 투여하여 5일 후에 혈액분석결과 다른 혈액성상은 변화가 없었으나 백혈구수가 약 50%정도 증가하여 동물세포이용하여 생산된 재조합체 rec-hG-CSF는 생리활성을 가지고 있는 것으로 나타났다. 이러한 세포이용 재조합체 관련 내용은 강력한 생리활성을 나타내는 재조합체 hG-CSF의 생산을 위하여 당쇄첨가를 한 새로운 고 활성 물질 생산 가능성을 나타내었다.

2. 조직 특이 발현백터구축 및 형질전환 생쥐생산

노와 유즙에서 생리활성 유용물질을 생산하기 위한 발현백터 구축을 위하여 방광 특이적으로 발현하는 생쥐의 Uroplakin II 프로모터와 유즙 특이적으로 발현하는 소의 beta-casein 프로모터를 크로닝 하였다. 이를 이용하여 표지인자인 EGFP 유전자를 첨가한 EGFP+mUII+hG-CSF와 EGFP+bovine beta-casein+hG-CSF 두 종류의 특이

백터를 구축하였다. 실험동물 모델에서 이들 백터를 검토하기 위하여 형질전환 생쥐를 생산하였다. 생쥐의 뇌에서 분비하는 재조합 hG-CSF는 생리활성을 가지고 있는 것으로 나타났다. 따라서, 이 백터를 활용하여 대 가축인 소와 돼지에서 활용가능성이 있을 것으로 사료된다.

3. 체세포와 수정란에 외래 유전자 도입

체세포에 외래유전자 도입방법은 세포막의 지방층을 이용하는 liposome-mediated 방법에 의하여 실시하여, 효과적으로 유전자 도입이 가능 하였다. 또한 특이백터인 EGFP의 표지 인자를 활용은 쉽게 유전자가 도입된 세포를 분리하는데 도움이 되었다. 수정란에 미세 주입법으로 유전자 도입방법은 배 발달이 진행됨에 따라 형광발현이 급격히 감소하는 경향이있다. 따라서 EGFP+mUII+hG-CSF의 백터 활용은 체세포를 이용하는 세포분리와 수정란을 활용하는 미세주입법에도 EGFP가 발현하는 것을 활용하면 더욱 쉽게 세포의 분리가능 및 이식하는 수정란을 선발할 수 있을 것으로 사료 된다.

4. 형질전환 수정란 생산 및 이식

형질전환 수정란의 생산에 있어서 미세 주입 법에 의한 생산 방법은 정확하게 핵에 삽입되는 것을 요구하기 때문에 고도의 삽입기술이 필요하다. 체세포에 있어서도 EGFP의 발현량이 많은 세포를 핵치환하여 발달되어진 수정란만을 선택적으로 이식할 수 있다는 장점이 있다. 또한 핵치환은 핵치환에 의한 배 발달율이 감소되는 것을 향상시킬 필요가 있다. 비록 본 연구에서는 형질전환 복제 소는 현재까지 생산되지는 않았지만, 사용되어진 백터의 활용은 충분히 소, 돼지에서 응용가능 할 것으로 기대되며, 유용생리활성 물질 생산 기술에 충분한 기초 자료가 될 것으로 기대하고, 국외 그룹과 경쟁할 수 있도록 바이오 생명공학 분야에 대한 지속적인 지원과 연구는 세계적인 수준으로 향상 시킬 수 있는 유일한 분야 일 것이다.

SUMMARY

1. Biological activity of recombinant human Granulocyte Colony-Stimulating Factor

The production of blood cells is regulated by a range of extracellular stimuli, including a network of hematopoietic growth factors and cytokines. One of these, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), is a major regulator of neutrophilic granulocyte production and augments the proliferation, survival, maturation, and functional activation of cells of the granulocytic lineage. Severe congenital neutropenia is a rare disease diagnosed at or soon after birth, characterized by a myeloid maturation arrest in the bone marrow, ineffective neutrophil production, and recurrent infections. In the presented study, the biological activity of recombinant hG-CSF was determined by the measuring WBC value after injection *in vivo* and constructed the transgenic vector for the somatic cell cloning. Using the cDNA prepared from CRL-11882 cell lines, PCR was amplified the primers designed from the sequences published previously. The cDNA fragment with 624 bp predicted for hG-CSF cDNA was amplified and then transfected into CHO cell line. After the rec-hG-CSF protein, we detected the biological activity with the mice. Two groups of mice were injected subcutaneously with 60 µg/ml of rec-hG-CSF on days 0 and 2. WBC values measured 5 days after the first injection. Mean WBC values were remarkably increased from 8.0 to 12.8. The values of negative control groups were not raised. The other composition of blood was not changed. These data suggest that rec-hG-CSF produced in this study has a potent activity *in vivo*. Thus, the results of these biological activity show that rec-hG-CSF could be remarkably enhance by the genetic engineering that affect the potential activity including the mutants, which added the oligosaccharide chain and constructed an hG-CSF+hG-CSF fusion protein.

2. Construction of vector of tissue specific expression and production of transgenic mice expressing hG-CSF gene

The bladder is an attractive organ of choice for the production of pharmaceuticals because urine is easily collected during the lifetime from a transgenic animal irrespective of sex. In addition, due to the highly efficient nature of secretion via urine, the urinary tract is considered to be a useful system to

produce biological materials that might cause deleterious effects when they accumulate and/or circulate inside the blood system of a transgenic animal. And the studies on a milk bioreactor system have shown that endogenous milk proteins are indeed found in the circulation of cattle, especially during the late gestation period and at parturition.

In order to express the protein of the utility gene into the urine and milk, we cloned the bladder and mammary specific promoter. we constructed the specific expressing vector which contains the EGFP. We took the approach using the mouse uroplakin II promoter to evaluate the feasibility of using an animal bladder for the production of biologically active hG-CSF. Our study has demonstrated that an animal bladder can be efficiently utilized as a bioreactor to produce human cytokines for clinical purpose. The expression cassette harboring the urinary specific mouse uroplakin II promoter and hG-CSF gene was micro-injected into one-cell mouse embryos. The produced human G-CSF was harvested from transgenic mouse urine, and the product has a biological activity. Urine from cows or pigs can be collected by placing a cannula in the ureter. The combination of further improvements for the collection method and the transgenic technology would allow for the large-scale production of clinically valuable cytokines.

3. Introduction of foreign DNA into bovine one-cell embryo by the micromanipulation and transfection of interest gene into the somatic cells

Success in the introduction of foreign DNA into a genome depends upon the ability to ensure that the DNA integrates into the germline. This allows the stable integration of the foreign DNA into the genome, and the transmission of the manipulation to future generation, thus establishing a new and novel strain of the organism. The most successful of these approaches has been the introduction of DNA into the male pronucleus of the one-cell embryo. Introduction of DNA into the preimplantation embryo ensures a high probability that the foreign DNA will incorporate into as many of the developing cells as possible. With introduction into these earlier cleavage stages, the probability of the integration of DNA into the germline is higher. Maximizing the production of transgenic bovine is dependent upon the amount of DNA delivered to the male pronucleus, and also to the expansion of the pronucleus. It has been postulated that the pressure of the microinjection of DNA causes breaks in the chromatin.

We also examined the effect of DNA concentration and its expression pattern in embryos. The DNA used for microinjection was a GFP gene. The development rates to 2-cell, 8-cell and blastocyst stage were significantly higher in vitro fertilized embryos than those in DNA-microinjected embryos. The developmental rates of embryos injected 2 ng/ul of DNA is the ideal compromise. The GFP expression rate of 1-cell embryos was significantly higher than that of 2-cell and 4-cell embryos. And the transfection for somatic cells was used the method of liposome-mediated with EGFP+mUII+hG-CSF gene. EGFP cell lines expressing fluorescent protein gene were selected by the GFP expression. The vector used in this study could be select easily for the expression pattern in the transfected somatic cell.

4. The production and implantation of micro-injected and NT embryos

It also conducted to investigate the effect of embryo development by fusion condition on the nuclear transfer. Somatic cells transfected with specific vector, which contains two genes of EGFP and hG-CSF, were transferred into an enucleated oocyte and fused with cytoplasm in the fusion condition with 1.9 kv/cm, 10 us. The NT embryos were activated with a combination of 5 uM ionomycin and 1.9 mM 6-DMAP (4 min, 4h). The fusion rate was 51-68% range among fusion condition. But cytoplasm lysis rate was increased by higher electric condition.

The pregnancy rate by NT was significantly decreased. It was about 10%. Four cloned calves of nine was aborted during pregnancy. Three cloned calve required delivery by cesarean section. The neonatal mortality of C-section delivered clones was also high (4/4) compared to that of spontaneous delivery in transfer of embryo fertilized *in vivo* and *in vitro*. And the birth weight of calves for C-section was more higher than control. Birth of oversized calves and perinatal abnormalities such as increased gestation length, lack of spontaneous parturition, higher incidence of dystocia, and reduced perinatal viability of offspring are frequently observed in pregnancies of cloned bovine fetuses. Disturbance of fetoplacental energy regulation or perturbation in DNA methylation of imprinted genes has been proposed as likely causes for abnormal growth and poor viability of offspring derived by cloning or *in vitro* embryo technology; however, the mechanism responsible for the perinatal problems is still unclear. Inappropriate

developmental changes in endocrine system may be partly responsible for the fetal over growth and perinatal complications associated with the cloning technology.

CONTENTS

SUMMARY.....	6
CONTENTS.....	10
Chapter 1. Objective and Scope.....	16
1. Significances of Research.....	16
2. Scope of Research.....	17
Chapter 2. Current Status on Domestic and Foreign Technology.....	19
Chapter 3. Experimental Methods and Results.....	21
1. Construction of expressing vector and cloning of hG-CSF.....	21
A. Materials and methods.....	21
B. Cloning of hG-CSF gene.....	21
C. Cloning of tissue specific promoter.....	22
D. Construction of specific expression vector hG-CSF for the bladder and mammary.....	27
E. Construction of GFP expression vector.....	28
F. Specific vector construction of EGFP+mUII+hG-CSF and G418+mUII+ hG-CSF.....	28
2. Production of recombinant hG-CSF into the mammalian cells.....	35
A. Materials and methods.....	35
B. Re-cloning of hG-CSF into mammalian expressing vector and transfection into the CHO cell lines.....	35
C. Selection of cell clone expressing hG-CSF gene.....	35
D. Quantification of rec-hG-CSG by ELISA.....	36
E. Analysis of biological activity.....	37

3. Efficiency method for the production of NT embryo.....	38
A. Fusion rate by the electric fusion pulse.....	38
B. Embryo developmental rate by the activation condition.....	38
4. Isolation of somatic cell clone and transfection of interest gene.....	39
A. Isolation of somatic cell lines.....	39
B. Transfection of GFP gene into the somatic cell.....	39
C. Developmental rate of NT embryo of somatic cell transfected with GFP gene.....	40
D. Establishment of somatic cell line transfected with hG-CSF and developmental rate of NT embryo.....	40
5. Production of transgenic mice.....	43
A. Production of transgenic mice harboring hG-CSF gene into the urine.....	43
B. Production of transgenic mice harboring hG-CSF gene into the milk.....	49
6. Implantation and production of transgenic embryo.....	51
A. Production of IVF embryo and development of micro-injected embryo.....	51
B. Estrus synchronization.....	55
C. Production and transfer NT embryo.....	57
D. Micro-injection of EGFP+mUII+hG-CSF and GFP expression of NT embryo.....	60
E. Transfer of embryo micro-injected with EGFP+mUII+hG-CSF gene and NT embryo.....	62
Chapter 4. Achievement and outward contribution.....	64
Chapter 5. Application plan.....	68

Chapter 6. Information of foreign science technology.....	69
Chapter 7. References.....	70

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	16
제 1 절	연구개발의 필요성	16
1.	기술적 측면에서의 필요성	16
2.	경제·사회적 측면에서의 필요성	16
3.	사회·문화적 측면에서의 필요성	17
제 2 절	연구개발의 목적	17
제 2 장	국내외 기술개발 현황	19
제 1 절	국내외 기술개발 현황	19
제 2 절	국내외 기술 수준비교	20
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	21
제 1 절	hG-CSF 유전자 크로닝 및 발현백터 구축	21
1.	재료 및 방법	21
2.	hG-CSF 유전자 크로닝	21
3.	조직특이 프로모터 크로닝	22
4.	방광 및 유선특이 발현 hG-CSF 발현백터 구축	27
5.	GFP 발현 백터 구축	28
6.	EGFP+mUII+hG-CSF+SV40 및 G418+mUII+hG-CSF+SV40 발현 백터구축	28
제 2 절	동물세포이용 재조합체 생산	35
1.	재료 및 방법	35
2.	pcDNA3 동물세포발현용 백터 재크로닝 및 CHO 세포 transfection	35
3.	hG-CSF 발현 클론 선택	35

4. 동물세포에서 재조합 hG-CSF의 정량분석	36
5. 재조합체 hG-CSF의 생리활성검토	37
제 3 절 효과적인 핵이식란 생산방법 확립	38
1. 전기자극의 융합조건에 따른 융합율	38
2. 핵치환 후 활성화 조건에 의한 배 발달율	38
제 4절 체세포주 확립 및 유전자 도입	39
1. 체세포주 확립	39
2. 체세포내 Marker(GFP) 유전자 도입 방법 시도	39
3. Marker 유전자 도입 체세포 핵치환 발달연구	40
4. 외래 유전자 도입 체세포 확립 및 핵치환 수정란 체외발달 연구	40
제 5 절 형질전환 생쥐생산	43
1. 노로 G-CSF를 분비하는 형질전환 생쥐생산	43
2. 유선으로 G-CSF를 분비하는 형질전환 생쥐생산	49
제 6 절 형질전환 복제수정란 대량생산 및 이식	51
1. 체외 수정란 생산 확립 및 미세주입에 의한 수정란 발달	51
2. 수란우의 발정 동기화 및 이식시기의 최적조건 확립	55
3. 복제 수정란의 생산 및 이식	57
4. EGFP+mUII-hG-CSF 미세주입 및 NT 수정란의 형광발현 확인	60
5. EGFP+mUII-hG-CSF 미세주입 및 핵치환 수정란이식	62
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	64
제 1 절 연도별 연구 목표	64
제 2 절 평가 착안점 및 달성도	66
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	68

제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	69
제 7 장	참고문헌.....	70

제 1 장 연구개발 과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면에서의 필요성

생명과학기술은 정보통신산업과 함께 21세기 지식기반 산업으로 최대의 황금시대를 맞이하고 있다. 1970년대 중반부터 유전자공학을 처음으로 세포공학, 발생공학, 세포생화학 등 Bio-technology(생명공학)가 급속한 추세로 발전되어져 왔다. 지금까지 생체로부터 미량밖에 얻을 수 없었던 인체생리활성물질을 미생물 또는 세포를 숙주로 이용하여 생산이 가능하게 되었으나, 이러한 방법에는 아직 해결해야만 하는 많은 문제점들이 남아 있다. 단백질의 발현 및 합성 기작이 고등동물과 달리 천연적인 인체생리활성물질과 생리 활성이 동일한 물질을 생산할 수 없고, 순수 정제가 어려워 의약품으로서의 요건인 품질의 안정성, 동질성이 결여되어 있다. 한편, 동물세포를 숙주로 이용하는 방법은 의약품의 생리활성 측면에서 미생물을 이용할 때 보다 천연물질과 유사하다고 할 수 있으나, 생산규모를 늘리는 등의 기업화가 곤란하고 원가 절감이 어려운 실정이므로 새로운 생산시스템의 개발이 절실히 요구되어져 왔다.

따라서, 인체생리활성물질의 대량생산, 생산원가절감, 안정적인 공급을 위하여 유용한 외래유전자를 가지는 형질전환 가축(transgenic animal)생산 기법을 이용해 인체생리활성물질을 대량생산하는 것이 가장 각광을 받고 있으며, 이러한 기술은 유전자의 탐색 및 재조합, 가축형질전환, 세포복제 및 생리활성검정등으로 구성되어 있고 형질전환기술이 가장 중요한 핵심사항이며 동물세포배양방법 보다 생산비를 1/1000로 줄일 수 있다. 이러한 방법을 동물생체반응기(Animal Bioreactor)라고 부르고 있는데 오늘날 전 세계적으로 기업연구소 및 대학, 연구기관에서는 형질전환가축생산 방법을 이용하여 각종 인체생리활성물질을 대량생산하기 위하여 막대한 연구비를 투자한 결과, 상당한 수준까지 연구가 진행되고 있으며 미국등 선진국은 벤처 산업화를 위한 연구로 발전되고 있는 상황이다.

2. 경제·사회적 측면에서의 필요성

앞으로 21 세기에는 생명공학기술을 바탕으로 한 새로운 산업이 전반적인 경제를 주도할 것으로 많은 경제학자들은 예언하고 있다. 1982년 유전자 재조합 기술에 의한 사람 인슐린의 시판이 인가된 이래 사람 성장호르몬, 각종 인터페론, 간염백신과 여러 가지 혈전증치료제가 유전공학기법에 의해 생산·시판되어 오고 있다. 이들 주요한 생리활성물질의 세계적 시장성은 연간 수 조원에 달할 것으로 예측하고 있어 경제·산업적인 측면에서 형질전환 가축을 이용한 인체생리활성 물질생산은 고 부가

가치를 지니는 만큼 세계시장에 진출할 수 있는 새로운 축산업으로 발전이 가능하게 된다.

3. 사회·문화적 측면에서의 필요성

사회·문화적 측면에서 국민의 생활수준이 향상되어 가면서 각종 암이나 성인병 환자는 점차 늘어가고 있는 실정이므로 이들 질병을 치료하거나 예방하려는 연구도 활발히 진행되고 있다. 이러한 질병의 치료나 예방에 있어서, 본 연구실에서 수행하고 있는 핵심기술인 형질전환 가축 생산기법을 이용하여 인체생리활성물질을 아주 저렴한 가격으로 대량생산이 가능하게 된다면 보다 많은 환자의 질병을 치료할 수 있으므로 인류의 복지증진에 이바지 할 수 있을 것이다. 또한, 형질전환가축 생산기법은 생명공학기술의 복합체이며, 형질전환가축생산은 분자나 세포수준이 아닌 개체단위에서의 연구가 가능하기 때문에 그 동안 알지 못했던 유전자 발현 등에 관한 기초연구의 활성화도 기대할 수 있을 것이다.

제 2 절 연구 개발의 목적

생명공학산업은 21세기를 이끌어갈 형질전환가축을 이용한 고부가가치 의약품생산은 지식기반산업으로 발전할 것이다. 대표적인 생명공학상품인 EPO를 예를 들면, EPO는 인간의 신장에서 만들어지는 조혈호르몬의 일종으로 빈혈치료제로 사용되는데 이는 체내에서 극소량밖에 존재하지 않아 유전자재조합에 의한 세포배양법을 이용하여 생산하고 있다. 그러나 유전자재조합 기술로 만든 EPO 1g의 가격이 금(gold) 1g의 수만배에 해당하는 67만 달러를 호가한다.

그러나 형질전환가축 생산기법을 통해 인체생리활성물질을 생산할 경우 값비싼 빈혈 및 항암제 등의 치료제, 성장촉진제 및 기타 인간복지에 필수적인 물질을 대량으로 생산할 수 있으므로 경제성은 매우 크다. 국내에서는 특수한 경우를 제외하고 고가의 의료 생리활성물질은 대부분 동물세포를 이용하여 생산한다. 동물세포를 이용한 단백질 생산은 주로 동물혈청을 이용한 세포로부터 생산되기 때문에 순도 및 분리에 문제가 있을 뿐만 아니라, 생산시설, 숙련된 연구자원과 같은 제반문제로 생산원가가 높은 것이 단점이라 할 수 있다. 반면, 형질전환가축을 이용하면 많은 양의 인체생리 활성물질을 1) 가축의 우유 중에서도 대량생산이 가능하고, 2) 기존의 목장 시스템을 그대로 이용함으로써 별도의 부대시설이 필요치 않아 생산원가가 절감, 3) 가축의 생체내에서 생산함으로써 천연형과 동일한 생리활성을 가진 물질의 생산이 가능하고, 4) 다음세대로 전이되기 때문에 생산에 변동없이 안정적으로 공급 할 수 있고, 5) 또한

Uroplakin promoter를 이용하여 노로부터 이들 단백질의 생산이 가능하여 암수 구별 없이 일생을 통하여 안정적인 생산이 가능하다. 따라서, 형질전환 복제기술을 더욱 개량 발전시켜 인간의 삶의 질향상을 위한 인체생리활성물질을 대량생산할 수 있는 형질전환가축생산 (소·돼지·산양) 및 복제기술을 개발할 필요성이 요구되고 있으며, 또한 생물공학 전반에 걸쳐 획기적인 기술 발전을 도모함과 동시에 축산업이 단순한 가축을 기르는 것이 아니라, 고부가 가치산업으로 발달시킬 수 있기 때문에 국가적인 차원에서 적극적인 지원이 필요하다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 기술개발현황

1. 국외 기술동향 및 수준

- 가. Kerr등(1988) Uroplakin II promoter이용 human GH을 생산하는 형질전환 생쥐 생산
- 나. Campbell등(2000), Onishi등(2000) 체세포 복제 돼지생산
- 다. Campbell등(2000) 체세포 복제기술 이용 procollagen 유전자 적중 면양생산
- 라. Forsberg등(2001) 인분해효소 phytase를 생산하는 형질전환 돼지생산
- 마. Clark등(2001) Prion 단백질 및 GGTA1 유전자 knockout 면양생산
- 바. Prather등(2002)은 핵치환 기술이용 α 1-3 galactosyltransferase knockout 돼지생산
- 사. Bondioli등(2003)은 α 1,3-fucosyltransferase를 발현하고 돼지의 α 1,3-galactosyltransferase를 knockout 돼지 생산
- 아. Shirakura등(2003)은 인간의 DAF 및 N-acetylglucosaminyltransferase III를 발현하는 형질전환 돼지 생산
- 차. Cooper등(2004)은 baboon에서 α 1,3-galactosyltransferase를 knockout성공
- 카. Nottle등(2004)은 α 1,3-galactosyltransferase를 knockout 돼지 생산
- 타. Wolf등(2005)은 인간의 TRAIL을 발현하는 형질전환 돼지 생산
- 파. Murakami등(2005)은 인간의 DAF 및 N-acetylglucosaminyltransferase III를 발현하고 동시에 돼지의 α 1,3-galactosyltransferase를 knockout 돼지 생산

2. 국내 기술동향 및 수준

- 가. 1997년 lactoferrin을 유즙에서 분비하는 형질전환젓소 “보람이” 생산
- 나. 1998년 체세포 복제기술이용 복제젓소 및 한우 “영롱이” 및 “진이” 생산
- 다. 1999년 EPO를 유즙에서 분비하는 형질전환돼지 “새롭이” 생산
- 라. 1999년 체세포 복제기술이용 복제한우 “새빛” 생산
- 마. 2003년 황등은 돼지 태아유래 체세포이용 GFP를 발현하는 형질전환 생산
- 바. 2004년 김등은 GFP를 발현하는 형질전환 닭 생산
- 사. 2005년 황등은 GFP를 발현하는 형질전환돼지 생산
- 아. 2005년 김등은 체세포 복제돼지 생산

이와 같은 최근의 연구결과를 보면, 돼지에서는 주로 장기이식과 관련하여 면역억제와 연관지어 형질전환 복제 연구에 초점을 맞추고 있으며, 소에서는 국내에서는

marker 유전자와 “보람이” 이외에는 유용유전자를 발현하는 형질전환 소 생산에는 아직까지 없는 것으로 알려져 있다.

제 2 절 국내외 기술수준 비교

○ 미국 : 산업화 단계, 일본, 유럽 : 성장기, 한국 : 기술도입기

구 분	미 국	일 본	한 국
○ 수정란 이식 및 발정동기화	확립	확립	확립
○ 유용유전자 재조합 기술	개발	개발	개발중
○ 수정란 핵내 유전자 미세주입 기술	개발	개발	개발
○ 정자백터이용 가축생산	개발	개발	실험동물 성공
○ 체세포이용 복제가축 생산	산업화중	성공	성공
○ 생체반응기 또는 질환모델 동물생산	개발	개발중	개발중

상기 표에서 알 수 있듯이 형질전환 가축생산을 위한 핵심기술은 선진국에 비해 다소 떨어지나 경쟁이 가능한 수준이고 형질전환가축 생산기법은 사람의 성장호르몬 뿐만 아니라 기존의 고가의 생리활성물질로서 알려진 tPA, EPO등의 물질도 생산 할 수 있기 때문에 이와 관련된 의약 및 제약 산업의 발전에 크게 기여하게 될 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 hG-CSF 유전자 크로닝 및 발현벡터 구축

1. 재료 및 방법

- 가. 공시재료 : 사람의 G-CSF유전자를 발현하는 CRL-11882 세포 주 와 소 및 면양의 유선조직
- 나. 크 로 닝 : 특이 primer이용 PCR로 CRL-11882세포주로부터 total RNA분리 후 cDAN 합성 후 template로 활용 증폭하였으며, 또한 각각의 유선조직으로부터 genome DNA를 분리후 template로 활용 증폭, pCR2.1벡터에 크로닝, 염기배열결정
- 다. 벡터구축 : mUII promoter+hG-CSF, EGFP+mUII promoter+hG-CSF, Casein promoter+hG-CSF, EGFP+ bcasein promoter+hG-CSF

2. hG-CSF 유전자 크로닝

hG-CSF 유전자를 크로닝하기 위하여 hG-CSF 유전자를 발현하고 있는 세포주를 ATCC 세포 주 은행으로부터 분양받은 CRL-11882 세포를 배양하여 TriZol이용하여 total RNA 분리후 Oligo-dT이용하여 first-strand cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 이용하여 hG-CSF를 코드하는 primer, 즉 5'에는 Kozak site와 Kpn I site와 3'에는 Xho I site를 첨가하여 합성하였으며 (F: 5'-tag gta cca cca tgg ctg gac ctg cca ccc ag-3'; R: 5'-tec teg agt cag ggc tgg gca agg tgg cgt ag-3'), 이를 이용하여 PCR 증폭결과 약 624 bp의 band가 확인되었다 (Fig. 2-1).



Fig. 2-1. Result of human G-CSF cDNA PCR using the RNA extracted from the CRL 11882 cell lines

PCR 밴드를 확인 정제하여 pCR2.1 크로닝 벡터에 ligation 후 염기서열 결정 (Fig. 2-2) 하였다. 염기서열 결과 human G-CSF 유전자와 동일한 염기서열을 확인하였다.

atggctgga cctgccaccc agagccccat gaagctgatg gccctgcagc tgctgctgtg gcacagtgca
 ctctggacag tgcaggaagc caccctctg gccctgcca gctccctgcc ccagagcttc ctgctcaagt
 gcttagagca agtgaggaag atccagggcg atggcgcagc gctccaggag aagctggtga gtgagtgtgc
 cacctacaag ctgtgccacc ccgaggagct ggtgctgctc ggacactctc tgggcatccc ctgggctccc
 ctgagcagct gcccagcca ggccctgcag ctggcaggct gcttgagcca actccatagc ggccitttcc
 tctaccagg gctcctgcag gccctggaag gatctcccc cgagttgggt cccaccttg acacactgca
 gctggacgtc gccgacttg ccaccacat ctggcagcag atggaagaac tgggaatggc ccctgccctg
 cagcccacc agggtgccat gccggccttc gcctctgctt tccagcgcg gccagggagg gtcctggttg
 cctccatct gcagagcttc ctggagggtg cgtaccgct tctacgccac ctgcccagc cctga

Fig. 2-2. Sequencing result of human G-CSF cDNA: 624bp
Underlines indicate the primer sequences

이 유전자의 아미노산 염기서열은 다음과 같다 (Fig. 2-3). 207개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 30개의 signal sequence를 가지고 있는 것으로 알려져 있다.

M A G P A T Q S P M K L M A L Q L L L W H S A L W T V Q E A T P L G P A S S L P Q S F L
 L K C L E Q V R K I Q G D G A A L Q E K L V S E C A T Y K L C H P E E L V L L G H S L G I P W A P L S S C P S Q A L
 Q L A G C L S Q L H S G L F L Y Q G L L Q A L E G I S P E L G P T L D T L Q L D V A D F A T T I W Q Q M E E L G M A
 P A L Q P T Q G A M P A F A S A F Q R R A G G V L V A S H L Q S F L E V S Y R V L R H L A Q P

Fig. 2-3. Deduced amino acid sequence of human G-CSF
Underline indicates the signal sequence of hG-CSF

3. 조직 특이 프로모터 크로닝

가. mUII promoter 크로닝

조직 특이적으로 형질전환 유용물질을 생산하기 위하여 mouse의 방광조직으로 DNA를 분리하여 생쥐 Uroplakin II (mUII) promoter의 3606 bp를 LA-PCR 방법으로 증폭하였다. 사용된 primer는 F: 5'-gaa ttc ctc gac gat ctc ggc cct ctt tct gc-3'와 R: 5'-cca gga tcc agt ccc agc gca gtg gta cc-3'를 이용하였다. 5'- primer에는 Eco RI site를 3'- primer에는 Kpn I site를 첨가하여 합성하였다. 증폭된 band는 예상되는

3.6 kb의 크기를 나타내어 mUII의 promoter라고 추정 할 수 있었으며, PCR 사진과 전체 염기서열은 다음과 같다 (Fig. 2-4, 2-5).



Fig. 2-4. PCR amplification of mouse UII promoter (3606 bp)

```

1  ctcgaggatc  tgggcccctct  ttctgcatcc  ttgtcctaaa  tcattttcat  atcttgctag
61  acctcagttt  gagagaaaag  aaccttctca  ttttcaagtt  gaaaaaaaaa  agaggttcaa
121  agtggctcac  tcaaagttac  aagccaacac  tcaccactac  gagtacaatg  gccaccatta
181  gtgctggcat  gccccaggag  acaggcatgc  atattattct  agatgactgg  gaggcagagg
241  ggtggcctag  tgaggtcaga  ctgtggacag  atcaggcaga  tgtgggttct  gatcccaatt
301  cctcaggcog  cagaactact  gtggttcaag  aaggggacaa  aaggactgca  gtcoggaaca
361  ggagggtccat  ttgagagctg  actgagcaga  agaggaaagt  gaagaacttc  tggggcaaga
421  gettacccta  ctttacagct  ttgttgtctt  ctttactcca  ggggcgtccc  tggtagctag
481  taaatgtctg  ttggcttgag  gaacatatgt  gtaaggagga  aggagagggg  acttgagggg
541  gttaaagactc  aagaatcaat  caaggagagg  acagcagaga  agacagggtt  tgggagagag
601  actccagaca  ttggcccctg  ttcccttctt  ggccactgtg  aaaccctcca  gaggaactga
661  gtgctgtggc  tttaaatgat  ctcagcactg  tcagtgaagc  gctctgtcca  aagagttatc
721  ctcttgctcc  tgtgcogggg  cctcccctc  ctctcagctc  ccaaaccctt  ctcagccact
781  gtgatggcat  aattagatgc  gagagctcag  accgtcaggt  ctgctccagg  aaccaccat
841  ttcccacaac  cccagagaaa  ggtcctagtg  gaaaagtggg  ggccactgaa  gggctgatgg
901  ggttctgtcc  tttcccctat  gctgggtgga  cttaaagtct  gcgatgtgtg  tagggggtag
961  aagacaacag  aacctggggg  ctccggctgg  gagcaggagg  aactctcacc  agaogatctc
1021  caaatttact  gtgcaatgga  cgatcaggaa  actggttcag  atgtagcttc  tgatacagtg
1081  ggtctgaggt  aaaaccgaa  acttaatttc  tttcaaaaat  ttaaagttgc  atttattatt
1141  ttatatgtgt  gcccatatgt  gtgccacagt  gtctatgtgg  aggtcagagg  gcaagttgtg
1201  ggcattggct  ctctccttc  ataatgtgac  ttctggggac  caaaatgtca  ggcattgggtg
1261  caagagcttt  tacctgttga  gccatctcat  ggtttcgtaa  aacttcctat  gacgcttaca
1321  ggtaacgcag  agacacagac  tcacatttgg  agttagcaga  tgctgtattg  gtgtaaacac
1381  tcatacacag  acacacacac  atactcatac  acacacacac  acacttatca  catgcacaca
1441  catactgta  tacacacaga  cacacacaca  tgcactctca  cattcacata  ttcatacaca
1501  tccacacaca  cactcatcca  cacacacaga  cacacatact  catccacaca  cacacacaca
1561  catactcata  cacacacaca  gacacacata  ctcatacaca  cacacagaca  cacacatata
1621  atcatacata  cacagacaca  ctcatacatg  tgcacacaca  cactcatcca  cacacacaca

```



```

1681 ctcatcacaca cacacactca tacacacaca cactcataca cacacacaag aggtttttct
1741 caggctgcct ttgggtggag actggaactg atttctgttt ttcagctcct tggctttttg
1801 tccttttaga tgagatctcc tctcacttt acacacagaa agatcacaca cgagggagaa
1861 ctggcgggtgc ggaagagggc tacacggtag ggtgtcaggg tcaggagatc ttcttgcaa
1921 gtctcaaac tccacatagc acagtgttta cgtgaggatt taggaggaat caggaagagg
1981 attggtttac tgcagagcag accatatagg tccactccta agccccattt gaaattagaa
2041 gtgagacagt gtgggataaa aagagcagat ctctgttcac atttttaag ggatatgagg
2101 gtctgtgcc ttaagcett cccatctccc tcaatcccc cctcaccttc cccaccctaa
2161 cctccccag gttctggag gagcagagt gogtctctc cctgccctgc cgagctgctc
2221 actggctgct ctagaggctg tgctttgagg tctccatgga aaccattagt tgctaagcaa
2281 ctggagcctc atctgtgctg agctcaggtc ctatcgagtt cacctagctg agacaccccac
2341 gccctgcag ccactttgca gtgacaagcc tgagtctcag gttctgcctc tataaaaaag
2401 agtagccttt caggagggca tgcagagccc cctggccagc gtctagagga gaggtgactg
2461 agtggggcca tgtcactcgt ccctggctgg agaacctcca tcagtctccc agttagcctg
2521 gggcaggaga gaaccagagg agctgtggct gctgattgga tgatttaagt acccaatctg
2581 ttgtcccagg catogaacc cagagcgacc tgcacacatg ccaccgctgc ccgcccctcc
2641 acctctctg ctctgtgta caggattgtt ttgtcttgaa gggttttgtt gttgctactt
2701 tttgctttgt ttttctttt ttaacataag gtttctctg gtaccctag ctgtcctgga
2761 actcactctg tagaccaggc tggcctcaaa ctcaaaaac caccttctc ccaagtgtg
2821 ggattaaagg catcgcacc atgcccagc ccccgctctt gtttctaag gtttctctg
2881 tttactgct accogttgca caaccgctg ctgtccaagt ctgtttgtat ctactccacc
2941 gccactagc ctgtctggac tggacctag tttacctgga agccttcaact aacttccctt
3001 gtctccacct tctggagaaa tctgaagget cacactgata cctccgctt ctcccagagt
3061 cgcagtttct taggctcag ttaaatacca gaattggatc tcaggctctg ctatccccac
3121 cctacctaac caaccccctc ctctccctc ctactagcc aaagcccttt caacccttg
3181 ggcttttct acacctacac accagggcaa ttttagaact catggctctc ctagaaaaag
3241 cctacctct tggagactga cctctacag tccaggaggc agacactcag acagaggaac
3301 tctgtcttc agtgcggga gttccagaaa gaccatact cccctgcaga gctaactaag
3361 ctgccaggac ccagccagag catccccctt tagccgaggg ccagctcccc agaatgaaaa
3421 acctgtctg ggcccctccc tgggctaca gtgcccaagg ggcaagttg actggattcc
3481 cagcagcccc tccactccg agcaaaaac agctaccctg gggcaggcct cattggcccc
3541 aggaaccccc agcctgtcag cacctgttc aggatccagt cccagcgag t

```

Fig. 2-5. Result for cDNA sequence of mouse UII promoter (3606 bp)

나. bovine beta-casein promoter 크로닝

노 뿐만아니라 유선조직을 형질전환 이용 특히 벡터로 활용하기 위하여 소의 유선조직으로부터 DNA를 분리하여 소의 beta-casein promoter 부분의 염기서열 기존의 발표된 논문을 활용 참고하여 (Aust. J. Biol. Sci 41:527-537;1988), primer를 합성(F: 5'-tcg aat cca tct cta tca att aat-3'; R: 5'-ggc tct aat cct ggg aat ggg-3')하여 LA-PCR로 증폭하여 (Fig. 2-6), pCR2.1 크로닝 벡터에 ligation후 염기서열 결정 (Fig. 2-7) 하였다.

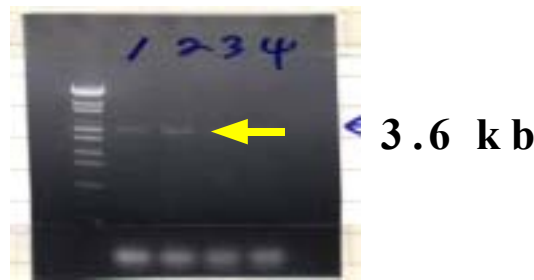


Fig. 2-6. PCR amplification of bovine beta-casein promoter
PCR template used in PCR was extracted from the bovine mammary gland

```

1  tcaaatccat  ctctatcaat  taatotaatt  caaaattoot  caacacacat  cattaacaaa
61  ttctctottt  attccacaat  atotaaacca  tcttctctaa  aaaaacacaaa  tottoaatoo
121  caaacacata  cttttctttt  tatctctttt  ctcaacaaatc  acactttttt  acctatoccc
181  ttccaaccca  aaacctaaca  cataaacaaa  cccatataaa  ctacccaacc  cctttttctac
241  ttatatctat  cacactcaat  tcatttcaatc  atttattttc  ctcaacttct  cctcaaccat
301  atcaacacatc  ttacaatcaa  tattaacctoa  ataatecaaa  tocataatca  atottcaattt
361  cctttttteta  acaaatacaa  cactttctata  acactcaaat  ctattaccat  ccaacacaca
421  tctcaacata  atataaatot  aactatatt  ctcaacacaaa  attatcaatt  atotcaaat
481  ccttacttta  caaatcact  tatctctccc  aaactctca  atatatatat  toaacataat
541  taataaccca  aacaaacctt  ctaaaaatca  ctactctaaa  atacaactac  atttatcaac
601  atctatcaat  aaaaacccaa  aaaaacttaa  caactcttt  totaaatcaa  ctcttattaa
661  tcaaaaactac  ttttaacatc  toacttaaac  ctattctaac  taactatoot  aacacactcc
721  tctctctctc  cctttcaatt  tctttctctc  tctctctatt  tcccttcca  toaatactac
781  ctcaataaca  ttcaactcact  ataaaacata  taacacacaa  ctcaactct  ccattttaat
841  aaatctctat  aaataatatt  tottctacac  aactatctct  aaataaatct  actttctctc
901  ttaaaatccc  tcaacaaatc  ccaactatct  acacaaataa  attoacatte  cctcaactca
961  caacatactt  totctccat  tatctcaacc  ctttctcttt  ctctctctct  acctccatct
1021  actccttttt  ccttcaata  cctcaaccaa  attcaactct  toatttccct  tocatctctc
1081  totactcaat  totctctcac  tcttctcaac  cccatcaata  acactccacc  aactccact
1141  atttcaactt  acaatactc  caatcaatto  tcttctctac  ttcatttcaat  taatttactc
1201  acttttttaa  tttttttcca  tattcaaac  cctattcttt  ccttttactc  tatactctct
1261  tccctcttca  cctctaaact  atcatcatct  ccttcttacc  ttctttcttt  ctccattata
1321  ccataaacac  taacaactat  tcaacttacc  atcaactct  attctttctc  toactctctc
1381  atttctctct  totattcaaa  tttaccccaa  cactctcaaa  accacaccaa  tactaaacac
1441  acctcattct  aattacaata  atttcaaac  tccccacaaa  cttccctctc  tccccacaaa
1501  cctctctaac  tactcaacaa  ttttaatttc  tttatcaaat  totcaattat  tccctttaaa
1561  atactcccca  caatttttca  caacacacaaa  atcaaacaaa  ttcattttct  aatcatcaac
1621  atttctagga  attcaaatcc  actatttggt  ttatttcaaa  ccacaaaatt  agcatgccat

```

```

1681 taataactat atataaacaa ccacaaaatc acatcattat ccattcaact cctccttcac
1741 ttctttctct ctacttttaa aaaaaactaa caatctcaca tataatttca ttctatctcc
1801 tactcatctt tttttcaaac taacttaaaa tctacaaaac acataattcc ttaaaaatac
1861 tcttaaaaaa aacgatottt aacataaaat ttacactatt ttcaacaaat ttcttaaaaa
1921 atacaaccaa ctataaacat ttotaacaot ccttctctatt ttctttacca ccaactactc
1981 taacacacct tattaaaaaa tcttttcttc aattaaatat ttccaatttc attaaacata
2041 cctcaacctt aaacccaac acatttaatt tatactatcc caatttcaat aattcttact
2101 caacaacctc taccacaaa aactttatag acctaccata tttactcaac acataaacac
2161 ccttcttaac atacatctcc ttttcaaac atattttata acaaacacta tattttataa
2221 aattctctac aacatccaaa ttccaacttt atcattttat ttacaatatt tcaaaaatat
2281 taaaatacat acatcaata cacaactaaa ttaaacacaa actattttat ttcttaaaaa
2341 aaaattctac ctccaacac caataccac aaacaaaaaa caatcaaaaa tctatctctc
2401 caaaatttat acctcaaac atactactca gtaactaaat cacttaaaaa ttccatata
2461 aatctctaat tataaaata acaaatota ataataacct cctacatctt aatcaactct
2521 caatattata ctcttttttc aactctaac aatcaaaaatt tatttaaac tttatadaca
2581 tcttcaataa actaaaacaa attacaaatt acctccatc acaaaaatat acaaaaattt
2641 cttaatctac ttccaacac tcccaattca acatctctct caacacattc tctcccaaca
2701 cttttttttt cacaactata aatccacaaa caaccattta atacattttc ctcaaaaata
2761 ctatctattt tattttatcc tacacacac taactctaac taactctcc cacaactctc
2821 acacctctct aatcaccac acatactaca cactctctct acaaaaaata acctactctt
2881 atcatctctc aaattatctc cacaaccccc acataacatt acctctctcc caatcaaac
2941 taactacaca acaacaatct actcaatcca acaaacactc tcaatcaatc caacaatatc
3001 acaaatctct aaaaacaaac acaactctta ctcaaaataa acaatctaac caacacaaac
3061 attcatcaaa atcaactact ttaactacaa aaacataaaa ataaaactatt accttctctt
3121 tcatatacat tttttcaatc caatccccct aataaaaactc actctccaac caaactcaaa
3181 ctttaaatatt ttcttcaact ctctaatccc acaactctaac acatctctcc caataaaaat
3241 taataaataa atatttttaa taactaaatc aatcaactta tttttctctc actatctctc
3301 acttctcttc tctttttcca aaaaacactc ataaactctc tcaataactc aaaaacactc
3361 aaataacata taactcttta cctcaaaaaca tctcaatccc tcaactcaaa accttaactt
3421 caaatctaac attaatcaat aatactaaat tttaaccttc cccatctaat aaaaatctct
3481 ttaatatatt tctaaaatac aacctttttt cttttttcca tcaactttcc acctctctcc
3541 ttccctctac acaactcaaa cctccactcc cctcaaacac caaactctta actattttct
3601 ttatacacta tctttcaatt ctttttaaac caactaattc tacttaata acaaaaatga
3661 ttgacaagta atacactatt tctctatctt ccatttcca ggaattgaga gcc

```

Fig. 2-7. Sequencing result of bovine beta-casein promoter
Underlines indicate the primers

4. 방광 및 유선특이 발현 hG-CSF 발현벡터 구축

pCR2.1 벡터에 크로닝 되어진 mUII 프로모터하류에 SV40 polyA 약 2.6 kb를 5'에 Kpn I + Sal I site와 3'에 Eco RV + Hind III site를 첨가하여 PCR로 증폭하였으며 이를 mUII promoter가 크로닝 되어있는 벡터에 Kpn I과 Hind III site로 절단 후 재 크로닝 하였다. hG-CSF를 첨가하기 위하여 hG-CSF를 Kpn I과 Xho I으로 절단한 후 mUII+SV40를 Kpn I과 Sal I으로 절단한 site에 ligation 하여 **fig. 2-8**에서 나타낸 것과 같이 mUII+hG-CSF+SV40 벡터를 구축하였다.

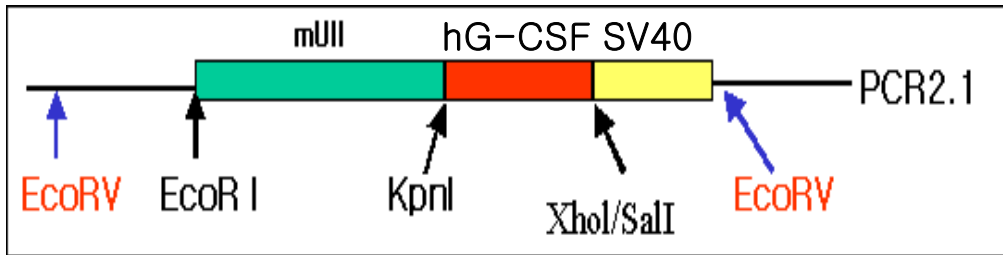


Fig. 2-8. Diagram of vector encoding the mUII+hG-CSF+SV40

beta-casein 활용 형질전환용 발현벡터 다음과 같이 구축하였다. pcDNA3에 크로닝 되어있는 hG-CSF유전자를 PCR을 이용하여 bGH poly 부분을 포함한 약 820bp를 증폭하여 KpnI과 HindIII로 절단 후 pCR2.1에 크로닝 되어있는 beta casein promoter 하류에 크로닝 하여 bovine beta casein+hG-CSF+bGH 형질전환용 벡터를 구축하였다 (**Fig. 2-9**).

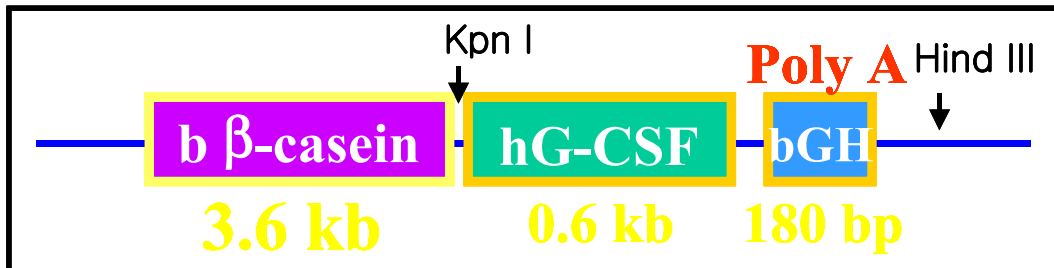


Fig. 2-9. Diagram of vector encoding the bovine beta casein+hG-CSF+bGH

5. GFP 발현 벡터 구축

표지 유전자를 활용하기 위하여 강력한 chicken beta-actin promoter와 CMV-IE Enhancer를 가지고 있으며, rabbit beta-globin polyA를 가지고 있는 pCAGGS 유래의 벡터를 사용하였다. chicken b-actin promoter 하류의 유일한 크로닝 site인 Xho I site에 GFP 유전자를 크로닝 하였다. 아래와 같은 chicken b-actin promoter+GFP 발현벡터를 구축하였다 (Fig. 2-10).

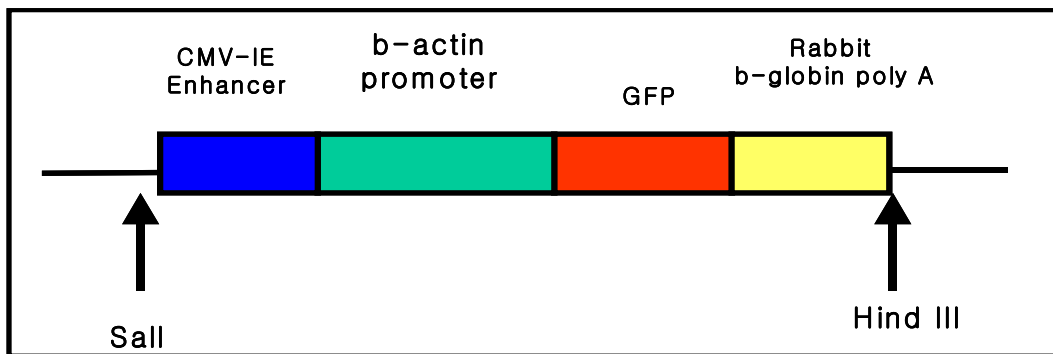


Fig. 2-10. Map of GFP expressing vector

6. EGFP+mUII+hG-CSF+SV40 및 G418+mUII+hG-CSF+SV40 발현 벡터구축

형질전환용으로 구축된 발현벡터 mUII+hG-CSF (Fig. 2-8)의 체세포내에 transfection 후 유전자가 삽입된 체세포의 selection을 효율성 있게 하기 위하여 다음과 같은 특이 발현 벡터를 구축하였다.

EGFP+mUII+hG-CSF+SV40 특이 벡터는 pEGFP-C2 발현벡터에서 EGFP의 ATG 부터 Stop codon까지 749bp PCR이용 증폭하였으며, 5'에 NheI과 3'에 ApaI site를 추가하여 pCR2.1 Vector에 크로닝 하였고, primer는 다음과 같이 사용하였다. pEGFP-F (NheI) 5'-TCA gAT CCg CTA gCg CTA CCg gTC-3'; pEGFP-R (ApaI) 3'-ggg CCC TTA ACT TgT ACA gCT CgT CCA T-3' (Fig. 2-11). Fig. 2-10의 왼쪽은 PCR 영동결과이며, 오른쪽은 pCR2.1에 크로닝 후 NheI과 ApaI 제한효소로 절단후 영동사진을 나타내었다.

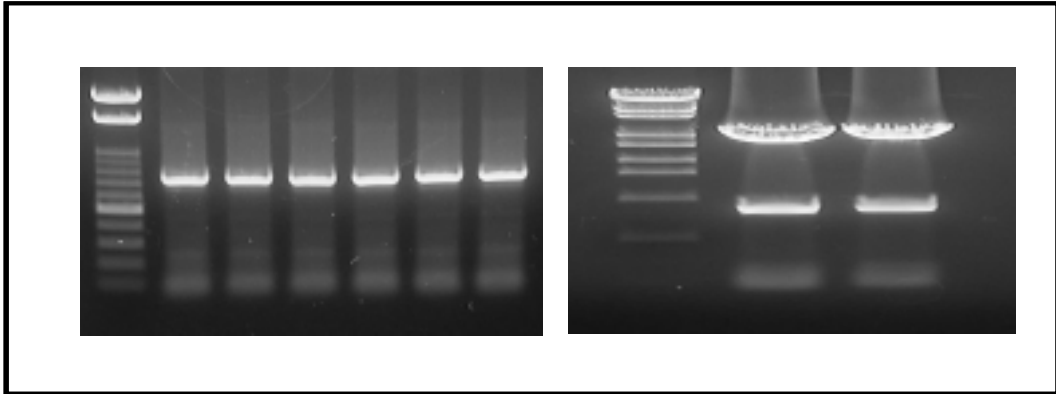


Fig. 2-11. pEGFP-C2 PCR result and pCR2.1 vector cloning

Left: EGFP 749 bp PCR; Right: Cut by Nhe I and Apa I

pCR2.1에서 NheI과 ApaI으로 cut한 후 pcDNA3.1/Zeo를 같은 제한효소로 절단후 ligation 시켜 삽입여부를 pEGFP-F(NheI)와 pEGFP-R(ApaI)의 Primer를 이용하여 E.coli PCR로 분석 결과 **Fig. 2-12**과 같이 pcDNA3.1/Zeo에 삽입된 clone을 확보하였다. **Fig. 2-12**은 각각 절단한 sample이며 이것을 ligation하여 E.Coli PCR은 오른쪽에서 확인하였다.

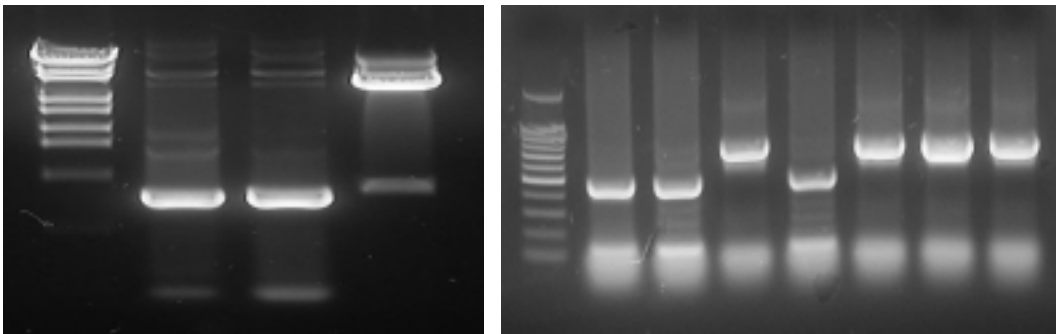


Fig. 2-12. Cloning of the EGFP cut by Nhe I and Apa I into the pcDNA3.1/Zeo. Left: cut by restriction ; Right: E.coli PCR result

pcDNA3.1/Zeo+EGFP 벡터에서 CMV Promoter와 BGH poly A를 활용하기 위해 다시 pEGFP (pcDNA3.1/Zeo)-F (Not1) Primer 5'-gCg gCC gCg Atg TAC ggg CCA gAT ATA C-3'; pEGFP(pcDNA3.1/Zeo)-R (EcoR1) Primer 5'-gAA TTC TCC CCA gCA TgC CTg CTA TT-3'를 이용하여 약 1697bp의 크기를 증폭한 결과 다음과 같다 (Fig. 2-13). PCR product를 pCR2.1에 크로닝하여 확인 결과는 오른쪽의 영동사진이다.

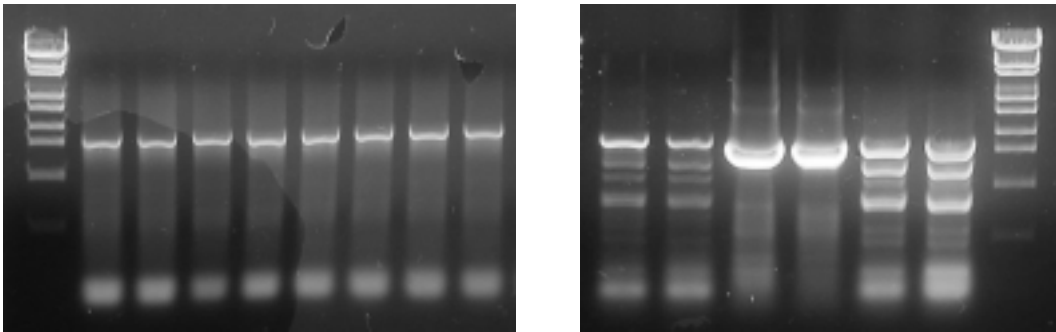


Fig. 2-13. PCR of Not I and Eco RI primers of pEGFP cloned in pcDNA3.1/Zeo. Left: PCR result; Right: E.coli PCR result

마지막으로 CMV promoter+EGFP+bGH polyA와 mUII+hG-CSF+SV40를 결합하기 위해 **Fig. 2-14**에의 왼쪽에서는 EGFP의 cut사진이고, 오른쪽은 mUII+hG-CSF의 같은 제한효소로 절단한 결과를 나타내었다.

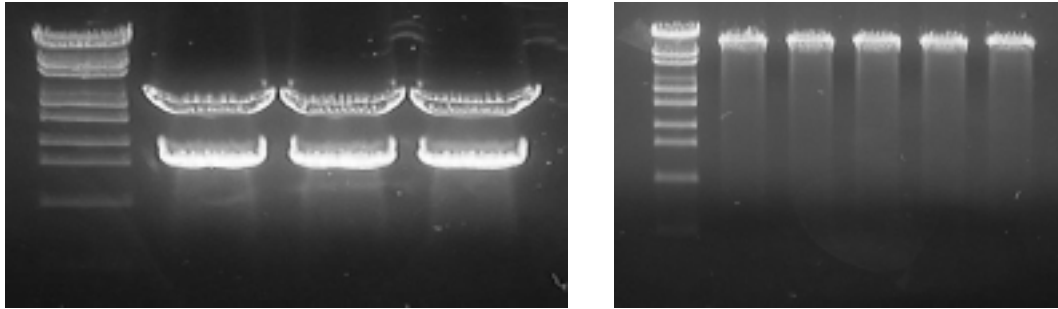


Fig. 2-14. Cutting result pCR2.1 EGFP (CMV+bGH polyA) and mUII+hG-CSF+SV40 by Not I and EcoRI cut

Fig. 2-14의 ligation 결과를 확인하기 위해, 즉 최종적으로 만들어지는 벡터는 pCR2.1+pCMV+EGFP+bGHpolyA+mUII+hG-CSF+SV40이며, 확인은 먼저 PCR로 EGFP (1.6 kb)를 증폭하였으며 (**Fig. 2-15; left**), 이를 다시 Xho I 제한 효소를 이용 절단한 결과는 중앙의 영동결과이고, 오른쪽은 최종적으로 NotI과 EcoRV로 절단한 결과 3.9 kb의 벡터와 insert 유전자의 8.4 kb의 밴드를 확인할 수 있었다.

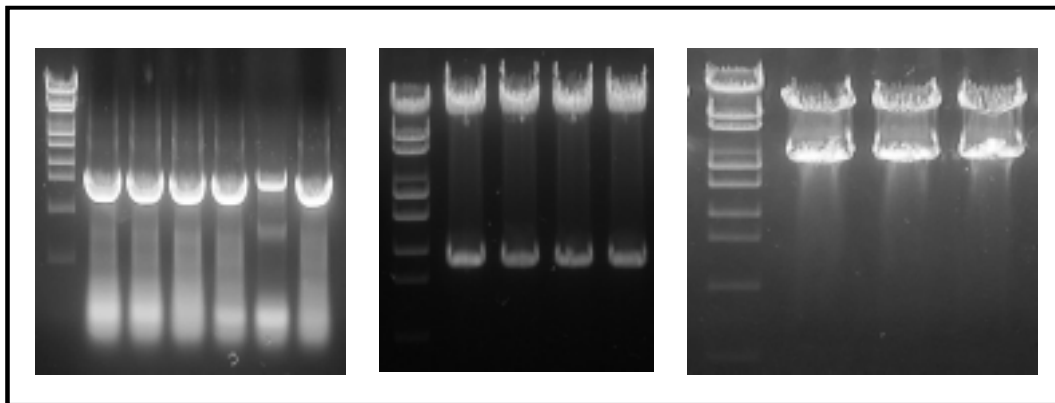


Fig. 2-15. PCR result of pCR2.1+pCMV+EGFP+bGHpolyA+mUII+hG-CSF+SV40

결과적으로 다음과 같은 노로 물질을 분비할 수 있는 형질전환용 벡터 EGFP+mUII+hG-CSF (8.4 kb)를 구축하였다.

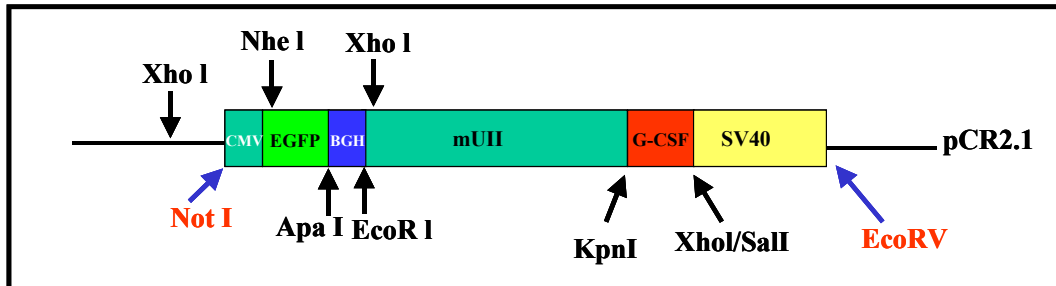


Fig. 2-16. Construction of transgenic vector EGFP+mUII+hG-CSF

추가적으로 G418을 이용한 효율적인 발현백터를 구축하기 위해 다음과 같은 백터 구축을 추진하였다. pcDNA3에 있는 SV40 promoter+Neomycin+SV40 poly A를 위해 **G418-F (Not1) primer** 5'-TgC ggC CgC CCA ggC Agg CAg AAg TAT gCA-3'와 **G418-R (EcoRI) primer** 5'-gCC gAA TTC TAT ACA gAC ATg ATA AgA TAC-3'를 이용하여 pcDNA3 백터에서 Neomycin 부분을 포함하는 1463bp를 증폭하였다 (**Fig. 2-17; left**), 이를 pCR2.1 백터에 크로닝한 것을 E. Coli PCR로 확인 (**Fig. 2-17**), 이를 EcoRI과 Not1 제한효소를 cut하여 영동한 결과 (**Fig. 13; right**)이다.

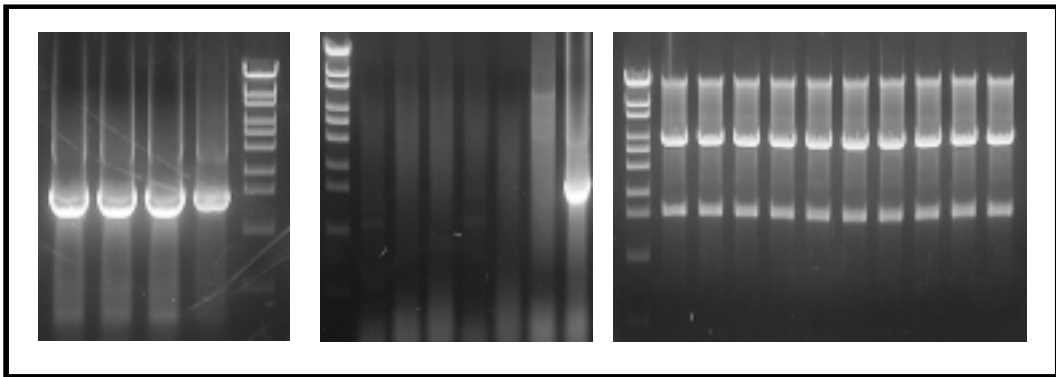


Fig. 2-17. Neomycin PCR, E. coli PCR and Restriction cutting result of SV40 promoter+Neomycin+SV40

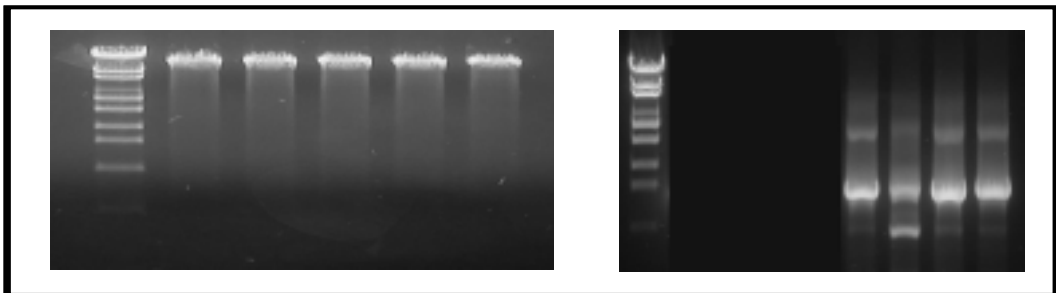


Fig. 2-18. mUII+hG-CSF+SV40 cut by Not I-Eco RI and E. coli PCR result

Fig. 2-16에서 Not1과 EcoRI으로 절단한 1463bp를 같은 제한효소로 절단한 mUII+hG-CSF+SV40와 ligation 후 PCR확인 영동사진 (**Fig. 2-18**)이며, 이를 확인하기 위하여 E. coli PCR 결과 3개의 colony에서 ligation 삽입개체 확인하였다.

최종적으로 이를 NotI과 EcoRV 제한 효소이용 절단한 영동사진결과는 Fig. 2-19과 같다.

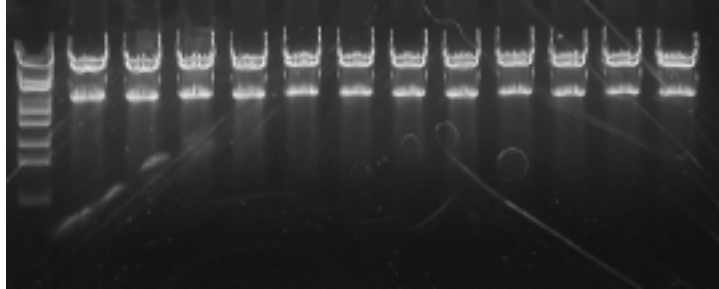


Fig. 2-19. Restriction cutting result of pSV40+G418+SV40polyA+mUII+hG-CSF+SV40

따라서, 다음과 같은 G418을 이용하여 쉽게 체세포에 유전자를 transfection 하여 selection 할 수 있는 발현백터를 구축하였다 (Fig. 2-20).

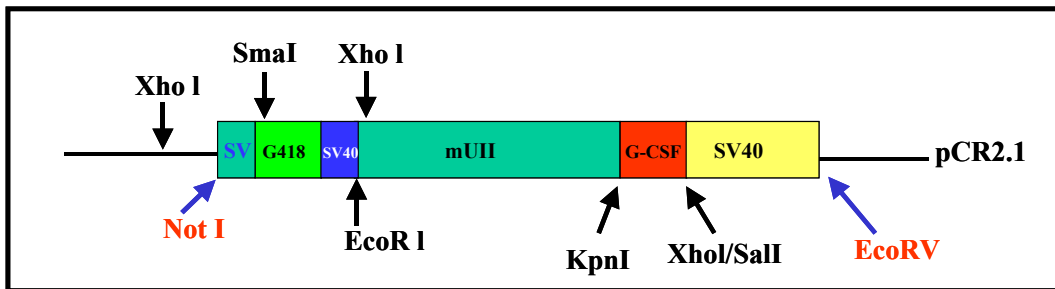


Fig. 2-20. Construction of expressing vector G418+mUII+hG-CSF

제 2 절 동물세포이용 재조합체 생산

1. 재료 및 방법

가. 공시재료 : CHO동물세포 및 발현벡터 (pcDNA3)

나. 처리항목 : pcDNA3 발현벡터에 유전자 재 크로닝 및 CHO 세포에 transfection하여 hG-CSF를 발현하는 세포 분리

다. 조사항목 : hG-CSF를 생산하는 세포 동결보존 및 배양상층회수하여 Elisa 방법으로 정량 분석하여 생쥐에 투여하여 혈액중 백혈구의 증가여부로 생리활성 분석

2. pcDNA3 동물세포발현용 벡터 재크로닝 및 CHO 세포 transfection

CHO 동물세포에서 hG-CSF를 생산하기 위해 pcDNA3 발현벡터의 site에 재 크로닝 하여 pcDNA3+hG-CSF벡터를 구축 (Fig. 2-21)하여 CHO 세포에 transfection 하였다.

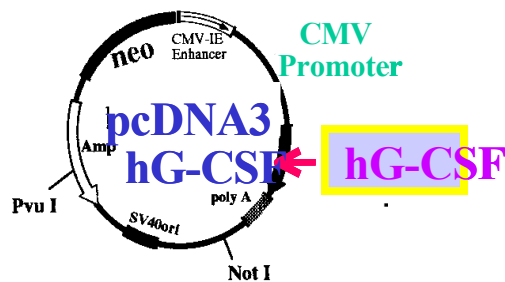


Fig. 2-21. Construction of expressing vector of pcDNA3+hG-CSF

3. hG-CSF발현 클론 선택

G-418 selection 약제를 처리하여 3주간 배양하여 colony (Fig. 2-22)를 분리 배양하였으며, 분리된 세포의 clolony는 동결보존 하였고 나머지는 CHO 세포로부터 RNA 분리하여 hG-CSF를 RT-PCR 방법으로 hG-CSF의 mRNA의 발현을 확인하였다 (Fig. 2-22).

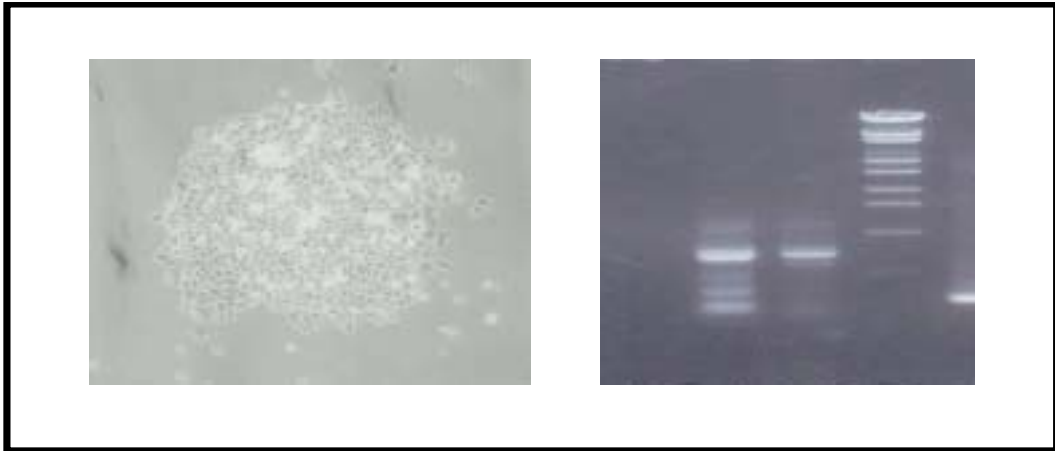


Fig. 2-22. Isolation of CHO cell line (left) and RT-PCR result

4. 동물세포에서 재조합 hG-CSF의 정량분석

CHO 동물세포에서 생산되어진 hG-CSF 재조합체의 정량을 분석하기 위해 CHO 배양상층을 회수하여 PBS에서 투석한후 농축한 후 hG-CSF Elisa kit(Bio Source사)를 이용하여 정량 분석한 결과는 다음과 같다 (Fig. 2-23). CHO 세포 클론 각각의 세포에서 43-81 pg/ml의 hG-CSF가 분비되는 세포 clone을 확보하였다 (Fig. 2-24).

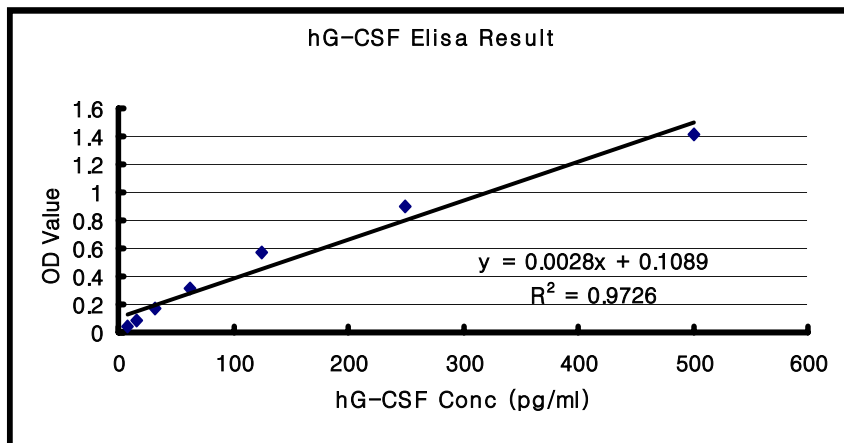


Fig. 2-23. ELISA result of hG-CSF Standard

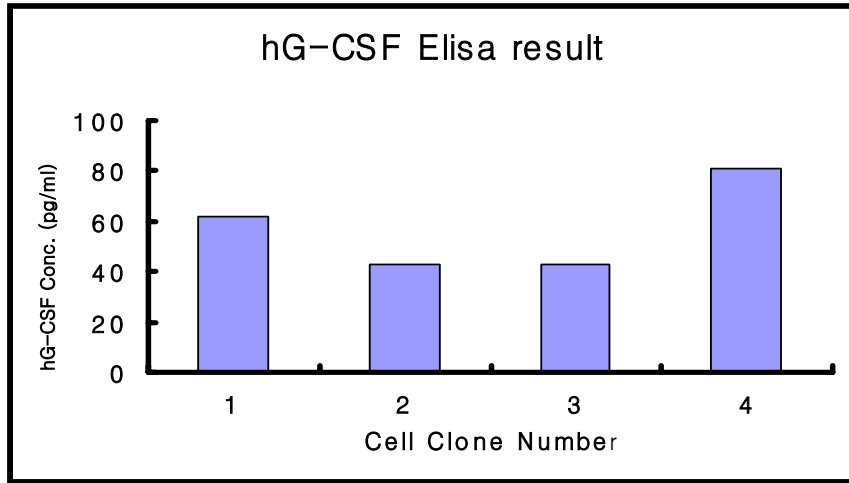


Fig. 2-24. The ELISA result of rec-hG-CSF in supernatant of cell clone selected

5. 재조합체 hG-CSF의 생리활성검토

재조합체 hG-CSF를 생쥐에 투여하여 백혈구의 증가되는 것으로 생리활을 분석하기 위하여 10배 이상 농축시킨 hG-CSF를 생쥐에 재조합체 hG-CSF 60 pg을 0일과 2일에 투여하여 백혈구수 (WBC)를 투여전과 투여 후 5일에 분석하였다. 분석결과 rec-hG-CSF 투여군에서는 유의적으로 WBC가 증가하였다 (Fig. 2-25). 따라서, 재조합체 hG-CSF는 효과적으로 백혈구 수를 증가시킬 수 있었다.

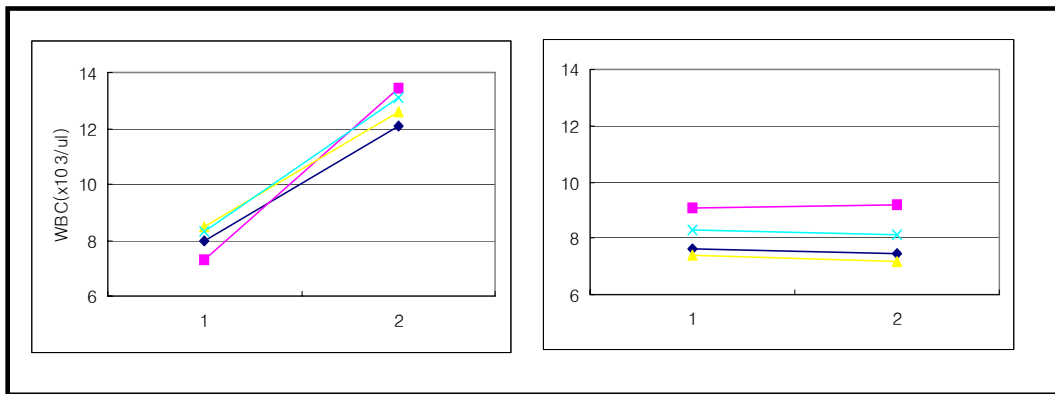


Fig. 2-25. rec-hG-CSF induces WBC increase in mice (right: control)

제 3 절 효과적인 핵이식란 생산방법 확립

1. 전기자극의 융합조건에 따른 융합율

효과적인 핵치완 수정란 생산방법을 확립하기 위하여 전기자극의 융합조건은 1.9~2.1kv/cm(10-20 μ s)로 융합율은 Table. 2-1에서 보는 바와 같이 51-68%로 큰 차이는 없었으나, lysis 율은 20 μ s일수록 높은 율을 나타내었다.

Table. 2-1. Fusion rate by electric fusion pulse

Fusion pulse	No. of		
	Fusing	Fused(%)	Lysis(%)
1.9kv/cm10 μ s	54	37(68.5)	0(0.0)
20 μ s	62	21(51.2)	24(38.7)
2.0kv/cm10 μ s	68	43(65.1)	2(2.9)
20 μ s	80	27(54.0)	30(37.5)
2.1kv/cm10 μ s	66	28(53.8)	64(21.2)
20 μ s	80	21(53.8)	42(51.8)

2. 핵치완 후 활성화 조건에 의한 배 발달율

융합된 핵이식란의 화학적 활성화 처리전 4시간 동안 10% FBS 첨가된 TCM199에서 배양하고, 활성화는 TCM199에 희석한 5 μ M ionomycin (Sigma, USA) 40 μ l drop에서 4분간 정치한 후 5분동안 TCM199에서 다시 4시간 동안 1.9mM 6-DMAP에서 배양하였으며, 핵이식후 2 cells 까지의 발달율은 68-76%, 배반포까지는 19-48%로 1.9kv/cm20 μ s에서 가장 높은 배 발달율을 나타내었다 (Table. 2-2).

Table. 2-2. Embryo development rate of electric fusion condition

Fusion pulse	No. of		
	Fused couplets	≥ 2 cells(%)	Blasto/2-cell(%)
1.9kv/cm10 μ s	54	41(75.9)	8(19.5)
20 μ s	53	37(69.8)	18(48.6)
2.0kv/cm10 μ s	65	50(76.9)	10(20.0)
20 μ s	64	44(68.8)	18(40.9)
2.1kv/cm10 μ s	61	43(70.5)	19(44.2)
20 μ s	54	37(68.5)	10(27.0)

제 4 절 체세포주 확립 및 유전자 도입

1. 체세포주 확립

체세포주 확립을 위해 도축장에서 채취한 임신 40-50일 정도의 태아유래의 조직으로부터 체세포주 확립 (Fig. 2-26)하여 각각 체세포의 성 결정은 Y-specific primer 이용 PCR 분석 후 현재 동결 보존하여 사용하고 있다 (우: 2; 상: 4 세포주).

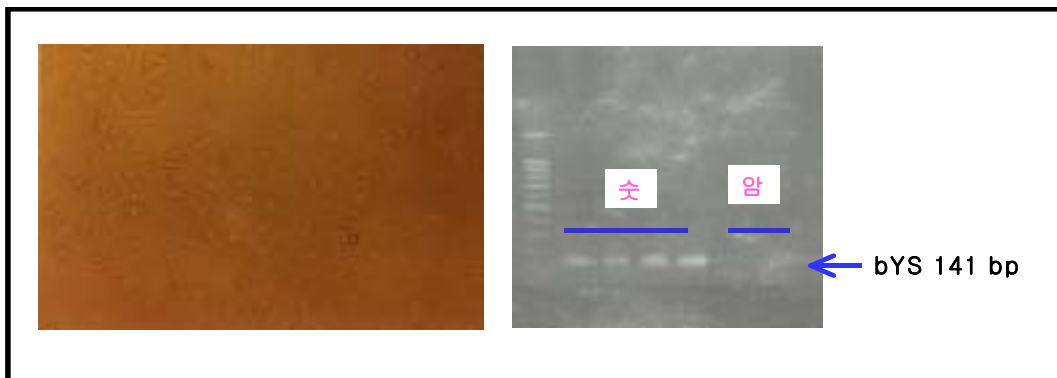


Fig. 2-26. Isolation of bovine somatic cell and determination of sex

2. 체세포내 Marker (GFP)유전자 도입 방법시도

체세포내 Marker (GFP) 유전자를 liposome-mediated transfection 방법으로 도입하여 GFP 발현 체세포 확인 및 confocal이용결과 핵내에서 GFP 발현되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2-27).

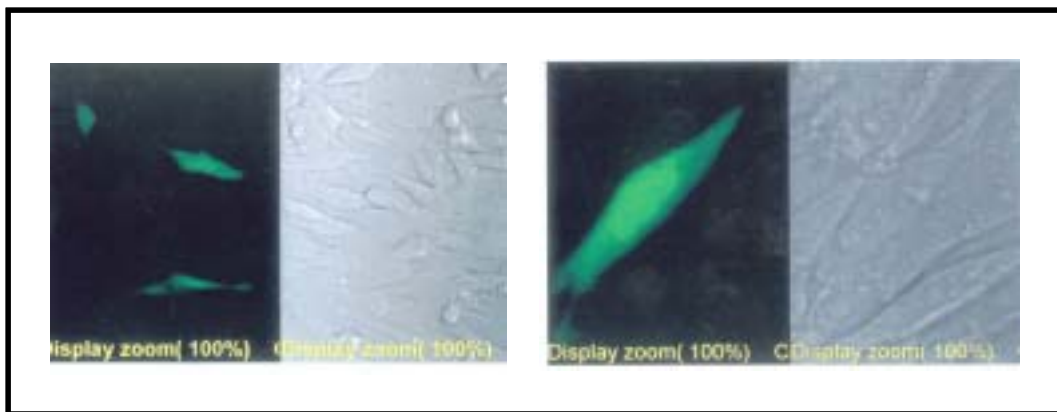


Fig. 2-27. Transfection and expression of GFP gene into somatic cell

3. Marker 유전자 도입 체세포 핵치환 발달연구

EGFP 발현 체세포의 발달 율을 조사하기 위해 핵이식란의 화학적 활성화 처리전 4시간 동안 10% FBS 첨가된 TCM199에서 배양하고, 활성화는 TCM199에 희석한 5 μ M ionomycin (Sigma, USA) 40 μ l drop에서 4분간 정치한 후 5분동안 TCM199에서 다시 4시간 동안 1.9mM 6-DMAP에서 배양하였으며, 핵이식후 2 cells 까지의 발달율은 EGFP 발현세포에서 59.2%로 대조구에 비해 약 10%정도 낮았으며, 2-cell 대비 blastocyst까지의 발달율은 37.7%로 대조구의 44.4%보다 6.7%낮았는데, 이러한 결과는 아마 EGFP 유전자가 배발달에 좋지 않은 영향 때문에 나타나는 결과라고 사료된다.

Tabel. 2-3. Developmental rate in the EGFP expression somatic cell

	fused oocytes	No. of	
		2 cells(%)	Blasto./2-cell(%)
Control	117	81(69.3)	36(44.4)
GFP Gene group	76	45(59.2)	17(37.7)

4. 외래 유전자 도입 체세포 확립 및 핵치환 수정란 체외발달 연구

가. 외래 유전자 도입 체세포 확립

형질전환 발현벡터 EGFP+mUII+hG-CSF를 구축된 소의 체세포에 liposome mediated method으로 transfection시켜 GFP가 발현되는 세포를 선택하여 각각의 세포주를 GFP의 유전자가 삽입되었는가를 GFP 특이 primer를 이용하여 PCR로 검정하였다 (**Fig. 2-28**). EGFP 특이 primer는 **EGFP-1061F** 5'-ACg TCT ATA TCA Tgg CCg-3'; **EGFP-1330R** 5'-ACT TgT ACA gCT CgT CCA Tg-3'로 270bp의 밴드를 확인하였다. 그 결과 선택된 7개 세포주 모두 GFP 유전자를 확인할 수 있었으며 (**Fig. 2-28**), 또한 PCR product의 southern blot 결과 삽입된 유전자는 구축된 벡터 유래의 유전자임을 확인하였다 (**Fig. 2-29**).

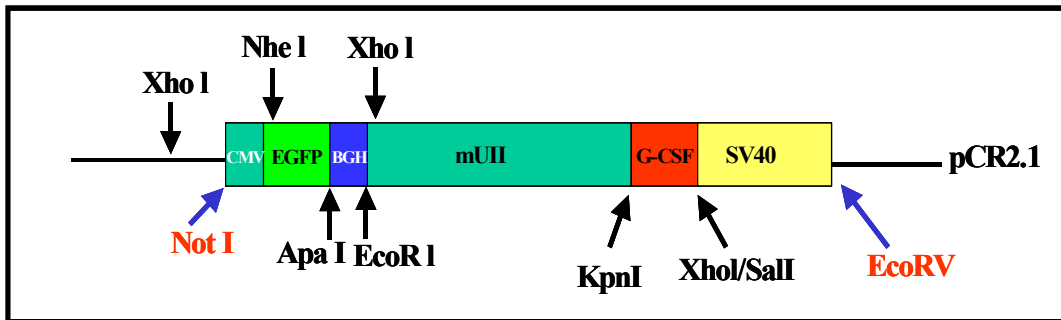


Fig. 2-15. Map of vector transfected into somatic cell



Fig. 2-28. PCR detection of EGPF gene transfected into bovine somatic cell



Fig. 2-29. Southern blotting result of PCR product

나. 외래 유전자 도입 핵치환 수정란 체외발달 연구

hG-CSF 유전자 도입 체세포의 핵치환 후의 배발달 율은 다음과 같다. Table. 2-4에서 보는 바와 같이 92개 융합된 것 중에서 2세포기까지는 61%, 2세포기 대비 Blastocyst까지는 35%의 배 발달 율을 나타내었다. 이러한 결과는 GFP 유전자와 hG-CSF 유전자의 삽입으로 배 발달율이 낮은 것으로 사료된다.

Table. 2-4. Embryo development rate after nuclear transfer of somatic cell inserted hG-CSF gene

	No. of		
	fused oocytes	2 cells(%)	Blasto./2-cell(%)
hG-CSF group	92	57(61.9)	20(35.1)

제 5 절 형질전환 생쥐생산

1. 뇨로 G-CSF를 분비하는 형질전환 생쥐생산

가. 형질전환 생쥐생산

생쥐 수정란은 BCF1생쥐를 무작위로 선발하여 5IU의 PMSG을 투여한후 48시간 후에 5IU의 hCG을 투여한후, 하룻밤 수놈과 교미후 hCG투여후 22시간째 난관으로부터 회수하였다. 전핵이 뚜렷한 난자만을 선발한후 미세주입기로 약 5pl ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 G-CSF유전자를 도입한후, 가임신된 대리모의 난관에 이식함으로써 산자를 생산했다. 415개의 수정란에 미세 주입하여 319개의 미세주입된 수정란을 이식하여 40마리의 산자를 생산하여 형질전환 분석결과 4두에서 확인되었다 (Table. 2-5).

Table. 2-5. Efficiency of transgenic mouse production

Gene	No. embryos injected	No. embryos survived	No. embryos transferred	No. offspring born	No. mice analyzed	No. of transgenics
hG-CSF	415	319	319	40	40	4

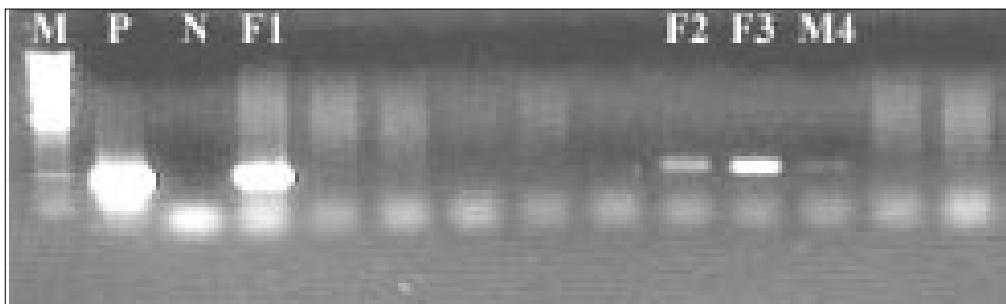


Fig. 2-30. Identification of transgenic mice by tail biopsy PCR.

M: lambda HindIII fragment, P: positive control (injection DNA), N : negative control (genomic DNA), F1, F2, F3 (female) and F4 (male)

나. 형질전환 산자의 유전자 형질전환율

형질전환된 생쥐로 판명된 계통을 보통 생쥐와 교배하여 형질전환 율을 분석한 결과는 다음과 같다 (Table. 2-6). 4두의 founder이용 50마리의 산자중 PCR 분석결과 18두가 확인되어 35%의 형질전환율을 나타내었다.

Table. 2-6. Transmission rate of the hG-CSF transgene to offspring

Line	Sex	Litter	No of offspring	transgenic mouse	Transmission Rate(%)
1	F	1	9	5	56
2	F	2	20	4	20
3	F	1	10	6	60
4	M	1	11	3	27
Total			50	18	36

F: female, M: male

다. hG-CSF 유전자의 발현검정

F1 형질전환 산자를 각 계통별로 분리한 다음 각 계통별 방광조직을 취한다음 이를 가지고 hG-CSF 유전자의 발현량을 분석하였다. RNA를 분리, 정량하여 20 μ g을 loading하여 Northern blot을 실시 하였다. Negative control 은 PCR을 하여 형질전환 산자가 아닌 개체를 사용하였다. 결과적으로 2번 계통이 가장 높은 발현을 보였고 (Fig. 2-31) 이 이후의 실험의 결과는 2번 계통을 이용하여 실험하였다.

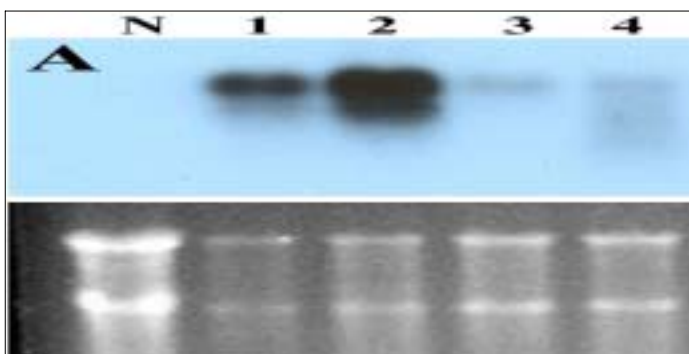


Fig. 2-31. Northern blot result

각각의 계통에서 방광조직으로부터 RNA를 분리한 후 G-CSF에 특이적인 probe를 이용하여 northern blot을 수행하였다. 각각의 line중 2번라인에서 가장 많은 발현을 보였다. N: negative control, 아래의 전기영동 사진은 각 조직에서 추출한 RNA의 18S와 28S rRNA를 보여주고 있다.

2번 라인의 생쥐로부터 각 조직을 채취하여 이로부터 얻은 RNA를 가지고 RT-PCR을 수행하였다. Fig. 2-32의 결과로 방광에서 특이적으로 발현됨을 확인할 수 있었다.

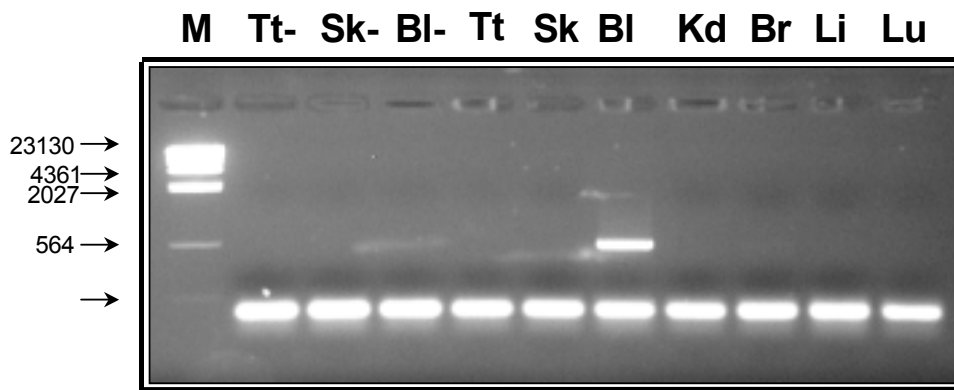


Fig. 2-32. RT-PCR result of each tissue expressing hG-CSF

M : lambda HindIII fragment, Tt- : non transgenic mice testis, Sk- : non transgenic mice skin, Bl- : non transgenic mice bladder, Tt : transgenic mice testis, Sk : transgenic mice skin, Bl : transgenic mice bladder, Kd : transgenic mice kidney, Br : transgenic mice brain, Li : transgenic mice liver, Lu : transgenic mice lung.

라. 조직내에서 hG-CSF 유전자의 발현 검증

2번 계통의 쥐와 비형질전환 산자의 방광과 뇨관조직을 이용 10% NBF buffer에서 고정후 파라핀 블록을 만든후 5um의 두께로 자른 다음 gelatin으로 코팅된 슬라이드에 붙인다. 이 슬라이드를 Primary Antibody (SC-1318, Santa Cruz)를 1: 500으로 희석하여 상온에서 2시간 반응한다. Secondary Antibody를 실온에서 30분간 처리하고, Streptavidin-Horseradish Peroxidase(HRP)를 30min간 반응후 AEC를 substrate buffer-hydrogen peroxidase에 mix한 것을 떨어뜨린후 반응 속도를 확인후, counterstain으로 mayer's hematoxylin 으로 염색한 결과 Fig. 2-33와 같다.

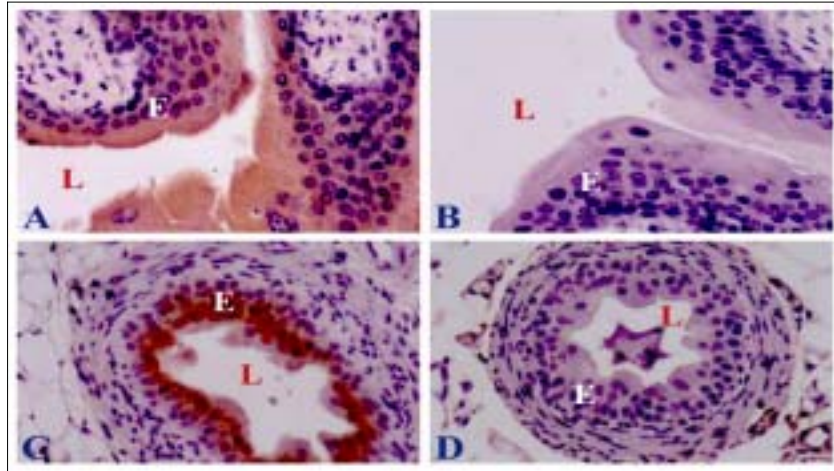


Fig. 2-33. Immunohistochemistry assay showing the bladder-specific expression of hG-CSF in transgenic mice using polyclonal goat antisera hG-CSF: A and B are bladder, C and D are ureter, A and C are tissues of transgenic mouse. B and D are tissues of a non-transgenic control mouse, respectively.

마. hG-CSF의 생산량 측정

415개의 수정란에 미세주입하여 319개의 수정란을 이식하여 40마리의 산자를 생산하여 형질전환 분석한 결과 4두를 확인하였으며, 그 중 3번 계통으로부터 F1을 생산하여 생산되어진 형질전환 생쥐의 계통으로부터 소변과 혈액을 획득한 다음 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 3번 계통의 F1중에서 3-10번이 가장 높았고 혈액에서의 결과와 소변에서의 결과가 비례하지는 않았다 (Fig. 2-34).

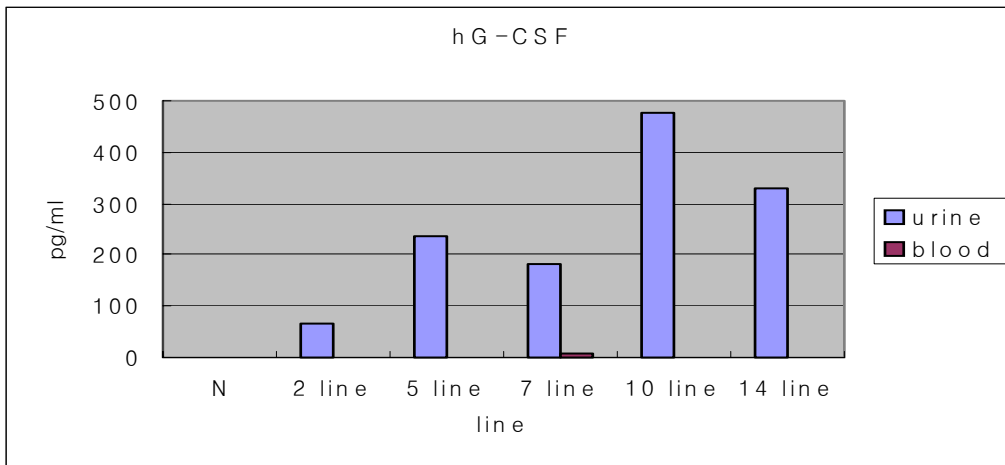


Fig. 2-34. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay detecting hG-CSF in urine and serum from transgenic mice

바. 쥐의 방광에서 생산된 hG-CSF의 활성검증

오줌으로부터 hG-CSF를 검증하기 위해 HL-60 cell을 이용해서 2×10^3 개의 세포가 들어있는 well에 각각의 형질전환 마우스의 계통들에서 얻어낸 소변을 처리한 후 48 시간후 cell counting으로 확인하였다 (Fig. 2-35).

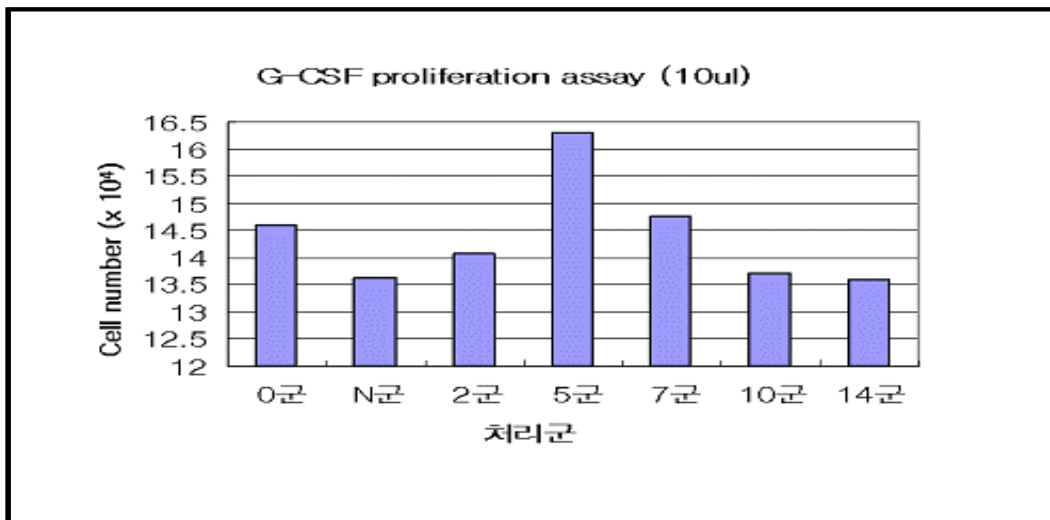


Fig. 2- 35. Cell proliferation of DMSO-treated HL-60 cells upon addition of transgenicurine

사. hG-CSF 생산에 따른 마우스 혈액에서의 영향성 검증

아래의 각각의 계통의 생쥐를 마취한 다음 혈액을 채취하였다. 슬라이드에 스프레드한 다음 May-Gru'nwald-Giemsa 방법으로 염색을 한 다음 각각의 혈액 세포를 측정하였다. Control군과 Transgenic 사이에 유의성은 없었다.

Table. 2-7. Peripheral blood Cell Levels in hG-CSF Tg and normal Mice

	Normal mice	Transgenic mice		
		3-2 line	3-5 line	3-14 line
WBC, no. X10 ³ /uL	3.25±0.730	2.84±0.230	2.45±1.030	4.215±0.195
Differential count (%)				
Neutrophils	0.555±0.045	0.335±0.095	0.425±0.305	0.52±0.520
Lymphocytes	0.68±0.680	2.47±0.150	1.89±0.620	3.765±0.205
Eosinophils	0±0.000	0±0.000	0±0.000	0.005±0.005
Monocytes	0.005±0.005	0.015±0.015	0.13±0.100	0.01±0.001
RBC, no. X10 ⁶ /uL	7.87±1.050	8.96±0.520	9.8±1.100	9.235±0.195
Hematocrit(%)	42.45±3.650	49.8±1.000	51.45±4.350	50.55±1.350
Hb (g/dL)	13.1±1.700	14.3±0.500	15.25±1.250	14.7±0.500
Reticulocytes, % of total RBC	2.62±0.550	3.6±3.600	3.08±0.800	2.475±0.355
Platelets, no. X10 ³ /uL	521±148	656.5±59.5	808±40	555.5±0.5

2. 유선으로 G-CSF를 분비하는 형질전환 생쥐생산

가. beta-casein promoter 이용 hG-CSF 형질전환 생쥐생산

beta-casein promoter hG-CSF 유전자이용 생쥐에게 미세주입 후 341개의 수정란을 이식하여 48마리의 산자를 생산하여 형질전환 확인결과 5마리가 형질전환 된 것을 확인 하였다. 이러한 결과는 전년도의 소변으로 발현하는 생쥐와 비슷한 결과를 나타내었다.

Table. 2-8. Production of transgenic mice expressing hG-CSF into mammary gland

Gene	No. of embryos transferred	No. off spring born	No. of transgenics
beta-casein hG-CSF	341	48	6

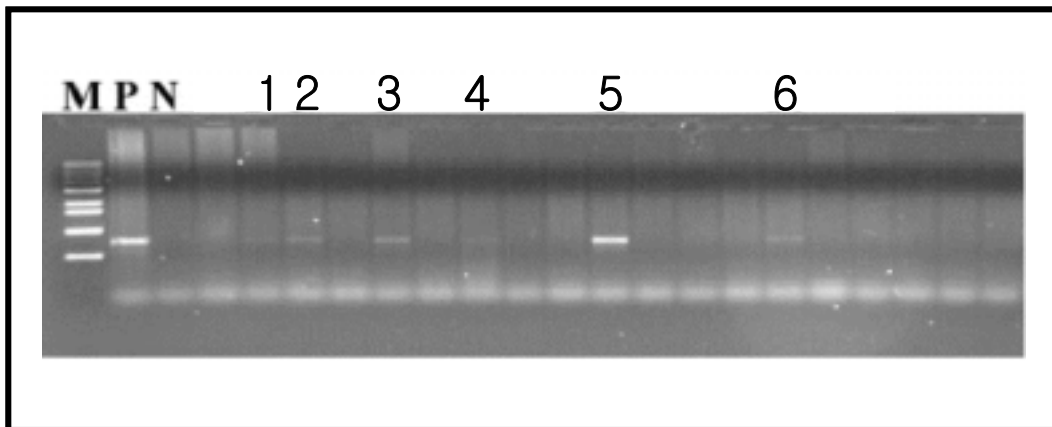


Fig. 2-36. identification of transgenic mice by tail biopsy PCR

M: lambda HindIII fragment, P: positive control (injection DNA), N: negative control

나. 형질전환 산자의 유전자 형질전환율

형질전환된 생쥐로 판명된 계통을 보통 생쥐와 교배하여 자손을 확보하였다.

F1 산자도 PCR을 이용하여 transmission 유무를 확인하였으며, F1 형질전환 산자를 이용해서 유전자의 유전율을 확인한 결과 평균 46.6%의 유전율을 얻었다.

Tabel.2-9. Transmission rate of the hG-CSF transgene to offspring

Founder line	sex	No. of littermates	No. of offsprings	No. of transgenic mice	Transgenic Ratio (%)
1	F	4	28	12	42.9
2	M	Dead			
3	M	4	36	11	30.6
4	M	ND			
5	F	1	5	4	80.0
6	F	3	28	18	64.3
Total			97	45	46.4

F: female, M: male

제 6 절 형질전환 복제수정란 생산 및 이식

1. 체외수정란 생산 확립 및 미세주입에 의한 수정란 발달

가. 혈청 첨가배지와 무 혈청배지의 수정란 발달

체외 배양에 이용되는 혈청 첨가 배지(TCM199)와 혈청 미첨가 배지(IVMD101)가 한우 수정란의 발달에 미치는 영향을 검토한 결과는 **Table. 2-10**과 같다. 수정율은 IVMD101과 TCM199 배지가 각각 71.8%와 65.3%로서 비슷한 경향이였다. 8세포까지의 발달율은 IVMD101 배지가 47.2%로서 TCM199 배지의 24.7%에 비하여 유의하게 높은 경향이였으나 ($p < 0.05$), 배반포까지 발달율은 각각 20.4%와 16.0%로서 유의성이 인정되지 않았다.

Table.2-10. Compare the development rate of embryo produced by IVMD101 and TCM199 culture system.

	No. of oocytes	No. (%) of embryos developed to		
		≥2cell	8cell	Blastocyst
IVMD101	142	102 (71.8)	67 (47.2)a	29 (20.4)
TCM199	150	98 (65.3)	37 (24.7)b	24 (16.0)

나. 미세주입에 의한 발달

체외 배양에 이용되는 혈청 첨가 배지(TCM199)와 혈청 미첨가 배지(IVMD101)가 DNA (mUII+hG-CSF)가 미세주입된 한우 수정란의 발달에 미치는 영향을 검토한 결과는 **Table. 2-11**과 같다. 수정율, 8세포 및 배반포기 발달율은 IVMD101 배지가 각각 47.2, 25.0 및 5.6%로서 TCM199 배지의 16.5, 3.5 및 0%에 비하여 유의하게 높은 경향 이었다 ($p < 0.05$).

Table. 2-11. Compare of the development rated of microinjected embryos matured and culture in serum with or without system.

	No. of oocytes	No. (%) of embryos developed to		
		≥2cell	8cell	Blastocyst
IVMD101	72	34 (47.2)a	18 (25.0)a	4 (5.6)a
TCM199	85	14 (16.5)b	3 (3.5)b	0 (0)b

다. 유전자 종류 및 방법 미세주입 수정란의 발달에 미치는 영향

유전자 종류별 즉 G-CSF, GFP 및 GFP+G-CSF의 3종류의 유전자를 미세주입하여 수정란의 발달단계에 미치는 영향을 분석한 결과는 다음과 같다. 2세포기까지는 55%정도로 발달하였으나, 8세포기에는 20%이하로 급격하게 낮아져 blastocyst까지는 3-4%의 아주 낮은 발달율을 나타내었다.

Table.2-12. Effect on embryo development rate by the injected gene (GCSF, GFP and GFP+GCSF

Gene type	n	No. (%) of		
		≥2 cell	8 cell	Blastocyst
sham inj	80	66 (82.5)	22 (27.5)	4 (5.0)
GCSF	150	96 (64.0)	31 (20.7)	6 (4.0)
GFP	260	140 (53.8)	60 (23.1)	8 (3.1)
GFP+GCSF	156	86 (55.1)	27 (17.3)	5 (3.2)

미세주입 방법에 의한 수정란의 발달율을 분석하기 위하여 고전적인 미세주입법과 piezo에 의한 주입방법의 비교분석 결과는 아래의 표에서 나타난 바와 같이 약 2-3% 대로 아주 낮은 발달율을 나타내었으나, piezo 처리구간이 약간 높은 경향을 보였으나 처리수의 부족으로 추가적으로 검토되어야 할 것으로 사료된다.

Table. 2-13. Effect on embryo development rate by micro-injection method (micro and piezo injection)

Method	n	No. (%) of		
		≥2 cell	8 cell	Blastocyst
micro	175	54 (30.9)	27 (15.4)	4 (2.3)

piezo 53 36 (67.9) 14 (26.4) 2 (3.8)

라. 유전자 주입위치에 의한 배 발달

유전자 주입위치가 수정란의 배발달에 미치는 영향을 분석하기 위하여 전핵과 세포질 및 cleaved 수정란에 주입한 결과는 다음과 같다. 즉 약 100여개의 수정란을 사용하였는데 세포질에 주입한 결과는 blastocyst까지 발달되어진 수정란이 없었으며, 전핵과 cleaved embryo 에서는 6-7%로 전핵에 의한 주입방법이 효과적이라는 것을 확인 할 수 있었다.

Table. 2-14. Effect on embryo development rate by gene injected site

	n	No. (%) of		
		≥2 cell	8 cell	Blastocyst
Pronucleus	120	90 (75.0)	20 (16.7)	8 (6.2)
Cytoplasm	100	35 (35.0)	6 (6.0)	0 (0.0)
cleaved embryo	104	96 (92.3)	48 (46.2)	8 (7.7)

마. 유전자의 양이 미세주입 한우 수정란의 발달에 미치는 영향

주입된 유전자의 양이 수정란의 발달단계에 미치는 효과를 분석한 결과 2ng/ul의 처리구에서 가장 높은 blastocyst의 발달이 있었다. 그러나, 8ng/ul 이상처리한 수정란 에서는 배발달율이 0로 나타나 주입량이 4ng/ul 이상이면 좋지 않다는 결과를 얻었다.

Table. 2-15. Effect on embryo development rate by gene injected quantity

Quantity	n	No. (%) of		
		≥2 cell	8 cell	Blastocyst
2 ng/uL	122	66 ^a (54.1)	26 (21.3)	10 (8.2)
4 ng/uL	137	39 ^b (28.5)	20 (14.6)	4 (2.9)

8 ng/uL 104 30^b (28.8) 6 (5.8) 0 (0.0)

바. 미세주입 수정란의 형광발현

미세주입 수정란의 형광발현관련 분석결과는 다음과 같다. 배발달이 진행됨에 따라 형광발현율이 1세포기 51%에서 4세포 42%로 배반포는 33%로 낮아지는 경향이였다 (Fig. 2-37). 형질전환율은 1세포기의 100%로 계산하면 배반포기에서는 약 12.5%로 급격히 낮아졌다.

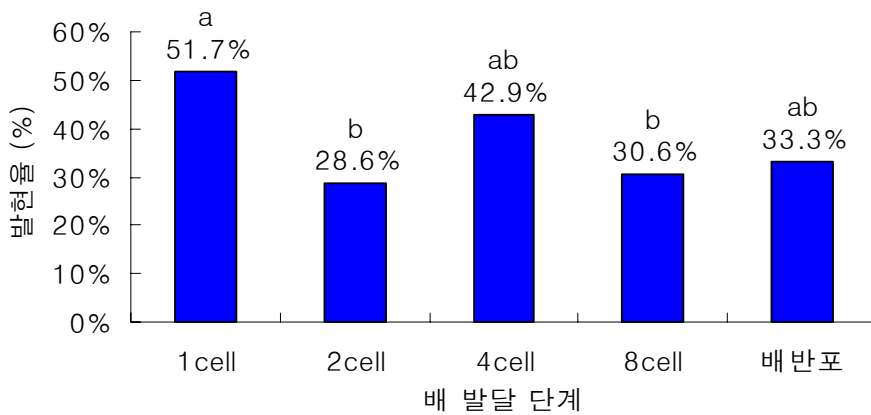


Fig. 2-37 . GFP expression during development in vitro

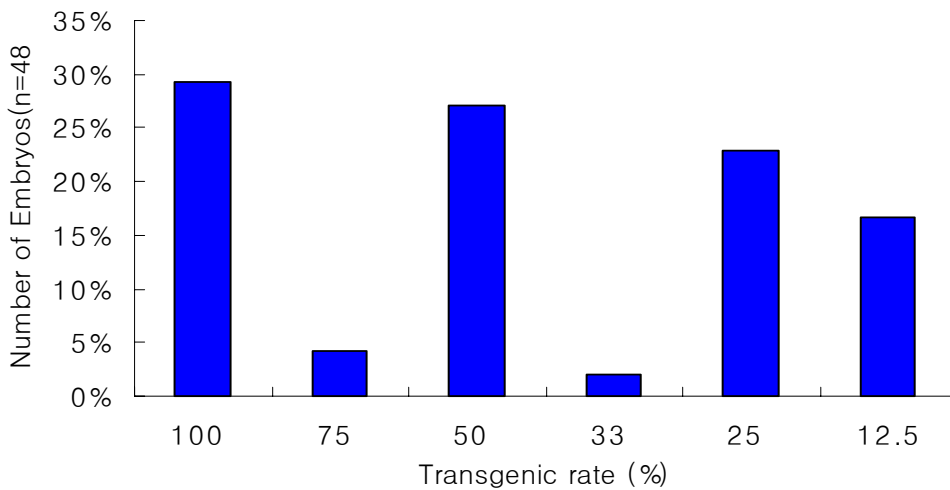


Fig. 2-38. GFP expression rate of microinjected embryo

2. 수란우의 발정동기화 및 이식시기의 최적조건 확립

가. 수란우의 선정 및 조건 확립

발정동기화 방법은 CIDR와 GnRH 처리방법을 사용하였으며 (Table. 2-16), 황체의 등급은 직장검사와 초음파 진단기를 이용하여 직경 2cm 이상, 1-2cm와 1cm미만의 황체를 1, 2, 3등급으로 분류하였다 (Table. 2-17).

Table. 2-16. Treatment method of estrus synchronization with CIDR and GnRH

CIDR	CIDR IV		PGF2a 30 mg	Estrus	Recipient selection	Embryo transfer
	D-0	D-6	D-7	D-9	D-15	D-16
GnRH	GnRH IM	PGF2a 30 mg	CIDR remove	Estrus	Recipient selection	Embryo transfer

Table. 2-17. Estrus expression rate by the estrus synchronization

Treatment method	No. of		Grade of corpus luteum(%)				
	Treatment	Estrus(%)	1	2	3	Follicular cyst	Total
CIDR	26	26(100)	17(65.4)	5(19.2)	2(7.7)	2(7.7)	26
GnRH	26	25(96)	14(56.0)	6(24.0)	2(8.0)	3(12.0)	25

발정발현율은 각각 100%와 96%로 나타났으며, 이식하기에 적합한 1등급 황체의 출혈율은 65.4와 56%로 CIDR 처리구에서 다소 높게 나타났다. 또한, GnRH가 혈중 호르몬 농도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 발정당일에 실험군은 GnRH (Receptal®, 5ml)을 대조군은 생리식염수(5ml)을 투여하였고 발정 후 5일과 7일째에 경정맥에서 혈액을 채취하여 호르몬을 분석한 결과 대조군에서는 5일과 7일체 차이가

없었으나 실험군에서 7일째 프로제스테론 농도가 대조군에 비하여 유의적($p < 0.05$)으로 증가하여, 혈중 프로제스테론 농도를 유지하기 위해서는 발정당일에 GnRH를 투여하는 것이 수태율을 증가시킬 수 있을 것으로 사료된다.

Table. 2-18. Serum hormone level on day 5 and 7 after hormone treatment

day	control 1		treatment 2	
	Estradiol-17 β (pg/ml)	Progesterone (ng/ml)	Estradiol-17 β (pg/ml)	Progesterone (ng/ml)
Day 5	1.03 \pm 0.19	0.77 \pm 0.34	1.20 \pm 0.47	1.59 \pm 0.28
Day 7	1.10 \pm 0.15	1.53 \pm 0.68 ^a	1.00 \pm 0.25	3.24 \pm 0.54 ^b

ab $P < 0.05$, duncan's multiple range test(mean \pm S.E.)

1 saline 5ml intramuscular injection

2 GnRH(Receptal[®], Upjohn) 5ml intramuscular injection

나. 수란우에 이식

발정동기화 처리후 수정란 이식 후 수태율은 CIDR 처리구에서 신선란과 동결란 일때 각각 66%, 60%로 GnRH 처리구(22%)보다 유의적으로 높은 결과를 얻었다. 따라서 수정란 이식을 위한 발정동기화 방법은 CIDR 처리방법을 적용하는 것이 GnRH 처리보다 효과적이다 (Table. 2-19).

Table. 8. Pregnant rate after embryo transfer with treatment method

Treatment method	Embryo	No. of	
		Embryo transfered	Pregnancy(%)
CIDR	fresh	6	4(66.7)
	frozen-thawed	5	3(60.0)
	total	11	7(63.6)
GnRH	fresh	9	2(22.2)
	frozen-thawed	2	0
	total	11	2(18.2)

3. 복제 수정란의 생산 및 이식

가. 복제 수정란의 수태율 및 송아지 체중

체내, 체외, 미세주입 및 복제 수정란의 수태율, 유산율, 임신기간 및 송아지의 체중을 조사한 결과는 Table. 2-20과 같다. 수태율은 체내 수정란이 56.3%로서 복제 수정란의 19.4%와 미세주입된 수정란의 14.3%에 비하여 유의하게 높았으나 ($p < 0.05$), 체외수정란과는 유의성이 인정되지 않았다. 유산율은 미세주입된 수정란이 이식된 수란우가 50%로서 높은 경향이었으나 처리군 간에 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 임신기간도 처리군 간에 유사한 경향이었으나, 체외수정란이 이식된 수란우가 평균 289.4일로 가장 길었고, 체내수정란이 이식된 수란우가 평균 278.8일로서 가장 짧았다. 한편 송아지의 체중은 복제수정란 유래 송아지가 평균 39.9kg으로서 체내수정란 유래 송아지의 평균 25.5kg에 비하여 유의하게 높았다 ($p < 0.05$).

Table.2-20. The pregnancy and subsequent calving of the bovine blastocyst produced by nuclear transferred or in vitro fertilized

a,b: Values in the same columns with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

¹NT: Nuclear transfer

나. 복제 수정란의 분만

Source of embryo	No. / total (%) of		Gestation length(day)	Body weight (kg)
	Pregnancy	Abortion		
in vivo	9/16(56.3) ^a	0/9(0.0)	278.8±1.8	25.5±0.9 ^b
in vitro	9/30(30.0) ^{ab}	2/9(22.2)	289.4±5.1	31.0±2.5 ^{ab}
Microinjection	2/14(14.3) ^b	1/2(50.0)	291	25
NT ¹	6/31(19.4) ^b	1/6(16.7)	281.4±3.1	39.9±3.3 ^a

체내, 체외 및 복제 수정란이 이식된 수란우의 분만 방법에 따른 송아지의 생존율을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 체내, 체외, 미세주입 및 복제 수정란 이식 후 분만까지 도달한 수란우는 각각 9두, 7두, 1두 및 5두 였다. 체내, 체외 및 미세주입 수정란이 이식된 수란우는 모두 정상 분만 하였다. 그러나 복제 수정란이 이식된 수란우 5두 중에서 2두에 난산의 징후가 나타나 제왕절개를 실시하였다. 정상 분만된 복제송아지 3두 중에서 1두 만이 생후 10일까지 생존하였으나, 제왕절개로 태어난 송아지는 모두 생후 10일까지 생존하였다.

Table. 2-21. Parturition results of recipients transferred blastocyst derived from MOET, IVF and NT

Source of embryo	No. recipients (head)	No. of live calves at Day 10 / No. of examined calves	
		normal	C-sec ¹
in vivo	9	5/5	-
in vitro	7	5/5	-
Microinjection	1	1/1	
NT ²	5	1/3	2/2

¹C-sec: Cesarian section

²NT: Nucleat transfer

체내, 체외, 미세주입 및 복제 수정란 유래 송아지의 분만 후 생존율을 조사한 결과는 Table 5와 같다. 체내(n=9), 체외(n=7), 미세주입(n=1) 및 복제(n=5) 수정란에서

유래된 송아지로서 생후 60일까지 생존한 두수는 각각 9두, 6두, 1두 및 2두였다. 체내 수정란 유래 송아지의 생존율이 복제 수정란 유래의 송아지의 것과 유의한 차이가 있었다 ($p < 0.05$). 체외 수정란 유래 송아지는 생후 48일령에 사망하였다. 복제 수정란 유래 송아지는 분만 후 1시간 이내에 2두가 폐사하였고, 1두는 전지의 기형으로 인하여 기립불능인 상태로 생존하다가 생후 18일령에 사망하였다. 한편 미세주입 수정란 유래의 송아지는 G-CSF 발현을 확인할 수 없었다.

Table. 2-22. Survival rates of calves derived from embryos produced by in vivo, in vitro or nuclear transfer at Day 1, 30 and 60 after parturition.

Source of embryo	No. calves	No. (%) of calf lived over Day 60	No/total (%) of calf dead during		
			- Day 1	- Day 30	- Day 60
in vivo	9	9 (100.0) ^b	-	-	-
in vitro	7	6 (85.7) ^{ab}	-	-	1 (14.3)
Microinjection	1	1 (100)	-	-	-
NT ¹	5	2 (40.0) ^a	2 (40.0)	1 (20.0)	-

¹NT: Nuclear transfer

다. 유산 및 분만 후 폐사내용

제왕절개 수술결과 중 쌍둥이가 있었는데, 수술 후 30분에 폐사하였으며, 원인은 일반 수정란 이식 시에는 나타나지 않는 제대정맥이 완전히 분리되지 않았으며, 제대정맥 절단 후 즉시 호흡기 이상으로 폐사하는 사례가 있었으며, 나머지 1두도 분만

시 제대정맥이 완전히 분리되지 않아 제왕절개로 인한 분만직후 폐사하였다. 실제로 최근 국내의 복제 소 생산 시 제왕절개 수술로 인하여 사망하는 경우가 많았는데 이는 거의 제대정맥의 완전한 분리가 되지 않는 경우에만 나타나는 현상으로 이에 대한 연구가 요망된다.

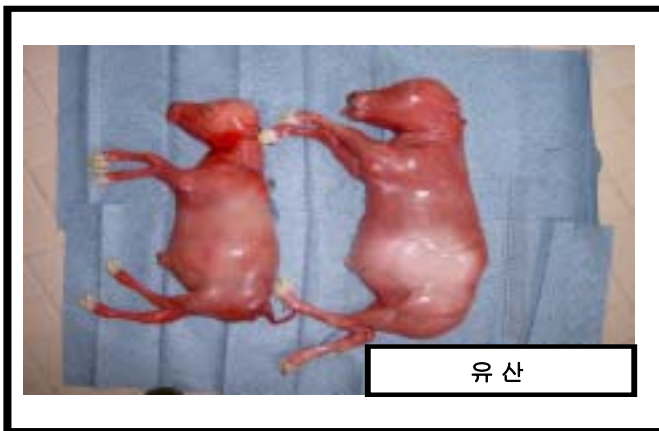


Fig. 2-39. Photography of born calves after C-Sec and abortion.

4. EGFP+mUII-hG-CSF 미세주입 및 NT 수정란의 형광발현 확인

가. 미세주입 수정란의 발현

EGFP+mUII-hG-CSF 유전자의 미세주입에 의한 수정란의 발현을 형광 현미경을 이용하여 분석한 결과로서, 이러한 결과는 GFP 단독 주입에 의한 결과와 유사하였다. 또한, 배 발달이 진행됨에 따라 형광 발현이 감소하는 추세를 나타내었다.

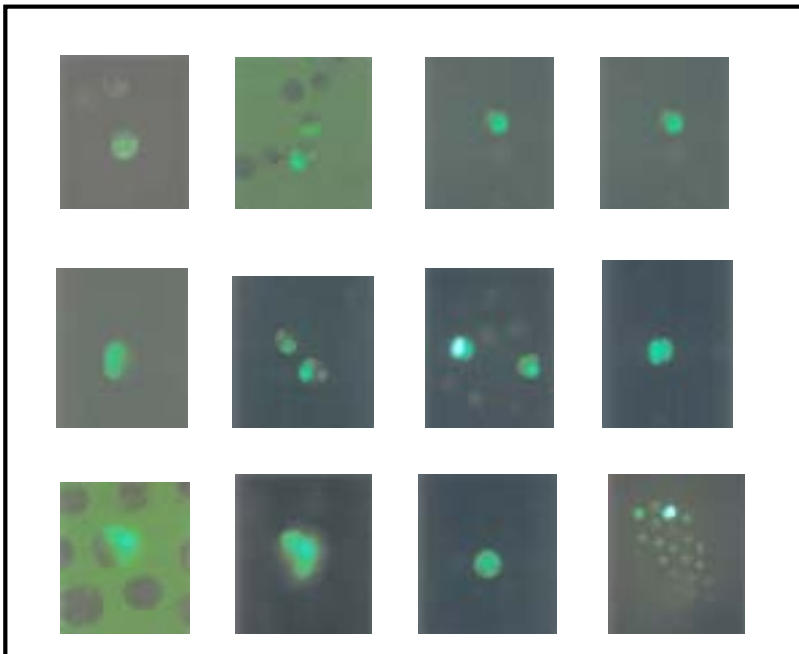


Fig. 2-40. EGFP expression of the embryo micro-injected with EGFP+hG-CSF gene

나. NT 수정란의 발현

EGFP+mUII-hG-CSF 유전자가 도입된 체세포를 이용하여 이를 난자에 핵치환 하여 이식 직전의 NT 수정란의 형광을 확인결과 강하게 형광을 나타내고 있었다. 이러한 수정란 만을 이용하여 대리모에 이식하였다.

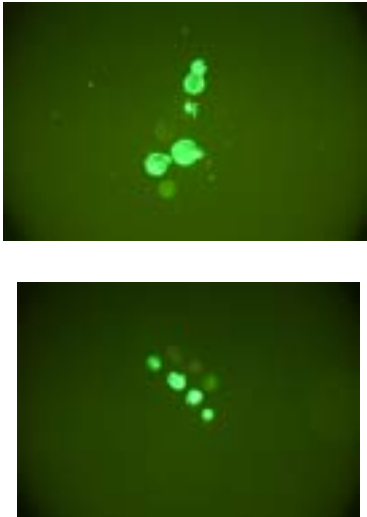


Fig. 2-41 . EGFP expression of NT embryo

5. EGFP+mUII-hG-CSF 미세주입 및 핵치환 수정란이식

EGFP+mUII-hG-CSF 유전자의 NT는 전체 61두에 실시하였으며, 그중 9두가 임신하여 14.7% 였으며, 9두중 6두는 유산을 하였다. 1두는 분만하였지만 분만직후 폐사되었다. 현재 2두가 임신중에 있다. 한편, 미세주입에 의한 결과는 전체 35두에 이식하여 7두가 임신하여 20%의 임신율을 나타냈으며, 1두가 유산하였고 2두가 분만하였으나, DNA 검사결과 유전자의 삽입은 이루어지지 않았다. 현재 미세주입은 4두가 임신 중에 있으며, NT 2두를 포함하여 전체 6두가 임신 중에 있다.

Tabel. 2-23. Effect on pregnancy rate by the NT and micro-injection

method	n	pregnancy	abortion	partu- rition	present pregnancy
Nuclear Transfer	31+30 (61)	9 (14.7%)	6 (16.7)	1	2
Microinjection	16+19 (35)	7 (20.0%)	1 (50.0)	2	4

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연도별 연구 목표

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2002-2003)	· 생리활성물질 유용 유전자의 탐색 및 크로닝	○ 유용유전자 및 발현벡터 구축 -hG-CSF 유전자 구축 -mUII-hG-CSF vector구축
	· 동물세포이용 재조합체 생산	○ 동물세포이용 hG-CSF 생산 -pcDNA3 동물세포발현용 벡터 재크로닝 -CHO 세포에 transfection -hG-CSF발현 클론 선택 -재조합체 hG-CSF생산
	· 체세포주 확립 및 유전자 도입	○ 효과적인 핵이식란 생산방법 확립 -공여세포의 세포주기조절 및 융합조건확립 -수핵란의 탈핵기술 및 활성화 조건확립 ○ 소 태아유래 체세포 구축 -종모축의 체세포 확보 -체세포내 Marker(GFP) 유전자 도입 ○ 체외수정란 생산 -체외수정란 생산방법 확립 -1cell 대량생산
	· 형질전환 생쥐생산	○ UII promoter이용 형질전환 생쥐생산 -hG-CSF를 생쥐의 뇨로 분비하는 Tg생산
	· 형질전환 수정란이식	○ 형질전환 수정란 이식(소) -수란 소의 발정동기화 및 이식시기의 최적조건확립 -이식방법개선을 통한 착상 및 임신률 향상방법 -유전자 미세주입법 확립

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2차년도 (2003-2004)	· 생리활성 유전자 발현백터 구축 및 검정	○ 유용유전자 및 transgenic 발현백터 구축 -WAP+hG-CSF발현백터 구축 ○ 형질전환 검정 -형질전환으로 태어난 산자 검정
	· 재조합체 G-CSF의 기능분석	○ 유전자 재조합체 hG-CSF활성검정 -재조합 hG-CSF의 생리활성 분석
	· 체세포내 유전자 도입방법 확인 및 미세주입	○ 체세포내 유전자 발현 검정 -Marker 유전자 도입 체세포 핵치환 발달연구 -외래 유전자 도입 체세포 확립 및 핵치환 수정란 체외발달 연구
	· 형질전환 생쥐생산	○ b-casein promoter이용 형질전환 생쥐생산 -hG-CSF를 유즙으로 분비하는 Tg생산
	· 형질전환 수정란이식	○ 수정란 이식 -mUII-hG-CSF미세주입 및 핵치환 수정란 20두 이식

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차년도 (2004-2005)	· 형질전환 분석 및 생리활성물질 분석	○ 형질전환분석 -복제수정란 이식소의 산자 생산 및 특이 primer 이용 형질전환 분석 -재조합 hG-CSF의 생리활성 분석
	· 형질전환 복제 수정란 대량생산	○ 복제 수정란 대량생산 -형질전환 복제 수정란의 대량생산 -생산 수정란의 동결보존 ○ 유전자 미세주입 수정란 대량생산
	· 형질전환 수정란이식 및 hG-CSF Tg소생산	○ 수정란 이식 -mUII-hG-CSF 미세주입 수정란 30두 이식 ○ hG-CSF를 발현하는 형질전환 소 생산

제 2 절 평가 착안점 및 달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도		
	착 안 사 항	척도 (점수)	달성도 (%)
1차년도 (2002-2003)	<ul style="list-style-type: none"> ○ mUII+hG-CSF발현백터 구축 ○ 동물세포에서 hG-CSF생산 ○ 체세포 주 확립 ○ mUII+hG-CSF 형질전환 생쥐생산 ○ 수란우의 이식조건 확립 	30 20 20 20 10	100 100 100 100 100
2차년도 (2003-2004)	<ul style="list-style-type: none"> ○ casein+hG-CSF발현백터 구축 ○ 재조합체 G-CSF 기능분석 ○ 체세포내 유전자 발현검정 ○ mUII+hG-CSF 유전자 20두 이식(소) ○ casein+G-CSF형질전환 생쥐생산 	10 15 20 30 20	100 100 100 100 100
3차년도 (2004-2005)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 체세포 복제수정란 생산 ○ 체세포 복제수정란 동결보존 ○ mUII+hG-CSF유전자 30두 이식(소) ○ mUII+hG-CSF발현하는 형질전환 소생산 	20 30 20 30	100 90 100 80
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 동물세포(CHO)hG-CSF생산 및 기능분석 ○ mUII/casein+hG-CSF형질전환생쥐생산 ○ 체세포 복제 형질전환 수정란 대량생산 ○ mUII+hG-CSF 형질전환 소 생산 	20 25 15 40	100 100 100 80

본 연구는 소의 뇨로 인간의 백혈구 조절인자를 생산하는 형질전환 소 생산에 관한 연구로서 hG-CSF 유전자의 크로닝을 시작으로 mUII 및 소의 beta-casein 프로모터를 직접 크로닝하여, EGFP+mUII+hG-CSF 및 EGFP+beta-casein+hG-CSF의 2종류의 특이 발현 벡터를 완벽하게 구축하였다. 뿐만 아니라, 체세포 주를 확립하여 각 체세포의 성판별을 하였으며, 또한 동물세포에서 hG-CSF의 재조합체를 생산하여 기능분석결과 동물세포에서 생산되어진 재조합체 hG-CSF는 생쥐를 이용한 in vivo 실험에서 백혈구를 증가시키는 생리활성을 가지고 있었다.

복제 연구에서도 비록 형질전환 소를 생산하지는 못했지만, 형질전환 소 생산기법을 확립하고 기초 과학 및 응용학문에서의 다양한 연구에 이용할 수 있는 기반을 확립하였다. 특히 복제소 생산에서는 미세주입법을 활용하는 방법에서 EGFP 유전자를 활용하기 위하여 특이 벡터 구축결과는 향후 여러 유전자를 활용하는데 좋은 모델이 될 것으로 사료된다.

이러한 생리활성 물질의 이용방법은 형질전환 소 생산 및 산업화에 따른 파급 효과는 첨단 가축사육이라는 새로운 축산으로 경쟁력을 강화할 뿐만 아니라 국제화로 가는 지름길 이라고 할 수 있다. 또한, 본 연구는 형질전환 소 생산을 위한 기초 자료로서 유용하게 이용될 것이며, 체세포의 배양 및 핵치완 후의 배 발달관련 분야, 대리모에 이식하여 분만까지의 기초생리 작용, 미세주입과 핵치완의 배 발달 비교분석 등은 향후 형질전환 소 생산관련 연구를 수행할 수 있는 기초자료를 확립할 수 있는 계기가 될 수 있기 때문에 활용도가 매우 높을 것으로 예상된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

현재 미국과 유럽에서는 형질전환 가축 생산에 수많은 연구비를 투입하여 활발한 연구가 진행 중에 있으며, 임상단계에 진행중임 유용생리물질도 있는 것으로 알려져 있다. 아직까지 상업화가 되어진 상품은 없는 것으로 나타나 있다. 따라서, 본 연구에 있어서 추가적인 실험이 진행된다면, 재조합체 즉 형질전환 소로부터 생산되어진 hG-CSF의 생산이 가능할 것으로 보이며, 만약 이에 대한 성공적인 연구결과로 상품화에 성공하였을 경우 파급 효과는 엄청나게 클 것으로 보여진다. 생쥐의 연구결과를 소에도 같은 결과가 반드시 나올 것이라고 할 수 없을 것이나, 추측하면 충분히 생리활성을 가지는 hG-CSF의 생산이 가능할 것이라고 볼 수 있다.

또한, 이식우 (대리모)의 수태성적이 낮은 것이 문제인데 앞으로 이 부분에서 많은 연구가 진행되어 수태성적을 향상하여 미세주입 방법이나, NT 방법이나 성공할 수 있을 것으로 사료된다. 타 연구에의 응용부분은 수정란의 복제기술이 개발되어 우수한 수정란 및 외래유전자 도입된 형질전환 가축 생산면에 있어서 활용효율이 증가되어 궁극적으로는 형질전환 동물생산의 확률을 높이는데 일조를 할 것이며, 첨단 생명공학 기법의 산업화를 촉진할 수 있을 것으로 사료된다. 기업화의 추진 방안은 형질전환 소가 생산이 된다면, 현재 공동연구원이 소속되어있는 한경 게놈텍에서 이부분을 추가적으로 연구하여 형질전환 재조합 hG-CSF를 생산할 계획이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 일본의 중외제약에서 동물세포이용 재조합체 hG-CSF 제품 생산관련 국내 CJ와 법정문제로 대두되었으나, CJ의 승소
- 미국 및 유럽, 일본에서도 형질전환 가축으로부터 물질 생산과 관련하여 많은 연구비를 투자하고 있는 실정이나, 아직까지 상업화가 이루어진 상품은 없는 실정이다. 그러나, 국내의 연구수준도 이 분야에서는 상당한 수준을 가지고 있기 때문에 국내에서 먼저 상품화가 실현되기를 기대한다.

제 7 장 참고문헌

1. Benjamin LE, Franklin B (1999): Regulation of the erythropoietin gene. *Blood* 94:1864-1877.
2. Brecher, G., Schneiderman, M., (1950): A timesaving device for the counting of reticulocytes. *American Journal of Clinical Pathology* 20:1079
3. Broudy VC, Tait JF, Powell JS (1988): Recombinant human erythropoietin: Purification and analysis of carbohydrate linkage. *Arch Biochem Biophys* 265:329-336.
4. Chiba S, Takaku F, Tange T, Shibuya K, Misawa C, Sasaki K, Miyagawa K, Yazaki Y, Hirai H, (1991): Establishment and erythroid differentiation of a cytokine-dependent human leukemic cell line F-36: a parental line requiring granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or interleukin-3, and a subline requiring erythropoietin. *Blood*. 1;78(9):2261-8
5. Dalle B, Henri A, Rouyer-Fessard P, Bettan M, Scherman D, Beuzard Y, Payen E (2001): Dimeric erythropoietin fusion protein with enhanced erythropoietin activity in vitro and in vivo. *Blood* 97:3776-3782.
6. Davis JM, Arkawa T, Strickland TW, Yphantis DA (1987): Characterization of recombinant human erythropoietin produced in chinese hamster cells. *Biochemistry* 26:2633-2638.
7. Druhan LJ, Ai J, Massullo P, Kindwall-Keller T, Ranalli MA, Avalos BR, (2005): Novel mechanism of G-CSF refractoriness in patients with severe congenital neutropenia. *Blood*. 15:105(2):584-91
8. Dyck, M.K., Gagne, D., Ouellet, M., Senechal, J.F., Belanger, E., Lacroix, D., Sirard, M. A., Pothier, F., (1999): Seminal vesicle production and secretion of growth hormone into seminal fluid. *Nature Biotechnology* 17, 1087 1090.
9. Egrie JC, Browne JK (2001): Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Nephrol Dial Transplant* 3:3-13.
10. Egrie JC, Strickand TW, Lane J, Aoki K, Cohen AM, Smalling R, Trail G, Lin

- FK, Browne JK, Hines DK (1986): Characterization and biological effects of recombinant human erythropoietin. *Immunology* 172:213-244.
11. Egrie JC, Dwyer E, Browne JK, Hitz A, Lykos MA (2003): Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater in vivo potency than recombinant human erythropoietin. *Exp Hematol* 31:290-299.
 12. Frampton, J.E., Lee, C.R., Faulds, D., (1994): Filgrastim a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in neutropenia. *Drugs* 48, 731760.
 13. George D. Demetri and James D. Griffin, (1991): Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Its Receptor. *Blood* 1;78(11):2791-808.
 14. Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Ruddle, F.H., (1980): Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceeding. National Academy Science United States of America* 77, 73807384.
 15. Hogan, B., Constantini, F., Lacy, E., (1986): Microinjection of DNA into pronuclei. *Manipulating the Mouse Embryo, 4A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 157 182.
 16. Houdebine, L.M., (1994): Production of pharmaceutical proteins from transgenic animals. *Journal of Biotechnology* 34, 269 287.
 17. Jilma B, Stohlawetz P, Pernerstorfer T, Eichler HG, Mullner C, Kapiotis S.(1998): Glucocorticoids dose-dependently increase plasma levels of granulocyte colony stimulating factor in man. *J Clin Endocrinol Metab* 83(3):1037-40
 18. Kaneko T, Ogawa Y, Hirata Y, Hoshino S, Takahashi M, Oshimi K, Mizoguchi H , (1990): Agranulocytosis associated with granular lymphocyte leukaemia: improvement of peripheral blood granulocyte count with human recombinant granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *Br J Haematol* 74(1):121-2.
 19. Kerr, D.E., Liang, F., Bondioli, K.R., Zhao, H., Kreibich, G., Wall, R.J., Sun, T.T., (1998):The bladder as a bioreactor: uroepithelium production and secretion of growth hormone into urine. *Nature Biotechnology* 16, 7579.
 20. Kubota, N., Orita, T., Hattori, K., Oheda, M., Ochi, N., Yamazaki, T., (1990):

- Structural characterization of natural and recombinant human granulocyte colony-stimulating factors. *Journal of Biochemistry* 107, 486-492.
21. Lai PH, Everett R, Wang FF, Arakawa T, Goldwasser E (1986): Structural characterization of human erythropoietin. *J Biol Chem* 261:3116-3121.
 22. Lee HG, Lee PY, Lee YK, Kim SJ, Chung HK, Seo MK, Park JK, Min KS, Chang WK (2003): Effects of changes in glycosylation sites on secretion of recombinant erythropoietin in cultured CHO cells. *Korean J Animal Reprod* 27:299-307.
 23. Lindsay, M., Gil, G.C., Candiz, A., Velander, W.H., Zhang, C., Van Cott, K.E., (2004): Purification of recombinant DNA-derived factor IX produced in transgenic pig milk and fractionation of active and inactive subpopulations. *Journal of Chromatography A* 1026, 149-157.
 24. Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G, Metcalf D, Stanley E, Cheers C, Fowler KJ, Basu S, Zhan YF, Dunn AR, (1994): Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* 15:84(6):1737-46
 25. Macdougall IC, Gray SJ, Elston O, Breen C, Jenkins B, Browne J, Egrie J (1999): Pharmacokinetics of novel erythropoiesis stimulating protein compared with epoetin alfa in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 10:2392-2395.
 26. Maga, E.A., Murray, J.D., (1995): Mammary gland expression of transgenes and the potential for altering the properties of milk. *Biotechnology (NY)*. 13, 1452-1457.
 27. Metcalf D., (1989) Actions and interactions of G-CSF, LIF, and IL-6 on normal and leukemic murine cells. *Leukemia*. 3(5):349-55.
 28. Metcalf, D., (1988): *The Molecular Control of Blood Cells*. Harvard University Press, London, UK.
 29. Metcalf D. (1986): The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood*. 67(2):257-67

30. Min KS, Hiyama T, Seong HH, Hattori N, Tanaka S, Shiota K (2004): Biological activities of tethered chorionic gonadotropin (eCG) and its deglycosylated mutants. *J Reprod Dev* 50:297-304.
31. Min KS, Kang MH, Yoon JT, Jin HJ, Seong HH, Chang YM, Chung HJ, Oh SJ, Yun SG, Chang WK (2003): Production of biological active single chain bovine LH and FSH. *Asian-Aust J Anim Sci* 16:498-503.
32. Morstyn, G., Burgess, A.W., (1988): Hemopoietic growth factors: a review. *Cancer Research* 48, 5624-5637.
33. Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, Kaziro Y, Yamazaki T, Yamamoto O, Hirata Y, Kubota N, Oheda M, Nomura H, (1986): Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature*. 30-Feb 5:319(6052):415-8.
34. Qiu H, Belanger A, Yoon HWP, Bunn HF (1998): Homodimerization restores biological activity to an inactive erythropoietin mutant. *J Biol Chem* 273:11173-11176.
35. Ryoo, Z.Y., Kim, M.O., Kim, K.E., Bahk, Y.Y., Lee, J.W., Park, S.H., Kim, J.H., Byun, S.J., Hwang, H.Y., Youn, J.H., Kim, T.Y., (2001): Expression of recombinant human granulocyte macrophage-colony stimulating factor (hGM-CSF) in mouse urine. *Transgenic Research* 10, 193-200.
36. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., (1989): *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd edR Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
37. Saneyoshi T, Min KS, Ma XJ, Nambo Y, Hiyama T, Tanaka S, Shiota K (2001): Equine follicle-stimulating hormone: Molecular cloning of α -subunit and biological role of the asparagine-linked oligosaccharide at asparagine⁵⁶ of α -subunit. *Biology of Reproduction* 65:1686-1690.
38. Sasaki H, Bothner B, Dell A, Fukuda M (1987): Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. *J Biol Chem* 262:12059-12076.

39. Shibata, H., Yamane, T., Aoyama, Y., Nakamae, H., Hasegawa, T., Sakamoto, C., Terada, Y., Koh, G., Hino, M., (2003). Excretion of granulocyte colony-stimulating factor into human breast milk. *Acta Haematologica* 110 (4), 200-201.
40. Sohn, B.H., Kim, S.J., Park, H., Park, S.K., Lee, S.C., Hong, H.J., Park, Y.S., Lee, K.K., (1999): Expression and characterization of bioactive human thrombopoietin in the milk of transgenic mice. *DNA Cell Biology* 18, 845-852.
41. Swanson, M.E., Martin, M.J., O'Donnell, J.K., Hoover, K., Lago, W., Huntress, V., Parsons, C.T., Pinkert, C.A., Pilder, S., Logan, J.S., (1992): Production of functional hemoglobin in transgenic swine. *Biotechnology* 10, 557-559.
42. Sytkowar AJ, Lunn ED, Risinger MA, Davis KL (1999): An erythropoietin fusion protein comprised of identical repeating domains exhibits enhanced biological properties. *J Biol Chem* 274:24773-24778.
43. Takeuchi M, Inoue N, Strickland TW, Kobata M, Wada M, Wada M, Shimizu R, Hoshi S, Kozutsumi H, Takasaki S, Kobata A (1989): Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7819-7822.
44. Uusi-Oukari, M., Hyttinen, J.M., Korhonen, V.P., Vasti, A., Alhonen, L., Janne, O.A., Janne, J., (1997): Bovine-s1-casein gene sequences direct high level expression of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the milk of transgenic mice. *Transgenic Research* 6, 75-84.
45. Van Cott, K.E., Lubon, H., Gwazdauskas, F.C., Knight, J., Drohan, W.N., Velander, W.H., (2001): Recombinant human protein C expression in the milk of transgenic pig and the effect on endogenous milk immunoglobulin and transferrin levels. *Transgenic Research* 10, 43-51.
46. Wall, R.J., Kerr, D.E., Bodioli, K.R., (1997): Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale. *Journal of Dairy Science* 80, 2213-2224.
47. Welte, K., Gabrilove, J., Bronchud, M.H., Platzer, E., Morstyn, G., (1996):

- Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. *Blood* 88, 1907-1929.
48. Wu, X.R., Lin, J.H., Walz, T., Haner, M., Yu, J., Aebi, U., Sun, T.T., (1994): Mammalian uroplakins. A group of highly conserved urothelial differentiation-related membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry* 269,13716-13724.
49. Yamaguchi, T., Yamaguchi, T., Kogi, M., Yamamoto, Y., Hayakawa, T., (1997): Bioassay of human granulocyte colony-stimulating factor using human promyelocyte HL-60 cells. *Biological Pharmacy Bulletin* 20, 943-947.
50. Yunis, A.A., Jimenez, J.J., Wu, M.C., Andreotti, P.E., (1984): Further evidence supporting an in vivo role for colony-stimulating factor. *Experimental Hematology* 12, 838-843.
51. Zanjani ED, Ascensao JL, McGlave PB, Banisadre M, Ash RC (1981): Studies on the liver to kidney switch of erythropoietin production. *J Clin Invest Med* 89:640-644.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.