

최 종
연구보고서

인간 PTH 및 Calcitonin을 정장액에서
분비하는 형질전환 돼지의 생산

Production of transgenic pig harboring
Human PTH or Calcitonin

연구기관
충북대학교

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “인간 PTH 및 Calcitonin을 정장액에서 분비하는 형질전환 돼지의 생산”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 11월 11일

주관연구기관명 : 충북대학교

총괄연구책임자 : 김 남 형

세부연구책임자 : 김 남 형

세부연구책임자 : 최 석 화

협동연구기관명 : 대구카톨릭대학교

협동연구책임자 : 김 태 완

요 약 문

I. 제 목

인간 PTH 및 Calcitonin을 정장액에서 분비하는 형질전환 돼지의 생산

II. 연구개발의 목적 및 중요성

본 연구는 발현할 인간 parathyroid hormone(hPTH)과 calcitonin 유전자의 발현 promoter로는 정낭(seminal vesicle)에 조직특이적인 P12 (seminal vesicle-specific, Dyck et al., 1999) promoter를 사용함으로써 외부 단백질이 동물체내에서 무분별하게 발현되어 야기되는 여러 가지 생리적 부작용을 최소화하는 형질전환 돼지 생산 기술을 개발하고자 실시하였다.

골다공증 치료제인 인간 parathyroid hormone(hPTH)과 calcitonin은 각각 골형성촉진제 및 골재흡수억제제로서의 효능을 가지고 있다. 골다공증의 치료시장은 2000년에 34억 달러이며, 2005년에는 65억 달러로 성장할 것으로 전망하고 있다(Theta Report and Decision Resources, 2002). 현재 개발 중인 치료제 중 hPTH는 mg당 1000 달러, human calcitonin은 mg당 250 달러를 호가하는 고가의 의약품으로 이를 대량생산 할 수 있다면 경제적인 파급효과도 대단히 클 것으로 전망된다.

Ⅲ. 연구 개발 내용 및 범위

본 연구의 목표는 골다공증 치료제인 인간 parathyroid hormone(hPTH)과 calcitonin을 정낭액 (seminal vesicle fluid)에 분비하는 형질전환돼지를 생산하는 것을 목표로 한다. 이러한 연구목표를 달성하기 위하여 이들 유전자의 발현을 통제하는 promoter로 mouse P12 promoter (Dyck et al., 1999)를 사용하여 핵이식 기술을 이용하여 연구를 진행 하였다. 아울러 복제 수정란의 배 발생률이 저조함을 감안하여 복제수정란의 발생효율을 증진시키기 위해 다각도로 연구를 진행 하였다.

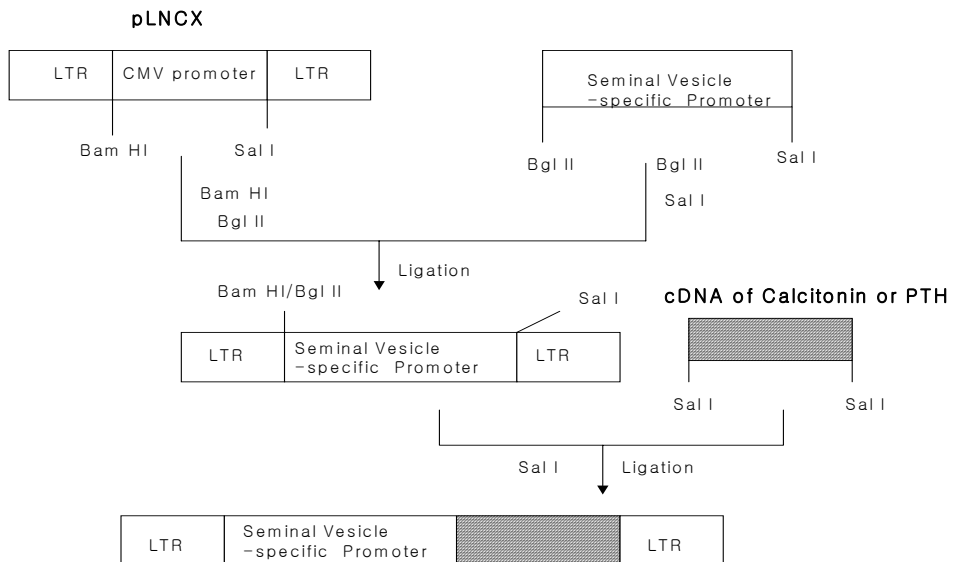
Ⅳ. 연구 결과의 활용과 건의

1. 외래 유전자의 cloning

4.0 kb 크기의 seminal vesicle-specific promoter는 PCR과 sequencing을 통하여 cloning하였다. Human PTH (350 bp) 유전자와 calcitonin 유전자 (100 bp)는 CLONTECH사의 human cDNA library를 로부터 PCR을 통하여 cloning한 다음 sequencing으로 확인하였다.

2. 발현 vector의 구축

Seminal vesicle-specific promoter 통제하에 calcitonin과 PTH를 발현하는 retrovirus vector의 construction은 다음의 공식에 의해 구축하였다.



3. Retrovirus vector system으로 부터의 virus 생산

Retrovirus를 생산하는 세포(retrovirus-producing cell)는 본 연구진이 개발한 293mGPHy (Kim et al., 2001) packaging cell에 retrovirus vector를 도입한 다음 VSV-G 유전자를 transfection하여 생산 하였다.

4. 돼지 핵이식

외부 유전자가 전이된 체세포를 핵공여체로 한다. 체세포에의 유전자 도입은 retrovirus vector system을 사용하거나 (retrovirus vector인 경우), DNA transfection (bovine casein promoter 통제하에 calcitonin이나 PTH가 발현되게끔 design된 DNA vector) 에 의해 실시하였다.

6. 형질전환 돼지수정란의 외과적 이식

체외성숙, 수정 및 배발생이 유도된 수정란을 이용하여 산자의 생산을 얻기 위하여 외과적 수정란 이식을 실시하여 복제 돼지 7마리를 생산하였고, 유전자 발현 검색을 통해 이중 2마리에서 형질전환돼지로 판명되었다.

7. Retrovirus vector system의 생물학적 안정성 (biosafety)의 조사

Retrovirus를 생산하는 세포 속에서 아주 낮은 빈도로 3가지의 retrovirus를 만드는 DNA (gag-pol, retrovirus vector DNA, VSV-G glycoprotein을 coding하는 DNA)가 Homologous recombination하여 replication competent한 retrovirus를 생산하였다.

V. 연구 결과의 활용과 건의

본 연구는 세계적으로 유전자 재조합 형질전환가축을 생산하여 인류에 획기적으로 공헌할 수 있는 방안으로 연구가 추진되고 있는 실정인 바 본 기술개발을 모델로 하여 다음과 같은 목적의 연구와 연계시켜 사회·경제적으로 삶의 질을 향상시킬 수 있는 기술을 국내관련기관에 이전하고자 한다.

1. 활용분야

- 가. 형질전환동물생산과 연관된 모든 연구분야 및 산업체.
- 나. 유전자 제작, 동결 이용과 관련된 모든 연구분야 및 산업 분야.
- 다. 수정란의 이용효율을 향상을 위한 신기술 창출 분야.
- 라. 돼지 수정란 이식 기술과 연관된 산업분야.

SUMMARY

I. Title

Production of transgenic pig harboring human PTH or Calcitonin

II. Goals and significance of the research

Using nuclear transfer and retrovirus vector system, present research were conducted to produce transgenic pigs harboring human PTH or calcitonin. parathyroid hormone(hPTH)과 calcitonin have been used to treatment for osteoporosis.

III. contents and scope of the project

The goal of this study was to produce transgenic pigs secreting human PTH through seminal plasma. To accomplish the goal, the project was conducted following sub projects.

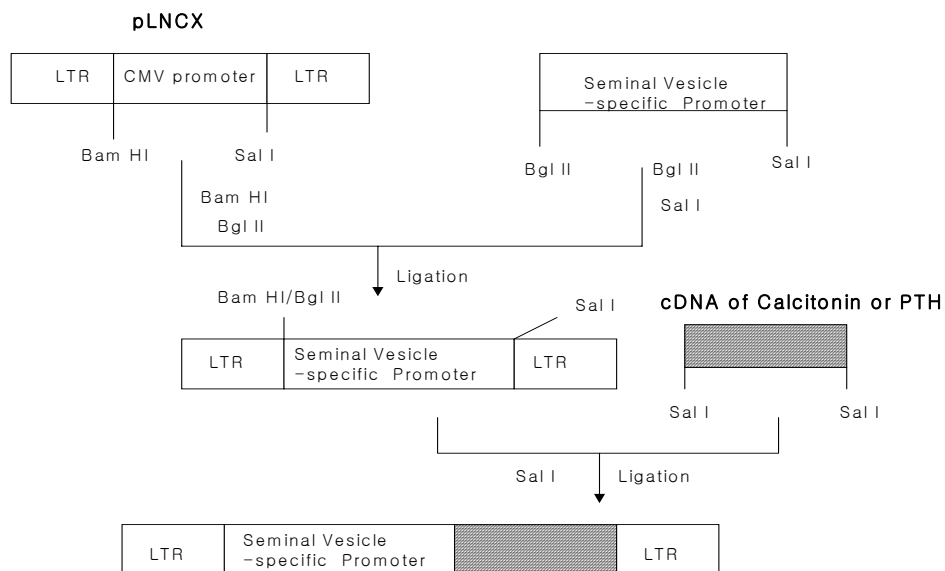
1. Cloning of genes
2. Construction of expression vector
3. Nuclear remodeling and nuclear reprogramming of nuclear transferred embryos
4. nuclear transfer in the pigs
5. Embryo transfer

IV. Results and application of the result

1. Seminal vesicle-specific promoter were cloned with PCR and sequencing. Human PTH (350 bp) and calcitonin were confirmed (100 bp) from human cDNA library after cloning and sequencing.

2. Construction of expression vector

The strategy of retrovirus vector containing seminal vesicle-specific promoter.



3. Production of retrovirus

Retrovirus-producing cell were produced from 293mGPHy packaging cell with retrovirus vector.

4. Nuclear remodeling and reprogramming were examined various molecular and cell technologies.

5. embryos transfer of clone dtransgenic embryos

seven cloned piglets were obtained followinf embryo transfer, and among them 2 were identified human PTH genes.

6. Bio safty were examined in Retrovirus vector system

V. Proposition for research, development and application of the results

The results and the technologies derived from our projects might be applied in

the various following areas and can be open in public including scientific meeting

and also should be followed in similar studies in the future.

- All the studies where the introduction of foreign DNA into egg are attempted.
- Researches and industries for the production of transgenic animals
- Research and industries for the development of bioreactor system where the production of biosubstances in animals are expected.
- All researches and industries for genetic modification.
- Basic science and technology for the production of transgenic livestock

CONTENTS

Chapter 1. Overview of project	13
Section 1. Necessity of the project	13
1. Technical aspect	13
2. Economical & industrial aspect	15
3. Social & culture aspect	16
Chapter 2. Current status of the technology	17
Section 1. Current status of the technology and problem	17
Section 2. prospect of the future	20
Chapter 3. Research contents and results	21
Section 1. The cloning of calcitonin, PTH and expression vector construction of retrovirus vector system	21
Section 2. The construction of porcine primordial germ cell (pPGC) line	41
Section 3. The diversion gene and expression vector development	48
Section 4. Transgenic pig production by nuclear transfer	52
Section 5. Transfer of Transgenic pig embryo	90
Chapter 4. Achievements and contribution	98
Section 1. Achievement	98
Section 2. Contribution to related research fields	102
Chapter 5. Application of results	103
Section 1. inflection project	103
Section 2. inflection a program	103
Chapter 6. Reference	104

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	13
제 1 절 연구개발의 필요성	13
1. 기술적 측면	13
2. 경제·산업적 측면	15
3. 사회·문화적 측면	16
제 2 장 국내 • 외 기술개발 현황	7
제 1 절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점	17
제 2 절 앞으로의 전망	20
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	21
제 1 절 유용유전자(Calcitonin 및 PTH)의 cloning과 retrovirus vector system의 구축	21
제 2 절 유사 줄기세포 및 줄기세포 구축	41
제 3 절 유용 유전자 및 발현벡터 개발	24
제 4 절 핵이식 기술에 의한 형질전환 수정란 생산	52
제 5 절 형질전환 수정란의 이식	90
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	98
제 1 절 연구개발 목표달성도	98
제 2 절 관련분야 기술 발전에의 기여도	102
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	103
제 1 절 활용계획	103
제 2 절 활용방안	103
제 6장 참고문헌	104

제 1장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구 개발의 목적 및 필요성

세계무역기구(WTO)의 출범에 따른 국내 농축산물시장의 대외 개방이 불가피하게 되어 국내 축산업은 치열한 국제시장경쟁에서 이겨야만 존속이 가능하게 되었다. 따라서 지금까지의 보호무역정책에서 과감히 탈피하여 축산생산성을 향상시키고 국가기술경쟁력을 제고하여 축산업의 국제화, 선진화를 달성하여야 한다. 이는 고부가가치의 첨단생명공학기술의 도입을 통하여서만 이루어 질 수 있으며, 최근 주목받고 있는 유전자조작 기술에 의한 형질전환 동물 생산기술은 생산성 향상의 한계를 극복할 수 있는 유일한 대안이다. 현재, 선진 각국에서는 상급 최첨단기술을 이용하여 가축의 생산성향상 및 각종 생리활성물질의 대량생산에 총력을 기울이고 있으며, 국내 축산업계 또한 이 분야에 대한 연구 및 자본의 투자필요성이 커지고 있다. 이러한 투자는 기존의 축산업을 고부가가치 창출의 첨단산업으로 발전시키는 계기가 되어, 다가오는 21세기를 위한 국가의 전략적 산업재편 및 기술첨단화에 크게 기여하리라 생각된다. 그러므로 현재 세계적으로 지대한 관심 속에서 연구개발이 진행되고 있는 수정란 이식기술과 형질전환 동물 생산기술의 효율성을 높이고 산업적 기술로 발전시키기 위해서는 기존의 형질전환동물 생산기술과 최근 새롭게 개발되고 있는 첨단생명공학 기술을 접목시키는 것이 선결되어야 한다.

본 연구에서는 골다공증 치료제인 인간 parathyroid hormone(hPTH) 혹은 calcitonin을 생산하는 형질전환 돼지를 생산하고자 하는데 이 연구의 필요성을 상술하면 다음과 같다.

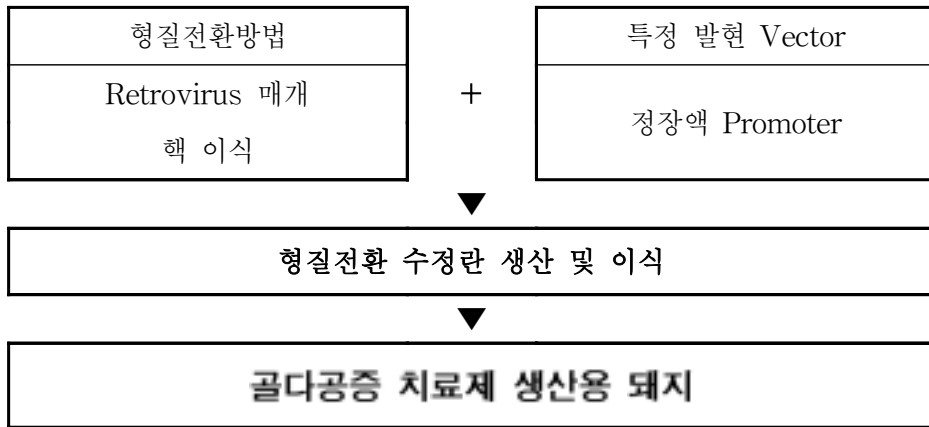
1. 기술적 측면

돼지에서의 번식공학 및 생물공학적인 기술은 생식세포 자체의 특이성에 의해 소나 면양 등의 다른 동물에 비하여 더디게 발전하고 있다. 그러나 본 연구에서

생산하고자 하는 형질전환동물로 돼지를 선택한 이유는 돼지의 다산성, 빠른 성장도, 그리고 무엇보다도 인간과 생리적인 면에서 가장 가까운 동물이기 때문에 만약 형질전환돼지의 생산이 성공하였을 때의 파급효과는 다른 어느 종의 형질전환가축보다 클 것임은 매우 자명하다. 본 연구진은 이미 2년 전부터 체세포를 이용한 복제돼지의 생산에 관한 연구를 수행하고 있는데 최근에 체세포의 핵이 도입된 난자의 임신에도 성공하는 등 그간 상당한 수준의 know-how를 축적하였다.

본 연구에서 형질전환돼지를 생산하는 방법으로 체세포의 핵치환을 이용한 방법과 retrovirus vector system에 의한 유전자 전이 방법을 사용하고자 하는데 그 이론적 근거는 다음과 같다. 첫째, 핵치환을 이용한 cloning 기술은 가장 최근의 기술로 Wilmut(1997)에 의해 embryonic cell이 아닌 분화가 끝난 유방조직 세포의 핵을 미수정란의 핵과 치환하여 Dolly라는 양을 탄생시킴으로써 세계적인 주목을 끌게 되었는데, 그 후 Cibelli 등(1998)은 태아조직세포의 핵을 이식하여 성공적으로 송아지를 생산하는데 성공하였다. 핵이식 기술은 복제동물 생산에 그치지 않고 외래 유전자가 삽입 혹은 치환된 체세포를 이용할 경우 유전자가 도입된 형질전환개체를 생산 할 수 있어 그 이용범위가 크다고 할 수 있다. 둘째, Retrovirus vectro system을 이용한 형질전환 동물의 생산 방법은 오래 전에 보고되었으나(Jaenisch et al., 1975) 대상 동물은 쥐와 닭에 국한되었다. 그 주된 이유는 有蹄類 동물의 embryonic cell에 감염성이 우수한 retrovirus vector system의 부재에 있었다. 그러나 최근에 Chan 등(1998)이 VSV-G (vesicular stomatitis virus glycoprotein)에 포장된 retrovirus vector (Burns et al., 1993)를 metaphase II 상태인 소의 미수정란 위란강에 주사하여 100%의 형질전환 송아지를 생산하였는데, 이러한 사실에 근거하여 본 연구에서는 형질전환 돼지를 생산하는데 있어서 retrovirus vector system을 사용하고자 한다.

본 연구에서 생산하고자 하는 형질전환돼지가 발현할 인간 parathyroid hormone(hPTH)과 calcitonin 유전자의 발현 promoter로는 정낭(seminal vesicle)에 조직특이적인 P12 (seminal vesicle-specific, Dyck et al., 1999) promoter를 사용함으로써 외부 단백질이 동물체내에서 무분별하게 발현되어 야기되는 여러 가지 생리적 부작용을 최소화하고자 한다.



2. 경제· 산업적인 측면

골다공증 치료제인 인간 parathyroid hormone(hPTH)과 calcitonin은 각각 골형성촉진제 및 골재흡수억제제로서의 효능을 가지고 있다. 현재 연어에서 추출한 calcitonin이 사용되고 있으나 인체 내에서 항체의 형성이 문제점으로 지적되고 있으며, hPTH의 경우는 신세뇨관에서 칼슘의 흡수를 촉진함으로써 골다공증을 치료할 목적으로 임상시험이 진행 중이다. 현재 골다공증환자의 수만도 세계적으로 8천만명으로 추산되고 있으며, 골다공증의 치료시장은 2000년에 34억 달러이며, 2005년에는 65억 달러로 성장할 것으로 전망하고 있다(Theta Report and Decision Resources, 2002). 현재 개발 중인 치료제 중 hPTH는 mg당 1000 달러, human calcitonin은 mg당 250 달러를 호가하는 고가의 의약품으로 이를 대량생산 할 수 있다면 경제적인 과급효과도 대단히 클 것으로 전망된다.

골다공증 치료시장		골다공증 치료제	
2000년	2005년	hPTH	Calcitonin
34억 \$	65억 \$	1000 \$/mg	250 \$/mg

3. 사회·문화적 측면

축산업을 하기에는 열악한 자연환경조건 등으로 국내 축산물의 생산 원가가 외국보다 매우 높은 현실을 감안할 때 국내 축산업의 국제 경쟁력이 빈약하여 축산업체의 도산이 속출하는 전례 없는 심각한 위기에 직면할 것이 예상되고 있다. 이에 각계에서는 이러한 농촌 사회의 시대적 위기를 극복할 수 있는 여러가지 대책이 제시되고 있다. 그러나 국내의 여러 조건들을 고려해 볼 때 유일한 길은 선진국과 같이 기술 집약적인 축산업을 추구하여야만 한다. 따라서 축산제반의 기술수준을 빠른 시일내에 선진국의 수준까지 끌어올리고 나아가서는 또한 축산업규모의 확대와 아울러서 전문인에 의한 농장경영으로 개발된 기술을 직접 응용 가능하게 해야 할 것이다.

이러한 어려운 국내 축산 실정에서 생명공학기술의 개발연구는 기술의 파급효과가 클 뿐만 아니라 농촌사회의 활성화와 축산전문인의 확보에 크게 기여할 것이다. 또한 본 기술에서 파생되는 기술, 예를 들면 수정란이식, 수정란동결, 유전자탐색 등을 가축생산에 직접 이용하게 되어 축산첨단기술의 보급이 보다 신속해질 것이다. 따라서 농촌사회의 어려운 현실을 극복할 수 있고 보다 많은 젊은 전문인들이 축산업에 관심을 갖게 할 수 있는 고능력 형질전환 돼지의 개발이 절실히 필요하다고 하겠다.

제 2 장 국내 • 외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 기술개발 현황과 문제점

1. 국내외 현황

1980년 Gordon 등에 의해 형질전환 생쥐 (transgenic mouse) 의 생산이 최초로 보고된 이래 돼지에 있어서도 유전자재조합 기술을 이용한 형질전환돼지의 생산이 보고되었는데 이를 정리하면 다음의 표와 같다.

연도	연구자 (기업)	도입된 외래 유전자
1985	Hammer 등	인간 성장호르몬
1987	Pursel 등	소 성장호르몬
1987	Pinkert 등	인간 성장호르몬 분비인자
1990	Pursel 등	인간 IGF-I
1991	Weidle 등	면역글로블린
1992	Swanson 등	α 및 β globin
1992	DNX	인간 헤모글로빈
1992	DNX	인간 Protein C
1997	Paleyahda 등	인간 Factor VIII
1997	Pursel 등	면양 성장호르몬
1998	Immutran	인간 DAF
1998	Bleck 등	소 α -lactoalbumin
1999	축산기술연구소	인간 조혈인자(erythropoietin)
2000	PPL Therapeutics	α 1-antitrypsin
2000	Chan 등	Green fluorescent protein

주목할 사항은 현재까지 보고된 형질전환돼지는 거의 대부분 종래의 전핵내 미세주입 방법으로 외래 유전자를 전이하여 생산된 것으로, 아직까지 retrovirus vector system에 의한 유전자 전이방법 혹은 체세포의 핵치환을 이용한 cloning 방법에 의해 형질전환 돼지를 생산하였다는 보고는 전무한 실정이다.

2. 현 기술상태의 문제점

형질전환돼지의 생산 그 자체의 성공적인 보고는 위의 표와 같이 전 세계적으로 다수의 성공적인 보고가 존재하지만, 생산된 형질전환 돼지를 경제적인 측면에서 고찰하였을 때는 성공적이라고 평가할 수 있는 보고는 아직까지 거의 전무한 실정이다. 근본적인 원인은 외래유전자를 미세주입에 의해 동물의 수정란내로 이식하는 기술자체가 매우 비효율적이며, 시간과 비용이 엄청나게 소요되는 데에 있다 (소의 경우, 성공률 1%미만, 5-10년, 약 백만달러, Wall, 1996). 더구나 외래 유전자의 전핵내 미세주입에 의해 생산된 형질전환동물의 대부분이 모자이크현상을 보이기 때문에 외래유전자가 후대에 전달되는 비율이 아주 낮다. (Eyestone, 1999) 최근 개발된 복제동물 생산기술을 형질전환동물의 생산에 이용하면 상술한 미세주입기술의 단점을 어느 정도 극복할 수 있지만, 이 기술도 체세포를 이식받은 수정란의 발생을 저하 및 이식 후의 높은 유산율 등과 같은 문제 때문에 체세포 핵이식을 통한 복제동물 생산효율이 아직까지 1%미만이다. 따라서 이처럼 비효율적인 수정란내 유전자 도입기술이나 복제동물 생산기술이 획기적으로 개선되거나 아니면 새로운 기술이 개발되지 않는다면 형질전환동물의 생산기술을 활용한 첨단 생물산업기술의 정착은 요원하다. 따라서 새로운 유전자 이식 기술 (정자나 retrovirus vector system의 활용)이나 체세포나 줄기세포 등을 이용한 복제기술과 같은 새로운 기술 개발만이 상술한 문제점들을 획기적으로 해결하여 최소의 비용과 최단의 시간에 고효율의 형질전환동물 생산을 가능하게 할 수 있다는 것은 자명한 일이다.

형질전환동물생산에서 시급히 해결하여야 할 또 다른 문제는 체내에 전이된 외부유전자의 발현을 인위적으로 조절할 수 있는 system의 부재를 들 수 있다. 즉 원래는 존재하지 않던 외부유전자를 인위적으로 체내에 도입시킨 만큼, 그 유전자의 지속적인 발현이 체내의 생리적 균형을 손상시키기 때문이다. 예를 들면, GH (growth hormone)을 발현하게끔 고안된 recombinant DNA를 초기 胚

(early embryo)에 도입하여 생산한 형질전환동물에 있어서, 쥐의 경우는 몸의 크기와 체중이 보통 쥐의 2~3배가 되는 super mouse가 만들어 졌지만 가축에 있어서는 외부로부터 도입된 GH 유전자의 지속적인 과잉발현으로 인하여 체내의 생리적 균형이 파괴됨으로써 여러 가지 심각한 부작용이 보고되었다 (Ebert et al., 1988; Pursel et al., 1989). 이러한 문제를 해결할 수 있는 방법으로는 체내에서의 transgene의 발현을 인위적으로 조절할 수 있는 regulatory promoter의 사용이 필수적이다. 현재까지 가장 널리 사용되는 regulatory promoter는 metallothionein (MT) promoter, heat shock protein (HSP) promoter, whey acidic protein (WAP) promoter 등이 있는데 이들 promoter들은 inducer가 없을 때도 상당히 높은 정도로 발현하는 단점이 있기 때문에 형질전환동물의 생산에 사용시 여러 가지 문제점을 내포하고 있다. 다시 말해서 MT나 HSP promoter에 의해 그 발현이 통제되게끔 고안된 유전자를 도입시켜 형질전환동물을 생산할 경우, 도입된 외부 유전자가 체내에서 Inducer의 공급이 없을 때도 지속적으로 과잉 발현되기 때문에 (이 현상을 'leaky' 라 함) 생산된 형질전환동물에서 심각한 생리적 부작용이 관찰될 뿐만 아니라 심한 경우 이러한 leaky 현상은 胚發達 (embryo development)에도 영향을 미칠 수 있다. 본 연구에서는 이러한 문제점을 극복하기 위해서 최근에 정낭(seminal vesicle)에 국한하여 발현하는 P12 (seminal vesicle-specific, Dyck et al., 1999)를 사용하고자 한다. 성숙한 수탉의 경우 1회 사정량이 약 200 ml 정도인 것을 감안하면 충분한 양의 calcitonin 과 PTH를 얻을 수 있으며, 또한 앞에서 언급한 종래의 promoter의 leaky 현상을 극복할 수 있을 것이다.

이상에서 언급한 문제점에 대한 기술개발이야말로 각종 외래유전자를 활용하여 형질전환 복제동물을 효율적으로 생산하고, 이의 산업화를 통해 첨단생물산업의 국제경쟁력을 제고를 보장할 수 있을 것이다. 특히, 본 기술의 수요는 엄청나고 그 시장의 규모도 수백억 달러에 이를 전망이다(Genetic Engineering News, 1995: 한국의 미래기술, 1999)

제 2 절 앞으로의 전망

본 연구에서 개발하고자 하는 새로운 첨단기술은 동물 생명공학 산업의 생산성과 경쟁력을 높이는 핵심기술인 만큼, 이 기술의 완성에 대한 기대는 범세계적으로 절실히 필요한 실정이다. 형질전환 복제동물의 생산기술은 기대효과가 지대한 만큼 고도의 전문지식과 최고의 기술적 숙련도가 요구될 뿐만 아니라 과정(생식세포, 수정란, 형질전환, 복제, 수정란 이식, 분석 및 안정성 검사)이 매우 복잡하여 독자적인 연구진에 의해서는 단편적인 연구에 불과하여 각 분야별 최고의 전문가들이 공동으로 새로운 기술을 개발하려는 연구추진이 세계적인 추세이다. 본 연구자들은 국내외에서 지난 십 여년 간 형질전환동물생산의 핵심적인 지식과 기술을 축적하였으며 본 연구의 바탕이 될 연구업적과 예비실험 결과를 다수 보유하고 있다. 각종 첨단기술이 필요한 본 연구는 전 세계적 기술동향을 신속히 파악하고 해외의 선진연구그룹과 각종의 연구정보를 교류하는 것이 연구의 성패를 결정한다. 본 연구의 공동연구자들은 가축번식학, 분자생물학, 수의외과학 등에서 최첨단 기술을 보유한 전문가들로 구성되어 있으며 각자의 지식, 기술 및 경험을 최대한 살린 공동연구를 수행할 것이다.

본 연구분야는 세계적으로 치열한 경쟁이 이루어지고 있는 첨단분야로서 해외 선진기술의 이전이 용이하지 않을 것이다. 실제, 각국은 특허를 통하여 자국이 확립한 기술의 사용을 엄격히 제한하고 있으며, 정부의 투자가 특정기술을 보유한 기업체 등에 집중되고 있다 (1998년 한해 동안 미국에서만 기술개발비로 약 3억 달러 투자). 이러한 상황을 고려할 때, 기술선진국으로부터 최대한의 정보수집과 독자적인 연구수행을 병행함이 바람직하다고 사료된다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 유용유전자(Calcitonin 및 PTH)의 cloning과 retrovirus vector system의 구축

1. 세포배양

본 실험에서 사용한 PT67 (Clontech, USA)과 GP293 (Clontech, USA), PFF (돼지의 태아섬유아세포, porcine fetal fibroblast), 그리고 CEF(닭의 배아섬유아세포, chicken embryonic fibroblast)는 10%의 FBS (HyClone, USA)와 penicillin (100 U/ml) - streptomycin (100 μ g/ml) (Pen/Strep; GibcoBRL, USA)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 4.5 g/l glucose, GibcoBRL, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

2. 외래 유전자의 cloning

4.0 kb 크기의 seminal vesicle-specific promoter는 PCR과 sequencing을 통하여 cloning하였다. Human PTH (350 bp) 유전자와 calcitonin 유전자 (100 bp)는 CLONTECH사의 human cDNA library를 로부터 PCR을 통하여 cloning한 다음 sequencing으로 확인하였다.

가. hPTH와 calcitonin의 cloning

hPTH (110 amino acids as a preprohormone) cDNA 단편(420 bp)은 갑상선암 환자로부터 추출한 부갑상선 조직의 RNA를 template로 한 RT-PCR을 통하여 합성하였다. 이때 사용한 primer set의 sequence는 5' tcagcatcagctactaacatacctg 3' (+ strand primer)와 5' ctgttttcattttcactgggatt3' (-strand primer)이다. 한편, human calcitonin (32 amino acids as a preprohormone) cDNA 단편(426 bp)은 TT 세포(medullary thyroid carcinoma, human, ATCC CRL 1803)로부터 추출한 RNA를 template로 한 RT-PCR을 통하여 합성하였다. RT-PCR에 사용한 primer set의 sequence는 5'

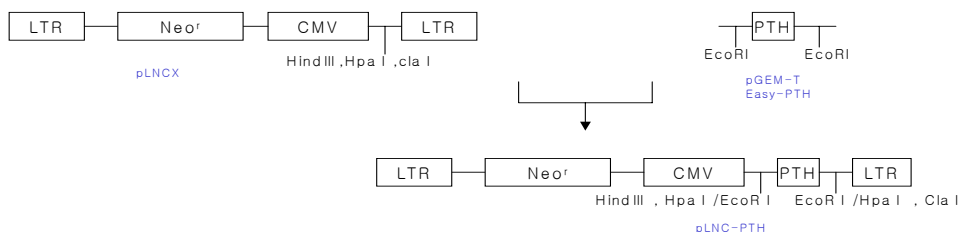
atgggcttccaaaagttctccc 3' (+ strand primer)와 5' ttagtggcattctggggcatg 3' (- strand primer)를 사용하였다.

합성한 cDNA 단편은 pGEM T-easy vector에 도입하여 다음 단계의 cloning에 사용하였다.

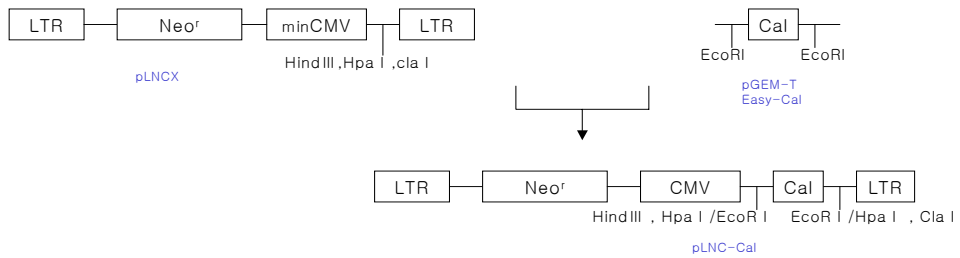
나. Retrovirus vector의 cloning

본 연구에서는 hPTH와 calcitonin 유전자의 발현을 위한 promoter로 정낭 (seminal vesicle)에 특이적인 P12 promoter (Dyck et al., 1999)를 사용하고자 하였다. 이는 장차 생산된 형질전환 동물에 있어서 외부 단백질이 동물의 체내에서 무분별하게 발현됨으로써 야기되는 여러 가지 생리적 부작용을 최소화하기 위함이다. 그러나 Canada의 Dyck 박사로부터 획득한 P12 promoter는 restriction enzyme site가 불명확하고 또 다른 몇 가지 이유로 retrovirus vector 상의 internal promoter로 사용하기에는 기술적으로 불가능하였다. 이에 대한 대안으로 tetracycline에 의해 발현을 유도할 수 있는 tetracycline-controllable promoter를 사용하기로 계획을 수정하였다. 또한 WPRE (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) 단편을 virus vector의 3' 말단 부위에 도입하여 단백질 발현의 증폭을 시도하였다. Tetracycline-controllable promoter의 대조군으로 널리 사용되고 있는 CMV promoter를 선택하였다. 각 retrovirus vector는 아래와 같은 strategy로 재조합되었다.

① pLNC-PTH

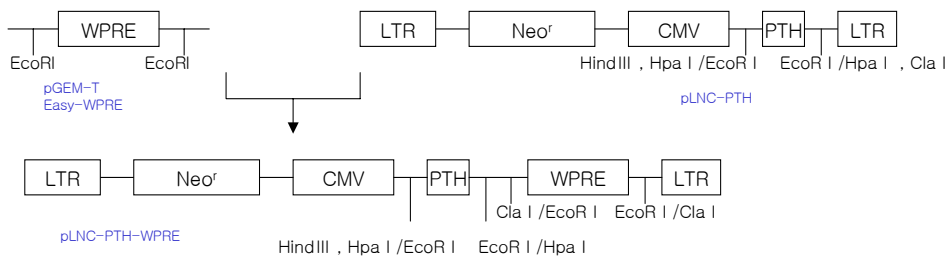


② pLNC-Cal

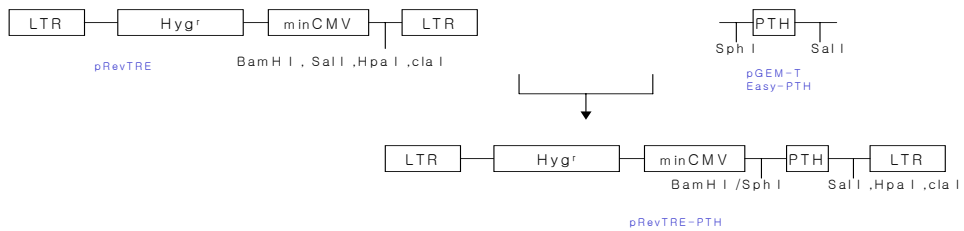


③ pLNC-PTH-WPRE

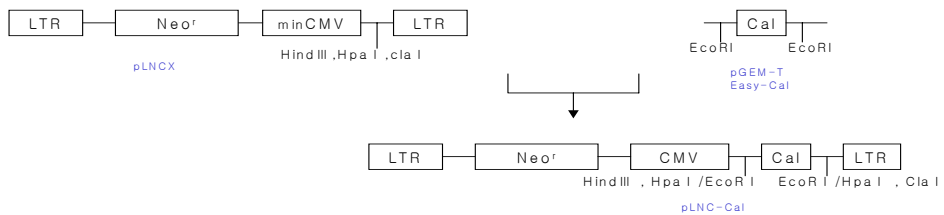
④ pLNC-Cal-WPRE



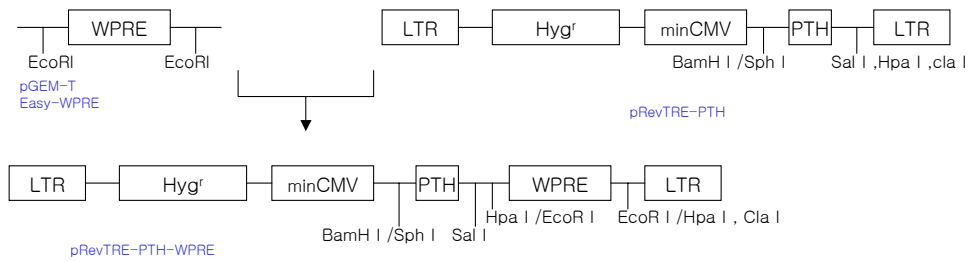
⑤ pRevTRE-PTH



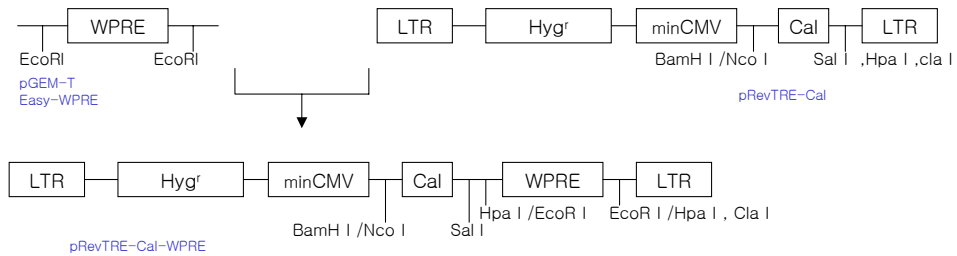
⑥ pRevTRE-Cal



⑦ pRevTRE-PTH-WPRE



⑧ pRevTRE-Cal-WPRE



위의 ⑤, ⑥, ⑦, 그리고 ⑧과 같은 vector 구조는 minCMV promoter를 trans-activation시키는 또 하나의 vector를 필요로 한다. 따라서 표적세포에 2개의 vector를 동시에 도입해야 하는 단점이 있기 때문에 아래의 ⑨와 ⑩ 같은 구조를 가진 vector의 구축을 고려 중에 있다.

⑨ pRevTRE-PTH-Ubc-rtTA2^sM2-WPRE

⑩ pRevTRE-Cal-Ubc-rtTA2^sM2-WPRE

3. hPTH의 발현을 위한 retrovirus vector system의 구축

본 연구실에서 이미 구축된 retrovirus vector인 pLNRPTH와 pLNRPTHW의 RSV promoter 위치에 CMV promoter를 대체하여 pLNCPTH와 pLNCPTHW를 구축하였다.

기본적인 retrovirus vector의 구조에서 hPTH의 발현을 확인한 후, 이 발현을 효율적으로 조절할 수 있는 retrovirus vector system을 구축하고자 하였다. 본

연구에서는 tetracycline 계열의 물질에 의해 외래유전자의 발현을 조절할 수 있는 tetracycline controllable expression system을 도입하였으며 기존의 two vector system을 보완한 형태인 one vector Tet system을 구축하기 위하여 rtTA 단백질을 발현하는 유전자 서열과 hPTH 유전자의 발현을 관장하는 miniCMV promoter 부위가 포함된 TRE 부분을 한 vector 내에 재조합하고자 하였다. 뿐만 아니라 WPRE 서열을 여러 위치에 도입하므로써 유전자의 발현 강도와 제어 정도가 가장 효율적인 vector를 선별하고자 하였다.

먼저 pLNCX (Clontech, USA)로부터 유래한 CMV promoter와 pGEM T easy-hPTH로부터 분리한 hPTH 유전자를 pRevTRE vector (Clontech, USA)의 minCMV promoter 하에 도입하여 pRevTRE-hPTH-CMVp를 구축하였다. 다음 단계로 rtTA 단백질에 해당하는 부분인 rtTA2SM2 유전자를 독일의 Hillen 박사로부터 증정받은 pUhrT62-1 plasmid로부터 분리하여 이를 pRevTRE-hPTH-CMVp vector의 CMV promoter 하에 도입함으로써 pRevTRE-hPTH-CMVp-rtTA2SM2 vector를 재조합하였다. 이 vector를 근간으로 하여 hPTH 유전자의 발현을 촉진시키는 인자인 WPRE 서열을 hPTH 유전자의 3' 위치와 rtTA2SM2 유전자의 3' 위치에 각각 도입하여 pRevTRE-PTH-WPRE-CMVp-rtTA2SM2와 pRevTRE-PTH-CMVp-rtTA2SM2-WPRE를 구축하였다.

재조합된 각각의 retroviral vector는 PT67에 calcium phosphate 방법으로 transfection하여 virus stock을 수확한 후 이 virus를 GP293에 감염시켜 hygromycin (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 선별용액으로 2주간 선별하였다. 선별된 각각의 세포에 calcium phosphate 방법으로 20 μg 의 pHCMV-G를 일시적으로 transfection하여 48시간이 경과한 후 retrovirus가 포함된 배양액을 수확하였다.

가. pLNR-PTH와 pLNR-PTH-WPRE

구축한 pLNC-PTH의 CMV promoter의 위치에 pLXRN에서 분리한 RSV promoter를 도입하여 pLNR-PTH를 구축하였으며 pLNC-PTH-WPRE의 CMV promoter의 위치에 pLXRN에서 분리한 RSV promoter를 도입하여 pLNR-PTH-WPRE를 구축하였다(Fig. 1). 구축된 재조합 vector들은 Qiagen maxiprep kit를 사용하여 대량분리 후 다음 실험에 사용하였다.

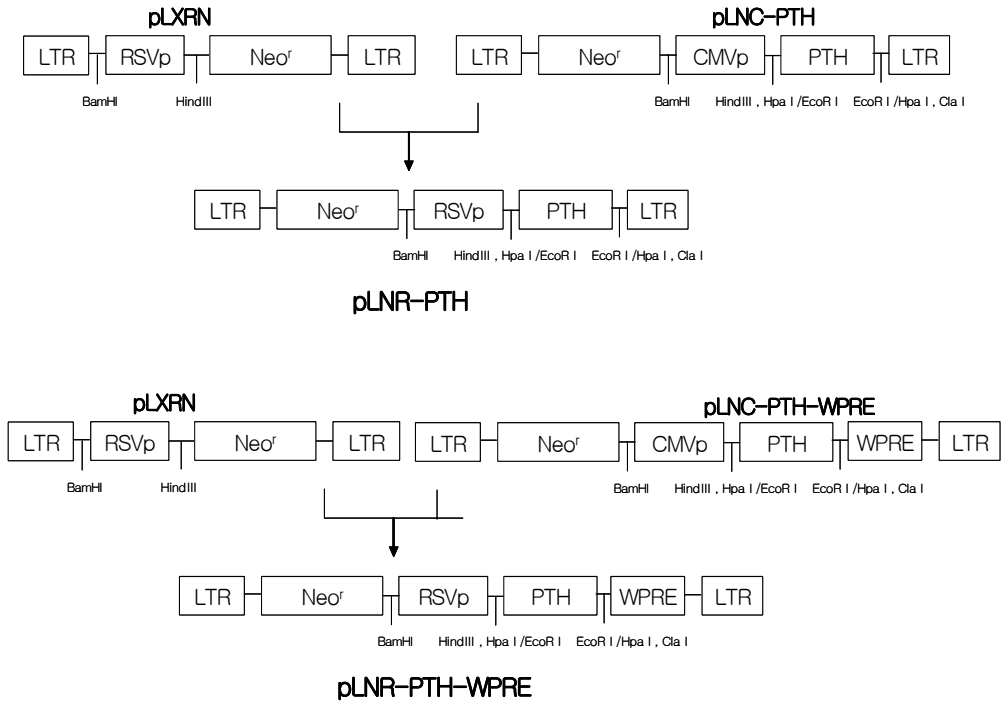


Fig. 1. Construction of pLNR-PTH and pLNR-PTH-WPRE retrovirus vectors. LTR, long terminal repeat; RSVp, Rous sarcoma virus promoter; Neo^r, Neomycin resistant gene; CMVp, human cytomegalovirus promoter; PTH, human parathyroid hormone gene; WPRE, woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element. Length of each sequence is not drawn to scale.

나. Tetracycline inducible expression vector의 구축

구축한 pRevTRE-PTH vector를 구축하여 pLXRN에서 분리한 RSV promoter와 증정받은 pUhrT62-1 plasmid의 rtTA2sM2 (rtTA 단백질에 해당하는 부분) 부분을 pRevTRE-PTH의 PTH 서열의 3' 위치에 도입하여 pRevTRE-PTH-RSVp-rtTA2sM2 vector를 재조합하였다. pGEM T-easy-WPRE로부터 분리한 WPRE 서열을 pRevTRE-PTH-RSV-rtTA의

PTH 유전자의 3' 위치와 rtTA의 3' 위치에 각각 삽입하여 pRevTRE-PTH-WPRE-RSV-rtTA와 pRevTRE-PTH-RSV-rtTA-WPRE를 구축하였다(Fig. 2). 구축된 재조합 vector들은 Qiagen maxiprep kit를 사용하여 대량분리 후 다음 실험에 사용하였다.

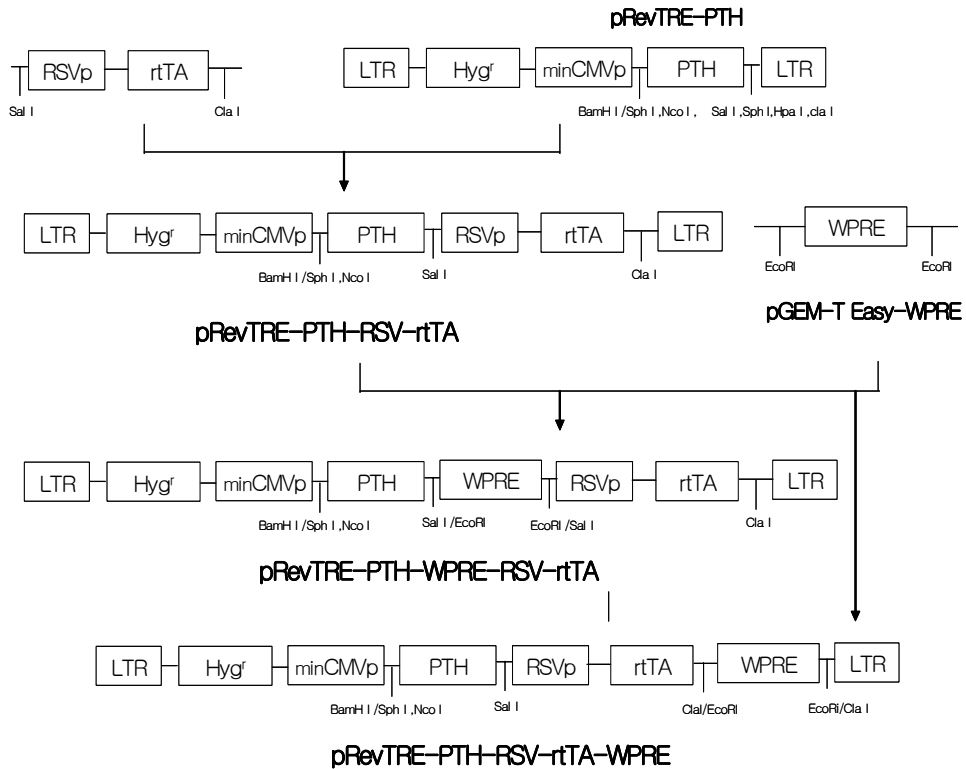


Fig. 2. Construction of pRevTRE-PTH-RSVp-rtTA retrovirus vectors. RSVp, Rous sarcoma virus promoter; rtTA, rtTA consist of the reverse tetracycline repressor (rTetR) fused to a VP16 transactivation domain; LTR, long terminal repeat; Hyg^r, Hygromycin resistant gene; minCMVp, human cytomegalovirus immediate early minimal promoter; PTH, human parathyroid hormone gene; WPRE, woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element. Length of each sequence is not drawn to scale.

4. *In vitro*에서 *hPTH* 유전자의 발현 측정

수확한 virus 용액은 하루 전날 60 mm dish에 1×10^6 개로 준비해 둔 표적세포인 CEF와 PFF에 각각 감염시켜서 hygromycin 내성 감염가를 측정하였으며 측정된 값을 근거로 하여 MOI를 1로 맞추어 동일한 virus particle 수를 표적세포로 감염시켰다. 24시간 경과 후 세포를 3일 간격으로 hygromycin ($150 \mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 배양액으로 교환하여 유전자가 전이된 세포주를 확립하였다.

선별된 각각의 세포에서 *hPTH*의 발현은 two-step RT-PCR과 ELISA 방법을 이용하여 확인하였다. 기본적인 retrovirus vector 구조인 pLNCPTH와 pLNCPTHW를 이용하여 구축한 세포주는 60 mm dish에 5×10^5 개의 세포를 준비한 후 그 다음날 배지를 교환하고 48시간 배양한 후 세포에서는 RNA를 분리하여 RT-PCR을 실시하였으며 세포 배양액은 수확하여 100배로 희석한 후 ELISA를 실시하였다. Tetracycline inducible expression system에서는 이 system이 tetracycline 계열의 물질이 존재할 경우에 유전자 발현이 turn on되는 system임을 감안하여 배양배지에 tetracycline 유도체인 doxycycline을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우에 *hPTH* 유전자의 발현을 비교하였다. 전날 각 세포를 60 mm dish에 5×10^5 으로 준비한 후 그 다음날 doxycycline을 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 첨가하였거나 첨가하지 않은 배지로 교환해 주었다. 48시간 배양한 후 각 세포의 배양액을 취하여 10배로 희석한 후 ELISA를 실시하였다.

감염과 선별과정이 끝난 각 세포는 trizol을 이용하는 방법으로 total RNA를 분리한 후 $1 \mu\text{g}$ 의 RNA로 ImProm-II reverse transcription system을 이용하여 RT를 실시하여 cDNA를 만들었다. 각각의 실험군에서 $2 \mu\text{l}$ 의 cDNA를 주형으로 이용하여 PCR을 실시하였으며 94°C 에서 30초, 50°C 에서 30초, 72°C 에서 30초간 반응하는 cycle을 25회 반복 실시한 후 최종 신장을 위해 72°C 에서 7분간 반응하였다. 본 실험에 사용한 primer는 + strand primer인 5' -TCAGCATCAGCTACTAACATACCTG-3' 와 - strand primer인 5' -CTGTTTTTCATTTTCACTGGGATT-3' 를 사용하였으며, 1.5% agarose gel을 이용한 전기영동을 실시하여 *hPTH* 유전자에 해당하는 420 bp의 DNA 단편을 확인하였다.

정상적인 전사과정이 일어나고 있음을 확인하기 위하여 각 세포의 cDNA를 GAPDH 유전자에 대한 primer로 PCR을 수행하였는데 CEF는 + strand primer

로 5'-ACGCCATCACTATCTTCCAGGAG-3', - strand primer로 5'-CAGCAGCCTTCACTACCCTCTTG-3'를 사용하였으며, PFF는 + strand primer로 5'-TCCACTACATGGTCTACATGTTCCAG-3', - strand primer로 5'-ATGTCATCATATTTGGCAGGTTTCTC-3'를 사용하였다. PCR 반응 과정은 94°C에서 30초, 54°C에서 30초, 72°C에서 30초간 반응하는 cycle을 25회 반복 실시하였다.

Virus에 감염되지 않은 표적세포와 PGH 유전자가 전이된 CEF-LNCPTH와 CEF-LNCPTHW, PFF-LNCPTH와 PFF-LNCPTHW 세포들을 각각 DMEM/FBS 배지에서 24시간 배양한 후 그 배양액을 수확하여 1:100으로 희석하여 ELISA를 수행하였다. 이 방법은 DSL-10-8000 ACTIVE I-PTH Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit (DSL-10-73100, USA)을 사용하는 two-step sandwich-type immunoassay 방법이다. Standard에 해당하는 재조합 PTH, 대조구, 실험구는 goat anti-human PTH antibody로 피막이 형성된 microtitration well에서 biotinylated anti-parathyroid hormone antibody와 같이 반응시킨 후 수세하였으며 HRP (horseradish peroxidase)로 표식이 된 streptavidin를 처리하였다. 다시 수세한 후 각 well에 기질인 TMB (tetramethylbenzidine)를 첨가하여 반응시켰다. 일정 시간 경과 후 반응 종결 용액을 첨가하고 microplate reader를 사용하여 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

Tet system에 있어서 *hPTH* 유전자의 유도적 발현 여부의 확인은 확립한 각각의 세포주를 DMEM/tetracycline free FBS 배지와, 이 배지에 doxycycline (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 배지에서 각각 48시간 배양한 후, 그 배양액을 수확하여 1 : 10으로 희석하여 전자와 동일한 방법으로 ELISA 분석을 실시하였다.

가. Retrovirus의 생산과 돼지 체세포로의 감염

본 실험에서는 retrovirus를 생산하기 위하여 1차년도와 2차년도에서 구축한 vector 중 pLNR-PTH, pLNR-PTH-WPRE, pRevTRE-PTH-RSVp-rtTA, pRevTRE-PTH-WPRE-RSVp-rtTA, pRevTRE-PTH-RSVp-rtTA-WPRE의 재조합된 5개의 retrovirus vector를 각각 PT67 (Clontech, USA) virus 생산세포에 calcium phosphate 방법으로 transfection한 후 수확한 virus를 포장세포인

GP293에 infection하였다. Infection된 GP293 포장세포주는 Hygromycin (150 μ g/ml)이 첨가된 선별 용액에서 2주간 선별하였다. 선별된 GP293 세포는 calcium phosphate 방법을 이용하여 20 μ g의 pHCMVG를 tranfection 하여 8시간 배양 후 새로운 배양액으로 갈아주었다. 48시간 배양 후 retrovirus가 포함된 배양액을 수확하여 PFF (porcine fetal fibroblast) 세포에 감염시켰다. 감염된 PFF 세포는 Hygromycin (150 μ g/ml)이 포함된 선별 배양액에서 2주간 선별하였다.

나. LNR-PTH와 LNR-PTH-WPRE retrovirus에 감염된 PFF 세포에서의 *PTH* 유전자의 전이 확인

PTH 유전자의 전이 여부를 확인하기 위하여 각각의 선별된 PFF 세포에서 RNA를 분리한 후 RT-PCR을 실시하였다. 분리된 RNA는 50 pmole의 primer, 0.2mM dNTP, 1mM MgSO₄, 5U AMV Reverse Transcriptase, 5U Tfi DNA polymerase, AMV/Tfi 5X Reaction Buffer로 만든 reaction mixture와 혼합하였다. 일차적 cDNA를 합성하기 위하여 48 $^{\circ}$ C에서 45분간 반응한 다음 AMV Reverse Transcriptase의 활성화와 RNA/cDNA/primer의 denaturation을 위해 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 반응시켰다. 2차 cDNA합성과 PCR 증폭을 위해 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 50 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 반응하는 cycle을 35회 반복 실시한 후 최종 신장을 위해 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 방치하였다. 반응에 사용한 primer는 + strand primer로 5' TCAGCATCAGCTACTAACATACCTG 3'와 - strand primer로 5' CTGTTTTTCATTTTCACTGGGATT 3'를 사용하였으며 2% agarose gel을 이용하여 결과를 확인하였다.

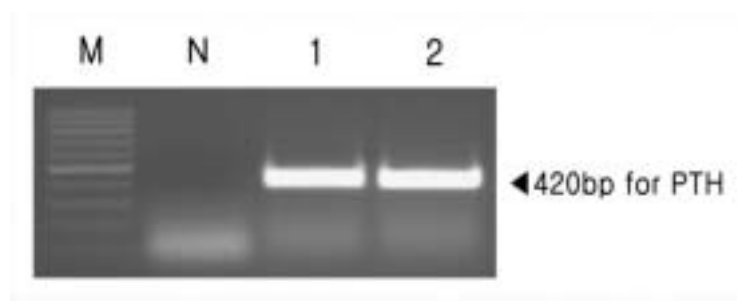


Fig. 3. RT-PCR analysis of *hPTH* gene expression in PFF cells. M, 100bp ladder; N, PFF cell; 1, PFF-LNR-PTH; 2, PFF-LNR-PTH-WPRE.

Fig. 3에서 나타난 바와 같이 감염시킨 PFF 세포에서는 PTH 유전자의 전이가 확인되었으며 유전자가 전이되지 않은 대조군 세포에서는 PTH 유전자가 존재하지 않음을 확인할 수 있었다.

다. Tet system에서 생산된 retrovirus에 감염된 PFF 세포에서의 PTH 유전자 전이의 확인

Tet system에서의 유전자 전이 여부를 확인하고자 total RNA를 이용하여 cDNA를 합성한 후 PCR을 수행하여 확인 하였다. 또한 WPRE 서열의 유무나 위치에 따른 전사 정도의 차이가 있는지 확인하고자 하였다. pRevTRE vector를 이용하여 구축된 세포들은 전날 2×10^6 으로 2개의 100 mm dish를 준비하였다. 2 dish 중 한 dish는 doxycycline이 첨가되지 않은 배양액으로 바꾸어주고 다른 한 dish는 doxycycline ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 배양액으로 바꾸어 주었다. 48시간 배양한 후 RNA를 분리하였다. 먼저 cDNA 합성을 위하여 total RNA $1 \mu\text{g}/\text{ml}$, MgCl_2 가 포함된 $5 \times$ Reaction buffer, 10mM dNTP, Oligo(d)T $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, RNase inhibition $40 \text{ U}/\mu\text{l}$, reversetranscriptase $200 \text{ U}/\mu\text{l}$, 50 pmole PTH primer를 혼합하였다. cDNA를 합성하기 위해 준비된 mixture를 실온에서 10min, 42°C 에서 60min간 반응한 다음 reversetranscriptase의 활성화와 RNA/cDNA/primer의 denaturation을 위해 95°C 에서 5 분간 반응한 후 4°C 에서 4 분간 방치하였다. 이렇게 하여 만들어진 cDNA 중 10 g을 이용하여 94°C 에서 1분, 50°C 에서 1분, 72°C 에서 1분간 반응을 25회 반복하는 PCR을 실시하여 2% agarose gel에서 확인 하였다. 반응에 사용한 primer는 + strand primer로 5' TCAGCATCAGCTACTAACATACCTG 3'와 - strand primer로 5' CTGTTTTTCATTTTCACTGGGATT 3'이다.

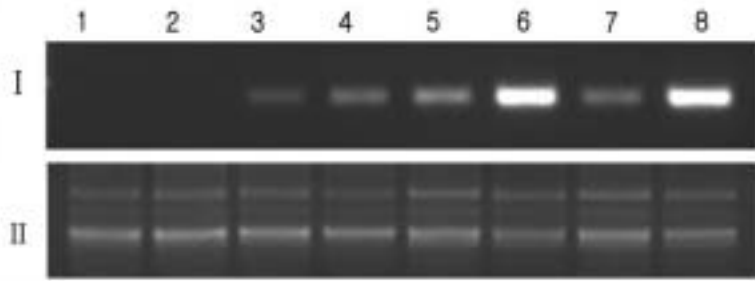


Fig. 4. I. RT-PCR analysis of the tetracycline-mediated *hPTH* gene expression. 1 and 2, cell line PFF; 3 and 4, cell line PFF-RevTRE-PTH-RSV-rtTA; 5 and 6, cell line PFF-RevTRE-PTH-WPRE-RSV-rtTA; 7 and 8, cell line PFF-RevTRE-PTH-RSV-rtTA-WPRE; 1, 3, 5 and 7 lanes untreated doxycycline. 2, 4, 6 and 8 lanes treated doxycycline. II. Total RNA electrophoresis of PFF cells.

실험 결과, virus를 감염시키지 않은 정상세포에서는 PTH 단편이 확인되지 않았으며 Tet system을 이용하여 생산한 virus를 이용하여 감염시킨 모든 세포주에서는 420 bp의 단편이 확인되었다(Fig. 4). 뿐만 아니라 유전자의 발현을 유도하는 조건인 doxycycline이 첨가된 배지에서 배양한 세포에서는 첨가되지 않은 배지에서 배양한 세포에서보다 많은 양의 RT-PCR 산물을 확인할 수 있었는데 이는 Tet system에 의한 유전자의 발현이 유도적으로 조절됨을 증명하는 것으로 보인다. 각 Tet system 중 WPRE가 존재하는 경우에 PTH의 발현이 높은 것으로 나타났으며 정확한 발현을 측정하기 위하여 전기적 화학 발광 방법인 ECLIA (Electrochemiluminescent immunoassay) 방법으로 정량하고자 하였다.

라. 각 세포에서 발현된 PTH의 정량

LN 종류의 virus에 의해 감염되어 구축된 PFF 세포는 100 mm dish에 1×10^6 만큼의 세포를 준비하여 16시간 후 새 배양액으로 교환한 후 48시간동안 배양하여 배양액을 수확하여 ECLIA 방법으로 단백질을 정량하였다. Tet system을 이

용하여 구축된 vector들은 RNA를 분리하는 전 실험과 동일한 조건에서 배양하여 배양액을 수확한 다음 ECLIA 방법으로 단백질을 정량 하였다.

LNR-PTH와 LNR-PTH-WPRE에 의해 감염되어 구축된 PFF 세포는 WPRE 서열이 도입된 경우에서 현저한 hPTH의 증가를 확인하였다. PFF-LNR-PTH의 배양액에서는 22 pg/ml의 단백질이 확인되었으나, WPRE 서열을 도입한 PFF-LNR-PTH-WPRE의 배양액에서는 5000 pg/ml 이상으로 상당히 많은 hPTH가 생산됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5). ECLIA 방법에 의한 호르몬 측정의 한계 수치가 최대 5000 pg/ml임을 감안하면 WPRE의 효과는 상당할 것으로 추정된다.

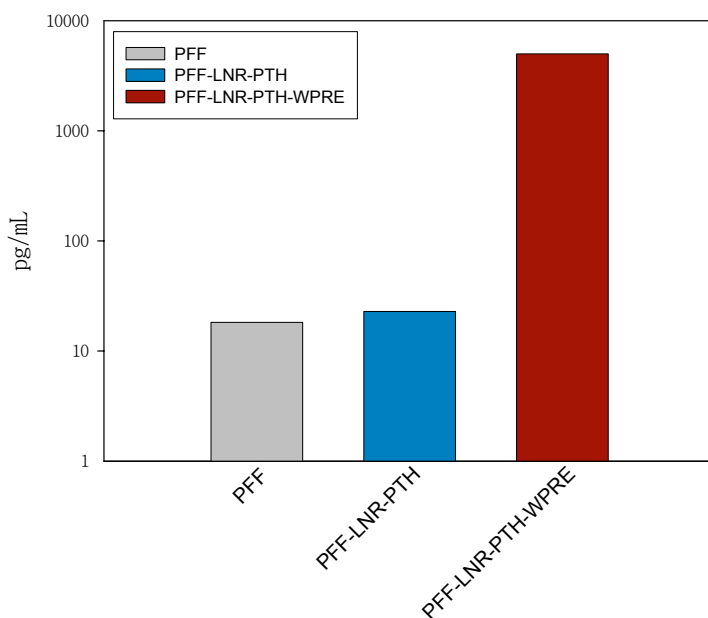


fig. 5. Measurement of human PTH in culture media of non-transgenic and transgenic PFF cells using ECLIA. PFF: non-transgenic PFF cells. LNR-PTH: PFF cell was infected with LNR-PTH virus. LNR-PTH-WPRE: PFF cell was infected with LNR-PTH-WPRE virus. All cell culture media harvested after incubate during 48 hours.

hPTH 유전자의 지속적인 발현으로 인한 생리적인 부작용을 줄이기 위하여 tetracycline계의 물질이 존재할 경우에만 유전자 발현이 유도되는 Tet-On system을 retrovirus vector에 도입한 결과 생산된 단백질 양의 현저한 차이를 확인 할 수 있었다. doxycycline을 첨가하지 않은 배양액에서는 감염되지 않은 PFF 세포의 측정값과 비슷한 20 pg/ml의 단백질이 생산되는 것을 확인하였으며, doxycycline을 첨가한 배양액에서는 WPRE의 존재 유무에 따라 단백질 생산량이 달라지는 것을 확인할 수 있었다. PFF-RevTRE-PTH-RSV-rtTA에서는 82 pg/ml의 단백질이 생산됨을 알 수 있었고 WPRE 서열이 도입된 PFF-RevTRE-PTH-RSV-rtTA-WPRE에서는 354 pg/ml, PFF-RevTRE-PTH-WPRE-RSV-rtTA에서는 865 pg/ml로 *hPTH* 유전자의 3' 위치에 WPRE 서열을 도입한 실험군에서 가장 많은 단백질이 생산되는 것을 확인 하였다(Fig. 6). 이상의 결과에서 WPRE 서열이 PTH의 발현량을 증가시켜 준다는 사실이 확인되었으며, 지금까지의 다른 연구 보고에서는 WPRE 서열이 도입되는 위치에 비의존적인 것으로 알려졌으나 본 연구에서는 외래 유전자의 3' 위치에 도입된 경우가 가장 효율적인 것으로 나타났다. 이러한 연구 결과는 *hPTH*를 생산하는 돼지를 만들기 위한 기초 실험으로써 앞으로 형질전환 돼지를 만들 수 있는 가능성을 제공해 줄 수 있을 것으로 기대된다.

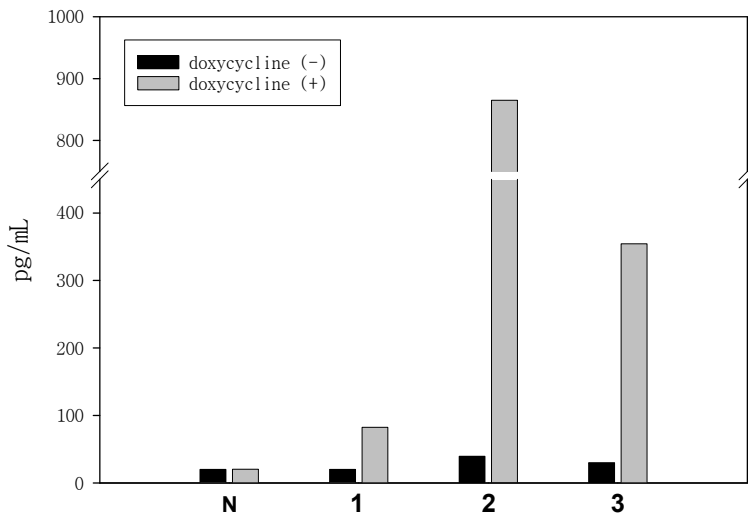


Fig. 6. Measurement of human PTH in culture media of PFF cells using ECLIA. N, PFF cells; 1, PFF cells was infected with RevTRE-PTH-RSV-rtTA virus; 2, PFF cells was infected with RevTRE-PTH-WPRE-RSV-rtTA virus; 3, PFF cells was infected with RevTRE-PTH-RSV-rtTA-WPRE virus.

5. hPTH의 발현을 위한 retrovirus vector system의 구축

본 연구에서는 일차 배양한 돼지와 닭의 세포에서 hPTH의 발현 양상과 그 발현의 조절 system을 구축하고자 하였다. hPTH는 인간의 부갑상선에서 분비되는 84개의 아미노산으로 이루어진 단백질로서 뼈에서의 칼슘의 방출을 촉진하여 혈중 칼슘 농도를 상승시키고 신세뇨관에서 인의 재흡수를 억제해서 혈중 인의 농도를 저하시키는 역할을 한다. 이 유전자를 CMV promoter하에 도입하여 pLNC-PTH retrovirus vector를 구축하였으며 일차배양한 PFF와 CEF 표적세포에 전이시켜서 발현을 분석한 결과, 각 세포 배양액 1 ml당 500 ~ 700 pg의 생

산량을 나타내었다. hPTH의 발현을 증대시키기 위하여 pLNCPTH에 WPRE 서열을 도입하였는데 PFF 세포에서는 126,000 pg/ml, CEF 세포에서는 426,000 pg/ml의 생산량을 나타내었다. 이는 WPRE 서열을 도입하지 않은 경우에 비해서 각각 252배, 609배의 발현 증가를 보임으로써 기존의 연구에서 외래 유전자의 발현을 3 ~ 5배로 증가시키는 것으로 나타난 것에 비해 매우 높은 발현 촉진 정도를 나타내었다(Fig. 7). 각각의 세포에서 분리한 RNA를 RT와 PCR을 순서대로 실시한 결과, WPRE가 도입된 실험군에서 PCR band가 더 두껍게 나타났으며 이는 WPRE 서열이 전사후 조절인자로 mRNA의 생산을 증가시키는 요인으로 작용한 때문인 것으로 생각된다(Fig. 8).

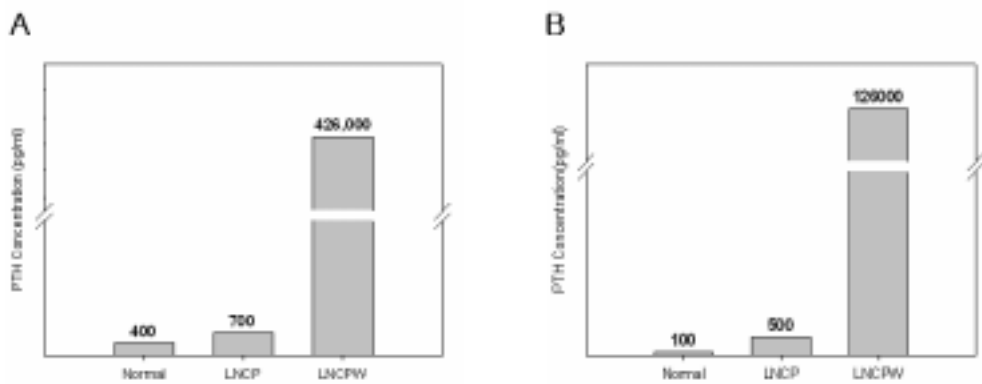


Fig. 7. ELISA analysis of hPTH. Normal, PFF cells; LNCP, PFF cells infected with LNR-PTH viruses; LNCPW, PFF cells infected with LNR-PTH-WPRE viruses, respectively. All cell culture media were harvested after 48 hours of incubation

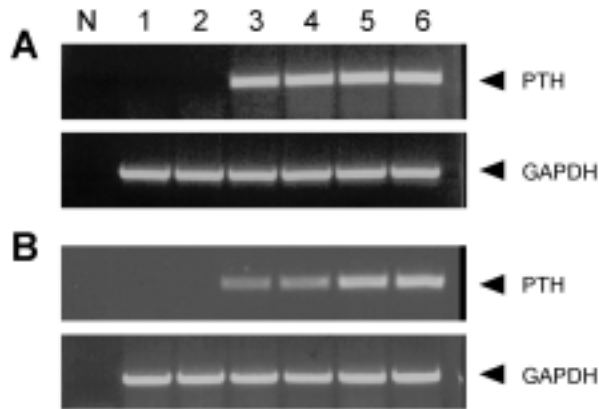


Fig. 8. RT-PCR analyses of *hPTH* gene expression in CEF (A) and PFF (B) cells. N, negative control; 1, 2, uninfected cell; 3, 4, cells infected with LNR-PTH viruses; 5, 6, cells infected with LNR-PTH-WPRE viruses, respectively.

6. One vector 형태의 tetracycline inducible expression system의 구축

본 연구에서는 보다 효율적인 유전자 전이 system을 구축하기 위하여 rtTA와 TRE 서열을 한 vector 내에 위치시킴으로써 one vector system을 구축하고자 하였다. 이 vector에 *hPTH*를 TRE 서열의 3' 위치에 도입하였으며 rtTA2SM2 단백질에 대한 promoter로 CMV promoter를 도입하였다. 그 결과 재조합된 vector는 pRevTRE-PTH-CMVp-rtTA2SM2로서 이 vector는 tetracycline 계열의 물질이 존재하면 rtTA 단백질이 그 물질과 결합하여 그 복합체가 TRE 부분에 결합함으로써 minCMV promoter 하의 *hPTH* 유전자의 발현을 나타내게 된다.

재조합한 pRevTRE-PTH-CMVp-rtTA2SM2에 유전자의 발현을 촉진시키는 것으로 알려진 WPRE 서열을 여러 위치에 도입하여 가장 효율적인 vector system을 선별하고자 하였다. WPRE 단편은 *hPTH* 유전자의 3' 과 rtTA 단백질을 암호화하는 유전자의 3' 위치에 도입하였으며 구축한 각 vector의 구조는 Fig. 9과 같다.

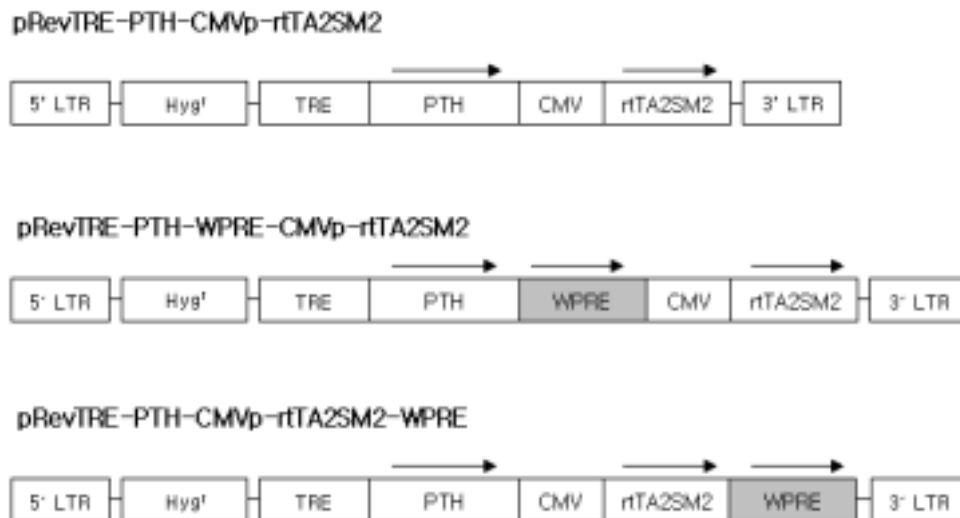


Fig. 9. Construction of tetracycline inducible expression retrovirus vectors. TRE, Tet-response element; LTR, long terminal repeat; Hyg^r, Hygromycin resistant gene; PTH, human parathyroid hormone gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; CMV, human cytomegalovirus promoter; rTA2SM2, rTA consist of the reverse tetracycline repressor (rTetR) fused to a VP16 transactivation domain. Length of each sequence is not drawn to scale.

전 단계에서 구축한 retrovirus vector를 GP293 세포에 전이시켜서 이 세포로부터 생산한 retrovirus를 PFF와 CEF 세포에 감염시켰다. 구축한 유전자 발현 system이 tetracycline 계열의 물질이 존재할 경우에 유전자 발현이 turn on되는 system임을 감안하여 배양배지에 tetracycline 유도체인 doxycycline을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우에 있어서 *hPTH* 유전자의 발현을 two-step RT-PCR 과 ELISA를 이용하여 비교 측정하였다. Tet system이 전이된 모든 표적세포주 들은 doxycycline이 존재하지 않는 배지에서 배양한 것보다 doxycycline이 함유된 배지에서 배양한 경우에 있어서 *hPTH*의 발현율이 높은 것으로 나타났다(Fig. 10). 외래 단백질의 발현을 증가시키기 위하여 도입한 WPRE 서열은 도입 위치에 따라 그 발현 양상이 각각 다르게 나타났다. 먼저 *hPTH* 유전자의 3' 위치에

WPRE가 위치한 RevTRE-PTH-WPRE-CMVp-rtTA2SM2의 경우 doxycycline이 함유된 조건에서 PFF에서는 3.0×10^4 , CEF에서는 5.3×10^4 pg/ml으로 가장 높은 발현 정도를 나타내었으며 doxycycline이 없는 조건에 대한 유도율도 각각 8.6배, 9.6배로 가장 높게 나타났다(Fig. 10). 선행된 연구에서 trTA2SM2에 대한 promoter로 RSV를 사용하였을 경우에는 WPRE가 외래 유전자의 3' 위치에 도입한 경우에서 절대적인 발현량은 가장 높게 나타났으나 유도율은 WPRE가 rtTA2SM2 다음에 위치한 경우에 가장 높은 것으로 나타난 것과는 차이를 보였다. WPRE가 rtTA2SM2의 3'에 위치한 RevTRE-PTH-CMVp-rtTA2SM2-WPRE의 경우에는 두 세포주 모두에서 절대적인 발현율과 유도율이 WPRE가 없는 경우에 비해서는 높고 WPRE가 외래 유전자 다음에 위치한 경우에 비해서는 낮은 것으로 나타났다. 따라서 재조합한 vector 중에서 WPRE가 외래 유전자의 3' 위치에 도입된 형태가 발현의 조절에 있어서 적절한 system인 것으로 생각된다.

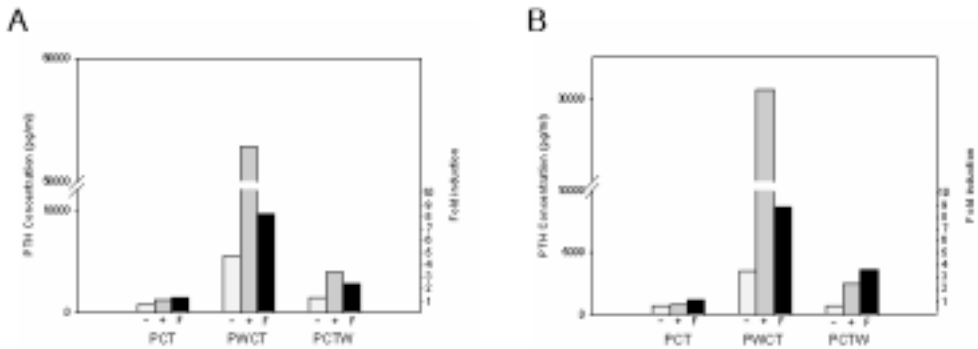


Fig. 10. Expression and fold induction of hPTH after doxycycline induction for 48 hours in target cells. A: CEF cell, B: PFF cell, -: cell was grown in the doxycycline free media with tetracycline free FBS. +: cell was grown in the media supplemented with doxycycline ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$). PFF cells were infected RevTRE-PTH-CMVp-rtTA2S-M2(PCT), RevTRE-PTH-WPRE-CMVp-rtTA2S-M2(PWCT), RevTRE-PTH-CMVp-rtTA2S-M2-WPRE (PCTW), respectively.

Two-step RT-PCR의 결과에서도 거의 동일한 양상을 나타내었는데, 각 실험군에서 전사가 정상적으로 이루어지는 것을 확인하기 위하여 GAPDH에 대한 RT-PCR을 동시에 수행하였으며 모든 실험군에서 동일한 PCR 단편을 나타내었는데 비해 PTH에 대한 PCR 단편은 여러 가지 형태로 나타났다. 모든 Tet vector에서 doxycycline이 첨가되지 않은 경우보다 첨가된 경우, 즉 유전자의 발현 유도가 일어난 경우에 PCR의 산물이 많은 것으로 보였으며 특히 WPRE가 PTH 유전자 다음에 위치한 pRevTRE-PTH-WPRE-CMVp-rtTA2SM2 vector가 전이된 세포주에서 가장 높은 발현율과 유도율을 나타내었다. 이는 ELISA 방법을 이용한 분석에서도 동일한 양상을 보였다. 이에 비해 WPRE가 삽입되지 않았거나 rtTA2SM2 유전자의 downstream에 위치한 경우에는 doxycycline이 첨가된 조건에서의 전사 정도와 유도율이 비교적 낮은 것으로 확인되었다(Fig. 11).

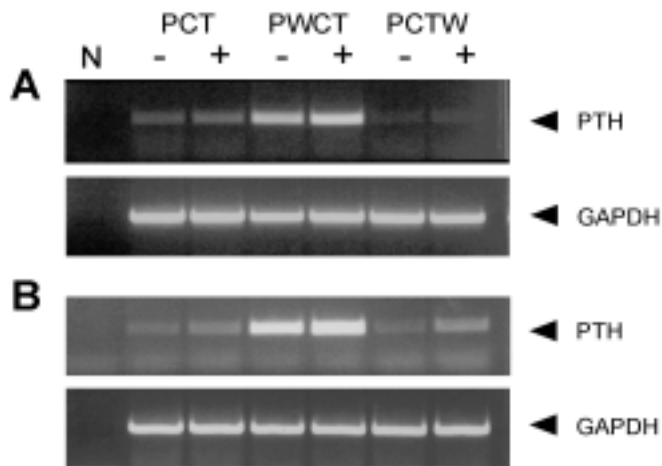
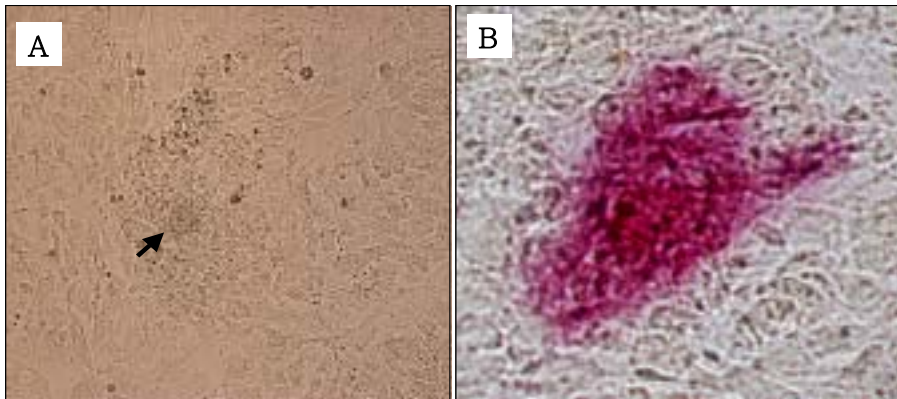


Fig. 11. Determination of doxycycline induction of the *hPTH* gene in CEF (A) and PFF (B) cells using RT-PCR analysis. N: Negative control, 1 and 2, cells infected with RevTRE-PTH-CMVp-rtTA2SM2. PWCT: target cell infected with RevTRE-PTH-WPRE-CMVp-rtTA2SM2. PCTW: target cell infected with RevTRE-PTH-CMVp-rtTA2SM2-WPRE. -: cell was grown in the doxycycline free media with tetracycline free FBS. +: cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). In RT-PCR analysis, two primer sets were used: One for the *hPTH* gene and the other for the control *GAPDH* gene.

제 2 절 유사 줄기세포 및 줄기세포 구축

1. Porcine primordial germ cell (pPGC) line의 구축

임신 24-28일째 폐지를 도살하여 태아의 genital ridge를 작출하여 PGC을 분리하여 10 μ g/ml mitomycin C의 처리에 의해 불활성화된 STO cell상에서 배양을 실시하였다. Embryonic germ (EG) cell-like colony의 형성을 유도한 후 trypsin 또는 dispase digestion을 통해 disaggregation을 유도한 후 subculture를 실시하여 pEG cell line을 구축하였다 (그림 12A). 구축된 pEG cell이 미분화 상태로 유지되는지 조사하기 위하여 Alkaline phosphatase (AP) 활성도를 측정된 결과 높



은 AP 활성도가 측정됨으로써 구축된 pEG cell line은 미분화 상태인 것이 확인되었다.

Figure 12. (A) STO feeder cell 상의 pEG cells. Arrow indicates EG-like colony. (B) pEG colony의 Alkaline phosphatase 염색하였다

2. OCT4 5'-upstream region의 특성 및 cis-regulatory elements 규명

가. Deletion mutant를 이용한 hOCT4 gene 5' upstream region의 분석
hOCT4 gene 5' upstream region내에 존재하는 mOCT4 promoter region과 conserved된 4개의 conserved region(CR1-4, 그림 13A)을 기준으로 하여 각각의 CR을 차례로 deletion시킨 mutant construct를 만든 후, NCCIT cell을 이용하여

promoter analysis를 실시하였다. 그림 13B에 보인바와 같이 각각의 CR4, CR3, CR2가 deletion 됨에 따라 promoter activity가 감소하였으며, -1019~-380 region을 deletion 시켰을 때 promoter activity가 증가 하는 것을 관찰하였다. 순차적으로 deletion 시킨 결과 -380~-1 region이 minimal promoter activity를 보였으며, minimal promoter의 중요성을 검증하기 위하여 -380~-1 region을 deletion 시킨 결과 promoter activity가 현저히 감소하는 것으로 보아, -380~-1 region이 minimal promoter로서 중요한 역할을 하는 것을 확인하였다. 그림 13의 결과를 통해 mOCT4 promoter region과 conserved된 region은 모두 positive cis-regulatory element로 작용하는 것을 확인하였으며, -1019~-380 region에 hOCT4 promoter에만 존재하는 negative cis-regulatory element가 존재하고, GC box 및 hormone responsive element (HRE)를 포함한 -380~-1 region이 minimal promoter로 작용하는 것을 확인하였다.

hOCT4 promoter region내의 negative cis-regulatory element가 정확히 어디에 존재하는지 mapping하기 위하여 -1588~-1 region을 이용하여 sub-deletion mutant construct를 만든 후 NCCIT cell을 이용하여 promoter-reporter assay를 실시하였다 (그림 14). 그림 13의 결과와 동일하게 CR2의 1B가 제거되었을 시 promoter activity가 현저히 감소하였으며, 순차적으로 deletion시킨 결과 -548~-380 region이 제거시 감소되었던 promoter activity가 현저히 증가하는 것을 관찰하였음. 이는 -548~-380 region에 putative hOCT4 negative cis-regulatory element가 존재한다는 것을 확인하였다.

1) hOCT4 minimal promoter내에 존재하는 GC box의 중요성 조사

hOCT4 minimal promoter region에 존재하는 positive cis-regulatory element를 규명하기 위하여 먼저 mOCT4 proximal promoter region과 염기서열을 비교한 결과 (그림 15A), GC box 및 HRE이 conserved된 것을 확인하였다. TATA-less promoter activity에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 GC box (Sp family transcription factor binding site) 2개(GC-1 and GC-2)를 찾아 (그림 15A) site-directed mutagenesis 유기하여 promoter-reporter assay를 실시한 결과, GC-1 site에 mutagenesis 유발한 경우에는 promoter activity가 현저히 감소한 반면, GC-2 site를 mutagenesis 유발한 경우에는 promoter activity에 영향을 미치지 않았다 (그림 15B). 그림 15의 site-directed mutagenesis 실험을 통하

여 hOCT4 proximal promoter region에 존재하는 GC-1 site가 minimal promoter activity를 나타내는데 중요한 역할을 하는 것을 확인하였다.

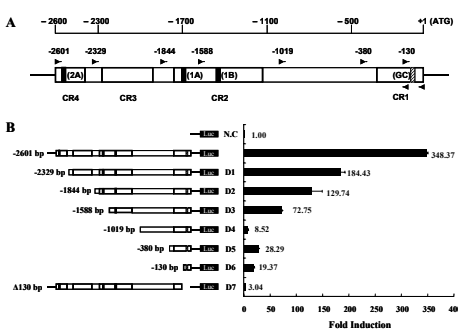


Figure 13. hOCT4 gene 5' upstream region (-2601~-1)의 기능적 분석. CR: conserved region.

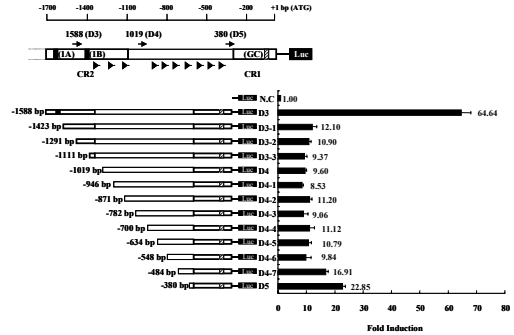


Figure 14. hOCT4 gene 5' upstream region (-1588~-380)의 기능적 분석. CR: conserved region.

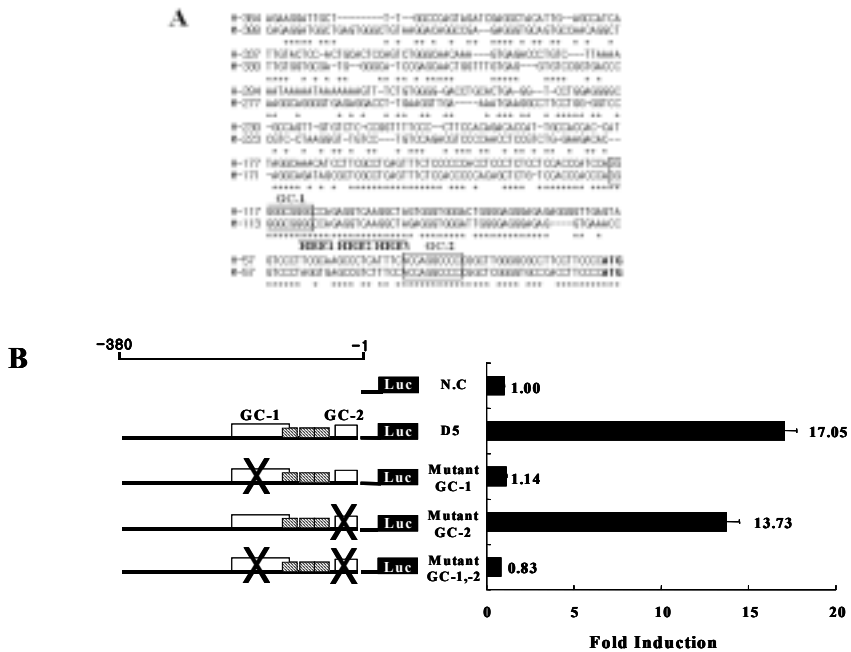


Figure 15. hOCT4 proximal promoter region에 존재하는 GC box의 기능적 분석. A, Human과 mouse OCT4 promoter conserved region 1의 염기서열 비교. B, GC box의 hOCT4 promoter activity에 미치는 영향을 알아보았다.

2) hOCT4 proximal promoter region에 존재하는 GC-1 site에 binding하는 전사인자의 규명

hOCT4 proximal promoter region에 존재하는 GC-1 site에 binding하여 promoter activity에 영향을 미치는 전사인자를 발굴하기 위하여 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)를 실시하였다 (그림 16). 이를 위해 wild type GC-1 site와 GC-1 site에 mutation이 유기된 oligonucleotide (그림 16A)를 probe로 NCCIT nuclear extract를 이용하여 EMSA를 실시한 결과, wild type probe에는 5종류의 nuclear protein들 (C1-C5)이 GC-1 site에 binding하였으나, mutant probe에는 nuclear protein의 binding이 관찰되지 않았다 (그림 16B,C, lane 2, 3). 또한 nuclear protein들이 GC-1 site에 특이적으로 binding하는지를 규명하기 위하여 cold wild type 및 cold mutant probe를 이용하여 competition assay를 실시한 결과, cold wild type probe를 competitor로 사용한 경우에는 모든 band들이 관찰되지 않았지만 (그림 16B, lane 4), cold mutant probe를 이용한 경우에는 nuclear protein들의 binding activity에 영향을 미치지 않았다 (그림 16B, lane 5). 이는 nuclear protein들이 GC-1 site에 특이적으로 binding하였다는 것을 시사한다.

GC-1 site에 특이적으로 binding하는 전사인자를 규명하기 위하여 GC-1 site에 특이적으로 binding할 것으로 예측되는 Sp family 전사인자가 그림 16B, C lane 2에서 관측된 인자중에 존재하는지를 Gel-supershift assay를 실시하여 조사하였다 (그림 16C). 그림 16C의 lane 4, 5에 나타낸 바와 같이 Sp1 특이항체를 첨가한 경우에는 C1 band가 supershift가 일어났으며, Sp3 특이 항체를 첨가한 경우에는, C2 band가 사라진 것을 확인하였다. 이상의 결과는 GC-1 site에 Sp1 및 Sp3 전사인자가 특이적으로 binding하였다는 것을 확인하였다.

3) Sp1 and Sp3 전사인자가 hOCT4 promoter activity에 미치는 영향
상기 그림 5의 결과를 바탕으로 Sp1 과 Sp3가 hOCT4 promoter activity에 미치는 영향을 조사하기 위하여 NCCIT cell을 이용하여 co-transfection assay를 실시하였음. 그림 17에서 보인바와 같이, hOCT4(-2601~-1) 및 hOCT4(-380~-1) construct를 이용한 경우 Sp1은 유의하게 promoter activity를 증가시킨 반면, Sp3는 promoter activity를 감소시키는 것을 확인하였다. 그림 17의 결과를 통하여, Sp1은 positive, Sp3는 negative regulator로 작용하여 hOCT4 promoter activity에 영향을 미치는 것을 확인하였다.

4) hOCT4 gene 5' upstream region의 특성

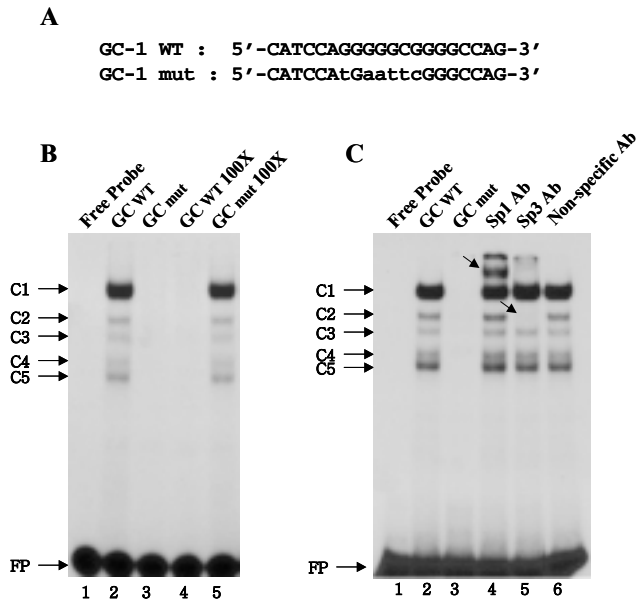


Figure 16. GC-1 site에 binding하는 NCCIT nuclear protein의 조사. A, GC-1 site wild type 및 mutant 염기서열. B, Electrophoretic mobility shift assay. C, Gel supershift assay.

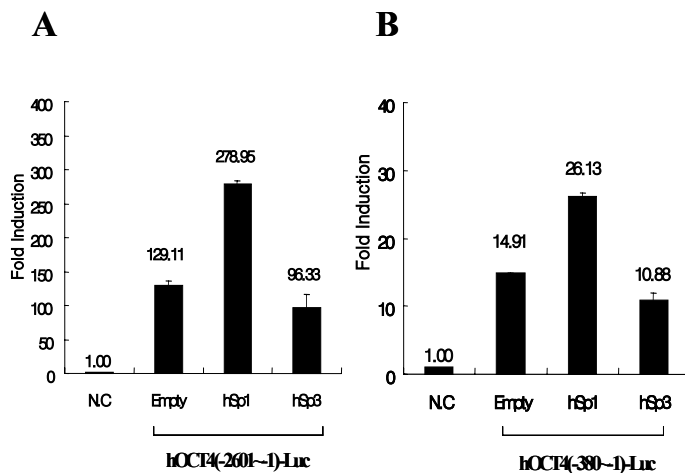


Figure 17. Sp1 및 Sp3 전사인자의 hOCT4 promoter activity에 미치는 영향.

이상의 그림 1에서 그림 17의 결과를 종합하여 hOCT4 gene 5' upstream region의 특성, hOCT4 promoter activity에 중요한 영향을 미치는 regulatory element 및 minimal promoter region에 binding하여 hOCT4 promoter activity에 영향을 미치는 전사인자를 규명하였다. (그림 18).

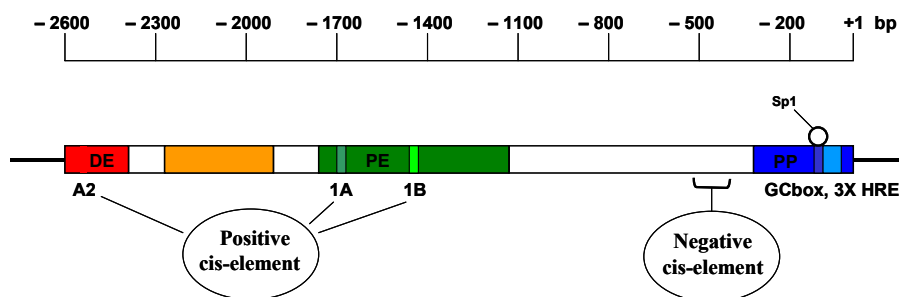


Figure 18. hOCT4 5' upstream region의 구조적 도해. DE: distal enhancer, PE: proximal enhancer, PP: proximal promoter, HRE: hormone responsive element.

3. 외래유전자 도입을 위한 non-liposomal gene delivery reagent의 개발

저비용 고효율의 외래유전자 전달체를 개발하고자 인간배아줄기세포내 외래유전자의 효과적인 전달체로 알려진 non-liposomal gene delivery reagent인 PEI의 이용을 극대화하고자 branched 25kD PEI를 이용하였다. 이를 위해 EGFP 발현 vector를 외래유전자로 이용하여 PEI에 존재하는 Nitrogen (N)과 외래유전자에 존재하는 phosphate (P)의 최적의 N/P ratio를 결정하고자 N/P ratio를 조사한 결과, 그림 19에 보인바와 같이 줄기세포의 일종인 NCCIT cell line과 일반 cancer cell line에서 N/P ratio가 높을수록 외래유전자의 전달 효율이 우수하였으며, N/P=40이 가장 효과적이었으며, 그 이상의 ratio에서는 더 이상의 상승효과가 관찰되지 않았다. 또한, 상품화된 고가의 liposomal (Lipofectamine 2000, Invitrogen), non-liposomal (Effectine, Qiagen; Linear 22Kd PEI [ExGen500], Fermentas) gene delivery reagent와의 효율을 비교한 결과 동등한 효과를 나타내었음. 특히, 동일 PEI 계열의 상품화된 고가의 linear 22kD PEI (Exgen 500)와도 줄기세포의 일종인 NCCIT cell line과 HEK293T cell line에서 동등한 효과 얻었

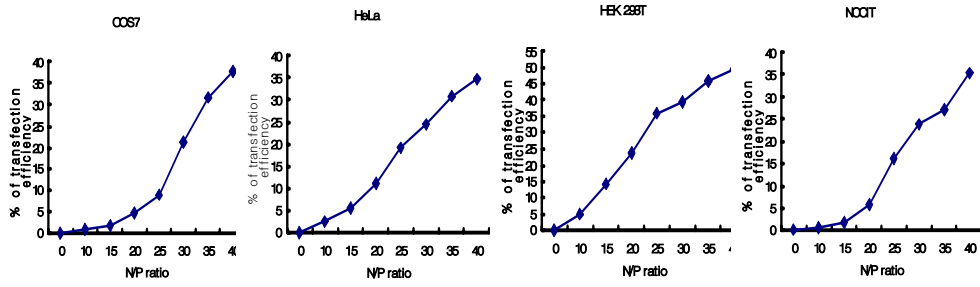


figure 19. Polyethylenimine과 외래유전자 N/P ratio에 따른 transfection 효율

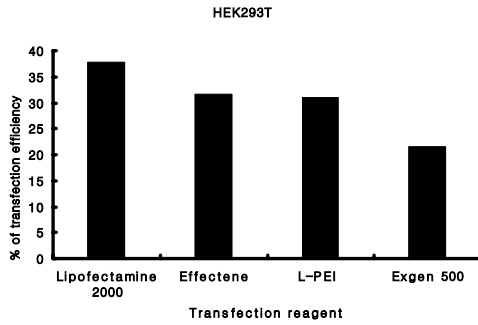


figure 20. Transfection reagents의 transfection efficiency 비교

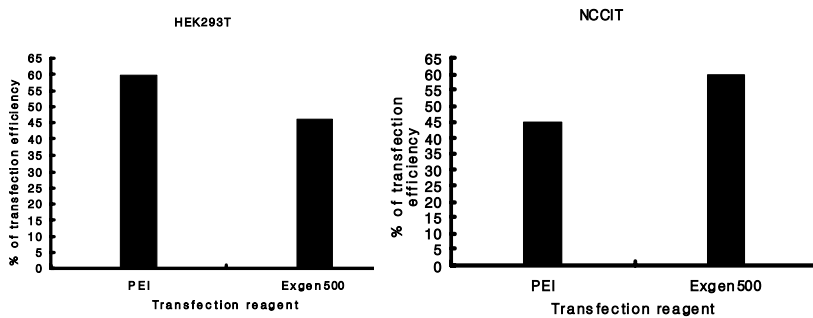


figure 21. Branched 25kD PEI와 Exgen500과의 transfection efficiency 비교

제 3 절 유용 유전자 및 발현벡터 개발

1. 유전자 적중 재조합 baculovirus vector의 개발

기 확보된 재조합 baculovirus vector의 CMV-promoter의 시작 부분과 끝 부분에 in vitro mutagenesis 기법을 이용하여 제한효소 절단부위(BstI-ApaLI)를 삽입한 후 pRNAi vector의 U6 promoter 부분을 같은 방법으로 절단하여 CMV-promoter 대신 삽입한다. 특정 유전자 발현을 적중시키기 위해 EcoRI-적중primer-gcccgggc-적중primer-BamHI의 유전자 적중 cassette를 벡터의 multiple cloning site에 삽입하여 유전자 적중 재조합 baculovirus vector를 완성한다. 또한 CMV-promoter의 장점을 활용하기 위하여 baculovirus 벡터의 multiple cloning site에 적중 cassette만 삽입한 벡터를 역시 제작 하였다.

돼지 fibroblast 세포(그림 22)는 10% fetal bovine serum (FBS)이 포함된 DMEM media에서 배양되었다. 하지만 일반 배양액에서는 3대 이상의 계대배양이 이루어 지지 않았다. 효과적인 배양체계를 확립하기 위하여 기본 배양액 (L15 + 10% FBS)에 50mIU Estrogen과 20ng/ml IGF-I을 첨가하여 최적의 배양체계를 확립하여 8대 이상의 계대배양을 유지할 수 있었다 (그림 23). 50mIU 이상의 Estrogen 첨가시 초기 유선상피세포의 계대배양 회수는 증가하지 않았고 약 4대에서 정지하는 양상을 보여주었다.



figure 22. 돼지 fibroblast세포

따라서 L15 배양액에 10% FBS와 50mIU의 Estrogen을 초기 배양 조건으로 선택하고, 유선상피 세포의 성장에 필수적인 Insulin-like growth factor(IGF)-I의 첨가 조건을 선택하였다. IGF-I을 20ng/ml 첨가 했을때 세포의 계대 배양 회수가 10회 이상으로 급격히 증가하는 것을 보여 주었고, 20ng/ml 이상의 IGF-I 첨가는 계대배양의 회수를 증가시키지 않았다. 따라서 본 실험을 통해 초기 유선상피세포를 효과적으로 채취하는 기술이 확립되었고, 체계적인 최적의 배양 조건을 확립하였다. 배양조건: DMEM + 10% FBS + 50mIU Estrogen + 20ng/ml IGF-I.

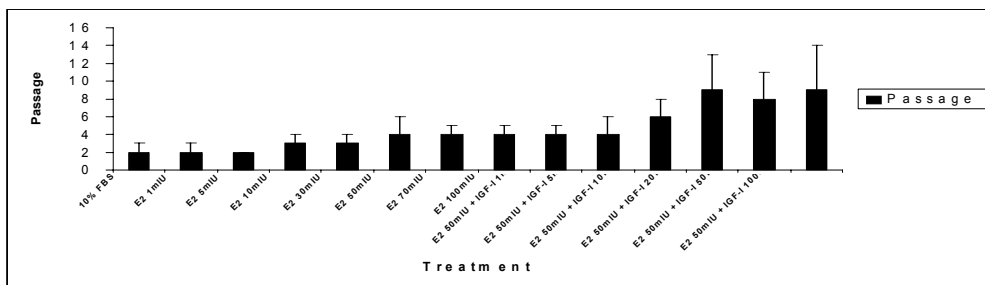


figure 23. 돼지 fibroblast 세포 배양체계 확립

2. GATA(alpha-1,3-galactosyl transferase) 유전자 확보 및 in vitro mutagenesis

GATA cDNA를 확보하기 위해 돼지의 정소 세포로부터 mRNA를 추출한 후 5'-gaggagaaaataatg-3' 과 5'-caatttaaagtcag-3' primer를 이용해 full-length GATA cDNA를 cloning 하였다. GATA 유전자의 활성을 억제시키기 위하여 임의로 5개 부위의 amino acid를 Site-directed in vitro mutagenesis kit(promega)을 사용하여 돌연변이 시켰다. 돌연변이 시킨 부위와 돌연변이된 amino acid는 G5A, S45A, C226A, N296A, C301A 이다.

기 확보된 재조합 baculovirus vector의 CMV-promoter의 시작 부분과 끝 부분에 in vitro mutagenesis 기법을 이용하여 제한효소 절단부위(BstI-ApaLI)를 삽입한 후 pRNAi vector의 U6 promoter 부분을 같은 방법으로 절단하여 CMV-promoter 대신 삽입한다. 특정 유전자 발현을 적중시키기 위해 EcoRI-적중primer-gcccgggc-적중primer-BamHI의 유전자 적중 cassette를 벡터의 multiple cloning site에 삽입하여 유전자 적중 재조합 baculovirus vector를 완성한다. 또한 CMV-promoter의 장점을 활용하기 위하여

baculovirus 벡터의 multiple cloning site에 적중 cassette만 삽입한 벡터를 역시 제작 하였다(그림 3).

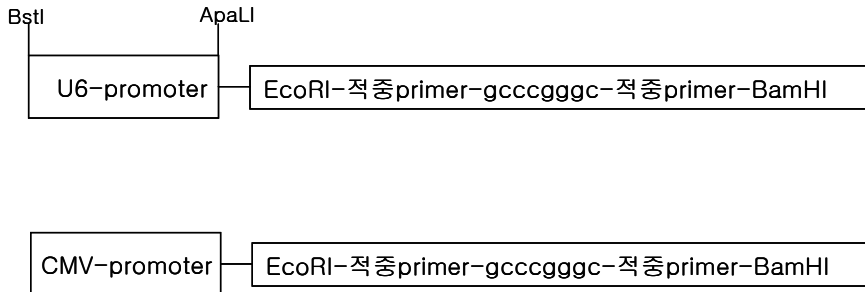


figure 24. 유전자 적중 Baculovirus vector

3. 돼지 fibroblast 세포에 재조합 GATA(돌연변이) 유전자 발현 및 GATA 유전자 적중

돼지 fibroblast 세포에 돌연변이 GATA 유전자를 발현 시키기 위해 재조합 baculovirus 벡터에 wildtype 및 돌연변이 GATA 유전자를 삽입하여 바이러스 제작 과정에 의해 재조합 baculovirus를 제작 하였다. 또한 GATA 유전자 적중을 위해 유전자 적중 재조합 baculovirus 벡터에 5'-ggcagcagtgctcagagg-gcccgggc-cctctgagcactgctgcc-3' cassette를 삽입하여 GATA 유전자를 적중시킬 수 있는 baculovirus 벡터를 제작하고, 바이러스 제작 과정을 따라 재조합 baculovirus를 제작하였다. 제작된 바이러스들은 돼지 fibroblast 세포에 주입하여 재조합 유전자들을 발현 시키고 G418, neomycin으로 selection 하여 cell line을 형성하였다.

GATA cDNA를 확보하기 위해 돼지의 정소 세포로부터 mRNA를 추출한 후 5'-gaggagaaaataatg-3' 과 5'-caatttaaagtcag-3' primer를 이용해 full-length GATA cDNA를 cloning 하였다. 현재 돼지 GATA 단백질에 대한 항체가 제작 되지 않은 관계로 단백질 발현 정도를 비교하기 위하여 Flag이라는 epitope tag 을 돼지 GATA cDNA에 부착하여 단백질 발현정도를 쉽게 관찰하고자 하였다. GATA 유전자의 활성을 억제시키기 위하여 임의로 5개 부위의 amino acid를 Site-directed in vitro mutagenesis system(promega)을 사용하여 돌연변이 시켰다. 돌연변이 시킨 부위와 돌연변이된 amino acid는 G5A, S45A, C226A, N296A, C301A 이다.

라. 돼지 fibroblast 세포에 재조합 GATA(돌연변이) 유전자 발현 및 GATA 유전자 적중
 돼지 fibroblast 세포에 돌연변이 GATA 유전자를 발현 시키기 위해 재조합 baculovirus 벡터에 wildtype 및 돌연변이 GATA 유전자를 삽입하여 바이러스 제작 과정에 의해 재조합 baculovirus를 제작 하였다. 또한 GATA 유전자 적중을 위해 유전자 적중 재조합 baculovirus 벡터에 5'-ggcagcagtgctcagagg-gcccgggc-cctctgagcactgctgcc-3' cassette를 삽입하여 GATA 유전자를 적중시킬 수 있는 baculovirus 벡터를 제작하고, 바이러스 제작 과정을 따라 재조합 baculovirus를 제작하였다. 제작된 바이러스들은 돼지 fibroblast 세포에 주입하여 재조합 유전자들을 발현 시키고 G418, neomycin으로 selection 하여 cell line을 형성하였다.

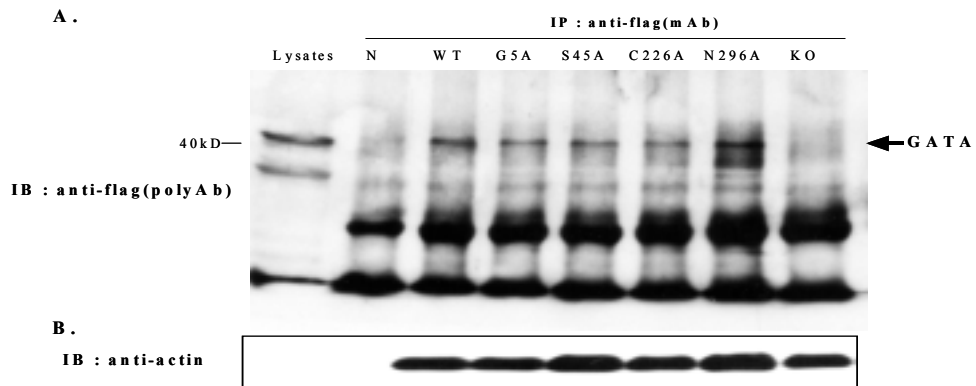


figure 25. GATA 유전자의 발현과 적중

돼지 fibroblast 세포에 Flag epitope tag이 부착된 wildtype GATA, G5A, S45A, C226A, N296A 유전자를 baculovirus system을 이용하여 발현시킨 후 monoclonal anti-flag antibody를 이용하여 immunoprecipitation을 한 후 polyclonal anti-flag antibody로 immunoblotting을 실시하였다(그림 25). wildtype GATA 유전자와 4개의 돌연변이 GATA 유전자는 효과적으로 돼지 fibroblast 세포에 도입되었고, 발현됨을 확인할 수 있었다. 또한 유전자 적중 벡터 시스템(KO)을 이용한 결과 도입되었던 Flag-GATA 유전자의 발현이 효과적으로 감소되어 GATA 유전자를 도입하지 않은 세포(N)에서 보여준 것과 같은 결과를 보여 주었다. 돌연변이 GATA 유전자를 성공적으로 생산해 내었다. 차기년도 과제에서는 GATA 유전자의 적중과 돌연변이 GATA 유전자들이 급속면역 거부 반응에 관여하는 다양한 단백질의 glycosylation에 미치는 영향을 분자 생물학적 방법으로 규명해 나갈 것이다.

제 4 절 핵이식 기술에 의한 형질전환 수정란 생산

1. 핵이식한 수정란의 배반포 단계에서의 총세포수 및 세포사멸에 관여하는 유전자의 발현

가. 미성숙 난의 성숙

도축장에서 도살되는 가축으로부터 난소를 회수하여 체외성숙 유도는 다음과 같이 실시하였다. 즉 도축장에서 도축한 돼지 난소를 회수하여 39℃ 멸균생리식염수가 들어있는 보온병에 담아 1시간 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 재차 멸균생리식염수로 세척한 다음 70 % 알콜스폰지를 이용하여 난소의 표면을 소독한 다음, 18 gauge의 주사침을 이용하여 2-6mm 크기의 가시난포에서 회수된 난포란 중 난구세포가 치밀하게 부착되고 난자의 세포질이 균일한 것만을 선별하여 본 실험에서 공시하였다.

돼지 난소의 경우 신선한 생리식염수로 다시 세척하고 18gauge 가 장착된 주사기로 직경 2~7mm인 난포란으로부터 난자를 채취한다. 미성숙난자의 체외성숙은 TCM-199 (Sigma) 배양액으로 0.014mM sodiumbicarbonate, 와 0.2ml/100ml prnicillin/streptomycin을 첨가하고, hormones은LH(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), FSH(35 $\mu\text{g}/\text{ml}$), estradiol-17 β (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가하며, 10 % FBS를 첨가하여 5% CO₂, 98~99% 습도, 39℃ CO₂ incubator 에서 44 시간 동안 체외성숙을 유도하였다.

나. 체세포의 준비

골다공증 치료제로 알려져 있는 hPTH를 생산하는 형질전환 돼지의 생산에 사용하기 위하여 *hPTH* 유전자를 효율적으로 발현하는 돼지세포를 구축하는데 있다. 이를 위하여 유전자 전이 수단으로 retrovirus vector system을 사용하였다. TRE vector와 Tet-On vector를 동시에 도입해야 외래 유전자의 발현이 이루어지는 형태를 one vector system으로 재조합하여 기존의 tetracycline-inducible expression vector의 단점을 보완하였으며 내부 promoter의 종류도 CMV promoter뿐만 아니라 RSV promoter도 대상으로 하였다. pLNR-PTH, pLNR-PTH-WPRE, pRevTRE-PTH- RSVp-rtTA, pRevTRE-PTH-WPRE-RSVp-rtTA, pRevTRE-PTH-RSVp-rtTA- WPRE 의

제조합된 5개의 retrovirus vector를 각각 PT67 (Clontech, USA) virus 생산세포에 calcium phosphate 방법으로 transfection한 후 수확한 virus를 포장세포인 GP293에 infection하였다. LNR-PTH와 LNR-PTH-WPRE retrovirus에 감염된 PFF 세포에서의 *PTH* 유전자의 전이를 확인하였고 tet system에서 생산된 retrovirus에 감염된 PFF 세포에서도 *PTH* 유전자 전이 확인한 후 형질전환 수정란 생산을 위한 핵이식에 제공하였다.

다. 체세포 핵이식

체세포 핵이식 방법은 Kato 등(1999) 방법에 준하여 실시하였다. 성숙된 난자는 0.5% hyaluronidase로 처리하고 HEPES buffered TCM에서 pipetting으로 난구세포를 제거하였다. 난자의 탈핵은 7.5 μ g/ml 의 cytochalasin B가 첨가된 PBS에서 1시간내에 실시하고 탈핵의 여부는 Hoechst 33342 염색하여 확인하였다. 탈핵 후 준비된 귀 상피세포를 난자의 위관강내에 조심스럽게 주입하여 핵이식란을 작출하였다. 작성된 핵이식란은 0.3M mannitol로 채워져 있는 electric chamber에 1.0mm 간격의 전극막대 사이에 조심스럽게 정렬을 시켰다. 세포의 융합은 Electro Cell manipulator BTX 2001로 통전압은 125V/mm, 통전시간은 25 μ sec으로 하고 15 분 간격으로 2회 통전하여 융합을 유도하였다. 융합된 핵이식란의 활성화를 위하여 5 μ M ionomycin에서 5분간 처리하고 1.99mM 6-dimethylaminopurine (DMAP)에서 3시간 배양기내에서 배양하였다. 활성화 이후 핵이식란은 mouse fibroblast로 feeder layer cells을 형성한 NCSU 23 배양액에서 7일 간의 배양을 하면서 분할율과 배발달율, 세포수 및 세포수멸 상황을 조사하였으며 TUNEL assay를 통하여 핵이식난자와 정상수정란의 세포사멸을 비교분석하였다.

Table 25-1. 핵이식 한 돼지 수정란의 체외에서의 발달상황

No. of oocyte	Fusion rate (%±SEM)	Cleavage per oocytes (%±SEM)	Blastocysts per cleaved embryos (%±SEM)
429	69.1±2.8	61.3±3.9	15.5±4.1

Table 25-2. 핵이식 한 돼지 수정란의 세포수 및 세포사멸

No. of oocyte	Fusion rate (%±SEM)	Blastocysts (%)	Cell numbers	Apoptosis index (%)
248	6891±3.0	9.1±2.4	36.1±11.3	7.8±0.8

라. 형질전환된 복제 수정란의 세포학적 평가

체외성숙 시점으로부터 수정이 이루어진 난자는 난구세포를 분리한 후 25% glycerol, 50mM KCl, 0.5mM MgCl₂, 0.1mM EDTA, 1mM 2-mercaptoethanol, 50mM imidazole, 4% Triton-X 100, pH 6.7 buffer에 노출 후 -10°C methanol에서 고정시켰다. 고정 후 4% Triton-X 100와 0.5% BSA가 함유된 PBS를 가지고 세척하였다. 다음 fluorescein-conjugated dUTP and the terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme (Roche, USA)으로 37도에서 1시간 배양하고 이어서 propidium iodide (PI)에서 1시간동안 배양하여 사멸된 세포수와 총세포수를 조하였다. 이로부터 핵이식한 난자가 정상적으로 수정된 난자보다 세포사멸이 더 많이 일어남을 알 수 있었다.

마. 형질전환 된 복제 수정란의 분자 생물학적 평가

Messenger RNA 추출은 Wrenzycki et al(1999)의 방법으로 Dynabeads mRNA Direct Kit를 사용하였다. 간략하게 설명하면 난자 또는 배아를 PBS에서 세척한 후 액체질소 또는 -80°C에 보관하였다가 사용한다. 시료에 Lysis/Binding Buffer(100mM Tris-Hcl, pH 7.5, 500mM LiCl, 10mM EDTA, 1% LiDS, 5mM DTT) 150μl를 넣어 세포를 용해시킨다. 그리고 시료에 1pg의 rabbit globin mRNA를 본질적인 표준으로써 각각 넣어준다. 실온에서 5분동안 섞어준 후, Dynabeads Oligo (dT)25를 20μl를 용해된 세포가 들어있는 튜브에 각각 넣어 주고 실온에서 5분동안 상보적 결합을 이루어지도록 섞어준다. Beads는 Dynal MPC-S magnetic particle concentrator에 의해 분리되며, Washing bufferA(10mM Tris-Hcl, pH 7.5, 0.15M LiCl, 1mM EDTA, 0.1% LiDS)300μl로 두 번 washing을 해주고 washing buffer B(10mM Tris-Hcl, pH 7.5, 0.15M

LiCl, 1mM EDTA) 150 μ l로 한번 washing을 해준다. Poly(A) RNAs는 65 $^{\circ}$ C에서 2분동안 10 μ l의 Tris-HCl(10mM Tris-HCl, pH 7.5)과 함께 반응시킨 후 beads로부터 용출한다. 그리고 이 용출액은 역전사를 위해 즉시 사용된다. 역전사는 0.5 μ g/ μ l oligo(dT) 12 18, 10XRT buffer(200mM Tris-HCl; pH 8.4, 500mM KCl), 25mM MgCl₂, 0.1M DTT, 10mM dNTPS Mix 그리고 Superscript II RT로 최종 볼륨 20 μ l에서 42 $^{\circ}$ C, 50분동안 수행된다. 반응은 70 $^{\circ}$ C에서 15분동안 배양한 후 종결된다.

바. PCR Amplification

다중합효소 연쇄 반응은 RT product 5 μ l로 수행되었다. 반응은 10XPCR buffer, Taq DNA polymerase 2.5 units, 10mM dNTP, 10pM sequence-specific primers를 최종농도 50 μ l에서 GeneAmp PCR System 2700에서 수행하였다. PCR cycle은 35 cycle이고 95 $^{\circ}$ CX5', 95 $^{\circ}$ CX30", 55 $^{\circ}$ CX1'30", 72 $^{\circ}$ CX1'30"이다. RT-PCR products는 1 μ l/ml ethidium bromide가 들어있는 1XTAE buffer로 1.5% agarose gels을 만들어 ultraviolet lightdkfo에서 관찰하였다. 각 band의 intensity는 image analysis program을 사용하여 densitometry로 측정하였다. mRNA의 상대적인 양은 globin을 standrd로 해서 상대적인 양을 구한다.

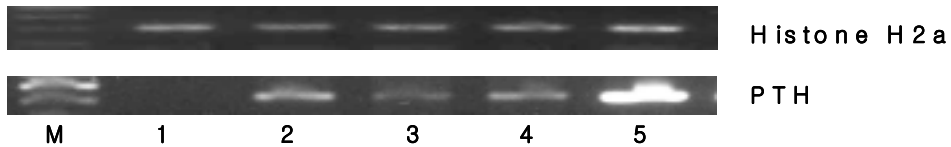
사. 전기영동 (Electrophoresis)

상기 DNA PCR 반응산물에 대하여 전기영동을 수행하였다.

상기 PCR 산물을 1% 아가로스 겔에서 전기영동하여 반응의 유무를 확인하고, 6% denaturing polyacrylamide gel (6% acryamide solution, 7M urea, 1X TBE buffer)을 준비하여 TEMED (Biorad, USA)와 10% Ammonium persulfate를 첨가하여 겔을 굳히고, 겔 플레이트를 약 50 $^{\circ}$ C가 될 때까지 pre-run시켜, 각각의 PCR 산물 6 μ l에 STR 3X 로딩 완충액 (10mM NaOH, 95% formamide, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol FF) 3 μ l를 첨가하여 95 $^{\circ}$ C에서 2분간 denaturing 시킨 후에 즉시 얼음에 꽂아두고, 그 중 6 μ l를 각 well에 로딩하여, 1,900Volts에서 50mA, 75W로 3시간동안 SQ3 sequencer (Hoefer Pharmacia Biotech Igc., USA)에서 전기영동하였다.

Table 1. Primers used for PCR.

Genes	Primer sequences (positions)	Fragment size (bp)
Histone H2a	5'-GTGGCAAACAGGGAGGCAAG 3'-TTCCGCGGTCAGGTACT	207
PTH	5'- TCAGCATCAGCTACTAACATACCTG 3'-CTGTTTTTCATTTTCACTGGGATT	420



M : DNA marker
 Line 1 : control (PTH -)
 Line 2~4 : Treated groups (PTH +)
 Line 5 : somatic cells used for line 2~4

Figure 26. 형질전환된 LNR-PTH 체세포를 이용하여 핵이식한 수정란(배반포)의 RT-PCR 결과. House keeping 유전자인 histone H2A는 Control, LNR-PTH 체세포로 핵이식한 배반포, 및 LNR-PTH 체세포에서 모두 발현되었지만, LNR-PTH 유전자는 LNR-PTH 체세포로 핵이식한 배반포에서만 발현되었음.

2. IGF-I를 배양액에 첨가시 돼지 수정란의 발달 조사

핵이식 난자의 발달율과 배아의 질을 향상시키기 위하여 돼지 단위발생 난자를 이용하여 배양액에 100ng/ml의 IGF-2를 첨가하여 배반포까지의 발달율, 배반포에서의 총세포수 및 세포사멸과 세포사멸에 관여하는 유전자의 발현양상을 조사하였다.

도축장에서 난소를 회수하여 실험실까지 운반한 후 18G 주사기를 이용하여 난구세포-미성숙난자의 복합체를 회수한다. TCM-199 배양액에서 5% CO₂, 39도의 incubator에서 44시간 체외성숙시킨다. 성숙된 난자는 전기자극법을 이용하여 활성화시킨후 cyclohexamide에서 3시간동안 배양한후 계속하여 NCSU 23 배양액에서 30시간동안 발달시킨다. 30시간후 2-세포기에 있는 세포를 회수하여 NCSU 23 배양액에 0.1% PVA 혹은 0.4% BSA를 첨가하고 각 배양액마다 0, 10 혹은 100ng/ml의 IGF-2를 첨가하여 발달율, 세포수 및 세포사멸과 그에 관련된 유전자를 real-time PCR를 통하여 조사하였다.

Table 2. 실험에 사용된 Primer의 sequence.

Gene	Genbank accession no	Primer sequence	Annealing tem. (C)	Amplification size (bp)
beta-actin	U07786	5' ACTACCTCATGAAGATCCTC 3' ATCTCCTTCTGCATCCTGTC 5' GGAGCTGGTGGTTGACTTTC	55	391
Bcl-xL	AF216205	3' TAGGTGGTCATTCAGGTAAGG 5' AAGTTCCCAAGCAAGGGATT	55	518
Fas	AJ001202	3' AATTTCCCATTTGTGGAGCAG 5' CTAGAACCTAGCAGCACCAT	55	207
Bak	AJ001204	3' CGATCTTGGTGAAGTACTC	55	151

가. IGF-I가 첨가된 배양액에서 발달율의 조사

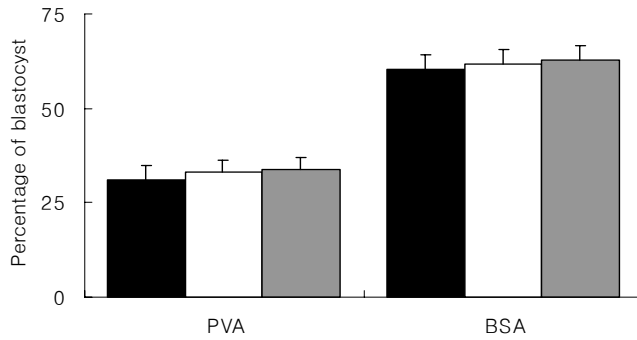


Figure 27. 2-세포기에 있는 세포를 회수하여 NCSU 23 배양액에 0.1% PVA 혹은 0.4% BSA를 첨가하고 각 배양액마다 0, 10 혹은 100ng/ml의 IGF-2를 첨가하였을때의 배반포까지의 발달율. 발달율에는 PVA/BSA 및 IGF-2 첨가의 유무에 상관없이 통계적인 차이가 없었다.

나. IGF-I가 첨가된 배양액에서 발달시켰을 때 세포수의 조사

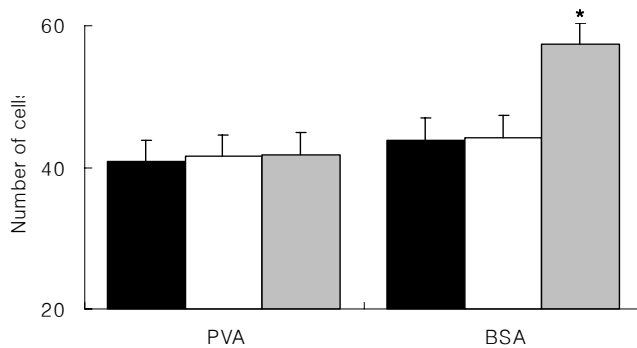


Figure 28. 2-세포기에 있는 세포를 회수하여 NCSU 23 배양액에 0.1% PVA 혹은 0.4% BSA를 첨가하고 각 배양액마다 0, 10 혹은 100ng/ml의 IGF-2를 첨가하였을때의 배반포에서의 총세포수. 0.4% BSA가 존재하는 배양액에 100ng/ml의 IGF-2를 첨가하였을때 세포수가 유의적으로 증가하였다. ($P < 0.01$)

다. IGF-I가 첨가된 배양액에서 발달시켰을 때 세포사멸

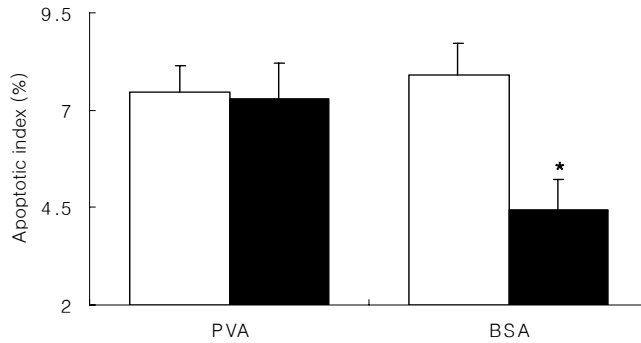


Figure 29. 2-세포기에 있는 세포를 회수하여 NCSU 23 배양액에 0.1% PVA 혹은 0.4% BSA를 첨가하고 각 배양액마다 0 혹은 100ng/ml의 IGF-2를 첨가하였을 때의 배반포에서의 총세포수. 0.4% BSA가 존재하는 배양액에 100ng/ml의 IGF-2를 첨가하였을 때 세포사멸이 유의적으로 감소하였다 ($P < 0.01$).

라. IGF-I가 첨가된 배양액에서 발달시켰을 때 세포사멸에 관련된 유전자의 조사.

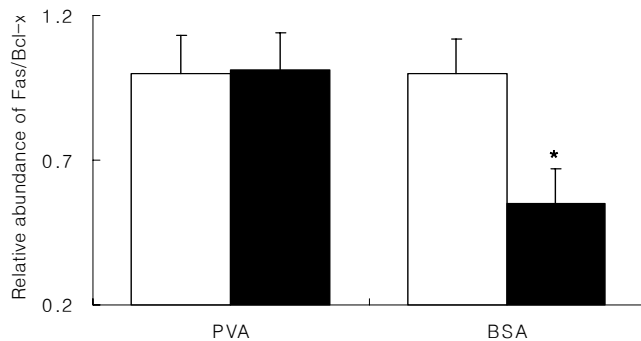


Figure 30. 2-세포기에 있는 세포를 회수하여 NCSU 23 배양액에 0.1% PVA 혹은 0.4% BSA를 첨가하고 각 배양액마다 0 혹은 100ng/ml의 IGF-2를 첨가하였을 때의 배반포에서의 세포사멸 관련 유전자의 발현. 0.4% BSA가 존재하는 배양액에 100ng/ml의 IGF-2를 첨가하였을 때 세포사멸 관련 유전자 Fas/Bcl-xL의 비율이 유의적으로 감소하였다 ($P < 0.01$).

마. IGF-I가 첨가된 배양액에서 발달시켰을 때 세포사멸에 관련된 유전자의 조사

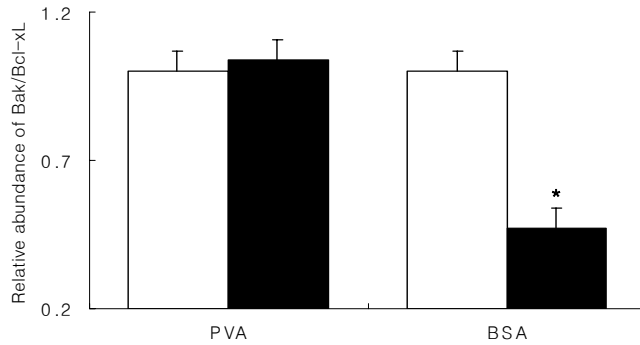


Figure 31. 2-세포기에 있는 세포를 회수하여 NCSU 23 배양액에 0.1% PVA 혹은 0.4% BSA를 첨가하고 각 배양액마다 0 혹은 100ng/ml의 IGF-2를 첨가하였을 때의 배반포에서의 세포사멸 관련 유전자의 발현. 0.4% BSA가 존재하는 배양액에 100ng/ml의 IGF-2를 첨가하였을 때 세포사멸 관련 유전자 Bak/Bcl-xL의 비율이 유의적으로 감소하였다 ($P < 0.01$).

3. Polyamine의 각각 또는 복합체 및 polyamine의 생합성과정을 억제하는

효소인 DFMO 와 CHA를 배양액에 첨가하였을 때 세포의 발달, 세포수 및 세포사멸과 세포사멸에 관련된 유전자의 발현에 미치는 영향 조사

Polyamine은 작은 분자량의 aliphatic amin으로서 세포의 분화와 증식에 대하여 작용을 일으킨다. 그러므로 핵이식 수정난의 발달에도 좋은 영향을 줄것으로 고려되어 우선 단위발생난자를 토대로 조사해 보았다.

도축장에서 난소를 회수하여 실험실까지 운반한 후 18G 주사기를 이용하여 난구세포-미성숙난자의 복합체를 회수한다. TCM-199 배양액에서 5% CO₂, 39도의 incubator에서 44시간 체외성숙시킨다. 성숙된 난자는 전기자극법을 이용하여 활성화시킨후 cyclohexamide에서 3시간동안 배양한후 계속하여 NCSU 23 배양액에서 30시간동안 발달시킨다. 30시간후 2-세포기에 있는 세포를 회수하여 NCSU 23 배양액에 0.4% BSA를 첨가하고 각 배양액마다 putrescine, spermidine 및 spermine을 첨가하였으며, 또 putrescine, spermidine 및 spermine

의 복합체를 첨가하여 2세포기의 난자가 배반포까지의 발달을, 배반포에서의 총 세포수, 세포사멸 및 세포사멸에 관여하는 유전자의 발현을 real-time PCR를 통하여 조사하였다.

그 외에 polyamine의 생합성의 억제효소인 DFMO 및 CHA를 배양액에 첨가하였을 때 수정란의 발달, 세포수 및 세포사멸과 세포사멸에 관여하는 유전자, 그리고 polyamine의 생합성에 관여하는 효소인 ODC와 spermidine synthase의 mRNA 발현을 조사하였다.

Table 3. 본 실험에 사용된 primer의 sequence.

Genes.	Genbank acc. No.	.Sequence	Ann. Tem. (C)	Size
Histone H2a	BF703857	5'- gtg gca aac agg gag gca a 3'- ttt ccg cgg tca ggt act	60	391
Bcl-xL	AF216205	5'-gga gct ggt ggt tga ctt tc 3'-cta ggt ggt cat tca ggt aag	55	518
Bak	AJ001204	5'-cta gaa cct agc agc acc at 3'-cga tct tgg tga agt act c	60	151
Fas	AJ001202	5'-aag ttc cca agc aag gga tt 3'-aat ttc cca ttg tgg agc ag	60	207
Caspase 3	NM_214131	5'-gag gca gac ttc ttg tat gc 3'-cat gga cac aat aca tgg aa	55	236
ODC	U36394	5'-cac geg tat taa cgt gta ga 3'-cag cag ttg aag cct tta gt	60	263
Sermidine Synthase	BC000309 (ξ)	5'-gca gta aga cct atg gca ac 3'-gct tgt aac act tgg ttg gt	55	293

가. Polyamine의 각 구성성분 즉 putrescine, spermidine, spermine을 각각 0, 0.1, 1, 10uM 첨가하였을 때 배반포까지의 발달율의 조사

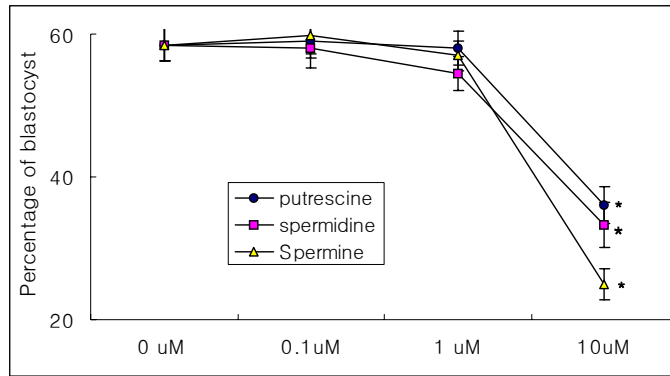


Figure 32. 2-세포기에 있는 세포를 회수하여 NCSU 23 배양액에 0, 0.1, 1, 10uM의 putrescien/spermidine/spermine를 각각 첨가하였을때 배반포까지의 발달율. 0.1 및 1uM을 첨가했을때는 대조군(0uM)과 차이가 없었으나 10uM을 첨가했을 때에는 발달율이 감소함. (P<0.05)

나. Polyamine의 각 구성성분 즉 putrescine, spermidine, spermine을 각각 0, 0.1, 1, 10uM 첨가하였을 때 배반포에서의 세포수의 조사

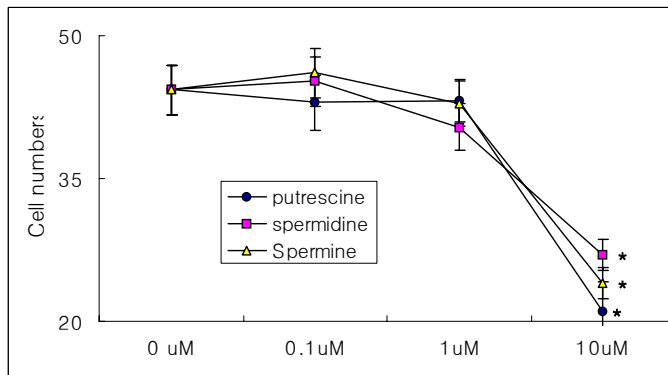


Figure 33. 2-세포기에 있는 세포를 회수하여 NCSU 23 배양액에 0, 0.1, 1, 10uM의 putrescien/spermidine/spermine를 각각 첨가하였을 때의 세포수. 0.1 및 1uM을 첨가했을 때는 대조군(0uM)과 차이가 없었으나 10uM을 첨가했을 때에는 세포수가 감소하였음 감소함 (P<0.05).

다. 3개의 polyamine (putrescien+spermidine+spermine)의 복합체를 0, 0.1 및 1 uM 첨가하였을 때 배반포까지의 발달율의 조사

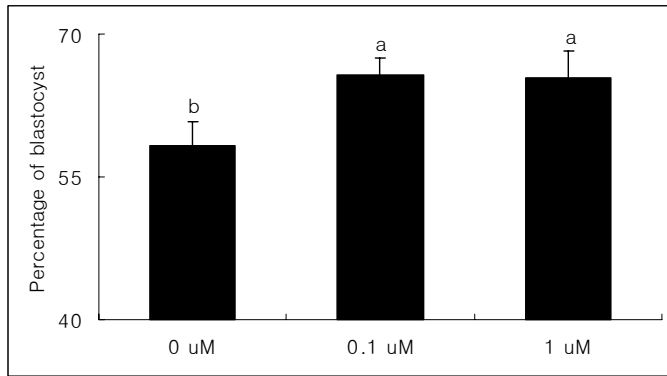


Figure 34. 2-세포기에 있는 세포를 회수하여 NCSU 23 배양액에 0, 0.1, 1uM의 putrescien+spermidine+spermine 복합체를 첨가하였을 때의 발달율. 0.1 및 1uM을 첨가했을 때는 대조군(0uM)과 에 비해 발달율이 유의적으로 증가하였음 ($P < 0.05$).

라. 3개의 polyamine (putrescien+spermidine+spermine)의 복합체를 0, 0.1 및 1 uM 첨가하였을 때 배반포에서의 세포수 및 세포사멸의 조사

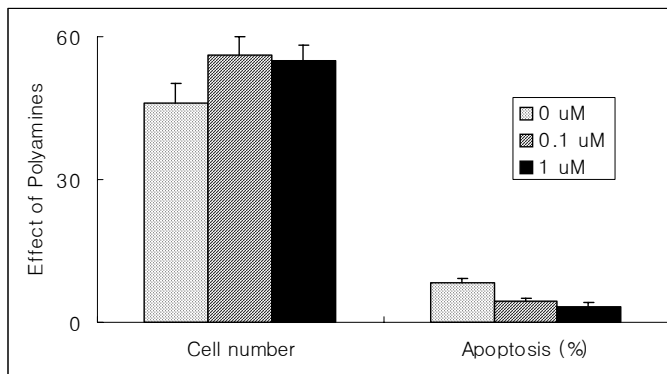


Figure 35. 2-세포기에 있는 세포를 회수하여 NCSU 23 배양액에 0, 0.1, 1uM의 putrescien+spermidine+spermine 복합체를 첨가하였을 때의 세포수. 0.1 및 1uM을 첨가했을 때는 대조군(0uM)과 에 비해 세포수가 유의적으로 증가하였고 세포사멸은 유의적으로 감소하였음 ($P < 0.05$).

마. Polyamine 의 생합성과정의 억제효소인 DFMO를 0, 5, 10 및 20mM 첨가하였을 때 배반포까지의 발달율의 조사

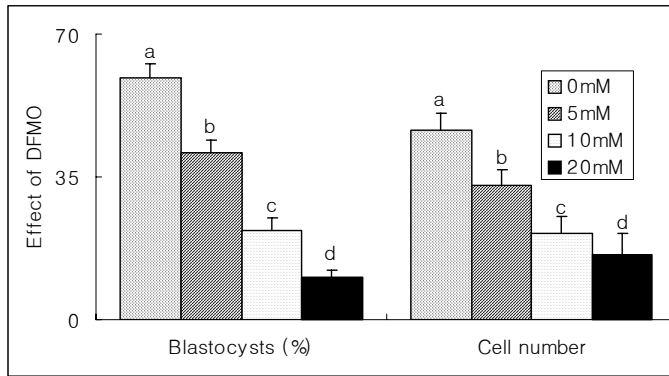


Figure 36. 2-세포기에 있는 세포를 회수하여 NCSU 23 배양액에 0, 5, 10, 20 mM의 DFMO를 첨가했을 때의 배반포까지의 발달율과 배반포에서의 세포수 DFMO를 첨가했을 때 발달율 및 세포수는 농도에 의존적으로 감소하였음.

바. Polyamine 의 생합성과정의 억제효소인 CHA를 0, 0.05, 0.5 및 1.0mM 첨가하였을 때 배반포까지의 발달율의 조사

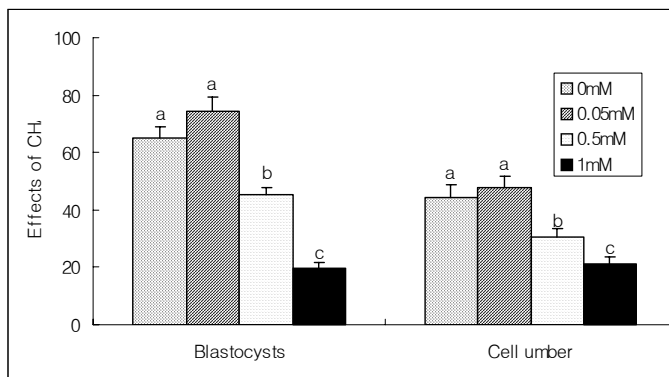


Figure 37. 2-세포기에 있는 세포를 회수하여 NCSU 23 배양액에 0, 0.05, 0.5 mM의 CHA를 첨가했을 때의 배반포까지의 발달율과 배반포에서의 세포수. CHA를 첨가했을 때 발달율 및 세포수는 농도에 의존적으로 감소하였음.

사. 3개의 polyamine (putrescien+spermidine+spermine)의 복합체를 0, 0.1 및 1 uM 첨가하였을 때 세포사멸에 관여하는 유전자 Fas/Bcl-xL, Bak/Bcl-xL 및 caspase 3와 polyamine의 생합성 효소인 ODC 및 spermidine synthase 의 mRNA 발현에 미치는 영향

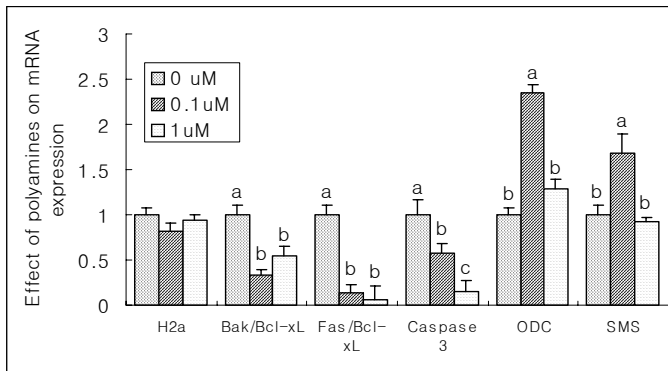


Figure 38. 2-세포기에 있는 세포를 회수하여 NCSU 23 배양액에 0, 0.1, 1uM의 putrescien+spermidine+spermine 복합체를 첨가하였을 때의 세포사멸에 관여하는 유전자의 발현. (P<0.05).

아. Polyamine 의 생합성과정의 억제효소인 DFMO를 0, 5, 10 및 20mM 첨가하였을 때 세포사멸에 관여하는 유전자 Fas/Bcl-xL, Bak/Bcl-xL 및 caspase 3와 polyamine의 생합성 효소인 ODC 및 spermidine synthase 의 mRNA 발현에 미치는 영향.

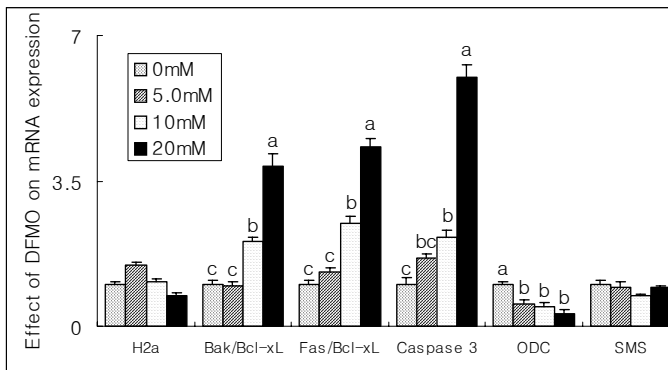


Figure 39. 2-세포기에 있는 세포를 회수하여 NCSU 23 배양액에 0, 5, 10 및 20mM의 DFMO 첨가하였을 때의 세포사멸에 관여하는 유전자의 발현. (P<0.05).

자. Polyamine 의 생합성과정의 억제효소인 CHA를 0, 0.05, 0.5 및 1.0mM 첨가하였을 때 세포사멸에 관여하는 유전자 Fas/Bcl-xL, Bak/Bcl-xL 및 caspase 3와 polyamine의 생합성 효소인 ODC 및 spermidine synthase 의 mRNA 발현에 미치는 영향

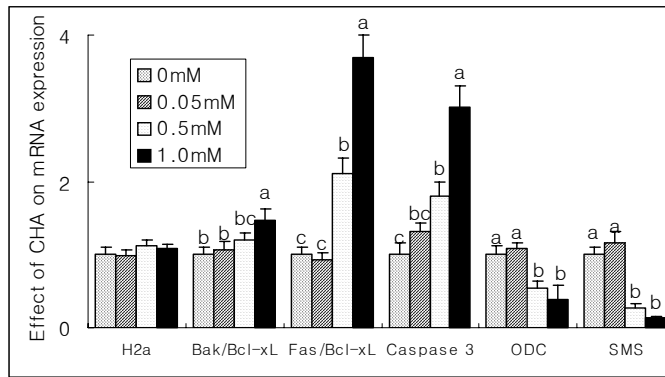


Figure 40. 2-세포기에 있는 세포를 회수하여 NCSU 23 배양액에 0, 0.05, 0.5 및 1.0mM의 CHA 첨가하였을 때의 세포사멸에 관여하는 유전자의 발현. ($P < 0.05$).

4. 돼지의 수정란에서 발생 및 genomic activation 관련 유전자의 확인

돼지 단위발생 수정란의 체외배양에서 2세포기와 배반포의 유전자 발현의 차이를 조사하였다. 돼지 단위발생 수정란을 이용하여 정상적인 수정란 및 핵이식란에서의 배아의 발달 및 genomic activation에 관여하는 유전자를 찾고자 2세포기와 배반포에서의 차이나는 유전자를 APC 방법을 통하여 비교분석하였다. I 각 mRNA 는 배반포와 2세포기의 세포로부터 분리를 하였고, 120개의 ACP-primer를 사용하였다. first-strand cDNA를 template로 하여, second-strand cDNAs를 합성하였고, arbitrary ACP primer와 dT-ACP2를 이용하여 PCR를 수행하였다. PCR의 첫 번째 단계는 65도에서 수행하였고, 이어서 55도에서 40 cycle를 수행하였다. 전기영동, cloning 및 염기서열분석과정을 거쳐 배반포와 2세포기의 세포에서 서로 다르게 발현하는 9개의 유전자를 확인할수 있었다. 확인된 유전자들은 다시 RT-PCR 및 Real time PCR를 수행함으로써 결과를 다시 한번 검증하는

조사단계를 거쳤다. 결과 9개의 유전자는 모두 ACP에서와 같은 발현 양상을 나타냈다. 다음 보편적으로 사용되고 있는 실험동물인 생쥐의 수정란을 이용하여 9개의 유전자를 real-time PCR를 통하여 다시 확인하였다.

table 4. 다르게 발현되는 유전자의 목록.

Functional role	Identifio	Clone	Genbank acc. no	Homology
Cytoskeleton reorganization	GDP-dissociation inhibitor 2(GDI-2)	C1	U07951 AF0273	Mouse 89% (1223/1363) Dog 88% (1182/13)
Nucleocytoplasmic traffic	Myotubularin related protein3 (MTMR3)	C7	NM_001494 BC002834	Human 87% (1185/1357) Rat 85% (BC061767)
	Intracellular mediator containing kelch motifs (MKLN1)		NM_021090 AK122261	Human 95%(305/318) Mouse 91% (281/307)
	Peptidyl arginine deiminase (ePAD)	C8	BC002834 U72194	Human 89% (BC002834) Mouse 95% (309/324)
	C15	NM_031359 XM_372767 XM_233601	Rat 92% (301/324) Human 87% (217/248) Rat 80% (264/330)	
Nonsense-mediated mRNA decay	Nucleoporin 88 (NUP88)	C12	BC053724 AJ532593 BC000335	Mouse 78% (313/397) Mouse 91% (515/565) Human 90% (517/572)
Cell migration & cell cycle progression	UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog B (UPF3B)	C21	NM_053616 NM_023010 XM_233312	Rat 89% (508/565) Human 82% (146/178) Rat 80% (135/167)
	Integrin alpha 2 subunit (ITGA2)	C25	XM_110787 L25886	Mouse 84% (81/96) Bovine 90% (196/216)
Unclassified	Cirrhosis, autosomal recessive 1A (CIRHIM)	C16	NM_002203 AB067445	Human 88% (188/212) Rat 81% (176/215)
			AK051050 BC009348	Mouse 80% (173/216) Human 93% (405/435)
	CGI-140 protein (CGI-14)	C27	NM_011574 XM_214663	Mouse 88% (359/406) Rat 89% (317/354)
			AF151898 AK010893 XM_2138	Human 90% (325/360) Mouse 88% (290/326) Rat 88% (288/32)

table 5. Sequence-Specific Primers used for Quantification of Differentially Expressed Transcripts.

C1	Pig	Forward	5'-CTGGGGCTGTGTGCAGTTTG-3'	170	AY553929
		Reverse	5'-CCAAACGCGTAGCTGTGCTG-3'		
	Mouse	Forward	5'-GACGCCAACTCCTGCCAGAT -3'	188	U07951
		Reverse	5'- GGTTCAAAAGCTCCAGGGC-3'		
C7	Pig	Forward	5'-TGCCTCCCTCCCTCTTG-3'	237	AY553930
		Reverse	5'-GCTCTTGCTTTTGCTGGA-3'		
	Mouse	Forward	5'- GGCCCCAGCCTCTCTTGT-3'	238	BC032166
		Reverse	5'- GGACTTGGGAAGGCAGCAGA-3'		
C8	Pig	Forward	5'-GGCTTTTCGGATGTGGATCA-3'	231	AY553928
		Reverse	5'-TCTGGTGCAGTCCTCGGTCA-3'		
	Mouse	Forward	5'- AGAGGGGGCCATCAAATGGT-3'	175	BC013703
		Reverse	5'- GACACGATCTGGCACTCGGA-3'		
C12	Pig	Forward	5'-AGGGAGATTTCAGCGGAGGG-3'	112	AY553927
		Reverse	5'-CGCTCAGCCATTCCCGTAG-3'		
	Mouse	Forward	5'- TGCCAACCCAGCATTCTCA-3'	167	AJ532593
		Reverse	5'- TGACCCTCCGCTGAATCTCC-3'		
C15	Pig	Forward	5'-TTCTAATGGGAGGGAGGCC-3'	173	AY553925
		Reverse	5'-GCTCCAGGCAGAAGAGCTGC-3'		
	Mouse	Forward	5'-AACCAGCAGAGCACAAACT-3'	224	AF529423
		Reverse	5'-GCACAGACGTCCCCTATGTT-3'		
C16	Pig	Forward	5'-TCCAAAATGCCAGCGTTCCT-3'	124	AY553924
		Reverse	5'-TGAAGCTTCCCTCCAGCAGC-3'		
	Mouse	Forward	5'- TTGCATACTTCCAGCCGCA-3'	201	NM_011574
		Reverse	5'- GTTGTGGTATTGGGGCGA-3'		
C21	Pig	Forward	5'-GGGAGCGGGATTATGAGCGT-3'	100	AY553923
		Reverse	5'-TCATAGCGCTCCTTCTGCT-3'		
	Mouse	Forward	5'-AGGAAACCGGAAAAAGGAGA-3'	227	XM_110787
		Reverse	5'-ATCATGCGTCCTGATCTCT-3'		
C25	Pig	Forward	5'-AGCAGCAGCATCACAGCCAG-3'	245	AY553922
		Reverse	5'-TAAACTCCGACCAGCCAGC-3'		
	Mouse	Forward	5'- CAAAGCATTGCTGACGTGGC-3'	167	BC065139
		Reverse	5'-TCCGCATCAAGCGTCATGTT- 3'		
C27	Pig	Forward	5'-CCC GCCAGTGAGTGTAACC-3'	297	AY553921
		Reverse	5'-AGAGGGGTCCAGGATGGGAC-3'		
	Mouse	Forward	5'-GGGTTGCTGTCTACTGCTCC -3'	115	CK129509
		Reverse	5'- AGATAGACATCACCACGGC-3'		
H2a	Pig	Forward	5'-GTGGCAAACAGGGAGGCAAG-3'	177	BF703857
		Reverse	5'-TTTCCGCGGTCAGGTACTCC-3'		
	Mouse	Forward	5'- TAACGGCCGAGATCCTGGAG-3'	196	U62674
		Reverse	5'- TGGCTCTCCGTCTTCTGGG-3'		

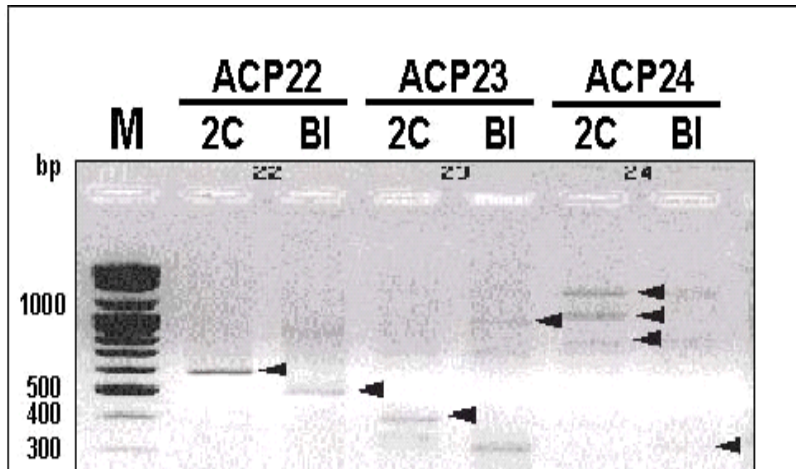


Figure 41. 돼지 수정란에서 초기 배아의 발달에 관여하는 유전자가 전기영동 상으로 나타난 그림

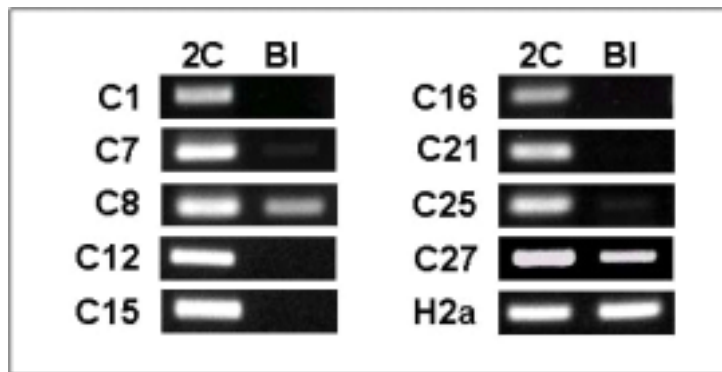


Figure 42. 돼지 수정란의 착상전 배아의 초기 발달에 관여하는 유전자들 다시 RT-PCR를 통하여 검증하였음.

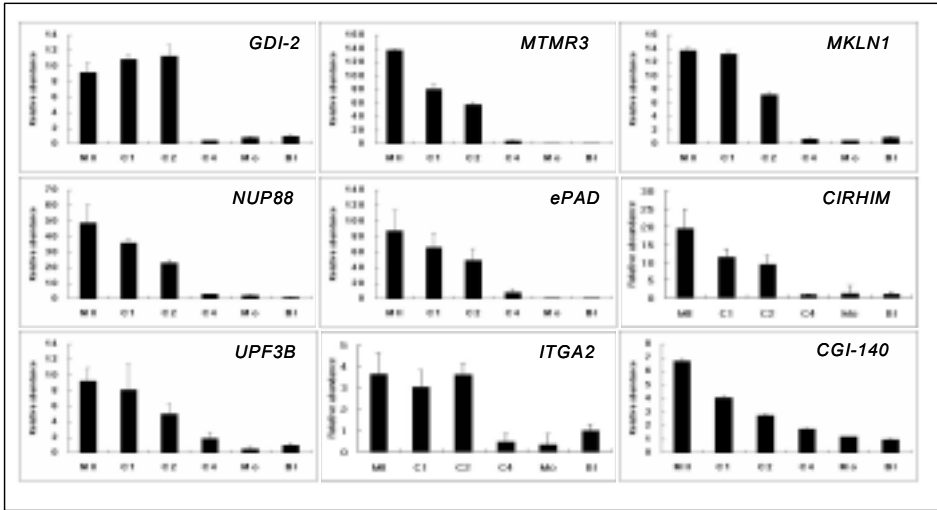


Figure 43. 착상전 배아의 초기배아 발달에 관여하는 유전자를 각 발달단계별로 Real-time RT-PCR를 통하여 발달단계에서의 양적 비교.

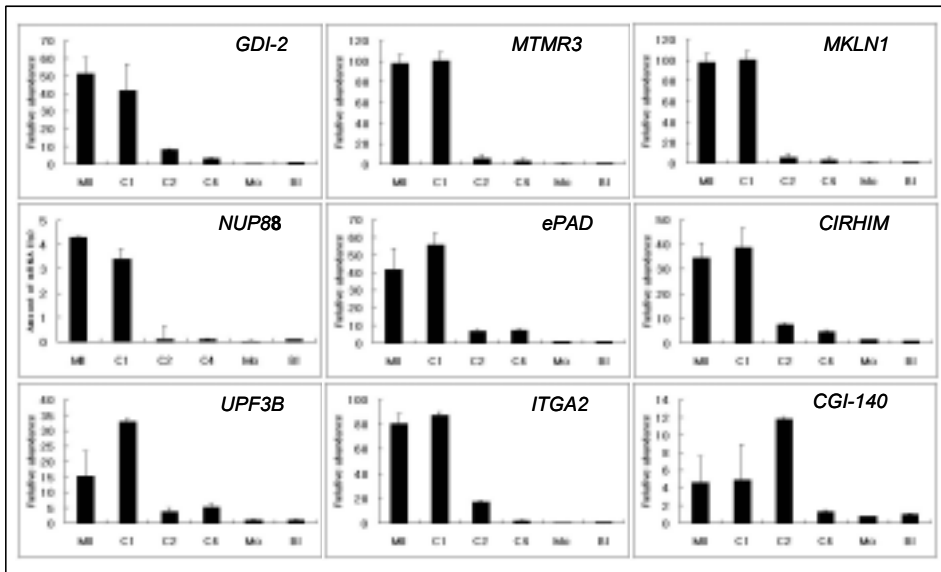


Figure 44. 착상전 배아의 초기배아 발달에서 genomic activation에 관여하는 9개의 유전자를 일반적으로 사용되고 있는 실험동물인 생쥐의 착상전 각 발달단계별 수정란을 회수하여 Real-time RT-PCR를 통하여 양적 비교.

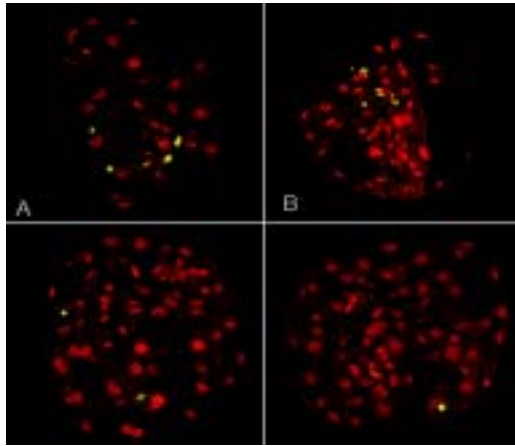


Figure 45. 핵이식한 난자와 단위발생된 2배수체 수정란의 총세포수 및 사멸된 세포수의 비교. A & B, 핵이식한 수정란의 총 세포수 및 사멸된 세포수; C & D, 단위발생된 2배수체 수정란의 총세포수 및 사멸된 세포수. .

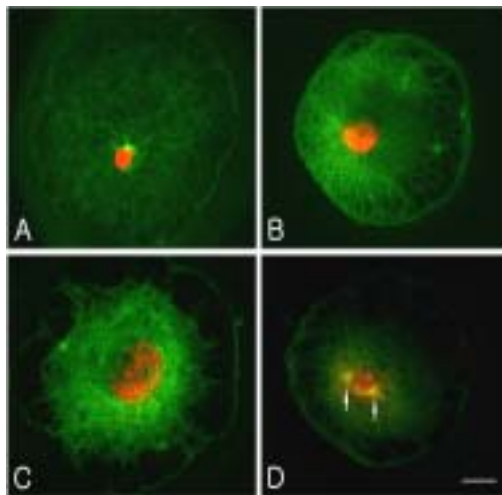


Figure 46. Laser scanning confocal microscopic images of chromatin and microtubules in porcine oocytes following pig somatic cell nuclear transfer (X630). A) Soon after NT. B) At 9h following NT. C) At 18h following NT. D) Nuclei numbers of NT blastocyst.

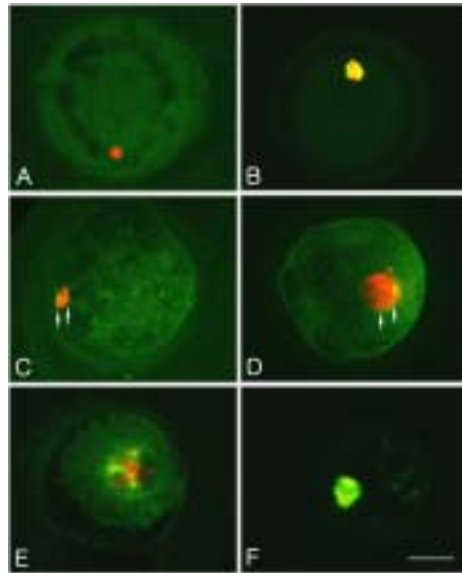


Figure 47. Laser scanning confocal microscopic images of chromatin and microtubules in porcine oocytes following pig somatic cell nuclear transfer under delay-activated condition. A) Soon after NT. B) At 1h following NT. C) At 3hr after fusion. D and E) Chromatin developed into two or more pronuclear-like structures. F) At 18h following NT.

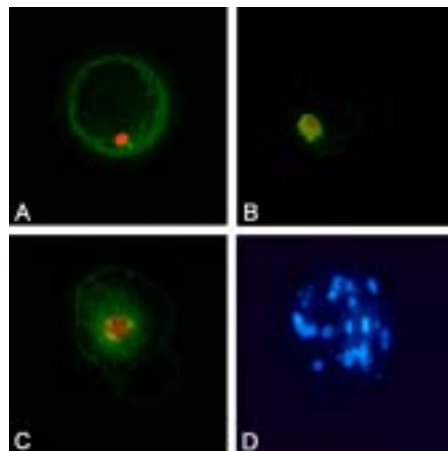


Figure 48. Laser scanning confocal microscopic images of chromatin and microtubules under simultaneously activated condition. A) Soon after NT. B and C) At 6h following NT. D)

Fig. 46에서 보여주듯이 융합 직후에는, 팽창된 염색질을 관찰할 수 있었으며 (Fig. 6A), 핵 치환 후 9시간 쯤에는 염색질이 응축되어 있는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 46B). 18시간 쯤에는 염색질이 두 개의 전핵과 같은 물질로 팽창되어져 있는 것을 볼 수 있었다(Fig. 46C). 배반포까지 발달한 수정란을 염색하여 핵의 개수를 확인한 결과 기존의 체외수정란과 차이가 없음을 알 수 있었다(Fig 46D)

난자의 활성화가 지연된 상태에서는 핵이식 직후에, 핵이 응축되어 있는 것을 관찰하였다(Fig. 47A). 핵치환 후 1시간 쯤에는 임의적으로 배열된 미체소관들이 응축된 염색질에 단단히 붙어있는 것을 관찰하였다(Fig. 47B). 핵치환 후 3시간 쯤에는 핵이 두 개의 염색질로 분리된 것을 볼 수 있었다. 6시간에서 15시간 사이에는 염색질이 두 개이상의 전핵과 같은 물질로 발달한 것을 관찰할 수 있었다. 18시간 후에는 염색질이 감수 분열 중기의 특징을 나타냈다. 반면에, 난 활성화가 동시에 이루어진 경우에는 핵 이식 직후에 핵이 팽창되어 있는 것을 관찰하였다(Fig. 48A).

5. 마우스 Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating factor(GM-CSF)가 돼지 단위발생 난자 및 핵이식 난자의 발달과 착상관련 유전자의 발현에 미치는 영향

NCSU 23을 기본배양액으로 하여 BSA를 첨가하거나 또는 첨가하지 않는 조건하에서 mGM-CSF를 첨가함으로써 돼지 단위발생 난자와 핵이식한 난자의 배반포까지의 발달율, 세포수 및 착상관련 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사하고자 실시하였다.

가. mGM-CSF가 돼지 단위발생 난자의 발달에 미치는 영향

BSA가 존재하는 배양액에 2, 10, 100 ng/ml의 GM-CSF를 첨가하였을 때 돼지 체외성숙난자의 cleavage, compaction 및 배반포의 형성에는 영향을 미치지 않았다(Table 2). 7일 쯤에 배반포의 총세포수도 첨가군과 비교군사이에서 차이가 없었다. 그러나 BSA가 없는 NCSU 23 배양액에 mGM-CSF (2, 10, 100ng/ml)를 첨가하였을 때 morula 및 배반포까지의 발달을 향상시켰다 (Table 3). 2, 10, 100ng/ml의 첨가군사이에서는 차이가 없었다.

나. mGM-CSF가 세포수에 미치는 영향

10ng/ml의 GM-CSF를 BSA가 없는 배양액에 첨가하였을 때 cleavage율은 증가하지 않았으나 배반포까지의 발달율은 유의적으로 향상시켰다 (Table 4, $P < 0.05$). NCSU 23 배양액에 5 mM의 glutathione와 GM-CSF를 첨가하였을 때 GM-CSF만 첨가하였을 때보다 배반포의 형성이 유의하게 향상되었다. 그러나 mGM-CSF는 배반포에서의 세포수는 증가시키지 못하였다.

다. mGM-CSF가 돼지 핵이식난자의 발달에 미치는 영향

mGM-CSF는 돼지 핵이식난자의 발달에도 마찬가지로 영향을 미치었다 (Table 5). 즉 NCSU 23 배양액에 glutathione을 첨가하고 mGM-CSF를 첨가하였을 때 morula 및 배반포까지의 발달을 통계적으로 향상시켰으며 배양 3일 째에 배양액에 FBS를 첨가하였을 때는 발달에 유의한 영향을 미쳤다.

라. mGM-CSF가 착상관련 유전자의 발현에 미치는 영향

mGM-CSF는 BSA가 존재하는 배양액에서 유전자의 발현에 영향을 미치지 못한다 (Fig. 49 & 50). 그러나 BSA가 없는 NCSU 23 배양액에 mGM-CSF를 첨가하였을 때는 착상관련 유전자인 LIF-r의 발현을 향상시켰다. 그러나 SGLT-1과 IL-6의 발현에는 영향을 미치지 못하였다.

Table 6. Developmental ability of porcine parthenotes after 7 days culture in NCSU 23 medium in the presence of BSA

[mGM-CSF]	No. of embryos examined (r)	Percentage of embryos developed to			Cell numbers
		Cleaved	Morulae	Blastocysts	
0	200 (7)	73.2±5.1	23.7±2.9	15.5±1.9	50.8±5.9
2 mM	111 (5)	81± 7.5	27.1±3.9	16.3 ±2.1	51.2±3.4
10 mM	196 (7)	78.6±6.8	26.8±3.3	17.3±2.1	41.2±6.5
100 mM	95 (5)	71.0±3.5	23.0±5.3	19.6±3.1	42.6±9.1

Table 7. Developmental ability of porcine parthenotes after 7 days culture in NCSU 23 medium in the absence of BSA

[mGM -CSF]	No. of embryos examined (r)	Percentage of embryos developed to			Cell numbers
		Cleaved	Morulae	Blastocysts	
0	159(5)	43.1±5.1	0 ^b	0 ^b	n.d
2 mM	73(3)	41.4±7.3	9.9±2.0 ^a	5.3±2.1 ^a	36±7.3
10 mM	162(5)	49.5±5.2	11.2±3.2 ^a	6.3±1.5 ^a	38±8.5
100 mM	81(3)	52.0±3.5	12.4±2.1 ^a	8.1±3.0 ^a	37±5.5

Table 8. Developmental ability of porcine parthenotes after 7 days culture in NCSU 23 medium in the absence of BSA

Supplement to medium	No. of embryos examined (r)	Percentage of embryos developed to			Cell numbers
		Cleaved	Morulae	Blastocysts	
Control (with BSA)	85(2)	75.0±3.1 ^a	32.3±4.1 ^a	22.5±2.5 ^a	42.6±8.1
Control (without BSA)	222(5)	45.6±2.5 ^b	0 ^c	0 ^c	n.d
GM-CSF	216(5)	51.6±3.6 ^b	2.3±0.4 ^d	1.4±0.2 ^d	34.3±8.4
Glutathione	273(5)	58.5±5.6 ^b	12.1±3.7 ^c	7.0±1.6 ^c	36.6±5.5
Glutathione +GM+CSF	248(5)	61.8±6.1 ^b	21.9±4.5 ^b	14.1±1.8 ^b	38.7±5.1

Table 9. The developmental ability of porcine nuclear transferred embryos after 7 days culture in NCSU 23 medium in the presence of BSA

Supplement To medium	No. of embryos examined (r)	Percentage of embryos developed to	
		Morulae	Blastocysts
Nothing	24 (2)	0 ^d	0 ^d
Glutathione	85 (4)	9 ± 4.3 ^c	5 ± 2.1 ^c
GM-CSF +Glutathione	89 (4)	21 ± 3.6 ^b	15 ± 4.1 ^b
Dual culture system*	86 (4)	39 ± 6.3 ^a	28 ± 5.5 ^a

b,c Different superscripts within columns denote significant differences ($P < 0.05$).

* Dual culture system : NCSU 23 + 23 (3 days) and NCSU 23 + fetal bovine serum (4 days)

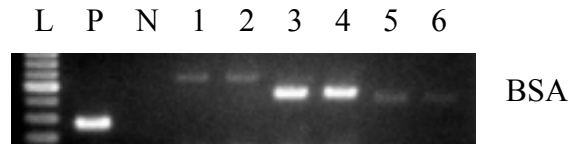


Figure 49. Semi-quantitative RT-PCR analysis of SGLT-1 (Lane 1,2), IL-6 (Lane 3, 4), and LIF-r (Lane 5, 6) in blastocysts cultured in the presence (Lane 1,3,5) and absence of mGM-CSF (lane 2, 4, 6).

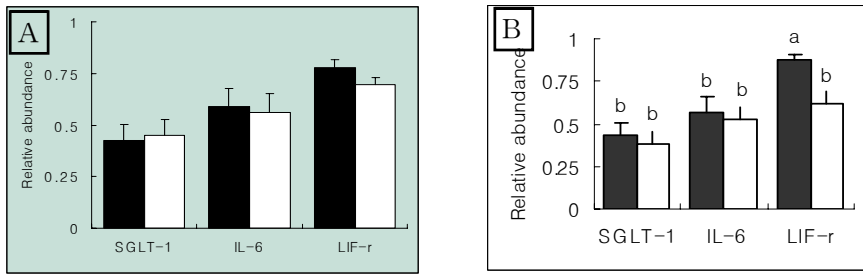


Figure 50. Relative abundance of SGLT-1, IL-6 or LIF-r mRNA expression in porcine parthenotes after 7 days cultured in the absence (A) or presence (B) of 0.4% BSA % BSA. Open bars, control; Black bars, mGM-CSF treatment.

6. Epidermal Growth Factor (EGF)가 돼지 단위발생난자의 발달과 세포사멸 및 세포사멸에 포사멸에 관련된 유전자의 발현에 미치는 영향

돼지 난자를 체외성숙시킨후 전기자극으로 단위발생을 유도하였다. cytochalasin B를 3시간 처리함으로써 diploid 단위발생난자를 얻었다. 48시간동안 0.4%의 BSA가 첨가된 NCSU 23 배양액에서 배양한후 4-cell stage부터 BSA가 존재하거나(0.1% 또는 0.4%) 또는 존재하지 않는 NCSU 23 배양액에 EGF를 10ng/ml 첨가함으로써 비교군과 처리군사이에 체외발달, 배반포에서의 총세포수, 세포사멸 및 세포사멸에 관여하는 유전자의 발현이 영향이 있는지를 조사하였다.

가. EGF가 4-cell stage의 돼지 단위발생 난자의 발달에 미치는 영향

0.1%와 0.4%의 BSA가 존재하는 NCSU 23 배양액에서 BSA가 없는 배양액에서보다 유의적으로 많은 4-cell stage의 돼지 단위발생 난자가 배반포까지 발달하였다(Fig. 51, $P < 0.05$). 그러나 BSA가 존재하는 배양액에 10ng/ml의 EGF를 첨가하였을 때 배반포까지의 발달율을 향상시키지 못하였다.

나. EGF가 4-cell stage의 돼지 단위발생 난자의 세포수와 세포사멸에 미치는 영향

EGF는 BSA가 없는 배양액에서는 배반포의 세포수를 증가시키지 못하였다 (Fig. 51). 그러나 0.1%와 0.4%의 BSA가 존재하는 배양액에서는 배반포의 세포수를 유의하게 증가시켰다($P < 0.01$).

TUNEL를 이용하여 세포사멸을 조사하였다(Fig. 52 & 53) BSA가 존재하지 않는 배양액에서 EGF는 배반포의 세포사멸을 억제하지 못하였다. 그러나 0.4%의 BSA가 존재하는 NCSU 23 배양액에서는 EGF를 첨가하였을 때 배반포에서의 세포사멸을 억제하는 것으로 나타났다($P < 0.001$).

다. EGF가 세포사멸에 관련된 유전자의 발현에 미치는 영향

RT-PCR를 통하여 EGF가 세포사멸에 관련된 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 54). EGF는 BSA가 없는 배양액에서는 세포사멸에 관련된 유전자중 세포사멸을 억제하는 유전자인 Bcl-xL의 발현에 영향을 미치지 못하였다. 그러나 0.4%의 BSA가 존재하는 배양액에서는 Bcl-xL의 발현을 유의하게 향상시켰다($P < 0.01$). EGF는 배양액에 BSA가 있거나 없거나를 물론하고 세포사멸을 유발하는 유전자인 Bak의 발현에는 영향을 미치지 않았다.

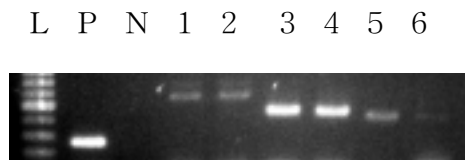


Figure 51. Percentage of 4-cell stage embryos that developed into blastocysts in the presence or absence of BSA and/or EGF. Open bars, control; Black bars, EGF treatment.

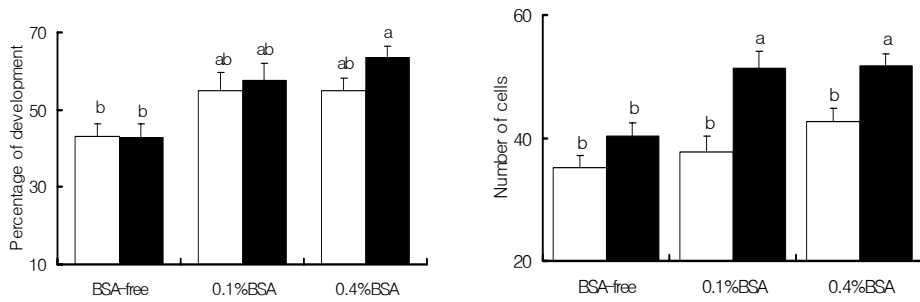


Figure 52. Number of cells per blastocyst after 5 days culture of 4-cell stage embryos in the presence or absence of BSA and/or EGF. Open bars, control; Black bars, EGF treatment

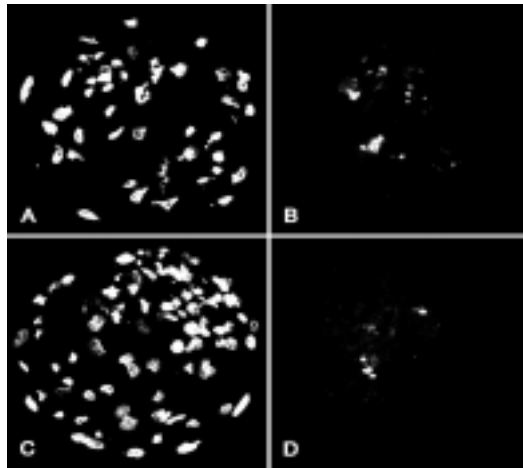


Figure 53. Laser scanning confocal microscopic images of total nuclei and fragmented DNA in porcine blastocysts following parthenogenetic activation ($\times 400$). A) Total nuclei of 0.4% BSA group. B) Fragmented DNA of 0.4% BSA group. C) Total nuclei of addition of EGF in 0.4% BSA group. D) Fragmented DNA of addition of EGF in 0.4% BSA group.

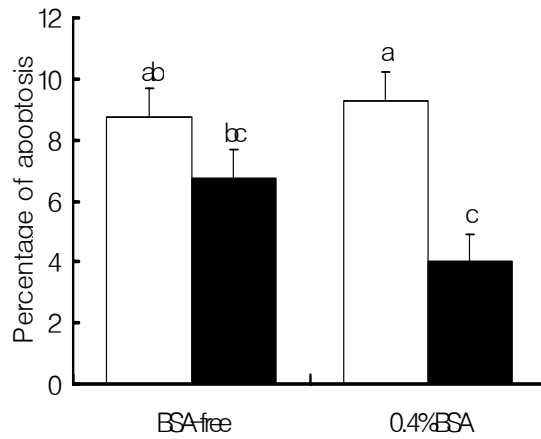


Figure 54. Degree of apoptosis (apoptotic cell no./total cell no.) in the blastocysts after 5 days culture of 4-cell stage embryos in the presence or absence of 0.4% BSA and/or EGF. Open bars, control; Black bars, EGF treatment.

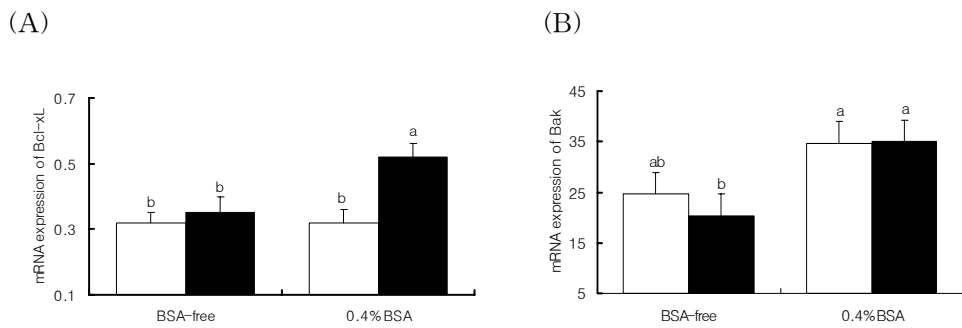


Figure 55. Relative abundance of Bcl-xL (A) and Bak (B) mRNA expression in porcine parthenotes after 5 days culture of 4-cell stage embryos in the presence or absence of 0.4% BSA and/or EGF. Open bars, control; Black (B) bars, EGF treatment.

7. 돼지 난자의 미성숙난과 성숙난에서 특이적으로 발현하는 유전자의 동정

가. 미성숙 난의 채취.

도축장에서 도살되는 가축으로부터 난소를 회수하여 체외성숙 유도는 다음과 같이 실시하였다. 즉 도축장에서 도축한 돼지 난소를 회수하여 39℃ 멸균생리식염수가 들어있는 보온병에 담아 1시간 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 재차 멸균생리식염수로 세척한 다음 70 % 알콜스폰지를 이용하여 난소의 표면을 소독한 다음, 18 gauge의 주사침을 이용하여 2-6mm 크기의 가시난포에서 회수된 난포란 중 난구세포가 치밀하게 부착되고 난자의 세포질이 균일한 것만을 선별하여 본 실험에서 공시하였다. 돼지 난소의 경우 신선한 생리식염수로 다시 세척하고 18gauge 가 장착된 주사기로 직경 2~7mm인 난포란으로부터 난자를 채취하였다. 미성숙난은 난구세포를 바로 제거하고 2-3회 세척한후 액체질소로 급속히 동결시킨후 실험에 공시할때까지 -70도에서 보관하였다.

나. 미성숙난의 체외성숙.

미성숙난자의 체외성숙은 TCM-199 (Sigma) 배양액으로 0.014mM sodiumbicarbonate, 와 0.2ml/100ml prnicillin/streptomycin을 첨가하고, hormones은LH(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), FSH(35 $\mu\text{g}/\text{ml}$), estradiol-17 β (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가하며, 10 % FBS를 첨가하여 5% CO₂, 98~99% 습도, 39℃ CO₂ incubator 에서 44 시간 동안 체외성숙을 유도하였다. 44시간 후 극체가 방출된 성숙난자만 선택하여 난구세포를 제거하고 2-3회 세척한후 액체질소로 급속히 동결시킨 후 실험에 공시할 때까지 -70도에서 보관하였다.

다. ACP-DDRT-PCR에 의한 미성숙난과 성숙난의 특이적으로 발현되는 유전자의 동정.

돼지 단위발생 수정란을 이용하여 미성숙난과 성숙난에서 특이적으로 발현함으로써 성숙에 관여하는 유전자를 찾고자 GV단계의 세포와 MII 단계의 성숙난자에서 차이나는 유전자를 APC 방법을 통하여 비교분석하였다. 각 mRNA 는 미성숙 및 성숙된 세포로부터 분리를 하였고, 40개의 ACP-primer를 사용하였다. first-strand cDNA를 template로 하여, second-strand cDNAs 를 합성하였고, arbitrary ACP primer와 dT-ACP2를 이용하여 PCR를 수행하였다. PCR의 첫 번째 단계는 65도에서 수행하였고, 이어서 55도에서 40 cycle를 수행하였다. 전기영

동, cloning 및 염기서열분석과정을 거쳐 미성숙난자의 특이적 유전자 11개와 성숙난자의 특이적 유전자 13개를 확인할수 있었다. 확인된 유전자중 성숙난에서 특이적으로 발현되는 유전자를 4개 선택하여 돼지의 착상전 초기배아의 각 발달 단계에서의 배아들을 다시 RT-PCR 및 Real time PCR를 수행함으로써 결과를 다시 한번 검증하는 조사단계를 거쳤다. 결과 4개의 유전자는 모두 ACP에서와 같은 발현 양상을 나타냈다. 다음 보편적으로 사용되고 있는 실험동물인 생쥐의 수정란을 이용하여 이 4개의 유전자를 real-time PCR로 분석하였음.

table 10. 돼지 미성숙난에서 특이적으로 발현되는 유전자들.

hypothetical Cation channels (non-ligand gated) containing protein	AK036040	Mou.	262/284 (92%)
	AC091100	Hum.	131/141 (92%) 112/118 (94%) 34/36 (94%)
3 BAC RP11-278L15	AC108751	Hum.	20/20 (100%)
	AC133204	Mou.	18/18 (100%)
Tenr mRNA for RNA binding protein	AK093297	Hum.	187/211 (88%)
	X84693	Mou.	164/186 (88%)
cytoplasmic dynein light chain 1	AB098977	Bov.	379/408 (92%)
	NM_003746	Hum.	366/404 (90%)
	BC034258	Mou.	234/250 (93%) 43/45 (95%) 20/20 (100%)
clone RP5-991B18 on chromosome 20q13.11-13.3 Contains a putative novel gene, ESTs, STSs and GSSs	AL049541	Hum.	19/19 (100%)
	AL953842	Zeb.	21/22 (95%)
N-myristoyltransferase 1N-myristoyltransferase 1	BC006569	Hum.	261/284 (91%) 187/199 (93%)
	BC016526	Mou.	192/202 (95%) 239/269 (88%)
	AF500494	Bov.	158/164 (96%)
	AJ492222	Rab.	156/164 (95%)
latipes OIGC-R2 gene for guanylyl cyclase	AC009646	Hum.	18/18 (100%)
Cisplatin resistance related protein CRR9p	XM_229475	Rab.	43/45 (95%)
	AK032295	Mou.	43/45 (95%)
	AK128462	Hum.	48/54 (88%)
	AY007685	Hum.	48/54 (88%)
clone RP11-569D9 on chromosome 13	AL160396	Hum.	121/135 (89%) 41/46 (89%)
	AC104326	Mou.	22/22 (100%)
BAC clone RP23-84N24 from 5	AC115118	Mou.	24/25 (96%)
	AL935115	Zeb.	23/24 (95%)
DC6 protein	NM_020189	Hum.	517/534 (96%)
	AK032957	Mou.	501/534 (93%)
	XM_216913	Rab.	453/484 (93%)

table 11. 돼지 성숙난에서 특이적으로 발현되는 유전자들

Identity	Clone #	GenBank acc. #	Homology (%) ^a	Species
Hepatitis B virus x interacting protein (HBXIP)	2	AK003358	281/309(91%)	Mouse
		NM_006402	376/430(87%)	Human
Hypothetical <u>Cation channels (non-ligand gated) containing protein</u>	3	AC091100	277/295 (94%)	Human
		AK036040	262/284 (92%)	Mouse
Glutamyl-prolyl-tRNA synthetase (Eprs)	7	XM_129647	48/52 (92%)	Mouse
		XM_213969	48/52 (92%)	Rabbit
		NM_004446	50/57 (87%)	Human
Clone RP44-428N16	9	AC129961	444/519 (86%)	Porcine
Clone RP11-394G3 on chromosome 6 <u>containsSTSs, ESTs and CDSs</u>	13	AL133319	24/26 (92%)	Human
Mitochondrion	16	AF034253	41/45 (91%)	Porcine
Transcription factor TZP (TZP)	19	AY027523	118/123 (95%)	Human
		AK033017	115/123 (93%)	Mouse
BAC clone 89K19 (LBNL H179)	20	AC005215	281/321 (88%)	Human
		AC096226	184/222 (83%)	Rabbit
Clone 25186	21	AF131831	113/126 (89%)	Human
		BC034079	103/120 (85%)	Mouse
<u>Annexin A2 (ANXA2)</u>	22	NM_004039	263/281(94%)	Human
		NM_174716	247/264(93%)	Bovine
		BC004659	186/202(92%)	Mouse
Hypoxia-inducible protein 2 (HIG2)	23	BC008573	115/122(94%)	Human
		AC111140	21/21 (100%)	Mouse
BAC clone RP11-80B23 from 4	25	AC079227	22/22 (100%)	Human
		BX247948	24/25 (96%)	<u>Zebrafish</u>
<u>ATPase 6</u>	28	AF304200	137/139(98%)	Porcine

table 12. Real time PCR에 사용된 돼지 및 마우스 유전자의 primer

Genes		Primer sequence	GenBank Acc. No.	Annealing Tem.	Base Pairs
<u>Histone H2a</u>	Pig	F: 5-GTGGCAAACAGGGAGGCCAAG-3 R: 5-TTCCOCGGTCAAGTACTCC-3	BF703857	60°C	177
	Mouse	F: 5-TAACGGCCGAGATCCTGGAG-3 R: 5-TGGCTCTCCGTCTTCTTGGG-3	U62674	60°C	196
TZP	Pig	F: 5-TTCCACGGAAATGGAGAAATC-3 R: 5-GGCTTCAACCTCACAAACTC-3	AY706384	55°C	197
	Mouse	F: 5-GAAGTCACCCAGAGCCAGAGG-3 R: 5-GTCTCACTGCAAGGACATT-3	AK033017	60°C	241
ANXA2	Pig	F: 5-ACGGCAAATCCCTGTACAAC-3 R: 5-OTCCAAAGCTGATCOTATAA-3	AY706383	55°C	164
	Mouse	F: 5-CACCAACTTCGATGCTGAGA-3 R: 5-CAAAATCAAGTCTCCAGGT-3	BC003327	60°C	211
HIG2	Pig	F: 5-TTCTCCCCAGAATCTCTCT-3 R: 5-ACCACGAAACATCCAAATCC-3	AY706382	60°C	167
	Mouse	F: 5-ACCTCTATCTCTCTGGOCATC-3 R: 5-ACTCTCCGGATGGATGGT-3	AF 141311	60°C	172
<u>ATPase 6</u>	Pig	F: 5-CTATTCCCAACACCCAAACG-3 R: 5-TGGGTGTGAATGAGTGTGT-3	AF304200	55°C	196
	Mouse	F: 5-CACCAAAGGACGAAACATGA-3 R: 5-TTCCTTGTGGAAGGAAGTG-3	AF093677	60°C	213

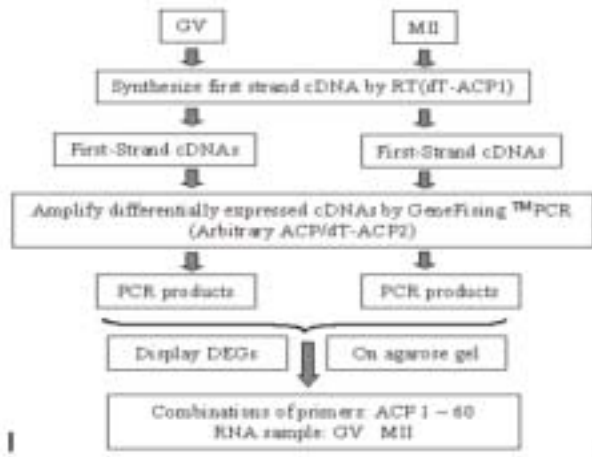


figure 56. ACP-DDRT-PCR에 사용된 방법

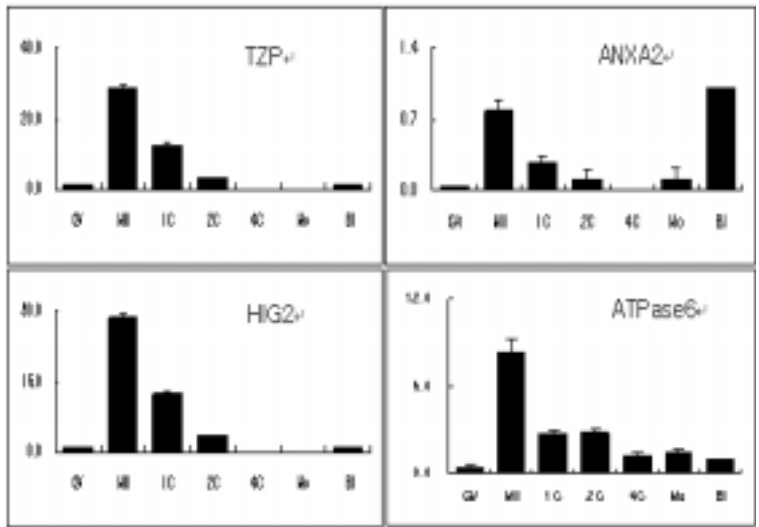


figure 57. 4개의 유전자의 돼지의 착상전초기배아의 각 발달단계에서 real time PCR로 발현양 조사

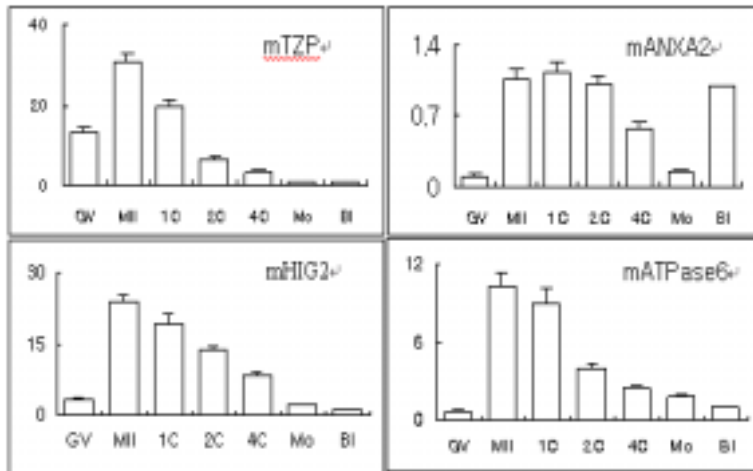


figure 58. 4개의 유전자의 마우스 착상전초기배아의 각 발달단계에서 real time PCR 로 발현양 조사

8. 돼지 배아의 배반포에서 특이적으로 발현하는 유전자의 동정

가. 미성숙 난의 채취 및 체외성숙

도축장에서 도살되는 가축으로부터 난소를 회수하여 체외성숙 유도는 다음과 같이 실시하였다. 즉 도축장에서 도축한 돼지 난소를 회수하여 39°C 멸균생리식염수가 들어있는 보온병에 담아 1시간 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 제차 멸균생리식염수로 세척한 다음 70 % 알콜스폰지를 이용하여 난소의 표면을 소독한 다음, 18 gauge의 주사침을 이용하여 2-6mm 크기의 가시난포에서 회수된 난포란 중 난구세포가 치밀하게 부착되고 난자의 세포질이 균일한 것만을 선별하여 본 실험에서 공시하였다.

미성숙난자의 체외성숙은 TCM-199 (Sigma) 배양액으로 0.014mM sodiumbicarbonate, 와 0.2ml/100ml prnicillin/streptomycin을 첨가하고, hormones 은LH(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), FSH(35 $\mu\text{g}/\text{ml}$), estradiol-17 β (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가하며, 10 % FBS를 첨가하여 5% CO₂, 98~99% 습도, 39°C CO₂ incubator 에서 44 시간 동안 체외성숙을 유도하였다.

나. 돼지 배아의 2세포기 및 배반포의 회수

성숙된 난자는 전기자극법을 이용하여 활성화시킨후 cyclohexamide에서 3시간 동안 배양한후 계속하여 NCSU 23 배양액에서 30시간동안 발달시킨다. 30시간후 2-세포기에 있는 세포를 회수하여 0.1% PVA가 포함된 PBS에서 세번 세척한 후 액체질소로 급속히 동결하한후 -70도에서 실험에 공시할때까지 보관하였하면서 사용 하였다.

그 외에 배반포는 NCSU 23 배양액에서 7일간 배양한후 배반확장된 배반포를 회수하여 0.1% PVA가 포함된 PBS에서 세번 세척한 후 액체질소로 급속히 동결한 후 -70도에서 실험에 공시할때까지 보관하였음.

다. RT-PCR 및 Real time PCR

각 mRNA 는 배반포와 2세포기의 세포로부터 분리를 하였고, 120개의 ACP-primer를 사용하였다. first-strand cDNA를 template로 하여, second-strand cDNAs 를 합성하였고, arbitrary ACP primer와 dT-ACP2를 이용하여 PCR를 수행하였다. PCR의 첫 번째 단계는 65도에서 수행하였고, 이어서 55도에서 40 cycle를 수행하였다. 전기영동, cloning 및 염기서열분석과정을 거쳐 배반포와 2세포기의 세포에서 서로 다르게 발현하는 9개의 유전자를 확인할수 있었다. 확인된 유전자들은 다시 RT-PCR 및 Real time PCR를 수행함으로써 결과를 다시 한번 검증하는 조사단계를 거쳤다. 결과 9개의 유전자는 모두 ACP에서와 같은 발현 양상을 나타냈다. 다음 보편적으로 사용되고 있는 실험동물인 생쥐의 수정란을 이용하여 이 9개의 유전자를 real-time PCR를 통하여 다시 확인하였다

table 13-1. 폐지 배아의 배반포에서 특이적으로 발현하는 유전자들 (1)

Functional role	EST name (length in bp)	GenBank Ac. No.	Sequence homology		
			Gene or EST Description (GenBank Ac. No.)	Species	Base pair Match (%)
Protein synthesis	C32 (311)	AY550065	Ribosomal protein, large, P1 (NM_018853)	<i>M. musculus</i>	3073/10 (99%)
	C45 (242)	AY550067	Ribosomal protein L23 (BC003518)	<i>H. sapiens</i>	2082/28 (91%)
	C48 (266)	AY550068	Ribosomal protein S16 (BC007977)	<i>H. sapiens</i>	2052/17 (94%)
	C49 (354)	AY550070	Ribosomal protein S20 (X51537)	<i>R. rattus</i>	2943/18 (99%)
	C58 (287)	AY550074	Ribosomal protein S29 (NM_174804)	<i>B. taurus</i>	1421/53 (92%)
	C60 (388)	AY550075	Ribosomal protein S3a (AB098832)	<i>B. taurus</i>	3343/55 (94%)
	C62 (325)	AY550038	Ribosomal protein S28 (AF307320)	<i>B. taurus</i>	96/106 (90%)
	C76 (461)	AY550040	Ribosomal protein L7 (BC008855)	<i>H. sapiens</i>	3994/31 (92%)
	C77 (201)	AY550041	Ribosomal protein S3a (AB098832)	<i>B. taurus</i>	1882/00 (94%)
	C81 (537)	AY550042	Ribosomal protein L11 (BC018970)	<i>H. sapiens</i>	5085/39 (94%)
	C99 (578)	AY550043	Translation factor euk1 (BC006996)	<i>H. sapiens</i>	5565/78 (96%)
	C100 (538)	AY547313	Ribosomal protein L11 (NM_000975)	<i>H. sapiens</i>	5415/76 (93%)
	C102 (407)	AY550044	60S Ribosomal protein L35 (AB053884)	<i>S. scrofa</i>	4064/07 (99%)
	C106 (611)	AY550045	Ribosomal protein L12 (NM_000976)	<i>H. sapiens</i>	5305/71 (92%)
	C109 (482)	AY550046	Ribosomal protein S11 (BC012489)	<i>H. sapiens</i>	1441/57 (91%)
C112 (405)	AY550050	Polymerase I polypeptide C (BC008118)	<i>H. sapiens</i>	1261/39 (90%)	
Biosynthesis	C63 (468)	AY550039	Spermidine synthase (BC033106)	<i>H. sapiens</i>	2482/74 (90%)
	C83 (802)	AY550053	Argininosuccinate synthetase (NM_173892)	<i>B. taurus</i>	6376/97 (91%)
	C104 (364)	AY550055	Arginyl-tRNA synthetase (NM_002887)	<i>H. sapiens</i>	3023/26 (92%)
Unclassified	C75 (1042)	AY550924	Hypothetical protein LOC1248 (NM_016484)	<i>H. sapiens</i>	4024/27 (94%)
	C87 (1074)	AY550926	Open reading frame 109 (XIM_058628)	<i>H. sapiens</i>	2658/00 (88%)
	C98 (853)	AY550927	Coiled-coil helix CHCHD3 (NM_017812)	<i>H. sapiens</i>	1732/02 (85%)
	C103 (571)	AY550928	C/GF-51 protein (BC011681)	<i>H. sapiens</i>	3954/39 (89%)

table 13-2. 돼지 배아의 배반포에서 특이적으로 발현하는 유전자들 (2)

Functional role	EST name (length in bp)	GenBank Ac. No.	Sequence homologs		
			Gene or EST Description (GenBank Ac. No.)	Species	Base pair Match (%)
Signal Transduction	C46 (986)	AY550059	TRK-fused gene (AK093456)	H. sapiens	636/713 (89%)
	C85 (628)	AY550058	Scavenger receptor class E2 (NM_005306)	H. sapiens	324/372 (87%)
	C90 (300)	AY550060	GTP binding protein Rab 5 (U18420)	H. sapiens	279/302(92%)
Transcription	C64 (607)	AY550061	Hypothetical protein (AF526390)	S. scrofa	280/289 (96%)
	C65 (356)	AY550062	Polymerase II polypeptide I (NM_006233)	H. sapiens	288/318 (90%)
	C69 (313)	AY550063	FBP-interacting repressor (B035435)	H. sapiens	200/223 (89%)
	C110 (250)	AY550064	TBP-associated factor (AF98312)	H. sapiens	206/217 (94%)
Cytoskeleton	C34 (771)	AY550066	Myosin regulatory light chain (B004994)	H. sapiens	402/455 (88%)
	C52 (862)	AY550069	Beta-actin (AY141970)	B. taurus	1173/1243 (94%)
	C88 (782)	AY550071	Actin-binding protein (AF043045)	H. sapiens	699/767 (91%)
	C117 (322)	AY550072	Alpha-actinin (B031262)	H. sapiens	89/97 (91%)
Development	C86 (708)	AY550076	Mouse brain protein EM6 (B007508)	H. sapiens	256/308 (83%)
	C105 (1731)	AY550037	ADRP (AF234676)	S. scrofa	1692/1699 (99%)
	C33 (341)	AY550047	BMDP (AJ420927)	S. scrofa	335/336 (99%)
Defence	C84 (693)	AY550048	Testis enhanced gene (B000916)	H. sapiens	632/690 (91%)
	C91 (499)	AY550049	Liver fibronectin (M81453)	S. scrofa	465/473 (98%)
	C119 (1091)	AY550051	NPPEPS (NM_006310)	H. sapiens	1027/1091 (94%)
	C28 (283)	AY550052	schB gene (U17248)	H. sapiens	118/127 (92%)
Metabolism	C31 (619)	AY550054	Retinoid-binding protein (D5399)	S. scrofa	642/645 (99%)
	C35 (608)	AY550056	Heme binding protein 1 (NM_015987)	H. sapiens	159/187 (85%)
	C36 (1406)	AY528245	Soluble carrier family 25 (NM_174660)	B. taurus	840/608 (92%)
	C44 (611)	AY550929	MTHFD1 (NM_005956)	H. sapiens	381/433 (87%)
	C96 (800)	AY550057	Oxidative decarboxylase (U36394)	B. taurus	551/634 (86%)

table 14. Real time 분석에 사용된 primers.

Clone name	Primer name	Sequence	Product length (bp)	GenBank Acc. No.
C31	Forward	5'-OCAAGATATGGAGAAAGAG-3'	172	AY550054
	Reverse	5'-GACGTAAGTTCAGGTCGTCAT-3'		
C33	Forward	5'-ACTCAACGTCACAACAAACA-3'	200	AY550047
	Reverse	5'-CCTAGAAGGGAATTTAAGAG-3'		
C36	Forward	5'-GCAAGTCTGGAGGTAAGTTC-3'	175	AY528245
	Reverse	5'-GGTGATCTTCACCAAGACAAT-3'		
C44	Forward	5'-GATATTGATTTGACCCCTGA-3'	197	AY550929
	Reverse	5'-CTTCTGGGAAACTCCTACT-3'		
C46	Forward	5'-ACAGATGATCAGGTTTCAGG-3'	275	AY550059
	Reverse	5'-TCTGACTATAAGCTTCTGTA-3'		
C63	Forward	5'-GCAAGTAAGACCTATGCCAAC-3'	293	AY550039
	Reverse	5'-GCTTGTAACAAGTTGGTTGGT-3'		
H2a	Forward	5'-GTCGTGCCAAACAGGGAG-3'	182	BF703857
	Reverse	5'-GATTCGCGGTCAGGTAAGT-3'		

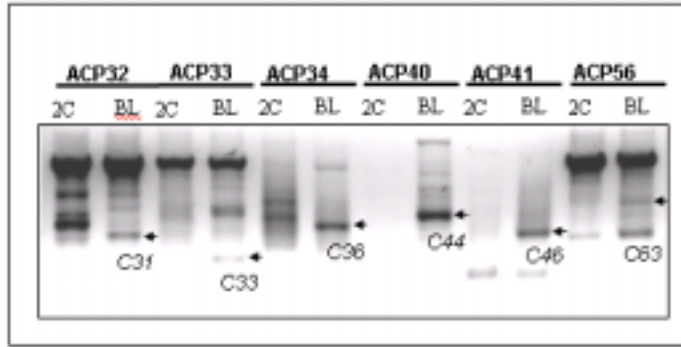


figure 59. ACP-DDRT-PCR 에 의하여 차이하는 유전자들을 전기영동으로 찾음

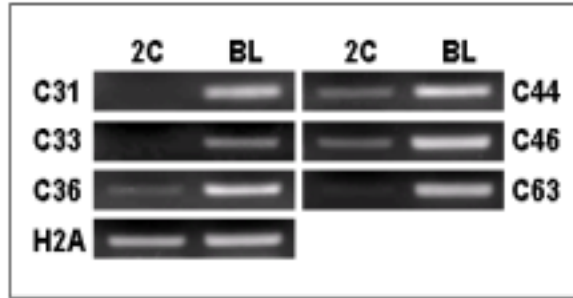


figure 60. 배반포 특이적 유전자를 6개 선택하여 RT-PCR로 검증

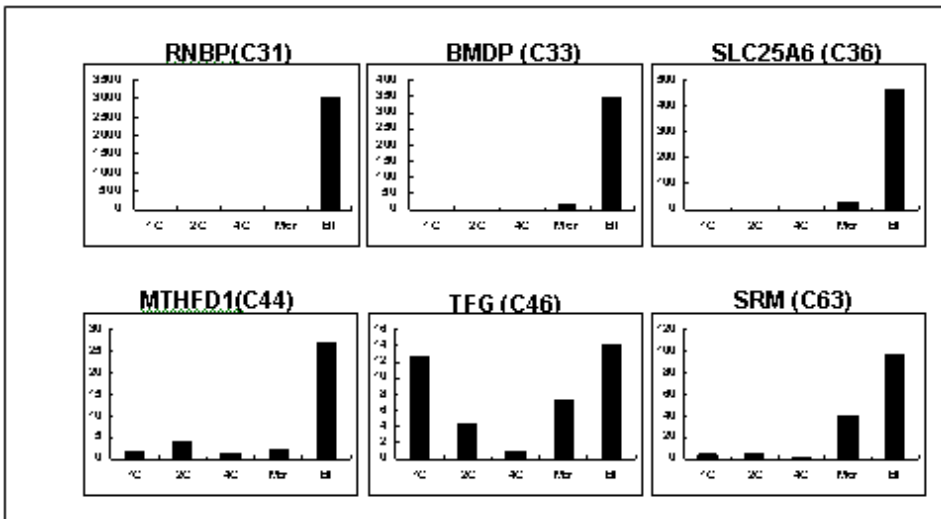


figure 61. 배반포 특이적 유전자를 6개 선택하여 real time PCR로 착상전 초기배아의 각 발달단계에서의 발현양 조사

제 5 절 형질전환 수정란의 이식

1. 체내수정란의 회수

본 연구에서는 효율적인 체내 수정란 확보를 위하여 altrenogest, PMSG, hCG 등의 호르몬을 투여하여 과배란을 유도하고, 인공수정을 통해 수정시킨 후 수정란을 생산하여 수정란의 발생관련 유전자의 발현을 조사하였다.

2. 단백질 첨가제가 세포사멸과 세포사멸에 관련된 유전자의 발현에 미치는 영향

단백질 첨가제가 돼지 단위발생 난자의 발달과 세포사멸에 미치는 영향을 조사하고자 실시하였다. 돼지 난자를 전기자극으로 단위발생시킨후 cytochalasin B 를 3시간 처리하여 diploid를 유도하였다. 30h (2-cell) 또는 72h (late 4-cell) 동안 0.4% BSA에서 배양한후 난자를 collection 하여 각각의 처리군에서 배양하였다. 즉 비교군, 0.1% PVA, 10% FBS 또는 0.4% BSA의 첨가군에서 배반포까지의 발달, 배반포에서의 총세포수, 세포사멸 및 세포사멸에 관여하는 유전자의 발현을 조사하였다.

가. 단백질 첨가제가 돼지 단위발생 난자의 발달에 미치는 영향

NCSU 23 배양액에 10%의 FBS를 첨가하였을 때 2-cell stage부터 처리하였거나 또는 late 4-cell stage부터 처리하였거나 모두 비교군(NCSU 23) 및 0.1%의 PVA 처리군과 배반포까지의 난자의 발달에 유의적인 차이가 없었다 (Fig. 62). 그러나 0.4%의 BSA를 첨가하였을 때는 2-cell 또는 late 4-cell stage로부터 처리하였을 때 모두 비교군, 0.1%의 PVA 처리군 및 10% FBS 처리군보다 배반포까지의 발달율이 유의하게 향상되었다. 그리고 비교군, PVA 또는 FBS 처리군은 모두 late 4-cell부터 처리하였을 때 2-cell부터 처리하였을 때보다 발달율이 높았다($P<0.001$).

나. 단백질 첨가제가 세포수 및 세포사멸에 미치는 영향

배반포에서의 세포수를 조사하였는데 2-cell부터 처리하였거나 또는 late 4-cell부터 처리하였거나 모두 FBS의 첨가군이 비교군, PVA 및 BSA 처리군보다 세포수가 유의하게 낮았다(Fig. 63, $P<0.05$). TUNEL에 의한 세포사멸을 조사한 결

과에 의하면 세포사멸은 2-cell 및 late 4-cell로부터의 처리배양에서 모두 FBS의 첨가군이 비교군, PVA나 또는 BSA 첨가군보다 세포사멸이 유의하게 많은 값을 나타냈다(Fig. 64, $P < 0.01$).

다. 단백질 첨가제가 세포사멸에 관련된 유전자의 발현에 미치는 영향

세포사멸을 억제하는 유전자인 Bcl-xL과 세포사멸을 유발하는 유전자인 Bak의 발현을 RT-PCR을 통하여 조사하였다. 2-cell부터 처리하였거나 또는 late 4-cell부터 처리하였거나 모두 FBS의 첨가군에서 in vitro 비교군, PVA와 BSA 첨가군 또는 in vivo 배반포보다 Bcl-xL의 발현은 유의하게 낮았고(Fig. 65, $P < 0.05$) 반대로 Bak의 발현은 유의하게 높았다(Fig. 66, $P < 0.005$). 여기에서 in vitro 1비교군, 0.1% 첨가군 및 0.4% BSA 첨가군은 모두 in vivo 첨가군과 Bcl-xL 및 Bak 유전자의 발현이 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그리고 세포사멸에 관련된 다른 하나의 유전자 P53의 발현은 비교군과 모든 처리군 및 in vivo 배반포에서 차이를 보이지 않았다(Fig. 67).

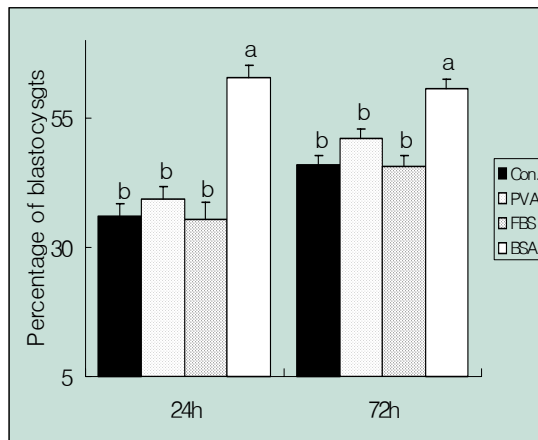


Figure 62. Percentage of 2- (24h) or 8-cell (72h) stage embryos that developed into blastocysts in the NCSU 23 medium supplemented PVA, FBS or BSA.

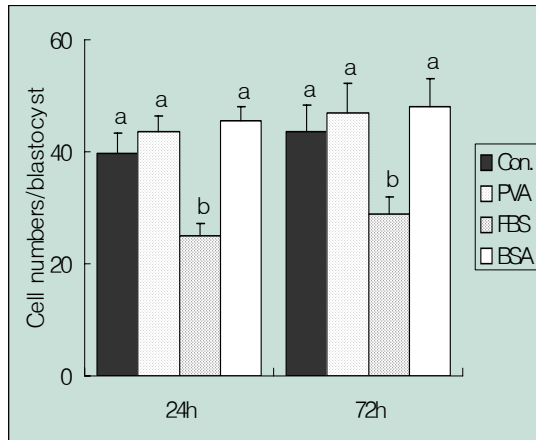


Figure 63. Number of cells per blastocyst at day 7 that cultured from 2- (24h) or 8-cell (72h) stage embryos in the NCSU 23 medium supplemented PVA, FBS or BSA.

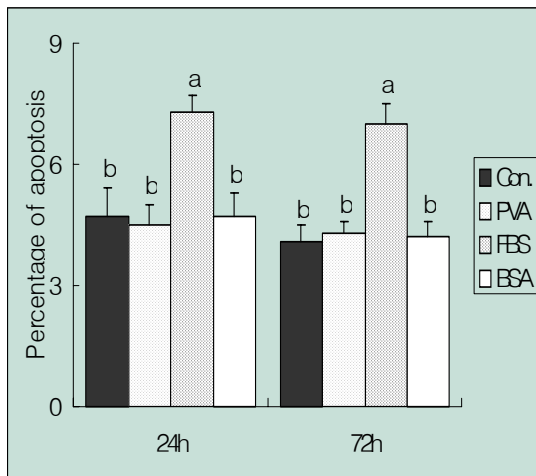


Figure 64. Degree of apoptosis (apoptotic cell no./total cell no.) in the blastocysts at day 7 that cultured from 2- (24h) or 8-cell (72h) stage embryos in the NCSU 23 medium supplemented PVA, FBS or BSA.

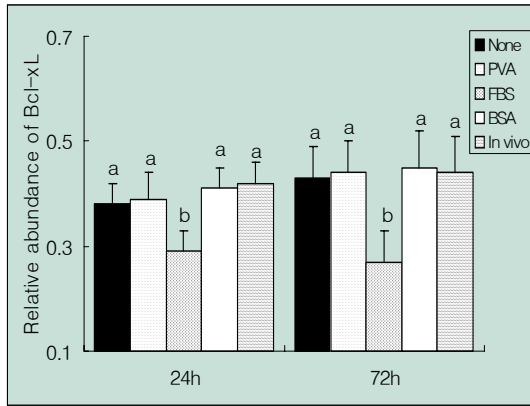


Figure 65. Relative abundance of Bcl-xL mRNA expression in porcine parthenotes at day 7 that cultured from 2- (24h) or 8-cell (72h) stage embryos in the NCSU 23 medium supplemented PVA, FBS or BSA.

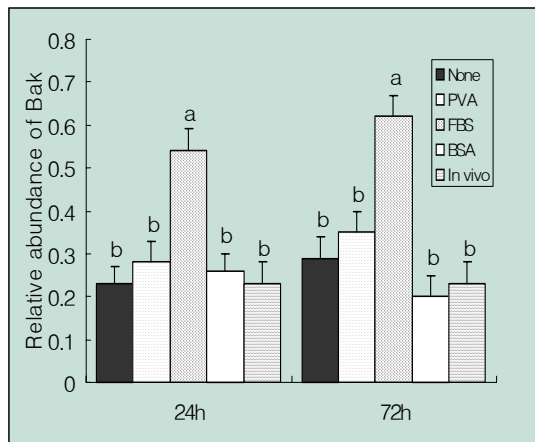


Figure 66. Relative abundance of Bak mRNA expression in porcine parthenotes at day 7 that cultured from 2- (24h) or 8-cell (72h) stage embryos in the NCSU 23 medium supplemented PVA, FBS or BSA.

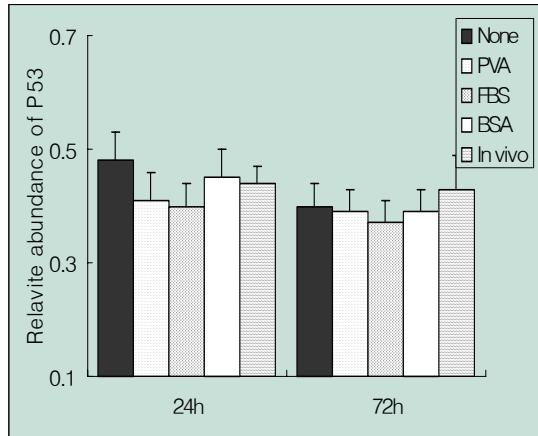


Figure 67. Relative abundance of P53 mRNA expression in porcine parthenotes at day 7 that cultured from 2- (24h) or 8-cell (72h) stage embryos in the NCSU 23 medium supplemented PVA, FBS or BSA.

3. 핵이식에서의 미세소관의 변화 조사

가. 난포란의 회수 및 체외성숙

도축장에서 돼지 난소를 회수하여 실험실로 운반한후 수술칼로 난소의 표면을 slicing 하여 GV 상태에 있는 미성숙 난자를 회수한후 NCSU37에 100 ng/ml EGF, (Sigma), 10 IU/ml PMSG (Sigma) and 10 IU/ml hCG (Sigma), 10 IU/ml 17 beta-estradiol를 첨가하고 paraffin oil을 덮은 후 at 37도에서 72 시간 배양하였다. 난자가 성숙된 후 1 mg/ml hyaluronidase 에서 15분 동안 37도에서 배양한 후 pipetting 하여 난구세포를 제거 후 핵이식에 제공하였다 .

나. 돼지 체세포의 준비

돼지 귀 부위를 알콜스폰지로 닦은 다음 멸균된 punch로 귀조직을 떼어내어 DME 배양액으로 원심 세정하여 핵 이식에 이용하였다.

다. 체세포 핵이식

체세포 핵이식 방법은 Kato 등(1999) 방법에 준하여 실시하였다. 세포의 융합은 Electro Cell manipulator BTX 2001로 통전압은 140V/mm, 통전시간은 50 μ sec으로 하고 2회 통전하여 융합 및 활성화를 유도하였다.

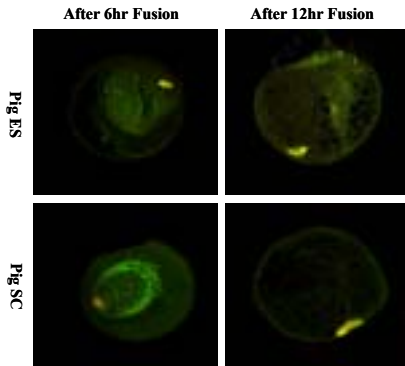


figure 68. 돼지 줄기 세포 및 체세포 핵이식후 세포융합 6h, 12h 후의 미세소관

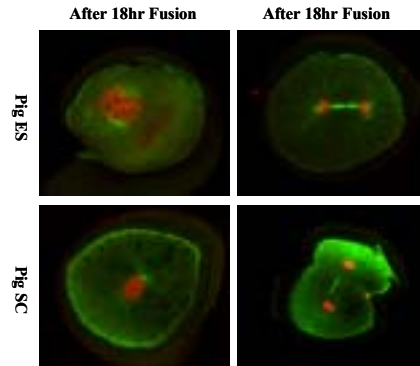


figure 69. 줄기세포 및 체세포 핵이식후 세포융합 18h 후의 미세소관

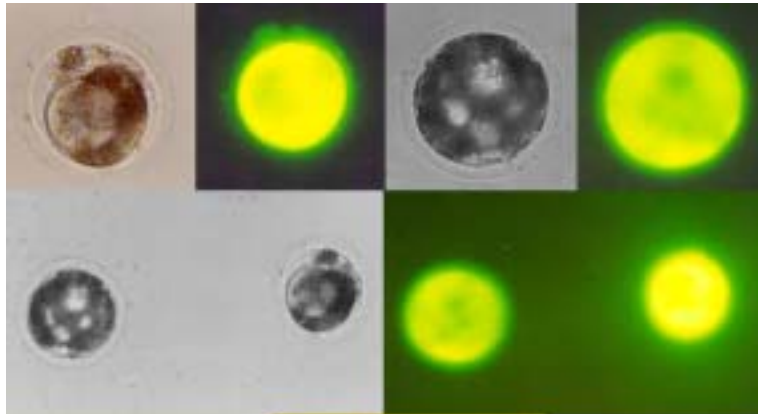
라. 핵이식 수정란에서 외래 유전자 확인

GFP 유전자를 retrovirus vector를 이용하여 체세포내로 도입 한후, 이 체세포를 이용하여 핵이식 방법에 의해 배양 한 배반포에서 아래와 같이 수정란에서 외래 유전자가 성공적으로 발현 함을 확인 할 수 있었다.

4. 수란돈의 발정동기화 조사

형질전환돼지를 생산하기 위해서는 이식가능한 난자 시기와 이식할 돼지의 발정시기가 일치해야 정상적인 착상과 산자의 생산이 가능하므로, 이러한 문제를 해결하고자 미경산돈을 공시하여 대조군 및 altrenogest 처리군의 발정동기화를 조사하였던 바, 발정발현율은 각각 85.0% 및 90.1%로 altrenogest 처리군이 높았으며, 대조군에서는 발정이 산재하여 나타나지만 altrenogest 투여 후 PMSG와

hCG를 처리하였을 때에는 4-12일 사이에 86.6%의 개체가 발정이 동기화 되었다.



5. 형질전환 수정란의 이식

가. 수란돈의 발정동기화 유도

핵이식한 수정란의 착상 및 임신유지와 산자의 생산을 위해서는 이식가능한 난자 시기와 이식할 돼지의 발정시기가 일치해야 정상적인 착상과 산자의 생산이 가능하므로, 이러한 문제를 해결하고자 2, 3차 경산돈을 공시하여 발정 동기화를 유도하였다.

나. 체외수정란의 이식

도축장에서 미성숙 난자를 회수한 후 실험실에서 체외성숙 시키고, 형질전환된 체세포를 이용하여 핵이식을 시킨다. 배아를 1세포기, 2세포기로 배양시킨후 대리모에 이식을 하였다.

다. 돼지 새끼의 DNA 분석

human PTH DNA를 이용하여 핵이식 후 1- 2세포기의 난자를 발정 동기화된 recipient의 난관에 이식하여 돼지새끼를 생산하였다. 총 963 개의 난자를 핵이식하여 그중 856 개의 수정란을 11마리의 recipient에 이식하여 7두의 새끼를 생산하였다. 태어난 자돈의 귀 조직으로부터 genomic DNA를 추출하여 PCR을

실시하였다. PTH specific primer를 이용하여 새끼 돼지의 genomic DNA를 PCR로 분석하였는데 핵이식으로부터 생산된 돼지 새끼에서 유전자 발현 검색을 통해 형질전환돼지를 판명해보려 하였으나 형질전환된 돼지가 아님을 확인하였다.

Table 15. 복제수정란의 수란돈내 이식.

핵이식 복제 난자수	이식한 수정란	수란돈 수 (두)
963	856	7



Figure 70. Embryo transfer of transgenic embryos into foster mother oviducts.

Table 16. Transgenic efficiency in pigs following nuclear transfer.

Treatment	No. of embryos transferred	No. of recipients	No. of pregnant recipients	No. of piglets born	No. of transgenic piglets
Nuclear Transfer	963	11	6	7	0

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표달성도

본 세부 과제 연구의 목적은 골다공증 치료제로 알려져 있는 hPTH를 생산하는 형질전환 돼지의 생산에 사용하기 위하여 *hPTH* 유전자를 효율적으로 발현하는 돼지세포를 구축하는데 있다. 이를 위하여 유전자 전이 수단으로 retrovirus vector system을 사용하였는데, 기존의 retrovirus vector에 WPRE (Woodchuck hepatitis virus Posttranscriptional Regulatory Element) 서열과 Tetracycline inducible expression system을 도입함으로써 hPTH 호르몬 생산의 양적인 증가와 함께 *hPTH* 유전자의 발현을 tetracycline으로 유도 할 수 있었다. 본 연구의 목표 달성도를 요약하면 다음과 같다.

1) 본 연구에서 생산하고자 하는 형질전환돼지가 발현할 인간 parathyroid hormone(hPTH)과 calcitonin 유전자의 발현 promoter로는 정낭(seminal vesicle)에 조직특이적인 P12 (seminal vesicle-specific, Dyck et al., 1999) promoter를 사용함으로써 외부 단백질이 동물체내에서 무분별하게 발현되어 야기되는 여러 가지 생리적 부작용을 최소화하고자 한다.

2) hPTH를 생산하는 형질전환 돼지의 생산이상의 결과를 바탕으로 하여 외래 유전자의 높은 발현과, 그 지속적인 발현에 의한 생리적인 부작용을 최소화하는 적절한 발현 유도 system은 WPRE가 *hPTH* 유전자의 downstream에 도입된 RevTRE-PTH-WPRE-CMVp-rtTA2SM2인 것으로 확인되었으며 앞으로 비유도 조건에서 보다 확실한 유전자 발현의 turn off가 이루어질 수 있도록 구조적으로 개선되어야 할 것으로 생각된다.

3) hOCT4 promoter 특성 규명의 결과를 바탕으로 pOCT4 유전자 발현기전의 규명을 위한 자료로 이용될 수 있으며, 또한 hOCT4 promoter-reporter system을 구축된 돼지 줄기세포에 도입시켜 hOCT4 promoter 하에 reporter gene이 발현되는 돼지줄기세포를 선별함으로써 줄기세포의 순도를 높이는데 사용될 수 있

으며, OCT4 promoter activity에 관련된 인자들이 줄기세포에서의 특이적 발현이 있는 경우 돼지 줄기세포의 표식인자로 사용할 수 있다고 본다.

4) 본 연구에서 구축한 PEI reagent는 인간줄기세포내 외래유전자의 도입에 효과가 있다고 보고되었으며, 상품화된 gene delivery reagent와 비교해 가격이 상대적으로 지극히 저렴하고 외래유전자 도입의 효율이 우수하여 돼지줄기세포내 외래유전자 도입을 위해 사용시 매우 유용할 것이라 사료되어진다.

5) 돼지의 체세포를 이용해 핵이식된 돼지수정란의 체외발달율은 재구성된 난자의 융합율은 56.7%, 난할율은 33.6%였으며, 상실배 또는 배반포까지 발달한 수정란은 6.9%였다. 융합 직후에는, 팽창된 염색질을 관찰할 수 있었으며, 핵 치환 후 9시간 쯤에는 염색질이 응축되어 있는 것을 볼 수 있었다. 18시간 쯤에는 염색질이 두 개의 전핵과 같은 물질로 팽창되어져 있는 것을 볼 수 있었다. 배반포까지 발달한 수정란을 염색하여 핵의 개수를 확인한 결과 기존의 체외수정란과 차이가 없음을 알 수 있었다.

6) 난자의 활성화가 지연된 상태에서는 핵이식 직후에, 핵이 응축되어 있는 것을 관찰하였다. 핵치환 후 1시간째에는 임의적으로 배열된 미세소관들이 응축된 염색질에 단단히 붙어있는 것을 관찰하였다. 핵치환 후 3시간 쯤에는 핵이 두 개의 염색질로 분리된 것을 볼 수 있었다. 6시간에서 15시간 사이에는 염색질이 두 개이상의 전핵과 같은 물질로 발달한 것을 관찰할 수 있었다. 18시간 후에는 염색질이 감수 분열 중기의 특징을 나타냈다. 반면에, 난 활성이 동시에 이루어진 경우에는 핵 이식 직후에 핵이 팽창되어 있는 것을 관찰하였다.

7) 마우스 Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating factor(GM-CSF)가 돼지 단위발생 난자 및 핵이식 난자의 발달과 착상관련 유전자의 발현에 미치는 영향을 알아본 연구는 mGM-CSF가 cleavage율은 증가시키지 않았으나 배반포까지의 발달율은 유의적으로 향상시켰다. NCSU 23 배양액에 5 mM의 glutathione와 GM-CSF를 첨가하였을 때 GM-CSF만 첨가하였을 때보다 배반포의 형성이 유의하게 향상되었다. 그러나 mGM-CSF는 배반포에서의 세포수는 증가시키지 못하였다. GM-CSF는 돼지 핵이식난자의 발달에도 마찬가지로 영향

을 미치지 않았다. mGM-CSF는 BSA가 존재하는 배양액에서 유전자의 발현에 영향을 미치지 못한다. 그러나 BSA가 없는 NCSU 23 배양액에 mGM-CSF를 첨가하였을 때는 착상관련 유전자인 LIF-r의 발현을 향상시켰다. 그러나 SGLT-1과 IL-6의 발현에는 영향을 미치지 못하였다.

8) Epidermal Growth Factor (EGF)에 관한 연구 결과는 4-cell stage에서 0.1%와 0.4%의 BSA가 존재하는 NCSU 23 배양액에서 BSA가 없는 배양액에서보다 유의적으로 많은 4-cell stage의 돼지 단위발생 난자가 배반포까지 발달하였다. 그러나 BSA가 존재하는 배양액에 10ng/ml의 EGF를 첨가하였을 때 배반포까지의 발달율을 향상시키지 못하였다. EGF가 4-cell stages에서 EGF는 BSA가 없는 배양액에서는 배반포의 세포수를 증가시키지 못하였다. 그러나 0.1%와 0.4%의 BSA가 존재하는 배양액에서는 배반포의 세포수를 유의하게 증가시켰다 ($P < 0.01$). RT-PCR를 통하여 EGF가 세포사멸에 관련된 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. EGF는 BSA가 없는 배양액에서는 세포사멸에 관련된 유전자중 세포사멸을 억제하는 유전자인 Bcl-xL의 발현에 영향을 미치지 못하였다. 그러나 0.4%의 BSA가 존재하는 배양액에서는 Bcl-xL의 발현을 유의하게 향상시켰다 ($P < 0.01$). EGF는 배양액에 BSA가 있거나 없거나를 물론하고 세포사멸을 유발하는 유전자인 Bak의 발현에는 영향을 미치지 않았다.

9) 수정란 이식을 본격적으로 실시하기 위하여 수정란 이식 기술을 확보하고자 연구를 실시하였다. 본 연구과제에서는 외과적 수술에 의한 수정란 이식 기술의 효율을 검정하였다.

10) 단백질 첨가제가 돼지 단위발생 난자의 발달에 미치는 영향에 관한 연구 결과는 NCSU 23 배양액에 10%의 FBS를 첨가하였을 때 2-cell stage부터 처리하였거나 또는 late 4-cell stage부터 처리하였거나 모두 비교군(NCSU 23) 및 0.1%의 PVA 처리군과 배반포까지의 난자의 발달에 유의적인 차이가 없었다. 그러나 0.4%의 BSA를 첨가하였을 때는 2-cell 또는 late 4-cell stage로부터 처리하였을 때 모두 비교군, 0.1%의 PVA 처리군 및 10% FBS 처리군보다 배반포까지의 발달율이 유의하게 향상되었다. 그리고 비교군, PVA 또는 FBS 처리군은 모두 late 4-cell부터 처리하였을 때 2-cell부터 처리하였을 때보다 발달율이 높았

다($P < 0.001$).

11) 배반포에서의 세포수를 조사하였는데 2-cell부터 처리하였거나 또는 late 4-cell부터 처리하였거나 모두 FBS의 첨가군이 비교군, PVA 및 BSA 처리군보다 세포수가 유의하게 낮았다($P < 0.05$). TUNEL에 의한 세포사멸을 조사한 결과에 의하면 세포사멸은 2-cell 및 late 4-cell로부터의 처리배양에서 모두 FBS의 첨가군이 비교군, PVA나 또는 BSA 첨가군보다 세포사멸이 유의하게 많은 값을 나타냈다($P < 0.01$).

12) 세포사멸을 억제하는 유전자인 Bcl-xL과 세포사멸을 유발하는 유전자인 Bak의 발현을 RT-PCR을 통하여 조사하였다. 2-cell부터 처리하였거나 또는 late 4-cell부터 처리하였거나 모두 FBS의 첨가군에서 in vitro 비교군, PVA와 BSA 첨가군 또는 in vivo 배반포보다 Bcl-xL의 발현은 유의하게 낮았고($P < 0.05$) 반대로 Bak의 발현은 유의하게 높았다($P < 0.005$). 여기에서 in vitro 1비교군, 0.1% 첨가군 및 0.4% BSA 첨가군은 모두 in vivo 첨가군과 Bcl-xL 및 Bak 유전자의 발현이 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그리고 세포사멸에 관련된 다른 하나의 유전자 P53의 발현은 비교군과 모든 처리군 및 in vivo 배반포에서 차이를 보이지 않았다.

13) 형질전환돼지를 생산하기 위해서는 이식가능한 난자 시기와 이식할 돼지의 발정시기가 일치해야 정상적인 착상과 산자의 생산이 가능하므로, 이러한 문제를 해결하고자 미경산돈을 공시하여 대조군 및 altrenogest 처리군의 발정동기화를 조사하였던 바, 발정발현율은 각각 85.0% 및 90.1%로 altrenogest 처리군이 높았으며, 대조군에서는 발정이 산재하여 나타나지만 altrenogest 투여 후 PMSG와 hCG를 처리하였을 때에는 4-12일 사이에 86.6%의 개체가 발정이 동기화 되었다.

14) 체외수정란의 이식의 연구 결과는 외과적 이식에 의한 수정란 이식 기술을 개발하고자, 세포질내 정자 직접주입법에 의해 생산된 수정란을 발정주기가 동기화된 수란돈에 주입하는 연구를 실시하여 약 30%의 돼지에서 발정주기가 재귀되지 않는 결과를 얻었다.

15) 체외성숙, 수정 및 배발생이 유도된 수정란을 이용하여 산자의 생산을 얻기 위하여 외과적 수정란 이식을 실시하여 복제 돼지 7마리를 생산하였고, 유전자 발현 검색을 통해 형질전환돼지를 판명해보려 하였으나 형질전환된 산자가 아님을 확인하였다.

제 2 절 관련분야 기술발전예의 기여도

본 연구에서 형질전환돼지를 생산하는 방법으로 체세포의 핵치환을 이용한 방법을 사용하고자 하는데 그 이론적 근거는 다음과 같다. 핵치환을 이용한 cloning 기술은 가장 최근의 기술로 Wilmut(1997)에 의해 embryonic cell이 아닌 분화가 끝난 유방조직 세포의 핵을 미수정란의 핵과 치환하여 Dolly라는 양을 탄생시킴으로써 세계적인 주목을 끌게 되었는데, 그 후 Cibelli 등(1998)은 태아조직 세포의 핵을 이식하여 성공적으로 송아지를 생산하는데 성공하였다. 핵이식 기술은 복제동물 생산에 그치지 않고 외래 유전자가 삽입 혹은 치환된 체세포를 이용할 경우 유전자가 도입된 형질전환개체를 생산 할 수 있어 그 이용범위가 크다고 할 수 있다. 또한, 본 연구에서 구축한 PEI reagent는 인간줄기세포내 외래유전자의 도입에 효과가 있다고 보고되었으며, 상품화된 gene delivery reagent와 비교해 가격이 상대적으로 지극히 저렴하고 외래유전자 도입의 효율이 우수하여 돼지줄기세포내 외래유전자 도입을 위해 사용시 매우 유용할 것이라 사료되어진다. 이러한 연구 결과를 근간으로 생산된 고가 의약품에 의한 국내 기업의 경쟁력 확보, 치료를 통한 인간건강의 복리 증진, 중소 가축을 이용한 형질전환 동물의 생산과 활용의 증대, 국내 기술의 세계적 경쟁성 확보, 국내 동물산업의 활성화 및 학문기술 발전예의 기여를 하리라 판단되어진다. 결론적으로 본 연구는 세계적으로 유전자 재조합 형질전환가축을 생산하여 인류에 공헌할 수 있는 방안으로 연구가 추진되고 있는 실정인 바 본 기술개발을 모델로 하여 이 연구 성과에 따라 앞으로 형질전환 돼지를 만들 수 있는 가능성을 제공해 줄 수 있을 것으로 사료되어진다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 활용계획

유용유전자의 국내 확보와 함께 생산된 고가 의약품에 의한 국내 기업의 경쟁력 확보를 가질 수 있다. 또한 치료를 통한 인간건강의 복리 증진 및 중소 가축을 이용한 형질전환 동물의 생산과 활용의 증대에 활용될 수 있다. 국내 기술의 세계적 경쟁성 확보와 국내 동물산업의 활성화 및 학문기술 발전에의 기여함으로 본 연구 과제가 활용될 것이다.

제 2 절 활용방안

본 연구는 세계적으로 유전자 재조합 형질전환가축을 생산하여 인류에 획기적으로 공헌할 수 있는 방안으로 연구가 추진되고 있는 실정인 바 본 기술개발을 모델로 하여 다음과 같은 목적의 연구와 연계시켜 사회·경제적으로 삶의 질을 향상시킬 수 있는 기술을 국내 관련 기관에 이전하고자 한다.

◆ 활용분야

- 가. 형질전환동물생산과 연관된 모든 연구분야 및 산업체.
- 나. 유전자 제작, 동결 이용과 관련된 모든 연구분야 및 산업 분야.
- 다. 수정란의 이용효율을 향상을 위한 신기술 창출 분야.
- 라. 돼지 수정란 이식 기술과 연관된 산업분야.

제 6 장. 참고문헌

Bleck, G. T., White, B. R., Miller, D. J., and Wheeler, M. B. 1998. Production of bovine alpha-lactalbumin in the milk of transgenic pigs. *J. Animal Sci.* 76: 3072-3078.

Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., and Yee, J.-K. 1993. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. USA* 90: 8033-8037.

Chan, A. W. S., Homan, E. J., Ballou, L. U., Burns, J. C., and Bremel, R. D. 1998. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *Proc. Natl. Acad. USA* 95: 14028-14033.

Chan, A. W. S., Chong, K. Y., Martinovich, C., Simerly C., Schatten, G. 2001. Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. *Science.* 291:309-312.

Cibelli J. B., Stice S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon FA., Robl, J. M. 1998. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat Biotechnol* 16(7): 642-646

Dyck, M. K., Gagne, D., Ouellet, M., Senechal, J-F., Belanger, E., Lacroix, D., Sirad, M-A., and Pothier, F. 1999. Seminal vesicle production and secretion of growth hormone into seminal fluid. *Nature Biotechnology* 17: 1087-1090.

Ebert, K. M., Low, M. J., Ovestorm, E. W., Buonomo, F. C., Baile, C. A., Roberts, T. M., Lee, A., Mandel, G., and Goodman, R. H. 1988. A moloney MLV-Rat somatotropin fusion gene produces biological active somatotropin in a transgenic pig. *Molecular Endocrinology* 2:277-283.

Jaenisch, R., Fan, H., and Croker, B. 1975. Infection of preimplantation mouse embryos and of newborn mice with leukemia virus: Tissue distribution of viral DNA and RNA and leukemogenesis in the adult animal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 4008-4012.

Kim, T., Leibfried-Rutledge, M. L., First, N. L. 1993. Gene transfer in bovine blastocysts using replication-defective retroviral vectors packaged with Gibbon Ape Leukemia virus envelopes. *Molecular Reproduction and Development* 35: 105-113.

Kim, T., Lee, Y. M., Lee, H. T., Heo, Y. T., Yom, H.-C., Kwon, M. S., Koo, B. C., Whang, K., and Roh, K. S. 2001. Expression of the E. coli LacZ Gene in Chicken Embryos using Replication Defective Retroviral Vectors Packaged with Vesicular Stomatitis Virus G Glycoprotein Envelopes. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 14: 163-169.

Koo, D.-B., Kang, Y.-K., Choi, Y.-H., Park, J. S., Kim, H.-N., Kim, T., Lee, K.-K. and Han, Y.-M. 2001. Developmental Potential and transgene expression of porcine Nuclear Transfer embryos using somatic cells. *Mol. Reprod. Dev.* 58: 15-21

Lai L., Kolber-Simonds D., Park K. W., Cheong H. T., Greenstein J. L., Im G. S., Samuel M., Bonk A., Rieke A., Day B. N., Murphy C. N., Carter D. B., Hawley R. J., Prather R.S. 2002. Production of α -1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer. *Scienceexpress.* 10.1126; 1-4.

Pursel, V. G., Pinkert, C. A., Miller, K. F., Bolt, D. J., Campbell, R. G., Palmiter, R. D., Brinster, R. L., and Hammer, R. E. 1989. Genetic engineering of livestock. *Science* 244: 1281-1288.

Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., and Campbell, K. H. S. 2001. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 385: 810-813.

주 의

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