최 종
연구보고서

우유로 αAT를 분비하는 체세포복제 형질전환 소 생산기술 연구

Development of technology for production of transgenic cow as αAT bioreactor by somatic cell nuclear transfer

충 남 대 학 교

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 "**우유로 αAT를 분비하는 체세포복제 형질전환 소 생산기술 연구**" 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 7 월 일

주관연구기관명 : 충남대학교
총괄연구책임자 : 신 상 태
세부연구책임자 : 조 종 기
연 구 원 : 김 영 실
연 구 원 : 손 정 민
연 구 원 : 신 영 지
연 구 원 : 이 두 수
연 구 원 : 이 승 재
연 구 원 : 이 옥 근
연 구 원 : 임 영 환
연 구 원 : 김 태 용
연 구 원 : 양 홍 석

요 약 문

Ⅰ. 제 목

우유로 αAT를 분비하는 체세포복제 형질전환 소 생산기술 연구

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 기술적 측면

인체치료용 단백질을 인공적으로 생산하기 위한 방법으로 미생물-세포 배양법, 동물세포 배양법 및 DNA 미세주입법 등이 시도되었으나 많은 단점들이 있다. 미생물-세포배양의 경우 고등동물과 상이한 미생물의 단백질 발현 및 합성 기작, 낮은 인체유래 단백질과의 homology로 인한 생물활성 감소 및 정제기술의 복잡화와 난해성의 문제가 있으며 동물세포 배양의 경우 생산규모의 급격한 확충에 따른 기업화의 난이성과 고가의 시료이용에 의한 생산원가 증가 등의 문제가 있다. DNA 미세 주입법의 경우 상기 방법들의 대안으로 포유동물 개체를 숙주로 이용하는 형질전환 생산기법이나 외래유전자의 게놈 내 삽입빈도가 동물의 경우 1% 미만이며 mosaicism이 형질전환가축이 대부분에서 출현과 후대 유전자 전달율이 극히 미미함 등의 해결해야 문제가 많다.

이에 형질전환 기술을 체세포핵이식 복제기술에 대입하는 방법이 대안으로 떠오르고 있다. 본 기법은 체세포에 미리 외래유전자를 도입하여 유전자가 도입된 체세포만을 이식하는 방법이며 다음과 같은 장점으로 현재 많은 연구가 시도되고 있다 먼저 mosaicism이 없는 100% 형질전환수정란 및 동물을 효율적으로 생산할 수 있으며 체세포의 성을 미리 판별하여 원하는 성의 형질전환동물만을 생산할 수 있고 형질전환 동물의 체세포를 공여핵원세포로 이용할 수 있으며 체치료용 단백질 생산 이외에 세포 단계에서 특정 유전자를 제거하여 질병내병성 동물 또는 인체장기이식용 동물을 생산할 수 있다.

본 연구에서는 체세포 핵이식 방법을 이용하여 인체 치료용 유용 단백질인 α_1 -antitrypsin(αAT)를 우유로 분비되는 형질전환 소를 생산하는 기술을 개발하고자 하였다. 우리나라는 동물 형질전환 기술분야에서 후발 국가였으나 빠른 시간 내 형질 전환된 젖소·흑염소·돼지 등이 생산하였다. 본 연구팀은 1998년 세계 최초로 GM-CSF를 분비하는 흑염소의 생산에 성공하였으며, 우리나라의 동물의 체세포 복제 기술은 이미 세계적인 수준에 있다. 본 연구팀은 선행과제에서 소 유선에서 발현되는 AT 벡터가 제작되어 있으며 다른 유용단백질 발현벡터도 제작중이다. 이 같은 기술을 토대로 본 기술이 개발되면 인체 치료용 유용 단백질을 생산하여 조기 산업화를 유도함으로써 해당산업분야의 발전을 크게 촉진할 수 있으며 향후 특정질병 내성 동물 또는 장기 이식용 형질전환 동물 생산에도 적용할 수 있을 것이다.

2. 경제·산업적 측면

인간의 질병을 치료하는 데 필요한 고가(高價) 약품을 동물의 젖에서 분비되도록 하고, 이를 정제해서 얻을 수 있는 새로운 제약시스템이 개발되어 형질전환 동물의 유용성은 산업적인 측면에서 인간의 삶의 질을 높이는 쪽으로 확대되었다. 기업 입장에서는 형질전환 동물기술을 이용해서 의약품 생산비용 절감과 생산량 증가 효과를 동시에 누릴 수 있으며 형질전환 소를 이용하여 치료용 고가의약품(혈전증치료제, 조혈촉진제, 암치료제 등)이나 호르몬을 생산하는 기술이 개발되고 있으며 특수 약품생산의 시장규모는 연간 수백억 달러에 이를 것으로 전문가들은 분석하고 있다. αAT의 경우 형질전환 젖소 한 마리가 가진 경제성은 31억여원으로 추정된다. 이 때문에 선진국에서는 국가의 경쟁력 확보와 국민의 삶의 질 향상이라는 측면에서 형질전환 동물 연구를 집중적으로 지원하고 있으며 막대한 부수효과 창출이 예견된다.

3. 사회·문화적 측면

현재 국내 축산인들은 그간 농촌지역에서 비교적 고소득을 올리며 풍족한 생을 영위해 오면서 지역 내 선도역을 수행했으며 일부에서는 대졸 이상의 고학력자가 농촌에서 삶의 터전을 일구는「돌아오는 농촌」현상의 주역이 되어 왔다. 또한 축산인들은 일반적으로 학력수준이 높고 진취적 사고를 지니고 있어 첨단 및 선진기술에 대한 적응도가 1차 산업중에서는 가장 높은 분야의

종사자들이다. 그러나 축산물시장 자유화시대에 접하게 되어 영농의욕의 상실 및 생산기반의 붕괴에 의해 농촌이 황폐화되면 축산인들은 사회소외 계층으로 전락될 것이다. 본 신청과제가 성공리에 수행되어 산업화가 이루어지면 형질전환 복제소에 의해 높은 시장성을 가진 치료용 단백질의 생산 등에 의해 축산생산성이 현재보다 향상되어 축산업은 향후에도 계속 안정적 직업으로 양질의 삶을 보장받을 수 있는 중상층 국민의 농촌지주역이 될 수 있을 것이다. 형질전환 복제소에 의한 치료용 단백질의 생산은 축산의 일반적인 개념을 의약품 생산 공장으로 바꾸어 놓을 수 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 우유에서 인간에게 유용한 αAT을 분비하는 형질전환 소 생산기술 개발을 위해 제 1세부 과제인 “유전자가 도입된 형질전환 세포주 수립”과 제 2세부 과제인 “형질전환 복제수정란의 생산과 이식 및 수란우의 사양관리”로 나누어 실시하였으며 각 세부과제별 연구개발 내용 및 범위는 다음과 같다.

제 1세부 과제 : αAT 유전자가 도입된 형질전환 세포주 수립

1) 우량 젖소 체세포주 수립
   - 태아섬유아, 귀섬유아, 난구세포 채취 후 primary 세포주 수립
   - 수립된 세포주 계대 배양 및 동결 보존
2) αAT 발현벡터의 체세포로의 도입
   - 전기충격법(electroporation)에 의한 발현벡터 transfection
   - Lipid-mediated methods에 의한 발현벡터의 transfection적용
3) 최적의 유전자 도입 조건 수립 및 형질전환 세포 선별
   - 세포 confluency, 계대수에 따른 유전자 도입률 비교
   - 발현벡터 농도에 따른 유전자 도입 비교

4) Stable한 형질전환 세포주 수립

· GFP 표지인자를 발현하는 유용 유전자 도입 세포주 수립

· 항생제 표지인자를 통한 유용 유전자 도입 세포주 수립

· 확립된 세포주의 계대 배양 및 동결보존

5) 형질전환 태아의 □AT 유전자 삽입 검증

· 태아에서 genomic DNA 분리

· 유전자 증폭 및 분석에 의한 유용유전자 도입 확인

제 2세부 과제 : 형질전환 복제수정란의 생산과 이식 및 수란우의 사양관리

1) 미성숙 난자의 체외 성숙 배양 효율 향상

· 미성숙 난자의 체외성숙 배양조건 및 성숙배지 조성 개선

· 세포질 성숙 비교 검정에 의한 세포질 성숙 요인 규명

2) 핵이식 미세조작 기술 개발

· 효율적인 탈핵기법 개발

· 일반 핵이식에서 최적의 체세포 종류 선별

· 최적의 융합 및 활성화 조건 수립하여 형질전환 핵이식에 적용

3) 형질전환 체세포 핵이식

· 외부유전자가 도입된 체세포를 이용 형질전환 핵이식란 생산

· 최적의 형질전환 핵이식란 배양배지 선별

4) 수란우의 선정 및 발정 동기화

· 정상 발정 주기의 수란우 선정

· 수란우 황체의 형태 및 등급 판정

· $PGF_{2\alpha}$ 및 CIDR을 이용하여 발정동기화 유도

· 수란우의 질병관리

5) 형질전환 핵이식란 이식 및 임신 진단

· 최적의 수란우 선별 및 비외과적 이식

・이식 후 직장검사 및 초음파에 의한 임신 진단

6) 임신된 수란우 관리 및 분만 전・후 관리

・임신된 수란우의 체계적인 관리

・임신 수란우의 사양관리

・수란우의 질병관리

・분만기 임신우의 관리 및 분만 유도

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

- 제1차년도 -

가. 제1세부 과제: αAT 유전자가 도입된 형질전환 세포주 수립

1) 우량 젖소 체세포주 수립

- 귀섬유아세포(Ear fibroblast) 3개주 수립

: 경기도 화성시 소재 목장(재은목장)에서 건강하고 착유량이 좋은 젖소 3마리에서에서 귀 섬유아세포를 채취하여 3개의 체세포주를 수립하였다. 체세포 공여우는 착유량 40kg/일 이상, 산차는 5산 이상인 번식능이 검증된 소로서 유산 유무, 부모의 혈통 및 기타질병 유무를 조건으로 하여 선별하였다.

- 난구세포(Cumulus cell) 2개주 수립

: 우량 젖소의 도축 시 난소를 채취한 후 난자를 추출 pipetting으로 난구세포를 분리 배양하였다

- 태아섬유아세포

: 도축장에서 임신 40-50일경의 태아를 선별하여 1개의 태아 섬유아세포주를 수립하였다

2) αAT 발현벡터의 제작

- αAT 발현벡터 제작를 위해 pcDNA3(Invitrogen)를 축으로 하여 promoter gene으로 bovine β-casein promoter gene을 소 genomic DNA에서 PCR로 증폭하여 추출하였으며 reporter gene으로 eGFP를 pEGFP-N1 vector (Clontech)에서 분리하여 pcDNA3에 넣어 제작하였다

나. 제2세부 과제: 형질전환 복제수정란의 생산과 이식 및 수란우의 사양관리

1) 미성숙 난자의 체외성숙 효율 향상

- 기존의 배양배지에 PMSG, LH를 첨가하고 기타 insulin, pyruvic acid 및 EGF를 첨가한 결과 75% 이상의 체외성숙률을 보였다

2) 일반 핵이식에서 최적의 공여핵원 조건 확립

- 공여핵원 종류에 따른 핵이식란의 발육률을 비교한 결과 귀섬유아세포와 난구세포군에서 유의적으로 높은 배반포로의 발육율을 보였다(43.8%, 40.6% vs. 19.0%)
- 공여핵원의 혈청기아 배양여부에 따른 핵이식란의 발육율을 비교한 결과 분할율에서만 non-starved 군에서 유의적으로 높았으나 배반포로의 발육율은 유의적인 차이가 없었다(28.4% vs. 33.6%).

3) 최적의 융합 및 활성화 조건 확립

- 핵이식란의 활성화 조건에 따른 핵이식란의 발육율을 비교한 결과 융합 후 활성화가 이루어진 군에서 융합전 활성화 군 및 융합 활성화 동시군보다 유의적으로 높은 분할률 및 배반포로의 발육율을 보였다(47% vs. 13%, 7%).

- 제2차년도 -

가. 제1세부 과제: αAT 유전자가 도입된 형질전환 세포주 수립

1) □AT 유전자의 최적의 도입 조건 확립

- 제작된 발현벡터를 2가지 다른 시약을 이용한 lipid-mediated transfer (LipoFectin vs. FuGene6) 방법과 electroporation 방법을 이용하여 실시 최적의 방법을 선별하였다.

2) 발현율 비교

- 상기 3가지 방법으로 transfection한 후 세포주를 single cell suspension하여 세포당 발현된 세포를 비교한 결과 FuGene을 이용한 군에서 유의적으로 높은 발현율을 보였다(11.5% vs. 0.6%, 2.6%).

3) Stable한 형질전환 세포주 수립

- 태아섬유아세포, 난구세포 및 귀섬유아세포에서 FuGene6을 이용하여 stable한 형질전환 체세포주를 수립하였다

나. 제2세부 과제: 형질전환 복제수정란의 생산과 이식 및 수란우의 사양관리

- 2차년도에 총 164개의 형질전환 핵이식란을 생산하였으며 이중 27개를 12마리의 대리모에 이식하였다

1) 공여핵원의 조건에 따른 transgenic SCNT embryos의 발육능 비교

-공여핵원의 체세포 종류에 따른 형질전환 핵이식란의 발육율을 비교한 결과 난구세포를 이용한 군에서 태아섬유아세포 및 귀섬유아세포 군보다 유의적으로 높은 배반포로의 발육능을 보였다(54.2% vs. 26.7%, 28.3%)

- 발육단계(Developmental stage)에 따른 transgenic SCNT embryos의 발현율을 비교한 결과 3가지 세포군 모두 embryos가 발육할수록 유의적으로 낮게 발현이 되었다.

- 공여세포의 계대배양수에 따른 형질전환 핵이식란의 발육율을 비교한 결과 배반포로의 발육능에서는 유의적인 차이가 없었으나 배반포에서 GFP 발현은 초기 계대군에서 유의적으로 높았다(69.0% vs. 42.4%)

- 공여세포의 GFP 발현량에 따른 형질전환 핵이식란의 발육능을 비교한

결과 GFP 발현이 낮은 군에서 유의적으로 높은 배반포로의 발육능을 보였으나 배반포에서 발현율은 발현이 높은 군에서 유의적으로 높았다.

2) 최적의 배양배지 선별

- 체외수정란에서 최적의 배양배지를 선별하기 위해 mSOF 배지를 대조군으로 하고 KSOM 배지에 BSA, FBS 및 PVA를 첨가한 4가지 배지에서 발육율을 비교한 결과 FBS가 첨가된 KSOM 배지 군에서 유의적인 차이는 없었으나 가장 높은 배반포로의 발육율 및 hatching율을 보였다.
- 상기 4가지 배양배지에 따른 체외수정란의 세포수 및 총세포수 대비 ICM 비율을 비교한 결과 KSOM-FBS군에서 가장 많은 세포수와 ICM 비율을 보였다

3) 수란우의 선정 및 발정동기화

- 홀스타인 처녀소 30마리를 수란우로 선정 총 23두에서 발정동기화를 성공하여 당초 목표인 20두 수란우 선정 및 발정동기화 50% 이상을 초과 달성하였다

4) 형질전환 핵이식란 이식 및 임신진단

- 최종 이식할 수란우를 선별한 목적으로 발정동기화를 통해 부동자세발정(standing estrus)이 관찰된 수란우는 핵이식란 이식일인 발정 7일째에 직장검사를 실시하여 자궁과 난소의 상태 및 황체의 위치를 확인하였으며 황체의 크기가 정상이고 좋은 형태의 crown을 지닌 1등급 수란우 12두에 총 27개의 형질전환 핵이식란을 이식하였다
- Non-return 방법으로 조사한 수란우 12두 중 9마리에서 이식 후 40일 이내에 재발정이 일어났으며 직장검사로 비임신을 확인하였고, 발정이 오지 않은 3마리는 직장검사 및 초음파 검사를 실시하였으나 임신을 확인할 수 없었다. 그러나 이 중 1마리에서 자궁의 뚜렷한 비후와 액체 저류가 관찰되어 유산이 일어난 것으로 추정하였다.

- 제3차년도 -

가. 제1세부 과제: αAT 유전자가 도입된 형질전환 세포주 수립

1) 형질전환 핵이식란에서의 αAT 유전자 발현 검증

- αAT를 도입한 체세포와 체세포 유래 형질전환 배반포에서 αAT 유전자의 발현 여부를 알아보기 위해 체세포 및 배반포에서 genomic DNA를 추출하여 αAT vector, wild type bovine gemomic DNA, transfected cell 및 trasngenic blastocysts에서 PCR를 실시 전기영동하여 밴드를 확인한 결과 vector, transfected cell 및 transfected 배반포에서 αAT 유전자가 발현이 되었으며 대조군인 wild type bovine genomic DNA에서는 발현되지 않았다.

2) 형질전환 핵이식란에서 배발생 관련 유전자 발현 분석

- 형질전환 핵이식란에서 유전자가 정상적으로 발현되는지를 알아보기 위해 단위발생란, 체외수정란, 핵이식란 및 형질전환 핵이식란에서 Hsp70.1 유전자의 발현을 비교한 결과 핵이식란과 형질전환 핵이식란에서 유의적으로 낮게 발현됨을 알 수 있었다.

나. 제2세부 과제: 형질전환 복제수정란의 생산과 이식 및 수란우의 사양관리

1) Demecolcine-assisted 탈핵에 의한 소 형질전환 핵이식란 생산

- 소 형질전환 핵이식란 생산시 탈핵을 용이하기 위해 demecolcine을 이용할 시 탈핵율과 형질전환 핵이식란의 발육능을 높이기 위한 최적의 조건을 알아본 결과 세포막의 protrusion rates는 0.2, 0.4, 0.8ug/ml 군에서 0.1ug/ml 군보다 유의적으로 높았다(82.8%, 86.2%, 90.4% vs. 70.1%).
- Conventional blind 탈핵 방법과 demecolcine-assisted 탈핵 방법간 탈핵율을 비교한 결과 demecolcine 군에서 유의적으로 높은 탈핵율을 보였다 (96.2% vs. 75.3%).
- Demecolcine 농도에 따른 배반포로의 발육율을 비교한 결과 0.1, 0.2ug/ml

군에서 유의적으로 높게 나타났다.

- 결론적으로 demecolcine을 이용하여 탈핵시 0.2ug/ml의 농도가 유의적으로 높은 탈핵율과 배반포로의 발육율을 얻을 수 있는 적정 농도였다.

2) 핵이식란 및 형질전환 핵이식란 최적의 배양배지 선별

- 핵이식란에서는 mSOF-BSA군과 KSOM-BSA 군에서 유의적으로 높은 배반포로의 발육율 및 hatching율을 보였다. 배반포에서 세포수는 KSOM-BSA 군에서 유의적으로 높게 나왔다.
- 형질전환 핵이식란에서는 배양배지별 배반포로의 발육율 및 세포수에서 유의적인 차이가 없었다.

3) 형질전환 핵이식란 이식 및 임신진단

- 매주 2회씩 형질전환 핵이식을 실시하여 233개의 형질전환 핵이식란을 생산하였고 이 중 발육 상태 및 발현율이 좋은 78개의 형질전환 핵이식란을 선별하여 53마리의 대리모에 이식하였다. 이식 후 진단 결과 2마리의 대리모에서 임신을 확인하였다.

4) 수란우의 건강 관리

- 수란대상우들은 독립된 우사에서 분리하여 사양, 관리하였으며 전임수의사 1명이 상주하면서 구충, 백신접종, 건강진단 및 소독 등의 기본적인 질병관리를 하였고, 수란대상우들의 건강상태를 수시로 점검하였다.

2. 연구개발 결과의 활용에 대한 건의

본 연구는 체세포 핵이식에 의한 인간에게 유용한 αAT를 우유에서 분비하는 형질전환 젖소를 생산 방법을 개발함으로써 다음과 같은 분야에서 이용토록 해야 한다.

가. 개발된 기초기술을 학술지를 통한 관련 연구진과 산업계에 보급

나. 형질전환 젖소의 농가 보급으로 생산성 증대에 의한 농가 소득 증대에 활용

다. 형질전환 동물 생산 등 기술적 기반 확보에 활용

라. 난포란의 체외성숙조건의 확립을 통한 체외수정, 세포질 내 정자미세주입, 동결보존 등 관련 분야에의 활용 및 기반제공

마. 현미수정 등과 같은 보조생식기술에 적용하여 사람 및 희귀동물의 불임장애 극복에 활용

바. 안정적인 세포주 배양기법의 확립에 의한 상업적 이용가능(벤처기업 창업 등)

사. 대체장기 생산을 위한 xenotransplantation용, knock-out pig 복제 생산 등 다른 종의 형질전환 동물 생산 방법에 적용

아. 이종간 핵이식 기술 적용에 의한 멸종위기 및 기멸종 동물 복원 연구

자. 연구과정에서 얻어질 다수의 특허를 산업화의 기초로 활용

차. 형질전환 복제소의 농가 보급 및 대량 생산체계에의 활용

SUMMARY
(영문요약문)

Due to the decline in the livestock industry in Korea, a research was financed by a grant from the Ministry of Agriculture and Forestry, “Development of technology for producing transgenic cow as αAT bioreactor by somatic cell nuclear transfer”. The mission was to develop a system enabling the production of transgenic cow as αAT bioreactor by somatic cell nuclear transfer within a project duration date of 3 years.

First year research objectives were 1) Establishment of bovine somatic cell lines, 2) Construction of αAT vector, 3) Improvement of oocyte maturation rates, and 4) Development of micromanipulation technique in the nuclear transfer. We established bovine somatic cell lines including with 3 ear fibroblasts, 2 cumulus cell, and 1 fetal fibroblasts. Moreover, we constructed α AT vector using pcDNA3 vector with bovine casein promoter, aAT gene and gGFP. We achieved maturation rates in the maturation of immature oocytes to 75%. Futhermore, we investigated efficient conditions of donor cell in the somatic cell nuclear transfer and optimal activation protocols.

Second year research objectives were 1) Establish an effective protocol for transfection of αAT vector into somatic cell, 2) Establishment of stable transgenic cell lines, 3) Transgenic somatic cell nuclear transfer, 4) Selection of recipient cows and estrus synchronization, and 4) Transgenic cloned embryo transfer and pregnancy diagnosis. We achieved efficient transfection protocol using FuGene6 and established stable transgenic somatic cell lines. Additionally, we produced 164 transgenic SCNT embryos and transferred 27 embryos into 12 recipient cows. Moreover, we investigated the efficient condition of donor cells in the transgenic somatic cell nuclear transfer

including with donor cell type, cell passages, level of GFP expression and size of donor cell. We also selected 30 recipient cows and achieved 23 estrus synchronized cows.

Third year research objectives were 1) Identification of □AT gene in the transgenic cell and blastocysts, 2) Transgenic somatic cell nuclear transfer, 3) Selection of optimal culture medium for transgenic SCNT embryos, and 4) Transfer of transgenic SCNT embryos. We identified □AT gene in the □AT vector, transfected cell lines and transgenic blastocysts. We produced 233 transgenic SCNT embryos and transferred 78 transgenic embryos into 53 recipient cows. We also established efficient enucleation protocols and selected KSOM-FBS medium as efficient culuture medium.

Our research findings show possibility of production of cloned transgenic cows as □AT bioreactor by somatic cell nuclear transfer and its application into development of the livestock industry is possible. Our research can be applied to other biotechnology and medical field including with production of cloned pig for xenotransplantation and preservation of endangered species.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction ····· 18
1. Necessity of research ····· 18
2. Objectives and contents of research ····· 21

Chapter 2. Current status of technology development ····· 25
1. International status and the point at issue ····· 25
2. Domestic status and the point at issue ····· 28
3. Problems of current technology ····· 29
4. Future prospect ····· 29
5. Validity of technology introduction ····· 30

Chapter 3. Research scopes and results ····· 31
1. Research scopes ····· 31
2. Results ····· 39

Chapter 4. Achievement and outward contribution ····· 92
1. Achievement ····· 92
2. Outward contribution ····· 93

Chapter 5. Application plan ····· 94

Chapter 6. Collected international information in the process of research ·· 95

Chapter 7. References ····· 102

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 ····· 18
제1절. 연구개발의 필요성 ····· 18
제2절. 연구개발의 목표 및 내용 ····· 21

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ····· 25
제1절. 국외의 현황 ····· 25
제2절. 국내의 현황 ····· 28
제3절. 현 기술 상태의 문제점 ····· 29
제4절. 앞으로의 전망 ····· 29
제5절. 기술도입의 타당성 ····· 30

제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과 ····· 31
제1절. 연구 개발 수행 내용 ····· 31
제2절. 연구 개발 수행 결과 ····· 39

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ····· 92
제1절. 연구개발 목표의 달성도 ····· 92
제2절. 관련분야에의 기여도 ····· 93

제 5 장 연구개발결과의 활용계획 ····· 94

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ····· 95

제 7 장 참고문헌 ····· 102

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절. 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

- 인체치료용 단백질을 인공적으로 생산하기 위한 방법으로 미생물-세포 배양법, 동물세포 배양법 및 DNA 미세주입법 등이 시도되었으나 다음과 같이 많은 단점들이 있음
  - 미생물-세포배양
    1) 고등동물과 상이한 미생물의 단백질 발현 및 합성 기작
    2) 낮은 인체유래 단백질과의 homology로 인한 생물활성 감소
    3) 정제기술의 복잡화와 난해성의 문제
  - 동물세포 배양
    1) 생산규모의 급격한 확충에 따른 기업화의 난이성
    2) 고가의 시료이용에 의한 생산원가 증가
  - DNA 미세 주입법
    - 상기 방법들의 대안으로 포유동물 개체를 숙주로 이용하는 형질전환 생산기법이나 이 방법 역시 다음과 같이 해결해야 문제가 있음
    1) 외래유전자의 게놈 내 삽입빈도가 동물의 경우 1% 미만
    2) Mosaicism 이 형질전환가축이 대부분에서 출현
    3) 후대 유전자전달율이 극히 미미

- 이에 형질전환 기술을 체세포핵이식 복제기술에 대입하는 방법이 대안으로 떠오름. 본 기법은 체세포에 미리 외래유전자를 도입하여 유전자가 도입된 체세포만을 이식하는 방법이며 다음과 같은 장점으로 현재 많은 연구가 시도되고 있음
  - Mosaicism이 없는 100% 형질전환수정란 및 동물을 효율적으로 생산할 수 있음
  - 체세포의 성을 미리 판별하여 원하는 성의 형질전환동물만을 생산할 수 있음

· 형질전환 동물의 체세포를 공여핵원 세포로 이용할 수 있음
· 인체치료용 단백질 생산 이외에 세포 단계에서 특정 유전자를 제거하여 질병내병성 동물 또는 인체장기이식용 동물을 생산할 수 있음

- 본 연구에서는 체세포 핵이식 방법을 이용하여 인체 치료용 유용 단백질인 αAT를 우유로 분비되는 형질전환 소를 생산기술을 개발하고자 한다.

- 우리나라는 동물 형질전환 기술 분야에서 후발 국가였으나 빠른 시간 내 형질전환된 젖소·흑염소·돼지 등이 생산되었으며 본 연구팀은 1998년 세계 최초로 GM-CSF를 분비하는 흑염소의 생산에 성공하였으며 우리나라의 동물의 체세포 복제 기술은 이미 세계적인 수준에 있다.

- 본 연구팀은 선행과제에서 소 유선에서 발현되는 αAT 벡터가 제작되어 있으며 다른 유용단백질 발현벡터도 제작중이다. 이 같은 기술을 토대로 본 기술이 개발되면 인체 치료용 유용 단백질을 생산하여 조기 산업화를 유도함으로써 해당산업분야의 발전을 크게 촉진시킬 수 있으며 향후 특정질병 내성 동물 또는 장기 이식용 형질전환 동물 생산에도 적용할 수 있을 것이다.

2. 경제·산업적 측면
- 인간의 질병을 치료하는 데 필요한 고가(高價) 약품을 동물의 젖에서 분비되도록 하고, 이를 정제해서 얻을 수 있는 새로운 제약시스템이 개발되어 형질전환 동물의 유용성은 산업적인 측면에서 인간의 삶의 질을 높이는 쪽으로 확대되었다.

- 기업 입장에서는 형질전환 동물기술을 이용해서 의약품 생산비용 절감과 생산량 증가 효과를 동시에 누릴 수 있다.

- 형질전환 소를 이용하여 치료용 고가의약품(혈전증치료제, 조혈촉진제, 암치료제 등)이나 호르몬을 생산하는 기술이 개발되고 있으며 특수 약품생산의 시장규모는 연간 수백억 달러에 이를 것으로 전문가들은 분석하고 있다.

- ㅁAT의 경우 형질전환 젖소 한마리가 가진 경제성은 31억여원으로 추정된다. 이 때문에 선진국에서는 국가의 경쟁력 확보와 국민의 삶의 질 향상이라는 측면에서 형질전환 동물 연구를 집중적으로 지원하고 있으며 막대한 부수효과 창출이 예견된다.

3. 사회·문화적 측면

- 현재 국내 축산인들은 그간 농촌지역에서 비교적 고소득을 올리며 풍족한 생을 영위해 오면서 지역 내 선도역을 수행했으며 일부에서는 대졸 이상의 고학력자가 농촌에서 삶의 터전을 일구는「돌아오는 농촌」현상의 주역이 되어 왔다. 또한 축산인들은 일반적으로 학력수준이 높고 진취적 사고를 지니고 있어 첨단 및 선진기술에 대한 적응도가 1차 산업중에서는 가장 높은 분야의 종사자들이다. 그러나 축산물시장 자유화시대에 접하게 되어 영농의욕의 상실 및 생산기반의 붕괴에 의해 농촌이 황폐화되면 축산인들은 사회소외 계층으로 전락될 것이다.

- 본 신청과제가 성공리에 수행되어 산업화가 이루어지면 형질전환 복제소에 의해 높은 시장성을 가진 치료용 단백질의 생산 등에 의해 축산생산성이 현재보다 향상되어 축산업은 향후에도 계속 안정적 직업으로 양질의 삶을 보장받을 수 있는 중상층 국민의 농촌지주역이 될 수 있을 것이다.

- 형질전환 복제소에 의한 치료용 단백질의 생산은 축산의 일반적인 개념을 의약품 생산 공장으로 바꾸어 놓을 수 있다.

제2절. 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발 목표 및 내용

- 본 연구는 우유에서 인간에게 유용한 αAT을 분비하는 형질전환 소 생산기술 개발을 위해 제 1세부 과제인 “αAT 유전자가 도입된 형질전환 세포주 수립”과 제 2세부 과제인 “형질전환 복제수정란의 생산과 이식 및 수란우의 사양관리”로 나누어 실시하였으며 연구개발의 목표 및 내용은 다음과 같다.

가. 우량 젖소 체세포주 수립

1)태아섬유아, 귀섬유아, 난구세포 채취 후 primary 세포주 수립

2)수립된 세포주 계대 배양 및 동결 보존

나. αAT 발현벡터의 체세포로의 도입

1)전기충격법(electroporation)에 의한 발현벡터 transfection

2)Lipid-mediated methods에 의한 발현벡터의 transfection

다. 미성숙 난자의 체외 성숙 배양 효율 향상

1)미성숙 난자의 체외성숙 배양조건 및 성숙배지 조성 개선

2)세포질 성숙 비교 검정에 의한 세포질 성숙 요인 규명

라. 핵이식 미세조작 기술 개발

1) 효율적인 탈핵기법 개발

2) 일반 핵이식에서 최적의 체세포 종류 선별

3) 최적의 융합 및 활성화 조건 수립하여 형질전환 핵이식에 적용

마. 최적의 유전자 도입 조건 수립 및 형질전환 세포 선별

1) 세포 confluency, 계대수에 따른 유전자 도입률 비교

2) 발현벡터 농도에 따른 유전자 도입 비교

바. Stable한 형질전환 세포주 수립

1) GFP 표지인자를 발현하는 유용 유전자 도입 세포주 수립

2) 항생제 표지인자를 통한 유용 유전자 도입 세포주 수립

3) 확립된 세포주의 계대 배양 및 동결보존

사. 형질전환 체세포 핵이식

1) 외부유전자가 도입된 체세포를 이용 형질전환 핵이식란 생산

2) 최적의 형질전환 핵이식란 배양배지 선별

아. 수란우의 선정 및 발정 동기화

1) 정상 발정 주기의 수란우 선정

2) 수란우 황체의 형태 및 등급 판정

3) $PGF_{2\alpha}$ 및 CIDR을 이용하여 발정동기화 유도

4) 수란우의 질병관리

자. 형질전환 핵이식란 이식 및 임신 진단

1)최적의 수란우 선별 및 비 외과적 이식

2)이식 후 직장검사 및 초음파에 의한 임신 진단

차. 임신된 수란우 관리 및 분만 전·후 관리

1)임신된 수란우의 체계적인 관리

2)임신 수란우의 사양관리

3)수란우의 질병관리

4)분만기 임신우의 관리 및 분만 유도

카. 형질전환 태아의 □AT 유전자 삽입 검증

1) 태아에서 genomic DNA 분리

2) 유전자 증폭 및 분석에 의한 유용유전자 도입 확인

2. 연차별 연구개발 내용

- 제1차년도 -

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2003)	-. 우량 젖소 체세포주 수립	· 태아섬유아, 귀섬유아, 난구세포 채취 후 primary 세포주 수립 · 수립된 세포주 계대 배양 및 동결 보존
	-. αAT 발현벡터의 체세포로의 도입	· 전기충격법(electroporation)에 의한 발현벡터 transfection · Lipid-mediated methods에 의한 발현벡터의 transfection
	-. 미성숙 난자의 체외 성숙 효율 향상	· 미성숙 난자의 체외성숙 배양조건 및 성숙배지 조성 개선 · 세포질 성숙 비교 검정에 의한 세포질 성숙 요인 규명
	-. 핵이식 미세조작 기술 개발	· 효율적인 탈핵기법 개발 · 일반 핵이식에서 최적의 체세포 종류 선별 · 최적의 융합 및 활성화 조건 수립하여 형질전환 핵이식에 적용

- 제 2차년도 -

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
2차년도 (2004)	-. 최적의 유전자 도입 조건 수립 및 형질전환 세포 선별	· 세포 confluency, 계대수에 따른 유전자 도입률 비교 · 발현벡터 농도에 따른 유전자 도입 비교
	-. Stable한 형질전환 세포주 수립	· GFP 표지인자를 발현하는 유용 유전자 도입 세포주 수립 · 항생제 표지인자를 통한 유용 유전자 도입 세포주 수립 · 확립된 세포주의 계대 배양 및 동결보존
	-. 형질전환 체세포 핵이식	· 외부유전자가 도입된 체세포를 이용 형질전환 핵이식란 생산 · 최적의 형질전환 핵이식란 배양배지 선별
	-. 수란우의 선정 및 발정동기화	· 정상 발정 주기의 수란우 선정 · 수란우 황체의 형태 및 등급 판정 · $PGF_{2\alpha}$ 및 CIDR을 이용하여 발정동기화 유도 · 수란우의 질병관리
	-. 형질전환 핵이식란 이식 및 임신 진단	· 최적의 수란우 선별 및 비외과적 이식 · 이식 후 직장검사 및 초음파에 의한 임신 진단

- 제 3차년도 -

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
3차년도 (2005)	-. 형질전환 핵이식란에서의 유용유전자 발현 검증	· 표지 유전자 및 유용유전자의 발현 여부 확인 · 형질전환 핵이식란에서 배발생 관련 유전자 발현 분석
	-. 형질전환 핵이식란 이식	· 2차년도에 이어 핵이식란 이식 · 수란우 임신 감정
	-. 임신된 수란우 관리 및 분만 전·후 관리	· 임신된 수란우의 체계적인 관리 · 임신 수란우의 사양관리 · 수란우의 질병관리 · 분만기 임신우의 관리 및 분만 유도
	-. 형질전환 태아의 αAT 유전자 삽입 검증	· 태아에서 genomic DNA 분리 · 유전자 증폭 및 분석에 의한 유용유전자 도입 확인

제 2 장　국내외 기술개발 현황

제1절. 국외 기술 개발 현황

1. 전핵 미세주입법(Pronuclear microinjection)에 의한 형질전환동물 생산

가. 영국 PPL Therapeutics에서는 Wright 등(1991)에 의해 human αAT을 우유로 대량 생산(35g/L)하는 면양을 개발하였으며 현재 우유로부터 human α AT을 분리·정제하여 임상 제3단계의 실험을 진행 중이다.

나. 네델란드 Pharming사에서는 Krimpenfort 등(1991)에 의해 Human lactoferrin cDNA 유전자가 도입된 젖소를 개발 하였으며 human lactoferrin 의 발현을 높이기 위하여 genome의 lactoferrin 유전자가 도입된 형질전환 젖소를 개발 중이다.

다. 미국 Genzyme Trangenics사에서는 Edmunds 등(1998)에 의해 human antithrombin을 리터당 1g 이상 우유로 생산하는 형질전환 산양을 개발하였으며 이 단백질을 우유로부터 분리·정제하여 임상실험이 진행중이다. 또한 human tPA를 생산(3mg/ℓ유즙)하는 형질전환 산양을 생산하였으며 현재 10여 종의 동물 생체반응기 개발 및 산업화 추진중이다.

2. 체세포 핵이식에 의한 복제동물 생산 현황

가. Wilmut 등(1997)에 의해 면양의 유선조직 상피세포를 핵이식하여 최초의 체세포 복제동물인 Dolly가 생산되었으며 자손들이 태어남으로써 이 체세포 복제 면양이 정상적 번식능력을 가지고 있음을 입증되었다.

나. Kato 등(1998)에 의해 난관세포 및 난구세포 유래 최초의 복제송아지가 생산되었으며 Wells 등(1999)은 mural granulosa cells을 이용하여 복제 소 생산에 성공하였으며 delayed activation이 효과적임을 보고하였다.

다. Zakhartchenko 등(1999)은 공여핵세포의 혈청기아배양에 따른 핵이식란의 발육률을 비교한 결과 혈청기아군에서 유의적으로 높은 발육율을 보고하였다. Hill 등(2000)은 소 복제 태아 및 산자에서 태반 기형성, 유사산 및 산자의 비정상 등을 보고하였다.

라. Wrenzyski 등(2001)은 핵이식란의 유전자의 비정상적 발현에 대해 보고하였다. Gibbons 등(2002)은 소 체세포 핵이식란 이식 후 임신율 증가에 수핵난자의 체외성숙 시 roscovitine의 첨가가 효과적임을 보고하였다.

3. 체세포 복제기법을 이용한 형질전환동물의 생산

가. Schnieke 등(1997)에 의해 혈액응고인자 IX 유전자를 면양 체세포에 도입한 후 체세포 복제기술로 최초의 형질전환동물인 Polly가 영국 PPL Therapeutics + Roslin연구소에서 생산되었다.

나. Cibelli 등에 의해 외래유전자 도입체세포를 핵이식 한 형질전환 젖소 (George와 Charlie) 가 생산되었다.

다. Baguisi 등(1999)에 의해 형질전환동물의 체세포를 복제하여 human antithrombin을 대량생산할 수 있는 산양이 생산되었다.

라. Echelard 등(2002)은 핵이식 복제로 우유로 human serum albumin을 높은 농도로 생산할 수 있는 산양을 생산하였으며 단백질의 높은 농도는 transgene의 copy number와 관련 있다고 보고하였다.

마. Lai 등(2002)은 이종장기 이식 시 나타나는 초급성 면연거부 반응에 관여하는 α-1,3-galactosyltransferase (α-GT) gene이 knock-out된 복제돼지 생산하였다.

제2절 국내 기술 개발 현황

1. 전핵 미세주입법에 의한 형질전환 동물 생산

가. 김 등(1997; 생명공학연구소)에 의해 human lactoferrin 유전자가 도입된 젖소가 생산되었으나 수소임. 현재 자손을 통한 전환형질 유전성을 검토중이다.

나. 유 등(1998; 한국과학기술원)은 본 연구실과 함께 human granulocyte macrophage- colony stimulating factor(GM-CSF)를 우유로 분비하는 형질전환 산양을 개발하였으며 현재 이 단백질을 분리·정제하여 의약품으로 활용하기 위한 실용화 단계실험을 진행 중이다.

다. 류 등(2001; 카톨릭의과대학교) human GM-CSF의 유전자를 이용하여 마우스의 오줌에서 리터당 최고 약 0.2mg 의 hGM-CSF를 생산할 수 있는 형질전환마우스를 생산하였다.

2. 체세포 복제분야

가. 황 등(1999)은 국내 최초의 복제동물인 젖소의 자궁상피세포를 공여핵원으로 하여 복제소 영롱이 생산에 성공하였으며 복제한우인 진이의 생산을 보고하였으며 2001년에는 소 체세포 핵이식에서 거대태아증후군 예방을 위한 효과적인 이식법에 관하여 보고하였다.

나. 강 등(2001)은 소 체세포 핵이식란의 비이상적 methylation 양상이 높은 유산율 및 태아의 비정상성과 연관이 있음을 보고하였으며 조 등(2002)은 소 체세포 핵이식에서 공여핵 세포의 종류에 따른 핵이식란의 발육에 관하여 보고하였다.

다. 황 등(2002)은 태아섬유아세포를 공여핵원으로 하여 복제 돼지 생산에 성공하였다.

3. 체세포 복제기법을 이용한 형질전환의 동물 생산

가. 황 등(2002년)은 green fluorescent protein(GFP) 유전자가 도입된 형질전환복제돼지 생산에도 성공하였다.

제3절. 현 기술 상태의 문제점

1. 체세포 복제기법을 이용한 형질전환 소 생산은 전핵내 미세주입법과 달리 100% 형질전환 동물을 생산할 수 있으며 후대의 성을 결정할 수 있는 효과적인 방법이며 형질전환 소 생산시 그 경제효과는 실로 크다고 할 수 있다. 하지만 아직 국내에서는 이에 관련된 기술 및 연구가 개발단계이며, 일부 결과만이 발표되고 있다.

2. 국내에서 소에서 체세포 핵이식 기법은 1999년 황 등에 의해 영롱이가 보고된 이래 수핵난자의 성숙, 미세조작, 체외배양기술 및 이식 등 각각의 단계별로 그 기술이 어느 정도 확립되었으나 체세포 핵이식 기법에 의한 형질전환 동물생산은 유용 단백질 유전자 발현 벡터 제작, 외부 유전자의 체세포로의 도입 및 stable한 형질전환 세포주 수립, 핵이식 및 형질전환 핵이식란의 수란우로의 이식 등 추가적으로 해결해야 할 문제들이 각 단계별로 있어 이에 대한 효율적인 기법 개발이 요구된다.

제4절. 앞으로의 전망

- 본 연구팀은 한국과학기술원 및 생명공학연구원과 협동으로 human G-CSF를 우유로 분비하는 형질전환 산양을 개발하였으며 이와 함께 20년 정도의 임상적용 경험을 바탕으로 향후 3-5년간 적극적으로 후속연구를 수행하면 예정

된 연구목표가 달성될 수 있을 것으로 전망되며 추후 본 기술을 이종장기 이식용 형질전환 돼지 생산 및 특정질병 유전자가 knock-out된 형질전환 동물 생산에까지 확대 적용할 수 있을 것으로 판단된다.

제5절. 기술도입의 타당성

- 본 연구의 내용은 선진국에서도 기술개발이 어느 정도 되었으나 아직 산업화의 적용이 어려운 실정이며 효율향상을 위한 각 요인별 기술개발이 추진되고 있으므로 이전을 꺼리고 있어 기술도입이 어려운 실정이다.

제 3 장　연구개발 수행내용 및 결과

제1절. 연구개발 수행내용

제 1세부 과제 : αAT 유전자가 도입된 형질전환 세포주 수립

- 1차년도 목표 및 내용 -

1. 우량 젖소 체세포주 수립
   - 공여핵원용 체세포주 수립을 위해 난구세포와 태아 및 귀섬유아세포를 분리 계대 배양한다. 난구 세포는 성숙 난자에서 pipetting으로 난구세포 분리한 후 PBS에서 원심 세정을 한다. 세정 후 침전 세포를 10% 혈청 DMEM에 부유하여 세포 배양용 petri dish로 옮겨 39℃, 5% CO_2, 포화습도 배양기내에서 배양하여 primary cell line를 수립한다. 태아 섬유아세포를 분리하기 위하여 40-50일령의 소 태아를 선별한다. 소 태아의 분리 후 수술용 도구로 태아의 사지와 머리 및 내부 장기를 제거하고 다시 위 용액으로 세척한다. 기계적인 방법으로 남은 조직을 최대한 작게 분쇄한 후 이를 바로 explant 배양을 실시하여 세포를 분리하거나 효소를 이용하여 유리된 세포를 얻는 방법으로 태아 섬유아세포를 분리한다. 귀 세포도 귀 조직을 1cm 정도 채취한 후 태아 세포와 같은 방법으로 분리 배양한다. 분리 후 배양 용기에 90-100% confluent 하면 계대배양을 실시하고 이들이 다시 80-90% confluent 로 증식하게 되면 일부는 계속 배양하고 잉여분은 동결・보존한다.

2. αAT 발현벡터의 체세포로의 도입
   - αAT 유용 유전자 vector의 세포내 전이를 위하여 전기충격법(electroporation)과 lipid-mediated 방법을 실시한다. 전기충격법은 도입 vector를 적정농도로 첨가한 후 이들을 잘 혼합하여 electroporator로 전기적인 충격을 가해 도입 vector의 세포내 주입을 통한 유전자 전이를 유도한다. 이후 세포가 원상태로 복귀할 수 있는 시간을 준 후 적정한 수로 배양을 실시한다. 리포좀 방법은 세포막 성분이 지방(lipid bilayer)인 점을 이용하여 적중 vector를 같은 지방성분인 liposome으로 둘러싼 후 이를 세포 배양시 첨가

하여 liposome이 세포막과 융합 (fusion)하게 하고 그 내용물인 적중 vector가 세포내로 도입되도록 한다.

- 2차년도 목표 및 내용 -

1. 최적의 유전자 도입 조건 수립 및 형질전환 세포 선별
   - 효과적인 유전자 도입법과 최적 세포의 선별을 위해 전술한 유전자 도입법을 이용하여 세포 confluency, 세포 passage, 유용 유전자 농도 등에 따른 유전자 도입율을 GFP 단백질 표현을 현미경상에서 계산하여 최적 세포와 유전자 도입 protocol을 확립한다.

2. Stable한 형질전환 세포주 수립

   가. GFP 표지인자를 발현하는 유용 유전자 도입 세포주 확립
   - 유용 유전자가 도입된 세포를 선별하기 위해 transfection 된 세포를 2-3일 배양 후 trypsin 처리에 의해 단구세포로 만든 후 FACS sorting을 통해 1차적으로 선발한다. 1차 sorting 에 의해 선발된 세포를 배지내에서 배양한 후 세포가 confluency에 이루면 2차 sorting을 실시한다. 3차 sorting을 하여 배양한 후 유용 유전자의 세포 genome내 도입여부를 PCR 법을 이용하여 확인한다.

   나. 항생제 표지인자를 통한 유용 유전자 도입 세포주 확립
   - 유용 유전자의 세포내 도입 후 세포 배양시 항생제를 이용한 방법으로 세포를 선별하여 분자생물학적 방법에 의해 유용 유전자의 세포 게놈내로의 도입 여부를 확인한다. 세포선별을 위한 적정 항생제 농도를 결정하기 위하여 puromycin 저항 유전자 (pIRES-Puro 2, Clontech, CA)를 확립된 최적 유전자 도입법을 이용하여 세포내로 도입한 후 다양한 농도 (0.1, 1, 2, 5, 10 ug/ml)의 puromycin을 포함하는 배지내에서 배양한다. 여러번의 배지 교환을 통하여 유전자가 도입된 세포만을 선별한다. 항생제 선별시 정확한 유전자도입으로 생존한 세포들은 하나의 세포괴(colony)로 자라게 되는데 이를 효소나 물리적 방법으로 처리하여 24-well의 배양용기로 옮겨 배양한다. 이들이 confluent하게 증식되면 계대배양을 실시한 후 일부분의 세포를 이용하여 유용 유전자의 게놈내 도입여부를 PCR 법을 이용하여 확인한다.

- 3차년도 목표 및 내용 -

1. 형질전환 핵이식란의 유전자 발현 검증

가. 형질전환 핵이식란에서의 유용 유전자 발현 검증

- 체세포 핵이식란에서의 표시 유전자 및 유용 유전자의 핵이식란에서의 발현 여부를 PCR 법과 GFP 형광현미경을 통하여 검증한다. 이러한 검증 결과를 토대로 유용 발현벡터의 효율성, 유전자도입법, 형질전환 세포주 확립법을 재검토하여 형질전환 핵이식란에의 최적 유전자 발현법을 확립한다.

나. 고효율 형질전환 핵이식란 생산을 위한 배발생 관련 유전자 발현 분석

- 유전자가 도입되지 않은 정상 핵이식란과 형질전환 핵이식란에서의 배발생율을 비교하고 낮은 배발생율을 보이는 형질전환 핵이식란의 배발달 단계에서 중요한 역할을 하는 유전자를 RT-PCR 법을 이용하여 분석한다. 정상 및 형질전환 핵이식란을 GTC buffer에서 lysis 시킨 후 total RNA extraction kit (Qiagen)을 이용하여 total RNA를 분리한다. 분리된 total RNA를 first cDNA synthesis kit (Amersham)을 이용하여 double strand로 바꾼 후 각각의 유전자 프라이머를 이용하여 PCR 증폭한다. PCR 산물을 agarose gel을 이용하여 분획화 한 후 Gel doc system (Biorad)를 이용하여 유전자의 발현 정도를 비교 분석한다.

2. 형질전환 태아의 유전자 삽입 및 발현 검증

- 산자의 유용 유전자의 게놈내 도입여부를 검증하기 위하여 전술한 바와 같이 귀 또는 꼬리 조직에서 genomic DNA를 분리한 후 특이적 PCR primer를 이용하여 PCR 증폭하여 검증한다. PCR product의 유용 유전자 증폭 여부를 확인하기 위하여 Southern blot 분석을 실시한다. 또한 분리된 genomic DNA를 제한효소로 절단한 후 0.6% agarose gel 상에서 분획화 한 후 Nylon membrane 으로 옮겨 genomic Southern blot 분석을 실시한다. 산자의 유용 유전자의 발현을 검증하기 위하여 전술한 방법에 의해 total RNA와 단백질을 분리한 후 Northern blot 과 Western blot 분석을 통해 검증한다.

제 2세부 과제 : 형질전환 복제수정란의 생산과 이식 및 수란우의 사양관리

- 1차년도 목표 및 내용 -

1. 미성숙 난자의 체외성숙 효율 향상

가. 미성숙 난자의 채취 조건 및 효율 향상

- 도축우의 난소에서 채취한 미성숙 난자의 채취 방법 및 효율을 검증한다. 난포의 크기 및 운반 시간, 온도 등의 환경 및 물리적 조건과 채취 당시의 난자의 형태에 따라 미성숙 난자를 분류하여 성숙 배양 후 품질 및 선별 기준을 정립한다.

나. 미성숙 난자의 체외 성숙 배양 조건 검증

- 도축우의 난소에서 채취한 미성숙 난자의 배양 조건을 검증한다. 기존 체외 성숙 배양법 상의 배지 및 첨가물, 배양기의 기상 조건과 배양 시간을 비교 검증하여 문제 파악과 동시에 배양 기법의 개선을 도모하며 난구 세포의 유무 및 배지 성분과의 상호 관계 등을 파악하여 성숙 배양 시스템 확립을 시도한다.

다. 체외 성숙 배양 배지 조성 개선

- 성숙 배지 구성 요소 중 미성숙 난자의 성숙에 중요한 영향을 미치는 성분을 검증한다. 혈청 첨가물 및 당 성분, 단백질과 amino acids가 미치는 영향을 조사한다. 배양 기상 상태에 따른 항산화제 첨가 등에 의한 성숙 배양 조건을 설정한다. 또한 각 첨가물의 첨가 농도 및 첨가 기간 등을 설정하여 체내의 난자 성숙 과정에 근접한 배양 시스템을 구축한다.

2. 핵이식 미세조작 기술 개발

가. 일반 핵이식에서 최적의 체세포 종류 선별

- 제 1세부과제에서 수립된 3가지 종류(태아섬유아세포, 난구세포, 귀섬유아세포)의 체세포를 이용하여 핵이식에 공여하여 체세포의 종류에 따른 핵이식란의 발육률을 비교한다. 공여핵원용 체세포의 세포주기에 따른 핵이식란의 발육률을 알아보기 위해 핵이식 전 공여세포를 0.5% 혈청이 첨가된 세포배양 배지에서 5일간 배양하여 G0기로 유도하여 10% 혈청의 대조군과 발육률을 비교한다.

나. 최적의 융합 및 활성화 조건 수립

- 체세포 핵이식에서 핵이식란의 전기융합은 Ca^{2+}를 첨가하지 않은 융합배지에서 난자 성숙 24시간에 실시한다. 융합 전 핵이식란을 5분간 mannitol 배지에 정치시켜 융합 시 세포질이 빠져나오는 것을 방지한다. 핵이식란을 융합배지가 들어있는 fusion chamber내에 넣고 미세 pippete를 이용 공여핵과 수핵난자의 접촉면이 fusion chamber의 electrode와 평행이 되도록 위치시킨 다음 electro cell manipulator를 이용하여 1.5-2.0 ㎸/㎝ DC 전압에 1.5㎲동안 2회 전원을 공급함으로써 세포융합을 유도한다. 전기적 세포융합 후 SOF 배지에서 39℃, CO_2 배양기에서 4시간 동안 배양한다. 최적의 전기 융합 조건을 알아보기 위해 전압, 통전 횟수 및 시간들에 따른 배 발육률을 비교한다. 최적의 활성화 조건을 알아보기 위한 실험으로 Ca^{2+}이 첨가된 융합배지에서 하는 전기적 활성화 방법과 융합 후 2시간 및 4시간 후에 하는 화학적 활성화 방법과 비교한다. 핵이식 후 핵이식복제란의 발육능을 향상시키기 위해 North Carolina State University의 Dr. Piedrahita 연구실에서 공여핵과 수핵난자간의 reprogramming 과정과 핵이식 복제란의 imprinting 기전에 대한 정보를 습득 본 연구 과제에 활용한다.

- 2차년도 목표 및 내용 -

1. 형질전환 체세포 핵이식

가. 형질전환 체세포 핵이식

- 제 1세부과제에서 수립된 형질전환 세포주를 이용하여 핵이식에 공여한다. 형질전환 세포주를 trypsin 처리 후 PBS로 부유하여 세포를 하나하나 분리한다. 미세조작 dish에 핵이식drop과 공여세포 drop를 만든 후 mineral oil로 도포한 후 미세조작기 현미경위에 올려놓는다. B-mode filter(450-490nm)의 자외선하에서 GFP가 발현된 세포만 선별하여 탈핵된 난자의 주란강내에 주입한다. 형질전환 핵이식란의 융합과 활성화는 일반 핵이식의 최적의 조건에 상응하여 실시한다.

나. 최적의 핵이식란 배양배지 선별

- Postactivation 후 핵이식란은 chemically defined medium인 KSOM (potassium simplex optimized medium)과 non-defined medium인 mSOF(modified Synthetic Oviductal Fluid) 배지와 CRaa 배지에서 배양하여 최적의 배양배지에서 5% CO_2, 5% O_2, 습윤한 조건의 배양기에서 7일간 배양한다. 성장인자의 첨가에 따른 발육률을 비교하기 위해 다음과 같이 basic FGF, EGF, IGF-Ⅰ 및 TGFβ1를 배양 배지에 적정 농도로 첨가하여 대조군과 발육을 비교한다. 체세포 핵이식란의 발육능을 알아보기 위해 배양 7일 후 배반포기에서 분별 염색을 실시한다. 분별 염색 후 내포세포괴와 영양막세포 수의 비를 체외 수정란과 비교 조사한다.

2. 수란우의 선정 및 발정동기화

가. 수란우는 본 연구팀에서 현재 번식관리 서비스를 제공하고 있는 인근에 위치한 착유우 30-50두 규모의 목장에서 13-14개월령 육성후보 Holstein 처녀우를 선정한다. 임상적 검사 및 혈액·혈청학적 검사에 의해 건강하다고 인정되며 처치 전까지 3회 이상의 정상적 발정주기를 보인 미경산우를 선별한다. 수정란 이식 시에는 직장검사 및 초음파 검사로써 난소의 활력 및 생식기관의 이상 유무를 확인한다.

나. 수란우의 황체를 촉진하고 같은 날 $PGF_{2\alpha}$나 유사체를 1회에 투여하거나 CIDR은 7일간 처리하여 발정을 유도한다. 발정동기화 처리 후 1일 3회, 1일 30분 이상 수란우 축군을 관찰하여 승가허용 발정을 보이는 개체를 발정우로 규정한다. 발정검색은 일시적인 식욕저하, 외음부 종창 및 맑고 점도가 높은 점액상태를 관찰하며, 승가허용자세를 보이는 수란우를 선발한다.

다. 최종 이식할 수란우를 선별할 목적으로 발정이 관찰된 수란우는 핵이식란 이식일인 발정 7일째에 직장검사를 실시하여 자궁과 난소의 상태 및 황체의 위치(좌 또는 우)를 확인한다. 황체의 크기가 정상(15~20mm)이고 좋은 형태의 crown을 지닌 것을 1등급으로, 정상크기이거나 crown이 없는 것을 2등급으로, 그리고 황체는 존재하나 크기가 적은 것을 3등급으로 하여 핵이식란 이식을 한다.

3. 형질전환 핵이식란 이식 및 임신 진단

가. 형질전환 핵이식란의 수란우로의 이식

- 최종 선별된 수란우에 형질전환 핵이식란을 이식한다. 이식을 용이하게 하기 위해 이식전의 2% lidocaine액 5ml로 미추경막외 마취를 실시한다. 분변에 의한 오염도 감소를 위하여 외음부, 미부 및 둔부를 세정하고 멸균된 tissue paper로 물기를 제거하고 2% chlorohexidine을 골고루 도포하고 멸균된 tissue로 다시 한번 닦아낸다. 질내 세균의 자궁내로의 감염을 막기 위하여 고안된 out sheath cover를 straw가 장착된 이식기에 덧씌운다. 수란우의 음순을 양손으로 벌리고 이식기를 위쪽으로 45° 각도로 삽입한 뒤 수평으로 유지한 후 직장내 삽입된 한 손으로 이식기를 자궁경부까지 유도하여, 자궁경과 자궁의 무리한 자극을 피하면서 가능한 한 조속히 자궁경관을 통과한다. 자궁내막에 손상을 주지 않도록 주의하면서 자궁각 선단부까지 수정란 이식기를 삽입한 후 약 10초간에 거쳐 서서히 형질전환 핵이식란을 주입한다. 이식 후 이식기의 선단부에서의 출혈여부를 확인하며, straw는 곧바로 회수하여 핵이식란의 잔존여부를 검사한다. 이식 후 음핵을 마사지하여 수정란의 자궁외 배출을 방지하며 수태율 향상을 도모한다.

나. 수란우의 임신 진단

- 형질전화 핵이식란을 이식한 후 30일경에 직장검사법에 의한 양막낭, 태막활, 태아 및 태반 촉진과 초음파를 이용하여 임신을 확인한다. 자궁축농증, 자궁수증, 종양성 성장물 및 기타 병리학적 상황을 감별 진단하여 수태율의 정확성을 높인다. 임신 60일 및 90일경에 재검하여 조기 배아사망 및 초기 유산율을 조사한다.

다. 수란우의 질병관리

- 수란우의 질병관리는 구충, 백신접종, 건강진단 및 소독 등이 기본적인 질병예방 외에 목장과 수의사, 연구책임자 간의 비상연락망을 구축하여 문제발생시 신속하고 효과적으로 대처토록 한다.

- 3차년도 목표 및 내용 -

1. 형질전환 핵이식란 수란우로의 이식

- 1~2차년도의 연구에 의하여 정립된 효율적인 핵이식 미세조작법과 소 핵이식란 체외발육에 영향을 미치는 인자로서 각종 아미노산, 에너지원, macromolecule 및 다양한 성장인자 및 아미노산 및 에너지원에 대한 축적된 정보와 연구결과를 바탕으로 대량생산체계를 구축한다. 형질전환세포의 핵이식을 통해 생산된 핵이식란을 수란우에 이식하여 형질전환 동물을 생산한다.

2. 임신 수란우의 사양관리

- 임신 전반기에는 양질의 건초를 위주로, 임신 후반기에는 농후 사료의 급여량을 증가시킨다. 칼슘과 인의 균형을 유지하고, 번식효율과 관련이 있는 아연, 망간, 구리,세레늄 및 비타민과 건초 등을 급여한다. 태아의 성장속도가 활발해지는 분만 전 2~3개월간은 평상시의 10~20% 정도 증량 급여한다.

3. 분만기의 임신우의 관리 및 분만 유도

- 분만 예정 약 2주전부터 수란우를 개별적으로 분만실에 수용하고, 저녁 사료 급여 후에 체온측정, 유방의 종대, 식욕의 유무, 분변의 상태, 좌골인대 이완, 자궁경관 및 질의 이완 상태, 질점액의 성상, 태아의 체위 등에 대하여 시간적으로 모니터링을 한다. 질의 부종과 이완 및 자궁경의 이완과 점액의 손실이 보이며 골반인대와 연조직의 이완으로 미근부의 함몰이 분만 2-3일전에 보이는 분만징후를 확인한다. 그리고 유방의 부종, 유즙분비물, 외음부가 확장 및 자궁경관의 점액의 유출도 관찰한다. 분만예정일이 지났으나 분만징후가 없는 수란우는 유도분만을 실시한다. 분만유도는 corticosteroid 또는 $PGF_{2\alpha}$를 투여하여 실시한다.

라. 임신우의 질병관리

- 목장-수의사-연구책임자간의 비상연락망을 최대한 활용하며 목장의 방역과 유산의 원인 진단 및 예방에 주력한다. 분만이 가까워지면 이상분산에 대비하여 항상 대기하고 적절히 대처토록 한다.

제2절. 연구개발 수행결과

- 제 1차년도 -

<제1세부 과제: αAT 유전자가 도입된 형질전환 세포주 수립>

1. 우량 젖소 체세포주 수립
  - 귀 섬유아세포(Ear fibroblast): 3개주 수립
  - 난구세포(Cumulus cell): 2개주 수립
  - 태아 섬유아세포(Fetal fibroblast): 1개주 수립
  - 모든 체세포주는 5대까지 배양 동결 보존하였으며 외부 유전자(αAT)의 도입 실험은 2-5대에서 실시하였다.

가. 귀 섬유아세포(Ear fibroblast)
  - 귀 섬유아세포주 수립을 위해 경기도 화성시 소재 목장(재은목장; 목장주 김 정겸)의 건강한 젖소에서 3개의 체세포주를 수립하였다.
  - 공여핵 세포 제공용 젖소 선별은 착유량 이외에 아래와 같은 항목을 고려하여 질병이 거의 없는 건강한 젖소에서 채취하였다. 이는 착유량도 중요하지만 체세포 복제 산자의 임신기 및 출생시 높은 비율로 발생하는 여러 가지 질병 (fetal/neonatal abnormalities) 때문에 공여동물의 건강이 우선적으로 필요하기 때문이다.
  - 착유량이 40kg/day 이상, 산차는 5산 이상, 유산은 재은63에서만 1번 있었으며 부모의 혈통이 우수하고 기타 질병력이 없음

1) 재은 63호
  - 착유량: 50kg/day
  - 생년월일: 1995년 10월 1일
  - 산차: 8
  - 유산: 1번
  - 특징: 유산1번 외 질병력 없음

Fig 1. Somatic cell donor cow (Jaeun63).

2) 재은77호

- 착유량: 51kg/daily
- 생년월일: 1999년 1월 1일
- 산차: 6
- 유산: 없음
- 특징: 착유량 높고 질병 병력 없음

Fig 2. Somatic cell donor cow (Jaeun77).

c. 재은81호

- 착유량: 44kg/daily
- 생년월일: 1999년 1월 1일
- 산차: 5
- 유산: 없음
- 특징: 착유량 높고 질병 병력 없음

Fig 3. Somatic cell donor cow (Jaeun77).

나. 난구세포(Cumulus cell)

1) 난구세포는 우수 젖소의 도축시 난소를 채취한 후 난자를 배양하여 성숙된 난자에서 난구세포를 pipeting으로 분리 DMEM에서 배양하였다.

2) 향후 OPU(Ovum pick-up)을 실시하는 연구팀과 연계하여 OPU 유래 성숙 난자에서 난구세포를 분리할 예정임

다. 태아섬유아세포

1) 도축장에서 임신40-50일경의 태아를 선별하여 1개의 태아 섬유아세포주를 수립하였다.

2. αAT 발현벡터의 체세포로의 도입

- αAT 발현벡터 제작
- αAT 발현벡터의 체세포로의 도입

가. αAT 발현벡터 제작

1) αAT 발현 벡터 모두 pcDNA3(Invitrogen, Groningen, The Netherlands)

를 축으로 하여 제작하였다.

2) Promoter gene: bovine β-casein promoter gene (3.7kb)

- 소 genomic DNA에서 forward(GTC GGT ACC AAC ATG TCG AAT CCAT CTC TAT CAA TTA ATG TAA TT) 및 reverse primer(GAC GGA TCC TCA TTA TCT CAA TTC CAG GGA ATG GGA AGA TGA GGA)로 PCR로 증폭하여 추출한 후 pcDNA3 MCS의 Kpn I 과 BamH I site에 도입하였다.

3) Desired gene: αAT(1,371bp)

가) ATCC (Manassas, Virginia USA)에서 αAT genomic DNA를 구입하여 PCR로 증폭함

나) αAT Primer

- Forward: TTG TAC CAC TCA GAA GCC TTC ACT GTC AAC
- Reverse: GTT GAC AGT GAA GGC TTC TGA GTG GTA CAA
- pcDNA의 MCS의 Xho I 의 Apa I site에 desired gene을 도입하였다.

3) Reporter gene: GFP(green fluorescent protein)

가) pEGFP-N1 vector(Clontech, CA, USA)에서 GFP를 분리 추출하였다.

나) pcDNA3에서 Sma I 과 BstB I 으로 Neomycin resistant gene 부위를 절제한 후 추출된 GFP유전자를 도입하였다.

나. αAT 발현벡터의 체세포로의 도입

1) 제작된 2개의 발현 벡터를 lipid-mediated 방법으로 수립된 3가지(귀섬유아세포, 난구세포, 태아섬유아세포)의 체세포주에 도입하였다.

2) Lipid-mediated 방법으로 Lipofectin (Life Technologies, USA)과 FuGene6 (Roche Molecular Biochemicals, IN, USA)을 이용하여 외부 유전자를 도입하였다. 각각의 protocol에 의하여 외부 유전자를 도입한 결과 FuGene6가 실험 방법 및 발현율 면에서 더 효과적이었다.

3) 전기적 방법에 의한 αAT발현벡터의 체세포로의 도입 방법은 아래와 같은 이유로 비효율적이었다.

가) 외부 유전자 1회 도입시 많은 양의 αAT 발현벡터 및 체세포 요구

나) Cuvette에 체세포 넣어야 하기 때문에 세포의 오염 확률이 높음

다) 실험 시 Lipid 방법보다 높은 경비 요구(Elctroporator, Disposable

cuvette)

4) 귀 섬유아세포, 난구세포 및 태아 섬유아세포 모두 높은 발혈율을 보였으며 체세포 종류에 따른 발현율 비교에서는 각 세포간 유의적인 차이가 없었다.
5) 3개의 세포주 모두에서 30% 이상의 발현율을 보여 당초 목표인 발현율 20% 이상을 초과 달성하였다.

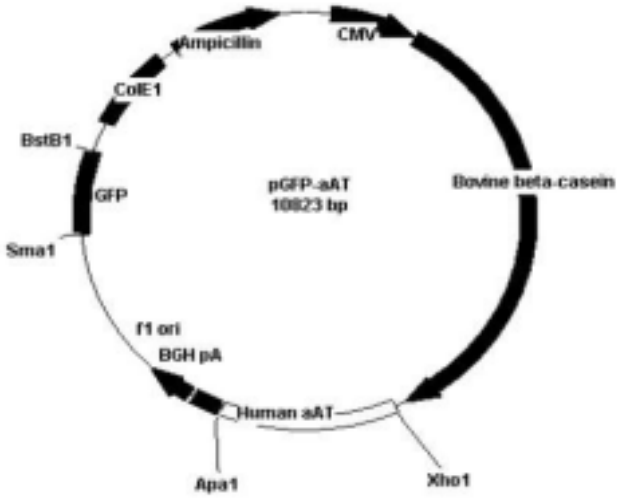


Fig 4. Diagrammatic representations of the features of the constructed vector containing bovine β-casein promoter, human aAT gene, ampicillin resistant gene, and GFP as a marker gene.

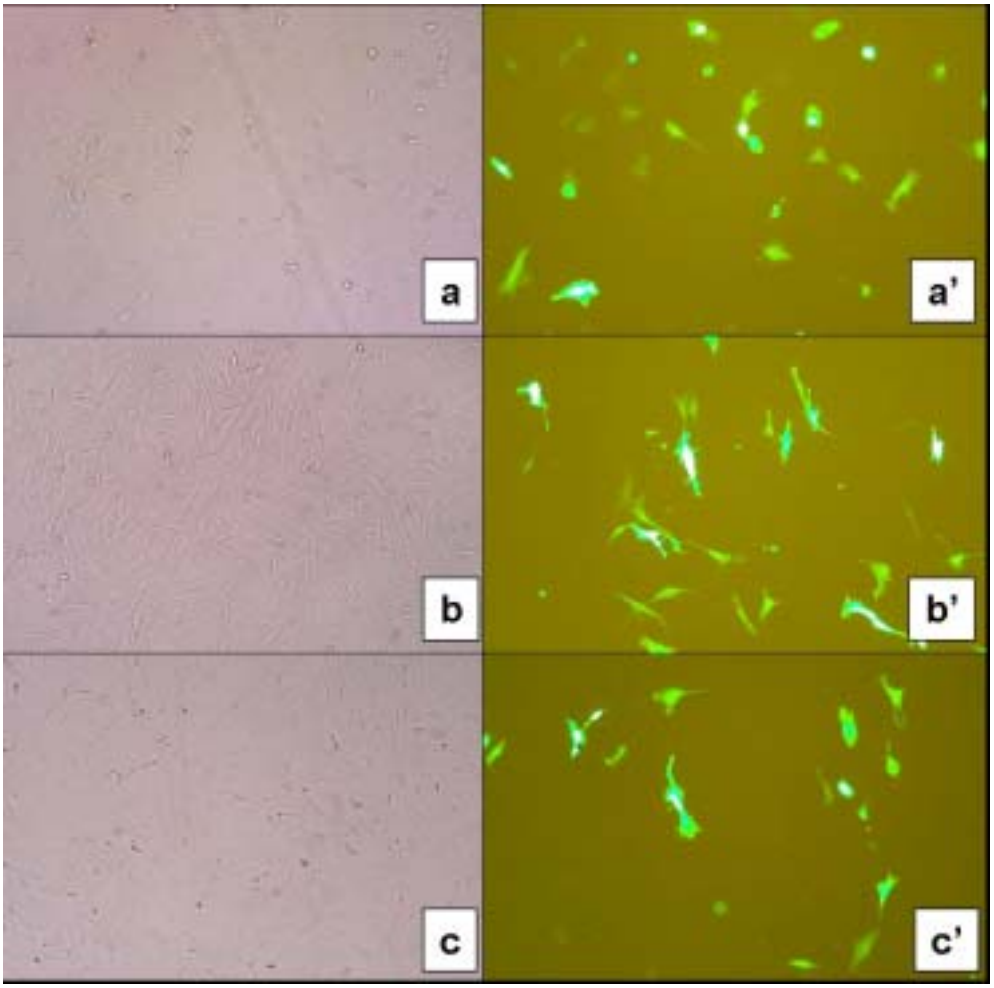


Fig 5. Morphology of 3 types of transfecte donor cell. All types of cells expressed eGFP at relatively high rates. a-c) transfected cells under normal light; a′-c′) transfected cells under UV light. a,a′) fetal fibroblast, b,b′) ear fibroblast, c,c′)cumulus cell.

<제2세부 과제: 형질전환 복제수정란의 생산과 이식 및 수란우의 사양관리>

1. 미성숙 난자의 체외성숙 효율 향상

가. 배양배지 조성에 개선에 따른 난자의 성숙률 증가

- 난자의 체외성숙 배지(TCM199) 조성을 변경한 결과 약 10% 정도의 성숙율 증가를 보였다. 기존의 첨가된 호르몬인 FSH 및 LH 대신 PMSG와 hCG를 첨가하고 기타 insulin, pyruvic acid 및 EGF를 첨가한 결과 75% 이상의 성숙유을 보였다.

2. 일반 핵이식에서 최적의 공여핵원 조건 확립

가. 최적의 공여핵원용 체세포 종류 선별

- 형질전환이 아닌 일반 핵이식에서 최적의 세포 종류를 알아보기 외해 3가지 종류의 체세포(난구세포, 귀섬유아세포, 태아섬유아세포)를 이용하여 핵이식을 실시하였다. 난구 및 귀 섬유아세포를 공여핵원으로 한 핵이식란에서 태아섬유아세포군에 비해 유의적으로 높은 융합율, 분할율 및 배반포로의 발육율을 보였다(Table 1).

나. 공여핵원의 혈청기아배양 유무에 따른 발육률 비교

- 공여핵원 세포의 혈청기아배양에 따른 배양에 따른 발육율을 비교한 결과 분할율에서만 non-starved 군에서 유의적으로 높았다. 분할율 및 배반포로의 발육율에서는 유의적인 차이가 없었으나 혈청기아 배양군에서 5% 정도 높은 양상을 보였다(Table 2).

3. 최적의 융합 및 활성화 조건 수립

- 핵이식란의 활성화 조건에 따른 핵이식란의 발육율을 비교한 결과 융합과 활성화가 동시에 이루어진 군보다 융합 후 활성화가 이루어진 군에서 유의적으로 높은 분할률 및 배반포로의 발육을 보였다(Table 3). 이는 Wells 등(1999)의 논문에서 delayed activation 시 높은 배반포로의 발육율과 유사한 결과를 보였다.

Table1. Effects of the serum starvation of different donor cells on preimplantation development of bovine reconstructed embryos to the blastocyst stage.

Type of cells	Number of oocytes (%)			
	Injected	Fused	Cleaved[a]	Developed to blastocyst[b]
Cumulus	277	192 (69.3)[c]	181 (90.3)[c]	84 (43.8)[c]
Ear fibroblast	311	197 (63.3)[c]	184 (93.4)[c]	80 (40.6)[c]
Fetal fibroblast	313	121 (38.7)[d]	104 (85.0)[cd]	23 (19.0)[d]

Replicate 8 times. Model effect of the types on the number of oocytes fused, cleaved and developed to the blastocysts, which was indicated as a P value was 0.0001.

[a] Percentage of the number of oocytes injected

[b] Percentage of the number of oocytes fused

[cd] Within a parameter in the same treatment, values with different letters differed significantly. $P<0.05$

Table 2. Overall data on the effect of the serum starvation of donor cells on preimplantation development of reconstructed oocytes to the blastocyst stages

Type of cells	Number of oocytes (%)			
	Injected	Fused	Cleaved[a]	Developed to blastocyst[b]
Non-starved	822	416 (50.6)	333 (80.0)[c]	118 (28.4)
Serum starved	1255	628 (50.0)	562 (89.5)[d]	211 (33.6)

Replicate 8 times. Model effect of the treament on the number of oocytes fused, cleaved and developed to the blastocysts, which was indicated as a P value was, 0.8, 0.547 and 0.1337, respectively.

[a] Percentage of the number of oocytes injected

[b] Percentage of the number of oocytes fused

[cd] Within a parameter in the same treatment, values with different letters differed significantly. $P<0.05$

Table3. Effects of the separation of fusion and activation procedures on preimplantation development of oocytes reconstructed with ear fibroblasts

Activation protocols	No. of oocytes (%)			
	Examined	Fused[d]	Cleaved[e]	Developed to blastocyst[e]
FAS[a]	188	100 (53)[f]	74 (74)[f]	13 (13)[f]
FAS[b]	159	67 (42)[g]	47 (70)[f]	5 (7)[f]
FBA[c]	199	115 (58)[f]	103 (90)[g]	54 (47)[g]

Model effect of treatment (P value) was 0.0113, 0.0017, and 0.0001 in the number of oocytes fused, cleaved and developed to blastocysts, respectively.

[a] Fusion and activation simultaneously at 24 hours after IVM

[b] Fusion and activation simultaneously at 28 hours after IVM

[c] Fusion before activation. Fusion at 24 hrs and activation 28 hrs after IVM

[d] Percentage of the number of oocytes examined

[e] Percentage of the number of oocytes fused

[fg] Different superscripts within each parameter are significantly different, $P<0.05$.

- 제 2차년도 -

<제1세부 과제: αAT 및 EPO 유전자가 도입된 형질전환 세포주 수립>

1. 최적의 유전자 도입 조건 수립 및 형질전환 세포 선별

- 최적의 유전자 도입 조건 수립: 태아섬유아세포, 난구세포, 귀섬유아세포 모두 FuGene에서 가장 좋은 유전자 도입율을 보임

가. Transfection

- 태아섬유아세포, 난구세포 및 귀섬유아세포에서 1차년도에 제작한 벡터를 Electroporation (BioRad, CA, USA), LipofectAMINE Plus (Invitrogen, CA, USA) 및 FuGene (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)를 이용하여 유전자 도입을 시도하였다.

나. 발현율 비교

- 상기 3가지 방법으로 transfection을 하고 3일간 배양한 후 B-mode 형광현미경하에서 marker gene인 GFP 발현율을 비교 관찰하고 trypsin으로 cell suspension을 하여 현광현미경 시하에서 세포 당 발현된 세포를 비교한 결과 FuGene을 이용한 군에서 유의적으로 가장 높은 발현율을 보였다 (11.5% vs. 0.6%, 2.6%).(Fig 6)
- Electroporation 방법은 발현율도 낮을 뿐 아니라 transfection 시 많은 양의 DNA가 요구되어 유전자 도입방법으로 그 효율이 낮았으며 2가지 Lipid-mediated 방법에서 FuGene이 transfection rates와 방법 면에서 최적의 도입 방법으로 사료된다.

다. 최적의 조건 수립

- 배양시 세포의 confluency는 40-70%에서 transfection을, 계대배양수는 2-5계대에서 유전자 도입시 최적의 유전자 도입율을 보였다.

2. Stable한 형질전환 세포주 수립

- 태아섬유아세포, 난구세포 및 귀섬유아세포에서 FuGene를 이용하여 stable한 형질전환 세포주 수립하였다.

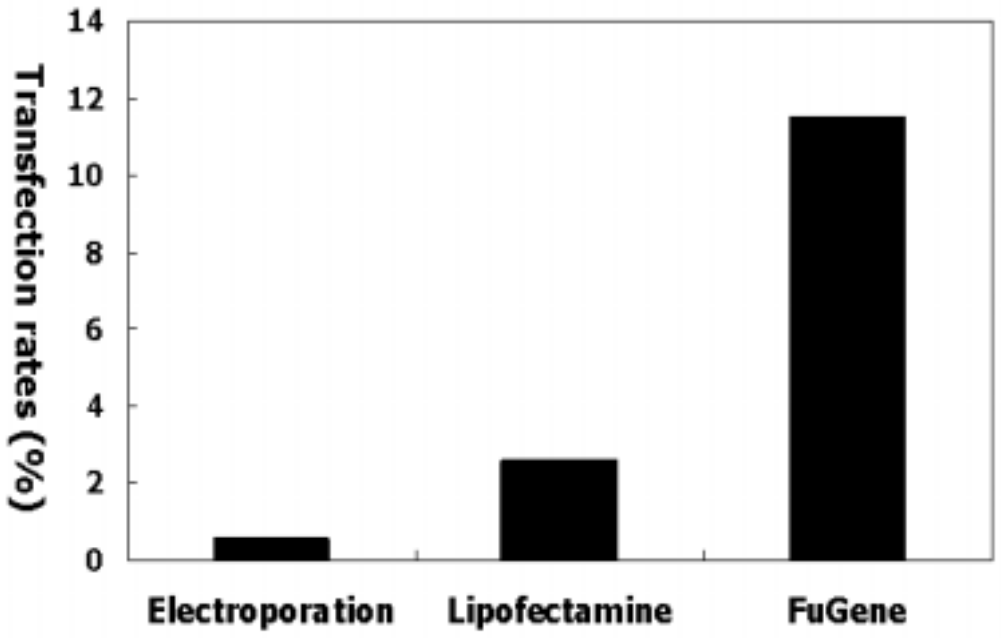


Fig 6. Comparison of transfection rates among the 3 transfection methods after cell suspension

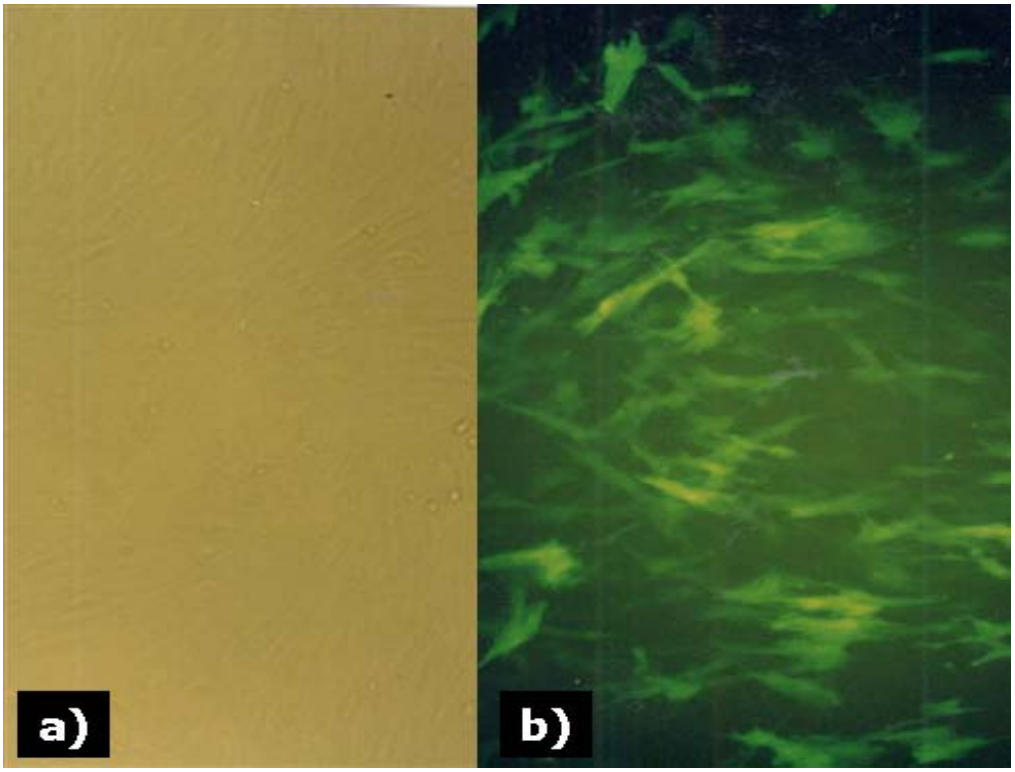


Fig 7. Bovine fetal fibroblast transfected with vector containing bovine β-casein promoter, human α_1-antitrypsin gene and green fluorescent gene (GFP) as a marker gene. a) bovine fetal fibroblast under normal light, b) transgenic bovine fetal fibroblast under fluorescein isothiocynate filter (excitation wavelength; 450-490 nm).

<제2세부 과제: 형질전환 복제수정란의 생산과 이식 및 수란우의 사양관리>

1. 형질전환 체세포 핵이식

- 총 164개의 transgenic SCNT embryos 생산(Fig 8)
  : 당초 목표인 50개 이상 생산 초과 달성

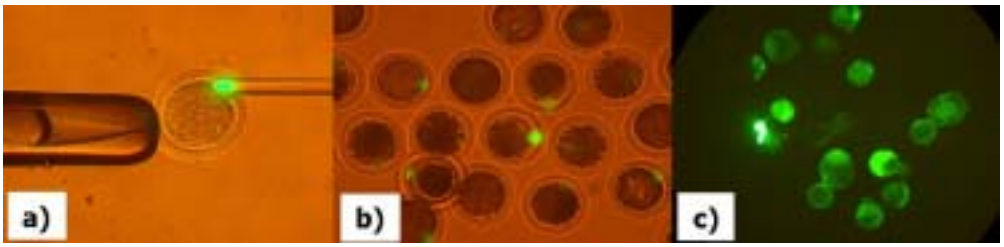


Fig 8. Process of transgenic somatic cell nuclear transfer. a) Injection of transfected cells, b) reconstructed embryos before fusion, c) transgenic blastocyst under B-mode filter.

가. Donor cell의 여러 가지 조건에 따른 형질전환핵이식란의 발육능 비교

1) 공여핵원용 세포 종류(Types of donor cell)에 따른 형질전환 핵이식란의 발육능 비교

- 공여핵원용 체세포 종류에 따른 형질전환 체세포 핵이식란의 발육능을 비교하기 위해 태아섬유아세포, 난구세포 및 귀섬유아세포를 가지고 실험한 결과 cumulus cells을 이용한 군에서 유의적으로 높은 발육능을 보였다(Table 4).

2) 발육단계에 따른 transgenic SCNT embryos의 발현율 비교

- 발육단계별 marker gene인 GFP의 발현율을 조사한 결과 3가지 세포군에서 모두 embryos가 발육할수록 유의적으로 낮게 발현이 됐다(Table 5, Fig 9). 이는 1차년도에 제작된 vector가 stable하게 integration 되기 보다는 transient로 된다는 것을 의미하여 유전자의 stable한 도입에 관한 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

Table 4. Development and GFP expression in bovine transgenic somatic cell nuclear transfer embryos derived from 3 types of transfected cells

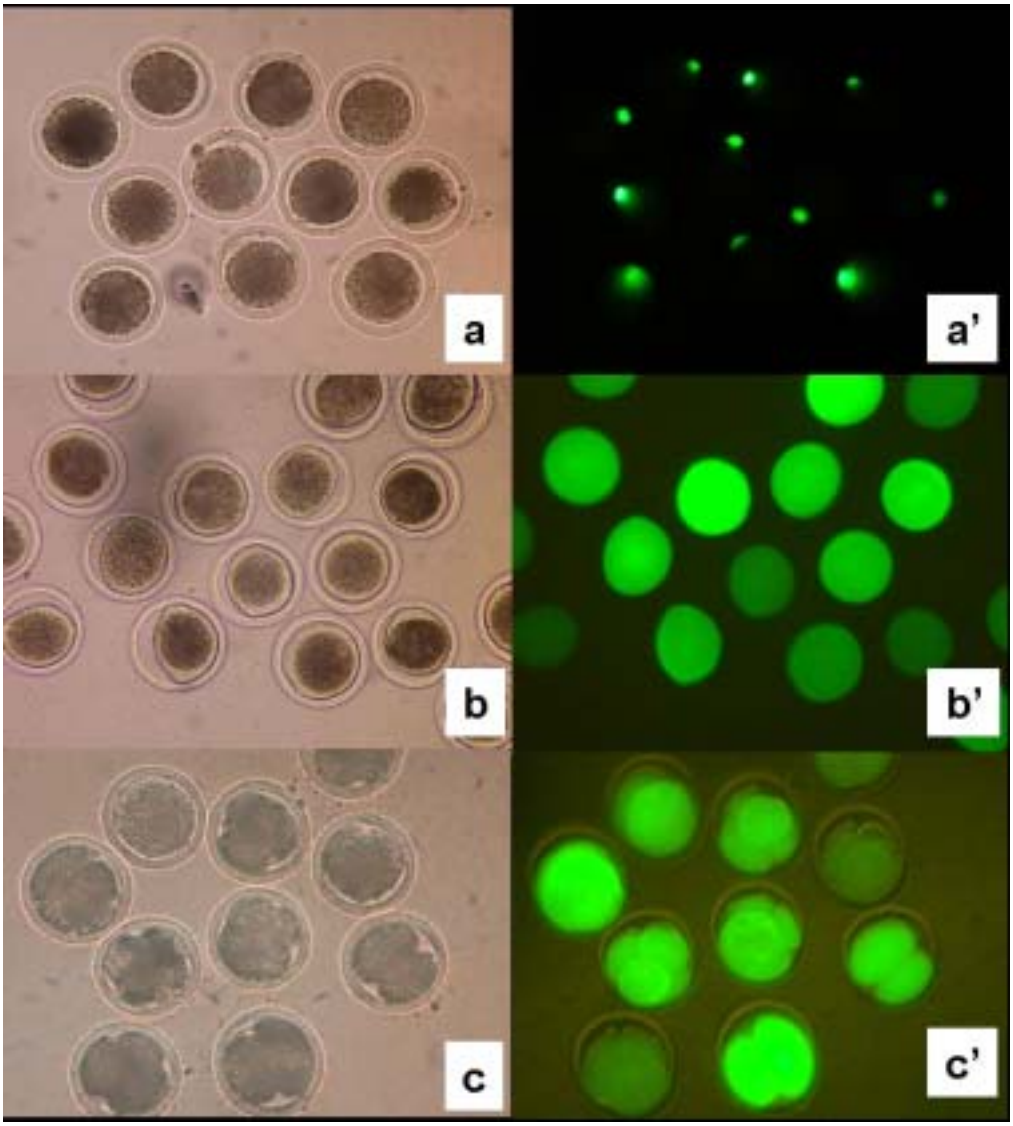
Types of donor cells	No. of embryos				
	Injected	Fused (%)[a]	Cleaved (%)[b]	Development to blastocysts (%)[b]	Expressed in blastocysts (%)
Fetal fibroblasts	363	214 (59.0)[c]	109 (50.9)[c]	15 (7.0)[c]	4 (26.7)[c]
Cumulus cells	426	334 (78.4)[d]	245 (73.4)[d]	96 (28.7)[d]	52 (54.2)[d]
Ear fibroblasts	379	303 (79.9)[d]	203 (67.0)[d]	46 (15.2)[e]	13 (28.3)[c]

Model effect of the donor cell on the number of embryos fused, cleaved, developed to the blastocysts and expressed, which was indicated as a P value, was 0.0001, 0.0001, 0.0001, and 0.0049, respectively.

[a] Percentage of the number of embryos injected.

[b] Percentage of the number of embryos fused.

[cde] Within a parameter, values with different superscripts differed significantly, $P<0.05$.


a
a'
b
b'
c
c'

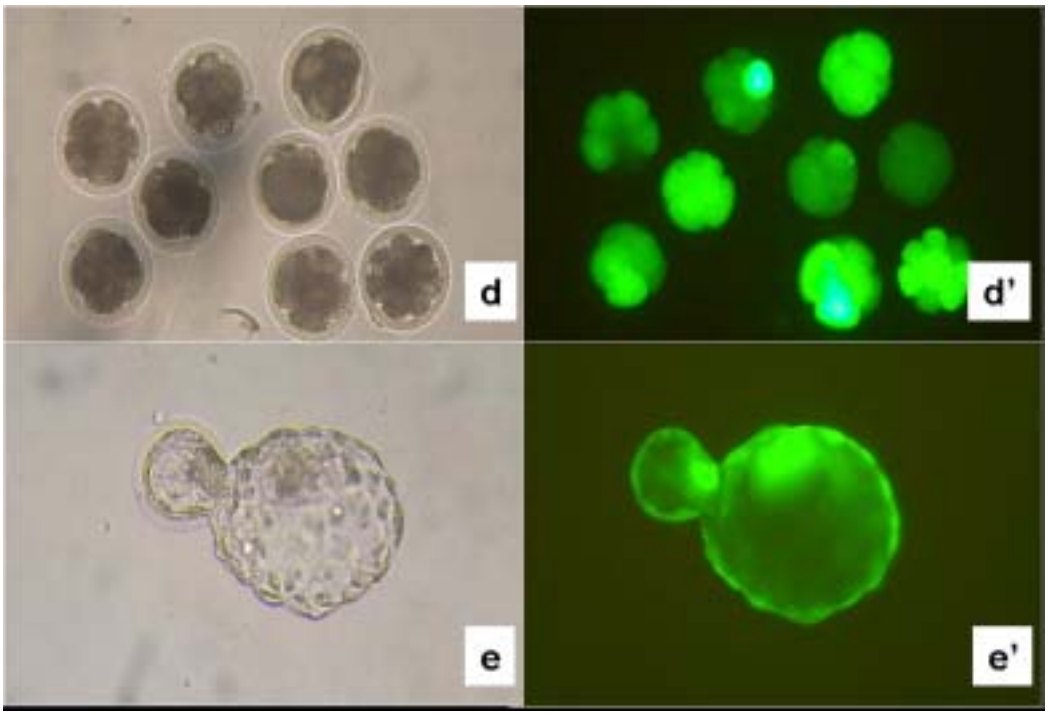


Fig 9. Development of bovine transgenic NT embryos from fusion to blastocyst stage (x100). All embryos expressed GFP at all stages. Fusion was considered to be 0 h. a-e) Embryos under normal light a′-e′) Embryos under fluorescein isothiocynate filter (excitation wavelength; 450-490 nm). a,a′)Reconstructed oocytes before fusion. GFP expression in the nucleus was detected only donor cell b,b′) Fused embryos at 4 hrs. Embryos expressed GFP c,c′) Two-four cell stage at 30 hrs d,d′)Eight-sixteen cell stage at 72 hrs e,e′) Hatching blastocyst at 168 hrs.

Table 5. GFP expression rates of bovine transgenic somatic cell nuclear transfer embryos derived from three types of donor cell in the each developmental stage

Donor cells	No. of expressed/no. of total (%) in each stage of		
	2 cells	8-16 cells	Blastocysts
Fetal fibroblasts	67/107 (62.6)[a]	22/62 (35.5)[a]	3/15 (20.0)[a]
Cumulus cells	106/123 (86.2)[b]	63/98 (64.3)[b]	16/29 (55.2)[b]
Ear fibroblasts	76/102 (74.5)[c]	46/81 (56.8)[b]	6/23 (26.1)[a]
Total[*]	249/332 (75.0)[A]	131/241 (54.4)[B]	25/67 (37.3)[C]

Model effect of the donor cell on the expression rates of embryos in stage 2-cell, 8~16-cell and blastocyst, which was indicated as a P value, was 0.0002, 0.0014, and 0.0275, respectively.

[abc] Within a parameter, values with different superscripts differed significantly, $P<0.05$.

[*] Superscripts indicate significant difference among A, B, and C ($P<0.05$).

3) Donor cell의 계대배양수(No. of cell passages)에 따른 transgenic SCNT embryos의 발육능 비교

- Donor cell의 계대 배양수에 따른 transgenic SCNT embryos의 발육능을 비교한 결과 배반포로의 발육능에서는 유의적인 차이가 없었으나 배반포에서 marker gene인 GFP의 발현은 early passage(2-4 passage) 세포군에서 유의적으로 높게 나왔다(Table 6). 이는 early passage의 세포에서 외래 유전자가 더 stable하게 integration이 됨을 알 수 있었다.

4) Donor cell의 GFP발현량(level of GFP expression)에 따른 transgenic SCNT embryos의 발육능 비교

- 본 실험은 donor cell에서 marker gene인 GFP의 발현수준에 따른 transgenic SCNT embryos의 발육능을 비교한 결과 GFP 발현이 낮은 donor cell 군에서 유의적으로 높은 배반포로의 발육능을 보였으나 배반포에서 GFP 발현율은 발현이 높은 donor cell군에서 유의적으로 높게 나왔다(Table 7)

5) Donor cell의 크기(size of donor cell)에 따른 형질전환 핵이식란의 발육능

- Donor cell의 크기에 따른 transgenic SCNT embryos의 발육능을 비교한 결과(Fig 10) 세포크기가 30㎛ 이하인 small donor cell군에서 유의적으로 높은 배반포로의 발육율을 보였지만 marker gene인 GFP의 발현율을 유의적인 차이가 없었다.(Table 8).

Table 6. Development rates of transgenic somatic cell nuclear transfer embryos reconstructed with cumulus cells at different cell passages

	No. of embryos				
Cell passages	Injected	Fused (%)[a]	Cleaved (%)[b]	Development to blastocysts (%)[b]	Expressed in blastocysts (%)
Early (2-4 passage)	264	202 (76.5)[c]	138 (68.3)	29 (14.4)	20 (69.0)[c]
Late (8-12 passage)	276	184 (66.7)[d]	129 (70.1)	33 (17.9)	14 (42.4)[d]

Model effect of the subculture after transfection on the number of embryos fused, cleaved, developed to the blastocysts and expressed, which was indicated as a P value, was 0.1798, 0.3106, 0.8650 and 0.7088, respectively.

[a] Percentage of the number of embryos injected.

[b]Percentage of the number of embryos fused.

Table 7. Comparison of development rates of bovine transgenic somatic cell nuclear transfer embryos derived from different size of transfected cumulus cells

Size of donor cells	No. of embryos				
	Injected	Fused (%)[a]	Cleaved (%)[b]	Development to blastocysts (%)[b]	Expressed in blastocysts*(%)
High	110	94 (85.4)	74 (78.7)	16 (17.0)[c]	12 (75.0)
Low	114	90 (78.9)	55 (84.4)	30 (33.3)[d]	13 (43.3)

Model effect of the expression level on the number of embryos fused, cleaved, developed to the blastocysts and expressed, which was indicated as a P value, was 0.2054, 0.3203, 0.0164 and 0.0408, respectively.

[a] Percentage of the number of embryos injected.

[b] Percentage of the number of embryos fused.

[cd] Within a parameter, values with different superscripts differed significantly, $P<0.05$.

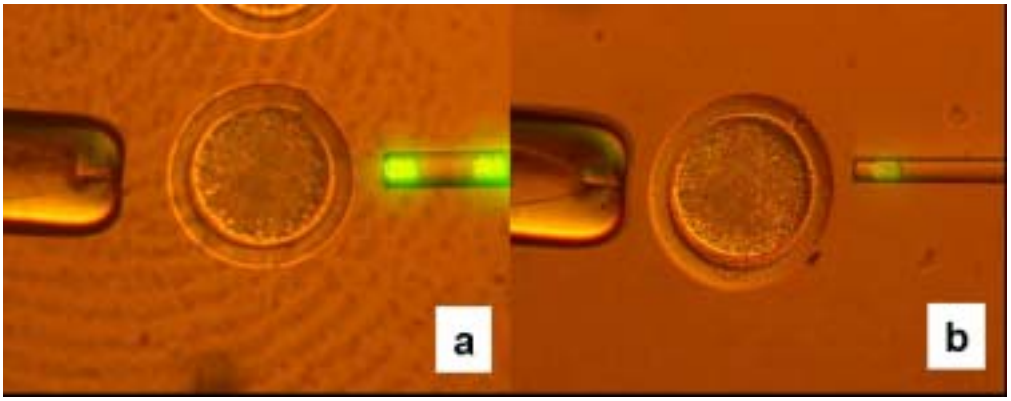


Fig 10. Morphological classification of donor cell by size. **a)** Large size of cell (≥ 30um) **b)** Small size of cell. (< 30um) (x 100).

Table 8. Comparison of development rates of bovine transgenic somatic cell nuclear transfer embryos derived from different size of transfected cumulus cells

Size of donor cells	No. of embryos				
	Injected	Fused (%)[a]	Cleaved (%)[b]	Development to blastocysts (%)[b]	Expressed in blastocysts* (%)
Small (< 30㎛)	123	93 (75.6)	78 (83.9)	36 (38.7)[c]	23 (63.9)
Large (≥30㎛)	114	91 (75.8)	72 (79.1)	21 (23.1)[d]	13 (61.9)

Model effect of the cell size on the number of embryos fused, cleaved, developed to the blastocysts and expressed, which was indicated as a P value, was 0.9678, 0.4093, 0.0340 and 0.8835, respectively.

[a] Percentage of the number of embryos injected.

[b] Percentage of the number of embryos fused.

[cd] Within a parameter, values with different superscripts differed significantly, $P<0.05$.

2. 최적의 배양배지 선별

가. 형질전환 핵이식란의 발육능을 높이기 위한 최적의 배양배지를 선별하기 위해 mSOF 배지를 대조군으로 하고 chemical-defined medium인 potassium simplex optimization medium (KSOM) 배지에 bovine serum albumin (BSA), fetal bovine serum (FBS) 및 polyvinyl alcohol (PVA) 를 첨가하여 총 4개의 배양배지군으로 하여 체외수정란(in vitro fertilization; IVF)에서 분할율과 8-16세포, 상실배(morula) 및 배반포(blastocyst)로의 발육율(developmental competence) 및 배반포에서 발육능 지표가 되는 배반포 세포수(cell number)와 감별염색(differential staining)을 하여 총세포수 대비 내부세포괴(inner cell mass; ICM) 비율을 비교하였다.

나. 체외수정란에서 4가지 배양배지에서 발육율을 비교한 결과 FBS가 첨가된 KSOM medium에서 유의적인 차이는 없었지만 가장 높은 배반포로의 발육율 및 부화(hatching)율을 보였다(Table 9). 4가지 배양배지에 따른 체외수정란의 세포수 및 총세포수 대비 ICM 비율을 비교한 결과 KSOM-FBS 군에서 가장 많은 세포수와 내부세포괴 비율을 보였다 (Table 10).

Table 9. Effect of protein supplementation of KSOM on preimplantation development of bovine in vitro fertilized (IVF) embryos.

	No. (%) of embryos					
Media[1]	Injected (replicates)	Cleaved	8-16 cell	Morula	Blastocyst	Hatching or hatched blastocyst
mSOF-BSA	149(10)	105(70.5)[ab]	79(53.0)	56(37.6)	39(26.2)	11(7.4)[ab]
KSOM-BSA	152(10)	122(80.3)[a]	85(55.9)	56(36.8)	39(25.7)	8(5.3)[ab]
KSOM-FBS	139(8)	96(69.1)[b]	67(48.2)	58(41.7)	39(28.1)	15(10.8)[a]
KSOM-PVA	138(9)	102(73.9)[ab]	73(52.9)	48(34.8)	25(18.1)	3(2.2)[b]

[a,b]Within the same column, values with different superscripts were significantly different (P < 0:05).

[1]Embryos derived from IVF were randomly distributed and cultured for 192 h in KSOM supplemented with BSA (KSOM-BSA), FBS (KSOM-FBS) or PVA (KSOM-PVA). The mSOF supplemented with BSA (mSOF-BSA) was served as the control.

Table 10. Effect of protein supplementation of KSOM on the number of total cells, inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) in bovine blastocysts derived from in vitro fertilization (IVF).

Media[1]	No. of blastocysts	No. (%) of cells (mean ± S.E.M.)			
		ICM	TE	Total	ICM:total (%)
mSOF-BSA	18	36.9±19.2[a]	89.2±35.7	126.1±43.5	29.9±11.1
KSOM-BSA	16	40.5±18.2[ab]	101.6±44.5	142.1±58.4	28.8±8.4
KSOM-FBS	20	50.4±20.2[b]	104.8±44.2	155.2±44.2	33.8±11.8
KSOM-PVA	16	39.5±15.3[ab]	85.9±34.3	125.1±45.2	32.2±9.0

[a,b]Within the same column, values with different superscripts were significantly different (P < 0:05).

[1]Embryos derived from IVF were randomly distributed and cultured for 192 h in KSOM supplemented with BSA (KSOM-BSA), FBS (KSOM-FBS) or PVA (KSOM-PVA). The mSOF supplemented with BSA (mSOFBSA) was served as control.

3. 수란우의 선정 및 발정동기화

- 총 30두의 수란우를 선정하여 23두에서 발정동기화 성공하여 당초목표인 20두의 수란우 선정 및 발정동기화 50% 이상 초과 달성하였다.

가. 총 30두의 수란우 선정

- 본 연구팀에서 현재 번식관리 서비스를 제공하고 있는 인근에 위치한 착유우 30-50두 규모의 목장에서 체중 350kg 이상의 13-14개월령 육성후보 Holstein 처녀우 30마리를 발정동기화 대상우로 선정하였다.
- 임상적 검사 및 혈액·혈청학적 검사를 하였으며 처치전까지 3회 이상의 정상적 발정주기를 보인 미경산우를 선별하여 발정동기화를 하였다.

나. 총 23두에서 발정동기화 성공

- 수란우의 황체를 촉진하고 같은 날 $PGF_{2\alpha}$나 유사체를 1회에 투여하거나 CIDR은 7일간 삽입 및 6일째 $PGF_{2\alpha}$ 투여로 발정을 유도하였으며 발정동기화 처리 후 1일 3회, 1일 30분 이상 수란우 축군을 관찰하여 승가허용 발정을 보이는 개체를 발정우로 규정으며 승가허용자세를 보이는 수란우 23두에서 발정 동기화를 달성하였다(Table 11).
- 수정란 이식시에는 직장검사 및 초음파 검사로서 난소의 활력 및 생식기관의 이상 유무를 확인하였다.

Table 11. The number of dairy heifers in standing estrus treated with $PGF_{2\alpha}$ and CIDR+$PGF_{2\alpha}$

Group*	No. of heifers treated	No. of heifers in standing estrus**
$PGF_{2\alpha}$ only	9	5
CIDR + $PGF_{2\alpha}$	21	18

*Treatments were $PGF_{2\alpha}$ (single injection of 25 mg Lutalyse®) or CIDR + $PGF_{2\alpha}$ (insert CIDR® for 7 days with a single injection of 25 mg of Lutalyse® on Day 6) after palpation of well-developed corpus luteum transrectally.
**Stand to be mounted for more than 7 seconds

4. 형질전환 핵이식란 이식 및 임신진단

가. 총 12두의 수란우에 이식

1) 총 12두의 수란우에 27개의 형질전환 핵이식란을 이식하였다.

2) 최종 이식할 수란우를 선별할 목적으로 발정이 관찰된 수란우는 핵이식란 이식일인 발정 7일째에 직장검사를 실시하여 자궁과 난소의 상태 및 황체의 위치(좌 또는 우)를 확인하였으며 황체의 크기가 정상(15~20mm)이고 좋은 형태의 crown을 지닌 것을 1등급 수란우 12두에 총 27개의 형질전환 핵이식란을 이식하였다.

나. 임신진단

- Non-return 방법으로 조사한 수란우 12두 중 9마리에서 이식 후 40일 이내에 재발정이 일어났으며 직장검사로 비임신을 확인하였고 이식 후 60일에 초음파 검사한 3마리도 임신을 확인할 수 없었으나 이 중 1마리에서 자궁의 뚜렷한 비후와 액체 저류가 관찰되어 유산이 일어난 것으로 추정하였다.

- 제 3차년도-

<제1세부 과제: αAT 유전자가 도입된 형질전환 세포주 수립>

1. 형질전환 핵이식란에서의 αAT 유전자 발현 검증
   - 형질전환 체세포 및 배반포에서 αAT 발현 검증
     : αAT를 도입한 체세포와 체세포 유래 형질전환 배반포에서 genomic DNA를 추출하여 primer(Forward: TGAGTTCGCCTTCCTAT, Reverse: CATGCCTAACTTCATCA)로 하여 aAT vector, wild type bovine genomic DNA, transfected cell 및 transgenic blastocyst로 PCR 실시하여 전기영동하여 밴드를 확인한 결과 vector, transfected cell 및 배반포에서 αAT가 발현되었으며 대조군인 wild type bovine genomic DNA에서는 발현되지 않았다(Fig 11).

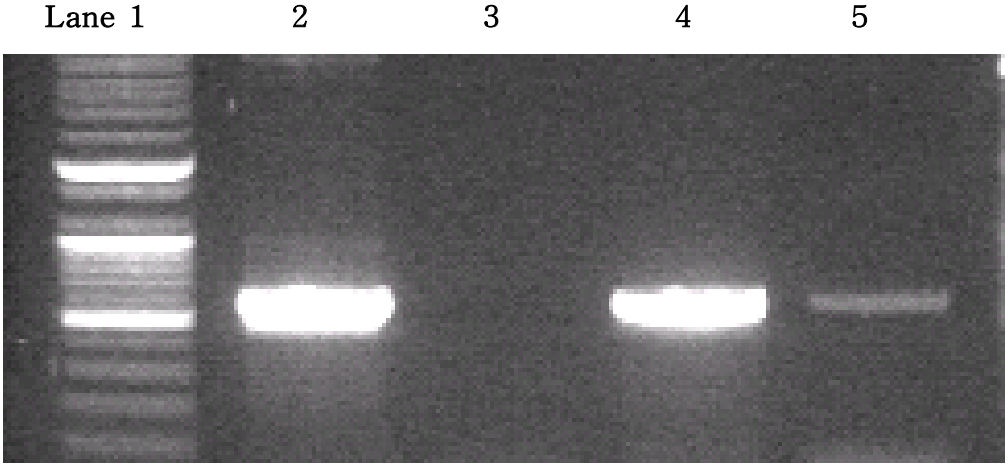


Fig 11. PCR analysis for identification of aAT gene (590bp) in transfected cell and transgenic blastocyst. Lane1, size marker; Lane2, ㅁAT vector; Lane3, wild type bovine genomic DNA; Lane4, transfected cell; Lane5, transgenic SCNT blastocyst.

2. 형질전환 핵이식란에서 배발생 관련 유전자 발현 분석

- 형질전환 핵이식란에서 유전자가 정상적으로 발현되는지를 알아보기 위해 단위발생란, 체외수정란, 핵이식란 및 형질전환 핵이식란에서 배발육 과정중에 외부 heat stress에 수정란을 보호하기 위해 발생하는 heat shock protein70.1(Hsp 70.1) 유전자의 발현 비교 조사하였다. 각각의 배반포에서 추출되는 RNA의 양이 다르기 때문에 배반포에서 β-actin도 RT-PCR를 실시하여 4가지 군에서 Hsp70.1/β-actin의 비로 유전자 발현을 relative abundance로 비교한 결과 Hsp70.1 유전자는 체외수정란에서만 유의적으로 높게 발현됨을 알 수 있었고 αAT가 transfection 된 형질전환 배반포 및 control 핵이식란에서는 낮게 발현되어 외부의 heat stress에 약함을 알 수 있었다(Fig 12).

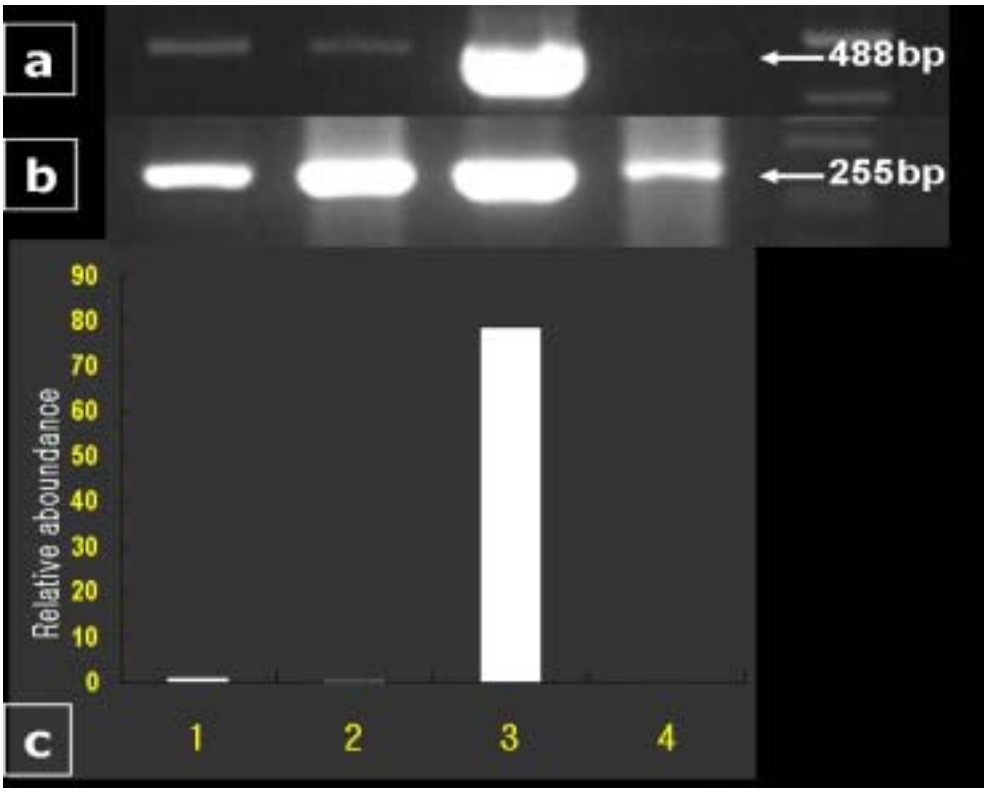


Fig 12. Representative gel photograph of a semi-quantitative RT-PCR of heat shock protein70.1 (Hsp 70.1) transcripts in transgenicNT, control NT, IVF, and parthenogenetic bovine blastocysts. **a)** Band of Hsp mRNA transcripts. **b)** Band of β-actin transcripts as a control. **c)**Relative abundance of Hsp mRNA transcripts. Expected PCR products of Hsp 70.1 gene (488 bp) in transgenic NT (lane 1), control NT (lane 2), IVF (lane 3), and parthenogenetic (lane 4) blastocysts was indicated (arrow), respectively. RT-PCR products were analyzed with 2.0 % agarose gel.

<제2세부 과제: 형질전환 복제수정란의 생산과 이식 및 수란우의 사양관리>

- 2차년도에 이어 3차년도에서도 매주 2회씩 형질전환 핵이식을 실시하여 233개의 형질전환 핵이식란을 생산하였고 이 중 발육상태가 우수한 78개의 형질전환 핵이식란을 선별하여 53마리의 대리모에 이식하였다(Fig 13).

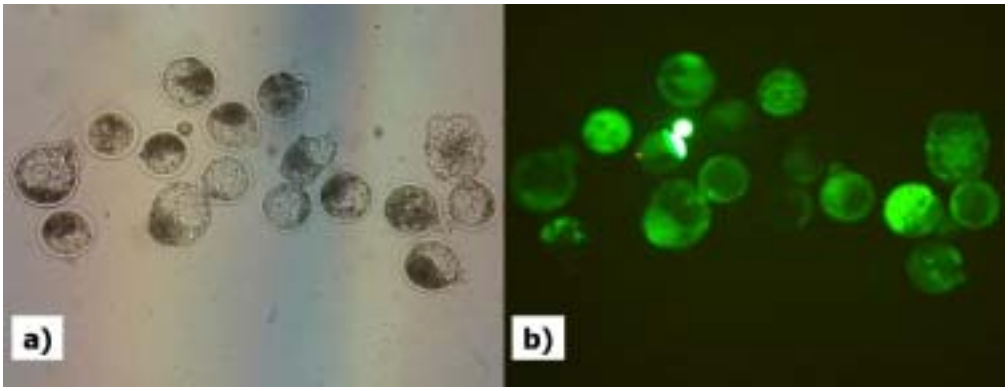


Fig 13. Bovine transgenic blastocysts with expression of green fluorescent protein produced by demecolcine-assisted enucleation. Under normal light microscope (a) and B-mode filter (b).

1. Demecolcine-assisted 탈핵에 의한 소 형질전환 핵이식란 생산

- 소 형질전환 체세포 핵이식에서 용이한 탈핵을 위해 demecolcine를 이용할 시 탈핵율과 형질전환 핵이식란의 발육능을 높이기 위한 최적의 조건을 알아보고자 실시하였다. 도축장 유래 미성숙 난자를 18시간 동안 체외성숙 시킨 후 pipetting으로 난구세포를 제거했다. 실체현미경 하에서 제1극체가 확인된 성숙 난자를 0.1, 0.2, 0.4 및 0.8 ug/ml의 demecolcine이 첨가된 체외성숙 배지에서 1시간 더 배양한 다음 MⅡ plates가 포함된 세포막이 돌출되어 있는 난자(Fig 14)를 체세포 핵이식에 공여하여 탈핵을 실시한 후 핵이식 및 융합을 거쳐 배양했다. Demecolcine 농도에 따른 세포막의 protrusion rates, demecolcine-assisted enucleation과 conventional enucleation rate 방법 간의 탈핵율 비교 및 각 군간 배반포로의 발육능을 비교하였다.

가. Demecolcine 농도에 따른 protrusion rates

- Demecolcine 처리 후 핵이 포함된 세포막의 protrusion rates를 각 군간 비교한 결과 0.2, 0.4 및 0.8 ug/ml 군에서 0.1ug/ml 군보다 유의적으로 높았다 (82.8%, 86.2%, 90.4% vs. 70.1%) (Table 12). Maternal chromosome의 돌출은 Fig 14와같이 확인할 수 있었으며 탈핵 시 최소한의 세포질과 함께 쉽게 제거할 수 있었다.

나. 탈핵율(Enucleation rates)

- Table 13에서와 같이 demecolcine-assisted 방법으로 탈핵을 실시한 결과 기존의 blind 탈핵방법보다 유의적으로 높은 탈핵율을 보였다(96.2% vs. 75.3%).

다. Demecolcine 농도에 따른 형질전환 핵이식란의 발육율

- Demecolcine의 첨가되지 않은 대조군과 함께 demecolcine 농도를 0.1, 0.2, 0.4 및 0.8ug/ml로 해서 형질전환 핵이식란의 융합율, 분할율 및 배반포로의 발육율을 비교한 결과 융합율에서는 5개의 군간 유의적인 차이가 없었으나 분할율에서는 0.2ug/ml 군에서 유의적으로 높았다(Table 14). 가장 중요한 배반포로의 발육율에서는 demecolcine이 첨가되지 않은 군과 0.1 및 0.2ug/ml 군에서 유의적으로 높았다 (37.5%, 30.6%, 25.0% vs. 9.4%, 10.8%).

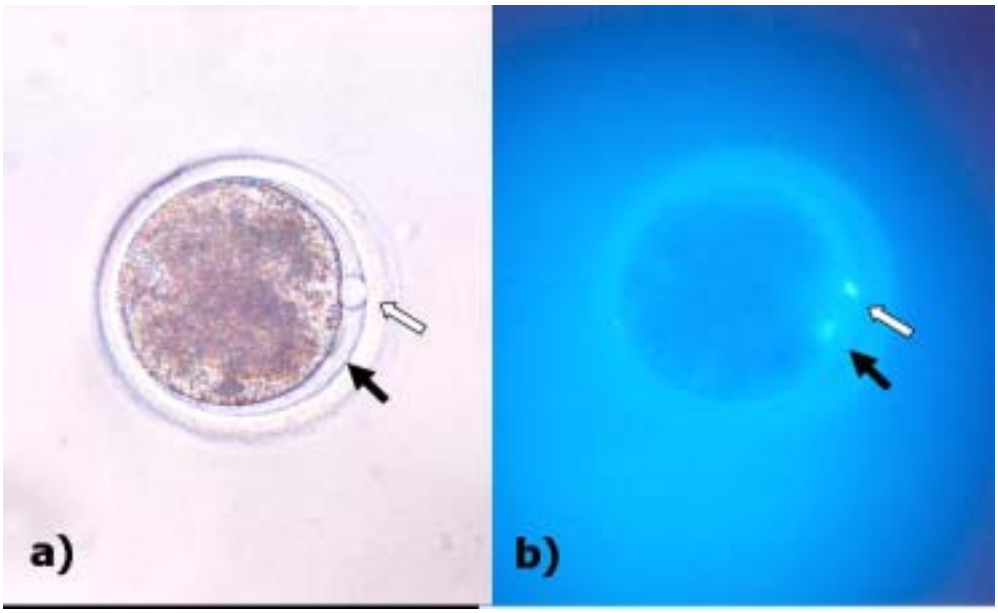


Fig 14. An oocyte with a membrane protrusion following 1 h of demecolcine treatment. Closed arrow shows the membrane protrusion with maternal chromosome, and open arrow indicates the first polar body. The condensed chromosome mass can be seen in the protrusion under fluorescent field (b) after Hoechst33342 stain.

Table 12. Protrusion of membrane with maternal chromosome after demecolcine treatment in the bovine oocytes

Concentration of demecolcine	No. of oocytes	
	Treated	Protruded (%)
0.1 ug/ml	134	94 (70.1)[a]
0.2 ug/ml	145	120 (82.8)[b]
0.4 ug/ml	123	106 (86.2)[b]
0.8 ug/ml	114	103 (90.4)[b]

[a,b)]Within a parameter, values with different superscripts differed significantly, $P<0.05$.

Table 13. Comparison of enucleation rates between blind method and demecolcine-assisted method

Enucleation methods	No. of oocytes	
	Enucleated	Confirmed enucleation (%)
Blind	89	67 (75.3)[a]
Demecolcine-assisted	106	102 (96.2)[b]

[a,b)]Within a parameter, values with different superscripts differed significantly, $P<0.05$.

다. Demecolcine 농도에 따른 형질전환 핵이식란의 발육율

- Demecolcine의 첨가되지 않은 대조군과 함께 demecolcine 농도를 0.1, 0.2, 0.4 및 0.8ug/ml로 해서 형질전환 핵이식란의 융합율, 분할율 및 배반포로의 발육율을 비교한 결과 융합율에서는 5개의 군간 유의적인 차이가 없었으나 분할율에서는 0.2ug/ml 군에서 유의적으로 높았다(Table 13). 가장 중요한 배반포로의 발육율에서는 demecolcine이 첨가되지 않은 군과 0.1 및 0.2ug/ml 군에서 유의적으로 높았다 (37.5%, 30.6%, 25.0% vs. 9.4%, 10.8%).

라. 결론

- 상기 3가지 실험 결과 demecolcine을 이용한 탈핵 시 protrusion rates와 배반포로의 발육율을 동시에 만족하는 농도는 0.2ug/ml이며 이 농도로 적용시 효과적임을 알 수 있었다.

Table 14. In vitro development of bovine transgenic SCNT embryos reconstructed with chemical-treated oocytes according to concentration of demecolcine

Concentration of demecolcine	No. of embryos			
	Injected	Fused (%)*	Cleaved (%)†	Develop to bl.#
Control (0 ug/ml)	143	88(61.5)	54 (61.4)^{ab}	33 (37.5)^{a}
0.1 ug/ml	102	62 (60.8)	40 (64.5)^{ab}	19 (30.6)^{a}
0.2 ug/ml	107	68 (63.6)	48 (70.6)^{a}	17(25.0)^{a}
0.4 ug/ml	91	64 (70.3)	28 (43.8)^{c}	6 (9.4)^{b}
0.8 ug/ml	98	65 (66.3)	31 (47.7)^{bc}	7 (10.8)^{b}

*Percentage of the number of embryos injected

† Percentage of the number of embryos fused

#Blastocyst

$^{a-c)}$Within a parameter, values with different superscripts differed significantly, $P<0.05$.

2. 핵이식란 및 형질전환 핵이식란의 최적 배양 배지 선별

- 수정란의 최적 배양 배지 선별을 한 2차년 도에 이어 3차년 도에서는 일반 핵이식란과 형질전환 핵이식란의 발육능을 높이기 위한 최적의 배양배지를 선별하기 위해 기존의 modified synthetic oviductal fluid (mSOF) 배지를 대조군으로 하고 chemical-defined medium인 potassium simplex optimization medium (KSOM) 배지에 bovine serum albumin (BSA), fetal bovine serum (FBS) 및 polyvinyl alcohol (PVA)를 첨가한 총 4개의 배양배지 군으로 하여 핵이식(somatic cell nuclear transfer; SCNT) 및 형질전환 핵이식(transgenic SCNT) 유래 수정란에서 분할율과 8-16세포, 상실배(morula) 및 배반포(blastocyst)로의 발육율(developmental competence)을 비교하였다. 그리고 배반포에서 발육능의 지표가 되는 배반포 세포수(cell number)와 감별염색(differential staining)을 통한 총세포수 대비 내부세포괴(inner cell mass; ICM)의 비율을 비교 분석하였다.

가. 핵이식란의 최적 배양 배지 선별

- 핵이식란에서 mSOF 배지와 defined-medium 간의 발육능을 비교한 결과 분할률, 8-16cell 단계 및 상실배로의 발육율에서는 각 군간 유의적인 차이가 없었다(Table 15). 그러나 배반포로의 발육율은 mSOF-BSA, KSOM-BSA 및 KSOM-FBS군이 KSOM-PVA 군보다 유의적으로 높았다(38.5%, 38.5%, 33.3% vs. 20.5%). 그리고 배반포에서 hatching율도 mSOF-BSA 및 KSOM-BSA군에서 유의적으로 높게 나왔다(33.9%, 30.8% vs. 17.1%, 13.9%).

- 배반포의 발육능의 지표가 되는 배반포 세포수와 총세포수 대비 내부세포괴(ICM)의 비율을 비교한 결과 각 군간 내부세포괴의 수는 유의적인 차이가 없었으나 영양막세포(trophectoderm; TE)의 수에서 차이가 나 총세포수에서 각 군간 유의적인 차이가 있었다. KSOM-BSA군이 평균 125개로 유의적으로 가장 높았으며 KSOM-PVA군에서 평균 104.6개로 가장 적게 나왔다(Table 16). 총 세포수 대비 내부세포괴의 수의 비율은 각군간 유의적인 차이가 없었다.

Table 15. Effect of protein supplementation of KSOM on preimplantation development of bovine non-transgenic cloned embryos in Experiment 2

Media1	No. of fused oocytes (no. of replicates)	No. (%) of embryos			
		Cleaved 8-16 cell	Morula	Blastocyst	Hatching or hatched blastocyst
mSOF-BSA	109(9)	81(74.3)	60(55.0)	47(43.1)	42(38.5)[a]	37(33.9)[a]
KSOM-BSA	104(9)	65(62.5)	47(45.2)	41(39.4)	40(38.5)[a]	32(30.8)[a]
KSOM-FBS	117(9)	71(60.7)	51(43.6)	47(40.2)	39(33.3)[a]	20(17.1)[b]
KSOM-PVA	122(10)	82(67.2)	61(50.0)	38(31.1)	25(20.5)[b]	17(13.9)[b]

Fusion rate was 81.6% (452/554).

[a,b]Within the same column, values with different superscripts were significantly different ($P < 0:05$).

[1]Embryos reconstructed with nontransfected donor cells were randomly distributed and cultured for 192 h in KSOM supplemented with BSA (KSOM-BSA), FBS (KSOM-FBS) or PVA (KSOM-PVA). The mSOF supplemented with BSA (mSOF-BSA) was served as control.

Table 16. Effect of protein supplementation of KSOM on the number of total cells, inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) in bovine non-transgenic cloned blastocysts in Experiment 2

Media	No. of blastosysts	No.(%) of cells(mean±S.E.M.)			
		ICM	TE	Total	ICM:total (%)
mSOF-BSA	17	34.3±12.2	76.2±26.2[ab]	110.5±30.5[ab]	31.8±10.1
KSOM-BSA	23	33.6±12.5	91.7±36.2[a]	125±39.7[a]	27.5±8.9
KSOM-FBS	15	33.5±8.6	80.7±33.3[ab]	114.3±36.1[ab]	31.0±9.1
KSOM-PVA	17	32.9±16.4	71.7±25.5[a]	104.6±32.2[b]	31.6±11.5

[a,b]Within the same column, values with different superscripts were significantly different (P < 0:05).

[1]Embryos reconstructed with nontransfected donor cells were randomly distributed and cultured for 192 h in KSOM supplemented with BSA (KSOM-BSA), FBS (KSOM-FBS) or PVA (KSOM-PVA). The mSOF supplemented with BSA (mSOF-BSA) was served as control.

나. 핵이식란의 최적 배양 배지 선별

- 형질전환 핵이식란에서 mSOF 배지와 defined-medium 간의 발육능을 비교한 결과 분할율, 8-16cell 단계, 상실배 및 배반포로의 발육율, hatching율 및 GFP 발현율 모두 각 군간 유의적인 차이가 없었다(Table 17). 그리고 전반적인 발육율이 일반 핵이식란보다 떨어짐을 알 수 있었다.

- 배반포의 발육능의 지표가 되는 배반포 세포수(cell number), 내부세포괴(ICM)의 수, 영양막 세포(trophectoderm)의 수 및 총세포수 대비 내부세포괴(ICM)의 비율을 비교한 결과 각 군간 차이가 없음을 알 수 있었다(Table 18).

Table 17. Effect of protein supplementation of KSOM on preimplantation development of bovine transgenic cloned embryos in Experiment 3

Media	No. of fused (replicates)	No. (%) of embryos					
		Cleaved	8-16 cell	Morula	Bl	Hatching Bl	Expressing Bl[b]
mSOF-BSA	138(15)	91(65.9)	68(49.3)	40(29.0)	32(23.2)	27(19.6)	12(37.5)
KSOM-BSA	138(15)	93(64.7)	69(50.0)	44(31.9)	32(23.2)	25(18.1)	13(40.6)
KSOM-FBS	130(14)	85(65.4)	56(43.1)	40(30.8)	26(20.0)	21(16.2)	15(57.7)
KSOM-PVA	127(14)	85(66.9)	66(52.0)	33(26.0)	24(18.9)	17(13.4)	13(54.2)

Fusion rate was 79.3% (533/672).

[a]Embryos reconstructed with transfected donor cells were randomly distributed and cultured for 192 h in KSOM supplemented with BSA (KSOM-BSA), FBS (KSOM-FBS) or PVA (KSOM-PVA). The mSOF supplemented with BSA (mSOF-BSA) was served as control.

[b]Percentage of the number of blastocysts expressing green fluorescence protein (GFP).

Table 18. Effect of protein supplementation of KSOM on the number of total cells, inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) in bovine transgenic cloned blastocysts

Media	No. of Bl	No. (%) of Cells(mean±S.E.M)			
		ICM	TE	Total	ICM:total (%)
mSOF-BSA	11	34.3±7.6	72.8±21.1	107.1±22.9	32.9±8.3
KSOM-BSA	10	36.0±13.1	92.0±35.4	128.0±42.6	24.9±10.4
KSOM-FBS	9	33.7±8.9	79.6±24.6	113.3±25.1	30.4±8.0
KSOM-PVA	13	28.2±15.0	72.8±18.5	102.5±27.6	28.4±6.9

[a]Embryos reconstructed with transfected donor cells were randomly distributed and cultured for 192 h in KSOM supplemented with BSA (KSOM-BSA), FBS (KSOM-FBS) or PVA (KSOM-PVA). The mSOF supplemented with BSA (mSOF-BSA) was served as control.

3. 형질전환 복제수정란 이식

- 매주 2회씩 형질전환 핵이식을 실시하여 233개의 형질전환 핵이식란을 생산하였고 이 중 발육 상태 및 발현율이 좋은 78개의 형질전환 핵이식란을 선별하여 53마리의 대리모에 이식하였다.

가. 수란우의 확보 및 선정

- 좋은 수란우를 안정적으로 확보할 목적으로 사양관리가 우수한 충남 태안에 위치한 대규모 목장의 홀스타인 처녀우 200여두를 수란대상우로 확보하였다.
- 체중이 320kg 이상 도달되었다고 판정되는 13-14개월령의 수란대상 처녀우들은 아침, 저녁으로 30분 이상씩 관찰하여 승가 및 승가허용 증상이 뚜렷한 강한 발정 증상을 나타내는 자연 발정우를 수란대상우로 선정하였다.

나. 형질전환 복제수정란 이식

- 최종 이식할 수란우를 선별할 목적으로 발정이 관찰된 수란우는 핵이식란 이식일인 발정 7일째에 직장검사를 실시하여 자궁과 난소의 상태 및 황체의 위치(좌 또는 우)를 확인하였으며, 자궁상태가 건강하고 황체의 크기가 정상(15~20mm)이고 좋은 형태의 crown을 지닌 것을 1등급 수란우 53두에 형질전환 핵이식란을 이식하였다(Fig 15).
- 총 53두의 수란우에 78개의 형질전환 핵이식란을 이식하였다.

4. 수란우의 건강관리

- 수란대상우들은 독립된 우사에 분리하여 사양, 관리하였다
- 전임수의사 1명이 상주하면서 구충, 백신접종, 건강진단 및 소독 등이 기본적인 질병관리를 하였고, 수란대상우들의 건강상태를 수시로 점검하였다.
- 수란우들은 스트레스가 가해지지 않도록 각별히 주의하였으며, 실험기간 중에 특별한 사고나 이상은 1건도 발생되지 않았으며 수란우 모두가 건강하였다.

Fig 15. Transfer of bovine transgenic somatic cell nuclear transfer embryos

나. 임신진단

- Non-return 방법으로 조사한 수란우53두 중 35마리에서 이식 후 40일 이내에 재발정이 일어났으며 직장검사로 비임신을 확인하였다. 이식 후 40일 경에 직장검사 및 초음파로 임신진단을 실시한 결과 목장번호 7108, 7102 소에서 임신을 확인하였다(Fig 16, Fig 17).

1) 공여핵원 세포의 계대수에 따른 임신율 비교

- 형질전환 핵이식란 이식 시 공여핵원 체세포의 계대수에 따른 임신율을 비교하기 위해 4계대, 5계대, 6계대 및 8계대 이상으로 4가지 군으로 분류하여 비교한 결과 5계대 군과 8계대 이상군에서 각각 1마리씩 임신을 확인하였다(Table 19).

2) 이식한 형질전환 핵이식란 수에 따른 임신율 비교

- 형질전환 핵이식란 이식 시 이식한 핵이식란 수에 따른 임신율을 비교하기 위해 이식한 핵이식란을 각각 1개, 2개 및 3개군으로 분류하여 조사한 결과 1개 및 2개를 이식한 군에서 각각 1마리씩 임신을 확인하였다(Table 20).

3) 형질전환 핵이식란의 체외 배양일의 길이에 따른 임신율 비교

- 형질전환 핵이식란의 체외 배양일의 길이에 따른 임신율을 비교하기 위해 각각 6일, 7일, 8일, 9일, 10일 및 11일 배양군으로 분류하여 비교한 결과 7일 및 11일 체외배양 군에서 각각 한 마리씩 임신을 확인하였다(Table 21).

Fig 16. Pregnancy diagnosis of transgenic cloned fetus in the recipient (#7108) by ultrasonography.

Fig 16. Pregnancy diagnosis of transgenic cloned fetus in the recipient (#7102) by ultrasonography.

Table 19. Comparison of pregnancy rates after transfer of transgenic bovine SCNT embryos according to passages of donor cell

Passages of donor cell	No. of transferred embryos	No. of recipients	No. of pregnancy*
4	20	15	-
5	18	12	1
6	14	11	-
8-11	23	13	1

* Diagnosed on Day 40 by rectal palpation and ultrasonography

Table 20. Comparison of pregnancy rates after transfer of transgenic bovine SCNT embryos according to number of transferred embryos

No. of transferred embryos	No. of transferred embryos	No. of recipients	No. of pregnancy*
1	30	30	1
2	36	18	1
3	9	3	-

* Diagnosed on Day 40 by rectal palpation and ultrasonography

Table 21. Comparison of pregnancy rates after transfer of transgenic bovine SCNT embryos according to periods of embryo culture

Periods of culture (day)	No. of transferred embryos	No. of recipients	No. of pregnancy*
6	8	6	-
7	10	7	1
8	7	7	-
9	12	7	-
10	24	17	-
11	14	7	1

* Diagnosed on Day 40 by rectal palpation and ultrasonography

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구개발 목표의 달성도

과제명	당 초 목 표	주 요 내 용	달성도(%)
-제1세부과제- □AT 유전자가 도입된 형질전환 세포주 수립	○우량 젖소 체세포주 수립	- 체세포주 2개 이상 수립	100
	○□AT 발현벡터의 체세포로의 도입	- 체세포 도입율 20% 이상 달성	100
	○최적의 유전자 도입조건 수립 여부	- 화학적 방법과 전기적 방법을 통한 최적의 조건 수립	100
	○Stable한 형질전환 세포주 수립	- Stable한 형질전환 세포주 2개 이상 수립	100
	○형질전환 핵이식란에서의 □AT 유전자 발현 여부	- 핵이식란에서 □AT 발현 여부 검사	100
-제2세부과제- - 형질전환 복제수정란의 생산과 이식 및 수란우의 사양관리	○미성숙 난자의 체외 성숙 효율 향상	- 체외 성숙률 50% 이상 달성	100
	○핵이식 미세조작 기술 개발	- 탈핵율 60% 및 융합율 30% 이상 달성	100
	○형질전환 체세포 핵이식	- 형질전환 핵이식란 120개 이상 생산	100
	○수란우 선정 및 발정동기화	- 수란우 20두 이상 선정 및 50% 이상의 발정 동기화	100
	○형질전환 핵이식란 이식	- 형질전환 핵이식란 30두 이상 이식	100
	○수란우 임신 진단	- 수란우 2두 이상 임신	100
	○임신된 수란우 질병 관리	- 수란우 폐사율 10% 이하	100

제2절 관련분야에의 기여도

1. 기술적 측면

가. 형질전환 생산을 위한 체세포 핵이식 기법 확립

나. 전핵내 미세 주입법보다 실용화 효율 2배 이상 증가

다. 여러 가지 종류의 인간 유용 단백질의 대량 생산 가능

라. 이종장기 생산을 위한 형질전환 복제돼지 생산 등 다른 종(種)에 확대 적용

마. 본 기술을 국내 여타기관 또는 산업체에 이전하여 관련 기술인력 양성 가능

바. 동물 생명공학 발전에 기여

2. 경제 · 산업적 측면

가. 고가의 인간 유용 단백질을 생산

나. 의학 분야에 적용하여 유용 단백질의 상용화

다. 형질전환 복제소의 농가 보급으로 농가소득 증대

라. 전반적인 국가 경쟁력 강화

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구는 체세포 핵이식에 의한 인간에게 유용한 alpha1-antitrypsin를 우유에서 분비하는 형질전환 젖소를 생산 방법을 개발함으로써 다음과 같은 분야에서 적용하고자 한다.

가. 개발된 기초기술을 학술지를 통한 관련 연구진과 산업계에 보급

나. 형질전환 젖소의 농가 보급으로 생산성 증대에 의한 농가 소득 증대에 활용

다. 형질전환 동물 생산 등 기술적 기반 확보에 활용

라. 난포란의 체외성숙조건의 확립을 통한 체외수정, 세포질내 정자미세주입, 동결보존 등 관련 분야에의 활용 및 기반제공

마. 현미수정 등과 같은 보조생식기술에 적용하여 사람 및 희귀동물의 불임장애 극복에 활용

바. 안정적인 세포주 배양기법의 확립에 의한 상업적 이용가능 (벤처기업 창업 등)

사. 대체장기 생산을 위한 xenotransplantation용, knock-out pig 복제 생산 등 다른 종의 형질전환 동물 생산 방법에 적용

아. 이종간 핵이식 기술 적용에 의한 멸종위기 및 기멸종 동물 복원 연구

자. 형질전환 복제소의 농가 보급 및 대량 생산체계에의 활용

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 우유에서 human growth hormone을 분비하는 형질전환 젖소 생산

High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow

Transgenic farm animals have been proposed as an alternative to current bioreactors by expression in E. coli but no comparisons have been made yet for the the production of the same protein by both methods. Recombinant growth hormone (hGH) was produced by fermentation in E. coli by a procedure routinely used for the commercial production of the hormone. Fetal fibroblasts were obtained from a Jersey 75-day fetus and transfected with separate plasmids containing constructs comprising the human growth hormone gene (650 bp cDNA) under the control of a bovine β-casein promoter and a neomycin resistance gene. Control was a nontransgenic parental cell line; all other groups were selected for 14 days with 800 μg/mL geneticin, and three cell lines (L0 - L2) were obtained and were used as donors. NT was performed as described by Salamone et al. 2004 Reprod. Fert. Dev. 16, 158. Two blastocysts were transferred nonsurgically per recipient cow. The blastocyst numbers per total numbers of NT by treatment were: control, 33/197; L0, 28/130; L1, 34/137; and L2, 71/470. Chi-square analysis showed no significant differences among groups. Calves born were: n = 1, 4, 0, and 5, from control, L0, L1, and L2 groups, respectively. The total rate of development to term of transferred doublets was 12%. After testing by PCR and Southern Blot, only one calf from line L0 showed a complete sequence for the coding region of the hGH whereas partial deletions were observed in the other animals. Artificial lactation was induced at 11 months and milking was started on Day 24 after the start of the hormonal treatment regime. Bioactivity of hGH in the milk, measured by a Nb2 cell proliferation assay, started to increase from values around 2 g/L at the onset of milking and rose steadily, reaching values of 5.0 g/L. A highly significant correlation was observed between the bioactivity and the immunoactivity determined with a specific antibody. Analysis of whey milk showed a major band

corresponding to rhGH after staining with Commassie blue. This band represents about 10% of the total protein content. In comparison, in the cell extract from E. coli, rhGH represented less than 5%. The peptidic map of rhGH from milk was identical to that of the hormone produced by bacterial fermentation. At the present production rates, which are expected to be increased after the cow reaches a natural lactation, the annual amounts of hGH produced from this single cow would be about 4,400 g, which represents a 445% increase over our yield in conventional bacterial fermentation (500 L fermentor). Only about 15 animals would be required to cover the world needs for the treatment of children suffering from dwarfism. Here we show the production of recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow in levels of up to 5 g/L. The hormone has identical bioactivity to that currently produced by expression in E. coli. These results demonstrate that transgenic cattle can be used as an alternative for the production of this hormone.

2. 형질전환 복제 수정란 배양시 Vitamin C, E를 첨가 효과

Development of bovine SCNT embryos reconstructed using recipient oocytes and eGFP-transfected cells that were cultured with vitamin C or E.

The objective of this study was to investigate the development of bovine embryos produced by somatic cell nuclear transfer (SCNT) after treatment of recipient oocytes and/or gene-transfected donor cells with vitamin E and/or vitamin C. In the first experiment, oocytes derived from a local slaughterhouse were cultured in vitro for 22 h in TCM-199 medium supplemented with 100 μg/mL vitamin E, 100 μg/mL vitamin C, a combination of vitamins E (100 μg/mL) and C (100 μg/mL), or no addition. After culture, a total of 1139 oocytes were randomly examined for their meiotic stage and glutathione (GSH) concentration, and 1171 oocytes were enucleated and reconstructed with fetal lung cells that had been transfected with a plasmid containing the enhanced green fluorescence protein (EGFP) and neomycin-resistant genes. As a control, the same cell line without gene transfection and recipient oocytes matured without vitamin treatment were used for SCNT. The SCNT was performed according to the established procedure in our laboratory (Murakami et al. 2005 Cloning and Stem Cells 7, 77 - 81). The total cells and DNA fragmented cells of SCNT blastocysts were examined on Day 7 after SCNT (Day 0). Data were subjected to arcsin transformation before analysis, and tested by a post-hoc, Fisher's protected least significant difference PLSD test using the Statview programme (SAS Institute, Inc., Cary, SC, USA). Differences at a probability $P < 0.05$ were considered significant. The levels of GSH synthesis in the matured ocytes were higher ($P < 0.05$) in vitamin supplementation groups (6.8 - 9.0 pmol/oocyte) than in the non-supplementation group (6.7 pmol/oocyte). As shown in Table 1, the vitamin E supplementation improved the blastocyst formation, total cell number, and DNA fragmentation of EGFP-embryos compared with those parameters for EGFP-embryos obtained from recipient oocytes without vitamin treatment. However, the numbers of total cells and DNA-fragmented cells of EGFP-embryos were significantly lower ($P < 0.05$) than those of control embryos obtained by the SCNT using somatic cells without transfection, irrespective of vitamin treatment. In the second

experiment, SCNT embryos were produced using 312 recipient oocytes treated with 100 μg/mL vitamin E and EGFP-transfected donor cells that had been cultured in medium supplemented with various concentrations (0, 50, or 100 μg/mL) of vitamin E. Although the supplementation of 100 μg/mL vitamin E decreased the proportion (30.8%) of blastocyst formation as compared with non-vitamin (42.8%) and 50 μg/mL vitamin E (46.0%), the proportion (2.0%) of DNA fragmented cells in the SCNT blastocysts was significantly lower ($P < 0.05$) than that of other groups (3.2 - 3.6%). In conclusion, supplementation of vitamin E during oocyte maturation and donor cell culture improved the development and quality of gene-transfected SCNT bovine embryos.

3. GFP발현 복제 소 생산

Birth of calves expressing the enhanced green fluorescent protein after transfer of fresh or vitrified/thawed blastocysts produced by somatic cell nuclear transfer

The present study examined effects of genetic manipulation and serum starvation on in vitro developmental potential of bovine somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos and vitrification on in vivo developmental competence of transgenic SCNT blastocysts. Fetal oviduct epithelial cells (FOECs) were isolated from the oviduct of a Day 147 bovine fetus and transfected with a plasmid (pCE-EGFP-IRES-NEO) containing the enhanced green fluorescent protein (EGFP) and neomycin-resistant (Neor) genes. There were no significant differences ($P > 0.05$) in cleavage rates or development rates to the blastocyst stage for SCNT embryos derived from FOECs (72.5 and 47.8%, respectively) or transfected FOECs (TFOECs, 73.8 and 47.7%, respectively); nor from serum-fed (73.6 and 47.2%, respectively) or serum-starved (72.7 and 48.3%, respectively) cells. Seventeen of Day 7 GFP-embryos (eight fresh blastocysts and nine vitrified/thawed blastocysts) were transferred to recipients with one embryo per recipient. Two (25%) recipients were confirmed pregnant at Day 60 in fresh blastocysts group, and three recipients (33%) were confirmed pregnant at Day 60 in vitrified/thawed blastocysts group. Two healthy calves (25%) were obtained from fresh blastocysts and one (11%) from vitrified/thawed blastocysts. Microsatellite analysis confirmed that the three clones were genetically identical to the donor cells. Moreover, PCR and Southern blot demonstrated integration of transgene in genomic DNA of all three cloned calves. Expression of GFP in skin biopsies isolated from transgenic cloned calves and fibroblasts derived from the skin biopsies revealed the activity of EGFP gene, and G418 resistance in vitro of these fibroblasts confirmed the activity of Neor gene. Our results show that genetic manipulation and serum starvation of donor cells (FOECs) do not affect in vitro developmental competence of bovine SCNT embryos, and vitrified transgenic SCNT blastocysts can develop to term successfully.

4. Hand-mading 복제에 의한 형질전환 돼지 생산

Production of transgenic porcine blastocysts by hand-made cloning

Recently, a zona-free technique for bovine somatic cell nuclear transfer (NT) with no requirement for micromanipulation (i.e. hand-made cloning (HMC)) has been described. The present study demonstrates the application of the HMC technique in the production of transgenic porcine blastocysts. In vitro-matured zona-free porcine oocytes were bisected manually using a microblade and halves containing no chromatin (i.e. the cytoplasts) were selected. Two cytoplasts were electrofused with one transgenic fibroblast expressing enhanced green fluorescent protein and reconstructed embryos were activated in calcium ionophore (A23187) followed by 6-dimethylaminopurine. Subsequently, embryos were cultured in NCSU-23 medium supplemented with 4 mg mL(-1) bovine serum albumin for 7 days. In five replicates, 93.0 +/- 7.0% (mean +/- s.e.m.) of attempted reconstructed embryos fused and survived activation (31/31, 15/23, 28/28, 37/37 and 28/28). On Day 7 after activation, the respective blastocyst rates (per successfully reconstructed embryos) were 6% (2/31), 7% (1/15), 7% (2/28), 3% (1/37) and 7% (2/28), resulting in an average of 6.0 +/- 0.8%. Enhanced green fluorescent protein was expressed in all cells of all eight developing blastocysts. Efforts are now directed towards the production of offspring from such transgenic NT blastocysts

5. Lentiviral gene transfer에 의한 형질전환 소 생산

Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes

The potential benefits of transgenic cattle range from the production of large quantities of pharmaceutically relevant proteins to agricultural improvement. However, the production of transgenic cattle is presently time-consuming and expensive because of the inefficiency of the classical DNA microinjection technique. Here, we report the use of lentiviruses for the efficient generation of transgenic cattle. Initial attempts to produce transgenic cattle by lentiviral infection of preimplantation embryos were not successful. In contrast, infection of bovine oocytes with lentiviral vectors carrying an enhanced green fluorescent protein (eGFP) expression cassette followed by in vitro fertilization resulted in the birth of transgenic calves. Furthermore, all of the calves generated by infection of oocytes were transgenic, and 100% of these animals expressed eGFP as detected by in vivo imaging and Western blotting. In addition, a transgenic calf was produced by infection of fetal fibroblasts followed by nuclear transfer into enucleated oocytes. Taken together, after adjusting lentiviral transgenesis to cattle, unprecedented high transgenesis and expression rates were achieved

제 7 장 참고문헌

Baguisi A, and Overstrom, EW. Induced enucleation in nuclear transfer procedures to produce cloned animals. Theriogenology. 2000; 53:209.

Cho JK, Lee BC, Park JI, Lim JM, Shin SJ, Kim KY, Lee BD, Hwang WS. Development of bovine oocytes reconstructed with different donor somatic cells with or without serum starvation. Theriogenology 2002; 57: 1819-1828.

Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. Science. 1998; 280: 1256-1258.

Echelard Y, Destrempes M, Koste J, Blackwe C, Groen W Pollock D, Williams J, Behboodi E, Pommer J, Meade H. Production of recombinant human serum albumin in the milk of transgenic cows. Theriogenology, 2002; 57:779

Edmunds T, Van Patten SM, Pollock J, Hanson E, Bernasconi R, Higgins E, Manavalan P, Ziomek C, Meade H, McPherson JM, Cole ES. Transgenically produced human antithrombin: structual and functional comparison to human plasma-derived antithrombin. Blood. 1998; 1:4561-4571.

Galli C, Duchi, R, Moor, R.M. Mammalian leukocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual. Cloning. 1999; 1: 161-170.

Gibbons J, Arat S, Rzucidlo J, Miyoshi K, Waltenburg R, Respess D, Venable A, Stice S.Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. Biol Reprod. 2002 66:895-900.

Hill JR, Burghardt RC, Jones K, Long CR, Looney CR, Shin T, Spencer TE, Thompson JA, Winger QA, Westhusin ME.Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. Biol Reprod. 2000 63:1787-1794.

Hwang WS, Cho JK, Kim KY, Shin SJ, Kim SK, Park JI, Kim DY, Lee JK, Lim JM, Lee BC.Births of freemartins derived from embryos reconstructed with ear fibroblasts.J Vet Med Sci. 2001 63 :577-578.

Hwang WS, Shin TY, Park JI, Roh SH, Lee BC. Production of Holstein and Korean native cattle cloned by somatic cell nuclear transfer (SNT) in Korea. Transgenic Res. 1999(abstr).

Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Chung AS, Lee KK, Han YM. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. Nat Genet. 2001 28:173-177.

Kato Y, Tani T, Sotomaru Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. Science. 1998; 282: 2095-2098.

Kim SJ, Sohn BH, Jeong S, Pak KW, Park JS, Park IY, Lee TH, Choi YH, Lee CS, Han YM, Yu DY, Lee KK.High-level expression of human lactoferrin in milk of transgenic mice using genomic lactoferrin sequence. J Biochem. 1999 126:320-325.

Krimpenfort P, Rademakers A, Eyestone W, van der Schans A, van den Broek S, Kooiman P, Kootwijk E, Platenburg G, Pieper F, Strijker R.Generation of transgenic dairy cattle using 'in vitro' embryo production. Biotechnology. 1991 9 :844-847.

Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. Science. 2002; 295: 1089-1092.

Ryoo ZY, Kim MO, Kim KE, Bahk YY, Lee JW, Park SH, Kim JH, Byun SJ, Hwang HY, Youn J, Kim TY. Expression of recombinant human granulocyte macrophage-colony stimulating factor (hGM-CSF) in mouse urine. Transgenic Res. 2001 10:193-200.

Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KH. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. Science. 1997; 278: 2130-2133.

Wells DN, Misica PM, Tervit HR. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. Biol Reprod. 1999; 60: 996-1005.

Wilmut I, Schnieke A,E. McWhir J. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature. 1997; 358: 810-813.

Wrenzycki C, Lucas-Hahn A, Herrmann D, Lemme E, Korsawe K, Niemann H.In vitro production and nuclear transfer affect dosage compensation of the X-linked gene transcripts G6PD, PGK, and Xist in preimplantation bovine embryos. Biol Reprod. 2002 66:127-134.

Wright G, Carver A, Cottom D, Reeves D, Scott A, Simons P, Wilmut I, Garner I, Colman A. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. Biotechnology. 1991 9: 830-834

Zakhartchenko V, Alberio R, Stojkovic M, Prelle K, Schernthaner W, Stojkovic P, Wenigerkind H, Wanke R, Duchler M, Steinborn R, Mueller M, Brem G, Wolf E. Adult cloning in cattle: potential of nuclei from a permanent cell line and from primary cultures. Mol Reprod Dev. 1999; 54: 264-272.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.