

<p>(뒷면)</p> <div data-bbox="183 1232 391 1355" style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: fit-content;"> <p>주 의 (편집순서 8)</p> </div> <p style="text-align: center;">(15 포인트 고딕체열)</p> <p style="text-align: center;">↑ 6cm ↓</p>	<p>500-2009 0039</p> <p>제브라피쉬 에서의 재조합 락토페린 대량생산체 계 구축 및 사료화 방안 마련</p> <p style="text-align: center;">농림수산식품부</p> <p style="text-align: center;">↑ 3cm ↓</p>	<p style="text-align: right;">(앞면)</p> <p>보안과제(), 일반과제(O) 과제번호 500-20090039</p> <div data-bbox="590 358 1029 459" style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: fit-content;"> <p style="text-align: center;">발 간 등 록 번 호 11-1541000-000764-01</p> </div> <p style="text-align: center;">5cm ↓</p> <p style="text-align: center;">제브라피쉬에서의 재조합 락토페린 대량생산체계 구축 및 사료화 방안 마련</p> <p style="text-align: center;">(Large scale production of recombinant human lactoferrin in zebrafish and development as feed additives)</p> <p style="text-align: center;">형질전환 제브라피쉬 작제 및 락토페린 효능검정</p> <p style="text-align: center;">(Production of transgenic zebrafish and Verification of recombinant human lactoferrin from transgenic zebrafish)</p> <p style="text-align: center;">서울대학교</p> <p style="text-align: center;">↑</p>
--	---	---

		<p>9cm</p> <p>↓</p> <p>농 립 수 산 식 품 부 (17포인트 명조계열)</p> <p>↑</p> <p>4cm</p> <p>↓</p>
--	--	--

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “제브라피쉬에서의 재조합 락토페린 대량생산체계 구축 및 사료화 방안 마련” 과제(세부과제 “형질전환 제브라피쉬 작제 및 락토페린 효능검정”)의 보고서로 제출합니다.

2010 년 11 월 26 일

주관연구기관명 : 서울대학교

주관연구책임자 : 박 재 학

세부연구책임자 : 박 재 학

연 구 원 : 석 승 혁

연 구 원 : 나 이 량

연 구 원 : 고 애 선

협동연구기관명 : 바이오노트

협동연구책임자 : 하 건 우

요 약 문

I. 제 목 : 제브라피쉬에서의 재조합 락토페린 대량생산체계 구축 및 사료화 방안 마련

II. 연구개발의 목적 및 필요성

락토페린은 가장 강력한 항바이러스, 항균성 물질로 자연 상태에서는 젖소의 초유와 사람의 초유에만 들어있다. 최근에는 질병 감염, 악성종양, 에이즈, 암의 예방 역할을 하는 것으로 알려져 많은 관심을 끌고 있으며, 우유 단백질 락토페린이 육류의 병원성 세균 오염을 막는 효과가 있음이 밝혀졌다.

락토페린의 넓은 생리학적 효과를 이용하기 위한 연구가 많이 선행되어 왔으며, 이러한 연구를 바탕으로 축산업 및 의학 분야에서는 락토페린을 이용하여 항생효과 및 질병치료의 목적을 달성하고 있다. 락토페린은 초유에서만 얻을 수 있다는 한계로 제조비용이 많이 들어가 kg 당 300달러에 달하는 고가의 물질이며, 우리나라를 비롯한 여러 나라에서는 이 같은 경제적인 문제를 해결하기 위해 유전공학적인 방법을 이용하여 재조합 락토페린을 대량으로 생산하기 위한 시도가 이루어져 왔다. 그럼에도 불구하고 현재 우리나라에서는 효율적으로 락토페린을 상업화한 예가 없으며, 필요한 부분은 전량 수입에 의존하고 있는 실정이다.

본 연구팀에서는 이미 사료 첨가제로서 우수한 역할을 담당하는 것으로 밝혀진 락토페린을 항생제 대체제로 선정하였으며, 이를 경제적으로 대량생산하여 사료화하는 것을 이번 연구의 최종 목표로 두었다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구팀은 사람 락토페린을 대량 공급할 수 있는 형질전환 제브라피쉬를 작제하였다. 작제된 제브라피쉬에서 락토페린이 발현하는 것을 PCR 및 ELISA로 확인하였다. 형질전환 제브라피쉬에서 순수 락토페린을 정제할 수 있는 방법을 확립한 후에는 생산된 재조합 락토페린의 구조 및 기능을 실제 천연 락토페린과 비교 분석하고, 실제로 정제한 락토페린의 항생효과를 마우스 실험을 통해 검증하였다. 마지막으로 순수 정제한 락토페린과 락토페린을 발현하는 제브라피쉬를 직접 사료화하여 실제 산업동물의 사료로 쓰일 경우의 항생효과 및 사료효율증진 효과를 알아보기 위한 동물실험을 실시하고, 산업화를 위한 평가를 하였다.

IV. 연구개발결과

사람 락토페린을 발현하는 형질전환 제브라피쉬를 작제하여 PCR 및 ELISA로 F2까지 사람 락토페린이 발현하는 것을 확인하였다. 또한 락토페린을 발현하는 제브라피쉬 치어를 파쇄하여 세균에서 항균효과가 있음을 실험을 통하여 증명하였다. 락토페린을 발현하는 제브라피쉬 치어를 이용하여 소화기 병원성 그람 음성균으로 돼지에서 salmonella cholerasuis 다음으로 장염을 일으키는 주된 원인세균인 salmonella typhimurium을 마우스에 감염시켜 각 장기에서 락토페린의 미생물 방어 효과를 검증한 결과 항균효과가 있음을 확인하였다. 마지막으로 산업동물인 돼지를 이용한 미생물 방어 효과 실험에서는 유의적인 결과를 확인할 수 없었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

실험과정 중에서 습득하고 적용한 형질전환 zebrafish 제작기법은 다른 연구의 gene expression에 응용하여 사용할 수 있다. 실험에서 성공한 muscle 벡터가 실제 상황에 적용하여 목표로 하는 결과를 얻어 응용이 확실해진다면 우리가 제작한 벡터는 충분한 시장성과 다른 연구에 응용될 가능성이 매우 높다.

벡터의 제작기술 및 형질전환 zebrafish 작제 기법이 확실히 확보되어 있는 것이기 때문에 다른 형태의 연구가 충분히 가능하다. 연구결과를 통해 외국에 의존하던 벡터제작 기술이나 연구를 독자적으로 수행할 수 있는 길을 제시하였다고 생각한다. 이렇듯 분자생물학의 응용을 통해서 과학분야에서 국제적 경쟁력을 확보할 수 있고 유전자 조작기술의 발전을 볼 수 있으며, zebrafish를 이용한 산업물질 획득이라는 새로운 분야를 개척해 나가는 것에 큰 공헌을 하였다.

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title of Product & Technology : Large scale production of recombinant human lactoferrin in zebrafish and development as feed additives

II. Technology Introduction

Lactoferrin is one of the strongest anti-viral, anti-bacterial material, which is contained in colostrum of cow and human in nature. In recent years, lactoferrin has known that it can protect disease infections, malignant tumors, AIDS and cancers, so it becomes an object of attention. It was revealed that milk protein lactoferrin has an effect about protecting of pathologic bacterial contamination in meat.

There are many studies for using broad physiological effect of lactoferrin, and livestock and medical industry have accomplished purpose about curing disease and anti-biotic effect. People can get lactoferrin only from colostrum, so it is very expensive - about 300\$ per kg. Many country including south Korea have tried to make large scale production of recombinant lactoferrin using genetic engineering. But there is no example about effective commercialization of lactoferrin in our country. We should totally depend on importation of lactoferrin if we need it.

In our research, lactoferrin is chosen as feed additives instead of antibiotics. The final goal of this research is the large scale production of recombinant human lactoferrin and making animal food.

III. Features

We made transgenic zebrafish which can give people human lactoferrin. These zebrafish were determined about expression lactoferrin by PCR and ELISA. We established method how crystallize pure lactoferrin from transgenic zebrafish and then compared structure and anti-bacterial function between the lactoferrin and commercial lactoferrin. We used Balb/c mice to verify anti-bacterial effect of recombinant human lactoferrin from transgenic zebrafish. Finally, we gave pigs mixed feed with pulverized transgenic zebrafish.

IV. Efficiency

We made transgenic zebrafish which express human lactoferrin and confirmed

expression of human lactoferrin by PCR and ELISA to F2 generation. We pulverized zebrafish larvae which express human lactoferrin. We used that powder to demonstrate anti-bacterial effect from *in vitro* test. We also confirmed anti-bacterial effect of recombinant human lactoferrin from transgenic zebrafish by injected salmonella typhimurium to balb/c mice. Salmonella typhimurium is the second pathogen of enteritis of pigs: the first pathogen is salmonella cholerasuis. Finally, we challenged anti-bacterial experiment with pigs which are one of the famous industrial animal. But we could not get significant data about that.

V. Applications & Results

This methods for vector construction and generation of transgenic zebrafish provide a standard or other transgenic studies. If the muscle vector which we succeeded in making transgenic zebrafish can be used actual conditions and determined its applications, our vector has enough marketability.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Part 1. Introduction	-----11
Section 1. Goal of study	-----11
1. Final goal	
2. The reason of choosing lactoferrin	
3. The purpose of each step	
Section 2. Contents of study	-----12
1. 1st year : Making transgenic zebrafish which express human lactoferrin	
2. 2nd year : Characterization and investigation of antibacterial effect of recombinant human lactoferrin from transgenic zebrafish.	
3. 3rd year : Preparation of industrial base of transgenic zebrafish which express human lactoferrin	
Section 3. Necessity of study	-----13
1. Significance, necessity of study developing	
 Part 2. Domestic and international technical situation	 -----18
Section 1. International level	-----18
Section 2. Domestic level	-----18
Section 3. Domestic and international study situation	-----18
 Part 3. Contents and results of study	 -----19
Section 1. Study range and method	-----19
1. To get Human lactoferrin gene by PCR and confirm its sequence	
2. To produce recombinant vector including human lactoferrin gene	
3. To inject recombinant vector to zebrafish embryo	
4. To confirm expression of human lactoferrin from transgenic zebrafish	
5. To obtain lactoferrin gene	
6. To choose muscle promoter	
7. To use various expression vector	
8. To confirm expressioin of human lactoferrin from transgenic zebrafish founder, F1 and F2	
9. To choose transgenic zebrafish line which express human lactoferrin	
10. Purification of lactoferrin	
11. To confirm antibiotic effect from <i>In vitro</i> test	
12. To confirm antibiotic effect from <i>in vivo</i> test	
13. To produce feed supplement including transgenic zebrafish which	

express lactoferrin and test effect to industrial animals	
Section 2. Contents and results of study -----	29
1. To confirm sequence after cloning	
2. To produce human lactoferrin vector which use Xenopus EF1a promoter vector	
3. To choose muscle promoter	
4. To insert pMDS6/MLC#2-Lactoferrin and Lactoferrin-GFP	
5. GAL4-UAS/Lactoferrin cloning	
6. To establish zebrafish breeding system and obtain zebrafish embryos	
7. To inject recombinant lactoferrin vector to zebrafish embryo	
8. To confirm expression of human lactoferrin from transgenic zebrafish	
9. To confirm expression of human lactoferrin from transgenic zebrafish founder, F1 and F2	
10. To analyze recombinant lactoferrin powder from transgenic zebrafish	
11. To reveal structure of recombinant lactoferrin from transgenic zebrafish	
12. <i>In vitro</i> test to confirm antibiotic effect	
13. <i>In vivo</i> test to confirm antibiotic effect	
14. To produce feed supplement including transgenic zebrafish which express lactoferrin and test effect to industrial animals	
Part 4. Achievement of study goal and contribution-----	66
Section 1. 1st year (2007. 5. 30. ~ 2008. 5. 29) -----	66
1. Percentage of the achievement of study goal	
2. Self assessment of the achievement of study goal	
Section 2. 2nd year (2008. 5. 30. ~ 2009. 5. 29) -----	68
1. Percentage of the achievement of study goal	
2. Self assessment of the achievement of study goal	
Section 3. 3rd year (2009. 5. 30. ~ 2010. 11. 29) -----	70
1. Percentage of the achievement of study goal	
2. Self assessment of the achievement of study goal	
Section 3. Final assessment (2007. 5. 30. ~ 2010. 11. 29) -----	71
1. Percentage of the achievement of study goal	
2. Self assessment of the achievement of study goal	
Part 5. Outcome of study and plan to use of study-----	72
Section 1. Submission to research papers -----	72
Section 2. Presentation at domestic· international symposium -----	72
Section 3. Technic transfer -----	73
Section 4. To apply for a patent -----	73
Section 5. Industrialization -----	73

Section 6. Training and application of human power-----74

Part 6. Information about international scientific technology during study-----75

Section 1. Environmental change of related field-----75

Part 7. References-----76

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	11
제 1절 연구목표	11
1. 최종 연구목표	
2. 락토페린 선정 이유	
3. 단계별 연구목표	
제 2절 연구내용	12
1. 1년차 연구내용 : 사람 락토페린을 발현하는 형질전환 제브라피쉬 작제	
2. 2년차 연구내용 : 형질전환 제브라피쉬에서 사람 락토페린 분리 정제 및 분리한 락토페린의 특성 규명과 미생물 방어효과 검증	
3. 3년차 연구내용 : 사람 락토페린을 발현하는 형질전환 제브라피쉬의 산업화 기반마련	
제 3절 연구개발의 필요성	13
1. 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성	
제 2 장 국내외 기술개발 현황	18
제 1절 세계적 수준	18
제 2절 국내 수준	18
제 3절 국내·외의 연구현황	18
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	19
제 1절 연구 범위 및 연구 수행 방법	19
1. PCR을 이용한 Human Lactoferrin 유전자 확보 및 염기서열 확인	
2. 사람 락토페린 유전자를 가진 재조합 벡터 제작	
3. 재조합 락토페린 벡터를 제브라피쉬 수정란에 주입	
4. 형질전환 제브라피쉬에서의 락토페린 발현 확인	
5. 락토페린 유전자 확보	
6. Muscle promoter의 선별	
7. 다양한 발현벡터의 이용	
8. 형질전환 제브라피쉬 founder 와 F1, F2 에서의 락토페린 발현 확인	
9. 사람 락토페린을 발현하는 형질전환 제브라피쉬 라인의 선별	
10. 락토페린의 정제	
11. <i>In vitro</i> 항생효과 검증	
12. <i>in vivo</i> 항생효과 검증	
13. Lactoferrin 발현 Zebrafish 의 사료첨가제 제조 및 산업동물에 효과 측정	
제 2절 세부 연구 수행 결과	29
1. 사람 락토페린 cDNA를 이용하여 클로닝후 염기서열확인	

2. Xenopus EF1a 프로모터 벡터를 이용하여 사람 락토페린 벡터 제조
3. Muscle promoter의 선별
4. pMDS6/MLC#2-Lactoferrin 및 Lactoferrin-GFP의 삽입
5. GAL4-UAS/Lactoferrin cloning
6. 제브라피쉬 사육 확립 및 수정란 획득
7. 재조합 락토페린 벡터를 제브라피쉬 수정란에 주입
8. 형질전환 제브라피쉬에서 사람의 락토페린 발현 확인
9. Transgenic zebrafish F0, F1에서의 lactoferrin 발현 확인
10. 재조합 제브라피쉬 락토페린의 분말에 대한 성분 조성 및 특성 분석
11. 재조합 제브라피쉬 락토페린의 3차원적 구조 규명 (아미노산 염기 구조 분석)
12. 항생효과 검증 실험 (*In vitro*)
13. 항생효과 검증 실험 (*In vivo*)
14. 락토페린 발현 제브라피쉬의 사료첨가제 제조 및 사료의 효능 실험

제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	-----66
제 1절	1년차 (2007. 5. 30. ~ 2008. 5. 29)	-----66
1.	연구개발목표의 달성도	
2.	평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가	
제 2절	2년차 (2008. 5. 30. ~ 2009. 5. 29)	-----68
1.	연구개발목표의 달성도	
2.	평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가	
제 3절	3년차 (2009. 5. 30. ~ 2010. 11. 29)	-----70
1.	연구개발목표의 달성도	
2.	평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가	
제 4절	최종평가 (2007. 5. 30. ~ 2010. 11. 29)	-----71
1.	연구개발목표의 달성도	
2.	평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가	
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	-----72
제 1절	논문게재 성과	-----72
제 2절	국내 및 국제 학술회의 발표 성과	-----72
제 3절	기술이전 성과	-----73
제 4절	특허 접수 및 출원 성과	-----73
제 5절	사업화 성과	-----73
제 6절	인력 활용/양성 성과	-----74
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	-----75
제 1절	국내외 관련분야의 환경 변화	-----75
제 7 장	참고문헌	-----76

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구목표

1. 최종 연구목표 : 사료 첨가제 중 항생제 대체제로 유전자적으로 조작한 사람 락토페린을 열대 담수어인 제브라피쉬(zebrafish) 에서 발현시키고, 이를 대량으로 사료화하여 경제적인 가격으로 공급함을 목적으로 축산업의 발전에 이바지하고자 본 연구를 수행한다.

2. 락토페린 선정 이유 : 사료 첨가제 중 항생제 대체제로 외국에서는 천연의 들플이나 약초에서 대안을 찾고 있다. 본 연구팀에서는 이미 사료 첨가제로서 우수한 역할을 담당하는 것으로 밝혀진 락토페린을 항생제 대체제로 선정하였으며, 아직 그 효과를 알 수 없는 들플이나 약초에서 대안을 찾기보다는 락토페린을 경제적으로 대량생산하여 사료화하는 것을 이번 연구의 최종 목표로 두었다.

락토페린은 가장 강력한 항바이러스, 항균성 물질로 자연 상태에서는 젖소의 초유와 사람의 초유에만 들어있다. 최근에는 질병 감염, 악성종양, 에이즈, 암의 예방 역할을 하는 것으로 알려져 많은 관심을 끌고 있으며, 우유 단백질 락토페린이 육류의 병원성 세균 오염을 막는 효과가 있음이 밝혀졌다.

락토페린의 넓은 생리학적 효과를 이용하기 위한 연구가 많이 진행되어 왔으며, 이러한 연구를 바탕으로 축산업 및 의학 분야에서는 락토페린을 이용하여 항생효과 및 질병 치료의 목적을 달성하고 있다. 락토페린은 초유에서만 얻을 수 있다는 한계로 제조비용이 많이 들어가 kg 당 300달러에 달하는 고가의 물질이며, 우리나라를 비롯한 여러 나라에서는 이같은 경제적인 문제를 해결하기 위해 유전공학적인 방법을 이용하여 재조합 락토페린을 대량으로 생산하기 위한 시도가 이루어져 왔다. 그럼에도 불구하고 현재 우리나라에서는 효율적으로 락토페린을 상업화한 예가 없으며, 필요한 부분은 전량 수입에 의존하고 있는 실정이다.

3. 단계별 연구목표 : 이에 본 연구팀은 사람 락토페린을 대량 공급할 수 있는 형질전환 제브라피쉬를 작제하려고 한다. 작제한 제브라피쉬에서 락토페린이 발현하는 것을 RT-PCR 및 Western blot, 면역화학염색 등으로 확인한다. 형질전환 제브라피쉬에서 순수 락토페린을 정제할 수 있는 방법을 확립한 후에는 생산된 재조합 락토페린의 구조 및 기능을 실제 천연 락토페린과 비교 분석하고, 실제로 정제한 락토페린의 항생효과를 마우스 실험을 통해 검증할 것이다. 마지막으로 순수 정제한 락토페린과 락토페린을 발현하는 제브라피쉬를 직접 사료화하여 실제 산업동물의 사료로 쓰일 경우의 항생효과 및 사료효율증진 효과를 알아보기 위한 동물실험을 실시하고, 산업화를 위한 평가를 거칠 것이다.

제 2절 연구내용

1. 1년차 연구내용 : 사람 락토페린을 발현하는 형질전환 제브라피쉬 작제

가. 사람 락토페린 유전자 클로닝

Human tumor multiple tissue cDNA(MTC) panel (USA, clontech)를 이용하여 Qiagen 社의 one step RT-PCR kit를 이용하여 사람 락토페린 cDNA 염기서열을 합성하여 클로닝후 염기서열을 결정한다.

나. 사람 락토페린 발현 벡터의 작제

Xenopus EF1 α 프로모터 벡터를 이용하여 사람락토페린 벡터를 제조한다. 이때 발현벡터의 3'에는 정제를 용이하게 하기위하여 his-tag을 삽입한다.

다. 형질전환 제브라피쉬의 작제

작제한 벡터를 제브라피쉬 수정란에 주입하여 형질전환 제브라피쉬를 생산한다.

라. 형질전환 제브라피쉬에서 사람 락토페린 발현의 검증

형질전환된 제브라피쉬를 선별하여 실제로 사람 락토페린을 발현하는지에 대해 RT-PCR과 Western blot 등으로 검증한다.

2. 2년차 연구내용 : 형질전환 제브라피쉬에서 사람 락토페린 분리 정제 및 분리한 락토페린의 특성 규명과 미생물 방어효과 검증

가. 형질전환 제브라피쉬에서 사람 락토페린의 정제법 확립

락토페린을 발현하는 제브라피쉬를 파쇄하고 원심분리를 실시하여 상청을 회수한다. 이때 발현된 락토페린은 his-tag을 가지고 있고, Ni-NTA가 결합된 sepharose CL-6B 컬럼에 준비한 검체를 loading하여 락토페린을 흡착시키고, pH를 조절하여 용출하여 정제한다.

나. 정제한 사람 락토페린의 구조 및 생화학적 특성 규명

정제한 사람 락토페린의 구조를 규명하여 천연락토페린과의 비교분석을 실시한다.

다. 정제한 사람 락토페린의 항균활성 효과평가

정제한 사람 락토페린을 이용하여 siderophores 함유 세균과 미보유 세균에 대한 방어능력을 in vitro에서 비교 평가한다.

라. 소화기 병원성 그람 음성균에 대한 방어실험

정제한 사람 락토페린을 이용하여 소화기 병원성 그람 음성균으로 돼지에서 salmonella cholerasuis 다음으로 장염을 일으키는 주된 원인세균인 salmonella typhimurium을 마우스에 감염시킨 일주일 후 각 장기별로 균을 배양하여 enumeration 하고, 주요 target 장기를 조직 검경하여 락토페린의 미생물 방어 효과를 검증한다.

3. 3년차 연구내용 : 사람 락토페린을 발현하는 형질전환 제브라피쉬의 산업화 기반마련

가. 형질전환 제브라피쉬의 사료화 방법 개발

형질전환 제브라피쉬를 키운후 과쇄하여 열풍건조 후 수분 함량을 5% 이내로 제조한다. 뭉치는 현상이 많이 발생하므로 뭉침 방지제로 이산화규소(SiO₂)를 사용하며, 제브라피쉬 과쇄액 분말 50%와 부형제(starch) 48%, 뭉침방지제 2%를 혼합하여 사료를 제조한다.

나. 제조한 사료의 효과 입증

제조한 사료의 효과를 입증하기 위하여 실제 산업동물을 이용한 동물실험 실시한다.

다. 사료의 대량공급을 위한 체계 마련

평방미터당 2000마리의 형질전환 제브라피쉬를 사육하여 최적의 사육환경조건을 설정하여 대량 생산체계를 갖춘다.

제 3절 연구개발의 필요성

1. 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

(1) 축산업에서 락토페린이 가지는 가치 : 락토페린은 철분이 결합된 단백질로서, 산모의 초유에 존재하는 천연면역물질이며 강력한 항바이러스, 항균작용으로 분유첨가제, 의약품, 화장품 등에 이용되고 있다. 최근에는 질병 감염, 악성종양, 에이즈, 암의 예방 역할을 하는 것으로 알려져 많은 관심을 끌고 있다. 우유 단백질 락토페린이 육류의 병원성 세균 오염을 막는 효과가 있음이 밝혀졌으며, 면역기능 외에도 세포증식, 감염부위 염증 억제 등의 효과가 있어 안약과 임상영양제 등에 많이 쓰이고 있다.

송아지에게 1g/d 의 농도로 우유 대용유에 락토페린을 첨가하여 주었을 때 이유시기가 대조군에 비해 7일이나 빨라졌으며 증체율이 높아진다는 연구 결과와 같이, 락토페린의 사료 첨가에 따른 효과는 축산업에서 이미 잘 알려져 있다¹⁾. 또한 락토페린을 첨가함으로써 항생제 사용량을 줄일 수 있기 때문에, 락토페린은 항생제 남용을 막기 위한 대체물질로서 확실한 입지를 굳히게 되었다.

(2) 락토페린 대량생산의 필요성 : 그럼에도 불구하고 아직까지 락토페린을 첨가하지 못하고 기존의 항생제를 쓸 수 밖에 없는 이유는 다름아닌 락토페린의 낮은 경제성 때문이다. 현재 산업계에서는 인체 락토페린 대용으로 우유에서 락토페린을 정제하고 있으나 추가비용이 많이 든다고 한다. 우리나라가 지난 92년 분유에 첨가하기 위해 수입한 락토페린 정제는 60여억원 어치나 된다고 하며, 현재도 락토페린은 연간 100억원 이상의 규모로 전량 수입에 의존하고 있다. 인체 락토페린의 세계 잠재시장 규모는 1백71억달러 수준이다.

(3) 사람 락토페린을 대량으로 발현하는 형질전환 물고기의 사료화 : FDA의 레스터 크로포드 차장은 “혁신적 기술은 미국내 신선한 식품공급을 가능케하는 결정적 자본”이라며 “안전한 식품 공급을 위해 과학적 연구와 신기술 개발을 지속적으로 장려해

1) Joslin RS, Erickson PS, Santoro HM, Whiteous NL, Santoro CG, Rejan JJ : Lactoferrin supplementation to dairy calves. *Journal of dairy science* 85(5):. 1237-42 (2002)

야 한다”고 강조했다.

축산물의 항생제 남용을 막기 위해서는 항생제를 확실하게 대체할 수 있고, 부가적인 이익증대효과까지 가져올 수 있는 락토페린을 저가로 공급하는 것이 좋은 대안이 될 수 있다. 본 연구팀에서는 사람 락토페린을 대량으로 발현하는 형질전환 물고기를 개발하여 사료화할 수 있는 충분한 여력을 가지고 있으며, 본 연구가 성공하면 현재 높은 가격으로 수입해서 사료첨가제 및 의약품으로 쓰이는 천연 락토페린을 대신하여 경제적으로 락토페린을 함유한 사료를 공급할 수 있으므로 결과적으로는 락토페린 사용량이 증가하여 축산업의 발전에 기여할 수 있다.

가. 기술적 측면

(1) 락토페린의 상업화 실패 요인 : 락토페린이 질병 감염·악성 종양·에이즈·암의 예방 역할 등의 다양한 기능을 수행함에도 불구하고, 현재 우리나라에서는 락토페린의 대량 생산과 산업화가 성공을 거두지 못하고 있다. 형질전환 담배에서 전체 단백질량의 0.3%로 사람 락토페린을 발현시킨 연구결과가 있고²⁾, 형질전환 소의 우유에서 최대 2 g/L의 락토페린을 정제할 수 있다는 결과도 있다³⁾. silkworm larvae의 hemolymph에서 65ug/ml의 재조합 락토페린을 얻었고⁴⁾, 산양의 우유에 adenoviral vector를 직접 주사하여 우유에서 2g/L의 락토페린을 얻을 수 있다는 결과가 보고되었다⁵⁾.

그러나 이러한 보고들은 락토페린의 생산량이 일정하지 않고, 형질전환 동물 작제 및 유지에 걸리는 시간등의 난점으로 인해 상업화에는 아직까지 성공하지 못한 것으로 보인다. 과학기술부에 따르면 한국생명공학연구원 이경광 박사팀이 지난 92년부터 10년에 걸친 연구 결과, 우유에서 락토페린을 분비하는 형질전환 소(보람이)의 우유에 함유된 사람 락토페린이 적어서 산업화가 불가능하다고 밝힌 바 있다. 락토페린 시장은 앞으로도 큰 잠재력을 지니고 있으므로 대량생산에 의한 산업화가 필요한 시점이다.

(2) 제브라피쉬의 적용 가능성 : 이에 새로운 발현숙주로서 대량 사육이 가능하고 세대교체가 빠른 제브라피쉬를 이용하여 사람의 락토페린을 대량으로 생산한다면 산업화로의 빠른 적용이 가능할 것으로 보이며, 사료화시킨 락토페린을 공급함으로써 축산업가의 소득 증대를 이룰 수 있을 것이다.

(3) 제브라피쉬의 산업화를 위한 GMO 문제점 검토 : 본 과제에 제안된 새로운 발현숙주로서 대량 사육이 가능하고 세대교체가 빠른 제브라피쉬를 이용하여 사람의 2007

2) Salmon V, Legrand D, Slomianny MC, el Yazidi I, Spik G, Gruber V, Boumat P, Olganier B, Mison D, Theisen M, M'erot B : Production of human lactoferrin in transgenic tobacco plants. *Protein expression and purification* **13(1)**: 127-35 (1998)

3) Patrick H.C. van Berkel, Mick M. Welling, Marlieke Geerts, Harry A. van Veen, Bep Ravensbergen, Mourad Salaheddine, Ernest K. J. Pauwels, Frank Pieper, Jan H. Nuijens, Peter H. Nibbering : Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nature Biotechnology* **20**: 484-487 (2002)

4) Tao Liu, Yao-Zhou Zhang, Xiang-Fu Wu : High level expression of functionally active human lactoferrin in silkworm larvae. *Journal of Biotechnology* **22**; **118(3)**: 246-56 (2005)

5) Zeng-Sheng Han, Qing-Wang Li, Zhi-Ying Zhang, Bo Xiao, Da-Wei Gao, Shu-Yun Wu, Jian Li, Hong-Wei Zhao, Zhong-Liang Jiang, Jian-Hong Hu : High-level expression of human lactoferrin in the milk of goats by using replication-defective adenoviral vectors. *Protein expression and purification* **53(1)** 225-231 (2007)

년에 보건복지부에서 발효된 유전자재조합실험지침⁶⁾ 전부개정안에 따르면, 본 실험은 유전자재조합 단백질을 발현시키는 숙주로서 대부분 사용하는 대장균이나 효모와 같은 전염성 미생물이 아닌 어류를 사용함으로써 사실상 가장 안전한 등급에서 제시하는 숙주계보다도 더 안전할 것으로 판단된다. 공여체 또한 사람의 cDNA 를 사용하므로 외래 유전자의 환경오염측면에서도 그 위험성이 거의 없는 것으로 생각된다. 제브라피쉬의 사료화 완료 후에 유전자재조합식품첨가물로서 농촌진흥청의 안전성 심사를 거쳐 산업화 단계로 시판될 수 있다.

(4) **과제 수행 능력** : 본 주관연구팀은 환경부 주관하에서 환경오염물질 탐색용 형질전환 제브라피쉬 제작을 주제로 성공적인 과제수행을 한 바 있고, 이번 연구에서 발현시키고자 하는 사람 락토페린의 cDNA 를 이미 확보하였으며, 제브라피쉬에서 강력한 발현벡터이고 elongation factor 1 alpha 를 promoter 로 갖는 Tol2 vector 역시 확보해 놓은 상태이기 때문에 제안하는 연구를 원만히 수행 할 수 있을 것이라고 생각된다.

세부과제를 함께 수행할 (주) 바이오노트는 유전자재조합 항원 제조기술과 단일 클론항체 제조기술을 이용하여 현재 개 파보 항원, 항체 진단 키트, 개 디스토포 항원, 항체 진단 키트, 돼지전염성위장염 항원 진단 키트, 돼지 유행성설사병 항원진단키트 등 30여가지의 dipstick 진단시약 및 효소면역측정법(ELISA) 진단시약을 세계최초로 자체 개발하여 국내를 포함한 전세계 40여개국에 수출하고 있는 국내 최고의 동물용 dipstick 및 ELISA 진단시약 전문회사로서 그 기술력을 인정받고 있다.

따라서 서울대학교 수의과대학과 (주)바이오노트는 현재 보유하고 있는 유전자 재조합 항원 제조 개발 기술력을 바탕으로 「제브라피쉬에서의 재조합 락토페린 대량생산체계 구축 및 사료첨가제로서의 개발」을 연구하고자 한다.

(5) **형질전환 제브라피쉬에서의 락토페린 발현 성공 가능성** : 어류를 숙주로 하여 재조합 유전자를 도입한 후 이로부터 유용한 단백질을 생산한 예는 주로 일본과 미국에서 많이 연구되었다. 어류에 green fluorescence protein (GFP) gene 을 도입하여 발현시킨 결과가 보고되었다. (Sumathy et al. 1996) 이 GFP 는 제브라피쉬에서 대량 발현되었으며 본 연구실에서의 선행 연구 결과 Tol2 vector 와 elongation factor 1 alpha promoter 를 사용하였을 경우 GFP 생성량은 7일령 치어에서 전체 단백질의 약 0.1% 에 다다랐다. 이는 형질전환 소가 분비하는 우유에서의 락토페린 분비량과 유사하며, 제브라피쉬의 경우 라인 유지가 쉽고 대량사육이 가능하기 때문에 락토페린 이용에 좀더 경제적으로 접근할 수 있을 것으로 보인다.

(6) **락토페린의 생산** : 사람 락토페린을 생산하는 형질전환 제브라피쉬를 제조하면 두가지 경우에서 락토페린을 생산할 수 있다. 첫째는 형질전환 제브라피쉬를 그대로 사료화하는 것이다. 제브라피쉬는 사육 및 관리가 쉽고 경제적이며 세대교체가 빨라서 형질전환 제브라피쉬의 작제 및 라인 유지가 편리할 것이다. 둘째로 형질전환 제브라피쉬로부터 락토페린을 추출, 정제하여 의약품이나 사료 첨가제로 사용하는 것이다.

(7) **락토페린 발현을 위한 기술 개요** : 본 연구에서는 사람의 락토페린을 생산하는 유전자를, 제브라피쉬의 전조직에서 발현하는 elongation factor -1 alpha promoter 하에 놓이도록 클로닝하려고 한다. 모체가 되는 벡터는 송사리인 *Oryzias latipes* 의 Tol2 element 이며, 이

6) 보건복지부고시 제 1997-22호, 1997.4.22

는 transposon 의 hAT family 에 속하여 transposase 와 함께 injection 할 경우 다른 벡터 보다 효율적으로 숙주 DNA에 integration 되며 다음 세대로의 전달 효율 또한 높은 것으로 알려져 있다. 지금까지 개발된 락토페린 생산 형질전환 동물들이 자손 세대로 내려가면서 그 발현량이 현저히 줄어들고, 세대 유지가 어려웠다면 본 연구에서는 이같은 Tol2 모벡터를 사용함으로써 기존의 문제를 해결할 수 있을 것으로 생각된다. 락토페린이 사람 유래이기 때문에 그 자체로 포유류에게 전혀 해가 없는 것으로 밝혀졌으며 이렇게 제조된 재조합 형질전환 제브라피쉬로부터 만들어진 락토페린이 여러 용도로 사용될 수 있으리라 생각된다.

나. 경제 · 산업적 측면

- (1) 항생제 남용에 대한 대안 마련 시급 : 식약청이 '2006년도 유해물질 정기 선행조사' 및 '2004-2006년 국내 유통식품 중 동물용 의약품 실태조사 결과'에 대한 분석을 실시한 결과, 총 600건 중에서 닭고기 1건과 계란 2건에서 '엔로플로사신(Enrofloxacin)'이 기준치 이상 검출됐으며 소고기 2건에서 '아목시실린(Amoxicillin)', 돼지고기 1건에서 '암피실린(Ampicillin)' 우려 2건과 장어 1건에서는 '옥시테트라사이클린(Oxytetracycline)'등이 각각 기준치 이상 검출됐다. 계란류 등에서 검출된 '엔로플로사신(Enrofloxacin)'은 체내에서 장시간 동안 작용하는 약물로 사람에게 식중독을 일으키는 캄피로박터(Campylobacter)라는 변종을 제거하지 못하게 하고, 항생제에 내성을 갖는 유전자를 퍼뜨리게 된다. 미국에서는 1996년 이후 엔로플로사신을 가금용 항생제로 사용하는 것을 금지하고 있다. 우럭이나 장어 등에서 검출된 옥시테트라사이클린(Oxytetracycline)의 경우 임신부나 소아에게 과다투여 했을 때 치아와 뼈가 황갈색으로 변할 수 있고, 태아의 골격발육을 지연시켜 기형아 출산 위험성이 높다. 그 밖의 동물항생제들도 기준치 이상 잔류된 축수산물을 장기간 섭취할 경우에 내성이 생겨 면역력을 떨어뜨리는 등 부작용이 생길 수 있다. 현재 미국 등지에서는 이들 항생제의 가금류에 대한 사용을 금지하고 있다. 이같이 항생제 남용이 큰 사회적 문제로 대두된 지 오래며, 각계에서는 식용 어류 및 축산업에서 항생제를 대체할 수 있는 물질 개발에 노력을 기울이고 있다. 유기산 및 생균제, 비특이면역증강제, 면역활성증강물질 등의 대체물질 개발이 이루어졌으며 이중 항균 및 면역증강제와 면역활성증강물질로서 락토페린의 우수성이 입증되었고 고가의 사료첨가제로서 지금도 사용되고 있다.
- (2) 보급형 락토페린 개발에의 노력 : 이러한 락토페린의 단가를 낮추기 위해 두산에서는 '보람이' 개발 이후 이를 산업화하기 위해 노력하고 있으며, 프랑스의 Clermont-Ferrand 사에서는 옥수수에서 재조합 락토페린을 생산하여 현재 phase I 임상실험 단계에 있다. 또한 미국에서는 재조합 형질전환 쌀에서 락토페린을 생산하여 현재 안정성 검사중에 있다. 우리나라도 이러한 움직임에 발맞추어 대응할 수 있도록 락토페린의 대량생산체제 구축 및 효과 입증이 조속히 시행되어야 할 것이다.
- (3) 사람 락토페린을 발현하는 형질전환 제브라피쉬의 사료화 : 본 연구에서 락토페린을 생산하는 제브라피쉬를 개발하여 사료화한다면 낮은 단가로 높은 경제성을 발휘할 수 있고, 덧붙여 락토페린을 순수 정제하여 고부가가치의 의약품까지도 개발할 수 있다고 생각된다.

다. 문화 · 사회적 측면

(1) 락토페린을 생산하는 형질전환 제브라피쉬를 대량 사육할 수 있는 시설을 건설함으로써 우리나라 농어촌에 고소득 창출의 일자리를 마련할 수 있을 것이다. 본 연구가 성공적으로 끝나면 형질전환 제브라피쉬 라인을 특허화하고 대량으로 사육하여 락토페린을 경제적으로 보급할 수 있으며, 이로 인해 가축이나 어류에서의 항생제 남용을 줄이고 사료 효율을 증진시킬 수 있으리라 생각된다. 또한 건강 보조 식품이나 의약품으로도 공급이 가능하여 부가 소득을 얻을 수 있을 것이다. 본 연구의 시도는 형질전환 제브라피쉬를 특허화하여 세계적인 상품으로 만들 수 있는 기초가 될 것이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 세계적 수준

개념정립 단계	√	기업화 단계		기술 안정화 단계	
---------	---	--------	--	-----------	--

제 2절 국내 수준

개념정립 단계	√	기업화 단계		기술 안정화 단계	
---------	---	--------	--	-----------	--

제 3절 국내·외의 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
한국동물 자원과학회	락토페린을 첨가한 저지방/저염 소시지의 품질 및 Escherichia coli O157:H7에 대한 항균활성에 미치는 효과	저장성 실험 결과에서는 항균효과가 확인되지 않았음. 차후의 연구로 락토페린의 항균활성을 높이기 위하여 케이싱의 내면에 필름으로 처리하는 방법으로 항균활성효과를 연구하는 것이 필요할 것으로 보임.
생명공학연구소	인체 유용 단백질을 대량 생산하는 형질전환 동물개발	우유에 함유된 인체 락토페린의 성분이 적어, 산업화가 불가능하다고 밝힘.
서울대학교	형질전환 누에를 이용한 락토페린의 생산 및 기능성 연구	지속적인 누에 형질전환 연구와 더불어 고발현 프로모터와 유용 유전자 개발이 병행되어야 한다고 밝힘.
Leiden University Medical Center, Netherlands	우유에서 락토페린을 분비하는 형질전환 소의 개발	산업화 없이 후속 연구만 진행중
Clermont-Ferrand , France	옥수수에서 재조합 락토페린의 생산	phase I 임상실험 단계에 있음

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 연구 범위 및 연구 수행 방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
1. PCR을 이용한 Human Lactoferrin 유전자 확보 및 염기서열 확인	<ol style="list-style-type: none"> 1. Human Adult Normal tissue (Breast (Cat#: C1234086)) cDNA 구매 2. Human lactoferrin (NCBI Accession No. AY178998) cloning 을 위한 primer design 3. Human lactoferrin PCR 4. Gel-extraction 5. T-vector cloning 6. 염기서열 확인 (sequencing) 	<ul style="list-style-type: none"> · Human lactoferrin의 유전자를 확보하기 위하여 NCBI Accession. No. AY178998를 기초로 Primer를 디자인함. · cDNA는 BioChain (http://www.biochain.com) 社의 cDNA-Human Adult Normal tissue (Breast(Cat#: C1234086)) 의 cDNA를 구매하여 PCR에 사용함. PCR 반응은 95℃에서 15분간 DNA를 extraction하면서 Hot start Taq을 활성화 시킨 후 95℃1분, 45℃ 1분, 72℃ 2분을 1회 반복, 95℃1분, 55℃ 1분, 72℃ 2분을 28회 반복하고 마지막으로 95℃ 1분, 60℃ 1분, 72℃ 15분간의 cycle을 1회 반복함. · 증폭된 lactoferrin의 유전자는 2236bp로 1.5% agarose gel에 loading하여 band 확인 후 이를 elution하여 pDrive (QIAGEN社) 에 T-vector cloning 함. · clone은 Sal I 과 BamH I 의 Restriction enzyme으로 digestion하여 유전자가 삽입된 것을 확인하고, 제노텍에 Sequencing 분석을 의뢰한 후 NCBI상의 염기서열과 비교, 분석함.
2. 사람 락토페린 유전자를 가진 재조합 벡터 제작	1. Human lactoferrin - expressing vector cloning	<ul style="list-style-type: none"> · CS2+벡터와 CS2+GFP 두개의 backbone 벡터를 사용하였음. · 락토페린 유전자 밑으로 monitor gene 인 GFP (green fluorescence protein) 유전자를 가지는 벡터와, GFP 유전자 없이 elongation factor-1 alpha promoter 하에 락토페린 유전자만을 가지고 이 유전자의 끝에 Histidine-tag 을 달아서 후에 단백질을 정제할 수 있도록 하는 벡터를 제작함. 전자는 제브라피쉬 수정란에 injection하여 전신에서 GFP를 발현하는지 확인함으로써 간접적으로 락토페린 발현을 확인할 수 있는 벡터이며, 후자는 실제로 라인을 형성하여 사람 락토페린을 대량으로 얻기 위한 발현벡터임.

<p>3. 재조합 락토페린 벡터를 제브라피쉬 수정란에 주입</p>	<p>1. Microinjection</p>	<ul style="list-style-type: none"> · Micromanipulator를 이용하여 수정된지 20분 이내의 one-cell 단계의 수정란에 작제한 벡터 (100 ng/u) 주입
<p>4. 형질전환 제브라피쉬에서의 락토페린 발현 확인</p>	<p>1. UV-lamp 하에서 GFP 발현 확인</p> <p>2. RT-PCR</p> <p>3. Anti-human lactoferrin monoclonal antibody 제작</p> <p>4. ELISA</p>	<ul style="list-style-type: none"> · 벡터를 주입한 수정란은 몸체가 투명함을 유지하는 7일령까지 UV-lamp 하에서 GFP 발현 확인. · 각 일령별로의 수정란을 샘플링하여 RT-PCR을 통해 락토페린 mRNA 발현을 확인. <p>[단클론 항체 제작 방법]</p> <ul style="list-style-type: none"> · 항체를 제작하기 위하여 항원은 Sigma-Aldrich社의 Lactoferrin (Cat. No. L0520) 을 구매하여 사용함. 이를 BalB/C mouse에 immunization하고 SP2/0에 fusion하여 ELISA 를 통하여 Positive well을 selection하였음. 이렇게 선별된 항체 중 12 가지를 matching test를 통하여 Lactoferrin ELISA kit를 개발하였고 “BIOXYTECH Lactof EIA(Oxis Research社)”와 비교 시험. · Transfection된 치어는 homogenizer로 유제하여 10% 유제액을 만들어 1%, 2.5%로 희석하여 ELISA와 Immunostaining에 사용 <p>[ELISA]</p> <ul style="list-style-type: none"> · ELISA로 검증 시에는 자체 개발 kit와 시판되고 있는 kit인 OxisResearch社 제품을 사용. OxisResearch社는 검체를 검체희석액으로 1/40 희석하여 well에 100μl첨가 후 37$^{\circ}$C에서 1시간 반응 후 세척액으로 5회 세척하고 Anti-LTF 100ul를 첨가하고 37$^{\circ}$C에서 60min 반응시킴. 이를 다시 세척액으로 5회 세척, Streptavin-HRP 100u를 첨가하여 37$^{\circ}$C,15min간 반응 시킨 후 OPD 100μl를 첨가하여 37$^{\circ}$C 10분 반응 후 Stop solution50μl로 반응을 정지시킨 후 450nm에서 파장값을 reading하여 Purified Lactoferrin의 값과 비교하여 Lactoferrin의 양을 추정. · 자체 개발 kit는 검체를 희석된 conjugate 와 1:1로 혼합하여 37$^{\circ}$C 90분, 상온에서 15분 반응시킨

	<p>5. Western blot (Immunostaining)</p>	<p>후 발색하여 파장값을 reading하여 Purified Lactoferrin의 값과 비교하여 Lactoferrin의 양을 추정.</p> <ul style="list-style-type: none"> · Lactoferrin을 단독 발현시킨 치어와 Lactoferrin과 GFP fusion protein form의 파장값을 보았을 때 Lactoferrin만 단독 발현시킨 치어에서 lactoferrin이 64ng/ml정도 발현되고 있음을 추정함. <p>[Immunostaining]</p> <ul style="list-style-type: none"> · 다른 lactoferrin 발현 검증 방법으로 Immunostaining을 사용함. Western blot의 원리와 마찬가지로 치어를 고정하여 자체 제작된 monoclonal 항체로 FITC를 붙여 형광 현미경 하에서 발현된 사람의 락토페린을 확인하였음. 단 western blot과는 달리 제브라피쉬 치어 전체를 항체와 반응시켜 실제 단백질이 만들어진 부위를 확인하여 볼 수 있는 방법으로 제브라피쉬에서 매우 유용하게 사용되는 방법임.
<p>5. 락토페린 유전자 확보</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. PCR (Polymerase Chain Reaction) 2. gel electrophoresis 3. gel extraction 4. TA ligation 5. sequencing 	<ul style="list-style-type: none"> · 사람의 Lactoferrin의 유전자는 NCBI Accession No. AY178998을 기초로 primer를 디자인하였다. · cDNA는 BioChain사의cDNA-Human Adult Normal tissue (Breast(Cat. No. C1234086))를 구매하여 PCR에 사용하였다. · PCR 반응은 95℃에서 15분간 DNA를 Pre-Denature 시키면서 Hot start Taq DNA polymerase를 활성화시킨 후 95℃ 1분, 45℃ 1분, 72℃ 2분 20초를 1회 반복, 95℃ 1분, 55℃ 1분, 72℃ 2분을 28회 반복하고 마지막으로 95℃ 1분, 60℃ 1분, 72℃ 15분간의 cycle을 1회 반복하였다. · 증폭된 lactoferrin의 유전자는 enzyme liner를 포함하여 2248bp로 1.5% agarose gel에 loading하여 band를 확인하였다. · 이를 elution 하여pDrive (QIAGEN)에 T-Vector cloning하고 이를 (주) 제노텍에 sequencing을 의뢰하여 sequence를 분석하였다.

<p>6. Muscle promoter 의 선별</p>	<p>1. promoter assay</p> <ul style="list-style-type: none"> · MLC#2 : zebrafish skeletal muscle myosin light chain 2 · TPMA-2 and 4 : zebrafish fast skeletal muscle α-tropomyosin <p>2. injection</p> <p>3. GFP expression confirm under flourescent microscope</p>	<ul style="list-style-type: none"> · 기존에 사용하던 promoter 들은 zebrafish의 전신에서 발견되어 치어에 손상을 입혀 치어 상태에서 사멸하는 경우가 많이 발생하였다. · 이에 일차년도에서 완성한 벡터에 더하여, 발현양을 높이면서 치어에게는 손상을 덜 입힐 수 있도록 근육에서 발현시키는 muscle promoter 를 사용하고 하였다. · 이를 위하여 몇 가지의 MLC#2, TPMA-2, TPMA-4 promoter를 클로닝하여 pMDS-EGFP에 삽입하였다. · zebrafish 에 injection 한 후 GFP 발현양을 측정하여 muscle에서 GFP를 많이 발현하는 promoter를 찾아내었다. · Muscle promoter 중 가장 GFP를 많이 발현하는 것은 MLC#2 로서, 이를 선정하여 차후 실험에서 lactoferrin 발현시 promoter 로 사용하기로 하였다.
<p>7. 다양한 발현벡터의 이용</p>	<p>1. pMDS6/MLC#2-lactoferrin cloning</p> <p>2.GAL4/UAS system 의 도입</p>	<ul style="list-style-type: none"> · 선별된 MLC#2 는 pMDS6에 MLC#2와 lactoferrin 유전자를 cloning하여 zebrafish에 injection시 사용하였다. · LAD system 과 lactoferrin 은 pDS-O4GLAD-LF의 plasmid를 Asc I과 SnaB I으로 restriction하였으며, 이미 제작된 pMDS6/MLC#2 역시 동일한 enzyme site를 사용하여 cloning 하였다. · Gal4-UAS 는 싱가포르로부터 입수한 vector로 sequencing한 후 enzyme site mapping 을 하여 사용하였다. Sequencing 결과 입수 시 insert되어있던 EGFP 유전자에 lactoferrin을 삽입하도록 하였다. 5'-end에 BamH I을 삽입하였고, 3'-end에 Not I을 삽입하여 lactoferrin을 PCR하여 pDrive cloning하여 sequencing으로 lactoferrin sequence를 확인한 후 Gal4-UAS에 lactoferrin 유전자를 삽입하였다.

<p>8. 형질전환 제브라피쉬 founder 와 F1, F2 에서의 락토페린 발현 확인</p>	<p>1. ELISA plate 제작</p> <p>2. Founder 치어 유제화</p> <p>3. 락토페린 검출을 위한 ELISA</p>	<ul style="list-style-type: none"> · Muscle Promoter 인 MLC#2 를 이용한 Lactoferrin 발현은 ELISA로 확인하였다. ELISA 키는 협동연구 수행기관 (Animal Genetics, Inc.) 에서 본 연구수행 과정 중 자체 개발한 monoclonal antibody 를 사용하여 개발하였다. · pMDS6/MLC#2-lactoferrin injection시 DNA의 농도를 달리하여 그에 따른 lactoferrin 발현양에 대한 영향을 살펴보았다. · F0의 경우 각 3일령, 7일령 치어에서 sampling하였다. · Sampling 은 치어를 saline 으로 3회 세척 후 이를 eppendorf tube에 담아 ice에 정치하였다. 치어가 tube 내에서 cold shock으로 밑부분에 가라앉는 것을 확인한 후 상층액을 최대한 제거하였다. Sampling 이 완료된 zebrafish는 바로 PBS에 유제하여 사용하거나, -70℃에 보관한 후 실험시 유제하여 사용하였다. · F0에서의 lactoferrin 발현 유무는 2007년 12월 6일 자체 제작한 ELISA plate를 사용하였다. · Capture antibody 로는 자사에서 개발한 Monoclonal antibody인 2E6을 8μg/ml로 사용하고, 검체는 PBS 에 최종 농도가 0.5%가 되도록 희석하였고, 양성대조액인 Pure Lactoferrin 역시 64ng/ml 부터 2배씩 희석하여 1 ng/ml 까지 PBS에 희석하여 사용하였다. · 희석된 검체와 희석된 양성대조액은 각 50μ를 well별로 넣은 후 101x conjugate를 conjugate 희석액에 1x로 희석하여 50μ를 첨가한 뒤 37℃에서 90분간 incubation시켰다. · Incubation 후 10x Washing solution을 증류수에 1x가 되도록 희석한 후 세척기로 6회 세척하고 well에 남아있는 세척액을 털어낸 후 기질액 A와 B를 1:1로 희석하여 100μ를 넣고 상온, 암처에서 15분간 반응시켰다. 반응이 끝난 plate는 반응정지액을 100μ 첨가하여 ELISA reader로 450nm에서 흡광도값을 reading하였다. ELISA reader를 통하여 수치화된 흡광도 값은 희석된 양성대조액을 기준으로 zebrafish의 lactoferrin 발현양을 산정하였다. · F0에서 발현이 확인된 zebrafish는 wild type과의
--	---	--

		<p>교배를 통하여 F1의 Lactoferrin expression line을 제작하였다. 제작된 germ line은 Animal Genetics, INC.(협동연구기관)에서 제조된 Lot No. T8001 의 kit 를 사용하여 lactoferrin 발현 유무를 검증하였다. 이는 Capture antibody로 기존의 2E6을 subcloning하여 선별한 2E6-3C3을 2μg/ml로 사용하였으며, 반응 시간과 조건은 F0에서와 동일한 방법으로 실험하였다.</p>
<p>9. 사람 락토페린을 발현하는 형질전환 제브라피쉬 라인의 선별</p>	<ol style="list-style-type: none"> embryo collection DNA extraction PCR 	<ul style="list-style-type: none"> 성어가 된 Founder를 wild-type 제브라피쉬와 교배하여 수정란을 획득한다. 수정 후 2일과 3일째의 배아를 모아 DNA를 추출한다. 차세대로의 락토페린 유전자 전달 검증은 사람 락토페린 유전자 시퀀스의 75~306, 1741~1924, 574~775 번째 서열을 증폭하는 primer 로 PCR을 실시하여 수행하였다.
<p>10. 락토페린의 정제</p>	<ol style="list-style-type: none"> 형질전환 제브라피쉬로부터 사람 락토페린 정제법의 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 제조한 단일클론 항 락토페린 항체를 sephose gel 에 흡착시켜 컬럼을 제조한다. 락토페린을 발현하는 제브라피쉬를 배양하여 회수하여 파쇄하고 원심분리를 실시하여 상청을 회수한다. 회수한 락토페린 상청을 제조한 컬럼에 loading 하여 락토페린만을 특이적으로 흡착시키고, PBS로 컬럼을 세척한다. NaCl 농도구배를 주어 특이적인 락토페린을 용출하여 정제한다. 단백질 농도를 측정한다.
<p>11. In vitro 항생 효과 검증</p>	<ol style="list-style-type: none"> <i>Escherichia coli</i> DH5a culture <i>Salmonella typhymirium</i> ATCC 13311 culture <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 culture 	<ul style="list-style-type: none"> 냉장 보관 중이던 실험 대상 균주 (<i>Escherichia coli</i> DH5a, <i>Salmonella typhymirium</i> ATCC 13311, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923) 를 꺼내어 LB broth에서 preculture 를 실시한다. 배양한 각각의 균의 배양액을 10μl 씩 따서 LB broth 10ml 에 넣고 incubation 을 실시한다.



· OD600 의 값이 0.3이 될 때까지 incubation을 실시한다.



· Lactoferrin solution 을 준비한다. 제브라피쉬에서 정제한 Lactoferrin 유제를 준비한다. 0.5% 제브라피쉬 유제액 Sample에서 추출한 정제 락토페린의 처리 농도는 0.072mg/ml, 0.14mg/ml, 이다.



- (1) 실험에 사용될 농도는 1000 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ 이며 처리시 1/5로 희석되기 때문에 처리 최고 농도의 5배인 5000 $\mu\text{g/ml}$ 을 제작한다.
- (2) 저울의 최소 측정단위를 고려하여 lactoferrin 1mg을 200 μl 의 LB broth에 녹여서 용액을 만든다. 실험에 사용될 양은 100 μl 이므로 나머지 용액은 -20 $^{\circ}\text{C}$ 냉동실에서 보관한다.
- (3) 제작한 5000 $\mu\text{g/ml}$ 용액 100 μl 에서 35 μl 을 따서 LB broth 35 μl 를 첨가하여 2500 $\mu\text{g/ml}$ 을 만들고 이 용액에서 8 μl 을 따서 LB broth 72를 첨가하

여 250 μ g/ml의 용액을 만든다.

- 1.5ml eppendorf tube 에 농도별 처리 용액 20 μ l 와 OD600 의 값이 0.3이 된 세균 배양액 80 μ l을 넣어서 incubation을 실시한다.

- 각 세균별로 control균은 eppendorf tube 에 LB broth 200 μ l와 세균 배양액 800 μ l 을 섞어서 5개 정도의 tube 을 사용한다. 여기서 control 균은 OD600 값을 측정하는데 사용됨은 물론 CFU 측정시 control로 사용되기 때문에 수가 부족하지 않도록 tube의 수를 준비한다.

- control의 OD600 값이 0.8이 될 때까지 배양을 실시한다.

- 96-well plate에서 10⁻¹~10⁻⁷까지 희석을 실시한다.

희석시 최초 처리 농도별 배양액에서 20 μ l을 따고 LB broth 180 μ l을 첨가하여 최초 10배 희석 용액을 만들고 이 용액에서 20 μ l을 따서 1/10 serial dilution을 실시한다.

- 희석이 끝나면 LB agar plate에 순서대로 10 μ 씩 희석 용액을 뿌린다.



- 희석 용액이 배지 위에서 마를 때 까지 기다린 다음 incubation에

넣는다.

- 6시간 정도 배양후 세균의 성장 양상을 보고 single colony의 수를 측정하여 CFU/ml 을 계산한다.



<p>12. <i>In vivo</i> 항생효과 검증</p>	<p>1. Bacterial culture 2. animal infection 3. lactoferrin treatment 4. 부검 5. colony enumeration 6. 조직검경</p>	<ul style="list-style-type: none"> · Bacterial strains and culture : <i>S. serovar Typhimurium</i> ATCC 13311 (ATCC 구입) 은 1% Bacto Peptone (Difco Laboratories, Detroit, MI, US) 이 함유된 Luria 배지에서 키운다. · 37°C 에서 200rpm 으로 12시간동안 키운 후 PBS 로 세 번 세척하고 600nm 에서 적절한 흡광도로 희석한다. Balb/c 마우스에서 감염후 30일에 알려진 LD50 (CFU) 는 4.4×10^2 이다⁷⁾ · CFU 측정 : 각 흡광도에서의 세균부유액 CFU 측정은 마우스 감염 당일 측정하며, 그 전날 세균 부유액을 등비로 희석하여 1.5% agar (Difco) 가 첨가된 plate 에 발라 키워서 콜로니를 계산하여 정한다. · 락토페린 : 형질전환 제브라피쉬에서 정제한 락토페린과 Sigma 에서 구입한 대조군 락토페린을 준비한다. · 동물실험 : 선천적으로 salmonella 에 감수성이 있는 8주령의 balb/c 마우스를 12마리 준비한다. 시험군은 다음과 같다. <ul style="list-style-type: none"> 1) 음성 대조군 : 30 mg/day wild zebrafish embryo 유제액 처치군 2) 실험군 : 30 mg/day Lactoferrin vector injected zebrafish embryo 유제액 처치군 3) 양성 대조군 : 2 mg/day 상용 락토페린 처치군 · 모든 군은 salmonella 10^8 CFU 를 100ul saline 에 섞어 경구투여한다. · 모든 군은 세균감염 2일 전부터 감염후 2일까지 총 일주일간 복강투여한다. · Enumeration of viable <i>S. enteric serovar Typhimurium</i> in mice : 공장의 Peyer's patch와 간, 비장에서 CFU 를 구하기 위해 세균 감염 후 3일째에 마우스를 희생시킨다. 무균적으로 적출한 장기의 동일한 부분을 분리하여 무게를 측정하고 Luria 배지에서 분쇄한다. 분쇄액 (0.1 g/mL) 을 열배 희석하여 1% glucose가 함유된 MaConkey agar (Difco) 에 바르고 37°C 에서 18시간 배양한 후 콜로니를 계산한다⁷⁾. · Histopathology : 공장 Peyer's patch 와 간, 비장을 10% 중성포르말린에 48시간 고정된 후 H&E 염색을 하여 군별 조직병변의 정도를 확인한다⁸⁾.
-----------------------------------	--	---

<p>13. Lactoferrin 발현 Zebrafish 의 사료첨가제 제조 및 산업동물에 효과 측정</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 증체율 측정 2. 설사 빈도 측정 3. IgG, IgM, IgA, IL-2 역가 측정 	<ul style="list-style-type: none"> · 사료 첨가제를 제조하여 사료 20kg당 500g의 첨가제를 혼합하여 20일간 투여하였다. · 사료 투여 시 개시 전과 종료 시점에 체중을 측정하여 증체율 측정하여 사료의 효율을 측정한다. · 사료 투여 시 설사 여부를 20일간 매일 측정하여 lactoferrin이 설사에 미치는 영향을 측정한다. · 사료 투여 돼지 혈청을 투여 10일/20일 후에 채취하여 IgG, IgM, IgA, IL-2의 역가를 ELISA로 측정
--	--	---

7) Tang IK, Ji DD, Chou CF, Lin HC, Liao CL, Sytwu HK, Wang JJ, Jiu YT : Characterization of a highly attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mutant strain. *Journal of microbiology, immunology and infection* **35(4)**: 229-35 (2002)

8) Susan Mosquito, Theresa J. Ochoa, Jaime Cok, Thomas G. Cleary : Effect of bovine lactoferrin in *Salmonella ser. Typhimurium* infection in mice. *Biometals* **23**: 515-521 (2005)

제 2절 세부 연구 수행 결과

1. 사람 락토페린 cDNA를 이용하여 클로닝후 염기서열확인

PCR을 이용한 Human Lactoferrin 유전자 확보 및 염기서열 확인을 위하여 BioChain社에서 구매한 cDNA에서 증폭된 human lactoferrin의 유전자는 2236bp로 1.5% agarose gel에 loading하여 확인한 band의 모습은 그림 1과 같다. 이를 elution하여 pDrive(QIAgen社)에 T-vector cloning하였다.

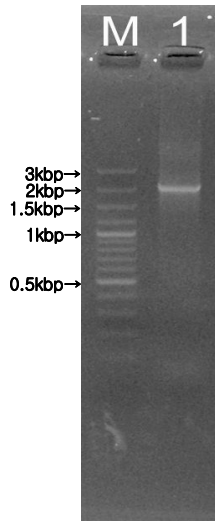


그림 1. 사람 락토페린 PCR 산물의 전기영동 사진

Lane M : 100bp ladder size marker

Lane 1 : lactoferrin PCR product

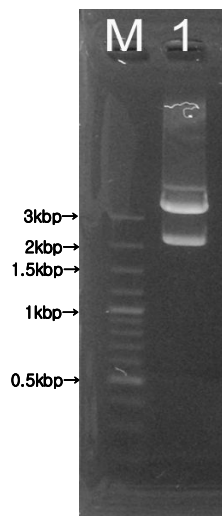


그림 2. T-vector 로 클로닝한 사람 락토페린 유전자를 SalI/BamHI 효소로 자른 전기영동 사진

Lane M, 100bp ladder size marker

Lane 1, Lactoferrin pDrive clone BamH I and Sal I digestion

이 clone은 Sal I 과 BamH I 의 Restriction enzyme으로 digestion하여 유전자가 삽입된 것을 확인하고(그림 2), 제노텍에 Sequencing 분석을 의뢰한 후 NCBI상의 염기서열과 비교, 분석하였다. 비교 분석결과 1bp의 염기서열이 변환되었으나, amino acid 로 translation시에는 변환되지 않아 Target lactoferrin과 동일한 protein을 발현할 것을 예측할 수 있었다. 분석한 염기서열은 그림 3과 같다.

Query: AY178998, Sbjct: Lactoferrin pDrive clone sequencing 결과
 Score = 4096 bits (2130), Expect = 0.0
 Identities = 2132/2133 (99%), Gaps = 0/2133 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 1  ATGAAACTTGTCTTCCTCGTCCTGCTGTTCCCTCGGGGCCCTCGGACTGTGTCTGGCTGGC 60
Sbjct 1  ATGAAACTTGTCTTCCTCGTCCTGCTGTTCCCTCGGGGCCCTCGGACTGTGTCTGGCTGGC 60

Query 61  CGTAGGAGAAGGAGTGTTCAGTGGTGCACCGTATCCCAACCCGAGGCCACAAAATGCTTC 120
Sbjct 61  CGTAGGAGAAGGAGTGTTCAGTGGTGCACCGTATCCCAACCCGAGGCCACAAAATGCTTC 120

Query 121  CAATGGCAAAGGAATATGAGAAGAGTGCCTGGCCCTCCTGTCAGCTGCATAAAGAGAGAC 180
Sbjct 121  CAATGGCAAAGGAATATGAGAAGAGTGCCTGGCCCTCCTGTCAGCTGCATAAAGAGAGAC 180

Query 181  TCCCCATCCAGTGTATCCAGGCCATTGCGGAAAACAGGGCCGATGCTGTGACCCTTGAT 240
Sbjct 181  TCCCCATCCAGTGTATCCAGGCCATTGCGGAAAACAGGGCCGATGCTGTGACCCTTGAT 240

Query 241  GGTGGTTTTATATACGAGGCAGGCCTGGCCCCCTACAACTGCGACCTGTAGCGGCGGAA 300
Sbjct 241  GGTGGTTTTATATACGAGGCAGGCCTGGCCCCCTACAACTGCGACCTGTAGCGGCGGAA 300

Query 301  GTCTACGGGACCGAAAAGACAGCCACGAACTACTATTATGCCGTGGCTGTGGTGAAGAAG 360
Sbjct 301  GTCTACGGGACCGAAAAGACAGCCACGAACTACTATTATGCCGTGGCTGTGGTGAAGAAG 360

Query 361  GGCGGCAGCTTTTCAGCTGAACGAACTGCAAGGTCTGAAAGTCTGCCACACAGGCCCTTCGC 420
Sbjct 361  GGCGGCAGCTTTTCAGCTGAACGAACTGCAAGGTCTGAAAGTCTGCCACACAGGCCCTTCGC 420

Query 421  AGGACCGCTGGATGGAATGTCCCTATAGGGACACTTCGTCCATTCTTGAATTGGACGGGT 480
Sbjct 421  AGGACCGCTGGATGGAATGTCCCTATAGGGACACTTCGTCCATTCTTGAATTGGACGGGT 480

Query 481  CCACCTGAGCCCATTGAGGCAGCTGTGGCCAGGTTCTTCTCAGCCAGCTGTGTTCCCGGT 540
Sbjct 481  CCACCTGAGCCCATTGAGGCAGCTGTGGCCAGGTTCTTCTCAGCCAGCTGTGTTCCCGGT 540

Query 541  GCAGATAAAGGACAGTTCGCCAACCTGTGTGCGCTGTGTGCGGGGACAGGGGAAAACAAA 600
Sbjct 541  GCAGATAAAGGACAGTTCGCCAACCTGTGTGCGCTGTGTGCGGGGACAGGGGAAAACAAA 600

Query 601  TGTGCCTTCTCCTCCCAGGAACCGTACTTCAGTACTCTGGTGCCTTCAAGTGTCTGAGA 660
Sbjct 601  TGTGCCTTCTCCTCCCAGGAACCGTACTTCAGTACTCTGGTGCCTTCAAGTGTCTGAGA 660

Query 661  GACGGGGCTGGAGACGTGGCTTTTATCAGAGAGAGCACAGTGTGTTGAGGACCTGTCAGAC 720
Sbjct 661  GACGGGGCTGGAGACGTGGCTTTTATCAGAGAGAGCACAGTGTGTTGAGGACCTGTCAGAC 720

Query 721  GAGGCTGAAAAGGACGAGTATGAGTTACTCTGCCAGACAACAACCTCGGAAGCCAGTGGAC 780
Sbjct 721  GAGGCTGAAAAGGACGAGTATGAGTTACTCTGCCAGACAACAACCTCGGAAGCCAGTGGAC 780

Query 781  AAGTTCAAAGACTGCCATCTGGCCCGGGTCCCTTCTCATGCCGTTGTGGCACGAAGTGTG 840
Sbjct 781  AAGTTCAAAGACTGCCATCTGGCCCGGGTCCCTTCTCATGCCGTTGTGGCACGAAGTGTG 840

Query 841  AATGGCAAGGAGGATGCCATCTGGAATCTTCTCCGCCAGGCACAGGAAAAGTTTGAAAAG 900
Sbjct 841  AATGGCAAGGAGGATGCCATCTGGAATCTTCTCCGCCAGGCACAGGAAAAGTTTGAAAAG 900

Query 901  GACAAGTCACCGAAATTCCAGCTCTTTGGCTCCCCTAGTGGGCAGAAAAGATCTGCTGTTT 960
Sbjct 901  GACAAGTCACCGAAATTCCAGCTCTTTGGCTCCCCTAGTGGGCAGAAAAGATCTGCTGTTT 960

Query 961  AAGGACTCTGCCATTGGGTTTTTCGAGGGTGCCCCGAGGATAGATTCTGGGCTGTACCTT 1020
Sbjct 961  AAGGACTCTGCCATTGGGTTTTTCGAGGGTGCCCCGAGGATAGATTCTGGGCTGTACCTT 1020

Query 1021  GGCTCCGGCTACTTCACTGCCATCCAGAACTTGAGGAAAAGTGAGGAGGAAGTGGCTGCC 1080
Sbjct 1021  GGCTCCGGCTACTTCACTGCCATCCAGAACTTGAGGAAAAGTGAGGAGGAAGTGGCTGCC 1080

Query 1081  CGGCGTGC GCGGGTTCGTGTGGTGTGCGGTGGGCGAGCAGGAGCTGCGCAAGTGTAAACCAG 1140
Sbjct 1081  CGGCGTGC GCGGGTTCGTGTGGTGTGCGGTGGGCGAGCAGGAGCTGCGCAAGTGTAAACCAG 1140

Query 1141  TGGAGTGGCTTGAGCGAAGGCAGCGTGACCTGCTCCTCGGCCTCCACCACAGAGGACTGC 1200
Sbjct 1141  TGGAGTGGCTTGAGCGAAGGCAGCGTGACCTGCTCCTCGGCCTCCACCACAGAGGACTGC 1200

Query 1201  ATCGCCCTGGTGCTGAAAAGGAGAAGCTGATGCCATGAGTTTGGATGGAGGATATGTGTAC 1260
Sbjct 1201  ATCGCCCTGGTGCTGAAAAGGAGAAGCTGATGCCATGAGTTTGGATGGAGGATATGTGTAC 1260

Query 1261  ACTGCAGGCAAATGTGGTTTGGTGCCTGTCCTGGCAGAGAACTACAAATCCCAACAAAGC 1320
Sbjct 1261  ACTGCAGGCAAATGTGGTTTGGTGCCTGTCCTGGCAGAGAACTACAAATCCCAACAAAGC 1320

```


Query 1321 AGTGACCCTGATCCTAACTGTGTGGATAGACCTGTGGAAGGATATCTTGCTGTGGCGGTG 1380
 Sbjct 1321 AGTGACCCTGATCCTAACTGTGTGGATAGACCTGTGGAAGGATATCTTGCTGTGGCGGTG 1380

Query 1381 GTTAGGAGATCAGACACTAGCCTTACCTGGAACCTCTGTGAAAGGCAAGAAGTCCTGCCAC 1440
 Sbjct 1381 GTTAGGAGATCAGACACTAGCCTTACCTGGAACCTCTGTGAAAGGCAAGAAGTCCTGCCAC 1440

Query 1441 ACCGCCGTGGACAGGACTGCAGGCTGGAATATCCCCATGGGCCTGCTCTTCAACCAGACG 1500
 Sbjct 1441 ACCGCCGTGGACAGGACTGCAGGCTGGAATATCCCCATGGGCCTGCTCTTCAACCAGACG 1500

Query 1501 GGCTCCTGCAAATTTGATGAATATTTTCAGTCAAAGCTGTGCCCTGGGTCTGACCCGAGA 1560
 Sbjct 1501 GGCTCCTGCAAATTTGATGAATATTTTCAGTCAAAGCTGTGCCCTGGGTCTGACCCGAGA 1560

Query 1561 TCTAATCTCTGTGCTCTGTGTATTGGCGACGAGCAGGGTGAGAATAAGTGCCTGCCAAC 1620
 Sbjct 1561 TCTAATCTCTGTGCTCTGTGTATTGGCGACGAGCAGGGTGAGAATAAGTGCCTGCCAAC 1620

Query 1621 AGCAATGAGAGATACTACGGCTACACTGGGGCTTTCCGGTGCCTGGCTGAGAATGCTGGA 1680
 Sbjct 1621 AGCAATGAGAGATACTACGGCTACACTGGGGCTTTCCGGTGCCTGGCTGAGAATGCTGGA 1680

Query 1681 GACGTTGCATTTGTGAAAGATGTCACTGTCTTGCAGAACACTGATGGAATAACAATGAC 1740
 Sbjct 1681 GACGTTGCATTTGTGAAAGATGTCACTGTCTTGCAGAACACTGATGGAATAACAATGAC 1740

Query 1741 GCATGGGCTAAGGATTTGAAGCTGGCAGACTTTGCGCTGCTGTGCCTCGATGGCAAACGG 1800
 Sbjct 1741 GCATGGGCTAAGGATTTGAAGCTGGCAGACTTTGCGCTGCTGTGCCTCGATGGCAAACGG 1800

Query 1801 AAGCCTGTGACTGAGGCTAGAAGCTGCCATCTTGCCATGGCCCCGAATCATGCCGTGGTG 1860
 Sbjct 1801 AAGCCTGTGACTGAGGCTAGAAGCTGCCATCTTGCCATGGCCCCGAATCATGCCGTGGTG 1860

Query 1861 TCTCGGATGGATAAAGGTGGAACGCCTGAAACAGGTGTTGCTCCACCAACAGGCTAAATTT 1920
 Sbjct 1861 TCTCGGATGGATAAAGGTGGAACGCCTGAAACAGGTGTTGCTCCACCAACAGGCTAAATTT 1920

Query 1921 GGGAGAAATGGATCTGACTGCCCGGACAAGTTTTGCTTATTCCAGTCTGAAACCAAAAAAC 1980
 Sbjct 1921 GGGAGAAATGGATCTGACTGCCCGGACAAGTTTTGCTTATTCCAGTCTGAAACCAAAAAAC 1980

Query 1981 CTTCTGTTCAATGACAACACTGAGTGTCTGGCCAGACTCCATGGCAAACAACATATGAA 2040
 Sbjct 1981 CTTCTGTTCAATGACAACACTGAGTGTCTGGCCAGACTCCATGGCAAACAACATATGAA 2040

Query 2041 AAATATTTGGGACCACAGTATGTCGAGGCATTACTAATCTGAAAAAGTGCTCAACCTCC 2100
 Sbjct 2041 AAATATTTGGGACCACAGTATGTCGAGGCATTACTAATCTGAAAAAGTGCTCAACCTCC 2100

Query 2101 CCCCTCCTGGAAGCCTGTGAATTCCTCAGGAAG 2133
 Sbjct 2101 CCCCTCCTGGAAGCCTGTGAATTCCTCAGGAAG 2133

그림 3. T-vector cloning 한 사람 락토페린의 유전자 염기서열 분석 결과

2. Xenopus EF1a 프로모터 벡터를 이용하여 사람 락토페린 벡터 제조

Xenopus EF1a 프로모터 벡터를 이용하여 사람 락토페린 벡터 제조를 위하여 CS2+ 벡터 (그림 4)와 CS2 + GFP (그림 5) 두 개의 모벡터를 사용하였다. 락토페린 유전자 밑으로 monitor gene 인 GFP (green fluorescence protein) 유전자를 가지는 벡터와, GFP 유전자 없이 elongation factor-1 alpha promoter 하에 락토페린 유전자만을 가지고 이 유전자의 끝에 Histidine-tag 을 달아서 후에 단백질을 정제할 수 있도록 하는 벡터를 제작하였다. 전자는 제브라피쉬 수정란에 injection 하여 전신에서 GFP를 발현하는지 확인함으로써 간접적으로 락토페린 발현을 확인할 수 있는 벡터이며, 후자는 실제로 라인을 형성하여 사람 락토페린을 대량으로 얻기 위한 발현벡터이다.

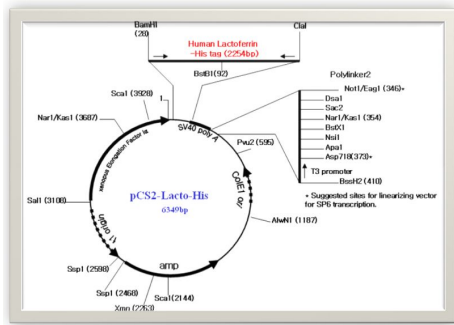


그림 4. CS2+백터 (XEF+Lactoferrin)

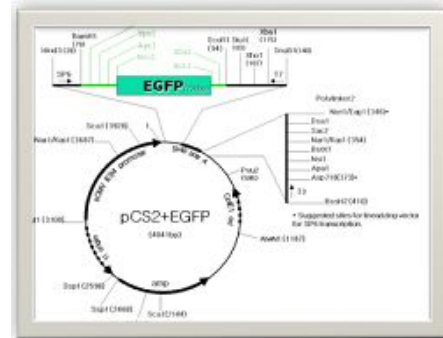


그림 5. CS2+GFP 백터

3. Muscle promoter의 선별

기존에 사용하던 promoter들은 zebrafish의 전신에서 발현되어 치어에 손상을 입혀 치어 상태에서 사멸하는 경우가 많이 발생하여, 발현양을 늘이면서 치어에게는 손상을 덜 입힐 수 있도록 근육에서 발현시키는 muscle promoter를 사용하고자 하였다. 이를 위하여 몇 가지의 MLC#2, TPMA-2, TPMA-4를 promoter가 존재하지 않는 pMDS-EGFP에 삽입하여 zebrafish에 injection 후 GFP 발현양을 측정하여 muscle에서 GFP를 많이 발현하는 promoter를 찾아내었다. Muscle promoter중 가장 GFP를 많이 발현하는 것은 MLC#2로, 이를 선정하여 차후 실험에서 lactoferrin 발현시 promoter로 사용하기로 하였다.

Muscle promoter는 promoter가 없는 pMDS-EGFP vector에 Muscle promoter를 삽입하여, EGFP 발현양이 가장 많은 promoter를 선별하였다. Control로는 “XEF CH”와 비교한 결과 MLC#2 promoter에서 EGFP가 가장 강하게 발현되어 이를 선별하여 차후 실험에 사용하였다.

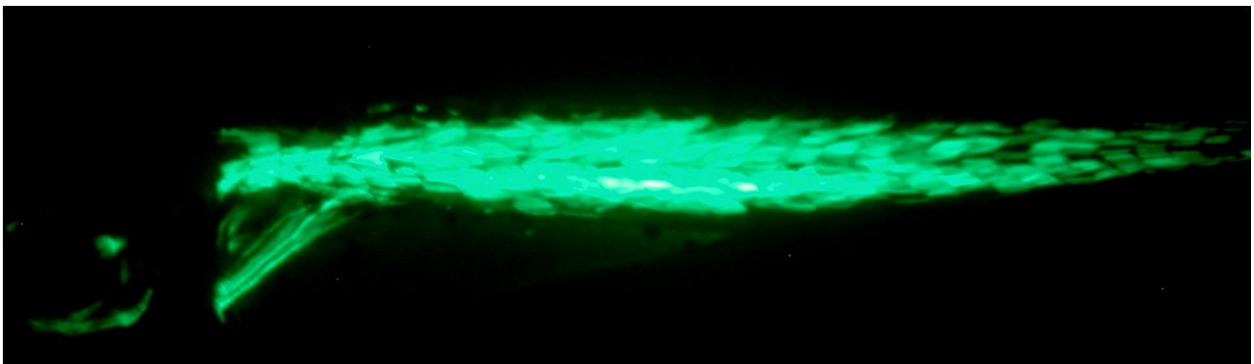
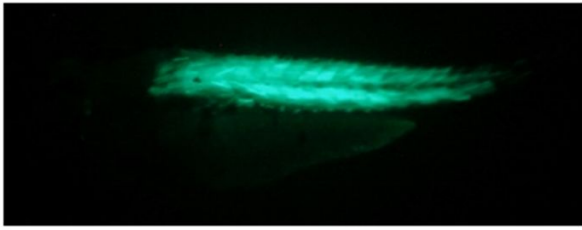
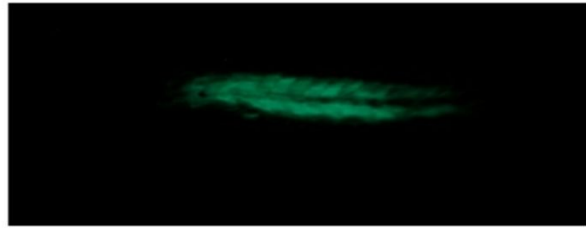


그림 5. TPMA근육프로모터 연결 EGFP 백터 구조에서의 프로모터 분석결과
DNA constructs were injected at one-cell stage zebrafish embryos and 4 dpf (days post fertilization) embryos were investigated for EGFP intensity.

pMDS-EGFP / TPMA4 (4dpf)

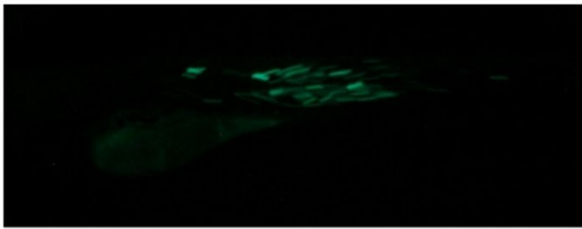


Expose : 1sec



Expose : 0.5sec

pMDS-EGFP / TPMA2 (4dpf)



Expose : 1sec

그림 6. MLC2근육 프로모터 연결 EGFP 벡터 구조에서의 프로모터 분석결과

MLC2-GFP construct drives strong reporter gene expression. Photograph was taken at 4 dpf.

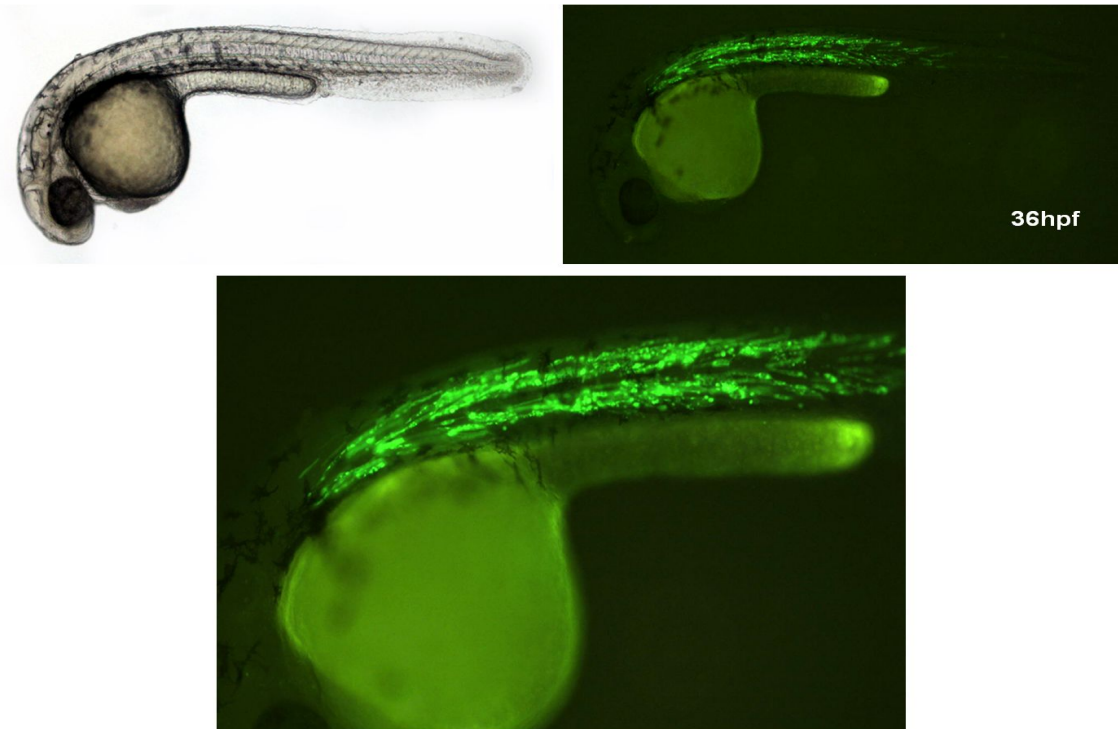


그림 7. MLC2 근육프로모터에서의 락토페린 발현과 퓨전 단백질인 GFP 발현

4. pMDS6/MLC#2-Lactoferrin 및 Lactoferrin-GFP의 삽입

GFP 발현양의 확인으로 선별된 muscle promoter인 MLC#2는 promoter가 존재하지 않는 plasmid인 pMDS6에 MLC#2와 lactoferrin 유전자를 cloning하여 zebrafish에 injection시 사용하였다. 우선 pMDS6를 Xho I 과 Sna I 으로 restriction하고, pDrive에 cloning되어있는 MLC#2 유전자는 Xho I /Pme I 으로 restriction하여 cloning하였다.

Sna I 과 Pme I 은 blunt end로 enzyme site와 상관없이 ligation되도록 design하여 cloning하였다. Lactoferrin 유전자는 pDS-O4GLAD-LF로부터 restriction 하여 얻었다. 이는 LAD system과 lactoferrin 유전자가 함께 존재하는 plasmid로 non-inducible system을 이용하기 위해 LAD system을 함께 promoter MLC#2의 뒤에 cloning 하였다.

LAD system과 lactoferrin은 pDS-O4GLAD-LF의 plasmid를 Asc I 과 Sna I 으로 restriction하였으며, 이미 제작된 pMDS6/MLC#2 역시 동일한 enzyme site를 사용하여 cloning 하였다.

Muscle promoter 중 선별된 MLC#2를 pMDS6에 삽입하였다. pMDS6/MLC#2를 선별한 후 Lactoferrin을 삽입하여 pMDS6/MLC#2-Lactoferrin clone(Fig. 5)을 제작하고, Lactoferrin 뒷부분에 EGFP를 삽입(Fig. 6)하여 zebrafish에 injection 하였다.

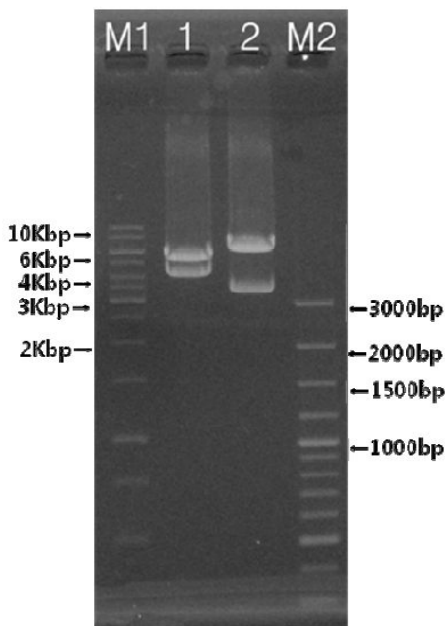


그림 8. Restriction analysis of pMDS6/MLC#2-Lactoferrin clone DNA.

Lane M1, 1Kb ladder size marker(MBI fermentas, Cat. No. #SM1163);

Lane M2, 100bp ladder size marker(MBI fermentas, Cat. No. #SM1143);

Lane 1, pMDS/MLC#2-LTF Asc I/Sna I Restriction;

Lane 2, : pMDS/MLC#2-LTF Xho I/Sna I Restriction

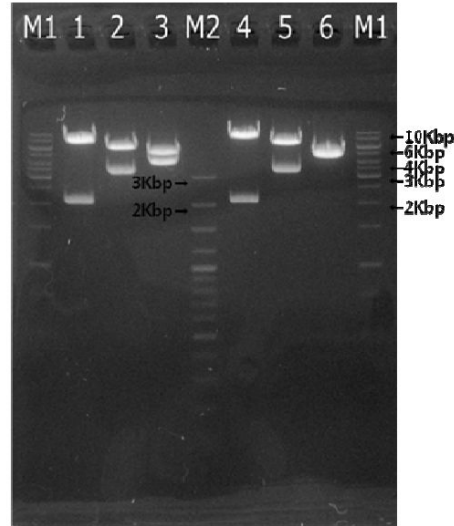


그림 9. Restriction analysis of pMDS6/ MLC#2-Lactoferrin-GFP clone DNA. Lane M1, 1Kb ladder size marker(MBI fermentas, Cat. No. #SM1163); Lane M2, 100bp ladder size marker(MBI fermentas, Cat. No. #SM1143); Lane 1, pMDS/MLC#2-LTG Xho I /Asc I Restriction(2kbp/8kbp); Lane 2, pMDS/MLC#2-LTG Xho I /Snab I Restriction(6.5kbp/3.5kbp); Lane 3, pMDS/MLC#2-LTG Asc I /Snab I Restriction (4.5kbp/5.5kbp); Lane 4, pMDS/MLC#2-LTG Xho I /Asc I Restriction(2kbp/8.8kbp); Lane 5, pMDS/MLC#2-LTG Xho I /Snab I Restriction(7.3kbp/3.5kbp); Lane 6, pMDS/MLC#2-LTG Asc I /Snab I Restriction(5.3kbp/5.5kbp)

pMDS6/MLC#2-Lactoferrin-GFP cloning: GFP 유전자는 Lactoferrin이 cloning 되어있는 vector에 삽입하였다. Lactoferrin 유전자 중 nt No. 2234에 위치한 Nde I site를 5'-end에 사용하고 EGFP의 3'-end에 Not I 을 restriction 유전자로 사용하여 cloning하였다.

5. GAL4-UAS/Lactoferrin cloning

Gal4-UAS는 싱가포르로부터 입수한 vector로 Vector를 sequencing 한 후 enzyme site mapping을 하여 사용하였다. Sequencing 결과 입수 시 insertion되어있던 EGFP 유전자에 lactoferrin을 삽입하도록 하였다. 5'-end에 BamH I 을 삽입하였고, 3'-end에 Not I 을 삽입하여 lactoferrin을 PCR하여 pDrive cloning하여 sequencing으로 lactoferrin sequence를 확인한 후 Gal4-UAS에 lactoferrin 유전자를 삽입하였다.

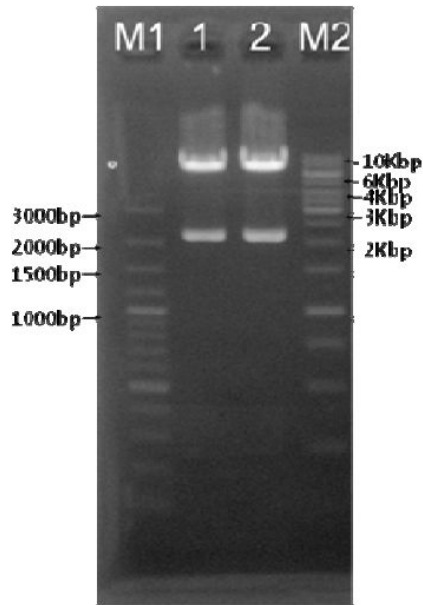


그림 10. Restriction analysis of Gal4-UAS/Lactoferrin clone.

Lane M1, 1Kbp DNA ladder (MBI Fermentas, Cat. No. #SM1163)

Lane M2, 100bp DNA ladder (MBI Fermentas, Cat. No. #SM1143)

Lane 1, Gal4-UAS#1/Lactoferrin BamH1/Not1 Restriction

Lane 2, Gal4-UAS#2/Lactoferrin BamH1/Not1 Restriction

6. 제브라피쉬 사육 확립 및 수정란 획득

제브라피쉬 사육 확립 및 수정란 획득을 위하여 제브라피쉬는 28.5 °C의 개별 순환어조(그림 11) 에서 사육하여, 암컷과 수컷을 분리하여 놓았다가 아침에 빛을 가하며 함께 합사시킴으로써 교배시켜 수정란을 아래 그림 (그림 12, 13) 과 같이 얻었다.



그림 11. 서울대학교 수의과대학 제브라피쉬 수조

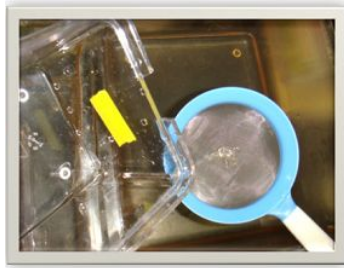


그림 12. 제브라피쉬의 교배후 낳은 수정란의 모습

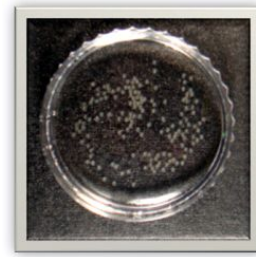


그림 13. 제브라피쉬의 교배후 낳은 수정란의 확대 모습

7. 재조합 락토파린 벡터를 제브라피쉬 수정란에 주입

재조합 락토파린 벡터를 제브라피쉬 수정란에 주입하기 위하여 Micromanipulator (그림 14) 를 이용하여 수정된지 20분 이내의 one-cell 단계의 수정란 (그림 15) 에 작제한 벡터 (100 ng/u) 를 주입하였다.

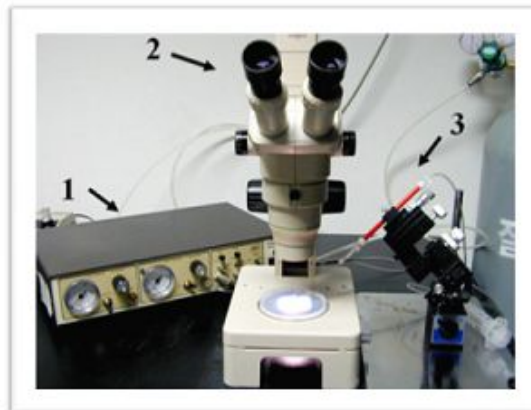


그림 14. 제브라피쉬 수정란에 DNA를 주입하기 위한 장치
1) pico-pump 2) microscope 3) micromanipulator

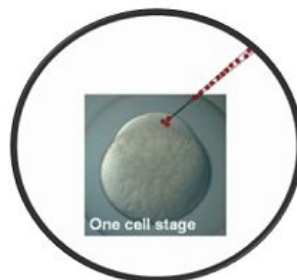


그림 15. 제브라피쉬 one cell 단계에 준비한 DNA를 미세주입하는 모습

8. 형질전환 제브라피쉬에서 사람의 락토페린 발현 확인

형질전환 제브라피쉬에서의 사람의 락토페린 발현 확인을 위하여 RT-PCR과 GFP를 발현하는 제브라피쉬의 육안관찰을 수행하였다.

가. 제브라피쉬의 수정란에 사람의 락토페린 유전자를 주입한 후 락토페린 mRNA의 발현을 RT-PCR로 확인

Primer	Base pair	Sequences
hLF-1F	202bp	ATGAAACTTGTCTTCCTCGTCCTG
hLF-2F	511bp	CAGCCACGAACTCACTATTATGCC
hLF-1R	453bp	ATGAAACCACCATCAAGGGTCCAC
hLF-2R	1040bp	CTTCGTGCCACAACGGCATGAG
GFP-1F	2393bp	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
GFP-2F	2750bp	TGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG
GFP-1R	2603bp	ACTGCACGCCGTAGGTCAGG
GFP-2R	3113bp	CAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGA

표1. 사람 락토페린과 GFP mRNA 발현 확인을 위한 Primers

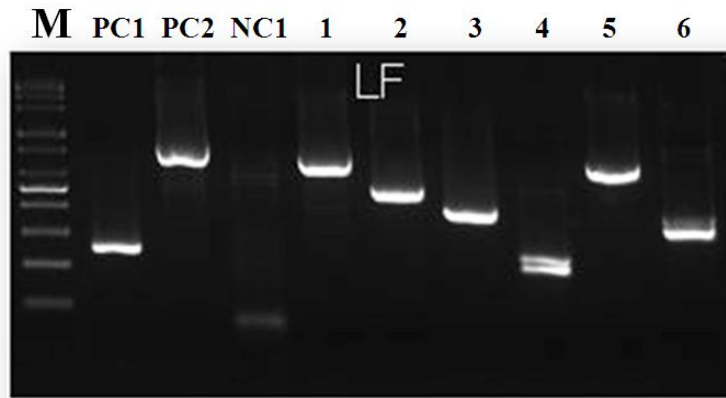


그림 16. 사람의 락토페린 유전자를 주입한 제브라피쉬 mRNA를 이용한 RT-PCR
(PC1: 락토페린 양성 DNA, PC2: GFP 양성 DNA)

1. hLF-1F + hLF-1R
2. hLF-1F + hLF-2R
3. hLF-2F + hLF-2R
4. GFP 1F + GFP 1R
5. GFP 1F + GFP 2R
6. GFP 2F + GFP 2R

나. 제브라피쉬의 수정란에 사람의 락토페린 유전자를 주입한 후 GFP 발현 확인
 벡터를 주입한 수정란은 몸체가 투명함을 유지하는 7일령까지 UV-lamp 하에서 GFP 발현을 확인하였다.

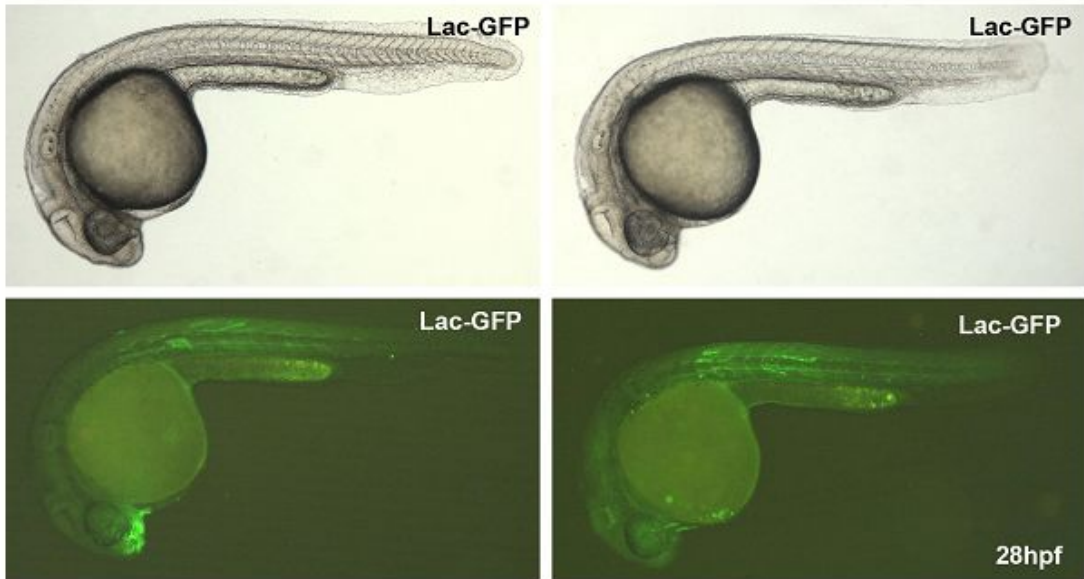


그림 17. 28 hpf (hour post fertilization:수정후 28시간 후 Embryo) 제브라피쉬 치어에서 Lac+GFP벡터를 주입한 후 형광발현모습

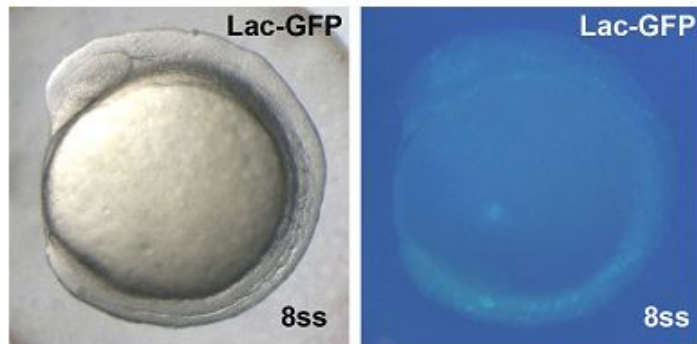


그림 18. 8 somite stage의 제브라피쉬 Embryo에서 Lac+GFP벡터를 주입한 후 형광발현모습

다. 항체 제작 및 ELISA

자체 개발 kit는 검체를 희석된 conjugate와 1:1로 혼합하여 37°C 90분, 상온에서 15분 반응시킨 후 발색하여 파장값을 reading (표 2) 하여 Purified Lactoferrin의 값과 비교하여 Lactoferrin의 양을 추정하였다. Lactoferrin을 단독 발현시킨 치어와 Lactoferrin과 GFP fusion protein form의 파장값을 보았을 때 Lactoferrin만 단독 발현시킨 치어에서만 lactoferrin이 64ng/ml정도 발현되고 있음을 추정할 수 있었다..

항체를 제작하기 위하여 항원은 Sigma-Aldrich社의 Lactoferrin(Cat. No. L0520)을 구매하여 사용하였다. 이를 BalB/C mouse에 immunization하고 SP2/0에 fusion하여 ELISA를 통하여 Positive well을 selection하였다. 이렇게 선별된 항체 중 12가지를 matching test를 통하여 Lactoferrin ELISA kit를 개발하였고 “BIOXYT ECH Lactof EIA(Oxis Research社)”와 비교 시험하였다. Transfection된 치어는 homogenizer로 유제하여 10% 유제액을 만들어 1%, 2.5%로 희석하여 ELISA와 Immunostaining에 사용하였다.

Sample	OxisResearch O.D	Sample	자체개발 kit O.D
100 ng/ml	1.865	NC	0.098
50 ng/ml	1.398	PC, 64ng/ml	2.644
25 ng/ml	0.951	PC, 32ng/ml	1.573
12.5 ng/ml	0.612	PC, 16ng/ml	0.805
6.2 ng/ml	0.439	PC, 8ng/ml	0.481
3.1 ng/ml	0.319	PC, 4ng/ml	0.297
1.6 ng/ml	0.249	PC, 2ng/ml	0.204
blank	0.161	PC, 1ng/ml	0.169
Control	0.205	Control	0.105
	0.198		0.081
LTF	0.317	LTF	2.457
	0.318		2.492
LTF/GFP	0.198	LTF/GFP	0.158
	0.190		0.168
blank	0.196	blank	0.103
	0.174		0.175

표 2. 형질전환 제브라피쉬 치어를 이용한 ELISA raw data

라. 사람의 락토페린 유전자를 주입한 후 사람의 락토페린 항체를 이용한 Immunostaining

Immunostaining 을 통해 단백질 발현을 확인하였다. 치어를 이용하여 락토페린에 특이적인 항체를 사용하여 면역염색을 실시하고, 실제로 어느 조직에서 어떠한 양상으로 락토페린을 발현하는지에 대한 데이터를 수집하였다.

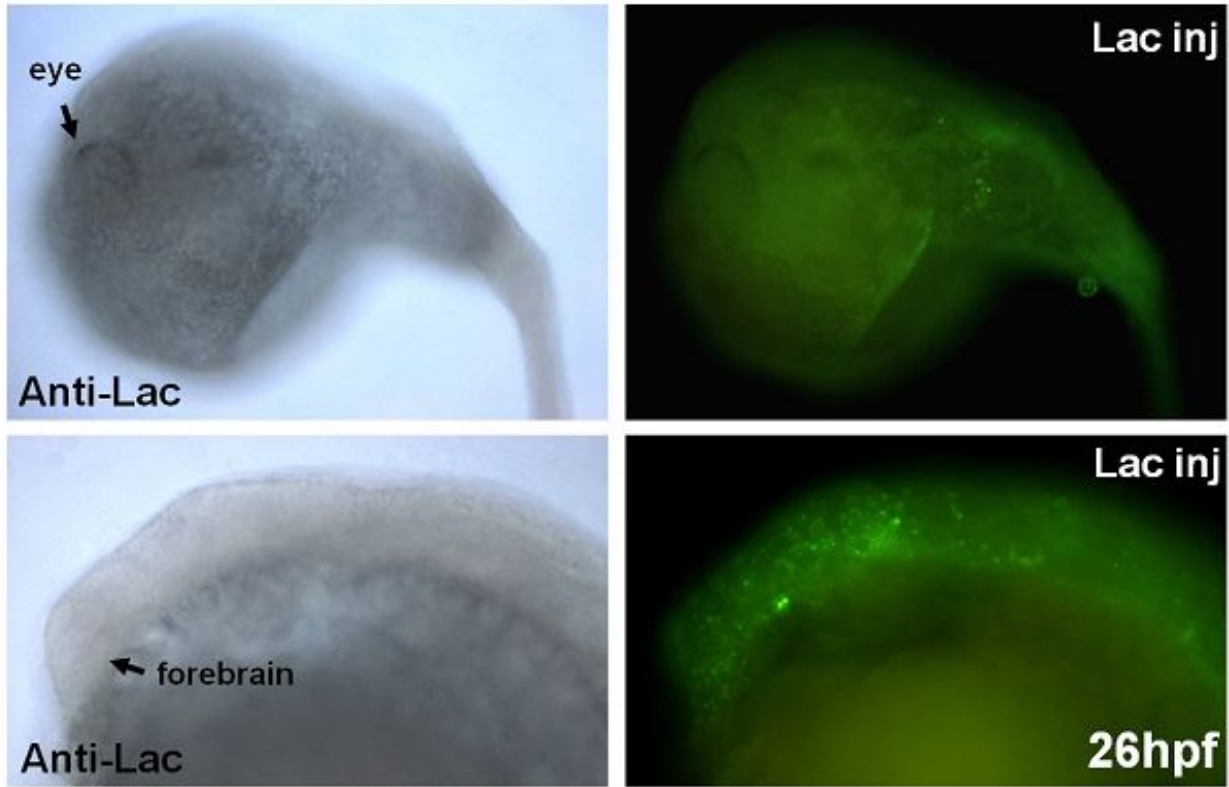


그림 20. 26 hpf (hour post fertilization:수정후 26시간 후 치어) 제브라피쉬 치어에서 사람의 락토페린 유전자 발현 백터를 주입한 후 FITC 발현 모습 (Immunostaining)

9. Transgenic zebrafish F0, F1에서의 lactoferrin 발현 확인

Muscle Promoter인 MLC#2를 이용한 Lactoferrin 발현은 ELISA와 genotyping을 통하여 확인하였다. ELISA kit는 (주)바이오노트(협동연구기관)에서 개발한 monoclonal antibody를 사용하여 개발하였다. 서울대학교로부터 입수한 Human Lactoferrin(Sigma)을 번역하여 제작한 monoclonal antibody 중 2E6과 1F12를 선별하여 각각 capture와 detector 사용하였다.

pMDS6/MLC#2-lactoferrin은 injection을 2회에 걸쳐 진행하였다. Injection시 DNA의 농도를 달리하여 그에 따른 lactoferrin 발현양에 대한 영향을 살펴보았다. F0의 경우 입고된 치어를 각 3일령, 7일령에서 sampling하였다. Sampling은 치어를 saline으로 3회 세척 후 이를 eppendorf tube에 담아 ice에 정치하였다. 치어가 tube 내에서 cold shock으로 밑부분에 가라앉는 것을 확인한 후 sup을 Micropipette으로 최대한 제거하였다. Sampling이 완료된 zebrafish는 바로 PBS에 유제하여 사용하거나, -70°C에 보관한 후 실험시 유제하여 사용하였다.

F0에서의 lactoferrin 발현 유무는 2007년 12월 6일 제조된 plate를 사용하였다. Capture antibody로는 자사에서 개발한 Monoclonal antibody인 2E6을 8 μ g/ml로 사용하고, 검체는 PBS(without Sodium azide)에 최종 농도가 0.5%가 되도록 희석하였고, 양성대조액인 Pure Lactoferrin 역시 64ng/ml부터 2배씩 희석하여 1 ng/ml까지 PBS(without Sodium azide)에 희석하여 사용하였다.

희석된 검체와 희석된 양성대조액은 각 50 μ l를 well별로 넣은 후 101x conjugate를 conjugate 희석액에 1x로 희석하여 50 μ l를 첨가한 뒤 37°C에서 90분간 incubation시켰다. Incubation 후 10x Washing solution을 증류수에 1x가 되도록 희석한 후 세척기로 6회 세척하고 well에 남아있는 세척액을 털어낸 후 기질액 A와 B를 1:1로 희석하여 100 μ l를 넣고 상온, 암처에서 15분간 반응시켰다. 반응이 끝난 plate는 반응정지액을 100 μ l 첨가하여 ELISA reader로 450nm에서 흡광도값을 reading하였다. ELISA reader를 통하여 수치화된 흡광도 값은 희석된 양성대조액을 기준으로 zebrafish의 lactoferrin 발현양을 산정하였다.

F0에서 발현이 확인된 zebrafish는 wild type과의 교배를 통하여 F1의 Lactoferrin expression line을 제작하였다. 제작된 germ line은 (주)바이오노트에서 제조된 Lot No. T8001의 kit를 사용하여 lactoferrin 발현 유무를 검증하였다. 이는 Capture antibody로 기존의 2E6을 subcloning하여 선별한 2E6-3C3을 2 μ g/ml로 사용하였으며, 반응시간과 조건은 F0에서와 동일한 방법으로 실험하였다.

Founder (F0)에서의 lactoferrin 발현 확인: Cloning한 plasmid를 injection 한 zebrafish의 치어는 3일령과 7일령을 samplings 하여 바이오노트(협동연구기관)에서 개발한 ELISA kit로 lactoferrin 발현 유무를 검증하였다.

pMDS6/MLC#2-Lactoferrin은 reporter gene인 EGFP가 있지 않아, Lactoferrin의 발현 유무를 ELISA kit로만 검증하였다. 2008년 6월 21일과 25일에 입수된 3일령/7일령 lactoferrin injected zebrafish는 ELISA kit로 검증 결과 0.5% 유제액을 기준으로 3일령에서 약 80ng/ml, 7일령에서 40 ng/ml이 발현됨을 확인하였다(표 3A). 이는 3일령에서 16 μ g/g, 7일령에서 8 μ g/g의 양이 발현되고 있는 것으로 사료된다. 이 발현양은 매우 적은 양으로 발현양을 늘리기 위해 zebrafish에 injection 양을 늘린 후 동일한 방법으로 검증하여

보았다(표 1B). ELISA 결과 0.5% 유제액을 기준으로 3일령에서 64ng/ml, 7일령에서 4 ng/ml의 수준으로 발현되어 zebrafish에서는 12.8 μ g/g, 0.8 μ g/g이 발현되는 것으로 기존의 치어와 대비하였을 때 발현양이 늘어나지 않는 것으로 확인되었다.

A>

<>	1		2		3	
A	0.0920	Negative	0.0850	Control 3일차	0.1090	Control 7일차
B	2.2490	Std 64ng/ml	0.0820		0.0950	
C	1.2710	Std 32ng/ml	0.0740		0.0940	
D	0.6160	Std 16ng/ml	2.9850	Injection 3일차	1.5250	Injection 7일차
E	0.2890	Std 8ng/ml	2.9420		1.4300	
F	0.1680	Std 4ng/ml	2.8820		1.6230	
G	0.1110	Std 2ng/ml	0.0850	PBS	0.0060	접합체 희석액
H	0.1230	Std 1ng/ml	0.0920	Negative	0.0890	Negative

B>

<>	1		2	
A	0.1310	Negative	2.9610	Injection 3일차
B	3.0390	Std 64ng/ml	2.9670	
C	3.0290	Std 32ng/ml	0.3250	Injection 7일차
D	2.9590	Std 16ng/ml	0.3230	
E	2.5790	Std 8ng/ml	0.1530	Control 7일차
F	1.4220	Std 4ng/ml	0.1470	
G	0.8540	Std 2ng/ml	0.1450	PBS
H	0.4160	Std 1ng/ml	-0.0030	접합체 희석액

표 3. ELISA test of pMDS6/MLC#2-Lactoferrin injected zebrafish.

F1에서의 lactoferrin 발현 확인: 수집한 F1의 치어들은 먼저 genotyping 으로서 유전자 삽입을 확인하였고 (표 4), GFP-lactoferrin fusion protein 인 경우는 EGFP 형광으로 발현을 확인하였다.

<>	1	2		3	4	5	
A	1.7040	1.7530	양성대조액(64ng/ml)	3.3490	3.3700	3.2350	기존 3일차
B	0.7450	0.7720	양성대조액(32ng/ml)	0.1630	0.1710	0.1700	기존 7일차
C	0.2710	0.2660	양성대조액(16ng/ml)	0.2310	0.2430	0.2330	1월20일생-Group1(3일차)
D	0.1130	0.1110	양성대조액(8ng/ml)	0.0470	0.0480	0.0530	1월20일생-Group2(3일차)
E	0.0790	0.0690	양성대조액(4ng/ml)	0.0470	0.0570	0.0510	New Negative
F	0.0590	0.0600	양성대조액(2ng/ml)	0.0600	0.0590	0.0150	PBS & conjugate 희석액
G	0.0570	0.1370	양성대조액(1ng/ml)	1.9500	2.1890	1.9270	기존 64ng/ml
H	0.0590	0.0570	Negative(기존 control)	0.9040	1.0070	0.8210	기존 32ng/ml

표 4. ELISA test of pMDS6/MLC#2-Lactoferrin F1 zebrafish(1st group).



그림 21. Genotyping results that amplified lactoferrin 1741~1924 sequences.
DNA sample from number 7 F1 embryos shows positive band.



그림 22. Genotyping result that amplified lactoferrin 1741~1924 sequences.
DNA sample from number 4, 5, 6, 8, 13, 7' F2 embryos shows positive band.

ELISA 및 EGFP 형광으로 발현을 확인한 zebrafish는 wild type과 mating을 통하여 germ line을 형성하였다. Germ line의 형성 여부는 F0에서와 동일한 ELISA test method로 검증하였다. 1차로 서울대학교에서 genotyping으로 검증된 F1을 입수하여 sampling 후 0.5% 유제액으로 test하였다(그림 21). 2009년 1월 20일생 은3일령을 입수 하여 sampling한 후 Lot. No. T8001 kit를 사용하여 검증하였다. Group1과 Group2 두 가지를 2008년 7월 11일과 15일에 입수한 F0와 함께 test 하였다. Test 결과 두 group 중 Group1에서만 lactoferrin이 0.5% 유제액에서 약 16ng/ml, 즉 zebrafish에서 3.2 μg/g의 수준으로 발현되고 있음을 확인하였다. 그림 21에서 positive band가 뜬 zebrafish에서 embryo를 받아 기른 뒤에 또다시 메이팅을 통하여 embryo를 수거하여 PCR을 실시한 결과 그 중 6마리에서 positive band를 확인하였다.

10. 재조합 제브라피쉬 락토페린의 분말에 대한 성분 조성 및 특성 분석

가. 제브라 피쉬의 분말 사료화 공정

성어로 자란 제브라 피쉬를 막자사발을 이용하여 샘플 1g에 증류수 1ml을 넣어 주면서 유제하였다. 유제된 샘플은 동결건조를 하기 위해 안정제로 casein을 final 0.1% 첨가하여 고루 섞어 주었다. 유제가 완료된 샘플은 진공동결건조기(Ilshin, PVTFD50A, Korea)를 이용하여 동결건조를 진행하였다.



그림 23. 진공동결건조기

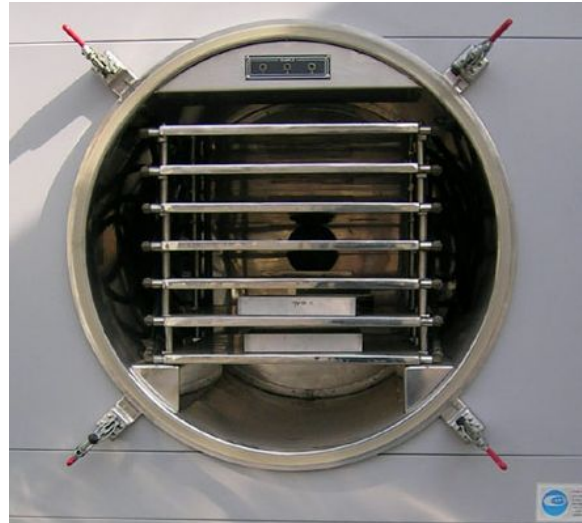


그림 24. 진공동결건조기의 내부 선반

먼저 유제된 샘플을 진공동결건조기의 내부 선반에 부어 표면적을 넓혔다. 표면적을 넓힘으로써 샘플의 두께를 얇게 만들어 건조 시간을 단축하고 효율을 올릴 수 있다. 샘플이 들어 있는 선반을 예비동결고에 넣어 -40°C 의 조건으로 6시간동안 동결시켰다. 예비 동결이 완료되면 선반을 진공동결건조기에 위치하여 내부압력을 물의 3중점 이하로 내리고, 온도를 -20°C 로 유지하며 샘플내부의 얼음이 기체로 승화되도록 유도하였다. 1차로 10시간 동안 건조를 마친 뒤 다시 30°C 로 내부 온도를 올려 3시간 동안 내부 수분을 완전히 제거 하였다.

건조를 마친 샘플은 작은 힘에도 쉽게 부서지는 형태로 남아 있게 되는데 이것을 mill 분쇄기를 이용하여 200메쉬의 고운 분말 형태로 만들었다. 만들어진 분말에 이산화규소 뭉침 방지제를 1% 첨가하여 분말이 흡습하여 뭉치는 현상을 방지하였다.



그림 25. 완성된 제브라피쉬 분말 사료 첨가제

뭉침방지제까지 첨가된 제브라피쉬 분말은 알루미늄 파우치에 담아 sealling 함으로써 습기를 차단하였다. 이렇게 만들어진 제브라피쉬 분말의 사료 첨가제를 한국사료협회의 사료기술연구소에 의뢰하여 성분을 분석하였다. 제브라피쉬 분말 사료 첨가제의 성분은 표 5과 같았다.

	제브라피쉬 분말	시험기관
수분	1.4%	사료기술연구소
조단백	48.6%	사료기술연구소
조지방	35.2%	사료기술연구소
조섬유	1.1%	사료기술연구소
조회분	4.4%	사료기술연구소

표 5. 제브라 피쉬 분말 사료첨가제의 영양성분

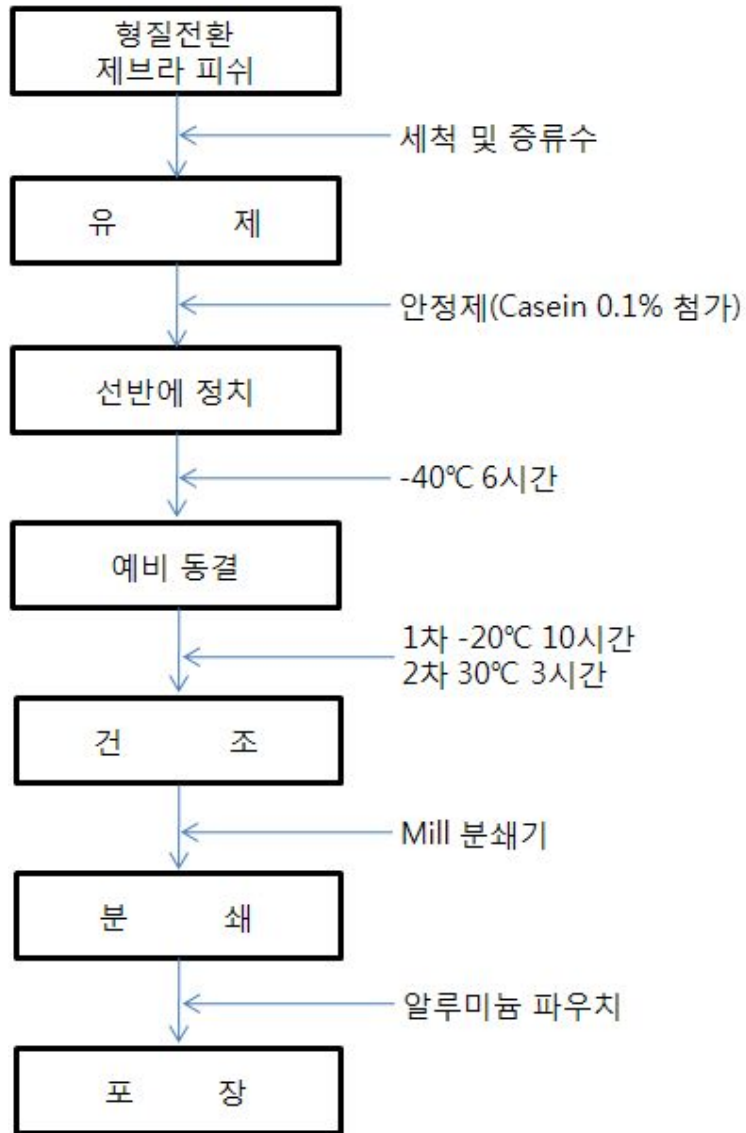


그림 26. 락토페린 발현 제브라 피쉬의 사료화 공정 요약도

11. 재조합 제브라피쉬 락토페린의 3차원적 구조 규명 (아미노산 염기 구조 분석)

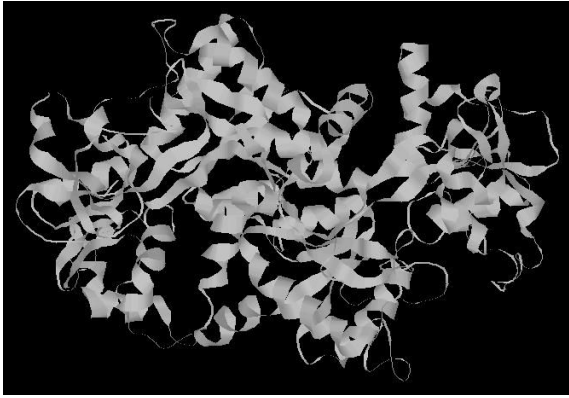


그림 27. N-lobe과 C-lobe의 리본 구조 (1)

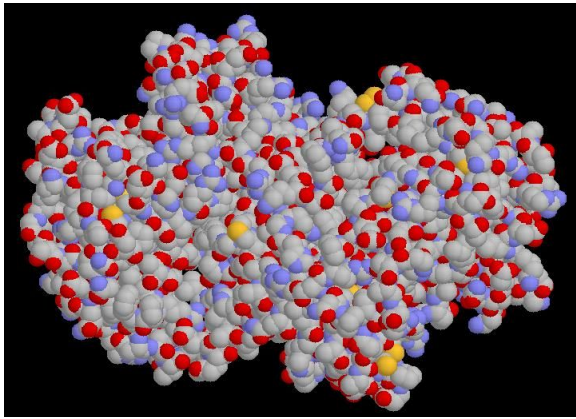


그림 28. N-lobe과 C-lobe의 Spacefill 구조 (2)

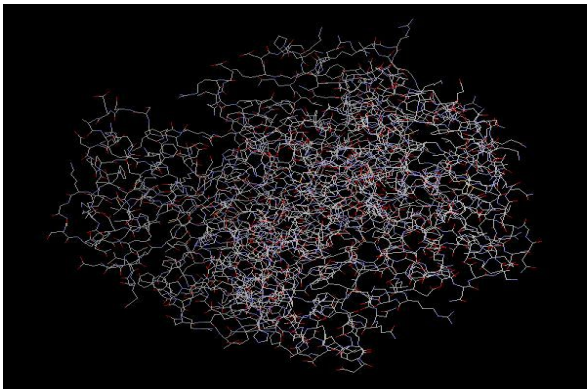


그림 29. N-lobe과 C-lobe의 wireframe 구조 (3)

12. 항생효과 검증 실험 (*In vitro*)

대상 균주의 시간에 따른 OD 값 변화는 표 6과 같다.

Time	Escherichia coli	Staphylococcus aureus ATCC 25923	Salmonella typhimurium ATCC 13311
45분	0.008	0.020	0.030
1시간 45분	0.044	0.184	0.118
2시간 15분	×	0.342	0.226
2시간 30분	×		0.292
2시간 45분	0.132	0.916	0.886
3시간 15분	0.336		
3시간 35분	0.416		
3시간 57분	0.532		
4시간 12분	0.796		

표 6. 시간별 박테리아 OD 600

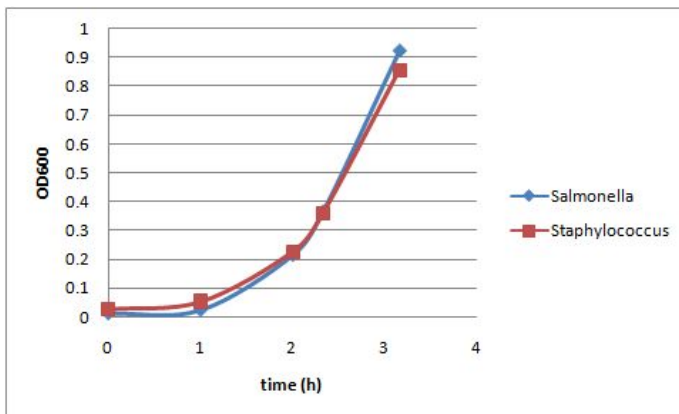


그림 30 Time-response OD 600 curve of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*

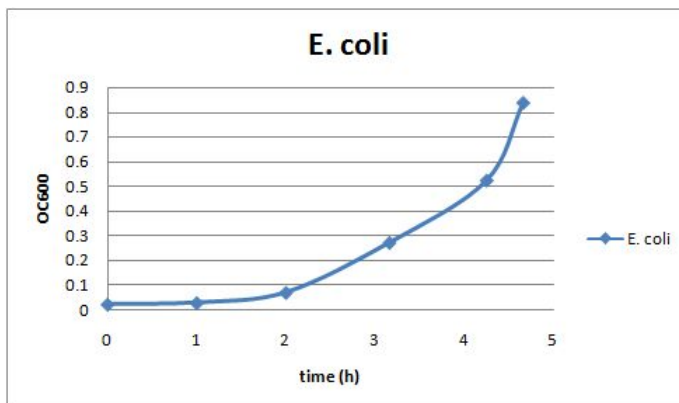


그림 31. Time-response OD 600 curve of *E. coli*

Ampicillin을 양성 대조군으로 하여 각각의 균주에 대한 dose-response curve를 그리면 아래 그림과 같고 (그림32~33), 시판되는 사람 락토페린의 항생효과도 대조군으로서 다음과 같은 그래프를 나타내었다 (그림34~36). 잘 알려진 바와 같이 사람의 락토페린은 농도 의존적으로 각 균주에 대한 성장 억제 효과를 나타내었다. 연구에서 형질전환 제브라피쉬로부터 분리한 정제 락토페린도 예상대로 각 균주에 대한 성장 억제 효과를 보여주었다 (그림 37~38).

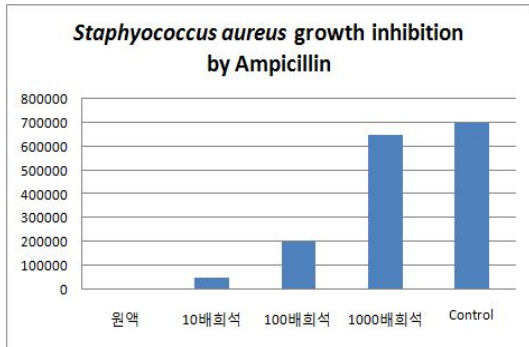


그림 32. *Staphylococcus aureus* dose-response curve by Ampicillin

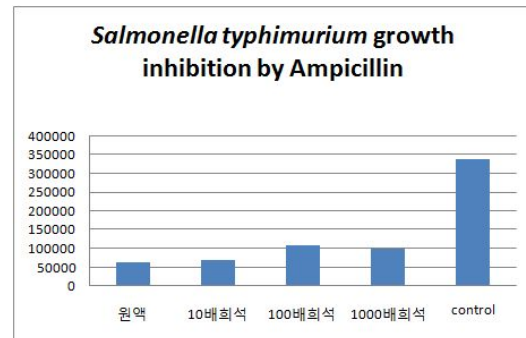


그림 33. *Salmonella typhimurium* dose-response curve by Ampicillin

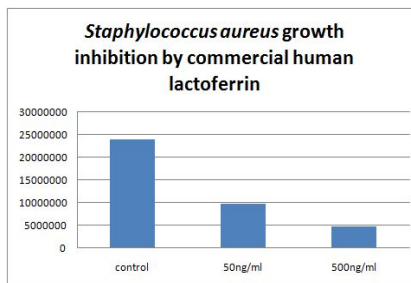


그림 34. *Staphylococcus aureus* dose-response curve by commercial human lactoferrin.

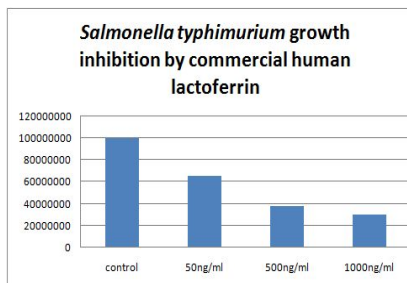


그림 35. *Salmonella typhimurium* dose-response curve by commercial human lactoferrin

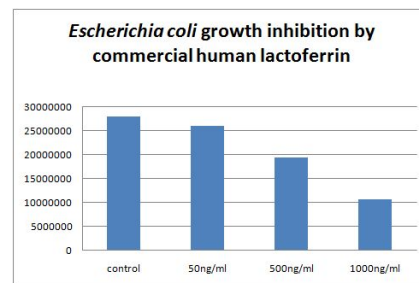


그림 36. *Escherichia coli* dose-response curve by commercial human lactoferrin

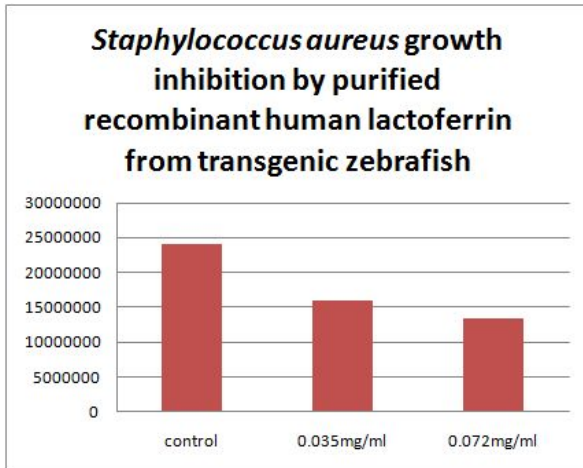


그림 37. *Staphylococcus aureus* dose-response curve by purified recombinant human lactoferrin.

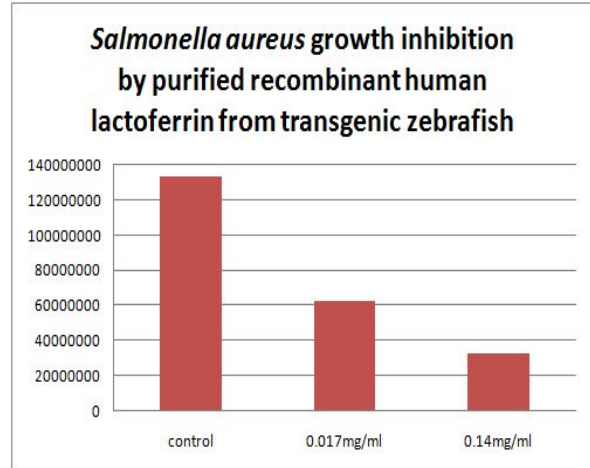


그림 38. *Salmonella typhimurium* dose-response curve by purified recombinant human lactoferrin.

13. 항생효과 검증 실험 (In vivo)

가. 마우스 항생효과 검증 실험

각각에 해당하는 물질을 투여하기 전 측정된 체중에서, 4일간 물질을 투여하고, 그 중 2일째에 *salmonella typhimurium*을 감염시킨 후 5일째 희생시켰을 때 체중을 빼서 줄어든 체중의 변화량을 측정하였을 때 다음과 같은 그래프(그림 39)를 도출해낼 수 있다. Commercial lactoferrin에서 가장 변화량이 적은 것을 확인할 수 있었지만 유의적인 차이는 보이지 않았다.

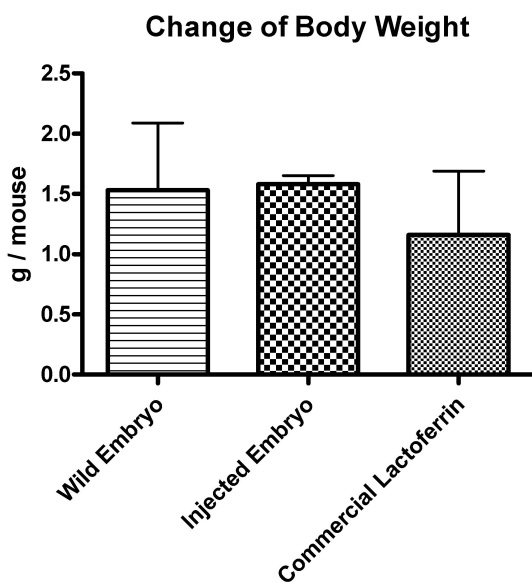


그림 39. Change of body weight of mice.

희생시킨 마우스의 간, 비장, 공장에서 salmonella typhimurium의 CFU를 측정한 결과는 다음 (그림 40~42)과 같다. 간과 비장에서 wild embryo보다 통계학적으로 유의적인 차이를 보이며 줄어든 CFU를 관찰할 수 있었다.

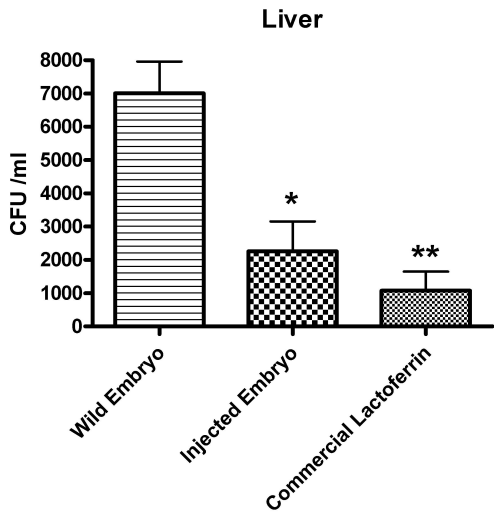


그림 40. CFU of salmonella typhimurium in mouse liver.

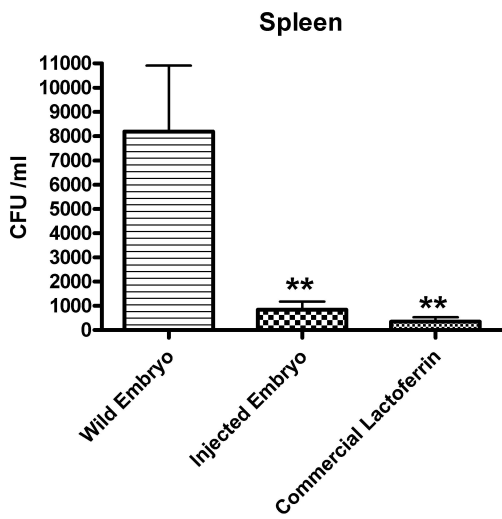


그림 41. CFU of salmonella typhimurium in mouse spleen.

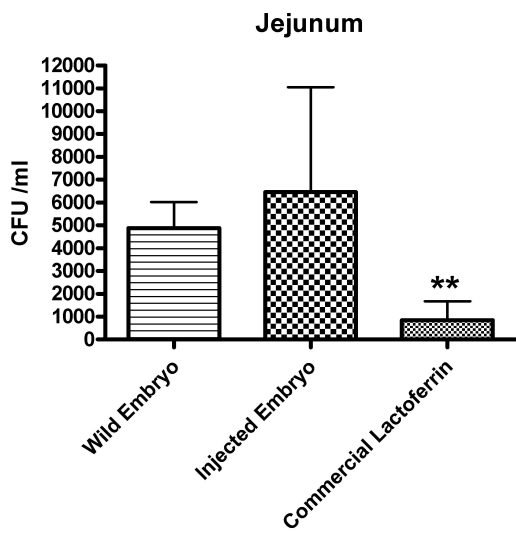
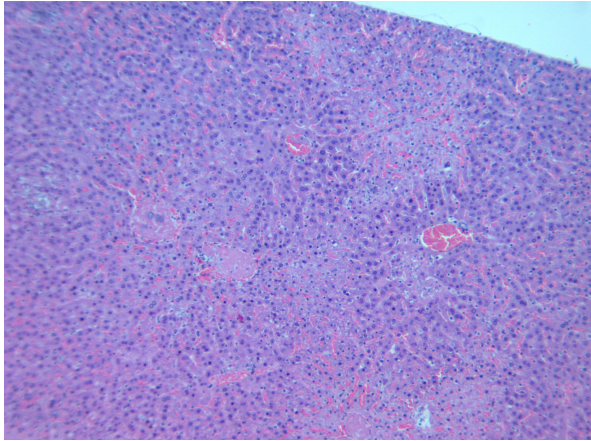


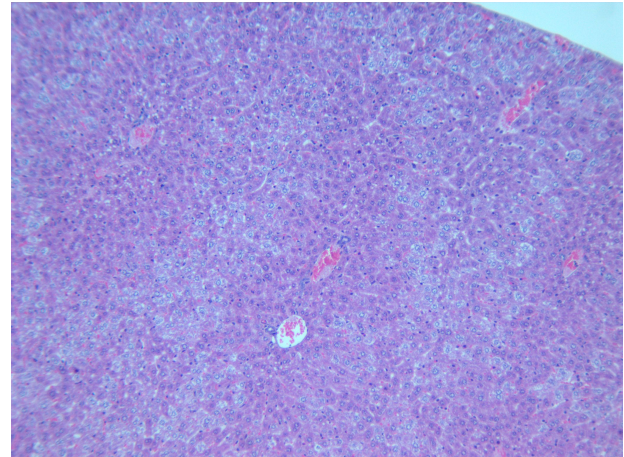
그림 42. CFU of salmonella typhimurium in mouse jejunum.

간 조직을 H&E 염색하여 관찰한 대표사진은 그림 43과 같다. 모든 사진의 배율은 200배이다. 또한 이 조직들의 상태를 scoring한 결과는 그림 44과 같으며, wild embryo와 비교했을 때 injected embryo 군에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

(A) Wild Embryo



(B) Injected Embryo



(C) Commercial Lactoferrin

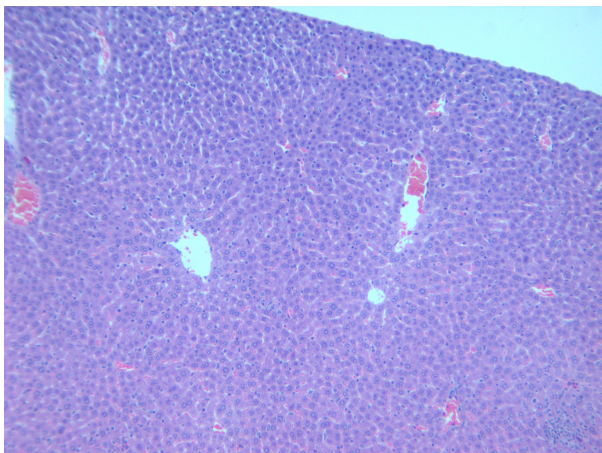


그림 43. Liver of mice.
H&E Staining. x200.

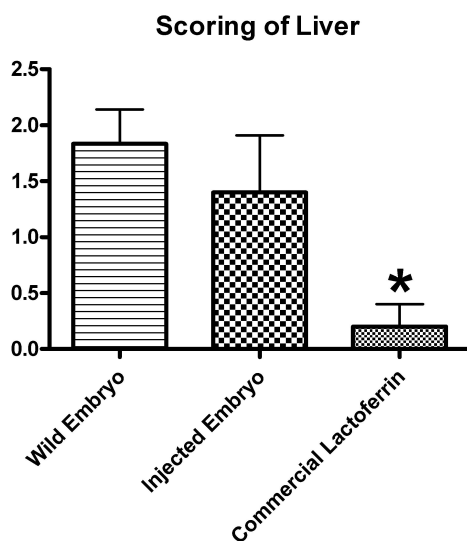
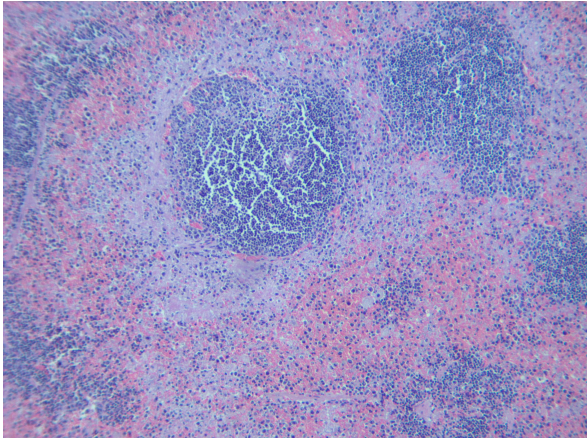


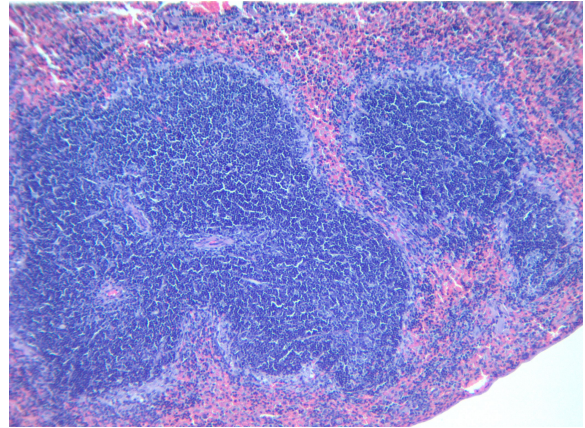
그림 44. Scoring of liver damage.
(Scoring point :
no damage (0),
mild damage (1),
moderate damage (2),
severe damage (3))

비장 조직을 H&E 염색하여 관찰한 대표사진은 그림 45과 같다. 모든 사진의 배율은 200배이다. 또한 이 조직들의 상태를 scoring한 결과는 그림 46과 같으며, wild embryo와 비교했을 때 injected embryo 군에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

(A) Wild Embryo



(B) Injected Embryo



(C) Commercial Lactoferrin

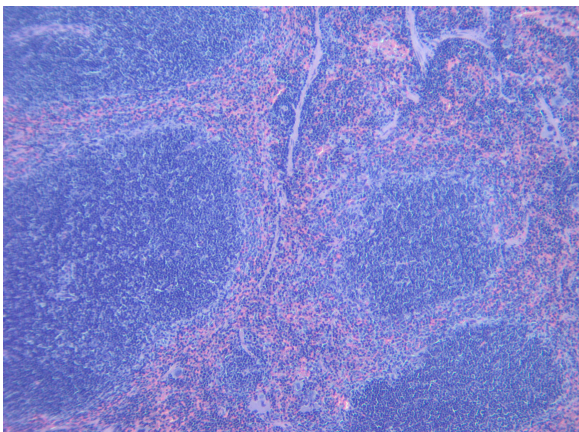


그림 45. Spleen of mice.
H&E Staining. x200.

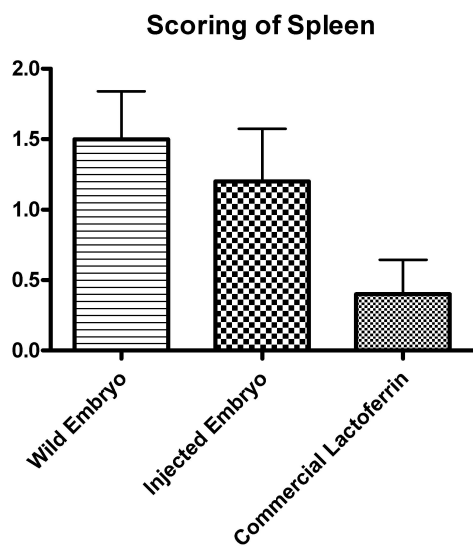
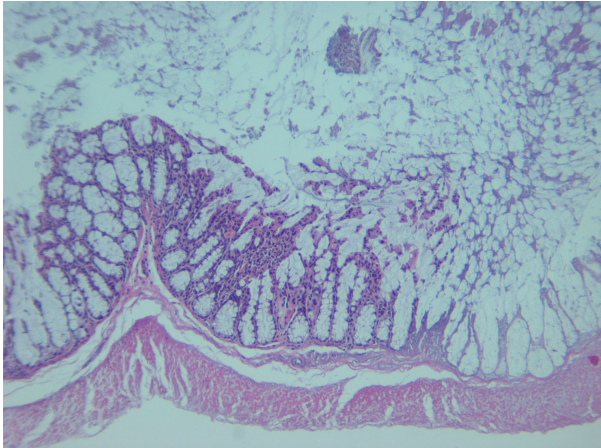


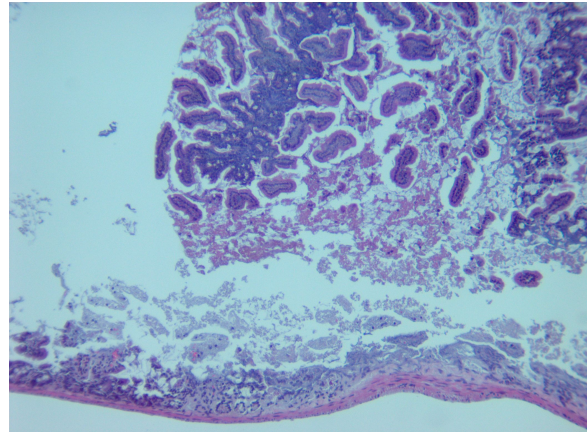
그림 46. Scoring of spleen damage.
(Scoring point :
no damage (0),
mild damage (1),
moderate damage (2),
severe damage (3))

공장 조직을 H&E 염색하여 관찰한 대표사진은 그림 47와 같다. 모든 사진의 배율은 200배이다. 또한 이 조직들의 상태를 scoring한 결과는 그림 48과 같으며, wild embryo와 비교했을 때 injected embryo 군에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

(A) Wild Embryo



(B) Injected Embryo



(C) Commercial Lactoferrin

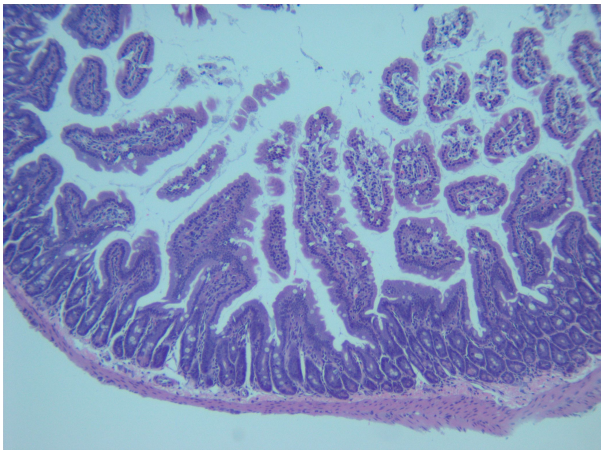


그림 47. Jejunum of mice.
H&E Staining. x200.

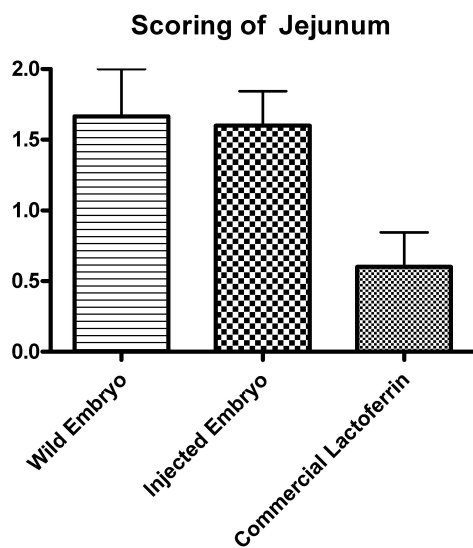


그림 48. Scoring of Jejunum damage.
(Scoring point :
no damage (0),
mild damage (1),
moderate damage (2),
severe damage (3))

14. 락토페린 발현 제브라피쉬의 사료첨가제 제조 및 사료의 효능 실험

가. 락토페린 발현 제브라피쉬의 사료첨가제 제조

락토페린을 첨가한 사료첨가제의 효능을 확인하기 위해 락토페린을 발현하는 제브라피쉬로 사료첨가제를 제조하였다. 사료첨가제는 옥수수 전분에 제브라피쉬를 유제하여 첨가하여 제조하였다. 실험을 위해 실험군은 4가지로 나눠 진행하였다. 실험군은 일반사료투여군, 일반사료에 제브라피쉬 발현 Lactoferrin 사료첨가제 투여군, 일반사료에 시중에 판매중인 인간 락토페린(Sigma, Cat. No. L0520) 투여군, 그리고 일반사료에 Lactoferrin을 발현하지 않는 제브라피쉬 투여군으로 나누어 진행하였다. 유제한 제브라피쉬는 ELISA test로 발현 유무 및 발현양을 검증한 결과 2 μ g/ml로 조사되었다(표 7).

<>	1		2		3		4	
A	양성대조액 64ng/ml	1.9330	양성대조액 4ng/ml	0.0530	돼지 1. 0.5% 유제 100907.(2일령) pMDS6 MLC#2 LTF	3.3790	Normal Zebrafish 0.5% 유제	0.0010
B		1.8350		0.0490		3.3510		0.0030
C	양성대조액 32ng/ml	0.8980	양성대조액 2ng/ml	0.0170	돼지 2. 0.5% 유제 100907.(2일령) pMDS6 MLC#2 LTF	2.8330	Conjugate 희석액	0.0030
D		0.9150		0.0160		2.6260		0.0030
E	양성대조액 16ng/ml	0.3310	양성대조액 1ng/ml	0.0070	돼지 3. 0.5% 유제 100910.(3일령) pMDS6 MLC#2 LTF	3.1370		0.0040
F		0.3320		0.0070		3.0150		0.0050
G	양성대조액 8ng/ml	0.1290	PBS (w/o NaN ₃)	0.0010	돼지 4. 0.5% 유제 100910.(2일령) pMDS6 MLC#2 LTF	2.9640	PBS (w/o NaN ₃)	0.0030
H		0.1230		0.0020		2.9520		0.0010

표 7. 유제한 제브라피쉬의 락토페린 발현양

발현이 확인된 제브라피쉬와 일반 제브라피쉬는 갈아 분쇄한 후 이를 35 $^{\circ}$ C, 상대습도 5% 이하인 건조챔버에서 12시간 건조하였다(그림 49). 건조된 제브라피쉬는 다시 갈아서 분말로 만들고(그림 50), 이 분말을 옥수수전분과 뭉침방지제(SiO₂)를 최종 1%가 되도록 첨가하여 혼합하였다(그림 51, 52). 각 실험군당 1kg의 사료첨가제(락토페린 함량: 1 μ g/kg)를 제조하고 이는 20일간 사용된 사료에 2.5%(사료 20kg당 사료첨가제 500g)로 혼합하여 사료로 사용하였다.



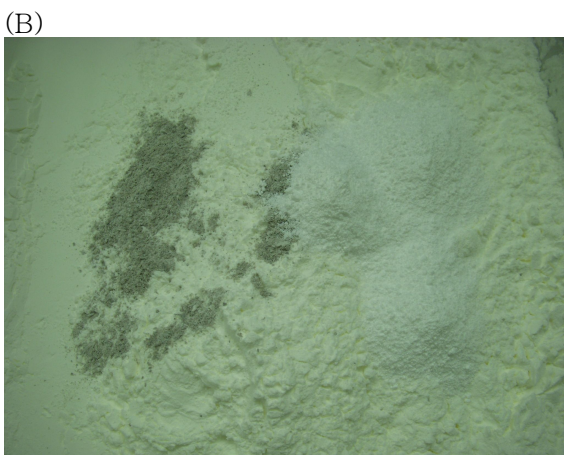
그림 49. 분쇄 후 건조된 제브라피쉬



그림 50. 건조 후 재분쇄한 제브라피쉬 분말



그림 51. 옥수수전분과 몽침방지제, 건조된 제브라피쉬 분말의 혼합 전 모습



(A)옥수수전분과 건조 제브라피쉬 분말
(B)옥수수전분과 건조 제브라피쉬 분말 (회색분말), 몽침방지제(흰색분말, SiO₂)



그림 52. 완성된 사료첨가제

나. 산업동물 사료첨가제 실험

사료첨가제 실험을 위한 산업동물은 돼지를 사용하였다. 실험군은 총 4개 군으로, 일반사료와 옥수수전분 투여군, 일반사료와 제브라피쉬 락토페린 투여군, 일반사료와 인간 락토페린 투여군, 그리고 일반사료와 재조합되지 않은 제브라피쉬 투여군으로 구성하였다. 실험에 투입된 돼지는 생후 3~4주된 평균 26일령인 이유자돈(평균 7.8kg)을 사용하였다. 실험은 각 군당 4마리로, 총 16마리로 실험을 진행하였다.

사료첨가제는 총 20일간 투여하였다. 사료 20kg당 준비된 사료첨가제 500g을 혼합하여 각 군 별로 투여하였다. 사료첨가제의 효능은 증체량과 설사빈도를 측정하였다. 증체량은 개시체중과 종료체중을 측정하였고, 각 군당 사료 투여량을 계산하여 사료 효율 또한 산정하였다.

또한 면역력 증강은 투여 후 10일차와 20일차에 채혈하여 Immunoglobulin과 Interleukin을 측정 하였다. Immunoglobulin은 IgG, IgA, IgM을 시중에 판매되는 ELISA kit를 구매하여 측정으며, Interleukin은 T-cell growth factor인 IL-2에 대한 ELISA kit를 구매하여 측정하였다. 각 과정은 kit에서 권장하는 방법으로 진행하였다.

각 실험군에서는 이유 초기에 설사가 발생하여 10일간 지속되었다. 각 실험군의 설사 양상은 유사하였으나, 일반사료와 제브라피쉬 락토페린 투여군이 상대적으로 약간 양호함을 나타냈다(표 8).

또한, 증체율은 전체적으로 설사로 인해 증체가 다소 저조하였으나, 설사가 양호하였던 제브라 피쉬 락토페린 투여군의 증체량과 사료효율이 가장 양호하였으며, 일반사료와 옥수수전분 투여 군에서 증체량과 사료효율이 가장 낮음을 나타냈다(표 9, 그림53).

Date	일반사료/ 옥수수전분 투여군			일반사료/ 제브라피쉬 락토페린 투여군			일반사료/ 인간 락토페린 투여군			일반사료/ 일반 제브라피쉬 투여군		
	Diarrhea		Feed	Diarrhea		Feed	Diarrhea		Feed	Diarrhea		Feed
	Head	Grade		Head	Grade		Head	Grade		Head	Grade	
09월 30일			20			20			20			20
10월 01일	1, 2, 3, 4	2		1, 2, 3, 4	2		1, 2, 3, 4	2		1, 2, 3, 4	2	
10월 02일	1, 2, 3, 4	2		1, 2, 3, 4	2		1, 2, 3, 4	2		1, 2, 3, 4	2	
10월 03일	1, 2, 3, 4	2		1, 2, 3, 4	2		1, 2, 3, 4	2		1, 2, 3, 4	2	
10월 04일	1, 2, 3, 4	2		1, 2, 3, 4	2		1, 2, 3, 4	2		1, 2, 3, 4	2	
10월 05일	1, 2, 3, 4	2	5	1, 2, 3, 4	2	5	1, 2, 3, 4	2	5	1, 2, 3, 4	2	5
10월 06일	1, 2, 3, 4	2		1, 2, 3, 4	2		1, 2, 3, 4	2		1, 2, 3, 4	2	
10월 07일	1, 2, 3, 4	2		1, 2, 3, 4	2		1, 2, 3, 4	2		1, 2, 3, 4	2	
10월 08일	1, 2, 3, 4	2		1, 2, 3	1		1, 2, 3, 4	2		1, 2, 3, 4	2	
10월 09일	1, 2, 3, 4	2		1, 2, 3	1		1, 2, 3, 4	1		1, 2, 3, 4	1	
10월 10일	1, 2, 4	1		3	1		2, 3	1		4	1	
10월 11일	1, 4	1					2	1		4	1	
10월 12일							2	1		4	1	
10월 13일												
10월 14일									-3.3			-4.6
10월 15일			15			15			15			15
10월 16일												
10월 17일	4	1										
10월 18일												
10월 19일			-7.7			-5.5			-7.6			-6.5

표 8. 사료첨가제 투여 실험군별 설사 빈도

Group	ID	Initial Wt	Final Wt	Weight Gain	ADG (일당 증체량)	FI (Feed Intake)	FCR (사료효율, feed conversion rate)
Group 1. 일반사료/ 옥수수전분 투여군	1-1	8.2	13.3	5.1	0.268421053		
	1-2	8.2	12.8	4.6	0.242105263		
	1-3	8.8	15.8	7.0	0.368421053		
	1-4	6.0	10.9	4.9	0.257894737		
	Total	31.2	52.8	21.6	0.284210526	32.3	1.49537037
	Average	7.8	13.2	5.4			
Group 2. 일반사료/ 제브라피쉬 락토페린 투여군	2-1	8.5	13.4	4.9	0.257894737		
	2-2	8.3	15.1	6.8	0.357894737		
	2-3	7.6	13.8	6.2	0.326315789		
	2-4	6.8	14.7	7.9	0.415789474		
	Total	31.2	57.0	25.8	0.339473684	34.5	1.337209302
	Average	7.8	14.25	6.45			
Group 3. 일반사료/ 인간 락토페린 투여군	3-1	7.0	13.0	6.0	0.315789474		
	3-2	8.4	15.0	6.6	0.347368421		
	3-3	8.7	11.0	2.3	0.121052632		
	3-4	7.2	13.7	6.5	0.342105263		
	Total	31.3	52.7	21.4	0.281578947	29.1	1.359813084
	Average	7.825	13.175	5.35			
Group 4. 일반사료/ 일반 제브라피쉬 투여군	4-1	8.1	13.7	5.6	0.294736842		
	4-2	8.4	12.7	4.3	0.226315789		
	4-3	7.9	15.6	7.7	0.405263158		
	4-4	6.9	11.7	4.8	0.252631579		
	Total	31.3	53.7	22.4	0.294736842	28.9	1.290178571
	Average	7.825	13.425	5.6			

표 9. 사료첨가제 투여 실험군별 증체율 및 사료효율

돼지 체 중 변화

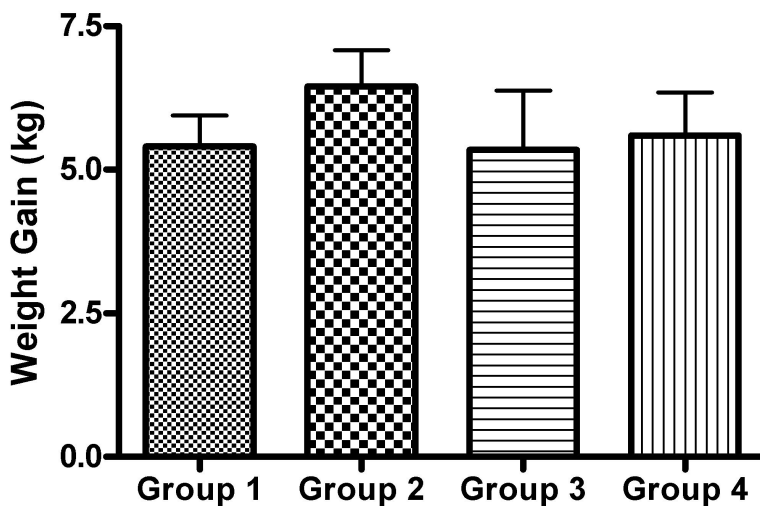


그림 53. 사료첨가제 투여 실험군별 증체율

- Group 1. 일반사료
+ 옥수수전분
- Group 2. 일반사료
+ 형질전환제브라피쉬
- Group 3. 일반사료
+ 상용락토페린
- Group 4. 일반사료
+ 일반제브라피쉬

락토페린의 면역 증강 효능을 알아보기 위해 사료첨가제 투여 후 10일차, 20일차(종료시점)에서 혈액을 채혈하고 혈청을 분리하여 IgA, IgG, IgM, IL-2에 대한 ELISA test(표 10~13, 그림 54~57)를 시행하였다. 표 10~13, 그림 54~57에서 나타난 Group 1은 일반사료와 옥수수전분 투여군, Group 2는 일반사료와 제브라피쉬 락토페린 투여군, Group 3은 일반사료와 인간 락토페린

투여군, 그리고 Group 4는 일반사료와 재조합되지 않은 제브라피쉬 투여군으로 각 군당 4마리에 대하여 각각의 혈청으로 ELISA test를 진행하였다.

ELISA test 결과, 개체별로 차이는 있었으나, 각 군의 4마리의 평균값을 산정하였을 때 IgA의 경우 일반사료와 옥수수전분 투여군에서는 10일차에서 약 500ng, 20일차에서는 375ng, 일반사료와 제브라피쉬 락토페린 투여군에서는 10일차에서 약 100ng, 20일차에서는 250ng, 일반사료와 인간 락토페린 투여군에서는 10일차에서 약 250ng, 20일차에서는 340ng, 일반사료와 재조합되지 않은 제브라피쉬 투여군에서는 10일차와 20일차에서 모두 약 300ng이 검출되었다(표 10, 표 14).

실험 결과, 일반사료/옥수수전분 투여군과 일반사료/재조합되지 않은 제브라피쉬 투여군에서는 투여 10일/20일 후 IgA가 감소하거나, 유사하였으나, 일반사료/제브라피쉬 락토페린 투여군과 일반사료/인간 락토페린 투여군에서는 각 2.5배, 1.36배 증가하여, 락토페린이 IgA를 증가시키는 것으로 나타났다.

IgG의 경우 일반사료와 옥수수전분 투여군에서는 10일차에서 약 3.5 μ g, 20일차에서는 3 μ g, 일반사료와 제브라피쉬 락토페린 투여군에서는 10일차에서 약 2.5 μ g, 20일차에서는 2.6 μ g, 일반사료와 인간 락토페린 투여군에서는 10일차에서 약 3.5 μ g, 20일차에서는 3.5 μ g, 일반사료와 재조합되지 않은 제브라피쉬 투여군에서는 10일차에서 약 3 μ g, 20일차에서는 2.6 μ g이 검출되었다(표 11, 표 14). IgG ELISA test 결과, 일반사료/옥수수전분 투여군과 일반사료/인간 락토페린 투여군에서는 IgG의 양이 감소하였으며, 일반사료/재조합되지 않은 제브라피쉬 투여군과 일반사료/제브라피쉬 락토페린 투여군에서는 10일차와 20일차에서 유사한 결과를 나타내었다.

IgM의 경우 일반사료와 옥수수전분 투여군에서는 10일차에서 약 1000ng, 20일차에서는 1000ng, 일반사료와 제브라피쉬 락토페린 투여군에서는 10일차에서 약 270ng, 20일차에서는 510ng, 일반사료와 인간 락토페린 투여군에서는 10일차에서 약 510ng, 20일차에서는 1000ng, 일반사료와 재조합되지 않은 제브라피쉬 투여군에서는 10일차에서 약 510ng, 20일차에서는 520ng이 검출되었다(표 12, 표 14). IgM의 ELISA test 결과, 일반사료/옥수수전분 투여군과 일반사료/제브라피쉬 락토페린 투여군에서는 유사한 IgM 검출량을 나타냈으며, 일반사료/인간 락토페린 투여군과 일반사료/재조합되지 않은 제브라피쉬 투여군에서는 각각 1.9배, 2배 증가함을 나타내었다.

IL-2의 경우 일반사료와 옥수수전분 투여군에서는 10일차에서 125pg, 20일차에서는 62.5pg, 일반사료와 제브라피쉬 락토페린 투여군에서는 10일차에서 약 62.5pg, 20일차에서는 62.5pg, 일반사료와 인간 락토페린 투여군에서는 10일차에서 약 80pg, 20일차에서는 거의 검출되지 않았으며, 일반사료와 재조합되지 않은 제브라피쉬 투여군에서는 10일차에서 약 88pg, 20일차에서는 거의 검출되지 않았다(표 13, 표 14). IL-2의 ELISA test 결과, 일반사료/옥수수전분 투여군과 일반사료/인간 락토페린 투여군, 일반사료/재조합되지 않은 제브라피쉬 투여군에서는 IL-2가 감소함을 나타내었으며, 일반사료/제브라피쉬 락토페린 투여군에서는 10일차와 20일차에서 IL-2의 양이 유사함을 나타내었다.

IgA	1		2		3		4		5	
A	Std 1,000ng/ml	1.6140	10일차 Group 1-1	1.7560	10일차 Group 3-1	0.2190	20일차 Group 1-1	1.1910	20일차 Group 3-1	0.3940
B	Std 500ng/ml	1.5180	10일차 Group 1-2	1.7190	10일차 Group 3-2	1.2520	20일차 Group 1-2	1.2380	20일차 Group 3-2	1.6370
C	Std 250ng/ml	1.1760	10일차 Group 1-3	1.5180	10일차 Group 3-3	1.7200	20일차 Group 1-3	1.5310	20일차 Group 3-3	1.6920
D	Std 125ng/ml	0.8760	10일차 Group 1-4	1.2270	10일차 Group 3-4	1.3750	20일차 Group 1-4	1.4750	20일차 Group 3-4	1.4460
E	Std 62.5ng/ml	0.5760	10일차 Group 2-1	0.0760	10일차 Group 4-1	0.0860	20일차 Group 2-1	0.1060	20일차 Group 4-1	0.1370
F	Std 31.25ng/ml	0.3440	10일차 Group 2-2	1.0740	10일차 Group 4-2	1.7400	20일차 Group 2-2	1.5100	20일차 Group 4-2	1.7510
G	Std 15.625ng/ml	0.2050	10일차 Group 2-3	0.0090	10일차 Group 4-3	1.2770	20일차 Group 2-3	1.2450	20일차 Group 4-3	1.6440
H	Std 7.8ng/ml	0.1240	10일차 Group 2-4	1.7870	10일차 Group 4-4	1.7680	20일차 Group 2-4	1.8570	20일차 Group 4-4	1.5420

표 10. 사료첨가제 투여 후 10일차/20일차 IgA ELISA test 결과

Group 1: 일반사료/옥수수전분 투여군

Group 2: 일반사료/제브라피쉬 락토페린 투여군

Group 3: 일반사료/인간 락토페린 투여군

Group 4: 일반사료/재조합되지 않은 제브라피쉬 투여군

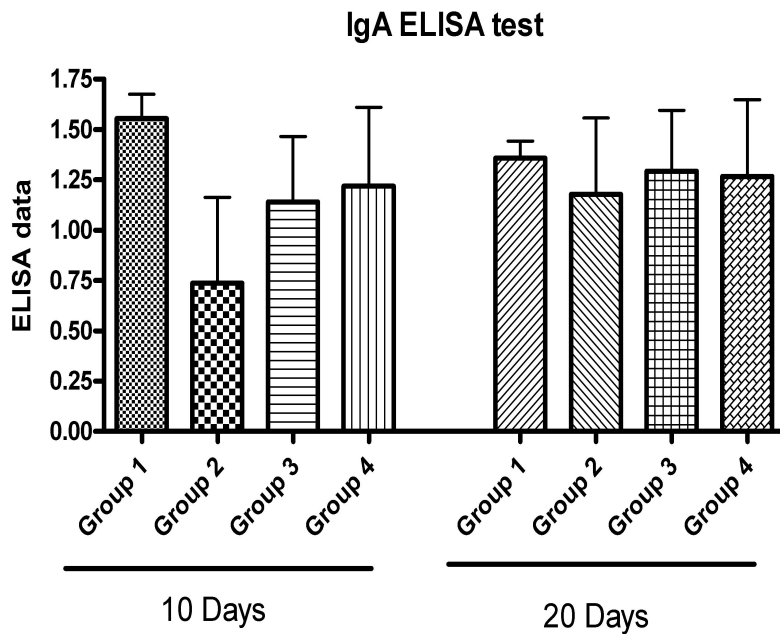


그림 54. 사료첨가제 투여 실험군별 IgA 발현양

Group 1. 일반사료
+옥수수전분

Group 2. 일반사료
+형질전환제브라피쉬

Group 3. 일반사료
+상용락토페린

Group 4. 일반사료
+일반제브라피쉬

IgG	1		2		3		4		5	
A	Std 10,000ng/ml	0.6130	10일차 Group 1-1	1.7560	10일차 Group 3-1	1.8430	20일차 Group 1-1	1.3070	20일차 Group 3-1	1.9350
B	Std 500ng/ml	0.3020	10일차 Group 1-2	1.6850	10일차 Group 3-2	2.5080	20일차 Group 1-2	1.1960	20일차 Group 3-2	2.2350
C	Std 250ng/ml	0.2750	10일차 Group 1-3	2.4420	10일차 Group 3-3	1.8170	20일차 Group 1-3	2.1980	20일차 Group 3-3	1.5830
D	Std 125ng/ml	0.2490	10일차 Group 1-4	2.3760	10일차 Group 3-4	2.4590	20일차 Group 1-4	2.6070	20일차 Group 3-4	2.7100
E	Std 62.5ng/ml	0.1970	10일차 Group 2-1	1.9570	10일차 Group 4-1	1.4720	20일차 Group 2-1	1.7600	20일차 Group 4-1	1.3060
F	Std 31.25ng/ml	0.1480	10일차 Group 2-2	2.5100	10일차 Group 4-2	1.6890	20일차 Group 2-2	2.2970	20일차 Group 4-2	1.7520
G	Std 15.625ng/ml	0.1040	10일차 Group 2-3	0.0510	10일차 Group 4-3	2.3700	20일차 Group 2-3	1.0420	20일차 Group 4-3	2.3210
H	Std 7.8ng/ml	0.0910	10일차 Group 2-4	1.5640	10일차 Group 4-4	1.8060	20일차 Group 2-4	1.8560	20일차 Group 4-4	1.4930

표 11. 사료첨가제 투여 후 10일차/20일차 IgG ELISA test 결과

Group 1: 일반사료/옥수수전분 투여군

Group 2: 일반사료/제브라피쉬 락토페린 투여군

Group 3: 일반사료/인간 락토페린 투여군

Group 4: 일반사료/재조합되지 않은 제브라피쉬 투여군

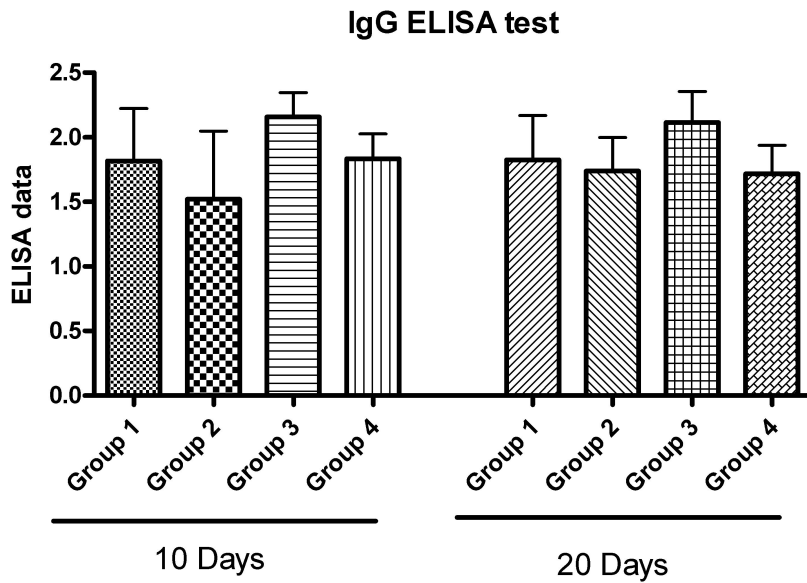


그림 55. 사료첨가제 투여 실험군별 IgG 발현양

Group 1. 일반사료 + 옥수수전분

Group 2. 일반사료 + 형질전환제브라피쉬

Group 3. 일반사료 + 상용락토페린

Group 4. 일반사료 + 일반제브라피쉬

IgM	1		2		3		4		5	
A	Std 1,000ng/ml	1.6030	10일차 Group 1-1	1.8110	10일차 Group 3-1	0.6190	20일차 Group 1-1	1.5480	20일차 Group 3-1	0.9550
B	Std 500ng/ml	1.2920	10일차 Group 1-2	1.7490	10일차 Group 3-2	1.7670	20일차 Group 1-2	1.5200	20일차 Group 3-2	1.9300
C	Std 250ng/ml	0.9070	10일차 Group 1-3	1.6610	10일차 Group 3-3	1.7860	20일차 Group 1-3	1.7710	20일차 Group 3-3	1.9070
D	Std 125ng/ml	0.5710	10일차 Group 1-4	1.5650	10일차 Group 3-4	1.6820	20일차 Group 1-4	1.7160	20일차 Group 3-4	1.7300
E	Std 62.5ng/ml	0.3190	10일차 Group 2-1	0.3830	10일차 Group 4-1	0.4280	20일차 Group 2-1	0.5810	20일차 Group 4-1	0.4990
F	Std 31.25ng/ml	0.1850	10일차 Group 2-2	1.5180	10일차 Group 4-2	1.7660	20일차 Group 2-2	1.7770	20일차 Group 4-2	1.8170
G	Std 15.625ng/ml	0.1110	10일차 Group 2-3	0.0110	10일차 Group 4-3	1.6910	20일차 Group 2-3	1.4830	20일차 Group 4-3	1.9010
H	Std 7.8ng/ml	0.0730	10일차 Group 2-4	1.9500	10일차 Group 4-4	1.9310	20일차 Group 2-4	1.9530	20일차 Group 4-4	1.8370

표 12. 사료첨가제 투여 후 10일차/20일차 IgM ELISA test 결과

Group 1: 일반사료/옥수수전분 투여군

Group 2: 일반사료/제브라피쉬 락토페린 투여군

Group 3: 일반사료/인간 락토페린 투여군

Group 4: 일반사료/재조합되지 않은 제브라피쉬 투여군

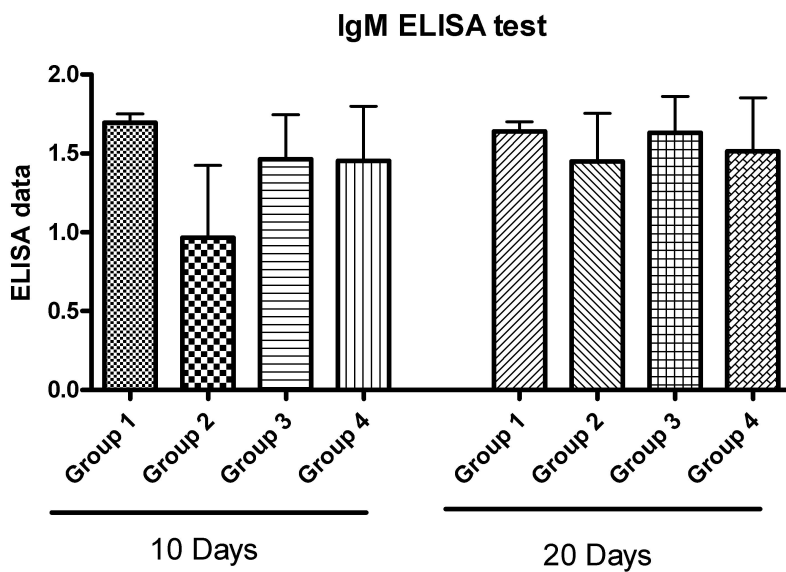


그림 56. 사료첨가제 투여 실험군별 IgM 발현양

Group 1. 일반사료
+옥수수전분

Group 2. 일반사료
+형질전환제브라피쉬

Group 3. 일반사료
+상용락토페린

Group 4. 일반사료
+일반제브라피쉬

IL-2	1		2		3		4		5	
A	Std 2,000pg/ml	0.8150	10일차 Group 1-1	0.3270	10일차 Group 3-1	0.0720	20일차 Group 1-1	0.1260	20일차 Group 3-1	0.0750
B	Std 1,000pg/ml	0.5180	10일차 Group 1-2	0.1650	10일차 Group 3-2	0.1830	20일차 Group 1-2	0.0850	20일차 Group 3-2	0.0910
C	Std 500pg/ml	0.3860	10일차 Group 1-3	0.1410	10일차 Group 3-3	0.0970	20일차 Group 1-3	0.2070	20일차 Group 3-3	0.0860
D	Std 250pg/ml	0.2820	10일차 Group 1-4	0.2060	10일차 Group 3-4	0.2480	20일차 Group 1-4	0.1090	20일차 Group 3-4	0.1310
E	Std 125pg/ml	0.2060	10일차 Group 2-1	0.1010	10일차 Group 4-1	0.0570	20일차 Group 2-1	0.0740	20일차 Group 4-1	0.0310
F	Std 62.5pg/ml	0.1300	10일차 Group 2-2	0.0850	10일차 Group 4-2	0.3450	20일차 Group 2-2	0.0850	20일차 Group 4-2	0.0830
G	Std 31.25pg/ml	0.1080	10일차 Group 2-3	0.1450	10일차 Group 4-3	0.0930	20일차 Group 2-3	0.0950	20일차 Group 4-3	0.0840
H	Std Dilution buffer(BL)	0.0740	10일차 Group 2-4	0.1680	10일차 Group 4-4	0.1780	20일차 Group 2-4	0.2790	20일차 Group 4-4	0.1390

표 13. 사료첨가제 투여 후 10일차/20일차 IL-2 ELISA test 결과

Group 1: 일반사료/옥수수전분 투여군

Group 2: 일반사료/제브라피쉬 락토페린 투여군

Group 3: 일반사료/인간 락토페린 투여군

Group 4: 일반사료/재조합되지 않은 제브라피쉬 투여군

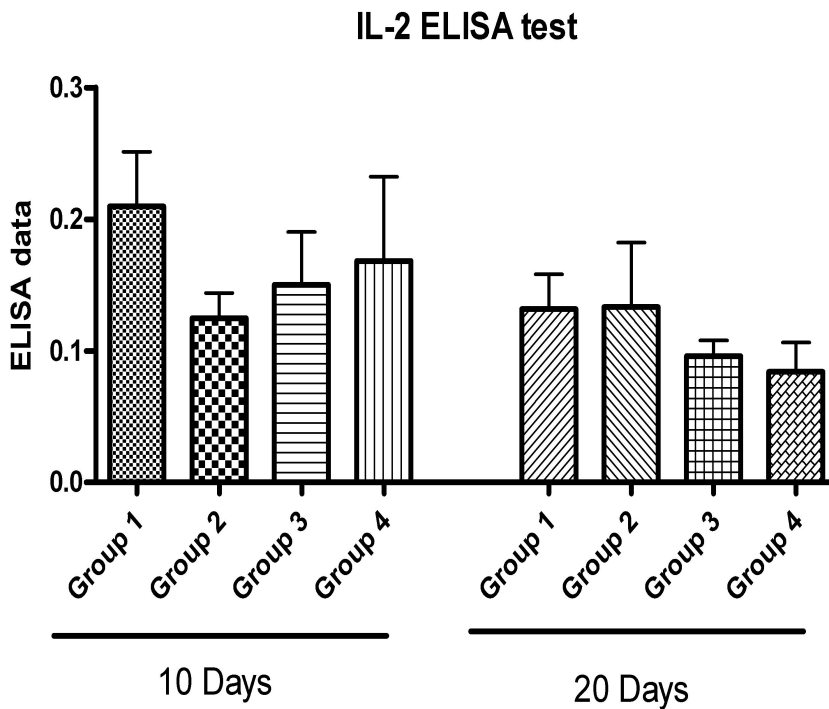


그림 57. 사료첨가제 투여 실험군별 IL-2 발현양

Group 1. 일반사료
+ 옥수수전분

Group 2. 일반사료
+ 형질전환제브라피쉬

Group 3. 일반사료
+ 상용 락토페린

Group 4. 일반사료
+ 일반제브라피쉬

평균값	IgA		IgG		IgM		IL-2	
	10일차	20일차	10일차	20일차	10일차	20일차	10일차	20일차
group 1	1.5550	1.3588	2.0648	1.8270	1.6965	1.6388	0.2098	0.1318
group 2	0.7365	1.1795	1.5205	1.7388	0.9655	1.4485	0.1248	0.1333
group 3	1.1415	1.2923	2.1568	2.1158	1.4635	1.6305	0.1500	0.0958
group 4	1.2178	1.2685	1.8343	1.7180	1.4540	1.5135	0.1683	0.0843

표 14. 사료첨가제 투여 후 10일차/20일차의 IgA, IgG, IgM, IL-2 ELISA test 실험군별 평균치

Group 1: 일반사료/옥수수전분 투여군

Group 2: 일반사료/제브라피쉬 락토페린 투여군

Group 3: 일반사료/인간 락토페린 투여군

Group 4: 일반사료/재조합되지 않은 제브라피쉬 투여군

산업동물인 돼지에 실험 결과, 제브라피쉬 락토페린은 증체량과 사료효율 증대에 효과가 있었다. 또한 혈청 분석 결과, 면역글로블린 ELISA 결과에서 인간 락토페린 투여군과 유사하게 증가함을 나타내었으며, IL-2의 경우 다른 실험군에서는 모두 감소하였으나, 제브라피쉬 락토페린 투여군에서는 증가함을 나타내었다. 제브라피쉬 락토페린은 항생제 대체물질로써, 발현 라인 확립과 대량 배양 체제를 확립한다면, 저렴하게 사료첨가제로써 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 1년차 (2007. 5. 30. ~ 2008. 5. 29)

1. 연구개발목표의 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
사람 락토페린 cDNA를 이용하여 클로닝후 염기서열확인	<ul style="list-style-type: none"> · Human Adult Normal tissue (Breast(Cat#: C1234086)) cDNA 구매 · Human lactoferrin (NCBI Accession No. AY178998) cloning 을 위한 primer design · Human lactoferrin PCR 및 T-vector cloning · 염기서열 확인 후 비교 분석결과 1bp의 염기서열이 변환되었으나, amino acid로 translation시에는 변환되지 않아 Target lactoferrin과 동일한 protein을 발현할 것을 예측함. 	100%
Xenopus EF1a 프로모터 벡터를 이용하여 사람 락토페린 벡터 제조	<ul style="list-style-type: none"> · CS2+ 및 CS2+GFP 모벡터를 이용하여 xenopus EF1a 프로모터 하에서 사람 락토페린을 발현하는 벡터의 제조 	100%
작제한 벡터를 제브라피쉬 수정란에 주입하여 형질전환 제브라피쉬를 생산	<ul style="list-style-type: none"> · 작제한 벡터를 제브라피쉬의 one-cell stage에 injection 하여 형질전환 제브라피쉬 생산 	100%
형질전환된 제브라피쉬를 선별하여 실제로 사람 락토페린을 발현하는지에 대해 RT-PCR과 Western blot (Immunostaining) 등으로 검증	<ul style="list-style-type: none"> · UV-lamp 하에서 GFP 발현을 확인하여 발현벡터를 일차적으로 검증한 후 형질전환 제브라피쉬 치어를 대상으로 RT-PCR Western blot(immunostaining), ELISA, 을 실시하여 실제로 사람 락토페린이 발현되는지 검증함. 	100%

2. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
실제 사람 cDNA 염기서열과 비교하여 정확도 측정	염기서열 분석 결과 목표하고자 하였던 NCBI Accession No. AY178998 의 염기서열과 1bp 염기서열이 변환되었으나 단백질 변환시의 아미노산 치환은 이루어지지 않아 100%의 정확도를 예측하여 성공적으로 실제 사람 cDNA 염기서열과 비교하여 정확도를 얻은 것으로 평가함
목표하고자 하는 프로모터 및 락토페린 염기서열로 벡터를 제작하였는가 여부	목표하였던 Xenopus elongation factor 1a promoter 하에서 사람 락토페린을 발현하는 벡터 제작 완료하여 목표달성이 100%된 것으로 평가함
형질전환 제브라피쉬의 phenotyping 으로 transgenesis 확인	제작한 벡터를 microinjection 한 제브라피쉬 치어를 대상으로 reporter gene인 GFP 발현을 확인하였고, 사람 락토페린의 mRNA 발현 여부 역시 확인하여 작제한 벡터를 제브라피쉬 수정란에 주입하여 형질전환 제브라피쉬를 생산한 것으로 100% 성공하였으므로 평가함
사람 락토페린을 발현하는지 여부	제작한 벡터를 수정란에 미세주입 한 제브라피쉬 치어를 대상으로 사람의 락토페린에 대한 항체를 가지고 Immunostaining 및 ELISA를 실시하여 발현 여부를 동일하게 확인한 것으로 목표달성을 100% 성공하였으므로 평가함

제 2절 2년차 (2008. 5. 30. ~ 2009. 5. 29)

1. 연구개발목표의 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
<p>사료화 진단계로서 형질전환 제브라피쉬에서 발현하는 사람 락토페린의 실제 특성과 효과를 규명하기 위해 순수 정제법을 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> · 제조한 단일클론 항 락토페린 항체를 sephose gel에 흡착시켜 컬럼을 제조.. · 락토페린을 발현하는 제브라피쉬를 배양하여 회수하여 파쇄하고 원심분리를 실시하여 상청을 회수하였다. 회수한 락토페린 상청을 제조한 컬럼에 loading 하여 락토페린만을 특이적으로 흡착시키고, PBS로 컬럼을 세척한다. NaCl 농도구배를 주어 특이적인 락토페린을 용출하여 정제함. 	<p>100%</p>
<p>정제한 사람 락토페린의 구조를 분석하고 생화학적 특성을 규명하여 천연락토페린과의 비교분석 실시</p>	<ul style="list-style-type: none"> · 정제락토페린을 지속적으로 확보하여 3차년도에 분말형태로 사료에 섞어 첨가물로 사용할 예정임. · 단백질의 crystal structure를 전문적으로 연구하는 기관 (수원대 최정원교수) 에 정제 락토페린의 위탁하여 구조 및 생화학적 특성을 규명함. 	<p>100%</p>
<p>정제한 사람 락토페린이 실제로 미생물 방어효과를 가지는지에 대해 마우스에 대한 동물실험을 실시</p>	<ul style="list-style-type: none"> · 분리 정제한 사람 락토페린의 <i>Escherichia coli</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311에 대한 항생효과를 <i>in vitro</i> 상에서 검증함. · 정제한 사람 락토페린을 이용하여 소화기 병원성 그람 음성균으로 돼지에서 장염을 일으키는 주된 원인 세균인 <i>Salmonella typhimurium</i> 을 마우스에 감염시킨 3일 후 각 장기별로 균을 배양하여 enumeration 하고, 주요 target 장기를 조직 검정하여 락토페린의 미생물 방어 효과를 검증함. 	<p>100%</p>

2. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
형질전환 제브라피쉬에서 사람 락토페린의 정제법 확립	단일클론 항 락토페린 항체를 제조하여 실제로 컬럼을 제조하였으며, 벡터를 짜른 제브라피쉬를 배양하여 이 컬럼을 이용하여 특이적인 락토페린을 용출하여 정제하는 것에 성공하였으므로 정제법을 확립하였다고 평가함.
정제한 사람 락토페린의 구조 및 생화학적 특성 규명	정제한 락토페린의 시퀀스를 이용하여 3차원적으로 단백질의 구조와 생화학적 특성을 규명해내었으므로 이 과정을 성공적으로 수행하였다고 평가함.
소화기 병원성 그람 음성균에 대한 방어실험	락토페린이 포함된 벡터가 들어가서 락토페린을 발현하는 치어를 갈아서 in vitro 및 in vivo 마우스 실험을 통하여 데이터를 확보하였다. 이에 따라 소화기 그람 음성균에 대한 방어효과를 검증하였다고 판단하고 목표를 100% 수행한 것으로 평가함.

제 3절 3년차 (2009. 5. 30. ~ 2010. 11. 29)

1. 연구개발목표의 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
사람 락토페린을 발현하는 형질 전환 제브라피쉬의 사료화 방법 개발	· 분쇄기를 이용하여 제브라피쉬를 파쇄한 후 열풍 건조기를 이용하여 건조한다. 이때 건조된 분말은 수분 함량을 5% 이내로 조절하고 뭉치는 현상이 많이 발생하지 않도록 이산화규소(SiO ₂)를 사용한다. v-mixer를 이용하여 제브라피쉬 분말 50%와 부형제(starch) 48%, 뭉침방지제 2%의 비율로 혼합하여 사료를 제조함.	100%
제조한 사료의 효과를 입증하기 위하여 실제 산업동물을 이용한 동물실험 실시	· 락토페린 벡터를 찌른 후 배양하여 성어가 된 형질전환 제브라피쉬를 사료와 혼합하여 <i>Salmonella typhimurium</i> 을 감염시킨 돼지에게 급여하여 미생물방어 효과가 있는지 확인함.	100%
형질전환 제브라피쉬를 이용한 사료를 대량으로 공급하여 산업화하기 위한 체계의 고안	· 제브라피쉬 사육 체계를 확립하여 대량 사육의 가능성을 제시함.	100%

2. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
사료화 방법 개발의 여부	사육된 제브라피쉬로 사료화가 가능함을 공정과정을 시행해봄으로써 확인하였으므로, 사료화 방법 개발의 목표를 달성하였다고 평가함.
제조 사료가 실제 목적동물에게 효과를 보이는지에 대한 실험 데이터의 제시	실제 목적동물이었던 돼지를 이용하여 일반사료와 제조사료로 군을 나누어 실험을 시행하였으며, 그 데이터를 제시하였으므로 목표를 달성하였다고 평가함.
제시한 산업화 체계가 실제로 유용한가에 대한 평가	제브라피쉬 사육 체계를 확립하여 대량 사육이 가능함을 제시하였으며, 실험실 조건으로 시행해 봄으로써 대량 사육이 가능함을 제시하였으므로 목표를 100% 달성한 것으로 평가함.

제 4절 최종평가 (2007. 5. 30. ~ 2010. 11. 29)

1. 연구개발목표의 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
사람 락토페린을 발현하는 형질 전환 제브라피쉬 작제	<ul style="list-style-type: none"> · 사람 락토페린을 포함하는 벡터를 작제하여 제브라피쉬 수정란에 주입하여 형질전환 제브라피쉬를 생산해냄. · 이 형질전환된 제브라피쉬를 선별하여 사람 락토페린을 발현해내는지 여부를 RT-PCR과 western blot, ELISA등으로 F2 세대까지 확인함. 	100%
형질전환 제브라피쉬에서 사람 락토페린 분리 정제 및 분리한 락토페린의 특성 규명과 미생물 방어효과 검증	<ul style="list-style-type: none"> · 사람 락토페린을 발현하는 형질전환 제브라피쉬 배아에서 사람 락토페린 시퀀스를 분석하여 입체구조와 특성을 규명함. · 사람 락토페린을 발현하는 형질전환 제브라피쉬 배아를 이용하여 <i>in vitro</i>에서 미생물 방어효과를 검증하였으며, 또한 마우스와 산업동물인 돼지에서도 데이터를 확보함. 	100%
형질전환 제브라피쉬의 산업화 기반 마련	<ul style="list-style-type: none"> · 형질전환 제브라피쉬를 이용하여 사료를 제조할 수 있는 공정을 확립함. · 제브라피쉬를 대량으로 사육 체계를 고안하였음. 	100%

2. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
형질전환 제브라피쉬 라인의 구축 여부	형질전환 제브라피쉬를 작제하여 F2까지 사람 락토페린을 발현함을 확인하여 라인을 구축하였으므로 목표를 달성하였다고 평가함.
재조합 락토페린의 특성에 대한 생화학적 및 생물학적 자료 제시	재조합 락토페린의 입체구조를 규명하였으며, <i>in vitro</i> 및 동물실험에서 미생물 방어효과에 대한 데이터를 제시하였으므로 목표를 달성하였다고 평가함.
적절한 산업화 기반에 대한 제시	사료공정 방법은 확립하였으며, 또한 제브라피쉬가 대량으로 사육이 가능한 체계를 제시하여 산업화의 가능성을 제시해주었으므로 이 목표를 완벽하게 달성한 것으로 평가함.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1절 논문게재 성과

Recombinant Human Lactoferrin Production in Transgenic Zebrafish.

Seung Hyeok Seok¹, Min Won Baek², Dong Jae Kim², Yi Rang Na², Ju Hee Han², Tae Hyun Kim², Hyun Jung², Ae Sun Goh², Gun Woo Ha³, Yeun Kyung Oh³, Jae Hak Park²

¹Institute for Experimental Animals, College of Medicine and ²Laboratory Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Seoul National University; ³Animal Genetics Incorporation, Suwon, Korea

Introduction Human lactoferrin (hLF) is an iron-binding bioactive protein and has large potential in nutritional, prophylactic and therapeutic applications. Therefore, production of recombinant lactoferrin using animal bioreactors was studied widely to satisfy its large requirement. We reported here a transgenic zebrafish model with recombinant hLF in muscle. **Materials and Methods** Recombinant hLF was expressed in a transgenic zebrafish injected with a vector containing zebrafish muscle promoter and intact hLF-encoding cDNA, approximately 2.1 kb. To define the properties of recombinant hLF, antimicrobial activity was assessed. **Results** Western blot and ELISA analyses showed that hLF protein was synthesized in the transgenic zebrafish and the line expressed recombinant hLF at 64 ng/tissue g. The growth of *Escherichia coli*, *Salmonella enteric serovar typhimurium* (ATCC1311), and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) was inhibited by co-culture containing recombinant hLF determined by monitoring optical density at 630 nm. **Conclusions** Taken together, the results illustrate the potential of the recombinant hLF from transgenic zebrafish as the large farm animal feed additives and in the biopharmaceutical fields.

(Transgenic Research 투고 준비중)

제 2절 국내 및 국제 학술회의 발표 성과

1. 국제 학술회 발표성과

학술회명	발표형식	제목	발표자	발표일시	발표장소
2009년 미국 실험동물학회	구두발표	Production of human Lactoferrin in Transgenic Zebrafish.	석승혁	2009년 11월 8일	Denver, Colorado

2. 국내 학술회 발표 성과

학술회명	발표형식	제목	발표자	발표일시	발표장소	비고
2009년 춘계 실험동물학회	포스터 발표	Recombinant human lactoferrin production in transgenic zebrafish	석승혁	2009년 4월 24일	서울대학교 호암교수회관	우수 포스터상 수상
2009년 춘계 실험동물학회	포스터 발표	Zebrafish muscle promoter assay for human lactoferrin expression	나이랑	2009년 4월 24일	서울대학교 호암교수회관	

제 3절 기술이전 성과

1. 락토페린 발현 제브라피쉬에서 재조합 단백질 분리 정제방법
2. 락토페린 발현 제브라피쉬에서 추출한 락토페린의 대량생산 및 사료화 방법

제 4절 특허 접수 및 출원 성과

1. 국내특허 출원
 - 가. 특허명 : 인간 락토페린을 대량 생산하기 위한 형질전환 제브라피쉬 및 이를 이용한 인간 락토페린의 대량 생산 방법
 - 나. 출원인 : 재단법인 서울대학교 산학협력재단
 - 다. 출원번호 : 10-2008-0067786
 - 라. 출원연도 : 2008년 7월 11일
2. PCT 출원
 - 가. 발명의 명칭 : A transgenic zebrafish for mass production of human lactoferrin and a process of producing human lactoferrin using the same.
 - 나. 출원인 : SNU R&DB Foundation
 - 다. 접수번호 : 6-1-2009-0029415-87
 - 라. 국제출원번호 : PCT/KR2009/003832
 - 마. 참조기호 : OPA09053PCT
 - 바. 접수일시 : 2009년 7월 13일

제 5절 사업화 성과

1. 사업화명 : Lactoferrin 검출 kit의 개발
2. 제품명 : Antigen Lactoferrin Ag ELISA
3. 업체명 : (주) 바이오노트

제 6절 인력 활용/양성 성과

1. 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
4	1	2		1	1	3	4		

2. 장, 단기 연수 지원 성과

단기 (2월 미만)	
국내	국외
본 연구의 지원을 받은 석사1인(나이랑, 박사과정) 이 2008년 07월 09일부터 2008년 07월 15일까지 국내 충남대학교 생명과학부를 방문하여 zebrafish 사육과 관련 실험 기법을 성공리에 연수받고, 현재 충남대학교에서 사육하고 있는 락토페린을 발현하는 형질전환 제브라피쉬 현황을 파악하였음.	박사1인(석승혁)이 싱가포르의 국립싱가폴대학교 (Temasek Life Sciences Laboratory)에 2007년 11월 4일부터 2007년 12월 14일까지 연수하여 락토페린 발현 벡터를 성공적으로 작제후 시험한 성과를 거두었음

3. 경제사회 파급효과

고용창출 성과 (단위 : 4명)		
창업	사업체 확장	합계
	본 과제 성과로 (주) 바이오노트의 4인의 고용창출 효과	4

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1절 국내외 관련분야의 환경 변화

락토페린은 젖이나 그 밖의 분비액 및 혈액 속에 있는 단백질로 항균성, 항종양 활성, 세포 증식 활성 말고도 철과 결합하기 쉬운 성질이 있기 때문에 철분을 필요로 하는 세균의 증식을 억제하는 등 여러 생리 작용이 있는 것으로 밝혀졌다 (출처 : 한국식품정보원).

재조합 락토페린 시장은 식품 첨가제시장에서 시장이 대규모로 형성되어 있으며 매년 10%의 성장세를 유지하고 있다. 일본의 모리나가유업은 일본 국립 암센터와의 공동 연구로 락토페린에 대장암 발생을 억제하고 C형 간염 바이러스의 감염을 막는 등의 효과가 있다는 것을 확인했다. 또한 연간 40톤의 락토페린 분말을 유아 분유나 요구르트, 음료 등의 용도로 공급하며 연간 10억 달러의 매출을 올리고 있다. (출처 : 식음료신문) 그밖에도 일본 유키지루시유업, 네덜란드 캄피나사, 엔알엘(NRL)과마사등도 락토페린을 이용한 신규 기능성 제품을 잇달아 출시하고 있다.

사료첨가제로써 재조합 락토페린 시장은 시장 형성 도입 단계이기 때문에 본격적인 시장이 형성되어 있지 않고 있으며, 본연구진이 성공적으로 연구를 완성함으로써 새로운 시장을 창출해 나갈 것이다. 재조합 락토페린과 유사한 사료첨가제 시장은 2007년 말 현재 국내시장이 약 6000억원, 세계시장은 약 25조원에 달하는 것으로 추정되고 있다. (출처: 대신경제연구소)

이 외에도 네덜란드의 Leiden University Medical Center 에서는 우유에서 락토페린을 분비하는 형질전환 소를 개발하였으며 산업화 없이 후속 연구만 진행 중이다. 또한 프랑스의 Clermont-Ferrand 에서는 옥수수에서 재조합 락토페린을 생산하는 것에 성공하여 Phase I 임상실험 단계에 있다.

제 7 장 참고문헌

1. Joslin RS, Erickson PS, Santoro HM, Whitehouse NL, Santoro CG, Rejan JJ : Lactoferrin supplementation to dairy calves. *Journal of dairy science* **85(5)**: 1237-42 (2002)
2. Salmon V, Legrand D, Slomianny MC, el Yazidi I, Spik G, Gruber V, Boumat P, Olganier B, Mison D, Theisen M, M'erot B : Production of human lactoferrin in transgenic tobacco plants. *Protein expression and purification* **13(1)**: 127-35 (1998)
3. Patrick H.C. van Berkel, Mick M. Welling, Marlieke Geerts, Harry A. van Veen, Bep Ravensbergen, Mourad Salaheddine, Ernest K. J. Pauwels, Frank Pieper, Jan H. Nuijens, Peter H. Nibbering : Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nature Biotechnology* **20**: 484-487 (2002)
4. Tao Liu, Yao-Zhou Zhang, Xiang-Fu Wu : High level expression of functionally active human lactoferrin in silkworm larvae. *Journal of Biotechnology* **22**; **118(3)**: 246-56 (2005)
5. Zeng-Sheng Han, Qing-Wang Li, Zhi-Ying Zhang, Bo Xiao, Da-Wei Gao, Shu-Yun Wu, Jian Li, Hong-Wei Zhao, Zhong-Liang Jiang, Jian-Hong Hu : High-level expression of human lactoferrin in the milk of goats by using replication-defective adenoviral vectors. *Protein expression and purification* **53(1)** 225-231 (2007)
6. 보건복지부고시 제 1997-22호, 1997.4.22
7. Tang IK, Ji DD, Chou CF, Lin HC, Liao CL, Sytwu HK, Wang JJ, Jiu YT : Characterization of a highly attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mutant strain. *Journal of microbiology, immunology and infection* **35(4)**: 229-35 (2002)
8. Susan Mosquito, Theresa J. Ochoa, Jaime Cok, Thomas G. Cleary : Effect of bovine lactoferrin in *Salmonella ser. Typhimurium* infection in mice. *Biometals* **23**: 515-521 (2005)

본문 작성 요령

- 가. 본문의 순서는 장, 절, 1, 가, (1), (가), ①, ㉔ 등으로 하고, 장은 17 포인트 고딕계열, 절은 15포인트 명조계열, 본문은 11 포인트 명조계열로 합니다. 다만, 본문의 내용중 중요부분은 고딕계열을 사용할 수 있습니다.
- 나. 장은 원칙적으로 페이지를 바꾸어 시작합니다.
- 다. 본문은 11 포인트 횡으로 작성합니다.
- 라. 쪽 번호는 하단 중앙에 표기하되, 11 포인트로 합니다.
- 마. 각주는 해당 쪽 하단에 8포인트로 표기하며, 본문과 구분하도록 합니다.
- 바. 쪽 수는 편집순서 2의 제출문부터 시작합니다. 이 경우 삽입물이 있을 때에는 그 삽입물의 크기에 관계없이 1면을 한 쪽으로 하여 일련번호를 붙입니다.
- 사. 한글·한문·영문을 혼용합니다.
- 아. 뒷면지에 주의문을 넣습니다.
- 자. 참고문헌(reference) 인용의 경우 본문 중에 사용처를 반드시 표시하여야 합니다.

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 **농림/고부가가치 식품/수산기술개발사업(해당사업만 표기)**의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 **농림/고부가가치 식품/수산기술개발사업(해당사업만 표기)**의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

[부 표]

인 쇄 내 용

I. 인쇄규격

1. 크기 : A4 신판(가로 210mm * 세로297mm)
2. 제본 : 좌철
3. 용 지
 - 가. 표지 200g/m² 양면 아트지
 - 나. 내용 80g/m² 모조지
4. 인쇄방법
 - 가. 표지 : 바탕 백색, 활자 흑색
 - 나. 내용 : 흑색 지정활자
 - 다. 양면인쇄

II. 편집순서

1. 표 지
2. 제출문
3. 보고서 요약서
4. 요약문
5. 영문 요약서(Summary)
6. 영문 목차(Contents)
7. 목 차
8. 본 문
9. 뒷면지

III. 참고사항

전자조판 인쇄시에는 이에 준한다.