

최 종
연구 보고서

섬유소분해효소유전자(CeID)이용 돼지의 생산성 증대기술 개발

Studies on Production of Transgenic Pigs
Including Cellulase Digest Gene(CeID)

연구기관
축산기술연구소

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “섬유소분해효소 유전자(CelD)이용 돼지의 생산성 증대기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002 년 12 월 일

주관연구기관명 : 축산기술연구소

총괄연구책임자 : 김 경 남

세부연구책임자 : 장원경, 박진기

연 구 원 : 이연근, 민관식
이창현, 최영진,
이현기, 이주영
이향훈, 김정호
김유경

협동연구기관명 : 카톨릭의과대학

협동연구책임자 : 류 재 응

요 약 문

I. 제 목

섬유소분해효소유전자(CelD)이용 돼지의 생산성 증대 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 현재보다 다양하게 사료를 이용할 수 있는 형질전환 돼지를 생산하는 것을 목적으로 하고 있다. 따라서, 본 연구의 구체적인 목표는 현재로서는 이용 불가능 하지만 향후 이용 가능한 cellulose, lignin, xylan, waxes, toxins 및 열손상물 등을 분해하고, 소화할 수 있는 돼지를 개발하는 것이다. 효소 이외에 관심 있는 다른 유전산물은 소화효소제를 분해 및 불활성화 하고, 결합할 수 있는 anti-microbial peptide와 단백질을 들 수 있다. 그러나, 제 4 위를 가진 소의 경우는 이들 미생물을 이식함으로써 소화율을 증진시킬 수 있으나, 돼지의 경우 이러한 미생물이 생체내에 존재할 수 없기 때문에, 소화기관인 췌장에서 동일 목적을 가진 소화효소를 분비시킴으로써 동일 목적을 달성할 수 있다. 이들 형질전환 돼지의 소화관은 궁극적으로 합성될 산물, 예를 들면 필수아미노산과 비타민을 향상시키는 물론 소화에도 필요 없는 제 요소들을 제거할 수 있을 것으로 추측된다. 이 실험에 공시한 재조합된 DNA구성물은 췌장에서 합성되고 소화관으로 분비를 원하는 산물을 얻을 수 있도록 용이하게 조작되도록 설계되어 있다. 즉, 이러한 “cassette-like vector”를 이용함으로써, 형질전환 돼지의 췌장은 bacterial cellulase를 합성하고 분비할 수 있을 것이다. 이 실험에 이용될 발현벡터는 바로 위에서 설명한 것과 같이 구축하여 준비하는 것이다. 이러한 동물을 생산하는 것은 소화과정을 조절할 수 있는 유전자전이법의 이용가능성을 명확히 보여줄 것이다. 따라서 본 연구는 여러 가지 섬유소 중에서도 cellulose D를 소화시킬 수 있는 형질전환 돼지를 생산하는데 목적이 있으며 이러한 형질전환 돼지를 이용함으로써 열악한 조사료 이용성을 증가시킬 뿐 아니라 사료비를 절감할 수 있으므로 농가의 소득증대에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 지금까지 개발된 여러 가지의 섬유소 분해관련 유전자 중 특히 체내에서 섬유소 소화에 크게 작용할 것으로 생각하는 섬유소분해효소 유전자인 cellulase digest D (CelD) 를 크로닝 하고 크로닝된 유전자를 마우스의 수정란 전핵에 주입하여 형질전환 마우스를 생산하여 생산된 마우스의 췌장에서 정상적으로 유전자가 발현되는가를 검토한 후 섬유소 소화율을 측정할 것이다. 또한 섬유소 소화관련 유전자를 돼지에 도입하여 형질전환 수정란을 생산, 발정동기화 된 수란돈의 자궁에 이식하여 생산된 새끼돼지의 꼬리로부터 유전자를 분리한 후 PCR 및 Southern blot를 실시하여 유전자의 삽입여부를 확인한 후 섬유소 함량이 증가된 사료를 급여하여 분 중 섬유소 소화능력을 측정할 것이다. 따라서 본 연구에서는 먼저 섬유소 분해효소 관련 유전자 및 췌장 acinar 세포 특이적 발현 조절인자인 rat유래의 elastase I 프로모터를 크로닝하여 형질전환 생쥐를 생산하고 생산된 생쥐를 이용한 섬유소 분해능력을 검정할 것이다. 모델생쥐 분석에 의해 고 발현 능력을 가지고 있는 생쥐를 선별하고 한편으로는 유전자를 보완하여 고발현용 재조합 섬유소분해관련 유전자를 크로닝할 뿐만 아니라 형질전환 생쥐의 병리현상을 검토할 것이다. 또한 섬유소관련 유전자 발현백터의 독성 및 안전성을 검정하면서 유전자의 제 문제점, 부작용(side effect)등을 검정할 것이며 유전자도입에 의한 돼지생산 시 각종 문제점을 검토하고 수정해 나감으로써 형질전환 돼지를 안정적으로 생산 및 산업화하는 기초 기술을 확립하는데 있다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 학회발표 및 논문 게재

구분	제 목
학회발표	○ 발정동기화와 호르몬처리에 의한 돼지배란율 및 수정란 회수율에 관한 연구 (2000년, 유전공학과, 이연근)
	○ Hyaluronic acid 및 Tocopherol첨가가 돼지 난포란 체외 발달율에 미치는 영향 (2001년, 유전공학과, 박진기)
	○ Adenylate cyclase(ACi)첨가가 돼지 난포란 체외 발달율에 미치는 영향 (2001년, 유전공학과, 박진기)
	○ Effect of EGF on in vitro maturation and embryo development and expression of EGF mRNA in Bovine oocytes and embryo. (2001년, 유전공학과, 장원경)
	○ 체외수정시 Sucrose첨가에 의한 돼지 난자의polyspermy제어에 관한 연구 (2001년, 유전공학과, 장원경)
	○ 돼지 난포란의 체외수정시 Adenosine Di-phosphate(ADP)첨가가 배발달에 미치는 영향 (2002, 응용생명공학과, 박진기)
	○ 항산화제와 Growth Factor첨가가 돼지 체외수정란의 체외발육에 미치는 효과 (2002년, 응용생명공학과, 장원경)
	○ 항산화제와 BSO의 첨가배양이 돼지 체외수정란의 체외발육에 미치는 영향 (2002년, 응용생명공학과, 박진기)
	○ 돼지 난자에 있어서 제1극체 형성을 억제하는 난포액 성분 (2002년, 응용생명공학과, 장원경)
논문 게 제	섬유소 분해효소 유전자가 도입된 형질전환 돼지 생산 (2002년, 축산기술연구소, 박진기)

SUMMARY

(영문 요약문)

This study was performed during the four seasons for the production of transgenic pigs containing the cellulase digestion (CelD) Gene. Purebred Landrace gilts and sows approximately 8 to 15 months of age (n=126) were used for the collection of one cell zygotes for DNA microinjection and transfer. Retrospectively, estrus synchronization and superovulation schemes were evaluated to assess practicality of zygote collection. Synchronization and superovulation procedures were as follows: Cyclic gilts were synchronized with 20mg altrenogest (ALT) per day for 9 days after PG600 administration followed by superovulation with 1500IU pregnant mares serum gonadotropin (PMSG) and 500IU human chorionic gonadotrophin (hCG). Microinjection DNA was constructed by linking rat elastase I promoter (rEl) to CelD gene. After hormone treatment, 1,422 embryos were collected from 91 donors and 95.6 per cent (1,359/1,422) embryos were in one cell stage that the pronuclei can be visualized for DNA microinjection. Total of 725 DNA microinjected embryos were transferred into 35 recipients and produced 65 piglets from 13 litters. Pregnancy rate according to the number of transferred embryos to recipients were higher in the group which received 21 to 24 embryos (50.0 per cent) than other groups with less (20.0 per cent) or more (33.3 per cent) embryos. Parturation rate was 37.1 per cent (13/35). Tail biopsies were collected from the piglets for DNA isolation. PCR screening was performed on each DNA sample using two separate sets of primers specific for the 5'- and 3'-flanking region of the rEl-CelD gene. Five of the 65 piglets (7.69 per cent) were positive for the transgene and the pigs which including a CelD used to analysis a digest ability of crude fiber in feed of pig. An assorted feed was composite of 5%fiber with other ingredients. The feed of 3kg per day provide to pigs including one transgenic pig and six control pigs were born same recipient swine. We check a feed surplus and a manure quantity during a month and were dried all of manure in dry-oven for a day. Nitrogen,

phosphate and fiber concentration were analysis into the manure after grinding of the samples. Digestion rate were not different between transgenic pig and control pigs in first generation, but in second generation, fiber digest rate are increased about 10% than control pigs and nitrogen concentration of transgenic pig's manure are decreased compare to control pigs. Accordingly, we can thinking that CelD gene are expression in pancreas of transgenic pig but didn't test that expression of mRNA in target organ, next time we analysis it by RT-PCR and in situ hybridization after number of transgenic pigs harboring CelD increased.

CONTENTS

Chapter I. A summary of research development	9
Chapter II. The present state of technical development for the inside and outside of country	13
Chapter III. The substances and results of study achievement	15
Chapter IV. The attainment of goal, and contribution for related fields	51
Chapter V. A application scheme of research results	54
Chapter VI. The scientific technical information of an oversea collected during research development	55
Chapter VII. Reference	57

목 차

제 1 장. 연구개발과제의 개요	9
제 1 절. 연구개발의 필요성	9
제 2 절. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점	11
제 3 절. 앞으로의 전망	12
제 4 절. 기술도입의 타당성	12
제 2 장. 국·내외 기술개발 현황	13
제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과	15
제 1 절. 형질전환 마우스 생산	15
제 2 절. 형질전환 돼지 생산	31
제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	51
제 1 절. 연도별 연구목표 및 평가의 착안점	51
제 2 절. 목표 달성도 및 관련분야에 기여도	52
제 5 장. 연구개발결과의 활용계획	54
제 1 절. 추가연구의 필요성	54
제 2 절. 타 연구에 응용	54
제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	55
제 7 장. 참고문헌	57

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 필요성

일반적으로 *C. thermocellum* 미생물은 cellulose 분해능을 가진 것으로 알려져 있다. 현재 이 균주로 부터 10개의 cellulase 유전자가 클론되어 있으며(43), 이중 7개인 endoglucanase(EG'S)는 가수분해의 Congo red test에 의해 carboxymethyl cellulose(CMC)를 분해할 수 있다. 나머지 3개는 methylumbelliferyl-beta-cellobioside (MUC)를 가수분해할 수 있으나, CMC를 분해할 수는 없다. 이 같은 사실은 아마도 이들 3 유전자가 cellobiohydrolase를 암호화하고 있기 때문인 것으로 추측되고 있다. 현재 분리 동정된 10개 유전자는 multi-enzyme 복합체의 보다 큰 것으로 알려져 있지만, 대장균에서 발현시켰을 때 비 조절 단순 peptide로써 작용한다. EG'S의 5개 유전자(Cel-A, -B, -C, -D, -E)는 일직선상으로 나열되어 있으며, 이중 Cel D(CMC +, MUC +)를 대장균내에서 발현시켰을 때 cellulase는 endo-와 exo-glucanase 활성을 가진다. 따라서, CelD는 cellobiase activity를 가지고 있지 않기 때문에 CelD 효소 단독으로 cellulose를 완전히 분해하리라 기대하기 어렵다. 그러나, 돼지의 소화관 점막의 경우 내인성 cellobiase의 활성을 보유한 것으로 알려져, 이러한 문제점은 돼지에서 β -glucosidase 활력에 의하여 보충될 것으로 기대된다.

따라서 형질전환생쥐의 생산을 통한 예비실험에서 섬유소분해효소의 인위적 조작에 의해 사용된 Cel D 유전자는, 다수의 형질전환생쥐에서 이들 효소가 활성화된 상태로 체장에서 분비되어 소장으로 cellulose의 소화력을 향상시키는 것으로 파악되었다. 본 연구의 예비실험결과는 돼지의 소화효율의 조작이 가능하며, 유전자의 조작에 의하여 태어난 돼지는 섬유소와 같은 식물 세포벽을 소화할 수 있을 뿐만 아니라, 축산산업에서 하나의 문제로 대두되고 있는 biomass의 양을 상당부분 줄일 수 있는 것으로 사료된다.

1. 기술적 측면

유용한 형질전환동물을 생산하기 위한 기술적 요체는 국내의 실정에 맞는 각종 유전자를 도입한 형질전환 모델생쥐를 생산하는 것이며, 또한 경제적 부가가치가 높은 모델동물의 생산을 극대화하는 것이다. 이를 위해서는 섬유소분해 유전자 클로닝, 외래유전자가 도입된 형질전환수정란의 체외(in vitro) 배양, 형질전환수정란의 이용효율증대, 형질전환수정란의

동결보존 및 형질전환수정란의 이식에 의한 형질전환동물의 생산효율증대 등에 관한 기초 연구와 기술개선이 필요하다. 그리고 이러한 기술을 상호 연계시켜 형질전환 모델동물을 생산함으로써 소득의 극대화를 도모해야 한다.

그러나 이상에서 기술한 구체적인 기술들 중 현미미세주입법을 제외한 어느 하나도 현재로서는 만족할 만한 수준에는 이르지 못하고 있다. 따라서 형질전환 모델생쥐의 생산기술을 응용하여, 가축의 산업화를 위해서는 이상에서 기술한 여러 과제에 대한 보다 일관적이며 체계적인 연구가 수행되어야 하며, 현재까지 개발된 국내외의 성적보다는 훨씬 더 양호한 결과를 안정되게 얻을 수 있는 새로운 기술의 개발이 절실하게 필요한 실정이다.

CelD를 이용한 모델생쥐는 유전자의 과발현, 점돌연변이의 도입 등의 여러 조작에 의하여 생산할 수 있다. 유전자의 과발현은 현미미세주입법에 의하여 비교적 간단하게 생산할 수 있으나, 나머지는 ES세포를 이용하여야만 가능하기 때문에 형질전환 모델동물의 생산효율은 지극히 저조하다. 따라서, 본 연구에서는 이와 같은 문제점을 극복하기 위한 하나의 수단으로서 현미미세주입법을 응용한 새로운 방법의 유전자치환법을 개발하고자한다. 이 방법은 기존의 배아주간세포를 이용한 것과는 달리 수정란의 체세포에 DNA/RNA oligonucleotide를 직접 도입하는 방법으로서 비교적 손쉽게 치환유전자를 도입할 수 있다는 장점 외에도, 세포의 경우에는 높은 효율을 가지는 것으로 보고되어 있다. 따라서 유전자 치환 또는 점돌연변이 도입에 의한 형질전환 모델동물의 생산효율을 높이기 위한 새로운 방법으로 DNA/RNA oligonucleotide을 이용하는 방법에 관한 연구가 많은 연구자의 관심의 대상이 되고 있다.

이 방법을 이용한 유전자치환가능성을 최초로 보고한 사람은 Klen (1997)이다. 이들 원리를 간단히 기술하면, 현재까지 그들의 연구 결과는 세포 또는 체내(in vivo)의 특정장기에 국한하여 수행되었을 뿐, 수정란의 체세포에 적용가능성의 실험적 연구는 아직 보고된 바 없다. 수정란의 체세포 또는 핵내에 이 방법을 도입할 경우 거의 동일한 효과가 기대되기 때문에, 지금까지 개발한 배아주간세포의 배양조건에 따른 세포의 분화 또는 낮은 효율을 극복하는데 매우 유용한 수단으로 사용가능성을 제시하고 있다. 현재 본 연구실에서 실시한 예비실험의 결과에 의하면 체내(in vivo)나 체외(in vitro)에서 외래유전자의 효율적 도입이 가능하며, 도입된 유전자가 정상적으로 치환 가능하다는 것을 배반포기의 수정란에서 검정하였다. 따라서 외래유전자 치환의 현미미세주입기술과 접목시켜 유전자치환형질전환 모델동물을 다량으로 용이하게 생산하기 위해서 DNA/RNA oligonucleotide의 세포내 또는 핵내 안정성 유지를 위한 유전자 도입기술(delivery system)의 개발이 매우 시급하다 하겠다.

2. 경제·산업적 측면

UR의 타결과 WTO출범은 국내시장의 대외개방을 불가피하게 하고 있다. 이러한 개방화시대에 있어서 실험동물 분야가 살아남기 위해서는 우리실정에 맞는 각종 모델생쥐의 생산성을 경이적으로 향상시켜야 한다.

한편 섬유소를 고에너지로 전환 가능한 가축을 생산할 수 있다면 적어도 연간 10~30%의 수입대체효과는 물론 소화효율향상에 따른 실질농가소득의 향상을 꾀할 수 있으며, 이러한 대내외적인 요청에 부응하기 위해서는 모델동물의 개발을 경이적으로 향상시킬 수 있는 첨단 기술을 다른 나라보다 먼저 개발하여 형질전환동물의 생산에 활용해야 한다. 특히 우리실정에 맞는 모델동물 기술체계의 개발을 목표로 하는 본 연구는 상술한 사회경제적 요구의 충족을 위해서도 시급히 수행할 필요가 있다.

3. 사회·문화적 측면

최근 축산 오폐수 및 환경문제가 사회적 문제로 대두되고 있는데, 그 원인의 하나로 가축의 사료효율 및 소화불능 배설물의 효과적인 검사를 수행할 모델동물을 사용하지 않는 데서 발생하는 문제라고 할 수 있다. 따라서 지금까지 CelD를 이용한 형질전환모델생쥐의 개발은 위에서 언급한 사회·문화적 측면을 충족시키기 위한 기초연구로서 반드시 수행되어야 할 것이다.

제 2 절. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

현재 비반추동물에서, 식물세포벽과 같은 섬유소를 분해시킬 수 있는 연구는 오직 2곳에서 실시되었다. 이들 연구중 한 그룹은 Cel E유전자를 이용하여 생쥐의 췌장에 발현시킨 결과 소화효소의 분비는 물론 생리적 활성이 있는 것으로 보고하였다. 또한 그룹은 본 연구의 세부연구원으로 내정되어 있는 김진희 박사에 의하여 시도된 CelD 유전자로, 이 또한 전자의 그룹과 동일한 결과를 얻어, 비반추동물에서 소화효율의 조작가능성은 별다른 문제점이 없는 것으로 전망된다. 그러나, 형질전환돼지의 생산은 생쥐와는 달리 그 효율이 매우 저조하여 1마리의 형질전환동물을 생산하는데 최소한 인건비를 제외하고 25,000~500,000 \$정도의 경비가 소요되는 것으로 알려져 있다.

따라서, 본 연구의 성패는 이같이 낮은 형질전환효율을 어떻게 향상시키느냐에 관건이 있다 하겠다. 현재, 이 같은 문제점을 충분히 검토한 본 연구진은 이들 제반 문제점을 개선

하기 위하여 실무연구자를 중심으로 협동연구진을 구성하였다.

제 3 절. 앞으로 전망

본 연구의 완료는, 지금까지 이용 불가능했던 섬유소 분해능력을 가진 형질전환 돼지의 생산으로 이는 농가의 실질적 경쟁력을 도모함은 물론, 국제경쟁력을 강화할 것이다. 이는 연간 약 4조 3천억원에 달하는 사료시장에서도 상당한 변화를 초래할 것이며, 나아가 지금까지 사료의 원료로서 이용 불가능했던 조섬유 및 농가부산물을 사료로 이용가능 할 것이다. 이는 90% 이상을 수입에 의존하는 현 곡물을 50%이하로 낮춤으로서, 상당한 수입대체 효과를 가질 것으로 예측된다. 또한, 현재 대부분이 수입에 의존하는 종돈시장에서도, 수입으로부터 수출로 국제경쟁력이 강화될 것이며, 암모니아등과 같이 독성이 있는 Biomass를 고열량으로 사용가능하기 때문에 분동의 정화비를 상당히 절감할 것으로 기대된다. 마지막으로, 이들 돼지는 섬유소를 분해한 결과 탄수화물을 고 에너지원으로 활용하기 때문에 체지방을 줄이고, 저콜레스테롤 고품질 돈육의 생산이 가능할 것이다.

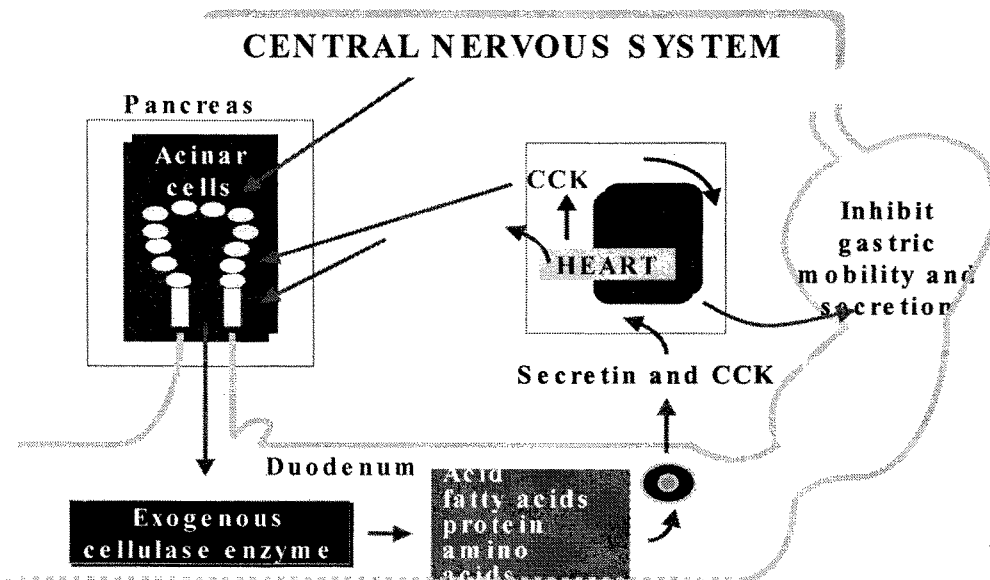
제 4 절. 기술도입의 타당성

부분적인 도입은 가능하겠지만, 기술체계 전체를 도입한다는 것은 불가능하다고 본다. 그것은 형질전환 모델동물의 생산과 같은 첨단기술은 개발 즉시 특허에 의해 보호될 뿐만 아니라 각국이 자국의 이익을 보호하기 위해 기술수출을 억제하기 때문이다. 또 생물공학기술은 화공학적 기술과는 달리, 기술 공정이 언제나 가변적이고 장기간에 걸친 연구자의 숙련을 필요로 함으로 특허를 도입해도 소기의 성과를 얻을 수 없으므로 자체 개발이 국익에 더 큰 도움이 될 것이다. 따라서 본 연구의 개발목표는 형질전환모델동물산업의 국제 경쟁력을 강화시키고 나아가 그것을 선도하기 위하여 다른 나라에 앞서 형질전환 모델동물 생산기술의 견고한 확립과 안정된 정착을 도모하고, 이 기술을 바탕으로 고부가가치를 가진 Cel D 형질전환돼지의 생산을 산업화하여 수입 대체 효과는 물론이거니와 수출을 통한 안정된 소득의 증진을 도모하는데 있다.

제 2 장. 국 · 내외 기술개발 현황

수정란의 전핵내 유전자 미세주입은 1980년 Gordon 그룹에서 처음 시도하였으며 이것이 형질전환 가축을 생산하는 첫 번째 시도였다. 그러나 그후 1982년 Palmiter 그룹에서 사람의 성장호르몬(human growth hormone)유전자가 도입된 마우스를 생산하기 전까지는 널리 알려지지 않았다. 그 후 2000년 전까지 형질전환 가축의 생산은 유전자를 전핵내 직접주입하는 방법으로 대부분 성공한 후, 곧 대동물을 이용한 단백질 생산을 위한 단계로 전환되면서 “pharming”이라는 형태의 용어가 등장하였다. 그러나 많은 노력에도 불구하고 수정란의 착상과 임신율 및 분만율이 저조하여 이러한 문제점을 개선하기 위해 유전자가 미세주입된 수정란의 이식전 유전자가 확실히 도입된 수정란을 선별하려는 시도가 있었으며, 이런 방법은 태어나는 동물의 새끼에서 형질전환 동물의 생산효율을 증가시킬 수 있다는 것이다. 이러한 전략으로 시도된 것이 1993년 Vernet 등은 β -galactosidase와 같은 reporter gene을 이용하여 수정란이식 전 유전자가 도입된 수정란을 선별하였으며, 그 후 1995년 Chan 등은 SEAP(Secreted placental alkaline phosphatase)를, Miranda 등은 firefly luciferase, Ikawa 등은 green fluorescent protein(GFP)을 이용한 형질전환 실험동물 및 가축생산을 위해 수정란의 선별방법으로 사용하였다. 이와 함께 Cousens 등(1994), Bowen 등(1994) 과 Hyttinen 등(1996)은 reporter gene이 첨가된 착상전 수정란의 유전자 도입여부를 판정하기 위해 PCR 방법을 이용하였으며 1996년 William 등은 유전자의 염색체내 도입여부를 알 수 있는 FISH (fluorescent in situ hybridization)방법을 보고하였다. 이러한 많은 연구에도 불구하고 1997년 Takada 등이 수정란이식 전 유전자가 도입된 수정란 선별을 위해 GFP유전자가 도입된 형질전환 Mice를 생산한 이후 새로운 형태의 형질전환 수정란 선별방법은 아직 보고된바 없다. 한편 수정란의 전핵내 유전자를 직접 주입하는 방법 외에도 수정란의 할구를 이용한 핵이식(Nuclear transfer : NT)방법이 1986년 Willadsen 등에 의해 성공을 거두기는 하였으나 수정란의 할구를 이용하여 우수가축의 복제를 위한 방법 이었다. 그 후 1997년 영국의 Willmut 그룹에서 체세포를 이용한 복제양 돌리를 생산하면서 형질전환 가축생산 시 복제 방법을 도입할 수 있는 전기를 마련한 이후 2000년 PPL사, 2002년 Prather 등이 형질전환 복제 돼지 생산에 성공하였다. 그러나 어느 방법도 아직까지는 형질전환 가축을 생산하기 위한 최적의 조건이라 할 수 없다. 한편 바이러스를 이용하는 방법 및 정자(sperm)를 유전자의 전달자로 이용하는 방법 등이 최근 보고되고 있으나 복제나 미세주입법에 비해 간편한 방법일 뿐 형질전환 가축생산 효율 면에서는 크게 차이가 없다. 동물이 보유하고 있는 활

성유전자는 약 10만개로 알려져 있다. 이들 유전자를 인위적으로 조작하여 인류가 이용할 수 있게 된 것은 금세기 최대의 과학적 업적중의 하나로 간주된다. 국내의 경우 생명공학연구소의 lactoferrin 유전자가 도입된 형질전환 젓소 생산이후, 축산기술연구소의 사람의 조혈 촉진 유전자(Erythropoietin : EPO)가 도입된 형질전환 돼지 생산, 서울대 황우석 교수팀의 복제젓소 생산 및 경상대 김진희 교수팀의 복제돼지의 생산 등, 그 동안 국내에서도 생명공학을 이용한 많은 연구가 진행되고 있으며, 그 성과들이 가시화 되고있다. 한편 2002년 Golovan등은 인 분해효소 유전자(phytase)가 도입된 형질전환 돼지를 생산하였는데, 이러한 형질전환 돼지는 분중 인 성분이 75%이상 감소하는 것으로 보아 돼지 분의 환경공해적 요인을 감소시키는 것으로 알려졌다. 이러한 측면에서 보면 CelD가 도입된 형질전환 돼지의 생산은 섬유소의 여러 형태 중, 특히 D계통의 섬유소를 분해시킴으로써 비 반추동물인 돼지에서 열악한 조사료를 사료로 이용함으로써 돼지의 생산비 중 많은 부분을 차지하고있는 사료이용성을 높임으로 생산성을 증대시킬 수 있을 것으로 기대된다.



Putative pathways regulating exogenous cellulase D enzyme

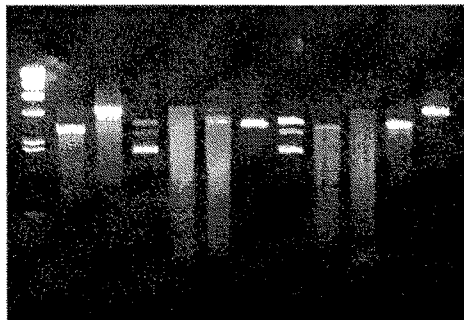
그림 1. 섬유소 분해효소에 의한 섬유소 분해 가상도

제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 형질전환 마우스 생산

1. 섬유소분해효소 관련 유전자 (CelA, B, C, D, E 및 xylen)의 cloning

섬유소분해효소관련 cDNA의 크로닝을 위하여, 소의 제4위에 기생하는 미생물로부터 전체 유전자를 분리한후, DNA library을 작성하였다. 이들 library로 부터 목적의 섬유소분해 관련 유전자를 크로닝 하였다. 증폭에 사용한 PCR primer는 5'- gCg gCC gCA ATg AgT AgA ATg CCT TgA AAA gCA-3' 와 5'- AgA TCT TTA TCA gAA TTT ATA TTg gTA A-3'를 사용했으며 PCR 조건은 98℃에서 1분간 변성시킨 후, 68℃에서 10분, 72℃에서 10분간 30 cycle을 실시하였으며, 마지막으로 72℃에서 10분간 extension시킴으로서 PCR을 종료했다(그림 2). 이때 증폭된 cDNA을 T-vector에 삽입하여 자동 DNA 염기서열분석기를 이용하여 직접적인 방법에 의해 유전자 배열을 결정하였다(그림 3).



←
≍ 2.0 kb



T-vector
←
←
Cel D

그림 2. PCR을 이용한 CelD 유전자 증폭

그림 3. T-vector 이용 CelD 크로닝

2. PCR에 의한 조직특이적 프로모터 유전자의 크로닝

흰쥐 조직으로부터 고분자 DNA를 추출하였다. 즉, 1ml의 혈액에 약 700 μ l의 lysis buffer (50mM의 Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M NaCl, 20mM EDTA, 1% SDS)와 proteinase K (최종농도 150 μ g/ml)을 첨가한 후, 약 55℃에서 하룻밤 정치시킨 후 Phenol법에 의하여 게놈 DNA를 추출하였다. 추출한 게놈 DNA는 GenBank의 유전자 배열을 참고로 하여 LTR-PCR법에 의하여 크로닝하였다. 목적의 조절특이 영역은 유전자은행의 자료를 기초로 하여 돼지와 흰쥐 유래의 게놈 DNA를 각각 분리 증폭하기 위하여, Takara사의 LA kit를

이용하여 돼지 및 흰쥐와 상동성이 높은 부분을 primer로 작성하여 Perkin Elmer에 의하여 증폭하였다. 증폭에 사용된 PCR primer는 5'-CCT TgT TCT gTC TTT Agg TAT-3'와 5'-TTg TTg gAg AgA gTA gTC CAC-3'이며 PCR 조건은 94°C에서 5분간 변성시킨 후, 94°C에서 1분, 55°C에서 2분, 72°C에서 2분간 30 cycle을 실시하였으며, 마지막으로 72°C에서 10분간 extension시킴으로서 PCR을 종료하였다(그림 4). 생산된 PCR산물을 0.7%의 전기영동에 의하여 분리한후, pBluscript SK (+)벡터에 삽입함으로써 칬장 특이적 조절 DNA를 작성하고, 이들 plasmid vector로부터 제한효소의 map 및 유전자배열을 결정한다(그림 5). 이들 분리된 DNA가 칬장 특이적 발현을 유도가능한지를 증명하기 위하여, 분리된 유전자는 각 중간 상동성이 높은 내부 primer를 이용하여 95°C에서 1분, 60°C에서 1분30초, 72°C에서 2분간 약 30 cycles을 증폭함으로써 확인하였으며, 이들 DNA는 자동염기서열분석기에 의하여 염기서열 분석함으로써 재확인하였다.

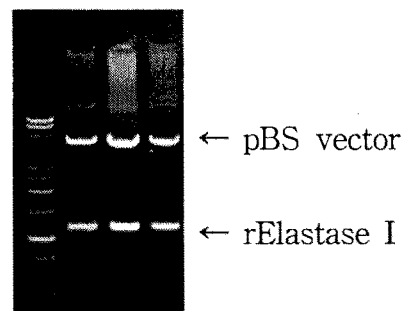
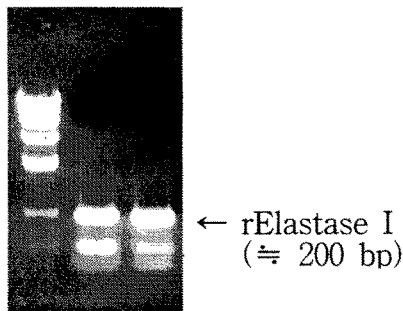


그림 4. PCR 이용 rElastase I 프로모터 증폭 그림 5. pBS KS벡터 이용 rE1 크로닝

3. 유전자 재조합 및 유전자 증폭

섬유소분해 관련 CeID 유전자를 조직 특이적 프로모터에 재조합한 후 수정란내의 유전자 도입을 위한 유전자를 대장균에 변성시켰다. 이들 LB-agar평판으로부터 하나의 콜로니를 골라 10ml의 LB 배양액에서 접종시킨 후 37°C 교반 배양기를 이용하여 OD₆₀₀에서 0.4를 나타낼 때까지 배양하였다. Polyethylene 원심분리용 튜브를 이용하여 4°C에서 3,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상층부를 완전히 제거하였다. 다시 전체량의 1/3에 해당하는 양의 RF I (100mM RbCl, 75mM CaCl₂, 15% glycerol) 용액을 전체량의 1/12.5를 가하여 얼음에서 15분 동안 놓아둔 다음 1.5ml eppendorf tube에 분주하여 질소탱크에서 얼린 후 초저온 냉동고 (-70°C)속에 보관하였다. 재조합된 plasmid DNA 10ng을 0°C 얼음 속에 냉각

시키고 얼음 속에서 해동시킨 competent cell (JM 101) 100 μ l와 혼합시킨 다음, 얼음 속에서 30분간 정체시키고 42 $^{\circ}$ C 온탕기로 옮겨 90초간 고온 처리하여 plasmid DNA의 세포막 통과를 유도하였다. 처리된 cell들을 다시 LB plate에 plating한 후 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 12~16시간 배양했다.

Plate상에 나타난 하나의 colony를 채취하여 ampicillin (50 μ g/ml)이 함유된 5ml의 LB용액에서 12~16시간 37 $^{\circ}$ C 교반 배양기 (225rpm)에서 배양하여 1ml만을 microtube에 옮긴 후, 12,000rpm에서 30초간 원심분리하여 침전물을 다시 100 μ l의 Solution I (25mM Tris-Cl (pH 7.5), 10mM EDTA (pH 8.0), 50mM glucose)용액으로 녹인 후, 200 μ l의 Solution II (0.2N NaOH, 1% SDS)를 첨가하고 교반하면서 녹여 얼음에 방치하였다. 다시 150 μ l의 Solution III(5M potassium acetate 50ml, glacial acetate 11.5ml, H₂O 28.5ml)을 첨가하여 3~5분 동안 얼음에서 냉각시켜 박테리아의 막을 파괴하였다. 다시 12,000rpm 5분간 원심분리하여 상층액만을 분리한 후, 동일량의 phenol을 첨가하여 불순물을 제거한 다음 2배의 ethanol을 첨가하여 잘 섞은 다음 4 $^{\circ}$ C 얼음물 속에서 10분간 정치 후 다음 12,000rpm 15분간 원심분리하고 침전물을 진공 건조시킨 다음 70% ethanol로 세척한 후 20 μ l의 TE (10mM Tris, pH 8.0, 1mM EDTA) 용액으로 녹인 후 재조합 plasmid를 검색하기 위해 Bgl II와 EcoRI/Sal I 등의 제한효소로 잘라 1% agarose gel에서 확인하였다(그림 6).

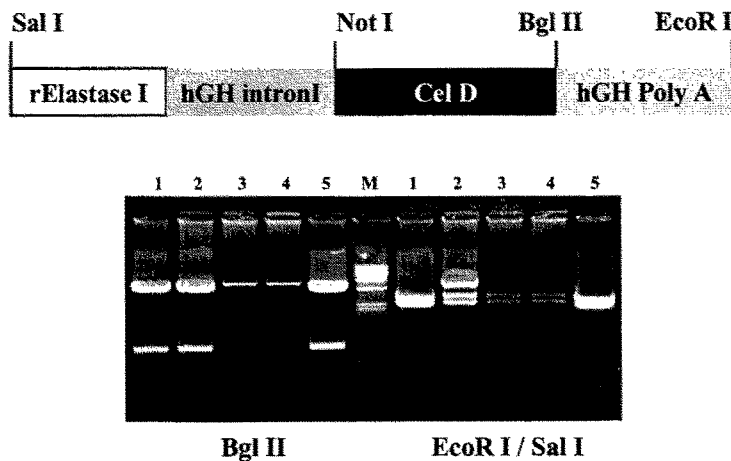


그림 6. 제한효소 처리에 의한 크로닝된 유전자의 확인

확인된 균주를 ampicillin (50 μ g/ml)이 포함된 500ml의 LB배양액에서 16시간동안 37 $^{\circ}$ C 교반 배양기(225rpm)에서 배양한 후 15분간 4,000rpm으로 원심분리하여 상층액을 버리고

10ml의 Solution I (25mM Tris-Cl (pH 7.5), 10mM EDTA (pH 8.0), 50mM glucose 용액으로 녹인 다음, 50ml tube에 옮긴 후 상온에 10분간 방치하였다. 20ml의 Solution II (0.2N NaOH, 1% SDS)용액을 첨가한 후 10분간 얼음속에 놓은 다음 15ml의 Solution III (3M potassium acetate (pH 4.6), glacial acetic acid 11.5ml, H₂O 28.5ml)을 첨가하여 섞은 후, 얼음에서 20분간 방치했다. 먼저 전체 45ml의 세포와 각종 용액을 phenol extraction을 실시하여 불순물을 제거한 다음, 초원심분리용 튜브에 옮긴 후 4,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액만을 회수한 후 0.6배의 iso-propanol과 혼합시켜 DNA침전을 유도했다. 다시 5,000rpm으로 15분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 70% ethanol로 세척, 건조시킨 다음, 3ml의 TE용액으로 녹인다. 2.83g의 CsCl₂와 0.25ml의 EtBr(ethidium bromide, 10mg/ml) 용액을 넣어 완전히 섞은 후, 20°C, 55,000rpm에서 18시간 초원심분리한 후, handtype UV 램프로 circular supercoiled plasmid층을 주사바늘(18 gauge)을 이용하여 tube를 찢어서 회수한다. 회수된 plasmid 함유 용액내의 EtBr을 증류수에 포화된 butanol로 5-6회 세척하여 제거하고, CsCl₂는 약 24시간 동안 3회 투석을 통해 제거하여 원하는 plasmid DNA를 다량 획득하였다.

추출된 유전자의 농도는 spectrophotometer로 OD₂₆₀에서 측정하였다. 미세주입용 선형유전자를 얻기 위하여, CelD 유전자를 갖고있는 각각의 plasmid를 제한효소인 SalI/EcoRI으로 절단하여 1% low melting agarose gel에서 전기영동 시키고, 각 유전자들을 포함하고 있는 DNA band를 면도칼로 도려내어 dialysis tube에 넣어 전기영동한후 phenol로 2번 세척하고 난 후 phenol / chloroform으로 세척하였다. 세척된 부유액을 ethanol로 침전시킨후 12,000rpm으로 5초간 원심분리하여 회수한 침전물을 50µl의 TE용액으로 녹인 후 45°C에서 5분간 정제시킨 후, 5초간 원심분리하여 상층액만을 취하여 냉동고에 보관하였다.

4. 형질전환생쥐의 생산

생쥐 수정란은 FVB생쥐를 무작위로 선발하여 5IU의 PMSG을 투여한후 48시간후에 5IU의 hCG을 투여한후, 하룻밤 수놈과 동거후 hCG투여후 22시간째 난관으로부터 회수하였다. 전핵이 뚜렷한 난자만을 선발한후 매뉴플레이트아래서 약 2pl (µg/ml)의 celD유전자를 도입한 후, 가임 생쥐의 난관에 이식함으로써 산자를 생산했다(표 1).

표 1. 재조합 발현벡터가 미세주입된 생쥐 수정란 이식 및 형질전환 생쥐 생산

주입 유전자	수정란 수(개)	미세주입 수정란수(개)	생존 수정란수(개)	이식 수정란수(개)	가임 대리모수	산자수	형질전환 산자수
CelD	700	700	429	429	25	33	4

태어난 산자의 귀조직 또는 발톱조직에서 genomic DNA를 정제하여 PCR을 수행하였다. 조직을 Lysis buffer (60mM Tris, pH 8.0, 100mM EDTA, 0.5% SDS)에 50 μ g/ml의 Proteinase K를 첨가한 용액에 넣은 다음 55 $^{\circ}$ C 교반 배양기에서 3~4시간 두어 완전히 녹인다. 12000rpm에서 30초간 spin down하여 상층을 새 튜브에 옮긴다. Phenol/CHCl₃를 이용하여 3회 처리를 한 후 CHCl₃만 1회 처리한다. 총량 1/10의 3M NaAc(pH 5.2)와 동량의 에탄올을 첨가하여 결정화된 DNA를 새 튜브로 옮긴다. 70% 에탄올로 1회 처리하고 건조시킨 후 적정량의 TE에 녹인다. PCR에 사용한 프라이머는 5'-TCC TgA TAA gAg CCC TAT AAA g-3'와 5'-ATT TgC AgC TAT AgT CgC CTT T-3' 같이 합성하여 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 58 $^{\circ}$ C에서 1분 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 1분의 조건으로 30 회 반복하여 반응하였으며, PCR 검정결과를 그림 7에 나타내었다.



그림 7. 섬유소 분해효소 재조합 유전자(rE1-CelD) 도입 형질전환 생쥐의 PCR 검정결과 (PCR 증폭 DNA 단편 : \approx 600 bp)

형질전환된 생쥐로 판명된 계통을 보통 생쥐와 교배하여 자손을 확보하였다. F1 산자도 PCR을 이용하여 transmission 유무를 확인하였으며(그림 8), F1 형질전환율은 36%로 나타났다(표 2). 따라서 F1 형질전환 산자를 이용해서 다음 실험을 수행하였다.

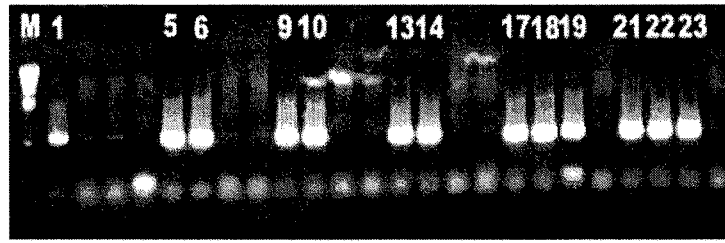


그림 8. rE1-CelD 유전자가 도입된 형질전환 생쥐의 F1 산자에 대한 PCR 검정

표 2. 4계통의 형질전환 생쥐를 이용한 F1 생산과 형질전환율

계통	성별	산자수	형질전환 마리수	형질전환율(%)
CelD-1	암	9	5	56
CelD-2	수	20	4	20
CelD-3	암	10	6	60
CelD-4	수	11	3	27
계		50	18	36

5. 섬유소 분해 유전자의 발현검정

F1 형질전환 산자를 각 계통별로 분리한 다음 1주, 4주, 6주, 8주령 때의 체중을 측정하여(표 3) 각 계통별 3마리 이상씩 수컷, 암컷으로 나누어 평균을 비교하여 간접적으로 섬유소 분해유전자의 발현을 확인하였다(그림 9). N.D는 형질전환 산자를 얻지 못하여 확인하지 못한 개체를 대신 표기하였다. Negative mouse는 CelD-1의 산자에서 PCR을 하여 형질전환 산자가 아닌 개체를 사용하였다.

그림 9에서 나타난 것과 같이 섬유소 분해 유전자가 전이되지 않은 생쥐(negative mouse) 암수와 섬유소 분해 유전자가 전이된 생쥐(CelD) 암수의 체중 변화를 비교하였을 때 생시 및 1주령까지는 체중의 차이가 나타나지 않았다. 그러나 1주령 이후부터 섬유소 분해 유전자가 전이된 생쥐 암수가 그렇지 않은 생쥐의 암수에서 체중의 차이가 나타남으로서 체중의 변화를 비교할 때 형질전환된 생쥐가 섭취 사료의 분해를 통하여 체중의 증가로 이어진다는 것을 알 수 있는 있었다.

표 3. 형질전환생쥐 계통별 생산 F1의 측정 체중

계통	성별	체중				
		생시	1주령	3주령	4주령	5주령
CelD-1	수컷	0.50	6.5	ND	16.5	23.0
	암컷	0.50	6.0	ND	16.0	21.5
CelD-2	수컷	0.47	5.8	6.8	15.5	ND
	암컷	0.49	6.0	7.5	15.5	ND
CelD-3	수컷	0.50	6.5	ND	ND	ND
	암컷	0.49	6.0	ND	13.9	19.7
CelD-4	수컷	0.50	6.0	ND	10	16.5
	암컷	0.48	5.5	ND	9	15.0
Negative mouse	수컷	0.49	5.9	ND	12	19.8
	암컷	0.48	6.0	ND	12.8	18.7

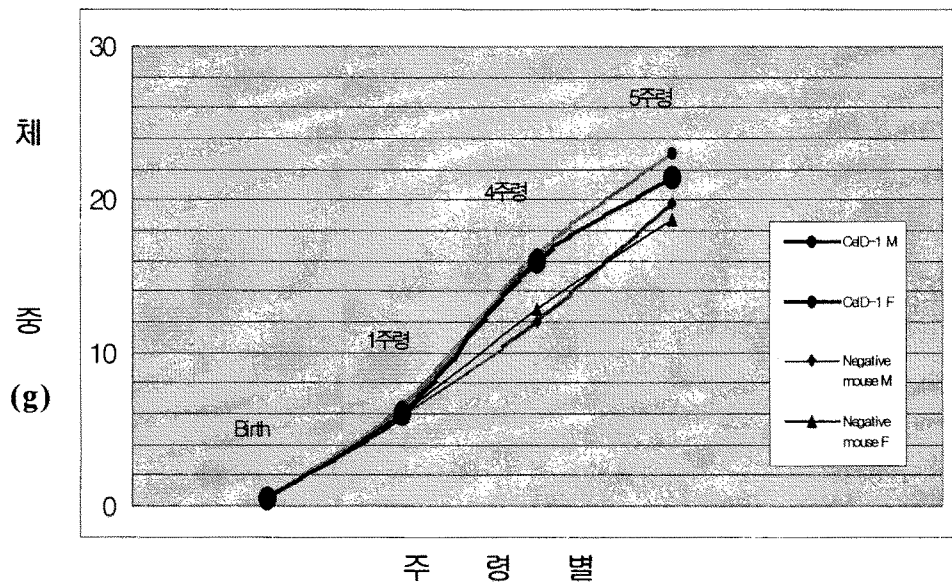


그림 9. 섬유소 분해 유전자 발현생쥐의 체중변화

섬유소분해 유전자의 발현을 직접적으로 확인하기 위하여 southern(그림 10)과 northern blot(그림 11)을 실시하였다. 각 계통별로 수컷을 1마리씩 선택하여 꼬리를 잘라 55℃에서 lysis buffer로 녹인 후 DNA를 분리, 정량하여 20 μ g을 이용하였다. Probe는 Stu I 을 처리하여 얻어진 575bp를 이용하였으며 5일간 노출하여 현상하는 방법으로 southern blot을 실시하였으며 positive control로 미세주입용 DNA를 사용하였다. Northern blot은 동일 수컷의 취장을 trizol에서 분쇄 정량하여 20 μ g을 이용하였다. Negative control 은 PCR 을 하여 형질전환 산자가 아닌 개체를 사용하였다. Probe는 southern blot과 동일한 것을 이용하였으며 5일간 노출하여 현상하는 방법으로 northern blot을 실시하였다.

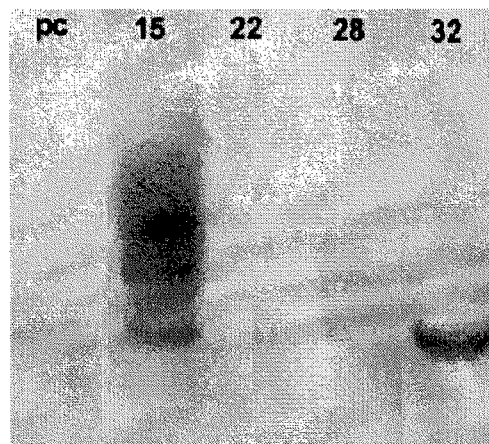


그림 10. 섬유소 분해효소 유전자가 형질전환된 개체에 대한 southern blot 결과

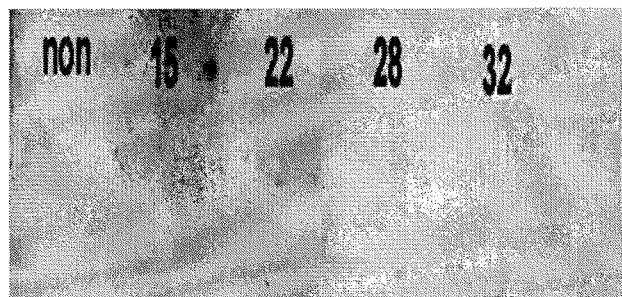


그림 11. 섬유소 분해효소 유전자가 형질전환된 개체에 대한 northern blot 결과

6. CelD 단백질의 검정

CelD 단백질이 체내에서 제대로 만들어지는지를 검정하기 위해 GST 유전자 융합 시스템을 이용하여 항체를 제조하였다(기존의 Pasteur에서 만든 CelD 항체로 western을 해보았으나 비특이적 밴드만이 관찰되었었다)(그림 12).

E.coli

non 15 22 28 32

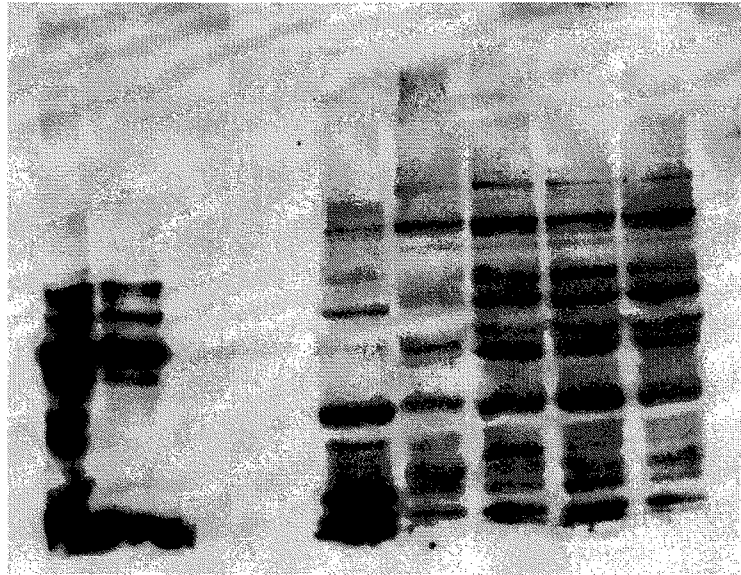


그림 12. CelD anti-body를 이용한 Western blot 결과(antibody from Pasteur)

SP73 벡터의 EcoR I 제한효소부위에 삽입되어 있는 CelD 단편에 PCR을 이용하여 BglII 제한효소부위를 부착 시켜(BglII site attaching primer 5'-gAT CAg ATC TTA TCA ATT TgA TTC ACg AAT-3') 전기영동후 gel elution 하여 pGEM-T 벡터에 접합시킨다. DH5a에 형질변환하여 plasmid를 midiprep.후 BglII 처리한다.

CelD 340 primer와 SP6 primer 사용하여 Sequencing으로 확인하였다. 전기영동후 gel elution 하여 BamH I , CIP(self ligation 방지) 처리한 pGEX-4T vector에 ligation 시킨다

pGEX-4T BamH I site	celD BglII site
CIGGTTCCGCGIGGATCCCCGAAT	GATCAGATCTTATCAATTTGATTCA
ligation 결과	
CIGGTTCCGCGIGGATCTTATCAATTTGATTCA	
(BamH I 과 BglII 는 compatible end.)	

선별된 colony를 선택하여 BL21에 transformation하여 one colony를 1/2씩 e-tube에 1ml LB배지로culture하여 IPTG induction 하였다. Control로 pGEX-4T vector를 사용하였다. inclusion body 즉 insoluble한 형태로 protein이 발현되어 GST system에서 95KD의 protein이 cytosol로 가기는 어렵다고 판단 340 primer와 1224 antisense primer를 사용하여

PCR에서 884bp의 fragment를 만들어 CelD를 truncated 하여 온도와 IPTG농도에 변화를 주어 induction 하였다(표 4, 그림 13).

CelD : $(1,800 \div 3) \times 110 = 66\text{KD}$	CelD : $(884 \div 3) \times 110 = 32.4\text{KD}$
GST : 29KD	GST : 29KD
▶ $66 + 29 = 95\text{KD}$	▶ $32 + 29 = 61\text{KD}$

표 4. IPTG 농도, 유도시간 그리고 온도에 따른 CelD 항체의 측정 O.D. 값

구 분	O.D(A ₆₀₀)					
	1.5	1.2	0.8	1.0 >	1.0 >	1.0 >
	A		B	C		
IPTG 농도 (mM)	0.1	0.5	0.5	0.5	0.1	0.07
유도 시간 (min)	90	90	120	120	120	120
온도(°C)	25	25	25	20	20	20

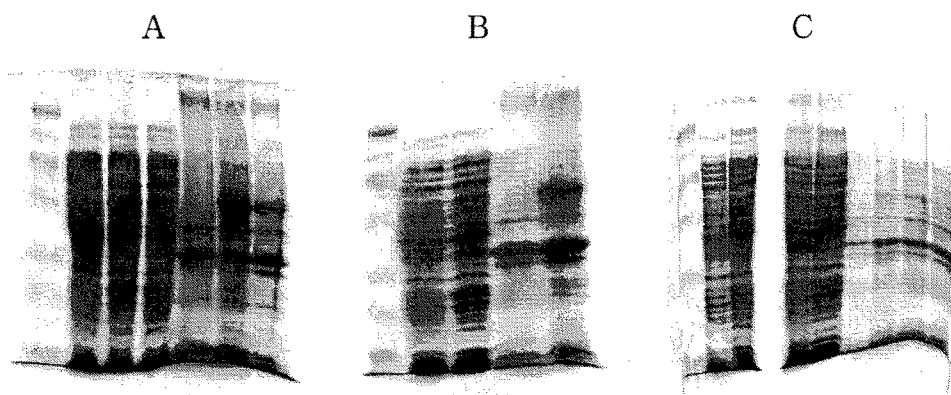


그림 13. 각 O.D. 별 단백질 전기영동 결과(Coomassie Blue 염색)

7. CelD의 활성화도 조사

6의 결과 20°C에서 induction시 cytosol에서 분리 가능할 정도로 발현되어 GST Fusion system의 batch method로 CelD 항체를 분리하여 Western blot을 실시하였다.

Transgenic mouse 15, 22, 28, 32 line Pancreas를 잘라낸 후 lysis buffer에서 homogenize 하여 Bicinchoninic Acid(BCA) assay kit로 단백질을 정량 $50\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 를 SDS-PAGE 후 transfer 하여 1/2,500 의 농도로 희석한 CelD 항체로 ECL kit를 이용하여 검정하였다. 그러나 비특이적인 밴드만 관찰되었다. 이것은 만들어지는 단백질 양이 Western blot으로 검정하기에는 적은 것으로 생각되어 enzyme activity assay를 실시하였다. Standard curve 를 위해 sigma에서 구입한 cellulase(c-1184)와 기질로 p-nitrophenyl β-D-cellobioside(sigma N-5759)를 사용하였다(그림 14. 표 4). 96 well plate를 이용하여 $100\mu\text{l}$ 에 $50\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도로 37°C 에서 1시간동안 p-nitrophenyl β-D-cellobioside(sigma N-5759)를 기질로 하여 CelD의 enzyme activity를 UV spec. 405nm 에서 측정 한 결과는 다음과 같다.

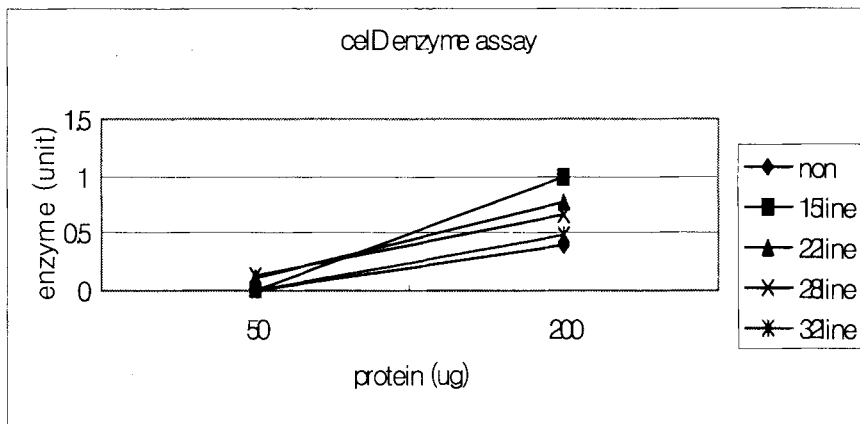


그림 14. CelD 활성측정을 위한 ECL kit standard curve

표 4. p-nitrophenyl β-D-cellobioside를 이용 Elisa 분석결과

형질 전환생쥐 계통	기질의 농도(ug)	
	50	200
non	0	0.4
15	0	1
22	0.1	0.77
28	0.13	0.66
32	0	0.48

8. 쥐의 분중 섬유소함량 분석결과

CeID가 형질전환된 생쥐에서 cellulase의 활성을 알아보기 위해 분중 섬유소함량을 분석하였다. 쥐를 일주일간 사료에 적응시킨후 연속3일간 각 line별로 총 사료섭취량과 총 배설량을 하루단위로 측정하고, 배설물은 매일 정해진 시간에 채취하여 분석하였다(표 5).

표 5. 형질전환 생쥐 분 분석을 위한 사료 배합구성표

시료명		DM	CF	시료명		DM	CF
		%				%	
쥐사료	(A-F)	90.45	4.61	22line2	(A-F)	91.91	14.29
	(M-F)	100.00	5.09		(M-F)	100.00	15.55
control	(A-F)	91.91	18.48	22line4	(A-F)	91.91	13.49
	(M-F)	100.00	20.11		(M-F)	100.00	14.67
contro2	(A-F)	91.91	15.57	28line	(A-F)	91.91	16.06
	(M-F)	100.00	16.94		(M-F)	100.00	17.48
contro4	(A-F)	91.91	14.33	28line2	(A-F)	91.91	14.31
	(M-F)	100.00	15.59		(M-F)	100.00	15.57
15line	(A-F)	91.91	14.18	28line4	(A-F)	91.91	13.68
	(M-F)	100.00	15.43		(M-F)	100.00	14.89
15line2	(A-F)	91.91	13.32	32line	(A-F)	91.91	13.50
	(M-F)	100.00	14.49		(M-F)	100.00	14.68
15line4	(A-F)	91.91	14.61	32line2	(A-F)	91.91	14.43
	(M-F)	100.00	15.89		(M-F)	100.00	15.70
22line	(A-F)	91.91	15.46	32line4	(A-F)	91.91	11.49
	(M-F)	100.00	16.82		(M-F)	100.00	12.50

- * A-F : 급여기준 M-F : 건물기준
- * DM : 건물량(%) CF : 조섬유(%)

영양소의 소화정도는 영양소의 섭취량과 총배설량을 측정하여 다음식으로 구하여 평가한다.

※ 예를 들어 조사하고자한 영양소가 섬유소인 경우는

- 섬유소 소화율(%) = (섬유소 섭취량(g) - 섬유소 배설량(g))/섬유소 섭취량(g)×100
- 섬유소 섭취량 = 총사료섭취량(g)/일 × 사료중 섬유소함량(%)
- 섬유소 배설량 = 총분배설량(g)/일 × 분중 섬유소함량(%)

각 처리구별 통계적 유의성은 general linear model의 Duncan's multiple range test를 이용하였으며 그 결과 5%의 유의수준에서 유의차를 보였다(표 6, 그림 15)

표 6. General linear model의 Duncan's multiple range test 결과

형질전환생쥐 계통	분중 섬유소 소화율(%)
3 cont.	17.547
3 lin15	15.270
3 lin22	15.680
3 lin28	15.980
3 lin32	14.293

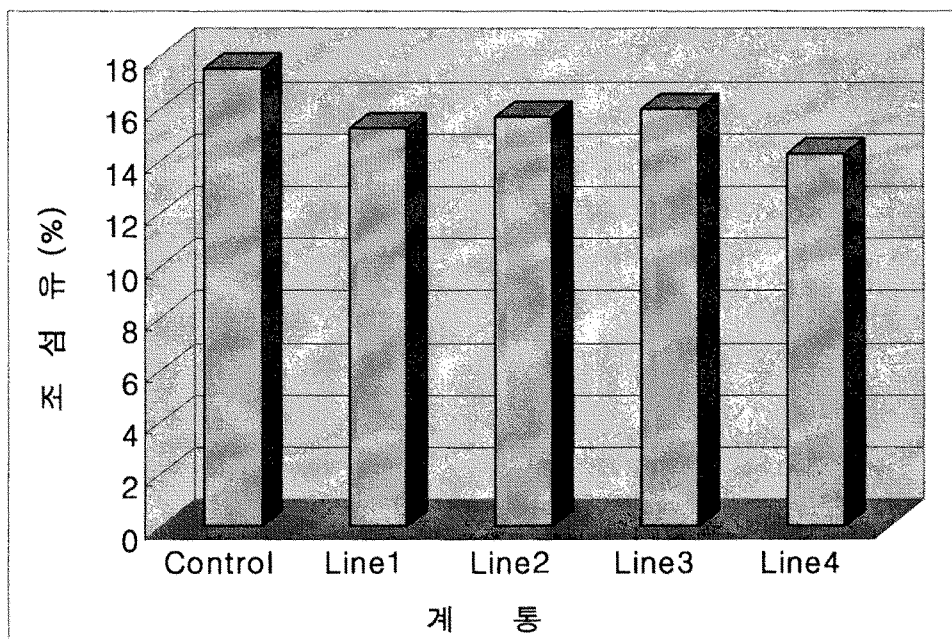


그림 15. 형질전환 생쥐 계통별 분중 조섬유 함유율 (%)

9. 췌장특이적 프로모터 유전자의 크로닝

췌장에서 좀더 특이적이고 강력한 프로모터를 크로닝하기 위해 인슐린 프로모터 팩터 1을 크로닝하였다. Genomic DNA를 흰쥐 조직으로부터 분리하기 위하여 1ml의 혈액에 약 700 μ l의 lysis buffer (50mM의 Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M NaCl, 20mM EDTA, 1% SDS)와 proteinase K (최종농도 150 μ g/ml)을 첨가한후 약 55 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 인큐베이션후 Phenol법에 의하여 추출하였다. 추출한 genomic DNA는 Gene Bank의 유전자 배열을 참고로 하여 LTR-PCR법에 의하여 크로닝하였다. 목적의 조절특이 영역은 유전자은행의 data를 기초로 하여 돼지 및 흰쥐 유래의 genomic DNA를 각각 분리 증폭하기 위하여, Takara사의 LA kit를 이용하여 돼지 및 흰쥐와 상동성이 높은 부분을 primer로 작성하여 Perkin Elmer에 의하여 증폭하였다. 증폭에 사용된 PCR primer는 5'- TAT AgA AAT TTg TAA gAT -3' 와 5'- CCA CCC CAg ATC gCT TTg -3'이며 PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성시킨후, 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 50 $^{\circ}$ C에서 2분, 72 $^{\circ}$ C에서 2분간 30 cycle을 실시하였으며, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 extension시킴으로서 PCR을 종료하였다. 생산된 PCR산물을 0.7%의 전기영동에 의하여 분리한 후, pBluscript SK (+)벡터에 삽입함으로써 췌장특이적 조절 DNA를 작성하고, 이들 plasmid vector로부터 제한효소의 map 및 유전자배열을 결정한다. 이들 분리된 DNA가 췌장특이적 발현을 유도가능한지를 증명하기 위하여, 분리된 유전자는 각 중간 상동성이 높은 내부 primer를 이용하여 95 $^{\circ}$ C에서 1분, 60 $^{\circ}$ C에서 1분30초, 72 $^{\circ}$ C에서 2분간 약 30 cycles을 증폭함으로써 확인하였으며, 이들 DNA는 자동염기서열분석기에 의하여 분석함으로써 재확인하였다

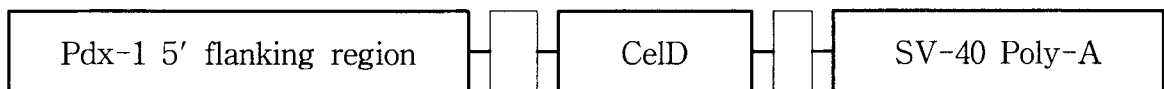


그림 16. 재조합 발현벡터로 구축된 Cel D 발현벡터

10. 발현검정된 CelD 마우스의 계통 확립

발현검정된 CelD 15, 22, 28, 32 line 중 활성도가 높았던 22, 15 line의 계통을 확립하기 위해 FVB 마우스와 교배하여 산자를 생산후 PCR로 검정하였다. 이후 homo 마우스를 생산하기 위해 CelD 마우스끼리 교배하여 PCR 과 southern blot으로 검정하였다. 생산된 형질전환동물은 췌장에서의 발현정도에 따라, 2개의 라인으로 분류하였다. 이들 각 라인의 생쥐는 대조구의 생쥐와 교배에 의한 germline 양도율을 조사하였다(표 7). 또한, 이들

테로 형질전환동물로부터 항상 celD유전자를 다음세대에 전달하는 호모 형질전환동물의 생산은 헤테로와 헤테로를 교배함으로써 두배의 copies수를 가진 호모 형질전환 마우스를 생산하였다(표 8).

표 7. 두 계통의 형질전환 생쥐를 이용한 후대생산 및 유전자 전이율

계통	산자수	형질전환 생쥐수	형질전환율(%)
CelD-15	61	23	38
CelD-22	58	15	26

표 8. 두 계통 형질전환생쥐 후대의 집합체 형태

계통	성비	산자수	이형집합체 수	동형집합체 수
CelD-15	9	50	20	11
	14			
CelD-22	5	25	11	5
	10			

11. CelD 마우스 수정란 동결

생산된 homo ♂ Cel D 마우스와 4-7주령의 FVB 암컷을 PMSG와 hCG를 이용하여 과배란하여 교배를 시켰으며 homo ♀ Cel D 마우스는 호르몬 처리 후 4-7주령의 FVB 수컷과 교배후 20시간 후 암컷의 질전을 확인하여 난관으로부터 수정란을 회수하였으며, 수정란 동결은 완만동결법을 이용하였으며, 기본 동결액은 PB1 용액을, 동결보호제는 1M DMSO (Dimethyl sulphoxide, Sigma, D2650, USA)를 사용하였다. 생존한 수정란을 고른 다음 0.5M DMSO가 포함된 PB1용액에서 2분간 평형하고 최종농도인 1M DMSO가 포함된 PB1용액에서 10분간 방치하였다. 최종 동결보존액으로 평형된 수정란을 미리 동결 보존액으로 충전하여 준비한 0.25ml의 plastic straw에 각각 20개씩 주입하여 sealing하였다. 실온에서 4℃까지 10분동안 온도를 서서히 내린후, 4℃에서 0℃까지 10분간 다시 내린다음 programmable freezer (CryoLogic, Australia) 를 사용하여 -70℃까지 동결하였다. 프로그램이 끝난 straw들은 즉시 액체질소 컨테이너에 옮겨 보관하였다(표 9).

표 9. 두 계통 형질전환 생쥐 수정란을 이용한 동결 현황

계 통	동결 수정란수
CelD - 15	356
CelD - 22	220
대조구	82

12. 융해후 배양 및 생존률 분석

동결 이틀 후 수정란을 융해하였다. 융해는 동결의 역순으로 평형시키고 미리 준비해 둔 mineral oil에 도포하여 전배양한 M16 배양액 drop에 옮겨 세척 후 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배반포기까지 배양하였다. 24시간마다 생존·발달율을 확인하였다(표 10).

표 10. 동결 수정란 융해시 생존율 및 발달율

계 통	검정 수정란수	생존 수정란수	2세포기 수정란수	배반포수(%)
CelD-15	100	45 (45.0)	31 (31.0)	21 (21.0)
CelD-22	100	50 (50.0)	26 (26.0)	19 (19.0)
Control	82	34 (41.5)	25 (30.5)	18 (22.0)

제 2 절. 형질전환 돼지 생산

1. 미세주입용 유전자의 준비

본 실험에 사용된 돼지 수정란 전핵 내 주입용 발현벡터는 그림 17과 같다. 먼저 목적유전자를 소의 제4위에서 기생하는 미생물로부터 전체유전자를 분리한 후 DNA library를 작성하고 이들 library로부터 섬유소분해효소유전자를 크로닝 하였으며, 프로모터의 경우 흰쥐의 조직으로부터 genome DNA를 추출한 후 Gene Bank의 유전자 배열을 참고로 크로닝 하였다. 크로닝된 각각의 유전자는 약 200bp의 rElastase I promoter 하류에 약 2.0kb의 CelD를 연결하였으며, CelD의 전후에는 각각 hGH intron부분과 hGH PolyA부분이 존재하도록 재 조합하였다. 재조합 발현벡터는 다시 pBluSK(+)벡터에서 크로닝하여 초원심분리 방법으로 순수 정제시킨 후 *EcoR I*과 *Sal I* 제한효소로 목표하는 부위만을 절단하였다. 제한효소 처리된 단편들을 0.9% 아가로스겔 전기영동 후 이들의 DNA 단편을 아가로스로부터 회수하고 2회 정제하였으며, 최종농도는 2~4 ng/ul 로 희석하여 미세주입용 발현벡터로 준비하였다.

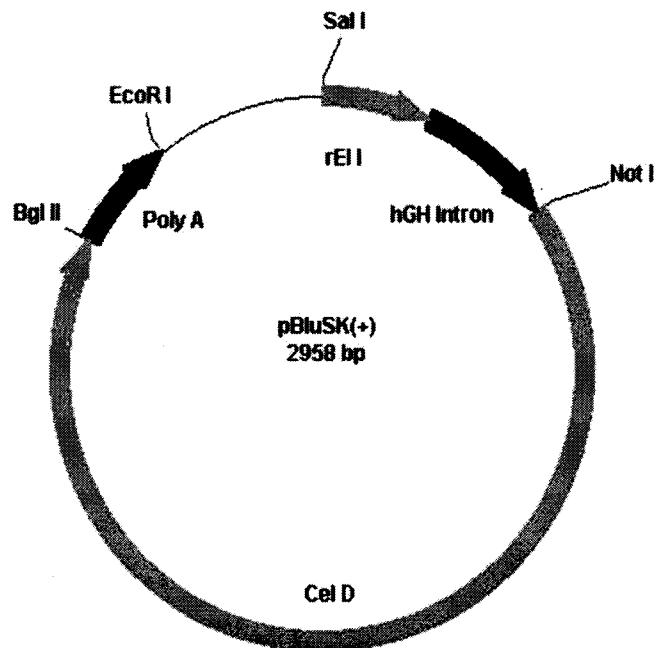


그림 17. 형질전환 발현 벡터의 구축

(pBlueScript SK(+))에 celD 및 rat elastase promoter삽입)

2. Micropipets의 제작 및 유전자 미세주입

외경이 1mm이고 길이가 13cm인 유리관(Garner glass, USA)으로 고정용과 주입용의 micropipets을 제작한다. 먼저 이 유리관을 puller(David korf 720, USA)에 장치한 다음 끝의 길이가 1~1.5cm정도 되도록 pulling한다. 그리고 모든 micropipet의 끝을 microforge로 15~30 ° 정도 구부려서 사용한다. 외래유전자의 미세주입은 미세조작기(micromanipulator: Nikon, Japan)를 이용하여 수정란의 응성전핵에 주입하였는데, 이때 핵막의 용이한 관찰과 실험의 편리함을 도모하기 위하여 DIC system을 갖춘 독립현미경하에서 수행하며, 외래유전자의 주입시 농도와 양은 2pg/2pl로 ~600 copies의 DNA를 주입한다. 또한 체내수정란의 전핵 노출을 위해 원심분리시 microtubule과 microfilament를 조사하기 위해 원심분리 또는 원심분리 하지 않은 수정란을 구분하여 면역염색법을 실시 한 후, 면역형광현미경을 통해 microtubule과 microfilament의 변화를 비교 조사하였다.

3. 교배 및 관리

hCG 투여후 매일 09시와 18시에 2회씩 육안적 관찰을 실시하여 점액의 유무, 음부의 상태 및 부동자세 등 발정 초기증상이 나타난 종빈돈에 한하여 성성숙된 수태지를 접촉시켜 최초 수태지 허용시 1회 자연교배를 실시하였으며 1회 자연교배 후 24시간에 2회 교배를 실시한다. 2회 교배후 종빈돈은 개체사육을 실시하며 수술시까지 2일간 사료를 절식시키고 물은 자유채식할 수 있게 관리를 실시하며 종빈돈의 사료는 DE 3,300kcal 및 CP 14%인 사료를 이용하고 기타 성분은 NRC 사양표준에 준하여 사양관리를 실시하였다.

4. 외과적 방법에 의한 수정란 채란

유전자를 주입할 수 있는 1세포기 단계의 수정란을 생산하기 위하여 돈방별로 5두씩 분리 사육하면서 수정란 회수율을 높이기 위해 Altrenogest를 발정주기 12일부터 14일 사이에 매일 두당 사료 2kg에 20mg을 혼합하여 9일간 급여하였으며 그후 과배란은 PMSG를 1000IU 근육주사한 후 72시간이 경과되었을 때 750IU의 hCG를 근육 주사하여 과배란을 유도 하였다. hCG 투여후 매일 09시와 18시에 2회씩 육안적 관찰을 실시하여 점액의 유무, 음부의 상태 및 부동자세 등 발정 초기증상이 나타난 종빈돈에 한하여 성성숙된 수태지를 접촉시켜 최초 수태지 허용시 1회 자연교배를 실시하였으며 1회 자연교배 후 24시간에 2회 교배를 실시한다. 2회 교배후 종빈돈은 개체사육을 실시하며 수술시까지 2일간 사료를 절식시키고 물은 자유채식할 수 있게 관리를 실시하며 종빈돈의 사료는 DE 3,300kcal 및 CP 14%인 사료를 이용하고 기타 성분은 NRC 사양표준에 준하여 사양관리를 실시한다.hCG주입후

약 24시간에 발정관찰한 후 발정이온 개체는 2회에 걸쳐 자연종부 시키고 그후 약53시간경 외과적 방법에 의해 난관을 D-PBS로 관류하여 수정란을 채란하였다. 마취제로는 하이프노달(JANSSEN, German) 7~8ml를 돼지 귀의 정맥에 주입하여 1차 마취를 실시하고, 그 후 가연성 흡입마취제인 할로탄 가스(신성신약) 3~5%를 산소(600~1,000ml/분)순환 시스템에 연결하여 마취상태를 유지시키면서 공란돈의 난관은 자궁-난관접합부에 18gage주사바늘을 이용하여 1회용 주사기로 1% BSA(Sigma, USA)와 항생제를 혼합한 25ml의 PBS(Difco · Laboratories, USA)를 난관관류시킴으로써 난자를 회수한다. 관류된 액체는 멸균시험튜브에 수집하여 실온에서 난자를 회수하여 검란을 실시하며 1세포기 난자를 이용한다.

표 11. 외과적 방법에 의한 수정란 채란 성적

채란두수 (두)	회수난자수 (개)	수정란 발달단계			미수정란수 (개)	평균1세포기 수정란수
		1세포기	2세포기	4세포기		
91	1,422	1,359	15	5	43	14.9

표 11은 91두의 채란돈으로부터 1,422개의 수정란을 채란하였으며 채란된 수정란 중 미세주입이 가능한 1세포기 단계의 수정란수는 1,359개 였으며, 평균 수정란 이식수는 14.9개 였다.

5. 외과적 방법에 의한 수정란 이식

돼지의 수정란을 이식하여 산자를 생산할 목적으로 외과적인 방법에 의해서 수정란 이식을 실시한다. 먼저 호르몬 처리에 의해서 발정이 동기화 된 수란돈 또는 자연적으로 발정주기가 동기화된 수란돈을 전신마취를 실시한다. 마취된 수란돈의 정중선을 중심으로 광범위하게 면도기를 이용하여 털을 제거하고 소독을 실시 한 다음 정중선을 약 10~15cm를 절개하여 생식기를 노출시킨다. 난소표면의 황체의 존재를 확인한 후, 수정란 20~50개가 함유된 배양액의 채워진 polycatether (Cook, Australia)를 난관 팽대부에 넣고, 수정란이 함유된 배양액을 주입하여 이식을 실시한다. 이식이 완료된 복강내로 밀어넣은 다음, Sodium chondroitin sulfate 1%가 함유된 생리식염수로 생식기를 세척하여 장간흡착을 방지하여야 한다. 그리고 절개부위를 봉합한 뒤 항생제를 투여한 후, 보온이 잘되는 돈방에서 마취가 풀릴 때까지 보호를 하였다.

표 12. 외과적 방법에 의한 수정란 이식 성적

수란돈수(두)	총이식란수(개)	평균이식란수(개)	분만두수(두)	산자수(두)
35	725	21	13	65

표12는 유전자가 미세주입된 수정란 725개를 35두의 수란돈에 이식하였으며, 평균 이식 수정란 수는 21개 였으며 13두로부터 65두의 새끼돼지를 생산하였다.

표 13. 수정란 이식 시 난자수가 임신율에 미치는 영향

수정란 이식수	이식된 수정란수	수란돈수	임신돈수(%)	산자수
≤20	154	10	2(20.0)	14
21-24	345	16	8(50.0)	41
≥25	226	9	3(33.3)	10

표 13은 수정란 이식시 수정란수가 임신율에 미치는 영향을 조사하기 위해 조사하였으며, 21~24개의 수정란을 이식시 임신율이 50%로 20개 이하 20%, 25개 이상 33.3%로 21~24개 이식시 높은 임신율을 보였다.

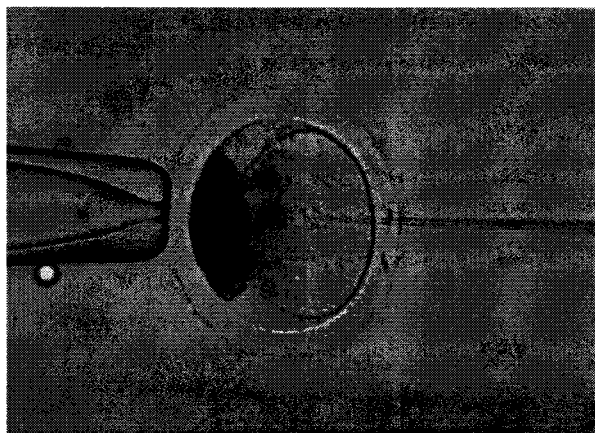


그림 18. 원심분리 후 전핵내 유전자 미세주입 장면

그림 18은 채란된 체내수정란을 약 13,000rpm으로 원심분리 후 미세조작기가 부착된 현 미경하에서 웅성전핵 내 유전자를 미세주입하는 장면을 찍은 사진이다.



그림 19. 과배란 처리 후 수정란 채란직전의 난소

그림 19는 앞에서 언급한 방법에 의해 공란돈을 발정동기화 및 과배란 유도한 후 수정란 채란 직전 복부절개 후 난소가 포함된 난관 및 자궁을 꺼낸 사진으로 사진에서 보는 바와 같이 난소의 많은 배란점과 함께 과배란된 상태의 난소를 보여주는 사진이다.

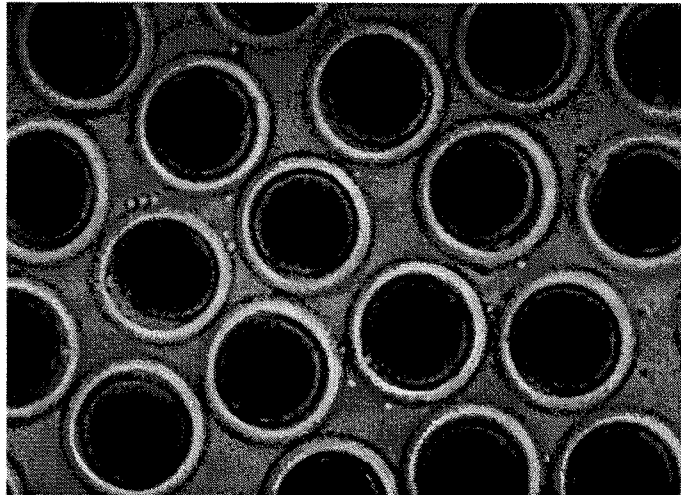


그림 20. 수정란 채란 후 현미경상의 돼지 수정란

그림 20은 과배란 처리된 1세포기 수정란을 현미경하에서 확대한 사진으로 세포질이 충실하고 세포막과 투명대사이가 확연히 구분이 가능한 돼지 체내수정란 이다.

6. 섬유소관련 유전자를 가진 형질전환돼지 생산

지금까지 사용되고 있는 외과적인 수정란 이식 방법을 이용하여 CelD 유전자가 도입된 돼지의 형질전환 수정란을 발정이 동기화된 수란돈의 난관에 이식하여 산자 생산을 유도

하였으며 이때 형질전환 돼지의 임신율, 분만율을 높이기 위하여 발정주기의 동기화 등과 같은 이식조건을 재정비하고 임신 돼지의 경우 태어난 산자들은 외래유전자의 삽입 및 발현율을 조사하고 계대번식을 유도하여 형질전환돼지가 섬유소분해효소의 생산 능력검정을 실시하여 산업적인 활용 가능성 여부를 검토한다.

표 14. rE1-CelD 형질전환돼지 생산 및 형질전환율

분만두수 (두)	산자수		형질전환돼지수		형질전환율(%)	
	암	수	암	수	암	수
13	33	32	2	3	6.06	9.38
계	65		5		7.69	

표 14는 분만한 13두로부터 태어난 산자수 및 형질전환율을 나타낸 것으로 65두의 태어난 새끼돼지 중 5두가 형질전환 돼지로 PCR검정 결과 판명되었으며, 표 14에서 나타난 것과 같이 태어난 산자수 대비 형질전환율은 7.69%였다.

7. 유전자 발현검정

수정란 이식 후 분만된 자돈의 꼬리조직을 채취한 후 1,300g로 15분간 원심분리 후 20 ug/ml pancreatic RNase, 0.5% SDS가 첨가된 TE-buffer 15ml을 첨가하여 37°C에서 1시간 둔 후 100ug/ml proteinase K(Merk, Darnstadt, Germany)을 첨가하고 즉시 55°C의 incubator에서 3시간 동안 용해시켰다. 처리 후 이들 시료를 꺼내 같은 양의 phenol을 첨가하여 genome DNA를 분리하였다. 분리된 genome DNA는 제작된 Primer(Forward 5'-TgC TgA TAA gAg CCg TAT AAA g-3', Reverse 5'-ATT TgC ATC TAT AgT CgC CTT T-3')를 이용 PCR mixture를 만든 후 94°C에서 1분, 58°C에서 1분, 72°C에서 1분간 35cycle를 반복한 후, PCR산물은 1% agarose gel을 이용하여 전기영동을 실시하였다. 수정란이식 후 분만기간을 거쳐 태어난 산자는 생후 즉시 또는 1주일내에 꼬리조직의 일부를 절단하여 전체 genome DNA를 추출하였으며, 우리가 주입한 DNA의 primer를 제작하여 PCR검정을 통해 적정 size의 band를 확인하였다. 검정결과 65마리의 산자 중 5마리에서 크기 600bp의 band를 확인하였다.

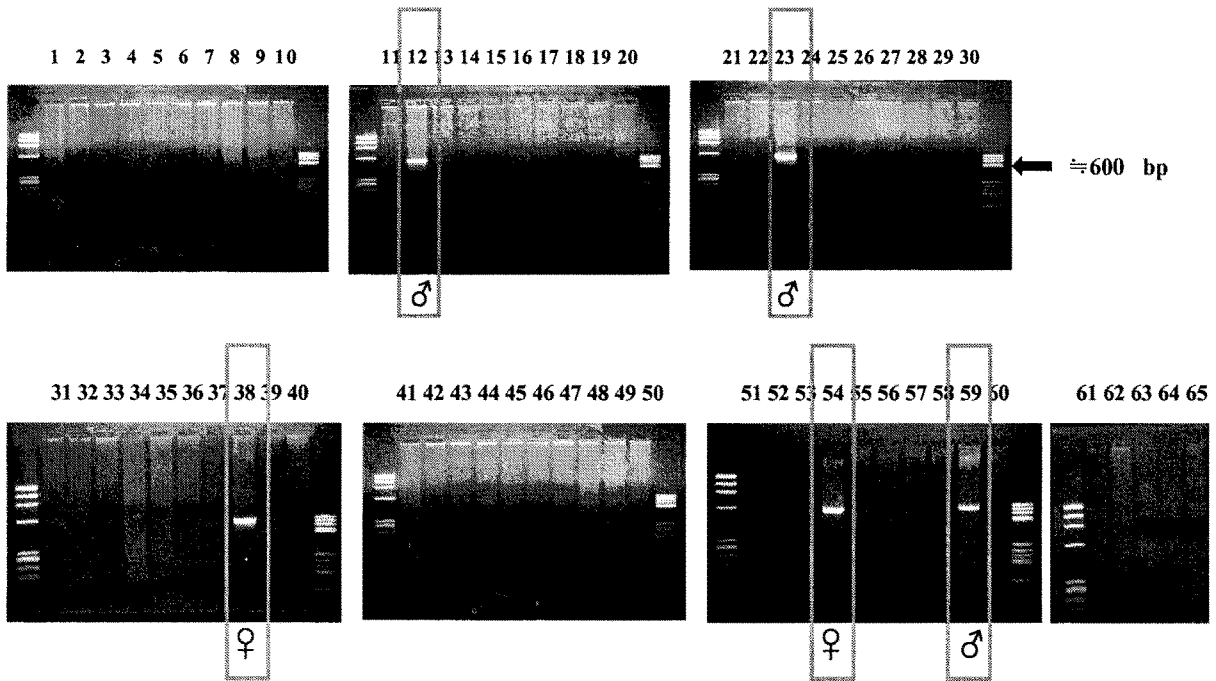


그림 16. 65두로부터 추출한 DNA를 PCR증폭 후 전기영동에 의해 분리한 결과

- Lines 12, 23, 38, 53 및 57은 형질전환돈
- 기타 Lines은 형질전환돈 아님

태어난 자돈 65두에 대한 PCR검정 결과 65두가 기대하는 크기의 유전자가 증폭되었으며, 그림 16은 전기영동에 의해 증폭된 유전자밴드 크기 600bp에서 5두의 형질전환돈을 확인할 수 있었으며 그 중 4두는 폐사하였고(표 15), 생존한 1두에 대한 사진은 그림 17에서 보여 주고있다.

표 15. rE1-CeID 형질전환돼지

자 돈 명 호	성 별	비 고
폐사1	♂	폐사
0-76	♂	14일령 폐사
0-95	♀	생존
폐사2	♀	폐사
3-130	♂	32일령 폐사

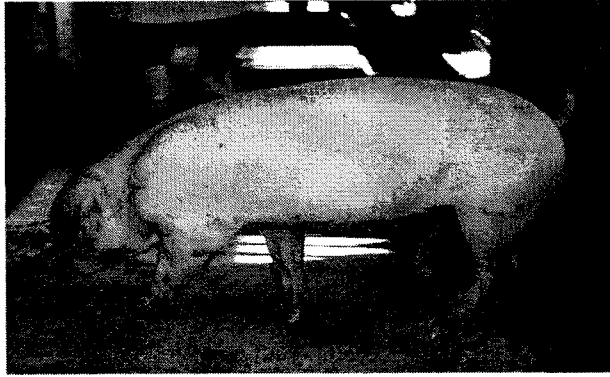


그림 17. 생존 형질전환 돼지

8. 조직특이적 발현검정

rElastase I 프로모터의 경우 약 4kb의 promoter가 췌장세포 특이적 발현을 유도하는 것으로 보고되어 있거나, 이는 종간의 유의차가 인정될 수 있다. 따라서, 돼지에 있어서는 elastase 유전자의 어느부위에서 조직특이적인 발현을 유도하는지는 잘 알려져 있지않으나, 현재로서는 약 200 bp 내부에서도 충분히 특이적으로 발현한다고 보여지며, 한가지 흥미로운 사실은 조절영역의 1.2kb 상류에는 타종과 매우 상동성이 높은 약 150 bp의 염기배열이 존재하였는데, 이 상동배열은 Ce1D 유전자를 췌장세포의 조직특이발현을 위해 필수불가결한 인자의 결합을 유도한다. 그러나 현재 생산된 형질전환 돼지의 수가 1세대 1두 및 2세대 2두로 보유두수가 적고 췌장 발현을 검정하려면 형질전환 돼지를 도축해야하나 아직 보유두수가 적어 수행하지 못하고 있으나 2세대 형질전환 돼지 암, 수 각 1두를 이용하여 교배 시 3세대 형질전환 돼지 생산시 수행할 계획이다.

9. 조직학적 검사

분리된 눈은 10%의 formalin에 하룻밤 고정후, 일련의 에탄올 (50, 70, 95, 100%)에 서 각각 5분간 처리후, 파라핀에 embedding하였다. 각 조직은 울트라토미를 이용하여 5 μ m 로 절단한후, 헤마탁실린과 이오신염색약을 사용하여 염색한 후 광학현미경하에서 관찰하였다.

10. 섬유소 소화율 검정

살아있는 섬유소 분해효소 유전자를 가지고있는 형질전환 돼지의 섬유소분해 능력을 평가하기 위해 같은 형제로 태어난 7두의 동복자와 함께 섬유소 함량을 높은 사료를 조제한 후 3일간 사료적응기간을 두고 3일은 시험사료를 급여한 이후 7일간 매일 분을 채취하여

dry oven에 1일간 건조한 후 건조전 분 및 건조 후 분의 무게를 정량한 후 섬유소, 질소 및 인의 함량을 분석하였다.

표 16. 시험사료 성분 분석 결과

시료명	성분분석결과(%)							
	수분	조단백질	조지방	조섬유	조회분	Ca	P	Cal(cal/g)
돼지사료	13.07	15.43	5.26	5.37	4.45	0.76	0.43	4,064

일반적으로 돼지사료 내 섬유소 함량은 4%전후로 낮은편 이며 현재의 사양표준에서 돼지의 유지와 성장에 필요한 영양소 함량은 조섬유 함량을 더 이상 증가시킬수 없게 되어있다. 따라서 사료 배합 후 시험사료의 성분 검사 결과 영양소함량은 표 16과 같으며 이때의 아미노산 함량은 표 17과 같다.

표 17. 사료내 주요 아미노산 함량

아미노산(%)	돼지사료
Cystine	0.265
Methionine	0.334
Aspartic acid	1.477
Threonine	0.598
Serine	0.778
Glutamic acid	3.050
Glycine	0.677
Alanine	0.806
Valine	0.691
Iso-leucine	0.605
Leucine	1.345
Tyrosine	0.624
Phenylalanine	0.728
Lysine	0.81
Histidine	0.503
Arginine	0.920
Proline	0.982

표 18. 섬유소분해효소 유전자 도입 형질전환 돼지 분 분석 결과

명호	날짜	사료잔량	분량	건조전 분량	건조후 분량	성분분석결과				
						수분	조단백질	조지방	조섬유	조회분
3-99	2/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2/18	1140	1700	180.98	50.73	14.15	19.50	6.32	8.66	15.82
	2/19	500	1630	204.78	55.95	12.58	18.73	5.82	18.99	16.72
	2/20	1500	1260	146.30	39.91	12.54	18.42	8.60	10.64	15.17
	2/21	900	1730	169.72	43.58	10.50	16.36	4.42	9.57	16.78
	2/22	830	310	205.29	61.76	11.23	16.85	3.32	9.01	17.01
	2/23	970	1370	269.59	46.70	11.08	17.89	5.07	8.80	17.68
	2/24	370	1230	140.11	37.23	10.64	17.36	4.46	9.63	17.01
3-101	2/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2/18	1108	1120	157.91	48.81	11.71	17.24	6.36	9.59	16.49
	2/19	310	1840	171.64	45.57	11.09	14.54	5.51	10.01	17.57
	2/20	340	1710	196.88	52.09	12.53	20.54	6.50	9.07	15.76
	2/21	850	2000	189.00	52.22	11.49	16.56	5.98	10.33	16.39
	2/22	380	410	221.7	67.60	14.25	13.79	3.21	8.73	15.77
	2/23	850	1470	222.14	56.37	10.39	14.01	4.02	9.46	16.86
	2/24	530	1810	166.08	45.72	9.93	15.52	4.53	10.76	16.23
3-98	2/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2/18	1120	1520	219.48	65.68	14.21	21.20	8.69	8.76	15.32
	2/19	320	2640	184.34	49.52	11.02	19.20	7.56	9.72	14.49
	2/20	630	2480	217.13	60.35	12.46	17.33	7.01	11.25	15.05
	2/21	710	1490	226.32	64.87	12.36	19.20	11.57	10.86	13.46
	2/22	430	1114	277.64	80.36	14.76	17.61	7.88	10.40	13.99
	2/23	1000	1400	189.45	49.53	9.48	16.82	6.53	11.05	14.88
	2/24	1010	1990	282.30	40.06	13.29	20.97	8.33	10.39	14.36
3-95 형질 전환 돼지	2/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2/18	750	1420	237.74	66.61	10.93	21.29	11.75	9.80	14.64
	2/19	420	2550	220.19	5.82	11.49	19.62	9.15	20.96	14.77
	2/20	1000	1670	201.15	57.09	10.76	20.65	6.98	8.77	16.39
	2/21	1040	2050	211.38	55.18	12.55	19.11	10.30	10.86	14.80
	2/22	130	810	133.18	33.54	10.27	17.32	7.08	10.67	14.41
	2/23	1150	1450	225.23	26.72	10.66	18.06	7.72	10.98	15.62
	2/24	2300	1100	186.00	49.64	13.00	19.84	10.23	10.29	13.71
3-100	2/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2/18	860	2080	159.52	45.14	12.77	21.49	10.10	9.41	15.37
	2/19	90	3480	199.87	49.43	13.67	19.15	6.26	19.38	14.53
	2/20	110	2230	259.90	69.46	10.91	15.27	4.63	9.54	17.28
	2/21	0	2350	212.16	56.05	11.86	18.31	9.75	9.85	14.78
	2/22	0	1250	151.94	41.10	10.54	18.69	6.39	12.45	14.45
	2/23	620	1840	225.50	62.64	12.54	17.10	5.19	10.08	14.80
	2/24	700	1850	160.39	20.92	9.25	19.25	8.86	8.87	15.62

3-97	2/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2/18	800	1360	186.17	52.24	13.07	20.07	7.85	11.05	14.05
	2/19	460	2890	138.83	36.59	11.50	20.59	5.82	24.66	14.23
	2/20	270	1950	125.36	32.70	11.82	17.05	6.03	9.73	17.51
	2/21	290	1960	178.71	47.92	12.65	19.95	8.04	11.50	14.41
	2/22	510	1130	190.11	53.02	10.27	17.32	7.08	10.67	14.41
	2/23	650	1750	175.69	48.81	10.13	17.95	6.29	9.76	14.32
	2/24	1580	1770	176.16	48.71	10.31	17.95	6.79	9.66	16.17
3-96	2/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2/18	1101	1130	203.96	56.22	13.35	21.86	9.21	8.34	14.83
	2/19	600	1610	209.93	55.15	13.17	20.39	7.50	19.88	16.33
	2/20	620	1520	151.00	41.54	12.33	18.76	6.20	9.97	15.00
	2/21	810	1510	202.60	58.55	11.84	18.47	5.33	9.61	15.59
	2/22	750	1010	166.71	45.44	9.65	16.42	4.03	10.58	16.43
	2/23	640	2280	230.01	63.80	10.08	16.54	4.72	10.48	16.85
	2/24	1130	2110	167.53	45.06	11.92	17.29	6.15	9.70	15.39

표 18에서 나타났듯이 본 연구에 의해 검정한 같은 복의 돼지 7두(형질전환돼지 1두, 일반돼지 6두)에 대한 7일간의 분 중 섬유소 소화율을 검정한 결과 일반돼지의 경우 건물 소화율은 82.4%, 형질전환돼지는 83.0%이며, 이중 섬유소 소화율을 검정한 결과 일반돼지의 분 중 조섬유 소화율은 67.3%로 형질전환돼지 64.8%보다 약간 높아 우리가 기대했던 연구 결과는 얻지 못했으나 일반돼지 및 형질전환돼지에 공시된 시험돼지의 수적인 차이가 크며, 근본적으로 형질전환돼지가 1두로 유의성을 검정할 수 없었을 뿐 아니라 소화시험을 수행한 시기가 돼지의 성장발육이 완료되고 지방이 축적되는 시기로 결국 소화시험을 수행한 시기가 지연된 것도 섬유소 소화율의 측정치가 정확하지 않을 것이라는 추측을 할 수 있다. 따라서 앞으로의 시험은 형질전환돼지 암컷 1두를 이용하여 일반돼지와 중부 후 F1후대를 생산하고 생산된 후대 중 형질전환 돼지를 선별하여 이유 후 자돈기 및 육성기의 섬유소 소화율을 검정할 계획이다.

표 19. 소화시험 성적

구 분	일반돼지	형질전환돼지
○ 섭취량(g/일)		
- 사료	2,909	2,651
- 건물	2,528	2,305
- 조섬유	156	142
○ 배설량(g/일)		
- 분	1,697	1,579
- 건물	446	393
- 조섬유	51	50
○ 소화율(%)		
- 건물	82.4	83.0
- 조섬유	67.3	64.8

11. Non-Isotope 시스템을 이용한 Southern blotting

Cellulase 관련유전자는 재조합 plasmid를 EcoRI으로 절단하여 정제하여 삽입유전자를 확인하기 위한 probe로 사용하였다. 또 다른 유전자를 수정란에 주입한 경우에는 이식 후 태어난 산자에서 외래 유전자의 삽입 여부를 알아보기 위하여, 생후 6-9주 쯤에 혈액으로부터 DNA를 추출 정제한 다음 Southern hybridization을 이용하여 DNA를 분석한다. 먼저 태어난 자돈의 혈액을 20ml을 채취한 후 1300g로 15분간 원심분리 후 15ml 용해용액(10mM Tris pH8.0, 100mM EDTA, 20 ug/ml pancreatic RNase, 0.5% SDS)을 첨가하여 37C에서 1시간 둔 후 100ug/ml proteinase K을 첨가하고 즉시 55C의 incubator에서 3시간 동안 용해시킨다. 처리 후 이들 시료를 꺼내 같은 양의 phenol을 첨가하여 DNA를 분리한다. 각각의 동물혈액으로부터 분리 정제한 약 5ug정도의 DNA를 BglII, Hinf I 제한효소로 처리하여 0.8% 농도의 agarose gel에 loading하여 전기영동한 후, agarose gel을 denaturaion용액에 30분간 중화시킨 후 DNA를 nylon membran에 전이한다. 이 nitrocellulose papers는 80℃ 진공속에서 2시간 처리후 prehybridization용액에 넣어 65℃에서 1시간동안 prehybridization를 실시한 후 목적의 probe를 이용한 방법에 의해 Random Labeling 방법을 이용하여 600bp 크기의 DNA 단편을 Labeling된 probe를 넣어 42℃에서 overnight동안 hybridization을 수행한다. 다음날, 세척액 (0.1xSSC, 0.1% SDS)으로 65℃에서 30분동안 3회 세척한 다음 DIG-Southern 시스템을 이용해 조사하였다(그림 18, 19).

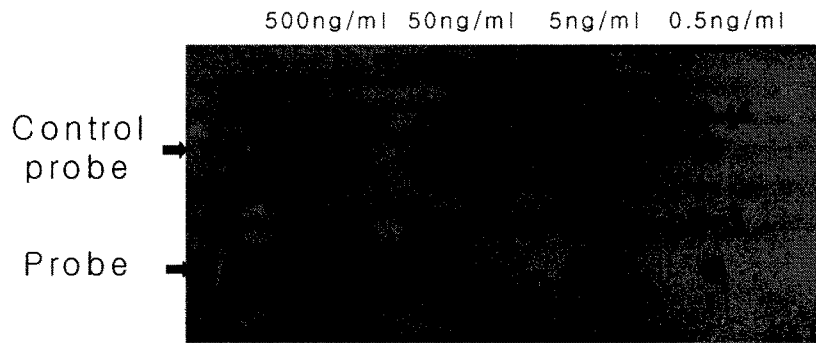


그림 18. PCR 검정에서 얻은 약 600bp 절편을 이용한 probe의 random labelling 상태

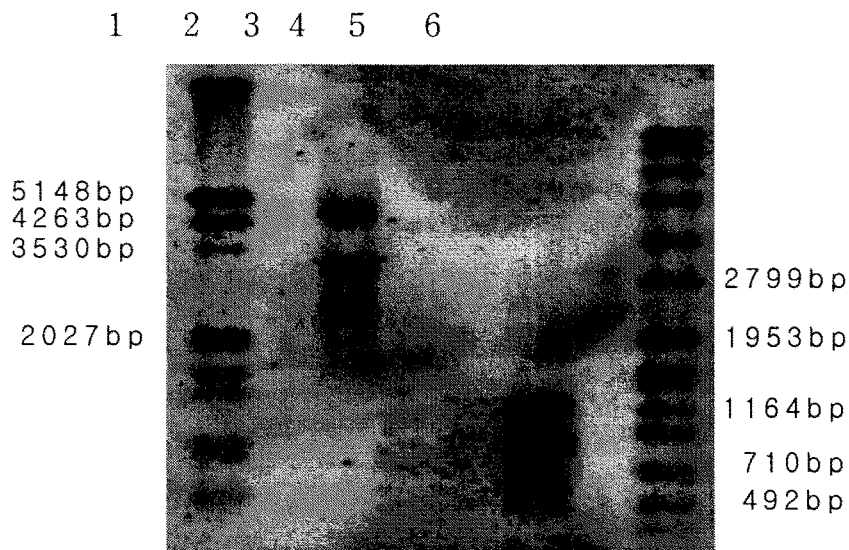


그림 19. DIG시스템을 이용한 섬유소 분해효소 형질전환체의 Southern 결과.

Lane 1 : DNA Molecular marker III (Roche),

Lane 2 : Cel D *Bgl*II cut,

Lane 3 : negative *Bgl*II cut ,

Lane 4 : negative *Hinf* I cut ,

Lane 5 : Cel D *Hinf* I cut, Lane 6 : DNA Molecular marker VII (Roche)

그림 19에서 나타난 것과 같이 형질전환된 섬유소분해효소 분비체는 재조합 섬유소 분해효소 유전자 (rE1-CelD) 가 2 copy 삽입된 것으로 추정할 수 있었음.

12. 수정란 발달 단계별 microtubule 및 microfilament 변화 분석

수정란 채란 후 전핵 노출을 위한 원심분리가 난자에 미치는 영향을 보기 위해 원심 분리 후 항체(anti-body)를 이용한 면역염색 후 microfilament 와 microtubule의 변화 양상을 보기 위해 염색한 결과를 나타내었다. Microtubule 과 microfilament는 돼지 난자의 parthenogenesis 와 수정후 분열 뿐 아니라 핵의 이동에 필요하며 또한 세포질 내에서 정자의 응축 과 팽창에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 마우스(Maro등, 1984), 랫드 (Zernicka-Goetz등, 1993)에서 microtubule 과 microfilament에 관한 연구에서는 microfilament는 감수분열기의 방추사섬유(meiotic spindle)를 싸고있으며, 이러한 방추사 섬유와 염색체의 유지에 작용하는 것으로 보고되어지고 있는데(Webb등, 1986), 김 등(1996c)은 성숙된 돼지 난자에서 얇고 두꺼운 형태의 microfilaments는 난자 외피(cortex)에서 발견 되었다고 설명하였다. 또한 양서류를 포함한 모든 동물에서 세포분열에 중심적인 역할을 하는 중심체(centrosome)는 부계(paternal)에 의해 이전된다고 알려져 왔다. 수정될 때 정자의 목 부위에 있는 중심립과 부가적인 단백질(gamma tubulin)이 난자 내에 이전되고 이것이 일평생 복제되면서 모든 세포분열에 그 역할을 수행한다. 이 가설은 1880년대에 Bovari이론으로 잘 알려져 왔는데, 최근 미국의 Schatten에 의해 간접 면역형광법에 의해서 Sathanathan 등(1991)의 전자현미경 관찰에 의해서 정설로 확인되었다. 그러나 기이하게도 생쥐나 hamster의 경우 전자현미경 관찰이나 형광현미경법으로도 정자에 의한 중심체 이전이 확인되지 않았다. 생쥐의 경우 정자 발생단계에 centrosome이 분해되고, 수정 후 난자에서 centrosome이 새로 합성되는 것으로 설명되고 있다. 이러한 설명은 생물체 발생의 진화론 개념과는 상치되는 것으로 정자에 의해 이전되는 중심체가 없는 상황에서는 난자 스스로가 후생적 조절기전에 의해 발생한다고 생각 할수 있다. microfilament는 microtubule과 함께 세포내 주요 골격체로써 세포분열 시 세포질을 분리시켜 주는 역할을 한다. 종류로는 G-Actin 과 F-actin 이 있고 난세포에서 극체방출, 핵의 이동 난할에 관여하는 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 유전자 미세주입전 전핵을 노출시키기 위한 수정란의 원심분리 시 수정란 내 microtubule 과 microfilament의 변화를 보기 위해 수행하였다. 먼저 난구세포가 제거된 난자를 buffer M에서 20분간 38.5℃에서 배양한 후 20℃ methanol에서 15분간 고정하고 store solution (0.02% sodium azide 와 0.1%BSA in PBS)에서 2-7일간 4℃에서 저장하였다. 저장 후 2-7일 사이에 적절한 시기를 이용해 39℃에서 1시간 30분 동안 PBS 와 α -tubulin antibody 가 200 : 1로 혼합된 PBS배양액 내에서 배양하였으며, 이 후 30분간 blocking solution에서 30분간 난자를 배양하였다. 1차 처리 후 또 다시 anti-mouse IgG

FITC-conjugate를 이차로 1시간 30분 동안 처리하고 ml당 $10\mu\text{l}$ 의 Phalloidin를 1시간 동안 처리 후 blocking solution에서 30분간 blocking하였으며, 염색체 염색을 위해 1시간 30분 동안 ml당 $1\mu\text{l}$ 의 propidium iodide를 처리하였다. 이와 같이 처리된 난자는 PBS solution에서 washing후 slide위에 고정한 후 confocal microscope를 이용해 microtubule 과 microfilament 의 변화를 조사하였다.

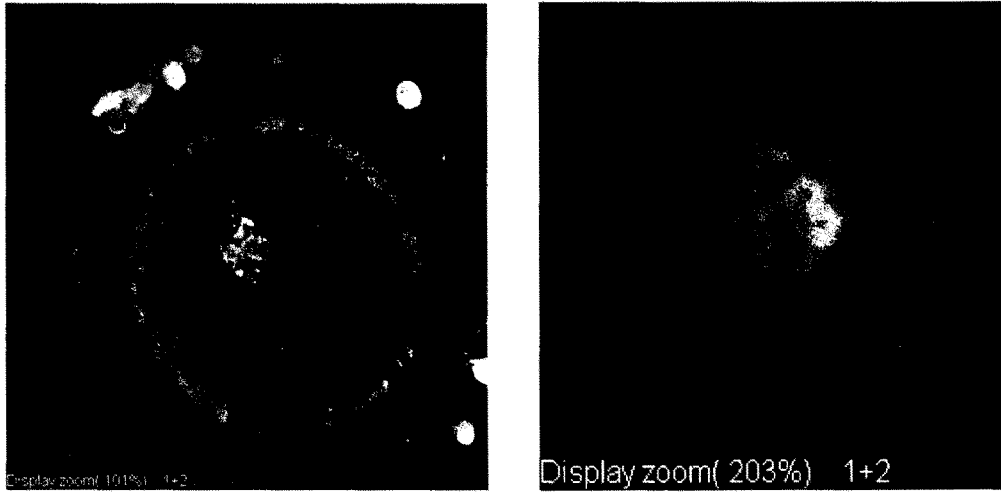


그림 20. 자웅 전핵 접합기의 수정란내 microtubule(green), microfilament(light green) 및 염색체(red)부위의 확대사진그림

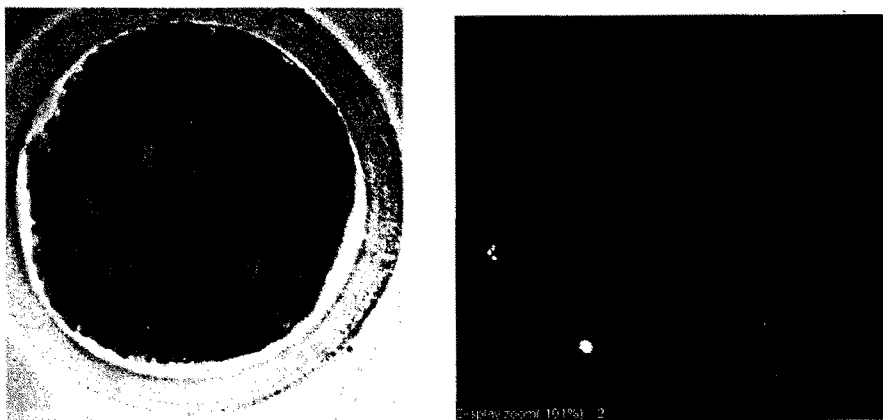


그림 21. 원심분리 전 1세포기 수정란의 염색체 부위(red)

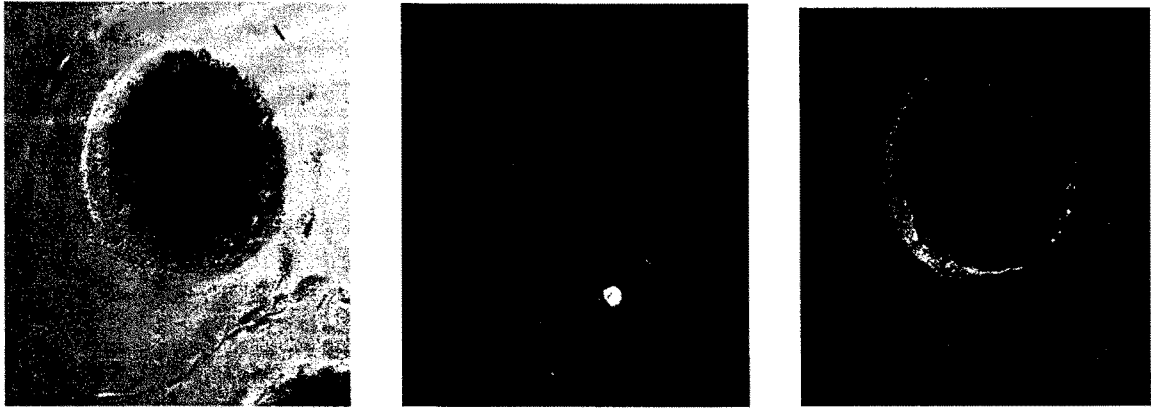


그림 22. 원심분리 후 수정란의 염색체(red)위치와 세포질내 microtubule(green)의 분포

그림 21과 22에서와 같이 microtubule이 원심분리에 의해 물리는 것을 볼 때 원심분리가 수정란 발달에 영향이 있을 것이라 생각하여 원심분리 하지 않은 구와 원심분리 한 체내수정란의 발달율을 조사한 결과 표 20과 같이 원심분리 하지 않은 구에서 배발달율이 높게 나타났다. 따라서 단순히 microtubule 이나 microfilament가 돼지 체외수정란의 발달에 영향을 미치는지는 정확히 판단할 수 없으나 원심분리가 이러한 세포내의 소구조의 변화에 영향을 주는 것으로 봐서 수정란의 발달율에 영향을 미치는 요인인지는 모르겠으나 우리의 결과에 의하면 배발달율에는 영향을 미치는 것으로 나타났다.

표 20 . 원심분리에 의한 체내 수정란의 배발달율

처리	배양액	수정란수	수정란 배발달율 (%)		
			Morula	Blastosyst	Hatching or hatched BL
Centrifugation	NCSU23	74	16(21.6)	28(37.8)	0(0)
	NCSU23-EMEM	55	10(18.2)	23(41.8)	5(9)
Non-centrifugation	NCSU23	73	9(12.3)	59(80.8)	0(0)
	NCSU23-EMEM	57	1(1.8)	43(75.4)	10(17.5)

표 20에서 보는 것과 같이 원심분리하지 않은 구에서 배반포 생산율은 배양용 medium에 상관없이 높게 나타난 것을 볼 수 있다. 이상의 결과를 볼 때 본 연구에서 확립된 여러 가지 기초기술과 형질전환 돼지생산 시 발생하는 문제점을 해결할 수 있는 실마리는 조금이

나마 해결된 것으로 생각되며, 지금까지 축산기술연구소의 수정란 이식기술로 볼 때, 본 연구에서 임신율이 낮은 것은 미세주입된 유전자의 기능이 수정란에서 발현될 시 난자에 미치는 영향이 크다고 생각하며, 문제해결을 위해 지속적으로 연구를 수행할 것이다.

13. 형질전환 돼지의 계대번식

1세대 65두의 자돈 중 형질전환된 5두 중 생존한 형질전환돼지(3-95) 암 돼지를 이용해 일반돼지 수컷과 자연종부 시킨 결과 태어난 자돈 12두 중 2두가 PCR검정결과 형질전환 돼지로 판명되었다(표 21). 이러한 형질전환 돼지 2두를 이용하여 섬유소 소화율을 검정하고 성돈으로 성장시 형질전환돼지간에 종부 시킴으로써 형질전환돈의 축균을 늘려 나감 과 동시에 사양시험 및 단백질 발현양상을 분석할 것이다.

표 21. 형질전환돼지 이용 F1 자돈 생산

일반돈	형질전환돈	분만두수	형질전환돈
0-75(♂)	3-95(♀)	12	2(♀1, ♂1)

14. 형질전환 돼지의 섬유소 소화율 검정

시험용 사료로 사용된 사료(표 22)에 대한 성분 분석결과는 표 23에 나타나 있다.

표 22. 급여사료의 성분분석 결과

구분	시료명	성분분석결과			
		수분	질소	인	조섬유
시험용	돼지사료	14.34	3.36	0.58	3.07

표 23. F1형질전환 자돈을 이용한 분 성분 분석 결과

시험 분석	구분	성분분석 결과			
		수분	질소	인	조섬유
1차	일반돈	6.93	4.19	2.63	7.27
	형질전환 1	6.94	4.02	2.48	7.49
	형질전환 2	6.39	4.27	2.43	7.05
2차	일반돈	5.06	4.19	2.76	7.45
	형질전환 1	5.22	4.03	2.81	6.91
	형질전환 2	5.12	4.13	4.28	7.06
3차	일반돈	7.68	4.23	2.30	8.54
	형질전환 1	7.74	3.88	2.63	7.62
	형질전환 2	7.16	4.17	2.23	8.06
4차	일반돈	4.43	4.48	0.83	11.45
	형질전환 1	5.43	4.48	0.89	8.92
	형질전환 2	4.62	3.98	0.87	8.74
5차	일반돈	6.18	8.70	2.47	8.70
	형질전환 1	6.13	10.46	2.35	10.46
	형질전환 2	4.59	8.83	2.48	8.83
6차	일반돈	5.92	4.43	2.40	7.43
	형질전환 1	5.00	4.54	2.31	7.03
	형질전환 2	5.78	4.21	2.48	6.72
7차	일반돈	6.89	4.11	2.60	8.17
	형질전환 1	9.54	4.43	2.92	7.09
	형질전환 2	8.34	4.21	2.81	6.86
8차	일반돈	7.91	4.22	2.92	8.05
	형질전환 1	7.59	4.29	3.23	6.08
	형질전환 2	6.68	4.49	2.80	7.85

표 24. F1형질전환 자돈을 이용한 평균 분 성분 분석 결과

조사내용	시료명	성분분석결과			
		수분	질소	인	조섬유
1차분석	일 반	6.93	4.19	2.63	7.27
	형질전환	6.67	4.15	2.46	7.27
2차분석	일 반	5.06	4.19	2.76	7.45
	형질전환	5.17	4.08	3.55	6.99
3차분석	일 반	7.68	4.23	2.30	8.54
	형질전환	7.45	4.03	2.43	7.84
4차분석	일 반	4.43	4.48	0.83	11.45
	형질전환	5.03	4.23	0.88	8.83
5차분석	일 반	6.18	4.54	2.47	8.70
	형질전환	5.36	4.18	2.42	9.65
6차분석	일 반	5.92	4.43	2.40	7.43
	형질전환	5.39	4.38	2.40	6.88
7차분석	일 반	6.89	4.11	2.60	8.17
	형질전환	8.94	4.32	2.87	6.98
8차분석	일 반	7.91	4.22	2.92	8.05
	형질전환	7.14	4.39	3.02	6.97
평균	일 반	6.38	4.30	2.36	8.38
	형질전환	6.39	4.22	2.50	7.68

형질전환돼지 2두는 같은 동복의 일반돈 3두와 함께 분만 후 폐사를 막기 위해 정상적인 이유 일령인 3주를 지나 약 7주에 이유 시켰으며 이유 1주 후부터 시험에 공시하였다. 2002년 7월 23일부터 8월 26일 까지 약 한달간 시험사료를 계속 급여하면서 분을 채취하였으며, 채취된 분은 분의 양에 따라 3-5일 간격으로 dry oven에서 건조하여 분중의 수분, 질소, 인 및 조섬유 함량을 분석하였다. 성분 분석을 위해 사용한 시료는 건조분 약 40g으로 HPLC

를 이용해 각각의 성분을 분석한 결과 표 23 및 24의 결과를 얻었으며 표에서 보는바와 같이 일반돈 보다는 형질전환돈에서 성장단계별로 볼 때 지속적으로 섬유소 소화능력이 우수한 것으로 나타났으며, 시험기간중의 전체 평균에서도 표 24에서 보는바와 같이 형질전환돈의 섬유소 소화율이 7.38%로 일반돈 8.68%에 비해 높은 것으로 나타나 간접적으로나마 유전자가 정상적으로 발현되는 것이 아닌가 생각되며 육성기에 다시 한번 재시험을 수행할 계획이며, 아울러 3세대 형질전환 돼지 생산 후 췌장 내에서의 단백질 발현양상을 시험할 계획이다.

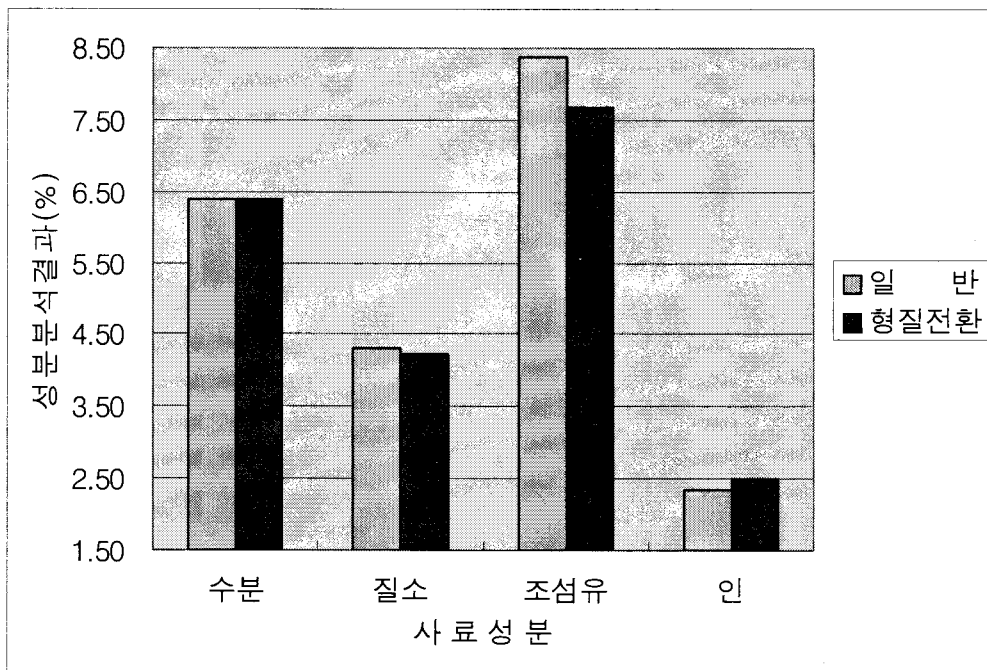


그림 23. 일반돈과 형질전환돈간 분 중 섬유소 소화율 변화

한편 그림 23은 표 24를 도표로 간략히 설명한 것으로 표에서 나타난 것과 같이 형질전환돈이 일반돈에 비해 조섬유 및 질소 함량이 낮고 인에서 약간 높았다.

따라서 아직은 시험용 형질전환돼지의 수가 적어 시험결과에 대한 신뢰도가 낮기는 하나 차후 자연종부에 의한 형질전환축이 증식이 되면 세포내, 췌장내 mRNA의 발현 및 섬유소 소화 정도를 구체적으로 파악할수 있을 것이라 생각한다.

제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절. 연도별 연구목표 및 평가의 착안점

년차	연구개발목표 및 내용	평가의 착안점 및 척도
1년차	<ul style="list-style-type: none"> ○ 섬유소관련유전자 크로닝 및 발현백타 구축 - 모델생쥐생산 및 분석 - 모델생쥐 분석에 의한 유전자 발현능력을 높이기 위한 유전자보완 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 체장특이 발현조절인자의 크로닝 ○ 섬유소 분해 관련 유전자 크로닝 ○ 유전자 도입방법별효과 구명 ○ 과배란에 의한 수정란 다량확보 ○ 모델생쥐 생산
2년차	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유전자미세주입 및 발현검색 - 섬유소 분해효소 분비능력을 가진 형질 전환돼지 생산 - 외형적인 섬유소 소화능력 검정 - PCR, Southern을 통한 유전자 발현 검정 - 유전자 주입전 원심분리가 난자에 미치는 영향 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유전자 도입기술 개발 및 보완 (섬유소 관련) ○ 양질의 수정란 생산을 위한 발정동기화 및 효과적인 채란 기술 개발 ○ 생쥐 소화능력 검정 및 유전자발현 능력 보완
3년차	<ul style="list-style-type: none"> ○ 외과적방법에의한 체내 수정란 생산 및 이식 - 양질의 수정란 생산을 위한 발정동기화 - 다량의 수정란 확보를 위한 채란 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 형질전환돼지 생산 ○ 형질전환돼지의 섬유소 소화능력 검정 ○ 유전자 발현검정 및 고효율 유전자 구축 ○ 유전자 체문제점 및 side effect검정
4년차	<ul style="list-style-type: none"> ○ 선발 및 사양관리 - 고효율의 형질전환 돼지 선발 및 도태 - 능력검정 및 사료효율 검정 - 섬유소 분해돼지의 계대번식 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 형질전환 모델돼지 생산 ○ 소화능, 번식능 검정 ○ 선발 및 병리현상 조사 ○ 사료효율, 동복 산자 및 육생산성 조사 ○ 산업적 이용방안 검토

본 연구는 4년간 수행한 과제로 1차년도 연구개발 목표 및 내용을 보면 먼저 섬유소관련 유전자 및 발현백터를 크로닝하여 발현백터를 구축하고 모델생쥐를 이용하여 형질전환 생쥐를 생산함은 물론 형질전환생쥐의 유전자 발현능력을 검정한 후 발현능력을 높이기 위한 유

전자를 보완하였다. 이와 관련된 구체적 내용을 보면 먼저 체장특이 발현조절 프로모터의 크로닝, 섬유소 분해 관련 유전자 크로닝, 유전자 도입방법별 효과 구명은 물론 과배란에 의한 수정란을 다량 확보함으로써 최종적으로 형질전환 모델생쥐를 생산한다. 2차 연도에는 돼지에 형질전환 수정란 이식효율을 높이기 위해 유전자 도입기술을 개발하고 보완함은 물론 양질의 수정란 생산을 위한 발정동기화 및 효과적인 채란 기술을 개발함으로써 형질전환 돼지생산 효율을 극대화하고 1차 년도에 생산된 형질전환 생쥐의 소화능력 검정함으로써 유전자 발현능력을 검토하였다. 이러한 기반연구의 확보로 3차 연도에는 형질전환 돼지를 생산하고 생쥐에서 확립된 유전자 발현검정 방법을 통해 섬유소 소화능력을 검정하여 유전자의 효율을 밝힌 후 유전자에 문제점 즉 효율이 낮거나 발현능력이 없을 시 유전자를 재 구축하여 섬유소를 소화할 수 있는 형질전환 돼지를 생산하고 유전자 발현양상을 검정하였다.

이후 마지막 4차 연도에서는 형질전환된 돼지를 이용하여 섬유소 소화능력을 검정하고 계대번식을 통하여 섬유소를 소화할수있는 형질전환돼지를 증식하고 섬유소 소화능력을 재 검정함으로써 사업적 이용가치를 평가한 후 산업적 이용성을 검토한다.

제 2 절. 목표 달성도 및 관련분야에 기여도

1. 기술적 측면

- 가. 단위동물에서 분해 불가능했던 섬유소를 이용 가능한 동물의 생산은 타종 특히 닭과 같은 종에 이용될 수 있는 파급효과
- 나. 가축의 경우, 유전자도입효율이 극히 저조 (1% 미만)하나, 본 연구의 수행에 의하여 타종 및 동종에 이용가능
- 다. 장기이식동물, 고부가 의료단백질 생산동물, 내병성이 강화된 동물생산등 새로운 유전자 이식에 따른 고부가가치의 동물을 생산을 위해 산업적으로 이용

2. 경제·산업적 측면

- 가. 소화효율의 개선은 현재의 생산비용을 적어도 20-30%정도 절감할 수 있다. 이는 소화 불가능한 기존의 섬유소, 리그닌, 자이렌, 탁신 및 열부산물 등을 이용가능하기 때문이다. 즉, 돼지의 경우, 소화 불가능한 형태로 배설된 영양분이 전체의 60%로 이를 경제적 수치로 환산하면 연간 약 1조 2천억원 정도의 규모로 환산

- 나. Biomass와 같은 정화 비용을 절감할 수 있다. 이는 돼지로부터 배설되는 암모니아 등과 같은 것을 고에너지원으로 활용가능
- 다. 종동 수입을 줄이고, 국가경쟁력을 가짐으로서 생산된 종돈을 수출에 이용할 수 있다. 이는 국가간 협약된 종다양성원칙에 입각하여 실용화
- 라. 열약한 조사료를 소화흡수가능하기 때문에, 수입사료를 국산화로 대체
- 마. 탄수화물을 고 에너지원으로의 사용은 체지방을 줄일 수 있다. 이는 돈육의 생산효율을 향상시키고, 저 콜레스테롤을 가진 돼지를 생산함으로써 경쟁력을 강화

제 5 장. 연구개발결과의 활용계획

제 1 절. 추가연구의 필요성

섬유소 분해효소 유전자가 도입된 형질전환 돼지의 2세대까지의 번식결과 3두의 형질전환 돼지를 보유하고 있으며 현재 1세대 및 2세대의 1차에 걸친 섬유소 분해능력을 검토하였으나 공시 축이 적어 결과에 대한 신빙성이 떨어지므로 계대번식을 지속적으로 추진하여 형질전환 돼지를 증식한 후 섬유소분해능력을 재검토해야 할 것으로 생각되며, 섬유소 분해효소 유전자에 의한 목적단백질이 체내의 채장에 실질적으로 분비되는지의 여부를 검정해야 하며 또한 채장 외에 다른 조직에서도 유전자가 발현하고 있는지를 검정해야 할 것으로 생각된다. 체내 유전자발현 여부가 결정되면 다수의 축군 확보 후 실제 조사료 급여에 의한 시험을 수행한 후 경제성을 검토하고 나아가서는 육질의 변화를 검토함으로써 본 연구의 최종마무리가 될 것으로 판단한다.

제 2 절. 타 연구에 응용

형질전환 가축생산 연구는 크게 발정동기화 및 과배란, 수정란 채란 및 이식과 같이 수정란 과 관련한 많은 지식과 연구가 밑바탕이 되어야함은 물론 유전자의 크로닝 및 재조합, 수정란 내 유전자의 도입 기술뿐 아니라 형질전환 돼지 생산 시 유전자 도입 검정, 유전자 발현 검정 및 단백질 발현 등을 검색해야 하는 복합적으로 여러 연구가 일괄적으로 진행되어야 하는 연구로 본 기술의 최종적 마무리 시 수정란, 유전자 크로닝 및 재조합 분야 뿐 아니라 단백질 발현분석 및 정제 기술 등 현재까지 여러 분야에서 개발된 기술들을 최종적으로 종합 검토할수 있는 기술분야로 최근 세계적으로 각광받고있는 형질전환동물 생산연구는 연구의 종합화와 각 부분 연구의 신뢰성이 형성되지 않으면 성공할 수 없는 분야이다. 따라서 본 연구과제의 결과를 보면 유전자가 도입된 형질전환 돼지를 생산하고 후대에까지 유전자가 전이되는 것을 확인함으로써 동물생명공학 연구자에 의해 진행되고 있는 생명공학 기술 대부분의 영역에 크게 공헌 할 것으로 생각한다. 특히 post-genome분야의 일부분으로 알려진 단백질 분석 및 발현에 관한 연구에도 선도적인 역할을 할 것으로 기대한다.

제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

최근 돼지에 대한 연구가 세계적으로 이슈가 되고있는 것은 크게 고가의 의료물질 생산 분야 및 이종간 바이오 장기이식 분야라 할 수 있을 것이다. 특히 돼지는 우리가 실험용으로 사용하는 타 가축에 비해 많은 장점을 가지고 있는 까닭으로 많은 연구자들이 돼지를 이용함을 주저하지 않는다. 돼지는 자연상태에서도 약 20개 내외의 수정란을 생산할 수 있으며, 과배란 처리시 많게는 50개 이상의 수정란을 얻을 수 있는 가축이며 임신기간이 짧아 빠른 기간 내에 태어난 새끼돼지로부터 유용유전자의 도입여부를 알 수 있으며 인간과 가장 밀접한 생리구조와 친밀성으로 인해 세계적으로 부족 되어 일어나고 있는 인간 장기이식 수요자에 대한 수요를 충족 시킬 수 있는 가능성을 제시해줄 수 있는 가축이기도 하다. 그러나 세계적으로 수많은 연구자에 의한 연구에도 불구하고 형질전환 돼지의 생산이 타 가축의 성공사례에 비해 다소 늦었던 것이 사실이다. 그러나 1997년 체세포를 이용한 복제양 돌리가 태어나면서 기존의 생식세포만을 이용한 복제가 가능하다는 지금까지의 이론을 뒤집음으로써 돼지를 이용한 복제의 유용성이 대두되기 시작하였다. 특히 돼지의 경우 의료용 단백질 생산하는데 필요할 뿐 아니라 인간의 장기를 대체할 수 있는 대체장기 생산에 큰 장점을 가지고 있어 2000년대 미국의 Prather등 및 PPL사에서는 인체면역관련유전자가 제거된 돼지를 개발하였다. 이와 더불어 형질전환 연구분야에서의 해외저널에 발표된 논문을 보면 1997년 Schnieke등은 면양의 태아섬유아 세포에서 lactoglobulin promoter 이용 사람 항혈액응고인자 Factor IX 형질전환 동물생산에 성공하였으나 유전자의 특성상 정상적으로 단백질이 분비되지 않는 것으로 알려졌으며, 유선에서 사람 항혈액응고인자 Factor VIII을 생산하는 형질전환 면양을 Niemann등의 그룹에서 개발하였다. 또한 Paleyanda등은 돼지의 유즙에서 Factor VIII단백질을 발현하는 형질전환 돼지를 생산하였으나 정상적인 단백질 발현을 보고하지는 못했다. Factor VIII은 목적기관으로 분비가 정상적으로 이루어지더라도 단백질 자체가 안정화되어있지 않아 단백질 분해효소에 의해 쉽게 잘려짐으로 인해 쉽게 정제 할수 없다. 미세주입이 아닌 사람 항혈액응고인자를 lentiviral vector 이용 마우스 혈관내 주입 후 독성 없이 Factor IX를 생산할 수 있음을 2002년 Lisa등이 확인하였으며, Zbikowska등은 Uromodulin promoter이용 형질전환 가축의 오줌내 재조합 단백질을 생산할 수 있는 가축을 생산하였다. 한편 사람 혈전증을 치료할 수 있는 tPA유전자를 생산하는 산양을 미국 Genzyme Transgenic 회사는 개발하였다. 이와 같이 인간에게 유용한 단백질을 가축을 통해 생산하는 연구는 그 이용성 및 가치가 높음으로 인해 많은 연구가 진행되고 있으며 2001년 이후 형질전환분야의 관심의 초점은 어떻게 하여 형질전환 효율을 높일 것이냐 하는 문

제가 대두되기 시작하였으며 1999년 Anthony 등은 GFP유전자를 ICSI 방법으로 수정란내 도입 후 형질전환 마우스를 생산하였으며, 또한 2001마우스 MetaphaseII 단계의 수정란 내 유전자가 도입된 sperm head를 주입하는 방법으로 형질전환 효율 증대연구를 추진하였으며 마우스에서의 효율은 증대한 것으로 나타났으나 가축에 적용한 결과는 없었다. 한편 영양학적 측면에서 접근한 phytase유전자를 이용한 형질전환 연구에서는 돼지의 분 중에 질소와 인을 저하시킴으로서 환경오염 절감형 돼지를 덴마크의 Golovan등은 2001년에 개발하기도 하였다. 이 외에도 수태율을 증가 시킬 수 있는 방법 및 착상능력을 배가할 수 있는 정보들을 수집하였으나 아직 검토가 되지 않았다.

제 7 장. 참 고 문 헌

1. Jaenisch, R. and Mintz, B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of adult micederived from preimplantion blastocysts injected with DNA. PNAS-US 71:1250-1254 (1974)
2. Hanahan, D. Transgenic mice as probes into complex systems. Science 246:1265-1275
3. Pattengale, P.K., Stewart, T.A., Leder, A., et al. Animal models of human disease. Am. J. Pathol. 135:39-61 (1989).
4. Borrelli, E., Heyman, R., Hsi, M. and Evans, R. M. Targeting of an inducible toxic phenotype in animal cells. PNAS-US 85:7572-7576(1988).
5. Braun, R.E., Behringer, R.R., Peschon, J.J., Brinster, R.L. and Palmiter, R.D. Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid. Nature 337:373-376(1989).
6. Edwards, R.H., Rutter, W.J. and Hanahan, D. Directed expression of NGF to pancreatic beta cells in transgenic mice. Cell 58:161-170 (1989).
7. Hauff, S. M., Sweetser, D.A., Rotwein, P.S., et al. A transgenic mouse model that is useful development. J. Biol. Chem. 264:8419-8429(1989).
8. Stacey, A., Bateman, J., Choi, T., Mascara, T., Cole, W. and Jaenisch, R. Prenatal lethal osteogenesis imperfecta in transgenic mice bearing an engineered mutant pro-alpha 1(I) collagen gene. Nature 332:131-136(1988).
9. Behringer, R.R., Ryan, T.M., Reilly, M.P., et al. Synthesis of functional human hemoglobin in transgenic mice. Science 245:971-973(1989)
10. Hammer, R.E., Pursel, V.G., Rexroad, C.E., Jr., et al. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection Nature 315:680-683(1985)
11. Brem, G., Brenig, B., Goodman, H.M., et al. Production of transgenic mice, rabbits, and pigs by microinjection into pronuclei. Zuchthygiene 20:251-252(1985)
12. Pursel, V.G., Rexroad, C.E., Jr., Bolt, D.J., et al. Progress on gene transfer in farm animals. Vet. Immunology Immunopathol. 17:303-321(1987).
13. Ebert, K.M., Low, M.J., Overstrom, E.w., et al. A Moloney MLV-rat somatotropin fusion gene produces biologically active somatotropin in transgenic pig. Mol. Endocrinol. 2:277-283(1988).

14. Simons, J. R., Wilmut, I., Clark, A.J., Archibald, G.L., Bishop, J.O. and Lathe, R. Gene transfer into sheep. *Bio/Technology* 6:179-183(1988).
15. Clark, A.J. Bessos, H., Bishop, J., et al. Expression of human anti-hemophilic factor IX in the milk of transgenic sheep. *Bio/Technology* 7:487-492(1989).
16. Hammer, R.E., Brinster, R.L. and palmiter, R.D. Gene transfer to increase animal growth. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 50:379-387(1985).
17. Knight, K.L., Spieker-Polst, H., Kaydin, D.S. and Oi, V.T. Transgenic rabbits with amphocytic leukemia induced by the c-myc oncogene fused with the immunoglobulin heavy chain enhancer. *PNAS-US*. 85:3130-3134(1998).
18. Roschlau, K.L., Spieker-Post, H., Kaydin, D.S. and Oi, V.T. Transgenic rabbits with amphocytic leukemia induced by the c-myc oncogene fused with the immunoglobulin heavy chain enhance. *PNAS-US* 85:3130-3134 (1998).
19. Salter, D. W., Smith, E.J., Hughes, S.H., Wright, S.E., and Crittenden, L.B. Transgenic chickens: insertion of retroviral genes into the chicken germline. *Virology* 157:236-240 (1995)
20. Bosselman, R.A., Hsu, R.-Y., Boggs, et al. Germline transmission of exogenous genes in the chicken. *Science* 243:533-535 (1989)
21. Salter, D.W. and Crittender, L.B. Artificial insertion of a dominant gene for resistance to avian leukosis virus into the germ line of the chicken. *Theor. Appl. Genet.* 77:457-461 (1989).
22. Chourrout, D., Guymard, R., and Houdebine, L.-M. High efficiency gene transfer in
23. Dunham, R.A., Eash, J., Askins, J. and Townes, T.M. Transfer of the metallothionein-human growth hormone fusion gene into channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 116:87-91(1987).
24. Brem, G., Brenig, B., Hoersten-Schuak, G. and Winnacker, E-L. Gene transfer in *Tilapia Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 68:209-219(1988).
25. McEvoy, T., Stack, M., Keane, B., Barry, T., Sreenan, J. and Gannon, F. The expression of a foreign gene in salmon embryos. *Aquaculture* 68:27-37(1988).
26. Prusel, V.G., Pinkert, C.A., Miller, K.F., et al. Genetic animals as bioreactors. *Bio/Technology* 6:1149-1154(1988).
27. Van Brunt, J. Molecular farming: Transgenic animals as bioreactors. *Bio/Technology*

6:1149-1154(1988).

28. Pittius, C.W., Hennighausen, L., Lee, F., et al. A milk protein gene promoter directs the expression of human tissue plasminogen activator cDNA to the mammary gland in transgenic mice. PNAS-US 85:5874-5878(1988).
29. Gordon, E.L., Vitale, J.A., Simdh, A., Westphal, H. and Hennighausen, L. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. Bio/Technology 5:1183-1187(1987).
30. Boulet, A.M., Erwin, C.R. and Rutter, W.J. Cell specific enhancers in the rat exocrine pancreas. PNAS-US 83:3599-3603(1986).
31. Walker, M.D., Edmund, T., Boulet, A.M. and Rutter, W.J. Cell-specific expression controlled by the 5' flanking region of insulin and chymotrypsin genes. Nature 306:557-561(1983).
32. Osborn, L., Rosenberg, M.P., Keller, S.A., Ting, C.-N. and Neisler, M.H. Insulin response of a hybrid amylase/CAT gene in transgenic mice. J. Biol. Chem. 263:16519-16522(1988).
33. Ornitz, D.M., Palmiter, R.D., Hammer, R.E., Brinster, R.L., Swift, G.H. and MacDonald, R.J. Specific expression of an elastase-human growth hormone fusion gene in transgenic mice. Nature 313:600-602(1985).
34. Hall, J.H., Rall, L. and Rutter, W.J. Selective expression of rat pancreatic genes during embryonic development. PNAS-US 83:110-114(1986).
35. Schick, J., Kern, H. and Scheele, G. Hormonal stimulation in the exocrine pancreas results in coordinate and anti-coordinate regulation in protein synthesis. J. Cell Biol. 99:1569-1574(1984).
36. Schick, J., Verspohl, R., Kern, H. and Scheele, G. Two distinct adaptive responses in the synthesis of exocrine pancreatic enzymes to inverse changes in protein and carbohydrate in the diet. Am. J. Physiol. 247:G611-G616(1984)
37. Swift, G.H., Hammer, R.E., MacDonald, R.J. and Brinster, R.L. Tissue specific expression of the rat pancreatic elastase I gene in transgenic mice. Cell 38:639-646(1984).
38. Ornitz, D.M., Palmiter, R.D., Messing, A., Hammer, R.E., Pinkert, C.A. and Brinster, R.L. Elastase I promoter directs expression of human growth hormone and SV40T

antigen genes to pancreatic acinar cells in transgenic mice. Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409(1985).

39. Quaife, C.J., Pinkert, C.A., Ornitz, D.M., Palmiter, R.D. and Brinster, R.L. Pancreatic neoplasia induced by ras expressed in acinar cells of transgenic mice. Cell 48:1023-1034(1987).
40. Ornitz, D.M., Hammer, R.E., Davison, B.L., Brinster, R.L. and Palmiter, R.D. Promoter and enhancer elements from rat elastase I gene function independently of each other and of heterologous enhancers. Mol. Cell. Biol. 7:3466-3472(1987).
41. Hammer, R.E., Swift, G.H., Ornitz, D.M., et al. The rat elastase I regulatory element is an enhancer that directs correct cell specificity and developmental onset of expression in transgenic mice. Mol. Cell. Biol. 7:2956-2967(1987).
42. Kruse, F., Komro, C.T., Micronoff, C.H. and MacDold, R.J. The cell-specific elastase I enhancer comprises two domains. Mol. Cell. Biol. 8:895-902 (1988)
43. Millet, J., Petre, D., Beguin, P., Raynaud, O., and Aubert, J.P. Cloning of ten distinct DNA fragments of Clostridium thermocellum coding for cellulase. FEMS Microbiol. Letters 29:145-149 (1986).
44. Knowles, J., Lehtovaara, P., and Teeri, T. Cellulase families and their genes. Trends in Biotech. 5:255-261 (1987).
45. Robson, L.M and Chambliss, G.H. Cellulases of bacterial origin. Enzyme Microb. Technol. 11:626-643 (1989).
46. Jaenisch, R. and Mintz, B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with DNA. PNAS-US 71:1250-1254 (1974)
47. Hanahan, D. Transgenic mice as probes into complex systems. Science 246:1265-1275
48. Pattengale, P.K., Stewart, T.A., Leder, A., et al. Animal models of human disease. Am. J. Pathol. 135:39-61 (1989).
49. Borrelli, E., Heyman, R., Hsi, M. and Evans, R. M. Targeting of an inducible toxic phenotype in animal cells. PNAS-US 85:7572-7576(1988).
50. Braun, R.E., Behringer, R.R., Peschon, J.J., Brinster, R.L. and Palmiter, R.D. Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid. Nature 337:373-376(1989).
51. Edwards, R.H., Rutter, W.J. and Hanahan, D. Directed expression of NGF to

pancreatic beta cells in transgenic mice. *Cell* 58:161-170 (1989).

52. Hauff, S. M., Sweetser, D.A., Rotwein, P.S., et al. A transgenic mouse model that is useful development. *J. Biol. Chem.* 264:8419-8429(1989).
53. Stacey, A., Bateman, J., Choi, T., Mascara, T., Cole, W. and Jaenisch, R. Prenatal lethal osteogenesis imperfecta in transgenic mice bearing an engineered mutant pro-alpha 1(I) collagen gene. *Nature* 332:131-136(1988).
54. Behringer, R.R., Ryan, T.M., Reilly, M.P., et al. Synthesis of functional human hemoglobin in transgenic mice. *Science* 245:971-973(1989)
55. Hammer, R.E., Pursel, V.G., Rexroad, C.E., Jr., et al. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection *Nature* 315:680-683(1985)
56. Brem, G., Brenig, B., Goodman, H.M., et al. Production of transgenic mice, rabbits, and pigs by microinjection into pronuclei. *Zuchthygiene* 20:251-252(1985)
57. Pursel, V.G., Rexroad, C.E., Jr., Bolt, D.J., et al. Progress on gene transfer in farm animals. *Vet. Immunology Immunopathol.* 17:303-321(1987).
58. Ebert, K.M., Low, M.J., Overstrom, E.w., et al. A Moloney MLV-rat somatotropin fusion gene produces biologically active somatotropin in transgenic pig. *Mol. Endocrinol.* 2:277-283(1988).
59. Simons, J. R., Wilmut, I., Clark, A.J., Archibald, G.L., Bishop, J.O. and Lathe, R. Gene transfer into sheep. *Bio/Technology* 6:179-183(1988).
60. Clark, A.J. Bessos, H., Bishop, J., et al. Expression of human anti-hemophilic factor IX in the milk of transgenic sheep. *Bio/Technology* 7:487-492(1989).
61. Hammer, R.E., Brinster, R.L. and palmiter, R.D. Gene transfer to increase animal growth. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 50:379-387(1985).
62. Knight, K.L., Spieker-Polst, H., Kaydin, D.S. and Oi, V.T. Transgenic rabbits with amphocytic leukemia induced by the c-myc oncogene fused with the immunoglobulin heavy chain enhancer. *PNAS-US.* 85:3130-3134(1988).
63. Roschlau, K.L., Spieker-Post, H., Kaydin, D.S. and Oi, V.T. Transgenic rabbits with amphocytic leukemia induced by the c-myc oncogene fused with the immunoglobulin heavy chain enhance. *PNAS-US* 85:3130-3134 (1988).
64. Salter, D. W., Smith, E.J., Hughes, S.H., Wright, S.E., and Crittenden, L.B. Transgenic chickens: insertion of retroviral genes into the chicken germline.

Virology 157:236-240 (1995)

65. Bosselman, R.A., Hsu, R.-Y., Boggs, et al. Germline transmission of exogenous genes in the chicken. *Science* 243:533-535 (1989)
66. Salter, D.W. and Crittender, L.B. Artificial insertion of a dominant gene for resistance to avian leukosis virus into the germ line of the chicken. *Theor. Appl. Genet.* 77:457-461 (1989).
67. Chourrout, D., Guymard, R., and Houdebine, L.-M. High efficiency gene transfer in
68. Dunham, R.A., Eash, J., Askins, J. and Townes, T.M. Transfer of the metallothionein-human growth hormone fusion gene into channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 116:87-91(1987).
69. Brem, G., Brenig, B., Hoersten-Schuak, G. and Winnacker, E-L. Gene transfer in *Tilapia Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 68:209-219(1988).
70. McEvoy, T., Stack, M., Keane, B., Barry, T., Sreenan, J. and Gannon, F. The expression of a foreign gene in salmon embryos. *Aquaculture* 68:27-37(1988).
71. Prusel, V.G., Pinkert, C.A., Miller, K.F., et al. Genetic animals as bioreactors. *Bio/Technology* 6:1149-1154(1988).
72. Van Brunt, J. Molecular farming: Transgenic animals as bioreactors. *Bio/Technology* 6:1149-1154(1988).
73. Pittius, C.W., Hennighausen, L., Lee, F., et al. A milk protein gene promoter directs the expression of human tissue plasminogen activator cDNA to the mammary gland in transgenic mice. *PNAS-US* 85:5874-5878(1988).
74. Gordon, E.L., Vitale, J.A., Simdh, A., Westphal, H. and Hennighausen, L. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Bio/Technology* 5:1183-1187(1987).
75. Boulet, A.M., Erwin, C.R. and Rutter, W.J. Cell specific enhancers in the rat exocrine pancreas. *PNAS-US* 83:3599-3603(1986).
76. Walker, M.D., Edmund, T., Boulet, A.M. and Rutter, W.J. Cell-specific expression controlled by the 5' flanking region of insulin and chymotrypsin genes. *Nature* 306:557-561(1983).
77. Osborn, L., Rosenberg, M.P., Keller, S.A., Ting, C.-N. and Neisler, M.H. Insulin response of a hybrid amylase/CAT gene in transgenic mice. *J. Biol. Chem.*

263:16519-16522(1988).

78. Ornitz, D.M., Palmiter, R.D., Hammer, R.E., Brinster, R.L., Swift, G.H. and MacDonald, R.J. Specific expression of an elastase-human growth hormone fusion gene in transgenic mice. *Nature* 313:600-602(1985).
79. Hall, J.H., Rall, L. and Rutter, W.J. Selective expression of rat pancreatic genes during embryonic development. *PNAS-US* 83:110-114(1986).
80. Schick, J., Kern, H. and Scheele, G. Hormonal stimulation in the exocrine pancreas results in coordinate and anti-coordinate regulation in protein synthesis. *J. Cell Biol.* 99:1569-1574(1984).
81. Schick, J., Verspohl, R., Kern, H. and Scheele, G. Two distinct adaptive responses in the synthesis of exocrine pancreatic enzymes to inverse changes in protein and carbohydrate in the diet. *Am. J. Physiol.* 247:G611-G616(1984)
82. Swift, G.H., Hammer, R.E., MacDonald, R.J. and Brinster, R.L. Tissue specific expression of the rat pancreatic elastase I gene in transgenic mice. *Cell* 38:639-646(1984).
83. Ornitz, D.M., Palmiter, R.D., Messing, A., Hammer, R.E., Pinkert, C.A. and Brinster, R.L. Elastase I promoter directs expression of human growth hormone and SV40T antigen genes to pancreatic acinar cells in transgenic mice. *Cold Spr. Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409(1985).