

최 중
연구보고서

세포질내 정자직접주입 및
상동유전자재조합 기술에 의한 고성장
형질전환 돼지의 생산

Production of Transgenic Pigs with High
Growth Efficiency Using Intracytoplasmic
Sperm Injection and Enhanced
Homologous Recombination Techniques

연구기관

충 남 대 학 교

충 북 대 학 교

선 문 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “세포질내 정자직접주입 및 상동유전자 재조합 기술에 의한 고성장 형질전환 돼지의 생산” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003년 8 월 일

주관연구기관명 : 충남대학교

총괄연구책임자 : 박창식

세부연구책임자 : 박창식

협동연구기관명 : 충북대학교

협동연구책임자 : 김남형

협동연구기관명 : 선문대학교

협동연구책임자 : 진동일

요 약 문

I. 제 목

세포질내 정자직접주입 및 상동유전자 재조합 기술에 의한 고성장 형질전환 돼지의 생산

II. 연구개발의 목적 및 중요성

동물의 형질전환방법은 1980년대 초에 개발되어 초기 growth hormone 유전자를 이용한 형질전환생쥐에서 보통 생쥐보다 빨리 자라는 super mice의 형질이 발현되면서 가축분야에 형질전환기술의 응용에 대한 관심이 일기 시작하였다. 이러한 형질전환기술은 가축에 유용유전자를 직접 이식하여 형질전환가축을 생산함으로써 유용한 유전 변이를 창출할 수가 있으며 전통적인 교미방법으로는 가능하지 않은 다른 종간의 유전정보의 교환이 가능하게 하는 새로운 기술이었다. 초기 형질전환동물의 생산 방법으로는 DNA microinjection 방법인데 유용 유전자를 수정란의 전핵에 주입시켜 대리모의 난관에 이식한 후 새끼를 얻는 방법이다. 다른 방법으로는 Embryonic Stem (ES) cell을 이용하여 homologous recombination 방법에 의해서 동물에서 무용유전자를 제거하고 유용유전자를 끼워 넣을 수 있게 되었다. 생쥐에서 homologous recombination 방법으로 myostatin 유전자를 유전자 적중시킨 형질전환생쥐에서도 보통 생쥐보다 빨리 자라는 형질을 나타내어 가축에서의 응용을 제시하고 있다. 그러나 이러한 장점에도 불구하고 아직까지 유전자 이식방법을 이용한 가축개량이 실용화되지 못하고 있는데 이는 현재의 유전자 이식방법은 효율이 낮아서 형질전환가축을 생산하는데 많은 비용과 노력이 필요로 하고, 가축에서 ES cell의 homologous recombination 방법에 대한 기술이 정착되지 못하고 있는 실정이다. 그러므로 축산분야에서 유전자이식을 실용화하기 위해서는 형질전환가축을 생산하는 효율을 증가시키는 방법을 개발하고 실제로 경제형질의 개량을 위해 경제형질에 관련된

유전자들을 찾아내어 그 유용성을 밝혀야 한다. 최근 Perry 등 (1999)은 세포질 내 정자직접주입법 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI)을 이용하여 형질전환생쥐의 생산 효율을 크게 증가시킨 바 있고, 심 등 (2000)은 이 기술을 이용하여 돼지에 있어서 형질전환수정란의 생산을 시도하였을 때, 발달한 수정란의 약 60%에서 외래유전자가 발현됨을 보고하였다. 또 하나 근래에 개발된 기술은 enhanced homologous recombination (EHR)으로 재조합효소인 recA를 외래유전자와 반응시켜 DNA-recA complex를 만들어 이를 수정란의 전핵 내에 주입하면 homologous recombination이 일어나 ES cell을 이용하지 않고도 용이하게 유전자적중 생쥐를 생산할 수 있음이 보고되었다 (Pati, 1998; Sargeant, 1999).

본 연구의 목적은 세포질내 정자직접주입법 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI)을 통하여 형질전환돼지의 생산효율을 현저히 제고시키고 또한 재조합효소를 이용한 유전자적중기술 (enhanced homologous recombination, EHR)을 돼지 수정란에서 확립시키는 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구의 개발 내용으로는 제 1 차년도에는 형질전환돼지의 생산을 위한 기초 기술들을 개발하고 정착시키고, 제 2 차년도에는 세포내정자주입법을 이용하여 insulin-like growth factor-I (IGF-I) 유전자를 지닌 형질전환돼지의 수정란을 생산하고 근육성장억제인자인 myostatin 유전자를 이용하여 유전자적중 백터를 구축하며, 제 3차년도에는 수정란이식을 통해 형질전환돼지를 생산하며 이들의 유전자를 검색하는 것으로 되어있다. 구체적인 내용은 다음과 같다.

1. 돼지 난포난자를 이용한 체외성숙 및 체외배양 기술의 개선을 통한 고품질 수정란의 생산
2. IGF-1 유전자 및 myostatin 유전자의 구축과 이를 이용한 형질전환 수정란 및 형질전환 돼지의 생산
3. 정자직접주입법에 의한 수정 방법과 미세수정법에 의해 외래유전자가 도입된 수정란의 생산
4. 세포질내 정자직접주입법에 의한 수정 및 체외 배양 조건 확립

5. 돼지 미수정란 및 수정란의 동결 용해 방법 개발
6. 과배란 및 발정동기화 기술개발에 의한 돼지 수정란이식 기술의 개발
7. 전핵 내 미세주입을 통한 유전자적중 수정란 생산 방법에 의한 상동유전자 재조합 기술의 확립

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

- 가. β -actin promoter-IGF-I DNA를 구축하여 세포질내 정자직접주입법을 이용하여 수정란을 만들고 대리모 돼지에 이식하여 2 마리의 형질전환돼지를 생산하였다.
- 나. 수정란을 대량으로 확보하기 위해 도축장 난소로부터 난포란을 채취하여 체외 성숙 및 배양조건에 관한 연구를 수행하여 제반기술을 확립하여 놓았다.
- 다. 돼지 미수정란 및 수정란의 장기간 보존방법에 대한 기초 실험을 통해 액체 질소에 보관할 수 있는 조건을 확립하였다.
- 라. 돼지에서 호르몬 처리에 의한 과배란 유도 방법과 대리모 돼지의 발정동기화에 대한 실험을 통해 돼지 수정란이식 기술의 조건을 개선하였다.
- 마. 정자두부를 위한 detergent의 처리 효과, 정자주입 부위 및 활성화 방법에 따른 생존율 및 conforcal image 분석 등을 통한 세포질내 정자직접주입법(ICSI)의 조건을 개선하였다.
- 바. GFP DNA를 이용하여 세포질내 정자직접주입 후 수정란의 배발달율 및 GFP 발현율을 검사하여 외래유전자 도입법을 확립하였다.
- 사. 돼지 myostatin cDNA를 이용하여 genomic library를 screening하여 myostatin genomic DNA를 cloning하여 exon 3 부위에 point mutation을 유발시켜 termination codon이 유발되도록 하였고, PCR에 의해 간단하게 screening 할 수 있는 restriction enzyme site를 만들어 유전자적중여부의 판단을 용이하게 하였다.

아. myostatin DNA를 recA protein을 혼합하여 발달된 수정란의 전핵에 주입 후 배양한 다음 PCR과 restriction analysis를 통해 상동유전자재조합이 이루어진 수정란을 확인하였다

2. 활용 방안

본 연구에서 생산된 IGF-1 형질전환돼지는 지속적인 관찰을 통한 성장관련 표현형의 발현을 측정할 예정이고 이식유전자의 발현에 따른 부작용 여부 등에 대한 연구를 계속하여 형질전환돼지에 대한 형질전환에 따른 이용성을 검사할 예정이다. 또한 세포질내 정자직접주입법 (ICSI)은 돼지에서 수정란이식 및 다른 형질전환용 수정란을 효율적으로 생산하는데 이용하고, 상동유전자재조합기술은 돼지만만 아니라 다른 가축에서도 효율적으로 수정란에서 유전자적중을 유발시키는데 활용하여 특정 유전자를 변형시킨 유전자적중 동물의 생산에 이용할 예정이다.

본 연구에서 개발된 돼지 수정란이식 기술을 이용한 고능력 종돈의 효율적인 생산이 가능하여 품종개량이 단축될 수 있으며 이를 통해 축산업의 국제경쟁력을 갖추는데 기여할 것이고 미수정란 및 수정란의 효율적인 동결보존방법으로 우수한 능력의 수정란을 생산할 수 있을 뿐만 아니라 형질전환수정란의 대량 생산에도 기여할 것으로 예상된다. 또한 동물생물공학 분야에 대두되고 있는 형질전환복제동물의 생산을 위한 중요한 기초자료로 이 분야를 발전시키는데 활용될 것이다.

SUMMARY

I . Title

Production of transgenic pigs with high growth efficiency using intracytoplasmic sperm injection and enhanced homologous recombination techniques.

II. Purpose and Necessity of the Research

Transgenic techniques were developed in early 1980 and the field of animal biotechnology have applied these techniques to produce useful livestock animals. The first technique for transgenic animal production was a gene transfer method by microinjection. When mouse embryos microinjected by growth hormone (GH) gene was transferred to the oviducts of pseudopregnants and offsprings were delivered, some of these offsprings were transgenic mice that had twice as fast as growth rate probably due to increasing growth efficiency. The techniques of genetic engineering and embryo micromanipulation are now a basis for transgenic animal production. The second was a gene targeting method in mice using homologous recombination. Myostatin gene was targeted in mouse ES cells and produced myostatin knock-out mice that also grew faster than normal mice. However, both techniques were not efficiently applied to livestock animals because of

difficulties of gene transfer in livestock animals such as low efficiency of transgenic animal production or ES cell establishment of livestock animals. Currently, new methods have been developed to produce transgenic animals more efficiently. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is one of the techniques for production of transgenic animals. And enhanced homologous recombination (EHR) technique is a gene targeting method for the production of gene knock-out animals. With these kinds of new techniques, transgenic pigs could be produced in more efficient ways. The aim of this study is to establish ICSI and EHR techniques to produce transgenic pigs with high efficiency and to have the international competitiveness.

III. The Contents of the Research

The overall objective of this study is to develop basic techniques for the production of transgenic pigs and to examine a model system using lab animal in the first year, to produce transgenic pig embryos which have foreign gene related with growth performance in the second year, and to produce transgenic pigs by embryo transfer into recipients and to confirm the expression of gene in last year. The contents of the research are as follows;

1. Production of good quality porcine embryos using in vitro maturation, fertilization and culture techniques for the immature oocytes of slaughterhouse ovaries.

2. Production of transgenic pig embryos by microinjection of recombinant DNA into pronucleus and transfer of these embryo into fosters.
3. Production of embryos by injecting a spermatozoon into unfertilized oocytes to improve in vitro fertilization techniques.
4. Cryopreservation for the porcine embryos to enhance availability of in vitro produced porcine embryos.
5. Improvement of pig embryo transfer techniques in superovulation and synchronization.
6. Establishment of enhanced homologous recombination technique in porcine embryos.

IV. Research Results

1. Cloning of recombinant DNA and development of promoter:

Growth related recombinant DNA was constructed with IGF-1 gene and β -actin promoter. And myostatic genes was cloned by screening pig genomic DNA library and homologous recombination vector was constructed with induction of point mutation in exon 3 of myostatin gene.

2. In vitro maturation and fertilization of pig immature oocytes:

The porcine oocytes collected from slaughterhouse ovaries were matured and fertilized in vitro. The effects of various additives such as hormones or growth factors were examined to develop optimum conditions for the in vitro production of pig embryos.

3. In vitro produced embryos were cultured in media which contained various additives:

The optimum condition for the culture of pig embryos was developed.

4. Superovulation induction in pig:

The ovulation rates were determined in sows following injection of hormones.

5. Microinjection of foreign gene using enhanced homologous recombination vector and in vitro developments of the embryos:

The development rate and integration of foreign genes following injection were examined. And dual culture system to enhance in vitro development of the embryos was developed.

6. Cryopreservation of pig embryos:

Pig embryos were stored in the -196°C liquid nitrogen tank until transfer to the foster mother pig. The various condition were determined to develop optimum methods to freeze pig embryos.

7. Synchronization of estrus and embryo transfer:

Optimum condition of pig embryo transfer was developed by synchronization of estrus following injecting hormones.

8. Production of transgenic pigs by ICSI with foreign gene:

Two transgenic piglets which has IGF-1 genes were produced by ICSI with β -actin promoter-IGF-1 DNA.

V. Implementation and Application

In this study we have established ICSI and EHR techniques in pig to produce transgenic pigs. Two transgenic piglets were produced with intracytoplasmic sperm injection with IGF-1 gene which was the evidence to establish transgenic system using ICSI. And enhanced homologous recombination system was developed with construction of vector which induced point mutation in exon 3 of myostatin gene. And homologous recombination could be confirmed in pig embryos following injection of this vector into pig pronucleus. Also, other basic technologies for in vitro pig embryo production and embryo transfer were established through this research.

CONTENTS

Chapter 1. Overview of project -----	1
Section 1. Necessity of the project -----	1
1. Technical aspect -----	1
2. Economical & industrial aspect -----	4
3. Social & culture aspect -----	6
Section 2. Objectives of the project -----	7
1. Overall objectives -----	7
2. Subtitle and year objectives -----	9
Chapter 2. Current status of the technology -----	10
Chapter 3. Research contents and results -----	12
Section 1. Production of transgenic pigs with high growth efficiency-----	12
1. Introduction -----	12
2. Materials and methods -----	14
3. Results and discussion -----	17
4. Conclusion -----	32
5. References -----	33
Section 2. Production of transgenic embryos by intracytoplasmic sperm injection -----	36
1. Introduction -----	36
2. Materials and methods -----	37
3. Results and discussion -----	39
4. Conclusion -----	53
5. References -----	54

Section 3. Production and examination of transgenic embryos by enhanced homologous recombination technique -----	57
1. Introduction -----	57
2. Materials and methods -----	58
3. Results and discussion -----	62
4. Conclusion -----	78
5. References -----	79
Chapter 4. Achievements and contribution -----	84
Chapter 5. Application of results -----	86

목 차

제 1 장 연구 개발과제의 개요 -----	1
제 1 절 연구개발의 필요성 -----	1
1. 기술적 측면 -----	1
2. 경제·산업적인 측면 -----	4
3. 사회·문화적 측면 -----	6
제 2 절 연구개발 목표 및 내용 -----	7
1. 총괄 연구개발 목표 -----	7
2. 세부 및 연차별 연구개발 목표 -----	9
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	10
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	12
제 1 절 고성장 형질전환 폐지의 생산 -----	12
1. 서론 -----	12
2. 재료 및 방법 -----	14
3. 결과 및 고찰 -----	17
4. 결론 -----	32
5. 참고문헌 -----	33
제 2 절 세포질내 정자 직접주입법에 의한 형질전환 폐지 수정란의 생산 --	36
1. 서론 -----	36
2. 재료 및 방법 -----	37
3. 결과 및 고찰 -----	39
4. 결론 -----	53
5. 참고문헌 -----	54
제 3 절 상동 유전자 재조합 기술에 의한 형질전환수정란의 생산 및 검정 --	57
1. 서론 -----	57
2. 재료 및 방법 -----	58
3. 결과 및 고찰 -----	62
4. 결론 -----	78

5. 참고문헌 -----	79
제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	84
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	86

제 1 장 연구 개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

형질전환기술을 이용하여 Palmiter 등 (1982)은 외래 성장호르몬 유전자를 도입하여 성장속도가 보통생쥐 보다 두 배가 증가한 거대생쥐 (supermouse)를 생산하였다. 이후 가축에서도 유전자 재조합 기술을 이용한 형질전환 동물의 생산이 시도되어 현재까지 소, 돼지, 양, 염소 등에서 수 십 종의 형질전환 가축들이 생산된 바 있다.

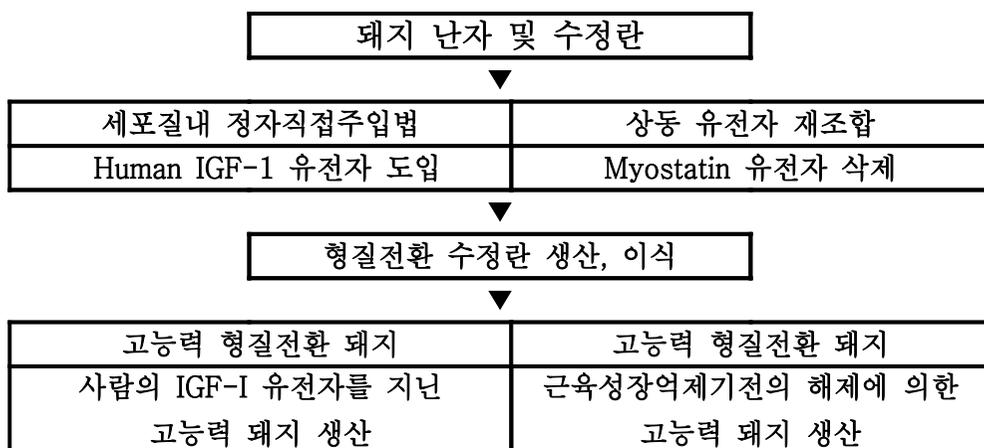
특히, 돼지는 성장 기능이 곧바로 그 부가가치를 결정짓기 때문에 타 가축에 비하여 보다 집중적인 연구 대상이 되어 왔으나 성장관련 유전자가 도입된 형질전환 돼지들의 성장속도가 배가된 예는 아직 없다 (Hammer 등, 1985). 비록 거대생쥐와 같이 체중에 있어서 큰 변화는 없었으나 이들 형질전환돼지의 등지방 두께는 보통 돼지보다 50%이상 감소하였다. 그러나 형질전환 돼지의 생산효율이 대단히 낮고 (산자 중 1%이하) 또 성장관련 유전자에 의해서 유전형질이 전환된 돼지들은 여러 가지 부작용, 즉 후구쇠약, 위궤양, 피부각화, 무기력증, 번식장애 등의 신체적인 이상이 나타나 산업화에 가장 큰 문제점으로 지적되고 있다. 이러한 신체적인 결함원인은 도입된 외래유전자들에 의해서 성장관련 인자들의 과다분비 (성장호르몬의 경우 평균 15배)되기 때문에 성장기간 중 체내농도가 높은 수준으로 유지되어 다른 기관의 형성과 기능 유지에 악영향을 미치기 때문인 것으로 알려져 있다. 따라서 많은 연구자들은 이러한 문제점을 해결하려는 연구를 집중적으로 수행해 오고 있다.

최근 Perry 등 (1999)은 세포질내 정자직접주입법 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI)을 이용하여 형질전환생쥐의 생산 효율을 크게 증가시킨 바 있다. 즉, green fluorescent protein (GFP), lacZ 등의 외래유전자를 세포막이 파괴된 정자와의 배양을 통하여 외래유전자의 정자내 도입을 유도한 후 이를 미세조작 기법을 통하여 난자내에 주입하여 형질전환생쥐를 생산하였다. 심 등 (2000)은 이 기술을 이용하여 돼지에 있어서 형질전환수정란의 생산을 시도하였을 때, 발

달한 수정란의 약 60%에서 외래유전자가 발현됨을 보고하였다. 또 하나 근래에 개발된 중요한 진보 중의 하나는 재조합효소를 이용한 유전자적중기술을 들 수 있다. 즉, E. coli의 재조합효소인 recA를 외래유전자와 반응시켜 DNA-recA complex를 만들고 이를 수정란의 전핵 내에 주입하면 homologous recombination이 일어나 배아간세포 (embryonic stem cell)를 이용하지 않고도 용이하게 유전자적중 생쥐를 생산할 수 있음이 보고되었으며 이 기술은 enhanced homologous recombination (EHR)으로 명명되었다 (Pati, 1998; Sargeant, 1999). 이 기술을 염소, 돼지 및 소에 응용하였을 때에도 유전자 적중이 가능하였다 (James D. Murray, personal communication).

이에 본 연구에서는 위에서 열거한 신기술의 개발로 기존의 형질전환동물 생산의 문제점을 획기적으로 개선하고자 한다. 즉, 세포질내 정자직접주입법 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI)을 통하여 형질전환동물의 생산효율을 현저히 제고시키고 또한 재조합효소를 이용한 유전자적중기술 (enhanced homologous recombination, EHR)을 이용하여 외래유전자의 도입부위를 정확히 조절함과 동시에 그 발현을 조직 특이적으로 국한시킴으로서 기존의 기술로는 불가피한 형질전환동물의 신체적 결함을 방지하고자 한다.

본 연구의 목적은 ...



본 연구에서는 세포질내 정자직접주입법 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI)을 이용하여 형질전환돼지의 생산효율을 획기적으로 제고시키고 근육특이적인 promoter (β -actin promoter)로 조절되는 human insulin-like growth factor (hIGF-I) 유전자를 도입함으로써 비육돈의 증체율을 높이는 동시에 외래유전자의 발현을 골격근에 국한시켜 종래의 성장호르몬 형질전환돼지에서 나타난 여러 가지 부작용을 방지하고자 한다. 나아가서는 재조합효소를 이용한 유전자적중기술 (enhanced homologous recombination)을 사용하여 근육성장억제인자 (myostatin) 유전자를 불활성화 시킴으로서 근육성장을 도모함을 그 목적으로 한다. IGF-I은 근육 및 골격의 성장을 결정하는 성장인자로, 종래의 전핵내 미세주입법에 의한 근육특이적 IGF-I 형질전환동물을 생산하였을 때 대조군에 비해 생쥐에 있어서는 약 15% (Barton-Davis 등, 1998), 돼지에 있어서는 약 11.4%의 증체가 보고된 바 있다. 한편, growth and differentiation factor-8 (GDF-8) 로 불리는 근육성장억제인자(myostatin)는 transforming growth factor (TGF)- β 군의 일원으로 근육에만 특이적으로 작용한다. Myostatin 유전자에 돌연변이가 일어난 품종인 Belgian Blue나 Piedmontese 품종의 소는 ‘근육비대 (double-muscling)’ 현상을 보이며 근 섬유 크기가 보통 소에 비해 20-25%가 크다 (McPherron and Lee, 1997). 또한 생쥐에 있어서는 근육성장억제인자의 유전자를 불활성화하는 돌연변이를 유도하였을 때 200-300%의 근육용적 증가가 보고되었다 (McPherron 등, 1997). 따라서 근육성장억제인자의 해체에 의해 증체가 가능함을 알 수 있다.

특히 돼지는 산자수가 많을 뿐만 아니라 번식력이 강하고 사양관리가 타 가축에 비해 용이하므로 이와 같은 기술을 조속히 개발하여 농업생산성을 향상시키는 것이 시급하다고 하겠다. 또 국제적으로 형질전환 가축생산 기술은 이제 초보단계로 개발할 부분이 매우 많이 남아있으며 개발된 형질전환 가축은 특허등록이 가능하여 국가기술력의 향상 및 경쟁력의 제고에도 필수적이므로 선진국에서는 생명공학회사를 설립하거나 직접 정부차원에서 본 기술을 개발하는데 막대한 연구자금과 인력을 동원하여 전력을 다하고 있는 실정이다. 따라서 국내에서도 시급히 본 기술을 개발하는데 국가차원의 지원이 요구된다.

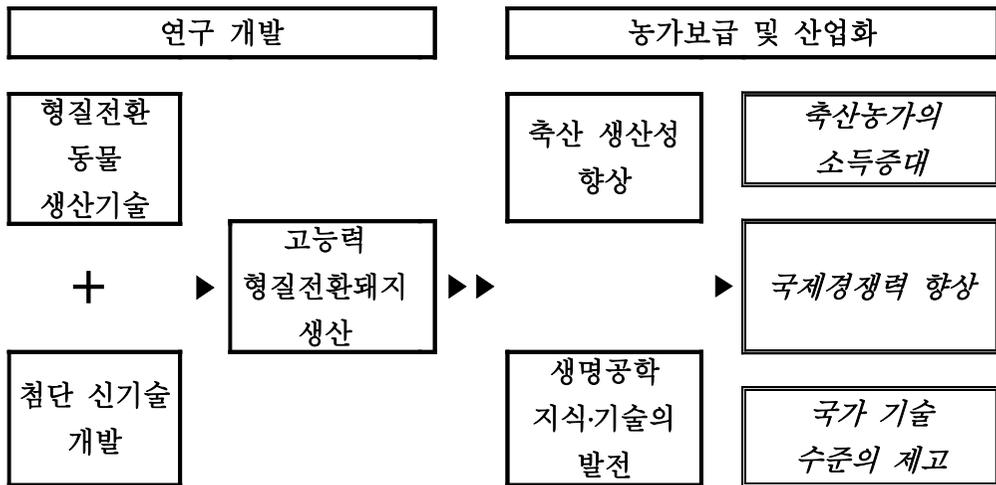
2. 경제· 산업적인 측면

생명공학의 핵심기술인 형질전환 동물의 생산기술은 이미 개발된 것도 적지 않지만 미래에 대한 기대가 더욱 크며, 국제적인 산업구조와 경제활동에 중대한 영향을 미칠 것으로 전망되고 있다. 현재 농축산물 수입자유화에 따라 국내 축산업이 심각한 위기에 처해 있는 상황임은 주지의 사실이다. 특히 양돈산업은 대부분의 종돈을 수입에 의존하고 있어 생산원가의 주요 상승요인이 되고 있을 뿐만 아니라 비육돈의 생산성 (일당 증체량: 선진국 비육돈의 90%수준)면에서도 외국에 크게 뒤지고 있기 때문에 장차 어려움이 예상된다. 비육돈 생산비 면에 있어서 국내 생산비와 비교하여 미국은 70%, 덴마크는 90%정도로 저렴하여 가격경쟁이 낮으며 장차 국내 돈육소비량의 급격한 증가 (1971년 대비 400%이상)에 따른 수급 불균형의 악순환과 저렴한 수입육의 과잉공급에 의한 일반농가의 피해는 막대하다고 하겠다. 이러한 심각한 문제점과 국내 최대 육류공급원을 사수한다는 점을 감안할 때, 양돈산업의 국제 경제력 강화를 위한 적절한 대책을 강구하지 않으면 안 된다.

그러나 지금까지 급속히 발전해 온 국내 양돈산업의 기반을 토대로 하여 최신 첨단기술들을 접목시켜 두당 생산성을 획기적으로 향상시킬 수 있다면 이러한 문제점들은 해결될 것이다. 이에 본 연구는 상동유전자 재조합, 세포질내 정자직접주입법과 같은 첨단생명공학기법을 이용하여 고능력의 형질전환 종돈을 생산함으로써 양돈산업의 국제 경쟁력 제고는 물론 일반 양돈농가의 경제적 안정에 기여하고자 한다. 돼지의 품종개량과 증식에 의한 생산성 제고를 위해 그간 많은 노력이 경주되어 왔으나 종래와 같은 선발과 도태에 근거한 개량 방법으로는 개량 속도가 너무 늦어 시장 개방에 따른 국내외 급격한 상황 변화에 대응할 수 없다. 그러므로 현재 선진국에서 개발 중에 있는 첨단형질전환기술을 국내에서도 조속히 개발하여 돼지의 개량과 증식을 신속하게 달성할 수 있는 산업적 기술로 정립하여야 한다. 이러한 기술의 개발은 국내에 새로운 생명공학관련 산업 군을 형성시킴과 동시에 국내 동물산업을 보다 활성화시키고 국제경쟁력을 제고시킬 수 있으므로 절실히 필요하다고 본다. 특히 각국마다 개발된 형질전환 가축들을 등록하고 특허권을 부여하여 세계시장을 장악하려는 정책을 강구하고 있으므로 우리 나라에서도 이를 정책적으로 지원하고 보호 육성하는데 필요한 대책이 시급히 요청되고 있다.

본 연구에서 시도하고자 하는 신기술을 이용한 IGF-I 및 근육성장억제인자의 형질전환 돼지를 생산하였을 때, 형질전환동물의 생산효율은 50%이상 또는 정상돈 대비 40%이상의 증체가 예상된다. 본 과제가 성공적으로 수행된다면 돼지생산성을 직접적으로 향상시킬 뿐만 아니라 축산농가의 소득 및 수입육에 대한 국내산 돈육의 국제경쟁력을 획기적으로 개선할 수 있는 계기가 될 것이다.

본 연구 과제를 통하여 ...



3. 사회·문화적 측면

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

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

제 2 절 연구개발 목표 및 내용

1. 총괄 연구개발 목표

본 연구는 insulin-like growth factor-I (IGF-I) 유전자 도입과 근육성장억제 인자 (myostatin) 유전자 삭제를 통해 증체량이 기존의 돼지에 비해 30-50% 향상된 형질전환 돼지의 생산을 목표로 한다.

기술 항목별 목표

- 1) 외래 유전자의 cloning
 - ▷ IGF-1 유전자 및 myostatin 유전자의 cloning 및 gene construct 개발
- 2) 정자 주입방법 개발
 - ▷ 세포질내 정자직접주입법에 의한 수정 및 체외 배양 조건 확립
- 3) 정자의 동결 용해, 세포막의 처리 및 정자두부 분리 방법 개발
 - ▷ 정자두부의 분리, 외래 유전자 도입을 위한 정자 두부 전처리 과정 확립
- 4) 전핵내 미세주입에 의한 유전자적중 수정란 작성
 - ▷ 상동 유전자 재조합 기술에 의한 유전자 적중 기술 개발
- 5) 정자에 외래 유전자 도입
 - ▷ 세포막이 처리된 정자에 외래 유전자 도입
- 6) 외래유전자가 도입된 정자에 의한 난자의 수정 방법 개발
 - ▷ 정자직접주입법에 의한 수정 방법 개발
 - ▷ 미세수정법에 의해 수정란 생산

- 7) 수정란 수준에서 외래 유전자 확인
 - ▷ PCR에 의한 형질전환 수정란의 확인
- 8) 수정란의 동결 방법 개발
 - ▷ 돼지 수정란의 동결 기술 개발 및 형질전환 수정란의 장기 보존
- 9) 수정란 이식에 의한 산자 생산
 - ▷ IGF-I 및 myostatin 형질전환수정란의 이식에 의한 형질전환 돼지의 생산
- 10) 형질전환 돼지의 유전형 검정
 - ▷ PCR 및 Southern analysis에 의해 IGF-I 및 myostatin 형질전환 돼지의 확인
- 11) 형질전환 돼지의 표현형 검정
 - ▷ IGF-I 및 myostatin 형질전환 돼지의 성장률, 증체율, 체단백질, 체지방, 근섬유의 분포 등을 대조군과 비교
- 12) 형질전환돼지의 번식 및 경제성 분석
 - ▷ IGF-I 및 myostatin 형질전환 돼지를 번식시켜 후대의 유전형 및 표현형을 조사하고 경제성을 분석
- 13) 고능력 형질전환 돼지의 보급

2. 세부 및 연차별 연구개발 목표와 내용

구분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도	돼지수정란 이식기술 개발 (제1세부과제)	<ul style="list-style-type: none"> · 체외수정란의 생산 조건 개선 · 수정란의 동결
	전핵내 미세주입법 및 세포질내 정자주입법 개발 (제2세부과제)	<ul style="list-style-type: none"> · 정자 및 정자두부에 의한 수정 및 체외 배양 기술개발 · 외래 유전자 전핵내 주입 후 배발달 조건 개선
	외래 유전자의 cloning 및 유전자 재조합 (제3세부과제)	<ul style="list-style-type: none"> · IGF-I 및 myostatin 유전자의 cloning · 외래 유전자 construct 제작
2차 년도	형질전환 수정란의 이식 (제1세부과제)	<ul style="list-style-type: none"> · 형질전환 수정란의 선발 및 이식 · 형질전환 수정란의 체외발달 조건 개선
	세포질내 정자 직접주입법을 이용한 형질전환 수정란의 생산 (제2세부과제)	<ul style="list-style-type: none"> · 외래 유전자 도입 정자에 의한 수정란의 생산 및 유전자발현 조사
	상동유전자 재조합 기술에 의한 형질전환 수정란의 생산 (제3세부과제)	<ul style="list-style-type: none"> · 상동유전자 재조합기술 (EHR)의 개발 · 전핵내 미세주입법에 의한 myostatin 형질전환 수정란의 생산
3차 년도	형질전환 돼지의 생산 (제1세부과제)	<ul style="list-style-type: none"> · 형질전환 돼지의 생산 및 관리
	형질전환 수정란의 대량생산 (제2세부과제)	<ul style="list-style-type: none"> · IGF-I 및 myostatin 형질전환 수정란의 대량생산 · 형질전환 수정란의 대량 이식
	형질전환 돼지의 검정 (제3세부과제)	<ul style="list-style-type: none"> · IGF-I 형질전환 돼지의 유전형 및 표현형 조사 · Myostatin 형질전환 돼지의 유전형 및 표현형 조사

제 2 장 국내외 기술개발 현황

형질전환 동물의 생산과 이용은 1980년 Gordon 등에 의해 형질전환 생쥐 (transgenic mouse) 의 생산이 최초로 보고된 이래 돼지에 있어서도 유전자재조합 기술을 이용한 형질전환돼지의 생산이 아래와 같이 보고되었다.

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

세포질내 정자직접 주입법의 개발은 정자를 외래유전자의 운반체로 이용하기 위한 시도들이 이루어져 왔으며 주요 연구 결과들은 아래와 같다.

연도	연구자	기술 개발 내용
1971	Brackett 등	외래유전자 도입 정자를 이용한 토끼난자의 수정
1989	Lavitrano 등	정자매개의한 형질전환 생쥐생산
1997	Lavitrano 등	체외수정에 의한 형질전환 돼지의 생산
1998	Kim 등	돼지 정자 및 정자두부 주입에의한 수정 및 배발달
1999	Perry 등	정자미세주입법에의한 형질전환생쥐의 생산
2000	Chan 등	정자미세주입법에의한 형질전환 원숭이 생산
2000	Shim 등	외래 유전자가 도입된 돼지정자를 난자에 미세주입하여 형질전환 수정란 생산

유전자적중기술의 개발은 형질전환동물의 생산에 있어서 유전자의 부가뿐만 아니라 유전자의 삭제 및 치환을 가능하게 하는 유전자적중기술은 외래유전자의 발현을 정확히 조절할 수 있는 중요한 기술이다. 지금까지는 주로 배아간세포 (embryonic stem cell, ES cell)를 이용하여 유전자적중이 이루어졌으나 최근에는 핵이식 (nuclear transfer) 및 재조합효소를 이용한 (enhanced homologous recombination, EHR) 유전자적중이 시도되고 있다. 현재까지 주요한 연구결과들은 아래와 같다.

연도	연구자	기술 개발 내용
1981	Evans와 Kaufman, Martin	생쥐의 ES cell 개발
1987	Doetschman 등	생쥐의 ES cell에서 유전자적중기술 개발
1987	Thomas와 Capecchi	유전자적중 생쥐의 생산
1992	Matsui 등, Resnick 등	생쥐 원시생식세포 유래의 ES cell 개발
1994	Wheeler	돼지 배반포에서 유래한 ES cell 개발
1997	Shim 등	돼지 원시생식세포 유래의 ES cell 개발
1997	Wilmut 등	체세포 핵이식에 의한 복제양 생산
1998	Pati	EHR을 이용한 유전자적중 생쥐의 생산
1999	PPL	체세포 핵이식에 의한 유전자적중 복제양 생산

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 고성장 형질전환 돼지의 생산

1. 서론

생명공학의 핵심기술인 형질전환 동물의 생산기술은 이미 개발된 것도 적지 않지만 미래에 기대가 더욱 크며, 국제적인 산업구조와 경제활동에 중대한 영향을 미칠 것으로 전망되고 있다. 현재 농축산물 수입 자유화와 첨단기술 특허권의 보장에 따라 국내 축산업이 심각한 위기에 처해 있는 상황이다. 앞으로 양돈산업이 어려울 것으로 예상되는데, 그것은 특히 대부분의 종돈을 수입 (91년도 1,260두, 25억원 상당)에 의존하고 있어 생산원가의 주요 상승요인이 되고 있을 뿐만 아니라 비육돈의 생산성 자체 (일당증체량: 선진국 비육돈의 90%수준)에서도 크게 뒤지고 있기 때문이다. 지금까지 급속히 발전해 온 국내 양돈산업의 기반을 토대로 하여 최신 첨단기술들을 접목시켜 두당 생산성을 획기적으로 극대화시킬 수 있다면 이러한 심각한 문제점들은 해결되리라 본다. 이에 본 연구는 유전자 재조합 기법과 수정란 미세조작 기법을 이용하여 고성장 transgenic 종돈을 생산함으로써 양돈산업의 국제 경쟁력 제고는 물론 일반 양돈농가의 경제적 안정에 기여하려고 하였다. 이것이 본 연구의 목적이다.

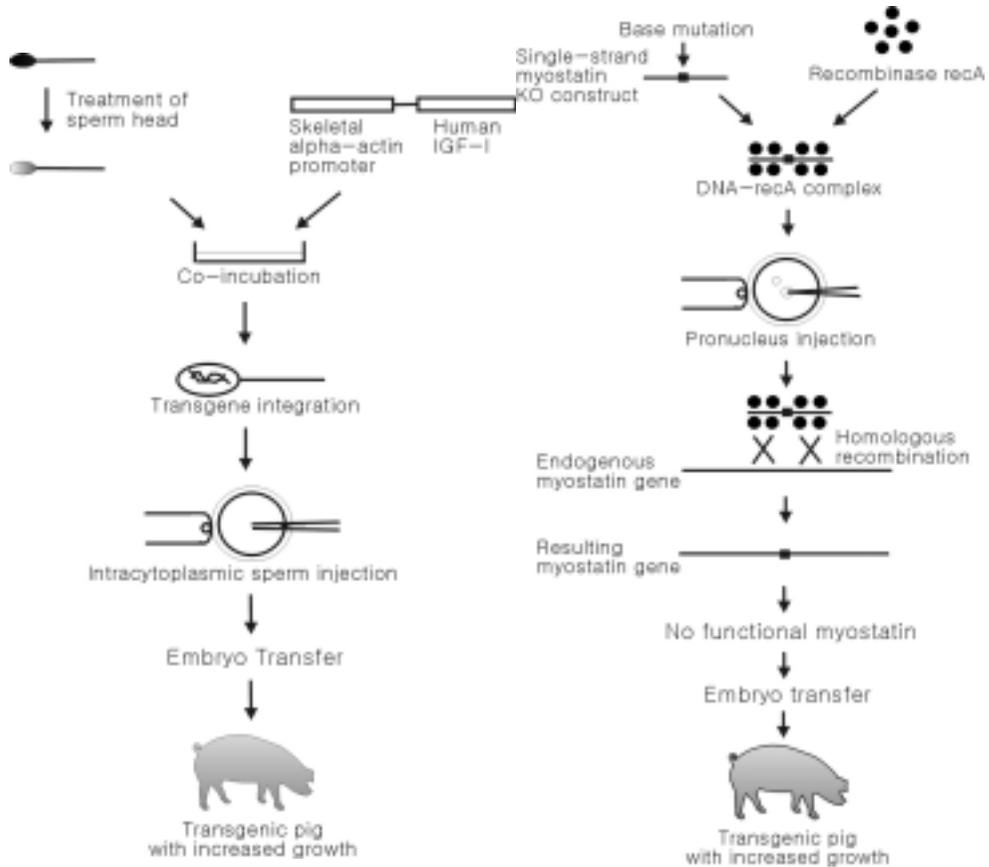
돼지의 품종개량과 증식에 의한 생산성 제고를 위해 그간 많은 노력이 경주되어 온 것이 사실이다. 그러나 종래와 같은 선발과 도태에 근거한 개량 방법으로는 개량 속도가 너무 늦어 시장 개방에 따른 국내외 급격한 상황 변화에 대응할 수 없다. 특히 종돈 수입에 의존하는 품질개량은 외화낭비는 물론 생산 원가 상승 요인이 되고 있다. 최근 국내에서 실시하고 있는 성장호르몬 투여에 의한 생산성 제고 효과는 극히 단기적인 것이며, 투여 방법의 복잡함과 이에 상응하는 인건비와 값비싼 성장호르몬 구입비 역시 생산 원가 상승 요인이 되어 장기적인 안목으로 볼 때 그 실용성에 의문이 제기된다. 따라서 현재 선진국에서 개발 중에 있는 첨단기술 특히 형질전환기술을 국내에서도 조속히 개발하여 돼지의 개량과 증식을 신속하게 달성할 수 있는 산업적 기술이 정립되어야 한다. 본 기술의 개발은 국내에 새로운 생명공학관련 산업군을 형성시킴과 동시에 국내 동물

산업을 보다 활성화시키고 국제경쟁력을 제고시킬 수 있으므로 절실히 필요하다고 본다. 특히 각국마다 개발된 형질전환 가축들에게 유래 없이 등록하고 특허권을 부여하여 세계시장을 장악하려는 정책을 강구하고 있으므로 우리 나라에서도 이를 정책적으로 지원하고 보호 육성하는데 필요한 대책이 시급히 요청되고 있다.

특히 돼지는 산자수가 많을 뿐만 아니라 번식력이 강하고 사양관리가 타 가축에 비해 용이하므로 이와 같은 기술을 조속히 개발하여 농업생산성을 향상시키는 것이 시급하다고 하겠다. 또 국제적으로 형질전환 가축생산 기술은 이제 초보단계로 개발할 부분이 매우 많이 남아있으며 개발된 형질전환 가축은 특허등록이 가능하여 국가기술력의 향상 및 경쟁력의 제고에도 필수적이므로 선진국에서는 생명공학회사를 설립하거나 직접 정부차원에서 본 기술을 개발하는데 막대한 연구자금과 인력을 동원하여 전력을 다하고 있는 실정이다. 따라서 국내에서도 시급히 본 기술을 개발하는데 국가차원의 지원이 요구된다.

2. 재료 및 방법

♠ 연구개발의 모식도



세포질내 정자직접주입법에 의한
고능력 형질전환돼지의 생산

상동유전자 재조합기술에 의한
고능력 형질전환돼지의 생산

가. 난포란의 회수와 체외성숙, 수정 및 배양

도축장에서 도살되는 돼지로부터 난소를 회수하여 체외성숙을 실시하였다. 즉 도축장에서 돼지의 난소를 회수하여 30~35°C 멸균생리식염수가 들어있는 보온병에 담아 1시간 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 재차 멸균생리식염수로 세척한 후 70% 알콜로 난소의 표면을 소독한 후, 18-gauge의 주사침를 이용하여 2-6 mm 크기의 가시난포에서 난포란을 회수하였다. 이중 난구세포가 치밀하게 부착되고 난자의 세포질이 균일한 것만을 선별하여 본 실험에서 공시하였다. 난포란의 체외성숙은 기존 사용 배양액인 TCM-199, NCSU-23, Waymouth 성숙배지에 10% porcine follicular fluid (pFF) 0.6 mM cysteine (Sigma, USA), 1 µg/ml FSH이 첨가된 배양액을 제조하여 paraffin oil이 덮인 50 µl로 소적한 뒤 2시간 이상 39°C, 5% CO₂ 및 95% 공기조건의 배양기내에서 평형 시킨 후 각 소적 당 10개의 미성숙 난포란을 침지하여 44시간 동안 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다. 또한 세포질 성숙율을 조사하기 위하여 이들 배양액에서 성숙된 난자의 glutathione 농도를 조사하였다.

체외수정 조건을 개선하기 위하여 TCM-Hepes, mTBM 체외수정 배지에서 정자와 공배양을 유도한 후 전핵형성을, 다정자침입을 조사하였다. 체외수정 난포란의 체외배양 조건을 개선하기 위하여 체외수정된 난자를 TCM-199 및 NCSU-23 배양배지에서 7-8일간 배양 후 상실배 및 배반포 발달을 조사하였다.

나. 형질전환 돼지수정란의 외과적 이식

체외성숙, 수정 및 배발생이 유도된 수정란을 이용하여 산자의 생산을 얻기 위하여 외과적 수정란 이식을 실시하였다. Single dose의 PG-600 투여로 발정동기화가 된 수란돈에 마취제 ketamine (유한양행, 한국) 50 mg을 이정맥에 주사하여 1차 마취를 유도한 다음 수술대에 양와자세로 보정한 다음 halothane가스로 기도마취를 실시하였다. 마취된 수란돈의 정중선을 중심으로 광범위하게 털을 제거하고 소독을 실시한 다음 정중선을 약 10-15cm를 절개하여 난소-난관-자궁을 노출하였다. 난소표면의 황체의 존재를 확인한 다음, 수정란 30-50개가 함유된 배양액이 채워진 polycatheter (Cook, Australia)를 난관팽대부에 넣고, 약 3-5

cm정도 부위에 수정란 함유 배양액을 주사하여 이식하였다. 이식이 완료된 난소-난관-자궁은 복강 내로 원상태로 밀어 넣은 다음, 생리식염수로 복강을 채워 장간흡착을 방지시켰다. 그리고 내피와 표피를 각각 봉합하고 항생제를 투여한 후, 보온이 잘되는 돈방에서 마취가 깰 때까지 모든 접근을 막고 보호하고, 재발정여부 및 초음파 임신진단기로 임신유무를 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 미성숙 난포난의 체외성숙

기존사용 배양액인 TCM-199, NCSU-23, Waymouth 성숙배지에 배양하여 성숙율을 비교한 결과 핵 성숙율이 모두 85-95%정도로 별 차이가 없음을 발견하였다 (Table 1).

세포질 성숙율을 조사하기 위하여 이들 배양액에서 성숙된 난자의 glutathione 농도를 조사한 결과 NCSU-23 배양액에서 배양된 난자의 glutathione 농도는 5.0 pmol/oocyte로 TCM-199 과 Waymouth 배양액에서 성숙된 난자들 보다 높았다 (Table 2).

Table 1. Nuclear maturation of porcine oocyte in different maturation media

Medium	No. of oocytes cultured	No. of oocytes (%)			
		GV	GVBD	M I	M II
TCM-199	250	5	5	10	230 (92)
NCSU-23	230	3	3	5	219 (95)
Waymouth	180	12	5	10	153 (85)

Table 2. Glutathione concentration of porcine oocytes matured in different culture media

Medium	No. of oocytes examined	Intracellular GSH concentration (pmol/oocyte)
TCM-199	80	4.0 ^a
NCSU-23	90	5.0 ^b
Waymouth	82	3.7 ^a

^{ab} Means in the same column with different superscript are different (P<0.05).

Table 3. Comparison of composition in protein free medium and conventional medium

Concentration (mmol l ⁻¹)	IVM medium	
	PF-TCM-199	NCSU-23
NaCl	116.36	108.73
KCl	5.36	4.78
CaCl ₂	1.80	1.70
KH ₂ PO ₄	–	1.19
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.81	1.19
NaHCO ₃	26.19	25.07
Glucose	5.55	5.55
Glutamine	0.68	1.0
Taurine	–	7.0
Hypotaurine	–	5.0
Penicillin G (i.u. ml ⁻¹)	100	100
Streptomycin (μg ml ⁻¹)	50	50
pFF (% , v/v)	–	10
Cysteine	0.57	0.57
PVA (% , v/v)	10	–

최근 Missouri 대학에서 개발한 EGF가 첨가된 protein-free 배양액에서 체외 성숙방법을 도입하여 체외 성숙율을 개선하고자 하였다. Table 3은 protein-free 배양액의 조성표를 보여주는 것이다.

Protein-free 배양액과 NCSU-23 배양액으로 미성숙 난자를 체외에서 성숙시킨 결과 성숙율이 96%, 92%으로 유의차가 인정되지 않았고, 각각 상실배와 배반포도 각각 37%와 36%로 유의차가 인정되지 않았다. 그러나 protein-free 배양액의 조성 성분이 간단하여 사용의 편리성이 인정된다 (Table 4, 5).

Table 4. Meiotic maturation of porcine oocytes of protein-free culture medium

Medium	No. of oocytes cultured	No. of oocytes (%)			
		GV	GVBD	MI	MII
PF-Medium	270	6	3	2	259 (96)
NCSU-23	250	10	0	10	230 (92)

Table 5. In vitro development of porcine oocyte matured in different media

Medium	No. of oocytes examined	Cultured oocytes	
		No. of cleaved oocytes (%)	No. of morula/blastocyst (%)
PF-Medium	200	160 (80)	59 (37)
NCSU-23	260	220 (85)	80 (36)

나. 체외성숙 난포난의 체외수정

체외수정조건을 개선하기 위해 TCM-Hepes, mTBM 체외수정 배지에서 정자와 공배양을 유도한 후 전핵형성율, 다정자 침입율 등을 조사하였다. TCM-Hepes에서 체외수정을 유도하였을 때 다정자 침입율이 현저히 개선되었음을 알 수 있었고 전핵형성율이 75%로 더 높음을 알 수 있었다 (Table 6).

Table 6. Pronuclear formation and polyspermic penetration of porcine oocytes

Medium	No. of oocytes examined	No. of oocytes inseminated	No. of oocytes penetrated		No. of polyspermic oocytes (%)
			Total (%)	with male pronucleus (%)	
TCM-Hepes	150	120	97 (81)	90 (75) ^b	27 (23) ^a
mTBM	140	105	80 (76)	68 (65) ^a	34 (32) ^b

^{ab} Means in the same column with different superscript are different (P<0.05).

동결 보존된 정자를 이용하여 수정을 유도하고 이들 난자의 전핵 형성과 다정자 침입을 조사한 결과 원정액 정자의 응성전핵 형성은 높았으나 다정자 침입에는 유의차가 인정되지 않았다 (Table 7).

Table 7. Pronuclear formation of porcine oocytes following in vitro fertilization using cryopreserved spermatozoa

Treatment	No. of oocytes examined	No. of oocytes inseminated	No. of oocytes penetrated		No. of polyspermic oocytes (%)
			Total (%)	with male pronucleus (%)	
Fresh	130	97	90 (93)	72 (74) ^b	20 (21)
Frozen semen	150	125	80 (64)	78 (62) ^a	18 (14)

^{ab} Means in the same column with different superscript are different (P<0.05).

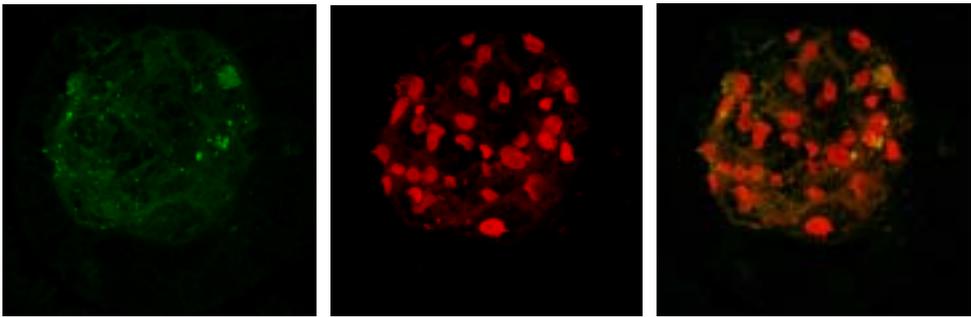


Fig. 1. Apoptotic cell death in porcine blastocysts. Green images shows apoptosis.

Table 8. In vitro development of porcine oocytes following in vitro fertilization

Medium	No. of oocytes examined	Cultured oocytes	
		No. of cleaved oocytes (%)	No. of morula/blastocyst (%)
NCSU-23	120	102 (85)	34 (33) ^b
TCM-199	120	82 (68)	12 (15) ^a

^{ab} Means in the same column with different superscript are different ($P < 0.05$).

체외수정 난포난의 체외배양 조건을 개선하기 위하여 체외 수정된 난자를 NCSU-23 배지와 TCM-199 배지에서 7-8일간 배양한 후 상실배 및 배반포 발생율을 조사한 결과 NCSU-23에서 배양하였을 경우 상실배 및 배반포 발생율이 33%인 반면 TCM-199에서 배양된 난자의 발생율은 15%에 불과하여 NCSU-23에서 배양된 난자의 배발생율이 우수하였다 (Table 8).

배발생율을 저하에 영향을 미치는 요인들을 조사하기 위하여 TUNNEL방법에 의한 세포사멸 (apoptosis)에 관하여 조사한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같다.

다. 형질전환 돼지 수정란의 체외 발달

형질전환 수정란 (GFP 함유 유전자)의 체외 발달능력을 조사하였는데, TCM-199, NCSU-23, NCSU-37 배양액에서 배양한 결과 배반포기까지의 배발달율은 각각 2, 22 그리고 25%로서 NCSU-37 배양액의 성적이 가장 우수하였다 (Table 9). 체외성숙, 체외수정 및 체외배양된 1-cell과 4-cell embryo의 NCSU-23 배양액에 cysteine을 첨가했을 때, 4-cell embryo의 2 mM cysteine 첨가군에서 유의하게 높은 배반포 발달율을 나타내었다. 그리고 NCSU-37 배양액에 EGF를 첨가하였을 때 배반포기 수정란의 발생율은 단순 배양액에서 배양했을 때 보다 유의하게 높았으며 ($P<0.05$), 또한 배양액 내 EGF (epidermal growth factor)의 첨가는 배반포까지의 배 발달율을 현저하게 향상시켰다. 따라서 cysteine이나 EGF가 배양액내 첨가됨으로써 세포내 배 발달율을 증가시키는 것이 확인되었다(Table 10, 11).

Fig. 2 에는 녹색형광단백질 (green fluorescent protein, GFP)을 포함한 돼지 수정란의 체외발달 현상을 나타내고 있다.

Table 9. Effect of culture media on in vitro developments of transgenic porcine embryos

Culture medium	No. of embryos examined	No. (%) of embryos developed to		
		Morula	Blastocyst	Hatching & hatched Bl
TCM-199	125	9 (7) ^a	2 (2) ^a	0 (0) ^a
NCSU-23	115	35 (30) ^b	25 (22) ^b	9 (8) ^b
NCSU-37	130	42 (32) ^b	33 (25) ^b	11 (8) ^b

^{ab} Means in the same column with different superscript are different ($P<0.05$).

Table 10. The effect of addition of cysteine to the NCSU-37 culture medium on in vitro development of transgenic porcine oocytes

Cell stage	Conc. of cysteine (mM)	No. of oocytes examined	No. (%) of embryos developed to	
			Morula	Blastocyst
1-cell	0	95	17 (18)	23 (24)
	1	101	22 (22)	28 (28)
	2	115	20 (17)	21 (18)
4-cell	0	91	38 (42)	22 (24) ^a
	1	96	45 (47)	32 (33) ^b
	2	98	50 (51)	42 (43) ^c

^{abc} Means in the same column with different superscript are different (P<0.05).

Table 11. The effect of addition of EGF on the development of porcine oocytes to NCSU-37 medium

Treatment	No. of oocytes examined	No. (%) of embryos developed to	
		Morula	Blastocyst
Control	160	38 (24)	28 (18) ^a
EGF (1 mM)	180	51 (28)	41 (23) ^b

^{ab} Means in the same column with different superscript are different (P<0.05).

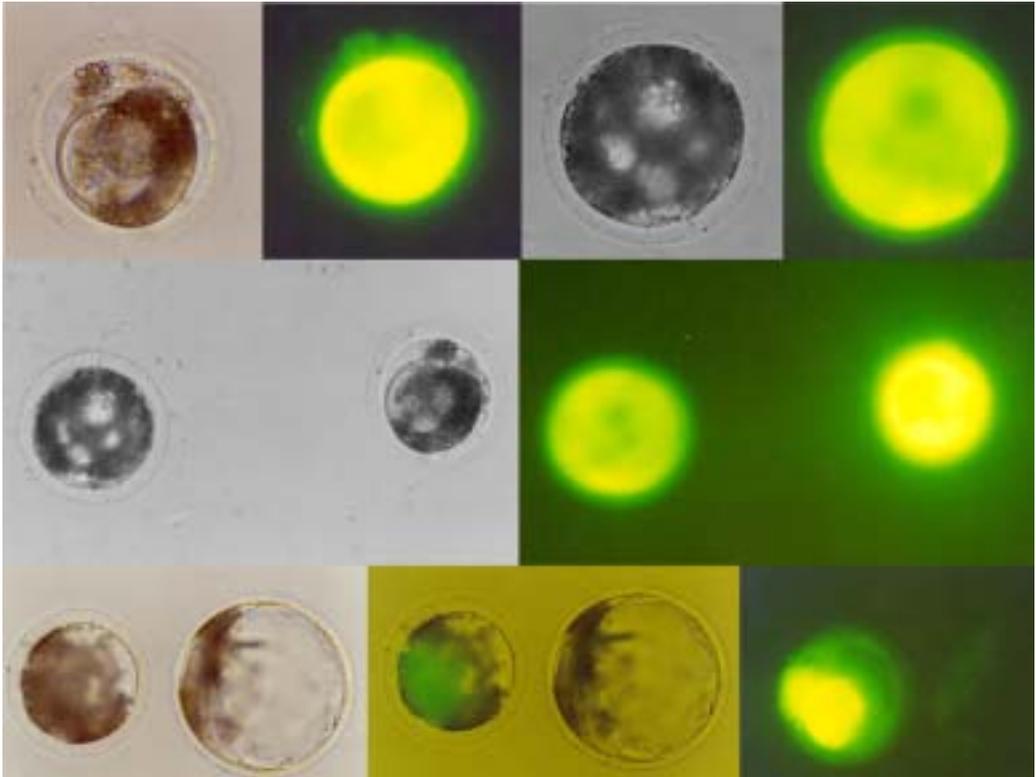


Figure 2. In vitro development of transgenic (GFP gene) porcine embryos and their expression

라. 돼지의 과배란유기

본 연구에서는 체외에서 성숙된 난자를 주로 사용하였지만 효율성 면에서 체내에서 성숙된 난자를 병행하여 사용하여왔다. 과배란을 유도하기 위하여 미경산돈 1두당 1.8 kg의 사료에 15 mg Altrenogest를 혼합하여 5-9일간 (발정주기 10-16일 사이에서 급여시작) 경구투여 하였다. Altrenogest 마지막 급여 후 24시간 지나서 400 IU PMSG와 200 IU hCG를 투여하고 PMSG-hCG 투여 후 78시간 지나서 500 IU hCG를 투여하여 42-44시간 후에 배란된 난자를 회수하였다. 평균 황체 수는 29.4개였고 체란수도 23개였다. 본 연구에서 얻어진 난자는 모두 전핵 내 미세주입법에 의해 형질전환 수정란 생산에 사용하였다.

마. 돼지 수정란의 동결

돼지 수정란의 동결기술은 시간적·공간적인 문제없이 수정란이식을 가능하게 하여 형질전환돼지 생산에 꼭 필요한 기술이다. 10% 난황과 10% glycerol을 기본 항동해제로 하는 처리구, 기본 항동해제에 2 mg/ml liposome을 첨가한 처리구 그리고 기본 항동해제에 2 mg/ml liposome과 0.1% orvus es paste를 첨가한 처리구에서 동결 용해 수정란의 생존율, 할구세포수 및 이식가능 수정란을 비교하였다. 확장 배반포의 경우 기본 항동해제에 2 mg/ml liposome과 0.1% orvus es paste를 첨가한 처리구가 우수하였고 (Table 12), 탈출 배반포에서는 기본 항동해제에 2 mg/ml liposome을 첨가한 처리구가 가장 우수하였다 (Table 13).

Table 12. Effect of various supplements before freezing of expanded blastocyst on the embryonic survival and quality

Treatment*	No. of embryos frozen-thawed	No. of embryos survived at 24h	Diameter (μm)		No. of nuclear	No. of transferable embryos
			Before freezing	After freezing		
Glycerol	22	12	216.9	126.5	9.8 ^a	3 ^a
Gly+Lip	23	16	212.0	175.9	13.5 ^a	7 ^b
Gly+Lip+OEP	28	14	219.6	146.8	22.3 ^b	10 ^b
Total	73	42	216.2	149.7	15.2	20

* Gly: Glycerol, Lip: Liposome, OEP: Orvus es paste.

^{ab} Means in the same column with different superscript are different (P<0.05).

Table 13. Effect of various supplements before freezing of hatched blastocyst on the embryonic survival and quality

Treatment*	No. of embryos frozen-thawed	No. of embryos survived at 24h	Diameter (μm)		No. of nuclear	No. of transferable embryos
			Before freezing	After freezing		
Glycerol	15	8	242.7	73.7	24.4 ^b	3
Gly+Lip	14	9	243.4	153.1	40.3 ^c	6
Gly+Lip+OEP	13	10	254.4	100.4	11.9 ^a	3
Total	42	27	246.8	109.1	25.5	12

* Gly: Glycerol, Lip: Liposome, OEP: Orvus es paste.

^{abc} Means in the same column with different superscript are different (P<0.05).

또한, 미성숙 돼지난포난의 동결융해 후 생존율을 조사한 결과 여러 가지 방법중 5.5 M ethylene glycol을 사용한 군에서 가장 높은 생존율을 보여주었다. 그러나 intact한 군과 centrifuged한 군의 생존율의 차이는 나타나지 않았다. 또한 상기와 동일한 실험을 성숙한 돼지 난자로 실시한 결과, 미성숙 난자와 같은 결과를 보여주었다 (Table 15). 이러한 결과는 grid methods에 의해 이루어졌으며, 이러한 방법은 기존의 방법보다 유의하게 효과적이라고 사료된다 (Table 14, 15).

Table 14. Survival rate of immature porcine oocytes cryopreserved in various cryoprotectants according to grid methods

Treatment	No. of replicates	No. of oocytes frozen	Intact rate (%)	Survival rate (%)
Intact				
EG 5.5M	10	23.4±12.1	94±4	92±5 ^a
40%EG+18%Ficoll (3:1)	10	21.5±9.4	85±12	80±16 ^b
40%EG+18%Ficoll (2:1)	8	20.8±10.2	88±8	82±12 ^b
DAP213	6	18.9±15.2	86±20	30±23 ^c
Centrifuged*				
EG 5.5M	10	21.2±10.2	96±3	93±3 ^a
40%EG+18%Ficoll (3:1)	10	23.5±10.6	83±10	80±10 ^b
40%EG+18%Ficoll (2:1)	8	25.6±15.6	86±12	80±8 ^b
DAP213	6	32.0±10.1	76±12	36±26 ^c

EG: Ethylene Glycol, DAP213: 2.0M DMSO+1.0M Acetamide+3.0M Propylene Glycol, * Centrifuged: 12500g for 10 min

^{abc} Means in the same column with different superscript are different (P<0.05).

Table 15. Survival rate of mature porcine oocytes cryopreserved in various cryoprotectants according to grid methods

Treatment	No. of replicates	No. of oocytes frozen	Intact rate (%)	Survival rate (%)
Intact				
EG 5.5M	10	26.3±4.5	98±1	94±2 ^a
40%EG+18%Ficoll (3:1)	7	22.3±6.2	87±3	85±2 ^a
40%EG+18%Ficoll (2:1)	8	25.2±9.6	94±5	90±3 ^a
DAP213	4	19.8±12.5	80±10	48±12 ^b
Centrifuged*				
EG 5.5M	10	25.2±7.8	94±3	92±1 ^a
40%EG+18%Ficoll (3:1)	4	22.4±5.3	89±5	86±4 ^a
40%EG+18%Ficoll (2:1)	5	26.2±7.8	96±2	89±4 ^a
DAP213	3	21.2±3.4	88±6	52±12 ^b

EG: Ethylene Glycol, DAP213: 2.0M DMSO+1.0M Acetamide+3.0M Propylene Glycol, * Centrifuged: 12500g for 10 min

^{ab} Means in the same column with different superscript are different (P<0.05).

바. 돼지의 발정동기화

형질전환돼지를 생산하기 위해서는 이식 가능한 난자 시기와 이식할 돼지의 발정시기가 일치해야 정상적인 착상과 산자의 생산이 가능하므로, 이러한 문제를 해결하고자 미경산돈을 공시하여 대조군 및 altrenogest 처리군의 발정동기화를 조사하였던 바, 발정 발현율은 각각 84.9 및 90.6%로 altrenogest 처리군이 높았으며, 대조군에서는 발정이 산재하여 나타나지만 altrenogest 투여 때에는 4-12일 사이에 86.8%의 개체가 발정이 동기화 되었다(Table 16).

Table 16. Number of gilts exhibiting estrus after administration of altrenogest (ALT)

Treat- ments	No. of gilts	No. of gilts showing estrus	estrus days after treatment(head)*							Non- estrus
			1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-18	19-21	
Control	53	45	9	12	4	7	3	6	4	8
ALT	53	48	1	12	25	9	1	-	-	5

* Day 1 was the day of last altrenogest treatment for the experimental gilts.

4. 결론

본 연구는 3년간의 연구를 수행함에 있어서 1차년도 (2000)에는 미성숙난포란의 체외성숙 조건 개선, 체외수정 조건 개선에 필요한 제반기술 확충, 2차년도 (2001)에는 체외배양조건, 이식조건 개발, 3차년도 (2002)에는 고급육 생산 형질 전환돼지 생산을 목표로 하였다. 또한, 3차년도 (2002)는 유전자특이발현 promoter의 유전자 재조합, 돼지정자를 이용한 형질전환 돼지생산기술개발, 우수 유전자가 주입된 수정란의 이식을 통한 고급육 생산 형질전환 돼지의 생산, 태어난 transgenic 산자의 유전자 발현을 조사 그리고 돼지수정란 이식 기술 확보(외과적 및 비외과적)을 평가의 착안점으로 하여 최종적으로 형질전환돼지 2마리를 생산하여, 본 연구는 당초의 취지에 맞게 연구를 완벽하게 수행하였다고 할 수 있다.

5. 참고문헌

1. Abeydeera LR, Day BN. 1997. In vitro penetration of pig oocytes in modified tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology* 48:537-544.
2. Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Prather RS, Day BN. 1998. Presence of epidermal growth factor during in vitro maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after in vitro. *Mol Reprod Dev* 51:395-401.
3. Barton-Davis ER, Shoturma DI, Musaro A, Rosenthal N, Sweeney HL. 1998. Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15603-15607.
4. Bleck GT, White BR, Miller DJ, Wheeler MB. 1998. Production of bovine alpha-lactalbumin in the milk of transgenic pigs. *J Anim Sci* 76(12): 3072-3078.
5. Brackett BG, Baranska W, Sawichi W, Koprowski H. 1971. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:353-357.
6. Chan AWS, Luetjens CM, Dominko T, Ramalho-Santos J, Simerly CR, Hewitson L, Schatten G. 2000. Foreign DNA transmission by ICSI: injection of spermatozoa bound with exogenous DNA results in embryonic GFP expression and live Rhesus monkey births. *Mol Hum Reprod* 6:26-33.

7. Coleman ME, DeMayo F, Yin KC, Lee HM, Geske R, Montgomery C, Schwartz RJ. 1995. Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *J Biol Chem* 270:12109-12116.
8. Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, Hooper ML, Melton DW, Thompson S, Smithies O. 1987. Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330:576-578.
9. Evans M.J, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.
10. Funahashi H, Cantley T, Day BN. 1994. Different hormonal requirements of pig oocyte-cumulus complexes during maturation in vitro. *J Reprod Fertil* 101:159~165.
11. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:7380-7384.
12. Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE Jr, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 315:680-683.
13. Kim NH, Jun SH, Do JT, Uhm SJ, Lee HT, Chung KS. 1999. Intracytoplasmic injection of porcine, bovine, mouse, or human spermatozoon into porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* 53:84-91.
14. Kim NH, Lee JW, Jun SH, Lee HT, Chung KS. 1998. Fertilization of porcine oocytes following intracytoplasmic spermatozoon or isolated sperm head injection. *Mol Reprod Dev* 51:436-444.

15. Koo DG, Kim NH, Lim JH, Lee HT, Chung KS. 1997. Comparison of in vitro Development and transgene expression of in vivo and IVM/IVF derived porcine embryos after microinjection of foreign DNA. *Theriogenology* 48:329-340.
16. Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C. 1989. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell* 57:717-723.

제 2 절 세포질내 정자 직접주입법에 의한 형질전환 수정란의 생산

1. 서론

그 동안 가축의 생산성을 향상시키기 위하여 다양한 기술이 개발, 응용되어 왔으나 그 대부분은 상당한 시간과 노력이 요구되는 단점이 있다. 그러나 최근 분자생물학기술이 급속히 발달하면서 가축의 생산성을 제고시키는데 있어서 생명공학기술의 이용이 가장 효과적인 방법으로 대두되어 그 장래가 크게 기대되고 있는데 이는 가축이 보유하고 있는 잠재능력을 유전자 재조합 방법을 이용하여 극대화시킴으로서 축산생산성의 향상을 이룰 수 있기 때문이다. 그러므로 현재 세계적으로 지대한 관심 속에서 연구개발이 진행되고 있는 수정란 이식기술과 형질전환동물 생산기술의 효율성을 높이고 산업적 기술로 발전시키기 위해서는 기존의 형질전환동물 생산기술과 최근 새롭게 개발되고 있는 첨단생명공학 기술을 접목시키는 것이 선결되어야 한다. 본 연구에서는 세포질내 정자직접주입법 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI)을 이용하여 형질전환돼지의 생산효율을 획기적으로 제고시키고 세포특이적인 promoter (skeletal β -actin promoter)로 조절되는 human insulin-like growth factor (hIGF-I) 유전자를 도입함으로써 비육돈의 증체율을 높이는 동시에 외래유전자의 발현을 골격근에 국한시켜 종래의 성장호르몬 형질전환돼지에서 나타난 여러 가지 부작용을 방지하고자 한다.

2. 재료 및 방법

1. 난포란의 회수 및 체외성숙

도축장에서 도살되는 돼지로부터 난소를 회수하여 체외성숙을 실시한다. 즉 도축장에서 돼지의 난소를 회수하여 30-35℃ 멸균생리식염수가 들어있는 보온병에 담아 1시간 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 재차 멸균생리식염수로 세척한 후 70% 알콜로 난소의 표면을 소독한 후, 18-gauge의 주사침을 이용하여 2-6mm 크기의 가시난포에서 난포란을 회수한다. 이 중 난구세포가 치밀하게 부착되고 난자의 세포질이 균일한 것만을 선별하여 본 실험에서 공시하였다.

난포란의 체외성숙은 TCM-199, NCSU-23, Waymouth 배양액에 10% porcine follicular fluid (pFF), 0.6 mM cysteine (Sigma, USA), 1 µg/ml FSH이 첨가된 배양액을 제조하여 paraffin oil이 덮인 50 µl로 소적한 뒤 2시간 이상 39℃, 5% CO₂ 및 95% 공기조건의 배양기내에서 평형 시킨 후 각 소적 당 10개의 미성숙 난포란을 침지하여 44시간 동안 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다.

2. 정자의 처리

본 연구에서 사용되는 정액은 종돈으로부터 수압법으로 채취한 정액을 사용하였다. 정액 채취 후 실험실에서 현미경적 검사에 의한 운동성이 80% 이상이고 기형율이 20% 이하의 것만을 사용하였으며, 액상정액의 보존기간은 3일 이상 경과된 것은 제외하였다. 정액은 10 mg/ml BSA가 첨가된 0.9% NaCl 배양액으로 원심분리를 통해 3번 세척하였다. 세척후 정자는 pH 7.8인 Tris buffer 배양액에 2×10^5 /ml로 resuspension하였다. 이후 Branson Ultrasonicator를 이용하여 1분간 sonication하여 정자의 두부를 분리해 내고 이를 0.02%의 Triton X-100으로 처리하여 두부전면의 세포막을 제거하였다.

3. 정자 및 정자두부에 의한 수정 및 체외배양

본 연구에서 사용되는 정액은 종모돈으로부터 수압법으로 채취한 농후정액을 사용하였다. 정액 채취 후 실험실에서 현미경적 검사에 의한 운동성이 80% 이상이고 기형율이 20% 이하의 것만을 원정액으로 사용하였고 동결정액제조에도 사용하였다. 정액은 10 mg/ml BSA가 첨가된 0.9% NaCl 배양액으로 원심분리를 통해 3번 세척하였다. 세척후 정자는 pH 7.8인 Tris buffer 배양액에 2×10^5 /ml로 resuspension하였다. 이후 Branson Ultrasonicator를 이용하여 1분간 sonication하여 정자의 두부를 분리해 내고 이를 0.02%의 Triton X-100으로 처리하여 두부전면의 세포막을 제거하였다.

Micromanipulator를 이용하여 정자 및 정자두부를 세포질내 정자주입법을 통해 난자와 체외수정시킨 후 39°C, 5% CO₂ 및 95% 공기조건하의 NCSU-23 배양액에서 체외배양하면서, 전핵형성을 및 배반포 발달을 조사하였다.

4. 미세조작에 의한 형질전환 난자 생산

IGF-I construct는 double-strand DNA를 세포막처리를 거친 정자두부와 공배양한 후, 정자 두부를 MII-stage의 난자에 제 1 극체를 피하여 세포질 내에 주입하였다. myostatin knockout (KO) construct는 denaturation을 거친 후 recA와 반응시켜 DNA-recA complex를 만든 후, 15,000 rpm에서 5분간 원심분리를 실시한 수정란의 전핵에 1-2 pl의 DNA-recA complex를 주입하였다. 외래유전자를 도입한 수정란은 39°C, 5% CO₂ 및 95% 공기조건하의 NCSU-23 배양액에서 발달을 관찰하고, 발달한 수정란의 일부는 PCR을 이용하여 외래유전자의 존재를 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 정자 및 정자 두부 주입에 의한 수정

돼지 정자 및 두부를 다양한 detergent가 포함된 NIM에서 분리한 후 미세 조작기를 이용해서 정자 및 정자두부를 주입하고 수정율을 조사한 결과는 Table 1에서 보는 것과 같았다.

Table 1. Pronuclear formation of porcine oocytes following intracytoplasmic sperm or sperm head injection

Treatment	No. of oocytes examined	No. of oocytes
		Pronuclear formation (%)
Sperm head	120	71 (60)
Intact sperm	140	73 (52)

수정율은 주입 후 20시간 후에 Hoechst 33342로 염색한 후 관찰하였는데 수정율이 52-60%에 달해 세포질내 정자직접주입법에 의해 성공적으로 수정이 됨을 확인할 수 있었다. 정자의 중심체가 없는 상태에서 수정이 일어나는 기전에 관한 기초 연구도 병행해서 실시한 결과 정자의 중심체가 없는 상태에서는 모계 유래의 microtubule에 의해 수정이 일어남이 확인되었다 (Fig. 1).

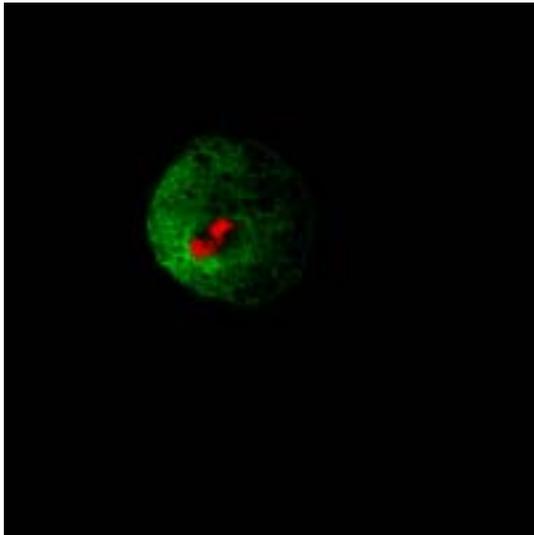
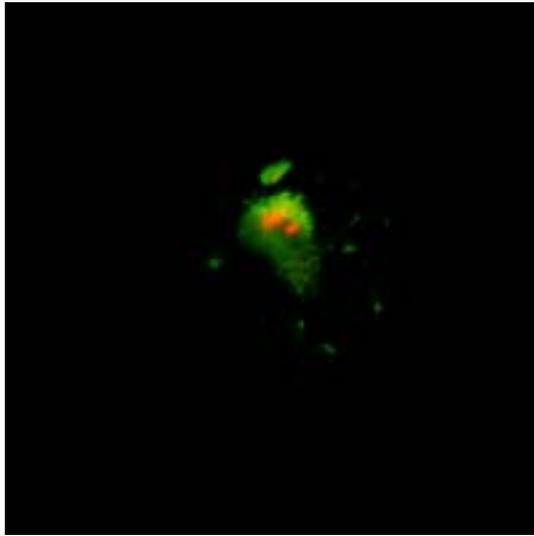


Fig. 1. Chromatin and microtubule organization in porcine oocyte following microinjection of sperm head. Green image shows microtubules; red shows chromatins.

세포질 내 정자 직접 주입 후 난자의 생존율을 개선하기 위해 극체의 위치에 따라 정자주입 부위를 달리하여 분할된 난모세포수, 배반포 발달율을 판별한 결과 유의차가 없음을 발견하였다 (Table 2).

Table 2. In vitro developments of porcine oocytes following sperm injection into specific injection points

Angle with polar body	No. of oocytes examined	Cultured oocytes	
		No. of cleaved oocytes (%)	No. of morula/blastocyst (%)
90°	57	37 (65)	15 (26)
Non-specific	201	120 (60)	58 (29)

세포질 내 정자 직접 주입 후 추가적인 난활성 여부가 수정율의 개선에 도움이 되는지 조사하였다. 추가적인 난활성을 유도하였을 때가 유도하지 않았을 때보다 배반포 발생율은 유의하게 높았으나 수정율에는 차이가 보이지 않았다 (Table 3). 이와 같이 수정율에 차이가 없이 배반포 발생율이 높은 이유는 추가적인 난활성을 유도하였을 때 단위 발생란의 증가에 기인된 것으로 사료된다.

Table 3. Fertilization ability and developmental ability of porcine oocytes following sperm injection in the presence or absence of additional activation

Activation	No. of oocytes examined	Number of oocytes	
		No. of fertilization (%) [*]	No. of morula/blastocyst (%)
None	255	150 (59)	56 (22) ^a
Yes	55	34 (62)	24 (44) ^b

^{*} Fertilization: two pronuclear formation at 18 h following sperm injection.

^{ab} Means in the same column with different superscript are different (P<0.05).

세포질내 정자 직접 주입 후 체외 수정율 및 배 발달율을 개선하기 위해 기초 연구를 병행해서 실시하였다. 본 연구에서는 정자주입 후 전핵의 형성 시기, DNA 합성 시기를 조사하였다. 자웅성 전핵의 DNA 합성을 조사한 결과, 돼지정자를 주입하였을 경우 웅성 전핵은 9시간 후에 부분적으로 시작한 반면 자성 전핵은 10시간 이후에 시작되는 것으로 관찰되었고, 11시간째에는 DNA 합성이 거의 대부분의 난자에서 완전하게 일어났다 (Fig. 2, 3).

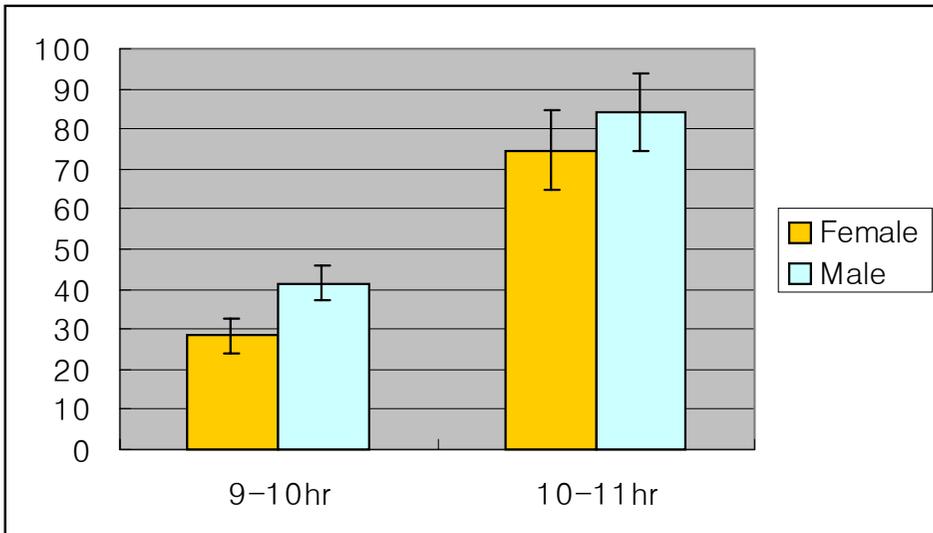


Fig 2. Intensity of BrdU in corporation in pronucleus following injection of pig sperm. Reported values are mean±S.E. (n=5)

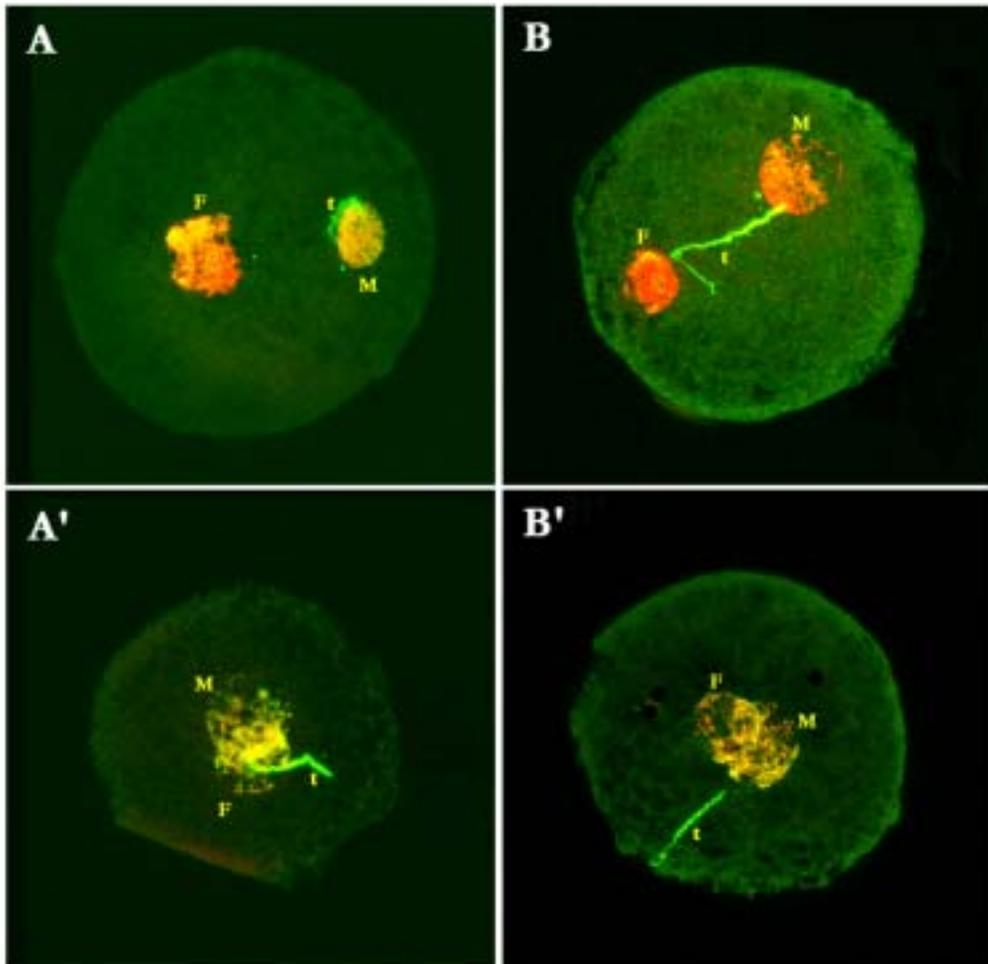


Fig 3. Laser scanning confocal microscopic images of DNA synthesis following ICSI (pig / mouse sperm); (x 630). Red image, DNA; Green image, D synthesis; M, male pronucleus; F, female pronucleus; t, tail. A) At 10 h following ICSI (pig sperm), DNA synthesis initiated male pronucleus. A) At 12 h following ICSI (pig sperm), DNA synthesis completely occurs in apposed two pronucleus. B) At 9 h following ICSI (mouse sperm), DNA synthesis initiated large female pronucleus. B) At 11 h following ICSI (mouse sperm), DNA synthesis completely occurs in apposed two pronucleus.

나. 외래 유전자 발현

본 연구에서 사용된 외래유전자는 pEGF-N1 벡터로서 녹색형광단백질 (green fluorescent protein: GFP)의 유전자를 포함하고 있으며 형질전환 여부를 확인하는 척도로 사용되었다. 이 유전자를 0.2%의 Triton X-100을 처리하여 첨체막 (acrosomal membrane)을 제거한 정자와 함께 20-30 분 동안 39°C로 온도가 설정된 배양기에서 배양한 후 세포질내 정자 직접주입에 사용하였다. Table 4는 돼지 난자 내에 세포막 표면을 화학적으로 처리한 돼지정자의 두부를 주입한 후 배발생율을 나타낸 것으로 주입 후 48시간 동안 NCSU-23 배양액에서 배양하였다. 그 결과는 배양한 난자의 총 수에 대한 난활성이 일어나 분할된 난자의 백분율로서 나타내었다. 이 결과는 장자두부의 세포막에 대한 화학적 처리가 수정란의 발생에 영향을 미치지 않음을 나타내고 있다.

Table 4. In vitro development of porcine oocytes following injection of different treated sperm head.

Treatment	No. of oocytes used	Developmental rates (%)
Control	35	17 (48.6)
Triton X-100	35	20 (57.1)
NaOH	35	14 (40.0)

Table 5는 화학적 처리를 거친 돼지정자의 두부에 외래유전자를 도입한 후 난자에 주입하였을 때의 배반포 발생율을 나타낸 것이다. 정자두부가 주입된 난자는 7-9일 동안 배양하였고 그 결과는 배양한 난자의 총 수에 대한 상실배/포배기 단계 난자의 백분율로서 나타내었다. 이 표에서 나타나는 바와 같이 정자 두부에 Triton X-100을 처리했을 경우 배 발달율 및 외래유전자 발현 율이 높게 나타났다.

Table 5. In vitro development of porcine oocytes following injection of sperm containing foreign DNA

Treatment	No. of oocytes used	Developed to blastocysts (%)	Expression of foreign DNA (%)
Control	45	9 (20.0)	0 (0.0)
Triton X-100	45	12 (26.7)	7 (58.3)
NaOH	45	11 (24.4)	3 (27.3)

Table 6은 Triton X-100을 처리한 돼지정자의 두부에 DTT를 추가적으로 처리한 후 난자에 주입했을 때 배발생율을 확인한 결과를 나타낸 것이다. 이 경우에서 DTT를 처리한 정자두부를 난자에 주입할 경우 배 발달율은 27.1%이고 외래유전자 발현율은 26.3%였다. 이 결과는 DTT의 처리 유무에 관계없이 세포질내 정자 직접주입법에 의해 수정란의 발생 및 외래 유전자의 발현이 일어날 수 있음을 나타낸다.

Table 6. Developmental ability and DNA expression porcine oocytes following sperm injection

Treatment	No. of oocytes examined	Developmental rates (%)	DNA expression (%)
Control	50	11 (22.0)	2 (18.2)
DTT	70	19 (27.1)	4 (26.3)

Table 7은 전핵 내 외래 유전자 미세 주입 후 발달된 상실배 및 배반포에서 외래 유전자 발현율을 살펴 본 것이다. 외래유전자 발현율은 42-52%로 비교적 높았다

Table 7. Gene expression of morula/blastocyst embryos following sperm injection

Source of oocytes	Stage	No. of embryos	
		examined	gene expression (%)
IVM/IVF	Morula	40	21 (52.5)
	Blastocysts	38	16 (42.1)

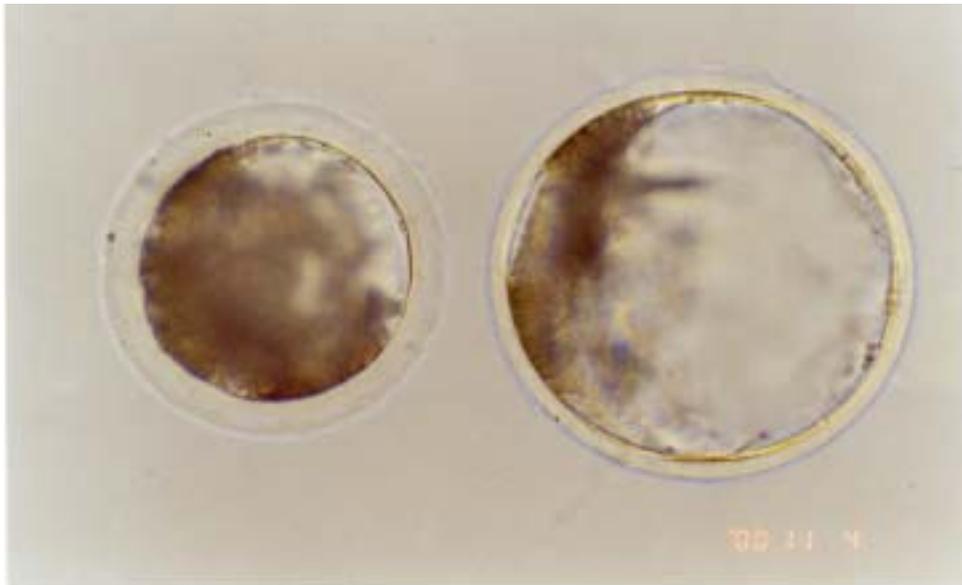
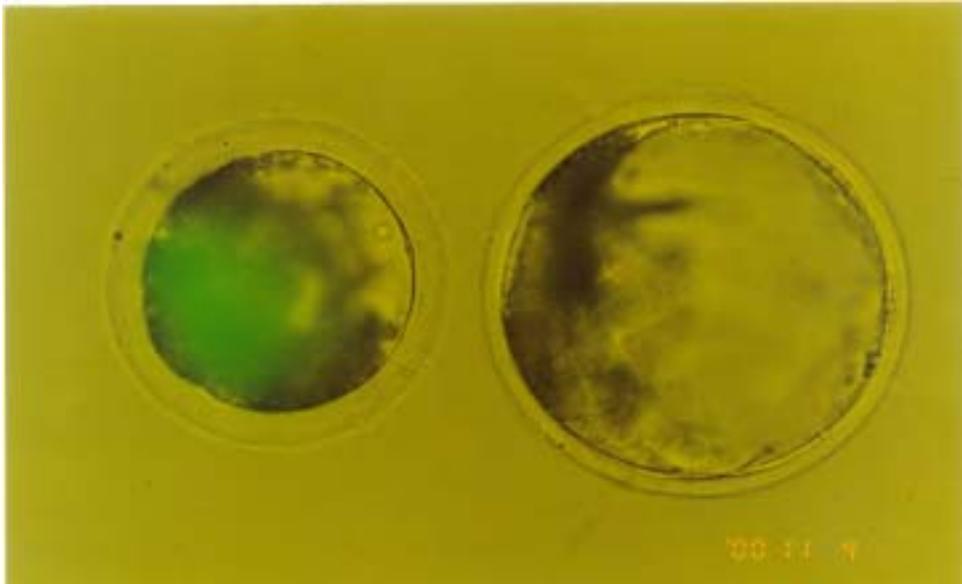


Fig 4. Gene expression of GFP gene. Green colour shows foreign gene expression

Fig. 4는 표면의 화학적 처리와 외래유전자의 도입을 거친 돼지정자의 두부를 나타낸 것이다. 도면의 상단은 위상차 현미경 하에서의 관찰을, 하단은 동일한 수정란을 형광현미경 하에서의 관찰을 나타낸 것으로 좌측은 외래유전자가 도입된 정자가 주입된 후 발생한 수정란을, 우측은 외래유전자가 도입되지 않은 정자가 주입된 후 발생한 수정란을 나타낸다. 세포질내 정자직접주입법에 의하여 발생한 수정란에서 GFP 외래유전자가 형광을 발현하는 것은 수정란에 외래유전자를 도입할 수 있음을 나타내고 있다.

외래 유전자가 도입된 세포질내 정자 주입법에 의해 생산된 수정란의 외래 유전자 발현율을 PCR 방법에 의해 조사한 결과 PCR에서 확인되었다 (Table 8).

Table 8. Foreign gene integration (PCR detection) in porcine oocytes following ICSI with IGF-1 gene

Stage of embryos examined	Embryos containing IGF-1 gene
2-cell	11/11 (100)
4-cell	7/7 (100)
8-cell	3/4 (75)
Morula	5/21(24)
Blastocyst	2/6 (33)

다. 돼지 난자의 체외배양 시 첨가제에 따른 세포사멸

돼지난자를 체외 배양시 우태아혈청 (fetal bovine serum: FBS), 우혈청 알부민 (bovine serum albumin: BSA) 및 상피세포성장인자 (epidermal growth factor: EGF)를 배양액에 첨가하였을 때 배반포, 총 세포수, 세포사멸 및 세포사멸에 관여하는 유전자의 발현을 조사하고자 수행하였다.

Table 9에서 보는 바와 같이 0.4% BSA와 0.4% BSA+EGF를 배양액에 첨가하였을때 2 세포기 단위발생 난자의 배반포까지의 발달율이 증가되었다 ($P<0.01$). FBS는 배반포의 총세포수를 감소시켰고 세포사멸을 증가하였다 ($P<0.01$). 그리고 Table 10에서 EGF는 BSA가 존재하는 조건하에서 배반포의 총세포수를 증가하였는데 EGF와 BSA가 각각 단독으로 존재할 때는 이런 작용이 없었다. 세포사멸도 이와 비슷한 경향을 보였는데 EGF와 BSA가 각각 존재할 때에는 비처리군과 차이가 없었지만 함께 존재할 때에는 세포사멸을 감소시켰다.

RT-PCR의 결과에 의하면 EGF는 BSA가 존재하는 배양액에서 Bcl-xL 유전자의 상대적 발현양을 증가시키고 Bak 유전자의 상대적 발현양에는 영향을 주지 않는 과정을 통하여 세포사멸을 감소시키는 것 같다 (Table 11). 반면에 FBS는 Bcl-xL의 발현양을 감소시키고 Bak 유전자의 상대적 발현양을 증가시킨다. 이러한 결과는 세포사멸에 관여하는 유전자의 발현은 배양액의 첨가물에 따라 유의적으로 영향을 받으며, 체외배양시 배아의 초기발달에 관여함을 시사한다.

Table 9. Developmental ability of porcine parthenotes after 7 days cultured in the NCSU-23 medium added different supplements

Supplement to medium	No. of embryos examined	Percentage of embryos developed to	
		Morulae	Blastocysts
Control	350	28.0±2.1 ^b	35.9±2.4 ^b
FBS	352	27.6±2.3 ^b	35.5±3.1 ^b
PVA	356	28.2±2.0 ^b	39.3±2.4 ^b
PVA+EGF	351	28.7±2.8 ^b	40.9±3.4 ^b
BSA	359	48.5±2.1 ^a	60.6±2.4 ^a
BSA+EGF	355	47.8±2.4 ^a	61.6±3.1 ^a

^{ab} Means in the same column with different superscript are different ($P<0.05$).

Table 10. Number of cells per blastocyst and apoptosis at day 7 that cultured in the NCSU-23 medium added different supplements

Supplement to medium	No. of embryos examined	Cell numbers	Percentage of apoptosis
Control (none)	68	39.8±3.6 ^b	4.7±0.7 ^b
FBS	64	24.9±2.3 ^c	7.3±0.4 ^a
PVA	65	40.6±2.9 ^b	4.5±0.5 ^b
PVA+EGF	64	40.2±2.1 ^b	4.4±0.7 ^b
BSA	68	46.1±2.6 ^b	4.7±0.6 ^b
BSA+EGF	66	61.8±2.1 ^a	2.1±0.6 ^c

^{abc} Means in the same column with different superscript are different (P<0.05).

Table 11. Relative abundance of mRNA expression in porcine parthenotes at day 7 that cultured in the NCSU-23 medium added different supplements

Supplement to medium	No. of embryos examined	Genes	
		Bcl-xL	Bak
Control	64	0.24±0.02 ^b	0.14±0.01 ^b
FBS	64	0.18±0.02 ^c	0.34±0.02 ^a
PVA	64	0.24±0.03 ^b	0.17±0.02 ^b
PVA+EGF	64	0.25±0.02 ^b	0.16±0.03 ^b
BSA	64	0.26±0.03 ^b	0.16±0.02 ^b
BSA+EGF	64	0.44±0.04 ^a	0.17±0.02 ^b

^{ab} Means in the same column with different superscript are different (P<0.05).

4. 결론

본 연구에서는 세포질내 정자 직접주입 후 난자의 생존율 개선하기위해 극체의 위치에 따라 정자주입 부위를 달리하여 배 생존율, 난활성율, 전핵 형성율을 조사함으로써 수정율을 판별한 결과 유의차가 없음을 발견하였다. 세포질 내 정자 직접 주입 후 추가적인 난활성 여부가 수정율의 개선에 도움이 되는지 조사 하였으나 추가적인 난활성을 유도하였을 때 유도하지 않았을 때 보다 배 발생율은 유의하게 높았으나 수정율에는 차이가 보이지 않았다. 이와 같이 수정율에 차이가 없이 배 발생율이 높은 이유는 추가적인 난활성을 유도하였을 때 단위 발생란의 증가에 기인 된 것으로 사료된다. 외래 유전자가 도입된 세포질내 정자 주입법에 의해 생산된 수정란의 외래 유전자 발현율을 PCR 방법에 의해 조사한 결과 PCR에서 확인 되었다. 이렇게 얻은 수정란은 이식하여 형질전환돼지 생산에 사용하였다. 또한 체외 배양시 우혈청 알부민 (BSA) 및 상피세포성장인자 (EGF)를 배양액에 첨가하였을 때 세포사멸을 감소시키는 것으로 나타났다. 이상에서와 같이 본 과제에서는 세포내 정자 직접주입법의 조건을 개선하였고 외래 유전자의 도입 조건을 확립하여 원래 계획대로 모든 연구를 성공적으로 수행하였다.

5. 참고문헌

1. Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Prather RS, Day BN. 1998. Presence of epidermal growth factor during in vitro maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after in vitro. *Mol Reprod Dev* 51:395-401.
2. Barton-Davis ER, Shoturma DI, Musaro A, Rosenthal N, Sweeney HL. 1998. Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15603-15607.
3. Bleck GT, White BR, Miller DJ, Wheeler MB. 1998. Production of bovine alpha-lactalbumin in the milk of transgenic pigs. *J Anim Sci* 76(12): 3072-3078.
4. Brackett BG, Baranska W, Sawichi W, Koprowski H. 1971. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:353-357.
5. Chan AWS, Luetjens CM, Dominko T, Ramalho-Santos J, Simerly CR, Hewitson L, Schatten G. 2000. Foreign DNA transmission by ICSI: injection of spermatozoa bound with exogenous DNA results in embryonic GFP expression and live Rhesus monkey births. *Mol Hum Reprod* 6:26-33.
6. Coleman ME, DeMayo F, Yin KC, Lee HM, Geske R, Montgomery C, Schwart RJ. 1995. Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *J Biol Chem* 270:12109-12116.

7. Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, Hooper ML, Melton DW, Thompson S, Smithies O. 1987. Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330:576-578.
8. Evans M.J, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.
9. Funahashi H, Cantley T, Day BN. 1994. Different hormonal requirements of pig oocyte-cumulus complexes during maturation in vitro. *J Reprod Fertil* 101:159-165.
10. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:7380-7384.
11. Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE Jr, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 315:680-683.
12. Kim NH, Jun SH, Do JT, Uhm SJ, Lee HT, Chung KS. 1999. Intracytoplasmic injection of porcine, bovine, mouse, or human spermatozoon into porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* 53:84-91.
13. Kim NH, Lee JW, Jun SH, Lee HT, Chung KS. 1998. Fertilization of porcine oocytes following intracytoplasmic spermatozoon or isolated sperm head injection. *Mol Reprod Dev* 51:436-444.
14. Koo DG, Kim NH, Lim JH, Lee HT, Chung KS. 1997. Comparison of in vitro Development and transgene expression of in vivo and IVM/IVF derived porcine embryos after microinjection of foreign DNA. *Theriogenology* 48:329-340.

15. Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C. 1989. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell* 57:717-723.
16. Lavitrano M, Forni M, Varzi V, Pucci L, Bacci ML, Di Stefano C, Fioretti D, Zoraqi G, Moioli B, Rossi M, Lazzereschi D, Stoppacciaro A, Seren E, Alfani D, Cortesini R, Frati L. 1997. Sperm-mediated gene transfer: production of pigs transgenic for a human regulator of complement activation. *Transplant Proc* 29:3508-3509.
17. Long CR, Dobrinsky JR, Johnson LA. 1999. In vitro production of pig embryos: comparisons of culture media and boars. *Theriogenology* 51:1375-1390.
18. Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y, Yanagimachi R. 1999. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* 284:1180-1183.
19. Pursel VG, Miller KF, Pinkert CA, Palmiter RD, Brinster RL. 1987. Development of 1-cell and 2-cell pig ova after microinjection of genes. *J Anim Sci suppl* 65:402.
20. Shim SW, Kim YH, Jun SH, Lim JM, Chung HM, Ko JJ, Lee HT, Chung KS and Shim H. 2000. Transgenesis of porcine embryos using intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 53:521.
21. Swanson ME, Martin MJ, O'Donnell JK, Hoover K, Lago W, Huntress V, Parsons CT, Pinkert CA, Pilder S, Logan JS. 1992. Production of functional human hemoglobin in transgenic swine. *Biotechnology* 10:557-559.

제 3 절 상동 유전자 재조합 기술에 의한 형질전환 수정란 의 생산 및 검정

1. 서론

가축의 Embryonic Stem (ES) cell의 배양이 가능하게 되면 능력이 좋은 가축의 복제가 무한정 가능할 뿐만 아니라 생쥐에서 이용되고 있는 상동유전자재조합 (homologous recombination) 방법에 의해서 가축에서도 무용유전자를 제거하고 유용유전자를 끼워 넣을 수 있게 된다. 이러한 장점에도 불구하고 아직까지 이 기술이 실용화되지 못하고 있는데 이는 아직 가축 ES cell의 배양이 제대로 정립되어 있지 않고 유전자 이식방법의 효율이 낮아서 형질전환가축을 생산하는데 많은 비용과 노력이 필요로 하기 때문이다.

근래에 개발된 중요한 진보 중의 하나는 재조합효소를 이용한 유전자적중기술을 들 수 있다. 즉, E. coli의 재조합효소인 recA를 외래유전자와 반응시켜 DNA-recA complex를 만들고 이를 수정란의 전핵 내에 주입하면 homologous recombination이 일어나 ES cell을 이용하지 않고도 용이하게 유전자적중 생쥐를 생산할 수 있음이 보고 되었으며 이 기술은 enhanced homologous recombination (EHR)으로 명명되었다 (Pati, 1998; Sargeant, 1999). 이 기술을 염소, 돼지 및 소에 응용하였을 때에도 유전자 적중이 가능하다는 보고도 있다 (James D. Murray, personal communication). 본 연구에서는 돼지에서 근육성장 억제인자 (myostatin) 유전자를 이용하여 재조합효소를 이용한 상동유전자 재조합기술 (enhanced homologous recombination)을 확립시키고자 한다.

2. 재료 및 방법

가. IGF-1 유전자

human IGF-1 (pHIGF1) DNA (tetracycline-resistant plasmid)는 ATCC사로부터 verified된 것이 들어있는 HB101 cell을 구입하여 tetracycline이 첨가된 LB 배지에서 배양한 후 plasmid DNA를 추출하여 restriction enzyme digestion으로 IGF-1 DNA를 확인하였다. 또한 sequencing을 실시하여 (Macrogen) signal peptide sequence와 poly (A) signal을 함유한 660 bp의 완전한 coding sequence를 가지고 있는 IGF-1 cDNA를 확보하였다. 이를 이용하여 이식용 외래 유전자를 구축하기 위해 PstI restriction enzyme을 이용하여 IGF-1 gene을 pBluescript vector로 subcloning을 하였다. cloning된 clone들을 PstI과 Bam HI 제한효소를 사용하여 IGF-1 gene의 삽입여부와 orientation을 확인하였다.

나. Myostatin cloning

돼지 갈비뼈에 붙어 있는 근육으로부터 RNA를 추출하고 돼지 myostatin exon 3 부위의 specific primers (forward:5'-GGAGAGATTTTGGACTCGAC-3' reverse: 5'-CATGGCTGGAATTTTCCCA-3')와 Oligo(dT) primer를 제작하였고 돼지근육 RNA와 Oligo(dT) primer를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR 수행 결과 약 320 bp의 product (myostatin exon 3 부위)를 확인하였다. 증폭된 342bp DNA를 gel에서 추출하여 T vector에 ligation한 후 sequencing을 실시하여 (Macrogen) 돼지 genomic DNA에서 Exon 3 부위와 100% match되는 것을 확인하였다. 또한 이 DNA sequence를 probe으로 이용하여 돼지 genomic DNA library를 screening하여 Exon I, II, III를 함유하고 있는 돼지 myostatin genomic DNA를 cloning하였다.

다. 외래유전자 구축

β-promoter plasmid (pJ6omega)를 vector로 이용하여 human IGF-1 유전자

를 inserts로 이용하였다. pBluescript에 subcloned 된 IGF-1 gene과 vector gene과 XbaI과 EcoRI restriction enzyme으로 자른 다음 vector sequences는 alkaline phosphatase로 처리하고 insert sequences와 gel purified한 후 DNA ligase반응을 시켜 competent DH5 α cell에 transformation 하였다. antibiotics가 첨가된 배지에서 자란 colony들로부터 DNA를 추출하여 restriction enzyme digestion으로 screening을 하여 바르게 유전자가 조립된 것을 선발하여 완성시켰다.

라. mutant myostatin DNA fragment 구축

Point mutation을 삽입하기 위한 primer로는 다음과 같은 specific primers를 이용하였다.

forward: 5'-GAGATTTTGGACTCGACTGTGATGAGCACTCAACAGAATCTG
ATGCTGTCGTTAaCCTCTA-3',

reverse: 5'-CATGGCTGGAATTTTCCCA-3'

forward primer에는 원래 GTTAcCCT인 염기배열을 GTTAaCT로 바꾸어 Hpa I site가 생기게 하였고 아울러 TAA ochre termination codon이 생기도록 하였다. PCR 후 약 300 bp가 증폭되는데 증폭된 mutant myostatin DNA를 T vector에 subcloning을 실시한 후 준비하였다. sequencing을 통해 point mutation과 Hpa I site 및 termination codon을 확인하였다.

마. 상동유전자재조합 PCR screening

상동유전자 재조합이 일어나 genomic DNA에 삽입되면 PCR 후 약 310 bp가 증폭되는데 wild type allele의 DNA는 Hpa I으로 digestion 되지 않는 반면 mutant allele DNA는 Hpa I으로 digestion 되어 60 bp와 250 bp의 fragment가 나타나 2% gel 전기 영동으로 구분할 수 있다.

바. myostatin 벡터의 미세주입 및 DNA screening

도축장에서 도살되는 돼지로부터 난소를 회수하여 멸균생리식염수로 세척한 후 70% 알콜로 난소의 표면을 소독한 후, 18-gauge의 주사침을 이용하여 2-6mm 크기의 가시난포에서 난포란을 회수한다. 이중 난구세포가 치밀하게 부착되고 난자의 세포질이 균일한 것만을 선별하였다. 난포란의 체외성숙은 기존 사용 배양액인 TCM-199, NCSU-23, Waymouth 성숙배지에 10% porcine follicular fluid (pFF) 0.6 mM cysteine (Sigma, USA), 1 µg/ml FSH이 첨가된 배양액을 제조하여 paraffin oil이 덮인 50 µl로 소적한 뒤 2시간 이상 39°C, 5% CO₂ 및 95% 공기조건인 배양기내에서 평형 시킨 후 44시간 동안 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다. 체외수정을 위하여 TCM-Hepes, mTBM 체외수정 배지에서 정자와 공배양을 실시하였다.

myostatin knock-out vector는 95°C에서 denaturation을 시킨 후 recA와 반응시켜 Tris buffer (pH7.5)에서 약 1ng/µl의 DNA와 recA (약 100µM) complex를 만들어 주입 준비를 완료하였다. 수정란은 15,000 rpm에서 5분간 원심분리를 실시한 후 micromanipulator하에서 수정란의 진행에 1-2 pl의 DNA-recA complex를 주입하였다. 외래유전자를 도입한 수정란은 39°C, 5% CO₂ 및 95% 공기조건하의 NCSU-23 배양액에서 발달을 관찰하고, 발달한 수정란은 boiling에 의해 genomic DNA가 방출되게 한 후 PCR을 이용하여 외래유전자의 존재를 확인하였다. control DNA로는 pFGFP DNA를 사용하여 정착여부를 비교하였다.

myostatin DNA의 PCR을 위한 primer로는

forward 5'-GAAGTCAAGGTAACAGACACAC-3' 과

reverse 5'-CATGGCTGGAATTTTCCCCA-3'을 사용하였고

GFP DNA를 위한 primer로는

forward 5'-CAAGGACGACGGCAACTACAAGAC-3' 과

reverse 5'-GTTCGATTATGATCAGTTATCTAGATCC-3'을 사용하였다.

사. Southern blotting

Southern blotting을 위해서는 약 10µg의 genomic DNA를 제한효소로 digestion시킨 다음 0.9% agarose gel에서 전기영동 시킨 후 denaturation buffer

(1.5M NaCl, 0.5M NaOH)에서 30분간 denature를 시키고 neutralization buffer (0.5M Tris, pH 7.4, 1.5M NaCl)에서 30분간 중화시킨 다음 nylon membrane으로 gel stacking에 의해 overnight transfer하였다. hybridization은 IGF-1 cDNA 부위를 이용하여 random labeling kit에 의해 P³²-dCTP로 labeling된 probe을 만들었고 hybridization을 시킨 후 extensive하게 washing한 다음 signal을 detection하였다.

3. 결과 및 고찰

가. IGF-1 유전자 및 외래유전자 구축

human IGF-1 DNA는 ATCC사로부터 verified된 것이 들어있는 HB101 cell을 구입하여 DNA를 추출하고 sequencing을 실시하여 signal peptide sequence와 poly(A) signal을 함유한 660 bp의 완전한 coding sequence를 가지고 있는 IGF-1 cDNA를 확보하였다. rat β -actin promoter DNA도 ATCC사로부터 입수하여 DNA 추출 후 이식용 외래 유전자를 구축하기 위해 restriction enzyme mapping을 하고 IGF-1 DNA를 ligation 시켜 완성하였다.

1) IGF-1 gene

human IGF-1 gene은 총 길이는 약 600 bp 이고 ATG initiation codon으로부터 74 bp의 signal peptide sequences (25 amino acids)를 가지고 있으며 3' 부위에 poly(A) signal을 함유하고 있다 (Fig. I). IGF-1 gene을 β -actin promoter에 cloning하기 위해서 먼저 PstI site를 이용하여 IGF-1 gene을 pBluescript에 subcloning을 하였고 universal primer와 reverse primer를 이용하여 sequencing을 실시하였다. 그리고 이식유전자가 바르게 삽입되었는지 확인하기 위해서 BamHI sites (0.5 kb release)가 있어 insert된 유전자가 release되는 것을 확인할 수 있었다.

1 GAAGGTGAAG ATGCACACCA TGTCCCTCCTC GCATCTCTTC TACCTGGCGC
51 TGTGCCTGCT CACCTTCACC AGCTCTGCCA CGGCTGGACC GGAGACGCTC
101 TGCGGGGCTG AGCTGGTGGA TGCTCTTCAG TTCGTGTGTG GAGACAGGGG
151 CTTTTATTTT AACAAGCCCA CAGGGTATGG CTCCAGCAGT CGGAGGGCGC
201 CTCAGACAGG TATCGTGGAT GAGTGCTGCT TCCGGAGCTG TGATCTAAGG
251 AGGCTGGAGA TGTATTGCGC ACCCCTCAAG CCTGCCAAGT CAGCTCGCTC
301 TGTCCGTGCC CAGCGCCACA CCGACATGCC CAAGACCCAG AAGGAAGTAC
351 ATTTGAAGAA CGCAAGTAGA GGGAGTGCAG GAAACAAGAA TACAGGATG
401 TAGGAAGACC CTCCTGAGGA GTGAAGAGTG ACATGCCACC GCAGGATCCT
451 TTGCTCTGCA CGAGTTCAAT GTTAAACTTT GGAACACCTACCAAAAAATA
501 AGTTTGATAA CATTTAAAAG ATGGGCGTTT CCCCCAATGAAATACACAAG
551 TAAACATTCC AACATTGTCT TTATCAATAA TGTTCTATAG

Fig. 1. Human IGF-1 cDNA sequences. ATG: initiation codon, TGA: termination codon and AAATAA: poly(A) signal.

2) 외래유전자 구축

이식 유전자를 구축하기 위해 pBR322에 들어가 있는 β -actin promoter DNA에 IGF-1 cDNA를 삽입하여 완성하였다. 약 350 bp actin promoter sequence 뒤에 있는 polylinker site에서 XbaI과 EcoRI sites를 이용하여 IGF-1 DNA를 ligation 시켜 구축하였다 (Fig. 2). 완성된 이식유전자는 XbaI-EcoRI double digestion에 의해 IGF-1 sequence가 release 되었고 (약 600 bp) BamHI digestion에 의해 올바른 orientation을 확인하였으며 (약 400 bp), vector sequence내의 PvuI에 의해 linearization시켜 실험에 이용될 예정이다.

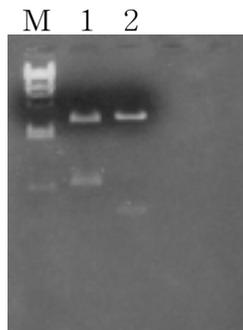


Fig. 2. Construction of Transgene (β -actin_{promoter}-IGF-1 cDNA). M: DNA marker(λ DNA HindIII marker), lane 1: XbaI-EcoRI digestion, Lane 2: Bam HI digestin)

나. Myostatin gene cloning

돼지 골격에 붙어 있는 근육으로부터 RNA를 추출하고 돼지 Myostatin Exon 3 부위의 specific primer를 제작하였고 이용하여 RT-PCR을 수행하였다 (Fig. 3). 증폭된 320 bp DNA를 추출하여 T vector에 ligation한 후 sequencing을 실시하여 돼지 genomic DNA에서 Exon 3 부위와 100% match되는 것을 확인하였다 (Fig. 4). RT-PCR에 의해 cloning된 myostatin exon 3 sequence를 Genebank에 발표된 것과 비교한 결과 100% homology를 나타내어 정확한 myostatin DAN를 얻은 것을 확인하였다 (Fig. 5). 이를 이용하여 site-specific mutagenesis를 유발하는 상동유전자 재조합기술에 사용될 DNA를 제작할 예정이다. 또한 이 DNA sequence를 probe으로 이용하여 돼지 myostatin genomic DNA를 cloning하기 위해 돼지 genomic DNA library를 screening하여 돼지 myostatin genomic DNA clone을 확보하였고 restriction mapping을 실시하였다 (Fig. 6, 7).

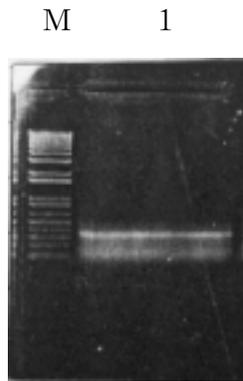


Fig. 3. RT-PCR using myostatin primers in exon. M : DNA maker, Lane 1: RT-PCR product

1 GGAGAGATTT TGGACTCGAC TGTGATGAGA CTCAACAGAA TCTCGATGCT
51 GTXGTTACCC TGTAAGTGTG GATTTTGAAG CTTTTGGATG GGAAGTGGATT
101 ATTGCACCCA AAAGATATAA GCCCAATTAC TGCTCTGGAGAGTGTGAATT
151 TGTATTTTTTA CAAAAATACC CTCACACTCA TCTTGTGCACCAAGCAAACC
201 CCAGAGGTTT AGCAGGCCCC TGCTGTACTC CCACAAAGAT GTCTCCAATC
251AATATGCTAT ATTTTAATGG CAAAGAACAA ATAATATATGGGAAAATTCC
301 AGCCAT

Fig. 4. Partial sequences of pig myostatin exon 3 cloned by RT-PCR using skeletal muscle RNA. Underline: Primers for RT-PCR

>gb|AF188638.1|AF188638 Sus scrofa breed Yorkshire myostatin (MSTN) mRNA, complete cds
Length = 1128

Score = 595 bits (300), Expect = e-167
Identities = 307/308 (99%), Gaps = 1/308 (0%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 8   ggagagatTTTggactcgactgtgatgagc-ctcaacagaatctcgatgctgtcgttacc 66
          |||
          794 ggagagatTTTggactcgactgtgatgagcactcaacagaatctcgatgctgtcgttacc 853

          67   ctctaactgtggatTTTgaagcTTTggatgggactggattatgcacccaaaagatata 126
          |||
Sbjct: 854  ctctaactgtggatTTTgaagcTTTggatgggactggattatgcacccaaaagatata 913

          127  aggccaatTactgctctggagagtgtgaattTgatTTTtacaaaaatccctcacactc 186
          |||
          914  aggccaatTactgctctggagagtgtgaattTgatTTTtacaaaaatccctcacactc 973

Query: 187 atctTgtgcaccaagcaaacccagaggTtcagcaggccctgctgtactcccacaaga 246
          |||
Sbjct: 974  atctTgtgcaccaagcaaacccagaggTtcagcaggccctgctgtactcccacaaga 1033

Query: 247  TgtctccaatcaatatgctataTTTaatggcaagaacaaataatataTgggaaaattc 306
          |||
Sbjct: 1034 TgtctccaatcaatatgctataTTTaatggcaagaacaaataatataTgggaaaattc 1093

Query: 307  cagccatg 314
          |||
Sbjct: 1094 cagccatg 1101
```

>gb|AF188637.1|AF188637 Sus scrofa breed Meishan myostatin (MSTN) mRNA, complete cds
Length = 1128

Score = 595 bits (300), Expect = e-167
Identities = 307/308 (99%), Gaps = 1/308 (0%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 8   ggagagatTTTggactcgactgtgatgagc-ctcaacagaatctcgatgctgtcgttacc 66
          |||
Sbjct: 794 ggagagatTTTggactcgactgtgatgagcactcaacagaatctcgatgctgtcgttacc 673

          67   ctctaactgtggatTTTgaagcTTTggatgggactggattatgcacccaaaagatata 126
          |||
Sbjct: 854  ctctaactgtggatTTTgaagcTTTggatgggactggattatgcacccaaaagatata 913

Query: 127  aggccaatTactgctctggagagtgtgaattTgatTTTtacaaaaatccctcacactc 186
          |||
          914  aggccaatTactgctctggagagtgtgaattTgatTTTtacaaaaatccctcacactc 973
```

Fig. 5. Swine myostatin DNA comparison with Genbank data.

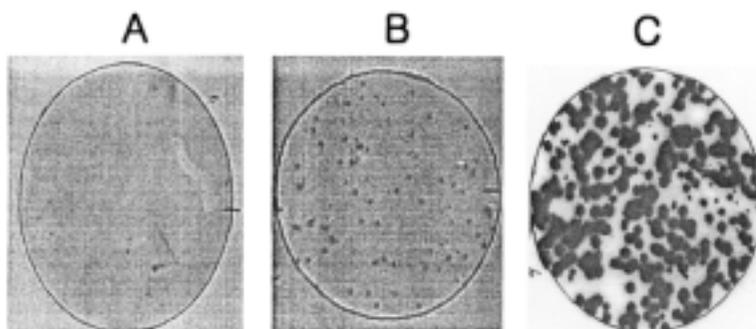


Fig. 6. Screening of pig genomic library with RT-PCR probe. A: first screening, B: second screening, C: third screening

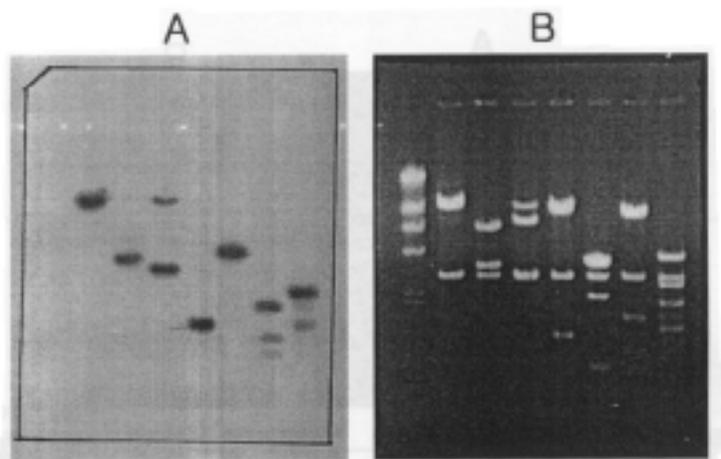


Fig. 7. Restriction enzyme mapping of pig myostatin genomic DNA. A: Southern blotting with RT-PCR probe, B: Pattern of restriction enzyme digestion

다. 상동유전자 재조합기술의 개발 및 조건 개선

recA와 크기가 적은 DNA fragment를 이용하여 상동유전자 재조합기술을 개발하기 위해 1 차 년도에 cloning한 myostatin 유전자를 이용하여 specific primer로 PCR하여 Fig. 8과 같이 mutant myostatin DNA를 구축하였다. site specific mutation에 의해 exon 3 5' 부위에 C를 A로 mutation 시켜 TAC (Tyr)를 TAA (termination codon)으로 바꾸었고 이올러 같은 부위가 GTTAAC로 부위가 변함으로써 새로운 Hpa I restriction enzyme site가 생겨나도록 하였다. PCR을 수행한 후 T vector에 클로닝 한 후 sequencing을 실시하여 Fig 9.과 같이 point mutation이 정확하게 생긴 것을 확인하였다. wild myostatin 유전자는 Hpa I 에 의해 잘리지 않는 반면 mutant myostatin DNA는 Hpa I digestion에 의해 PCR 후 약 50 bp와 250 bp로 잘리게 되어 있다 (Fig. 9). 그러므로 본 DNA를 수정란에 주입 후 상동유전자 재조합이 일어나면 myostatin 유전자에 immature termination이 일어나 knock-out효과가 나타나게 되고 PCR 후 Hap I digestion에 의해 wild allele과 구분할 수 있게 되어 상동유전자재조합이 일어난 수정란을 효율적으로 감지할 수 있도록 구축하여 놓았다.

1 GGAGAGATTT TGGACTCGAC TGTGATGAGA CTCAACAGAA TCTCGATGCT
 51 GTCGTTACCC TGTAACTGTG GATTTTGAAG CTTTTGGATG GGACTGGATT
 Cys Arg Tyr pro Val Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile
 ⇒ GTCGTTA**ACC** TGTAACTGTG GATTTTGAAG CTTTTGGATG GGACTGGATT
 Cys Arg **Term**

101 TTGCACCCA AAAGATATAA GCCCAATTAC TGCTCTGGAG AGTGTGAATT
 151TGTATTTTTTA CAAAAATACC CTCACACTCA TCTTGTGCAC CAAGCAAACC
 201 CCAGAGGTTT AGCAGGCCCC TGCTGTACTC CCACAAAGAT GTCTCCAATC
 251AATATGCTAT ATTTTAATGG CAAAGAACAA ATAATATATGGGAAAATTCC
 301 AGCCAT

Fig. 8. Partial sequences of pig myostatin exon 3 and mutant sequences (arrow). Bold: point mutation site, Underline: termination codon and Hpa I site produced by point mutation

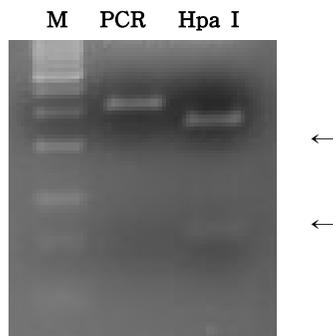


Fig. 9. Restriction analysis of mutant myostatin DNA with Hpa I enzymes following PCR, M: 100 bp DNA marker, PCR: PCR product, Hpa I: PCR product with Hpa I digestion, arrows: 250 bp (upper), 50 bp (lower)

라. 전핵내 미세주입법에 의한 myostatin 형질전환 수정란의 생산

Mutant myostatin vector DNA는 denaturation을 시킨 후 recA와 반응시켜 돼지 IVF 수정란에 주입한 후 수정란은 39°C, 5% CO₂ 및 95% 공기조건하의 NCSU-23 배양액에서 배양하였고 발달한 수정란은 PCR과 restriction enzyme digestion (Hpa I)을 이용하여 외래유전자의 존재를 확인하였다. 먼저 DNA-recA complex를 주입한 효과를 조사하기 위해 주입하지 않은 intact 수정란과 GFP DNA 주입 수정란과의 배발달율을 조사하였다. Table 1에서와 같이 본 실험의 돼지 IVF란의 배발달율은 약 32.4%로 나타났고 DNA를 주입한 수정란의 배발달율은 Intact 수정란보다는 약간 저하되는 것으로 나타나고 있으나 유의차는 없었고 mutant myostatin DNA-recA complex와 GFP DNA는 차이가 없는 것으로 나타났다 (각각 27.5%와 25%).

Table 1. In vitro development of porcine embryos following injection of mutant myostatin DNA-recA complex

Treatment	No. of embryos	Developmental rates to blastocysts (%)
Intact	40	13 (32.5)
GFP DNA	40	11 (27.5)
DNA-recA complex	40	10 (25.0)

배반포까지 발달된 수정란은 DNA를 추출하고 random integration된 것을 배제하고 정확하게 상동유전자재조합이 일어난 것만을 분석해 내기 위해 mutant vector의 바깥쪽 wild myostatin 유전자의 primer를 이용하였고 PCR을 실시한 후 Hpa I으로 digestion을 하여 mutant myostatin DNA의 존재여부를 확인하였다. Fig. 10 에서와 같이 상동유전자재조합이 일어나지 않은 embryo에서는 약

310 bp의 band (Fig. 3의 1, 2, 4, 6, 8번 lanes)만 나타나고 상동유전자 재조합이 일어난 embryo에서는 250 bp와 60 bp의 mutant band와 wild type의 310 bp (Fig. 3의 3, 5, 7번 lanes)가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이로써 앞에서 구축한 mutant myostatin vector가 recA protein과 함께 wild allele DNA에 상동유전자재조합이 일어났음을 확인할 수 있었다.

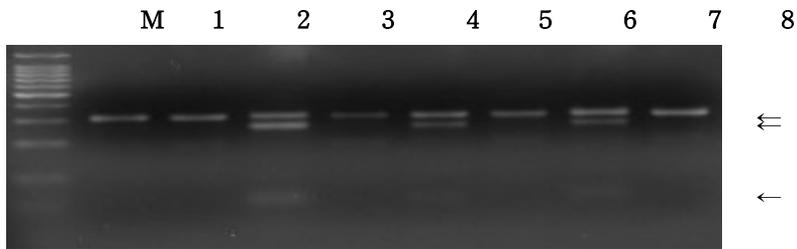


Fig. 10. PCR and Hap I digestion of porcine embryos following injection of mutant myostatin DNA-recA complex and culture for 7-9 days. M: 100 bp marker, 1-8: embryo DNA, Allows: wild allele (upper), mutant allele (middle) and Hap I fragment of mutant allele lower)

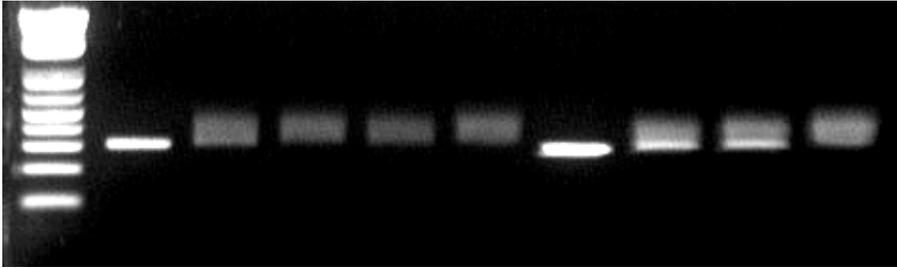
Mutant myostatin DNA를 주입하고 배반포까지 발달한 수정란의 상동유전자재조합 효율을 조사한 결과 약 8%로 나타났다 (Table 2). GFP DNA를 주입한 수정란에서의 DNA 정착율은 약 14%로 나타났으나 이는 무작위로 정착된 모든 것이 detection되는 반면 상동유전자재조합은 정확하게 genomic myostatin 유전자에서 유전자재조합이 일어난 것만이 detection되기 때문에 전체 효율면에서 차이가 나타난 것으로 사료된다. 본 연구에서 수정란에서의 8%의 상동유전자재조합을 상당히 높은 것으로 recA protein의 유전자재조합 기능 때문인 것으로 추정된다.

Table 2. Developmental ability and DNA integration of porcine embryos following DNA injection

Treatment	No. of embryos injected	Developmental rates (%)	No. of embryos contained with injected DNA (%)
GFP	50	16 (32.0)	7 (14.0)
Myos DNA-recA	100	23 (23.1)	8 (8.0)

마. myostatin DNA fragment와 recA protein을 이용한 binding assay

본 연구에서 구축한 mutant myostatin DNA가 recA protein과 잘 binding 하는지를 알아보기 위해 in vitro binding assay를 실시하였다. Fig. 11에서와 같이 gel상에서 볼 수 있는 양의 myostatin DNA를 recA protein의 양을 증가시킴에 따라 DNA band가 더 많이 shift 되는 것을 확인 할 수 있어 recA protein이 효율적으로 mutant myostatin DNA에 binding한다는 것을 알 수 있었다.



Lane#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DNA conc. (pM)	100bp ladder	35	35	35	35	35	70	70	70	70
DNA vol. (ul)	“	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RecA conc. (uM)	“	2	2	2	2	2	2	2	2	2
RecA vol. (ul)	“	0	5	6	8	10	0	10	12	15

Fig. 11. RecA binding assay to myostatin DNA fragment. Shift of DNA band occurs when more than 6 ul of recA is added to 1 ul of 35 pM DNA or more than 15 ul of recA to 1 ul of 70 pM DNA

바. ICSI 후 embryo screening

이식 유전자인 β -actin_{promoter}-IGF-1 DNA를 ICSI를 이용하여 blastocyst까지 발달된 수정란을 PCR을 이용하여 DNA microinjection 방법과 효율성을 비교하여 보았다 (Fig. 12). 이식유전자를 0.2%의 Triton X-100을 처리하여 첨체막 (acrosomal membrane)을 제거한 정자와 함께 20-30 분 동안 39°C로 온도가 설정된 배양기에서 배양한 후 세포질내 정자 직접주입에 사용하였다. Table 3은 돼지난자 내에 세포막 표면을 화학적으로 처리한 돼지정자의 두부를 주입한 후 배 발생율을 나타낸 것으로 정자두부를 난자에 주입할 경우 배발달율은 26%를 나타냈고 DNA microinjection은 24 %를 나타내어 배발달율에 있어서는 큰 차이를 나타내지 않았다. PCR 분석 후 형질전환율은 ICSI의 경우 약 8%, DNA microinjection의 경우는 4%를 나타내어 ICSI가 약간 더 좋은 결과를 보였다. 26.3%였다.

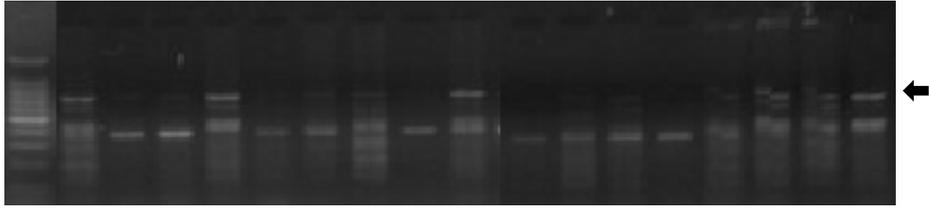


Fig. 12. PCR analysis of pig blastocysts derived from embryos treated by intracellular sperm injection with β -actin_{promoter}-IGF-1 DNA. Arrow is correct bands for amplification of transgene.

Table 3. In vitro development of porcine oocytes following injection of sperm containing foreign DNA.

Treatment	No. of zygotes	Developed to blastocysts (%)	No. of transgenics (%)
ICSI	50	13 (26.0)	4 (8.0)
Microinjection	50	12 (24.0)	2 (4.0)
Control	50	16 (32.0)	-

사. 돼지새끼의 DNA 분석

β -actin_{promoter}-IGF-1 DNA를 이용하여 ICSI나 DNA microinjection 후 발정 동기화된 Recipient의 난관에 이식하여 제 1세부과제에서 돼지새끼를 생산하였다. ICSI의 경우 제 1 세부 및 제 2 세부과제와 함께 수행하여 현재까지 395마리의 embryos를 7마리의 recipient에 이식하여 12두의 새끼를 생산하였고, DNA microinjection에 의해서는 총 74마리를 이식하여 5두를 생산하였다 (Table 4).

태어난 새끼돼지의 귀 조직으로부터 genomic DNA를 추출하여 PCR 및 Southern blotting을 실시하였다. IGF-1 specific primer를 이용하여 새끼돼지의 genomic DNA를 먼저 PCR 분석하였는데 ICSI로부터 생산된 2마리의 돼지 새끼에서 positive band가 확인되었다 (Fig. 13). 그러나 DNA microinjection에 의해 생산된 5두에서는 특정 band가 나타나지 않았다.

Southern blotting을 위해서는 약 10 μ g의 genomic DNA를 BamHI으로 digestion시킨 다음 0.9% agarose gel에서 전기영동 시킨 후 nylon membrane으로 gel stacking에 의해 transfer하였다. hybridization을 위해 IGF-1 cDNA부위를 이용하여 random labeling kit에 의해 P³²-dCTP로 labeling된 probe을 만들었고 hybridization을 시킨 후 washing한 다음 x-ray film에 노출시켜 signal을 detection하였다. IGF-1 cDNA의 경우 BamHI에 의해 double cut에 의해 약 0.5 kb의 band와 나타날 것으로 예상되었는데 ICSI로부터 생산된 2 마리의 돼지새끼에서 0.5 kb의 band가 detection 되었고 약 2 copy 정도가 정착된 것으로 나타났다(Fig. 14). 전체적인 효율은 0.5 %로 나타났고 DNA microinjection 경우 sample size가 적어 형질전환돼지가 생산되지 않은 것으로 판단된다.

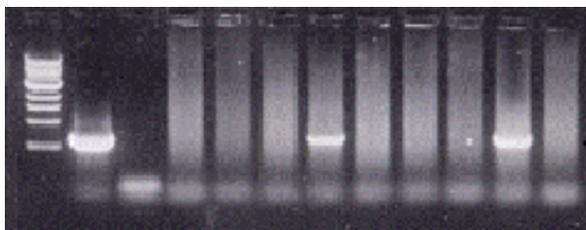


Fig. 13. PCR analysis of piglets originated from ICSI with β -actin_{promoter}-IGF-1 DNA

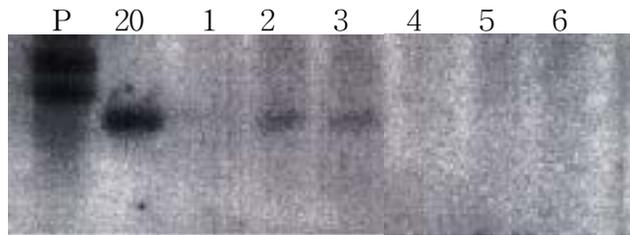


Fig. 14. Southern blot analysis of piglet genomic DNA originated from ICSI with β -actin_{promoter}-IGF-1 DNA. 20 marker means equal copy number of 20 transgenes.

Table 4. Transgenic efficiency in pigs following ICSI or DNA microinjection

Treatment	No. of embryos transferred	No. of recipients	No. of pregnant recipients	No. of piglets born	No. of transgenic piglets (%)
ICSI	395	7	3	12	2 (0.5)
Microinjection	74	2	1	5	0

4. 결론

본 연구과제에서는 IGF-1 유전자 및 myostatin 유전자를 이용하여 이식할 외래 유전자를 구축하고 이를 이용하여 상동유전자재조합기술에 의해 수정란을 생산하며 IGF-1 형질전환태지를 검정하였다. human IGF-1 gene을 확보하여 β -actin promoter DNA와 ligation을 시켜 형질전환태지의 생산을 위한 유전자를 구축하였고, 돼지 myostatin cDNA를 이용하여 genomic library를 screening하여 myostatin genomic DNA를 cloning하여 exon 3 부위에 point mutation을 유발시켜 termination codon이 유발되도록 하였고, PCR에 의해 간단하게 screening할 수 있는 restriction enzyme site를 만들어 상동유전자재조합기술을 이용할 수 있도록 하였다. 이 mutant myostatin DNA를 recA protein과 함께 IVF 수정란의 전핵에 주입하였고 배양한 후 발달된 수정란의 DNA를 PCR과 restriction analysis를 통해 상동유전자재조합이 이루어진 수정란을 확인하였다 또한 ICSI에 의해 생산된 돼지새끼의 DNA 분석하여 형질전환태지를 확인하였다.

제 1 세부 및 제 2 세부과제와 함께 IGF-1 유전자를 지닌 형질전환태지는 계속 표현형을 관찰할 예정이고, mutant myostatin DNA는 위해서는 상동유전자재조합기술의 개발을 위한 system 확립에 활용할 계획이다.

5. 참고문헌

1. Barton-Davis ER, Shoturma DI, Musaro A, Rosenthal N, Sweeney HL. 1998. Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15603-15607.
2. Bleck GT, White BR, Miller DJ, Wheeler MB. 1998. Production of bovine alpha-lactalbumin in the milk of transgenic pigs. *J Anim Sci* 76:12 3072-3078.
3. Brackett BG, Baranska W, Sawichi W, Koprowski H. 1971. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:353-357.
4. Chan AWS, Luetjens CM, Dominko T, Ramalho-Santos J, Simerly CR, Hewitson L, Schatten G. 2000. Foreign DNA transmission by ICSI: injection of spermatozoa bound with exogenous DNA results in embryonic GFP expression and live Rhesus monkey births. *Mol Hum Reprod* 6:26-33.
5. Coleman ME, DeMayo F, Yin KC, Lee HM, Geske R, Montgomery C, Schwartz RJ. 1995. Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *J Biol Chem* 270:12109-12116.
6. Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, Hooper ML, Melton DW, Thompson S, Smithies O. 1987. Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330:576-578.
7. Evans, M.J, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.

8. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:7380-7384.
9. Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE Jr, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 315:680-683.
10. Kim NH, Jun SH, Do JT, Uhm SJ, Lee HT, Chung KS. 1999. Intracytoplasmic injection of porcine, bovine, mouse, or human spermatozoon into porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* 53:84-91.
11. Kim NH, Lee JW, Jun SH, Lee HT, Chung KS. 1998. Fertilization of porcine oocytes following intracytoplasmic spermatozoon or isolated sperm head injection. *Mol Reprod Dev* 51:436-444.
12. Koo DG, Kim NH, Lim JH, Lee HT, Chung KS. 1997. Comparison of in vitro Development and transgene expression of in vivo and IVM/IVF derived porcine embryos after microinjection of foreign DNA. *Theriogenology* 48:329-340.
13. Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C. 1989. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell* 57:717-723.
14. Lavitrano M, Forni M, Varzi V, Pucci L, Bacci ML, Di Stefano C, Fioretti D, Zoraqi G, Moioli B, Rossi M, Lazzereschi D, Stoppacciaro A, Seren E, Alfani D, Cortesini R, Frati L. 1997. Sperm-mediated gene transfer: production of pigs transgenic for a human regulator of complement activation. *Transplant Proc* 29:3508-3509.

15. Martin GR. 1981. Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned to teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78:7634-7638.
16. Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. 1992. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70:841-847.
17. McPherron AC, Lewler AM, and Lee SJ. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature* 387:83-90.
18. McPherron AC, Lee SJ. 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:12457-12461.
19. Paleyanda RK, Velander WH, Lee TK, Scandella DH, Gwazdauskas FC, Knight JW, Hoyer LW, Drohan WN, Lubon HT. 1997. Transgenic pigs produce functional human factor VIII in milk. *Nature Biotechnol.* 15:10971-975.
20. Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC, Evans RM. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 30:611-615.
21. Pati S. 1998. Zygote homologous recombination. *Proceedings in Genetically Engineering and Cloning Animals.* Park City, Utah.
22. Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y, Yanagimachi R. 1999. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* 284:1180-1183.

23. Pinkert CA, Pursel VG, Miller KF, Palmiter RD, Brinster RL. 1987. Production of transgenic pigs harboring growth hormone (MTbGH) or growth hormone releasing factor (MThGRF) genes. *J Anim Sci Suppl* 65:260.
24. Pursel VG, Hammer RE, Bolt DJ, Palmiter RD, Brinster RL. 1990. Integration, expression and germ-line transmission of growth-related genes in pigs. *J Reprod Fertil Suppl* 41:77-87.
25. Pursel VG, Miller KF, Pinkert CA, Palmiter RD, Brinster RL. 1987. Development of 1-cell and 2-cell pig ova after microinjection of genes. *J Anim Sci suppl* 65:402.
26. Pursel VG, Wall RJ, Solomon MB, Bolt DJ, Murray JE, Ward KA. 1997. Transfer of an ovine metallothionein-ovine growth hormone fusion gene into swine. *J Anim Sci* 75:2208-2214.
27. Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. 1992. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 359:550-551.
28. Sargent G. 1999. Enhanced homologous recombination. *Proceeding in Transgenic Animal Research Conference*. Tahoe City, California. pp. 21.
29. Shim H, Gutierrez-Adan A, Chen LR, BonDurant RH, Behboodi E, Anderson GB. 1997. Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cells. *Biol Reprod* 57:1089-1095.
30. Shim SW, Kim YH, Jun SH, Lim JM, Chung HM, Ko JJ, Lee HT, Chung KS and Shim H. 2000. Transgenesis of porcine embryos using intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 53:521.

31. Swanson ME, Martin MJ, O'Donnell JK, Hoover K, Lago W, Huntress V, Parsons CT, Pinkert CA, Pilder S, Logan JS. 1992. Production of functional human hemoglobin in transgenic swine. *Biotechnology* 10:557-559.
32. Thomas KR, Capecchi MR. 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51:503-512.
33. Weidle UH, Lenz H, Brem G. 1991. Genes encoding a mouse monoclonal antibody are expressed in transgenic mice, rabbits and pigs. *Gene* 98:185-191.
34. Wheeler MB. 1994. Development and validation of swine embryonic stem cells: a review. *Reprod Fertil Dev* 6:563-568.
35. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 세부과제는 형질전환생산에 필요한 난자를 체외에서 다량 생산하기 위해 미성숙 난포란의 체외성숙 조건, 체외성숙 난포란의 체외수정 조건 및 체외배양조건 등에 대한 연구를 수행하여 체외 수정란 생산 조건 등을 개선하였으며, 형질전환수정란의 효율적인 생산을 위한 형질전환수정란의 배양과 선발 방법 등에 대한 연구를 수행하여 형질전환 수정란의 생산 효율을 향상시키는 결과를 얻었다. 또한 돼지 미수정란 및 수정란의 동결 방법에 대한 연구를 수행하여 돼지 난자의 동결보존 방법을 확립시켜 놓았고, 호르몬 주입에 의한 과배란 및 발정동기화를 통해 돼지에서 수정란 이식의 효율을 향상시키는 목표를 달성하여 2 마리의 형질전환돼지를 생산하는데 기여하였다.

제 2 세부과제에서는 세포질내 정자 직접주입법에 의해 형질전환 돼지 수정란의 생산 기술을 개발하기 위해 정자 또는 정자두부를 미세주입한 후 수정 및 체외배양 기술을 확립하였고, 외래 유전자와 정자를 공배양한 후 이 정자를 난자의 세포질에 주입하여 완전한 수정란으로 발달하는 조건을 개발하였다. 또한 이렇게 생산된 형질전환 수정란에서 외래유전자의 검색과 발현 상황을 분석하여 대량으로 형질전환 돼지 수정란을 생산하는 체계를 확립하였다.

제 3세부과제에서는 IGF-1 유전자 및 myostatin 유전자를 cloning하여 이식할 외래 유전자를 구축하고 이를 이용하여 상동유전자 재조합기술에 의해 수정란을 생산하며 IGF-1 형질전환돼지를 검정하는 것이 수행하고자 하는 연구내용이다. human IGF-1 gene을 확보하여 subcloning을 실시한 후 β -actin promoter DNA와 ligation을 시켜 외래 유전자를 구축하였고, 돼지 골근육으로부터 RNA를 추출하여 RT-PCR에 의해 myostatin cDNA를 확보하였고 이를 이용하여 genomic library를 screening하여 myostatin genomic DNA를 확립하였다. 또한 1차 연도에서 cloning한 myostatin 유전자를 이용하여 exon부위에 point mutation을 유발시켜 termination codon이 유발되도록 하는 construction을 cloning하였고, PCR에 의해 간단하게 screening 할 수 있는 restriction enzyme site를 만들어 놓았다. 이 mutant myostatin DNA를 recA protein과 함께 IVF 수정란의 전핵에 주입하였고 배양한 후 발달된 수정란의 DNA를 PCR과 restriction analysis를 통해 상동유전자재조합이 이루어진 수정란을 확인하였다.

또한 ICSI에 의해 생산된 돼지새끼의 DNA 분석하여 형질전환돼지를 확인하여 원래 계획대로 모든 실험이 거의 완료되었다.

이상으로 본 연구과제는 제 1 세부, 제 2 세부와 제 3 세부가 모두 형질전환 돼지를 생산하는데 필요한 기술을 개발하여 효율적인 형질전환 돼지 수정란을 생산하고 이식하는 각각의 기술을 이용하여 형질전환 돼지를 생산하였으며 기술을 확보하여 100%에 달하는 연구 목표를 달성하였다.

본 과제에서 개발된 연구결과물은 돼지의 수정란이식 분야에 직접 적용하여 우수한 종돈을 대량으로 증식하고 유전적인 검정을 실시하는데 기여할 것이며, 최근에 가장 빠르게 발전하고 있는 동물생물공학분야인 형질전환복제 동물의 생산에 중요한 자료를 제공하게 되어 이 분야의 국제 경쟁력을 강화시키는데 기여할 것이다. 또한 본 연구에 관여하고 배출된 연구자들은 첨단 생물공학적 지식 및 기술을 지닌 인력으로 연구소 및 산업체에서 이를 이용한 연구 및 생산 분야에서 일익을 담당할 것으로 사료된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 연구개발 결과

가. β -actin promoter로 조절되는 human insulin-like growth factor (hIGF-I) 유전자가 도입된 형질전환돼지의 생산: 본 연구에서는 β -actin promoter-IGF-I DNA를 구축하여 세포질내 정자직접주입법을 이용하여 수정란을 만들고 대리모 돼지에 이식하여 2 마리의 형질전환돼지를 생산하였다.

나. 도축장의 돼지 난소로부터 미성숙 난포란의 체외성숙 조건과 체외수정 및 체외 배양 조건의 확립: 품질 좋은 수정란을 대량으로 확보하기 위해 도축장 난소로부터 난포란을 채취하여 체외 성숙 및 배양조건에 관한 연구를 수행하여 제반기술을 확립하여 놓았다.

다. 돼지 난포란 및 수정란의 동결보존 방법의 확립: 돼지 미수정란 및 수정란의 장기간 보존방법에 대한 기초 실험을 통해 액체질소에 보관할 수 있는 조건을 확립하였다.

라. 돼지의 과배란 유도 및 발정동기화 기술의 개선을 통한 효율적인 돼지 수정란이식기술의 조건 개선: 돼지 수정란이식기술의 활용을 위해 호르몬 처리에 의한 과배란 유도 방법과 대리모 돼지의 발정동기화에 대한 실험을 통해 돼지 수정란이식 기술의 조건을 개선하였다.

마. 세포질내 정자직접주입법 (ICSI)에 의한 난활성, 전핵형성을 및 생존율에 대한 개선: 정자두부를 위한 detergent의 처리 효과, 정자주입 부위 및 활성화 방법에 따른 생존율 및 conforcal image 분석 등을 통한 세포질내 정자직접주입법의 조건을 개선하였다.

바. 세포질내 정자직접주입법에 의한 돼지 수정란에 외래유전자 도입법 확립:
GFP DNA를 이용하여 세포질내 정자직접주입 후 수정란의 배발달을 및
GFP 발현율을 검사하여 외래유전자 도입법을 확립하였다.

사. 상동유전자재조합기술을 위한 돼지 myostatin genomic DNA를 cloning하
여 exon 3 부위에 point mutation을 유발시켜 termination codon이 생성된
벡터 구축: 돼지 myostatin cDNA를 이용하여 genomic library를
screening 하여 myostatin genomic DNA를 cloning하여 exon 3 부위에
point mutation을 유발시켜 termination codon이 유발되도록 하였고, PCR
에 의해 간단하게 screening 할 수 있는 restriction enzyme site를 만들어
유전자적중 여부의 판단을 용이하게 하였다.

아. 이 mutant myostatin DNA를 recA protein과 함께 IVF 수정란에 주입하여
상동유전자재조합에 의한 수정란 생산: myostatin DNA를 recA protein을
혼합하여 발달된 수정란의 전핵에 주입 후 배양한 다음 PCR과 restriction
analysis를 통해 상동유전자재조합이 이루어진 수정란을 확인하였다.

2. 활용 계획

- 가. 본 연구에서 생산된 IGF-1 형질전환돼지는 지속적인 관찰을 통한 성장관련 표현형의 발현을 측정할 예정이고 이식유전자의 발현에 따른 부작용 여부 등에 대한 연구를 계속하여 형질전환돼지에 대한 형질전환에 따른 이용성을 검사할 예정이다.
- 나. 미성숙 난포란의 체외성숙 및 체외수정 기술을 이용하여 형질전환 및 핵이식 등의 연구에 사용할 수 있는 고품질의 우수 돼지 난자를 대량 생산하는데 이용하고자 한다.
- 다. 세포질내 정자직접주입법 (ICSI)은 돼지에서 수정란이식 및 형질전환용 수정란을 효율적으로 생산하는데 이용하고, 정자주입 후 초기 배아 발달에 대한 염색질 및 세포질에 대한 연구와 genetic reprogramming에 대한 중요한 연구를 수행하는데 활용될 것으로 사료된다.
- 라. 상동유전자재조합기술은 돼지뿐만 아니라 다른 가축에서도 효율적으로 수정란에서 유전자적중을 유발시키는데 활용할 수 있고, 특정 유전자를 변형시킨 유전자적중 동물의 생산이 가능할 것으로 예상된다.
- 마. 돼지 수정란이식 기술을 이용한 고능력 종돈의 효율적인 생산이 가능하여 품종개량이 단축될 수 있으며 이를 통해 축산업의 국제경쟁력을 갖추는데 기여할 것이다.
- 바. 미수정란 및 수정란의 효율적인 동결보존방법으로 우수한 능력의 수정란을 생산할 수 있을 뿐만 아니라 형질전환수정란의 대량 생산에도 기여할 것으로 예상된다.

사. 동물생물공학 분야에 대두되고 있는 형질전환복제동물의 생산을 위한 중요한 기초자료의 제공으로 이 분야를 발전시키는데 활용될 것이다.

아. 본 연구에 관련된 연구기관들에서 배출된 연구원들은 이 분야의 첨단기술을 지닌 고급인력으로 동물생물공학기술의 연구소 및 산업체에서 기술개발 및 산업화에 활용될 것이다.