

최 종
연구보고서

형질전환돼지의 뇨로부터 빈혈치료제의
대량생산

Mass Production of Human Erythropoietin
into Transgenic Pig Urine

연구기관
경상대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “형질전환돼지의 노로부터 빈혈치료제의 대량생산”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003년 8월 29일

주관연구기관: 경상대학교

총괄연구책임자: 김진희

세부연구책임자: 김진희

세부연구책임자: 노규진

세부연구책임자: 서한극

요 약 문

I. 제 목

형질전환돼지의 뇨로부터 빈혈치료제의 대량생산

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1993년도 미국 생명공학 의약품의 매출실적은 세계의 선두제품인 EPO, 알파 인터페론, G-CSF의 경우 약 20억\$로, 2003년경에는 70억\$의 시장규모가 예상된다. 이중 EPO는 이들 약품중 판매량 제 1위로서 1993년도 8.25억\$의 판매실적이 2003년 경에는 235억\$로 약 300%의 신장이 예상된다, 일본의 경우에도 93년도의 생명공학 의약품중 EPO의 매출액이 1위인 630억\$로서 전년도에 비해 약 10% 신장되었다. 유럽과 아프리카의 경우 아직 정확한 통계가 없으나, 상기 두나라의 합산보다 더 큰 시장규모가 예측되는데 이는 이들 국가의 경우 지중해성 빈혈환자가 더 많기 때문이다. **EPO의 세계 시장규모는 지금까지 개발되어 시판되고 있는 의료약품가운데 단일 품목으로는 두번째로 높은 판매고를 보이고 있으며, 현재 년 300억\$이상의 국제 시장과 1000억원 이상의 국내시장이 있으며, 오는 2003년 경 약 500억\$이상의 세계시장이 예상된다.**

신부전신장환자의 빈혈증 치료를 위해 1회 투여에 소요되는 경비는, 체중당 3000 U가 소요된다는 점을 고려할때, 약 120\$이 소요된다. 수혈을 전제로 하지 않은 경우, 매달 단위로 이 정도의 경비가 소요되기 때문에 연간 개인당 약 1440\$ 이 소요된다. 따라서, 미국의 경우 전체 인구의 약 5%가 신 부전증을 앓고 있으며, 또한 임신에 동반된 일시적 빈혈을 야기하는 환자까지 합할 경우 그 숫자는 약 1000만명 이상으로 추정되고 있다. 또한, 이 병은 유럽과 아프리카에서 더욱 심각한데 이는 지중해성 악성 빈혈이 이들 국가에서 많이 발생하기 때문이다. 동양의 경우, 이 병에 대한 정확한 통계가 없으나, 일본의 경우 전체인구의 1% 정도가 신부전에 의한 빈혈로 판명되고 있으며, 우리나라의 경우에도, **정확한 통계가 없어 그 규모를 예측할 수는 없지만, 빈혈 및 신부전 환자의 규모로 예측했을 때 적어도 연간 3000억원 이상의 시장규모가 예측된다.** 따라서, 농가의 생산성 향상은 물론 국민의 생활의 질과 삶의 질을

개선하기 위해서도 형질전환동물의 뇨에서 EPO의 생산 기술 개발은 수입대체효과는 물론이거니와 수출을 위해서도 절실히 요구된다 하겠다.

그러나, 이들 방법과는 달리, EPO를 정상적인 기능을 가진 방광의 상피세포로부터 대량생산한다면, 앞에서 열거한 각종 문제점이 극복될 수 있을 것이다. 그 주된 이론적인 배경은, Uroplakin 프로모터는 오직 방광상피세포에서만 발현하기 때문에 EPO의 과발현이 숙주 또는 태아에 나쁜 영향을 미칠 확률이 전무하기 때문이다. 한편, 미국 의약생산자협회(PMA)의 통계에 의하면, 하나의 생명공학의 약품이 초기 연구단계에서 최종심사 승인에 이르기까지의 소요되는 경비는 약 2억 3천 1백만 \$로서 약 12년이 소요된다고 한다. 그러나, 이를 형질전환 동물의 뇨에서 대량 생산할 경우 개발 경비는 현재의 1/1000 이하로 줄일 수 있으며, 또한 고순도의 의약품의 생산이 가능하다. 경비절감의 주된 이유는 형질전환동물이 한 마리 생산비용은 약 5만\$에서 20만불정도로 생산이 가능하며, 또한 그 유전자가 다음세대로 유전되어 생산원가가 더욱 저렴해지기 때문이다. 현재, EPO는 1g당 83만\$에 시판되고 있다. 즉, 1l당 1g의 EPO를 생산한다고 가정하면, 소 한 마리가 일일 생산하는 소의 뇨의 양은 20kl로 이를 합산하면 연간 약 6,600kl에 이른다. 따라서, 이를 금액으로 환산하면 $6,600 \times 83\text{만}\$ = 54\text{억}7,800\text{만}\$$ 로서 소 한마리가 생산한 부가가치가 우리나라 전체 자동차 수출량에 버금갈 정도의 경제적 가치가 있다 하겠다. 또한 뇨를 이용한 생리활성물질의 생산은 우유와는 달리 압수구분없이 이용가능함은 물론 태어나서부터 죽을때까지 생산이 가능하다는 장점을 가진다. 따라서 본 연구는 빈혈 및 신부전환자의 치료제로 사용되고 있는 고 부가가치를 가진 EPO이라는 특수생리활성 물질을 동물의 부산물인 뇨로부터 대량하는 형질전환돼지 생산에 필요한 전반적인 지식과 기술을 축적한 다음, 최종적으로는 hEPO을 신부생산함으로서 이들 단백질을 산업화하여 수입 대체 효과는 물론이거니와 수출을 통한 농가소득의 안정된 증진하는데 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 빈혈치료제인 사람 EPO 유전자를 방광특이 유전자에 재조합하여, 뇨에서 이들 물질을 생산하는 형질전환돼지의 산자를 생산하는데 있다. 본 연구를 위하여 제1세부과제에서는 돼지의 뇨에서 hEPO을 발현하는 최적의 발현 벡터를 구

축하며, 또한 핵치환 방법, 성숙정자이용법, 원형세포이용법, 전핵주입법등에 의한 형질전환태지의 생산효율을 증진시킨다. 제 2세부과제에서는 발정동기화에 의한 미수정란/수정란의 채란효율을 증진시키고, 수정란의 이용효율과 산자 생산능력을 증진시킨다. 3세부과제에서는 뇨에서 EPO의 분리 및 정제에 의한, 생리활성을 규명으로 나누어 실시되었고, 각 세부과제별 연구개발 내용 및 범위는 다음과 같다.

제 1세부과제: 뇨에서 hEPO을 발현하는 최적 발현벡터의 구축과 형질전환 동물 생산

□ Urine에서 EPO을 분비하는 최적의 방광특이적 프로모터의 유전자의 크로닝

- 방광특이 발현만을 유도하는 프로모터크로닝

□ 형질전환 수정란의 생산효율 향상

- 섬유아세포 이용한 핵치환 기법에 의하여
- 성숙정자 매개에 의한 ICSI에 의하여
- 원형세포를 이용한 ROSCI에 의하여
- 전핵주입에 의하여

○ 음성생식세포에 UP/hEPO 유전자전이에 의한 형질전환태지 생산

- 정자생성세포분리 및 유전자 도입
- 세포 융합 및 형질전환 수정란 생산

○ 체세포에 UP/hEPO 유전자 전이에 의한 형질전환생산

- 유전자의 도입의 최적조건 확립 및 선발
- 핵치환 및 형질전환수정란 생산

○ Microinjection법에 의한 UP/hEPO 유전자의 도입 및 검정

- 도입 유전자의 삽입 및 copy수에 검정
- 물질 생산에 적합한 promoter의 길이 및 발현율의 결정

제 2세부과제: 발정동기화에 의한 미수정란/수정란의 채란효율을 증진 및 수정란 이식

- 발정동기화에 의한 수정란 및 미수정란 채란기술의 향상
 - 자연 배란법에 의하여
 - 호르몬 처리에 의한 과배란법에 의하여
- 외과적 방법에 의한 미수정란/수정란의 채란기술 확립
 - 외과적 수술방법에 의한 채란 효율 검정
 - 난관으로 부터의 회수율 향상
- 상이한 과배란유도에 의한 난자채란의 극대화
 - 호르몬 투여에 의한법
 - 호르몬 + 구강호르몬 섭취에 의한 법
 - 자연발정에 의한 법
- 이식방법의 개선을 통한 착상율 및 임신율 향상
 - 공란돈의 수란돈사용에 의한 동기화 이식
 - 수란돈의 동기화에 의한 이식

제3세부과제: EPO의 분리 및 정제에 의한 생리활성을 규명

- 단백질 분리 및 정제
 - Peptide 또는 아미노산 이용 복합항체의 생산
 - EPO 단백질의 안정성 및 독성 분석, in vivo 생리활성 분석
 - HPLC에 의한 뇨로부터 사람의 EPO단백질 분리 및 정제
 - 분리된 단백질의 구조 및 amino산 배열결정
 - 뇨로부터 단백질 분리 정제 및 순도 검정
 - 분리 단백질의 안정성 및 독성검정
 - 분리 단백질의 생리활성 검정

SUMMARY

I. Title

Mass Production of Human Erythropoietin into Transgenic Pig Urine

II. Goals and significance of this research

Many targets will be possible for the genetic engineering of mammary gland or bladder in pigs. The production of recombinant proteins is one of the major successes of biotechnology. Animal cells are required to synthesize proteins with the appropriate post-translational modifications. Transgenic animals are being used for this purpose. Milk, egg white, blood, seminal plasma and silkworm cocoon from transgenic animals are candidates to be the source of recombinant proteins at an industrial scale. However, a certain number of technical problems remain to be solved before the various systems are optimized. This is clearly due to the fact that the expression vectors are not constructed in an appropriate manner or that transgenic animal with the desirable trait due to high cost was not sufficiently produced. This undoubtedly comes from the fact that all the signals contained in genes have not yet been identified and that one needs to produce a multitransgene animal for livestock with high-yield production of pharmaceuticals.

The advent of new animal transgenesis technologies will allow valuable modifications to the genome of virtually any animal. Such technologies will improve agronomic traits and will lead to the introduction of new and lower cost biopharmaceuticals and medical procedures. Therefore, several attempts have been undertaken to produce human EPO in the milk of transgenic mice and rabbits. Based on obtained results, EPO was recognized as a very difficult cytokine/growth factor to be produced in transgenic animals. Even though transgenic mice and rabbits secreting up to 50g/ml of rhEPO in milk were generated, most of transgenic animal showed deleterious side effects such as premature death or

polycythemia, splenomegaly, and hepatomegaly in human. Furthermore, the previous produced transgenic animal does not prove to be beneficial for commercial production of hrEPO because of low expression. The present study was designed to test the hypothesis whether 1) hrEPO secreted in transgenic milk has quality assurance and biological activity, 2) EPO is secreted activity into transgenic milk, 3) the heterogeneous rhEPO secreted in milk is resistant to digestion after freezing and thawing. To answer these questions, the current study is to investigate whether analysis of carbohydrate content and structure of milk derived EPO can be provided as a valuable tool for measurement of biologically active hEPO

The selection of animals chosen to generate transgenics on one hand and the elimination of the potentially contaminated animals, thanks to recently defined quite sensitive tests may reduce the risk to an extremely low level. The available techniques to produce pharmaceutical proteins in urine can be used as well to optimize urine composition of farm animals, to add nutraceuticals in urine and potentially to reduce or even eliminate some mammary infectious diseases. In this study, we report the cloning of the mouse, pig, and bovine UP genomic DNA, which contains a putative full-length open reading frame encoding the UPII protein. Northern and immunohistochemical analyses show that the mouse UPII gene is expressed only in the urothelium and that the protein specifically localizes to urothelial superficial cells. Among urothelial superficial cells, 8.5-9.8% of umbrella cells express the UPII gene. Also, we have generated transgenic mice expressing human erythropoietin (hEPO) in urine. In particular, the expression plasmid DNA containing mouse, pig and human uroplakin promoters were used to direct uroepithelium-specific transcription of transgene. In this study, hEPO transcript was detected only in bladder uroepithelium as determined by northern blot analysis. Furthermore, hEPO protein was detected in the suprabasal layer of the uroepithelium and ureter by immunohistochemistry. The hEPO was secreted into urine at high level (up to 0.5-1.0 mg/ml), and enhanced proliferation of

hEPO-dependent human hepatocyte cells, suggesting that transgenic urine-derived hEPO was bioactive. This is the first case of demonstrating biological activity of a cytokine produced in the urine of a transgenic animal. Our results demonstrate that bladder can be used as a bioreactor to produce biologically important substances. In addition, it suggests a potential application of bladder expression system to livestock for high-yield production of pharmaceuticals.

III. Contents and scope of the project

The goal of this study was production of transgenic mouse and pig secreting human EPO through milk or urine. To accomplish the goal, the project was divided into three parts. The first, second and third subdivisions were "production of transgenic mice and pig, cloning of bladder specific promoter gene, and development of ICSI or somatic cloning methods, respectively. The detailed are described as follows.

Part 1. Cloning of bladder specific promoter genes

☺ Probe preparation by degenerated RT-PCR

Reverse transcriptase (RT)-PCR was performed using total cellular RNA obtained from porcine bladder and degenerated primers derived from conserved regions of both mouse and bovine UPII cDNAs that were designed to amplify the partial UPII coding sequence. The upstream and downstream primers were 5'-GATCCTGATTCTGCTGGCTB-3' and anti 5'ATGGTGGTCATCACRGTGCT - 3' respectively. MuMLV reverse transcriptase (Promega) was used for the first strand cDNA synthesis after priming with downstream primer.

Second strand cDNA synthesis and sequent PCR amplification were carried out with *Taq* polymerase (Gibco BRL). Amplified DNA was cloned into pGEM T-easy vector (Promega). Fragments of DNA amplified by degenerated RT-PCR were labeled with [α -³²P]dCTP using a random labeling kit according to the manufacture's instruction. Briefly, 50ng of DNAs were denatured by boiling for 3

min and then cooled on ice. ^{32}P -labeled probe DNAs were synthesized by Klenow fragment in a reaction buffer containing random primer, dNTPs and [α - ^{32}P]dCTP (3.000 Ci/mmol) for 1 hr at 37°C. Probe DNAs were purified using Sephadex G-50 column as described (Sambrook *et al.*, 1989). Probe DNAs (1–5 μl) were mixed with 3 ml of AquaLUMA solutions (Lumac Lsc. Groningen, Netherlands) and then counted in a liquid scintillation counter (Beckman).

☺ Genomic library screening

Porcine genomic DNA library constructed in the lambda FixII phage vector (Stratagene, #097001b). Membranes containing DNAs were hybridized with labeled probe DNAs (5 x 10⁷ cpm) for 18 hrs at 68°C, then washed twice in 2 X SSC containing 0.1% SDS at 65°C. After three rounds of screening process, 8 positive clones were selected and analyzed. DNA of positive clones were purified using the QIAGEN lambda mini kit.

☺ Southern blot analysis of porcine genomic DNA

Genomic DNA was obtained from adult porcine tissues as described previously (Sambrook *et al.* 1989). Briefly, 10 μg of porcine genomic DNA were digested with appropriate restriction enzyme, transferred on a 0.7% agarose gel and then, transferred onto nylon membrane. Hybridization was carried out in an aqueous solution containing 6 x SSC, 5 x Denhardt's reagent, 1% SDS by using a random-primed 456 bp of UP II probe DNA with activity of 5 x 10⁶ cpm/ml at 68°C. Final washes were performed with 1 x SSC, 0.1% SDS at 65°C

Part 2. Sperm vector in vitro and in vivo

Transfection of Spermatozoa

The DNA derived from the pUPhEPOSVneo plasmid, which contains human erythropoietin and neo genes digested with HindIII and EcoRI, was used for in vitro transfection of spermatozoa. The DNA (0.6 ug) and liposome (2 ug, Gibco) were separately diluted in 20 ml of sterile water and allowed to stand for 30 min at room temperature followed by gentle mixing of both solutions. Spermatozoa were washed twice with 1 ml of bovine serumalbumin (BSA) free IVF medium. Spermatozoa at 1×10^6 cells/ml were transfected with both linear DNA derived from pZIP(X)hEPOSVneo plasmid and liposome in BSA free in vitro fertilization (IVF) medium for 2 hr at 37°C, 5% CO₂ in air. Oocytes were recovered from ampullae at 12 to 15 hr post hCG in PBS containing 10% FBS. In vitro fertilization was performed by placing approximately 30 oocytes in 50 ul droplets of IVF medium and 2 ul of the transfected sperm suspension (final concentration in droplet, 1×10^6 spermatozoa/ml) were added.

Immunofluorescence

To follow the transportation of foreign DNA into zygotes, the DNA for transfection was prepared by PCR for incorporation of fluorescein dUTP into their DNA according to method recommended by manufacturer (Boehringer-Mannheim). Sperm cells were then incubated with liposome/fluorescein labeled DNA for 2 hr at 37°C 5% CO₂ in air and then, oocytes were fertilized by transfected sperm cells. The fertilized embryos were mounted onto slide glass, fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min and washed using the method recommended by the manufacturer (Boehringer-Mannheim). The samples were incubated with anti-digoxigenin-fluorescein conjugate at a final concentration of 20 ug/ml for 30 min. Excess antibody was removed by twice washing for 5 min in TBS (0.05 M Tris-HCl, pH 7.4 and 0.85% NaCl) at room temperature. For double staining, embryos were stained with propidium iodide at a final concentration of 0.01mg/ml for a few seconds and the signal of the introduced DNA in the embryos was

evaluated by fluorescein microscopy. In some places, the yellow color indicates the colocalization of a green fluorescence and propidium iodide emission.

☺ *Flow cytometry*

The binding and uptake of exogenous DNA in spermatozoa were examined by LSC system (LSCTM, CompuCyte). Spermatozoa with high mobility were selected by swimming-up. In situ hybridization was performed as described above and then co-stained with ethidium bromide. In order to determine the percentage of FITC-positive cells, FITC and PI fluorescence emission were excited at 488nm with an argon laser and the fluorescence signals were measured using band pass 530nm and 570nm filters. In all experiments, a minimum of 2000 cells per slide were scanned and analyzed by LSC system. All experiments were duplicated at least three times.

☐ Transfer of Liposome/DNA Complex into Seminiferous Tubule.

The mouse testis was exposed by laparotomy. The tunica albuginea of both testes was pierced partially by using a sharp 30 gauge needle, and approximately 5 to 10ml of liposome/bacterial LacZ gene, derived from pCH110 plasmid under the control of SV 40 promoter (Takeda and Toyda, 1991), complexes (4 ug/1 ug) were introduced into a site of seminiferous using a microinjection needle under light microscopy (Fig. 3). In the pigs, 4 weeks after the first busulfan treatment, the testes were exposed by surgical operation. Then, approximately 500 ul of DNA/liposome (1:4 rate;10 ug/40 ug) complexes were randomly introduced into 3 or 4 sites of both testes using a glass microinjection needle after piercing the tunica albuginea with a 30-gauge needle. Mice and pigs were injected with the liposome/DNA complexes twice seven days between treatment.

☐ Separation of Male Germ Cells

The spermatogenic and spermiogenic cells were prepared from the testes and purified by the Celsep™ (Eppendorf) separation system according to the method described by Bellve (1993) with minor modifications. Briefly, 4 to 8 weeks after transfection, the tunica was removed and testes were dissociated by mincing with scissors. The cells were incubated for 30 min at 37°C in HBSS (58.44 mM NaCl, 74.55 mM KCl, 137.9 mM Na₂PO₄, 0.1% Glucose, and 84.01 mM NaHCO₃) containing 1 mg/ml of collagenase type I (Sigma, Cat. No. C-0130) and 1 mg/ml of DNase I. After centrifugation, cells were resuspended with 0.25% trypsin/1mM EDTA and incubated for 5 min at room temperature. Then, trypsin was removed by centrifugation, and cells were separated on a linear gradient of 2-4% Percoll in PBS. After 2 hr of sedimentation at 40°C, cells were collected as 40 ml fractions. The cell types of each fraction were examined under light microscopy, fractions containing the same cell types were pooled, washed two times with PBS, and then subjected for analysis of LacZ expression.

□ Immunohistochemistry

A antibody against β -galactosidase was purchased from Oncogene Science. Tissue for immunostaining was cleared in histoclear for approximately 10 min and dehydrated in decreasing concentrations of ethanol. Immunohistochemistry was performed according to standard procedures provided by the manufacture (Oncogene Science Inc., Mouse, Rabbit and Rat UniTect™ Immunohistochemistry System). Sections were placed in 3% peroxide in pure methanol and 0.1% of pepsin in 0.05N HCl (pH 2.25) for 30 min to reduce background staining. Sections were washed twice (5 min each) in TBS (0.05 M Tris-HCl, pH 7.4 and 0.85% NaCl) and blocked with normal horse serum diluted in TBS (1:5; NSS-TBS). Sections were incubated overnight with primary β -galactosidase antibody diluted at a concentration of 1:500 in NHS:TBS. One drop of horse serum from ABC Kit was used as a negative control. Excess antibody was removed by washing

twice for 5 min with TBS, and then biotinylated Secondary IgG was added for 30 min, with a rinsing with 3 changes of TBS for 5 min. Sections were incubated with ABC reagent for 30 min and washed extensively with TBS, and rinsed in 1% Triton-X-PBS for 30 sec. The color reaction was developed with a solution of 0.5% diaminobenzidine in 0.05 M Tris-HCl (pH 7.6) containing 0.01% hydrogen peroxide. After development of the color reaction, sections were washed in water, dehydrated, and mounted with a coverslip.

□ Tunnel Assay (TdT-mediated dUTP-X Nicked End labeling)

Testes were fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS (pH 7.4). They were then washed in PBS and dehydrated in ethanol (70, 90, and 100%) before embedding in paraffin wax. Testicular sections (5µm) were rehydrated (xylene 5min; ethanol 100%, 95%, 70% 2 min each) and then washed in distilled water before beginning the tunnel reaction. The testicular sections were incubated for 15 min with proteinase K (20 µg/mL) at room temperature. After a wash with PBS (x1), endogenous peroxidase were blocked with 2% H₂O₂ for 5 min. Sections were washed three times with PBS (x1). The specimens were then incubated 60 min at 37°C in a moist chamber with the tunnel mix, which consisted of 0.3U/L calf thymus terminal deoxynucleotidyl transferase, 0.007 nmol/L biotin dUTP, 1mM cobalt chloride in 1 x reaction buffer in distilled water. After washing (four PBS baths of 5 min each RT), the sections were saturated 10 min in BSA 2% at RT. Sections were treated for 30 min at 37°C in a moist chamber with a 1:20 dilution of ExtraAvidin peroxidase antibody. After three washes in PBS, detection was performed with DAB [1.24mg of DAB, 25/L of 3% NiCl₂, 1M Tris-HCl (pH 7.5) in distilled water of 2ml]. Slides were mounted in crystal mount (Biomedex, Foster City, CA).

Part3. Somatic cloning of pig

Isolation and Culture of Porcine Somatic Cells

Fetal fibroblast cells were obtained from a Duroc strain fetus (7.5 cm in length) acquired from a slaughterhouse; the age and breed of the fetus were unknown. The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) under 5% CO₂ in air at 37°C. After reaching confluence, the cells were passaged. Donor cells were used for nuclear transfer between passages 8 and 15 of culture. The cells were used for nuclear transfer within 3 days after reaching confluence.

In vitro maturation of oocytes

Ovaries were collected from prepubertal gilts at a local slaughterhouse and transported to the laboratory at 25°C-35°C. Antral follicles (2-6 mm in diameter) were aspirated with an 18-gauge needle. Aspirated oocytes that had an evenly granulated cytoplasm and were surrounded by at least three uniform layers of compact cumulus cells were selected and washed three times in HEPES-buffered NCSU37 with 0.1% PVA. Oocytes were cultured in four-well plates (Nnc) containing 500µl each of NCSU-37 medium supplemented with 10% porcine follicular fluid, 0.6 mmol/L cysteine, 1 mmol/L dibutyryl cyclic adenosine monophosphate (dbcAMP, Sigma), and 0.1 IU/ml human menopausal gonadotropin (hMG, Teikokuzoki, Tokyo, Japan) for 20 h, and then cultured without dbcAMP and hMG for another 18-24 h as previously reported (Yin et al., 2002).

Nuclear transfer

Nuclear transfer was carried out as described in Yin et al (2002). Briefly, the matured eggs with the first polar body were cultured in medium supplemented with 0.4 mg/ml demecolcine (Sigma) and 0.05 mol/l sucrose for 1 h. Sucrose was used to enlarge the perivitelline space of the eggs. Treated eggs with a protruding membrane were moved to medium supplemented with 5 mg/ml cytochalasin B

(CB) and 0.4 mg/ml demecolcine and the protrusion was removed with a beveled pipette. A single donor cell was injected into the perivitelline space of each egg and electrically fused using two direct current pulses of 150 V/mm for 50 msec in 0.28 mol/L mannitol supplemented with 0.1 mM MgSO₄ and 0.01% polyvinyl alcohol (PVA, Sigma). Fused eggs were cultured in medium with 0.4 mg/ml colcemid for 1 h before parthenogenetic activation, and then cultured in 5 ug/ml of CB-supplemented medium for 4 h. The reconstructed oocytes were activated by 2 direct current pulses of 100 V/mm for 20 msec in 0.28 mol/L mannitol supplemented with 0.1 mmol/L MgSO₄, and 0.05 mmol/L CaCl₂. Activated eggs were cultured in the medium for 6 days in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% air at 39°C. In order to obtain simultaneously activated oocytes, a group of oocytes were fused and activated with two 50 msec pulses of 1.5 kv/cm.

Embryo transfer

The nuclear-transferred eggs that were activated with electric pulses and cultured for 1 or 2 days were then transported to the experimental station in modified NCSU-37 with antibiotics. Nuclear-transferred eggs were surgically transferred into the oviducts of synchronized recipients. The pregnancy status of recipients between Day 30 and Day 35 was determined by ultrasound.

Microsatellite Analysis

Parentage analysis was performed on the piglets obtained by nuclear transfer and the surrogate recipient females. DNA was extracted from donor cells and from ear punches or tail clippings obtained from each recipient and newborn piglet. Three porcine DNA microsatellite markers (SWR1120, SW1311 and SW1327) were used to confirm the genetic identity of the cloned piglets as coming from the donor cells used for nuclear transfer.

PCR conditions

A total of 12.5 ng of porcine DNA, 5 pmol of each primer, and 0.1U of Tag polymerase were included in an 8 reaction containing 1 x Taq buffer, 1.5mM MgCl₂, 30 M of dTTP, dGTP and dCTP, 15mM dATP and 0.1 Ci of [³²P]dATP. The thermocycler profile was 1 min at 92°C, then 28 cycles of 30s at 94°C, 1 min at the annealing temperatures showed in Table 1, 1 min at 72C followed by a 5 min final extension at 72°C.

Part 4. production of transgenic mice

Transgenic mice were generated using a standard procedure (Hogan et al., 1986). Fertilized one cell embryos were obtained from BCF1 (C57BL/6 x DBA hybrid) females. Expression DNA cassette was purified by dialysis in TE buffer and microinjected into pronuclei of fertilized embryos. Injected embryos were cultured for 20hr before being transferred to pseudopregnant ICR female mouse. All mice were raised and kept under specific pathogen free conditions.

Genomic DNA was obtained from mice tails as described previously (Sambrook *et al.* 1989) and the transgene was identified by PCR. The primer used are: hEPO primer, promoter primer and hEPO primer, vector primer. Transgenic mice screened by PCR were re-confirmed by Southern blot analysis. Briefly, 10 μ g of porcine genomic DNA were digested with appropriate restriction enzyme, transferred on a 0.7% agarose gel and then, transferred onto nylon membrane. Hybridization was carried out in an aqueous solution containing 6 x SSC, 5 x Denhardt's reagent, 1% SDS by using a random-primed 456 bp of UP II probe DNA with activity of 5 x 10⁶ cpm/ml at 68°C. Final washes were performed with 1 x SSC, 0.1% SDS at 65°C

IV. Results on application of the results

Part 1. Cloning of bladder specific promoter genes

- Approximately 9kb of bladder specific promoter gene were cloned and sequenced.
- Construction of pBC1hEPO or pUPIIhEPO designed to express hEPO gene under the control of mammary gland or bladder specific promoter gene.
- In HC11 mouse mammary gland cell or bladder specific cells, the highest expression of hEPO was observed

Part 2. Sperm vector in vitro and in vivo

- Using mature sperm, approximately 60% of mature sperm cells were bound to exogenous DNA onto their membrane.
- Approximately 1-10% sperm cells were transferred foreign DNA into oocyte through IVF
- Any transgenic animals were not produced by sperm-mediated gene transfer
- By direct gene transfer into germ cell depleted male testis, xenotransferred pig male germ cells were survived to meiosis stages, but did not progress to mitotic stages.
- Even though antibody-mediated-sperm-aided gene transfer through in vivo were successfully produced piglets, but any transgenic piglets were not detected by this methods.

Part 3. Somatic cloning of pig

- From somatic cell-mediated nuclear transfer, cloned piglets were successfully produced
- Though transgenic piglets harboring reporter gene were produced, transgenic piglets with hEPO gene were not detected by somatic cloning methods

Part 4. Production of transgenic mice

- Transgenic mice were produced
- Detection of existence and expression of the foreign gene were confirmed from

mammary gland or bladder specific organs

-Successful transfer and expression of the foreign DNA were detected from the pig embryos

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

The results and the technologies derived from our projects might be applied in the various following areas and can be open in public including scientific meeting and also should be followed in similar studies in the future.

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

CONTENTS

| | |
|--|-----------|
| Chapter 1. Overview of the project | 1 |
| Section 1. Aims and Necessity of the research and development | 1 |
| 1. Technical aspect | 1 |
| 2. Economic and industrial aspect | 5 |
| | |
| Chapter 2. Status of the technology development in Korea and foreign countries | 7 |
| Section 1. Status and problem of development of the technique in Korea and other countries | 7 |
| Section 2. The future prospect | 8 |
| | |
| Chapter 3. Research contents and results | 10 |
| Section 1. Promoter cloning and expression vector construction of bladder-specific gene | 10 |
| Section 2. Transgenic pig production by ICSI | 27 |
| Section 3. Gene transfer by autologous transplantation | 43 |
| Section 4. Estrus synchronization of recipients | 46 |
| Section 5. Transgenic pig production using somatic cell | 49 |
| Section 6. EPO protein production and analysis of transgenic animal | 66 |
| | |
| Chapter 4. Achievement and contribution to related fields | 79 |
| Section 1. Achievement | 79 |
| Section 2. Contribution to related research fields | 80 |

| | |
|---|----|
| Chapter 5. Application of the results | 81 |
| Chapter 6. References | 82 |

목 차

| | |
|--|-----------|
| 제 1 장 연구개발과제의 개요 | 1 |
| 제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성 | 1 |
| 1. 기술적 측면 | 1 |
| 2. 경제·산업적 측면 | 5 |
| 제 2 장 국내·외 기술개발 현황 | 7 |
| 제 1 절 국내·외 기술개발 현황 및 문제점 | 7 |
| 제 2 절 앞으로의 전망 | 8 |
| 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 | 10 |
| 제 1 절 방광특이적 프로모터유전자의 크로닝과 최적의 발현벡타구축 | 10 |
| 제 2 절 ICSI에 의한 형질전환 돼지 생산 | 27 |
| 제 3 절 자가세포이식에 의한 유전자 전이 | 43 |
| 제 4 절 발정동기화 유도 | 46 |
| 제 5 절 체세포를 이용한 형질전환 복제돼지의 생산 | 49 |
| 제 6 절 형질 전환 동물로부터 EPO 단백질 생산 및 분석 | 66 |
| 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 | 79 |
| 제 1 절 연구개발 목표달성도 | 79 |
| 제 2 절 관련분야 기술발전예의 기여도 | 80 |
| 제 5 장 연구개발결과의 활용계획 | 81 |
| 제 1 절 활용계획 | 81 |
| 제 2 절 활용방안 | 81 |

제 6 장 참고문헌 82

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 기술적 측면

현재, EPO는 1g당 83만\$에 시판되고 있다. 즉, 1l당 1g의 EPO를 생산한다고 가정하면, 돼지 한 마리가 일일 생산하는 뇨의 양은 10k/로 이를 합산하면 연간 약 3,600k/에 이른다. 따라서, 이를 금액으로 환산하면 $3,600 \times 83\text{만}\$ = 29\text{억}8,800\text{만}\$$ 로서 돼지 한마리가 생산한 부가가치가 우리나라 전체 자동차 수출량에 버금갈 정도의 경제적 가치가 있다 하겠다. 또한 뇨를 이용한 생리활성물질의 생산은 우유와는 달리 압수구분없이 이용가능함은 물론 태어나서부터 죽을때까지 생산이 가능하다는 장점을 가진다. 따라서 본 연구는 빈혈 및 신부전환자의 치료제로 사용되고 있는 고 부가가치를 가진 EPO이라는 특수생리활성 물질을 돼지의 부산물인 뇨로부터 대량생산함으로써 이들 단백질을 산업화하여 수입 대체 효과는 물론이거니와 수출을 통한 농가소득의 안정된 증진을 도모해야 한다. 이러한 국내 외적 여건이 바로 본 연구를 착수하게된 목적이라할 수 있다.

유선을 이용하여 목적의 의료단백질을 우유에서 대량으로 생산시키는 방법으로서 지금까지 개발된 방법에 비하여 우수한 것으로 알려져 있다. 그러나, 이 방법의 경우는 주로 소를 이용하기 때문에 life cycle이 크다는 것과 발현의 정도, 생리활성의 측정 등에 소요되는 경비만으로도 천문학적인 경비가 소요되는 것은 물론, 어떤 의료단백질의 경우에는 유선에서 생산하는 것이 불가능한 경우도 있다. 따라서, 본 연구는 보다 저렴하고 또한 고농도의 생산을 위하여 동물의 뇨 또는 우유에서 EPO를 대량생산하는 체계를 개발하여, 농가의 소득증대는 물론 국민의 삶의 질과 생활의 질을 향상시킴으로서 소득창출은 물론 고용확대에 의한 국민 소득을 증진시키기 위하여 실시하고자 한다.

가. 기술개발의 중요성

고가의 의료 생리활성물질인 당단백질은 특수한 경우를 제외하고는 대부분 동물세포를 이용하여 생산한다. 동물세포를 이용한 단백질생산은 주로 동물 혈청을 이용한 세

포로부터 생산되기 때문에 순도 및 분리에 문제가 있을 뿐만 아니라 생산시설, 숙련된 연구자원과 같은 제반 문제로 생산원가가 높은 것이 단점이라 할 수 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 최근에 동물을 이용한 Animal bioreactor가 개발되었다. 이 방법은 고가의 의료 생리활성물질이 동물의 노에서 생산가능한지, 가능하다면 이들이 생리적 활성을 가지고 전임상적 응용가능한지를 검토하는데 있다. 본 연구의 장점은 ㉠ 우유의 경우 비유중인 암컷만 이용가능하나 암수 구별없이 일생을 통하여 생산가능하며, ㉡ 태어나자마자 조기에 발현의 진단이 가능함은 물론 생리적 활성을 측정할 수 있으며, ㉢ 우유의 경우에 이용 불가능한 당단백질도 이용가능하다는데에 있다. 지금까지 개발된 주요 기술을 요약하면 다음과 같다.

현재의 EPO생산은 Serum 의존성생산체계와 정제비용 때문에 높은 생산비를 요한다.

- 양변기의 사용은 고순도의 EPO생산을 저해한다.
- 세포에서의 EPO생산은 높은 생산단가와 순도에 있어 문제점이 많다.
- 1g의 생산비용은 83만\$이다

1) 뇨로부터 EPO의 정제

EPO는 34,000da의 당단백질이며, 2개의 N-glycosylation 부위와 하나의 O-glycosylation부위를 가지고 있다. 따라서, 대장균에서 EPO를 대량생산하는 것이 불가능하다. 이같은 문제점으로 인해 EPO의 분리정제는 주로 신부전환자의 뇨로부터 분리정제하였다. 그러나, 정상인의 경우 뇨로부터의 EPO의 정제는 뇨에 분비되는 EPO의 농도가 낮을 뿐만 아니라, 양변기의 사용에 의하여 수거와 분리에 따른 여러가지 번거로움과 경비부담이 크기 때문에 실용화에 한계가 있다. 더욱이 신장이상에 의하여 사구체를 통과한 뇨로부터 분리한 EPO 경우 생체내의 EPO구조와는 C-말단이 변형되어 그 활성이 체내의 EPO에 비해 떨어지는 경향이 있다.

2) 배양세포로부터의 EPO생산

EPO의 배양세포에서의 생산은 1) 숙련된 배양 전문가를 요구하며, 2) 이들 세포가 대부분 표면적에 의존하기 때문에 대량생산에는 한계가 있으며, 3) 배양세포는 serum의존성 성장을 요구하기 때문에 이들 배양액으로부터의 고순도 사람 EPO만을 분리정제하는 것이 불가능하다. 이 방법에 의해 생산된 EPO를 신부전 말기의 빈혈환자에 주로 이용하고 있으나, 현재 이 방법은 EPO생산 원가를 높을 뿐만 아니라 고순도의 EPO생산을 저해한다.

Table 1. 고가의 의료 생리활성물질의 생산에 있어 각 군의 장단점 비교

| | CHO | E. coli | Milk |
|---|------------------|----------------|-----------------|
| Product Concentration (mg / l) | 33.5 | 460 | 100 |
| Capital Investment | \$ 61M | \$ 389M | \$ 3.3M |
| Annual Expenses | \$ 117M | \$ 242.3M | \$ 0.51M |
| Kg per annum | 11.4 | 11.6 | 51 |
| Cost per Gram | \$ 10.207 | \$ 20.912 | \$ 10 |

| | Yesterday | Today | Tomorrow |
|-------------------------|------------------------------------|--|--------------------------|
| Market Demand | kg ' s | 10 ~ 100 kg | 100 kg -tonnes |
| | Cell Culture / Microbial | Transgenic Production | Transgenic Production |
| Production costs | High | Low | Low |
| Purification costs | High | High | Low |
| Cost of goods | 1,000 ' s/g | \$ 10 ~ 100 ' s/g | \$ 1 ~ 10 ' s/g |

3) 생체반응기에 의한 EPO의 대량생산

형질전환동물은 의료단백질의 생산 비용을 절감하는 최적의 생체수용기다

- 현재 생산비용의 1/1000이상을 경감할 수 있다
- 1마리의 생산이 세계 시장을 석권할 수 있다(생산비용: 5억~10억)
- 노는 EPO의 생산을 위한 최적 기관이다

Colorado대학의 Dr. Seidel과 DNX사에서 EPO의 대량생산 체계를 확립하기 위해 형질전환 젖소의 생산을 꾀하고 있다. 이는 고순도의 EPO를 우유에서 저렴한 가격으로 생산하는 것이 가능하기 때문이다. 사람의 의료단백질을 산양의 우유에서 대량생산을 보고한 DNX사의 protein G나 factorIX의 산업적 이용성의 보고와 유사한 경우로서 그 실용성 및 산업화가 가능한 것으로 예측된다. 상기 유사 기술에 의해 개발된 분야는 다음과 같다. 그러나, 현재 EPO의 경우 우유에서의 대량생산은 비조직 특이적 발

현에 의하여 많은 문제점이 지적되고 있다.

Table 2. 형질전환동물에 의한 의료약품생산현황

| 기 관 명 | 제품명 | 개발시기 | 개발단계 | 내 용 |
|---------------------------|------------|------|------|-----------------|
| Collagen사와 International사 | Collagen | 1993 | 기초 | 형질전환 젖소 개발합의 |
| DNX사 전환 | Hemoglobin | 1993 | 개발 | 혈액중 32g/l 형질 |
| DNX와 Duke대 | DAF | 1993 | 기초 | 장기이식 돼지 생산 |
| VPI사 | Protein C | 1992 | 개발 | 형질전환양의 유즙에 생산 |
| Genzyme | AT-III | 1995 | 개발 | 2-3g/l |
| Transgenic사 | TPA | 1994 | 기초 | TPA생산 형질전환양의 확보 |

그러나, 이들 방법과는 달리, EPO를 정상적인 기능을 가진 방관의 상피세포로부터 대량생산한다면, 앞에서 열거한 각종 문제점이 극복될 수 있을 것이다. 그 주된 이론적인 배경은, Uroplakin 프로모터는 오직 방광상피세포에서만 발현하기 때문에 EPO의 과발현이 숙주 또는 태아에 나쁜 영향을 미칠 확율이 전무하기 때문이다. 한편, 미국 의약생산자협회(PMA)의 통계에 의하면, 하나의 생명공학의 약품이 초기 연구단계에서 최종심사 승인에 이르기까지의 소요되는 경비는 약 2억 3천 1백만 \$로서 약 12년이 소요된다고 한다. 그러나, 이를 형질전환 동물의 노에서 대량 생산할 경우 개발 경비는 현재의 1/1000 이하로 줄일 수 있으며, 또한 고순도의 의료약품의 생산이 가능하다. 경비절감의 주된 이유는 형질전환동물이 한 마리 생산비용은 약 5만\$에서 20만불정도로 생산이 가능하며, 또한 그 유전자가 다음세대로 유전되어 생산원가가 더욱 저렴해지기 때문이다. 현재, EPO는 1g당 83만\$에 시판되고 있다. 즉, 1/당 1g의 EPO를 생산한다고 가정하면, 소 한 마리가 일일 생산하는 소의 노의량은 20kI로 이를 합산하면 연간 약 6,600kI에 이른다. 따라서, 이를 금액으로 환산하면 6,600 x 83만\$=54억7,800만\$로서 소 한마리가 생산한 부가가치가 우리나라 전체 자동차 수출량에 버금갈 정도의 경제적 가치가 있다 하겠다. 또한 노를 이용한 생리활성물질의 생산은 우유와는 달리 압수구분없이 이용가능함은

물론 태어나서부터 죽을때까지 생산이 가능하다는 장점을 가진다. 따라서 본 연구는 빈혈 및 신부전환자의 치료제로 사용되고 있는 고 부가가치를 가진 EPO이라는 특수생리활성 물질을 동물의 부산물인 뇨로부터 대량생산함으로써 이들 단백질을 산업화하여 수입 대체 효과는 물론이거니와 수출을 통한 농가소득의 안정된 증진을 도모해야 한다. 이러한 국내외적 여건이 바로 본 연구를 착수하게된 배경이라할 수 있다.

2. 경제·산업적 측면

EPO는 매년 10%이상 신장하는

고가의 생리활성물질이다

- 인구 5%는 신부전 및 빈혈을 앓고 있다
- 전세계 시장규모는 최소한 1400억\$이상이다
- 신부전환자에 있어, 1일투여 비용은 120\$로 연간 1440\$이상 소요되는 고가의 의료품이다
- 빈혈, 신부전치료에 이어 자가수혈과 AIDS치료시에도 사용되고 있다.

1993년도 미국 생명공학 의약품의 매출실적은 세계의 선두제품인 EPO, 알파인터페론, G-CSF의 경우 약 20억\$로, 2003년경에는 70억\$의 시장규모가 예상된다. 이중 EPO는 이들 약품중 판매량 제 1위로서 1993년도 8.25억\$의 판매실적이 2003년경에는 235억\$로 약 300%의 신장이 예상된다. 일본의 경우에도 93년도의 생명공학 의약품중 EPO의 매출액이 1위인 630억\$로서 전년도에 비해 약 10% 신장되었다. 유럽과 아프리카의 경우 아직 정확한 통계가 없으나, 상기 두나라의 합산보다 더 큰 시장규모가 예측되는데 이는 이들 국가의 경우 지중해성 빈혈환자가 더 많기 때문이다. EPO의 세계 시장규모는 지금까지 개발되어 시판되고 있는 의료약품가운데 단일 품목으로는 두번째로 높은 판매고를 보이고 있으며, 현재 년 300억\$이상의 국제시장과 1000억원 이상의 국내시장이 있으며, 오는 2003년 경 약 500억\$이상의 세계시장이 예상된다.

신부전신장환자의 빈혈증 치료를 위해 1회 투여에 소요되는 경비는, 체중당 3000 U가 소요된다는 점을 고려할때, 약 120\$이 소요된다. 수혈을 전제로 하지 않은 경우, 매달 단위로 이 정도의 경비가 소요되기 때문에 연간 개인당 약 1440\$ 이 소요된다. 따라서, 미국의 경우 전체 인구의 약 5%가 신 부전증을 앓고 있으며, 또한 임신에 동반된 일시적 빈혈을 야기하는 환자까지 합할 경우 그 숫자는 약 1000만명 이상으로

추정되고 있다. 또한, 이 병은 유럽과 아프리카에서 더욱 심각한데 이는 지중해성 악성 빈혈이 이들 국가에서 많이 발생하기 때문이다. 동양의 경우, 이 병에 대한 정확한 통계가 없으나, 일본의 경우 전체인구의 1% 정도가 신부전에 의한 빈혈로 판명되고 있으며, 우리나라의 경우에도, 정확한 통계가 없어 그 규모를 예측할 수는 없지만, 빈혈 및 신부전 환자의 규모로 예측했을 때 적어도 연간 3000억원 이상의 시장규모가 예측된다. 따라서, 농가의 생산성 향상은 물론 국민의 생활의 질과 삶의 질을 개선하기 위해서도 형질전환동물의 노에서 EPO의 생산 기술 개발은 수입대체효과 는 물론이거니와 수출을 위해서도 절실히 요구된다 하겠다.

가. 산업기술에 미치는 영향

우리나라에서도 생리활성물질을 유즙에서 대량생산함

으로서, 동물산업의 구조를 혁신시켰다

- 이경광박사팀은 lactoferrin동물의 특허로 동물자체를 산업화시켰다
- 유육준 박사팀은 G-CSF의 개발에 성공함으로써, 무한한 가능성을 제시

1980년도 초의 생명공학기술에 의한 의료약품 판매실적이 “0”에서 1993년의 경우 미국내에서만 약 40억\$에 달하였다. 현재까지 개발된 생명공학 의료품은 14개 (치료제 12, 백신 1, 진단약 1)가 승인되어 있다. 이들 생명공학 의료품은 주로 배양세포에서 생산되었으나 1990년대를 전후해서 보다 저렴하면서 대량생산을 위해 형질전환 젖소의 유즙에 분비시키려는 연구가 시작되었다. 따라서, EPO와 EPO를 분비하는 형질전환가축의 생산기술은 G-CSF, α -interferon 등은 물론 백신, 항암치료제등과와 같은 유사관련분야에도 확대되어, 연쇄적 파급효과를 가져올 것이다. 현재 이들 제품에 대한 세계 시장규모가 약 1000억\$ 이상으로 추정되는 점으로 보아, 형질전환동물의 유즙으로부터 이들 유용의료약품의 생산은 괄목할 만한 파급효과를 가져올 것으로 보인다.

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 관련기술의 현황 및 문제점

1. 국내·외 기술현황

○ 국내 연구동향

- 사람 Lacoferrin 생산 형질전환젓소 개발(97, 생명연)
- 사람 G-CSf 생산 형질전환산양 개발(97, 과기원)
- 사람 EPO를 유선에서 분비하는 형질전환돼지 개발(99, 축기연과 경상대 공동)

○ 국외 연구동향

- 사람 성장호르몬 유전자이용 형질전환돼지 개발(89, USDA)
- 사람 Hemoglobin 생산 형질전환돼지 개발(92, DNX사)
- 사람 혈전치료제 생산 형질전환산양 개발(94, Gene Transgenic 사)
- 사람 Protein 생산 형질전환복제소 생산(98, ACT사)

국내외의 현황을 요약하면 다음과 같다.

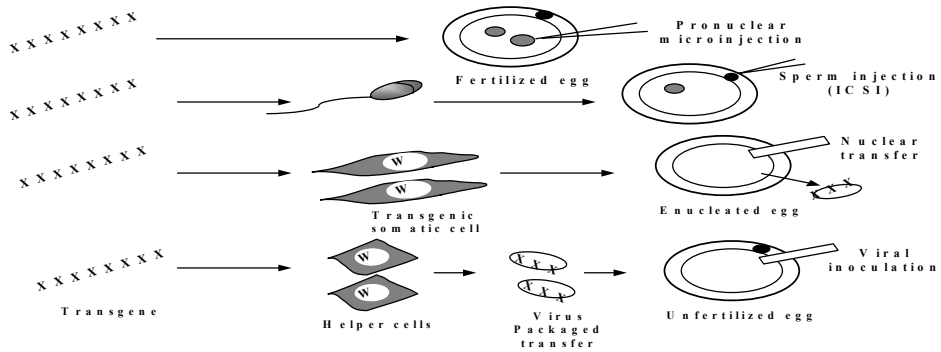
| | |
|------|---|
| 1980 | ◀ Transgenic animal produced by PN injection Gordon. et., 1980 |
| 1982 | ◀ Fusion gene used in transgenic animal Brinster. et al., 1982 |
| 1984 | |
| 1986 | ◀ Frist transgenic farm animals produced Hammer. et al., 1985 |
| 1988 | ◀ Expression of pharmaceutical in mammary gland Gordon. et al., 1987 |
| | ◀ First sheep bioreactor produced Simons. et al., 1988 |
| 1990 | |
| 1992 | ◀ First goat, pig and bovine bioreactors produced Ebert, et al., 1991; Wall et al., 1991; Krimpenfort, et al., 1991 |
| 1994 | ◀ Pre-clinical bioreactor product testing begun |
| 1996 | ◀ Human clinical trials of bioreactor product begun |
| 1998 | ◀ First bioreactor produced by nuclear transfer Schneike, et al., 1997 |

<Figure> **Milestones in transgenic animal bioreactor technology**

2. 문제점

EPO의 대량 생산은 ①낮은 순도(95%)에 의한 항체생산, ② serum 및 노동력에 의한 고비용, ③ 분리 및 정제에 따른 고비용이 가장 큰 문제점 중의 하나이다. 금후,

유선 또는 뇨에서의 대량생산으로 저렴하고 고효성을 가진 EPO의 생산이 절대적으로 필요하다. 그외의 문제점으로서는 형질전환생산효율이 낮아 개발비용이 고가이며, 발현율을 인위적으로 조절하지 못하는데 있다. 그러나 이러한 방법은 다음의 방법에 의하여 개량가능하다. 즉 정자 매개에 의한 유전자 전이법의 개발은 경비를 1/100정도 절감가능하다.



제 2 절 앞으로의 전망

1. 생명공학 관련 세계시장규모

| 제 품 명 | | 1994 미국 매출액 | 2004 미국 예상 매출액 | 2004 세계 예상 매출 |
|--------|-----------------------|----------------|-------------------|------------------|
| 순환계 치료 | EPO (조혈 촉진) | 1.14 | 7.44 | 22.32 |
| | tPA (혈전증 치료) | 0.21 | 1.01 | 3.03 |
| 암 치료 | CSFs(백혈구 증식 촉진) | 0.7 | 6.20 | 18.60 |
| | Interferon(암 치료) | 0.67 | 6.76 | 20.28 |
| | Interleukins(암 치료) | 0.3 | 1.90 | 5.7 |
| 호르몬류 | hGH(성장 촉진제) | 0.19 | 1.22 | 3.66 |
| | Other Growth factors | 0 | 0.36 | 1.08 |
| | Human Insulin(당뇨병 치료) | 0.48 | 2.35 | 7.05 |
| 백신류 | AIDS(선천성면역결핍증) | 0 | 2.16 | 6.48 |
| | Hepatitis(B형간염) | 0.52 | 3.00 | 9.00 |
| 락토파린 | (항균제, 조제분유첨가제) | 4.00 | 6.00 | 18.00 |
| 합 계 | | 8.21 | 38.40 | 115.20 |

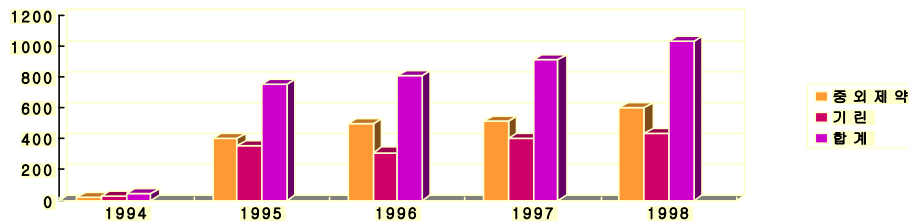
2. 빈혈치료제인 EPO의 세계 및 국내 예측 규모는 다음과 같다.

| 구 분 | 현재의 시장규모 | 예상되는 시장규모 |
|-------------|----------|-------------------|
| 세 계 시 장 규 모 | 20,000억원 | (2003년) 60,000 억원 |
| 한 국 시 장 규 모 | 500억원 | (2003년) 1000 억원 |

▷ 지난 5년간 EPO의 미국내 판매실적은 다음과 같다.

| 구 분 | '92 | '93 | '94 | '95 | '96 |
|-------|--------|--------|--------|--------|---------|
| 판 매 액 | \$ 506 | \$ 587 | \$ 721 | \$ 883 | \$ 1072 |
| 판 매 율 | 24% | 16% | 23% | 22% | 21% |

▷ 지난 5년간 일본내 EPO 시장규모는 다음과 같다.



제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제1절 방광특이적 프로모터 유전자의 크로닝 및 최적의 발현벡터 구축

1. 돼지방광특이적 유전자의 크로닝 및 발현분석

가. 방광특이적 발현 probe 유전자의 크로닝

방광특이적 유전자의 크로닝을 위하여 기존의 밝혀진 유전자를 토대로 돼지 degenerative primer의 작성에 이용한 primer와 그 RT-PCR산물은 아래와 같다. 이들 유전자 배열은 sequencing 결정후 Genbank에 등록되었다.

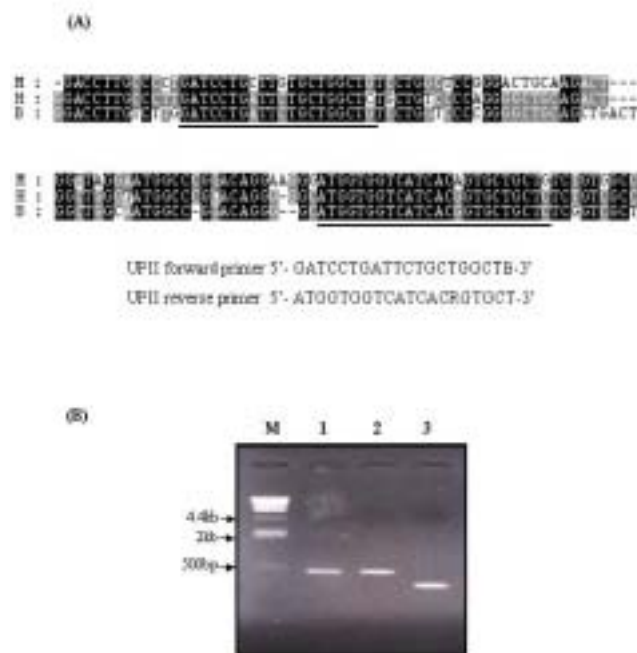


Figure 1. degenerated primer for UPs cloning and RT-PCR

AGCAAGAGTGCTGCGGCACGTCAGGTCCCATGGACTGGGTGAACTTCACATCG
 GCCTTCCGGGCCTCCACCCCGGAGGTGGTGTTCCTGGCCGCCACTGTGCTGT
 CGACGGACTGGCAACTTCATCCCCGTCAATGAAGAGGGCTGCCGCCTGGGCCA
 CATGGACTACCTGTTACCAAATCACTAGT

라. 돼지 UPIII 유전자의 크로닝

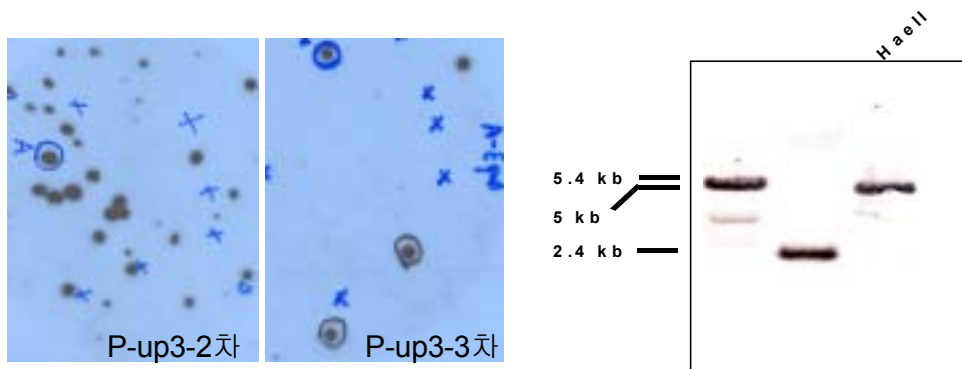


Figure 3. colony hybridization and southern blot of promoter region

상단의 그림은 돼지 library로부터 pig UPIII partial cDNA을 이용하여 분리한 genomic DNA의 colony hybridization을 나타내고 있다. 이들 colony hybridization으로부터 분리한 library DNA을 이용하여 약 5.4kb의 UPII promoter 유전자 단편이 분리동정되었으며, 현재 특허등록 관계로 이 부분에 대한 유전자 배열은 생략함. UPIII partial cDNA 유전자의 크로닝된 배열은 아래와 같으며, 이들 유전자는 Genbank에 등록되었다.

TTTGACCTGATCCCTTGTGGTGACCTGCCAGCCTGGATGCCGTCAGGGAT
 GTGTCCAGGCCTCGGAGATCCTGAATGCATACCTGGTCAGGGTGGGCATCAA
 TGGGACCTGCCTGTCTGACCCCAACTTCCGGGGCCTCTGCAACCCACCCCTGTC
 AGCAGCTACGGAGTACAGGTTCAAGTACGTCCTGGTCACAAT


```

Bovine upI : MASFPVWTLISWLLILLAVLVFCAAADFNISLSGLLSFVMTESLLVALPPCHLTGNNATITVRRANDSKVIR : 73
Human upII : MAPLPPIRITLPTLLILLALLSFC-AADFNISLSGLLSFALTESLLVALPPCHLTGNNATIMVRRANDSKVIT : 72
Mouse upII : MASTIPVQTLPTLLILLAVLAFCAADFNISLSGLLSFALTESLLIALPPCHLTGNNATIMVRRANDSKVIR : 72
Pig upII : MASPLPVRTLPTLLILLAVLILGL---QENIZAFSGLLSFALTGSLLVALPPVTSQGVTFHZWSGEPPTQWZNL : 70
      MAs 1P6 TLplILILLA L pg adFNIss1SGLLSPa6TeSLl6ALPPchltGgnatl vrrandskvv

      80          *          100          *          120          *          140
Bovine upI : SSFVVPPCRGRRELVSVDSCSGFTVTRLsAYQVTNLAPGTRKYIISYLVTKGASTEESREIPMSTLPRRKAES : 146
Human upII : SSFVVPPCRGRRELVSVDSCAGFTVTRLsAYQVTNLVPGTKFYISYLVKKGATATESREIPMSTLPRRNMES : 145
Mouse upII : SDFVVPPCRGRRELVSVDSCSGYTVTRLsAYQVTNLVPGTKYIISYLVKKGATESREIPMSTLPRRNMES : 145
Pig upII : AATCCHWTQAGSCS---GQVWVWLHSHRLsAYQVTNLVPGTKYHLLP-SDKGIATESREIPMSTLPRKPE--GG : 137
      ss5v6ppcrGrrElvsvvdsg g tvtrLSAYQVTNL PGTK5y6sy v KG TESSrEiPMSTlP4 es

      *          160          *          180
Bovine upI : IGLMARTGGMVVITVLLSVAMFLVLGLIITAIALGARK : 185
Human upII : IGLMARTGGMVVITVLLSVAMFLVLGLIITAIALGSRK : 184
Mouse upII : IGLMARTGGMVVITVLLSVAMFLVLGLIITAIALHWDARK : 184
Pig upII : SGLMARTGGIVVITVLLSPCSCWWWASSLPWHVPEV : 176
      iGLMARTGG6VVITVLLSvamfllv g i6al rk

```

Figure 5. Comparison of UPIIs amino acid.

1

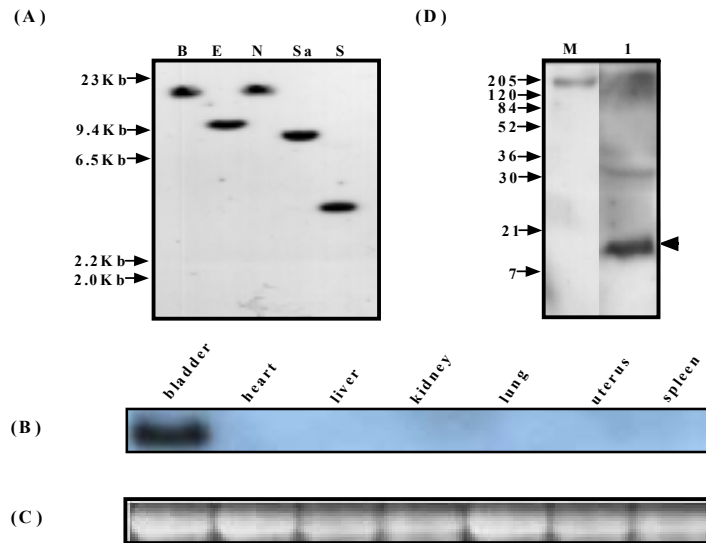


Figure 6. Determination of the porcine UPII gene copy number and tissue-specific expression.

사. 돼지 UPII발현의 localization과 발현을 및 발현세포의 결정

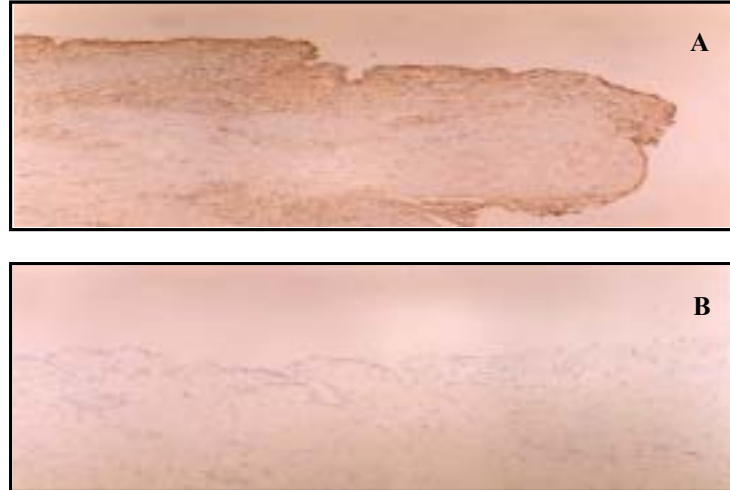


Figure 7. Localization of the porcine UPII gene expression in porcine bladder by immunohistochemistry

UPII 유전자는 방광조직내에서도 방광상피세포에서만 발현되는 것으로 확인되었다. 그러나, 방광 상피세포의 경우는 유선조직과는 달리 왕성한 단백질 합성능력이 없기때문에, 이들 조직을 바이오리액트로 사용하기 위해서는 UPII발현하는 세포수가 매우 중요하다.

따라서, 방광내에서 UP을 발현하는 능력을 UPII antibody을 polypeptide를 합성하여 carrier protein에 융합한후 토끼에 주입하여 polyclonal antibody 생산한 후, 이들 항체를 이용하여 세포에 labeling 한후 LSC을 이용하여 분석한 결과는 아래 그림과 같다. 즉 UPII는 전체 방광세포에서 8-14%정도로 발현되었으며, 이중 unbellar 세포에서 특이적으로 발현된 것이 확인되었다. 일반적으로 뇨의 경우 신장이상이 없을 경우 저단백이다. 일반적으로, 생쥐의 뇨내의 단백질이 보통 5-25mg/1 liter인 것을 감안하면, 최소한 고가의 생리활성물질을 방광에서 분리 정제하는 것은 유선 조직보다는 더 손쉬울 것으로 사료된다.

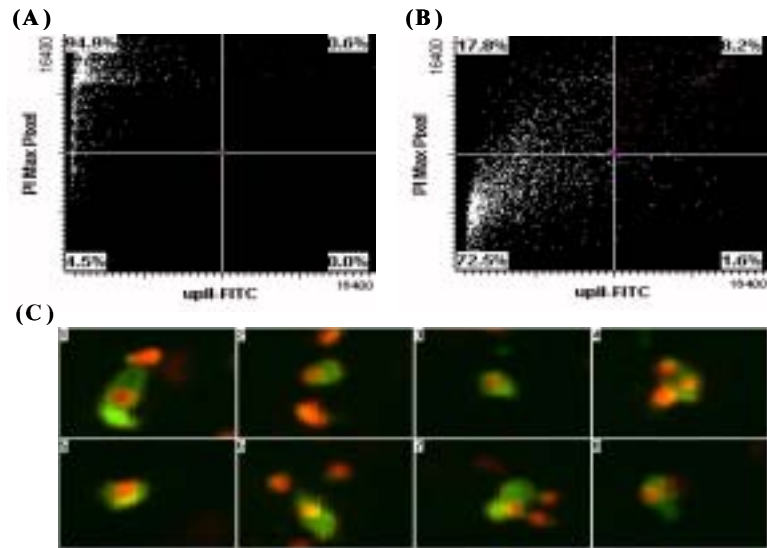


Figure 8. Identification of cell types expression UPII gene and LSC analysis.

2. 최적의 발현벡터 구축

가. 유선(mammary gland)에서 EPO를 분비하는 최적의 벡터 구축

1). EPO 발현량을 증가 시키기 위한 WPRE 유전자의 클로닝

WPRE (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element)는 mRNA의 안정화에 기여하여 결국 단백질 합성을 증대시키는데 관여한다고 보고된 조절인자이다. WPRE 조절인자를 EPO 바로 뒤에 연결하여 EPO가 전사(transcription)될 때 함께 mRNA가 만들어 지도록 하기 위해 앞서 구축된 pBC1-hEPO 벡터에 삽입하였다. 삽입은 pBC1-hEPO의 Xho1 제한효소 위치에 WPRE 0.6 kb를 forward primer

5'-ACCAGGTTCTGTTTCCTGTTAATCAACCTC-3'와 reverse primer

5'-CTCGAGGAGCCCGAGGCGAAACAGGCG-3' 이용하여 0.6 kb PCR product를

증폭하였고 pGEM T-easy vector에 clone하였다. Clone된 0.6 kb WPRE는 SalI과 XhoI 제한효소로 절단하여 insert 부위를 준비하였고 vector는 pBC1-hEPO의 XhoI 제한효소로 절단하여 준비하였다. 이 두 부위를 ligation를 하여 23975 bp인 pBC1-hEPO-WPRE vector를 구축하였다.

ACCAGGTTCTGTTTCCTGTTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGA
 TTGACTGGTATTCTTAACCTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTG
 CTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTC
 CTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTT
 GTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGG
 TTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCGGGACTTTCGCTTTCCCC
 TCCCTATTGCCACGGCGGAACCTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACA
 GGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCGGTGGTGTGTCGGGGAAGCTGAC
 GTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGT
 CCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCC GCGGCC
 TGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTC
 GGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGTTTCGCCTCGGGCTCCTCGAG

Cloning of WPRE 0.6 kb sequence using PCR with forward primer
 5'-ACCAGGTTCTGTTTCCTGTTAATCAACCTC-3'와 reverse primer
 5'-CTCGAGGAGCCC GAGGCGAAACAGGCG-3'

Table 1. Primer sequence for EpBC1-hEPO expression vector construction

| Name | Sequence | Product size |
|--------|---------------------------------------|--------------|
| WPRE-F | 5'-ACCAGGTTCTGTTTCCTGTTAATCAACCTC-3' | 0.6 kb |
| WPRE-R | 5'-CTCGAGGAGCCCGAGGCGAAACAGGCG-3' | |
| neo-F | 5'-GCGGCCGCGCGCGTCAGGTGGCAC-3' | 1.9 kb |
| neo-R | 5'-CGATCGGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTC-3' | |

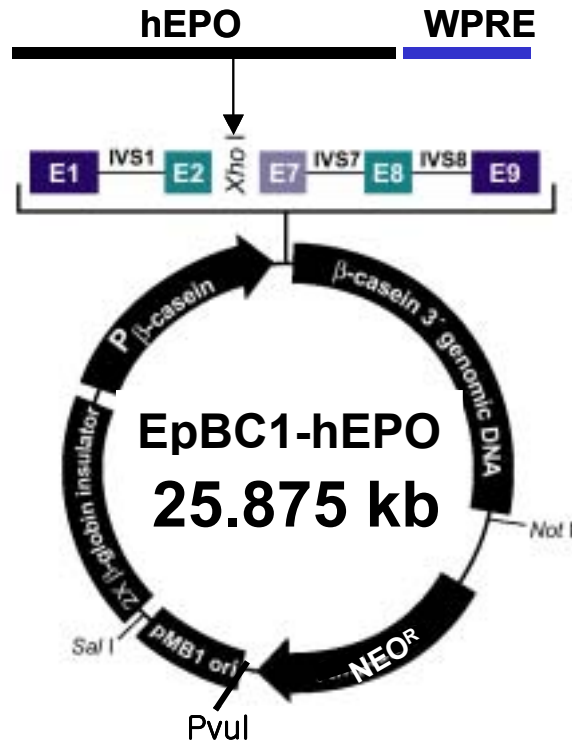


Figure 9. EpBC1-hEPO expression vector map for human erythropoietin (EPO) which regulated by β -casein promoter. A post transcriptional regulatory element derived from the wood-chuck hepatitis virus (WPRE) was inserted downstream of hEPO gene, generating the EpBC1-hEPO expression vector.

2) 효율적인 cell line 구축을 위한 neo 유전자의 클로닝

유전 특이적 프로모터인 베타 casein의 조절하에 EPO 생산을 극대화할 수 있는 vector만을 가진 cell들을 효과적으로 선택하기 위해 neo 유전자(neomycin-resistance gene)를 clone하였다. G418 drug에 저항할수 있는 neo' 유전자는 5'-GCGGCCGCGCGTCAGGTGGCAC-3'와 reverse primer인 5'-CGATCGGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTC-3' 이용하여 1.9 kb PCR product를 증폭한후 pGEM T-easy vector에 clone하였다. Clone된 1.9 kb neo 유전자는 NotI과 PvuI 제한효소로 절단하여 insert 부위를 준비하였고 pBC1-hEPO-WPRE vector의 amp' 유전자 (ampicillin-resistance gene) 부위를 NotI과 PvuI 제한효소로 절단하여 제거한후 vector 부위를 준비하였다. 이렇게 준비된 두 부위를 ligation를 통해 WPRE 조절인자와 neo 유전자(neomycin-resistance gene)가 기존에 구축된 pBC1-hEPO vector에 삽입된 EpBC1-hEPO (Enhanced pBC1-hEPO) 벡터를 구축하였다. EpBC1-hEPO는 WPRE 조절인자의 도입으로 EPO 단백질 합성이 매우 증가되리라 사료된다. 또한 neo' 유전자의 삽입은 cell line 구축에 매우 효율적인 선택적 표시 유전자로 활용되리라 사료된다.

```
GCGGCCGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTA
TTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAAT
AACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTCCTGAGGCGG
AAAGAACCAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGC
TCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA
GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCA
TCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCC
TAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTT
ATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTG
AGGAGGCTTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAGATCGATCAAGAGACAGG
ATGAGGATCGTTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCG
GCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCG
GCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGTTCTT
TTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGC
GCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACG
TTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCA
GGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTG
ATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTCGACCAC
CAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTIONCGGATGGAAGCCGGTCTTG
TCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTG
TTCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGTGACCCA
```

TGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGA
TTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTT
GGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCC
TCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGC
CTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCA
AGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGATTTTCGATTCCACCGCCGCTTCTATG
AAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAG
CGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCACCCTAGGGGGAGGCTAACTGA
AACACGGAAGGAGACAATAACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAA
AGACAGAATAAAACGCACGGTGTGGGTCGTTTGTTTCATAAACGCGGGGTTTC
GGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGAGACCCCATTTGGGGCCAA
TACGCCC GCGTTTCTTCCTTTTCCCCACCCCAAGTTCGGGTGAAGG
CCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCCTCAGGTT
ACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTTAATTTAAAAGGA
TCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGA
GTTTTCGTTCCACTGAGCGTCCGATCG

Cloning of NEO^R 1.9 kb sequence using PCR with forward primer
5'-GCGGCCGCGCGC TCAGGTGGCAC-3' and reverse primer
5'-CGATCGGACGCTCAGTGGAACGAAAATC-3'

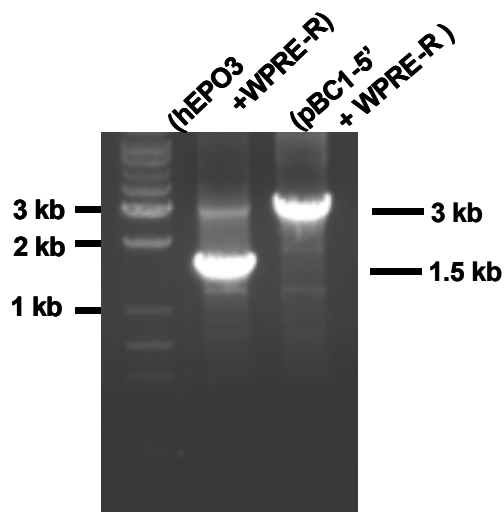
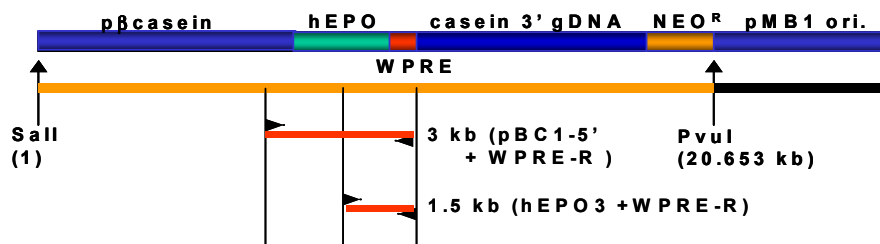


Figure 10. EpBC1-hEPO expression vector and the strategy of PCR analysis for the detection of transgene by using hEPO3 and WPRE-R or pBC1-5' and WPRE-R primer.

나. 방광(bladder)에서 EPO를 분비하는 최적의 벡터 구축

1) 효율적인 cell line 구축을 위한 neo 유전자의 클로닝

방광 특이적 프로모터인 UroplakinII의 조절하에 EPO 생산을 극대화할 수 있는 vector만을 가진 cell들을 효과적으로 선택하기 위해 neo 유전자(neomycin-resistance gene)를 clone하였다.

G418 drug에 저항할수 있는 neo' 유전자는

5'-GCGGCCGCGCGCGTCAGGTGGCAC-3'와 reverse primer인

5'-CGATCGGACGCTCAGTGGAACGAAACTC-3' 이용하여 1.9 kb PCR product를 증폭한후 pGEM T-easy vector에 clone하였다. Clone된 1.9 kb neo 유전자는 NotI 제한효소로 절단하여 insert 부위를 준비하였고 pUPII/hEPO vector의 amp' 유전자(ampicillin-resistance gene) 부위를 NotI과 SalI 제한효소로 절단하여 제거한후 vector 부위를 준비하였다. 이렇게 준비된 두 부위를 ligation를 통해 neo 유전자(neomycin-resistance gene)가 기존에 구축된 pUPII/hEPO vector에 삽입된 pUPII/hEPO-Neo 벡터를 구축하였다. 이러한 neo' 유전자의 삽입은 cell line 구축에 매우 효율적인 선택적 표시 유전자로 활용되리라 사료된다. Neomycin의 sequence는 앞에서 보고 된바와 같다.

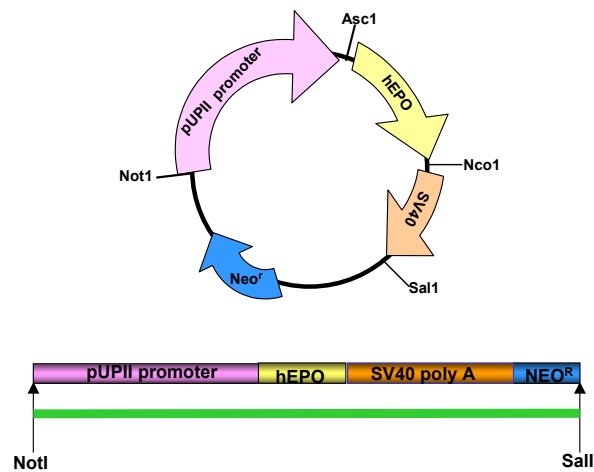


Figure 11. UPII/hEPO-Neo expression vector map for human erythropoietin (EPO) which regulated by porcine UPII promoter.

2) EPO 발현량을 증가 시키기 위한 WPRE 유전자의 클로닝

WPRE (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element)는 mRNA의 안정화에 기여하여 결국 단백질 합성을 증대시키는데 관여한다고 보고된 조절인자이다. WPRE 조절인자를 EPO 바로 뒤에 연결하여 EPO가 전사 (transcription)될 때 함께 mRNA가 만들어 지도록 하기 위해 앞서 구축된 pUPII/hEPO-Neo 벡터에 삽입하였다.

WPRE gene 0.6 kb를 forward primer

5'-ACCAGGTTCTGTTCCTGTTAATCAACCTC-3'와 reverse primer

5'-CTCGAGGAGCCCAGGCGAAACAGGCG-3' 이용하여 0.6 kb PCR product를 증폭하였고 pGEM T-easy vector에 clone하였다.

삽입은 pUPII/hEPO-Neo의 NcoI 제한효소 위치에 Clone된 0.6 kb WPRE는 BspHI 제한효소로 절단하여 insert 부위를 준비하였고 vector는 pBC1-hEPO의 XhoI 제한효소로 절단하여 준비하였다. 이 두 부위를 ligation를 하여 pUPII/hEPO(WPRE)-Neo vector를 구축하였다.

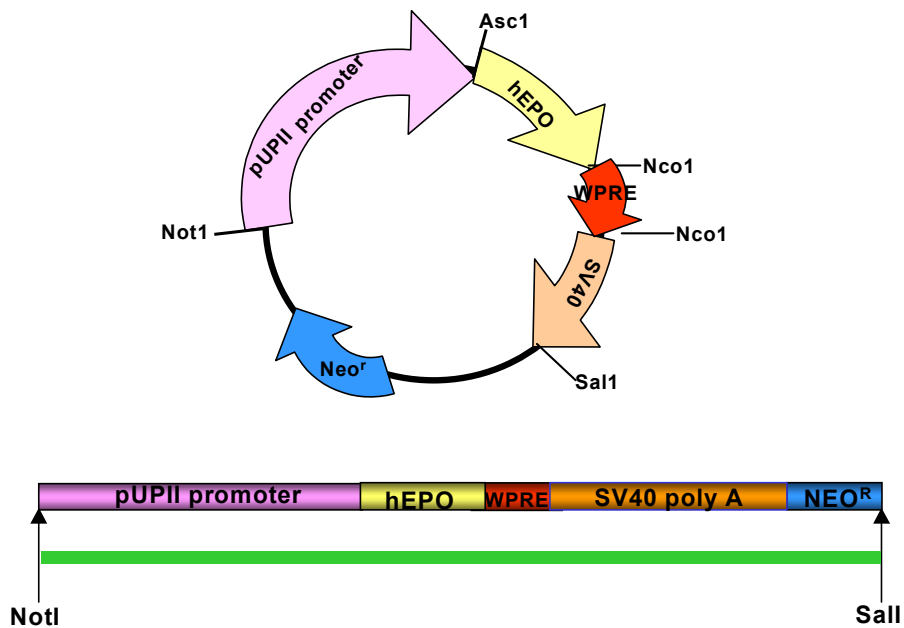


Figure 12. pUPII/hEPO(WPRE)-Neo expression vector map for human erythropoietin (EPO) which regulated by porcine UPII promoter.

3) EPO의 발현을 안정되게 하기 위한 insulator 유전자의 클로닝
 insulator는 프로모터에 가까이 존재하는 조절인자의 영향과 position-independent한 발현을 도와주는 인자로 Chicken의 B-globin에서 분리하여 그 효율을 높이기 위해 2copy를 증폭하여 기존에 구축되어진 pUPII/hEPO-Neo vector에 삽입하였다.
 다음은 insulator 유전자로 유전자 배열은 다음과 같다.

```
TCGACTCTAGAGGGACAGCCCCCCCCAAAGCCCCCAGGGATGTAATTACGTC
CCTCCCCCGCTAGGGGCAGCAGCGAGCCGCCGGGGCTCCGCTCCGGTCCGGCG
CTCCCCCGCATCCCCGAGCCGGCAGCGTGCGGGGACAGCCCGGGCACGGGGAA
GGTGGCACGGGATCGCTTTCCTCTGAACGCTTCTCGCTGCTCTTTGAGCCTGC
AGACACCTGGGGGGATACGGGGAAAAAGCTTTAGGCTGAAAGAGAGATTTAG
AATGACAGAATCATAGAACGGCCTGGGTTGCAAAGGAGCACAGTGCTCATCC
AGATCCAACCCCCTGCTATGTGCAGGGTCATCAACCAGCAGCCCAGGCTGCCC
AGAGCCACATCCAGCCTGGCCTTGAATGCCTGCAGGGATGGGGCATCCACAGC
CTCCTTGGGCAACCTGTTTCAGTGCGTCACCACCCTCTGGGGGAAAAACTGCCT
CCTCATATCCAACCCAAACCTCCCCTGTCTCAGTGTAAGCCATTCCCCCTTG
TCCTATCAAGGGGGAGTTTGCTGTGACATTGTTGGTCTGGGGTGACACATGT
TTGCCAATTCAGTGATCACGGAGAGGCAGATCTTGGGGATAAGGAAGTGCA
GGACAGCATGGACGTGGGACATGCAGGTGTTGAGGGCTCTGGGACACTCTCC
AAGTCACAGCGTTCAGAACAGCCTTAAGGATAAGAAGATAGGATAGAAGGAC
AAAGAGCAAGTTAAAACCCAGCATGGAGAGGAGCACAAAAAGGCCACAGACA
CTGCTGGTCCCTGTGTCTGAGCCTGCATGTTTGATGGTGTCTGGATGCAAGC
AGAAGGGGTGGAAGAGCTTGCCTGGAGAGATACAGCTGGGTGAGTAGGACTG
GGACAGGCAGCTGGAGAATTGCCATGTAGATGTTTCATACAATCGTCAAATCA
TGAAGGCTGGAAGCCTCCAAGATCCCCAAGACCAACCCCAACCCACCCACCG
TGCCCACTGGCCATGTCCCTCAGTGCCACATCCCCACAGTTCTTCATCACCTC
CAGGGACGGTGACCCCCCACCTCCGTGGGCAGCTGTGCCACTGCAGCACCGCT
CTTTGGAGAAGGTAATCTTGCTAAATCCAGCCCGACCCTCCCCTGGCACAAC
GTAAGGCCATTATCTCTCATCCAACCTCCAGGACGGAGTCAGTGAGGATGGGG
CTCTAGAGGGACAGCCCCCCCCAAAGCCCCCAGGGATGTAATTACGTCCCTC
CCCCGCTAGGGGCAGCAGCGAGCCGCCGGGGCTCCGCTCCGGTCCGGCGCTCC
CCCCGCATCCCCGAGCCGGCAGCGTGCGGGGACAGCCCGGGCACGGGGAAGGTG
GCACGGGATCGCTTTCCTCTGAACGCTTCTCGCTGCTCTTTGAGCCTGCAGAC
ACCTGGGGGGATACGGGGAAAAAGCTTTAGGCTGAAAGAGAGATTTAGAATG
ACAGAATCATAGAACGGCCTGGGTTGCAAAGGAGCACAGTGCTCATCCAGAT
CCAACCCCCTGCTATGTGCAGGGTCATCAACCAGCAGCCCAGGCTGCCAGAG
CCACATCCAGCCTGGCCTTGAATGCCTGCAGGGATGGGGCATCCACAGCCTCC
```

TTGGGCAACCTGTTTCAGTGCCTCACCACCCTCTGGGGGAAAAACTGCCTCCTC
 ATATCCAACCCAAACCTCCCCTGTCTCAGTGTAAAGCCATTCCCCCTTGTCCT
 ATCAAGGGGGAGTTTGTCTGTGACATTGTTGGTCTGGGGTGACACATGTTTGC
 CAATTCAGTGCATCACGGAGAGGCAGATCTTGGGGATAAGGAAGTGCAGGAC
 AGCATGGACGTGGGACATGCAGGTGTTGAGGGCTCTGGGACACTCTCCAAGT
 CACAGCGTTCAGAACAGCCTTAAGGATAAGAAGATAGGATAGAAGGACAAA
 GAGCAAGTTAAAACCCAGCATGGAGAGGAGCACAAAAAGGCCACAGACACTG
 CTGGTCCCCTGTGTCTGAGCCTGCATGTTTGATGGTGTCTGGATGCAAGCAGA
 AGGGGTCCATGTCCCTCAGTGCCACATCCCCACAGTTCTTCATCACCTCCAGG
 GACGGTGACCCCCCACCTCCGTGGGCAGCTGTGCCACTGCAGCACCGCTCTTT
 GGAGAAGGTAAATCTTGCTAAATCCAGCCCGACCCTCCCCTGGCACAACGTAA
 GGCCATTATCTCTCATCCAACCTCCAGGAACGGAGTCAGTGAG

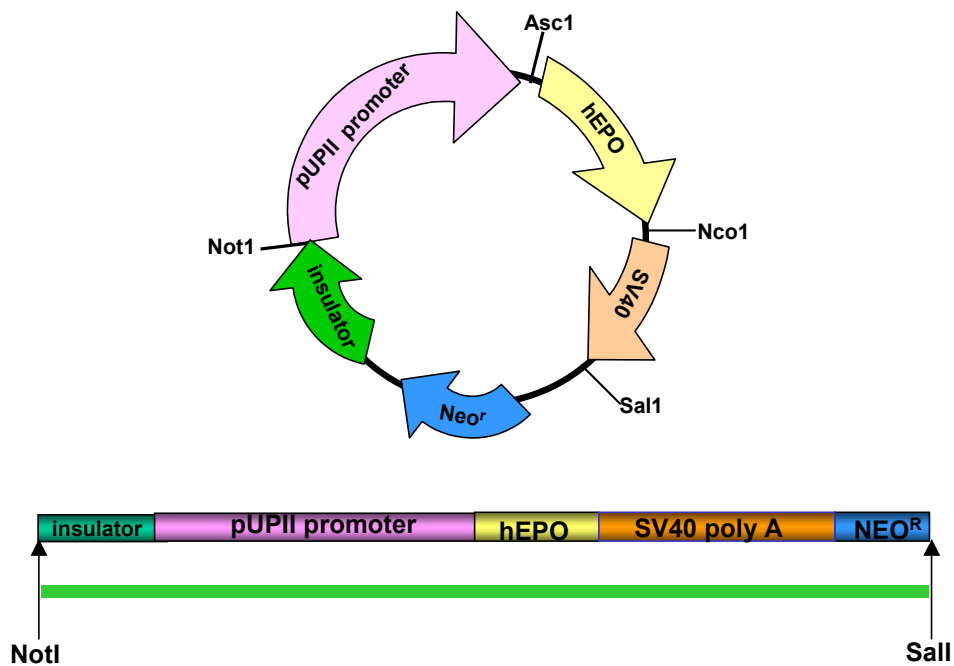


Figure 13. Insulator-pUPII/hEPO-Neo expression vector map for human erythropoietin (EPO) which regulated by porcine UPII promoter.

4) EPO를 분비하는 최적의 발현벡터

본 벡터는 기존의 벡터들을 조합하여 발현량의 극대화와 효율적인 cell line 구축을 동시에 꾀하는 최적의 발현벡터로 사료되어진다.

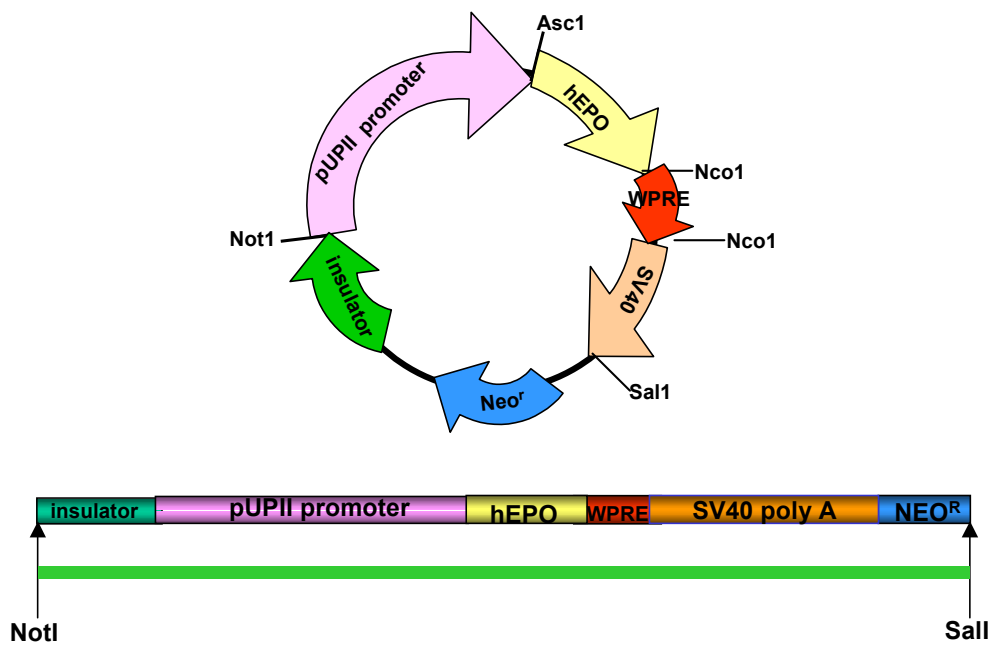


Figure 14. Insulator-pUPII/hEPO(WPRE)-Neo expression vector map for human erythropoietin (EPO) which regulated by porcine UPII promoter.

제2절 ICSI에 의한 형질전환 돼지 생산

1. 돼지 체외성숙 난포란의 Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI)에 의한 후기배로의 발달에 관한 연구

가축을 포함한 여러 동물에 있어서 세포질내정자주입법(Intracytoplasmic sperm injection, ICSI)에 의한 산자 생산을 위한 연구가 rabbit(Hosoi 등, 1988), murine(Kimura와 Yanagimachi, 1995; Perry 등, 1999), ovine(Catt 등, 1996), equine(Grondahl 등, 1997), bovine(Hamano 등, 1999) 및 monkey(Chan 등, 2000) 등에서 활발하게 진행되어 왔으며, 최근에 돼지에서 체내성숙 난자를 이용하여 세포질내정자주입법에 의한 최초의 산자 생산을 보고하였다(Martin, 2000).

그러나, 난포란을 이용한 세포질내정자주입법에 있어서 나타나는 문제점 중 하나는 유제류에 있어서 사용된 체외성숙 난포란은 난구세포 제거후에도 세포질내에 존재하는 지방과립층이 두터워 정자의 주입여부를 정확히 확인하기가 어렵다는 점이다. 따라서 이를 해결하기 위하여 난포란을 원심분리 시키는 방법이 몇몇 가축에서 보고되었다(Wall 등, 1985; Nagashima 등, 1994; Tatham 등 1995, 1996; Kim 등, 1998; Rho 등, 1998). 이러한 원심분리는 체외성숙후 난구세포가 제거된 난포란을 원심분리 시키면 ICSI에 있어서의 편리를 도모할 수 있을 뿐만 아니라 주입된 정자의 관찰을 용이하게 하여 정확성을 높일 수 있고, 주입시 사용하는 배양액의 난포란내 진입을 최소화 할 수 있을 뿐만 아니라, 후기배로의 발달율에 있어서도 유해한 효과를 나타내지 않는다고 보고하였다(Kim 등, 1998; Rho 등, 1998; Martin, 2000).

또한 ICSI를 하기 전에 사용할 정자를 5 mM DTT에 처리하여 침체반응을 유기한 다음 세포질내에 주입을 하면 응성전핵형성율이 높아진다고 보고하였다(Perreault 등, 1988; Rho 등, 1998). 또한 포유동물의 정자에 DTT를 처리하였을 때 정자의 침체와 중편부 그리고 머리부분에서의 형태학적 변화를 나타낸다고 하였다(Calvin 등, 1971; Olson 등, 1976; 1997; Rho 등 1998). 이러한 DTT처리 후 일련의 정자변화는 응성전핵의 형성과 함께 수정율과 후기배로의 발달율에도 영향을 미친다고 하였다(Martin, 2000).

따라서 본 연구에서는 ICSI에 의한 돼지 체외수정란의 생산효율을 높이고자, ICSI에 사용되는 돼지 체외성숙 난포란의 원심분리에 의한 효과, 세포질내에 주입하는 정

자의 DTT 전처리 효과, 체외성숙 난포란의 체외수정시 주로 사용되는 IVF방법과 ICSI방법 사용에 따른 수정율과 후기배로의 발달율을 조사 그리고 IVF방법과 ICSI방법에 의해 발달한 배반포기배의 할구수를 조사하였다.

2. 외래유전자 도입정자를 이용한 돼지 체외성숙 난포란의 Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) 후 후기배로의 발달율과 외래유전자의 발현에 관한 연구

형질전환동물을 생산하기 위하여 사용한 일반적인 방법으로는 pronuclear injection (Hammer 등, 1985), retroviral vector (Kim 등, 1993), sperm vector (Spadafora, 1998; Huguet와 Esponda, 1998; Kim 등, 1997; Lavitrano 등, 1989) 그리고 somatic cell nuclear transfer (Cibelli 등, 1998; Schnieke 등, 1997) 등이 있으며, 이 중 형질전환동물 생산에 있어서 쉽게 이용할 수 있는 방법중의 하나로 sperm-mediated gene transfer 방법이 개발되었다. 모든 종의 sperm cells은 단백질과 DNA를 binding하는 성질을 갖고 있어(Lavitrano 등, 1989; Brackett 등, 1971), 정자를 외래유전자를 매개하는 vector로 사용하여 정상 체외수정이나 ICSI (intracytoplasmic sperm injection, 세포질내정자주입법)를 통하여 난자에 도입하는 것이 가능하기 때문이다. 정자에 외래유전자를 binding하기 위한 방법으로는 liposome처리법(Bachiller 등, 1991), electroporation법(Horan 등, 1992; Gagne 등, 1991), Triton X-100처리법(Kurataka 등, 1996), freeze-thawing법(Wakayama 등, 1998), Freeze-dry법(Wakayama와 Yanagimachi, 1998) 및 sperm/DNA 공배양법 (Chan 등, 2000b; Lavitrano 등, 1989) 등이 주로 이용되고 있다.

Perry 등(1999)은 mouse에서 정자와 외래유전자를 각각 Triton X-100 처리법(Kuretake 등, 1996), freeze-thawing 처리법(Wakayama 등, 1998) 및 Freeze-dry 처리법(Wakayama와 Yanagimachi, 1998)으로 준비한 후 ICSI를 통해 각각 6마리, 2마리, 3마리의 형질전환 mouse생산에 성공하였다. 그러나, Chan 등(2000b)은 Rhesus monkey를 이용하여 sperm/DNA co-incubation 처리법으로 외래유전자를 흡착(binding)한 정자를 ICSI에 의한 방법으로 산자생산에는 성공하였으나, 외래유전자의 발현은 단지 체외수정란 상태에서만 발현되었고, 생산된 산자에서는 발현되지 않았다고 보고하였다.

최근 돼지에서는 체외성숙 난자를 이용하여 ICSI를 통한 체외수정란의 발달율을

보고하였고(Di Bernardino 등, 2001; Lee 등, 2001; Kolbe와 Holtz, 1999; Kim 등, 1998, 1999), Kolbe와 Holtz (2000) 그리고 Matrin (2000)은 체내성숙 난자를 이용한 ICSI후 체외수정란을 이식하여 산자생산에 성공하였다고 보고하였다. 그러나, 지금까지 체외에서 성숙된 난자를 이용하여 ICSI에 의한 산자생산과 sperm-mediated gene transfer에 의한 ICSI후 산자를 생산하였다는 보고는 없었다.

따라서 본 연구는 sperm-mediated gene transfer를 이용하여 ICSI에 의한 형질전환동물생산의 기초자료로서 활용하기 위하여, ICSI에 사용할 정자를 electroporation 처리법(Gagne 등, 1991)으로 외래유전자(Reporting-encoding DNA, pcDNA Lac)를 도입하여 ICSI을 실시하였으며, ICSI 후 추가 전기자극을 통한 난자의 활성화를 유도함으로써 수정율 및 후기배로의 발달율을 향상시키고, 그에 따른 외래유전자의 발현 여부를 조사하기 위하여 X-Gal 염색을 실시하였다.

3. 재료 및 방법

가. 배양액

난포란의 체외성숙에 사용한 배양액은 NCSU 23을 기본배양액으로 하여 Baxter (Baxter Healthcare Co., U.S.A.)의 물 1ℓ로 제조하여 0.2 μm filter (Gelman Sci., U.S.A.)로 여과한 후 pH 7.2~7.3으로 조정하여 50 ml tissue culture flask (Falcon, U.S.A.)에 45 ml씩 분주하여 4℃의 냉장고에 보관하면서 약 2 주간 사용하였다. 체외성숙용 배양액은 NCSU 23 배양액에 10% 난포액, 0.1 mg/ml cysteine, 0.01 μg/ml EGF, 10 IU/ml eCG 그리고 10 IU/ml hCG를 첨가하여 제조하였다. 체외배양액은 NCSU 23 배양액에 0.4% BSA를 첨가하여 사용하였다. 돼지 난포액은 2~7 mm 크기의 난포에서 난포액을 채취하여 1,900 x g로 3회 원심분리하고, 최종 0.2 μm 필터로 거른 후 -20℃ 냉장고에 보관하여 사용하였다.

나. 난포란의 채란

본 실험에 공시된 난소는 도축장에서 도살직후 난소를 적출하여 penicillin G (100 units/ml)와 streptomycin (100 μg/ml)이 함유된 생리식염수(30~35℃)가 들어있는 보온병에 담아 3~4시간 내에 실험실로 운반하였고, 미성숙 난포란을 채란하기 전 난소 주위의 지방과 결합조직을 제거하고, 생리식염수로 3~4회 세척한 후, 18-G needle이

부착된 20 ml 주사기를 이용하여 2~7 mm의 가시난포를 흡입하여 난포란을 채란하였다. 난포란의 채취시 사용된 배양액은 0.1 mg/ml PVA가 첨가된 TALP-HEPES (Prather 등, 1995)를 사용하였다. 흡입된 난포액은 5~10 분간 정치시킨 후 침전된 하부액을 5 ml의 피펫으로 흡입하여 직경 60 mm 배양접시에 옮겨 40X 배율의 도립현미경(Olympus Co., Japan)에서 난포란을 수집한 후 체외성숙용 기본배양액 NCSU 23으로 4~5회 세척하면서 선발하였다. 난포란의 선발은 난구세포의 부착 정도와 세포질의 충실도에 따라 실시하였으며, 최소한 2층 이상의 난구세포층으로 되어 있고, 세포질이 균일하고 충실한 것을 선발하여 실험에 공시하였다.

다. 난포란의 체외성숙

난포란의 체외성숙은 체외성숙용 배양액을 35 mm dish (Nunc, Denmark)에 100 μ l 씩 drop 분주하여 18 시간 이상 전 배양을 실시하여 평형을 유도한 다음, 체외성숙용 배양액에 난구세포가 2층 이상이고 세포질이 충실한 15~20 개의 난포란을 넣고 5% CO₂, 98~99% 습도, 39°C CO₂ incubator에서 20~22시간 동안 호르몬이 첨가된 체외성숙용 배양액에서 배양하고, 다음 20~22시간은 호르몬이 첨가되지 않은 배양액에서 배양하여 총 40~44시간 동안 배양하였다.

라. 정자의 준비

정자의 준비는 신선정자를 이용하여 Swim-up방법으로 2.5 mM caffeine과 0.4% bovine serum albumin (BSA)이 첨가된 modified Tris-buffered medium으로 활력이 높은 정자를 채취하기 위하여 5% CO₂, 98~99% 습도, 39°C CO₂ incubator에서 실시하였다. Swim-up의 유도는 15 ml conical plastic tube에 농후정자와 체외수정용 배양액이 층을 이루도록 하기 위해서 tube의 아래층에 정자를 넣고 그 위의 층에 modified Tris-buffered medium을 섞이지 않도록 조심스럽게 분주한 후 45°의 각도로 눕혀서 1 시간 동안 활력 정자의 부유를 유도하였다. Swim-up을 유도하여 부유된 상층액의 정자를 채취한 후 500×g에서 2회 5 분간 원심분리하여 정자를 세척하였다.

ICSI에 이용할 일부 정자는 Rho 등(1998)의 방법에 따라 5 mM dithiothreitol (DTT)에서 1시간 동안 침체반응을 유도하였다.

마. 난포란의 체외수정

체외수정은 체외성숙된 난포란을 2.5 mM caffeine과 0.4% BSA가 첨가된 수정용 modified Tris-buffered medium으로 3~4회 세척한 후 수정용 medium에 50 μ l drop 당 30~40개의 난자를 옮긴 다음 수정능이 획득된 활력도가 높은 정자의 최종농도가 0.5×10^6 sperms/ml이 되도록 조절하여 매정한 후, 6시간 동안 39°C, 5% CO₂ incubator에서 수정을 유도하였다. 최종 정자의 농도는 hemocytometer 또는 Makler Counting Chamber로 정자의 수를 계산하였다.

바. 정자와 외래유전자의 처리

정자와 함께 이용될 외래유전자 (Reporting-encoding DNA)는 β -galctosidase가 포함된 pcDNA LacZ 유전자를 사용하였다. 정자와 외래유전자를 처리하는 방법에 있어서 대조군으로서 0.6 ml TALP medium (0.6% fatty acid-free BSA)에 정자 (6×10^6 sperms/ml)와 외래유전자(600 ng)를 30분 동안 공동배양하는 방법을 사용하였으며(Parrish 등, 1986), 실험군으로서는 같은 배양액에 정자(6×10^6 sperms/ml)와 외래유전자(600 ng)를 4 mm 간격의 전극으로 구성된 1.4 ml Gene Pulser Cuvette (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)에 넣어 300~750 V, 25 μ F, 0.25 sec의 Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)에서 처리하였다(Rieth 등, 2000; Gagne 등, 1991).

사. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI)용 난자의 준비

40~44시간 체외성숙된 난자는 난구세포를 제거하기 위하여 0.1% hyaluronidase가 첨가된 D-PBS 배양액으로 vortexing 및 repipetting한 후, 제 1극체가 선명하게 나타나고 세포질이 균질한 난자를 선별하여 사용하였다. 선별된 난포란의 일부는 0.1 mg/ml PVA가 첨가된 TALP-HEPES를 사용하여 12,000 \times g에서 7분간 원심분리를 실시해 세포질의 지방과립을 한쪽으로 치우치게 한 다음 ICSI에 이용하였다.

아. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI)

외경 1 mm capillary tube (Narishige Co., Japan)를 이용하여 정자주입용 pipette은 내경 6~7 μ m, 외경 8~9 μ m로 제작하여 사용하였으며, 난자고정용 pipette은 외경이

100~120 μm 로 조절하였고 내경은 10~15 μm 로 제작하여 사용하였다.

세포질내 정자의 주입은 micromanipulator (Narishige Co., Japan)가 부착되어 있는 200배 도립현미경(Nikon Co., Japan)을 이용하여 Kim 등(1998)의 방법을 약간 수정하여 이용하였다.

한마리의 정자를 주입용 pipette에 흡인·장착하기 위해서는 정자의 운동성을 저하시키기 위하여 10% polyvinylpyrrolidone (PVP)이 첨가된 10 μl 정자용 D-PBS drop에서 정자의 꼬리를 먼저 주입용 pipette으로 흡인하여 0.4% BSA가 첨가된 20 μl 난자용 D-PBS drop으로 이동하였다.

체외성숙된 난자의 난구세포를 제거하여 도립현미경의 stage 위에 준비된 0.4% BSA가 첨가된 ICSI용 D-PBS drop으로 옮겨 제 1극체가 6시 또는 12시 방향으로 향하게 하여 고정용 pipette으로 난자를 고정시킨 후, 정자가 들어있는 주입용 pipette을 고정된 난자의 적도부근(3시 방향) 약간 아래에서 난자의 세포질 속으로 진입시킨 다음 세포질의 내용물을 약간 흡인하여 정자용 pipette의 진입여부를 확인한 후 흡인된 세포질의 내용물과 함께 정자를 세포질 속으로 진입시켰다. 이때 정자를 진입시킴과 동시에 10% polyvinylpyrrolidone (PVP)이 첨가된 정자용 D-PBS 배양액의 최소량을 함께 주입한 후 주입용 pipette을 빨리 후퇴시켰다. 난자의 세포질내 정자의 주입은 난자가 도립현미경 stage의 ICSI용 drop에서 노출되는 시간을 최소화하기 위해 10개의 난자를 이용하여 20분 이내에 작업을 완료하였다.

Shame injection 방법은 주입용 pipette에 정자를 흡인·장착하는 과정을 제외한 모든 과정은 ICSI와 동일한 방법으로 실시하였다.

자. IVF와 ICSI 후 체외수정란의 체외배양

IVF와 ICSI 후 0.4% BSA가 첨가된 체외배양액 NCSU 23에 3~4회 세척한 후 20~30개의 수정란을 50 μl drop에 넣어 39 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. ICSI 후 난자는 두 그룹으로 나누어 전기적 활성화를 실시한 군과 실시하지 않은 군으로 나누었으며, 전기적 자극은 BTX Electro Cell Manipulator (Biotechnologies and Experimental Research, Inc., San Diego, CA)를 이용하여 85 V, 30 μsec , 1 pulse에서 실시하였다. 두 그룹은 각각 0.4% BSA가 첨가된 체외배양액 NCSU 23에 3~4회 세척한 후 20~30개의 수정란을 50 μl drop에 넣어 39 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 incubator에서 배양

하였다. 수정 후 48시간에 수정율을 조사하였으며, 144~168시간까지 배반포기 상태의 수정란을 조사하였다.

차. 체외수정란의 할구수 조사

체외수정란의 할구수를 조사하기 위하여 수정 후 8일까지 배양한 배반포기배를 Hoechst 33342 (Sigma, U.S.A.)를 이용하여 Pursel 등(1985)의 방법에 준하여 핵염색을 실시하여 형광현미경 200~400 배의 배율하에서 핵의 수를 조사하였다.

카. 체외수정란의 외래유전자 발현을 조사

체외수정란의 pcDNA LacZ 유전자 발현 유·무를 확인하기 위하여 ICSI후 72~144 시간동안 배양된 체외수정란을 5 mg/ml BSA가 첨가된 D-PBS액으로 3~4회 세척하여 1%(v/v) formaldehyde, 0.2%(v/v) glutaraldehyde와 5 mg/ml BSA가 첨가된 D-PBS (pH 7.6) 고정액으로 4℃에서 15분간 고정시킨 후 D-PBS액으로 3~4회 세척한 다음, 1 mg/ml의 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside (X-gal)이 첨가된 X-Gal staining용액으로 옮겨 39℃ incubator에서 배양하였다. 배양 후 5시간부터 광학현미경하에서 pcDNA Lac Z 유전자의 발현 유·무를 확인하였다(Tsukui 등, 1996).

4. 결과

본 연구에서는 제 1차 연구에 있어서 ICSI에 의한 돼지 체외수정란의 생산효율을 높이고자, ICSI에 사용되는 돼지 체외성숙 난포란의 원심분리에 의한 효과, 세포질내에 주입하는 정자의 DTT 전처리 효과, 체외성숙 난포란의 체외수정시 주로 사용되는 IVF방법과 ICSI방법 사용에 따른 수정율과 후기배로의 발달율을 조사 그리고 IVF방법과 ICSI방법에 의해 발달한 배반포기배의 할구수를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

ICSI에 사용되는 돼지 체외성숙 난포란을 이용하여 원심분리를 실시하지 않은 군과 실시한 군에 있어서 수정율과 후기배로의 발달율에 있어서는 두 처리군간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

Table 2. Effect of centrifugation on development *in vitro* of pig zygotes following intracytoplasmic sperm injection

| Oocyte treatments | Replicates | No. of oocytes used | No.(%) of oocytes cleaved | No.(%) of embryos developed to blastocysts | |
|-----------------------------|------------|---------------------|---------------------------|--|------------------------|
| | | | | At day 6 | At day 8 |
| Control (noncentrifugation) | 10 | 296 | 143 (48.3) ^a | 8 (5.6) ^b | 34 (23.8) ^c |
| Centrifugation* | 10 | 268 | 142 (53.0) ^a | 10 (7.0) ^b | 28 (19.7) ^c |

† Values with same superscripts in the column were not significantly different ($P < 0.05$).

*At 12,000 × g for 7 min.

또한 ICSI에 사용되는 정자를 주입전에 DTT를 처리한 군과 DTT를 처리하지 않은 군에서의 수정율과 배반포기배로의 발달율에 있어서도 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 그리고 체외성숙 후 IVF 또는 ICSI에 의한 체외수정 후 수정율과 후기배로의 발달율에 있어서도 두 처리군간의 유의성은 나타나지 않았다. IVF와 ICSI에 의해 체외수정된 수정란에 있어서 8일째까지 발달한 배반포기배의 할구수를 조사한 결과 각각 46.7±2.9개와 41.9±4.6개로 나타나 두 처리군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

Table 3. *In Vitro* developmental capacity of porcine zygotes following intracytoplasmic injection of oocytes with sperm either treated or not treated with dithiothreitol (DTT)

| Sperm treatments | Replicates | No. of oocytes used | No.(%) of oocytes cleaved | No.(%) of embryos developed to blastocysts |
|------------------|------------|---------------------|---------------------------|--|
| Control (no DTT) | 6 | 167 | 81 (48.5) ^a | 18 (22.2) ^b |
| DTT | 4 | 101 | 61 (60.4) ^a | 10 (16.4) ^b |

† Values with same superscripts in the column were not significantly different ($P < 0.05$).

이상의 실험 결과들을 종합해보면, ICSI에 의한 체외수정란의 생산은 체외성숙 후 난구세포가 제거된 난포란을 원심분리시키면 ICSI에 있어서의 편리를 도모할 수 있을 뿐만 아니라 주입된 정자의 관찰을 용이하게 하여 정확성을 높일 수 있고, 주입 시 사용하는 배양액의 난포란내 진입을 최소화 할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 ICSI전 정자의 침체반응 유도과 난포란의 활성화, 그리고 후기배로의 발달을 향상에 따른 할구수의 증가를 위한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다. 지금까지의 이러한 결과들을 바탕으로 하여 ICSI에 의한 체외수정란의 생산을 위한 연구가 지속적으로 수행해 나가야 할 것이며, 또한 계속적인 연구로 ICSI를 이용하여 외부유전자의 도입에 의한 형질전환동물의 생산이 가능 할 수 있을 것으로 사료된다.

제 2차 연구에서는 sperm-mediated gene transfer를 이용하여 ICSI에 의한 형질전환동물생산의 기초자료로서 활용하기 위해, ICSI에 사용될 정자의 조건과, 그에 따라 적합한 돼지 정자와 외래유전자의 전처리 및 ICSI를 통한 수정율 및 후기배로의 발달율과 외래유전자의 발현여부를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

Table 4. *In vitro* development of porcine embryos cultured for 7 days following intracytoplasmic injection of various sperm-condition

| Sperm condition | No. of oocytes used | No.(%) of oocytes cleaved | No.(%) of embryos developed to blastocysts |
|-----------------|---------------------|---------------------------|--|
| Epididymal | 94 | 68 (72.3) | 12 (17.6) |
| Ejaculated | 117 | 75 (64.1) | 14 (18.7) |
| Frozen-thawed | 81 | 60 (74.1) | 9 (15.0) |

[†] Values with same column are not significantly different ($P<0.05$).

ICSI에 이용될 정자의 조건에 따라 정소상체미부정자, 사출정자 및 동결정자를 이용하여 ICSI후 수정율은 각각 72.3%, 64.1% 및 74.1%로 나타나 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 또한 후기배로의 발달율에 있어서도 각각 17.6%, 18.7% 및 15.0%로

나타나 각 처리군간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

Table 5. *In vitro* development of porcine embryos cultured for 7 days following intracytoplasmic sperm injection

| ICSI groups | No. of oocytes used | No.(%) of oocytes cleaved | No.(%) of embryos developed to blastocysts |
|-----------------|---------------------|---------------------------|--|
| Shame injection | 85 | 40 (47.1) ^a | 1 (2.5) ^a |
| activation* | 255 | 203 (79.6) ^b | 49 (24.1) ^b |
| non-activation | 285 | 132 (46.3) ^a | 19 (14.4) ^c |

† Values with different superscripts in the columns are different significantly ($P<0.05$).

*Activation; 30 min after ICSI, 85 volts, 30 μ sec, 1 pulse

그리고, ICSI후 전기적자극을 실시한 군과 실시하지 않은 군에서 난자의 활성화에 따른 수정율은 대조구로 이용한 shame injection과 전기적활성화를 실시하지 않은 군에서 각각 47.1%와 46.3%로 나타나 전기적활성화를 실시한 군의 79.6%에 비해 유의적인 차이를 나타내었다. 후기배로의 발달율에 있어서도 전기적활성화를 실시한 군에서는 24.1%로 나타나 전기적활성화를 실시하지 않은 군에서의 14.4%와 유의적인 차이를 나타내었다. 그리고 대조구로 이용한 shame injection에 있어서 후기배로의 발달율은 2.5%로 낮은 결과를 나타내었다.

Table 6. Transgenic expression of porcine embryos after microinjection into metaphase II stage oocytes with or without electrical stimulation

| Oocyte treatments | No. of embryos used* | Tg expression embryos | |
|-------------------|----------------------|-----------------------|----------------|
| | | Negative | Positive (%)** |
| Activation *** | 116 | 81 | 35 (30.2) |
| Non-activation | 124 | 94 | 30 (24.2) |

† Values with same column are not significantly different ($P < 0.05$).

‡ Sperm electroporation; 300~750 volts, 25 μ F, 0.4 cm electrode

*72~144 h post-insemination.

** All mosaic expression of pcDNA Lac Z

*** Activation; 30 min after ICSI, 85 volts, 30 μ sec, 1 pulse

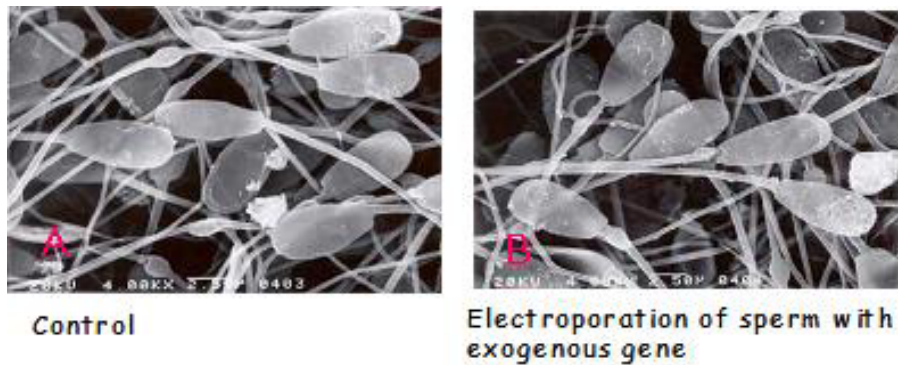


Figure 15. Electroporation of porcine spermatozoa to carry exogenous gene

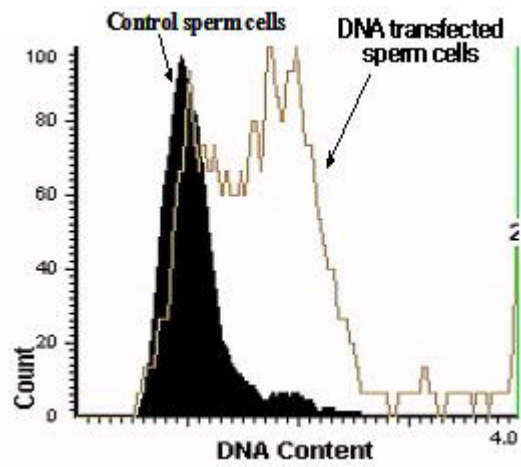
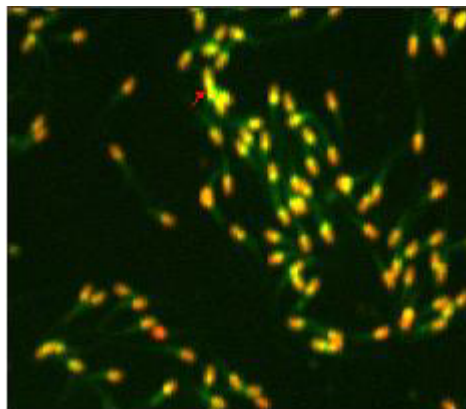


Figure 16. DNA contents different of transfected sperm cells by LSC



Yellow color; Transfected sperm cell

Figure 17. Transfected sperm cell by electroporation

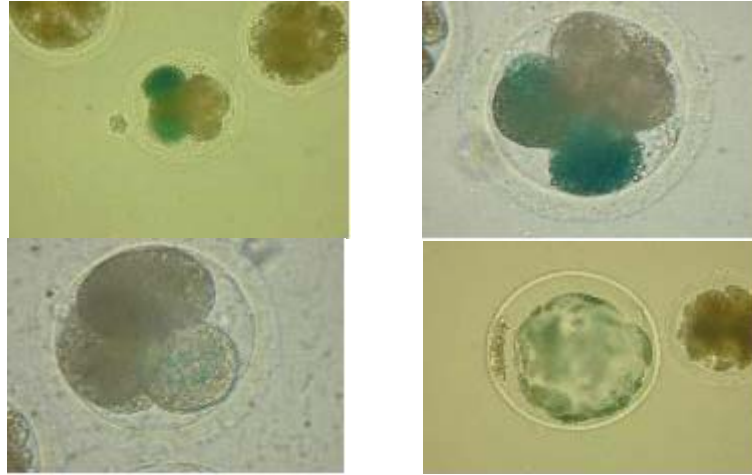


Figure 18. Expression of transgenic embryos.

A: DTT treated, B: Liposome mediated,
C: Electroporation and D: Liposome+IVF

또한, 정자와 pcDNA LacZ 유전자의 처리시 electroporation 방법을 실시하여 ICSI 후 난자를 각각 전기적활성화를 실시한 군과 실시하지 않은 군에 있어서 유전자 발현율은 각각 30.2% 와 24.2% 나타났으나, 두 처리군간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 그러나, 두 군에서 pcDNA LacZ 유전자는 모두 mosaic 발현 양상을 보였다.

이상의 실험 결과들을 종합해보면, ICSI에 사용될 수 있는 돼지의 정자는 정소상 체미부정자, 사출정자 및 동결정자 모두가 이용 가능하며, ICSI후 추가 전기적자극에 의한 난자의 활성화가 수정율과 후기배로의 발달율을 향상시킬 수 있음을 시사하였다.

따라서, 돼지에 있어서 정자의 외래유전자 도입에 대한 정확하고 실용적인 방법은 보고되고 있지는 않은 상태로, 정자와 외래유전자의 처리법을 향상시키기 위하여 다양한 방법으로 많은 연구가 요구된다.

Table 7. Pronuclear formation of porcine oocytes following IVF or ICSI with and without activation

| Treatment | No. of oocytes | Pronuclear formation (%)* | | | |
|-----------------------|----------------|---------------------------|-----------|---------|---------|
| | | 1PN | 2PNC | 1PN+sPN | Others |
| Control (IVM-F-C) | 62 | 12 (19.4) | 40 (64.5) | 4 (6.5) | 6 (9.7) |
| ICSI (activation**) | 52 | 0 | 50 (96.2) | 0 | 2 (3.8) |
| ICSI (non-activation) | 46 | 0 | 43 (93.5) | 3 (6.5) | 0 |

^{a, b} within column, percentages with different superscripts differ significantly, $P < 0.05$.

*2PNC, male and female pronuclear chromosomal structure; 1PN+sPN, condensed or swelling male chromatin, and others, metaphase plate, unidentified multiple pronuclei. **Activation; 30 min after ICSI, 85 volts, 30 sec, 1 pulse

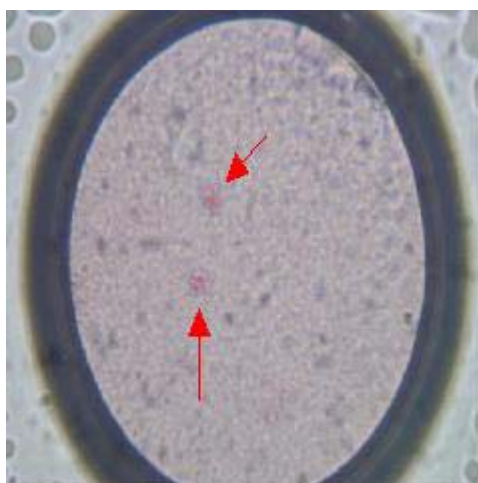


Figure 19. Pronuclear formation of porcine oocytes following IVF or ICSI. Representative photographs of porcine zygotes obtained 16~18 h after ICSI with fresh sperm. A normally developing zygote. PNC, Pronuclear chromosomal structure.

Table 8. In vitro development of porcine zygotes cultured for 7 days following IVF or intracytoplasmic sperm injection

| Treatments | No. of oocytes used | No. (%) of oocytes cleaved | No. (%) of embryos developed to blastocysts | % of blastocysys | |
|-----------------------|---------------------|----------------------------|---|------------------|------|
| | | | | cleaved | used |
| Control (IVM-F-C) | 731 | 379 (51.8) | 85 | 22.4 | 11.6 |
| ICSI (activation**) | 355 | 279 (78.6) | 67 | 24.0 | 18.9 |
| ICSI (non-activation) | 496 | 228 (46.0) | 45 | 19.7 | 9.1 |

*Percentages with different superscripts within a column differ significantly. $P < 0.05$.

**Activation; 30 min after ICSI, 85 volts, 30 sec, 1 pulse

Table 9. Chromosomal analysis of porcine embryos produced by IVF or ICSI

| Treatments | No. of blastocysts identified | Chromosomal analysis | | |
|-----------------------|-------------------------------|----------------------|-----------|-----------|
| | | Haploid | Diploid | Othors* |
| Control (IVM-F-C) | 17 | 0 | 9 (52.9) | 8 (47.1) |
| ICSI (activation**) | 27 | 0 | 17 (63.0) | 10 (37.0) |
| ICSI (non-activation) | 17 | 0 | 11 (64.7) | 6 (35.3) |

*Others include embryos with unidentified and mixed multiple chromosomes.

**Activation; 30 min after ICSI, 85 volts, 30 sec, 1 pulse

Table 10. Number of blastomere of in vitro developed porcine blastocysts derived from IVF or ICSI

| Treatments | No. of blastocysts | No. of blastomeres | |
|-----------------------|--------------------|--------------------|--------|
| | | Mean±S.E. | Ranges |
| Control (IVM-F-C) | 22 | 46.7±2.9 | 22~68 |
| ICSI (activation) | 10 | 44.7±4.2 | 20~64 |
| ICSI (non-activation) | 10 | 41.9±4.6 | 27~52 |

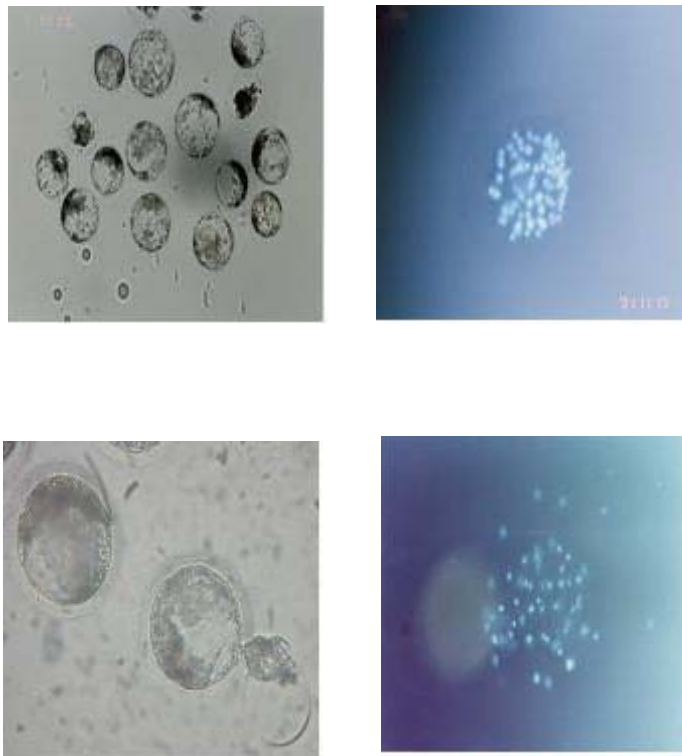


Figure 20. Number of blastomere of in vitro developed porcine blastocyst derived from IVF or ICSI

제3절 자가세포이식에 의한 유전자 전이

1. 항암제 처리에 의한 대리정소의 준비

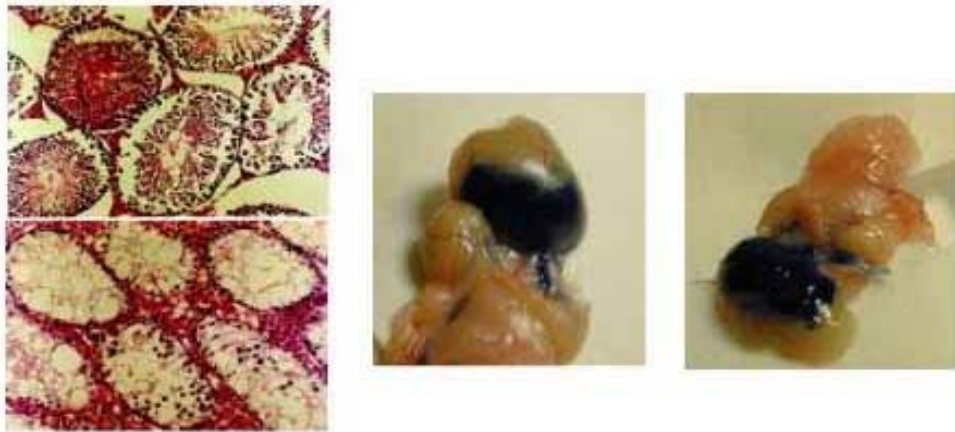


Figure 21. H-E stain of control mouse testis and busulfan treated mouse testis.

대리정소를 준비하기 위하여, 성숙한 생쥐의 복강내에 kg당 40mg의 busulfan을 처리하였다. 그림에서와 같이 busulfan 처리후 4주경(왼쪽그림 하단, 상단은 대조구)에 발달중인 정자생성세포는 모두 사멸하였다. 이들 정소조직에 laminin으로 coating한 배양접시(아래)을 이용하여, 선발한 정소근원세포를 분리하여, 이들 세포를 efferent duct(오른쪽 그림)을 이용하여 주입한후, 이들 정소세포로부터 유래한 정자 생성세포가 발생가능한지를 조사하였다.

결과: laminin으로 coating한 배양접시로 부터는 약 70%정도의 순도로(germ cell specific marker, TRA98 항체사용(아래오른쪽상단 및 하단은 merge), Dr T. Nishimune로부터) 정제되었고, 이식성공율은 50%, 성공적으로 이식한 정소중 약 30%는 이들 자가 이식한 세포를 가지는 것으로 확인되었다.

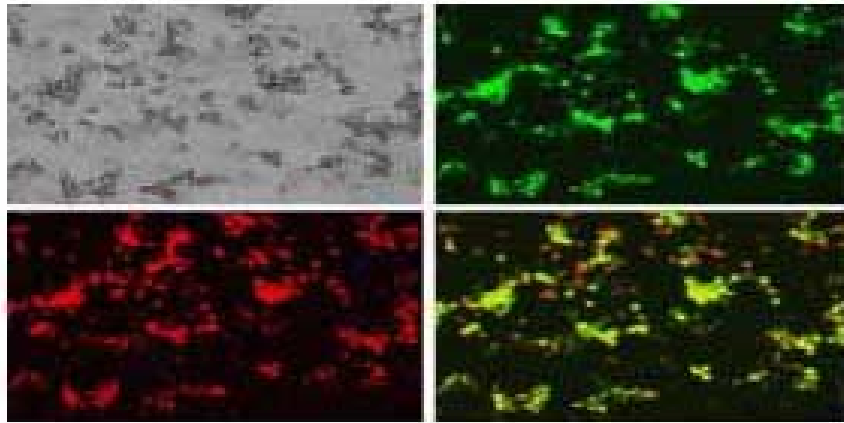


Figure 22. laminin selected spermatogonia stain TRA98

Busulfan처리에 의한 생식세포의 세포사멸의 원리를 Tunnel assay로 살펴보면 대조구(왼쪽 그림 a)에서는일부의 spermatocyte세포만이 사멸하나, 항암제인 busulfan투여 후 제 1주(b)째는 일부의 정조세포를 포함한 감수분열세포에도 사멸을 초래하였다. 항암제투여후 2주(c)와 3주(d)째는 70%이상의 세포가 사멸하였고, 4주(e)째는 90%이상의 생식세포가 사멸하였다. 이중 일부의 정조세포도 사멸하는 것으로 확인되었다. 그러나 5주(f)째는 일부의 정조세포는 여전히 사멸한 상태이나, 대부분의 정조세포는 증식분열을 시작하는 것으로 확인되었다. 이 결과는 Flow cytometry을 이용한 오른쪽의 그림 B에서도 동일한 결과를 얻었다. 즉, 대조구(A)는 감수분열세포(a)가 90%이상을 점유하나 항암제 투여후 4주째는 2n을 가진 세포가 90%이상을 점유한 것으로도 재확인되었다.

이들 정조세포가 항암제에 내성으로 생존한 원리를 알아보기 위하여 약제 내성 유전자인 MDR을 이용한 면역화학적 방법으로 살펴본 결과는 아래의 왼쪽그림과 동일하다. 항암제 투여후 1주째(A)는 일부의 Leydig(갈색염색부분)만이발현하나, 2주째 부터는 일부의 세정관(B)에서 발현하기 시작하여 3주(C)째는 모든 세정관에서 발현하는 것으로 확인되었다. 4주째(D)는 일부의 정조세포와 Leydig 세포에서 발현하기 시작하여 5주째 부터는 거의 정상 상태로 돌아오는 것으로 확인되었다. 사멸에 민감한 세포와 정조세포의 분화시기를 알아보기 위하여 항암제 투여후 RT-PCR로 알아본 결과 분화중인 정조세포가 가장 민감(c-kit)하였으며, 이들 정조세포는 항암제 투여후 4주

부터는 증식을 재개하는 것으로 확인되었다. Cyclin과 CDK의 발현 결과는 정조세포가 항암제치리에 의한 세포사로부터 보호받은 이유는 MDR의 과발현에 의한 약제의 재빠른 배출과 세포 손상에 동반된 세포주기억제에 의하여 의하여 야기되었다는 결과가 도출되었다.

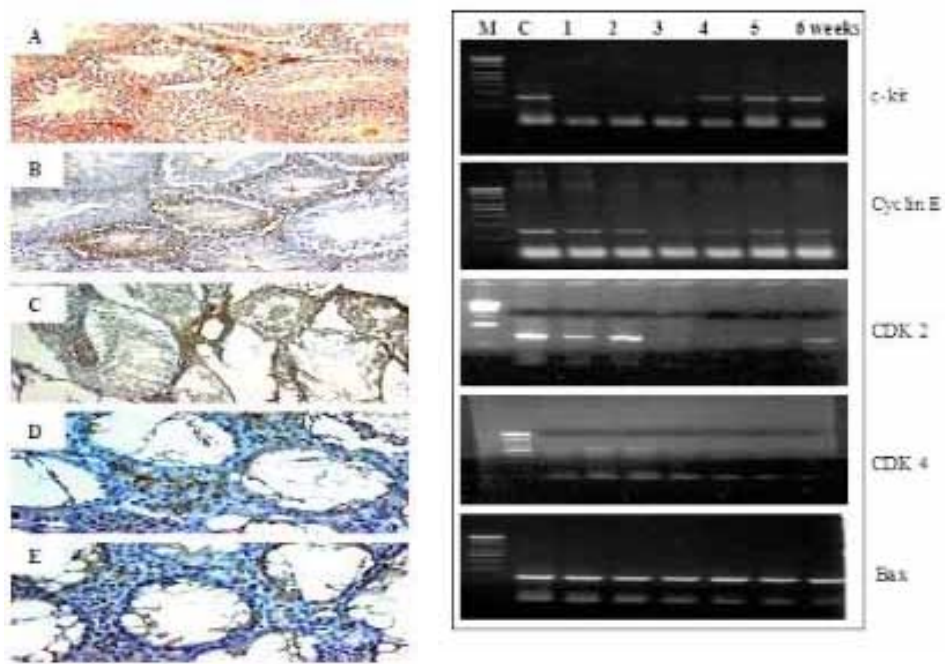


Figure 23. Detection of programmed cell death in busulfan treated mouse testis by tunel assay and experssion of stage-specific gene about busulfan mouse testis.

이러한 결과는 Busulfan 처리후 4주째 정자 생성의 근원세포인 정조세포만을 선별적으로 분리가능하며, 이들 분리된 정조세포를 이용한 유전자 전이와 이식이 가능함을 시사한 결과로 금후 돼지에도 이용가능함을 시사하였다.

제 4절 발정동기화 유도

발정동기화는 크게 2가지 방법을 사용하였다. 첫째는 스트레스 유도후 PG600을 투여하는 방법과 자연종부후 임신 30~50일령경 PGF2a을 투여한후 유산을 유도한후 PMSG/hCG을 투여하여 발정을재개하는 2가지 방법을 비교검토한 결과 130kg의 미경산돈을 사용시 PG600의 경우는 총 67마리를 사용하여 61%인 40두에서 발정이 재귀하였으나, 수정란 이식후 임신유지는 10%미만이였다. 반면, 자연종부후 30~40일 사이에 임신중절을 유도한후 과배란 처리에 발정이 재귀된 미경산돈은 30마리중 29마리가 발정재귀을 보였다. 따라서, 발정동기화측면에서는 다소 시간이 소요되는 곳이 단점이나 임신중절을 유도한후 과배란 처리에 의한 발정동기화가 대리모준비에는 적합한 것으로 판단되었다.

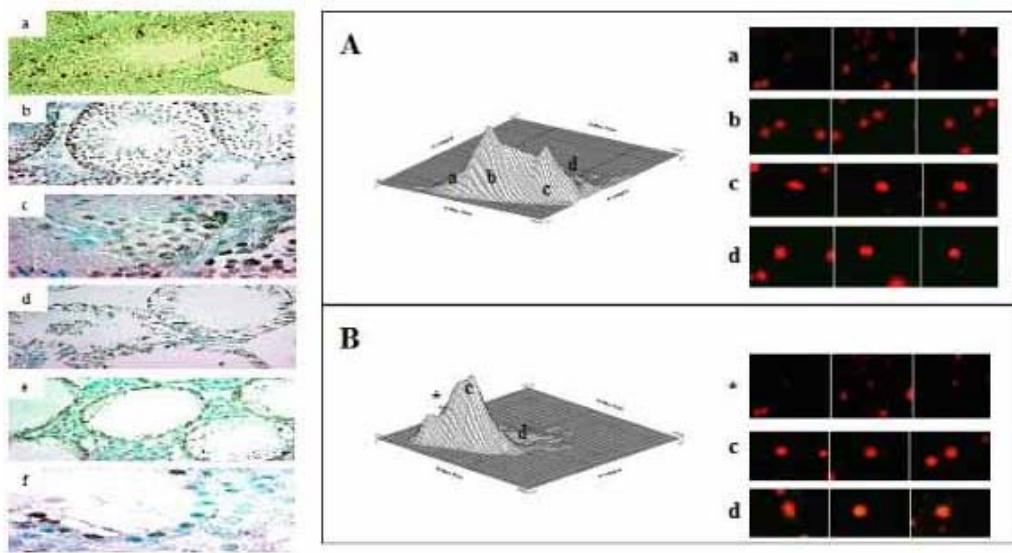


Figure 24. Immunohistochemistry of busulfan treated series mouse testis and Detection of germ cell by flowcytometry.

Table 11. Recipient gilts embryos produced by ICSI used in vitro matured oocytes.

| No. of recipients | No. of embryos transferred | | Pregnancy diagnosis |
|-------------------|----------------------------|------------------|---------------------|
| | Total | Cell stage | |
| PGF2alpha | | | |
| 40 | 1,914 | 1-cell to 8-cell | 4* |
| PG800 | | | |
| 29 | 1,252 | 1-cell to 8-cell | 1** |

*2 recipients were carried out uterotomy in order to confirm the pregnancy.

**At day 45 after ET, re-estrus standing

현재 이식후 70일령경 임신된 돼지는 2마리로 초음파검사에 각각 6마리 5마리가 임신된 것으로 확인되었다.

이식된 대리모에서의 in vivo 배발달을 조사한 결과는 아래 table 12와 같다.

Table 12. In vivo development of in vitro matured oocytes in the recipient gilts

| Recipient number | Days post ICSI (Day of estrus cycle of recipients) | | Number of ICSI Oocytes transferred | Number (%) of Fetuses recovered |
|------------------|---|---------|--|---------------------------------------|
| | Transfer | Autopsy | | |
| 1 | -1 | 18 | 114 | 2 |
| 2 | -1 | 54 | 57 | 7 |
| 3 | 1 | 96 | 114 | 9 |
| 4 | -1 | 111 | 170 | 11 |

*Pregnancy day 18 fetuses

**Abortion, mummified fetus sites

이들 대리모로부터 산자의 회수는 초음파 검사에 의하여 태아의 활동이 중단된 경우에 한하여 실시하였기 때문에 대부분의 산자는 미이라상태를 보였다.



Mummified fetuses of 54 days pregnant



Mummified fetuses of 96 days pregnant

Figure 25. Mummified fetues of 54 and 96 days pregnant

본 연구실에서 사용하고 있는 대리모의 준비방법은 다음과 같다.

● Hormone treatments ; **PGF2 α Treatment**

Natural estrus detection → Mating, 2 times

volunteer; # 1, 2, 3, 4, 5

↓
21~ 50 days after mating,
PGF2 α 2 ml, 1 time, i.m. injection
↓
After 24 hours,
PGF2 α 2 ml + PM SG 1,000 units, 1 time, i.m. injection
↓
After 72 hours, estrus detection and then,
hCG 500 I.U., 1 time, i.m. injection
↓
Embryo transfer 50 h after estrus detection
ICSI, NT or IVF embryos transfer

제 5절. 체세포를 이용한 형질전환 복제돼지의 생산

1. 재료 및 방법

가. 배양액

난포란의 체외성숙에 사용한 배양액은 NCSU 23을 기본배양액으로 하여 Baxter (Baxter Healthcare Co., U.S.A.)의 물 1ℓ로 제조하여 0.2 μm filter (Gelman Sci., U.S.A.)로 여과한 후 pH 7.2~7.3으로 조정하여 50 ml tissue culture flask (Falcon, U.S.A.)에 45 ml씩 분주하여 4℃의 냉장고에 보관하면서 약 2 주간 사용하였다. 체외성숙용 배양액은 NCSU 23 배양액에 10% 난포액, 0.1 mg/ml cysteine, 0.01 μg/ml EGF, 10 IU/ml eCG 그리고 10 IU/ml hCG를 첨가하여 제조하였다. 체외배양액은 NCSU 23 배양액에 0.4% BSA를 첨가하여 사용하였다. 돼지 난포액은 2~7 mm 크기의 난포에서 난포액을 채취하여 1,900 x g로 3회 원심분리하고, 최종 0.2 μm 필터로 거른 후 -20℃ 냉장고에 보관하여 사용하였다.

나. 난포란의 채란

본 실험에 공시된 난소는 도축장에서 도살직후 난소를 적출하여 penicillin G (100 units/ml)와 streptomycin (100 μg/ml)이 함유된 생리식염수(30~35℃)가 들어있는 보온병에 담아 3~4시간 내에 실험실로 운반하였고, 미성숙 난포란을 채란하기 전 난소 주위의 지방과 결합조직을 제거하고, 생리식염수로 3~4회 세척한 후, 18-G needle이 부착된 20 ml 주사기를 이용하여 2~7 mm의 가시난포를 흡입하여 난포란을 채란하였다. 난포란의 채취시 사용된 배양액은 0.1 mg/ml PVA가 첨가된 TALP-HEPES (Prather 등, 1995)를 사용하였다. 흡입된 난포액은 5~10 분간 정치시킨 후 침전된 하부액을 5 ml의 피펫으로 흡입하여 직경 60 mm 배양접시에 옮겨 40X 배율의 도립현미경(Olympus Co., Japan)에서 난포란을 수집한 후 체외성숙용 기본배양액 NCSU 23으로 4~5회 세척하면서 선발하였다. 난포란의 선발은 난구세포의 부착 정도와 세포질의 충실도에 따라 실시하였으며, 최소한 2층 이상의 난구세포층으로 되어 있고, 세포질이 균일하고 충실한 것을 선발하여 실험에 공시하였다.

다. 난포란의 체외성숙

난포란의 체외성숙은 체외성숙용 배양액을 4-well dish (Nunc, Denmark)에 500 μ l씩 분주하여 18 시간 이상 전 배양을 실시하여 평형을 유도한 다음, 체외성숙용 배양액에 난구세포가 2층 이상이고 세포질이 충실한 100~150 개의 난포란을 넣고 5% CO₂, 98~99% 습도, 39°C CO₂ incubator에서 20~22시간 동안 호르몬이 첨가된 체외성숙용 배양액에서 배양하고, 다음 20~22시간은 호르몬이 첨가되지 않은 배양액에서 배양하여 총 40~44시간 동안 배양하였다.

라. 공여세포의 채취 및 배양

본 실험에 사용된 공여세포는 임신 30일령 된 돼지 태아를 채취하여 이용하였다. 채취한 태아의 조직을 미세하게 세절하여 0.05% trypsin (Gibco, USA)과 EDTA (Sigma, USA)가 첨가된 D-PBS로 3분간 처리한 후 D-PBS로 원심분리를 실시하여 trypsin과 EDTA를 제거하였다.

분리된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM으로 25 cm² flask (Falcon, USA)에 분주하여 CO₂ incubator에서 배양을 실시하였으며, 배양 12시간 후 바닥에 붙지 않은 세포는 제거하고, 신선한 DMEM에 10% FBS가 첨가된 배양액으로 교체하면서 3~5일간 배양하였다. 계대배양은 공여세포가 flask에 80%이상 자랐을 때, 0.05% trypsin과 EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 1/3~1/4씩 나누어 10회이상 계대해서 배양을 실시하였다. 계대배양한 공여세포는 10% DMSO가 첨가된 DMEM 배양액으로 동결 보존해두고, 핵이식에 사용할 때는 38~39°C 온수에 용해하여 동결보호제를 제거한 다음 신선한 DMEM에 10% FBS가 첨가된 배양액으로 1회 계대배양한 후 세포가 culture dish에 monolayer를 충분히 형성하여 confluency 상태로 2~3일 정도 배양함으로써 G0나 G1단계로 유도한 다음 공여세포로 사용하였다.

마. 핵이식

핵이식에 사용된 pipette은 직경이 1 mm인 capillary tube (Narishige, Japan)를 사용하여 보정용(holding), 탈핵용(enucleation) 및 주입용(injection) pipette을 각각 제작하였다. Holding pipette의 외경은 150~180 μ m, 탈핵과 주입용 pipette은 외경이 30~40 μ m로 조절하였다. 제작이 완료된 pipette은 PVP로 코팅처리 한 후 사용하였다. 체외성숙된 수핵난자를 0.1% hyaluronidase (Sigma, USA)가 첨가된 D-PBS에 넣어 난

구세포를 제거하고, 3회~4회 PVA-TALP-HEPES로 세척한 다음, 0.05 M sucrose (Sigma, USA) 및 0.4% BSA가 첨가된 배양액에서 세포질이 양호하고 제1 극체가 뚜렷하게 보이는 난자만을 선별하여 사용하였다. 핵이식은 NCSU-23에 0.4% BSA가 첨가된 배양액 소적에 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 cytochalasin B (Sigma, USA)와 0.05 M sucrose를 첨가하여 30% 정도의 세포질을 흡입함으로써 핵을 제거하였다. 탈핵한 난자는 세포질이 제거된 공간에 G0나 G1으로 유도한 공여세포를 loading하여 세포질과 부착되게 주입하였다. 공여세포가 주입된 난자는 전기융합을 실시하기 전까지 NCSU-23에 0.4% BSA가 첨가된 IVC 배양액에 처리하였다.

바. 핵이식 수정란의 융합 및 활성화

핵이식이 완료된 난자의 공여세포와 세포질의 융합은 전기세포융합장치(BTX, USA)로 실시하였다. 이때 전기융합 배양액은 0.1 mM CaCl_2 (Sigma, USA) 및 0.1 mM MgCl_2 (Sigma, USA)가 첨가된 0.28 M Mannitol (Sigma, USA) 용액에 2~3분간 평형을 실시한 다음, 핵이식란을 전기 융합용 chamber로 옮겨 양 전극 사이에 일렬로 주입하여 핵은 전극의 양극(+)쪽으로 향하게 하고 세포질은 음극(-)쪽으로 향하게 하여 전기자극을 가하였다. 전기융합 및 활성화는 150 V, 50 μsec , 2 pulse를 주어, 수정란의 융합과 전기활성화를 동시처리 하였다. 핵이식 수정란의 융합과 활성화를 유도한 다음 cytochalasin B에 4시간 처리후 체외배양을 실시하였다.

사. 수란돈 준비

복제 수정란을 이식하기 위하여 임신 30~40일된 수란돈에 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 를 근육주사하여 유산을 유도한 후 24시간이 경과되었을 때 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 와 PMSG를 동시에 주사하였다. 그 후 72시간이 경과되었을 때 hCG를 근육주사하여 과배란을 실시하였다. 48시간 후에 복제수정란을 이식하였다.

아. 수정란 이식 및 임신진단

돼지의 복제 수정란을 이식하여 산자를 생산할 목적으로 외과적인 방법에 의해서 수정란 이식을 실시하였다. 먼저 호르몬 처리된 수란돈은 케타민과 럼폰을 귀 정맥에 주입하여 전신 마취를 실시하였다. 마취된 수란돈의 정중선을 중심으로 광범위하게

면도기를 이용하여 털을 제거하고 소독을 실시한 다음 정중선을 따라 약 10~15cm를 절개하여 자궁을 노출시킨 후 난소 표면의 출혈체 혹은 난포상태를 확인한 후, 복제된 수정란을 난관 팽대부에 주입하였다. 일부 수란돈은 복제 수정란의 체내 발달여부를 확인하기 위하여 이식후 7일째에 외과적방법으로 개복하여 이식된 수정란의 발달을 조사하였다. 또한 수란돈의 임신여부는 수정란 이식후 27~30일째에 초음파진단기를 이용하여 확인하였다.

2. 결과

본 연구에서는 체세포를 이용한 복제돼지의 생산효율을 향상시키고, 그 기술을 이용하여 형질전환 복제돼지를 생산하고자 여러 가지의 요인들을 조사하여 실험한 결과는 다음과 같다.

Table 13. In vitro development of embryos cloned with female and male fetal fibroblasts

| Origin of donor cells* | No. of oocytes fused (r**)* | No. of oocytes cleaved (%) | No. of embryos developed to blastocysts (%) | Cell no. of blastocysts****(range) |
|------------------------|-----------------------------|----------------------------|---|------------------------------------|
| Female | 211 (4) | 149 (70.6) | 25 (11.8) | 21.6±2.8 (17~34) |
| Male | 132 (4) | 100 (75.8) | 19 (14.4) | 23.1±1.2 (16~58) |

† Values with different superscripts differ significantly (P<0.05).

*4 to 10 passaged porcine fetal fibroblasts.

r, replication, *150 Voltages, 60 isec, 2 pulses

****Mean±S.D.

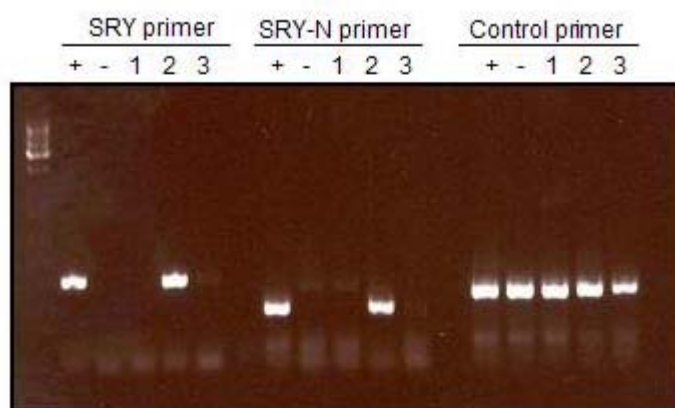


Figure 26. Sexing of porcine fetal fibroblast cells

Table 14. In vivo development of nuclear transferred porcine oocytes receiving female and male fetal fibroblasts

| Origin of donor cells* | No. of embryos transferred** | No. of blastocysts recovered (%) | Cell no. of blastocysts | | |
|------------------------|------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|
| | | | ICM (no. of blastocysts used) | Total (range) | ICM/total cells*** |
| Female | 167 | 12 (7.2) | 35.4±22.7 (5) | 83.8±46.2 (46~138) | 42.2±0.12 |
| Male | 230 | 27 (11.7) | 48.2±17.9 (5) | 99.2±55.7 (47~160) | 48.6±0.14 |

† Values with different superscripts differ significantly (P<0.05).

*4 to 10 passaged porcine fetal fibroblasts.

**One cell to four cell stage embryos transferred.

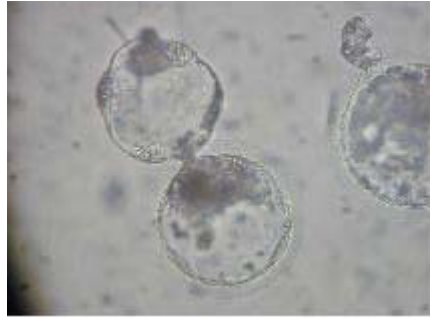


Figure 27. Porcine blastocysts produced by nuclear transfer. A; Day 6 nuclear transfer blastocysts, B; number of cells

Table 13에 나타난 바와 같이 female과 male donor를 각각 이용하여 실험한 결과 수정란의 체외배양에 있어서는 수정율과 후기배로의 발달을 및 할구수에 있어서 유의적 차이를 나타내지 않았으며, Table 14에 있어서도 핵이식된 수정란을 수란돈에 이식하여 체내배양 후 외과적으로 채란하여 조사한 결과 배반포기배로의 발달율과 할구수 및 내부세포괴의 비율에 있어서도 female과 male donor에 있어서 유의적 차이를 나타내지 않았다. 그러나, female과 male donor를 이용한 체내배양 핵이식 수정란에 있어서 배반포기배의 할구수는 체외배양에 비하여 훨씬 높았으나(21.6 ± 28 vs. 83.8 ± 46.2 at female, 23.1 ± 1.2 vs. 99.2 ± 55.7 at male), 체내배양 배반포기배에 있어서 총할구수에 대한 내부세포괴의 비율에 있어서는 female과 male donor에 있어서 각각 42.2 ± 0.12 와 48.6 ± 0.14 로 나타나, 착상에 필요한 영양막외배엽세포의 비율이 낮게 나타나는 문제점으로 인하여 임신을 위한 착상에 있어서 불리한 조건으로 대두될 수 있을 것으로 사료된다.

Table 15. Production of piglets derived from nuclear transfer embryos

| Donor cell line* | No. of embryos transferred (Range) | No. of recipients | | | No. of cloned piglets born | | |
|------------------|------------------------------------|-------------------|----------------|----------|----------------------------|---------------------------|-------------------------|
| | | Used | Pregnant (%)** | Farrowed | Total | Average birth weight (Kg) | Birth weight range (Kg) |
| Female | 6,789 (64 to 400) | 41 | 7 (17.1) | 5 | 15 | 1.47±0.09 | 0.48~1.83 |
| Male | 4,746 (100 to 292) | 25 | 7 (28.0) | 5 | 22 | 0.84±0.05 | 0.45~1.25 |

† Values with different superscripts differ significantly (P<0.05).

*Donor cell line; female: #10 and #1-1, male: #5 and #6 fetal fibroblast cell

**Female-recipient; 2 recipients aborted, Male-recipient; 2 recipients aborted

***Gestational days of female and male piglets are 118.4±2.4 and 118.0 ±2.3, respectively.

****piglet/total embryo transferred eggs; female: 452.6, male: 215.7

Table 16. Birth weight in somatic cloned piglets

| Methods | Female | Male |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| NT | 1.47 ± 0.09 (n=15) | 0.84 ± 0.05 (n=22) |
| AI | 1.36 ± 0.12 (N=9) | 1.43 ± 0.13 (N=6) |
| In Vivo Fertilization | 1.35 ± 0.05 (n=19) | 1.29 ± 0.05 (n=22) |

*Gestational days of female and male piglets are 118.4±2.4 and 118.0±2.3,

Table 15에 있어서는 female과 male donor cell을 이용하여 생산된 수정란을 각각 41마리와 25마리의 대리모에 이식하여 각기 5마리씩의 대리모에서 암컷 15마리와 수컷 22마리의 산자를 생산하였으며, 산자 1마리당 생시체중에 있어서 암컷산자는

1.47±0.09 kg과 수컷산자는 0.84±0.05 kg으로 나타나 수컷에 비하여 암컷 산자에서 높은 생시체중을 나타내는 결과를 보였으며, 각각의 산자들의 생시체중 범위는 수컷 산자에서는 0.45 kg~1.25 kg으로 나타났고, 암컷 산자에서는 0.48 kg~1.83 kg으로 나타났다. 그러나 인공수정과 체내수정에 의하여 생산된 산자에 있어서는 암컷과 수컷에 있어서는 생시체중에 있어서는 유의적 차이를 나타내지 않았다.

Table 17. Neonatal post-birth condition and survival of cloned piglets produced by female and male-derived donor cells

| Sex of piglets | No. of cloned piglets born | Neonatal conditions | | Survival piglets | |
|----------------|----------------------------|------------------------|----------|------------------|-----------------------|
| | | Normal (%) | Abnormal | Dead** | Live (%) |
| Female | 15 | 13 (86.7) ^a | 2* | 6 | 9 (60.0) ^a |
| Male | 22 | 7 (31.8) ^b | 15 | 18 | 4 (18.2) ^b |

† Values with different superscripts differ significantly (P<0.05).

*Abnormality; female piglets: Hypo-weight (<0.8 kg); 0.48 and 0.75 kg.

**Dead; stillbirth: 1 female piglet and 2 male piglets, first breast-feeding failure: 3 female piglets and 13 male piglets, diarrhoea: 2 male piglets, crushed to death: 1 female piglets and 1 male piglet, bite to death: 1 female piglet

그리고 Table 17에서는 female과 male donor cell을 이용하여 복제된 체외수정란의 이식에 의해 생산된 산자들에 있어서 생후 암수 복제산자의 건강상태를 비교하였다. 암컷 복제산자에 있어서는 15마리중 13마리(86.7%)가 정상상태였으나 수컷 복제산자에 있어서는 22마리 중 7마리(31.8%) 만이 정상으로 간주되었다. 비정상으로 간주된 암컷 복제 산자 2마리는 저체중(0.8 kg 이하, 한국 평균 돼지산자의 생시체중에 대하여)으로 나타났으나, 수컷 복제 산자의 비정상 산자는 저체중, 발가락기형, 앞발기형, 생후 기립불능 및 혀가 나온 상태 등으로 다양하게 발견되었으며, 이는 주로 생후에 초유의 급여불가능으로 나타나 사망으로 이어지는 결과를 나타내었다. 따라서 복제

산자의 출생후 현재까지의 생존율에 있어서도 암컷은 9마리(60.0%)인 반면에 수컷은 4마리(18.2%)로 유의적으로 낮은 생존율을 나타내었다. 사망한 6마리의 암컷 복제산자 중에서 1마리는 유산으로, 2마리는 대리모의 오진에 의한 제차 제왕절개수술로 인한 초유급여 부족으로, 1마리는 초유급여에 의한 기도 막힘으로, 그리고 나머지 2마리는 각각 대리모에 물리거나 깔려서 사망하게 되었다. 또한, 18마리의 죽은 수컷 복제산자 중에서 2마리는 유산으로, 13마리는 앞서 설명한 다양한 비정상 상태에서 기인된 초유급여부족으로 인하여, 2마리는 세균감염에 의한 설사증세로, 그리고 나머지 1마리는 대리모에 깔려서 사망하게 되었다. 이러한 결과에서 나타나는 것으로 보아 돼지의 복제산자 생산에 있어서 태아세포를 이용한 donor cell의 선택에 있어서 수컷 태아세포 보다는 암컷 태아세포를 이용하는 것이 생후 복제 산자의 건강상태와 생존율에 있어서 유리할 것으로 사료된다.

Table 18. Nuclear transfer embryos transferred to surrogate gilts or sows

| Recipients | No. of recipients used | No. of embryos transferred | | No. of recipients Pregnant (%) | No. of recipients farrowed | No. of cloned piglets born |
|------------|------------------------|----------------------------|-----------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | Total (range) | Cell stage | | | |
| Sow | 13 | 2,437 (130 to 260) | 1- to 4-cell | 0 | 0 | 0 |
| Gilt | 12 | 2,309 (100 to 292) | 1- to 4-cell | 7 (58.3) | 5 | 22 |

*Donor cell line; male: #5 and #6 fetal fibroblast cells

Table 18에 있어서는 복제수정란의 이식에 있어서 대리모를 경산돈과 미경산돈 2가지로 분류하여 이식한 결과 지금까지 따른 연구팀에서 보고한 결과와는 달리 본 연구에서는 경산돈에서는 이식된 복제 수정란에 의한 산자는 태어나지 않았고 오히려 임신된 7마리의 미경산돈 중에서 5마리가 22마리의 복제돼지를 생산하였다. 그러나 이러한 결과만으로 경산돈 보다는 미경산돈이 복제산자 생산에 유리하다는 결과를 도출해 내기는 어려운 것으로 사료된다.

Table 19. Postnatal conditions and survival of AI, in vivo fertilization and cloned piglets

| Piglet production methods | No. of recipients | | | No. of cloned piglets born | | |
|---------------------------|-------------------|---------------|----------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|
| | Used | Pregnant (%)* | Farrowed | Total | Average birth weight (Kg) | Live rate (%) |
| AI | 36 | 36 (100) | 36 | 418 | 1.393±0.123 (0.61-1.82) | 372 (89.0) ^a |
| In vivo fertilization | 23 | 5 (21.7) | 5 | 41 | 1.285±0.055 (0.88-1.98) | 27 (65.9) ^b |
| NT | 68 | 13 (19.1) | 10 | 37 | 1.153±0.069 (0.45-1.83) | 12 (32.4) ^c |

Table 19에서는 인공수정과 체내수정 및 핵이식에 의해 생산된 산자들의 평균 생시체 중과 생존율을 비교·조사한 결과 생시체중에 있어서는 차이를 나타내지 않았으나, 생후 생존율에 있어서는 인공수정으로 태어난 산자들이 89.0%로 가장 높게 나타났고, 체내 수정에서는 65.9%의 생존율을 나타내었으나, 핵이식에 의한 복제산자의 생존율은 32.4%로 가장 낮은 결과를 나타내었다. 따라서 복제 산자에 있어서는 아직까지 정확하게 밝혀지지 않은 원인으로 인한 사망률에 대해서 이를 찾아내기 위한 다양한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

Table 20. In vivo development of nuclear transferred porcine oocytes following embryo transfer

| Recipient conditions* | No. of recipients used*** | No. of embryos transferred | No. of recipients pregnant (%) | No. of recipients farrowed | No. of cloned piglets born |
|-----------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| A type** | 9 | 1,923 | 0 | 0 | 0 |
| B type | 9 | 1,668 | 3 (33.3)**** | 2 | 6 |
| C type | 38 | 6,423 | 8 (21.1)***** | 6 | 22 |
| D type | 10 | 1,521 | 3 (30.0)***** | 2 | 9 |

† Values with different superscripts differ significantly (P<0.05).

*A; preovulatory follicles; B, preovulatory follicles and corpus hemorrhagicum; C, corpus hemorrhagicum; D, B type and C type

**All Graafian follicles

*** Embryo transfer on day 2 after the onset of estrus (or hCG injection day)

****1 recipient (ET-37) aborted during the period of conception.

*****2 recipients (ET-34, ET-76) aborted during the period of conception.

*****1 recipient (ET-13) aborted during the period of conception.



Figure 28. Ovary conditions of surrogate recipients.

A, preovulatory follicles

B, preovulatory follicles and corpus hemorrhagicum; C, corpus hemorrhagicum

Table 21. Transfer of nuclear transfer embryos produced by different culture day conditions

| Embryo stage | No. of recipients used* | No. of embryos transferred | No. of recipients pregnant (%) | No. of recipients farrowed | No. of cloned piglets born |
|--------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 1-cell | 21 | 3,202 | 5 (23.8)** | 3 | 12 |
| 1- to 2-cell | 9 | 2,401 | 2 (22.2) | 2 | 6 |
| 2- to 4-cell | 26 | 4,411 | 4 (15.4)*** | 3 | 10 |
| 1- to 4-cell | 10 | 1,521 | 3 (30.0)**** | 2 | 9 |

† Values with different superscripts differ significantly (P<0.05).

* Embryo transfer on day 2 after the onset of estrus (or hCG injection day).

**2 recipients (ET-37, ET-76) aborted during the period of conception.

***1 recipient (ET-34) aborted during the period of conception.

****1 recipient aborted (ET-13) aborted during the period of conception.

Table 22. Pregnancy following transfer with different numbers of cloned embryos

| No. of embryos transferred range | No. of recipients used* | No. of embryos transferred | No. of recipients pregnant (%) | No. of recipients farrowed | No. of cloned piglets born |
|----------------------------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <150 eggs | 30 | 3,537 | 3 (10.0)** | 2 | 8 |
| 150~200 eggs | 12 | 2,103 | 4 (33.3)*** | 2 | 4 |
| >200 eggs | 24 | 5,895 | 7 (29.2)**** | 6 | 25 |

† Values with different superscripts differ significantly (P<0.05).

* Embryo transfer on day 2 after the onset of estrus (or hCG injection day).

**1 recipient (ET-34) aborted during the period of conception.

***2 recipients (ET-13, ET-76) aborted during the period of conception.

****1 recipient (ET-37) aborted during the period of conception.

그리고 Table 20에서는 체외에서 복제된 수정란을 이식하는데 있어서 대리모의 난자 상태에 따라서 각각 4가지-A type; 배란전 난포 상태, B type; 배란중인 난소상태, C type; 배란완료 후인 출혈체 상태 및 D type; B type과 C type의 혼재-로 분류하여 이식한 결과 배란전 난포상태에 있었던 A type 수란돈에서는 임신이 되지 않았으나, 나머지 3가지 type에서는 임신과 함께 각각 6 마리, 22 마리 그리고 9 마리의 산자를 생산하였다. 또한 체외에서 핵이식에 의해 생산된 복제수정란의 발달단계에 따라 각기 다른 조건으로 이식하였으나, 1-cell에서 4-cell 까지 모두 산자를 생산하였으며 (Table 21), 대리모 1두당 이식하는 복제수정란의 숫자에 있어서도 3가지의 처리구-1. <150 eggs, 2. 150~200 eggs, 3. >200 eggs-에 있어서 각각 산자를 생산하였다 (Table 22).

Table 23. In vitro development of nuclear transplants produced by different methods

| Methods* | No. of oocytes fused | No. of embryos cleaved (%) | No. of developed to blastocysts (%) | Cell number of Blastocysts (range) |
|----------|----------------------|----------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| A type | 185 | 135 (73.0) | 17 (9.2) | 21.6±2.8 (17~34) |
| B type | 165 | 125 (75.8) | 13 (7.9) | 23.1±1.2 (16~58) |
| C type | 173 | 122 (70.5) | 20 (11.6) | 20.8±2.4 (14~39) |

† Values with different superscripts differ significantly (P<0.05).

*Three fusion and/or activation methods; A: fusion and activation, simultaneously
B: fusion/activation, simultaneously, and then CCB treatment, C: fusion and then activation, and CCB treatment

Table 24. Developmental potential of nuclear transplants produced by different methods

| Methods | No. of embryos transferred (Range) | No. of recipients | | | No. of piglets born | | |
|---------|------------------------------------|-------------------|----------------|----------|---------------------|------------------------------|---------------|
| | | Used | Pregnant (%)** | Farrowed | Total | Average birth weight (Kg)*** | Live rate (%) |
| A type | 2,832 (100~252) | 17 | 3 (17.6) | 3 | 8 | 1.16±0.39 (0.75~1.83) | 5 |
| B type | 4,214 (100~100) | 24 | 7 (29.2) | 5 | 20 | 0.87±0.27 (0.45~1.45) | 3 |
| C type | 3,489 (64~322) | 25 | 3 (12.0) | 2 | 9 | 1.22±0.36 (0.48~1.50) | 5 |

*Three fusion and/or activation methods; A: fusion and activation, simultaneously
B: fusion/activation, simultaneously, and then CCB treatment, C: fusion and then activation, and CCB treatment



Figure 29-1. Production of cloned piglets by nuclear transfer of cultured female and male fetal fibroblast cells

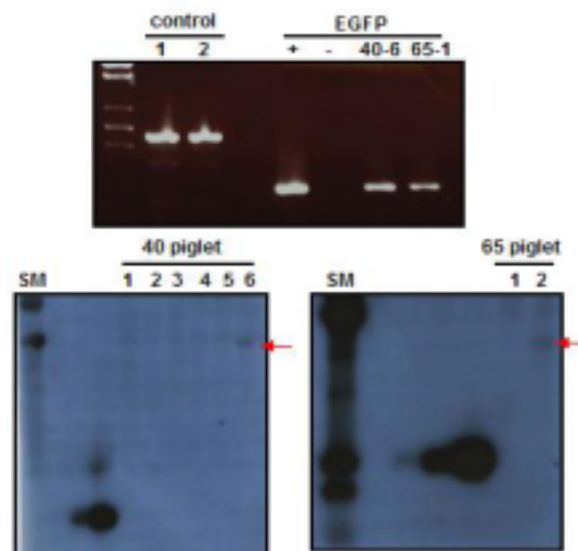


Figure 29-2. PCR and southern blot analysis of EGFP expression piglet

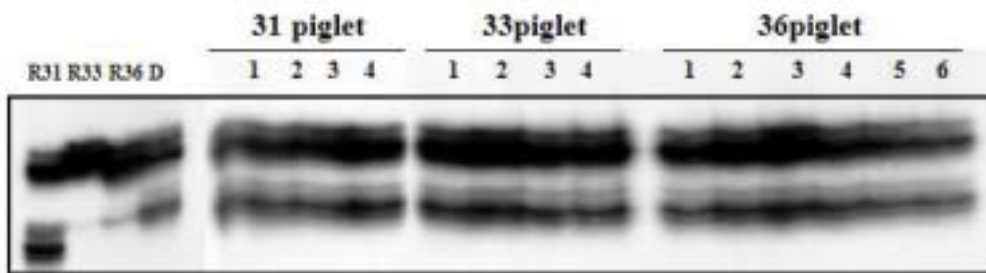


Figure 30. Microsatellite analysis of the male cloned piglets. Shown is the result from one microsatellite marker: *SWR1120*. The microsatellite alleles for the nuclear transfer-derived piglets (120) were compared with those from the recipient gilt (R) and the donor fetal fibroblast cell line (D).



Figure 31. ET-36-3, 5 and 6 had abnormal feet. One of the dewclaws of the front right leg was abnormally large (short arrow), and the front left leg had three dewclaws (long arrow shows additional dewclaw).

또한 핵이식에 의한 체외수정란의 생산에 있어서 융합과 활성화의 방법을 각각 비교하여 생산된 체외수정란을 이식한 결과에 있어서도 3가지의 비교조건(A type; 융합과 활성화를 동시에 주는 조건, B type; 융합과 활성화를 동시에 준 후 CCB를 처리하는

조건, C type; 융합시킨후에 활성화를 유도하고 CCB를 처리하는 조건)에서 2 세포기 로의 분할율(73.0%, 75.8%, 70.5%)과 배반포기배로의 발달율(9.2%, 7.9%, 11.6%) 및 할구수(21.6±2.8, 23.1±1.2, 20.8±2.4)에 있어서 유의적인 차이를 나타내지 않았으며 (Table 23), 이러한 3가지의 방법에 의해 생산된 수정란을 각각의 대리모에 이식한 결과에 있어서도 8마리, 20마리 및 9마리의 복제산자를 생산하였다(Table 24).

이러한 결과를 종합하여 본 실험에서는 male과 female 두 종류의 donor cell를 이용하여 모두 37마리의 복제돼지를 생산하였고, 이러한 복제돼지의 표현형에 이상이 있음을 확인하였다. 복제돼지의 생시체중이 암컷에 비해 수컷이 유의적으로 낮았음을 확인하였고, 수컷 복제돼지 22마리 중 18는 출생후 일주일내에 폐사되는 것을 확인하였다.

18마리 중 10마리는 폐와 간에서 심각한 울혈을 보였고, 뇌에 박테리아나 바이러스에 의한 감염을 확인하였으며, 일부 수컷 산자는 생후 기립불능에 의한 초유의 급여부족으로 인한 사망이 확인되었다. 또한 해부학적인 견해에서 보면, 대부분의 수컷 복제돼지는 정상적이었으나, 몇몇 새끼 돼지에서는 다수의 장기에서 비정상적인 면을 보여주었고, leydig cell의 결핍, 짧은 턱 길이, 관절뼈의 발달 미숙 그리고 flexor tendon를 나타내었다. 그러나 인공수정과 체내수정에 의하여 생산된 산자에 있어서의 생후 생존율과 발육율에 있어서는 복제산자에 비하여 높은 성적을 나타내었다.

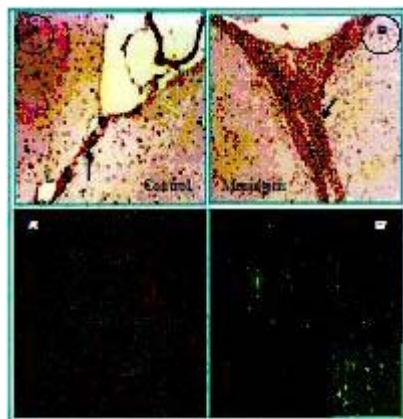


Figure 32. Meningitis in temporal lobe of somatic cloned male piglets

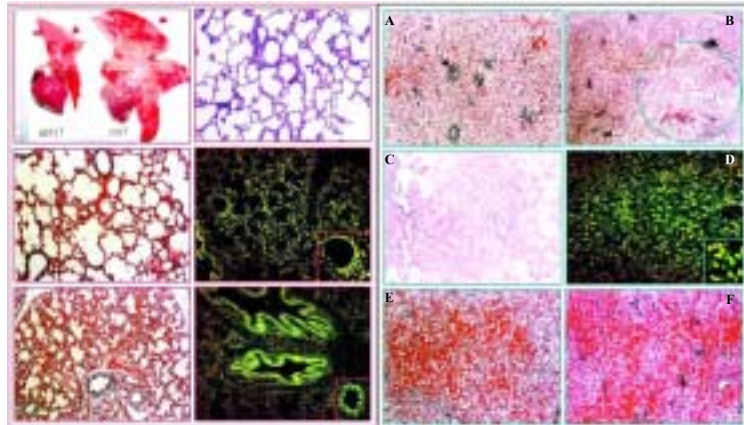


Figure 33. Congestion in lung and liver of cloned male piglets.

따라서, 본 연구에서는 돼지의 복제동물 생산에 있어서 여러 가지의 조건을 제시하고 다양한 방법을 이용하여 실험한 결과, 복제동물의 생산효율을 향상시키고 더 나은 연구범위를 제시하기 위하여 복제동물 생산에 대한 많은 연구가 지속적으로 수행되어야 할 것으로 사료된다.

제 6절 형질 전환 동물로부터 EPO 단백질 생산 및 분석

1. 모델 생쥐의 생산에 의한 생리활성 검정 및 안정성 평가

가. 형질전환생쥐의 생산방법

1) 교배

가) 수정란을 채취하는 3일전에 암컷 마우스에 PMSG를 복강내에 투여한다.

나) PMSG투여 하고 2일후 오후 5시에 hCG를 투여한다.

다) hCG 투여하고 나서 수컷 마우스와 교배한다.

라) 교배 다음날 오전 중에 plug의 유무를 검사한다.

2) 수정란의 채취

가) 보온판과 항온조에서의 배양할 준비를 한다. 배양액이 들어있는 병을 냉장고에서 37℃ incubator에 옮긴다.

나) hyaluronidase용액을 냉장고에서 꺼내 실온에 옮겨놓는다 (이상은 실험개시하기 30분전).

다) 실험대 위, 보온판 위, chamber안팎으로 70% 알콜을 뿌리고 페이퍼 타올로 닦는다.

라) 배양액이 들어가 있는 주사기로 35mm 플라스틱 샬레 안에 3~6개의 drop(1개당 0.02~0.05ml)을 만들고, 파라핀 오일로 덮는다. 샬레의 뚜껑에 유성펜으로 난(卵)의 계통명 등을 기입하고, chamber 안에 넣는다.

마) Mouse의 경추탈골 실시

바) Mouse의 외과용 가위로 외피와 내피를 개봉한다.

사) 자궁의 결합조직부분을 안과용가위의 날을 사용하여 떼어낸다. 난관과 자궁 사이를 핀셋으로 찢고, 처음에 난소와 난관의 사이를 가위로 자르고, 다음에 핀셋으로 찢은 부분의 자궁쪽을 잘라 난관을 잘라 낸다.

아) 잘라낸 난관을 M2 medium에 넣어 보온판위에 놓고, 온도가 내려가는 것을 방지한다.

자) 1ml needle을 이용하여 현미경하에서 난관 팽대부를 터트려 embryo를 회수한다.

차) 회수된 embryo를 hyaluronidase용액에서 난구세포가 떨어질 때까지 방치한다.

카) M2 medium에서 2~3차례 Washing한다.

타) Centrifuge에서 13,000rpm에서 5분간 원심 분리한 후에 M2 medium에서 2~3차례 Washing하며 정상난을 선별한다.

파) Oil로 도포한 M16 medium에서 2~3차례 Washing한 후에 37°C incubator에 옮긴다.

3) 수정란에 DNA주입

(1) 배(胚)조작용 피펫을 만드는 방법

가) 주입용 피펫(Injection pipet)

1) 글래스관(capillary)를 puller에 셋팅하여 start한다.

2) capillary는 좌우로 당겨져 가늘게 되면 뒷끝을 둥글게 하여 보관한다.

3) Microforge에서 앞끝을 알맞은 각도를 구부려 보관한다.

나) Holding pipet

1) Puller에서 뽑은 capillary tube를 microforge를 이용하여 직경이 50 μ m정도에 서 끊어준다.

2) 90. 로 세워 유리구슬에서 앞끝 부분을 둥글게 만들어 준다(내경 10 μ m).

3) 알맞은 각도를 구부려 보관한다.

(2)DNA의 주입

1) Micromanipulator의 전원을 켜다.

2) Micromanipulator의 카라에 만들어 둔 Holding pipet과 Injection pipet을 끼워서 피펫홀더에 setting한다.

3) 각각의 피펫홀더를 움직여서 현미경스테이지에 대해 양 피펫의 앞끝이 평행이 되도록 한다.

4) 먼저 Holding pipet을 현미경 초점상에서 배울을 높여가며 하나로 합쳐지는

점을 찾는다.

- 5) Injection pipet도 위와 같은 방법으로 설치한다.
- 6) Holding pipet의 앞 끝에 Injection pipet의 끝부분을 살짝 cracking해준다.
- 7) 피펫을 위로 올려둔후 medium(Embryo를 30개 정도 넣어준다.) 과 DNA가 들어 있는 drop을 현미경상에서 초점을 맞춘다.
- 8) Drop상에 올려둔 피펫을 drop과 동일 초점상에 내려서 맞추어 준다.
- 9) Injection pipet의 기포를 모두 뺀 후 DNA drop 상에서 DNA를 빨아들인다.
- 10) Holding pipet과 Injection pipet, Embryo를 동일 초점이 되도록 맞춘다.
- 11) Holding pipet으로 Embryom를 잡아준 후 압을 조절하면서 응성전핵이 보이는 방향으로 다시 잡아준다.
- 12) manipulator의 joystick을 움직여서 주입용피펫을 전핵을 향해서 찢러 넣고, 응성 전핵이 팽창되는 것이 확인 되어지면 수정란으로부터 pipet을 빼준다.
- 13) DNA를 주입한 수정란과 미처리난을 분리하여 놓고, 위와 같은 방법으로 모든 수정란에 Injection 작업을 실시한다.
- 14) 피펫의 끝이 막히면 다른 피펫으로 교체하여 똑같은 작업을 반복하여 준다.
- 15) 생존란을 선별하여 37°C incubator에서 배양한다.

4) 배의 이식

(1) 정관결찰 마우스

- 1) 6주령의 수컷 ICR mouse를 사용한다.
- 2) Avertin을 가온시켜둔다.
- 3) 수술대를 소독하고 , 가위와 핀셋을 70% 알콜로 닦은 뒤, 알콜 램프로 화염 멸균한다.
- 4) 10g당 0.2ml로 마취를 시킨다.
- 5) 마취가 되면 배위로 놓고 털을 깎아낸 후에, 핀셋과 가위로 치골(恥骨)에서 부터 약 1.5cm되는 상부의 외피를 정중선을 따라서 약 1cm가량 절개한다.
- 6) 절개구를 겹치기 않게 오른쪽 또는 왼쪽으로 비켜서 근층(筋層)을 절개한다.
- 7) 음낭으로 내려와 있는 정소를 손가락으로 가볍게 밀어올리듯이 해서 복강 내로 이동시킨다.

- 8) 핀셋으로 지방을 꺼내지도록 하면서, 정소, 정소상체 및 정관을 체외로 꺼낸다.
- 9) 정관을 확인한 후, 정관 주변의 막을 핀셋으로 분리해서 정관을 달군 핀셋으로 끊어준다.
- 10) 분리를 확인한 후에 근층을 핀셋으로 당겨서 올리고, 정소상체의 미부에서 복강으로 되돌려준다.
- 11) 봉합사를 사용해서 근층을 봉합한다. 정유고환(停留睾丸)이 되지 않도록 정소를 음낭에 되돌려 놓는다.
- 12) 마취가 깰때까지 가온기에 둔다.
- 13) 개별 사육하며 test를 거친후에 위임신 mating용으로 사용한다.

(2) 위임신 암컷(recipient mouse) mouse를 만드는 방법

- 1) 실험일 전에 발정이 확인된 ICR female mouse를 정관 결찰한 ICR male mouse와 교배를 실시한다.
- 2) 실험일 오전에 plug를 확인하여 위임신 유무를 확인한다.

(3) 난관 내 이식(Embryo Transfer)

- 1) 70% 알콜로 사용할 실험대를 소독
- 2) Avertin을 가온시켜둔다.
- 3) 수술대를 소독하고 , 가위와 핀셋을 70% 알콜로 닦은 뒤, 알콜 램프로 화염 멸균한다.
- 4) Mouse의 마취
- 5) 수정란을 transfer pipet에 일렬로 배열한다.
- 6) 복위로 놓고 털을 깎아낸 후에 외피와 근층을 조금만 절개하여 홍채핀셋을 사용해 난소, 난관 및 자궁각의 상부를 주위에 붙어 있는 지방조직과 함께 체외로 꺼낸다.
- 7) 난소가 난소낭을 통해서 보이는 부분이 위로 가도록 하고 지혈 크렌메로 지방조직을 끼워, 가제에 고정한다.
- 8) 실체 현미경하에서 왼손에 쥐고 있던 앞이 가는 핀셋으로 난소낭을 잡아 그 표면에 뻗어 있는 혈관을 자르지 않도록 주의하면서, 막을 절개한다. 앞이 가는 핀셋으로

로 절개한 난소낭의 막을 집어서 난관과 난소를 끌어 당기면 쉽게 난관채를 발견할 수 있다.

9) 난관채에 이식용 피펫의 앞끝 부분을 2~3 mm 삽입하고, 난을 배양액과 함께 난관내로 조심스럽게 주입한다. 피펫 내의 기포 두 개 중 마커로 하는 첫 번째 기포를 난관내에 넣어주는 것으로 주입을 확인한다.

10) 홍채 핀셋으로 근층을 들어올리는 것처럼 하면 밖으로 꺼냈던 자궁, 난관, 난소가 복강 내로 자연히 되돌아가므로 이것들을 정상의 위치로 되돌려 준다.

11) 마취가 깰때까지 가온기에 둔다.

12) 케이지에 넣어 사료와 물을 준다.

나. 유선 특이적 형질전환생쥐 생산 및 검정

유선 특이적 형질전환생쥐의 생산을 위해 기존에 크로닝되어 있는 rat 의 WAP 프로모터와 goat의 베타-casein 프로모터를 이용하여 EPO를 발현하는 두 종류의 발현벡터를 구축하였다.

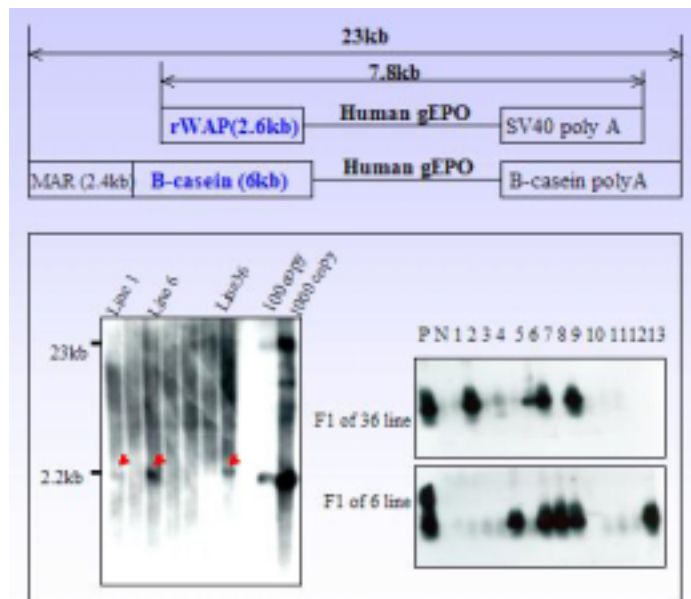


Figure 34. Generation of Transgenic Mouse

A. Transgenic construction for mammary gland-specific of human EPO

B. Detection the copy number of the transgene.

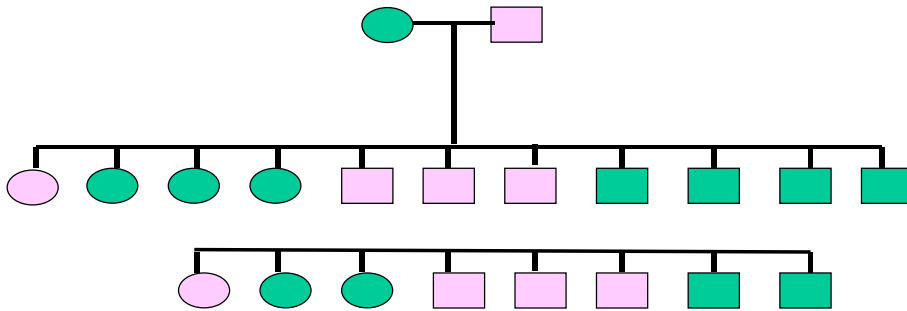
Fig. 34의 A에서와 같이 우선 유전 특이적인 2.6kb rat의 WAP 프로모터에 사람의 genomic EPO 유전자를 삽입한 7.8kb 발현벡터를 구축하였고 두번째로 유전 특이적 프로모터인 베타 casein의 조절하에 EPO 생산을 극대화할 수 있도록 23kb 발현벡터를 구축하였다. 프로모터 활성 강화와 EPO의 발현을 안정되게 하기 위한 insulator 유전자를 프로모터 앞부분에 삽입하여 프로모터 가까이 존재하는 조절인자의 영향과 position-independent한 발현을 도와주게끔 Chicken의 베타-globin에서 분리하여 그 효율을 높이기 위해 2copy를 증폭하여 사용하였다.

위의 유전 특이적 벡터를 이용하여 현미미세주입주입에 의하여 42마리의 산자중 3line이 형질전환되었음을 PCR과 Genomic Southern blot으로 확인하였다.

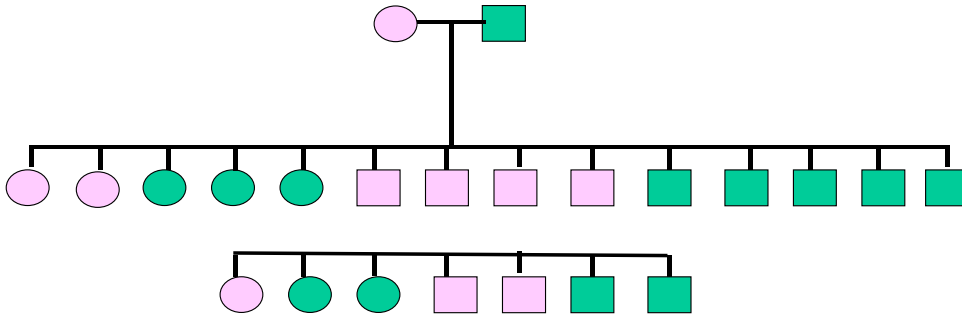
Fig. 34의 B에서와같이 생쥐의 꼬리로부터 게놈 유전자를 분리한후 형질전환여부를 EPO probe을 사용하여 확인한 결과 태어난 42마리의 산자중 3마리가 형질전환으로 검정되었다. 삽입된 copies을 확인하기 위하여 southern blotting을 행한 결과 약 500-1000 copies을 가진 것으로 확인되었으며, 이들 copies수와 발현과는 상관관계가 없는 것으로 확인되었다.

생산된 형질전환 생쥐로부터 수립한 line중 가장 강력한 발현을 가진 line 6과 37 line의 가계도는 아래와 같다.

line 6



line 37



다. WAP 프로모터를 이용한 형질전환 마우스에서의 ectopic 발현과 이상현상 rat의 WAP 프로모터가 유선 특이적으로 발현하는지의 여부를 알아보기 위해 18일 된 태아와 형질전환된 마우스의 각 조직을 section한후 immunohistochemistry를 수행한 결과 Fig. 35에서 보는바와 bone marrow, brain의 정상세포, heart와 spleen에서 ectopic 발현을 보이는 것을 확인하였다. 그리고 Fig. 36에서와 같이 control 마우스에 비해 형질전환된 마우스의 비장이 비정상적으로 큰 것을 확인하였다.

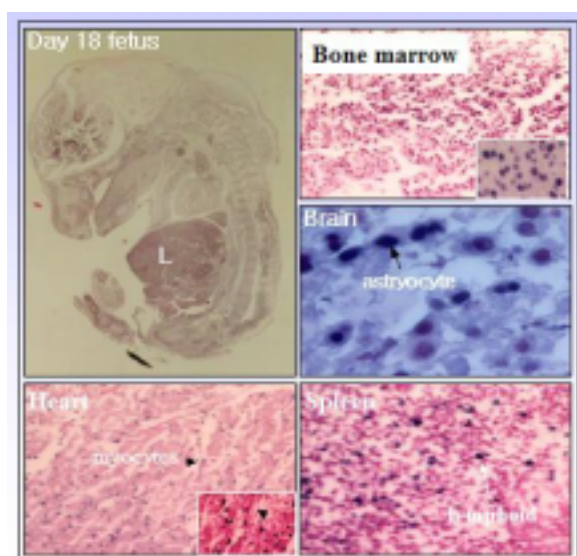


Figure 35. Ectopic expression of pWAP/hEPO vector in transgenic embryos

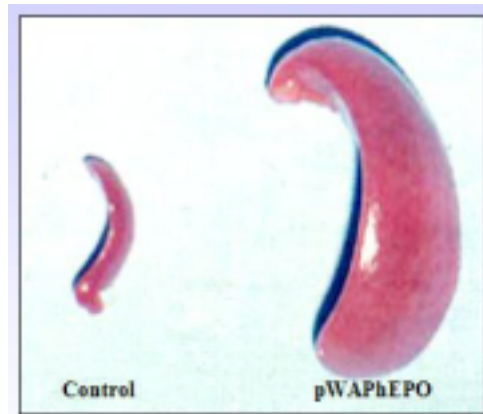


Figure 36. Splenomegaly of pWAP/hEPO transgenic founder mice.

라. 베타 cagine 프로모터를 이용한 형질전환 마우스에서의 유선 특이적 발현의 검정
goat의 베타-cagine 유전자를 이용한 EPO의 발현이 유선특이적으로 발현하는지의 여부를 RNA 또는 protein을 이용하여 분석한 결과 EPO유전자는 오직 유선에서만 특이적으로 발현되는 것을 확인하였다.

Fig. 37 에서와 같이 형질전환된 생쥐로부터 수립한 6과 37 line 마우스의 각각의 조직에서 RNA를 추출한후 RT-PCR과 Northern blot을 한 결과 다른 조직에서는 전혀 발현되지 않고 EPO유전자는 오직 유선에서만 특이적으로 발현되는 것을 확인하였다.

그리고 Fig. 38에서와 같이 protien level에서 EPO의 발현을 알아보기 위해 immunohistochemistry를 수행한 결과 유선의 알비올라 상피세포에서만 특이적인 발현을 보이는 것을 확인하였다.

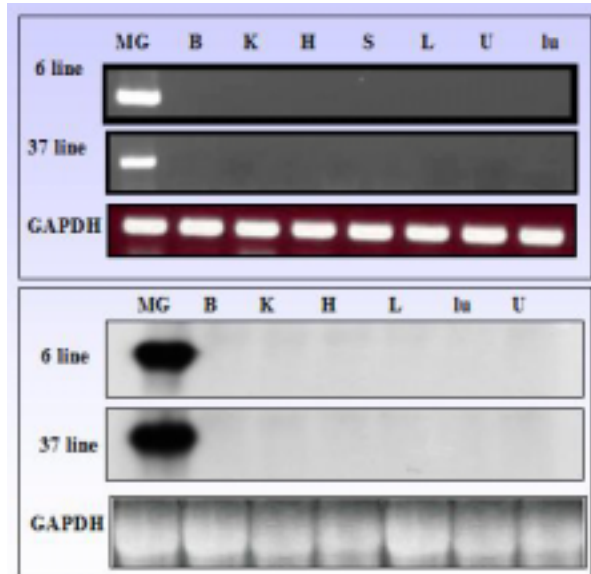


Figure 37. Expression of pBC1/hEPO in the mammary gland.

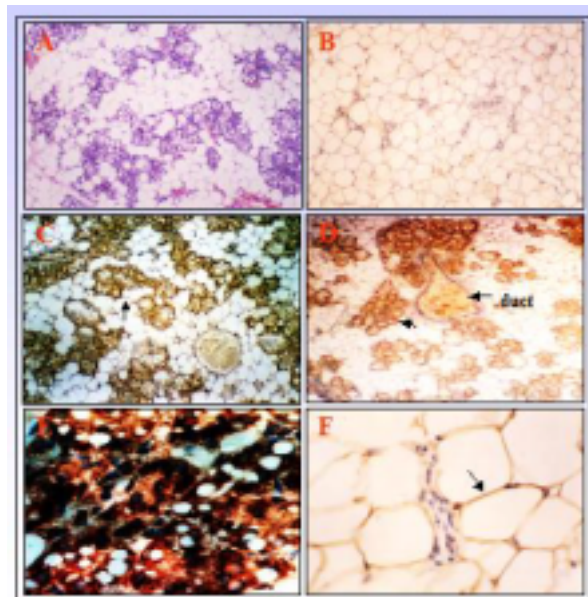


Figure 38. Expression of human erythropoietin in transgenic mammary gland

마. Western blot에 의한 단백질 분석 및 안정성 검정

goat의 베타-casein 유전자를 이용한 형질전환 마우스의 EPO 단백질 발현과 그 농도를 알아보기 위해 Fig. 39 에서와 같이 Westren blot을 한 결과 유선과 유즙에서 발현됨을 확인하였으며 total 단백질중 0.7-1.4%를 차지하였다.

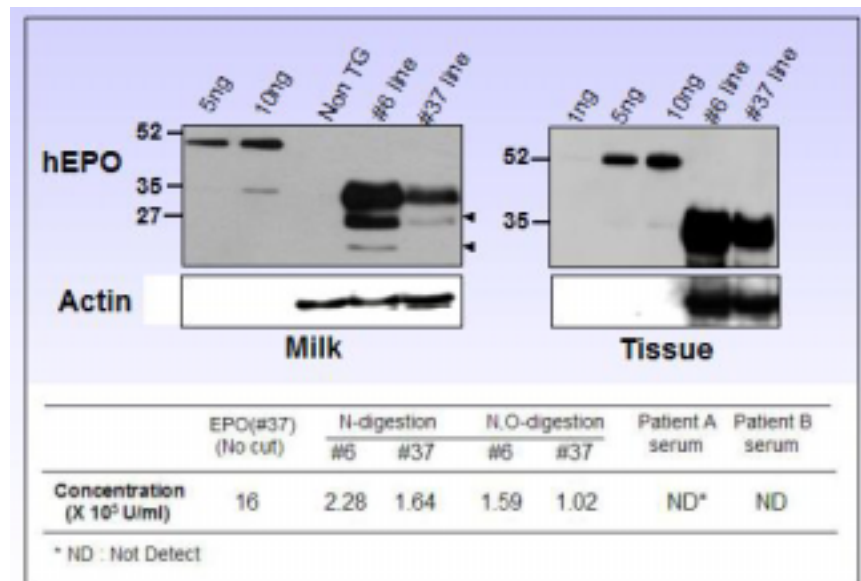


Figure 39. Determination of hEPO concentration from pBC1hEPO mouse milk-derived protein

그리고 일반적으로 native 상태의 EPO는 166개의 아미노산으로 구성되어 있으며 3개의 N-glycosylation sites와 1개의 O-glycosylation site를 가지고 있다. 이러한 EPO와 같은 단백질이 bioactivity를 가질려면 glycosylation이 이루어져야하는데 translation이 개시된후 signal peptide에 의해 cleavage가 일어나 단백질이 N-glycosylation 되면서 단백질의 folding에 관여하며 o-glycosylation되면서 단백질

이 분비되게 된다. 이에 따라 형질전환된 마우스의 밀크에서 생산된 재조합된 hEPO의 Glycosylation site를 알아보기 위해 N-glycosidase와 O-glycosidase를 처리하여 Western blot을 실시한 결과 Fig. 40에서와 같은 패턴을 확인하였다.

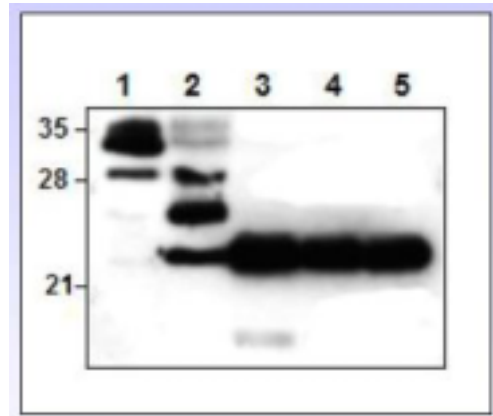


Figure 39. Digestion of N- and O-glycosylation site in TG milk

lane 1, Tg milk EPO

lane 2, incomplete digestion (0.01U N-glycosidase, 37°C 4hr digestion)

lane 3, N,O-diglycosylation (2U N-glycosidase, 1.5mU O-glycosidase, 37°C 22hr)

lane 4, 6line complete N-glycosylation (2U N-glycosidase, 37°C 22hr)

lane 5, 37line complete N-glycosylation (2U N-glycosidase, 37°C 22hr)

그리고 Fig. 41번은 EPO의 안정성을 검정하기 위해 형질전환된 마우스의 밀크에서 생산된 재조합된 hEPO와 신부전증 환자의 혈액을 이용해 2D 분석을 한 것으로 형질전환된 6과 37line의 마우스의 밀크에서 재조합된 hEPO는 acidic 상태로 sialic acid를 많이 함유하고 있으며 control과 신부전증 환자의 혈액은 asialic 상태를 확인하였다.

Sialic acid와 같은 sugar chain은 단백질의 구조와 기능에 영향을 미치며 sialic 상태는 RBC 전구세포에 작용해 단백질 활성을 가지며 asialic 상태는 liver receptor와

결합해 오줌으로 배출되어 활성을 가지지 못한다.

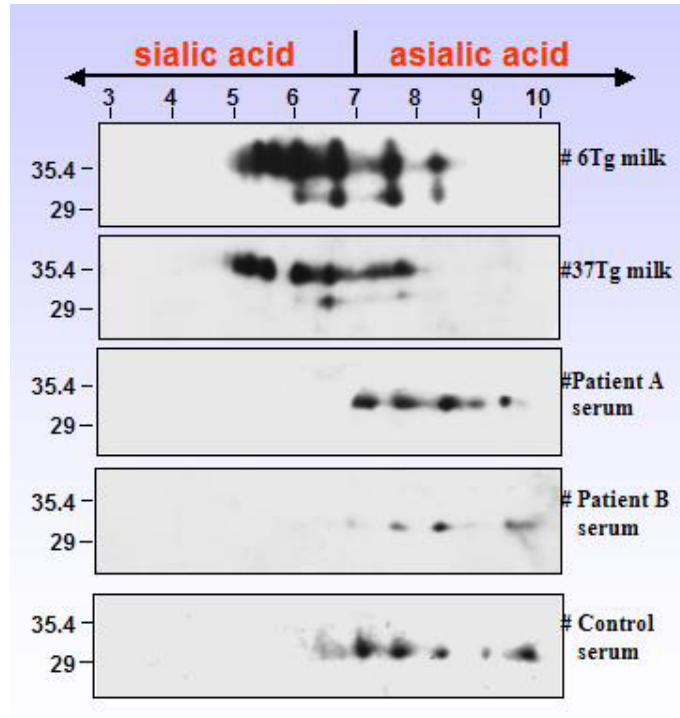


Figure 41. Western blot of 2D analysis in EPOTG milk and human serum

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표달성도

본 연구는 3년간의 연구를 수행함에 있어서 1차 년도에는 형질전환 동물생산을 위한 최적 생산체계를 적립하기 위하여, 정자를 이용한 유전자 도입법과, 정자세포를 이용한 유전자 도입법을 확립하였다. 그러나 이들 정자를 이용한 유전자 도입법은 효율적으로 정자나 또는 정자 막에 유전자가 도입됨에도 불구하고, 형질전환 동물의 생산에는 실패하였다.

또한 1차 년도와 2차 년도에는 EPO를 유선 및 방광에서 특이적으로 발현하는 재조합백터를 구축하기 위하여, 9kb의 방광 특이적 프로모터 유전자를 cloning, sequencing하였으며, 아울러 4kb의 유선 특이적으로 발현하는 pBC1프로모터 유전자를 구축하였다. 이들 구축한 재조합백터를 이용하여 형질전환 생쥐를 생산한 결과 약 500mg/1 little의 EPO 생산성을 가진 형질전환 생쥐의 생산에 성공하였다.

생산된 EPO가 생리적 활성을 가지는지의 여부를 조사하기 위하여, EPO의 당쇄부가 및 glycosylation여부를 조사한 결과, 유선 및 방광상피세포에서 EPO의 당쇄부가 및 glycosylation은 기존에 보고된 CHO세포보다 더 우수하다는 결과를 도출하였다. 이 단백질의 활성을 조사하기 위하여, 0.6kb의 bcl-XL promoter 유전자를 이용한 in vitro assay법을 개발하여 측정된 결과, 양적 농도에 따른 고효성을 가지는 것으로 판단되었다. 본 연구 프로젝트는 무관하나, EPO의 당쇄조사에 의한 결과는 금후 운동선수들의 EPO남용에 의한 doping에도 사용가능함이 시사되었다.

2차년과 3차년에 걸쳐, 형질전환 돼지의 생산을 시도하였다. 1년차에 개발된 정자를 이용한 유전자 전이법을 이용하여 총 34두의 돼지를 생산하였으나, 이중 형질 전환된 돼지는 확인되지 않았다. 따라서 형질전환 돼지의 생산을 위하여, 체세포를 이용한 유전자 전이법을 개발하였다. 체세포에 유전자 도입 및 형질전환 여부의 간단한 식별을 위하여, GFP marker유전자를 이용하여 복제 형질전환 돼지를 37생산한 결과 2두에서 GFP reporter유전자를 가진 형질전환돼지의 생산에 성공하였다.

비록 본 연구를 통하여 EPO를 생산하는 형질전환돼지의 생산에는 실패하였으나, 본 연구기간 내에 발생한 돈 콜레라 및 구제역의 어려운 시기적 여건을 고려 시에, 3년간에 걸친 연구결과는 보다 효율적으로 형질전환동물의 생산을 위한 연구에 귀중한 재료로 활용되리라 믿는다.

제 2 절 관련분야 기술발전의 기여도

본 연구의 최종 목표인 EPO를 생산하는 형질전환 돼지의 생산에는 실패하였으나, 다수의 복제돼지의 생산 기술의 확립과 체세포유전자 전이에 의한 GFP를 가진 형질전환 복제 돼지의 생산은 다음과 같은 기술발전 분야에 기여할 수 있는 제반 연구를 갖추게 되었다.

- 효율적인 형질 전환 동물의 생산 방법이 개발되었으며, 이 결과는 타 동물에는 이용 가능할 것이다.
- 형질전환 생쥐를 통한 결과는, EGO의 충분한 양은 우유 및 요에서 생산가능하며, 생산된 EPO는 충분한 생리활성을 갖는 것으로 증명되었다.
- 본 연구를 통하여 크로닝한 유전자는 국제간 우수 유전자의 상호 교류를 통해 상호협력의 증대에 기여할 것으로 사료된다.
- 고부가 가치성 희귀물질을 대량 생산하는 연구기반을 제공함으로써 세계시장내에서 국내축산업의 경쟁력을 강화하는데 기여할 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구는 유전자 재조합 기술을 이용한 유용 생리활성단백질을 생산하는 기술의 개발로, 본 연구의 성공적인 수행은 사회 경제적 삶의 질과 생활의 질 개선에 도움이 될 것으로 사료된다. 따라서 본 연구를 통하여 얻어진 결과는 다음과 관련된 국내외 연구기관에 이전하고자 한다.

제 1 절 활용계획

- 유전자 재조합 관련 연구기관 및 산업분야
- 외래 유전자를 수정란에 도입하려고 하는 모든 연구기관 및 산업체
- 동물의 특위 기관에서 유용 생리활성물질 생산코자하는 기관 및 연구소

제 2 절 활용방안

- 개발된 기술은 학술지에 발표하고, 가능하면 특허권을 획득한 다음 관련 산업계에 보급한다.
- 연구 중에 얻은 각종 know-how를 희망하는 기관에 보급

본 연구는 금후 추가적인 연구를 통하여 이미 확립된 기술을 바탕으로 EPO를 생산하는 형질전환 돼지의 생산이 가능할 것으로 사료된다.

제 6 장 참고문헌

1. Uehara T, Yanagimachi R. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol Reprod* 1976;15:467-70.
2. Hosoi Y, Miyake M, Utsumi K, Iritani A. Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoa. In: *Proc 11th Int Congr Anim Reprod Artif Insemin*; 1988; Dublin, Ireland. Abstract 331.
3. Kimura Y, Yanagimachi R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod* 1995;52:709-20.
4. Kuretaka S, Kimura Y, Hoshi K, Yanagimachi R. Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads. *Biol Reprod* 1996;55:789-95.
5. Deng M, Yang X. Full term development of rabbit oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Mol Reprod Dev* 2001;59:38-43.
6. Martin MJ. Development of in vivo-matured porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod* 2000;66:109-12.
7. Kolbe T, Holtz W. Birth of a piglet derived from an oocyte fertilization by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Anim Reprod Sci* 2000;64:97-101.
8. Goto K, Kinoshita A, Takuma Y, Ogawa K. Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilized, killed spermatozoa. *Vet Rec* 1990;127:517-20.
9. Hamano K, Li X, Funahashi K, Furudate M, Minato Y. Gender preselection in cattle with intracytoplasmically injected, flow cytometrically sorted sperm heads. *Biol Reprod* 1999;60:1194-7.
10. Horiuchi T, Emuta C, Yamauchi Y, Oikawa T, Numabe T, Yanagimachi R. Birth of normal calves after intracytoplasmic sperm injection of bovine oocytes: a methodological approach. *Theriogenology* 2002;57:1013-24.
11. Catt SL, Catt JW, Gomez MC, Maxwell WMC, Evans G. The birth of a male lamb derived from an in vitro matured oocyte fertilization by intra-cytoplasmic

- injection of a single presumptive male sperm. *Vet Rec* 1996;139:494-5.
12. Cochran R, Meintjes M, Reggio B, Hylan D, Carter J, Pinto C, Paccamonti D, Godke RA. Live foals produced from sperm-injected oocytes derived from pregnant mares. *J Equine Vet Rec* 1998;18:736-40.
 13. Hewitson L, Dominko T, Takahashi D, Martinovich C, Ramalho-Santos J, Sutovsky P, Fanton J, Jacob D, Monteith D, Neuringer M, Battaglia D, Monteith D, Neuringer M, Battagli D, Simerly C, Schatten G. Unique checkpoints during the first cell cycle of fertilization after intracytoplasmic sperm injection in rhesus monkey. *Nat Med* 1999;5:431-3.
 14. Pope CE, Johnson CA, McRae MA, Keller GL, Dresser BL. Denelopment of embryos procedure by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Anim Reprod Sci* 1998;53:221-36.
 15. Flaherty SP, Payne D, Swann NJ, Matthews CD. Assessment of fertilization failure and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reprod Fertil Dev* 1995;7:197-210.
 16. Palermo GD, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992;340:17-8.
 17. Tesarik J, Sousa M. More than 90% fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection and artificial induction of oocyte activation with calcium ionophore. *Fertil Steril* 1995;63:343-9.
 18. Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenswillen C, Tournaye H, Derde MP, Van Assche E, Devroey P. Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. *Hum Reprod* 1993;8:1055-60.
 19. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J, Wisanto A, Devroey P. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993;8:1061-6.
 20. Catt JW, Rhodes SL. Comparative intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in human and domestic species. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:161-7.

21. Tesrik J, Sousa M, Testart J. Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1994;9:511-8.
22. Keefer CL. Fertilization by sperm injection in the rabbit. *Gamete Res* 1989;22:59-69.
23. Perreault SD, Barbee RR, Elstein KH, Zucker RM, Keefer CL. Interspecies differences I the stability of mammalian sperm nuclei assessed in vivo by sperm microinjection and in vitro by flow cytometry. *Biol Reprod* 1988;39:157-67.
24. Kolbe T, Holtz W. Intracytoplasmic injection (ICSI) of in vivo or in vitro matured oocytes with fresh ejaculated or frozen-thawed epididymal spermatozoa and additional calcium-ionophore activation on the pig. *Theriogenology* 1999;52:671-82.
25. Lee JW, Jeong BS, Rieson J, Hoagland T, Yang . Fertilization and embryonic development following injection of froen-thawed spermatozoon into in vitro matured porcine oocyte. *Theriogenology* 2001;55:506. Absr.
26. Di Berardin D, Gil MA, Parrilla I, Fernandez MA, Coppola G, Mzza MR, Roca J, Vazquez JM, Lucas X, Martinez EA. Pronuclear formation and development in pig oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 2000;53:389. Absr.
27. Keefer CL, Younis AI, Brackett BG. Cleavage development of bovine oocytes fertilized by sperm injection. *Mol Reprod Dev* 1990;25:281-5.
28. Westhusin ME, Anderson JG, Harms PG, Kraemer DC. Microinjection of spermatozoa into bovine eggs. *Theriogenology* 1984;21:274. Absr.
29. Kimura Y, Yanagimachi R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod* 1995;52:709-20.
30. Catt J, Rhodes SL. Comparative intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in human and domestic species. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:161-7.
31. Rho GJ, Wu B, Kawarsky S, Leibo SP, Betteridge KJ. Activation regimens to prepare bovine oocytes for intracytoplasmic sperm injection. *Mol Reprod Dev* 1998; 50:485-92.

32. Rho GJ, Kawarsky S, Johnson WH, Kochhar K, Betteridge KJ. Sperm and oocytes treatment to improve the formation of male and female pronuclei and subsequent development following intracytoplasmic sperm injection into bovine oocytes. *Biol Reprod* 1998;59:918-24.
33. Kaufman MH. Methodology: In vitro and in vivo techniques. In MH Kaufman (ed): *Early Mammalian Development: Parthenogenetic Studies*. Cambridge University Press, 1983;20-6.
34. Chen SH, Seidel GE. Effects of oocytes activation and treatment of spermatozoa on embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in cattle. *Theriogenology* 1997;48:1265-73.
35. Qian XQ, Inagaki H, Sasada H, Sugawara S. Decondensation and male pronuclear formation in bovine oocytes after microinjection of bovine sperm pretreated with disulfide bond reducing agent. *J Mammal Ova Res* 1996;13:118-21.
36. Kubiak JZ. Mouse oocytes gradually develop the capacity for activation during the metaphase II arrest. *Dev Biol* 1989;136:537-45.
37. Minamihashi A, Watson AJ, Watson PH, Church RB, Schurtz GA. Bovine parthenogenetic blastocysts following in vitro maturation and oocyte activation with ethanol. *Theriogenology* 1993;40:63-76.
38. Nagai T. Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes in vitro with ethanol. *Gamete Res* 1987;16:243-9.
39. Wang WH, Abeydeera LA, Prather RS, Day BN. Functional analysis of activation of porcine oocytes by spermatozoa, calcium ionophore, and electrical pulse. *Mol Reprod Dev* 1998;51:346-53.
40. Funahashi H, Cantley TC, Stumpt TT, Terlouw SL, Day BN. In vitro development of in vitro-matured porcine oocytes following chemical activation or in vitro fertilization. *Biol Reprod* 1994;50:1072-7.
41. Ware C, Barnes F, Maiki-Lauria M, First NL. Age dependence of bovine oocyte activation. *Gamete Res* 1989;22:265-75.
42. Zhu J, Telfer EE, Fletcher J, Springbett A, Dobrinsky JR, De Sousa PA,

- Wilmot I. Improvement of an electrical activation protocol for porcine oocytes. *Biol Reprod* 2002;66:635-41.
43. Kure-bayashi S, Miyake M, Okada K, Kato S. Successful implantation of in vitro-matured electro-activated oocytes in the pig. *Theriogenology* 2000;53:1105-1.
44. Jolliff WJ, Prather RS. Parthenogenic development of in vitro-matured, in vivo-cultured porcine oocytes beyond lastocyst. *Biol Reprod* 1997;56:544-8.
45. Prather RS, Eichen PA, Nicks DK, Peters MS. Artificial activation of porcine oocytes matured in vitro. *Mol Reprod Dev* 1991;28:405-9.
46. Hagen DR, Prather RS, First NL. Response of porcine oocytes to electrical and chemical activation during maturation in vitro. *Mol Reprod Dev* 1991;28:70-3.
47. Prochazka R, Kanka J, Sutovsky P, Fulka J, Motlik J. Development of pronuclei in pig oocytes activated by a single electric pulse. *J Reprod Fertil* 1992;96:725-34.
48. Campbell KHS, Ritchie WA, Wilmot I. Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for deoxyribonucleic acid replication and development. *Biol Reprod* 1993;49:933-42.
49. Powell JW, Barnes FL. The kinetic of oocytes activation and polar body formation in bovine embryo clones. *Mol Reprod Dev* 1992;33:53-8.
50. Prochazka R, Durnford R, Fiser PS, Marcus GJ. Parthenogenetic development of activated in vitro matured bovine oocytes. *Theriogenology* 1993;39:1025-32.
51. Prather RS, Boice ML, Gibson J, Hoffman KE, Parry TW. In vitro development of embryos from Sinclair miniature pigs: a preliminary report. *Theriogenology* 1995;43:1001-7.
52. Petters RM, Wells KD. Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil* 1993;48(Suppl):61-73.
53. Kim NH, Lee JW, Jun SH, Lee HT, Chung KS. Fertilization of porcine oocytes following intracytoplasmic spermatozoon or isolated sperm head injection. *Mol Reprod Dev* 1998;51:436-44.
54. Kim NH, Simerly C, Funahashi H, Schatten G, Day N. Microtubule

- organization in porcine oocytes during fertilization and parthenogenesis. *Biol Reprod* 1996;54:1397-1404.
55. Tarkovaki AK. An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs. *Cytogenesis* 1966;5:394-400.
56. Wallenhorst S, Holtz W. Transfer of pig embryos to different uterine sites. *J Anim Sci* 1999;77:2327-9.
57. Parrington J, Swann K, Schevchenko VI, Sesay AK, Lai FA. Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* 1996;379:364-8.
58. Kuretake S, Kimura Y, Hoshi K, Yanagimachi R. Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads. *Biol Reprod* 1996;55:789-95.
59. Prather RS, Sims MM, First NL. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol Reprod* 1988;41:414-8.
60. Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenswillen C, Tournaye H, Derde MP, Van Assche E, Devroey P. Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum Reprod* 1993;8:1055-60.
61. Perreault SD, Barbee RR, Elstein KH, Zucker RM, Keefer CL. Interspecies difference in the stability of mammalian sperm nuclei assessed in vivo by sperm microinjection and in vitro by flow cytometry. *Biol Reprod* 1988;39:157-67.
62. Kim NH, Shin JS, Jun SH, Lee HT, Chung GS. Fertilization and in vitro development of porcine oocytes following intracytoplasmic injection of round spermatid or round spermtid nuclei. *Theriogenology* 1999;51:1441-9.
63. Balczon, R. (2000). Centrosome replication in somatic cells: The significance of G1phase. *Cur. Top. Dev. Biol.* **49**, 251-66.
64. Betthausen, J., Forsberg, E., Augenstein, M., Childs, L., Eilertsen, K., Enos, J., Forsythe, T., Golueke, P., Jurgella, G., Koppang, R., Lesmeister, T., Mallon, K., Mell, G., Misica, P., Pace, M., Pfister-Genskow, M., Strelchenko, N., Voelker, G., Watt, S., Thompson, S., & Bishop, M. (2000). Production of cloned pigs from in

- vitro systems. *Nat. Biotech* **18**,1055~ 59.
65. Bondioli, K., Ramsoondar, J., Williams, B., Costa, C. & Fodor, W. (2001). Cloned pigs generated from cultured skin fibroblasts derived from a H-transferase transgenic boar. *Mol. Reprod. Dev.* **60**, 189 ~ 95.
66. Campbell, K.H.S., Loi, P., Otaegui, P. & Wilmut, I. (1996). Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Rev Reprod* **1**, 40-46.
67. Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F.A. & Robl, J.M. (1998). Cloned transgenic calves produced from non-quiescent fetal fibroblasts. *Science* **280**, 1256-58.
68. Collas, P., Pinto-Correia, C., Ponce De Leon, F.A. & Robl, J.M. (1992). Development of nuclear transplant rabbit embryos : Influence of the cell cycle stage of the donor nucleus. *Biol. Reprod.* **46**, 492-500.
69. Czolowska, R.J.A., Modlinski, J.A. & Tarkowski, A.K. (1984). Behavior of thymocyte nuclei in non-activated and activated mouse oocytes. *J. Cell. Sci.* **69**, 19-34.
70. Hill, I.R., Burghardt, R.C., Jones, K., Long, C.R., Looney, C.R., Shin, T., Spencer, T.E. Thompson, J.A., Winger, Q.A. & Westhusin, M.E. (2000). Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol Reprod* **63**, 1787-92.
71. Johnson, R.T. & Rao, P.N. (1970). Mammalian cell fusion: Induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature* **226**, 717-722.
72. Kim, N.-H., Funahashi, H., Prather, R.S. & Schatten, G. & Day, B.N. (1996). Microtubule and microfilament dynamics in porcine oocytes during meiotic maturation. *Mol. Reprod. Dev.* **43**, 248-255.
73. Kim, N.-H., Cho, S.K., Choi, S.H., Kim, E.Y., Park, S.P. & Lim, J.H. (2000). The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during in vitro maturation. *Zygote* **8**, 25-32.
74. Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H. & Perry AC. (2000). Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast

- nuclei. *Science* **289**, 1188– 1190.
75. Polejaeva, I.A., Chen, S.H., Vaught, T.D., Page, R.L., Mullins, J., Ball, S., Dai, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D.L., Colman, A. & Campbell, K.H. (2000). Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* **407**, 86–90.
76. Shin, M.R., Park, S.W., Shim, H. & Kim, N.-H. (2002) Nuclear and microtubule reorganization in nuclear transferred bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **62**, 74–82.
77. Simerly, C. & Schatten, G. (1993). Techniques for localization of specific molecules in oocytes and embryos. *Method. Enzymol.* **225**, 516–552.
78. Szollosi, D., Czolowska, R., Szollosi, M. & Tarkowski, A. (1988). Remodeling of mouse thymocyte nuclei depends on the time of their transfer into activated, homologous oocytes. *J. Cell. Sci.* **91**, 603–613.
79. Tani, T., Kato, Y. & Tsunoda, Y. (2001). Direct exposure of chromosomes to non-activated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. *Biol. Reprod.* **64**, 324–330.
80. Tarkowski, A.K. & Balakier, H. (1980). Nucleo- cytoplasmic interaction in cell hybrids between mouse oocytes, blastomeres and somatic cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **55**, 319–330.
81. Tsunoda, Y. & Kato, Y. (2000). The recent progress on nuclear transfer in mammals. *Zool. Sci.* **17**, 1177–84.
82. Verma, P.J., Du, Z.T., Crocker, L., Faast, R., Grupen, C.G., McIlpatrick, S.M., Ashman, R.J., Lyon, I.G. & Nottle MB. (2000). In vitro development of porcine nuclear transfer embryos constructed using fetal fibroblasts. *Mol. Reprod. Dev.* **57**, 262–269.
- 83.** Yin, X.J., Tani, T., Yonemura, I., Kawakami, M., Miyamoto, K., Hasegawa, R., Kato, Y. & Tsunoda, Y. (2002). Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biol. Reprod.* **67**, 442–446.
84. Krantz S. (1991) *Blood* **77**, 419–434

85. Nissenson A.R., Nimer S.D., Wolcott D.L. (1991) *Ann Intern Med.* 114 , 402-416
86. Caro J., Erslev A.J., Silver R., Miller O., Birgegard G. (1982) *Blood* 60, 984
87. Zanjani ED, Ascensata JL, McGlave P, Banissadre M. (1981) *J Clin. Invest.* 67, 1183
88. Fried W, Barone VJ, Barone T. (1982) *Exp. Hematol.* 5, 472
89. Grosveld F., Assendelft JL., McGlave P., and Kollias G. (1987) *Cell* 51,975-985
90. Pondel MD, Proudfoot NJ., Whitelaw C, Whitelaw E. (1992). *Nucleic Acids Res.* 20, 5655-5660
91. Hayes, E., Galea, S., Verkuylen, A., Pera, M., Morrison, J., Lacham-Kaplan, O. & Trounson, A. (2001). Nuclear transfer of adult and genetically modified fetal cells of the rat. *Physiol. Genomics* 5, 193~203.
92. Kono, T., Kwon, O.Y. & Nakahara, T. (1991). Development of enucleated mouse oocytes reconstituted with embryonic nuclei. *J. Reprod. Fert.* 93, 165-72.

주 의

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