

유전자전환 수정란의 선별과 복제

이 효 중

경상대학교 수의학과

Preselection and cloning of transgenic emb

Lee, Hyo-jong

Department of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

ABSTRACT

The technology of creating transgenic animals has a potential value in improving productivity and disease resistance of animals, gene therapy, drug pharming and production of model animals for certain diseases.

Up to date, fairly low success rate of production of transgenic animals and a pronounced variability with respect to the expression of transgenes have been much observed. The mechanisms how to integrate the injected genes with a certain part of the genomes are unknown yet. Many techniques in gene transfer, beside microinjection, have been introduced and explored thus to improve the production efficiency of transgenic animals.

In this article, the methods and efficiency of gene-transfer techniques, the detection and preselection of transgenes in embryos by PCR- and GFP-screenings and cloning of preselected transgenic embryos by nuclear transplantation are described and discussed.

Some experimental results showed that the early screening and selection of integration of the injected gene with embryonic genome by polymerase chain reaction(PCR) and green fluorecence protein(GFP) were promising methods. Further, the application of nuclear transplantation technology to cloning and multiplication of the positively integrated genes in the cleaving embryos and embryonic cells will be beneficially used for the mass production of transgenic embryos and consequently improving the production efficiency in transgenic animals.

본 연구의 일부는 한국과학재단에서 1996년도에 지원한 목적기초연구 사업비로 수행되었음. (KOSEF:961-0606-052-2)

I. 서론

태고로부터 지구의 생물체는 virus나 세균의 감염 그리고 정자의 수정 등에 의하여 외래성 유전정보가 숙주의 게놈(genome)에 삽입되어 유전자전환이 야기되어 왔으며 이로 인하여 수없는 형질전환이 자연상태에서 이루어져 왔다. 그러나 근래에 분자생물학과 발생생물학의 발전을 바탕으로 하여, 특히 유전자재조합기술(recombinant DNA technique), 미세조작기술(micromanipulation technique), 동물 수정란의 체외성숙(IVM), 체외수정(IVF), 체외배양(IMC) 등 체외조작기술(*in vitro* embryo manipulation techniques)과 수정란이식기술(embryo transfer technique)의 발달로 동물 수정란에 외래유전자를 도입하고 이를 대리모에 이식하여 후대에 발현시킬 수 있게 됨으로써 형질전환동물(transgenic animal)의 인위적 생산에 흥미를 갖기 시작하였다. 1974년 Jaenisch와 Minz는 Simian virus(SV40) DNA를 생쥐 수정란의 포배강에 주입하여 산자를 생산함으로써 처음으로 외래성 유전자를 동물에 인위적으로 삽입시키는데 성공하였다. 그 이후 Gurdon(1977)은 개구리 난자에 mRNA 및 DNA를 주입하고 이들 핵산의 기능을 살펴보고, 1980년 Gordon 등 및 1981년 Brinster 등은 생쥐 수정란의 응성전핵내에 재조합 유전자(recombinant DNA)를 주입하여 미세주입법에 의한 형질전환동물을 생산하는데 성공하였다. 그 이후 수많은 과학자들이 인류에 유익한 유전자를 재조합하고 이를 여러 동물에 도입시켜 왔으며, 생쥐 이외에도 소, 양, 돼지, 산양, 닭, 토끼, 물고기 등 많은 동물종에서 10,000종이상의 형질전환동물이 생산되었다(First, 1991). 이러한 형질전환동물생산기술(transgenic animal technology)은 가축에서 육질 개선과 성장속도의 조절 등 생산성향상을 통한 더욱 효율적이고 질 좋은 축산식품의 생산, 희귀한 단백질이나 약물을 양이나 소의 유선에서 생산하는 분야에의 이용(gene pharming), 동물의 질병에 대한 저항성의 증가, 질병과 생체기작 및 장기이식에 관한 연구에 있어서 매우 독특하고 유용한 질환모델 동물의 생산, 사람과 동물의 선천적 또는 후천적 질병에 대한 유전자치료 등에 있어서 획기적인 기여를 할 가능성이 있기 때문에 세계 각국은 이 기술의 산업화를 위하여 막대한 투자를 하고 있다(Reviews; Pursel과 Rexroad, 1993; Brem, 1993). 현재(1998년)까지 Medline data bank에 수록된 형질전환 동물생산에 관한 연구는 총 11,745건이다. 이를 동물 품종별로 분류하면, 생쥐; 10,362건, 소; 271건, 돼지; 222건, 면양; 144건, 토끼; 190건, 닭; 95건, 어류; 153건 및 말; 7건 등이 보고되어 있다. 이를 관심있는 연구분야별로 다시 조사하여 보면, PCR-screening; 881건, Retrovirus vector; 556건, Emryonic stem cell; 157건, GFP-screening; 26건, Sperm-mediated gene trnasfer; 14건 및

transgenic embryos 의 cloning; 23건이 보고되어 있다. 이외에도 세계 도처에서 수많은 연구가 수행되고 있을 것으로 본다.

본 연제에서는 유전자 이식방법의 개발 현황과 유전자식별 방법들에 관하여 알아보고, 아직까지는 낮은 수준에 있는 형질전환동물의 생산성을 향상시키기 위한 한 방법으로서 수정란을 이식하기 전단계에서 주입된 유전자의 존재여부 및 발현여부를 조기에 식별하는 방법들에 관하여 문헌적 고찰과 아울러 본 연구진의 실험결과를 검토하고, 나아가서 이들 식별된 유전자전환 수정란을 핵 이식기법으로 복제하여 다량 확보하는 방법에 관하여 알아보고자 한다.

2. 유전자 이식방법(Methods of gene transfer)

형질전환동물을 생산하기 위하여 제조합 유전자를 수정란의 게놈(genome)에 삽입하는 방법에는 물리적, 화학적 및 생물학적인 방법으로 많은 수단이 강구되었으나 이들의 효율성, 유전자의 특성 및 응용성에 있어서 제한적 요소가 많다. 이들 방법중 효율성이 비교적 좋으며 응용가능성이 있어 관심을 가지고 활발히 연구.개발되고 있는 방법으로서는 (1) 수정직후 전핵단계에 있는 접합체의 응성전핵내에 미세조작기술로서 유전자를 주입하는 미세주입법(Microinjection technique), (2) embryonic stem cells에 유전자를 삽입시키고 이를 배반포기의 수정란내에 이식하는 방법(Stem cell insertion technique), (3) Retroviral vector를 활용하여 유전자를 수정란내에 주입하는 방법(Retroviral insertion technique), 및 (4) 유전자를 수컷의 정소내에 주입하여 유전자를 정자에 삽입시키고 이를 난자와 수정시키는 방법(sperm-mediated gene transfer technique) 등이 있다(Table 1 참조). 그러나 이러한 기술들은 아직 여러가지 문제점들을 가지고 있을 뿐만 아니라 주입된 유전자의 후대에의 발현율이 낮아 가축에서 실용화단계에는 도달하지 못하고 있다. 미세주입법으로 유전자가 주입된 수정란을 기준으로 할 때 산자에서 이의 발현율은 생쥐같은 실험동물에서는 1~5% 정도이고 토끼에서는 0.75%이며 가축인 소에서는 0.7%, 산양에서는 0.99%, 면양에서는 0.88%, 돼지에서는 0.91% 등 1%에 미치지 못하고 있다(Pursel과 Rexroad; 1993, Riego 등; 1993, Thomas 등; 1993). 그 이유는 외래유전자의 크기와 성상, 주입방법과 시기, 주입된 유전자의 통합(integration), 주입된 수정란의 체외발생, 이식후의 생존성 및 모자이크현상(mosaicism) 등 많은 요인이 개재되어 있는 것으로 밝혀지고 있지만 그 주된 이유는 동물 수정란에 주입된 유전자가 genome의 적당한 부위에서의 통합(integration)이 무작위적으로 일어나기 때문이다(Pursel과 Rexroad; 1993). 그러나 최근 Schnieke 등(1997)은 사람의 혈액응고인자 IX 유전자를(이 인자

Table 1. Production efficiency of transgenic animals with various gene-transfer techniques

Gene-transfer techniques	Transgenic offspring /embryos transferred (%)		References
	Mouse	Livestock	
Microinjection	5/527 (0.95)		Brem et al(1986),
	6/174 (3.4)		Ninomiya et al(1989)
		Cattle: 2/29 (1.6)	Krimpenfort et al(1991)
		Pig: 20/2,035 (0.98)	Hammer et al(1985)
		Sheep: 5/591 (0.8)	Damak et al(1996)
		Goat: 2/203 (1.0)	Ebert et al(1991)
	Rabbit:13/322 (3.3)	Wang et al(1996)	
Transfection + Nuclear transfer		Sheep: 6/62 (9.7)	Schnieke et al(1997)
Retroviral vector	2/15 (13)		Rubenstein et al(1986)
		Cattle: 17/241 (7.0)	Haskell & Bowen(1995)
Sperm-mediated	30% of 250 progeny		Lavitrano et al(1989)
		Pig: succeed(rate:?)	Lavitrano et al(1997)

가 결핍되면 사람에서 혈우병이 생김.) lipofectamine의 도움으로 면양 태아의 섬유아세포(fibroblast)에 전이시킴(transfection) 다음 이를 핵이식하여 복제한 것을 대리모의 자궁에 이식하여 6마리의 산자를 생산하였는데 이들 모두가 유전자를 발현하여 매우 높은 형질전환동물 생산효율을 얻었다. 그리하여 이들은 대리모의 수요를 절반이하로 경감시킬 수 있을 것이라고 보고하였다. Rubenstein 등(1986)은 retrovirus에 유전자를 삽입하고 이를 생쥐 수정란에 감염시켜 이식후 태어난 산자 15 마리 중 2마리(13%)가 형질전환됨을 관찰하여 이 방법(retroviral vector)이 유용함을 주장하였으나 가축 등 다른동물에서는 효율이 낮아 적용되지 못 하여 왔다. 그러나 최근 Haskell 과 Bowen(1995)은 소에서 수정란 241개를 이식하여 태어난 송아지 17마리(7.0%)에서 형질전환되었음을 확인함으로써 많은 발전을 보았다. 그리고 Lavitrano 등(1989)은 정자에 유전자를 삽입하고 이를 난자와 수정시킨 후 이식하여 형질전환동물을 생산하는 방법(sperm-mediated gene transfer technique)을 활용하여 태어난 생쥐 250마리 중 30%가 형질전환되었다고 하였으며, 나아가서 이들은 돼지에서도 이러한 방법으로 형질전환동물생산을 성공하였다는 보고가 있다. 이러한 방법들은 앞으로 형질전환동물 생산에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 예측되어 많은 연구가 수행되고 있으며 괄목할만한 연구성과가 보고되고 있다.

3. 유전자의 식별과 유전자전환 수정란의 선별(Detection and Preselection of transgenes in embryos)

핵내에 주입된 유전자가 어떻게 하여 recipient genome에 통합되는가에 대한 기전은 아직 불명하다. 그러므로 형질전환동물 생산의 효율을 향상시키기 위하여서는 수정란에서 주입된 유전자의 존재/통합/발현을 확인한 다음 이를 선별적으로 대리모에 이식하는 것이 매우 효과적이다. 이를 실행하기 위하여 Gorman 등(1982)은 Chloramphenicol acetyl transferase(CAT)를, Gould 등(1988)은 Firefly luciferase를 그리고 Verger 등(1988)은 secreted alkaline phosphatase를 사용하였으나 이러한 방법은 검사후 수정란이 모두 사멸하여 동물생산에는 사용이 불가능하였다. 근래에는 동물의 수정란 내에 주입된 유전자를 조기에 판별할 수 있는 방법으로 유전자가 주입된 수정란을 배양시킨 다음 할구세포를 하나 또는 일부분 분리하여 취하고 여기에서 polymerase chain reaction(PCR)기법을 사용하여 유전자를 증폭시켜 검색하는 방법과 GFP 유전자를 reporter gene 으로 사용하여 이를 수정란에 주입하고 이의 발현을 형광현미경으로 조기에 확인하는 방법이다.

1) PCR-screening

본 연구진은 재조합된 유전자를 토끼 수정란의 응성전핵내에 미세주입하고 이를 체외배양하여 발달과정별로 이들에서의 유전자 존재와 소멸을 PCR 분석을 통하여 확인하여 붓고 또한 이들 수정란의 할구세포를 분리하여 이들 수준에서 검출 가능성을 알아본 후 핵이식으로 복제한 다음 이들 유전자전환 수정란에서의 유전자 존재/소멸을 확인하였다. 그 과정을 간략히 기술하면, 주입된 외래유전자는 한국생명과학연구소의 이경광 박사팀에서 준비한 mouse metallothionein-I (mMT-I)-human growth hormone (hGH) fusion gene(2.6 Kb) 및 일본 National Children's Medical Research Center의 Dr. Takada로부터 분양받은 GFP fusion gene(2.7 Kb)으로서 본 실험에 차질없이 준비되어 사용되었다. 유전자가 주입된 수정란은 TCM-199 배양액 및 RD 배양액을 사용하여 난관상피세포와 공배양하여 이들이 배반포로 발달할 때까지 주입된 유전자의 존재여부를 PCR-screening으로 검사하여 보았다(Table 3 참조). 유 MT-hGh 유전자는 수정란이 발달할수록 수정란 뿐만 아니라 할구세포에서도 양성으로 검출되는 율이 점차 낮아지는 경향을 보였다(Table 4 참조). 배반포기까지 발달한 수정란 132 개 중 PCR-screening 에 양성인 것은 33개로서 25%를 차지하였다. Burdon과 Wall(1992)은 생쥐에서 KH gene을 전핵내에 주입하고 체외발달을 시키면서 발달단계별로 수정란에서의 유전자를 PCR로 검출하여 보았더니, 2- 및 4-세포기에서는 100% 양성을 보였으나 상실배기에

Table 2. Preselection efficiency of transgenic embryos by PCR-screening

Animal species	Genes	No. of morulae or blastocysts		References
		Analyzed	Positive(%)	
Mouse	pSV2-pgt-gE1A	84	30(35.7)	Ninomiya et al (1989)
	WAP-KH	85	22(26.0)	Burdon & Wall(1992)
	WAPPC-3	89	26(29.0)	Page et al(1995)
Rabbit	MT-hGH	132	33(25)	Lee et al (1998)
Cattle	SV40-glycoprotein	92	6(6.5)	Thomas et al(1993)
	MT-oGH	26	14(54)	Behboodi et al(1993)
	hPC	20	19(95)	Krisher et al(1994)
	b-casein+h-erythropoietin	41	2(5)	Hyttinen et al(1996)
Pig	LacZ-gGH	18	8(44.4)	Koo et al(1996)

에서는 44% 그리고 배반포기에서는 26%의 양성율을 보여 본실험에서와 같이 점차 양성율이 낮아지는 경향을 보였다고 한다. 구 등(1996)은 돼지 수정란에서 gGH를 응성전핵내에 주입하고 발달단계별로 조사하였는데, 역시 2-, 4-, 8-세포기에서는 100% 양성율을 보였고, 상실배기에서는 45% 그리고 배반포기에서는 44.4%가 양성율을 보였다고 한다. 그리고 Thomas 등(1993)은 소에서 2.25 Kb의 SV-40-gp51 gene을 전핵내에 주입하고 배반포로 자란 것에서 PCR로 유전자를 검출하여 보았더니 6.7% 만이 양성율을 보였다고 한다. Hyttinen 등(1996)도 소에서 DNA 주입후 배반포로 자란 수정란에서 93%의 음성인 것을 PCR검색으로 가려낼 수 있었다고 한다. 그러나 Krisher 등(1994)은 소의 배반포 수정란에서 89%가 양성율을 보였다고 한다(Table 2 참조). Bowen 등(1993)은 PCR로 검사된 수정란을 이식하여 형질전환 소를 생산하였고 533개의 수정란 중 421개의 transgene negative 를 가려냄으로써 수란우의 수를 79%나 줄일 수 있었다고 한다. 동물 품종, 유전자 종류 및 연구자에 따라 PCR 검출에 대한 양성율이 서로 다르게 나타나므로 더욱 정확한 규명이 있어야 할 것으로 본다. 그리고 수정란의 발달단계에 따른 유전자 검출율은 설치류에서는 현저히 떨어지는 경향을 보이나 소에서는 다양한 변화가 있었다. 향후 PCR 검색으로 유전자 통합이 일어나지 않았거나 소실된 것을 조기에 선별함으로써 수란축의 수요를 격감시키고 나아가서 형질전환 산자의 생산을 향상에 도움이 될 것으로 본다.

Table 3. Detection of MT-hGh gene-injected rabbit embryos by PCR-screening at various developmental stages

Cell stage	No. of embryos analyzed	PCR-screening	
		Positive(%)	Negative(%)
2-cell	51	30(59) ^a	21(41)
4-cell	43	28(65) ^a	15(35)
8-cell	43	27(63) ^a	16(37)
Blastocyst	132	33(25) ^b	99(70)

* The values with different superscripts within column were significant different(P<0.05).

Table 4. PCR analysis of the presence of transgene in individual blastomeres of 2-, 4-, 8-, 16-cell stage rabbit embryos microinjected with MT-hGH gene

Cell stage	No. of blastomeres analyzed	PCR-screening	
		Positive(%)	Negative(%)
2-cell	32	27(84) ^a	5(16)
4-cell	43	33(77) ^a	10(23)
8-cell	38	18(47) ^b	20(53)
16-cell	43	20(47) ^b	23(53)

* The values with different superscripts within column were significantly different(P<0.05).

2) GFP-screening

최근에는 GFP(Green fluorescent protein) gene을 reporter gene으로 사용함으로써 수정란의 조기감별과 확인이 더욱 용이하게 되었다. Chalfie 등(1994) 및 Prasher 등(1995)은 해파리의 일종인 *Aequore Victoria*를 사용하여 조기발현 및 감별에 응용하였고 Ikawa 등(1995)은 이를 응용하여 GFP-transgenic mice를 생산하였다. 그러나 토끼를 위시한 다른 가축에서는 수정란 단계에서만 연구보고되고 있으며, 이를 이용한 산자생산에는 아직 보고되고 있지 않다. 더구나 이 유전자를 사용하여 핵이식으로 복제된 예는 드물다.

본 연구진은 토끼 수정란에 GFP 유전자를 주입하고 체외에서 배양하였던 바, 배반포로의 발달율은 67.6%이었으며, 이들을 형광현미경으로 유전자 발현

을 검사하였더니 30.6%가 양성을 보였다(Table 5 참조). GFP유전자는 핵내에서 발현이 일어나지 않으면 녹색을 나타내지 않는 특성을 가지고 있어서 상실배기 이후에야 형광현미경으로 발현을 확인할 수 있다. 또한 이들 수정란을 PCR-screening 하였던 바, GFP 양성을 보인 11개의 수정란에서 5개(45.5%)는 역시 PCR-screening에서도 양성을 보였고, 6개(54.5%)는 음성을 보였다. GFP 음성인 수정란은 모두 PCR-screening에서도 음성을 보였다(Table 6 참조).

Table 5. Effect of GFP gene microinjection on *in vitro* development and GFP expression in rabbit embryos

No. of zygotes injected	No. of embryos developed to blastocyst(%)	No. of GFP positive blastocysts(%)
108	73(67.6)	33(30.6)

Table 6. PCR analysis of rabbit blastocysts injected with GFP gene at pronuclear stage

Fluorescent microscopy	No. of gene-injected blastocysts	PCR-analysis	
		Positive(%)	Negative(%)
GFP +	11	5(45.5)	6(54.5)
GFP -	8	0(0)	8(100)

4. 핵이식에 의한 유전자전환 수정란의 복제(Cloning of transgenic embryos by nuclear transplantation)

유전적으로 동일한 복제동물을 대량 생산하기 위한 핵이식기술(Nuclear transplantation technique)의 개발은 경제적으로 유익한 가축을 위시한 각종 동물에서 수정란에 주입된 외래유전자나 우수한 유전자를 복제하고 선발하는데 매우 유리하다. 핵이식 기술에 의한 수정란의 cloning의 가능성은 Gurdon(1964)에 의하여 양서류에서 처음으로 시사된 이후 포유류에서는 Illmensee와 Hoppe(1981)가 처음으로 생쥐 수정란에 핵이식을 시도하여 3마리의 신생자를 생산하는데 성공하였다. 가축에서는 Willadsen(1986)이 면양에

서 핵이식에 의한 산자생산에 성공하였다는 보고가 있고, Prather 등(1987)은 소에서 이에 의한 산자생산에 성공하였으며, 국내에서는 이 등(1989) 및 최 등(1989)이 처음으로 핵치환 생쥐를 생산하는데 성공하였고, 이후 이 등(1994)이 복제토끼 생산에 성공하였으며, 황 등(1996)이 복제 송아지를 생산한 바 있다. Willadsen 등(1991)은 소의 8내지 64세포기의 핵을 이식하여 42.4%의 산자생산율을 기록한 바도 있다. 작년 3월 영국 Roslin 연구소의 Wimut 박사가 생식세포가 아닌 면양의 유선세포로부터 복제양 "Dolly"를 생산하였다는 보고가 알려지자 세인의 관심사가 되었다. 이는 기존의 생명복제에 관한 개념을 뛰어 넘는 커다란 변혁이었다. 그러나 이후 많은 과학자가 이의 재현을 시도하여 보았으나 성공하지 못 하고 있으며 논란이 많다.

최근에는 태아의 세포(embryonic stem cells, fetal fibroblasts)에 유전자를 transfection 시킨 다음 이를 핵이식으로 복제하여 형질전환동물의 생산효율을 더욱 증가시키는 방법을 연구하는 사람이 많다. Scnieke 등(1997)은 면양에서 태아의 fibroblast에 사람의 혈액응고인자 유전자를 transfection 시킨 다음 이를 핵이식으로 복제하여 형질전환 면양을 생산한 바 있다. 그러나 이들은 수정란에서 이식전에 유전자 발현을 조기에 확인하지는 못 하였다.

유전자가 주입된 수정란을 체외에서 발달시킨 다음 이들로부터 할구를 분리하여 핵이식을 실시한 연구보고는 흔하지 않다. Krisher 등(1995)은 WAP-hPC 유전자를 소 수정란에 주입하고 이들을 체외배양한 다음 이들로부터 할구세포를 분리하여 핵이식을 실시한 후 이들의 발달능력을 조사하여 본 바, 13.1%가 상실배기 또는 배반포기로 발달하였다고 한다. 본 실험에서는 토끼에서 MT-hGH 유전자가 주입된 수정란을 8- 및 16- 세포기로 발달시킨 다음 이들로부터 할구를 분리하여 핵이식을 실시하였던 바, 핵융합율은 대조군에 비하여 유의성 있게 낮았고, 또한 이들의 체외배양에서 배반포기까지 발달율에 있어서도 대조군에 비하여 유의성 있는 낮은 발달율을 보였다(Table 7, 8 참조).

또한 Krisher 등(1995)은 WAP-hPC 유전자가 주입된 소 수정란으로부터 할구세포를 분리하여 핵이식을 실시한 후 이들의 발달단계별로 PCR-screening 을 하여본 바, 상실배기 또는 배반포기 수정란에서는 90% 이상 양성으로 나타났으나 이들을 핵이식한 후 복제된 상실배기 또는 배반포기 수정란에서는 32.4% 만이 양성으로 나타났다고 한다. 본 실험에서는 유전자 주입후 8- ,16- 세포기로 자란 토끼 수정란을 핵이식으로 복제하고 이들을 체외에서 배반포기까지 자란 것을 PCR-screening으로 유전자를 검출하였던 바, 각각 23 및 33%의 양성율을 보였다(Table 9 참조). 유전자가 주입된 수정란은 핵이식후 발

달하면서 대다수(70-80%)가 유전자를 소실하는 것으로 보인다. 그러므로 핵이 식으로 복제된 수정란을 체외에서 배반포기까지 발달시킨 다음 주입된 유전자의 유무를 PCR-screening을 통하여 확인하고 이식하여 산자를 생산한다면 형질전환동물의 생산효율이 높아질 것으로 보이므로 이에 관한 연구는 앞으로 더 수행되어야 할 것으로 생각된다.

Ikawa 등(1995)은 GFP gene을 유전자전환 동물의 marker로서 유익하다고 주장한 바 있다. 그들은 생쥐를 대상으로 GFP gene을 166개의 수정란 전핵내에 주입하고 이를 이식하여 16(9.6%) 마리의 산자를 생산하였는데 그중, 3마리(1.8%)의 조직에서 GFP 유전자의 발현이 확인되었다고 한다. 본 실험에서는 토끼 수정란에 GFP 유전자를 주입하고 체외에서 배양하였던 바, 배반포로의 발달율은 67.6% 이었으며, 이들을 형광현미경으로 유전자 발현을 검사하였더니 30.6%가 양성을 보였다. Takada 등(1997)은 생쥐 및 소 수정란에 GFP 유전자를 주입하고 체외에서 배양하였던 바, 배반포로의 발달율은 46.9% 및 11% 이었으며, 이들을 형광현미경으로 유전자 발현을 검사하였더니 각각 39.9%, 9.3%가 양성을 보였다고 한다. 토끼에 관한 다른 연구보고가 없으므로 정확한 비교가 어려우나 동물 품종간에 유전자 발현율에 차이가 있다고 본다. 또한 이들 수정란을 PCR-screening 하였던 바, GFP 양성을 보인 11개의 수정란에서 5개(45.5%)는 역시 PCR-screening에서도 양성을 보였고, 6개(54.5%)는 음성을 보였다. Takada 등(1997)은 GFP 양성인 생쥐 수정란을 대리모에 이식하여 22%의 산자생산율을 얻었고 이중 11마리(8%)에서 GFP 유전자의 발현을 확인하였다.

아직까지는 GFP 유전자가 주입된 수정란을 핵이식으로 복제한 연구는 보고된 바가 없으므로 비교검토가 어려우나, 본 실험에서는 GFP 유전자 양성인 상실배기 수정란의 할구를 사용하여 핵이식을 실시하였던 바, 이들 핵융합이 일어난 61개의 수정란 중 13개(23%)가 체외에서 배반포기까지 자랐다. 또한 이들을 형광현미경으로 GFP 유전자 발현을 조사하였더니 13개 모두(100%) 양성을 나타내었다(Table 10 참조).

앞으로 GFP 유전자를 reporter gene으로 활용하면 형질전환 수정란의 복제효율이 높아질 것으로 보며, 나아가 이들을 이식전에 용이하게 선별할 수 있으므로 형질전환 동물의 복제생산에도 유익하게 활용될 수 있을 것으로 본다. 또한, 이들 주입된 유전자의 수정란내 존재/통합/발현을 선별할 때에 성감별(sex preselection)을 병행하면 유증을 통한 형질전환 동물생산에 있어서 효율성을 제고할 수 있을 것으로 본다.

Table 7. Effect of cell stage of MT-hGH gene-injected rabbit embryos on electrofusion following nuclear transplantation

Cell stage of donor nuclei	No. of zygotes used	No. of oocytes fused		Fusion rate(%)
8-cell	142	98		60.0 ^a
16-cell	191	120		62.8 ^a
Control	102	82		80.4 ^b

* The values with different superscripts within column were significant different(P<0.05).

* Control : non-injected 16-cell stage embryos.

Table 8. Effect of cell stage of MT-hGH gene-injected donor embryos on *in vitro* development following nuclear transplantation in rabbits

Cell stage of donor nuclei	No. of zygotes used	Developed to(%)	
		Morula	Blastocyst
8-cell	81	38	28(34.6) ^a
16-cell	96	43	27(28.1) ^a
Control	28	27	11(39.3) ^b

* The values with different superscripts within column were significant different(P<0.05).

Table 9. PCR analysis of blastocysts cloned with MT-hGh gene-injected donor embryos by nuclear transplantation in rabbits

Cell stage of donor nuclei	No. of NT blastocysts analyzed	PCR analysis	
		Positive(%)	Negative(%)
8-cell	22	5(23) ^a	17(77)
16-cell	21	7(33) ^a	14(67)
Total	43	12(28)	31(72)

* The values with different superscripts within column were significant different(P<0.05).

Table 10. Efficiency of cloning of GFP transgenic embryos by nuclear transplantation

Nuclear donor embryos	No. of oocytes used	No. of oocytes fused (%)	No. of blastocysts(%)	
			Developed	GFP positive
GFP + morula	78	61(78.2)	13(21.3)	13(100)

5. 결론

근래에 형질전환동물의 생산기술이 개발되어 연구차원을 넘어서 일부 산업 목적으로 활용하기에 이르렀다. 이 기술은 최근 10년간에 두드러진 발전을 거듭하여 미세주입법에서부터 viral vector 및 정자를 매개로 하는 방법 등 여러 가지 유전자이식기술(gene transfer techniques)이 개발되고 또한 PCR분석 등을 통하여 주입된 외래유전자의 조기 확인과 선별이 가능하게 되어 형질전환 동물생산 효율이 크게 향상되고 있다. 나아가 PCR 및 GFP 분석에 의한 유전자의 조기분석과 핵이식에 의한 복제기술이 더욱 발전한다면, 형질전환된 수정란을 다량 확대 보급할 수 있으므로써 형질전환동물의 생산효율을 향상시킴과 아울러 가축의 번식과 개량에 있어서 종래에 사용되어 오던 교배법이나 인공수정법에서 탈피하여 새로운 기법의 개발로 발전될 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 이들 기법의 실용화를 구현하기 위하여서는 생산효율성의 향상과 아울러 산자에서의 부작용 제거, 발현 조절, mosaicism의 억제, 후대에서의 지속적 발현, 사회적 인식과 이해 등 많은 문제점을 해결하여야 한다고 본다. 형질전환 동물은 미국을 위시한 선진국에서 특허로 등록되어 오고 있어서 이의 도입에 따른 기술적 어려움과 외화지불을 절감하기 위하여서는 국내에서의 기술개발이 필요하다.

최근 20년간 핵이식에 의한 동물의 복제기술은 동물의 번식과 개량에 있어서 매우 효율적이며 장점이 많아 연구가 많이 이루어져 왔으나 산자의 생산효율성과 기형, 거대태아 등 부작용이 극복되지 못하여 실용화하는 데에는 어려움을 겪어 왔다. 그러나 작년에 생식세포가 아닌 체세포를 이용하여 핵이식기법으로 복제면양을 생산하였다는 보고가 있는 이래 핵이식기술에 다시 관심을 가지고 많은 연구가 수행되고 있다. 몇가지 문제점을 해결한다면 앞으로 가축의 생산에 있어서도 핵이식에 의한 복제동물생산기술의 실용적 응용이 가능할 것으로 보인다. 복제동물 생산기법은 특히 우리나라와 같이 우량 종축의 자원이 부족한 실정에서는 외국에서 값비싼 종축을 다량 수입하지 않고서도

짧은 기간에 종축을 증식 및 확보하는데 매우 효과적인 방법이며, 복제동물은 여러 가지 면에서 이용가치가 매우 높다.

형질전환동물을 복제생산하는 기술이 개발되면, 이는 복제기술의 단점을 보완할 뿐만 아니라 아직은 낮은 수준과 많은 시간 및 막대한 비용이 소요되는 형질전환동물생산 기술의 단점도 서로 보완될 수 있다고 본다. 아직까지는 형질전환된 수정란을 핵이식으로 복제하고 이들을 대리모에 이식하여 복제된 형질전환동물을 생산하는 연구는 미진하여 앞으로 이에 관한 연구가 많이 수행되어야 할 것이다. 재조합 유전자가 주입된 수정란에서 외래 유전자의 통합 또는 발현에 대한 조기감별과 아울러 핵이식기법을 활용하여 유전자전환 수정란의 수 많은 복제를 이룩하면 수란축의 수요를 기존의 1/10 이하로 경감시키고, 따라서 형질전환동물의 생산효율을 10배이상 증가시킬 수 있을 것이다. 또한, 이들 주입된 유전자의 수정란내 존재/통합/발현을 조기에 선별할 때에 성감별(sex preselection)을 병행하면 성에 따른 유전형질의 효율성 및 유증을 통한 형질전환동물 생산에 있어서 효율성을 제고할 수 있을 것으로 본다.

6. 참고문헌

1. Abramczuk J, Sawicki W. Pronuclear synthesis of DNA in fertilized and parthenogenetically activated mouse eggs. *Exptl Cell Res* 1975;92:361-372
2. Behboodi E, Anderson GB, Horvat S, Medrano JF, Murray JD, Rowe JD. Microinjection of bovine embryos with a foreign gene and its detection at the blastocyst stage. *J Dairy Sci* 1993; 76:3392-3399.
3. Bondioli KR, Westhusin ME, Looney CR. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology* 1990;33(1):165-174.
4. Bowen RA, Reed M, Schnieke A, Seidel GE, Brink Z, Stacey A. Production of transgenic cattle from PCR-screened embryos. *Theriogenol* 1993;39:194.
5. Brem G. Transgenic animals. In *Genetic Engineering of Animals*. Edited by Puhler A. VCH Weinheim Press, 1993:83-177.
6. Brinster RL, Chen HY, Trumbauer ME, Senear AW, Warren R, Palmiter RD. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell* 1981; 27:223-231.
7. Brinster RL, Chen HY, Trumbauer ME, Yagle MK, Palmiter RD. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc Natl Sci USA* 1985;82:4438-4442.
8. Burdon TG, Wall RJ. Fate of microinjected genes in preimplantation mouse embryos. *Mol Reprod Develop* 1992; 33:436-442.

9. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescence protein as a marker for gene expression. *Science* 1994;263:802-805
10. Chung CT, Miller RH. Preparation and storage of competent *Escheria coli* cells. In *Methods in Enzymology*. Vol 218. Academic Press. 1993 pp. 621-627.
11. Damak S, Su HY, Jay NP, Bullock DW. Improved wool production in transgenic sheep expressing insulin-like growth factor 1. *Bio/Technology* 1996; 14:185-188.
12. Dziadek M, Bakker M. Genetic analysis of the preimplantation embryos. In *Handbook of In Vitro Fertilization*. CRC Press 1993:151-171.
13. First N, Kim T, Mcnamara G, Bleck G. Transgenic animals. The 2nd ARRC International Symposium. 1991:9-32.
14. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1980;77(12):7380-7384.
15. Gurdon JB. Egg cytoplasm and gene control in development. *Proc R Soc London B* 1977; 198: 211-247.
16. Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Macmillan J Ltd* 1985;315(6021):680-683.
17. Haskell RE, Bowen RA. Efficient production of transgenic cattle by retroviral infection of early embryos. *Mol Reprod Develop.* 1995; 40:386-390.
18. Hyttinen JM, Peura T, Tolvanen M, Aalto J, Janne J. Detection of microinjected genes in bovine preimplantation embryos with combined DNA digestion and polymerase chain reaction. *Mol Reprod Dev.* 1996; 43:150-157.
19. Ikawa M, Kominami K, Yoshimura Y, Yaanaka K, Nishimune Y and Okabe M. Green fluorescent protein as a marker in transgenic mice. *Develop. Growth Differ.* 1995;37:455-459.
20. Illmensee K, Hoppe PC. Nuclear transplantation in *Musculus* :developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell* 1981;23:9-18.
21. Jaenisch R, Mintz B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1974; 71:1250-1254.
22. Kim JH, Ha HJ, Lee HT, Chung KS. Development of a positive method for male stem cell-mediated gene transfer in mouse and pig. *Mol Reprod Dev* 1997; 46:515-526
23. Krimpenfort P, Rademakers A, Eyestone W, Schans A, Broek S, Kooiman P, Kootwijk E, Platenburg G, Pieper F, Strijker R, Boer H. Generation of transgenic dairy cattle using 'in vitro' embryo production. *Bio/Technology* 1991; 9:844-847.
24. Krisher RL, Gibbons JR, Cahseco RS, Johnson JL, Russell CG, Notter DR, Velandar WH, Gwaxdauskas FC. Influence of time of

- microinjection on development and DNA detection frequency in bovine embryos. *Transgenic Research* 1994;3:226-231.
25. Krisher RL, Gibbons JR, Gwaxdauskas FC. Nuclear transfer in the bovine using microinjected donor embryos: Assessment of development and deoxyribonucleic acid detection frequency. *J Dairy Sci.* 1995; 78:1282-1288
 26. Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs; genetic transformation of mice. *Cell* 1989; 57:717-723.
 27. Lavitrano M, Forni M, Varzi V, Pucci L, Bacci ML, Di Stefano C, Fioretti D, Zoraqi G, Moioli B, Rossi M, Lazzereschi D, Stoppacciaro A, Seren E, Alfani D, Cortesini R, Frati L. Sperm-mediated gene transfer: production of pigs transgenic for a human regulator of complement activation. *Transplant Proc* 1997; 29(8): 3508-3509.
 28. Lee H, Ogawa H, Fujioka M, Gerton GL. Guanidinoacetate methyltransferase in the mouse: Extensive expression in sertoli cells of testis and in microvilli of caput epididymis. *Biol Reprod* 1994; 50:152-162.
 29. McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in mouse embryos by microsurgery and cell fusion. *Science* 1983;220:1300-1302.
 30. Murphy D. Isolation of genomic DNA from tail tissue. In *Methods in Molecular Biology Vol 18 : Transgenic Techniques; Principles and Protocols*. Ed. Murphy D, Carter DA. 1993 Humana Press. pp. 309-311.
 31. Ninomiya T, Hoshi M, Mizuno A, Nagao M, Yuko A. Selection of mouse preimplantation embryos carrying exogenous DNA by polymerase chain reaction. *Mol Reprod Dev* 1989;1:242-248.
 32. Page RL, Canseco RS, Russell CG, Johnson JL, Velander WH, Gwaxdauskas FC. Transgene detection during early murine embryonic development after pronuclear microinjection. *Transgenic Research* 1995; 4:12-17.
 33. Palmiter RD, Brinster RL. Inheritable expression of fusion genes microinjected into mouse eggs. *Gene Structure and Regulation in Development* 1983;235-239.
 34. Palmiter RD, Chen HY, Brinster RL. Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring. *Cell* 1982;29:701-710.
 35. Polites HG, Pinkert CA. DNA microinjection and transgenic animal production. In *Transgenic Animal Technology : A Laboratory Handbook*. ed. Pinkert CA. 1994 Academic Press. SanDiego pp 15-68.
 36. Prather RS, Barners FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH, First NL. Nuclear transplantation in the bovine embryo. Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol Reprod* 1987;37:859-866.
 37. Pursel VG, Rexroad Jr CE. Status of research with transgenic farm animals. *J Anim Sci* 1993;71(Suppl. 3):10-19.
 38. Riego E, Limonta J, Aguilar A, Perez A, de Armas R, Solano R, Ramos B, Castro FO, de la Fuente J. Production of transgenic mice

- and rabbits that carry and express the human tissue plasminogen activator cDNA under the control of a bovine alpha S1 casein promoter. *Theriogenol* 1993;39:1173-1185.
39. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. In *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Colding Spring Harbor laboratory Press. 1989.
 40. Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Ritchie M, Wilmot I, Colman A, Campbell KH. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 1997; 278(5346): 2130-2133.
 41. Sharma A, Martin MJ, Okabe JF, Truglio RA, DhahjalmNK, Logan JS, Kumar R. An isologous porcine promoter permits high level expression of human haemoglobin in trnasgenic swine. *Bio/Technology* 1994; 12:55-59.
 42. Smith DR, Murphy D. Genomic analysis of transgenic animals. In *Methods in Molecular Biology Vol 18 : Transgenic Techniques; Principles and Protocols*. Ed. Murphy D, Carter DA. 1993 Humana Press. pp. 323-3327.
 43. Snedecor GW, Cochran WG. "Statistical Method" Ames: Iowa State University Press. 1980.
 44. Stice SL, Keefer CL, Maki-Laurila M, Phillips PE. Producing multiple generations of bovine nuclear transplant embryos. *Theriogenology* 1991;35:273.
 45. Strom CM, Rechitsky S, Verlinsky Y. Reliability of gender determination using the polymerase chain reaction(PCR) for single cells. *J Vitro Fert Embryo Transfer* 1991;8(4):225-229.
 46. Strom CM, Rechitsky S, Wolf G, Verlinsky Y. Reliability of Polymerase Chain Reaction(PCR) analysis of single cells for preimplantation genetic diagnosis. *J Ass Reprod Gene* 1994;11(2):55-62.
 47. Strom CM, Verlinsky Y, Rechitsky S, Evsikov S, Cieslak J, Lifchez A, Valle J, Valle J, Moise J, Ginsberg N, Applebaum M. Preconception genetic diagnosis for cystic fibrosis by polar body removal and DNA analysis. *Lancet* 1990;336:306-308.
 48. Takada T, Lida K, Awaji T, Itoh K, Takahashi R, Shibui A, Yoshida K, Sugano S and Tsujimoto G. Selective production of transgenic mice using green fluorescent protein as a marker. *nature Biotechnology* 1997: 15:458-461.
 49. Thomas WK, Schnieke A, Seidel GE. Methods for production transgenic bovine embryos from in vitro matured and fertilized oocytes. *Theriogenol* 1993
 50. Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom CM. Analysis of the first polar body: Preconception genetic diagnosis. *Hum Reprod* 1990;5(7):826-829.
 51. Verlinsky Y, Rechitsky S, Evsikov S, White M, Cieslak J, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom CM. Preconception and preimplantation diagnosis for cystic fibrosis. *Prenatal Diagnosis* 1992;12:103-110.

52. Wang B, Page RL, Yang X. Improved transgenic efficiency in rabbits attributed to successful microinjection, embryo transfer and animal husbandry procedures. *Theriogenology* 1996; 45:342.
53. Willadsen SM, Janzen RE, McAlister RJ, Shea BF, Hamilton G, McDermand D. The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology* 1991;35:161.
54. Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 1986;320:63-65.
55. 구덕본, 임준교, 이상민, 장원경, 김남형, 이훈택, 정길생. DNA 미세주입 돼지 체외수정란의 발달능력과 유전자 발현. *한국가축번식학회지* 1996; 20(1):19-26.
56. 노규진, 이효종, 송상현, 윤희준, 박충생. 토끼 수정란의 체외발달에 미치는 배양액 및 소와 토끼의 난관상피세포들과 공배양 효과. *한국가축번식학회지* 1994;18(1) :39-46.
57. 박충생, 공일근, 노규진, 주영국, 송상현, 황영균, 박준규, 조성근, 전병균, 이경미, 윤희준, 최민철, 곽대오, 이효종, 최상용. 체외성숙, 수정 및 배양된 한우 체외수정란의 유우이식에 의한 산자 생산. *한국가축번식학회지* 1994; 18(1): 47-54.
58. 이강세, 신태영, 권창희, 이광희, 손채익, 김영근. 형질전환 마우스 생산을 위한 GFP 유전자의 이용. *한국수정란이식학회지 추계학술대회*. 1997(부록): 51.
59. 이경광, 한용만, 남궁 옥, 이철상, 김용주, 김재만, 김지영, 한문희. 생쥐에 있어서 사람 성장호르몬 유전자의 발현. *한국축산학회지*. 31(3):139-147. 1989.
60. 이철상, 박흥대, 정길생, 이경광. 핵취환 생쥐의 생산. *한국축산학회지* 1989; 31:69-71.
61. 이효종, 전병균, 윤희준, 이경미, 송상현, 공일근, 노규진, 최민철, 최상용, 박충생. 핵이식에 의한 복제토끼 생산. *한국수정란이식학회지* 1994; 9(2): 161-165.
62. 이효종, 정미경, 전병균, 최민철, 최상용, 박충생. 토끼에서 난자의 성숙도가 전기융합 및 핵이식 수정란의 체외발달에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지* 1994a;9(1):23-29.
63. 진동일. 형질전환동물의 생산과 이용. *한국수정란이식학회지 추계학술대회*. 1997(부록): 5-12
64. 한용만, 강만중, 이철상, 유대열, 이경광. 사람 성장호르몬 유전자를 발현하는 형질전환생쥐의 불임성. *한국가축번식학회지* 1992;16(3):225-230.
65. 한용만, 김선정, 유대열, 박정선, 이철상, 정상균, 박인영, 손보화, 최영희, 남명수, 이훈택, 정병현, 정길생, 고대환, 김영훈, 양철성, 유욱준, 이경광. 락토페린을 우유에서 생산하는 형질전환 젖소의 개발에 관한 연구. *한국가축번식학회지* 1996; 20(4):371-378.
66. 황우석, 조충호, 한재용, 이병천, 신태영, 이원유, 송길영, 민순기, 김영천, 구자홍, 이윤수, 민종식, 김기영, 김준선, 장중명, 임홍순, 이광원, 이수현, 김용길, 이후식, 1995. 소 핵이식 수정란에 의한 산자 생산에 관한 연구. *한국수정란이식학회지* 10(1):83-90.