

유전자 변환 동물 생산을 위한 Plasmid Vector(pSS4)의 개발

전진태 · 이상호 · 박성수*

고려대학교 자연자원대학 축산학과, 유전공학과*

Development of a Plasmid Vector(pSS4) for the Use in Animal Transgenesis

Jeon, J. T., S. H. Lee and S. S. Park*

Departments of Animal Science and Genetic Engineering*

College of Natural Resources, Korea University, Seoul

SUMMARY

Transgenic animals have become an important tool in the basic and applied sectors of genetic and biomedical sciences. In particular transgenes provide clear-cut markers in the spatial and temporal analysis of developing embryos for the understanding of developmental mechanisms. For the long-term use of plasmid vector in a particular purpose it would be necessary to develop one's own vector system which can be properly expressed in eukaryotic system. Plasmids were constructed from *ori* region of pUC19 and early region of SV40 through various steps. *LacZ* gene coding for β -galactosidase was fused to early gene of SV40 in translational in-frame. Poly(A) tailing site of SV40 was inserted at the 3' *lacZ* so that initiation, elongation and termination be controlled by SV40 transcription (pSS4). Biological function of the constructed pSS4 was demonstrated via microinjection of the plasmid into fertilized loach eggs and subsequent detection of β -galactosidase in developing embryos. The result indicate that the newly constructed pSS4 is functional in a eukaryotic system *in vivo*. Thus pSS4 may be used as an efficient tool for the study of embryogenesis and a basic carrier for various genes for animal transgenesis.

I. 서 론

비록 다양한 종류의 유전자 운반체가 이용되고 있지만 진핵세포에서의 발현을 유기할 수 있는 벡터체계를 자체 개발한다는 것은 이의 계속적인 이용에 의한 새로운 물질 및 품종의 개발과 연결시켜 상업적 이용의 단계를 생각할 때 자체 개발은 매우 중요한 의미를 갖는다. 더구나 플라스미드 벡터의 재조합 기술에 대한

기술 기반의 축적과 훈련은 물론, 유전자원의 확보 측면에서도 큰 가치를 갖는다. 포유동물, 조류, 어류 등의 발생학적 연구는 최근 들어 이 같은 다양한 체계의 유전자를 이용함으로써 (Brinster 등, 1985; Stuart 등, 1990; Vick 등, 1993) 발생 연구의 분자생물학적 기작을 이해하는 데는 물론 응용연구에도 크게 기여하고 있는 실정이다. 이와 같은 상황에서 유전자 변환 동물 생산을 위한 첫 단계로 플라스미드 벡터를 개발하고 이의 생물학적 기능을 보여주기 위해 어류의 초기

*본 연구는 한국과학재단의 일부자원에 의해 수행되었음.

발생중에 외래유전자의 발현을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 플라스미드의 작성

SV40(Tooze, 1980)의 초기 유전자 조절지역과 초기 유전자의 N-말단 부분을 포함하고 있는 *DraI-DraI* DNA 절편(1.7kb)을 pSV40 (노정혜 교수 증정, 서울대)로부터 취한 다음 pUC19 (Yanish-Perron 등, 1985)의 *SmaI* 위치에 subclone 하였다(pSS2). *E. coli* 에서 분리한 β -galactosidase 유전자를 pMC 1871 (Shapira 등, 1993)로부터 *SatI*으로 절단하여 (3kb) pSS2의 *SatI*위치에 융합시켰다(pSS3). SV40 초기유전자의 N-말단과 β -galactosidase 유전자와의 단백질 번역 reading frame을 조정하기 위하여 pSS3에 존재하는 2개의 *BamHI* 위치를 제한효소로 절단한 다음 Klenow 효소와 dNTPs로 blunt end로 만든 후 재연결(religation)시켰다.

2. poly(A) tailing site의 삽입

Poly(A) tailing 위치를 β -galactosidase 유전자의 3' 말단에 삽입시키기 위하여 pSV40를 *PstI-ApaI* DNA 절편 (0.4kb)을 얻은 다음 pSS3의 *PstI-ApaI* 위치에 삽입시켰다(pSS4).

3. 제한효소 처리와 전기영동

각 제한효소는 각 회사의 추천방법에 따라 처리하고 각 절편의 확인과 염기서열 분석을 위한 전기영동은 Sambrook 등 (1989)의 방법에 따라 행하였다.

4. 염기서열 분석

pSV40와 β -galactosidase 유전자의 전체 염기서열은 이미 알려져 있기 때문에 pSS4 플라스미드 작성 후 *EcoRI* 등으로 pSS4를 제한하여 나타나는 DNA 절편들과 서열만으로 추정하여 산출될 수 있는 DNA 절편들과 비교 검토하였다. 염기서열 분석은 dideoxy chain termination 방법(Sanger 등, 1977;Wallace 등, 1981)에 의하여 SV40 초기유전자의 N말단에 β -galactosidase 유전자가 단백질 번역에서 in-frame으로 융합되어 있는가를 확인하기 위하여 융합된 junc-

tion 부분 (*HindIII-ClaI*, pSS4)을 분리하여 pUC19에 subcloning한 후에 위에 기술한 방법으로 염기서열을 분석하였다.

5. DNA의 미세주입과 발현 검증

새로이 개발된 플라스미드 벡터의 생물학적 활성을 진핵세포체계에서 검증하기 위해 미리 보고한 방법에 따라 미꾸라지의 수정란에 주입하였다 (Lee 등, 1993). 미세주입된 초기배의 발생을 유기시켜 β -galactosidase의 발현을 시각화 하기 위해 조직 화학적 방법 (Stuart 등, 1989)에 의해 초기배를 염색한 후 세정하여 발현 여부를 결정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 발현 플라스미드 벡터의 개발

1) pSS2 vector의 구축

SV40에서 기원하는 핵산복제 origin과 small t와 large T의 일부를 포함하는 DNA절편 (*DraI-DraI*, 1.7 kb)을 pUC19 *SmaI* site에 subcloning하여 pSS2 플라스미드를 작성하였다(Fig. 1).

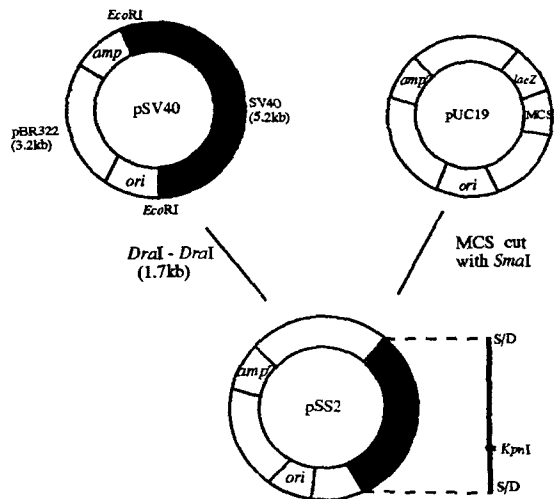


Fig. 1. pSS2 construction for subcloning of *DraI-DraI* DNA fragment (1.7kb) from pSV40 to *SmaI* site of pUC19. *DraI-DraI* of SV40 fragment contains the regulatory region and part of N-terminal sequences of SV40 early gene. 1.7kb

fragment of pSV40 was isolated from 1% of tris-acetate-EDTA(TAE) agarose gel by GENECLANE kit and inserted into *Sma*I site of pUC19 with condensing agent(PEG 8000). S/D indicates junction site between *Sma*I and *Dra*I.

2) *lacZ*-pSS2의 융합

*E. coli*의 β -galactosidase의 유전자 (*lacZ*)를 marker 유전자로 사용하기 위해 pMC1871로부터 번역 reading frame을 조정하여 pSS3를 작성하였다 (Fig. 2).

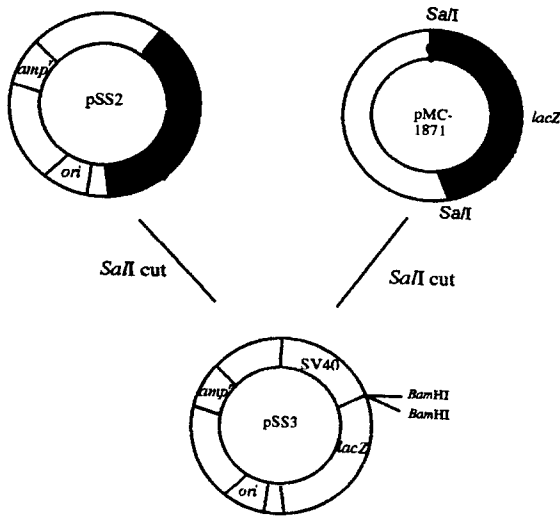


Fig. 2. Fusion of β -galactosidase gene to pSS2. *LacZ* from pMC1871 was isolated and ligated into pSS2. For the final adjustment of translational reading frame, pSS3 was cut with *Bam*HI, following by Klenowfilling and religation.

3) poly(A)의 삽입에 의한 pSS4의 구축

poly(A) tailing site를 pSV40의 0.4kb 크기의 *Pst*I-*Apa*I 절편을 이용하여 pSS4를 최종적으로 구축하였다(Fig. 3). *Eco*RI으로 제한한 최종 pSS4의 restriction pattern을 Fig. 4에서 볼 수 있다. 5.3kb의 β -galactosidase 유전자를 포함하는 절편과 1.7kb의 poly(A) tailing site 및 2.3kb의 pBR322의 절편이 삽입되어 있음을 확인하였다. 그 junction 부분의 DNA 염기서열을 분석한 결과 SV40 초기유전자와 β -

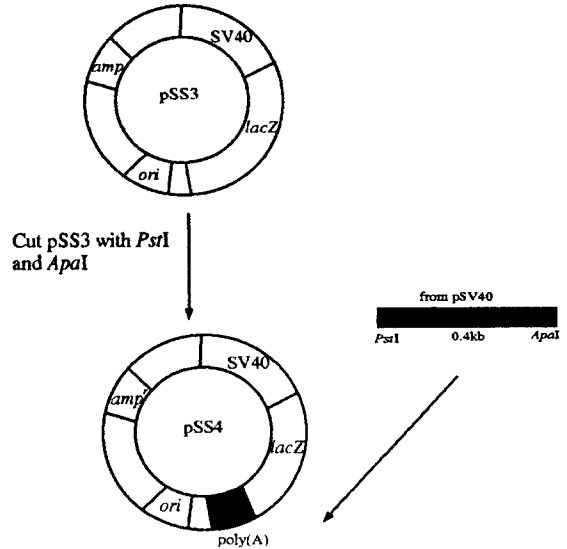


Fig. 3. Insertion of poly(A) tailing site into pSS3. Poly A tailing site of SV40 was inserted to C-terminal region β -galactosidase gene.

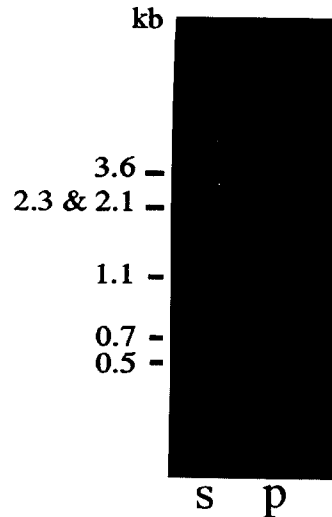


Fig. 4. pSS4 restricted with *Eco*RI restriction enzyme after electrophoresis on a 0.8% agarose gel. The gel run in 40mM trisacetate and 1 mM EDTA with a voltage gradient of 7V cm^{-1} for 4h. One μg of λ DNA digested to completion with *Dra*I and 5 μg of pSS4 cut with *Eco*RI were loaded in lanes s and p, respectively.

galactosidase 유전자 안에 융합이 translational in-frame으로 이루어져, 기대했던 염기서열과 분석한 염기서열이 일치함을 보여주었다(Fig. 5)

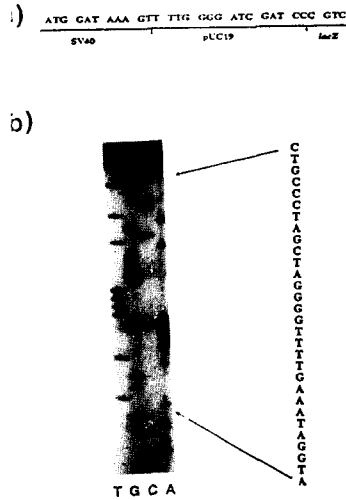


Fig. 5. Confirmation of the junction sequence by DNA sequencing. Sequencing of the junction area was performed by dideoxy chain termination method on double-strand template. The reaction mixture were applied to 6% polyacrylamide gel containing 8M urea. Expected sequence around the junction between SV40 and *lacZ* (a) and DNA sequence of the junction (b) are shown.

2. 미꾸라지 발생중 *lacZ* 유전자의 발현 검증

이같이 최종적으로 구축된 pSS4를 플라스미드를 분리하고 *Apa*I로 제한하여, 선형화한 후 수정란에 미세주입한 결과 *lacZ* 유전자의 발현은 낭배기 초기배에서 발현되기 시작하여 mosaic 형태의 β -galactosidase의 존재를 보여주었다(Fig 6). 이와 같은 발현은 zebrafish에서 볼 수 있는 외래유전자 주입에 의한 결과(Stuart 등, 1990)와 유사하게 나타났으며, 이와 같이 새로이 구축된 플라스미드 벡터 pSS4가 진핵 생물체내에서 정상적인 생물학적 기능을 나타냄을 보여준 것이다. 특히 reporter 유전자로서 *lacZ* 유전자를 가지고 있어 여러가지 생물체내에서의 유전자의 삽입발현을 이용한 세포계통의 연구는 물론 다양한 종

류의 유용유전자의 융합에 의한 기초 벡터로서 이용될 수 있을 것이다.

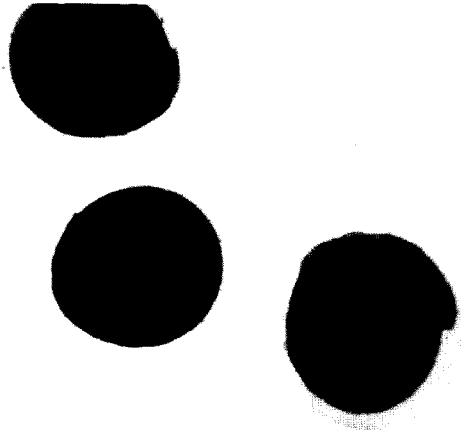


Fig. 6. Expression of *lacZ* gene in a loach embryo. Fertilized eggs were received pSS4 by microinjection procedure, cultured and stained for visualization of expressed β -galactosidase in neurula embryos. Control embryos did not show any positive staining under same condition (not shown).

IV. 적 요

유전자 변환동물의 생산은 생물, 의학적으로 여러 부분의 기초 및 응용분야에서 주요 연구수단의 하나가 되고 있다. 특히 배발생 중에 일어나는 기작의 해석에 있어 transgene은 공간적, 시간적으로 이들 유전자의 발현을 분석하는데 뚜렷한 marker를 제공해준다. 이 같은 transgene을 생식질에 유입시킨 후 첫 단계로 유입된 유전자의 발현을 탐지하는데 있어 조작된 초기 배를 대상으로 신속, 간단히 수행하는 것은 효율적인 연구수행에 필수적 요건이다. 본 실험은 이같은 실용성의 문제점을 인식하여 유용한 plasmid vector를 여러 단계를 거쳐 구축하였다. *E. coli* pBR322와 SV40의 전체 genome을 연결시켜 작성된 pSV40 플라스미드로부터 SV40 early gene의 regulatory region을

분리하여 *E. coli*의 β -galactosidase를 coding하는 *lacZ* 유전자를 in-frame으로 translational fusion 시켰다. 다음으로 *lacZ* 유전자의 3' 말단에 SV40의 poly(A) tailing site를 삽입시킴으로써 *lacZ* 유전자의 발현은 전사의 initiation, elongation 및 termination이 SV40의 전사조절하에 배치시킨 새로운 pSS4 plasmid를 작성하였다. 이 같이 구축된 pSS4의 생물학적 기능을 검증한 결과 미꾸라지 난자에서 신속, 정확한 유전자발현 탐지법을 이용하여 미세주입한 β -galactosidase가 실험구의 초기배에서 다양한 발현양식을 보임으로써 구축된 pSS4가 진핵세포체계 내에서 발현되는 것을 확인하여 생물학적 기능을 확인하였다.

사사

미꾸라지 난자의 조작과 발현양식을 도와준 이재현 군에게 고마움을 전합니다.

V. 인용문헌

1. Brinster, R.L., H.Y. Chen, M.E. Trombauer, M.R. Yagle and R.D. Palmiter. 1985. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. 82:4438-4442.
2. Lee, J.H., H.Y. Park and S.H. Lee. 1993. Spatial and temporal analyses of early embryonic development in loach (*Misgurnus mizolepis*). Korean. J. Anim. Sci. 35:155-162.
3. Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning, 2nd edition : Gel electrophoresis of DNA, part 6. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
4. Sanger, F., S. Niklen and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. Proc. Nati. Acad. Sci. 74:5463-5467.
5. Stuart, G.W., J.R. Veilkind, J.V. McMurray and M. Westerfield. 1990. Stable

- lines of transgenic zebrafish exhibit reproducible pattern of transgene expression. Development 109:577-584.
6. Shapira, S.K., J. Chou, F.V. Richaud, J. Casadaban. 1983. New versatile plasmid vectors for expression of hybrid proteins coded gene fused to *lacZ* gene sequences encoding an enzymatically active carbon-terminal protein of β -galactosidase. Gene 25:71-82.
7. Tooze, J. 1980. Molecular biology of tumor viruses, 2nd edition : DNA tumor viruses, part 2. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
8. Vick, L., Y. Li and K. Simkiss. 1993. Transgenic birds from transformed primordial germ cells. Proc. R. Soc. Lond. B. 251:179-182.
9. Wallace, R.B., M.J. Johnson, S.V. Suggs, K.I. Miyoshi, R. Bhatt and K. Itakura. 1981. A set of synthetic oligonucleotide primer for DNA sequencing in the plasmid vector pBR322. Gene 16:21-26.
10. Yanisch-Perron, C., J. Vieira and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains : Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33:103-119.