

흰쥐 베타-카제인 유전자의 발현조절 부위를 이용하여 유선에서 사람 락토페린을 발현하는 형질전환 생쥐의 개발

김선정 · 이고운 · 배수경* · 조용연** · 한용만 · 이철상 · 이경광 · 유대열

유전공학연구소 생물자원그룹

Expression of Human Lactoferrin in the Mammary Glands of Transgenic Mice using Regulatory Elements of Rat β -Casein Gene

Kim, Sun-Jung, Ko-Woon Lee, Soo-Kyung Bae*, Yong-Yeon Cho**,

Yong-Mahn Han, Chul-Sang Lee, Kyung-Kwang Lee and Dae-Yeul Yu

Bioresources Research Group, Genetic Engineering Research Institute

SUMMARY

Two human lactoferrin expression vectors (pCChcLf and pCChcLf-1) were constructed using rat β -casein gene and human lactoferrin cDNA. The recombinant DNAs containing human lactoferrin cDNA were microinjected into the fertilized eggs of hybrid mice (BDF1 : C57BL \times DBA) and the DNA-injected eggs were transferred into the oviducts of foster mothers. Genomic DNAs were isolated from the tails of mice born from the microinjected eggs and analyzed by Southern blot analysis. As a result, 5 and 9 transgenic mice with CChcLf and CChcLf-1 gene were produced, respectively. To determine tissue-specificity of transgene expression, Northern blot analysis was performed. Female transgenic mice were killed at day 10 of lactation and total RNAs from various tissues were isolated. Based on Northern blot analysis, it was shown that transgene was mainly expressed in the mammary glands of transgenic mice. In addition, the human lactoferrin in milk was detected by enzyme-linked immunosorbent assay. For this study, milk was obtained from the mammary glands of the transgenic mice at day 10 of lactation. In line #2 of CChcLf and line #7 of CChcLf-1 transgenic mice, human lactoferrin was secreted into the milk at concentration levels of 340 ng/ml and 60 ng/ml, respectively.

I. 서 론

락토페린은 분자량이 약 80 kDa인 철 결합성 당단백질 (Powel과 Ogden, 1990)로서 1 분자당 2 개의 철 결합부위 (Aisen과 Listowsky, 1980)를 가지고 있다. 락토페린은 주로 포유류의 유즙에 존재하고,

neutrophils의 secondary granule과 자궁의 점액질에도 존재하는 것으로 알려져 있다 (Baggiolini 등, 1970). 뿐만 아니라 신체 중에서 점액질을 분비하는 기관, 특히 눈물, 침, 콧물, 담즙, 췌장액 등에서도 소량으로 발견되고 있다 (Masson과 Heremans, 1966). 락토페린은 N-말단부위와 C-말단부위의 2 개 영역으로 구성되어 있으며, 아미노산 염기배열이 유사

본 연구는 1994년도 과학기술처에서 시행한 특정연구사업의 연구결과임.

* 부산대학교 분자생물학과

** 국립보건안전연구원

하여 유전자의 중복에 의해 생겨난 것으로 추정하고 있다 (Metz-Boutigue 등, 1984). 락토페린의 당쇄는 mannose, galactose, N-acetylglucosamine, fructose, sialic acid로 구성되어 있다. 당 함량은 중성당이 8.5%, 염기성 당이 2.7%이고, 650~700 개의 아미노산이 한 개의 펩타이드로 연결되어 있는 트랜스페린 계열에 속하는 것으로 알려져 있다. 사람 락토페린은 생쥐 락토페린의 아미노산 서열과 70%, 소의 락토페린과는 69%의 상동성을 갖고 있다. 락토페린의 기능에 대하여 살펴 보면 장내 유해 세균에 대한 항균작용이 있으며, 면역체계에 작용하여 숙주의 보호에 관여한다 (Ellison 등, 1991). 또한 면역조절 기능이 있고 (Ellison 등, 1988), 어머니로부터 신생아로의 철이온의 전달 역할을 겸비하고 있는 것으로 보고되어 있다 (Arnold 등, 1977).

락토페린을 생산하고자 하는 연구는 곰팡이 (*Aspergillus oryzae*, Ward 등, 1992)와 동물세포 배양 (Stowell 등, 1991) 등을 통한 대량 생산 및 발현조절의 연구 등이 시도되었으며, 최근에는 소의 알파S1-카제인 (Platenburg 등, 1994)과 베타-카제인 (Kim 등, 1994)의 프로모터를 이용하여 형질전환 생쥐를 생산한 사례가 보고되었다.

본 연구에서는 흰쥐의 베타-카제인 프로모터를 이용하여 사람 락토페린을 유선에서 발현하는 형질전환 생쥐를 개발할 목적으로, 사람 락토페린의 cDNA와 재조합 벡터를 제조하여 이를 수정란에 미세주입함으로써 형질전환 생쥐를 생산하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물 및 다배란 유지

공시동물은 한국 화학 연구소 안전성 센터에서 분양 받은 교잡종 생쥐 (C57BL×DBA)와 ICR 계통을 사용하였다. 다배란 유지를 위하여 PMSG (pregnant mare's serum gonadotropins; Seraruman, Japan)와 HCG (human chorionic gonadotropin; Sigma, USA)를 48 시간 간격으로 각각 5 IU씩 생쥐의 복강 내에 주사한 다음, 동일 계통의 옹성생쥐와 자연 교미를 유도하였으며, 다음날 아침 질전이 확인된 개체만을 실험에 사용하였다. 수정란을 준비하기 위하여 HCG 주사 후 18~22 시간에 난관으로부터 1 세포기

수정란을 회수한 다음, hyaluronidase (300 unit / mL, Sigma, USA) 용액에서 3 분간 처리하여 난구세포를 제거하였다. 난구세포가 제거된 수정란을 HEP-ES로 완충된 M2 배지로 수회 세척한 후 실험에 사용하였다. 교잡종 생쥐의 수정란은 전핵의 관찰을 쉽게 하기 위해 12,000 rpm에서 3 분간 원심처리하여 미세주입에 이용하였다.

2. 흰쥐 베타-카제인 유전자와 사람 락토페린 cDNA를 이용한 유선조직 특이적 발현 벡터의 개발

흰쥐 베타-카제인 유전자의 5' 쪽 2.8 kbp 절편과 폴리(A) 첨가신호를 포함하고 있는 3.4 kbp 절편이 들어 있는 pCC 벡터의 ClaI 위치 (Yu 등, 1992)에 hLF cDNA를 삽입하여 pCCChcLf를 제조하였다. 한편, pCC 벡터의 ClaI 위치에 5'-UTR이 제거된 락토페린 cDNA를 삽입시켜 pCCChcLf-1의 유선조직 특이적 발현 벡터를 개발하였다.

3. 수정란으로 외래 유전자 주입

외래 유전자는 사람 락토페린 발현 벡터를 선 형태로 만든 다음, 완충용액 (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 mM EDTA)에 용해하여 미세주입에 사용하였다. 미세주입시 DNA 농도는 4~8 ng / μ l 정도로 사용하였으며, 외래 유전자의 미세주입은 도립 현미경 (Nikon, Japan) 하에서 미세조작기 (Leitz, Germany)를 사용하여 수정란의 옹성전핵에 주입하였다. 외래 유전자가 주입된 수정란을 M16 배양액에서 17~20 시간 배양하였으며, 정상적인 2 세포기 수정란으로 발달한 수정란만을 선별하여 대리모의 난관에 이식하였다.

4. Southern blot 분석

미세주입하여 얻은 생쥐의 염색체 내 벡터의 삽입 여부를 확인하기 위하여 Southern blotting을 실시하였다. 생쥐의 꼬리 조직을 proteinase K가 포함된 용해용액 (50 mM Tris pH 8.0, 100 mM EDTA, 0.5% SDS, 50 μ g / mL proteinase K)으로 55°C에서 밤새 반응시켰다. 반응이 끝난 후 phenol과 phenol/chloroform (1:1) 추출을 각각 두 번씩 실시하였다. 여기서 얻은 상층액에 1/10 부피의 3 M sodium acetate (pH 5.2)와 두 배의 에탄올을 첨가한 후, 원심분리하여 chromosomal DNA를 침전시켰다.

침전된 chromosomal DNA 를 RNase A가 포함된 TE 완충용액 (pH 8.0)에 녹여 RNA를 분해하였다. DNA 농도는 260 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 10 μ g의 chromosomal DNA를 EcoRI으로 절단하고 0.8% 아가로즈 겔에서 전기영동한 후 변성 및 중화과정을 거쳐 나일론막에 흡착시켰으며, 80°C 건조기에서 2 시간 동안 구워서 막에 고정시켰다. Hybridization은 50% formamide, 5×SSPE, 2×Denhardt 용액, 0.5% SDS, 100 μ g/ml의 salmon sperm DNA의 반응조건 및 42°C에서 12 시간 동안 실시하였다. Probe는 락토페린 cDNA의 EcoRI-SmaI 절편을 nick translation 방법을 이용하여 만들었다. Hybridization이 끝난 뒤 0.1×SSC와 0.1% SDS의 세척용액으로 65°C 수조에서 세척하였다.

5. Northern blot 분석

형질전환 생쥐의 유선 조직에서 외부로부터 도입된 유전자의 발현을 알아보기 위해서 RNA를 분리 정제한 후 northern blot 분석을 실시하였다. Sambrook 등 (1989)의 방법에 따라 total RNA를 분리하였다. 용액 D (25 g guanidium thiocyanate, 29.3 ml DEPC-증류수, 1.76 ml 0.75 M sodium citrate pH 7.2, 2.64 ml 10% sarcosyl, 38 μ l 2-mercaptoethanol) : 2 M sodium acetate (pH 4.0) : phenol : chloroform/isoamylalcohol (49:1)을 1 : 0.1 : 1 : 0.2의 비율로 넣고 잘 섞은 후, 4°C에서 13,000 rpm으로 30 분간 원심 분리하여 상층액만 회수하였다. 다음에 두 배의 에탄올을 첨가하고 -20°C에서 1 시간 처리한 후 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 침전된 RNA를 500 μ l의 용액 D에 녹인 후 에탄올 침전을 다시 실시하였으며, 침전된 RNA는 DEPC로 처리된 증류수 50 μ l에 녹였다. 30 μ g의 total RNA를 1% 아가로즈-18% formaldehyde 겔에서 100 mA로 3~4 시간 정도 전기영동하고, 모세관 전이 방법에 의해 나일론막에 흡착시킨 후, 80°C에서 2 시간 구웠다. Northern blot 분석에 사용된 probe와 hybridization은 Southern blot 분석에 사용된 것과 동일한 방법으로 수행하였다.

6. Polymerase chain reaction (PCR)

형질전환 생쥐의 생식세포로의 유전은 생후 4~6 주

령에 있는 F1 생쥐의 귀 조직을 얻어 PCR 방법으로 확인하였다. 먼저 귀에서 얻은 조직을 20 μ l의 추출용액 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 μ g/ml SDS, 1% Proteinase K)에 넣어 55°C에서 30 분간 처리하였다. 다음에, 이 시료를 5 분간 끓여서 proteinase를 변성시킨 후, 1 μ l의 양을 따서 PCR을 수행하였다. 프라이머는 사람 락토페린 cDNA의 3' 쪽에 있는 oligo 10 (5'-GGCCGCG-GTTTTACTTCTGAGG-3')과 oligo 27 (5'-GG-AAATAACAATGAGGC-3')을 사용하였다. PCR은 denaturation을 94°C에서 1 분, annealing을 55°C에서 1 분, 그리고 extension을 72°C에서 1 분씩, 30 회를 반복하여 실시하였다. 이렇게 하여 얻은 PCR 생성물을 1.5% 아가로즈 겔에서 전기영동을 실시한 후, 외래유전자의 합성 여부를 확인하였다.

7. Polyclone 항체의 제조

생후 6~8 주령의 뉴질랜드 화이트종 토끼를 구입하여 1 주일의 적응기간을 거친 뒤, 항체 제조에 사용하였다. 사람 락토페린 (Sigma, USA) 250 μ g과 Freund's complete adjuvant를 동량씩 잘 섞은 후, 머리 뒤와 양 앞발과 뒷다리의 피하조직에 주사하고, 양쪽 엉덩이 근육에 주사하였다. 2 주일 후부터 1 주일 간격으로 두 번 boosting 주사를 실시하였으며, 3 번째 주사가 끝난 다음 3~4 일째에 귀의 정맥에서 피를 뽑아 ELISA를 통해 락토페린 항체가 제대로 생성되었는지 확인하였다. 락토페린 항체가 제대로 생성되었을 경우 락토페린 250 μ g을 귀의 정맥에 주사하여 최종 boosting을 실시하였다. 7 일후 토끼의 심장에서 채혈하여 4°C에서 4 시간 보관한 후 3,000 rpm에서 30 분간 원심분리하여 혈청층을 분리하였다.

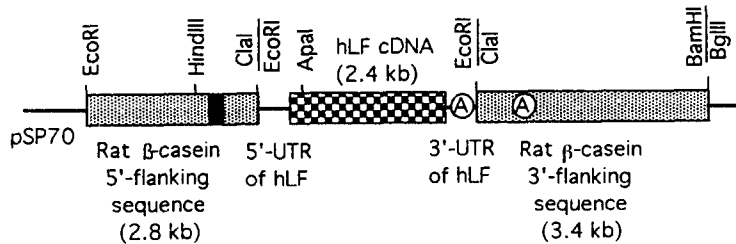
8. Enzyme linked immunosorbent assays (ELISA)

형질전환 생쥐에서 분만 10 일째에 유즙을 채취하고 이를 원심분리하여 얻은 유청 단백질을 ELISA에 이용하였다. 먼저 96-well plate에 유청 단백질을 coating 용액 (0.1 M sodium carbonate, pH 9.6, 0.02% sodium azide)과 함께 섞어 37°C에서 2 시간 coating하고, 세척용액 (0.01 M sodium phosphate pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20)으로 세척

한 후 blocking 용액 (1% BSA in PBS)으로 37°C에서 1 시간 동안 처리하였다. Blocking이 끝난 후 세척용액으로 다시 한 번 세척하고 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 락토페린 항체가 들어있는 희석용액 (0.05 M Tris-HCl pH 8.0, 1 mM MgCl_2 , 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, 0.02% sodium azide, 1% BSA)을 첨가한 다음 37°C 항온기에서 2 시간 처리하였다. 이것을 다시 세척용액으로 세척하고 alkaline phosphatase 가 붙은 anti-rabbit IgG goat 항체 (1/2000 희석액)로 37°C에서 2 시간 처리하였다. 항체반응이 끝난 후 세척용액으로 세척하고 기질용액 (0.05 M sodium carbonate, pH 9.8, 10 mM MgCl_2)에 1 mg/ml의 농도로 녹인 p-nitro phenyl phosphate를 처리하여 실온에서 1 시간 동안 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

A. pCChcLf



B. pCChcLf-1

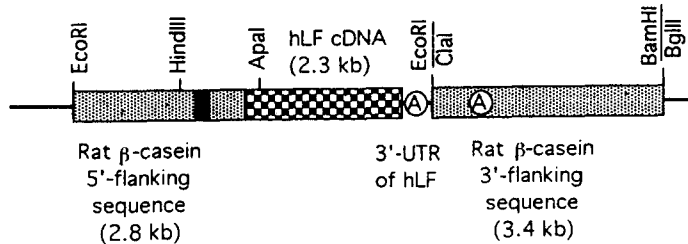


Fig. 1. Schematic diagram of human lactoferrin (hLF) expression vectors, pCChcLf (A) and pCChcLf-1 (B). The vectors were constructed by ligating hLF cDNA into the *Cla*I site of pCC vector (Yu 등, 1992). The black box indicates the exon 1 region of rat β -casein gene. Polyadenylation signals of hLF cDNA and rat β -casein gene were represented by the symbol, (A)

Fig. 1에서 보는 바와 같이, pCC 벡터 (흰쥐 베타-카제인 프러모터 5' 2.8 kbp와 3' 3.4 kbp가 pSP70 벡터에 삽입된 것, Yu 등, 1992)의 *Cla*I 위치에 사람 락토페린 cDNA를 삽입하여 pCChcLf를 제조하였으며 5'-UTR이 제거된 사람 락토페린 cDNA를 삽입시켜 pCChcLf-1을 제조하였다. 형질전환 동물의 개발을 위해서는 pCChcLf와 pCChcLf-1을 *Xho*I과 *Hpa*I으로 절단하고 0.7% 아가로스 겔에서 전기영동한 다음 Elutip (Schleicher & Schuell, Germany)으로 정제하여, 최종적으로 4~8 ng/ μl 의 미세주입용 DNA를 준비하였다.

형질전환 생쥐의 개발을 위해 BDF1 (C57BL \times DBA) 생쥐를 이용하였으며 재료 및 방법에 따라 수정란을 준비하고 융성 진행에 미세주입하였다. 이들을 ICR의 가친에 이식하고 이들로부터 얻은 산자의 꼬리에서 genomic DNA를 분리, 먼저 PCR 방법을 이용하여 분석하였다. PCR 방법으로 외래유전자의 삽입 여부를 판별하였고 그 뒤 다시 Southern blot 분석

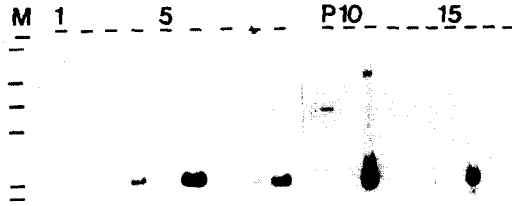


Fig. 2. Southern blot analysis of tail DNAs from transgenic founder mice harboring CChcLf and CChcLf-1 transgenes. Lanes 1 to 9, DNAs from CChcLf mice; lanes 10 to 18, DNAs from CChcLf-1 mice. Lane M is a λ /HindIII DNA size marker. Lane P is 20 pg of the microinjected DNA.

(Fig. 2)을 실시하였으며, 형질전환 생쥐 개발의 전체적인 결과를 Table 1에 정리하였다. pCChcLf, pCChcLf-1의 경우 각각 총 1,067, 648 개의 생쥐 수정란에 유전자를 미세주입한 다음, 생존한 836, 482 개의 수정란 중 741, 473 개를 가친에 이식하여 각각 49, 62 마리의 산자를 생산하였다. 생산된 산자 중에서 각각의 유전자를 지닌 형질전환 생쥐는 각각 5, 9 마리인 것으로 확인되었다. 미세주입한 DNA는 흰쥐의 염색체 상에 몇 개에서 수십 개 까지 다양한 개수로 삽입되어 있었다. 그리고 이들 형질전환 생쥐에서 유전현상을 관찰하였는데, pCChcLf의 경우 5 계통 중 (2 계통은 유전이 안됨) 3마리가 멘델의 유전법칙에 따라 삽입된 외래 유전자를 안정적으로 후대에 전달하고 있었다. pCChcLf-1의 경우 2 계통은 자손에 전달이 되나 2 마리는 유전되지 않았다 (Table 2). 이와 같이 유전이 되지 않는 형질전환 생쥐는 외래유전자 삽입에 있

Table 1. Production of transgenic mice carrying CChcLf and CChcLf-1 genes

Gene	Survived eggs /injected eggs	No. of eggs transferred	No. of young	No. transgenic /No. analysed
CChcLf	836 /1067	741	49	5 /33
CChcLf-1	482 /648	473	62	9 /45

Table 2. Profiles of the transgenic founder mice

Transgenic mice		Fertility /Sex	Transmission	Expression in milk (ng /ml)
CChcLf	TG1	Fertile / ♂	transmit	ND
	TG2	Fertile / ♀	not	340
	TG3	Fertile / ♂	transmit	ND
	TG4	Fertile / ♂	not	ND
	TG5	Fertile / ♀	transmit	0
CChcLf-1	TG1	Fertile / ♂	not	ND
	TG2	died		
	TG3	Fertile / ♀	ND	ND
	TG4	Fertile / ♂	not	ND
	TG5	died		
	TG6	Fertile / ♂	transmit	ND
	TG7	Fertile / ♀	transmit	60
	TG8	died		
	TG9	Fertile / ♀	ND	ND

ND : not determined

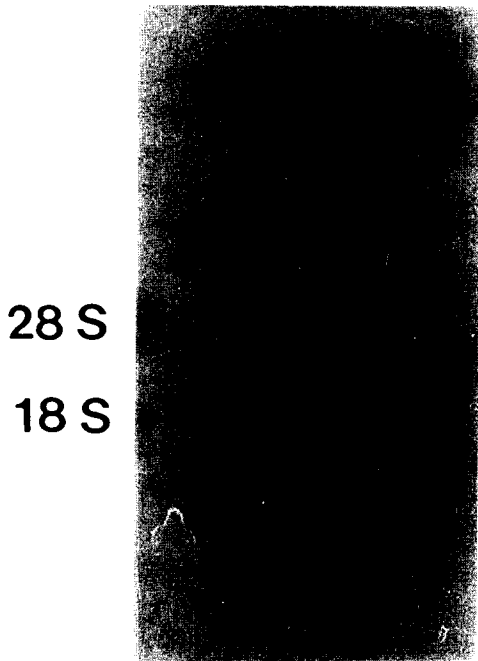


Fig. 3. Human lactoferrin RNA expression in transgenic mice harboring CChcLf-1 transgene. Total RNAs were isolated from the tissues at day 10 of lactating transgenic females. Lanes are 1, brain; 2, kidney; 3, liver; 4, mammary gland, respectively.

어서 mosaicism 현상으로 인해 유전이 되지 않는 것으로 생각되나, 보다 정확한 삽입형태를 알아보기 위해서는 더 많은 산자를 생산하여 유전 효율을 검토해야만 할 것이다.

형질 전환체로 확인이 된 생쥐는 교잡종 (C57BL × DBA) 생쥐와 교배, 번식시키면서 분만 후 10 일에 유즙을 채취하였다. 다음에 생쥐의 장기 조직으로 부터 total RNA를 분리한 후 외래 유전자 발현을 관찰하였다. CChcLf 형질전환 생쥐의 경우에 다른 장기 조직과는 달리 유선 조직에서 사람 락토페린 유전자 발현이 강하게 나타남을 관찰하였다 (결과 생략).

CChcLf-1의 경우는 Fig. 3에 나타난 바와 같이 유선 조직에서 가장 강하게 발현되었으며 간 조직에서도 약간의 양이 검출되었다. 이러한 차이점이 CChcLf

DNA에 있는 5'-UTR에 기인하는지를 알아 보기 위해 더 많은 계통에서 발현 양상을 조사할 예정이다. 형질 전환된 생쥐들이 어느 정도 양의 락토페린을 유즙 속으로 분비하는지 조사하고자 ELISA 방법을 사용하였다. pCChcLf의 형질전환 생쥐 TG-2 계통은 340 ng/ml 수준의 사람 락토페린을 유즙 중으로 분비하고 있었고 CChcLf-1의 TG-7 계통은 60 ng/ml 수준이었다.

이상의 연구결과를 통해 본 연구에서는 사람 락토페린을 생산할 수 있는 재조합유전자 2 종류를 개발하여 이를 형질전환 생쥐의 유선에서 발현시켰다. 또한 사람 락토페린 cDNA의 5'-UTR이 존재하는 pCChcLf의 발현을 5'-UTR을 제거한 pCChcLf-1과 비교해 보았다. CChcLf, CChcLf-1으로 형질전환된 생쥐의 경우 각각 1 마리씩 분석한 결과에서 CChcLf 형질전환 생쥐의 유즙에서 사람 락토페린이 더 많이 검출되었다. 이러한 결과는 2 가지 재조합유전자의 삽입된 갯수가 비슷한 점으로 미루어 볼 때, 형질전환 생쥐의 유선조직에서도 아마 5'-UTR이 양성조절을 한다고 생각해 볼 수 있다. 그러나 형질전환 생쥐에 있어서 외래 유전자의 삽입 위치가 발현효율에 영향을 미치는 것으로 알려져 있기 때문에 형질전환 생쥐들의 발현량의 차이가 "위치 효과"에 의해 초래될 수 있음을 배제할 수 없다. 앞으로 이와 관련한 연구를 위해서는 더 많은 수의 형질전환 계통을 얻어 비교해야만 할 것으로 생각된다.

IV. 적 요

본 연구의 목적은 animal bioreactor system의 모델동물로서 유즙 중으로 사람 락토페린을 분비하는 형질전환 생쥐를 개발하는데에 있다. 사람 락토페린의 유선 조직 특이적 발현을 위한 기본 벡터 (pCC)를 이용하여 두 가지의 발현벡터를 재조합하였다 (pC-ChcLf와 pCChcLf-1). 이들 각각의 DNA가 삽입된 형질전환 생쥐를 개발하였다. 형질전환 생쥐에서 사람 락토페린은 pCChcLf의 경우에는 유선 조직에서만 발현되었고 pCChcLf-1은 유선 조직에서 주로 발현되는 외에도 간 조직에서 약간의 양이 발현되었다. 형질전환 생쥐의 유즙으로 사람 락토페린이 분비되는지를 알아보기 위하여 ELISA로 확인한 결과, 각각의 형질

전환 생쥐 계통은 유즙 중으로 각각 340 ng/ml과 60 ng/ml의 사람 락토페린을 분비하고 있었다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때, 본 연구에서 개발한 유선조직 특이적 발현 벡터는 포유동물 유선에서 유용한 단백질을 생산하는데 이용될 수 있을 것으로 생각한다.

V. 인용문헌

1. Aisen, P. and I. Listowsky. 1980. Iron transport and storage proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 49:357-393.
2. Arnold, R. R., M. F. Cole, J. R. McGhee. 1977. A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science*. 197:263-265.
3. Baggiolini, M., C. DeDuve, P. L. Masson and J. F. Heremans. 1970. Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leukocytes. *J. Exp. Med.* 131:559.
4. Ellison, R. T., T. J. Giehl and F. M. LaForce. 1988. Damage of the outer membrane of enteric Gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infect. Immu.* 56:2774-2781.
5. Ellison, R. T., III and T. J. Giehl. 1991. Killing of Gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J. Clin. Invest.* 88:1080-1091.
6. Kim, S. J., Y. Y. Cho, K. W. Lee, D. Y. Yu, C. S. Lee, Y. M. Han and K. K. Lee. 1994. Expression of human lactoferrin in milk of transgenic mice using bovine β -casein/human lactoferrin cDNA fusion gene. *Mol. Cells*. 4:355-360.
7. Masson, P. L. and J. F. Heremans. 1966. Studies on the iron-binding protein of secretions. *Peptides of the biological fluids*. 14: 115-124.
8. Metz-Boutigue, H. H., J. Jolles, J. Mazurier, F. Schoentgen, D. LeGrand, G. Spik, J. Montreuil and P. Jolles. 1984. Human lactoferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur. J. Biochem.* 145:659-676.
9. Platenburg, G. J., E. P. A. Kootwijk, P. M. Kooiman, S. L. Woloshuk, J. H. Nuijens, P. J. A. Krimpenfort, F. R. Pieper, H. A. de Boer and R. Strijker. 1994. Expression of human lactoferrin in milk of transgenic mice. *Transgenic Research*. 3:99-108.
10. Powell, M. J. and J. E. Ogden. 1990. Nucleotide sequence of human lactoferrin cDNA. *Nucl. Acids Res.* 18:4013.
11. Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. in *Molecular Cloning*, 2nd ed. 7. 3-7. 23., Cold Spring Harbor Press, New York.
12. Stowell, K. M., T. A. Rado, W. D. Funk and J. Tweedie. 1991. Expression of cloned human lactoferrin in baby hamster kidney cells. *Biochem. J.* 276:349-355.
13. Ward, P. P., J. Y. Lo, M. Duke, G. S. May, D. R. Headon and O. M. Conneely. 1992. Production of biologically active recombinant human lactoferrin in *Aspergillus oryzae*. *Bio/Technology*. 10:784-789.
14. Yu, D. Y., C. S. Lee, Y. M. Han, M. J. Kang, and K. K. Lee. 1992. Effect of the 3' flanking sequence of rat β -casein and human growth hormone genes on gene expression in mammary epithelial cells. *Mol. Cells*. 2:315-320.