

형질전환 생쥐에서 Bovine β -Casein/Bovine Growth Hormone 제조합 유전자의 유전적 안정성에 관한 연구

최영희 · 오건봉 · 강용국 · 방남수* · 서길웅** · 이경광 · 이철상
생명공학연구소

Stable Inheritance of Bovine β -Casein/Bovine Growth Hormone Fusion Gene in Transgenic Mice

Choi, Y. H., K. B. Oh, Y. K. Kang, N. Z. Fang*, K. W. Seo**, K. K. Lee and C. S. Lee

Plant and Animal Cell Biotechnology Division,
Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

SUMMARY

To investigate the fidelity of transgene transmission and expression, we produced transgenic mice carrying bovine β -casein /bovine growth hormone(bGH) fusion gene and examined transmission efficiency and expression level of the transgene in the founders and their progeny. The transgene was composed of 1.8 kb bovine β -casein promoter and 2.1 kb bGH gene. Ten transgenic mice were produced. Milk and mammary gland were collected from eight transgenic lines at 10-day lactation and applied to Western and Northern blot analyses. The bGH expression was detected in four of them. The concentrations of bGH in milk were highly variable from 4 μ g /ml to 600 μ g /ml depending on the lines. The bGH mRNA level in mammary gland was closely correlated with the bGH concentration in milk in each transgenic line. These results indicated that bGH transgene expression was appropriately regulated in the mammary gland and secreted into milk in transgenic mice. By using two transgenic lines(#2, #7) secreting a considerable amount of bGH into their milk, the inheritance and maintenance of transgenic phenotype were assessed in successive four generations. The mean transmission frequencies of transgene in lines #2 and #7 were 34% and 40%, respectively. The bGH concentrations in milk were 80, 240, 120, 60 μ g /ml in each G0(generation 0), G2, G3, G4 generation of line #2 and 600, 1600, 860, 900 μ g /ml in each G1, G2, G3, G4 generation of line #7. These results demonstrated that bovine β -casein /bGH gene was stably transmitted from generation to generation in a Mendelian fashion in transgenic mice and consistently expressed in their milk throughout the generations, although there was a little variation in the transmission frequency and expression level of the transgene between generations.

(Key words: Transgenic mice, Bovine β -casein, Bovine growth hormone)

본 연구는 1997년도 과학기술처 선도기술개발 과제의 일환으로 수행되었습.

* 연변대학 농학원 축산학부(Department of Animal Science, Yanbian University, China)

** 충남대학교 동물자원학부(Division of Animal Science and Resources, Chungnam National University)

I. 서 론

포유동물의 유선은 다량의 단백질을 지속적으로 생산할 수 있는 유용한 생체 기관이다. 따라서 유선조직 특이적으로 외래유전자를 발현시킬 수 있는 형질전환 동물은 목적으로 하는 유용단백질을 비유기의 유즙을 통해 대량 생산할 수 있는 유용한 도구가 될 수 있다. 이 같은 가능성을 확인하기 위해 유단백질 유전자의 발현조절 부위를 이용하여 재조합 유전자를 개발하고 이 유전자의 기능을 형질전환 동물에서 확인한 후, 이를 후대에 계속 전달시키려는 연구가 시도되어 왔다. Gordon 등(1987)은 유청단백질(whey acidic protein, WAP) 유전자의 발현조절 부위에 혈전중 치료제인 tissue plasminogen activator(tPA) cDNA를 연결시킨 재조합 유전자가 도입된 형질전환 생쥐를 생산하였고, 이들 생쥐의 유즙에서 tPA가 생산됨을 보고함으로써, 이러한 연구 접근 방법의 유용성이 인정되었다. 이후 다양한 동물에서 여러 유단백질 유전자의 발현조절 부위, 즉 α_{s1} - 및 β -casein, WAP, β -lactoglobulin 등의 유전자 발현조절 부위를 이용하여 여러 종류의 단백질(사람 성장호르몬, tPA, protein C, urokinase, factor IX, α_1 -antitrypsin, lactoferrin 등)을 형질전환 동물의 유즙에서 생산하기 위한 연구가 수행되어 왔다(Simons 등, 1987; Pittius 등, 1988; Bühler 등, 1990; Wright 등, 1991; Ebert 등, 1991; Platenburg 등, 1994).

형질전환 동물에서 외래 유전자의 발현은 유전자의 프로모터부위 뿐만 아니라 발현될 유전자의 염기서열과 3' 쪽 조절 부위에 의해서도 영향을 받는다(Shani 등, 1992; Lee 등, 1996). 따라서 형질전환 동물에서 재조합 유전자의 발현 수준은 도입되는 재조합 유전자의 구성에 따라 다르게 나타난다(Maga와 Murray, 1995). 또한 동일한 구성의 재조합 유전자라 하더라도 유전자가 삽입(integration)되는 염색체 상의 위치적 차이에 의해서도 유전자 발현이 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Jaenisch 등, 1983; al-Shawi 등, 1990). 소에 있어서, β -casein은 전체 유단백질의 약 30%를 차지하고 있으며, β -casein 유전자 전체서열을 도입한 형질전환 생쥐에서도 매우 높은 수준으로 발현되었다(Rijnkels 등, 1995), 그러나 이 유전자의 조절

부위에 다른 종류의 발현 유전자를 연결하였을 때는 목적으로 하는 단백질의 발현 수준은 발현 유전자의 종류에 따라 매우 다양하였다. 즉, lysozyme과 lactoferrin은 낮은 수준으로 발현되었으나(Maga 등, 1994; Kim 등, 1994), 사람 성장호르몬은 높은 수준으로 발현되었다(Ninomiya 등, 1994; Cerdan 등, 1998). 한편, 소 성장호르몬은 토끼의 WAP 유전자의 발현조절 부위를 이용하여 과량 생산이 보고되었으며(Thépot 등, 1995), 동일한 발현 부위를 이용하여 발현시킨 사람 성장호르몬보다 더욱 엄격한 유선조직 특이적 발현양상을 보였다(Devinoy 등, 1994). 더불어, 소 성장호르몬(bGH)은 사람 성장호르몬이 과량 생산된 형질전환 동물에서 발생하는 불임을 유도하지 않는다고 보고되었다(Bartke 등, 1992; Kopchick 등, 1998). 따라서, 본 연구는 소 β -casein 유전자의 발현조절 부위에 소 성장호르몬 유전자를 연결시킨 재조합 유전자를 만들어 소 성장호르몬의 대량 생산 가능성을 확인하고자 실시하였고, 또한 소 β -casein /bGH 재조합 유전자가 후대에 안정적으로 유전됨과 동시에 그 발현능력도 유지되는가를 조사하므로써, 형질전환 동물의 유즙에서의 단백질 생산에 대한 효용성을 검토하기 위해서 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 소 β -casein/bGH 재조합 유전자의 제작

소 β -casein 유전자의 발현조절 부위는 pb β cas(-1792/+42)CAT 재조합 유전자(Lee 등, 1998)를 주형으로 PCR 방법으로 소 β -casein 유전자 -1792 위치의 *Hind*Ⅲ 부분에서부터 exon I(+38)부위까지 *Bam*HI 염기서열을 첨가시켜 합성하였다. PCR로 합성된 1.8 kb 소 β -casein(*Bam*HI /*Hind*Ⅲ) 단편과 2.1 kb의 bGH 유전자(*Bam*HI /*Eco*RI)를 pSP70 벡터(Promega, USA)에 삽입시킴으로써 pb β CN1.8bGH 발현벡터를 완성하였다(Fig. 1). 재조합 유전자를 미세주입에 사용하기 위하여, pb β CN1.8bGH 발현벡터를 제한효소 *Hind*Ⅲ로 절단한 후 agarose 전기영동으로 분리하고 Elutip-D column(Schleicher & Schuell, Germany)을 통과시켜 정제하였다. 정제한 재조합 유전자는 10 mM Tris / 0.1 mM EDTA 용액에서 약 4 μ g/ml 농도로

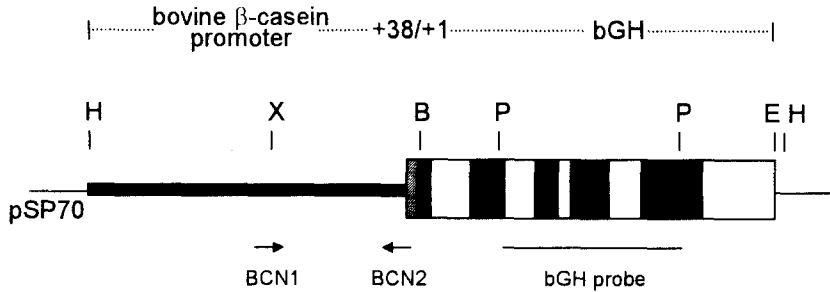


Fig. 1. Schematic representation of the bovine β -casein/bGH fusion gene. The 5' flanking of the bovine β -casein gene is represented as a bold line. The first exon (+38) of bovine β -casein gene is shaded, the five exons of bGH gene filled in, and introns and 3' flanking region on bGH gene are blanked. Plasmid (pSP70) is represented as a thin line. BCN1 and BCN2 are PCR primers to identify transgenic mice. bGH probe indicates a 1.2 kb *Pvu* II fragment of bGH gene for Northern blot analysis. B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind* III; P, *Pvu* II; X, *Xba*I. The diagram is not shown to scale

조정하여 미세주입에 사용하였다.

2. 형질전환 생쥐의 생산 및 확인

형질전환 생쥐를 생산하기 위하여 정제된 재조합 유전자를 교잡종 생쥐 (C57BL/6×CBA)로부터 회수된 1-cell 수정란에 미세주입하였고, 이 수정란을 가임 신시킨 ICR종 대리모에 이식하였다. 태어난 산자중 형질전환 생쥐는 PCR분석으로 선별하였다. 이를 위해 산자의 귀 조직으로부터 DNA를 추출한 후 소 β -casein 유전자 조절 부위 (-790)의 *Xba*I 부위에 위치한 정방향 primer 5'-CTTGGQTCCAAAGTAG-AGGACAAGAA-3'와 소 β -casein 유전자의 첫번째 exon의 *Bam*HI 부위에 위치한 역방향 primer 5'-CC-ACTATCTAGAGAATAAGATTGAC-3'를 사용하여 PCR을 실시하였다.

3. 유즙의 Western 분석

비유 10 일째의 형질전환 생쥐로부터 Lee 등(1996)의 방법에 따라 유즙을 채취하였다. 채취된 유즙은 원심분리를 통해 skim milk를 회수하였고, 원심분리를 반복하여 상층액만을 채취하여 Western 분석을 실시하였다. 채취된 유즙을 12% polyacrylamide gel에서 전기영동으로 분리한 후 nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Germany)으로 흡착하였

다. 흡착된 membrane을 anti-bGH antiserum과 alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody (Sigma, USA)로 반응시킨 후 BCIP/NBT (Sigma, USA)로 발색반응을 유도하였다. 유즙에서 bGH의 농도는 membrane 상에 나타난 다양한 농도로 회석된 유즙 sample의 발색 강도와 정제된 bGH standard의 발색 강도를 비교하여 측정하였다.

4. 유선 조직에서 RNA의 추출 및 Northern 분석

비유 10 일째 유즙을 채취한 형질전환 생쥐로부터 유선 조직을 절취한 후, 이 조직으로부터 Chomczynski 등(1987)의 방법으로 total RNA를 추출하였고, 약 30 μ g을 1% formaldehyde-agarose gel에서 전기영동을 실시하였다. Gel에서 분획된 RNA를 nylon membrane (Boehringer Mannheim, Germany)에 흡착시킨 후, 32 P로 표지된 bGH 유전자의 exon I 부터 exon V 부위의 1.2 kb *Pvu* II 단편을 probe로 hybridization을 실시하여 Northern 분석을 수행하였다.

5. 형질전환 생쥐의 후대 검정

형질전환 생쥐에 삽입된 재조합 유전자가 다음 세대로 유전되는지를 확인하기 위하여 형질전환 생쥐를 교잡종 생쥐 (C57BL/6×CBA)와 교배시킨 후, 이로부터

터 얻은 자손의 귀 조직으로부터 DNA를 추출하여 PCR 분석을 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 형질전환 생쥐의 생산

재조합 유전자 pb β CN1.8bGH를 647 개의 교잡종 생쥐 수정란의 용성전핵에 미세주입하였을 때, 592 개 (91.4%)의 수정란이 생존하였다(Table 1). 그 중 516 개 (87.2%)를 수정란의 대리모에 이식하여 80 마리의 새끼가 태어났고, 80 마리 중 75 마리를 PCR 분석법으로 bGH 유전자의 삽입 여부를 조사하여 10 마리의 형질전환 생쥐를 얻었다. 일반적으로 형질전환 동물의 생산 빈도는 쥐에서 10~30%, 돼지에서 10%, 면양에서 1.3~10%, 소에서 5% 정도를 나타낸다고 보고되었다(Hammer 등, 1985). 본 실험에서 bGH 유전자가 삽입된 형질전환 생쥐의 생산 빈도는 13.3%(10/75)로 위의 결과와 유사한 수준이었다.

2. bGH 유전자의 발현

10 계통의 형질전환 생쥐에서 bGH 유전자의 발현 수준을 조사하기 위하여 암컷 형질전환 생쥐 4 계통은 founder(G0)에서, 수컷 형질전환 생쥐 4 계통은 계대 번식을 통해 얻은 제 1 세대 암컷 형질전환 생쥐로부터 비유기 10 일째에 유즙을 채취하였으며, 수컷 형질전환 생쥐 founder #5와 #8에서는 유즙을 채취할 수 없었다. Founder #5는 bGH 유전자를 다음 세대로 유전시키지 못하였는데, 이는 재조합 유전자가 수정란 발달 단계의 후기에 삽입되어 발생하는 mosaicism 현상에 의한 것으로 판단되었다. Founder #8은

자연적인 임신이 이루어지지 않았을 뿐만 아니라 정소 상체미부에서 정자를 채취하여 체외수정을 실시하였음에도 수정되지 않아 불임으로 판정하였다. 따라서 8 계통(#1, #2, #3, #4, #6, #7, #9, #10)의 형질전환 생쥐에서 채취된 유즙을 Western 분석 방법으로 분석하여 bGH 단백질의 발현량을 측정하였다(Fig. 2). 계통 #3, #6, #9, #10의 유즙에서는 bGH 단백질이 검출되지 않았으나, 계통 #1은 40 μ g/ml, 계통 #2는 80 μ g/ml, 계통 #4는 4 μ g/ml 수준으로 bGH 단백질을 발현하였고, 계통 #7은 가장 높은 농도인 600 μ g/ml 수준의 bGH 단백질이 발현되고 있음이 확인되었다(Table 2). Northern 분석을 통해 유선 조직에서 bGH mRNA의 발현을 조사하였을 때에도 Western 분석 결과와 마찬가지로 계통 #1, #2, #4, #7에서만 bGH mRNA의 발현이 확인되었으며(Fig. 3), 개체별 bGH mRNA의 발현 수준은 bGH 단백질 함량의 개체별 변이 양상과 유사하였다. 형질전환 동물에서 외래 유전자의 발현은 염색체 상에 삽입된 위치에 따라 그 발현 수준이 조절된다고 알려져 있다(Jaenisch 등, 1983; al-Shawi 등, 1990). 따라서, 본 실험에서 bGH 유전자 발현의 계통별 변이는 염색체 상에 삽입된 유전자의 위치에 따른 position effect에 의한 것으로 판단된다. 이상의 결과에서, 소 β -casein/bGH 재조합 유전자는 형질전환 생쥐의 유선에서 발현과 분비가 정상적으로 조절되었으며, 그 결과 bGH 단백질은 유즙에서 최고 600 μ g/ml 수준으로 발현되었다.

3. 계대 번식에 따른 bGH 유전자 유전과 발현

발현이 확인된 4 계통의 형질전환 생쥐 중에서 bG-

Table 1. Microinjection of bovine β -casein/bGH fusion gene

DNA	No. of injected embryos	No. of survived embryos	No. of transferred embryos	No. of pups	No. of transgenic /No. of analyzed
pb β c1.8bGH	647	592 (91.5% ^a)	516 (87.2% ^b)	80 (15.5% ^c)	10/75 (13.3% ^d)

a: No. of survived embryos / No. of injected embryos \times 100

b: No. of transferred embryos / No. of survived embryos \times 100

c: No. of pups / No. of transferred embryos \times 100

d: No. of transgenic mice / No. of analyzed mice \times 100

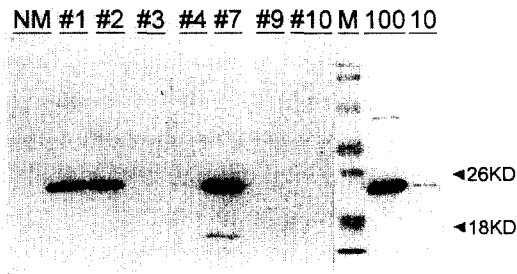


Fig. 2. bGH expression in founder transgenic milk samples. Milk samples(1 μ l) of transgenic mice(#1, #2, #3, #4, #7, #9, #10) and non-transgenic mouse(NM) together with purified bGH(10 ng, 100 ng) were applied to Western blot with polyclonal bGH antibody

H의 발현량이 비교적 높은 두 계통(#2, #7)을 대상으로 bGH 유전자가 여러 세대를 통하여 안정적으로 유지되는가를 PCR 분석법으로 조사하고, 각 세대에서 유증대 bGH 단백질 함량을 Western 분석 정량법으로 조사하였다(Table 3). bGH 유전자의 유전율은 제 4세대까지 조사되었다. 계통 #2의 유전율은 제 1세대에서는 25.0%(2/8)이었고, 제 2세대에서는 38.3%(13/34), 제 3세대에서는 44.1%(15/34), 제 4세대에서는 28.6%(2/7)로, 평균 34%의 유전율을 보였다. 계통 #7은 그 유전율이 제 1세대에서는 40.0%(4/10), 제 2세대에서는 36.7%(11/30), 제 3세

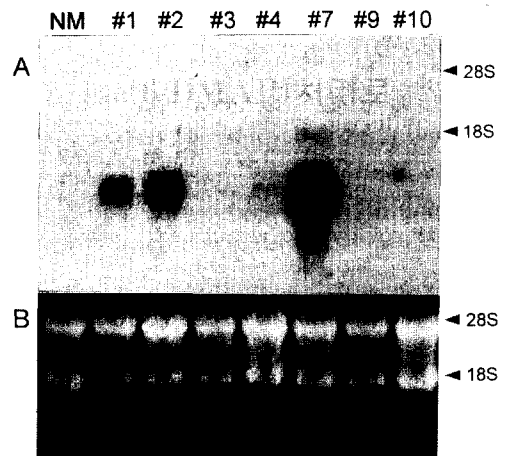


Fig. 3. Identification of bGH mRNA in the mammary gland of transgenic mice. Total RNAs were isolated from mammary gland of transgenic mice and non-transgenic mouse(NM). A: RNAs were applied to Northern blot analysis using 32 P-labeled bGH-specific probe shown in Fig. 1. B: Ethidium bromide stained total RNAs were shown to confirm their integrity and amount

대에서는 42.9%(18/42), 제 4세대에서는 40.5%(15/37)이었다. 평균 유전율은 40%로 계통 #2보다는 비교적 높은 유전율을 나타냈으며, 안정적으로

Table 2. bGH concentration in the milk of transgenic mice

Transgenic mice	Sex	Transmission frequency	bGH concentration in milk(μ g/ml) ^a
#1	female	— ^b	40
#2	female	2/8	80
#3	female	—	UD ^c
#4	male	5/13	4
#5	male	0/24	—
#6	male	12/21	UD
#7	male	6/22	600
#8	male	infertile	—
#9	male	5/14	UD
#10	female	—	UD

a: estimated from Western blot analysis, b: not analyzed, c: undetectable level

Table 3. Stable Transmission and expression of bGH transgene in several generations of transgenic mice

Line	Generation	Transmission frequency	bGH concentration in milk ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ^f
#2	G0 ^a	female(founder)	80
	G1 ^b	2/8	— ^g
	G2 ^c	13/34	240
	G3 ^d	15/34	120
	G4 ^e	2/7	60
#7	G0	male(founder)	—
	G1	4/10	600
	G2	11/30	1600
	G3	18/42	860
	G4	15/37	900

a: founder transgenic mouse, b: first generation, c: second generation, d: third generation, e: fourth generation, f: approximately estimated by Western blot analysis, g: not analyzable because they were male.

bGH 유전자를 전달하고 있었다. 세대별 발현량은 계통 #2의 founder에서 $80\mu\text{g}/\text{ml}$, 제 2세대에서 $240\mu\text{g}/\text{ml}$, 제 3세대에서 $120\mu\text{g}/\text{ml}$, 제 4세대에서 $60\mu\text{g}/\text{ml}$ 수준이었고, 계통 #7은 그 발현량이 제 1세대에서 $600\mu\text{g}/\text{ml}$, 제 2세대에서 $1,600\mu\text{g}/\text{ml}$, 제 3세대에서 $860\mu\text{g}/\text{ml}$, 제 4세대에서 $900\mu\text{g}/\text{ml}$ 수준으로 세대 간 상당한 변이를 나타내었다. 이 같은 세대간 발현 수준의 변이는 어미 쥐의 건강 상태나 산자수 등의 개체 차이에 의한 것으로 판단된다(Andrew 등, 1993). 이상의 결과에서 볼 때 계통 #2와 계통 #7은 다소의 변이는 있으나, bGH 유전자를 여러 세대에 걸쳐 일반적인 멘델 유전법칙에 따라 안정적으로 후대에 전달하며, 그 발현도 지속적으로 유지하는 것으로 판단되었다. 결론적으로 염색체상에 삽입된 재조합유전자는 mosaicism을 보이는 일부 생쥐를 제외하고 대부분 안정적으로 다음 세대에 전달되며, 그 발현특성 또한 여러 세대에 걸쳐 지속적으로 유지됨이 확인되므로 형질전환 동물의 유즙에서 유용단백질을 대량 생산하려는 연구의 효용성을 확인할 수 있었다.

IV. 적 요

소 β -casein 유전자의 발현조절 부위 1.8 kb와 소 성장호르몬(bGH) 유전자 2.1 kb를 연결하여 만든 소

β -casein/bGH 재조합 유전자가 형질전환 동물에서 여러 세대를 걸쳐 안정적으로 유전되고 발현되는지를 알아보려고 10계통의 형질전환 생쥐를 생산하였다. 형질전환 생쥐 8 계통에서 유즙을 채취하여 Western 분석 방법으로 bGH 단백질의 발현량을 조사하였다. 4 계통의 생쥐 유즙에서 bGH 단백질이 $4\sim 600\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 수준으로 발현되었다. bGH mRNA의 발현을 Northern 분석 방법으로 조사한 결과, 유즙에서 bGH 단백질을 생산하는 4계통에서만 bGH mRNA가 검출되었으며, 그 발현 수준은 유즙내 bGH 함량과 정의 상관관계가 있었다. 따라서 소 β -casein/bGH 재조합 유전자는 형질전환 생쥐의 유선에서 정상적으로 발현, 분비됨을 확인할 수 있었다. 발현이 확인된 4계통 중에서 bGH의 발현량이 비교적 높은 두 계통(#2, #7)을 대상으로 재조합 유전자가 여러 세대를 통하여 안정적으로 유전되고 지속적으로 발현되는가를 4세대까지 조사하였다. 계통 #2는 평균 34%의 유전율을 보였으며, 계통 #7의 평균 유전율은 40%이었다. 유즙에서 bGH 단백질의 발현량은 계통 #2의 founder에서 $80\mu\text{g}/\text{ml}$, 제 2세대에서 $240\mu\text{g}/\text{ml}$, 제 3세대에서 $120\mu\text{g}/\text{ml}$, 제 4세대에서 $60\mu\text{g}/\text{ml}$ 수준이었고, 계통 #7은 그 발현량이 제 1세대에서 $600\mu\text{g}/\text{ml}$, 제 2세대에서 $1,600\mu\text{g}/\text{ml}$, 제 3세대에서 $860\mu\text{g}/\text{ml}$, 제 4세대에서 $900\mu\text{g}/\text{ml}$ 수준이었다. 이상의 결과는 형

질전환 생쥐에서 bovine β -casein/bGH 재조합 유전자의 유전형질이 멘델의 유전법칙에 따라 세대 간에 안정적으로 유전되고, 유즙으로 bGH 단백질이 지속적으로 분비되고 있음을 보여줌으로써 유용단백질의 대량 생산을 위한 형질전환 동물의 효용성을 확인할 수 있었다.

V. 인용문헌

1. al-Shawi, R., J. Kinnaird, J. Burke and J. O. Bishop. 1990. Expression of a foreign gene in a line of transgenic mice is modulated by a chromosomal position effect. *Mol. Cell. Biol.*, 10:1192-1198
2. Andrew, S. C., A. D. Michael, W. Gordon, S. C. Denise, B. R. Dawn, H. G. Yvonne, L. K. Jayne, D. B. Jayne, R. S. Ann, C. Alan and G. Lan. 1993. Transgenic livestock as bioreactors : Stable expression of human α_1 -antitrypsin by a flock of sheep. *Bio/Technology*, 11:1263-1270.
3. Bartke, A., E. M. Naar, L. Johnson, M. R. May, M. Cecim, J. S. Yun and T. E. Wagner. 1992. Effects of expression of human or bovine growth hormone genes on sperm production and male reproductive performance in four lines of transgenic mice. *J. Reprod. Fertil.*, 95:109-18.
4. Bühler, T. A., T. Bruyere, D. F. Went, G. Stranzing and K. Burki. 1990. Rabbit β -casein promoter directs secretion of human interleukin-2 into the milk of Trans. Rabbits. *Bio/Technology*, 8:140-143.
5. Cerdan, M. G., J. I. Young, E. Zino, T. L. Falzone, V. Otero, H. N. Torres and M. Rubinstein. 1998. Accurated spatial and temporal transgene expression driven by a 3.8-kilobase promoter of the bovine β -casein gene in the lactating mouse mammary gland. *Mol. Reprod. Dev.*, 49:236-45.
6. Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162:156-159.
7. Devinoy, E., D. Théapot, M. G. Stinnakre, M. L. Fontaine, H. Grabowski, C. Puissant, A. Pavirani and L. M. Houdebine. 1994. High level production of human growth hormone in the milk of transgenic mice: the upstream region of the rabbit whey acidic protein(WAP) gene targets transgene expression to the mammary gland. *Transgenic Res.*, 3:79-89.
8. Ebert, K. M., J. P. Selgrath, P. DiTullio, J. Denman, T. E. Smith, M. A. Memon, J. E. Schindler, G. M. Monastersky, J. A. Vitale and K. Gordon. 1991. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: Generation of transgenic goats and analysis of expression. *Bio/Technology*, 9:835-838.
9. Gordon, K., E. Lee, J. A. Vitale, A. E. Smith, H. Westphal and L. Hennighausen. 1987. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Bio/Technology*, 5:1183-1187.
10. Hammer, R. E., V. G. Pursel, C. E. Rexroad, R. J. Wall, D. J. Bolt, K. M. Ebert, R. D. Palmiter and R. L. Brinster. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep, and pig by microinjection. *Nature*, 315:680-683.
11. Jaenisch, R., K. Harbers, A. Schnieke, J. Lohler, I. Chumakov, D. Grotkopp and E. Hoffman. 1983. Germline integration of Moloney murine leukemia virus at the Mov 13 locus leads to recessive lethal mutation and early embryonic death. *Cell*, 32:209-216.
12. 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.*

- Cell., 4:355-60.
13. Kopchick, J., X. Z. Chen, Y. Li, R. W. Steger, J. S. Yun, T. E. Wagner and A. Bartke. 1998. Differential *in vivo* activities of bovine growth hormone analogues. *Transgenic Res.*, 7:61-71.
 14. Lee, C. S., K. Kim, D. Y. Yu and K. K. Lee. 1998. Pretreatment with glucocorticoid is essential for lactogenic induction of the bovine β -casein /CAT expression in HC11 cells. *Endocrine Res.*, 24:65-77.
 15. Lee, C. S., K. J. Kim, D. Y. Yu and K. K. Lee. 1996. An efficient expression of human growth hormone(hGH) in the milk of transgenic mice using rat β -casein /hGH fusion gene. *Applied Biochem. Biotech.*, 56:211-222.
 16. Maga, E. A., G. B. Anderson, M. C. Huang and J. D. Murray. 1994. Expression of human lysozyme mRNA in the mammary gland of transgenic mice. *Transgenic Res.*, 3:36-42.
 17. Maga, E. A. and J. D. Murray. 1995. Mammary gland expression of transgenes and the potential for altering the properties of milk. *Bio /Technology*, 13:1452-7.
 18. Ninomiya, T., M. Hirabayashi, J. Sagara and A. Yuki. 1994. Functions of milk protein gene 5' flanking regions on human growth hormone gene. *Mol. Reprod. Dev.*, 37:276-283.
 19. Pititus, C. W., L. Hennighausen, E. Lee, H. Westphal, E. Nicols, J. Vitale and K. Gordon. 1988. A milk protein gene promoter directs the expression of human tissue plasminogen activator cDNA to the mammary gland in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5874-5878.
 20. Platenburg, G. J., E. P. Kootwijk, P. M. Kooiman, S. L. Woloshuk, J. H. Nuijens, P. J. Krimpenfort, F. R. Pieper, H. A. de Boer and R. Strijker. 1994. Expression of human lactoferrin in milk of transgenic mice. *Transgenic Res.*, 3:99-108
 21. Rijnkels, M., P. M. Kooiman, P. J. A. Krimpenfort, H. A. de Boer and F. R. Pieper. 1995. Expression analysis of the individual bovine β -, α_{s2} and κ -casein genes in transgenic mice. *Biochem. J.*, 311:929-37.
 22. Shani, M., I. Barash, M. Nathan, G. Ricca, G. H. Searfoss, I. Dekel, A. Faerman, D. Givol and D. R. Hurwitz. 1992. Expression of human serum albumin in the milk of transgenic mice. *Transgenic Res.*, 1:195-208.
 23. Simons, J. P., M. McClenaghan and A. J. Clark. 1987. Alteration of the quality of milk by expression of sheep β -lactoglobulin in transgenic mice. *Nature*, 328:530-532.
 24. Thépot D., E. Devinoy, M. L. Fontaine, M. G. Stinnakre, M. Massoud, G. Kann and L. M. Houdebine. 1995. Rabbit whey acidic protein gene upstream region controls high-level expression of bovine growth hormone in the mammary gland of transgenic mice. *Mol. Reprod. Dev.*, 42:261-267.
 25. Wright, G, A. Carver, D. Cottom, D. Reeves, A. Scott, P. Simons, I. Wilmut, I. Garner and A. Colman. 1991. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Bio /Technology*, 9:267-275.
- (접수일자 : 1998. 7. 15. /채택일자 : 1998. 8. 20.)