

사람성장호르몬 유전자의 전핵내 미세주입이 토끼 수정란의 체외발달에 미치는 영향과 PCR 검색

강태영 · 채영진* · 이 항* · 이경광** · 박충생*** · 이효종
경상대학교 수의과대학, 동물의학연구소

Effect of Pronuclear Injection with Human Growth Hormone Gene on Development and PCR-Screening in Rabbit Embryos

T. Y. Kang, Y. J. Chae*, H. Lee*, K. K. Lee**, C. S. Park*** and H. J. Lee

College of Veterinary Medicine, Institute of Animal Medicine, Gyeongsang National University

SUMMARY

The pronuclear injection of metallothionein-human growth hormone(MT-hGH) gene into rabbit zygotes was performed to establish *in vitro* developmental system and to detect the presence of the injected gene by nested PCR.

Mature female New Zealand White rabbits were superovulated by eCG and hCG treatments. The rabbits were mated and the zygotes were collected from the oviducts 18~22 h after hCG injection by flushing with D-PBS. Two to three picoliters of MT-hGH gene was microinjected into male pronuclei. The foreign gene-injected zygotes were cultured in TCM-199 or RD medium containing 10% FCS with a monolayer of rabbit oviductal epithelial cells in a 5% CO₂ incubator. The presence of injected DNA in rabbit embryos or blastomeres at different developmental stages was detected by a nested PCR analysis. The results are summarized as follows :

1. The developmental rate of the MT-hGH gene-injected zygotes to blastocyst was significantly higher in TCM-199 medium (68.1%) than in RD medium (42.9%).
2. The gene injection into pronuclei at 18 or 22 hours post hCG treatment during pronuclear stage did not much affect on the *in vitro* development of the rabbit embryos.
3. The rate of gene-positive embryos detected by the nested PCR analysis was significantly decreased when they developed to blastocysts.

The results indicate that the screening of transgene in rabbit embryos by nested PCR analysis could be a promisable method for the preselection of transgenic embryos. Furthermore, the preselection of transgenic embryos would greatly reduce both the cost and effort of production of transgenic animals.

(Key words : MT-hGH gene, PCR, transgene preselection, rabbit)

본 연구는 한국과학재단에서 1996년도에 지원한 목적기초 연구사업비로 수행되었음.
(KOSEF:961-0606-052-2)

*서울대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Seoul National University)

**한국과학기술연구원 유전공학연구소(Genetic Engineering Research Institute, KIST)

***경상대학교 농과대학(College of Agriculture, Gyeongsang National University)

서 론

형질전환동물(transgenic animal)은 외래유전자를 도입받은 새로운 변이체 동물을 의미하며, 근래에 유전자재조합기술(recombinant DNA technique)과 미세조작기술(micromanipulation technique)의 발달로 동물 수정란에 외래유전자를 도입하고 이를 대리모에 이식하여 후대에 발현시킬 수 있게 됨으로써 형질전환동물의 생산이 가능하게 되었다. 이러한 형질전환동물생산기술(transgenic animal technology)은 가축에서 생산효율 및 축산식품의 품질향상, 고가의 유용한 인체단백질이나 약물의 생산, 동물의 질병에 대한 저항성의 증가, 질병과 생체기작 및 장기이식에 관한 연구에 있어서 매우 독특하고 유용한 질환모델동물의 생산 등에 획기적인 기여를 할 가능성이 있기 때문에 세계 각국은 이 기술의 산업화를 위하여 막대한 투자를 하고 있다. 형질전환동물은 미국을 위시한 선진국에서 특허로 등록되어 오고 있어서 이의 도입에 따른 기술적 어려움과 외화지불을 절감하기 위해서는 국내에서의 기술개발이 필요하다.

동물에서 형질전환동물의 생산에 관한 연구는 Gurdon(1977)이 처음으로 개구리 난자를 사용하여 시도하였고, 그 이후 1980년 Gordon 등 및 1983년 Palmiter 등은 생쥐 수정란의 응성전핵내에 사람의 성장호르몬 유전자를 주입하여 거대생쥐를 생산함으로써 포유동물에서는 최초로 형질전환동물을 생산하는데 성공하였다. 이러한 생쥐에서의 성공은 가축에서도 형질전환동물을 생산하는데 많은 기초자료와 가능성을 제시하였다. 그 이후 많은 과학자들이 생쥐(Canseco 등, 1994)를 비롯하여 많은 동물종에서 형질전환동물을 생산하였다. (Damak 등, 1996; Krimpenfort 등, 1991)

현재까지 형질전환동물 생산 방법 중 가장 많이 사용하고 있는 microinjection technique에서는 미세주입 후 수정란의 사멸률이 증가하고(Krimpenfort 등, 1991; Roschlau 등, 1989), 유전자의 삽입 빈도와 발현률의 저하(Roschlau 등, 1989; Brinster 등, 1985), 그리고 미세주입된 수정란의 무분별한 이식으로 인한 많은 수란축이 동원되어야 하는 것

과 유전자가 삽입되지 않은 수정란을 가진 수란축을 임신기간 동안 유지해야 하므로 많은 경비와 시간이 소요된다(McEvoy와 Sreenan, 1990). 한 마리의 형질전환 돼지를 생산하는데는 25만 달러가 소요되고, 형질전환 소의 경우에는 50만 달러 이상의 경비가 소요된다고 한다(Wall 등, 1992). 그러므로 형질전환동물 생산의 효율을 향상시키기 위하여서는 수정란에서 주입된 유전자의 통합을 확인한 다음 이를 선별적으로 대리모에 이식함으로써 많은 경비, 시간 및 노력을 줄일 수 있을 것이다.

근래에는 동물의 수정란 내에 주입된 유전자를 조기에 판별할 수 있는 방법으로 유전자가 주입된 수정란을 배양시킨 다음 미세조작기법을 이용하여 할구세포를 하나 또는 일부분 분리하여 취하고 여기에서 polymerase chain reaction(PCR)기법(Saiki 등, 1985)을 사용하여 King과 Wall(1988)은 소의 배반포에서 주입된 유전자를 확인하였고, Ninomiya 등(1989)은 생쥐의 상실배를 양분하여 나머지 반의 상실배에서 유전자를 증폭시켜 검색하였다. Thomas 등(1993)은 소의 수정란에서 주입된 외래유전자의 integration rate를 조사하였던 바 299개의 수정란 중 단지 2개(0.7%)에서만 통합이 확인되었다고 하며, Bowen 등(1993)은 PCR로 검색된 수정란의 이식에 의하여 형질전환 소를 생산하였고 533개의 수정란 중 421개의 transgenic negative를 가려냄으로써 수란우의 수를 79%나 줄일 수 있었다고 한다. 이렇게 PCR 분석으로 수정란을 대리모에 이식하기 전에 유전자의 통합을 조기에 판정함으로써 형질전환동물 생산효율을 향상시키는데 매우 유익하게 활용될 수 있다.

본 연구는 토끼를 모델동물로 사용하여 MT-hGH 유전자를 사용하여 응성전핵 내에 미세주입하고, 이들 수정란의 체외배양체계를 구축하고자 하였으며, MT-hGH 유전자를 주입한 토끼 수정란의 분할세포기에 따른 유전자의 존재 여부를 PCR 분석으로 조사하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용한 토끼는 연암축산전문대학으로

부터 공급받은 New Zealand White 종으로 생후 3~5 개월령의 암컷으로 체중은 3~3.5 kg인 것을 사용하였고, 수컷토끼는 생후 10 개월 이상된 것으로 체중은 4 kg 이상인 것을 공시하였다. 이들의 사료급여와 물의 공급은 자유로이 급식시켰으며, dark-light cycle 조절은 14 시간은 light, 10 시간은 dark로 하였다.

2. 과배란유기와 수정란의 채란

과배란의 유기는 성숙한 암컷토끼에 100 IU의 eCG(Serarumon[®], Denka Co. Japan)로 근육주사하고, 72시간 후 수컷토끼와 교미시킨 다음 100 IU의 hCG(hCG[®], Yuhan Co., Korea)를 이정맥으로 주사하였다. 수정란의 채란은 hCG 주사 후 18~22 시간에 암토끼를 chlorpromazine HCl(Sepamin[®], Samsung Co., Korea)를 25 mg/kg으로 근육 주사하여 진정시키고 하복부의 털을 제거하였다. 그리고 ketamine HCl(Ketara[®], Yuhan Co., Korea)을 25 mg/kg으로 이정맥주사하여 전신마취를 유도하고 베타딘과 알콜스폰지로 소독하고 하복부 정중선 절개로 개복수술을 실시하였다. Catheter를 이용하여 토끼의 난관누두부쪽으로 삽입하고 자궁 난관접합부에서 D-PBS가 든 주사기로 역관류하여 수정란을 채란하였다. 채란된 수정란은 실제현미경 상에서 검경하여 세포질이 정상인 것과 전핵형성이 뚜렷하게 잘 보이는 것을 선택하여 실험에 공시하였다.

3. 수정란의 체외배양

수정란의 체외배양을 위하여 먼저 토끼 난관 상피세포의 준비는 도살된 토끼의 난관을 penicillin G(500 unit/ml)와 streptomycin(500 μ g/ml)이 첨가되어있는 생리식염수로 깨끗이 세척한 다음 멸균된 거즈로 난관 표면을 닦고 결합조직과 지방조직을 제거하였다. 70% 알콜에서 소독한 다음 다시 항생제가 첨가된 식염수로 세척하고 TCM-199 배양액(GibcoBRL, USA) 1ml이 들어있는 주사기로 난관협부에서 누두부쪽으로 관류시킨 다음 핀셋으로 난관을 압착하면서 난관 상피세포를 채취하였다. 채취된 난관 상피세포는 500 g에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 나머지 pellet 부분을

2회 이상 원심분리기로 세척하여 1~2 \times 10⁶ cells/ml의 최종농도로 조절한 다음 10% fetal calf serum(FCS, Sigma, USA)을 첨가한 TCM-199 배양액으로 배양시켜 사용하였다.

수정란의 체외배양은 3 처리구로 구분하여 실시하였다. 1) 10% FCS를 첨가한 TCM-199 배양액, 2) D-MEM(GibcoBRL, USA)와 RPMI 1640(GibcoBRL, USA)을 1:1로 희석하여 만든 RD 배양액, 3) RD 배양액에서 48시간 배양한 후 TCM-199 배양액으로 교체한 것으로 3 구분하였다. 모든 수정란은 토끼의 난관 상피세포와 같이 39 $^{\circ}$ C의 5% CO₂ 배양기내에서 공배양하였다. 그리고 배양액은 48시간마다 신선한 배양액으로 교환하였으며 모든 배양액은 배양하기 전 최소 2시간 이상을 배양기내에서 pH의 평형을 유도하여 사용하였다.

4. 유전자의 미세주입

본 실험에 사용한 유전자는 KIST의 이경광 박사과 University of Washington의 Dr. Palmiter로부터 분양받은 mouse metallothionein promoter-human growth hormone fusion gene(MT-hGH)이었다.

외래유전자의 미세주입은 미세조작기가 장착된 DIC(Differential Interference Contrast) 도립현미경하에서 실시하였다. 수정란의 응성전핵에 준비된 2.6 kb의 MT-hGH 유전자를 약 2~3 pl 정도 조심스럽게 주입하여 핵막이 약간 부풀어 오를 정도에서 미세피펫을 후진하였다. 수정란의 체외배양은 미세주입이 끝난 후 세포질이 파괴되지 않은 것만 골라 배양액으로 옮겨 토끼의 난관 상피세포와 같이 5% CO₂ 배양기내에서 공배양하였다.

5. MT-hGH 유전자의 PCR

유전자주입 후 2-새포기에서 배반포까지 발달한 수정란은 D-PBS로 2~3회 세척한 후 microtube에 옮겼고, 할구의 준비는 각 세포단계의 수정란을 pronase 처리로 투명대와 mucin coat를 제거하고 Ca²⁺과 Mg²⁺이 첨가되지 않은 D-PBS에서 할구를 분리한 다음(이 등, 1994). 분리된 할구를 mouth pipette으로 조작하여 25 ng/ μ l의 salmon sperm DNA가 포함된 PBS에 씻은 후 200 μ g/ml의 pro-

teinase K가 들어있는 1x PCR buffer 1 μ 에 옮겨서 58 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양한 후 93.5 $^{\circ}$ C에서 10분간 가열하였다. Nested PCR 반응은 Dziadek과 Baker(1993)의 방법에 따라 실시하였다. 1XPCR buffer, 1.2 mM MgCl₂(2차 증폭시는 1.0 mM), 0.2 mM dNTP, 0.4 μ M primer, 0.5 U Dynazyme(Finnzymes) 으로 구성된 PCR reaction stock solution을 만들어 분주하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다가 PCR 분석 직전에 녹여 cell lysate이 들어있는 각 tube에 18 μ 씩 mineral oil 층을 통하여 더한 후 PCR cycle을 시작하였다. PCR의 primer는 먼저 첫 primer 쌍은 5'-CGTAATATCGGGGAAAGC-ACTA-3'와 5'-TCATTCAGAAGCCCCAAACC-T-3' 으로 첫 cycle은 94 $^{\circ}$ C에서 180초, 60 $^{\circ}$ C에서 40초, 72 $^{\circ}$ C에서 35초로 하고 그 다음 cycle에서 35 cycle까지는 94 $^{\circ}$ C에서 35초, 60 $^{\circ}$ C에서 40초, 72 $^{\circ}$ C에서 40초로 하고 마지막 72 $^{\circ}$ C에서는 300초로 하여 실시하였다. 이렇게 하여 생성된 산물을 2 μ 를 취하여 다시 두 번째 primer쌍 5'-GCTCTGCACTCCG-CCCGAAAAG-3'와 5'-GGTTAGTGCCCCCGT-CCCATCT-3' 으로 같은 cycle로 증폭시켰다. 2차 PCR 반응 생성물 중 약 15 μ 를 LE(FMC) agarose gel에서 전기영동하여 ethidium bromide stain 후 UV transilluminator로 증폭된 DNA를 확인하였다.

6. 통계학적 분석

실험결과와 통계학적 분석은 MicroSoft 사의 MicroExcel로 Chi-Square test를 실시하여 시험군 간의 유의차를 검정하였다.

결 과

유전자주입 토끼 수정란의 배양액에 따른 체외발달률을 조사하고자 먼저 유전자를 주입하지 않은 전핵배단계의 정상 수정란을 채란하여 TCM-199 배양액 및 RD 배양액을 사용하여 체외배양하여 보았던 바 Table 1과 같은 결과를 얻었다. RD 배양액으로 배양한 군에서는 57.7%의 배반포의 발달률을 보였고, RD 배양액으로 48시간 배양한 다음 TCM-199 배양액으로 교체한 군 및 TCM-199 배양액으로 체외배양한 군에서 각각 77.6%, 81.5%로 유의적으로 높은 배반포 발달률을 보였다. 이와 같은 결과로 보아 토끼 수정란은 RD 배양액으로 48시간 배양 후 TCM-199 배양액으로 교체하는 것과 TCM-199 배양액으로 체외배양하는 것이 효과적임을 알 수가 있었다. 토끼 수정란의 응성전핵에 MT-hGH 유전자를 미세주입하고 RD 배양액과 TCM-199 배양액으로 체외발달률을 조사하였던 바, 정상 토끼 수정란의 발달률과 마찬가지로 RD 배양액군에서는 42.9%의 배반포 발달률을 보였고, RD 배양액으로 48시간 배양한 후 TCM-199배양액으로 교체한 군과 TCM-199 배양액으로 배양한 군에서는 각각 64.4%와 68.1%로 유의적($P < 0.05$)으

Table 1. Effect of culture media on *in vitro* development of non-injected or MT-hGH gene injected rabbit zygotes

Gene treatments	Media	No. of zygotes cultured	No. of zygotes developed to (%)	
			Morula	Blastocyst*
Noninjected	RD	52	48	30(57.7) ^a
	RD-TCM	67	59	52(77.6) ^b
	TCM	81	73	66(81.5) ^b
Injected	RD	184	146	79(42.9) ^c
	RD-TCM	149	120	96(64.4) ^d
	TCM	135	118	92(68.1) ^d

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

**RD : RPMI 1640 + D-MEM medium, TCM : TCM-199 medium, RD-TCM : cultured in TCM-199 medium after 48 hours cultured in RD medium.

*** All of the zygotes were co-cultured with rabbit oviductal epithelial cells.

로 높은 배반포 발달률을 보였다. 그러나 유전자를 주입한 수정란은 정상 수정란에 비해 체외발달률이 다소 떨어졌다.

유전자 주입시기에 따른 토끼 수정란의 체외발달률을 조사하기 위하여 hCG 투여 후 18 시간과 22 시간에 유전자를 음성전핵에 주입하였던 바, Table 2와 같은 결과를 얻었다. 유전자 주입시기도 수정란의 체외발달 능력에 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다. hCG 투여 후 18시간에 유전자를 주입한 수정란의 배반포 발달률은 58.3%였고, 22시간에 유전자를 주입한 수정란에서는 64.5%로 다소 체외발달률은 높았으나 두 처리군간에 유의성을 인정할 수 없었다.

MT-hGH 유전자를 토끼 접합체의 음성전핵에 미세주입하고 PCR 방법으로 수정란의 발달단계별로 유전자의 검색 여부를 조사한 결과는 Table 3 및 Fig. 1과 같다. 초기 수정란단계인 2-, 4-, 및 8-세포기에서 양성율은 각각 59, 65, 및 63%로 서로 유의적인 차이는 없었다. 그러나 배반포까지 발달한 수정란 132 개 중 PCR-screening 에 양성인 것은 33 개로서 25%를 차지하여 다른 세포단계와는 유의적으로 유전자의 양성 검출률이 낮았다($P < 0.05$).

유전자를 주입한 수정란에서 세포단계별로 할구를 하나씩 분리하여 각 할구에서 유전자를 PCR방법으로 검출한 결과는 Table 4와 같다. 세포가 발달

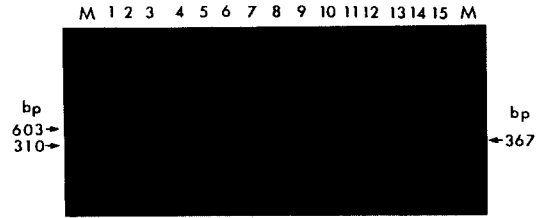


Fig. 1. Detection of MT-hGH gene in rabbit embryos by nested PCR(367bp). M; marker (phix 174/ HaeIII), Lane 1-3: 2-cell, Lane 4-6: 4-cell, Lane 7-9: 8-cell, Lane 10-12: blastocyst, Lane 13-14: negative control, Lane 15: positive control.

할수록 할구에 존재하는 유전자의 양성률은 점차 감소하는 경향을 보였다. 2세포기의 할구에서는 84%, 4세포기의 할구에서는 77%의 유전자 양성률을 보였고, 8세포기와 16세포기에서는 47%의 동일한 양성률을 보여 2세포기와 4세포기의 할구에 비하여 유의적으로 양성률이 낮게 나타났다($P < 0.05$).

고 찰

형질전환동물을 생산하기 위하여 외래유전자를 수정란의 게놈에 삽입하는 방법은 음성전핵에 미세

Table 2. Effect of time of MT-hGH gene microinjectin on *in vitro* development of rabbit zygotes

Injection time (hrs post hCG)	No. of zygotes injected	No. of zygotes developed to(%)		
		Cleaved	Morula	Blastocyst*
18	73	61	49	42(58.3) ^a
22	93	89	81	60(64.5) ^a

* There was no significant difference between the gene-injection times.

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

Cell stages	No. of embryos analyzed	PCR-screening of MT-hGH gene		
		No. of positive	No. of negative	Percent positive*
2-cell	51	30	21	59 ^a
4-cell	43	28	15	65 ^a
8-cell	43	27	16	63 ^a
Blastocyst	132	33	99	25 ^b

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

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

Cell stages	No. of blastomeres analyzed	PCR-screening of MT-hGH gene		
		No. of positive	No. of negative	Percent positive*
2-cell	32	27	5	84 ^a
4-cell	43	33	10	77 ^a
8-cell	38	18	20	47 ^b
16-cell	43	20	23	47 ^b

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

주입하는 방법, 레트로바이러스 벡터를 이용하는 방법 및 embryonic stem cell을 활용하는 방법 등이 주로 사용되고 있다. 본 연구에서는 이들 방법들 중 유전자를 용성전핵에 직접 미세주입하는 방법을 이용하여 형질전환 수정란을 생산하고, PCR 검색으로 조기감별하고자 하였다.

먼저 토끼에서 유전자전환 수정란의 체외배양체를 구축하고자 각기 다른 조성의 배양액을 이용하여 체외발달률을 조사하였다. 정상 토끼 수정란에서의 체외발달률은 RD 배양액 단독 배양에서 57.7%로 Carney와 Foote(1991)가 보고한 RD 배양액에서의 체외발달률 68%에 비하여 다소 낮은 경향은 있었으나, TCM-199 배양액이 다른 배양조건과 비교하여서 유의적으로 높게 체외발달을 보이고 세포수도 높았다는 Carney 등(1990)의 보고와는 본 연구 결과와 거의 일치하였다. 외래유전자인 MT-hGH 유전자를 직접 용성전핵에 미세주입한 후 TCM-199 배양액 및 RD 배양액을 사용하여 난관 상피세포와 공배양한 결과, RD 배양액 단독 배양보다는 RD 배양액으로 48시간 배양한 다음 TCM-199배양액으로 교체한 것 및 TCM-199 배양액으로 공배양한 것에서 배반포 발달률이 높게 나타났다. 이는 수정란에 미세주입으로 인한 손상을 고려하면 정상 수정란의 체외발달률에 비하여 다소 낮았지만, 배양조건에 따른 체외발달 양상은 정상 수정란에서의 조건과 같았다. 본 연구의 결과에서는 유전자를 주입하지 않은 수정란에서는 배반포까지의 발달률은 81.5%인데 반해 유전자를 주입한 수정란은 68.1%로 다른 종의 동물보다는 주입후 생존률이 높았다. Voss 등(1990)은 토끼와 생쥐에서 유전자 미세주입후 수정란의 생존률을 조사한 결과, 토끼에서는 85.4%의 상실배까지 발달한 것에 비해

생쥐는 43.2%의 상실배까지의 발달을 보였다. 본 연구에서도 상실배까지의 발달률이 위 연구자의 결과와 비슷한 결과를 보였던 것으로 보아 토끼의 수정란이 다른 종의 수정란보다 미세주입시 기계적인 손상이 덜 민감하다는 사실을 알 수가 있었다. 그리고 Williams 등(1992)은 미세주입의 민감도는 종 특이적일 것이라고 생각되어진다고 하고 체외수정란과 체내수정란간에도 배발달률에 차이를 보였다고 하였다.

본 연구에서는 토끼 수정란의 유전자 주입 시기에 따른 체외발달 능력을 조사하고자 하였다. 토끼에서는 교미 자극을 받고 hCG 투여 후 9시간에서 13시간 사이에 배란이 일어난 다음 18~21시간 사이에 전핵이 형성되고 약 21시간에서 28시간 사이에 첫 분열이 일어난다. 생쥐는 hCG 투여 후 12시간 전후로 배란이 일어나 2~3시간 후에 전핵을 형성하여 4~5시간 후 DNA 합성시기에 들어가는 것으로 알려져 있다(Abramczuk & Sawicki, 1975). 소에서는 전핵 형성시기는 수정 후 최초 7에서 8시간째 형성하고 대부분의 수정란은 9~14시간 제 두개의 전핵을 형성하게 되며, 첫 분열은 수정 후 약 28시간에 일어난다고 한다(Xu & Greve, 1988; Saeki 등, 1991). 일반적으로 DNA의 복제는 전핵 형성 이후 일어나며(Browder 등, 1991), 합성은 첫 분열 후 즉시 일어나게 된다(McLaren, 1992). 후기 전핵 단계에 주입된 DNA는 두 번째 복제기에 통합될 것이다. 그래서 미세주입시기는 DNA 합성시기 이전에 이루어져야만 효율적인 외래유전자의 도입이 이루어질 것으로 생각된다. 만약 외래유전자의 삽입이 DNA 합성시기 이후에 이루어진다면 삽입 효율의 감소는 물론 모자이크 형질전환동물의 생산 가능성도 높아질 것으로 생각된다. 토끼 수정란에

유전자 미세주입시간을 hCG 투여 후 18시간과 첫 분열직전인 22시간에 실시한 바 체외발달률에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 한 등(1990)은 생쥐에서 미세주입시기에 따른 체외발달을 조사한 결과 수정란의 생존률에는 차이를 보이지 않았으나, 착상률과 유전자의 통합 여부에는 차이를 보였다고 한다. 그러나 Krisher 등(1994)의 결과는 본 연구와는 상반되는 보고를 하였다. 전핵 형성시기에 가까운 수정란에 미세주입한 것이 오히려 높은 발달률을 보였다고 한다. 전핵이 뚜렷히 잘 보이고 크면 오히려 유전자의 주입량이 많아 수정란의 사멸을 초래한 것으로 사려되었다.

형질전환 동물 또는 태아의 조직에서 유전자의 발현 검출은 chloramphenicol acetyl transferase (Gorman 등, 1982), firefly luciferase(Morrey 등, 1992), puromycin N-acetyltransferase(Lahoz 등, 1992), growth hormone gene(Palmiter 등, 1991; Ting 등, 1992), 그리고 lac Z gene(Hughes와 Balu, 1990; Weis 등, 1991)과 같은 reporter 유전자를 이용하여 유전자의 발현을 조사하였다. 그러나 reporter 유전자를 이용하여 수정란 단계에서 유전자의 발현 여부를 조사하고자 하면 이들 유전자들의 검출방법이 효소반응을 하거나 luminometer를 이용하기 때문에 발현된 수정란은 사멸이 불가피하게 되어 살아있는 상태에서 조기선별법으로는 활용이 부적합하다. King과 Wall(1988)은 PCR분석법을 이용하여 소의 배반포에서 유전자 검출을 하였으며, 미세조작기법을 이용하여 수정란의 일부를 biopsy하여 할구에서 유전자의 발현 여부를 조사할 수 있어 수정란을 사멸시키지 않고 선별이 가능하였다. 실제 실험동물인 생쥐(*Ninomya* 등, 1989)와 가축(Krimpenfort 등, 1991; Hyttinen 등, 1996; Bowen 등, 1993)의 배반포에서 PCR기법으로 유전자가 발현된 수정란을 검출하여 대리모에 이식함으로써 많은 경비와 노력을 절감하고 형질전환동물 생산효율을 향상시키는 연구가 수행되어 오고 있다.

MT-hGH 유전자는 수정란이 발달할수록 수정란 뿐만 아니라 할구세포에서도 양성으로 검출되는율이 점차 낮아지는 경향을 보였다. 배반포기까지 발달한 수정란 132 개 중 PCR 검색에서 양성인 것은

33개로서 25%를 차지하였다. Burdon과 Wall (1992)은 생쥐에서 KH gene을 전핵내에 주입하고 체외발달을 시키면서 발달 단계별로 수정란에서의 유전자를 PCR로 검출하여 보았더니, 2- 및 4-세포기에서는 100% 양성을 보였으나, 상실배기에서는 44%, 그리고 배반포기에서는 26%의 양성률을 보여 본 실험에서와 같이 점차 양성률이 낮아지는 경향을 보였다고 한다. Koo 등(1996)은 돼지 수정란에서 gGH 유전자를 웅성전핵 내에 주입하고 발달 단계별로 조사하였는데, 역시 2-, 4-, 및 8-세포기에서는 100% 양성률을 보였고, 상실배기에서는 45% 그리고 배반포기에서는 44.4%가 양성을 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 양성을 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 양성을 보였다고 한다. 이러한 유전자 검색률의 차이는 동물의 품종, 유전자의 종류 및 PCR 검출 방법에 따른 차이로 생각되며 대체로 수정란이 발달할수록 점차 낮아지는 것을 알 수 있었다. 이는 착상전의 초기단계 수정란에서도 PCR 검색으로 유전자 통합이 일어나지 않았거나 소실된 것을 조기에 55~90% 이상 선별함으로써 이식 후 형질전환 산자의 생산률 향상에 도움이 될 것으로 본다.

적 요

토끼 수정란의 웅성전핵 내에 MT-hGH 유전자를 미세주입하고 유전자전환 수정란을 작출하고, PCR 검색으로 주입된 유전자의 존재 여부 및 발현을 조기에 확인하여 유전자 전환 수정란의 선별기술을 개발함으로써 형질전환동물 생산기술을 향상시키고자 일련의 실험을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 토끼 수정란에 MT-hGH 유전자를 주입한 후 수정란을 몇 가지 배양액으로 배반포까지 체외 배양시킨 결과, TCM-199 배양액에서는 68.

1%, RD 배양액에서 48시간 배양후 TCM-199 배양액으로 교체배양한 것은 64.4%의 배반포 발달률을 보여 RD 배양액 단독으로 배양한 것의 42.9%보다 유의적($P < 0.05$)으로 높았다.

- 유전자 주입시기에 따른 토끼수정란의 배반포까지의 체외발달능력과 배반포에서 PCR로 유전자 검출률을 조사한 바, 주입시기에 따른 배반포기까지의 체외발달률과 PCR 검출률은 유의적 차이를 나타내지 않았다.
- MT-hGH 유전자를 주입한 토끼 수정란을 체외배양하면서 세포단계별로 PCR screening한 결과, 2-, 4-, 8-세포기에서 각각 59, 65, 63%의 비슷한 양성검출률을 나타내었으나, 배반포에서는 유의적($P < 0.05$)으로 낮은 25%의 양성검출률을 보였다. 그리고 할구별 PCR-screening에서도 2- 및 4-세포기 할구에서 각각 84, 77%의 양성검출률을 보였으나 8- 및 16-세포기 할구에서는 유의적($P < 0.05$)으로 낮은 25%의 양성검출률을 보였다.

참고문헌

- Abramczuk J and Sawicki W. 1975. Pronuclear synthesis of DNA in fertilized and parthenogenetically activated mouse eggs. *Exptl. Cell. Res.*, 92:361-372.
- Bowen RA, Reed M, Schnieke A, Seidel GE, Brink Z and Stacey A. 1993. Production of transgenic cattle from PCR-screened embryos. *Theriogenology*, 39:194.
- Brinster RL, Chen HY, Trumbauer ME, Yagle MK and Palmiter RD. 1985. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc. Natl. Sci. USA*. 82:4438-4442.
- Browder LW, Erickson CA and Jeffery WR. (Eds) 1991. *Fertilization : the activation of development*. In : *Developmental Biology*, 3rd Edition p. 142. Orlando, FL : Holt, Reinhart and Winston, Inc.
- Burdon TG and Wall RJ. 1992. Fate of microinjected genes in preimplantation mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 33:436-442.
- Canseco RS, Sparks AET, Page RL, Russell CG, Johnson JL, Velander WH, Person RE, Drohan WN and Gwazdauskas FC. 1994. Gene transfer efficiency during gestation and the influence of co-transfer of non-manipulated embryos of production of transgenic mice. *Transgenic Research*, 3:20-25.
- Carney EW and Foote RH. 1991. Improved development of rabbit one-cell embryos to the hatching blastocyst stage by culture in a defined, protein-free culture medium. *J. Reprod. Fertil.*, 91(1):113-123.
- Carney EW, Tobback C and Foote RH. 1990. Co-culture of rabbit one-cell embryos with rabbit oviduct epithelial cells. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 26(6):629-635.
- Damak S, Su HY, Jay NP, Bullock DW and Su HY. 1996. Improved wool production in transgenic sheep expressing insulin-like growth factor 1. *Bio /Technology*, 14:185-183.
- Dziadek M and Bakker M. Genetic analysis of the preimplantation embryos. In *Handbook of In Vitro Fertilization*. CRC Press 1993: 151-171.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA and Ruddle FH. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 77(12):7380-7384.
- Gorman CM, Moffat LF and Howard BH. 1982. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, 2:1944-1951.
- Gurdon JB. 1977. Egg cytoplasm and gene control on development. *Proc. R. Soc. London B*. 198:211-247.
- Hughes SM and Blau HM. 1990. Migration of myoblasts across basal lamina during skeletal muscle development. *Nature*, 345:350-

- Hyttinen JM, Peura T, Tolvanen M, Aalto J and Janne J. 1996. Detection of microinjected genes in bovine preimplantation embryos with combined DNA digestion and polymerase chain reaction. *Mol. Reprod. Dev.*, 43:150-157
- King D and Wall RJ. 1988. Identification of specific gene sequences in preimplantation embryos by genomic amplification : detection of a transgene. *Mol. Reprod. Dev.*, 1:57-62.
- Koo DB, Lim JG, Lee SM, Chang WK, Kim NH, Lee HT and Chung KS. 1996. Developmental ability and transgene expression of IVM/IVF derived porcine embryos after DNA microinjection. *Korean J. Anim. Sci.*, 20:19-26.
- Krimpenfort P, Rademarkers A, Eyestone W, Schans A, Broek S, Kooiman P, Kootwijk E, Platenburg G, Piper F, Strijker R and de Boer H. 1991. Generation of transgenic dairy cattle using *in vitro* embryo production. *Bio/Technology*, 9:844-847.
- Krisher RL, Gibbons JR, Canseco RS, Johnson JL, Russell CG, Notter DR, Velander WH and Gwazdauskas FC. 1994. Influence of time of gene microinjection on development and DNA detection frequency in bovine embryos. *Transgenic Research*, 3:226-231.
- Lahoz EG, de Haro MSL, Esponda P and Nieto A. 1992. Tissue-specific and hormonally regulated expression of the puromycin N-acetyltransferase-encoding gene under control of the rabbit uteroglobin promoter in transgenic mice. *Gene*, 117:255-258.
- McEvoy TG and Sreenan JM. 1990. The efficiency of production, centrifugation, microinjection and transfer of one- and two-cell bovine ova in a gene transfer program. *Theriogenology*, 33:819.
- McLaren A. 1992. The embryo. In : Austin, C.R. and Short, R.V. eds, *Reproduction in mammals 2: Embryonic and Fetal Development*, p 3. Cambridge University Press.
- Morrey JD, Bourn SM, Bunch TD, Sidwell RW and Rosen CA. 1992. HIV-1 LTR activation model : evaluation of various agents in skin of transgenic mice. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 5:1195-1203.
- Ninomiya T, Hoshi M, Mizuno A, Nagao M and Yuki A. 1989. Selection of mouse preimplantation embryos carrying exogenous DNA by polymerase chain reaction. *Mol. Reprod. Dev.*, 1:242-248.
- Palmiter RD, Norstedt G, Galinas RE, Hammer RE and Brinster RL. 1983. Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science*, 222:809.
- Palmiter RD, Sandgren EP, Avarbock MR, Allen DD and Brinster RL. 1991. Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 478-482.
- Pinkert CA and Stice SL. 1995. Embryonic stem cell strategies : beyond the mouse model. In: Monastersky, GM., Robl, JM.(eds). *Strategies in transgenic animal science*. ASM Press, Washington, D. C. pp 73-88.
- Roschlau K, Bommel P, Andreewa L, Zackel M, Roschlau D, Zackel B, Schwerin M, Huhn R and Gazarjan KG. 1989. Gene transfer experiments in cattle. *J. Reprod. Fertil. suppl.*, 38:153-160.
- Saeki RK, Kato H, Hosoi Y, Miyake M, Utsumi K and Iritani I. 1991. Early morphological events of *in vitro* fertilized bovine oocytes with frozen thawed spermatozoa. *Theriogenology*, 35:1051-1058.
- Thomas WK, Schnieke A and Seidel GE. 1993. Methods for production transgenic bovine embryos from *in vitro* matured and fertilized oocytes. *Theriogenology*, 40:679-688.
- Ting CN, Rogenberg MP, Snow CM, Samuelson LC and Meisler MH. 1992. Endogenous ret-

- roviral sequences are required for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene. *Genes Dev.*, 6:1457-1465.
- Voss AK, Sandmoller A, Suske G, Strojek RM, Beato M and Hahn J. 1990. A comparison of mouse and rabbit embryos for the production of transgenic animals by pronuclear microinjection. *Theriogenology*, 34(5):813-824.
- Wall RJ, Hawk HW and Nel N. 1992. Making transgenic livestock : genetic engineering on a large scale. *J. Cell. Biochem.*, 49:113-120.
- Weis J, Fine SM, David C, Savarirayan S and Sanes JR. 1991. Integration site-dependent expression of a trasgene reveals specialized features of cells associated with neuro-muscular junctions. *J. Cell. Biol.*, 113:1385-1397.
- Williams BL, Sparks AET, Canseco RS, Knight JW, Johnson JL, Velandar WH, Page RL, Drohan WN, Young JM, Pearson RE, Wilkins TD and Gwazdauskas FC. 1992. *In vitro* development of zygotes from prepubertal gilts after microinjection of DNA. *J. Anim. Sci.*, 70:2207-2211.
- Xu KP and Greve TA. 1988. A detailed analysis of early events during *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 82:127-134.
- 이효종, 전병균, 윤희준, 이경미, 송상현, 공일근, 노규진, 최민철, 최상용, 박충생. 1994. 핵이식에 의한 복제토끼 생산. *한국수정란이식학회지*, 9(2):161-165.
- 한용만, 이철상, 강만중, 유대열, 이경광. 1990. Transgenic 생쥐생산에 있어서 미세주입시기 및 외래유전자의 농도가 삽입빈도에 미치는 영향. *한국축산학회지*, 32:309-314.

(접수일 : 1998. 7. 10 / 채택일자 : 1998. 8. 18)