

## 사람성장호르몬 유전자주입 토끼수정란의 핵이식에 의한 복제

강태영 · 채영진\* · 이함\* · 박충생\*\* · 이효종  
경상대학교 수의과대학, 동물의학연구소

### Cloning of MT-hGH Gene-injected Rabbit Embryos by Nuclear Transplantation

Kang, T. Y., Y. J. Chae\*, H. Lee\*, C. S. Park\*\* and H. J. Lee  
College of Veterinary Medicine, Institute of Animal Medicine,  
Gyeongsang National University

#### SUMMARY

The present study was carried out to examine the efficiency of cloning of transgenic embryos by nuclear transfer(NT) using gene-injected rabbit embryos. The rabbit embryos at pronuclear stage were microinjected with methallothionein-human growth hormone(MT-hGH) gene and cultured to 8- and 16-cell in TCM-199 containing 10% FCS with a monolayer of rabbit oviductal epithelial cells in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. The recipient oocytes were collected from the oviducts 14~16 h after hCG injection. The oocytes were enucleated and activated with 5 $\mu$ M ionomycin and 2 mM 6-dimethylaminopurine. Blastomeres from gene-injected embryos were transferred into the enucleated oocytes by micromanipulation. The nuclear transplant oocytes were electrofused and co-cultured with rabbit oviductal cells. Following 120 h of culture, blastocysts were prepared for gene analysis by polymerase chain reaction(PCR). In previous experiment, the rate of gene-positive embryos detected by the nested PCR analysis was significantly decreased while developing to blastocyst(25%)(Kang et al., 1998).

The fusion rate of gene-injected blastomeres was significantly( $P < 0.05$ ) lower than non-injected blastomeres(66% vs 80%). However, the NT embryos that were derived from gene-injected donor embryos did not differ from control embryos in development to the blastocyst stage(39% vs 31%). Of the 43 NT blastocysts developed from the gene-injected donor embryos, twelve(28%) were positive for the injected DNA. The results indicate that NT with gene-injected embryos can be successfully used for cloning and multiplication of transgenic embryos, furthermore applicable to improvement of transgenic animal production.

(Key words : MT-hGH gene, Microinjection, Nuclear transplantation, Rabbit)

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

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

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

## I. 서 론

유전적으로 동일한 복제동물들 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 Briggs와 King (1952)이 처음으로 시도한 이래 많은 연구자들이 소 (Robl 등, 1987; Prather 등, 1987; Bondioli 등, 1990)를 비롯한 가축(Stice와 Robl, 1988; Prather, 1989; Smith와 Wilmut, 1989)에서 핵이식에 의한 산자 생산의 보고가 있었다. 그리고 최근 Wilmut 등 (1997)이 체세포인 유선세포를 이용하여 복제양 "Dolly"를 생산함으로써 다시금 연구가 활기를 띠게 되었다. 그러나 핵이식 기술은 생산효율이 낮으며, 체외 발달뿐만 아니라 산자생산률 역시 낮아 산업적인 실용화에 이르는 데에는 많은 연구가 필요한 실정이다.

Krisher 등(1995)은 소의 수정란에 mWAP-human protein C 유전자를 미세주입하고 PCR 기법으로 양성인 수정란을 선별하여 그것을 핵이식의 공급핵으로 사용하여 총 337 개를 복제하여 37개(11%)가 배반포까지의 발달률을 보였고 그 중 12 개(32.4%)만이 유전자를 가진 양성으로 나타났다고 한다. 그리고 Schnieke 등(1997)은 양에서 태아섬유아세포의 핵을 이용하여 핵이식함으로써 6 마리의 산자를 생산하여 그 중 3마리가 human coagulation factor IX를 가지고 있는 형질전환 복제산자를 생산하는 쾌거를 거두었다. 이러한 유전자의 조기분석과 핵이식기법을 병용하여 형질전환된 수정란을 다량 생산하면 형질전환동물의 생산효율을 향상시킬 수 있을 것이다.

본 연구는 토끼에서 사람성장호르몬(MT-hGH) 유전자를 이용하여 미세주입하고 이들을 8~16 세포기의 할구를 이용하여 핵이식을 실시하여 형질전환 복제 수정란의 생산효율을 조사하고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 수핵난자 준비

핵을 수여받을 난자는 암컷 New Zealand White

토끼에 ECG 100 IU(Serarumon<sup>®</sup>, Denca Co., Japan)를 근육주사하고 72시간 후 hCG(hCG<sup>®</sup>, Yuhan Co., Korea) 100 IU를 정맥주사하여 과배란을 유도한 다음 hCG 투여 14 ~ 16시간 후 토끼를 개복수술하여 난관으로부터 성숙된 난자를 D-PBS 로 회수하였다. 회수한 난자를 bovine testis hyaluronidase (Sigma, USA) 1 mg/ml이 함유된 배양액으로 처리한 다음 좁은 pipette 으로 흡입을 반복하여 난구세포를 제거하였다.

### 2. 공핵수정란의 준비

핵을 공급할 수정란은 전핵기에 mouse metallothionein promoter-human growth hormone fusion gene(MT-hGH)을 미세주입한 후 체외에서 8~16 세포기로 발달한 것을 사용하였다. 이 수정란은 pronase로 투명대를 연화시켜 제거하고, Ca<sup>2+</sup>과 Mg<sup>2+</sup>이 첨가되지 않은 D-PBS에서 할구세포를 분리하였다.

### 3. 유전자주입 수정란의 핵이식

수핵란의 탈핵을 위한 미세조작은 Stice와 Robl (1988)의 방법에 준하여 실시하였다, 즉, 수핵난자와 공핵수정란으로부터 분리된 할구세포를 7.5 µg/ml의 cytochalasin B (Sigma, USA)와 10% FCS가 함유된 D-PBS에서 미세조작 15 분전에 전처리한 다음, 미세조작을 위하여 micromanipulator (Narishige Co., Japan)를 DIC가 장착된 도현현미경(Nikon Co., Japan)위에 장치하였다. 탈핵은 McGrath와 Solter(1983)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 성숙된 난자로부터 핵을 제거하기 위하여 30~35 µm의 연마된 미세 pipette을 투명대 내로 진입시키고 제 1극체와 그 주위에 위치하는 핵을 원형질막에 싸여진 채로 흡입하여 제거하였다. 그리고 탈핵된 난자의 활성화를 위하여 5 µM ionomycin에서 5 분간 처리하고, 2 mM 6-dimethylaminopurine(DMAP)에서 2시간 배양하였다. 난자의 활성화를 마친 후 완전히 탈핵이 된 난자만을 회수하기 위하여 난자의 세포질에서 극체 모양을 띤 돌기가 나온 것은 실험에서 제거하였다. 한편, 공핵수정란으로부터 분리된 할구세포 하나를 미세 pipette에 흡입하고 이를 미세조작으로 탈핵된 수핵난자의 위관막강에 주입하였다. 핵이 주입된 난자는 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>이 첨가되지 않은 0.3 M mannitol 용액

이 채워져 있는 전기세포융합기(Electro cell manipulator 200<sup>®</sup>, BTX Co., USA)의 chamber에서 hCG 투여 후 20시간째에 핵의 융합을 유도하였다. 융합조건은 직류전류로서 전압을 1.25 kV/cm, 통전시간은 60 $\mu$ sec로 1회 또는 2회 통전하였다.

#### 4. MT-hGH 유전자의 PCR

핵이식하여 배반포까지 발달한 수정란을 D-PBS로 2~3회 세척 한 후 200 $\mu$ g/ml의 proteinase K가 들어있는 1x PCR buffer 1  $\mu$ l에 옮겨서 58 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양한 후 93.5 $^{\circ}$ C에서 10분간 가열하였다. Nested PCR 반응은 Dziadek과 Bakker(1993)의 방법에 따라 실시하였다. 1x PCR buffer, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 0.4  $\mu$ M primer, 0.5 U Dynazyme (Finnzymes)으로 구성된 PCR reaction stock solution을 만들어 PCR 분석 직전에 녹여 cell lysate이 들어있는 각 tube에 18  $\mu$ l씩 mineral oil 층을 통하여 더한 후 PCR cycle을 시작하였다. PCR의 primer는 5'-CGTAATATCGGGAAAGCACTA-3'와 5'-TC-ATTCAGAAGCCCCAAACCT-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 300초로하여 실시하였다. 이렇게하여 생성된 산물을 2  $\mu$ l를 취하여 primer 5'-GCTCTGCACTCCGCCGAAAAG-3'와 5'-GGTTAGTGCCCCGTCATCT-3'으로 다시 같은 cycle로 증폭시켰다. 2차 PCR 반응 생성물 중 약 15  $\mu$ l를 LE (FMC) agarose gel에서 전기영동하여 ethidium bromide stain 후 UV transilluminator로 증폭된 DNA를 확인하였다.

#### 5. 핵이식 수정란의 체외배양

융합이 확인된 수정란은 노 등(1994)의 기술에 따라 10% FCS가 포함된 M-199 배양액에 옮겨 토끼의 난관상피세포와 같이 39 $^{\circ}$ C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기내에서 공배양하였다. 그리고 배양액은 48시간마다 신선한 배양액으로 교환하였으며, 모든 배양액은 배양하기 전 최소 2시간 이상을 배양기내에서 pH의 평형을 유도하여 사용하였다.

#### 6. 통계학적 분석

실험결과의 통계학적 분석은 MicroSoft 사의 MicroExcel로 Chi-Square test를 실시하여 시험군간의 유의차를 검정하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 유전자 주입 토끼 수정란의 핵이식에 의한 복제효율

유전자가 주입된 수정란을 8- 및 16- 세포기로 발달시킨 다음 이들로부터 할구를 분리하여 핵이식을 실시하였던 바, 핵융합률과 체외배발달률의 결과는 Table 1, 2와 같다. 유전자가 주입된 할구를 핵이식한 결과 세포기간에 따른 핵융합률은 8-세포기에서는 60%, 16-세포기에서는 62.8%로 유의적인 차이를 나타내지 않았지만, 유전자를 주입하지 않은 대조군에서의 80.4%에 비하여 유전자를 주입한 할구를 이용한 것에서 보다 유의적(P<0.05)으로 낮게 나타났다.

또한 이들중 정상적으로 융합이 일어난 수정란을 TCM-199 배양액으로 옮겨 체외배양시켜 배반포기까지 발달률을 조사한 결과, 유전자가 주입된 8-, 16-세포기 할구를 이용한 것은 각각 34.6%, 28.1%의 발달률을 보여 세포기간에 따른 유의적인 차이를 보이지 않았고, 대조군의 39.3%에 비하여 낮은 발달률을 보였으나, 역시 유의적 차이를 나타내지 않았다(Table 2). 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, 핵융합률은 대조군에 비하여 유의성 있게 낮았으나 이들의 체외배양에서 배반포기까지 발달률에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 유전자를 주입한 수정란의 할구는 세포융합시 정상 수정란의 할구보다 탄력성이 적어 전기자극에 의해 할구 자체가 와해되는 것이 많았다. 이는 전핵에 유전자미세주입시 핵막과 세포질의 손상으로 인한 것으로 사려된다.

**Table 1. Effect of cell stage of nuclear donor blastomeres and gene injection on electrofusion in rabbit embryos reconstituted by nuclear transplantation**

Gene injection	Cell stages of donor nuclei	No. of oocytes used	No. of oocytes fused	Fusion rate(%)*
-	16-cell	102	82	80.4 <sup>a</sup>
+	8-cell	142	98	60.0 <sup>b</sup>
+	16-cell	191	120	62.8 <sup>b</sup>

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

**Table 2. Effect of cell stage of nuclear donor blastomeres and gene injection on *in vitro* development of rabbit embryos reconstituted by nuclear transplantation**

Gene injection	Cell stage of donor nuclei	No. of NT zygotes used	Developed to(%)	
			Morula	Blastocyst*
-	16-cell	28	27	11(39.3) <sup>a</sup>
+	8-cell	81	38	28(34.6) <sup>a</sup>
+	16-cell	96	43	27(28.1) <sup>a</sup>

\* There was no significant difference between the cell stage of donor nuclei.

**Table 3. PCR-screening of blastocysts cloned with MT-hGH gene injected blastomeres at 8- and 16-cell stages**

Cell stages of donor nuclei	No. of NT blastocysts analyzed	PCR-screening of MT-hGH gene		
		No. of positive	No. of negative	Percent positive*
8-cell	22	5	17	23 <sup>a</sup>
16-cell	21	7	14	33 <sup>a</sup>
Total	43	12	31	28

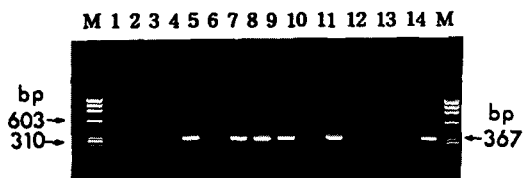
\* There was no significant difference between the two cell stages of donor nuclei.

## 2. 유전자 주입 복제 토끼 수정란에서의 MT-hGH gene의 PCR 검색

유전자 주입 후 8- 및 16-세포기로 자란 수정란의 할구세포를 핵공급원으로 사용하여 핵이식으로 복제하고 이들을 체외에서 배반포기까지 자란 것을 PCR 검색으로 유전자를 검출하였던 바, 8-세포기의 할구를 이용한 것은 23%의 양성률을 보였고, 16-세포기의 할구를 이용한 것은 33%의 양성률을 보여 세포기간에 따른 배반포기에서의 양성률은 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Krisher 등(1995)은 WAP-hPC 유전자가 주입된 소 수정란으로부터 할구세포를 분리하여 핵이식을 실시한 후 이들의 발달단계별로 PCR 검색을 하여본 바,

상실배기 또는 배반포기 수정란에서는 90% 이상 양성으로 나타났으나 이들을 핵이식한 후 복제된 상실배기 또는 배반포기 수정란에서는 32.4% 만이 양성으로 나타났다. 본 실험에서는 유전자 주입 후 8-, 16-세포기로 자란 토끼 수정란을 핵이식으로 복제하고 이들을 체외에서 배반포기까지 자란 것을 PCR 검색으로 유전자를 검출하였던 바, 각각 23 및 33%의 양성률을 보아 유전자가 주입된 수정란은 핵이식 후 발달하면서 대다수(70~80%)가 유전자를 소실하는 것으로 보인다. 그러므로 핵이식으로 복제된 수정란을 체외에서 배반포기까지 발달시킨 다음 주입된 유전자의 유무를 PCR 검색을 통하여 확인하고 이식하여 산자를 생산한다면 형질전환동물의 생산효율이 높아질 것으로 보이므로 이에 관한 연구는 앞으로 더 수행되어



**Fig. 1. Detection of MT-hGH gene in NT blastocysts of rabbit by nested PCR(367bp)**  
**M; marker(phix 174/HaeIII), Lane 1-11; NT blastocysts, Lane 12-13; negative control, Lane 14; positive control**

야 할 것으로 생각된다.

#### IV. 적 요

토끼 수정란의 전핵에 MT-hGH 유전자를 주입하고 핵이식 기법으로 형질전환 복제수정란의 생산효율과 PCR검색으로 복제수정란에서 유전자 존재 여부를 조사한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MT-hGH 유전자를 주입하여 8- 및 16-세포기로 자란 수정란을 공핵란으로 사용하여 핵이식을 실시하였던 바, 세포융합률은 각각 60.0%, 62.8%로 비슷하였으나 정상수정란을 공급핵으로 사용한 80.4%보다 유의적으로 낮은 융합률을 보였다. 그러나 이들 복제수정란의 체외발달률은 처리군간에 유의적인 차이는 인정되지 않았다.
2. 유전자 주입 후 8- 및 16-세포기로 자란 수정란의 할구를 이용하여 핵이식으로 복제하고 체외에서 배반포까지 자란 수정란을 PCR-screening 으로 유전자를 검출한 결과, 각각 23%와 33%의 유전자 양성 수정란을 감별하였다.

#### V. 인용문헌

1. Bondioli, K. R., M. E. Westhusin and C. R. Looney. 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. Theriogenology, 33(1):165-174.
2. Briggs R. and T. J. King. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into

enucleated frog eggs. Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 38:455-463.

3. Krisher, R. L., J. R. Gibbons and F. C. Gwazdauskas. 1995. Nuclear transfer in the bovine using microinjected donor embryos: Assessment of development and deoxyribonucleic acid detection frequency. J. Dairy Sci., 78:1282-1288.
4. McGrath, J. and D. Solter. 1983. Nuclear transplantation in mouse embryos by microsurgery and cell fusion. Science, 220:1300-1302.
5. Prather, R. S. 1989. Nuclear transfer in mammals and amphibians : Nuclear equivalence, species specificity ? In : Schatten H and Schatten G(eds). The molecular Biology of Fertilization. San Diego: Academic Press. Inc., pp. 323-340.
6. Prather, R. S., F. L. Barnes, M. M. Sims, J. M. Robl, W. H. Eyestone and N. L. First. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo. Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. Biol. Reprod., 37:859-866.
7. Robl, J. M., R. Prather, F. L. Barnes, W. H. Eyestone, D. Northey, B. Gilligan and N. L. First. 1987. Nuclear transplantation in bovine embryos. J. Anim. Sci., 64:642-647.
8. Schnieke, A. E., A. J. Kind, Q. A. Ritchie, K. Mycock, A. R. Scott, M. Ritchie, L. Wilmut, A. Colman and K. H. S. Campbell. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. Science, 278:2130-2133.
9. Smith, L. C. and I. Wilmut 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development *in vivo* of sheep embryos after nuclear transplantation. Biol. Reprod., 40: 1027-1035.
10. Stice, S. L. and J. M. Robl. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. Biol Reprod., 39:657-664.

11. Wilmut, I., J. McWhir, W. A. Ritchie and K. H. S. Campbell. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385:810-813.
12. 강태영, 채영진, 이항, 이경광, 박충생, 이효종. 1998. 사람성장호르몬 유전자의 전핵내 미세주입이 토끼 수정란의 체외발달에 미치는 영향과 PCR 검색. *한국수정란이식학회지*, 13(2):97-106.
13. 노규진, 이효종, 송상현, 윤희준, 박충생. 1994. 토끼수정란의 체외발달에 미치는 배양액 및 소와 토끼의 난관상피세포들과 공배양 효과. *한국가축번식학회지*, 18(1):39-46.  
(접수일자 : 1998. 12. 20. / 채택일자 : 1998. 12. 28.)