

소 수정란에서 Green Fluorescent Protein 유전자 검색 및 PCR에 의한 성감별

이효종[†] · 강태영¹ · 노규진 · 채영진² · 이 항² · 최상용
경상대학교 수의과대학, 동물의학연구소

Screening of Green Fluorescent Protein Gene and Sexing by PCR in Bovine Embryos

H. J. Lee[†], T. Y. Kang¹, G. J. Rho, Y. J. Chae², H. Lee² and S. Y. Choe

Department of Veterinary Medicine and Institute of Animal Medicine,
Gyeongsang National University, Chinyu, 660-701, Republic of Korea

SUMMARY

The efficiency of transgenic livestock production could be improved by early screening of transgene-integration and sexing of embryos at preimplantational stages before transferring them into recipients. We examined the efficiency of multiplex PCR analysis for the simultaneous confirmation of the transgene and sex during the preimplantational development of bovine embryos and the possibility of green fluorescent protein(GFP) gene as a non-invasive marker for the early screening of transgenic embryos. The GFP gene was microinjected into the male pronuclei of bovine zygotes produced *in vitro*. The injected zygotes were co-cultured in TCM-199 containing 10% FCS with bovine oviductal epithelial cells in a 5% CO₂ incubator. Seventeen(13.0%) out of 136 gene-injected bovine zygotes developed to blastocysts.

The presence of injected DNA and their sex were simultaneously detected by multiplex PCR analysis and the expression of GFP was detected by observing green fluorescence in embryos under a fluorescent microscope. Eight(67%) of 12 embryos at 2-cell to blastocyst stage were positive in the PCR analysis, but only two(11.8%) of 17 blastocysts expressed the GFP gene. Their sex was determined as 7 female and 5 male embryos by the PCR analysis.

The results indicate that the screening of GFP gene and sex in bovine embryos by PCR analysis and fluorescence detection could be a promisable method for the preselection of transgenic embryos.

(Key words: GFP gene, sexing, PCR, bovine embryo)

서 론

형질전환동물을 생산하기 위하여 재조합 유전
자를 수정란의 genome에 삽입하는 방법에는 수정

본 연구는 1995~1998년도 농림부 첨단기술개발과제 연구비에 의하여 수행되었음

¹구엘프 대학교 생명과학과 (Department of Biomedical Sciences, University of Guelph, Canada)

²서울대학교 수의과대학 및 농생명공학부(College of Veterinary Medicine and School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University)

[†]Correspondence

란 전핵내 주입법, retrovirus 매개법, transfection된 세포의 핵이식법 그리고 정자매개법 등이 개발되어 오고 있다.

그러나 아직까지는 형질전환동물생산 효율이 낮아 한 마리의 형질전환가축을 생산하기 위하여서는 많은 시간과 경비가 소요된다. 그 이유로서 수정란의 사멸률 증가(Roschlau 등, 1989; Krimpenfort 등, 1991), 유전자의 삽입빈도와 발현률의 저하(Brinster 등, 1985; Biery 등, 1988; Roschlau 등, 1989), 이식 후 태아 사망률의 증가, 산자에서 모자이크 현상의 다발 및 수정란의 무분별한 이식에 의한 많은 수란축의 소요(McEvoy와 Sreenan, 1990) 등이 있다. 그러므로 형질전환동물 생산의 효율을 향상시키기 위해서는 수정란에서 주입된 유전자의 통합 또는 발현을 조기에 확인한 다음 이를 선별적으로 대리모에 이식함으로써 많은 경비, 시간 및 노력을 줄일 수 있을 것이다. 이를 실행하기 위하여 많은 연구자들은 reporter 유전자를 사용하여 초기 수정란단계에서 유전자의 발현여부를 조사하고자 하였으나 이러한 방법들은 검사 후 효소반응에 의하여 수정란의 사멸이 불가피하여 형질전환동물 생산에는 사용이 불가능하였다. 그러나 PCR 기법을 이용하여 수정란을 사멸시키지 않고 King과 Wall(1988)은 소의 배반포에서 주입된 유전자를 확인하였고, 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 향상시키는 데 매우 유익하게 활용될 수 있다. 또한 PCR 기법으로 수정란에서 성감별을 동시에 실시하면 원하는 성의 산자를 얻을 수 있으므로 더욱 유리하게 활용할 수 있다.

최근에는 해파리의 일종인 *Aequorea victoria*에서 자발적으로 형광을 띠는 특성을 가진 green fluorescent protein(GFP) gene을 추출하여 reporter

gene으로 사용함으로써 살아 있는 식물이나 동물에서 유전자의 역동학을 조사할 수 있게 되어 수정란의 조기감별과 확인이 더욱 용이하게 되었다(Chalfie 등, 1994; Amsterdam 등, 1995; Prasher 등, 1995; Huang 등, 1997). 이 GFP 유전자를 이용하면 해로운 효소를 사용하지 않아도 되며, PCR을 이용할 경우 불필요한 biopsy로 인한 수정란의 손상도 줄일 수 있으며, 짧은 시간에 쉽게 유전자의 발현을 확인하고 대리모에 이식하여 형질전환동물을 효과적으로 생산할 수 있을 것이다. Ikawa 등(1995)은 이를 응용하여 형광빛을 띠는 양성의 수정란 82개를 선별하여 대리모에 이식하여 32마리의 산자 중 32마리의 GFP-transgenic mice를 생산하였고, Takada 등(1997)은 GFP 양성 수정란 55개를 이식하여 태어난 12마리의 산자 중 11마리의 형질전환 생쥐를 생산함으로써 예전의 방법에 의한 형질전환생쥐의 생산률보다는 엄청난 효율향상을 이루게 되었다.

본 연구에서는 GFP 유전자를 한우 수정란내에 미세주입하고 이를 체외에서 배양하여 이들의 체외발생능과 유전자 주입에 따른 생존력에 미치는 영향을 조사하였고, 이들 수정란이 배반포기까지 발달하는 동안 multiplex PCR 및 GFP 분석을 통하여 수정란에서의 외래유전자의 존재 또는 발현을 확인하였을 뿐만 아니라 성감별을 실시하였다. 또한 수정란에 주입된 유전자의 조기 확인과 선별을 통한 형질전환동물생산기술을 향상시키기 위한 한 방법으로 수정란에서 주입된 유전자의 존재 또는 발현 확인과 동시에 성감별을 실시하기 위한 multiplex PCR기법을 개발하고 유전자전환 수정란의 조기선별을 위한 GFP 분석기법을 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

1. GFP 유전자와 primer의 제작

본 실험에 사용한 GFP plasmid(Fig. 1)는 일본 National Children's Medical Reserch Center의 Dr. Takada로부터 분양받은 것을 사용하였다. Plasmid는 electroporation 방법으로 DH5a methylase-defective strain CPLK-17에(Polites와 Pinkert, 1994) tr-

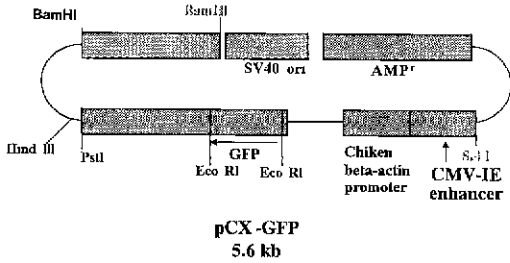


Fig. 1. Restriction map of green fluorescent protein (GFP) plasmid.

ansform시켜 배양하여 통상적인 분자생물학적 방법으로 대량의 plasmid를 준비하였다(Sambrook 등, 1989). 이 plasmid를 제한효소로 digestion하고 agarose gel로 전기영동하여 fusion gene이 들어 있는 fragment를 확인한 후(Palmiter 등, 1983) 잘라내어 Qualex II kit(Quagen)를 이용하여 정제, 농축하고 microinjection buffer(10mM Tris, pH 7.4; 0.1 mM EDTA)에 용해시켜 최종 2 ng/ μ l 농도로 희석하여 사용하였다.

2. GFP유전자의 수정란 전핵내 주입

외래유전자의 미세주입은 미세조작기가 장착된 DIC(Differential Interference Contrast) 도립현미경 하에서 실시하였다. 한우 수정란의 응성전핵에 준비된 2.7 kb의 GFP 유전자를 약 2~3 pl 정도 조심스럽게 주입하여 핵막이 약간 부풀어 오를 정도에서 미세피펫을 후진하였다. 미세주입이 끝난 후 세포질이 파괴되지 않은 것만 골라 TCM-199 배양액으로 옮겨 배양에 공시하였다.

3. 수정란의 체외 공배양

수정란의 체외 공배양을 위하여 먼저 도살된 한우의 난관으로부터 난관상피세포를 무균적으로 회수하여 최종 농도 1~2 $\times 10^6$ cells/ml로 조절한 다음 10% fetal calf serum(FCS, Sigma, USA)을 첨가하여 TCM-199 배양액으로 배양한 다음 공배양에 사용하였다. 수정란의 체외배양은 10% FCS를 첨가한 TCM-199 배양액을 한우의 난관 상피세포와 같이 39°C의 5% CO₂ 배양기내에서 공배양하였다.

4. GFP 유전자의 PCR-screening

1) GFP 유전자 증폭을 위한 Primer 설계 및 합성
GFP 유전자를 검출하기 위하여 다음 네 가지의 primer를 설계하였다.

- GFP-1 (forward), 22mer,
5'-TTGCACTACTGGAAAACCTACCT-3'
- GFP-2Mu (forward), 22mer
5'-ACACTTGTCACTACTTTCACCTT-3'
- GFP-3 (forward), 22mer
5'-TTAACTTTGATTCCATTCTTTT-3'
- GFP-4(reverse),
5'-TTTTGTTGATAATGGTCTGCTA-3'

GFP 1-4쌍에 의하여 PCR을 수행했을 때 예상되는 생성물의 크기는 414 bp이며 GFP-1, 4 product의 내부에 위치한 GFP-2Mu, 3쌍에 의한 product는 317 bp이다. 이와 동시에 성감별을 위하여 Y chromosome에 특이적 primer와 PCR의 성공여부를 알기 위한 internal control로 SMC gene을 증폭할 수 있는 primer를 사용하여 multiplex PCR을 시행하였다.

2) 할구분리 및 세포 lysate 준비

Gene injection 후 8-cell 혹은 16-cell stage로 자란 수정란을 pronase 처리로 투명대를 제거하고 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺-free D-PBS에서 할구를 분리하였다(이 등, 1994). 분석될 세포는 D-PBS로 여러 번 세척 후 200 μ g/ml의 proteinase K가 들어 있는 1x PCR buffer 1 μ l에 옮겨서 58°C에서 1시간 배양한 후 94°C에서 10분간 가열하여 효소의 활성을 없앴다.

3) GFP 유전자의 PCR 분석

GFP gene의 PCR은 분석 다음과 같이 실시하였다. PCR reaction components의 구성은 1x PCR buffer, 1.2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.4 uM primer, 0.5 U Taq pol로 하였다. GFP gene의 PCR 증폭을 위하여 한국생공으로부터 주문제작된 primer를 사용하였고 그의 염기배열은 다음과 같다.

P1 (forward), 22-mer,
 5' -TTGCACTACTGGAAAACCTACCT- 3'
 P2 (reverse), 21-mer,
 5' -TTTTGTTGATAATGGTCTGCTA- 3'

그리고 PCR은 45 cycle을 실시하였다. PCR 반응의 negative control로는 GFP 유전자를 주입하지 않은 정상 수정란과 멸균된 증류수를 사용하였으며, positive control로는 약 100 fg의 GFP를 사용하였다. 2차 PCR 반응 생성물 중 약 10 μ l를 agarose gel에서 전기영동하여 ethidium bromide stain 후 UV transilluminator로 증폭된 DNA를 확인하였다.

5. 형광현미경에 의한 GFP 유전자 발현 검색

소 수정란에 GFP 유전자를 주입하고 배반포기까지 자라는 동안 이들에서의 유전자발현을 excitation : 488 nm, emission: 500 nm의 GFP filter (Chroma Tech, Corp., USA)가 장치된 형광현미경 (Diaphot 300[®], Nikon Co., Japan)으로 관찰 조사하였다.

6. 한우 수정란에서 PCR-screening에 의한 성감별

1) 성감별을 위한 primer의 설계

한우 수정란에서 성감별을 하기 위해 Y chromosome 특이적인 primer를 다음과 같이 설계하였다.

337BY(forward), 25mer,
 5'-CACGCTGCAATTCCAATACACAGAG-3'
 338BY(reverse), 26mer,
 5'-CAAGCTAATCGATCCATCCTATAGTC-3'

PCR product의 크기는 287bp이다.

PCR 성공여부를 알기 위한 primer로 SMC gene을 증폭하기 위해 다음과 같이 primer를 설계하였다.

SMCX-1(forward), 18mer,
 5'-CCGCTGCCAATTCTTTGG-3'
 SMC4-1(reverse), 19mer
 5'-TGAAGCTTTTGGCTTTGAG-3'

PCR product의 크기는 300bp이다.

2) PCR 반응과 확인

위와 같은 방법으로 할구 및 세포 lysate를 준비하여 PCR 반응에 이용하였다. GFP gene의 존재여부와 성감별 및 PCR 반응의 성공여부를 동시에 확인하기 위하여 반응에 들어가는 세 가지 종류의 primer를 넣고 multiplex PCR을 하기 위하여 각각의 primer 농도 및 annealing 온도를 정교하게 조절하였다. PCR 반응은 처음 45 cycles는 GFP를 증폭하기 위한 primer와 internal control을 위한 primer를 넣고 성감별을 위한 primer는 소량 넣어 반응시켰다. 반응이 끝난 후 1.5% agarose gel에 전기영동하여 GFP gene의 존재여부를 확인한 후 GFP gene이 확인되면 1차 PCR product 1 μ l를 template로 이용하여 성감별을 위한 primer쌍 및 GFP-2Mu, 3쌍의 primer를 넣어 성감별 및 GFP nested의 multiplex PCR를 실시하였다. PCR product는 2% agarose gel에 전기영동하여 band를 확인하였다.

7. 통계학적 분석

실험 결과의 통계학적 분석은 Chi-square test를 실시하여 시험군간의 유의차를 검정하였다.

결 과

1. 외래유전자 주입 한우 수정란의 체외발달

한우 수정란에 외래유전자를 주입하여 수정란의 분할율과 배발달율을 조사한 성적은 Table 1에서 보는 바와 같다. 미세주입하지 않은 수정란의 분할율은 80.3%이고 GFP gene을 미세주입한 수정란의 분할율은 73.5%를 보였다. 그리고 배반포기까지의 발달율은 미세주입하지 않은 수정란에서는 31.1%를 보였고, GFP gene을 미세주입한 수정란에서는 17.0%를 보여 유전자를 주입하지 않은 대조군보다 유의적(p<0.01)으로 낮은 발달율을 보였으나, buffer를 주입한 군과는 유의적 차이를 보이지 않았다.

2. 외래유전자 주입 한우 수정란내 유전자의 발현 확인과 성감별

Table 1. *In vitro* development of bovine embryos co-cultured with bovine oviductal epithelial cells following microinjection with GFP gene into male pronuclei

| Groups | No. of embryos | No. of embryos cleaved (%) | No. of blastocysts (%) |
|--------------------|----------------|----------------------------|------------------------|
| Control | 132 | 106(80.3) | 33(31.1) ^a |
| Buffer-injection | 73 | 42(57.5) | 7(16.7) ^b |
| GFP gene-injection | 136 | 100(73.5) | 17(17.0) ^b |

Control, non-injected *in-vitro*-produced bovine embryos.

The values with different superscript denote significant($p < 0.01$) difference in the same column

Table 2. PCR analysis of GFP gene and sexing of bovine embryos at various cell stages following gene injection

| No. of embryos | Cell stage of embryos | PCR analysis | |
|----------------|-----------------------|--------------|--------------------|
| | | GFP-gene | Sexing |
| 1 | 2-cell | + | female |
| 2 | 2-cell | - | male |
| 3 | 2-cell | + | female |
| 4 | 4-cell | - | male |
| 5 | 4-cell | - | female |
| 6 | 4-cell | + | male |
| 7 | 8-cell | + | male |
| 8 | 8-cell | + | female |
| 9 | morula | + | female |
| 10 | blastocyst | + | female |
| 11 | blastocyst | - | male |
| 12 | blastocyst | + | female |
| Total | 12 | +, 8; -, 4 | female; 7, male; 5 |

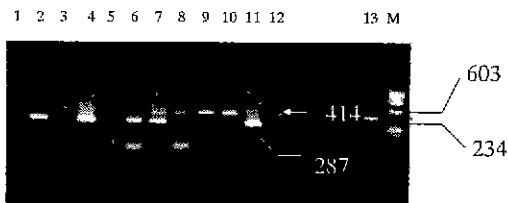


Fig. 2. Detection of GFP gene(414 bp) and Y chromosome(287 bp) in bovine embryos at various cell stages by PCR. M; marker, Lane 1-3; 2-cell, Lane 4-6; 4-cell, Lane 7, 8; 8-cell, Lane 9; morula, Lane 10-12; blastocyst, Lane 13; positive control.

GFP 유전자를 한우 수정란에 주입하고 체외에서 발달시켜 세포기별로 유전자를 PCR-screening을 통하여 확인함과 아울러 성감별을 동시에 실시하여 보았던 바, 12개의 수정란 중 8개가 양성반응을 보였고 4개가 음성반응을 보였으며, 성감별한 결과 암컷이 7개였고 수컷이 5개였다(Table 2). 수정란 단계에서 유전자의 조기감별과 식별을 용이하게 하기 위하여 한우 수정란 136개에 GFP 유전자를 주입하고 이들을 체외배양하면서 배반포까지

Table 3. GFP expression in bovine blastocysts under a fluorescent microscope following the *in vitro* culture of the gene injected zygotes

| No. of blastocysts examined | No. of GFP positive(%) | No. of GFP negative(%) |
|-----------------------------|------------------------|------------------------|
| 17 | 2(11.8) | 15(88.2) |



Fig. 3. GFP expression in a bovine blastocyst under a fluorescent microscope, 400 \times . The GFP gene was injected into the male pronucleus and the zygote was cultured *in vitro*.

의 발달과 이들에에서의 유전자 발현을 조사하였던 바, 이 중 17(12.5%)개가 배반포로 자랐으며, 이들 중 2개(11.8%)에서 GFP 유전자 발현을 형광현미경으로 확인하였다(Table 3과 Fig. 3). 이의 결과로 보아, 이식 전단계에서 GFP 유전자를 활용하여 88.2%의 유전자 음성인 수정란을 가려낼 수 있었다. 이와 같이 외래유전자를 수정란에 주입하고 체외배양을 통하여 유전자전환 수정란을 생산하며 PCR- 및 GFP-screening을 통하여 주입된 유전자의 존재/발현을 초기에 확인함으로써 조기선별이 가능하다고 생각되며 또한 성감별을 동시에 실시함으로써 산자에서의 성조절이 가능함을 확인하였다.

고 찰

형질전환 동물 또는 태아의 조직에서 유전자의 발현을 검출하는 여러 가지 방법이 연구되어 왔다. Chloramphenicol acetyl transferase(CAT)(Gorman 등, 1982; Shaw 등, 1975), Firefly luciferase (Crenshaw 등, 1989; Morrey 등, 1992), Puromycin N-acetyltransferase(Lahoz 등, 1991; Lahoz 등, 1992), Growth hormone gene(Swift 등, 1989; Palmiter 등, 1991; Ting 등, 1992), 그리고 lac Z gene(Hughes

and Balu, 1990; Weis 등, 1991)과 같은 reporter 유전자를 이용하여 유전자의 발현을 조사하였다. 그러나 reporter 유전자를 이용하여 수정란 단계에서 유전자의 발현여부를 조사하고자 하면 이들 유전자들의 검출방법이 효소반응을 하거나 luminometer를 이용하기 때문에 발현된 수정란은 사멸이 불가피하게 되어 살아 있는 상태에서 조기선별으로는 활용이 부적합하다. King과 Wall(1988)은 PCR분석법을 이용하여 소의 배반포에서 유전자검출을 하였으며, 미세조작기법을 이용하여 수정란의 일부를 biopsy하여 할구에서 유전자의 발현여부를 조사할 수 있어 수정란을 사멸시키지 않고 선별이 가능하고 나머지 할구는 핵이식에 사용하면 다수의 형질전환 수정란을 복제할 수도 있는 장점을 가지고 있다. 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.

Burdon과 Wall(1992)은 생쥐에서 KH gene을 전핵내에 주입하고 체외발달을 시키면서 발달 단

Table 4. Preselection efficiency of transgenic embryos by PCR- or GFP-screening

| Animal species | Genes | Screening methods | No. of morulae or blastocysts | | References |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------------------|------------------|-------------------------|
| | | | Analyzed | Gene Positive(%) | |
| Mouse | pSV2-pgt-gE1A | PCR | 84 | 30(35.7) | Ninomiya et. al. (1989) |
| | WAP-KH | PCR | 85 | 22(26.0) | Burdon & Wall(1992) |
| | WAPPC-3 | PCR | 89 | 26(29.0) | Page et. al.(1995) |
| | GFP | Fluoromicro* | 148 | 59(39.9) | Takada et. al.(1997) |
| Rabbit | MT-hGH | PCR | 132 | 33(25) | Lee et. al.(1998) |
| | GFP | Fluoromicro | 73 | 33(45.2) | Lee et. al.(1999) |
| Bovine | SV40-glycoprotein | PCR | 92 | 6(6.5) | Thomas et. al.(1993) |
| | MT-oGH | PCR | 26 | 14(54) | Behhoodi et. al.(1993) |
| | hPC | PCR | 20 | 19(95) | Krisher et. al.(1994) |
| | b-casein+EPO | PCR | 41 | 2(5) | Hyttinen et. al.(1996) |
| | GFP | Fluoromicro | 43 | 4(9.3) | Takada et. al.(1997) |
| Porcine | LacZ-gGH | PCR | 18 | 8(44.4) | Koo et. al.(1996) |

* Fluoromicro : Fluoromicroscopic screening.

계별로 수정란에서의 유전자를 PCR로 검출하여 보았더니, 2- 및 4-세포기에서는 100% 양성을 보였으나 상실배기에서는 44% 그리고 배반포기에서는 26%의 양성률을 보여 착상전의 수정란에서 발달과정 중에 양성률이 점차 낮아지는 경향을 보였다고 한다. 본 연구에 앞서 강 등(1998)은 사람 성장호르몬 유전자를 토끼 수정란의 전핵내에 주입하고 이들의 발달 과정 중에 PCR 검색을 하였던 바, 점차 외래 유전자의 검출률이 낮아져서 배반포기에서는 25%만이 검출되는 것을 확인한 바 있다. Koo 등(1996)은 돼지 수정란에서 gGH 유전자를 응성전핵 내에 주입하고 발달 단계별로 조사하였는던 바, 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(Table 4 참조). 본 연구에서 한우의 수정란에 GFP 유전자를 주입한 후 배반포에서 PCR검색으로 11.8%의 양성율을 확인할 수 있었다. 그리고 multiplex PCR 기법을 이용하여 한우의 수정란에서 성감별을 동시에 확인할 수가 있었다. Hyttinen 등(1996)도 소에서 DNA 주입 후 배반포로 자란 수정란에서 5%만이 양성을 보여 95%의 음성인 것을 PCR검색으로 가려낼 수 있었다고 한다. 그러나 Krisher 등(1994)은 소의 배반포 수정란에서 95%가 양성을 보였다고 한다. 이러한 유전자검색률의 차이는 동물의 품종, 유전자의 종류 및 PCR 검출 방법에 따른 차이로 생각되며 대체로 수정란이 발달할수록 유전자의 검출률이 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 생산효율 향상에 도움이 될 것으로 본다. 그리고 본 연구에서는 GFP분석과 PCR분석을 이용하여 유전자발현여부와 성감별을 동시에 실시함으로써 소의 수정란에서 이식하기 전에 형질전환과 성감별을 동시에 확인이 가능하다고 사려되며, 이로서 형질전환동물 생산효율을 향상시키는 데 활용 가

치가 있다고 생각되나 앞으로 이들의 이식후 산자 생산여부와 주입된 유전자의 발현 효율을 확인하는 연구가 더 수행되어야 할 것으로 본다.

적 요

한우 수정란의 응성전핵 내에 GFP 유전자를 미세주입하여 유전자전환 수정란을 작출하고, PCR-screening 및 GFP-screening으로 주입된 유전자의 존재여부 및 발현을 조기에 확인하여 유전자전환 수정란의 선별기술을 개발하고자 하였다.

한우 수정란에 GFP 유전자를 주입한 후 체외배양한 결과, 배반포기까지의 발달률은 17.0%였다. 이들 배반포 중에서 형광현미경으로 확인된 GFP 유전자의 발현율은 11.8 % 였다. 그러므로 GFP 분석을 통하여 유전자 발현이 일어나지 않은 수정란(88%)을 조기에 선별함이 가능하게 되었다. 또한 multiplex PCR 분석으로 수정란의 성별을 동시에 확인함으로써 형질전환 동물의 생산효율을 향상시키는 데 활용이 가능하다고 본다.

참고문헌

- Amsterdam A, Lin S and Hopkins N. 1995. The *Aequorea victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. *Dev. Biol.* 171:123-129.
- Behboodi E, Anderson GB, Horvat S, Medrano JF, Murray JD and Rowe JD. Microinjection of bovine embryos with a foreign gene and its detection at the blastocyst stage. *J. Dairy Sci.* 1993; 76: 3392-3399.
- Biery KA, Bondioli KR and De Mayo FJ. 1988. Gene transfer by pronuclear injection in the bovine. *Theriogenology* 29:224.
- 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. Acad. Sci. USA. 82:4438-4442.
- Burdon TG and Wall RJ. 1992. Fate of microinjected genes in preimplantation mouse embryos. Mol. Reprod. Dev. 33:436-442.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, and Prasher DC. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 263:802-805.
- Crenshaw EB, Kalla K, Simmons DM, Swanson LW and Rosenfeld MG. 1989. Cell-specific expression of the prolactin gene in transgenic mice is controlled by synergistic interactions between promoter and enhancer elements. Genes Dev. 3:959-972.
- Gorman CM, Moffat LF and Howard BH. 1982. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. Mol. Cell Biol. 2:1944-1951.
- Hughes SM and Blau HM. 1990. Migration of myoblasts across basal lamina during skeletal muscle development. Nature 345:350-353.
- Huang Y, Xu XP and Li BJ. 1997. Improved green fluorescent protein as a fast reporter of gene expression in plant cells. Bio/Technology 11: 133-136.
- 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.
- Ikawa M, Kominami K, Yoshimura Y, Tanaka K, Nishimune Y and Okabe M. 1995. A rapid and non-invasive selection of transgenic embryos before implantation using green fluorescent protein(GFP). FEBS Letter 375:125-128.
- 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, Rademakers 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.
- Krisner RL, Gibbons JR, Canseco RS, Johnson JL, Russell CG, Nottter DR, Velandier 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, Nieto A and Esoponda P. 1991. Use of puromycin N-acetyltransferase as a new reporter gene in transgenic animal. Nucl. Acids Res. 19:3465.
- Lahoz EG, de Haro MSL, Esoponda 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.
- 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.
- Page RL, Canseco RS, Russell CG, Johnson JL, Velandier WH, Gwazdauskas FC. Transgene detection during early murine embryonic development after pronuclear microinjection. *Transgenic Research* 1995. 4:12-17.
- 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.
- Polites HG, Pinkert CA. DNA microinjection and transgenic animal production. In *Transgenic Animal Technology : A Laboratory Handbook*. ed. Pinkert CA. 1994. Academic Press. San Diego pp. 15-68.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG and Cormier MJ. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111:229-233.
- Roschlau K, Bommel P, Andreeva 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.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. In *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Colding Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- Shaw WV. 1975. Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. In Hash JH ed., *Methods in Enzymology*, vol. 43: Antibiotics, pp. 737-755. New York: Academic Press, Inc.
- Swift GH, Kruse F, MacDonald RJ and Hammer RE. 1989. Differential requirements for cell-specific elastase I enhancer domains in transfected cells and transgenic mice. *Genes Dev.* 3: 687-696.
- Takada T, Lida K, Awaji T, Itoh K, Takahashi R, Shibui A, Yoshida K, Sugano S and Tsujimoto G. 1997. Selective production of transgenic mice using green fluorescent protein as a marker. *Nature Biotechnology* 15:458-461.
- 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 retroviral sequences are required for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene. *Genes Dev.* 6:1457-1465.
- 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.
- 강태영, 채영진, 이 항, 이경광, 박충생, 이효중. 1998. 사람성장호르몬 유전자의 전핵내 미세주입이 토끼 수정란의 체외발달에 미치는 영향과 PCR 검색. *한국수정란이식학회지* 13(2):97-106.
- 강태영, 윤희준, 채영진, 이 항, 이효중. 1999. 토끼 수정란에서 Green fluorescent protein 유전자의 발현. *한국수정란이식학회지* 14(1):1-8.
- 이효중, 전병균, 윤희준, 이경미, 송상현, 공일근, 노규진, 최민철, 최상용, 박충생. 1994. 핵이식에 의한 복제토끼 생산. *한국수정란이식학회지* 9(2):161-165.

(집수일: 2000. 7. 19 / 채택일: 2000. 8. 10)