

Green Fluorescent Protein 발현 토끼 수정란의 핵이식에 의한 복제

강태영¹ · 윤희준² · 노규진 · 이 항³ · 채영진³ · 이효종[†]
경상대학교 수의과대학, 동물의학연구소

Cloning of Transgenic Rabbit Embryos Expressing Green Fluorescent Protein Gene by Nuclear Transplantation

T. Y. Kang¹, X. J. Yin², G. J. Rho, H. Lee³, Y. J. Chae³ and H. J. Lee[†]

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

SUMMARY

The principal objective of this study was to clone transgenic embryos in order to improve the efficiency of transgenic animal production by the combination of microinjection and nuclear transplantation techniques.

Mature female New Zealand White rabbits were superovulated by eCG and hCG treatments, followed by natural mating. Zygotes were collected from the oviducts at 18~22 h after hCG injection by flushing with D-PBS containing 5% fetal calf serum(FCS). Two to three picoliters of green fluorescent protein(GFP) gene was microinjected into male pronucleus. 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 morulae expressing GFP gene were selected and their blastomeres were separated for the use of nuclear donor. Following nuclear transplantation of fluorescence-positive morula stage blastomeres, 13 (21.3%) out of 61 fused oocytes developed to blastocyst stage and all of the cloned blastocysts expressed GFP.

The results indicate that the screening of transgene in rabbit embryos by GFP detection could be a promisable method for the preselection of transgenic embryos. Also the cloning of preselected transgenic embryos by nuclear transplantation could be efficiently applied to the multiple production of transgenic animals.

(Key words: GFP gene, nuclear transplantation, transgene preselection, rabbit)

본 연구는 한국과학재단에서 1996년도에 지원한 목적기초 연구사업비(KOSEF: 961-0606-052-2) 연구비에 의하여 수행되었음

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

²킨키대학 동물번식학교실(Laboratory of Animal Reproduction, Kinki University, Japan)

³서울대학교 수의과대학 및 농생명공학부(College of Veterinary Medicine and School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University)

[†]Correspondence

서 론

형질전환 동물생산기술(transgenic animal technology)은 가축에서 생산효율 증진, 축산식품의 품질향상, 고가의 유용한 인체단백질이나 약물의 생산, 동물의 질병에 대한 저항성의 증가, 질병과 생체기작 및 잠기이식에 관한 연구에 있어서 매우 독특하고 유용한 질환모델동물의 생산 등에 매우 유용하게 활용되고 있으나 외래유전자가 도입된 수정란과 태아에서의 사멸률의 증가(Roschl며 등, 1989; Krimpenfort 등, 1991), 유전자의 삽입빈도와 발현률의 저하(Brinster 등, 1985; Biery 등, 1988) 그리고 수정란의 부분별한 이식으로 인한 많은 수란축의 동원 및 산자에서의 발현율과 발현량의 저조로 인한 많은 이식과 산자의 생산 등으로 막대한 경비와 시간이 소요된다(McEvoy와 Sreenan, 1990). 그러므로 형질전환동물 생산의 효율을 향상시키기 위해서는 수정란에서 주입된 유전자의 통합을 확인한 다음 이를 선별적으로 대리모에 이식함으로써 많은 경비, 시간 및 노력을 줄일 수 있을 것이다. 이를 실행하기 위하여 chloramphenicol acetyl transferase(Gorman 등, 1982), 그리고 firefly luciferase(Shaw 등, 1993), 그리고 lac Z (Hughes와 Blau 등, 1990)와 같은 reporter 유전자를 사용하여 초기 수정란단계에서 유전자의 발현여부를 조사하고자 하였으나 이러한 방법들은 검사 후 효소반응에 의하여 수정란의 사멸이 불가피하여 형질전환동물 생산에는 사용이 불가능하였다. 근래에는 유전자가 주입된 수정란을 배양시킨 다음 할구세포를 하나 또는 일부분 분리하고 polymerase chain reaction(PCR) 분석을 이용하여 주입된 외래유전자의 통합이 확인된 수정란을 대리모에 이식함으로써 수란우의 수를 79%나 줄일 수 있었다고 한다(Bowen 등, 1993). 최근에는 해파리의 일종인 *Aequorea victoria*에서 자발적으로 형광을 띠는 특성을 가진 GFP 유전자를 추출하여 reporter gene으로 사용함으로써 살아 있는 식물이나 동물에서 유전자의 역동학을 조사할 수 있게 되어 수정란의 조기감별과 확인이 더욱 용이하게 되었다(Chalfie 등, 1994; Huang 등, 1997). 이 GFP 유전자를 이용

하면 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)과 Takada 등(1997)은 이를 응용하여 형질전환 생쥐를 생산함으로써 예전의 방법에 의한 형질전환생쥐의 생산률보다는 엄청난 효율향상을 이루게 되었다. 이러한 유전자의 조기분석과 핵이식기법을 병용하여 형질전환된 수정란을 대량생산한다면 형질전환동물의 생산효율을 향상시켜 막대한 경비와 시간을 절약할 수 있을 것으로 본다. 그러나 이에 관한 연구는 매우 미진한 실정이다.

본 연구는 토끼에서 GFP유전자를 수정란의 응성전핵 내에 미세주입하고, 배반포기까지 체외발달시켜 이들에서의 유전자의 발현이 확인된 수정란만을 가려서 이들의 할구세포를 핵이식하여 이들 복제수정란의 생산효율과 GFP 유전자 발현효율을 확인함으로써 형질전환동물 생산효율을 향상시키는 데 있어서 활용이 가능한지를 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용한 토끼는 연암축산전문대학으로부터 공급받은 New Zealand White 종으로 암컷은 생후 4~5개월령이며 체중이 3~3.5 kg인 것을 사용하였고, 수컷토끼는 생후 10개월 이상된 것으로 체중이 4 kg 이상인 것을 공시하였다. 이들에게 사료(토끼용 펠릿사료, 퓨리나)와 물은 자유로이 급식시켰으며, 명암조절은 14시간은 조명하고 10시간은 차광하였다.

2. 난자 및 수정란의 채란

과배란의 유기는 성숙한 암컷토끼에 100 IU의 eCG(Serarumon[®], 덴카 Co. Japan)로 근육주사하고, 72시간 후 난자채취용 암토끼는 100 IU의 hCG(hCG[®], Yuhan Co., Korea)를 이정맥으로 주사하였고 수정란채취용 암토끼는 수컷토끼와 교미시킨 다음 hCG 처리를 하였다. 배란된 난자 및 수정

란의 채란은 각각 hCG 주사 후 14~16 시간 및 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 난자 및 수정란을 채란하였다. 채란된 수정란은 실제현미경상에서 검경하여 세포질이 정상인 것과 전핵형성이 뚜렷하게 잘 보이는 것을 선택하여 실험에 공시하였다.

3. 유전자의 준비

본 실험에 사용한 유전자는 green fluorescent protein(GFP) gene으로서 일본 National Children's Medical Reserch Center의 Dr. Takada로부터 분양 받은 것을 사용하였다(강 등, 1999). Plasmid는 TSS 방법(Chung과 Miller, 1993)으로 DH5α methylase-defective strain CPLK-17에(Polites와 Pinkert, 1994) transform시켜 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) electroelusion에 의하여 이 band의 DNA를 분리하고 이를 glass bead adsorption 방법에 의하여 정제, 농축하고 phenol/chloroform 추출과 ethanol 침전법으로 더 정제하였다(Polites와 Pinkert, 1994). 정제된 DNA를 microinjection buffer(10mM Tris, pH 7.4; 0.1 mM EDTA)에 용해시켜 fluorometer로 정확한 농도를 결정하고 2 ng/μl 농도로 희석하여 300 μl씩 microcentrifuge tube에 분주하여 -20°C에 보관하였다가 injection에 사용하였다(Polites와 Pinkert, 1994).

4. 외래유전자의 수정란내 미세주입

외래유전자의 미세주입은 미세조작기가 장착된 DIC(Differential Interference Contrast) 도립현미경

하에서 실시하였다. 수정란의 용성전핵에 준비된 2.7 kb의 GFP 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 TCM-199과 RD 배양으로 옮겨 토끼의 난관 상피세포와 같이 5% CO₂ 배양기내에서 공배양하였다.

5. 유전자 주입 및 핵이식 수정란의 체외공배양

GFP 유전자 주입 또는 핵이식 수정란의 체외공배양을 위한 토끼난관상피세포의 준비는 강 등(1999)의 방법을 이용하였다. 수정란의 체외배양은 10% FCS를 첨가한 TCM-199 배양액과 D-MEM(GibcoBRL, USA)과 RPMI 1640(GibcoBRL, USA)을 1 : 1로 희석하여 만든 RD 배양액을 토끼의 난관 상피세포와 같이 39°C의 5% CO₂ 배양기내에서 공배양하였다. 그리고 배양액은 48시간마다 신선한 배양액으로 교환하였으며, RD 배양액은 48시간 배양 후 TCM-199 배양액으로 교환하였다.

6. 수정란에서 GFP 유전자의 발현 확인

체외에서 배양된 GFP 유전자주입 수정란 및 핵이식 수정란은 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.

7. 유전자전환 수정란의 핵이식

핵을 수여받을 난자는 앞서 기술한 바와 같이 과배란처리된 토끼로부터 회수하고 난구세포를 제거한 다음 사용하였다. 핵을 공급할 수정란은 전핵기에 외래유전자를 미세주입한 후 체외에서 상실배기로 자란 것을 사용하였다. GFP gene이 주입된 수정란은 형광현미경으로 green 색상을 나타내는 것만을 가려서 그의 할구를 분리하여 공핵란으로 사용하였다. 수정란의 탈핵을 위한 미세조작은 Stice와 Robl(1988)의 방법에 준하여 실시하였다, 그리고 탈핵된 난자의 활성화를 위하여 5 μM ionomycin에서 5분간 처리하고, 2 mM 6-dimethy-

laminopurine(DMAP)에서 2시간 배양하였다. 난자의 활성화를 마친 후 완전히 탈핵이 된 난자만을 회수하기 위하여 난자의 세포질에서 극체모양을 띤 돌기가 나온 것은 실험에서 제거하였다. 한편, 공핵수정란으로 부터 분리된 할구세포 하나를 미세 pipette에 흡입하고 이를 미세조작으로 탈핵된 수핵난자의 원형질 바깥 위란막강에 주입하였다. 핵이 주입된 난자는 Ca^{++} , Mg^{++} 이 첨가되지 않은 0.3 M mannitol 용액이 채워져 있는 전기세포융합기(Electro cell manipulator 200, BTX Co., USA)의 chamber에서 hCG 투여 후 20시간째에 핵의 융합을 유도하였다. 융합조건은 직류전류로서 전압을 1.25 KV/cm, 통전시간은 60 sec로 1회 또는 2회 통전하였다.

결 과

1. 핵이식에 의한 GFP 유전자전환 토끼 수정란의 복제효율

GFP 유전자를 미세주입하고 상실배까지 체외 배양한 후 형광현미경으로 GFP 유전자가 발현된 양성인 상실배기 수정란의 할구를 분리하여 핵이식을 실시하였던 바, 융합률과 체외배발달률은 Table 1에 나타난 바와 같다. GFP 양성인 상실배의 할구로 핵이식한 결과 이들의 핵융합률은 78.2%였고, 핵융합이 일어난 61개의 수정란 중 13개(16.7%)가 체외에서 배반포기까지 발달하였다.

2. 유전자전환 토끼 복제수정란에서의 GFP 발현

GFP 양성인 할구를 사용하여 핵이식으로 복제한 다음 이를 체외배양으로 배반포기까지 발달시킨 복제수정란을 형광현미경으로 GFP 유전자 발

Table 1. Efficiency of cloning of GFP transgenic embryos by nuclear transplantation

Nuclear donor blastomeres	No. of oocytes used	No. of oocytes fused (%)	No. of blastocysts(%)
GFP-positive morula	78	61(78.2)	13(16.7)

Table 2. GFP expression of rabbit blastocysts cloned with blastomeres from transgenic embryos by nuclear transplantation(NT)

No. of NT blastocyst observed	GFP expression		
	No. of positive	No. of negative	Percent positive
13	13	0	100



Fig. 1. GFP expression in a rabbit blastocyst produced by nuclear transplantation and *in vitro* culture. A: phase contrast microscopic appearance, B: fluorescence microscopic appearance. 400 ×.

현을 여부를 조사하였더니 13개 모두(100%) 양성으로 나타났다(Table 2와 Fig. 1 참조).

고 찰

해파리의 일종인 *Aequorea victoria*에서 분리된 green fluorescent protein(GFP)은 푸른 빛을 흡수하여 유기기질이나 cofactor의 도움없이 초록형광을 방출한다. 그러므로 GFP의 검사는 luciferase, β -galactosides나 CAT와 같이 추출이나 기질을 필요로 하지 않는다. 살아 있는 수정란에서 효소반응이나 혹은 PCR 방법과 같이 많은 시간을 거치지 않으며 쉽고 빠르게 유전자의 발현 여부를 알 수 있다. GFP 유전자를 이용하여 수정란에 주입하고 체외발달시켜 형광현미경으로 관찰하여 초록색 빛을 발산하는 수정란을 선택하여 이식함으로써 형질전환동물을 생산하는 데 있어서 조기감별에 매우 유용하게 활용될 수 있게 되었다. Ikawa 등(1995)은 GFP 유전자를 유전자전환 동물의 marker로서 유익하다고 주장한 바 있다. 그들은 생쥐를 대상으로 GFP 유전자를 166개의 수정란 전핵 내에 주입하고 이를 이식하여 16(9.6%) 마리의 산자를 생산하였는데, 그 중 3마리(1.8%)의 조직에서 GFP 유전자의 발현이 확인되었다고 한다. 본 실험에 앞서 강 등(1999)은 토끼 수정란에 GFP 유전자를 주입하고 체외에서 배양하였던 바, 배반포로의 발달률은 67.6%이었으며, 이들을 형광현미경으로 유전자 발현을 검사하였더니 30.6%가 양성을 보였다. Takada 등(1997)은 생쥐 및 소 수정란에 GFP 유전자를 주입하고 체외에서 배양하였던 바, 배반포로의 발달률은 46.9% 및 11% 이었으며, 이들을 형광현미경으로 유전자 발현을 검사하였더니 각각 39.9%, 9.3%가 양성을 보였다고 한다. Takada 등(1997)은 GFP 양성인 생쥐 수정란을 대리모에 이식하여 22%의 산자생산율을 얻었고 이 중 11마리(8%)에서 GFP 유전자의 발현을 확인하였다.

본 실험에서는 GFP 유전자 양성인 상실배기 수정란의 할구를 사용하여 핵이식을 실시하였던 바, 이들 핵융합이 일어난 61개의 수정란 중 13개(23%)가 체외에서 배반포기까지 자랐다. 또한 이들을 형광현미경으로 GFP 유전자 발현을 조사하

였더니 13개 모두(100%) 양성을 나타내었다. Uhm 등(1999)은 돼지 수정란에서 태아의 섬유아세포에 EGFP 및 neomycin-resistant 유전자를 retrovirus로 transfection 시킨 다음 이를 핵의 공급원으로 사용하여 핵이식을 실시하였던 바, 이 중 16.4% 배반포로 자랐으며, 이들 배반포 중 94.7%가 GFP를 발현하였다고 한다. Cherenek 등(1999)은 GFP를 발현하는 배반포기의 토끼 수정란 할구세포를 분리하여 이를 한 개 또는 두 개를 4-세포기의 수정란에 주입하여 chimeric 수정란을 작출하고 이들 중 배반포로 자란 것에서 한 개를 주입하였을 경우에는 60.5%가 GFP를 발현하였다고 하며, 두 개를 주입하였을 경우에는 100% GFP를 발현하였다고 한다. 이들의 실험 결과는 본 연구의 결과와 유사하였다.

앞으로 GFP 유전자를 reporter gene으로 활용하면 형질전환 수정란의 복제효율이 높아질 것으로 보며, 나아가 이들을 이식 전에 용이하게 선별할 수 있음으로써 형질전환 동물의 복제생산에도 유익하게 활용될 수 있을 것으로 사려된다. 그리고 본 실험에서는 GFP 유전자 자체의 발현 여부만을 조사하였지만 앞으로 이 유전자와 유익한 유전자를 융합하여 GFP 유전자의 발현을 확인하고 유익한 유전자와 함께 형질전환된 동물을 생산할 수 있는 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

적 요

본 연구는 토끼에서 GFP 유전자를 수정란의 응성전핵 내에 미세주입하고, 배반포기까지 체외발달시켜 이들에서의 유전자의 발현이 확인된 수정란만을 가려서 이들의 할구세포를 핵이식하여 이들 복제수정란의 생산효율과 GFP 유전자 발현효율을 확인함으로써 형질전환동물 생산효율을 향상시키는데 있어서 활용이 가능한지를 검토하고자 하였다.

GFP 양성인 상실배의 할구로 핵이식한 결과 이들의 핵융합률은 78.2% 였고, 핵융합이 일어난 61개의 수정란 중 13개(16.7%)가 체외에서 배반포기까지 발달하였다. 또한 이들 GFP 양성인 할구로 핵이식된 다음 체외에서 배반포기로 자란 복제수정란을 형광현미경으로 GFP 유전자 발현을 여부를

조사였더니 13개 모두(100%) 양성으로 나타났다.

본 연구의 결과로 미루어 보아 앞으로 GFP 유전자를 reporter gene으로 활용하면 형질전환 수정란의 복제효율이 높아질 것으로 보며, 나아가 이를 이식 전에 용이하게 선별할 수 있으므로써 형질전환 동물의 복제 생산에도 유익하게 활용될 수 있을 것으로 사려된다.

사 사

본 연구에 사용된 GFP expression vector를 공급하여 주신 일본 National Children's Medical Research Center의 Dr. Tatsuyuki Takada께 감사드립니다.

참고문헌

- 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. Sci. USA*. 82:4438-4442.
- 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.
- Chernek P, Boulanger L, Fischer D, Chesne P and Heyman Y. 2000. Preimplantation development of rabbit embryos after transfer of cloned and transgenic embryonic cells. *Theriogenology* 53:511.
- Chung CT and Miller RH. Preparation and storage of competent Escheria coli cells. In *Methods in Enzymology*. Vol 218. Academic Press. 1993 pp. 621-627.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Palmiter RD, Norstedt G, Galinas RE, Hammer RE and Brinster RL. 1983. Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science*. 222:809.
- Polites HG and Pinkert CA. DNA microinjection and transgenic animal production. In *Transgenic Animal Technology : A Laboratory Handbook*. ed. Pinkert CA. 1994 Academic Press. SanDiego pp 15-68.
- Roschlau K, Bommel P, Andreeva L, Zackel M, Roschlau D, Zackel B, Schwcrin 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-White JR, Denko N, Alberts L Doetschman TC and Stringer JR. 1993. Expression of the lac Z gene targeted to the HPRT locus in embryonic stem cells and their derivatives. Transgenic Research. 2:1-13.
- Stice SL and Robl JM. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. Biol Reprod. 39:657-664.
- 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.
- Uhm SJ, Kim NH, Kim T, Chung HM, Chung KH, Lee HT and Chung KS. 2000. Expression of enhanced fluorescent protein and neomycin-resistant genes in porcine embryos following nuclear transfer using porcine fetal fibroblasts injected by retrovirus vector. Therigenology 53:414.
- 강태영, 윤희준, 채영진, 이 항, 이효종 1999. 토끼 수정란에서 green fluorescent protein 유전자의 발현. 한국수정란이식학회지 14(1):1-8.
-

(접수일: 2000. 7. 19 / 채택일: 2000. 8. 10)