

hFSH 유전자가 도입된 소 태아섬유아세포를 이용한 형질 전환 복제 수정란의 발달

양병철[†] · 임기순 · 김동훈 · 민관식¹ · 윤두학 · 박효숙 · 김세웅 · 황인선 · 서진성 · 성환후 · 양보석
농촌진흥청 축산연구소

Development of Transgenic NT Embryos Using Bovine Fetal Fibroblasts Transfected with hFSH Gene

B. C. Yang[†], G. S. Im, D. H. Kim, K. S. Min¹, D. H. Yoon, H. S. Park, S. W. Kim,
I. S. Hwang, J. S. Seo, H. H. Seong and B. S. Yang

National Livestock Research Institute, RDA, Suwon 441-706

SUMMARY

The purpose of this study was to develop the transgenic cattle expressing hFSH into the urine using the nuclear transfer. To produce the interest gene in urine, the specific vector was ligated with hFSH gene under mUII promoter. The fetal fibroblast cells (KbFF) were isolated from a 45-day male fetus. The hFSH gene was co-transfected with pcDNA3 (neo) vector to KbFF cells by electroporation. The gene-transfected cells were cultured with G-418 selection medium for 2 weeks. Selected colonies were confirmed by PCR. For nuclear transfer, enucleated bovine oocytes were transferred with hFSH transfected or nontransfected fetal fibroblasts. The cleavage and blastocyst formation rates were significantly lower ($p < 0.05$) in cloned embryos transfected with hFSH gene (68.7% and 15.7%) than in those non-transfected (67.6% and 24.5%), respectively. Apoptosis analysis showed no difference between hFSH transfected and non-transfected blastocysts ($p > 0.05$). The blastocysts were transferred to 77 (control 24, hFSH 53) recipient cows. Two calves were born (1.9%) following transfer with NT embryos transfected with hFSH gene, but they were confirmed not to be transgenic calves. This result shows that the hFSH colonies were mixed with transfected and non transfected cells. Further research will be needed for selection and establishment of gene transfected cells.

(Key words : electroporation, hFSH, Fetal fibroblast, nuclear transfer)

서 론

복제 동물의 탄생에 이어서 복제 기술을 이용한 형질 전환 동물이 생산되었다(Cibelli 등, 1998). 그 이후 형질 전환 동물의 생산에 많은 연구자들이

노력하고 있다. 이것은 종래의 미세주입법으로 인한 형질 전환 동물의 생산(Gorden 등, 1980), 바이러스 벡터를 이용한 형질 전환(Chan 등 2001), 정자매개 형질 전환(Perry 등, 1999; Sin 등, 2000; Cappello 등, 2000)보다 더 효율적이라고 생각했기

¹ 한경대학교 (Animal Biotechnology, Graduate School of Bio. and Information Technology, Hankyong National University)

[†] Correspondence : E-mail : bcyang@rda.go.kr

때문이다. 하지만 인체 유용 물질을 생산할 수 있는 동물의 생산은 많은 부가가치가 있음에도 불구하고 좀처럼 낮은 효율을 유지하고 있다(Noble 등, 2002; Fan 등, 2002).

그러나 복제 기술을 이용한 형질 전환 동물의 생산이 많은 시행 착오에도 불구하고 시도되고 있는 것은 여러 가지 장점을 가지고 있기 때문일 것이다. 특히 세포 단계에서 유전자의 transfection 여부를 측정할 수 있다는 장점이 있으나, 이와 같은 경우는 GFP 같은 표지 유전자를 이용하였을 때에 해당된다고 할 수 있다. 하지만 실제 유용 유전자를 이용할 경우 선발된 colony의 세포가 모두 transfection 된 세포라고 단정할 수는 없을 것이다. 이것은 GFP를 이용하였을 때도 모든 세포가 transfection된 colony를 선발해 내기가 어렵기 때문이다(Lee 등, 2005; Keefer 등, 2001).

형질 전환 동물로부터 얻고자 하는 인체 유용 물질로는 유즙 등을 통한 human TPO, TPA, vWF 등 치료 목적의 단백질 생산과 인체의 대체 장기 생산을 목적으로 하는 동물의 생산으로 크게 나눌 수 있다. 본 연구에서는 hFSH(follicle stimulating hormone)는 사람에서 불임 치료의 목적으로 사용되는 것으로서 현재 재조합체(human recombinant follicle stimulating hormone)가 판매되고 있지만 이것을 동물로부터 생산하고자 시도하였다.

그래서 본 연구의 목적은 사람의 FSH(난포자극 호르몬)를 소의 요로부터 분비할 수 있는 동물의 생산이다. 그래서 소의 태아섬유아세포를 이용하여 human FSH gene을 transfection하고 선발하여 이를 복제하는 방법으로 형질 전환 수정란을 생산, 이식하여 송아지를 생산하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 수핵 난자의 준비

본 시험에 공시된 소의 난자는 도축장에서 도살된 소의 난소를 적출하여 35°C 생리식염수로 실험실까지 운반한 후, 18G 주사기를 이용하여 직경 2~7mm 난포로부터 난포액을 흡입하여 난포란을 채취하였다. 채취된 난포란은 실험현미경(Olympus, Japan) 하에서 양질의 난포란만을 선별하여 체외

성숙에 공시하였다.

난포란의 체외성숙은 10%의 FBS(fetal bovine serum, Gibco)가 함유된 TCM199(Gibco)를 사용하였다. 선별된 난포란은 배양액 500 μ l에 40개의 난자를 넣어 mineral oil로 피복한 다음 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 18~20시간 동안 성숙 배양하였다.

배양후 성숙난자는 0.1% hyaluronidase으로 난구세포를 제거하고 실험현미경하에서 세포질이 균일하고 극체가 뚜렷하게 보이는 것만을 선별하여 핵이식에 이용하였다.

2. Transfection용 형질 전환 벡터 준비

생쥐의 방광조직으로부터 DNA를 분리하여 밝혀져 있는 uroplakin II (mU II) promoter의 염기배열을 이용하여 PCR(sense primer: 5'-gAA TTC CTC gAC gAT CTC ggC CCT CTT TCT gC-3'; anti-sense primer: 5'-CCA ggA TCC AgT CCC AgC gCA gTg gTA CC-3')을 이용하여 3603 bp를 증폭하였다. 합성 primer는 Eco RI와 Kpn I site를 가지고 있다. 증폭된 산물을 pCR2.1 벡터 클로닝하여 염기 서열 분석 결과 생쥐 유래의 mU II의 염기 서열과 동일하였다. Poly A 부분은 SV40의 약 2.6 kb를 5'-primer는 Kpn I과 Sal I site를 3'-primer 부분은 Eco RV와 Xho I site를 첨가하여 PCR 증폭후 mU II 프로모터가 삽입되어 있는 벡터를 Kpn I과 Sal I으로 절단하고 PCR 산물을 Kpn I과 Xho I으로 절단하여 프로모터 하류에 ligation한 후 유용 유전자인 인간의 뇌하수체 유래의 단일체인 hFSH β/α 유전자를 Kpn I과 Sal I site에 연결하여 Fig. 1과 같이 발현 벡터를 구축하였으며 이 벡터를 Eco RV로 절단하여 transfection에 이용하였다(Fig. 1).

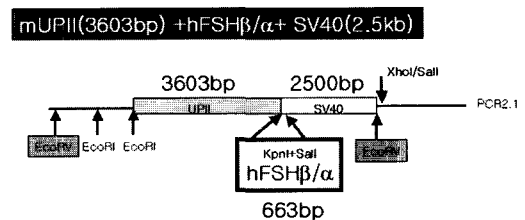


Fig. 1. hFSH vector (6.8KB) with mouse uroplakin II promoter.

3. 형질 전환 세포의 준비

세포의 형질 전환을 위해 임신 45일령의 한우로부터 태아를 채취하였다. 채취된 태아로부터 0.05% Trypsin-EDTA를 이용하여 태아섬유아세포(KbFF)를 분리하여 10% FBS가 첨가된 DMEM(Gibco)으로 배양하였다(Passage-0). 배양중인 태아섬유아세포는 hFSH 유전자를 transfection 하기 위하여 passage 2 또는 3에서 0.05% trypsin을 처리하여 1×10^6 cells/ml의 농도로 회수한 후 400 μ l의 세포와 10 μ g의 hFSH gene 및 pcDNA3(neo)를 혼합하여 electroporation 방법으로 co-transfection 하였다.

Electroporation 조건은 Gene Pulser II(BIO-RAD)를 이용하였으며, 0.4cm cuvette을 이용하여 0.25kV 통전하였다. Electroporation 처리 후 세포는 10% FBS가 첨가된 Dulbecco's modified eagle medium (10% DMEM)에 배양하였으며 24시간 배양 후 400, 600, 800 μ g/ml의 neomycin(Geneticin, Gibco)이 포함된 10% DMEM으로 배양하였다. 배양 2주일 후 cloning cylinder(Sigma)를 이용하여 각각의 colony를 채취하여 배양, 증식하였다. 또한 DNA 검사를 위하여 이들의 일부는 PCR을 실시하였다.

4. 방광세포로부터 hFSH 분비 검증

구축된 hFSH vector가 방광세포로부터 hFSH를 분비하는지를 알아보기 위하여 대조구로 태아섬유아세포(KbFF), CHO cell 그리고 방광세포(bladder cell)를 이용하였다. 여기서 사용된 방광세포는 수소의 방광 내부의 상피세포를 분리하여 primary culture를 하여 사용하였다. hFSH gene을 transfection 한 그룹과 transfection 하지 않은 그룹을 각각 6 well dish에 3일 동안 배양하여 배양액으로부터 hFSH의 분비량을 측정하였다.

5. 핵이식, 배양 및 수정란 이식

제핵은 20% FBS와 50 μ g/ml phytohemagglutinin이 포함된 TCM199 30 μ l의 drop에서 극체와 주변의 karyoplast를 제거하였다. 핵이 제거된 난자는 Hoechst 33342(Sigma)를 이용하여 염색, 형광 현미경을 통하여 제핵을 확인하였다. 이어서 유전자가 transfection된 것으로 확인된 colony의 세포

를 제핵된 난자의 위란강으로 미세 주입하였다. 미세주입된 난자는 Zimmerman cell fusion medium에서 25V/mm 로 10 μ s 동안 pulse를 가하여 융합하였다. 난자와 세포질의 융합이 확인된 세포는 10 μ M Ca ionophore에서 5분, 이어서 2mM DMAP에서 3시간동안 활성화 처리를 하였다.

융합 활성화 처리 후 복제 수정란은 3일 동안 FBS가 첨가된 CR2aa에서, 이어서 3일 이후부터 FBS와 BSA가 첨가된 CR2aa에서 배양하였다. 배양조건은 CR2aa 배양액으로 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂, 38.5°C의 조건에서 7~8일 배양하였다. 7일령의 KbFF로부터 발생된 배반포 수정란은 자연발정 후 7일령의 한우 수란우 24두에 각각 2개의 배반포를 이식하였으며, KbFF-hFSH로부터 발생된 배반포 수정란은 역시 자연발정 수란우 53두에 각각 2개의 배반포를 이식하였다. 이식후 수란우는 발정관찰을 하여 임신 60일과 120일에 NR율(non-return rate)을 확인하였다. 분만은 자연분만을 유도하였다.

6. 복제송아지의 Transfection 검사 및 Microsatellite 분석

Transfection하여 분리된 세포와 태어난 복제 소는 혈액을 채취하여 PCR 방법으로 hFSH 단일체인의 베타와 알파부분을 포함하는 primer(417 bp)로 transfection 여부를 검사하였다. 또한 공여세포와 태어난 송아지의 일치성을 확인하기 위해 ISAG(International Society of Animal Genetics; 국제동물유전학회)에서 추천하는 개체식별용 microsatellite markers 중에서 10쌍을 선정(ETH10, ETH 225, ILSTS008, MGTG4B, ILSTS005, ILSTS013, ILSTS 028, TGLA122, TGLA126, TGLA227)하여 microsatellite 분석을 실시하였다. 각 샘플의 DNA를 template(주형)로 PCR 증폭 수행하고 PCR 증폭산물의 전기영동에 의한 증폭 여부를 확인하였다. 이어서 ABI 377 DNA sequencer(Applied Biosystems, USA)를 이용한 GeneScan 및 Genotyping으로 개체별 대립유전자 크기에 따른 유전자형을 결정하고, 결정된 개체별 유전자형을 토대로 공여세포, 수란우 및 복제 송아지간의 유전자형을 비교 분석하여 복제 여부를 판정하였다.

7. 통계학적 분석

본 연구의 결과 얻어진 자료는 SAS package를 이용하여 처리간의 Duncan 및 LSD 방법을 이용하여 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

1. Transfection 세포의 선발

본 실험에서 hFSH vector와 pcDNA3-neo가 co-transfection된 소 태아섬유아세포를 농도별로 Geneticine(G-418)으로 배양하여 colony를 선발한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다. 400, 600, 800 $\mu\text{g/ml}$ 의 G-418 농도에서 24, 23, 13개의 colony가 각각 선발되었으며, 이들 colony들로부터 PCR 분석 결과 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 19개 colony를 검사하여 이중 5개의 colony에서 hFSH gene의 band가 나타나 hFSH가 transfection 되었음을 확인하였다. 그러나 600, 800 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 3개씩의 colony를 검사한 결과 hFSH가 transfection 되지 않았음을 확인하였다.

PCR 분석을 하지 못한 나머지 colony들은 대부분 선발 후 배양과정에서 세포가 더 이상 증식하지 못하는 것으로 확인되었다. 즉 클로닝 실린더를 이용하여 colony를 채취하여 neomycin-free DMEM으로 옮겨 배양하였으나 colony들은 증식이 억제되었다. 또한 PCR 결과 transfection이 확인된 colony들도 계대배양 과정에서 transfection되지 않은 세포보다 증식율이 떨어지며 수명이 짧아지는 것을 확인하였다. 또한 선발된 colony에서 hFSH gene이 확인되지 않은 colony들은 transfection 과정에서 두

개의 vector를 사용했으므로 어느 한 개의 vector만, 즉 pcDNA3(neo)만 transfection 되었을 가능성이 있다. 그렇지만 일반적으로 neomycin으로 선발된 colony일지라 하더라도 한 colony내의 모든 세포가 pcDNA3(neo)가 transfection 되는 경우는 그리 많지 않다. 이러한 예로서 표지유전자(GFP)를 이용하여 세포에 transfection, 선발 과정을 거친 후 colony 내의 모든 세포들이 100% GFP를 발현하는 것을 고르기는 쉽지 않음이 알려져 있다(Keefer 등, 2001; Lee 등, 2005; Chen 등, 2002). 또한 Ramsoondar 등(2003)은 G-418 선발 colony에서 PCR 결과 0.9~8.7%의 positive 결과를 나타냈다고 하여 매우 낮은 선발율을 보인 반면, 본 실험에서 선발후 PCR로 확인된 colony(5개의 colony)들은 pcDNA3-neo와 hFSH가 모두 transfection 된 것이므로 확률은 낮지 않은 것으로 보인다(26.3%).

2. 방광세포로부터 hFSH Vector 분비

구축된 hFSH vector가 방광세포로부터 hFSH를 분비하는지를 알아보기 위하여 태아섬유아세포(KbFF), CHO cell 그리고 방광세포(bladder cell)에 hFSH gene을 transfection 하여 배양액으로부터 hFSH의 분비량을 측정하였다(Fig. 2).

hFSH의 분비량을 각각의 배양 세포로부터 측정한 결과 hFSH가 transfection 되지 않은 태아섬유아세포, CHO cell 그리고 방광세포와 hFSH가 transfection 된 CHO cell에서는 분비되지 않음을 확인하였다. 그러나 hFSH가 transfection된 방광세포 colony에서 hFSH가 분비됨을 확인하였다(Fig. 2A: 0.12~0.14IU/l). 또한 태아섬유아세포(Fig. 2B)에서도 일

Table 1. hFSH transfection and selection efficiency

Concentration of G-418 ($\mu\text{g/ml}$)	No. of		
	Selected colony	Analysis colony by PCR	Transfected colony (%)
400	24	19	5 (26.3)
600	23	3	0
800	13	3	0
Total	60	25	5 (20.0)

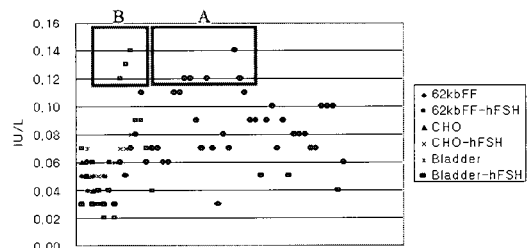


Fig. 2. hFSH secretion of gene transfected cells. A hFSH transfected bladder cells, B: hFSH transfected fetal fibroblasts.

부 분비되는 것으로 확인되어 방광세포 특이적인 vector는 태아섬유아세포에서도 일부 발현할 수 있는 것으로 나타났다. 이것은 나중에 hFSH 유전자 transfection된 형질 전환 동물의 초기 임신과정에서 유사산의 요인이 될 수 있었던 것으로 생각된다.

3. Transfected Cell의 수정란 발달을

hFSH가 transfection 된 colony의 세포를 이용하여 복제 수정란을 생산하였다. 이 때 대조구의 공여세포는 hFSH가 transfection된 태아섬유아세포와 동일한 개체의 세포를 이용하였다. 그 결과는 Table 2에서 나타난 바와 같다. 각각의 세포를 이용하여 NT를 한 결과 융합율은 KbFF와 KbFF-hFSH 세포에서 비슷한 결과를 나타냈으며, 2 세포기 이상 발달율은 KbFF에서 67.6%로 KbFF-hFSH의 68.7%와 유의적인 차이가 없었다 ($p>0.05$). 그러나 NT 수정란의 배반포 발달율에 있어서는 각각 24.51, 15.66%로 유의차를 나타냈다($p<0.05$).

Cibelli 등(1998)은 소에서 형질 전환 복제 수정란의 배반포 발달율이 12% 이었으며, Valeri 등(2001)에 의하면 소에서 형질 전환 세포를 이용한 NT에서 융합율과 난할율, 배반포 발달율에서 차이가 있

는 것으로 보고하고 있다. 그러나 Lee 등(2005)에 의하면 EPO-GFP 유전자를 이용한 세포에서 융합율은 형질전환세포가 떨어지는 반면 난할율과 배반포 발달율에 있어서는 차이를 보이지 않는다고 보고하고 있고, Chen 등(2002)은 GFP 유전자 단독으로 사용하였을 때 융합율, 분할율, 배반포 발달율에서 차이를 보이지 않는다고 보고하여 어떤 유전자를 사용하였는지에 따라 조금씩 차이가 있는 것으로 나타나고 있다.

그렇지만 배반포로 발달된 수정란의 apoptosis 분석 결과 KbFF에서 blastocyst당 총 할구수는 82 ± 30.2 cells 이었으며 apoptosis를 나타내는 할구수는 5.2 ± 3.8 cells(6.3%) 이었다. 그리고 KbFF-hFSH에서 blastocyst당 총 할구수는 91.4 cells 이었으며 apoptosis를 나타내는 할구수는 1.4 ± 1.6 cells(1.6%) 로서 유의적인 차이를 보이지 않았다($p>0.05$).

4. 이식후 임신율

소의 태아섬유아세포와 이 세포에 hFSH 유전자를 transfection한 cell로부터 생산된 복제 수정란의 이식후 결과는 Table 3에서 나타난 바와 같다. KbFF의 수정란을 이식한 24두의 대리모에서는 60일령

Table 2. Effect of hFSH transfected and non-transfected cells on the development of cloned embryos

Donor cells	No. of oocytes		No. (%) of developed to		No. of apoptotic cells/total cells
	Enucleated	Fused	2-cell	Blastocysts	
KbFF	153	102 (66.7)	69 (67.6)	25 (24.5) ^a	5.2±3.8 / 82±30.2
KbFF-hFSH	253	166 (65.6)	114 (68.7)	26 (15.7) ^b	1.43±1.6 / 91.43±26.7

^{a,b}: Different superscripts within column denote significant differences ($p<0.05$).

Table 3. Pregnancy rate following transfer of cloned embryos with hFSH transfected fetal fibroblasts

Donor cells	No. of recipient cows	NR rate		No. (%) of birth calf
		Day 60	Day 120	
KbFF	24	6 (25.0)	1 (4.2)	0
KbFF-hFSH	53	26 (49.1)	9 (17.0)	2 (1.9) [*]

^{*} Two calves were confirmed not to be transgenic calves.

에 6두를 제외한 18두에서 발정이 재귀되었으며, 120일령 이후 1두만이 발정이 재귀되지 않아 임신된 것으로 추정하였다. 그러나 최종 분만까지는 도달하지 못하였으며, 따라서 대조구에서 생산된 송아지는 없었다.

그러나 KbFF-hFSH로부터 생산된 복제 수정란은 이식후 60일에 49.1%인 26두가 발정이 재귀되지 않았으며, 또한 120일령에서도 9두(17.0%)가 임신이 된 것으로 추정되었으며 이중 1두가 150일령에 사산되었다. 결국 수란우중 2 마리가 최종 임신까지 도달하여 2두의 송아지가 각각 태어났다. 1두는 262일령에 분만하였으며, 체중이 평균보다 높은 38kg이었으며, 태어난 직후 건강상태가 좋지 않았으나 적절한 조치를 통하여 회복하였고, 나머지 1두는 304일령에 자연분만에 성공하였으며, 25.6 kg의 정상 체중을 가지고 태어났다. 그 외에 건강이나 외모적으로 이상은 발견하지 못했으며, 현재 21~25 개월로 잘 자라고 있다.

복제 수정란 뿐만 아니라 형질 전환 수정란의 임신율은 보고자간 큰 차이를 보이고 있는데, 소에서 7%(Keefer 등, 2001), 9~20%(Vilceu 등, 2003) 등으로 보고하고 있으며, Chen 등(2002)은 GFP를 이용하여 소에서 21~40%의 높은 산자 생산율을 보고하고 있다. 그러나 본 연구에서 2%내의 산자 생산율은 위 보고자들과 비교하여 매우 낮은 것으로 보인다. Cibelli 등(1998)은 형질 전환 복제 수정란의 이식후 40일령 임신율이 55%, 60일령에 45% 이었다고 보고하였으며 11두 중 3두가 분만하여 27%의 산자 생산율을 얻었다. 일반적으로 복제 소는 과체중이 많이 나타나는 것으로 이미 알려져 있으나(Cibelli 등, 1998), 이것은 장기제태의 경우에 더 위험할 수 있다. 그러나 본 연구에서는 262일령에 분만했지만 체중이 평균보다 매우 높은 것으로 나타난 반면 304일령에 태어난 소는 정상체중을 보임으로 인해 반드시 장기제태가 과체중을 나타내는 요인으로는 보이지 않는다. 다만 이식전 수정란의 배양조건 등에서 어떤 요인이 있을 것이라는 일반적인 보고 내용과 다르지 않다는 것을 나타내주고 있다(Enright 등, 2002). 또한 일반적으로 거대산자의 경우 생후 사망률이 매우 높은 것으로 알려져 있다(Cibelli 등, 1998; Hill 등, 1999;

Chen 등, 2002).

본 연구에서 생산된 두 마리의 송아지는 모두 수송아지이며, 이는 요를 통하여 유용 물질을 분리하기 위해 vector를 구성하였기 때문에 요를 채취하기 용이한 수송아지의 태아섬유아세포를 이용하였다.

5. 복제소로부터 hFSH Transfection 분석

복제 소로부터 채취한 혈액을 PCR한 결과 colony (Fig. 3A)와 같은 hFSH 유전자가 삽입되지 않은 것으로 나타났다(Fig. 3B). 이는 같은 colony에서 다수의 세포 중 어느 한 세포만 유전자가 transfection 되어도 colony들을 PCR을 했을 때 유전자가 나타나게 되므로 본 실험에 사용한 colony는 transfection 되지 않은 세포가 혼합된 colony인 것으로 생각된다. 또한 외부 유전자가 transfection된 세포는 증식율이 떨어지는 것을 관찰했으며 이 세포로부터 복제된 수정란도 역시 발달율이 떨어지거나 또는 이식후 임신의 진행과정에서 유산이 더 많이 일어날 가능성을 내포하고 있다. 이와 같은 증거는 Table 2의 융합율에서 나타내는 바와 같이 두 처리간 차이가 없었지만 2-cell 발달율과 증식율이 다른 colony에 비해 매우 떨어지는 것이 관찰된 것으로 보아 이는 hFSH 유전자의 영향인 것으로 생각된다. 비록 hFSH 유전자의 vector 구성에서 mouse Uroplakin II promoter를 이용하였으므로 태아섬유아세포에서 hFSH 유전자가 발현되지는 않았지만, 외부 유전자의 삽입 여부가 수정란의 발달에도 영향을 주는 것으로 생각된다. 그렇지만 hFSH 유전자가 transfection 된 세포를 이용하여 복

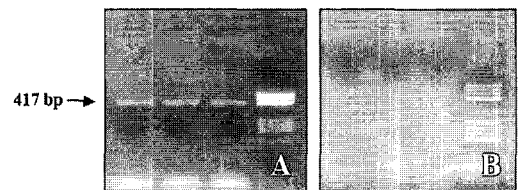


Fig. 3. PCR result of hFSH vector (6.8KB) transfected colony cells (A) and cloned calves (B) from hFSH transfected colony. A: hFSH transfected colony (lane 1, 2, 3) and size marker (lane 4); B: Negative control (lane 1), calf 1 (lane 2), calf 2 (lane 3) and size marker (lane 4).

Table 4. Microsatellite results of donor cells, recipients and cloned calves

MS loci	ILSTS028		TGLA227		TGLA126		MGTG4B		ILSTS008	
Donor cell	131	131	80	82	119	127	132	140	175	177
Recipient	131	131	97	97	127	129	132	142	177	177
Calf	131	131	80	82	119	127	132	140	175	177
MS loci	TGLA122		ILSTS005		ILSTS103		ETH225		ETH10	
Donor cell	147	153	184	184	221	221	142	142	218	218
Recipient	155	155	186	186	223	227	138	146	226	226
Calf	147	153	184	184	221	221	142	142	218	218

제된 배반포 수정란은 apoptosis 분석을 실시한 결과 두 처리간 유의적인 차이를 보이지 않았다.

6. Microsatellite 분석

PCR 결과 태어난 송아지가 형질 전환되지 않은 것으로 확인이 되었지만 복제된 송아지인 것을 확인하기 위하여 이들의 혈액과 대리모의 혈액으로부터 DNA를 채취하였고, 또한 이들을 복제하는데 사용한 동일 개체의 세포로부터 DNA를 채취하여 현재까지 알려진 microsatellite 마커 중 10개를 이용하여 친자 감별을 하였으며 결과는 Table 4에 나타난 바와 같다. 복제 송아지와 대리모는 모든 마커에서 차이를 보이는 반면 donor cell과 복제 송아지간에는 차이를 보이지 않음에 따라 이 송아지는 태아섬유아세포를 이용하여 복제한 송아지인 것을 확인하였다(Table 4). 이상의 연구 결과에 의하면 형질 전환 세포를 이용하여 복제 수정란을 생산 이식하였으나 태어난 복제 소는 형질 전환되지 않은 소인 것으로 판정되었다. 현재 이들은 복제 소의 관리에 준하여 사육하고 있으며, 성우가 됨에 따라 정액 채취 성상 분석 등 성장 발육 및 생식과 관련된 연구를 지속적으로 할 필요가 있다.

적 요

본 연구의 목적은 요를 통해 hFSH를 발현하는 형질 전환 소의 생산이다. 요의 분비와 관련 있는 유전자로서 mUII promoter를 사용하여 hFSH 유전자를 구성했다. 태아섬유아세포(KbFF)는 임신 45

일령의 태아(송)에서 채취하였다. hFSH gene은 pcDNA3(neo) vector와 같이 KbFF 세포에 electroporation 방법으로 transfection하였다. 유전자를 transfection한 세포는 G-418로 2주 동안 배양하였고, 선발된 colony는 PCR로 확인하였다. 핵이 제거된 난자는 hFSH가 transfection된 세포와 transfection되지 않은(control) 세포를 이용하여 핵이식하였다. 48시간 후 hFSH가 transfection된 세포는 68.7%의 수정란이 난탈되었으며, 8일 후 15.7%의 수정란이 배반포로 발달하였다. 그러나 대조구에서는 67.6%가 난탈되었으며, 24.5%가 배반포로 각각 발달하였다. 이들 배반포에서 apoptosis 분석 결과 hFSH 유전자가 transfection된 또는 transfection되지 않은 대조구에서 유의적인 차이는 보이지 않았다. 배반포는 53두의 수란우에 이식하여 두 마리의 산자가 생산되었으나(1.9%) hFSH가 transfection되지 않은 것으로 나타났다. 이 결과는 선발된 hFSH colony에서 transfection되지 않은 세포가 혼합되어 있었다는 것을 나타내 주고 있으며, colony의 선발과 검증에 더 많은 연구의 필요성이 있음을 나타내준다.

참고문헌

Bordignon V, Keyston R, Lazaris A, Bilodeau AS, Pontes JHF, Arnold D, Fecteau G, Keefer C and Smith LC. 2003. Transgene expression of green fluorescent protein and germ line transmission in cloned calves derived from *in vitro*-transfected somatic cells. Bio. Reprod., 68:2013-2023.

- Cappello F, Stassi G, Lazzereschi D, Renzi L, Di Stefano C, Marfe G, Giancotti P, Wang HJ, Stoppacciaro A, Forni M, Bacci ML, Turchi V, Sinibaldi P, Rossi M, Bruzzone P, Pretagostini R, Della Casa G, Cortesini R, Frati L and Lavitrano M. 2000. hDAF expression in hearts of transgenic pigs obtained by sperm-mediated gene transfer. *Transplant. Proc.*, Aug 32(5): 895-896.
- Chan AW, Chong KY, Martinovich C, Simerly C and Schatten G. 2001. Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. *Science*, 291(5502):309-312.
- Chen SH, Vaught TD, Monahan JA, Boone J, Emshie E, Jobst PM, Lamborn AE, Schnieke A, Robertson L, Colman A, Dai Y, Polejaeva IA and Ayares DL. 2002. Efficient production of transgenic cloned calves using preimplantation screening. *Biol. Reprod.*, Nov 67(5):1488-1492.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA and Robl JM. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, May 22 280(5367):1256-1258.
- Enright BP, Taneja M, Schreiber D, Riesen J, Tian XC, Fortune JE and Yang X. 2002. Reproductive characteristics of cloned heifers derived from adult somatic cells. *Biol. Reprod.*, Feb 66(2):291-296.
- Fan W, Plaut K, Bramley AJ, Barlow JW and Kerr DE. 2002. Adenoviral-mediated transfer of a lysostaphin gene into the goat mammary gland. *J. Dairy Sci.*, Jul 85(7):1709-1716.
- 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.*, Dec 77(12):7380-7384.
- Hill JR, Roussel AJ, Cibelli JB, Edwards JF, Hooper NL, Miller MW, Thompson JA, Looney CR, Westhusin ME, Robl JM and Stice SL. 1999. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology*, Jun 51(8):1451-1465.
- Keefer CL, Baldassarre H, Keyston R, Wang B, Bhatia B, Bilodeau AS, Zhou JF, Leduc M, Downey BR, Lazaris A and Karatzas CN. 2001. Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and *in vitro*-matured oocytes. *Biol. Reprod.*, Mar 64(3):849-856.
- Lee GS, Kim HS, Hyun SH, Lee SH, Jeon HY, Nam DH, Jeong YW, Kim S, Kim JH, Han JY, Ahn C, Kang SK, Lee BC and Hwang WS. 2005. Production of transgenic cloned piglets from genetically transformed fetal fibroblasts selected by green fluorescent protein. *Theriogenology*, Mar 1 63(4):973-991.
- Noble MS, Rodriguez-Zas S, Cook JB, Bleck GT, Hurley WL and Wheeler MB. 2002. Lactational performance of first-parity transgenic gilts expressing bovine alpha-lactalbumin in their milk. *J. Anim. Sci.*, Apr 80(4):1090-1096.
- Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y and Yanagimachi R. 1999. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science*, May 14 284(5417):1180-1183.
- Sin FY, Walker SP, Symonds JE, Mukherjee UK, Khoo JG and Sin IL. 2000. Electroporation of salmon sperm for gene transfer: Efficiency, reliability, and fate of transgene. *Mol. Reprod. Dev.*, Jun 56(S2):285-288.
- Zakahartchenko V, Mueller S, Alberio R, Schernthanner W, Stojkovic M, Wenigerkind H, Wanke RD, Lassnig C, Mueller M, Wolf E and Brem G. 2001. Nuclear transfer in cattle with non-transfected and transfected fetal or cloned transgenic fetal and postnatal fibroblasts. *Mol. Reprod. Dev.*, 60:362-369.

(접수일: 2005. 12. 10 / 채택일: 2006. 2. 25)