

돼지  $\beta$ -Casein을 이용한 EGFP 발현 Knock-in 벡터의 구축 및 발현 검증

이상미 · 김혜민 · 문승주 · 강만종\*

전남대학교 농업생명과학대학 농업과학기술연구소 동물자원학부

Construction and Expression Analysis of Knock-in Vector for EGFP Expression in the Porcine  $\beta$ -Casein Gene LocusSang Mi Lee, Hey-Min Kim, Seung Ju Moon and Man-Jong Kang<sup>†</sup>

Department of Animal Science and Institute of Agricultural Science and Technology, College of Agriculture &amp; Life Science, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

## ABSTRACT

This study was carried out to develop knock-in vector for EGFP (enhanced green fluorescent protein) expression in porcine  $\beta$ -casein locus. For construction of knock-in vector using porcine  $\beta$ -casein gene, we cloned the  $\beta$ -casein genome DNA from porcine fetal fibroblast cells, EGFP and SV40 polyA signal using PCR. The knock-in vectors consisted of a 5-kb fragment as the 5' recombination arm and a 2.7-kb fragment as the 3' recombination arm. We used the neomycin resistance gene (*neo*<sup>r</sup>) as a positive selectable marker and the diphtheria toxin A (DT-A) gene as a negative selectable marker. To demonstrate EGFP expression from knock-in vector, we are transfected knock-in vector that has EGFP gene in murine mammary epithelial cell line HC11 cells with pSV2 neo plasmid. The EGFP expression was detected in HC11 cells transfected knock-in vector. This result demonstrates that this knock-in vector may be used for the development of knock-in transgenic pig.

(Key words :  $\beta$ -Casein gene, Knock-in vector, HC11 cells, Gene targeting)

## 요 약

본 연구는 돼지  $\beta$ -casein 유전자 위치에서 EGFP가 발현될 수 있는 knock-in 벡터를 구축하기 위하여 실시되었다. 돼지의  $\beta$ -casein 유전자를 이용하여 knock-in 벡터를 구축하기 위해 돼지의 태아 섬유아세포로부터  $\beta$ -casein 유전자를 동정하였고 EGFP, SV40 polyA signal을 동정하였다. Knock-in 벡터는 5' 상동 영역 약 5 kb와 3' 상동 영역 약 2.7 kb로 구성되어 있으며, positive selection marker로 *neo*<sup>r</sup> 유전자를, negative selection marker로 DT-A 유전자를 사용하였다. 구축된 knock-in 벡터로부터 EGFP의 발현을 확인하기 위하여 생쥐 유전 세포인 HC11 세포에 knock-in 벡터를 도입하였다. 그 결과 EGFP의 발현을 HC11 세포에서 확인하였다. 이와 같은 결과로서 이 knock-in 벡터는 knock-in 형질전환 돼지를 생산하는데 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 서 론

유전공학의 발전은 외래 유전자를 삽입시키거나 특정 유전자를 제거시켜 특정 유전자로부터 유용한 단백질을 생산하는 형질전환 동물의 생산을 가능하게 되었다(Rodriguez 등, 1995; Van Cott 등, 1999; Dai 등, 2002). 형질전환 동물은 대장균이나 동물세포 배양에 의하여 생산되는 단백질보다 생산 단가가 낮고 특히 대장균을 이용한 시스템에서 단백질의 '변역 후 변이(posttranslational mo-

dification)'의 문제점을 해결할 수 있는 장점을 가지고 있다(Houdebine, 2000). 형질전환동물의 생산 방법에는 미세주입법(microinjection), 레트로바이러스 벡터법(retroviral vector), 배아줄기세포 및 체세포를 이용한 동물 복제법 등이 이용되고 있다(Houdebine, 2000; Wolf 등, 2000). 미세주입법은 발현시키고자 하는 외래 유전자를 수정란의 진행에 미세조작기를 이용하여 삽입하는 방법으로, 고전적으로 많이 이용되어져 왔다(Richa 등, 1989). 그러나 이러한 방법은 형질전환된 산자의 생산 효율이 2 내지 3%로 매우 낮으며, 삽입된 유전자의 위치도 무작위

\* 본 연구는 바이오그린 21사업(20070101034009) 지원으로 수행되었음.

<sup>†</sup> Corresponding author : Phone: +82-62-530-2113, E-mail: mjkgang@chonnam.ac.kr

로 삽입되어 유전자의 발현이 낮은 경우가 일반적이다 (Chan, 1999; Wolf 등, 2000). 그리고 특정 위치로 외래 유전자를 삽입하거나 특정 내부 유전자를 제거하는 것이 불가능하다. 또한, 레트로바이러스 벡터법도 삽입된 유전자의 위치가 무작위로 삽입되며, 미세주입법과 같이 특정 위치로 외래 유전자를 삽입하거나 특정 내부 유전자를 제거하는 것이 불가능하다 (Wolf 등, 2000). 이와 같은 문제점들을 극복할 수 있는 방법으로 상동유전자 재조합 원리를 이용한 gene targeting 방법이 이용될 수 있다. Gene targeting은 생쥐에서 처음 위치 특이적으로 특정 유전자에 변이를 도입할 수 있는 기술로 이용되어 왔으며, 생쥐에서는 gene targeting을 위한 벡터를 배아줄기세포에 도입하고 상동유전자 재조합이 일어난 세포를 선별한 다음, 이들 세포를 이용하여 키메라 생쥐를 생산하는 방법을 이용하여 gene targeting된 생쥐를 생산하여 유전자 기능 연구에 많이 활용되고 있다(Thomas 등, 1987).

Gene targeting 방법은 특정 내부유전자 위치에 변이된 유전자를 도입하여 특정 내부 유전자의 발현을 제거하는 knock-out과 특정 내부유전자 위치에 변이된 유전자를 도입하여 특정 유전자를 knock-out 후, 그 유전자의 위치에 정확하게 발현시키고자 하는 외래 유전자를 도입하는 방법인 knock-in 방법이 있다(Clark 등 2000; Wang와 Zhou, 2003). Knock-in 방법은 외래 유전자를 원하는 위치에 삽입할 수 있는 시스템으로, knock-in 방법에 의하여 삽입된 외래 유전자는 삽입된 위치의 게놈 상에 위치한 유전자 발현 조절 영역의 모든 부분을 이용할 수 있으므로, 원래 그 위치에 존재하는 유전자의 발현량만큼 발현될 가능성이 있다.

생쥐에서 gene targeting 방법인 knock-out 방법을 이용하여  $\beta$ -casein 유전자의 발현을 제거하였을 때 knock-out된 생쥐는 정상적으로 생존하였으며, 임신에도 문제가 없고 태어난 산자의 포유에도 문제가 없는 것으로 보고되었다(Kumar 등, 1994). 이와 같은 연구 보고는 gene targeting 방법인 knock-in 방법을 이용하여  $\beta$ -casein 유전자를 knock-out시키고 그 자리에 특정 외래 유전자를 삽입하면 그 유전자는  $\beta$ -casein 유전자 조절 영역을 이용하여 발현할 수 있는 가능성을 나타낸다. 상기의 방법에 의하여 산양의  $\beta$ -casein 유전자 영역을 이용한 gene targeting 벡터(Yu 등, 2004)가 개발되었으며, 산양의  $\beta$ -casein 유전자 영역을 이용하여 ht-PAm(human plasminogen activator mutant)(Shen 등, 2007), GFP (Shen 등, 2005) 또는 사람의 락토펜(Li 등, 2006)의 knock-in 세포가 개발되었다. 그러나 돼지  $\beta$ -casein을 이용한 knock-in 벡터는 보고된 바가 없다.

본 연구에서는 돼지  $\beta$ -casein을 이용한 EGFP 발현 knock-in 벡터를 구축하고 HC11 세포에서 정상적으로 EGFP를 발현하는지 검증하여 Knock-in 벡터의 이용 가능성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 돼지 $\beta$ -casein Genomic DNA, EGFP 및 SV40 PolyA 신호서열 DNA의 동정

돼지  $\beta$ -casein genomic DNA는 태아섬유아세포로부터 정제한 genomic DNA를 이용하여 다음과 같이 PCR에 의하여 동정하였다. PCR은 NCBI에 보고된 돼지  $\beta$ -casein promoter region(accession No. AY452035)과 c-DNA 분석 결과를 바탕으로 primer를 제조하여 long PCR을 수행하였다. PCR primer는 돼지  $\beta$ -casein promoter 상류 sense (CCCACTATTTCCTGATTCTTGATTA-ACTTT) primer, beta-casein exon 6으로 추정되는 antisense(TGTTGTTCCTCCCGCTTTAGCTTCTCAATT) primer, exon 2를 포함하는 sense(GACTTGATCGCCAT-GAAGCTCCTCATCCTT) primer와 마지막 exon 9를 포함하는 antisense(GCCTAAGGATTAATTTATTGAAATG-ACTGG) primer를 사용하였다. PCR은 돼지의 태아섬유아세포에서 회수된 genomic DNA 100 ng을 사용하여 10 pmol의 sense 및 antisense primer, 0.5U i-Max II DNA polymerase(Intron, Korea), 1×PCR-buffer, 200  $\mu$ M dNTP 조성으로 denaturation 94°C 30초, annealing 63°C 30초, extension 72°C 7분 30초, 30 cycle의 반응 조건으로 long PCR을 수행하였다. PCR 산물은 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였으며 pGEM T-easy 벡터(Promega, USA)에 subcloning 하여 염기배열을 결정하였다.

EGFP 유전자는 pEGFP-N3 벡터(Clontech, USA)를 이용하여 PCR에 의하여 동정하였다. PCR은 pEGFP-N3 벡터 DNA 10 pg, 20 pmol의 sense (AAGCTTCGAATTC-TGCAGTC) primer와 antisense(CTCGAGTTACTTGTACAGCT) primer, 1×PCR-buffer, 0.5 U Taq polymerase (Promega, USA), 각 200  $\mu$ M dNTP 조성으로 denaturation 94°C 30초, annealing 60°C 30초, extension 72°C 1분, 35cycle의 반응 조건에서 수행하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였으며, pGEM T-easy 벡터(Promega, USA)에 subcloning 하여 염기배열을 결정하였다.

SV40 polyA 신호서열은 pCMV-Tag1 벡터(Stratagene, USA)를 주형으로 사용하여 PCR에 의하여 동정하였다. PCR은 pCMV-Tag1 벡터 DNA는 10 pg, 20 pmol의 sense (AAGCTTATCGATACCGTCTGA) primer와 antisense (GGGCCCTTAAGATACATTGATGAG) primer, 1×PCR-buffer, 0.5U Taq polymerase(Promega, USA), 각 200  $\mu$ M dNTP을 이용하여 실시하였으며 PCR 반응 조건은 denaturation 94°C 30초, annealing 50°C 30초, extension 72°C 40 초, 40 cycle 수행하였다. PCR 산물은 2% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였으며, 염기서열 결정을 위하여 pGEM T-easy 벡터(Promega, USA)에 subcloning 하였다.

### EGFP 발현 Knock-in 벡터의 구축

Knock-in 벡터의 5' arm 부분의 구축을 위해 promoter의 5' 영역에는 *NotI* restriction enzyme site를 promoter의 3' 영역인 exon2 부분에는 *NcoI* restriction enzyme site를 넣어 primer를 제작하여 PCR로 증폭하였다(sense primer: GCGGCCGCGATATCTAGGGTCTCTTCTAGT, antisense primer: GCGGCCGCGATATCTAGGGTCTCTTCTAGT). PCR은 동정된 돼지  $\beta$ -casein genomic DNA를 주형으로 이용하여 genomic DNA 동정과 동일한 조건의 PCR 조건을 사용하였다.

이렇게 PCR 증폭된 Knock-in 벡터의 5' arm 부분은 *NotI* - *NcoI* 제한 효소 처리에 의하여 약 5 kb의 insert를 제조하였고, 과발현시킬 유전자인 EGFP 유전자는 *NcoI* - *Sall* 제한 효소 처리를 하여 연결할 DNA 단편을 준비하였다. 이렇게 준비된 단편은 pBSK+/*NotI*-*Sall* 벡터에 3 fragment ligation을 실시하여 pBSK+5' arm+EGFP plasmid를 얻었다. EGFP 유전자 뒤에 SV40poly A를 연결하기 위해 PCR에 의해 subcloning 되어 있는 SV40-poly A plasmid를 *XhoI* - *EcoRV*로 절단하여 insert를 준비하였고, pBSK+5' arm+EGFP plasmid를 *NotI* - *Sall*으로 절단하여 insert를 준비한 후 pBSK+/*NotI*-*EcoRV* 벡터에 3 fragment ligation을 하여 pBSK+5' arm+EGFP+poly-A plasmid를 구축하였다.  $\beta$ -casein 3' 부분을 knock-in 벡터에 이용하기 위해  $\beta$ -casein genomic DNA의 intron 4에 존재하고 있는 *PstI*과 intron 7에 존재하고 있는 *XbaI* enzyme site를 이용하였다.  $\beta$ -casein 3' 부분을 *PstI*과 *XbaI*로 절단하여 생성된 약 2.6 kb의 단편 pBSK +/*PstI* - *XbaI* vector에 subcloning하였다. Subcloning된 DNA를 *PstI*으로 절단 후 blunting 시키고 *Sall* Linker를 연결한 후 *XbaI*으로 절단하여 이 fragment를 pBSK +/*Sall* - *XbaI* 벡터에 연결하였다. Enzyme site가 *PstI*에서 *Sall*로 치환된 것을 확인한 후 *XbaI* site를 *XhoI*으로 치환하는 과정을 수행하였다. 이 과정을 통해 pBSK +/*Sall* - *XhoI* 벡터에  $\beta$ -casein 3'가 연결된 plasmid를 얻었다. PGK - neo 유전자는 enzyme site를 치환하는 과정을 통해 pBSK +/*EcoRV* - *Sall* vector에 연결하였다.  $\beta$ -casein 3' 부분과 PGK - neo를 연결하기 위해  $\beta$ -casein 3' 부분이 연결되어 있는 plasmid를 *EcoRV* - *Sall*으로 절단하여 벡터로 이용하고 PGK-neo plasmid는 *EcoRV* - *Sall*로 절단하여 insert를 준비하여 이 두 개의 fragment를 ligation하여 pBSK+/*EcoRV* - *XhoI*에 PGK-neo와  $\beta$ -casein 3' 부분이 연결된 pBSK+neo+3' arm plasmid를 얻었다. pBSK +5' arm+EGFP+polyA plasmid와 pBSK+neo+3' arm plasmid를 최종적으로 연결하기 위해 pBSK+neo+3' arm plasmid를 *EcoRV* - *XhoI*으로 절단하여 insert를 준비하였고, pBSK+5' arm+EGFP+polyA plasmid를 *EcoRV* - *XhoI*으로 절단하여 벡터로 이용하여 이 두 fragment를 ligation하였다. 이렇게 하여 pBSK+5' arm+EGFP+polyA+neo+3' arm plasmid를 얻었다. 이 플라스미드를 *NotI* - *XhoI*으로 절단하여 insert를 만든 후 pMCDT-A(A + T/pau) 벡터의 *NotI* - *XhoI* site에 삽입하여 최종 knock-in 벡터인 pMCDT- $\beta$ CEGFP가 완성하였다.

#### Knock-in 벡터의 HC11 세포내 도입과 발현 확인

구축된 knock-in 벡터는 약 3 kb의 promoter 영역을 포함하고 있으므로 생쥐 유선 세포인 HC11 세포에 벡터를 도입하여 EGFP의 발현 여부를 다음과 같이 검증하였다. HC11 세포의 배양에는 10%의 FBS(Hyclon, USA)와 항생제가 포함된 RPMI 1640(WelGENE, Korea)을 사용하였다. Transfection은 HC11 cell을 3 cm dish에  $2.4 \times 10^5$  cell 접종한 다음 16시간 후에 jetPEI transfection reagent(Polyplus Transfection, USA)을 이용하여 실험설명에 따라 실시하였다. Transfection에 사용된 DNA 농도는 knock-in 벡터와 G418(Gibco, BRL Co, USA) 선별을 하기 위해 pSV2neo plasmid DNA의 물비를 5:2로 하여 total 4 ug를 사용하였다. Transfection 24시간 후에 G-

418 300 ug/ml가 포함된 배지로 교체하였고, 3일마다 배지를 교체하면서 EGFP가 발현하는 것을 형광현미경을 통해 확인하였다. Knock-in 벡터의 transfection 효율을 확인하기 위한 control DNA로 pEGFP-N3(Clontech, USA)를 사용하여 EGFP 발현을 형광현미경을 통해 확인하였다.

## 결 과

### Knock-in 벡터 구축을 위한 DNA의 동정

돼지의 beta-casein genomic DNA를 cloning 하기 위해 돼지의 태아섬유아세포에서 추출한 genomic DNA를 이용하여 long PCR을 수행한 결과 5' 부분 약 6.8 kb와 3' 부분 5 kb의 PCR 산물을 얻었다(Fig. 1(A)). PCR 산물은 pGEM T-easy vector에 연결하여 염기배열을 결정하였다(결과 제시 안함). Knock-in 벡터 구축에 필요한 유전자인 EGFP(Fig. 1(B)), SV40 polyA(Fig. 1(C))도 PCR을 이용하여 동정하였고 염기배열을 결정하여 상동성을 확인한 결과, 모두 100% 일치하는 것을 확인하였다(결과 제시 안함). 특히 돼지 beta-casein genomic DNA는 9개의 exon과 8개의 intron으로 구성되어 있었다(Fig. 2).

### Knock-in 벡터의 구축

돼지의 beta-casein genomic DNA를 이용하여 얻은 PCR product 5' arm과 3' arm 그리고 벡터 구축에 필요한 유전자들을 이용하여 Fig. 2에서 나타낸 바와 같이 pMCDT- $\beta$ CEGFP knock-in 벡터를 구축하였다. Knock-in 벡터의 전체 길이는 13.4 kb이며 positive selection marker로 neo 유전자를 negative selection marker로 diphtheria toxin A 유전자에 의하여 상동유전자 재조합된 세포를 선별할 수 있도록 고안되어 있다.

### HC11 세포에 있어서 Knock-in 벡터에 의한 EGFP의 발현

본 연구에서 제작된 EGFP 발현 knock-in 벡터는 돼지  $\beta$ -casein의 promoter 약 3 kb가 5' arm에 포함되어 있으며, EGFP는 원래  $\beta$ -casein 유전자의 ATG 위치에 정확하게 치환되어 삽입되도록 고안되어 있다. 따라서 본

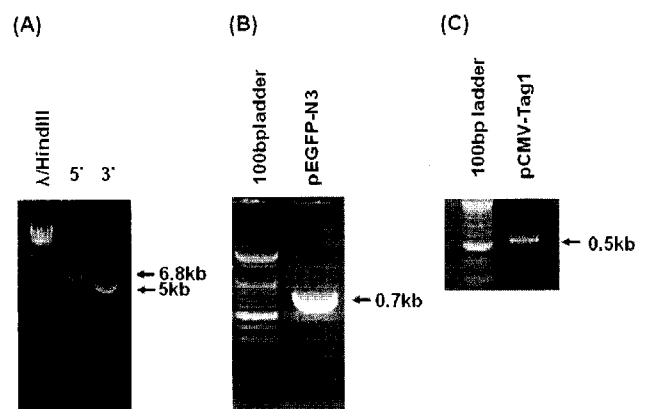


Fig. 1. Cloning of porcine  $\beta$ -casein genome (A), EGFP (B), and SV40 polyA signal (C).

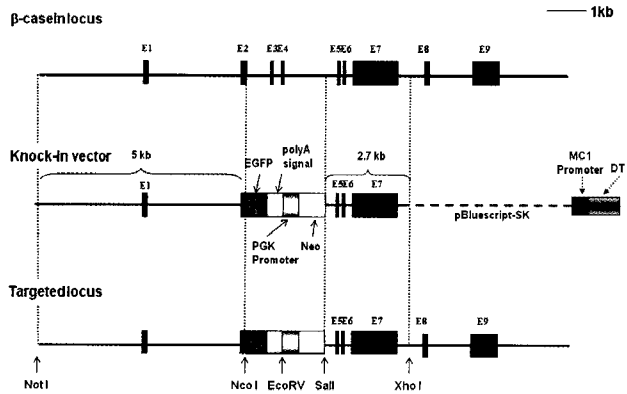


Fig. 2. The knock-in strategy for porcine  $\beta$ -casein gene. Upper line shows porcine  $\beta$ -casein genome locus. Middle line displays porcine  $\beta$ -casein knock-in vector contained EGFP gene. Under line shows structure of the targeted locus after homologous recombination.

백터를 생쥐 유선 세포주인 HC11 세포에 도입하면 EGFP는 발현하게 된다. Fig. 3B에 제시한 바와 같이 knock-in 백터를 HC11 세포에 도입하고 48시간 후 안정적으로 EGFP가 발현함을 확인하였다. 또한, G418 선별한 결과 세포 colony에서도 EGFP를 발현함을 확인할 수 있었다(Fig. 3(C)). 이와 같은 결과는 EGFP가 돼지  $\beta$ -casein genomic DNA 영역을 이용한 knock-in 백터에 의하여 발현할 수 있음을 나타내고 있다.

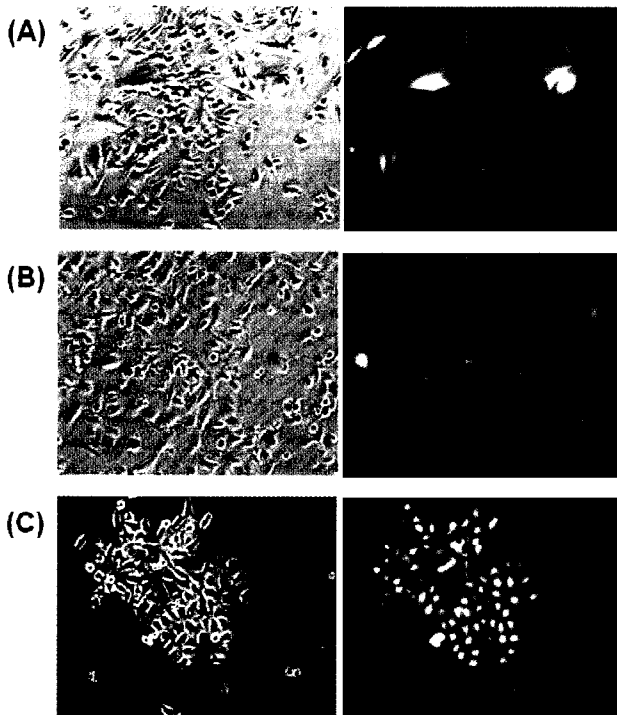


Fig. 3. Expression of EGFP in HC11 cells transfected knock-in vector. Knock-in vector was transfected in HC11 cells using Jet-PEI transfection reagent with pSV2 neo plasmid. After 48 h, EGFP expression was observed in pEGFP-N3 transfected cells (A) and knock-in vector transfected cells (B) through a fluorescence microscope. After G418 selection for 10 day, transfected cell formed single colony and expressed EGFP in single colony (C).

## 고찰

본 연구에서는 돼지  $\beta$ -casein 유전자 영역을 이용하여 EGFP를 발현시킬 수 있는 knock-in 백터를 구축하였고 이 백터가 생쥐 유선 세포인 HC11 세포에서 EGFP를 발현시킴을 확인하였다. 일반적인 형질전환동물의 발현은 유전자 도입 위치 및 발현 백터의 구조 등에 따라 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Houdebine 등, 2002). 그러나 gene targeting 방법의 하나인 knock-in 방법을 이용하여 생쥐의 ApoE 유전자 위치에 사람 ApoE4 유전자를 삽입하였을 경우 안정적으로 발현하였음을 보고하고 있다(Hamanaka 등, 2000). 따라서 돼지  $\beta$ -casein 유전자 영역을 이용하여 EGFP를 발현시키고자 하는 knock-in 백터를 이용하면 돼지  $\beta$ -casein 유전자 영역의 gene regulatory sequence를 이용하여 안정적으로 EGFP가 발현될 수 있음을 나타내고 있다. 본 연구에서는  $\beta$ -casein 유전자 영역을 이용하고, positive selection marker로 neo 유전자를, negative selection marker로 diphtheria toxin A를 이용한 백터를 구축하였다. 이 백터가 체세포에 도입되어 상동유전자 재조합이 일어나게 되면 G418 선별에 의해 세포는 생존하게 되고 vector가 비특이적으로 삽입되면 diphtheria toxin A가 발현하여 세포는 사멸하게 되는 특징을 가지고 있다. Positive selection marker로 neo 유전자, negative selection marker로 diphtheria toxin A를 이용한 gene targeting vector는 생쥐 ES cell을 이용한 gene targeting에 이용되어져 왔으며(Yanagawa 등, 1999), 본 연구에서 구축된 백터도 돼지 체세포에서 정상적으로 기능할 것으로 생각된다.

또한, casein 단백질은 유즙의 주성분으로 우유 속에 포함된 단백질 중 70~80%의 비율을 차지하고 있다. Casein 단백질의 종류는  $\alpha$ -casein,  $\beta$ -casein,  $\kappa$ -casein 등 여러 종류가 있으며, 돼지  $\beta$ -casein은 돼지 casein 단백질 중 24% 이상인 것으로 알려져 있다(Kauf 등, 2002). 이러한  $\beta$ -casein의 특성에 의하여 유즙을 통한 animal bio-reactor의 생산에는  $\beta$ -casein promoter가 주로 사용되고 있다(Ko 등, 2000; Brophy 등, 2003). 본 연구에서는 구축된 knock-in 백터는 생쥐 유선 세포인 HC11 세포에 도입하였을 경우, 안정적으로 EGFP가 발현됨을 확인하였다. 이러한 결과는 knock-in 백터의 5' arm에는 약 3 kb의 promoter 영역을 가지고 있기 때문에 기본적인 전사에 의하여 EGFP가 발현하고 있는 것으로 생각된다. 그리고 이와 같은 결과는 goat  $\beta$ -casein 유전자 영역을 이용하여 GFP가 발현될 수 있는 백터를 구축하고 knock-in된 체세포가 확보된 것으로 보고되고 있으며(Shen 등, 2005), 이들 체세포는 안정적으로 GFP를 발현한다는 보고와 일치하는 결과이다. 또한 Shen 등(2007)이 goat  $\beta$ -casein 유전자 영역을 이용하여 사람 tissue plasminogen activator mutant가 발현될 수 있는 knock-in 백터를 구축하고 체세포에 도입한 후 상동유전자 재조합이 일어난 knock-in된 세포를 얻었다고 하였다. 이 체세포를 이용하여 복제 수정란을 생산하였을 때 안정적으로 GFP가 발현하고 있음을 보고하고 있다. 특히 이들은 positive selection marker는 neo 유전자를 사용하였으나, negative selection marker로는 thymidine kinase 유전자를 사용하고 있다. 그리고 이들 세포를 이용하여 복제

수정란을 600개를 생산하여 146개의 수정란을 16마리의 산자에 이식한 결과 3마리의 대리모가 임신 90일째까지 임신이 유지되고 있음을 보고하고 있다(Shen 등, 2007).

따라서 본 연구에서 구축된 EGFP 발현 knock-in 벡터는 돼지 체세포에 도입하여 knock-in된 체세포를 선별하는데 이용될 수 있으며, knock-in된 체세포가 확보되면 이들 세포를 이용하여 EGFP가 유선에서 안정적으로 발현하는 복제 형질전환 돼지를 생산할 수 있을 것으로 사료된다. 또한, 고가의 의약품 생산을 위해서 특정한 유전자를 knock-in 벡터에 삽입하여 복제 동물을 생산한다면 복제된 돼지의 유즙에서 안정적이며 다량의 의약품이 생산될 것으로 기대된다.

## 인용문헌

- Brophy B, Smolenski G, Wheeler T, Wells D, L'Huillier P, Laible G (2003): Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. *Nat Biotechnol* 21:157-162.
- Chan AW (1999): Transgenic animals: current and alternative strategies. *Cloning* 1:25-46.
- Clark AJ, Burl S, Denning C, Dickinson P (2000): Gene targeting in livestock: a preview. *Transgenic Res* 9:263-275.
- Dai Y, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, Monahan JA, Jobst PM, McCreath KJ, Lamborn AE, Cowell-Lucero JL, Wells KD, Colman A, Polejaeva IA, Ayares DL (2002): Targeted disruption of the alpha 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol* 20:251-255.
- Hamanaka H, Katoh-Fukui Y, Suzuki K, Kobayashi M, Suzuki R, Motegi Y, Nakahara Y, Takeshita A, Kawai M, Ishiguro K, Yokoyama M, Fujita SC (2000): Altered cholesterol metabolism in human apolipoprotein E4 knock-in mice. *Hum Mol Genet* 9:353-361.
- Houdebine LM (2000): Transgenic animal bioreactors. *Transgenic Res* 9:305-320.
- Houdebine LM, Attal J, Vilotte JL (2002): Vector design for transgene expression. In: Pinkert CA. *Transgenic Animal Technology*. 2nd ed. Academic press, California, USA, pp 420-458.
- Kauf AC, Kensinger RS (2002): Purification of porcine beta-casein, N-terminal sequence, quantification in mastitic milk. *J Anim Sci* 80:1863-1870.
- Ko JH, Lee CS, Kim KH, Pang MG, Koo JS, Fang N, Koo DB, Oh KB, Youn WS, ZhengGD, Park JS, Kim SJ, Han YM, Choi IY, Lim J, Shin ST, Jin SW, Lee KK, Yoo OJ (2000): Production of biologically active human granulocyte colony stimulating factor in the milk of transgenic goat. *Transgenic Res* 9:215-222.
- Kumar S, Clarke AR, Hooper ML, Horne DS, Law AJ, Leaver J, Springbett A, Stevenson E, Simons JP (1994): Milk composition and lactation of beta-casein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6138-6142.
- Li L, Shen W, Pan QY, Min LJ, Sun YJ, Fang YW, Deng JX, Pan QJ (2006): Nuclear transfer of goat somatic cells transgenic for human lactoferrin. *Yi Chuan* 28:1513-1519.
- Richa J, Lo CW (1989): Introduction of human DNA into mouse eggs by injection of dissected chromosome fragments. *Science* 245:175-177.
- Rodriguez A, Castro FO, Aguilar A, Ramos B, Del Barco DG, Lleonart R, De laFuente J (1995): Expression of active human erythropoietin in the mammary gland of lactating transgenic mice and rabbits. *Biol Res* 28:141-153.
- Shen W, Min LJ, Li L, Pan QJ, Wu XJ, Zhou YR, Deng JX (2005): High-efficient gene targeting of goat mammary epithelium cell by the multi-selection mechanism. *Yi Chuan Xue Bao* 32:366-371.
- Shen W, Lan G, Yang X, Li L, Min L, Yang Z, Tian L, Wu X, Sun Y, Chen H, Tan J, Deng J, Pan Q (2007): Targeting the exogenous htpAm gene on goat somatic cell beta-casein locus for transgenic goat production. *Mol Reprod Dev* 74:428-434.
- Thomas KR, Capecchi MR (1987): Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51:503-512.
- Van Cott KE, Butler SP, Russell CG, Subramanian A, Lubon H, Gwazdauskas FC, Knight J, Drohan WN, Velandar WH (1999): Transgenic pigs as bioreactors: a comparison of gamma-carboxylation of glutamic acid in recombinant human protein C and factor IX by the mammary gland. *Genet Anal* 15:155-160.
- Wang B, Zhou J (2003): Specific genetic modifications of domestic animals by gene targeting and animal cloning. *Reprod Biol Endocrinol* 1:103.
- Wolf E, Schernthaner W, Zakhartchenko V, Prella K, Stojkovic M, Brem G (2000): Transgenic technology in farm animals-progress and perspectives. *Exp Physiol* 85:615-625.
- Yanagawa Y, Kobayashi T, Ohnishi M, Kobayashi T, Tamura S, Tsuzuki T, Sanbo M, Yagi T, Tashiro F, Miyazaki J (1999): Enrichment and efficient screening of ES cells containing a targeted mutation: the use of DT-A gene with the polyadenylation signal as a negative selection maker. *Transgenic Res* 8:215-221.
- Yu HQ, Li ZG, Liu HR, Wu GX, Cheng GX (2004): Expression of goat beta-casein gene targeting vector in mammary gland cell. *Sheng Wu Gong, Cheng Xue Bao* 20:21-24.

(접수일자: 2008. 9. 5 / 채택일자: 2008. 9. 12)