

## Construction of Transgenic Silkworms Expressing Human Stem Cell Factor (hSCF)

Sung Wan Kim<sup>1</sup>, Eun Young Yun<sup>1</sup>, Seong Ryul Kim<sup>1</sup>, Seung Won Park<sup>1</sup>, Seok Woo Kang<sup>1</sup>, O-Yu Kwon<sup>2</sup> and Tae Won Goo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Agricultural Biology, NAAS, RDA, Suwon 441-100, Korea

<sup>2</sup>College of Medicine, Chungnam National University, Tajeon 301-131, Korea

Received October 14, 2011 / Revised November 28, 2011 / Accepted December 2, 2011

Human Stem Cell Factor (hSCF) is a cytokine that binds to the c-Kit receptor and plays an important role in hematopoiesis, spermatogenesis, and melanogenesis. To produce the human Stem Cell Factor (hSCF) recombinant protein, we constructed a germline transgenic silkworm using the piggyback vector. The expression of the hSCF gene was driven by the *Drosophila* heat shock protein 70 (dHsp70) promoter. 3XP3 promoter-driven EGFP was used as a marker which allowed us to rapidly distinguish the transgenic silkworm. A mixture of the donor and helper vector was micro-injected into 1,020 eggs of bivoltin silkworms, Keomokjam. We obtained approximately 22 G1 broods that were EGFP-positive. The expression of the hSCF gene in the transgenic silkworm was analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. Also, analysis of insertion sites into the silkworm genome using inverse PCR showed that exogenous DNA was inserted into the transgenic silkworm genome. These results show that successfully constructed transgenic silkworm expresses the hSCF recombinant protein.

**Key words** : Stem cell factor (SCF), transgenic silkworm, piggyback, EGFP, *Bombyx mori*

### 서 론

5000년 전 중국에서 처음으로 실크가 발견된 이후, 누에는 인간에 의해 수 천 년 간 사육되었으며, 섬유와 식품 및 기타 산업 소재로 사용되어 왔다. 최근에는 이러한 누에가 학문적, 산업적으로 주목 받고 있는데, 그 중에서도 형질전환 기술을 이용하여 유전자의 기능분석과 재조합단백질을 대량생산하는 연구는 기존의 실크 생산에만 사용되던 누에를 새로운 산업자원으로 사용할 수 있게 되었다. 최초의 누에 형질전환 실험은 1971년 일본의 Nawa에 의해 이루어졌으며 흑란계통의 계놈을 백란계통의 알에 주입하여 흑란계통의 누에를 얻는 실험이었다[7]. 이후 오랜 기간 동안 누에 형질전환을 위한 많은 시도가 있었는데, 수정전후의 누에알에 DNA를 직접 주사하거나, 초파리 열충격(heat shock) 단백질과 누에 액틴(actin) 유전자 프로모터를 이용하여 Chloramphenicol acetyltransferase 또는  $\beta$ -galactosidase 리포터 유전자를 발현시키는 실험이었다[2]. 그러나 주사된 DNA가 급속히 분해되거나 주사 방법의 불편함 등 많은 문제점이 있었다. 또한 1995년 Mori 등은 AcNPV를 이용하여 형질전환 실험을 하였는데, 초파리의 열충격단백질 유전자(hsp70)의 프로모터와 반딧불이의 luciferase 유전자를 이용하여 재조합바이러스를 제작하였다. 이 재조합 배큘로바이러스(baculovirus)를 5령 초기 누에에 접종하고 유충과 번데기 및 차세대 유충에서 표지유전자

발현을 검정하였다. 그 결과, 차세대 부화 유충과 G3 세대에서 luciferase 발현과 바이러스 유래 유전자의 존재를 확인함으로써 AcNPV를 누에 형질전환에 이용할 수 있다는 가능성을 제시하였다[5]. 한편, 1998년 Yamao 등은 누에 경쇄(L-chain) 피브로인 유전자의 7번째 엑손 부위에 표지유전자인 Green Fluorescent Protein (GFP)를 삽입시키는 재조합 AcNPV를 제작하였고, 누에 5령 유충에 접종한 후 차세대 알과 유충에서 GFP 유전자의 전이와 발현 검정을 통해 형질전환 된 누에를 선발하였다. 비록 G2 세대를 얻기까지 형질전환률이 약 0.16%로 상당히 낮지만 누에에 있어서 최초의 유전자 표적 형질전환이었다. 그리고 F3 세대간의 교잡을 통해 형질전환 된 GFP 유전자의 유전양식과 분리비를 조사한 결과에서 1:1의 분리비를 확인함으로써 멘델의 법칙에 따라 GFP 유전자가 유전하며 염색체에 안정적으로 존재하고 있음을 확인하였다[14]. 2000년에 접어들면서 일본의 Tamura 등은 piggyBac 유전자를 이용하여 누에 형질전환에 성공하였다[10]. 이 실험은 BmA3 프로모터에 표지유전자인 GFP로 제작한 전이벡터와 transposase를 발현시키는 helper 플라스미드를 제작하여 누에 초기배에 미세주사 하였고 부화유충과 차세대 개체의 GFP 발현 유무로 형질전환체를 검정하였다. 그 결과 G1세대에서 GFP 발현을 확인할 수 있었고, Southern blot 분석으로 유전자 전이를 분석한 결과에서 누에 염색체 내에 1-3 copy의 GFP 유전자가 확인되었다. 또한, Inverse PCR 분석으로 염색체 내에 전이벡터 유래의 말단 역배열 염기인 TTAA 서열이 확인됨에 따라 piggyBac에 의한 유전자 전이가 일어났음이 확인되었다. 이러한 Tamura의 실험 이후 많은 누에 형질전환 실험에서

#### \*Corresponding author

Tel : +82-31-290-8532, Fax : +82-31-290-8503

E-mail : gootw@korea.kr



GTGAGGATTCT-3' (25 mer)을 사용하였다. 3' 접합부위를 증폭하기 위해서 sense primer는 5'-TACGCATGATTATCTT TAACGTA-3' (23 mer)을 사용하였고, antisense primer는 5'-GGGGTCCGTCAAAACAAAACATC-3' (23 mer)을 사용하였다. 증폭된 DNA 절편은 pGEM-T easy벡터(Promega Co.)에 클로닝하여 ABI Prism 377 DNA sequence (Perkin Elmer Co.)를 이용하여 유전자서열을 분석하였다.

Western blot 분석

선발된 G2세대의 5령 기잡 누에에 lysis buffer [100 mM sodium citrate, pH 8.0, 100 mM KCl, 2 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol (DTT), 20 mg/l phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)]를 첨가하고 Homogenizer를 이용하여 누에를 파쇄하였다. 그리고 4°C에서 10,000x g의 속도로 15분간 원심 분리 후 상층액만을 분리하여 2x protein sample buffer [Tricine sample buffer ; 0.1 M Tris-Cl/SDS, 24% glycerol, 8% SDS, 0.2 M DTT, 0.02% Coomassie blue G-250]와 동량으로 혼합하였고, 100°C에서 5분간 가열하여 시료를 준비하였다.

이렇게 준비된 시료는 12% SDS-PAGE에서 전기영동 후 Semiphore transfer unit (Hoefer, TE-70)를 이용하여 PVDF membrane (Amersham Co., U.S.A.)에 transfer하였다. 비특이적인 반응을 막기 위해 5% skim milk로 2시간 동안 blocking 한 후, TBS-T 완충액(10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)으로 5분간 2회 세척(washing)하였다. 세척 후 blocking 용액에 1차 항체 (primary antibody)를 적정량 희석해서 넣어주고 상온에서 5시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 TBS-T 완충액으로 상온에서 10분간 5회 세척하고 HRP (horseradish peroxidase)로 표지된 2차 항체(secondary anti-

body)를 희석해서 첨가하고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 TBS-T로 상온에서 10분간 5회 세척한 후, 3M Paper에서 PVDF membrane에 남아 있는 물기를 제거하였다. ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences., USA)를 사용하여 PVDF membrane을 상온에서 5분간 반응시킨 후, X-ray film에 노출시킨 후 현상하여 확인하였다.

결 과

형질전환용 전이벡터 제작

hSCF 재조합 단백질이 발현되는 형질전환 누에를 제작하기 위해 piggyBac 벡터를 이용하여 전이벡터를 구축하였다. 형질 전환체를 선발하기 위한 마커 유전자로는 EGFP를 사용하였고, 이 유전자의 조절 프로모터로는 3xP3 promoter를 사용하였다. hSCF 유전자의 발현조절에는 초파리의 Heat shock 70 promoter (dHsp70 promoter)를 사용하였으며[13], 이러한 과정을 통해 형질전환 전이벡터인 pG-3xP3-EGFP-dHsp70-hSCF를 제작하였다(Fig. 1A).

형광현미경으로 누에형질전환체 선발

누에형질전환체 제작을 위한 누에 초기배로의 microinjection은 배아의 주공과 후부 사이의 가운데 배면 부분에 injection 하였고, 총 1,020개의 누에알을 microinjection 하였다. 그 결과 241 (23.6%) 마리의 유충이 부화되었고, 그 중 124 마리(12.1%)가 성충이 되었다. 성충이 된 나방들은 서로 교배시켜 G1세대를 얻은 후, 형질전환체의 선발을 위해 시기별로 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 누에알은 산란 후 5일

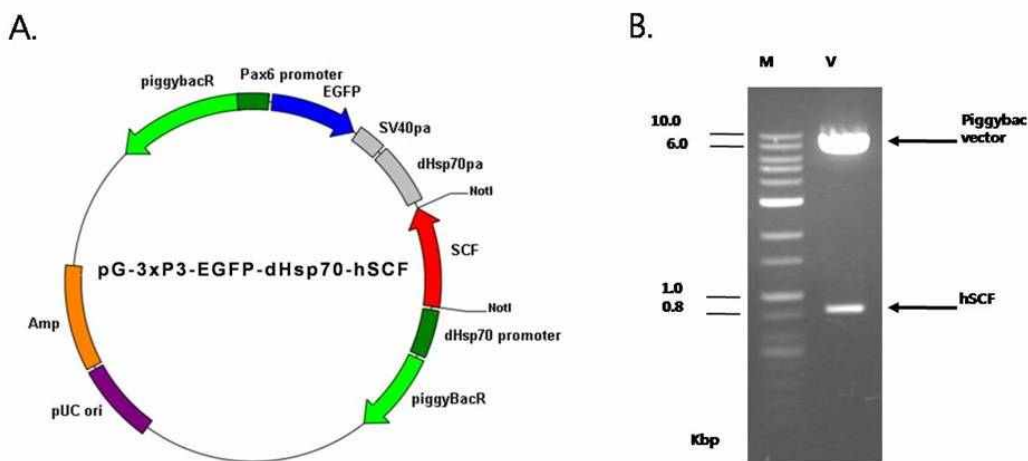


Fig. 1. Construction of the transfer vector pG-3xP3-EGFP-dHsp70-hSCF. (A) The PCR product for ORF flanked by Not I/Not I site was inserted into pGEM-T vector. The pGEM-T-hSCF was digested with Not I/Not I and then DNA fragment was subcloned into the Not I/Not I site on piggyBac (pG-3xP3-EGFP-dHsp70-hSCF). (B) M, 1 kb DNA marker; V, The pG-3xP3-EGFP-dHsp70-hSCF was digested with Not I/Not I.

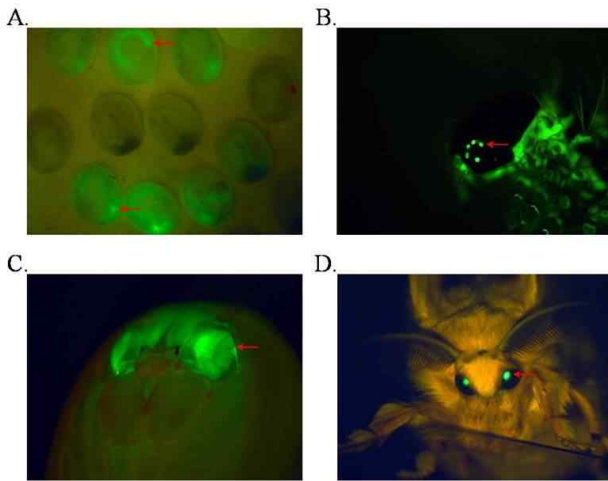


Fig. 2. GFP expression in transgenic silkworms. (A) GFP were expressed in the eyes and the abdominal nervous system of seven days old G1 embryo. Arrows point to eyes and nervous system in panel. (B) GFP was expressed in the eyes of a G1 11th instar larvae. (C) and (D) Fluorescent images of pupa and Moth. Arrows point to eyes in panel B, C and D.

째에 눈과 신경조직에서 형광이 관찰되었고, 유충과 번데기, 성충은 눈에서 형광이 각각 관찰되었다(Fig. 2). 이런 과정을 통해 G1세대에서 22 개체의 형질전환체를 선발할 수 있었다 (Table 1).

Western blot으로 hSCF재조합단백질의 발현 분석

선발된 형질전환체들은 서로 교배시 G2 세대의 형질전환체를 얻었고, hSCF 재조합단백질의 발현을 분석하기 위해 Western blot을 하였다. 분석에는 G2세대의 5령 1일째 누에를 사용하였고, 사용된 항체는 Anti-SCF rabbit monoclonal antibody (UK, Abcam)를 사용하였다. 그 결과 hSCF재조합단백질의 예상 위치인 약 30.9 kDa 에서 밴드를 확인할 수 있었

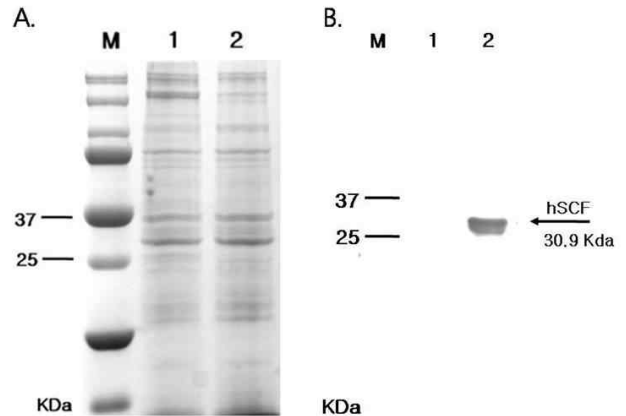


Fig. 3. Analysis of the recombinant protein expression by SDS-PAGE and Western blot. (A) The protein samples were subjected to 12% SDS-PAGE. (B) The protein samples were transferred PVDF membrane and incubated with the anti-hSCF antibody. M, molecular mass standard; 1, wild type 5th instar larva; 2, transgenic 5th instar larva with pG-3xP3-EGFP-dHsp70-hSCF.

다(Fig. 3B).

Inverse PCR

Inverse PCR을 이용하여 형질전환체의 게놈에 전이벡터가 삽입되어 있는지를 분석하였고, 3' junction 영역에서 2개의 서열을 확인 할 수 있었다(Table 2). 그 중 1개의 서열은 silkworm genome research program (<http://sgp.dna.affrc.go.jp>) 분석에서 Chromosome 15 (14175331- 14175380)에 삽입되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

고 찰

약 5,000년 전부터 사육되기 시작한 누에는 대량사육이 쉽고, 인공사료에 의한 사육이 가능하며, 인간 또는 가축 간에

Table 1. Transgenic rate of the construct DNA to Keomokjam embryos

Vector	Injected Embryos	Hatched Embryos	G0 moths	G1 EGFP positive
pG-3XP3-EGFP-dHsp70-hSCF	1020	241 (23.6%)	124 (12.1%)	22 (2.1%)

Table 2. Identification of the genomic insertion of the pG-3xP3-EGFP-dHsp70-hSCF vector in G2 transgenic silkworm genome by inverse PCR

No.	3' Junction sequence
1	Piggyback-TTAAAGGCAGTGTCTTATCAGGCTATTATATTGATGTTCCAAATGGTGG GTAATTTCAAAGCAAATACATACTTATAGCATGCACTATCAGATTCCACAATAAGAGG
2	Piggyback-TTAAGTACGTGTGTCCGCTCTCCCGTGTATTGACTGGCATCAATGGT GGCGT

Insertion length means the length of genomic DNA between the Sau3A I site and the 3' insert boundaries of the vector. TTAA duplicated sequences appearing at 3' insert boundaries are in underline.

공통 병원균이 존재하지 않는 등의 장점을 가지고 있다. 최근에는 이러한 장점으로 재조합 단백질 생산을 위한 생체반응장치(Bioreactor)로 누에를 이용하는 연구가 진행되고 있다. 본 실험은 형질전환 누에를 이용하여 인체에 유용한 재조합 단백질을 생산하기 위한 연구의 일환으로, 초파리 형질전환에 널리 사용되는 piggyBac 전이벡터에 초파리 유래의 promoter인 *Drosophila* heat shock protein 70 (dHsp70) promoter와 3xP3 promoter를 사용하여 누에형질전환 전이벡터와 형질전환 누에를 제작하였다. dHsp70 promoter는 이미 누에에서 열충격에 의해 재조합단백질의 발현을 조절할 수 있다고 알려져 있다[13]. 따라서 dHsp70 promoter에 의해 hSCF재조합단백질의 발현이 조절됨으로써, 열충격의 유무에 따라 누에 생육에 미치는 영향을 최소화 시키거나 재조합단백질의 발현을 최대화 할 수 있도록 하였다. 또한 EGFP marker의 발현 조절을 위해 사용된 3xP3 promoter는 초파리의 눈과 신경조직에서 작용하는 것으로 알려져 있는데, 누에의 초기배 단계에서도 눈과 신경조직에서 작용하고, 유충과 번데기, 성충에서는 눈에서 작용한다고 알려져 있다[11]. 그리고, 이 프로모터의 사용으로 부화 후 5일째 되는 초기배 단계에서 형질전환체를 선발할 수 있었다. 누에알에 전이벡터를 주입하는 것은 2000년 Tamura 등이 사용한 microinjection 법을 참고하여 실험하였는데, 누에 초기배로의 microinjection은 배아의 주공과 후부사이의 가운데 배면 부분에 주사됨으로써 형질전환 효율을 향상시킬 수 있었다. 또한, 형질전환에 사용된 누에 품종인 금옥잠은 잠125와 잠140의 교잡종으로서 일반 원종에 비해 누에알이 크고, 인공사료에 의한 연중 사육이 가능하며, 월년종의 특징인 염산처리에 의해 부화된다. 그러므로 선발된 누에형질전환체를 장기간 보관 할 수 있으며, 일반농가에도 보급하여 대량사육을 할 수 있는 장점을 가지고 있다. 본 연구에서 형질전환 효율은 1020 개의 누에알에 microinjection하여 241(23.6%)마리의 유충이 부화되었고, 그 중에서 124마리(12.1%) 만이 성충이 되었다. 또한 성충들을 서로 교배시켜 G1 세대의 알을 얻었고, 그 중에서 22 bloods (21%) 만이 형질전환체로 선발되었다. 또한 선발된 누에형질전환체에서 hSCF 재조합단백질의 발현은 Western blot을 사용하여 분석하였는데, 분석에 사용된 누에는 G2세대의 5령 1일째 유충을 이용하였다. 항체는 Anti-His-taq antibody와 Anti-SCF antibody를 사용하였다. 본 논문에서는 Anti-His-taq antibody를 사용하여 얻은 결과를 보여주지 못했지만 Anti-SCF antibody를 사용한 것과 동일한 30.9kDa에서 밴드를 확인 할 수 있었다. 또한 Fig. 2에서 확인된 EGFP 형광단백질도 Anti-EGFP antibody로 Western blot을 통해 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 마지막으로, inverse PCR 분석을 통해 3'영역에서 2개의 서열을 얻을 수 있었다. 비록 5'영역의 서열을 얻을 수는 없었지만, 서열분석을 통해서 누에게놈의 Chromosome 15 (14175331-14175380)번 위치에 전이벡터가 삽입된 것을 확인할 수 있었

다. 이상의 결과에서 hSCF재조합단백질을 생산하는 누에형질전환체가 성공적으로 제작 되었음을 확인할 수 있었고, 이러한 결과는 재조합 단백질 대량생산 연구에 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 논문은 농림부 농림기술개발사업의 지원(307003-03-1-HD140)에 의하여 이루어진 결과의 일부입니다.

## References

1. Ali, S. 2007. Role of c-kit/SCF in cause and treatment of gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Gene* **401**, 38-45.
2. Chkoniiia, T. T., A. I. Nikolaev, and K. A. Kafiani-Eristavi. 1991. Restriction analysis of autonomously replicating molecules containing exogenous DNA in a transgenic silkworm line. *Mol. Biol. (Mosk)*. **25**, 1427-1436.
3. Fraser, M. J., T. Ciszczon, T. Elick, and C. Bauser. 1996. Precise excision of TTAA-specific lepidopteran transposons piggyBac (IFP2) and tagalong (TFP3) from the baculovirus genome in cell lines from two species of Lepidoptera. *Insect Mol. Biol.* **5**, 141-151.
4. Imamura, M., J. Nakai, S. Inoue, G. X. Quan, T. Kanda, and T. Tamura. 2003. Targeted gene expression using the GAL4/UAS system in the silkworm *Bombyx mori*. *Genetics* **165**, 1329-1340.
5. Mori, H., M. Yamao, H. Nakazawa, Y. Sugahara, N. Shirai, F. Matsubara, M. Sumida, and T. Imamura. 1995. Transovarian transmission of a foreign gene in the silkworm, *Bombyx mori*, by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Biotechnology (NY)* **13**, 1005-1007.
6. Nagaraju, J. G. and L. Singh. 1997. Assessment of genetic diversity by DNA profiling and its significance in silkworm, *Bombyx mori*. *Electrophoresis* **18**, 1676-1681.
7. Nawa, S., B. Sakaguchi, M. A. Yamada, and M. Tsujita. 1971. Hereditary change in *Bombyx* after treatment with DNA. *Genetics* **67**, 221-234.
8. Seo, N. S., J. R. Hollister, and D. L. Jarvis. 2001. Mammalian glycosyltransferase expression allows sialoglycoprotein production by baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr. Purif.* **22**, 234-241.
9. Tamura, T., T. Kanda, S. Takiya, K. Okano, and H. Maekawa. 1990. Transient expression of chimeric CAT genes injected into early embryos of the domesticated silkworm *Bombyx mori*. *Jpn J. Genet.* **65**, 401-410.
10. Tamura, T., C. Thibert, C. Royer, T. Kanda, E. Abraham, M. Kamba, N. Komoto, J. L. Thomas, B. Mauchamp, G. Chavancy, P. Shirk, M. Fraser, J. C. Prudhomme, and P. Couble. 2000. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nat. Biotechnol.* **18**, 81-84.
11. Thomas, J. L., M. Da Rocha, A. Besse, B. Mauchamp, and

- G. Chavancy. 2002. 3xP3-EGFP marker facilitates screening for transgenic silkworm *Bombyx mori* L. from the embryonic stage onwards. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**, 247-253.
12. Tomita, M., H. Munetsuna, T. Sato, T. Adachi, R. Hino, M. Hayashi, K. Shimizu, N. Nakamura, T. Tamura, and K. Yoshizato. 2003. Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nat. Biotechnol.* **21**, 52-56.
13. Uhlirva, M., M. Asahina, L. M. Riddiford, and M. Jindra. 2002. Heat-inducible transgenic expression in the silkworm *Bombyx mori*. *Dev. Genes Evol.* **212**, 145-151.
14. Yamao, M., N. Katayama, H. Nakazawa, M. Yamakawa, Y. Hayashi, S. Hara, K. Kamei, and H. Mori. 1999. Gene targeting in the silkworm by use of a baculovirus. *Genes Dev.* **13**, 511-516.

---

초록 : 인간 유래 Stem Cell Factor (hSCF) 재조합단백질이 발현되는 누에형질전환체 제작

김성원<sup>1</sup> · 윤은영<sup>1</sup> · 김성렬<sup>1</sup> · 박승원<sup>1</sup> · 강석우<sup>1</sup> · 권오유<sup>2</sup> · 구태원<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>국립농업과학원 잠사양봉소재과, <sup>2</sup>충남대학교 의과대학 해부학과)

본 연구의 목적은 누에형질전환체를 이용하여 재조합단백질 대량생산 시스템을 개발하는 것으로서, 본 실험에서는 hSCF 유전자를 이용하여 누에에서 재조합단백질을 생산하였다. 실험에 사용된 piggyBac 전이벡터는 hSCF 유전자의 발현 조절을 위해 초파리 유래의 dHsp70 promoter를 사용하였고, EGFP marker 유전자는 3xP3 promoter로 발현을 조절하였다. 총 1,020 개의 누에알에 microinjection 하여 G1 세대에서 22 bloods의 형질전환체를 선발하였고, 선발된 누에형질전환체는 초기배 단계의 눈과 신경조직, 유충과 번데기 그리고 성충의 눈에서 GFP 형광을 관찰 할 수 있었다. hSCF 재조합단백질의 발현은 Western blot 분석으로 확인 할 수 있었고, inverse PCR 분석을 통해서 누에 계놈에 전이벡터가 삽입된 것을 확인할 수 있었다. 지금까지의 실험 결과에서 hSCF 재조합단백질이 누에에서 생산될 수 있음을 확인 할 수 있었다. 비록 누에에서 생산된 hSCF 재조합단백질의 생리활성에 대한 실험이 추후에 요구되지만, 이러한 실험결과는 piggyBac 전이벡터와 microinjection 법으로 누에에서 고부가가치의 재조합단백질을 대량생산 할 수 있음을 보여 주었다고 할 수 있겠다. 따라서 누에를 유용물질 생산을 위한 생체반응기로서 활용할 수 있을 것으로 기대된다.