

BSG70390-422-4

Transgenic 동물생산 기법에 의한 포유동물 유즙의 성분 조절에 관한 연구

Alteration of Milk components in Transgenic Animals

연 구 기 관
한국과학기술연구원
부설유전공학연구소

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처 장관 귀하

본 보고서를 "Transgenic 동물생산 기법에 의한 포유동물 유즙의 성분 조절에 관한 연구" 사업의 년차보고서로 제출합니다.

1992. 6

주관연구기관 : 한국과학기술연구원 유전공학연구소

연구책임자 : 유 대열 (한국과학기술연구원 유전공학연구소 선임연구원)

연 구 원	: 이 경광 ("	책임연구원)
	한 용만 ("	선임연구원)
	이 철상 ("	연 구 원)
	강 만종 ("	연 구 원)
	조 용연 ("	위촉연구원)
	박 윤호 ("	위촉연구원)
	민 성란 ("	위촉연구원)
	정 경희 ("	위촉연구원)
	이 창호 ("	위촉연구원)
	이 상춘 ("	위촉연구원)
	한 윤정 ("	위촉연구원)
	김 희식 ("	위촉연구원)
	박 정선 ("	위촉기능원)
	윤 창연 ("	위촉기능원)

요 약 문

I . 제 목

Transgenic 동물생산 기법에 의한 포유동물 유즙의 성분 조절에 관한 연구

II . 연구개발의 목적 및 중요성

락토페린은 유즙에 존재하는 철이 결합된 단백질로써, 모유 중에 비교적 많으며 (모유 1리터당 1.7g, 우유 1리터당 0.02g이하), 박테리아 감염에 대한 저항성을 길러주고, 특히 대장 내에서 이 작용이 강하다고 알려져 큰 관심을 불러 일으키는 단백질이다. 항균성이 있으므로 유아 또는 송아지의 설사방지나 발육향상에 효과가 있고, B-림프구의 증식촉진 및 백혈구 생산 억제기능도 가지고 있다. 락토페린은 소화효소에 의해 분해되면 락토페리신이라는 물질이 되는데, 이 물질은 식중독의 원인균인 리스테리아와 병원성 대장균을 1시간 이내에 99.99% 사멸시키며, Salmonella, Candida, Campylobacter등과 같은 미생물에 대해서도 항생물질에 뒤지지 않는 살균작용을 보였고, Bifidus균 같은 유익한 장내세균에는 작용하지 않음이 보고되어있다. 이처럼 락토페린은 유아 또는 송아지의 건강에 중요한 역할을 다하고 있으므로, 락토페린을 대량생산할 수 있는 길을 모색하는데 많은 연구자가 관심을 갖고 있다.

1970년도 후반부터 시작된 유전공학 기법의 비약적인 발전에 따라 인체 또는 가축에 미량으로 밖에 생산되고 있지 않은 각종 생리활성물질을 대량으로 생산할 수 있는 길이 열렸다. 이들 생리활성물질의 생산은, 처음에는 대장균, 효모등과 같은 미생물을 숙주로 하여 이루어졌으나, 본래 동물세포에서 생산되고 있던 단백질을 대장균과 같은 하등생물에서 생산한다는 것은 몇가지 문제점이 있음을 알게되었다. 즉 대장균은 단백질을 생산 분비시키는 각종 시스템이 없으므로 순수정제가 어려워, 불필요한 단백질이 남게 되는데 이에 따라 각종 부작용이 일어나는 경우가 많다. 또한 당쇄를 추가하는 작용이 미생물에는 없기 때문에, 당쇄가 단백질의 생리활성에 중요한 역할을 하는 경우, 본래의 생리활성을 기대할 수 없다. 이러한 문제점을 해결할 수 있는 방법은 동물세포를 숙주로 이용하여 대량생산하는 방법인데, 이방법을 이용하여 당쇄의 첨가 및 단백질의 분비생산이 가능하며, 미생물을 숙주로 이용할 경우의 문제점은 해결되었으나, 동물세포의 배양은 기술적인 면에서 대량생산, 기계화하기 어려운 면이 많이 있고, 생산수준이 낮으며, 배지가 비싸기 때문에 경제적으로 비현실적이다. 따라서 동물개체 자체를 숙주로 이용하여 생리활성물질을 대량생산하려는 움직임이 1987년부터 시작되고 있는데, 이는 형질전환동물 (transgenic animal)의 유선을 통해서 유즙과 함께 생리활성물질을 대량생산하는 방법으로 이미, 혈전증 치료제인 tPA(tissue Plasminogen Activator), 항암제인 IL-2, 혈액응고제인 FactorIX등을 생산하는 형질전환 생쥐, 토끼, 양이 개발되어 포유동물의 유선을 통해서 각종 인체 생리활성물질을 대량 생산할 수 있게 되었다.

락토페린은 우유 단백질 중 영양 단백질일 뿐만 아니라 항생물질 등과 같은 천연적인 생리활성작용을 지닌 단백질로써, 유전자에는 철 결합부위가

한군데 있고 또한 당쇄 첨가부위(N-glycosylation site)가 한군데 있어 미생물을 숙주로 이용하여 생산할 경우 미생물은 당쇄부가 및 철이 없는 형태로 락토페린을 분비할 수 없으므로, 생물활성이 갖춰진 락토페린을 얻는 것은 거의 불가능하다. 락토페린은 사람의 유선 상피세포에서 가장 많이 생산되고 있으므로, 사람의 유선과 동질성이 높은 소의 유선에서 락토페린을 생산한다면, 이는 모유에 함유되어 있는 락토페린과 동일한 생리활성을 나타낼 것이다. 소의 유선은 생물공학적 뿐만 아니라 분자생물학적으로 볼 때 락토페린을 철이 불포화되고 당쇄부가가 적절히 형성된 형태로 생산할 수 있는 이상적인 조직일 뿐만 아니라, 우유는 사람들이 늘 애용하는 식품이므로, 정제할 필요도 없이 그대로 이용할 수 있다. 따라서 락토페린과 같은 유용한 우유 단백질을 형질전환동물들을 숙주로 이용해 생산하는 것은 국민 건강차원 뿐만 아니라 낙농업 및 유가공업의 획기적인 발전에 크게 기여할 것으로 기대된다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

1. 사람 락토페린 cDNA의 클로닝 및 구조 결정

이미 보고된 사람 락토페린 cDNA의 3' sequence를 template로 이용하여 oligonucleotide DNA를 합성하고, 이를 probe로 사용하여, 사람 breast cDNA library (Clontech)로부터 lactoferrin cDNA 전체를 클로닝하고 제한효소지도를 작성하였다.

2. 미세주입을 위한 DNA의 준비

사람 락토페린을 유즙중에 생산하는 형질전환 생쥐(transgenic mouse)를 개발할 목적으로, 클로닝된 사람 락토페린 cDNA를 유선조직 특이적 발현벡터 pCS에 재조합하여 미세주입을 위한 DNA를 준비하였다.

3. 생쥐 수정란에 DNA 미세주입

재조합 유전자 pCShcLf를 미세주입을 위한 DNA로 준비하고, 교잡종(C57BL X DBA)의 자성으로 부터 수정란을 회수하여, 미세조작기(micromanipulator)를 이용해 수정란의 응성전핵에 미세주입하였다.

IV. 결과 및 활용에 관한 건의

1. 사람 락토페린 cDNA의 클로닝 및 구조결정

사람의 breast cDNA library (Clontech) 1.6×10^5 plaques를 90mm X 20mm 크기의 LB plate에 plating 한후 Benton Davis 방법에 따라 nitrocellulose filter에 phage를 옮겨 denature시켜 baking 한 다음 hybridization을 하였다. 이때 사용된 probe는 이미 영국의 M.J.Powell등이 1990년 Nucleic Acids Research에 보고한 human lactoferrin cDNA의 3'영역 sequence를 DNA 합성기로 합성하여 oligonucleotide (5'-CTTCCTGAGGAATTCACAGG-3')를 만들고, 이를 [γ - 32 P] ATP로 kination하여 labeling한 것이다. 1차 screening결과, 100개의 positive plaques를 얻어 같은 probe로 2차 screening을 하였다. 그 결과 30여개의 positive single 클론을 얻었다. 이것을 liquid culture 방법에 의해 phage DNA를 얻

어 제한효소로 소화시켜 전기영동하여 본 결과, 1.5kb 정도의 lactoferrin 이 클로닝되었음을 알 수 있었다. 그 다음에 클로닝된 클론이 정말 human lactoferrin cDNA의 일부분인지를 확인하기 위해 southern blot를 한 결과, 각 band와 hybrid함을 알 수 있어, lactoferrin이 클로닝됨에 틀림없었다. 다음에는 클로닝된 1.3kb lactoferrin DNA을 probe로 사용하여 human breast cDNA library를 다시 screening하였다. 그 결과 사람 lactoferrin cDNA 전체 길이를 포함하고 있는 클론(2.4kb)을 얻는데 성공하였다. 이 클론의 DNA를 각종 제한효소로 소화시키고 제한효소지도를 작성하였다.

2. 미세주입을 위한 DNA의 준비

사람 락토페린을 유즙중에 생산하는 형질전환 생쥐 (transgenic mouse) 를 개발하기 위해서, 클로닝된 사람 락토페린 cDNA 2.4kb를 Apal¹으로 소화시키고 2.2kb의 signal peptide와 poly adenylation 부위를 포함하는 DNA를 유선조직 특이적 발현벡터 pCS의 클로닝 부위인 ClaI에 subcloning하여 재조합 유전자(pCShcLf)를 만들고 제한효소 XhoI과 HpaI으로 linear form을 만들어 미세주입하기에 충분할 정도로 DNA를 정제하였다.

3. 생쥐수정란에 미세주입

정제된 재조합 유전자 DNA CShcLf를 교잡종 (C57BL X DBA)의 수정란에 미세주입 시키고 있는 중이다.

Summary

Human milk proteins have a specific function for infants, besides being a source of amino acids. Lactoferrin(Lf) is of particular interest from a scientific and a commercial point of view. Human milk contains much more lactoferrin than bovine milk. Both lactoferrin are similar in molecular weight, however different immunochemically and in carbohydrate compositions. Therefore supplying human lactoferrin will be necessary for humanizing cow milk. Production of functional hLf in micro-organism will be impossible as they are unable to secrete hLf in a glycosylated and iron-free form. Production in cell culture is economically impractical due to its low production levels compared to the large amounts required. So, new production system has been desired.

At present, transgenic animal, which is produced to secrete human proteins through mammary gland by gene manipulation and embryological technologies is expected to be the most favorable system until now. Therefore we are in the process of production of transgenic mouse secreting human lactoferrin in milk as a model system.

We cloned human lactoferrin cDNA and recombined it into the pCS expression vector designed to be expressed in mammary gland. From now on we are going to produce transgenic mice secreting human lactoferrin in milk.

CONTENTS

I. Introduction	13
1. Humanizing cow milk?	13
2. A new research for humanizing cow milk	15
References	16
II. Cloning of human lactoferrin cDNA and determination of its struction	17
1. Introduction	17
2. Materials and methods	20
3. Results and discussion	30
1) Cloning of human lactoferrin cDNA	30
2) Structure of human lactoferrin cDNA	40
References	41
III. Construction of recombinant DNA for inducing the expression in mammary gland	43
1. Introduction	43
2. Materials and methods	44
3. Results and Discussion	47
1) Construction of pCS vector	47
2) Recombination of human lactoferrin cDNA to pCS vector	48
3) Preparation of DNA for microinjection	50
4) Microinjection into mouse embryos	51
References	52

목 차

제 1장 총론	13
제 1절 모유화란?	13
제 2절 모유화를 위한 새로운 시도	15
참고문헌	16
제 2장 사람 락토페린 cDNA의 클로닝 구조결정	17
제 1절 서론	17
제 2절 재료 및 방법	20
제 3절 결과 및 고찰	30
1. 사람 락토페린 cDNA 클로닝	30
2. 사람 락토페린 cDNA의 구조	40
참고문헌	41
제 3장 유선조직 특이적발현을 유도하기 위한 재조합 유전자의 개발	43
제 1절 서론	43
제 2절 재료 및 방법	44
제 3절 결과 및 고찰	47
1. pCS vector의 construction	47
2. pCS vector에 사람 락토페린 cDNA 재조합	48
3. 미세주입을 위한 DNA의 준비	50
4. 생쥐 수정란에 미세주입	51
참고문헌	52

제 1장 총론

제 1절 모유화란?

젖은 어미가 자식에게 주는 사랑의 선물이며, 영양학적으로 볼때 지구상에 존재하는 가장 좋은 천연식품 중의 하나이다. 뿐만 아니라 젖에는 유아의 건강과 성장 발육에 필요불가결한 생체활성물질이 함유되어 있는 기능성 식품이다. 그러나 젖의 조성성분과 생물학적인 성질은 영양학적으로나 생리학적으로 각 포유동물의 발육에 적합하도록, 창조주가 매우 합리적으로 구성해 놓았기 때문에, 각 포유동물간의 젖의 성분조성이 서로 다르다. 실제로 각 동물의 젖의 함량과 젖먹이 동물의 발육상태에는 상관관계가 있는 것으로 나타나고 있다(1). 사람의 유아에게는 사람의 젖인 모유가 최상의 식품이다. 오늘날 식품공업의 발달에 힘입어, 유아가 이용할 수 있는 식품이 많이 개발되어 있지만, 어느 것도 모유만한 것이 없다. 그러나 여러가지 사정으로 유아에게 모유를 줄 수 없을 때에는 모유대신에 젖의 조성성분이 모유와 가장 가까운 소의 젖인 우유를 모유의 조성에 근접시켜, 즉 모유화하여 주지않으면 안된다. 우유란 서양 사람들이 연구 개발하여 오늘날 식품으로 중요한 위치를 차지하고 있으나, 우리나라에서도, 「삼국유사」에 우유를 보신용으로 이용한 기록이 있고, 「일본酪農史」에 고구려 사람 「福常」이 일본에서 우유 먹는 것을 지도했다는 기록(2)도 있을 정도로, 동·서 고금을 막론하고 많은 사람들이 이용해왔다. 이처럼 우유는 옛부터 성인의 영양식품일 뿐만 아니라, 유아에게는 모유대용 식품의 공급원이 되고 있다.

최근 선진각국을 중심으로 모유화에 관한 연구가 활발히 진행된 결과, 영양 측면에 있어서는 유아용 조제분유의 모유화가 상당한 수준으로 향상되었다. 그러나 젖이란 영양식품일 뿐아니라, 각종 생체활성물질을 지닌 기능성 식품으로, 사람의 젖에 함유되어 있는 물질은 우유 속에 함유되어 있는 물질과 비교하여 구조적으로는 유사하지만, 생체활성에 있어서 차이가 있음이 밝혀지고 있어, 이러한 생체활성물질을 모유화하는 것이 매우 중요한 연구 과제로 부상되고 있다.

모유와 우유의 단백질 성분 조성을 살펴보면 각성분 함량에 있어서 서로 큰 차이가 있다(3,4,5). 즉, 우유에는 카제인이 우유단백질의 80%를 차지하고 있으나, 모유에는 카제인의 함량이 모유단백질의 20% 정도이다. 우유에는 사람에게 allergen인 β -lactoglobulin이 3.6mg/ml 정도 함유되어 있으나, 모유에는 존재하고 있지 않다. 모유에는 lysozyme이 0.5mg/ml 정도 함유되어 있으나, 우유에는 거의 존재하고 있지 않다. 면역글로블린 중 유아에게 중요한 역할을 하는 IgA가 모유에는 우유보다 30여배 더 많이 함유되어 있다. 한편, 유아의 장 질환예방에 중요한 역할을 하는 Lactoferrin은 모유에 1.7mg/ml 함유되어 있으나, 우유에는 흔적정도의 극미량이 존재하고 있다.

이처럼 모유와 우유의 함량차가 큰 물질을 중심으로 모유화 작업이 우선 수행될 수 있을 것으로 생각된다.

제 2절 모유화를 위한 새로운 시도

앞에서 언급한 바와 같이 영양적인 측면에서는 식품공업의 발달로 모유화가 상당한 수준에 이르렀으나 생체활성 측면에서의 모유화 작업은 상당히 어려운 과제로 남아 있다. 그러나, 1980년도 후반부터 인체 또는 가축에 미량밖에 생산되고 있지 않는 각종 생리활성물질을 유전자 조작 및 발생공학 기법을 이용해 포유동물의 유즙 중에 대량생산할 수 있는 기법 즉, Animal Bioreactor란 새로운 생산시스템이 개발됨에 따라 우유 속에 거의 존재하지 않거나 극미량 존재하는 락토페린, 라이소자임 같은 생체활성물질을 사람의 유전자를 이용하여 포유동물의 유즙 중에서 대량생산할 수 있도록 하고자 하는 연구가 시작되어, 오늘날 좋은 결과가 얻어지고 있다. 즉, 영국 AFRC의 Simons팀이 1987년 염소의 β -lactoglobulin 유전자를 생쥐의 수정란에 미세주입시켜 transgenic 생쥐를 개발하여, transgenic 생쥐의 비유기 중 염소의 β -lactoglobulin이 유선조직 특이적으로 풍부하게 생쥐의 유선 중에 발현되고 있음을 보고함으로써(7), 포유동물의 유즙성분을 조절할 수 있다는 가능성을 제시하였고, 그 후 rat의 Whey acid protein(설치류의 젖에만 존재)이 돼지의 유즙 중에 다량 분비 생산되는 형질전환 돼지가 개발되었다고 보고되었다(8). 한편 네델란드의 Gene pharming Europe B.V 기업 연구소에서는 사람 락토페린 유전자가 젖소의 염색체 내에 삽입된 transgenic 소를 개발하였다고 1991년말에 보고하였다(9).

본 연구진은 수피생쥐의 개발 및 유즙 중에 사람성장호르몬을 생산하는 형질전환생쥐 개발을 통해 축적된 형질전환 생쥐를 생산함으로써 포유동물의 유즙성분을 조절할 수 있는 기반기술을 확립하고자 한다.

참고 문헌

1. 김영교, 전우민 (1983) Korean Dairy Technol. 3(1) : 45-55.
2. 김권철 (1987) Korean Dairy Technol. 5(1) : 38-46.
3. 山本高治郎 (1984) 母乳 岩波新書.
4. First, N.L. et al., (1991) 제2회 건국대학교 동물자원연구센터 국제심포지움 "Transgenic Animals": 9-32.
5. 祐川金次郎 (1989) Korean Dairy Technology. 7(1) : 1-5.
6. 이경광 등 (1991) 특정연구개발 사업의 연구보고서 "포유동물을 이용한 인체생리활성물질의 대량생산 모델 시스템 개발" BSN80231-314-4.
7. Simons, J.P., McClenagen, M., & Clark, A.J. (1987) Nature, 328, 530-532.
8. Wall, R.J., Pursel, V.G., Shamay, A., Mcknight, R.A., Pittius, C.W., and Hennighausen, L. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 1696-1700.
9. Krimpenfort, P., Rademakers, A., Eyestone, W., Schans, A.V.D, et al (1991) BIO/TECHNOLOGY 9, 844-847.

제 2장 사람락토페린 cDNA의 클로닝 및 구조결정

제 1절 서론

락토페린은 분자량이 80KD인 철 결합성 당단백질이다(1). 1분자당 2개의 철 결합부위를 갖고 있으며 그 반응은 가역적이고, 락토페린의 각종 활성의 발현에 관여하고 있다고 생각되고 있다. 그 당쇄는 mannose, galactose, N-acetylglucosamine, fructose, sialic acid로 구성되었고, 당 함량은 중성당 8.5%, 아미노당 2.7%이다(2). 소 락토페린의 등전점은 약 8이고(3), 사람 락토페린보다도 pH2정도 높다. transferrin이나 melanomas antigen p97과 같은 gene family에 속하며, 300-500만년 전에 유전자간의 중복에 의해 분리되어 있다(5). 락토페린의 고차구조에 대해서는 X선 해석결과, 2개의 은행잎을 약간 떨어뜨려 배열한 (라선축의 주위에 180°C 회전시켜, -25Å 떨어뜨림) 형태를 취하고 있는 것으로 보고되어 있다(4).

락토페린은 주로 포유동물의 유즙 중에 존재하고, 눈물, 침, 콧물, 담즙, 체장액, 정액등의 각종 분비액 및 호중구에도 검출되고 있다(6). 그러나, 동물종에 따라 그 함량에 큰 차이가 있으며, 모유 중에는 우유 중에 보다도 훨씬 많은 락토페린이 포함되어 있다(Table 1). 세균 감염등이 원인이 되는 유방염에 걸린 소의 우유 중에는 상유 중에 보다 많은 락토페린이 분비되고 또한 건유기(乾乳期)에 락토페린이 유방 안에 꽤 높은 농도로 분비된다(7). 이처럼 유방염이나 건유기에 락토페린 농도가 높은 것은, 락토페린에 의한 정균작용을 이용하여, 유선조직내의 병원균에 의한 감염을 억제하기 위한 것으로 생각되고 있다.

Table 1. Lactoferrin concentrations in human and bovine milk(g/liter)

human	colostral milk normal milk	6-8 2-4
bovine	colostral milk normal milk involved mammary gland mastitic milk	~1 0.02~0.35 1~8* 20~30** 1~8
	cheese whey	~0.06

* Early stage.

** After middle stage.

Table 2. Biological functions of lactoferrin

(a) Bacteriostatic effect
(b) Effects on phagocytic cell function
(c) Myelopoietic regulation
(d) Regulation of complement activation
(e) Effect on NK and ADCC activities
(f) Regulation of inflammatory reaction
(g) Stimulation of reduced lysozyme regeneration
(h) Stimulation or regression of iron-absorption in guts
(i) Anti-virus effects
(j) Biologically active fragments
(k) Control of rumen microorganisms

이와같은 락토페린의 생물활성을 Table 2에 정리해 보았다. 옛부터 알려져 있는 정균작용 외에도 각종 혈구세포와의 상호작용, 보체계의 조절작용, 감염부위에서의 염증제어 효과 및 장내에서의 철의 흡수촉진, 제어등이 알려져 왔다(3,6,8).

이상에서 살펴본 바와 같이 락토페린은 다양한 생리기능, 특히 화학전달물질로써의 기능을 살려 의약품으로써 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 정균작용을 이용하여 식품제조업에 이용될 수 있을 것으로 생각되지만, 현재는 유아용 조제분유의 모유화의 일환으로써 락토페린이 첨가된 제품 또는 포유기의 송아지 육성용 사료 첨가제등이 일본에서 시판되고 있을 정도다. 그러나, 락토페린 fragment에 각종 생리활성 peptide가 발견되고 있고, 기능성 식품으로의 응용 가능성이 기대되는 결과가 얻어지고 있으며, 반추동물의 사료첨가제로써의 효능도 확인되고 있고, 또한 철의 공급원으로써의 용도도 고려되고 있으며 그외도, 식품가공 공정중 천연적인 첨가제로써 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

이러한 락토페린을 식품 또는 의약품으로 사용하기 위해서는, 그것이 사람에게 대한 것이라면 당연히 사람의 락토페린을 사용하는 것이 최상이다. 현재, 우유 부산물이나 초유로부터 락토페린을 정제하여 유아용 조제분유에 첨가하고 있으나, 앞으로는 유전공학적 방법, 특히 그중에서도 Animal Bioreactor system을 이용하여 형질전환된 소의 우유 중에서 사람락토페린을 대량생산할 수 있는 기술 개발이 가장 효과적인 방법으로 생각되어, 사람락토페린 cDNA를 클로닝하고 구조를 해석하였으며 우선 모델시스템으로 형질전환 생쥐를 만들기 위해 pCS 벡터와 재조합 유전자를 만들었다.

제 2절 재료 및 방법

1. 실험 재료

가. library

human breast cDNA library(CLONTECH Lib,HL1061a)는 CLONTECH으로 부터 구입하여 사용하였다. 이 mRNA source는 well-differentiated tissue and lactational competence로 보이는 임신 8개월째의 여성의 mastectomy동안 excised된 adult breast tissue이다. 이때 5'stretch를 만들기 위해서 아주 짧은 RNA는 사용하지 않았으며, λ gt10의 EcoRI site에 cloning된 것이다.

나. bacterial host

C600Hf1(BNN102: Hf1 stands for high frequency of lysogenization)을 bacterial host로 사용하였다.

다. probe

한국 과학 기술 연구원에서 인위적으로 합성한 20mer의 oligo-nucleotide를 probe로 사용하였다. template sequence는 1990년 Nucleic Acid Research에 보고된 sequence를 사용하였다.

probe I : 5'- CTCCTGAGGAATTCACAGG-3'

라. chemicals and enzymes

제한 효소는 (주)제철화학, Boeringer Mannheim and New England Biolabs, Inc로부터 구입하여 사용하였고, deoxy NTP, DNA polymerase I 등은 Boeringer Mannheim으로부터, T4 polynucleotide kinase는 KOSCO로부터 구입하여 사용하였다. [γ - 32 P]ATP와 [α - 32 P]dCTP는 Amersham or New England Biolabs, Inc로 부터 구입하였으며, Trizma base, SDS, salmon sperm DNA(NA.salt-TypeIII)등은 Sigma에서 구입하였고, 기타 유기화합물 및 무기 화합물은 Junsei chemical Co Ltd(Japan), Wako chemical Co Ltd(Japan), 그리고 Merk사(Germany)로 부터 구입하여 사용하였다.

2. 실험방법

가. Libray screening

(1) plating bacteria의 준비

C600Hf1을 0.4%의 maltose가 포함된 10ml LB medium에서 밤샘동안 배양하여 full growth 상태의 bacteria를 이용하였다. 이때 bacteria의 수는 4×10^8 cell/ml 정도이다.

(2) Bacteriophage의 plating

90mm petri dish((주) 녹십자)에 LB medium(bacto-yeast extract:5g, bacto-trypton:10g, NaCl:10g, bacto-agar:15g/1l, adjust pH 7.0)을 부어 굳힌 다음, 37°C에서 적당히 건조시켜 사용하였다. 또한 이때 사용한

glass tube와 pipette도 멸균한 뒤 완전히 건조시키고, 사용하기 전 dry oven에서 따스하게 하여 사용하였으며, top agar(LB broth + 0.72% agarose)도 멸균한 뒤 50°C water bath에서 온도를 유지하였다. 먼저 plating bacteria 0.6ml과 SM buffer(0.4ml), library 8,000-10,000pfu를 잘 섞어 37°C에서 20분간 preincubation시킨뒤 top agar 3ml을 부어 골고루 섞은 후 재빠르게 plating하고, 실온에서 30분 정도 방치한 후 37°C incubator에서 6시간 정도 배양하였다.

(3) nitro-cellulose paper로 bacteriophage의 이전

Molecular cloning에 있는 방법에 준하여 시행하였다. plating한 phage가 plate상에 confluent한 상태인 것을 확인하고, plaque의 지름이 0.5mm정도 되었을때 4°C에서 1시간 정도 방치하여 top agar가 굳게하였다. 다음에 N.C.paper를 plate에 가만히 얹은후, 19 gauge syringe를 이용하여 paper가 부착된 plate를 뚫어서 replica와 master plate를 만들고, 1분이 경과한 후 paper를 떼어내어 다음 실험에 계속 사용하였고, master plate는 4°C에 보관하여 positive plaque를 selection하는데 사용하였다.

(4) 전이된 phage DNA의 변성과 고정

Master plate에서 떼어낸 filter를 denaturing solution(1.5M NaCl, 0.5M NaOH)으로 적신 3MM paper 위에 phage DNA가 위쪽으로 향하게 하여 올려놓고 30초가 경과한 후, denaturing solution에 완전히 담가 1분을 경과시켰다. 그 다음으로 neutralizing solution(1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl, pH 7.4)에 5분동안 가만히 담가두었다가 3X SSC에서 수초동안 담가 rinse한

후, 3MM paper위에서 한시간 정도 건조시켰다. 그후 nitrocellulose filter를 paper towel 사이에 넣고 80°C에서 2시간 baking하여 filter paper에 DNA를 단단히 고정시켰다.

(5) Prehybridization

Baking한 filter를 6X SSC로 적신 후 비닐 주머니 속에 넣은 다음 3-5ml의 hybridizing solution(6X SSC, 2X Denhart's solution, 0.25% SDS, 100 μ g/ml of denatured salmon sperm DNA)을 넣고 공기방울을 완전히 제거한 다음, 42°C에서 gentle agitation을 통해 전 처리 과정을 실시하였다.

(6) Oligo-nucleotide kination

Prehybridization 기간 동안 oligo-nucleotide를 kination하여 probe로 사용하였다. Kination enzyme은 KOSCO로부터 구입한 T4 polynucleotide kinase를 사용하였고 Oligo-nucleotide는 20 pmole 정도를 사용하였다. 또한 10X kination buffer 2 μ l, T4 polynucleotide kinase 1.3 μ l, [γ -³²P] ATP 2 μ l와 멸균 증류수를 합해 total 20 μ l가 되게하여 37°C에서 한시간 반응시켰다. 그후 30 μ l의 증류수를 넣고 1/2volume씩의 phenol과 CIAA(chloroform:isoamyl alcohol=24:1)를 넣은 후 수초동안 vortexing 한 다음 12,000rpm에서 5분동안 원심분리하였다. 원심분리가 끝난 후 상층액을 떠서 G-50 sephadex column을 통해 매번 100 μ l의 TE(pH 7.4)를 더하면서 elution하고, 1 μ l씩을 취하여 L.S.C. counting을 하여 첫번째 peak에서 3개의 tube를 selecting하여 probe로 사용하였다.

(7) Hybridization과 exposure

4시간의 전처리 과정을 거친 후 비닐의 한쪽 끝을 가위로 자르고, 100°C에서 denature 시킨 probe를 N.C. filter 장당 1×10^5 cpm이 되게 넣고 sealing한 후, 잘 섞이도록 문지르고 공기방울을 완전히 제거한 다음 42°C에서 nutator를 이용하여 18시간 정도 hybridization을 실시하였다. hybridization된 filter는 5X SSC에서부터 1X SSC까지 농도를 낮추어가며 room temperature에서 gentle shaking을 통해 적당히 washing한 후, 3MM paper 위에서 건조시킨 후 cassette에 film과 함께 넣고 -70°C deepfreezer에서 20시간 정도 exposure시켰다. 그후 film을 cassette에서 꺼내어 hanger에 고정시킨 후 developer에 3분동안 담가 둔뒤 꺼내 수도물로 washing하고 fixer에 담가 고정시킨 다음, 수도물로 다시 씻어 실온에서 완전히 건조시켰다. 이때 film상의 dot와 master plate를 대조하여 dot 주위의 plaque를 selection하여 1ml의 SM buffer에 녹여 4°C에 보관하였다.

(8) Rescreening

SM buffer에 녹인 phage를 1/10 dilution하여 $1 \mu l$ 를 취하고, plating bacteria 0.6ml, SM 0.4ml을 잘 섞은 후 20분동안 preincubation하고 3ml의 top agar와 잘 섞어 바로 plating 하였으며 top agar가 굳은 다음 37°C incubator에서 incubation하여 plaque 수로 titer를 구하고, plate당 100-200의 plaque가 생기도록 다시 plating하여 1차 screening과 동일한 방법으로 2차 screening을 실시하였다. 이러한 결과 single positive plaque을 selection할 수 있었다.

나. Positive clone의 분석

hybridization에 의해 동정된 positive plaque는 Molecular cloning에 기재된 방법에 의해 DNA를 얻어 분석하였다. DNA를 preparation하는 방법에는 plate lysate 방법과 liquid culture 방법이 있는데 전자의 경우 결과가 좋지 않아, 본 연구에서는 후자의 방법을 이용하여 실험하였다.

(1) Liquid culture 방법

Molecular cloning에 있는 방법에 준하여 실험하였으나 약간 변형하였다. master plate에서 single bacteriophage plaque을 1ml의 SM에 녹인 후 4°C에 보관하였다. 먼저 competent bacteria를 준비하였는데, full growth 상태의 600Hf1을 1ml 취하여 0.4%의 maltose가 들어있는 50ml의 LB broth medium에 접종한 후 37°C shaking incubator에서 OD₆₀₀=0.5가 될때까지 배양하였다. 이 culture supernatant를 멸균된 50ml 원심 tube에 넣고 4°C, 3,000rpm에서 20분간 원심분리한 후, bacteria만 얻어 15ml의 cold 10mM MgSO₄로 suspension 시킨다음, 4°C에 보관하였다. 이러한 competent bacteria 0.5ml과 1ml의 single plaque이 녹아 있는 SM을 잘 섞어 5분동안 실온에 방치한 후, 0.4% maltose와 final concentraion 5mM CaCl₂가 들어있는 5ml LB medium에 접종하여, 37°C에서 5시간정도 배양하였다. bacteria가 lysis된 것을 확인한 후 100 μ l의 chloroform을 첨가하고, 37°C에서 15분정도 더 배양한 후 16ml의 centrifuge tube로 옮겨 4°C, 9,000g에서 10분동안 원심분리한 후 supernatant만 취하였다. 여기에 1 μ g/ml의 DNase I 과 RNase A를 처리하고 37°C에서 30분 배양시킨 다음, 같은 양의 20% PEG/2M NaCl을 첨가하고 0°C에서 1시간 정도 방치하였다. 다시 12,000g으

로 원심분리하여 bacteriophage를 down시킨 다음, supernatant는 버리고 여기에 0.5ml의 TE(pH 8.0)를 넣어 phage particle을 완전히 녹인 후, microfuge로 옮기고 12,000rpm에서 5분정도 원심분리하여 bacterial debris를 완전히 제거하였다. 여기에 5 μ l의 10% SDS를 넣고 68°C에서 5분동안 반응시킨 다음, 1/10 volume의 5M NaCl, 250 μ l의 phenol 250 μ l의 CIAA를 넣은 후 vortexing하고, 5분동안 12,000rpm에서 원심하여, 위층만 얻었으며, 여기에 2 volume ethyl alcohol을 처리하여 -20°C에서 하루동안 보관하였으며, 15,000rpm, 4°C에서 30분간 원심분리한 후 supernatant는 버리고 침전물을 70% ethyl alcohol로 rinse한 후 50 μ l의 TE용액에 녹여 0.7% agarose gel 전기영동에 의해 phage DNA를 확인하였으며, 적당한 제한효소와 반응시켜, insert DNA의 크기를 확인하였다. 그 다음에 cloning된 lactoferrin cDNA를 분석하기 위해 Southern blotting을 수행하였다.

(2) Southern blotting and Enzyme mapping

Southern blotting에도 Nitrocellulose paper에 transfer 하는 방법과 in situ gel hybridization 방법이 있는데 본 연구에서는 두가지를 DNA의 크기에 따라 적절히 사용하였다. N.C. paper에 transfer 하는 방법을 먼저 설명하면, cloning 된 DNA를 각종 제한효소로 절단하고 0.7% agarose gel에서 전기영동한 후, EtBr(0.2 μ g/ml) 용액으로 DNA band를 염색시킨 다음 형광자를 대고 폴라로이드 사진을 찍어 전기영동 상태를 확인하고, Gel을 0.2N NaOH, 0.6M NaCl 용액에 담가 30분동안 실온에서 gentle shaking을 통해 Denature 시킨다음 증류수로 2번 washing 하고, 0.2M Tris-HCl(pH 7.4), 0.6M NaCl 용액에 담가 위와 같은 방법으로 2회 반복하여 증화시켰다.

Southern transfer는 buffer 조에 6XSSC를 넣고 유리판을 깔고, 3MM whatman paper로 bridge를 만든 다음, gel을 그 위에 넣고 그위에 6XSSC에 미리 적시어 놓은 N.C.paper를 얹고 다시 3MM whatman paper를 올려 놓은 다음, 적당한 크기로 자른 towel paper를 20cm가량 올려놓고, 그 위에 500g의 저울 추를 올려 놓아 눌러주고 12시간에서 20시간동안 transfer 하였다. transfer가 끝나고 나면 U.V lamp 하에서 well의 위치를 확인하여 놓고 6XSSC로 Rinse한 후 3MM paper 위에서 말린다음 80°C에서 2시간 baking 하였으며, 그 후의 처리과정 즉 Prehybridization, Nicktranslation, Hybridization, Exposure, Development는 앞에서 언급한 바와 동일하게 수행하였다.

다음의 in situ gel hybridization 방법을 설명하면, DNA를 Enzyme으로 자르고 전기영동하는 과정까지는 전과 동일하다. 그 다음, 자를 대고 플라로이드 사진을 찍은 다음 gel dryer에서 3MM paper를 밑에 깔고 그 위에 gel을 올려 놓고, 그 위에 랩을 얹은 다음 50°C에서 vaccumn으로 1시간 반 동안 dry 시켰다. gel이 완전히 dry되었을때, Denaturing Solution(0.5N NaOH, 0.15M NaCl)에 gel을 담가 30분간 실온에서 서서히 흔들면서 DNA를 Denature 시킨 후, Neutralizing solution으로 2회 rinse한 다음, 같은 용액에 담가 30분간 실온에서 서서히 흔들며 2번 Neutralization 시킨 후 그 상태 그대로 Prehybridization, Nick translation, Hybridization, Exposure, Development을 앞에서 언급한 바와 동일하게 하였다.

(3) DNA large preparation

DNA large scale preparation은 molecular cloning의 방법을 준하여 실시하였다. 먼저 bacteriophage의 titer를 정확히 구한 다음 100ml의 NZCYM

medium(NZ amine type A:10g, NaCl:5g, MgCl₂.6H₂O:2g, bacto-casamino acids:1g, bacto-yeast extract:5g/1l, adjust pH 7.0)에 single colony를 OD₆₀₀=2.0이 될때까지 키운 다음, 4개의 50ml conical tube로 aliquot하고 나서, 3,000rpm에서 10분동안 원심분리한 후 medium은 버리고, SM 3ml을 넣고 bacteria를 완전히 suspension하였다. 이러한 bacteria는 8×10^8 cells/ml 정도이며, 이 suspension을 0.75ml 회수하고, 여기에 6.5×10^7 pfu의 bacteriophage를 넣어 37°C에서 20분간 preincubation시킨 후, prewarmed NZCYM 250ml에 inoculation하고 37°C shaking incubator에서 9시간정도 incubation하였다. cell이 완전히 lysis되는지 계속 monitoring 하면서 lysis되면 1.25ml의 chloroform을 넣고 10분정도 30°C에서 shaking incubation한다음, medium을 500ml centrifuge tube로 옮기고 7,000g, 4°C에서 원심한 후 supernatant만 얻고, 여기에 NaCl 10g, PEG 8,000 25g을 넣고 녹여 ice에서 3시간동안 보관한 후, 4°C 12,000rpm으로 15분간 원심분리 하여 bacteriophage를 얻었다. 여기에 5ml의 20mM tris-HCl(pH 7.4)/10mM MgSO₄를 넣어 bacteriophage를 suspension시키고, 16ml centrifuge tube로 옮기고 bacteria debris를 완전히 없애기 위하여 5,000rpm에서 5분간 원심 분리 하였다. supernatant를 다른 tube로 옮기고 100 μ g의 DNase I을 첨가한 후, 37°C에서 30분간 incubation하여 bacterial chromosomal DNA를 digestion하였다. 그 후 5ml의 CIAA를 넣고 5분간 vortexing한 후 7,000rpm, 4°C에서 15분간 원심분리하여 위층만 selection 하였다. 이 과정을 3번 반복한 후 Beckman SW41 tube의 가장 밑에 $\rho=1.7$ g/ml의 CsCl 1.5ml, 그 위에 $\rho=1.5$ g/ml CsCl의 2.5ml, 맨 위에 $\rho=1.3$ g/ml의 CsCl 2.5ml이 gradient가 섞이지 않게 만들어 주고 그 위에 sample을 apply하였다.

이 tube를 SW41 rotor에 넣고 15°C, 32,000rpm에서 90분간 원심분리 하였다. 원심 tube로부터 $\rho=1.5\text{g/ml}$ CsCl 위치의 bacteriophage를 3ml syringe를 이용 tube벽을 관통하여 selection한 후, dialysis tube 속에 넣고 4°C에서 10mM tris-HCl(pH7.4)/10mM MgCl₂ 용액 속에서 16시간동안 dialysis 하였다. dialysis 후 부석액을 1.35ml로 조정하고, 여기에 15 μl 의 10% SDS, 5M NaCl 150 μl , phenol 0.75ml, CIAA 0.75ml을 넣고 30분간 gentle vortexing한 후 실온에서 2,500rpm으로 원심분리 하였다. 이 과정을 두번 반복한 후 CIAA extracting 2회하고, 1 volume의 diethyl ether로 1회 extraction한 후 후두에서 완전히 증발시켰다.

(4) DNA elution

DNA elution하는 방법으로는 dialysis tube를 이용한 eletroelution이 가장 보편적으로 사용되고 있으며, 또한 DE 81 paper를 이용한 DEAE-cellulose elution 방법도 많이 이용되고 있다. 본 연구에서는 주로 후자의 방법을 이용하였다. 먼저 elution할 DNA를 restriction enzyme으로 자르고 그 중 일부만 취하여 DNA가 잘 cutting 되었는지 확인한 후, elution할 band를 확인하고 나머지 DNA를 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 후 EtBr solution으로 염색한 후, UV lamp 아래에서 band 앞부분을 자르고 그곳에 DEAE paper를 끼워 넣었다. 이때 사용한 도구, 즉 칼 자등은 70% alcohol로 소독하여 깨끗한 상태로 사용하였다. DEAE-cellulose paper가 제대로 끼워졌는지 UV lamp하에서 확인하고, 다시 전기영동하여 DEAE-cellulose paper에 DNA를 붙인다음, DEAE-cellulose paper를 꺼내 1ml syringe에 접어 넣었다. 그 다음 low salt buffer(0.1M NaCl, 10mM

EDTA(pH 8.0))를 300 μ l 넣고 1,500rpm에서 1초동안 원심하였다. 이 단계를 3회 반복한 후 high salt buffer(1M NaCl, 10mM EDTA(pH 8.0))를 75 μ l 씩 넣고 1,500rpm에서 1초동안 원심분리 하였다. 이 과정을 5회 반복하고 받은 용액을 microfuge tube로 옮긴 후 phenol extration을 실시하고, ethyl alcohol precipitation을 실시한 후, gel을 걸어 elution이 잘 되었는지 확인하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 사람 락토페린 cDNA 클로닝

사람 락토페린은 모유에 많이 함유되어 있으며, 그 messenger RNA는 임신말기인 여인의 유선 중에도 많이 발현되고 있다. 본 연구진은 사람 락토페린 cDNA를 클로닝하기 위해 사람의 breast cDNA library (Clontech) 1.6 X 10⁵ plaques를 90mm X 20mm 크기의 LB plate에 plating 한후 Benton Davis 방법에 따라 nitrocellulose filter에 phage를 옮겨 denature 시키고 baking하여 plaque를 고정시킨후 hybridization을 하였다. 이때 사용된 probe는 이미 영국의 M.J.Powell등이 1990년 Nucleic Acids Research 에 보고한 사람 락토페린 cDNA의 3' 영역 sequence를 DNA 합성기로 합성한 oligonucleotide를 [γ -³²P] ATP로 kination하여 labelling시킨 것이다. 1차 screening한 결과 100개의 positive plaques를 얻었으며, 같은 probe로 2차 screening하여 30여개의 single 클론을 얻었다(Fig.1). 이 클론들을

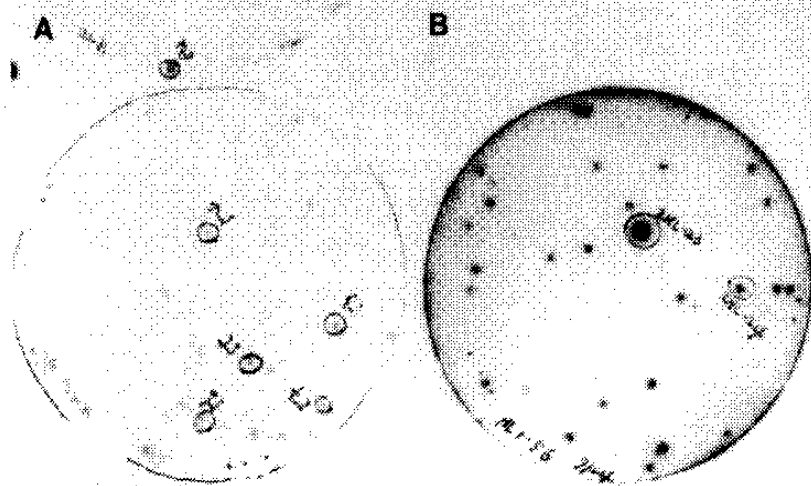


Fig.1. Autoradiogram of plaque hybridization of human lactoferrin cDNA from human breast cDNA library by 3'probe
A; 1st screening B; 2nd screening
3'probe: 5'-CTTCCTGAGGAATTCACAGG-3'

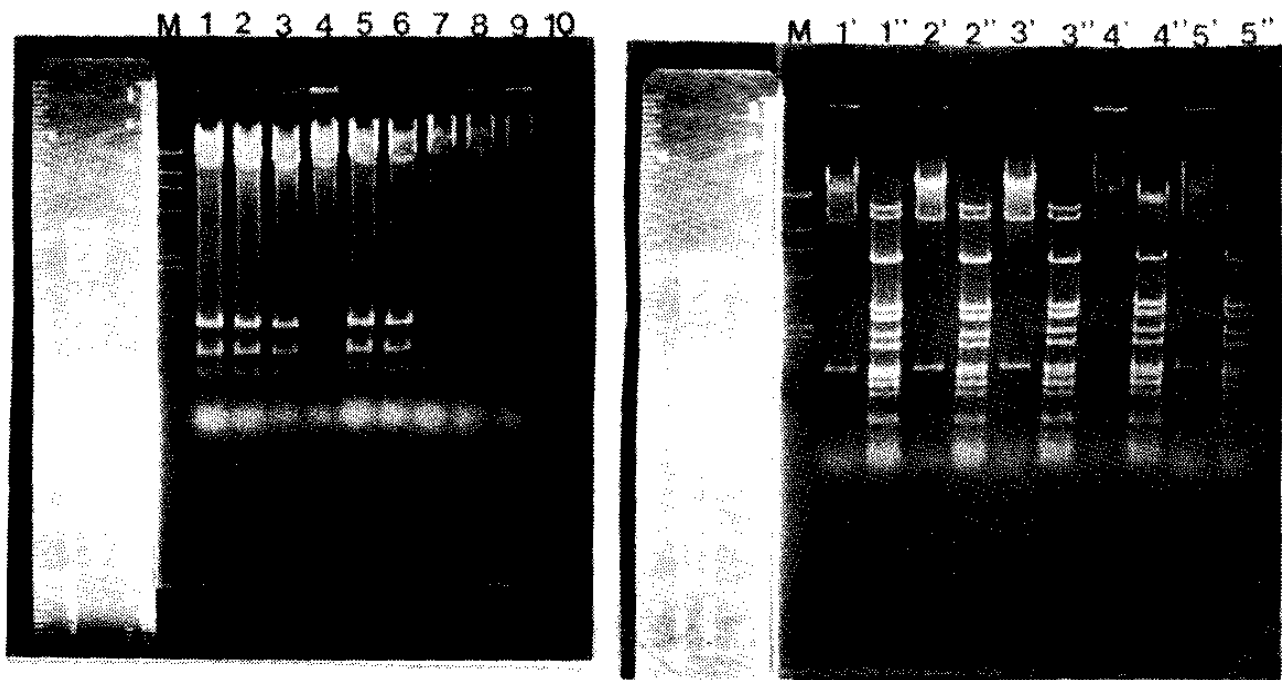


Fig.2. Restriction enzyme digestion of 1st cloned DNAs
 1-10 : BglII 1'-5' : EcoRI
 1''-5'' : PstI
 M : marker

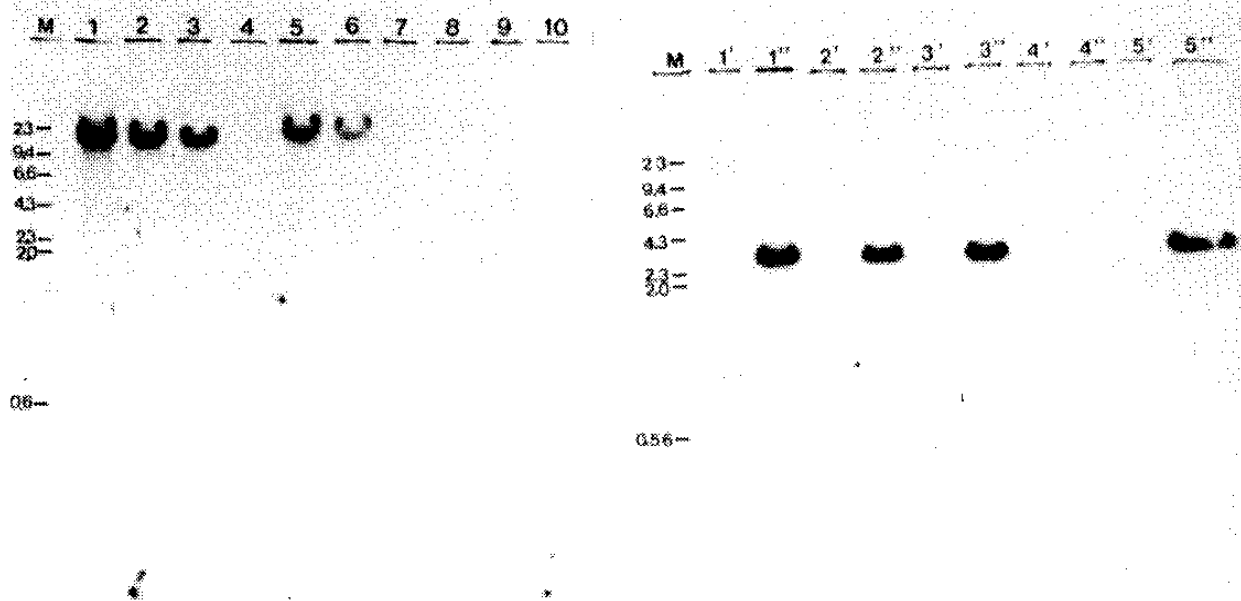


Fig.3. Southern blotting of 1st cloned DNAs by 3' oligo nucleotide
 1-10 : BglII 1'-5' : EcoRI
 1''-5'' : PstI

liquid culture 방법에 의해 bacteriophage DNA를 얻어 제한효소 EcoRI¹으로 절단한 결과, 1.5kb 정도의 DNA fragment가 클로닝되었음을 알 수 있었다 (Fig.2). 그 다음으로 cloning된 DNA fragment가 정말 human cDNA lactoferrin fragment인지 확인하기 위해서 in situ gel hybridization과 NC paper transfer southern blotting을 실시하였다. cloning된 30개의 clone중 clone 22에서 부터 30번까지를 먼저 실시하였는데, Bgl II , EcoR I, Pst I으로 digestion하고 전기영동한 다음 gel 사진을 찍어놓았다 (Fig.2). 다음으로 Bgl II digestion한것은 NC paper에 transfer하고, EcoR I으로 digestion한것은 in situ gel hybridization 방법을 통해 southern blotting을 실시하였다. 이때 사용한 probe는 재료 및 방법에서 언급한 바와 같이 3' terminal oligo probe를 사용하였다. 그 결과 probe와 hybridize하는 각 DNA band를 볼 수 있었다(Fig.3). 즉, EcoR I으로 digestion하였을 경우 oligo nucleotide 중앙이 잘려져 DNA band가 나타나지 않았으며, Pst I으로 digestion하였을 경우 14kb 정도에서 band가 hybridize하는 것을 알 수 있었다. 그리고 벡터 (phage) arm의 map과 비교한 결과 reverse orientation으로 클로닝된 클론임을 알 수 있었다. 이 클로닝된 DNA는 full length DNA가 아님을 미리 보고된 DNA map과 비교하여 알 수 있었고, 이것을 full length를 찾는 probe로의 이용 및 enzyme mapping을 위해, 재료 및 방법에서 언급한 바와같이 bacteriophage를 large scale preparation 하였다. 그 결과 total 2mg 정도의 DNA를 얻을 수 있었으며, 이 DNA를 EcoR I digestion하여 DEAE-cellulose DNA elution 방법에 따라 DNA를 elution하여 40 μ g의 DNA를 얻을 수 있었다. 이 DNA를 Bgl II와 Pst I으로 double digestion하여 probe로 사용 될 0.5kb, 0.3kb, 0.2kb, 0.1kb

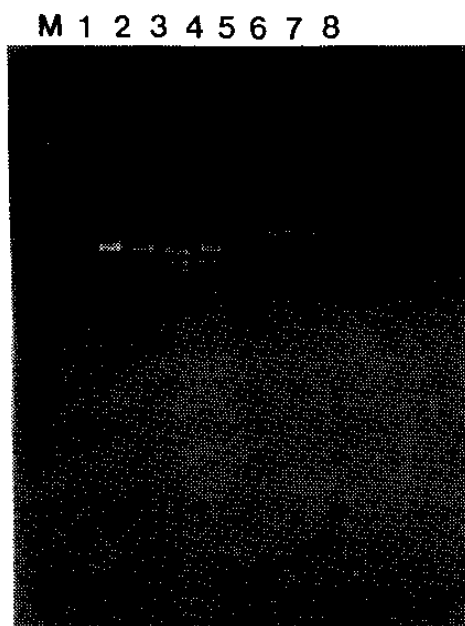


Fig.4. Enzyme digestion of 1st cloned human lactoferrin cDNA for mapping

1 : SmaI	2 : SmaI/BglII	3 : BglII	4 : BglII/PstI
5 : PstI	6 : PstI/PvuII	7 : PvuII	8 : non-digestion
M : marker			

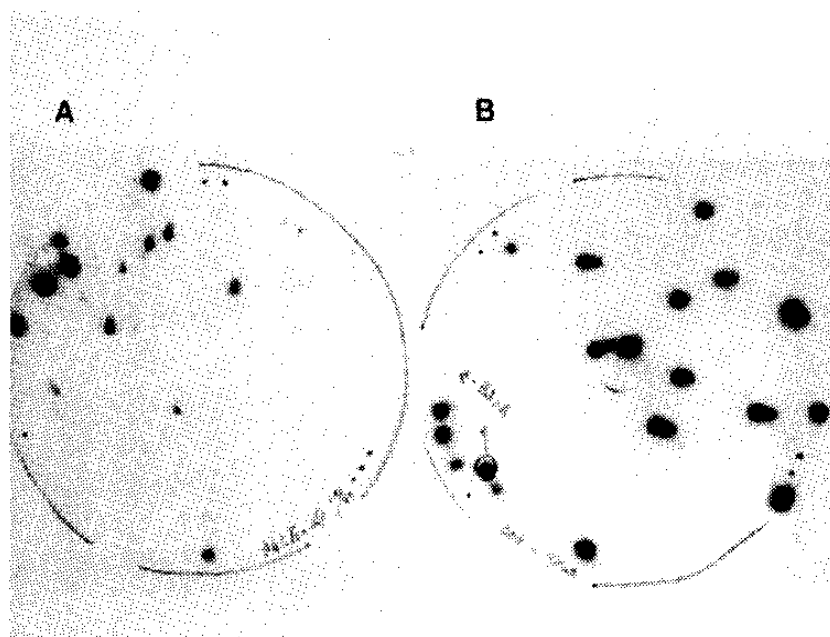


Fig.5. Autoradiogram of rescreening of human breast cDNA library by 1st cloned cDNA probe

A : 1st screening

B: 2nd screening

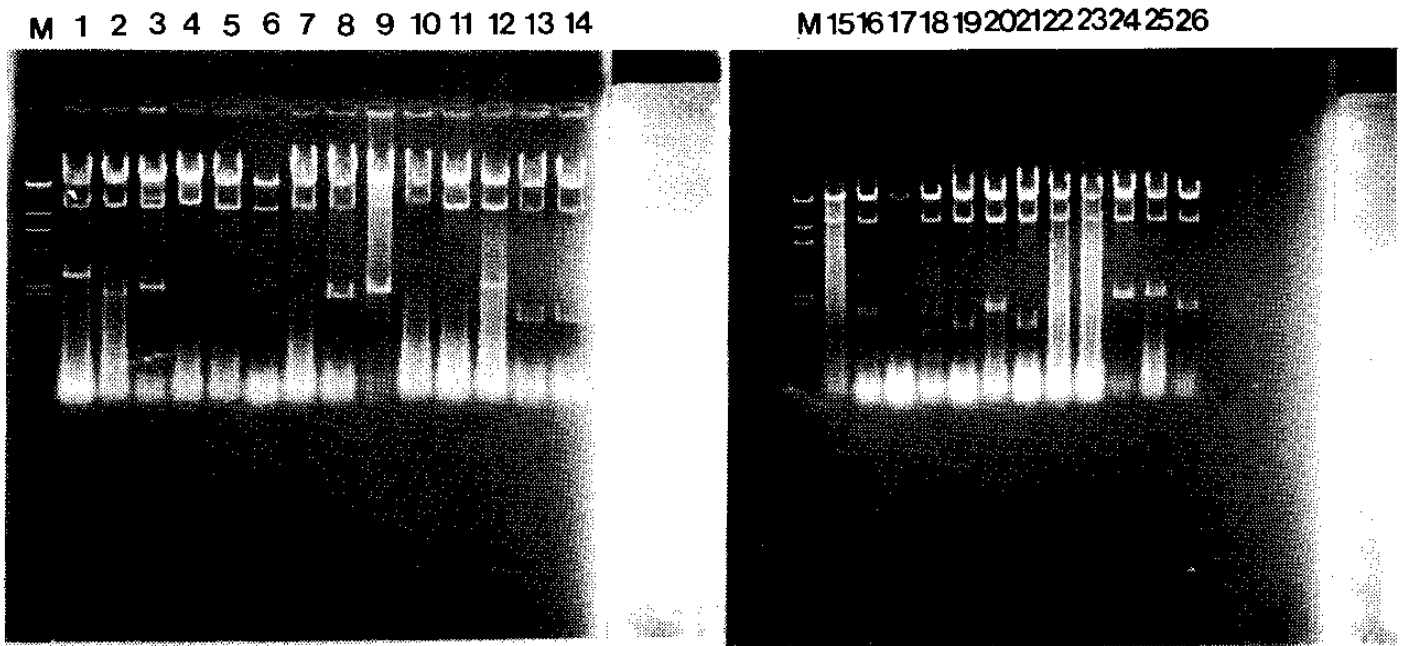


Fig.6. Enzyme digestion analysis of rescreened DNAs by EcoRI

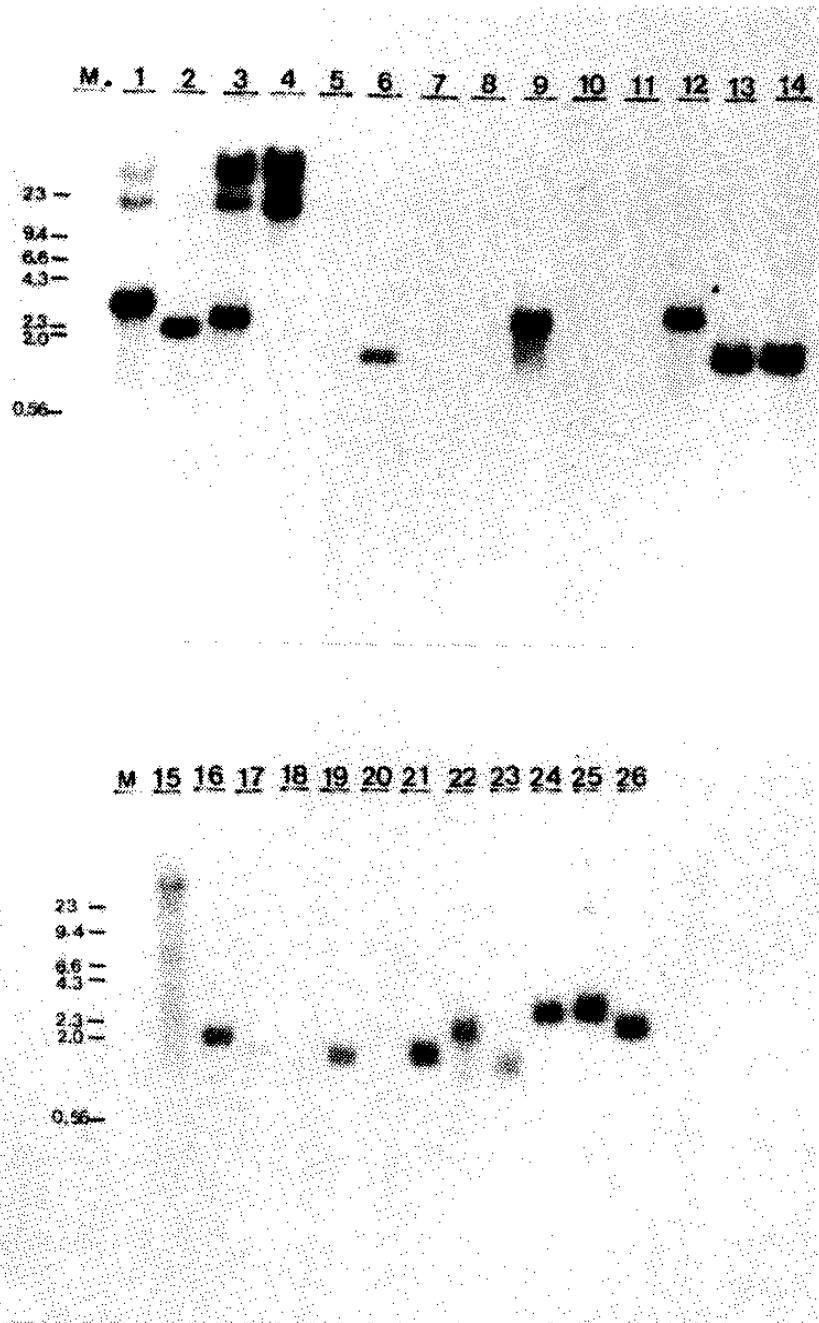


Fig.7. Southern blotting analysis of rescreened DNAs by BglIII/PstI 0.3kb probe

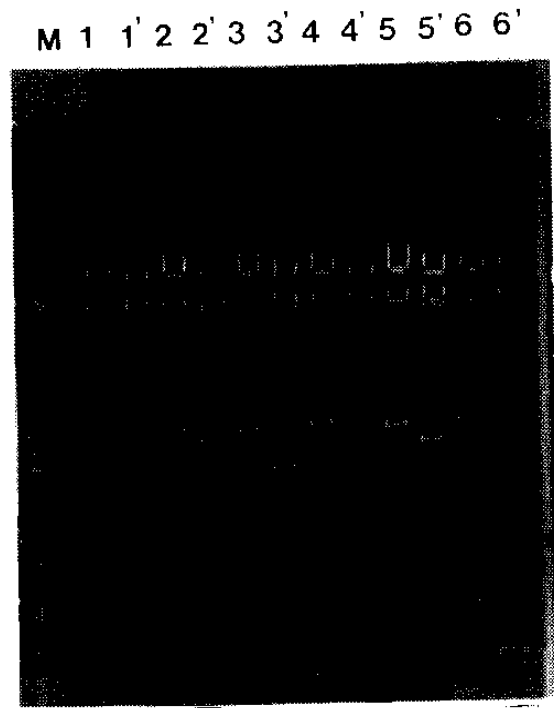


Fig.8. Enzyme digestion of cloned human lactoferrin cDNA
 1-5 : EcoRI 1'-5' : BglII
 M : marker

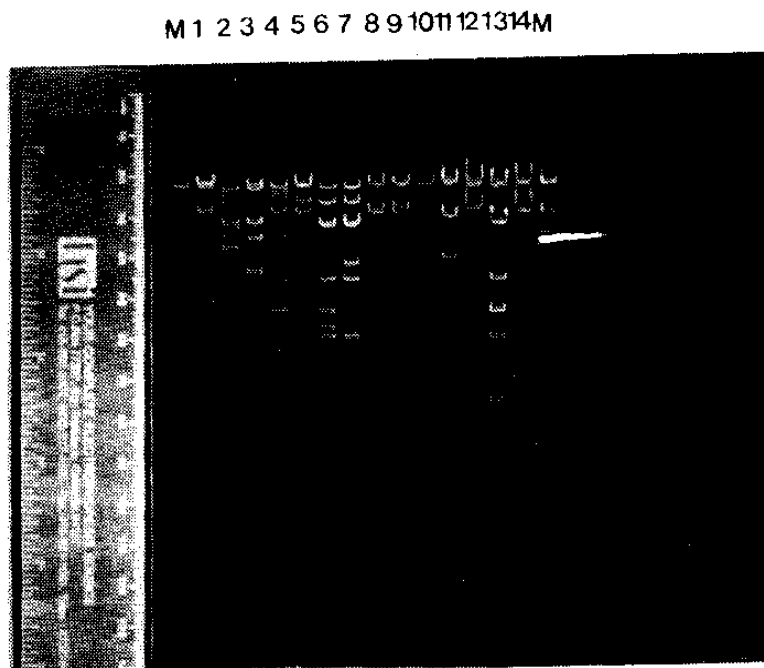


Fig.9. Enzyme digestion of cloned human lactoferrin cDNA for mapping
 1 : EcoRI 2 : EcoRI/SmaI 3 : SmaI 4 : EcoRI/ApaI
 5 : ApaI 6 : EcoRI/StuI 7 : StuI 8 : EcoRI/bglII
 9 : BglII 10 : EcoRI/hindIII 11 : HindIII
 12: vector ApaI 13 : vector StuI 14 : vector BglII
 M : marker

DNA를 elution 하였다. 또한 이 DNA를 가지고 enzyme mapping을 하기 위하여 Sma I, Sma I/Bgl II, Bgl II, Bgl II/Pst I, Pst I, Pst I/Pvu II로 digestion한 다음 nondigested DNA와 함께 전기영동하고(fig. 4), mapping한 결과 이미 보고된 사람락토페린 cDNA 850bp 부근부터 3' terminal까지의 약 1.65kb의 lactoferrin cDNA fragment가 클로닝되었음을 알 수 있었다. 다음으로 full length의 lactoferrin cDNA를 클로닝하기 위하여 재료 및 방법에서 언급한 바와 동일하게 human breast cDNA library를 rescreening 하였으며, 그 결과 장당 25개의 positive dot가 형성하였고 그 중 강한 것으로 40개를 selection하여 2차 screening을 실시하였다(fig.5). 그 결과 33개의 plate에서 positive dot를 형성하였으며, 이 plate로부터 single plaque을 분리하여 1ml의 SM buffer에 녹였다. 이들 클론을 stock용으로 먼저 plating하여 4°C에 보관하고, 나머지는 liquid mini-preparation한 후 EcoRI으로 digestion하여 insert의 길이를 비교하고(fig.6), in situ gel hybridization을 하여 southern blotting을 실시하였다. 이때 사용한 probe는 Bgl II/Pst I 0.3kb fragment이며, 그 결과 22개의 클론이 hybridization되었다(fig.7). 이러한 clone 중 size가 2.3kb정도 되는 클론 7개를 selection하여 large scale preparation을 실시하였고, 이들을 먼저 EcoRI으로 digestion한 후 acrylamide gel과 0.7% agarose gel을 이용하여 정확한 band를 확인할 수 있었다(fig.8). 그다음 이들이 정말 full length의 lactoferrin cDNA를 갖고 있는지 확인하기 위해서 EcoR I, EcoR I/Sma I, Sma I, EcoR I/Apa I, Apa I, EcoR I/Stu I, Stu I, EcoR I/Bgl II, Bgl II, EcoR I/Hind III, Hind III, 그리고 λgt 10의 양 arm을 Apa I, Stu I, Bgl II로 digestion하고 전기영동하고 band를 분석하였다(fig. 9). 그

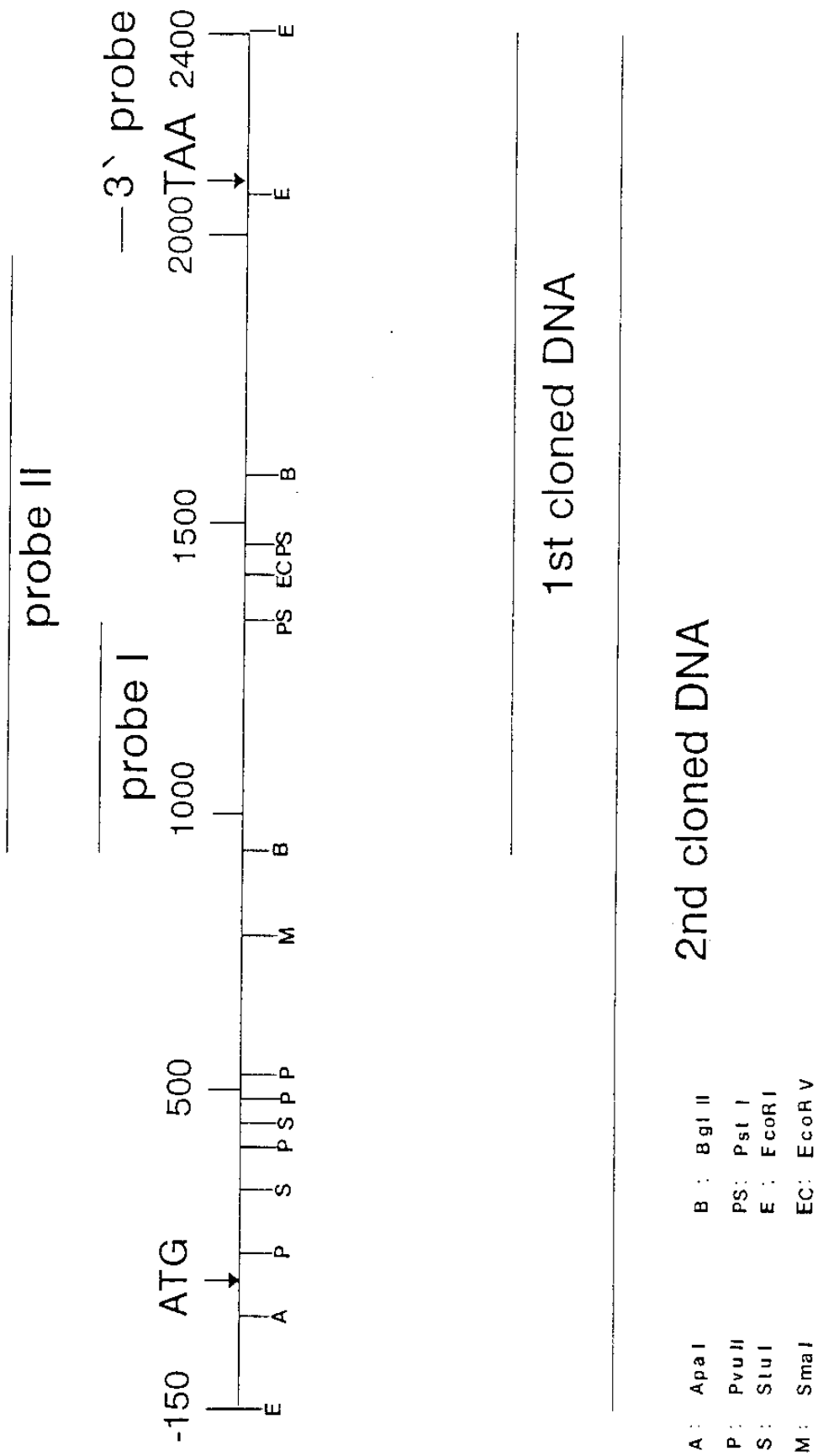


Fig. 10 Restriction enzyme map of human lactoferrin cDNA

결과 클로닝된 human lactoferrin cDNA가 full length DNA를 포함하고 있음을 확인할 수 있으며, 그 map은 fig.10에서 보는 바와 같다.

2. 사람락토페린 cDNA의 구조

human lactoferrin cDNA는 Fig.10에 도시한 바와 같이 구조 유전자만 2.1kb의 크기를 갖고 있으며, 다른 일반적인 protein과 비교하여 상당히 큰 분자로 추측된다. 현재까지 알려진 바에 의하면, 분자량이 78KDa으로 603개의 아미노산이 single polypeptide로 이루어져 있는 거대한 분자로(11), 여러가지 기능이 있는 것으로 보고되어 있다. 특히 non-immunoglobulin host defence factor로 mucosal surface의 acinar epithelial cell에서 합성되며, leucocyte의 secondary granule에서도 발견됨이 보고되어 있다(10). 이들은 Ig A, histatin(histidine rich protein), lysozyme 등과 함께 antibacterial, antifungal activity를 갖고 있고(12), cell growth 및 differentiation을 자극하며, Immune Response를 regulation하고(13), 특히 BALA/C 3T3 cell에서 DNA 합성을 자극시키는 효과가 있음이 보고되어 있다(14). 본 연구에서 cloning된 LF cDNA 유전자를 보면 90년 Nucleic Acid Research에 보고된 DNA보다 5' terminal 쪽으로 약 150bp 정도 더 연장된 것으로 판명되었다. stop codon은 2128bp에 위치하며, 그 뒤로 poly A region이 존재하고 있다.

이상의 결과로 볼때 cloning된 human lactoferrin cDNA는 Nucleic Acid Research에 보고된 cDNA와 Enzyme map이 정확히 일치함을 알 수 있었다 (fig.10).

참 고 문 헌

1. Powell, M. J. and Ogden, J. E. (1990) *Nucleic Acids Research*, 18, 13.
2. 河野信貴, 浦島匡, 島崎敬一, 高澤後英 (1989) 第81回 日本畜産學會大會
講演要旨.
3. Groves, M. L. (1971) "Milk proteins : chemistry and molecular
biology ", Vol. II. ed. by H. A. McKenzie, Academic Press (New York)
pp. 367-418.
4. Baker, E. N., Rumball, S. V. and Anderson, B. F. (1987) *Trends Biochem.
Sci.*, 12, 350 (1987).
5. Legrand, D., Mazurier, J., Nontreuil, J. and Spik, G. (1988) *Biochimie*, 70,
1185.
6. Reiter, B. (1985) *Developments in Dairy chemistry-3-Lactose and
Minor constituents*", ed. by Fox, P. F., Elsevier App. Sci. Pub. (New
York) pp. 281-336.
7. Smith, L. L. and Schanbacher (1977) *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 170, 1224.
8. Nemet, K. and Simonovits (1985) *Haematologia*, 18, 3.
9. Bowman, B. H., Yang, F., and Adrian, G. S. (1988) *Adv. Genet.* 25, 1-38.
10. Park, I., Schaeffer, I. E., Sidole, A. A., Baralle, F. E., Cohen, G. N. and
Zakin, M. M. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 3149-3153.
11. T. William Hutchens, Joseph F. Henry, Tai-Tung Yip (1991) *Proc.
Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2994-2998.

12. Tero Soukka, Jorma Tenovuo, Marianne Lenander-lumikari (1992)
FEMS Microbiology letter 90, 223-228.
13. Raha, S., Dosquet, C., Abgrall, J.F., Jolles, P., Fiat, A.M. &
Caen, J.P. (1998) Blood 72, 172-178.
14. Norihiro Azuma, Hiroake Mori, Shuichi Kaminogawa, Kunio Yamauchi.
(1989) Agric. Biol. Chem., 53, 31-35.

제 3장 유선조직 특이적 발현을 유도하기 위한 재조합 유전자의 개발

제 1절 서론

포유동물의 유선조직을 통해 발현되는 우유 단백질에는 여러가지가 존재하는데, 그 대부분을 차지하는 단백질은 Casein이다. 이러한 Casein 유전자는 유선조직에서 특이적으로 발현되며, 특히 비유기에 더욱 많이 발현되고 있다. Casein의 발현에는 peptides와 Steroid Hormone이 작용하며, 그 외에도 세포원질 및 세포간의 상호작용을 포함하는 많은 factors에 의해 발현이 조절되고 있다(1-4). 이러한 이유로 Casein gene은 발생단계에 따른 hormonal gene regulation을 연구하는 좋은 model system으로 제공되어 왔다. 또한 in vitro mammary gland tissue culture에서, Casein gene은 insulin, glucocorticoid 및 prolactin의 상호작용에 따라 자극되어 발현하게 된다 (5). Casein 유전자의 발현을 조절하는 여러 cis-element를 찾기 위하여 여러 종류의 포유동물로부터 유전자가 동정되어 분석되었는데 그 결과 5' flanking 영역에 몇개의 공통인자가 존재함을 알 수 있었다(6-8). 이러한 공통 sequence 인자를 포함하고 있는 rat β -Casein의 5' flanking sequence로 mammary gland epithelial cell인 HC 11에서 재조합 유전자가 hormone의 유도를 받아 발현되는데 필요한 유전자 부위인 것으로 밝혀졌으며, 생쥐 β -Casein 5' flanking sequence에 CAT gene을 붙여 만든 재조합 DNA가 호르몬의 자극을 받아 생쥐 유선상피 primary cell에서 발현됨이 보고되어 있다(9-10). 한편 흰쥐의 β -Casein 유전자가 hormone의 자극에 의해 충분히 발현되기 위해서는 5' flanking 영역뿐만 아니라, 3' flanking

영역 및 intron에 존재하는 sequence elements가 추가로 필요한 것으로 알려졌다(11).

본 연구실에서는 포유동물의 유선조직을 통해 사람성장호르몬을 생산, 분비하는 형질전환동물을 개발하고 이상과 같은 특성을 지닌 rat β -Casein 유전자를 이용하여, 유선조직에서 특이적으로 발현될 것을 기대하는 vector에 cDNA를 연결한 재조합 DNA를 만들어 생쥐의 수정란에 미세주입시킴으로써, 형질전환 생쥐를 개발하였음을 보고한 바 있다(19). 따라서 본 연구에서는 사람의 초유에 가장 많이 존재하며, host defense에 중요한 역할을 하는 Lactoferrin을 유선조직에서 특이적으로 발현시키기 위하여 human lactoferrin cDNA를 pCS vector에 연결한 재조합 DNA(pCShcLf)를 만들었으며, 수정란에 미세주입하여 형질전환 생쥐를 개발할 목적으로 있다. 따라서 본 장에서는 어떻게 vector를 만들고 lactoferrin cDNA와 재조합 DNA를 어떻게 만들었는지 밝히고자 한다.

제 2절 재료 및 방법

1. 실험재료

가. DNA

Rat Genomic Library로부터 cloning된 β -Casein 유전자 clone DNA RBC-5를 EcoR I으로 소화시켜 얻은 5' flanking 영역의 2.8kb DNA 단편을 promoter 부위로 사용하고, vector로써는 pSP70(promega로부터 구입)을 이용하였으며, pSV2cat plasmid의 SV40 poly A 영역을 Hpa I /BamH I으로 소화시켜 poly A 부위를 사용하였다.

나. Bacterial strain

E.coR I HB101{F, hgd S20(rB,mB-), recA13, ara14, proA2, lacK1, galK2, rSP20(Sm), XyL-5, mtl-1, saPE44}를 transformation 할때 host로 사용하였다.

다. Enzymes

제한효소는 (주)제철화학, Boehringer Mannheim, 그리고 New England Biolabs, InC로부터 구입하여 사용하였고, T4 DNA ligase는 (주)제철화학, Boehringer Mannheim으로부터, Bacterial alkaline phosphatase는 Amersham 및 Boehringer Mannheim, Klenow는 KAIST에서 구입하여 사용하였다.

2. 실험방법

가. Competent cell 준비

LB plate에서 2주 간격으로 계대배양하던 HB101의 single colony를 무균상태에서 5ml LB tube에 접종하고, 37°C shaking incubator에서 하루밤동안 배양하였다. 다음날 아침 full growth 상태의 배양액으로부터 2.5ml을 LB 5ml tube에 넣어 37°C shaking incubator에서 약 2-3시간 배양시켰다. 이때 성장 상태가 가장 양호한 때를 택하여 배양액 전체를 250ml의 LB(glucose 포함됨)에 넣어 37°C shaking incubator에서 2시간 정도 배양시킨 후 OD₆₀₀=0.55인 경우 배양을 멈추고 0°C 얼음 속에서 30분간 냉각시켰다. 냉각시킨 후 0°C 원심기에서 3,000rpm의 속도로 5분간 원심을 걸어주어 상층은 버리고 침전물을 냉각된 50mM CaCl₂ 125ml로 천천히 녹여주고 0

℃ 얼음 속에 60분간 담가 두었다. 다음에 2,000rpm의 속도로 0℃에서 5분간 원심분리하여 침전물을 25ml의 냉각된 50ml CaCl₂/20% glycerol 용액으로 잘 녹여준 후, 0.8ml씩 분주하여 Liquid N₂ tank 속에 보관하였다. 이렇게 만든 competent cell로 transformation한 결과 plasmid 1μg당 1x10⁷ 이상의 colony가 생겨 competent cell이 양호함을 확인하였다.

나. Transformation

10mM CaCl₂, 50mM MgCl₂ 97μl에 plasmid DNA(puc 19) 1 ng을 넣고 0℃ 얼음 속에서 냉각시킨 후 competent cell(HB101) 100μl을 넣어서 천천히 잘 섞어준 후, 0℃ 얼음속에서 20분간 처리하고, 실온에서 10분간 방치시킨 뒤, LB 1ml을 넣고 37℃ shaking incubator 속에서 1시간동안 배양시켜, 30 μg/ml의 Ampicillin이 포함된 LB plate에 plating 하였다. plating된 LB plate는 37℃ incubator 속에서 하루밤(10-11시간) 배양시켰다.

다. Plasmid mini-preparation

Plasmid mini-preparation은 Molecular cloning에 기재되어 있는 alkaline Method를 이용하여 사용하였다. transformation된 single colony를 30μg/ml의 Ampicillin이 포함된 LB medium에 inoculation하여 하루밤동안 shaking incubator에서 배양하였다. 다음날 아침 충분히 자란 culture 1.5ml을 microfuge tube로 옮기고, 4℃ 12,000rpm에서 30초간 원심을 하여 배양액은 버리고 cell만 얻었다. 여기에 얼음에서 냉각시킨 solution I (50mM glucose, 25mM Tris-HCl(pH 8.0), 10mM EDTA(pH 8.0) autoclaved)을 100μl 넣고 cell을 suspension 시킨다음, 새롭게 만든 solution II(0.2N

NaOH, 1% SDS)를 200 μ l 넣고 빠르게 5번 inverting하고 얼음에서 잠시동안 보관하였다. 이때 절대로 vortexing을 하여서는 안되며, 그 다음으로 150 μ l의 solution III (3M potassium acetate, 5M acetate)를 넣고 다시 빠르게 5번 invert하고 얼음에서 5분 보관한 다음, 4°C 14,000rpm에서 5분동안 원심분리한 후 1ml pipette을 이용하여 용액만 조심스럽게 취하였다. 여기에 phenol/CIAA를 용액과 같은 양 넣고 1분동안 vortex하여 실온 12,000rpm에서 5분동안 원심분리 하였고, 상층만 취하였다. 이 과정을 3번 실시한 후 용액 2배의 ethyl alcohol을 넣어 -70°C에서 ethanol precipitation을 실시하였다. 최종적으로 DNA를 50 μ l에 녹여 제한효소 처리를 하여 DNA를 분석하였으며, 5 μ g 정도의 DNA를 얻을 수 있었다.

제 3절 결과 및 고찰

1. pCS vector의 construction

본 연구에서 사용한 pCS vector는 이미 본 실험실에서 IL-2 transgenic mouse를 만드는데 사용한 vector를 사용하였다.

먼저 pSP70 vector를 EcoRI으로 cutting하여 bacterial alkaline phosphatase를 처리하여 준비하였고, rat β -Casein의 5' 5.2kb를 회수하여 EcoRI digestion한 후 다시 2.8kb를 회수하였다. 이들을 T4 DNA ligase를 이용하여 15°C에서 4시간 이상 ligation 시킨다음, transformation 하였으며, 5ml plasmid mini-preparation을 하여 2.8kb가 들어간 것만 골라내었다. 이곳에서 bacteria를 large preparation하여 plasmid를 얻은다음 EcoRI / Bgl II는 double digestion하고, pSV2Cat을 BamHI / Hpa I으로 double

digestion하여 얻은 SV40 poly A 0.15kb를 ligation시켜 5.4kb의 pCS vector를 만들었다. 이 vector는 Ampicillin resistance marker가 있고, Replication ori를 갖고 있으며, expression을 조절할 수 있는 β -Casein 5' 2.8kb를 포함하고, 전사종결 부위로 SV40 poly(A)를 포함하고 있고, 그 사이에 cloning site로 Cla I을 포함하고 있으므로 expression vector로써는 아무런 문제가 없는 것으로 생각되었으며, 이미 이 vector를 이용하여 expression을 확인한 바 있다.

2. pCS vector에 사람 Lactoferrin cDNA 재조합

Lactoferrin은 철을 함유할 수 있는 단백질로 mammary gland에서만 발현되는 protein으로 알고 있었으나, 현재는 house-keeping gene으로 생각되어 지기도 한다. 특히 눈물, 타액, 점액질을 분비하는 곳에서는 쉽게 발견할 수 있으며, antibacterial, antifungal activity가 있음이 이미 증명되어 있다(18). 특히 salmonella와 같은 해로운 균을 1시간 내에 괴멸 시키는 효과를 갖고 있음도 밝혀져 있다. 사람의 경우 락토페린이 가장 많이 존재하는 곳은 초유이고, 소, 양, 등의 유즙에는 lactoferrin이 거의 존재하지 않음이 밝혀져 있으며, 특히 소의 경우는 사람의 1/80 정도 밖에 되지 않음이 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 포유동물의 유즙을 통해 human Lactoferrin을 생산할 목적으로 pCS vector를 construction하였다.

먼저 pCS를 Cla I으로 자르고 CIP(Calf-Intestine Phosphatase)와 klenow를 처리하여 cohesive end와 5' phosphate group을 제거하였다. 그리고 human cDNA Lactoferrin을 Apa I으로 잘라 5'UT를 제거하였으며, S1 nuclease와 klenow를 처리하여 blunt end를 만들었다. 이 두 DNA를

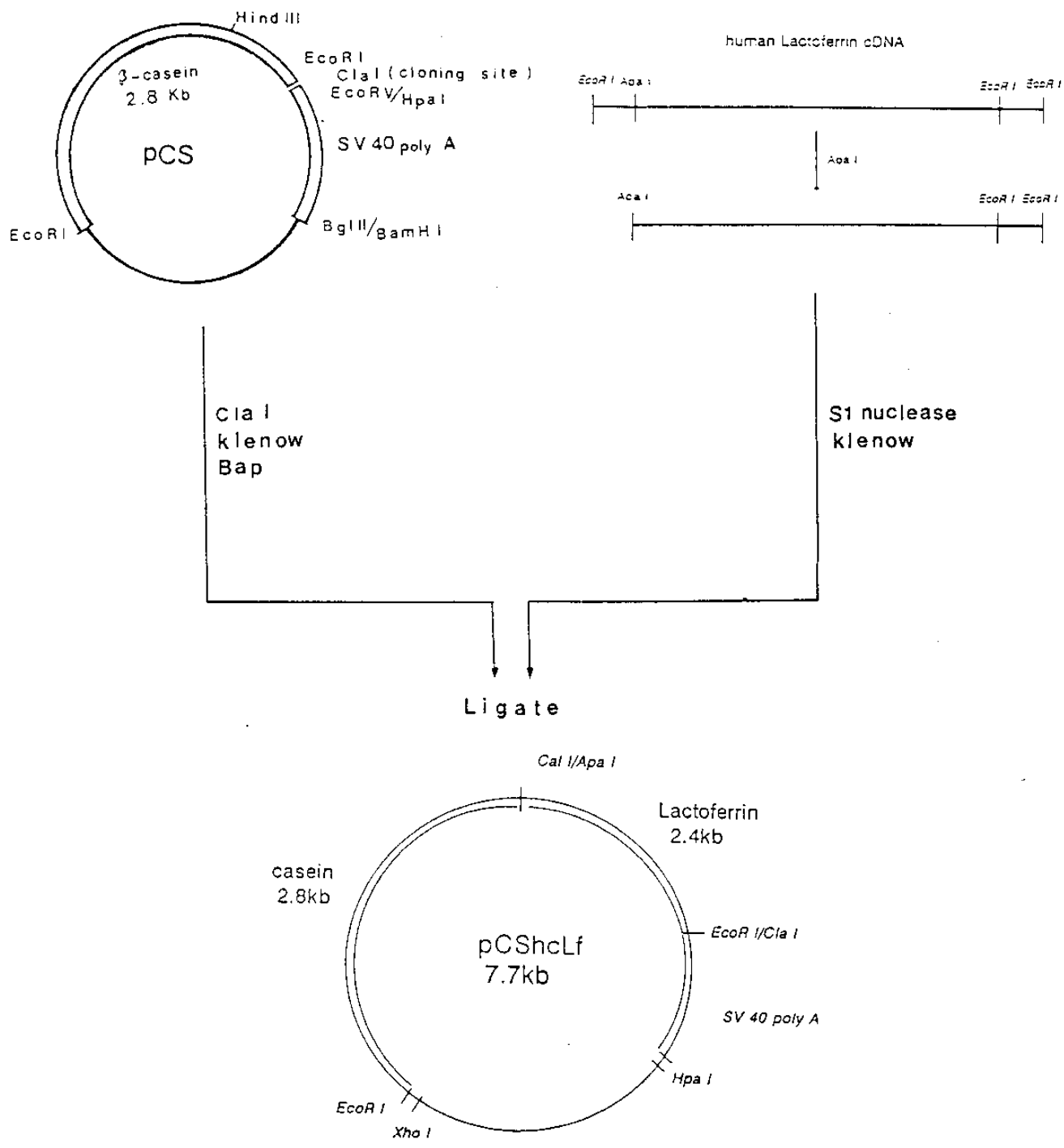


Fig.1. Construction of pCShcLf plasmid

Ligation시켜 transformation한 결과 7.7kb의 pCShcLF가 얻어졌다. 이때 vector의 orientation 여부는 EcoR I으로 소화시켜 알 수 있었다.

3. 미세주입을 위한 DNA의 준비

사람의 lactoferrin을 유즙에서 생산하는 형질전환 생쥐를 개발하기 위하여 fig.1에서 pCS vector의 Cla I site에 cloning한 pCShcLF를 HB101에 transformation하여 500ml large preparation을 하였다. 이 결과 3mg의 plasmid를 얻을 수 있었으며 그 중 일부를 Xho I 과 Hpa I으로 digestion하여 0.7% agarose gel을 걸어 5.3kb의 band를 electroelution 하였다. 이 결과 10 μ g의 DNA가 얻어졌으며 이 DNA를 injection DNA로 다시 purify 하기 위하여 10 μ g의 DNA와 3gram의 CsCl(Boehringer Mannheim)을 2.4ml TE(10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0)에 녹여 1.3x5cm polyallomer ultracentrifuge tube(Bectman)로 옮기고, light mineral oil(Sigma)로 가득 채운다음, TST 55.5(Kontron) rotor를 이용하여 20°C에서 48시간동안 40,000rpm으로 원심분리하였다. 원심분리 후 peristaltic pump를 이용하여 tube의 바닥으로부터 0.2ml씩 분획을 채취하여, 분획마다 2 μ l씩 agarose gel로 DNA 절편의 유무를 확인하였다. DNA 절편이 확인된 분획을 모아 injection Buffer(10mM Tris, 0.1mM EDTA, pH 7.4)하에서 48시간동안 수회 buffer를 교체하면서 dialysis를 수행한 후 회수하였다. 회수한 DNA 용액을 260NM 파장에서 spectrophotometer로 이 값을 측정하여 DNA 농도로 계산하였으며, 최종적으로 DNA 농도가 4-8ng/ μ l이 되게 희석하고 이를 50 μ l씩 aliquot하여 냉동 보관하였다가 미세주입 실험에 사용하였다.

4. 생쥐 수정란에 미세주입

외래 유전자의 미세주입은 미세조작기(micromanipulator:Leitz, West Germany)를 이용하여 이 등의 방법에 따라 수정란의 응성 전핵에 주입하였다. 이때 사용한 mouse는 교잡종으로 C57BLxDBA이며, 과배란을 유도하기 위해서 PMSG와 HCG를 48시간 간격으로 각각 5IU씩 자성 생쥐의 복강내에 주사한 후, 동일계통의 응성생쥐와 1:1로 합사시켜 자연교미를 유도하였고, 다음날 난관을 절취한 후 주사바늘로 팽대부를 터뜨려 난구 세포괴를 회수한다음, 300unit/ml의 hyaluronidase(sigma, USA) 용액을 2-3분 처리하여 난구세포를 제거하고, 이들 수정란을 신선한 배양액으로 3회 이상 세척하였으며 핵막을 관찰하기 위하여 1,500rpm에서 3분간 원심분리하여 사용하였으며, 현재 미세주입을 계속 수행 중에 있다.

참고 문헌

1. Mehta, N.M., Ganguly, N., Ganguly, R. & Banerjee, M.R. (1980) *J. Biol. Chem.* 255 4430-4434.
2. Li, M.L., Aggeler, J., Farson, D.A., Hatier, C., Hatier, C., Hassel, J. & Bissell, M.J. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84, 136-140.
3. Blum, J.L., Zeigler, M.E. & Wicha, M.S. (1987) *Esp. Cell Res.* 173, 322-340.
4. Wiens, D., Park, C.S. & Stockdale, F.E. (1987) *Dev. Biol.* 120, 245-258.
5. Guyette, W.A., Matusik, R.J., & Rosen, J.M. (1979) *Cell* 17, 1013-1023.
6. Yu-Lee, L.Y., Richter-Mann, L., Couch, C.H., Stewart, A.F., Mackinlay, A.G. & Rosen, J.M. (1986) *Nucleic Acids Res.* 14, 1883-1902.
7. Gorodetsky, S.I., Tkach, T.M. & Kapelinskaya, T.V. (198) *Gene* 66, 87-96.
8. Yoshimura, M. & Oka, T. (1989) *Gene* 78, 267-275.
9. Doppler, W., Groner, B. & Ball, R.K. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 104-108.
10. Yoshimura, M. & Oka, T. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3670-3674.
11. Lee, K.F., Atiee, S.H., Henning, S.J., & Rosen, J.M. (1989) *Mol. Endocrinol.* 3, 447-453.

12. Lee, K.F., Atiee, S.H., and Rosin, J.M. (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9, 560-565.
13. Morgan, D.A., Ruscetti, F.W. & Gallo, R. (1976) *Science* 193, 1003-2027.
14. Gillis, S., Ferm, M.M., Ou, W. & Smith, K.J. (1978) *Immunology* 120, 2023-2027.
15. Hamblin, A.S. (1988) *LYMPHKINES*, IRL PRESS 20.
16. Karasuyama, H. (1987) *代謝* 24, 179-188.
17. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning* pp. 6.24-6.27.
18. Tero Soukka, Jorma Tenovuo, Marianne Lenander-lumikari (1992) *FEMS Microbiology letter* 90, 223-228.
19. 이경광 등 (1991) 특정연구개발 사업의 연구보고서 "포유동물을 이용한 인체생리활성물질의 대량생산 모델 시스템 개발" BSN80231-314- 4.

주 의

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.