



Transgenic 동물생산 기법에 의한 포유동물
유즙의 성분조절에 관한 연구

Alteration of Milk Components in Transgenic Animals

연구 기관

한국과학기술연구소

부설유전공학연구소

과학기술처

이 페이지는

삭제된 페이지입니다

제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 “Transgenic 동물생산 기법에 의한 포유동물 유즙의 성분 조절에 관한 연구” 사업의 보고서로 제출합니다.

1994. 8.

주관연구기관 : 한국과학기술연구원 유전공학연구소

연구책임자 : 한 용만 (한국과학기술연구원 유전공학연구소 선임연구원)

연구원	: 이 경광 ("	책임연구원)
	유 대열 ("	책임연구원)
	이 철상 ("	선임연구원)
	김 선정 ("	Post-Doc)
	조 용연 ("	위촉연구원)
	배 수경 ("	위촉연구원)
	이 고운 ("	위촉연구원)
	이 지영 ("	위촉연구원)
	박 정선 ("	기 능 원)
	김 소영 ("	위촉기능원)

Handwritten text, possibly a signature or date, enclosed in a rectangular box.

요약 보고서

I. 제목

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 1 리터당 0.02g 이하 함유), 박테리아 감염에 대한 저항성을 길러주고, 특히 대장내에서 이 작용이 강하다고 알려져 큰 관심을 불러 일으키는 단백질중의 하나이다. 항균성이 있으므로 유아 또는 송아지의 설사방지나 발육향상에 효과가 있으며, B-림프구의 증식촉진효과 및 백혈구 생산 억제기능도 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 락토페린은 소화기관내에서 소화효소에 의해 분해되면 락토페리신이라는 물질이 되는데, 이 물질은 식중독의 원인균인 리스테리아와 병원성 대장균을 1시간 이내에 99.99% 사멸시키나, *Salmonella*, *Candida*, *Campylobacter* 등과 같은 유익한 장내 세균에는 작용하지 않는 것으로 보고되고 있다. 이처럼 락토페린은 신생아 또는 송아지의 건강에 중요한 역할을 하며 이와관련하여 사용용도가 날로 증가하고 있기 때문에, 락토페린을 대량 생산할 수 있는 길을 모색하는데 많은 연구자가

관심을 갖고 있다.

1970년도 후반부터 시작된 유전공학 기법의 비약적인 발전에 의해서 인체 또는 가축에서 미량으로 생산되고 있지 않은 각종 생리활성물질을 대량으로 생산할 수 있는 길이 열렸다. 이들 생리활성물질을 생산하기 위해서 처음에는 대장균, 효모등과 같은 미생물을 숙주로 하여 이루어졌으나, 본래 동물세포에서 합성 분비되고 있던 단백질을 대장균과 같은 하등생물에서 생산하는데에는 몇가지 문제점이 있음을 알게 되었다. 즉 대장균은 단백질을 합성·분비시키는 각종 시스템이 없으므로 생산된 산물의 순수정제가 어려워, 불필요한 단백질이 남게 되는데 이에 따른 각종 부작용이 일어날 수 있다는 것이다. 또한 당쇄를 부가하는 작용이 미생물에는 전혀 없기 때문에, 당쇄가 단백질의 생리활성에 중요한 역할을 하는 생리활성물질인 경우에는 본래의 생리활성을 기대할 수 없다는 결점이 대두하게 되었다. 이러한 문제점을 해결할 수 있는 방법은 동물세포를 숙주로 이용하여 대량생산하는 방법인데, 이 방법으로 당쇄의 첨가 및 단백질의 분비생산이 가능하게 되어 미생물을 숙주로 이용할 경우의 문제점은 해결하게 되었다. 그러나 동물세포의 배양은 기술적인 측면에서 대량생산 및 기계화등에 어려운 점이 있고, 생산효율이 낮으며, 세포배양을 위한 배지가 비싸기 때문에 경제적으로 비현실적이다. 한편, 형질전환동물 생산 기법의 개발로 인하여 동물개체 자체를 숙주로 이용하여 생리활성물질을 대량 생산하려는 움직임이 1987년부터 시작되고 있는데, 이는 형질전환동물 (transgenic animals)의 유선을 통해서 유즙과 함께 생리활성물질을 대량 생산하는 방법으로서 이미 혈전증 치료제인 tPA (tissue Plasminogen Activator), 항암제인 IL-2, 혈액응고제인 Factor IX 등을 생산하는 형질전환 생쥐, 토끼, 양이 개발되어 포유동물의 유선을 통해서 각종 인체 생리활성물질을 대량 생

산할 수 있게 되었다.

락토페린은 우유 단백질 중 영양 단백질로서 뿐만 아니라 항생물질 등과 같은 천연적인 생리활성작용을 지닌 단백질로서 철 결합부위가 한군데 있고 또한 당쇄 첨가부위 (N-glycosylation site)가 한군데 있어 미생물을 숙주로 이용하여 생산할 경우 미생물은 당쇄부가 및 철이 없는 형태로의 락토페린을 분비할 수 없으므로, 생물활성이 갖춰진 락토페린을 얻는 것은 거의 불가능하다.

락토페린은 사람의 유선 상피에서 가장 많이 생산되고 있으므로, 사람의 유선과 동질성이 높은 소의 유선에서 락토페린을 생산한다면, 이는 모유에 함유되어 있는 락토페린과 동일한 생리활성을 나타낼 수 있을 것이다. 소의 유선은 생물공학적 뿐만 아니라 분자생물학적으로 볼 때, 철이 불포화되고 당쇄부가가 적절히 형성된 형태의 락토페린을 생산할 수 있는 이상적인 조직으로 생각된다. 우유는 사람들이 늘 애용하는 식품이므로 형질전환 젖소의 유선으로부터 락토페린을 생산하게 된다면 정제할 필요도 없이 그대로 이용할 수 있다. 따라서 락토페린과 같은 유용한 우유 단백질을 형질전환동물을 숙주로 이용해 생산하는 것은 국민 건강차원 뿐만 아니라 낙농업 및 유가공업의 발전에 크게 기여할 것으로 기대된다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 유선조직 특이적 세포주에서 사람 락토페린의 발현 조사

재조합 유전자 (pCChcLf-1)를 calcium phosphate precipitation방법에 따라 유선조직 특이적 세포주인 HC11에 pSV2neo 유전자와 함께 cotransfection 시

키고 G418로 stable transfectants를 선별하였다. 선별된 transfectant HC11 cells을 모아서 genomic DNA를 추출한 다음 도입된 재조합 유전자 (pCChcLf-1)가 안정하게 세포내 염색체상에 삽입되었는지를 Southern analysis로 확인하였다. 그리고 이들 유전자가 세포내에서 정상적으로 발현되는지를 Northern analysis으로 확인하였으며, 또한 생성된 락토페린이 세포 밖으로 제대로 분비되는지의 여부는 Western blotting에 의해 관찰하였다.

2. 사람 락토페린 유전자가 도입된 형질전환 생쥐의 개발.

재조합유전자 (pCChcLf-1)를 교잡종 (C57BL×DBA)의 암컷 생쥐로부터 회수한 수정란 융성전핵에 미세주입시킨 다음 가임신된 생쥐 (ICR 계통)의 난관에 이식하였다. 이로부터 태어난 산자중에서 외래유전자의 삽입여부를 확인하기 위하여 꼬리로부터 genomic DNA를 추출하여 Southern analysis를 행하였다. 형질전환체로 확인된 생쥐는 교잡종 (C57BL x DBA)생쥐와 교배, 번식시키면서 분만후 10일쯤에 유즙을 채취하였다. 그런 다음 생쥐를 희생시켜 각각의 장기조직을 절제하여 total RNA를 분리하였다. Northern analysis에 의해 사람 락토페린 유전자가 유선조직에서 특이적으로 발현되는지를 관찰하였고, 어느정도 양의 락토페린이 유즙속으로 분비되는지 조사하고자 ELISA 방법을 사용하여 정량하였다. 그리고 이들 형질전환 생쥐의 염색체상에 삽입된 DNA가 다음 세대로 germ line transmission되는지의 여부는 PCR을 통해 검정하였다.

IV. 결과 및 활용에 관한 건의

1. 유선조직 특이적 세포주에서 사람락토페린의 발현 조사

1) *In vitro* transfection

Calcium phosphate precipitation 방법을 이용하여 유선조직 특이적 세포주인 HC11 cells에 pCChcLf-1과 pSV2neo 유전자로 cotransfection 시킨 뒤 G418로 stable transfectants만을 선별하였다. 선별된 transfectant HC11 cells에서 실제 재조합 유전자가 host chromosome내로 안정하게 삽입되었는지 알아보기 위해 Southern analysis를 실시하였다. 그 결과, transfectant HC11 cells에서는 사람 락토페린의 cDNA의 크기인 2.4 kbp의 위치에 band가 관찰되었다.

2) Transfectant HC11 cells에서 사람 락토페린의 발현

pCChcLf-1으로 transfection된 HC11 cells로부터 실제로 사람 락토페린이 발현되는지 여부를 Northern analysis로 관찰하였다. Lactogenic hormones (prolactin, dexamethasone, insulin)으로 transfectant HC11 cells의 분화를 유도하여 이들 세포로부터 total RNA를 분리, Northern analysis를 실시하였다. 그 결과 parental HC11 cells에서는 사람 락토페린의 RNA가 검출되지 않았으나 transfectant HC11 cells에서는 사람 락토페린 유전자가 발현됨을 확인하였다. 그리고 transfectant HC11 cells내에서 생성된 사람 락토페린이 정상적으로 세포 외부로 분비하는지 조사하고자 Western blotting을 실시하였다. pCChcLf, pCChcLf-1로 transfection된 cells을 4일간 prolactin, dexamethasone, insulin으로 분화시킨 후 그 배지를 회수하여 농축시켰다. 이들 samples로부터 Western blotting을 해본 결과, pCChcLf와 pCChcLf-1 transfectant HC11 cells에서는 각각 80kDa의 사람 락토페린 단백질이 검출됨을 확인하였다.

2. 사람 락토페린 유전자가 도입된 형질전환 생쥐의 개발

1) pCChcLf-1 유전자가 도입된 형질전환 생쥐의 개발

사람 락토페린이 유선조직에 특이적으로 발현되는지의 여부를 확인하기 위해 재조합 유전자 CChcLf-1을 BDF1 (C57BL x DBA) 생쥐의 수정란에 미세주

입한다음 대리모 (ICR)에 이식하여 현재까지 9마리의 형질전환 생쥐를 개발하였다. 이들 형질전환 생쥐의 염색체상에 삽입된 DNA가 다음 세대로 germ line transmission되는지 여부를 조사한 결과, pCChcLf-1 TG-6 계통은 산자 3마리중 3마리, TG-7 계통은 6마리중 1마리가 이들 외래유전자를 가지고 있었으나, TG-1과 4 계통은 전혀 transmission이 되지 않았다.

2) 형질전환 생쥐에서 사람 락토페린의 발현

지난해 결과에서 보고한 pCChcLf 형질전환 생쥐와 이번에 새로 개발한 pCChcLf-1 형질전환 생쥐의 유선에서 사람 락토페린의 발현과 유즙으로의 분비가 정상적으로 일어나는지를 조사하고자 Northern analysis와 ELISA를 실시하였다. 먼저 형질전환 생쥐의 임신을 유도시켜 분만하게 한후 유즙을 채취하고 그뒤 생쥐를 희생시켜 각각의 장기조직을 절제하였다. 이들 조직으로부터 total RNA를 분리하여 Northern analysis를 실시한 결과, 다른 조직보다도 유선조직에서 사람 락토페린의 발현이 강함을 알 수 있었다. 그리고 채취한 유즙에서 ELISA방법으로 사람 락토페린 단백질을 정량한 결과, pCChcLf TG-2 계통의 경우 340ng/ml 수준이었고 pCChcLf-1 TG-7 계통에서는 60ng/ml의 농도로 분비됨을 알 수 있었다.

이상의 연구결과를 통해, 본 연구진은 사람 락토페린을 포유동물의 유즙중에 생산 분비 가능한 형질전환 생쥐를 개발하게 되었다. 이러한 모델시스템의 생산기술을 기초로 하여 가축 (젖소 또는 산양)의 발현시스템을 개발할 경우 형질전환 가축의 유즙중에서 우리가 원하는 인체생리활성 물질을 대량으로 생산할 수 있을 것으로 전망된다.

Summary

Human milk proteins have a specific function for infants, besides being a source of amino acids. Lactoferrin, an iron-binding glycoprotein, has biological significance as a natural bacteriostatic agent and performs an important role in regulation of iron absorption.

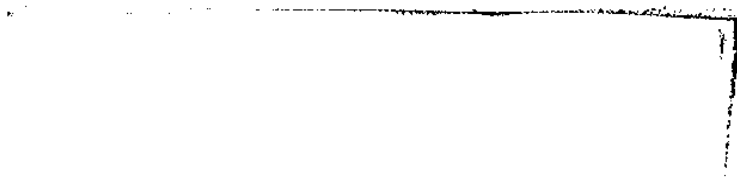
At present, transgenic animal which could secrete human proteins through mammary gland is one of the most favorable systems for production of valuable human proteins. The object of this study is to produce the transgenic mice secreting human lactoferrin in their milk as model animals of bioreactor system.

We previously cloned human lactoferrin cDNA and then recombined it into the pCC expression vector. The recombinant plasmids were designated as pCChcLf and pCChcLf-1, respectively. The plasmids were cotransfected with pSV2neo gene into mammary specific HC11 cells. It was shown by Northern and Western analyses that human lactoferrin was expressed in the mammary epithelial cells, HC11 transfectants. The recombinant DNAs containing human lactoferrin gene were microinjected into the fertilized eggs of hybrid (BDF1 : C57BL x DBA) mice and the DNA-injected eggs were transferred into the oviducts of foster mothers. Genomic DNAs were isolated from the tails of mice born from the microinjected eggs and analyzed by Southern blot. As a result, 5 and 9 transgenic mice with CChcLf gene and CChcLf-1 gene were produced,

respectively. To determine tissue-specificity of transgene expression, Northern analysis was performed. Each female transgenic mouse was killed at day 10 of lactation and total RNAs from various tissues were isolated. Based on Northern analysis, it was shown that transgene was exclusively expressed in the mammary gland of transgenic mice. In addition, the human lactoferrin in milk was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Milk was obtained from the mammary gland of the transgenic mouse at day 10 of lactation. In CChcLf #2 and CChcLf-1 #7 transgenic lines, human lactoferrin was secreted in the milk at the concentration level of 340ng/ml and 60ng/ml, respectively.

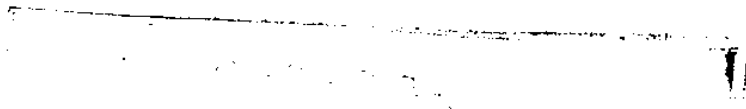
CONTENTS

I. Introduction	13
II. Materials and Methods	15
III. Results and Discussion	23
1. Construction of expression vector (pCChcLf-1)	
2. Expression of human lactoferrin in HC11 transfectants	
3. Development of transgenic mice secreting human lactoferrin in the milk	
References	36



목 차

제 1 장 서론	13
제 2 장 재료 및 방법	
1. 실험재료	15
2. 실험방법	
가. 사람 락토페린 유전자를 이용한 유선조직 특이적 발현 벡터의 개발	16
나. 세포 배양 및 transfection	17
다. Western blot analysis	17
라. Southern blot analysis	18
마. Northern blot analysis	19
바. Polymerase chain reaction (PCR)	20
사. Enzyme linked immunosorbent assays (ELISA)	20
아. Polyclonal Antibody의 제조	21
자. 공시동물 및 다배란 유기	21
차. 수정란 준비	22
카. 수정란으로 외래 유전자 주입	22
제 3 장 결과 및 고찰	
제 1 절 : 유선조직 특이적 발현 재조합 유전자의 개발	23
제 2 절 : 유선조직 특이적 세포주에서 사람 락토페린의 발현	23
제 3 절 : 유즙중으로 사람 락토페린을 분비하는 형질전환 생쥐의 개발	28
참고문헌	36



제 1 장 서 론

락토페린은 분자량이 약 80kDa인 철 결합성 당단백질 (Powel and Ogden, 1990)로서 락토페린 1분자당 2개의 철 결합부위와 2개의 bicarbonate ion의 결합부위를 갖고 있다 (Aisen and Listowsky, 1980). 락토페린은 주로 포유류의 유즙에 존재하고, neutrophils의 secondary granules과 자궁의 점액질에도 존재하는 것으로 알려져 있다 (Baggiolini *et al*, 1970). 뿐만아니라 신체중에서 점액질을 분비하는 기관, 특히 눈물, 침, 콧물, 담즙, 체장액등에서 대체로 발견되고 있다 (Masson and Heremans, 1966). 락토페린은 N-terminal과 C-terminal의 2개의 domain으로 구성되어 있으며, 그의 아미노산 염기배열이 유사하여 300~500년전에 유전자의 중복에 의해 생겨난 것으로 추정하고 있다 (Metz-Boutigue *et al*, 1984). 락토페린의 당쇄는 mannose, galactose, N-acetylglucosamine, fructose, sialic acid로 구성되어 있으며 당 함량은 중성당이 8.5%, amino당 2.7%이고, 650~700개의 amino acid가 single peptide로 연결되어 있는 transferrin family에 속하는 것으로 알려져 있다. 사람 락토페린은 murine의 락토페린 서열과 70%의 homology를 갖고 있으며, bovine의 락토페린과는 69%의 homology를 갖고 있다. 락토페린의 기능에 대하여 살펴보면 장내 유해 세균에 대한 항세균작용이 있으며, 면역체계에 작용하여 host defense에 관여 하는 것으로 알려져 있으며 (Bullen, 1981), 면역조절 기능이 있고 (Ellison, 1988), 어머니로부터 신생아로의 첫 이온의 승급역할을 겸비하고 있는 것으로 보고되고 있다 (Arnold, 1977).

우유는 모든 식품중에서 영양성분이 가장 균형있게 함유되어 있는 완전식

품으로 알려져 있는데, 이는 영양학적 측면에서 좋을 뿐만 아니라 각종 다양한 생리활성물질들을 포함하고 있기 때문이다. 특히 락토페린의 경우는 다양한 생리활성기능, 특히 화학전달 물질로서의 기능을 살려 의약품 및 락토페린이 첨가된 제품 또는 포유기의 송아지 육성용 사료 첨가제등으로 일본에서 시판되고 있는 실정이다. 최근 락토페린 절편에 각종 생리 활성 peptide가 발견되고 있고, 기능성 식품으로서의 응용 가능성이 기대되는 결과를 얻고 있다. 또한 반추동물의 사료 첨가제로서 또한 철의 보급원으로서의 용도도 고려되고 있고, 그 외에도 식품가공 공정과정중 천연적인 첨가제로서 이용될 수 있을 것으로 기대된다. 이러한 생물활성을 지닌 락토페린을 대량 생산할 수 있고 생산 system을 개발하는 것은 경제적인 측면으로나 국민보건 증진의 측면으로 매우 중요한 일이다. 이미 알려진 바에 의하면 진핵생물의 유전자 산물을 세균등과 같은 미생물에서 대량 생산할 경우 glycosylation이나 post translational modification이 제대로 이루어지지 않아 활성은 지닌 물질을 얻는다는 것은 매우 힘든 일이다. 또한 세포배양기술을 이용할 경우 위의 문제는 해결할 수 있지만 비용과 분리 정제라는 측면에서는 비 효율적인 것으로 평가되고 있다. 따라서 많은 연구자들은 이들 대량 생산 system 을 개발하고자 노력하여 왔으며 이들을 포유동물의 유즙을 통해 대량 생산하는 bioreactor system을 개발하게 되었다.

본 연구에서는 사람 락토페린을 대량 생산하는 형질전환 생쥐를 개발하기 위한 일환으로 락토페린 유전자의 클로닝 및 유선조직 특이적 발현 vector의 개발을 제1차년도에 결과에서 이미 보고하였다. 제2차년도에서는 이들 vector를 이용, model system으로 형질전환 생쥐를 개발하였고, 이들 형질전환 생쥐에서 유선조직 특이적 발현성을 조사하였다.

제 2 장 재 료 및 방 법

1. 실험재료

가. DNA

제1차년도에 클로닝한 사람 락토페린 cDNA 2.4kbp (유 등, 1992), promoter와 polyadenylation signal을 포함하고 있는 pCC (rat β -casein gene) (이 등, 1992), 그리고 cell transfection 실험시 selective marker로 pSV2neo 유전자를 유전자 재조합 실험에 이용하였다.

나. Bacterial strain

E. Coli HB101 [F⁻, hsd S20(rB⁻, mB⁻), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rspL20(Sm), xyL-5, mtL-1, supE44], E. Coli DH5 α [supE44 Δ lac U169 (ϕ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 end A1 gyrA96 thi-1 relA1]를 transformation 및 plasmid 증폭용으로 사용하였다.

다. 제한효소 및 기타효소

제한효소는 제철화학 및 Boehringer Mannheim으로부터 구입하여 사용하였으며, T₄ DNA ligase, CIP (Calf intestine alkaline phosphatase) 및 Klenow, T₄ DNA polymerase는 Boehringer Mannheim 그리고 DNA sequencing kit version 2.0은 U.S.B에서 구입하여 사용하였다.

라. 시약류

방사성 동위원소는 Amersham과 Du Pont사에서 구입하였고, Trisma base, SDS, salmon sperm DNA 등 일반 시약은 주로 Sigma에서 구입하여 사용하였으며, 유기 및 무기용매는 Merck와 Junsei Chemical Co. Ltd (Japan), Wako Chemical Co. Ltd (Japan)에서 구입하여 사용하였다.

마. 배지류 및 세포주

HC11 (mouse mammary epithelial cell line) 세포주는 스위스의 Dr. R.K. Ball 박사로부터 제공받아 본 연구실에서 계대 배양하여 사용하였다. 세포 배양에 사용된 RPMI 1640 medium, fetal bovine serum (FBS), gentamicin은 Gibco에서, epithelial growth factor (EGF), insulin, dexamethasone, prolactin은 Sigma에서 구입하여 사용하였다.

바. 실험동물

공시동물로는 한국화학연구소 안정성 센터로부터 분양받은 교잡종 (BDF1 : C57BL x DBA) 생쥐를 사용하였고, 암수의 연령은 각각 4~7주령 및 12주령 이상의 것을 이용하였다. 사육조건은 일조시간을 14시간으로 고정하였으며, 22℃ 사육조건에서 사료와 물은 무제한으로 공급하였다.

2. 실험방법

가. 사람 락토페린 유전자를 이용한 유선조직 특이적 발현 벡터의 개발

제 1차년도에서는 이미 rat β -casein 유전자의 5' promotor region 2.8kbp 절편과 동 유전자의 3' polyadenylation signal을 포함하고 있는 3.4kbp

질편을 이용하여 유선조직 특이적 발현 vector를 개발하였음을 보고한 바 있다.

한편 제 2차년도에서는 이 pCC vector의 ClaI site에 5' UTR이 제거된 락토페린 cDNA를 삽입시켜 pCChcLf-1의 유선조직 특이적 발현 vector를 개발하였다.

나. 세포 배양 및 transfection

본 연구에 사용된 생쥐의 유선조직 특이적 세포주인 HC11은 10% FBS, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 insulin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EGF와 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 gentamycin을 포함하는 RPMI 1640 배지에서 유지되었다. 90mm의 배양접시에 3×10^5 cells을 깔아주고 20~24시간 후 10% FBS가 포함된 DMEM 배지로 교환한 뒤, 재조합 발현 vector 10 μg 와 pSV2neo 유전자 1 μg 을 cotransfection 시켰다. 그런 다음 24시간 배양 후 RPMI 1640 growth medium으로 교환하고, 그 다음날부터 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 G418이 포함된 transfectants의 선택배지에서 선별을 시작하였다. 2-3주간 선별된 G418 내성 colony를 pooling하여 실험에 사용하였다. Lactogenic hormones으로 사람 락토페린 유전자의 발현을 유도하기 위하여 confluent 상태의 transfectant cells을 G418이 포함된 growth medium으로 2일간 배양하고 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 insulin, 1mM dexamethasone, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 prolactin을 서로 조합시켜 3~4일간 처리하였다.

다. Western blot analysis

Lactogenic hormones으로 유도한 세포 배양액을 3,000 g에서 10분간 원심 분리하여 상층액만 취한다음, XPERTEX Micro-Spin filter를 이용하여 100배

농축시켰다. 이러한 sample은 SDS-PAGE에서 전기영동하고, Hoefer transfer kit를 이용하여 nitrocellulose membrane에 전이한 후 3% BSA가 포함된 PBS buffer로 실온에서 overnight blocking 하였다. 다음날 PBST (PBS + 0.05% Tween 20)로 washing 한후 anti-human lactoferrin rabbit antiserum (1 : 1500)을 상온에서 2시간 처리하였다. 그런 다음 다시 PBST로 washing하였으며 alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit IgG goat antibody (1 : 2000)를 상온에서 2시간 처리하였다. 이렇게 처리된 membrane을 충분히 washing 한후 NBT (nitro blue tetrazolium)와 BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)가 함유된 substrate buffer에서 30분간 발색반응을 실시하였다.

라. Southern blot analysis

Calcium phosphate방법으로 transfection한 HC11 cells과 microinjection하여 얻은 생쥐의 chromosome내 vector의 삽입여부를 확인하기 위하여 Southern blotting을 실시하였다. pCChcLf-1으로 transfection된 cells을 proteinase K가 포함된 lysis buffer (50mM Tris pH 8.0, 100mM EDTA, 0.5% SDS, 50 μ g/ml proteinase K)로 55 $^{\circ}$ C에서 overnight 반응시켰다. 반응이 끝난후 phenol과 phenol/chloroform (1:1) extraction을 각각 두번 실시하였다. 여기서 얻은 상층액에 1/10 volume의 3M NaOAc(pH 5.2)와 2 volume의 ethanol을 첨가한 후, 원심분리하여 chromosomal DNA를 침전시켰다. 침전된 chromosomal DNA pellet은 RNase A가 포함된 TE(pH 8.0)에 녹여 RNA를 제거하였다. DNA농도는 260nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 10 μ g의 chromosomal DNA를 EcoRI으로 절단하고 0.8% agarose gel에서 전기영

동한 후 변성 증화과정을 거쳐 Nylon membrane에 전이하였으며, 80°C dry oven에서 2시간 baking하여 membrane 상에 고정시켰다. Hybridization은 50% formamide, 5×SSPE, 2×Denhardt's solution, 0.5% SDS, 100µg/ml의 salmon sperm DNA의 반응조건 및 42°C에서 42시간동안 실시하였다. Probe는 lactoferrin cDNA의 EcoRI-SmaI 절편을 nick translation 방법을 이용하여 만들었다. Hybridization이 끝난 뒤 0.1 X SSC와 0.1% SDS의 washing buffer로 65°C 수조에서 washing 하였다.

마. Northern blot analysis

배양 Cells과 형질전환 생쥐의 유선조직에서 외부로부터 도입된 유전자의 발현을 알아보기 위해서 RNA를 분리 정제한 후 Northern blot analysis를 실시하였다. 먼저 HC11 cells의 경우 confluent하게 키운 90mm dish에 prolactin, dexamethasone, insuline이 포함된 FBS-free RPMI 1640 medium에서 3~4일간 induction한 후 Sambrook *et al.* (1989) 방법에 따라 total RNA를 분리하였다. Solution D : 2 M NaOAc (pH 4.0) : phenol : chloroform/isoamylalcohol (49:1)을 1 : 0.1 : 1: 0.2의 비율로 넣고 vortexing한 후, 4°C에서 13,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 상층액만 회수하였다. 그런다음 2 volume의 ethanol을 첨가하고 -20°C에서 1시간 처리한 후 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 침전된 RNA pellet을 500µl의 solution D에 녹인 후 ethanol 침전을 다시 실시하였으며, 침전된 RNA는 DEPC-처리된 증류수 50µl에 녹였다. 30µg의 total RNA를 1% agarose-18% formaldehyde gel에서 100mA로 3~4시간정도 전기영동하고, capillary transfer 방법에 의해 Nylon membrane에 transfer한 후 80°C에서 2시간 baking하였다. Northern

blot analysis 사용된 probe와 hybridization은 Southern blot analysis에 사용된 동일한 방법으로 수행하였다.

바. Polymerase chain reaction (PCR)

형질전환 생쥐의 germ line transmission은 생후 4-6주령에 있는 F1생쥐의 ear 조직을 얻어 PCR방법으로 확인하였다. 먼저 ear punch로부터 얻은 조직을 20 μ l의 extraction buffer (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 20mM NaCl, 1mM EDTA, 1% 20 μ g/ml SDS, Proteinase K)에 넣어 55 $^{\circ}$ C에서 30분간 digestion시켰다. 그다음, 이 sample을 5분간 boiling하여 proteinase를 변성시킨 후, 1 μ l의 양을 따서 PCR을 수행하였다. Primers는 사람 락토페린 cDNA의 3'쪽에 있는 oligo 10 (5'-GGCCGCGGTTTTACTTC CTGAGG-3')과 oligo 27 (5'-GGAAATAACA ATGAGGC-3')을 사용하였다. PCR은 denaturation을 94 $^{\circ}$ C에서 1분, annealing을 55 $^{\circ}$ C에서 1분, 그리고 extension을 72 $^{\circ}$ C에서 1분씩, 30 cycles을 반복하여 실시하였다. 이렇게 하여 얻은 PCR 생성물을 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후, 외래유전자의 합성여부를 확인하였다.

사. Enzyme linked immunosorbent assays (ELISA)

형질전환 생쥐에서 분만 10일째 유즙을 채취하고 이를 원심분리하여 얻은 유청 단백질을 ELISA에 이용하였다. 먼저 96-well plate에 유청단백질을 coating buffer (0.1M NaHCO₃ pH 9.6, 0.02% sodium azide)와 함께 섞어 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 coating하고, rinse buffer (0.01M sodium phosphate pH 7.4, 0.15M NaCl, 0.05% Tween 20)로 washing한 후 blocking solution (1% BSA in PBS)으로 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 처리하였다. Blocking이 끝난 후 rinse

buffer로 다시한번 washing을 하고 300ug/ml의 lactoferrin antibody가 들어있는 diluent buffer (0.05M Tris-HCl (pH 8.0) 1mM MgCl₂·6H₂O, 0.15M NaCl, 0.05% Tween 20, 0.02% sodium azide, 1% BSA)를 첨가한 다음 37°C incubator에서 2시간 처리하였다. 이것을 다시 rinse buffer로 washing하고 alkaline phosphatase가 conjugation된 anti-rabbit IgG goat antibody (1/2000 diluent)로 37°C에서 2시간 처리하였다. 배양이 끝난후 rinse buffer로 washing하고 substrate buffer (0.05M NaHCO₃, pH 9.8, 10mM MgCl₂·6H₂O)에 1mg/ml의 농도로 녹인 p-NPP (p-nitro phenyl phosphate)를 처리하여 실온에서 1시간동안 반응시킨 후 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

아. Polyclonal Antibody의 제조

생후 6~8주령의 뉴질랜드 화이트종 토끼를 구입하여 1주일의 적응기간을 거친뒤 antibody제조에 사용하였다. 사람 락토페린 (Sigma) 250 μ g과 Freund's complete adjuvant (FCA)를 동량씩 잘 섞은 후, 머리뒤와 양 앞발 뒷다리의 피아조직에 immunization하고, 양쪽 엉덩이 근육에 주사하였다. 2주일 후부터 일주일 간격으로 두번 boosting주사를 실시하였으며, 3번째 immunization이 끝난다음 3~4일째에 귀의 정맥에서 피를 뽑아 ELISA를 통해 anti-lactoferrin antibody가 제대로 생성되었는지 확인하였다. Lactoferrin antibody가 제대로 생성되었을 경우 lactoferrin 250 μ g을 귀의 정맥에 주사하여 최종 boosting을 실시하였다. 7일후 토끼의 심장에서 채혈하여 4°C에서 4시간 보관한 후 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 혈청층을 분리하였다.

자. 공시동물 및 다배란 유기

공시동물은 한국 화학 연구소 안전성 센터에서 분양받은 교잡종 생쥐 (C57BL×DBA)와 ICR 계통을 사용하였다. 다배란 유기를 위하여 PMSG (pregnant mare's serum gonadotropins; Seraruman, Japan)와 HCG (human chorionic gonadotropin; Sigma, USA)를 48시간 간격으로 각각 5 IU씩 생쥐의 복강내에 주사한 다음, 동일계통의 웅성생쥐와 자연 교미를 유도하였으며, 다음날 아침 질전이 확인된 개체만을 실험에 사용하였다.

차. 수정란 준비

1세포기 수정란을 HCG주사 후 18~22시간에 난관으로부터 회수한 다음, hyaluronidase (300 unit/ml, Sigma, USA) 용액에서 3분간 처리하여 난구세포를 제거하였다. 난구세포가 제거된 수정란을 HEPES-buffered M2 배지로 수회 세척한 후 실험에 사용하였다. 교잡종 생쥐의 수정란은 전핵의 관찰을 쉽게 하기 위해 12,000 rpm에서 3분간 원심처리하여 미세주입에 이용하였다.

카. 수정란으로 외래 유전자 주입

외래 유전자는 rat의 β -casein promoter와 polyadenylation signal을 포함하고 있는 pCC vector에 사람 락토펜 cDNA가 삽입된 expression vector를 linear형태로 만든 다음, T₁₀E_{0.1} (10mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1mM EDTA)에 용해하여 미세주입에 사용하였다. 미세주입시 DNA 농도는 4~8ng/ μ l 정도로 사용하였으며, 외래 유전자의 미세주입은 DIC system을 갖춘 Inverted microscope (Nikon)하에서 미세조작기 (Leitz)를 사용하여 수정란의 웅성전핵에 주입하였다. 외래 유전자가 주입된 수정란을 M16 배양액에서 17~20시간 배양하였으며, 정상적인 2세포기 수정란으로 발달한 수정란만을 선별하여 대리모의 난관에 이식하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 : 유선조직 특이적 발현 재조합 유전자의 개발

본 연구실에서 개발한 pCC vector (rat β -casein promoter 5' 2.8kbp와 rat β -casein 3' 3.4kbp가 pSP70 vector에 삽입된것)의 cloning site인 ClaI에 5' UTR이 제거된 사람 락토페린 cDNA를 삽입시켜 Fig. 1에서 보는 바와같이 subcloning하여 유선조직 특이적 발현 vector를 개발하였으며, 이를 pCChcLf-1이라 명명하였다. 형질전환동물의 개발을 위해서는 pCChcLf-1을 XhoI과 HpaI으로 절단하고 0.7% agarose gel에서 전기영동한 다음 ELUTIP-d (S & S)으로 정제하여, 최종적으로 4~8ng/ μ l의 미세주입용 DNA를 준비하였다.

제 2 절 : 유선조직 특이적 세포주에서 사람 락토페린의 발현

1. *In vitro* transfection

지난해 보고서에서 pCChcLf transfectant HC11 cells은 이미 개발하였고, 5' UTR이 제거된 pCChcLf-1의 transfectants를 얻기 위해 다음과 같이 실험하였다. 90mm 배양접시에 3×10^5 cells을 깔아주고, 20~24시간 뒤 calcium phosphate precipitation방법으로 HC11 cells에 transfection하였다. 그런다음 200 μ g/ml의 G418로 2-3주간 선별하여 내성 colony만 pooling하였다. 이들 transfectant HC11 cells의 염색체상에 재조합 유전자가 안정하게 삽입되어 있

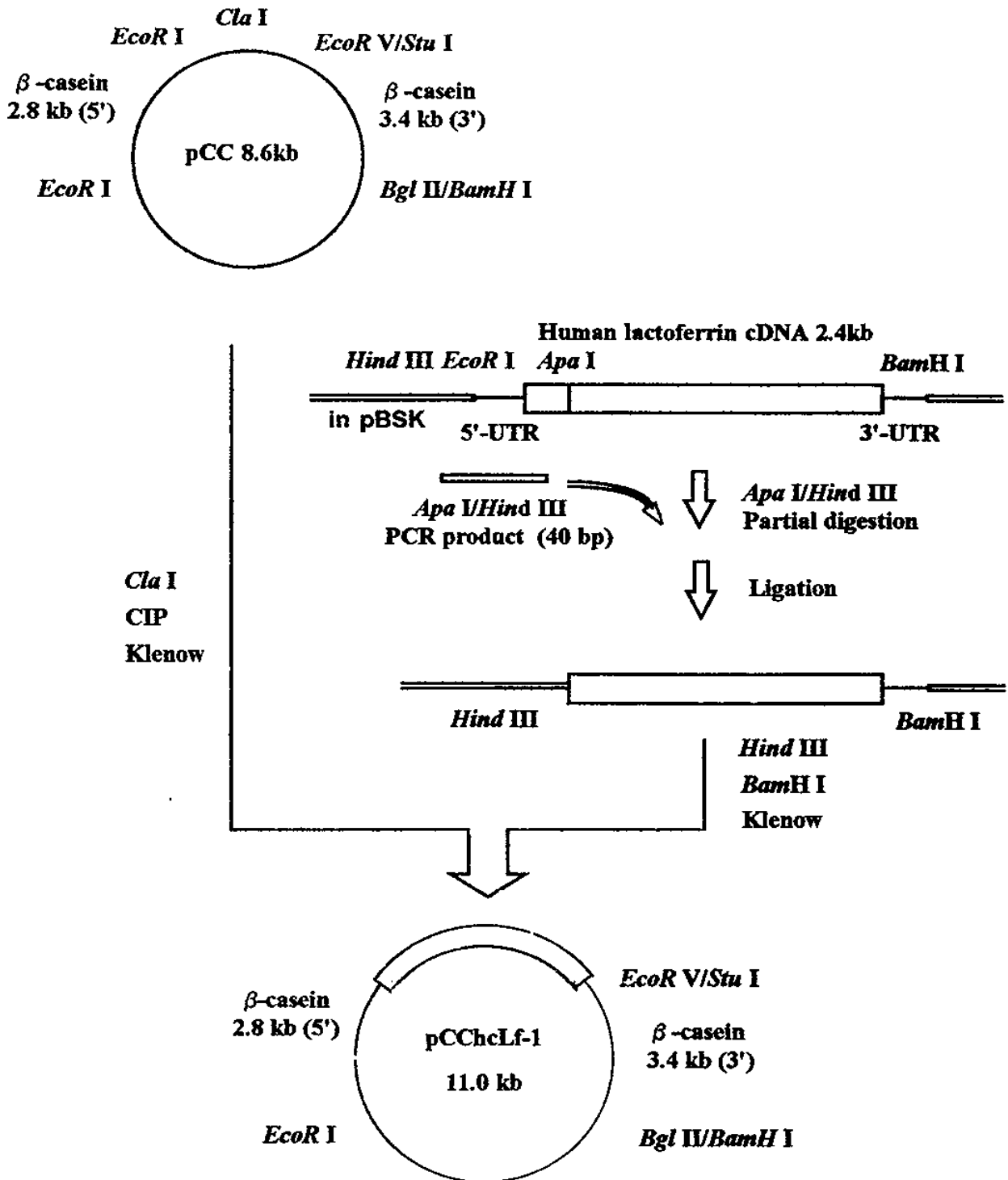


Fig. 1. Construction of pCChcLf-1 plasmid

는지 확인하기 위하여 genomic DNA를 분리하여 Southern analysis를 실시하였다 (Fig. 2). 그 결과 pCChcLf, pCChcLf-1 transfectant HC11 cells에서는 사람 락토페린 cDNA가 삽입된 것으로 확인되었다. 따라서 본 실험에서 실시한 transfection에 의해 pCChcLf-1 유전자가 HC11 cells의 chromosome내로 안정하게 유지되고 있음을 알 수 있었다.

가) Lactogenic hormones 유도에 의한 사람 락토페린 발현 분석

HC11 cells은 유선조직 특이적 세포주로서 lactogenic hormones, 즉 prolactin과 dexamethasone등과 같은 hormones에 영향을 받아 유선조직 특이적 발현 양상을 보여 주는 것으로 보고되어 있다. 따라서 본 연구에서는 pCChcLf-1 유전자가 실제 lactogenic hormones의 영향을 받아 사람 락토페린을 발현하는지 관찰하고자 상기 hormones을 처리하여 Northern blotting을 실시하였다. pCChcLf-1로 transfection된 HC11 cells를 prolactin과 dexamethasone으로 유도하여 total RNA를 분리한 다음 Northern blotting을 실시하였다 (Fig. 3). 그 결과 parental HC11 cells에서는 사람 락토페린의 발현이 보이지 않는 반면 pCChcLf-1 transfectant HC11 cells에서는 사람 락토페린의 발현이 관찰되었다. 따라서 transfection한 pCChcLf-1의 유전자가 HC11 cells에서 lactogenic hormones의 영향을 받아 정상적으로 사람 락토페린을 발현하고 있음을 알 수 있었다.

나) Western blot analysis

pCChcLf와 pCChcLf-1 transfectant HC11 cells이 lactogenic hormones에 의해 사람 락토페린을 합성, 분비하는지 알아보하고자 Western blotting을 실시

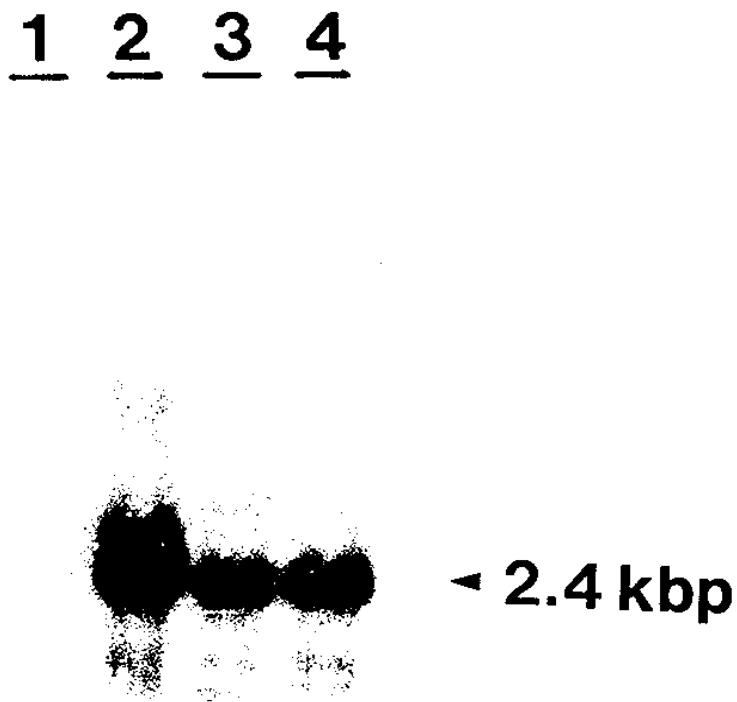


Fig. 2. Southern analysis in pCChcLf, pCChcLf-1 transfected HC11 cells. Genomic DNAs isolated from the cells were digested with EcoR1, electrophoresed, and blotted to nylon membrane. The blot was probed with ³²P-labeled human lactoferrin cDNA. Lane 1; HC11 cells, Lane 2; pCChcLf transfected HC11 cells, Lanes 3-4; pCChcLf-1 transfected HC11 cells.

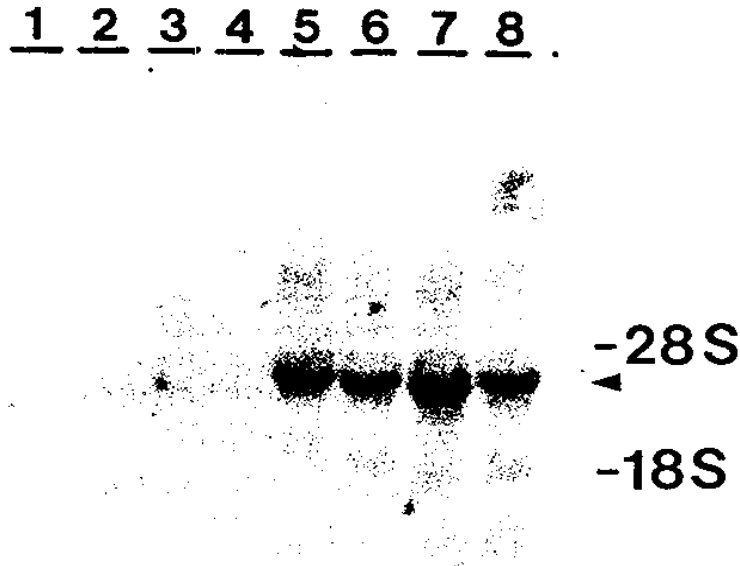


Fig. 3. Expression of human lactoferrin gene in pCChcLf-1 transfected HC11 cells.

Transfectants were cultured in the presence or absence of lactogenic hormones (insulin, dexamethasone and prolactin) for 4 days. Total RNA was isolated from these cells and Northern analysis was performed.

Lane 1; HC11 cells, Lanes 2-4; ins + dexa, dexa + prl, ins + dexa + prl treated HC11 cells, Lane 5; pCChcLf-1 transfected HC11 cells, Lanes 2-4; ins + dexa, dexa + prl, ins + dexa + prl treated pCChcLf-1 transfected HC11 cells.

하였다 (Fig.4). pCChcLf와 pCChcLf-1 transfectant HC11 cells의 배양액에서 80kDa의 사람 락토페린이 검출되는 반면, parental HC11 cells의 배양액에서는 검출되지 않았다. 따라서 lactogenic hormones에 의해 사람 락토페린의 발현이 유도되고 이로부터 합성 및 분비가 정상적인 경로를 통해 일어나는 것으로 생각된다. 또한 단백질의 분자량도 사람으로부터 분리정제된 락토페린 positive control과 같은 크기로 만들어짐으로써 인체내에서의 post translational modification과 유사한 processing 과정을 거치는 것으로 추정된다.

제 3 절 : 유즙중으로 사람 락토페린을 분비하는 형질전환 생쥐의 개발

본 연구에서는 *in vitro* 상태에서와 같이 실제 *in vivo*에서도 재조합 유전자가 유선조직에 특이적으로 발현이 되는지 조사하고자 형질전환 생쥐를 개발하였다. pCChcLf, pCChcLf-1을 이용한 형질전환 생쥐 생성은 각각 5 마리, 9 마리를 만들고 이중 각각 1 line의 여러 장기조직을 분리, total RNA를 추출하여 유선조직 특이적 발현을 확인하였다. 또한 milk에서 ELISA 방법을 이용하여 분비되는 락토페린의 양을 결정하였으며, 다음 세대로의 germ line transmission 여부를 PCR로 확인하였다.

1. pCChcLf와 pCChcLf-1 유전자가 도입된 형질전환 생쥐의 개발과 후대검정

형질전환 생쥐의 개발을 위해 BDF1 (C57BL × DBA) 생쥐를 이용하였으며 재료 및 방법에 따라 수정란을 준비하고 옹성 진행에 미세주입하였다. 이들을 ICR의 가천에 이식하고 이들로부터 얻은 산자의 꼬리에서 genomic

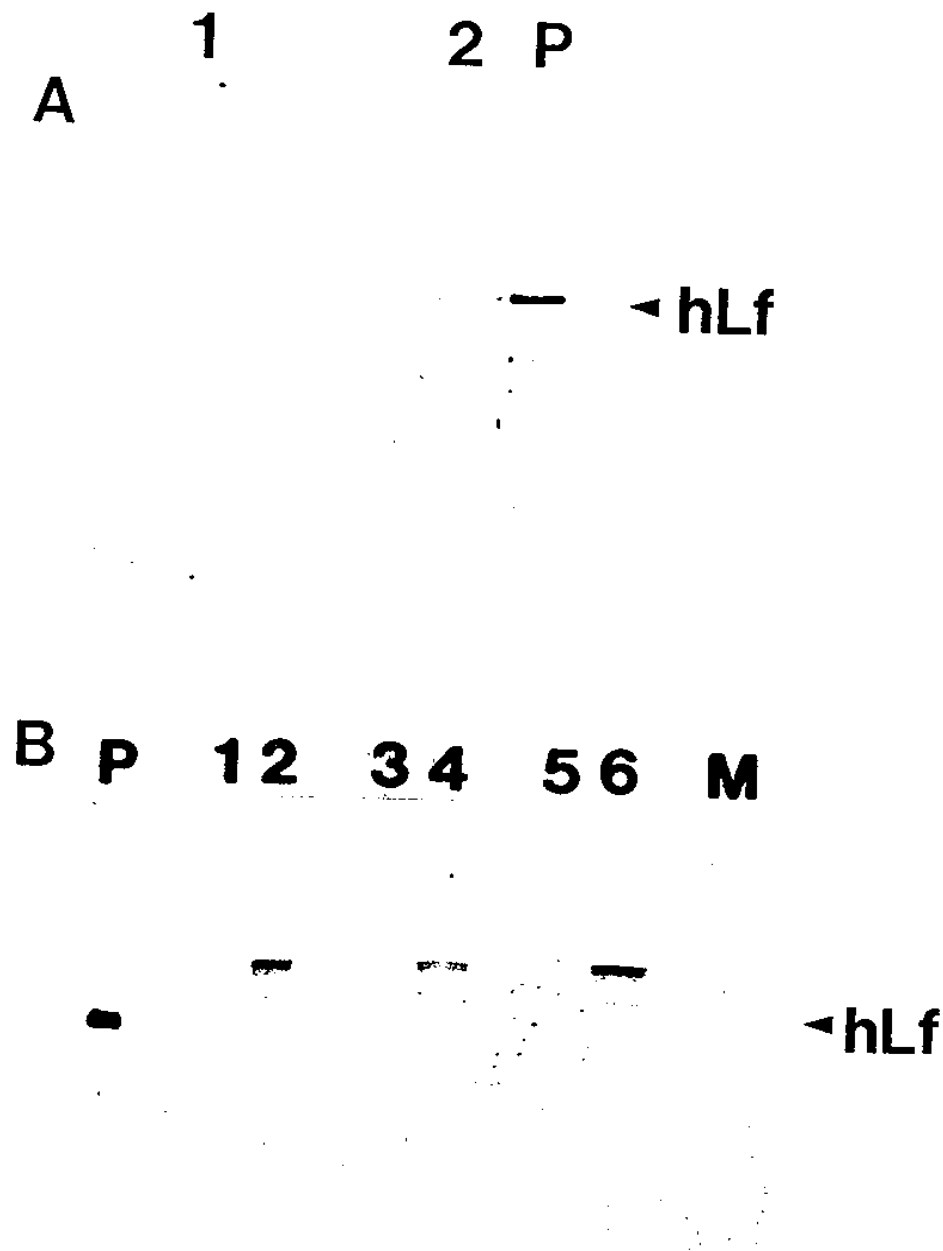


Fig. 4. Western blot analysis of human lactoferrin in lactogenic hormone -induced HC11 transfectants.

Induction media of cells were prepared and the human lactoferrin was detected by using alkaline phosphatase-conjugated antibody followed color reaction.

A. pCChcLf transfected HC11 cells

Lane 1; ins + dexta + prl treated HC11 transfectants; Lane 2; ins + dexta + prl treated HC11 cells.

B. pCChcLf-1 transfected HC11 cells

Lanes 1,3,5; ins + dexta, dexta + prl, ins + dexta + prl treated HC11 cells, Lanes 2,4,6: ins + dexta, dexta + prl, ins + dexta + prl treated HC11 transfectants.

DNA를 분리, 먼저 PCR (Polymerase Chain Reaction) 방법을 이용하여 분석하였다. pCChcLf의 경우는 지난해 보고서에서 이미 형질전환 생쥐를 개발하였음을 보고하였다. pCChcLf-1의 경우는 PCR 방법으로 외래유전자의 삽입 여부를 판별하였고 그뒤 다시 Southern analysis (Fig. 5)를 실시하였으며, 형질전환 생쥐 개발의 전체적인 결과를 Table 1에 정리하였다. pCChcLf, pCChcLf-1의 경우 각각 총 1067, 648개의 생쥐수정란에 유전자를 미세주입한 다음, 생존한 836, 482개의 수정란 중 741, 473개를 가친에 이식하여 각각 49, 62마리의 산자를 생산하였다. 생산된 산자 중에서 각각의 유전자를 지닌 형질전환 생쥐는 각각 5, 9마리인 것으로 확인되었다. 그리고 이들 형질전환 생쥐에서 transmission을 관찰하였는데, pCChcLf의 경우 5 lines 중 (2 lines은 transmission이 안됨) 3마리가 멘델의 유전법칙에 따라 삽입된 외래유전자를 안정적으로 후대에 전달하고 있었다. pCChcLf-1의 경우 2 lines은 자손에 전달이 되나 2마리는 transmission 되지 않았다 (Table 2). 이와같이 transmission이 되지 않는 형질전환 생쥐는 외래유전자 삽입에 있어서 mosaicism 현상으로 인해 germ line transmission이 안되는 것으로 생각되나, 보다 정확한 삽입형태를 알아보기 위해서는 보다 많은 산자를 생산하여 transmission 효율을 검토해야만 할 것이다.

2. 형질전환 생쥐의 유선조직 및 유즙에서 사람 락토페린 발현

형질전환체로 확인이 된 생쥐는 교잡종 (C57BL x DBA)생쥐와 교배, 번식시키면서 분만후 10일쯤에 유즙을 채취하였다. 그런후 생쥐를 희생시켜 각각의 장기조직으로부터 total RNA를 분리한 후 외래 유전자 발현을 관찰하였다. 다른 장기조직과는 달리 유선조직에서 사람 락토페린 유전자 발현이 강

Table 1. Production of transgenic mice carrying CChcLf and CChcLf-1 genes

Gene	Survived eggs /injected eggs	No. of eggs transferred	No. of young	No. transgenic /No. analysed
CChcLf	836/1067	741	49	5/33
CChcLf-1	482/648	473	62	9/45

Table 2. Profiles of the transgenic founder mice

Transgenic mice	Fertility /Sex	Transmission	Expression in milk (ng/ml)	
CChcLf	TG1	Fertile/♂	transmit	-
	TG2	Fertile/♀	not	340
	TG3	Fertile/♂	transmit	-
	TG4	Fertile/♂	not	-
	TG5	Fertile/♀	transmit	ND
CChcLf-1	TG1	Fertile/♂	not	-
	TG2	died	-	-
	TG3	Fertile/♀	ND	-
	TG4	Fertile/♂	not	-
	TG5	died	-	-
	TG6	Fertile/♂	transmit	-
	TG7	Fertile/♀	transmit	60
	TG8	died	-	-
	TG9	Fertile/♀	ND	-

ND : not determined

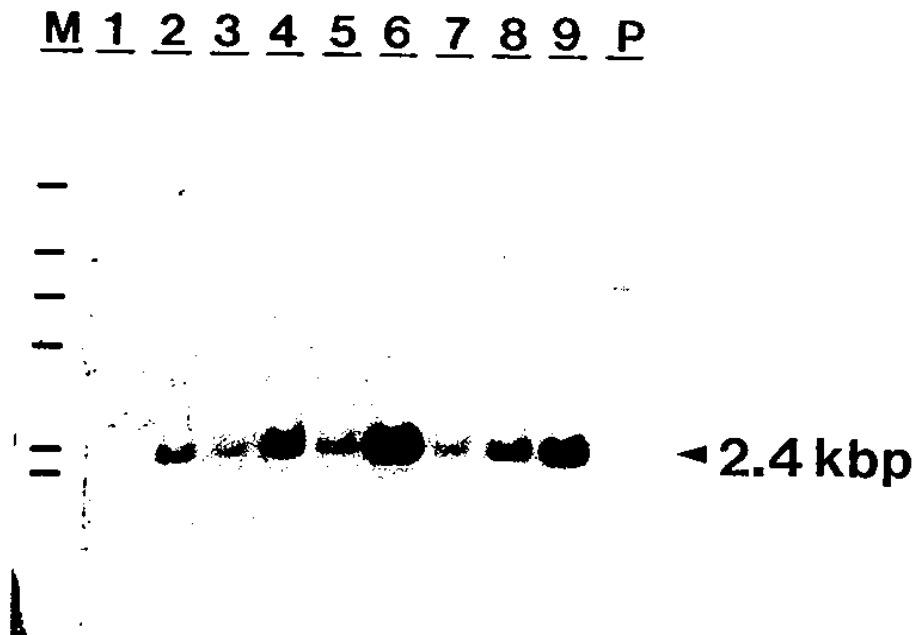


Fig. 5. Southern analysis of tail DNAs from pCChcLf-1-transgenic founder mice. Lane 1; size marker, Lanes 2-10; transgenic founder mice, Lane 11; positive control (20pg of injected DNA)

하게 나타남을 관찰하였다 (Fig. 6). 그리고 형질전환된 생쥐들이 어느정도의 락토페린을 유즙속으로 분비하는지 조사하고자 ELISA 방법을 사용하였다. pCChcLf의 형질전환 생쥐 TG-2 line은 340ng/ml 수준이었으며, CChcLf-1의 TG-7 line은 60ng/ml 수준의 사람 락토페린을 유즙중으로 분비하고 있음이 확인되었다.

이상의 연구결과를 통해 본 연구진은 사람 락토페린을 생산할수 있는 재조합유전자 2종류를 개발하여 이를 유선조직 특이적 세포주(HC11)와 형질전환 생쥐의 유선에서 조직 특이적으로 발현시켰다. 최근에 5' untranslated region (UTR)이 유전자 발현의 조절에 관여한다는 보고가 있다. 본 연구에서도 유선조직 세포주에서 사람 락토페린 cDNA의 5' UTR이 존재하는 pCChcLf의 발현을 5' UTR을 제거한 pCChcLf-1과 비교해 보았다. Western blotting의 결과에 의하면 pCChcLf-1 보다 5' UTR이 있는 pCChcLf로 transfection된 세포주에서 보다 많은 양의 사람 락토페린을 분비하고 있었다. 이는 세포내 pCChcLf의 copy수가 pCChcLf-1보다 3-4배 높게 존재함을 고려하더라도 5' UTR이 유전자 발현을 양성 조절하는 것으로 생각된다. 또한 CChcLf, CChcLf-1으로 형질전환된 생쥐의 경우 각각 1마리씩 분석한 결과에서도 CChcLf 형질전환 생쥐의 유즙에서 사람 락토페린이 더 많이 검출되었다. 이러한 결과는 2가지 재조합유전자의 copy수가 비슷한 점으로 미루어 볼때, 형질전환 생쥐에 유선조직에서도 아마 5' UTR이 양성조절을 한다고 생각해 볼 수 있다. 그러나 형질전환 생쥐에 있어서는 외래유전자의 삽입 위치가 발현효율에 영향을 미치는 것으로 알려져 있기 때문에 형질전환 생쥐들의 발현양의 차이가 "position effect"에 의해 초래될 수 있음을 완전히 배제할

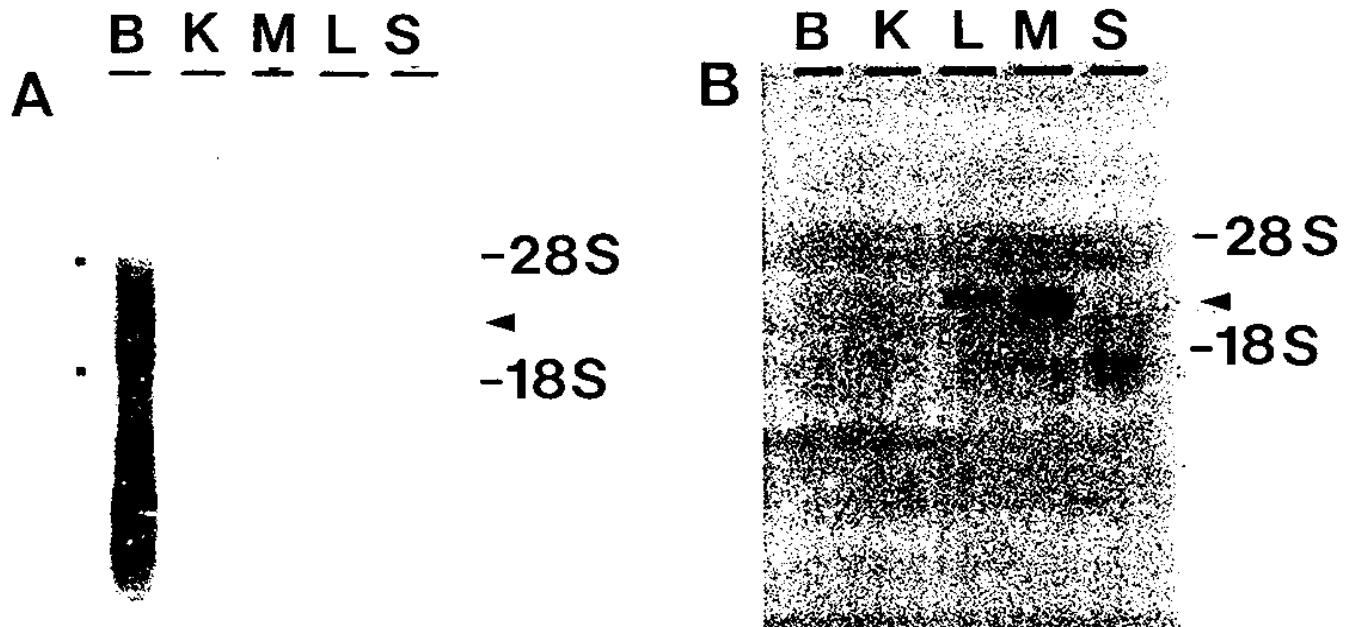


Fig. 6. Mammary gland expression of human lactoferrin in transgenic mice. Total RNA was isolated from the tissues of day 10 lactating transgenic females (B; brain, K; kidney, L; liver, M; mammary gland, S; spleen).
 A. CChcLf⁻transgenic mice
 B. CChcLf-1⁻transgenic mice

수 없다. 앞으로 이와 관련한 연구를 위해서는 좀 더 많은 수의 형질전환 라인을 얻어 비교해야만 할 것으로 생각된다.

제 4 장 결 론

사람 젖의 단백질들은 유아에게 특이적 기능을 가질 뿐만아니라 아미노산 원으로도 제공되고 있다. 특히 철 결합성 당단백질인 락토페린은 항균작용과 같은 생물학적 의의를 가지며, 철흡수의 조절에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구의 목적은 animal bioreactor system의 모델동물로서 유즙중으로 사람 락토페린을 분비하는 형질전환 생쥐를 개발하는데에 있다. 제 1차년도에서 이미 사람 락토페린의 클로닝과 유선조직 특이적 발현을 위한 기본 벡터(PCC)를 이용하여 두가지의 발현벡터를 재조합하였다 (PCChcLf와 pCChcLf-1). 유선조직 특이적 세포주인 HC11세포에 이들 벡터를 transfection시켜 발현성을 검토하였으며, 또한 이들 유전자가 삽입된 형질전환 생쥐를 개발하였다. 그 결과로서, 상기 발현벡터 플라즈미드를 pSV2neo 유전자와 함께 co-transfection 시켰을때, 사람 락토페린이 유선조직 특이적 세포주(HC11)에서 발현되고 있음을 Northern과 Western 분석으로 검증하였다. 그리고 이들 유전자가 삽입된 형질전환 생쥐의 유즙으로 사람 락토페린이 분비되는지를 알아보기 위하여 ELISA로 확인한 결과, 각각의 형질전환 생쥐 계통은 유즙중으로 각각 340ng/ml과 60ng/ml의 사람 락토페린을 분비하고 있었다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때, 본 연구에서 개발한 유선조직 특이적 발현 벡터는 포유동물 유선에서 유용한 단백질을 생산하는데 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Aisen, P. and Listowsky, I. (1980) *Annu. Rev. Biochem.* 49, 357.
- Arnold, R.R., Cole, M.F., and McGhee, S.R. (1977) *Science* 197, 263.
- Baggiolini, M., DeDuve, C., Masson, P.L., and Heremans, F. (1970) *J. Exp. Med.* 131,559.
- Bullen, J.J. (1981) *Rev. Infect. Dis.* 3, 1127.
- Ellison III, R.T., Giehl, T.J., and LaForce, F.M. (1988) *Infect. Immunol.* 56, 2774.
- Masson, P.L. and Heremans, J.F. (1966) *Procid. Biol. Fluid* 14,115.
- Metz-Boutigue, M.-H., Jolles, J., Mazurier, J. Schoeutgen, F., Legrand, D., Spik, G., Montreuil, J., and Jolles, P. (1984) *Eur. J. Biochem.* 145, 659.
- Powell, M.J. and Ogden, J.E. (1990) *Nucleic Acids Research* 18,13.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) in *Molecular Cloning*, 2nd ed. 7.3
- 유대열 등 (1992) 특정연구개발사업 보고서 BSG 70390-422-4.
- 이경광 등 (1992) 특정연구개발사업 보고서 BSN 80430-421-4.