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

과학기술처장관 귀하

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

1993. 8.

주관연구기관 : 한국과학기술연구원 유전공학연구소

연구책임자 : 유 대열 (한국과학기술연구원 유전공학연구소 책임연구원)

연 구 원 : 이 경광 (" " 책임연구원)

한 용만 (" " 선임연구원)

이 철상 (" " 연 구 원)

강 만종 (" " 연 구 원)

조 용연 (" " 위촉연구원)

배 수경 (" " 위촉연구원)

김 우영 (" " 위촉연구원)

안 상건 (" " 위촉연구원)

박 정선 (" " 위촉기능원)

윤 창연 (" " 위촉기능원)

윤 병재 (" " 위촉기능원)

요약보고서

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 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 보고 되어있다. 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 부가하는 작용이 미생물에는 없기 때문에, 당쇄가 단백질의 생리활성에 중요한 역

할을 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 가능하여, 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 Factor XI 등을 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 형태로의 락토페린을 분비할 수 없으므로, 생물활성이 갖춰진 락토페린을 얻는 것은 거의 불가능하다. 락토페린은 사람의 유선상피세포에서 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 볼때 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 형질전환동물을 숙주로 이용해 생산하는 것은 국민 건강차원 뿐만 아니라 낙농업및 유가공업의 획기적인 발전에 크게 기여할 것으로 기대된다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

1. In vitro transfection 및 lactoferrin assay

재조합유전자(pCChcLf)를 인산칼슘공침전 방법에 따라 생쥐유선상피세포주(HC11)에 pSV2-neo 유전자와 함께 transfection 시키고 G-418로 stable transformant를 selection하였다. selection된 세포를 모아서 genomic DNA를 추출한 다음 도입된 재조합 유전자가 stable하게 세포내 염색체 상에 삽입되었음을 southern blotting으로 확인하였다.

2. 사람락토페린 유전자가 도입된 형질전환 생쥐개발

재조합유전자(pCChcLf)를 미세주입에 용이하게 정제하고(CChcLf) 이를 교잡종(C57BL×DBA)의 자성으로부터 회수한 수정란 웅성전핵에 미세주입시킨 다음 가임신된 생쥐(ICR)의 난관에 transfer하여 산자를 얻었다. 태어난 산자의 꼬리로부터 genomic DNA를 추출하고 제한효소로 절단한 다음 Southern blot를 행하였다.

Ⅳ. 결과및 활용에 관한 건의

1. In vitro transfection 및 lactoferrin assay

1)In vitro transfection

Calcium phosphate precipitation 방법을 이용하여 HC11 cells을 pCChcLf와 pSV2neo로 transfection 시킨 뒤 G418로 stable transfectant만을 선별해 내고 실제 expression vectors의 host chromosome내로의 stable integration 여부를 알아보기 위해 Southern hybridization을 실시하였다. 먼저, cell culture flask에서 200μg/ml G418이 포함된 RPMI growth medium으로 overgrowth 시킨 transfectant cells을 trypsin 처리후 원심분리 하여 cell pellet 만을 모은뒤 TBS buffer로 충분히 씻어내고 proteinase K가 들어있는 extraction buffer를 처리하여 4시간동안 55℃에서 incubation하였다. 이어 phenol extraction과 EtOH precipitation을 거

쳐 chromosomal DNA를 분리해 내고 20μg의 chromosomal DNA를 EcoR1으로 complete digestion 시킨뒤 0.8% agarose gel에서 electrophoresis하였다. Southern transfer는 Hybond C filter paper로 행하였고(α-^{32}p)dCTP로 labelling된 EcoR1에서 Smal까지의 1Kb fragment를 probe로 하여 42℃에서 hybridization을 행하였다. 다음날 반응이 끝난 filter paper를 0.1%SDS, 0.1XSSC의 washing solution으로 washing하고 guiger counter에 나타난 signal정도에 따라 exposure를 행한뒤 X-ray film을 현상하였다. 실험결과, transfectant HC11 의 경우 2.4kb의 위치에서 Lactoferrin gene이 detection되었으나 parental HC11 cell에서는 negative로 본 실험에서 행한 transfection에 의해 pCChcLf vector가 chromosomal DNA내로 stable integration된 상태로 유지되어 왔음을 알 수 있다.

2) 락토페린 Assay

pCChcLf로 transfection된 HC11 cells로 부터 human lactoferrin이 실제 expression되는 지의 여부와 그 정도를 알아보기 위한 assay방법으로 Western Blot이 요구된다. 본 실험에서는 모유를 사용하여 Western Blot의 control실험을 우선 행하였다. 모유내에서는 2g/L정도의 Lactoferrin이 존재하고 있어 이를 positive control로 사용할 수 있다. 먼저, 모유 1.5ml을 원심분리하여 지질층인 윗층을 제거하고 5μl를 따서 SDS-PAGE을 행하였다. Gel로부터 NC filter paper로의 Western transfer는 Hoefer제품인 Transfer Kit를 사용하였다. Lactoferrin만의 specific detection은 polyclonal anti-Lactoferrin Ab (rabbit)를 사용하였으며 이는 peroxidase로 conjugation되어 있어 primary reaction 후 바로 color reaction을 행하였다.

본 실험에서 positive control로 사용한 모유로 Western blotting을 행한 결과 80KD 부위에서 positive band가 detection되었다. 이로써 실제 모유내에 존재하고 있는 Lactoferrin을 본 실험실의 western blot방법으로 detection할 수 있었으므로 앞으로의 실험에 응용할 예정이다.

2. 사람락토페린 유전자가 도입된 형질전환 생쥐 개발

사람락토페린이 유선조직 특이적 발현시스템에서 발현되는지의 여부를 확인하기 위해 재조합유전자 pCChcLf를 제한효소 XhoI과 HpaI으로 절단하여 linear형태의 주입 DNA로 정제하고 (CChcLf), 이 주입유전자 (CChcLf)를 생쥐 BDF1 (C57BL/DBA)의 수정란에 미세주입한 다음 대리모(ICR)에 이식함으로써 현재까지 4마리의 락토페린 transgenic mice를 얻는데 성공하였다.

이들 락토페린 transgenic mice의 염색체상에 삽입된 주입 DNA가 다음 세대로 transmission되는지 여부를 조사한 결과 CChcLf TG-1 line은 산자 16마리 중 8마리가 transgenic으로 판명되어 mendelism에 따라 주입 DNA가 transmission되고 있음을 확인하였다. 그러나 CChcLfTG-4 line은 전혀 hybrid하지 않아 모자일 type으로 판명되었다. 현재 transmission 실험을 계속하고 있으며 앞으로 유즙을 채취하여 락토페린 발현유무를 확인할 예정이다.

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 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.

Previously we cloned human lactoferrin cDNA and recombined it into the pCC expression vector designed to be expressed in mammary gland. This time we transfected pCChcLf recombinant DNA with pSV2neo gene into HC 11 cells and microinjected CChcLf DNA into the pronucleus of fertilized embryo of hybrid mouse(C57BL×DBA). When transfectant of the pCChcLf into HC 11 cells were analyzed by southern blot, It was proved that the transfected DNA was inserted into the chromosome of host. We also succeeded in producing five transgenic mice carrying the injected DNA(CChcLf ; rat β-casein/Human Lactoferrin Fusion gene).

We are in the process of analyzing the expression of human lactoferrin in both transfected cell and mammary gland of transgenic mice.

CONTENTS

목 차

제1장 서 론

락토페린은 분자량이 80KD인 철 결합성 당단백질이다(1). 락토페린은 주로 포유동물의 유즙 중에 존재하고 눈물, 침, 콧물, 담즙, 췌장액, 정액등의 각종 분비액 및 호중구에도 검출되고 있다(2). 락토페린은 항균작용뿐만 아니라 각종 생리활성 작용을 지니고 있어 생체방어에 대단히 중요한 기능을 가지고 있는데 그 이용현황과 전망을 살펴보면 다음과 같다(3). 즉, 락토페린의 각종 생리활성기능, 특히 화학전달물질로서의 기능을 살린 의약품 및 정균작용을 이용한 식품제조업에의 용도가 고려되고 있으나, 오늘날 모유화의 일환으로써 유아용 조제분유에 락토페린이 첨가되고 있고 또한 포유기의 송아지 사료에 사료첨가제로써 시판되고 있을 정도다. 그러나, 락토페린의 단편에 각종 생물활성 peptide가 발견되고 있어 항생제 및 기능성 식품으로의 응용이 기대되고 있으며 또한, 반추동물의 사료첨가제로서의 효능도 인정되고 있다. 아울러, 철의 보급원으로써의 용도로도 연구개발되고 있다. 그외에도 식품가공공정에서 천연물질이며 안전한 첨가제로써, 방부효과를 이용할 수 있을 것이다. 이처럼 락토페린은 다양한 생리활성을 지니고 있어 의약품 뿐만 아니라 식품 및 사료첨가제로써의 다양한 용도로 개발될 수 있어 주목되는 연구대상으로 부각되고 있다. 이러한 생물활성을 지닌 락토페린을 대량 생산할 수 있는 생산시스템을 개발한다는 것은 매우 중요하다. 왜냐하면, 오늘날 유아용 조제분유에 첨가되고 있는 락토페린은 사람의 락토페린과 상당한 차이를 보여주고 있어(4,5) 사람이 이용하는 경우에는 사람의 락토페린을 사용하는 것이 가장 좋을 것으로 생각된다. 그러나 아직까지 사람의 락토페린을 대량생산할 수 있는 방법이 확립되어 있지 않아 이를 대량생산할 수 있는 생산시스템을 개발하는 것이 필요하다. 사람 락토페린을 대량생산하는 방법이 전세계적으로 연구개발 중에 있는데 그 연구현황을 살펴보면 다음과 같다.

뉴우질랜드의 Tweedie 그룹은 baby-hamster kidney cell에서 사람 락토페린의 발현을 검토해 보았는데 락토페린이 20mg/litre의 농도로 배양액 중에 생산되고 있음을 보

고하였다(6). 미국 Baylor 의과대학 Conneely 그룹은 Aspergillus nidulans에서 ethanol 유도가능한 alcohol dehydrogenase (aLcA) promoter의 작용 하에 사람 락토페린을 생산하는 발현시스템을 보고하고 재조합 락토페린이 5μg/ml 생산된다고 발표하였다(7). 또한 그들은 Aspergillus Oryzae에서 α-Amylase promoter의 작용 하에 25mg/l수준까지 사람 락토페린이 생산되고 있음을 보고하였다(8). 한편 네델란드의 Gene pharming Europe B.V. 회사에서는 사람 락토페린 재조합 유전자가 염색체 상에 삽입된 형질전환젖소를 개발하였다고 보고하였으나(9), 태어난 젖소가 숫컷이었으며 그 이후 사람 락토페린의 발현 유무에 관한 보고가 나오지 않고 있다. 본 연구실에서는 락토페린을 대량생산하는 형질전환젖소를 생산할 것을 목표로 금번 in vitro transfection 및 transgenic mice 실험을 통하여 약간의 지견을 얻었기에 이를 보고한다.

제 2장 재료 및 방법

1. 실험재료

가. DNA

제 1차년도에 클로닝한 사람 락토페린 cDNA 2.4kb(hcLf)(10), 벡터로써 pCC(rat β-casein gene의 조절 부위 이용 제작)(11), 그리고 pSV2neo gene을 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]은 transformation 할 때 host로 사용하였다.

다. 제한효소 및 기타효소

제한효소는 제철화학, Boehringer Mannheim, 그리고 New England Biolabs, Inc.으로부터 구입하여 사용하였고, T4 DNA ligase는 제철화학, Boehringer Mannheim으로부터, Bacterial alkaline phosphatase는 Amersham으로 부터 구입하였다.

라. 세포주 및 호르몬

HC11(mouse mammary epithelial cell line) 세포는 스위스의 R.K.Ball 박사로부터 제공받았다. 세포배양에 사용된 RPMI 1640 medium, fetal bovine serum, gentamycin은 Gibco로부터 구입하였고, EGF, insulin, dexamethasone, prolactin은 Sigma로부터 구입하였다.

마. 실험동물

공시동물로는 유전공학연구소 생물 검정실로부터 분양받은 교잡종(F1:C57BL × CBA)의 자성과 웅성생쥐로서, 연령은 각각 4-7주령 및 12주령 이상의 것을 이용하였다. 사육조건은 일조시간을 14시간으로 고정하였으며, 사료와 물은 무제한으로 급여하였다.

바. 수정란의 준비

다배란 유기를 위하여 PMSG(Pregnant mare's serum gonadotropin: Serarumon, Japan)와 HCG(Human Chorionic Gonadotropin : Sigma, USA)를 48시간 간격으로 각각 5IU씩 자성생쥐의 복강내에 주사한 다음, 동일계통의 웅성생쥐와 1:1로 합사시켰다. 다음날 아침, 질전의 유무를 확인하여 질전이 있는 개체만을 골라서 경추파열법(cervical dislocation method)으로 도살한 다음 난관을 절취하였다. 절취된 난관의 팽대부를 주사바늘로부터 터뜨려 난구세포괴(cumulus cell mass)를 회수하였다. 회수된 난구세포괴를 300 unit/ml의 hyaluronidase(Sigma, USA) 용액에 2-3분 처리하여 난구세포(cumulus cells)를 제거한 다음, 이들 수정란을 신선한 배양액으로 3회 이상 세척하였다. 세척 후, 핵막이 뚜렷이 보이게 하기 위해 microfuge 원심분리기로 15,000rpm에서 3분간 원심처리하였다.

사. 배양액

외래 유전자를 미세주입하기 전후의 수정란을 배양하기 위한 배양액으로는 0.4% BSA(Sigma, USA)가 함유된 bicarbonate-buffered M16 배양액을 사용하였으며, 체외배양을 위하여 petridish(Falcon, USA)에 약 50μl의 배양액 방울을 만들어 heavy mineral oil(Sigma, USA)로 피복한 다음, 5% CO_2 배양기 내에서 최소한 2시간 이상 전배양을 실시하였다. 수정란의 미세조작은 HEPES-buffered M2 배양액에서 실시하였고, 이들 배양액은 사용하기 전에 0.22μm의 millipore membrane(Gelman Sci., USA)으로 여과하였다.

2. 실험방법

가. 세포배양

HCII 세포는 5μg/ml insulin, 10μg/ml epidermal growth factor(EGF), 50μg/ml gentamycin 그리고 10% fetal bovine serum(보체불활성 시킴)을 포함하는 RPMI 1640 배지 속에서 배양 유지되었다. 배양기의 조건은 2-3일에 한번씩 배지를 교환하여 주

었다.

나. Transfection

Calcium phosphate precipitation 방법에 의해 cells을 transfection 시켰다. 즉, 직경 9cm의 배양접시(Culture dish)에 약 2×10^5 cells을 깔아주고 RPMI growth medium으로 24시간 정도 배양한 뒤 10% fetal bovine serum이 포함된 DMEM으로 배양액을 교환하여 4시간 더 배양한 후 20㎍의 재조합 유전자 pCChcLf와 1㎍의 pSV_2-neo 유전자를 동시에 transfection 시켰다. 배양액은 24시간 후 growth medium으로 교환해 주었으며 그 다음날부터는 G418(200㎍/ml)이 포함된 Selective growth medium으로 바꿔줌으로써 transfectant만을 선별해 내는 과정에 들어갔다. 3주정도의 선별 배양을 통해 생겨난 G418 내성 colony를 모두 모아 confluence 상태까지 배양시켰다.

다. Southern Blot

1. Southern Hybridization

Calcium phosphate precipitation 방법을 이용하여 HC11 cells을 pCChcLf와 pSV2neo로 transfection 시키고 G418로 stable transfectant만을 선별해 낸뒤 실제 expression vectors의 host chromosome내로의 stable integration 여부를 알아보기 위해 Southern hybridization을 실시하였다.

먼저, cell culture flask에서 200㎍/ml G418이 포함된 RPMI growth medium으로 overgrowth 시킨 transfectant cells을 trypsin 처리후 원심분리하여 cell pellet만을 모든다. 이를 PBS buffer로 충분히 씻어내고 proteinase K가 들어있는 extraction buffer(10mN Tris ClCpH8.01, 0.1M EDTA(pH 8.0), 0.5% SDS)를 처리하여 4시간동안 55℃에서 incubation 하였다. 이어 phenol extraction과 EtOH precipitation을 거쳐 chromosomal DNA를 분리해 내고 20㎍의 chromosomal DNA를 EcoRI으로 complete digestion 시킨뒤 0.8% agarose gel에서 electrophoresis 하였다. Southern transfer는 Hybond C filter paper로 행하였고 [α-^{32}P]dCTP로 labelling된 EcoRI에서 SmaI까지의 1Kb fragment를 probe로 하여 42℃에서 hybridization을 행하였

다. 다음날 반응이 끝난 filter paper를 0.1% SDS, 0.1 X SSC의 washing solution으로 washing하고 guiger counter에 나타난 signal 정도에 따라 exposure를 행한뒤 X-ray film을 현상하였다.

라. Lactoferrin Assay

PCChcLf로 transfection된 HC11 cells로부터 human lactoferrin이 실제 expression 되는지의 여부와 그 정도를 알아보기 위한 assay 방법으로 Western blot이 요구된다. 본 실험에서는 모유내 Lactoferrin의 존재유무와 그 정도를 Western blot으로 먼저 조사하였다. 실제 모유에는 2g/l 정도의 Lactoferrin이 존재하고 있어 이를 positive control로 사용하였다. 먼저 모유 1ml을 원심분리하여 지질층인 윗층을 제거하고 5μl를 취하여 SDS-PAGE(12% Separating gel, 5% stocking gel)를 행하였다. Gel로부터 NC filter paper로의 단백질 이동은 Hoefer 제품인 transfer kit를 사용하였고 polyclonal anti-Lactoferrin Ab(rabbit)로 Western hybridization을 실시하였다. 이들 Ab는 Peroxidase로 conjugation되어 있으므로 H_2O_2와 4-Chloro-1-Naphtol을 사용한 Color reaction을 통해 Lactoferrin이 존재하는 Specific band를 detection해 내었다.

마. 주입용 DNA의 준비

앞서 만든 plasmid 즉, pCChcLf 약 20μg을 제한효소 XhoI과 HpaI으로 절단하여, 0.8% agarose gel electrophoresis, dialysis tube을 이용한 electroelution, phenol extraction 2회, ether extraction 3회, ethanol precipitation을 연속적으로 수행함으로써 rat β-casein 유전자의 5'말단부위, 사람 락토페린 structural gene과 전사종결 signal sequence를 포함한 3'말단부위를 포함하는 7.2kb의 CChcLf DNA절편을 분리하였다. 이렇게 분리한 DNA절편을 미세주입에 적합하도록 정제하기 위해 아래와 같이 CsCl equilibrium gradient centrifugation을 실시하였다. 즉, 약 4-6μg의 DNA 절편을 TE(10mM Tris, 1mM EDTAm pH8.0)에 녹여 2.4ml이 되게 하고, 여기에 3g의 CsCl(Boehringer Mannheim)을 녹임으로써 1.7g/ml density의 DNA-CsCl 용액을 준비하

였다. 이를 1.3×5cm polyallomer ultracentrifuge tube(Beckman)로 옮기고, light mineral oil(Sigma)로 가득 채운 다음, TST 55.5 rotor(Kontron)를 이용하여 20℃에서 48시간 동안 40,000rpm으로 원심분리하였다. 원심분리 후, peristaltic pump를 이용하여 tube의 바닥으로부터 0.2ml의 분획을 채취하였으며, 분획에서 2μl씩을 따서 분획 내 DNA절편의 유무를 agarose gel로 확인하였다. DNA절편의 존재가 확인된 분획을 함께 모아 dialysis tube에 옮긴 다음, 2l의 injection buffer(10mM Tris, 0.1mM EDTA, pH 7.4)하에서 48시간동안 수회 buffer를 교체하면서 dialysis를 행한 후 회수하였다. 회수한 DNA 용액을 260nm 파장으로 조절된 spectrophotometer로 O.D. 값을 측정함으로써 DNA의 농도를 계산하였으며, 최종적으로 DNA 농도가 4-8ng/ml 되게 희석하였고, 이를 50μ aliquot로 나누어 냉동 보관하였다가 미세주입 실험에 사용하였다.

바. Micropipets의 제작

외경이 1mm이고 길이가 13cm인 유리관(Garner glass, USA)으로 고정용과 주입용의 micropipets를 제작하였다. 먼저 이 유리관을 puller(David kofp, USA)에 장치한 다음 가늘게 된 부위의 길이가 1-1.5cm정도 되도록 pulling하였다. 이렇게 뽑은 microprpets을 현미경 하에서 선별하여 좋은 것은 미세주입용으로 사용하였고, 좋지 않은 것은 microforge(DeFronbrune, France)를 이용하여 외경 약 20μm 위치에서 잘라 끝을 매끄럽게 한 후 고정용 pipet으로 사용하였다. 그리고 모든 micropipets의 끝을 microforge로 15-30° 정도 구부려서 사용하였다.

사. 재조합 유전자의 미세주입(microinjection)

외래유전자는 미세조작기(micromanipulator:Leitz, West Germany)를 이용하여 수정란의 웅성 전핵에 주입하였는데, 이때 핵막의 용이한 관찰과 실험의 편리함을 도모하기 위하여 DIC system을 갖춘 도립현미경 하에서 실험을 수행하였다.

아. 가친의 준비

자연적인 상태에서 발정기의 ICR 자성생쥐를 육안으로 선별하여, 정관 수술을 실시한 웅성생쥐와 3:1의 비율로 합사시킨 후, 다음 날 아침에 질전이 있는 개체 만을

가친으로 사용하였다.

자. 수정란의 이식

외래 유전자가 주입된 수정란들은 CO_2 배양기내에서 2세포기까지 배양한 후 건강한 상태의 수정란을 선별하여 이식에 공시하였다. 먼저 마취제(Somnopentyl; Pitman-Moore, USA)를 생쥐 체중 10g당 0.6mg을 복강 내에 주사하여 전신 마취를 실시하였다. 마취된 가친의 배측 정중선을 약 1cm 정도 절개하고 난소와 난관을 들어 내어 각각의 난관에 수정란을 이식한 다음, 근육층과 표피를 봉합하였다.

차. 외래 유전자의 분석

이식 후 태어난 산자에서 외래 유전자의 삽입(integration) 여부를 알아보기 위하여, 생후 4-6주령에 꼬리를 잘라 DNA를 추출 정제한 다음, southern 및 slot hybridization으로 DNA를 분석하였다.

(1) 생쥐 꼬리 DNA의 분리

생쥐 꼬리를 1-2cm 길이로 잘라 700μl의 용해용액(50mM Tris pH 8.0, 100mM EDTAm 0.5% SDS, 500μg/ml proteinase K)과 함께 1.5ml tube에 넣고, 55℃에서 밤샘동안 shaking하여 꼬리 조직을 용해시켰다. 다음날 조직 용해액을 phenol extraction 1회, phenol/chloroform(1:1) extraction 2회, chloroform extraction 1회 실시한 후, 상층액을 취하여 이 용액 1/10 volume의 3M sodium acetate와 2 volume의 absolute ethanol을 첨가하여 precipitation 시킴으로써 DNA pellet을 얻었다. 이를 70% ethanol로 2회 세척한 후, 공기중에서 말리고서 RNase A(20μg/ml, Boehringer Mannhaim)를 포함한 TE(8.0)를 400μl 첨가하여 상온에서 하룻밤 방치함으로써 DNA를 녹임과 동시에 RNA를 분해시켰다. 여기에 다시 1/10 volume의 3M NaOAc와 2 volume absolute ethanol을 넣어 precipitation 시킴으로써 RNA를 제거하였으며, 70% ethanol로 2회 세척하고 DNA pellet을 회수한 다음, 100μl의 증류수를 첨가하여 상온에서 녹인 후, spectrophotometer(Kontron)로 260nm 파장에서의 흡광도를 측정함으로써, DNA의 농도를 결정하였다.

(2) Southern hybridization

제한효소 EcoRI으로 절단한 약 5㎍의 생쥐 꼬리 DNA를 size marker와 함께 0.8%의 agarose gel에서 전기영동을 실시하였다. 그 후 Tsao 등(16)과 Purrello와 Balaxs(17)의 방법에 따라 gel을 완전히 말린 후, denaturing 용액(0.5N NaOH, 0.15M NaCl)과 neutralizing 용액(0.5M Tris, 0.15M NaCl)에서 각각 30분씩 처리한 다음, 일반적인 방법으로 hybridization을 실시하였다.

(3) Autoradiography

Hybridization 후 bag에서 꺼낸 NC filter는 washing 용액Ⅰ(1×SSPE, 0.5% SDS)를 5분간 상온에서 2회 세척하고, washing 용액Ⅱ(0.1×SSPE, 0.5% SDS)로 42℃에서 1시간, 65℃에서 1시간씩 각각 1회 세척한 후 최종적으로 0.1×SSPE용액으로 헹구고서 공기중에서 건조시켰다. 건조된 NC filter는 X-ray film과 함께 casette에 넣어 -70℃에서 deep-freezer에서 48시간 노출시킨 후 현상하였다.

제 3장 결과 및 고찰

제 1절 재조합유전자(pCChcLf)의 Construction

본 연구실에서 개발한 pCC 벡터(rat β-casein promoter 2.8kb와 rat β-casein 3' 3.4kb가 pSP 70 vector에 삽입된 것) (11)의 유일한 클로닝 Site인 ClaI에 사람 락토페린 cDNA 2.4kb를 그림 1과 같이 Subcloning하여 재조합유전자 pCChcLf를 만들었다. in vitro transfection 실험을 위해 pCChcLf를 무균상태로 준비하였고, 형질전환동물 개발을 위한 미세주입 DNA를 만들기 위해 제한효소 XhoI과 HpaI으로 절단하고 0.7% agarose gel을 걸어 7.2kb를 electroelution하고 CsCl 원심방법으로 정제하였다.

제 2절 In vitro transfection 및 lactoferrin assay

1. In vitro transfection

transfection 이후 G418 내성 colony를 모두 모아 confluent 상태로 키운 뒤 이들 cells에서 Chromosomal DNA를 분리하여 southern Hybridization으로 외래 유전자의 삽입여부를 조사한 결과 그림 2에서 보는 바와 같이 transfectant HC11의 경우 2.4kb의 위치에서 band가 나타났고 parental HC11 cell에서는 negative 하였다. 따라서 이 결과로부터 본 실험에서 행한 transfection에 의해 pCChcLf vector가 Chr. DNA내로 Stable integration 된 상태로 유지되어 왔음을 알 수 있다.

2. Lactoferrin Assay

본 실험에서 positive control로 사용한 모유 단백질 Lactoferrin Protein에 관한 Western blotting을 실시한 결과 80KD 부위에서 positive band가 detection 되었다(그림 3). 이로써 본 실험실의 Western blot 방법을 이용하여 실제 Lactoferrin을 detection 할 수 있으므로 향후 transfected HC11 cell에서의 Lactoferrin expression에 관한 실험을 해 나갈 예정이다.