韓國受精卵移植學會誌(1994) 第 9 券 第 3 號
Korean J. Emb. Trans. (1994) Vol. 9, No. 3 pp. 229~234

사람 성장호르몬 유전자가 미세주입된 체외수정란 유래의 송아지 생산

손동수 · 김선정* · 김일화 · 서국현 · 이광원 · 상병돈 ·
박무균 · 이철상* · 한용만* · 이경광* · 정상원
국립종축원

Production of a Normal Calf from Bovine Embryo Microinjected with Human Growth Hormone Gene

D. S. Son, S. J. Kim*, I. H. Kim, G. H. Seo, K. W. Lee, B. D. Sang, M. K. Park, C. S. Lee*, Y. M. Han*, K. K. Lee* and S. W. Jung
National Animal Breeding Institute

SUMMARY

This experiment was carried out to develop the model system for mass production of biomedical and nutritional proteins (human proteins) through mammary gland of the transgenic cattle produced by gene manipulation and embryological technologies. Human growth hormone gene fused with rat β-casein gene promoter was microinjected into pronuclei of one cell bovine embryos produced by *in vitro* fertilization. After microinjection, embryos were cultured *in vitro* for 6 or 7 days. Twenty embryos reaching to blastocysts were transferred to 10 beef recipients, each receiving two embryos. Recipients were diagnosed for pregnancy by rectal palpation at 76 days after embryo transfer. One of them was pregnant to term and produced a female calf weighing 21 kg at 280 days following embryo transfer. DNA was extracted from umbilical cord tissue and blood of calf born for confirming gene insertion. As determined by Southern hybridization, the transgene was not found.

서 론

포유동물의 수정란에 외래 유전자를 미세주입하여 형질전환동물이 개발된(Gordon등, 1987) 이래 부가가치가 높은 인체생리 활성물질을 유즙과 함께 분비할 수 있도록 하는 유전공학기법의 연구가 수행되어 오고 있다(Hammer 등, 1985; Simons 등, 1988; Pursel 등, 1989; McEvoy와 Sreenan, 1990; Krimpenfort, 1991). Bühler 등(1990)은 토끼의 β-casein유전자의 promoter에 cytokine으로 작용하고 암환자의 면역치료제로 사용되는 사람 IL-2(인터루킨 2)유전자를 연결시킨 재조합유전자를 토끼의 수정란에 미세주입하여 토끼의 유즙에서 사람 IL-2가 생산, 분비되었다고 보고하였다.

Meade 등(1990)은 Bovine α_{S1}-casein 유전자조절에 의해 사람의 urokinase가 생쥐의 유즙 중에서 생산, 분비된다고 하였다.

이 등(1992)과 구 등(1993)은 사람의 성장호르몬 유전자와 rat β-casein 유전자의 promoter 부위를 연결하여 만든 재조합 유전자(CChGH)를 생쥐의 수정란에 미세주입후 대리모에 이식하여 생산된 형

* 한국과학기술연구원 유전공학연구소(Genetic Engineering Research Institute, KIST)

질전환 생쥐의 유즙에서 사람 성장호르몬이 발현, 분비되었다고 하였다.

따라서 본 실험에서는 사람 성장호르몬을 대량으로 생산하는 형질전환 소를 개발, 산업적으로 활용하기 위하여 사람 성장호르몬 유전자가 주입된 한우 수정란을 육우 수란우에 이식하여 형질전환 송아지의 생산을 시도하였다.

재료 및 방법

1. 수정란의 유전자 조작

한국과학기술연구원 유전공학연구소에서 재조합 유전자인 ChGH(유 등, 1993)를, 미세조작기(micromanipulator)를 이용하여 체외수정후 24~28시간째 수정란의 전핵에 미세주입한 다음, 39℃, 5% CO_2의 배양기에서 6~7일간 배양한 배반포기의 한우 수정란을 제공받았으며, 이들 수정란은 다음과 같은 방법으로 체외수정이 이루어졌다.

1) 난자의 채취와 체외성숙

도축된 한우로부터 적출한 난소를 100 IU/ml의 penicillin G와 100 mg/ml의 streptomycin sulfate(Sigma, USA)이 포함된 생리식염수가 든 보온병(30~33℃)에 넣어 3시간 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 다시 생리식염수로 수회 세척하고 난소 표면을 멸균된 kimwipe로 닦은 다음, 18 gauge 주사침이 부착된 10ml 주사기로 직경 2~6 mm 크기의 난포만을 골라 난자를 흡입, 회수하였으며 회수된 난자 중 실체현미경하에서 난구세포가 치밀하고, 난자의 세포질이 균질한 난포난만을 골라 수회 세척한 후, well당 0.5 ml의 체외성숙용 배지가 든 4 well-dish로 옮겨 39℃, 5% CO_2배양기에서 24시간 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다.

난자의 회수 및 세척에는 10 mM HEPES(Sigma, USA), 2 mM $NaHCO_3$(Sigma, USA), gentamicin(Sigma, USA)가 포함된 TCM199(Gibco 400-1100, USA)에 비동화 fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA)을 2% 첨가하여 사용하였다. 배양용 배지는 TCM99(Gibco 380-2340, USA)에 10% FBS가 첨가된 것을 이용하였다.

2) 체외수정 및 체외배양

체외수정은 한우개량사업소에서 구입한 한우 동결정액을 이용하여 실시하였다. 1회의 실험을 위해 0.5 ml straw 2개를 37℃ water bath에서 가볍게 흔들어 녹인 다음, 1 ml의 정자세척용 배지가 든 tube의 바닥으로부터 tube당 0.2 ml씩 서서히 넣고, 39℃ 배양기에 1시간 방치함으로서 정자의 swim-up을 유도하였다. swim-up을 유도한지 1시간 후, tube 상층으로부터 tube당 약 0.8 ml의 정자부유액을 회수한 다음, 정자를 정자 세척용 배지로 약 450 g으로 15분간 원심분리하는 방법으로 2회 세척하고서 hemocytometer로 정자수를 조사하였으며, 이를 난자가 든 체외수정용 배지 방울에 최종 농도가 $1\sim2\times10^6$/ml이 되도록 첨가하여 체외수정을 유도하였다. 체외수정시 사용한 배지는 glucose를 뺀 TALP배지에 10 mg/ml heparin(Sigma, USA)을 첨가하였으며, 난자 세정용은 체외수정용 배지의 $NaHCO_3$농도를 2 mM로 낮추고, HEPES 농도를 10 mM로 조정하였다. 정자의 swim-up을 유도하는 동안 체외성숙용 배지에서 성숙된 난포란을 난자 세척용 배지에서 수회 세척한 후, 미리 petridish(Falcon, USA)에 만들어 둔 45 ㎕의 체외수정용 배지 방울로 방울당 5~10개씩 옮겼다. 체외수정 유도후 18~20시간 지나서, 10% FBS가 첨가된 TCM199(Gibco 380-2340, USA)으로 난구난자 복합체를 수회 세척하고 재조합 유전자를 주입한 후, well당 0.5 ml의 동일한 배지가 든 4 well-dish에 옮겨 난자-난구세포의 공동배양을 실시하여 발달상태를 관찰하였다.

2. 수란우의 발정동기화

본 실험에 이용된 수란우는 국립종축원 대관령지원에서 사육하고 있는 미경산 및 1~5산차의 육우(헤어포드, 앵거스, 샤로레)로 발정을 동기화하기 위하여 dinoprost(Lutalyse, Upjohn) 30 mg을 1회 또는 11일 간격으로 2회 주사하였다.

3. 수정란이식

발정이 발현된 후 5~7일째의 수란우 10두에 2% lidocaine으로 경막외 마취를 하고 0.25 ml straw에 수정란 2개를 장진하여 비외과 이식기로 황체가 확

인된 쪽의 자궁각 선단부에 각각 이식하였다.

4. 임신진단

이식후 76일에 직장검사에 의하여 임신여부를 진단하였다.

5. DNA 분석

분만된 송아지의 염색체에 주입한 유전자의 삽입을 확인하기 위하여 송아지의 제대 및 혈액으로부터 DNA를 분리하였으며, 분리된 DNA는 BamHI 제한효소로 완전히 자른 후 Southern hybridization(Southern, 1975)을 실시하였다. 이때 사용한 probe는 사람 성장 호르몬 유전자의 1.2-kb PvuII 절편을 [α-^{32}P]dATP로 nick translation(Rigby 등, 1977)한 것으로 specific activity는 2×10^8 cpm/μg DNA 이상이었다.

결과 및 고찰

사람 성장호르몬 유전자가 주입된 한우 수정란 20개를 육우 수란우 10두에 이식한 결과는 Table 1과 같다.

미경산 및 1~2산차의 헤어포드 3두, 앵거스 5두, 샤로레 2두에 유전자 주입후 6~7일간 배양된 배반포기의 수정란을 1두당 2개씩 이식하였던 바 1두가 임신되었다.

초기분할 단계의 소 난자는 체외에서 성공적으로 배양이 어렵기 때문에(Goto 등, 1989; Mermillod 등, 1992) 일반적으로 다수의 형질전환 자축을 얻기 위해서는 1세포기 수정란에 미세주입 직후 수란우의 난관에 이식하고 있는 실정이다(McEvoy와 Sreenan, 1990). 그러나 McLaughlin 등(1992)은 핵치환된 난자 26개를 체외에서 상실기 혹은 배반포기까지 배양후 17두의 수란우에 각각 1~3개씩 이식한 결과 3두(17%)가 임신되었으며 그 중 1두에서 송아지 1두가 생산되었다고 하였다.

Hill 등(1992)은 소에서 체내수정 난자와 체외에서 성숙 및 수정된 난자에 유전자를 주입하여 배양하였을 때 상실기 혹은 배반포기까지 발육된 것은 체내수정 난자가 9~15%로, 체외 수정난자의 7~9%보다 높았으며 수란우에 이식후 수태율에 있어서도 체내수정 난자가 30~40%로 체외수정 난자의 24~31% 보다 높았다고 보고하였다.

Eyestone과 First(1989)는 효과적인 소 난포란의 체외성숙, 수정 및 수정란의 체외배양을 위하여 M199+FCS 배지에 난관조직으로 공배양하였을 때가 M199+FCS 단독배지에서 배양시보다 상실기 혹은 배반포기까지 발육율이 높았으며 공배양한 수정란을 수란우 11두에 각각 1~2개씩 이식한 결과 6두(55%)가 임신되었다고 하였다.

Table 1. Transfer of human growth hormone gene microinjected IVF-derived bovine embryos

Recipient				Transferred	
Breed	I.D. No	Parity	Heating[a]	embryos[b]	Pregnancy[b]
Hereford	0031	1	day 6	B & B	−
Hereford	6066	4	day 5	B & B	−
Hereford	9060	1	day 6	B & B	−
Angus	1137	Heifer	day 6	B & B	+
Angus	5159	5	day 6	B & B	−
Angus	8117	3	day 6	B & B	−
Angus	8152	3	day 6	B & B	−
Angus	8162	3	day 6	B & B	−
Charolais	5206	5	day 7	B & B	−
Charolais	9202	3	day 6	B & B	−

[a] Elapsed day from heat.

[b] B : Blastocyst.

[c] + : Pregnant, − : Non pregnant.

국내에서 이 등(1993)은 소 체외수정란에 재조합 유전자를 미세주입하여 배반포기배로의 발생율이 21%로 난포란으로부터 재조합유전자가 미세주입된 정상 배반포기배를 생산할 수 있음을 보여 주었다고 했다.

Hill 등(1992)은 체내 및 체외 수정란에 유전자를 주입하여 상실기 및 배반포기까지 배양된 수정란 1,018개를 발정이 동기화된 수란우에 이식한 결과 315두가 임신되었다고 했다.

사람 성장호르몬 유전자가 주입된 한우 수정란을 육우 수란우에 이식하여 임신된 수란우 1두에서 태어난 송아지의 내역은 Table 2와 같다.

임신된 수란우는 수정란이식후 280일에 체중 21 kg의 건강한 한우 암송아지를 분만하였다(Fig. 1).

태어난 송아지의 제대 및 혈액으로부터 DNA를 분리하여 Southern hybridization으로 염색체 상의 유전자 삽입을 확인한 결과 삽입이 되지 않았다.

유 등(1993)은 사람 성장호르몬 재조합유전자 ChGH와 CShGH를 주입한 수정란이식으로 태어난 생쥐중 염색체 상에서 유전자가 삽입된 생쥐는 ChGH 31마리중 2마리, CShGH 66마리중 3마리였다고 하였다.

Hill 등(1992)은 유전자를 주입한 수정란이식으로 분만된 송아지 193두에서 유전자가 삽입된 형질전환 소는 7두 였다고 했다.

한편 황 등(1993)은 난포란을 회수하여 체외에서 성숙 및 수정하여 국내 최초로 체외수정 유래 송아지를 생산한 바 있다.

국내에서 체외수정 송아지의 생산 자체가 극히 부진한 실정에서 본 시험에 있어서 비록 유전자가

Table 2. Production of a Korean native calf [a)] by transfer of human growth hormone gene microinjected IVF-derived embryos

Sex of calf	Birth weight (kg)	Day of transfer	Day of parturition	Gestation length[a)] (days)
Female	21	'93. 11. 02	'94. 08. 09	280

[a] DNA was extracted from umbilical cord tissue of calf for confirming gene insertion. But the transgene was not found by Southern hybridization.

[b] Gestation length after embryo transfer.

Fig. 1. A Korean native calf produced by transfer of human growth hormone gene microinjected IVF-derived embryos.

삽입은 되지 않은 송아지가 분만되었지만 재조합유전자가 주입된 수정란을 이식하여 1두가 임신이 되고 송아지가 생산된 것은 형질전환동물의 생산 전망을 밝게 해주고 있으며, 유전자주입 수정란의 발생률, 수란우의 발정동기화 등의 수정란처리 및 이식과정을 보완하여 계속적인 연구를 할 때 좋은 결과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

외래의 유용유전자를 포유동물의 유선조직에서만 특이적으로 발현시킴으로서 인체생리활성물질을 대량으로 분비할 수 있는 형질전환 소를 개발하여 가축의 생산성을 극대화시킬 목적에서 본 실험을 실시하였다. 즉, 체외에서 수정된 1세포기 수정란의 웅성전핵에 사람 성장호르몬 유전자에 흰쥐 β-casein 유전자의 조절부위를 연결시킨 재조합 유전자를 주입하여 배반포기까지 발달한 수정란을 발정발현 후 5~7일째의 육우수란우 10두에 각각 2개씩 이식을 하였으며,수정란이식후 76일에 임신진단에서 1두가 임신되었다. 임신된 수란우는 수정란이식후 280일에 체중 21 kg의 건강한 한우 암송아지를 분만하였다. 태어난 송아지의 제대 및 혈액으로부터 DNA를 분리하여 Southern hybridization으로 염색체 상의 유전자 삽입 여부를 확인한 결과 삽입이 되지 않았다.

참고문헌

Bühler TA, Brüyere T, Went DF, Stranzinger G and Bürki K. 1990. Rabbit B-casein promoter directs secretion of human interleukin-2 into the milk of transgenic rabbits. Bio/Technology 8:140-143.

Eyestone WH and First NL. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. J. Reprod. Fert. 85:715-720.

Gordon K, Lee E, Vitale JA, Smith AE, Westphal H and Hennighausen H. 1987. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mice. Bio/Technology 5:1183-1187.

Goto K, Kajihara Y, Koba M, Kosaka S, Nakanishi Y and Ogawa K. 1989. *In vitro* fertilization and development of *in vitro* matured bovine follicular oocytes. J. Anim. Sci. 67:2181-2185.

Hammer RE, Pursel VG, Rexroad Jr. CE, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD and Brinster RL. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. Nature 315:680-683.

Hill KG, Curry J, DeMayo FJ, Jones-Diller K, Slapak JR and Bondioli KR. 1992. Production of transgenic cattle by Pronuclear injection. Theriogenology 37:222.

Krimpenfort P, Rademakers A, Eyestone E, Van de Schans A, Van derBroek S, Kooiman P, Kootwijk E, Platenburg G, Pieper F, Strijker R and de Boer H. 1991. Generation of transgenic dairy cattle using '*in vitro*' embryo production. Bio/Technology 9:844-847.

McEvoy TG and Sreenan JM. 1990. The efficiency of Production, centrifugation, microinjection and transfer of one-and two-cell bovine ova in a gene transfer program. Theriogenology 33:819-828.

McLaughlin KJ, McCLean DM, Lewis PA, Hicks L, Stevens G, Bartsch BD and Seamark RF. 1992. *In vitro* culture of bovine nuclear transfer embryos in synthetic oviduct fluid medium(SOFM). Theriogenology 37:255 (Abstr.).

Meade H, Gates L, Lacy E and Lonberg N. 1990. Bovine S1-casein gene sequences directs high level expression of active human urokinase in mouse milk. Bio/Technology 8:443-446.

Mermillod P, Boccart C, Wils C, Massip A and Dessy F. 1992. Effect of oviduct-conditioned

medium and of cumulus cells on bovine embryo development *in vitro*. Theriogenology 37:256 (Abstr.).

Pursel VG, Pinkert CA, Miller KF, Bolt DJ, Campbell RG, Palmiter RD, Brinster RL and Hammer RE. 1989. Genetic engineering of livestock. Science 244:1281-1288.

Rexroad Jr. CE and Powell AM. 1988. Co-culture of bovine ova with oviductal cells in medium 199. J. Anim. Sci. 66:947-953.

Rigby PWJ, Dieckmann M, Rhodes C and Berg P. 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase. J. Mol. Biol. 113:237-251.

Simons JP, Wilmut I, Clark AJ, Archibald AL, Bishop JO and Lathe R. 1988. Gene transfer into sheep. Bio/Technology 6:179-183.

Southern E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-517.

구덕본, 최강덕, 정형민, 이상민, 이경광, 이훈택, 정길생. 1993. 형질전환동물의 유선조직으로부터 인간 성장호르몬의 분비. 한국가축번식학회지 17:375-383.

이경광, 유대열, 한용만, 이철상, 강만종, 강주현, 조용연, 박윤호, 박정선, 윤창연, 김창숙. 1992. 포유동물을 이용한 인체 생리활성물질의 대량생산 모델시스템 개발. 과학기술처 특정연구개발사업의 연구보고서 BSN80430-421-4.

이철상, 한용만, 박정선, 강용국, 김선정, 유대열, 이경광. 1993. 재조합유전자의 미세주입이 소 난포난의 체외발생에 미치는 영향. 한국가축번식학회지 17:193-199.

유대열, 이철상, 강만종, 한용만, 이경광. 1993. 사람 성장호르몬이 유선조직에서 특이적으로 발현되는 형질전환 생쥐의 개발. 한국축산학회지 35:32-38

황우석, 조충호, 이병천, 신태영, 노상호, 김성기, 전병준, 이강남, 신언익, 임홍순. 1993. 한우정액 유래 체외수정 송아지 생산에 관한 연구. 한국수정란이식학회지 8:143-149.