

포유동물 세포와 생쥐 배에서 Retrovirus Vector를 이용한 SEAP와 GFP 유전자의 전이 및 발현¹

金泰完 · 李永滿 · *朴世必

大邱曉星가톨릭大學校 醫科大學 生理學教室

Transfer and Expression of SEAP (secreted alkaline phosphatase) or GFP (green fluorescence protein) Gene in Mammalian Cells and Mouse Embryos by Using Retrovirus Vector System¹

Kim, T. Y., Y. M. Lee and S. P. Park*

Department of Physiology, School of Medicine, Taegu Hyosung Catholic University

SUMMARY

One of the biggest problems involved in transgenic animal production is lack of appropriate marker genes. To overcome this problem, we tested whether the genes of SEAP (secreted alkaline phosphatase) and GFP (green fluorescence protein) on our retrovirus vectors can be applicable to the transgenic animal production. The main advantage of these marker genes over other generally used ones is that before transfer to the surrogate mothers, the embryos after gene transfer manipulation can be selected without sacrificing viability. The results obtained in this study are summarized as follows:

1. Removal of zona pellucida from the mouse zygotes did not affect embryo developments to blastocysts.
2. Co-culture of zona-free embryos with virus-producing cells for 6 hours also did not affect embryo developments to blastocysts.
3. Among 58 blastocysts developed from the zona-free zygotes co-cultured with the virus-producing cells, SEAP expression was observed from the 6 blastocysts.
4. Expression of the GFP gene was detected from the virus-producing cells but no embryo expressing the gene was counted among 50 blastocysts developed from the zona-free zygotes co-cultured with the virus-producing cells.

I. 서 론

형질전환 동물 (transgenic animal)의 생산에 있어서 당면한 가장 큰 문제점으로 첫째, 기초실험을 하

기 위한 적당한 marker gene의 부재와, 둘째, 표적세포(target cell)에 대한 외부 유전자 전이율의 저조로 요약할 수 있다. 현재까지 널리 쓰이고 있는 marker gene으로는 TK (thymidine kinase) (Shimotohno 와 Temin, 1981), neomycin resistant (Colbere-

* 마리아基礎醫學研究所, 서울 (Maria Infertility Medical Institute, Seoul)

¹ 이 논문은 1995년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

Garapin 등, 1981), hygromycin B resistant (Blochlinger와 Diggelmann, 1984), gpt (xanthine-guanine phosphoribosyl transferase) (Mulligan과 Berg, 1981), DHFR (dihydrofolate reductase) (Simonsen과 Levinson, 1983), trp 및 his D (Hartman과 Mulligan, 1988), ouabain (Kent 등, 1987), CAT (chloramphenicol acetyltransferase) (Gorman 등, 1982), luciferase (Brasier 등, 1989), *E. coli Lac Z* (Forss-Petter 등, 1990), Gus (Bronstein 등, 1994) gene 등이 있다. TK, neomycin 혹은 hygromycin B resistant, gpt, DHFR, trp, his, 그리고 ouabain gene 등의 경우 이들을 형질전환 동물을 생산하기 위해 동물의 胚에 도입할 경우 새끼가 태어난 후에야 외래 유전자(transgene)의 발현 유무를 알 수 있는 단점이 있다. 한편 CAT, luciferase 그리고 *E. coli Lac Z*와 같이 이들 유전자의 발현 유무를 cell lysate를 이용한 반응이나 histochemical staining 방법으로 결정하는 경우는 assay 하고자 하는 모든 세포를 희생해야 된다는 단점이 있다.

이러한 문제점을 극복할 수 있는 가장 유력한 marker gene으로 SEAP (secreted alkaline phosphatase)와 GFP (green fluorescence protein) marker gene들을 들 수 있는데 SEAP의 경우는 retrovirus vector가 아닌 일반 vector DNA를 포유동물의 세포에 calcium phosphate transfection 방법으로 발현시킨 보고 (Cullen 과 Malim, 1992; Bronstein 등; 1994)가 있으나 아직까지 retrovirus vector를 이용한 SEAP gene의 전이 및 발현에 관한 보고는 없는 실정이다. GFP reporter gene의 경우는 *E. coli*와 *C. elegans*에서의 성공적인 전이 및 발현의 보고가 있으나 (Chalfie 등, 1994), 포유동물 세포에서의 발현에 관해서는 여러 가지 문제가 있는 것으로 지적되고 있다. 동물세포에의 유전자 전이 방법으로는 calcium phosphate (Chen과 Okayama, 1988), liposome mediated (Innes 등, 1990), electroporation (Takahashi 등, 1991), DEAE-Dextran (Puchalski와 Fahl, 1992), particle bombardment (Thompson 등, 1993) 등의 transfection 방법과 adenovirus (Salle 등, 1993), adeno-associated virus (Muzyczka, 1992), 그리고 retrovirus등을 이용한 infection 방법이 있는데 gene therapy의 경우 retrovirus

(Friedmann, 1994; Culver와 Blaese, 1994; Fujiwara 등, 1993)를 이용한 방법이 가장 보편적이며, 형질전환 동물 생산에 있어서는 retrovirus를 이용한 외래 유전자 전이 방법만이 보고되고 있다. 이는 retrovirus에 의해 전이되는 외부 유전자가 선택적으로 target cell chromosome의 euchromatin 지역에 integration되는 retrovirus vector의 특성에 기인한다고 하겠다 (Roddewohl 등, 1987). 이러한 잠재적인 우수성에도 불구하고 형질전환 동물의 생산 방법중 종래의 전핵기 난자의 유전자 미세 주입법이 주종을 이루는 이유는 retrovirus vector system의 경우 고농도의 virus stock을 얻기 어려운 데에 있는데, 점차적인 virus의 농축 기술의 발전은 가까운 시일 내의 retrovirus를 이용한 방법이 형질전환 동물의 생산에 있어서의 주종을 이루리라 예견되어지고 있다.

본 연구는 포유동물 세포와 생쥐 배에서 retrovirus를 이용한 SEAP 및 GFP reporter gene의 효율적인 전이 및 발현을 통해서 지금까지 상술한 결점들을 개선할 수 있다는 가능성을 제시하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. Virus vector의 개발 (construction)

SEAP marker gene을 내포하는 retrovirus vector는 본 연구자가 이미 개발한 pLNCZ와 pLN β Z vector (Kim 등, 1993)의 CMV (cytomegalovirus)와 β -actin promoter downstream에 SEAP gene (Tropix Co, Bedford, Massachusetts)을 삽입함으로써 이루어졌다. 상세한 과정은 Fig. 1에 圖解된 바와 같은데, 최종의 vector를 pLNC-SEAP (CMV internal promoter의 경우)와 pLN β -SEAP (β -actin internal promoter의 경우)라 칭하였다. GFP marker gene을 내포하는 vector는 미국 농무성 (USDA)의 Douglas Prasher 박사로부터 공급받은 pGFP 10.1 에서 GFP gene을 PCR을 이용하여 분리한 후, SEAP의 경우와 같이 pLNCZ와 pLN β Z의 *E. coli Lac Z* gene과 치환하였다. Translation의 효율을 극대화 하기 위하여 (Kozak, 1986) PCR을 이용하여 Kozak sequence (ACCATGG)와 유사한 sequence (ACCATGA)를 reporter gene의 5'쪽에 첨가하였다. 상세한 cloning strategy는 Fig. 2에 그

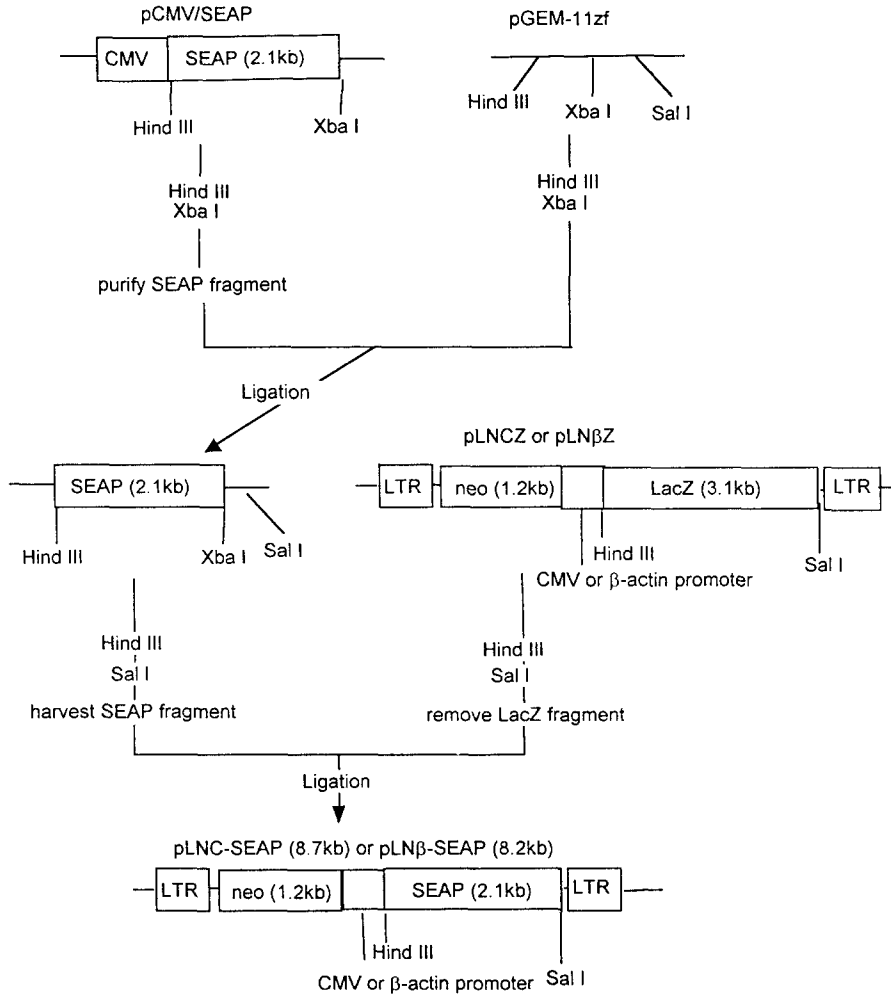


Fig. 1. Construction of pLNC-SEAP and pLNβ-SEAP.

림으로 그린 바와 같은데 최종의 vector들을 pLNC-GFP(CMV internal promoter의 경우)와 pLNβ-GFP라 칭하였다.

2. Retrovirus vector를 생산하는 세포의 개발 (construction)

보다 효율적인 vector virus의 생산을 위하여 (Hwang 과 Gilboa, 1984) vector DNA를 psi 2 ecotropic packaging cell (Mann 등, 1983)에 transient하게 transfection 한 후, virus가 함유된 배양액

을 다시 pA317 (Miller와 Buttimore, 1986) packaging cell에 감염시켜 최종적으로 virus producing cell을 제작 하였는데 이는 앞서 보고된 Kim 등 (1993)의 방법을 기초로 한 것이었다.

3. 수정란 배양액

생쥐 수정란 회수 및 감염 후 배양을 위한 배양액으로는 M2 (Hogan 등, 1986)와 M16 (Hogan 등, 1986)을 사용하였다. 감염 후 체외배양을 위하여 20 μl의 M16 배양액 소적을 만들어 mineral oil (Sigma,