

정소실질내 유전자 도입에 의한 형질전환동물의 생산⁺

I. 형질전환 흰쥐와 생쥐의 생산

윤창현 · 장규태 · 오석두* · 주학진 · 박미령 · 이병오

경상대학교 농과대학 낙농학부

Production of Transgenic Animals by the Testis-Mediated Gene Transfer⁺

I. Production of Transgenic Rats and Mice

Yun, C.H., K. T. Chang, S. D. Oh*, H. J. Chu, M. R. Park and B. O. Lee

Department of Dairy Science, College of Agriculture,
Gyeongsang National University

SUMMARY

Many trials have been made to produce transgenic animals using sperm cells as a vector transferring foreign DNA into eggs, but reliable results are yet to be obtained (Brinster et al., 1989; Lavitrano et al., 1989; Bachiller et al., 1991; Sato et al., 1994). Recently, one of author(SO) demonstrated that mouse blastocysts derived from eggs fertilized by spermatozoa of male mice single injected with liposome-DNA complexes within the testis expressed the gene (Ogawa et al., 1995).

Here we report that a single injection of liposome-encapsulated DNAs into the testis of either male rats or mice resulted in successfully gene transfer to the postpartum progeny. The expression of mRNA derived from transgenes was also demonstrated in transgenic animals thus obtained. Further, the transmission of the exogenous gene to the descendants was confirmed in one line of transgenic rat up to F₄ generation, indicating that the gene was stably incorporated into the germ line. Thus, direct single injection of foreign DNA into the testis provides a novel and convenient means to generate transgenic animals.

(Key words: hGH, Spermatozoa, Testis, Rat, Mice)

I. 서 론

본 연구에서는 형질전환동물 생산을 위한 vector로써 정자의 이용 가능성에 대하여 검토하였다. Lavitrano 등(1989)은 외래유전자와 *in vitro*에서 배양시

킨 정자로 체외수정시킨 경우 그 수정란내에 외래성유전자가 성공적으로 incorporate 되었다고 보고하였다. 이러한 방법은 유전자 발현을 위한 'sperm vector'로써 잘 알려져 있지만, 그 이후로는 재현되지 않았다. Bachillar 등(1991)은 liposome-DNA 복합체를 정소상체에서 회수한 mice 정자와 배양한 경우 외

⁺ 이 논문은 한국과학재단 1996년도 국제공동연구과제의 연구비로 수행되었음.

* 진주산업대학교 낙농자원학과 (Department of Dairy Science and Technology, Chinju National Industry University)

래성 유전자가 정자두부에 incorporate 되었다고 보고하였지만, 이들 정자를 이용하여 형질전환 mice 생산에는 성공하지 못하였다. 종래의 방법과는 달리 외래유전자를 발현시키기 위한 vector로써 정자를 이용한 점은 동일하지만 전자의 경우는 *in vitro*에서 정자를 외래유전자와 *in vivo*에서 수정란에 도입하고자 하는 즉, 외래유전자를 liposome-DNA 복합체 형태로서 정소실질내에 직접 주입하였다는 점에 있어 그 차이가 있다. 정자를 *in vitro*에서 외래유전자와 배양시킬 경우 외래 유전자가 정자에 incorporation이나 integration 되었음에도 불구하고 형질전환 mice 생산에는 실패하였다. 그러나 외래 유전자를 liposome-DNA 복합체 형태로 정소실질내에 직접 주입하는 형질전환 효율성이 훨씬 높은 것으로 보고하고 있다(Ogawa 등, 1995). 그들은 외래 유전자를 liposome-DNA 복합형태(MT promoter-*E.coli*. β -galactosidase gene)로 mice에 4일 간격으로 3회 정소실질내에 주입하여, 정상적인 암컷과 교배시킨 후 자성생식기로부터 회수한 배반포의 대부분(50~70%)에서 그 활성치를 나타내었다고 보고하였다. 그러나, 자성생식기로부터 회수한 blastocysts에 대하여 Southern blotting을 실시하지 않아 발현된 외래유전자가 incorporated 유전자에 기인한것인지는 불분명하지만, 본 연구의 결과로 미루어 볼때 일부의 blastocysts에는 외래성유전자가 발현되었던 것으로 사료된다. 그래서 본 연구에서는 이러한 방법으로 외래유전자를 정소실질내 투여로 형질전환되어지는지, 그 가능성을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 주입 유전자의 준비

본 실험에 사용된 hGH (human Growth Hormone)과 hGHR (human Growth Hormone Receptor)는 high copy vector에 insertion하여 대량 배양하였고, 각각의 plasmid를 5' 및 3'의 제한효소(Fig. 1 a, b)로 digestion한 후 1% TAE gel에서 전기 영동을 실시한 후 GeneClear kit (BID 101, USA)를 이용하여 회수하였다. 그리고 hGH의 construct는 유선에서 특이적으로 발현되어지는 mWAP (murine whey acid protein)의 promotor와 hGH genome DNA를 연결하고 3' 부분에 SV40 PolyA를

연결함으로써 construct를 준비하였고, hGHR는 liver에서 특이적으로 발현되어지는 Methallothionelin-I promotor와 human liver GHR의 cDNA를 연결하고 역시 3'부분에 SV40 Poly A⁺를 ligation함으로써 본 실험에 사용되어진 construct를 구축하였다(Fig. 1).

2. 정소실질내 유전자 주입

정자 내에 외래유전자를 도입하기 위하여 liposome을 이용하였는데 liposome은 음이온 핵산분자와 작용하여 *in vivo*와 *in vitro*에서 효율적으로 DNA를 세포내에 전이 또는 incorporate시키는 것으로 알려져 있다(Flegner 등, 1989; Zhu 등, 1993; Tsukamoto 등, 1995). 형질전환 rat 생산을 위하여 MT/hGHR, mWAP/hGH 유전자 (25 μ g)을 5 μ l PBS에 녹인 후 liposome-DNA 복합체로 형성시키기 위해 양이온 liposome solution (200 μ l)과 천천히 혼합하여 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 그리고 rat는 ether 마취후, liposome-DNA 복합체를 12주령 된 rat (Wistar-Imamichi)의 양쪽 정소실질내에 각각 100 μ l씩 주입하였다. WAP/hGH 유전자의 경우는 PBS 5 μ l에 5 μ g의 DNA를 녹인 후 20 μ l의 liposome solution과 혼합하였다. Liposome-DNA 복합체를 8주령 된 수컷 mice (ICR계)의 양쪽 정소실질내에도 각각 10 μ l 씩 주입하였다. 주입후 rat는 4일, mice는 3일째에 각각 동일계통의 정상적인 발정전기상태에 있는 암컷과 교배시켜 다음날 오전에 질내 정자 plug를 확인한 후 수컷과 암컷을 분리 사육하였다.

3. Southern 및 Northern blotting

F₀세대에서 생산되어진 개체들의 tail로부터 genome DNA를 일반적인 방법으로 회수하였고(Sambrook 등, 1989), hGH의 경우는 EcoRI으로, hGHR은 EcoRI과 Hind III로 각각 digestion 1% TAE gel에서 전기영동을 실시한 후 이 gel을 Alkali 및 Neutralization 과정을 거쳐 nylon membrane에 transfer하였다. Northern blotting은 각 조직으로부터 회수한 total RNA를 CSCI초원심법에 의하여 회수하였다(Sambrook 등, 1989). 회수한 RNA는 65°C에서 15분간 heat denature를 실시한 후 1% Mops-formaldehyde agarose gel로 20 v에서 15시

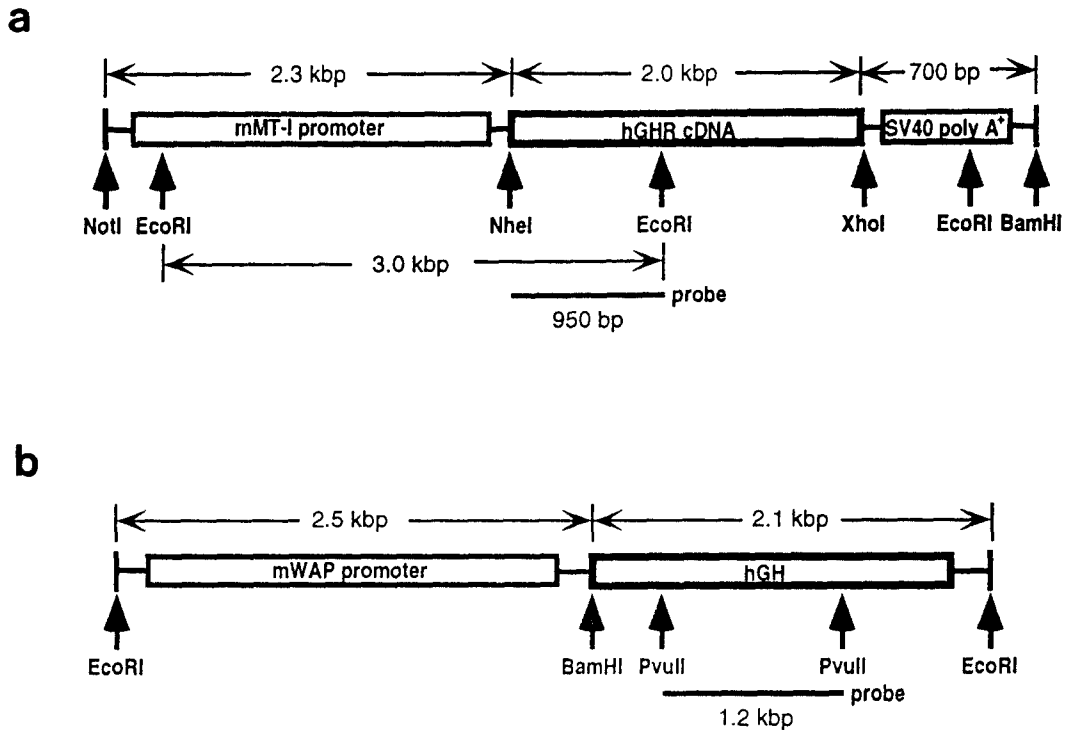


Fig. 1. Schematic illustrations of the gene constructs for the intratesticular injection and probes for gene analyses. a, Gene construct of MT/hGHR. A NheI-XhoI fragment containing hGHR cDNA (about 2.0 kbp) was inserted into pTB plasmid with mMT-I promoter, and a 5.0 kbp NotI-BamHI fragment of the recombinant plasmid was prepared for the injection. NheI-EcoRI (Fig. 2a and c) and NheI-XhoI (Fig. 2b) fragments of this construct were used as probes. b, The construct of mWAP-hGH fusion gene. A 2.1 kbp BamHI-EcoRI fragment containing genomic hGH gene was inserted into pBR327/5'WAP plasmid, and a 4.6 kbp EcoRI-EcoRI fragment was prepared. A PvuII-PvuII fragment was used as a probe

간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 nylon membrane (BIUDyne Nylon, Pall Biosupport, NY)에 transfer하였다. Southern 및 Northern membrane의 hybridization은 Church Phosphate Buffer (Church GM 등, 1984)를 이용하여 42°C에서 실시하였다. Probe는 Random labelling Kit (Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 labelling하였고, Column (TE select-DG-50, 5'-prime 3'-prime Co. USA)를 이용하여 정제후 hybridization solution 내에 hybridization을 42°C overnight하였다. Washing은 2×SSC, 실온 10분,

0.5×SSC 50°C 10분, 0.1×SSC 50°C 5분간으로 실시하였다. Washing이 끝난 membrane은 x-ray film (Kodak, BioMax, USA)으로 -70°C에서 3~4일간 차광하여 현상하였다.

4. FITC labelling 및 PCR

본 실험에 사용되어진 hGHR FITC labelling은 TaKaRa (TaKaRa, Japan) 회사로부터 의뢰하여 labelling을 실시하였고, labelling된 construct는 2와 동일한 방법으로 정소실질 내에 injection 하였다. PCR은 injection후 4일 간격 각 시기별로 채취하고

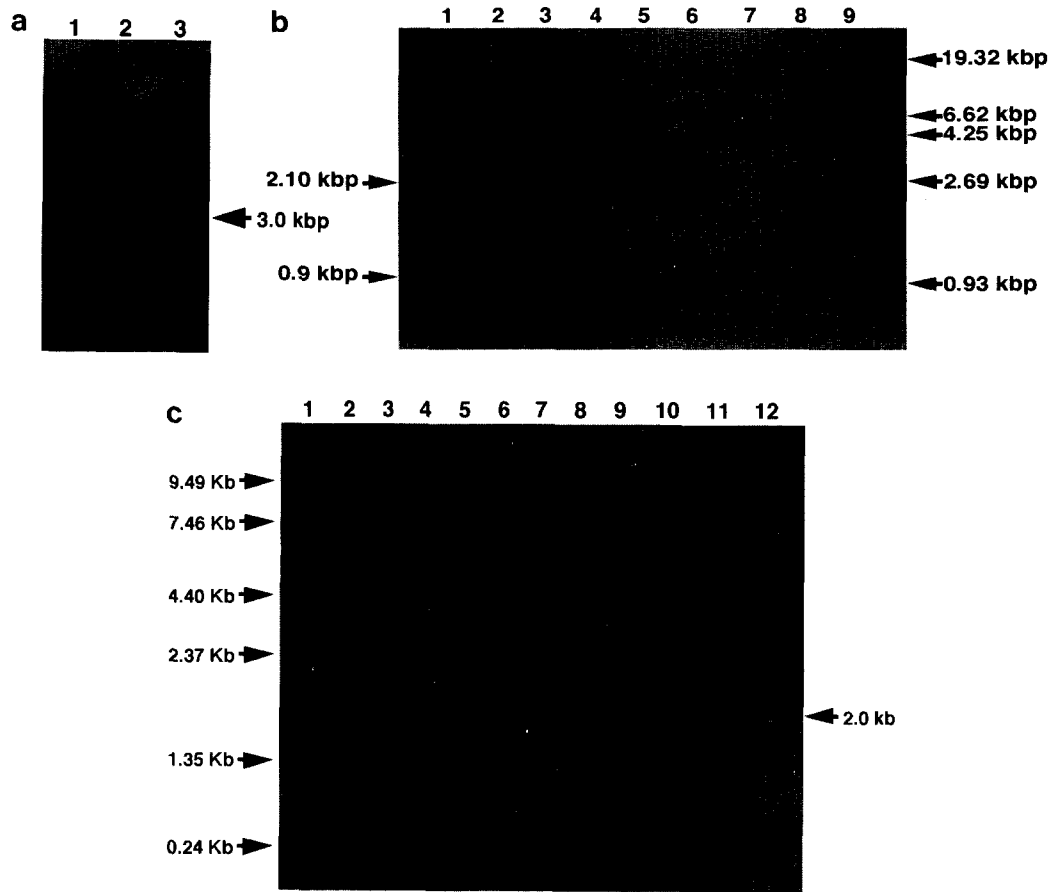


Fig. 2. Detection of hGHR gene in the progeny

a : Southern blot analysis for hGHR gene in F₁ generation. According to the preliminary results, 4 negative samples were not loaded on this gel. The gene was detected in EcoRI-digested genomic DNA obtained from 2(lanes 2 and 3) of 3 rats shown at the predicted size of 3.0 kbp.

b : Detection of hGHR gene (lanes 2, 3 and 6) among 8 littermates of F₃ generation by Southern blot analysis. The gene was detected in Hind III-digested genomic DNA at the predicted size of 0.9 and 2.1 kbp.

c : Northern blot analysis for hGHR mRNA(2.0 kbp) in a transgenic rat (F₃ generation, lanes 3~10) and non-transgenic littermates (lanes 11 and 12). Lane 1, marker; lane 2, blank; lane 3, muscle; lane 4, kidney; lane 5, heart; lane 6, brain; lane 7, mammary gland; lane 8, uterus; lane 9, liver; lane 10, lung; lane 11, Intact liver; lane 12, Intact liver. Expression of hGHR mRNA was detected in they muscle, kidney, heart, brain and liver of hGHR transgenic rats.

DNase I (Promega, USA) 처리를 실시한 후 genome DNA를 회수하여 Template로 사용하였다. PC-

R은 Gene Amp™ PCR Kit (Perkin Elmer, NJ, USA)을 사용하였으며 Primer는 Fig. 5의 legend에

나타난 바와 같으며 PCR조건은 94℃ 1분, 63℃ 1분 30초 및 72℃에서 1분 30초간 35 cycle 실시한 후 최종적으로 final extension을 72℃에서 10분간 실시하였다. 증폭되어진 PCR산물은 1% TAE gel에서 전기영동을 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

형질전환동물을 생산하기 위해 hGH (human growth hormone) 및 hGHR (human growth hormone receptor) 유전자를 각기 WAP(whey acid protein) 그리고 MT (metallothionein- I) promoter와 연결하여 각각의 유전자를 준비하였다. 외래 유전자를 발현하는 형질전환 rat 와 mice를 생산하기 위하여 준비된 각각의 유전자를 liposome-DNA 복합체 형태로 정소실질 내에 직접 주입하는 새로운 방법도 시도하였다. hGHR 유전자 구축을 위한 cDNA는 poly A⁺ RNA를 이용하였고 각각 사람의 간으로부터 얻었다. 그리고 MT/hGHR(Fig. 1a)와 mWAP/hGH는 Ikeda 등 (1994)의 방법에 준하여 준비하였다(Ikeda 등, 1994). 준비된 MT/hGHR 유전자를 rat의 정소실질내에 직접 주입한 후 4일째에 정상적인 암컷 개체와 교배하여 이들 개체로부터 17마리의 산자를 얻었다. 이들 산자의 꼬리로부터 genpme DNA를 추출한 후 외래성 유전자의 발현 여부를 알아보기 위하여 Southern Blotting을 실시하였다. 그 결과로 17마리 중 3(F₀) 마리아에서 hGHR 유전자가 발현되는 것으로 Southern blotting 결과 나타났다. 형질전환된 3마리 모두 암컷 개체로서 정상적인 수컷 개체와 교배시켜 7마리(F₁)의 산자를 얻었으며, 이들 중 2마리가 hGHR 유전자를 발현하였다(Fig. 2a). 형질전환된 F₁ 수컷 개체를 정상적인 암컷 개체와 교배시켜 61마리의 산자를 얻었고 이중 21마리가 hGHR 유전자를 발현하는 것으로 나타났다. hGHR 유전자를 발현하는 형질전환 rat 3마리 (F₃)를 3주동안 ZnSO₄ (50 mM)가 함유된 물과 공급한 후(Fig. 2b), Northern Blotting을 실시한 결과, hGHR mRNA가 근육, 신장, 심장, 뇌 그리고 간에서는 발현되었으나 폐, 자궁, 유선에서는 발현되지 않은 것으로 Northern blotting 결과 나타났다(Fig. 2c). hGHR 유전자의 발현은 F₄ 개체에서도 확인되었고. 따라서, MT/hG-

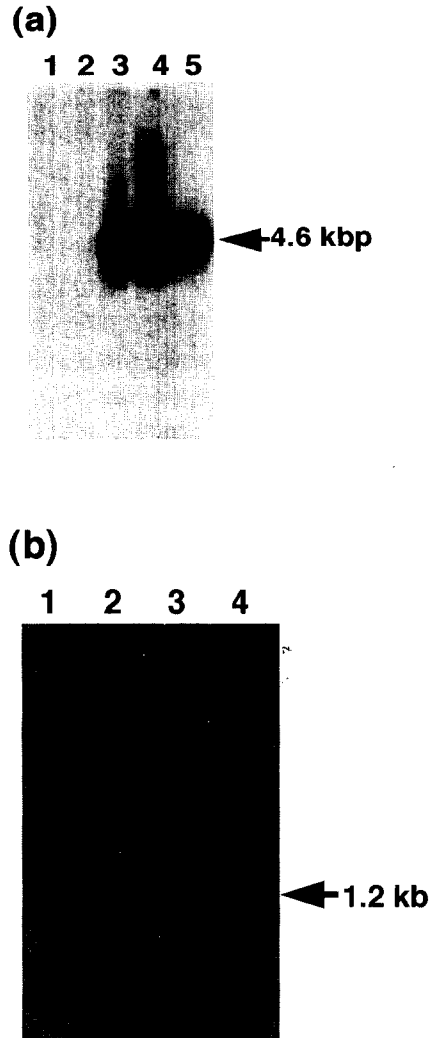


Fig. 3. Detection of hGH gene in the progeny. a, Southern blot analysis for hGH gene in F₀ generation. The gene was detected in EcoRI-digested genomic DNA obtained from 3(lanes 3~5) of 5 mice shown at the predicted size of 4.6 kbp (lanes 1 and 2; non-transgenic littermates). b, Expression of hGH mRNA (1.2 kbp, lanes 2~4) in the mammary gland from 3 transgenic mice detected by Northern blot analysis (lane 1; non-transgenic littermate)

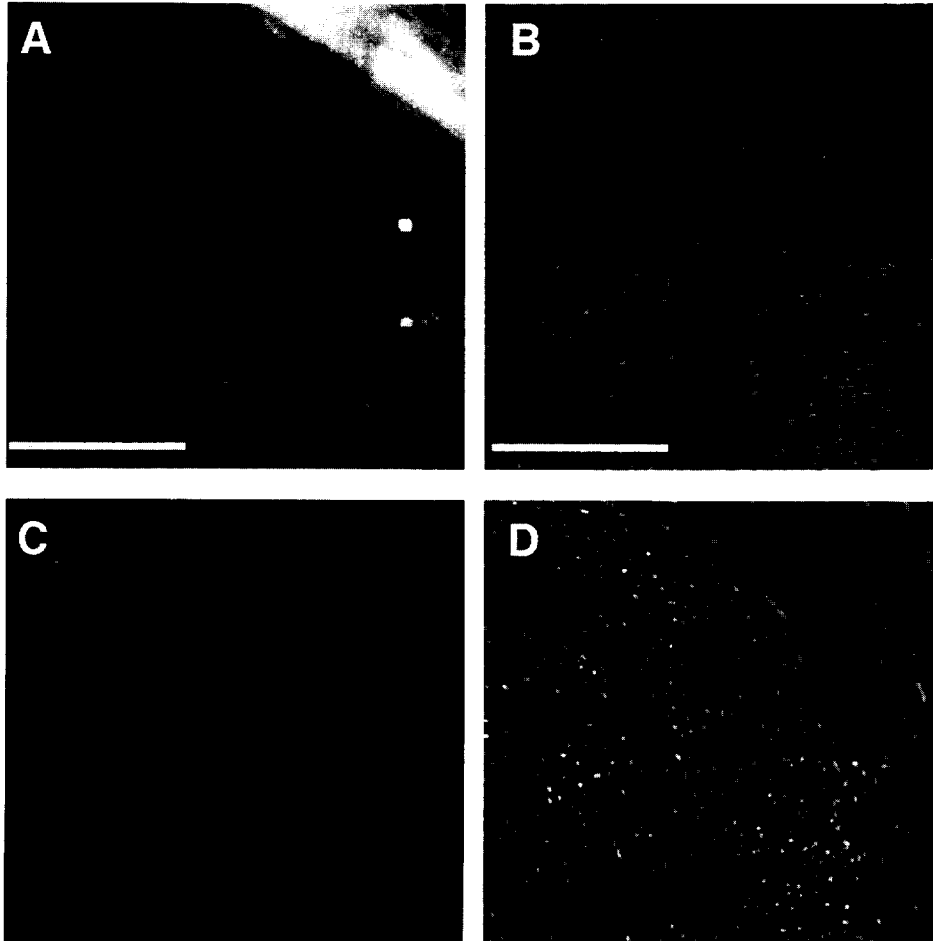


Fig. 4. Confocal images of spermatozoa in the epididymis 4 days after the injection of FITC-labeled MT/hGHR gene into the testis(A and B) or within that of a intact rat(C and D). A and C, fluorescence image; B and D, differential interference contrast image. Scale bars represents 50 μm

HR 유전자를 발현하는 F₀ 개체는 자손에게도 외래성 유전자를 지속적으로 발현되는 것으로 나타났다.

한편, WAP /hGH 유전자를 주입한 mice는 정상적인 암컷과 교배시킨 후 각각 15 및 16마리의 산자를 얻었으며 Southern Blotting을 실시한 결과 3마리에서 hGH 유전자가 발현되었다(Fig. 3a). 10주령의 mouse에 Northern Blotting을 실시한 결과 유선에서 hGH 유전자가 발현되었다(Fig. 3b). 외래성 유전자를 liposome-DNA 복합체 형태로 rat 4마리와 mi-

ce 2마리의 각 정소실질 내에 주입하였는데, 이들 중 rat는 3마리, mice는 2마리로부터 태어난 총 84마리(F₀)의 산자중 8마리가 외래 유전자를 발현되어지는 것으로 본 실험결과 나타났다. 정소실질 내에 유전자를 주입한 후 rat는 4일째, mice는 3일째 교배시킨 경우, 그 간격을 살펴보면 도입된 외래성 유전자가 정자의 genome에 intergration 되었다고는 단정하기가 어렵고, 그리하여 그 원인규명의 한 방법으로써, MT /hGHR 유전자를 FITC labelling하여 rat의 정소에

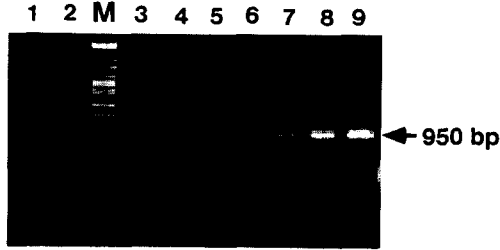


Fig. 5. Detection of MT/hGHR gene in spermatozoa by PCR. A proestrous female rat was mated with a male injected with MT/hGHR gene in the testis 4 days before, and spermatozoa were recovered from the uterus on the next morning. Spermatozoa were incubated in the presence (lanes 3~6) or absence (lanes 7~9) of deoxyribonuclease (DNase I), and then genomic DNA was extracted. Subsequent PCR were carried out with primers designed based on the sequences reported previously (Leung et al, 1987). the forward primer, 5'-GATCAGAGGCGAA-GCTCGGA-3' (hGHR -32 to -13, 20 bp); the reverse primer, 5'-TGGGGGCAGAA-TCAGCATTT-3' (hGHR 943 to 924, 20 bp). The PCR products was detected only in the spermatozoa incubated without DNase I at the predicted size of approximately 950 bp. Lanes 1 and 2, spermatozoa of intact males incubated without DNase I; M, marker

주입한 후 4일째에 정소를 절개하여 confocal microscopy로 조직학적 검토를 실시하였다. Fig. 4에 나타난 것처럼, 정소상체 두부뿐만 아니라 미부에 있는 거의 모든 정자에서 FITC labelling을 확인할 수 있었고, 또한 암컷과 교배시킨 후 자성생식기 내로 부터 회수한 정자로부터 genome DNA 를 회수하여 PCR 로 외래 유전자를 확인하였다. 그러나 Deoxyribonuclease I으로 정자를 washing한 정자의 genome DNA 에서는 발견되지 않았다 (Fig. 5).

이상의 결과를 종합하여 보면 주입된 liposome DNA 복합체는 정자의 genome에 intergration 되

않는 것으로 판단되어지며 Calcium-Phosphate에 침전시킨 DNA를 mice 정소실질에 직접 주입시켰을 경우 7일까지는 정자에 non-integration형태로 나타났다는 보고와 일치하는 경향이였다 (Sato 등, 1994).

본 실험에서는 형질전환동물생산 방법의 하나인 TMGT방법을 이용하였는데, 실험동물에 있어서는 비교적 안정적으로 형질전환 되어지는 결과로 나타났으나, 가축에 있어서는 어떤 양상으로 나타날지 그 기대가 주목되어지며, 유전자의 종류 및 구조형태에 따라 서로 보다 상세히 검토되어야 할 것으로 사료되어진다.

IV. 적 요

외래성 유전자 (foreign DNA)를 수정란에 도입시키기 위한 vector로써 정자 (sperm cell)을 이용한 형질전환 동물의 작출에 관한 많은 연구가 진행되고 있지만 아직까지 성공한 사례는 보고되어 있지 않다 (Brinster 등, 1989; Lavitrano 등, 1989; Bachiller 등, 1991; Sato 등, 1994). 최근 Ogawa 등(1995)은 생쥐에게 외래유전자를 liposome-DNA 복합체 형태로 정소실질내에 주입하여 정상적인 암컷과 수정시킨 후 이들의 개체로부터 회수한 배반포 (blastocysts)에서 도입한 외래성 유전자가 발현되었다고 보고하였다. 그리하여 본 연구에서는 liposome-encapsulated DNA 복합체를 mice와 rat의 정소실질 내에 각각 주입하여 정상적인 암컷개체와 교배시켜 태어난 산자에서 유전자가 발현되는지를 검토하였는데, hGHR에 있어서는 F₄ 세대까지 지속적으로 발현되어져, 정소실질 내에 외래유전자를 직접 주입하는 방법은 형질전환 동물 생산을 위한 새로운 방법으로 그 효율성이 높아 그 기대가 주목되어진다.

V. 인용문헌

1. Lavitrano, M., A. Camaioni, V. M. Fazio, S. Dolci, M. G. Farace and C. Spadafora. 1989. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice [see comments]. *Cell*, 57:717-723.
2. Bachiller, D., K. Schellander, J. Peli and U.

- Ruther. 1991. Liposome -mediated DNA uptake by sperm cells. *Mol. Reprod. Develop.*, 30:194-200.
3. Sato, M., R. Iwase and N. Tada. 1994. Direct injection of foreign DNA into mouse testis as a possible alternative of sperm-mediated gene transfer. *Anim. Biotech.*, 5:19-31.
 4. Brinster, R. L., E. P. Sandgren, R. R. Behringer and R. D. Palmiter. 1989. No simple solution for making transgenic mice[letter; comment]. *Cell*, 59:239-241.
 5. Ogawa, S., K. Hayashi, N. Tada, M. Sato, T. Kurihara and M. Iwaya. 1995. Gene expression in blastocysts following direct injection of DNA into testis. *J. Reprod. Develop.*, 41:379-382.
 6. Ikeda, A., S. Matsuyama, M. Nishihara, H. Tojo and M. Takahashi. 1994. Changes in endogenous growth hormone secretion and onset of puberty in transgenic rats expressing human growth hormone gene. *Endocrine J.*, 523-529.
 7. Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold and M. Danielsen. 1989. Lipofection: a highly efficient, lipidmediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 84: 7413-7417.
 8. Zhu, N., D. Liggitt, Y. Liu and R. Debs. 1993. Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science*, 261: 209-211.
 9. Tsukamoto, M., T. Ochiya, S. Yoshida and T. Sugimura. 1995. Gene transfer and expression in progeny after intravenous DNA injection into pregnant mice. *Nature Genetics*, 9:243-248.
 10. Leung, D. W., S. A. Spencer, G. Cachianes, R. G. Hammonds, C. Collins, W. J. Henzel, R. Barnard, M. J. Water and W. I. Wood. 1987. Growth hormone receptor and serum binding protein : purification, cloning and expression. *Nature*, 330:537-543.
 11. Church, G. M. and W. Gilbert. 1984. Genomic Sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 81:1991-1995.
- (접수일자 : 1998. 4. 30 / 채택일자 : 1998. 6. 10)