

정소실질내 유전자 도입에 의한 형질전환동물의 생산[†]

II. 형질전환 한국재래산양의 생산

윤창현 · 장규태 · 김성현 · 박미령 · 주학진 · 오석두* · 이병오

경상대학교 농과대학 축산과학부

Production of Transgenic Animals by the Testis-Mediated Gene Transfer[†]

II. Production of Transgenic Korean Native Goats

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

Division of Animal Science and Technology, College of Agriculture,

Gyeongsang National University

SUMMARY

The totipotential spermatogonial stem cells of adult testis which give rise to mature sperm cells is well-known to incorporate foreign DNA as well as those of somatic cells. Also, the integration rates of foreign DNA after haploid stages are generally known to decrease and/or is simply bound foreign DNA into the sperm plasma membrane. To overcome these problems, liposome and DNA complexes were used to determine how direct injection of these complexes into testis were integrated into sperm genome and resulted in transgenic offspring. To study this purpose, cation liposome was gently mixed with WAP/hGH DNA (1: 2) and the complexes were injected into testis. At 10, 20, 40, 60, and 80 days after direct injection into testis, mature sperm cells were recovered by using artificial virgin method from two goats and each semen except a part of semen used for DNA analysis such as PCR or Southern blotting was cryopreserved for the artificial insemination. The results obtained in this study are summarized as follows.

1. By PCR, the presence of exogenous DNA was confirmed up to 80 days after injection with liposome/DNA complexes. The highest integration rates were obtained at day 40 after direct injection. This results suggested that spermatogonial stem cells were integrated exogenous DNA into their genome.
2. Among 23 Korean Native Goats which were artificially inseminated, 4 goats resulted in pregnancy and produced 7 young goats.
3. Two young goats were confirmed as a transgenic by PCR and Southern blot analysis. Therefore, our results suggested that testis-mediated gene transfer can be used as a feasible tools for the production of transgenic livestock.

(Key words: hGH, Spermatozoa, PCR, Korean Native Goat)

[†] 이 논문은 한국과학재단 1996년도 국제공동연구과제의 연구비로 수행되었음. (KOSEF: 966-0500-004-2).

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

I. 서 론

형질전환동물 생산을 위한 방법의 하나로 정자를 매개로 한 유전자 전이법의 이용 가능성이 다수의 연구자에 의하여 보고되었다 (Lavitrano 등, 1989; Bachiller 등, 1991; Sato 등, 1994). 이러한 방법은 외래 유전자 도입을 위한 "sperm vector"로써 잘 알려져 있지만 재현성에는 많은 문제점이 제기되었다 (Brinster 등, 1989). 한편, Bachillar 등(1991)은 지질인 liposome과 외래유전자 복합체를 정소상체 미부에서 회수한 정자와 체외에서 공배양할 경우 비록 외래유전자가 정자두부에는 결합이 가능하나 이들 정자를 이용하여 형질전환 개체 생산에는 성공하지 못하였다고 보고하였다. 그러나 목적의 외래 유전자를 liposome 과 *in vitro*에서 배양하여 liposome /DNA 복합체 형태로 정소실질내에 직접 주입하는 것이 형질전환 효율 가능성이 훨씬 높은 것으로 보고하였다(Ogawa 등, 1995). 한편, 생쥐 정소 실질내에 4일 간격으로 이러한 방법으로 liposome /DNA 복합체 (MT promoter / β -galactosidase gene)를 3회 주입한 후 성성숙에 도달한 정상적인 암컷과 교배시켜 자성생식기로부터 회수한 배반포에서는 대부분 (50~70%)이 β -galactosidase 염색 반응을 나타냈다고 보고하였다(Ogawa 등, 1995). 그러나, 자성생식기로부터 회수한 배반포에 대하여 Southern 및 dot blotting을 실시하지 않아 발현된 외래유전자가 삽입된 유전자에 기인한 발현인지 또는 ectopic 발현에 의한 것인지는 규명하지 못하였다.

본 연구는 정자를 이용한 형질전환 동물 생산을 위한 vector로써 정자를 이용한 점에서는 기존의 방법과

거의 유사하나, 이들의 경우는 *in vitro*에서 정자와 외래 유전자를 융합시킨 후 체내에서 수정란에 도입하고자 하는 형태임에 반해(Khoo 등, 1992; Nakanish와 Iritani 1993; Lauria 와 Gandolfi, 1993; Rottmann 등, 1996; Lavitrano 등, 1997; Tsi 등, 1997; Shamilia 등, 1998), 본 연구에서는 외인성 유전자를 liposome-DNA복합체 형태로 정소실질내에 직접 주입하였다는 것에 그 차이가 있다(Ogawa 등, 1995; 윤 등, 1998). 따라서, 본 연구에서는 상기의 방법(Ogawa 등, 1995)과 보고자들의 먼저번의 결과(윤 등, 1998)에 의하여 흰쥐와 생쥐에서 발현이 확인되어진 mWAP /hGH의 유전자를 liposome /DNA 복합체 형태로 한국 재래산양의 정소실질내에 주입하여 형질전환동물의 생산 가능성을 검토하기 위하여 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. Exogenous gene construct의 준비

본 실험에 사용된 유전자는 사람 유래의 성장호르몬 (hGH)이며, promoter는 유선조직에서 특이적으로 발현되어지는 생쥐 유래의 유청단백질 호르몬 (whey acidic protein) 프로모터와 hGH genome DNA를 연결하고 3' 부분에 SV40 PolyA+를 재조합 함으로써 발현벡터를 준비하였다(Fig. 1). 이들 발현벡터는 PUC18에 ligation한 후, 대장균에서 대량 배양하였고, 각각의 plasmid를 5' 및 3'의 부위에 위치하고 있는 제한효소로서 절단한 후 1% TAE gel에서 전기영동을 실시하였고, 도입 유전자는 Geneclear kit (BIO 101, USA)를 사용하여 정제하였다.

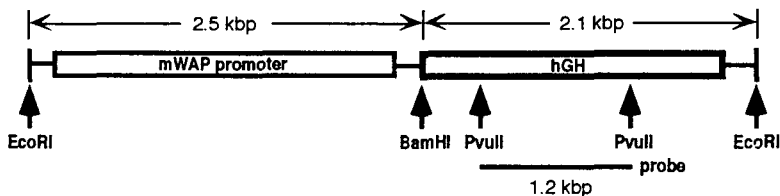


Fig. 1. The construct of mWAP/hGH expression vector. A 4.6 kbp EcoRI-EcoRI fragment containing genomic hGH under the control of whey acidic protein promoter was separated from PUC18 plasmid and injected into testis for the production of transgenic goats. A Pvu II/Pvu II fragments were used as probe for the Southern blot analysis.

2. Liposome/DNA 복합체의 준비 및 정소실질내 유전자 주입

정소실질내의 정자에 외래유전자를 삽입 또는 도입시키기 위하여 liposome(Lipofectin Reagent, GIBCO-BRL)을 이용하였다. 형질전환 재래산양 생산을 위하여 mWAP/hGH 유전자 (125 µg)를 125µl PBS (Ca²⁺ free)에 용해 한 후 liposome-DNA 복합체 형태로 하기 위하여 양이온 liposome 용액 200 µl 과 서서히 혼합하여 실온 (약 25°C)에서 1시간 동안 배양하였다. 그리고 liposome-DNA 복합체를 한쪽 정소를 제거한 한국 재래산양의 정소실질내에 300µl를 주입하였다.

외래 유전자의 정자내 삽입 여부를 규명하기 위하여, 20개월령된 한국 재래산양의 정소실질내에 직접 복합체를 주입한 후 5, 10, 20, 40, 60 및 80일 경과 후에 오전 9시에서 10시 사이에 인공절법으로 정액을 채취하였다. 채취 후 일반적인 검사과정을 거친 후 미리 준비된 1차 희석액(Citrate-Egg yolk-Tris Extender(sodium citrate 1,920mg, sodium phosphate diacid 80mg, glycine 170mg, glucose 83mg, fructose 170mg, Tris 500mg, EDTA 25mg, sodium bicarbonate 166mg, BSA 3mg/ml, streptomycin-penicillin-G 10,000IU/100ml, egg yolk 20%(v/v))과 혼합하였다. 냉장고에서 2~3시간 동안 4°C까지 cooling시킨 후 최종 희석비율의 1/2이 되도록 1차 희석액과 혼합 후 정액량에 따라 3°C에서 4회에 걸쳐 글리세롤이 첨가된 2차 희석액을 첨가하였다. 2시간동안 글리세롤 평형을 실시한 후 0.5ml 스토로우에 봉입하여 -79°C deep freezer에 보관하였다. 용해는 37°C water bath에서 2분간 급속용해 방법으로 실시하였다. 희석비율은 0.5ml 스토로우당 평균 80×10⁶개로서, 글리세롤 최종 농도는 7%였으며, 인위적 발정이 유기된 재래산양의 인공수정시까지 동결보존 하였다.

3. 발정유기 및 인공수정

한국 재래 산양의 발정유기는 약 15개월령 된 24두의 암컷 산양에 두당 PGF_{2α}(prostaglandin F_{2α}, Upjohn Co., USA) 3mg (0.2mg/kg/BW)을 근육주사 후 36시간째부터 1일 4시간 간격으로 발정유도

를 관찰하였으며, 1차 투여에서 발정이 유기되지 않은 개체는 1차 투여 후 8일째에 PGF_{2α} 동량을 2차 투여함으로써, 인위적 발정을 유기하였다. 발정이 유기된 23두는 동결정액으로서 인공수정을 실시하였다.

4. mWAP/hGH gene의 검출

동결보존된 정액의 정자로부터 genomic DNA 추출은 Sambrook 등(1989)의 방법에 따랐다. 먼저, 정액은 lysis buffer(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 100mM EDTA, 35µl proteinase(30mg/ml), 0.1% SDS)에 부유시킨 후 45°C incubator에서 12시간 이상 배양하였고, DNA 회수는 finger print method(Sambrook 등, 1989)에 준하였다. 추출된 DNA의 농도는 spectrophotometer (U-2000, HITACH)에서 측정하였다. PCR은 타종의 hGH와 상동성이 낮은 부분의 Primer (Forward: 5'-CTCAGAGTCTATTCCGACAC-3'(1047 to 1067, 20bp), Reverse: 5'-TCTTGAGTAGTGCATCG-3'(1687 to 1706, 20bp))를 이용하여 수행하였다. PCR은 500ng의 genomic DNA를 주형으로 하고 100µM dNTP, 12.5mM MgCl₂, 10× PCR buffer, 10 µM의 hGH forward 및 reverse primer, 5unit의 Taq DNA polymerase (TaKaRa, Japan)를 함유하고 있는 10 mM Tris-HCl buffer와 총 100µl로서, 94°C 1분, 61°C 1분, 72°C 1분으로 총 35 cycle을 DNA Thermocycler(Perkin-Elmer Cetus)에서 실시하였다. 그리고 final extension은 72°C에서 10분간 실시하였다.

5. 형질전환동물의 검정

총 23두의 인공수정 결과 태어난 7두의 자양으로부터 주입된 유전자의 expression 여부를 검토하기 위하여 혈액을 채취하여 genomic DNA를 추출하였다. 혈액으로부터 추출한 DNA는 EcoRI 제한효소로서 37°C에서 하룻밤 절단시킨 후 phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25:24:1)로서 추출하여 0.8%의 TAE agarose gel에서 50v 전압에서 60분간 loading 하였다. Loading이 끝난 gel은 alkali solution (1.5M NaCl과 0.5N NaOH) 및 중성배지(1M Tris(pH 7.4), 1.5M NaCl)에서 각각 45분 및 30분간 변성시킨 후 nylon membrane (Hybond+ N, USA)에 전

이하였다. 전이가 끝난 필터는 0.2X SSC(0.1% SDS)로 50℃에서 10분 동안 2회 세정한 후 hybridization하였다. Probes는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 재래산양의 성장호르몬과 상동성이 비교적 낮은 부분을 [α - 32 P]dCTP로 labelling한 probe($1\sim 2\times 10^6$ cpm/ml)와 hybridization solution (6X SSC, 0.5% SDS, 열변성한 100 μ g/ml의 salmon sperm DNA 및 50X Denhardt's solution)과 함께 42℃에서 하룻밤 incubation하였다. Hybridization이 끝난 필터의 세정은 0.5X SSC buffer 와 50℃에서 30분 및 10분 2회 실시하였고, 마지막으로 50℃의 0.1X SSC buffer에서 2~3분간 실시한 후 -70℃에서 48시간 동안 X-ray film(Kodak, Japan)에 노광시켜 검토하였다.

III. 결과 및 고찰

본 연구는 정자를 매개로 하여 형질전환 산양생산을 위한 기법을 확립하기 위하여 정소내 유전자도입법의 개발과 산양정자의 동결법 및 산양의 발정동기화법의 개발을 위하여 실시하였다. 형질전환 재래산양(Korean native goat)을 생산하기 위하여 사용한 유전자 구조는 Fig. 1과 같다. 이들 발현벡터를 이용하여 형

질전환동물을 생산하기 위하여 liposome /DNA 복합체를 한쪽 정소를 거세한 2두의 재래산양 (No. 42 와 No. 47)의 정소실질 및 정소상체 미부에 각각 150 μ l씩 주입하였다. 이들 개체로부터 유전자를 도입한 후 5, 10, 20, 40, 60 및 80일째에 정액을 채취하여 PCR과 Southern blot을 실시한 결과 약 659 bp의 단편을 확인할 수 있었다(Fig. 2a). 이들 채취한 정액에서 외래 유전자가 가장 강력하게 검출된 것은 유전자 도입 후 40일째의 정액에서 검출되었으며 (Fig. 2b), 따라서 본 연구에서는 형질전환 재래산양을 생산하기 위하여 유전자 도입 후 40일째의 정자만을 인공수정에 공시하였다.

한편, 재래 산양의 발정을 유기하기 위하여 PGF $_{2\alpha}$ 3mg(0.2mg /kg /BW)을 근육 투여하였다. 그 결과 1차 투여 후 총 24두중 16두(66.6%)가 발정을 나타내었으며, 발정이 유기되지 않은 개체는 1차 투여로부터 8일 후 동량의 PGF $_{2\alpha}$ 를 재투여함으로써 7두의 재래산양에서 발정이 유도되어 전체 평균 약 96% 발정 유기율을 보였다. 이들 산양에 유전자를 도입하여 40일째 채취한 정액을 이용하여 인공수정에 공시한 결과 총 4두가 임신하여 7마리(암컷 3, 수컷 4)를 분만하였다 (Fig. 3a). 이러한 결과는 자연교미에 의한 수태율 보다는 현저하게 낮은 수태율을 보였는데 이는 동결보

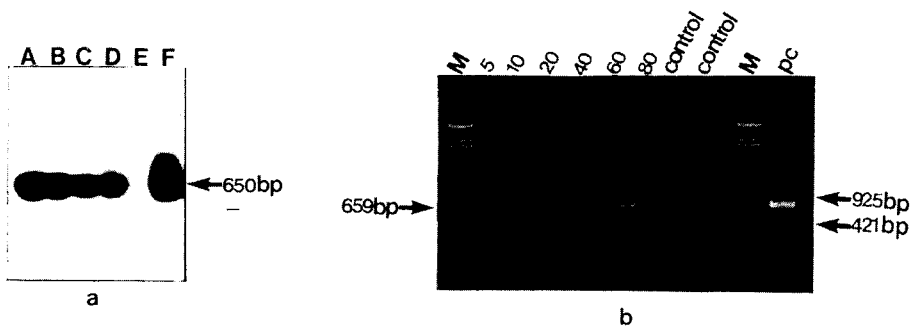


Fig. 2. a) PCR/Southern analysis in Korean native goat spermatozoa. Mature sperm cells were recovered from hemi-castrated Korean native goats at 5, 10, 20 and 40 days after direct injection of testis; Lane A to D means their PCR products, respectively. Lane E and F indicate DNA size marker and positive control amplified from mWAP/hGH plasmid DNA. Arrow indicate approximately 659 bp fragments of hGH. b) PCR/Southern analysis of mWAP/hGH fusion gene in the sperm cells of Korean native goats. To avoid artifact of PCR products, PCR products were re-confirmed by Southern blot analysis using Pvu-Pvu II fragments of human growth hormone gene.

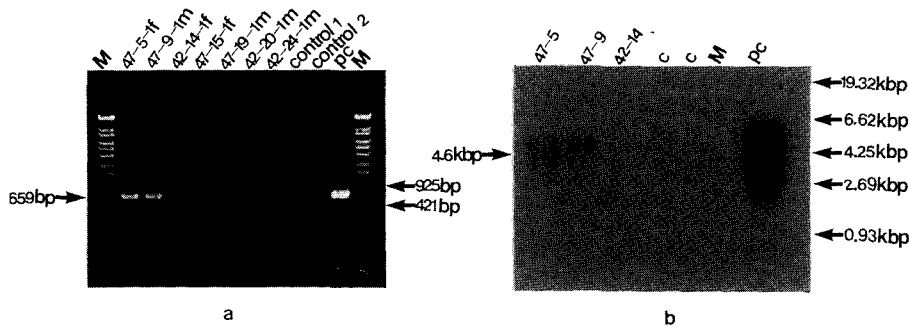


Fig. 3. a) PCR analysis of hGH DNA from young goats (M; DNA size marker, f: female, m: male, and pc: positive control). Arrows indicated 659 bp fragment of hGH amplified by PCR. b) Detection of the mWAP/hGH gene from young goats by Southern blotting. Two young goats were transgenic by Southern blotting: Lanes 1 and lanes 2 indicate transgenic goats, while lanes 6 was DNA size marker of λ DNA (EcoRI digestion). For the detail, see the materials and methods. Arrows indicated approximately 4.6 kbp.

존 정액을 이용하였기 때문인 것으로 추론되었다. 이러한 원인은 동결보존제 및 동결보존 과정 중에서 발생하는 기계적 물리적 손상에 의하여 기인한 것으로 추론되었다.

형질전환동물의 검정을 위하여 생후 3주령 산자의 경정맥으로부터 혈액을 채취하여, 이들 혈액으로부터 고분자 DNA를 분리한 후, PCR을 실시한 결과 2두 (암컷 및 수컷)의 자양에서 약 659bp의 유전자가 검출되었다 (Fig. 3a). 이들 결과는 Southern blotting에서도 동일한 결과로서 나타났다.

따라서, 본 연구에서 사용한 정소실질내의 유전자 도입법은 그 효율이 낮은 가축에 있어서 매우 효과적으로 형질전환동물을 생산하는데 이용 가능성을 시사하였다.

이상과 같이 본 연구의 결과를 종합하면 1) liposome /DNA 복합체의 정소실질내 도입으로 인한 형질전환동물의 대량 생산 가능성 제고, 2) 한국 재래산양 정액의 동결보존에 있어서 동결보존액의 확립, 3) 재래산양의 인공수정 기법의 확립을 들 수 있다. 그러나 금후 가장 우선적으로 해결되어야 할 문제점은 다수의 외인성유전자가 정자에 결합 또는 삽입을 향상할 수 있는 기술 개발은 물론 정소실질 내에서의 외인성 유전자가 어떤 경로로 응생성세포에 도입되는지에 관한 기전규명이 정립되어야 하겠다. 또한, 보다 효

율적으로 형질전환 산양의 생산을 위해서는 산양 정자의 동결 및 용해를 위한 방법의 개선이 절실히 요구된다고 하겠다.

IV. 적 요

정소내 성숙한 정자를 생산하는 전능성을 가진 정조세포는 체세포와 동일수준으로 외래 유전자를 삽입 가능한 것으로 알려져 있다. 그러나, 이들 세포가 반수체 이후의 단계로 분화한 경우에는 왜래 유전자를 삽입하기 보다는 단순히 결합하는 능력이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 연구는 외래 유전자를 정소실질내 주입함으로써 형질전환 동물생산이 가능한지에 대하여 검토하기 위하여, 한쪽 정소를 거세한 한국 재래산양을 사용하였다. Liposome /DNA 복합체를 1: 2의 비율로 희석한 후 정소실질내에 주입하여 정자를 경유한 유전자 전이의 가능성을 확인하였다. 또한 동결보존한 정액을 인공수정하기 위하여 PGF₂ α (0.15mg/kg /BW)를 근육 주사함으로써 인위적으로 발정을 유도한 후, 인공수정을 이용하여 임신과 분만을 유도하였다. 이들 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. PCR에 의하여, 유전자 도입 후 채취한 정액에서 외래유전자는 80일 이상 존재하였으며, 가장 높은 전이율은 40일째 얻어졌다. 이들 결과는 정조

세포에 외래 유전자가 성공적으로 삽입되었음을 제안하였다

2. 23두(평균 96 %의 발정 유기율)의 재래산양에게 인공수정을 실시한 결과 이들 중 4두가 임신되어 7두의 자양이 생산되었다.
3. 생산된 7두의 산자중 genome DNA를 추출하여 PCR 및 Southern blotting을 실시한 결과 2두가 형질전환으로 확인되었다.

이상의 결과로서 정자를 매개로 한 정소실질내 외래 유전자의 주입법은 형질전환의 생산을 위한 매우 유용한 수단으로 사용 가능함을 제안하였다.

V. 인용문헌

1. Bachiller, D., K. Schellander., J. Peli and U. Ruther. 1991. Liposome-mediated DNA uptake by sperm cells. *Mol. Reprod. Develop.*, 30:194-200.
2. 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.
3. Khoo H.W., L.H. Ang, H.B. Lim and K.Y. Wong. 1992. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into zebrafish. *Aquaculture*, 107:1-19.
4. Lauria, A. and F. Gandolfi. 1993. Recent advances in sperm cell mediated gene transfer. *Mol. Reprod. Dev.*, 36: 255-257.
5. 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.
6. Lavitrano, M., M. Forni, V. Varzi, L. Pucci, M.L. Bacci, C. Di Stefano, D. Fioretti, G. Zoraqi, B. Moioli, M. Rossi, D. Lazzereschi, A. Stoppacciaro, E. Seren, D. Alfani, R. Cortesini and L. Frati. 1997. Sperm-mediated gene transfer: production of pigs transgenic for a human regulator of complement activation. *transplant Proc.*, 29:3508-3509.
7. Nakanishi, A. and A. Iritani. 1993. Gene transfer in the chicken by sperm-mediated methods. *Mol. Reprod. Dev.*, 36:256-261.
8. 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.
9. Rottmann, O., R. Antes, P. Hofer, S. Sommer, G. Wanner, A. Gorchach, F. Grummt and F. Pirchner. 1996. Liposome-mediated gene transfer via sperm cells. High transfer efficiency and persistence of transgenes by use of liposomes and sperm cells and a murine amplification element. *J. Anim. Breed. Genet.*, 113:401-411.
10. Sambrook, J., E.F. Fritsh and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual and edition.* New York. Cold Spring Harbor laboratory press.
11. 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.
12. Shamilia, Y. and S. Mathavan. 1998. Sperm-mediated gene transfer in the silkworm *Bombyx mori*. *Arch. Insec. Biochem. Physiol.*, 37:168-177.
13. Tsim, H.J., C.H. Lai and H.S. Yang. 1997. Sperm as a carrier to introduce an exogenous DNA fragment into the oocyte of Japanese abalone (*Haliotis divorsicolor supertexta*). *Transgenic Research*. 6:85-95.
14. 윤창현, 장규태, 오석두, 주학진, 박미령, 이병오. 1998. 정소실질내 유전자 도입에 의한 형질전환동물의 생산. I. 형질전환 흰쥐와 생쥐의 생산. *한국가축번식학회지*. 22(2):145-152.
(접수일자 : 1999. 1. 25. /채택일자 : 1999. 2. 15.)