

## 사람 조혈인자 유전자(Human Erythropoietin Gene)를 도입한 형질전환돼지 생산

이연근<sup>†</sup> · 박진기 · 민관식 · 이창현 · 성환후 · 전익수 · 임석기 · 양병철 · 임기순 ·  
장원경 · 김진희<sup>1</sup> · 이훈택<sup>2</sup> · 정길생<sup>2</sup>

축산기술연구소 응용생명공학과

## Production of Transgenic Porcine harboring the Human Erythropoietin(EPO) Gene

Lee Y. K.<sup>†</sup>, J. K. Park, K. S. Min, C. H. Lee, H. H. Seong, I. S. Jeon, S. K. Im, B. C. Yang,  
K. S. Im, W. K. Chang, J. H. Kim<sup>1</sup>, H. T. Lee<sup>2</sup> and K. S. Chung<sup>2</sup>

Animal Biotechnology Division, National Livestock Research Institute

### SUMMARY

This study was performed during the four seasons for the production of transgenic pigs containing the human erythropoietin (hEPO) transgene. Purebred Landrace gilts and sows approximately 8~15 months of age (n=42) were used for the collection of 1-cell zygotes for DNA microinjection and transfer. Retrospectively, estrus synchronization and superovulation schemes were evaluated to assess practicality for zygote collection. Synchronization and superovulation procedures were used that cyclic gilts were synchronized with 20mg altrenogest (ALT) per day for 9days after PG600 administration followed by superovulation with 1500IU pregnant mares serum gonadotropin (PMSG) and 500IU human chorionic gonadotrophin (hCG). Preparation of recombinant gene for microinjection is mice whey acidic protein promoter (mWAP) linked to human erythropoietin (hEPO) gene. After hormone treatment, 650 embryos were collected from 23 donors and 83.1% (540/650) embryos were in 1-cell stage which can be visualized the pronuclei for DNA microinjection. A total of 543 DNA microinjected embryos from donors were transferred to 19 synchronized recipients, seven of them maintained pregnancy and delivered 47 piglets. One of the 47 offsprings were determined to have transgene by PCR analysis. The overall rate of transgenic production was 2.13% (transgenic/offspring). This study provides the success and useful information regarding production of transgenic pig for bioreactor research.

(Key words : Transgenic pig, mWAP, Human EPO gene, Microinjection, Superovulation)

<sup>†</sup> Corresponding author : Y. K. Lee, Animal Biotechnology Division, National Livestock Research Institute, RDA Omokchun-dong Suwon 441-350, Korea. Tel : 031-290-1584, e-mail : lyk3687@rda.go.kr

<sup>1</sup> Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University

<sup>2</sup> College of Agriculture, Animal and Life Science, Konkuk University

## I. 서 론

최근 유전자 재 조합기술이 발달하면서 Gordon 등(1980)에 의해 최초로 수정란 전핵내 미세주입 방법을 통한 형질전환 가축생산이 보고된 이후 1982년 Palmiter 등에 의해 Metallothionine growth hormone fusion gene이 도입된 형질전환 mouse를 생산함으로써 형질전환 동물생산의 기틀을 마련하였다. 이후 많은 과학자들에 의해 가축의 조직이나 혈액내 재조합 의료용 단백질 생산이 가능할 수 있다는 것이 제시되면서 Lathe 등(1985)은 유전체 포야말로 의료용 단백질을 생산할 수 있는 이상적인 기관이라는 것을 시사하였다. 또한 유전자 도입에 관한 연구는 Hammer 등(1985)에 의해 토끼와 면양의 난자에서 시도되었으며, 돼지와 소에서는 Wall 등(1985)에 의해 보고되었다. Wall 등(1991)은 형질전환 가축을 생산하는데 있어 돼지를 사용하는 것은 돼지가 타 가축에 비해 세대간격이 짧고, 난자와 산자수가 많기 때문에 경제적으로 유리하다고 보고하였다.

이러한 재조합 유전자를 이용한 생명공학의 발달로 최근에는 인체 고가 의료용 생리활성물질 중의 하나인 사람의 조혈촉진 유전자(human erythropoietin : hEPO)가 도입된 형질전환 동물을 생산하기 위해 외국의 많은 연구자들이 형질전환연구를 하고 있는 것으로 보고(Mikus 등, 2001; Divoky 등, 2001; Kirby, 1999; Kochling 등, 1998; Aguirre 등, 1998; Korhonen 등, 1997; Massoud 등, 1996; Rodriguez 등, 1995; Semenza 등, 1989, 1990)가 있으나 대가축(소 또는 돼지)에서는 성공한 사례가 없고 본 연구의 돼지를 이용한다는 면에서 성공가능성이 기대되고 있다. 또한 유용 유전자를 도입한 형질전환동물에서의 물질 분비를 위하여 많은 promoter의 연구가 이루어지고 있으며 본 연구에서는 mouse whey acidic protein(mWAP) 프로모터를 이용하여 돼지의 유즙으로 유용물질의 분비를 유도하기 위하여 이용하였다(Mikus 등, 2001; Inuzuka 등, 2001; Barash 등, 1999; Lee 등, 1998; Van Cott 등, 1997; Wall, 1996; Wall 등, 1996). 한편 일반적

인 수정란 전핵내 미세주입에 의한 형질전환 동물 생산 효율은 소를 포함한 가축에 있어 효율이 1% 전후로 낮으며, 초기배 발달과 임신율에서도 감소하는 경향이 있다고 보고(Wall 등, 1985; Eyestone, 1994)하였으나 본 연구에서는 많은 연구자들이 사용하고 있는 체내 수정란을 이용한 미세주입 방법을 이용하였다(Persel과 Wall, 1996; Bowen 등, 1994; Eyestone, 1994; Hill 등, 1992).

따라서 본 연구는 고가의 의료용 단백질인 사람의 조혈촉진인자(hEPO)를 도입하여 고생리활성 물질을 유즙으로 분비하는 형질전환돼지를 생산하는데 그 목적이 있다고 하겠다.

## II. 재료 및 방법

### 1. mWAP-hEPO 발현 벡터 구축

본 실험에 사용된 돼지 수정란 전핵 내 주입용 발현벡터는 Fig. 1과 같다. 먼저 클로닝 된 약 2.6 kb의 mouse Whey Acidic Protein(mWAP) 프로모터 하류에 약 2.6kb의 사람 계놈 Erythropoietin 유전자(hEPO)를 연결하였으며, hEPO 후반부에는 SV40 poly A(2.6 kb) 부분이 존재하도록 재조합하여 전체 7.8 kb의 미세주입용 발현벡터를 제작하였다(Fig. 1).

재조합 발현벡터는 다시 pCRII-TOPO (Invitrogen; Cat. No. K4600-10) 벡터에 클로닝하여 초원심분리 방법으로 순수 정제시킨 후 *EcoR* I과 *BamH* I 제한효소로 목표하는 부위만을 절단하였다. 제한효소 처리된 단편들을 0.9% 아가로즈겔 전기영동 후, 수정란 주입용 DNA 단편(7.8kb)만 얻어내어 Gel Extraction Kit(Qiagen; Cat. No. 28704)를 이용, 이들의 DNA 단편을 아가로즈로부터 회수하고 2회 정제하였으며, 최종농도는 2~4 ng/ $\mu$ l로 희석하여 미

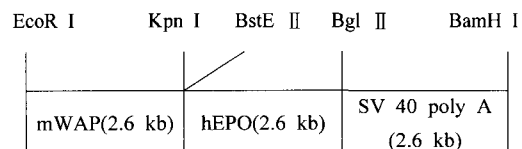


Fig. 1. Recombinant gene constructed for micro-injection into the porcine pronuclear.

세주입용 발현벡터로 준비하였다.

## 2. 발정동기화 및 과배란유기

Altrenogest(Regumate, Hoechst Roussel Pharmaceuticals Inc., Somerville, NJ)를 발정주기 12일부터 14일 사이에 매일 두당 사료 2kg에 20mg을 혼합하여 9일간 급여하였으며 그 후 과배란은 PMSG (Intervert International, B.V Boxmeer, Holland)를 1000IU 근육주사한 후 72시간이 경과되었을 때 750IU의 hCG를 근육주사하여 과배란을 실시한다.

hCG(Intervert International, B.V Boxmeer, Holland) 투여후 매일 09시와 18시에 2회씩 육안적 관찰을 실시하여 점액의 유무, 음부의 상태 및 부동 자세 등 발정 초기증상이 나타난 종빈돈에 한하여 성성숙된 수태지를 접촉시켜 최초 수태지 허용시 1회 자연교배를 실시하였으며 1회 자연교배 후 24시간에 2회 교배를 실시하였다.

## 3. 외과적 수술 및 수정란 회수

마취제로는 하이프로널(JANSSEN, German) 7~8 ml를 돼지 귀 정맥에 주입하여 1차 마취를 실시하고, 그 후 가연성 흡입마취제인 할로탄 가스(신성신약) 3~5%를 산소(600~1,000ml/분)순환 시스템에 연결하여 마취상태를 유지시키면서 공란돈의 난관은 자궁-난관접합부에 18gage 주사바늘을 이용하여 1회용 주사기로 1% BSA(Sigma, USA)와 항생제를 혼합한 25ml의 D-PBS(Gibco, USA)를 난관 관류시킴으로써 수정란을 회수하였다. 관류된 D-PBS는 멸균시험튜브에 수집하여 실온에서 난자를 회수하여 실체현미경상에서 수정 유무를 판단한 후 1세포기 수정란만을 이용하였다.

## 4. 수정란의 외과적 이식

돼지의 수정란을 이식하여 산자를 생산할 목적으로 외과적인 방법에 의해서 수정란 이식을 실시하였다. 먼저 호르몬 처리에 의해서 발정이 동기화된 수란돈 또는 자연적으로 발정주기가 동기화된 수란돈을 전신 마취하였다. 마취된 수란돈의 정중선을 중심으로 광범위하게 면도기를 이용하여 털을 제거하고 소독을 실시한 다음 정중선을 따라

약 10~15cm를 절개하여 생식기를 노출시킨 후 난소 표면의 황체의 존재를 확인한 후, 제조합 유전자가 미세주입된 20~50개의 수정란을 polycather (Cook, Australia)를 이용하여 난관 팽대부에 주입하였다.

## 5. 도입된 외래 유전자의 분석

수정란 이식 후 분만된 자돈의 꼬리조직을 채취한 후 Sambrook과 Russell(2001)의 페놀방법으로 게놈 DNA를 추출하였다. 추출된 게놈 DNA는 PCR을 하기 위해 25 ng/ $\mu$ l 농도로 희석하였다. PCR 검정을 위해 사용된 primer는 hEPO 게놈의 exon 2와 3을 증폭하는 304 bp 단편을, intron 3과 4를 증폭하는 567 bp 크기의 단편을 증폭할 수 있도록 제작하였다. 제작된 mWAP-hEPO304(Forward; 5'-CgA gAA TAT CAC ggT AgA ACC-3', Reverse; 5'-CTC ATT CAA gCT gCA gTg TTC-3')와 mWAP-hEPO567 (Forward; 5'-AAG Tgg TgC ATg gTg gTA gTC-3', Reverse; 5'-TTA CAg AAA ggg CAA gCA gAA-3') primer를 이용 PCR을 수행하였는데, 반응총액은 25  $\mu$ l로 하였고 tDNA는 100~200ng, primer는 각각 20 pmole, 중합효소는 1unit(Toyobo; Cat. No.TAP-201)로 하였다. PCR을 수행하기 위한 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 4분간 전처리를 한 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 58 $^{\circ}$ C에서 1분, 74 $^{\circ}$ C에서 1분간 30cycle를 반복하고 다시 74 $^{\circ}$ C에서 4분간 수행한 후, PCR산물은 2.5% 아가로스 겔(0.5X TBE) 전기영동을 실시하여 형질전환 여부를 판별하였다.

## III. 결 과

### 1. 외과적 방법에 의한 돼지수정란 채란 성적

호르몬 처리에 의한 발정동기화 및 과배란 처리된 돼지의 외과적인 방법에 의한 과배란 및 수정란 회수 성적은 Table 1과 같다. 총 23두의 공란돈으로부터 738개의 황체수를 확인하여 650개의 난자를 회수하였으며 회수율은 88.08%로 나타났다. 회수된 난자 중 1 세포기 단계의 수정란은 540개로 전체 회수난중 83.1%를 차지하였으며, 공란돈 1두당 평균 회수된 수정란수는 28.3개였다. 한편

**Table 1. Results of embryos collected from donor swines**

Donor	No. of C.L.*		No. of recovered embryos		Development stage of embryos				No. of N.F.E.***
	Left	Right	Left	Right	1 Cell	2 Cell	4 Cell	D.G.**	
23	389	349	340	310	540	23	35	1	51
Total	738		650		599				

\* C.L ; Corpus luteum, \*\* D.G. ; Degeneration, \*\*\* N.F.E. ; Non-fertilized embryos

미세주입을 할 수 없는 4세포기, 퇴화 수정란 및 미수정란수는 각각 35개, 1개 및 51개로 극히 소수에 불과해 효과적인 발정동기화가 유도된 것으로 생각된다.

**2. 외과적인 방법에 의한 수정란 이식 성적**

총 19두의 수란돈에 대한 미세주입된 수정란의 이식 결과 및 분만 결과는 Table 2와 같다. 외과적 방법으로 채란된 650개의 체내 수정란 중 1-, 2-

포기 563개의 수정란 핵내에 유전자를 미세주입하여 19두의 수란돈에 외과적 방법으로 이식된 전체 수정란수는 543개로 1세포기는 529개였고 2세포기는 14개였다. 수란돈 마리당 이식 수정란수는 평균 28.6개였으며, 분만두수 7두에 대한 산자수는 47두로 분만율은 36.8%, 마리당 평균 산자수는 6.7두였다.

**3. 분만 자돈에 대한 PCR 검정**

**Table 2. Results of embryos transfer to recipient swines**

No. of recipients	No. of transferred embryos		Transferred embryos per recipient	No. of delivered	No. of offsprings
	1 cell stage	2 cell stage			
19	529	14	28.6	7	47
	543				

**Table 3. Relationship coefficients of sequence homology among mammals' erythropoietin (EPO) cDNA**

Homology	Human (582bp)	Swine (585)	Bovine (579)	Sheep (585)	Monkey (579)	Mouse (578)	Rat (579)
Human	1.00	0.86	0.85	0.83	0.93	0.79	0.77
Swine		1.00	0.88	0.89	0.83	0.78	0.79
Bovine			1.00	0.94	0.84	0.78	0.76
Sheep				1.00	0.83	0.76	0.78
Monkey					1.00	0.79	0.78
Mouse						1.00	0.93
Rat							1.00

\* Analysis software: DNASIS Ver. 2.6(Hitachi Software)  
 \*\* Human(Lin, et al. 1985; Accession No. M11319), Swine(David, et al., 2001; AJ249745), Bovine(U44762), Sheep(Fu, et al., 1993; Z24681), Monkey(Lin, et al., 1986; M18189), Mouse(Shoemaker and Mitssock, 1986; M12482), Rat(Nagao, et al., 1992; NM 017001).

유전자가 미세주입된 수정란이식 후 분만 7두에 대한 자돈 47두의 PCR검정을 위해 primer를 제작하기 위해서는 포유류 사이의 EPO 유전자 cDNA 분석을 통하여 primer를 구축하여야 할 것으로 사료된다. 이것은 돼지의 수정란에 도입된 사람의 EPO유전자(hEPO)와 돼지의 EPO 유전자(sEPO)간의 상동성(homology) 때문에 PCR 검정시 잘못된 PCR 결과를 방지하기 위해서이며 그 결과는 Table 3과 같다.

Table 3에서 제시된 것과 같이 사람과 돼지 EPO cDNA의 상동성은 86%로 monkey와의 93%에 비하여서는 낮은 상동성을 나타내지만 다른 종간의 상동성보다는 높다는 것을 알 수 있다. 따라서 본 연구에서는 사람 계놈 EPO 유전자에서 두 곳을 증

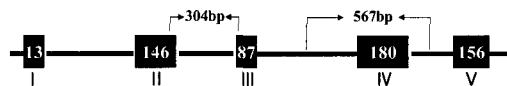


Fig. 2. Primer design for PCR analysis on hEPO gene introduced into transgenic swine.

폭하여 돼지와 상동성으로 인한 PCR 검정의 오류를 방지하도록 하였는데 그 모식도를 Fig. 2에 나타내었다.

Fig. 2에서와 같이 구축한 primer(mWAP-hEPO 304, 567)를 이용하여 PCR 수행 후 전기영동 결과를  $\Phi$ 174 DNA-Hae III와 pBR322 DNA-Hae III Size marker와 비교한 결과 예측된 크기의 304와 567bp에서 band를 확인할 수 있었다.

Fig. 3(A)에서 나타난 것과 같이 mWAP-hEPO 567 primer를 사용하여 생산된 자돈에 대해 PCR 검정을 수행한 결과 0-74번 개체에서 PC와 동일한 크기의 567bp 단편을 확인할 수 있었으며, Fig. 3 (B)에서도 mWAP-hEPO304 primer를 사용한 결과 0-74번 개체가 PC와 같은 304 bp 단편이 확인되었다. 따라서 0-74번 개체가 사람의 조혈촉진유전자(hEPO)가 형질전환된 것으로 판명하였으며, 그 개체는 수컷으로 나타났다. 이렇게 분만 모든 7두로부터 생산된 47두의 자돈에 대하여 PCR 검정을 수행한 결과를 Table 4에 나타내었다.

Table 4에 나타난 것과 같이 47두의 생산자돈에

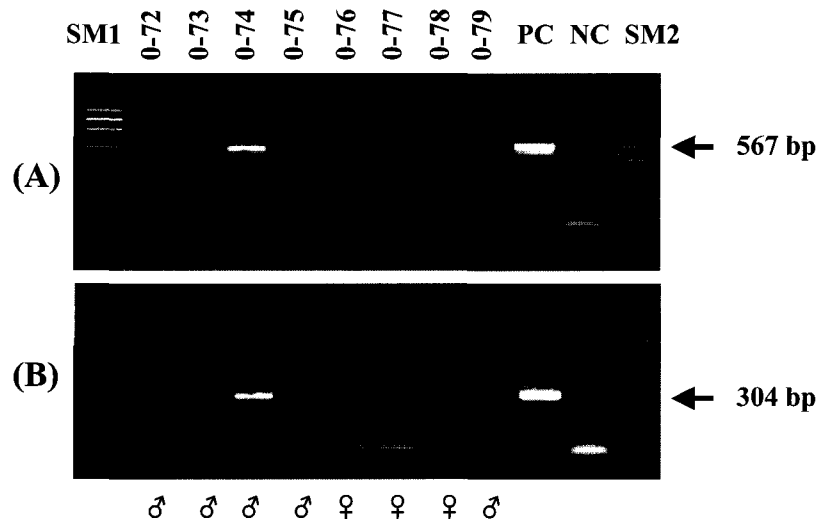
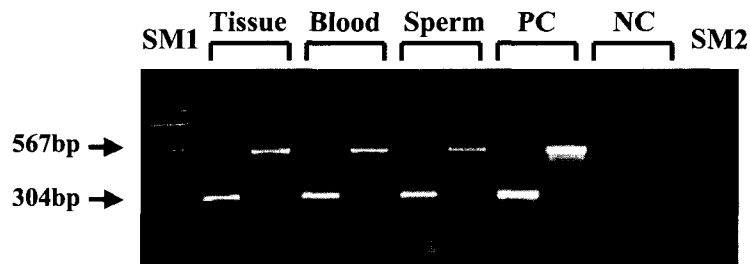


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis showing PCR products obtained from transgenic pig. PCR products proliferated at the different sites(567bp and 304bp) of the transgene according to primer. (A) Amplified fragment(567 bp) by using mWAP- hEPO567 primer (B) Amplified fragment(304 bp) by using mWAP-hEPO304 primer.(PC : Positive Control, NC : Negative Control). SM1 ;  $\Phi$ 174 DNA-Hae III Size marker, SM2 ; pBR322-Hae III Size marker

**Table 4. Results of transgene analysis by PCR**

No. of parturition	No. of piglets		Piglets/recipient	Transgenic pigs		Rate of transgene(%)
	Male	Femal		Male	Female	
7	28	19	6.7	1	0	2.13
	47					



**Fig. 4. Analysis of EPO gene from tissue, blood and sperm of the transgenic pig by PCR. (PC : Positive control, NC : Negative control). SM1 ;  $\nabla$ 174 DNA-HaeIII Size marker, SM2 ; pBR322-HaeIII Size marker**

대한 PCR 검정결과 수컷 1두가 최종 형질전환된 것으로 확인되었으며 형질전환율은 2.13%(1/47)로 나타났다.

본 연구에서 형질전환된 개체인 경우 도입된 유전자가 mWAP-hEPO로서 사람의 조혈촉진유전자가 돼지에 형질전환되어 유즙으로 생리활성 단백질이 분비되도록 하였으나 형질전환 개체(0~74번)가 수컷으로 F<sub>1</sub> 생산에 의한 암컷을 기대하여야 하기에 다음 세대로의 전이 가능성을 위하여 성숙기에 이르렀을 때 정자에서도 그 유전자가 도입되어 있는지를 검정하기 위해 확인된 개체에 대해서 꼬리조직과 혈액 그리고 정액을 채취하여 그 조직으로부터 DNA를 추출하고 재검정을 실시한 결과가 Fig. 4와 같이 나타났다.

Fig. 4에 나타났듯이 꼬리조직과 혈액 및 정액의 정자로부터 추출된 DNA에서도 모두 567bp와 304bp 크기의 단편이 PCR 재검정으로 확인되어 사람의 조혈촉진 유전자가 다음 세대로의 전이 가능하다는 것이 밝혀졌다.

#### IV. 고 찰

일반적으로 유전자가 미세주입된 수정란은 그렇지 않은 것에 비해 발달율이 50%까지 감소하는 것으로 보고되었다(Hadju 등, 1994; Hammer 등, 1985; Kubisch 등, 1995). 보고되지 않은 우리의 결과에 의하면 체외수정란 내 미세주입 후 배발달율은 약 22.2%로 Funahash 등(1994), Williams 등(1992b)와 유사하였으나 Kubisch 등(1995)의 결과보다는 낮았으며, 체내수정란 생산을 위한 수정란 회수율은 Schlieper와 Holtz(1986), White 등(1988)이 보고한 결과보다 낮았으나 Martin 등(1990)이 보고한 72.9%와는 유사한 결과를 보였는데 수정란 회수율이 낮은 것은 아마 operator의 실수나 수정란 회수시 Surgery의 부적절한 시간에 기인하는 것으로 본다. William 등(1992b)은 배란과 발정시간을 정확히 판단하는 것은 쉽지 않다고 하였으며 이것은 곧 1세포기 수정란을 생산하는 능력과 관련 있다고 하였다. Hajdu 등(1994)이 1세포기 수정란 회수율을 86.4%로 보고하였는데, 본 연구의 결과는 86.6%(650/738)로 유사한 결과를 나타내었다. 체내수정란을 이용한 형질전환 가축생산 시 무엇보다 중요한 것은 수정란의 회수에도 있겠으나 더

육 중요한 것은 hCG 주입 후 수정란 회수시 자·  
 응 전핵을 볼 수 있는 수정란을 얼마나 많이 얻을  
 수 있는가 하는 문제이다(Hajdu 등, 1994; Williams  
 등, 1992a). 본 연구에서는 hCG 주입 후 54시간  
 전·후에서 전핵 노출이 가능한 많은 수정란을 얻  
 을 수 있었으며 이것은 Persel과 Wall(1996)의 보  
 고와 거의 유사하였다. 수정란의 발달 단계에 대한  
 변이는 배란 시점에서의 조절이 중요하므로 배란  
 유시기 hCG 주입시기에 의해 좌우될 수 있다  
 (Soede 등, 1992). 그러므로 우리의 결과는 hCG 주  
 입 농도를 500 내지 750 IU를 주입함으로써 과배  
 란을 유기할 수 있었으며 동기화된 One cell stage  
 의 수정란을 회수할 수 있었다. 이식시 수정란의  
 수가 임신율에 미치는 영향에 관한 연구는 Brem  
 등(1985), Wei 등(1993)에 의해 보고되었으며 우리  
 의 보고되지 않은 결과에 의하면 21~24개의 수정  
 란을 이식 시 그보다 적거나 많은 수의 수정란 이  
 식시보다 약간의 차이를 보였는데 이것은 1993년  
 Wei 등의 보고와 거의 유사한 것으로 봐서 수정란  
 의 수가 임신율에 미치는 영향은 크지 않은 것으  
 로 보며, 다만 미세주입된 난자와 그렇지 않은 난  
 자를 이식할 시에는 약간의 차이가 있는 것으로  
 보고되었다(Eyestone, 1994). 사실 형질전환 돼지  
 을 생산하기 위해서 아니면 수정란 이식시 임신율  
 에 미치는 중요한 요인은 수란돈과 공란돈 간의  
 발정동기화이며 동기화 정도에 따라 수정란 이식  
 후 초기배의 사망, 착상 지연 및 배 성장과 발달 등  
 과 같은 복잡한 문제들이 일어나곤 한다(Barnes,  
 2000). 이러한 연구수행 결과에도 불구하고 세계적  
 으로 미세주입에 의한 형질전환 돼지 생산율은 거  
 의 1% 전·후에 머물고 있는 실정이다(Wall 등,  
 1985). 결과적으로 우리의 data에서 보는 바와 같  
 이 미세주입방법을 통한 형질전환 가축을 생산하  
 기 위한 단계는 복잡하며 생산 효율이 낮을 뿐 아  
 니라 많은 인력과 돈을 필요로 하는 분야이므로  
 이러한 문제점을 극복하기 위한 새로운 방법들이  
 많이 시도되고는 있으나 그러한 방법들 또한 이론  
 적 배경과는 달리 성공률이 극히 저조한 편이며  
 그럼에도 불구하고 성공시 경제적 효과 등을 고려  
 한다면 형질전환 가축생산을 위한 연구는 지속적

으로 발전할 것이며 결론적으로 본 연구 결과로서  
 생산된 형질전환 돼지는 돼지 사육에 있어 사료효  
 율을 높이고 생산성을 향상시키는데 일조할 것으  
 로 기대한다.

## V. 적 요

본 연구는 사람의 조혈촉진 유전자(hEPO)가  
 도입된 형질전환 돼지를 생산하기 위해 사계절동  
 안 수행하였다. 약 8~15개월령의 순종의 랜드레  
 이스 경산돈 및 미경산돈 42두는 유전자 미세주입  
 을 위한 1세포기 단계의 수정란 채란 및 이식을 위  
 해 사용하였으며, 발정동기화 및 과배란 방법은  
 PG 600 주입 후 9일간 매일 20mg의 altrenogest를  
 사료에 첨가하여 급여하였다. Altrenogest를 9일간  
 급여 후 1,500IU의 PMSG와 500IU의 hCG를 주입  
 하므로써 과배란을 유도하였다. 미세주입을 위한  
 유전자는 mouse whey acidic protein(mWAP) 프로  
 모터에 hEPO 유전자를 연결하여 준비하였으며,  
 호르몬 처리후 23두의 공란돈으로부터 650개의  
 난자를 회수하였으며, 이 중 83.1%(540/650)는  
 DNA 미세주입을 위해 전핵을 관찰할 수 있는 1-  
 세포기의 수정란이었다. 이중 유전자가 미세주입  
 된 543개의 난자를 19두의 수란돈에 이식하였으며  
 7두의 임신돈으로부터 47두의 자돈을 생산하였다.  
 생산된 자돈 47두로부터 꼬리조직으로부터 분리된  
 DNA의 PCR 검정 결과 수컷 1두가 형질전환 양성  
 반응을 나타내어 2.13%의 형질전환율을 나타내었  
 으며, 이러한 연구의 결과는 생체반응기(bioreactor)  
 연구에 있어서 형질전환 돼지생산의 성공적이며  
 유용한 정보를 제공할 것으로 사료된다.

## VI. 인용문헌

1. Aguirre, A., Castro-Palomino, N., De la Fuente,  
 J. and Ovidio Castro F. O. 1998. Expression of  
 human erythropoietin transgenes and of the  
 endogenous WAP gene in the mammary gland  
 of transgenic rabbits during gestation and  
 lactation. *Transgenic Res.*, 7(4):311-317.

2. Barash, I., Faermanm, A., Richenstein, M., Kari, R., Damary, G. M., Shani, M. and Bissell, M. J. 1999. *In vivo* and *in vitro* expression of human serum albumin genomic sequences in mammary epithelial cells with beta-lactoglobulin and whey acidic protein promoters. *Mol. Reprod. Dev.*, 52(3):241-252.
3. Barnes, F. L. 2000. The effects of the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. *Theriogenology*, 53: 649-658.
4. Bowen, R. M. R., Schnieke, A., Seidel, G., Brink, Z., Stacey, A., Thomas, W. and Kajikawa, K. 1994. Transgenic cattle resulting from biopsied embryos: Expression of c-ski in a transgenic calf. *Biol. Reprod.*, 6:647-652.
5. Brem, G., Brenig, B., Goodman, H. M., Selden, R. C., Graf, F., Kruff, B., Springman, K., Hondele, J., MEyer, J., Winnaker, E-I. and Krausslich, H. 1985. Production of transgenic mice, rabbit and pigs by microinjection into pronuclei. *Zuchthygiene*, 20:251-252.
6. David, R. B., Blom, A. K., Sjaastad, O. V. and Harbitz, I. 2001. The porcine erythropoietin gene: cDNA sequence, genomic sequence and expression analyses in piglets. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 20(2):137-147.
7. Divoky, V., Liu, Z., Ryan, T. M., Prchal, J. F., Townes, T. M. and Prchal, J. T. 2001. Mouse model of congenital polycythemia: Homologous replacement of murine gene by mutant human erythropoietin receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98(3):986-991.
8. Eyestone, W. H. 1994. Challenges and progress in the production of transgenic cattle. *Reprod. Fertil. Dev.*, 6:647-652.
9. Fu, P., Evans, B., Lim, G. B., Moritz, K. and Wintour, E. M. 1993. The sheep erythropoietin gene: molecular cloning and effect of hemorrhage on plasma erythropoietin and renal/liver messenger RNA in adult sheep. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 93(2):107-116.
10. Funahashi, H., Stumpf, T. T., Terlouw, S. L., Cantley, T. C., Rieke, A. and Day, B. N. 1994. Developmental ability of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 39:965-973.
11. Gordon, J., Scagnos, G., Plotkin, D., Barbosa, J. and Ruddle, F. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7380-7384.
12. Hajdu, M. A., Knight, J. W., Canseco, R. S., Krisher, R. L., Velander, W. H., Pearso, K. E. and Gwazdauskas, F. C. 1994. Effect of culture conditions, Donor age, and Injection Site on *in vitro* development of DNA microinjected porcine zygotes. *J. Anim. Sci.*, 72:1299-1305.
13. Hammer, R. E., Pursel, V. G., Rexroad, C. E., Wall, R. J., Bolt, D. J., Ebert, K. M., Palmiter, R. D. and Brinster, R. L. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 315:680-683.
14. Hill, K., Curry, J., DeMayo, F., Jones-Diller, K., Slapak, J. and Bondioli, K. 1992. Production of transgenic cattle by pronuclear injection. *Theriogenology*, 37:222abstr.
15. Inuzuka, H., Yamanouchi, K., Tachi, C. and Tojo, H. 2001. A transgenic mouse model for investigating the response of the upstream region of whey acidic protein (WAP) gene to various steroid hormones. *Exp. Anim.*, 50(1):1-7.
16. Kirby, S. L. 1999. The therapeutic potential of erythropoietin receptor transgenes. *Cytokines. Cell. Mol. Ther.*, 5(2):97-104.
17. Kochling, J., Curtin, P. T. and Madan, A. 1998. Regulation of human erythropoietin gene induction by upstream flanking sequences in transgenic mice. *Br. J. Haematol.*, 103(4):960-968.
18. Korhonen, V. P., Tolvanen, M., Hyttinen, J.



- M., Uusi-Oukari, M., Sinervirta, R., Alhonen, L., Jauhiainen, M., Janne, O. A. and Janne, J. 1997. Expression of bovine beta-lactoglobulin/human erythropoietin fusion protein in the milk of transgenic mice and rabbits. *Eur. J. Biochem.*, 245(2):482-489.
19. Kubisch, H. M., Larson, M. A., Funahashi, H., Day, B. N. and Roberts, R. M. 1995. Pronuclear visibility, development and transgene expression in IVM/IVF-derived porcine embryos. *Theriogenology*, 44:391-401.
  20. Lathe, R., Clark, A., Archibald, A., Bishop, JI, Simons, P. and Wilmut, 1985. I.Novel products from livestock. In: smith, C., King, W. McKay, J.,(eds). *Exploiting new technology in animal breeding* . Oxford: Science Publications 99-102.
  21. Lee, T. H., Kim, S. J., Han, Y. M., Yu, D. Y., Lee, C. S., Choi, Y. J., Moon, H. B., Baik, M. G. and Lee, K. K. 1998. Matrix attachment region sequences enhanced the expression frequency of a whey acidic protein/human lactoferrin fusion gene in the mammary gland of transgenic mice. *Mol. Cells.*, 8(5):530-536.
  22. Lin, F. K., Lin, C. H., Lai, P. H., Browne, J. K., Egrie, J. C., Smalling, R., Fox, G. M., Chen, K., Castro, M. and Suggs, S. 1986. Monkey erythropoietin gene: Cloning, expression and comparison with the human erythropoietin gene. *Gene*, 44:201-209.
  23. Lin, F. K., Suggs, S., Lin, C. H., Browne, J. K., Smalling, R., Egrie, J. C., Chen, K., Fox, G. M., Martin, F., Stabinsky, Z., Badrawi, S. M., Lai, P. H. and Goldwasser, E. 1985. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 (22): 7580-7584
  24. Massoud, M., Attal, J., Thepot, D., Pointu, H., Stinnakre, M. G., Theron, M. C., Lopez, C. and Houdebine, L. M. 1996. The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. *Reprod. Nutr. Dev.*, 36(5): 555-563.
  25. Mikus, T., Maly, P., Poplstein, M., Landa, V., Trefil, P. and Lidicky, J. 2001. Expression of human erythropoietin gene in the mammary gland of a transgenic mouse. *Folia Biol (Praha)*, 47(6):187-195.
  26. Nagao, M., Suga, H., Okano, M., Masuda, S., Narita, H., Ikura, K. and Sasaki, R. 1992. Nucleotide sequence of rat erythropoietin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1171(1):99-102.
  27. Palmiter, R., Brinster, R., Hammer, R., Trubaner, M., Rosenfeld, M., Birnberg, N. and Evans, R. 1982. Dramatic growth of mice that developed from eggs microinjected with metallothionine growth hormone fusion genes. *Nature*, 300:611-615.
  28. Pursel, V. G. and Wall, R. J. 1996. Effect of transferred ova per recipient and dual use of donors as recipients on production of transgenic swine. *Theriogenology*, 46:201-209.
  29. Rodriguez, A., Castro, F. O., Aguilar, A., Ramos, B., Del Barco, D. G., Lleonart, R. and De la Fuente, J. 1995. Expression of active human erythropoietin in the mammary gland of lactating transgenic mice and rabbits. *Biol. Res.*, 28(2):141-153.
  30. Sambrook, J. and Russell, D. W. 1991. *Molecular Cloning. A laboratory manual*.(3rd Ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  31. Schlieper, B. and Holtz, W. 1986. Transfer of pig embryos collected by laparotomy or slaughter. *Anim. Reprod. Sci.*, 12:109-114.
  32. Semenza, G. L., Dureza, R. C., Traystman, M. D., Gearhart, J. D. and Antonarakis, S. E. 1990. Human erythropoietin gene expression in transgenic mice: multiple transcription initiation sites and cis-acting regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.*, 10(3):930-938.

33. Semenza, G. L., Traystman, M. D., Gearhart, J. D. and Antonarakis, S. E. 1989. Polycythemia in transgenic mice expressing the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86(7):2301-2305.
34. Shoemaker, C. B. and Mitscock, L. D. 1986. Murine erythropoietin gene: Cloning, expression, and human gene homology. *Mol. Cell. Biol.*, 6:849-858.
35. Soede, N. M. Noordhuizen, P. P. T. M. and Kemp, B. 1992. The duration of ovulation in pigs, studied by transrectal ultrasonography, is not related to early embryonic diversity. *Theriogenology*, 38:653.
36. Van Cott, K. E., Lubon, H., Russell, C. G., Butler, S. P., Gwazdauskas, F. C., Knight, J., Drohan, W. N. and Velander, W. H. 1997. Phenotypic and genotypic stability of multiple lines of transgenic pigs expressing recombinant human protein C. *Transgenic Res.*, 6(3):203-212.
37. Wall, R. 1996. Modification of milk composition in transgenic animals. *American Society of Animal Science*. 165-188.
38. Wall, R. J., Pursel, V. G., Shamay, R. A., McKnight, Pittius, C. W. and Hennighausen, L. 1991. High-level synthesis of a heterologous milk protein in the mammary glands of transgenic swine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1696.
39. Wall, R. J., Pursel, V. G., Hammer, R. E. and Brinster, R. L. 1985. Development of porcine ova that were centrifuged to permit visualization of pronuclei and nuclei. *Biol. Reprod.*, 32:645-651.
40. Wall, R. J., Rexroad, C. E. Jr., Powell, A., Shamay, A., McKnight, R. and Hennighausen, L. 1996. Synthesis and secretion of the mouse whey acidic protein in transgenic sheep. *Transgenic Res.*, 5(1):67-72.
41. Wei, Q., Fan, J. and Chen, D. 1993. Effect of number of transferred microinjected embryos on pregnancy rate and litter size of pigs. *Theriogenology*, 39:338 abstr.
42. White, K. L., Southern, L. L., Rickords, L. F. and Wood, T. C. 1988. Embryonic development and quality in cycling crossbreed gilts following altrenogest synchronization and exogenous gonadotrophin administration. *Theriogenology*, 29:326 abstr.
43. Williams, B. L., Sparks, A. E. T., Canseco, R. S., Knight, J. W., Johnson, J. L., Velander, W. H., Page, R. L., Drohan, W. N., Kornegay, E. T., Pearson, R. E., Wilkins, T. D. and Gwazdauskas, F. C. 1992a. Evaluation of systems for collection of porcine zygotes for DNA microinjection and transfer. *Theriogenology*, 38:501-511.
44. Williams, B. L., Sparks, A. E. T., Canseco, R. S., Knight, J. W., Johnson, J. L., Velander, W. H., Page, R. L., Drohan, W. N., Young, J. M., Pearson, R. E., Wilkins, T. D. and Gwazdauskas, F. C. 1992b. *In vitro* development of zygotes from prepubertal gilts after microinjection of DNA. *J. Anim. Sci.*, 70:2207-2211. (접수일자: 2002. 3. 22. / 채택일자: 2002. 4. 20.)