

형질전환 생쥐의 후대에서 인간 Interleukin-10 유전자의 안정적 전이와 지속적인 발현*

정진우 · 구덕본 · 한용만 · 이경광[†]

한국생명공학연구원 발생분화연구소

초 록

형질전환 동물의 유선에서 특이적으로 발현되도록 고안된 pBIL-10 발현 벡터를 이용하여 인간 IL-10 유전자가 삽입되어 한 계통으로 확립된 형질전환 생쥐에서 이 유전자가 장기 세대까지 안정적으로 전이되고, 또한 발현 수준도 지속적으로 유지되는지를 조사하였다. 이를 위해 제 8 세대의 수컷 hIL-10 형질전환 생쥐를 실험에 공시하였고, 제 15 세대까지의 전이율과 hIL-10 유전자의 발현수준을 분석하였다. 제 8 세대 생쥐의 계대 번식에 의한 자손 중 50.9±5.8%가 형질전환 생쥐로 판명되었다. 또한 제 9 세대에서 외래 유전자의 전이율은 66.0±20.1%이었고, 제 10세대에서 외래 유전자의 전이율은 61.5±16.7%이었고, 제 11세대에서 외래 유전자의 전이율은 41.1±8.4%이었고, 제 12세대에서 외래 유전자의 전이율은 40.7±20.3%이었고, 제 13세대에서 외래 유전자의 전이율은 61.3±10.8%이었고, 제 14세대에서 외래 유전자의 전이율은 49.2±18.8%이었고, 제 15세대에서 외래 유전자의 전이율은 43.8±25.9%이었다. 이러한 결과로 hIL-10 형질전환 생쥐는 그 외래유전자의 유전적 손상이 없이 장기 세대까지 안정적으로 전이되는 것으로 판단된다. 제 9 세대의 암컷 형질전환 생쥐로부터 유즙내 인간 hIL-10의 발현 수준을 분석하였을 때, 그 농도는 평균 3.6±1.2 mg/ml의 수준에서 측정되었다. 제 10세대에서는 유즙내 인간 hIL-10의 발현 수준을 분석하였을 때, 그 농도는 평균 4.2±0.9 mg/ml의 수준에서 측정되었고, 제 11세대에서는 유즙내 인간 hIL-10의 발현 수준을 분석하였을 때, 그 농도는 평균 5.7±1.5 mg/ml의 수준에서 측정되었고, 제 12세대에서는 유즙내 인간 hIL-10의 발현 수준을 분석하였을 때, 그 농도는 평균 6.3±3.5 mg/ml의 수준에서 측정되었고, 제 13세대에서는 유즙내 인간 hIL-10의 발현 수준을 분석하였을 때, 그 농도는 평균 6.8±4.5 mg/ml의 수준에서 측정되었고, 제 14세대에서는 유즙내 인간 hIL-10의 발현 수준을 분석하였을 때, 그 농도는 평균 6.8±3.1 mg/ml의 수준에서 측정되었다. 이러한 수준은 제 1 세대의 것보다 높은 결과로 형질전환 생쥐에서 인간 IL-10 유전자의 발현은 최소한 15 세대까지 지속적으로 유지된다는 것을 알 수 있었으며, 장기 세대까지도 발현 수준이 유지될 것으로 판단된다. 이러한 연구 결과는 계통으로 확립된 형질전환 동물에 부여된 새로운 유전형질은 지속적으로 후대로 유전될 수 있음을 제시한다.

(주제어 : Transgenic mice, IL-10, Transmission, Expression)

서 론

최근 유전공학 및 동물발생공학 기술의 발달에 따라 종래 생체로부터 미량밖에 얻을 수 없었던 인체생리활성물질을 포유동물 개체를 숙주로 이용하는 방법, 즉, 형질전환동물(transgenic animal) 생산가능하게 되었다. 실제로 형질전환동물의 유선을 bioreactor로 활용하려는 연구가 Gordon 등(1987)에 의해 생쥐에서 처음으로 시도된 이후로 많은 연구자들에 의해 의약품으로 사용되는 유용단백질을 유선에서 대량으로 생산할 수 있는 시스템 개발이 진행되어 왔고, 그 결과로 매우 높은 수준에서 발현하는 형질전환 생쥐, 래트, 산양,绵양, 돼지, 소가 생산되었다(Wall, 1998; Rudolph, 1999). 이들의 연구에서 대부분은 형질전환 동물의 외래 유전자가 다음 세대로 전이되는 것이 확인되면 계통이 확립된 것으로 인정하였고, 그 외래유전자에 대한 형질은 안정적으로 자손에게 유전될 것으로 예측하였다. 그렇지만, 일

단 계통이 확립된 형질전환 동물에서 그 외래유전자의 발현 수준이 세대에 관계없이 지속적으로 유전되는지 또는 모든 자손에게 유전되는지에 대해서는 아직 실험적으로 명확하게 구명되지 않았다. 실제로, 일반적인 현상은 아니지만, 몇몇 연구자에 의하면 외래유전자가 삽입된 위치에 따라 비록 그 유전자가 다음 세대로 전이되더라도 발현 수준이 감소하거나(Dobie 등, 1996; Migliaccio 등, 2000; Opsahl 등, 2002), 유전자의 변형에 의한 외래유전자의 결손에 의해 야기된 발현의 중지(Sandgren 등, 1992; Aigner 등, 1999), 그리고 유전적 또는 후생학적 변형(Robertson 등, 1996; Dobie 등, 1997)에 의해 발현에 이상이 있음이 보고 되고 있다.

인간 Interleukin-10(hIL-10)은 항염증에 작용하는 주요 면역조절인자로서 모유에서 그 존재가 밝혀졌다(Go 등, 1990; Howard 등, 1993; de Vries, 1995; Garofalo 등, 1995). 이러한 항염기능은 IL-10이 항염제로서 작용할 수 있음을 시사하며, 만성염증, 자가면역 질환, 이식 거부 등의 분야에 치료제로서 개발이 가능하다는 것을 제시하고 있다. 칩샘과 눈물샘에서 IL-10은 Fas 경로를 통하여 apoptosis를 유발함

* 본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21 사업 과제(ABM0020413)의 일환으로 수행되었음.

[†] Corresponding author : Laboratory of Development and Differentiation, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejeon 305-333, Korea. TEL: 82-42-860-4420, E-mail: leekkk@kribb.re.kr

이 최근에 밝혀졌다. 형질전환모델 생쥐에서 IL-10은 CD4+ T 세포에서 Fas-L의 발현을 유도하며, Fas-L을 발현하는 세포가 Fas를 발현하는 세포에 작용하여 apoptosis를 유발하게 된다. 위의 사실은 IL-10의 과발현이 Sjogren's syndrome을 일으키는 요인으로 작용할 수 있음을 보여준다(Fox와 Saito, 1994; Saito 등, 1999). 침샘이나 눈물샘과는 달리, 유선조직의 세포들은 성장과 분화, 퇴화를 반복한다. 인간의 모유에는 TNF, TGF, IL-1, IL-6 등이 생리적으로 충분히 유의할 정도의 양이 포함되어 있다(Wiley 등, 1995; Basolo 등, 1996). IL-10은 60 ~ 9,300 pg/ml 정도의 양이 포함되어 있다(de Vries, 1995). 그러나 이의 정확한 생리적 기능은 아직 밝혀지지 않고 있다.

본 연구실에서는 hIL-10을 대량 생산할 수 있는 형질전환 동물의 체계를 확립하고자 IL-10 유전자를 구조분석한 후, IL-10 유전자를 β -casein promoter에 연결하여 발현 벡터 pBIL-10(β -casein promoter/Interleukin-10)을 제조하여 pBIL-10이라 명명한 형질전환 생쥐를 개발한 바 있다(Sohn 등, 2003). 이 중에서 pBIL-10 #6 형질전환 생쥐는 최고 1.6 mg/ml 수준으로 유즙에서 IL-10을 분비하며, 이로부터 생산된 IL-10은 그 생리 활성이 매우 높은 것으로 검증되었다. 그러나 이러한 형질전환 동물이 15세대 이상 여러 세대에 걸쳐서 그 형질을 계속 유지할 수 있는지에 관해서는 아직 실험적으로 명확히 밝혀진 것이 없다. 따라서 본 실험에서는 이러한 형질유전성을 알아보고자 제 1세대에서 높은 수준으로 인간 IL-10을 발현하는 형질전환 생쥐를 제 8세대까지 계대번식을 통해 유지시킨 후 제 9세대에서 제 15세대까지 외래유전자 전이율과 IL-10 발현 수준을 조사하였다.

재료 및 방법

공시동물

본 실험을 위해 유즙으로 인간 IL-10을 제 1세대에서 1.6 mg/ml 수준으로 생산하는 hIL-10 형질전환 생쥐의 8세대를 공시하였고, 다음과 같은 방법으로 15세대까지 계대 번식을 실시하였다.

교잡종 생쥐(C57BL/6XDBA) δ × 각 세대의 형질전환 생쥐 δ

인간 IL-10 유전자의 전이 확인

교배를 통하여 태어난 산자들의 IL-10 유전자 전이 여부를 PCR 방법으로 분석하였다. 이를 위해 자손의 꼬리를 일부 절취한 후, 이를 300 μ g/ml의 proteinase K(Promega, USA)가 첨가된 0.3 ml의 조직 용해 용액[100 mM Tris-HCl(pH 8.5), 5 mM EDTA, 0.2% SDS에서 용해시켰다. 55 $^{\circ}$ C에서 16-18 시간 동안 용해된 조직용액에 이와 동일한 양의 Tris-saturated Phenol(Sigma, USA)을 첨가하여 완전히 섞은 후 5,000 \times g에서 15분간 원심분리를 수행하였다. 이러한 과정을 2 회 더 실시한 후 상층액을 회수하여 이와 동일한 양의 순수 ethanol과 서서히 섞어 genomic DNA의 침전을 유도하였다. 침전된 genomic DNA를 멸균 증류수로 용해한 다음 PCR 분석 실험에 사용하였다(Sambrook



Fig. 1. Identification of IL-10 transgene from the tail genomic DNA of offsprings. PCR analysis was carried out as described in Materials and Methods. IL-10-specific band of 580 bp only was showed in offsprings carrying the transgene, which was indicated as an underlined number.

등, 1989).

PCR은 primer를 제외한 *Taq* polymerase, PCR buffer, dATP, dCTP, dGTP, dTTP가 한 튜브에 미리 준비된 pre-mix kit(Bioneer, Korea)를 사용하여 수행하였다. 약 100 ng의 genomic DNA와 20 pmol의 정방향과 역방향 primer를 최종 20 μ l가 되도록 멸균증류수로 조정된 후 pre-mix kit에 첨가하였다. 외래유전자 pBIL-10에 대한 primers를 이용하여 thermocycler(Perkin Elmer Co., Rockville, MD, Model 480)에서 PCR을 수행하였으며, PCR 조건은 아래와 같다.

pBIL-10 : 94 $^{\circ}$ C 60초, 55 $^{\circ}$ C 60초, 72 $^{\circ}$ C 40초 / 30 회

PCR을 수행한 후 그 반응 산물의 10 μ l를 1.5 % agarose gel에서 전기영동을 실시하였다. Ethidium bromide 염색에 의해 hIL-10 유전자가 580 bp에서 PCR 증폭 단편이 확인되는 생쥐를 형질전환 생쥐로 판명하였다(Fig. 1).

유즙에서 인간 IL-10 단백질의 분석

암컷 형질전환 생쥐의 유즙을 채취하기 위하여 임신과 분만을 유도하였다. 분만 후 10일째에 유즙 분비를 촉진시키기 위해 10 IU의 oxytocin(Sigma, USA)을 복강내에 주사하였고, 그 즉시 5 ml 주사기를 이용하여 유즙을 흡입하였다. 채취된 유즙은 분석 전까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

형질전환 생쥐의 유즙에 함유된 인간 IL-10 단백질의 농도는 ELISA kit(Pharmingen사, USA)를 이용하여 측정하였다. 분석은 구입한 kit에서 제공하는 방법에 따라 실시하였고, 이 kit에서 제공되는 standard와 sample 반응액을 micro-plate reader(BIO-RAD, USA)를 이용, 450 nm에서 O.D. 값을 측정하였다. Standard에 대한 O.D. 값을 microcal origin 6.0 software를 사용하여 standard curve를 완성하였고, 유즙 sample O.D. 값의 평균을 대입하여 유즙내 IL-10 농도를 결정하였다.

통계처리

본 연구결과에 대한 각 군 간의 통계학적 유의성은 SAS package의 General Linear Model(GLM) procedure(SAS Institute, 1996)를 이용하여 Duncan's multiple range test에 의하여 검정하였다.

결과 및 고찰

hIL-10 유전자의 후대로의 안정적 전이

제 1세대에서 유즙으로 인간 IL-10을 생산하는 것으로

확인된 형질전환 생쥐에서 그 외래유전자가 장기 세대까지 안정적으로 전이되는지를 알아보기로 제 9세대부터 제 15 세대의 형질전환 자손의 생산 비율을 조사하였다. 이를 위해 8 세대의 수컷 형질전환 생쥐를 실험에 공시하여 제 9세대부터 암컷 형질전환 생쥐를 수컷 정상 생쥐와 교배시켜 그 자손의 형질전환 여부를 PCR 방법으로 분석하였고, 그 결과는 Table 1에 나타내고 있다.

제 8세대의 형질전환 수컷으로부터 생산된 자손 중 50.9±5.8%가 형질전환 생쥐로 판명되었다. 이것은 pBIL-10 유전자는 형질전환 생쥐의 생식선(germline)으로 완전히 전이되었다는 것을 의미한다. 제 9세대부터 암컷 형질전환 생쥐를 수컷 정상 생쥐와 교배시켰을 경우 전체의 형질전환 전이율은 66.0± 20.1%, 제 10세대는 61.5± 16.7%, 제 11세대는 41.1± 8.4%, 제 12세대는 40.7± 20.3%, 제 13세대는 61.3± 10.8%, 제 14세대는 49.2± 18.8%, 제 15세대는 43.8± 25.9%로 나타났다(Table 1). 또한, 제 9세대 형질전환 생쥐의 계대 번식에 의해 생산된 형질전환 생쥐 자손에서 수컷인 경우 67.2± 7.5%, 암컷인 경우 75.0± 43.3%, 제 10세대에서는 수컷인 경우 57.8± 15.4%, 암컷인 경우 65.6± 15.0%, 제 11세대에서는 수컷인 경우 45.1± 19.6%, 암컷인 경우 38.9± 24.1%, 제 12세대에서는 수컷인 경우 54.8± 43.0%, 암컷인 경우 46.8± 12.2%, 제 13세대에서는 수컷인 경우 58.3± 14.4%, 암컷인 경우 63.9± 12.7%, 제 14세대에서는 수컷인 경우 60.0± 40.0%, 암컷인 경우 44.0± 16.9%, 제 15세대에서는 수컷인 경우 33.3± 33.4%, 암컷인 경우 50.0± 25.0%가 형질전환 생쥐로 판명되었다(Table 1). 제 9세대부터 제 15세대까지 암컷 형질전환 생쥐를 수컷 정상 생쥐와 교배시켰을 경우 그의 자손에게 전이되는 외래유전자를 보유할 비율이 수컷과 암컷이 동 세대간에 약간 차이가 있는 경향이 관찰되었으나, 각 세대간 전이율에서 유의차가 인정되지 않았다. 종합적으로 제 9세대부터 제 15세대까지 외래유전자 전이율은 유사하였으며, 통계적인 유의차가 인정되지 않았다.

위와 같은 PCR 분석에 의한 전이율 조사만으로 그 외래 유전자가 유전적으로 손상되어 다음 세대로 전이되었는지를 판단할 수 없다. 그렇지만, Sohn 등(2003)에 의하면 본 실험에 공시된 형질전환 생쥐 계통은 1 copy의 외래유전자가 삽입되었다고 보고하였기 때문에, 멘델의 법칙에 거의 유사하게 나타난 전이율로 볼 때, hIL-10 형질전환 생쥐는 그 외래유전자의 유전적 손상이 없이 15세대 이상 장기 세대에 걸쳐서 안정적으로 전이되는 것으로 판단된다.

형질전환생쥐의 유즙에서 인간 IL-10 유전자의 지속적 발현

위의 결과로부터 일단 염색체에 삽입된 외래의 유전자는 장기 세대까지 안정적으로 유전된다는 것을 확인하였다. 인간 IL-10의 발현 수준도 제 1세대에서 1.6 mg/ml의 수준에서 인간 IL-10을 발현했던 형질전환 생쥐가 장기 세대까지 그 발현 능력이 유지되는지를 알아보기 위하여, 제 8 세대의 형질전환 수컷으로부터 다수의 형질전환 생쥐의 자손을 확보하였다(Table 1). 그 중에서 암컷 형질전환 생쥐 3 마리를 대상으로 성성숙 후 임신과 분만을 유도하였다. 비유 10일 째에 유즙내에 함유된 인간 IL-10의 농도를 ELISA 방법으로 측정하였다(Fig. 2). 인간 IL-10 단백질의

농도는 최소 2.5 mg/ml에서 최고 4.9 mg/ml까지 약 2.4 mg/ml의 변이를 나타내었다. 이러한 차이는 유선을 표적으로 하는 형질전환 생쥐에서 흔히 보이는 현상이며(최 등, 1998), 개체간의 건강이나 유즙 생산 능력의 차이에 의한 결과로 생각된다. 평균적으로 제 9 세대 형질전환 생쥐의 인간 IL-10 발현 수준은 약 3.6± 1.2 mg/ml로 나타났다. 제 9 세대의 형질전환 생쥐로부터 제 10대의 형질전환 생쥐를 생산하였고, 이로부터 제 9 대와 같은 방법으로 제 10 세대의 3 마리 암컷 형질전환 생쥐의 인간 IL-10 발현 능력을 조사하였다. 제 10 세대에서도 9 세대의 경우와 마찬가지로 인간 IL-10의 발현 수준은 3.4 mg/ml부터 5.2 mg/ml 까지 다양하였다. 평균 농도도 4.2± 0.9 mg/ml 로서 제 9 세대의 것과 비슷하게 나타났다. 제 11 세대에서는 인간

Table 1. Transmission rates of offspring after crossbreeding of transgenic female mice

Generation	No. of offsprings born			No. of transgenic mice			Transgenic rate (%)		
	M	F	T	M	F	T	M	F	T
F 8 ^P (3)	14	14	28	6	8	14	41.7± 17.7	63.3± 32.1	50.9± 5.8
F 9 (3)	16	9	25	11	6	17	67.2± 7.5	75.0± 43.3	66.0± 20.1
F10 (3)	11	10	21	6	7	13	57.8± 15.4	65.6± 15.0	61.5± 16.7
F11 (3)	18	11	29	8	4	12	45.1± 19.6	38.9± 24.1	41.1± 8.4
F12 (3)	10	15	25	3	7	10	54.8± 43.0	46.8± 12.2	40.7± 20.3
F13 (3)	12	9	21	7	6	13	58.3± 14.4	63.9± 12.7	61.3± 10.8
F14 (3)	13	15	28	7	7	14	60.0± 40.0	44.0± 16.9	49.2± 18.8
F15 (3)	7	10	17	3	5	8	33.3± 33.4	50.0± 25.0	43.8± 25.9

P : Number of transgenic male mice bred with non-transgenic female.

() : Number of transgenic female mice bred with non-transgenic male.

M: male, F: female, T: total.

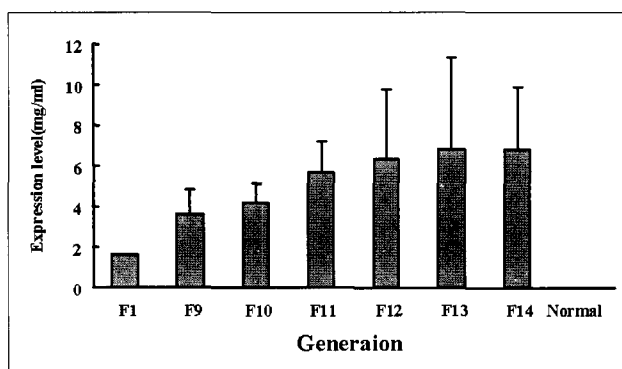


Fig. 2. ELISA analysis of hIL-10 gene expression in the milk of transgenic mice. The expression level of the hIL-10 protein in the milk of the transgenic founder mice and their offspring was evaluated by the ELISA analysis for each transgenic line. The sensitivity of the ELISA was 7.8 pg/ml.

IL-10의 발현 수준은 4.2 mg/ml부터 7.1 mg/ml 까지 다양하였으며, 평균 농도는 5.7 ± 1.5 mg/ml로 나타났다. 제 12세대에서는 인간 IL-10의 발현 수준은 2.5 mg/ml부터 9.3 mg/ml 까지 다양하였고 평균 농도는 6.3 ± 3.5 mg/ml로 나타났다. 제 13 세대에서는 인간 IL-10의 발현 수준은 4.2 mg/ml부터 12.0 mg/ml 까지 다양하였고 평균 농도는 6.8 ± 4.5 mg/ml로 나타났다. 제 14 세대에서는 인간 IL-10의 발현 수준은 4.2 mg/ml부터 10.2 mg/ml까지 다양하였으며 평균 농도는 6.8 ± 3.1 mg/ml로 나타났다. 이러한 발현 수준은 제 1 세대의 1.6 mg/ml의 수준보다(Sohn 등, 2003) 높은 결과로 나타났으며, 이는 세대간 hIL-10 단백질 발현량의 변이는 position effect에 의한 현상이 아니라, 어미 쥐의 건강상태나 산자수 등의 개체 차이에 의한 것으로 판단된다(Andrew 등, 1993). 이러한 결과로부터 형질전환 생쥐에서 인간 IL-10 유전자의 발현은 최소한 15 세대까지 지속적으로 유지된다는 것을 알 수 있었고, 장기 세대까지도 발현 수준이 유지될 수 있을 것으로 판단된다.

이상의 결과들은 일단 형질전환 동물이 한 계통으로 확립되면, 그 동물에 부여된 새로운 유전형질은 장기 세대까지 유전될 수 있으며, 이에 따른 유전자의 발현 수준도 지속적으로 유지되고 있음을 시사한다.

Stable Transmission and Continuous Expression of Human Interleukin-10 Transgene in the Offspring of Transgenic Mice

Zheng, Z. Y., D. B. Koo, Y. M. Han and K. K. Lee
Laboratory of Development and Differentiation, Korea
Research Institute of Bioscience and Biotechnology

ABSTRACT

The transgenic mice carrying human Interleukin-10 (hIL-10) gene in conjunction with bovine β -casein promoter express hIL-10 in milk during lactation. In this study, stability of germ line transmission and expression of hIL-10 transgene integrated into host chromosome were monitored up to generation F8 of transgenic mice. When male mouse of generation F8 was crossbred with normal females, approximately half of offspring ($50.9 \pm 5.8\%$) were identified as transgenic mice. Generation F9 to F15 mice also showed similar transmission rates ($66.0 \pm 20.1\%$, $61.5 \pm 16.7\%$, $41.1 \pm 8.4\%$, $40.7 \pm 20.3\%$, $61.3 \pm 10.8\%$, $49.2 \pm 18.8\%$ and $43.8 \pm 25.9\%$, respectively), implying that hIL-10 transgene can be transmitted stably up to long term generation in the transgenic mice. Expression levels of human IL-10 from milk of generation F9 to F14 mice were 3.6 ± 1.2 mg/ml, 4.2 ± 0.9 mg/ml, 5.7 ± 1.5 mg/ml, 6.3 ± 3.5 mg/ml, 6.8 ± 4.5 mg/ml and 6.8 ± 3.1 mg/ml, respectively, which was showed high-level expression compared with that of generation F1 (1.6 mg/ml) mice. In conclusion, our results suggest that transgenic mice can be continuously passed their transgenes to the progeny through the breeding program with the same productivity of human

IL-10 protein in their milk.

(Key words : Transgenic mice, IL-10, Transmission, Expression)

인용문헌

- Andrew SC, Michael AD, Gordon W, Denise SC, Dawn BR, Yvonne HG, Jayne LK, Jayne DB, Ann RS, Alan C, Lan G (1993): Transgenic livestock as bioreactors: stable expression of human alpha-1-antitrypsin by a flock of sheep. *Bio/Technology* 11: 1263-1270.
- Aigner B, Fleischmann M, Muller M, Brem, G (1999). Stable long-term germ-line transmission of transgene integration sites in mice. *Transgenic Res* 8:1-8.
- Basolo F, Fiore L, Fontanini G, Conaldi PG, Calvo S, Falcone V, Toniolo A (1996): Expression of and response to interleukin 6 (IL6) in human mammary tumors. *Cancer Res* 56:3118-3122.
- de Vries JE (1995): Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10. *Ann Med* 27:537-541.
- Dobie KW, Lee M, Fantes JA, Graham E, Clark AJ, Springbett A, Lathe R, McClenaghan M (1996): Variegated transgene expression in mouse mammary gland is determined by the transgene integration locus. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 93:6659-6664.
- Dobie K, Mehtali M, McClenaghan M, Lathe R (1997): Variegated gene expression in mice. *Trends Genet* 13:127-130.
- Fox RI, Saito I (1994): Criteria for diagnosis of Sjogren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 20:391-407.
- Garofalo R, Chheda S, Mei F, Palkowetz KH, Rudloff HE, Schmalstieg FC, Rassin DK, Goldman AS (1995): Interleukin-10 in human milk. *Pediatr Res* 37:444-449.
- Go NF, Castle BE, Barrett R, Kastelein R, Dang W, Mosmann TR, Moore KW, Howard M (1990): Interleukin 10, a novel B' cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J Exp Med* 172:1625-1631.
- Gordon K, Lee E, Vitale JA, Smith AE, Westphal H, Henninghausen L (1987): Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Bio/Tech* 5:1183-1187.
- Howard M, Muchamuel T, Andrade S, Menon S (1993): Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp Med* 177:1205-1208.
- Migliaccio AR, Bengra C, Ling J, Pi W, Li C, Zeng S, Keskinetepe M, Whitney B, Sanchez M, Migliaccio G, Tuan D (2000): Stable and unstable transgene integration sites in the human genome: extinction of the Green Fluorescent Protein transgene in K562 cells. *Gene* 256:197-214.

13. Opsahl ML, McClenaghan M, Springbett A, Reid S, Lathe R, Colman A, Whitelaw CBA (2002): Multiple Effects of Genetic Background on Variegated Transgene Expression in Mice. *Genetics* 160: 1107-1112.
14. Robertson G, Garrick D, Wilson M, Martin DI, Whitelaw E (1996): Age-dependent silencing of globin transgenes in the mouse. *Nucleic Acids Res* 15: 1465-1471.
15. Rudolph N (1999): Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *Trends in Biotech* 17:367-374.
16. Saito I, Haruta K, Shimuta M, Inoue H, Sakurai H, Yamada K, Ishimaru N, Higashiyama H, Sumida T, Ishida H, Suda T, Noda T, Hayashi Y, Tsubota K (1999): Fas ligand-mediated exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in mice transgenic for IL-10. *J Immunol* 162:2488-2494.
17. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
18. Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL, Brinster RL, Degen JL (1992): DNA rearrangement causes hepatocarcinogenesis in albumin-plasminogen activator transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 89:11523-11527.
19. Sohn BH, Chang HG, Kang HS, Yoon H, Bae SY, Lee KK, Kim SJ (2003): High level expression of the bioactive human interleukin-10 in milk of transgenic mice. *Journal of Biotechnology* 103:11-19.
20. Wall RJ (1998): Biotechnology for the production of modified and innovative animal products: Transgenic livestock bioreactors. In *Proceedings special symposium and plenary sessions, The 8th world conference animal production*. pp. 364-378.
21. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA (1995): Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3:673-682.
22. 최영희, 오건봉, 강용국, 방남수, 서길웅, 이경광, 이철상 (1998): 형질전환 생쥐에서 bovine β -casein/bovine growth hormone 재조합 유전자의 유전적 안정성에 관한 연구. *한국가축번식학회지* 22:237-244.
(접수일자: 2004. 9. 10. / 채택일자: 2004. 9. 24.)