

Single Cell PCR을 이용한 형질전환 유산양 체세포의 Transfection 효율 분석

김백철, 장석민, 전연실, 나루세겐지, 진동일

충남대학교 동물자원학부, 형질전환복제돼지연구센터

형질 전환된 체세포의 핵이식을 이용한 복제 기법의 개발로 다양한 형질 전환 동물이 생산이 가능하게 되었다. 특정 유전자를 체세포에 주입 또는 제거한 후 핵이 제거된 난자에 이식하여 복제 동물을 생산하는 방법은 100% 형질 전환 효율이 가능한 것으로 알려져 있다. 그러나 체세포에 유전자를 transfection 시킨 후 drug selection에 의해 colony를 선별하고 PCR이나 Southern blotting에 의해 형질 전환을 확인하게 되는데, colony 선발시 유전자가 도입되지 않은 체세포들의 오염으로 인해 완전히 100%의 형질 전환율을 기대할 수 없다. 본 연구에서는 tPA 유전자를 유산 양 섬유아세포에 transfection 시킨 후 G418에 의해 선발된 colony별로 세포주를 확립하여 transfection 효율을 확인하기 위해 개개의 single cell의 transfection 효율을 PCR을 이용하여 확인하였다. 유산 양 태아 섬유아세포를 FuGENE 6를 이용하여 transfection 시킨 다음 800 ug/mL G418이 첨가된 선별 용액으로 세포군을 수확하여 배양하였다. Transfection이 확인된 세포는 0.25% Trypsin-EDTA를 사용하여 single-cell로 만들어 각각의 세포를 증류수에 넣고 proteinase K (10 mg/mL) 1 uL를 첨가하여 55°C에서 1시간 incubation한 다음 95°C에서 10분간 가열하여 proteinase K를 불활성화하였다. PCR 반응은 1 uL 10 pM의 forward와 reverse primer, 2 uL 2 mM dNTP, 3 uL 10X buffer, 0.5 uL taq polymerase를 혼합하여 95°C에서 5분간 반응한 후 94°C에서 1분, 56°C에서 1분, 72°C에서 1분간 반응을 40회 반복 실시하였다. 반응 후 72°C에서 최종 신장을 위하여 7분간 반응하였으며, 반응이 종결된 후 2% agarose gel에서 전기 영동을 실시하였다. 이 같은 방법으로 3개의 독립된 tPA 세포주에 대해 약 50개의 single cell들을 PCR로 분석한 결과 각각 90%, 100%, 80% transfection된 세포군으로 밝혀졌다. 그러므로 DNA transfection 후 상당수의 세포주가 완전하게 100% transfection 되지 않음이 확인되었으며 형질 전환 가축 생산시 transfection 시킨 세포들에 대한 완전한 선별 작업이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

Key words) *Tissue-type plasminogen activator, Goat, Transfection efficiency*