

리포솜을 이용한 형질전환 닭 생산에 관한 연구

박철^{1,2}, 강영란¹, 성유홍¹, 김진아¹, 손시환², 김태운³, 김상훈⁴, 변승준¹, 전익수¹
 축산연구소¹, 진주산업대학교², 가톨릭대학교³, 경희대학교⁴

Abstract

본 연구는 1세포기 닭 수정란에서 외래 표지유전자(EGFP)와 리포솜(liposome)을 사용하여 외래 유전자의 핵 전이의 효율성을 검증하고자 하였다. 실험은 리포솜과 혼합된 표지유전자와 naked 유전자 두 그룹으로 나누고, 유전자 미세 주입방법을 이용하여 배반엽 단계(stage X)와 1세포기 수정란의 세포질에 미세 주입하고 지속적으로 배양하면서 GFP의 발현 양상들을 관찰하였다.

실험결과, 배반엽 단계와 1세포기 수정란 모두에서 리포솜과 외래 유전자의 혼합물을 미세 주입한 경우 일주일 정도 지속적으로 GFP가 발현되었으나, 외래 유전자만을 주입한 경우 GFP의 발현이 관찰되지 않았다. 본 연구결과는 리포솜이 효율적으로 외래 유전자를 닭 수정란의 핵으로 이동시킴을 보여주고 있다.

Key words : liposome, microinjection, GFP(green fluorescence protein), embryo

서 론

현재까지 조류의 형질전환 방법은 유전자 운반체로서 바이러스 또는 원시생식세포(primordial germ cell)를 이용하는 방법과 외래 유전자를 1세포기 수정란에 직접 미세 주입하는 방법이 개발되어 있다. 닭 수정란은 포유류와는 달리 다량의 난황을 함유하고 있어 수정란을 다루기가 몹시 어렵고, 배자 내에 있는 핵은 현미경을 이용한 육안 관찰이 불가능한 특성으로 인해 실험동물인 생쥐와 같은 효율적인 형질전환 방법이 수립되어 있지 않다.

최근 여러 연구그룹에서(Kwon 등, 2004) 배반

엽 단계에 virus를 이용하여 형질전환 닭을 생산한 보고가 있다. 하지만 이 방법으로 제조된 형질전환 닭의 G0 형질전환체가 100 % 모자이크이므로, 완전한 형질전환 닭을 생산하기 위해서는 수천 마리 닭의 후대검정을 해야 하는 문제점이 있다.

본 실험은 모자이크가 나타날 확률이 현저히 낮으며, 외래 유전자가 성세포에 도입될 확률이 높은 1세포기 수정란 단계에서 외래 유전자를 효율적으로 핵 내로 전이시키는 방법을 liposome을 사용하여 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용한 실험동물과 수정란은 축산연구소에서 보존중인 갈색 산란 실용계(commercial layer)와 동종이 산란한 수정란을 사용했다. 1세포기 수정란의 채란 및 체외배양은 Perry와 Mather 방법을 좀더 개선한 본 실험실의 지침서(전, 2000)에 준해 배양하였다. 리포솜과 GFP 유전자는 상업적으로 사용 가능한 Invitrogen사의 제품들과 linear 형태의 pEGFP-N1 벡터를 사용하였다.

먼저 배반엽 단계 수정란에서 아래의 실험조건들을 확립 후, 1세포기 수정란에 pEGFP-N1 벡터 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 리포솜(리포펙타민 2000, Invitrogen) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 혼합한 혼합물 20~50 n ℓ 를 1세포기 수정란의 세포질에 미세 주입하여 4일간 배양한 후 배아의 생존을 및 GFP 발현정도를 조사하였다. 대조군에는 pEGFP-N1 벡터만을 미세 주입하여 GFP 발현양상을 비교 관찰하였다.

결 과

표1은 닭의 1세포기 수정란에서 리포솜과 외래

표 1. 닭 1세포기 수정란에서 배양 4일차 배자의 생존율 및 GFP 발현율

그룹	DNA ($\mu\text{g/ml}$)	리포솜 ($\mu\text{g/ml}$)	주입량 ($\text{n}\ell$)	생존율	GFP 발현율
대조군	25	0	20~50	14/29	0/29
실험 1	25	100	20~50	15/24	15/24
실험 2	25	100	20~50	16/28	26/28
실험 3	25	100	20~50	15/29	25/29
실험 4	25	100	20~50	11/30	23/30
실험 5	25	100	20~50	10/29	24/29
실험 6	25	100	20~50	16/31	29/31

유전자 혼합물을 수정란에 미세 주입한 경우 배양 4일차 배자에서 GFP 발현이 관찰되나, 외래 유전자만을 주입한 경우에는 GFP가 전혀 발현되지 않음을 보여주고 있다.

적 요

리포솜 방법은 1세포기 수정란에서 60~90 %의 효율로 외래 유전자를 핵 내로 도입할 수 있음을 보여주고 있다. 주입된 외래 유전자에 의해 만들어진 GFP가 배자에서 일주일 정도 지속적으로 발현됨을 현미경으로 관찰하였으나, 이후 생산된 후대들의 유전적 분석에서 긍정적인 결과들을 얻지 못하였다.

1세포기 수정란의 이러한 결과들은 앞서 닭의 배반엽 단계에서 리포솜을 이용하여 실험한 연구 (Rosenblum, 1995)와 유사한 결과를 나타내었다. 따라서 리포솜은 1세포기와 배반엽 단계의 수정란에서 모두 효율적으로 외래 유전자를 핵으로 이동시키거나 수정란의 genome상의 삽입에는 큰 역할이 없는 것으로 생각된다.

참고문헌

- 전익수, 1세포기 닭 수정란 체외 배양과 대리 난자 배양기술의 개선, 동물자원지 42(6):777-786, 2000
- Kwon MS, Koo BC, Choi BR, Lee HT, Kim YH, Ryu WS, Shim H, Kim JH, Kim NH, Kim T. 2004. Development of transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein, *Biochem Biophys Res Commun.* 320(2):442-8.
- Rosenblum CI, Chen HY. 1995. In ovo transfection of chicken embryos using cationic liposomes, *Transgenic Res.* 4(3):192-8.