

Retrovirus를 이용한 형질전환닭 생산 연구

박철^{1,3}, 변승준¹, 김성우¹, 박진기¹, 장원경¹, 양보석¹, 김태윤², 손시환³, 김상훈⁴, 전익수¹
¹축산연구소 응용생명공학과, ²가톨릭대학교, ³진주산업대학교 동물생명과학과, ⁴경희대학교

Abstract

본 연구는 1세포기 닭 수정란에 retrovirus vector (RSV-GFP)를 도입하여 외래유전자의 핵 전이 효율을 높이고자 하였다. 실험은 polybrene과 retrovirus 혼합물을 1세포기 또는 배반엽 단계의 수정란 세포질에 미세 주입하고 배양 3 또는 4일차에 GFP의 발현 양상들을 관찰하였다. 실험의 결과는 배반엽 수정란에서 GFP 발현을 관찰할 수 있었으나, 1세포기 수정란에서는 GFP의 발현을 관찰할 수 없었다. 연구결과는 형질전환닭 생산에 있어서 가장 효율적인 방법은 배반엽 단계에 retrovirus를 미세주입하는 방법임을 보여주고 있다.

▶ **Key words** : Retrovirus, microinjection, GFP, Chicken embryo)

서론

닭의 형질전환 방법은 유전자 운반체로서 재조합 바이러스(Harvey et al., 2002) 또는 원시생식세포(primordial germ cell)를 이용하는 방법(Petitte et al., 1990)과 외래 유전자를 1세포기 수정란에 직접 미세 주입하는 방법(Love et al., 1994)이 개발되어 있다. 지금까지 생산된 형질전환닭은 첫째와 셋째의 방법에서만 성공하였다고 보고되고 있다. 그러나 가장 일반적이고 널리 이용되는 형질전환닭 생산방법은 배반엽 단계 수정란에 재조합 virus를 주입하여 모자이크 형태의 G₀ 형질전환체를 생산하는 방법이다(McGrew et al., 2004; Koo et al., 2004; Chapman et al., 2005). 그러나 이 방법으로 생산된 G₀ 형질전환닭은 대부분이 모자이크이므로, 완전한 형질전환체를 생산하기 위하

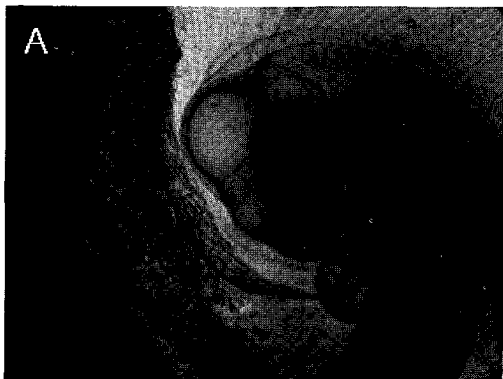


그림1A. 배양 3일차 수정란에서 GFP 발현양상. (A): 배반엽단계 수정란



그림1B. 배양 3일차 수정란에서 GFP 발현양상. (B): 1세포기 수정란.

여 수천 마리 후대 닭을 생산하고 분석을 수행하여야 하는 번거로움이 있다.

본 연구는 이론적으로 모자이크가 나타날 확률이 낮으며, 주입한 외래유전자가 성세포에 도입될 확률이 높은 1 세포기 수정란에 retrovirus system을 도입하여 외래유전자 도입 효율을 검토하고자 하였다. 더불어 배반엽 단계 수정란과 1세포기 단계 수정란에서 외래 유전자의 핵전이 효율성을 서로 비교해 보고자 하였다.

재료 및 방법

본 실험의 공시동물로는 본 연구소에서 보존중인 갈색 산란 실용계(commercial layer)와 동종이 산란한 수정란을 사용하였다. 1 세포기 수정란의 채란 및 체외 배양은 Perry와 Mather방법을 좀더 개선한 본 실험실의 지침서(전, 2000)에 준해 배양하였다. Retroviral vector(RSV-GFP)는 대구가톨릭대 김태완 교수님으로부터 제공받아 사용하였고, polybrene은 상업적으로 가용한 Sigma사의 제품을 사용하였다. 바이러스의 미세 주입 조건은 연구실에서 확립된 방법으로 수행하였다. GFP 발현율은 배양 3 또는 4일차에 배아들에서 조사하였다.

결 과

배반엽 단계의 수정란은 주입한 RSV/GFP retrovirus가 배양 3일차 배아에서 GFP 발현이 관찰되었으나(그림 1A), 1세포기 수정란은 배양 4일차 배아에서 GFP가 전혀 발현되지 않음을 나타내었다(그림 1B).

적 요

현재 가장 활발하게 진행되고 있는 형질전환닭 생산 연구방법은 배반엽 단계 수정란에 농축한 virus를 주입하여 모자이크 형태의 G₀ 형질전환체를 생산하고 이들을 이용하여 G₁ 형질전환 후대를 생산하는 방법이 가장 보편적으로 이용되고 있다. 상기의 연구방법은 완전한 형질전환체를 획득하기 위해서는 수천수의 G₁을 생산하고 각각을 유전분석을 수행하여 하는 문제점을 가지고 있다.

이러한 문제점을 개선하고자 다음의 연구를 계획하고 수행하였다. 20 nℓ의 농축된 GFP retrovirus를 1세포기 수정란에 주입하고, 주입한 유전자의 발현율과 수정란의

생존율을 배양4일차 수정란에서 GFP의 발현과 배아의 생존 여부로 판정하였다. 연구결과는 1세포기 수정란은 배반엽 단계 수정란과 달리 주입한 virus의 유전자를 발현하지 않는 것으로 관찰되었다.

연구결과는 현재까지 형질전환닭 생산에 있어서 가장 효율적인 방법은 배반엽 단계 수정란에 virus를 주입하는 것을 보여주고 있다.

참고 문헌

1. 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.
2. 전익수, 2000, 1세포기 닭 수정란 체외배양과 대리난 각 배양기술의 개선, *동물자원지* 42(6):777-786.