

닭 수정란에서 Retrovirus를 이용한 형질전환 닭 생산 연구

변승준¹ · 박철^{1,3} · 김성우¹ · 박진기¹ · 장원경¹ · 양보석¹ · 김태윤² · 손시환³ · 김상훈⁴ · 전익수^{1,†}

¹축산연구소 응용생명공학과, ²가톨릭대학교 의과대학, ³진주산업대학교 동물생명과학과, ⁴경희대학교 생물학과

A Study of the Retrovirus-Mediated Transgenic Chicken Production on Chicken Embryos

S. J. Byun¹, C. Park^{1,3}, S. W. Kim¹, J. K. Park¹, W. K. Chang¹, B. S. Yang¹,
T. Y. Kim², S. H. Sohn³, S. H. Kim⁴ and I. S. Jeon^{1,†}

¹National Livestock Research Institute, Division of Animal Biotechnology, 564 Omokchun-Dong, Suwon, 441-350 Korea

²The Catholic University of Korea, Seoul Korea, ³Department of Animal Biotechnology, Jinju National University, Jinju Korea

⁴Department of Biology, Kyung Hee University, Hoegi-dong, Dongdaemoon-gu, Seoul 130-701, Korea

ABSTRACT Microinjection of recombinant retrovirus beneath the blastoderm of non-incubated chicken embryo is now the most widespread method for generating transgenic chickens, but transgenesis rates are very low. So to improve this problem, we first introduced retrovirus vector carrying RSV-GFP gene to an one-cell embryo culture system. To investigate whether retrovirus could work on an one-cell chicken embryo, we microinjected the concentrated retrovirus stocks into the germinal disc of one cell or stage-X chicken embryos. Analysis of reporter gene expression on day 4 embryos showed that GFP expression was observed in the only stage-X chicken embryo but was not in the one-cell embryo group. These results suggest that retrovirus system is the most efficient method to generate transgenic chickens in the stage-X embryo.

(Key words : retrovirus, microinjection, GFP, chicken embryo)

서 론

닭은 일반 다른 고등동물들과 달리 수정란이 체외발생을 함으로써 수정란의 발생과정을 쉽게 현미경으로 관찰이 가능하였기에 척추동물 발생 연구의 자료로서의 매우 중요한 가치를 가지고 있었다. 그러나 최근 의료기술의 발달은 인간 수명의 연장을 가져왔으며, 의료 및 산업용 인체 유용물질의 수요가 증가되고 더불어 유용물질 생산의 중요성이 매우 높아지게 되었다. 이러한 주위환경의 변화는 계란을 이용한 유용물질 생산의 훌륭한 bioreactor 모델 동물로서 닭의 가치를 높이는 기회가 되었다.

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 1 세포기 수정란에 직접 미세 주입하는 방법(Love et al., 1994)이 개발되어 있다. 지금까지 생산된 형질전환 닭은 첫째와

셋째의 방법에서만 성공하였다고 보고되고 있다. 그리고 가장 일반적인 형질전환 닭 생산방법은 배반엽 단계 수정란에 재조합 virus를 주입하여 모자이크 형태의 G₀ 형질 전환체를 생산하는 방법이 가장 널리 이용되어지고 있다(McGrew et al., 2004; Koo et al., 2004; Chapman et al., 2005). 그러나 이 방법으로 생산된 G₀ 형질 전환 닭은 대부분이 모자이크이므로, 완전한 형질 전환체를 생산하기 위하여 수천 마리 후대 닭을 생산하고 분석을 수행하여야 하는 번거로움이 있다.

본 연구는 이론적으로 모자이크가 나타날 확률이 낮으며, 주입한 외래유전자가 성세포에 도입될 확률이 상대적으로 높은 1 세포기 수정란에 retrovirus를 미세주입하는 새로운 방법과 기존에 확립된 형질전환 닭 생산 방법인 배반엽 단계 수정란에 retrovirus를 이용하는 방법간의 외래유전자 도입 효율성을 서로 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

[†] To whom correspondence should be addressed : jeonis@rda.go.kr

1. 공시동물

본 실험에 사용한 실험계와 수정란은 축산연구소에서 보유 중인 갈색 산란계와 동종이 산란한 수정란들을 사용하였다. 공시동물의 사육실은 외부 공기를 Pre-filter와 Medium filter로 2중 여과를 시켜서 사육실 내부로 공급하여 청정도(진집효율 99% 이상)를 유지하였다. 실내온도는 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지시켰으며, 16시간 고정점등하였다. 물과 사료는 무제한 급여하면서 독립 케이지에서 사육하였다.

2. 1세포기 닭 수정란의 채란

1세포기 수정란을 제공하는 공여계(donor hen)의 선발은, 클리칭당 5개 이상의 계란을 산란하는 개체 135수를 선발하고, 채란 이틀 전 동일계통의 수탉 정액을 이용하여 인공수정하였다. 채란 당일 산란 후 2시간 15분 후에 공여계를 도살하고, 복부로부터 1세포기 수정란이 들어 있는 난관 팽대부에서 협부까지의 난관을 외과적 수술 방법으로 들어낸 다음, 협부와 수정란까지의 길이를 측정한 뒤 난관을 벗겨내고 1세포기 수정란을 채란하였다.

3. 1 세포기 수정란의 체외배양

1세포기 수정란의 체외배양은 Perry and Mather(1991)의 방법을 약간 수정한 본 연구실의 지침서(전, 2000)에 준하여 수행하였다. 1세포기 수정란의 체외배양을 위한 배양 용기로는 공여계가 도살되기 전에 산란한 알의 무게와 동일한 신선란을 선별하여 예단부를 직경 3.5 cm로 자른 대리난각을 사용하였다. 1차 배양에 사용한 배양액은 신선란에서 수양성 단백을 채취한 후, CO_2 가스로 버퍼링(buffering)하고 pH 7.30~7.35로 조정하여 사용하였다. 이와 같이 준비된 배양액 5 mL를 대리난각에 채운 후, 채란된 1세포기 수정란을 이식하였다. 이식 후 1회용 배양접시로 대리난각의 입구를 덮고 41.5°C , 5% CO_2 , 습도 포화 상태의 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 2차 배양을 위한 배양액은 배양 1일 전에 신선란에서 수양성 단백을 채취한 후, 버퍼링하지 않고 37.6°C 까지 가온시켜 사용하였다. 1차 배양이 끝난 후 준비된 배양액을 이용하여 대리난각을 완전히 채운 후, 랩으로 밀봉하여 온도 37.6°C , 습도 65~70%의 배양기에서 11분마다 90° 씩 전란 시키면서 3일간 2차 배양하였다.

4. 배반엽단계(Stage-X) 수정란의 체외배양

배반엽단계 수정란은 인공 수정된 공여계가 체외로 배출한 수정란들을 이용하였다. 배반엽단계 수정란의 배양과정은 수정란이 닭의 체 내에 머무르는 동안 이미 수정란의 배

아 발달이 진행되었으므로 1차 배양의 과정 없이 바로 3일간 2차 배양을 진행하였다. 나머지 조건들은 1세포기 수정란의 배양 과정과 동일하게 진행하였다.

5. Retrovirus 생산

Retroviral vector(pRSV-GFP)와 virus producing cell(293m GPY)은 대구가톨릭대 김태완 교수님으로부터 제공받아 사용하였다. 세포배양, virus 생산, 그리고 virus의 농축은 Kwon et al.(2004)이 제시한 방법들에 준하여 수행하였다. 생산된 virus의 titer는 아래의 순서로 검증하였다. 먼저 virus의 감염 전달에 1×10^5 NIH/3T3 세포를 6-well plate에 심고, 다음날 배양배지에 10배씩 순차적으로 희석한 viurs를 세포에 감염시켰고, 더불어 virus 감염의 과정에 polybrene(Sigma, St. Louis, MO, USA)의 농도가 $10\ \mu\text{g/mL}$ 되게 첨가하였다. 그리고 배양 3일차에 $800\ \mu\text{g/mL}$ 농도의 G-418 항생제(Sigma)를 포함하는 G-418 선별배지로 교환하고, 배지는 3일에 한번 교환하였고, 대조구 세포군이 완전히 죽을 때까지 2주 동안 지속적으로 수행하였다.

6. 배반엽단계 수정란에 Retrovirus 도입

먼저 virus의 감염을 도와주는 물질인 polybrene이 닭의 수정란 발생에 영향이 없는 농도 범위를 확립하고자, 배반엽단계 수정란에 각각 0, 10, 100, 그리고 $300\ \mu\text{g/mL}$ 농도의 polybrene/DMEM(Gibco, Grand Island, NY, USA) 혼합액 1,000 nL를 수정란의 세포질에 주입하고, 배양 3일차에 polybrene의 농도에 따른 수정란의 생존율을 발생과 발생 중지란들을 대상으로 조사하였다. 다음으로 수정란의 생존율에 영향이 없는 polybrene의 농도 범위에서 virus의 감염이 최적인 농도를 확인하고자, virus와 각각 0, 10, 그리고 $100\ \mu\text{g/mL}$ 농도의 polybrene이 혼합된 1,000 nL의 virus를 세포질에 주입하고, 배양 3일차의 수정란에서 주입한 GFP virus의 발현양상을 관찰하여 최적의 polybrene의 농도를 결정하였다.

7. 1세포기 수정란에 Retrovirus 도입

$10\ \mu\text{g/mL}$ 의 농도의 polybrene과 1×10^8 cfu(colony forming unit) retrovirus를 혼합한 20 nL의 혼합물을 1세포기 수정란의 세포질에 미세 주입하였다. 배자의 생존율과 발현율은 배양 4일차 배자에서 전언한 방법과 동일한 방법으로 조사하였다.

8. 통계분석

모든 얻어진 실험 결과들의 통계분석은 Statistical Analysis

System(SAS, 1996)을 이용하여 5% 유의수준에서 T-test 및 duncan의 다중검증을 실시하여 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. Virus의 생산과 Titration

Retrovirus의 생산은 293mGPHY 세포에 calcium phosphate (Sigma) 방법으로 두 종류의 pVSV-G와 pRSV-GFP plasmid들을 transfection 하고, 배양 72시간 후에 배지를 수거하는 방법으로 virus를 생산하였고, 초고속원심분리기를 사용하여 생산된 virus를 농축하였다. 농축한 retrovirus의 titer는 검증은 생쥐의 NIH/3T3 세포에 세포 배양액을 이용하여 10배씩 순차적으로 희석한 virus를 감염시키고, 배양 접시상에서 crystal violet(Sigma) 시약으로 염색하여 G-418 항생제에 저항성을 가지는 세포 군집의 수를 세는 방법으로 수행하였다. Fig. 1은 $10^2 \sim 10^6$ 으로 희석한 virus를 감염시킨 경우와 그렇지 않은 NIH/3T3 세포를 crystal violet으로 염색한 결과이다. 연구 결과는 virus를 감염시키지 않은 대조구를 제외한 세포들에서 항생제에 저항성을 가지는 세포 군집들이 형성됨을 보여주고 있다. 더불어 virus가 $10^2 \sim 10^5$ 이 희석된 경우는 군집의 수가 너무 많아 정확한 군집수의 파악이 불가하였으나, 10^6 이 희석된 virus를 감염한 세포군에서 대략 100여개의 군

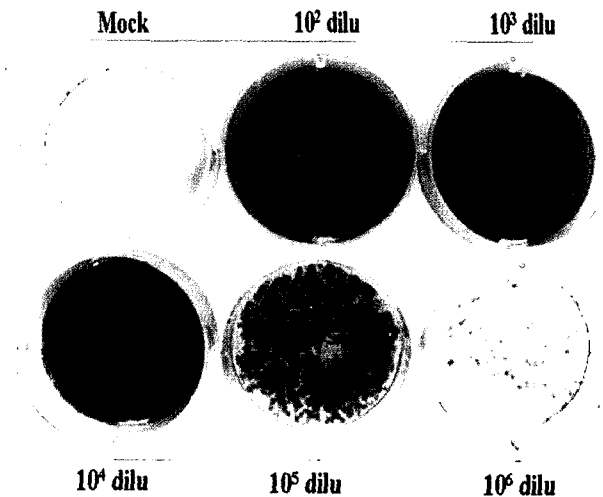


Fig. 1. Photograph of crystal violet stained NIH/3T3 cells transduced with the serially diluted retroviruses expressing the neomycin resistance gene. Following virus infection, cells were cultured with complete media for 24 hr and then changed with the selective media containing 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of G-418 for 14 days prior to staining.

집을 형성함을 보여주고 있다. 따라서 연구에 이용된 virus의 titer는 대략적으로 1×10^8 cfu가 됨을 확인하였다.

2. 배반엽 단계 수정란에 Retrovirus 도입

1세포기 닭의 수정란에 retrovirus 미세주입 적용에 앞서, 최적의 실험 조건들을 확립하고자 1세포기 수정란에 비해 비교적 배양이 쉬운 배반엽 단계의 수정란에서 polybrene 농도에 따른 수정란의 생존율 및 외래 주입유전자의 발현율을 조사하였다.

먼저 DMEM 배지에 polybrene의 농도를 0, 10, 100, 그리고 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 달리하여 수정란의 세포질에 1,000 nL의 polybrene 혼합액을 주입하였다. 배양 3일차 수정란의 생존율은 polybrene의 농도가 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 인 경우를 제외하고 비슷한 결과를 나타내었으나, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 실험군은 생존율이 극명하게 저하되는 결과를 나타내었다(Table 1). Table 1의 연구 결과는 polybrene의 농도가 0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 사이에서 배아의 생존 및 발생과정에 큰 영향이 없음을 보여주었으며, 기존의 연구 결과들에서 발표하였던 polybrene의 농도 범위들과 일치하였다(Kwon et al., 2004; Mozdziaik et al., 2003).

다음으로 virus의 감염률에 영향을 미치는 최적의 polybrene의 농도를 찾고자, 수정란의 발생에 영향이 없는 범위인 0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 사이에서 아래의 연구들을 진행하였다. 실험은 polybrene의 농도를 각각 0, 10, 그리고 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 함유한 1,000 nL의 농축한 virus들을 배반엽 단계 수정란의 세포질에 주입하고, 배양 3일차 수정란에서 GFP 유전자의 발현양상으로 판별하였다(Fig. 2A). Table 2의 결과는 polybrene의 농도가 0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 범위에서 배아의 GFP 발현

Table 1. Effect of polybrene concentration on survival rate of stage-X embryo

	Polybrene ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	(nL)	Embryo survival rate ¹
Control	0	1,000	0.94 \pm 0.10 ^a
Exp 1	10	1,000	1.00 \pm 0.00 ^a
Exp 2	100	1,000	0.83 \pm 0.29 ^a
Exp 3	300	1,000	0.41 \pm 0.16 ^b

¹ Values are means \pm SD from three independent experiments consisting of 10 embryos each.

^{a,b} Values with different superscripts within columns differ significantly ($p < 0.05$).

Table 2. Effect of polybrene concentration on transduction of stage-X embryo

	Titers of virus (cfu/mL)	Polybrene(μ g/mL)	(nL)	Embryo survival rate ¹	GFP expression rate ¹
Exp 1	1×10^8	0	1,000	0.93 ± 0.06	0.80 ± 0.17
Exp 2	1×10^8	10	1,000	0.93 ± 0.12	0.86 ± 0.12
Exp 3	1×10^8	100	1,000	0.97 ± 0.06	0.77 ± 0.25

¹ Values are means \pm SD from three independent experiments consisting of 10 embryos each.

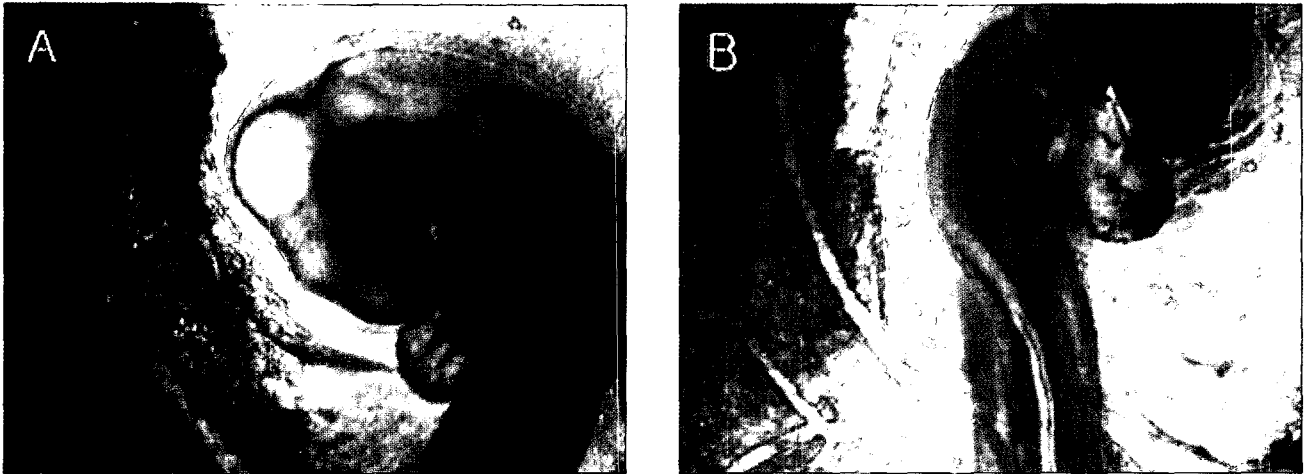


Fig. 2. GFP expression pattern on chicken embryos. (A) 1,000 nL of mixtures of viurs and polybrene (10 μ g/mL) were microinjected into the germinal disc of blastoderm stage embryo. The embryos were sacrificed at 3 day post-microinjection and examined under a fluorescence inverted microscope. GFP expression is mainly shown in the chorioallantoic membranes. (B) 20 nL of mixtures of virus and polybrene (10 μ g/mL) were microinjected into the germinal disc of one cell embryo. The embryos were sacrificed at 4 day post-microinjection and examined under a fluorescence inverted microscope. The embryo did not exhibit GFP expression.

양상에 유의적인 차이를 나타내지 않음을 보여주고 있다. 최종적인 polybrene의 농도는 Table 2의 연구 결과와 배반엽 단계 수정란에서 10 μ g/mL의 polybrene 농도를 사용하였던 연구 결과들(Kwon et al., 2004; Chapman et al., 2005)의 상황들을 고려하여 이후 진행한 실험들에서 polybrene의 농도를 10 μ g/mL으로 고정하였다.

3. 1 세포기 수정란에 Retrovirus 도입

Retrovirus의 미세주입이 1세포기 수정란의 생존율에 미치는 영향을 확인하고자 다음의 연구를 진행하였다. 1세포기 수정란에 20 nL의 농축된 virus 혹은 대조군으로 기존의 방법으로 사용하였던 naked 유전자 미세주입하고 배양 4일차 수정란에서 배아의 생존율을 조사하여 그 결과를 Table 3에 나타내었다. Table 3 연구 결과는 배양 4일차에서 수정란의 생존율은 기존의 naked DNA 미세주입방법에 비해 다소 낮은 것으로 나타났으나, 상호간 유의성은 없는 것으로 나타났다.

1세포기 수정란에 retrovirus 미세주입은 배반엽 단계에서 확립된 polybrene의 농도 조건으로 수행하였다. 연구 결과는 배양 4일차 수정란에서 주입한 외래유전자인 GFP의 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 2B). 연구 결과에 보여주지 않았으나, retrovirus의 특성중의 하나인 세포분열을 하는 세포에만 감염하는 특성을 고려하여 1세포기 수정란을 *in vitro*에서 2~3 시간동안 배양하여 수정란의 세포수가 256세포가 되는 시점에 virus를 미세 주입하였으나 긍정적인 연구 결과를 얻지 못하였다. 또한 감염되는 세포수와 주입한 virus의 수의 관계를 나타내는 MOI(multiplicity of infection)값 역시 계산상으로 최소 100 이상인 관계로 virus titer가 낮아서 발생한 문제가 아니라고 판단된다. 가장 가능성이 있는 원인은 1세포기 수정란은 배반엽단계의 수정란 달리 germinal disc에 하나의 세포만이 존재하는 것에 비해서, 배반엽단계 수정란은 동일한 공간에 약 60,000개의 세포로 구성되어 있는 차이점이 있다. 그러므로 배반엽단계 수정란은 주입한 virus가 직접적으로

Table 3. Comparison of survival ratio of the naked DNA or retroviral injection on the one-cell stage embryo

	DNA ($\mu\text{g/mL}$)	Titers of virus (cfu/mL)	(nL)	Embryo survival rate ¹
Naked DNA	25		20	0.47 \pm 14.0
Retrovirus		1 \times 10 ⁸	20	0.46 \pm 18.5

¹ Values are means \pm SD from four independent experiments consisting of 10 embryos each.

세포들과 접촉하지만 1세포기 수정란은 그렇지 못할 가능성이 매우 높은 것으로 추정된다. 그러므로 1세포기 수정란에서 주입한 virus의 GFP 유전자가 발현되지 못하는 것은 virus와 수정란이 접촉하지 못하거나, 혹은 현재까지 규명되지 못하고 있는 다른 인자들에 기인한 것으로 사료되어진다.

결론적으로 본 연구 결과는 가장 효율적인 형질전환 닭 생산 방법은 배반엽 단계에 retrovirus를 주입하는 방법임을 다시 한번 보여주고 있다.

적 요

현재 가장 활발하게 진행되고 있는 형질전환 닭 생산 연구방법은 배반엽단계 수정란에 농축한 virus를 주입하여 모자이크 형태의 G₀ 형질 전환체를 생산하고 이들을 이용하여 G₁ 형질전환 후대를 생산하는 방법이 가장 보편적으로 이용되고 있다. 상기의 연구방법은 완전한 형질 전환체를 획득하기 위해서는 수천수의 G₁를 생산하고 각각 유전분석을 수행하는 문제점을 가지고 있다.

이러한 문제점을 개선하고자 다음의 연구를 계획하고 수행하였다. 20 nL의 농축된 GFP retrovirus를 1세포기 수정란에 주입하고, 주입한 유전자의 발현율과 수정란의 생존율을 배양 4일차 수정란에서 GFP의 발현과 배자의 생존 여부로 판정하였다. 연구결과는 배양 4일차 수정란의 생존율은 기존의 naked DNA 미세주입방법에 비해 다소 낮은 것으로 나타났으나 유의성은 없었다. 1세포기 수정란은 배반엽 단계 수정란과 달리 주입한 virus의 유전자를 발현하지 않는 것으로 관찰되었다.

연구결과는 배반엽단계 수정란에 virus 미세주입 방법이 형질전환 닭 생산에 가장 효율적인 방법임을 보여주고 있다.

(색인어: 레트로바이러스, 미세주입, 녹색형광단백질, 수정란)

사 사

이 논문은 농촌진흥청 Biogreen 21 사업비 지원에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

- Chapman SC, Lawson A, MacArthur WC, Wiese RJ, Loechel RH, Trinidad MB, Wakefield JK, Ramabhadran R, Mauch TJ, Schoenwolf GC 2005 Ubiquitous GFP expression in transgenic chickens using a lentiviral vector. *Development* 132:935-940.
- Harvey AJ, Speksnijder G, Baugh LR, Morris JA, Ivarie R 2002 Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens. *Nat biotechnol* 19:396-399.
- Koo BC, Kwon MS, Choi BR, Lee HT, Choi HJ, Kim JH, Kim NH, Jeon IS, Chang WK, Kim T 2004 Retrovirus-mediated gene transfer and expression of EGFP in chicken. *Mol Reprod Dev* 68:429-434.
- 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* 320:442-8.
- Love J, Gribbin C, Mather C, Sang H 1994 Transgenic birds by DNA microinjection. *Biotechnology* 12:60-63.
- McGrew MJ, Sherman A, Ellard FM, Lillico SG, Gilhooley HJ, Kingsman AJ, Mitrophanous KA, Sang H 2004 Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep* 5(7):728-33.
- Perry MM, Mather CM 1991 In *Avian incubation*, Butterworth-Heinemann Ltd. London UK, p 91.
- Petitte JN, Clark ME, Liu G, Verrinder Gibbins AM, Etches RJ 1990 Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *Development* 108(1):185-9.
- Statistical Analysis System 1996 SAS user's guide. Statistical Analysis System Institute Cary NC USA.
- 전익수 2000 1세포기 닭 수정란 체외배양과 대리난각 배양 기술의 개선. *J Anim Sci & Technol* 42(6):777-786.