

사람의 SOD-3 단백질을 발현하는 형질전환 닭 생산 연구

변승준¹ · 박철¹ · 김진아¹ · 우제석¹ · 이휘철¹ · 김태운² · 김상훈³ · 성환후¹ · 박진기¹ · 전익수^{1,†}
¹축산과학원 응용생명공학과, ²가톨릭대학교 의과대학, ³경희대학교 생물학과

A Study of the Generation of Transgenic Chickens That Express Human SOD-3 Protein

S. J. Byun¹, C. Park¹, J. A. Kim¹, J. S. Woo, H. C. Lee, T. Y. Kim², S. H. Kim³,
H. H. Seong¹, J. K. Park¹ and I. S. Jeon^{1,†}

¹Division of Animal Biotechnology, National Institute of Animal Science

²College of Medicine, The Catholic University of Korea

³Department of Biology, Kyung-Hee University

ABSTRACT Lentiviral vector system is efficient vehicles for the delivery of exogenous genes, and it is generally used in the generation of transgenic chickens. In this study, we used recombinant lentiviral vectors to generate transgenic chicks that express the human superoxide dismutase-3 gene driven by the chicken ovalbumin promoter. It is well known that superoxide dismutases (SODs) are believed to play a crucial role in protecting cells against oxygen toxicity. There are three forms of SOD proteins: cytosolic Cu-Zn SOD, mitochondrial Mn SOD, and extracellular SOD (SOD-3). The recombinant lentivirus containing the human SOD-3 gene was injected into the subgerminal cavity of freshly laid eggs. Subsequently, the embryos were incubated to hatch using phases II and III of the surrogate shell *ex vivo* culture system. From 341 injected embryos, the 78 chicks hatched after 21 days incubation. The hatched chicks were screened for the human SOD-3 gene by using PCR. Two of 47 male chickens that survived to sexual maturity contained the human SOD-3 gene in their semen. These results showed that our transgenic chicken generation system was completely established.

(Key words : Lentivirus, microinjection, human SOD-3, chicken embryo)

서 론

현대 의료 기술의 발달은 의료와 관련된 인체 유용물질의 수요 증가와 더불어 인체 유용물질 생산의 필요성이 크게 높아지고 있다. 이러한 상황에서 계란 생산이라는 특성을 가지는 닭은 인체 유용물질을 생산하는 생체반응기(bioreactor) 모델로서 매우 매력적인 가능성을 가지고 있는 동물이라고 생각된다. 현재 이러한 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 가시적인 연구 성과들이 보고되고 있다(Lillico et al., 2007; Kwon et al., 2008).

에너지 생산은 생명체의 생존에 있어서 꼭 필요한 과정이다. 사람의 경우, 산소는 에너지 생산의 호흡 과정에서 꼭 필요한 물질이지만, 또한, 활성산소 생성의 주된 요인이기도 하다. 산소를 사용하여 호흡하는 생명체들은 부수적으로 생성되는 활성산소를 안정한 형태의 물질로 바꾸는 방어 기전에 꼭 필요한 효소들을 가지고 있다. 사람의 경우 SOD

(superoxide dismutases) 단백질들이 이러한 기능을 가지는 것으로 잘 알려져 있다. 사람의 경우, SOD 단백질은 세 가지 종류가 존재하는 것으로 알려져 있다(Choung et al., 2004).

본 연구는 이들 가운데 세포 밖으로 분비되어 세포 밖에서 생성되는 활성산소 제거 기능이 있는 것으로 알려진 사람의 SOD-3 단백질의 유전자를 배반엽 단계 수정란에 재조합 렌티바이러스(lentivirus)를 유전자 전달 운반체로 사용하여 계란의 난백에 사람의 SOD-3 단백질을 분비하는 형질 전환 닭을 생산하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물

연구에 사용한 실험동물과 수정란은 축산과학원에서 보유중인 갈색산란계(하이라인)와 동종이 산란한 수정란들을

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

사용하였다. 공시동물의 사육실은 16시간 고정 점등하였고, 물과 사료는 무제한 공급하면서 독립 케이지에서 사육하였다.

배반엽 단계(Stage-X) 수정란을 제공하는 공여계는 일주일에 5개 이상의 계란을 낳는 암탉 100수를 선발하였고, 이들을 동종의 수탉 정액을 이용하여 매주 2회씩 정기적으로 인공수정하였다.

2. 배반엽 단계 수정란 인공배양

배반엽 단계 수정란은 인공수정된 공여계가 체외로 배출한 수정란을 말하며, 배반엽 단계 수정란의 배양 과정은 Perry and Mather(1991)의 방법을 약간 수정한 본 연구실의 지침서(전, 2000)에 준하여 수행하였다. 수정란의 인공배양에 필요한 대리난각과 배양액의 준비는 아래와 같다. 2차 배양에 필요한 대리난각은 시험란의 무게보다 3~4 g 무거운 신선란을 선별하여 예단부를 직경 3.5 cm로 자른 계란 껍질을 사용하였다. 2차 배양을 위한 배양액은 배양 1일 전에 신선란에서 수양성 난백을 채취한 후, 버퍼링하지 않고 37.6 °C까지 가온시켜 사용하였다. 2차 배양은 시험란을 파각하여 수정란을 대리난각 속으로 옮기고, 현미경하에서 유전자를 주입 후, 대리난각을 준비된 배양액으로 완전히 채운 후, 랩으로 밀봉하여 온도 37.6 °C, 습도 65~70%의 배양기에서 11분마다 90°씩 전란시키면서 3일간 2차 배양하였다. 3차 배양은 2차 배양이 끝난 후, 시험란의 무게보다 약 25 g 무거운 신선란을 선별하여 둔단부를 직경 4 cm로 잘라서 3차 배양용 대리난각을 준비하였고, 3차 배양용 대리난각으로 2차 배양이 완료된 수정란과 배양액 내용물을 모두 옮긴 후, 랩으로 밀봉하고, 온도 37.6 °C, 습도 65~70%의 배양기에서 30분마다 30°씩 전란하면서 15일간 배양하였다. 부화까지는 전란의 과정 없이 3차 배양을 계속하였다.

3. 바이러스 생산

사람의 SOD-3 유전자와 닭의 2.8 kb 크기의 계란 특이적인 ovalbumin 유전자의 발현을 조절하는 프로모터 영역이 결합된 OVP2800/hnSOD-3 lentiviral vector를 multigateway system(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 구축하였고, 최종적으로 염기 서열 분석 방법으로 구축한 vector를 재검증하였다. 구축한 lentiviral vector는 바이러스 packaging 세포인 293FT를 사용하여 제조사의 실험방법에 따라 재조합 렌티바이러스를 생산하였다. 생산된 재조합 바이러스 titer는 HeLa 세포와 항생제인 blasticidin(Invitrogen)을 사용하여 아래의 순서로 검증하였다. 먼저 바이러스 감염 전날에 1×10^5 HeLa 세포를 6-well plate(Promega, Madison, WI, USA)에 심고, 다

음날 배양 배지에 10배씩 순차적으로 희석한 바이러스를 세포에 감염시키고, 더불어 바이러스 감염의 과정에 polybrene(Sigma, St. Louis, MO, USA)의 농도가 10 µg/mL되게 첨가하였다. 그리고 배양 3일차에 10 µg/mL 농도의 blasticidin 항생제를 포함하는 선별 배지로 교환하고, 배지는 3일에 한번 교환하였고, 대조구 세포군이 완전히 죽을 때까지 계속적으로 배지를 교환하였다.

4. 바이러스 미세주입

재조합 렌티바이러스의 미세 주입은 Love 등(1994)이 제시한 방법을 약간 수정하여 수행하였다. 사용한 렌티바이러스는 사람의 SOD-3 유전자와 닭의 계란 특이적인 프로모터를 가지는 재조합 바이러스를 사용하였다. 그리고 미세 주입에 사용한 피펫은 puller와 grinder를 사용하여 피펫 끝의 외경(40×80 µm)과 피펫 말단의 각도(30°)가 되도록 가공하여 사용하였다. 먼저 바이러스의 감염을 도와주는 물질인 polybrene을 10 µg/mL의 농도로 재조합 바이러스를 혼합하고, 1~5 µL 가량의 바이러스 혼합물을 배반엽 단계 수정란의 세포질에 미세 주입하고, 앞서 언급한 배반엽 단계 수정란 인공배양법을 이용하여 후보 병아리를 생산하였다.

5. 형질전환 후보 병아리(G0)생산과 PCR 유전 분석

부화한 형질 전환 후보 병아리들(G0)은 연구실에 확립되어 있는 백신 프로그램에 맞추어 백신을 하였고, 생산된 모든 개체들은 식별을 위하여 부화와 동시에 익대를 부착하였다. 배반엽 단계 수정란을 이용한 형질 전환 닭 생산 방법은 생산된 형질 전환 닭(G0)이 100% 모자이크 형태로 생산되는 특징을 가진다. 그러므로 완전한 형태의 형질 전환 닭의 생산은 모자이크 형태의 형질 전환 닭(G0)과 정상의 닭들과 교배하여 생산된 닭들(G1) 가운데 목적 유전자를 가지는 닭을 완전한 형태의 형질 전환 닭이라고 명명할 수 있다. 완전한 형태의 형질 전환 닭(G1) 생산은 생산된 후보 형질 전환 닭들(G0) 가운데 정액에 목적 유전자를 가지는 개체의 선발이 필수적이다. 그러므로 생산된 수컷들에서 정액을 채취, Genomic DNA purification kit(Promega)를 사용하여 genomic DNA 분리하여, OVP-F(5-ggt caa act tct gaa ggg aac ctg tg-3)와 hnSOD3-B(5-agc agg cag gaa cac agt agc g-3) primer들과 Accu-Prime SuperMix II(Invitrogen)를 사용하여 94 °C-2분, 94 °C-45초, 62 °C- 30초, 68 °C-20초의 조건으로 PCR를 수행하여 정액에 목적 유전자를 가지는 개체를 선별하였다. PCR 반응으로 증폭된 DNA 단편은 pTOPO(Invitrogen)에 클로닝하여 증폭된 DNA 단편의 염기 서열을 분석하였다.

결과 및 고찰

1. OVP2800/hnSOD-3 재조합 바이러스 생산

구축한 재조합 OVP2800/hnSOD-3 lentiviral vector의 모식도와 PCR 유전 분석 방법은 Fig. 1과 같다. 특히 PCR 검증 방법은 주입한 재조합 바이러스의 사람 SOD-3 유전자와 닭의 ovalbumin 프로모터가 결합된 부분이 선택적으로 증폭될 수 있도록 디자인하였다. 재조합 바이러스의 생산은 바이러스 packaging 세포인 293FT를 사용하였고, 생산된 재조합 렌티바이러스의 titer 검증은 세포에 바이러스 감염과 항생제에 저항성을 가지는 세포군집의 수를 세는 방법으로 검증하였다. 그림 2는 생산된 OVP2800/hnSOD-3 재조합 렌티바이러스가 대략적으로 10⁶ cfu/mL 정도의 바이러스 titer가 됨을 보여주고 있다.

2. 바이러스 미세주입과 후보 병아리(G0) 생산

후보 병아리 생산은 배반엽 단계 수정란에 사람의 SOD-3 유전자와 계란 특이적인 프로모터를 가지는 재조합 렌티바이러스를 미세주입하고 대리난각을 이용한 인공배양을 실시하여 Table 1의 연구 결과를 얻었다. 배반엽 단계 수정란에 바이러스 미세주입의 과정 없이 단지 대리난각 인공배양을 수행한 대조군은 50%의 부화율을 보였다. 대조군의 50% 부화율 연구 결과는 배반엽 단계 수정란과 대리난각 방법을 이용한 병아리 인공배양 연구 결과(Borwornpinyo et al., 2005)와 비슷하게 나타내었다. 이는 배반엽 단계 수정란을 이용한

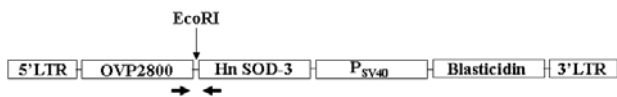


Fig. 1. Diagram of the PCR amplification and EcoRI restriction enzyme site of the OVP2800/hnSOD-3 construct. LTR, long terminal repeat; Blastidicin, blastidicin resistance gene; P_{SV40}, SV40 promoter; OVP2800, 2.8kb chicken ovalbumin promoter; Hn SOD-3, human SOD-3 gene. Arrows indicate the primer set for the detection of the foreign gene.

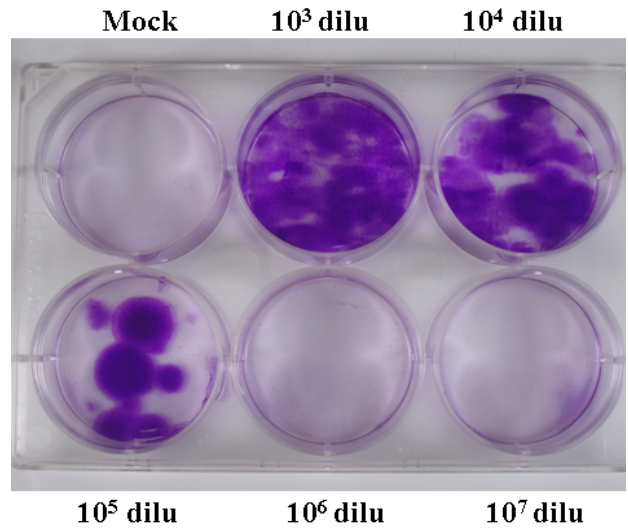


Fig. 2. Photograph of crystal violet stained HeLa cells transduced with the serial diluted lentivirus expressing the blasticidin resistance gene. Following virus infection, cells were cultured with complete media for 24 hrs and then changed with the selective media containing 10 μg/mL of the blasticidin for 14 days prior to staining.

인공배양 체계가 확립되었음을 보여주는 간접적인 연구 결과이다. 이에 반하여 재조합 렌티바이러스를 미세주입한 실험군은 대조군에 비하여 다소 낮은 부화율인 22.9%의 부화율을 보여주고 있다. 이러한 결과는 바이러스 미세 주입 과정에서 수정란의 손상과 주입한 재조합 바이러스 등이 부화율 저하에 영향이 있다고 사료된다.

3. 후보 형질전환 병아리(G0) 유전 분석

부화하여 일주일 이상 생존한 형질전환 후보 병아리(G0)는 암컷 23수와 수컷 47수 모두 70수였으며, 이들의 유전 분석을 위하여 모든 개체들에서 날개에서 채혈하여 genomic PCR을 수행하였다. 연구 결과에 나타내지 않았지만, 분석한 모든 개체들의 혈액에는 주입한 목적 유전자가 존재하지 않는 것으로 나타났다. 수컷 후보 병아리 47수 정액의 PCR 분

Table 1. Viability of embryos injected with DNA in surrogate eggshell during culture

Experimental group	Stage-X embryos (n)	Survival of embryos during culture			No. of hatched chicks (%)	No. of 1 week old birds (%)	No. of males (%)	No. of males with transgene in their sperm (%)
		4 days (%)	11 days (%)	19 days (%)				
human SOD-3	341	274(80.3)	194(56.9)	168(49.3)	78(22.9)	70(20.5)	47(67.1)	2(4.7)
Control	20	-	-	-	10(50)	-	-	-

석은 성 성숙이 완료된 개체들에서 정액을 채취하고 혈액과 동일한 방법으로 genomic DNA를 분리하고 유전 분석을 수행하여 그림 3의 연구 결과를 얻었다. 분석한 개체들 가운데 2마리의 정액에서 233bp 크기의 특이적인 DNA 단편이 증폭되었으며, 증폭된 DNA 단편은 EcoRI 제한 효소 처리 결과 positive control과 동일한 형태로 절단됨을 또한 보여주었다 (Fig. 3의 1과 4번 후보 병아리).

또한, 정액의 PCR 분석 결과 특이적으로 증폭된 DNA 단편의 염기 서열 분석 결과(Fig. 4)는 닭의 ovalbumin 프로모터, 사람의 SOD-3 유전자, 유전 분석에 사용하였던 primer들의 염기 서열 위치 그리고 EcoRI 제한 효소자리가 모두 존재함을 보여주고 있다.

배반엽 단계 수정란, 대리난각 인공배양법 그리고 재조합 렌티바이러스를 이용한 형질 전환 닭(G0) 생산 연구 결과를 종합하면 다음과 같다. 부화한 모든 후보 형질 전환 닭들의 혈액에는 주입한 목적 유전자가 없었지만, 정액에는 목적 유전자를 가지는 개체가 2수 존재함을 PCR 유전 분석으로 확인

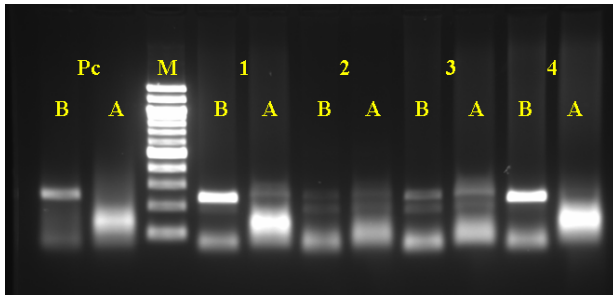


Fig. 3. PCR analysis of the semen from G0 chickens. Pc is a positive control. Lane 1 and 4 represent positive birds; lane 2 and 3 represent negative birds. B, EcoRI digestion before; A, EcoRI digestion after.

TATTTTGACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTGATAAGCAATGCTTTTTATAA
TGCCAACCTTGTATAGAAAAGTTGGCTCCGAATTCGCCCTTGGTCAAACTTCTGAAGGGA
ACCTGTGGGTGGGTCACAATTCAGGCTATATATCCCCAGGGCTCAGCCAGTGTCTGTAC
ATACAGCATCGGATCTCGAGCGGCCGCACTGTGCTGGATATCTGCAGAAATTCGGCTGG
GTGCAGCTCTCTTTTCAGGAGAGAAAGCTCTCTTGGAGGAGCTGGAAGGTGCCCGACTC
CAGCCATGCTGGCGCTACTGTGTTCCCTGCCTGCTAAGGGCGAATTCGACCCAAGTTTGTA
CAAAAAAGTTGAACGAGAAACGTAATAATGATATAAATATCAATATATTAATAATAGATTTT

Fig. 4. Result of the DNA sequencing analysis of the amplified PCR fragments. Red letters: human SOD-3 gene; underlined red letters: the hnSOD3-B primer sequences; blue letters: chicken ovalbumin promoter region; blue underlined letters: the OVP-F primer sequences; black letters: cloning vector sequences; underlined italic black letters: EcoRI enzyme site.

할 수 있었다. 이상의 연구 결과들은 배반엽 단계 수정란에서 재조합 렌티바이러스를 이용한 형질 전환 닭 생산의 가능성을 확인하였다.

적 요

형질 전환 닭 생산 방법들 가운데 목적 유전자 운반에 탁월한 능력이 있는 것으로 알려진 렌티바이러스는 배반엽 단계 수정란을 이용한 형질 전환 닭 생산 연구에 활발하게 이용되고 있다. 본 연구는 재조합 렌티바이러스를 이용하여 사람의 SOD-3 단백질이 닭의 ovalbumin 프로모터에 의해서 유도되는 형질 전환 닭을 생산하고자 하였다. 사람의 SOD-3 단백질은 호흡 과정에서 체내에서 생성되는 활성산소를 중화시키는 탁월한 기능이 있는 것으로 알려져 있다. 후보 병아리의 생산은 앞서 언급한 유전자를 가지는 1×10^6 cfu/mL 재조합 렌티바이러스를 배반엽 단계 수정란의 미세 주입하고 대리난각 배양법을 이용하여 배양기에서 21일 동안 배양하는 방법으로 생산하였다. 유전자를 미세주입한 341개의 수정란에서 78수의 후보 형질 전환 병아리를 생산하였으며, 생산된 후보 형질 전환 병아리들의 유전 분석은 PCR 방법을 이용하여 검증하였다. 유전 분석 결과는 성 성숙에 이른 47수의 수컷들 가운데 2수의 정액에서 사람의 SOD-3 유전자가 존재함을 보였다. 이상의 연구 결과는 완전한 형태의 형질전환 닭 생산의 가능성을 보여주고 있다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업과 축산과학원 경상연구 지원에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

- Borwornpinyo S, Brake J, Mozdziak PE, Petite JN 2005 Culture of chicken embryos in surrogate eggshells. *Poult Sci* 84:1477-1482.
- Choung BY, Byun SJ, Suh JG, Kim TY 2004 Extracellular superoxide dismutase tissue distribution and the patterns of superoxide dismutase mRNA expression following ultraviolet irradiation on mouse skin. *Exp Dermatol* 13:691-699.

- Kwon MS, Koo BC, Choi BR, Park YY, Lee YM, Suh HS, Park YS, Lee HT, Kim JH, Roh JY, Kim NY, Kim T 2008 Generation of transgenic chickens that produce bioactive human granulocyte-colony stimulating factor. *Mol Reprod Dev* 75: 1120-1126.
- Lillico SG, Sherman A, McGrew MJ, Robertson CD, Smith J, Haslam C, Barnard P, Radcliffe PA, Mitrophanous KA, Elliot EA, Sang HM 2007 Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:1771-1776.
- Love J, Gribbin C, Mather C, Sang H 1994 Transgenic birds by DNA microinjection. *Biotechnology* 12:60-63.
- Perry MM, Mather CM 1991 In *Avian Incubation*, Butterworth-Heinemann Ltd. London, U.K., p. 91.
- 전익수 2000 1-세포기 닭 수정란 체외배양과 대리난자 배양 기술의 개선. *J Anim Sci & Technol* 42:777-786.
(접수: 2008. 06. 25, 수정: 2008. 9. 17, 채택: 2008. 09. 19)